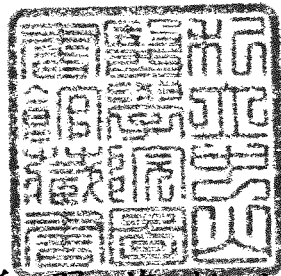


R
008.8
1160

私立中山醫學院生物化學研究所碩士論文

亞硝酸化梅納反應物對小白鼠癌促進作用及其
分子機制之研究

Tumor promoting effect and the mechanism of
action of nitrosated Maillard reaction product in
mouse skin



指導教授：曾翠華教授 (Tsui-Hwa Tseng)

研究生：張明誠 (Ming-Cheng Chang)

參考書恕不外借

中華民國八十六年八月

中山醫學院圖書館



C046156

授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在中山醫學院生物化學研究所
組 86 學年度第 2 學期所撰碩士學位論文。

論文名稱：亞硝酸化梅納反應物對小白鼠癌促進作用及其分子機制之研究

同意 不同意
本國家網路或
人具科，本
家路，紙
網，本
重製
與製
台發
行
財會
產科
權學
之技
論網
文資
提路
要中
，心
授，得
予重
國製
家製
圖成
書電
館子
、資
本料
人檔
畢後
業收
學錄
校於
及該
行單
政位
院之
以光
碟

同意 不同意
本資縮佰至
人料縮元
具中小之
心組服
不有
同著
意作
財不
產限
權地
之域
論時
文間
全與
資次
料以
，微
授縮
予、
行博
政光
院重
國製
家後
科發
學行
委，
員並
會得
科享
學該
技中
術伍
心後
延

同意 不同意
本業人
人業人
具學以
不有
同著
意作
財不
產限
權地
之域
論時
文間
全與
資次
料以
，微
授縮
予、
行博
政光
院重
國製
家後
科發
學行
委，
員並
會得
科享
學該
技中
術伍
心後
延

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研究利用均為無償。

指導教授姓名：曾翠華

研究生簽名：張明誠 學號：R84207
(親筆正楷)

日期：民國 86 年 8 月 27 日

備註：1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。
3. 本授權書已於民國 85 年 4 月 10 日送請著委會修正定稿。

簽署人須知

1. 著作權法規定，任何人單位以網路、光碟、微縮等方式的整合國內學術資料，妥當授權他人，並可授權他人專授。您已簽署，如使用權，如非專屬授權，即為專權。並即為專權。並即為專權。
2. 著作權法規定，任何人單位以網路、光碟、微縮等方式的整合國內學術資料，妥當授權他人，並可授權他人專授。您已簽署，如使用權，如非專屬授權，即為專權。並即為專權。並即為專權。
3. 著作權法規定，任何人單位以網路、光碟、微縮等方式的整合國內學術資料，妥當授權他人，並可授權他人專授。您已簽署，如使用權，如非專屬授權，即為專權。並即為專權。並即為專權。
4. 著作權法規定，任何人單位以網路、光碟、微縮等方式的整合國內學術資料，妥當授權他人，並可授權他人專授。您已簽署，如使用權，如非專屬授權，即為專權。並即為專權。並即為專權。
5. 著作權法規定，任何人單位以網路、光碟、微縮等方式的整合國內學術資料，妥當授權他人，並可授權他人專授。您已簽署，如使用權，如非專屬授權，即為專權。並即為專權。並即為專權。

研究生姓名：張明誠 聯絡電話：(02) 921-0636
 地址：北縣永和市青安街7巷7號3F

本論文為中山醫學院授予理學碩士學位之必備條件之一，
經中山醫學院生化研究所碩士論文考試委員會審查合格及
口試通過。

口試委員

國立台灣大學醫學院
生物化學研究所教授

林仁混

國立台灣大學醫學院
毒理學研究所副教授

郭明良

私立中山醫學院生物化學研究所
教授兼所長

王朝錫

私立中山醫學院生物化學研究所
教授

朱嘉一

私立中山醫學院生物化學研究所
教授

曾翠華

(本論文指導教授)

學生張明誠，論文題目為亞硝酸化梅納反應物對小白鼠癌促進作用及其分子機制之研究，其論文已經中山醫學院生物化學研究所論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：

曾翠華 教授

簽名：

曾翠華

中華民國八十六年八月

感言與誌謝

實在是不想寫這一篇感言！彷彿就像要收拾東西，離開這個實驗室。逃避了很久，也還是到了非寫不可的時候了。在我打開起電腦，開始寫起這一篇文章，五年的點點滴滴，又好像全都湧上我的思緒。五年前，我還是一個大學部的學生時，鼓起勇氣走向老師的辦公桌前，向老師提出想進實驗室的要求。接著開始第一次剃老鼠皮膚的毛，第一次殺老鼠，第一次做放射線，一切的一切彷彿又將我拉回五年前那個夏日的午後。對當時的我來說，實驗室是一種充滿了神祕的地方。認真而冷酷的學長姐，一台又一台不知道做什麼的機器，以及總是坐在最裡面那個既黑暗又潮濕位置上的老師。說實是在實驗室中跟大家相處的時間越來越久，心中的感覺也在越覺得溫暖。生化科老師的笑聲，老闆的關懷，都讓我的深深的體會到這個有著大家庭感覺般的實驗室是多麼的充滿朝氣與活力！我放了五年的時間在這裡，從學士到碩士，我不僅是學到了一個碩士研究生所應該擁有的技術與知識；更重要的，我也學會了如何與人相處及擁有了更多的朋友。如今，我又即將遠離這個修業的場所，從碩士到博士。我想學的，想要去實現的，都將以這個實驗室中的一切做為跳板。我將驕傲的說，這裡是我最初的鍛鍊地，也將會是我研究生涯中最好的回憶。

這篇論文的完成，的確是花了不少的心血。在王朝鐘教授殷切的指導，曾翠華教授細心的教誨下，使本篇論文能呈現出最完整的風貌。也有幸的承蒙台大醫學院林仁混教授及郭明良博士的指正，精闢的論點真使我受益非淺。我也感謝朱嘉一教授在百忙之中也提供許多寶貴的意見，讓我從更多方面來從事未來的研究。此外，也感謝許振東醫師、溫寶香學姊也在病理切片上提供了許多的幫助。另外，生化科的周芬碧老師、林玉玲與妙

真學姊，也由於妳們的幫助，使我有能力獨自完成這些實驗。還有實驗室中的夥伴，華彬、怡君、清麟、光坪、達偉、元志、滄澤。沒有你們，實驗室就會缺乏了活動力，也只有你們更加的努力，實驗室中才會有更好的成績。願互相共勉。

最後，我要以慚愧的心，向已經在家裡等了我六年的母親說謝謝。從我父親過世後，她不要求我趕快出社會養家，一直鼓勵我積極向上來努力，而獨自一人負擔家中龐大的生活家計。就像我以前在自傳中所寫的，我不後悔走向這條研究的路。今後，我也將秉持著這種信念，積極而努力的去面對所有的挑戰。

僅以此論文獻給我的家人：我敬愛的母親、認真的妹妹、陪伴我兩年的玉娟、以及一直在天保佑這個不肖子的父親。

目錄

第一章	緒論	1
第二章	材料與方法	
	第一部分 NO-NTA 的動物實驗模式	8
	第二部分 NO-HNTA 的動物實驗模式	17
第三章	結果	
	第一部分 NO-NTA 的動物實驗模式結果	23
	第二部分 NO-HNTA 的動物實驗模式結果	26
第四章	討論	29
第五章	緒論	31
第六章	實驗方法	36
第七章	結果	
	第一部分 NO-NTA 的促癌分子機制結果	44
	第二部分 NO-HNTA 的促癌分子機制結果	47
第八章	討論	50
第九章	NO-HNTA 結構的鑑定	53
	附圖	56
第十章	參考文獻	104

中文摘要

一種常發生在食品製備、儲存、及烹調的過程中所產生在還原糖及胺基酸之間的一種重要反應—梅納反應，在其反應過程中會產生許多的產物，皆具有致突變性及毒性。而大部分的亞硝酸化合物亦具有致癌性，故推測亞硝酸化梅納反應產物亦具有致癌性。在經過二十種胺基酸的篩選，NO-NTA 及 NO-HNTA 是其中兩種具有很強致突變性的產物。我們利用質譜儀、核磁共振儀、紅外光掃描儀來鑑定出其中 NO-HNTA 的結構。又利用了兩階段式的致癌原理找出是否 NO-NTA 及 NO-HNTA 真的在動物體上具有致癌的效果。包括觀察老鼠皮膚的腫瘤實驗、發炎及水腫的反應、是否有過氧化氫的生成及鳥胺酸脫縮酵素的活性，並測定如脊髓內過氧化酵素的活性。在這些實驗中可以得知包括 NO-NTA 及 NO-HNTA 都有促進癌化的現象。這些證據都顯示出 NO-NTA 及 NO-HNTA 是一種新的腫瘤的促進劑。

在更進一步的實驗中，我們也檢查了由 NO-NTA 及 NO-HNTA 他們致癌作用的分子機制。包括測定蛋白激酶 C 是否有活化的現象，並測定一些致癌蛋白的表現量。結果發現蛋白激酶 C 的表現量有增加的現象，並有發生轉位的情形。而包括 c-Jun、c-Fos 及 c-Myc 等的致癌蛋白的表現量也有呈現出一種時間及濃度關係的現象。這些結果都顯示出 NO-NTA 及 NO-HNTA 都具有引起癌症發生的效果，且其引起癌症發生的機制是活化了蛋白激酶 C 的活性並促使其大量的表現，並引起一些原致癌基因的活化，如 c-Jun、c-Fos 及 c-Myc，進而引起其致癌作用的發生。

英文摘要

N-nitroso-N-(3-keto-1,2-butanediol)-3'-nitrotyramine (NO-NTA) and NO-HNTA is a product of model browning system in the presence of sodium nitrite. The chemical structure of this has been confirmed by spectroscopic methods, including UV, mass, nuclear magnetic resonance and infrared in our previous study. A genotoxic effect of NO-NTA on primary culture rat hepatocyte was observed. The results also demonstrate that topical application of NO-NTA and NO-HNTA caused tumor promotion in the skin of mice initiated with benzo(a)pyrene. The results also demonstrate that NO-NTA and NO-HNTA was treated topically to mouse skin caused inflammation, hyperplasia, H_2O_2 production and increase the activities of myeloperoxidase and ornithine decarboxylase, which are effects of NO-NTA and NO-HNTA associated with tumor promotion. These results indicate that NO-NTA and NO-HNTA possesses potential as a new tumor promotor.

Furthermore study, we examined the molecular mechanism of the NO-NTA and NO-HNTA tumor promotion effect by measuring the activity of protein kinase C (PKC) and the expression of the c-jun and c-fos protein in response to NO-NTA and NO-HNTA topical treatment in CD-1 mouse skin. When mouse skin were treated with NO-NTA and NO-HNTA, PKC translocated from cytosolic fraction to the particulate fraction. Elevation of NO-NTA and NO-HNTA-induced expressions of c-jun and c-fos protein was also observed in mouse epidermis. Our results provided evidence for a molecular mechanism of NO-NTA and NO-HNTA medicated tumor promotion in which induced PKC activity, translocation and expression of the c-jun and c-fos.

縮寫表

BCIP	: 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
BSA	: Bovine serum albumin
DAG	: Diacylglycerol
DEAE	: DEAE-cellulose
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
EDTA	: Ethylene diamine tetraacetic acid
EGTA	: Ethylene glycol bis (β -aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraacetic acid
NBT	: Nitrobluetetrazolium
PKC	: Protein kinase C
PMSF	: Phenylmethylsulfonyl fluoride
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
TEMED	: Tetramethyl ethylenediamine
TPA	: 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate

第一章

緒論

一．前言

梅納反應產物 (Maillard reaction products) 在早期許多研究中顯示具有致突變性及動物毒性。此種反應在一般含有還原糖及胺基酸或蛋白質的食品，在經過如加熱、滅菌、或是利用長期保存的過程中經常會發生。又由於亞硝酸鹽是一種廣泛地存在於各類食品中的保鮮劑，而許多的研究也已經證實了亞硝酸鹽具有很強的致癌性，加上食品中同時含有還原糖、胺基酸、亞硝酸鹽類的機率相當高，故本實驗是在探討在還原糖，胺基酸及亞硝酸鹽類三者同時存在的情況下，所產生的亞硝化梅納反應產物對於實驗動物之癌症促進 (Tumor promotion) 作用及其對於癌症促進作用之分子機制。

二 . 梅納反應產物之歷史背景

法國化學家 Louis Camille Maillard 在 1912 年發現，當甘胺酸及葡萄糖一起加熱時，會由於甘胺酸中的胺基與葡萄糖中的羰基反應而生成一種褐色物質 (1)。這種反應並不需要任何酵素參與催化，Maillard 特別將此種反應命名為梅納反應 (Maillard reaction)。目前梅納反應廣泛地應用於食品工業上，如焦糖製備 (2)，巧克力製作工業 (3)，咖啡烘焙工業 (4)，麵包製作 (5) 及一些食品加工上，對於食品中的色澤、香味、品質之變化十分地重要，是食品工業最重要的反應之一。

梅納反應之褐變過程根據 Hodge (6) 的研究可以分為三個階段，分別是起始期，中間期及最終期，如圖一所示。以下將逐一的分別說明之。

(A). 起始期

起始期的梅納反應第一步驟會使還原糖的羰基 (carbonyl group) 與胺基酸的胺基進行可逆縮和反應 (condensation)，並很快地失去一分子的水，然後轉變成為 Schiff base 的衍生物，再經環化作用生成 N-substituted glycosylamino compounds，進而產生 amadori 化合物，經重組作用而生成 1-amino-1-deoxy-2-ketone，這是一種不可逆的反應(如附圖二)。

(B). 中間期

中間期的梅納反應為 amadori 化合物到 melanoidin 形成之階段，其反應包括三種不同的步驟：

1. 第一反應是從 amadori 化合物開始，以 2-

furfur-aldehyde 為主要的產物。

2. 第二反應途徑是從 amadori 化合物開始，經由不可逆之 2,3- enolization 作用，形成 aldehyde、furans、pyrroles，及 thiophenes 等。
3. 第二反應途徑是胺基酸之 Strecker degradation。

中間期的梅納反應之最後階段會形成相當多的雜環化合物，包括含氮雜環化合物、含硫雜環化合物、含氧雜環化合物等不同的結構，在此階段所形成的褐色先驅物，是梅納反應的主要褐變階段。

(C). 最終期

最終期的梅納反應是產生褐變 melanoidin 色素，而這種色素的生成乃是由於中間期的許多化合物經由高度的聚合作用所形成，另外尚有 aldol condensation，及一些異環狀含氮雜環化合物的褐變作用。

三．梅納反應產物之生物效應

在許多的研究中指出在經過梅納反應之後會使食物中的必需胺基酸流失，產生一些抗營養物質及生成一些有毒的化合物，使食物的營養價值降低 (7)。若長期給予老鼠食用梅納反應產物，會使老鼠發生生長發育遲緩的現象 (8,9)。另外在根據其他許多位學者的研究，也已經證實了梅納反應產物的確會產生一些毒性效應 (10-13)。舉一個例子來說，若將梅納反應產物之一的焦糖 (caramels) 以短期或是長期的方式讓老鼠來食用，會造成老鼠的淋巴球減少 (lymphocytopenia) 及淋巴球的破片增加 (14,15)。而梅納反應其他的產物所造成的細胞毒性，如 furfural 會造成兔子的骨髓發育不全 (hypoplasia) (16)。經過高溫處理的梅納反應產物，如 creatine 或 creatinine 及甘胺酸與各種糖類在 180 °C 反應 10 到 15 分鐘 (17)，或將 20 種胺基酸與糖類在 100 °C 共熱，再以 *S. typhimurium* strains TA98 及 TA100 作 Ame's 試驗 (18)，都可以發現其產物具有致突變性。在食品中如咖啡中的 diacetyl，glyoxal 和 methylglyoxal (19,20)，不但其產物具有致突變性，也與胰臟癌有間接的關係。因此，在食品加工工業中佔有相當重要地位的梅納反應，其產物在細胞毒性與動物毒性的致癌作用上，也扮演著相當重要的角色。

四．食品中的硝酸鹽 (Nitrate) 及亞硝酸鹽類 (Nitrite)

人類癌症的發生和其每日的飲食有很重要的關連 (21)。硝酸鹽是一種普遍存在於蔬菜(如甘藍、萵苣、菠菜)中的化合物 (22)。當這類蔬菜類的食品上消化道被人體所吸收後，硝酸鹽便會經由血液到達唾腺，並在唾液腺中被還原成亞硝酸鹽類 (23,24)。這些亞硝酸鹽類會隨即地被吞入胃中，而在像胃酸這類強酸的情形下，這些食物中的硝酸鹽及亞硝酸鹽會與其他食物中的胺基酸進行亞硝化反應 (nitrosation)，而產生許多的亞硝基化合物，進一步地去達到促癌的機制 (25)。

另外一方面，利用硝酸鹽及亞硝酸鹽來保存食品也已經有幾十年的歷史了 (26)。起先是用做抑制肉品中微生物的生長，且能增加食物中鮮紅的色澤。到目前為止，各種不同的亞硝酸化合物或硝酸化合物處理在許多不同的動物體中，都已經被證實具有致突變性及致癌性 (27)。並且在流行病學的調查報告中也指出亞硝酸化合物或硝酸化合物和人類的癌症有關 (28)。以亞硝酸鈉為例，當用亞硝酸鈉處理老鼠的 BABL/c3T3 細胞 72 小時後，繼續培養該細胞成爲轉形細胞，再將該轉形細胞注射於裸鼠體內，會導致裸鼠的惡性轉移 (29)。而在將亞硝酸鈉及 chlordiazepoxide 於酸性下所形成的複合物，將之餵食老鼠，發現會使老鼠的 DNA 受損 (30)。若單獨以亞硝酸鈉餵食雄性 F344 老鼠 115 週，會使其體重下降，紅血球及血紅素減少，並有淋巴瘤 (lymphoma) 產生 (31)，這些證據顯示亞硝酸鈉具有慢性毒性及致癌性。

五．亞硝酸化梅納反應產物之毒性

梅納反應過程中產生了許多成份，而這些成份很可能容易和亞硝酸鹽及硝酸鹽類起作用成亞硝酸化反應。因此，在近幾年來對於由褐變產物與亞硝酸鹽類所形成的 N-nitroso 化合物之致突變性引起了相當大的重視，已經有實驗證明指出梅納反應產物是很容易和亞硝酸鹽類離子作用 (32)，利用胺基酸，還原糖及亞硝酸鹽類共同反應之產物也證明有致突變性，如 amadori 化合物，本身無致突變性，但由於其為弱鹼性二級胺類，且廣泛地存在各類食物中，它很容易與亞硝酸鹽類形成 N-nitroso amadori 化合物，而某些 amadori 化合物如 fructose-L-tryptophan 和亞硝酸鹽類反應後會形成很強的致突變物。當以純的亞硝酸化的 fructose-L-tryptophan 加入 Hela S3 的人類細胞時 (33)，或加入 *S. typhimurium* strains TA98 和 TA100 時，都證明其產物具有致突變性。另外，由葡萄糖、乳糖、或果糖及離胺酸 (lysine) 共同反應生成的梅納反應產物--2-acetylpyrrole (AP) (34-36)，與亞硝酸鹽類一起反應時，其致突變性已經被證實 (37)，而其反應所形成的衍生物 nitro-pyrrole 化合物，如：1-nitro-2-acetylpyrrole (NAP) 及 1,3,5-trinitro-2-acetylpyrrole (TNAP) 在加入 *Salmonella* TA98 和 TA100 的菌株中，也發現具有致突變性，對於 C3H10T1/2 細胞也具有細胞毒性 (38)。

六．研究目的

由於梅納褐變產物極可能與亞硝酸鹽共存於我們的日常食品中，但是對於其在加工貯存過程中，甚至在代謝過程的交互作用，其在目前的資料仍相當的缺乏。在梅納反應產物及亞硝酸鈉分別存在時，他們對生物體都各自具有毒性及致突變性，而且亞硝酸鹽在胃酸或酸性的情形下更容易形成氮-亞硝酸化合物。由於之前在我們實驗室已經證實了亞硝酸化梅納反應產物具有很強的細胞及基因毒性 (39)，故本研究的目的是想了解這種具有細胞及基因毒性的化合物是否也能應用在動物促癌作用實驗的模式上，並想更進一步的了解亞硝酸化梅納反應物究竟是如何導致促癌作用的分子機制。

第二章

材料與方法

第一部分 亞硝酸化梅納反應物 NO-NTA

一、動物來源

CD-1 (ICR) strain 雌性小白鼠(約六周大)購自臺大醫院動物中心，使用前至少飼養於動物房一周。在動物房中以 Purina Lab Chow 為飼料，蒸餾水不限制飲用，並維持在 12 小時亮及 12 小時暗的循環中。藥物處理前至少兩天以電動除毛刀剃除老鼠背部的毛，老鼠必須無毛髮痕跡才可以使用。

二、化學試劑

DL-[¹⁴C]ornithine (55 mCi/mmol)購自 Amershan 公司 (U.K.)， benzo[a]pyrene (B[a]P)， dithiothreitol， bovine serum albumin， sodium nitrite， dextrose， tyrosine 購自 Sigma 化學公司 (St. Louis, MO, USA)。而蛋白質濃度測定組則購自 KENLOR 公司。

三、亞硝酸化梅納反應物的製備

亞硝酸鹽梅納反應產物的製備是根據 Huang 等的方法 (39)。以 sodium nitrite， dextrose， tyrosine 在

37°C 的條件下於 SSC 溶液中反應 24 小時，再將反應後的溶液用二氯甲烷 (Dichloromethane) 萃取兩次，此時為粗萃取液。將粗萃取液通以 silica gel column，所純化的濾液分別用試管來收集。接著將收集到的濾液用冷凍乾燥的方式乾燥。所得到的 sample 再以薄層色層分析來確認其純度及收集所要的溶液。

四、老鼠皮膚的腫瘤研究

根據兩步驟的致癌實驗方式 (2-stage oncogenic protocol) 來證明一個化合物對動物體是否具有致突變性必須包含著幾種不同的實驗，包括是否會直接引起腫瘤的生成、發炎反應、上皮增生、鳥胺酸脫羧酶的增加、過氧化氫及脊髓內過氧化酶的反應 (40)。接著就是根據這些重點來做致癌性的研究。

(一) 動物分組

六周大的 CD-1 雌鼠以隨機分組分成五組，每組 15 隻，每隻都以電動除毛刀剃去背部的毛，並在背部塗抹藥物以觀察腫瘤的生長。各組給藥的情形是：Group I 為控制組，只給予 200 μ l acetone；Group II 則給予 initiator B[a]P (20 nmol，溶於 200 μ l acetone)，每週一次，持續 10 週；Group III 則是以 20 nmol B[a]P 當 initiator，每週給予一次，持續 10 週；此外，在給予 B[a]P 後一週，則開始給予 10 μ mol NO-NTA (溶於 200 μ l acetone)，每週 2 次，持續 20 週；Group IV 也是以 20 nmol B[a]P 當 initiator，每週給予一次，持續 10 週，只是在給予 B[a]P 後一週後則開始給予 50 μ mol NO-NTA (溶於 200 μ l acetone)，每週 2 次，持續 20 週；Group V 處理方法如 Group IV，只是 NO-NTA 的濃度提高為 250 μ mol。(實驗流程如 Figure 3)

(二) 測量方法

本實驗參照 Huang 等 (41) 的方法來測量，每隔兩週觀察一次老鼠皮膚上腫瘤生長的情形，以量尺在固定

面積內(面積計算公式: $A = \pi / 6 \times D1 \times D2$)量取直徑大於 1mm 的腫瘤才可列入計算並紀錄下來，共紀錄 21 週，結果以 Tumors / mouse 及 percentage / mice with tumors 來表示。

五、老鼠耳朵水腫測試

老鼠耳朵水腫的發炎作用以 NO-NTA 引起的老鼠耳朵水腫之實驗方法來測知。

(一) 動物分組

同樣以 CD-1 female mice 隨機分為 10 組，Group I 為控制組，只給予 20 μ l acetone；Group II 給予 20nmol 的 B(a)P；Group III 至 VI 則是分別給予 0.2、1.0、5.0 及 25.0 μ mol NO-NTA；Group VII 至 X 則是給予 20nmol 的 B(a)P 及四種不同濃度的 NO-NTA。

(二) 測試方法

本實驗參照 Huang 等 (42) 的方法作修定後來作測試，在 CD-1 雌鼠的右耳以藥物塗抹，塗抹完畢 5 小時後，將老鼠斷頸犧牲，接著將右耳藥物處理部份以打洞機打出直徑約 6mm 的切割部份，將此切割部份拿來稱重、平均，結果以 Mean \pm SE 來表示，加藥後增加的重量則可反應發炎的程度。

六、以 NO-NTA 處理之老鼠皮膚的形態改變測試

(一) 動物分組

CD-1 品系小白鼠以隨機方式分為四組，每組 6 隻，在老鼠背上剃毛，兩天之後，給予藥物處理，各組給藥情形是：Group I 為控制組，只給予 200 μ l acetone；Group II 給予 200 μ l, 10 μ mol NO-NTA；

Group III 給予 $200 \mu\text{l}$, $50 \mu\text{mol}$ NO-NTA ; Group IV 則處理 $200 \mu\text{l}$, $250 \mu\text{mol}$ NO-NTA 。

(二) 測試方法

本實驗參照 Huang 等(42)的方法來偵測，將藥物塗抹於老鼠皮膚，一天兩次，連續四天，在最後一次給藥後 18 小時，將老鼠斷頸犧牲，取下約 $2\text{cm} \times 2\text{cm}$ 的背部皮膚，立即浸泡於 10% neutral buffered formalin 中固定，然後作 H&E stain 及 immunohistochemistry stain。H&E stain 與 immuno stain 的方式分述如下：

A. H&E stain :

1. 脫蠟後，以紫蘇木 (Hematoxylin) 溶液染 2-15 分鐘。(時間可長可短，視紫蘇木溶液之不同而異)
2. 以水浸洗。
3. 以 0.5% 鹽酸溶液行分辨染色色度，約 1-5 秒。
4. 浸入氨水(水 1000 ml 中滴入氨水 2 滴)至組織呈現藍色，約須數秒。
5. 於流水中清洗，至少須 15 分鐘。
6. 染以 0.5% 伊紅 Y 溶液，數秒至 2 分鐘。
7. 依次通過 80%，90%，95% 酒精。
8. 移入 100% 酒精，二甲苯-100% (1:1)，二甲苯-木餾油 (4:1)，二甲苯(I)，二甲苯(II)各半分鐘。
9. 以二甲苯使之透明。
10. 封蓋。

B. Immunohistochemistry stain :

1. 將包埋在蠟中的組織切片置入已預熱至 56°C 的烘箱中脫蠟。
2. 將已加熱的切片依照順序移至純的二甲苯，絕對酒精，95% 酒精中各五分鐘。
3. 將切片以二次水沖洗十分鐘。
4. 將切片移至 Tris buffer (0.05M, pH 7.8; NaCl 0.15M. 再加入 1ml Triton X-100/1000ml) 中五分鐘。
5. 將 citrate buffer 以微波爐加熱至沸騰。

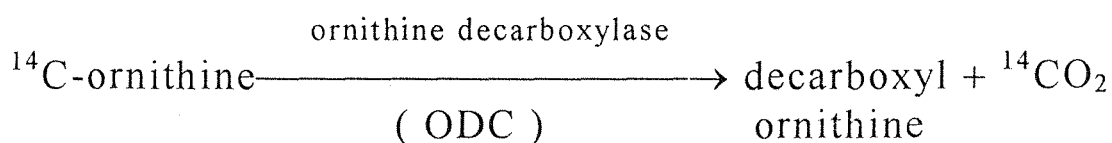
6. 將已脫蠟完全的切片移至煮沸中的 citrite buffer，再繼續加熱五分鐘。
7. 待玻片自動降溫至室溫。
8. 將玻片取出後以二次水沖洗。
9. 用 Tris buffer 沖洗五分鐘。
10. 用 3% 的 H₂O₂ 沖洗五至十分鐘。
11. 將玻片取出後以二次水沖洗。
12. 用 Tris buffer 沖洗五分鐘。
13. 在玻片上加入第一次抗體反應 20 至 40 分鐘。
14. 將玻片取出後以二次水沖洗。
15. 用 Tris buffer 沖洗五分鐘。
16. 在玻片上加入第二次抗體反應 30 分鐘。
17. 將玻片取出後以二次水沖洗。
18. 用 Tris buffer 沖洗五分鐘。
19. 在玻片上加入 Biotin ligand 反應 30 分鐘。
20. 將玻片取出後以二次水沖洗。
21. 用 Tris buffer 沖洗五分鐘。
22. 加入 DAB 呈色劑在室溫下反應五分鐘。
23. 以二次水清洗五分鐘。
24. 加入 Hematoxylin 以染背景，但染色的時間不能超過一分鐘。
25. 以二次水清洗五分鐘。
26. 將已染色的玻片置於 95% 的酒精。
27. 將玻片置於絕對酒精鐘五分鐘以脫水。
28. 將玻片滴上 xylene。
29. 用封片膠來封片。

本實驗的結果表示方法共分 4 部份，發炎細胞 (leukocyte) 浸潤 (infiltration) 的情形乃是藉著與溶劑控制組 (acetone control) 比較上皮中單核發炎細胞 (mononuclear inflammation cells) 的 diffuse infiltration，結果以輕微 (slight, +)、中度 (moderate, ++) 及重度 (severe, +++) 來表示；細胞間的水腫 (intercellular edema, 即上皮細胞間體液的堆積) 則以存在或不存在來計數；細胞層數則是每一片切片中隨機選取 5 處來計

算並平均；非角質細胞層厚度則是利用類似前述方法來計算，結果以 Mean \pm SE 來表示。本實驗使用顯微鏡放大 40 倍(物鏡 \times 目鏡)來觀察。

七、鳥胺酸脫羧酶活性測試(ornithine decarboxylase, ODC)

ODC 乃是皮膚癌早期的一種指標，若 ODC 的濃度升高，則暗示著可能引起皮膚癌。其測定的原理為：



至於測定的方法則是參考以往文獻(42-44)修定而成，其實驗步驟為：

(一) 動物分組

CD-1 品系小白鼠被隨機分成 9 組，每組 6 隻，剃除背部的毛之後再將藥物塗抹於背部，至於各組的處理則為：Group I，不給予任何的處理，是為正常控制組；Group II，只給予 200 μ l 溶劑 (acetone) 當作溶劑控制組；Group III 只給予 20 nmol B(a)P；Group IV 至 VI 則分別給予 10.0、50.0 及 250.0 μ mol 的 NO-NTA，Group VII 至 IX 則是給予 B(a)P 及三種不同劑量的 NO-NTA。

(二) ODC 活性測試實驗步驟

1. 藥物處理老鼠皮膚，5 小時後，將老鼠斷頸犧牲，取背部皮膚，直徑約 0.5 公分。
2. 皮膚以 58 $^{\circ}$ C 水浴 30 秒，然後快速置於冰上，刮取上皮 (epidermis)。
3. 將上皮置於 potassium phosphate buffer (50mM,

pH7.7, 1ml, 內含有 2mM Dithiothreitol 及 0.1mM EDTA)。

4. 以 polytron tissuizer 在冰上打 30 秒，使上皮在 buffer 中均質化。
5. 以 $11,000 \times g$ ，在 4°C 下離心 30 分鐘。
6. 取上清液分成四等份，每等份 $50 \mu\text{l}$ ，置於 eppendroff 中，一等份作 protein assay，三等份作 ODC activity assay，存於 -20°C ，overnight
7. 每一試管內放 $0.1 \mu\text{Ci}$ L-[^{14}C -1]ornithine 及 DL-ornithine，使總體積為 0.2 ml，ornithine 濃度為 0.25 mM，而後立刻密封試管口（以上步驟均於冰上操作，試管裝置請看 Figure 6）
8. 於 37°C 水浴恆溫槽中進行酵素反應，時間為 1 小時，然後用內裝 0.5ml 2M Citric acid 的注射針筒打入反應液中以中止反應，以內裝 0.2 ml sodium hydroxide 的小杯子吸收釋出之 CO_2 。
9. 30 分鐘後，打開反應試管，取出裝 sodium hydroxide 的小杯子，整個放入輻射計數小瓶（counting vial）中，加 4ml 液體閃爍液，以閃爍計數儀計數輻射量（dpm）。
10. 計數出之 dpm 轉換成 $^{14}\text{CO}_2$ 的莫耳數，測出之 ODC 以 $\text{nmol } ^{14}\text{CO}_2 \text{ evolved/h/mg protein}$ 表示。
11. 蛋白質濃度測定使用 KENLOR 公司的 Coomassive Blue protein reagent 來測定。

八、老鼠上皮中過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 的測定

爲了利用 *in vivo* 的系統得知 NO-NTA 處理於老鼠皮膚時，上皮中之 H_2O_2 量的變化，我們修飾了 Pick 及 Keisari 的測試方法 (45-46) 並使用之。

(一) 動物分組

CD-1 品系小白鼠依隨機分爲 9 組，將其背部的毛

剝除後以藥物處理，處理情形為：Group I，不給予任何處理；Group II，只給予溶劑（200 μ l acetone）當作控制組；Group III，在老鼠背部塗抹 20 nmol 的 B(a)P；Group IV 至 VI 則是給予 10、50、250 μ mol 的 NO-NTA，Group VII 至 IX mol，處理 50 μ mol 的 NO-NTA；Group VII 至 IX 則在老鼠背部塗抹 B(a)P 及三種不同劑量的 NO-NTA。

（二）H₂O₂ 的測試

老鼠皮膚塗抹藥物 20 小時後，再重覆一次藥物的給予。1 小時後，將老鼠斷頸犧牲，以打軟木塞的打洞機打出約直徑 2cm 的皮膚，刮取上皮（方法同 ODC activity assay）並用剪刀剪碎置於 4ml 的 buffer（10 mM 的 sodium azide，溶於 50 mM 的 KH₂PO₄ 中）內，用 polytron homogenizer 均質化 3 次 10 秒，再以 10,000 rpm 離心 20 min，之後的上清液用兩層紗布過濾後，取澄清的液體 0.5 ml，每 ml 加入 0.5 ml 的 PR/horseradish peroxidase（HRPO）（25 μ g PR/ml and 50 μ g HRPO/ml），靜置 10 分鐘後加入 1N NaOH 10 μ l 調整 pH 值為 12.5 以終止反應，接著在 610 nm 的吸收峰時測吸光。

（三）H₂O₂ 標準曲線的測定

配製 phenol red solution (PRS)，solution 中含有 140 mM 的 NaCl，10 mM potassium phosphate buffer，pH 7.0，5.5 mM dextrose，在使用時再加入 0.07 mM（0.025g/l）的 phenol red 及 8.5 U/ml（50 μ g/ml）的 HRPO，使全部的量為 990 μ l，接著再加入 10 μ l 的 H₂O₂，使 H₂O₂ 的最終濃度為 0.1、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0、100.0 μ M，置於室溫下 5 分鐘後，加入 10 μ l 的 1N NaOH 調整 pH 值為 12.5 以終止反應，接著在 610 nm 的吸收峰時測吸光。

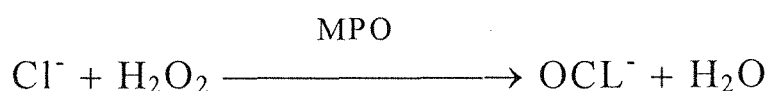
九、老鼠皮膚中脊髓過氧化酶(myeloperoxidase, MPO)的測試

(一) 動物分組

同前述之 H_2O_2 測試之動物分組。

(二) MPO 的測試

當細胞內有大量的 H_2O_2 時，MPO 的量會增加(47)，其應用原理為：



本實驗乃是參考以往文獻(48)修改而成，其實驗方法如下：

老鼠皮膚塗抹藥物 20 小時後，再重覆一次藥物的給予，1 小時後，將老鼠斷頸犧牲，以打軟木塞的打洞機打出約直徑 2cm 的皮膚，並用剪刀剪碎置於 4ml 的 buffer (0.5% hexadecyltrimethyl ammonium) 內，用 polytron homogenizer 在 4 °C 均質化 3 次 10 秒，再以 10,000 rpm 離心 20 min，之後的上清液用兩層紗布過濾後，將濾液置於冰上。取 25mM 的 4-aminoantipyrine-2% phenol solution 1.3 ml 及 1.7mM H_2O_2 1.5ml 混勻平衡約 3-4 分鐘，在建立了這個基礎速率之後，取澄清的液體 0.2 ml，加入前述的混合液中迅速混勻，接著在 510nm 波長的吸收峰測吸光並紀錄 4 分鐘。MPO 的活性由所紀錄的曲線之直線部份計算得來，結果以 units/cm² area of mouse skin 來表示。一個 unit 的 MPO 表示在 25 °C 時，每分鐘水解 1 μ mol H_2O_2 的能力。

第二部分 亞硝酸化梅納反應物 (NO-HNTA)

一、動物來源

CD-1 (ICR) strain 雌性小白鼠(約六周大)購自臺大醫院動物中心，使用前至少飼養於動物房一周。在動物房中以 Purina Lab Chow 為飼料，蒸餾水不限制飲用，並維持在 12 小時亮及 12 小時暗的循環中。藥物處理前至少兩天以電動除毛刀剃除老鼠背部的毛，老鼠必須無毛髮痕跡才可以使用。

二、化學試劑

DL-[¹⁴C]ornithine (55 mCi/mmol) 購自 Amersham 公司 (U.K.)，benzo[a]pyrene (B[a]P)，dithiothreitol，bovine serum albumin，sodium nitrite，dextrose，tyrosine 購自 Sigma 化學公司 (St. Louis, MO, USA)。而蛋白質濃度測定組則購自 KENLOR 公司。

三、亞硝酸化梅納反應物 NO-HNTA 的製備

亞硝酸鹽梅納反應產物的製備是根據 Huang 等的方法 (39)。以 sodium nitrite 4.8g，dextrose 90g，tyrosine 19.12g 在 100°C 的條件下於 SSC 溶液中反應 2 小時。將反應過後的溶液放入冰箱中急速冷卻以終止其反應。再將終止反應後的溶液用二氯甲烷 500ml (Dichloromethene) 萃取兩次，此時為粗萃取液。將粗萃取液以冷凍乾燥的方式加以濃縮後通以 silica gel column，所純化的濾液分別用試管來收集。接著將收集

到的濾液用冷凍乾燥的方式乾燥。所得到的 sample 再用薄層色層分析 (TLC) 以正己烷：冰醋酸：乙酸乙酯 (40：5：20, v/v) 為展開液將其分離。經 TLC 分離後用試管收集第 8 個 band 的溶液。乾燥後的 sample 再以 NMR、Mass spectrum 及 IR 做結構上的鑑定。

四、老鼠皮膚的腫瘤研究

根據兩步驟的致癌實驗方式 (2-stage oncogenic protocol) 來證明一個化合物對動物體是否具有致突變性必須包含著幾種不同的實驗，包括是否會直接引起腫瘤的生成、發炎反應、上皮增生、鳥胺酸脫羧酶的增加、過氧化氫及脊髓內過氧化酶的反應 (40)。接著就是根據這些重點來做致癌性的研究。

(一) 動物分組

六周大的 CD-1 雌鼠以隨機分組分成五組，每組 15 隻，每隻都以電動除毛刀剃去背部的毛，並在背部塗抹藥物以觀察腫瘤的生長。各組給藥的情形是：Group I 為控制組，只給予 200 μ l acetone；Group II 則給予 initiator B[a]P (20 nmol，溶於 200 μ l acetone)，每週一次，持續 10 週；Group III 則是以 20 nmol B[a]P 當 initiator，每週給予一次，持續 10 週；此外，在給予 B[a]P 後一週，則開始給予 10 μ mol NO-HNTA (溶於 200 μ l acetone)，每週 2 次，持續 20 週；Group IV 也是以 20 nmol B[a]P 當 initiator，每週給予一次，持續 10 週，只是在給予 B[a]P 後一週後則開始給予 50 μ mol NO-HNTA (溶於 200 μ l acetone)，每週 2 次，持續 20 週；Group V 處理方法如 Group IV，只是 NO-HNTA 的濃度提高為 250 μ mol。(實驗流程如 Figure 1)

(二) 測量方法

本實驗參照 Huang 等 (41) 的方法來測量，每隔兩週觀察一次老鼠皮膚上腫瘤生長的情形，以量尺在固定面積內 (面積計算公式： $A = \pi / 6 \times D1 \times D2$) 量取直徑大

於 1mm 的腫瘤才可列入計算並紀錄下來，共紀錄 21 週，結果以 Tumors / mouse 及 percentage / mice with tumors 來表示。

五、老鼠耳朵水腫測試

老鼠耳朵水腫的發炎作用以 NO-HNTA 引起的老鼠耳朵水腫之實驗方法來測知。

(一) 動物分組

同樣以 CD-1 female mice 隨機分為 5 組，Group I 為正常控制組 (normal control)，不給予任何的處理；Group II 只給予 200 μ l 的 acetone 作為溶液控制組 (solvent control)；Group III 至 V 則是分別給予 1.0、5.0 及 25.0 μ mol NO-HNTA (溶於 200 μ l 的 acetone)。

(二) 測試方法

本實驗參照 Huang 等 (42) 的方法作修定後來作測試，在 CD-1 雌鼠的右耳以藥物塗抹，塗抹完畢 5 小時後，將老鼠斷頸犧牲，接著將右耳藥物處理部份以打洞機打出直徑約 6mm 的切割部份，將此切割部份拿來稱重、平均，結果以 Mean \pm SE 來表示，加藥後增加的重量則可反應發炎的程度。

六、以 NO-HNTA 處理之老鼠皮膚的形態改變測試

(一) 動物分組

CD-1 品系小白鼠以隨機方式分為四組，每組 6 隻，在老鼠背上剃毛，兩天之後，給予藥物處理，各組給藥情形是：Group I 為控制組，只給予 200 μ l acetone；Group II 給予 200 μ l, 10 μ mol NO-HNTA；Group III 給予 200 μ l, 50 μ mol NO-HNTA；

Group IV 則處理 $200 \mu\text{l}$, $250 \mu\text{mol}$ NO-HNTA。

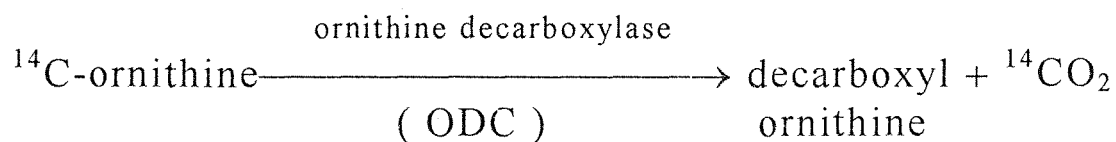
(二) 測試方法

1. 本實驗參照 Huang 等(42)的方法來偵測，將藥物塗抹於老鼠皮膚，一天兩次，連續四天，在最後一次給藥後 18 小時，將老鼠斷頸犧牲，取下約 $2\text{cm} \times 2\text{cm}$ 的背部皮膚，立即浸泡於 10% neutral buffered formalin 中固定，然後作 H&E stain 及 immunohistochemistry stain (H&E 及 immunohistochemistry stain 的作法請參閱第一部分)。

本實驗的結果表示方法共分 4 部份，發炎細胞 (leukocyte) 浸潤 (infiltration) 的情形乃是藉著與溶劑控制組 (acetone control) 比較上皮中單核發炎細胞 (mononuclear inflammation cells) 的 diffuse infiltration，結果以輕微 (slight, +)、中度 (moderate, ++) 及重度 (severe, +++) 來表示；細胞間的水腫 (intercellular edema, 即上皮細胞間體液的堆積) 則以存在或不存在來計數；細胞層數則是每一片切片中隨機選取 5 處來計算並平均；非角質細胞層厚度則是利用類似前述方法來計算，結果以 Mean \pm SE 來表示。本實驗使用顯微鏡放大 40 倍 (物鏡 \times 目鏡) 來觀察。

七、鳥胺酸脫羧酶活性測試 (ornithine decarboxylase, ODC)

ODC 乃是皮膚癌早期的一種指標，若 ODC 的濃度升高，則暗示著可能引起皮膚癌。其測定的原理為：



至於測定的方法則是參考以往文獻(42-44)修定而成，其實驗步驟為：

(一) 動物分組

CD-1 品系小白鼠被隨機分成 5 組，每組 6 隻，剃除背部的毛之後再將藥物塗抹於背部，至於各組的處理則為：Group I，不給予任何的處理，是為正常控制組；Group II，只給予 200 μ l 溶劑 (acetone) 當作溶劑控制組；Group III 至 V 則分別給予 10.0、50.0 及 250.0 μ mol 的 NO-HNTA (溶於 200 μ l 的 acetone 中)。

(二) ODC 活性測試實驗步驟

ODC 活性測試實驗步驟請參閱第一部分。

八、老鼠上皮中過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 的測定

為了利用 *in vivo* 的系統得知 NO-HNTA 處理於老鼠皮膚時，上皮中之 H_2O_2 量的變化，我們修飾了 Pick 及 Keisari 的測試方法 (45-46) 並使用之。

(一) 動物分組

CD-1 品系小白鼠依隨機分為 5 組，將其背部的毛剃除後以藥物處理，處理情形為：Group I，不給予任何處理；Group II，只給予溶劑 (200 μ l acetone) 當作控制組；Group III 至 V 則是給予 10、50、250 μ mol 的 NO-HNTA (溶於 200 μ l acetone 中)。

(二) H_2O_2 的測試

(三) H_2O_2 標準曲線的測定

至於 H_2O_2 的測試與 H_2O_2 標準曲線的測定請自行

參閱第一部分。

九、老鼠皮膚中脊髓過氧化酶(myeloperoxidase, MPO)的測試

(一) 動物分組

同前述之 H_2O_2 測試之動物分組。

(二) MPO 的測試

MPO 的測試原理與方法請參閱第一部分。

第三章

第一部分 亞硝酸化梅納反應物 NO-NTA

結果

一、NO-NTA 引起之老鼠耳朵水腫的促進作用

以 $0.2 \mu\text{mol}$ 的 NO-NTA 塗抹於老鼠右耳，5 小時後取下直徑約 6mm 的耳朵稱重後發現每一片耳朵的平均的增加重量約 $1.54 \pm 0.18 \text{ mg}$ ，而在以 1.0、5.0 及 $25.0 \mu\text{mol}$ 的 NO-NTA 處理的組別則發現耳朵的平均重量分別為 1.87、2.14 及 2.87 mg；在另一方面以 B(a)P 及四種不同的 NO-NTA 反應則分別會使老鼠耳朵的重量增加 2.05、2.27、2.76 及 3.12 mg，這結果顯示了 NO-NTA 的確會引起老鼠皮膚的發炎反應，且證實了 NO-NTA 可能是一種癌症的促進劑 (tumor promoter) (Table 1)。

二、NO-NTA 引起的 hyperplasia 之促進作用

我們用 NO-NTA 引起皮膚的形態改變，另外並用 NO-NTA 濃度的不同來作觀察。結果以上皮細胞層數、上皮層厚度、上皮發炎細胞 (白血球) 的滲出及細胞間的水腫等四部份來表示。在上皮細胞層數方面，無 NO-NTA 者只有 1-2 層，塗 NO-NTA $10 \mu\text{mol}$ 的組別約增為 2-3 層，而在 NO-NTA 濃度為 50 及 $250 \mu\text{mol}$ 的組別則分別使細胞層數增加為 3-4 及 4-6 層；

在上皮之厚度方面，塗抹了 $10 \mu \text{ mol}$ NO-NTA 後比不處理 NO-NTA 者增厚為約 1.2 nm ，當處理了不同濃度的 NO-NTA 之後，這種增厚有明顯增加的現象；在發炎細胞的滲出方面，加了 NO-NTA $10 \mu \text{ mol}$ 的組別會有些微的增加，中劑量及高劑量的組別中，則會使皮膚中發炎細胞的滲出更為明顯；至於在細胞間的水腫情形，結果與發炎細胞滲出的情形雷同，濃度較高的 NO-NTA 具有較強的水腫現象。(Figure 5-8 及 Table 2)

三、NO-NTA 引起的老鼠上皮的鳥胺酸脫羧酶活性的促進作用

以 $10 \mu \text{ mol}$ 的 NO-NTA 處理在老鼠皮膚上，5 小時後取下皮膚測鳥胺酸脫羧酶活性為每小時每毫克蛋白質 $377.29 \pm 20.15 \text{ pmol CO}_2$ ，處理 $50 \mu \text{ mol}$ 及 $250 \mu \text{ mol}$ 的 NO-NTA 之組別則分別增加為 408.67 及 441.50 ，而以 B(a)P 及三種不同濃度的 NO-NTA 處理的組別則分別使 ODC 的活性增加為 419.04 、 476.08 、 549.97 pmol CO_2 (Table 3)。

四、NO-NTA 引致過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 產生時的促進作用

在間隔 20 小時的時間中，在老鼠皮膚上前後給予 2 次 $10 \mu \text{ mol}$ 的 NO-NTA，以誘使 H_2O_2 的產生，結果發現在每平方公分皮膚中產生 $19.73 \pm 5.19 \text{ nmol}$ 的 H_2O_2 ，是未給予 NO-NTA 者的 2.1 倍。當我們以 $50 \mu \text{ mol}$ 及 $250 \mu \text{ mol}$ 的 NO-NTA 處理在老鼠皮膚上，在給予後發現 H_2O_2 的產量各被增加為 23.19 及 28.87 nmol/cm^2 ，而在給予 B(a)P 及不同濃度的 NO-NTA 則使 H_2O_2 的表現量變為 25.96 、 34.34 及 40.61 nmol/cm^2 。(Table 4)

五、NO-NTA 引起 MPO 的產生之促進作用

如同第五項結果所述，在間隔 20 小時中，前後給予 2 次 $10 \mu\text{mol}$ 的 NO-NTA，以偵測 MPO 產生的情形，結果發現每平方公分皮膚中產生 57.19 ± 12.89 units，是未給予 NO-NTA 組別的 28.2 倍，在以 50 及 $250 \mu\text{mol}$ 的 NO-NTA 處理後的組別中則發現 MPO 的量各被增加為 106.37 及 166.48；在有給予 B(a)P 及 NO-NTA 的組別則分別成為 133.06、210.50 及 373.09 units。(Table 5)

第二部分 亞硝酸化梅納反應物 NO-HNTA

結果

一、NO-HNTA 引致之癌促進作用的效果

小白鼠每次塗抹癌起始劑 (20 nmol B[a]P/200 μ l) 及癌促進劑 (10 μ mol NO-HNTA/200 μ l)，如此以 B[a]P 連續處理 10 週，每週一次；NO-HNTA 連續處理 20 週，每週二次。結果發現發生的腫瘤數平均每隻老鼠為 3.1 個；而在以 NO-HNTA 濃度為 50 及 250 μ mol 時，其腫瘤的數目有隨著 NO-HNTA 濃度的濃度的增加而有上升的趨勢。(平均為 4.3 及 5.7 個)(如 Figure. 9, 10)。而另一方面，小白鼠體重增加的速率有隨著 NO-HNTA 濃度的增加而有下降的現象(如 Figure. 11)。在本實驗中，僅給予 B[a]P 者並未發現有產生腫瘤。

二、NO-HNTA 引起之老鼠耳朵水腫的促進作用

以 1.0 μ mol 的 NO-HNTA 塗抹於老鼠右耳，5 小時後取下直徑約 6mm 的耳朵稱重後發現每一片耳朵的平均的增加重量約 0.62 ± 0.38 mg，而在以 5.0 及 25.0 μ mol 的 NO-HNTA 處理的組別則發現耳朵的平均重量分別為 0.97 及 0.99 mg；這結果顯示了 NO-HNTA 的確會引起老鼠皮膚的發炎反應。並證實了 NO-HNTA 可能是經由刺激老鼠的發炎反應而引起皮膚的腫瘤 (Table 6)。

三、NO-HNTA 引起的 hyperplasia 之促進作用

我們用 NO-HNTA 引起皮膚的形態改變，另外並用 NO-HNTA 濃度的不同來作觀察。結果以上皮細胞層數、上皮層厚度、上皮發炎細胞（白血球）的滲出及細胞間的水腫等四部份來表示。在上皮細胞層數方面，無 NO-HNTA 者只有 1-2 層，塗 NO-HNTA $10 \mu\text{mol}$ 的組別約增為 2-4 層，而在 NO-HNTA 濃度為 50 及 250 μmol 的組別則分別使細胞層數增加為 3-5 及 4-7 層；在上皮之厚度方面，塗抹了 $10 \mu\text{mol}$ NO-HNTA 後上皮增厚為 1.76 nm，當處理了不同濃度的 NO-HNTA 之後，這種增厚有明顯增加的現象；在發炎細胞的滲出方面，加了 NO-HNTA $10 \mu\text{mol}$ 的組別會有些微的增加，中劑量及高劑量的組別中，則會使皮膚中發炎細胞的滲出更為明顯；至於在細胞間的水腫情形，結果與發炎細胞滲出的情形雷同，濃度較高的 NO-HNTA 具有較強的水腫現象。(Figure. 12-15 及 Table 7)

四、NO-HNTA 引起的老鼠上皮的鳥胺酸脫羧酶活性的促進作用

以 $10 \mu\text{mol}$ 的 NO-HNTA 處理在老鼠皮膚上，5 小時後取下皮膚測鳥胺酸脫羧酶活性為每小時每毫克蛋白質 $589.81 \pm 99.93 \text{ pmol CO}_2$ ，處理 50 μmol 及 250 μmol 的 NO-HNTA 之組別則分別增加為 1218.48 及 1843.27 pmol CO_2 (Table 8)。

五、NO-HNTA 引致過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 產生時的促進作用

在間隔 20 小時的時間中，在老鼠皮膚上前後給予

2 次 $10 \mu\text{mol}$ 的 NO-HNTA，以誘使 H_2O_2 的產生，結果發現在每平方公分皮膚中產生 16.40 nmol 的 H_2O_2 。當我們以 $50 \mu\text{mol}$ 及 $250 \mu\text{mol}$ 的 NO-HNTA 處理在老鼠皮膚上，在給予後發現 H_2O_2 的產量各被增加為 23.19 及 38.89 nmol/cm^2 ，呈現出一種 dose-dependent 的關係。(Table 9)

六、NO-HNTA 引起 MPO 的產生之促進作用

如同第五項結果所述，在間隔 20 小時中，前後給予 2 次 $10 \mu\text{mol}$ 的 NO-HNTA，以偵測 MPO 產生的情形，結果發現每平方公分皮膚中產生 49.63 units ，是未給予 NO-HNTA 組別的 22.91 倍，在以 50 及 $250 \mu\text{mol}$ 的 NO-HNTA 處理後的組別中則發現 MPO 的量各被增加為 131.34 及 210.78 unit ，也呈現出一種 dose-dependent 的關係。(Table 10)

第四章

討論

在老鼠皮膚上給予 B[a]P 當癌起始劑及 TPA 當癌促進劑是一種經常被使用的動物模型，它最初被用來研究一些物質的致癌作用，諸如與環境相關的致癌物如多環芳香烴或其他致癌物等，近來則被廣泛用來當成研究抗癌藥物的動物模型。在這模型中常被用來當作癌促進劑的是 phorbol ester 之類的藥物如 TPA、PMA 等(49)，它會在老鼠皮膚上引起組織及生化方面的變化如皮膚水腫、增生、增加嗜中性白血球滲出的量(50)、增加 ODC 活性以及 H_2O_2 和 MPO 活性的增加(51)，而上述所有的組織生化的變化皆有可能是癌促進作用的指標。基於上述各項敘述，我們利用這個實驗模式來探討 NO-NTA 及 NO-HNTA 的促癌作用。

本實驗結果顯示 NO-HNTA 及 NO-NTA 都可以促進由 B[a]P 引起的 CD-1 female mice 的皮膚癌。另外，對 NO-HNTA 及 NO-NTA 所引起的發炎反應、增生反應、ODC 活性及過氧化氫和 MPO 的產生皆有增加的現象，所以本實驗的這些結果顯示著 NO-HNTA 及 NO-NTA 在 CD-1 female mice 的皮膚癌中的確是扮演著促癌的角色。

許多研究指出在老鼠皮膚上給予 TPA 會快速的引起發炎細胞 (inflammatory cell) 如嗜中性白血球 (neutrophils) 及巨噬性白血球 (macrophages) 等的大量堆積(52)，並且會增加活性氧 (active oxygen species) 的釋出(53)，本實驗的結果也符合這些研究的發現。而且 NO-HNTA 及 NO-NTA 在這些結果中也被發現明顯的會增加這種發炎細胞堆積及活性氧釋出的情形。在稍早的一些研究中指出活性氧及自由基 (free radicals) 在癌促進作用階段扮演著極重要的角色 (Figure 12)(54)，一些會產生自由基的化合物在老鼠皮膚上也具有癌促進作用(55)，並且有人發現以 TPA 處理於老鼠皮膚上會刺激 arachidonic acid (56) 的代謝及釋出且增加活性氧的形成(53,54)，根據 Reiners 等(57)的研究指出當在老鼠皮膚上以 TPA 處理時，會使 xanthine dehydrogenase 被引出且急速水解並生成 xanthine oxidase，這會產生 $\cdot O_2^-$ 及 H_2O_2 ，在這同時，TPA 抑制了抗氧化酵素 SOD (superoxide dismutase) 及 catalase 的活性(58,59)，這樣會促使上皮細胞遭受更大的 oxidative stress。而 ROS (reactive oxygen species) 的形成會被 arachidonic acid 的抑制劑像 lipoyxygenase 所降低，所以當 arachidonic acid 的代謝被刺激增加時會增加過氧化物的量並使氧化物增加。

許多可以促進由 B(a)P 引起的癌促進作用之癌症促進劑如 TPA 都是先藉由活化蛋白激酵素 C (protein kinase C) 促使蛋白接上磷酸，再進一步藉由活化一些原致癌基因 (protooncogene) 如 c-jun, c-fos 及 c-myc 來達到其促癌之機制。所以本實驗也從這一方面來探討 NO-NTA 及 NO-HNTA 在促癌機轉方面的研究。

第五章

緒論

在皮膚接收到一些致癌物的刺激後會導致白血球的浸潤。而白血球在慢性發炎的部位產生會產生過量的 H_2O_2 、 $\text{O}_2^{\bullet-}$ 及其他自由基，而這些活性氧系會導致細胞或組織劇烈的傷害。組織傷害會將金屬離子自其在細胞中的儲存位置釋出，而導致 $\bullet\text{OH}$ 的產生。當過量形成 $\text{O}_2^{\bullet-}$ 時，細胞內的遺傳物質如 DNA 便會受到傷害甚至斷裂。

當氧化平衡傾向氧化狀態的一邊時，對刺激細胞分裂是一個有效的指標 (60)。因此喪失了良好的氧化平衡可能導致細胞轉化為不可控制的複製，甚至是癌症的形成 (61)，下面就對活性氧與自由基之致癌作用作簡單介紹：

- (1). 所生成的物質，如 H_2O_2 ，屬於腫瘤促進劑中的一種。
- (2). 傷害生物體中的大分子 (62)。
- (3). 促使癌細胞轉移 (63)。
- (4). 經活化蛋白質基酵素 (protein kinase)。
- (5). 活化與生長及分化相關的基因。
- (6). 影響細胞內及細胞間的交流作用。
- (7). 誘導致癌基因之活化和抑癌基因之不活化。

Protein kinase C (PKC) 是 1977 年首先由日本學者 Nishizuka 等人，從牛的小腦所發現異於 protein kinase A 的 protein kinase (64)，此後即受到廣泛地重視與研究，因而得知 PKC 是一種鈣和磷脂依賴的蛋白激酵素 (65)，是由肌醇磷脂 (inositol phospholipid) 所分解而

來；在穿透細胞膜的訊息傳遞系統上扮演一個相當重要的角色 (66,67)，此酵素的活化需要細胞膜的磷脂和 Diacylglycerol (DAG) (68,69)，當細胞受到外界刺激時，外來物與膜上相關接受器作用後，經由受體的活化可進而活化 phospholipase C (PLC)，可將細胞膜上的肌醇磷脂 (inositol phospholipid) 分解，產生第二訊息傳遞物 (second messengers)：diacylglycerol (DAG) 和 inositol triphosphates (IP₃)；DAG 是一種與細胞內傳遞訊息有關的物質 (70)，因此當時認為 PKC 可能與細胞內傳遞訊息 (signal transduction) 的作用有關，此論點經由發現血小板所釋放的 serotonin 可被 PKC 增強而得到證實 (71)；IP₃ 溶解於細胞質促使儲存的鈣離子釋放而增加細胞中的鈣離子濃度，親脂性的 DAG 則留在膜上，在此時細胞質內的 protein kinase C 會移動到細胞膜上與 DAG、鈣、磷脂質形成複合體 (66,67,72)，當 PKC 轉位到膜上時會造成細胞內特殊蛋白質，例如：p80/87 kDa、68 kDa 或 Marcks 蛋白等的磷酸化而引起訊息傳遞 (73)。

而當 PKC 引發了與細胞開始進入分裂週期有密切關係的原致癌基因 (proto-oncogenes) *c-fos*、*c-jun* 的表現，所產生的 *Jun-Fos complex* (AP-1) 便能促動多種基因的轉譯作用 (transcription) (74)，而帶動整個細胞進入活躍狀態，使細胞產生增殖 (proliferation) 和分化 (differenti-ation) (75)。因此 PKC 被認為有促進細胞增殖、分化作用、基因表現和腫瘤催化作用 (76)。

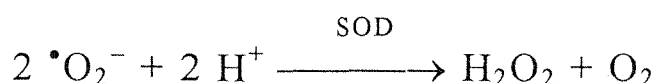
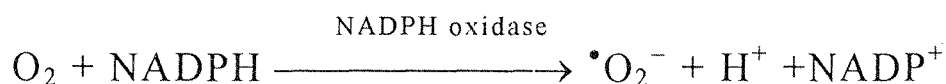
截至目前我們對 PKC 的了解，尚可歸納出至少約有 12 種的異構體 (isoforms) (α 、 β I、 β II、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 η 、 θ 、 ι 、 λ 與 μ) (71,77~80)，而各種異構體在細胞內負責不同訊息的傳遞工作，也具有不同調控的基因表現和細胞增殖的能力 (81~93)。而依照參與 PKC 活化所需的輔因子 (cofactor) 的不同，可將異構體區分為三類 (71,77-80,84-86)：第一類為鈣離子依賴性 (Ca²⁺-dependent) 的異構體，如 α 、 β I、 β II 和 γ ，稱為 cPKCs (conventional PKCs)；第二類為不需要鈣離子 (Ca²⁺-

independent) 參與活化反應的異構體，如 δ 、 ϵ 、 η 、 θ 與 μ ，稱為 nPKCs (novel PKCs)；第三類為不需要鈣離子 (Ca^{2+} -independent) 及磷脂質 (diacylglycerol 或 phosphatidylserine) 參與活化反應的異構體，如 ζ 、 ι 與 λ ，稱為 aPKCs (atypical PKCs)。

在細胞訊息傳遞中，PKC 具有調節基因表現及細胞增殖等的作用，而不同的異構體間由於結構的不同，其酵素特性、活化方式及所表現出來的生理功能便有所不同 (87-89)。

而一旦 PKC 被活化，將進一步促使細胞內的許多蛋白質磷酸化，如 histone (90)、EGF receptor (91)、insulin receptor (92)、transferrin receptor (93)、轉譯作用二號起始因子 (elf2) (94)、ribosomal protein S6 (95) 等，而引發一連串細胞內的訊息傳遞途徑；在一些細胞外的訊息如生長因子 (growth factors)、荷爾蒙 (hormones) 和神經傳導物質 (neurotransmitters) 的傳遞穿過細胞膜的反應中，PKC 扮演著一個重要的角色 (96,97)。

PKC 的結構包括有：分子量約 50 kDa 具 protein kinase 活性區及分子量約 30~35 kDa 的調節區，調節區有結合位置，可與 DAG、鈣、磷脂質結合。protein kinase C 與 Ca^{2+} 可共同增強激發 H_2O_2 的生成 (98)；另外，protein kinase C 經過磷酸化的活化之後促使非活化型的 NADPH oxidase 轉變成活化型的 NADPH oxidase (99)，以進行 (100)：



而使得 H_2O_2 增加。 H_2O_2 在人體被發現會造成 DNA 的損傷 (101)；在 Rochat (102~106) 等人的研究中顯示 H_2O_2 除了如前述會被 PKC 所引發而增加外；在 H_2O_2 增加的情況之下， H_2O_2 也會反過來刺激 PKC 的活性而促進訊息傳遞；另外，Rao 等人 (107) 則在 vascular smooth

muscle cell 的 model 中發現 H_2O_2 會經由刺激 PKC 的活化而刺激 *c-jun* (protooncogene, 原致癌基因的一種) 進行 transcription; 而 Rao 也在另一項研究中 (108) 指出, H_2O_2 也會經由刺激 PKC 的活化而刺激 *c-fos* 的表現。

就 PKC、 H_2O_2 與 proto-oncogene (如 *c-jun*、*c-fos* 與 *c-myc* 等等) 的關係而言; proto-oncogene 是指存在於正常細胞的一段基因, 平時有其正常的生理功能, 但當細胞受到外界刺激後, 會促使 proto-oncogene 在很短的時間內被激發而大量表現故又稱為早期反應基因 (109,110); 基因過度活化的結果很可能會使得細胞增生或變形, 亦有可能因病毒的感染而使得某段基因被插入、漏失導致生成融合蛋白質, 而參與癌症的形成 (111)。

1987 年 Maki (112) 在小雞自發性肉瘤細胞中分離出一種反轉錄病毒, 其中含有一段具有轉形能力的基因, 命名為 *v-jun*, 其蛋白產物的 C 端與酵母菌的轉錄因子 GCN4 的 DNA 結合區具有相當高的相似性, 而在正常細胞中也存在著一段相對應的 *c-jun* 原致癌基因, 它是一個 early response gene, 在遇到促細胞分裂劑 (mitogen) 刺激的細胞生長時, *c-jun* 就會被活化, 其基因產物為構成轉錄因子 AP-1 (Activator protein 1) 的其中成員, 執行細胞內的轉錄作用 (113)。

v-fos 最早是從鼠類的反轉錄病毒 osteosarcoma virus 中所分離出來的, 同樣地, 在人體的正常細胞中亦有相對應的 *c-fos* 原致癌基因具有調節轉錄的功能 (114)。*c-fos* 基因的表現是細胞受刺激後早期的反應, *c-fos* 基因的表現受其上游三個調節區的控制, 此三個區域分別為 (1) TATA box, (2) *c-fos* 基本表現控制區, 其包含一段受 cAMP 調控的區域 (CRE) 與一段 GC rich 的區域, (3) 加強表現區, 此區內含有一段對稱序列 DSE, 又稱 TRE, 主要受到過氧化物、生長因子、TPA 而表現 (115,116)。

根據以往研究推測 (107) H_2O_2 可能是經 PLA_2 dependent 的 arachidonic acid 釋出及經由 lipoxxygenase

cytochrome p450 monooxygenase 系統的傳遞而使得 *c-jun* mRNA 的表現增加，在這種傳遞之間，PKC 可能也參與其中，而在 H_2O_2 的刺激下，*c-fos* 表現增加的機轉可能也與 *c-jun* 的路徑相同 (108)。

myc 基因是一段含有 1.6 kb 的核苷酸序列，是由 Duesbere 和 Mellon 於 1977 年在 Avian Myelocytomatosis virus MC 29 的基因庫內首先發現。他可以致使宿主產生 carcinoma、leukemia 和 sarcomas，並可使 fibroblast 和 hemopoietic 發生變形 (transformation)。在 1982 年左右，同時有許多的研究發現在正常禽類和某些哺乳類(包括人類)細胞中的 DNA 也有一段類似於 Avian Myelocytomatosis Virus Mc 29 上的 *myc* 基因順序，由於它的基因順序與上述病毒基因庫上的 *myc* 基因順序有很大的相容性 (homolog) 而將之命名為 *c-myc* 原致癌基因。

大約在 1982~1983 年間，許多的研究均證實這種 *c-myc* 原致癌基因在某些情況下可以被活化而具有致癌性；在 1983 年，Land 等人更證實在 *in vitro* 的情況下，viral *c-myc* 原致癌基因可以將 primary rat cells 變成一種細胞株，此種細胞株能持續不斷地分裂，也由於 *myc* 基因的這種特性，因而引起大家研究的興趣。有許多的證據顯示，在 *c-myc* 基因與細胞的分化與增殖有密切關連。對於某些處於靜止態的細胞 (quiescent cell)，其 *c-myc* 基因的表現微弱；但是當給予某些 mitogen 刺激後，在 1~2 小時內即可見 *c-myc* RNA 有明顯增強的表現，因此更證實 *c-myc* 基因可能與細胞生長的管制及調控有密切的關連性。

第六章

實驗方法

一、化學試劑

Dextran, Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Guanidinium thiocyanate, Sodium citrate, Sarcosyl, 2-mercaptoethanol, Sodium acetate, Formaldehyde, formamide, Bromophenol blue, xylene cyanol, Glycerol, Bovine serum albumin (fraction V), Sucrose, Triton X-100, Leupeptin, N,N,N,N-tetramethylethylenediamide (EGTA) 皆是購自美國 Sigma 化學公司。

Acrylamide, Bis-acrylamide, Ammonium persulfate, TEMED, Glycine, Sodium dodecyl sulfate (SDS), Tris-HCl, 皆是購自美國 Bio-Rad 化學公司。

二、上皮組織的萃取

各組 ICR 小白鼠經斷頸犧牲後迅速取，將鼠腦置入 1.8 ml 均質液 buffer A 中，在冰浴中切碎腦組織，用均質機上下研磨約 20 下，將此均質液在 4°C 下，以 100,000g 的轉速離心 1 小時，離心後所得的上清液先貯存 -70°C 冰箱，此即為細胞質萃取液 (cytosolic fractions)。

下層沉澱物則加入 buffer B 1 ml，用振盪器震盪數次，接著冰浴 1 小時，期間每隔 5 分鐘震盪一次，之後再加入 buffer A 2.0 ml 使 TritonX-100 的濃度為 0.1%，然後再以 100,000g 的轉速，在 4°C 下，離心 1 小時，所得的上清液部份即為細胞膜萃取液 (membrane

or particulate fraction) ，亦貯存於 -70°C 冰箱中。

三、蛋白質定量：

其原理為利用蛋白質可與 coomassie brilliant blue G-250 形成藍色複合物，當藍色愈深表是蛋白質含量愈高。測試的方法如下：

取 $10\ \mu\text{l}$ 之小白鼠上皮組織萃取液，加入所購買的蛋白質定量試劑組 (protein assay dye, Bio-Rad) $200\ \mu\text{l}$ ，補蒸餾水至 $1\ \text{ml}$ ，於室溫下反應 10 分鐘後，在波長 $595\ \text{nm}$ 條件下偵測吸光值，以 BSA (bovin serum albumin) 為標準液以換算各萃取液的蛋白質濃度。再取已定量的 $60\ \mu\text{g}$ 蛋白質萃取液，加入等體積的 protein loading buffer，於 100°C Dri-Bath 機器加熱 5 分鐘使蛋白質變性，迅速置回冰上 5 分鐘，再經 Microcentrifuge 低速離心後，放於冰上，等待 loading。

* protein loading buffer：

1	ml	0.5M Tris-HCl, pH 6.8
1.6	ml	glycerol ($10^{(w/v)\%}$)
1.6	ml	10% SDS
0.4	ml	β -mercaptoethanol
0.4	ml	0.5% bromophenol blue(in water)
3.0	ml	distilled water

四、蛋白質電泳：

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 電泳分析方法，主要是參照 Laemmli 在 1970 年所建立的模式，濃縮用的上層膠濃度為 4% ，而分離用的下層膠濃度為 7.5% ，利用 $16\times 20\ \text{cm}$ 大小的電泳槽 (PROTEAN[®] II xi slab cell, Bio-Rad) 進

行蛋白質分析；其詳細作法是將電泳玻片洗淨，烘乾，擦乾乾淨後，用厚度為 0.75 mm 的 spacer 為間隔裝好電泳片，製備 7.5 % 的下層 separating gel，混合均勻後迅速倒入電泳片中，直到液面距離 well 約 1.5 cm 處為止，加入去離子水覆蓋液面，待膠體凝固後，將上層的水吸掉；在開始製備 4.0 % 的上層 stacking gel，混合均勻後倒入電泳片中，將電泳齒梳插入電泳片中，若有氣泡，則上下移動齒梳，使氣泡離開 stacking gel，待上層膠凝固後，拔掉齒梳，用二次水清洗 well 數次，準備 loading sample。

取經定量等步驟處理的蛋白質樣本，用毛細管 tips 小心加到每個 well 中，將 protein standard marker (Bio-Rad) 亦加入其中一個 well 內。用塑膠滴管取一倍的 SDS 電泳緩衝液 (electrode buffer) 小心地將每個 well 填滿，已避免樣本被激出，將上下電泳槽各加入一倍的電泳緩衝液至電導線被蓋過為止。

將電源供應器與電泳槽相連，打開電源。開始時以 15 mA 的電流跑 stacking gel，直到色帶跑至 stacking gel 與 separating gel 的交界處，調整電流為 30 mA，當色帶跑至底線時，才停止電泳。

電泳完畢後，將膠體取出，切除上層的 stacking gel，將下層 separating gel 以 coomassie blue 染色，再以脫色液脫色。

* 7.5% separating gel :

12.5	ml	acrylamide/bis (30%/0.8%)
24.25	ml	distilled water
12.5	ml	1.5M Tris-HCl, pH=8.8
500	μl	10% SDS
250	μl	10% ammonium persulfate
25	μl	TEMED

* 4.0% separating gel :

1.3	ml	acrylamide/bis (30%/0.8%)
6.1	ml	distilled water
2.5	ml	0.5M Tris-HCl, pH=6.8
100	μl	10% SDS
50	μl	10% ammonium persulfate
10	μl	TEMED

* 1× electrode running buffer :

7.5	g	Tris base (25 mM)
36	g	glycine (192 mM)
2.5	g	SDS (0.1%)

加 distilled water 至 2500 ml (pH=8.3)

* 0.1% coomassie blue :

1.0	g	coomassie blue G-250
100	ml	acetic acid
400	ml	methanol

加 distilled water 至 1000 ml , 待 coomassie blue 溶解後 , 過濾之

* 脱色液 :

75	ml	acetic acid
100	ml	methanol

加 distilled water 至 1000 ml

五、西方墨點吸漬法分析 PKC 的轉位作用 :

取經蛋白定量 60 μg 小白鼠上皮組織萃取液 , 加入等體積的 protein loading buffer 混合均勻 , 經前處理後 , loading 至 10% 的 SDS-PAGE , 電泳完畢後 , 再以 4°C , 100 mA 進行電泳膠轉移 (參考前述蛋白電泳、電轉移方

法)。

電轉移過夜後，將硝化纖維紙取出浸入含有 3% 胎牛血清的 TBST 緩衝液 (即 blocking buffer) 內，在室溫下搖動 2 小時，將硝化纖維紙空白處覆蓋上蛋白後，加入 primary antibody，即 PKC antibody (50 μ g 購自 Promega 的 PKC α antibody，溶於含 3% 胎牛血清的 TBST 緩衝液)，於室溫下與硝化纖維紙作用 3.5 小時，再以 TBST 緩衝液清洗三次，每次 10 分鐘；與 primary antibody 作用後的硝化纖維紙再進一步與 secondary antibody (即 alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG, Promega)，約 0.2 μ g/ml 溶於含 1% 胎牛血清的 TBST 緩衝液，於室溫下與硝化纖維紙作用 1 小時。

再以 TBST 緩衝液清洗三次，每次 10 分鐘，最後將硝化纖維紙浸入受質緩衝液 (內含有 7 mg Nitroblue-tetrazolium [BCIP] 及 5 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate [NBT]) 進行呈色反應，約 10~30 分鐘，待色帶出現後，再以蒸餾水終止呈色反應並清洗拍照。

* 12% separating gel :

20	ml	acrylamide/bis (30%/0.8%)
16.75	ml	distilled water
12.5	ml	1.5M Tris-HCl, pH=8.8
500	μ l	10% SDS
250	μ l	10% ammonium persulfate
25	μ l	TEMED

* 1 \times electrotransfer buffer :

3.1	g	Tris-HCl (25 mM)
14.4	g	glycine (192 mM)
200	ml	methanol (20%)
加 distilled water 至 1000 ml (pH=8.3)		

* blocking buffer :

2.5 g 脱脂奶粉
0.605 g Tri-HCl (10 mM)
0.45 g NaCl (100 mM)
0.05 ml Tween-20 (0.1%)
加 distilled water 至 50 ml (pH=7.5)

* TBST buffer :

12.108 g Tri-HCl (10 mM)
9 g NaCl (100 mM)
1 ml Tween-20 (0.1%)
加 distilled water 至 1000 ml (pH=7.5)

* substrate buffer :

10 mg BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate)
14 mg NBT(nitorbluetetrazolium)
0.484 g Tri-HCl (10 mM)
0.233 g NaCl (100 mM)
40.6 mg MgCl₂ (5 mM)
加 distilled water 至 40 ml (pH=9.5)

* buffer A :

0.242 g Tris-Hcl , pH 7.4 (20 mM)
67.24 mg EDTA (2 mM)
10 ml glycerol (10%)
11.29 g sucrose (0.33M)
349 μl β-mercaptoethenol (50 mM)
34.8 mg PMSF (2 mM)
2.5 mg Leupeptin (25 μg/ml)

加 distilled water 至 100 ml (pH=7.4)

* buffer B :

0.242	g	Tris-Hcl , pH 7.4 (20 mM)
67.24	mg	EDTA (2 mM)
10	ml	glycerol (10%)
11.29	g	sucrose (0.33M)
0.3	ml	Triton X-100 (3%)
349	μ l	β -mercaptoethenol (50 mM)
34.8	mg	PMSF (2 mM)
2.5	mg	Leupeptin (25 μ g/ml)

加 distilled water 至 100 ml (pH=7.4)

* 10% separating gel :

16.65	ml	acrylamide/bis (30%/0.8%)
20.1	ml	distilled water
12.5	ml	1.5M Tris-HCl, pH=8.8
500	μ l	10% SDS
250	μ l	10% ammonium persulfate
25	μ l	TEMED

* blocking buffer :

1.5	ml	胎牛血清 (Foetal Bovine Serum)
0.605	g	Tri-HCl (10 mM)
0.45	g	NaCl (100 mM)
0.05	ml	Tween-20 (0.1%)

加 distilled water 至 50 ml (pH=7.5)

六、西方墨點吸漬法分析 *c-Jun*、*c-Fos*、*c-Myc* 致癌基因蛋白表現：

將小白鼠上皮組織粗萃取液置入相當於其重量比五倍體積比例之均質液 buffer A 內，在冰浴中切碎上皮組織，用均質機上下研磨約 20 下，取上皮組織粗萃取物經蛋白定量 100 μg 上皮組織粗萃取液，加入等體積的 protein loading buffer 混合均勻，經前處理後，loading 至 10% 的 SDS-PAGE，電泳完畢後，再以 4°C，100 mA 進行電泳膠轉移（參考前述蛋白電泳、電轉移方法）。

電轉移過夜後，將硝化纖維紙取出浸入含有 3% 胎牛血清的 TBST 緩衝液（即 blocking buffer）內，在室溫下搖動 2 小時，將硝化纖維紙空白處覆蓋上蛋白後，分別在每張硝化纖維紙加入 *c-Jun*、*c-Fos*、*c-Myc* 三種 primary antibodies（購自 Promega antibody，溶於含 3% 胎牛血清的 TBST 緩衝液），於室溫下與硝化纖維紙作用 3.5 小時，再以 TBST 緩衝液清洗三次，每次 10 分鐘；與 primary antibody 作用後的硝化纖維紙再進一步個別與 secondary antibody（即 *c-Jun*、*c-Myc* 為 alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse Ig G, Promega；*c-Fos* 為 alkaline phosphatase conjugated goat anti-rabbit Ig G, Promega），約 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶於含 1% 胎牛血清的 TBST 緩衝液，於室溫下與硝化纖維紙作用 1 小時。

再以 TBST 緩衝液清洗三次，每次 10 分鐘，最後將硝化纖維紙浸入受質緩衝液（內含有 BCIP、NBT）進行呈色反應，約 10~30 分鐘，待色帶出現後，再以蒸餾水終止呈色反應並清洗拍照。

第七章

第一部分 亞硝酸化梅納反應物 NO-NTA 促癌作用之分子機制

結果

一、NO-NTA 誘發 PKC 的轉位作用

我們在老鼠的上皮組織以濃度為 250 μmol 的 NO-NTA 處理六種不同的時間，包括 0 分鐘，15、30、60 分鐘、兩小時及四小時後將老鼠斷頸犧牲後取其上皮組織的萃取液來觀察 PKC 在 cytosol 及 particular 之間轉位的情形。結果很明顯的發現 PKC 會從不活化型的 cytosol 轉位到活化型的 particular 上，同時在量的表現量上也有明顯的增加 (Figure 16)。同時我們亦發現到由 NO-NTA 所誘發的 PKC 的轉位作用在兩小時會有最大量的表現。另一方面我們亦選用兩小時的時間來做 NO-NTA 誘發 PKC 的轉位作用的濃度變化關係 (dose-response)。我們利用上述之三種不同的 NO-NTA 濃度：10、50 及 250 μmol 分別處理小白鼠的上皮組織，結果亦發現 PKC 的轉位作用也呈現出一種 dose-response 的關係 (Figure 17)。

二、NO-NTA 誘發 c-Fos 的活化作用

我們在老鼠的上皮組織以濃度為 250 μmol 的 NO-NTA 處理六種不同的時間，包括 0 分鐘，15、30、

60 分鐘、兩小時及四小時後將老鼠斷頸犧牲後取其上皮組織的粗萃取液來觀察 c-Fos 在老鼠上皮組織中活化的情形。結果很明顯的發現 c-Fos 會從剛開始的不活化表現逐漸出活化的蛋白表現量。同時我們亦發現到由 NO-NTA 所誘發的 c-Fos 的活化作用在三十分鐘時會有最大量的表現 (Figure 18.1)。另一方面我們亦選用三十分鐘的時間來做 NO-NTA 誘發 c-Fos 活化作用的濃度變化關係 (dose-response)。我們利用上述之三種不同的 NO-NTA 濃度：10、50 及 250 μmol 分別處理小白鼠的上皮組織，結果亦發現 c-Fos 的活化作用也呈現出一種 dose-response 的關係 (Figure 18.2)。

三、NO-NTA 誘發 c-Jun 的活化作用

我們在老鼠的上皮組織以濃度為 250 μmol 的 NO-NTA 處理六種不同的時間，包括 0 分鐘，15、30、60 分鐘、兩小時及四小時後將老鼠斷頸犧牲後取其上皮組織的粗萃取液來觀察 c-Jun 在老鼠上皮組織中活化的情形。結果很明顯的發現 c-Jun 會從剛開始的不活化表現逐漸出活化的蛋白表現量。同時我們亦發現到由 NO-NTA 所誘發的 c-Jun 的活化作用在六十分鐘時會有最大量的表現 (Figure 19.1)。另一方面我們亦選用六十分鐘的時間來做 NO-NTA 誘發 c-Jun 活化作用的濃度變化關係 (dose-response)。我們利用上述之三種不同的 NO-NTA 濃度：10、50 及 250 μmol 分別處理小白鼠的上皮組織，結果亦發現 c-Jun 的活化作用也呈現出一種 dose-response 的關係 (Figure 19.2)。

四、NO-NTA 誘發 c-Myc 的活化作用

我們在老鼠的上皮組織以濃度為 250 μmol 的 NO-NTA 處理六種不同的時間，包括 0 分鐘，15、30、60 分鐘、兩小時及四小時後將老鼠斷頸犧牲後取其上皮

組織的粗萃取液來觀察 c-Myc 在老鼠上皮組織中活化的情形。結果很明顯的發現 c-Myc 會從剛開始的不活化表現逐漸出活化的蛋白表現量。同時我們亦發現到由 NO-NTA 所誘發的 c-Myc 的活化作用在兩小時時會有最大量的表現 (Figure 20.1)。另一方面我們亦選用兩小時的時間來做 NO-NTA 誘發 c-Myc 活化作用的濃度變化關係 (dose-response)。我們利用上述之三種不同的 NO-NTA 濃度：10、50 及 250 μmol 分別處理小白鼠的上皮組織，結果亦發現 c-Myc 的活化作用也呈現出一種 dose-response 的關係 (Figure 20.2)。

第二部分 亞硝酸化梅納反應物 NO-HNTA 促癌作用之分子機制

結果

一、NO-HNTA 誘發 PKC 的轉位作用

我們在老鼠的上皮組織以濃度為 250 μmol 的 NO-HNTA 處理六種不同的時間，包括 0 分鐘，15、30、60 分鐘、兩小時及四小時後將老鼠斷頸犧牲後取其上皮組織的萃取液來觀察 PKC 在 cytosol 及 particular 之間轉位的情形。結果很明顯的發現 PKC 會從不活化型的 cytosol 轉位到活化型的 particular 上，同時在量的表現量上也有明顯的增加。同時我們亦發現到由 NO-HNTA 所誘發的 PKC 的轉位作用在一小時會有最大量的表現 (Figure 21)。另一方面我們亦選用一小時的時間來做 NO-HNTA 誘發 PKC 的轉位作用的濃度變化關係 (dose-response)。我們利用上述之三種不同的 NO-HNTA 濃度：10、50 及 250 μmol 分別處理小白鼠的上皮組織，結果亦發現 PKC 的轉位作用也呈現出一種 dose-response 的關係 (Figure 22)。

二、NO-HNTA 誘發 c-Fos 的活化作用

我們在老鼠的上皮組織以濃度為 250 μmol 的 NO-HNTA 處理六種不同的時間，包括 0 分鐘，15、30、60 分鐘、兩小時及四小時後將老鼠斷頸犧牲後取其上皮組織的粗萃取液來觀察 c-Fos 在老鼠上皮組織中活化的情形。結果很明顯的發現 c-Fos 會從剛開始的不活化表現逐漸出活化的蛋白表現量。同時我們亦發現到由

NO-HNTA

所誘發的 c-Fos 的活化作用在三十分鐘時會有最大量的表現 (Figure 23.1)。另一方面我們亦選用三十分鐘的時間來做 NO-HNTA 誘發 c-Fos 活化作用的濃度變化關係 (dose-response)。我們利用上述之三種不同的 NO-HNTA 濃度：10、50 及 250 μmol 分別處理小白鼠的上皮組織，結果亦發現 c-Fos 的活化作用也呈現出一種 dose-response 的關係 (Figure 23.2)。

三、NO-HNTA 誘發 c-Jun 的活化作用

我們在老鼠的上皮組織以濃度為 250 μmol 的 NO-HNTA

處理六種不同的時間，包括 0 分鐘，15、30、60 分鐘、兩小時及四小時後將老鼠斷頸犧牲後取其上皮組織的粗萃取液來觀察 c-Jun 在老鼠上皮組織中活化的情形。結果很明顯的發現 c-Jun 會從剛開始的不活化表現逐漸出活化的蛋白表現量。同時我們亦發現到由 NO-HNTA 所誘發的 c-Jun 的活化作用在六十分鐘時會有最大量的表現 (Figure 24.1)。另一方面我們亦選用六十分鐘的時間來做 NO-HNTA 誘發 c-Jun 活化作用的濃度變化關係 (dose-response)。我們利用上述之三種不同的 NO-HNTA 濃度：10、50 及 250 μmol 分別處理小白鼠的上皮組織，結果亦發現 c-Jun 的活化作用也呈現出一種 dose-response 的關係 (Figure 24.2)。

四、NO-HNTA 誘發 c-Myc 的活化作用

我們在老鼠的上皮組織以濃度為 250 μmol 的 NO-HNTA 處理六種不同的時間，包括 0 分鐘，15、30、60 分鐘、兩小時及四小時後將老鼠斷頸犧牲後取其上皮組織的粗萃取液來觀察 c-Myc 在老鼠上皮組織中活化的情形。結果很明顯的發現 c-Myc 會從剛開始的不活化

表現逐漸出活化的蛋白表現量。同時我們亦發現到由 NO-HNTA 所誘發的 c-Myc 的活化作用在兩小時時會有最大量的表現 (Figure 25.1)。另一方面我們亦選用兩小時的時間來做 NO-HNTA 誘發 c-Myc 活化作用的濃度變化關係 (dose-response)。我們利用上述之三種不同的 NO-HNTA 濃度：10、50 及 250 μmol 分別處理小白鼠的上皮組織，結果亦發現 c-Myc 的活化作用也呈現出一種 dose-response 的關係 (Figure 25.2)。

除了做西方墨點吸漬法來找出一些致癌蛋白的表現量之外，另外我們也做了一些利用免疫化學組織的染色法來觀察上皮組織在受到 NO-HNTA 的刺激後，致癌蛋白是否有表現 (Figure 26-28)。

第八章

討論

由本實驗的結果可以得知亞硝酸化梅納反應物包括 NO-NTA 及 NO-HNTA 都有能使小白鼠上皮組織中的 PKC 及一些原致癌基因的活化的能力。在原致癌基因方面,這些氧化態的基因如 c-jun 及 c-fos 在受到了 NO-NTA 或 NO-HNTA 的刺激後,便會開始進行轉錄 (Transcription) 的工作,並開始兩者相互的結合並相互的活化,此時便會結合到 AP-1 binding site 上。然而在許多的基因的 promoter 上都具有一段的能與 AP-1 結合的序列,許多的基因便藉此機制開始生成大量的蛋白。根據本實驗的結果,c-Jun 及 c-Fos、c-Myc 蛋白表現的最大量分別是發生在上皮組織在接受藥物處理過後約一小時、三十分鐘、及兩個小時,與之前的實驗能相互的吻合。另外在 PKC 的活化方面,在時間及濃度的關係上,這些亞硝酸化梅納反應物也都有很明顯的表現。這些結果告訴我們包括 NO-NTA 及 NO-HNTA 也像 TPA 一樣是走向著活化 c-Jun、c-Fos 及 c-Myc 而間接促使 PKC 的活化,進一步的促使上皮組織的發炎反應增加,最後而導致的癌症的發生。

根據 Dang 等人在 1994 年所作的研究(117),從人類的白血球中抽出 PKC 之後,再以各種不同的 PKC isoform 抗體去做免疫呈色反應。結果發現有三種 isoform 包括 α 、 β 及 ζ 在組織尚未受到藥物的刺激便可以在 cytosol 中很明顯的發現,而在受到了 phorbol ester 的刺激之後,會使這三種 isoform 從原本的不活化態的 cytosol 轉位到活化態的 particular 中。這些已經被活化的 PKC isoform 會促使其他的蛋白接上磷酸,包括促使 PKC 80 kda 的受質活化。另一方面這些

活化型的 PKC 也會促使一些轉錄因子如 c-Fos、c-Jun 的表現。由於這一連串訊息傳遞而促使這些蛋白活化的結果會使 NADPH oxidase 活化而開始進行其氧化的功能。當 NADPH oxidase 被活化再加上 catalase 的作用，便能促使組織內 H_2O_2 的表現量增加。在本次的實驗中我們所使用的 western blot 的方式來觀察組織中的 PKC 是否有被活化的現象，所使用的抗體也是利用 α -form。同樣的我們也可以看到這些上皮組織在受到亞硝酸化梅納反應物，包括 NO-NTA 及 NO-HNTA 的刺激下，會使的 PKC 的 α -form 的總表現量增加。另一方面 PKC 也有從 cytosol 轉位到 particular 的活化現象。與之前的實驗結果相吻合。

而 H_2O_2 在體內的作用方面，有許多的學者研究 (118-124) 指出，當細胞內的 H_2O_2 含量變高時，可能會促使這些活性氧系經由下列這些途徑使 c-Fos 及 c-Jun 的表現量增加：

- (1). 使 DAG 的表現量增多而刺激 PKC，經由活化 PKC 這個訊息傳遞路徑的不斷刺激與磷酸化而進一步使 c-Jun 及 c-Fos 等的原致癌基因活化。
- (2). H_2O_2 會刺激 PLA2 的活性上升而使 arachidonic acid 的產量增加，進而刺激 PKC 的活性，再促使 c-Jun 及 c-Fos 增加。
- (3). H_2O_2 也會刺激 phase I 的解毒系統，使 mono-oxygenase-cytochrome p450 system 活化，這個過程也可能刺激 c-Jun 的表現。(Figure. 29)。

所以由以上的機轉我們也可以推測在小白鼠的上皮組織受到了 NO-NTA 及 NO-HNTA 的刺激後，可能也是依照著這些路徑而使組織走向癌化的趨勢。

綜合以上的這些結果，我們可以得知這些亞硝酸化梅納反應產物對於小白鼠的上皮組織中的 PKC 及一些原致癌基因具有活化的作用。所以在事後我們所要探討的由 NO-NTA 及 NO-HNTA 所引起的誘癌性機制時可以再根據一些途徑做更深入的研究，如：

- (1). 找尋由 NO-NTA 及 NO-HNTA 所引起的 PKC 的活化是有哪些的 PKC isoform 參予?
- (2). 上皮組織在受到 NO-NTA 及 NO-HNTA 的刺激後，其 c-jun、c-fos 及 c-myc 在 mRNA 的表現量方面否有所差異?
- (3). 找尋 NO-NTA 及 NO-HNTA 在刺激上皮組織後，與另一條訊息傳遞 receptor tyrosine kinase 是否有所關係?

相信從未來更進一步的實驗中，可以找出一條完整的路徑來證明亞硝酸化梅納反應物的促癌機制。

第九章

亞硝酸化梅納反應物之結構鑑定

結果

NO-HNTA 在可見光下為一種淡黃色的物質，經熔點測定儀後所得到的數值為 114.3°C

(一) $^1\text{H-NMR}$

從 proton NMR (Figure 29) 得知有三個 aromatic proton ($\delta = 6.5\sim 8$)，分別位於 chemical shift 6.8、7.2 及 7.6 附近，計算其耦合常數 (couple constant) (δ) 值為：

$^1\text{H-NMR}$	δ (ppm)	
	7.605	} (1H, J=2.4)
	7.603	
	7.597	
	7.226	} (1H, J=9.3)
	7.222	
	7.203	
	7.201	
	7.197	
	7.195	
	6.827	} (1H, J=9.6)
	6.825	
	6.824	
	6.797	
	6.795	

又 J_{ortho} 的範圍約在 7-9 Hz 之間；
 J_{para} 的範圍約在 0-0.6 Hz 之間；
 J_{meta} 的範圍約在 1-3 Hz 之間，
所以三個芳香環上的 H 位置如圖示。

(二) ^{13}C -NMR (Figure 30)

- 從 167.006 (160~180) ppm 之間之 peak 知道有一個 c=o carbonyl group.
- 從 131.704 (100~120) ppm 之間有 peak 知道有 aromatic carbone.
- 在 52.495 及 66.884 (50~70) ppm 之間有兩 peak 知道有 C-N 或 C-O group.
- 在 10~30 ppm 之間有多個 peak 知道有 alkane group.

(三) IR

從 IR 的分析圖 (Figure 31) 上得知在 $1525 \pm 15 \text{ cm}^{-1}$ 的地方有 peak，知道有 N=O 的不對稱結構 (asymetry strenching)。在 $1345 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$ 有 peak，此 peak 是代表為 N=O 的對稱型結構 (symetry strenching)。另外在 $1150\text{-}925\text{cm}^{-1}$ 有 peak，這是表示結構中具有 N-N strenching。此外在 3080-3100 及 1760 cm^{-1} 均有 peak 的出現，分別表示為具有 aromatic-H 及 C=O 的結構。

(四) Mass

在質譜儀所分析出來的結果 (Figure 32) 中可以得知在 43、57、113、149、261、279 的質量中具有片

段，而根據之前 NMR、IR、 ^{13}C 等分析出來的結果，在 Mass 43 所代表的 peak 為 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ，57 所代表的為 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ，113 是 $\text{C}_4\text{H}_7 + \text{COCH}_2\text{-N}$ ，149 是 base peak，261 是質量 113 與 148 的總和，而 279 是 261 再加上一分子的水所得到的質量。

由於在梅納反應中，還原糖及胺基酸之間經常發生 Amadori rearrangement，再加上我們根據上述的儀器分析之後，我們推測 NO-HNTA 的結構應是如此 (Figure 33)。

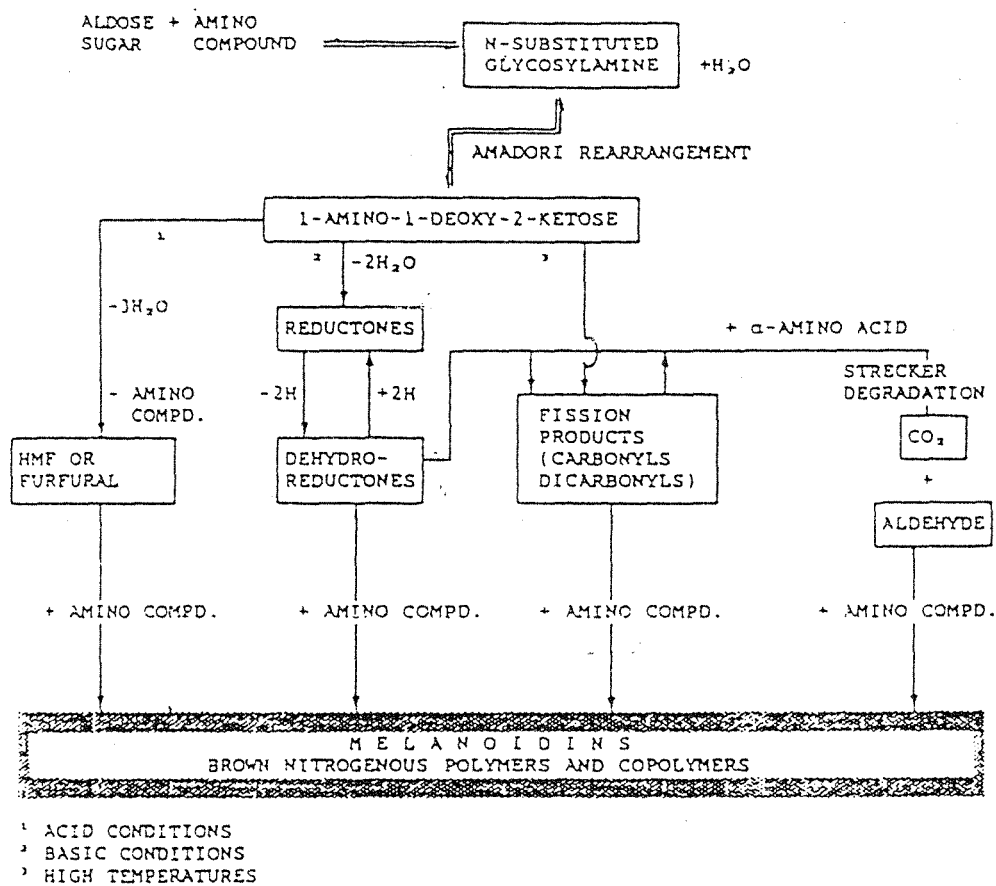


Figure 1. The Maillard reaction. (6).

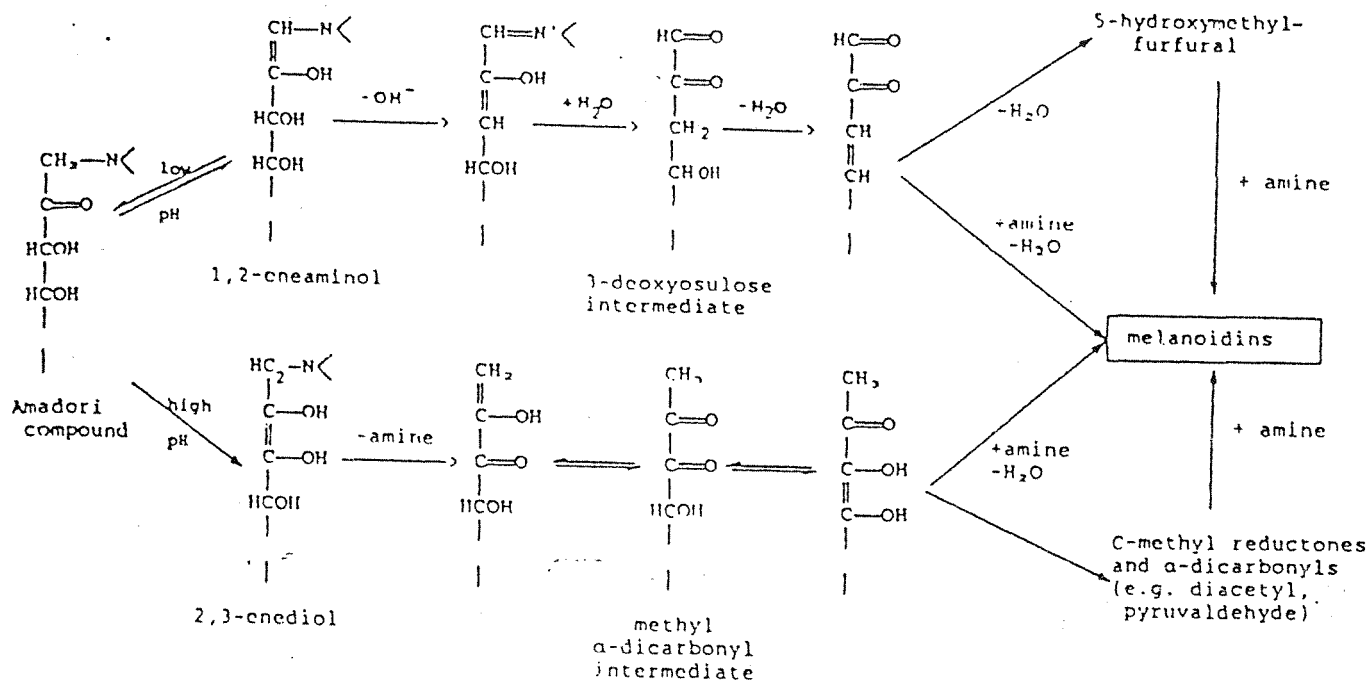


Figure 2. Pathways of Amadori compound degradation. (6).

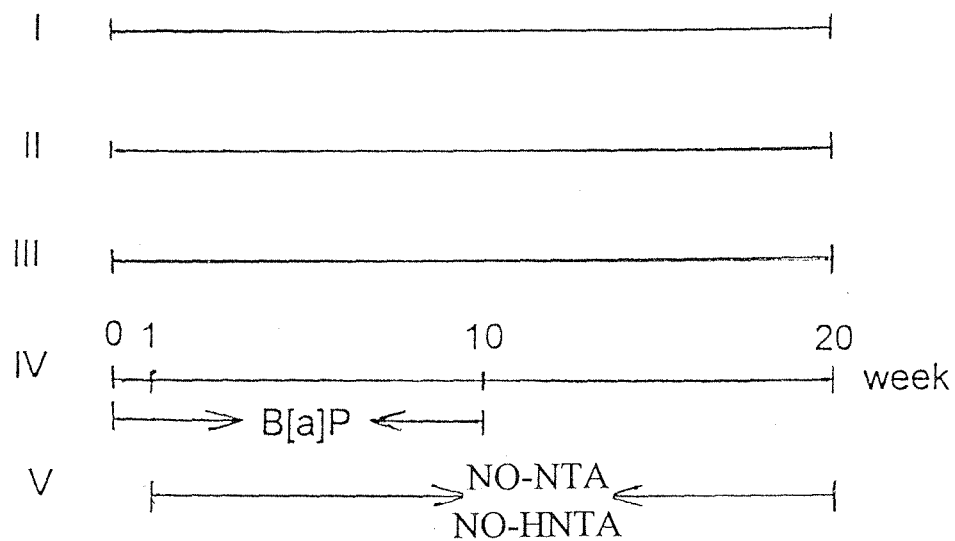


Figure 3. Diagrammatic repression of experimental animal treating. Group I : solvent control, adminiatration of 200 ul acetone; Group II : 20 nmol B(a)P/200 ul acetone; Group III : 20 nmol B(a)P/200 ul acetone and 10 umol NO-NTA or NO-HNTA /200 ul; Group IV : 20 nmol B(a)P/200 ul acetone and 50 umol NO-NTA or NO-HNTA /200 ul; Group V : 20 nmol B(a)P/200 ul acetone and 250 umol NO-NTA or NO-HNTA /200 ul.

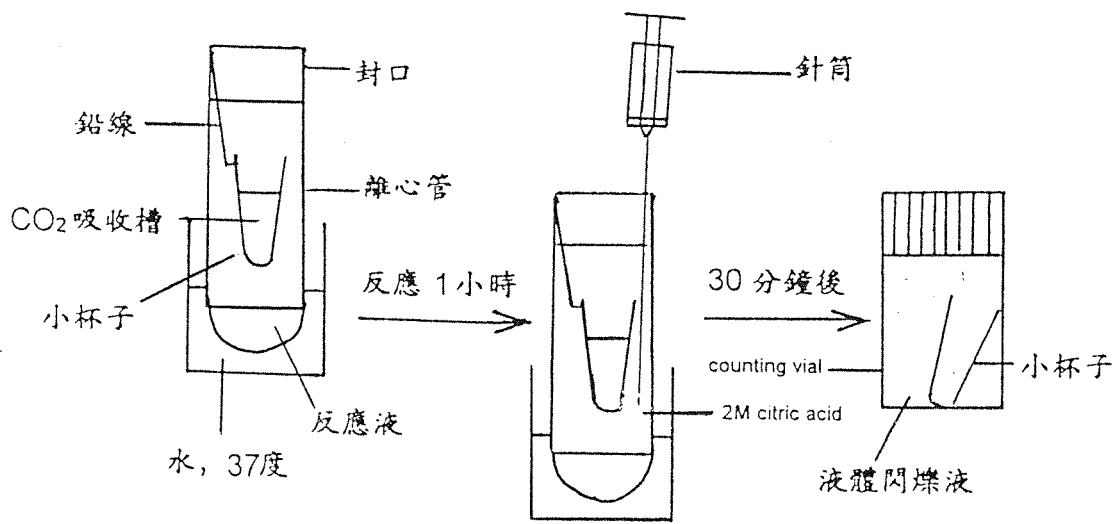


Figure 4. ODC activity 測定之裝置圖

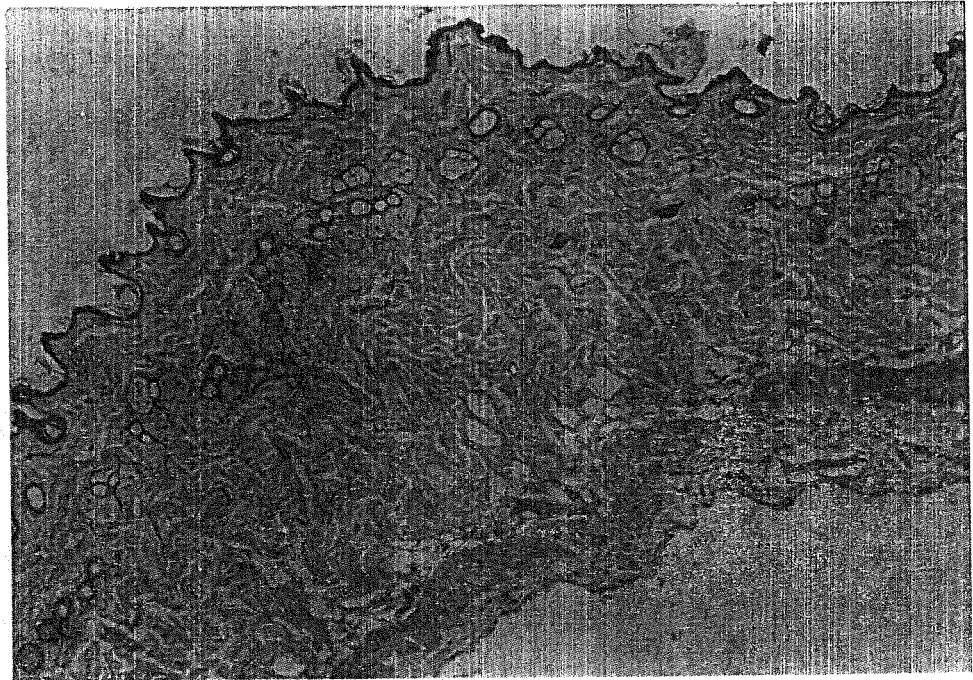


Figure 5. The morphology change of mice epidermis by treated topically with acetone

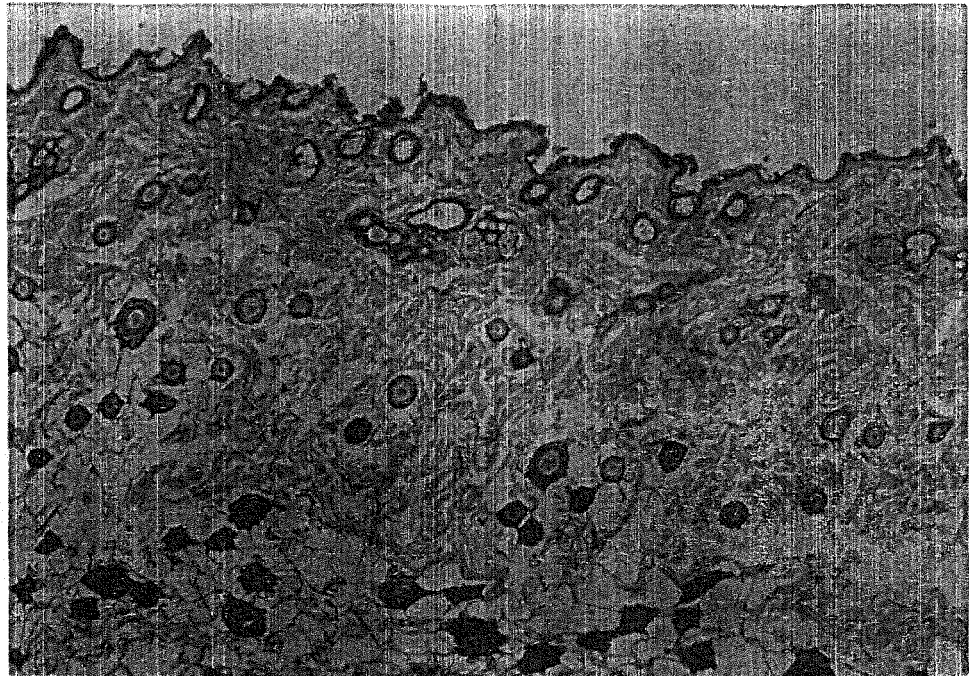


Figure 6. The morphology change of mice epidermis by treated topically with NO-NTA 10 umol (H & E \times 100)

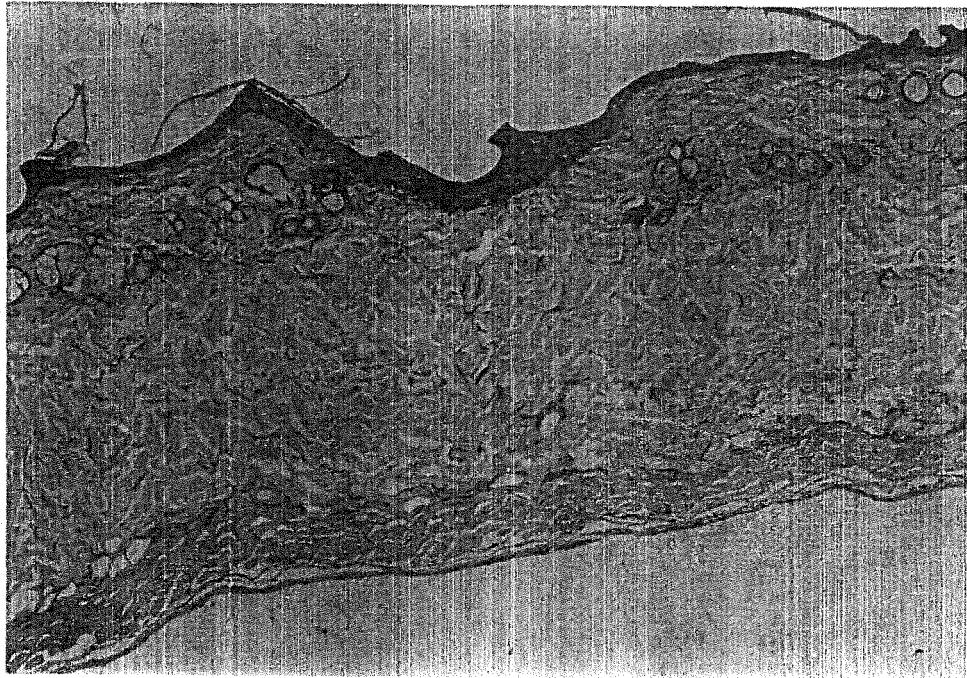


Figure 7. The morphology change of mice epidermis by treated topically with NO-NTA 50 umol
(H & E \times 100)

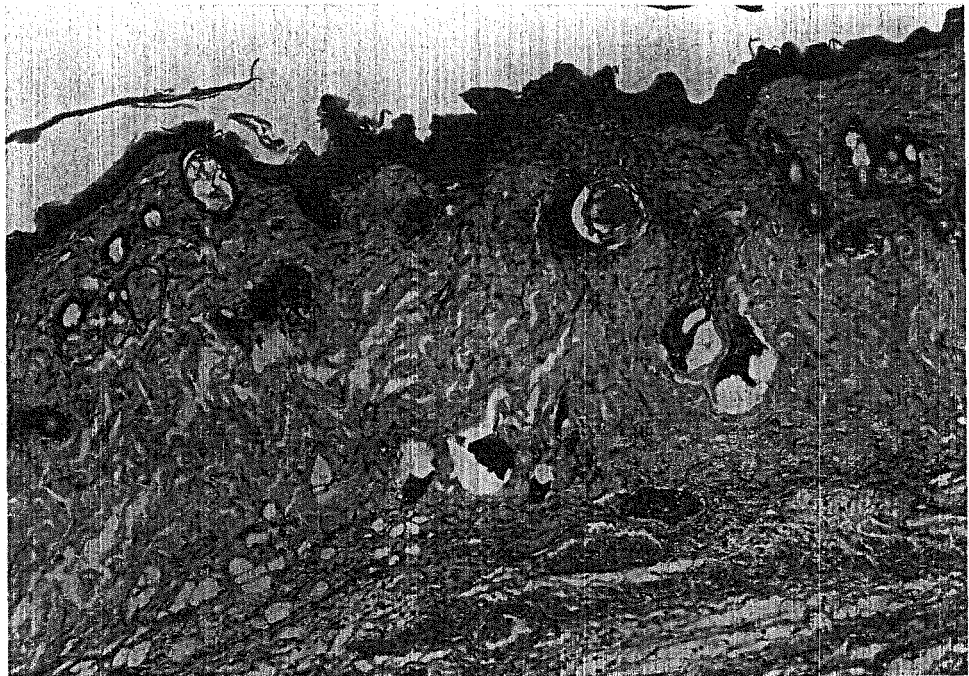


Figure 8. The morphology change of mice epidermis by treated topically with NO-NTA 250 umol
(H & E \times 100)

Table I .Effect of NO-NTA-induced edema of mouse ears.

Treatment ^a		Increase weight/punch (mg)
Acetone		0.56 ± 0.17
B(a)P	20.0 nmol	1.66 ± 0.12
NO-NTA	0.2 nmol	1.54 ± 0.18*
	1.0 nmol	1.87 ± 0.06*
	5.0 nmol	2.14 ± 0.26*
	25.0 nmol	2.87 ± 0.29*
B(a)P + NO-NTA	0.2 nmol	2.05 ± 0.11*#
	1.0 nmol	2.27 ± 0.20*#
	5.0 nmol	2.76 ± 0.35*#
	25.0 nmol	3.12 ± 0.23*#

^a Mouses' left ears were treated with acetone (20 µl), B(a)P in acetone (20 µl), NO-NTA in acetone (20 µl) or B(a)P together with NO-NTA. Five hours later, the animals were killed and ear punches (diameter 6 mm) were weighted. The result of mice's ear inflammation was obtained from the weight of left ear minus the right one. The data present the mean ± SD from 6 mice/group.

* Staistically different from acetone-treated group (p< 0.001).

Staistically different from B(a)P alone treated group (p< 0.001).

Table II . Effect of NO-NTA-induced epidermal ornithine decarboxylase in mouse skin

Treatment ^a		Ornithine decarboxylase (cpm CO ₂ /μg protein)
Normal		348.68 ± 30.43
Acetone		324.34 ± 17.15
B(a)P	20.0 nmol	386.38 ± 21.56
NO-NTA	10.0 nmol	377.29 ± 20.15*
	50.0 nmol	408.67 ± 18.89*
	250.0 nmol	441.50 ± 27.85*
B(a)P + NO-NTA	10.0 nmol	419.04 ± 11.74*#
	50.0 nmol	476.08 ± 28.82*#
	250.0 nmol	549.97 ± 37.70*#

^a Mices were treated with acetone (200 μl), B(a)P in acetone (200 μl), NO-NTA in acetone (200 μl) or B(a)P together with NO-NTA. Five hours later, the animals were killed and the epidermis was isolated. Ornithine decarboxylase activity was determined. The data present the mean ± SD from 6 mice/group.

* Staistically different from acetone-treated group (p < 0.001).

Staistically different from B(a)P alone treated group (p < 0.001).

Table III . The formation of H₂O₂ in mouse skin by topical treated NO-NTA in mice epidermis

Treatment ^a		H ₂ O ₂ (nmol/cm ²)
Normal		13.13 ± 4.13
Acetone		12.12 ± 3.13
B(a)P	20.0 nmol	18.34 ± 1.92
NO-NTA	10.0 nmol	19.73 ± 5.19 ^b
	50.0 nmol	23.19 ± 2.36 [*]
	250.0 nmol	28.87 ± 4.32 [*]
B(a)P + NO-NTA	10.0 nmol	25.96 ± 2.73 ^{*#}
	50.0 nmol	34.34 ± 3.13 ^{*#}
	250.0 nmol	40.61 ± 3.16 ^{*#}

^a Mices were treated with acetone (200 µl), B(a)P in acetone (200 µl), NO-NTA in acetone (200 µl) or B(a)P together with NO-NTA. 20 hours later, the animals were treated again. The mices were killed after the second treatment 1 h and the skin were removed. The formation of H₂O₂ and MPO activity were determined. The data present the mean ± SD from 6 mice/group.

^b Staistically different from acetone-treated group (p < 0.01).

^{*} Staistically different from acetone-treated group (p < 0.001).

[#] Staistically different from B(a)P alone treated group (p < 0.001).

Table IV . The formation of MPO activity in mouse skin by treated topically in mice's epidermis

Treatment ^a		MPO (units/cm ²)
Normal		2.69 ± 0.73
Acetone		2.74 ± 0.50
B(a)P	20.0 nmol	52.24 ± 12.89
NO-NTA	10.0 nmol	57.19 ± 11.01 [*]
	50.0 nmol	106.37 ± 17.67 [*]
	250.0 nmol	166.48 ± 13.96 [*]
B(a)P + NO-NTA	10.0 nmol	133.06 ± 25.91 ^{*#}
	50.0 nmol	210.50 ± 20.85 ^{*#}
	250.0 nmol	373.09 ± 32.07 ^{*#}

^a Mices were treated with acetone (200 µl), B(a)P in acetone (200 µl), NO-NTA in acetone (200 µl) or B(a)P together with NO-NTA. 20 hours later, the animals were treated again. The mices were killed after the second treatment 1 h and the skin were removed. The formation of MPO activity were determined. The data present the mean ± SD from 6 mice/group.

^{*} Staistically different from acetone-treated group (p < 0.001).

[#] Staistically different from B(a)P alone treated group (p < 0.001).

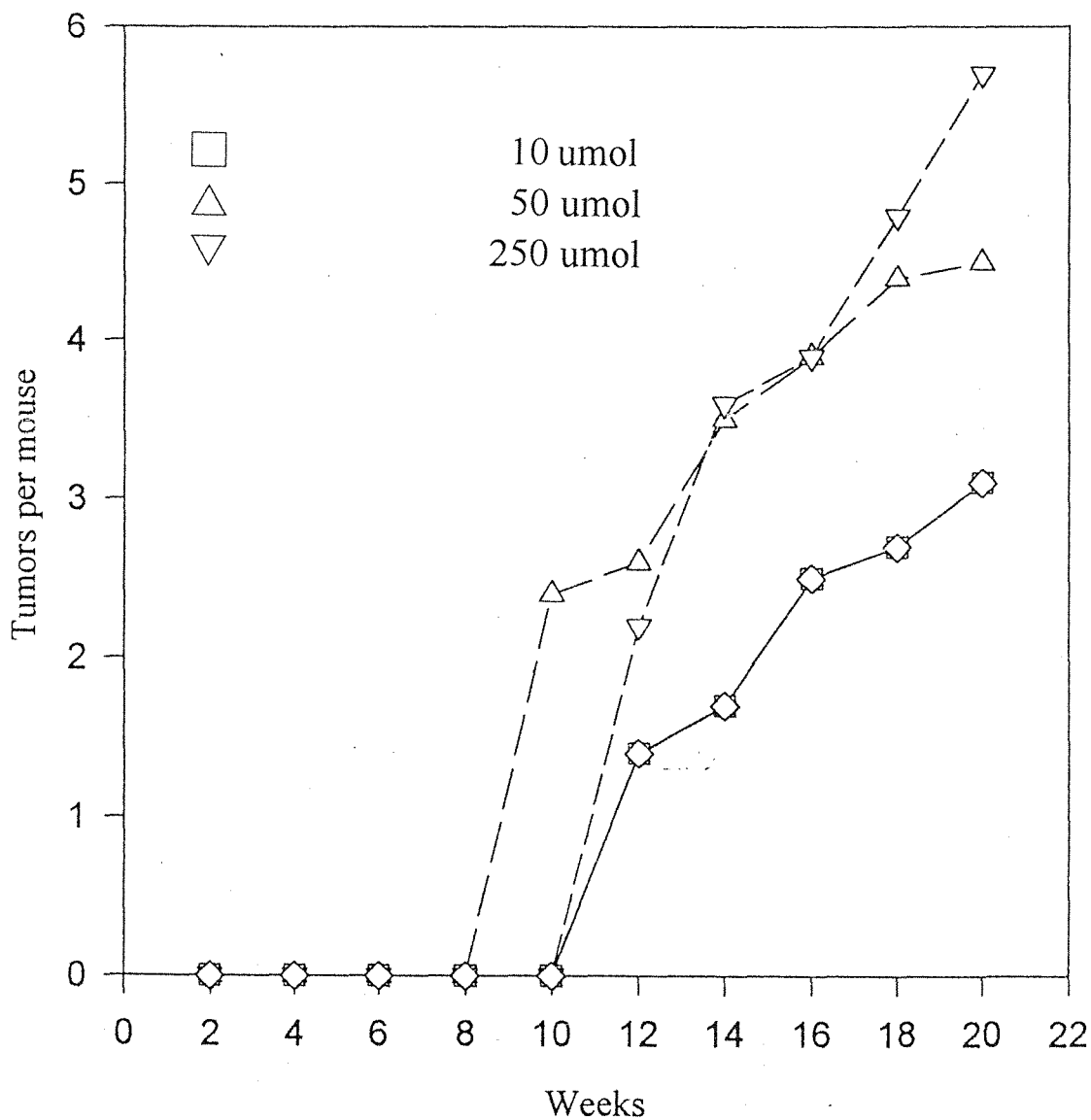


Figure 9. Promoting effect of topical application of NO-HNTA in mouse skin. Female CD-1 mice (6-weeks old, 15/group) were initiated with B(a)P (20 nmol). One week later, the mice were promoted with NO-HNTA (200ul) twice weekly for 20 weeks. Skin tumors of diameter > 1mm were counted and recorded every 2 weeks. All skin tumors were papilloma.

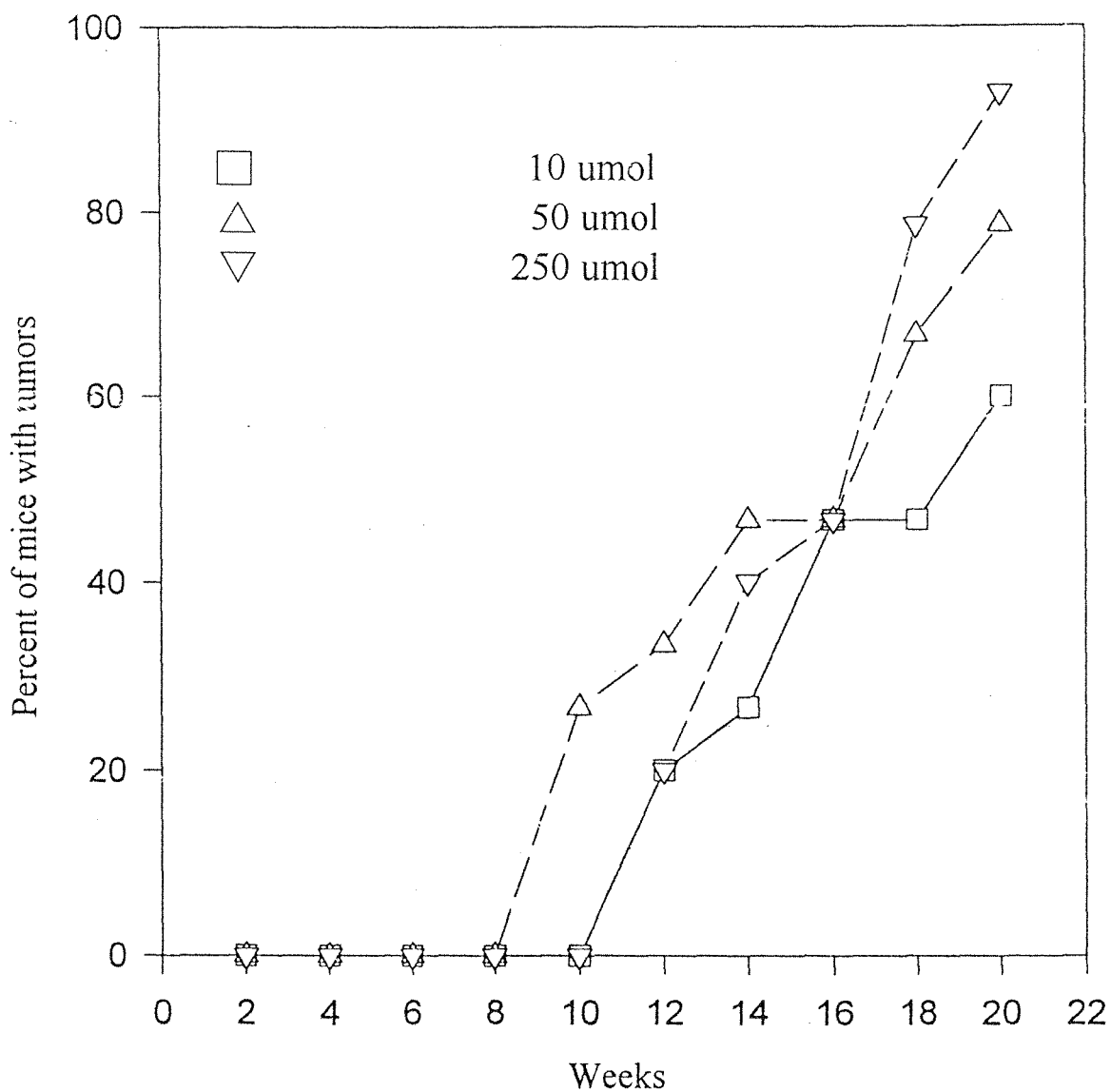


Figure 10. Promoting effect of topical application of NO-HNTA in mouse skin. Female CD-1 mice (6-weeks old, 15/group) were initiated with B(a)P (20 nmol). One week later, the mice were promoted with NO-HNTA (200ul) twice weekly for 20 weeks. Skin tumors of diameter > 1mm were counted and recorded every 2 weeks. All skin tumors were papilloma.

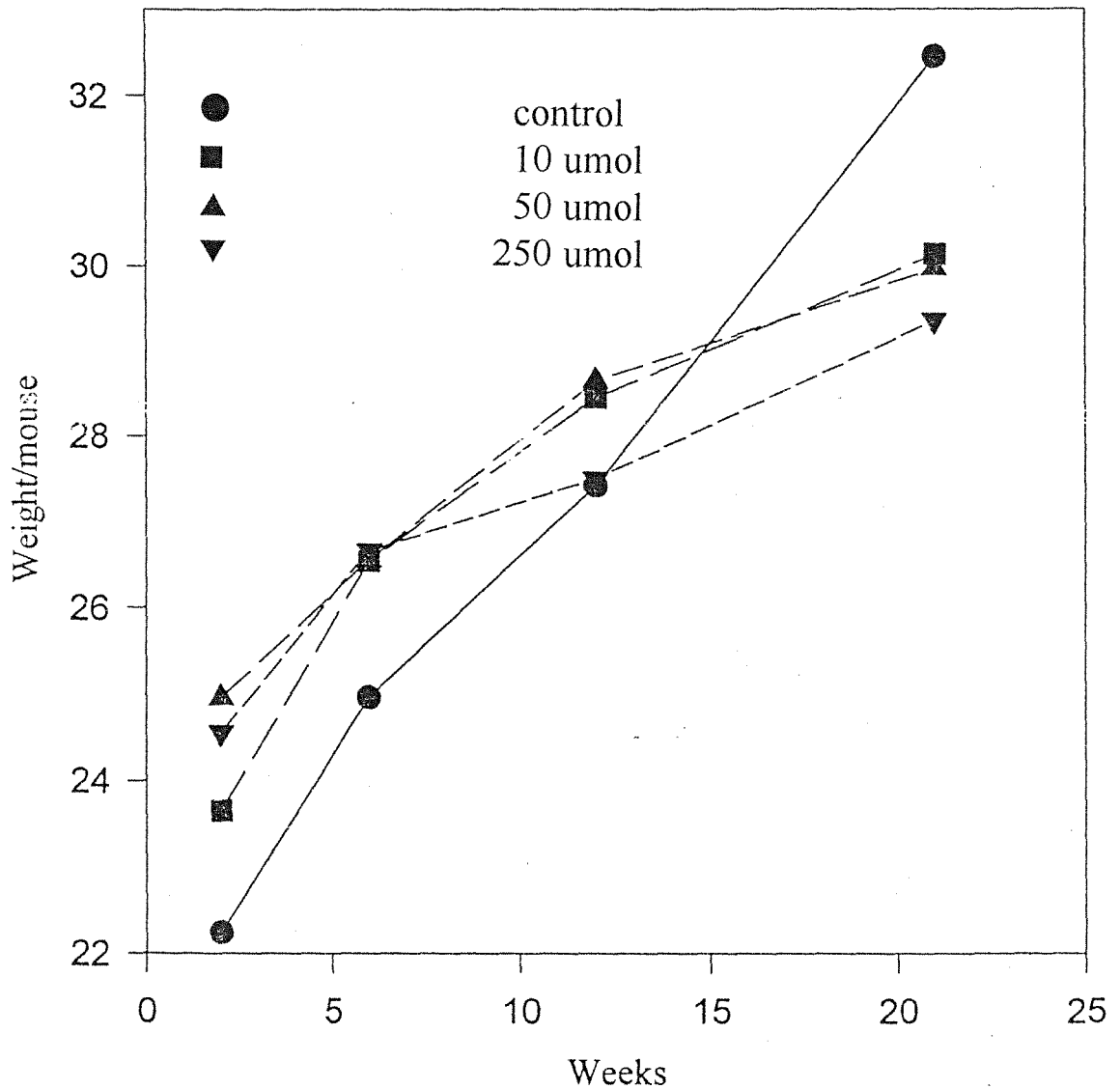


Figure 11. The average body weight increase by treated topically with NO-HNTA on the epidermis of mice. Female CD-1 mice (6-weeks old, 15/group) were initiated with B(a)P (20 nmol). One week later, the mice were promoted with NO-HNTA (200ul) twice weekly for 20 weeks. The body weight were weighted and recorded every 2 weeks.

Table V. Effect of NO-HNTA-induced edema of mouse ears.

Treatment ^a		Increase weight/punch (mg)
Acetone		0.13 ± 0.10
NO-HNTA	1.0 umol	0.62 ± 0.38 *
	5.0 umol	0.97 ± 0.19 **
	25.0 umol	0.99 ± 0.16 **

^a Mouses' left ears were treated with acetone (20 ul) or NO-HNTA in acetone (20 ul). Five hours later, the animals were killed and ear punches (diameter 6 mm) were weighted. The result of mice's ear inflammation was obtained from the weight of left ear minus the right one. The data present the mean ± SD from 6 mice/group.

* p < 0.05; ** p < 0.0001; compared with acetone control group.

Table VI . Morphological examination of NO-HNTA-treated mouse skin.

Treatment ^a	No. of epidermal layers	Epidermal thickness (μm)	Leukocyte infiltration	intercellular edema
Acetone	1 - 2	15.89 \pm 3.71	+ ^{**}	+ ^{**}
NO-HNTA (10 μmol)	2 - 4	59.02 \pm 13.26	+ ^{**}	+ ^{**}
(50 μmol)	3 - 5	71.92 \pm 18.84	++	++
(250 μmol)	4 - 7	71.69 \pm 20.23	++	++

^a Mices were treated topically with acetone (200 μl) or NO-HNTA in acetone (200 μl) twice a day for four days. The animals were killed 18 h after the last dose and skins were processed for histological tests. Data are expressed as the mean \pm SE from 6 mice/group.

^{**} Leukocyte infiltration that was slight (+), moderate (++), or severe (+++) was characterize by diffuse infiltration of mononuclear infiltratory cells in the dermis when compared with the acetone controls. Intracellular edema was scored as present or absent.

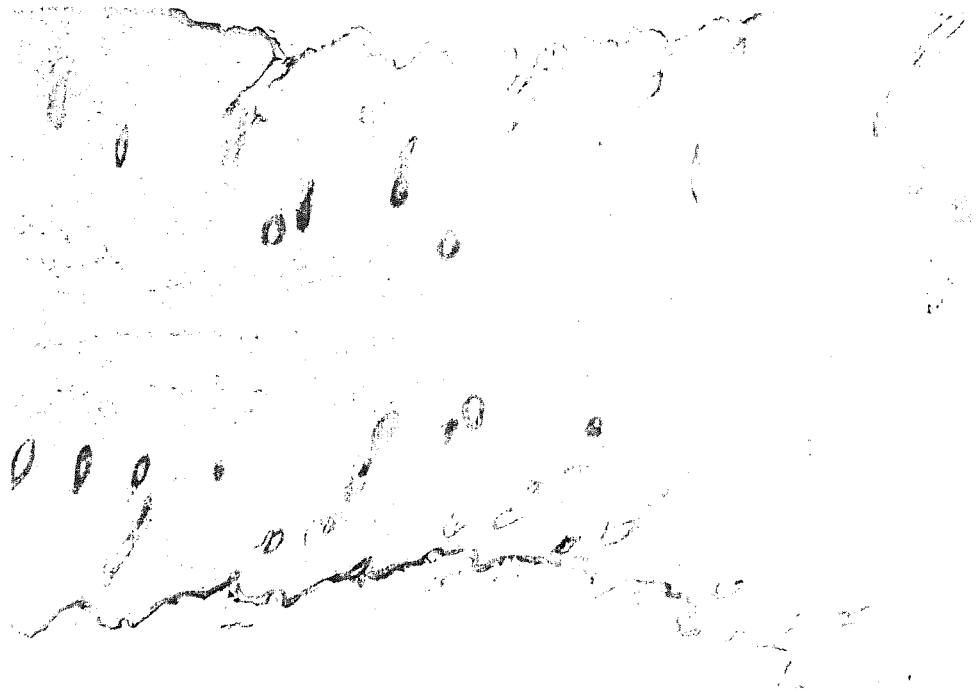


Figure 12.1 Mice were treated topically with 200ul acetone
(H & E \times 40)

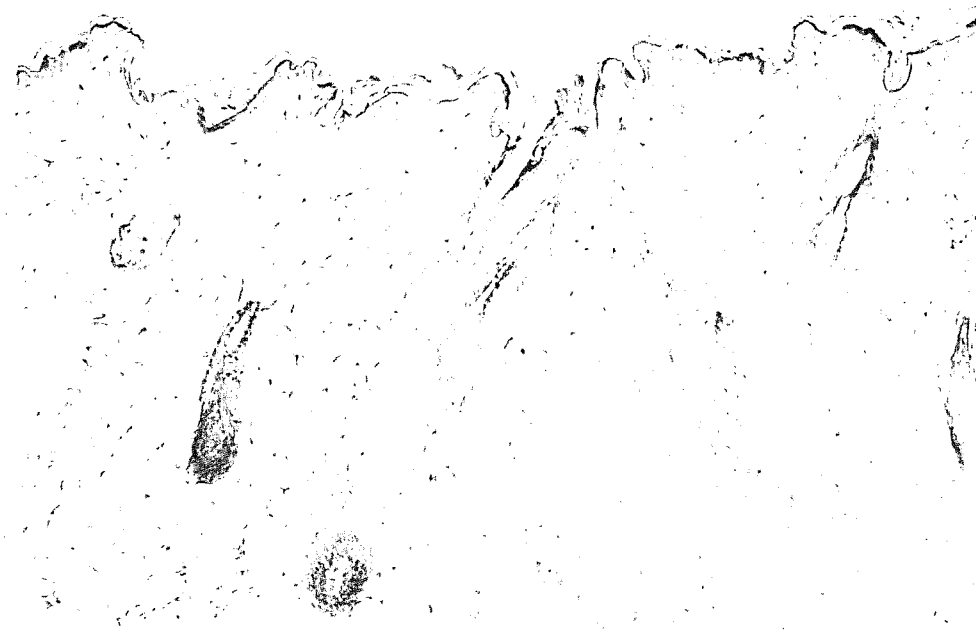


Figure 12.2 Mice were treated topically with 200ul acetone
(H & E \times 100)

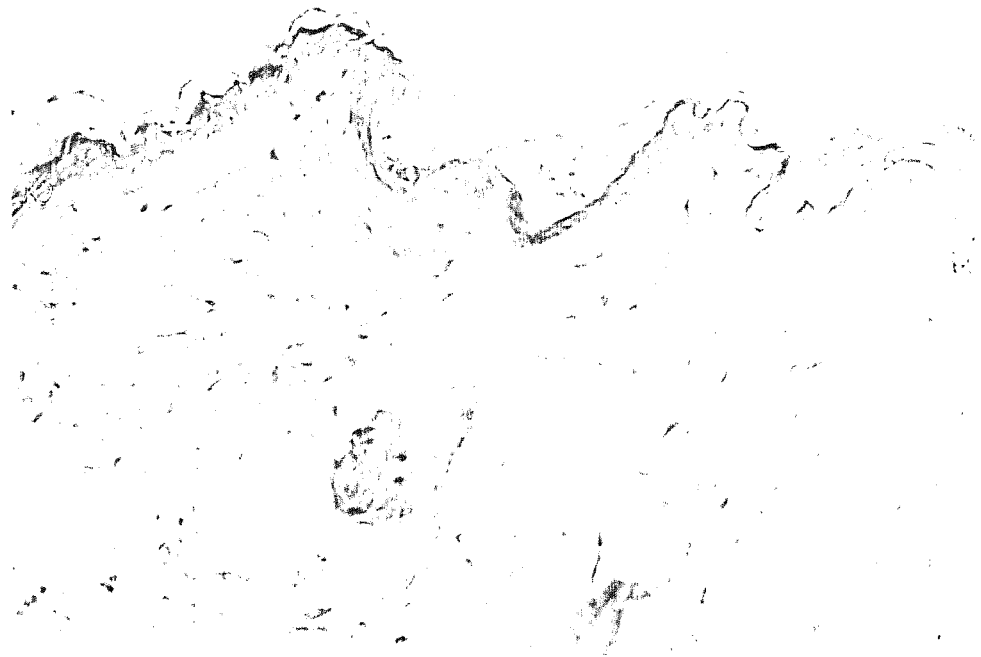


Figure 12.3 Mice were treated topically with 200ul acetone
(H & E \times 200)

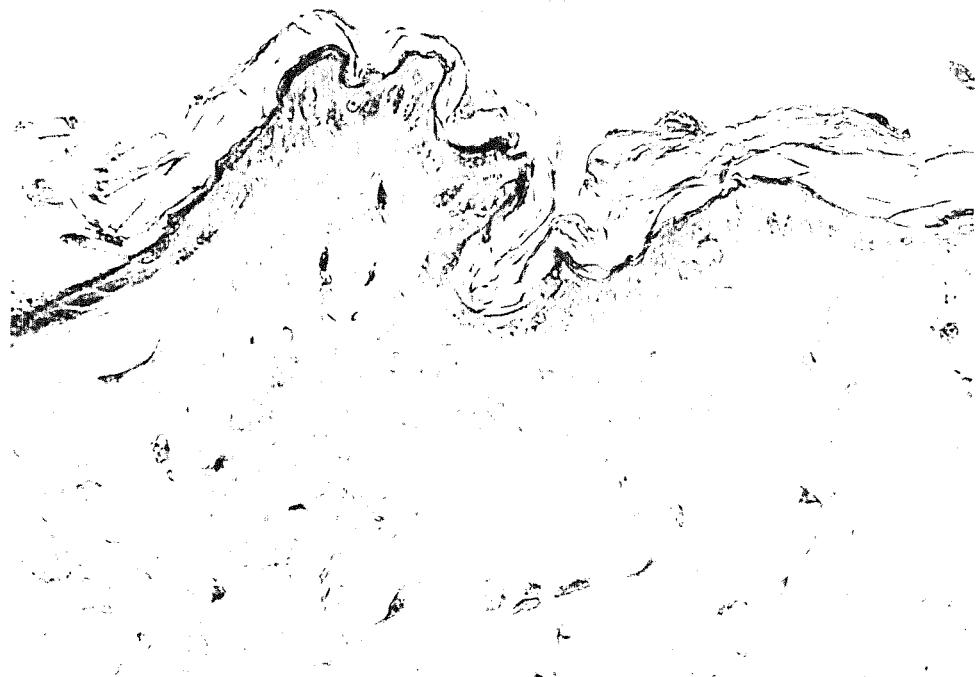


Figure 12.4 Mice were treated topically with 200ul acetone
(H & E \times 400)

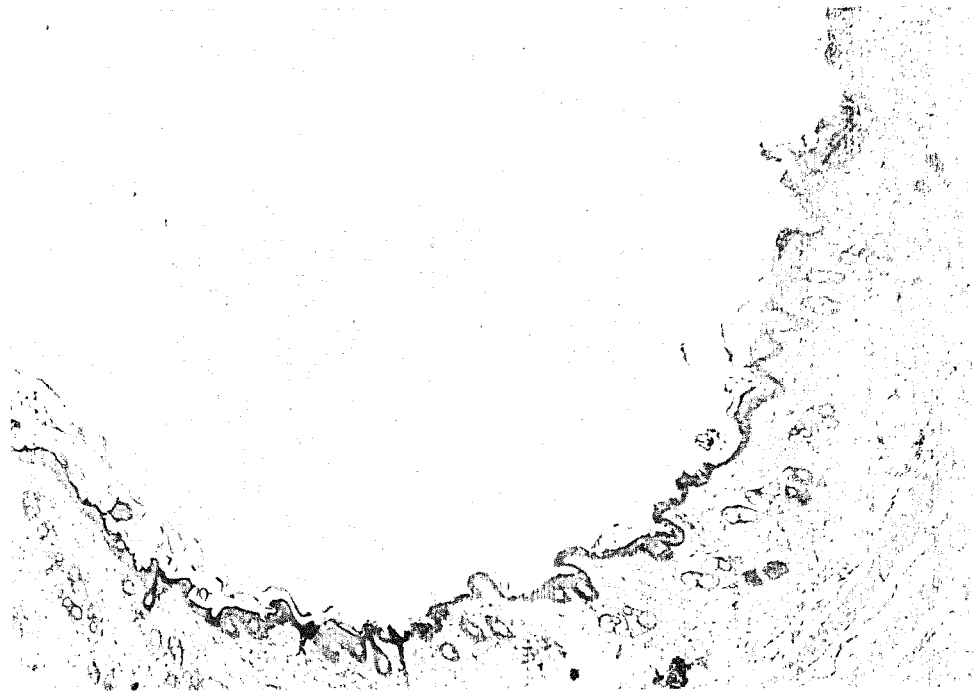


Figure 13.1 Mice were treated topically with 200ul NO-HNTA 10 umol (H & E \times 40)

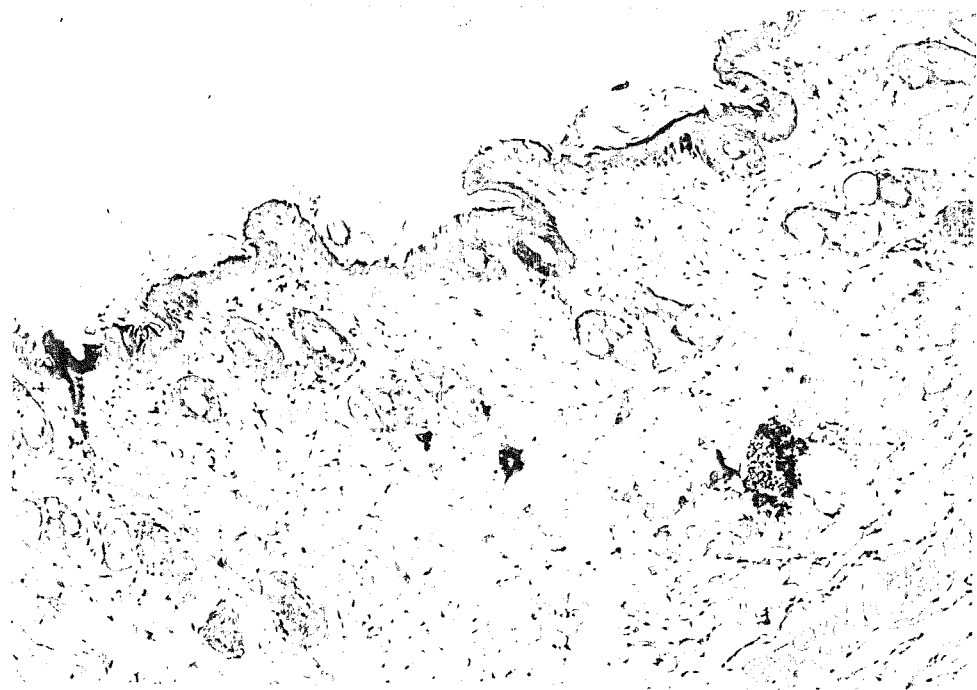


Figure 13.2 Mice were treated topically with 200ul NO-HNTA 10 umol (H & E \times 100)

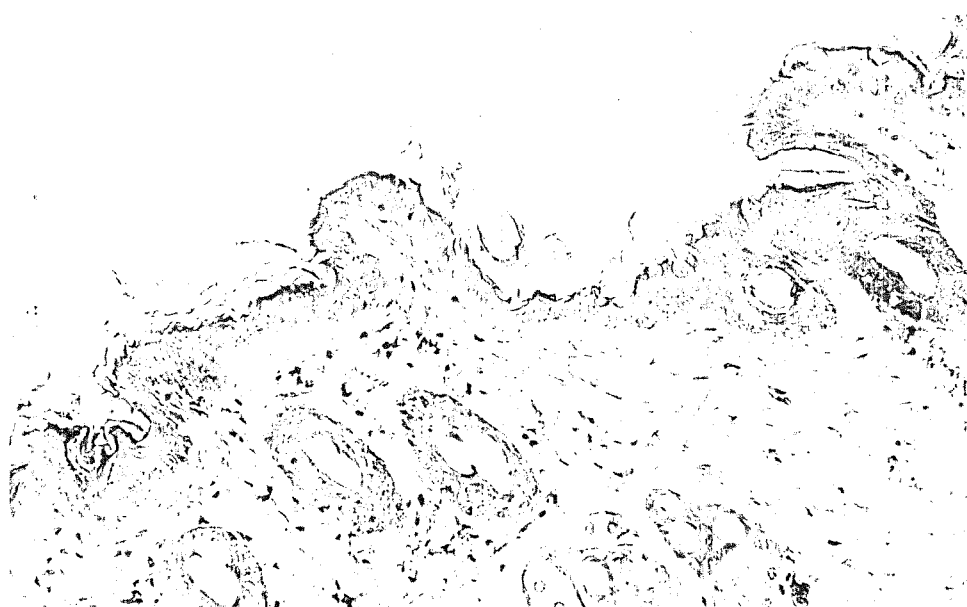


Figure 13.3 Mice were treated topically with 200ul NO-HNTA 10 umol (H & E \times 200)

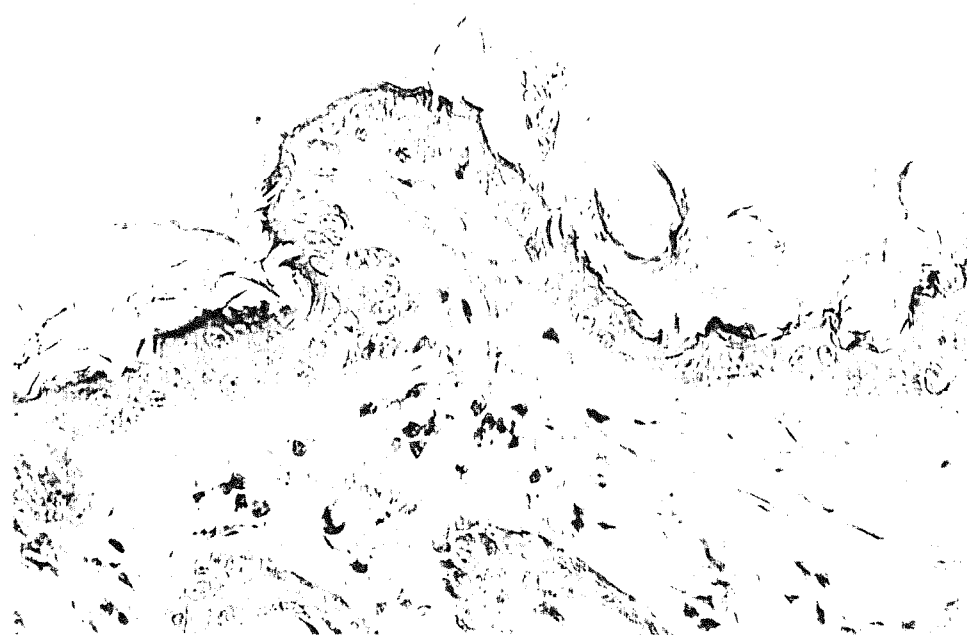


Figure 13.4 Mice were treated topically with 200ul NO-HNTA 10 umol (H & E \times 400)

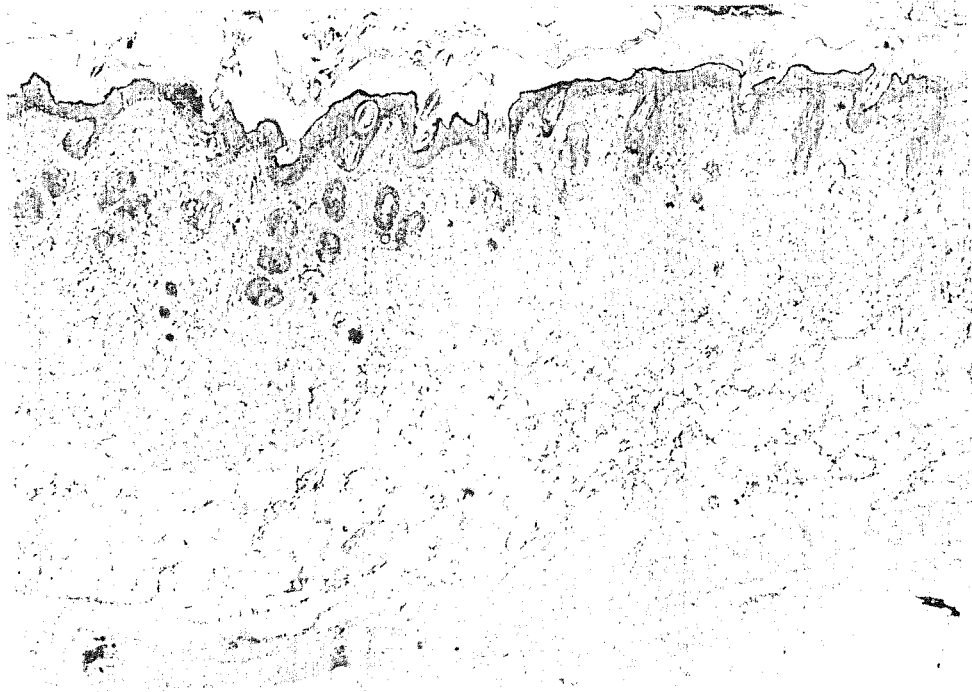


Figure 14.1 Mice were treated topically with 200ul NO-HNTA 50 umol (H & E \times 40)

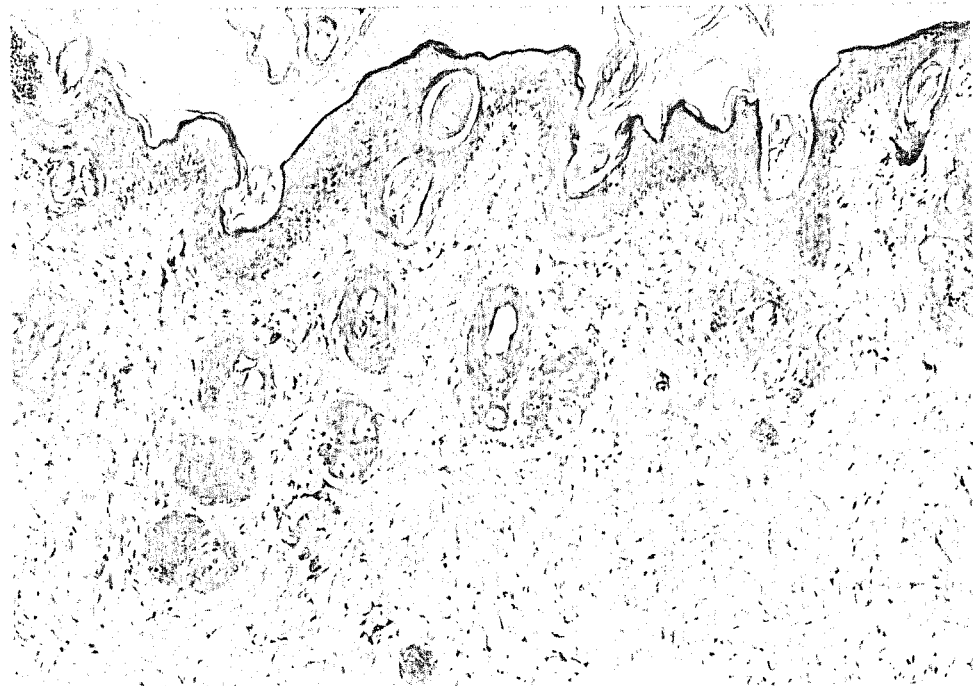


Figure 14.2 Mice were treated topically with 200ul NO-HNTA 50 umol (H & E \times 100)

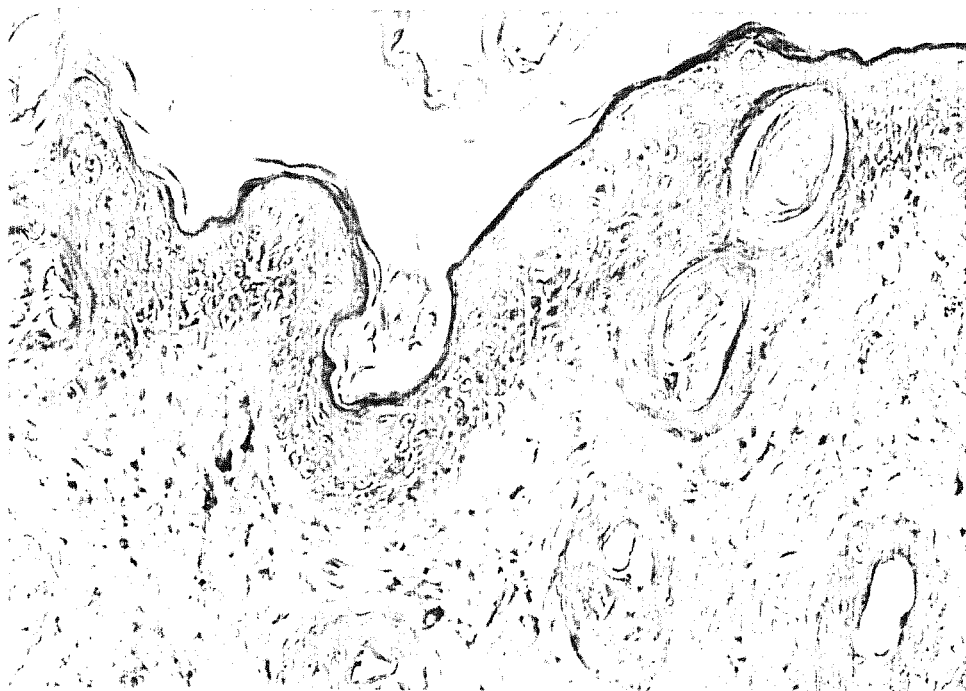


Figure 14.3 Mice were treated topically with 200ul NO-HNTA 50 umol (H & E \times 200)

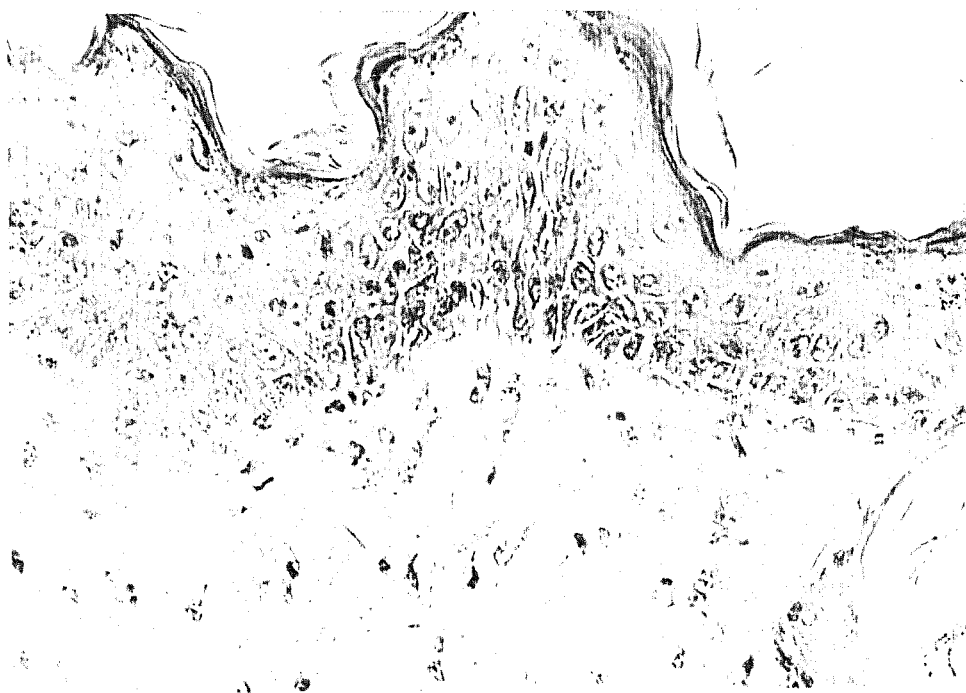


Figure 14.4 Mice were treated topically with 200ul NO-HNTA 50 umol (H & E \times 400)

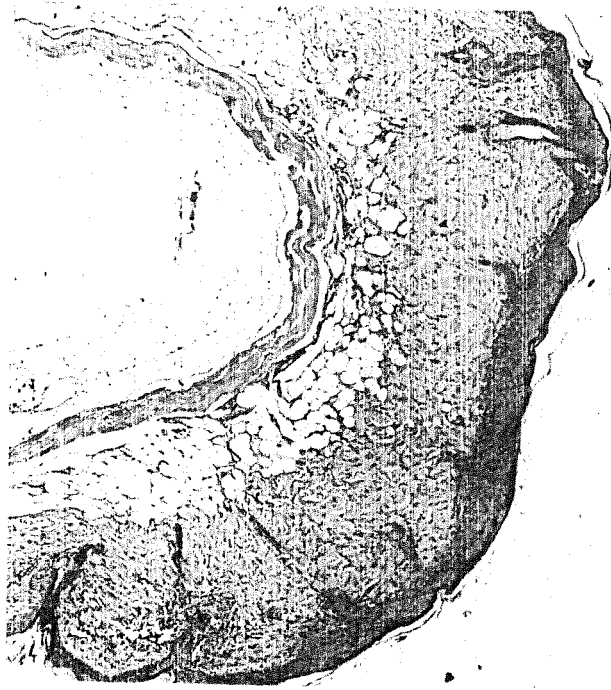


Figure 15.1 Mice were treated topically with 200ul NO-HNTA
250 umol (H & E \times 40)

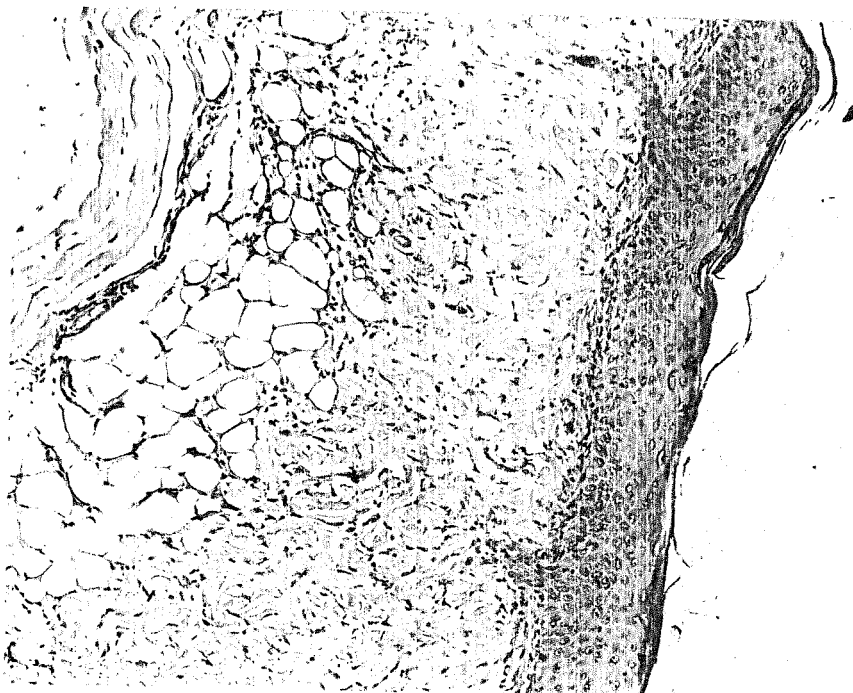


Figure 15.2 Mice were treated topically with 200ul NO-HNTA
250 umol (H & E \times 100)

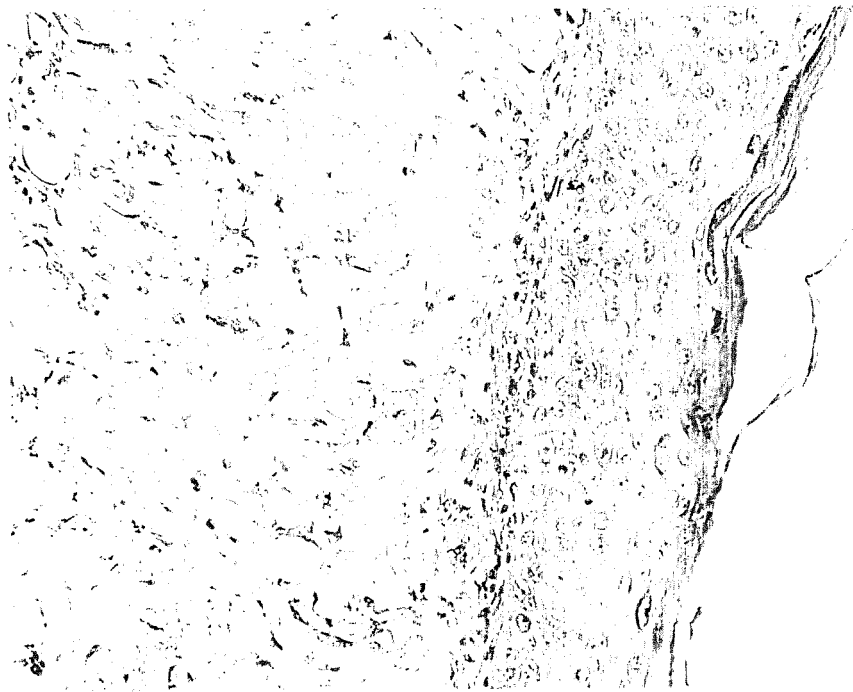


Figure 15.3 Mice were treated topically with 200ul NO-HNTA
250 umol (H & E \times 200)

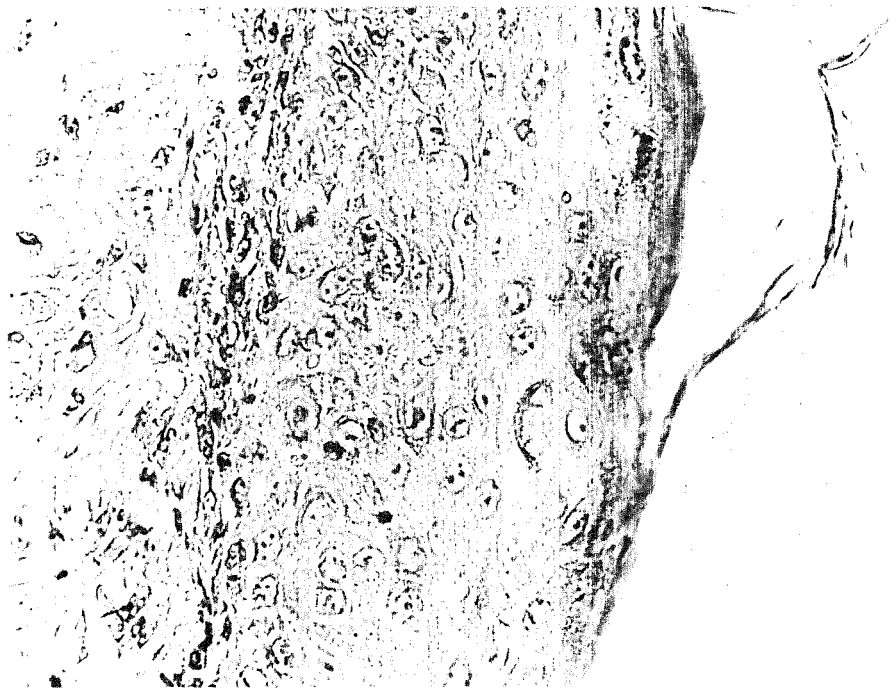


Figure 15.4 Mice were treated topically with 200ul NO-HNTA
250 umol (H & E \times 400)

Table VII . Effect of NO-HNTA-induced epidermal ornithine decarboxylase in mouse skin

Treatment ^a	Ornithine decarboxylase (cpm CO ₂ /μg protein)
Normal	66.71 ± 7.43
Acetone	74.97 ± 5.14
NO-HNTA	
10.0 umol	585.81 ± 99.93*
50.0 umol	1218.48 ± 138.37*
250.0 umol	1843.27 ± 234.83*

^a Mices were treated with acetone (200 μl), NO-HNTA in acetone (200 μl). Five hours later, the animals were killed and the epidermis was isolated. Ornithine decarboxylase activity was determined. The data present the mean ± SD from 6 mice/group.

* Staistically different from acetone-treated group (p < 0.001).

Table VIII . The formation of H₂O₂ in mouse skin by topical treatment of NO-HNTA

Treatment ^a	H ₂ O ₂ (nmol/cm ²)
Normal	10.97 ± 2.16
Acetone	11.92 ± 2.43
NO-HNTA 10.0 umol	16.40 ± 5.54 ^b
50.0 umol	23.19 ± 6.36 ^b
250.0 umol	38.89 ± 10.50 ^b

^a Mices were treated with acetone (200 µl), NO-HNTA in acetone (200 µl). 20 hours later, the animals were treated again. The mices were killed after the second treatment 1 h and the skin were removed. The formation of H₂O₂ were determined. The data present the mean ± SD from 6 mice/group.

^b Staistically different from acetone-treated group (p < 0.01).

Table IX . The formation of MPO activity in mouse skin by topically treated with NO-HNTA

Treatment ^a	MPO (units/cm ²)
Normal	1.74 ± 0.41
Acetone	2.07 ± 0.50
NO-HNTA	
10.0 umol	49.63 ± 7.25*
50.0 umol	131.34 ± 23.50*
250.0 umol	210.78 ± 37.44*

^a Mices were treated with acetone (200 µl), , NO-HNTA in acetone (200 µl). 20 hours later, the animals were treated again. The mices were killed after the second treatment 1 h and the skin were removed. The formation of MPO activity were determined. The data present the mean ± SD from 6 mice/group.

* Staistically different from acetone-treated group (p< 0.001).

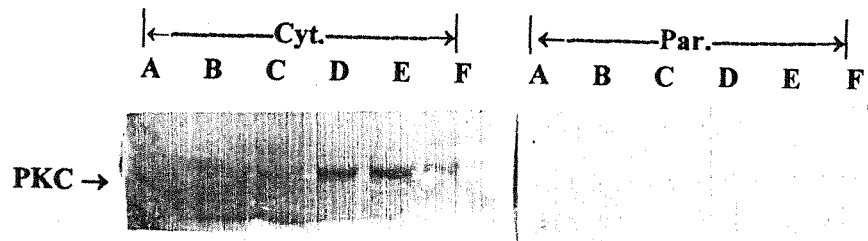


Figure 16. PKC expression in NO-NTA-treated mice epidermis.

Lane A : normal; Lane B, C, D, E and F : NO-NTA-treated for 15 min, 30 min, 60 min, 2hr and 4hr respectively.



Figure 17. Dose-response of PKC expression in NO-NTA-treated mice epidermis.

Lane A : normal control; Lane B : NO-NTA (10 μmol); Lane C : NO-NTA (50 μmol); Lane D : NO-NTA (250 μmol).

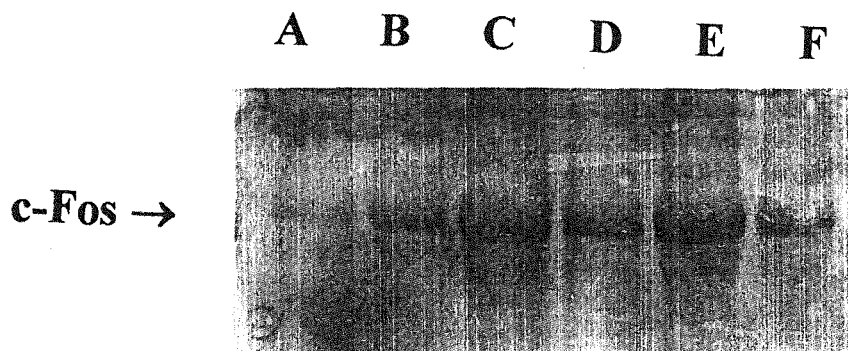


Figure 18.1 C-Fos expression in NO-NTA-treated mice epidermis

Lane A : normal; Lane B, C, D, E and F : NO-NTA-treated for 15 min, 30 min, 60 min, 2 hr and 4hr respectively.

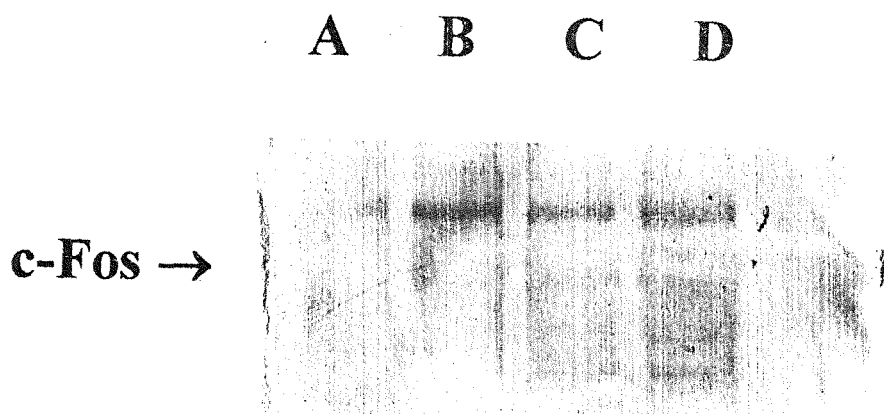


Figure 18.2 Dose-response of c-Fos expression in NO-NTA-treated mice epidermis.

Lane A : normal control; Lane B : NO-NTA (10 μ mol);
Lane C : NO-NTA (50 μ mol); Lane D : NO-NTA (250 μ mol).

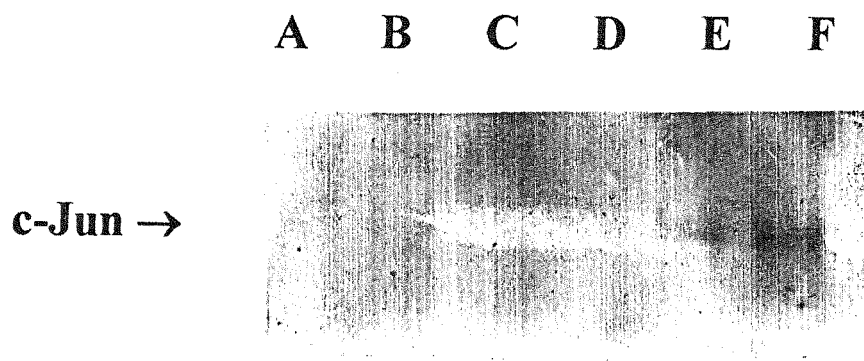


Figure 19.1 C-Jun expression in NO-NTA-treated mice epidermis

Lane A : normal; Lane B, C, D, E and F : NO-NTA-treated for 15 min, 30 min, 60 min, 2 hr and 4hr respectively.

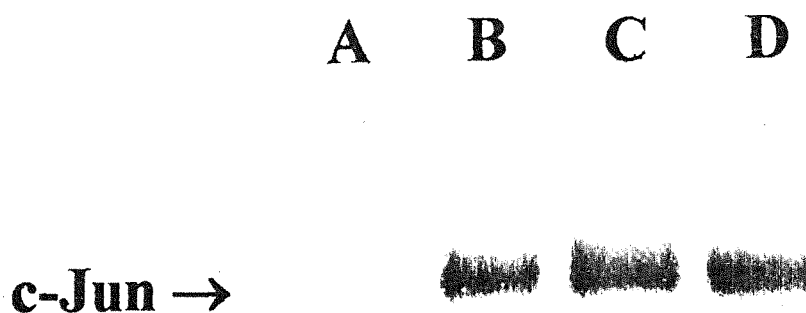


Figure 19.2 Dose-response of c-Jun expression in NO-NTA-treated mice epidermis.

Lane A : normal control; Lane B : NO-NTA (10 μmol);
Lane C : NO-NTA (50 μmol); Lane D : NO-NTA (250 μmol).

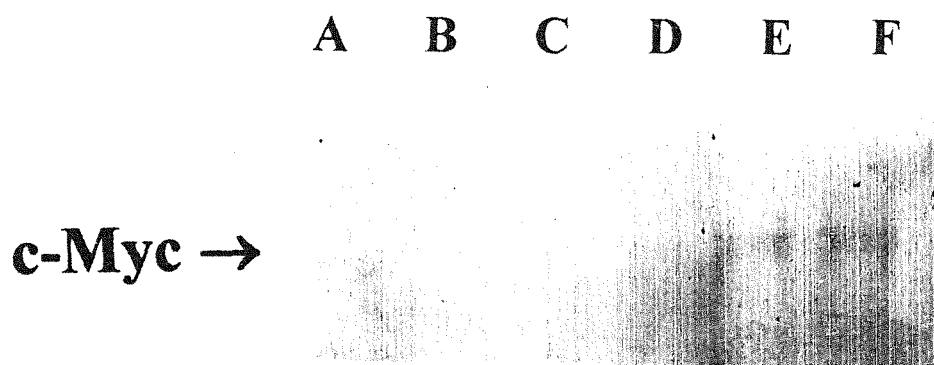


Figure 20.1 C-Myc expression in NO-NTA-treated mice epidermis

Lane A : normal; Lane B, C, D, E and F : NO-NTA-treated for 15 min, 30 min, 60 min, 2 hr and 4hr respectively.

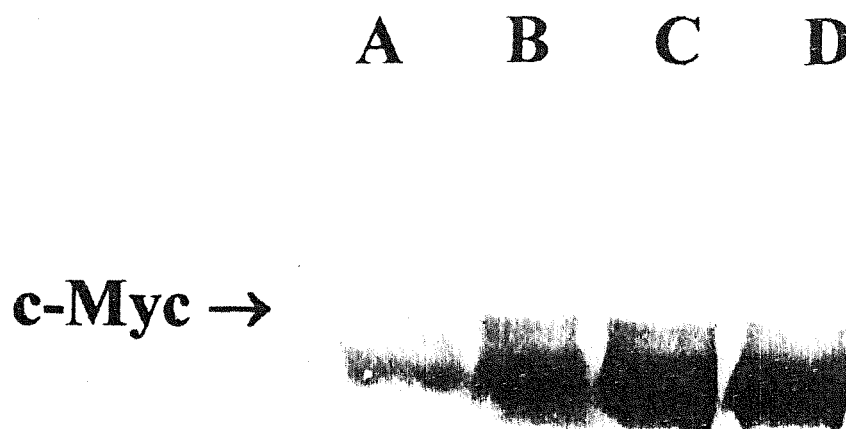


Figure 20.2 Dose-response of c-Myc expression in NO-NTA-treated mice epidermis.

Lane A : normal control; Lane B : NO-NTA (10 μmol);
Lane C : NO-NTA (50 μmol); Lane D : NO-NTA (250 μmol).

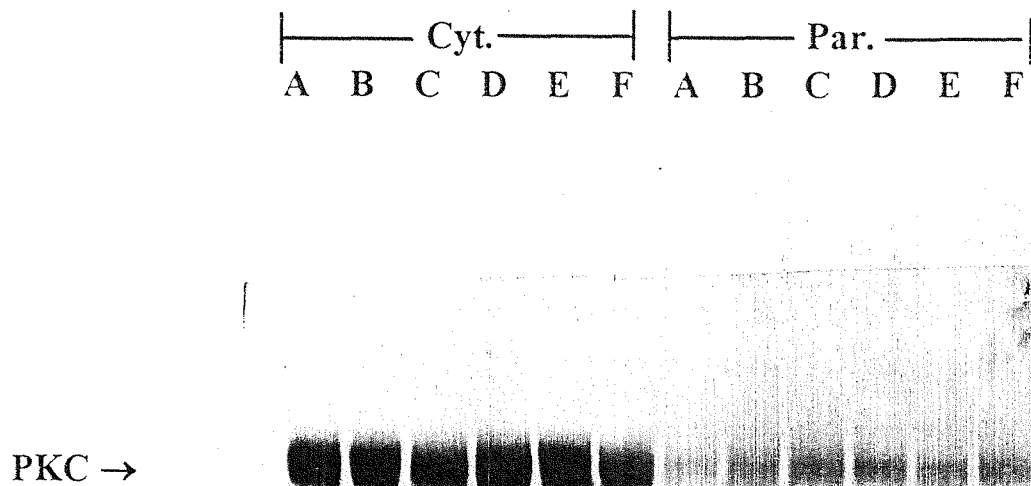


Figure 21. PKC expression in NO-HNTA-treated mice epidermis.

Lane A : normal; Lane B, C, D, E and F : NO-HNTA-treated for 15 min, 30 min, 60 min, 2hr and 4hr respectively.

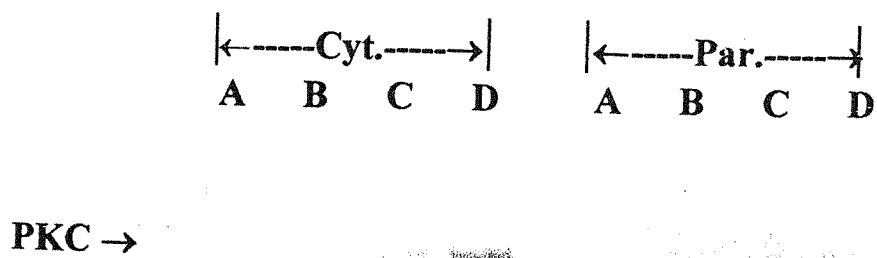


Figure 22. Dose-response of PKC expression in NO-HNTA-treated mice epidermis.

Lane A : normal control; Lane B : NO-HNTA (10 μmol); Lane C : NO-HNTA (50 μmol); Lane D : NO-HNTA (250 μmol).

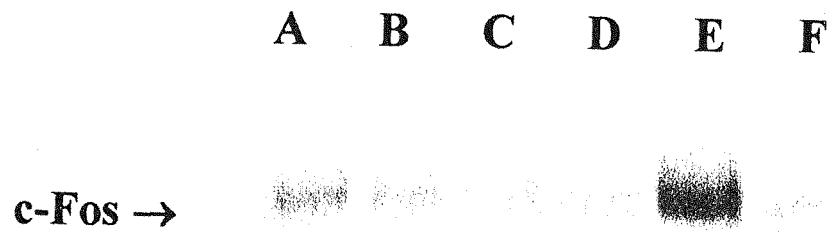


Figure 23.1 C-Fos expression in NO-HNTA-treated mice epidermis

Lane A : normal; Lane B, C, D, E and F : NO-HNTA-treated for 15 min, 30 min, 60 min, 2 hr and 4hr respectively.

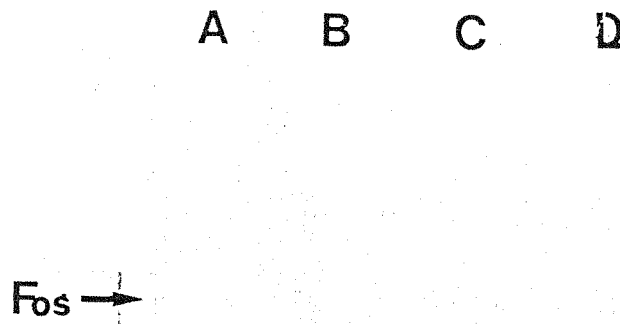


Figure 23.2 Dose-response of c-Fos expression in NO-HNTA-treated mice epidermis.

Lane A : normal control; Lane B : NO-HNTA (10 μmol);
Lane C : NO-HNTA (50 umol); Lane D : NO-HNTA (250 μmol).

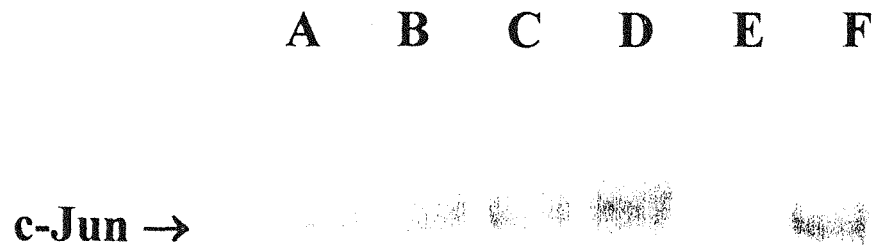


Figure 24.1 C-Jun expression in NO-HNTA-treated mice epidermis

Lane A : normal; Lane B, C, D, E and F : NO-HNTA-treated for 15 min, 30 min, 60 min, 2 hr and 4hr respectively.

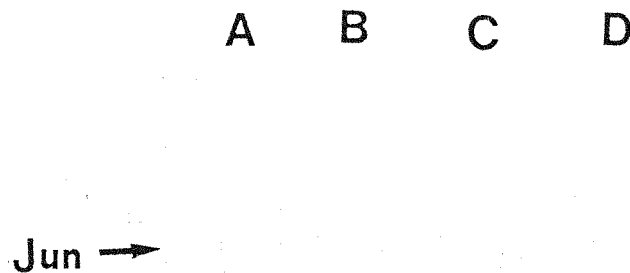


Figure 24.2 Dose-response of c-Jun expression in NO-HNTA-treated mice epidermis.

Lane A : normal control; Lane B : NO-HNTA (10 μ mol);
Lane C : NO-HNTA (50 μ mol); Lane D : NO-HNTA (250 μ mol).

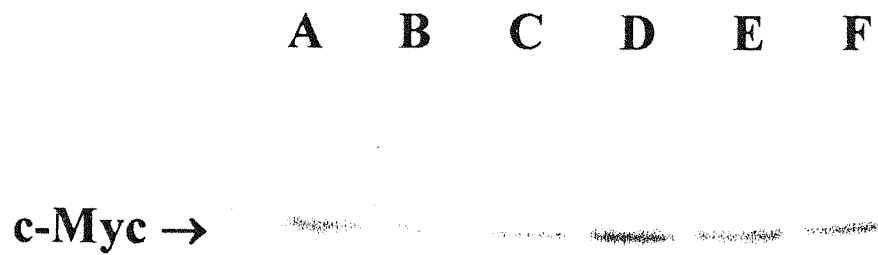


Figure 25.1 C-Myc expression in NO-HNTA-treated mice epidermis

Lane A : normal; Lane B, C, D, E and F : NO-HNTA-treated for 15 min, 30 min, 60 min, 2 hr and 4hr respectively.

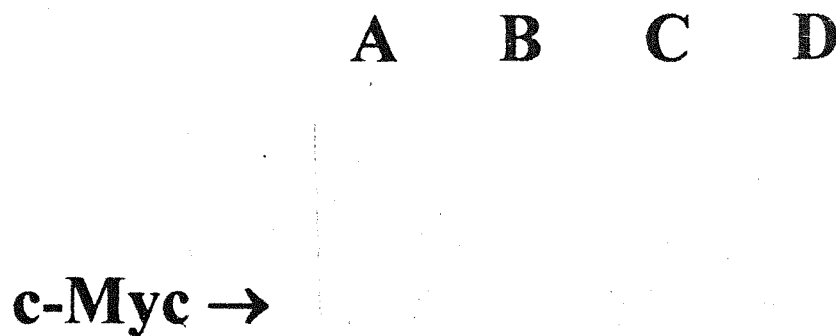


Figure 25.2 Dose-response of c-Myc expression in NO-HNTA-treated mice epidermis.

Lane A : normal control; Lane B : NO-HNTA (10 μ mol);
Lane C : NO-HNTA (50 μ mol); Lane D : NO-HNTA (250 μ mol).

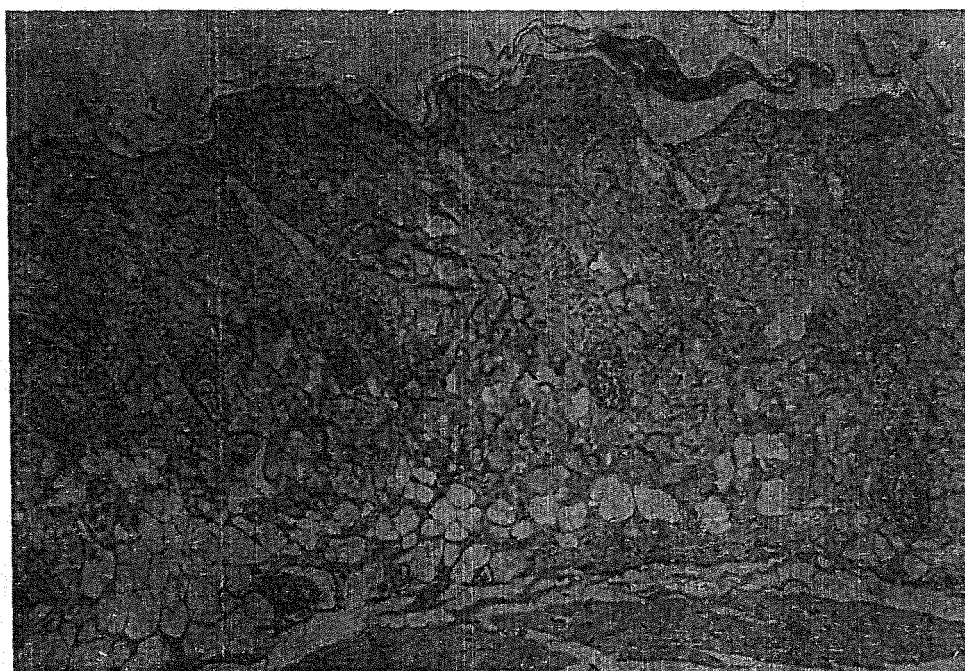


Figure 26.1 The expression of c-Fos in mouse epidermis by treated topically with 10 umol NO-HNTA (100 ×)

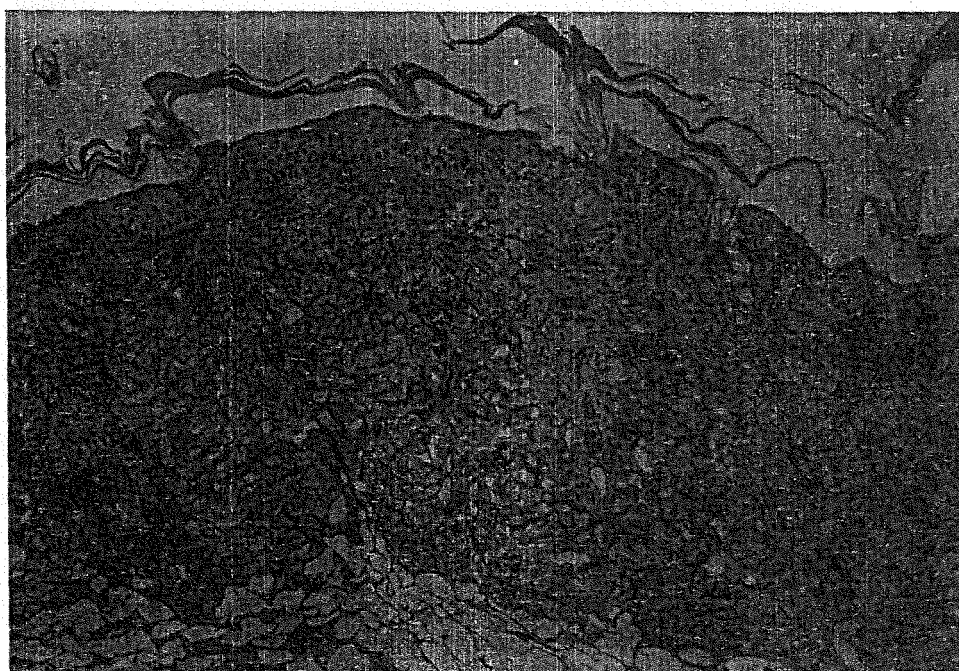


Figure 26.2 The expression of c-Fos in mouse epidermis by treated topically with 250 umol NO-HNTA (100 ×)

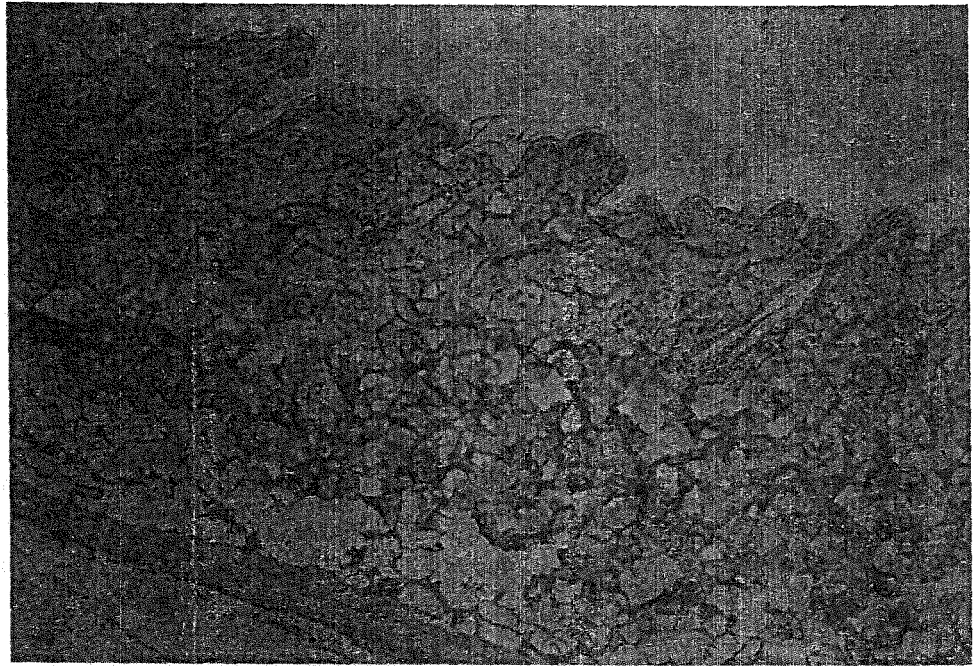


Figure 27.1 The expression of c-Jun in mouse epidermis by treated topically with 10 umol NO-HNTA (100 ×)

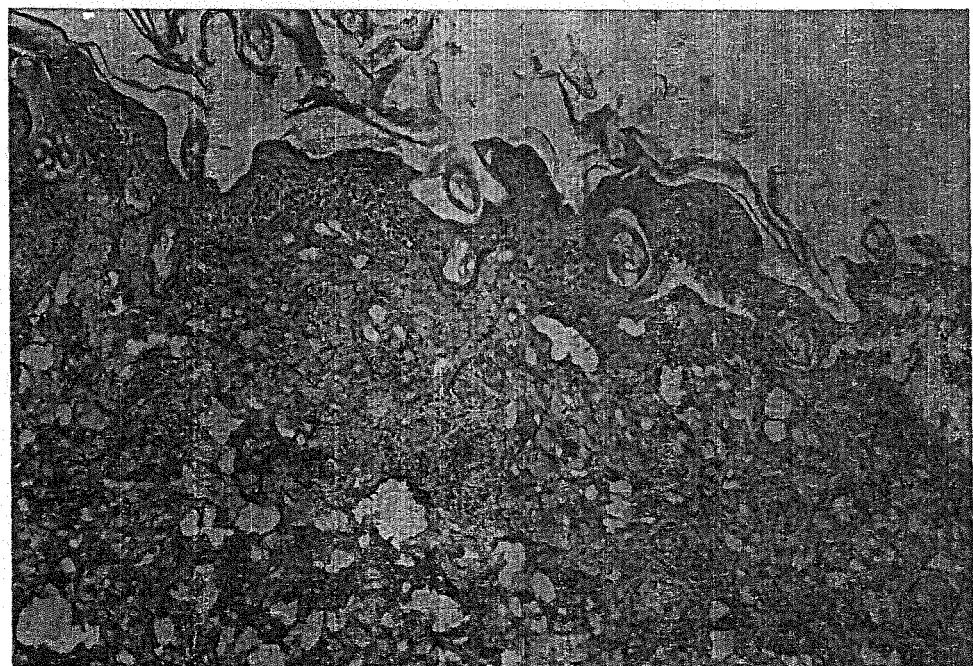


Figure 27.2 The expression of c-Jun in mouse epidermis by treated topically with 250 umol NO-HNTA (100 ×)



Figure 28.1 The expression of c-Myc in mouse epidermis by treated topically with 10 umol NO-HNTA (100 ×)

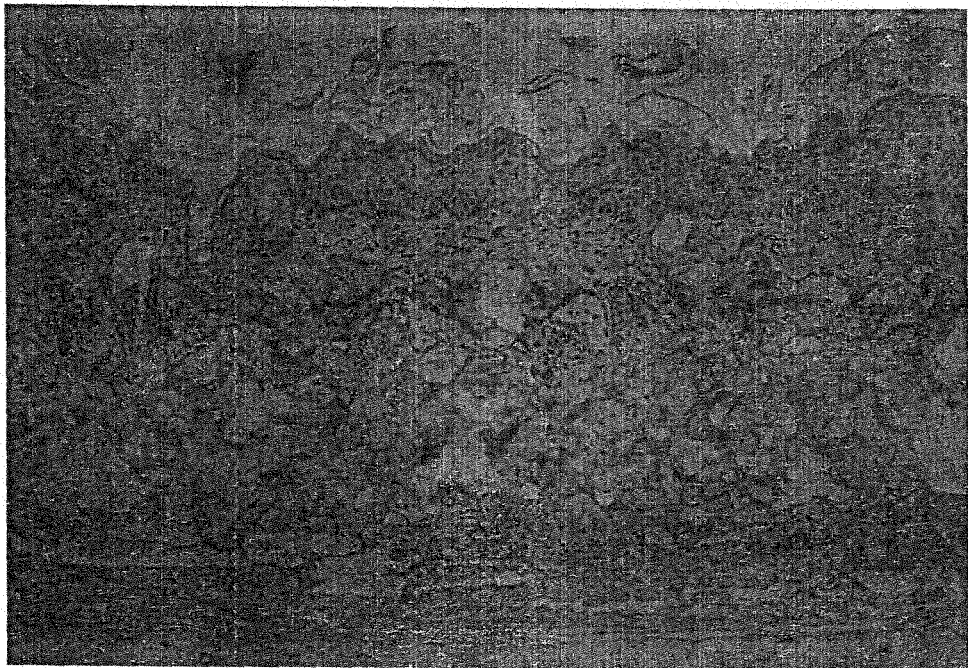


Figure 28.2 The expression of c-Myc in mouse epidermis by treated topically with 10 umol NO-HNTA (100 ×)

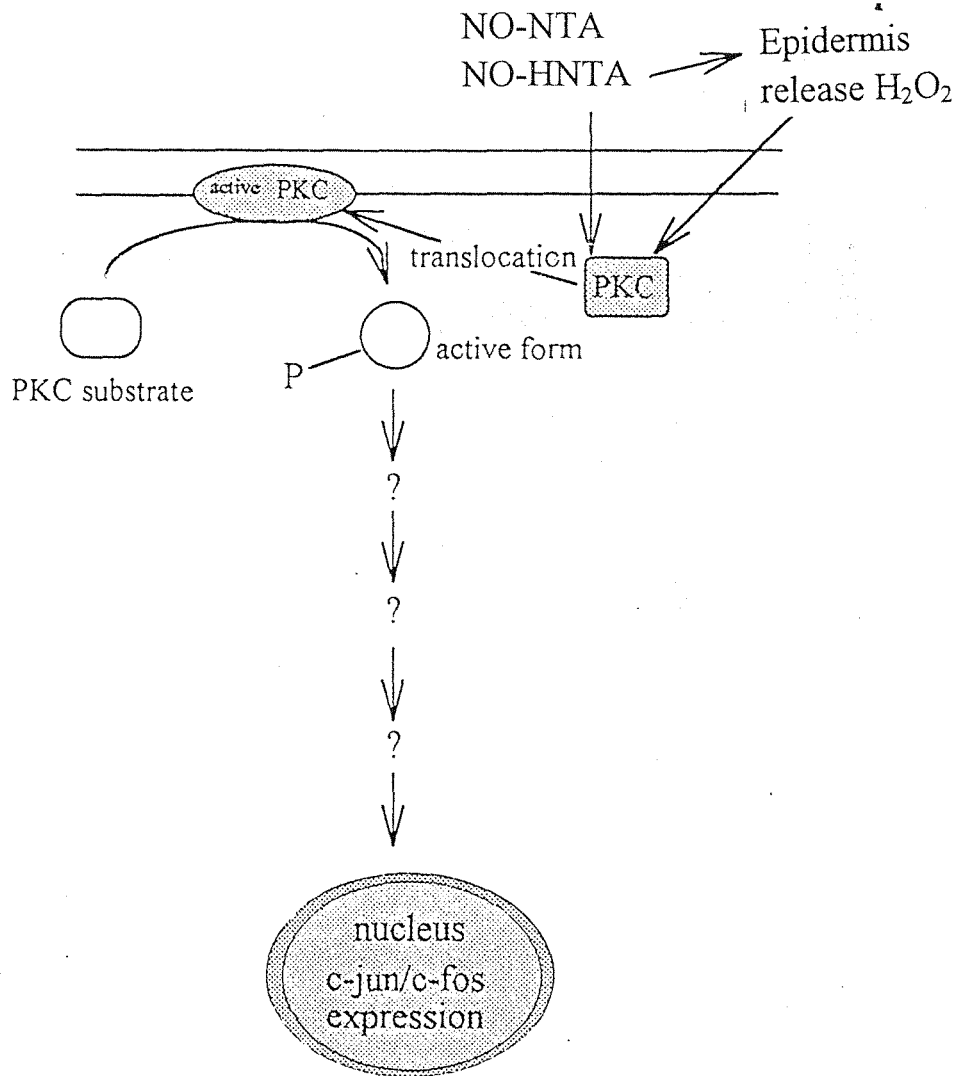
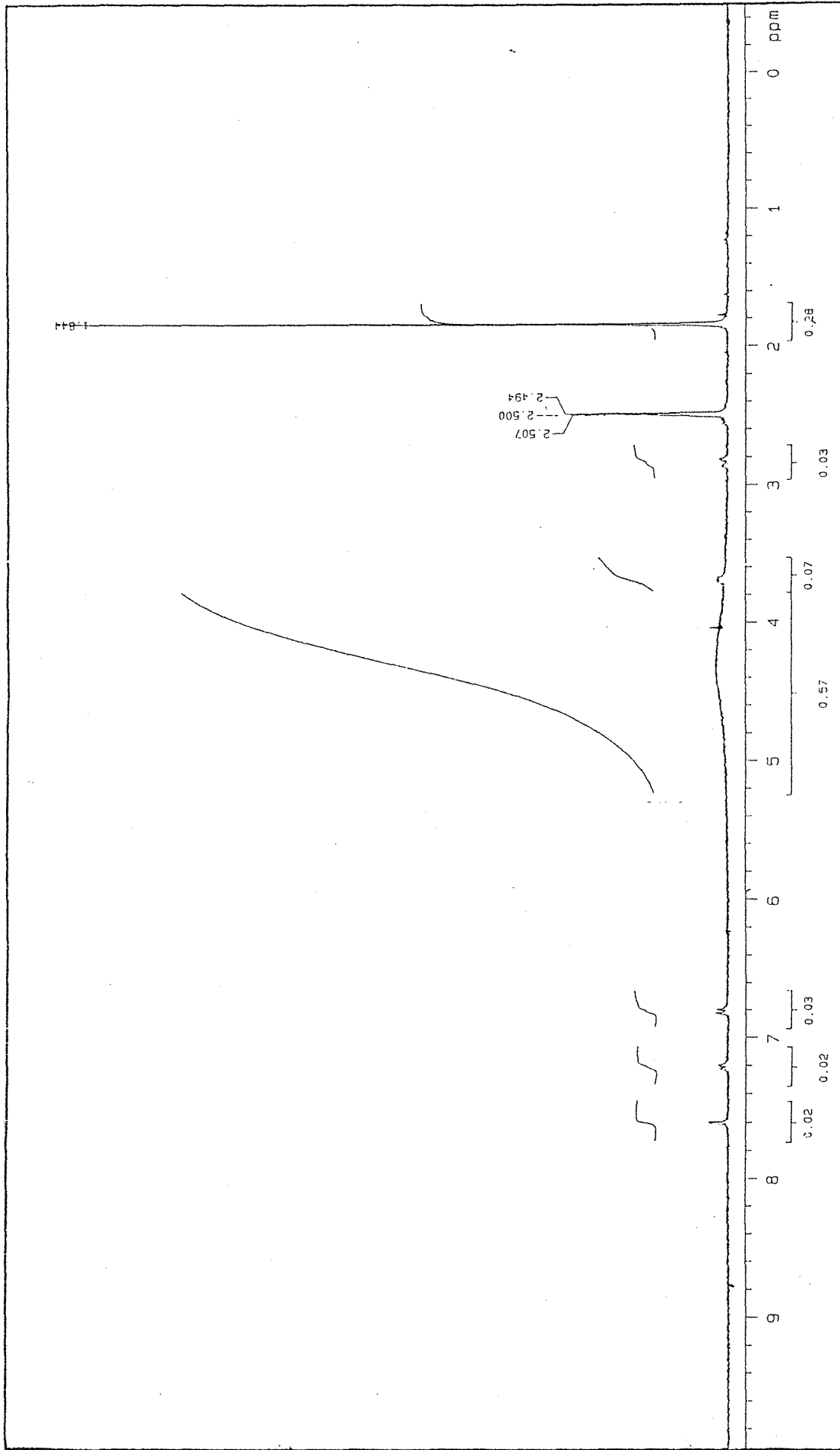
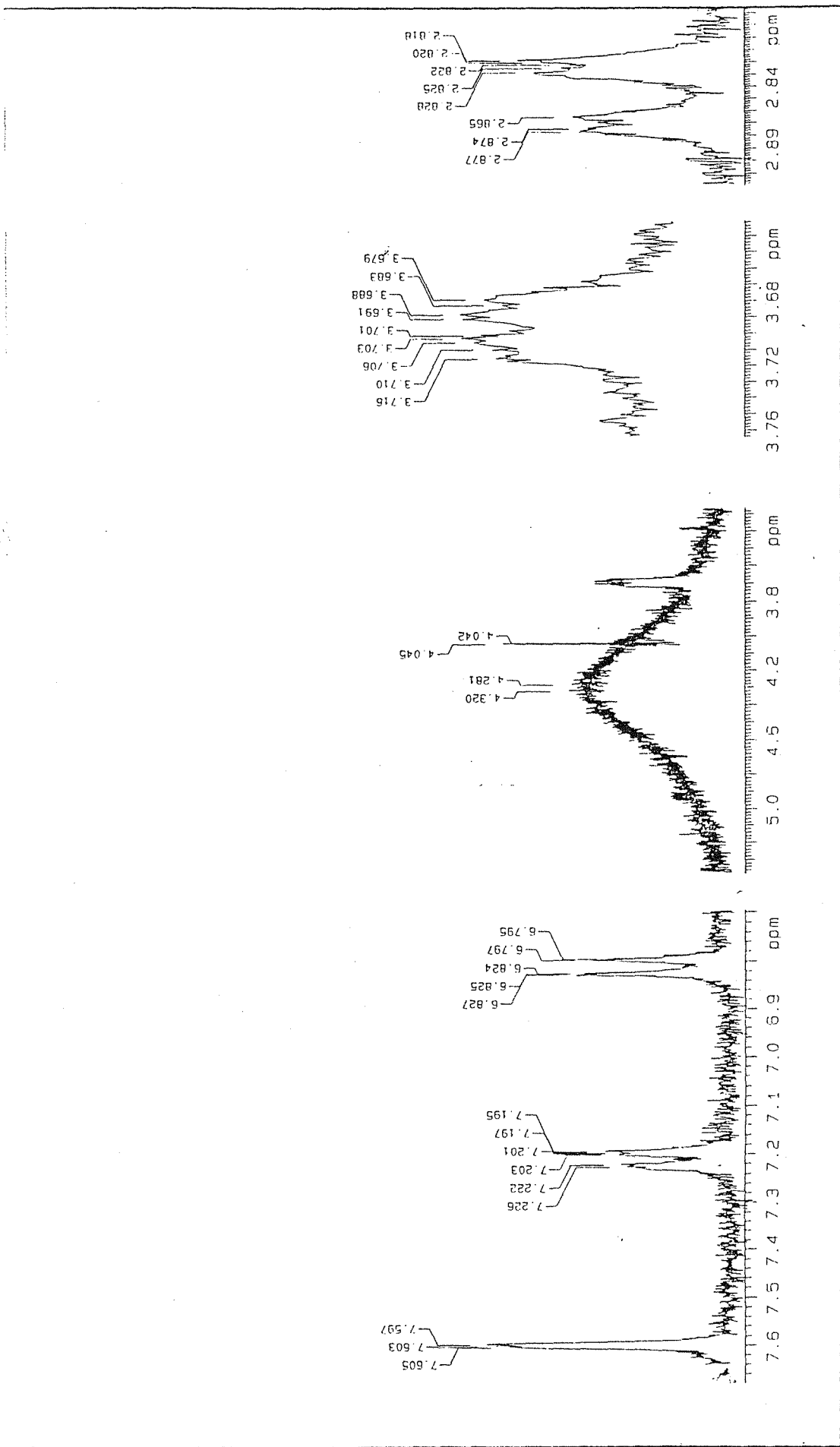


Figure 29. The possible mechanism on NO-NTA and NO-HNTA induced the tumor promotion.



NUCLEUS 1H FREQ 300.135 MHz
 SPEC WIDTH 15.00 Hz OTHER 300.00 Hz
 ACQ TIME 3.00 SEC DELAY 0 SEC
 PULS WIDTH 3.00 SEC TRANSFER 18.00 SEC
 NUCLEUS 1H MODE NOU POWER 15.00 dB
 MEASUREMENT MODE 0 FREQ 300.135 MHz
 PULS WIDTH 3.00 SEC POWER MAGN 18.00 dB
 PLOT/PROCESSING
 REFERENCE WATER WGT 0.37 NO/DAMP 0 SER 150.11 Hz/damp
 LB ADJ used Hz-WF 0 SEC COB 0
 PH ADJ used X Hz 0 SEC CD 0 SEC
 EXPERIMENT
 TUBE CD nm
 TEMP not used °C
 SOLVENT DMSO
 SAMPLE
 TH-B
 FILE 311
 DATE 6-2-84
 XL 300

Figure 30. The ¹H-NMR map analysis of NO-HNTA



OBSERVE: Nucleus 1H Freq 250.135 MHz
 Mode 0.00 Power 15.00 dB
 Acc. Width 4500.00 Hz Offset 300.00 Hz
 Acq. Time 3.00 sec Delay 0 sec
 Pulse Width 3.00 sec Transmits 18.00

DECOUPLE: Nucleus 1H Offset 0 Hz
 Mode 0.00 Power 15.00 dB
 Modulator Mod 0 Hz Freq 300.00 Hz
 Pulse Width 0.00 sec Power Mod 0.00 dB

PLOT/PROCESSING: F1 Mod 0.00 sec CD 0 sec
 US Mod 0.00 sec CD 0 sec
 Width 0.25 Hz/Chan Start 0.12 dB/Chan
 Reference 0.00

EXPERIMENT: Pulse Sequence 2d11
 Tube ID mm
 Temp not listed °C
 Solvent DMSO

SAMPLE: TH-9
 FW 8x2
 DW 5.34
 AL 300

NATIONAL SCIENCE COUNCIL
 CENTRAL INSTRUMENTATION CENTER

Figure 31. The ¹H-NMR map analysis of NO-HNTA

1488

exp2 std1dc

```

SAMPLE          DEC. & UT
date   Oct 18 96   dfrq   289.943
solvent DMSO d1      HI
file    exp dpr    not used
ACQUISITION
sfrq   75.429 dm      VVV
tn     C13 dms      u
at     1.002 def      9900
np     44032 dsng    undefined
su     21978.0 dres  undefined
fb     12200 homo    n
bs     16          PROCESSING
pu     7.0 lb       J.00
di     2.000 utitle
tof     1500.0 proc   ft
nt     20000 fn      not used
ct     15632 math    f
alock  n
gain   J6 unrr      n
FLAGS   n unxp      uft
ll     n n ubx      uft
ln     n n y
dp     y
hs     nn
DISPLAY
sp     -754.5
up     17341.9
vs     1300
sc     0
uc     250
hzmw   69.37
ls     1.33399e+07
rfl    5115.0
rfp    2979.5
tk     23
fns    1.800
nw no ph

```

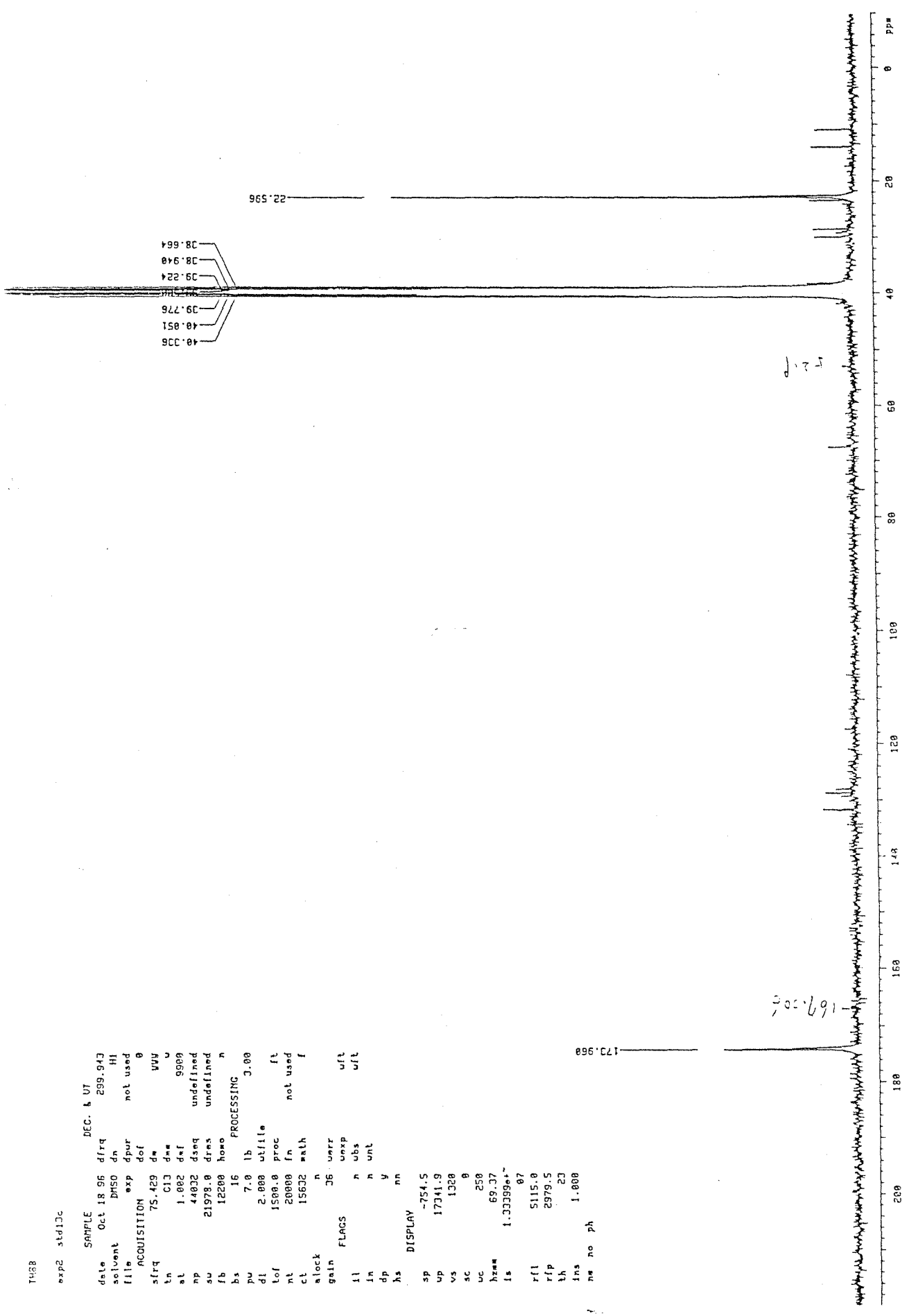
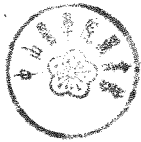


Figure 32. The ¹³C-NMR map analysis of NO-HNTA



NONAME.SPE

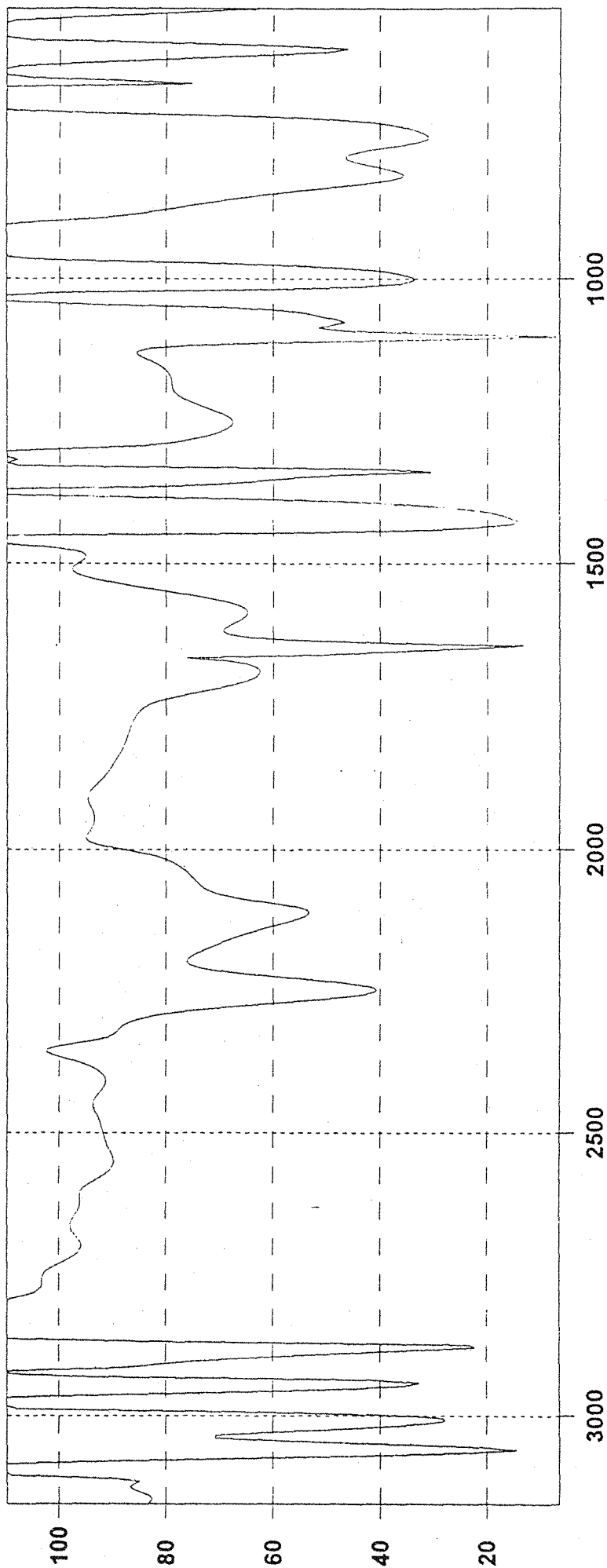


Figure 33. The IR map analysis of NO-HNTA

Mass Library Spectrum J

Library Database : Public/NIST

Entry No. : 41915

Name : 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester

MW : 390 BP : m/z 149.0 Formula : C₂₄H₃₈O₄

CAS No. : 27554-26-3 EPA No. : 62126 R.Index :

Inlet Type : Note : D.HENNEBERG, MAX-PLANCK INSTITUTE, MULH...

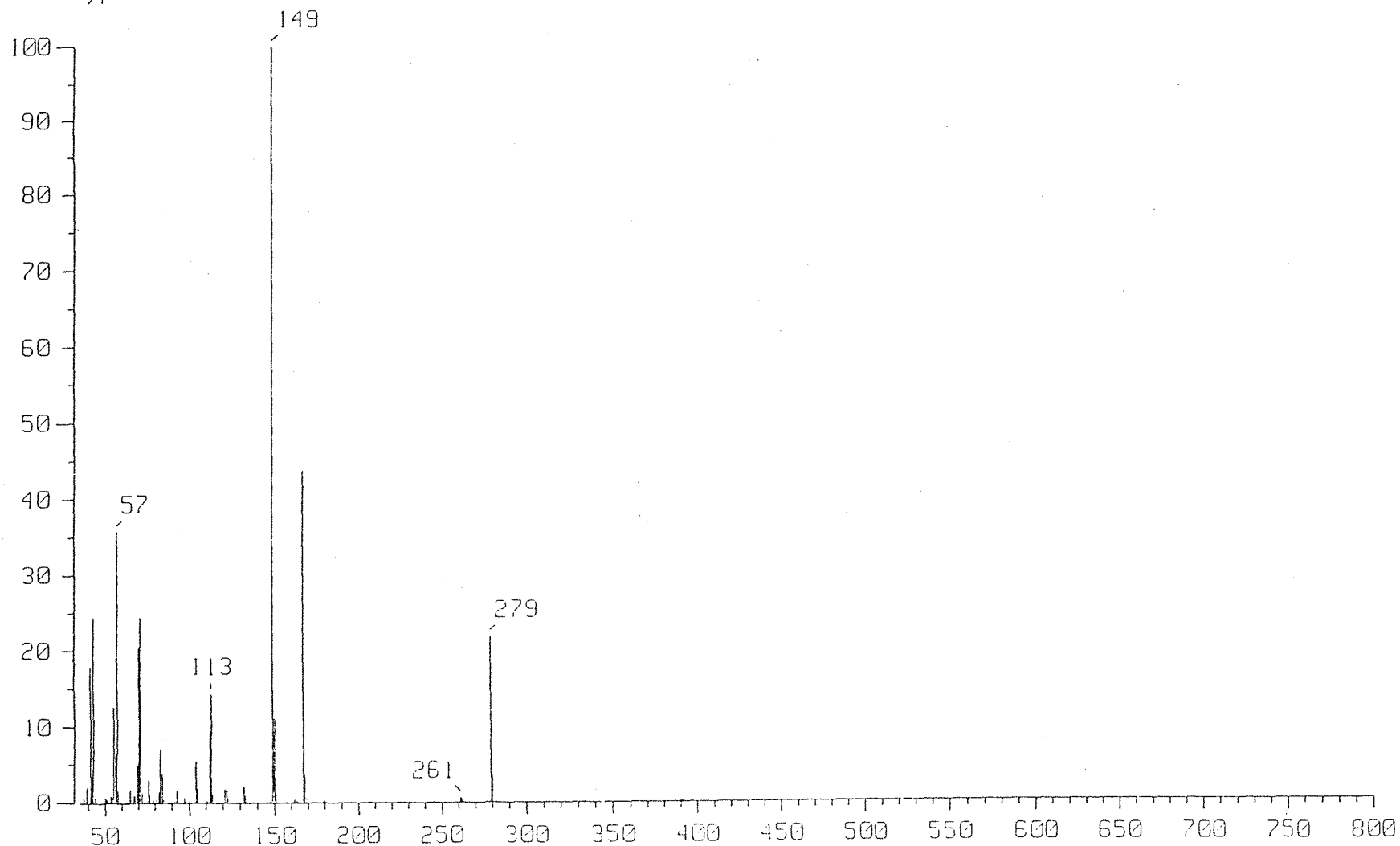


Figure 34. The Mass map analysis of NO-HNTA

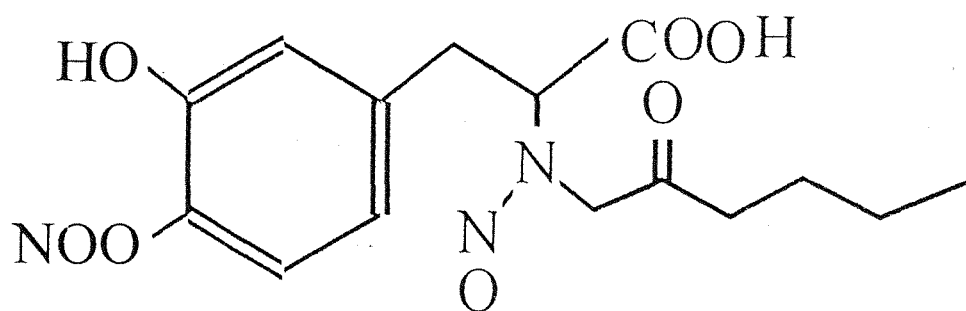


Figure 35. The structure of NO-HNTA

第十章

參考文獻

1. Maillard L. C. Action des caids amines sur les sucres: formation des melanoidines par voie methodique., *C. R. Acad. Sci.*, 154, 66, 1912.
2. Greenshields R. N., Caramel II. Manufacture, composition and properties., *Process Biochem.*, 8, 17, 1973.
3. Reymond D., and Rostagno W., Flavor aspects of chocolate, in Flavor of foods and Beverages, Chemistry and technology., Charalambous, G. and Inglett, G. E., Eds., *Academic Press*, New York, 1978, 75.
4. Tressl R., Grunewald K. G., Kamperschroer H., and Silwar R., Formation of pyrroles and aroma contributing sulfur components in malt and roasted coffee., *Prog. Food Nurt. Sci.*, 5, 71, 1981.
5. Flokes D. J., and Gramshaw J. W., the flavour and volatiles of whote bread crust., *Prog. Food Nurt. Sci.*, 5, 369, 1981.
6. Hodge j. E., Dehydrated foods: chemistry of browng reaction in model systems., *J. Agric. Food Chem.*, 1, 928, 1953.
7. Mauron j., The Maillard reaction in food: a critical review from the nutritional standpoint., *Prog. Food Nutr. Sci.*, 5, 5, 1981.
8. Henry K. M., Kon S. K., Lea C. H., and White J. C., Deterioation on storage of dried skin milk., *J. Dairy Res.*, 15, 292, 1948.
9. Rao M. N., sreenivas H., Swaminathan m., Carpenter K. J., and

- Morgen C. B., The nutritionally available lysine and methionine of heated casein-glucose mixtures., *J. Sci. Food Agric.*, 14, 544, 1963.
10. Wiseman r. F., and Gordon H. A., reduced levels of a bioactive substance in the caecal content of gnotobiotic rats monoassociated with *Salmonella typhimurium*., *Nature*, 205, 502, 1965
 11. Adrian J., Nutritional and physiological consequences of the Maillard reaction., *World. Rev. Nutr. Diet.*, 19, 71, 1974.
 12. Lee T. C., Kimiagar M., Pintauro S. J., and Chichester C. O., Physiological and safety aspects of Maillard browning of foods., *Prog. Food Nutr. Sci.*, 5, 243, 1981.
 13. Kimiagar M., Pintauro S. J., and Chichester C. O., Longterm feeding effects of browning egg albumin to rats., *J. Agric. Food Chem.*, 38, 150, 1980.
 14. Gaunt I. F., Llotd A. G., Grasso P., Gangolli S. D., and Butterworth K. R., Short-term study in the rat on two caramels produced by variations of the ammonia process., *Food Chem. Toxicol.*, 26, 195, 1988.
 15. Evans J. G., Butterworth K. R., Gaunt I. F., and Grasso P., Long-term toxicity study on the rat of a caramel produced by the " half open-half closed pan " ammonia process., *Food Chem. Toxicol.*, 26, 195, 1988.
 16. Castellino n., Elmino O., and Rozera G., Experimental research on toxicity of furfural., *Arch. Environ. Health*, 7, 574, 1975.
 17. Kerstin S., and Margaretha J., Effect of monosaccharides on the formation of food mutagens in model systems., *Mut. Res.*, 230, 263, 1990.

18. Hirohisa O., Nazmav J., Kazuki S., and Hiroki M., Formation of mutagens by the Maillard reaction.,
19. Aeschbacher H. U., Chappuis C., and Wurzer H. P., Mutagenicity testing of coffee: a study of the problems encountered with the Ame's salmonella test system., *Food Cosmet. Toxicol.*, 18, 605, 1980.
21. Lin J. K., Lee Y. J., and Chang H. W., High concentrations of dimethylamine in squid and octopus and their implication in tumor etiology., *Fd Chem. Toxicol.*, 21, 143, 1983.
22. Lin J. K., and Yen J. Y., Changes in the nitrate and nitrite contents of fresh vegetables during cultivation and post harvest storage., *Fd Chem. Toxicol.*, 18, 597, 1980.
23. Goaz P. W., and Biswel H. A., Nitrite reduction in whole saliva., *J. Dent. Res.*, 40, 355, 1961.
24. Eisenbrand G., Spiegelhalder B., and Prussmann R., Nitrate and nitrite in saliva., *Oncology*, 37, 227.
25. Bellander T., Osterdahl B., and Hagmar L., Formation of N-mononitrosopiperazine in the stomach and its excretion in the urine after oral intake of piperazine. *Toxico Appl. Pharmacol.*, 80, 193, 1985.
26. Joseph H. H., and Robert G. C., Nitrate, nitrite, and nitroso compounds in foods., *Food Tech.*, Apr., 127, 1987.
27. Bogovski p., and Bogovski S., Animal species in which N-nitroso compounds induce cancer., *Int. J. Cancer*, 27, 471, 1981.
28. Helmut B., Hiroshi O., David E. G., and Brigitte P., Exposure of humans to endogenous N-nitroso compounds: implications in cancer etiology., *Mut. Res.*, 238, 255, 1990.
29. Hirshisa T., and Makiko, H., Malignant transformation of mouse

- BALB/c3T3 cells induced by NaNO_2 ., *Carcinogenesis*, 11, 595, 1990.
30. Luigi R., Pia C., Renata F., and Giovanni B., DNA damage induced in rats by oral administration of Chlordiazepoxide plus sodium nitrite or of N-nitrosochlordiazepoxide., *Toxicol. Applied Phar.*, 102, 186, 1990.
 31. Grant D., and Butler W. H., Chronic toxicity of sodium nitrite in the male F344 rat., *Food Chem. Toxicol.*, 27, 565, 1989.
 32. Gerald F. R., Nitrite interactions in Maillard browning systems., *Amer. Chem. Soci.*, 18, 83, 1983.
 33. Lynch S. C., Gruenwedel D. W., and russell G. F., Mutagenic activity if a nitrosated early Maillard product: DNA synthesis (DNA repair) induced in Hela S3 carcinoma cells by nitrosated 1-(N-L-tryptophan)-1-deoxy-D-fructose., *Food Chem. Toxicol.*, 21, 551, 1983.
 34. Ferretti A., and Flangen V. P., Characterization of volatile constituents of an N-formyl-L-lysine-D-lactose browning system., *J. Agric. Food Chem.*, 21, 35, 1973.
 35. Kato H., Nakayama T., Sugimoto S., and Hayase F., Volatile and nonvolatile Maillard reaction products between L-lysine and D-glucose., *Agric. Biol. Chem.*, 46, 2599, 1982.
 36. Shaw P. E., and Berry R. E., Hexose-amino acid dehydration studies involving formation of pyrrole, furans, and other low molecular weight products., *J. Agric food Chem.*, 25, 641, 1977.
 37. Yen G. C., and Lee T. C., Mutagen formation in the reaction of Maillard browning, 2-acetyl pyrrole and its analogens, with nitrite., *Food Chem. Toxic.*, 24, 1303, 1986.
 38. Wang C. T., Lin Y. L., and Lin J. K., mutagenicity and cytotoxicity of nitropyrrole compounds derived from the reaction of 2-

acetylpyrrole with nitrite., In press.

39. Wang C. J., Huang H. P., Tseng T. H., Lin Y. L., and Shioh S. J., N-nitroso-N-(3-keto-1,2-butanediol)-3'-nitrotyramine, A new genotoxic agent derived from the reaction of tyrosine and glucose in the presence of sodium nitrite., *Arch. Toxicol.*, 70, 10, 1995
40. Wang C. J., Lee M. J., Chang M. C., and Lin J. K., Inhibition of tumor promotion in benzo[a]pyrene-initiated CD-1 mouse skin by crocetin., *Carcinogenesis*, 16, 187-191, 1995.
41. Huang M. T., Wang Z. T., Georgiadis C. A., Laskin J. D., and Conney A. H., Inhibitory effects of curcumin on tumor initiation by benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene., *Carcinogenesis*, 13, 2183-2186, 1992.
42. Huang M. T., Smart R. C., Wong C. Q., and Conney A. H., Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate., *Cancer Res.*, 48, 5941-5946, 1988.
43. Slaga T. J., Das S. B., Rice J. M., and Thompson S., Fractionation of mouse epidermal chromatin components., *J. Invest. Dermatol.*, 63, 343-349, 1974.
44. Smart R. C., Huang M. T., and Conney A. H., sn-1,2-diacylglycerols mimic the effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate *in vivo* by inducing biochemical changes associated with tumor promotion in mouse epidermis., *Carcinogenesis*, 7, 1865-1870, 1986.
45. Pick E., and Keisari Y., A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture., *J. Immunol. Methods*, 38, 161-170, 1980.
46. Wei H., Tye L., Bresnick E., and Brit D. F., Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice., *Cancer Res.*, 50, 499-502,

1990.

47. Krystyna F., Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage., *Pharmac. Ther.*, 53, 127-166, 1992..
48. huachen W., and Krystyna F., Suppression of tumor promotor-induced oxidative events and DNA damage *in vivo* by Sarcophytol A: A possible mechanism of antipromotion., *Cancer Res.*, 52, 2298-2303, 1992.
49. O'Brien T. G., Simsiman R. C., and Boutwell R. K., Induction of the polyamine-biosynthetic enzyme in mouse epidermis by tumor promoting agents., *Cancer Res.*, 35, 1662-1670, 1975.
50. Lim J. S., Frenkel K., and Troll W., Tamoxifen suppresses tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation by human neutrophils., *Cancer Res.*, 52, 4969-4972, 1992.
51. Huang M. T., Ho C. T., Wang Z. Y., Ferraro T., Finnegan-Olive T., Lou Y. R., Mitchell J. M., Laskin J. D., Newmark H., Yang C. S., and Conney A. H., Inhibitory effect of topical application of a green tea polyphenol fraction on tumor initiation and promotion in mouse skin., *Carcinogenesis*, 13, 947-954, 1992.
52. Lewis J. G., and Adams D. O., Early inflammatory changes in the skin of SENCAR and C57BL/6 mice following exposure to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate., *Carcinogenesis*, 8, 889-898, 1987.
53. Copeland E. S., A National Institutes of Health Workshop Report., Free radicals in promotion—a chemical pathology study section workshop., *Cancer Res.*, 43, 5631-5637, 1983.
54. Cerutti P. A., Prooxidant states and tumor promotion., *Science*, 227, 375-381, 1985.
55. Klein-Szanto A. J. P., and Slaga T. J., Effects of peroxides on rodent skin, epidermal hyperplasia and tumor promotion., *J.*

Invest. Dermatol., 79, 30-34, 1982.

56. Ziboh V. A., Arachidonic acid metabolism in the skin, In S. M. Fischer and T. J. Slaga, Arachidonic acid metabolism and promotion, 6-20, The Hague, Martinus Nijhoff Publishers., 1985.
57. Reiners J. J., Pence B. C., Barcus M. C., and Cantu A. R., 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate dependent induction of xanthine dehydrogenase and conversion to xanthine oxidase in murine epidermis., *Cancer Res.*, 47, 1775-1779, 1987.
58. Solanki V., Rana R. S., and Slaga T. J., Diminution of mouse epidermal superoxide dismutase and catalase activities by tumor promoters., *Carcinogenesis*, 2, 1141-1146, 1981.
59. Reiners J. J., Thai G., Pavone A., Rupp T., and Kodari E., Modulation of catalase activities in murine epidermal cells as a function of differentiation and exposure to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate., *Carcinogenesis*, 11, 957-963, 1990.
60. Murrel G. A. C., Francis M. J. O., and Biomley L., Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals., *Biochem. J.*, 265, 659-665, 1990.
61. Church S. L., Grant J. W., Ridnour L. A., Oberley L. W., Swanson P. E., Meltzer P. S., and Trent J. M., Increased manganese superoxide dimutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 3113-3117, 1993.
62. Niki E., Active oxygens and free radicals in biology., *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, 41(9), 768-773, 1992. (Japanese)
63. Orr F. W., Adamson I. Y., Warner D., The effects of oxygen radical-mediated pulmonary endothelial damage on cancer metastasis., *Mol. Cell. Biochem.*, 84, 189-198, 1988.
64. Inoue M., Kishimoto A., and Takai Y., Studies on a cyclic

- nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Enzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain., *J. Biol. Chem.*, 252, 7610-7616, 1977.
65. Takai Y., Kishimoto A., Iwasa Y., Kawahara Y., Mori T., and Nishizuka Y., Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids., *J. Biol. Chem.*, 254, 3692-3695, 1979.
 66. Hisaki T., Stephane M., Masami S., and Koiti T., Mristorylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) a major protein kinase C substrate is an in vivo substrate of proline-directed protein kinase., *J. Biol. Chem.*, 269, 18299-18302, 1994.
 67. Castagna M., Takai Y., Kaibuchi K., Sano K., Kikkawa U., and Nishizuka Y., Direct activation of calcium-activated phospholipid dependent protein kinase by tumor promoting phorbol esters., *J. Biol. Chem.*, 257, 7847-7851, 1982.
 68. Michell R. H., Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta.*, 415, 81-147, 1975.
 69. Chen C. C., Protein kinase α , δ , ϵ and ζ in C6 glioma cells. TPA induced translocation and down-regulation of conventional and new PKC isoforms but not atypical PKC ζ ., *FEBS Lett.*, 332, 169-173, 1993.
 70. Nishizuka Y., The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion., *Nature*, 308, 693-698, 1984.
 71. Nishizuka Y., Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C., *Science*, 258, 607-614, 1992.
 72. Sharkly N. A., Leach K. L., and Blumberg P. M., Competitive inhibition by diacylglycerol of specific phorbol ester binding., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, 607-610, 1984.

73. Blumber P. M., In vitro studies on the model of action of phorbol ester, potent tumor promoter., Part 2, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 8, 199-234, 1981.
74. Curran T., and Franza B. R., Fos and Jun, the AP-1 concentration., *Cell*, 55, 395-397, 1988.
75. Nishizuka Y., Studies and perspectives of protein kinase C., *Science*, 233, 305-312, 1989.
76. Nishizuka Y., The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature*, 334, 661-665, 1988.
77. Asaoka Y., Nakamura S., Yoshida K., and Nishizuka Y., Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation., *Trends Biochem. Sci.*, 17, 414-417, 1992.
77. Gschwendt M., Kittstein W., and Marks F., Protein kinase C activation by phorbol esters: do cysteine-rich regions and pseudo-substrate motifs play a role?, *Trends Biochem. Sci.*, 16, 167-169, 1991.
78. Bell R. M., and Burn D. J., lipid activation of protein kinase C., *J. Biol. Chem.*, 266, 4664, 1991.
79. Parker P. J., Protein kinase C – a family affair., *Mol. Cell. Endocrinol.*, 65, 1-11, 1989.
80. Hug H., and sarra T. F., Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction?, *Biochem. J.*, 281, 329-343, 1993.
81. Zhou G., Wooten M. W., and Coliman W. S., Regulation of atypical ζ -protein kinase C in cellular signaling., *Exp. Cell Res.*, 214, 1-11, 1994.
82. Ohno S., Akita T., Hata A., Osada S., Kubo K., Konno Y., Aki-

- moto K., Mizuno K., Saido T., Kuroki T., and Suzuki K., *Adv. Enzyme Regul.*, 441, 287-303, 1991.
83. Kraft A. S., and Anderson W. B., Phorbol esters increase the amount of Ca^{2+} , phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane., *Nature*, 301, 621-623, 1983.
84. Blumberg P. M., Complexities of the protein kinase C pathway., *Mol. Carcinogen.*, 4 339-344, 1991.
85. Nakanishi H., and Exton J. H., Purification and characterization of the ζ -iso-form of protein kinase C from bovine kidney. *J. Biol. Chem.*, 267, 16347-16354, 1992.
86. Nakanishi H., Brewerm K. A., and Exton J. H., Activation of the ζ isoform of protein kinase C by phosphatidyl-inositol 3,4,5-trisphosphate., *J. Biol. Chem.*, 268, 13-16, 1993.
87. Selbie L. A., Schmitz-Peiffer C., Sheng y., and Biodent T. J., Molecular cloning and characterization of PKC ι , and a typical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells., *J. Biol. Chem.*, 268, 24296-24302, 1993.
88. Nishizuka Y., Turnover of inositol phospholipids and signal transduction., *Science*, 225, 1365-1370, 1984.
89. Hug H., and Sarre T. F., Protein kinase C isoenzymes., *Biochem. J.*, 391, 329-343, 1993.
90. Wetsel W. C., Khan W. A., Merchantler I., Tivera H., Halpern A. E., Phung H. M., Negro-Vilar A., and Hannun Y. A., Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes., *Cell. Biol.*, 17, 121-133, 1992.
91. Takai Y., Kishimoto A., Inoue M., and Nishizuka Y., Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues., *J. Biol. Chem.*, 252, 7603-7609, 1977.

92. Hunter T., Ling N., and Cooper J. A., Protein kinase C phosphorylation of the EGF receptor at a threonine residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane., *Nature*, 311, 480-483, 1984.
93. Jacobs S., Sahyoun N. E., Saltiel A. R., and Cuatrecasas P., Phorbol ester stimulate the phosphorylation of receptors for insulin and somatomedin C., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80, 6211~6213, 1983.
94. May W. S., Jacobs S., and Cuatrecasas P., Association of phorbol ester-induced hyperphosphorylation and reversible regulation of transferrin membrane receptors in HL-60 cell., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, 2016-2020, 1984.
95. Schatzman R. C., Grifo J. A., Merrick W. C., and Kuo J. F., Phospholipid-sensitive Ca^{2+} -dependent protein kinase phosphorylates the beta subunit of eukaryotic initiation factor 2 (elf2). *FEBS lett.*, 159, 167-170, 1983.
96. Le Peuch C. J., Ballester R., and Rosen O. M., Purified rat brain calcium and phospholipid-dependent protein kinase phosphorylates ribosomal protein S6., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80, 6858-6862, 1983.
97. Berridge M. J., Inositol triphosphate and diacylglycerol, two interacting second messengers., *Annu. Rev. Biochem.*, 56, 153 - 193, 1987.
98. Rozengurt E., Signal transduction pathways in mitogenesis., *Brit. Med. Bull.*, 45, 515-528, 1989.
99. Takasu N., Yamada T., Shimizu Y., Nagasawa Y., and Komiya I., Generation of hydrogen peroxide in cultured porcine thyroid cells: Synergistic regulation by cytoplasmic free calcium and protein kinase C., *J. Endocrinol.*, 120, 503-508, 1989.
100. Babior B. M., The respiratory burst oxidase., *Trends Biol. Sci.*, 12,

241-242, 1987.

101. Warren J. S., Johnson K. J., and Ward P., Oxygen radicals in cell injury and cell death., *Pathol. Immunopathol. Res.*, 6, 301- 315, 1987.
102. Krystyna F., Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage., *Pharmac. Ther.*, 53, 127-166, 1992.
103. Rochat T., Burkhard C., Finci-Cerkez V., and Meda P., Oxidative stress causes a protein kinase C-independent increase of paracellular permeability in an in vivo epithelial model., *Amer. J. Respir. Cell & Mol. Biol.*, 9, 496-504, 1993.
104. Klyszcz-Nasko H., Richter-Landsberg C., and Beyersmann D., Modulation of bradykinin-induced calcium signals by oxidation stress in PC21 cells., *Arch. Biochem. Biophys.*, 306, 383-390, 1993.
105. Miura T., Muraoka S., and Ogiso T., Inhibitory effect of urate on oxidative damage induced by adriamycin-Fe³⁺ in the presence of H₂O₂., *Res. Commun. Chem. Pathol. & Pharmac.*, 79, 75-85, 1993.
106. Chakraborti S., and Michael J. R., Role of protein kinase C in oxidant-mediated activation of phospholipase A2 in rabbit pulmonary arterial smooth muscle cells., *Mol. & Cell. Biochem.*, 122, 9-15, 1993.
107. Taher M. M., Garcia J. G., and Natarajan V., Hydroperoxide-induced diacylglycerol formation and protein kinase C activation in vascular endothelial cells., *Arch. Biochem. & Biophys.*, 303, 260-266, 1993.
108. Rao G. N., Lassegue B., Griendling K. K., and Alexander R. W., hydrogen peroxide stimulates transcription of *c-jun* in vascular smooth muscle cells: role of arachidonic acid., *Oncogene*, 10, 2759-2764, 1993.

109. Rao G. N., Lassegue B., Griending K. K., Alexander R. W., and Berk B. C., Hydrogen peroxide-induced *c-fos* expression is mediated by arachidonic acid release: role of protein kinase C., *Nucleic Acid Res.*, 21, 1259-1263, 1993.
110. Curran T., Franza B. R., Fos and Jun the AP-1 concentration., *Cell*, 55, 395-397, 1988.
111. Castagna M., Takai Y., Kaibuchi K., Sano K., Kikkawa U., and Nishizuka Y., Direct activation of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters., *J. Biol. Chem.*, 257, 7847-7851, 1982.
112. Lewis C. C., Kurt R. A., Christopher C., Brian d., Andres D., Rosanna K., and Stephen S, Oncogenes and signal transduction., *Cell*, 64, 282-302, 1991.
113. Maki Y., Bos T. J., Davis C., Starbuck M., and Vogt P. K., Avian sarcoma virus 17 carries the *jun* oncogene., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84, 2848-2852, 1987.
114. Angel p., Imagawa M., Chiu R., Stein B. P., and Karin M., Phorbol ester-inducible genes contain a common cis-element reconized by a TPA modulated transacting factor. *Cell*, 49, 729-739, 1987.
115. Sassone C. P., Sisson J. C., and Verma I. M., Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene *fos*., *Nature*, 245, 314- 319, 1988.
116. Verma I. M., and Sasson C. P., Proto-oncogene *fos*: complex but verstile regul-ation., *Cell*, 51, 513-514, 1987.
117. Dang P. M., Hakim J., and Perianin A., Immunochemical identification and translocation of protein kinase C zeta in human neutrophils., *Febs Lett.*, 8, 338-342, 1994.
118. Rochat T., Burkhard C., Finci-Cerkez V., and Meda P., Oxidative stress causes a protein kinase C-independent increase of

paracellular permeability in an in vitro epithelial model., *Amer. J. Respir. Cell & Mol. Biol.*, 9, 496-504, 1993.

119. Klyszcz-Nasko H., Richter-Landsberg C., and Beyersmann D., Modulation of bradykinin-induced calcium signals by oxidation stress in PC12 cells., *Arch. Biochem. Biophys.*, 306, 383-390, 1993.
120. Miura T., Muraka S., and Ogiso T., Inhibitory effect of urate on oxidative damage induced by adrimycin-Fe³⁺ in the presence of H₂O₂., *Res. Commun. Chem. Patho. & Pharmac.*, 79, 75-85, 1993.
121. Chakraborti S., and Michael J. R., Role of protein kinase C in oxidant-mediated activation of phospholipase A2 in rabbit pulmonary arterial smooth muscle cells., *Mol. & Cell. Biochem.*, 122, 9-15, 1993.
122. Taher M. M., Garcia J. G., and Natarajan V., Hydroperoxide-induced diacylglycerol formation and protein kinase C activation in vascular endothelial cells., *Arch. Biochem. & Biophys.*, 303, 260-266, 1993.
123. Rao G. N., Lassegue B., Griendling K. K., and Alexander R. W., Hydrogen peroxide stimulates transcription of c-jun in vascular smooth muscle cells: role of arachidonic acid., *Oncogene*, 10, 2759-2764, 1993.
124. Rao G. N., Lassegue B., Griendling K. K., and Alexander R. W., and Berk B. C., Hydrogen peroxide -induced c-fos expression is mediated by arachidonic acid release: role of protein kinase C., *Nucleic Acid Res.*, 21, 1259-1263, 1993.