

R
208.8
1541-1

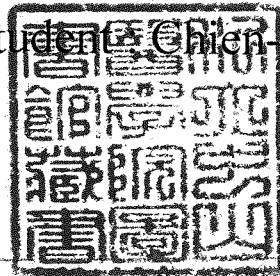
私立中山醫學院營養科學研究所碩士論文
Master Thesis, Graduate Institute of Nutritional Science,
Chung-Shan Medical and Dental College

碩士論文
Master Thesis

指導教授：陳 暉 雯 博士
Advisor : Haw - Wen Chen, Ph. D.

維生素 E 對於 Sprague-Dawley 大鼠
肝臟前癌細胞生成之影響
The effect of dietary vitamin E on hepatocarcinogenesis
in Sprague-Dawley rats

研究生：陳 乾 瑋
Graduate Student: Chen - Wei Chen



中華民國八十八年七月 借

July, 1999

中山醫學院圖書館



C055176

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 87 學年度第 2 學期
取得碩士學位之論文。

論文名稱：維生素 E 對於 Sprague-Dawley 大鼠肝臟前癌細胞生成之影響

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：陳 暉 雯

研究生簽名：陳乾瑋
(親筆正楷)

學號：R 86304
(務必填寫)

日期：民國 88 年 7 月 14 日

1. 本授權書於民國 85 年 4 月 10 日送請內政部著作權委員會 (現為經濟部智慧財產局) 修正定稿。
2. 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。

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，請分別在兩種利用方式的同意欄內鈎選並填妥各項資料。我國博碩士論文八十二學年度以前摘要資料庫及八十四學年度以後全文資料微片目錄資料庫已上載於行政院國家科學委員會科學技術資料中心網站 www.stic.gov.tw，八十一學年度以後摘要資料庫已上載於教育部國家圖書館網站 www.ncl.edu.tw。

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，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可授權其他法人或自然人上述的行為。

3. 全國博碩士論文全文資料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。

研究生姓名：陳乾璋 聯絡電話：(07) 7827396

地址：高雄縣大寮鄉山頂村長榮街 42 巷 19 號

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。

口試委員

私立中國醫藥學院營養系副教授

沈立言 博士

沈立言

私立中山醫學院營養科學研究所教授

李宗貴 博士

李宗貴

私立中山醫學院營養科學研究所教授

陳暉雯 博士

陳暉雯

(論文指導教授)

中華民國八十八年七月

學生陳乾瑋論文題目維生素 E 對於 Sprague-Dawley 大鼠肝臟前癌細胞生成之影響，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：陳暉雯教授 簽名：陳暉雯

中華民國 88 年 7 月

謝 誌

感謝指導教授 陳暉雯 博士兩年來在學業及研究上之指導與教誨，使本論文得以順利完成。文稿初成，承蒙 沈立言 博士與 李宗貴 博士撥冗審閱及斧正，使本論文更臻完善，併此哀忱致謝。

實驗期間，感謝 劉哲育 博士在實驗技術及儀器設備上之指導與支援，以及同學、學長姊、學弟妹在學業及實驗上的協助與鼓勵，在此一併致上誠摯的謝意。

最後，要特別感謝父母、大姊、二姊及哥哥在這兩年來的體諒與支持，使我能順利完成學業，謹以此論文獻給我的家人、師長及好友，一起分享這份喜悅。

陳 乾 瑋 謹誌於

中山醫學院營養科學研究所
中 華 民 國 八 十 八 年 七 月

目 錄

中文摘要	1
前言	3
文獻探討	
自由基的產生	5
自由基與癌症生成關係	6
圖一. 自由基致癌機制	7
生物體內抗氧化系統	8
圖二. 維生素 E 的再生	10
圖三. 麩胱甘肽與藥物代謝之機制	11
維生素 E	12
維生素 E 的生理特性	13
圖四. 維生素 E 異構物之結構	14
Prostaglandin E ₂ (PGE ₂) 之生理功能	16
圖五. 維生素 E 的生理功能	17
圖六. 花生四烯酸之代謝	18
PGE ₂ 與腫瘤形成的關係	19
維生素 E 與 PGE ₂ 的關係	21
蛋白激酶 (Protein kinase C, PKC)	22
圖七. 蛋白激酶在細胞生理調控之角色	24
PKC 與癌症的關係	25
維生素 E 與 PKC 的關係	27

前癌細胞(Preneoplasia cell)與肝癌生成 的關係	28
---	----

表一. 肝臟前癌細胞之細胞標記	29
-----------------------	----

材料與方法

一. 材料	31
-------------	----

二. 動物飼養及肝癌誘發模式	31
----------------------	----

三. 實驗飼料組成	32
-----------------	----

四. 維生素 E 濃度測定	33
---------------------	----

五. 脂質過氧化產物(lipid peroxidation)分 析	34
--	----

六. 還原態麩胱甘肽與氧化態麩胱甘肽 (GSH/GSSG)分析	35
--	----

七. 血漿總脂質(plasma total lipid)分析	37
--------------------------------------	----

八. 肝臟細胞質液(cytosol)製備	37
----------------------------	----

九. 麩胱甘肽過氧化酶活性測定	38
-----------------------	----

十. 麩胱甘肽還原酶活性測定	39
----------------------	----

十一. 麩胱甘肽硫轉移酶活性測定	39
------------------------	----

十二. 肝臟 γ -glutamyltransferase-positive foci (GGT-positive foci)分析	40
---	----

十三. 肝臟 placental glutathione S- transferase positive foci (PGST- positive foci)分析	41
---	----

十四. Protein kinase C (PKC)活性分析	42
--------------------------------------	----

十五.血漿 PGE ₂ 濃度分析	45
十六.肝臟 γ -glutamyltransferase 活性測 定	46
十七.蛋白質濃度測定	47
十八.統計分析	48
結果	49
討論	52
結論	59
表次	
表一.實驗飲食組成	60
表二.飲食中維生素 E 處理對於大鼠飼料 攝取、體重增加、相對肝重及脾重之影 響	61
表三. 飲食中維生素 E 處理對於大鼠肝 臟還原態麩胱甘肽與氧化態麩胱甘肽比 值之影響	62
表四.飲食中維生素 E 處理對於大鼠肝 臟 GST、GSH Px、GSH Rd 及 GGT 酵素 活性之影響	63
表五. 飲食中維生素 E 處理對於大鼠肝 臟 GGT-positive 及 PGST-positive 生成之 影響	64

圖次

圖一.不同維生素 E 處理對大鼠血漿維生素 E 濃度之影響	65
圖二.不同維生素 E 處理對大鼠肝臟維生素 E 濃度之影響	66
圖三.不同維生素 E 處理對大鼠肝臟脂質過氧化產物之影響	67
圖四.不同維生素 E 處理對大鼠血漿 PGE ₂ 濃度之影響	68
圖五.不同維生素 E 處理對大鼠肝臟細胞質及膜部份 PKC 活性之影響	69
參考文獻	70
附錄	83



摘 要

流行病學研究指出，飲食中不僅含有致癌因子，亦具有抗癌分子。在抗癌分子中有許多是屬於抗氧化劑(如維生素 E、維生素 C、維生素 A)。許多研究指出維生素 E 對於許多類型的癌症具有抑制作用(如皮膚癌、乳癌等)。為了解維生素 E 對肝癌生成是否具有抑制作用及對肝臟抗氧化功能之影響，而進行本次研究。

22 隻雌性 Sprague-Dawley 大鼠，於出生 24 小時內，腹腔注射 diethylnitrosamine (DEN) (15 mg/kg body weight) 作為誘發劑，三週後離乳，隨機分成維生素 E 缺乏組、正常組、補充組。並於各組飲食中添加 phenobarbital (PB) (50 mg/100 gm diet) 作為促進劑，餵食 6 個月後犧牲大鼠收集血液及肝臟進行以下分析：血漿及肝臟維生素 E 濃度；肝臟脂質過氧化作用；血漿 prostaglandin E₂ (PGE₂) 濃度；肝臟麩胱甘肽(glutathione, GSH) 含量、麩胱甘肽過氧化酶(GSH peroxidase, GSH Px)、麩胱甘肽還原酶(GSH reductase, GSH Rd)、麩胱甘肽硫轉移酶(GSH S-transferase, GST)、gamma-glutamyl transferase (GGT) 及蛋白激酶(protein kinase C, PKC) 酵素活性；並以免疫組織化學法觀察 GGT-positive 及 PGST-positive foci 數量及面積。

結果顯示，血漿及肝臟維生素 E 濃度，正常組及補充組顯

著高於缺乏組($p < 0.05$)。維生素 E 缺乏組相較於其他兩組有顯著較高的脂質過氧化反應($p < 0.05$)。肝臟 GST、GSH Px、GSH Rd 活性上，缺乏組明顯低於其他兩組($p < 0.05$)。而 GSH 含量、PKC 及 GGT 活性、PGST-positive 和 GGT-positive foci 數目及面積以及血漿中 PGE₂ 濃度，三組間則無明顯差異。

由結果得知維生素 E 存在有助於維持肝臟抗氧化功能，但對以 DEN 誘發/PB 促進下前癌細胞的生成則沒有影響。結果暗示此種癌化模式下，氧化/抗氧化之間的平衡並不會影響前癌細胞的生成。

關鍵詞：維生素 E、麩胱甘肽、前列腺素 E₂、蛋白激酶、
GGT-positive foci 及 PGST-positive foci.

緒 言

癌症，近二十年來一直占臺灣地區十大死因的榜首。同時，在歐美先進國家同樣是造成人們死亡的主要原因之一。癌症形成的機制迄今仍不清楚，但由流行病學調查顯示，癌症的形成與周遭環境有極大相關，而飲食因子則扮演著重要角色。在飲食成份中可能含有癌化誘發劑 (initiators)、促進劑 (promoters)、基因毒性致癌物或輔致癌物 (cocarcinogens)，除了致癌物外，飲食中亦含有可降低癌症產生的營養素如維生素 E、維生素 C (Zaridze et al., 1985)。

維生素 E 為脂溶性維生素，亦是優良的天然抗氧化劑，它可防止細胞膜遭受自由基傷害 (Parker, 1991)。維生素 E 的抗癌機制至今吸引了許多學者的注意，而這些研究結果均指出維生素 E 的抗癌機制除了可藉由其本身所具有良好的抗氧化特性清除自由基，進而防止自由基對細胞產生的損傷外，亦會影響細胞中 GSH 含量及 GSH 相關酵素系統，而進一步影響細胞的抗氧化功能 (Lii et al., 1998; van Lieshout et al., 1996; Mitchel and McCann, 1993)。此外，維生素 E 可降低 PGE₂ 的合成、抑制 PKC 活性，亦被認為可能是其抗癌機制中的一環 (Yano et al., 1997; Azzi et al., 1997)。

為了解維生素 E 是否可以透過這些機制來影響肝癌生成，

本實驗將觀察飲食中不同含量維生素 E 對於以 DEN 誘發/PB 促進肝臟前癌細胞生成的影響，並探討可能的作用機制。

文 獻 探 討

自由基(free radicals)形成

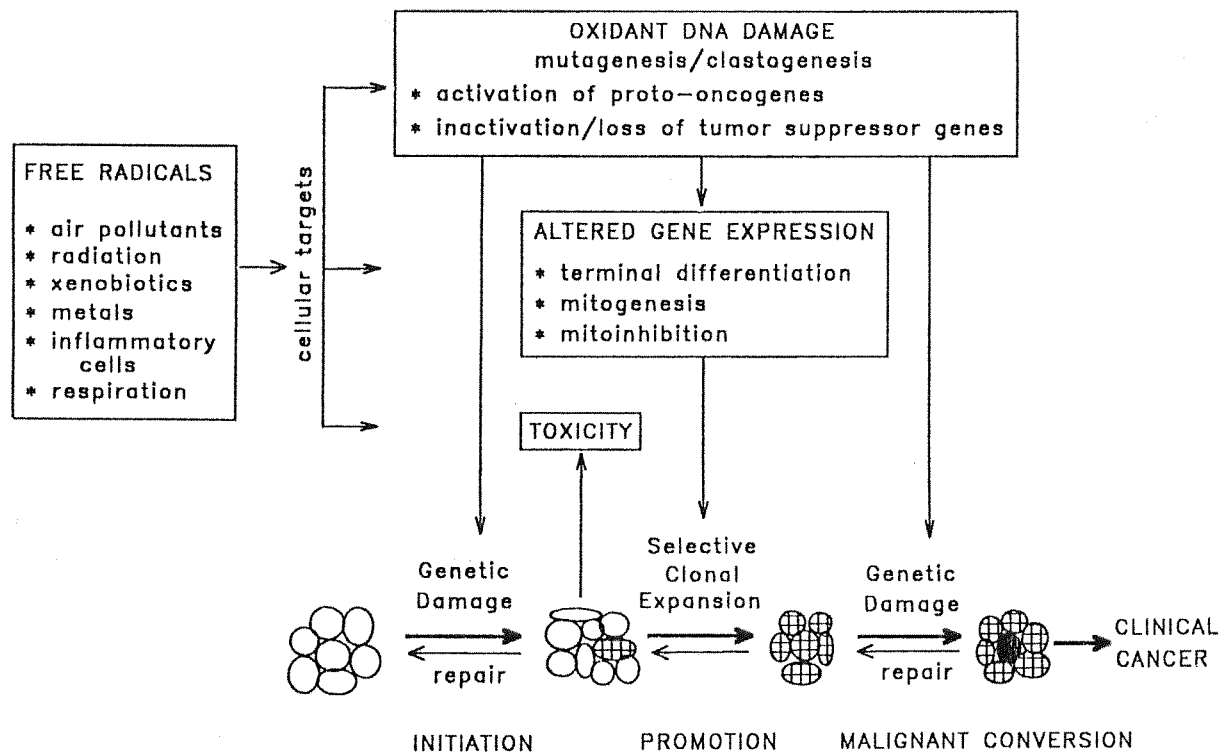
自由基為具有未配對電子之原子或分子的通稱，在生理狀態下細胞所產生的自由基，以含氧自由基為主：包括超氧陰離子(superoxide anion)、氫氧自由基(hydroxyl radical)、脂質與其他過氧化物自由基(lipid and other peroxy radicals)、一氧化氮(nitrous oxide)等。而含氧自由基與過氧化氫(hydrogen peroxide)、脂質過氧化物(lipid peroxide)、單氧分子(singlet oxygen)、次氯酸(hypochlorous acid)等物質則合稱為活性氧分子(reactive oxygen species) (Punchard and Kelly, 1996)。活性氧分子形成是因為細胞內抗氧化系統與氧化系統作用不平衡所致，氧是生物生存所必須的分子，在細胞進行正常生理作用：如粒線體電子傳遞鏈、脂質氧化等能量代謝作用及巨噬細胞進行吞噬作用時，會有大量活性氧分子伴隨產生(Chance et al., 1979)。這些分子在正常生理狀態下可經由生物體內抗氧化系統加以清除，當抗氧化系統無法清除大量生成的活性氧分子時，活性氧分子會進一步與胞內其他分子作用，導致胞內抗氧化物質損耗、膜上脂質過氧化、蛋白質功能喪失、膜結構被破壞及去氧核糖核酸(DNA)受損，致使細胞受傷進而死亡(Gilbert,

1981)。已知有許多疾病的形成與自由基有相關性：如遲緩性運動困難(tardive dyskinesia)、粥狀動脈硬化、類風濕性關節炎、老化、鬱血性組織傷害及癌症(Lohr et al., 1988; Horvarth and Ip, 1983)。

自由基與癌症生成關係

自由基生成與癌症形成具有高度相關：在 1993 年 Yano 等人以小鼠進行肺癌生成研究，發現若有含氧自由基存在，則 4-nitroquinoline 1-oxide 誘發肺癌生成效果顯著增加。將 ras 致癌基因(oncogene) 殖入 NIH3T3 纖維母細胞株中，發現纖維母細胞株會產生大量超氧陰離子，而此現象可能與 ras 所誘導細胞轉移現象有關(Irani et al., 1997)。關於肝癌生成的研究中發現以過氧化體增生劑(peroxisome proliferator)誘發肝癌時，是經由活化 Kupffer's 細胞產生大量超氧陰離子，進而誘發肝癌形成(Rose et al., 1999)。

雖然自由基會攻擊許多胞內分子，但如何造成癌症形成？一般認為 DNA 遭受攻擊是主要原因(圖一)。Olinski 等人(1998)指出受自由基攻擊而被氧化的鹼基，在癌症起始過程中扮演重要角色。在研究雌性激素如何促使肝癌的形成，發現雌性



圖一. 自由基致癌機制(Guyton and Kensler, 1993)

Wistar 大鼠以雌性激素類似物處理時，肝臟中 8-hydroxydeoxyguanosine 濃度有顯著上升，顯示在雌性激素誘發肝癌形成的過程，自由基攻擊鹼基可能扮演重要角色(Ogawa et al., 1995)。以非基因毒性致癌物：如過氧化體增生劑、organochlorides、barbiturates 及金屬，誘發癌症時可發現肝中活性氧分子含量均會增加，且 8-hydroxydeoxyguanosine 濃度也上升(Klaung et al., 1995)。由以上文獻可知自由基引發癌症的原因，與自由基直接攻擊 DNA 造成損傷有密切關係。

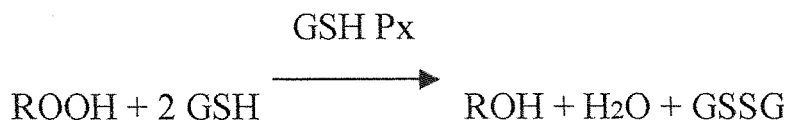
生物體內的抗氧化系統

生物進行正常生理作用時，自由基會伴隨產生，若未加以清除，將會造成細胞傷害。為了預防或減少這種傷害的產生，生物體內有一套相當完善的抗氧化系統與之抗衡，其中包括兩大部分：一是由抗氧化分子組成、另一則是由抗氧化酵素系統所組成，抗氧化分子依其分佈可區分為脂溶性分子(如維生素 E、 β -胡蘿蔔素)及水溶性分子(如維生素 C、麩胱甘肽 [glutathione, GSH]、尿酸)，而抗氧化酵素系統則由超氧化物歧化酶(superoxide dismutase)、觸酶(catalase)、麩胱甘肽過氧化酶(GSH peroxidase, GSH Px)等所構成，為生物構築一道嚴密

的抗氧化防線(Cotgreave et al., 1988)。

而抗氧化分子與抗氧化酵素之間，則由 GSH、GSH Px、GSH reductase (GSH Rd)三者之間的作用，使兩種系統得以緊密結合。GSH 是一個三肽分子，由 γ -glu-cys-gly 三種氨基酸所構成，是一水溶性抗氧化分子，具有多種生理功能如：

1. GSH 可利用 GSH Px，而將 H_2O_2 代謝成 H_2O ，以降低細胞傷害：



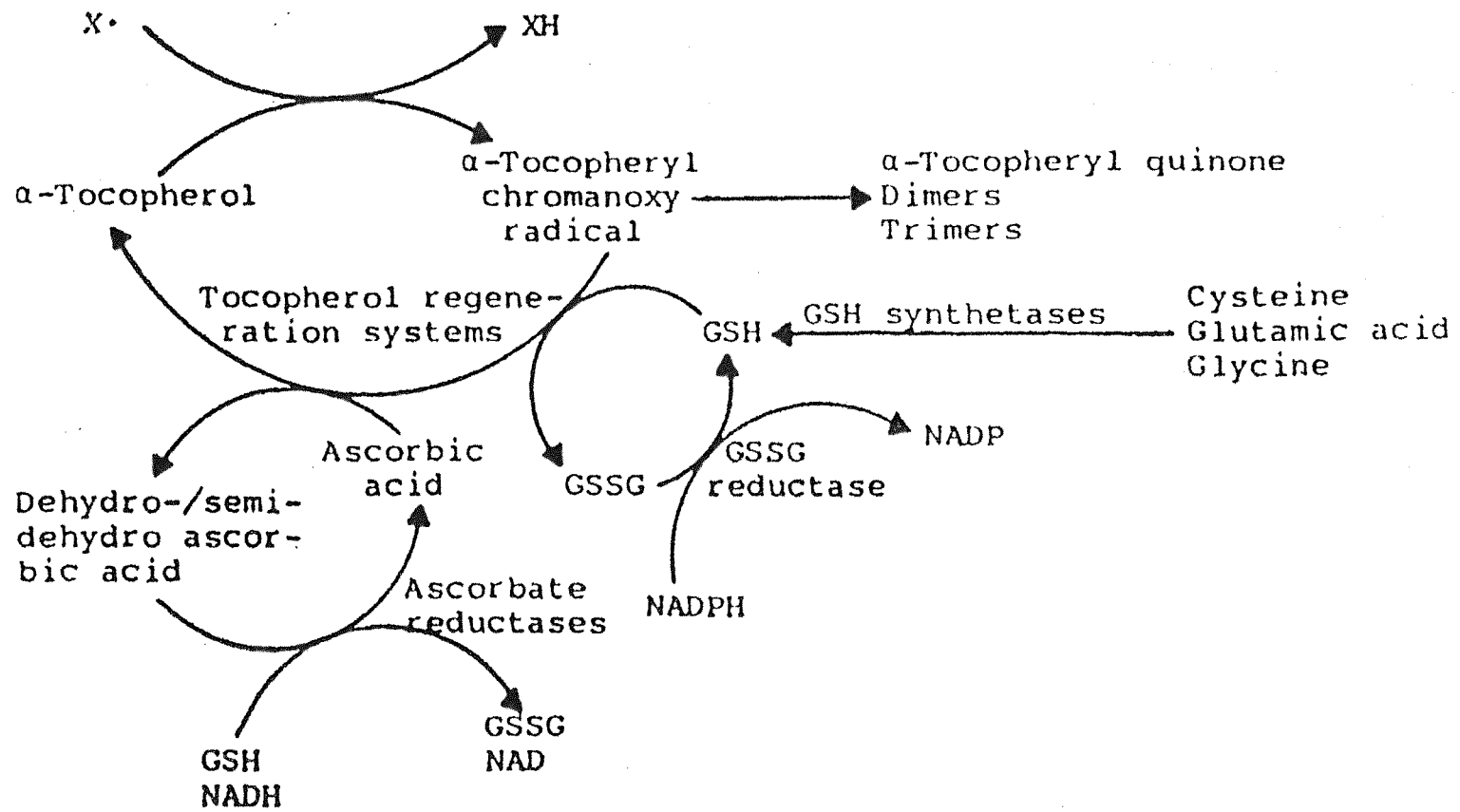
(Jcaob, 1995)

而所生成的 GSSG 可經由 GSH Rd 作用，再還原成 GSH。

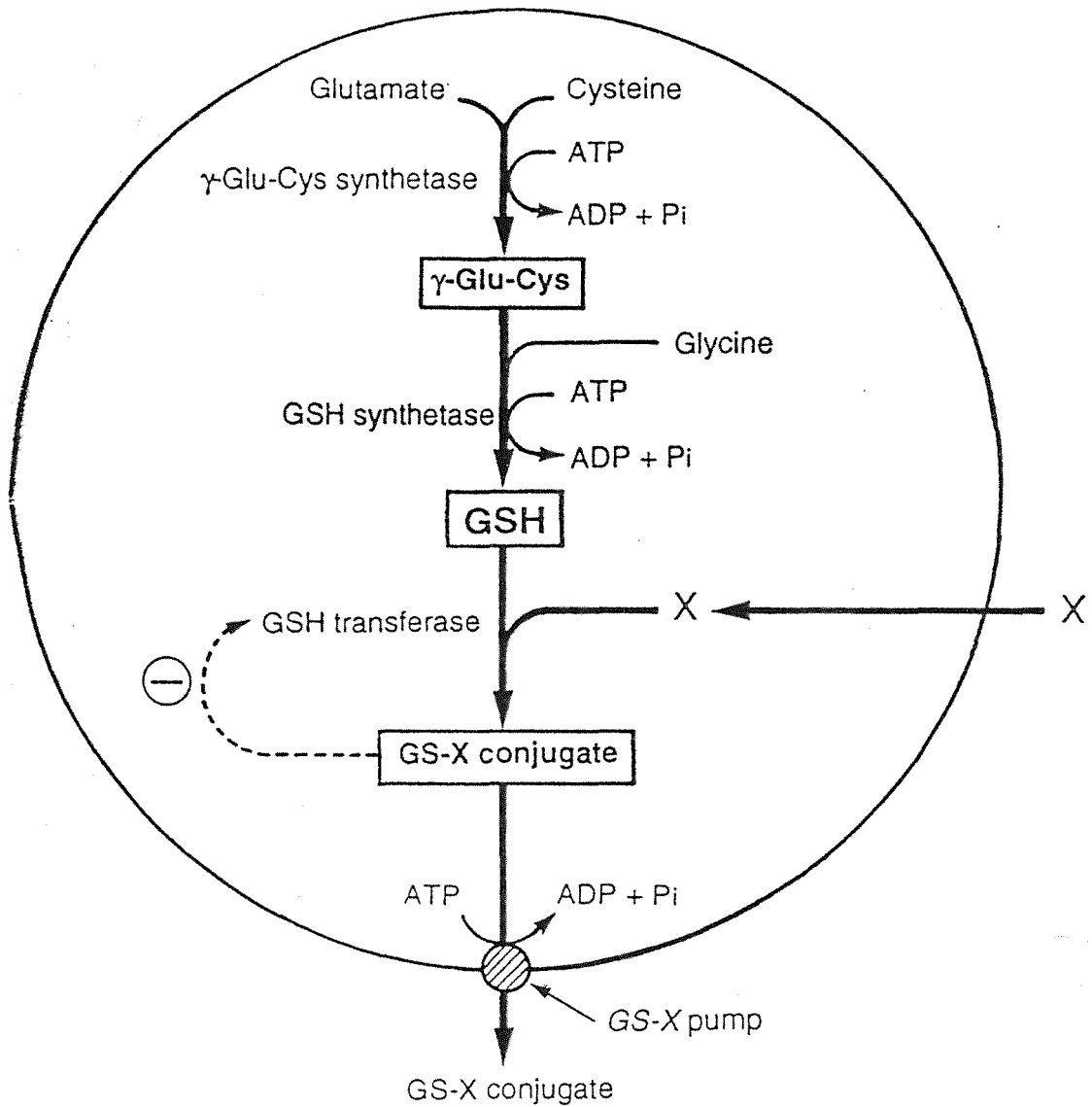
(Skrzydłewska and Farbixewdki, 1997)。

2. GSH 參與維生素 E 的再生，維生素 E 自由基可經由維生素 C 及 GSH 作用而還原成維生素 E (圖二)。
3. GSH 參與胞內解毒代謝作用，GSH 透過 GST 的作用與外來物質結合，可增加外來物的水溶性，以利排出體外 (Reed, 1990; Neal et al., 1987) (圖三)。
4. GSH 維持膜蛋白硫醇完整性，並維持細胞正常生理功能 (Kosower and Kosower, 1978)。

肝臟是合成 GSH 的主要器官，血液中 GSH 主要是由肝臟所分泌 (Meister, 1984)。從肝臟釋放到血液中的 GSH 對於淋



圖二. 維生素E的再生(Chow, 1991)



圖三. 麩胱甘肽與藥物代謝之機制(Ishikawa and Akimaru, 1993)

巴細胞增生是必要的，Hamilos 等人 (1989) 在 *in vitro* 狀態下進行淋巴細胞增殖實驗發現，外加 GSH 可回復 2000 μ M buthionine sulfoximine 所導致的細胞增殖抑制現象，顯示 GSH 對於細胞增殖有其必要性。在對癌症的研究上，學者指出 GSH 可以抑制促進期(promotion)及生成期(progression)兩個階段的皮膚癌生成，diethyl maleate (可降低胞內 GSH 濃度)被發現是腫瘤生成期階段的強力促進劑(Slaga, 1995)。此外當 GGT(γ -glutamyltransferase)過度表現時能促進腫瘤生成，並伴隨有 GSH 含量下降現象 (Warren et al., 1993)。顯示 GSH 與腫瘤生成的過程具有相關性。

維生素 E

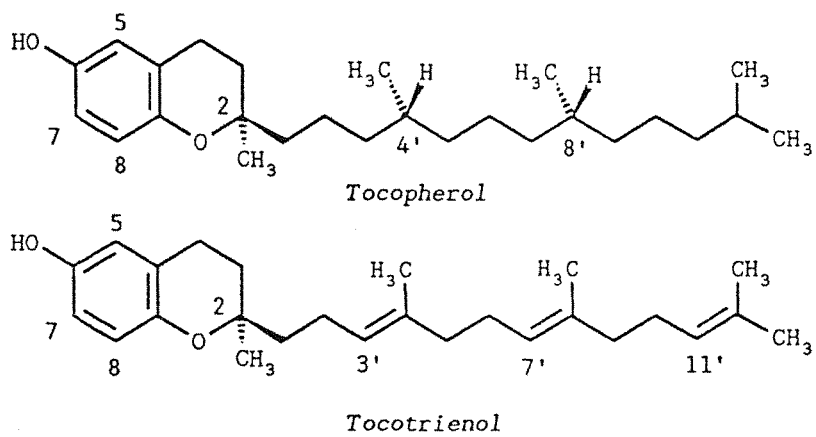
維生素 E 是屬於脂溶性的維生素，在 1922 年即被發現與大鼠生殖能力成熟有關(Evans and Bishops, 1922)，但直到 1936 年，才在小麥胚芽油中被分離出來，並命名為生育醇(tocopherol) (Evans et al., 1936)。1938 年維生素 E 的結構被確立(Fernholz, 1938)。自然界中有八種維生素 E 異構物存在，主要結構為一酚類環及一側鏈。依側鏈的不同可分為 tocots 及 trienols 兩類。而以酚類環所接甲基數目及位置不同又可分為

α 、 β 、 γ 、 δ 四型(圖四)。就 tocopherol 而言其生物活性強弱依序為 $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ (Century and Horwitt, 1965)。Tocopherols 異構物清除自由基的能力與其生物活性強弱相同(Burton and Ingold, 1981)。添加於飼料中的 α -tocopheryl acetate (TA) 和 α -tocopheryl succinate (TS) 皆屬於維生素 E 酯化物。不論那一種 α -tocopherol 衍生物皆具有相似的抗氧化活性(Burton and Traber, 1990)。

維生素 E 的生理特性

維生素 E，因其脂溶性的特性，分布在生物膜上，為生物膜上最有效的過氧化自由基清除者(peroxy radical)及脂質過氧化連鎖反應阻斷劑，它可避免自由基所引起膜的損傷(Burton et al., 1983; Ingold et al., 1987)。在所有維生素 E 異構物中，不論是抗氧化或生理活性上，皆以 α -tocopherol 具有最大活性(Bunyan et al., 1961; Burton and Ingold, 1981)。

生物膜主要由磷脂質所組成，為維持膜適度流動性，膜上含有多元不飽和脂肪酸。多元不飽和脂肪酸易受自由基攻擊，而造成脂質過氧化現象，對細胞造成傷害。維生素 E 分布在

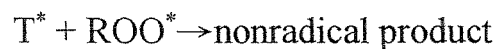
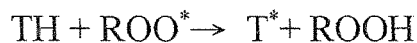


Position of Methyl Groups	Trivial Names (Abbreviations)	
	Tocopherols	Tocotrienols
5, 7, 8	α -tocopherol (α -T)	α -tocotrienol (α -T-3)
5, 8	β -tocopherol (β -T)	β -tocotrienol (β -T-3)
7, 8	γ -tocopherol (γ -T)	γ -tocotrienol (γ -T-3)
8	δ -tocopherol (δ -T)	δ -tocotrienol (δ -T-3)

圖四.維生素E異構物之結構(Machlin, 1984)

膜上，利用其結構中的植基尾端(phytyl tail)嵌入膜中，不僅可有效地終止多元不飽和脂肪酸脂質過氧化連鎖反應，並可清除高能量不穩定的自由基，如氫過氧化自由基(hydroxyl radical)、過氧化自由基(peroxy radical)及超過氧化自由基(superoxide radical)而可避免膜組成受損，是最有效的天然脂溶性連鎖反應阻斷(chain-breaking)抗氧化劑(Burton and Ingold, 1989; Machlin, 1984; Packer, 1991; Ahn et al., 1995)。

維生素E的抗氧化機制是利用酚類環上氫氧基(OH-group)，提供氫質子給自由基，而自己形成相對穩定的維生素E自由基(tocopheryl radical)。維生素E自由基可與其它含氧自由基作用形成非自由基產物,反應式如下:



(Ham and Liebler, 1997)

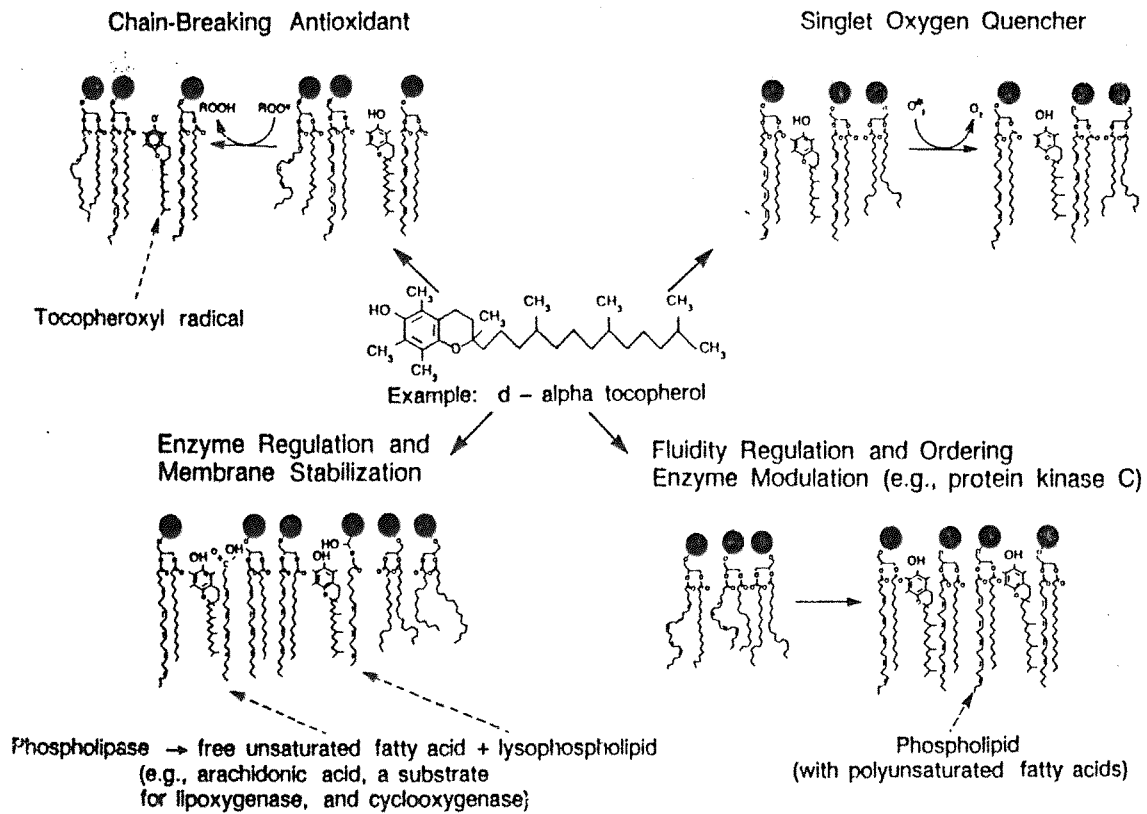
維生素E自由基也可經由維生素E再生系統將其還原，以降低維生素E的損耗(May et al., 1998)。維生素E在膜上除扮演抗氧化角色外，並可穩定膜的構造，而影響磷酸酯解酶(phospholipase)對磷脂質的作用，進一步影響花生四烯酸(arachidonic acid)的代謝;維生素E也可調節膜的流動性，進而影響在膜上才能表現出生理活性酵素的作用(e.g. protein kinase

C, PKC) (圖五)。

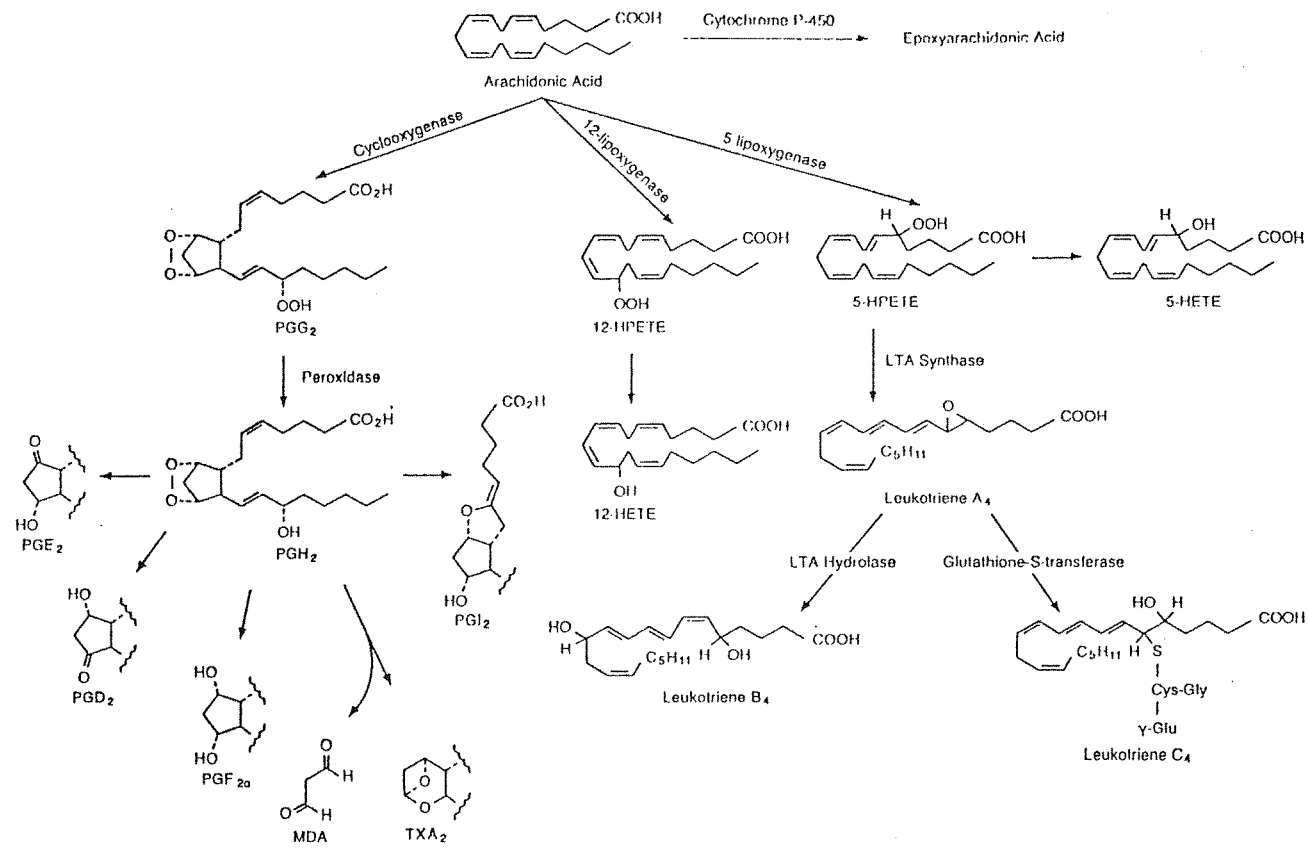
Prostaglandin E₂ (PGE₂)之生理功能

Eicosanoids 是二十碳烯酸經氧化代謝而形成具有生物活性的一群物質統稱。花生四烯酸經環氧化酶(cyclooxygenase)作用，可產生前列腺素系列 2，PGE₂ 即是其中一種;花生四烯酸若經脂氧化酶(lipoxygenase)作用則可生成血球凝集素 4 (LTB₄)。Eicosanoids 合成途徑是由位於細胞膜上的磷酸脂解酶 A₂ (phospholipase A₂, PLA₂)作用，將膜上磷脂質甘油結構上第二個碳位置所接的花生四烯酸切除，再經環氧化酶或脂氧化酶途徑而生成不同種類的 eicosanoids。兩種代謝途徑的共通點為氧直接參與反應形成過氧化中間產物，最大不同在於環氧化酶途徑產物為五碳環，而脂氧化酶途徑產物則呈直鏈狀(圖六)。

PGE₂ 在生理上有多樣的功能且隨不同組織而異;在腎臟方面，PGE₂ 可增加腎臟血流、刺激腎素(renin)形成、另外可調控腎小管對水分再吸收，進而調控身體鹽類與水分平衡，因此被認為與高血壓續發的病程有關(Codde and Beilin, 1986);當使用內毒素及間白素-1(interleukin-1)誘發發燒時，也會造成腦中 PGE₂ 濃度上升，若同時給予非固醇類抗發炎性藥物(nonsteroid



圖五. 維生素E的生理功能(Packer, 1991)



圖六. 花生四烯酸之代謝(Ara and Teicher, 1996)

anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 抑制 PGE₂ 生成，則會影響發燒發生(Ferrari et al., 1996; Sirko et al., 1989); Sano 等人(1992)發現在類風濕性關節炎病人的滑液中,含有高濃度 PGE₂，他們認為 PGE₂ 可能參與關節炎所導致軟骨及骨骼糜爛的過程。另外對巨噬細胞而言，PGE₂ 則可影響巨噬細胞毒殺細胞的能力，若給予 indomethacin (cyclooxygenase 抑制劑)抑制 PGE₂ 合成，將可增加巨噬細胞毒殺細胞的能力，而且皮下黑色素細胞瘤生長也會受到抑制，顯示 PGE₂ 具有抑制巨噬細胞毒殺細胞的能力(Somers et al., 1989; Suzuki et al., 1994)。此外由老化老鼠和年輕老鼠所取出的巨噬細胞作一比較，發現老化老鼠的巨噬細胞經 lipopolysaccharide (LPS)刺激後有較高量的 PGE₂ 產生(Wu et al., 1998)。在 in vitro 狀態下，添加 10⁻⁶ ~ 10⁻⁵ M PGE₂ 可抑制特應性周邊血液單核球細胞釋放免疫球蛋白 E 的能力(Melnik et al., 1991)，顯示 PGE₂ 可能參與體內免疫反應。由以上文獻結果可知 PGE₂ 在體內具有多重生理功能。

PGE₂ 與腫瘤形成的關係

飲食脂肪長久以來即被認為與腫瘤形成具有相關性。1976年 Rao 及 Abraham 指出高脂飲食可促進移植到小鼠體內乳癌

細胞生長，並發現腫瘤組織中含有高量花生四烯酸。在隨後的
研究中也指出，使用前列腺素合成抑制劑(eicosa - 5,8,11,14 -
tetraynoic acid)將可抑制高脂飲食誘發乳癌細胞的增生作用
(Rao and Abraham, 1997)。除了乳癌細胞外，在結腸、肺臟、
口腔上皮等腫瘤組織中亦可發現含有高濃度 PGE₂，以
aspirin、indomethacin 處理可以抑制腫瘤生長(Rao et al., 1993;
Estensen and Wattenberg, 1993; El Attar and Lin, 1987)。另外以
azoxymethane (AOM)誘發雄性 F344 大鼠結腸癌時，再以
aspirin 處理降低結腸 PGE₂ 濃度，同時並顯著抑制 aberrant crypt
foci (ACF)的形成(Li et al., 1999)。在研究膽酸與十二指腸腫瘤
生成的關係時，亦發現腸道 PGE₂ 濃度與腫瘤的形成具有高度
相關性(Mahmoud et al., 1999)。由以上文獻顯示 PGE₂ 與腫瘤生
成具有密切關係。而 NSAIDs 抑制腫瘤生長的作用，可能是經
由其可抑制環氧化酶活性，進而降低 PGE₂ 生成所致(Ara and
Teicher, 1996)。

但是另一方面，關於 PGE₂ 與腫瘤生成的研究，Santora
等人(1976)卻指出 PGE₂ 可抑制腫瘤生長。而 El Attar 及 Lin (1993)
在人類口腔癌細胞株 SCC-25 添加 10⁻⁹ ~10⁻⁶ M PGE₂ 時，也發
現它可抑制 SCC-25 細胞株 DNA 合成。以 BL - 6 黑色素瘤細
胞株所進行的研究亦發現若增加細胞 PGE₂ 的濃度，則可抑制
細胞株的生長(Ottino and Duncan, 1996)。顯示 PGE₂ 對不同組

織的腫瘤可能具有完全不同的作用。

維生素 E 與 PGE₂ 的關係

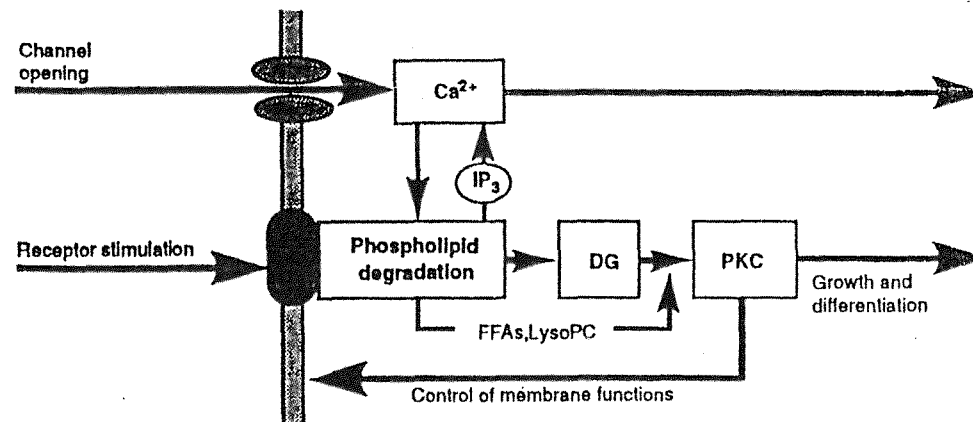
維生素 E 利用嵌入細胞膜的植基尾端與磷脂質形成架橋，不僅具有穩定膜結構的功能，並且可避免磷脂質被 PLA₂ 水解而產生花生四烯酸(Parker, 1991)。以維生素 E 植基尾端修飾的衍生物，添加到角質細胞發現維生素 E 植基尾端可抑制磷酸脂解酶活性而降低花生四烯酸的產生(Pentland et al., 1992)。環氧化酶是花生四烯酸代謝為 PGE₂ 過程中一重要酵素，在環氧化酶作用時需要少量過氧化物存在，加入抗氧化劑抑制過氧化物形成，可降低環氧化酶活性而減少 PGE₂ 生成(Land et al., 1979)。另外對老化老鼠巨噬細胞所進行的研究發現，以 LPS 活化巨噬細胞會造成環氧化酶活性增加，若同時加入維生素 E 可抑制此酵素活性，而減少 PGE₂ 生成(Wu et al., 1998)。Tomohiro 等人(1997)以 urethane 誘發小鼠肺癌生成，肺組織 PGE₂ 濃度增加，若於飲食中添加維生素 E (400 mg/kg diet)，則可降低組織中 PGE₂ 濃度並抑制肺癌生成，但是若同時添加外源性 PGE₂，維生素 E 抑制肺癌生成的效用則被抑制。在免疫系統的研究亦發現，給予健康成人維生素 E (800 mg/天)，

30 天後周邊血液單核球細胞維生素 E 濃度顯著增加($p < 0.0001$)，而 PGE₂ 合成則明顯下降($p < 0.005$) (Meydani et al., 1990)。雖然以上文獻皆證實維生素 E 可抑制 PGE₂ 生成，但 Ottino 及 Duncan (1997) 對 BL-6 黑色素瘤細胞株的研究，發現添加 10 $\mu\text{g/ml}$ 維生素 E，可以有效抑制 BL-6 細胞株生長，同時細胞株 PGE₂ 濃度有明顯增加($p < 0.0025$)。而以大鼠心臟肌肉纖維母細胞進行培養，亦發現添加維生素 E 可以促進 PLA₂ 活性，而增加 PGE₂ 前趨物質花生四烯酸的釋放(Tran et al., 1996)。由以上文獻結果顯示，維生素 E 可經由影響 PLA₂、環氧化酶活性，進而影響 PGE₂ 合成。隨維生素 E 作用的細胞對象不同，造成細胞 PGE₂ 濃度上升或下降，進而使細胞表現出不同生理功能。

蛋白激酶(Protein kinase C, PKC)

PKC 屬於絲氨酸/蘇氨酸(serine/threonine)蛋白激酶，於 1977 年被確認，遍存於組織及器官中的一群酵素(Nishizuka, 1986)。PKC 依其活化輔因子的不同可以分為三大次型，約有 11 種異構酶: classical/conventional PKCs (α 、 β I、 β II、 γ) 分子量介於 77-78 KDa，屬於 phosphatidylserine (PS)-、diacylglycerol (DAG)- 及 Ca^{2+} -dependent 的酵素；non-

classical/novel PKCs (δ 、 ϵ 、 η 、 θ)分子量約為 80 KDa，為 PS-及 DAG-dependent 酵素，但不需 Ca^{2+} 參與; atypical PKCs (ζ 、 ι/λ)分子量約為 67 KDa，為 DAG-及 Ca^{2+} -independent 酵素; 而 PKC μ 分子量為 115 KDa，性質介於 novel 及 atypical PKC 之間(Schenk and Snaar-Jagalska, 1999)。在胞內訊息傳遞過程中 PKC 扮演重要角色(圖七)，隨組織不同，PKC 表現會產生不同生理功能: 在神經系統方面，不同動物的神經系統有大量 PKC 存在，並且以腦部分布最多，PKC 參與許多神經系統的控制，例如 Ca^{2+} -channel、 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 的調控，調節 nicotinic acetylcholine、gamma-aminobutyric acid subtype A (GABA_A)等 receptors，並可能參與大腦神經元生長及分化作用(Conn and Sweatt, 1994); 在平滑肌方面，以 phorbol ester 刺激平滑肌 PKC 時，可活化平滑肌 Ca^{2+} -channel 增加 Ca^{2+} 的流入，此外 PKC 亦可促使 myosin light-及 heavy-chain 磷酸化，顯示 PKC 與平滑肌收縮功能有關(Nishikawa and Hidaka, 1994); 在腎臟生理方面，對大鼠腎臟皮質小管所進行研究指出，以 phorbol ester 活化 PKC，可以直接促進 Na^+ - K^+ -adenosinetriphosphatase (Na^+ - K^+ -ATPase)活性，當同時添加 PKC 抑制劑(GF-109203X)，則可抑制 Na^+ - K^+ -ATPase 活性，顯示 PKC 可能參與腎臟陽離子運送過程(Carranza et al., 1996); 而在人類血小板的研究中以血球凝集素及 serotonin 處理時，



圖七. 蛋白激酶在細胞生理調控之角色(Nishizuka, 1992)

會促使 PKC 自細胞質轉移到細胞膜上，此過程與血小板凝集作用有關(Wang and Friedman, 1990); 對於骨骼系統而言，骨的恆定有賴於造骨細胞與蝕骨細胞的平衡，以 tumor necrosis factor- α (TNF- α)處理造骨細胞，可以促使造骨細胞分泌 interleukin-6 (IL-6)，而 IL-6 可進一步活化蝕骨細胞，促進骨的 resorption 作用，但當同時添加 phorbol ester 活化造骨細胞 PKC α ，則可抑制 IL-6 釋放，進而抑制蝕骨細胞進行 resorption (Kozawa et al., 1997)。由以上文獻可知 PKC 的確在正常生理功能維持上扮演重要角色。

PKC 與癌症的關係

PKC 為胞內訊息傳遞過程中，重要的蛋白激酶，參與細胞許多生理反應的調控：例如分化、增生、凋亡等細胞生理反應，癌症的形成是癌細胞不斷增殖所致，在研究中常用的誘癌劑如 phorbol ester 為 PKC 活化劑，顯示 PKC 活化似乎與癌症的形成具有相關性。Birt 等人 (1999) 以 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) 為皮膚癌誘發劑 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 為促進劑誘發啮齒類動物皮膚癌，給予飲食能量限制(dietary energy restriction)，結果

發現可以抑制皮膚癌生成，同時 PKC 活性及蛋白質表現也有下降現象。二級膽酸的形成被認為與結腸癌產生具有高度相關，Fitzer 等人(1987)指出結腸中的二級膽酸可直接活化結腸黏膜上的 PKC，進而改變組織的生長性質，顯示在二級膽酸誘發結腸癌產生的過程中，PKC 的活化可能是原因之一。在乳癌細胞株(MDA-MB-231)的研究中以 tamoxifen (NSAIDs)處理細胞株，使用 5-20 mM 的濃度時，可以抑制細胞株生長，同時也發現 PKC 活化受到抑制(Gundimeda et al., 1996)。在癌症的致死原因中，癌細胞轉移是最主要的原因之一，Herbert (1993)指出癌細胞經由血液運送轉移至其他組織時，癌細胞必須先附著在轉移組織的血管內皮上，才會進行增生，不論是 *in vitro* 或 *in vivo* 模式，此附著過程皆受 PKC 所調控，當給予 staurosporine (PKC 抑制劑)，可抑制癌細胞附著作用的進行。以雄性 Fischer 344 大鼠進行肝癌轉移實驗，使用 diethylnitrosamine (DEN) (200 mg/kg body weight)為誘發劑，經 15 個月後犧牲觀察肝癌轉移情形，發現癌細胞轉移至肺臟，並且肝臟及轉移至肺臟的癌組織，PKC 有明顯活化現象(Porta et al., 1997)。由以上文獻可知 PKC 活化與癌症生成及轉移具有高度相關性。

維生素 E 與 PKC 的關係

PKC 是膜依賴型酵素(membrane-dependent enzyme) ，必須位於細胞膜上才能表現生理活性。維生素 E 是脂溶性維生素，主要分佈在細胞膜上，當細胞膜上維生素 E 含量增加時，會改變細胞膜流動性，進而影響膜依賴型酵素活性。PKC 在活化時不僅需要依附在細胞膜上，而且其本身亦需要被磷酸化才具有活性， Ricciarelli 等人(1998)指出維生素 E 可經由活化蛋白質磷酸酶 type II，將 PKC α 去磷酸化，使 PKC α 活性喪失。

巨噬細胞進行噬菌作用時，會產生超氧陰離子去破壞被吞噬的菌體，以 phorbol myristate acetate (PMA) 刺激巨噬細胞，同時添加維生素 E，發現巨噬細胞超氧陰離子產量下降，同時 PKC 活性亦有被抑制現象(Sakamoto et al., 1990)。以血管平滑肌細胞株(A7r5)及中國沙鼠卵巢細胞株(HeLa)進行培養，在添加維生素 E 後發現可抑制兩種細胞株 PKC 活性，並且同時抑制 A7r5 細胞株增生(Fazzio et al., 1997)。在糖尿病腎病變的病程中，PKC 活化被認為是造成糖尿病腎功能喪失的原因之一，對糖尿病腎功能研究發現，給予維生素 E 可降低腎絲球 PKC 活性，同時抑制蛋白尿產生(Koya et al., 1998)。由以上文獻顯示維生素 E 處理會抑制 PKC 活化，進而影響 PKC 對於細胞的作用。

前癌細胞(Preneoplasia cell)與肝癌生成的關係

在癌症形成過程中，正常細胞要轉變成癌細胞時，先要轉成前癌細胞，由於細胞性質變化會導致整個細胞生理產生重大改變，而使得前癌細胞在酵素活性表現與正常細胞極不相同，而這些酵素則可作為前癌細胞的標記，依酵素在前癌組織表現可分成兩大類標記：一是活性上升、一是活性下降（表一）。其中 gamma-glutamyl transferase (GGT) 與 placental glutathione S-transferase (PGST) 被證實是前癌細胞標記，並可作為前癌細胞轉成癌細胞的有效指標 (Sato, 1989; Dragan et al., 1995)。

GGT 可催化 γ -glutamyl group 轉移到其他 peptide 或 L 型氨基酸上，而形成另一個 γ -glutamyl peptide。而能運送氨基酸通過細胞膜，此酵素在正常成鼠肝臟活性並不高，而在胚胎時期的鼠肝會有高濃度 GGT。而以化學致癌物誘發大鼠肝癌形成研究中發現，GGT 的活性有顯著上升現象 (Nagh et al., 1991)。以免疫組織化學法研究肝臟前癌細胞的生成，GGT - positive foci 數目與面積是常被作為癌化誘發標記，學者以不同化學致癌物及不同誘發肝癌模式 (DEN 為 initiator, acetylaminofluorene (AAF)、phenobarbitol (PB) 為 promoter) 皆可誘發 GGT - positive foci 形成 (Tsuda et al., 1984)。

TABLE I
MARKER ENZYMES FOR PRENEOPLASTIC HEPATIC LESIONS^a

Enzymes with decreased activity

- Carbohydrate-metabolizing enzymes
 - Liver-type isoenzymes of glycolysis (glucokinase, aldolase B, pyruvate kinase L)
 - Glucose-6-phosphatase (G6Pase) and other glycconeogenic enzymes
 - Glycogen phosphorylase (liver type; → glycogen storage)
- Amino acid-metabolizing enzymes
 - Tryptophan 2,3-dioxygenase
 - Serine dehydratase
- Drug-metabolizing enzymes (in phase I)
 - Cytochrome P-450s
 - Mixed-function oxygenases (aryl hydrocarbon hydroxylase)
 - NADPH P-450 reductase
 - Glutathione peroxidase (Se-dependent)
- Other enzymes
 - ATPase (Ca²⁺, Mg²⁺ dependent)

Enzymes with increased activity

- Carbohydrate-metabolizing enzymes
 - Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)
 - Nonhepatic (fetal-type) isoenzymes of glycolysis
- Drug-metabolizing enzymes (in phase II)
 - UDP-glucuronosyltransferase (type I, or fetal type)
 - Epoxide hydrolase (EH)
 - DT-diaphorase (quinone reductase)
 - Aldehyde dehydrogenase (NADP⁺)
 - Butyryl esterase
- Glutathione-related enzymes
 - Glutathione transferases (GT) (1-1, 3-3, 7-7)
 - γ-Glutamyltransferase (GGT)
 - Glutathione peroxidase (Se-independent) (GTs 1-2, 2-2, 7-7)
 - Glutathione reductase
 - (Total glutathione)

表一. 肝臟前癌細胞之細胞標記(Sato, 1989)

PGST 在 1984 年由 Sato 等人自大白鼠胎盤分離出來，並加以命名，是胎盤中僅有的 GST 型式。在正常成鼠肝細胞中並不表現，但在肝癌形成過程中 PGST - positive foci 是一良好指標。以 aflatoxin B1 作為誘發大鼠肝癌生成模式發現，PGST 的蛋白量及 mRNA 表現的確有增加現象 (Power et al., 1987)。PGST 被認為可標記非常早期的前癌細胞，以 DEN (200 mg/kg body weight; 10 mg/kg body weight) 進行誘發，經六個月後可發現 PGST-positive foci 形成，當以 AAF 為 promoter，並施以部份肝切除 2 至 3 星期後，PGST - positive foci 將轉變為更大型的 foci (Sato, 1988; Takahashi et al., 1987)。

而 PGST、GGT positive foci 那一種是肝癌形成的良好指標? Tatematsu 等人 (1985) 以 DEN 為誘發劑，而以 PB、N-2-fluorenylacetylamide 為促進劑，餵食六週後，施以部份肝切除，結果發現所有表現 GGT - positive foci 亦表現 PGST - positive，而所有表現 PGST - positive foci 則有 5 ~ 10 % 不表現 GGT - positive foci。在隨後的研究中，Tatematsu 等人 (1988) 證實 PGST 在作為肝癌形成的指標是較 GGT 準確，而 GGT 則可用於指示癌前病害表現的改變情形。因此本實驗將利用免疫組織法觀察 PGST - positive foci 及以化學組織法觀察 GGT - positive foci 作為肝癌形成指標。

材料與方法

一. 材料

見附錄。

二. 動物飼養與肝癌誘發模式

本實驗採用 Peraino 等人(1971)的模式誘發雌性 Sprague-Dawley (SD)大鼠肝臟前癌細胞生成。自國科會動物中心購入懷孕的 SD 大鼠，於雌性大鼠出生 24 小時內，腹腔注射 DEN (15 mg / kg body weight)誘發起始期 (initiation)，哺乳這段期間同時也為肝細胞快速增殖期。出生後三週離乳，隨機分成三組分別為維生素 E 缺乏組(n = 8)、維生素 E 正常組(n = 7)、維生素 E 補充組(500 mg / 100g diet) (n = 7)，飼養 24 週後犧牲。飼料與水以任食方式給予，每組飼料中皆含有 PB (50 mg / 100g diet)作為促進劑 (promoter)。大鼠每兩週秤量一次體重，動物房溫度控制在 22 ± 1 °C，光照時間(light cycle) 8:00~20:00。飼養結束前一天，秤量大鼠體重並予以禁食，但飲水則繼續提供。利用過量 CO₂ 犧牲大鼠，由頸靜脈抽取 1.5 ml 血液

，內含 0.15 ml 抗凝血劑(50 mM EDTA 及 0.7 mg/ml indomethacin in PBS (含 1.2 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、17 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及 140mM NaCl))，裝入 1.5 ml 微量離心管中，於 4°C 下以 1500× g 離心 5 分鐘，取上層液即血漿部份，分裝於 1.5 ml 微量離心管中，放入零下 80°C 冷凍櫃中，待日後分析血漿中 PGE₂ 濃度。由腹腔靜脈抽取 6 ml 血液，內含 0.6 ml 抗凝血劑(50 mM EDTA in PBS)，置於 15 ml 離心管中，以 500× g 離心 10 分鐘，取上層液置入 1.5 ml 微量離心管，放入零下 80°C 冷凍櫃儲存，待日後進行血漿維生素 E 及總脂質分析。將肝臟自腹腔取出，秤重後切取最大肝葉中段 1 cm 厚組織，置入混合丙酮的乾冰上急速凍結，待組織丙酮揮發後，存放於零下 80 °C 冷凍櫃，待日後進行免疫組織化學法分析前癌細胞生成。剩餘的肝組織立即放入液態氮中急速冷凍，隨即放入零下 80°C 冷凍櫃，待日後進行其他項目分析。

三. 實驗飼料組成

飼料組成見表一，依維生素 E 含量可分為三組，在維生素 E 缺乏組是使用不含維生素 E 的玉米油及綜合維生素

，維生素 E 正常組使用一般玉米油及含有維生素 E 的綜合維生素，維生素 E 補充組飲食成份與正常組相同，並額外添加維生素 E (500 mg /100 g diet)作為補充，其他飲食成份三組皆同。

四. 維生素 E 濃度測定(Catignani and Bieri, 1983)

取 0.1 g 肝臟加入 0.9 ml 50 mM 磷酸鉀緩衝溶液(pH 7.0)進行均質，均質完成後取 200 μ l 均質液(血漿維生素 E 分析則由先前製備的腹腔血漿直接取用 200 μ l)，加入 100 μ l α -tocopheryl acetate (50 ng/ml, in 100% 乙醇作為內標，振盪混合 1 分鐘，再加入 200 μ l 己烷萃取 1 分鐘，於 4°C 下以 1500 \times g 離心 3 分鐘，取上層液置於 1.5 ml 微量離心管，剩餘下層液再經三次萃取、離心，將蒐集的上層液以氮氣吹乾，最後溶於 350 μ l 甲醇，經濾膜(0.45 μ m)過濾後，取 200 μ l 裝入自動注射瓶內管中，注入 50 μ l 於 HPLC，定量肝臟及血漿中維生素 E 濃度，依標準曲線計算，肝臟維生素 E 濃度以 μ g/g liver 表示，血漿維生素 E 濃度則以 μ g/mg total lipid 表示。

HPLC 系統組成:

L-6200A intelligent pump , L-4200 UV-VIS detector , D-6000 interface 及 LC organizer (Hitachi, Tokyo, Japan);

mobile phase: methanol : dd H₂O=98 : 2 (v / v); flow rate: 1.2 ml / min; detector wavelength: 290 nm; sensitivity: 0.01

A.U. F. S. (absorbance units full scale);

HPLC column: 3.9 × 300 nm stainless steel packed with micro Bondapak C18 (Waters Inc., Milford, MA)

五. 脂質過氧化產物(lipid peroxidation)分析: (Fraga et al., 1988)

肝臟以 50 mM 磷酸鉀緩衝溶液(pH 7.0)均質(1:9, w/v) , 取 0.2 ml 均質液 , 置於冰浴中依序加入 0.3 ml 50 mM 磷酸鉀緩衝溶液(pH 7.4) 、 0.5 ml 3% sodium dodecyl sulfate(SDS) 、 2 ml 0.1 N HCl 、 0.3 ml 10% phosphotungstic acid 及 1 ml 0.7% thiobarbituric acid (TBA) , 混合均勻 , 以 100 °C 水浴 30 分鐘 , 再置於冷水浴 5 分鐘 , 加入 5 ml 1-丁醇(1-butanol)萃取 TBA reactive substances (TBARS) , 於 1100× g 、 18°C 下離心 15 分鐘 , 取上層液以螢光分光光

譜儀 (F-4500, Hitachi, Tokyo, Japan) 在 excitation 515 nm、emission 555 nm 下進行分析。所得數值經與 1, 1, 3, 3-tetramethoxypropane (TMP) 所作出的標準曲線比較，可計算出樣品中 TBARS 濃度，以 nmole/g liver 為表示單位。

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

肝臟以 50 mM 磷酸鉀緩衝溶液(pH 7.0) (1: 9, w/v)均質，取 0.4 ml 均質液加入等量含 2.5 mM phenanthroline 之 10% perchloric acid (PCA)，靜置 40 分鐘，於 4°C 下以 2000× g 離心 3 分鐘，取 400 μl 上層液，加入 40 μl 新鮮製備的 100 mM iodoacetic acid (IAA)溶液，接著緩慢加入 KHCO₃ 粉末中和酸液至不起泡為止，經暗反應 15 分鐘後，再加入 440 μl 3% 2, 2-dinitrofluorobenzene (FDNB, in 99.5% 乙醇)溶液，混合均勻置於 4°C 下隔夜，以 4000× g 離心 5 分鐘，取出上層液，經濾膜(0.45 μm)過濾後，以 HPLC 進行分析，GSH 及 GSSG 濃度以 nmole/mg protein 表示，總 GSH 濃度等於 GSH 濃度加上 2× GSSG 濃度(總 GSH = GSH+ 2× GSSG)。

HPLC 條件設定:

偵測波長: 365 nm

流速: 1.2 ml / min

移動相: solvent A : 80% 甲醇

solvent B : solvent A : stock solvent B (20: 80, v/v)

(stock solvent B: 272 g CH₃COONa + 621 ml

CH₃COOH +189 ml H₂O)

stop time: 30 min

移動相梯度變換設定:

gradient time (min)	solvent A (%)	solvent B (%)
0	80	20
3	80	20
12	5	95
20	5	95
22	80	20
30	80	20

七. 血漿總脂質(plasma total lipid)分析(Frings and Dunn, 1970)

取 50 μ l 血漿與 1 ml 濃硫酸混合，於 100°C 水浴 10 分鐘，取其中 100 μ l 再加入 5 ml phospho-vanillin reagent (200 ml 0.6 % vanillin 及 800 ml 濃磷酸)，混合後於 37°C 水浴 15 分鐘，取出置於室溫下冷卻 5 分鐘，以分光光譜儀於波長 540 nm 下測吸光值，並以橄欖油(1g / dl absolute ethanol)為標準品，製作標準曲線以求出總脂質濃度。

標準曲線製作:

stock solution: 1g / dl absolute ethanol

working solution

Conc. (mg / dl)	200	400	600	800	1000
Stock solution	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Absolute ethanol	0.4	0.3	0.2	0.1	0

八. 肝臟細胞質液(cytosol)製備(Huang et al., 1988)

肝臟以 0.01 M 磷酸鉀緩衝溶液(pH 7.4 內含 1.15% KCl)均質(1 : 4, w/v)，將均質液倒入離心管中，於 4°C 下先

以 $10000\times g$ 離心 30 分鐘，取出上層液，再於 4°C 下以 $105000\times g$ 離心 1 小時，離心所得上層液為細胞質液，下層沉澱物為微小體，將細胞質液置於零下 80°C 冷凍櫃儲存，待日後分析。

九. 麩胱甘肽過氧化酶活性測定(Lawrence and Burk, 1976)

於 1.5 ml 石英管中加入 0.8 ml 反應液(含 1 mM EDTA、1 mM NaN_3 、0.2 mM NADPH、1 U/ml GSH Rd 及 1 mM GSH 之 100 mM 磷酸鉀緩衝液, pH 7.0)。加入 $100\mu\text{l}$ 經 20 mM 磷酸鉀緩衝液(pH 7.0)稀釋 150 倍的細胞質液樣品，於室溫下靜置 5 分鐘，再加入 0.1 ml 2.5 nM H_2O_2 ，以分光光譜儀在波長 340 nm、 25°C 下測量三分鐘內吸光值變化情形，計算 NADPH 消耗速率，比活性以 nmol NADPH/min/mg protein 表示。

十. 麩胱甘肽還原酶活性測定(Bellomo et al., 1978)

於 1.5 ml 石英管中加入 0.9 ml 反應液(含 1.1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、5.0 mM GSSG 及 0.1 mM NADPH 之 100 mM 磷酸鉀緩衝液, pH 7.0), 接著加入 80 μl 20 mM 磷酸鉀緩衝液(pH 7.0)及 20 μl 樣品, 以分光光譜儀於波長 340 nm、25°C 下測量五分鐘內吸光值變化情形, 計算 NADPH 消耗速率, 比活性以 nmol NADPH/min/mg protein 表示。

十一. 麩胱甘肽硫轉移酶活性測定(Habig et al., 1974)

於 1.5 ml 石英管中加入 880 μl 反應液(含 1 mM GSH 之 100 mM 磷酸鉀緩衝液, pH 6.5), 再依序加入 20 μl 50 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) (溶於 99.5 % 乙醇)、80 μl 20 mM 磷酸鉀緩衝液(pH 7.0)及 20 μl 經 20 mM 磷酸鉀緩衝液(pH 7.0)稀釋 150 倍後的細胞質均質液樣本, 混合均勻後以分光光譜儀於 340 nm 下記錄 5 分鐘內吸光值變化。

GST 活性以 CDNB-GSH conjugate 生成速率計算。比活性以 nmole CDNB conjugate formed/min/mg protein 表示, $\text{CDNB-GSH } \Delta \varepsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。

十二. 肝臟 γ -glutamyl transferase-positive foci (GGT-positive foci) 分析 (Rutenburg et al., 1969)

切片製備

以冷凍切片機 (Jung CM 1800, Leica, West Germany) 於零下 20°C 切取 10 μ m 厚的肝臟切片，每隻大鼠肝臟連續切片六片，貼於載玻片上，置於玻片盒中暫存於零下 20°C 冷凍櫃中，待進行免疫組織化學分析前癌細胞。

γ -glutamyl-4-methoxy-2-naphthylamide (γ -GMNA) 溶液配製

Stock solution : 5 mg GMNA 溶於含有 0.1 ml dimethyl sulfoxide (DMSO)、0.1 ml 1N NaOH 及 1.8 ml 去離子水的溶液中，於 4°C 下可存放 3 天。working solution: 取 0.5 ml stock solution 加入 2.5 ml 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4)、7 ml 0.85 % saline (含有 5 mg glycylglycine 及 5 mg 4-benzoylamino-2, 5,-diethoxybenzene-diazoium chloride hemi (zinc chloride) salt (Fast Blue BBN))。

切片染色

將冷凍肝臟切片置於室溫晾乾 (10~15 分鐘)，滴上新

鮮配製的 γ -GMNA 溶液反應 15 分鐘，以 0.85 % saline 浸洗 2 分鐘，加入 0.1 M CuSO_4 反應 2 分鐘使呈色穩定，再以 0.85 % saline 浸洗 2 分鐘，最後以去離子水清洗，待切片乾燥後再以 glycerol gelatin 封片，即完成染色。

十三. 肝臟 placental glutathione S-transferase-positive foci (PGST-positive foci) 分析 (Hendrich et al.,1991)

切片製備

同 GGT-positive foci。

切片染色

將肝臟切片置於室溫下晾乾(10~15 分鐘)，先將切片以 1:1 比例(v/v)配製的乙醇：丙酮(acetone)固定液浸泡 3 分鐘固定組織，依序再以 0.3 % H_2O_2 (in 95 % 甲醇)處理 30 分鐘使組織過氧化酶失活、PBS 浸洗三次(5 min /次)、滴上 normal goat serum (200x dilution in buffer B, 含 25 mM Tris 及 150 mM NaCl, pH 7.4)覆蓋組織切片，於室溫下靜置 1 小時、PBS 浸洗三次(5 min /次)、滴上 rabbit anti-PGST antibody (1:300, in buffer B, v/v)置於 4°C 冰箱中 overnight、

用 PBS 浸洗三次(5 min /次)、加入 biotinylated anti-rabbit IgG (1:200, in buffer B, v/v)於室溫下靜置 1 小時、用 PBS 浸洗三次(5 min /次)、滴上 AB complex (1:200, in buffer B, v/v)靜置 30 分鐘、用 PBS 浸洗三次(5 min /次)、滴上新鮮配製 AEC kit (依序加入 5 ml 一次水、兩滴 buffer stock solution、三滴 AEC stock solution 及兩滴 H₂O₂)室溫下反應 15 分鐘、以二次水浸洗 5 分鐘以終止反應、待乾燥後以 glycerol gelatin 封片。

Foci 觀察

將製作完成的肝臟切片置於顯微鏡下觀察(Zeiss, Germany)，利用電腦影像分析系統(Color Video Camera, Q 500 MC, Leica, Germany)分析 GGT-及 PGST- positive foci 面積及數目，foci 的判定以直徑 > 0.25 mm 為標準。

十四. Protein kinase C (PKC) 活性分析(Chang et al., 1996)

樣品製備

0.1g 肝臟以 3 ml buffer A 均質，於 4°C 下以 10000× g 離心 30 分鐘，取出上層液再於 4°C 下以 100000× g 進行

超高速離心 1 小時，將上層液(cytosol)儲存於零下 80°C 冷凍櫃，將沉澱物以均質 buffer B 懸浮後，進行超音波振盪，靜置 30 分鐘後，置於 4°C 下 rotating mixed 1 小時，再於 4°C 下以 100000× g 超高速離心 1 小時，取上層液(membrane)儲存於零下 80°C 冷凍櫃，於 1 星期內完成分析。

PKC 純化

將 DE 52 column 製備好，先以 elution buffer 沖 column 三次(0.75 ml /次)，分別將先前製備的樣品通過 column (cytosol 1.5 ml, membrane 0.75 ml)，以 elution buffer 沖 column 三次(0.75 ml /次)，再以 0.25 ml 含 120 mM KCl 之 elution buffer 沖 column，最後以 0.5 ml 含 120 mM KCl 之 elution buffer 沖 column，並收集至微量離心管中測活性。

活性測定

將純化後的樣品，取 50 μ l 與 100 μ l 反應液((+)PS;(-)PS) 混合後加入含 cold ATP (3 μ l)、 γ -³²P ATP (0.2 μ l) 及 20 mM Tris-HCl (46.8 μ l) 溶液，混合後水浴 10 分鐘，依序加入 50 μ l 1 mg/ml BSA、250 μ l 40 % TCA (4°C)、1.5 ml 1 %

TCA (4°C) ，在 4°C 下以 3000× g 離心 30 分鐘，倒掉上清液再加入 1.5 ml 1 % TCA (4°C) ，在 4°C 下以 3000× g 離心 30 分鐘，倒掉上清液以 β -counter 測量放射強度。活性表示為 nmole ATP/ mg protein /min 。

反應液配製

buffer A: 內含 20 mM Tris-HCl、0.03 mM Na₃VO₄、20 mM MgCl₂· 6H₂O、2 mM EDTA、0.5 mM EGTA、2 mM PMSF、1 mM dithiothreitol、250 mM sucrose、10 μ g /ml leupeptin 調至 pH 7.4 。

均質 buffer B: 內含 20 mM Tris-HCl、0.03 mM Na₃VO₄、2 mM MgCl₂· 6H₂O、2 mM EDTA、0.5 mM EGTA、2 mM PMSF、1 mM dithiothreitol、5 mM NaF、10 μ g /ml leupeptin、0.1 % Triton X-100 調至 pH 7.5 。

PKC 活性測定反應液 (每一支樣品使用量)

Reactive solution	(+)PS	(-)PS
	用量(μ l)	用量(μ l)
200 mM Tris	20	20
2 mM Ca ²⁺	10	10
24 mM EGTA	5	5
200 mM Mg ²⁺	10	10
histone (1.6 μ g/ml)	25	25
leupeptin (1 μ g/ml)	10	10
20 mM Tris	10	20
phosphatidylserine (PS) (1 μ g/ μ l)	10	0
總體積	100	100

十五. 血漿 PGE₂ 濃度分析

使用 Prostaglandin E₂[¹²⁵I]RIA kit(NEN[®] Research Products)分析血漿 PGE₂ 濃度。

十六. 肝臟 γ -glutamyl transferase 活性測定(Smith et al., 1979)

將肝臟與 10 倍均質液(10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 含 150 mM NaCl 及 1 % Triton X-100) 均質, 均質後置入冰浴 30 分鐘, 並於 4°C 下以 500 \times g 離心 30 分鐘, 取上層液為分析樣品, 依序加入 25 μ M 7-amino-4-methylcoumarin (AMC, 溶於 methoxyethanol, 可存於零下 20°C)、均質液、10 mM L- γ -glutamyl AMC (GAMC, 溶於 methoxyethanol 可存於零下 20°C)、分析樣品及反應液(含 20 mM glycylglycine、0.1 % Triton X-100 溶於 100 mM Tris-HCl, pH 8.5), 經 37°C 水浴 30 分鐘, 再加入 50 mM glycine buffer (含 50 mM glycylglycine、5 mM L-serine 及 5 mM sodium borate, 調整 pH 至 10.4)以終止反應。以 F- 4500 於 excitation 370 nm 及 emission 440 nm 測吸光值。比活性以 nmole AMC formed/min/mg protein 表示。

	標準曲線(nmole)						分析 樣品
	0	62.5	125	250	500	1250	
25 μ M AMC(μ l)	0	2.5	5	10	20	50	-
均質液(μ l)	105	102.5	100	95	85	55	-
10 mM GAMC(μ l)	-	-	-	-	-	-	5
分析樣品(μ l)	-	-	-	-	-	-	100
反應混合液(μ l)	245	245	245	245	245	245	245

十七.蛋白質濃度測定(Lowry et al., 1951)

樣品製備

取 20 μ l 待測樣品於 1.5 ml 微量離心管中，加入等量 10 % trichloroacetic acid (TCA)，靜置 30 分鐘使蛋白質沉澱，於 4°C 下以 10000 \times g 離心 6 分鐘，將上清液吸出，再加入 400 μ l 1N NaOH，混合均勻後，靜置 30 分鐘以上使沉澱物完全水解。

標準曲線製備

以牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)為標準品，配製 1 mg/ml 的 BSA，利用分光光譜儀校正真正濃度，

在 280 nm 下 BSA (1mg/ml)理論吸光值為 0.667，經校正後再以 NaOH 將 BSA 稀釋至 $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，利用 1 N NaOH 可配成 0、8、16、24、32 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 濃度。

樣品分析

取 100 μl 蛋白質水解樣品(可使用 1 N NaOH 稀釋)及不同濃度的標準品，置於 1.5 ml 微量離心管中，依序加入 200 μl 去離子水及 100 μl 反應液(25 % Na_2CO_3 : 2 % Na-K-tartrate : 1 % $\text{CuSO}_4 = 8 : 1 : 1$)，混合均勻，於室溫下靜置 10 分鐘，加入 1 ml Folin reagent (Folin : $\text{H}_2\text{O} = 1 : 19.5$)，混合均勻，置於 37°C 水浴中反應 20 分鐘，取出置於室溫下冷卻 10~15 分鐘，並使用分光光譜儀在波長 660 nm 下測吸光值。對照標準曲線可得蛋白質濃度。

十八. 統計分析

使用 one way analysis of variance (ANOVA)進行統計分析，並以 Tukey's test 進行顯著性差異分析，當 $p < 0.05$ 時表示有顯著性差異。

結 果

不同濃度維生素 E 對大鼠生長的影響

由表二結果顯示，飲食中維生素 E 濃度，並不會影響大鼠體重、食物攝取量及肝臟重量。但在肝重/體重比值上，維生素 E 缺乏組大於正常組及補充組($p < 0.05$)，在脾臟重量部份維生素 E 缺乏組明顯大於維生素 E 補充組($p < 0.05$)，但與維生素 E 正常組無顯著差異。

不同濃度維生素 E 對大鼠血漿維生素 E、肝臟抗氧化分子及脂質過氧化的影響

由表三結果顯示肝臟 GSH / GSSG 及 GSH / total GSH，三組之間沒有顯著差異。在血漿維生素 E 濃度上(圖一)，明顯受到飲食中維生素 E 的影響，缺乏組($1.597 \pm 2.073 \mu\text{g} / \text{mg total lipid}$)顯著低於正常組($6.139 \pm 1.995 \mu\text{g} / \text{mg total lipid}$)及補充組($12.452 \pm 1.723 \mu\text{g} / \text{mg total lipid}$) ($p < 0.05$)。而肝臟維生素 E 濃度方面(圖二)，維生素 E 補充組肝中維生素 E ($276.766 \pm 139.204 \mu\text{g} / \text{g liver}$)明顯大於其他兩組(9.698 ± 7.125 ; $27.274 \pm$

12.578 $\mu\text{g} / \text{mg liver}$) ($p < 0.05$)。而在脂質過氧化程度(圖三)則以維生素 E 缺乏組($99.439 \pm 37.078 \text{ nmol} / \text{g liver}$)明顯高於其他兩組(53.961 ± 7.252 ; $41.271 \pm 4.476 \text{ nmol} / \text{g liver}$) ($p < 0.05$)。

不同維生素 E 處理對大鼠肝臟 GST、GGT、GSH Px、GSH Rd 活性之影響

由表四得知維生素 E 正常組及維生素 E 補充組在 GST、GSH Px 及 GSH Rd 三種酵素活性相較於維生素 E 缺乏組有顯著增加($p < 0.05$)。對於 GGT 酵素活性，維生素 E 處理則不影響其表現。

維生素 E 處理對大鼠肝臟 GGT-及 PGST-positive foci 形成之影響

由表五結果顯示不論是 GGT-或 PGST-positive foci，其形成皆不受維生素 E 處理所影響。

維生素 E 處理對大鼠血漿 PGE₂ 濃度的影響

由圖四結果顯示在血漿 PGE₂ 濃度，三組之間沒有顯著性差異(維生素 E 缺乏組為 4.171 ± 0.599 ng/ml; 正常組為 3.857 ± 1.050 ng/ml; 補充組為 3.04 ± 0.607 ng/ml)。隨飲食中維生素 E 濃度增加，仍有抑制 PGE₂ 濃度趨勢。

維生素 E 處理對大鼠肝臟 PKC 活性之影響

由圖五結果顯示，大鼠肝臟膜上以及細胞質中 PKC 活性不受飲食中維生素 E 濃度的影響(缺乏組膜 PKC 活性: 639.153 ± 337.075 , 細胞質 PKC 活性: 84.301 ± 55.969 ; 正常組膜 PKC 活性: 615.051 ± 181.103 , 細胞質 PKC 活性: 72.814 ± 43.136 ; 補充組膜 PKC 活性: 693.694 ± 281.415 , 細胞質 PKC 活性: 103.269 ± 63.108 , 比活性單位: pmol / mg protein / min)，三組之間無顯著差異性。

討 論

動物生長情形

不同維生素 E 含量的飲食，對於大鼠食物攝取及體重增加，均無顯著影響(表二)。此結果與本實驗室先前研究所得結果相同(Lii et al., 1997)。另外以 Fischer 344 大鼠進行維生素 E 之毒性研究，經過 13 週不同維生素 E 劑量(0, 125, 500, 2000 mg/kg body weight)處理，發現維生素 E 添加並不會影響大鼠攝食情況及體重變化(Abdo et al., 1986)。

雖然不同維生素 E 處理對於大鼠肝重變化沒有影響。若計算肝重與體重的比值時，可以發現維生素 E 缺乏組在肝重對體重比值上顯著大於維生素 E 正常組及補充組($p < 0.05$)。Hendrich 等人(1991)指出 PB 可活化肝臟中解毒代謝酵素系統，產生自由基對肝臟造成損傷，並會造成肝臟腫大現象，進而造成大鼠肝重/體重比值上升。若同時於飲食中添加維生素 E，經過 11 個月可發現 PB 所促進肝重/體重比值的效應有被減弱的趨勢。而本次實驗結果亦發現維生素 E 正常組及補充組之肝重/體重比值明顯低於缺乏組($p < 0.05$)。顯示維生素 E 可能藉由清除自由基，而降低 PB 對於肝臟的影響。

缺乏組的脾臟重量相較於補充組的脾臟重量，明顯較高

($p < 0.05$)。Wang 等人(1994)指出被引發後天免疫不全症候群的小鼠脾臟重量會有明顯增加，但在飲食中添加維生素 E 可抑制脾臟重量增加情形。另外 Bendich 等人(1986)指出給予斷乳大鼠含有維生素 E (7.5 mg/kg diet)飲食，可維持大鼠正常生長速率及脾臟重對體重的比值。顯示維生素 E 存在可維持脾臟正常功能的表現。

體內抗氧化系統的變化

隨飲食中維生素 E 含量的增加，血漿及肝臟中維生素 E 含量亦隨之上升，顯示體內維生素 E 含量的確受到飲食中維生素 E 濃度的影響 (圖一、二)。維生素 E 是脂溶性抗氧化劑，可以有效的抑制脂質過氧化反應(Chen et al., 1993; Miyazawa et al., 1990)。黃麴毒素 B1 對肝臟具有強烈毒性，並且可誘發肝癌，當其對肝臟作用時，會促進肝臟脂質過氧化反應，若同時給予抗氧化劑 tertatin 或維生素 E，可有效降低黃麴毒素誘發肝臟脂質過氧化反應及對肝臟的毒性作用(Souza et al., 1999)。本次實驗亦觀察到維生素 E 處理，確實可降低肝臟脂質過氧化作用(圖三)。

GSH/GSSG 及 GSH/總 GSH 兩種比值，是用來表示 GSH

氧化還原狀態(redox)，由表三結果發現飲食中補充維生素 E 不會影響肝臟 GSH/GSSG 及 GSH/總 GSH 比值。Costagliola 等人(1986)對人類、兔子及大鼠的眼房水(aqueous humor)及晶狀體(lens)作研究指出，維生素 E 補充不會影響這些組織中 GSH/GSSG 比值。但在心臟方面的研究，卻發現維生素 E 補充會增加天竺鼠心臟中 GSH/GSSG 及 GSH/總 GSH 比值(Rojas et al., 1996)。心臟跳動需要大量氧氣，進行有氧能量代謝，會伴隨大量自由基的產生，而造成 GSH/GSSG 比值變低，當供給維生素 E 可清除自由基，進而提高心臟 GSH/GSSG 比值。由本次實驗結果及先前學者研究結果顯示，維生素 E 對 GSH 氧化還原作用的影響，會隨器官本身所承受的氧化壓力而有所不同。

GST 是一重要解毒酵素，它可利用 GSH 上的硫氫基團(SH group)修飾毒物，而使毒物較易被排除。GSH Px 及 GSH Rd 則為參與 GSH 氧化還原循環的兩個重要酵素，並參與維生素 E 的再生。此外 GSH Px 亦可將 H₂O₂ 代謝成 H₂O。研究指出，脂質過氧化作用會降低肝臟 GST 酵素活性，若給予抗氧化劑抑制脂質過氧化作用，則可延緩 GST 活性降低速率(Harris and Stone., 1988)。van Lieshout 等人(1996)指出給予雄性 F344 大鼠維生素 E 補充，發現可同時促進 GST 及 GSH Px 活性，其原因可能是維生素 E 添加，可提高肝臟 GSH 含量，而影響

GSH Px 及 GST 的活性。另外有學者研究指出以維生素 E (14 μ M)處理沙鼠腎臟纖維母細胞株(BHK-21/C13) , 可促進 GSH Px 活性上升(Hu et al., 1992)。本實驗室先前研究指出, 給予大鼠 100 ppm 維生素 E 相較於不含維生素 E 飲食, 具有較高 GSH Rd 活性(Lii et al., 1998)。而本次實驗結果亦可發現維生素 E 缺乏組在 GST、GSH Px 及 GSH Rd 活性明顯低於維生素 E 正常組(表四) ($p < 0.05$)。顯示缺乏維生素 E 會造成 GSH 酵素系統活性的下降。

血漿 PGE₂ 濃度

Teng 等人(1996)以維生素 E (400 mg/天)給予健康成人, 經 28 天後取出周邊血液單核球細胞進行培養, 發現維生素 E 處理可以降低單核球 PGE₂ 生成。此現象似乎與維生素 E 抑制淋巴細胞脂質過氧化作用有關。Meydani 等人(1990)給予健康老人維生素 E 補充(400 mg/天) , 經 30 天後, 自血液中分離出周邊單核球進行培養, 發現維生素 E 可降低單核球 PGE₂ 產生。此作用的進行除了是經由抑制脂質過氧化反應, 另外也有可能是經由抑制花生四烯酸代謝途徑而達成。Yano 等人(1997)指出以 urethane 誘發小鼠肺癌生成, 在肺臟組織中 PGE₂ 濃度

會增加，若同時給予維生素 E (400 mg/kg diet) 補充，發現花生四烯酸代謝成 PGE₂ 的途徑有被抑制，且肺癌形成也同時被抑制。維生素 E 抑制 PGE₂ 產生，是經由抑制環氧化酶活性來達成 (Sakamoto et al., 1991)。環氧化酶是花生四烯酸代謝成 PGE₂ 的速率限制酵素，在其被活化時需要有少量過氧化物存在 (Land et al., 1979)。而維生素 E 可能藉由自身抗氧化特性清除過氧化物降低環氧化酶活性，進而降低 PGE₂ 生成。由過去文獻可知維生素 E 可經由抑制環氧化酶活性而減少 PGE₂ 生成。但在此次實驗中，維生素 E 處理對於血漿 PGE₂ 濃度雖然沒有顯著性影響，PGE₂ 濃度仍隨維生素 E 補充而呈現下降趨勢。此現象可能是受到實驗中的誘發劑 DEN 干擾所導致。Gonul 等人 (1996) 將 DEN (280 mg/kg BW) 以腹腔注射方式給予雄性 Wistar 大鼠，經 6 個月後與控制組 (注射生理食鹽水) 比較，發現注射 DEN 組其血液中 PGE₂ 濃度有明顯較高的趨勢 ($p < 0.01$)，顯示 DEN 具有提高血液中 PGE₂ 濃度的作用。而此次實驗結果不明顯可能維生素 E 效應被 DEN 遮蔽所致。

肝臟 PKC 活性

雖然維生素 E 可經由改變膜的穩定性、將 PKC 去磷酸化

等過程使 PKC 活性表現下降(Packer, 1991; Ricciarelli et al., 1998)。但本次實驗結果(圖五)卻發現維生素 E 處理並不影響 PKC 活性，顯示此種肝癌誘發模式下，維生素 E 並不影響 PKC 活性。但在其他肝癌誘發系統中，以 DEN 為誘發劑，2-AAF 及部份肝切除為促進劑，進行肝癌生成研究，經 15 個月後發現肝癌組織較正常組織具有較高的 PKC 活性(La Porta et al., 1997)。顯示肝癌生成過程中，PKC 應參與其中。本次實驗維生素 E 處理並不影響 PKC 活性。由這些結果暗示兩個可能性：一是在此種肝癌誘發模式下，維生素 E 無法影響 PKC 活性。另一則是此種肝癌誘發模式所導致肝癌生成，PKC 並沒有參與其中。而這些可能性有待日後加以證實。

肝臟前癌細胞生成

本次實驗 GGT-positive 及 PGST-positive foci 並不受維生素 E 處理所影響(表五)。雖然本實驗室在先前研究結果也發現維生素 E 處理並不會影響肝臟 GGT-positive foci 生成(Lii et al., 1997)。但在其他的研究中卻指出由雌性激素、DEN 所誘發的 GGT-positive 及 PGST-positive foci 可經由飲食中維生素 E 添加而被抑制(Ogawa et al., 1995; Ura et al., 1987; Hendrich et al.,

1991)。觀察他們所使用的實驗模式，可發現與本次實驗模式最大不同點在於維生素E處理的時間，他們所觀察到維生素E抑制前癌細胞生成是在供給三個月內發生，當處理時間延長時，維生素E對於前癌細胞生成抑制作用則會消失。而本次實驗模式處理時間為六個月，可能因此而無法觀察到維生素E對於前癌細胞產生的抑制作用。至於為何維生素E對於前癌細胞生成具有時間上的差異，其機制仍待日後研究。

結 論

在本實驗模式下，飲食中維生素 E 含量，可影響肝臟中 GSH Px、GSH Rd 及 GST 活性，血漿中及肝臟的維生素 E 含量，肝臟脂質過氧化反應也同時受到影響。血漿中 PGE₂ 濃度，雖然統計上沒有明顯的差異，但隨維生素 E 補充，而呈現下降的趨勢。肝臟 PKC 活性、前癌細胞生成數目及面積則不受飲食中維生素 E 含量所影響。顯示維生素 E 存在時，對於抗氧化作用維持有其重要性，但對於前癌細胞生成則沒有影響。此結果暗示氧化/抗氧化作用可能並不影響前癌細胞生成。

表一. 實驗飲食組成

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredient	Vitamin E		
	deficient	adequate g/100g	supplemented
Corn oil, α -tocopherol stripped ^a	15	-	-
Corn oil ^b	-	15	15
Casein ^a	15	15	15
Dextrose ^a	15	15	15
Corn starch ^a	45	45	45
Cellulose ^a	4.95	4.95	4.45
Vitamin mix, tocopherol devoid ^a	1	-	-
AIN vitamin mix ^a	-	1	1
AIN mineral mix ^a	3.5	3.5	3.5
Choline bitartrate ^a	0.2	0.2	0.2
DL-Methionine ^a	0.3	0.3	0.3
α -Tocopheryl succinate ^c	-	-	0.5
Phenobarbital ^c	0.05	0.05	0.05

a: from Teklad (Madison, WI)

b: from CPC Intl Inc. (Englewood, NJ)

c: from Sigma (St. Louis, MO)

表二. 飲食中維生素 E 處理對於大鼠飼料攝取、體重增加、肝重、相對肝重
及脾重之影響

Table 2. Effect of dietary vitamin E on food intake, body weight gain, liver weight and
liver weight / body weight and spleen weight

	Vitamin E		
	Deficient	Adequate	Supplemented
Food intake (g)	3269 ±336	3142 ±173	3062 ±269
Body weight gain(g)	325 ±40	340 ±29	371 ±47
Liver weight (g)	11.3±1.5	10.7±1.2	11.8±2.2
Liver wt / body wt	0.035±0.002 ^a	0.031±0.003 ^b	0.031±0.003 ^b
Spleen weight (g)	0.633±0.085 ^a	0.551±0.143 ^{ab}	0.476±0.085 ^b

Values are means ± SD. Groups that do not share the same letter (a,b) are significantly different from one another (p<0.05).

表三. 飲食中維生素 E 處理對大鼠肝臟還原態與氧化態麩胱甘肽及還原態與總麩胱甘肽比值之影響

Table 3. Effect of dietary vitamin E on hepatic reduced GSH/GSSG and reduced GSH/total GSH ratios of rats

	Vitamin E		
	Deficient	Adequate	Supplemented
GSH/GSSG	21.9±2.8	25.2±1.7	25.6±4.9
GSH/total GSH	0.92±0.01	0.93±0.01	0.93±0.02

Values are means ± SD. Groups that do not share the same letter (a,b) are significantly different from one another ($p < 0.05$).

表四. 飲食中維生素 E 處理對大鼠肝臟 GST、GSH Px、GSH Rd 及 GGT 酵素活性之影響

Table 4. Effect of dietary vitamin E on hepatic GST, GSH Px, GSH Rd, and GGT activities of rats

	Vitamin E		
	Deficient	Adequate	Supplemented
GST (nmol/mg protein/min)	3384.0±616 ^a	4415.0±732 ^b	4391.0±694 ^b
GSH Px (nmol/mg protein/min)	618.0±114 ^a	1062.0±165 ^b	913.0±215 ^b
GSH Rd (nmol/mg protein/min)	58.0±8.6 ^a	74.9±11.3 ^b	71.9±15.5 ^b
GGT (nmol/mg protein/min)	1396.0±595	1163.0±276	1453.0±576

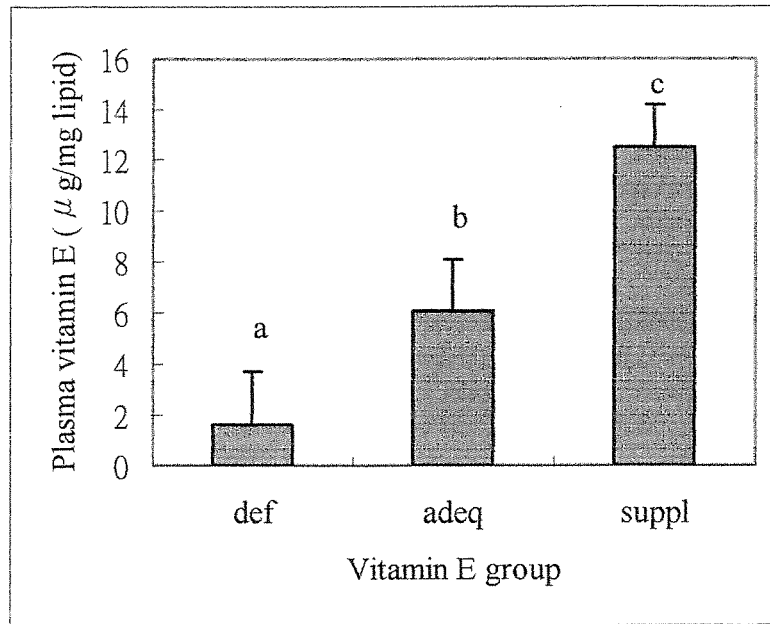
Values are means ± SD. Groups that do not share the same letter (a,b) are significantly different from one another (p<0.05).

表五. 飲食中維生素 E 處理對大鼠肝臟 GGT-positive 及 PGST-positive foci 生成之影響

Table 5. Effect of dietary vitamin E on area and number of hepatic GGT- and PGST-positive foci of rats

Foci area and number	Vitamin E		
	Deficient	Adequate	Supplemented
Area occupied by GGT-positive foci, %	1.7±0.7	1.1±0.5	2.1±1.4
GGT-positive foci number, no./cm ²	9.8±4.2	11.8±5.9	15.4±6.8
GGT-positive foci number, no./cm ³	132 ±70	187 ±93	223 ±86
Area occupied by PGST-positive foci, %	2.5±0.9	1.7±0.6	2.9±1.6
PGST-positive foci number, no./cm ²	15.5±6.1	17.4±8.0	17.7±5.7
PGST-positive foci number, no./cm ³	226 ±102	274 ±143	253 ±107

Values are means ± SD.



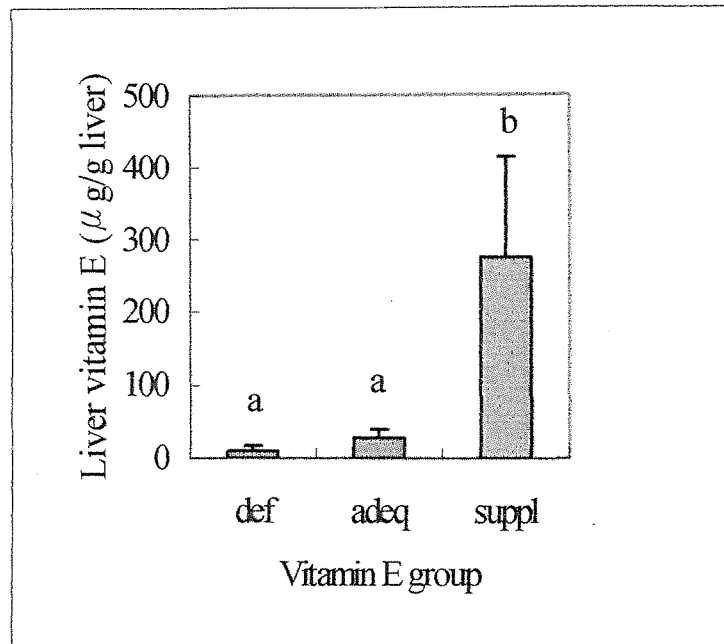
圖一.不同維生素 E 處理對大鼠血漿維生素 E 濃度之影響。

Fig. 1 Plasma vitamin E concentration of rats fed different levels of vitamin E.

Values are means \pm SD. Groups that do not share the same letter (a,b,c) are significantly different from one another ($p < 0.05$).

Abbreviations:

def = deficient; adeq = adequate; suppl = supplemented.



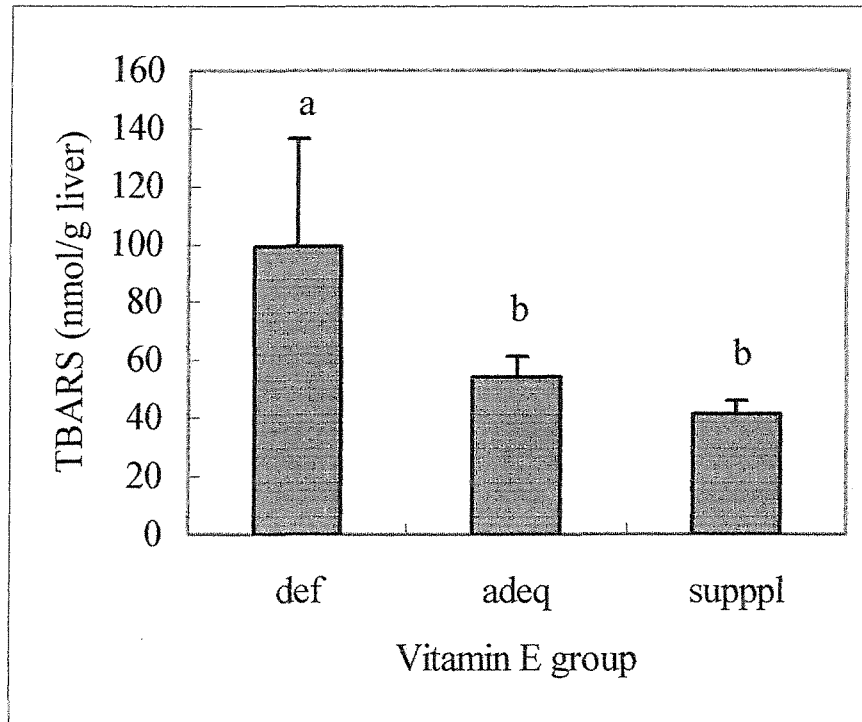
圖二. 不同維生素E處理對大鼠肝臟維生素E濃度之影響。

Fig. 2 Hepatic vitamin E concentration of rats fed different levels of vitamin E.

Values are means \pm SD. Groups that do not share the same letter (a,b) are significantly different from one another ($p < 0.05$).

Abbreviations:

def = deficient; adeq = adequate; suppl = supplemented.



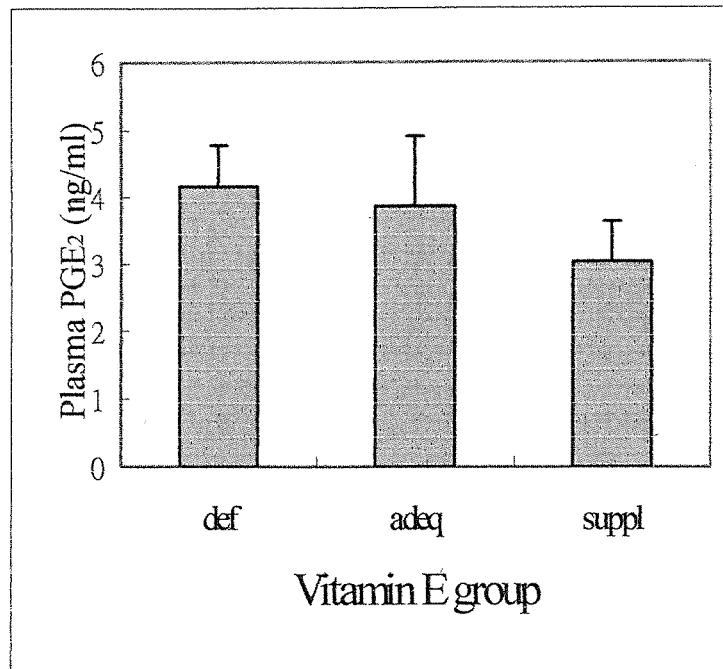
圖三. 不同維生素 E 處理對大鼠肝臟脂質過氧化產物之影響。

Fig.3 Liver lipid peroxidation of rats fed different levels of vitamin E.

Values are means \pm SD. Groups that do not share the same letter (a,b) are significantly different from one another ($p < 0.05$).

Abbreviations:

def = deficient; adeq = adequate; suppl = supplemented.



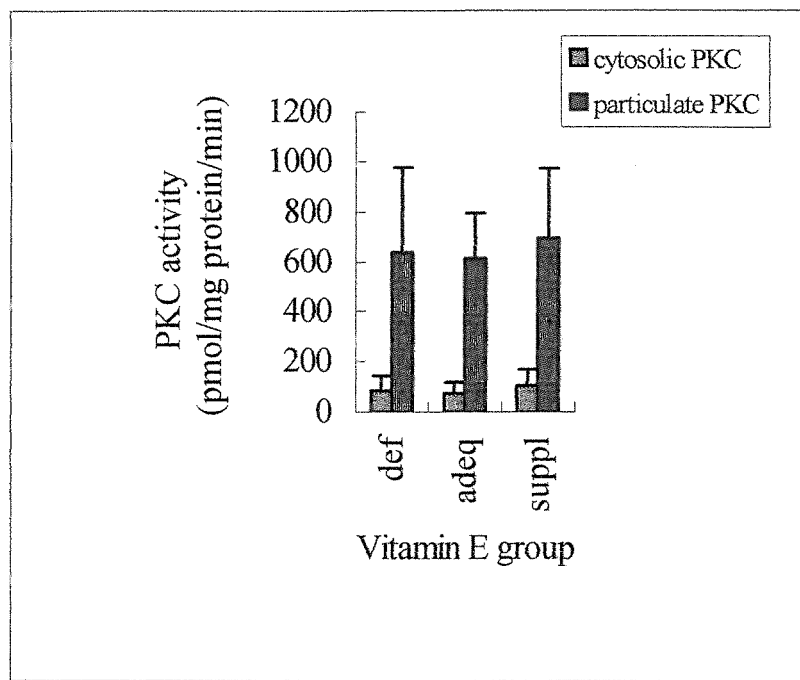
圖四. 不同維生素 E 處理對大鼠血漿 PGE₂ 濃度之影響。

Fig. 4 Plasma PGE₂ level of rats fed different levels of vitamin E.

Values are means \pm SD.

Abbreviations:

def = deficient; adeq = adequate; suppl = supplemented.



圖五. 不同維生素E處理對大鼠肝臟細胞質及膜部份PKC活性影響。

Fig. 5 Hepatic cytosolic and particulate PKC activities of rats fed different levels of vitamin E.

Values are means \pm SD.

Abbreviations: def = deficient; adeq = adequate; suppl = supplemented.

參 考 文 獻

Abdo K. M., Rao G., Montgomery C. A., Dinowitz M. and Kanagalingam K. (1986) Thirteen-week toxicity study of d-alpha-tocopheryl acetate (vitamin E) in Fischer 344 rats. *Food Chem. Toxicol.* 24: 1043-1050.

Ahn D. V., Wolfe F. H. and Sim J. S. (1995) Dietary α -linolenic acid and mixed tocopherols and packaging influences on lipid stability in broiler chicken breast and leg muscle. *J. Food. Sci.* 60: 1013-1018.

Ara G. and Teicher B. A. (1996) Cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitor in cancer therapy. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 54: 3-16.

Azzi A., Boscoboinik D., Clement S., Marilley D., Ozer N. K., Ricciarelli R. and Tasinayo A. (1997) α -Tocopherol as a modulator of smooth muscle cell proliferation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 57: 507-514.

Bellomo G., Mirabelli F., Dimonte O., Richelmi P., Thor H., Orrenius C. and Orrenius S. (1987) Formation and reduction of glutathione protein mixed disulfides during oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* 36: 1313-1329.

Bendich A., Gabriel E. and Machlin L. J. (1986) Dietary vitamin E requirement for optimum immune responses in the rat. *J. Nutr.* 116: 675-681.

Birt D. F., Yaktine A. and Duysen E. (1999) Glucocorticoid mediation of dietary energy restriction inhibition of mouse skin carcinogenesis. *J. Nutr.* 129: 571S-574S.

Bunyan J., Mchale D., Green J. and Marcinkiewicz S. (1961) Biological potencies of ϵ - and ζ -tocopherol and 5-methyltolcol. *Br. J. Nutr.* 15: 253-257.

Burton G. W. and Ingold K. U. (1981) Autooxidation of biological molecules. I. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *J. Am. Chem. Soc.*

103: 6472-6477.

Burton G. W. and Traber M. G. (1990) Vitamin E : antioxidant activity, biokinetics and bioavailability. *Annu. Rev. Nutr.* 10: 357-382.

Burton G. W., Joyce A. and Ingold K. U. (1983) Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch. Biochem. Biophys.* 221: 281-290.

Carranza M. L., Feraille E. and Favre H. (1996) Protein kinase C-dependent phosphorylation of Na⁺-K⁺-ATPase α -subunit in rat kidney cortical tubules. *Am. J. Physiol.* 271: C136-C143.

Catignani G. L. and Bieri J. G. (1983) Simultaneous determination of retinol and α -tocopherol in serum or plasma by liquid chromatography. *Clin. Chem.* 29: 708-712.

Century B. and Horwitt M. K. (1965) Biological availability of various forms of vitamin E with respect to induces of deficiency. *Proc. Fed.* 24: 906-911.

Chance B., Sies H. and Boveris A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59: 527-625.

Chang K. J., Lin J. K., Lee P. H., Hsieh Y. S., Cheng C. K. and Liu J. Y. (1996) The altered activity of membrane-bound protein kinase C in human liver cancer. *Cancer Lett.* 105: 211-215.

Chen H., Pellett L. J., Andersen H. J. and Tappel A. L. (1993) Protection by vitamin E, selenium and beta-carotene against oxidative damage in rat liver slices and homogenate. *Free Rad. Biol. Med.* 14: 473-482.

Chow C. K. (1991) Vitamin E and oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* 11: 215-232.

Codde J. P. and Beilin L. J. (1986) Prostaglandins and experimental hypertension: A review with special emphasis on the effect of dietary lipids. *J. Hypertens.* 4: 675-686.

Conn P. J. and Sweatt J. D. (1994) Protein kinase C . Kuo J. F. (ed) Oxford University Press, New York.

Costagliola C., Iuliano G., Menzione M., Rinaldi E., Vito P. and Auricchio C. (1986) Effect of vitamin E on glutathione content in red blood cells, aqueous humor and lens of humans and other species. *Exp. Eye Res.* 43: 905-914.

Cotgreave I. A., Moldeus P. and Orrenius S. (1988) Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* 28: 189-212.

Dragan Y., Teegarden J., Campbell H., Hisa S. and Pitot H. (1995) The quantitation of altered hepatic foci during multistage hepatocarcinogenesis in the rat: Transforming growth factor α expression as a marker for the stage of progression. *Cancer Lett.* 93: 73-83.

El Attar T. M. A. and Lin H. S. (1993) Inhibition human oral squamous carcinoma cell (SCC-25) proliferation by prostaglandin E₂ and vitamin E succinate. *J. Oral. Pathol. Med.* 22: 425-427.

Estensen R. D. and Wattenberg L. W. (1993) Studies of chemopreventative effects of myo-inositol on benzo[a]pyrene-induced neoplasia of the lung and forestomach in female A/J mice. *Carcinogenesis* 14: 1975-1977.

Evans H. M. and Bishops K. S. (1922) On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* 56: 650-651.

Evans H. M., Emerson O. H. and Emerson G. A. (1936) The isolation from wheat germ oil of an alcohol alpha-tocopherol having the properties of vitamin E. *J Biol. Chem.* 113: 319-332.

Fazzio A., Marilley D. and Azzi A. (1997) The effect of alpha-tocopherol and beta-tocopherol on proliferation, protein kinase C activity and gene expression in different cell lines. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 41: 93-101.

Fernholz E. J. (1938) On the constitution of alpha-tocopherol. *J. Am. Chem. Soc.* 60: 700-705.

Ferrari R. A., Ward S. J., Zobre C. M., van Liew D. K., Perrone M.H., Connell M. J. and Hanbrich D. R. (1990) Estimation of the in vivo effect of cyclooxygenase inhibitors on prostaglandins E₂ level in mouse brain. *Eur. J. Pharmacol.* 179: 25-34.

Fitzer C. J., O'Brian C. A., Guillem J. G. and Weinstein I. B. (1987) The regulation of protein kinase C by chenodeoxycholate, deoxycholate and several structurally related bile acids. *Carcinogenesis* 8: 217-220.

Fraga C. C., Leibovitz B. E. and Tappel A. L. (1988) Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison between homogenates and microsomes. *Free Rad. Biol. Med.* 4: 155-161.

Frings C. S. and Dunn R. T. (1970) A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phosphovanillin reaction. *Am J. Clin. Pathol.* 53: 89-91.

Gilbert W. (1981) DNA sequencing and gene structure. *Science* 214: 1305-1312.

Gonul B., Soylemezoglu T. and Erbas D. (1996) Epidermal growth factor and glucocorticoid effects on blood prostaglandin E₂ level in DENA-induced carcinogenesis. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 55: 257-260.

Guyton K. Z. and Kensler T. W. (1993) Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *Br. Med. Bull.* 49: 523-524.

Habig W. H., Pabst M. J. and Jakoby W. B. (1974) Glutathione S-transferase. The enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139.

Ham A. J. L. and Liebler D. C. (1997) Antioxidant reactions of vitamin E in the perfused rat liver: product distribution and effect of dietary vitamin E supplementation. *Arch. Biochem. Biophys.* 339: 157-164.

Hamilos D. L., Zelarney P. and Mascali J. J. (1989) Lymphocyte proliferation in glutathione-depleted lymphocytes: direct

relationship between glutathione availability and the proliferative response. *Immunopharmacol.* 18: 223-235.

Harris C. M. and Stone W. L. (1988) The effects of in vitro lipid peroxidation on the activity of the rat liver microsomal glutathione S-transferase from rats supplemented or deficient in antioxidants. *Life Sci.* 42: 415-420.

Hendrich S., Duitsman P., Krueger S. K., Jackson A. and Myers R. K. (1991) Effects of α -tocopherol, phenobarbital, and butylated hydroxyanisole during promotion of diethylnitrosamine-initiated rat hepatocarcinogenesis. *Nutr. Cancer* 15: 53-62.

Herbert J. M. (1993) Protein kinase C: A key factor in regulation of tumor cell adhesion to the endothelium. *Biochem. Pharmacol.* 45: 527-537.

Horvath P. M. and Ip C. (1983) Synergistic effect of vitamin E and selenium in the chemoprevention of mammary carcinogenesis in rats. *Cancer Res.* 43: 5335-5341.

Hu W. L., Goldring C. E., Rao N. R., Rice-Evans C., Burdon R. H. and Diplock A. T. (1992) Variable alpha-tocopherol stimulation and protection of glutathione peroxidase activity in established and malignant fibroblasts. *Biofactors* 4: 47-49.

Ingold K. V., Weeb A. C., Witter D., Burton G. W., Metcalfe T. A. and Muller D. P. R. (1987) Vitamin E remains the major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human plasma even in individuals suffering severe vitamin E deficiency. *Arch. Biochem. Biophys.* 259: 224-225.

Irani K., Xia Y., Zweier J. L., Sollott S. J., Der C. J., Fearon E. R., Sundaesan M., Finkel T. and Goldschmidt-Clermont P. J. (1997) Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 275: 1649-1652.

Ishkawa T. and Akimaru K. (1996) Glutathione S-transferases structure, function and clinical implications. Vermeulen N. P. E., Mulder G. J., Nieuwenhuys H., Peters W. H. M. and van Bladeren. (eds). Taylor and Francis Press, Bristol, P. A.

Jacob R. A. (1995) The integrated antioxidant system. *Nutr. Res.* 15: 755-766.

Jeng K. C. G., Yang C. S., Siu W. Y., Tasi Y. S., Liao W. J. and Kuo J. S. (1996) Supplementation with vitamin C and E enhances cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in healthy adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 64: 960-965.

Jenkins M. Y. and Mitchell G. V. (1975) Influence of excess vitamin E on vitamin A toxicity in rats. *J. Nutr.* 105: 1600-1606

Klanunig J. E., Xu Y., Bachowski S., Ketcham C. A., Isenberg J. S., Kolaja K. L., Baker T. K., Walborg Jr. E. F. and Stevenson D. E. (1995) Oxidative stress in nongenotoxic carcinogenesis. *Toxicol Lett.* 82/83: 683-691.

Kosower N. S. and Kosower E. M. (1978) The glutathione status of cell. *Intl. Cytol.* 54: 109-160.

Koya D., Haneda M., Kikkawa R. and King G. L. (1998) d-Alpha-tocopherol treatment prevents glomerular dysfunction in diabetic rats through inhibition of protein kinase C-diacylglycerol pathway. *Biofactors* 7: 69-76.

Kozawa O., Suzuki A., Kaida T., Tokuda H. and Uematsu T. (1997) Tumor necrosis factor- α autoregulates interleukin-6 synthesis via activation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 272: 25099-25104.

La Porta C. A. M., Tessitore L. and Comolli R. (1997) Changes in protein kinase C α , δ and in nuclear β isoform expression in tumour and lung metastatic nodules induced by diethylnitrosamine in the rat. *Carcinogenesis* 18: 715-719.

Land W. E. M. (1979) The biosynthesis and metabolism of prostaglandins. *Annu. Rev. Physiol.* 41: 633-652.

Lawrence R. A. and Burk R. F. (1980) Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rats liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71: 952-958.

Li H., Schut H. A. J., Conran P., Kramer P. M., Lubet R. A., Steele V. E., Hawk E. E., Kelloff G. J. and Pereira M. A. (1999)

Prevention by aspirin and its combination with α -difluoromethylornithine of azoxymethane-induced tumors, aberrant crypt foci and prostaglandin E₂ levels in rat colon. *Carcinogenesis* 20: 425-430.

Lii C.K., Ko J. J. and Chen H. W. (1997) No inhibition of γ -glutamyl transpeptidase-positive foci by vitamin E with or without phenobarbital. *Nutr. Cancer* 27:200-205.

Lii C. K., Ko Y. J., Chiang M. T., Sung W. C. and Chen H. W. (1998) Effect of dietary vitamin E on antioxidant status and antioxidant enzyme activities in Sprague-Dawley rats. *Nutr. Cancer* 32: 95-100.

Lohr J. B., Cadet J. L., Lohr M. A., Larson L., Wasli E., Wade L., Hylton R., Vidoni C., Jeste D. V. and Wyatt R. J. (1988) Vitamin E in the treatment of traudive dyskinesia: the possible involvement of free radical mechanisms. *Schizophr Bull.* 14: 291-296.

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.

Machlin L. J. (1984) Handbook of vitamins nutritional biochemical and clinical aspects. Malchiln L. J. (ed). Marcel Dekker Press, New York.

Mahmoud N. N., Dannenberg A. J., Bilinski R. T., Mestre J. R., Chandburn A., Churchill M., Martucci C. and Bertagnolli M. M. (1999) Administration of an unconjugated bile acid increases duodenal tumors in murine model of familial adenomatous polyposis. *Carcinogenesis* 20: 299-303.

May J.M., Qu Z. C. and Mendiratta S. (1998) Protection and recycling of α -tocopherol in human erythrocytes by intracellular ascorbic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 349: 281-289.

Melnik B. C., Plewig G. and Tschung T. (1991) Disturbances of essential fatty acid- and prostaglandin E- mediated immunoregulation in atopy. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 42: 125-130.

Meister A. (1988) Glutathione metabolism and its selective

modification. *J. Biol. Chem.* 263: 17205-17208.

Meydani S. M., Barklund M. P., Liu S., Meydani M. and Miller R. A. (1990) Vitamin E supplementation enhances cell-mediated immunity in healthy elderly subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 52: 557-563.

Mitchel R. E. J. and McCann R. (1993) Vitamin E is a complete tumor promoter in mouse skin. *Carcinogenesis* 4: 659-662.

Miyazawa T., Suzuki T., Fujimoto K. and Kaneda T. (1990) Phospholipid hydroperoxide accumulation in liver of rats intoxicated with carbon tetrachloride and its inhibition by dietary alpha-tocopherol. *J. Biochem.* 107: 689-693.

Nagh W. Z. W. Jarien Z., San M. M. and Marzuki A. (1991) Effect of tocotrienols on hepatocarcinogenesis induced by 2-acetylaminofluorene in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 1076S-1081S.

Nishikawa M. and Hidaka H. (1994) Protein kinase C. Kuo J. F. (ed). Oxford University Press, New York.

Nishizuka Y. (1986) Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233: 305-312.

Nishizuka Y. (1992) Intercellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258: 607-614.

Neal G. E., Nielsch U., Judah D. J. and Hulbert P. B. (1987) Conjugation of model substrates or microsomally-activated aflatoxinB1 with reduced glutathione, catalysed by cytosolic glutathione S-transferase in livers of rats, mice and guinea pigs. *Biochem. Pharmacol.* 36: 4269-4276.

Ogawa T., Higashi S., Kawarada Y. and Mizumoto R. (1995) Role of reactive oxygen in synthetic estrogen induction of hepatocellular carcinomas in rats and preventive effect of vitamins. *Carcinogenesis* 16: 831-836.

Olinski R., Jaruga P. and Zastawny T. H. (1998) Oxidative DNA base modifications as factors in carcinogenesis. *Acta Biochim. Pol.*

45: 561-572.

Ottino P. and Duncan J. R. (1996) The role of adenylate cyclase, cAMP and PGE₂ in the in vitro growth regulation of murine melanoma cells by vitamin E. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 54: 375-383.

Ottino P. and Duncan J. R. (1997) Prostaglandin levels in BL-6 melanoma cells cultured in vitro: the effect of vitamin E succinate supplementation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 56: 451-456.

Packer L. (1991) Protective role of vitamin E in biological systems. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 1050S-1055S.

Pentland A. P., Morrison A. R., Jacobs S. C., Hruza L. L., Herbert J. S. and Packer L. (1992) Tocopherol analogs suppress arachidonic acid metabolism via phospholipase inhibition. *J. Biol. Chem.* 267: 15578-15584.

Peraino C., Staffeldt E. F. and Ludeman V. A. (1981) Early appearance of histochemically altered hepatocyte foci and liver tumors in female rats treated with carcinogens one day after birth. *Carcinogenesis* 2: 463-465.

Power C., Sinha S., Webber C., Manson M. M. and Neal G. E. (1987) Transformation related expression of glutathione S-transferase P in rat liver cells. *Carcinogenesis* 8: 797-801.

Punchard N. A. and Kelly F. J. (1996) Free radicals: A practical approach. Punchard N. A. and Kelly F. J. (eds). Oxford University Press. New York, N. Y.

Rao C. V., Rivenson A., Katiwalla M., Kelloff G. J. and Reddy B. S. (1993) Chemopreventive effect of oltipraz during different stages of experimental colon carcinogenesis induced by azoxymethane in male F344 rats. *Cancer Res.* 53: 2502-2506.

Rao G. A. and Abraham S. (1976) Enhanced growth rate of transplantable mammary adenocarcinoma induced in C3H mice by linoleate. *J. Natl. Cancer Inst.* 56: 431-432.

Rao G. A. and Abraham S. (1977) Reduced growth rate of transplantable mammary adenocarcinoma in C3H mice fed eicosa-5,8,11,14-tetraenoic acid. *J. Natl. Cancer Inst.* 58: 445-447.

Reed D. J., 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, glutathional disulfide, and related thiols and disulfides. *Anal. Biochem.* 106: 55-62.

Reed D. J. (1990) Glutathione: Toxicological implications. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 603-631.

Ricciarelli R., Tasinato A., Clament S., Közer N., Boscoboinik D. and Azzi A. (1998) α -Tocopherol specifically inactivates cellular protein kinase C α by changing its phosphorylation state. *Biochem. J.* 334: 243-249.

Rojas C., Cadenas S., Lopez-Torres M., Perez-Campo R. and Barja G. (1996) Increase in heart glutathione redox ratio and total antioxidant capacity and decrease in lipid peroxidation after vitamin E dietary supplementation in guinea pigs. *Free Rad. Biol. Med.* 21: 907-915.

Rose M. L., Rivera C. A., Bradford B. U., Graves L. M., Cattley R. C., Schoonhoven R., Swenberg J. A. and Thurman R. G. (1999) Kupffer cell oxidant production is central to the mechanism of peroxisome proliferators. *Carcinogenesis* 20: 27-33.

Rutenburg A. M., Kim H., Fischbein J. W., Hanker J. S., Wasserkrug H. L. and Seligman A. M. (1969) Histochemical and ultrastructural demonstration of γ -glutamyl transpeptidase activity. *J. Histochem. Cytochem.* 17: 517-526.

Sakamoto W., Fujie K., Handa H., Ogihara T. and Mino M. (1990) In vivo inhibition of superoxide production and protein kinase C activity in macrophages from vitamin E-treated rats. *Intl. J. Vitam. Nutr. Res.* 60: 338-342.

Sakamoto W., Fujie K., Handa H., Nishihira J. and Mino M. (1991) Vitamin E inhibits PGE₂ and O₂ production in rat macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1074: 251-255.

Sano H., Hla T., Maler J. A. M., Crofford L. J., Case J. P., Maciag T. and Wilders R. L. (1992) In vivo cyclooxygenase expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis osteoarthritis and rats with adjuvant and streptococcal cell wall arthritis. *J. Clin. Invest.* 89: 97-108.

Santoro M.G., Philpott G. W. and Jaffe B. M. (1977) Inhibition of B-16 melanoma growth in vivo by a synthetic analog of prostaglandin E₂. *Cancer Res.* 37: 3774-3779.

Sato K., Kitahara A., Satoh K., Ishikawa T., Tatematsu M. and Ito N. (1984) The placental form of glutathione S-transferase as a new marker protein for preneoplasia in rat chemical hepatocarcinogenesis. *Gann.* 75: 199-202.

Sato K. (1988) Glutathione S-transferase and hepatocarcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.* 79: 556-572.

Sato K. (1989) Glutathione transferase as markers of preneoplasia and neoplasia. *Adv. Cancer Res.* 52: 205-255.

Schenk P. W. and Snaar-Jagalska B. E. (1999) Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1449: 1-24.

Sirko S., Bishai I. and Cocceani F. (1989) Prostaglandin formation in the hypothalamus in vivo: effect of pyrogens. *Am. J. Physiol.* 256: R616-24

Skrzydłewska E. and Farbiszewski R. (1997) Glutathione consumption and inactivation of glutathione-related enzymes in liver, erythrocytes and serum of rats after methanol intoxication. *Arch. Toxicol.* 71: 741-745.

Slaga T. J. (1995) Inhibition of the induction of cancer by antioxidation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 369: 167-174.

Smith G. D., Ding J. L. and Peters T. J. (1979) A sensitive fluorimetric assay for γ -glutamyl transferase. *Anal. Biochem.* 100: 136-139.

Somers S. D., Chapkin R. S. and Erickson K. L. (1989) Alteration

of in vitro murine peritoneal macrophage function by dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in menhaden fish oil. *Cell. Immunol.* 123: 201-211.

Souza M. F., Tome A. R. and Rao V. S. (1999) Inhibition by the bioflavonoid ternatin of alfatoxin B1-induced lipid peroxidation in rat liver. *J. Pharm. Pharmacol.* 51: 125-129.

Suzuki M., Li J., Asahura T. and Arai K. (1994) Opposing effects of indomethacin and nordihydroguaiaretic acid on macrophage function and tumor growth. *Japn. J. Cancer Res.* 85: 306-314.

Takahashi S., Tsutsumi M., Nakae D., Denda A., Kinugasa T. and Konishi Y. (1987) Persistent effect of a low dose of preadministered diethylnitrosamine on the induction of enzyme-altered foci in rat liver. *Carcinogenesis* 8: 509-513.

Tatematsu M., Mera Y., Ito N., Satoh K. and Sato K. (1985) Relative merits of immunohistochemical demonstrations of placental A, B and C forms of glutathione S-transferase and histochemical demonstration of γ -glutamyl transferase as markers of altered foci during liver carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 6: 1621-1626.

Tatematsu M., Mera Y., Inoue T., Satoh K., Sato K. and Ito N. (1988) Stable phenotypic expression of glutathione S-transferase placental type and unstable phenotypic expression of gamma-glutamyl transferase in rat liver preneoplastic and neoplastic lesions. *Carcinogenesis* 9: 215-220.

Tomohiro Y., Yoshihisa Y., Mikako U., Ayumi M., Kiyokazu H., Shuzo O. and Tomio I. (1997) The modulation effect of vitamin E on prostaglandin E₂ level and ornithine decarboxylase activity at promotion phase of lung tumorigenesis in mice. *Biochem. Pharmacol.* 53: 1757-1759.

Tran K., Wang J. T., Lee E., Chan A. C. and Choy P. C. (1996) Vitamin E potentiates arachidonate release and phospholipase A₂ activity in rat heart myoblastic cells. *Biochem. J.* 319: 385-391.

Tsuda H., Hasegawa R., Imaida K., Masui T., Moore M. A. and Ito N. (1984) Modifying potential of thirty-one chemicals on the short-term development of gamma-glutamyltranspeptidase-positive foci

in diethylnitrosamine-initiated rat liver. *Gann* 75: 876-883.

Ura H., Denda A., Yokose Y., Tsutsumi M. and Konishi Y. (1987) Effect of vitamin E on the induction and evolution of enzyme-altered foci in the liver of rats treated with diethylnitrosamine. *Carcinogenesis* 8: 1595-1600.

van Lieshout E. M., Peters W. H. and Jansen J. B. (1996) Effect of oltipraz, alpha-tocopherol, beta-carotene and phenethylisothiocyanate on rat oesophageal, gastric, colonic and hepatic glutathione, glutathione S-transferase and peroxidase. *Carcinogenesis* 17: 1439-1445.

Wang H. Y. and Friedman E. (1990) Protein kinase C translocation in human blood platelets. *Life Sci.* 47: 1419-1425.

Wang Y., Huang D. S., Eskelson C. D. and Watson R. R. (1994) Long-term dietary vitamin E retards development of retrovirus-induced dysregulation in cytokine production. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 72: 70-75.

Warren B. S., Naylor M. F., Winberg L. D., Yoshimi N., Volpe J. P., Gimenez-Conti I. and Slaga T. J. (1993) Introduction and inhibition of tumor progression. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 202: 9-15.

Wu D., Mura C., Beharka A. A., Han S. N., Paulson K. E., Hwang D. and Meydani S. N. (1998) Age-associated increase in PGE₂ synthesis and COX activity in murine macrophages is reversed by vitamin E. *Am. J. Physiol.* 275: C661-C668.

Yano T., Ishikawa G. and Ichikawa T. (1993) Is vitamin E a useful agent to protect against oxyradical-promoted lung tumorigenesis in ddY mice? *Carcinogenesis* 14: 1133-1136.

Zaridze D. G., Muir C. S. and McMichael A. J. (1985) Diet and cancer: Value of different types of epidemiological studies. *Nutr. Cancer* 7: 155-166.

附 錄

試劑	來源
Acetic acid	Tedia Company Inc.
Acetone	Merck
AEC kit	Vector Laboratories Inc.
Alcohol (95%)	臺灣省菸酒公賣局
AMC, 7-amino-4-methylcoumarin	Sigma chemical Co.
ATP; adenosine-5'-triphosphate	Merck
BF ₃ ; boron trifluoride methanol complex	Merck
BSA; bovine serum albumin	Sigma chemical Co.
Butanol	Merck
CaCl ₂	Sigma chemical Co.
CDNB; 1-chloro-2,4-dinitrobenzene	Sigma chemical Co.
CHCl ₃	Tedia Company Inc.
CuSO ₄	島久藥品株式會社
DEAE	Merck
DEN; diethylnitrosamine	東京化成工業
DMSO; dimethyl sulfoxide	Sigma chemical Co.
EDTA	Sigma chemical Co.
EGTA	Sigma chemical Co.
Ethanol	昭和化學株式會社
Fast blue BBN; 4-benzoylamino-2,5-Diethoxybenzene-diazonium chiride Hemi (zinc chloride) salt	Merck
FDNB; 2,4-dinitrofluoro-benzene	Sigma chemical Co.

Folin-cicalteu reagent; Phenol reagent	Wako
L- γ -glutamyl AMC	Sigma chemical Co.
Glycerol gelatin	Sigma chemical Co.
Glycylglycine	Sigma chemical Co.
GSH; reduced glutathione	Sigma chemical Co.
GSH reductase	Sigma chemical Co.
GSSG; oxidized glutathione	Sigma chemical Co.
γ -GMNA; γ -glutamyl-4-methoxy-2-naphthylamine	Sigma chemical Co.
HCl; hydrochloric acid	Merck
Hexane	Merck
Histone (type III-S)	Sigma chemical Co.
H ₂ O ₂ ; hydrogen peroxide	Merck
IAA; iodoacetic acid	Sigma chemical Co.
KCl	Sigma chemical Co.
K ₂ CO ₃	和光純藥工業株式會社
KHCO ₃	Sigma chemical Co.
K ₂ HPO ₄	Sigma chemical Co.
KH ₂ PO ₄	Sigma chemical Co.
KOH	Merck
Leupeptin	Sigma chemical Co.
MeOH; methanol	Tedia Company Inc.
Methoxyethanol	Sigma chemical Co.
2-Mercaptoethanol	Sigma chemical Co.
MgCl ₂ · 6H ₂ O	Merck
NaCl; sodium chloride	Merck
Na ₂ CO ₃	Sigma chemical Co.

β -NADPH; nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	和光純藥工業株式會社
NaF	Sigma chemical Co.
Na ₂ HPO ₄	Sigma chemical Co.
NaH ₂ PO ₄	Sigma chemical
NaN ₃ ; sodium azide	Sigma chemical Co.
NaOH; sodium hydroxide	Wako
Na ₃ VO ₄	Sigma chemical Co.
Olive oil	Sigma chemical Co.
PB; Phenobarbital	Sigma chemical Co.
PCA; perchloric acid	GFS Chemicals Inc.
Phenanthroline	Sigma chemical Co.
Phosphotungstic acid	Sigma chemical Co.
PMSF; phenylmethylsulfonyl fluoride	Sigma chemical Co.
Sodium acetate	Sigma chemical Co.
Sodium borate	Sigma chemical Co.
SDS; sodium dodecyl sulfate	Sigma chemical Co.
TBA; thiobarbituric acid	Sigma chemical Co.
TCA; trichloroacetic acid	Merck
TMP; 1,1,3,3-tetramethoxy propane	Sigma chemical Co.
α -tocopheryl succinate	Sigma chemical Co.
Triton X-100	Sigma chemical Co.
Trizma base; Tris[hydroxymethyl]aminomethane	Sigma chemical Co.
Vanillin	Sigma chemical Co.
γ -[³² P] ATP (5000Ci/mmol)	Amersham