

R
008.8
4604
88

私立中山醫學院營養科學研究所碩士論文

Master Thesis , Graduate Institute of Nutritional Science,

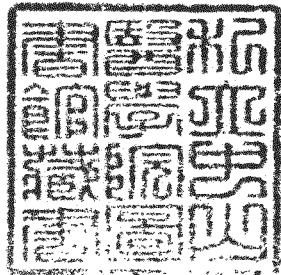
Chung-Shun Medical and Dental Collage

指導教授：李宗貴 博士

胰島素及甲基脫氫皮質醇對肝細胞麩胱甘肽合成之影響

Effect of Insulin and Dexamethasone on Glutathione

Synthesis in rat hepatocytes



研究生：楊詒芬

參考書恕不外借

中華民國八十八年六月

中山醫學院圖書館



C055230

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營養科學研究所
八十七學年度第二學期取得理學碩士學位之論文。

論文名稱：胰島素及甲基脫氫皮質醇對肝細胞麩胱甘肽合成之影響

同意 不同意

本人具有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資料中心、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。

同意 不同意

本人具有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畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限時間與地域，惟每人以一份為限。

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。上述同意與不同意之欄位若未鈎選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：李宗貴

研究生簽名：楊詒芬 學號：R86308
(親筆正楷)

日期：民國八十八年六月二十五日

簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鈎選並填妥各項資料。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。
3. 授權人的權利與義務：
在美國授權博碩士論文予 UMI 公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金 45 元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入 10% 的權利金約美金 20 元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣 500 元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如第 5 項。義務方面唯一要注意的是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。
4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。
5. 本案聯絡電話:(02)7377746 江守田、王淑貞
地址: 台北市和平東路二段 106 號 17 樓 1702 室

研究生姓名: 楊詒芬 聯絡電話: (04)2970100

地址: 台中市北區平德路 53 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，經中山醫學院營養科學研究所碩士論文考試論文委員會審查合格及口試通過。

口試委員

私立中國醫藥學院營養學系副教授

沈立言 博士

沈立言

私立中山醫學院營養科學所教授

陳暉雯 博士

陳暉雯

私立中山醫學院營養科學所教授

李宗貴 博士

(論文指導教授)

李宗貴

中華民國八十八年六月

學生楊訟芬論文題目為胰島素及甲基脫氫皮質醇對肝細胞
麩胱甘肽合成之影響，其論文已經中山醫學院營養科學研
究所碩士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：李宗貴 博士

簽名：李宗貴

中華民國八十八年六月二十五日

謝 誌

感謝指導教授 李宗貴博士兩年來在實驗、學業及生活上的指導與教誨，使本論文能順利完成，藉此致最深的謝意。文稿初成，承蒙 沈立言博士與 陳暉雯博士費心的審閱及大力斧正，並提供寶貴建議，使論文更加完善，在此致謝。

在兩年的求學過程中，承蒙學長、學姐、同學及朋友們的鼓勵與支持，使得研究所的日子更加充實。在實驗、學業上，謝謝有藝婉、淑琴的協助與相伴，使生活更多采多姿。謝謝科銘、文華、惠珉、伊萍、文虎、智尹等同學平日的幫忙與鼓勵。珍菱、恩菱、婉茹、青峰、健群等學妹、學弟們一年來的相伴與鼓勵，在此一併致最深的謝意。

最後，感謝父母、大姨、哥哥、大嫂、妹妹、弟弟及坤宗的支持與體諒，使我能順利完成碩士學位，謝謝你們的關心與疼愛。

中華民國八十八年六月 楊詒芬 謹識

目 錄

	頁次
摘要	1
壹、前 言.....	4
貳、文獻探討	6
一、麩胱甘肽(GSH)之合成	6
二、生物體內主要抗氧化系統	9
三、GSH 與疾病	11
四、GSH 含量之提升	12
五、GSH 合成之調控	13
參、材料與方法	16
一、實驗材料	16
二、大白鼠初代肝細胞之製備	18
三、生化分析	21
A、細胞存活率分析.....	21
B、還原態麩胱甘肽及氧化態麩胱甘肽(GSH/GSSG)分析...	23
C、 γ -glutamylcysteine synthetase (GCS)活性測定 ...	23
D、Glutathione S-transferase (GST) 活性測定.....	24
E、GSH peroxidase 活性測定	24
F、GSH reductase 活性測定	25
四、GST isoforms 及 GSH synthetase 蛋白表現	25
A、電泳分析.....	25
B、西方墨點法	26

五、統計分析	28
肆、結果	
一、含硫氨基酸、insulin 及 dexamethasone 對肝 細胞存活率之影響	29
二、含硫氨基酸、insulin 及 dexamethasone 對肝 細胞蛋白質之影響	29
三、含硫氨基酸、insulin 及 dexamethasone 對肝 細胞 GSH/GSSG 之影響	30
四、含硫氨基酸、insulin 及 dexamethasone 對胞 內 GSH 相關酵之影響	32
五、免疫染色分析	34
伍、討論	54
陸、結論	59
柒、參考文獻	60

摘 要

本研究目的在探討大白鼠肝細胞培養時常被添加於培養液中的胰島素(insulin)及甲基脫氫皮質醇(dexamethasone)兩種荷爾蒙對肝細胞內麩胱甘肽(GSH)、GSH 相關酵素活性之影響，其中酵素部分包括有 γ -glutamylcysteine synthetase (GCS)、GSH S-transferase (GST)、GSH peroxidase 及 GSH reductase 四種，除酵素活性外，也分析四種 GST isoforms 及 GSH synthetase 的蛋白表現。

實驗方法：從雄性 SD 大鼠分離出肝細胞進行為期六天的體外培養，培養液中的含硫氨基酸濃度分為兩種，分別為 1.0 mM methionine + 1.0 mM cysteine(高濃度)或 0.1 mM methionine + 0.1 mM cysteine(低濃度)；各組培養液再依 5 mg/L 胰島素(insulin)與 1 μ M 甲基脫氫皮質醇(dexamethasone)添加的有無分為 4 小組：第一組加 insulin、第二組加 dexamethasone、第三組同時加入 insulin 及 dexamethasone、第四組則不含任何荷爾蒙。

結果顯示：在高濃度含硫氨基酸培養下，各組胞內 GSH 濃度均在第三天(72 h)達到最高，隨後遞減；第三天時，insulin 組 GSH 濃度約增加 2 倍的起始濃度(90.5 vs 29.4 nmol/mg protein)，然而未添加組僅增加 1 倍；至於 dexamethasone 組增加最少，僅增加了 70%，同時加入 insulin 及 dexamethasone

組 GSH 增加幅度則介於 insulin 組與未添加組之間。在酵素活性方面，GCS 活性的變化則與 GSH 濃度變化相似，insulin 組最高而 dexamethasone 組最低；GST 活性在第六天時，dexamethasone 組與加有 insulin 及 dexamethasone 兩組活性上升且兩組均顯著大於 insulin 組與未添加組；GSH peroxidase 活性隨著培養時間而漸減，其中未添加荷爾蒙組減少速率最慢，而添加 dexamethasone 組減少最快；至於 GSH reductase 活性在第四天後，才見 dexamethasone 組與同時添加 insulin 及 dexamethasone 兩組增加速率較其他兩組快。

在低濃度含硫氨基酸培養下，各組細胞 GSH 含量在六天培養期間均未較起始濃度高，雖然 GSH 濃度不似高濃度含硫氨基酸培養條件，但 GCS、GST、GSH peroxidase 及 GSH reductase 活性變化則均與高濃度含硫氨基酸組相似。

GST isoforms 中 Ya 及 Yc 蛋白質均隨著培養時間而漸減，且四組相似，Yb2 則在有 dexamethasone 存在時，在六天中表現大致維持相似水準，然而 Yb2 在 insulin 組(+I)與未添加組(-,-)的表現是在第四天後快速減少；至於 Yp 蛋白質則在第三天才見表現，隨後並快速增加，但 dexamethasone 組(+D)與 insulin 及 dexamethasone 均添加組(+I,+D)增加幅度較(+I)組與均不添加組(-,-)小，另外，Yp 在低濃度含硫氨基酸下的表現也較高濃度含硫氨基酸下明顯。

綜合以上結果，methionine 及 cysteine 濃度與胞內 GSH 含

量高低有關，至於荷爾蒙作用上則是 insulin 促進 GSH 生合成，但 dexamethasone 則是抑制，Insulin 及 dexamethasone 改變胞內 GSH 濃度與它們調控 GCS 活性有關。除活性外，含硫氨基酸濃度高低、insulin 與 dexamethasone 處理也明顯影響 GST Yp 蛋白表現，與 GCS 活性的變化相似，也是 insulin 增加 Yp 表現，但 dexamethasone 降低 Yp 表現。

關鍵字：胰島素，甲基脫氫皮質醇，麩胱甘肽，glutathione S-transferase isoforms, 甲硫氨酸，半胱氨酸，老鼠肝細胞。

壹、前言

Glutathione (GSH)是由 glutamate 、 cysteine 及 glycine 三個氨基酸所構成的三胜肽分子，其中 cysteine 為限制氨基酸， GSH 合成僅需二個步驟二種酵素，一為 γ -glutamylcysteine synthetase (GCS)另一為 GSH synthetase ，但 GCS 則為 GSH 合成之速率決定因子。GSH 在胞內扮演重要且多種角色，主要功能有：預防過氧化物的毒性、參與解毒代謝、調節細胞生長與代謝、扮演 cysteine 儲存及傳送的形式等。由於 GSH 扮演著重要且多重角色，因此胞內 GSH 含量及其合成調控一直吸引不少學者的注意。

一般細胞僅能使用 cysteine 來合成 GSH，但在肝細胞中，除了 cysteine 外，methionine 由於可經 cystathione 途徑轉換成 cysteine，因此也可進一步被利用來合成 GSH，因此培養液中 methionine 及 cysteine 二種含硫氨基酸濃度均可能影響肝細胞內 GSH 的合成。除了含硫氨基酸濃度會影響胞內 GSH 含量外，GSH 的合成尚受到不同機制的調控，比如調控 GSH 流失或 GSH 回饋調控 GCS 活性均可以改變胞內 GSH 狀態；近來也有研究指出肝細胞 GSH 的合成也可受多種荷爾蒙所調節，例如：升糖激素(glucagon)及交感神經加壓素(phenylephrine)可透過 c-AMP 或 protein kinase C-dependent 途徑抑制 GCS 活性，進而減少 GSH 的合成；但胰島素(insulin)及氫化可體松

(hydrocortisone)則可活化 GCS，因而增加 GSH 的合成。本實驗因此將含硫氨基酸與肝細胞培養液常見使用的 insulin 及甲基脫氫皮質醇(dexamethasone)兩種荷爾蒙同時考慮，探討它們對肝細胞 GSH 合成及 GSH 相關酵素的影響。

貳、文 獻 探 討

麩胱甘肽之合成：

GSH 是由 glutamate (Glu)、cysteine (Cys) 及 glycine (Gly) 三個氨基酸所構成的三胜肽分子 (Fig. 1)，其中 glutamate 與 cysteine 之間是 γ -peptide bond，因此可避免 GSH 被胜肽酶所水解，而且 GSH 較 cysteine 及 γ -glutamylcysteine 不易被氧化。

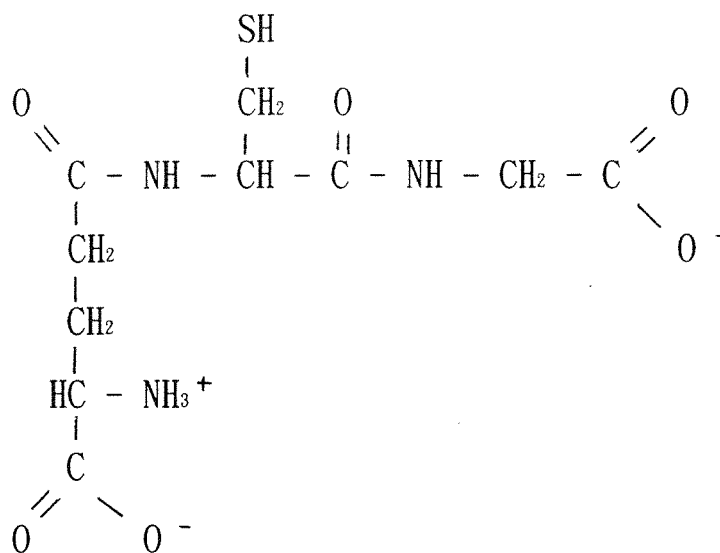
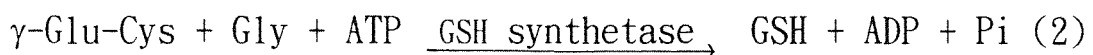
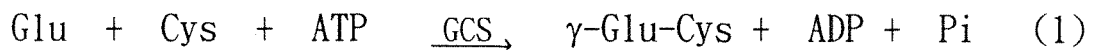


Fig. 1. glutathione (GSH) 的結構式

合成 GSH 只需二個步驟，分別利用二個酵素來催化，其中第一步驟是透過 γ -glutamylcysteine synthetase (GCS) 將 Glu 與 Cys 先反應生成 γ -glutamylcysteine (γ - Glu-Cys)，第二步驟則是透過 GSH synthetase 將 Gly 加到 γ - Glu-Cys 而完成 GSH 的合成，此二個步驟皆需有 ATP 的參與。



Meister 在 1988 年的研究指出，正常狀況下，胞內 GSH 合成後，部分 GSH 會持續釋放到胞外，此胞外 GSH 並不會再被吸收到胞內，而需透過一再生系統再利用。體內多種細胞的細胞膜上即被發現存有一種名為 γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT) 的酵素，此酵素可將釋放至胞外的 GSH 中 γ -glutamate 轉移至另一氨基酸上而形成 γ -glutamyl amino acid 及 Cys-Gly，而 Cys-Gly 再被細胞膜上的 dipeptidase 分解成 Cys 及 Gly；其中 γ -glutamyl amino acid 則經由 γ -glutamylcyclo-transpeptidase 與 oxoprolinase 反應生成 Glu。GSH 分解後生成的三個氨基酸進入胞內後，即可再利用而合成 GSH 或蛋白質

等 (Fig. 2) 。體內以腎臟、肝臟、胰臟、小腸、膽管等器官含有較多 γ -GT 酵素活性 (Meister, 1991) 。

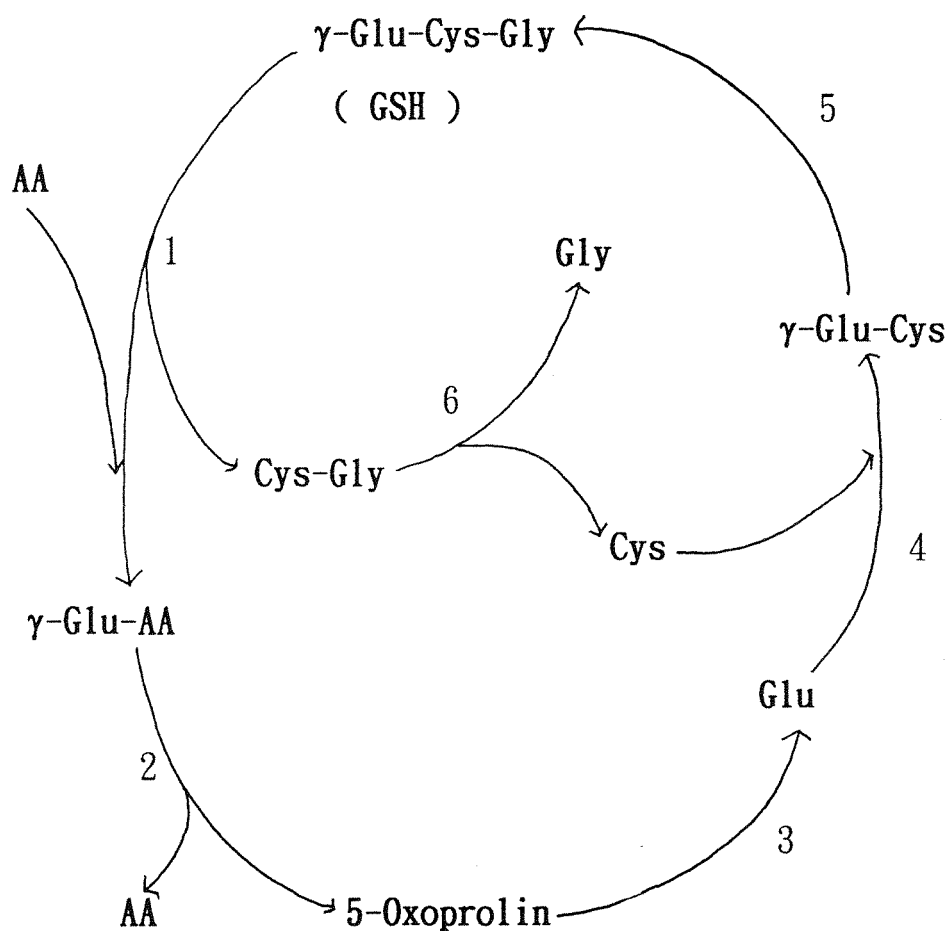


Fig. 2. GSH 之代謝

(Meister, 1988)

1. γ -glutamyl transpeptidase
2. γ -glutamyl cyclotranspeptidase
3. oxoprolinase
4. γ -glutamylcysteine synthetase
5. GSH synthetase
6. dipeptidase

生物體內主要抗氧化系統

生物體內抗氧化系統依其作用方式可分為兩大類 (Cotgreave et al., 1988) , 第一類由多種抗氧化分子組成, 如: 水溶性麩胱甘肽 (glutathione, GSH)、脂溶性維生素 E (α -tocopherol) 、維生素 C (ascorbic acid) 、 β -胡蘿蔔素 (β -carotene) 、尿酸 (uric acid) 等; 第二類則由多種酵素所組成, 如: 麩胱甘肽硫轉移酶 (glutathione-S-transferase, GST) 、麩胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GSH Px) 、觸酶 (catalase) 、超氧化歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 等: 至於麩胱甘肽還原酶 (glutathione reductase, GSH Rd) 、葡萄糖 6 磷酸去氫酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase) 、transferrin 、cerruoplasmin 等則被歸類為有助於抗氧化系統的輔助因子。在前述第一類抗氧化分子方面, 細胞膜中以維生素 E 、細胞內則以 GSH 及維生素 C 最為重要。

GSH 在體內除了抗氧化外, 尚扮演著其他重要且多樣化的生理功能。GSH 廣泛分佈在動植物、微生物細胞中; 在動物細胞內, 濃度可高達 0.5 mM ~ 10 mM (Kosower and Kosower, 1978) 。Kosower and Kosower (1978) 及 Meister 等人 (1989)

指出，GSH 的主要功能包括：1. 預防過氧化物的毒性，GSH 可當作 glutathione peroxidase 受質來移除過氧化氫 (hydrogen peroxide) 或其他有機過氧化物 (organic hydroperoxides)；2. 參與解毒代謝，可在 GST 酵素催化下與多種外來毒物 (xenobiotics) 或內生性反應物結合，因而增加外來毒物的水溶解能力，加速排出體外達到解毒 (detoxification) 目的；3. 參與蛋白質與 DNA 合成；4. 調節細胞生長與代謝；5. 扮演半胱氨酸 (cysteine) 儲存及傳送形式；6. 參與維生素 E 再生 (Leedle and Aust, 1990 ; Mario et al., 1989)。

GSH 除了利用 GSH Px 催化來移除胞內生成的過氧化物外，也可直接清除自由基扮演清道夫角色，GSH 在這些反應中因而氧化成氧化態 GSH (oxidized GSH, GSSG)，此時 GSSG 可排出胞外或利用 GSH reductase 作用而還原成 GSH，因而避免了 H_2O_2 或其他過氧化物裂解所生成自由基造成的細胞氧化傷害。

肝臟是動物體內生物轉化酵素系統 (biotransformation enzyme system) 主要存在的部位，因此肝臟為動物體內進行藥物代謝及解毒的主要器官。解毒酵素在胞內主要存在內質網或細胞質中，少部分則在粒線體、細胞核及溶小體中。肝細胞



所含有的對抗外來毒物的生物轉化酵素依其作用方式可分為兩大類，又稱為 phase I 及 phase II 系統，在 phase I 中有 cytochrome P450s 、 monoamine oxidase 等酵素 (Vandenberghé et al., 1992 ; Waxman et al., 1990)，主要進行氧化、還原或水解反應；在 phase II 中則包含有 GST 、 sulfotransferase 、 methyltransferase 、 UDP-glucuronic acid transferase 、 acetyl CoA transferase 、 amino acid conjugase 等酵素，主要進行結合(conjugation)反應，其中與 GSH 有關的酵素即為 GST ， GST 可將 GSH 接合到外來異物(xenobiotics)上，因而提高外來異物的水溶性，再透過 α -GT 、 dipeptidase 與 N-acetyl CoA transferase 作用將之轉化成硫醚(mercapturic acids)，即可由腎臟排出體外；GSH-Xe 另一條排出途徑則是直接經由膽汁系統將之注入十二指腸中 (Kenner, 1987 ; Meister et al., 1988 ; Paulson., 1986)。

GSH 與疾病：

由於 GSH 在胞內扮演著多種重要角色，因此 GSH 合成不足時將影響到細胞生理功能，進而改變生物體的健康。目前已知有許多疾病和 GSH 含量缺乏有關，例如：C 型肝炎、第二型

糖尿病、潰瘍性結腸炎、白內障、HIV 等疾病 (White et al., 1994)，的確發現 GSH 含量比較低。當 GSH 缺乏時，抵抗活性氧分子的能力則降低，而活性氧分子與動脈粥狀硬化、呼吸窘迫症、癌症等也有相關性，因此，GSH 缺乏的模式常被用來了解健康與病人中 GSH 所扮演的角色，而胞內 GSH 含量的減少應與胞內 γ -glutamylcysteine synthetase 或 GSH synthetase 不足有關，有研究指出，在 GSH 合成酵素先天缺乏的個案中，GSH 含量即有不足的情形 (Larsson et al., 1995)；另外，在溶血性貧血及神經傳導異常病人中， γ -glutamylcysteine synthetase 和 GSH synthetase 兩種酵素活性也較正常人為低。

GSH 含量之提升

因此如何改善胞內 GSH 含量即是一值得挑戰的課題，cysteine 是胞內 GSH 合成的限制氨基酸，如能有充分的提供當可增加 GSH 含量 (Meister, 1991)，但由於高濃度 cysteine 會造成細胞傷害，因此改用 cysteine 衍生物為一可行辦法，或者在肝臟中也能改以提供 methionine 替代 cysteine 來增加 GSH 合成。在 cysteine 衍生物中，比如 N-acetylcysteine 即被大量應用來增加 GSH 含量 (Williamson et al., 1982)，因

N-acetylcysteine 可經胞內 deacetylation 的作用轉換成 cysteine ；另一常用的 cysteine 衍生化合物為 2-oxothiazolidine-4-carboxylate ，此化合物進入胞內後也可因水解而生成 cysteine(Williamson et al., 1981)；其他提昇胞內 GSH 的可用化合物有 γ -glutamylcysteine (Anderson and Meister, 1983; Pileblad and Magusson, 1992)或 GSH 酯化物，如 GSH monoester (Anderson et al., 1985, 1994)與 GSH diester (Levy et al., 1993)等。

由於 cysteine 為維持胞內 GSH 濃度所必須，因此，在體外細胞的培養模式中，給予足夠的含硫氨基酸是維持肝細胞正常 GSH 含量的必要條件 (Beatty and Reed, 1981; Wang et al., 1997)。然而，常用的肝細胞商業培養液中含硫氨基酸的濃度並不相同，範圍可由只含 0.03 mM methionine 及 0.3 mM cysteine 的 F-12 培養液到含有 1.0 mM methionine 及 1.0 mM cysteine 的 L-15 培養液。因此，在長期培養情況下，利用不同培養液將對胞內 GSH 含量造成顯著影響。

GSH 合成之調控：

除了提供充分 cysteine 是維持胞內 GSH 濃度必要的條件

外，經由調控 GSH 合成的速率決定酵素- GCS 也是改變胞內 GSH 濃度的有效方式。GCS 早在 1980 年代即在老鼠腎臟及 *E. coli* 中被純化出來(Meister and Anderson, 1983; Yan and Meister, 1990)，GCS 的分子量約 100 kDa，屬 dimer 型式分別由一分子量較大的 heavy subunit 及分子量較輕的 GCS light subunit (GCS-LS)，其分子量分別為 73000 及 27700 (Huang et al., 1993; Yan and Meister, 1990)。為了維持胞內 GSH 濃度的恆定，藉由調控 GCS genes 將是一重要關鍵(Mucahy et al., 1997)。研究指出細胞在體外培養時，為了調適 GSH 的消耗(Ogino et al., 1989)及對抗氧化壓力(Kugelman et al., 1994)，胞內 GSH 合成的增加，主要是由於 GCS-HS mRNA 表現升高(Cai et al., 1995)。

胞內 GSH 合成受到幾個途徑來調控，因此其濃度可維持在一定範圍，比如肝臟 GSH 含量即大約是 2-3 mM(Kosower and Kosower, 1978)。要維持胞內 GSH 濃度不外兩個方式：消耗或合成，在消耗方面，主要是 GSH 排出胞外的速率，已有文獻指出，cholera toxin、glucagon、cAMP 可刺激 GSH 排出胞外(Goss et al., 1994; Lu et al., 1990)。而在合成方面，則主要作用在 GCS 活性的調控上，目前已知有二種，第一種是 GSH 負迴饋調控；第二種則為荷爾蒙調控。所謂負迴饋調控，指 GSH 含量過高時($K_i=2.5$ mM)將抑制 GCS 活性，而降低 GSH 的合

成 (Deleve and Kaplowitz, 1990)；在荷爾蒙調控方面，則有：(1) glucagon 透過 c-AMP 途徑刺激 GSH 釋出胞外且抑制 GCS 活性，(Lu et al., 1990)；(2) 交感神經加壓素 (phenylephrine) 及血管加壓素 (vasopressin) 則是透過 Ca^{+2} 或 protein kinase C 的途徑抑制 GCS 活性 (Lu et al., 1991)，最近，文獻進一步指出，透過 c-AMP 與 protein kinase C 抑制 GCS 活性與 GCS 被磷酸化有關 (Sun et al., 1996)；(3) 人工合成的 dexamethasone 也有報告指出可降低肺泡內皮細胞 GCS 活性 (Rahman et al., 1998)；(4) insulin 及 hydrocortisone 此二種荷爾蒙除了扮演細胞生長因子外，且能誘發 cysteine 的運送及增加 GCS 活性 (Lu et al., 1992)。

本實驗主要目的是探討含硫氨基酸與肝細胞培養液中常見使用的胰島素 (insulin) 及甲基脫氫皮質醇 (dexamethasone) 兩種荷爾蒙它們對肝細胞 GSH 合成、GSH 相關酵素及 GST isoforms 蛋白質表現的影響。

參、材料與方法

一、實驗材料

A. 實驗動物：

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

B. 細胞培養用藥：

1. N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES)、bovine serum albumin (BSA)、 Na_2HPO_4 、KCl、glucose、phenol red、galactose、 Na_2SeO_3 、dexamethasone、L-cysteine、L-methionine 等購自美國 Sigma Chemical Company。
2. Leibovitz's -15 medium、sulfur amino acid-free L-15 medium、insulin、transferrin、penicillin、streptomycin、7.5% bovine serum albumin(BSA) solution 及 fetal bovine serum (FBS) 購自美國 Gibco Laboratory。
3. Percoll 購自美國 Phamacia Biotech。

C. 一般分析用藥：

1. NADH、pyruvate、KCl、 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCl_2 、 NaHCO_3 、BSA、Triton X-100、iodoacetic acid (IAA)、phenanthroline、reduced glutathione (GSH)、oxidized glutathione (GSSG)、2,4-dinitrofluoro-benzene (FDNB)、EDTA、glycerol、glycine、 β -NADPH、GSH reductase、 NaN_3 、phosphoenolpyruvate $\cdot \text{Na}_3$ 、L-glutamate、pyruvate kinase、L- α -aminobutyrate、lactate dehydrogenase、1-chloro-2,4 dinitrobenzene (CDNB) 等購自美國 Sigma Chemical Company。
2. NaCl、NaOH、 CuSO_4 、 Na_2CO_3 、trichloroacetic acid (TCA)、 Na_2ATP 、 H_2O_2 、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 等購自德國 Merck Chemical Company。
3. Perchloric acid (PCA) 購自 GFS Chemicals Inc.。
4. Methyl alcohol 購自美國 Tedia Chemicals Inc.。
5. Ethanol (99.5%) 購自日本 Showa Chemicals Inc.。

D. 電泳分析及免疫染色分析用藥：

1. Sodium dodecyl sulfate (SDS)、Trizma Base (Tris)、 β -

- mercaptoethanol、KCl、等購自美國Sigma Chemical Company。
2. NaCl 購自德國Merck Chemical Company。
 3. Iso-butanol 購自美國Fisher Scientific Company。
 4. Methanol 購自美國Tedia Chemical Inc。
 5. Comassie brilliant blue R-250、glycine、30% acrylamide/0.8% N,N'-methylene-bis-acrylamide 溶液、bromophenol blue 購自美國BioRad Laboratories。
 6. Ammonium persulfate、N,N,N',N'-tetramethylethylenediamide (TEMED) 購自Pharmacia Biotech。
 7. Polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane 購自美國Millipore。
 8. Goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugated antibody 購自美國Chemicon。
 9. Anti-rat GST Ya、Yb₂、Yc、Yp isoforms 及 anti-rat GSH synthetase antibodies 購自愛爾蘭Biotrin Company。

二、大白鼠初代肝細胞之製備

肝細胞分離及培養 (Hepatocytes isolation and culture)

肝細胞係採用 Berry 及 Friend (1973) 與 Bonney 等人 (1974) 所提二階段膠原蛋白酶灌流法分離 (Wang et al., 1997)。方法如下，老鼠先以腹腔注射 (i.p.) sodium pentobarbital (80 mg/kg body weight) 麻醉，打開腹腔，利用頭皮針經肝門脈灌洗，第一階段先以不含膠原蛋白酶 (collagenase) 之灌流液 (pH 7.6) 將肝臟中之血液洗出；灌流液中含 25 mM sodium phosphate buffer、3.1 mM KCl、119 mM NaCl、3.5 mM glucose、0.1 % BSA 和 5 μ g/ml phenol red，流速控制在 25 ml/min。隨後以 200 ml 相同的灌流緩衝液中加入 50 mg 膠原蛋白酶，進行第二階段肝灌流，流速改為每分鐘 20 ml，約經 10 分鐘消化後，肝臟將變軟、失去彈性且細胞間隔放大，外觀顏色也逐漸淡化，此時即可將肝臟剪下並移出體外，置放於過濾尼龍網上，輕柔攪拌於含 18 mM HEPES、0.2 % BSA、0.05 % glucose 和 5 mg/L insulin 之 L-15 medium 中，將肝細胞洗出。洗出之肝細胞先經二次離心 (1100 rpm, 225xg)，每次 3 分鐘，第二次離心後，將細胞懸浮液加入等量 Percoll 溶液 (Percoll:10X Hanks buffer= 9:1)，於 1400 rpm (350xg) 下離心十分鐘，此次的等密度離心 (isodensity centrifugation) 可將健康肝臟實質細胞 (hepatic parenchymal cells) 與受傷細胞、死細胞或非實質肝細胞分離開。隨後再進行兩次低速離心，條件如同第一、二次離心，以去除殘留的 Percoll 溶液。完成清洗後，將細胞再懸浮於以 L-15 為基礎的細胞培養液中 (pH 7.6)，其中含有 18 mM HEPES、2.5% 胎牛血清、5 mg/L 的 insulin 和 transferrin、1 g/L

galactose 、 1 $\mu\text{mol/L}$ dexamethasone 、 100,000 IU/L penicillin 、 100 mg/L streptomycin 和 5 $\mu\text{g/L}$ Na_2SeO_3 。

在分植到培養皿前，先計數細胞存活率及細胞數，方法如下：取 0.1 ml 之細胞懸浮液加入 1.5 ml L-15 細胞培養液及 0.4 ml 0.4% 的 trypsin blue 染色液，輕柔震盪混和後，以血球計數板來估算總細胞數(total cell counts)及存活細胞數並依此計算細胞存活率(cell viability)。最後將細胞懸浮液密度以細胞培養液調為每毫升含 0.4×10^6 個細胞。

分別將 2.5 ml 細胞懸浮液分注到直徑 3 公分已預先經膠原蛋白(collagen)處理的培養皿內，然後置於 37°C 培養箱中培養。分注後的前 4 小時為細胞著床期，所用的細胞培養液含有 2.5% 胎牛血清，但著床期後所使用的培養液將以 0.2% BSA 替代 FBS，而且培養液中的含硫氨基酸濃度也將分為二種，分別為 1 mM L-cysteine + 1 mM L-methionine (高濃度組) 或 0.1 mM L-cysteine + 0.1 mM L-methionine (低濃度組)；各組培養液再依 insulin 與 dexamethasone 添加的有無分為 4 小組：第一組加 insulin (1.4 μM)、第二組加 dexamethasone (1 μM)、第三組同時加入 insulin 及 dexamethasone、第四組則不含 insulin 及 dexamethasone。每天培養液更換一次，分別於第 1 (24h)、第 3 (72h)、第 4 (96h)、第 6 (144h) 天取樣。取樣時，首先將培養液吸除，以 4°C PBS 洗

兩次，加入 300 μ l 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 將細胞刮取出，製備後進行酵素活性及蛋白表現分析。

三、生化分析 (Biochemical assay)

A. 細胞存活率(cell viability)測定(Moldeus et al., 1978)

1. 樣品製備：

(1)取細胞外液 300 μ l 於微量離心管中，儲存於 -80°C 中，此部分所測得的 lactate dehydrogenase (LDH)活性為胞外滲漏部分。

(2)細胞部分則以 3 ml 之 4°C PBS 溶液清洗細胞二次，加入 300 μ l 20 mM 磷酸鉀緩衝液(pH 7.0) ，以細胞刮取器將細胞刮下，置於 -80°C 冷凍後再解凍使細胞破裂，然後於 4°C 下以 10000 $\times g$ 離心 10 分鐘，取上清液測 LDH 活性，此部分測得的活性為胞內 LDH 活性。

2. 樣品分析：

(1)反應混合液 (reaction mixture)

為 10 mM Krebs-Henseleit buffer (pH 7.4) ，另含
0.2 mM NADH 及 1.36 mM sodium pyruvate

10 mM Krebs-Henseleit buffer (pH 7.4) 配方

	g / L
NaCl	6.9
KCl	0.36
KH ₂ PO ₄	0.13
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.295
CaCl ₂	0.322
NaHCO ₃	2.0
BSA	20.0

(2)分析步驟如下：

取 900 μ l 反應混合液，加入 80 μ l 細胞外液或 5 μ l 細胞內液，最後反應液總體積則以 20 mM 磷酸鉀緩衝液補充至 1000 μ l ，放入分光光度計中，於 25 $^{\circ}$ C 下以 340 nm 波長掃瞄 5 分鐘，測 NADH 減少的速率。另外，細胞液如以 20 mM 磷酸鉀緩衝液取代，則是為空白樣本。

(3)活性以比活性表示：nmol/min/plate

(4)最後以胞外 LDH 活性占總 LDH 活性百分比表示細胞存活率；

$$\text{LDH leakage} = \frac{\text{胞外 LDH 活性}}{\text{(胞外+胞內) LDH 活性}} \times 100 \%$$

B. 還原態麩胱甘肽 / 氧化態麩胱甘肽 (GSH/GSSG) 分析 (Reed et al., 1980)

培養液吸除後，以 4 °C PBS 沖洗兩次，加入 1 ml 5% perchloric acid (PCA)，靜置 30 分鐘，將酸溶性的 GSH/GSSG 溶出，取 400 μl 酸液加入 40 μl iodoacetic acid (IAA, 120 mg/ml) 溶液，再緩慢加入 potassium bicarbonate 粉末中和酸液直到不起泡為止，將樣品靜置於暗處 15 分鐘，再加入 440 ul 3% 2,4-dinitro-fluorobenzen (FDNB)(溶於 ethanol)，震盪混合；至少 8 小時冷藏後，以 6000 xg 離心 10 分鐘，取上層液並以 0.45 mm 過濾膜過濾雜質後即可注入 HPLC 中分析。GSH 與 GSSG 濃度均以 nmol/mg protein 表示。

C. γ-glutamylcysteine synthetase (GCS) 活性測定 (Seelig and Meister, 1985)

1.5 ml 石英管中依次加入 0.9 ml 反應液 (100 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 含 150 mM NaCl, 5 mM Na₂·ATP, 2mM

phosphoenolpyruvate·Na₃, 10 mM L-glutamate, 10 mM L- α -aminobutyrate, 20 mM MgCl₂·6H₂O, 2 mM Na₂EDTA, 0.2 mM NADH, 5 unit pyruvate kinase, 5 unit lactate dehydrogenase)、20 μ l 20 mM 磷酸鉀緩衝液(pH 7.0)及 80 μ l 細胞質液樣本。混合均勻後於 25^oC 下以 340 nm 掃瞄吸光值變化 5 分鐘。GCS 比活性以 NADH 減少速率來計算，並以 nmole NADH/min/mg protein 表示。

D. Glutathione S-transferase (GST) 活性測定(Habig et al., 1974)

1.5 ml 石英管中依次加入 880 μ l 反應液 (含 1mM GSH 之 100mM 磷酸鉀緩衝液, pH 6.5) 、 20 μ l 50 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)(溶於 ethanol)、90 μ l 20 mM 磷酸鉀緩衝液(pH 7.0)及 10 μ l 細胞質液樣本。混合均勻後於 340nm 下掃瞄吸光值變化 5 分鐘 (25^oC)，GST 比活性則以 CDNB-GSH 生成速率來計算，最終並以 nmol CDNB-GSH conjugate formed/min/mg protein 表示，CDNB-GSH 的 $\Delta\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。

E. GSH peroxidase 活性測定 (Lawrence and Burk, 1976)

1.5 ml 石英管中依序加入 800 μ l 反應液(含 1 mM EDTA 、 1 mM NaN₃ 、 0.2 mM NADPH 、 1U/ml GSH reductase 及 1 mM GSH 之 100 mM 磷酸鉀緩衝液, pH 7.0) 、 80 μ l 20 mM 磷酸鉀緩衝

液(pH 7.0)及 20 μ l 細胞質液樣本，室溫下靜置 5 分鐘後，加入 0.1 ml 2.5 mM H_2O_2 ，並立即置於分光光譜儀中以 340 nm 波長掃描 3 分鐘內吸光值的變化(25 $^{\circ}C$)，依 NADPH 減少的速率來計算 GSH peroxidase 的比活性，並以 nmole NADPH/min/mg protein 表示。

F. GSH reductase 活性測定 (Bellomo et al., 1978)

1.5 ml 石英管中依序加入 0.9 ml 反應液(含 1.1 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、5.0 mM GSSG 及 0.1 mM NADPH 之 100 mM 磷酸鉀緩衝液, pH 7.0)、20 μ l 20 mM 磷酸鉀緩衝液(pH 7.0)及 80 μ l 細胞質液樣本，利用分光光譜儀於波長 340nm 下測定 5 分鐘內吸光值的變化(25 $^{\circ}C$)，依 NADPH 減少的速率來計算 GSH reductase 比活性，並以 nmole NADPH/min/mg protein 表示。

四. GST isoforms and GSH synthetase 蛋白表現 — 西方墨點分析法 (Towbin et al., 1979 ; Laemmli, 1970)

1. 電泳分析

首先將細胞液於 4 $^{\circ}C$ 下先以 10000 xg 離心 30 分鐘去除細胞膜及雜質，取上層液再以 105000 xg 進行超高速離心 1 小時。離心後之上層液即為細胞質(cytosol)樣本，接著測定細胞質中

蛋白質濃度 (Lowry et al., 1951)，然後將樣品蛋白質濃度調整為 0.5 或 1 mg/ml，加入等體積的 SDS-PAGE sample buffer (含 0.125 mM Tris-HCl, 4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.01% bromophenol blue)，沸水浴 5 分鐘，隨後將等量蛋白質樣本加入各個樣本凹形槽中，利用 10% polyacetylamide gels 將不同蛋白質分離。

2. 西方墨點法 (Western blotting)

電泳完成後，先將 stacking gel 切除，剩下的 separating gel 則浸泡於 transfer buffer (含 25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol) 中 15 分鐘；同時切取大小與膠片相同之 PVDF 轉印膜，再以 methanol 處理 5 分鐘後，也與膠片共同浸泡於 transfer buffer 內。浸泡後依序將海綿、濾紙、膠片、PVDF 膜、濾紙、海綿放置於三明治式塑膠版中，隨後放入轉印槽中，以 100 伏特進行轉移，1 小時後取出 PVDF 膜，先以 buffer A (25 mM Tris-HCl buffer, 含 150 mM NaCl, 0.3% Tween20, pH7.4) 沖洗三次，每次 5 分鐘，隨後加入含有 normal goat serum 的 blocking solution (20 ml buffer B (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.0) 中加入 150 μ l normal goat serum)，於 4^oC 下隔夜處理或 37^oC 水浴下半小時，即可進行免疫染色步驟。

3. 免疫染色

- a. 將 PVDF 轉印膜由 blocking solution 取出，以 buffer A 沖三次，每次 5 分鐘。
- b. 倒入含初級抗體 (anti-rat GST Yp、Ya、Yb₂、Yc 或 GSH synthetase 抗血清) 的 buffer B，其中 GST Ya、Yb₂ 及 Yc 三種蛋白質表現為 co-staining，Yp 與 GSH synthetase 則獨立染色，37°C 水浴中震盪 30 分鐘，抗體溶液製備比例如下。

1⁰Ab 或 2⁰Ab + A-B complex 配製比例

	1 ⁰ Ab : buffer B	2 ⁰ Ab : buffer B
Yp	= 1 : 400	= 1 : 1500
Ya/Yb ₂ /Yc	= 1 : 2 : 2 : 200 (三種抗體混合在一起)	= 1 : 1000
GSH synthetase	= 1 : 1000	= 1 : 1000

- c. 取出初級抗體溶液，以 buffer A 沖洗三次，每次 5 分鐘。
- d. 接著倒入含有二級抗體 (anti-rabbit IgG-peroxidase

- conjugate antibody)溶液，於 37°C 水浴中震盪 30 分鐘。
- e. 取出二級抗體溶液，以 buffer A 沖洗三次，每次 5 分鐘。
 - f. 最後加入 DAB (3,3-diaminobenzidine) (10 ml buffer B 加入 4 μ l 3% H₂O₂ 及 40 μ l 25mg/ml DAB)呈色。
 - g. 倒出顯色液，以 buffer A 沖洗 5 分鐘。
 - h. 取出 PVDF 膜，陰乾即可。

4. 定量 band 強度

利用數位照相顯相儀定量 band 的強度。

五、統計分析

資料以平均值加減一個正負標準差 (means \pm SD) 表示，統計以 one-way analysis of variance (ANOVA) 分析 (SAS, Cary, NC), 並以 Duncan's test 進行顯著差異分析，當 $P < 0.05$ 表示具有顯著差異。

肆、結果

一、含硫氨基酸、insulin 及 dexamethasone 對肝細胞存活率之影響：

肝細胞在高濃度含硫氨基酸(1 mM methionine + 1 mM cysteine)或是低濃度含硫氨基酸(0.1 mM methionine + 0.1 mM cysteine)培養下，不論有無 insulin (1.4 μ M) 或 dexamethasone (1 μ M)，在前四天的培養期間，細胞存活率並不受影響（表一），但第六天時，在低濃度含硫氨基酸培養下，不含 insulin 及 dexamethasone (-,-)組與加 insulin (+I)兩組則有較高 LDH leakage。

二、含硫氨基酸、insulin 及 dexamethasone 對肝細胞蛋白質含量之影響：

無論是培養在高濃度或是低濃度含硫氨基酸的培養液中，各組肝細胞在六天的培養期間對胞內蛋白質含量的影響均相似，培養的前 24 小時維持不變，隨後則遞減，但是下降速率則受到 insulin 與 dexamethasone 有無的影響，不論是培養在 1 mM methionine + 1 mM cysteine 或 0.1 mM methionine + 0.1 mM cysteine 條件下，

單獨添加 dexamethasone 的細胞蛋白質含量在第三天時下降得最快，而添加 insulin 組則是在四天到六天間下降幅度最大，到了第六天時，除了同時添加 insulin 及 dexamethasone(+I,+D)組的蛋白質含量仍維持較高外(流失約 25%)，其他三組均相似(約流失 40%)(表二)。

三、含硫氨基酸、insulin 及 dexamethasone 對胞內 GSH 及 GSSG 含量的影響：

在高濃度含硫氨基酸培養下，各組細胞 GSH 濃度在培養初期均逐漸升高，第三天時最高，隨後遞減(圖一 B)。可是比較荷爾蒙效應時，發現 insulin 與 dexamethasone 對 GSH 的影響並不相同，insulin 組(+I)相較未添加組(-,-)會有更高 GSH 濃度，第三天的 GSH 含量約為起始濃度的 3 倍，然而未添加組則僅增加了 1 倍。至於 dexamethasone(+D)組增加程度最低，僅增加 70%。但當 insulin 和 dexamethasone 同時處理下(+I,+D)，GSH 增加幅度則介於 insulin 組與未添加組間，但較接近(+I)組。不同處理組在相同培養時間比較下，(+I)和(+I,+D)二組之 GSH 含量在第三、四、六天時均顯著高於(+D)組($p < 0.05$)。

相較於在高濃度含硫氨基酸培養下 GSH 濃度在培養前三天顯

著升高，當細胞培養在低濃度含硫氨基酸時，各組 GSH 濃度可見在培養的前 24 小時顯著減少，隨後則增加，第三天時約與起始濃度相似，但第三天後又遞減。雖然在低濃度含硫氨基酸條件下，GSH 未見增加，但 insulin 及 dexamethasone 對 GSH 濃度的影響則與高濃度含硫氨基酸培養下相似，insulin 組和同時添加 insulin 及 dexamethasone 組前三天 GSH 濃度雖未見顯著高於 (+D) 及 (-, -) 兩組，但最後三天的減少則較 dexamethasone 組與未添加組慢。不同處理組在相同培養時間比較時，dexamethasone 組 GSH 濃度在前四天培養期間均是最低，第四天顯著低於 (+I) 及 (+I, +D) 組，未添加組 GSH 濃度則在第四天與第六天低於 (+I) 及 (+I, +D) 兩組。

在高濃度含硫氨基酸培養下，GSSG 濃度變化和 GSH 相似(圖二 A)，在培養前期隨著培養時間漸增，除了未添加 insulin 及 dexamethasone 組外，均在第三天達到最高，隨後遞減。不同荷爾蒙組間的比較則顯示僅在培養的第 24 小時，未添加組顯著較其他三組高($p < 0.05$)，之後五天各組間均無明顯差異。至於在低濃度含硫氨基酸培養下，GSSG 濃度在六天的培養期間內均較高濃度含硫氨基酸培養組低且大略維持相似水準，但 dexamethasone 組細胞在第三天時顯著高於對照組及 insulin 組(圖二 B)，insulin 組在第六天顯著高於其他三組。

四、含硫氨基酸、insulin 及 dexamethasone 對胞內 GSH 相關酵素之影響：

(一) GCS：

GCS 酵素是 GSH 合成的速率決定因子。既然 insulin 及 dexamethasone 對肝細胞在培養期間的胞內 GSH 濃度有不同影響，是否表示與它們調控 GCS 活性有關。結果如圖三所示，無論含硫氨基酸濃度高低，前 24 小時 GCS 活性均有降低現象，尤其在低濃度含硫氨基酸條件下，隨後 GCS 活性視荷爾蒙處理有不同結果，在 +I 及同時加 I 及 D 的兩組細胞 GCS 活性均在第一天後遞增，第四天時達到最高，至於(+D)或未添加組(-,-)則未見 GCS 活性遞增而是在後五天維持相似水準(圖三)。荷爾蒙效應比較上，也以單獨加有 insulin 這一組最高，依次為同時加入 insulin 及 dexamethasone 組、對照組，至於 dexamethasone 組則是最低，雖然培養在低濃度含硫氨基酸的細胞 GSH 含量較低，但 GCS 活性在六天間的變化相較培養在高濃度含硫氨基酸的細胞相似 (圖三 B)。

(二) GST：

另一重要 GSH 相關解毒酵素-GST 活性之變化如圖四所示，在高濃度含硫氨基酸下，各組細胞的第一天 GST 活性均略為降低，隨後三天維持相似水準，但在第四天後，加有 dexamethasone 的兩組 (+D 與+I+D)其 GST 活性上升，但未加有 dexamethasone 的兩組

(+I 與 -, -)則減少，所以第六天時 GST 活性 (+D)與 (+I+D)兩組顯著大於(+I)與(-, -) 兩組。至於在低濃度含硫氨基酸下，GST 活性在培養前三天各組均維持相似的水準，但第三天或第四天後，GST 活性在 dexamethasone 組與同時加入 insulin 及 dexamethasone 組持續上升，但 (+D)組的增加速率較 (+I+D)組快，第六天時，兩組均達到最高，其中 dexamethasone 組更是顯著高於對照組 (-, -)、insulin (+I)及 (+I+D)組 (圖四 B)。

(三) GSH peroxidase :

GSH peroxidase 活性無論在高低含硫氨基酸下，六天培養期的變化大致相似 (圖五)，酵素活性在四組中均隨著培養時間持續地減少，其中對照組 (-, -)減少的速率相較其他各組最慢，單獨添加 dexamethasone 這一組則最快，第三天及第六天 dexamethasone 組酵素活性顯著較對照組低；在低濃度含硫氨基酸下，在六天培養期間，dexamethasone 組皆顯著低於對照組(圖五 B)，而添加 insulin 及 dexamethasone (+I+D)組則在第一天及第三天顯著低於對照組。

(四) GSH reductase :

GSH reductase 活性在六天培養期間的變化也不受含硫氨基酸濃度高低的影響 (圖六)，培養前 24h，GSH reductase 活性略為降低，隨後則遞增，且與 GST 活性變化結果相似，dexamethasone

組與同時加入 insulin 及 dexamethasone 組在第四天後的增加速率較 insulin 組與對照組快。

五、免疫染色分析：

除了分析 GST 活性外，我們更進一步針對不同 GST isoforms，利用免疫染色法定量其表現，進一步探討哪一種 isoform 可受到含硫氨基酸濃度與 insulin 或 dexamethasone 的影響。結果顯示(圖七)，Ya 與 Yc 蛋白質在六天培養期間的表現(圖七；表三、五)，無論是在高或低濃度含硫氨基酸培養下均隨著培養時間的增加而漸減，且四組的變化相似。相較 Ya 與 Yc 的漸減，Yb2 的表現則視 dexamethasone 的有無而有不同的變化，dexamethasone 組(圖七 C；表四)與同時加入 insulin 及 dexamethasone 組(圖七 A) 的 Yb2 表現大致維持不變，然而在 insulin 組(圖七 B)與對照組(圖七 D)，Yb2 的表現則是在第四天後快速減少。至於 Ya、Yb2 與 Yc 在低濃度含硫氨基酸培養條件下的表現，則與高濃度含硫氨基酸相似 (data not shown)

GST Yp 蛋白質在培養初期 24 小時(lane 2)並未表現，到第三天時(lane 3)開始有少量表現，隨後即快速增加(圖八；表六)，但增加的速率明顯受到荷爾蒙的影響，+D 組(圖八 C)與+I+D 組(圖

八 A) Yp 蛋白質表現的增加速度明顯較其他兩組慢，致於 insulin 組 (圖八 B) 與對照組 (圖八 D) 則相似。Dexamethasone 影響 Yp 表現的現象同樣也在低濃度含硫氨基酸培養下可觀察到 (lanes 6-9)。另一值得注意的是 GST Yp 蛋白質的表現在低濃度含硫氨基酸下明顯較細胞培養在高濃度含硫氨基酸 (lanes 2-5) 條件下來得快且多，第三天時已明顯可見 (lane 7)，到第六天時蛋白質量更是顯著大於高濃度含硫氨基酸的第六天 (lane 9 vs lane 5)。

GSH synthetase 蛋白質表現方面 (圖九；表七)，則不受含硫氨基酸濃度影響，在六天培養期間，各組 GSH synthetase 蛋白質表現皆維持相似水準。

表一、含硫氨基酸濃度、胰島素及甲基脫氫皮質醇對肝細胞存活率之影響：

SAA	Day			
	1	3	4	6
1.0 + 1.0 mM	- - - - (%) - - - -			
(-, -)	3.7	2.0	2.7	4.1
(+ I)	3.4	3.0	2.3	5.9
(+ D)	4.7	3.4	2.4	3.0
(+I, +D)	3.8	1.5	1.6	1.2
0.1 + 0.1 mM				
(-, -)	7.3	6.1	3.9	8.0
(+ I)	5.3	2.1	2.6	13.0
(+ D)	5.4	1.4	1.8	2.3
(+I, +D)	6.0	0.7	0.6	1.6

含硫氨基酸 (SAA) : methionine and cysteine .

(-, -) : 不含胰島素(uinsulin)及甲基脫氫皮質醇(dexamethasone)

(+ I) : 含 1.4 μ M insulin ; (+ D) : 含 1 μ M dexamethasone

(+I, +D): 同時含 insulin 及 dexamethasone

結果以平均值表示(means, n=2)

表二、含硫氨基酸濃度、胰島素及甲基脫氫皮質醇對肝細胞蛋白質
含量之影響：

SAA	Day				
	0	1	3	4	6
1.0 + 1.0 mM	----- mg protein / dish -----				
(-, -)	1.47±0.38	1.41±0.37	1.03±0.20 ^{b*}	1.02±0.08 ^{b*}	0.94±0.16 ^{b*}
(+ I)	1.47±0.38	1.65±0.24	1.40±0.17 ^a	1.33±0.26 ^a	0.84±0.13 ^{b*}
(+ D)	1.47±0.38	1.42±0.14	1.11±0.17 ^{b*}	0.97±0.17 ^{b*}	0.85±0.07 ^{b*}
(+I,+D)	1.47±0.38	1.56±0.25	1.28±0.20 ^{ab}	1.26±0.21 ^a	1.18±0.25 ^a
0.1 + 0.1 mM					
(-, -)	1.47±0.38	1.46±0.22	1.28±0.23	1.14±0.25	0.80±0.23 [*]
(+ I)	1.47±0.38	1.61±0.19	1.38±0.20	1.17±0.25	0.77±0.15 [*]
(+ D)	1.47±0.38	1.51±0.31	1.11±0.27	1.02±0.22 [*]	0.82±0.14 [*]
(+I,+D)	1.47±0.38	1.51±0.17	1.31±0.15	1.25±0.23	1.05±0.18 [*]

SAA : methionine (Met) and cysteine (Cys)。

(-, -) : 不含 insulin 及 dexamethasone ; (+ I) : 含 1.4 μ M insulin

(+ D) : 含 1 μ M dexamethasone ; (+I,+D):同時含 insulin 及 dexamethasone

結果以平均值±標準差表示(means \pm SD, n=5)。

‘ab’ 在相同時間比較未具相同符號者具有顯著差異(P<0.05)。

‘*’ 與第 0 天比較，具有顯著差異(P<0.05)。

表三、含硫氨基酸、胰島素及甲基脫氫皮質醇對 GST Ya 蛋白質定量之影響：

1.0 mM Met +	Day				
1.0 mM Cys	0	1	3	4	6
	----- band intensity -----				
(-, -)	8257±524	7150±1493	5895±1243*	4878±1466*	4581±1093 ^{ab} *
(+ I)	8257±524	6879±2415	5889±1001*	5494±1275*	3206±286 ^b *
(+ D)	8257±524	8124±1619	7002±1835	5659±1774*	4590±1082 ^{ab} *
(+I, +D)	8257±524	8495±610	7106±1323	5844±1342*	5409±1078 ^a *

(-, -): 不含 insulin 及 dexamethasone ; (+I): 含 1.4 μ M insulin

(+D): 含 1 μ M dexamethasone ; (+I, +D): 含 insulin 及 dexamethasone

結果以平均值±標準差表示 (means±SD, n=4) 。

‘ ab’ 在相同時間比較未具相同符號者具有顯著差異(p<0.05)。

‘ *’ 與第 0 天比較，具有顯著差異(p<0.05)。

表四、含硫氨基酸、胰島素及甲基脫氫皮質對 GST Yb2 蛋白質定量之影響：

1.0 mM Met +	Day				
1.0 mM Cys	0	1	3	4	6
	----- band intensity -----				
(-, -)	4004±778	2718±697 [*]	2552±360 ^{b*}	2704±597 ^{ab*}	2515±427 ^{b *}
(+ I)	4004±778	2787±807 [*]	2542±618 ^{b*}	2534±439 ^{b*}	2104±386 ^{b *}
(+ D)	4004±778	4285±1073	3722±888 ^a	3657±961 ^{ab}	4032±1211 ^a
(+I, +D)	4004±778	3912±658	3818±436 ^a	3846±787 ^a	4166±565 ^a

(-, -): 不含 insulin 及 dexamethasone ; (+I): 含 1.4 μM insulin

(+D): 含 1 μM dexamethasone ; (+I, +D): 含 insulin 及 dexamethasone

結果以平均值±標準差表示 (means±SD, n=4) 。

‘ ab’ 在相同時間比較未具相同符號者具有顯著差異(p<0.05)。

‘ *’ 與第 0 天比較，具有顯著差異(p<0.05)。

表五、含硫氨基酸、胰島素及甲基脫氫皮質對 GST Yc 蛋白質定量之影響：

1.0 mM Met +	Day				
1.0 mM Cys	0	1	3	4	6
	----- band intensity -----				
(-, -)	4439±421	2812±509 ^{ab*}	2389±682 [*]	2100±448 [*]	2171±698 [*]
(+ I)	4439±421	2465±756 ^{b*}	2062±756 [*]	1947±695 [*]	1550±553 [*]
(+ D)	4439±421	3506±466 ^a	2986±471 [*]	2797±609 [*]	2453±707 [*]
(+I, +D)	4439±421	3267±178 ^{ab*}	2546±491 [*]	2188±211 [*]	2176±219 [*]

(-, -): 不含 insulin 及 dexamethasone ; (+I): 含 1.4 μM insulin

(+D): 含 1 μM dexamethasone ; (+I, +D): 含 insulin 及 dexamethasone

結果以平均值±標準差表示 (means±SD, n=4) 。

‘ ab’ 在相同時間比較未具相同符號者具有顯著差異(p<0.05)。

‘ *’ 與第 0 天比較，具有顯著差異(p<0.05)。

表六之一、含硫氨基酸、胰島素及甲基脫氫皮質對 GST Yp 蛋白質定量之影響：

1.0 mM Met +	Day				
1.0 mM Cys	0	1	3	4	6
	----- band intensity -----				
(-, -)	0	0	1405±256	2758±586 ^{a *}	13373±3903 ^{a *}
(+ I)	0	0	1177±210	3673±805 ^{a *}	16347±3951 ^{a *}
(+ D)	0	0	695±213	1257±500 ^b	2398±1202 ^{b *}
(+I, +D)	0	0	1163±355	1490±591 ^b	3639±1024 ^{b *}

(-, -): 不含 insulin 及 dexamethasone ; (+I): 含 1.4 μM insulin

(+D): 含 1 μM dexamethasone ; (+I, +D): 含 insulin 及 dexamethasone

結果以平均值±標準差表示 (means±SD, n=4) 。

‘ ab ’ 在相同時間比較未具相同符號者具有顯著差異(p<0.05)。

‘ * ’ 與第 0 天比較，具有顯著差異(p<0.05)。

表六之二、含硫氨基酸、胰島素及甲基脫氫皮質對 GST Yp 蛋白質定量之影響：

0.1 mM Met + 0.1 mM Cys	Day				
	0	1	3	4	6
	----- band intensity -----				
(-, -)	0	0	2066±411 ^{ab}	5993±586 ^{b *}	16532±2769 ^{b *}
(+ I)	0	0	2718±401 ^{a *}	7396±963 ^{a *}	26784±2776 ^{a *}
(+ D)	0	0	701±250 ^b	3090±1148 ^{c *}	9170±2570 ^{c *}
(+I, +D)	0	0	1614±713 ^b	3388±977 ^{c *}	9220±1248 ^{c *}

(-, -): 不含 insulin 及 dexamethasone ; (+I): 含 1.4 μ M insulin

(+D): 含 1 μ M dexamethasone ; (+I, +D): 含 insulin 及 dexamethasone

結果以平均值±標準差表示 (means±SD, n=4) 。

‘ abc ’ 在相同時間比較未具相同符號者具有顯著差異(p<0.05)。

‘ * ’ 與第 0 天比較，具有顯著差異(p<0.05)。

表七之一、含硫氨基酸、胰島素及甲基脫氫皮質對 GSH synthetase 蛋白質定量之影響：

1.0 mM Met +	Day				
1.0 mM Cys	0	1	3	4	6
	----- band intensity -----				
(-, -)	4265±293	4187±496	4349±247	4066±637	4207±214
(+ I)	4265±293	4312±348	4351±436	4062±680	3687±445
(+ D)	4265±293	4450±301	4246±418	4172±538	3806±737
(+I, +D)	4265±293	4103±416	3966±577	3872±635	3789±436

(-, -): 不含 insulin 及 dexamethasone ; (+I): 含 1.4 μ M insulin

(+D): 含 1 μ M dexamethasone ; (+I, +D): 含 insulin 及 dexamethasone

結果以平均值±標準差表示 (means±SD, n=4) 。

‘ ab’ 在相同時間比較未具相同符號者具有顯著差異(p<0.05)。

‘ *’ 與第 0 天比較，具有顯著差異(p<0.05)。

表七之二、含硫氨基酸、胰島素及甲基脫氫皮質對 GSH synthetase 蛋白質定量之影響：

0.1 mM Met + 0.1 mM Cys	Day				
	0	1	3	4	6
	- - - - - band intensity - - - - -				
(-, -)	4265±293	4043±376	4226±255	4269±351	4212±629
(+ I)	4265±293	4334±364	4200±380	4152±440	4073±683
(+ D)	4265±293	4229±389	4110±600	4237±665	4062±477
(+I, +D)	4265±293	3910±541	3932±535	3908±582	4170±290

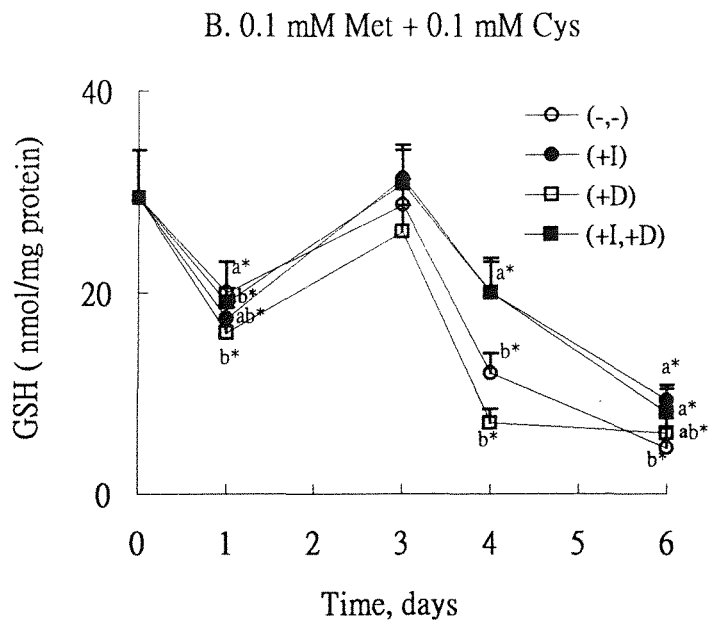
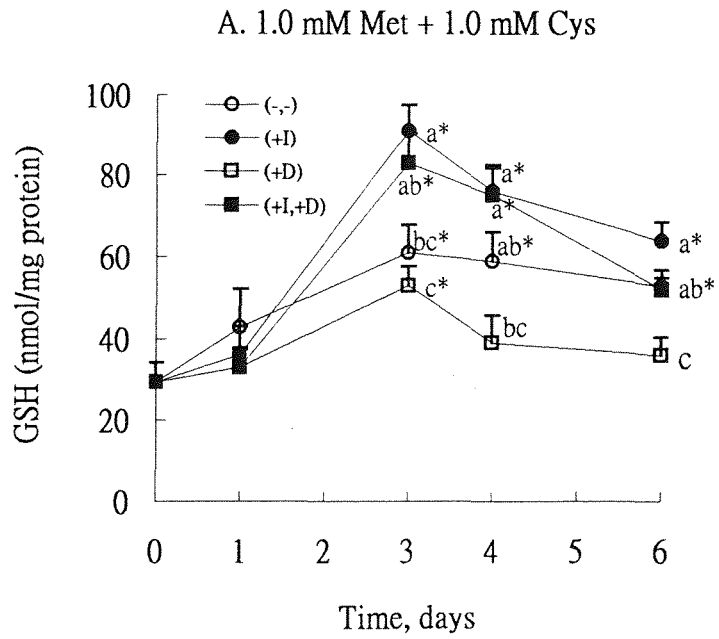
(-, -): 不含 insulin 及 dexamethasone ; (+I): 含 1.4 μ M insulin

(+D): 含 1 μ M dexamethasone ; (+I, +D): 含 insulin 及 dexamethasone

結果以平均值±標準差表示 (means±SD, n=4) 。

‘ ab’ 在相同時間比較未具相同符號者具有顯著差異(p<0.05)。

‘ *’ 與第 0 天比較，具有顯著差異(p<0.05)。

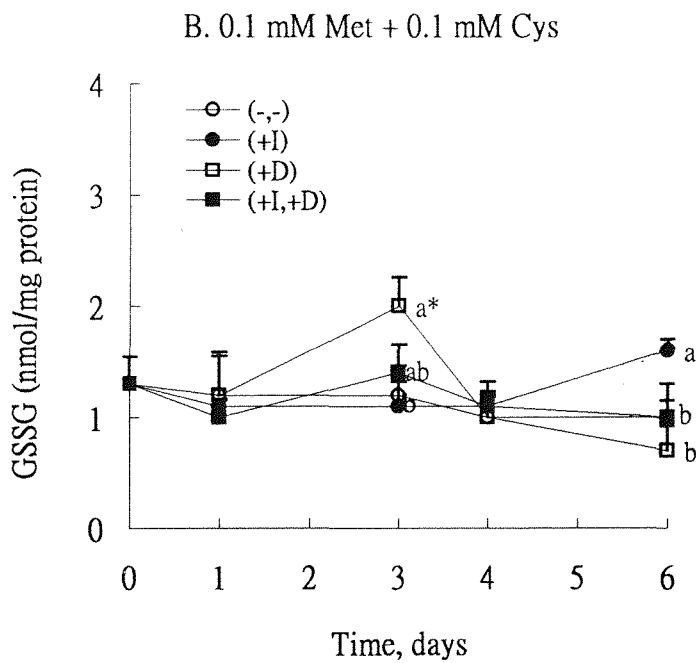
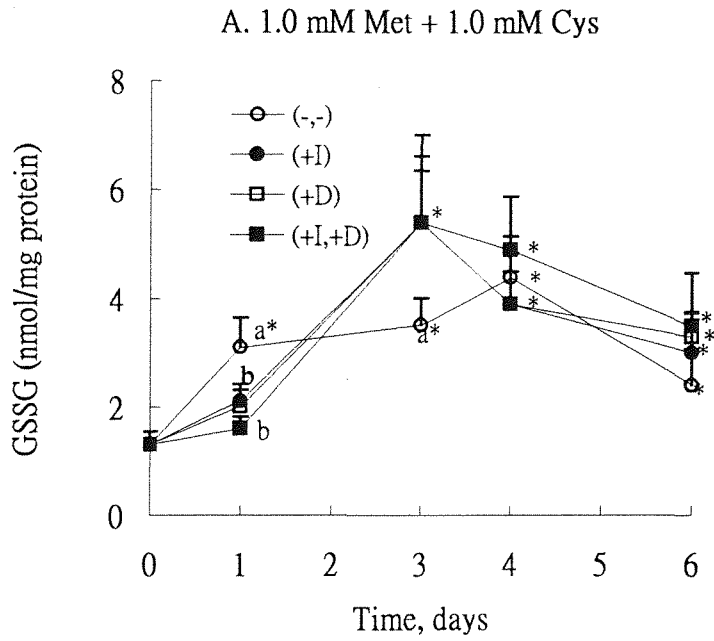


圖一、含硫氨基酸、胰島素及甲基脫氫皮質醇對肝細胞GSH含量之影響。

結果以平均值±標準差表示 (means ± SD, n=5) 。

' abc ' : 同一時間比較不同符號具有顯著差異 (p < 0.05) 。

' * ' : 與第0天比較, 具有顯著差異 (p < 0.05) 。

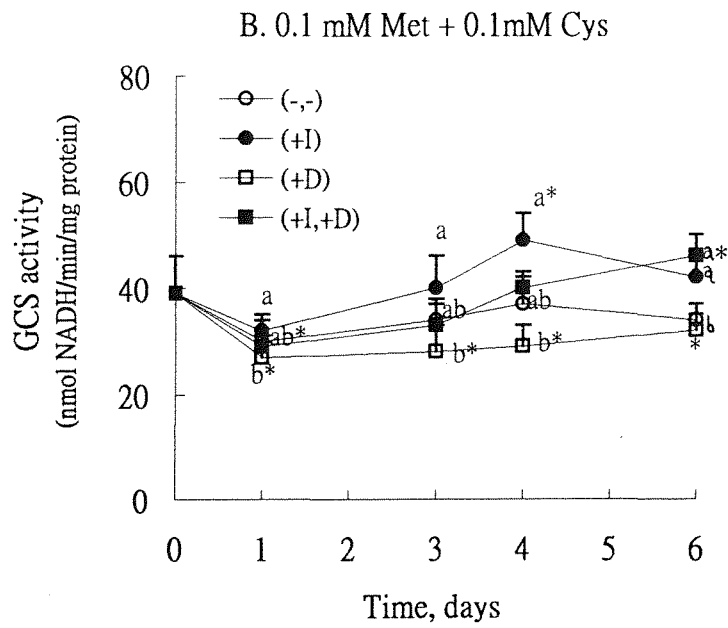
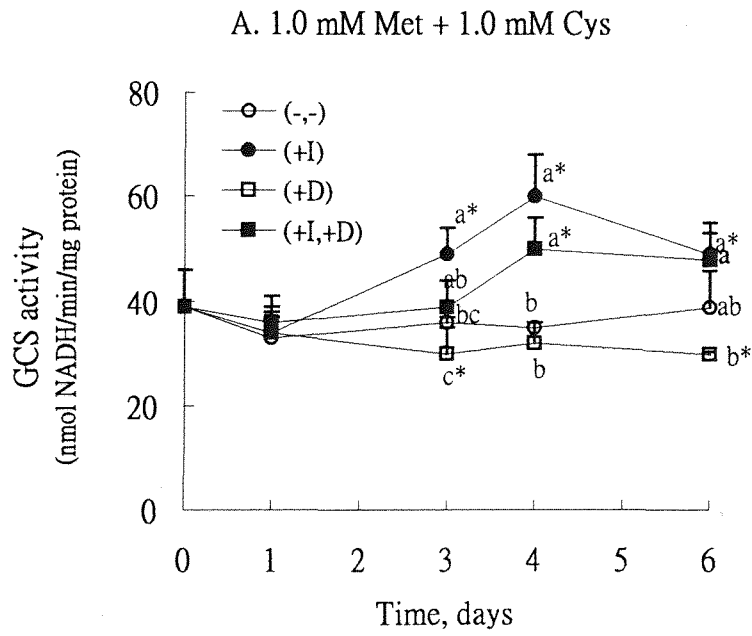


圖二、含硫氨基酸、胰島素及甲基脫氫皮質醇對肝細胞GSSG含量之影響。

結果以平均值±標準差表示(means ± SD, n=5)。

' abc ' : 同一時間比較不同符號具有顯著差異 (p<0.05) 。

' * ' : 與第0天比較, 具有顯著差異 (p<0.05) 。

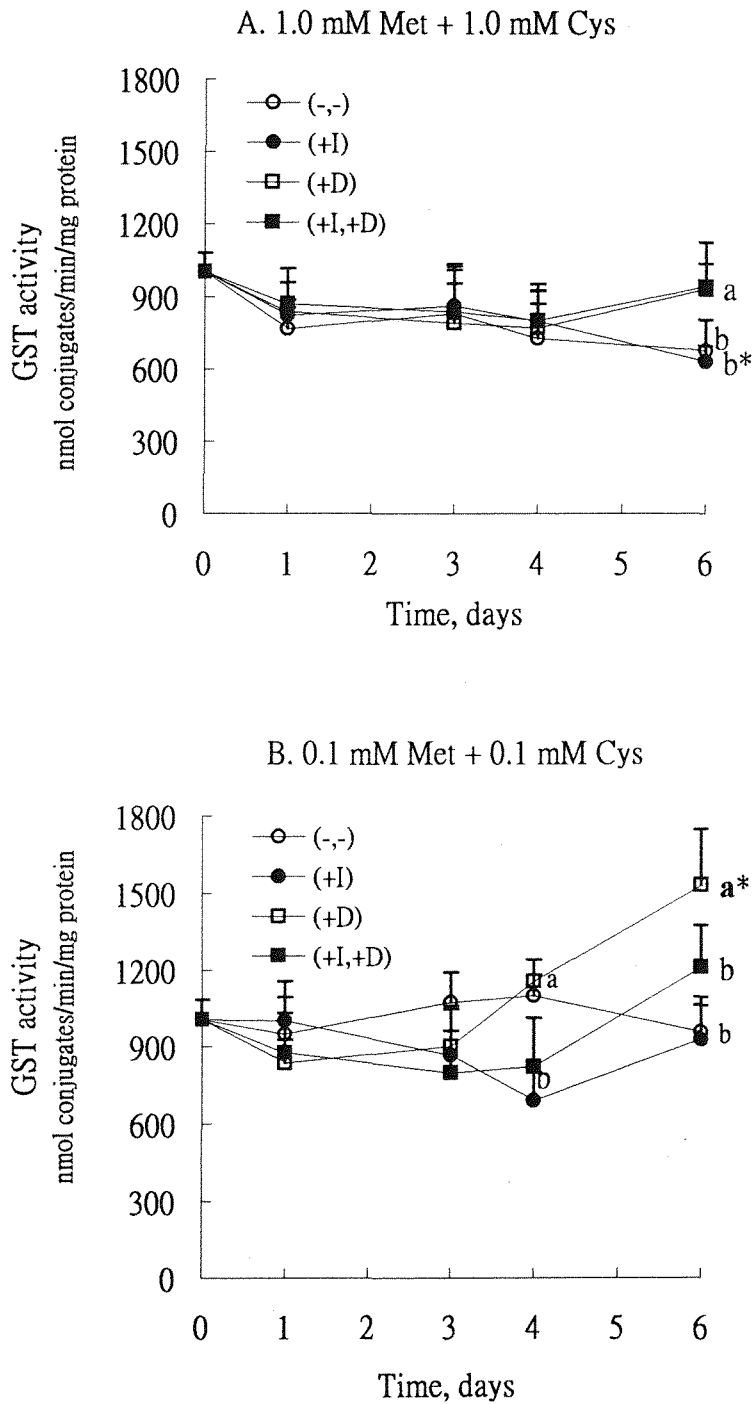


圖三、含硫氨基酸、胰島素及甲基脫氫皮質醇對肝細胞GCS活性之影響。

結果以平均值 標準差表示(means SD, n=4)。

' abc' : 同一時間比較不同符號具有顯著差異 (p<0.05) 。

' * ' : 與第0天比較具有顯著差異 (p<0.05) 。

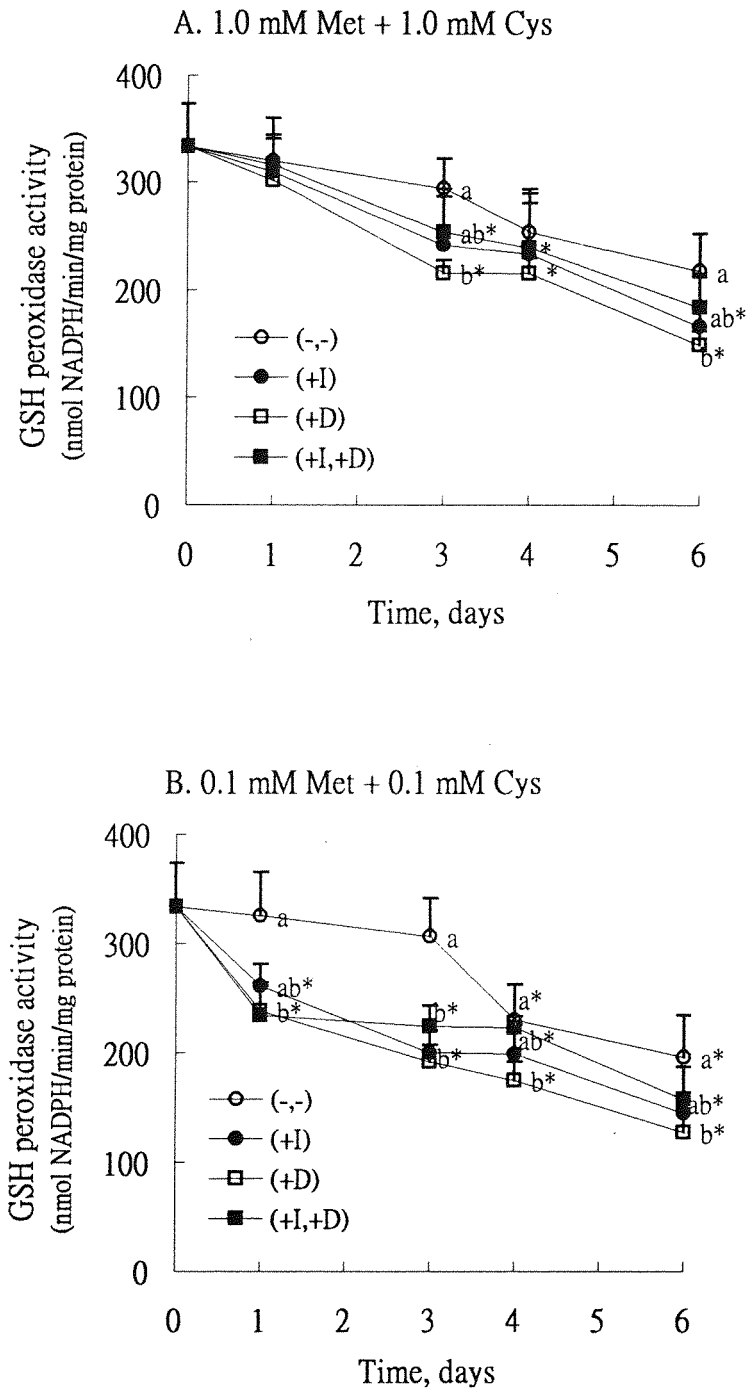


圖四、含硫氨基酸、胰島素及甲基脫氫皮質醇對肝細胞GST活性之影響。

結果以平均值±標準差表示(means±SD, n=4)。

' ab ' : 同一時間比較不同符號具有顯著差異 (p<0.05) 。

' * ' : 與第0天比較具有顯著差異 (p<0.05) 。

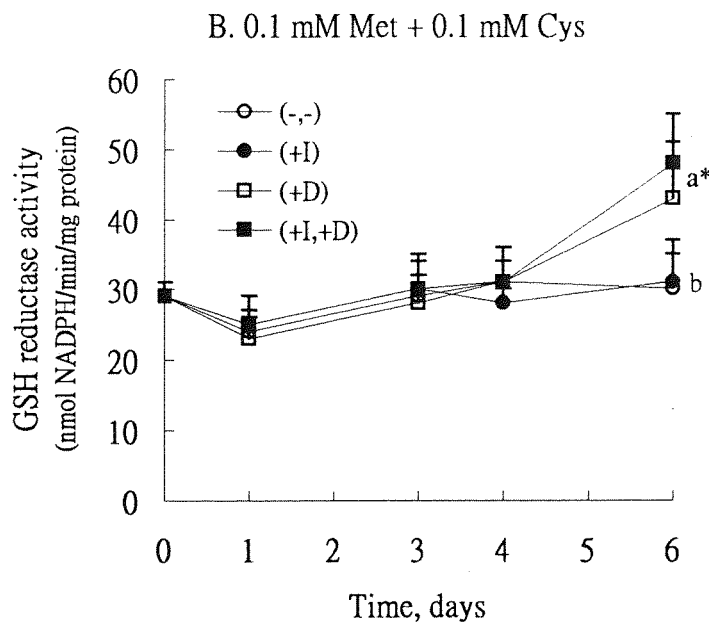
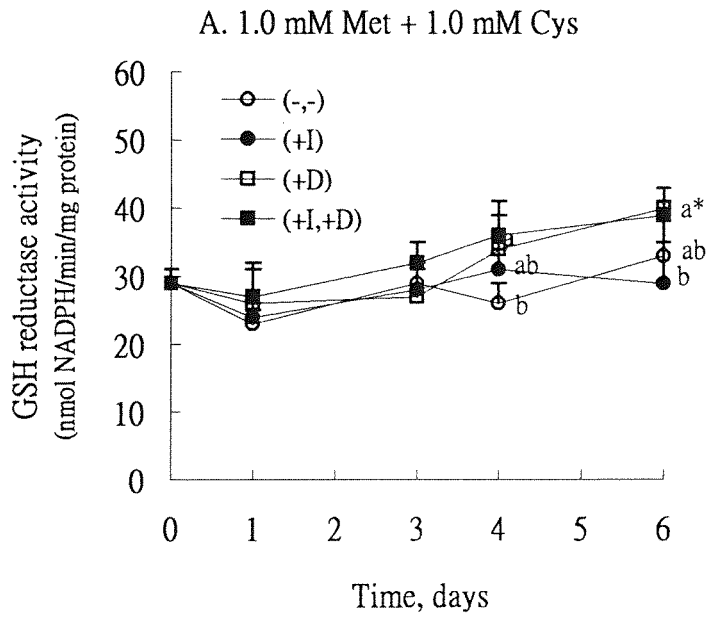


圖五、含硫氨基酸、胰島素及甲基脫氫皮質醇對GSH Px 活性之影響。

結果以平均值 標準差表示 (means SD, n=4) 。

' ab ' : 同一時間比較不同符號具有顯著差異 (p<0.05) 。

' * ' : 與第0天比較具有顯著差異 (p<0.05) 。

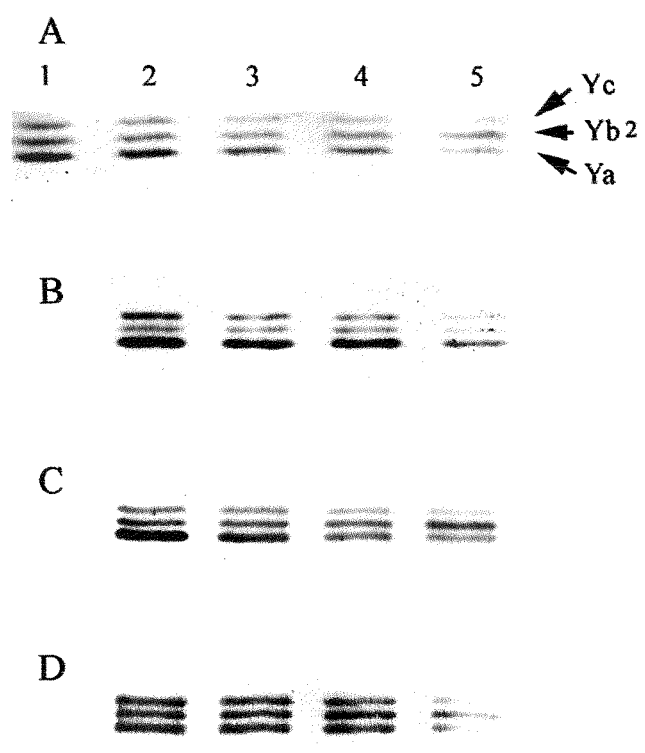


圖六、含硫氨基酸、胰島素及甲基脫氫皮質醇對GSH Rd 活性之影響。

結果以平均值 標準差表示(means SD, n=4)。

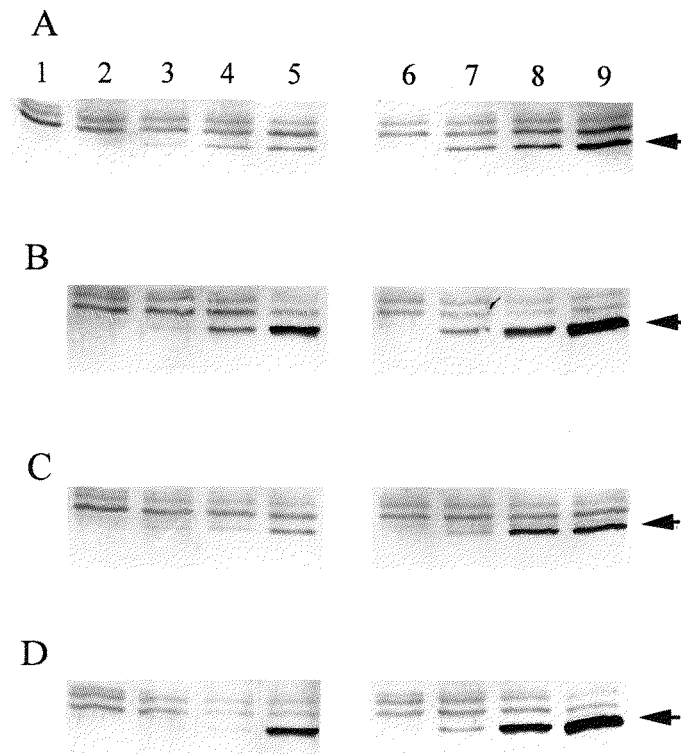
' ab ' : 同一時間比較不同符號具有顯著差異 (p<0.05) 。

' * ' : 與第0天比較具有顯著差異 (p<0.05) 。



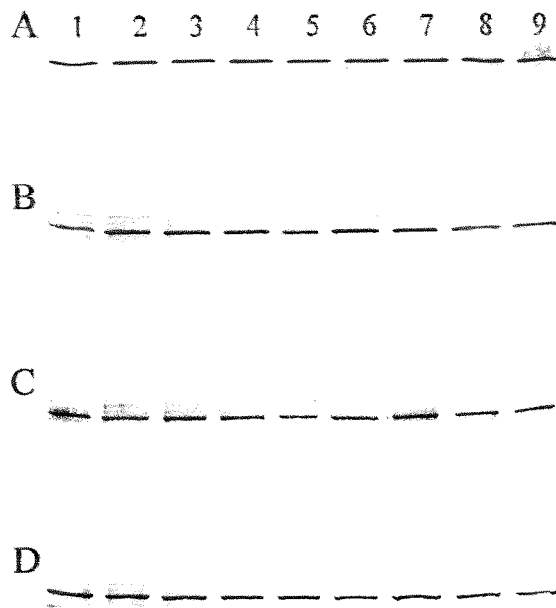
圖七、1.0 mM 含硫氨基酸、insulin 及 dexamethasone 對肝細胞 GST Ya、Yb2、Yc 蛋白質表現之影響。

圖 A : (+I, +D), 圖 B : (+I), 圖 C : (+D), 圖 D : (-, -), 蛋白質濃度為 1 μ g ; 樣品依序為第 0 天(lane 1), 第 1 天(lane 2), 第 3 天(lane 3), 第 4 天(lane 4), 第 6 天(lane 5)。



圖八、含硫氨基酸、insulin 及 dexamethasone 對肝細胞 GSTYp 蛋白質表現之影響。

圖 A : (+I, +D), 圖 B : (+I), 圖 C : (+D), 圖 D : (-, -), 蛋白質濃度為 $6\mu\text{g}$; 樣品依序為第 0 天(lane 1), 1.0 mM SAA : 第 1 天(lane 2), 第 3 天(lane 3), 第 4 天(lane 4), 第 6 天(lane 5); 0.1 mM SAA : 第 1 天(lane 6), 第 3 天(lane 7), 第 4 天(lane 8), 第 6 天(lane 9)。



圖九、含硫氨基酸濃度、insulin 及 dexamethasone 對肝細胞 GSH synthetase 蛋白質表現之影響。

圖 A : (+I, +D), 圖 B : (+I), 圖 C : (+D), 圖 D : (-, -), 蛋白質濃度為 8 μ g ; 樣品依序為第 0 天(lane 1), 1.0 mM SAA : 第 1 天(lane 2), 第 3 天(lane 3), 第 4 天(lane 4), 第 6 天(lane 5); 0.1 mM SAA : 第 1 天(lane 6), 第 3 天(lane 7), 第 4 天(lane 8), 第 6 天(lane 9)。

伍、討 論

研究指出肝細胞經分離並於體外培養時，胞內 GSH 濃度會有上升現象 (Guillemette et al., 1993; Lii et al., 1996; Mertens et al., 1991; Wang et al., 1997)，一般認為這可能與肝細胞在體外培養時面臨較大氧化壓力有關，然而也有些報告指出 GSH 濃度並不一定會增加，顯示尚有其他因子參與其中，比如細胞培養條件的異同即非常有可能與 GSH 濃度變化有關，Wang et al. (1997) 即指出培養液中含硫氨基酸濃度的高低與 GSH 濃度有關，除此之外，培養液中常見添加不同荷爾蒙或生長因子也是可能影響因素之一。

GSH 在細胞保護系統中扮演著多重且重要角色，比如抵抗藥物的毒性及清除活性氧的傷害 (Meister, 1989)，因此，離體培養的肝細胞為了維持正常的功能或抵抗氧化傷害，GSH 濃度適度的增加是有必要的 (Mertens et al., 1993)，但增加細胞內 GSH 含量，在培養液中必需提供足夠的 methionine 及 cysteine，本研究中即發現 GSH 濃度與含硫氨基酸濃度有關，在高濃度含硫氨基酸 (1.0 mM Met + 1.0 mM Cys) 存在下，可使胞內 GSH 含量在第三天時較起始濃度增加約 2 倍 (90.5 vs 29.4 nmol/mg protein) (圖一)，但當含硫氨基酸濃度降到 0.1 mM Met + 0.1 mM Cys 時，胞內 GSH 含量不但無法維持起始濃度而且在六天培養期間還漸減，顯然此濃度不足以提供 GSH 合成所需，雖然對 GSH 合成是如此，但從

蛋白質的表現 (表二) 及酵素活性分析 (圖三、圖四、圖五、圖六) 及不同 GST isoforms (圖七、圖八) 及 GSH synthetase 蛋白表現 (圖九) 並未明顯受影響看來，可證實 0.1 mM Met + 0.1 mM Cys 將是優先提供細胞蛋白質合成用，因此無法充分合成 GSH。

Cysteine 及 methionine 為含硫氨基酸，其中 cysteine 是 GSH 合成的限制氨基酸，methionine 雖然不能直接參與 GSH 的合成，但在肝臟中利用 cystathione 的反應途徑可被轉換成 cysteine，因此在肝細胞中也可被用來合成 GSH (Beatty and Reed, 1981)，由於高濃度的 cysteine 會造成細胞傷害，因此部分 cysteine 改以 methionine 形式給予將可減少細胞傷害。

除了含硫氨基酸濃度會影響 GSH 含量外，也有文獻指出多種荷爾蒙可藉由調控肝細胞 GSH 釋出胞外速率及 GCS 活性 (Lu et al., 1990)，來改變胞內 GSH 濃度，比如升糖激素 (glucagon) 即可透過 c-AMP 途徑，不但加速 GSH 流出胞外，也可降低 25-43% GCS 活性；Mercedith et al. (1998) 利用含有 RsGshT transporter (調節 GSH 流出的 transporter) 的 HeLa 細胞培養時，發現當 Bcl-2 過度表現時也可同時增加胞內 GSH 濃度，此調控主要在於 Bcl-2 抑制 GSH 流出胞外，而不是在於增加 GSH 合成；另外交感神經加壓素 (phenylephrine) 及血管加壓素 (vasopression) 也可透過 Ca^{+2} -或 protein kinace C-dependent 途徑抑制 GCS 活性，進而降低 GSH 合成 (Lu et al., 1991)；有研究進一步指出，GCS-HS 在受到

protein kinase A、protein kinase C 或 Ca^{+2} /calmodulin-dependent kinase II 作用而磷酸化時，將增加 GCS 被降解的速率，所以荷爾蒙可能透過調控 GCS 磷酸化或去磷酸化來改變其活性 (Sun et al., 1996)；至於 insulin 及 hydrocortisone 則可提昇 GCS 活性 45-65% 之多，也可增加 GCS 的蛋白表現，此調控主要是作用在 translation 階段 (Lu et al., 1992)；除此外，也有研究指出，dexamethasone (hydrocortisone 人工合成品) 處理 48 小時後，可降低肺泡內皮細胞 GSH 含量與抑制 GCS 活性 (Rahman et al., 1998)。本次研究，也發現 insulin 能增加 GSH 含量，且此現象與 insulin 促進 GCS 活性有關，另外 insulin 作用並不受含硫氨基酸濃度的影響，雖然在較低濃度含硫氨基酸下，大部分 methionine 及 cysteine 氨基酸優先應用於蛋白質合成 (表二) 而不是 GSH (圖二)。至於 dexamethasone 組細胞在高濃度含硫氨基酸下，雖然培養前三天仍見增加 GSH，但增加則明顯較未添加任何荷爾蒙的對照組 (-,-) 低 (圖一)，顯示 dexamethasone 抑制效果，而且此作用與其抑制 GCS 活性有關 (圖三)。至於在低含硫氨基酸下，雖然 GSH 濃度在培養期間漸減，但 dexamethasone 組的添加細胞 GSH 濃度與 GCS 活性仍是 4 組中最低的。當我們同時處理 insulin 及 dexamethasone 時，卻見 GSH 含量及 GCS 活性變化均介於 insulin 組和 dexamethasone 組之間，顯示兩者作用有互相抵消的現象，但由於其變化曲線較接近 insulin 組，顯示 insulin 的作用應大於 dexamethasone。

GCS 是 GSH 合成的速率決定因子，因此老鼠肝臟內 GSH 含量增加應與 GCS 活性的提升一致 (Eaton and Hamel, 1994, Teshigawra et al., 1995)。GCS 活性除了會受到荷爾蒙調控外，也有學者指出會受到 GSH 本身的迴饋抑制 (Deleve and Laplowitz, 1990)，而且估算其 K_i 約為 2.5 mM。但在本次研究中發現在第三天時胞內 GSH 濃度卻高達 7.56 mM，顯然此迴饋並未完全發揮作用，這可能是細胞本身培養時因應特別需要所致，也有可能 insulin 促進 GCS 活性的作用勝過於 GSH 迴饋抑制 GCS 活性所致。

GST 與 GSH peroxidase 兩種酵素主要作用在移除外來毒物及對抗過氧化物 (Koswer and Koswer, 1978; Paulson, 1986)。本次實驗，發現在高濃度含硫氨基酸培養下的前四天，GST 活性受 insulin 或 dexamethasone 荷爾蒙影響不大，但在第六天時，卻可見到加有 dexamethasone 處理的細胞酵素活性明顯增高，此現象不但可在高濃度含硫氨基酸下發生，同樣在低濃度含硫氨基酸下也有相似情形；除了 GST 活性外，在 GST 蛋白表現上，也可見在第六天時 dexamethasone 確實有助細胞維持 Yb2 的表現，至於 Ya 及 Yc 則不受影響 (圖七；表三、四、五)，但相較於另一誘發型的 GST isoform -Yp 的表現，dexamethasone 則抑制了 Yp 的表現 (圖八；表六)，所以顯示相同荷爾蒙對不同 GST isoforms 的影響並不一定是相同的。至於各組中 4 種 GST isoforms 表現變化的最終結果與 GST 活性並不完全一致，可能與 GST 活性測量時採用

CDNB 為受質有關，因為 CDNB 雖然是最常被使用來測量 GST 活性的受質，但卻不一定表示 CDNB 與所有 GST isoenzymes 有相同反應活性 (Maurya and Singh, 1991)。本實驗另一有趣的發現是 GST Yp 在低濃度含硫氨基酸下的表現明顯比高濃度含硫氨基酸下來得強烈，而且同樣也是以添加有 dexamethasone 的細胞(+D 及 +I +D)表現最低，為什麼含硫氨基酸濃度會影響 GST Yp 表現，我們目前並不清楚，但值得後續再深入探討。

在 GSH peroxidase (圖五)、 GSH reductase (圖六)活性與 GSH synthetase 蛋白表現 (圖九；表七)方面，除了第六天時，添加 dexamethasone 肝細胞 (+D； +I+D) 中的 GSH reductase 有增加情形外，本次研究，顯示 insulin 及 dexamethasone 這兩種荷爾蒙及含硫氨基酸濃度對它們並沒有明顯影響。

陸、結 論

綜合以上結果，methionine 及 cysteine 濃度與胞內 GSH 含量高低有關，充分的含硫氨基酸才能有效提昇 GSH 濃度；Insulin 對 GSH 生合成的作用與 dexamethasone 相反，Insulin 促進 GSH 合成而 dexamethasone 則是抑制 GSH 增加；另外，Insulin 及 dexamethasone 改變胞內 GSH 濃度與它們調控 GCS 活性有關。除了 GCS 活性外，其他 GSH 代謝相關酵素比如 GST 也受到 dexamethasone 的影響，尤其是 GST Yp isoform 的表現最明顯，dexamethasone 抑制 Yp 的表現，除了荷爾蒙外，含硫氨基酸也可影響 Yp 的表現；至於 insulin 及 dexamethasone 對 GSH peroxidase 與 GSH reductase 則無明顯影響。

柒、參考文獻

- Anderson, M. E., and Meister, A. (1983) Transport and direct utilization of γ - glutamylcysteine for glutathione synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 701-711.
- Anderson, M. E., Powrie, F., Puri, F., and Meister, A. (1994) Glutathione monoethyl ester: preparation, uptake by tissues, and conversion to glutathione. Arch. Biochem. Biophys. 239: 538-548.
- Anderson, M. E., Levy, E. J., and Meister, A. (1994) Preparation and use of glutathione monoesters. Methods Enzymol. 234: 492-499.
- Beatty, P. W., and Reed, D. J. (1981) Influence of cysteine upon the glutathione status of isolated rat hepatocytes. Biochem. Pharmacol. 30: 1227-1230.
- Bellomo, G., Mirabelli, F., Dimonte, D., Richelmi, P., Thor, H., Orrenius, C., and Orrenius, S. (1978) Formation and reduction for glutathione protein mixed disulfides during oxidative stress. Biochem. Pharmacol. 36: 1313-1320.
- Cotgreve, I. A., Moldeus, P., and Orrenius, S. (1988) Host biochemical defense mechanisms against peroxidant. Annu. Rev. Pharmacol. 28: 189-212.

- Deleve, L. D., and Kaplowitz, N. (1990) Importance and regulation of hepatic glutathione. *Semin. Liver Dis.* 10: 251-266.
- Dwivedi, R. S., Primiano, T. and Novak, R. F. (1993) Xenobiotic-modulated expression of hepatic glutathione S-transferase genes in primary rat hepatocytes culture. *Biochem. Biophys. Acta* 1174: 43-53
- Eaton, D. L., and Hamel, D. M. (1994) Increase in γ -glutamylcysteine synthetase activity as a mechanism for butylated hydroxyanisole-mediated elevation of hepatic glutathione. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 126: 145-149.
- Goss, P. M., Bray, T. M. and Nagy, L. E. (1994) Regulation of hepatocyte glutathione by amino acid precursor and cAMP in protein-energy malnourish rat. *J. Nutr.* 124: 323-330.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., and Jakoby, W. B. (1974) Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139.
- Hung, C. S., Moore, W. R., and Meister, A. (1988) On the active site thiol of γ -glutamylcysteine synthetase : relationship to catalysis inhibition. and regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2464-2468.
- Hwang, C. S., Chang, L. S., Anderson, M. E., and Meister, A. (1993) Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney

γ -glutamylcysteine synthetase. *J. Biol. Chem.* 268: 19675-19680.

Kenner, J., German, J. B. and Kinsella, J. E. (1987) Initiation of lipid peroxidation in biological system. *CRC Crit. Food Sci. Nutr.* 25: 317-364.

Kornbrust, D. J. and Mavis, R. D. (1978) The glutathione status of cell. *Intl. Rev. Cytol.* 54: 109-160.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Larsson, A. (1989) Hereditary disorder related to glutathione deficiency. In: D. Dolphin., R. Poulson., O. Avramovic (eds.). *Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects.* Wiley. New York, pp 197-233.

Lawrence, R. A., and Burk, R. F. (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71: 953-958.

Leary, E. J., Anderson, M. E., and Meister, A. (1993) Transport of glutathione diethyl ester into human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9171-9175.

Leedle, R. A., and Aust, S. D. (1990) The effect of glutathione on the vitamin E requirement for inhibition of liver microsomal lipid

- peroxidation. *Lipids* 25: 241-245.
- Lii, C.-K., Wang, S.-T., Sheen, L.-Y., and Chen, H.-W. (1996) Glutathione and glutathione-related enzyme activities of male and female rat hepatocytes under various culture conditions. *Arch. Toxicol.* 70: 822-829.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lu, S. C., Garcia-Ruiz, C., Kuhlenkamp, J., Ookhten, M., Salas-Prato, M. and Kaplowitz, N. (1990) Hormonal regulation of glutathione efflux. *J. Biol. Chem.* 265: 16088-16095.
- Lu, S. C., Garcia-Ruiz, C., Kuhlenkamp, J. and Kaplowitz, N. (1991) Hormone-mediated down-regulation of hepatic glutathione synthesis in the rat. *J. Clin. Invest.* 88: 260-269.
- Lu, S. C., Ge, J. L., Kuhlenkamp, J. and Kaplowitz, N. (1992) Insulin and glucocorticoid dependence of hepatic gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthesis in the rat. Studies in cultured hepatocytes and in vivo. *J. Clin. Invest.* 90: 524-532.
- Maiorino, M., Coassin, M., Roveri, A., and Ursini, F. (1989) Microsomal lipid peroxidation : effect of vitamine E and its functional interaction with

- phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Lipid* 24: 721-726.
- Maurya, H. K., and Singh, S. V. (1991) Differential induction of glutathione transferase isoenzymes of mice stomach by diallyl sulfide, a naturally occurring anticarcinogen. *Cancer Letters*. 57: 121-129.
- Meister, A., and Anderson, M. E. (1983) Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 71-760.
- Meister, A. (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 263: 17205-17208.
- Meister, A. (1989) Metabolism and function of glutathione. In: *Glutathione : Chemical, Biochemical, and Medical Aspect*. Wiley. New York, pp 1461-1477.
- Meister, A. (1991) Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis. and its reversal: applications in research and therapy. *Pharmacol. Therapeut* . 51: 155-194.
- Meister, A., and Larsson, A. (1995) Glutathione synthetase deficiency and other disorders of the γ -glutamyl cycle, In : *The metabolic basis of inherited disease*. C. R., Scriver, A. L. Beaudet., W. S., Sly, and D. Valle, (eds). 7th ed. McGraw Hill. New York, pp 1461-1477.
- Meredish, M. J., Cusick, C.L., Soltaninassab, C., Sekhar, K. S., Lu, S., and

- Freeman, M. L. (1998) Expression of Bcl-2 increases glutathione by inhibiting methionine-dependent GSH efflux. *Biochemical and Biophys. Res. Commun.* 248: 458-463.
- Mertens, K., Rogiers, V., Snock, W., and Vercruyse, A. (1991) Reduced and oxidized glutathione contents in adult rat hepatocytes under various culture conditions. *Cell Biol. Toxicol.* 7: 101-110.
- Mertens, K., Rogiers, V. and Vercruyse, A. (1993) Glutathione dependent detoxication in adult rat hepatocytes under various culture conditions. *Arch. Toxicol.* 67 : 680-685.
- Moldeus, P., Jones D. P., Ormstad, K., and Orrenius, S. (1978) Formation and metabolism of a glutathione-S-conjugate in isolated rat liver and kidney cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14: 195-200.
- Mulcahy, R. T., Wartman, M. A., Bailey. H. H., and Gipp, J. J. (1997) Constitutive and B-naphthoflavone-induced expression of the human γ -glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant response element/TRE sequence. *J. Biol. Chem.* 272: 7445-7454.
- Pileblad, E., and Magusson, T. (1992) Increase in brain glutathione following intracerebroventricular administration of γ -glutamylcysteine. *Biochem, Pharmacol.* 44: 895-903.

- Poulson, G.D., Caldwell, J., Hutson, D. H. and Menn, J, J (eds) (1986) Xenobiotic conjugation chemistry. American Chemical Society. Washington, DC.
- Rahman,I., Bel, A., Muliter, R., Donaldson, K., and Macnee, W. (1998) Differential regulation of glutathione by oxidants and dexamethasone in alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 275: L80-L86.
- Reed, D. I., Babson, J. R., Beatty, P. W., Brodie, A. E., Ellis, W. W., and Potter, D. W. (1980) High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Anal. Biochem.* 106: 55-62.
- Richman,P.G., and Meister, A. (1973) Regulation of γ -glutamylcysteine synthetase by non-allosteric feedback inhibition by glutathione. *J. Biol. Chem.* 250: 142-1426.
- Seeling, G. F., Simodsen, R. P. and Meister, A. (1984) Reversible dissociation of γ -glutamylcysteine synthetase into two subunits. *J. Biol. Chem.* 259: 9345-9347.
- Seelig, G. F. and Meister, A. (1985) Glutathione biosynthesis; γ -glutamyl -cysteine synthetase from rat kidney *Methods Enzymol.* 113: 379-390.
- Shi, M. M., Kugelman, A., Iwamoto,T., Tian, L. and Forman, H. J.(1944) Quinone induced oxidative stress elevates glutathione and induces

r-glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells. *J. Biol. Chem.* 269: 26512-26517.

Silbernagl, S. (1987) The renal handling of amino acids and oligopeptides. *Physiol Rev.* 68: 911-1007.

Sun, W. M., Huang, Z. Z., and Lu, S. C. (1996) Regulation of γ -glutamylcysteine synthetase by proteine phosphorylation. *Biochem. J.* 320: 321-328.

Tateishi N, Higashi T, Shinya S, Naruse A, Sakamoto Y (1974) Studies on the regulation of glutathione level in rat liver. *J. Biochem* 75: 93-103.

Teshigawara, M., Matsumoto, S., Tsuboi, S., and Ohmori, S. (1995) Changes in levels of GSH and related compounds and activities of GSH-related enzymes during rat liver regeneration. *Res. Exp. Med.* 195: 55-60.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 7: 4350-4356.

Vandenberghe, Y., Ratanasavanh, D., Galise, D., and Guillouzo, A. (1988) Influence of medium composition and culture conditions on glutathione S-transferase activity in adult rat hepatocytes during culture. *In Vitro Cell. Develop. Biol.* 24: 281-288.

- Vandenbergh, Y., Tee, L., Rogiers, V. and Yeoh, G. (1992) Transcriptional- and post-transcriptional-dependent regulation of glutathione S-transferase expression in rat hepatocytes as function of culture condition. *FEBS*. 2: 155-159.
- Wang, S.-T., Chen, H.-W., Sheen, L.-Y. and Lii, C.-K. (1997) Methionine and cysteine affect glutathione level, glutathione-related enzyme activities and the expression of glutathione S-transferase isoenzyme in rat hepatocytes. *J. Nutr.* 127: 2135-2141.
- Waxman, D. J., Morrissey, J. J., Naik, S. and Jauregui, H. O. (1990) Phenobarbital induction of cytochrome P-450. High-level long term responsiveness of drug induction, and glucocorticoid dependence of phenobarbital response. *Biochem. J.* 271: 113-119.
- White, A. C., Thannickal, V. J., and Fanburg, B. L. (1995) Glutathione deficiency in human disease. *J. Nutr. Biochem.* 5: 218-226.
- Williamson, J. M., and Meister, A. (1981) Stimulation of hepatic glutathione formation by administration of L-oxothiazolidine-4 carboxylate, a 5-oxo-L-proline substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 936-939.
- Williamson, J. M., Beottcher, A., and Meister, A. (1982) Intracellular cysteine delivery system that protect against toxicity by promoting glutathione synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6246-6249.

Yan, N., and Meister, A. (1990) Amino acid sequence of rat kidney γ -glutamylcysteine synthetase. *J. Biol. Chem.* 265: 1588-1593.