



行政院國科會專題研究計畫成果期末報告

計畫編號：NSC 89-2320-B-040-052

✓ NSC 90-2320-B-040-011

含硫氨基酸及荷爾蒙調控肝細胞麩胱甘肽合成之研究

執行期限：89年8月1日至91年7月31日

主持人：李宗貴

參與人員：楊頌芬、蔡佩璋、陳婉茹

執行單位：中山醫學大學營養科學系

緣由與目的

麩胱甘肽(Glutathione, GSH)為胞內重要三胜肽分子，由 glutamate、cysteine 及 glycine 三個胺基酸所組成，其生合成分別受到 γ -glutamylcysteine synthetase (GCS)及 glutathione synthetase (GS)兩個 ATP 依賴型酵素的催化反應調節(Griffith, 1999; Lu, 1999)。GSH 廣泛分佈在真核生物體中，如動、植物與微生物等，通常 GSH 濃度約在 1~10 mM 間，而在哺乳動物肝細胞中的 GSH 濃度更高達 10 mM (Soltaninassab et al., 2000)。GSH 以還原型(GSH)及氧化型(GSSG)兩種形式存在，在體內扮演多種重要的生理功能角色，比如清除自由基與過氧化物，以對抗氧化壓力(Sugiyama et al., 2000)、參與外來物的解毒作用(Blaauboer, 1996)、扮演還原劑的角色，以維持體內氧化還原狀態(Griffith, 1999)、提供半胱胺酸的儲存及運送(Lu, 1999)、參與蛋白質與 DNA 合成、刺激干擾素 IL-1 及 IL-2 的產生，促使淋巴球細胞增生，以增強免疫細胞對抗外來物質的侵略，提升免疫功能(Wu et al., 1994)、參與維生素 E 再生等生理功能(Ibrahim, 1999)。在 GSH 各種不同的生理功能中，又以解毒作用與抗氧化作用最為人所熟知。解毒作用方面，GSH 在 GST (glutathione S-transferase)酵素催化下，可將此三胜肽分子與外來物(xenobiotics, Xe)結合，提高代謝產物(GSH-Xe)的水溶解能力(Wormhoude et al., 1999)，使化合物增加親水性，並增加排出體外的速率(Teyssier et al., 2001; Iersel et al., 1999; Rahman et al., 1999)；抗氧化作用方面，GSH 可作為第一道防禦體系之天然抗氧化物質，其半胱氨酸殘基上所含的巯基(-SH group)在消除體內過氧化氫與自由基中扮演著重要的角色，除可直接清除活性氧、參與維生素 C、E 再生外、也可作為 GSH 過氧化酶(glutathione peroxidase)的受質而將體內過氧化物還原，保護細胞免受氧化傷害(Keppler, 1999; Rahman, 1999)。許多證據顯示，GSH 與白內障、老化、心血管疾病、C 型肝炎、第二型糖尿病、發炎、癌症、HIV 等，具有密切的關係(Choi et al., 2000; Iwata-Ichikawa et al., 1999)。目前，血液或細胞組織中 GSH 濃度已成為健康與疾病判別的一項指標，因此如何維持胞內 GSH 濃度於正常的範圍，也就相形重要。

決定 GSH 生合成的兩個酵素中，一般認為 GCS 是第一限制調節酵素，已有相當證據指出，其為合成速率決定步驟，GCS 受到許多因子的調節，比如氧化壓力的高低、抗氧化劑、藥物、GSH 消耗劑的存在於否等(Soltaninassab et al., 2000; Tsuboi, 1999; Cai et al., 1997)，除此之外，GCS 活性也受到多種荷爾蒙的影響，比如胰島素、甲基脫氫皮質醇及升糖激素(glucagon)等(Huang et al., 1998; Rahman et al., 1998; Cai et al., 1997)。升糖激素可透過 cAMP 來調控胞內 GSH 釋出至胞外，或經由 PKA (protein kinase A)、PKC (protein kinase C)或 CMK (Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II)作用磷酸化 GCS，因而降低 GCS 活性(Sun et al., 1996)。除此之外，交感神經加壓素(phenylephrine)與血管加壓素(vasopression)也可透過 Ca^{2+} / protein kinase C 的途徑抑制 GCS 活性，進而降低 GSH 合成(Goss et al., 1994)。Cai 等人(1995)在初代培養肝細胞中發現，若於培養液中添加胰島素或氫化可體松(hydrocortisone)，或是細胞種植密度較低時(高密度為 0.6 x

10^5 cell/cm²，而低密度為 0.1×10^5 cell/cm²)，可提升 GCS 活性，因而使胞內有較高 GSH 濃度。

麩胱甘肽硫轉移酶(glutathione S-transferases, GST)是生物轉換酵素系統 Phase II 中重要的酵素之一(Cabelguenne et al., 2001; Dusinska et al., 2001)，它是一個複合酵素家族，屬 dimer 型式，至少有 8 種同分異構酶和多種不同的次單元體，大部分存在細胞質中，而少部分則存在於粒線體(Rahman et al., 1999)。在各種 GST 同分異構酶中，胎盤型麩胱甘肽硫轉移酶(placental form of GST, PGST)在正常體內肝細胞中表現量很低，但在一些特定條件下，PGST 會被誘發並大量表現，此現象一般認為對細胞解毒能力應有正面助益(Chen et al., 2001)，另一方面，由於 PGST 在多種細胞中常隨著癌化會大量表現，例如：它與肝癌的形成有關，可降低肝癌的發生率(Nakae et al., 1998)。因此細胞如何調控此解毒酵素活性及表現，是相當值得探討的課題。

氨基酸濃度在體內必需維持一個穩定的狀態，此恆定現象具有多樣性的重要功能，例如作為生合成各種蛋白質的原料、修補體組織、維持體液的中性、調控多種基因表現，以及對於哺乳類的生理功能做調節等(Fafournoux et al., 2000)。若體內缺乏某一種必需氨基酸或蛋白質攝取不足，將會影響到氮的代謝或引發各種壓力的形成。許多研究指出，因為營養因子狀況的改變或是各種壓力的形成而造成氨基酸血症 (amino-acidemia)時，將引起多種生理功能的改變，生物體為了對抗或適應這個改變，氨基酸因此有必需而且也必要適時的扮演著一個訊號的角色，調節多種基因的表現，幫助生物體適應改變後的營養狀態(Fafournoux et al., 2000)。例如，Fafournoux 等人(1998)即發現在人類 HepG2 細胞株和大鼠肝細胞中，當限制 leucine 供應時，可誘發 IGFBP-1 表現，但 IGF- I 和 IGF- II 表現則不受影響，此證據明顯指出 leucine 的供給可透過調節 IGFBP-1 表現，在 IGFs 相關生理活性中扮演著關鍵因素。

本研究將肝細胞培養於不同含硫氨基酸(cysteine/methionine)濃度及有無添加胰島素、甲基脫氫皮質醇(dexamethasone)的培養液中，探討含硫氨基酸濃度及胰島素、甲基脫氫皮質醇對 GSH 濃度、GCS 及 PGST 表現的影響。

材料與方法

雄性 Sprague-Dawley 大白鼠(6-7 週齡)，由國家科學委員會實驗動物繁殖及研究中心購進。依據二階段膠原蛋白酶(collagenase)灌流法分離初代肝細胞(Wang et al., 1997)，將細胞懸浮於以 L-15 為基礎的培養液中(含 18 mM HEPES, 2.5% FBS(fetal bovine serum), 5 mg/L insulin, 5 mg/L transferrin, 1 g/L galactose, 1 μ M/L dexamethasone, 100,000 U/L, 100 mg/L streptomycin, 5 μ g/L Na₂SeO₃, pH 7.6)，先計算細胞數，及細胞存活率，最後將細胞懸浮液密度調整為每一毫升含 0.5 百萬個細胞，再分植到培養皿。經 4 小時著床期後，細胞培養液中的 2.5 % FBS 改以 0.2 %

BSA(bovine serum albumin)替代，培養液將依含硫氨基酸濃度分為二大組，分別為 1.0 mM L-cysteine + 1.0 mM L-methionine (正常 L-15 medium 的濃度，高含硫氨基酸組, HSAA) 及 0.1 mM L-cysteine + 0.1 mM L-methionine (低含硫氨基酸組, LSAA)；除 SAA 濃度外，HSAA 與 LSAA 組並另依 insulin 及 dexamethasone 添加與否再分為 +Ins 組、+Dex 組及均不添加組(-Ins-Dex, control)組，全部共分為 6 組(2 x 3)，每天更換一次培養液，並分別於 24h、72h、96h 及 144h 分別取樣。

胞內 GSH/GSSG 濃度：培養液吸除後，以 PBS(phosphate buffered saline)沖洗兩次，加入 1 ml(含 2.5 mM phenanthroline / 0.5 mM BHT) 5% PCA(perchloric acid)溶液，取出酸液加入 iodoacetic acid 溶液，並以 potassium bicarbonate 中和，2,4-dinitro-fluorobenzen 顯色後即可利用 HPLC 分析(Reed et al., 1980)。

酵素活性分析：移除培養液後，細胞先以 PBS 清洗細胞二次，加入 0.5 mL 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4. 刮取細胞，細胞液利用超高速離心機分離細胞質液，GCS 酵素活性依據 Seelig and Meister (1985)發表方法測量。GST 及 PGST 酵素活性依據 Habig and Jakoby (1974)發表方法測量。

GCS 抗血清製備：加入 1 mL Trizol reagent 抽取肝細胞 RNA，依據 GCS 核酸序列設計引子再利用 RT-PCR 製備 DNA，經電泳分析確認後，將純化 PCR 產物載入 pET32a 質體中，隨後送入 JM109 細胞中增殖，培養後所篩選出的質體 DNA 將利用核酸定序以 ABI PRISM™ Cycle sequencing kit 確認核酸序列是否正確。將確認無誤的 pET32a 質體送入宿主 BL21(DE3)細胞中，並以 2 mM isopropyl-D-thiogalactopyranoside 誘發蛋白表現，經 Ni-metal column 純化所得蛋白質以皮下方式注射入兔子體內誘發抗體製造，抗血清則於第二次補強注射後每兩週收集一次。

蛋白質表現之分析：每一樣本取等量蛋白質(5 μ g)，GCS 及 PGST 分別利用 8%及 10% SDS-polyacrylamide gels 于 160 伏特電壓下進行電泳。之後以西方墨點法(Western blotting) (Tombin et al., 1979)將蛋白質轉印至 PVDF 膜上，然後以免疫染色法分析蛋白質表現。

mRNA 表現之分析：以 TRIZOL reagent 抽取肝細胞 Total RNA，每個樣品取等量 RNA (20 μ g)後，跑洋菜膠(agarose)電泳後，將 Total RNA 轉印至硝化纖維膜 (Hybond™-N+) 上，之後以北方墨點法(Northern blot)經預雜交及雜交反應 (prehybridization & hybridization)，利用 α ³²P-dCTP 標定後，分析 mRNA 之表現。

結果與討論

抗體確認：

所採集抗血清分別利用(一)臟器酵素活性與蛋白質表現相關(圖一)，(二)分子篩濾層析法(圖二)進行確認，如圖所示：腎臟有最高 GCS 活性，心臟與肝臟次之(圖一 A)，利用採集兔子抗血清行免疫墨點法所得結果，顯示除了心臟外，各組織酵素活性與蛋白質表現一致(圖一 B)。腎臟均質液經分子篩濾層析所得圖譜如圖二 A，所收集各分區濾出液 GCS 活性如圖二 B 所示，將各分區濾出液 GCS 活性與免疫墨點法所得蛋白質表現量相較下，可見 27.67 分鐘所得蛋白濾出液活性與蛋白表現一致。

細胞蛋白質總量：

肝細胞無論是培養在高濃度或低濃度含硫氨基酸的培養液中，在六天的培養期間，各組細胞蛋白質含量的變化均相似，均呈緩慢遞減現象，第 6 天時蛋白質約為新鮮肝細胞的 60%(圖三)，至於荷爾蒙組與控制組比較下，相差不大。

胞內 GSH 濃度：

雖然各組蛋白質總量並無差異，但須利用半胱氨酸做為原料的 GSH 則在 HSAA 與 LSAA 培養條件下呈現明顯差異，HSAA 組胞內 GSH 濃度從第 1 天後即明顯較 LSAA 組高，到第 3 天時 HSAA 組 GSH 濃度可高達 LSAA 組的 1 倍；各組細胞內 GSH 濃度均於前三天逐漸上升，第 3 天達到最高，隨後逐漸下降(圖四)。至於荷爾蒙效應，則僅 Dex 處理組顯著影響胞內 GSH 濃度，無論是在 HSAA 或 LSAA 培養下，+Dex 組的 GSH 濃度均低於+Ins 組及 control 組，且於第 4 天時顯著低於對照組($P < 0.05$)。而+Ins 組及 control 組無論是在 HSAA 或 LSAA 培養下，兩組間 GSH 含量均沒顯著差異。

胞內 GSSG 濃度：

胞內 GSSG 的濃度變化與胞內 GSH 結果相似，HSAA 組的 GSSG 含量明顯高於 LSAA 組(圖五)。HSAA 組的胞內 GSSG 濃度維持 6 天期間漸次增加，LSAA 組的胞內 GSSG 濃度變化，則是前三天逐漸上升，第 3 天達到最高峰，隨後逐漸下降。至於胰島素與甲基脫氫皮質醇的效應，也與胞內 GSH 濃度變化的結果相似，大抵是+Ins 組與 control 組高於+Dex 組，且在第 6 天時，+Ins 組顯著高於+Dex 組($P < 0.05$)。

酵素活性分析：

GCS：各組細胞 GCS 活性經六天培養期間是遞減情形，第 6 天的酵素活性相較新鮮肝細胞，(HSAA 組為 215.86 ± 20.44 與 164.9 ± 31.47 , $n=12$; LSAA 組則為 215.86 ± 20.44 與 181.37 ± 30.49 , $n=12$)，並無明顯差異(圖六)，Ins 或 Dex 對 GCS 活性也無

影響。

GST：以 CDNB 為受質時所測得酵素活性的如圖七所示，LSAA 組的 GST 活性高於 HSAA 組，第 3 天時 HSAA 組與 LSAA 組酵素活性分別是 1410.62 ± 203.41 ($n=12$) 與 1869.49 ± 264.02 ($n=12$)，培養期間，HSAA 組 GST 活性維持穩定但緩慢下降的狀況，但 LSAA 組 GST 活性則是前三天逐漸上升，第 3 天達到最高，隨後逐漸下降。比較荷爾蒙效應時，HSAA 組的荷爾蒙效應並不明顯，而 LSAA 組的荷爾蒙效應則為第 4 天後，為 control 組明顯低於 +Dex 組及 +Ins 組 ($P < 0.05$)。

PGST：除了以 CDNB 為受質外，我們另以 ethacrynic acid 為受質針對 PGST 進行酵素活性分析，結果顯示(圖八)：各組細胞 PGST 活性在六天培養期間，均隨時間增加而遞增，同樣的酵素活性也是以 LSAA 組高於 HSAA 組，第 3 天時兩組活性分別為 612.79 ± 132.03 ($n=12$) 與 707.13 ± 116.66 ($n=12$)。比較荷爾蒙效應，不論 HSAA 組及 LSAA 組，對照組酵素活性均高於 +Ins 組及 +Dex 組，且第 6 天均達顯著差異水準 ($P < 0.05$)。

蛋白質表現分析：

GCS：GCS 蛋白質表現的結果與 GCS 活性相似，各組細胞 GCS 蛋白質表現在六天培養期間，均隨著時間而遞減(圖九)。當比較含硫氨基酸的效應時，LSAA 組的 GCS 蛋白質含量稍高於 HSAA 組，且第六天時最顯著。至於 Ins 與 Dex，對 GCS 蛋白質表現則無影響。

PGST：與 PGST 活性變化相似，無論在 LSAA 或 HSAA 培養條件下，各組細胞 PGST 蛋白質表現在六天培養期間，均是隨著時間而遞增(圖十)，且 LSAA 組的 PGST 蛋白質表現高於 HSAA 組。至於 Ins 與 Dex 的效應，不論在 HSAA 組及 LSAA 組，也可發現 +Dex 組的 PGST 蛋白質質量低於 control 組及 +Ins 組，顯示甲基脫氫皮質醇抑制 PGST 蛋白質的表現，然而胰島素對 PGST 蛋白質表現則無作用。

mRNA 表現分析：

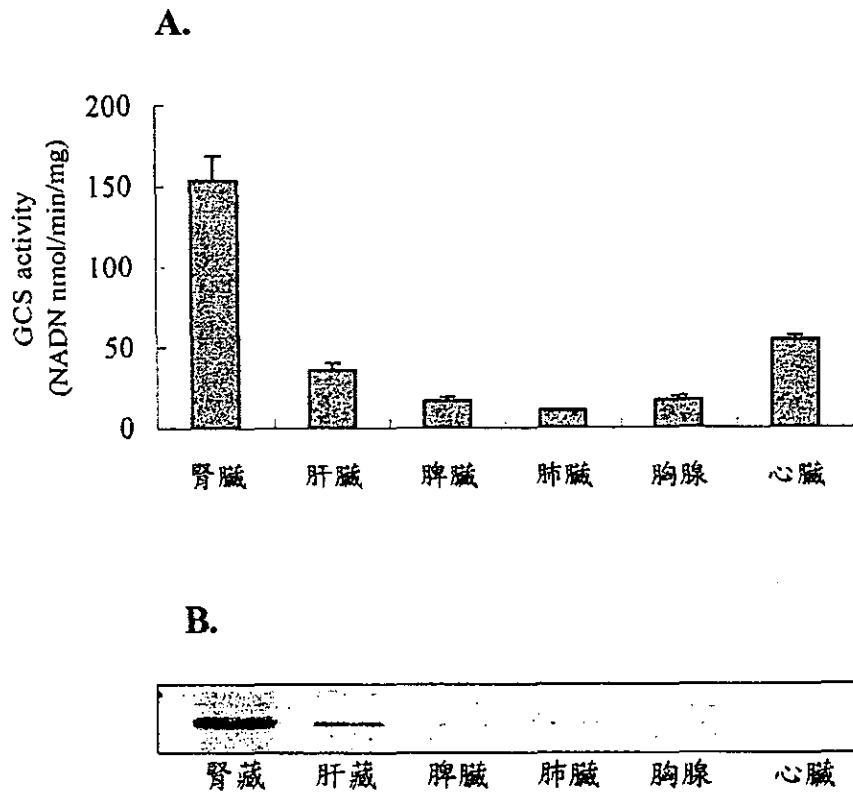
GCS 及 PGST mRNA 的表現與蛋白質表現結果一致，各組 GCS mRNA 表現均於第 1 天後即呈現減少現象，但 LSAA 組減少趨勢較為緩和(圖十一)，至於 PGST mRNA 的表現則各組均隨時間而遞增，同樣的，LSAA 組 mRNA 含量較 HSAA 組高(圖十一)。至於荷爾蒙效應則如圖十二所示，不論 HSAA 組及 LSAA 組，+Dex 組 PGST mRNA 均明顯低於 +Ins 組，至於 GCS mRNA 的表現則不受影響。

參考文獻

- Blaauboer, B. M., Niesink, J. M., Vries, J. and Hollinger, M. A. (1996) Biotransformation: detoxication and bioactivation. In *Toxicology*, pp 41-45. CRC Press, London.
- Cabelguenne, A., Lorient, M. A., Stucker, I., Blons, H., Koum-Besson, E., Brasnu, D., Beaune, P., Laccourreye, O., Laurent-Puig, P. and Waziers, I. D. (2001) Glutathione-associated enzymes in head and neck squamous cell carcinoma and response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy. *Int. J. Cancer* 93: 725-730.
- Cai, J., Huang, Z.-Z. and Lu, S. C. (1997) Differential regulation of γ -glutamylcysteine synthetase heavy and light subunit gene expression. *Biochem. J.* 326: 167-172.
- Cai, J., Sun, W.-M. and Lu, S. C. (1995) Hormonal and cell density regulation of hepatic γ -glutamylcysteine synthetase gene expression. *Mol. Pharmacol.* 48: 212-218.
- Chen, H. W., Yang, J.J., Tsai, C. W., Wu, J.J., Sheen, L. Y., Ou, C.C. and Lii, C.K. (2001) Dietary fat and garlic oil independently regulate hepatic cytochrome P₄₅₀ 2B1 and the placental form of glutathione S-transferase expression in rats. *J. Nutr.* 131: 1438-1443.
- Choi, J., Liu, R.-M., Kundu, R. K., Sangiorgi, F., Wu, W., Maxson, R. and Forman, H. J. (2000) Molecular mechanism of decreased glutathione content in human immunodeficiency virus type 1 Tat-transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 275: 3693-3698.
- Dusinska, M., Ficek, A., Horska, A., Raslova, K., Petrovska, H., Vallova, B., Drlickova, M., Wood, S. G., Stupakova, A., Gasparovic, J., Bobek, P., Nagyova, A., Kovacikova, Z., Blazicek, P., Liegebel, U. and Collins, A. R. (2001) Glutathione S-transferase polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage and antioxidant protection in humans. *Mutat. Res.* 482: 47-55.
- Fafournoux, P., Bruhat, A and Jousse, C. (2000) Amino acid regulation of gene expression. *Biochem. J.* 351: 1-12.
- Goss, P. M., Bray, T. M. and Nagy, L. E. (1994) Regulation of hepatocyte glutathione by amino acid precursors and cAMP in protein-energy malnourished rats. *J. Nutr.* 124: 323-330.

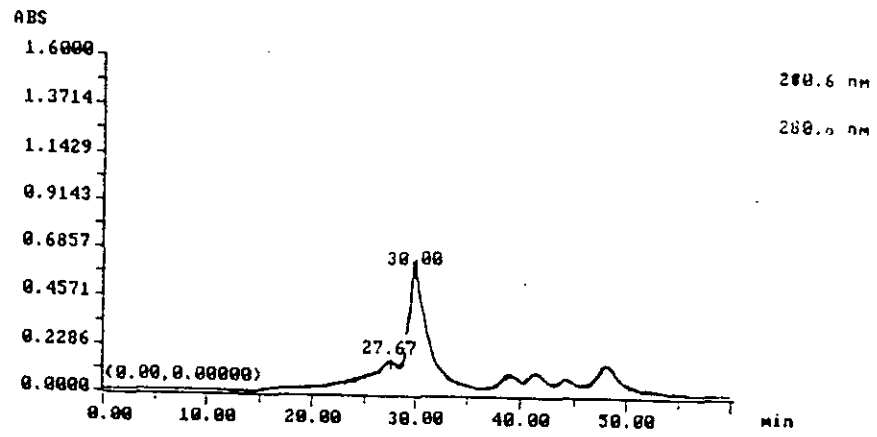
- Griffith, O. W. (1999) Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 922-935.
- Habig, W. H. and Jakoby, W. B. (1974) Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139.
- Ibrahim, W., Lee, U.-S., Szabo, J., Bruckner, G. and Chow, C. K. (1999) Oxidative stress and antioxidant status in mouse kidney: effects of dietary lipid and vitamin E plus iron. *J. Nutr. Biochem.* 10: 674-678.
- Iersel, M. P. S., Verhagen, H. and Bladeren, P. J. (1999) The role of biotransformation in dietary (anti) carcinogenesis. *Mutat. Res.* 443: 259-270.
- Iwata-Ichikawa, E., Kondo Y., Miyazaki, I., Asanuma, M. and Ogawa, N. (1999) Glial cells protect neurons against oxidative stress via transcriptional up-regulation of the glutathione synthesis. *J. Neurochem.* 72: 2334-2344.
- Keppler, D. (1999) Export pumps for glutathione S-conjugates. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 985-991.
- Lu, S. C. (1999) Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J.* 13: 1169-1183.
- Nakae, D., Denda, A., Kobayashi, Y., Akai, H., Tsujiuchi, T., Konishi, Y., Suzuki, T. and Muramatsu, M. (1998) Inhibition of early-phase exogenous and endogenous liver carcinogenesis in transgenic rats harboring a rat glutathione S-transferase placental form gene. *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 1118-1125.
- Rahman, I., Antonicelli, F. and MacNee, W. (1999) Molecular mechanism of the regulation of glutathione synthesis by tumor necrosis factor- α and dexamethasone in human alveolar epithelial cells. *J Biol. Chem.* 274: 5088-5096.
- 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 thols and disulfides. *Anal. Biochem.* 106: 55-62.

- Seelig, G. F. and Meister, A. (1985) Glutathione biosynthesis: γ -glutamylcysteine synthetase from rat kidney. *Methods Enzymol.* 113: 379-390.
- Soltaninassab, S. R., Sekhar, K. R., Meredith, M. J. and Freeman, M. L. (2000) Multi-faceted regulation of γ -glutamylcysteine synthetase. *J. Cell Physiol.* 182: 163-170.
- Sugiyama, K. I., Izawa S. and Inoue, Y. (2000) The Yap1p-dependent induction of glutathione synthesis in heat shock response of *saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275: 15535-15540.
- Sun, W. M., Huang, Z. Z. and Lu, S. C. (1996) Regulation of γ -glutamylcysteine synthetase by proteine phosphorylation. *Biochem. J.* 320: 321-328.
- Teyssier, C., Amiot, M. J., Mondy, N., Auger, J., Kahane, R. and Siess, M. H. (2001) Effect of onion consumption by rats on hepatic drug-metabolizing enzymes. *Food Chem. Toxicol.* 39: 981-987.
- Tombin, H., Staehelin, T. and Gordan, J. (1979) Electrophoretic transfer protein form polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 7:4350-4356.
- Tsuboi, S. (1999) Elevation of glutathione level in rat hepatocytes by hepatocyte growth factor via induction of γ -glutamylcysteine synthetase. *J. Biochem.* 126: 815-820.
- 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.
- Wormhoude, L. W., Commandeur, J. N. M. and Nico, P. E. (1999) Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathion-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 29: 59-124.
- Wu, D., Meydani, S. N., Sastre, J., Hayek, M. and Meydani, M. (1994) In vitro glutathione supplementation enhances interleukin-2 production and mitogenic response of peripheral blood mononuclear cells from young and old subjects. *J. Nutr.* 124: 655-663.

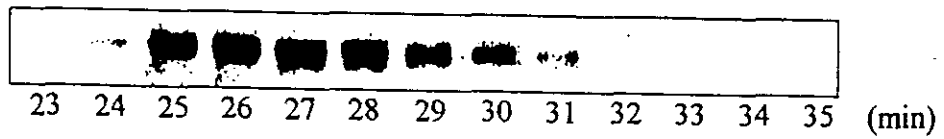
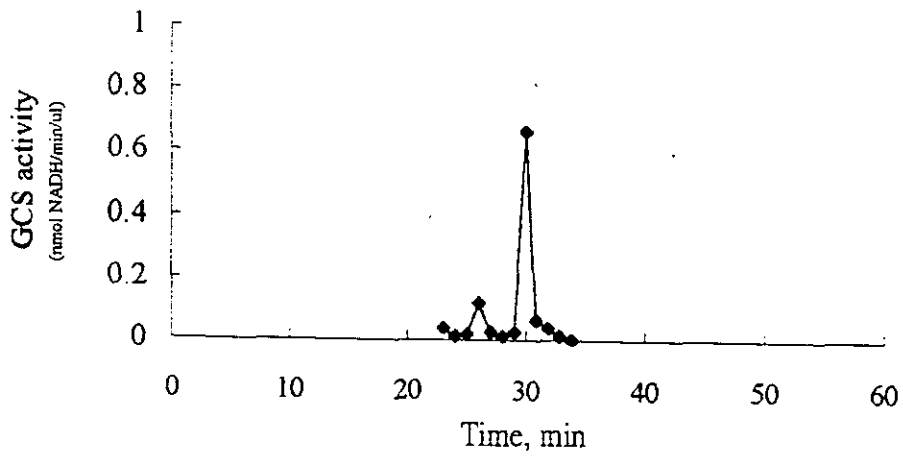


圖一、(A)測定不同器官 γ -GCS 活性(means \pm SD, n=2)。
(B)蛋白質表現之情形(20 μ g/lane)。

A.



B.

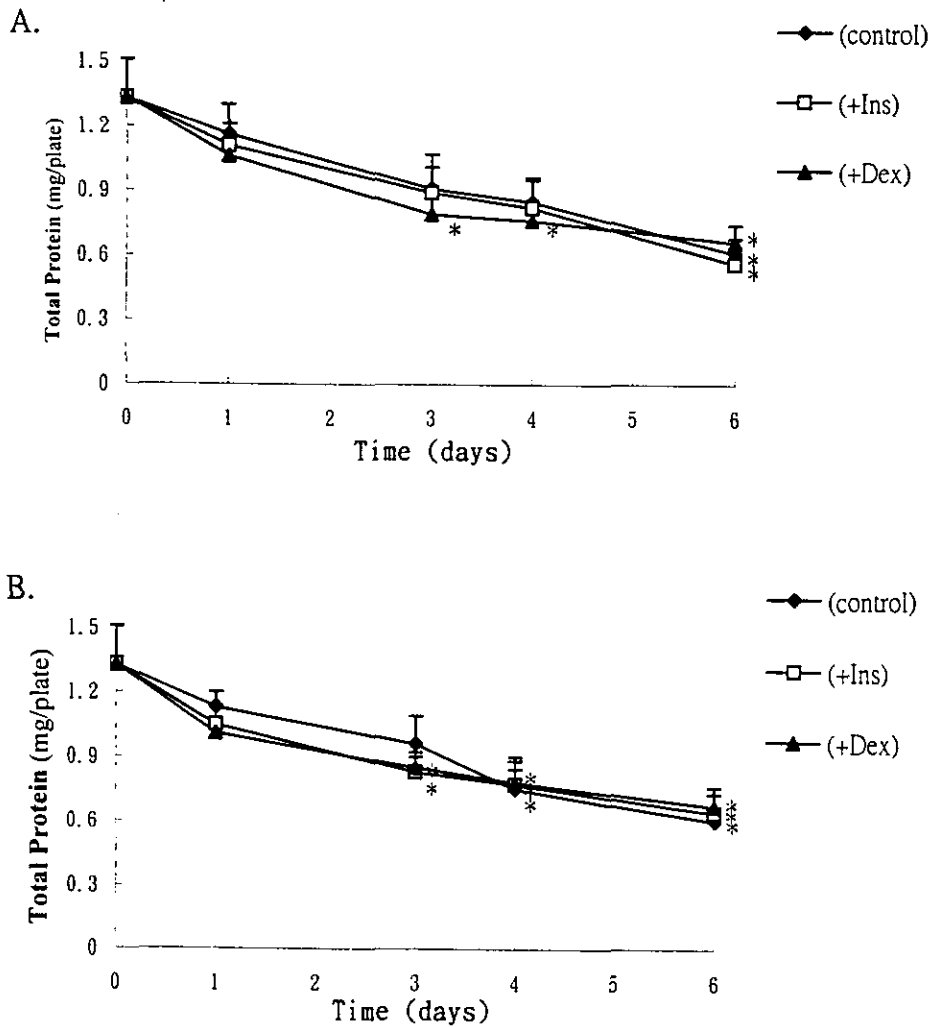


圖二、經分子篩濾層析法，進一步確認抗體的正确性。

(A)層析圖。

(B) γ -GCS 活性之曲線圖。

(C) γ -GCS 蛋白質表現之情形。



圖三、胰島素、甲基脫氫皮質醇在不同含硫氨基酸濃度下對細胞蛋白質總量之影響。

結果以平均值±標準差表示(means±SD, n=4)。

A. 1.0 mM Met + 1.0 mM Cys (HSAA)

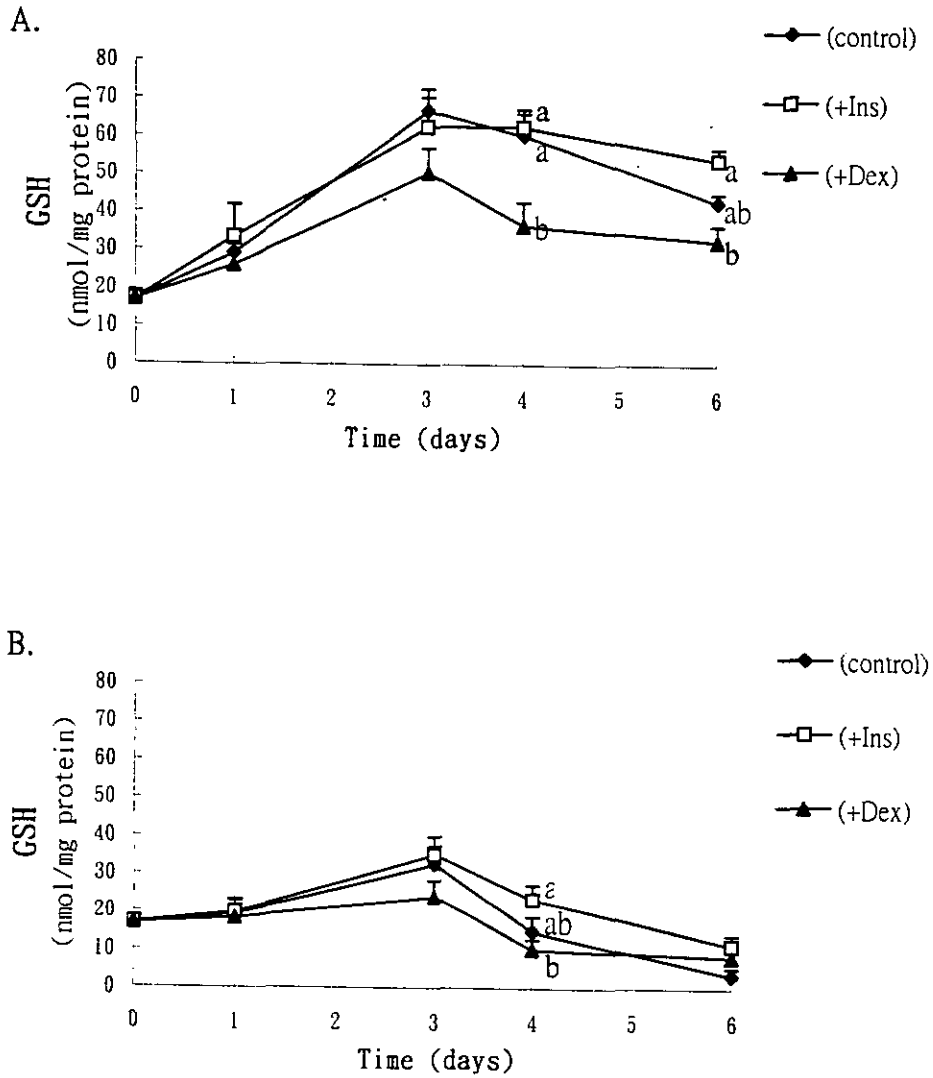
B. 0.1 mM Met + 0.1 mM Cys (LSAA)

control: 未以胰島素(insulin)及甲基脫氫皮質醇(dexamethasone)處理

+Ins: 1.4 μ M insulin

+Dex: 1.0 μ M dexamethasone

*與第0天做比較，具顯著差異(P<0.05)。



圖四、胰島素、甲基脫氫皮質醇在不同含硫氨基酸濃度下對胞內還原型胱胺甘肽含量之影響。

結果以平均值±標準差表示(means±SD, n=4)。

A. 1.0 mM Met + 1.0 mM Cys (HSAA)

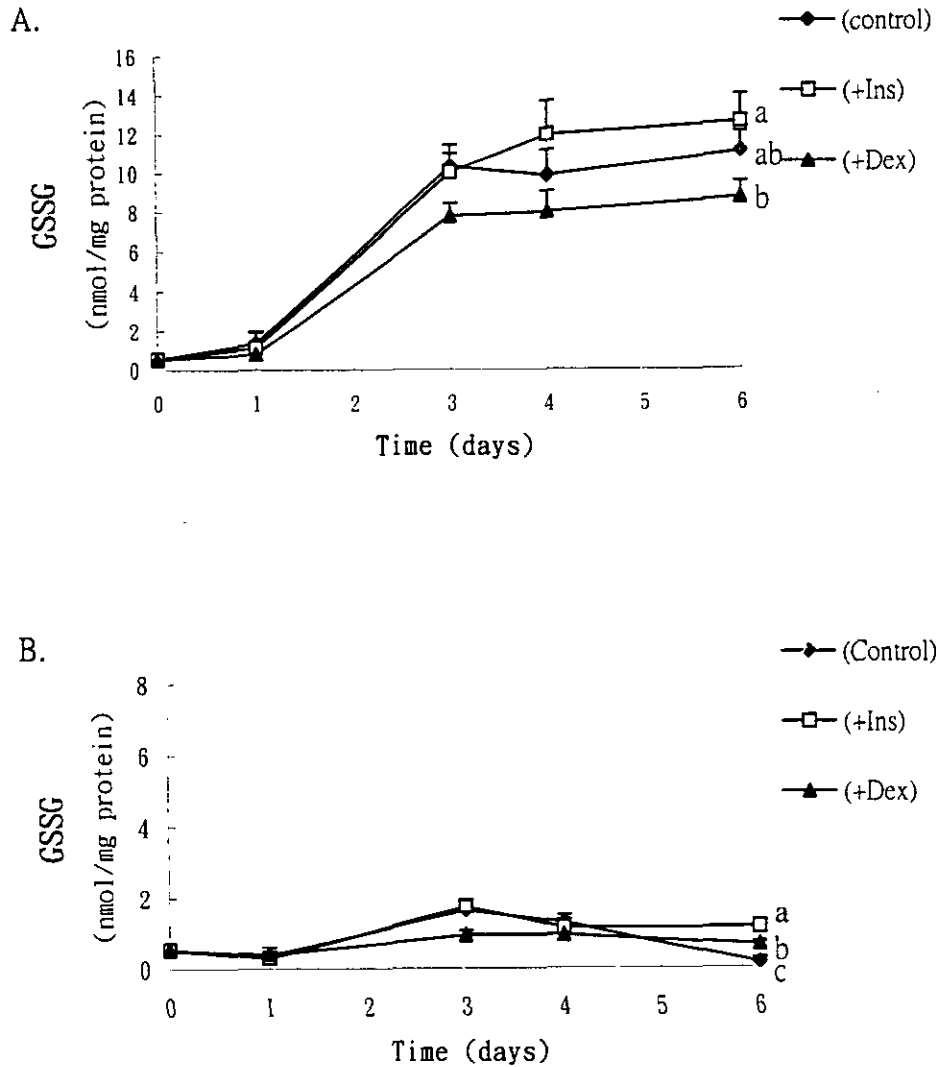
B. 0.1 mM Met + 0.1 mM Cys (LSAA)

control: 未以胰島素(insulin)及甲基脫氫皮質醇(dexamethasone)處理

+Ins: 1.4 μM insulin

+Dex: 1.0 μM dexamethasone

ab 相同時間下，各組間有不同符號者表示具顯著差異(P<0.05)。



圖五、胰島素、甲基脫氫皮質醇在不同含硫氨基酸濃度下對胞內氧化型麩胱甘肽含量之影響。

結果以平均值±標準差表示(means±SD, n=4)。

A. 1.0 mM Met + 1.0 mM Cys (HSAA)

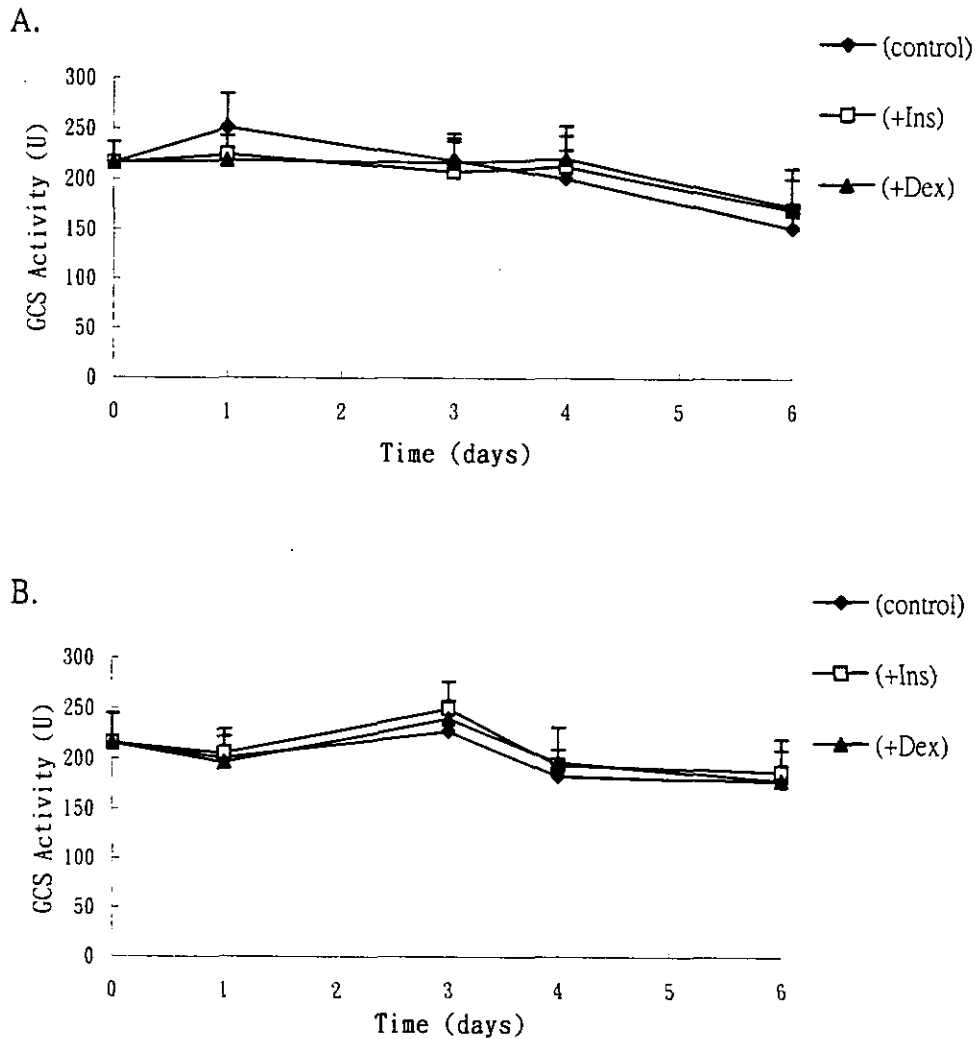
B. 0.1 mM Met + 0.1 mM Cys (LSAA)

control: 未以胰島素(insulin)及甲基脫氫皮質醇(dexamethasone)處理

+Ins: 1.4 μ M insulin

+Dex: 1.0 μ M dexamethasone

abc 相同時間下，各組間有不同符號者表示具顯著差異(P<0.05)。



圖六、胰島素、甲基脫氫皮質醇在不同含硫氨基酸濃度下對細胞 GCS 活性之影響。

結果以平均值±標準差表示(means±SD, n=4)。

U: nmol NADH/min/mg protein

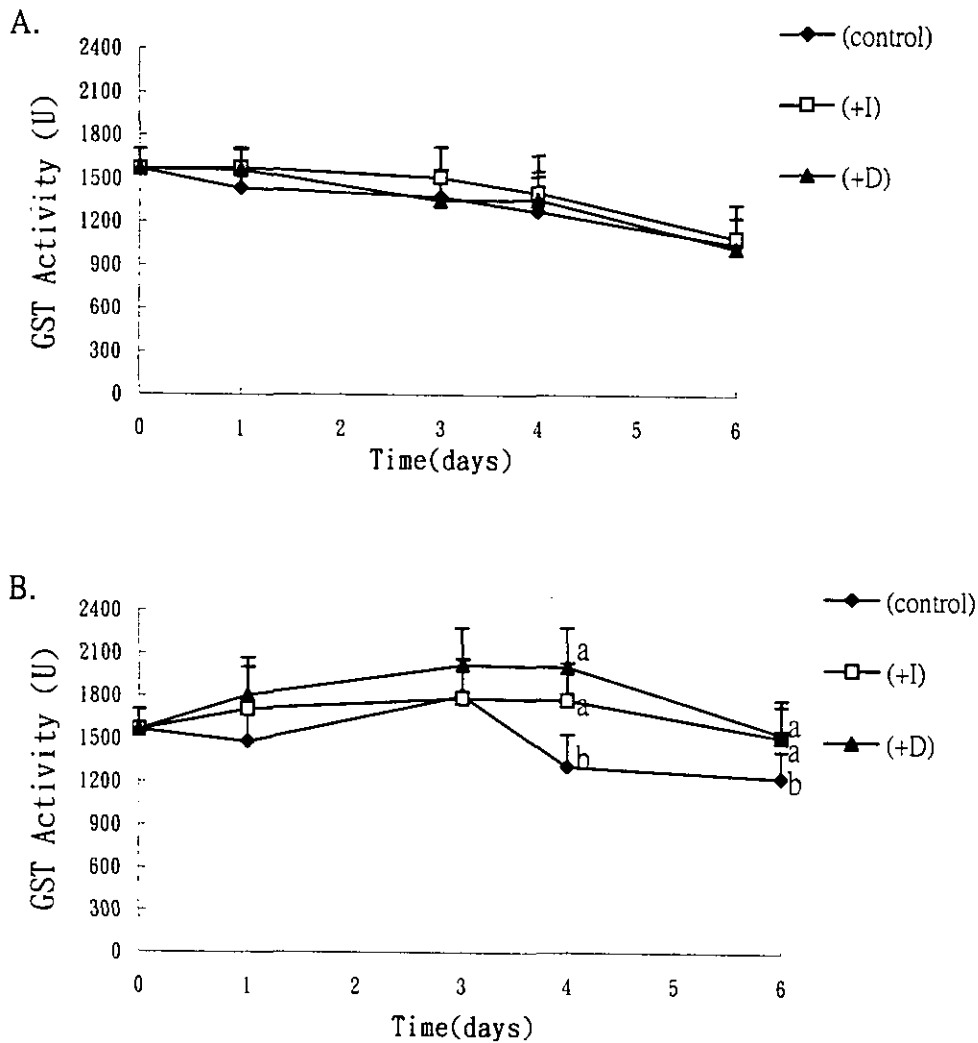
A. 1.0 mM Met + 1.0 mM Cys (HSAA)

B. 0.1 mM Met + 0.1 mM Cys (LSAA)

control: 未以胰島素(insulin)及甲基脫氫皮質醇(dexamethasone)處理

+Ins: 1.4 μ M insulin

+Dex: 1.0 μ M dexamethasone



圖七、胰島素、甲基脫氫皮質醇在不同含硫氨基酸濃度下對細胞 GST 活性之影響。

結果以平均值±標準差表示(means±SD,n=4)。

U: nmol CDNB-GSH conjugates/min/mg protein

A. 1.0 mM Met + 1.0 mM Cys (HSAA)

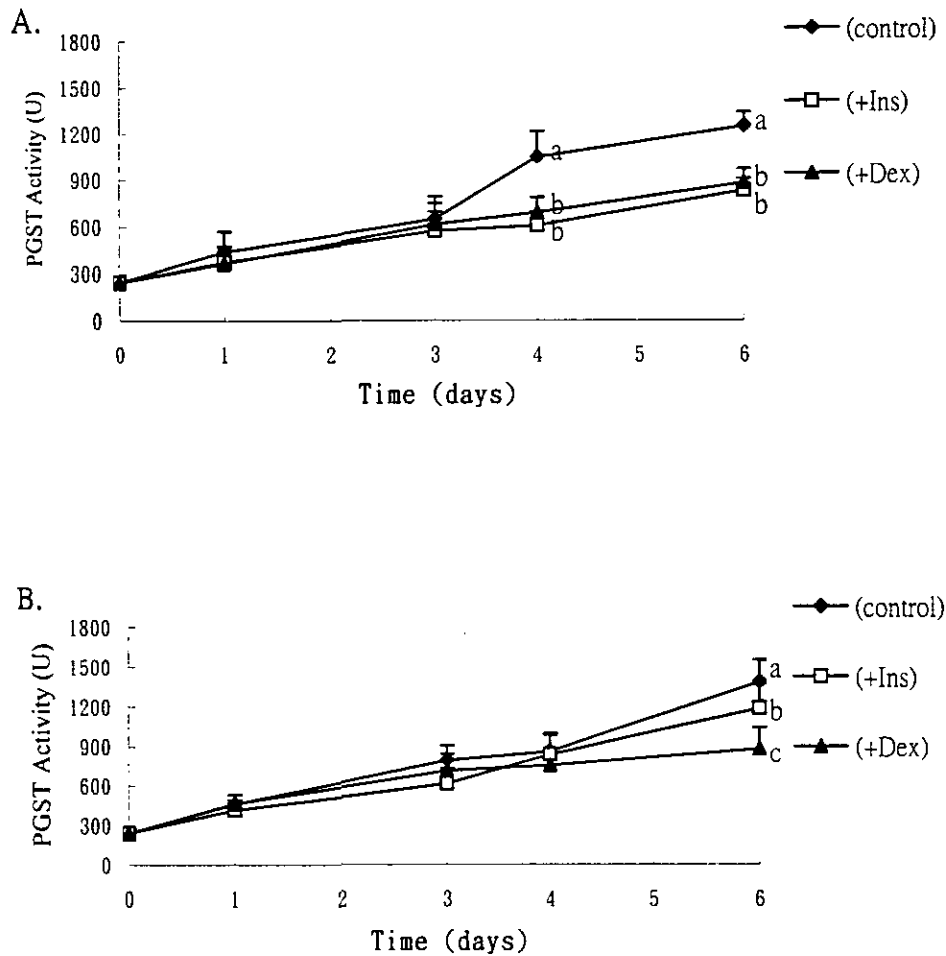
B. 0.1 mM Met + 0.1 mM Cys (LSAA)

control: 不含胰島素(insulin)及甲基脫氫皮質醇(dexamethasone)

+I: 含 1.4 μ M insulin

+D: 含 1 μ M dexamethasone

ab 相同時間下，各組間具有不同符號者具有顯著差異(P<0.05)。



圖八、胰島素、甲基脫氫皮質醇在不同含硫氨基酸濃度下對細胞 PGST 活性之影響。

結果以平均值±標準差表示(means±SD, n=4)。

U: nmol GSH-ethacynate conjugate formed/min/mg protein

A. 1.0 mM Met + 1.0 mM Cys (HSAA)

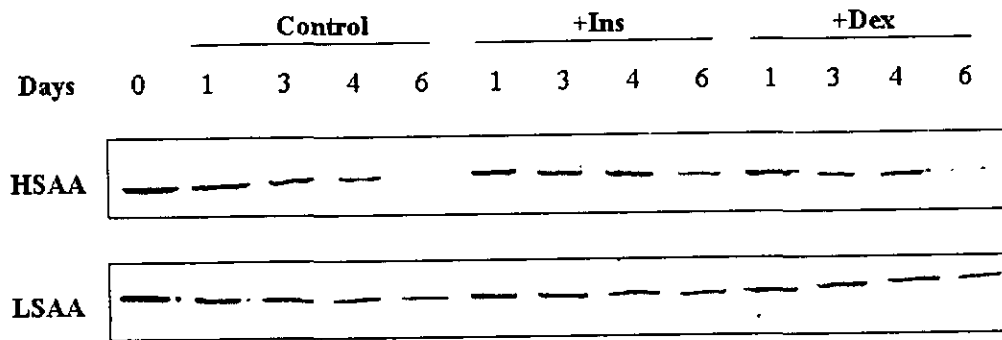
B. 0.1 mM Met + 0.1 mM Cys (LSAA)

control: 未以胰島素(insulin)及甲基脫氫皮質醇(dexamethasone)處理

+Ins: 1.4 μ M insulin

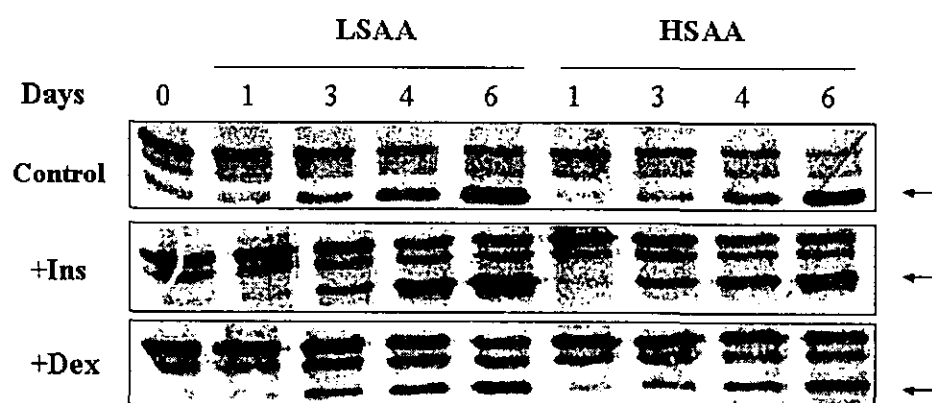
+Dex: 1.0 μ M dexamethasone

abc 相同時間下，各組間有不同符號者表示具顯著差異(P<0.05)。



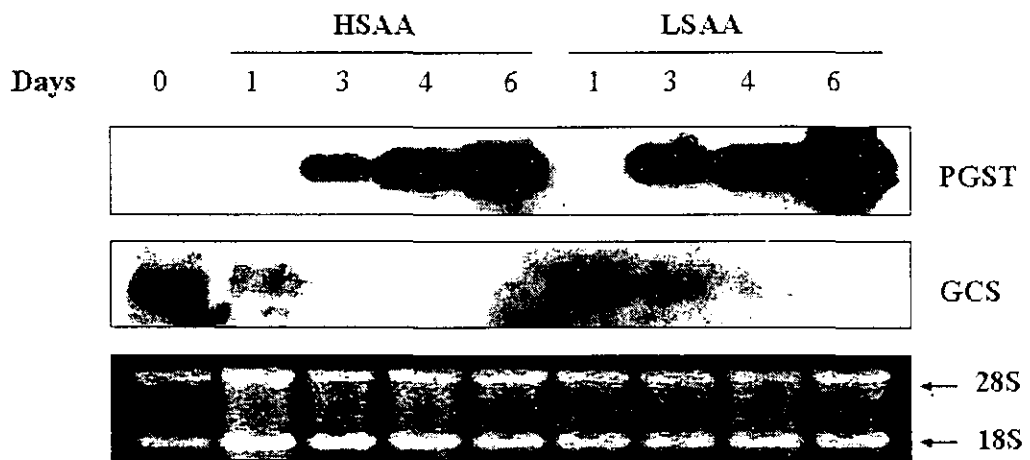
圖九、含硫氨基酸、胰島素及甲基脫氫皮質醇對 GCS 蛋白質表現之影響。

在不同含硫氨基酸濃度(HSAA: 1.0 mM Met + 1.0 mM Cys; LSAA: 0.1 mM Met + 0.1 mM Cys)及胰島素或甲基脫氫皮質醇處理下(+Ins: 1.4 μ M insulin; +Dex: 1.0 μ M dexamethasone; Control: 未以 insulin 及 dexamethasone 處理)，觀察培養 6 天肝細胞之 GCS 蛋白質表現情形。



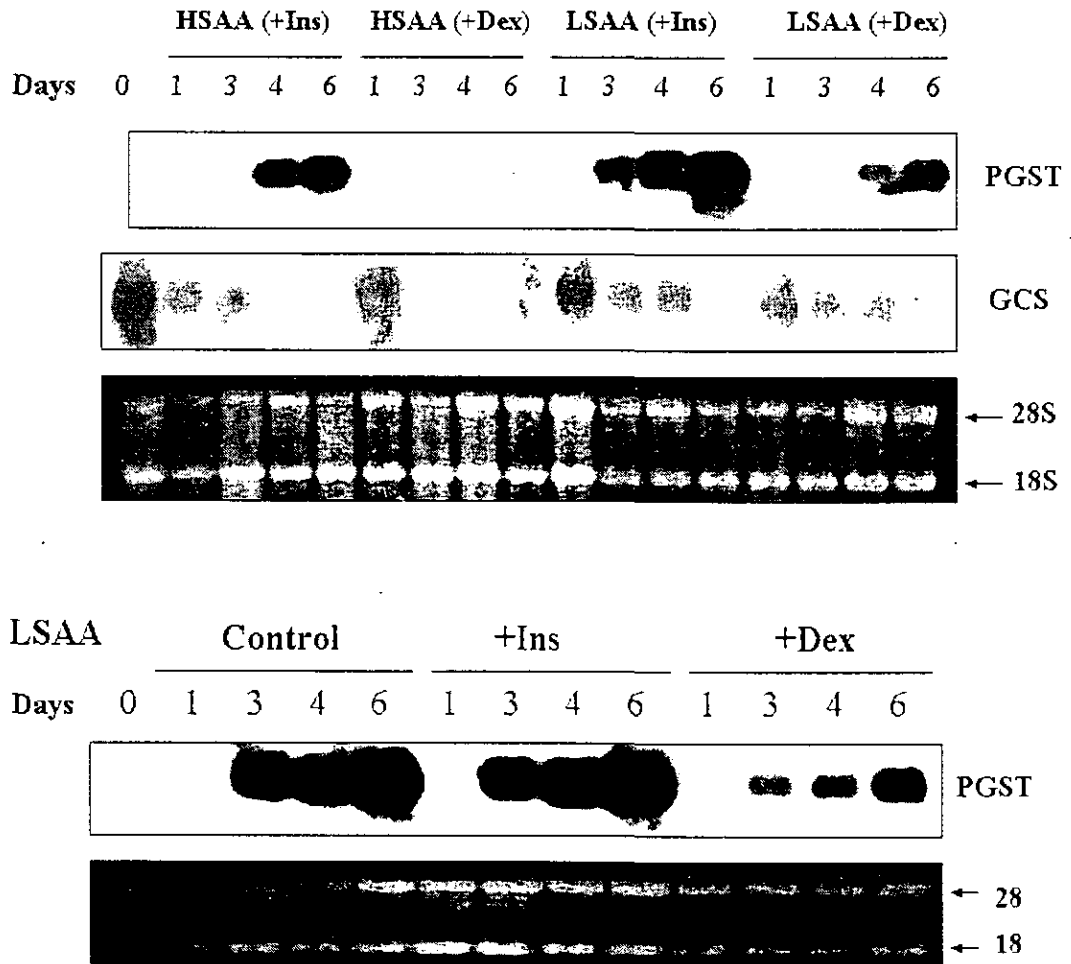
圖十、含硫氨基酸、胰島素及甲基脫氫皮質醇對PGST蛋白質表現之影響。

在不同含硫氨基酸濃度(HSAA: 1.0 mM Met + 1.0 mM Cys; LSAA: 0.1 mM Met + 0.1 mM Cys)及胰島素或甲基脫氫皮質醇處理下(+Ins: 1.4 μ M insulin; +Dex: 1.0 μ M dexamethasone; Control: 未以 insulin 及 dexamethasone 處理), 觀察培養 6 天肝細胞之 PGST 蛋白質表現情形。



圖十一、不同含硫氨基酸濃度對 PGST 及 GCS mRNA 表現之影響。

在不同含硫氨基酸濃度下(HSAA: 1.0 mM Met + 1.0 mM Cys
LSAA: 0.1 mM Met + 0.1 mM Cys)，觀察培養 6 天肝細胞之 PGST
及 GCS mRNA 表現情形。



圖十二、胰島素及甲基脫氫皮質醇於不同含硫氨基酸下對 PGST 及 GCS mRNA 表現之影響。

在不同含硫氨基酸濃度(HSAA: 1.0 mM Met + 1.0 mM Cys
LSAA: 0.1 mM Met + 0.1 mM Cys)及胰島素(+Ins:1.4 μ M insulin)
或甲基脫氫皮質醇(+Dex:1.0 μ M dexamethasone)下，觀察培養 6
天肝細胞之 PGST 及 GCS mRNA 表現情形。