

R
008.8
7591

私立中山醫學院生物化學研究所

碩士論文

梔子中防癌物質藏紅酸及去氫梔子甘對鼠肝細胞
中 Glutathione-S Transferase 基因表現的影響

Effects of Crocetin and Geniposide on the Expression
of Glutathione-S Transferase in the Rat Hepatocytes



指導教授：王朝鐘 博士 (Chau-Jong Wang)

周芬碧 博士 (Fen-Pi Chou)

研究生：陳怡君 (Yi-Jun Chen)

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



C046168

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：梔子中防癌物質藏紅酸及去氫梔子甘對鼠肝細胞GST基因表現之影響

同意 不同意
本人具著作財產權之論文摘要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院
國家網路，得重製、電子、資料、後錄、於該單位之
或紙本並製發行。
或紙本並製發行。

同意 不同意
本人具著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會、科學技術
或紙本並製發行。
或紙本並製發行。

同意 不同意
本人具著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人
或紙本並製發行。
或紙本並製發行。

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、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名：王朝鐘，周芬碧

研究生簽名：陳怡君 學號：R84201
(親筆正楷)

日期：民國 86 年 8 月 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. 著作權人授權，請分別在網路、光碟與微縮等方式的整合國內學術資料，妥當依均各項所謂相書權美須20持代表其國個逾您訂性尋案址：台
2. 依均各項所謂相書權美須20持代表其國個逾您訂性尋案址：台
3. 依均各項所謂相書權美須20持代表其國個逾您訂性尋案址：台
4. 依均各項所謂相書權美須20持代表其國個逾您訂性尋案址：台
5. 依均各項所謂相書權美須20持代表其國個逾您訂性尋案址：台

研究生姓名：陳怡君 聯絡電話：(05) 2781521
地址：嘉義縣六腳鄉六腳村81號

本論文為中山醫學院授予以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：

台灣大學醫學院毒理研究所副教授

郭明良 博士

郭明良

中山醫學院生物化學研究所教授兼所長
(本論文指導教授)

王朝鐘 博士

王朝鐘

中山醫學院生物化學研究所副教授
(本論文指導教授)

周芬碧 博士

周芬碧

中華民國 86 年 7 月

學生陳怡君，論文題目為梔子中防癌物質藏紅酸及去氫梔子甘對鼠肝細胞中 GST 基因表現的影響，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:

王朝鐘 教授

簽名: 王朝鐘

周芬碧 副教授

簽名: 周芬碧

中華民國八十六年八月

目錄

壹. 前言及緒論-----	1
貳. 研究動機-----	8
參. 實驗材料-----	9
肆. 實驗方法-----	14
伍. 結果-----	27
陸. 討論-----	33
柒. 圖表-----	38
玖. 參考資料-----	60

摘要

藏紅酸及去氫梔子甘都是分離自茜草科的植物梔子。由於本實驗室先前的研究發現藏紅酸及去梔子甘都具有抑制 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 的促癌作用，於是欲進一步分析藏紅酸及去梔子甘是否會誘導 GST 的表現。先以 RT-PCR 複製 Yb cDNA，嵌入 PGEM 3Z(f)+，送入 JM109 大腸桿菌大量複製，選殖所要的質體，然後分離 Yb cDNA，準備進行探針的標幟。至於選擇 Yb cDNA 來製備探針，以分析 GST 的表現，乃是因為 Yb 的序列和 Ya、Yc 相似性少，可減少交叉反應的發生以提高專一 GST mRNA 的分析度。實驗的進行以初代肝細胞為模式，加去氫梔子甘或藏紅酸處理，抽取 RNA，進行北方墨點法，觀察 GST 量的變化。結果發現，兩者皆會誘導肝細胞中 GST 的表現，表現量的增加皆可持續至 24 小時。另一方面，欲觀察在有 TPA 的情形下，藏紅酸誘導 GST 的表現情形。在肝細胞處理不同濃度的藏紅酸五分鐘後，抽取 RNA，進行北方墨點法，結果發現，在 TPA 的存在下，藏紅酸的濃度越高愈能引發 GST 的表現，這說明藏紅酸在有 TPA 的作用下，會誘導表現較多 GST mRNA。

Abstract

Crocetin and geniposide were isolated from the seeds of *Gardenia jasmimoides*. Our previous study revealed that they are potent inhibitor of tumor promotion induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. And we further study whether crocetin and geniposide can induce the expression of glutathione-S-transferase. First, we amplified Yb cDNA with RT-PCR. Then Yb cDNA was inserted into PGEM 3Z(f)+ and transformation. We have isolated a Yb-subunit clone, and prepared Yb cDNA for probe labelling. Treating primary culture of rat hepatocyte cells with geniposide or crocetin, and prepared RNA to proceed to northern blotting. As a result, crocetin or geniposide can induce the expression of GST mRNA in rat hepatocytes. In the other hand, the expression of GST mRNA was enhanced when hepatocytes were treated with crocetin and 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate.

壹、前言

癌症的發生大致須經過三大步驟: 1、Initiation (起始): 細胞受到化學致癌物的傷害。2、Promotion (促進): 癌促進物質對已損害細胞的促癌作用。3、Progression: 刺激連續地進行, 致使腫瘤的形成。研究顯示百分之九十的癌症起因於環境中的化學致癌物, 如吸煙、飲酒和空氣汙染等。解毒酵素活性的誘發則是生物體代謝致癌物最主要的保護機制 (1)。這些解毒酵素大致可分成 phase I 及 phase II 酵素。Phase I 酵素如 P-450, 經由氧化的方式加以代謝致癌物; phase II 酵素如 glutathione transferase (GST) 則是會催化 glutathione 和致癌物結合, 解毒步驟首先形成 thioethers, 最後形成 mercapturic acid 使這些致癌攻擊物去活化。一旦解毒酵素有缺陷, 如 GST 和 N-acetyltransferase (NAT) 酵素有缺陷, 則致癌的危險性會隨之提高, 如肺癌及膀胱癌都有相關的研究發表 (2)。所以防止癌症的發生, 避免活化型致癌物的攻擊是相當重要的 (3), 解毒酵素 GST 在此扮演了一個非常重要的角色。

Glutathione S-transferase (GST)

GST 是一種具多種功能的蛋白質。它可以和細胞內的生化分子結合, 例如 heme、bilirubin、polycyclic aromatic compounds 及 dexamethasone (4,5), 並攜帶運送。另一方面, 在解毒過程中, 它會催化 glutathione 和多種的化學物的活化型結合, 這些化合物可能是內生性也可能來自於外在, 進而進入 mercapturic acid 路徑加以代謝

(6)，以保護細胞免於傷害。GST 是個雙單元體的複合蛋白質，以老鼠而言，其中組成 GST 的單元體多達八種 (7)。GST 的八個單元體分別是 $Y\alpha$ ($M_r = 24400$)， Y_a ($M_r = 25600$)， Y_n ($M_r = 26300$)， Y_b ($M_r = 27000$)， Y_c ($M_r = 28000$)， $Y\beta$ ($M_r = 26300$)， $Y\delta$ ($M_r = 25000$)，及 Y_p ($M_r = 24000$)。由這些相異的單元體組合而成的雙元體並非是隨意配對的，例如由肝臟細胞的細胞質可分離出 Y_aY_c 和 Y_bY_n 的組合體，卻發現不到 Y_bY_a 和 Y_bY_c 的組合體。如果以 anti- Y_b 的抗體作用，只會抓下 Y_b GST，不會和 Y_c GST 有交叉反應的情形出現。同時，在 mRNA 方面， Y_a 及 Y_c 的 cDNA 在適當的條件下不會和 Y_b mRNA 雜交。在 cDNA 序列分析方面， Y_b 單元體的和 Y_a 、 Y_c 的 DNA 相似性非常的少，且在蛋白質方面， Y_b 和 Y_a 、 Y_c 只有 28% 的相似性 (7)。所以， Y_b 的序列和其他單元體的序列缺少相似性。

GST 的分類

依 GST 所分佈的位置大致可區分成兩類，其一是結合在細胞膜上的 GST，例如 microsomal GST。另一則是細胞質的 GST，而大部份的 GST 都存在細胞質部份，這些 GST 依其來自不同的基因族 (8)，分別命名為 alpha 族，mu 族，pi 族，sigma 族，以及 theta 族。sigma 族和 theta (9) 族由於最近才被發現，所以對於他們的特性了解不多 (10)。在細胞質以 alpha，mu 及 pi 族的 GST 為主。在酸鹼特性方面，alpha 族屬於鹼性，mu 族較偏中性，pi 族則屬於酸性。在 rat、mouse 以及人類中，這三種不同族的 GST 在結構方面，酵素方

面的特性都很類似 (11)。但這三種不同的 GST 的表現往往具組織的特異性，以老鼠而言，alpha GST 主要分佈在肝臟、腎臟，mu GST 主要分佈在在 testis、心臟、肝臟 (12)，至於 pi GST 在正常的情況之下，除了肝臟之外，均勻的分佈在各個組織器官。且這些不同的 GST，在細胞形成腫瘤細胞當中的不同階段，其表現量也有所改變。以肝細胞為例，在正常的肝細胞中以 alpha 族 GST 為主，Mu 族 GST 其次，但是偵測不到 GST-P (13-15)。在前腫瘤結節中，則 alpha，mu 及 pi 族的 GST 都會過度的表現，但一旦肝細胞變成腫瘤細胞，尤其是化學性的致癌作用，GST-P 則會很明顯且大量的表現 GST-P (15)。過去的 GST 的研究大都著重於 GST-P，也是因為 GST-P 有此特性，所以對於 GST-P 的研究，不論是在基因的調節 (16-19)、表現 (20-22)，或是抗藥性的探討 (23) 較透徹。在 Alpha 族的 GST，於抗藥性方面多有所研究，特別是發現它會代謝一些抗癌藥物，如 cisplatin、alkylating agent，而抑制了抗癌藥物對於癌症初期的治療 (24-27)。至於 mu 族 GST，對於某些抗癌藥物具抗藥性，且和組織的發炎有關 (28)。在正常的肝細胞，mu 族 GST 也會表現。一旦肝細胞受到致癌化合物的刺激作用，mu 族 GST 表現也會增加(14)，因此推論 mu 族 GST 在肝細胞中扮演著不可或缺的保護性角色。但是，在過去有關 mu 族 GST 的研究不多，所以了解並不深入。事實上，GST 生化功能的調控及發揮是很複雜的，這和遺傳、性別、年齡、組織、種類以及細胞癌化的不同階段都有關連。至少有 100 種的化合物被鑑定出會誘導 GST 的表現。其中，有些化合物存在蔬菜及柑橘類的水果中 (8)。

GST 的活化

大部份的化合物會間接經由影響 GST 上游的基因(8)而促進 GST 的表現，這上游的基因有 antioxidant-responsive element (ARE)，xenobiotic-responsive element，GST-P enhancer 1 (GPE)，或者是 glucocorticoid-responsive element (GRE)。AP-1 (Jun/Fos)在促進 GST 表現也被廣泛的討論。活化 GST 大量表現的機制包括促進基因的轉錄，穩定 mRNA 及蛋白質，以及基因的放大(amplification)。

藏紅酸(crocin)的介紹

中藥當中的梔子(*Gardenia jasminoids* Eills)是茜草科 Rubiaceae 植物。梔子在中藥的應用甚多，廣泛使用於如黃蓮解毒湯、茵陳蒿湯、梔子乾羌湯、加味道遙散等約 47 劑中藥(29, 30))。其性寒、味苦、入心肺，可達清熱解火之功效，且具抗發炎的效用。雖然研究發現，梔子的萃取物可以降低 CCl₄ 所引起的急性肝損傷(31)，但對於梔子藥理學上的作用仍不清楚。

梔子的主成分之一藏紅酸(crocin)，是類胡蘿蔔素的衍生物。類胡蘿蔔素是一種植物色素，普遍存在於水果及蔬菜。在早期，藏紅酸廣泛應用於食用色素，添加於冰棒、飲料、酒及糖果當中。早期的研究發現，藏紅酸可抑制由乳突狀病毒感染所引起的雞腫瘤(32)。另有研究顯示藏紅酸透過抑制 RNA polymerase II 的活性來抑制多種惡性腫瘤細胞內的核酸及蛋白質的合成(33)。

本實驗室在動物實驗方面，曾以 B[a]P 為 initiator，結合 TPA 當 promotor，塗抹在 CD-1 mice 的皮膚身上，結果發現， ornithine decarboxylase 活性增加，而且皮膚有乳頭狀腫瘤的出現；若動物同時施予藏紅酸則可以抑制 70-80% 的 TPA 癌促進作用(34)。以老鼠初代培養肝細胞為研究模式，發現藏紅酸會降低 Aflatoxin B1 致癌物所誘導產生的致肝癌作用(35)，並有效的提高肝細胞中 GST 解毒酵素的活性，抑制 Aflatoxin B1-DNA 加成物的形成(36, 37)。藏紅酸對於肝臟受到氧化性的傷害亦具有保護的作用(38)。至於在藏紅酸抑制促癌作用的分子機制方面，以 TPA 為誘發因子，則發現藏紅酸是經由 PKC 的路徑抑制 TPA 的癌促進作用，並且抑制 TPA 誘導 fos 及 jun RNA 的表現(39)。

去氫梔子甘(Geniposide)

去氫梔子甘分離自梔子，是梔子的主成份之一，是屬於 iridoid 化合物。過去的研究多偏重於藥理學的作用，如去氫梔子甘具利膽及促進胃液分泌的作用(40)。也有不少的研究顯示去氫梔子甘在胃腸內的代謝及構造的轉變，人體內的腸內細菌就是扮演著這樣的角色，將去氫梔子甘代謝成 genipinine(41)。Genipinine 是個含有 nitrogen 的化合物。至於有關去氫梔子甘其在生理生化功能上所扮演的角色則仍不清楚。

至於在毒性方面的研究，高量(3 mg/kg)的去氫梔子甘餵食老鼠會有肝毒性的現象(42)。但另一方面，也有保肝作用的研究報告指出，以去氫梔子甘(240 mg/kg)連續處理三天，其肝中的酵素如 GST 的活

性會顯著增加(43)。最近的研究證實，去氫梔子甘對於 aflatoxin B1 所導致的肝毒性及基因毒性有一定的抑制作用。另外對於 TPA 癌促化的作用有抑制的效果(44)，亦可降低因為高量輻射所造成的傷害(45)，對於 Aflatoxin 所引起肝毒性的有抑制的作用(46)。

TPA 與原致癌基因 c-jun 及 c-fos

TPA 的全名是 12-O-Tetradecanoyl phorbol-13-Acetate 是由 Croton Tiglium 的種子所提煉的巴豆油中萃取出來的 phorbol ester(47)。Phorbol ester 之所以會被重視，乃是因為在老鼠皮膚癌二階段促癌實驗中，phorbol ester 不僅可以促使被 initiation 的皮膚提前癌化，並且使腫瘤數目增加(48)。以細胞株的培養為模式，TPA 則會促進 NIH3T3 及 C3H10T1/2 細胞的轉型(49,50)。

1987 年 Maki 在小雞自發性肉瘤細胞中分離出一種反轉錄病毒，其中的一段基因具有使細胞轉型的能力，命名為 v-jun(51)。在正常細胞中也存著 c-jun 原致癌基因，執行細胞內轉錄作用的調節(52)。v-fos 則最早是由鼠類的 osteosarcoma virus 反轉錄病毒中分離出來的，事實上，在正常的細胞亦有 c-fos 原致癌基因，扮演著調節轉錄的功能(53)。c-fos 基因極易受刺激而表現，其表現受上游三個調控區所調控，這三個區域分別是(1) TATA box；(2) c-fos 基因表現調控區，其上具一段 cAMP 辨識區，GRE 和一段 GC rich 的序列；(3) 以及受到刺激而加強 fos 表現的加強表現區，這段基因上含有一段對稱序列 DSE，也就是 TPA response element，可受到多鈦類的生長因子、血清、氧化物 TPA 等因子刺激而表現。而 TPA 誘導這些基因

的轉錄是其促進癌化作用的重要因素。

貳、研究動機

本實驗室先前的研究發現，藏紅酸以及去氫梔子甘能降低 alfatoxin B1 所誘導產生的致肝癌作用，另外發現，不論在動物實驗及 NIH3T3 細胞株的研究方面，均具抑制 TPA 所引起的癌促化作用。本研究乃欲以大白鼠初代培養的肝細胞為工具，深入探討藏紅酸及去氫梔子甘本身保護細胞的機制，從其是否會誘導 GST 基因的表現，以了解兩者作用的分子機制。另外，本研究亦針對藏紅酸抑制 TPA 所引起的肝毒性的作用做同樣分子機制的探討。為提高分析 GST mRNA 的專一性，將首先自老鼠的 total mRNA 選殖出 GST 的 cDNA，設計成探針。

參、實驗材料

藥品試劑:

購自美國 Sigma 化學公司:

Acryamide, Ethidium Bromide, Brophenol blue, Glycerol, Xylene cyanol, Tris-HCl, Tris base, Sodium citrate, 2-mercaptoethanol, NaCl, Sodium acetate, Formamide, Formaldehyde, Phenol, Chloroform, Maleic acid, Tween 20, Isopropanol, DEPC, Guanidinium thiocyanate (GNTC), Morpholinopropane sulfonic acid (MOPS), EDTA, SarcosylN,N,N',N'-tetramethyl ethenediamide (EGTA), 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), Crocetin, Percall, Collogenase.

購自美國 Boehringer Mannheim (BM)公司

Glycogen, N-C membrane, Dig-labeled system.

購自德國 GIBCO 公司

Fetal calf serum, HEPES, HBSS, William E, Penicillin-streptomycin-neomycin (PSN).

購自美國 Promega 公司

Ligase, BamH I, Hinf I, Sma I, EcoR I, Xba I, PGEM(3Z)f+ plasmid.

購自瑞典 Pharmacia 公司

microspin column

常用儀器材料

天平:OHAUS

水平式電泳槽(DNA):mupid-2

水平式電泳槽(RNA):Hoefer Max HE99

電源供應器: Bio-Red 200/2.0

細菌培養箱:orbital shaking incubator Os1500

加熱攪拌器: Coring Stirrer/Hotplate

高速離心機:Sigma 2K15

微量高速離心機::Centrifuge 5415C

烘箱: Memmert 9 Tensit 3

pH meter:Jenco model 6200

無菌操作台:NuAIR class 2 Type a/B3

細胞培養箱: Nuaire AutoFluo CO2 Water-Jacked Incubator

感光夾: Okamoto 8X10

實驗所需溶液, 緩衝液, 培養液的配製

20X SSC: 每公升含下列成份

173.5 g NaCl

88.2 g Sodium citrate

處理 DEPC(0.1%)->autoclave



LB medium: 每公升含下列成份

peptone	10 g/L
yeast extract	5 g/L
NaCl	5g /L
1 N NaOH	1 ml/L

Autoclave->store at 4 °C

William E:

取可配一公升的 William E 粉末，加入 2.2 g 碳酸氫鈉，先溶於小於一公升的二次水，調 pH 至 7.3 。加二次水至 945 ml ，過 minipore 。欲使用時，再加入 Fetal serum 50 ml 以及 PSN-Antibiotic 5 ml 。

Solution A:

取可配置一公升的 HBSS 粉末(沒有 Ca^{2+} , Mg^{2+})，加入 2.2 g 碳酸氫鈉，加入 5.958 g HEPES ，先溶於小於一公升的二次水，及秤 0.19 g EGTA ，先溶於 1 ml 的 2 N NaOH 至溶解，再加入。調 pH 至 7.3 ，加二次水至 1000 ml 。過 minipore 。

Solution B:

取可配置一公升的 HBSS 粉末(沒有 Ca^{2+} , Mg^{2+})，加入 2.2 g 碳酸氫鈉，加 5.958 g HEPES ，先溶於一公升的二次水，調 pH 至 7.3 ，加二次水至 1000 ml 。過 minipore 。

High SDS concentration hybridization buffer

7% SDS

50% formamide

5X SSC

2% blocking reagent

50 mM sodium-phosphate, pH 7.0

0.1% N-lauroylsarcosine

配置 High SDS buffer: 100ml

100% formamide	50 ml
30X SSC	16.6 ml
1 M sodium-phosphate, pH 7.0	5 ml
10% blocking solution	20 ml
10% N-lauroylsarcosine	5 ml
SDS	7 g

->加熱溶解，不足 100 ml 的體積以 DEPC-treated water 補足。

保存方式: High SDS hybridization buffer 放在 20 °C.

使用之前的處理: 放在 65 °C 的水浴槽處理直至溶解。必須小心且注意的是，所用的藥避免受到 RNase 的污染，瓶子必須先滅菌，所使用的水是須經 DEPC 處理。

Maleic acid buffer 的配製:

0.1 mM maleic acid

0.15 M NaCl

用固態的 NaOH 調 pH 值至 7.5

10X blocking buffer 的配置

10 g blocking reagent 溶於 100 ml maleic acid buffer，放入 60 °C 的水浴槽，搖晃至溶解為止。

Washing buffer 的配置

1X Maleic acid buffer 含 0.3% Tween 20

肆、實驗方法

一、分離肝細胞及初代培養

試劑:

1. solution A: HBSS, 0.2 mM NaOH-EGTA, 10 mM HEPES, pH 7.3
2. solution B: HBSS, 10 mM HEPES, 10,000 單位的 collagenase, pH 7.3
3. William E: William E (GIBCO), 10% fetal serum (GIBCO), 5% antibiotic (GIBCO)
4. HBSS: HBSS 一包, 總體積 100 ml, pH 7.3

購自台中榮總動物中心之 SD 系大白鼠，體重約 250-300 公克，根據 Butterworth, B. E. 等人之研究方法(54)，以灌流方式分離肝細胞。首先，以腹腔注射 pentobarbitol 麻醉大老鼠，給予劑量為 0.2 ml (50 mg/ml) 每 100 g 大白鼠體重。待麻醉後，固定老鼠，由肛門上方成 V 字型剪開，達劍突下方。打開腹腔，以 20G angiocath 注入肝門靜脈，之後立刻拔掉硬針，以事先回溫至約 37 °C 的 50 ml solution A 灌流，並剪斷下腔靜脈，此時將幫浦轉速開至最大，以達完全放血之目的。再以止血鉗夾住下腔靜脈，剪碎心臟，同時以回溫至 37 °C 的 100 ml solution B 灌流，並將幫浦開至中速，待 solution B 用盡之後，小心的取下肝臟，浸於 50 ml 的冰 William E，快速的將肝臟剪碎，之後，於 4 °C，以轉速 600 rpm 離心 10 分鐘。移去上清液，留下下層肝細胞。加入適量的 William E 和細胞均勻混合，再加入 percoll-10X HBSS (其中 percoll : 10x HBSS = 9 : 1)，使得細胞/william E : percoll-HBSS 兩者的比例為 3 : 2。混合完全，分裝於無菌的離心管，同樣 600 rpm，

離心 10 分鐘。移去上清液，加入適量的 William E，混合完全，取少許做細胞計數。

二、Microculture Tetrazolium Assay (MTT)

根據 Michael, C. A. 的研究得知(55, 56)，活細胞會將 tetrazolium 代謝成藍紫色的結晶，且此藍紫色的結晶可溶於異丙醇，故以測其吸光來得知活細胞的數目。

取 10^5 的肝細胞置於 24 well-plate，讓細胞貼壁四個小時，吸乾培養液，換取新鮮的 William E 培養液，加入不同濃度的 crocetin，並以 0.02% DMSO 當控制組。繼續培養 18-24 小時後，吸乾培養液，再以 PBS 輕輕的洗兩次。換上新鮮的培養液 2.5 ml，加入 20 μ l tetrazolium (25 mg/ml)。培養 4 小時，移除培養液，加入 1 ml isopropanol，以 pippetman 來回打散均勻，直接吸 1ml 以波長 563 nm 測吸光。

三、Northern Hybridization

(一)、Total RNA 的抽取(57)

試劑:

solution D: 4 M GNTC, 25 mM sodium citrate pH 7.0, 0.5% N-lauroylsarcosine

將分離好的肝細胞種在培養皿中，以 William E 培養液貼壁 12 小時。換取新鮮的 William E 培養液，加藥處理，處理完畢之後，吸乾培養液，用冰 PBS 小心的沖洗兩次，加入 2 ml 的 solution D 至培養皿，以 micropipetman 將細胞沖下，置入無菌的離心管中，依次加入

200 μ l 2 M sodium acetate pH 4.0 , 400 μ l chloroform , 2 ml phenol pH 4.0 , 震盪均勻, 放在冰上靜置 1 分鐘, 拿起搖晃約 10 秒鐘, 再放在冰上靜置 1 分鐘, 重複這樣的步驟達 20 分鐘, 最後靜置於冰上 5 分鐘。於 4 $^{\circ}$ C , 以轉速 1,200 rpm 離心 20 分鐘。將上層液吸取至另一新離心管, 加入同體積的 isopropanol , 混合完全, 放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中沈澱 2 小時或 -70 $^{\circ}$ C 中 30 分鐘後, 於 4 $^{\circ}$ C , 以轉速 12,000 g 離心 20 分鐘。倒掉上清液, 加入 0.5 ml 的 solution D 以溶解 pellet , 加入 2 μ l 的 glycogen , 混合均勻, 放入 -20 $^{\circ}$ C 沈澱 2 小時。於 4 $^{\circ}$ C , 以轉速 12,000 g 離心 20 分鐘, 倒掉上清液, 加入 70% 酒精做來回的沖洗, 同樣的條件, 再離心 20 分鐘。倒乾上清液, 蒸乾 pellet , 視 pellet 大小加入適量的 DEPC-treated water 溶解。存放於 -20 $^{\circ}$ C 或 -70 $^{\circ}$ C 中。

(二)、Total RNA 電泳(58)

試劑:

1. 10X MOPS buffer (gel running buffer): 0.2 M MOPS, 50 mM sodium acetate, 10 mM EDTA, pH 7.0. 以 DEPC-treated water 稀釋成一倍。
2. 6X loading buffer: 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol
3. RNA denaturing buffer:

12.25 μ l	10X MOPS
4 μ l	37% formaldehyde
2.5 μ l	formaldehyde
1. 1.2% RNA denaturing gel 的製備

秤重 1.8 g agarose ，放入乾淨的滅菌燒杯，加入 130.5 ml DEPC-treated water ，標上記號以確知原來水量，放在加熱板上加熱至騰以溶解 agarose 。然後再補足減少的水量。冷卻至 60 °C ，加入 15 ml 的 10X MOPS 、 4.5 ml 37% formamide 。混合均勻之後，使其冷卻至手可碰觸之溫度。倒在事先已調好水平的鑄膠槽內讓其凝固。此膠盡量在當天使用。

2. RNA 樣本的處理:

取 5 μ l RNA (2 μ g/ μ l) ，加入 17.5 μ l RNA-denaturing buffer ，震盪均勻，放在 55 °C 的水浴槽作用 15 分鐘，短暫離心後，立刻置於冰上，loading 前加入 2.5 μ l loading buffer 。

3. 跑膠

小心的拔掉膠上的齒梳，將膠體置入電泳槽中，倒入 1X running buffer 使其剛好蓋住膠體，將 25 μ l RNA 樣品注入齒槽中。以 75 伏特電壓跑三個小時，以拍立得相機在紫外線的照射下拍攝 RNA 的電泳圖。

(三)、RNA 轉印 (Transfer)

試劑；

20X SSC: 3M NaCl ， 0.3M sodium citrate ， pH 7.0 ，加入 DEPC 0.1% ，用力搖晃，靜置 2 小時後滅菌。

將電泳後的膠體放入 DEPC-treated water 1-2 小時，再浸泡於 50 mM NaOH 20 分鐘，然後換以 50 mM Na₂HPO₄ 20 分鐘。再將膠體放入 transfer solution (10X SSC buffer) 中 20 分鐘。剪取與膠體大小相同硝化纖維紙，濾紙和三條長濾紙，先以 10X SSC buffer 浸泡。取

適當淺槽，以玻璃片橫架於槽上，再將三條濾紙放置玻璃片上，兩端垂下，接觸槽底部，在淺槽中倒入 10X SSC buffer，蓋過濾紙下垂部份。再以玻棒將濾紙內的氣泡趕走。放上膠體，正面朝下，背面向上，同樣的，以玻棒將氣泡趕走。於膠體上方疊上浸濕的硝化纖維紙，及兩張濕濾紙，小心趕走層層之間的氣泡。最後置上折疊好的衛生紙，再用玻璃片將此架好的 sandwich 穩固，並放置約 600 g 的重物於玻璃片上。在室溫下，轉印 16-17 小時後，以兩張濾紙夾住硝化纖維紙，在 120 °C 烘箱烘烤 25 分鐘，保存於室溫乾燥處。

(四)、雜交反應 (Hybridization)

試劑:

1. 探針: 50 ng/ml
2. high SDS buffer: 7% SDS, 50% formamide, 5X SSC, 2% blocking reagent, 50 mM sodium phosphate pH 7.0, 0.1% N-lauroylsarcosine.

將 high SDS buffer 先放置在 65 °C 的水浴槽約 15 分鐘，再放入已調好溫度的雜交箱至少 30 分鐘。然後將烘烤好的硝化纖維紙放入保鮮盒，倒入已預溫的 high SDS buffer，放入雜交箱中 prehybridization 1-3 個小時。

另一方面，吸取適量的探針於沸水中煮沸 10 分鐘使其完全的變性，將變性的探針馬上放置在 ice/NaCl 上 5-10 分鐘，再吸取探針至已預溫至雜交溫度的 high SDS buffer，使探針的最終濃度為 50 ng/ml。同樣的，也將配好的探針放在調好溫度的雜交箱至少 30 分鐘。最後倒掉 prehybridization 的 high SDS buffer，加入具探針的 high SDS buffer，繼續在雜交箱中，於適當溫度下反應 12-20 個小時。然

後倒出 hybridization buffer，存放在 -20°C 。下一次重複使用時，放入 68°C 水浴槽搖晃 15 分鐘，使探針變性，再放入調好溫度的雜交箱中。另一方面，依序將硝化纖維紙放入 2X SSC/0.1% SDS 和 0.2X SSC/0.1% SDS 中，各於適當溫度漂洗適當時間。最後做免疫偵測及壓片。

(五)、免疫偵測法(Immunological Detection)以及壓片

試劑:

1. maleic acid buffer: 0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5.
2. washing buffer: 0.3% Tween 20 (w/v) in maleic acid buffer.
3. 10X blocking buffer: 10 g blocking reagent 加 maleic acid 至 100 ml, 放入 60°C 的水浴槽搖晃直至溶解, 保存在 4°C .
4. detection buffer: 100 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, pH 9.5

將漂洗過的硝化纖維紙放入乾淨的保鮮盒中，倒入 1X washing buffer 漂洗 1 分鐘以平衡硝化纖維紙，換以 1X blocking buffer，在室溫下溫和的搖晃作用 30-60 分鐘。倒掉 blocking buffer，加入 Anti-Digoxigenin-AP (以 blocking buffer 做 1:10000 的稀釋，溫和的混合均勻)，同樣的在室溫下溫和的搖晃 30 分鐘。再用 washing buffer 以微快的搖晃速度洗硝化纖維紙兩次，每次 15 分鐘。最後用 detection buffer 平衡達三分鐘。在此時可先剪開塑膠袋，攤開塑膠袋，小心避免弄髒袋面，然後小心的將硝化纖維紙由角邊夾起，放進已攤開的塑膠袋的其中一面，正面朝上，並小心的將硝化纖維紙攤平。以 pipetman 吸取適量的 CSPD 加入 detection buffer 稀釋 100 倍，加在硝化纖維紙的一角，再慢慢的將塑膠袋的另一面覆蓋上，盡量避免

氣泡的產生。然後用面紙以固定方向，輕輕的將硝化纖維紙上的 CSPD 均勻推散開來，放在 37 °C 中作用 15 分鐘，直接壓 X 光片。

(六)、探針移除

用乾淨的燒杯裝 100 ml DEPC-treated water 含 0.1% SDS (washing buffer)，放在加熱板上加熱至沸騰，另一方面，事先將已經雜交過的硝化纖維紙先以 DEPC-treated water 洗 5 分鐘，以去除 CSPD，然後將沸騰的溶液直接倒在硝化纖維紙上，在室溫下劇烈的搖晃 10 分鐘，不需要持續的加熱。換以 washing buffer 在室溫搖晃 5 分鐘後，則可直接進行雜交反應。

四、GST cDNA 的選殖 (Cloning of GST cDNA)

(一)、Reverse Transcription (RT)

取用 5 μ l 老鼠 RNA，加入 DEPC 水 5 μ l，以 pipetman 打均勻，放入事先以調為 70 °C 的溫度循環機 5 分鐘，直接再置於冰上。加入 18.5 μ l DEPC 水，2 μ l RNase inhibitor，10 μ l Reverse Transcription buffer，4 μ l 2.5 mM dNTP，5 μ l GST-3 primer，同樣的，以 pipetman 來回打均勻，放入 42 °C 的水浴槽 5 min。加入 0.5 μ l 的 Reverse transcriptase，此時總體積為 50 μ l，放入 42 °C 水浴槽中，再放入事先已調好 95 °C 的溫度循環機 5 分鐘，拿出來短暫離心，置放於 4 °C 或 -20 °C。

(二)、Polymerase Chain Reaction (PCR)

依序吸取 23.8 μl 2 次水，4 μl 10X PCR buffer，3.2 μl 2.5 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)，5 μl GST 5'端的 primer，及 4 μl 3'端的 primer，和 10 μl 由 Reverse Transcription 所得的 cDNA，以 pipettman mix 均勻。為了避免高溫反應時液面蒸發，加入少許的礦物油覆蓋液面。放入 94 $^{\circ}\text{C}$ 的溫度循環器 5 分鐘，加入 0.5 μl Tag enzyme，然後在 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 分鐘，72 $^{\circ}\text{C}$ 1 分鐘，72 $^{\circ}\text{C}$ 2 分鐘進行 30 個循環。最後，在 72 $^{\circ}\text{C}$ 作用 10 分鐘做最後的休補成雙股 DNA。

(三)、Ligation

已經過 restriction enzyme 作用的 DNA，pGEM3Z(f)+及 GST cDNA (PCR 產物)，各吸取適量，使其兩者的 mole 數相等。放入 45 $^{\circ}\text{C}$ 加熱 5 分鐘，加入適量的 ligase 及 10X ligase buffer，總體積不足 10 μl 則以無菌水補足。混合均勻後，放入 16 $^{\circ}\text{C}$ 過夜。

(四)、Competent cells 的製備

由 -20 $^{\circ}\text{C}$ 取出 JM109 的菌種塗在 LB 培養基上，放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培養過夜。再挑單一菌落至 5 ml 的 LB 培養液，放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的細菌培養箱中，以劇烈的搖晃培養過夜。吸取 0.6 ml 隔夜菌液至 30 ml 的新鮮 LB 培養液，放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 中劇烈搖晃培養 2-3 個小時直到 590 nm O.D. 為 0.5 左右。然後放在 4 $^{\circ}\text{C}$ ，以 4800 rpm 離心 10 分鐘，倒乾上層液，留下 pellet，加入 10 ml 的冰 CaCl_2 solution (含 60 mM CaCl_2 ，15% glycerol，10 mM Tris HCl，pH 7.0)，將 pellet 打散，靜置於冰上 30 分鐘。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 以 4800 rpm 的轉速離心 10 分鐘。倒乾上清液，加入 2

ml 的冰 CaCl_2 solution (含 60 mM CaCl_2 , 15% glycerol , 10 mM Tris HCl pH 7.0 , 將 pellet 打散 , 快速的分裝成 10 個 eppendorff tubes , 存放於 -70°C 。以上實驗需要在無菌狀況下進行。

(五)、Transformation

將上述之 ligation 樣本與 200 μl 的 competent cells 混合 , 於冰上作用 30 min 。經過 42°C , 3 分鐘熱處理後 , 立即放回冰上。儘速添加 0.5 ml LB 培養基到每一試管 , 混合後將菌液置於 37°C 作用 30 min 。最後將菌液塗抹在含 ampicillin (100 mg/ml) 的 plate 上。為方便利用顏色來篩選含 cDNA plasmid 的菌落 , plate 上需塗抹 X-gal 及 IPTG 。

(六)、抽取細胞內的質體

試劑:

1. Lysozyme: 40 mg 溶於 1 ml 的二次水 , 欲使用才配置。
2. Solution II: 0.2 M NaOH, 1% SDS
3. Solution III: 3 M potassium acetate, 2 M acetic acid
4. RNase A: 10 mg 溶於 1 ml 的二次水

取固態 LB 培養基上單一菌落接種於 2 ml 的 LB 培養液(一升培養液中含有 10 g peptome , 5 g yeast extrant , 5 g NaCl , 每毫升的 LB mediam , 100 μg ampicillin), 於 37°C , 急劇的搖動隔夜 , 再將 1.5 ml 菌液接入相同培養液 150 ml , 同樣條件下培養隔夜。

將菌液分裝於離心管中 , 以 4800 rpm 離心 10 min , 倒掉上清液 , 加入 3 ml 50 mM Tris , pH8.0 , 將 pellet 完全打散 , 再加入 800 μl

lysozyme (40 mg/ml)，置放於冰上 15 分鐘後，加入 500 μ l 250 mM EDTA，pH 8.0，混合均勻後，靜置在冰上 15 分鐘。加入 5 ml solution II，輕輕混合均勻，靜置於冰上 5 min，加入 3.5 ml 的 solution III 混合均勻，靜置於冰上 5 分鐘。以 8000 rpm 轉速離心 20 分鐘後，小心吸取上清液至另一新的試管(phenol-resistant)，加入同體積的 phenol (pH 8.0)，於室溫下，輕輕來回搖晃 5 分鐘。以 3500 rpm 離心 10 分鐘，此時可以看見試管內的溶液分成三層，吸取最上層至另一新試管，加入同體積的 phenol:chism (1:1)，於室溫下溫和的來回搖晃 5 分鐘，以 3500 rpm 離心 10 分鐘。同樣的吸取最上層至另一新試管，加入 1 ml 3 M sodium acetate (pH 7.0)，混合後加入冰的 99% 的酒精。放在 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中過夜或 -70 $^{\circ}$ C 中 30 分鐘。以轉速 12000 rpm，4 $^{\circ}$ C 下，離心 20 分鐘，移除上清液，加入 70% 酒精，溫和的來回搖晃幾下，同樣條件離心，移除上清液。Pellet 蒸發乾後溶於 1 ml 的 TE beffer (pH 8.0)。加入 5 μ l Rnase (10 mg/ml)，放入 37 $^{\circ}$ C 的水浴槽 30 分鐘，加入同體積的 phenol (pH 8.0)，在室溫下，來回溫和地搖晃 5 分鐘，3500 rpm 離心 10 分鐘。小心地吸取上清液至另一新的管子(注意不要碰到中下層)，加入同體地 phenol:chism (1:1)在室溫下，來回溫和地搖晃 5 分鐘 3500 rpm 離心 10 分鐘。小心地吸取上清液，至另一新管子，加入 3 M sodium acetate (pH 7.0)，先混和，再加入 2.5 ml 99% 酒精，放入 -20 $^{\circ}$ C 沉澱隔夜或 -70 $^{\circ}$ C 30 min。以 12000 rpm 4 $^{\circ}$ C 離心 20 分鐘，倒乾上清液，加入 70% alcohol，來回溫和地晃動幾次。再以 12000 rpm，4 $^{\circ}$ C 離心 20 分鐘，倒乾上清液，蒸乾 pellet。

五、DNA 探針的製備

(一)、酵素切特定核酸序列之反應

將抽取好的 plasmid，以吸光 260/280 測試濃度，並跑小片膠以確定 plasmid 的純度。擬定好適當濃度的 plasmid，加入適量的酵素以及酵素 buffer，使 DNA 和酵素的比約 1 μ g DNA 有 2 unit 的酵素，且酵素加入的量必須小於作用總體積的 1/10，不足總體積的量以 2 次水來補足。視酵素的特性放入適當的溫度反應適宜時間。反應之後，吸取少量跑小片 DNA 膠體，以確知酵素是作用完全。

(二)、膠體中 DNA 片斷的純化

在取少量經酵素作用後的 DNA 跑電泳，確知酵素確實有將所要的 DNA 片段由 plasmid 切離出來之後，再將經酵素作用的 plasmid 全部跑小片膠，以分離所要的 DNA 片段。電泳的步驟和前述相同。然後用刀片切下所要的 DNA 膠體，秤其重量，放進 appendorff tube，加入 NaI 溶液，加入的體積是膠體重量的三倍。放入 45-55 $^{\circ}$ C 的水浴槽 5 分鐘，每隔 1-2 分鐘拿起搖晃，以使膠體能盡快溶解。加入 5 μ l glassmilk (DNA 量 \leq 5 μ g)，混合均勻，靜置在冰上 5 分鐘，每隔 1-2 分鐘拿起搖晃。高速離心 5 秒鐘。吸乾上清液，加入 New wash 打散 pellet，高速離心 5 秒鐘，吸乾上清液，重複這個步驟 3 次。然後加 DEPC-treated water，加入體積和加入的 glassmilk 體積相同，打散 pellet，放入 45-55 $^{\circ}$ C 的水浴槽 2-3 分鐘，高速離心 30 秒鐘，吸起上清液至另一新 appendorff tube，同樣的重複這個步驟三次，收集欲要之 DNA 即告完成。

(三)、Microcolumn:

將存放在 4 °C 的 microcolumn 拿出，用力震盪將 microcolumn 的 resin 打散成均勻狀，蓋子旋鬆約 3/4，折斷底支部分，3000 rpm 離心 1 分鐘(由一開始離心即開始時間計時)。打開蓋子，下接乾淨的 appendorff tube，將樣本加在 resin 的中心點，樣本的體積需介於 25 μ l-50 μ l。於 3000 rpm 離心 2 分鐘(由一開始即開始計時)，純的 DNA 樣本即存在於下接的 appendorff tube，存放在 -20 °C，預備做 DNA 探針或 transformation 之用。

(四)、DNA 探針的標幟

跑小片膠電泳以觀察 DNA 的純度，並預估其濃度。吸取 1-5 μ g DNA，加 DEPC-treated water 至總體積 16 μ l，在沸騰的水中煮 10 分鐘後，馬上放置在 ice/NaCl 10 分鐘。稍微離心後加入 4 μ l high prime，混合均勻，放入 37 °C 的水浴槽 20 個小時。加入 2.5 μ l EDTA 溶液終止反應。

(五)、偵測 DNA 探針的標幟效果

吸取 1 μ l 已經標幟好的 DNA，加入 dilution buffer 做 10 倍的稀釋，混合均勻，吸取其中的 5 μ l 以及另外吸取 pre-labeled DNA 5 μ l，各別加入 45 μ l dilution buffer 稀釋 10 倍，再以同樣的稀釋倍數做連續稀釋 5 管。濃度由低到高各別吸取 1 μ l 點在硝化纖維紙上，直接進入免疫偵測的實驗步驟，最後使用化學呈色觀察結果。由於 pre-labeled DNA 的濃度是已知的，所以由呈色結果間接的可推算出探針的濃度。

六、DNA 小片膠體電泳

試劑:

1. 1.6X loading dye: 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cynol, 10% glycerol
2. 2.10X TAE buffer: 0.4 M Tris base, 0.01M EDTA, 以醋酸調至 pH 8.0

1. 膠體的製備

1.2 g 的 agarose 加入 10 ml 10X TAE buffer, 加入二次水至 100 ml, 放在加熱板上, 煮至沸騰溶解後靜置冷卻至手可觸之溫度, 將膠倒在鑄膠模上, 待至 30 分鐘後, 即可使用。

2. Running buffer :

吸取 10X TAE buffer 30 ml, 加入二次水 270 ml 混合成 1 倍的 TAE buffer。

3. 檢體處理

取適量 DNA 樣品, 加入 2 μ l 6X DNA Loading dye, 用二次水補足總體積 12 μ l, 混合均勻, 稍為離心後將樣品加到齒槽內, 於 100 V 固定電壓進行電泳 30 分鐘。將膠體以 Ethiumdium bromide (1 μ g/ml) 染色 10 分鐘, 以二次水洗膠體約 20 min, UV 燈下進行觀察, 並以拍立得相機拍照。

伍、結果

一、PCR 及 Yb cDNA 的選殖

利用合成的 5'-primer 及 3'-primer，如圖 1，以 PCR 的方式大量複製 Yb cDNA。為方便之後將 cDNA 嵌入載體，兩個 primer 上各設計有一個限制酵素 BamHI 認識的位置。複製出的 Yb cDNA 片段的長度應為 591 bp，其 5'及 3'兩端上各具有一個 BamHI 認知的位點。PCR 的產物經過 1.2%洋菜膠分離後，如預期的，見圖 2，在 600 bp 附近有一條很明顯的 band。

為方便隨後的 cDNA 驗證工作及大量生產 cDNA 作為探針，因此自洋菜膠中將此 DNA 片段利用 GeneClean II 的方法純化出來，然後以 BamHI 酵素作用，再將其與經由 BamHI 作用過的 pGEM3Z(f)+質體接合之後，送入 JM 109 E. coli。利用 X-gal 及 IPTG 呈色系統篩選，由於 Yb cDNA 接入 PGEM 的 lac 基因，所以一但接合成功後，即會破壞 lac 基因，而不能產生酵素代謝 X-gal，因而菌落的顏色呈現白色，不會呈現藍色。自白色的菌株抽出 plasmid，大量的做篩選，見圖 3。為了確定 plasmid 內含所送入的 cDNA，於是以前 BamHI 限制酵素進行反應，跑 1.2%洋菜膠分離 DNA，結果發現有兩條 band，見圖 6，位置分別在 3200 bp 及 600 bp 附近，而 pGEM3Z(f)+的大小是 3199 bp，所以初步確定是所要的 plasmid，並命名為 pGEM-Yb。為了更進一步確定這個 plasmid 所含的 cDNA 即為 Yb，因此用不同的限制酵素來切 pGEM-Yb，分別是 SmaI、EcoRI 和 XbaI，再跑

1.2%的洋菜膠，將所得到的這些 bands 的大小與由 restriction enzyme mapping 所預期的 bands 相比較，結果發現兩者非常符合，如圖 6 所示。由於此接合的 plasmid 只有一個 SmaI 認知位置，所以以 SmaI 進行反應，則會使環狀的 PGEM-Yb 成線狀使得結構鬆散，由於直線狀的 DNA 在膠上跑的速度較環狀 DNA 慢，所以在膠上的位置會稍微的往後移動，且不會出現其它的 band。至於以 EcoRI 進行反應時，由於在 pGEM 上有 EcoRI 的位置，Yb cDNA 上也有一個 EcoRI 的位置，所以會出現兩條 band，如結果所示，3470 bp 及 321 bp 兩條 bands。為了更進一步確定，於是以 EcoRI 及 XbaI 一起作用，如圖所示，則會出現三條 band，分別是 3172 bp，321 bp，297 bp，而由於 321 bp 及 297 bp 的大小相近，所以不能分開得很明顯。

大量純化 Yb cDNA，以製備 DNA 探針。在 pGEM-Yb 經 restriction enzyme 作用之後，電泳分離出 Yb cDNA，再以 GeneClean II 的方式純化出 Yb cDNA。為了進一步確定此 cDNA 確是我們所要的，於是以 Yb DNA 上有的限制酵素認知位，分別是 EcoRI 及 HinfII，進行酵素反應。如圖 8.所示，以 EcoRI 進行反應，則會產生兩條大小各 300 bp 左右的片段。以 HinfII 進行反應，則會產生兩條大小各 400 bp 及 200 bp 的片段。於是進一步以此 DNA 進行探針製備的工作。

二、藏紅酸實驗濃度的決定

藏紅酸分離自梔子，是梔子的主成份之一。藏紅酸對細胞的毒性很低()，所以被廣泛的應用於食品當中。為了採用適當且對細胞無毒性的濃度來進行實驗，分別以 10、25、50、100 及 200 μM 的藏

紅酸處理大白鼠的初代培養肝細胞，觀察不同濃度的藏紅酸對肝細胞存活率的影響。以 MTT assay 來定量藏紅酸的細胞毒性，活細胞會將 MTT 還原成 formazan，以 isopropanol 將 crystal 溶解後，於波長 563 nm 測其吸光值，以無藏紅酸者之吸光值為 100% 存活率，其於處理者與之比較。實驗結果發現，如圖 10，濃度 10、25、50 μM 的藏紅酸對肝細胞幾乎沒有毒性。處理濃度 100 和 200 μM 的藏紅酸，細胞的存活率分別是 70% 及 57%。在藏紅酸為 200 μM ，存活的細胞才降至 57%，由此可知藏紅酸對肝細胞的毒性作用很低。選擇濃度 50 μM 的藏紅酸為實驗濃度，但是為觀察更明顯的實驗結果，於是也加做濃度 100 μM 的藏紅酸。

三、藏紅酸促進 GST RNA 的表現

過去的一些研究指出，藏紅酸會抑制細胞的轉型，並會抑制 TPA 的促癌化作用。雖然以知藏紅酸處理會提高 GST 酵素活性，但對於其分子機制仍不清楚。由於細胞一旦受到攻擊或傷害，GST 則會代謝這些攻擊物扮演著保護細胞免於傷害的主要角色，因此欲觀察藏紅酸是否會誘導 GST 的表現。為觀察藏紅酸是否會誘導 GST Yb 的表現，以 50 μM 的藏紅酸分別處理大白鼠的初代培養肝細胞 0 小時，3 小時，6 小時，9 小時、12 小時及 24 小時後，從各組抽取 total RNA，然後取定量的 total RNA 進行北方墨點法實驗。所使用的 RNA 的量除了以 Ethidium bromide 染色來觀察其一致性之外，如圖 11 所示，亦用 cDNA 探針偵測 GNPDH mRNA 的量當作 internal control，來換算出 GST Yb mRNA 的相對含量。北方墨點法實驗的

結果，見圖 12、13，發現 GST 在藏紅酸處理 3、6、9 小時，所表現的量並無太大的改變，GST 的表現量大約是控制組的 1.2-1.3 倍。在處理 12 小時後，GST 的量才有較稍明顯的升高，和控制組比較，大約是控制組的 1.6 倍，至 24 小時仍呈稍微的增加。以 100 μ M 藏紅酸處理肝細胞，見圖 14、15，更可以明顯的看出 GST Yb mRNA 的表現量的變化。在處理 6 小時後已有明顯的增加現象，GST 的表現量大約是控制組的 2.6 倍。直至 9 小時的表現量達到最高，增加的量是控制組的 3 倍，一直持續至 12 小時。

四、Geniposide 促進 GST Yb mRNA 的表現

Geniposide 是梔子的主成份之一。序論部份提到本實驗室先前證實 geniposide 具保護肝細胞免於傷害的能力，且也具抑制癌促進的作用，於是欲觀察 geniposide 是否也會誘導 GST Yb mRNA 的表現。以 0.1 mM geniposide 處理大白鼠的初代培養肝細胞 0 小時、3 小時、6 小時、9 小時、12 小時及 24 小時。從各組抽取 total RNA，後取定量的 total RNA 進行北方墨點法實驗。所使用的 RNA 的量除了以 Ethidium bromide 染色來觀察其一致性之外，亦用 cDNA 探針偵測 GNPDH mRNA 的量當作 internal control，來換算出 GST Yb mRNA 的相對含量。見圖 16、17，結果發現在 3、6 小時，GST Yb mRNA 的表現量並無規則性，推想很可能是因為實驗的誤差所造待進一步實驗的證實。GST mRNA 的表現量在處理 9 小時之後才有持續增加的現象，在處理時間 9、12、24 小時，其 GST 的量是控制組的 1.01 倍，1.02 倍，1.2 倍。處理 25 μ M、50 μ M、100

μM 、 $150 \mu\text{M}$ 及 $200 \mu\text{M}$ 濃度的 geniposide，培養 24 小時後抽取肝細胞的 total RNA，取定量的 total RNA 進行北方墨點法實驗。所使用的 RNA 的量除了以 Ethidium bromide 染色來觀察其一致性之外，亦用 cDNA 探針偵測 GNPDH mRNA 的量當作 internal control，來換算出 GST Yb mRNA 的相對含量。見圖 19、20，結果發現，GST Yb mRNA 的表現量隨著處理藥物濃度的增高，呈現很明顯的 dose-dependent 的現象。在處理濃度 $25 \mu\text{M}$ 時，GST 的量是控制組的 1.7 倍，之後一直持續的增加，在處理濃度 $200 \mu\text{M}$ 時，GST 的表現量是控制組的 4.3 倍，上升了 3 倍之多。

五、TPA 處理對藏紅酸刺激 GST Yb mRNA 表現的影響

由於本實驗室以往的研究皆用 TPA 作為癌促化劑，再觀察藏紅酸抑制癌化的作用。前面的結果顯示，單獨的加入藏紅酸會誘導 GST Yb 基因的轉錄，但殊不知肝細胞處理藏紅酸之後，再加入 TPA 是否會影響 GST 基因的表現，因而在此探討 TPA 處理對藏紅酸刺激 GST Yb mRNA 表現的影響。首先加入 $25 \mu\text{M}$ 、 $50 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$ 藏紅酸處理大白鼠的初代培養肝細胞 5 分鐘，再加入 100 ng/ml TPA，分別在培養 30 分鐘或是 60 分鐘後，抽取 total RNA，進行北方墨點法後取定量的 total RNA 進行北方墨點法實驗。所使用的 RNA 的量除了以 Ethidium bromide 染色來觀察其一致性之外，亦用 cDNA 探針偵測 GNPDH mRNA 的量當作 internal control，結果顯現 GAPDH 的量相當一致，但是由於 GAPDH 的背景質高，為了避免換算 GST 之後的換算質有誤差，於是不以 GAPDH 再加以換算。結果見圖 21、22，

比較控制組和只加了藏紅酸的 GST 表現量，藏紅酸的 GST 量是控制組的 1.15 倍 仔細觀察，在單單只加 TPA 所誘導的 GST Yb 表現量卻顯現出稍微的抑制現象，大約是控制組的 0.9 倍。而在藏紅酸及 TPA 一起作用的處理方式，乃事先加入 3 種不同濃度的藏紅酸 5 分鐘，再加入 100ng/ml TPA，這樣的處理是避免藏紅酸可能先和 TPA 作用而影響實驗結果。且隨著藏紅酸加入濃度的提高，GST Yb 的表現量也隨之增加，在處理 25 μM 及 TPA 時，GST 的量和控制組比較相差不多，處理 50 μM 及 TPA 時，GST 的量是控制組的 1.25 倍，當藏紅酸濃度提高至 100 μM ，仍處理相同濃度的 TPA，GST 的量是控制組的 1.34 倍。而且加了 TPA、100 μM 藏紅酸處理所表現的 GST 比起只單單加了加 100 μM 藏紅酸所誘導表現的量有明顯的增加現象，GST 的表現量是單單只加藏紅酸的 1.07 倍。可見在促癌化劑 TPA 的作用下，藏紅酸會誘導較多量的 GST Yb。

陸、討論

老鼠體內主要的GST依其不同的特性大致可分為三種，分別是GST pi，GST mu, GST alpha。GST pi的單元體是Yp，GST alpha的單元體是Ya，GST mu的單元體是Yb單元體(25)，雖然這三種不同族的GST在結構方面，酵素方面的特性都很類似，對於某些化合物的代謝，在功能上的發揮，很可能互相重複，但是大致上對於代謝那一種化合物仍具有一定的特異性，而這些特異性的調節可能和個人的體質，組織的分佈，荷爾蒙的影響都有關。而且他們所負責的生理功能也有相異之處。以肝細胞為例，一旦肝細胞變成腫瘤細胞，尤其是化學性的致癌作用，GST P則會很明顯且大量的表現，GST alpha則是主要負責解毒的工作，特別發現它會代謝一些抗癌物質，如cisplatin、alkylating agent，而抑制了抗癌藥物對癌症初期的治療(25)。至於GST mu有關其報告探討較少，有報告曾經顯示其和組織的發炎有關，在肝臟中扮演著保護性的角色。本研究的動機乃是想探討藏紅酸和去氫梔子甘兩種抗癌藥物本身保護肝臟的作用，以了解他們是以那一個途徑去抑制或延緩癌症的發生。而由於在正常肝細胞中，GST mu會表現，且其組成單位體Yb，和Ya、Yc單位體的相似性不高(59)，以此當作探針則可避免交叉反應的發生，所以可以確定的是，可以專一的分析GST mu的表現。

為取得Yb cDNA，我們首由老鼠的睪丸total RNA以RT-PCR的方式，經由特殊設計的5'-primer及3'-primer，大量複製我們所要的Yb cDNA。至於我們成功的接合PGEM-Yb，並送入JM109大腸桿菌大量

的複製，抽取plasmid，以及最後經酵素作用所取得的Yb cDNA的確定，都是依此plasmid及Yb上所具有的限制酵素認知位，選擇不同的酵素作用來確定。雖然以PCR的方式所得到的DNA可能會出現些微的錯誤，而不能夠完全的精確，但是，Yb cDNA在此是當作北方墨點法的探針，並不是藉著PGEM-Yb plasmid表現蛋白質，因此些微的錯誤並不會影響其擔任探針的功能。而且的Yb cDNA為591 bp長，幾個鹽基的突變，對其在雜交的專一性不會有影響。

正常的肝細胞會表現GST mu，先前有文獻指出，GST mu表現為xenobiotics所調節，如phenobarbitol，3-methyl-butylhydroquinone，其中的3-methylcholanthrene及isosafrole則會抑制GST mu的表現，其餘化合物則會促進GST mu的表現(60)。我們實驗所用的藏紅酸，是類胡蘿蔔素的衍生物，普遍存在蔬菜及水果，另一方面，有研究指出，存在於蔬菜及水果柑橘內的某些成份具誘導GST表現的能力。我們的實驗結果顯示，單獨的處理藏紅酸會誘導GST的表現。在圖12，藏紅酸濃度50uM時，我們發現GST在3，6小時的量，沒有很大的變化，9小時有些微的上升，並不明顯，3、6、9小時的GST表現量是控制組的1.2-1.3倍左右，至12小時GST的量約則是控制組的1.6倍左右，在圖14，100uM的藏紅酸，GST的被誘導情形在9小時上升的最明顯，和控制組比較，GST的表現量是控制組的4倍左右，上升的量則是控制組的3倍，在12小時，其表現量和9小時差不多，可見濃度較高的藏紅酸能誘導較多量的GST。至於誘導的路徑，我們猜測可能是經由活化fos，jun的表現，刺激GST上游的基因，而促使下游基因的表現，然而，對於更上游的路徑仍不明瞭，有待進一步的研究。在1991年時，有學者利用初代肝細胞為工具，加入EGF或

是insulin處理肝細胞，結果發現，EGF及insulin會誘導GST-P的表現，而且也促使fos，jun的表現，且肝細胞並未轉型，此位學者認為GST-P的表現乃是因為fos，jun結合至GST-P的上游基因，也就是TRE-like sequence，刺激下游GST-P的表現(61)。

TPA對細胞的促癌作用，一般的研究顯示，是經由PKC路徑，活化fos，jun的表現，刺激上游基因，而促使下游基因表現。也有一些文獻提到TPA的致癌作用也與自由基的產生有關。以抗氧化劑BHT，BHA或是維他命C、E與TPA一起處理細胞，可以使TPA誘發的ODC活性及致癌作用降低(62)。本實驗室指出藏紅酸具抑制癌化及細胞轉型的能力(34)，最近的實驗結果證實TPA誘發的c-jun及c-fos mRNA的表現，可以被藏紅酸抑制，推測TPA造成c-jun及c-fos mRNA的活化主要受藏紅酸抑制PKC的訊息傳遞作用而形成(39)，但對於其整體的分子機制仍不清楚。所以，進一步觀察藏紅酸抑制癌化，GST所扮演的角色。在圖20，由於internal control GAPDH的結果背景嫌髒，以致於定量時不夠正確，所以以控制組為標準值，將此圖的結果給標準化，結果發現，在單單處理100uM的藏紅酸1個小時，GST的表現是控制組的1.1倍左右，和先前的結果，也就是圖14.做比較，在以100uM藏紅酸處理處理3個小時，GST的表現量是控制組的1.2倍左右，可見GST在處理100uM的藏紅酸處理1個小時之後，可能仍在繼續表現，且也很有可能在處理藏紅酸後的一個小時內GST就被誘導表現了，但是對於1小時之前的GST的變化情形，則有待再做更進一步的探討。同樣的，在圖21，單單只處理TPA所表現的GST，似乎有稍微被抑制的現象，和控制組比較，GST的量是控制組的約0.9倍左右，可見有稍微的被抑制現象。最近的研究指出，TPA並不是如過

去所認為的會誘導GST mu，及GST alpha的表現，反而是會使GST mu及GST alpha的mRNA表現下降，且c-jun mRNA 在處理2小時後表現才上升，同時在蛋白質的層次方面，GST酵素的量也下降(63)，於是推測可能是此因。在處理25uM藏紅酸，50uM藏紅酸，100uM藏紅酸5分鐘之後，再個別加入100ng/ml TPA，培養60分鐘。至於先處理藏紅酸5分鐘之後，再加入TPA，乃是避免藏紅酸與TPA可能先互相作用，而影響實驗的結果，結果可以發現，在加入TPA處理，隨著藏紅酸的處理濃度提高，和控制組比較，GST的表現量在藏紅酸濃度25uM，TPA 100ng/ml時相差不大，在處理50uM 藏紅酸和100ng/ml TPA，以及100uM藏紅酸和100ng/ml TPA，其GST的表現量分別是控制組的1.28倍及1.34倍，由此可以明顯的看出，當細胞處理100uM藏紅酸及100ng/ml TPA時，其誘導GST表現的能力，較只單加100uM藏紅酸的誘導力強，可見，TPA本身不會誘導GST的表現，但是一旦和藏紅酸一起處理細胞，可能會促進藏紅酸誘導GST表現。前面部份敘述TPA的促癌可能和自由基的產生有關連，GST在體內扮演的角色即是催化GSH和化學活化物結合，加以代謝，而對藏紅酸會抑制TPA的促癌作用，是否和其會誘導GST表現有相關，這樣的結果，說明了藏紅酸的抑制效果應和GST的誘導有關，未來，在這一方面，會再做更深入的探討。

去氫梔子甘是屬於iridoid化合物，多偏於腸胃道的藥理作用之研究以及構造式的探討，鮮少有研究致力於癌症的探討。如前所述，本實驗室證實去氫梔子甘會抑制TPA的促癌作用。同樣的，欲進一步探討其分子的機制。在圖16，處理相同濃度的去氫梔子，培養不同時間，分別為0，3，6，9，12，24小時，抽取RNA，進行北方墨點

法。在量化之後，見圖17，我們發現GST的表現在0，3，6小時並不規則，所以可能需要實驗進一步的確定，在培養24小時，我們發現GST的量和12小時比較，量約是12小時的1.2倍，約上升了0.2倍左右。而在以不同濃度處理肝細胞，很明顯的可以看的出，見圖19，GST的表現量隨著加入的劑量增多，量也隨之增加。在處理濃度25uM時，GST的量是控制組的1.6倍，上升的量約是控制組的0.7倍，由這樣的結果，似乎暗示著去氫梔子甘在低濃度時就有誘導GST表現的能力，而且GST的表現量和去氫梔子甘的濃度有關。但是在序論方面提到，去氫梔子甘進入胃腸後，會被細菌代謝並可能轉化其構造，所以，是否會改變或是降低原來的效能，仍不清楚。

探討梔子中的主成份，藏紅酸及去氫梔子甘，具誘導GST表現的能力，由結果歸納出藏紅酸及去氫梔子，應是在加入細胞後，作用短暫時間，即會誘導GST的表現，但是對於它們的持續性如何，事實上，是令人相當感興趣的。對於其上游的路徑及基因的調控都是我們未來欲探討的重點。

*** GST anionic Yb subunit 5' primer**

The nucleotide sequence of Yb

TAC AGC ATG GGG GAT GCT CCC GAC TAT GAC AGA AGC CAG
TGG

G GAT CC(BamH I)

5' primer

ATG GGG GAT CCT CCC GAC TAT GAC AGA
BamH I

*** GST anionic Yb subunit 3' primer**

The nucleotide sequence of Yb

TAG CAC CAC AAA GTC CAG ACC TAG GGA TAC TCA TGA GTG
CCC **GGA TCC(BamH I)**

GTC CAG ACC TAG GGA TCC TCA TGA GTG

3' primer

CAC TCA TGA GGA TCC CTA GGT CTG
BamH I

Fig. 1. The 5' primer and 3' primer.

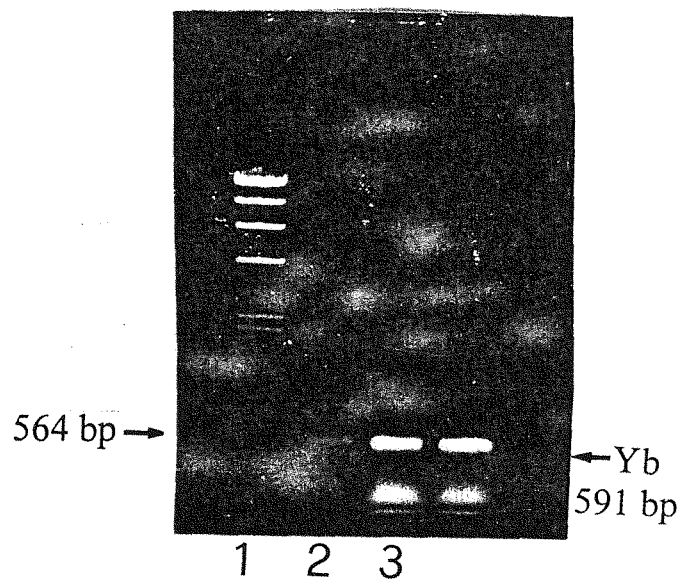


Fig. 2. The result of PCR. PCR: $94^{\circ}\text{C} \times 5$ minutes, then $94^{\circ}\text{C} \times 2$ minutes, $72^{\circ}\text{C} \times 1$ minutes, $72^{\circ}\text{C} \times 2$ minutes for 30 cycles. And $72^{\circ}\text{C} \times 10$ minutes. Lane 1: DNA marker. Lane 2 , 3 Yb cDNA generated from RT-PCR.

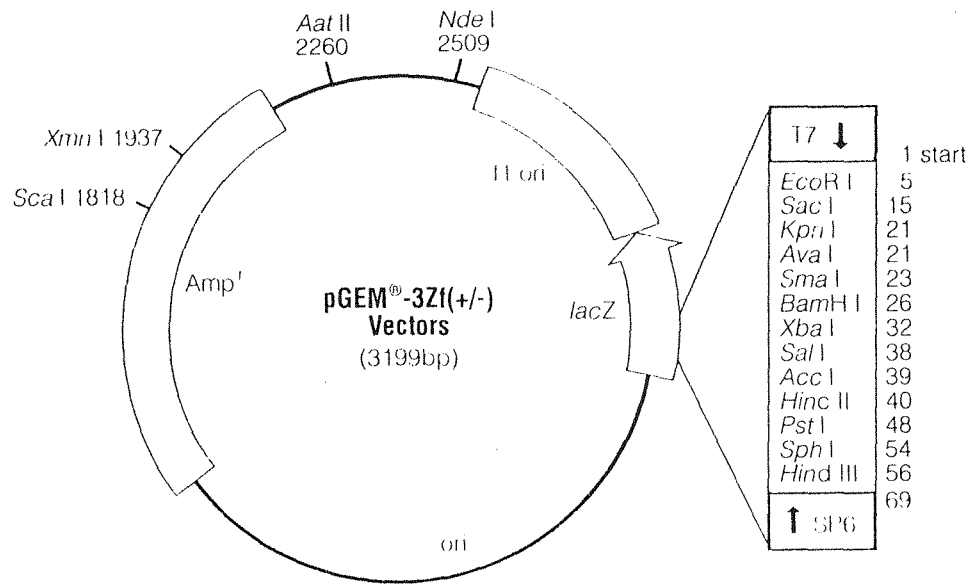


Fig. 3. The map of PGEM 3Z(f)+.

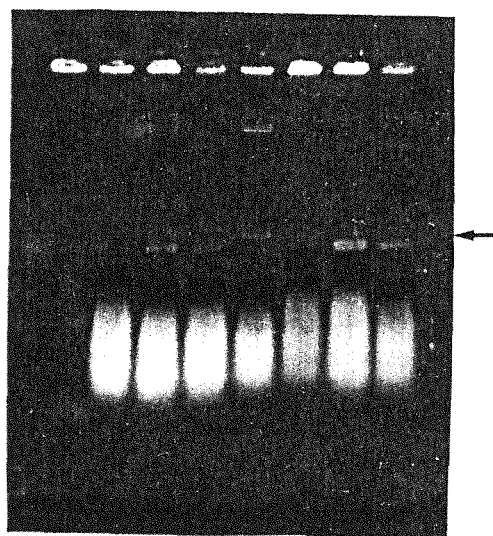


Fig.4. Screening of the *E. coli* clone with PGEM-Yb plasmid prepared from the white *E. coli* colonies were analyzed by electrophoresis on 1.2% agarose gel.

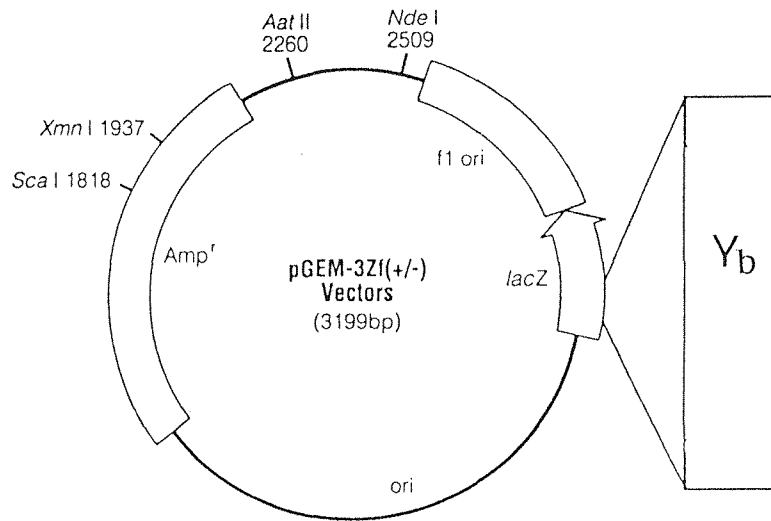


Fig. 5. Yb cDNA obtained from RT-PCR was inserted into PGEM 3Z(f)+.

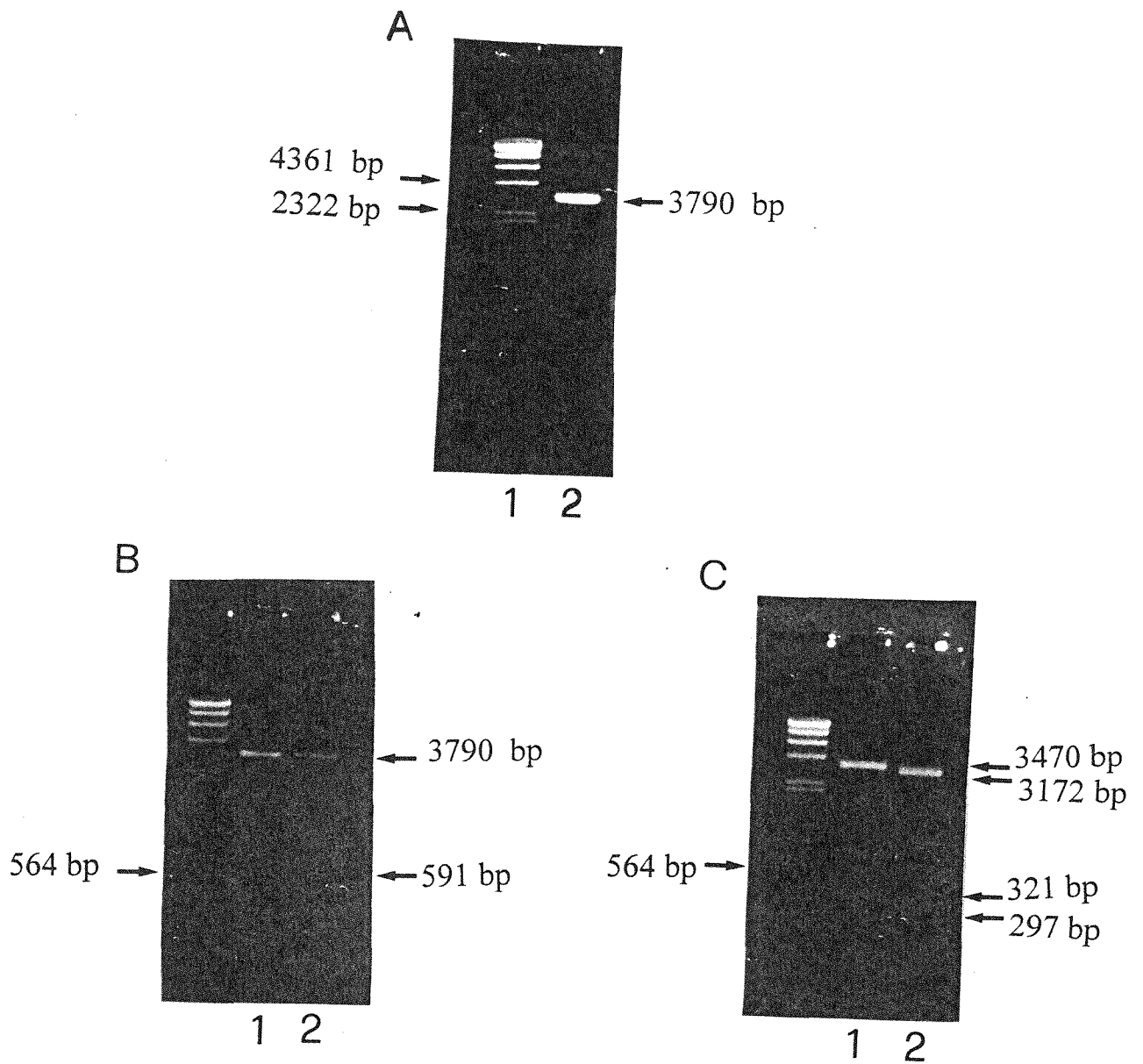


Fig.6. Comfirm Yb-PGEM 3Z(f)+ plasmid with digestion worked by different enzyme. A. Lane 1: DNA marker. Lane 2: Yb-PGEM 3Z(f)+. B. Lane 1: Plasmid digested with BamH I. Lane 2: Plasmid digested with Sma I. C. Lane 1: Digested with EcoR I. Lane 2: Digested with Xba I and EcoR I.

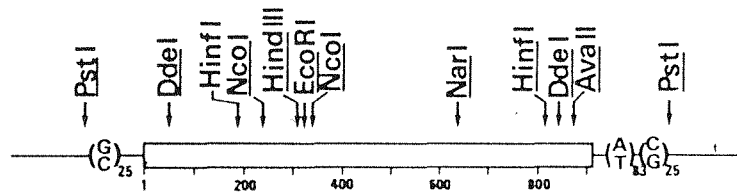


Fig. 7. Restriction enzyme mapping of GST Yb cDNA
 (From Hui-Chen J. Lai, (1986) Rat Glutathione S-
 Transferase Supergene Family. J.Biol. Chem. 13793-
 13799.)

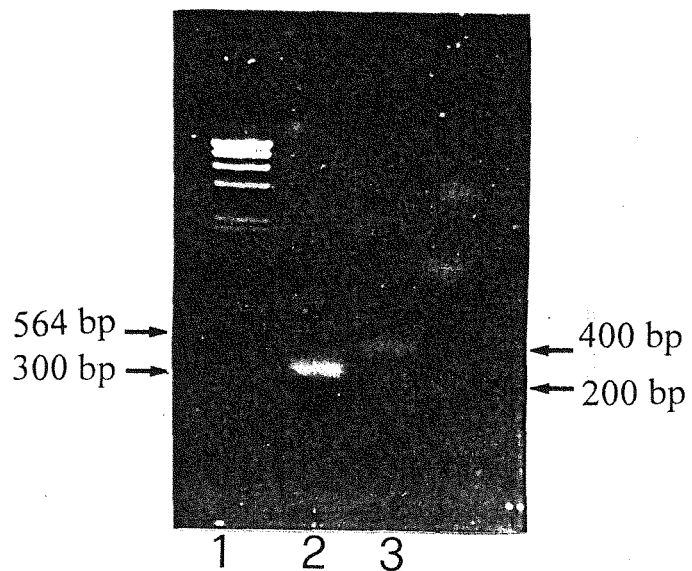
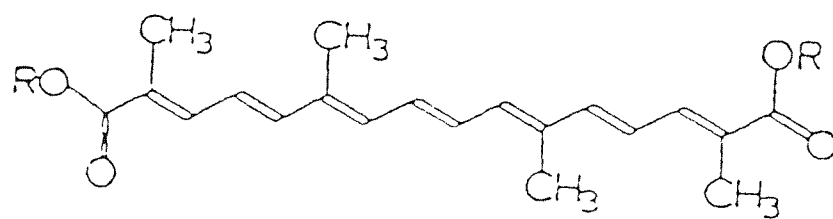


Fig. 8. Confirm Yb cDNA with enzyme digestion. Lane 1: DNA marker. Lane 2: Digested with EcoR I. Lane 3: Digested with Hinf I.



Crocetin R = H (CCT)

Fig. 9. Structure of crocetin

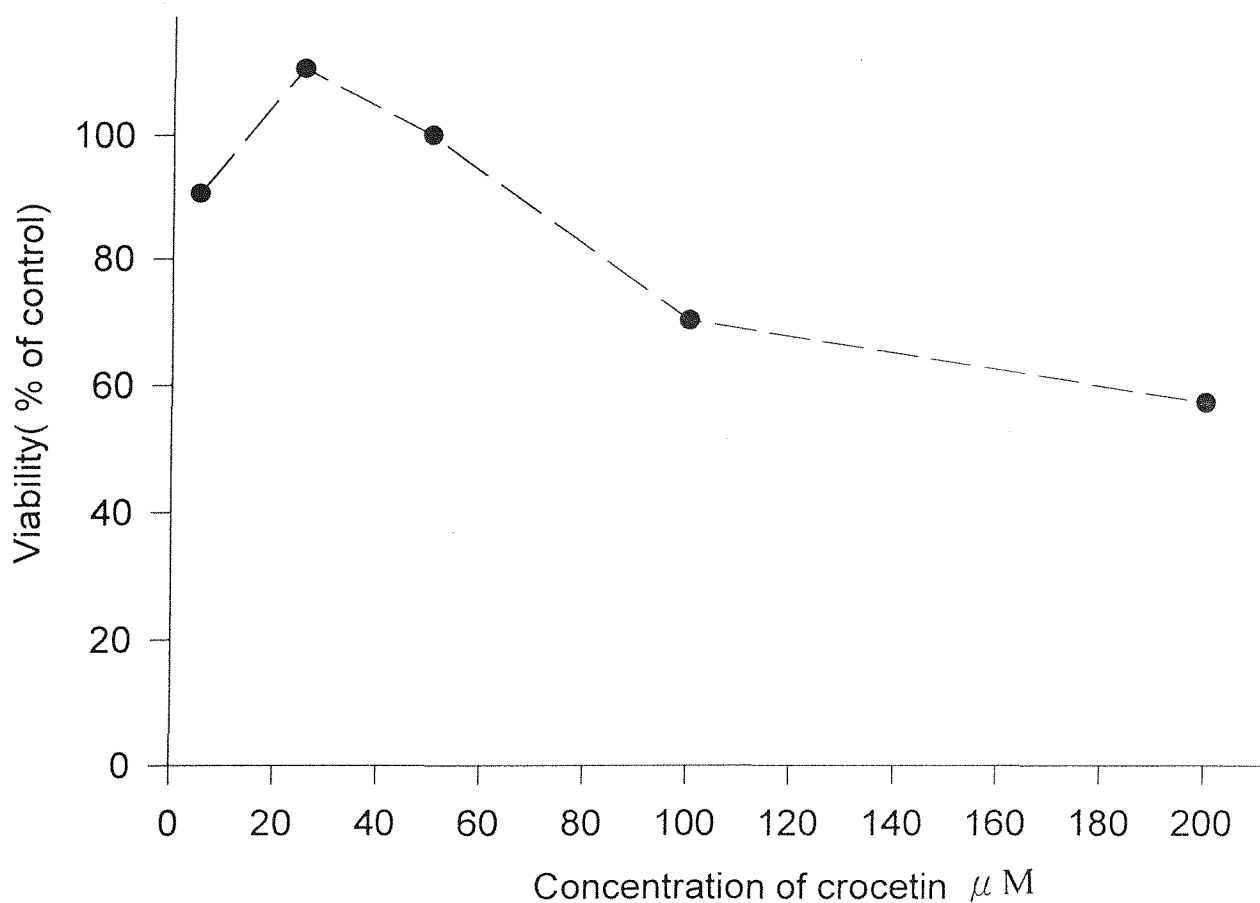


Fig. 10. The cytotoxicity of crocetin analyzed by MTT assay. The primary culture of rat hepatocyte cells(5×10^5 cells/well) were treated with different concentrations of crocetin for 18 hours and, then, were cultured with the presense of MTT for 4 hours. The medium was removed and the cells were washed once with PBS. One minililler of isopropanol was added to the cells to dissolve the formazan crystal. The absorbance was determed at 563nm.

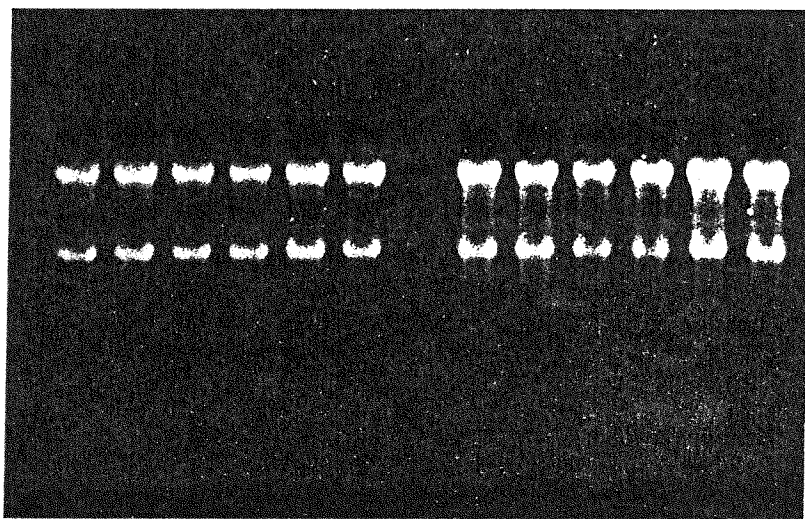


Fig.11. RNA eletrophoresis in 1.2% denaturing gel

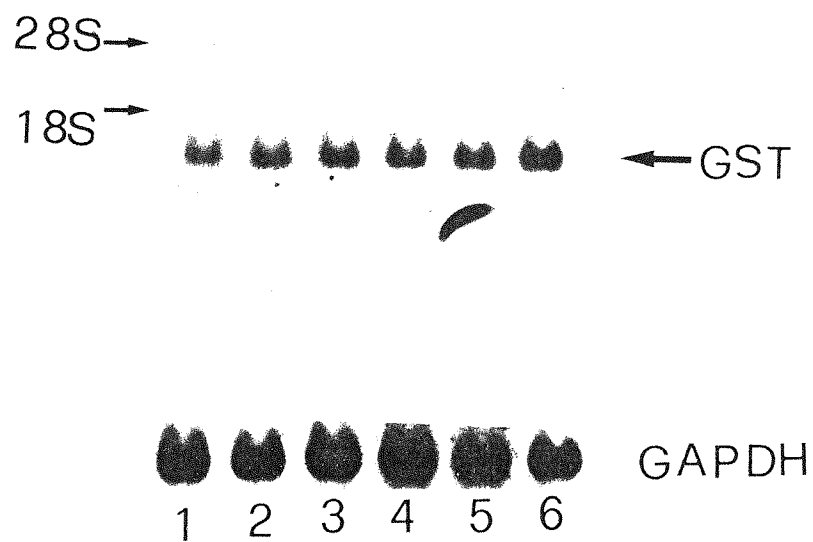


Fig. 12. The time course of the effect of Crocetin on the expression of GST mRNA in the primary culture of rat hepatocytes. Hepatocyte cells were treated with or without $50 \mu\text{M}$ crocetin and then total RNA was prepared at the indicated time points after the initiation of the treatment. Lane 1: 0 hour. Lane 2: 3 hour. Lane 3: 6 hour. Lane 4: 9 hour. Lane 5: 12 hour. Lane 6: 24 hour. Northern blot was hybridized with Yb and GAPDH cDNA probes.

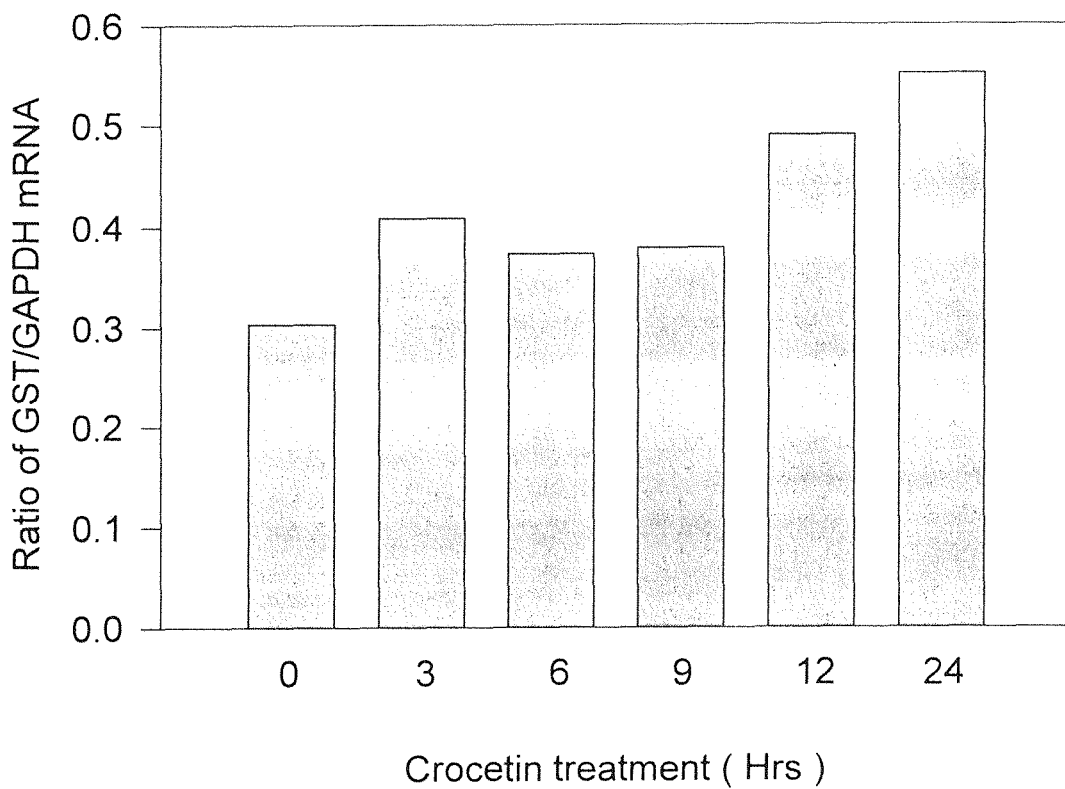


Fig. 13. Densitometric measurements of the time course of the effect of 50 μ M crocetin on the expression of GST mRNA in the primary culture of rat hepatocytes.

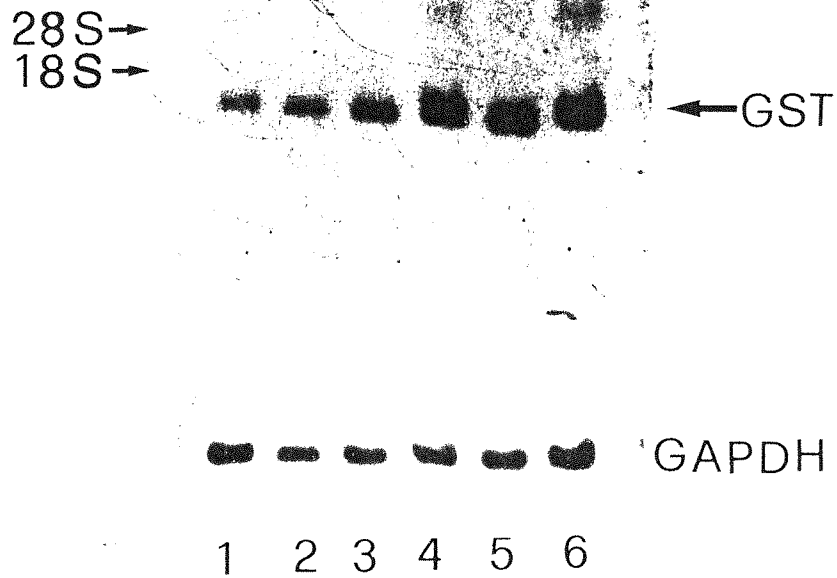


Fig. 14. Crocetin induced expression of GST mRNA in rat hepatocytes. The hepatocyte were or were not treated with 100 μ M crocetin and then total RNA was prepared at selected time after the initiation of the treatment. Lane 1: 0 hour. Lane 2: 3 hour. Lane 3: 6 hour. Lane 4: 9 hour. Lane 5: 12 hour. Lane 6: 24 hour. Northern blot was performed with Yb and GAPDH cDNA probes.

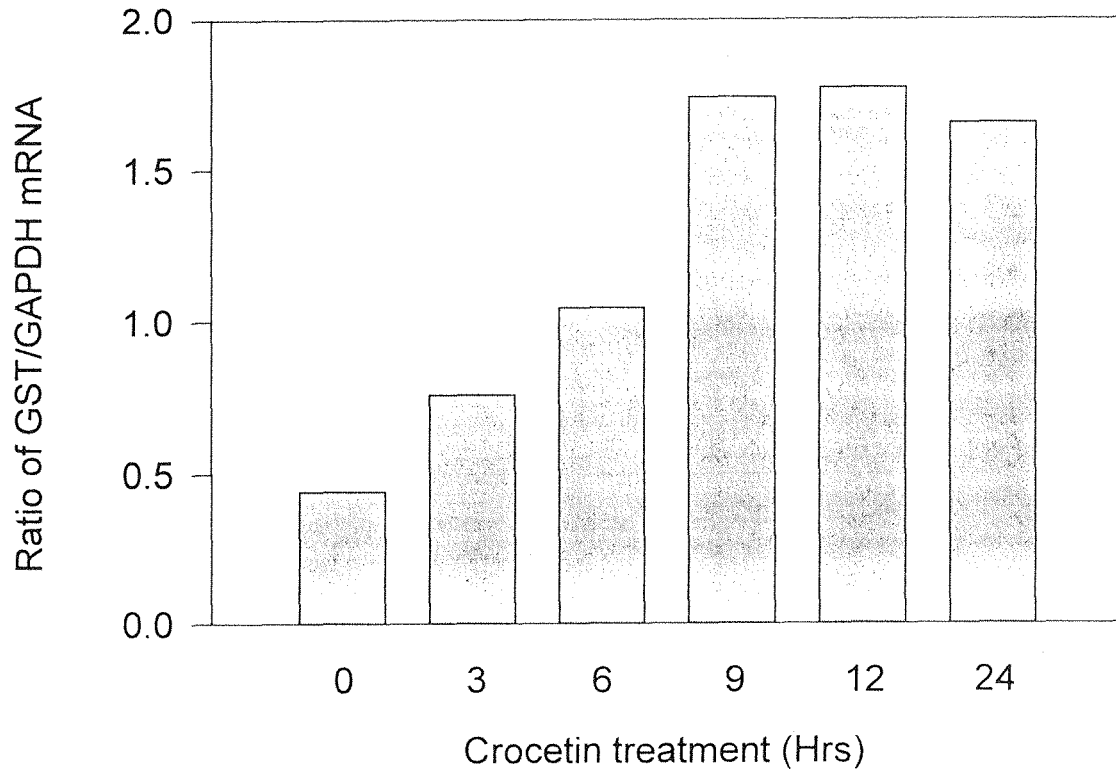


Fig. 15. Densitometric measurements of the time course of the effect of $100 \mu\text{M}$ crocetin on the expression of GST mRNA in the primary culture of rat hepatocytes.

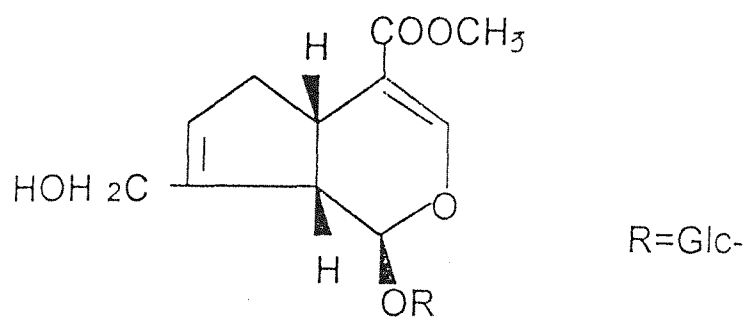


Fig. 16. Structure of geniposide

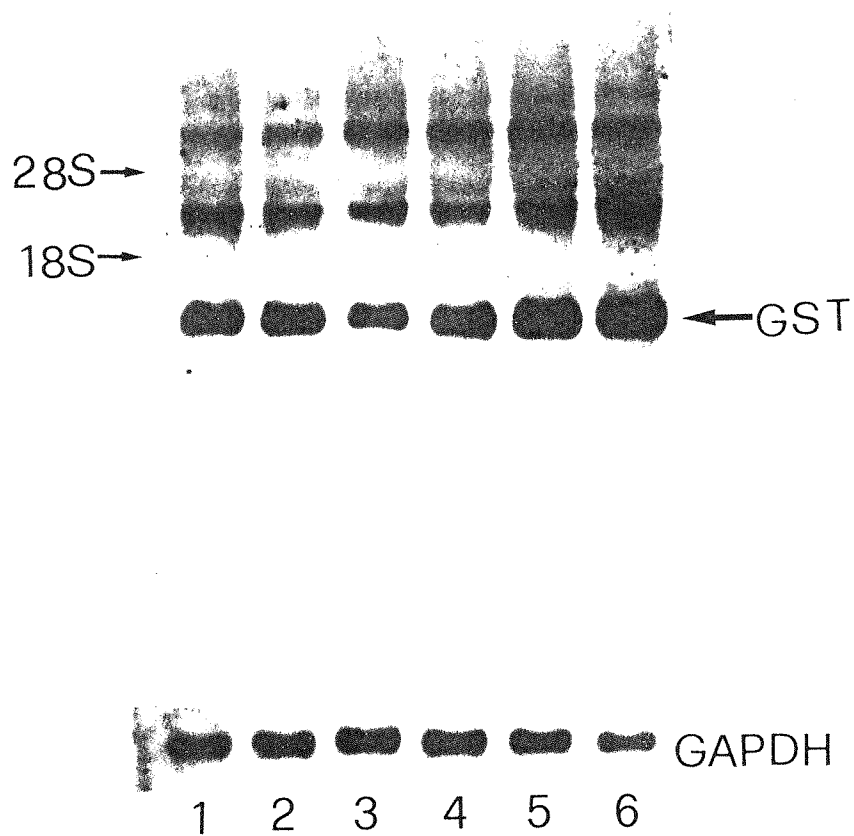


Fig. 17. Geniposide induced expression off GST mRNA expression in rat hepatocytes. The hepatocytes were or were not treated with 100 μ M geniposide and then total RNA was prepared at selected time after the initiation of the treatment. Lane 1: 0 hour. Lane 2: 3 hour. Lane 3: 6 hour. Lane 4: 9 hour. Lane 5: 12 hour. Lane 6: 24 hour. Northern blot was performed with Yb and GAPDH cDNA probes.

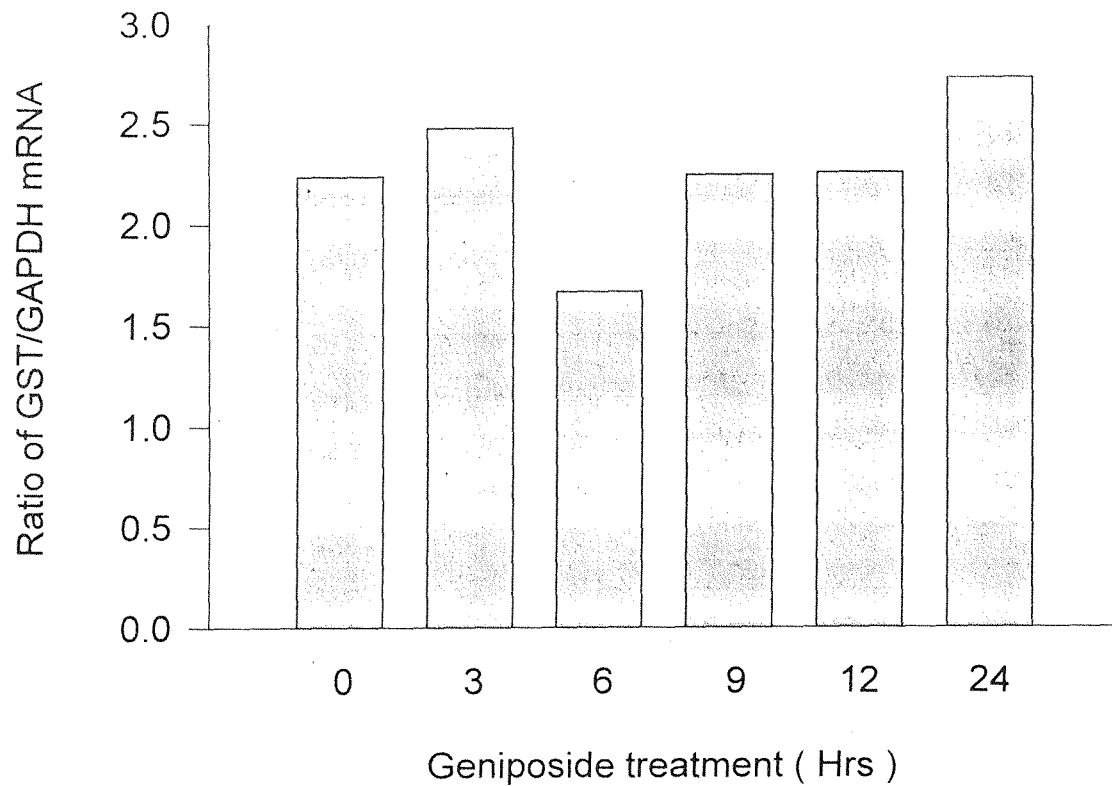


Fig. 18. Densitometric measurements of the time course of the effect of $100 \mu\text{M}$ geniposide on the expression of GST mRNA in the primary culture of rat hepatocytes.

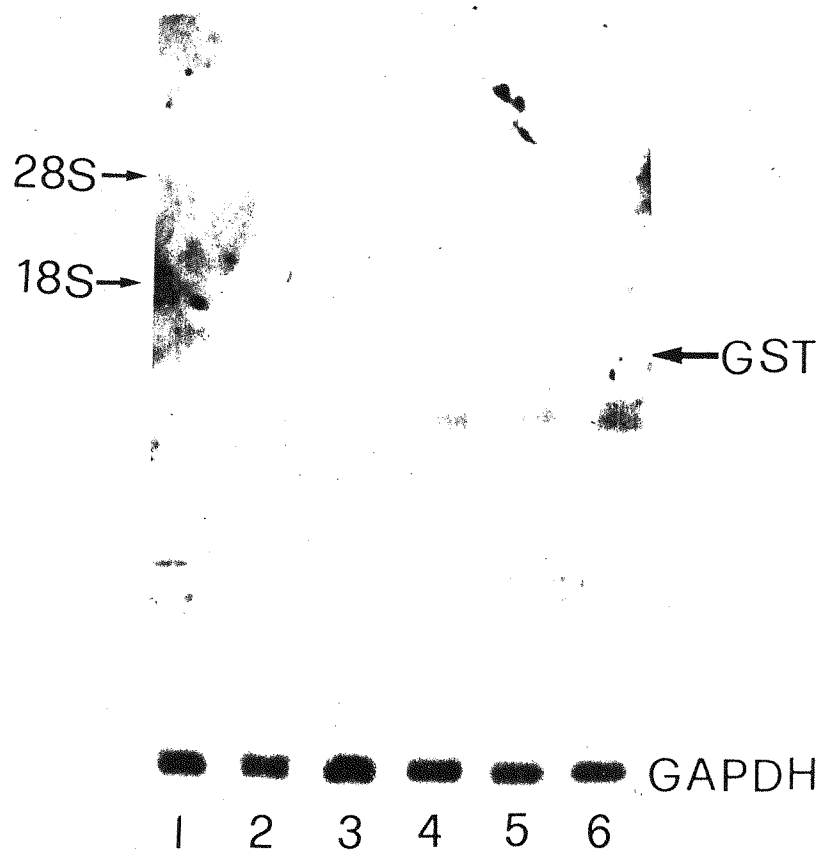


Fig. 19. Geniposide induced the expression of GST mRNA in the primary culture of rat hepatocyte. The cells were treated with or without different concentrations of geniposide(GP): The total RNA was prepared 24 hours after the initiation of the treatment and applied for Northern Hybridization analysis. Lane 1: control group. Lane 2: 25 μ M GP. Lane 3: 50 μ M GP. Lane 4: 100 μ M. Lane 5: 150 μ M GP. Lane 6: 200 μ M GP. Northern blot was hybridized with Yb and GAPDH cDNA probes.

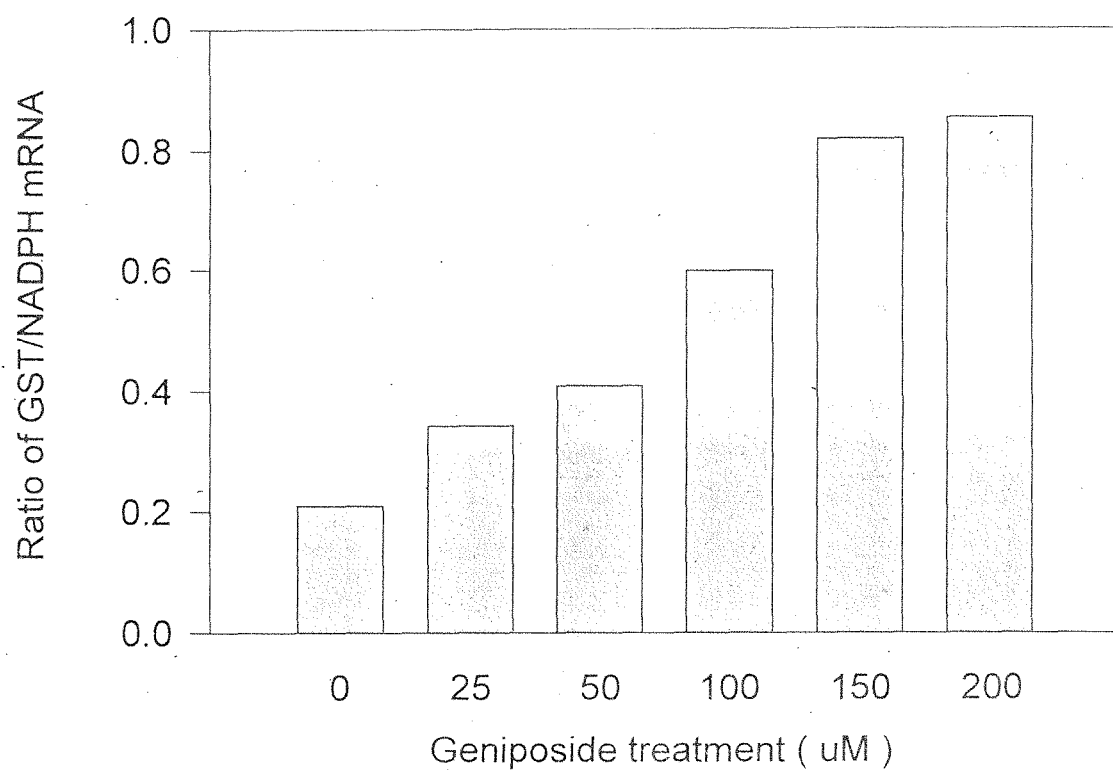


Fig. 20. Densitometric measurements of does response of the effect of geniposide on the expression of GST mRNA in the primary culture of rat hepatocytes.

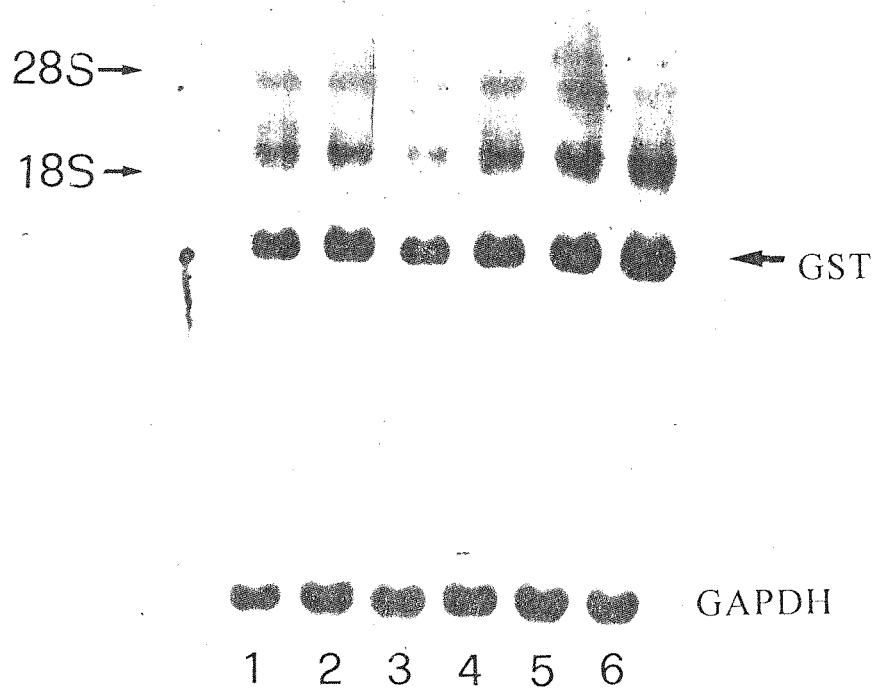


Fig. 21. Crocetin induced GST mRNA expression with treating with TPA in rat hepatocyte, then the RNA was prepare after treating for 60 minutes. Lane 1: control group. Lane 2: 100 μ M crocetin. Lane 3: 100ng/ml TPA. Lane 4: Treating with 25uM crocetin for 5 minutes, then adding 100ng/ml TPA. Lane 5: Treating with 50 μ M crocetin for 5 minutes, then adding 100ng/ml TPA. Lane 6: Treating with 100 μ M crocetin for 5 minutes, then adding 100ng/ml TPA. Northern blot was hybridized with Yb and GAPDH cDNA.

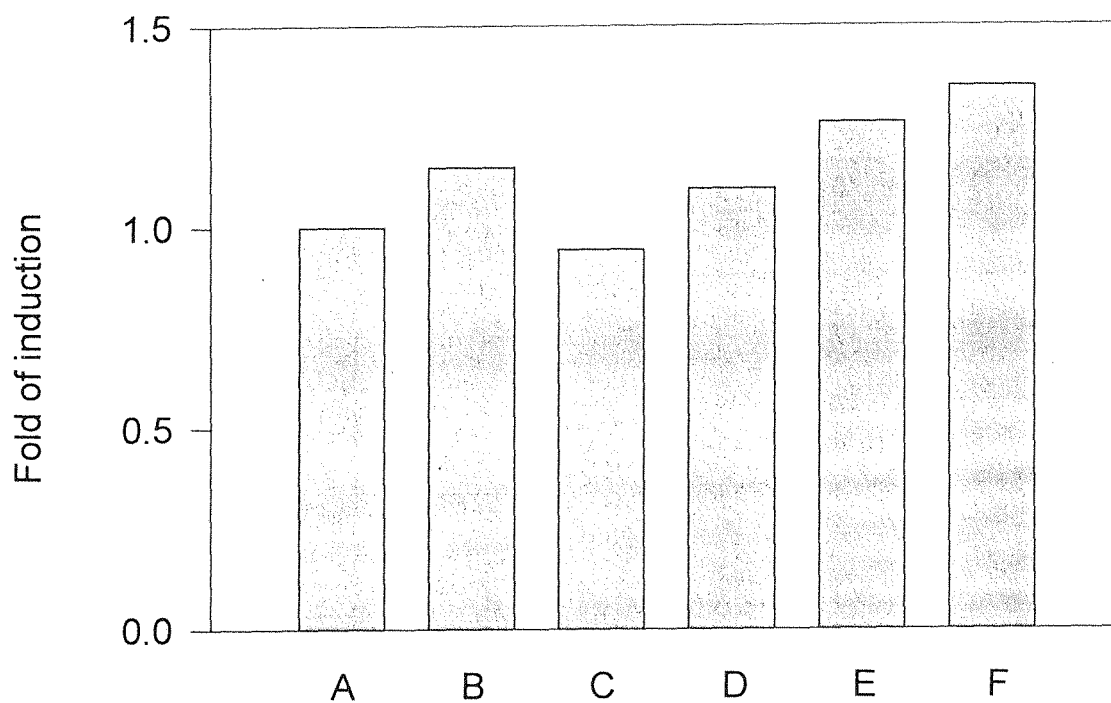


Fig. 22. Densitometric measurements of GST mRNA in the primary culture of rat hepatocytes. A. Control. B. 100 μ M crocetin. C. 100ng/ml TPA. D. Treating with 25 μ M crocetin for 5 minutes, then adding 100ng/ml. E. Treating with 50 μ M crocetin for 5 minutes, then adding 100ng/ml TPA. F. Treating with 100 μ M crocetin for 5 minutes, then adding 100ng/ml TPA..

1. Ranuio H, Husgafuel-Pursiainen K. Anttila S., Hietanen E., Hirvonen A., Pelkonen O., (1995) Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility. 159(1) *Gene*, 113-21
2. Pioto, H. C. Beer, P. Hendirch, S., (1989) Multistage carcinogens of the rat hepatocyte. Banburg Report 25: Nongenotoxic mechanism in carcinogenes, Cold Spring harbor, New York, pp41-53
3. Iucker, (1995) Influence of glutathione S-transferase B(ligandin) on the intermembrane transfer of bilirubin. Implication for the intracellular transport of nonsubstrate ligands in hepatocytes. *J. clin. Invest.* 96, 1972-1935
4. Arias, I. M., Fleischner G., Kirsch R., Mishkin, S., and Gatmaitan, Z. (1996) in *glutathione: Metabolism and function*, pp. 175-188, Raven Press, New York.
5. Mannervik, B., (1985) The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv. Enzym. Reant. Areas. molec. Biol.* 57, 357-417
6. Hui-Chen J, Lui and Chen-Pei D. Tu. (1986) Rat Glutathione S-Transferase Supergene family 261., 13793-13799
7. Hayes JD, Pulford, DJ (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30(6): 445-600
8. Mainwaring (1996) Isolation of a mouse theta-glutathione S-transferase active with methylene chloride. *Biochem. J.* 314, 445-448
9. Hayes JD., Stravge RC (1995) Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative

- stress. *Free Radic. Res.* 22(3): 193-207
10. Bengt mannervik., Rer Alin, Cleas Guthenberg, Helgi Jensson, Warholm, and Hans Jornvall (1995) Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: Correlation between structural data and enzymatic properties. *PNA.S.* vol 82. 7202-7206
 11. Sugimoto M. (1995) Glutathione S-transferase. *Nippon Rinsho- Japanese Journal of clinical Medicine.* 53(5): 1253-9
 12. Masaharu Sakai, Yuko Matsushima-Hibiya, Mako Nishizawa, and Shinzo Nishi, (1995) Suppression of Rat Glutathione Transferase P Expression by Peroxisome Proliferators: Interaction between Jun and Peroxisome Proliferator-activated Receptor-Alpha
 13. Tee, (1996) Dual phenotypic expression of hepatocytes and bile ductular markers in developing and preneoplastic rat liver. *Carcinogenesis* 17, 251-259
 15. Dillio C, (1996) Purification and characterization of three pi class glutathione transferase from monkey (*Macaca fascicularis*) placenta. *Comp. Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.* 114(4), 377-382
 16. Ainbinder E, (1997) Regulatory mechanisms involved in activator-protein-1 (AP-1)-mediated activation of glutathione-S-transferase gene expression by chemical agents. *Eur J. Biochem.* 243(1-2), 49-57
 17. Imagawa M., (1996) Regulation mechanism of specific expression of tumor marker gene during carcinogenesis. *Yakugaku Zasshi* 116(7), 505-518
 18. Suzuki T., (1996) Activation of glutathione transferase P gene by lead requires glutathione transferase P enhancer I. *J. Biol. Chem.*

- 271(3), 1626-1632
19. Diccianni MB., (1992) The dyad palindromic glutathione transferase P enhancer binds multiple factors including AP1. *Nucleic Acids Res.* 20(19), 5153-5158
 20. Imai T., (1997) Reduction of glutathione S-transferase P-form mRNA expression in remodeling nodules in rat liver revealed by in situ hybridization. *Carcinogenesis* 18(3), 545-551
 21. Imagawa M., (1996) Regulation mechanism of specific expression of tumor marker gene during carcinogenesis. *Yakugaku Zasshi* 116(7), 627-632
 22. Sakai M., (1996) Regulation of tumor marker gene expression. *Nippon Rinsho* 54(6), 1560-1567
 23. Hayes JD., (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30(6), 445-600
 24. Ahmad H., (1993) Characterization of two novel subunits of the alpha-class glutathione-S-transferase of human liver. *Biochem. Biophys. Acta.* 1161(2-3), 333-336
 25. Waxman DJ., Sundseth SS., Srivastava PK., and Lapenson DP., (1992) Gene-specific oligonucleotide probes for alpha, mu, pi, and microsomal rat glutathione S-transferase: analysis of liver transferase expression and its modulation by hepatic enzyme inducers and platinum anticancer drugs. *Cancer Res.* 52(20): 5797-5802
 26. Morel F., Fardel O., Meyer Dj., (1993) Preferential increase of glutathione S-transferase class alpha transcripts in cultures human

- hepatocytes by phenobarbital, 3-methylcholanthrene, and dithiolethiones. *Cancer Res.* 53(2):231-234
27. Shea TC., Kelley SI., Henner WD., (1988) Identification of an aninoic form of glutathione transferase present in many human tumor and tumor cell lines. *Cancer Res.* 48(3): 527-533
 28. Herterving E., Nilsson A., and Seidegard J., (1994) The expression of glutathione transferase mu in patients with inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol* 29(8): 729-735
 29. Miyasita, S., (1976) A historical study of Chinese drugs for the treatment of jaundice. *Am. J. Chin. Med.*, 4, 239-243
 30. Wu, Y. Y., (1956) Clinical efficiency of capillaries combination as main therapy for launice. *Chin. Med. J.*, 10, 930-932
 31. Chiu, H. F., Lin C.C., Yang F., (1989) The pharmacological and Pathological studies on several hepatic protective crude drug from Taiwan. *American Journal of Chinese Medicine.* 17: 17-23
 32. Gainer, G. J., Wallis, D. A. and Jones, J.R., (1976) The effect of crocetin on skin papillomas and Rous sarcoma. *Oncology*, 33, 222-226
 33. Abdullaev, F.I. (1994) Inhibitory effect of crocetin on interacellular nucleic acid and protein synthesis in malignant cells. *Toxicology Letter.* 70: 243-251
 34. Wang, C. J., Lee, M. J., Cheng, M. C., Lin, J. K., (1995) Inhibition of tumor promotion in benzo[a]pyrene-initiated CD-1 mouse by crocetin *Carcinogenesis*, 16:187-91
 35. Wang, C. J., Shiah, H. S. and Lin, J. K., (1991) Modulatory effect of crocetin on aflatoxin B1 cytotoxicity and DNA adduct formation in C3H10T1/2 fibroblast cells. *Cancer Lett.* 56: 1-10

36. Wang, C. J., Shlow, S. J. and Lin, J. K., (1991) Effects of crocetin on the hepatotoxicity and hepatic DNA Binding of aflatoxin B1 in rats. *Carcinogenesis*, 12: 459-462
37. Wang, C. J., Hsu, J.D., and Lin, J. K., (1991) Suppression of aflatoxin B1-induced hepatotoxic lesions by crocetin (a natural carotenoid). *Carcinogenesis* 12: 1807-1810
38. Tseng TH., (1995) Crocetin protects against oxidative damage in rat primary hepatocytes. *Cancer Lett.* 97(1), 61-67
39. Wang CJ., (1996) Inhibition of protein kinase C and proto-oncogene expression by crocetin in NIH/3T3 cells. *Mol. Carcinog.* 17(4), 235-240
40. Harada M., (1974) Pharmacological studies of gardeniae frutus. I. Effect of geniposide and genipin on the biliary extraction, the gastric juice secretion, and the gastric contraction, and other pharmacological actions. *Yakugaku Zasshi* 94(2), 157-162
41. Kawata Y., (1991) Formation of nitrogen-containing metabolites from geniposide and gardenoside by human intestinal bacteria. *Planta. Med.* 57(6), 536-542
42. Yamano T., (1990) Hepatotoxicity of geniposide in rats. *Food Chem. Toxicol.* 28(7), 515-519
43. Lau, F. T. K., Chang, H. M. and Pak, R. C. K. (1986) *Asia Pacific J. Pharmacol.*, H. and Inoue, K. (1976) Effects of Gardenia jasminoides and geniposide on hepatic drug-metabolizing enzyme activities, implications for gamma-naphthylisothiocyanate-induced hepatotoxicity. *Planta. Med.* 30, 39-47
44. Lee MJ., (1995) Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-caused tumor promotion in benzo[a]pyrene-initiated CD-1 mouse

- skin by geniposide. *Anticancer Res.* 15(2), 411-416
45. Hsu HY., (1997) Comparisons of geneposidic acid and geniposide on antitumor and radioprotection after sublethal irradiation. *Cancer Lett.* 113(1-2), 31-37
 46. Wang CJ., Wang SW. and Lai CY. (1992) Inhibitory effect of geniposide on aflatoxin B1-induced DNA repair synthesis in primary cultured rat hepatocytes. *Cancer Lett.* 65: 133-137
 47. Hecker, E., (1968) Cocarcinogenic principle from the seed oil of croton tiglium and from other Euphorbiaceae. *Cancer Res.* 28:2338-2349
 48. Farstenberger G., Marks, F., (1983) Growth stimulation and tumor promotion in skin. *J. Invest. Dermatol.* 81: 175s-161s
 49. Hall, A. Marshall, C.J., Spurr, N. K., Weiss, R. A., (1983) Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member sa ras gene family located on chromosome 1. *Nature*, 303: 396-400
 50. Momdal, S., Brankow, D W., and Heidelberger, C., (1976) two-stage chemical oncogene is culture of C3H10T1/2 cells. *Cancer Res.* 36:2254-60
 51. Lewis C. C., Kurt R. A., Christopher C., Brain d., Andres D., Rosanna K., and Stephen S.,(1991) Oncogenes and signal transduction. *Cell*, 64, 282-302.
 52. Maki Y., Bos T., Davis C., Strabuck M., and Vogt P. K., (1987)Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. *PNAS.*, 84, 2848-2852.
 53. Angle P., Imagawa M., Chiu R., Stein B p., and Karin M.,(1987) Phorbol ester-inducible genes contain a common cis-element recognized by a TPA modulated transacting factor. *Cell*, 49, 729-739.

54. Butterworth B. E., Ashby J., Bermudex E., Casciano D., Mirsalis J., Probst G., and Williams G., (1987) A protocol and guide for the in vitro rat hepatocytes DNA repair assay. *Mut. Res.* 189, 113
55. Alley M. C., Scudiero D. A., Monks A., Hursey M. L., Czerwinski M J., Fine D L., Abbott B. J., Mauo J. G., Shoemaker R. H. and Boyd M. R., (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48, 589
56. Alley M.C., Pacula-Cox C. M., Hursey M. L., Rubinstein R. and Boyd M.R., (1991) Morphometric and colorimetric analyses of human tumor cell line growth and drug sensitivity in soft agar culture. *Cancer Res.* 51, 1247
57. Xie, W., and Rothblum, L. I., (1991) Rapid, small Scale RNA isolation from tissue culture cells. *Biotech.*, vol. 11, no. 3: 325-327
58. Sambrook, J., Fritsh, E. F., Maniatis, T., (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*. And ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
59. Chen-Pei D. Tu and C. Channa Reddy (1985) On the Multiplicity of Rat Liver Glutathione S-Transferase. *J. Biol. Chem.* Vol. 260, No. 18, pp. 9961-9964
60. Thomas Primiano and Raymond F. Novak (1993) Purification and characterization of Class u glutathione S-transferase isoenzymes from rabbit hepatic tissue. *Archives of Biochemistry and Biophysics* Vol. 301, No. 2, pp. 404-410
61. Tchiyo Hatayama, tuichi Yamada, Keiji Tanaka, Akira Ichihara and Kiyomi Sato (1991) Induction of Glutathione S-Transferase P-form in primary cultured Rat hepatocyte by Epidermal Growth Factor and Insulin. *Jpn. J. Cancer Res.* 82, 807-814

62. Kozumbo, W. J., Seed, J. L., and Kensler, T. W., (1983) Inhibition by 2(3)-tetra-butyl- β -hydroxyanisole and other antioxidants of epidermal ornithine decarboxylase activity induced by 12-o-tetradecanoylphorbol -13-acetate. *Cancer Res.*, 43: 2555-2559
63. Eickelmann, P., (1995) Turnover of GST alpha mRNA is accelerated by TPA in human hepatoma and colon carcinoma cell lines. *Eur. J. Biochem* 229(1):21-26