

R  
008.8  
1296  
88

私立中山醫學院生物化學研究所碩士論文

Study of the chemopreventive mechanism of geniposide:  
The signal transduction pathway of the geniposide-induced  
Glutathione S-transferase.

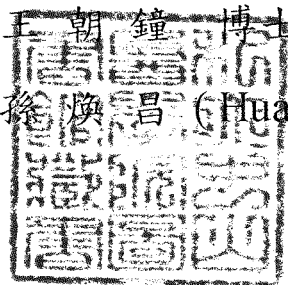
去氫梔子甘防癌機制之探討：

去氫梔子甘誘導 Glutathione S-transferase 酵素活性表  
現之訊息傳導路徑

指導教授：周芬碧 博士 (Fen-Pi Chou)

王朝鐘 博士 (Chau-Jong Wang)

研究生：孫煥昌 (Huan-Chang Sun)



中華民國八十八年八月

參考書恕不外借

中山醫學院圖書館



C055164

# 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 ~~大學~~(學院) 生物化學 系所  
\_\_\_\_\_ 組 八十七 學年度第 二 學期取得 碩 士學位之論文。

去氫梔子甘防癌機制之探討:

論文名稱: 去氫梔子甘誘導 Glutathione S-transferase (GST) 酵素活性表現之訊息傳導路徑

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。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利的附件之一，請將全文資料延後兩年後再公開。(請註明文號: \_\_\_\_\_)

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，不限地域與時間，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: 周芬碧

研究生簽名: 孫煥昌 學號: R 86205  
(親筆正楷) (務必填寫)

日期: 民國八十八年八月九日

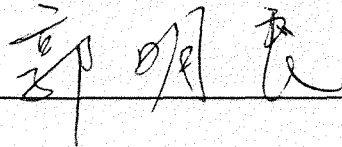
1. 本授權書請以黑筆撰寫並影印裝訂於書名頁之次頁。
2. 授權第一項者，請再交論文一本予畢業學校承辦人員或逕寄台北市 10636 和平東路二段 106 號 1702 室 國科會科學技術資料中心 江守田、王淑貞。(本授權書諮詢電話: 02-27377746)
3. 本授權書於民國 85 年 4 月 10 日送請經濟部智慧財產局修正定稿。
4. 本案依據教育部國家圖書館 85.4.19 台(85)圖編字第 712 號函辦理。

本論文為中山醫學院授與理學碩士學位之必備條件之一，  
經中山醫學院生物化學研究所碩士論文考試委員會審查合  
格及口試通過。

考試委員

國立台灣大學醫學院  
毒理學研究所教授


郭明良 教授



---

私立中山醫學院  
生化研究所教授兼所長

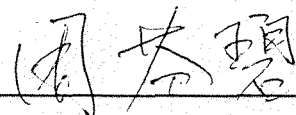
王朝鐘 教授



---

私立中山醫學院  
生化研究所副教授  
(本論文指導教授)

周芬碧 副教授



---

中華民國八十八年七月

學生孫煥昌，論文題目為去氫梔子甘防癌機制之探討：去氫梔子甘誘導 Glutathione S-transferase 酵素活性表現之訊息傳導路徑。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，並由指導教授核閱後無誤。

指導教授：

周芬碧 副教授

簽名 周芬碧

中華民國八十八年八月

## 誌 謝

轉眼間研究所生活已暫告一段落，箇中滋味，百味雜陳，非筆墨所能形容。這份論文得以完成，由衷地感謝周遭師長的指導、同儕間之提攜及學弟妹們的協助。

首先感謝周芬碧博士，提供一個能令我自由揮灑之研究空間，並感謝王朝鐘博士之指導及教誨。尤要感謝謝易修博士在實驗上所給與寶貴的建議及技巧上之指導，及劉哲育博士在實驗器具上之提供，使我突破實驗瓶頸，受益匪淺；而論文口試期間，承蒙台灣大學毒理所郭明良博士對論文之審閱及指正，使論文更臻周延；同時也感謝林玉玲老師之關懷與鼓舞。師恩浩瀚，永銘於心！

感謝陳晉勳主任、賴志昌及江蕙玲夫婦、妙真學姐在生活上及實驗上之關懷及協助，及玉娟在實驗技術之傳承；還有實驗室之夥伴—曉薇、育津、舜傑、意維、雪君、滄澤、正智等同學及學弟妹們之協助，及所上其他學長姐及同學們熱情之幫忙，使研究過程更加順利，生活更加充實，在此一併致上最誠摯之謝意。

另外，也感謝宗儒、宜樺夫婦，不時於實驗及生活上提供寶貴之經驗；志鴻於觀念上之交流，及紹鴻於實驗上之協助，亦讓我受益良多。

最後特別感謝我的家人及女友—玉珠。謝謝你們的支持與鼓勵，使我無後顧之憂，能專心致力於研究，順利完成碩士學位；感謝你們，謝謝！！

孫煥昌 謹誌於中山醫學院生化所

中華民國 八十八年 八月 七日

## 摘要

由之前文獻指出, 去氫梔子甘具有抗氧化、抗癌化作用。而解毒酵素 Glutathione S-transferase ( GST )在抗癌化作用之過程中, 又扮演一個很重要之角色; 因此, 我們想去了解去氫梔子甘是否會誘導 GST 之酵素活性及蛋白之增加, 以及整個誘導過程之訊息傳導路徑為何?

我們以大白鼠初代培養的肝細胞作為實驗工具, 首先先探討去氫梔子甘是否會誘導 GST 之酵素活性及蛋白之表現。結果證實了去氫梔子甘對 GST 酵素活性之影響, 同時具有時間上及濃度上之相關性, 在時間之表現上發現, 酵素活性最大值發生於 12 小時, 約為對照組的 2.66 倍, 而取 12 小時之各濃度比較則發現, 酵素活性最大值發生於 100  $\mu$ M, 約為對照組的 1.5 倍, 此外, 利用西方墨點法也證實去氫梔子甘所誘導之 GST 蛋白之表現, 主要是針對 GST Yb1、Yb2, 以 GST Yb1 而言, 蛋白表現最大值發生於 12 小時, 約為對照組的 1.6 倍, 以 GST Yb2 而言, 蛋白表現最大值發生於 24 小時, 約為對照組的 1.8 倍, 至於 GST Ya 則無明顯之影響。其次, 再以西方墨點法進一步探討整個誘導過程中之訊息傳導路徑, 結果顯示 Protein tyrosine kinase、Ras、Raf、MEK 及 MAPK cascade 之蛋白表現最大值多發生於 9 小時以前, 其中影響最大的為 MEK 及 MAPK cascade 中的 ERK1 及 ERK2, 結果顯示在 9 小時之蛋白變化依序為 2 倍, 3.75 倍, 1.8 倍; 至於, PKC  $\alpha$  之蛋白表現, 就 cytosol 部分而言, 在 9 小時以前約降為對照組的 0.8-0.9 倍, 就 particulate 部分之蛋白變化可看出 PKC  $\alpha$  隨時間增長而提高, 最大值發生於 24 小時, 約為對照組的 1.4 倍, 這結果顯示 PKC  $\alpha$  之活化似和去氫梔子甘誘導 GST 有關。最後為了再次驗證 MAPK cascade 是否參與整個誘導過程之調控, 在實驗中加入 MEK 的專屬性抑制劑 — PD98059 和去氫梔子甘共同處理細胞, 結果證實 GST 酵素活性明顯受到抑制, 由原來的 2.66 倍降低為

1.33 倍，同時在 GST Yb1、Yb2 之蛋白表現也因而降低，這個結果也再次說明 MAPK cascade 和整個誘導過程關係之密切。

總而言之，去氫梔子甘誘發 GST 酵素活性之提昇，作用機制之一可能是透過 MAPK cascade 之活化進行，而 PKC  $\alpha$  及蛋白之磷酸化作用似乎也參與其中。

## Abstract

Geniposide is extracted from the fruits of *Gardenia jasminoides*, which are usually used as a food colorant and as a traditional Chinese medicine for treatment of hepatic and inflammatory diseases. There are many Biological functions in geniposide including anti-oxidation and anti-carcinogenesis. The detoxication enzyme ,GST, is known to play a very important role in the process of anti-carcinogenesis. In this study, the effect of geniposide on the activity and expression of GST subunits, and the signal transduction pathway of this effect were investigated.

Primary cultured rat hepatocytes were used as a tool in this study. Treatment of geniposide evidently induce the GST activity in a time- and dose- dependent manner. Western blotting data indicated that geniposide induced the protein level of GST Yb1 and GST Yb2 subunits, but not GST Ya. Further studies on the signal transduction pathway of the induction effect of geniposide on GST activation and expression, showed that protein tyrosine kinase, Ras, Raf, MEK, and MAPK cascade were involved in the process. PKC $\alpha$  may also play an important role in this process as suggested by western results. To confirm the involvement of MAPK cascade, PD98059, a specific inhibitor for MEK was applied to the cells along with geniposide. The results showed that GST enzyme activity was inhibited by PD98059 significantly, from a maximal induction fold of 2.66 without inhibitor to 1.33 with inhibitor. The geniposide-induced GST Yb1 & Yb2 subunits were also inhibited by PD98059. This result surported that MAPK cascade participates in the geniposide-induced GST activity and expression.

To sum up, MAPK cascade activation was involved in the geniposide-induced GST. Other protein, PKC and protein kinases, might also make contribution to this process.



# 目 錄

壹、 前言及緒論.....	1
貳、 研究動機.....	6
參、 實驗材料.....	7
肆、 實驗方法.....	15
伍、 結果.....	20
陸、 討論.....	30
柒、 圖表.....	34
捌、 參考資料.....	67



## 壹、前言及緒論

### 一、去氫梔子甘 (Geniposide) 的介紹：

去氫梔子甘是梔子中之主要成份，其結構如(圖一)，為 iridoid 型之配醣體 (1)；梔子為茜草科 Rubiaceae 植物，多分佈於印度支那、大陸、日本西南部、琉球、菲律賓、台灣等地，海拔大約 1600 公尺左右之闊葉林區，其在天然藥物方面應用甚多，尤其在中藥方劑上如黃連解毒湯、茵陳湯、梔子乾姜湯等，被收載的方劑多達 47 個。

就去氫梔子甘的研究方面，過去多著重於藥物動力學方面之研究，經由實驗證實去氫梔子甘在動物體內胃腸消化系統中可被轉變成其去醣體 (2)，同時有證據顯示其藥理作用可能來自其去醣體 (3)；另外也有報告證實去氫梔子甘具有利膽作用，以胃管灌食老鼠，發現去氫梔子甘能刺激膽汁之分泌，但以腹腔注射則不具有此作用 (4-6)；也有研究顯示去氫梔子甘經由人體的腸內細菌代謝之後會形成一種新物質 — genipinine (7)，這是個含有 nitrogen 的化合物。置於去氫梔子甘在生理生化功能上所扮演的角色則仍不清楚。

至於在毒性研究方面，當老鼠以高劑量(320mg/kg)餵食，24 小時後血清中轉胺酵素會顯著的上升，同時肝中 GSH 含量亦隨之下降 (8)；也有報告指出以去氫梔子甘(3mg/kg)餵食老鼠，會有肝毒性的現象 (9)。但另一方面，也有保肝作用的研究報告指出，以去氫梔子甘(240mg/kg)連續處理三天，其肝中結合性酵素如  $\alpha$ -naphthol glucuronosyltransferase 及 Glutathione-S-transferase 之活性會顯著增加 (10)，也有研究證實，當老鼠以 0.1 g/kg/day 的 geniposide 連續灌食四天後，其肝中 glutathione 及 GST 之活性皆有增加 (11)。

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 (12, 13)。另外研究證實去氫梔子肝對於

TPA 癌促化作用有抑制的效果( 14 )。亦可降低因為高量輻射所造成的傷害。

## 二、癌症與解毒酵素之關連：

一般而言，癌症的發生主要由物理、化學及輻射等因素所影響；其中化學因子為致癌的主因。絕大多數的癌症起因於環境中的化學致癌物，如吸煙、飲酒或空氣汙染；因此，若能將化學致癌物有效的代謝，便可降低癌症發生的機率。而生物體內化學致癌物的代謝，主要是依賴解毒酵素進行，所以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( 15 )。這些解毒酵素大致可分為 phase I 及 phase II 酵素。Phase I 酵素如 P-450，係經由氧化的方式加以代謝致癌物；Phase II 酵素如 glutathione-S-transferase (GST)，則是經由催化 glutathione 和致癌物結合，解毒步驟首先形成 thioethers，最後形成 mercapturic acid 使這些致癌物去活化，達到解毒之效果，以 aflatoxin B1 為例，即以此種方式進行代謝 ( 16 )。一旦解毒酵素有缺陷，如 GST 和 N-acetyltransferase(NAT)等，則致癌的危險性會隨之提高，在肺癌、膀胱癌及喉癌都有相關的研究發表( 17 - 20 )。所以欲防止癌症的發生，避免活化性致癌物的攻擊是相當重要的，而解毒酵素 GST 在此扮演了一個非常重要的角色。

## 二、Glutathione-S-transferase (GST)：

GST 是一種具多功能的蛋白質它可以和細胞內的生化分子結合，並進一步攜帶及運送這些分子例如：heme、bilirubin、polycyclic aromatic compounds 及 dexamethasone ( 21 )，並進一步攜帶及運送這些分子。此外，在解毒過程中，它會催化 glutathione 和多種內生性 or 外在的活化型化學物結合，進而進入 mercapturic acid 路徑加以代謝 ( 16, 22 )，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（23）。GST 的八個單元體分別是：Y $\alpha$  (Mr = 24400), Y $\beta$  (Mr = 26300), Y $\delta$  (Mr = 25000), Y $\alpha$  (Mr = 25600), Y $\beta$  (Mr = 27000), Y $\gamma$  (Mr = 28000), Y $\eta$  (Mr = 26300), Y $\rho$  (Mr = 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 $\alpha$ Y $\gamma$  和 Y $\beta$ Y $\eta$  的組合體，卻發現不到 Y $\beta$ Y $\alpha$  和 Y $\beta$ Y $\gamma$  的組合體。如果以 anti-Y $\beta$  的抗體作用時，只會抓下 Y $\beta$  GST，不會和 Y $\gamma$  GST 有交叉反應的情形出現。同時，在 mRNA 方面，Y $\alpha$  及 Y $\gamma$  的 cDNA 在適當條件不會和 Y $\beta$  mRNA 雜交。在 cDNA 序列分析方面，Y $\beta$  單元體和 Y $\alpha$ 、Y $\gamma$  的 DNA 相似性很低，且在蛋白質方面，Y $\beta$  和 Y $\alpha$ 、Y $\gamma$  只有 28% 的相似性（24）。所以，Y $\beta$  的序列和其它單體的序列缺少相似性。

#### （一）GST 的分類：

依 GST 所分佈的位置大致可分為兩類，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，而大部分的 GST 都存在細胞質部分，這些 GST 依其來自不同的基因族，分別命名為 alpha、mu、pi、sigma、theta 族（25）。其中 sigma 及 theta 族由於最近才被發現，所以對於他們特性上的了解不多（26, 27）。而在細胞質中的 GST 主要以 alpha、mu 及 pi 族為主。在酸鹼特性方面，alpha 族屬於鹼性，mu 族偏中性，pi 族則屬於酸性。在 rat、mouse 以及人類中，這三種不同的 GST 在結構方面、酵素方面等特性都很類似（28）。

此外，這三種不同的 GST 的表現往往具組織特異性，以老鼠而言，alpha GST 主要分佈在肝臟、腎臟；mu GST 主要分佈在 testis、心臟、肝臟（29）；至於 pi GST 在正常的情況下，除了肝臟外，均勻的分佈在各個組織器官內。另外也發現這些不同的 GST，在細胞形成腫瘤過程中的各個階段，其表現量也有所變化。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 ( 30 )。在前腫瘤結節中, 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 會很明顯且大量的表現 ( 31 )。

過去對於 GST 的研究, 大都著重於 GST-P, 不論是在基因的調節、表現、或是抗藥性等方面的探討較透徹 ( 32- 34 )。就 alpha 族 GST 的研究, 多著重於其抗藥性方面, 特別是發現它會代謝一些抗癌藥物, 如 cisplatin、alkylating agent 等, 而抑制了某些抗癌藥物對於癌症初期的治療( 35-37 )。至於 mu 族 GST, 對於某些抗癌藥物具有抗藥性, 且和組織的發炎有關 ( 38 )。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, 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 研究不多, 所以了解並不深入。事實上, 有關 GST 生化功能的調控過程是很複雜的, 這和遺傳、性別、年齡、組織種類以及細胞癌化程度的不同皆有關連。目前至少有 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水果中 ( 39 )。

## (二)、GST 的活化：

大部分的化合物會以間接的方式, 經由影響 GST 上游基因來進一步促進 GST 的表現, 這些上游基因有 antioxidant-responsive element (ARE) ( 40-42 )、xenobiotic-responsive ( 43 )、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 ( 44, 45 )。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)。

(三)、GST 與 chemoprevention 間之關係：

由於 GST 屬於 phase II 酵素，本身具有解毒的功能，故近來有許多研究皆偏向於 chemoprevention 的方向，希望藉由提高 GST 活性，以增加細胞之抗癌效果，進而達到 chemoprevention 之目的。( 46 )

## 貳、研究動機

由於生活環境變遷，致使生物體接觸致癌物的機會提昇，相對地，癌症發生的比例亦漸漸升高，故許多實驗室皆致力於抗癌物質方面的研究，希望由許多的天然物中，單離萃取其中的成份分析，以找出具有防癌、抗癌效果之物質，以提高細胞耐受性，並進一步達到化學預防(Chemoprevention)之目的。

經由先前許多文獻及研究發現，去氫梔子甘不但能降低 aflatoxin B1 所誘導產生的致肝癌作用；此外，對於 TPA 所引起的癌促化作用也有抑制的效果；在動物實驗中，亦證實它可有效的提昇 Glutathione S-transferase 的活性，但對於其訊息傳導路徑仍不是很清楚。

本實驗室先前研究亦證實，去氫梔子甘會誘導 *gst* 基因之表現，但對於去氫梔子甘是否會進一步誘導 GST 蛋白、活性表現及其誘導過程之訊息傳導路徑為何，仍未研究的很透徹，因此想進一步釐清，去氫梔子甘是否會誘導 GST 活性及蛋白之表現及其訊息傳導路徑(圖二)。

本實驗利用大白鼠初代培養的肝細胞為工具，探討去氫梔子甘是否會誘導 GST 活性的增加、蛋白之表現，及其誘導過程中係受何種上游機制所調控，以期對去氫梔子甘的化學預防及防癌機制有整體的瞭解。

## 參、實驗材料

一、動物來源：購自台中榮總動物中心之 Sprague Dawley 系雄性大白鼠。

二、藥品試劑：

購自美國 Sigma 化學公司：

geniposide、protocatechuic acid、Lauryl sulfate (SDS)、sodium phosphate、Tris-HCl、Tris-base、collogenase、polyxythylene-sorbitan monolaurate (Tween 20)、percall bromophenol blue、glycerol、2-mercaptoethanol.

購自美國 Boenringer Mannrein(BM)公司：

Glycogen、NC-membrane.

購自德國 GIBCO 公司：

Fetal calf serum、HEPES、HBSS、William E、Penicillin-streptomycine-neomycine (PSN).

購自美國 Amersham 公司：

ECL kit.

購自美國 Calbiochem 公司：

PD 98059

三、常用儀器：

天平：OHAUS.

微量天平：Mettler Toledo AB104



電源供應器：Bio-Rad 200/2.0  
Bio-Rad power/PAC 3000  
加熱攪拌器：Coring Stirrer/Hotplate  
微量高速離心機：Eppendorf centrifuge 5415C  
高速離心機：Sigma 2K15  
超高速離心機：Hitach, himac CP 85  $\beta$ .  
Beckman L-80  
分光光度計：Beckman DU640 Spectrophotometer  
無菌操作台：NuAIR class 2 Type a/B3  
感光夾：Okamoto 8X102  
幫浦：Micro tube pump MP-3  
數位化影像分析系統：Alphar Imager 2000  
組織均質機：EYELA MAZELAZ  
震盪水浴槽：TIHDERN Water Bath, Model BT-15  
X 光感光軟片：Kodak X-OMAT  
電泳轉印槽：TE22 Mighty Small Transphor  
震盪器：Vortex-2 Genin  
水平式搖晃器：Orbital shaker OS701  
烘箱：Memmert  
- 70°C 冰箱：SANYO Ultra Low  
- 20°C 冰箱：  
細胞培養箱：NAPCO Model 6100  
超音波洗淨器：Branson 8200  
乾浴槽：Termolyne Type 17600 Dri-Bath  
pH meter：Jenco modle 6200

四、實驗常用之溶液、緩衝液、培養液的配製：

(A).做 Western blotting 所需之溶液及緩衝液：

1. 製備細胞萃取液之 buffer — Whole cell lysis buffer：

Tris-base	1.816	g
Surcose	85.575	g
EDTA	0.3722	g

調 pH 7.4，再補二次水至 1000 ml

2.SDS running buffer：( 1000 ml )

Glycine	15.18	g
Tris-base	3.18	g

加二次水至 1000ml

3.Electro-transfer buffer：( 1000ml )

Glycine	11.25	g
Tris-base	2.43	g
Methanol	200	ml

加二次水至 1000ml

4.Blocking buffer：

5%的脫脂奶粉加 0.1%的 Tween-20，溶於 PBS buffer。

5. Phosphate-Buffer saline-Tween 20 ( PBST )：

NaCl	8	g
KCl	0.2	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -12H <sub>2</sub> O	3.632	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24	g

---

Tween-20 1 ml

---

調 pH7.4，再以二次水補至 1000 ml

6. 5× Loading dye :

DTT (Dithiothreitol)	0.77	g
SDS	1	g
Tris-HCl (2M; pH 6.8)	2	ml
Glycerol (100%)	5	ml
Bromophenol blue (0.5%)	0.3	ml

---

再以二次水補至 10 ml

7. 8% separating gel ( 20 ml ) :

Distilled water	9.3	ml
Acrylamide/bis (30%/0.8%)	5.3	ml
Tris-HCl ( pH8.8 )	5	ml
10% SDS	0.2	ml
10% ammonium persulfate	0.2	ml
TEMED	12	ul

---

8. 10% separating gel ( 20 ml ) :

Distilled water	7.9	ml
Acrylamide/bis (30%/0.8%)	6.7	ml
Tris-HCl ( pH8.8 )	5	ml
10% SDS	0.2	ml
10% ammonium persulfate	0.2	ml
TEMED	8	ul

---

9. 12% separating gel ( 20 ml ) :

Distilled water	6.6	ml
-----------------	-----	----

Acrylamide/bis (30%/0.8%)	8 ml
Tris-HCl ( pH8.8 )	5 ml
10% SDS	0.2 ml
10% ammonium persulfate	0.2 ml
<u>TEMED</u>	<u>8 ul</u>

10. Stacking gel ( 10 ml ) :

Distilled water	6.8 ml
Acrylamide/bis (30%/0.8%)	1.7 ml
Tris-HCl ( pH6.8 )	1.25 ml
10% SDS	0.1 ml
10% ammonium persulfate	0.1 ml
<u>TEMED</u>	<u>10 ul</u>

(B). 測 GST 活性所需之溶液及緩衝液 :

1. Homogenizer Buffer ( 1000 ml ) :

Tris-HCl (50mM)	6.055 g
<u>Surcose</u>	<u>85.575 g</u>

調 pH7.5 , 再以二次水補至 1000 ml

2. GSH substrate buffer ( 500 ml ) :

取 0.3073 g 的 GSH 溶於 500 ml 的 homogenization buffer

3. CDNB substrate buffer ( 500 ml ) :

取 0.2025 g 的 CDNB 先溶於 2.5 ml 的 alcohol 中 , 再加 homogenization buffer 至 500 ml 。

(C). PKC 活性測定所需之溶液及緩衝液：

1. Homogenization Buffer A：

	Stock	10 ml
20 mM Tris-HCl	200mM	1.00 ml
0.03 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	30 mM	0.01 ml
2 mM MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	100mM	0.20 ml
2 mM EDTA	100mM	0.20 ml
0.5 mM EGTA	100mM	0.05 ml
2 mM PMSF	200mM	0.10 ml
1 mM DTT	500mM	0.02 ml
250 mM Surcose	342.3M.W	0.86 g
10 ug/ml Leupeptin	1.0mg/ml	0.10 ml
10 ug/ml Aprotinin	1.0mg/ml	0.10 ml

調 pH7.4，再以二次水補至 10ml

2. Homogenization Buffer B：

	Stock	10 ml
20 mM Tris-HCl	200mM	1.00 ml
0.03 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	30 mM	0.01 ml
5 mM MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	100mM	0.50 ml
2 mM EDTA	100mM	0.20 ml
0.5 mM EGTA	100mM	0.05 ml
2 mM PMSF	200mM	0.10 ml
1 mM DTT	500mM	0.02 ml
5 mM NaF	100mM	0.50 ml
10 ug/ml Leupeptin	1.0mg/ml	0.10 ml
10 ug/ml Aprotinin	1.0mg/ml	0.10 ml
0.1% Triton X-100		10.0 ul

調 pH7.5，再以二次水補至 10ml

3. PKC activity reaction buffer :

200 mM	Tris-HCl, pH 7.4	20 ul
200 mM	MgCl <sub>2</sub>	10 ul
40 ug	Lysine-rich histone	25 ul
10 ug	Phosphatidylserine	10 ul
10 ug	Leupeptin	10 ul
25 mM	CaCl <sub>2</sub>	10 ul
24 mM	EGTA	5 ul
20 mM	Tris	10 ul
		<hr/>
		100 ul

(D). 細胞培養液及其它溶液：

1. William E medium : ( 1000ml )

William E powder	一包
NaHCO <sub>3</sub>	2.2 g
<hr/>	

加二次水至一公升，調 pH7.3，再過 minipore。

2. William E (OK) medium :

將 450 ml 已配好的 William E medium 加入

fetal serum ( 10% )	50 ml
PSN-antibiotic ( 5% )	5 ml
<hr/>	

3. 10× HBSS ( 100 ml ) :

HBSS powder (含 phenol red)	一包
----------------------------	----

NaHCO<sub>3</sub> 2.2 g

溶於最後體積為 100 ml 的二次水中，  
調 pH 7.3，再過 minipore。

4. Substrate buffer：(硝化纖維紙呈色用)

Tris-HCl 0.133 g

NaCl 0.9 g

調 pH 7.4，以二次水補至 100 ml。

## 肆、實驗方法

### 一、分離肝細胞及初代培養( Primary culture hepatocyte )：

初代肝細胞之培養係根據 Butterworth, B.E. 等人之研究方法 ( 47 )，以肝臟灌流方式取得( two stage liver perfusion method )。

首先以購自台中榮總動物中心之 SD 系大白鼠(體重約 200-300g)給予腹腔注射 pentobarbitol 麻醉老鼠，給予劑量為 0.2 ml(50 mg/ml)每 100 g 大白鼠體重。待完全麻醉後，加以固定四肢，自肛門上方沿劍突方向成 V 字型剪開腹腔，達劍突下方。打開腹腔後，以 20FAI.V.catheter /needle 注入肝門靜脈後，拔掉硬針，以軟針固定在肝門靜脈，開始灌流預熱 37°C 之 50-70ml solution A，並剪斷下腔靜脈以達放血之目的，此時幫浦轉速開至最大。待 solution A 用盡，再以預熱 37°C 之 100ml solution B 灌流，並將幫浦轉速調至中速，同時以止血鉗夾住下腔靜脈並剪碎心臟，待 solution B 用盡後，迅速取下肝臟，浸於 50ml 冰 William E，快速剪碎肝臟並加以過濾，再以轉速 600rpm、4°C 離心十分鐘。移去上清液，取下層沈澱之肝細胞，並加入適量之 William E 和細胞均勻混合，再加入 percoll-10X HBSS ( percoll :10×HBSS = 9 : 1 )，使得(細胞 + William E) : (percoll-10X HBSS) 為 3 : 2 混合完全，再以轉速 600rpm、4°C 離心十分鐘，移去上清液加入適量之 William E 混合完全，並取少許作細胞計算。

### 二、Microculture Tetrazolium Assay ( MTT Assay )：

根據 Michale, C.A. 等人之研究得知( 48， 49 )，活細胞會將 tetrazolium 代謝成藍紫色之結晶，且此藍紫色之結晶可溶於異丙醇，故測其吸光可得知活細胞的數目，以確定所選之實驗藥劑濃度為適當



且無細胞毒性。

取  $1 \times 10^5$  的肝細胞置於 24 well-plate，讓細胞貼壁四小時，換新鮮之 William E 培養液，加入不同濃度之 Geniposide，並分別以二次水及 0.02% DMSO 作為對照組。繼續培養 18-24 小時後，吸乾培養液，再以 PBS 輕輕洗兩次。換上新鮮的培養液 2.5 ml，並加入 20 ul tetrazolium ( 25 mg/ml )；培養四小時，移除培養液，加入 1ml isopropanol，以 pipetman 打散均勻，直接取 1ml 以波長 563nm 測吸光。

### 三、Glutathione-S-transferase activity assay：

將經藥劑處理後之肝細胞用 homogenization buffer 均質，均質完後以 39000rpm、4°C，超高速離心 30 分，取上清液為樣本，並儲存於 -70°C。

首先將 GSH substrate buffer 及 CDNB substrate buffer 回溫，再各取 1.5 ml 置入石英測光管中，再加入 20 ul sample，並迅速混合均勻，以波長 340 nm 掃描三分鐘，並以下列公式換算活性變化量：

$$1. C = A / \Delta A \times 1/9.6 \times 1/l$$

2. GST 之活性表示為 nmole/min/mg.

### 四、西方墨點法分析 GST、Ras、Raf、MEK、ERK1、ERK2、JNK2、PY54、PKC 蛋白之表現：

#### (A) 蛋白質定量：

利用 Coomassie brilliant blue G-250 會和蛋白質結合成藍色之複合物，於波長 595nm 有一較大之吸光值，以此定量蛋白質。

首先以 BSA (bovin serum albumin) 為蛋白質標準溶液，以換算各樣本細胞萃取液之蛋白質濃度。

取 100 ul 肝細胞萃取液加入 200 ul 蛋白質定量試劑組( protein assay dye, Bio-Rad )，補二次水置 1ml，於室溫下反應 5-10 分鐘，於波長 595nm 測吸光。

#### (B)樣本處理：

將已定量之 whole cell lysate，取 160 ug 的蛋白質樣本，加入適量之 5× loading dye，再以 whole cell lysis buffer 將各 sample 之體積補成一致，以 100°C 煮沸 5 分鐘，煮完後再迅速置於冰上至少 5 分鐘。

#### (C)鑄膠：

將電泳玻璃片洗淨，擦拭乾淨後，用厚度約 0.75mm 或 1.25 mm 之 spacer 為間隔裝好電泳片，並架到電泳座上固定，若欲做 GST 及 Ras 蛋白，則配製 12% 的下層 separating gel；若做 MEK、ERK1、ERK2、JNK2、及 P<sub>tyr</sub>-20 等蛋白，則配製 10% 的 separating gel，若做 Raf、PKC 蛋白，則需配製 8% 的 separating gel。

將配膠所需物質混和均勻後，直到液面離 well 約 1.5 cm 處為止，加入二次水覆蓋液面，待膠體凝固後，將上層的二次水吸乾，再配製上層 stacking gel 倒入，將電泳齒梳插入電泳片之 stacking gel 中，若有氣泡則上下移動齒梳，使氣泡脫離 stacking gel，待上層膠凝固後，抽出齒梳，用二次水清洗 well 數次，再將配好之整組電泳玻璃膠體，置入電泳槽中，準備將 sample 加入 well 中。

#### (D) 跑 SDS-PAGE：

將處理好之蛋白質樣本小心注入 well 中，勿使樣本溢出 well，其中一個 well 注入 protein standard marker (Bio-Rad)，再取 SDS-running

buffer 小心地將各 well 補滿，持續加入 SDS-running buffer 至內槽，直到蓋過最內側之玻璃上緣；外槽也以 SDS-running buffer 補至蓋過電導線為止。

連接電泳槽與電源供應器，打開電源，先以 100V 的電流跑過 stacking gel，直至色帶跑至 stacking gel 與 separating gel 之交界處，再調整電流為 150V，當色帶跑至底線時才停止電泳。

(C) 蛋白質樣本之轉漬 (Electrotransfer)：

電泳完畢後將膠體取出，截去多餘之部份，將膠體置於兩張經 transfer buffer 浸濕過的濾紙上，膠體上面再放上與膠體大小相同之硝化纖維紙 (硝化纖維紙也需事先經 transfer buffer 浸濕)，再放上兩張經 transfer buffer 浸濕過的濾紙，並用玻璃棒趕走夾在其中的氣泡，最後再以夾板 (內含海棉襯墊) 夾緊，放入轉漬槽中，同時將轉漬槽放在冷房中，以固定電流 0.1 安培轉漬 16-18 個小時。

(D) 免疫墨點法 (Immunoblot)：

轉漬完後將硝化纖維紙取出，用 PBS-T buffer 漂洗 5 分鐘，以 5% blocking buffer 於室溫下溫和作用 1 小時。倒掉 blocking buffer，再以 PBS-T buffer 漂洗三次，時間分別為 5、10、15 分鐘。換上一級抗體，於室溫下溫和作用一小時，再以 PBS-T buffer 快速漂洗三次，時間也是 5、10、15 分鐘。再換上二級抗體，於室溫下溫和作用 1 小時，再以 PBS-T buffer 漂洗三次，也是 5、10、15 分鐘。最後將硝化纖維紙放入透明塑膠套中，以濾紙吸掉硝化纖維紙上殘餘的 PBS-T buffer，再將 ECL substrate 覆蓋整個硝化纖維紙，將多餘的 ECL substrate 用面紙擦拭掉。將塑膠封套放到感光夾中，以 X 光片感光，再將 X 光片以顯影液顯影 1-3 分鐘，換上清水漂洗數次，再以定影液處理 1-3 分鐘，最後再以清水清洗乾淨即可 X 光片即可。

一、西方墨點法分析 PKC 蛋白之表現：

(A)、PKC 萃取：

將經藥劑處理後之肝細胞用 homogenization buffer A 均質，使用機械研磨 30 次使細胞破碎，將萃取液倒入超高速離心管，經超高速離心 (40000 rpm, 4°C, 1hr) 之後，所得上清液即為 PKC 的細胞質部份 (cytosolic fraction)，而沈澱物再加入適量之 Homogenization buffer B，並以超音波振盪器將沈澱物打散，然後在 4°C 下反應 1hr，並且每隔十分鐘用力搖晃離心管，使 Triton-X 100 能充分作用；一小時後再次以超高速離心 (40000 rpm, 4°C, 1hr) 此萃取液，離心所得之上清液即為 PKC 微粒部份 (particulate fraction；含細胞膜及細胞核之部份) (50)。經萃取得到的 PKC sample 分裝儲存在 -70°C 下。

(B) 西方墨點法之實驗步驟參考實驗方法四。

## 伍、結果

### 一、去氫梔子甘對肝細胞毒性的測定：

為了選用對細胞無毒性且適當的藥劑濃度進行實驗，分別以 25、50、100、150、200  $\mu\text{M}$  的 geniposide 處理大白鼠的初代培養肝細胞 24 小時，同時觀察不同濃度的去氫梔子甘對細胞存活率的影響。以 MTT assay 定量 geniposide 的細胞毒性；由於活細胞會將 MTT 還原成 formazan，以 isopropanol 將 crystal 溶解後，於波長 563 nm 測其吸光，以無 geniposide 處理者之吸光值定為 100% 存活率，再將經 geniposide 處理者與之比較。

實驗結果如(圖三)顯示，以低於 100  $\mu\text{M}$  的 geniposide 處理肝細胞，皆能維持 100% 的存活率，而在 150  $\mu\text{M}$  及 200  $\mu\text{M}$  的 geniposide 處理下，細胞存活率依次降為為 93% 及 85%，顯示以 100  $\mu\text{M}$  的 geniposide 作為實驗藥劑濃度是適當且無毒性的。

### 二、去氫梔子甘對 GST 酵素活性的影響

過去雖有研究指出，geniposide 會誘發 GST 活性的增加( 11 )，但因其使用材料為 Male Wistar rats，使用方法為直接灌食，且實驗時間達四天，皆與本實驗模型不符；因此，在本實驗欲再次確定 geniposide 是否會誘發 GST 酵素活性的增加，分別觀察 GST 酵素在不同藥劑處理時間及不同藥劑處理濃度條件下之變化情形。

#### (一)、不同藥劑處理時間對於 GST 酵素活性變化之影響：

本實驗選用 100  $\mu\text{M}$  geniposide 處理肝細胞，再依不同處理時間分別是：0, 3, 6, 9, 12, 24 小時收集細胞後，再進行 GST 酵素活性測定。

實驗結果顯示如(圖四)，以 100  $\mu\text{M}$  geniposide 處理肝細胞後，隨著處理時間增長，GST 酵素活性表現亦隨之增加，至 12 小時達最大值，此時所誘發 GST 酵素活性比 0 小時的 GST 酵素活性提高近四

倍；而在 24 小時之 GST 酵素活性則降低為近 1.5 倍。

## (二)、不同藥劑濃度處理對於 GST 酵素活性變化之影響：

依照之前實驗結果，採用 12 及 24 小時兩個時間點，再以不同濃度之 geniposide 分別是：0, 25, 50, 100, 150, 200  $\mu\text{M}$  處理肝細胞 12 及 24 小時，同時觀察 GST 酵素活性之變化情形。

首先，先看以不同濃度之 geniposide 處理肝細胞 12 小時後，GST 酵素活性之變化情形如(圖五)，結果顯示隨著 geniposide 濃度升高，GST 酵素活性亦相對地增加，當 geniposide 濃度為 100  $\mu\text{M}$  時，所誘發的 GST 酵素活性達最大值，約比對照組增加近 1.5 倍，當 geniposide 濃度為 150 或 200  $\mu\text{M}$  時，其 GST 酵素活性依序降低為 1.48 及 1.2 倍。

其次，再看以不同濃度之 geniposide 處理肝細胞 24 小時後，GST 酵素活性之變化情形如(圖六)，結果顯示隨著 geniposide 濃度升高，GST 酵素活性亦相對地增加，當 geniposide 濃度為 100  $\mu\text{M}$  時，所誘發的 GST 酵素活性達最大值，約比對照組增加近 3 倍，當 geniposide 濃度為 150 或 200  $\mu\text{M}$  時，其 GST 酵素活性依序降低為 2.3 及 2.6 倍。

綜合以上結果可知，geniposide 對於肝細胞 GST 酵素活性之影響，同時具有時間及濃度上的相關性。

## 三、去氫梔子甘對 GST 蛋白的影響：

在緒論中曾提及，GST 可因基因族之不同概分為 alpha 族、mu 族、pi 族、sigma 族、及 theta 族等五大類，分別分佈於不同區域，且其生理功能亦不盡相同。其中 GST alpha 對於代謝抗癌物具有良好的功效，而 GST mu 就保肝作用而言，扮演一個很重要的角色，故欲探討 geniposide 對於此兩類之 GST 蛋白表現之影響為何？

### (一)、不同藥劑處理時間對 GST 蛋白變化之影響：

本實驗選用 100  $\mu\text{M}$  geniposide 處理肝細胞，再依不同處理時間

分別是: 0, 3, 6, 9, 12, 24 小時收集細胞後，再以西方墨點法分析 GST 蛋白的表現，並以  $\alpha$ -tubulin 當作 internal control。依(圖七)結果可知，GST Ya 似乎沒有很大的變化；而在 GST Yb1 蛋白方面(圖八)，發現其變化量隨藥劑處理時間增長而提高，至 12 小時達最大值，約比 0 小時對照組增加約 1.6 倍，至 24 小時時，下降為 1.5 倍左右，同時在電泳圖上亦可清楚的看到在 GST Yb1 的位置是由兩條 bend 組成；至於在 GST Yb2 蛋白方面(圖九)，顯示其變化量隨藥劑處理時間增長而有漸漸提高之趨勢，在 24 小時達最大值，約比 0 小時對照組增加約 1.8 倍左右；因此，geniposide 對於 GST Yb1、Yb2 蛋白變化之影響有時間上之相關性，對於 GST Ya 蛋白變化之影響則較不顯著。

#### (二)、不同藥劑濃度處理對於 GST 蛋白變化之影響：

本實驗以不同濃度之 geniposide 分別是: 0, 25, 50, 100, 150, 200  $\mu$ M，處理肝細胞 12 小時後，再以西方墨點法分析 GST 蛋白的表現，並以  $\alpha$ -tubulin 當作 internal control。依(圖十) 結果可知，不同濃度之 geniposide 對 GST Ya 蛋白之影響並不一致，在 25 及 100  $\mu$ M 的 geniposide 處理下，有略為上升的現象，分別為對照組的 1.1 及 1.03 倍，而在 50 及 150  $\mu$ M 的 geniposide 處理下，有略為下降的現象，分別為對照組的 0.95 及 0.9 倍，至於在 200  $\mu$ M 的 geniposide 處理下，GST Ya 蛋白之表現和對照組相近；而在 GST Yb1 蛋白方面(圖十一)，發現其變化量隨藥劑處理濃度增加而提高，至 200  $\mu$ M geniposide 時達最大值，約比對照組增加約 1.23 倍，至於在 GST Yb2 蛋白方面(圖十二)，顯示其變化量隨藥劑處理濃度增加而有漸漸提高之趨勢，在 200  $\mu$ M geniposide 時達最大值達最大值，約比對照組增加約 1.15 倍左右；因此，geniposide 對於 GST Yb1、Yb2 蛋白變化之影響有濃度上之相關性，對於 GST Ya 蛋白變化之影響則較不一致。

#### 四、去氫梔子甘對 protein tyrosine kinase 蛋白的影響：

經由許多文獻及研究證實，protein tyrosine kinase 在細胞內之訊息傳導路徑佔有很重要之影響，故欲了解 Geniposide 對於細胞內蛋白磷酸化的影響為何？

(一)、不同藥劑處理時間對 ptyr54 蛋白變化之影響：

本實驗選用 100  $\mu$ M geniposide 處理肝細胞，再依不同處理時間分別是：0, 3, 6, 9, 12, 24 小時收集細胞後，再以西方墨點法分析 ptyr54 蛋白的表現，並以  $\alpha$ -tubulin 當作 internal control。依(圖十三)電泳結果可知，發現細胞內磷酸化蛋白的變化量隨藥劑處理時間增長而有漸漸增加之趨勢，尤其是在 6 及 9 小時間，其磷酸化之情形較為顯著，至於在 24 小時，其蛋白磷酸化之現象似有減緩。因此，geniposide 對於 ptyr54 蛋白變化之影響似乎也有時間上之相關性。

(二)、不同藥劑濃度處理對於 ptyr54 蛋白變化之影響：

本實驗以不同濃度之 geniposide 分別是：0, 25, 50, 100, 150, 200  $\mu$ M，處理肝細胞 9 小時後，再以西方墨點法分析 ptyr54 蛋白的表現，並以  $\alpha$ -tubulin 當作 internal control。依(圖十四)電泳圖結果可知，顯示其變化量隨藥劑處理濃度增加而有漸增之趨勢，尤其在 100 及 150  $\mu$ M geniposide 處理下，其蛋白磷酸化情形較顯著，而在 200  $\mu$ M geniposide 處理下，其蛋白磷酸化情形卻有減緩之趨勢；因此，geniposide 對於 ptyr54 蛋白變化之影響似乎也有濃度上之相關性。

五、去氫梔子甘對 Ras 蛋白的影響：

由於有研究證實，Ras 蛋白在整個訊息傳導路徑中，扮演較上游訊息傳遞者的角色，故欲了解 Geniposide 對於 Ras 蛋白變化之影響為何？

本實驗選用 100  $\mu$ M geniposide 處理肝細胞，再依不同處理時間分別是：0, 3, 6, 9, 12, 24 小時收集細胞後，再以西方墨點法分



析 Ras 蛋白的表現，並以  $\alpha$ -tubulin 當作 internal control。依(圖十五)電泳結果可知，Ras 蛋白在 9 小時後才表現，同時隨藥劑處理時間加長而有漸減之情形發生。

#### 六、去氫梔子甘對 Raf 蛋白的影響：

也有許多文獻指出，Raf 蛋白在整個訊息傳導路徑中，亦扮演上游訊息傳遞者的角色，故欲了解 Geniposide 對於 Raf 蛋白變化之影響為何？

##### (一)、不同藥劑處理時間對 Raf 蛋白變化之影響：

本實驗選用 100  $\mu$ M geniposide 處理肝細胞，再依不同處理時間分別是：0, 3, 6, 9, 12, 24 小時收集細胞後，再以西方墨點法分析 Raf 蛋白的表現，並以  $\alpha$ -tubulin 當作 internal control。依(圖十六)結果可知，自 3 小時至 9 小時間，Raf 蛋白之表現皆較 0 小時高出約 2.2 倍左右，至 12 小時時，其蛋白表現降為近 1.8 倍，至 24 小時，其蛋白表現又上升至 2.25 倍，此結果顯示，geniposide 影響 Raf 蛋白之表現，就時間發生而言屬於較早之時期。

##### (二)、不同藥劑濃度處理對於 Raf 蛋白變化之影響：

本實驗以不同濃度之 geniposide 分別是：0, 25, 50, 100, 150, 200  $\mu$ M，處理肝細胞 9 小時後，再以西方墨點法分析 Raf 蛋白的表現，並以  $\alpha$ -tubulin 當作 internal control。依(圖十七)之結果顯示，當藥劑濃度在 100  $\mu$ M 以下，隨著藥劑濃度之提昇，Raf 蛋白之表現亦隨之增加，而在 100  $\mu$ M 以上，隨著藥劑濃度之提昇，蛋白表現有隨之遞減之現象，其中以 100  $\mu$ M geniposide 對肝細胞中 Raf 蛋白之表現影響最大，約為對照組的 1.4 倍。

#### 七、去氫梔子甘對 MEK 蛋白的影響：

由與許多文獻及研究指出，MAPK cascade 在整個訊息傳導路徑中扮演一個很重要的角色，而 MEK 又為此路徑中之中心調控者，故欲了解 geniposide 對於 MEK 蛋白變化之影響為何？

(一)、不同藥劑處理時間對 MEK 蛋白變化之影響：

本實驗選用 100  $\mu$ M geniposide 處理肝細胞，再依不同處理時間分別是：0, 3, 6, 9, 12, 24 小時收集細胞後，再以西方墨點法分析 MEK 蛋白的表現，並以  $\alpha$ -tubulin 當作 internal control。依(圖十八)結果可知，發現 MEK 蛋白變化量隨藥劑處理時間增長而提高，MEK 蛋白最大表現量發生在 24 小時，約為對照組的 2.5 倍左右；因此，geniposide 對於 MEK 蛋白變化之影響具有時間上之相關性。

(二)、不同藥劑濃度處理對於 MEK 蛋白變化之影響：

本實驗以不同濃度之 geniposide 分別是：0, 25, 50, 100, 150, 200  $\mu$ M，處理肝細胞 9 小時後，再以西方墨點法分析 MEK 蛋白的表現，並以  $\alpha$ -tubulin 當作 internal control。依(圖十九)結果顯示，MEK 蛋白變化量隨藥劑處理濃度增加而有漸增之趨勢，至藥劑處理濃度達 200  $\mu$ M 時，MEK 蛋白之表現達最大值，約為對照組的 1.2 倍；因此，geniposide 對於 MEK 蛋白變化之影響具有濃度上之相關性。

八、去氫梔子甘對 ERK 蛋白的影響：

由結果七可知，geniposide 對於 MEK 蛋白之表現同時具有時間及濃度上之相關性，而許多文獻報告亦指出，ERK 蛋白位於 MEK 之下游，受 MEK 所調控，故欲進一步了解 geniposide 對於 ERK 蛋白變化之影響為何？

(一)、不同藥劑處理時間對 ERK 蛋白變化之影響：

本實驗選用 100  $\mu$ M geniposide 處理肝細胞，再依不同處理時間分別是：0, 3, 6, 9, 12, 24 小時收集細胞後，再以西方墨點法分

析 ERK 蛋白的表現，並以  $\alpha$ -tubulin 當作 internal control。首先比較 ERK1 之表現，依(圖二十 A)結果可知，以 geniposide 處理 9 小時以前，ERK1 之蛋白表現會隨處理時間增長而提高，最大表現值發生在 9 小時，約為對照組的 3.75 倍，而在 12 及 24 小時，ERK1 之表現分別降為 3.25 及 3.5 倍；其次比較 ERK2 之表現，依(圖二十 B)結果可知，以 geniposide 處理 12 小時以前，ERK2 之蛋白表現會隨處理時間增長而提高，最大表現值發生在 12 小時，約為對照組的 2 倍，而在 24 小時，ERK2 之表現則降為 1.5 倍

#### (二)、不同藥劑濃度處理對於 ERK 蛋白變化之影響：

本實驗以不同濃度之 geniposide 分別是：0, 25, 50, 100, 150, 200  $\mu$ M，處理肝細胞 9 小時後，再以西方墨點法分析 ERK 蛋白的表現，並以  $\alpha$ -tubulin 當作 internal control。首先比較 ERK1 之蛋白變化，依(圖二十一 A) 結果可知，當 geniposide 濃度在 150  $\mu$ M 以下，隨著藥劑濃度之提昇，ERK1 蛋白之表現亦隨之增加，其中以 150  $\mu$ M geniposide 處理細胞時，ERK1 之蛋白表現達到最大，約為對照組的 1.4 倍，而以 200  $\mu$ M geniposide 處理細胞時，ERK1 之表現反而降低為對照組的 1.2 倍；其次比較 ERK2 之蛋白變化，依(圖二十一 B) 結果可知，當 geniposide 濃度在 100  $\mu$ M 以下，隨著藥劑濃度之提昇，ERK2 蛋白之表現亦隨之增加，其中以 100  $\mu$ M geniposide 處理細胞時，ERK2 之蛋白表現達到最大，約為對照組的 1.3 倍，而以 150 或 200  $\mu$ M geniposide 處理細胞時，ERK2 之表現則分別遞減為對照組的 1.28 及 1.1 倍。

#### 九、去氫梔子甘對 JNK2 蛋白的影響：

由許多文獻及研究亦指出，MEK 會藉由調控 JNK 來進一步影響細胞生理，故欲進一步了解 geniposide 對於 JNK2 蛋白變化之影響為何？

#### (一)、不同藥劑處理時間對 JNK2 蛋白變化之影響：

本實驗選用 100  $\mu$ M geniposide 處理肝細胞，再依不同處理時間分別是：0, 3, 6, 9, 12, 24 小時收集細胞後，再以西方墨點法分析 JNK2 蛋白的表現，並以  $\alpha$ -tubulin 當作 internal control。依(圖二十二)結果可知，以 geniposide 處理 6 小時以前，JNK2 之蛋白表現會隨處理時間增長而提高，最大表現值發生在 6 小時，蛋白表現量約為對照組的 1.35 倍，而在 9, 12 及 24 小時，JNK2 蛋白之表現分別遞減為對照組的 1.1, 1.08 及 1.01 倍。

#### (二)、不同藥劑濃度處理對於 JNK2 蛋白變化之影響：

本實驗以不同濃度之 geniposide 分別是：0, 25, 50, 100, 150, 200  $\mu$ M，處理肝細胞 9 小時後，再以西方墨點法分析 JNK2 蛋白的表現，並以  $\alpha$ -tubulin 當作 internal control。依(圖二十三)結果可知，JNK2 之蛋白變化大致上隨藥劑濃度之增加而遞增，除了在 100  $\mu$ M 時有些微之減少，其中以 200  $\mu$ M geniposide 處理細胞時，JNK2 之蛋白表現達到最大，約為對照組的 1.25 倍。

#### 十、PD 98059 對於去氫梔子甘誘導 GST 酵素活性的影響：

綜合前面數項之結果可知，MAPK cascade 可能和 geniposide 誘導 GST 酵素活性及蛋白表現之過程有關，另由文獻報告指出，PD 98059 是 MEK 的專一性抑制劑，可藉由抑制 MEK 之活性，block MAPK cascade，故本實驗希望藉由 PD 98059 來反證 MAPK cascade 和 geniposide 誘導 GST 酵素及蛋白表現過程間之關連性。

本實驗以 100  $\mu$ M geniposide 及 25  $\mu$ M PD98059 共同處理肝細胞，再依不同處理時間分別是：0, 3, 6, 9, 12, 24 小時收集細胞後，再進行 GST 酵素活性測定。

實驗結果顯示如(圖二十四)，以 100  $\mu$ M geniposide 及 25  $\mu$ M PD98059 共同處理肝細胞後，隨著藥劑處理時間增長，GST 酵素活性

表現雖亦隨之增加，有時間上之相關性，但是，其酵素活性最大值由原來的 12 小時變為 24 小時，同時其酵素活性變化僅較對照組增加 1.33 倍。因此，PD 98059 似乎可使 geniposide 所誘發 GST 酵素活性降低，這也說明了，MAPK cascade 似乎和 geniposide 誘導 GST 酵素活性之過程有關。

#### 十一、PD 98059 對於去氫梔子甘誘導 GST 蛋白表現的影響：

本實驗以 100  $\mu$ M geniposide 及 25  $\mu$ M PD98059 共同處理肝細胞，再依不同處理時間分別是：0, 3, 6, 9, 12, 24 小時收集細胞後，再以西方墨點法分析 GST 蛋白之表現並以  $\alpha$ -tubulin 當作 internal control。依(圖二十五)結果可知，對 GST Ya 而言，其蛋白表現似乎沒有很大的變化；就 GST Yb1 而言如(圖二十六)，在 12 小時之前，其蛋白表現似乎受到抑制而減少，9 小時為其表現量最低點，約為對照組的 0.9 倍，9 小時後 GST Yb1 之表現又漸增，至 24 小時時，GST Yb1 的表現又提昇為對照組的 1.1 倍左右；至於 GST Yb2 蛋白之表現如(圖二十七)，自加藥處理 3 小時起蛋白表現即降至最低點，約為對照組的 0.6 倍，其後隨藥劑處理時間增長而遞增，直至 24 小時才恢復為和對照組相同之表現量。因此，PD 98059 似乎可使 geniposide 所誘發 GST Yb1、Yb2 蛋白表現降低，這也說明了，MAPK cascade 似乎也和 geniposide 誘導 GST 蛋白表現之過程有關。

#### 十二、去氫梔子甘對 PKC 蛋白的影響：

經由以前文件及很多實驗證實 PKC pathway 在細胞內 signal transduction 佔有很重要的影響，因此想去了解 geniposide 對 PKC pathway 是否有影響？

本實驗選用 100  $\mu$ M geniposide 處理肝細胞，再依不同處理時

間分別是：0, 3, 6, 9, 12, 24 小時收集細胞後，同時製備其 cytosol 及 particulate fraction 的蛋白樣本，再以西方墨點法分析其蛋白的表現，並以  $\alpha$ -tubulin 當作 internal control。首先就 PKC- $\alpha$  蛋白之表現而言如(圖二十九、三十)，在 cytosol 方面，各時間點間之蛋白變化都較對照組低，變化情形自 3 小時起蛋白表現逐漸增加，持續至 9 小時，此時蛋白變化為對照組的 0.95 倍，至 12 小時時，蛋白變化又降低至對照組的 0.85 倍，至 24 小時，其蛋白表現量又回復至與對照組相同；在 particulate 方面，除了在 9 小時其蛋白表現降低為對照組的 0.8 倍外，其餘各時間點之蛋白表現則隨藥劑處理時間增長而遞增，至 24 小時時，其蛋白表現約為對照組的 1.4 倍左右，此結果顯示 PKC  $\alpha$  似有活化之現象。

其次就 RACK 蛋白表現而言如(圖二十九、三十一)，就 cytosol 方面，除了在 6 小時其蛋白表現降低為對照組的 0.96 倍外，其餘各時間點之蛋白表現則隨藥劑處理時間增長而遞增，至 24 小時時，其蛋白表現約為對照組的 1.4 倍左右；在 particulate 方面，變化情形自 3 小時起蛋白表現逐漸增加持續至 24 小時，3 小時為蛋白表現之最低點，約為對照組的 0.7 倍，24 小時為蛋白表現之最高點，約為對照組的 1.1 倍左右，此結果顯示 RACK 似無活化之情形。

最後再就 PKC  $\gamma$  蛋白之表現而言如(圖三十二、三十三)，在 cytosol 方面，其蛋白表現變化情形先自 0 小時增至 3 小時，隨後蛋白表現便持續遞減至 9 小時，此時之 PKC  $\gamma$  蛋白表現量最低，約為對照組的 0.6 倍，9 小時後 PKC  $\gamma$  蛋白表現再持續遞增至 24 小時，此時之 PKC  $\gamma$  蛋白表現量最高約為對照組的 1.15 倍；在 particulate 方面，除了 6 小時 PKC  $\gamma$  蛋白表現量最低，約為對照組的 0.8 倍，其餘各時間點之 PKC  $\gamma$  蛋白表現皆與對照組相近，無很大之差異，此結果亦顯示 PKC  $\gamma$  似無活化之情形。

## 陸、討論

本論文利用大白鼠初代培養肝細胞為工具，探討 geniposide 是否會誘導解毒酵素 GST 之蛋白及酵素活性，同時進一步釐清其誘導過程中之訊息傳導路徑，獲致以下結論：

- (1) Geniposide 不但可誘發鼠肝細胞中 GST 酵素活性之提昇，同時也會誘導部份 GST 蛋白(如 GST Yb1、Yb2)之表現。
- (2) MAPK cascade 在 geniposide 誘導 GST 表現之過程中，似乎扮演一重要之角色。
- (3) 在 geniposide 誘導 GST 表現之過程中，PKC  $\alpha$  似乎也佔有一影響之地位。

以下就本論文之結果部份提出討論：

### 一、 Geniposide 誘導 GST 酵素活性之變化：

雖然已有文獻指出 Geniposide 會誘導 GST 之酵素活性( 11 )，但因其實驗材料及方法皆不同，為了再次驗證此結果，進行 GST 酵素活性測定，由實驗結果(圖四, 五, 六)可看出，geniposide 對 GST 酵素活性之影響同時具有時間及濃度之相關性，就 Time course 之酵素活性變化而言，酵素活性最高發生於 12 小時，但就 Dose response 之結果發現，24 小時之活性變化似較 12 小時之變化還高，推測可能原因為老鼠個體間之差異所致，因做初代肝細胞培養，每次所獲得之細胞數有限，實驗過程中也發現，以越年輕之老鼠為材料，所測得之活性亦越高。

### 二、 Geniposide 影響 GST 蛋白表現：

由於實驗結果顯示 geniposide 的確會誘發 GST 酵素活性之提昇，欲進一步了解，就蛋白層級方面是否也有相對之變化？

就老鼠而言，其 GST 依特性之不同分為三類：1. GST alpha: 由 Ya 單

體組成；2. GST mu: 由 Yb 單體所組成；3. GST pi: 由 Yp 單體所組成。(25)，其中 GST Yp 在肝細胞變成腫瘤細胞時會大量表現，由於本實驗所用之工具為大白鼠初代培養細胞，為正常細胞，故研究重點著重於 GST alpha 及 GST mu 兩類蛋白，而這兩類蛋白又以 GST mu 和保肝作用較密切，而實驗結果顯示(如圖七 — 圖十二)geniposide 所誘導 GST 蛋白表現主要為 GST Yb1 及 Yb2，對 GST Ya 則無明顯之影響，也和之前所提之論點相符，顯示 geniposide 所誘發之 GST 蛋白，主要為 GST mu 而非 GST alpha。

三、MAPK cascade 在 geniposide 誘發 GST 過程中所扮演之角色：

許多文獻報告及研究皆指出，MAPK cascade 在訊息傳導路徑中佔有很重要之角色，其中 protein kinase 為其主要成員，它會對下游蛋白分子進行磷酸化，並引發一連串之反應，並進而調控細胞生理；故實驗中首先觀察 geniposide 對細胞內蛋白分子磷酸化之情形(如圖十三，十四)，電泳結果顯示蛋白磷酸化較顯著之情形發生於 9 小時以前，較 GST 蛋白表現更早，而在 dose response 方面顯示，在 100  $\mu$  M geniposide 的處理下，細胞內蛋白磷酸化之現象最為顯著，而以 150 及 200  $\mu$  M geniposide 的處理時，蛋白磷酸化之現象反而有減緩之趨勢，推測可能因藥害作用所致。

其次再觀察 MAPK cascade 上游之訊息傳遞調節者 — Ras 及 Raf 蛋白之表現(如圖十五—十七)，其中 Ras 之表現在 9 小時才有表現，而 Raf 表現時間點則自 3 小時起即有明顯之變化，顯示 Ras 所扮演之角色可能較為間接，而 Raf 蛋白和 geniposide 誘發 GST 之過程較為密切。接著即進入 MAPK cascade 之探討。

另外，MAPK cascade 之活化主要經由 MEK 所調控，故先觀察 MEK 之表現(如圖十八、十九)，結果顯示其蛋白表現在時間 dose response 及皆有相關性，接著即進入 MAPK cascade 之探討。



近來已有研究指出 MAPK cascade 在抗癌作用及解毒酵素誘導之過程中扮演一重要調節之角色( 51 ,52 )；先就 ERK 而言，實驗結果顯示(如圖二十、二十一)，ERK1 及 ERK2 之蛋白表現，不論於時間點或 dose response 方面皆有一致性，就時間表現而言，在 9 小時前有時間之相關性，就 dose response 而言，在 150  $\mu$ M 以下有濃度之相關性，顯示 ERK1 及 ERK2 似乎也參與 geniposide 誘導 GST 表現之過程中。再就 JNK2 而言(如圖二十二、二十三)，其蛋白表現最大量發生於 6 小時，比 ERK 之時間更早，至於在濃度之表現上，大致呈現遞增之趨勢，顯示 JNK2 可能也與 geniposide 誘導 GST 表現之過程有關，且其調控作用之時間可能較 ERK 更早。

為了再次驗證 MAPK cascade 在 geniposide 誘導 GST 表現之過程中扮演一重要調控角色，於實驗過程中加入 PD98059 和 geniposide 共同處理細胞；由許多研究證實 PD98059 是 MEK 的專屬性抑制劑，它能有效抑制 MEK 之活性，進一步阻礙 MAPK cascade 之活化。實驗結果如(圖二十四)，顯示加入 PD98059 後，GST 之酵素活性雖有逐漸增加之趨勢，但其增加之幅度較未加入 PD98059 處理前降低許多，以 12 小時之處理時間為例，未加入 PD98059 時 GST 酵素活性是對照組的 2.67 倍，當加入 PD98059 之後，GST 酵素活性則降為對照組的 1.33 倍；就 GST 蛋白層級之表現而言(如圖二十五—二十七)當加入 PD98059 之後，GST Yb1、Yb2 之蛋白表現皆明顯受到抑制，但在 24 小時之蛋白表現，確有明顯上升之趨勢，推測可能有其他之訊息傳導路徑參與其中，至於詳細情形，仍有待進一步實驗證據來確定。

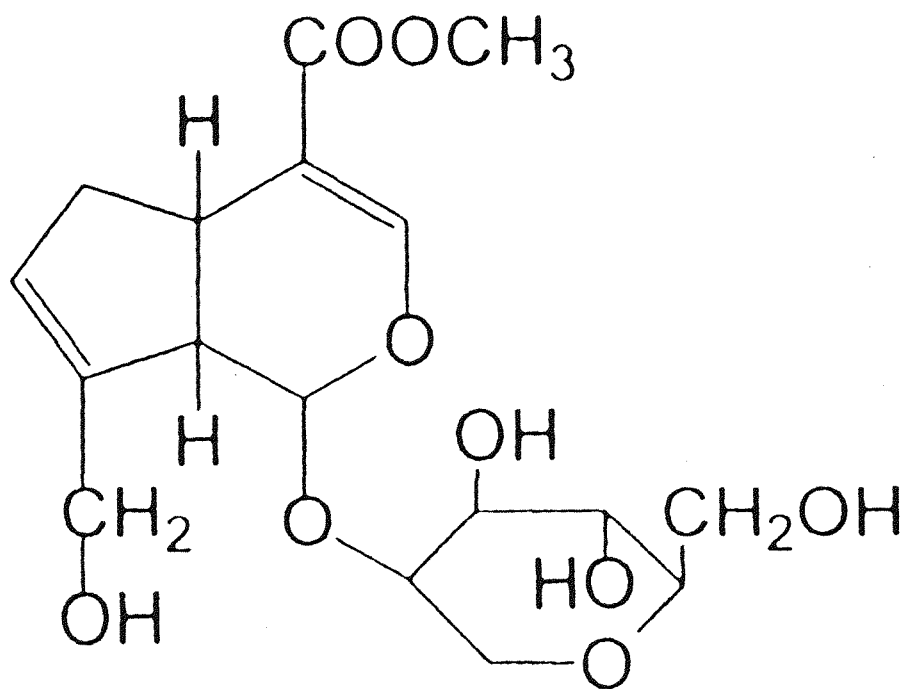
四、PKC 在 geniposide 誘發 GST 過程中所扮演之角色：

PKC 於 1977 年，首先由 Nishizuka 等人所發現，隨後即受到廣泛的重視與研究( 53 )。PKC 之活化需要鈣離子、磷酸酯質及 DAG(Diacylglycerol) 之共同作用，與細胞內之訊息傳導作用有關

( 54 )，當 PKC 由細胞質轉移至細胞膜時，即造成 PKC 之活化，而活化後之 PKC 會對下游蛋白如 Histone，EGF receptor 等進行磷酸化，同時引發一連串之訊息傳遞，並進一步影響細胞生理。( 55 , 56 )。

已有研究證實，PKC  $\alpha$  於許多細胞中可直接磷酸化 Raf，並進而活化 Raf ( 57)；亦有證據顯示 TPA 之癌促化作用，是直接活化 PKC 在經由 Raf 活化 MEK、MAPK cascade，進而促進細胞之生長( 58, 59 )；而依結果(如圖二十九、三十)顯示，geniposide 似乎會促使 PKC  $\alpha$  活化，且其影響之時期似乎也較長；而另兩個 isoform - PKC  $\gamma$ 、RACK 則似乎較無明顯之活化情形，有關這個部份仍有待進一步之實驗來證明。

此外，也有許多證據顯示 Antioxidant/ Electrophile-Responsive Element ( ARE/ERE )、Xenobiotic-Response Element ( XRE )、AP-1 site 和解毒酵素之誘發過程有關(46)，這個部份也需再更深入的探討。



**Fig 1. Structure of geniposide.**

天然萃取物 — Geniposide

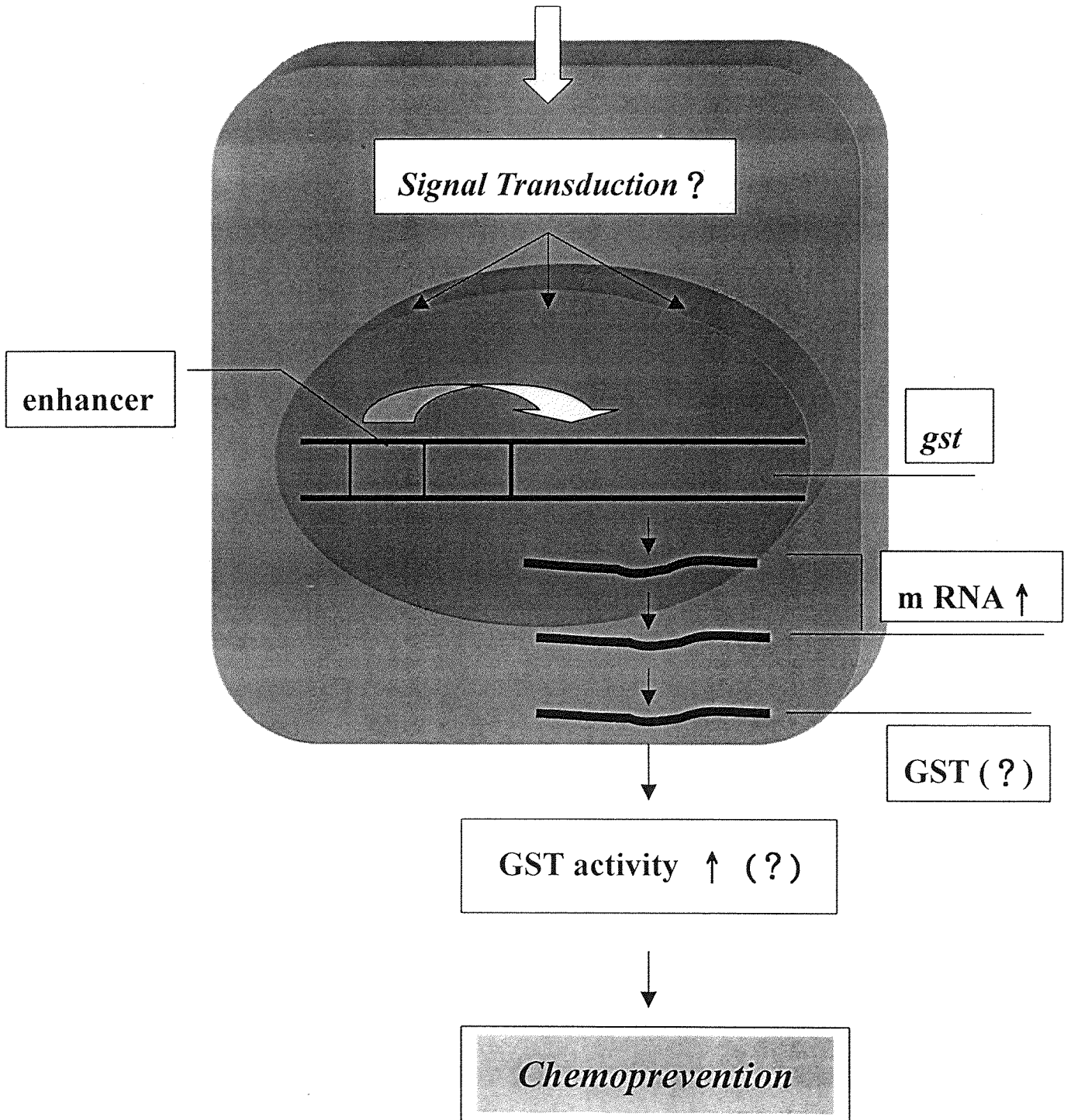


Fig. 2. The presumptive mechanism of geniposide-induced GST activity.

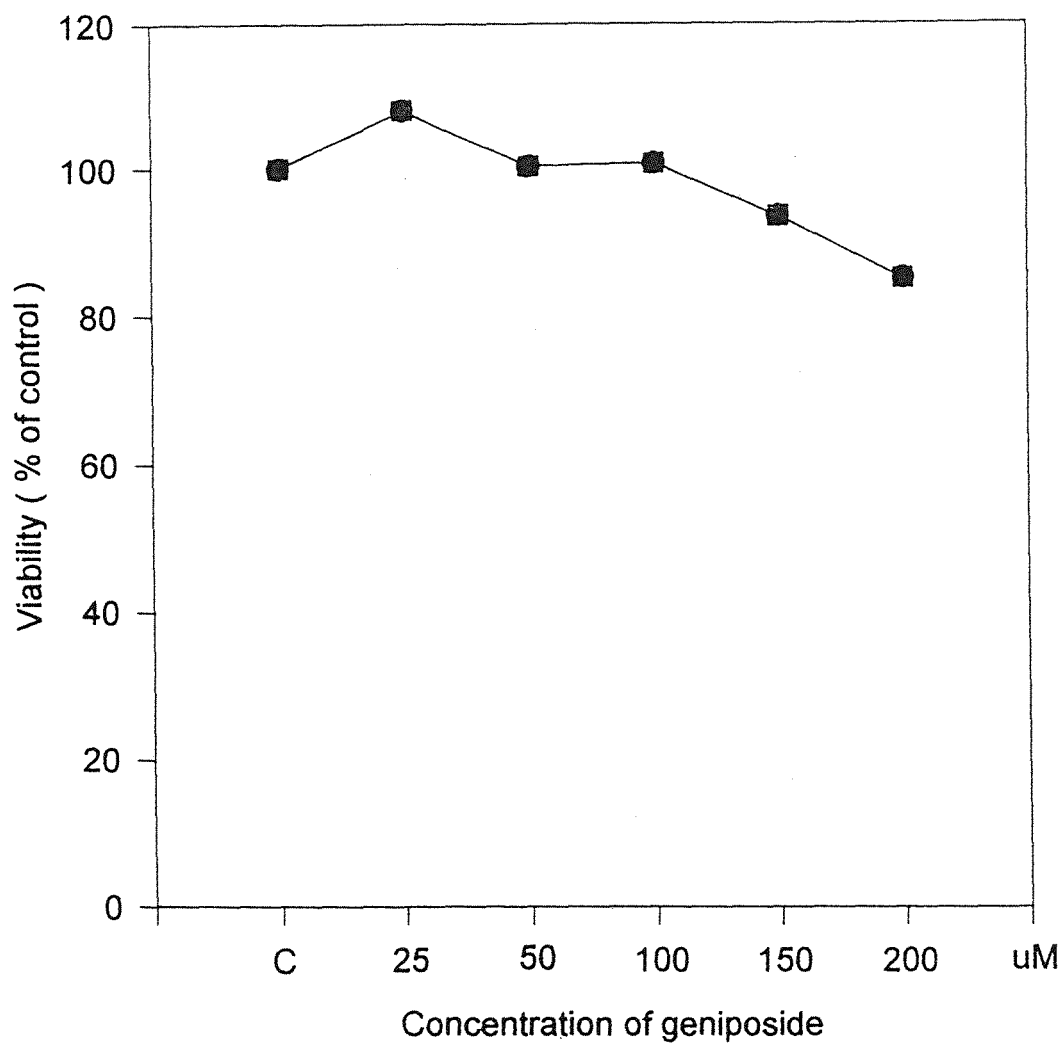
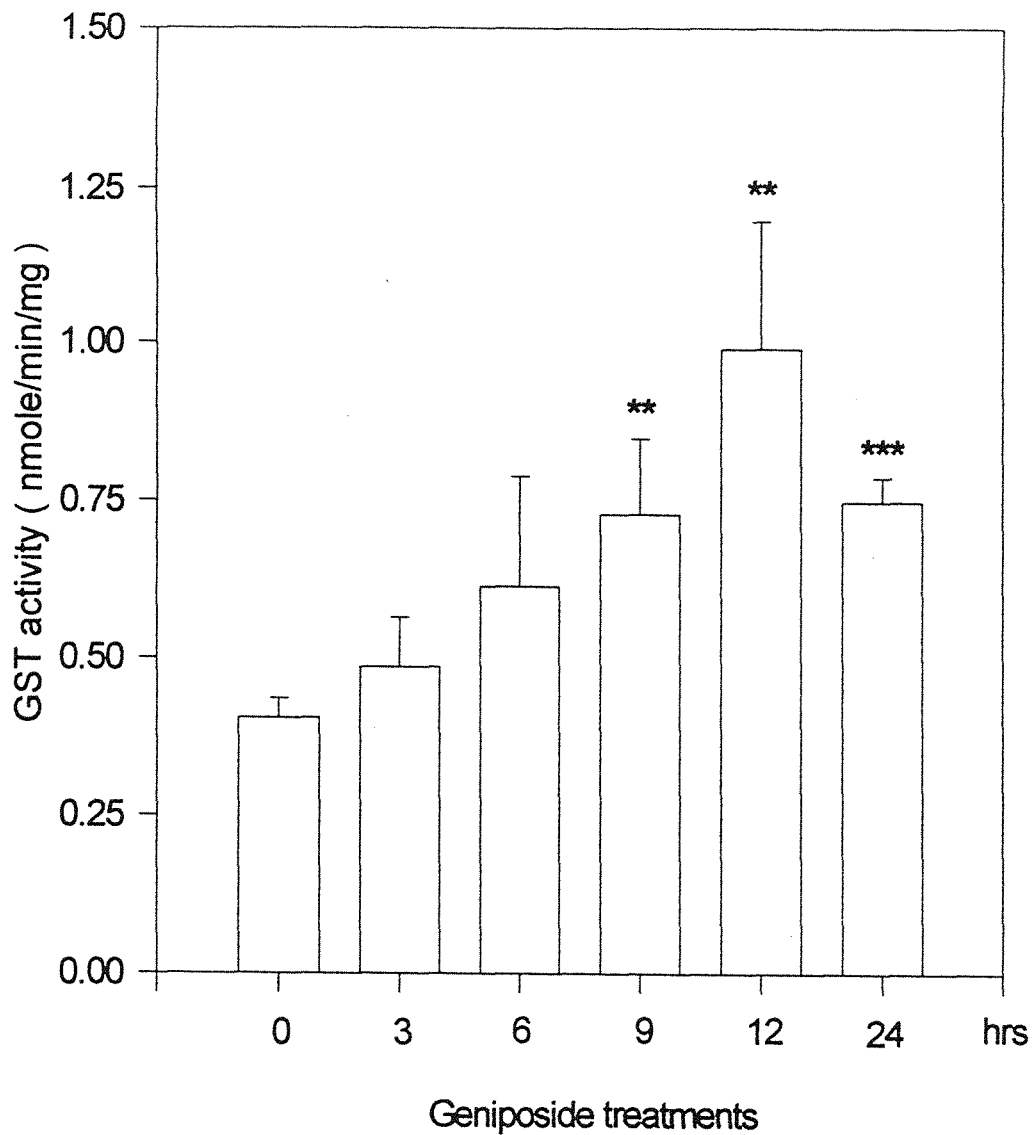


Fig. 3. The cytotoxicity of geniposide analyzed by MTT assay. The primary culture of rat hepatocyte cells ( $1 \times 10^5$  cells/well) were treated with different concentration of geniposide for 24 hours and then, were cultured in the presence of MTT for 4 hours. The medium was removed, one milliliter of isopropanol was added to the cells to dissolve the formazan crystal. The absorbance was determined at 563 nm.



**Fig. 4. Time course of geniposide induced Glutathione-S-transferase activity in primary hepatocyte culture. Hepatocyte was treated by geniposide ( 100  $\mu$ M ) for the time indicated.**

**\*\* p < 0.01 , compared with 0 hr.**

**\*\*\*p < 0.001 , compared with 0 hr.**

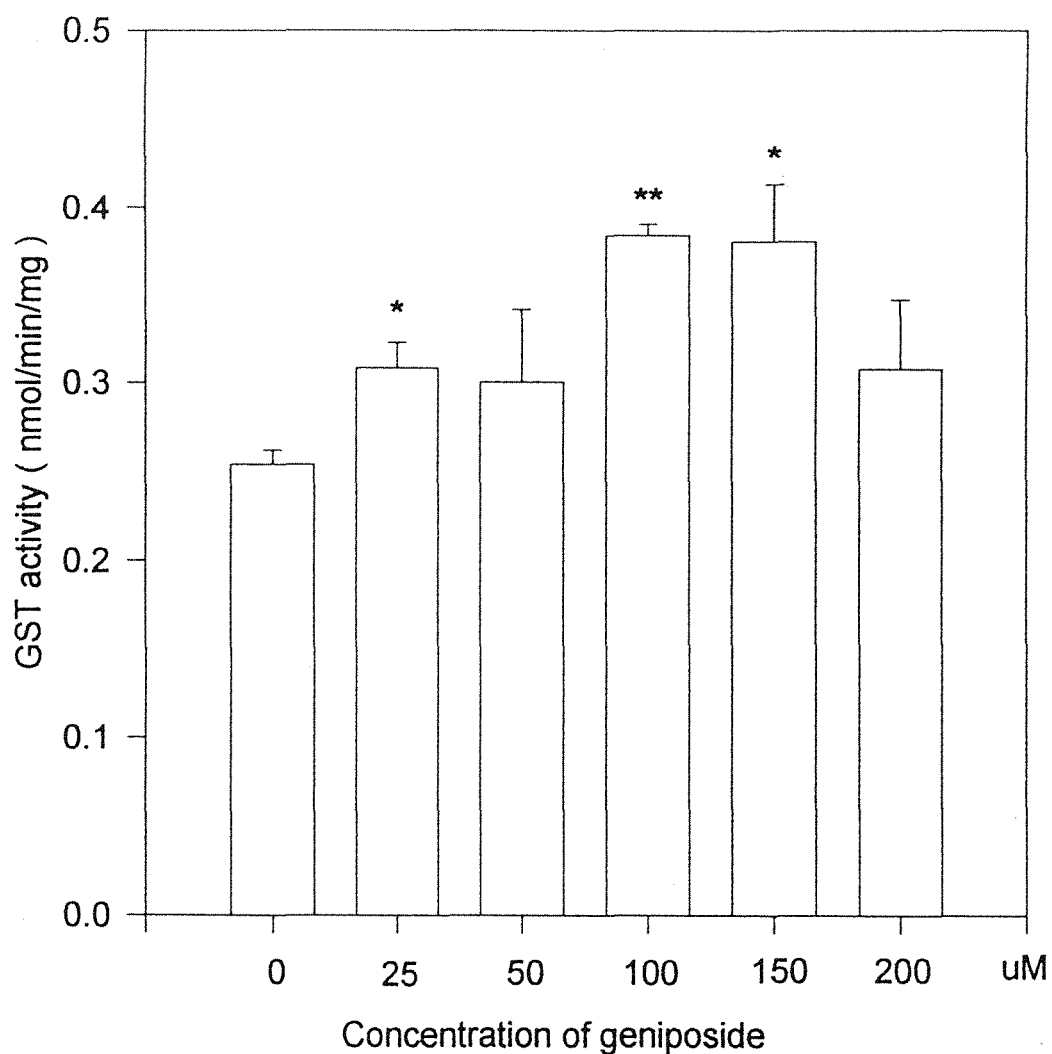


Fig. 5 Effects of various concentrations of geniposide on GST enzyme activity in rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with different concentrations ( 0, 25, 50, 100, 150, 200  $\mu$ M ) of geniposide for 12 hours. GST activity was determined spectrophotometrically using CDNB as substrates and is expressed in the unit of nmole/min/mg. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of three experiments.

Significantly different from control : \*p < 0.05 ; \*\*p < 0.01.

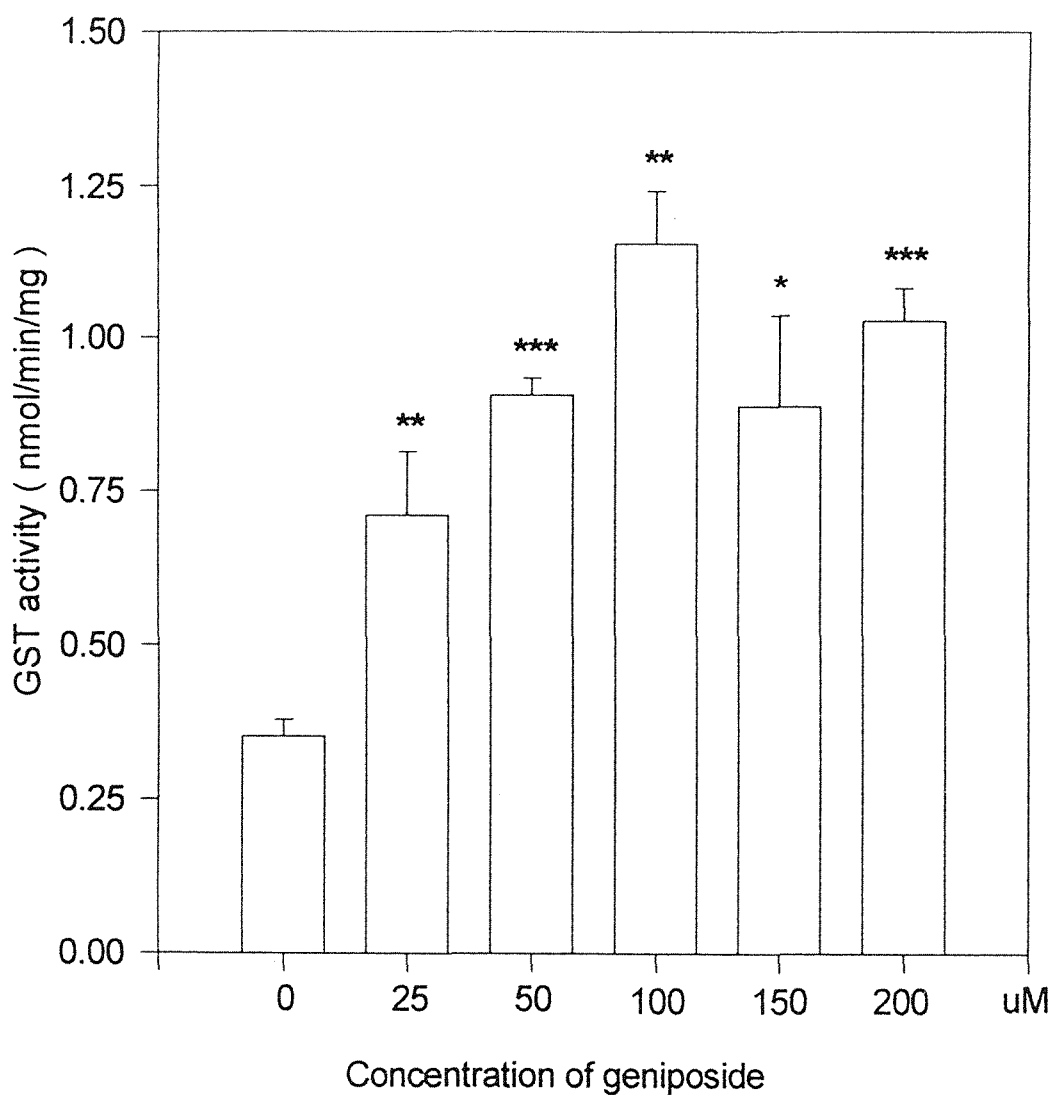


Fig. 6. Effects of various concentrations of geniposide on GST enzyme activity in rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with different concentrations ( 0,25,50,100,150,200  $\mu$  M ) of geniposide for 24 hours. GST activity was determined spectrophotometrically using CDNB as substrates and is expressed in the unit of nmole/min/mg. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of three experiments. Significantly different from control : \*p < 005 ; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001.



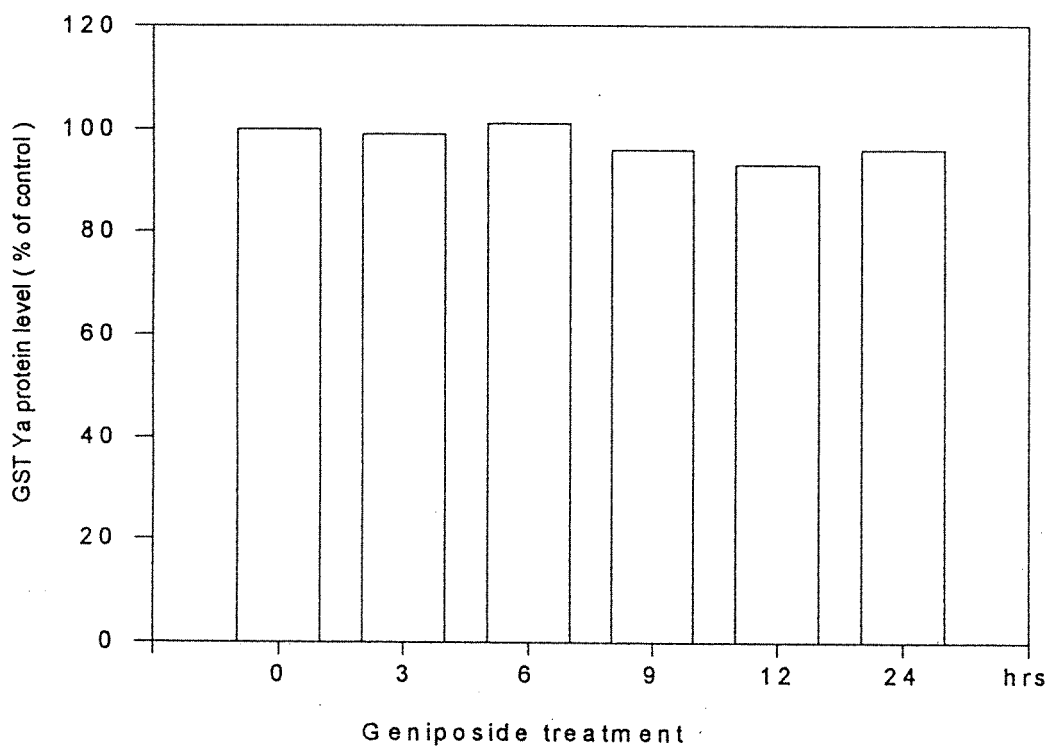
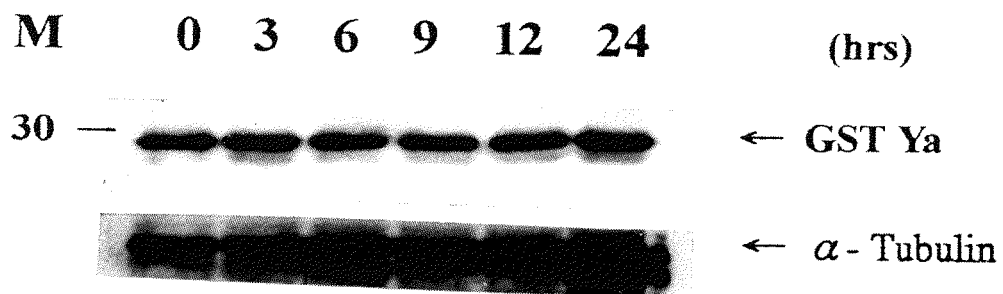


Fig. 7 Time course of the effect of geniposide on GST Ya protein level in rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with geniposide (100 μM) for the time indicated. Hepatocyte homogenates were analyzed by western blotting. Anti-α-tubulin antiserum was used for internal control.

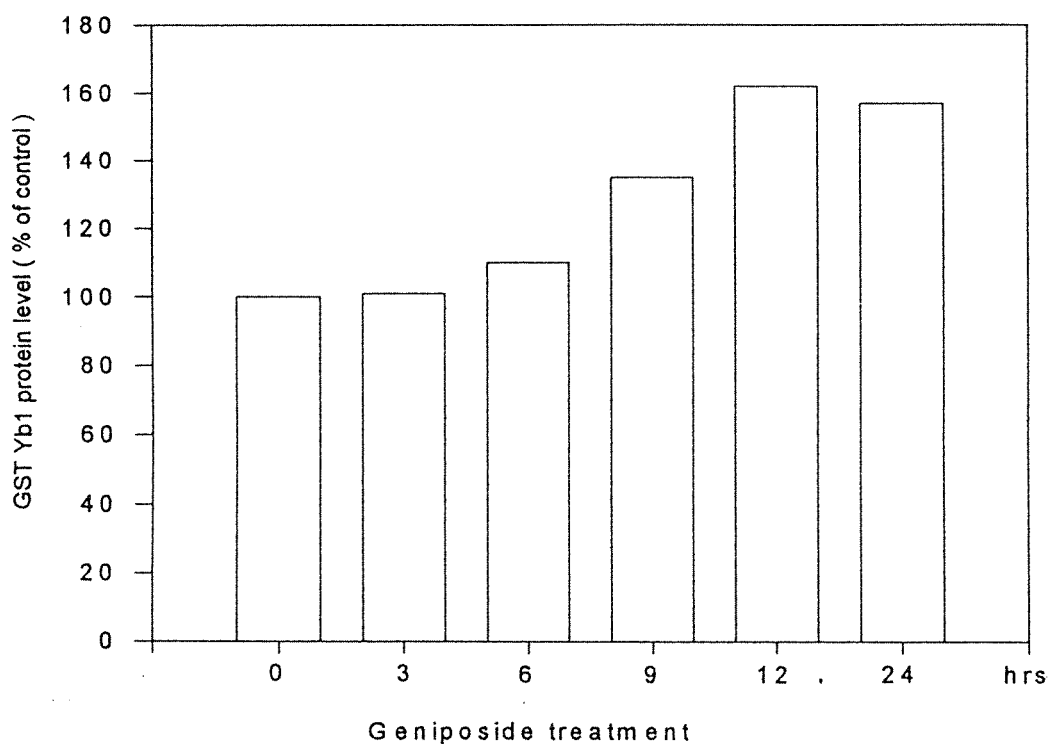
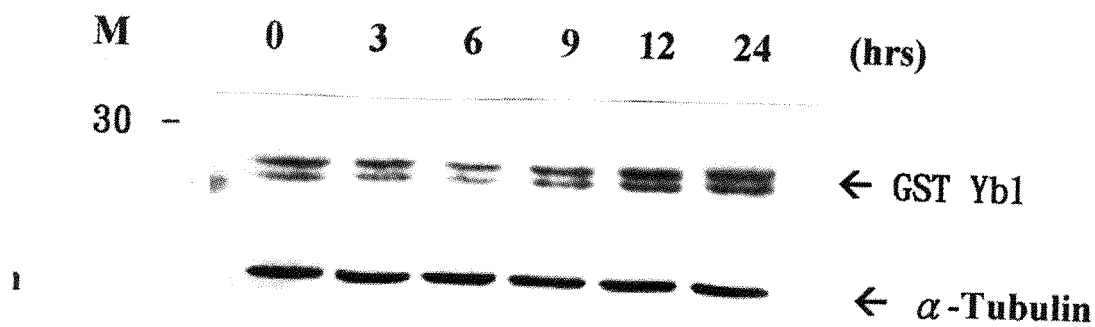


Fig. 8 Time course of the effect of geniposide on GST Yb1 protein level in rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with geniposide (100  $\mu$ M) for the time indicated. Hepatocyte homogenates were analyzed by western blotting. Anti- $\alpha$ -tubulin antiserum was used for internal control.

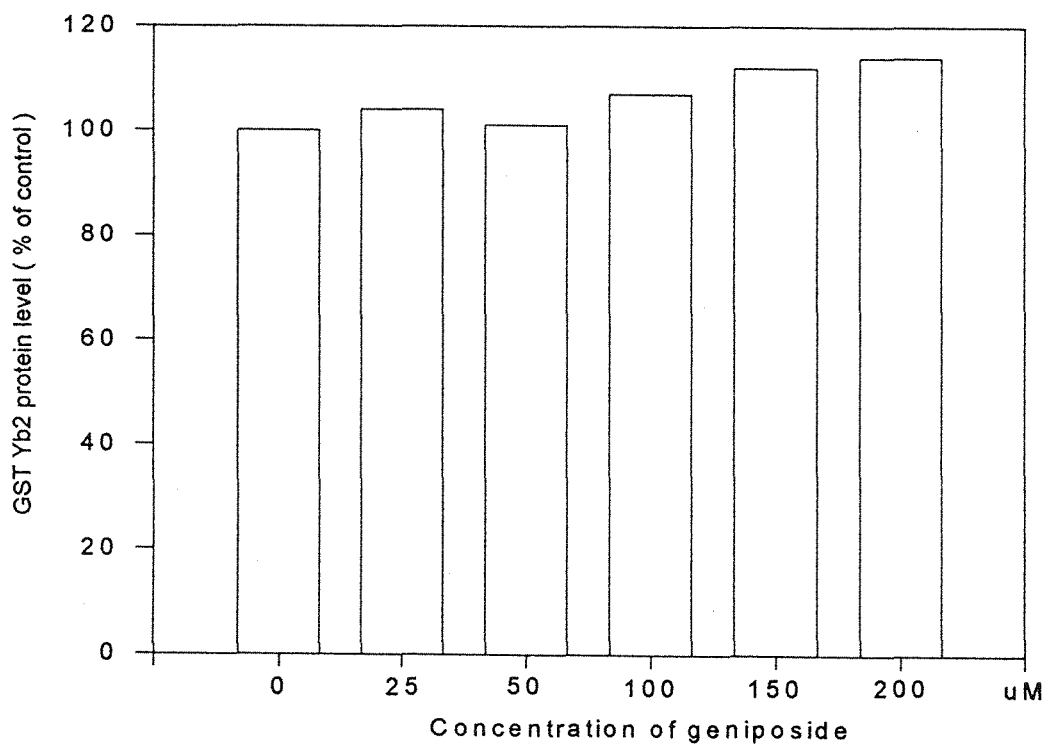
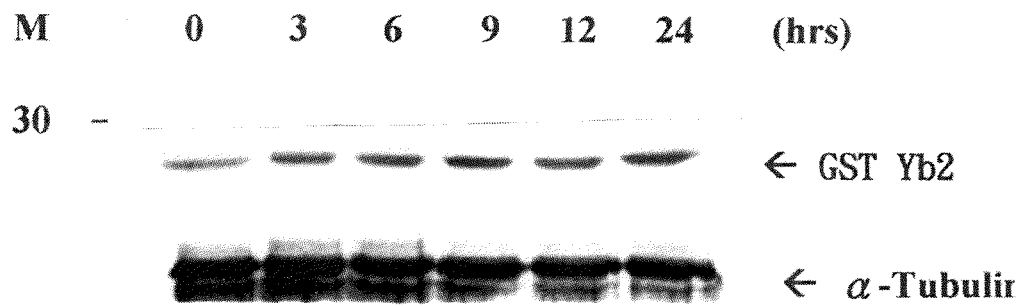


Fig. 18. Dose response of the effect of geniposide on GST Yb2 protein level in rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with various concentration of geniposide for 12 hours. Hepatocyte homogenates were analyzed by western blotting. Anti- $\alpha$ -tubulin antiserum was used for internal control.

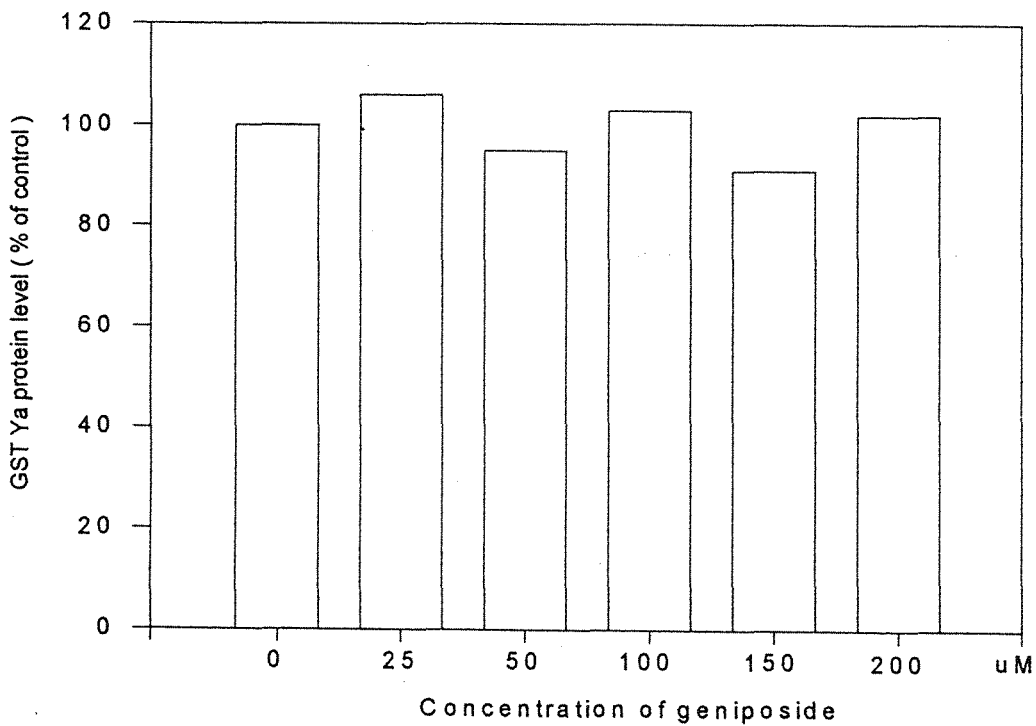
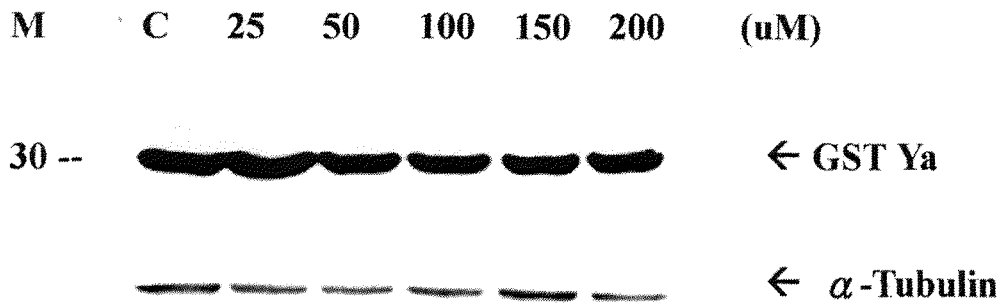


Fig. 10. Dose response of the effect of geniposide on GST Ya protein level in rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with various concentration of geniposide for 12 hours. Hepatocyte homogenates were analyzed by western blotting. Anti- $\alpha$ -tubulin antiserum was used for internal control.

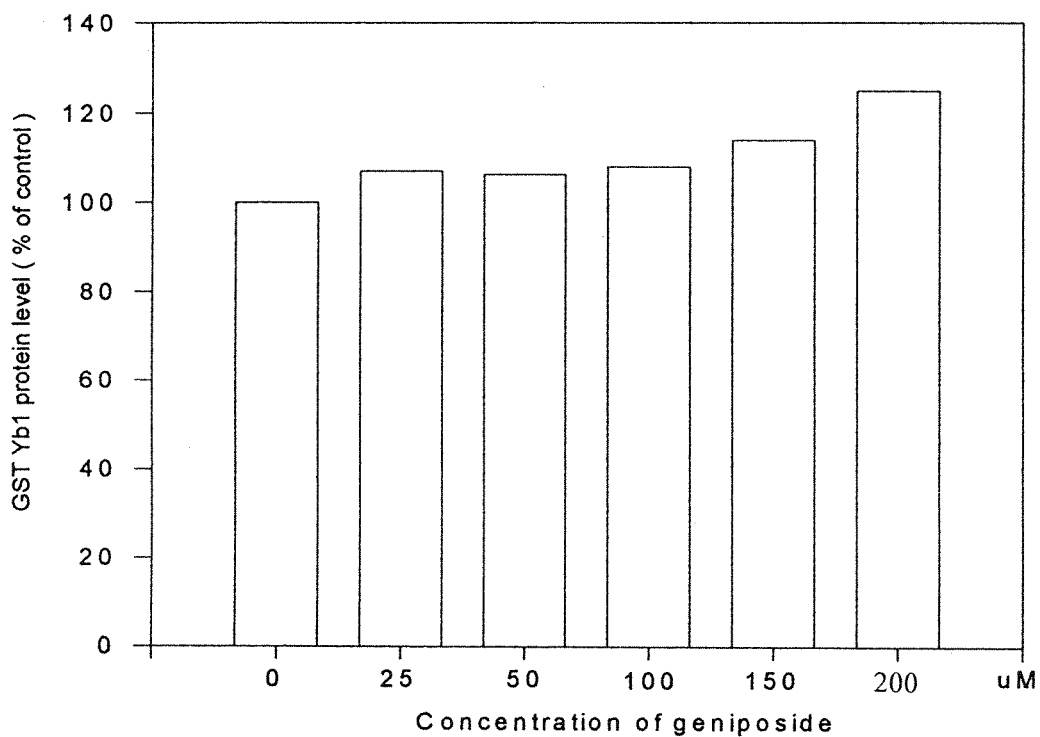
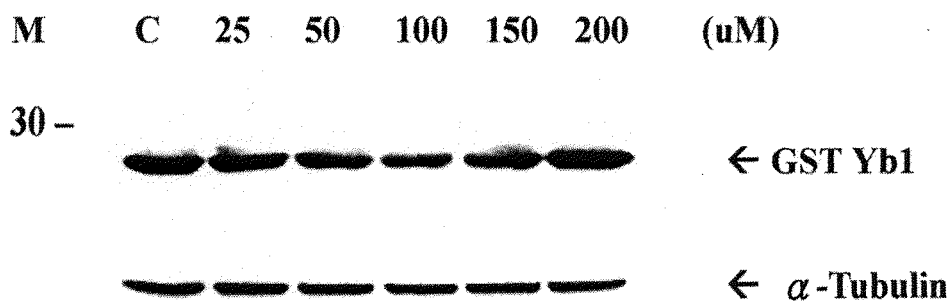


Fig. 11. Dose response of the effect of geniposide on GST Yb1 protein level in rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with various concentration of geniposide for 12 hours. Hepatocyte homogenates were analyzed by western blotting. Anti- $\alpha$ -tubulin antiserum was used for internal control.

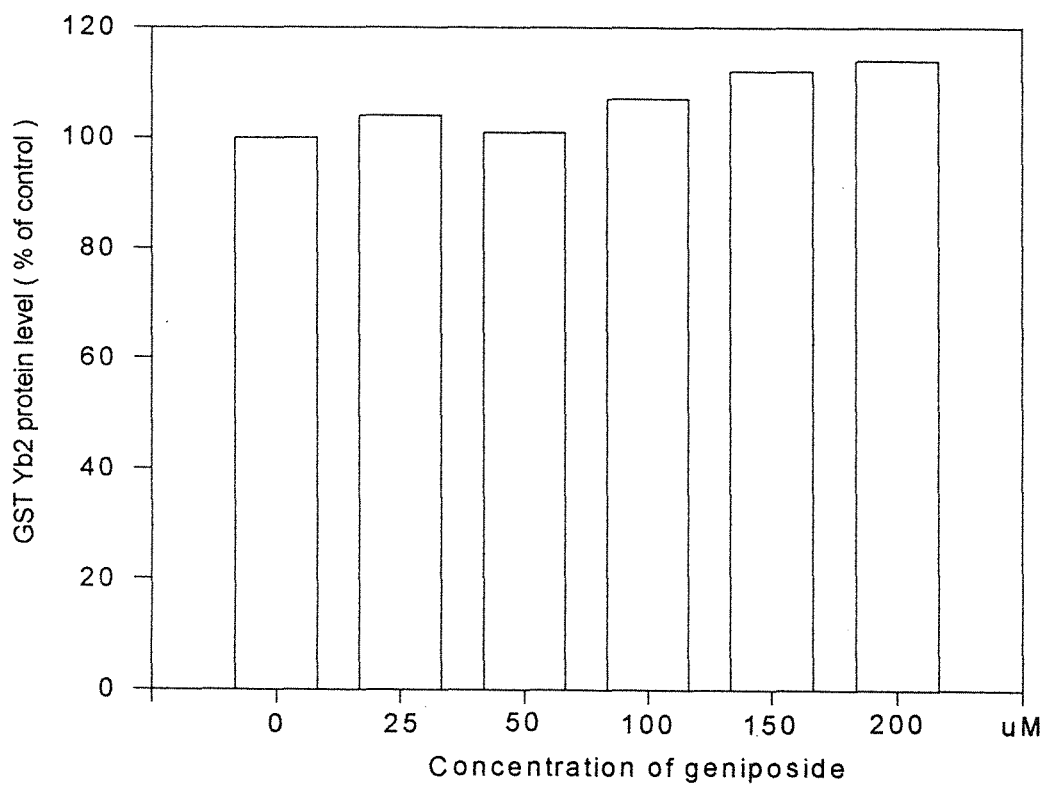
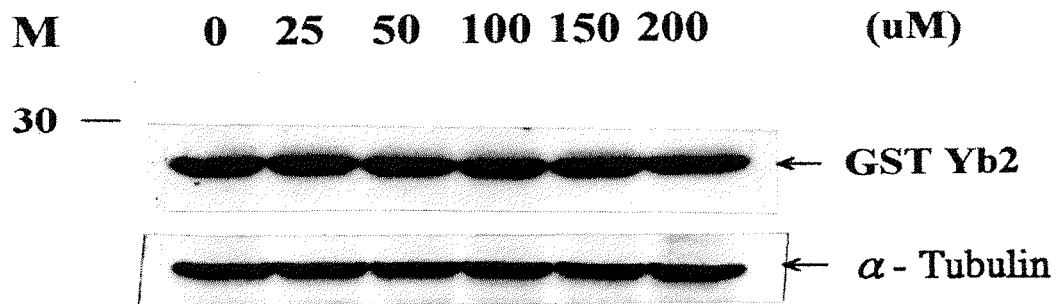


Fig. 12 . Dose response of the effect of geniposide on GST Yb2 protein level in rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with various concentration of geniposide for 12 hours. Hepatocyte homogenates were analyzed by western blotting. Anti- $\alpha$ -tubulin antiserum was used for internal control.

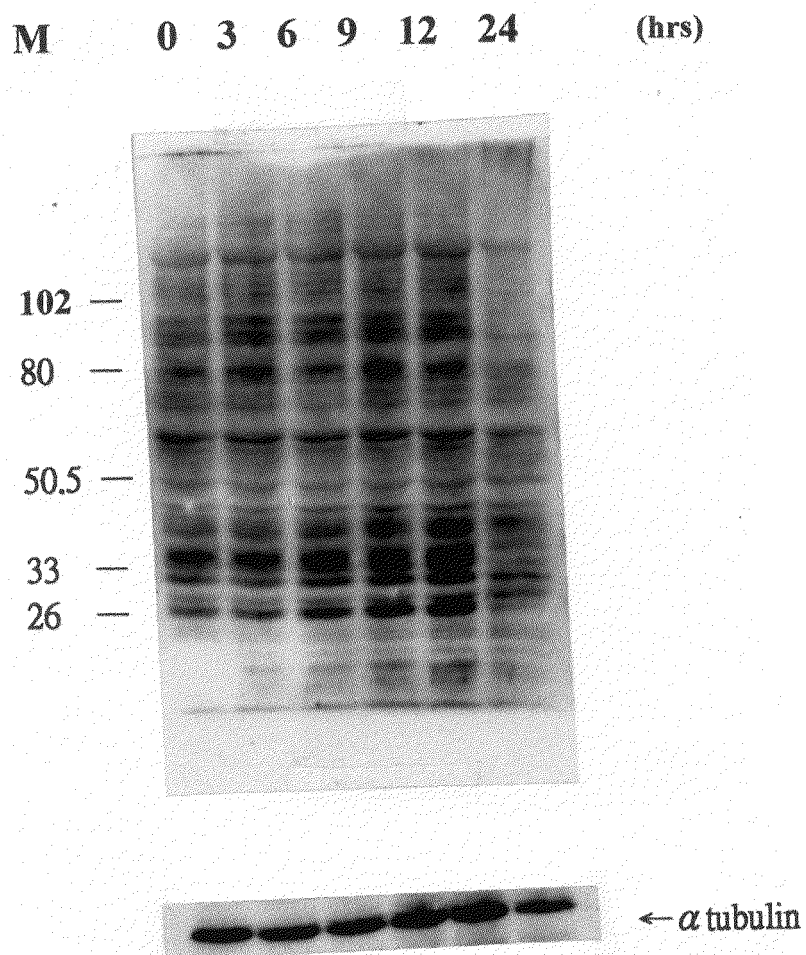


Fig. 13. Time course of the effect of geniposide on ptyr-54 protein level in rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with geniposide ( 100  $\mu$ M ) for the time indicated. Hepatocyte homogenates were analyzed by western blotting. Anti- $\alpha$ -tubulin antiserum was used for internal control.

M            0   25   50 100 150 200    (uM)

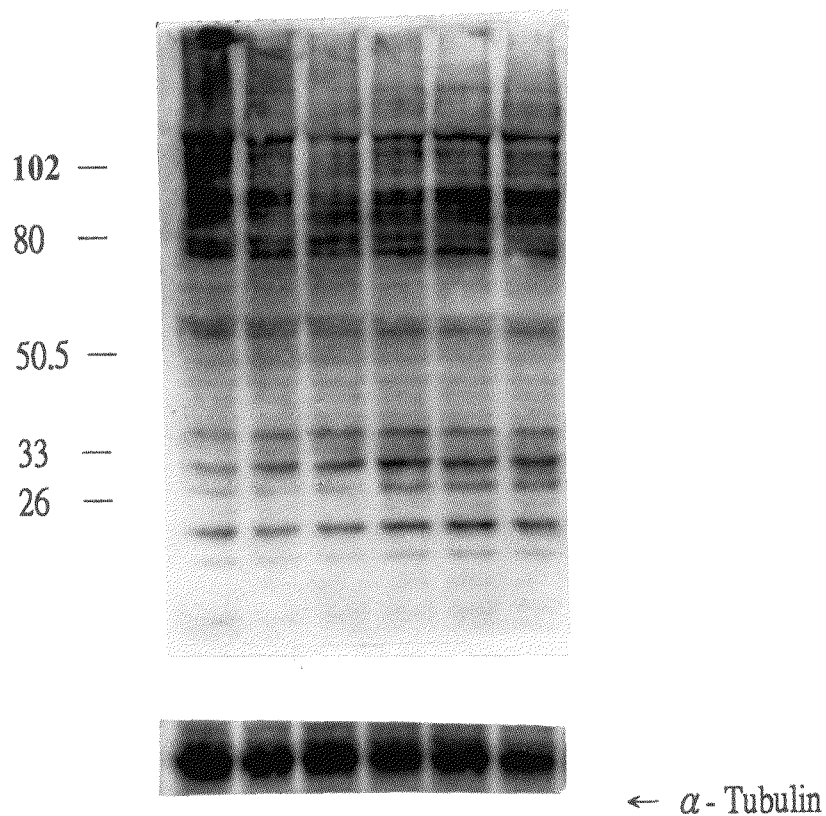


Fig. 14. Dose response of the effect of geniposide on ptyr54 protein level in rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with various concentration of geniposide for 9 hours. Hepatocyte homogenates were analyzed by western blotting. Anti- $\alpha$ -tubulin antiserum was used for internal control.



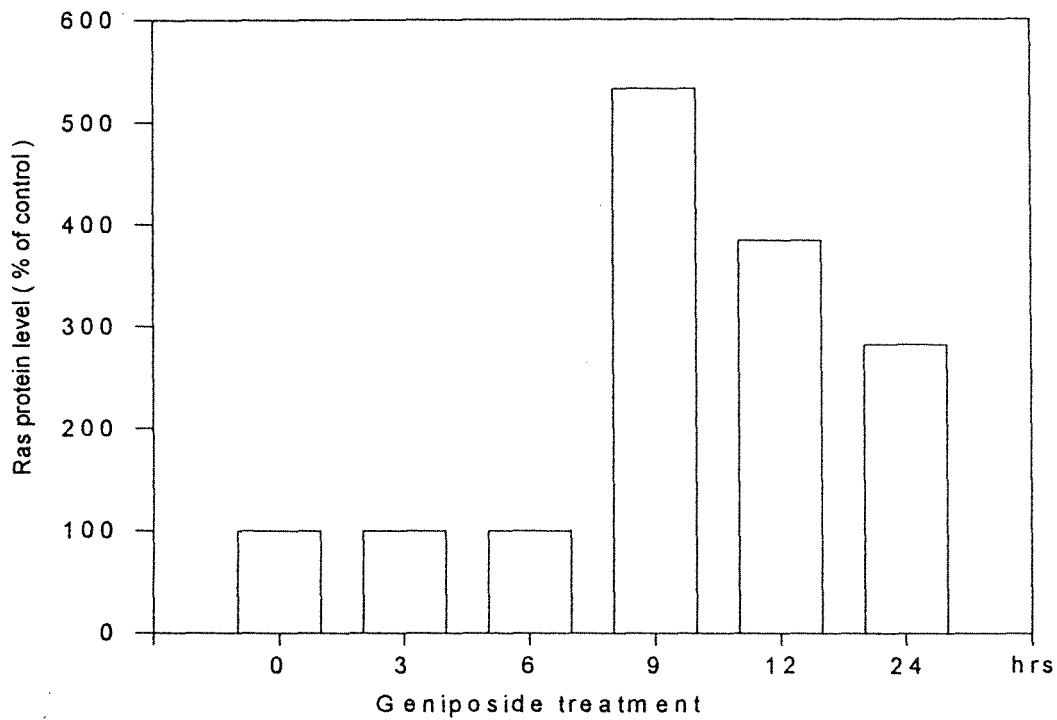
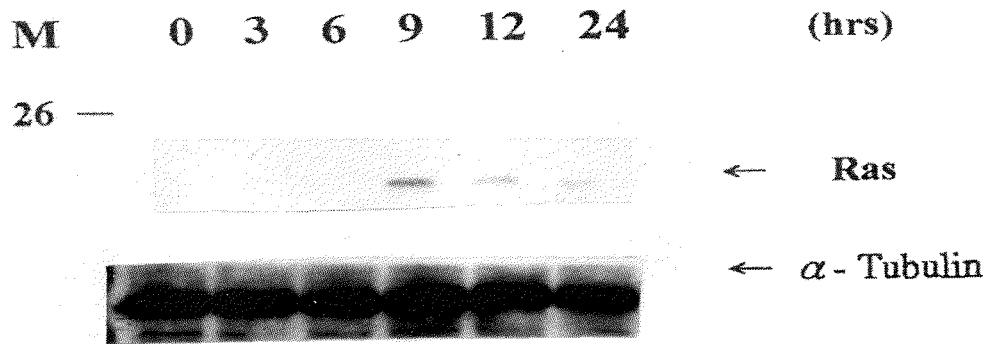


Fig. 15. Time course of the effect of geniposide on Ras protein level in rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with geniposide (  $100 \mu\text{M}$  ) for the time indicated. Hepatocyte homogenates were analyzed by western blotting. Anti- $\alpha$ -tubulin antiserum was used for internal control.

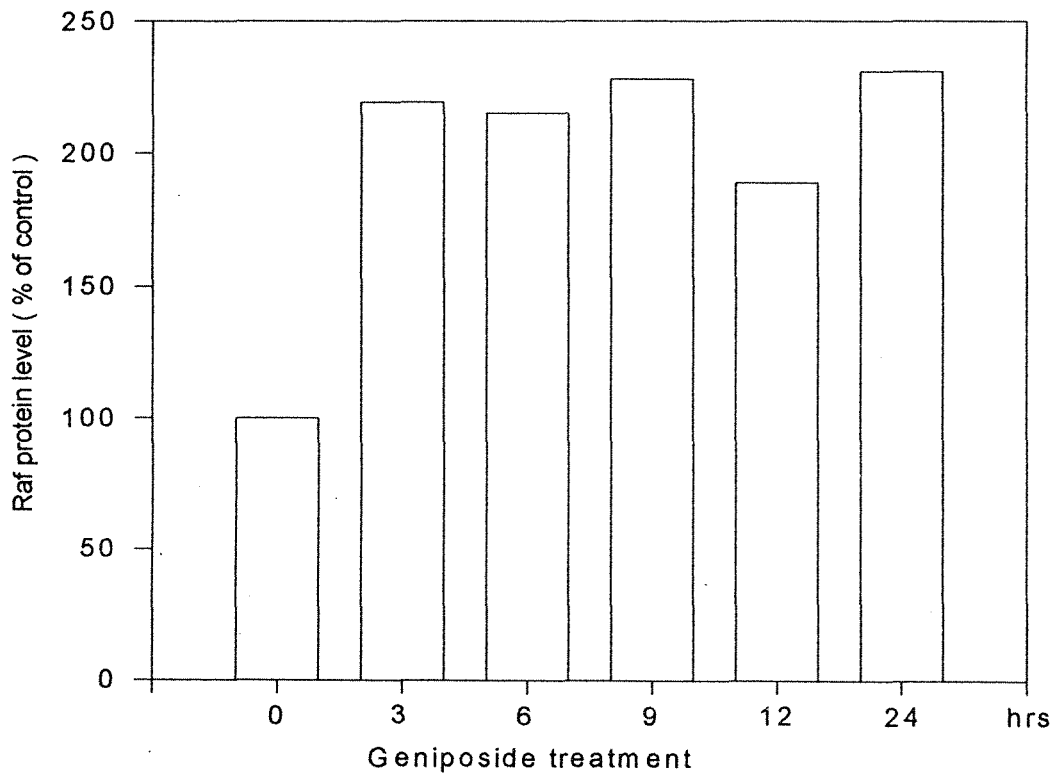
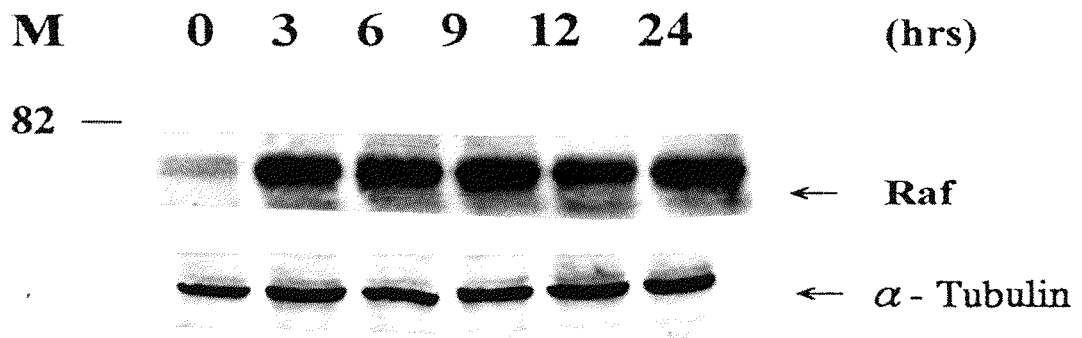


Fig. 16. Time course of the effect of geniposide on Raf protein level in rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with geniposide (  $100 \mu\text{M}$  ) for the time indicated. Hepatocyte homogenates were analyzed by western blotting. Anti- $\alpha$ -tubulin antiserum was used for internal control.

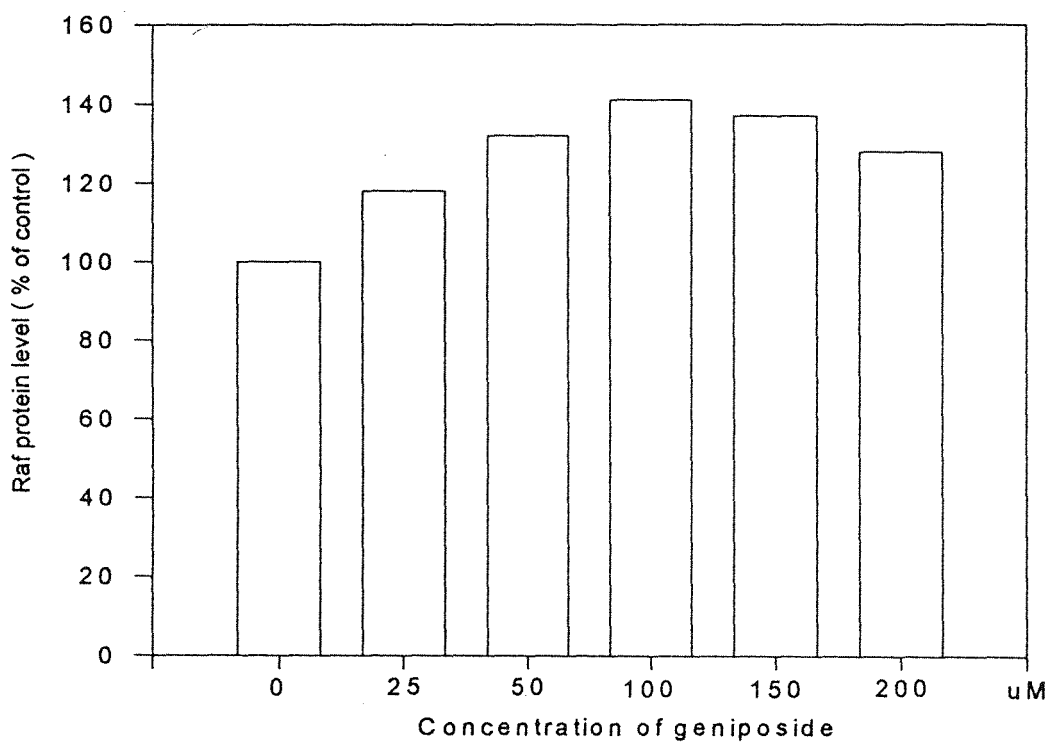
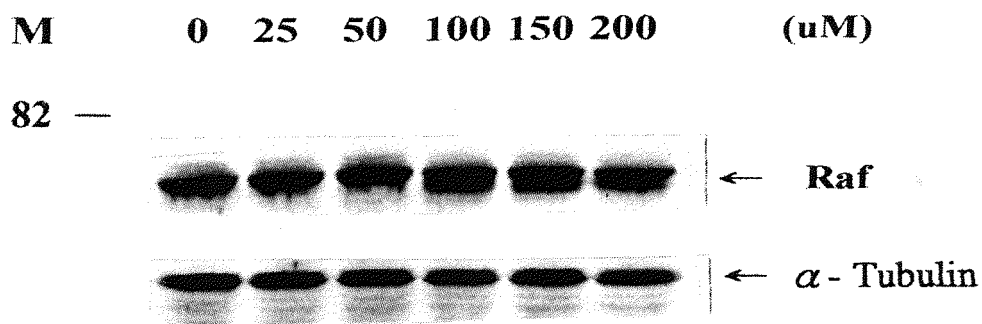


Fig. 17. Dose response of the effect of geniposide on Raf protein level in rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with various concentration of geniposide for 9 hours. Hepatocyte homogenates were analyzed by western blotting. Anti- $\alpha$ -tubulin antiserum was used for internal control.

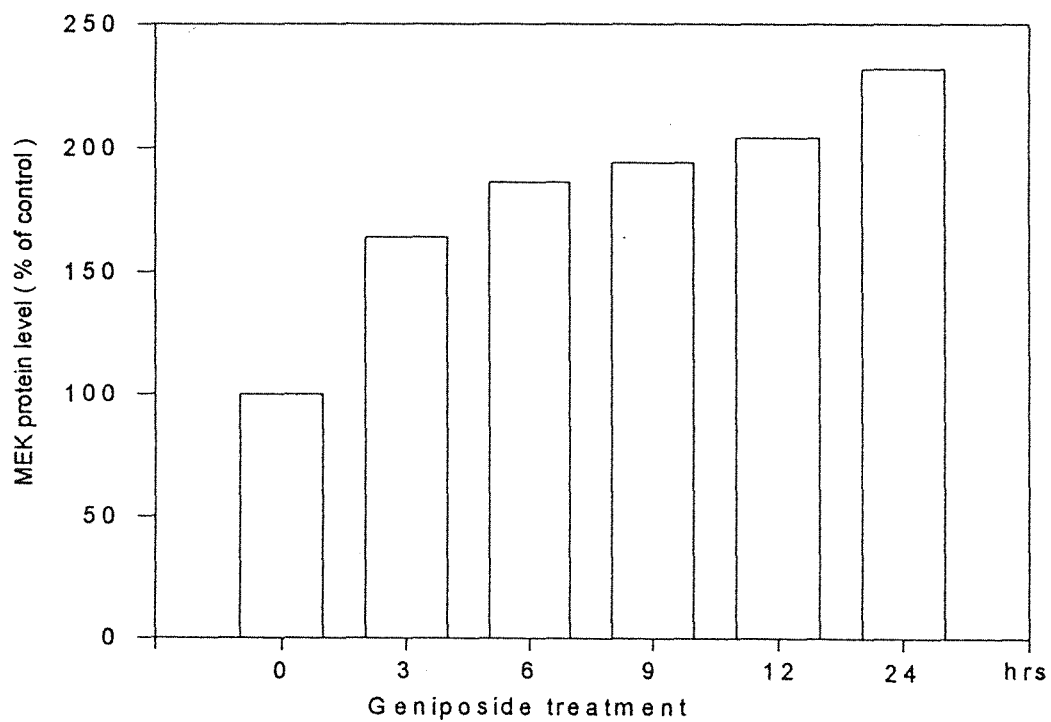
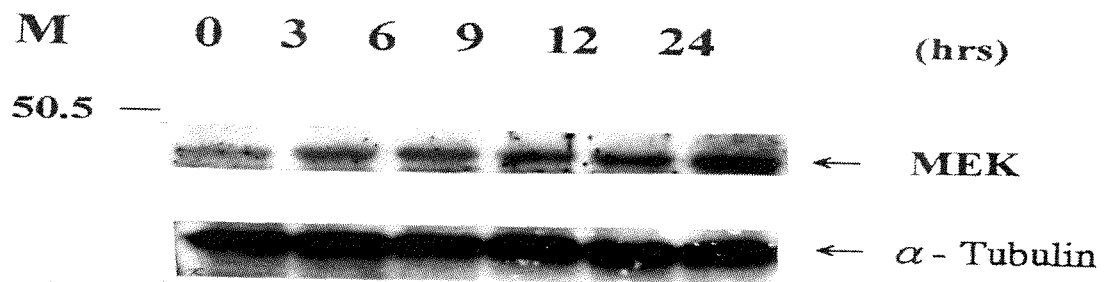


Fig. 18. Time course of the effect of geniposide on MEK protein level in rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with geniposide (100  $\mu$ M) for the time indicated. Hepatocyte homogenates were analyzed by western blotting. Anti- $\alpha$ -tubulin antiserum was used for internal control.

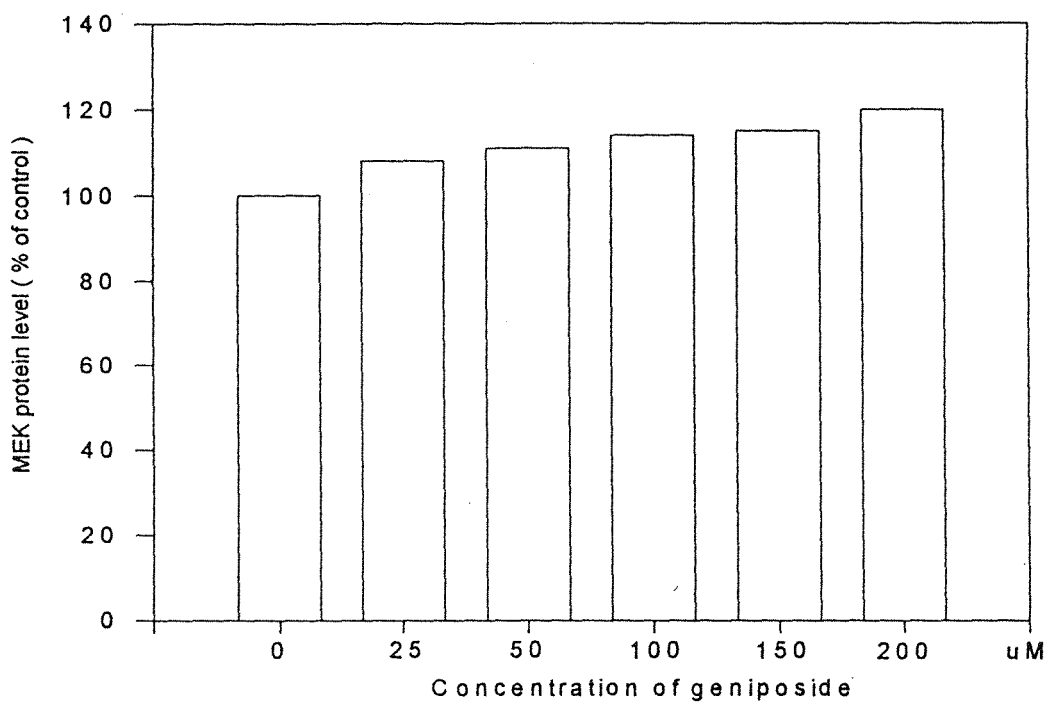
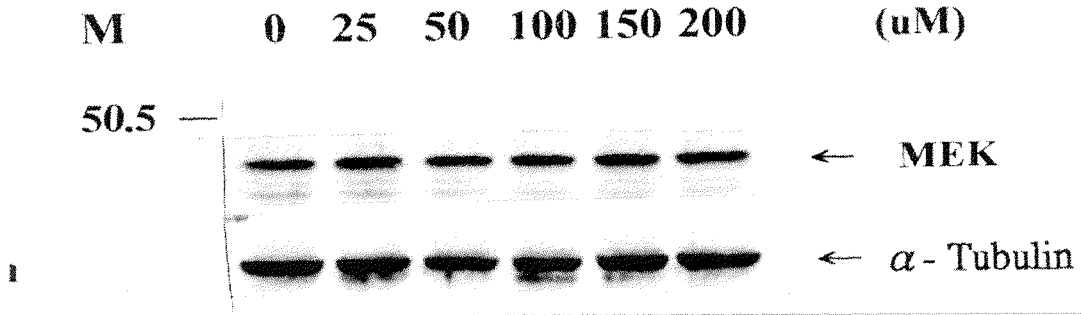


Fig. 19. Dose response of the effect of geniposide on MEK protein level in rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with various concentration of geniposide for 9 hours. Hepatocyte homogenates were analyzed by western blotting. Anti- $\alpha$ -tubulin antiserum was used for internal control.

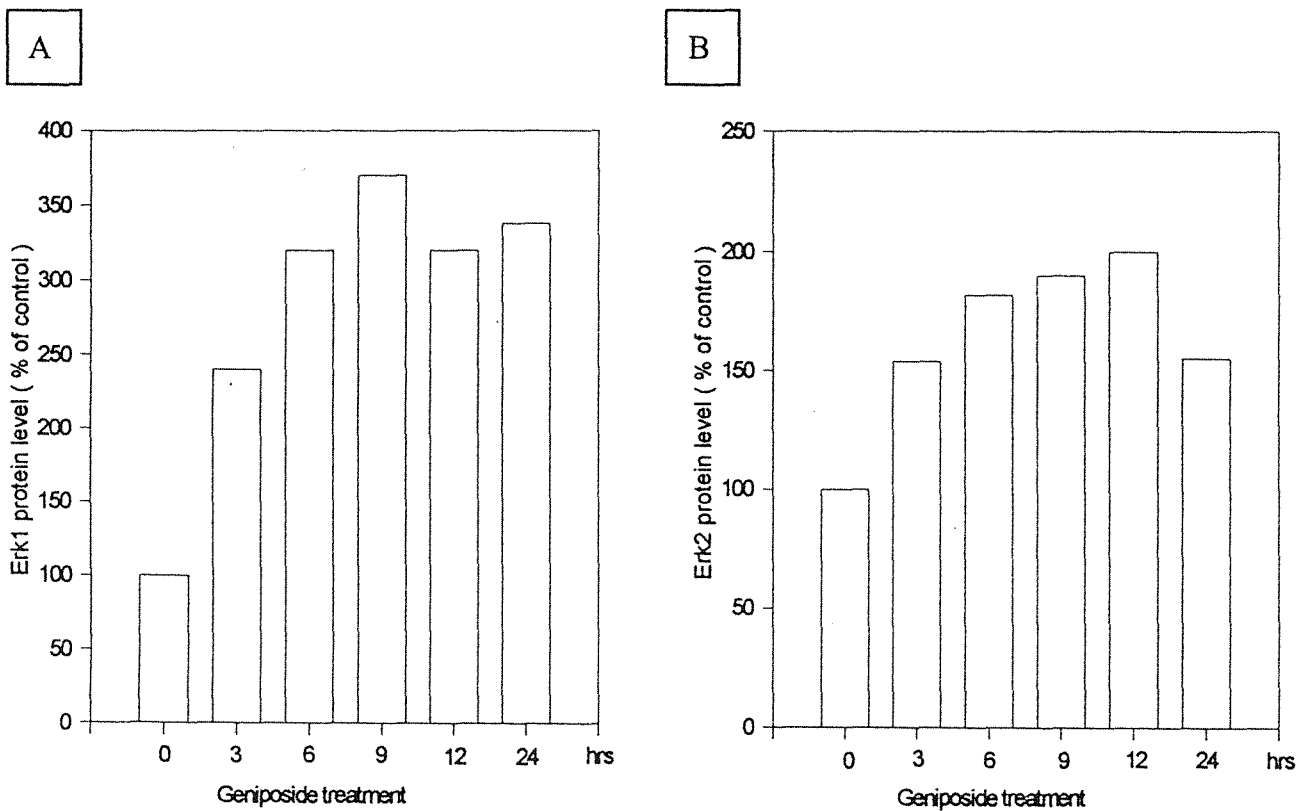
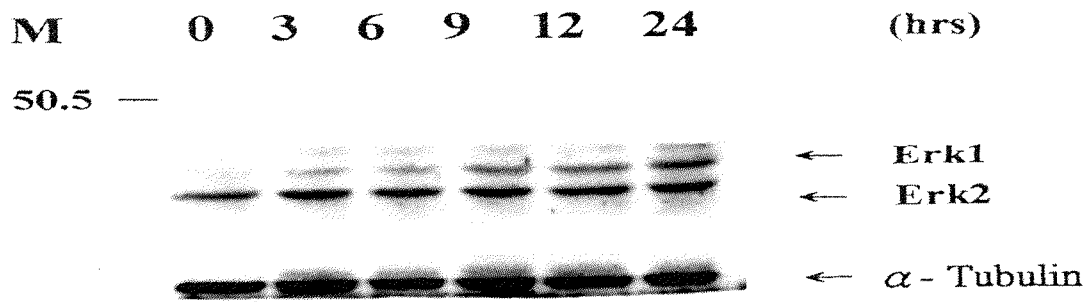


Fig. 20. Time course of the effect of geniposide on Erk1 and Erk2 protein level in rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with geniposide (  $100 \mu\text{M}$  ) for the time indicated. Hepatocyte homogenates were analyzed by western blotting. Anti- $\alpha$ -tubulin antiserum was used for internal control.

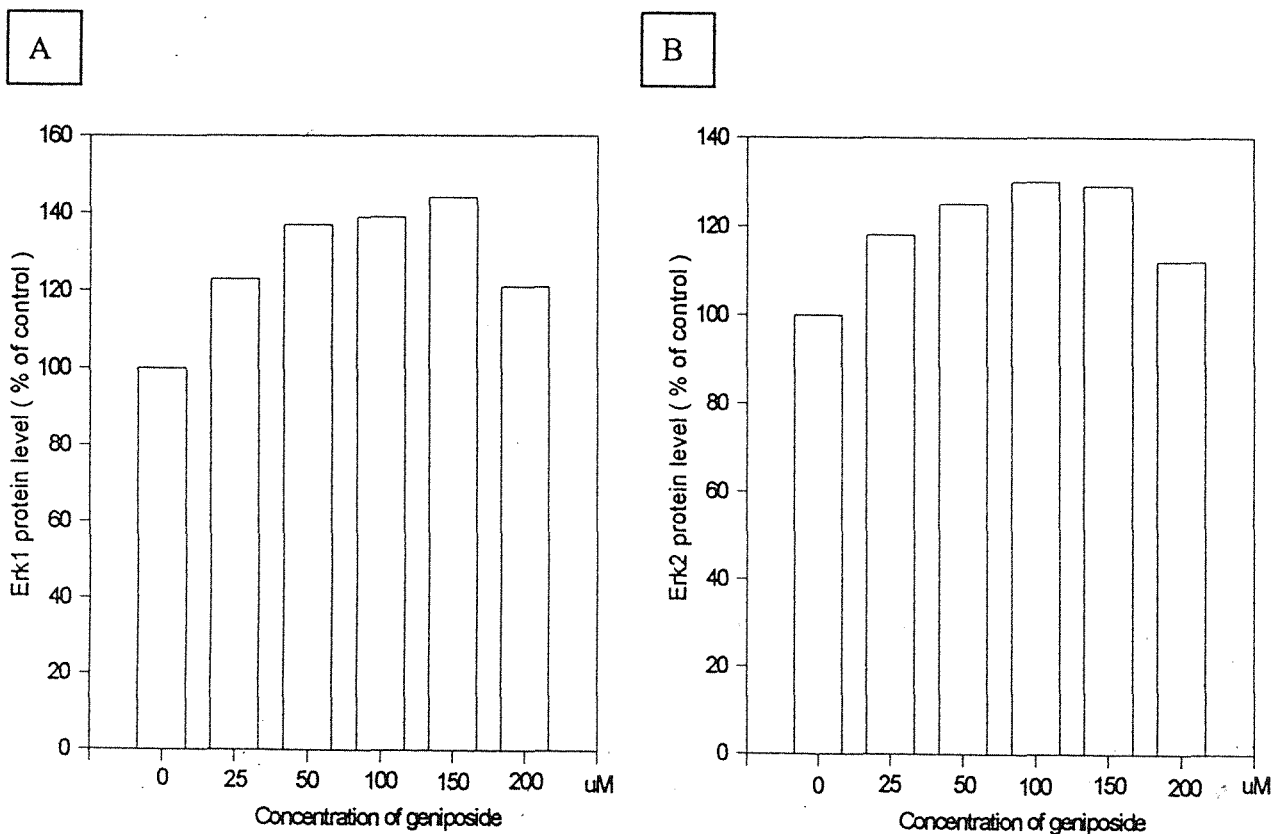
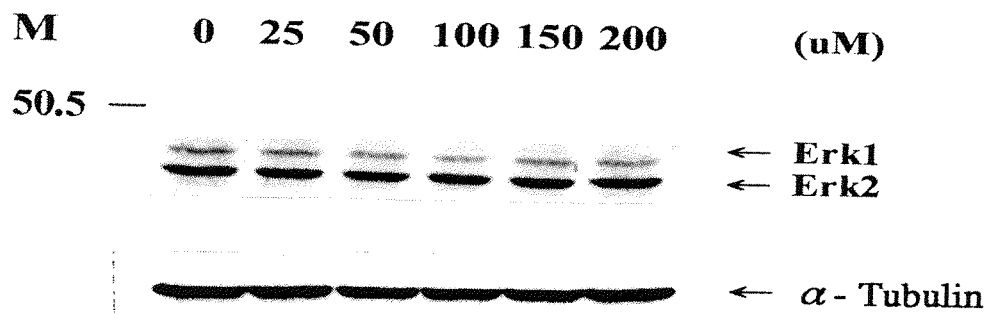
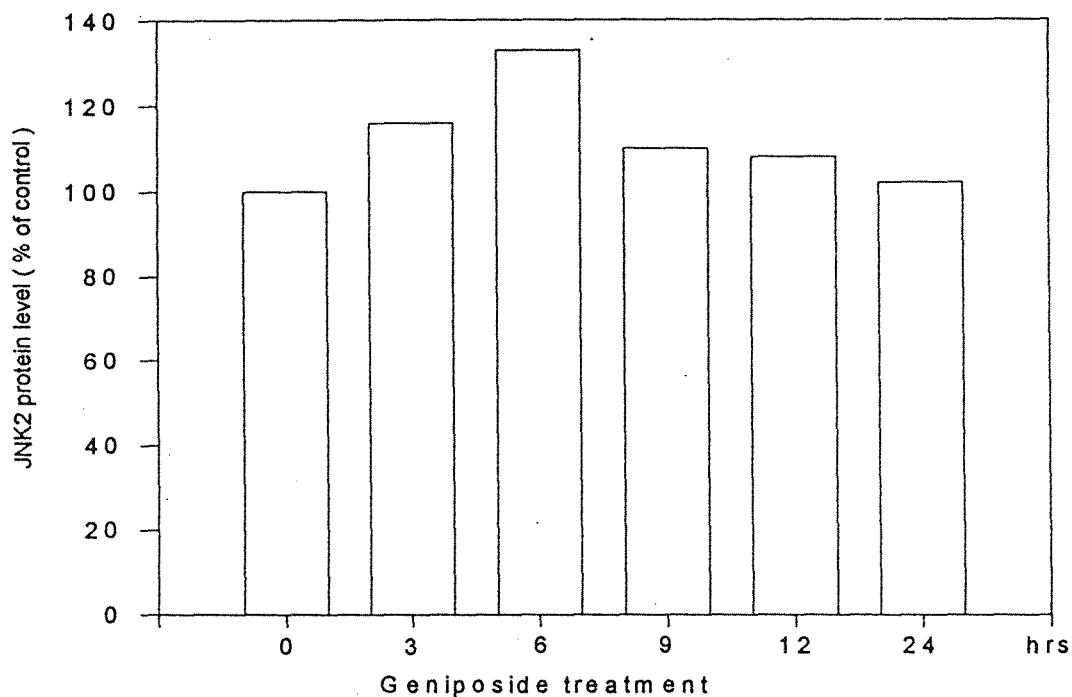
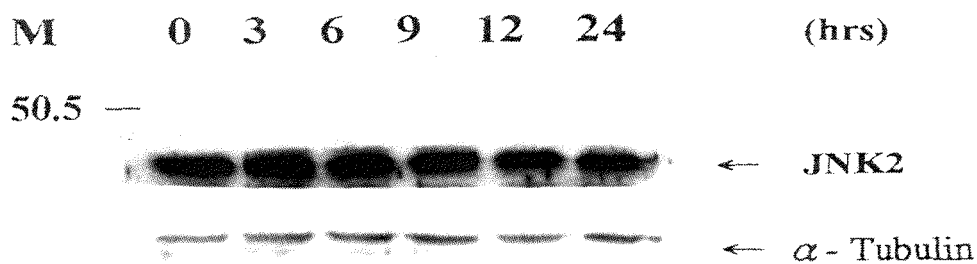


Fig. 21. Dose response of the effect of geniposide on Erk1 and Erk2 protein level in rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with various concentration of geniposide for 9 hours. Hepatocyte homogenates were analyzed by western blotting. Anti- $\alpha$ -tubulin antiserum was used for internal control.



**Fig. 22.** Time course of the effect of geniposide on JNK2 protein level in rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with geniposide (  $100 \mu\text{M}$  ) for the time indicated. Hepatocyte homogenates were analyzed by western blotting. Anti- $\alpha$ -tubulin antiserum was used for internal control.



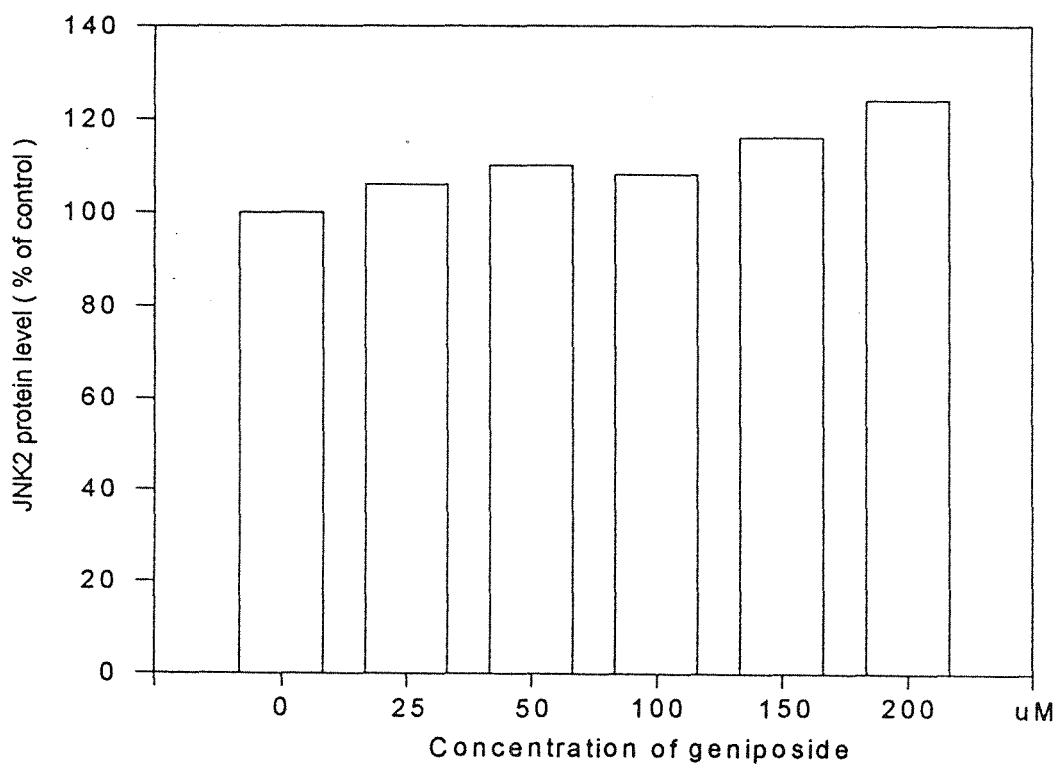
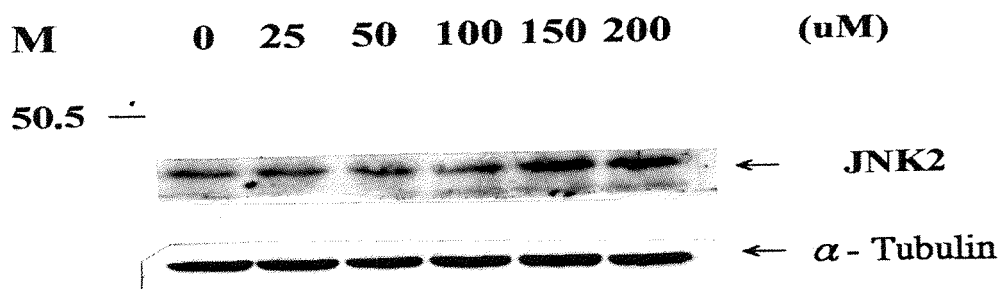


Fig. 23 Dose response of the effect of geniposide on JNK2 protein level in rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with various concentration of geniposide for 9 hours. Hepatocyte homogenates were analyzed by western blotting. Anti- $\alpha$ -tubulin antiserum was used for internal control.

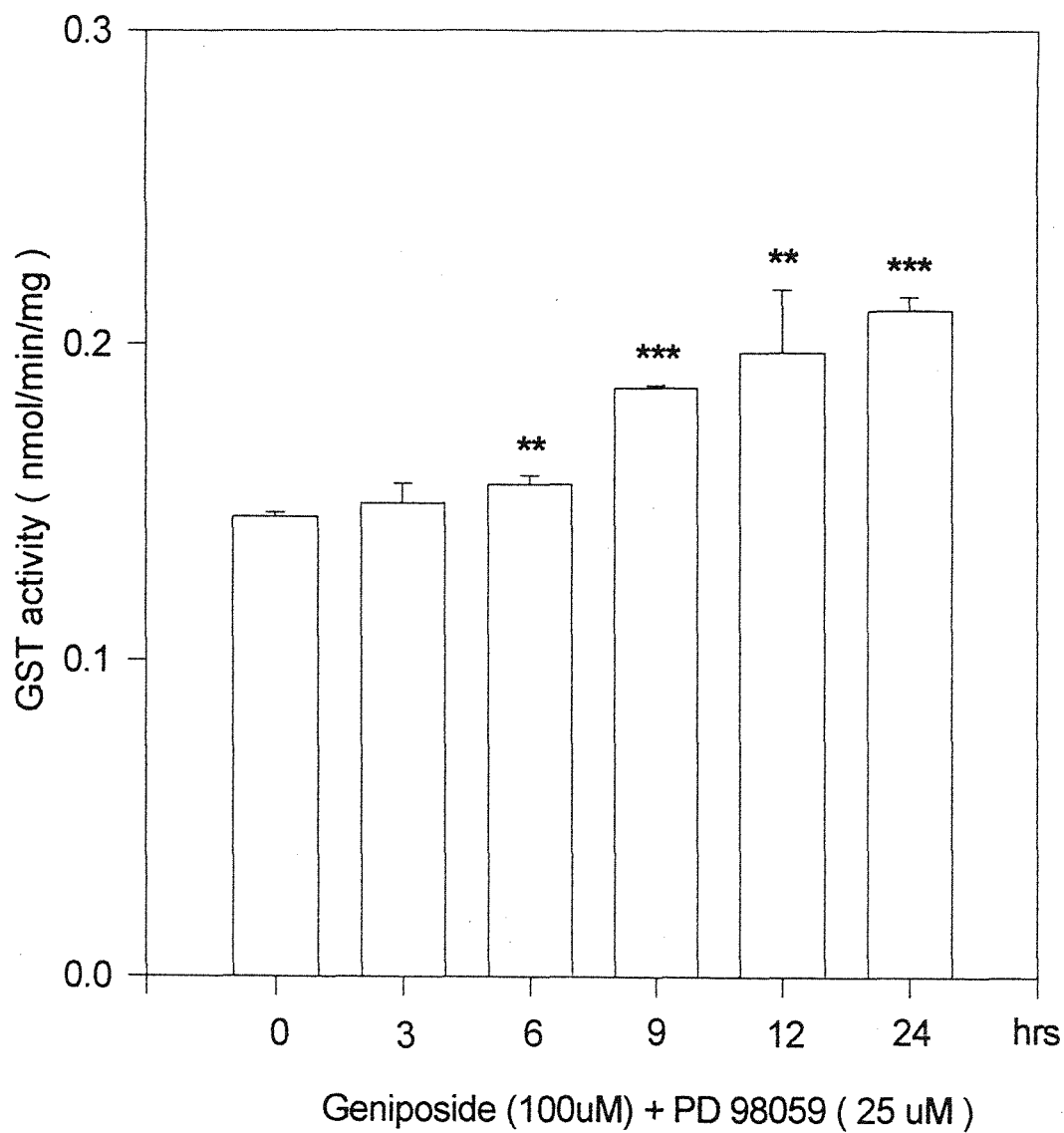


Fig. 24 Time course of geniposide induced Glutathione-S-transferase activity in primary hepatocyte culture. Hepatocyte was treated by geniposide ( 100  $\mu$  M ) and PD 98059 ( 25  $\mu$  M ) for the time indicated.

\*\*  $p < 0.01$  , compared with 0 hr.

\*\*\*  $p < 0.001$  , compared with 0 hr.

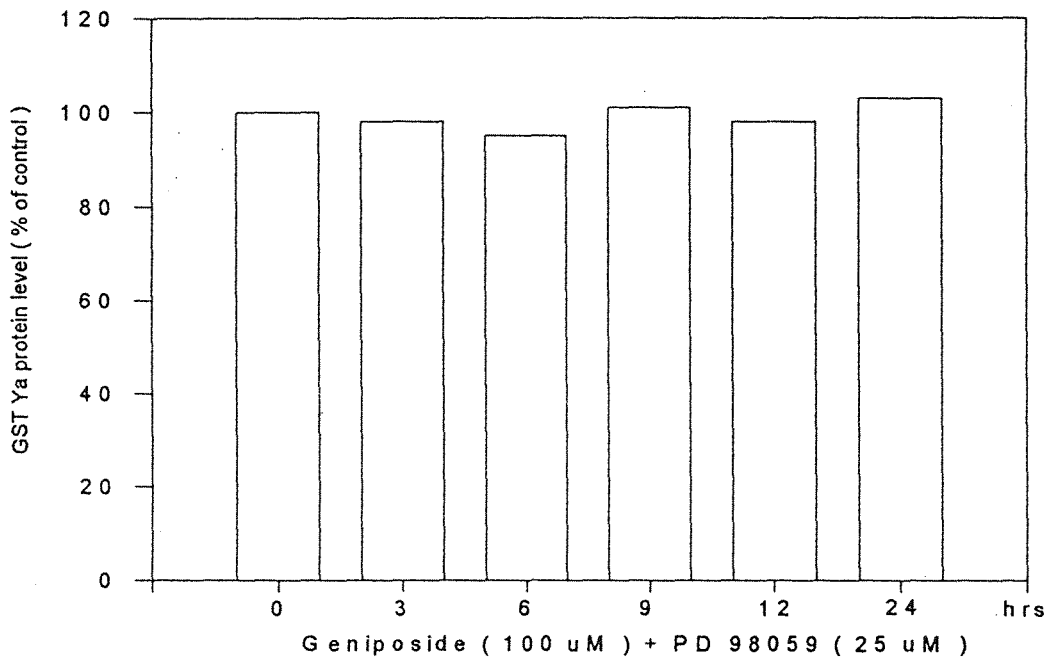
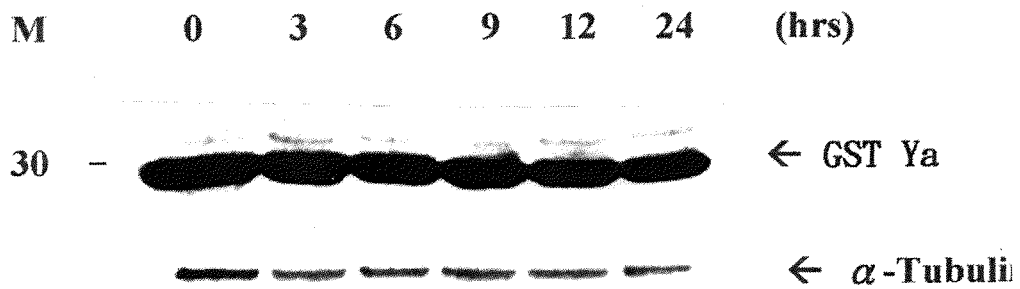


Fig. 25 Time course of the effect of geniposide on GST Ya protein level in rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with geniposide ( 100  $\mu$  M ) and PD -98059 ( 25  $\mu$  M ) for the time indicated. Hepatocyte homogenates were analyzed by western blotting. Anti-  $\alpha$  -tubulin antiserum was used for internal control.

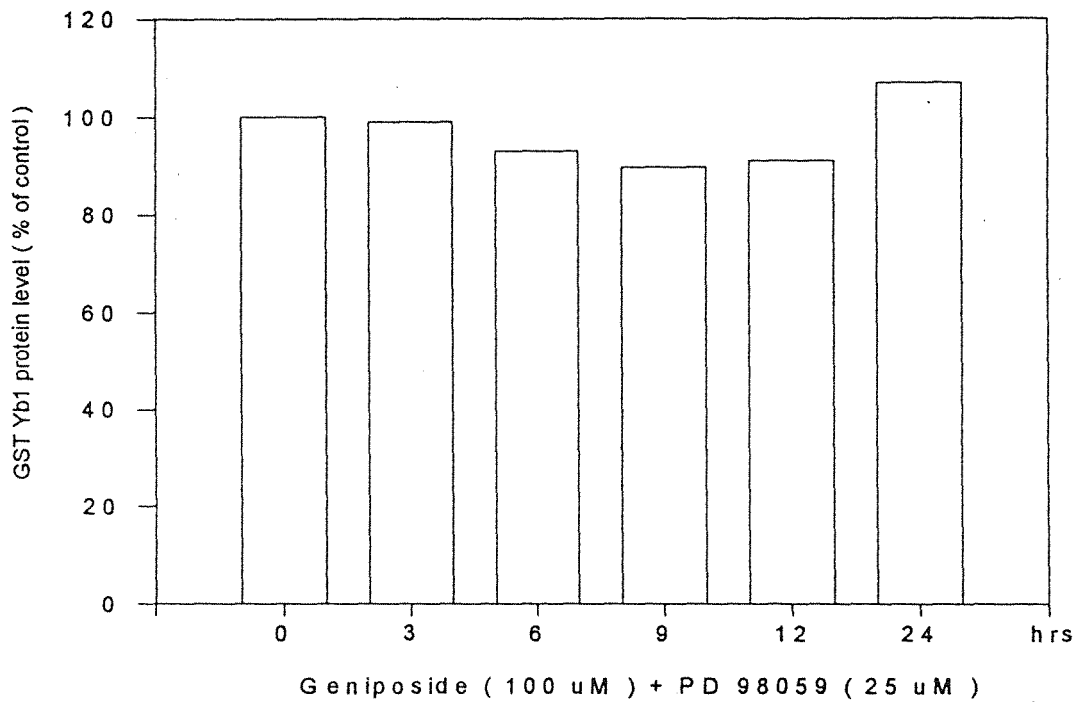
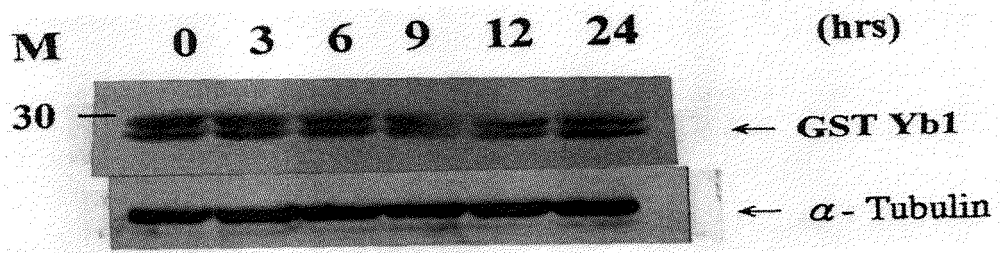


Fig. 26 Time course of the effect of geniposide on GST Yb1 protein level in rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with geniposide (100  $\mu$ M) and PD -98059 (25  $\mu$ M) for the time indicated. Hepatocyte homogenates were analyzed by western blotting. Anti- $\alpha$ -tubulin antiserum was used for internal control.

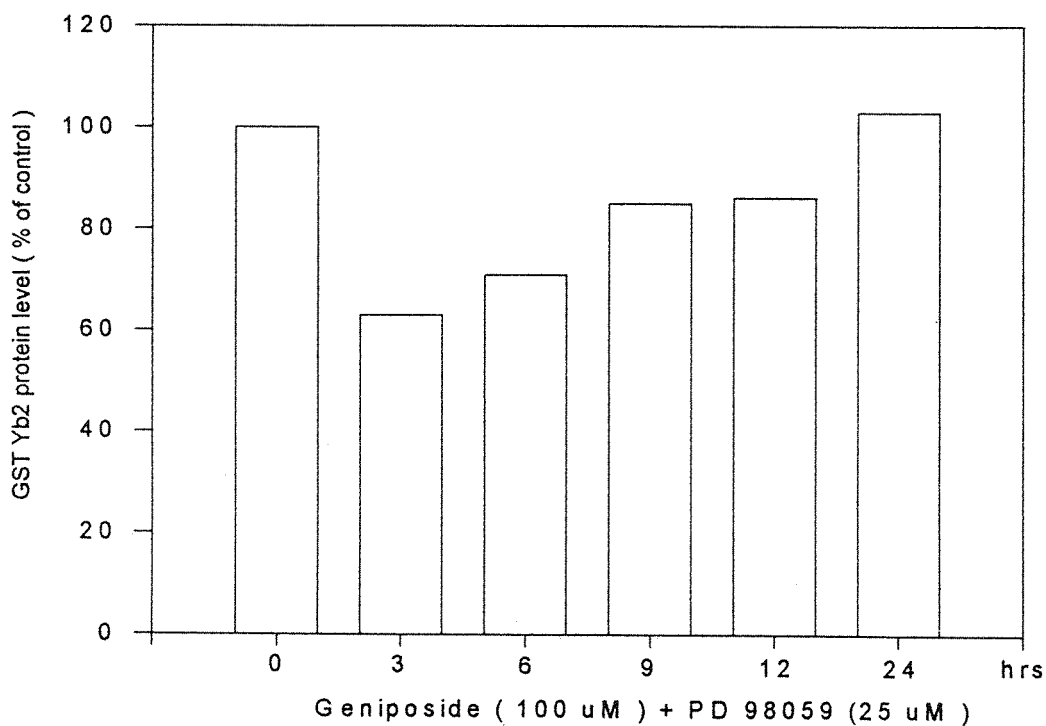
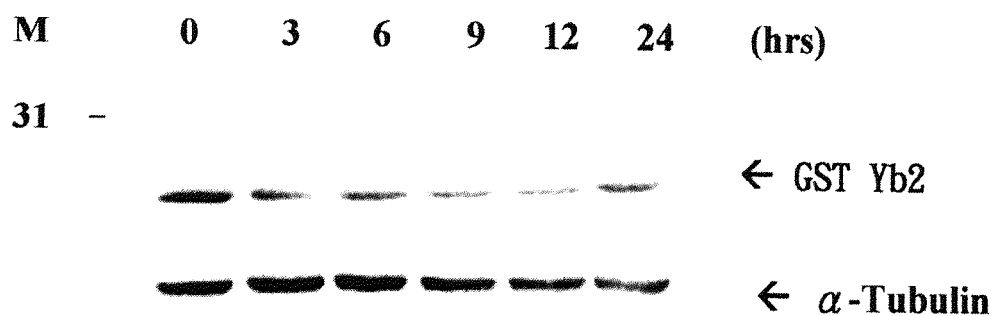


Fig. 27 Time course of the effect of geniposide on GST Yb2 protein level in rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with geniposide ( 100  $\mu$ M ) and PD -98059 ( 25  $\mu$ M ) for the time indicated. Hepatocyte homogenates were analyzed by western blotting. Anti-  $\alpha$  -tubulin antiserum was used for internal control.

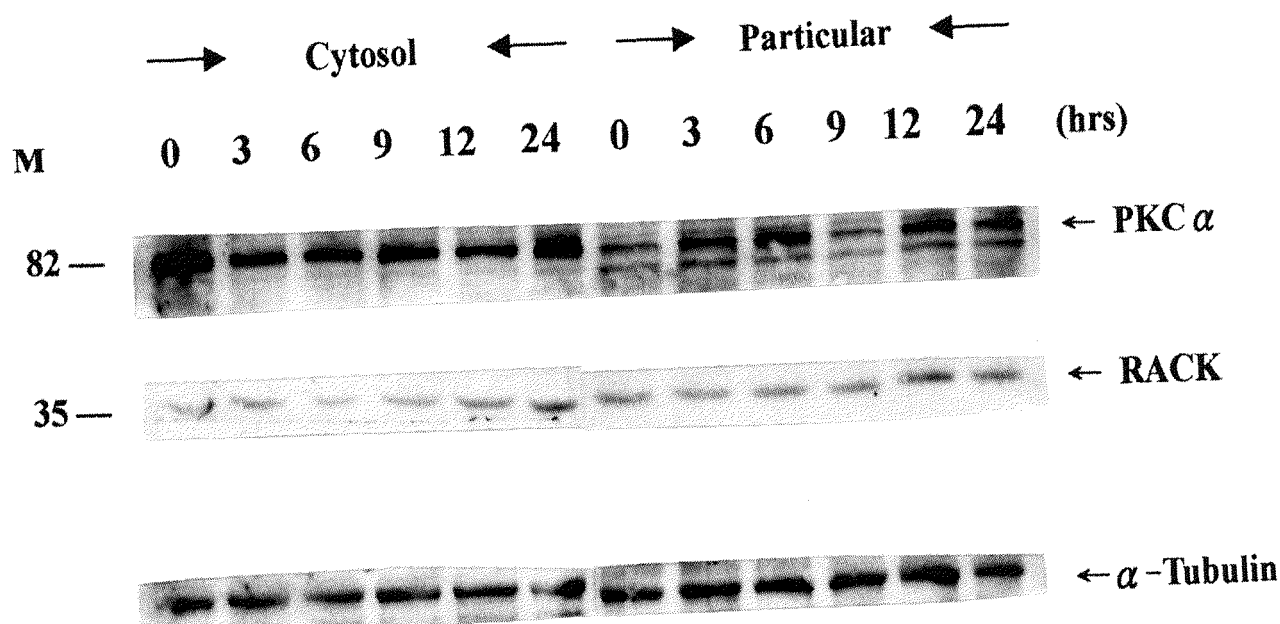
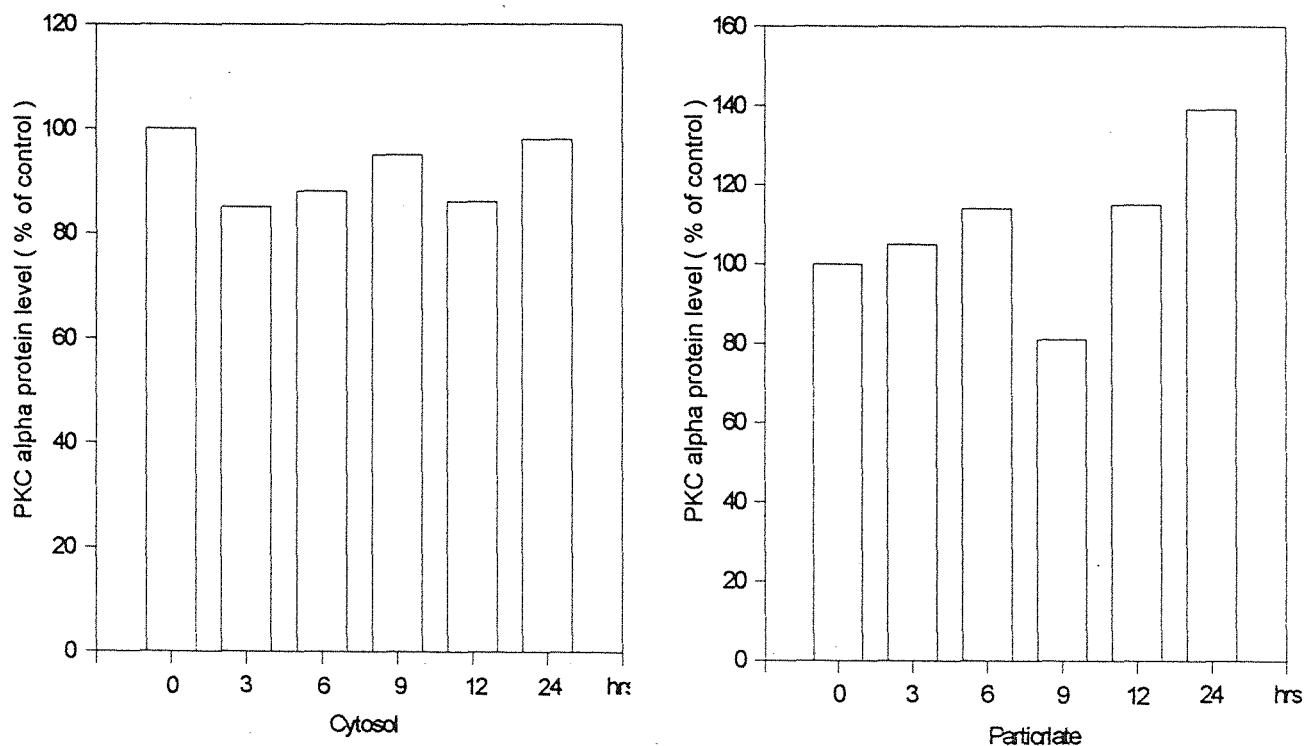
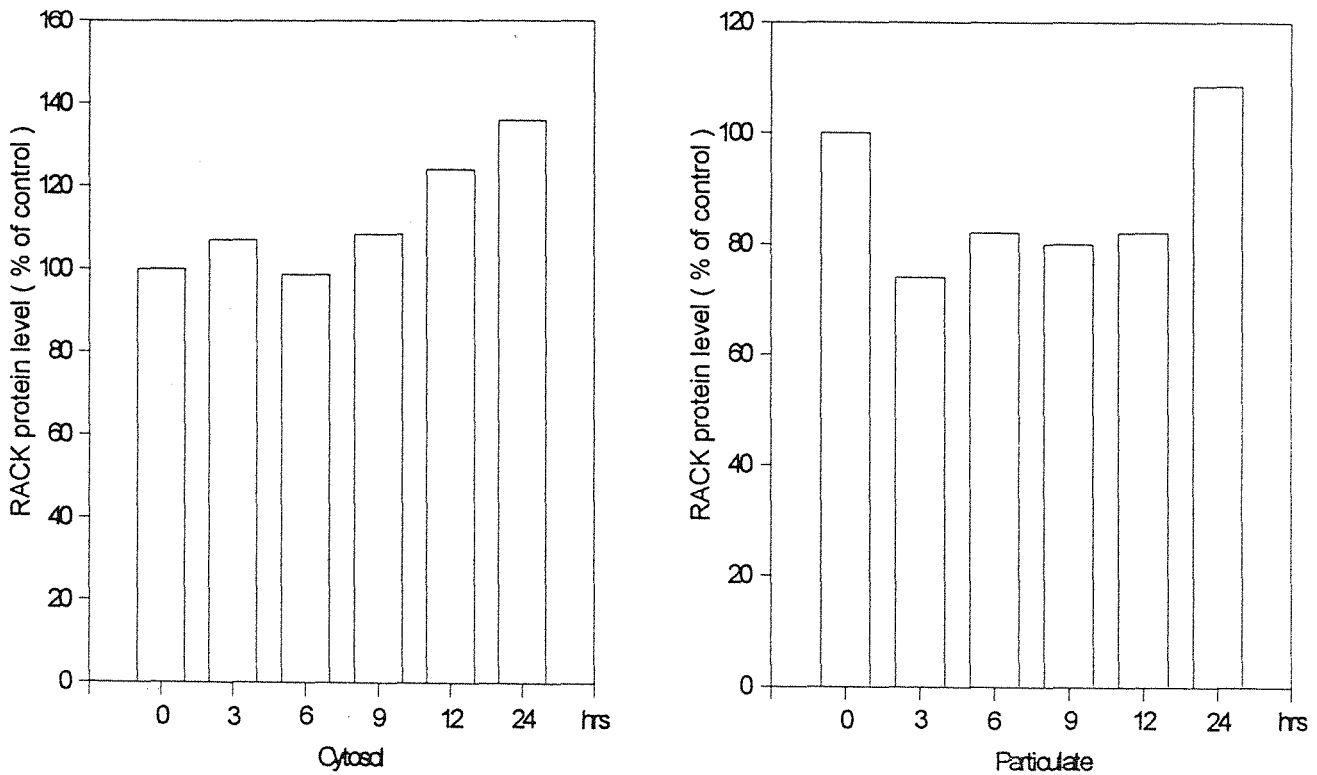


Fig. 29 Time course of the effect of geniposide on PKC- $\alpha$  and RACK protein level in rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with geniposide ( 100  $\mu$ M ) for the time indicated. The cytosol and particulate fraction of the hepatocytes were prepared according to the procedures described in the method section, and analyzed by western blotting. Anti- $\alpha$ -tubulin antiserum was used for internal control.



### Geniposide treatment

Fig. 30 Densitometric measurements of the time course of the effect of geniposide on PKC- $\alpha$  protein level in hepatocytes. The data were corrected by the amount of  $\alpha$ -tubulin of each sample, and expressed as the percentages of control level. ( time point 0 )



### Geniposide treatment

Fig. 31 Densitometric measurements of the time course of the effect of geniposide on RACK protein level in hepatocytes. The data were corrected by the amount of  $\alpha$ -tubulin of each sample, and expressed as the percentages of control level. ( time point 0 )



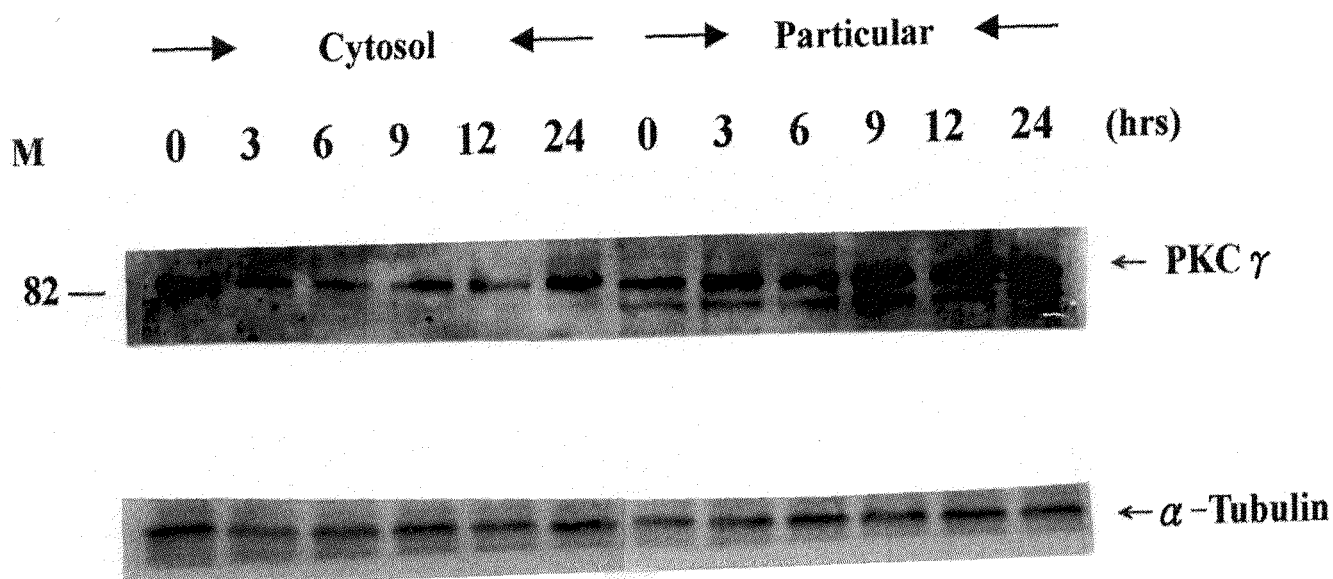
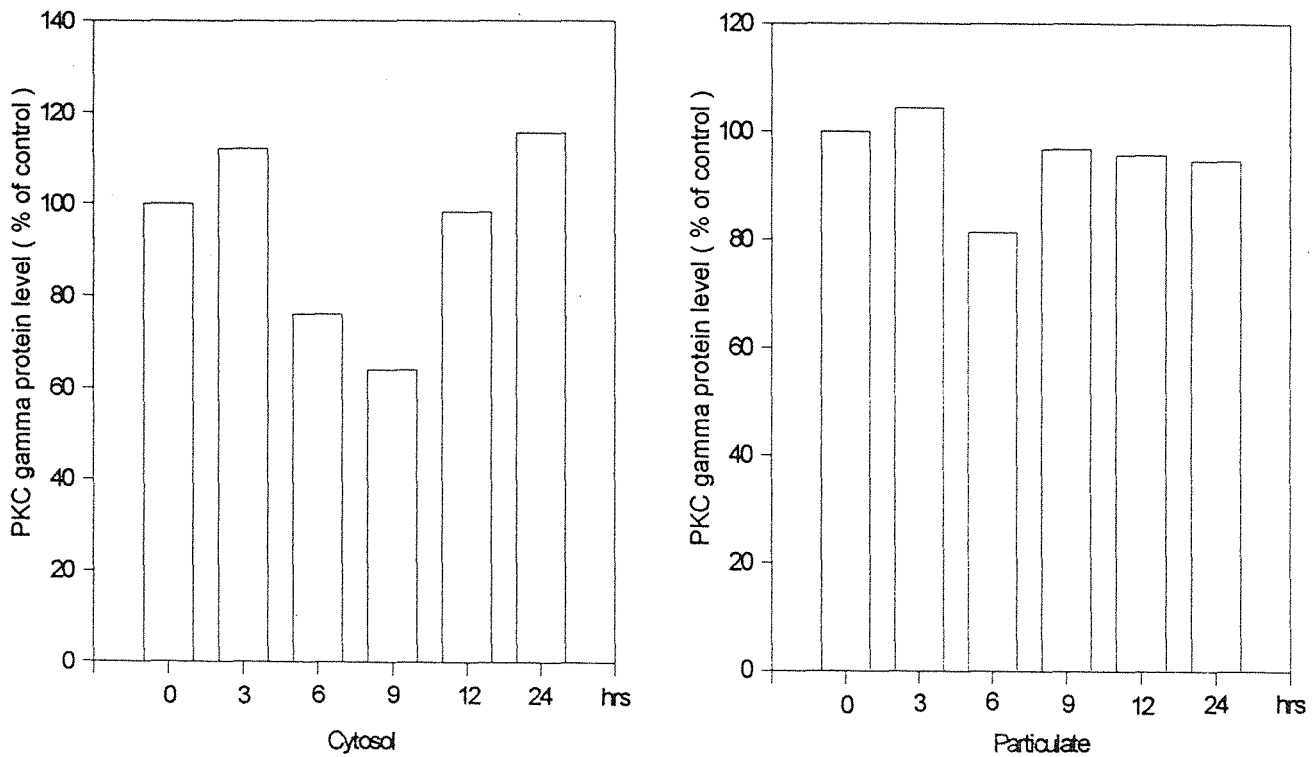


Fig. 32 Time course of the effect of geniposide on PKC- $\gamma$  protein level in rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with geniposide (100  $\mu$ M) for the time indicated. The cytosol and particulate fraction of the hepatocytes were prepared according to the procedures described in the method section, and analyzed by western blotting. Anti- $\alpha$ -tubulin antiserum was used for internal control.



### Geniposide treatment

Fig. 31 Densitometric measurements of the time course of the effect of geniposide on PKC- $\gamma$  protein level in hepatocytes. The data were corrected by the amount of  $\alpha$ -tubulin of each sample, and expressed as the percentages of control level. ( time point 0 )

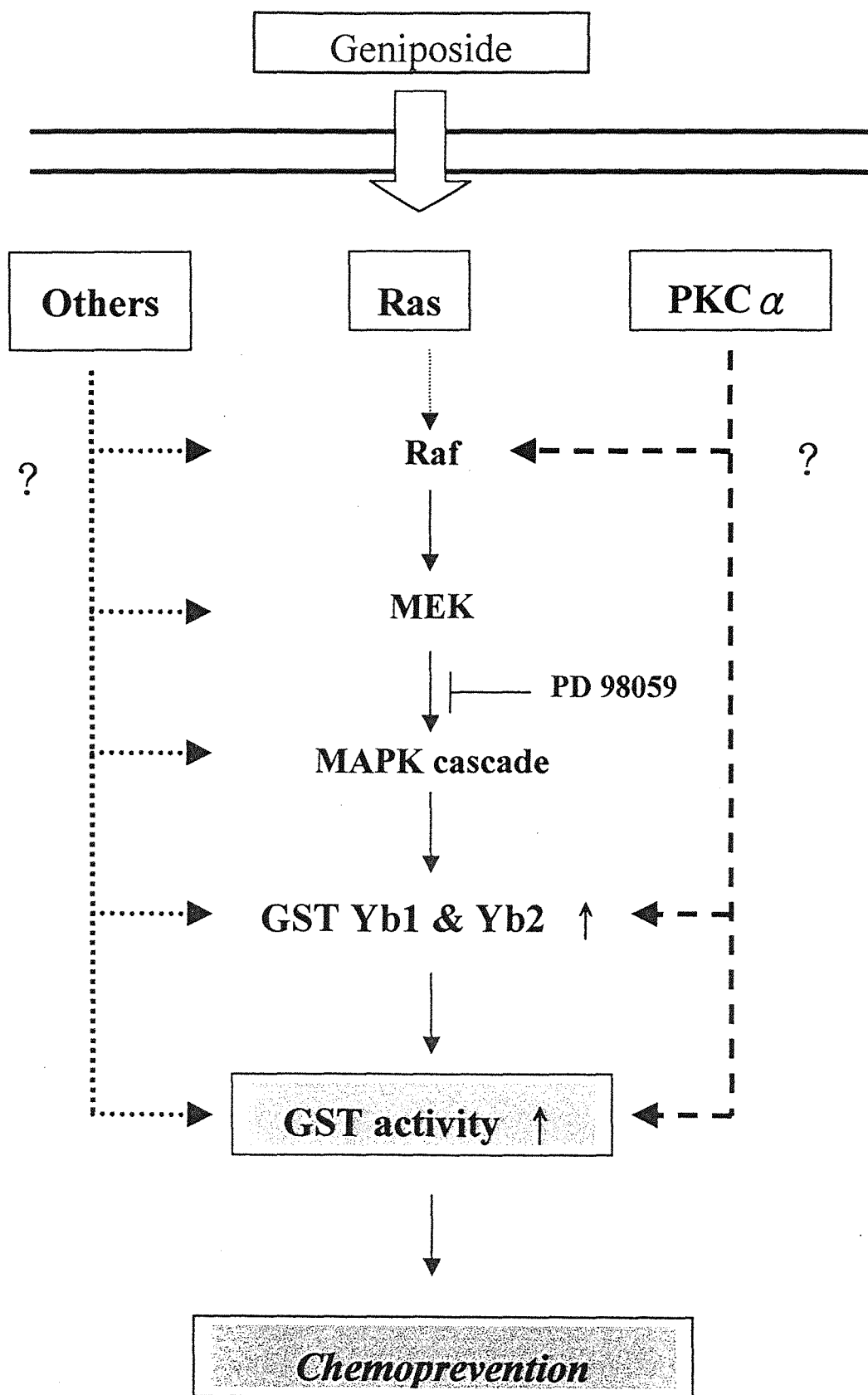


Fig. 34. Proposed mechanism of geniposide-induced glutathione-S-Transferase.

## 捌、参考文献

1. Inouye, H., Saito, S., Taguchi, H. and Endo, T. (1969) On the biosynthesis of iridoidglucosides. *Tet. Lett.*, 28, 2347-2350.
2. Aburada, M., Takeda, S., Shibata, Y. and Harada, M. (1978) *J. Pharm. Dyn.*, 81-88.
3. Aburada, M., Takeda, S., Sadurai, M., and Harada, M. (1980) Pharmacological studies of gardenia fruits. V. Mechanisms of inhibitory effect of genipin on gastric acid secretion and its facilitatory effect on bile secretion in rat. *J. Pharm. Dyn.*, 3, 423- 433.
4. Aburada, M., Sasaki, H., and Harada, M. (1976) Pharmacological studies of *Gardenia fructus*. II. Contribution of the constituent crude drugs to choleric activity of "Inchiko-to" in rats. *Yakugakuzasshi*, 96, 147-153.
5. Harada, M., Tenmto, N., Aburada, M., and Endo, T., (1974) Pharmacological studies of *Gardenia fructus*. I. Effect if geniposide and geneipin on the biliary excretion, the gastric juice secretion, and the gastric contraction, and other pharmacological actions. *Takugakuzasshi*, 94, 157-162.
6. Takeda, S., Yuasa, K., Endo, T. and Aburada, M. (1980) Pharmacological studies on iridoid compounds. II. Relationship between structures and choleric actions of iridoid compound. *J. Pharm. Dyn.*, 3, 485-492.

7. Kawata, Y., Hattori, MF., Akao, TI., Kobashi, K., Namba, T. (1991) Formation of nitrogen-containing metabolites from geniposide and gardenoside by human intestinal bacteria. *Planta Medica.*, 57(6), 536-542.
8. Yamauchi, K., Fujimoto, N., Kfuwano, S., Inouye, H., and Inou, K. (1976) *Planta. Med.*, 30, 39-47.
9. Yamano T., (1990) Hepatotoxicity of geniposide in rats. *Food Chem. Toxicol.* 28(7), 515-519.
10. 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.
11. Kang, J. J., Wang, H. W., Liu, T. Y., Chen, Y. C., Ueng, T. H. (1997) Modulation of cytochrome P-450-dependent monooxygenases, glutathione and glutathione S-transferase in rat liver by geniposide from *Gardenia jasminoides*. *Food Chem. Toxicol.*, 35(10-11), 957-965.
12. Wang, C. J., Wang, S. W., and Lin, J. K. (1991) Suppressive effect of geniposide on the hepatotoxicity and hepatic DNA binding of aflatoxin B1 in rats. *Cancer Letters.*, 60, 95-102.
13. Wang, S. W., Lai, C. Y., and Wang, C. J. (1992) Inhibitory effect of geniposide on aflatoxin B1-induced DNA repair synthesis in primary cultured rat hepatocytes. *Cancer Letters.*, 65, 133-137.

14. Lee, M. J., Hsu, J. D., and Wang, C. J. (1995) Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-caused tumor promotion in benzo[a]pyrene-initiated CD-1 mouse skin by geniposide. *Anticancer Research.*, 15, 411-416.
15. Ranuio, H., Husgafuel, P. K., Anttila, S., Hietanen, D., Hirvonen, A., Pelkonen, O., (1995) Diagnosis of polymorphisms in carcinogen activation and inactivation enzymes and cancer susceptibility. *Gene*, 159, 113-121.
16. Kensler, T. W., Groopman, J. D., Sutter, T. R., Curphey, T. J., and Roebuck, B. D. (1999) Development of cancer chemopreventive agents: Oltipraz as a paradigm. *Chem. Res. Toxicol.*, 12(2), 113- 126.
17. Pioto, H. C., Beer, P., Hendirch, S., (1989) Multistage carcinogenesis of the rat hepatocyte. *Banburg Report 25: Nongenotoxic mechanism in carcinogenes*, Cold Spring harbor, New York, 41-53.
18. Seidegard, J., Pero, R. W., Miller, D. G., Beattie, E. J. (1986) A glutathione transferase in human leukocytes as a marker for the susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis*, 7, 751-753.
19. Lafuente, A., Pujol, F., Carretero, P., Villa, J. P., Cuchi, A. (1993) Human glutathione S-transferase  $\mu$  ( GST  $\mu$  ) deficiency as a marker for the susceptibility to bladder and larynx cancer among smokers. *Cancer Lett.*, 68, 49-54.
20. Bell, D. A., Taylor, J. A., Paulson, D. F., Robertson, C. N., Mohler, J. L., Lucier, G. W. (1993) Genetic risk and carcinogen exposure: A common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 ( GSTM1 ) that increases susceptibility

- to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst.*, 85, 1159- 1164.
21. 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, 1935-1972.
  22. Arias, I. M., Fleischner, G., Kirsch, R., Mishkin, S., and Gatmaitan, Z., (1996) In glutathione: Metabolism and function. Raven Press, New York., 175-188.
  23. Mannervik, B. (1985) The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv. Enzyme. Rralt. Areas. Molec.*, 57, 357-417.
  24. Hui-Chen J, Lui and Chen-Pei D. Tu. (1986) Rat Glutathione S-Transferase Supergene family., 261, 13793-13799.
  25. Hayes, J. D., Pulford, D. J. (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.
  26. Mainwaring (1996) Isolation of a mouse theta-glutathione S-transferase active with methylene chloride. *Biochem. J.*, 314, 445-448.
  27. Hayes, J. D., Stravge, R. C. (1995) Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Radic. Res.*, 22(3), 193-207.
  28. Bengt, M., Rer, A., Cleas, G., Helgi, J., Warholm, and Hans, J (1995) Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: Correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*,

- 82, 7202-7206.
29. Sugimoto, M. (1995) Glutathione S-transferase. *Nippon Rinsho-Japanese Journal of clinical Medicine.*, 53, 1253-1259.
  30. Masaharu, S., Yuko, M., Mako, N. and Shinzo, N. (1995) Suppression of Rat Glutathione Transferase P Expression by Peroxisome Proliferator-activated-Receptor-Alpha.
  31. Tee, (1996) Dual phenotypic expression of hepatocytes and bile ductular markers in developing and preneoplastic rat liver. *Carcinogenesis.*, 17, 251-259.
  32. 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, 545-551.
  33. Imagawa, M. (1996) Regulation mechanism of specific expression of tumor marker gene during carcinogenesis. *Yakugaku Zasshi*, 116(7), 627-632.
  34. Sakai, M., (1996) Regulation of tumor marker gene expression. *Nippon Rinsho.*, 54(6), 1560-1567.
  35. 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.
  36. Waxman, D. J., Sundseth, S. S., Srivastava, P. K., and Lapenson, D. P. (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.



37. Morel, F., Fardel, O., Meyer, D. J. (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.
38. Hertervig, 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.
39. Margaret, M. M., Helen, W. L. B., Mandy, C. B., Helen, L. C., David, J. J., Gary, W., and Gordon, E. N. (1997) Mechanism of action of dietary chemoprotective agents in rat liver: induction of phase I and phase II drug metabolizing enzymes and aflatoxin B1 metabolism.
40. Rushmore, T. H., Morton, M. R., Pickett, C. B. (1991) The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem.*, 266, 11632-11639.
41. Nguyen, T., Rushmore, T. H., Pickett, C. B. (1994) Transcriptional regulation of a rat liver glutathione S-transferase Ya subunit gene. Analysis of the antioxidant response element and its activation by the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *J Biol Chem.*, 269, 13656-13662.
42. Prestera, T., Talalay, P., Alam, J., Ahn, Y. I., Lee, P. J., Choi, A. M. K. (1995) Parallel induction of heme oxygenase-1 and chemoprotective phase 2 enzymes by electrophiles and antioxidants: Regulation by upstream antioxidant responsive elements (ARE). *Mol Med.*, 1, 827-837.

43. Rushmore, T. H., King, R. G., Paulson, K. E., Pickett, C. B. (1990) Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: Identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 87, 3826-3830.
44. Friling, R. S., Bergelson, S., Daniel, V. (1992) Two adjacent AP-1-like binding sites from the electrophile-responsive element of the murine glutathione S-transferase Ya subunit gene. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 89, 668-672.
45. Bergelson, S., Daniel, V. (1994) Cooperative interaction between ERS and AP-1 transcription factors regulates induction of glutathione S-transferase Ya gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.*, 200, 290-297.
46. Wilkinson IV, J., Clapper, M. L. (1997) Detoxication enzymes and chemoprevention. *Proc Soc Exp Biol Med.*, 216, 192-200.
47. 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.
48. Alley, M. C., Pacula-Cox, C. M., Hursey, M. L., Rubinstein, R. and Boyd, M. R. (1991) Morphometric and colorimetric analysis of human tumor cell line growth and drug sensitivity in soft agar culture. *Cancer Res.*, 51, 1247.
49. 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., (1998) Feasibility of drug screening with paneks of human tumor

- cell lines using microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.*, 48, 589.
50. Kikkawa, U., Takai, Y., Minakuche, R., Inohara, S. and Nishizuka, Y. (1982) Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain: subcellular distribution, purification and properties. *J. Biol. Chem.*, 257, 13341-13348.
51. Yu, R., Jiao, J. J., Duh, J. L., Gudehithlu, K., Tan, T. H. and Kong, A. N. T. (1997) Activation of mitogen-activated protein kinases by green tea polyphenols: potential signaling pathways in the regulation of antioxidant-responsive element-mediated Phase II enzyme gene expression. *Carcinogenesis*, 18(2), 451-456.
52. Dong, Z., Ma, W., Huang, C. and Yang, C. S. (1997) Inhibition of tumor promoter-induced activator protein 1 activation and cell transformation by tea polyphenols, (-)-epigallocatechin gallate, and theaflavins.
53. Tadai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M., and Nishizuka, Y. (1977) Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissue. *J. Biol. Chem.*, 252, 7603-7609.
54. Nishizuka, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature*, 308, 693-698.
55. Nishizuka, Y. (1984) Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science*, 225, 1365-1370.
56. Hunter, T., Ling, N. and Cooper, J. A. (1984) Protein kinase C phosphorylation of the EGF receptor at a threonine residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane. *Nature*, 311, 480-483.
57. Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme, D. and Rapp, U. R. (1993) Protein kinase C- $\alpha$  activates Raf-1 by direct phosphorylation. *Nature*, 364, 249-252.

58. Crews, C. M., Alessandrini, A. and Erikson, R. L. (1992) Erks: There fifteen minutes have arrived. *Cell Dif*, 3, 135-142.
59. Molecular signal integration. Interplay between serum, theonine and tyrosine phosphorylation. *Mol. Biol. Cell.*, 3, 585-592.