

摘要

根據以往的研究結果發現，餵食大鼠高魚油與高玉米油飲食，結果發現高魚油飲食可顯著抑制肝前癌細胞形成，但機轉未知。由於Eicosapentaenoic acid (EPA)、Docosahexaenoic acid (DHA) 具有活化peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α)的作用，故本實驗目的在探討飲食中油脂種類與含量對大鼠肝臟內PPAR α response 基因及非PPAR α response 基因蛋白質和mRNA的表現。出生24小時內雄性大白鼠腹腔注射diethylnitrosamine (DEN, 15mg/kg)，離乳後於飲食添加phenobarbital (PB, 0.05%) 個別餵食高玉米油 (23.5%)、高玉米油及clofibrate (0.1%) 或高魚油(20%魚油及3.5%玉米油) 6個月。以吸入過多二氧化碳方式犧牲大鼠，分離大鼠肝臟蛋白質及mRNA。結果發現，高魚油組肝臟中CYP 4A1 (Cytochrome P450 4A1)、L-FABP (Liver – fatty acid binding protein) 及ACO (Acyl-CoA oxidase) mRNA表現皆高於高玉米油組和高玉米油及clofibrate (0.1%) 組，而之前的研究也顯示，高魚油組肝臟中CYP 4A1蛋白質表現高於高玉米油組和高玉米油及clofibrate (0.1%) 組，由結果發現clofibrate (0.1%) 劑量的給予雖會促進PB誘發肝前癌細胞的發生但效果並不顯著，這可能是由於clofibrate會誘發體內解毒及抗氧化酵素產生的結果，另一方面因為餵食實驗飲食長達六個月，因此肝臟對於實驗飲食所帶來的影響，可能已經產生了一些適應性的反應，因此本研究另一個實驗是以短時間餵食 (2週或6週) 並增加不同油脂含量及不同clofibrate 量 (0.5%) 的實驗飲食組。出生4週雄性大白鼠腹腔注射DEN (15mg/kg) ，並於飲食添加PB(0.05%) 個別餵食高玉米油 (23.5%)、高玉米油及clofibrate (0.1%或0.5%)、低玉米油 (5%)、低玉米油及clofibrate (0.1%或0.5%) 或高魚油(20%魚油及3.5%玉米油) 2週或6週後。以吸入過多二氧化碳方式犧牲大鼠，分離大鼠肝臟蛋白質及mRNA。經由Western Blot結果中發現餵食高魚油組大鼠肝臟中CYP 4A1、CYP 2B1蛋白質的表現會高於高玉米油組，飲食中添加clofibrate的老鼠肝臟

中蛋白質CYP 4A1、Cytochrome P450 2B1 (CYP 2B1) 的表現量也有增加的情形。在Northern Blot實驗中大鼠餵食高魚油組和高玉米油及clofibrate (0.1

%或0.5%) 與餵食高玉米油組相較，肝臟中CYP 2B1 mRNA表現量增加。

Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction實驗中發現大鼠餵食高魚油組和高玉米油及clofibrate (0.5%) 與餵食高玉米油組相較，會增加ACO mRNA的表現量,另外在高魚油組及高或低玉米油及clofibrate (0.1%或0.5%) 組中也會增加CYP 4A1、L-FABP mRNA的表現量，雖有些未達統計上的顯著差異。為了釐清脂肪酸對調控PPAR α response基因和非PPAR α response基因的表現，在本研究另一實驗結果中亦發現，n-3脂肪酸 (EPA和DHA) 誘導大鼠肝臟初代肝細胞CYP 4A1蛋白質、ACO及L-FABP mRNA表現的效果高於n-6脂肪酸 (Linoleic, LA)，而n-3脂肪酸誘導非PPAR α response基因Placental glutathione S-transferase (PGST) 蛋白質表現效果低於n-6脂肪酸 (LA)。綜合以上，本研究證實與玉米油相較，魚油可誘發PPAR α response基因表現外亦可調控非PPAR α response基因之解毒酵素PGST及2B1表現，而魚油抑制肝臟foci形成與魚油調控基因表現間之關係仍須進一步研究。

關鍵詞：PPAR, fish oil, clofibrate, liver, EPA, DHA。

文獻探討

一、 油脂的組成和生理作用及其與癌症的相關性

(1) 飲食中脂肪酸的組成

常見的飽和脂肪酸中，短鏈丁酸 (Butanoic acid, 4:0) 為乳脂肪的獨特成分，而其他短鏈至中鏈的飽和脂肪酸 (6:0 ~ 14:0)，雖廣存於動、植物，如乳酪、椰子油、花生油，但含量極微，而長鏈軟脂酸 (Hexadecanoic acid, 16:0) 及硬脂酸 (Octadecanoic acid, 18:0) 常見於一般動、植物油中，例如棕櫚油及豬油等。在不飽和脂肪酸中，單元不飽和脂肪酸 (Monounsaturated fatty acid, MUFA) 中的油酸 (Oleic acid, 18:1) 及棕櫚油酸 (Palmitoleic acid, 16:1)，在動植物體都有豐富的含量，含兩個雙鍵以上的多元不飽和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acid, PUFA)，通常存在於種籽油脂中，例如黃豆油及玉米油。PUFA 中亞麻油酸 (Linoleic acid, LA, 18:2)、次亞麻油酸 (Linolenic acid, LNA, 18:3) 和花生四烯酸 (Arachidonic acid, AA, 20:4) 因人體內無法自行合成，必須仰賴食物的供應，稱為必需脂肪酸 (Essential fatty acid, EFA) 通常在植物油，如紅花油、玉米油和葵花籽油中含量較多。魚油中富含 n-3 系列之二十碳五烯酸 (Eicosapentaenoic acid, EPA, 20:5 及二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic acid, DHA, 22:6)，而另一 n-3 系列之次亞麻油酸則富含於大豆油中。

(2) n-3和n-6多元不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids , PUFAs) 之生理作用

在人體內LA和LNA可經由 $\Delta 5$ 、 $\Delta 6$ 去飽和酵素與加長酵素 (elongase) 分別合成花生四烯酸(n-6)和二十碳五烯酸(n-3) 及二十二碳六烯酸(n-3)。n-6 PUFA代謝生成之AA可再經Cyclooxygenase (COX) 或Lipoxygenase被代謝生成系列2前列腺素 (prostaglandins)、白烯三素 (leukotriene)、前列凝素 (thromboxane) 合稱為eicosanoids, eicosanoids在體內可調節許多生理功能, 而過量之eicosanoids生成分泌與發炎免疫反應及癌細胞增生有關(James et al., 2000; Simopoulos, 2000) , n-3 PUFA在體內經COX2和Lipoxygenase代謝生成為系列3之eicosanoids, 具有可抗AA生成系列2之前列腺素(prostaglandins)和白烯三素(leukotriene)的作用。在動物及人體研究中發現, 攝取EPA及DHA會降低前列腺素E₂ (Prostaglandins E₂, PGE₂)、白烯三素B₄ (leukotriene B₄) 及前列凝素A₂ (thromboxane A₂)的濃度, 但增加前列凝素B₃ (thromboxane B₃)、前列環素(prostacyclin I₃)、白烯三素B₅ (leukotriene B₅)的濃度。在脂肪酸對基因表現的研究發現, AA透過內生性的代謝轉變成PGE₂, 會降低小鼠3T3纖維母細胞中c-fos及egr-1基因表現, 相反的, EPA和DHA會顯著降低外生性AA代謝轉變成PGE₂, 同時它們會增加小鼠3T3纖維母細胞中c-fos及Egr-1基因表現(Sellmayer et al., 1997)。目前研究已發現n-3和n-6 PUFAs在代謝上主要影響eicosanoids之代謝、維持生物體正常生長和發展、構成細胞膜上磷脂質的成份以及影響基因表現和細胞間的訊息傳遞(Simopoulos, 2000)。

(3) 油脂與癌症的相關性

人類的癌症發生因素中至少有三分之一與飲食及生活方式有關，而飲食中所攝取的脂肪被認為是重要的危險因子之一。故探討油脂在癌化過程中所扮演的角色一直是許多學者感興趣的課題之一。根據許多流行病學及動物實驗發現，飲食中油脂種類及含量與癌症發生有密切關係，其中以肝癌、胰臟癌、乳癌、結腸癌為最。雖然目前脂肪酸在人類癌症中所扮演的角色還未清楚，但根據流行病學及一些研究結果發現相對於 n-3 PUFA，若飲食中 n-6 PUFAs 如 LA 攝取過量，會增加罹患結腸癌、乳癌及前列腺癌的機率(Key, 1995; Lipworth, 1995; Potter, 1995)。

乳癌

據流行病學的調查結果發現，愛斯基摩人和阿拉斯加人有較低的乳癌罹患率，原因可能是其飲食中含有較多的深海魚類（如鱈魚、沙丁魚等）所致，深海魚類的脂肪組成中含有多量的 n-3 多元不飽和脂肪酸，其中以 EPA 和 DHA 為主，在鼠類的研究發現增加飲食中 n-6/n-3 脂肪酸比例，會顯著增加乳癌罹患率(Bartsch et al., 1999)，另外有研究指出(Maillard et al., 2002)，人類乳房組織中 n-3 多元不飽和脂肪酸含量增加及 n-6/n-3 脂肪酸比例降低，可使乳癌的發生率降低。此外在 *in vivo* 實驗中，以 7,12-dimethylbenz[a]anthracene 誘發小鼠乳癌發生模式中，餵食小鼠 n-3 PUFA 之魚油飲食，與富含 n-6 PUFA 玉米油飲食相較，會顯著減少乳腺腫瘤血管增生和腫瘤生成數目(Hubbard et al., 1998)。除了飲食中脂質的種類外，飲食中脂質的含量也會影響乳癌的發生。研究指出相對於低量 n-6 (10%) 油脂，在大鼠懷孕期間給予高量 (40%) n-6 油脂會顯著增加大鼠體內雌激素濃度，導致以 7,12-dimethylbenz[a]anthracene 所誘發雌性大鼠乳腺腫瘤的生成增加(Hilakivi-Clarke et al., 1996)。

胰臟癌

O'Connor 等人 (1985)，以出生 14 天的雄性 Wistar 大鼠為實驗對象，腹腔注射 L-azaserine (30 mg/kg) 誘發胰臟腫瘤產生，在餵食實驗飲食四個月後 (20% 玉米油或魚油)，結果發現相較於玉米油，魚油可顯著降低胰前癌細胞的生成。O'Connor 等人 (1989) 之後的實驗中也發現隨著 n-3/n-6 脂肪酸比率增加，胰前癌細胞的生成將隨之減少 (O'Connor et al., 1985; O'Connor et al., 1989)，亦有研究發現，n-6 PUFA 會促進胰腫瘤細胞增生，反之，n-3 PUFA 會抑制胰腫瘤細胞增生 (Tisdale, 1993)。

由 Herrington 等人 (1997) 發現高油脂 (玉米油 23.5%) 的攝取會增加以 N-nitrosobis (2-oxoproryl) amine 所誘發倉鼠胰臟癌的發生率 (Herrington et al., 1997)。Wenger 等人 (2001a) 推論其原因可能與脂質過氧化作用增加、GSH-peroxidase 和 superoxide dismutase (SOD) 活性的降低有關，而其以後的研究也證明，給予抗氧化劑維生素 A、E 和 C 的確會增加倉鼠胰臟腫瘤中 SOD 活性，顯著降低以 N-nitrosobis (2-oxoproryl) amine 所誘發倉鼠胰臟癌的發生率 (Wenger et al., 2001a; Wenger et al., 2001b)，因此可知胰臟癌的發生可能與飲食中 n-6 油脂的氧化作用，進而造成 DNA 損傷有相關 (Li, 2001; Wang et al., 1998)。

肝癌

以 diethylnitrosamine (DEN) -phenobarbital (PB) 誘發雌性 Sprague-Dawley 大白鼠肝前癌細胞發生的模式下，餵食大鼠脂質含量 23.5% 3 個月 (Lii et al., 2000) 或 15% 6 個月 (Ko et al., 2000) 之實驗飲食，結果發現，相較於餵食實驗飲食之玉米油組，餵食實驗飲食之魚油組會顯著增加肝中解毒酵素系統活性及脂質過氧化反應和大鼠肝前癌細胞的形成。Kim 等人研究發現以 DEN 誘發雄性 Sprague-Dawley

(SD) 大白鼠肝前癌細胞發生的模式下，給予油脂含量 15% ，而 n-6/n-3 脂肪酸比例不同的飲食，結果發現飲食中小於或等於 4 的 n-6/n-3 脂肪酸比例，是最有效降低肝前癌細胞發生的飲食，而其作用可能與肝臟微粒體中單氧化酵素的活性有關。魚油中的 n-3 PUFA 可能是藉由降低肝臟微粒體細胞膜的脂質過氧化作用以及穩定微粒體細胞膜，進而對肝前癌細胞的發生產生保護作用(Kim et al., 2000)，但相關機制仍需進一步探討。

(4) 脂質影響癌症發生的可能機轉

飲食中的脂肪酸，特別是 n-3 和 n-6 PUFAs 可直接或間接影響癌症發生的過程，目前對於飲食中油脂影響腫瘤發生的原因，有學者提出以下幾個可能的機轉：

(1) 在 PUFAs 的過氧化反應，主要是其雙鍵位置上的氫原子被移除後，導致氧化壓力以及脂質過氧化產物（如 malondialdehyde, 4-hydroxyalkenal）不斷產生而誘導 DNA 損傷；(2) 脂質影響訊號傳遞途徑而改變基因的表現；(3) 脂質影響細胞膜上酵素的結合而影響其酵素活性，如 CYP 450 家族，其負責調節外來毒物及雌激素的代謝；(4) 細胞膜的結構和功能改變，而導致賀爾蒙及生長因子的接受器 (growth factor receptors) 產生變化；(5) 影響脂肪酸代謝物前列腺素的合成(Bartsch et al., 1999)。

脂質過氧化作用與氧化壓力

目前已知，多元不飽和脂肪酸會提高過氧化作用的產生，使得細胞內的氧化壓力不斷產生，導致 DNA 和蛋白質損傷，並且會中斷訊號傳遞的途徑，而這些反應都會刺激人類惡性腫瘤的生長。脂肪酸尤其是 LA 及 AA 過氧化作用產生有

trans-4-hydroxy-2-nonenal 和 malondialdehyde 等過氧化產物。其是藉由 LA 或 AA 氧化而形成的，trans-4-hydroxy-2-nonenal 和 malondialdehyde 通常可當作體內脂質過氧化程度的指標，許多研究都發現在 PUFAs 的處理下 trans-4-hydroxy-2-nonenal 及 malondialdehyde 生成增加，而脂質過氧化程度的增加與細胞存活率的降低有密切關係。此外長鏈不飽和脂肪酸進行過氧化小體 β -氧化作用時，透過 Acyl-CoA oxidase (ACO) 催化作用後會產生大量的 H_2O_2 ，研究發現 PUFA 處理下，使 ACO 過度表現的細胞中會增加 H_2O_2 產量，並且會減少細胞的分化(Okamoto et al., 1997; Tamatani et al., 1999)。若在給予 PUFA 同時添加 catalase、glutathione peroxidase 或維生素 E、BHT 等抗氧化劑可降低 PUFAs 所造成的氧化壓力，減輕其造成的氧化傷害(Foretz et al., 1999; Hawkins et al., 1998)。

調節前列腺素 (prostaglandins) 的合成

由於前列腺素在調節生理功能上扮演多樣而且重要的角色，所以對能影響前列腺素生成量及種類的n-3、n-6脂肪酸在生理上的角色也不容忽視。腫瘤研究發現，飲食中富含EPA及DHA可抑制大鼠乳房腫瘤細胞的生長，可能原因與EPA是合成前列腺素系列3的前驅物質有關(Karmali et al., 1987)。Sasaki 等人(1998)即指出，前列腺素系列2具有促進腫瘤生長的作用，而前列腺素系列3則可抑制腫瘤生長。由於n-3 PUFAs可與n-6 PUFAs共同競爭調控前列腺素合成的重要酵素--COX，導致n-6 PUFAs轉變為前列腺素系列2的量減少(James et al., 2000)，因此在鼠類乳房腫瘤生長過程中給予n-3 PUFA可以抑制腫瘤生長(Sasaki et al., 1998)。

COX可分為COX1及COX2，其中COX2在正常組織細胞中表現量低，但當發炎反應發生時，其表現會明顯增加，此外COX2的表現在結腸癌、肺癌、乳癌和胃癌細胞中也有顯著增加的情形(Costa et al., 2002)。研究發現非固醇類抗發炎藥物可抑制腫瘤生長，其作用機制可能是藉由抑制COX的活性進而抑制PGE₂生成所致

(Hanif et al., 1996)。另外Li等人(2002)在in vitro實驗中發現COX抑制劑aspirin會誘發食道癌細胞的apoptosis並且藉由抑制細胞生長而降低食道癌發生(Li et al., 2000)。Aspirin可能可經由抑制膽酸所刺激COX2的表現及減少PGE₂生成而降低食道癌細胞生長。由以上實驗結果得知，PGE₂生成與癌症發生有著密切的關係，而飲食中攝取富含n-3 PUFAs的油脂會降低前列腺素系列2生成，抑制腫瘤的生長。此外研究亦發現飲食中n-3 PUFAs亦會增加大鼠結腸細胞中粒腺體細胞膜磷脂質不飽和度，增加apoptosis發生，而在降低癌症發生過程中扮演相當重要的角色(Chapkin et al., 2002)。

近年來許多研究亦著重於探討脂肪酸對基因表現之調控，結果顯示脂肪酸經由調控轉錄因子活化，影響基因表現之能力亦可能是決定脂肪酸調控癌症形成之重要因素。

二、peroxisome proliferator-activator receptor (PPAR) 生理功能及基因調控關機制

(1) PPAR 的結構與生理功能

過氧化小體增生劑活化接受體(PPAR)，因其cDNA序列與固醇類荷爾蒙核受器(steroid hormone nuclear receptor)有同質性，故歸類於固醇類荷爾蒙核受器家族的一員，並由於其能夠被過氧化小體增生劑(peroxisome proliferator)活化，因而命名為PPAR。繼發現mouse PPAR α 之後，也陸續在大鼠、兩棲類和人類等組織中發現其他PPAR isoforms，至今PPAR可分為三種不同isoforms：PPAR α 、PPAR β (PPAR δ 或NUC1)及PPAR γ 。PPAR α 主要表現於肝臟、棕色脂肪組織、腎臟、心臟及骨骼肌；PPAR β 廣泛存在於大部分組織中，尤以腸道、腎臟表現量

較高；PPAR γ 又可區分為 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 及 $\gamma 3$ ；PPAR $\gamma 1$ 在肝臟、心臟及脂肪組織中皆有表現，而 PPAR $\gamma 2$ 則專一性的表現在脂肪組織，另外在人類發現的 PPAR $\gamma 3$ ，則主要表現在結腸及脂肪組織。不同 PPAR isoforms 基因在染色體上位於不同之區域，具組織特異性並表現出不同的生理功能(Desvergne and Wahli, 1999)。本章節主要著重在探討 PPAR α 生理功能及其對基因調控之相關機制。

PPAR 為 ligand-dependent 轉錄因子，當 ligand 進入細胞與 PPAR 結合後，活化的 PPAR 會與另一固醇類荷爾蒙核受器成員：9-cis retinoic acid X receptor (RXR) 形成 heterodimer 共同辨識在基因促進區域上之 DNA 特定序列 (peroxisome proliferator responsive element, PPRE) 並與其結合，繼而調控 PPAR response 基因轉錄之表現 (圖一)。目前已知 PPAR α response 基因有 cytochrome P450 4A1 (CYP 4A1)、ACO 和 liver – fatty acid binding protein (L-FABP) 等。

PPAR 具有四個主要的功能性區域，分別為 A/B、C、D 和 E/F (Mangelsdorf et al., 1995)，A/B domain 位於 N 端，具有 ligand-independent transactivation 功能，磷酸化 A/B domain 作用可調節 PPAR 轉錄活性；C domain 是由約 70 個高度保留之胺基酸形成之 DNA-binding domain，可辨識 PPRE 之 DNA 序列並與其結合；D domain 又稱 hinge domain，為連接 DNA-binding domain 與 ligand binding domain 的橋樑；E/F domain 又稱 ligand binding domain，位於 C 端，具有 ligand 結合及 ligand-dependent transactivation 等功能，當 PPAR 與 ligand 結合後，會改變 PPAR 構形而活化 PPAR，誘發基因轉錄之一系列步驟(Escher and Wahli, 2000)。

雖然一些 PPAR ligand 如多元不飽和脂肪酸可活化三種 PPAR，但一般而言不同的 PPAR isoforms 各自有特定的 ligand 與其結合之親和性高，而 PPAR 的 ligand 依其來源可分為合成性的 ligand 及內生性的 ligand (圖二)，fibrate 類降血脂藥物及 Wy14,643 與 PPAR α 有高度親和性，為 PPAR α 專一合成性的 ligand，而另一個 fibrate 類降血脂藥物 clofibrate，雖與 PPAR α 親和性較 Wy14,643 低，但仍為 PPAR α 具代表性之合成性 ligand。體內亦有一些脂肪酸及其代謝產物被發現可活化

PPAR α 為 PPAR α 內生性之 ligand，目前已被證實 PPAR α activator 包括有長鏈不飽和脂肪酸，如 EPA、DHA、LA、AA 和 LNA；支鏈、共軛或氧化的脂肪酸，如 Conjugated linoleic acid (CLA) 及脂肪酸代謝物如 eicosanoid 8 (S)-hydroxyeicosatetraenoic 和 leukotriene B4 (表一) (Desvergne and Wahli, 1999; Lin et al., 1999; Moya-Camarena et al., 1999; Willson and Wahli, 1997)。

(2) PPAR α 於脂質代謝之角色

PPAR α 主要可調控與脂質氧化相關的基因表現，如脂肪酸進出細胞膜運輸之關鍵酵素 carnitine palmitoyltransferase、Acyl-Co synthase (ACS) 及過氧化小體中脂肪酸行 β -氧化作用 (β -oxidation) 之速率限制步驟的關鍵酵素 ACO 等。至今發現 PPAR α 亦影響 Lipoprotein lipase (LPL) 及 Apolipoprotein III 生成而影響脂蛋白 (如 Very low-density lipoprotein) 釋放出脂肪酸。此外 PPAR α 亦可調控 fatty acid transport protein、fatty acid translocase (FAT/CD36) 及 L-FABP 基因表現，促使脂肪酸進入肝臟細胞中 (Motojima et al., 1998)，而 PPAR α 調控與脂質異化相關因子之基因表現，促進脂質在肝臟細胞中分解，使得肝臟可用以合成三酸甘油酯之脂肪酸減少，而達到降血脂之生理效應 (Schoonjans et al., 1995)。另外，位於粒線體上的 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase，為調控體內生酮作用 (ketogenesis) 之速率限制酵素，在其基因之 promoter 上含有 PPRE，當活化 PPAR α 後會使 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase 轉錄增加，進而調節脂質之代謝及平衡 (Rodriguez et al., 1994)。

Cytochrome P450 之 4A 亞族可由 Peroxisome proliferator 或脂肪酸透過 PPAR 誘導其 mRNA 表現，目前已知 CYP4A1 及 CYP4A6 基因上皆含有 PPRE。CYP450 (4A) 家族之酵素主要作用為催化中鏈或長鏈脂肪酸及 eicosanoids 於微粒體進行 ω -hydroxylation；脂肪酸經 ω -hydroxylation 作用後，會生成 dicarboxylic acid，而大

部分生成的dicarboxylic脂肪酸會經由過氧化體 β -oxidation路徑代謝(Johnson et al., 1996b)。

1995年PPAR α knockout mice 的出現有助於定義PPAR α 在生理上扮演的角色。由Lee等學者(1995) 觀察發現PPAR α null mice其外表特徵與正常鼠無異，但若投予peroxisome proliferators (例如Wy14,643或clofibrate)，並不會產生過氧化體增生的效應，也不會誘發ACO、thiolase、CYP4A1、CYP4A3 及L-FABP 等基因之表現，且鼠肝中出現脂肪堆積之情形，顯示PPAR α 在調節脂肪酸 β -oxidation 及維持細胞內脂質代謝恆定之重要性(Lee et al., 1995)。

(3) PPAR α 於肝癌之角色

長期投予過氧化小體增生劑(peroxisome proliferators) 會增加鼠類發生肝腫瘤的機會(Gonzalez et al., 1998)，但因為過氧化小體增生劑不會與DNA 產生共價結合，所以過氧化小體增生劑被歸類為一種非基因毒性的致癌物(Green, 1995)。在鼠類肝臟中，過氧化小體增生劑會引起適應性的反應，像是一些氧化壓力的產生(Yeldandi et al., 2000)、細胞增生及 cell cycle regulation (Gonzalez et al., 1998),而這些變化被認為和腫瘤形成的機轉有關。

若投與過氧化小體增生劑會使得H₂O₂ 生成明顯增加(Nemali et al., 1988)。過氧化小體中讓H₂O₂ 產生的關鍵酵素ACO，為PPAR的responsive 基因，而過氧化小體增生劑增加ACO的活性，可能是增加ACO的轉錄作用。鼠類過氧化體對於過氧化小體增生劑極為敏感，餵食正常老鼠Wy14,643 或 clofibrate 會導致老鼠肝細胞及過氧化小體增生有的現象，並誘發肝腫瘤之形成，但投予Wy14,643 於PPAR α knockout mouse，並不會產生肝腫大及肝腫瘤的現象(Lee et al., 1995; Peters et al., 1997)，所以PPAR α 在鼠類肝癌發生的過程中具重要意義。

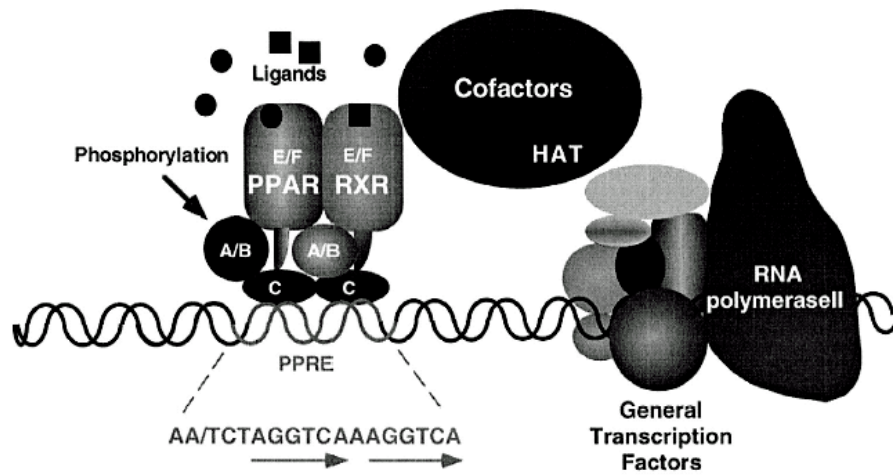
具有基因毒性與無基因毒性之藥物皆可能刺激細胞增生，而細胞增生在腫

瘤形成中扮演一個非常重要的角色(Lake, 1995)。研究發現 Wy-14,643 和 clofibrate 可以有效的誘導 c-myc、fos、jun 和 c-Ha-ras 等 growth-regulatory gene 表現(Peters et al., 1998)。這些被誘導的 growth-regulatory genes 會促使細胞進入 S 期(Ledwith et al., 1996)。此外當大鼠給予 Wy-14,643 之後可藉由一些 growth-regulatory gene 的調節使細胞增生 (Ma et al., 1997)。至於 PPAR α null mice 餵食 Wy-14,643 後並無有絲分裂的反應以及 cell cycle 中重要蛋白質之表現 (Peters et al., 1998), 由此可知 PPAR α 在過氧化小體增生劑誘導 DNA 合成扮演相當重要的角色(Plant et al., 1998)。

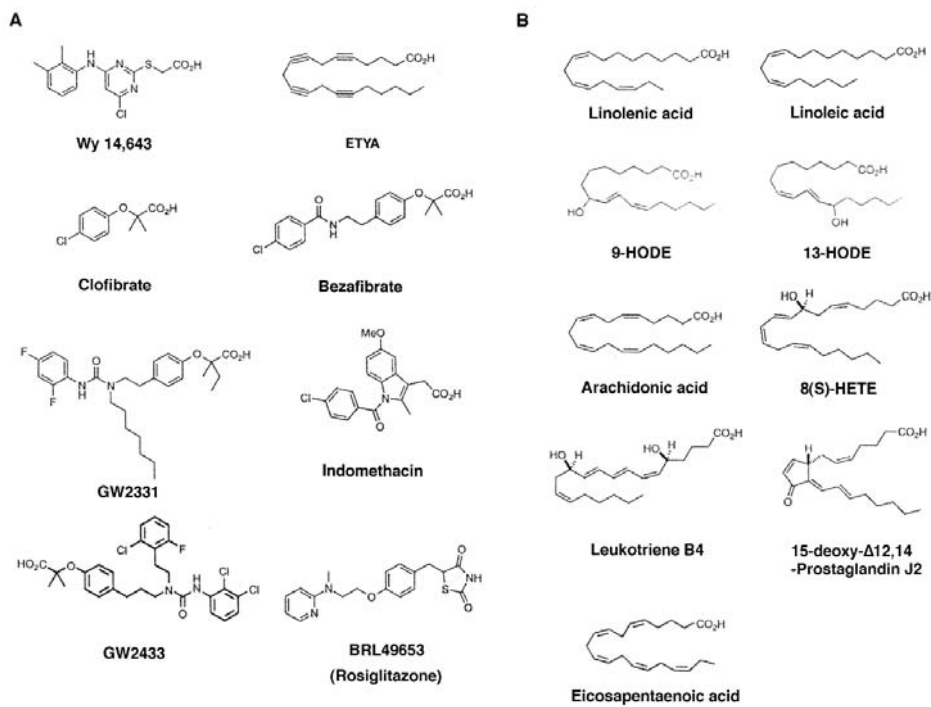
此外，過氧化小體抑制apoptosis作用，使細胞不正常分裂是PPAR α 造成另一個肝腫瘤形成的因子(Bayly et al., 1994; Roberts, 1996)。在 In vivo及in vitro中過氧化小體增生劑—nafenopin，相較於控制組會抑制apoptosis作用。在肝細胞中 transforming growth factor β 1 會誘導apoptosis產生，但可藉由nafenopin來抑制。轉植入 hPPAR α B/29 dominant negative入肝細胞後，可以抑制藉由過氧化小體誘導的apoptosis，因此過氧化小體增生劑抑制apoptosis 的過程中PPAR α 是一個重要的因子(Gonzalez et al., 1998)。此外PPAR α 的活化劑活化PPAR α ，增加PPAR α response 基因ACO、CYP4A1和L-FABP表現可當作PPAR α 誘發老鼠肝癌形成之指標 (Bentley et al., 1993; Chu et al., 1995; Gonzalez et al., 1998; Strange and Roberts, 1996)。

PPAR α 主要的 ligand Wy14,643是屬於沒有基因毒性的藥劑，但長期餵食老鼠Wy14,643可增加老鼠肝臟中過氧化小體的數量 (peroxisome proliferation) 及肝細胞的增生 (hyperlasia；與刺激DNA的生成有關) 和增大 (hypertrophy)，因而使得老鼠肝臟增大 (liver enlargement)，最後導致肝癌細胞形成(Gonzalez et al., 1998)，相對的，clofibrate雖亦可活化PPAR α ，使得老鼠肝臟過氧化小體的數量增加及ACO酵素活性增加，卻沒有肝癌細胞形成，推測可能由於clofibrate對PPAR α 活化功效較Wy14,643弱，誘發之ACO酵素活性不足以誘發肝癌細胞形成。有關過氧化小體增生劑對老鼠肝癌形成影響之實驗，除了探討過氧化小體增生劑本身對

誘發老鼠肝癌形成能力外，亦有研究探討過氧化小體增生劑對促進DEN/PB誘發老鼠肝癌形成之功效。DEN為initiator再經PB tumor promoter作用能有效誘導雌性大白鼠肝前癌細胞的發生(Onodera et al., 1991)。Chen及Lii等人研究發現，大鼠攝取魚油相較於攝取等量玉米油能顯著減少DEN/PB誘發雌性大鼠每平方公分肝臟所含GGT-positive foci和PGST-positive foci (Chen et al., 1997; Lii et al., 2000)。然而本實驗室之前的研究結果發現，在DEN/PB處理下，玉米油組相較於魚油組對雄性大鼠GGT-positive foci的數目無顯著影響，此結果可能與以DEN/PB誘發雄性大鼠肝前癌細胞的效果不佳(Stark et al., 1993) 有關，故魚油抑制肝癌形成之功效是否與性別有關仍須進一步探討。Cattley等人（1994）發現，給予老鼠DEN誘發劑後，長期餵食Wy14,643（37週），可促進肝前癌細胞形成，並增加肝臟腫瘤生成數目及發生率，而長期餵食老鼠較弱的PPAR α 活化劑clofibrate，雖然clofibrate本身不會誘發肝癌細胞形成，但是clofibrate可增加DEN誘發老鼠肝癌形成數目及發生率 (Cattley et al., 1994)。



圖一、Mechanisms of transactivation of PPAR. (Escher and Wahli, 2000)



圖二、Natural and synthetic PPAR ligands. (Escher and Wahli, 2000)

表一、Compounds that effect PPAR α function (Bishop-Bailey and Wray,2003)

High affinity agonists (<1 μ M)	Medium affinity agonists (low μ M)	Low affinity agonists (high μ M-mM)	Antagonists
8-HETE 8-HEPE LB4 LG100268a BM17.0744 GW7647 GW9578	15d-PGJ2 PGA1 12-HETE Wy14,643	NSAIDs Fibrates ETYA DHA LA AA	GW6471 MK886

三、生物轉換 (Biotransformation)

各種藥物及環境污染物質等外來毒物(xenobiotics)，被吸收進入人體後，雖有些以原型經腎臟排出體外，但多數在排出體外前會經過體內生物轉換(biotransformation)的代謝過程，改變其化學性質及生理效應。生物轉換作用對各種外來毒物的代謝作用並不相同，有些物質經生物轉換可降低其生理毒性，有些卻會提高毒性，有些藥物，經生物轉換後可能被活化(activation)或去活化(inactivation)，而某些藥物在經過去活化的過程中被解毒代謝而排出體外，但有些藥物卻可能在致活化的過程中使其毒性增加，對生物體造成更大的傷害，所以最後代謝的結果有可能決定藥物是可解毒或是引起毒性(Wormhoudt et al., 1999)。

一般而言生物轉換分為兩階段反應:第一階段反應 (phase I reaction) 及第二階段反應 (phase II reaction)。第一階段反應主要是將一些極性官能基加到受質(即 xenobiotics)上，此反應階段包括了氧化、還原、水解、氫化和去烷基等反應，使受質官能基轉變成具有極性，進而增加其親水性以利排出體外，cytochrome P450 (CYP 450) 酵素群主要參與第一階段反應中的氧化代謝，此氧化的基本反應是將一個氧原子嵌入受質中，因此CYP 450又稱為單氧化酵素 (monooxygenase)，與同樣鑲嵌於內質網上的NADPH cytochrome P450 reductase合稱為混合功能氧化酵素 (mixed-function oxidase)。除氧化反應外CYP 450也參與化學物質或天然物的環氧化 (epoxidation) 或還原 (reduction) 反應。第二階段反應是進一步的代謝第一階段反應之產物，此類反應是將特定內生性的小分子如glucuronic acid、 sulfate 和glutathione等水溶性小分子接合到經第一階段反應所產生的中間產物上，而這部份反應則由體內特定酵素如glutathione-S-transferases、UDPglucuronosyl transferase、acetyltransferases及methyltransferases負責。第二階段反應的功用包括改變受質的生理活性並將其轉換成比第一階段反應的代謝物更具親水性的產物，

使其更易溶於膽汁或尿液中，藉此幫助身體排除毒性物質，減少有毒物對生物體的傷害(van Iersel et al., 1999)。

生物轉換酵素系統中的酵素通常不是以單一種類形式存在，而是以複合基因家族 (multigene families) 或超基因家族 (supergene families) 的形式存在於生物體中，且各別的isoenzymes也可進行不同的催化作用，而它們的反應機轉和調節性質亦有不同，研究發現生物轉換系統的酵素通常對受質具有極大的選擇性(van Iersel et al., 1999)，但是也有學者認為此類酵素具有如此廣大的受質應稱之為對受質不具選擇性 (non-selectivity)，也就是僅認得受質中共通化學特性而非受質化學物本身，如此才足以應付種類繁多的外來毒物，這也是生物轉換系統酵素不同於其它酵素的特徵之一。

在流行病學研究報告指出生物轉換系統酵素具基因多態性 (genetic polymorphisms) 的特質，且此特性與癌症的發生率具相關性(Gonzalez, 1997; Raunio et al., 1995)。這些酵素的基因多態性也被認為是對於生物個體對genotoxic chemical誘發腫瘤形成的敏感性重要的決定因子，然而關於生物轉換系統酵素的基因多態性與癌症發生的敏感性之間的機轉尚需進一步研究。

(1) 細胞色素P450

肝臟為生物體內最主要的解毒器官，位於肝微粒體膜上有一群解毒酵素系統，CYP 450為其成員之一，是生物轉換酵素系統第一階段反應的重要酵素。CYP 450是由b型態血基質蛋白 (b-type heme proteins) 所組成的大家族 (super family) (Miles et al., 2000)，其基本結構包括含單一鐵原子的原紫質IX (protoporphin IX)，並以鐵原子和去輔基蛋白質 (apoprotein) 上半胱胺酸的硫原子 (cysteine-thiolate) 形成協同結構鍵結 (coordinate bond)，鑲嵌在細胞的平滑內質網上。當CYP 450呈還

原態並與一氧化碳結合後會在光譜450nm處有最大的吸收峰，基於此種光譜特性，因而命名為細胞色素P450。至目前為止此大家族已經發現至少一百五十多種異構物，有七十多種異構物的基因序列已被訂出，CYP 450各異構物之命名主要依胺基酸結構序列相似性來決定，若胺基酸序列小於40%的相似性，則屬不同家族 (family)，並以不同的阿拉伯數字如CYP1或CYP2來表示，同一家族的氨基酸序列相似性大於55%但小於77%的相似性，則再以英文字母細分為亞族 (subfamily) 如CYP2A 和CYP2B來表示，同一亞族則再以另一阿拉伯數字區分不同亞族家族CYP 酵素的各別基因 (individual gene) 如CYP1A1和CYP2A2(Miles et al., 2000; Szklarz and Halpert, 1998)。目前已知哺乳類動物有17種CYP450家族，並且發現細胞對諸多藥物代謝功能分別由不同的基因家族所執行。肝臟細胞主要表現CYP 1-4家族，其主要功能為代謝外來毒物 (xenobiotics) 如藥物、環境中的化學物質和內生性脂溶性物質。CYP4A主要代謝的基質為長鏈脂肪酸如arachidonic acid、prostaglandins A1和E2及Leukotriene B4等，而其mRNA表現主要是peroxisome proliferator和PPAR α 結合後促進其轉錄作用有關。其他13個CYP450基因家族主要與代謝內生性物質有關，如CYP5和8參與thromboxane和prostacyclin合成；CYP 11, 17, 19 和21是膽固醇及固醇類荷爾蒙 (steroid hormones) 合成作用中催化氫氧化作用 (hydroxylation) 需要的酵素；CYP 7, 24, 27 和51是膽酸合成、活化維生素D3過程中催化氫氧化作用所必需的酵素；CYP26則是催化視網酸 (retinoic acid) 合成步驟中氫氧化作用所需的酵素。目前也已知這些生物合成作用所需要的CYP酵素同樣也受到內生性荷爾蒙及其它因子所調節，並且在功能表現上具有組織特異性 (Waxman, 1999)。

參與外來物質代謝的CYP450多為可誘發型式，先前的研究發現有些物質會誘發或抑制CYP450活性表現，隨著基質不同，所進行的反應不同，且所誘發的異構酵素亦不同，目前主要將這些誘發型的CYP450區分為以下幾類：

1、phenobarbital (PB) - inducible 型式

phenobarbital具有安眠及鎮靜的作用，且可誘發肝臟中藥物代謝酵素（即CYP450）和引起肝臟腫大，在鼠類動物被認為是腫瘤的促進劑(Marc et al., 2000)。目前已知PB誘發CYP 2B的作用，必須透過活化基因的轉錄作用(Denison and Whitlock, 1995)。在小鼠PB-inducible Cyp 2b10基因中，PB-response element被確定在一個51 bp的序列中，將之稱為phenobarbital – responsive enhancer module (Honkakoski and Negishi, 1997)。利用基因轉殖鼠也證實PBREM是PB誘發CYP 2B基因所必需，所以顯示phenobarbital – responsive enhancer module是調節PB誘發作用的enhancer element (Ramsden et al., 1999)。除小鼠外在其他的研究亦發現phenobarbital – responsive enhancer module序列存在於大鼠及人類的CYP 2B基因 (Sueyoshi et al., 1999)。

在CYP家族中PB可高度誘發老鼠肝臟中CYP2B1的表現，Waxman等學者(1999)發現在in vivo實驗中，PB可增加CYP2B1蛋白質及mRNA的表現至50~100倍之多。而CYP家族的其他基因，PB對誘導其基因表現的能力則不及CYP2B1，PB只能誘發CYP 2C6和CYP3A5之蛋白質及mRNA表現2~4倍，相同的情形也出現在大鼠初代肝細胞的培養模式上，PB誘發CYP2B1 mRNA表現所需之劑量遠低於PB誘發程度相同的CYP3A1 mRNA所需之量。

2、Peroxisome proliferator - inducible 型式

過氧化體為細胞內參與解毒及脂肪酸代謝的重要場所，在哺乳類的肝臟中，過氧化小體增生所引起的反應包括誘導微粒體內lauric acid ω -hydroxylase的活性以及增加過氧化小體中脂肪酸的 β -氧化作用，而這些反應需藉由CYP4A1的催化。在大鼠及兔子中發現，一些促進過氧化體增生的物質，包括有降血脂藥物（如clofibrate）和環境污染物（如trichloroacetic acid）等，會誘發CYP 4A之酵素表現，另一方面也可增加 β -氧化作用中Acyl CoA oxidase、enoyl-CoA hydratase及

3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase等酵素的基因轉錄作用。

目前已知當過氧化體增生劑與PPAR α 結合後會和RXR形成heterodimer共同辨識CYP 4A基因上PPRE位置，藉此刺激CYP 4A基因的轉錄作用。在大鼠肝臟中，clofibrate可以在短期內增加CYP 4A1及4A6 mRNA表現，另外在in vivo中也發現當PPAR α 存在時，若投與Wy14,643會增加CYP 4A6 mRNA之表現(Johnson et al., 1996a)。

3、多環狀芳香族碳氫化合物- inducible型式

多環狀芳香族碳氫化合物，例如環境中的致癌物質3-methylcholanthrene和benzo(α)pyrene可誘發CYP1A的酵素活性；CYP1A主要包括了CYP1A1與CYP1A2兩個成員，當這一類的酵素被多環狀芳香族碳氫化合物誘導出後，可再負責多環狀芳香族碳氫化合物代謝反應。除了多環狀芳香族碳氫化合物外，一些鹵素族的芳香碳氫化合物(halogenated aromatic hydrocarbon) 包括了多氯聯苯及戴奧辛等環境有毒物質，亦會誘發CYP1A的表現。

4、Ethanol - inducible型式

酒精在體內的代謝除了可藉由alcohol dehydrogenase系統外，亦可藉由微粒體中酒精氧化酵素系統(microsomal ethanol oxidizing system)執行之，在microsomal ethanol oxidizing system系統中，以CYP2E1為主要的酵素之一。CYP2E1的活性可由酒精或丙酮等小分子所誘發，長期禁食或是糖尿病控制不佳時，亦可能使CYP2E1之活性增加。CYP2E1可催化一些小分子的有毒物質活化而產生較具活性的中間產物，例如亞硝酸類的化合物，會促進癌症的發生，所以在飲食中若可抑制CYP2E1之酵素活性，則可能在抑制癌症的過程中扮演一重要角色。

CYP 的誘發作用 (induction) 包括提高CYP轉錄速率增加mRNA的產生，調節轉譯速率增加蛋白質的合成，另外有些則是透過轉譯後調控 (post-translational regulation) 增加CYP酵素的穩定性。CYP 的誘發作用，可視為生物體的一種調適

反應 (adaptive response) ，藉由增加酵素的去毒活性 (detoxification activity) 來保護細胞不受外來物質的侵害。

表二、CYP induction mediated by nuclear receptor (Waxman, 1999)

P450 inducing agents	Prototypic responsive rat liver CYPs	Receptor
Polycyclic aromatic hydrocarbons	1A1, 1A2, 1B1	Ah receptor ^a
Phenobarbital	2B1, 2B2	CAR
Dexamethasone	3A1, 3A2, 3A23	PXR
Fibrate drugs	4A1, 4A2, 4A3	PPAR α
Cholesterol	7A1	LXR α
Bile acids ^b	7A1	FXR
Thyroid hormone	P450 reductase	TR

^a PAS transcription family member, not a nuclear receptor.

^b Inhibitors of CYP7A1 transcription.

研究目的

本實驗主要藉由評估魚油對 DEN/PB 誘發肝腫瘤生成模式下及魚油中富含之 n-3 脂肪酸 EPA 和 DHA 在初代肝細胞對 PPAR α response 基因表現之功效，以探討魚油抑制肝前癌細胞生成與 PPAR 途徑間之相關性。

材 料 與 方 法

一、 實驗材料

(1) 實驗動物

雄性 Sprague-Dawley 大白鼠，由國家科學委員會實驗動物繁殖及研究中心購進。

(2) 化學試劑

A. 細胞培養用藥

1. 購自 Sigma Chemical Company :

Collagen VII、collagenase IV、Dexamethasone、EGTA、HEPES
(N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])、EBSS (Earle's balanced salt solution)、sodium bicarbonate、EGTA (Ethylene glycol – Bis[β -aminoether] N,N,N',N'-tetraacetic acid)、CaCl₂·2H₂O (Calcium chloride)、Magnesium chloride (MgCl₂·6H₂O)、 α -tocopheryl succinate、BHT、Dimethyl sulfoxide (DMSO)。

2. 購自 Gibco Laboratory :

Penicillin/Streptomycin、Trypsin blue stain、RPMI Medium 1640。

3. 購自 eBioscience :

ITS、Matrigel。

4. 購自 Pharmacia Biotech :

Percoll。

5. 購自 Nu Chek Prep:

docosahexaenoic acid (22:6, n-3)、eicosapentaenoic acid (22:5, n-3)、arachidonic acid (20:4, n-3)、linoleic acid (18:2, n-6)、conjugated linoleic acid (18:2, n-6)。

6. 購自 Biomol :

clofibrate, Wy14,643 (4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio acetic acid)。

7. 購自 Calbiochem :

bovine serum albumin。

B. 西方點墨法 (Western blotting) :

1.購自 Sigma Chemical Company :

β -Mercaptoethanol、Potassium chloride、Sodium dodecyl sulfate (SDS)、Trizma Base (Tris)、DAB (3,3-diaminobenzidine)。

2.購自 BioRad Laboratory :

30% Acrylamide/0.8% N,Nmethylene-bis-acrylamide 溶液、Bromophenol blue、Glycine。

3.購自 Pharmacia Biotech :

Ammonium persulfate、N,N,N',N'-Tetramethylethylene-diamine。

4.購自 Chemicon :

Goat anti-rabbit IgG peroxidase-conjugated antibody。

5.購自 Fisher Scientific Company :

Isobutanol。

6. 購自 Millipore :

Polyvinylidene difluoride membrane。

7. 購自 Merck Chemical Company :

Methanol、Sodium chloride、H₂O₂。

8. 購自 Biotrin :

mouse anti-human GST- π polyclonal Antibody。

9 購自 Chemicon International Inc.:

goat anti-rat CYP 4A1 polyclonal Antibody、goat anti-rat CYP 2B1 polyclonal Antibody。

10. 購自 Pierce:

Coomassie plus protein assay reagent kit。

C.北方墨點法 (Northern blot)、RT-PCR:

1.購自 Sigma Chemical Company :

MOPS、Sodium acetate。

2.購自 Molecular research center,Inc.:

Tri Reagent ◦

3.購自 Merck Chemical Company :

Formamide、37% Formaldehyde、Sodium chloride、Sodium dodecyl sulfate ◦

4.購自 Amersham International Company :

[α -³²P]dCTP ◦

5.購自 Amersham pharmacia biotech :

硝化纖維膜(HybondTM-N+) ◦

6.購自 Promega:

MgCl₂、oligo (dT)、recombinant RNasin ribonuclease inhibitor、reverse transcriptase、dATP、dCTP、dGTP、dTTP、Taq DNA polymerase ◦

D. 肝臟磷脂質及肝細胞脂肪酸成分分析

1.購自 Tedia company Inc.:

CHCl₃ (Chloroform) ◦

2.購自 Merck Chemical Company:

methanol、TLC aluminum sheets、HexaneDiethyl ether、formic acid

3.購自 Fischer

benzene ◦

4.購自 Janssen Chemical:

acetyl chloride ◦

5.和光純藥工業株式會社:

K₂CO₃ ◦

二、 實驗方法

(1) 動物飼養

於出生 4 週 Sprague-Dawley 雄性大白鼠腹腔注射 diethylnitrosamine (DEN, 15 mg/kg BW), 且在飲食中添加 phenobarbital (0.05%) 及不同處理, 共可分成七大組: 餵食高玉米油 (23.5%)、高玉米油 (23.5%) 及 clofibrate (0.1% 或 0.5%)、低玉米油 (5%)、低玉米油 (5%) 及 clofibrate (0.1% 或 0.5%) 或高魚油 (23% 魚油及 0.5% 玉米油) 【表一】。飼料與水以任食方式給予, 大鼠每週秤重一次, 動物房溫度控制在 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, 黃光照時間 (light cycle) 8:00-20:00。飼養兩個禮拜及兩個月後, 以吸入過多 CO_2 方式犧牲大鼠, 剪開腹腔取肝臟, 以液態氮急速冷凍後, 置於零下 80°C 冷凍櫃中, 待日後進行其他項目分析。

(2) 細胞質/微粒體製備

取 0.3g 肝臟至均質管中, 加入 1.2ml 0.01M phosphate buffer (1L 含 1.068g K_2HPO_4 、0.52g KH_2PO_4 、11.5g KCL, pH7.4), 均質後, 離心 30 分鐘 (10,000 g), 吸取上層液進行超高速離心 (105000 g) 1 小時, 上清液為細胞質, 而附著於管壁的顆粒為微粒體, 加入 1ml 微粒體懸浮容液 (1L 含 6.23g K_2HPO_4 、1.94g KH_2PO_4 、0.37g EDTA, pH7.7) 震盪均勻。細胞質及微粒體分別置於零下 80°C 冷凍櫃中, 待日後進行其他項目分析。

(3) 蛋白質濃度測定

蛋白質定量是依據 Lowry 等人(1951)發表的方法, 原理是利用鹼處理使蛋白質水解成胺基酸, 胺基酸上的羧基 ($-\text{COOH}$) 可與 Cu^{2+} 作用, 再利用 Folin reagent 使之呈色, 最後以分光光譜儀於波長 660nm 下測吸光值。實驗步驟簡述如下: 取適量

蛋白質均質液於 1.5ml 微量離心管中，加入等量 10% trichloroacetic acid，靜置 30 分鐘使蛋白質沈澱，於 4°C 下以 10000 g 離心 10 分鐘，倒除上清液，加入 1N NaOH，混合均勻，靜置 30 分鐘使蛋白質完全水解。取 100 μ l 蛋白質水解液及不同濃度標準品 (Bovine serum albumin) 置於 1.5 ml 微量離心管中，依序加入 200 μ l 二次水及 100 μ l 反應液(25% Na₂CO₃ : 2% Na-K-tartrate: 1% CuSO₄ = 8:1:1,v/v/v)，混合均勻，室溫下靜置 10 分鐘，使游離氨基酸上的羧基與 Cu²⁺作用，最後加入 1 ml Folin reagent (phenol reagent: ddH₂O = 1:19.5)，混合均勻，37°C 水浴 20 分鐘呈色，取出置於室溫下冷卻 10 分鐘，以分光光譜儀中波長 660 nm 測定吸光值，並以標準曲線計算樣品之蛋白質濃度。

(4) 西方點墨法 (Western blotting)

本研究利用西方點墨法 (Western blotting) 測量肝臟組織或肝細胞中蛋白質表現，將不同蛋白質樣品 (細胞質: PGST, 微粒體: CYP 4A1、CYP 2B1) 分別注入 Acylamide gels 樣品凹形槽中 CYP 2B1(53 kDa)、CYP 4A1 (約 52~53 kDa) 與 PGST (23 kDa)分別利用 7.5% 及 10% SDS-polyacrylamide gels 于 160 伏特電壓下進行電泳。電泳完成後，以 PVDF 轉印膜進行轉印。依序將海綿、濾紙、膠片、PVDF 轉印膜、濾紙、海綿固定於三明治式塑膠板中將氣泡趕出後夾緊，隨即放入轉印槽，以 100 伏特電壓於冰浴下進行一小時轉印。完成轉印之 PVDF 轉印膜，以 buffer A (25 mM Tris-HCl, 含 150 mM NaCl, 0.3% Tween-20, pH 7.4)沖洗 3 次，每次 5 分鐘，隨後放置於以 buffer B (25 mM Tris-HCl / 150 mM NaCl, pH 7.4)配製成的 blocking solution (5%脫脂奶粉)中，4°C 隔夜或室溫 1 小時。

將 PVDF 轉印膜由 blocking solution 中取出，以 buffer A 沖洗 4 次，每次 5 分

鐘，接著浸泡於含抗 CYP 4A1 (goat anti rat)、CYP2B1 (goat anti rat) 或 PGST (mouse anti human) 一級抗體的 buffer B 中，室溫反應一小時，接著將 PVDF 轉印膜取出，抗體回收，再以 buffer A 沖洗 4 次，每次五分鐘。接著置於含二級抗體 (CYP 4A1、CYP 2B1 : HRP-conjugated rabbit anti-goat IgG，PGST : HRP-conjugated goat anti-mouse IgG) 的 buffer B 中，室溫反應一小時，取出二級抗體溶液回收，PVDF 轉印膜以 buffer A 沖洗 4 次。最後加入 DAB 呈色液(10 ml buffer B 中加入 4 μ l 30% H_2O_2 及 40 μ l 25 mg/ml 3,3'-diaminobenzidine) 使之呈色，5 分鐘後倒出呈色液，PVDF 轉印膜以 buffer A 沖洗 5 分鐘，取出陰乾即可。

(5) RNA 純化及定量

均質肝臟組織及肝細胞與 1ml Tri-reagent 混合後，室溫靜置 5 分鐘，加入 200 μ l chloroform，vortex 15 秒，室溫靜置 10 分鐘，接著於 4 $^{\circ}$ C 下以 11,000 g 離心 15 分鐘，取最上層的透明液至另一滅菌的 1.5 ml 離心管中，加入 500 μ l 2-isopropanol，混合，靜置 10 分鐘使 RNA 沈澱，於 4 $^{\circ}$ C 下以 1,0000 g 離心 15 分鐘，小心倒掉上清液後所留下白色沈澱物即為 RNA，加入 1 ml 75% cold ethanol (-20 $^{\circ}$ C) 洗去殘餘的鹽類，於 4 $^{\circ}$ C 下以 9,500g 離心 5 分鐘，小心倒掉上清液，再加入 1 ml 70% cold ethanol，於 4 $^{\circ}$ C 下以 15,000 g 離心 15 分鐘，小心倒掉酒精溶液，白色沈澱物為 RNA，將其置於室溫下陰乾，加入 50 μ l 滅菌的二次水(二次水使用量依 RNA 沈澱量多寡而定)將 RNA 溶解，取出 4 μ l RNA 溶液，加入 996 μ l 無菌二次水，均勻混合後，利用分光光譜儀於 260 nm 波長下測吸光值。

Total RNA 濃度之計算公式：

$$\text{RNA (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = \text{吸光值(OD 260)} \times 10$$

(6) 北方墨點法 (Northern blot)

每個樣品均取出等量 RNA (20 μ g)，加入無菌二次水 180 μ l，再依次加入 20 μ l 3M sodium acetate 及 500 μ l 100% iced cold ethanol，置於-20 $^{\circ}$ C 冷凍櫃隔夜或置於-80 $^{\circ}$ C 冷凍櫃 1 小時，使 RNA 沈澱。

取 3.3g agarose 加入 242 ml 二次水，置於微波爐加熱至沸騰使 agarose 完全溶解，冷卻至手可碰觸的溫度後，隨即加入 33 ml 10x MOPS buffer 及 55 ml 37% formaldehyde，混合均勻後倒入水平的製膠槽中，將液面的氣泡清除，凝膠後使用。將定量好的 RNA 樣品，於 4 $^{\circ}$ C 下以 11,000 g 離心 15 分鐘，倒掉上清液，室溫下陰乾，接著加入 20 μ l sample solution，混合均勻，置於 65 $^{\circ}$ C 乾熱槽中，加熱 5 分鐘後，置於冰上冷卻，離心後加入 4 μ l loading buffer (0.25 % bromophenol blue / 0.25 % xylene cyanol / 30% glycerol)。將凝固的膠體置於電泳槽內，倒入 1x MOPS buffer 【表二】，並將 RNA 樣品注入凹槽內，先以 75 伏特電壓將凹槽中 RNA 轉移入膠體後，再將電壓降至 25 伏特，進行約 15~16 小時電泳。

電泳完成後，將膠體置放於紫外線燈下裁除多餘的膠體，並拍攝 RNA 電泳圖，方便日後進行定量比對 (18s、28s)，再將膠體置於 2x SSC buffer 中浸泡 10 分鐘，剪取 1 張與膠體相同大小之硝化纖維膜(HybondTM-N+)及 2 張 3M 濾紙，以 2x SSC buffer 浸泡後，依序將膠體、硝化纖維膜及濾紙放置鹽橋上，內含 20x SSC buffer (20x SSC buffer : NaCl 3M, Na₂CO₃ 0.65M, pH 7.0)，利用玻璃棒除去各層間的氣泡，使膠體與硝化纖維膜及濾紙緊密貼合，最後放上一疊吸水紙巾並以重物重壓，四周以保鮮膜封住，以避免 20x SSC buffer 因風乾而產生結晶，室溫下進行 24~48 小時的轉印。轉印完成後取出硝化纖維膜，於 2x SSC buffer 中浸濕 (避免膜上殘留的 20x SSC buffer 產生結晶)，放置於紙巾上風乾，將正面朝下於紫外燈上進行 5~10 分鐘的 cross-link，使 RNA 與轉移膜緊密結合。

將轉移膜以 2x SSC buffer 浸濕後，放進封口袋(polyester barrier film)中，加入 10 ml 預雜交溶液【prehybridization solution，表三】，將氣泡趕出塑膠袋後封口，置於 42 $^{\circ}$ C 水浴中進行預雜交 1 小時。

在預雜交反應進行的同時，可同步製備雜交反應(hybridization)使用的探針(probe)，方法如下：取 2 μ l 2B1 的 cDNA template 及 31 μ l 二次水混合均勻，95 $^{\circ}$ C 下加熱 5 分鐘(denaturation)後，立即冰浴 5 分鐘，依序加入 5 μ l 10x labeling buffer、6 μ l dNTP mixture (各 2 μ l dATP、dTTP 及 dGTP)、5 μ l α -³²P-dCTP (3,000 ci/mmol，50 μ Ci)，混合均勻，於 37 $^{\circ}$ C 下水浴 1 小時，之後加入 200 μ l TE buffer (0.4 M Tris-HCl / 0.1 M EDTA, pH 7.4)，注入以 Sephadex[®] G25 填充的管柱中，400 g 離心 1 分鐘，收集過濾液，將過濾液置於 95 $^{\circ}$ C 下加熱 5 分鐘，再立即冰浴 5 分鐘，之後將含 ³²P-標定的探針過濾液加入已完成預雜交反應的封口袋中，趕出氣泡，封口，再將封口袋放入 42 $^{\circ}$ C 水浴槽中進行 16~24 小時的雜交反應。

取出封口袋中的轉移膜，以 2x SSC / 0.05% SDS 溶液清洗 3~4 次，每次 5~10 分鐘；再於 52 $^{\circ}$ C 水浴下以 0.1x SSC / 0.1% SDS 溶液清洗 2~3 次，每次 5~10 分鐘，以蓋格計數器追蹤檢測，直到膜上非專一性結合之放射性同位素清洗乾淨為止。利用保鮮膜將轉移膜固定於感光夾中，於暗房中置入 X 光片，再將感光夾置於 -80 $^{\circ}$ C 冷凍櫃中進行壓片，時間長短則視放射線強弱決定。

從 -80 $^{\circ}$ C 冰箱內取出感光夾，於室溫下退冰，到暗房將感光夾中的底片取出，經顯影劑 1 分鐘反應後水洗，再置入定影劑反應處理後水洗，即會顯示出影像，晾乾保存。再次使用此張轉印膜時，需先將膜上的 ³²P 標定探針移除，將轉印膜置於煮沸的 0.1% SDS 溶液中浸泡，等到自然降溫後，拿出膜片，用蓋格計數器檢測，確定洗淨後，放在紙巾上晾乾，即可再次進行預雜交及雜交反應。

(7) 肝臟磷脂質及肝細胞脂肪酸成分分析

肝臟及肝細胞樣品製備 — 取肝臟 0.2 ~ 0.3 克加入 2ml 萃取液【CHCl₃:methanol(2:1, v/v)】，置於均質管中加以均質，以濾紙過濾於微量離心管中，用氮氣吹乾，隨後加入 50 μ l CHCl₃ 充分混勻，將脂質萃取液點在 TLC aluminum sheets (TLC aluminum sheets 上覆蓋 0.2mm silica gel 60) 上，置入展開槽中 (展開液為 Hexane:Diethyl ether:formic acid=20:5:1, v/v/v)。當展開液移動至 TLC aluminum sheets 頂端約 1 cm 時，取出風乾。在 TLC aluminum sheets 上噴上呈色劑 (2'-7'-dichlorofluorescein, 0.1% , w/v , in methanol)，在紫外燈照射下會顯現出磷脂質的位置，利用藥杓將其刮下，收集至玻璃試管中。

將肝臟磷脂質或細胞均質液 (3 百萬肝細胞以 1ml PBS 刮下) 加入 2ml methanol:benzene (4:1) 均勻混合，隨後震盪並緩慢的沿管壁加入 200 μ l acetyl chloride, 90 $^{\circ}$ C 乾熱 1 小時以進行甲基化反應。冷卻 10 分鐘後，加入 5 ml 6% K₂CO₃，以 1100g 離心 10 分鐘，取上層液於微量離心管中，用氮氣吹乾，加入 100~150 μ l Hexane 溶解脂肪酸，利用 Gas Chromatography G3000 (Hitachi, Tokyo, Japan) 測脂肪中各脂肪酸比例。

Gas Chromatography 是以氫氣為攜帶氣體 (carrier gas)，利用 Gas Chromatography column — SP-2330 fused silica capillary column (30m \times 0.25mmID, 0.2 μ m film thickness, Supelco Bellefonte, PA)。設定的起始管柱溫度為 150 $^{\circ}$ C 持續八分鐘，之後每秒上升 3 $^{\circ}$ C 直至 190 $^{\circ}$ C 後持續 43 分鐘。注射器及偵測器皆為 220 $^{\circ}$ C。樣品的滯留時間與脂肪酸標準品作比較，以出現的波峰面積計算脂肪酸含量，每種脂肪酸百分比依佔總面積的比來計算。

(8) 初代肝細胞分離及培養 (Hepatocyte isolation and culture)

以腹腔注射 pentobarbital (80 mg/kg body weight) 方式麻醉老鼠，剪開腹腔，將頭皮針插入肝門靜脈，利用二階段灌流液方式灌洗肝臟。第一階段灌流，以不含膠原蛋白酶之灌流液(含 EBSS、EGTA 0.75mM、penicillin/streptomycin 1ml/100ml，pH 7.38)，在 25 ml/min 流速控制下，進行 5 分鐘的灌流，將肝臟中的血液完全洗出。在 200 ml 灌流液(含 EBSS、HEPES 10 mM、CaCl₂·2H₂O 1.8mM、MgCl₂·6H₂O 0.8Mm、penicillin/streptomycin 1ml/100ml、pH 7.38) 中加入 50 mg 膠原蛋白酶(collagenase type 1)，為第二階段灌流液以 20 ml/min 流速灌洗 10 分鐘消化肝臟中的結締組織，肝臟會變軟且失去彈性，細胞間隔放大，外觀顏色上逐漸變淡，以含 ITS (內含 insulin、transferrin 及 selenium) 的 RPMI 培養液在 200 μm nylon gauze 將肝細胞洗出。以低速離心 (150g) 2 分鐘將肝細胞分離，再將肝細胞混合於 washing solution 經低速離心兩次 (150g，2 分鐘) 完成細胞清洗動作。為了更有效的將健康的肝實質細胞 (hepatic parenchymal cells) 與非肝實質細胞分開，將細胞懸浮液加入等量 Percoll 溶液(10x Hanks buffer : Percoll = 1: 9)【表四】，利用等密度梯度離心(250 g，10 分鐘)，所得肝實質細胞最後再以二次低速離心(150 g，3 分鐘)洗去殘餘的 percoll 溶液。將細胞懸浮於 RPMI 為基礎的培養液中以每一毫升含 0.6 百萬個細胞之細胞懸浮液密度，將 5 毫升細胞懸浮液注入直徑 6 公分已預先經膠原蛋白 (collagen, type VII) 處理的培養皿中。隨後置於 37°C 含 5% CO₂ 的培養箱中，經細胞著床約 4 小時後，更換培養液(2.5 毫升)，再經一小時後，加入 matrigel(116.5μl)，3 小時之後再補上培養液(2.5 毫升)，經 16-18 小時培養後依實驗作不同的處理。

細胞處理

細胞分別添加 150 mM DHA (22:6, n-3)、EPA (22:5, n-3)、AA (20:4, n-3)、

LA (18:2, n-6)、CLA (18:2, n-6), Wy14,643, 另外添加 α -tocopheryl succinate 20 μ M, BHT 0.1% 及 bovine serum albumin 25mM (與脂肪酸為 1:6 複合), 經 24 小時培養後收取細胞, 進行各項目分析。

(9) Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

取 2 μ l RNA (0.05 μ g/ μ l)及 2 μ l target gene internal standard 加上 cDNA Mix 16 μ l (ddH₂O、MgCl₂、10X PCR buffer、oligo(dT)、recombinant RNasin ribonuclease inhibitor、reverse transcriptase、dATP、dCTP、dGTP、dTTP) 置於 PCR 儀器進行 reverse transcription 反應。再將 PCR Mix (ddH₂O、MgCl₂、10X PCR buffer、target gene primer 【表五】、Taq DNA polymerase), 加入各試管中進行 25-32 循環的 PCR 反應。將所得之 RT-PCR 產物利用 2% agarose gel 於 1 倍 TBE buffer 中進行電泳, 再以 ONE - Dscan 軟體完成定量分析。

(10) 統計分析

以 ANOVA 進行統計分析, Dunne He's 或 Scheffe's Test 檢驗各組間差異性, 若當 $P < 0.05$ 代表有統計上顯著差異。

【表一】

飼料組成

成分/組別 (%)	高魚油	高玉米油	高玉米油 Clofibrate 0.1%	高玉米油 Clofibrate 0.5%	低玉米油	低玉米油 Clofibrate 0.1%	低玉米油 Clofibrate 0.5%
Casein purified high nitrogen	23.5	23.5	23.5	23.5	20	20	20
Dextrose	8.3	8.3	8.3	8.3	13	13	13
Cornstarch	33	33	33	33	52	52	52
Cellulose	6	6	6	6	5	5	5
DL-Methionine	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
Choline Bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
AIN-76 Mineral mix	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
AIN-76 Vitamin mix	1.18	1.18	1.18	1.18	1	1	1
Corn oil	3.5	23.5	23.5	23.5	5	5	5
Fish oil	20						
Clofibrate			0.1	0.5		0.1	0.5
PB	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

【表二】緩衝液配製

10x MOPS buffer (pH 7.0):	0.2M	MOPS
	0.05M	sodium acetate
	0.013M	EDTA
Sample solution:	formamide	250 μ l
	37% formaldehyde	83.5 μ l
	10X MOPS buffer	50 μ l
	無菌二次水	111.5 μ l
	EtBr	5 μ l
	Total	500 μ l

【表三】

<u>20x SSPE (pH 7.4):</u>	3M	NaCl
	0.2M	NaH ₂ PO ₄
	0.025M	EDTA (Na ²⁺)
<u>prehybridization solution:</u>	20x SSPE	2.5 ml
	100% formamide	5 ml
	50x Denhard's	2 ml
	ssDNA (10 mg/ml)	100 μ l
	20% SDS	1 ml
	Total	10 ml

【表四】**10x Hanks buffer (pH 7.4)的配法：**

	g/L
NaCl	80.0
KCl	4.0
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	0.9
KH ₂ PO ₄	0.6
MgSO ₄	0.49
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0
MgCl ₄ · 6H ₂ O	1.0
Phenol Red	0.1
Glucose	10.0
NaHCO ₃ (add last)	3.5

配製後，需過濾，並於 4°C 下保存。

【表五】

Name	forward primer	reverse primer
ACO	5'-CTGCCAACACCAACACTGACC-3'	5'-GACGGGCGCATCCATTTC-3'
CYA4A1	5'-CAGGCCATTGGGAACCTTGA-3'	5'-GGTCCAGGTGATCCCAGGTAA-3'
CYP 2B1	5'-GGATGGGAAAGAGGAGTGTGGA-3'	5'-CTGGAGGATGGTGGTGAAGAAG-3'
L-FABP	5'-GAGATGGGTCTGCCTGAG-3'	5'-CACGCACTTATGCCTTTGAA-3'
GST-P	5'-CGCCTGCAATCGTGGTAGTT-3'	5'-AAGCTTTGCCTCCCTGGTTCT-3'

結果

一、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及 DEN/PB 處理對大鼠肝臟 ACO mRNA 表現的影響 (n = 2~6)

結果顯示 (圖一), 實驗飲食中無添加 DEN/PB 時, 餵食高玉米油實驗飲食 6 個月之大鼠肝臟 ACO mRNA 表現顯著高於高魚油及高玉米油及 clofibrate 0.1% 之實驗飲食組, 當實驗飲食中單獨添加 DEN 時, 發現高魚油組之大鼠肝臟 ACO mRNA 表現顯著高於高玉米油和高玉米油及 clofibrate 0.1% 之實驗飲食組, 而實驗飲食中同時添加 DEN/PB 時, 各處理組大鼠肝臟 ACO mRNA 表現無顯著差異。

二、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及 DEN/PB 處理對大鼠肝臟 L-FABP mRNA 表現的影響 (n = 2~6)

結果顯示 (圖二), 實驗飲食中無添加 DEN/PB 時, 餵食高魚油實驗飲食 6 個月之大鼠肝臟中 L-FABP mRNA 表現顯著高於高玉米油及 clofibrate 0.1% 組, 當實驗飲食單獨添加 DEN 或同時添加 DEN/PB 時, 各處理組大鼠肝臟 L-FABP mRNA 表現無顯著差異。

三、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及 DEN/PB 處理對大鼠肝臟 CYP 4A1 mRNA 表現的影響 (n = 2~6)

結果顯示 (圖三), 實驗飲食中無添加 DEN/PB 時, 餵食高魚油實驗飲食 6

個月之大鼠肝臟 CYP 4A1 mRNA 表現顯著高於高玉米油和高玉米油及 clofibrate 0.1%之實驗飲食組，當實驗飲食中單獨添加 DEN 或同時添加 DEN/PB 時，高魚油組大鼠肝臟 CYP 4A1 mRNA 表現顯著高於高玉米油組。

四、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及 DEN/PB 處理對大鼠肝臟 CYP 2B1 mRNA 表現的影響 (n = 5~8)

結果顯示 (圖四)，餵食 6 個月實驗飲食之高魚油組、高玉米油組和高玉米油加 clofibrate (0.1%) 組的大鼠肝臟中發現 CYP 2B1 mRNA 表現無顯著差異。

五、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及 DEN/PB 處理對大鼠肝臟磷脂質脂肪酸組成的影響 (n = 2~3)

結果顯示 (表一及表二)，相較於其他處理組，餵食實驗飲食之高魚油組大鼠肝臟 EPA (2 週 9.18% ; 6 週 9.68%) 及 DHA (2 週 16.7% ; 6 週 6.31%) 組成和 n-3/n-6 的比值均高於其他處理組，而無論在餵食高或低玉米油和高或低玉米油及 clofibrate(0.1%或 0.5%) 實驗飲食 2 或 6 週，大鼠肝臟磷脂質組成相較於魚油組，有較高的 AA 含量，且除餵食實驗飲食之低玉米油組 (2 週) 和高玉米油及 clofibrate (0.1%) (2 週和 6 週) 大鼠肝臟 LA 含量略低於高魚油組外，其他組別均高於高魚油組，由此可知大鼠肝臟中磷脂質脂肪酸組成會反應飲食中脂質脂肪酸的組成。

六、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及 DEN/PB 處理對大鼠肝臟 ACO

mRNA 表現的影響 (n = 2~3)

結果顯示 (圖五), 餵食高玉米油及 clofibrate(0.5%) 實驗飲食 2 週之大鼠肝臟 ACO mRNA 表現顯著高於高魚油組, 餵食實驗飲食 6 週後發現高魚油組大鼠肝臟 ACO mRNA 表現顯著高於高玉米油組。

七、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及 DEN/PB 處理對大鼠肝臟 L-FABP

mRNA 表現的影響 (n = 2~3)

結果顯示 (圖六), 餵食低玉米油及 clofibrate (0.5%) 實驗飲食 2 週之大鼠肝臟 L-FABP mRNA 表現顯著高於高魚油組、高或低玉米油組、高玉米油及 clofibrate (0.1%) 組和低玉米油及 clofibrate (0.1%) 組, 餵食實驗飲食 6 週後發現高玉米油及 clofibrate (0.5%) 組, 大鼠肝臟 L-FABP mRNA 表現顯著高於低玉米油組、高玉米油及 clofibrate(0.1%) 組和低玉米油及 clofibrate (0.1% 或 0.5%) 組。

八、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及 DEN/PB 處理對大鼠肝臟 CYP 4A1

mRNA 表現的影響 (n = 2~3)

結果顯示 (圖七), 餵食低玉米油及 clofibrate(0.5%) 實驗飲食 2 週之大鼠肝臟 CYP 4A1 mRNA 表現顯著高於高或低玉米油組和低玉米油及 clofibrate(0.1%) 組, 餵食實驗飲食 6 週後發現大鼠肝臟 CYP 4A1 mRNA 表現無顯著差異。

九、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及 DEN/PB 處理對大鼠肝臟 CYP 4A1

蛋白質表現的影響 (n = 2~3)

結果顯示 (圖八、九), 餵食實驗飲食 2 週或 6 週之大鼠肝臟中 CYP 4A1 蛋白質表現無顯著差異。

十、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及 DEN/PB 處理對大鼠肝臟 CYP 2B1

mRNA 表現的影響 (n = 2~3)

結果顯示 (圖十、十一), 餵食實驗飲食 2 週之大鼠肝臟 CYP 2B1 mRNA 表現無顯著差異, 餵食實驗飲食 6 週後發現高魚油組大鼠肝臟 CYP 2B1 mRNA 表現顯著高於高或低玉米油組和低玉米油及 clofibrate (0.1% 和 0.5%) 組。

十一、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及 DEN/PB 處理對大鼠肝臟 CYP

2B1 蛋白質表現的影響 (n = 2~3)

結果顯示 (圖十二、十三), 發現餵食高魚油實驗飲食 2 週之大鼠肝臟 CYP 2B1 蛋白質表現顯著高於高或低玉米油組和低玉米油及 clofibrate (0.1% 或 0.5%) 組, 餵食高魚油實驗飲食 6 週之大鼠肝臟 CYP 2B1 蛋白質表現顯著高於高或低玉米油組。

十二、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及 DEN/PB 處理對大鼠肝臟 PGST

蛋白質表現的影響 (n = 2~3)

結果顯示 (圖十四、十五)，餵食實驗飲食 2 週或 6 週之大鼠肝臟中 PGST 蛋白質表現無顯著差異。

十三、n-6、n-3 脂肪酸添加對大鼠初代肝細胞脂肪酸組成的影響 (n = 3)

結果顯示 (表三)，wy14,643 和 clofibrate 的添加不會影響細胞內脂肪酸的組成。相較於其他處理組，唯培養液中添加 EPA、DHA 或 CLA 的處理組，其細胞內才含有 EPA (8.5%)、DHA (12.3%) 或 CLA (4.6%) 等脂肪酸的存在。培養液中添加 LA 的處理組，在其細胞內的 LA 組成百分比高於其他組別 (23%)；在培養液中添加 AA 的處理組，則細胞中 AA 組成百分比高於其他組別 (40.7%)。

十四、n-6、n-3 脂肪酸添加對大鼠初代肝細胞 ACO mRNA 表現的影響 (n = 2)

結果顯示 (圖十六)，wy14,643 和 clofibrate 誘發大鼠肝臟初代肝細胞 ACO mRNA 表現顯著高於 control 組、CLA、n-3 脂肪酸 (EPA 和 DHA) 及 n-6 脂肪酸 (LA 和 AA)。

十五、n-6、n-3 脂肪酸添加對大鼠初代肝細胞 L-FABP mRNA 表現的影響 (n = 2)

結果顯示 (圖十七), n-3 脂肪酸或 n-6 脂肪酸的添加, 對於誘發大鼠肝臟初代肝細胞 L-FABP mRNA 表現無顯著差異。

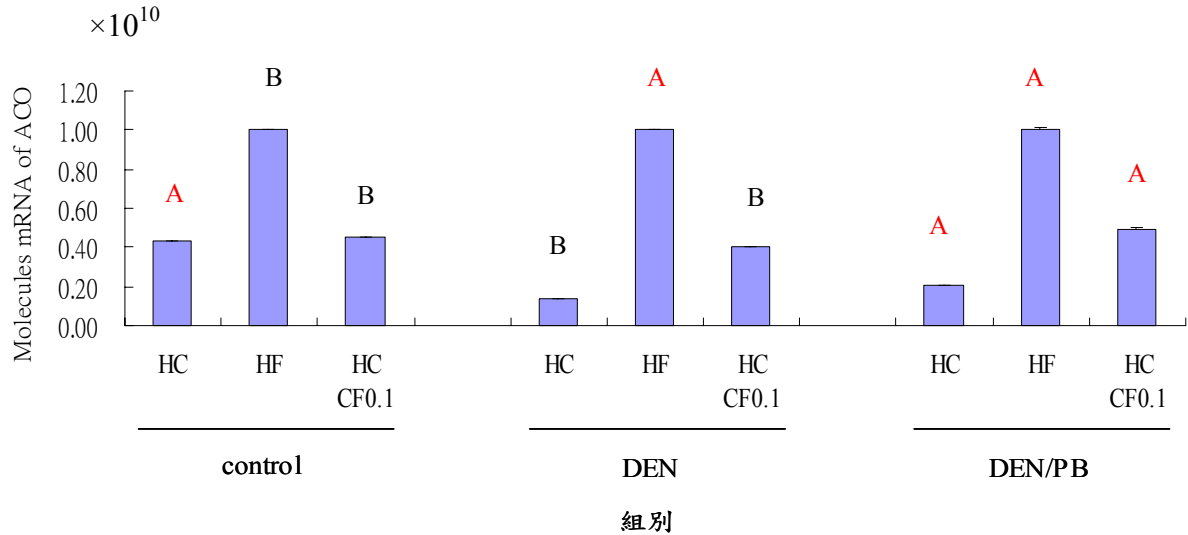
十六、n-6、n-3 脂肪酸添加對大鼠初代肝細胞 CYP 4A1 蛋白質表現的影響 (n = 2)

結果顯示 (圖十八), clofibrate 誘發大鼠肝臟初代肝細胞 CYP 4A1 蛋白質表現顯著高於 control 組、n-6 脂肪酸 (AA 和 LA) 及 n-3 脂肪酸 (DHA)。

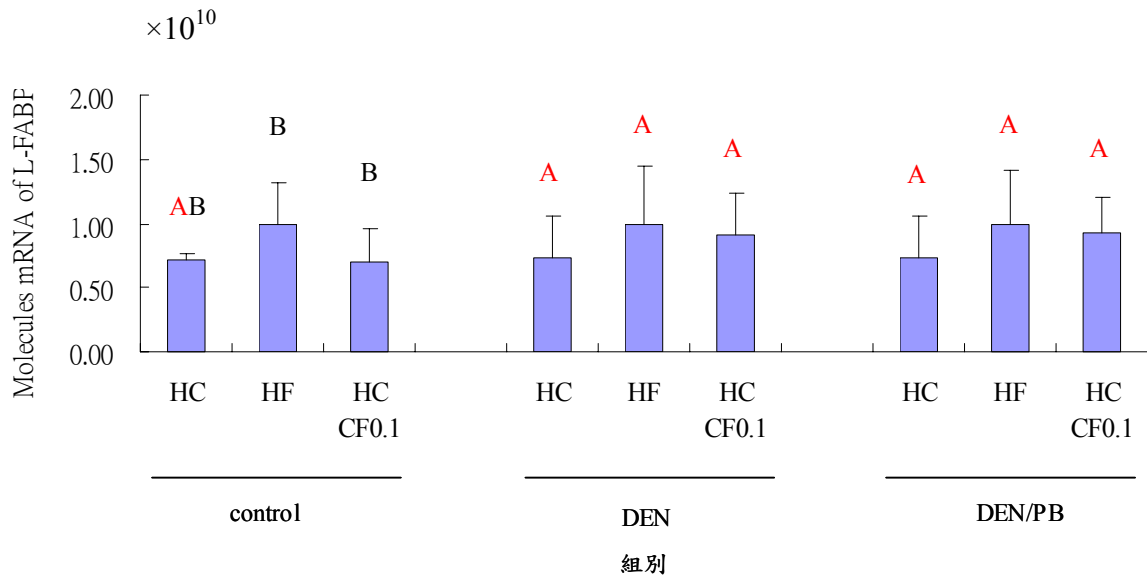
十七、n-6、n-3 脂肪酸添加對大鼠初代肝細胞 PGST 蛋白質表現的影響 (n = 2)

結果顯示 (圖十九), n-3 脂肪酸 (EPA 和 DHA) 誘發大鼠肝臟初代肝細胞 PGST 蛋白質表現顯著高於 control 組。

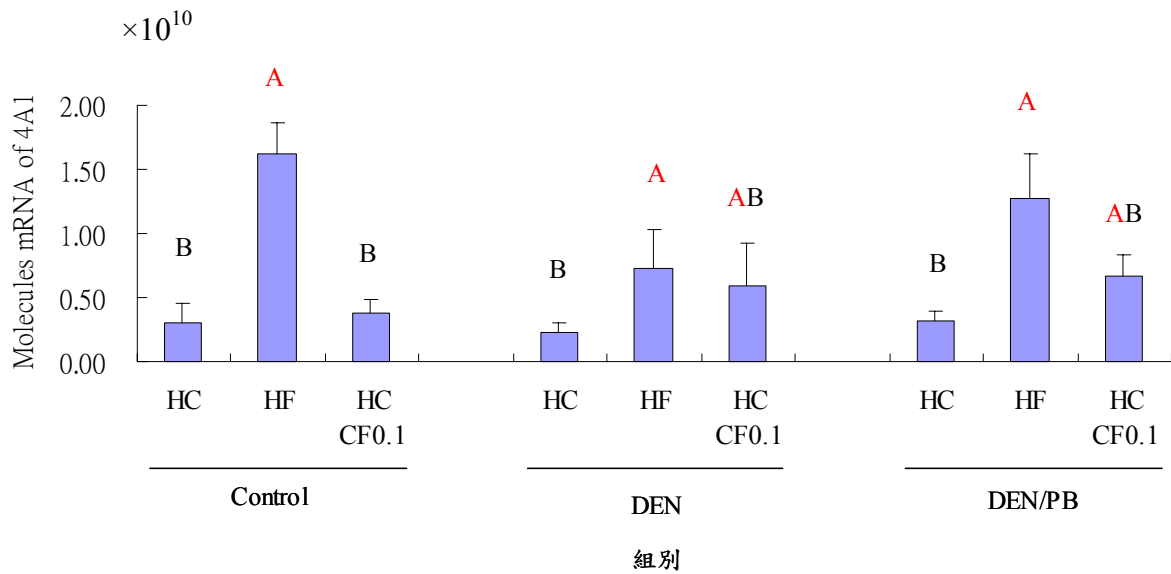
結果圖表



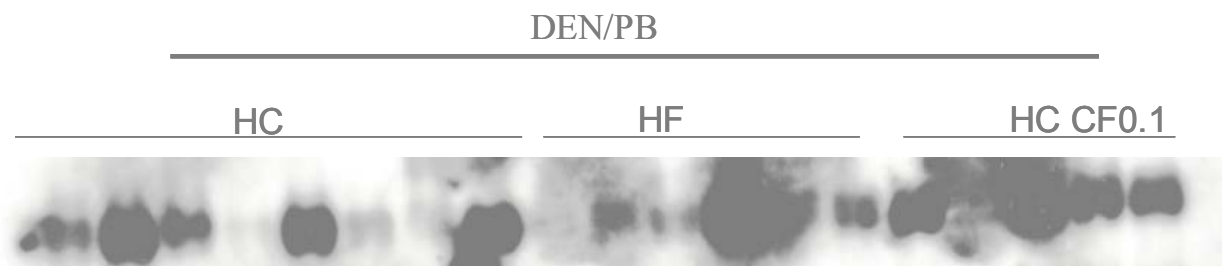
圖一、 $n-6$ 、 $n-3$ 油脂與 clofibrate 以及有或無 DEN/PB 處理對大鼠肝臟 ACO mRNA 表現的影響。出生 24 小時雄性大白鼠腹腔注射 diethylnitrosamine，並於飲食添加 phenobarbital (0.05%)，個別餵食高玉米油 (23.5%；以 HC 表示)、高玉米油及 clofibrate (0.1%；以 HC 0.1 表示) 或高魚油 (23%，以 HF 表示) 6 個月。以吸入過多二氧化碳方式犧牲大鼠，分離大鼠肝臟 mRNA，進行 Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction 分析，觀察大鼠肝臟 ACO mRNA 表現 (n = 2~3)。各處理組間標有不同英文字母代表有顯著差異 (P < 0.05)。



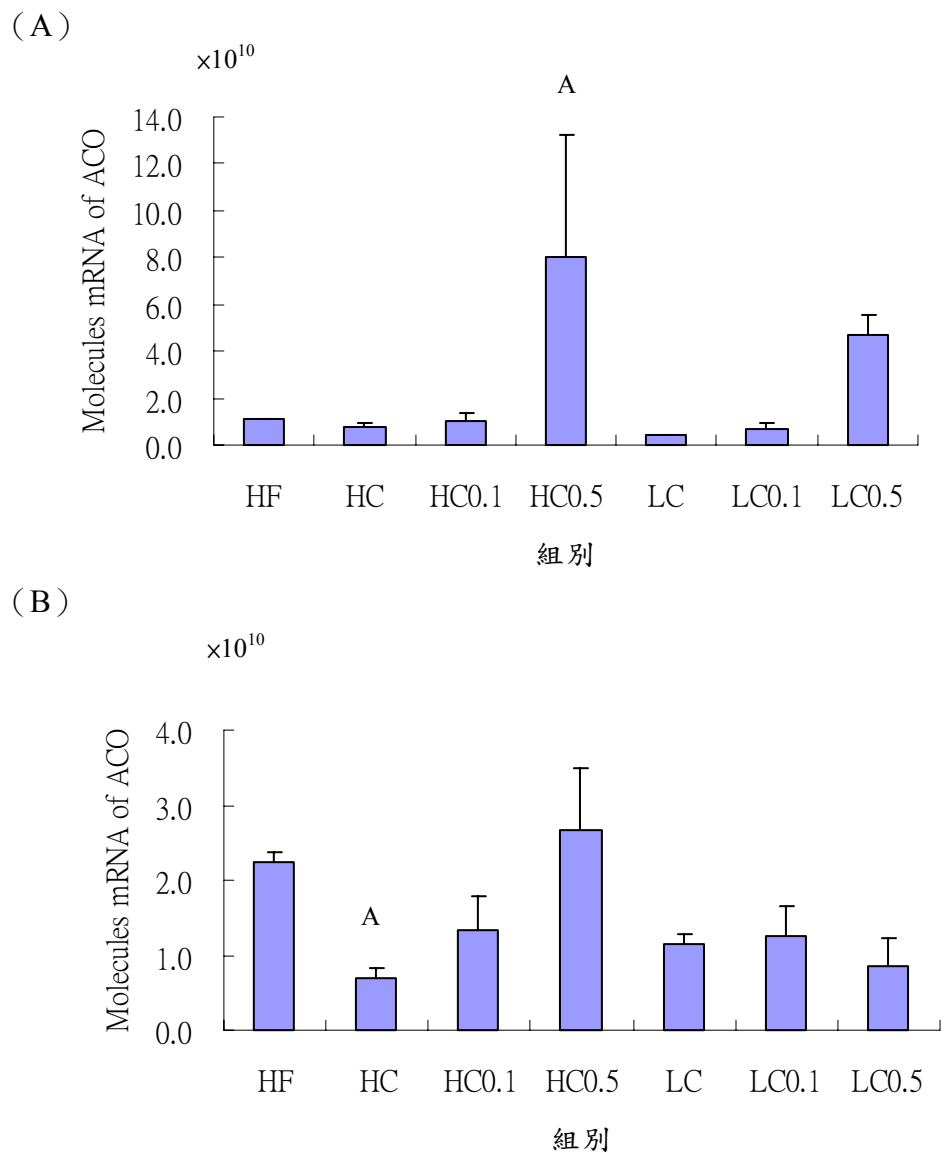
圖二、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及有或無 DEN/PB 處理對大鼠肝臟 L-FABP mRNA 表現的影響。 出生 24 小時雄性大白鼠腹腔注射 diethylnitrosamine，並於飲食添加 phenobarbital (0.05%)，個別餵食高玉米油 (23.5%；以 HC 表示)、高玉米油及 clofibrate (0.1%；以 HC 0.1 表示) 或高魚油(23%，以 HF 表示) 6 個月。以吸入過多二氧化碳方式犧牲大鼠，分離大鼠肝臟 mRNA，進行 Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction 分析，觀察大鼠肝臟 L-FABP mRNA 表現 (n = 2~3)。各處理組間標有不同英文字母代表有顯著差異 (P<0.05)。



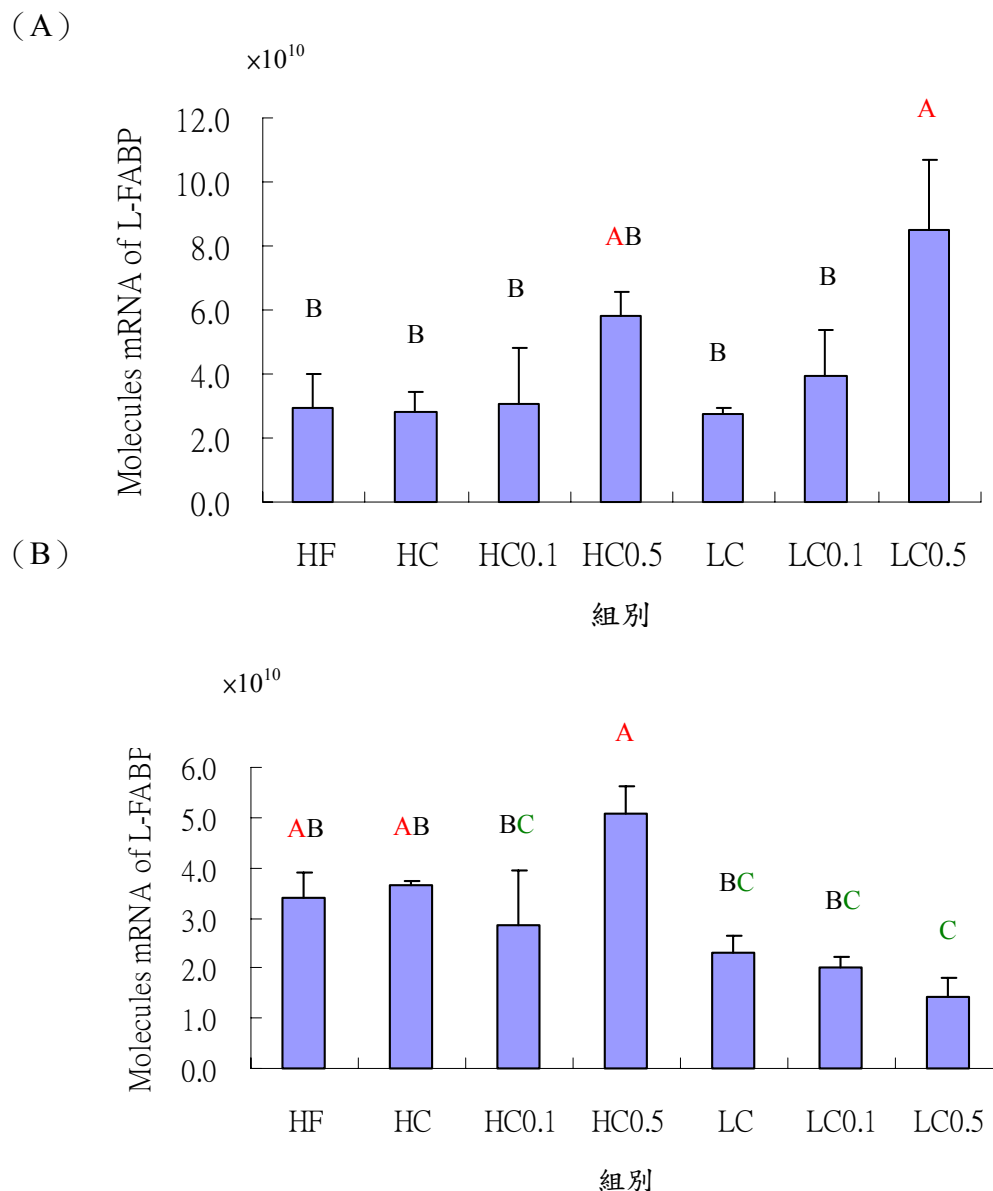
圖三、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及有或無 DEN/PB 處理對大鼠肝臟 CYP 4A1 mRNA 表現的影響。 出生 24 小時雄性大白鼠腹腔注射 diethylnitrosamine，並於飲食添加 phenobarbital (0.05%)，個別餵食高玉米油 (23.5%；以 HC 表示)、高玉米油及 clofibrate (0.1%；以 HC 0.1 表示) 或高魚油 (23%，以 HF 表示) 6 個月。以吸入過多二氧化碳方式犧牲大鼠，分離大鼠肝臟 mRNA，進行 Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction 分析，觀察大鼠肝臟 CYP4A1 mRNA 表現 (n = 2~3)。各處理組間標有不同英文字母代表有顯著差異 (P < 0.05)。



圖四、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及 DEN/PB 處理對大鼠肝臟 CYP 2B1 mRNA 表現的影響。出生 24 小時雄性大白鼠腹腔注射 diethylnitrosamine，並於飲食添加 phenobarbital (0.05%)，個別餵食高玉米油 (23.5%；以 HC 表示)、高玉米油及 clofibrate (0.1%；以 HC 0.1 表示) 或高魚油(23%，以 HF 表示) 6 個月。以吸入過多二氧化碳方式犧牲大鼠，分離大鼠肝臟 mRNA，進行 Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction 分析，觀察大鼠肝臟 CYP2B1 mRNA 表現 (n = 5 ~ 8)。

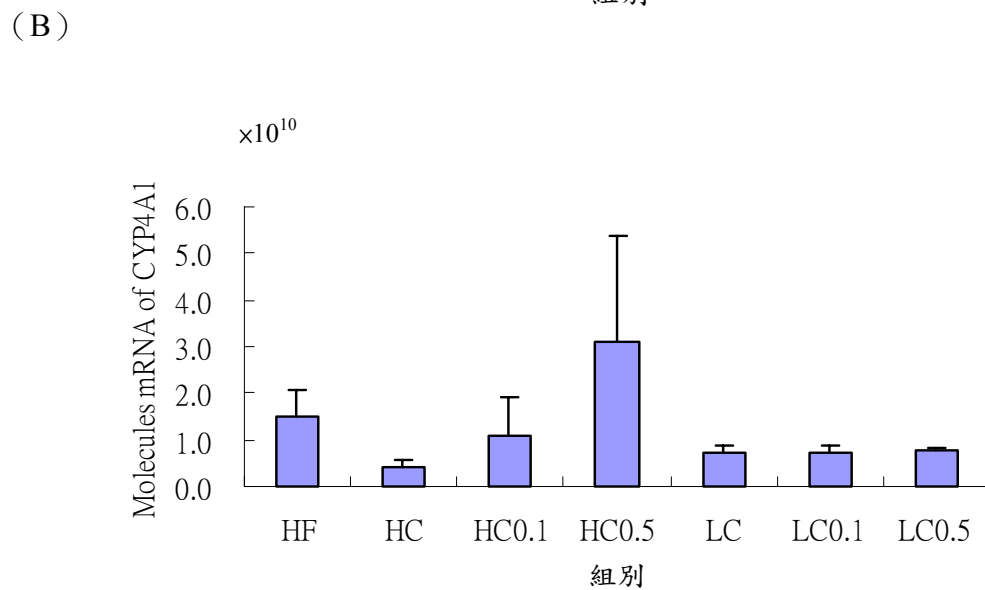
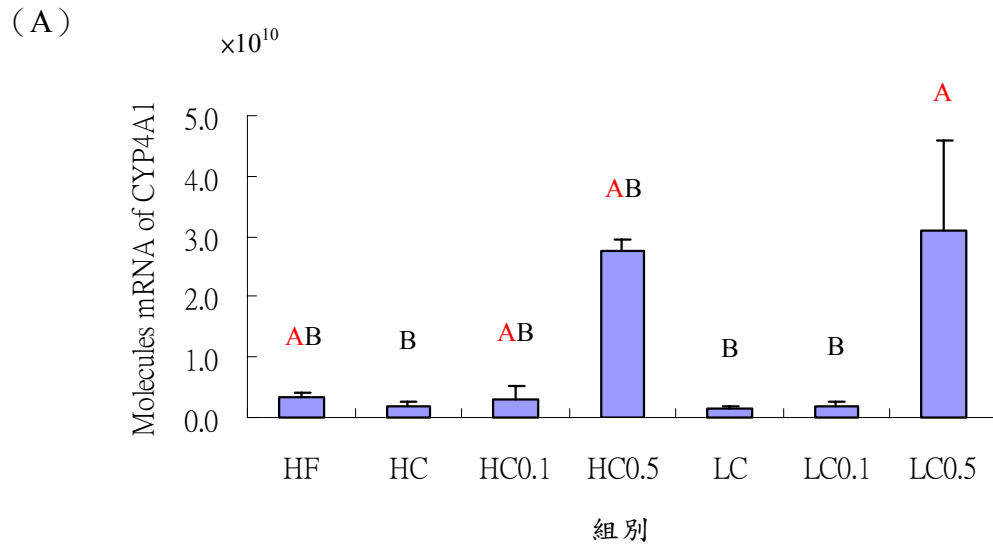


圖五、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及 DEN/PB 處理對大鼠肝臟 ACO mRNA 表現的影響。 出生 4 週雄性大白鼠腹腔注射 diethylnitrosamine，並於飲食添加 phenobarbital (0.05%)，個別餵食高玉米油 (23.5%；以 HC 表示)、高玉米油及 clofibrate (0.1% 或 0.5%；分別以 HC 0.1 或 HC 0.5 表示)、低玉米油 (5%；以 LC 表示)、低玉米油及 clofibrate (0.1% 或 0.5%；分別以 LC CF0.1 或 LC CF0.5 表示) 或高魚油 (23%，以 HF 表示) 2 (A) 或 6 (B) 週。以吸入過多二氧化碳方式犧牲大鼠，分離大鼠肝臟 mRNA，進行 Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction 分析，觀察大鼠肝臟 ACO mRNA 表現 (n = 2~3)。A：表示與高魚油組相較有顯著差異 (P < 0.05)。

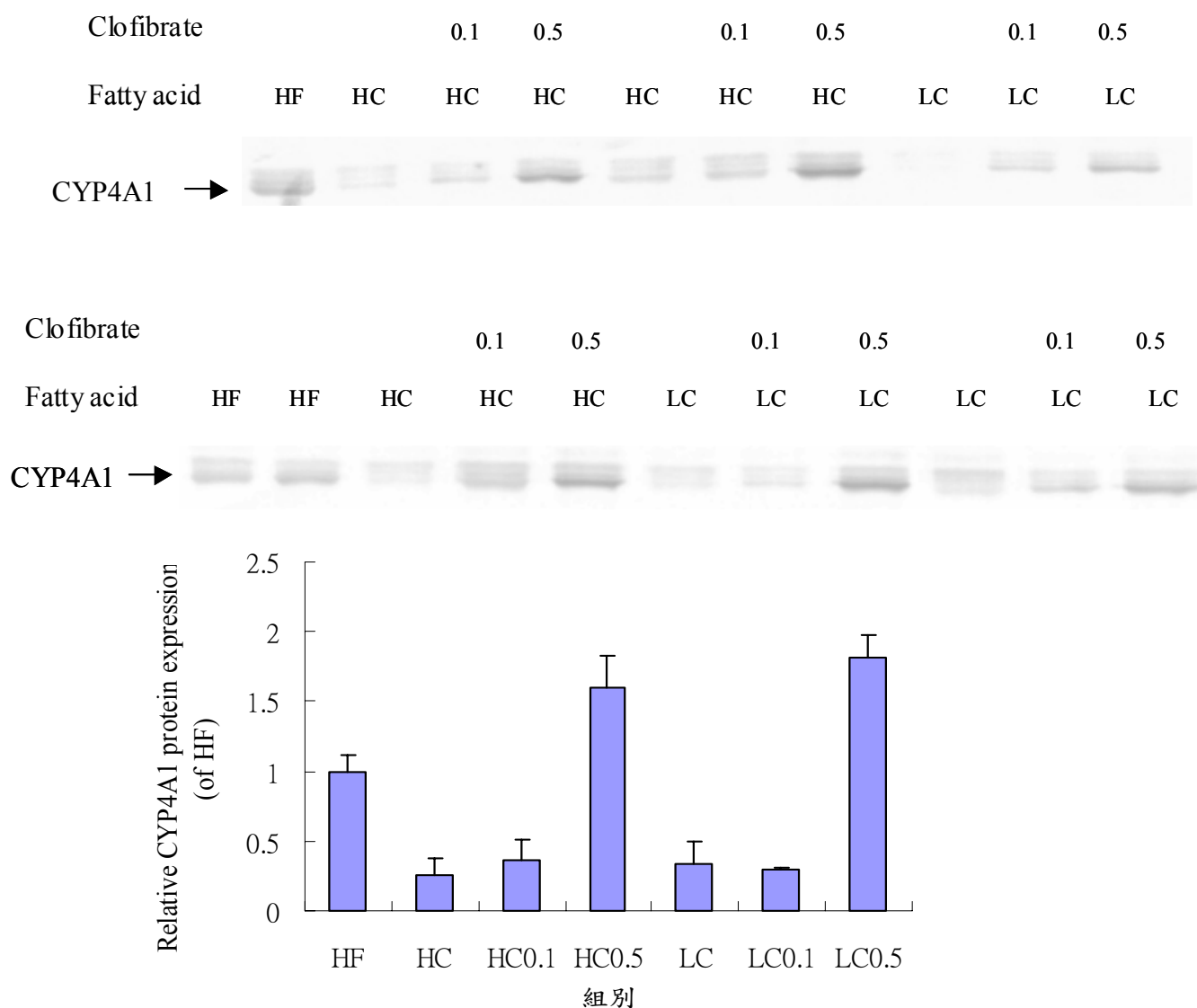


圖六、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及 DEN/PB 處理對大鼠肝臟 L-FABP mRNA

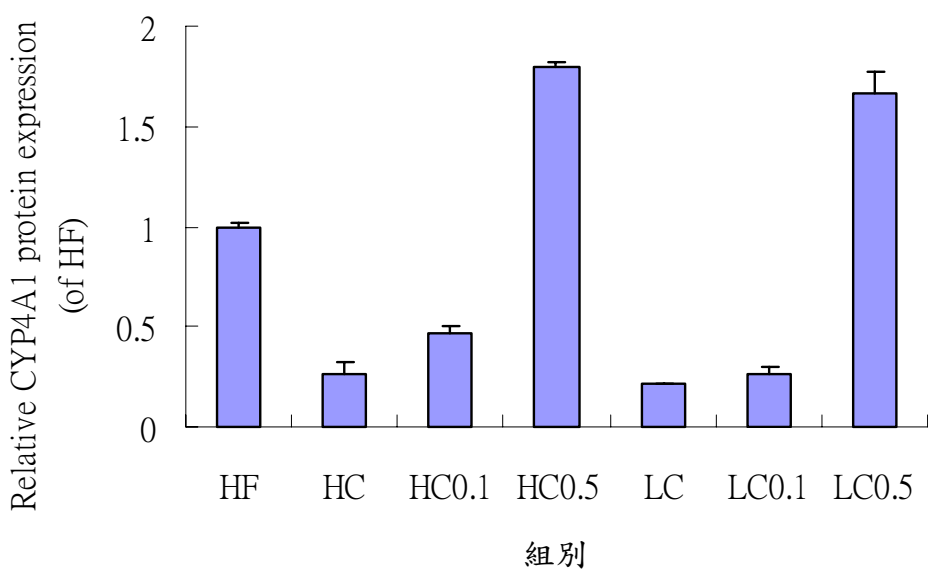
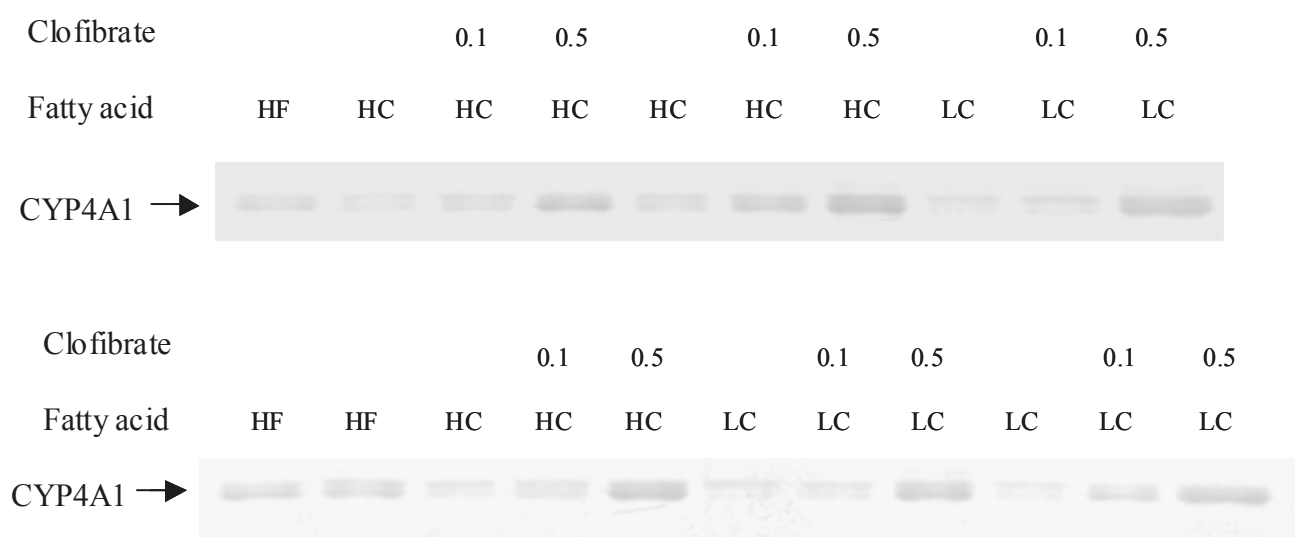
表現的影響。 出生 4 週雄性大白鼠腹腔注射 diethylnitrosamine，並於飲食添加 phenobarbital (0.05%)，個別餵食高玉米油 (23.5%；以 HC 表示)、高玉米油及 clofibrate (0.1% 或 0.5%；分別以 HC 0.1 或 HC 0.5 表示)、低玉米油 (5%；以 LC 表示)、低玉米油及 clofibrate (0.1% 或 0.5%；分別以 LC CF0.1 或 LC CF0.5 表示) 或高魚油 (23%，以 HF 表示) 2 (A) 或 6 (B) 週。以吸入過多二氧化碳方式犧牲大鼠，分離大鼠肝臟 mRNA，進行 Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction 分析，觀察大鼠肝臟 L-FABP mRNA 表現 (n = 2~3)。各處理組間標有不同英文字母代表有顯著差異 (P < 0.05)。



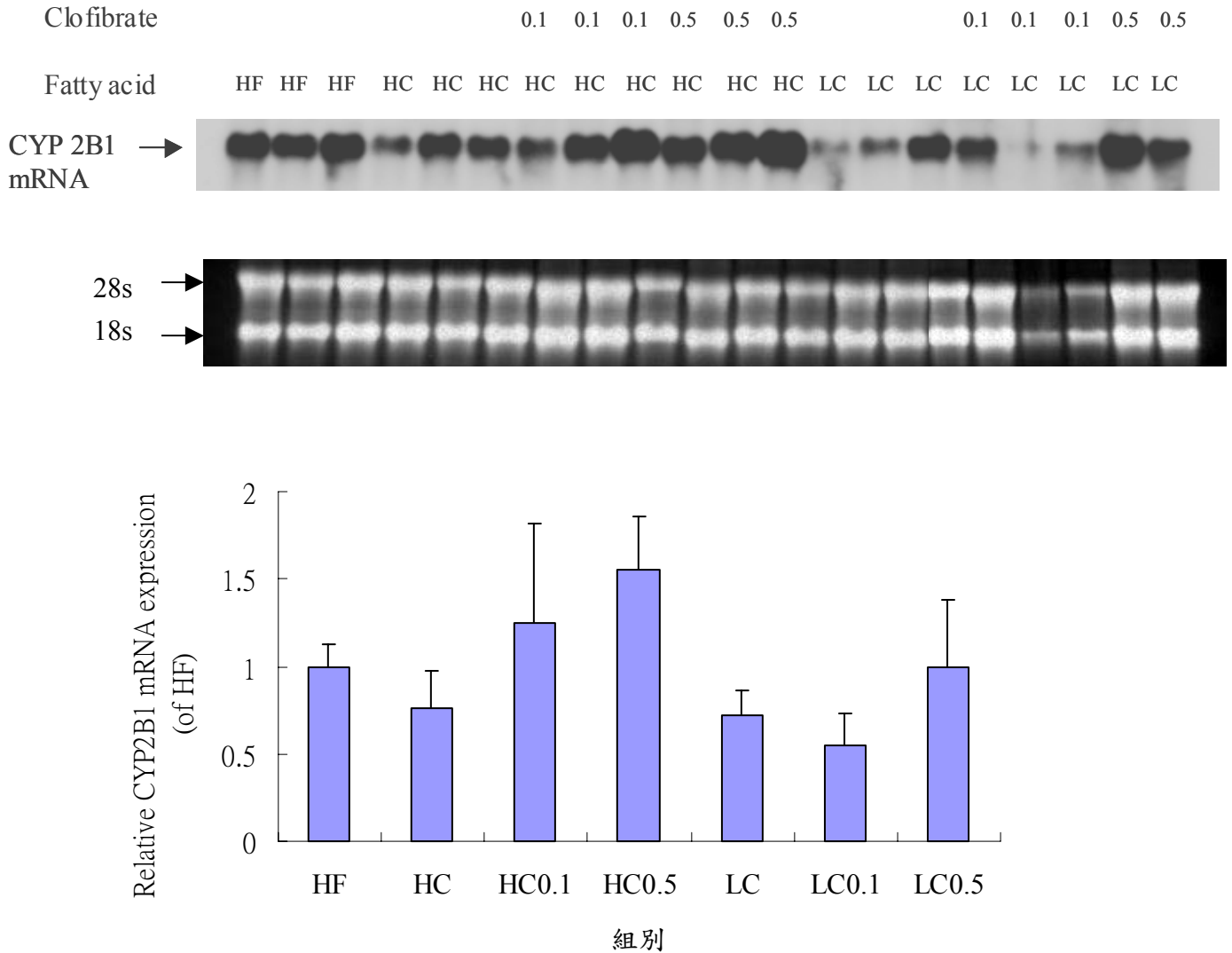
圖七、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及 DEN/PB 處理對大鼠肝臟 CYP 4A1 mRNA 表現的影響。 出生 4 週雄性大白鼠腹腔注射 diethylnitrosamine，並於飲食添加 phenobarbital (0.05%)，個別餵食高玉米油 (23.5%；以 HC 表示)、高玉米油及 clofibrate (0.1% 或 0.5%；分別以 HC 0.1 或 HC 0.5 表示)、低玉米油 (5%；以 LC 表示)、低玉米油及 clofibrate (0.1% 或 0.5%；分別以 LC CF0.1 或 LC CF0.5 表示) 或高魚油 (23%，以 HF 表示) 2 (A) 或 6 (B) 週。以吸入過多二氧化碳方式犧牲大鼠，分離大鼠肝臟 mRNA，進行 Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction 分析，觀察大鼠肝臟 CYP4A1 mRNA 表現 (n = 2~3)。各處理組間標有不同英文字母代表有顯著差異 (P < 0.05)。



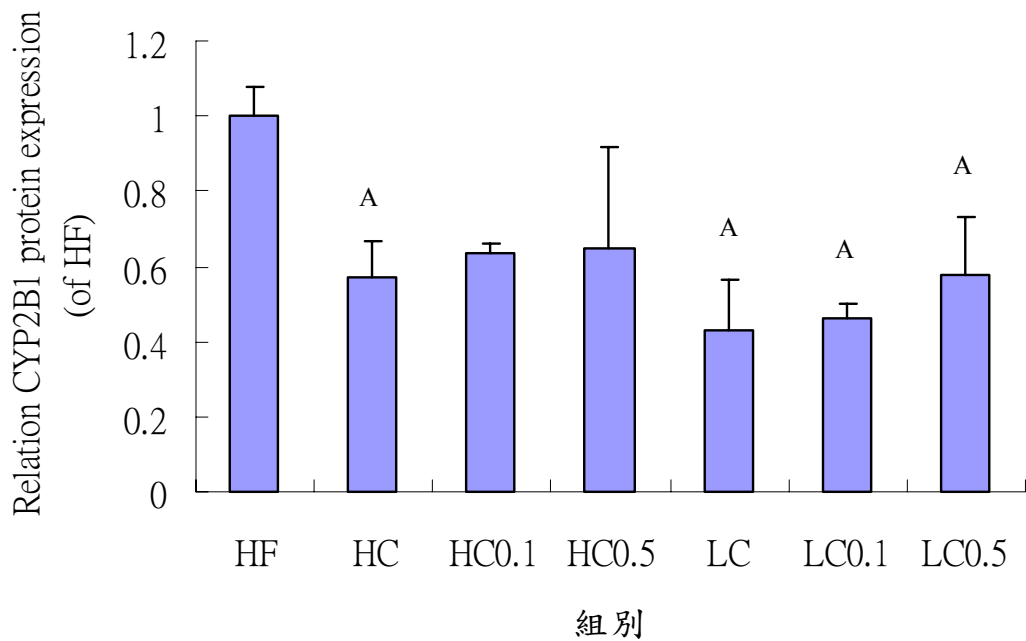
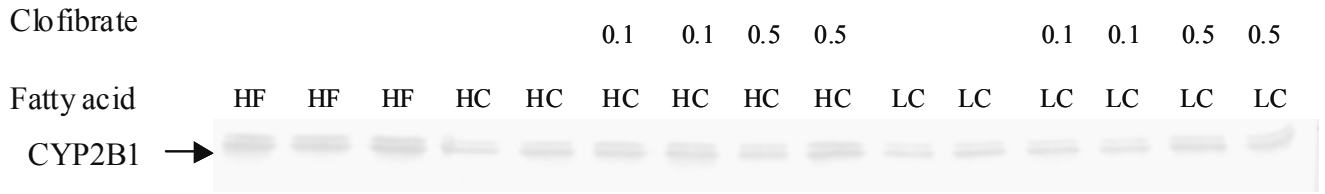
圖八、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及 DEN/PB 處理對大鼠肝臟 CYP4A1 蛋白質表現的影響。出生 4 週雄性大白鼠腹腔注射 diethylnitrosamine，並於飲食添加 phenobarbital (0.05%)，個別餵食高玉米油 (23.5%，以 HC 表示)、高玉米油及 clofibrate (0.1% 或 0.5%，分別以 HC 0.1 或 HC 0.5 表示)、低玉米油 (5%，以 LC 表示)、低玉米油及 clofibrate (0.1% 或 0.5%；分別以 LC CF0.1 或 LC CF0.5 表示) 或高魚油 (23%，以 HF 表示) 2 週。以吸入過多二氧化碳方式犧牲大鼠，分離大鼠肝臟蛋白質，進行西方點墨法 (Western blotting) 分析，觀察大鼠肝臟 CYP4A1 蛋白質表現 (n = 2~3)。各處理組間標有不同英文字母代表有顯著差異 (P<0.05)。



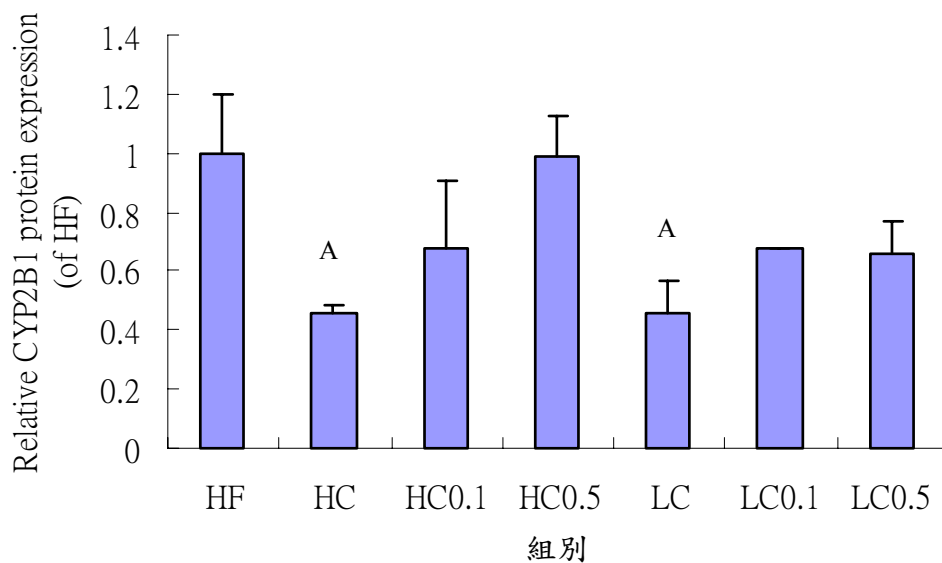
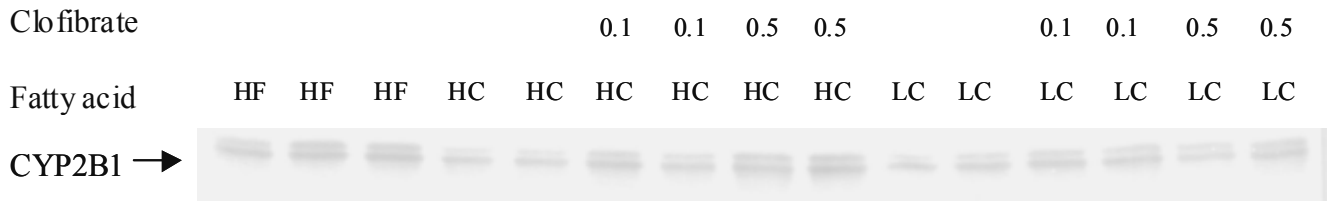
圖九、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及 DEN/PB 處理對大鼠肝臟 CYP4A1 蛋白質表現的影響。 出生 4 週雄性大白鼠腹腔注射 diethylnitrosamine，並於飲食添加 phenobarbital (0.05%)，個別餵食高玉米油 (23.5%；以 HC 表示)、高玉米油及 clofibrate (0.1% 或 0.5%；分別以 HC 0.1 或 HC 0.5 表示)、低玉米油 (5%；以 LC 表示)、低玉米油及 clofibrate (0.1% 或 0.5%；分別以 LC CF0.1 或 LC CF0.5 表示) 或高魚油(23%，以 HF 表示) 6 週。以吸入過多二氧化碳方式犧牲大鼠，分離大鼠肝臟蛋白質，進行西方點墨法 (Western blotting) 分析，觀察大鼠肝臟 CYP4A1 蛋白質表現 (n = 2~3)。各處理組間標有不同英文字母代表有顯著差異 (P<0.05)。



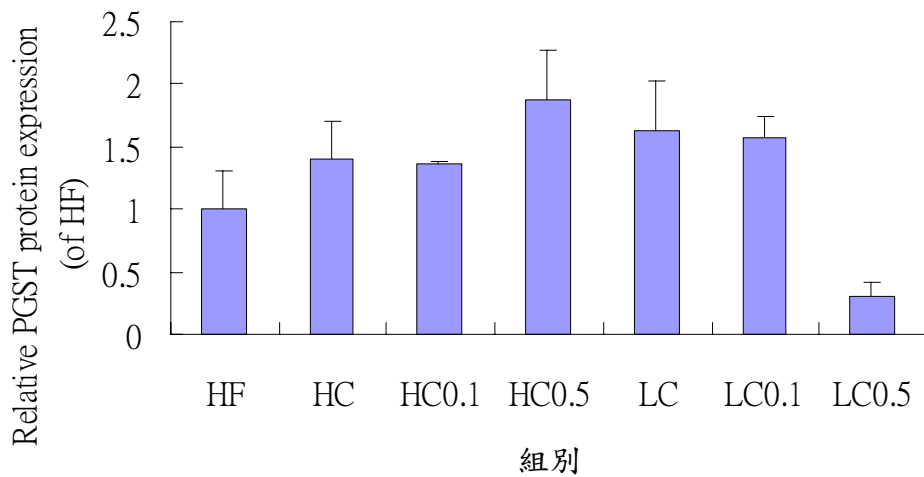
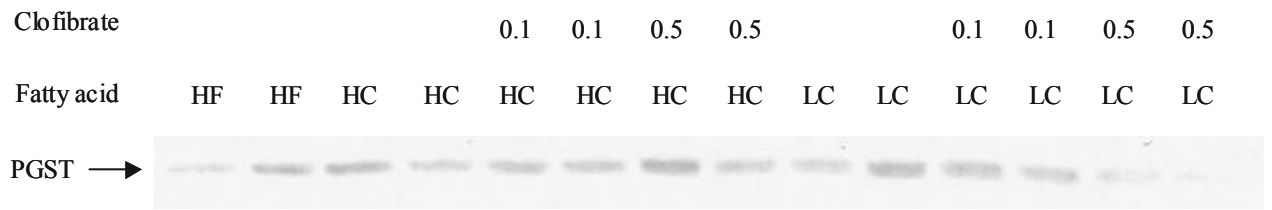
圖十、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及 DEN/PB 處理對大鼠肝臟 CYP 2B1 mRNA 表現的影響。 出生 4 週雄性大白鼠腹腔注射 diethylnitrosamine，並於飲食添加 phenobarbital (0.05%)，個別餵食高玉米油 (23.5%；以 HC 表示)、高玉米油及 clofibrate (0.1% 或 0.5%；分別以 HC 0.1 或 HC 0.5 表示)、低玉米油 (5%；以 LC 表示)、低玉米油及 clofibrate (0.1% 或 0.5%；分別以 LC CF0.1 或 LC CF0.5 表示) 或高魚油(23%，以 HF 表示) 2 週。以吸入過多二氧化碳方式犧牲大鼠，分離大鼠肝臟 RNA，進行北方墨點法 (Northern blot) 分析，觀察大鼠肝臟 CYP2B1 mRNA 表現 (n = 2~3)。A：表示與高魚油組相較有顯著差異 (P<0.05)。



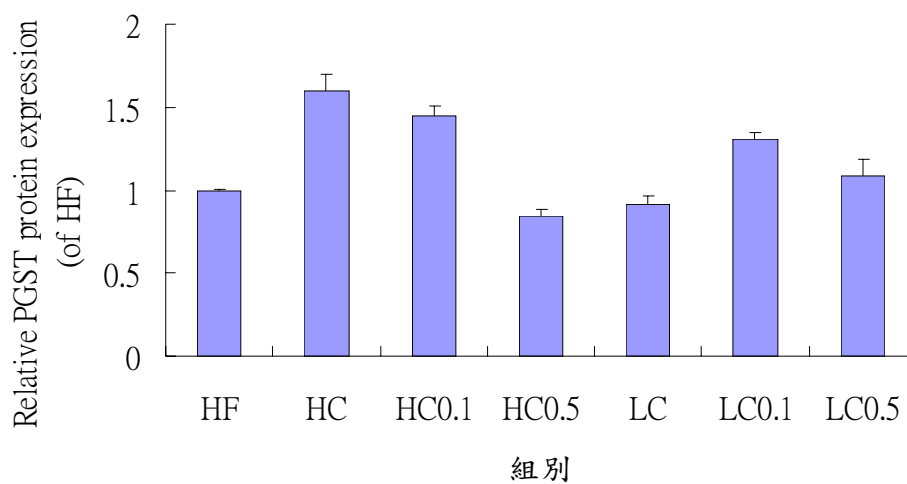
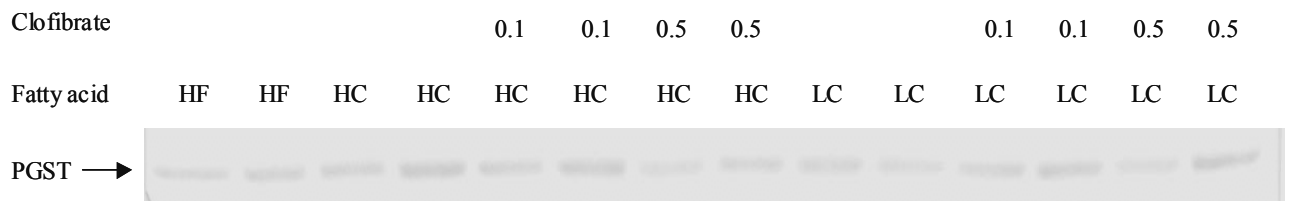
圖十二、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及 DEN/PB 處理對大鼠肝臟 CYP 2B1 蛋白質表現的影響。 出生 4 週雄性大白鼠腹腔注射 diethylnitrosamine，並於飲食添加 phenobarbital (0.05%)，個別餵食高玉米油 (23.5%；以 HC 表示)、高玉米油及 clofibrate (0.1% 或 0.5%；分別以 HC 0.1 或 HC 0.5 表示)、低玉米油 (5%；以 LC 表示)、低玉米油及 clofibrate (0.1% 或 0.5%；分別以 LC CF0.1 或 LC CF0.5 表示) 或高魚油 (23%，以 HF 表示) 2 週。以吸入過多二氧化碳方式犧牲大鼠，分離大鼠肝臟蛋白質，進行西方點墨法 (Western blotting) 分析，觀察大鼠肝臟 CYP2B1 蛋白質表現 (n = 2~3)。A：表示與高魚油組相較有顯著差異 (P < 0.05)。



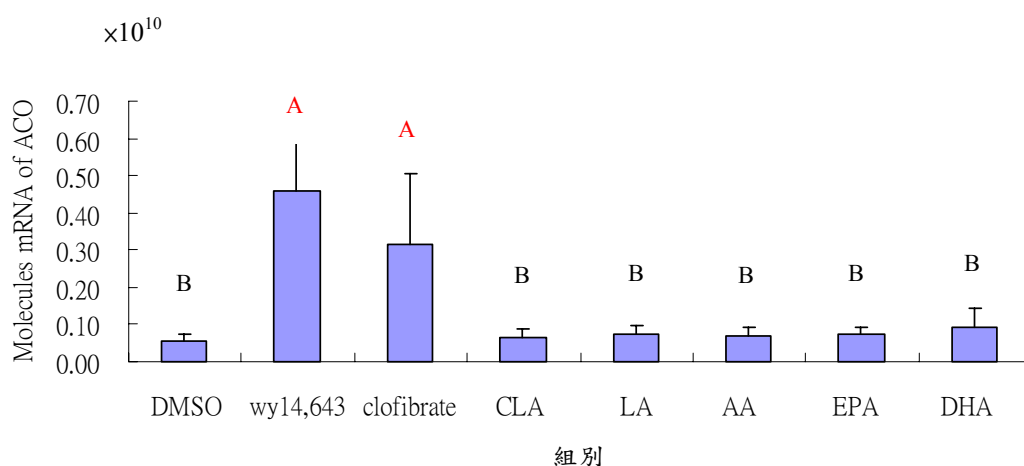
圖十三、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及 DEN/PB 處理對大鼠肝臟 CYP 2B1 蛋白質表現的影響。出生 4 週雄性大白鼠腹腔注射 diethylnitrosamine，並於飲食添加 phenobarbital (0.05%)，個別餵食高玉米油 (23.5%；以 HC 表示)、高玉米油及 clofibrate (0.1% 或 0.5%；分別以 HC 0.1 或 HC 0.5 表示)、低玉米油 (5%；以 LC 表示)、低玉米油及 clofibrate (0.1% 或 0.5%；分別以 LC CF0.1 或 LC CF0.5 表示) 或高魚油(23%，以 HF 表示) 6 週。以吸入過多二氧化碳方式犧牲大鼠，分離大鼠肝臟蛋白質，進行西方點墨法 (Western blotting) 分析，觀察大鼠肝臟 CYP2B1 蛋白質表現 (n = 2~3)。A：表示與高魚油組相較有顯著差異 (P<0.05)。



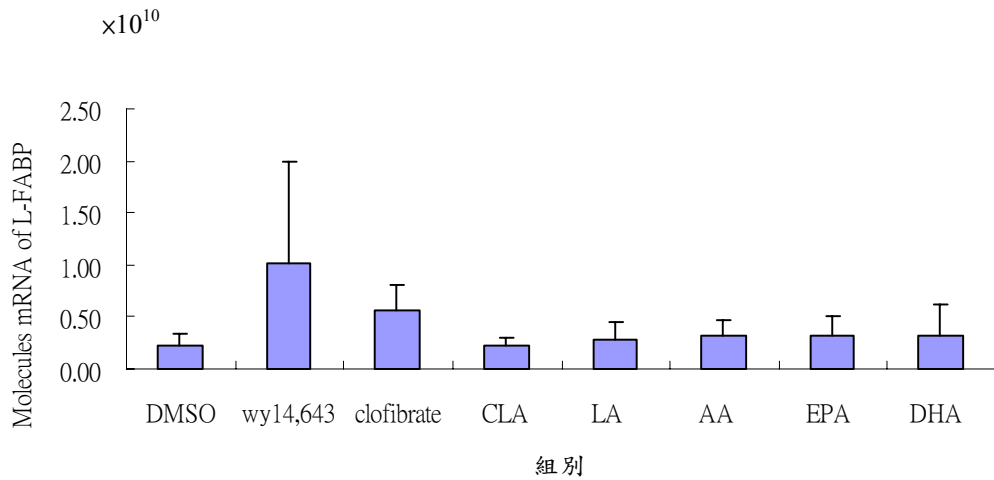
圖十四、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及 DEN/PB 處理對大鼠肝臟 PGST 蛋白質表現的影響。出生 4 週雄性大白鼠腹腔注射 diethylnitrosamine，並於飲食添加 phenobarbital (0.05%)，個別餵食高玉米油 (23.5%；以 HC 表示)、高玉米油及 clofibrate (0.1% 或 0.5%；分別以 HC 0.1 或 HC 0.5 表示)、低玉米油 (5%；以 LC 表示)、低玉米油及 clofibrate (0.1% 或 0.5%；分別以 LC CF0.1 或 LC CF0.5 表示) 或高魚油 (23%，以 HF 表示) 2 週。以吸入過多二氧化碳方式犧牲大鼠，分離大鼠肝臟蛋白質，進行西方點墨法 (Western blotting) 分析，觀察大鼠肝臟 PGST 蛋白質表現 (n = 2~3)。各處理組間標有不同英文字母代表有顯著差異 (P < 0.05)。



圖十五、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及 DEN/PB 處理對大鼠肝臟 PGST 蛋白質表現的影響。 出生 4 週雄性大白鼠腹腔注射 diethylnitrosamine，並於飲食添加 phenobarbital (0.05%) 個別餵食高玉米油 (23.5%；以 HC 表示)、高玉米油及 clofibrate (0.1% 或 0.5%；分別以 HC 0.1 或 HC 0.5 表示)、低玉米油 (5%；以 LC 表示)、低玉米油及 clofibrate (0.1% 或 0.5%；分別以 LC CF0.1 或 LC CF0.5 表示) 或高魚油 (23%，以 HF 表示) 6 週。以吸入過多二氧化碳方式犧牲大鼠，分離大鼠肝臟蛋白質，進行西方點墨法 (Western blotting) 分析，觀察大鼠肝臟 PGST 蛋白質表現 (n = 2~3)。各處理組間標有不同英文字母代表有顯著差異 (P < 0.05)。

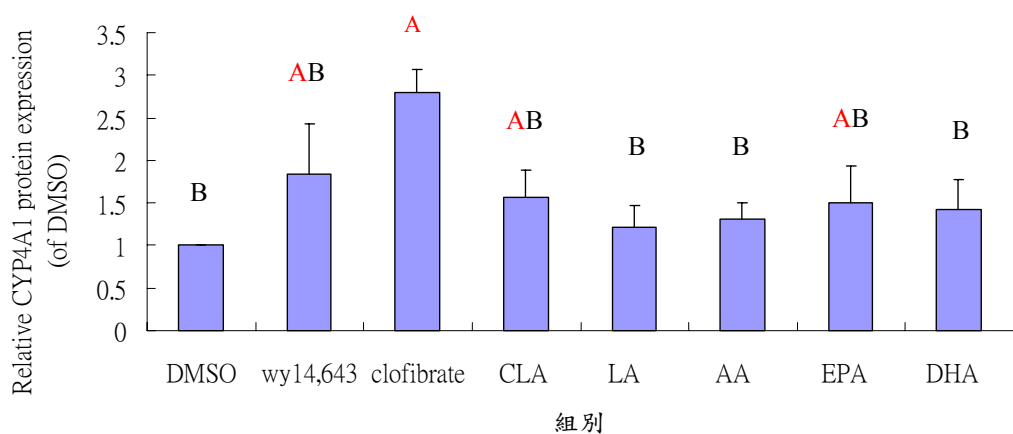


圖十六、n-6、n-3 脂肪酸對大鼠肝臟初代肝細胞 ACO mRNA 表現的影響。大鼠初代肝細胞培養在 RPMI 培養液中，分別添加 150 mM docosahexaenoic acid (DHA, 22:6, n-3)、eicosapentaenoic acid (EPA, 22:5, n-3)、arachidonic acid (AA, 20:4, n-3)、linoleic acid (LA, 18:2, n-6)、conjugated linoleic acid (CLA, 18:2, n-6)，clofibrate，4-chloro-6-(2,3-xylylidino)-2-pyrimidinylthio acetic acid (Wy14,643)，另外添加 α -tocopheryl succinate 20 μ M、BHT 0.1%、2% DMSO 及 bovine serum albumin 25mM (BSA 與脂肪酸為 1:6 複合)，經 24 小時培養後抽取細胞 mRNA，進行 Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction 分析，觀察初代肝細胞 ACO mRNA 表現 (n = 6)。各處理組間標有不同英文字母代表有顯著差異 (P<0.05)。

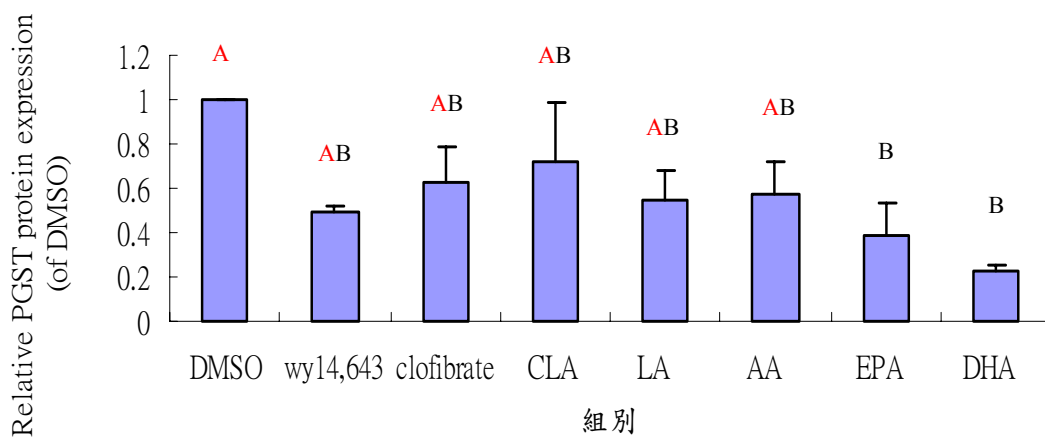
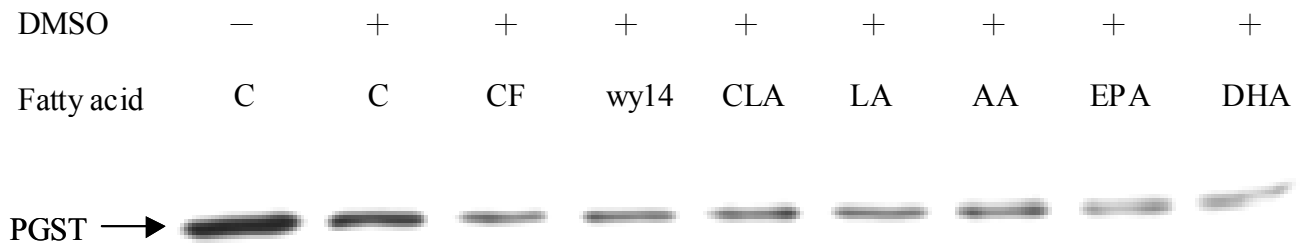


圖十七、n-6、n-3 脂肪酸對大鼠肝臟初代肝細胞 L-FABP mRNA 表現的影響。大鼠初代肝細胞培養在 RPMI 培養液中，分別添加 150 mM docosahexaenoic acid (DHA, 22:6, n-3)、eicosapentaenoic acid (EPA, 22:5, n-3)、arachidonic acid (AA, 20:4, n-3)、linoleic acid (LA, 18:2, n-6)、conjugated linoleic acid (CLA, 18:2, n-6)、clofibrate, 4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio acetic acid (Wy14,643)，另外添加 α -tocopheryl succinate 20 μ M、BHT 0.1%、2% DMSO 及 bovine serum albumin 25mM (BSA 與脂肪酸為 1:6 複合)，經 24 小時培養後抽取細胞 mRNA，進行 Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction 分析，觀察初代肝細胞 L-FABP mRNA 表現 (n = 6)。各處理組間標有不同英文字母代表有顯著差異 (P<0.05)。

DMSO	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Fatty acid	C	C	CF	wy14	CLA	LA	AA	EPA	DHA



圖十八、n-6、n-3 脂肪酸對大鼠肝臟初代肝細胞 CYP4A1 蛋白質表現的影響。大鼠初代肝細胞培養在 RPMI 培養液中，分別添加 150 mM docosaheptaenoic acid (DHA, 22:6, n-3)、eicosapentaenoic acid (EPA, 22:5, n-3)、arachidonic acid (AA, 20:4, n-3)、linoleic acid (LA, 18:2, n-6)、conjugated linoleic acid (CLA, 18:2, n-6)、clofibrate, 4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio acetic acid (Wy14,643)，另外添加 α -tocopheryl succinate 20 μ M、BHT 0.1%、2% DMSO 及 bovine serum albumin 25mM (BSA 與脂肪酸為 1:6 複合)，經 24 小時培養後抽取細胞蛋白質，進行西方點墨法 (Western blotting) 分析，觀察初代肝細胞 CYP4A1 蛋白質表現 (n = 2)。各處理組間標有不同英文字母代表有顯著差異 (P < 0.05)。



圖十九、n-6、n-3 脂肪酸對大鼠肝臟初代肝細胞 PGST 蛋白質表現的影響。大鼠初代肝細胞培養在 RPMI 培養液中，分別添加 150 mM docosahexaenoic acid (DHA, 22:6, n-3)、eicosapentaenoic acid (EPA, 22:5, n-3)、arachidonic acid (AA, 20:4, n-3)、linoleic acid (LA, 18:2, n-6)、conjugated linoleic acid (CLA, 18:2, n-6)、clofibrate, 4-chloro-6-(2,3-xylylidino)-2-pyrimidinylthio acetic acid (Wy14,643)，另外添加 α -tocopheryl succinate 20 μ M、BHT 0.1%、2% DMSO 及 bovine serum albumin 25mM (BSA 與脂肪酸為 1:6 複合)，經 24 小時培養後抽取細胞蛋白質，進行西方點墨法 (Western blotting) 分析，觀察初代肝細胞 PGST 蛋白質表現 (n = 2)。各處理組間標有不同英文字母代表有顯著差異 (P<0.05)。

表一、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及 DEN/PB 處理對大鼠肝臟磷脂質脂肪酸組成的影響 (n=2~3)

餵食實驗飲食 2 週之大鼠肝臟磷脂質脂肪酸組成

組別/脂肪酸 (%)	16:0	18:0	18:1	18:2	20:4	20:5	22:6	LA/AA	n-3/n-6
HF	20.85±3.03	23.68±0.46	3.28±2.09	10.29±1.97	16.03±0.83	9.18±2.38	16.7±3.11	0.64±0.14	0.99±0.24
HC	16.90±4.77	29.51±5.02	5.43±1.36	12.32±4.12	31.19±1.65		4.65±1.24	0.39±0.12	0.11±0.02
HC CF 0.1	17.61±2.74	31.97±3.82	3.55±1.41	9.33±1.17	32.56±6.16		4.99±2.2	0.30±0.09	0.12±0.04
HC CF 0.5	23.27±3.79	25.93±3.08	6.96±3.04	16.84±2.87	25.51±6.09		1.49±1.4	0.70±0.25	0.05±0.02
LC	25.85±1.97	37.93±7.31	5.64±0.90	9.68±3.08	19.58±7.53		1.33±1.97	0.55±0.24	0.04±0.05
LC CF 0.1	19.35±3.18	27.20±1.48	7.03±4.84	10.28±1.35	31.89±7.15		4.25±1.3	0.33±0.08	0.1±0.02
LC CF 0.5	19.79±1.53	30.63±7.59	9.31±0.77	10.39±1.47	28.01±2.70		1.86±1.13	0.37±0.02	0.05±0.02

表二、n-6、n-3 油脂與 clofibrate 以及 DEN/PB 處理對大鼠肝臟磷脂質脂肪酸組成的影響 (n=2~3)

餵食實驗飲食 6 週的大鼠肝臟磷脂質脂肪酸之組成

組別/脂肪酸 (%)	16:0	18:0	18:1	18:2	20:4	20:5	22:6	LA/AA	n-3/n-6
HF	29.46±8.68	42.71±13.49	3.76±1.42	6.80±3.17	4.11±1.12	9.68±16.77	6.31±8.90	1.23±0.01	2.1±1.73
HC	25.44±4.86	46.38±9.78	1.98±0.51	8.02±0.84	16.95±12.65		1.24±1.11	0.72±0.54	0.04±0.018
HC CF 0.1	5.14±1.95	45.64±34.30	0.33±0.17	5.52±4.45	14.87±5.81		1.13±0.47	0.39±0.23	0.08±0.048
HC CF 0.5	28.10±0.19	55.09±3.93	3.43±2.74	7.24±3.47	6.05±3.51		0.10±0.14	1.24±0.15	0.01±0.016
LC	23.72±8.46	40.27±13.01	2.71±1.93	8.91±3.71	22.47±17.50		1.92±1.84	0.61±0.42	0.05±0.029
LC CF 0.1	23.56±4.68	39.75±11.82	2.06±0.33	8.24±1.20	24.68±14.79		1.72±0.53	0.40±0.16	0.06±0.01
LC CF 0.5	21.43±7.48	40.30±14.65	3.18±1.90	6.63±2.83	26.98±19.66		1.47±1.34	0.40±0.32	0.03±0.028

表三、n-3 及 n-6 脂肪酸的添加對大鼠初代肝細胞脂肪酸組成之影響(n = 3)

組別/脂肪酸 (%)	16:0	18:0	18:1	18:2 (LA)	20:4 (AA)	20:5 (EPA)	22:6 (DHA)	18:2 (CLA)	LA/AA
Control	20.4±0.64	27.5±3.82	5.0±2.15	16.4±1.71	30.7±3.17				0.54±0.11
Control/DMSO	14.0±0.45	26.6±0.92	4.0±1.5	16.7±1.03	38.7±1.47				0.43±0.03
Wy14,643/DMSO	18.8±2.71	29.2±3.36	5.3±2.64	16.4±0.67	30.3±3.88				0.55±0.07
clofibrate/DMSO	15.9±0.49	27.4±0.47	5.6±0.54	16.5±0.36	34.6±1.19				0.48±0.02
CLA/DMSO	14.9±0.83	28.8±2.68	3.1±0.77	16.4±1.43	32.1±1.36			4.6±1.22	0.51±0.06
LA/DMSO	14.2±1.18	28.3±1.78	2.9±1.57	23.0±0.95	31.7±2.01				0.73±0.06
AA/DMSO	14.0±0.35	28.6±1.96	3.6±1.32	13.0±0.55	40.7±1.83				0.32±0.01
EPA/DMSO	13.7±0.72	27.1±0.77	4.0±0.73	16.2±0.32	30.5±0.26	8.5±1.09			0.53±0.01
DHA/DMSO	16.1±1.66	28.6±2.15	4.4±0.21	13.7±0.65	24.9±1.55		12.3±1.77		0.55±0.05

討論

肝臟中 PPAR α response 基因和非 PPAR α response 基因表現

從流行病學或是動物實驗模式的研究結果顯示飲食中油脂之含量及種類與某些癌症發生有密切的相關(Miller, 1990)。魚類油脂中富含超長鏈脂肪酸如 EPA 和 DHA，均屬 n-3 多元不飽和脂肪酸，以往研究結果已證實，相較於玉米油，魚油具有抑制乳癌及直腸腫瘤生成的作用(Lee et al., 1993; Reddy et al., 1991)，在飲食油脂與肝癌形成的相關研究方面，也發現高魚油飲食 (10% by weight) 與高玉米油飲食 (15% by weight) 比較下，魚油可有效抑制以 diethylnitrosamine (DEN; 誘發劑) -phenobarbital (PB; 促進劑) 模式誘發肝前癌細胞(Chen et al., 1997)。

Fibrate 類降血脂藥物如 Wy14,643 和 clofibrate 皆能活化 PPAR α ，大鼠肝臟中 PPAR α 經 ligands 活化後能誘發 PPAR α response 基因的表現，包括 CYP 4A1、ACO、L-FABP mRNA 及蛋白質表現(Gonzalez et al., 1998)，PPAR α 的活化劑，除了過氧化小體增生劑外，一些脂肪酸 (例如：LA, LNA, AA, EPA 和 DHA) 及 eicosanoids (8-hydroxyeicosatetraenoic acid, leukotriene B4 等)(Desvergne and Wahli, 1999; Lin et al., 1999; Moya-Camarena et al., 1999)，也被證實具有活化 PPAR α 的能力，並調節 PPAR α -response gene mRNA 的轉錄。脂肪酸對於 PPAR α 活化的能力，將脂肪酸與基因調節連接在一起，是一個相當重要的發現，因為這發現可幫助瞭解為何脂肪酸可調控細胞生長，分化，進而影響一些疾病的發展 (例如：癌症的形成)，而在本實驗亦有相同的結果，在餵食實驗飲食 6 個月的大鼠中發現，高魚油組 (富含 EPA 和 DHA) 肝臟中 CYP 4A1、L-FABP 及 ACO mRNA 表現皆高於高玉米油組 (富含 LA)。本實驗室之前的研究資料也顯示，高魚油組肝臟中 CYP 4A1 蛋白質表現皆高於高玉米油組，由此可知相較於高玉

米油，魚油可誘發較高 PPAR response 基因表現。

由餵食大鼠 6 個月實驗飲食之結果發現在高玉米油飲食中添加 0.1% clofibrate 與高魚油組相較並無顯著誘發 PPAR α response 基因表現，這可能是因為 clofibrate 量太少或因為餵食實驗飲食長達六個月，因此肝臟對於實驗飲食所帶來的影響，可能已經產生了一些適應性的反應，所以本研究另一個實驗是以短時間餵食（2 週或 6 週）並增加不同油脂量及不同 clofibrate（0.5%）量之實驗飲食組。實驗結果發現，餵食實驗飲食 2 週之大鼠，高魚油組和高或低玉米油及 clofibrate（0.1% 或 0.5%）組之肝臟中 L-FABP、ACO 和 CYP 4A1 mRNA 皆高於高或低玉米油組，而 CYP 4A1 蛋白質表現也類似於 mRNA 表現的結果，由此可知在短時間餵食實驗飲食，與高玉米油相較，高魚油和 clofibrate 皆可誘發大鼠肝臟中較高之 PPAR α response 基因表現。無論是高或低玉米油及 clofibrate（0.5%）其誘發 L-FABP、ACO 和 4A1 mRNA 表現的效果均優於高魚油組，另外發現 clofibrate 劑量增至 0.5%，其誘發肝臟中 PPAR α response 基因（L-FABP、ACO 和 4A1）和非 PPAR α response 基因（CYP 2B1）蛋白質或 mRNA 表現效果較 clofibrate 0.1% 佳，由此可知 clofibrate 量可顯著影響 PPAR α response 基因表現，但由於以往研究證實長期給予 clofibrate 0.5% 的劑量易造成大鼠死亡，故本研究在長期餵食之研究中給予 clofibrate 0.1% 的劑量而非 clofibrate 0.5% 的劑量。

當餵食實驗飲食延長至 6 週後，大鼠肝臟中 L-FABP、ACO 和 CYP 4A1 mRNA 的表現有些許的變化，發現在低玉米油和低玉米油 clofibrate（0.1% 或 0.5%）組誘導大鼠肝臟 CYP 4A1、L-FABP 和 ACO mRNA 表現效果不如餵食實驗飲食 2 週，推論可能是餵食實驗飲食的時間加長，使得肝臟產生適應性，導致 clofibrate 誘導 PPAR α response 基因的效果不顯著。

富含多元不飽和脂肪酸（EPA 和 DHA）的魚油，由以往的研究可知魚油除可活化 PPAR α response 基因外亦可調控肝中解毒酵素的表現(Takahashi et al., 2002)。CYP 2B1 及 PGST 分別為第一階段和第二階段解毒酵素系統中的成員之

一，本實驗結果發現，相較於高或低玉米油和高或低玉米油及 clofibrate (0.1%)，餵食實驗飲食之高魚油組會降低肝臟中 PGST 蛋白質表現。本實驗結果也發現無論餵食實驗飲食 2 或 6 週，高魚油實驗飲食組誘導大鼠肝臟中非 PPAR α response 基因 CYP 2B1 mRNA 及蛋白質表現效果皆高於高玉米油組。由此可知，在 DEN/PB 誘發大鼠肝癌形成模式下，有關於魚油誘導非 PPAR α response 基因例如 CYP 2B1 及 PGST 之表現與魚油抑制 liver foci 形成間之關係仍須進一步的探討。

用 Glucocorticoid receptor-PPAR 模式下證實魚油中富含之 EPA 和 DHA 對 PPAR α 的活化比 AA 強(Gustafsson et al., 1994)，研究發現，大鼠肝臟 PPAR α 可被 EPA 活化，但 LA、LNA 和 AA 則無此作用(Ren et al., 1997)。雖然與 Wy14,643 相比較，EPA 對 PPAR α 的活化效率較弱，但 EPA 可活化 PPAR α ，增加 ACO 以及 CYP 4A1 mRNA 的轉錄(Krey et al., 1997)。為了釐清脂肪酸對調控 PPAR α response 基因和非 PPAR α response 基因的表現，本研究另一實驗是以初代肝細胞為研究模式，探討添加不同脂肪酸對 PPAR α response 基因之影響，實驗結果發現，n-3 脂肪酸 EPA 和 DHA 誘導大鼠肝臟初代肝細胞 CYP 4A1 蛋白質、ACO 及 L-FABP mRNA 表現的效果高於 n-6 脂肪酸 LA，而實驗中當作 positive control 的 Wy14,643 和 clofibrate 等處理組，誘導大鼠肝臟初代肝細胞 CYP 4A1 蛋白質、ACO 及 L-FABP mRNA 表現的效果皆優於 n-3 及 n-6 脂肪酸，且 Wy14,643 和 clofibrate 誘導 ACO 及 L-FABP mRNA 表現相較於 EPA、DHA 及 LA，有顯著上的差異，而 clofibrate 誘導 CYP 4A1 蛋白質表現與 EPA、DHA 及 LA 相較也具有顯著差異。n-3 脂肪酸 EPA 和 DHA 誘導大鼠肝臟初代肝細胞中非 PPAR α response 基因 PGST 蛋白質表現效果低於 n-6 脂肪酸 LA，且 DHA 誘導大鼠肝臟初代肝細胞中 PGST 蛋白質表現顯著低於 clofibrate 處理組。綜合以上，本研究證實與玉米油相較，魚油可誘發 PPAR α response 基因表現外亦可調控非 PPAR α response 基因之解毒酵素 PGST 及 2B1 表現，而魚油抑制肝臟 foci 形成與魚油調控基因表現間之關係仍須進一步研究。

結論

綜合以上，本研究證實與玉米油相較，魚油可誘發 PPAR α response 基因表現外亦可調控非 PPAR α response 基因之解毒酵素 PGST 及 2B1 表現，而魚油抑制肝臟 foci 形成與魚油調控基因表現間之關係仍須進一步研究。

參考文獻

- Bartsch, H., Nair, J. and Owen, R.W. (1999) Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis*, **20**, 2209-2218.
- Bayly, A.C., Roberts, R.A. and Dive, C. (1994) Suppression of liver cell apoptosis in vitro by the non-genotoxic hepatocarcinogen and peroxisome proliferator nafenopin. *J Cell Biol*, **125**, 197-203.
- Bentley, P., Calder, I., Elcombe, C., Grasso, P., Stringer, D. and Wiegand, H.J. (1993) Hepatic peroxisome proliferation in rodents and its significance for humans. *Food Chem Toxicol*, **31**, 857-907.
- Cattley, R.C., Kato, M., Popp, J.A., Teets, V.J. and Voss, K.S. (1994) Initiator-specific promotion of hepatocarcinogenesis by WY-14,643 and clofibrate. *Carcinogenesis*, **15**, 1763-1766.
- Chapkin, R.S., Hong, M.Y., Fan, Y.Y., Davidson, L.A., Sanders, L.M., Henderson, C.E., Barhoumi, R., Burghardt, R.C., Turner, N.D. and Lupton, J.R. (2002) Dietary n-3 PUFA alter colonocyte mitochondrial membrane composition and function. *Lipids*, **37**, 193-199.
- Chen, H.W., Ko, J.J., Lii, C.K., Ou, C.C. and Sheen, L.Y. (1997) Corn oil enhances gamma-glutamyl transpeptidase-positive foci development in the presence of phenobarbital during hepatocarcinogenesis in rats. *Nutr Cancer*, **28**, 252-257.
- Chu, S., Huang, Q., Alvares, K., Yeldandi, A.V., Rao, M.S. and Reddy, J.K. (1995) Transformation of mammalian cells by overexpressing H₂O₂-generating peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7080-7084.
- Costa, C., Soares, R., Reis-Filho, J.S., Leitao, D., Amendoeira, I. and Schmitt, F.C. (2002) Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol*, **55**, 429-434.
- David Bishop-Bailey., Jessica Wray (2003) Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical review on endogenous pathways for ligand generation *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, **71**, 1-22.
- Denison, M.S. and Whitlock, J.P., Jr. (1995) Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. *J Biol Chem*, **270**, 18175-18178.
- Desvergne, B. and Wahli, W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*, **20**, 649-688.
- Escher, P. and Wahli, W. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat Res*, **448**, 121-138.

- Foretz, M., Foufelle, F. and Ferre, P. (1999) Polyunsaturated fatty acids inhibit fatty acid synthase and spot-14-protein gene expression in cultured rat hepatocytes by a peroxidative mechanism. *Biochem J*, **341** (Pt 2), 371-376.
- Gonzalez, F.J. (1997) The role of carcinogen-metabolizing enzyme polymorphisms in cancer susceptibility. *Reprod Toxicol*, **11**, 397-412.
- Gonzalez, F.J., Peters, J.M. and Cattley, R.C. (1998) Mechanism of action of the nongenotoxic peroxisome proliferators: role of the peroxisome proliferator-activator receptor alpha. *J Natl Cancer Inst*, **90**, 1702-1709.
- Green, S. (1995) PPAR: a mediator of peroxisome proliferator action. *Mutat Res*, **333**, 101-109.
- Gustafsson, J.A., Gearing, K., Widmark, E., Tollet, P., Stromstedt, M., Berge, R.K. and Gottlicher, M. (1994) Effects of fatty acids on gene expression mediated by a member of the nuclear receptor supergene family. *Prog Clin Biol Res*, **387**, 21-28.
- Hanif, R., Pittas, A., Feng, Y., Koutsos, M.I., Qiao, L., Staiano-Coico, L., Shiff, S.I. and Rigas, B. (1996) Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. *Biochem Pharmacol*, **52**, 237-245.
- Hawkins, R.A., Sangster, K. and Arends, M.J. (1998) Apoptotic death of pancreatic cancer cells induced by polyunsaturated fatty acids varies with double bond number and involves an oxidative mechanism. *J Pathol*, **185**, 61-70.
- Herrington, M.K., Gasslander, T., Cina, R.A., Fehsenfeld, D.M., Kazakoff, K.R., Pour, P.M. and Adrian, T.E. (1997) Effects of high-fat diet and cholecystokinin receptor blockade on promotion of pancreatic ductal cell tumors in the hamster. *Nutr Cancer*, **28**, 219-224.
- Hilakivi-Clarke, L., Onojafe, I., Raygada, M., Cho, E., Clarke, R. and Lippman, M.E. (1996) Breast cancer risk in rats fed a diet high in n-6 polyunsaturated fatty acids during pregnancy. *J Natl Cancer Inst*, **88**, 1821-1827.
- Honkakoski, P. and Negishi, M. (1997) Characterization of a phenobarbital-responsive enhancer module in mouse P450 Cyp2b10 gene. *J Biol Chem*, **272**, 14943-14949.
- Hubbard, N.E., Lim, D. and Erickson, K.L. (1998) Alteration of murine mammary tumorigenesis by dietary enrichment with n-3 fatty acids in fish oil. *Cancer Lett*, **124**, 1-7.
- James, M.J., Gibson, R.A. and Cleland, L.G. (2000) Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr*, **71**, 343S-348S.
- Johnson, E.F., Palmer, C.N., Griffin, K.J. and Hsu, M.H. (1996a) Role of the peroxisome proliferator-activated receptor in cytochrome P450 4A gene regulation.

Faseb J, **10**, 1241-1248.

Johnson, E.F., Palmer, C.N. and Hsu, M.H. (1996b) The peroxisome proliferator-activated receptor: transcriptional activation of the CYP4A6 gene. *Ann N Y Acad Sci*, **804**, 373-386.

Karmali, R.A., Reichel, P., Cohen, L.A., Terano, T., Hirai, A., Tamura, Y. and Yoshida, S. (1987) The effects of dietary omega-3 fatty acids on the DU-145 transplantable human prostatic tumor. *Anticancer Res*, **7**, 1173-1179.

Key, T. (1995) Risk factors for prostate cancer. *Cancer Surv*, **23**, 63-77.

Kim, Y., Ji, S.K. and Choi, H. (2000) Modulation of liver microsomal monooxygenase system by dietary n-6/n-3 ratios in rat hepatocarcinogenesis. *Nutr Cancer*, **37**, 65-72.

Ko, Y.J., Lii, C.K., Ou, C.C., Liu, J.Y., Lin, W.L. and Chen, H.W. (2000) Comparison of the effect of fish oil and corn oil on chemical-induced hepatic enzyme-altered foci in rats. *J Agric Food Chem*, **48**, 4144-4150.

Krey, G., Braissant, O., L'Horsset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M.G. and Wahli, W. (1997) Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol*, **11**, 779-791.

Lake, B.G. (1995) Peroxisome proliferation: current mechanisms relating to nongenotoxic carcinogenesis. *Toxicol Lett*, **82-83**, 673-681.

Ledwith, B.J., Johnson, T.E., Wagner, L.K., Pauley, C.J., Manam, S., Galloway, S.M. and Nichols, W.W. (1996) Growth regulation by peroxisome proliferators: opposing activities in early and late G1. *Cancer Res*, **56**, 3257-3264.

Lee, D.Y., Chapkin, R.S. and Lupton, J.R. (1993) Dietary fat and fiber modulate colonic cell proliferation in an interactive site-specific manner. *Nutr Cancer*, **20**, 107-118.

Lee, S.S., Pineau, T., Drago, J., Lee, E.J., Owens, J.W., Kroetz, D.L., Fernandez-Salguero, P.M., Westphal, H. and Gonzalez, F.J. (1995) Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol*, **15**, 3012-3022.

Li, D. (2001) Molecular epidemiology of pancreatic cancer. *Cancer J*, **7**, 259-265.

Li, M., Lotan, R., Levin, B., Tahara, E., Lippman, S.M. and Xu, X.C. (2000) Aspirin induction of apoptosis in esophageal cancer: a potential for chemoprevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **9**, 545-549.

Lii, C.K., Ou, C.C., Liu, K.L., Liu, J.Y., Lin, W.L. and Chen, H.W. (2000) Suppression of altered hepatic foci development by a high fish oil diet compared with a high corn oil diet in rats. *Nutr Cancer*, **38**, 50-59.

Lin, Q., Ruuska, S.E., Shaw, N.S., Dong, D. and Noy, N. (1999) Ligand selectivity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Biochemistry*, **38**, 185-190.

Lipworth, L. (1995) Epidemiology of breast cancer. *Eur J Cancer Prev*, **4**, 7-30.

Ma, X., Stoffregen, D.A., Wheelock, G.D., Rininger, J.A. and Babish, J.G. (1997) Discordant hepatic expression of the cell division control enzyme p34cdc2 kinase, proliferating cell nuclear antigen, p53 tumor suppressor protein, and p21Waf1 cyclin-dependent kinase inhibitory protein after WY14,643 ([4-chloro-6-(2,3-xylydino)-2-pyrimidinylthio]acetic acid) dosing to rats. *Mol Pharmacol*, **51**, 69-78.

Maillard, V., Bougnoux, P., Ferrari, P., Jourdan, M.L., Pinault, M., Lavillonniere, F., Body, G., Le Floch, O. and Chajes, V. (2002) N-3 and N-6 fatty acids in breast adipose tissue and relative risk of breast cancer in a case-control study in Tours, France. *Int J Cancer*, **98**, 78-83.

Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. and et al. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, **83**, 835-839.

Marc, N., Galisteo, M., Lagadic-Gossmann, D., Fautrel, A., Joannard, F., Guillouzo, A. and Corcos, L. (2000) Regulation of phenobarbital induction of the cytochrome P450 2b9/10 genes in primary mouse hepatocyte culture. Involvement of calcium- and cAMP-dependent pathways. *Eur J Biochem*, **267**, 963-970.

Miles, C.S., Ost, T.W., Noble, M.A., Munro, A.W. and Chapman, S.K. (2000) Protein engineering of cytochromes P-450. *Biochim Biophys Acta*, **1543**, 383-407.

Miller, A.B. (1990) Diet and cancer. A review. *Acta Oncol*, **29**, 87-95.

Motojima, K., Passilly, P., Peters, J.M., Gonzalez, F.J. and Latruffe, N. (1998) Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. *J Biol Chem*, **273**, 16710-16714.

Moya-Camarena, S.Y., Van den Heuvel, J.P. and Belury, M.A. (1999) Conjugated linoleic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha and beta subtypes but does not induce hepatic peroxisome proliferation in Sprague-Dawley rats. *Biochim Biophys Acta*, **1436**, 331-342.

Nemali, M.R., Usuda, N., Reddy, M.K., Oyasu, K., Hashimoto, T., Osumi, T., Rao, M.S. and Reddy, J.K. (1988) Comparison of constitutive and inducible levels of expression of peroxisomal beta-oxidation and catalase genes in liver and extrahepatic tissues of rat. *Cancer Res*, **48**, 5316-5324.

O'Connor, T.P., Roebuck, B.D., Peterson, F. and Campbell, T.C. (1985) Effect of dietary intake of fish oil and fish protein on the development of L-azaserine-induced preneoplastic lesions in the rat pancreas. *J Natl Cancer Inst*, **75**, 959-962.

O'Connor, T.P., Roebuck, B.D., Peterson, F.J., Lokesh, B., Kinsella, J.E. and Campbell, T.C. (1989) Effect of dietary omega-3 and omega-6 fatty acids on development of azaserine-induced preneoplastic lesions in rat pancreas. *J Natl Cancer Inst*, **81**, 858-863.

Okamoto, M., Reddy, J.K. and Oyasu, R. (1997) Tumorigenic conversion of a non-tumorigenic rat urothelial cell line by overexpression of H₂O₂-generating peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. *Int J Cancer*, **70**, 716-721.

Onodera, H., Matsushima, Y., Uneyama, C., Shibutani, M., Mitsumori, K., Maekawa, A. and Hayashi, Y. (1991) [Dose-response relationship of promotion by phenobarbital in rat two-stage hepatocarcinogenesis]. *Eisei Shikenjo Hokoku*, 55-60.

Peters, J.M., Aoyama, T., Cattley, R.C., Nobumitsu, U., Hashimoto, T. and Gonzalez, F.J. (1998) Role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in altered cell cycle regulation in mouse liver. *Carcinogenesis*, **19**, 1989-1994.

Peters, J.M., Cattley, R.C. and Gonzalez, F.J. (1997) Role of PPAR alpha in the mechanism of action of the nongenotoxic carcinogen and peroxisome proliferator Wy-14,643. *Carcinogenesis*, **18**, 2029-2033.

Plant, N.J., Horley, N.J., Savory, R.L., Elcombe, C.R., Gray, T.J. and Bell, D.R. (1998) The peroxisome proliferators are hepatocyte mitogens in chemically-defined media: glucocorticoid-induced PPAR alpha is linked to peroxisome proliferator mitogenesis. *Carcinogenesis*, **19**, 925-931.

Potter, J.D. (1995) Risk factors for colon neoplasia--epidemiology and biology. *Eur J Cancer*, **31A**, 1033-1038.

Ramsden, R., Beck, N.B., Sommer, K.M. and Omiecinski, C.J. (1999) Phenobarbital responsiveness conferred by the 5'-flanking region of the rat CYP2B2 gene in transgenic mice. *Gene*, **228**, 169-179.

Raunio, H., Husgafvel-Pursiainen, K., Anttila, S., Hietanen, E., Hirvonen, A. and Pelkonen, O. (1995) Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility--a review. *Gene*, **159**, 113-121.

Reddy, B.S., Burill, C. and Rigotty, J. (1991) Effect of diets high in omega-3 and omega-6 fatty acids on initiation and postinitiation stages of colon carcinogenesis. *Cancer Res*, **51**, 487-491.

Ren, B., Thelen, A.P., Peters, J.M., Gonzalez, F.J. and Jump, D.B. (1997) Polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic fatty acid synthase and S14 gene expression does not require peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem*, **272**, 26827-26832.

Roberts, R.A. (1996) Non-genotoxic hepatocarcinogenesis: suppression of apoptosis by peroxisome proliferators. *Ann NY Acad Sci*, **804**, 588-611.

- Rodriguez, J.C., Gil-Gomez, G., Hegardt, F.G. and Haro, D. (1994) Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. *J Biol Chem*, **269**, 18767-18772.
- Sasaki, T., Kobayashi, Y., Shimizu, J., Wada, M., In'nami, S., Kanke, Y. and Takita, T. (1998) Effects of dietary n-3-to-n-6 polyunsaturated fatty acid ratio on mammary carcinogenesis in rats. *Nutr Cancer*, **30**, 137-143.
- Schoonjans, K., Watanabe, M., Suzuki, H., Mahfoudi, A., Krey, G., Wahli, W., Grimaldi, P., Staels, B., Yamamoto, T. and Auwerx, J. (1995) Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J Biol Chem*, **270**, 19269-19276.
- Sellmayer, A., Danesch, U. and Weber, P.C. (1997) Modulation of the expression of early genes by polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **57**, 353-357.
- Simopoulos, A.P. (2000) Human requirement for N-3 polyunsaturated fatty acids. *Poult Sci*, **79**, 961-970.
- Stark, A.A., Zeiger, E. and Pagano, D.A. (1993) Glutathione metabolism by gamma-glutamyltranspeptidase leads to lipid peroxidation: characterization of the system and relevance to hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, **14**, 183-189.
- Strange, J. and Roberts, R.A. (1996) Reduced expression of mature TGF beta 1 correlates with the suppression of rat hepatocyte apoptosis by the peroxisome proliferator, nafenopin. *Mutat Res*, **372**, 107-113.
- Sueyoshi, T., Kawamoto, T., Zelko, I., Honkakoski, P. and Negishi, M. (1999) The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. *J Biol Chem*, **274**, 6043-6046.
- Szklarz, G.D. and Halpert, J.R. (1998) Molecular basis of P450 inhibition and activation: implications for drug development and drug therapy. *Drug Metab Dispos*, **26**, 1179-1184.
- Takahashi, M., Tsuboyama-Kasaoka, N., Nakatani, T., Ishii, M., Tsutsumi, S., Aburatani, H. and Ezaki, O. (2002) Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPARalpha activation and ROS production. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **282**, G338-348.
- Tamatani, T., Hattori, K., Nakashiro, K., Hayashi, Y., Wu, S., Klumpp, D., Reddy, J.K. and Oyasu, R. (1999) Neoplastic conversion of human urothelial cells in vitro by overexpression of H2O2-generating peroxisomal fatty acyl CoA oxidase. *Int J Oncol*, **15**, 743-749.
- Tisdale, M.J. (1993) Mechanism of lipid mobilization associated with cancer cachexia: interaction between the polyunsaturated fatty acid, eicosapentaenoic acid, and

inhibitory guanine nucleotide-regulatory protein. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **48**, 105-109.

van Iersel, M.L., Verhagen, H. and van Bladeren, P.J. (1999) The role of biotransformation in dietary (anti)carcinogenesis. *Mutat Res*, **443**, 259-270.

Wang, M., Abbruzzese, J.L., Friess, H., Hittelman, W.N., Evans, D.B., Abbruzzese, M.C., Chiao, P. and Li, D. (1998) DNA adducts in human pancreatic tissues and their potential role in carcinogenesis. *Cancer Res*, **58**, 38-41.

Waxman, D.J. (1999) P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys*, **369**, 11-23.

Wenger, F.A., Kilian, M., Mautsch, I., Jacobi, C.A., Steiert, A., Peter, F.J., Guski, H., Schimke, I. and Muller, J.M. (2001a) Influence of octreotide on liver metastasis and hepatic lipid peroxidation in BOP-induced pancreatic cancer in Syrian hamsters. *Pancreas*, **23**, 266-272.

Wenger, F.A., Kilian, M., Ridder, J., Stahlknecht, P., Schimke, I., Guski, H., Jacobi, C.A. and Muller, J.M. (2001b) Influence of antioxidative vitamins A, C and E on lipid peroxidation in BOP-induced pancreatic cancer in Syrian hamsters. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **65**, 165-171.

Willson, T.M. and Wahli, W. (1997) Peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Curr Opin Chem Biol*, **1**, 235-241.

Wormhoudt, L.W., Commandeur, J.N. and Vermeulen, N.P. (1999) Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Crit Rev Toxicol*, **29**, 59-124.

Yeldandi, A.V., Rao, M.S. and Reddy, J.K. (2000) Hydrogen peroxide generation in peroxisome proliferator-induced oncogenesis. *Mutat Res*, **448**, 159-177.