

摘要

已知苯乙基巴比妥酸 (phenobarbital, PB) 可誘發肝臟細胞色素 P-450 2B1 (CYP2B1) 酵素活性，此外胞內 cAMP 濃度上升時會抑制 PB 誘發肝細胞 CYP2B1 基因表現，而 cAMP 是透過何種機制影響肝臟中 PB 誘發肝細胞 CYP2B1 的表現，至今仍是未知。文獻指出，前列腺素 E₂ (PGE₂) 會促進細胞中 adenylate cyclase 活性，進而增加胞內 cAMP 合成，因此本實驗採用初代肝細胞培養模式，在培養液中添加不同濃度 PGE₂ 來觀察肝細胞 CYP2B1 表現是否有受到影響。一些研究顯示 PGE₂ 影響基因表現是透過它的 4 種 EP receptor，其中 EP2 receptor 的活化會增加胞內 cAMP 濃度進而增加 protein kinase A (PKA) 活性。根據上述線索，我們在實驗中添加對 EP2 receptor 具有專一性的 agonist-- butaprost，來證實 PGE₂ 調控肝細胞 CYP2B1 表現是否與 EP2 receptor 有關。動物實驗證實，PB 會誘發 NF-κB 與 DNA binding site 的結合。因此，本實驗也進一步探討 PB 誘發肝細胞 CYP2B1 表現是否與 NF-κB 活化有關。

實驗方法：由雄性 SD 大鼠肝臟分離出肝細胞，以 RPMI 1640 進行培養。(1) 於培養液中添加不同濃度 PGE₂、butaprost，觀察它們對 PB 誘發 CYP2B1 蛋白質表現的影響。(2) 預處理 PKA 抑制劑 H-89

後，觀察 PGE₂、butaprost 對 PB 誘發 CYP2B1 蛋白質表現的影響。(3)
以 RT-PCR 證實 EP2-receptor 的存在。(4) 處理 PB、PGE₂、butaprost
後，觀察 NF-κB 在細胞核內的表現。

目前研究結果發現，培養液中添加 PGE₂、butaprost 在一定濃度
範圍內 (0.01~1μM) 會抑制 PB 誘發 CYP2B1 蛋白質表現，而預處理
H-89 則會逆轉 PGE₂、butaprost 抑制 PB 誘發 CYP2B1 蛋白質表現，
另外，PB 會促進細胞核中 NF-κB 與 DNA binding site 的結合。基於
以上結果，我們認為 PGE₂ 抑制 PB 誘發 CYP2B1 蛋白質表現是透過
EP2 receptor，且與 PKA 活性有關，而且 PB 會促進 NF-κB 進入細胞
核內與 DNA 結合。

關鍵詞：苯乙基巴比妥酸、細胞色素 P-450 2B1、前列腺素 E2、EP2
receptor、PKA、NF-κB

前言

細胞色素 P450 屬於肝臟 phase I 解毒酵素，主要存在於肝細胞內質網中，負責動物體內藥物、類固醇及其他外來物質的代謝。過去研究顯示，phenobarbital (PB) 可誘發細胞色素 P450 2B (CYP 2B) 活性，尤其是 2B1。(Tsai et al., 2001)

Prostanoid E₂ (PGE₂) 的生理功能與體內發炎反應、痛覺、發燒、生殖、腫瘤生成有關。PGE₂ 調控細胞生理是透過 4 種 EP receptor，分別是 EP1、EP2、EP3、EP4，其中 PGE₂ 結合至 EP2、EP4 receptor 後，會活化 adenylyl cyclase 然後增加胞內 cAMP 濃度，進而活化 PKA。文獻指出，當胞內 cAMP 濃度上升時 PB 誘發 CYP 2B1 表現會受到抑制(Sidhu et al., 1995)，而 PGE₂ 透過 EP2、EP4 receptor 增加胞內 cAMP 濃度，因此推測 PGE₂ 有可能透過 EP2、EP4 receptor 增加胞內 cAMP 濃度，進而抑制 PB 誘發 CYP 2B1 的表現。

於是本實驗利用 SD 大鼠初代肝細胞培養模式，探討 PGE₂ 影響 PB 誘發 CYP 2B1 表現的可能機制。

文獻探討

Prostanoid E₂ (PGE₂)的生理及生化角色

前列腺素 (Prostanoids, PGs) 的生理功能主要是維持體內的恆定，包括調節發炎反應、血小板凝結、平滑肌收縮，這些生理功能必須透過特殊的膜蛋白來調控 (Coleman et al., 1994)。除了上述生理功能外，體外實驗也證實，肝組織受損時 PGs 對肝臟的再生具有刺激再生的作用 (Tsuji et al., 1993)；2000 年 Kimura 等人發現，PGs 會透過 phospholipase C/Ca²⁺ 以及 receptor tyrosine kinase pathway 刺激肝細胞 DNA 合成以及增生，這些研究顯示 PGs 與細胞的有絲分裂有關。PGs，尤其是 PGE₂，在調節腸胃道功能上也扮演著重要角色，這些功能包括：調節腸胃道的血流、酸鹼值以及黏液與碳酸的分泌 (Eberhart et al., 1995)。此外，PGs 也會影響中樞神經系統的功能，中樞神經系統中有多種細胞皆具有合成 PGs 之功能，這些包括 astroglial cells, microglial cells 以及 neurons，這些細胞中 PG 的產生都是由 cyclooxygenase-1 或 -2 (COX-1/2) 調控 (Pasinetti and Aisen, 1998)。最近研究發現 PGs 與 Alzheimer's disease (AD) 有關 (Prasad et al., 1998)，結果顯示抑制 cyclooxygenase 能夠阻斷 PG 生成，而防止 AD 發生 (Hüll et al., 2000)，AD 患者的 cerebrospinal fluid 能測出高濃度的 PGE₂ (Montine et al., 1999)。

飲食中直接影響體內 PGE₂ 濃度的因素主要為亞麻油酸，它進入

體內後會被轉變成花生四烯酸，在細胞受到刺激以及組織受到傷害時，花生四烯酸會經由氧化性代謝迅速合成 PGs (Matsumura et al., 2003)。花生四烯酸會因磷酸脂解酶 A₂ (phospholipase A₂, PLA₂) 的作用而從細胞膜上游離出來，游離的花生四烯酸經由 cyclooxygenase pathway 代謝成 PGG₂，PGG₂ 再經 peroxidase 作用轉變成 PGH₂，PGH₂ 最後透過特定異構酶作用即可產生不同的前列腺素，經由 prostaglandin E synthase (PGES) 作用合成 PGE₂ (Ueno et al., 2001)。

(如圖 1)。

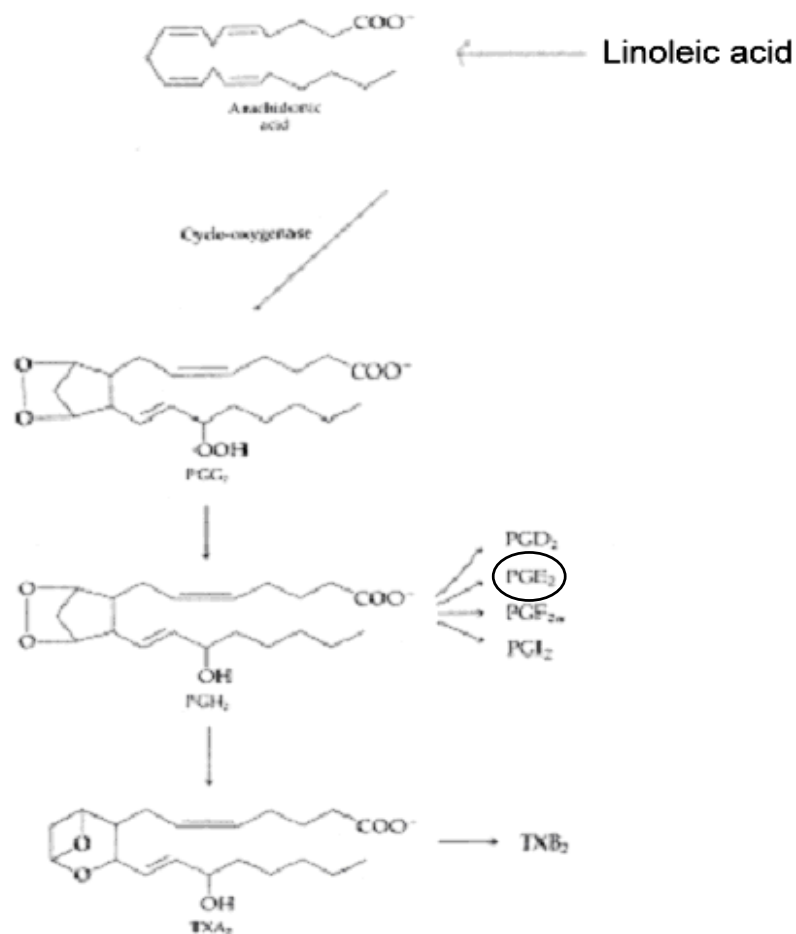


圖 1.前列腺素合成路徑

一系列的體內及體外實驗證實 PGE₂ 在生殖與分娩、發炎、痛覺和免疫反應過程中扮演相當重要的角色。此外，PGE₂ 也可影響細胞有絲分裂，與腫瘤成長、轉移有關，同時它也參與細胞轉錄作用。發炎刺激物，如 lipopolysaccharide (LPS)、zymosan、anaphylatoxins 和 proinflammatory cytokines 能夠刺激非實質肝臟細胞 (nonparenchymal liver cells) 分泌 PGs。文獻指出 PGE₂ 於正常腦中濃度極低，當發燒、外傷、局部性貧血、多發性硬化症或因免疫功能不全而由病毒引起痴呆等病症出現時，腦中 PGE₂ 的濃度會快速上升 (Patrizio et al., 2000)；在類風濕性關節炎病患的關節骨液中亦可發現高濃度 PGE₂ (Sano et al., 1992)，顯示 PGE₂ 參與了許多疾病及發炎反應的發展過程。對於腫瘤的發展而言，一般認為 PGE₂ 會抑制巨噬細胞分泌 tumor necrosis factor α (TNF- α)、interleukin-2 (IL-2) 及 NO，造成巨噬細胞毒殺腫瘤能力降低，有助於腫瘤發展，若以 indomethacin 抑制 PGE₂ 的合成，則可以增加巨噬細胞的活性，而抑制腫瘤生長 (Alleva et al., 1995；Milano et al., 1995)。

EP receptors 與基因表現

前列腺素透過 receptor 影響細胞功能，EP receptor 是一種 heptahelical transmembrane domain 構造。針對 5 種前列腺素，PGE₂、PGF_{2α}、PGD₂、PGI₂ 和 TXA₂，有 5 種不同類型的 G-protein-coupled receptors，分別是 EP、FP、DP、IP、TP receptors (Negishi et al., 1995)。PGE₂ receptor 有四種 subtypes，分別與不同 G-protein couple 在一起。EP1 與 Gq，EP3 與 Gi，EP2 和 EP4 與 Gs。這四種 EP 在構造、ligand 結合性質、組織分佈、或其伴隨的訊號傳遞途徑均不盡相同 (Fennekohl et al., 2002)。

EP1 經由 phosphoinositol pathway 來調控細胞內 inositol triphosphate (IP₃) /Ca²⁺；EP2 與 EP4 活化 adenyl cyclase 進而增加胞內 cAMP 濃度；EP3 則經由抑制 adenyl cyclase 活性降低胞內 cAMP 濃度。PGE₂ 與 EP2 結合後會活化 adenyl cyclase 增加胞內 cAMP 濃度，cAMP 再活化 cAMP-dependent protein kinase (PKA) 來磷酸化蛋白質，而改變蛋白質活性。活化的 PKA 能夠磷酸化多種轉錄因子，如 NF-κB、cAMP response element binding protein (CREB) 等。以 CREB 為例，磷酸化的 CREB 會結合至 cAMP response element (CRE) 上，進而調控基因表現。

PGE₂ 透過這四種 EP 調控許多基因表現，研究發現 PGE₂ 能藉由 EP4 活化 PKA 而促進兔子腸道上皮細胞分泌黏液 (Takahashi et al.,

1999); 在 astrocyte 中, PGE₂ 誘發 interleukin-6 的產生可能與 EP4-like receptors 活化 p38 mitogen-activated kinase (p38 MAPK) 以及 protein kinase C (PKC) 有關 (Fiebich et al., 2002); PGE₂ 透過 EP3 receptor 選擇性地抑制 voltage-dependent Ca²⁺ (VDC), 進而影響 Ca²⁺ 進入大鼠 melanotrophs (Nagata et al., 2003); 在 Kupffer cells 和小鼠 peritoneal neutrophils 中, PGE₂ 也能藉由 EP2 及 EP4 影響由 LPS 誘發 TNF α 和 IL-6 產生 (Fennekohl et al., 2002; Yamane et al., 2000)。

Phenobarbital (PB) 生理作用

苯乙基巴比妥酸 (phenobarbital, PB) 為巴比妥酸鹽 (barbiturates) 的一種, 常被用來作為鎮靜及抗癲癇藥物, 它的作用, 就是抑制神經電流的傳導, 間接地使腦部的神經達到穩定的效果, 另一個作用就是能夠當作安眠以治療失眠。毒理研究上, PB 對齧齒類動物具有促進肝臟腫瘤的形成 (Peraino et al., 1975) 以及干擾細胞間聯絡 (gap-junctional intercellular communication) 的作用 (Ruch et al., 1986)。PB 同時也能夠誘發多種肝臟酵素活性, 包括 cytochrome P450 (P450), epoxide hydrolase, UDP-glucuronosyl transferase 和 glutathione S-transferase, 雖然 PB 可誘發多種 P450, 但對 CYP2B 誘發效果最強。最近研究發現, PB 能

增加 α 1-acid glycoprotein (AGP) 的表現，AGP 是 acute-phase protein 家族的一員 (Fournier et al., 1994)，AGP 能夠和鹼性藥物結合延長藥物在血管中停留的時間而延長藥物在體內的效應，因此當 AGP 受到 PB 誘發時，可能會造成鹼性藥物在血液內停留時間延長，而對身體造成不良影響。

PB 促進齧齒類動物肝腫瘤形成的作用，一般認為是因為它會促進肝細胞的增生以及抑制肝細胞 apoptosis。(Jirtle et al., 1991)。另外，PB 會導致肝細胞氧化傷害，原因是 PB 誘發肝臟 P450 酵素活性，P450 在代謝過程中所產生的活性氧分子和過氧化氫可導致 DNA 氧化傷害 (Bondy et al., 1994)。PB 也被發現會影響基因表現，它可透過 antioxidant response elements (AREs) 活化 glutathione S-transferase Ya subunit 及 NAD(P)H:oxidoreductase 的 promoter 而影響基因表現 (Pinkus et al., 1993)。

PB 與 CYP 2B1 表現之相關性

肝臟是動物體內負責藥物代謝和解毒的重要器官，藥物代謝和解毒系統是由兩大酵素系統所組成，他們是 phase I 以及 phase II 酵素系統。phase I 系統-混合功能氧化酶，包括細胞色素 P450s (cytochrome

P450s, CYP)和 NAD (P) H 細胞色素 P-450 還原酶，phase II 系統包括 glutathione S-transferase、UDP-glucuronyl transferase、sulfotransferase 等結合酵素所組成。

細胞色素 P450 系統普遍存在於大部分的細胞中，尤其以肝細胞含量最多。當 P450 上的 Fe^{2+} 和 CO 結合時，在可見光波長 450 的位置上會出現最大吸光值。P450 在代謝藥物時會和氧化態(Fe^{3+})的細胞色素 P450 結合形成 enzyme-substrate complex，接著 cytochrome P450 reductase 會從 NADPH 接受一個電子，把細胞色素 P450-藥物複合體中的鐵還原成 Fe^{2+} 。然後加入一個氧分子，另外同樣從 NADPH 得到電子，再把氧分子變成活化態(O_2^-)。最後，一個氧原子變成水被釋放，另一個氧原子則轉移到藥物上被釋放。同時細胞色素 P450 也再度變回原來的氧化態(Fe^{3+})而能再被重複使用（圖 2）。

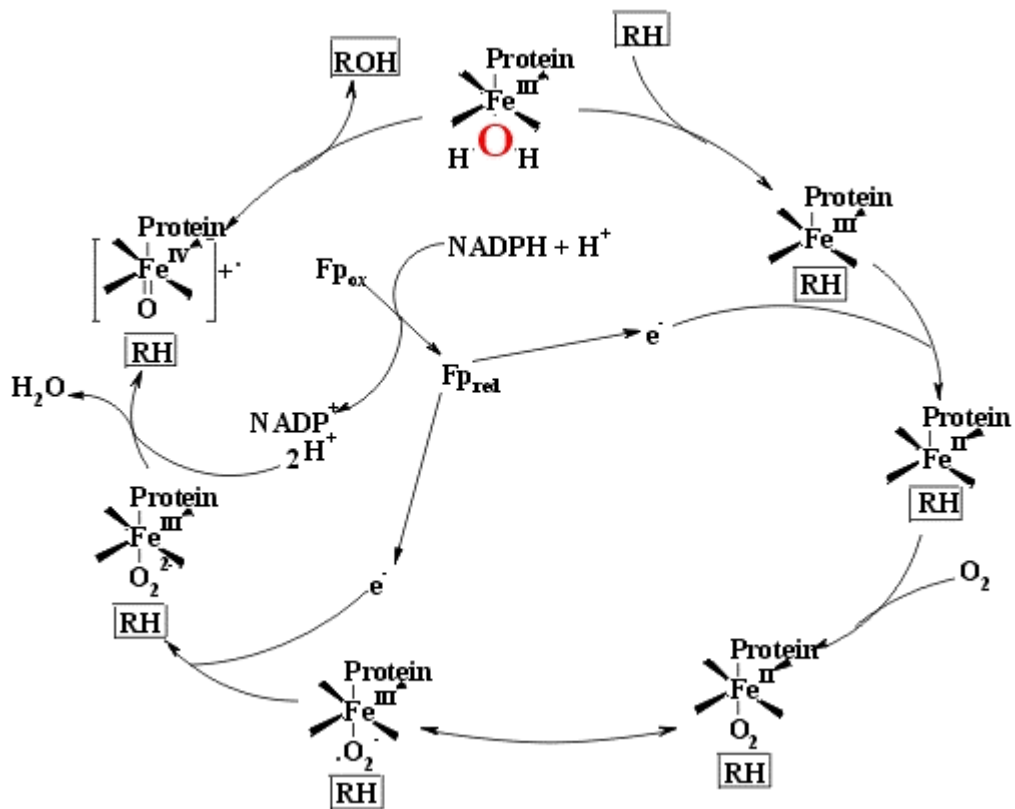


圖 2.P450 循環途徑

表 1、參與調控細胞色素 P450 基因表現有關的細胞核接受器

Nuclear Receptors Involved in CYP Gene Regulation		
Nuclear receptors	Chemicals	Regulated CYP genes
CAR	PB, TCPOBOP, chlorpromazine, 16-androstenes, progesterone, androgens, estrogens	CYP2B, 3A, 2C, 2H
PXR/SXR/PAR	Rifampicine, dexamethasone, pregnenolone 16 α -carbonitrile	CYP3A
FXR	Bile acids, farnesol metabolites, forskolin	CYP7A
LXR	Derivatives of cholesterol, mevalonic acid	CYP7A
VDR	Vitamin D, calcitriol	CYP2D, CYP24, CYP27A1, CYP27B1
PPAR	Fatty acids, fibrate drugs, phthalate esters	CYP4A
SF-1/A4BP	Oxysterols	Steroidogenic CYPs

表一列出參與調控 CYP gene 表現的核內接受器。PB 誘發 CYP2B 表現是透過核內接受器 constitutive androstane receptor

(CAR)，CAR 的 ligand 有 PB、TCPOBOP、chlorpromazine、16-androstenes、progesterone、androgens 和 estrogens。CYP2B 又區分為 CYP2B1 與 CYP2B2 二型，其中 CYP2B1 是誘發型，其表現可被多種化學物質所誘發，而 PB 是最被為人知的一種。近年來，學者在小鼠 CYP2B1 的 promoter 基因序列上發現有一區域與 PB 誘發作用有關，將此區命名為 PB-responsive enhancer module (PBREM)。PBREM 序列中有 NR1 及 NR2 兩個 nuclear receptor-binding motifs 與一個 nuclear factor 1 (NF-1) binding site。CAR 是 PB 接受器，CAR 被 PB 活化後，會與 retinoid X receptor (RXR) 結合成 heterodimer，接著 CAR-RXR 這個 heterodimer 會結合至 PBREM 上的 NR1 及 NR2 位置，然後啟動 CYP2B1 基因表現。(圖 3)

PBREM 序列被認為應與 PB 或 PB-like 誘發劑調控 CYP2B 基因表現有關，事實上，除了小鼠、大鼠，人類細胞中的 CYP2B 基因也存有此一類似 PBREM 的構造(Sueyoshi et al., 1999)。PB 調節 CYP2B1 表現的機轉相當複雜，至今仍未完全釐清，證據顯示 PB 活化 CYP2B 表現與胞內訊號傳遞有關 (Sidhu and Omiecinski, 1995)，例如，cAMP/PKA 的活化可抑制活化 CYP 酵素活性 (Pyerin and Taniguchi, 1989)；Kawamura 等人 (1999) 也發現當細胞以磷酸酶活化劑 (insulin、interleukin-6、cAMP、epidermal growth factor) 或去磷酸酶

抑制劑 (vanadate 或 okadaic acid) 處理時，PB 誘發 CYP2B1 基因表
 會受到抑制。

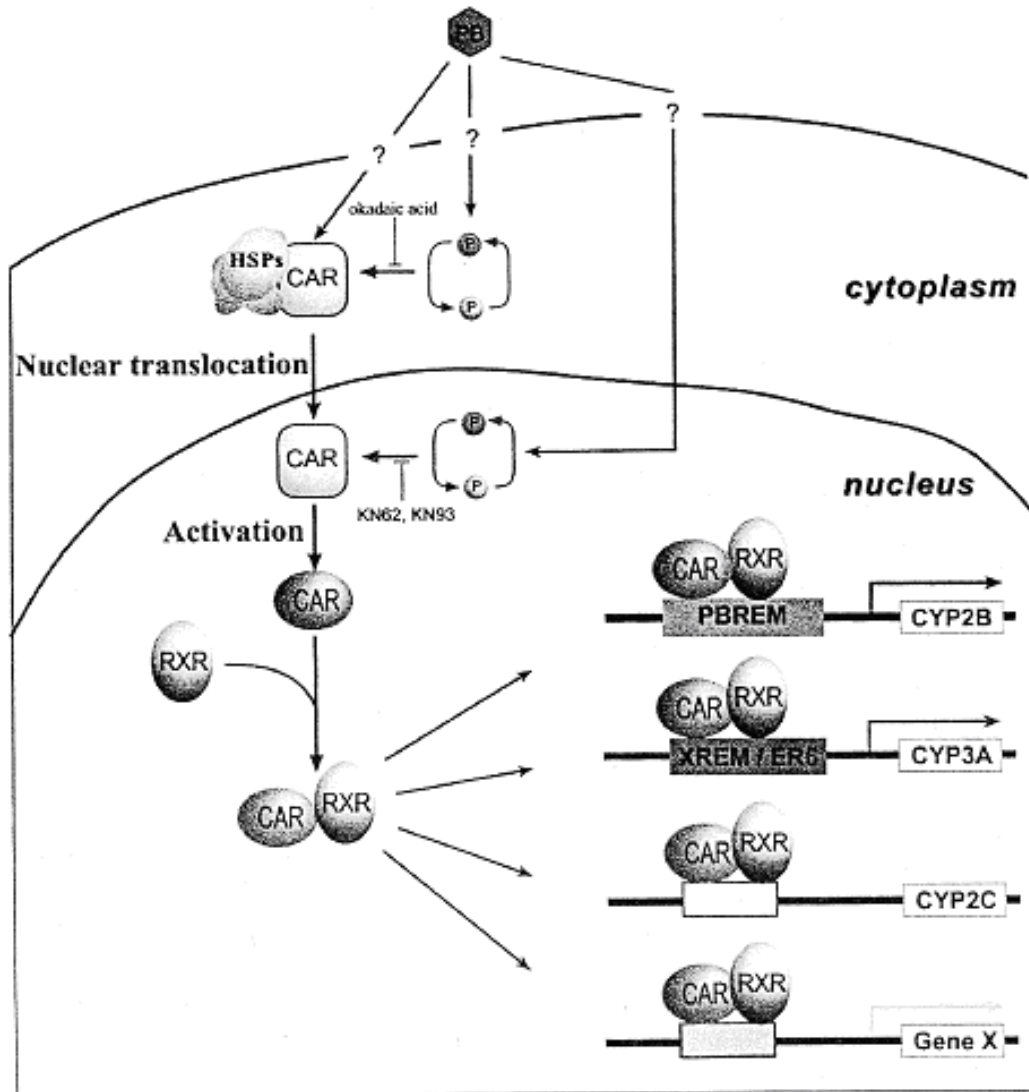


圖 3. PB 誘發基因表現的途徑 (Igor et al., 2000)

NF- κ B pathway 與基因表現

Nuclear factor κ B (NF- κ B) 在多種細胞中是一個重要的壓力誘發轉錄因子 (stress-induced transcription factor)，誘發此轉錄因子的來源有多種，包括 tumor necrosis factor α (TNF- α) ,interleukin-1 (IL-1) , 及 lipopolysaccharides (LPS)。在細胞質中，NF- κ B 是由 p50、p65 與 I κ B 所組成。I κ B 經過 I κ B kinase (IKK) 磷酸化後會進行 ubiquitination 然後被 proteasome 分解而脫離 NF- κ B，使 NF- κ B 能夠轉移進入細胞核內與特定的 DNA binding site 結合，進而影響基因表現 (圖 4)。

IKK 是由 3 個次單元所組成，分別是 2 個具催化功能的 IKK $_{\alpha}$ 和 IKK $_{\beta}$ ，以及 1 個具調節功能的 IKK $_{\gamma}$ (Israel, 2000)，I κ B 的 serine 32 與 36 被磷酸化後 (Brockman et al., 1995)，由 3 個酵素執行 ubiquitination，分別是 E1(Ub activating enzyme)、E2 (Ub-conjugating enzyme) 以及 E3 (Ub protein ligase) (Laney and Hochstrasser, 1999)。

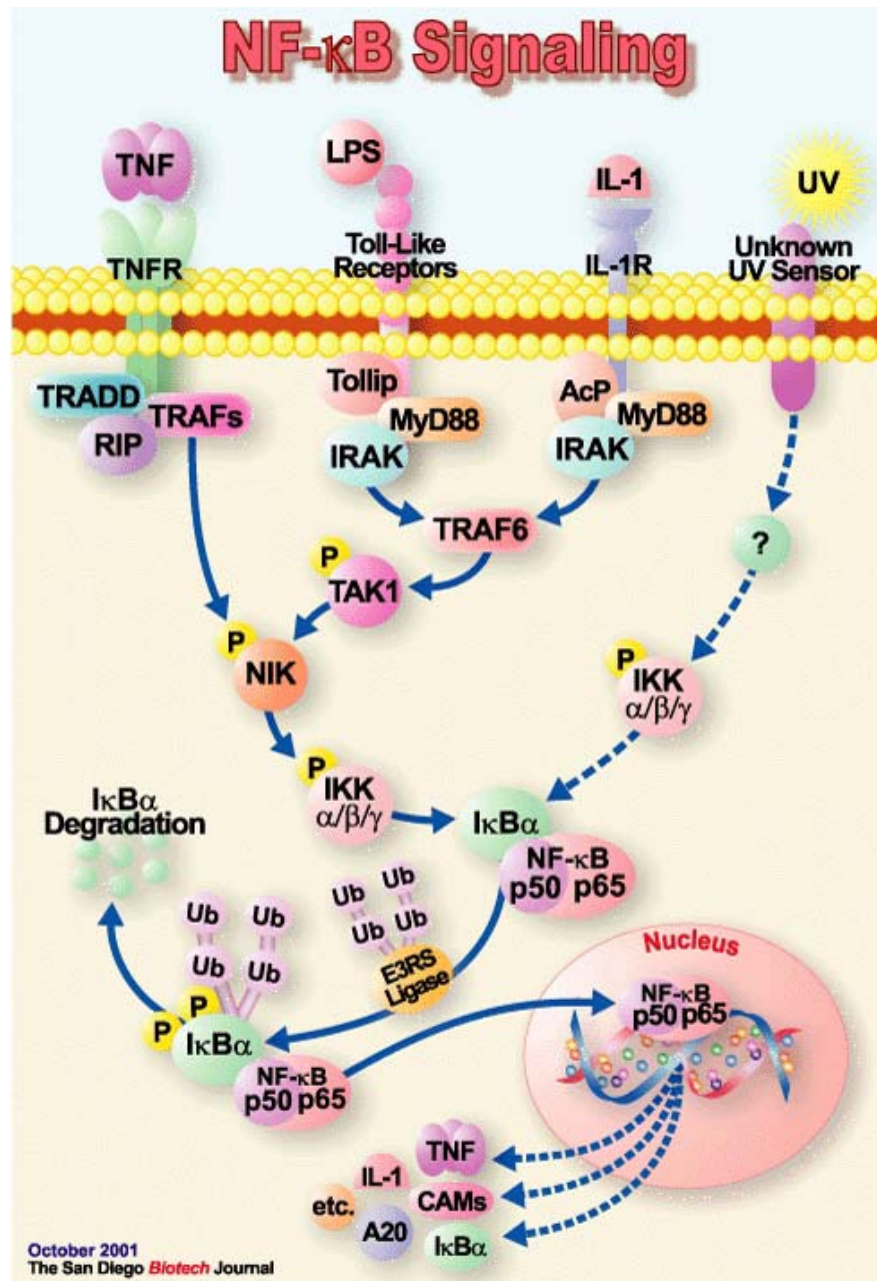


圖 4. NF- κ B 訊息傳遞路徑

研究顯示 NF- κ B 與 CYP2B1 的表現有關，CYP2B1 的 promoter +27~-3878，發現有一個 AP-1、2 個 NF- κ B 以及數個可能是 STAT 的結合位置 (Shaw et al.,1996)；1996 年 Li 等人的研究發現，大鼠餵食 PB 後會增加 NF- κ B 與 DNA binding site 的結合。此外，NF- κ B 與

PKA 亦有關聯，1998 年 Zhong 等人的研究指出 PKA 會磷酸化 NF- κ B 而促進與輔因子 (coactivator) CBP/p300 產生共價作用而刺激轉錄作用；也有文獻指出，PKA 會磷酸化 p65-p50 heterodimer 以及 p65-p65 homodimer 而增強它們與 DNA binding site 的結合 (Norris et al., 1992)。另有報告指出，cAMP 濃度過高可能降低 I κ B 降解以及減少 NF- κ B 轉移進入細胞核內，減少 NF- κ B 活性 (Chen and Rothenberg, 1994; Neumann et al., 1995)。1997 年 Zhong 等人實驗指出，PKA catalytic subunit (PKAc) 會和 I κ B 結合，而非 PKA regulatory subunit (PKAr)，PKAc 與 I κ B 的結合造成 PKAc 活性受到抑制。活化的 PKAc 會磷酸化 NF- κ B p65 而加強與 DNA binding site 的結合。

由上述文獻，我們推測肝細胞中 PB 誘發 CYP 2B1 表現可能和 NF- κ B 與 DNA binding site 的結合有關。另外，PGE₂ 能透過 EP2 的調控增加胞內 cAMP 增加 PKA 的活性，而 PKA 能透過磷酸化 NF- κ B p65 增加與 DNA binding site 的結合，因此我們認為 PGE₂ 的影響下，可能會活化 NF- κ B p65 與 DNA binding site 的結合。

實驗動機與目的

由文獻中我們發現 PGE₂ 能夠影響多種基因表現，本實驗室之前的研究發現 PGE₂ 能夠抑制 PB 誘發 CYP2B1 表現，本實驗目的欲證實 PGE₂ 是否會透過 EP2 來調控 CYP2B1 基因表現，因此利用 EP2 agonist--butaprost 來證實此一假設。

文獻指出 PGE₂ 與 EP2 結合後誘發 adenylyl cyclase 活性而增加胞內 cAMP 濃度，cAMP 被證實會活化 PKA，因此本實驗利用 PKA 抑制劑 H-89 來抑制 PKA 活性，觀察 PGE₂ 抑制 PB 誘發 CYP2B1 的表現是否因 PKA 受到抑制而有所影響。

動物實驗發現，PB 能夠誘發 NF- κ B 與 DNA binding site 的結合，本實驗也利用肝細胞模式來探討此一現象。

材料與方法

實驗材料

1. 實驗動物

6-8 週齡雄性 Sprague-Dawley 大白鼠，由國家科學委員會實驗動物繁殖暨研究中心購入。

2. 細胞處理化學試劑

PGE2 (Cayman)

Butaprost (Cayman)

H-89 (Sigma Chemical Co.)

實驗方法

1. 肝細胞分離

肝細胞分離採用二階段灌流法，將第一階段用灌流液（EBSS，EGTA 0.75 mM，penicillin/streptocin 1 ml/dl，pH 7.38）將血水沖出，

第二階段灌入含有膠原蛋白分解酶(collagenase)的灌流液 (EBSS, HEPES 10 mM, CaCl₂·2H₂O 1.8mM, MgCl₂·6H₂O 0.8mM), 將肝臟的膠原蛋白分解, 以取得肝細胞。首先由腹腔注射 sodium pentobarbital (80 mg/kg body weight) 的方式麻醉 6~8 週大的 SD 大鼠。待老鼠昏迷後, 以手術剪剪開腹腔, 由肝門靜脈將灌流液 經由頭皮針導入, 靜待數秒讓灌流液 充滿肝臟後再剪開下腔靜脈讓灌流液 流出。以 25 ml/min 的流速將 150 ml 的灌流液 流入血管中, 以充分洗出血水。接下來以含有 0.025% 膠原蛋白分解酶 (collagenase) 的 200 ml 灌流液 進行第二階段灌流, 當灌流液 使用完之後肝臟會因膠原蛋白分解酶的消化作用而失去彈性, 細胞隔間變大, 顏色轉為土黃色, 接著, 將肝臟小心剪下移出體外置於過濾用的尼龍網上, 以 25 ml 吸管吸取 suspension solution (RPMI 1640, ITS 1ml/100ml, 1 μ M dexamethasone) 攪拌肝臟, 將肝細胞洗出。

肝細胞懸浮液以 washing solution 沖洗後以 50g 低速離心 2 分鐘, 此項步驟重複 2 次, 之後加入 24 ml Percoll solution (10 \times Hanks buffer : Percoll = 1 : 9), 並補充 washing solution (RPMI 1640, 1 μ M dexamethasone) 至 50ml, 利用密度梯度以 200g 離心 10 分鐘, 將健康的肝實質細胞分離出來。所得的肝實質細胞再以 washing solution 沖洗後以 100g 離心 3 分鐘, 此項步驟重複 2 次, 洗去殘餘的 Percoll

solution 後，加入取得細胞體積 2.5 倍的 suspension solution 即為細胞原液。

由細胞原液中取 100 μ l 加入 1.5 ml suspension solution 和 0.4 ml 的 trypan blue 混勻後，以血球計數板估計細胞總數及細胞實際存活率，然後以每盤 300 萬個細胞的數量分植到預先以膠原蛋白 (collagen) 處理過的培養皿中。

2.肝細胞培養

植入培養皿中的細胞經過 3~4 小時後，會貼附於培養皿上，這時將 5 ml suspension solution 吸除並用 PBS 沖洗過後加入為 2.5 ml culture medium (RPMI 1640, ITS 1 ml/100 ml, 0.1 μ M dexamethasone)，再經過 1 小時後添加 116.5 μ l/dish matrigel。待 3 小時 matrigel 反應完全後，再補充 2.5 ml culture medium，於貼附起後之第 2 天作處理。

3.肝細胞處理

先以 5 μ M H-89 預處理 1 小時後，細胞再分別處理 0.01、0.1、1 μ M PGE₂ 以及 0.01、0.1、1 μ M butaprost，15 分鐘後再添加 0.05 mM phenobarbital (PB)。

4.分析方法

4.1 微小體、細胞核與 RNA 的製備

微小體蛋白質及細胞質蛋白質的製備

添加 PB 後 20 小時，吸除 culture medium 再以 PBS 清洗細胞 2 次，之後以含 1.5% KCl 的 PPB 刮取細胞。將刮取的細胞用超音波震盪使細胞破碎，然後以 9000g 離心 30 分鐘。再將上清液部分取出以 105000g 離心 1 小時，離心後上清液部分為細胞質，pellet 即為微小體。

細胞核的製備

以冰涼的 PBS 清洗細胞 2 次，之後加入冰涼 400 μ l PBS (15.67mM Na₂HPO₄.7H₂O,4mM NaH₂PO₄.H₂O,140.3mM NaCl, pH 7.3) 刮下細胞後，在 4 °C 下離心 1700g (Hitachi himac CF15D2,HERMLE MK-2)

5 分鐘，然後吸除上清液。再將細胞懸浮於低張溶液 (hypotonic buffer : 10mM HEPES,10mMKCl,1.0mM MgCl₂,1.0mM EDTA,0.5mM DTT,0.2mM PMSF,4 μ l/ml leupeptin,20 μ g/ml apotinin ,0.5% NP-40)，置

於冰浴中 15 分鐘，以 6000g 離心 15 分鐘，上清液為細胞質液。Nuclear pellet 以等張溶液（10mM HEPES, 10mM KCl, 1.0mM MgCl₂, 1.0mM EDTA, 0.5mM DTT, 0.2mM PMSF, 4μl/ml leupeptin, 20μg/ml aprotinin）清洗一次再以 6000g 離心 15 分鐘，吸除上清液，加入高張溶液（hypertonic buffer：10mM HEPES, 10mM KCl, 1.0mM MgCl₂, 1.0mM EDTA, 0.5mM DTT, 0.2mM PMSF, 4μl/ml leupeptin, 20μg/ml aprotinin, 10% glycerol, 400mM KCl, 0.2mM EDTA）懸浮細胞，置於冰浴中 30 分鐘並每隔 5 分鐘震盪一次，之後，以 10000g 離心 15 分鐘，所得上清液即為細胞核萃取液。

蛋白質定量

取適量 0.025、0.125、0.25、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0 mg/μl 的 BSA 為標準品以及與標準品等量的預測樣品，之後加入 1:30 的 comassie reagent（總體積小於 300μl）於 96 孔盤中，輕敲 96 孔盤的邊緣使 comassie reagent 與標準品或樣品混合均勻，然後靜置 10 分鐘以 595nm 波長 ELISA 測量其吸光值。

Western blotting

將 microsome 懸浮於 microsome suspension buffer（0.035 mM

K_2HPO_4 、0.015 mM KH_2PO_4 及 1 mM EDTA pH 7.7) 中，測定蛋白質濃度後，以 sample buffer (0.5 M Tris、20% glycerol、10% SDS、0.1% bromophenol blue 和 5% β -mercaptoethanol) 和 suspension buffer 將蛋白質濃度調整為 $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。取 $5 \mu\text{g}$ 蛋白質於 7.5 % SDS-PAGE 中進行電泳分離，再轉印至 PVDF 膜上。再以 5 % 脫脂奶粉溶液 (25 mM Tris、150 mM NaCl 及 0.5% 脫脂奶粉) 進行 blocking，再以 CYP 2B1 polyclonal antibody 進行 1 小時免疫反應 (at 24°C)，反應完成後以 TBST 清洗二次，隨後再以 HRP-conjugated rabbit anti-rabbit IgG 於室溫下反應 1 小時，最後以 TBST 清洗二次後，即可加入 DAB 及 H_2O_2 使之呈色。

RNA 的製備

利用 Trizol reagent 抽取肝細胞 total RNA 方法如下：細胞經 PBS 清洗二次，加入 500 μl Trizol reagent 靜置 5 分鐘後將細胞刮下置於 1.5 ml 的微量試管中，加入 chloroform 使之與細胞液混和均勻後以 10900g 離心 15 分鐘。轉移含 RNA 的上清液至新的微量試管中，再加入 100 μl isopropanol 沉澱 RNA，以 10900g 離心 10 分鐘後吸除 isopropanol，加入 70 % ethanol 即可置於 -80°C 下儲存。

RNA 的定量

將儲存於 70 % ethanol 的 RNA 以 10900g 離心 15 分鐘，使懸浮

的 RNA 重新沈澱，移除上清液後加入 50 μ l 滅菌水溶解沈澱的 RNA。取 4 μ l RNA 溶液加入 996 μ l 滅菌水充分混和，然後以分光光譜儀於 260 nm 下測吸光值，在利用吸光值求出 total RNA 量。

吸光值乘以 10 即為每 μ l 樣品含多少 RNA 量。每個樣品中取出 20 μ g，加入滅菌水至 200 μ l，再加入 20 μ l 3M sodium acetate 及 500 μ l 100% cold ethanol，置於-20 $^{\circ}$ C 隔夜或是-80 $^{\circ}$ C 下 1 小時使 RNA 沈澱即可。

Northern blotting

以 RNase-free 的 ddH₂O 溶解 RNA，定量後取 20 μ g 進行洋菜膠電泳。跑膠前先將 RNA 溶於 20 μ l 新鮮配製的 RNA sample buffer (50 % Formamide、6 % Formaldehyde、1 \times MOPS buffer 及 0.1 μ g/ml EtBr)，以 75 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘即可點至洋菜膠 (1 % agarose、1 \times MOPS、6 % Formaldehyde) 樣品槽，然後在 1 \times MOPS buffer 中進行電泳，以 21 伏特進行隔夜電泳，隔天取出洋菜膠進行 RNA 轉印。將 RNA 轉印至 Hybond-N nylon membrane 上，經過 24 小時後取下 nylon membrane，以 UV 照射 nylon membrane 進行 cross link 後即可進行雜交。

轉印後的 nylon membrane 浸泡於 10 ml prehybridization buffer(5 \times SSPE、10 \times Denhardt's、100 μ g/ml single-strand DNA、2 % SDS 及 50 % formamide) 於 42 $^{\circ}$ C 下 blocking 1 小時。

Probe 的製備：利用 NEB 公司的 Random Priming Reaction kit，依廠商所附的步驟製備 probe，步驟如下：將含有 25 ng 之 template DNA (CYP2B1 cDNA) 溶於 31 μ l ddH₂O，置於 95°C 下 denature 5 分鐘再冰浴 5 分鐘，依序加入 5 μ l 10 \times labeling buffer、6 μ l dNTP (2 μ l dATP, 2 μ l dTTP, 2 μ l dGTP)、5 μ l α ³²P dCTP (3,000 ci/mmol) 及 1 μ l DNA polymerase 於 37°C 下反應 30 分鐘，然後加入 200 μ l TE buffer 終止反應，取出 probe 經 Sephadex G25 分離，收集通過管柱的溶液，再次於 95°C 下進行 denature 5 分鐘，再冰浴 5 分鐘，此時 probe 可供雜交反應使用。將製備好的 probe 加入完成 blocking 的 membrane，置於 42°C 下隔夜反應。

反應完成後將 membrane 先以 2 \times SSC 及 0.05% SDS 溶液沖洗 3 次，每次 5 分鐘，再以 0.1 \times SSC 及 0.1% SDS 溶液於 52°C 下沖洗，並以蓋格計數器偵測膜上放射線強度的變化，經壓片後即可觀察 mRNA 表現情形。

MOPS buffer : 20 mM MOPS、0.5 mM sodium acetate、0.13 mM EDTA

SSC buffer : 150 mM NaCl、32.5 mM sodium acetate

SSPE : 150 mM NaCl、10 mM NaH₂PO₄.H₂O、1.25 mM EDTA

TE buffer (pH 7.4) : 400 mM Tris-HCl、100 mM EDTA

50 \times Denhardt's : 1 % Ficoll (Type400.pharmacia)、1 %

polyvinylpyrrolidone、1% BSA

結果

以RT-PCR分析EP2表現

圖 1 結果顯示，肝細胞中有 EP2 的存在

PGE₂ 對 PB 誘發 CYP2B1 蛋白質之影響

由圖 2 結果顯示，PB 誘發 CYP2B1 蛋白質表現的效果隨著培養液中 PGE₂ 濃度增高 (0.01~1 μ M) 而有抑制現象。

PGE₂ 對 PB 誘發 CYP2B1 mRNA 之影響

由圖 3 結果顯示，PB 誘發 CYP2B1 mRNA 表現的效果隨著培養液中 PGE₂ 濃度增高 (0.01~1 μ M) 而有抑制現象。

Butaprost 對 PB 誘發 CYP2B1 蛋白質之影響

由圖 4 結果顯示，隨著培養液中 butaprost 濃度增高 (0.01~1 μ M)，PB 誘發 CYP2B1 蛋白質表現的效果隨之下降。這個

趨勢與處理 PGE₂ 是相同的。

Butaprost 對 PB 誘發 CYP2B1 mRNA 之影響

由圖 5 結果顯示，隨著培養液中 butaprost 濃度增高 (0.01~1 μ M)，PB 誘發 CYP2B1 mRNA 表現的效果隨之下降。這個趨勢與處理 PGE₂ 是相同的。

預處理 H-89 後，PGE₂ 對 PB 誘發 CYP2B1 蛋白質之影響

由圖 6 結果顯示，預處理 H-89 的 PGE₂ (1 μ M) 處理組，抑制 CYP2B1 表現的效果被逆轉。

由圖 2、3、4 及 5 的結果，我們可以知道 PB 誘發肝細胞 CYP 2B1 的表現是透過 EP2 來調控。圖 6 結果則顯示，EP2 可能是經由增加胞內 cAMP 濃度，接著活化 PKA 來調控肝細胞 CYP 2B1 的表現。

初代肝細胞處理 PB、PGE₂、butaprost 後，細胞核萃取液中 NF- κ B 的表現

由圖 7 結果顯示，添加 PB 處理組 NF- κ B 的表現較沒有添加 PB 的強，這個結果顯示，PB 會促進 NF- κ B 由細胞質轉移入細胞核內。

結果圖表

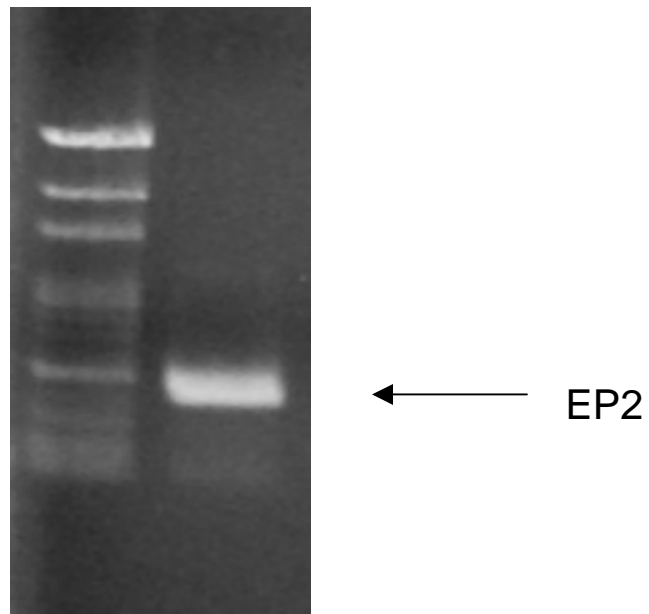


圖1. 以RT-PCR分析EP2表現

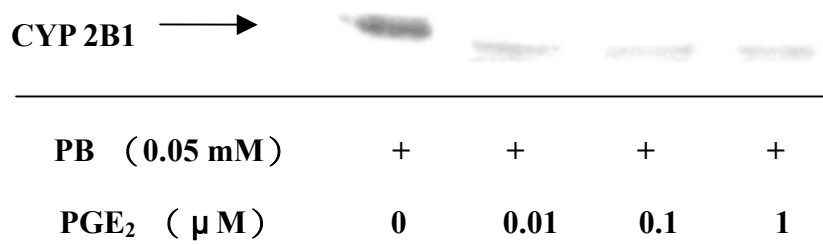


圖 2.PGE₂ 對 PB 誘發 CYP2B1 蛋白質之影響

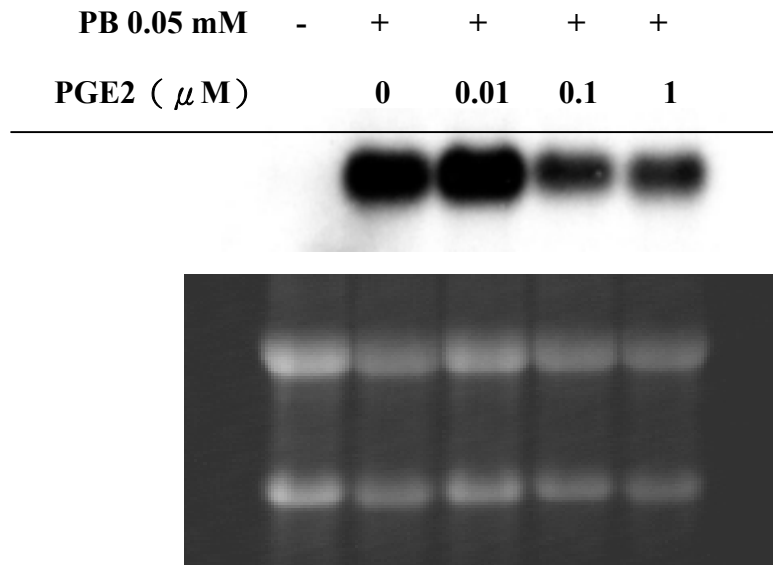


圖 3.PGE₂ 對 PB 誘發 CYP2B1 mRNA 之影響

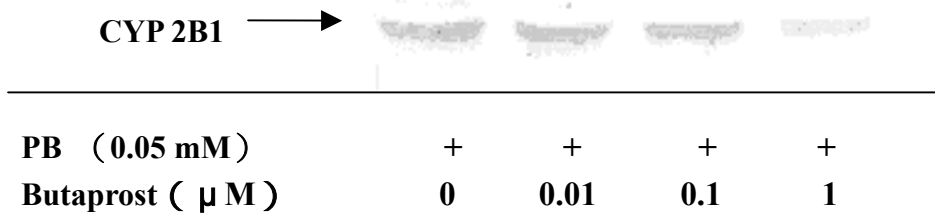


圖 4.Butaprost 對 PB 誘發 CYP2B1 蛋白質之影響

Butaprost (μ M)	0	0.01	0.1	1
PB (0.05 mM)	+	+	+	+



圖 5. Butaprost 對 PB 誘發 CYP2B1 mRNA 之影

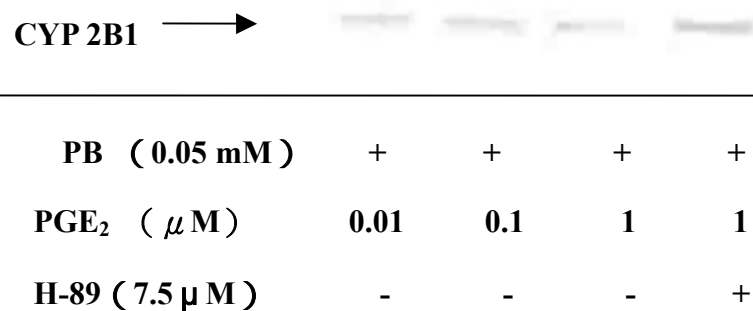


圖 6. 預處理 H-89 後，PGE₂ 對 PB 誘發 CYP2B1 蛋白質之影響

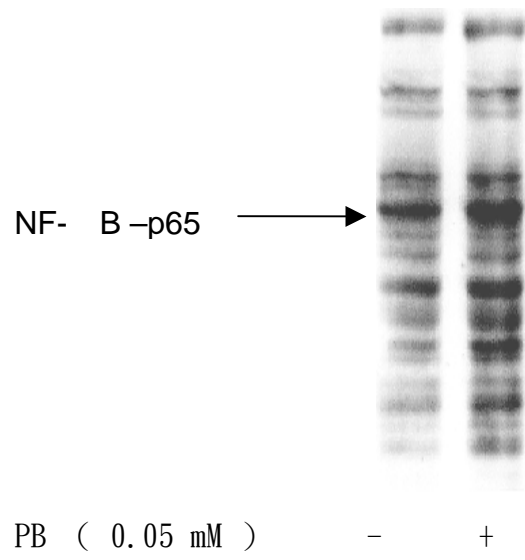


圖 7. 初代肝細胞處理 PB 後，細胞核萃取液中 NF-κB 的表現

討論

本實驗初代肝細胞培養模式主要是根據本實驗室之前所建立的模式，在細胞貼附於培養皿後添加 matrigel，模擬在 in vivo 系統中初代肝細胞正常的生理狀態，添加 PB 後才能正常誘發 CYP 2B1 表現，細胞處理 PB 20 小時後收下細胞，可得到最佳的 CYP 2B1 蛋白質及 mRNA 表現。2000 年 Iwahashi 等人以小鼠 macrophage 進行實驗，使用濃度 20 μ M H-89 處理細胞，因此本實驗 H-89 的處理上，參考此實驗使用 30 μ M H-89 處理細胞，但發現會造成細胞毒性，在顯微鏡下觀察可以看見細胞質中出現許多異常的空泡，以 western blotting 分析也發現 CYP 2B1 無法正常表現。H-89 為 PKA 的抑制劑，推測可能因為過高濃度的 H-89 會使細胞內 PKA 有關的代謝路徑皆被阻斷，因而造成細胞代謝異常，經過測試後發現以 7.5 μ M H-89 處理細胞不會對細胞造成毒性並能表現 H-89 的效果。

文獻指出，當肝細胞內 cAMP 濃度上升會使 PB 誘發 CYP 2B1 表現被抑制 (Sidhu et al., 1995)。另外學者也指出，PGE₂ 可透過細胞膜上的 EP₂ 刺激腎臟細胞及小神經膠質細胞中 adenylyl cyclase 活性 (Rottela et al., 1983; Patrizio et al., 2000)，進而增加胞內 cAMP 濃度。在齧齒類動物肝臟萃取液中發現 EP receptor 的存在，所以有學者認為 PGE₂ 也可透過此受器來影響肝臟功能 (Katsuyama et al., 1995)。於是本實驗利用 EP₂ 的 agonist-butaprost 來證實 PGE₂ 抑制 PB 誘發 CYP 2B1 表現與 EP₂ 的關係。Western blotting 結果顯示，處理 butaprost

與 PGE₂ 一樣皆能抑制 PB 誘發 CYP 2B1 蛋白質表現 (圖 1、3) 以及 mRNA 表現 (圖 2、4), butaprost 為 EP2 的 agonist 並具有專一性, 因此我們推論 PGE₂ 抑制 PB 誘發 CYP 2B1 表現確實是透過 EP2, 而且以 RT-PCR 分析發現, 處理 butaprost 後 EP2 的 mRNA 有明顯表現。PGE₂ 與 butaprost 在濃度 0.01~1 μM 呈現劑量效應, 濃度在 1 μM 時有最佳抑制效果, 但濃度在 10 μM 時, 其抑制效果反而較 1 μM 差。PGE₂ 與 EP2 結合後會活化 adenylyl cyclase 使胞內 cAMP 濃度上升, 進而促使 PKA 的活性上升, 因此我們為確定 EP2 的下游機制是否與 PGE₂ 抑制 PB 誘發 CYP 2B1 表現有關, 於是在肝細胞處理 PGE₂ 前 1 小時預處理 PKA 抑制劑 H-89。結果發現, 添加 H-89 的處理組, PGE₂ 與 butaprost 抑制 PB 誘發 CYP 2B1 表現的效果被逆轉 (圖 5), 也就是抑制 PKA 後會使 PGE₂ 失去原來抑制 PB 誘發 CYP 2B1 表現的效果, 這個結果顯示 PKA 在 PGE₂ 抑制 PB 誘發 CYP 2B1 表現扮演一重要角色。

NF-κB 在細胞質內與 I-κB 結合成一個不具活性的複合體, I-κB 經過磷酸化後會被降解, NF-κB 才會進入細胞核內與 DNA binding site 結合, 而影響細胞生理。外來刺激物活化 NF-κB 的方式主要是增加 NF-κB 進入細胞核內以及增強 NF-κB 與 DNA binding site 的結合

(Ghosh et al., 2002)。增加 NF-κB 進入細胞核內主要與 IKK 的活性增加或 proteasome 的活性增加, 或加強 I-κB 的降解有關。其中 IKK 的活化必需由上游的 kinase, NIK, 磷酸化。2000 年 Lee 等人指出, 大鼠 CYP 2B1 的 promoter 區域有 NF-κB 的 binding site, 而且在動物

實驗中證實以 PB 餵食大鼠會誘發肝臟中 NF- κ B 的活性 (Li et al., 1996), 因此我們探討在肝細胞模式下 PB 是否會誘發 NF- κ B 的活性。以 western blotting 分析肝細胞細胞核萃取液中 NF- κ B-p65 的表現(圖 7), 發現有處理 PB 的組別其 NF- κ B-p65 的表現較沒有處理 PB 的強, 因此我們推論 PB 可以誘發 NF- κ B-p65 由細胞質轉移至細胞核內, 而在有 PGE2 與 butaprost 的處理組, NF- κ B-p65 的表現與只有 PB 的處理組相比並無顯著影響。

結論

由實驗結果發現，添加 PGE₂ 與 butaprost 於培養液中均會減少 PB 誘發肝細胞 CYP2B1 蛋白質表現，而預處理 H-89 會逆轉 PGE₂ 與 butaprost 抑制 PB 誘發 CYP2B1 表現的效果。由此推論，PGE₂ 會透過 EP2 影響 CYP2B1 表現，而且與 PKA 的活化有關。另外，實驗結果顯示在肝細胞模式中，添加 PB 會促進 NF-κB 由細胞質進入細胞核內。

参考文献

- Alleva DG, Walker TM, Elgert KD. (1995) Induction of macrophage suppressor activity by fibrosarcoma-derived transforming growth factor-beta 1: contrasting effects on resting and activated macrophages. *J Leukoc Biol* 57, 919-928.
- Bondy SC, Naderi S. (1994) Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol.* 48, 155-159.
- Brockman JA, Scherer DC, McKinsey TA, Hall SM, Qi X, Lee WY, Ballard DW. (1995) Coupling of a signal response domain in I κ B to multiple pathways for NF- κ B activation. *Mol Cell Biol* 15, 2809-2818.
- Chen D, Rothenberg EV. (1994) Interleukin 2 transcription factors as molecular targets of cAMP inhibition : delayed inhibition kinetics and combinatorial transcription roles. *J Exp Med* 179, 931-942.
- Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. (1994) International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 46, 205-229.
- Eberhart CE, Dubois RN. (1995) Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 109, 285-301.
- Fenekohl A, Sugimoto Y, Segi E, Maruyama T, Ichikawa A, Puschel GP. (2002) Contribution of the two Gs-coupled PGE₂-receptor and EP4-receptor to the inhibition by PGE₂ of the LPS-induced TNF- α -formation in Kupffer cells from EP2-or EP4-receptor -deficient mice. pivotal role for the EP4-receptor in wild type Kupffer cells. *J Hepatology* 36,328-334.
- Fiebich BL, Schleicher S, Spleiss O, Czygan M, Hull M. (2002) Mechanism of prostaglandin E2-induced interleukin-6 release in astrocytes : possible involvement of EP4-like receptors, p38 mitogen-activated protein kinase and protein kinase C. *J Neurochemistry* 79, 950-958.

Fournier T, Mejdoubi N, Monnet D, Durand G, Porquet D. (1994) Phenobarbital induction of alpha 1-acid glycoprotein in primary rat hepatocyte cultures. Hepatology 20, 1584-1588.

Ghosh S, Karin M. (2002) Missing pieces in the NF- κ B puzzle. Cell 109, S81-S96.

Hüll M, Lieb K, Fiebich BL. (2000) Anti-inflammatory drugs : a hope for Alzheimer's disease? Expert Opin Investig Drugs 9, 671-683.

Israel A. (2000) The IKK complex : an integrator of all signals that activate NF- κ B ? Trends Cell Biol 10, 129-133.

Iwahashi H, Takeshita A, Hanazawa S. (2000) Prostaglandin E2 stimulates AP-1-mediated CD14 expression in mouse macrophages via cyclic AMP-dependent protein kinase A. J Immunol. 164, 10, 5403-8.

Jirtle RL, Meyer SA, Brockenbrough JS. (1991) Liver tumor promoter phenobarbital: a biphasic modulator of hepatocyte proliferation. Prog Clin Biol Res 369, 209-216.

Katsuyama M, Nishigaki N, Sugimoto Y, Morimoto K, Negishi M, Narumiya S, Ichikawa A. (1995) The mouse prostaglandin E receptor EP2 subtype: cloning, expression, and northern blot analysis. FEBS Lett. 1995 .372(2-3): 151-156.

Kawamura A, Yoshida Y, Kimura N, Oda H, Kakinuma A. (1999) Phosphorylation/Dephosphorylation steps are crucial for the induction of CYP2B1 and CYP2B2 gene expression by phenobarbital. Biochem Biophys Res Commun 264, 530-536.

Kimura M, Osumi S, Ogihara M. (2000) Stimulation of DNA synthesis and proliferation by prostaglandins in primary cultures of adult rat hepatocytes. Eur J Pharmacol. 404, 259-271.

Laney JD, Hochstrasser M. (1999) Substrate targeting in the ubiquitin system. Cell 97, 427-430.

Lee SH, Wang X, DeJong J. (2000) Functional interactions between an atypical NF- κ B site from the rat CYP2B1 promoter and the transcriptional repressor RBP-J κ /CBF1. Nucleic Acids Res. 15;

28(10): 2091-2098.

Li Y, Leung LK, Spear BT, Glauert HP. (1996) Activation of hepatic NF- κ B by Phenobarbital in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 229, 982-989.

Matsumura T, Degawa T, Takii T, Hayashi H, Okamoto T, Inoue J, Onozaki K. (2003) TRAF6- NF- κ B pathway is essential for interleukin- 1-induced TLR2 expression and its functional to TLR2 ligand in murine hepatocytes. *Immunology* 109, 127-136.

Milano S, Arcoleo F, Dieli M, D'Agostino R, D'Agostino P, De Nucci G, Cillari E. (1995) Prostaglandin E2 regulates inducible nitric oxide synthase in the murine macrophage cell line J774. *Prostaglandins*. 49(2): 105-15.

Montine TJ, Sidell KR, Crews BC, Markesbery WR, Marnett LJ, Roberts LJ 2nd, Morrow JD. (1999) Elevated CSF prostaglandin E2 levels in patients with probable AD. *Neurology* 53, 1495-1498.

Nagata T, Harayama N, Sasaki N, Inoue M, Tanaka K, Toyohira Y, Uezono Y, Maruyama T, Yanagihara N, Ueta Y, Shibuya I. (2003) Mechanism of cytosolic Ca²⁺ suppression by prostaglandin E₂ receptors in rat melanotrophs. *J Neuroendocrinology* 15, 33-41.

Negishi M, Sugimoto Y, Ichikawa A. (1995) Molecular mechanisms of diverse actions of prostanoid receptors. *Biochim Biophys Acta* 1259 109-119.

Negishi M, Sugimoto Y, Ichikawa A. (1995) Prostaglandin E receptors. *J Lipid Mediat Cell Signal* 12, 379-391.

Neumann M, Grieshammer T, Chuvpilo S, Kneitz B, Lohoff M, Schimpl A, Franza BR Jr, Serfling E. (1995) RelA/p65 is a molecular target for the immunosuppressive action of protein kinase A. *EMBO J* 14, 1991-2004.

Norris JL, Manley JL. (1992) Selective nuclear transport of the *Drosophila* morphogen dorsal can be established by a signaling pathway involving the transmembrane protein Toll and protein kinase A. *Genes Dev* 6, 1654-1667.

Pasinetti GM, Aisen PS. (1998) Cyclooxygenase-2 expression is

increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neuroscience* 87, 319-324.

Patrizio M, Colucci M, Levi G. (2000) Protein kinase C activation reduces microglial cyclic AMP response to prostaglandin E2 by interfering with EP2 receptors. *J Neurochem* 74, 400-405.

Peraino C, Fry RJ, Staffeldt E, Christopher JP. (1975) Comparative enhancing effects of phenobarbital, amobarbital, diphenylhydantoin, and dichlorodiphenyl trichloroethane on 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in the rat. *Cancer Res* 35, 2884-2890.

Pinkus R, Bergelson S, Daniel V. (1993) Phenobarbital induction of AP-1 binding activity mediates activation of glutathione S-transferase and quinone reductase gene expression. *Biochem J* 290, 637-640.

Prasad KN, Hovland AR, La Rosa FG, Hovland PG. (1998) Prostaglandins as putative neurotoxins in Alzheimer's disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 219, 120-125.

Pyerin W, Taniguchi H. (1989) phosphorylation of hepatic phenobarbital-inducible cytochrome P-450. *EMBO J* 8, 3003-3010.

Rotella CM, Brandi ML, Toccafondi R. (1983) Effect of prostaglandin E2 on adenylate cyclase system in human kidney cell cultures: interactions with parathormone and arginine-vasopressin. *J Endocrinol Invest.* 6(5): 369-74.

Ruch RJ, Klaunig JE. (1986) Effects of tumor promoters, genotoxic carcinogens and hepatocytotoxins on mouse hepatocyte intercellular communication. *Cell Biol Toxicol* 2, 469-483.

Sano H, Hla T, Maier JA, Crofford LJ, Case JP, Maciag T, Wilder RL. (1992) In vivo cyclooxygenase expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis and rats with adjuvant and streptococcal cell wall arthritis. *J Clin Invest* 89, 97-108.

Sidhu JS, Omiecinski CJ. (1995) cAMP-associated inhibition of phenobarbital-inducible cytochrome P450 gene expression in primary rat hepatocyte cultures. *J Biol Chem* 270, 12762-12773.

- Sidhu JS, Omiecinski CJ. (1995) Modulation of xenobiotic-inducible cytochrome P450 gene expression by dexamethasone in primary rat hepatocytes. *Pharmacogenetics* 5, 24-36.**
- Shaw PM, Edigkauer M, Doehmer J, Adesnik M. (1996) Sequence of the PB-inducible CYP2B1 promoter. *Biochim Biophys Acta* 1305, 54-58.**
- Sueyoshi T, Kawamoto T, Zelko I, Honkakoski P, Negishi M. (1999) The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. *J Biol Chem* 274, 6043-6046.**
- Takahashi S, Takeuchi K, Okabe S. (1999) EP4 receptor mediation of prostaglandin E₂-stimulated mucus secretion by rabbit gastric epithelial cells. *Biochem Pharmacology* 58,1997-2002.**
- Tsai CF, Lii CK, Yang JJ, Liu K, Lin WL, Chen HW. (2001) Prostaglandin E₂ is involved in the increase of cytochrome P-450 2B1 expression by α -tocopheryl succinate in primary rat hepatocytes in the presence of phenobarbital. *Nutrition & Cancer*.41, 188-195.**
- Tsujii H, Okamoto Y, Kikuchi E, Matsumoto M, Nakano H. (1993) Prostaglandin E2 and rat liver regeneration. *Gastroenterology* 105, 495-459.**
- Ueno N, Murakami M, Tanioka T, Fujimori K, Tanabe T, Urade Y, Kudo I. (2001) Coupling between cyclooxygenase, terminal prostanoid synthase, and phospholipase A₂. *J Biochem Chem* 276, 34918-34927**
- Yamane H, Sugimoto Y, Tanaka S, Ichikawa A. (2000) Prostaglandin E (2) receptors, EP2 and EP4, differentially modulate TNF-alpha and IL-6 production induced by lipopolysaccharide in mouse peritoneal neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 278, 224-228.**
- Zelko I, Negishi M. (2000) Phenobarbital-elicited activation of nuclear receptor CAR in induction of cytochrome P450 genes. *Biochem Biophys Res Commun* 277, 1-6.**
- Zhong H, SuYang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S. (1997) The transcriptional activity of NF- κ B is regulated by the I κ B-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell* 89, 413-424.**

Zhong H, Voll RE, Ghosh S. (1998) Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. Mol Cell 1, 661-671.