

# 中山醫學院生物化學研究所碩士論文

Master Thesis, Institute of Biochemistry,

Chung Shan Medical and Dental College

1. 利用短暫性殖入系統探討 carbonic anhydrase  
與肝癌的關係

Study of the relationships between carbonic anhydrase and  
liver cancerous cells, the use of a transient expression  
system

2. silibinin 對 GST isoforms 表現之影響

Effect of silibinin on the expression of GST isoforms

指導教授：周芬碧博士 (Dr. Fen-Pi Chou)

研究生：許瑞玲 (Jui-Ling Hsu)

中華民國九十年六月

## 目錄

### 第一部份：利用短暫性植入系統探討 carbonic anhydrase 與肝癌關係

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
背景介紹.....	3
動機.....	12
實驗方法.....	13
結果.....	30
討論.....	35
圖表與圖表說明.....	39
參考文獻.....	64

### 第二部份：silibinin 對 GST isoforms 表現之影響

中文摘要.....	69
英文摘要.....	70
背景介紹.....	71
動機.....	87
實驗方法.....	88
結果.....	99
討論.....	104
圖表與圖表說明.....	108
參考文獻.....	124

## 摘要:

CA 是一種含鋅的金屬酵素，其分子量約為 30kDa 左右，廣泛分佈於動植物中，是屬於六大酶裡面的 Lyase。在二氧化碳的輸送或分泌過程扮演重要的角色。在之前的研究，發現接種肉瘤細胞 Sarcoma 180 的老鼠，肝臟組織之細胞質 carbonic anhydrase III 之表現，在六天後逐漸減少。此外也有報告指出在直腸大腸癌的病人，他們的 CA I,II 的表現是減少的。是什麼原因導致此現象並不清楚？所以本實驗乃使用短暫性植入系統以探討 carbonic anhydrase 與肝癌的關係，期望能找出一個解答。

實驗利用 RT-PCR 放大 CA 的基因序列，再接至 GFP 載體以得到 CA 的 cloning，之後短暫性植入肝癌細胞( Hep 3B )。結果發現 CA 的曲線經校正後有下降的趨勢；且在螢光顯微鏡下，植入 GFP-HCA II 的細胞形狀與植入 GFP (控制組)的細胞形狀有些不同。隨時間增加，植入 GFP-HCA II 細胞形狀呈現圓形的增多，且綠色螢光亮度增強，此圓亮的細胞最後會死亡。作 TUNEL 實驗，發現轉殖 GFP-HCA II 細胞，呈現螢光反應，表示細胞可能有 apoptosis 的現象。

結果顯示過度表現 CA II 可能對細胞造成傷害，必須作更多實驗來確認細胞的死亡是 apoptosis 或 necrosis。

## Abstract

Carbonic anhydrases are zinc-containing metalloenzymes with molecular weights about 30 kDa that are widely distributed in animals and plants. CAs belong to lyases. CAs play an important role in transportation or secretion of carbon dioxide. In previously study, we found that mouse inoculated with sarcoma 180 cells showed a gradual decrease in the expression of CA III in the liver 6 days after the inoculation. Other reports also demonstrated that the expressions of CA I and II were reduced in colorectal tumors. In order to understand the role of CAs in cancer development, a transient expression system was used to explore the effect of over-expressed CA II on liver cancerous cells.

Hepatoblastoma cells (Hep 3B) were transfected with cDNA of CA II that was amplified by RT-PCR and cloned into pGFP vector. The results, after normalized with transfection efficiency, showed that the number of cells transfected with CA II gradually decreased as the culture

time increased. Furthermore, the cells transfected with CA II were morphologically different from that of control cells. The number of cells that were round in shape and bright in green fluorescence increased along with the increasing culture time. These cells were not viable. The results of TUNEL assay found that the cells transfected with GFP-HCA II presented fluorescence indicating that these cells may be apoptotic cells.

These results indicated that over-expression of CA II might be toxic to cells. Further study will be needed to clarify the cause of their death, apoptosis or necrosis.

## I. 背景介紹

在 1933 年 Meldrum 和 Roughton 首先在牛的紅血球發現了 CA (1)。CA 是一種含鋅的金屬酵素，其分子量約為 30kDa 左右，廣泛分佈於動植物中，是屬於六大酶裡面的 Lyase。在二氧化碳的輸送或分泌過程扮演重要的角色(2)。系統性分析 CA 蛋白質的序列，可分為 3 個獨立的 families、 $\alpha$ -CA、 $\beta$ -CA、 $\gamma$ -CA。所有哺乳動物的 CA 屬於  $\alpha$ -CA family，結構為 monomer；植物和一些 eubacteria 屬於  $\beta$ -CA family，結構為 octamer；archaebacterium 屬於  $\gamma$ -CA family，結構為 hexamer (2、3)。

### 一、 $\alpha$ -CA family 的分類

$\alpha$ -CA family 有 11 個 isozymes 被分離出來，包括：

1、存於細胞質的 CA I CA II CA III CA VII:負責離子交換 ( $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  ,  $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ ), 分子量為 29-30kDa。CA I 在紅血球的數目是最多的，但是活性只有 CA II 的 15% (4)。CA II 的活性最高，分佈也很廣，例如：在中樞神經系統及人類食道上皮，CA II 是分佈最廣的 CA (5、6)，調節酸鹼平衡 (7)；在哺乳動物的骨骼肌，CA II 存在於 type II 的纖維(fast-contracting, white, glycolytic or mixed glycolytic-oxidative)。CA III 是活性最低的 isozyme 主要位於 type I 的肌肉纖維 (slow twitch, red, oxidative) (8)。CA III 在老鼠肝臟是高度氧

化的，和 oxidative modification 有關；另外只有 CA III 有 phosphatase 的活性，此 phosphatase 的活性會隨年齡而降低 (9、10)。CA VII 是神秘的 isozyme，因為它的蛋白還未純化出來，序列就已經被分析，但至今還未弄清其特性功能 (4)。

2、存在粒線體的 CA V<sub>A</sub> 和 CA V<sub>B</sub>：負責幫助二氧化碳排出粒線體外。CA V 是一個染色體基因所轉譯的粒線體 isozyme，它在 gluconeogenesis 和 ureagenesis 有重要的功能，因為這些路徑須要有粒線體的酵素(8)。在 gluconeogenesis 的第一步驟，CA V 提供 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 給 pyruvate carboxylase；在 ureagenesis 的第一步驟，CA V 提供 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 給 carbamyl phosphate synthetase (11)。

3 分泌型 CA VI：分子量為 42kDa。它是哺乳動物 CA family 中，唯一分泌型的糖蛋白(12)，由 salivary gland (parotid 和 submandibular glands) 製造並分泌至唾液(13、14)。CA VI 可以中和酸產生 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O，保護 esophageal, gastric 和 intestinal mucosa 免於酸的傷害(15)。CA VI 並不直接參與調控 saliva 的 pH 值 (16)。

4、和細胞膜相關的 CA IV、CA IX、CAXII、CAXIV：幫助二氧化碳排出細胞外。CA IV 的分子量為 33-35kDa (17)，靠 glycosylphosphatidylinositol anchor anchored 在膜上或存在神經系統、肺、腎、心和身體的一些微血管的 endothelium (4、18)。CA IX 是一

個 transmembrane protein，從前的名字是 MN，在正常組織(胃)和腫瘤組織(HeLa cell)，cDNA 並沒有不同(19)。CA IX 在人類腸道上皮細胞的表現與細胞的快速增生有關(20)。CA IX 是和腫瘤有相關的 isozyme (21、22)。CA XII 的分子量為 39kDa (23)，CA XII 也是和膜有相關的 isozyme，CA XII 在子宮內膜表現被認為是受精前，精子的 pH-dependent 有關(24)，另外 CA XII 也和 oncogenesis 有關。CA IX 和 CA XII 在一些惡性腫瘤被觀察到有過度表現的情形(25、26)。CA XIV 的分子量為 37.5kDa，存在 plasma membrane，在腎和心 CA IX 有大量表現的情形 (27)。

## 二、CA 的功能

CA 主要的功能是催化  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ ，CA 的功能可分為三大類：一個是在呼吸方面，包括二氧化碳的運送和分泌。二是離子的運送，包括細胞外液離子的調節。三為參與代謝合成路徑中碳的固定，包括 gluconeogenesis 和 ureagenesis，及植物中的光合作用。CA 生理或生化上所扮演的角色，包括酸鹼平衡，呼吸，二氧化碳和  $\text{HCO}_3^-$  的運送，離子的運送，水和電解質的平衡， $\text{H}^+$  的分泌， $\text{HCO}_3^-$  的分泌，pH 值的調控，骨的再吸收，腎性的酸化，形成胃液、胰液，形成腦脊髓液，光合作用(28、29)，代謝性的角色如參與代謝合成路徑中碳的固定，包括 gluconeogenesis 和 ureagenesis (4、8)。



一般認為與細胞膜有關的 CA，參與二氧化碳的運送；細胞質的 CA 維持立即的 CO<sub>2</sub> 平衡；而細胞內部(包含胞器)的 CA，參與中間代謝合成路徑中碳的固定。

### 三、CA 的結構和催化機制

CA 是一個含鋅的金屬酵素，鋅位在 CA 的中心點，主要扮 catalytic 的角色，鋅離子位在酵素的活化位置，可直接參與催化機制和反應物分子有反應(Fig.1, 2)，在這個 catalytic zinc site，最常見的 ligand 是 histidine，再來是 glutamic acid，aspartic acid 和 cysteine，在 CA II 的四面結構中，鋅位在 CA 的中心點，三面為含 His 的 imidazole，可以看到 H94 和 H96 ligand 位在同一個  $\beta$ -sheet 上。而第三個 ligand H119 位在另一個  $\beta$ -sheet 上。Zn 和 histine ligand 是透過 histidine 的 N 原子連接一起。另一面則是透過 Thr119 的 OH 與鋅連接，這個 catalytic zinc site 提供了一個很便利的位置，讓藥物去攻擊，抑制酵素的作用(2、30)。

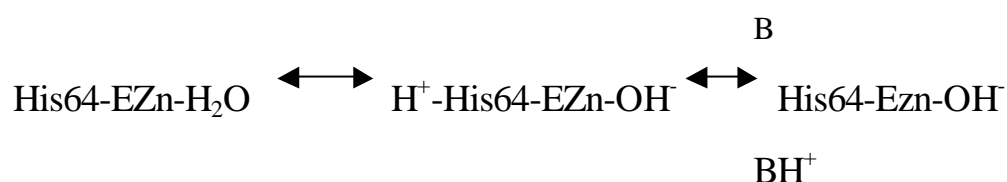
CA 的催化機制：

第一步驟：水解二氧化碳為碳酸根離子(29、31、32)



Zn 結合氫氧根攻擊 CO<sub>2</sub> 的碳端，形成 Zinc 結合重碳酸鹽，經由 ligand exchange，H<sub>2</sub>O 將 CO<sub>2</sub> 置換。CO<sub>2</sub> 對膜有高度的通透性，但是氣體型式的 CO<sub>2</sub> 難溶於水溶液裡如血漿，而 CA 可以轉換 CO<sub>2</sub> 為水溶性的 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>。

第二步驟：質子的轉移



經由 shuttle group (CAII 的 H64) 將 H<sup>+</sup> 轉移到外面的緩衝液，重新產生一個有催化活性的 Zn 結合氫氧根。

#### 四、CA 的抑制劑(inhibitor)

CA 的抑制劑有 acetazolamide，sulfonamides。sulfonamides 可以抑制 CA，是結合到 active site：sulfonamide 的 N 取代了 ' zinc water '，而 sulfonamide 的 O 置換了 ' deep water '，此時鋅原子仍然維持對等四面體構型 (33)。

#### 五、CA 缺陷的疾病

目前已知 CA I 的缺陷並不會造成很嚴重的疾病，但 CAII 的缺陷卻會造成 osteopetrosis (骨質石化病)，腎小管性酸毒症，大腦鈣化和偶發性的心智延遲(34)。CA II 的缺陷是一個新的代謝疾病，屬於體染色體隱性症狀，影響在腎、骨頭及腦 (35、36)。在人類 CAII 的基

因有 7 個結構性突變被發現(Fig.3)。CAII 的缺陷被觀察到有心智遲緩和常發性的骨折；而常發性的骨折和 homozygous His→ Tyr 突變或 heterozygous H<sup>107</sup> → Tyr 有關。另外在阿拉伯病人，最常見的突變是 5' 端 gt at 的改變，破壞了 splicing junction sit，造成了心智延遲和代謝性酸毒症。

在未來 CA 的分子病理學診斷，可以用純化的 DNA 或 RNA 藉由 PCR 和雜交偵測系統探討 target genome 的序列，而達成研究未知的疾病進而加以診斷及治療(37)。

Figure 1

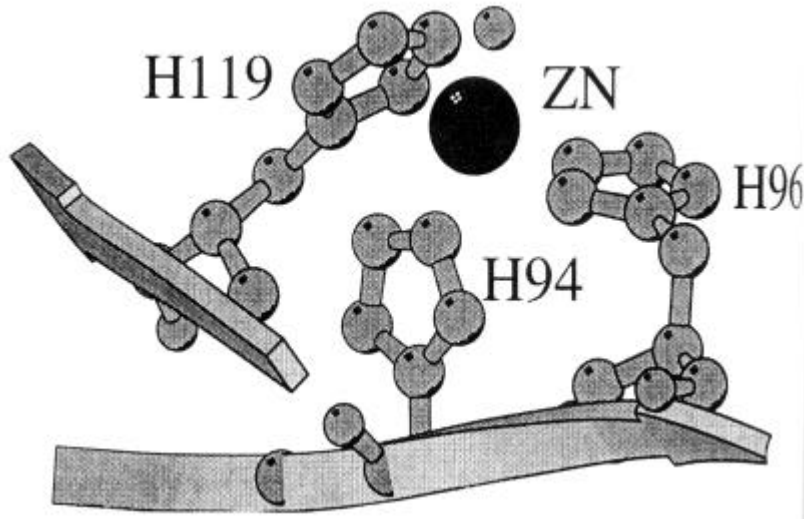


Figure 2

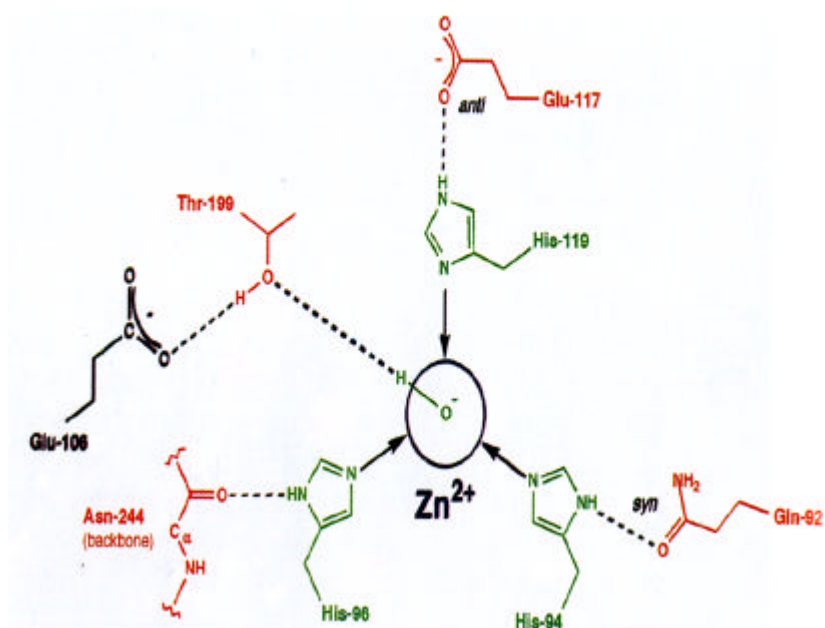
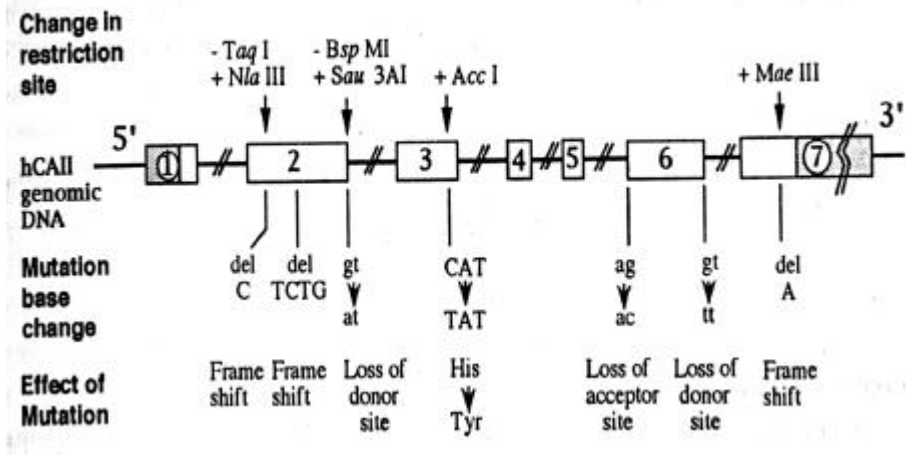


Figure 3



## II. 研究動機

本實驗室之前的研究，發現接種肉瘤細胞 Sarcoma 180 的老鼠，肝臟組織之細胞質 carbonic anhydrase III 之表現，在六天後逐漸減少 (38)。是什麼原因導致此現象並不清楚？

此外也有報告指出在直腸大腸癌的病人，他們的 CAII 的表現是減少的。

所以本實驗以短暫性植入的系統探討 carbonic anhydrase 與肝癌的關係，並期望能找出一個解答。

### III. 實驗方法

#### 一、細胞培養

##### 1. Hep 3B: Human hepatocellular carcinoma cells

所需要的培養基為 DMEM + 10% FBS + 1% PSN + 1% sodium pyruvate + 1% non essential amino acids。培養在 5% CO<sub>2</sub> 培養箱，細胞 subculture 至 3cm 的 dish，至 8 分滿時，做實驗(transfection)，24hr 後觀察結果。

##### 2. Clone 9 : Rat normal liver cells

所需要的培養基為 F-12K 添加 2mM L-glutamine，1.5g/L sodium bicarbonate 及 10% FBS。培養在 5% CO<sub>2</sub> 培養箱，細胞 subculture 至 3cm 的 dish，至 8 分滿時，做實驗(transfection)，24hr 後觀察結果。

#### \*細胞培養之注意事項：

##### (1). 血清瓶的處理：

首先泡在 0.1-0.05N 的 HCl 的溶液裏，24 小時後用清潔劑刷洗乾淨後滅菌，用濕滅的方式(121<sup>0</sup>C，30 分鐘，15 lb.)，之後烘乾，蓋子與瓶子分別用錫箔紙包好。瓶子拿去乾滅(200<sup>0</sup>C，4hr)，而蓋子再濕滅烘乾。



(2). 配製 DMEM 培養基：

準備 1800ml 的 ddH<sub>2</sub>O，加上二包的 DMEM，再加上 NaHCO<sub>3</sub> [ 7.4 g (3.7 g/1L)]，調 pH 值為 7.2~7.4，過 millipore 即可。

(3). pipette 的處理：

第一天-將棉花沖走，放於洗 pipette 的筒子，沖洗至隔夜。

第二天-用 dH<sub>2</sub>O 加清潔劑，於超音波的機器震 30 分鐘，再放入 pipette 的筒子，沖 6 小時或隔夜。

第三天-用 ddH<sub>2</sub>O 於超音波的機器，震 30 分鐘，共兩次，之後烘乾(60°C，隔夜)。

第四天-於 pipette 尾端塞棉花，乾滅(200°C，4 小時)。

## 二、RNA 純化

1.Total RNA 的抽取：

將老鼠(ICR)及人的肝臟組織，加入適量的 Solution

D-mercaptoethanol，將組織研磨成黏稠均勻透明狀，將黏

稠液倒至 25ml 的離心管中依次加入 2M sodium acetate

(pH4.0)[1 : 0.1]、chloroform[1 : 0.2]、phenol(pH4.0)[1 :

1], 1 指 Solution D 的體積。上下混合均勻成同一層狀態，放到冰上靜置一分鐘，重覆這樣的步驟達 20 分鐘，使其能充分作用，最後放到冰上作用 5 分鐘，轉速 12000g、4°C 離 20 分鐘。將上層吸取至另一新的 25ml 的離心管，以 chloroform 及 phenol (1:1) 的混合液和 RNA 水層(1:1) 上下混合，重覆上面混合、靜置、離心步驟，重覆萃取 2~3 次，直到在水層和有機層之間沒有看到白白的蛋白質。吸水層到新的 eppendorf，加入同體積的 isopropanol，混合完全，放入 -20 °C 冰箱中，沉澱二小時或隔夜。之後於 4°C、轉速 12000g 離心 20 分鐘，用 pipette 抽乾液體，加入 0.5ml 的 Solution D 溶解 pellet，加入 2 $\mu$ l 的 glycogen，混合均勻，放入 -20 °C 沉澱，2 小時至隔夜。於 4 °C，以轉速 12000g 離心 20 分鐘，用 pipette 抽乾液體，加入 1ml 70% 的酒精清洗(pellet 跳起來才表示有洗到)，於 4 °C，轉速 12000g 離心 20 分鐘，用 pipette 抽乾液體，蒸乾 pellet，視 pellet 大小加入適量的 DEPC water 溶解，存放於 -20 °C 或 -70 °C 中。

\*RNA isolation 試藥的配製

(1). Solution D : 4M GNTC [Guanidine Thiocynate (F.W.118.2)] , 25mM sodium citrate pH7.0 (F.W.294.1) , 0.5% N-Lanroylsarcosine (Sarcosyl)

(a) 需避光 , 所以先將容器用錫箔紙包起來。

(b) 倒入 ddH<sub>2</sub>O 約 50ml。

(c) 稱 GNTC 47.28g。

(d) 稱 sodium citrate 0.735g , 調 pH7.0。

(e) 稱 sarcosyl 0.5g , 攪拌均勻(會釋熱) , 補 ddH<sub>2</sub>O 至 100ml , 加 100ul 的 DEPC 靜置 2 小時 , 再滅菌。

(2). Sodium acetate 2M , pH=4.0

泡好之後 , 再用 DEPC 處理 (0.1~0.2%) 混合均勻 , 靜置 2 小時 , 再 autoclave。

(3). DEPC H<sub>2</sub>O : DEPC 的含量為 0.1~0.2%

泡 2 升的 DEPC H<sub>2</sub>O , 用棕色瓶 , 取二次水 2 升 , 加入 2ml 的 DEPC , 上下混合均勻 , 靜置兩小時 , 再滅菌。

2. Total RNA 電泳 :

(1). 1.2% RNA denaturing gel 之製備

稱 0.36g 的 agarose 加 26.1ml DEPC 水 , 加熱至沸騰 , 冷卻至約 60°C , 加入 3ml 10X MOPS , 0.9ml 37%

formamide，混合均勻之後，使其冷卻至手可碰觸之溫度，倒膠，當天使用。

### (2). RNA 樣本的處理

取 2.22 $\mu$ l RNA (2 $\mu$ g /  $\mu$ l)，加入 7.78 $\mu$ l RNA-denaturing buffer，震盪均勻，在 55 $^{\circ}$ C 的水浴槽，作用 15 分鐘，馬上置於冰上，再短暫離心後，加上 1.1 $\mu$ l 的 RNA Loading buffer (10X)。

### (3). 跑膠

將 11.1 $\mu$ l 的 RNA sample 注入齒槽中，倒入 1X running buffer，以 100 伏特跑半小時左右，以拍立得照相機於紫外線的照射下拍攝 RNA 的電泳圖。

\*Total RNA 電泳試藥的配製：

(a). 1X 的 running buffer：

315ml 的 DEPC water + 35ml 的 10X MOPS

(b). 6X 的 loading buffer：

0.25% bromophenol blue，0.25% xylene cyanol，30% glycerol。

(c). RNA denaturing buffer：

Sample:		2.22ul
	5ul	
10X MOPS :	1μl	2.25μl
37% formaldehyde :	1.78μl	4μl
formamide(CH <sub>3</sub> NO) :	5μl	11.25μl
	<hr/>	<hr/>
	10ul	22.5ul

(d). 10X MOPS (1L) :

0.2M MOPS , 50mM sodium acetate , 10mM EDTA ,  
pH7.0 。

取 800ml 的 DEPC 水 , 加上 41.8g 的 MOPS , 再  
6.805g 的 sodium acetate 再加上 20ml 0.5M EDTA  
8.0 , 調 pH=7 , 滅菌。

### 三、. RT-PCR

1. Reverse Transcription (RT) :

將 RNA 反轉錄為 cDNA。做法為：取 5μg 的 total RNA 加上  
DEPC H<sub>2</sub>O , 以溫度循環機 , 70°C 預熱 5 分鐘 , 除去 RNA 之二  
級結構後 , 馬上放在冰上 , 避免 RNA 二級結構回復 , 加入 2μl  
RNAase inhibitor (可不加) , 加 10μl 的 5X Reverse Transcription

buffer , 加上 2.5mM dNTP 4 $\mu$ l , 加上 2.5 $\mu$ l oligo dT (50 p mole/ $\mu$ l) , 輕輕的 mix 均勻 , 放入溫度循環機 , 42 $^{\circ}$ C 預熱 5 分鐘 , 再加上 0.5 $\mu$ l 的 Reverse Transcriptase (200u /  $\mu$ l) [Promega] , 進行 RT 反應。RT 的條件為 , 42 $^{\circ}$ C , 1hr 99 $^{\circ}$ C , 5 分鐘。RT 完成之後於 4 $^{\circ}$ C 短暫離心 , 儲存在 4 $^{\circ}$ C 或-20 $^{\circ}$ C。

## 2. Polymerase Chain Reaction (PCR) :

取 13.8 $\mu$ l DEPC H<sub>2</sub>O , 4 $\mu$ l 10X PCR buffer , 3.2 $\mu$ l 2.5mM dNTP (final-0.2mM) , 8 $\mu$ l 15mM MgCl<sub>2</sub> (final-3mM) , 5 $\mu$ l 5 端的 primer (10pmole/ $\mu$ l)及 5 $\mu$ l 3 端的 primer (10pmole/ $\mu$ l) , 加上 10 $\mu$ l 的 cDNA (RT 產物) , 輕輕 mix 均勻 , 短暫離心後 , 加一滴礦物油 , 以溫度循環機 , 94 $^{\circ}$ C 預熱 5 分鐘 , 加 Taq (5u /  $\mu$ l) 1  $\mu$ l , 然後在 94 $^{\circ}$ C , 2 分鐘 , 67 $^{\circ}$ C , 1 分鐘 , 72 $^{\circ}$ C , 2 分鐘 , 進行 40 cycle , 第 20 cycle 之 94 $^{\circ}$ C 補 Taq 1 $\mu$ l , 最後 72 $^{\circ}$ C , 20 分鐘 PCR 完成後儲存在 4 $^{\circ}$ C 或-20 $^{\circ}$ C。

## 3. DNA 電泳 :

跑 DNA 電泳 , 以確認 RT-PCR 結果是否正確。

\*DNA 電泳試藥之配製 :

(1). sample : PCR 後之 cDNA , 取 5 $\mu$ l , 加 6X 的 DNA Loading buffer

(2). gel : 1.2% 的 agarose gel (用 1X 的 TAE buffer 泡)

(3). running buffer : 1X 的 TAE buffer :

(4). 6X 的 DNA Loading buffer

0.25% bromophenol blue , 0.25% xylene cyanol , 30% glycerol

(5). TAE buffer (50x) :

Tris base (242g) , glacial acetic acid(57.1ml) , 0.5 M EDTA(pH8.0)  
[100ml]

#### 四、HCA II cDNA 選殖

1. Competent cell 的製備 :

從-20°C 取出 JM109 的菌種 , 放至 2ml 的 LB 培養液中 , 在 37°C 培養過夜。隔天取 1ml 至 100ml 新鮮的 LB 培養液 , 放在 37°C 中 , 劇烈搖晃( 200rpm)培養至 O.D .為 0.4~0.5(600nm)左右。然後 , 在 4°C , 以 4000rpm 離心 10 分鐘 , 倒乾上層液 , 留下 pellet , 每管加入 10ml 的冰 50mM CaCl<sub>2</sub> (含 10mM Tris-HCl) , 將 pellet 打散 , 靜置於冰上 30 分鐘。在 4°C , 以 4000rpm 離心 10 分鐘 , 倒乾上清液 , 加入 2ml 的冰 CaCl<sub>2</sub> (含 10mM Tris-HCl) , 將 pellet 打散。如要儲存 , 加入滅菌過的 glycerol , 使其 final 濃度為 10% , 儲存在-70 °C , 如要做 transformation , 即可馬上使用。

\*Competent cell 試藥的配製(全部都要滅菌), 以上實驗均需在無菌狀況下進行。

(1). 10ml cold 50mM CaCl<sub>2</sub> , 10mM Tris-HCl , pH7.5 (滅菌)。

(2). 87%的 glycerol , 滅菌。

(3). LB 培養液 100ml (滅菌)

#### LB broth 及 LB agar 的配製

	LB broth	LB agar
	200 ml	200 ml
peptone	2 g	2 g
Yeast extract	1 g	1 g
NaCl	1 g	1 g
1N NaOH	200 ul	200 ul
agar		3 g

調 pH 為 7

滅好菌後, 要用時再加 ampicillin , 培養盤的 ampicillin final 濃度為 50 $\mu$ g / ml , 培養液的 ampicillin final 濃度為 100 $\mu$ g / ml。

2. Vector 的處理 :

切 pGEM : PGEM 2  $\mu$ g , 1.92  $\mu$ l , buffer A : 2.5  $\mu$ l , E<sub>1</sub> : *Kpn I* : 1  $\mu$ l , E<sub>2</sub> : *Sma I* : 1  $\mu$ l , 滅菌水 : 18.58  $\mu$ l , 共 25  $\mu$ l (enzyme 的體積不可超過總體積的 1/10), 反應時間 37 $^{\circ}$ C , 3hr , 最後 70 $^{\circ}$ C , 10 min (理論上 restriction enzyme 1 unit 可切 1 $\mu$ g 的 DNA , 考慮效用 , 用



2unit 來切 1 $\mu$ g 的 DNA)。

### 3. cDNA 的處理：

(1). 先回收 PCR 之產物，用 kit (GENE CLEAN)來回收。取 cDNA 50 $\mu$ l 跑 gel，放入 EtBr 照 UV 之後，用數位照相機定量，切下 gel (想要的 band)，稱重。加入 NaI (15~30 $^{\circ}$ C)，體積是 3 倍 gel 重，放入 water bath 45~55 $^{\circ}$ C，5 分鐘，使 gel 完全溶解。加入 glass milk 使用前 vortex，每 1  $\mu$ g 的 DNA 用 1 $\mu$ l glass milk，5 ug 以上，每 0.5 $\mu$ g 的 DNA 用 1 $\mu$ l glass milk，例如：DNA 15 $\mu$ g 需要 5 $\mu$ l + 10 $\mu$ l X 2 = 25 $\mu$ l (glass milk)。室溫作用 5 分鐘，每隔 1~2 分 mix 一次，以 12000rpm、5 秒鐘離心，丟掉上清液，用 500 $\mu$ l 的 New wash，wash 3 次，每次 wash 以 12000rpm、5 秒鐘離心，丟掉上清液；wash 完成後，吸乾，打開蓋子，空氣中乾燥，加上 elution buffer (體積同使用 glass milk 之量)，再以 12000rpm、30 秒離心，吸到新的 eppendorf，可再用 10 $\mu$ l 的 elution buffer，作第二次 elution (第一次 elution 可回收 cDNA 80%，第二次 elution 可回收 cDNA 20%)。

(2). 切 cDNA：HCA II：5  $\mu$ l，10X buffer A：1.25 $\mu$ l，E<sub>1</sub>：*Kpn* I：0.5 $\mu$ l，滅菌 H<sub>2</sub>O：5.75 $\mu$ l，共 12.5 $\mu$ l。

### 4. Ligation：

用 DNA ligation kit (TakaRa)。將已經用 restriction enzyme 作用的 cDNA 及 PGEM, 使其兩者的 mole 數相等。PGEM 約 200ng, cDNA 約 94ng。PGEM 2.5ul 加上 cDNA 2ul, ligation buffer I : 4.5ul, 共 9ul, 混合均勻後, 放溫度循環機 11°C, 16 小時以上。

#### 5. Transformation :

將上述之 ligation 樣本與 200ul 的 competent cell 混合, 於冰上作用 30 分鐘, 於 37°C, 3 分鐘熱處理後, 立即放回冰上, 儘速添加 0.5ml 的 LB 培養液(勿超過 4min)。混合後於 37°C, 作用 30 分鐘, 最後將菌液塗抹在含有 ampicillin (50ug/ml), X-gal 及 IPTG 的 LB 培養盤上。隔天挑白色的菌落。

P s : (1) 一早先將含 ampicillin(50ug/ml)的 LB plate 烘乾, 塗上 60ul 2% X gal + 30ul 25mg/ml 的 IPTG。

(2) 2% X gal in DMF 須避光 ; 25mg/ml 的 IPTG 須過濾。

#### 6. 抽小量的質體 DNA :

菌的 pellet 加上 100ml 冰的 solution I, 用力振盪均勻, 加上 200ul 的 solution II, 上下輕輕的混合至透明(不可振盪), 再加上 150ul 冰的 solution III, 上下輕輕的混合, 放在冰上靜置 3~5 分鐘, 於 4°C, 12000g 離心 5 分鐘, 吸上清液至另一個 eppendorf, 加上等體積的 phenol: chloroform 混合後, mix 均勻, 於 4°C, 12000g 離

心 2 分鐘，吸上清液至另一個 eppendorf，用兩倍體積的酒精沉澱 DNA， $-20^{\circ}\text{C}$  靜置二小時。於  $4^{\circ}\text{C}$ ， $12000\text{g}$  離心 5 分鐘，丟棄上清液，用 70% 的酒精洗 pellet，於  $4^{\circ}\text{C}$ ， $12000\text{g}$  離心 5 分鐘，丟棄上清液，空氣中乾燥 10 分鐘，加入適當的 TE (pH8.0) 溶解，然後跑 DNA 電泳，control 組放入空的載體，以 band 有上移，表示有 ligation 成功，之後再用限制酶切下，以確認載體所接的 cDNA 是正確的。

**\*抽小量的質體 DNA 試藥的配製**

sol I : 50 mM glucose	sol II : 0.2N NaOH
25mM Tris-Cl (pH8.0)	1% SDS
10mM EDTA (pH8.0)	儲存在室溫
儲存在 $4^{\circ}\text{C}$	

sol III : 5M potassium acetate	60ml
glacial acetic acid	11.5ml
$\text{H}_2\text{O}$	28.5ml
儲存在 $4^{\circ}\text{C}$	

## 五、抽取大量的質體 DNA

取固態 LB 培養基上單一菌落接種於 2 ml 的 LB 培養液(一升培養液中含有 10 g peptone , 5 g yeast extract , 5 g NaCl , 每毫升的 LB

medium 含 100  $\mu$ g ampicillin), 於 37<sup>0</sup>C , 急劇的搖動隔夜, 再將 1.5 ml 菌液接入相同培養液 150 ml, 同樣條件下培養至 O.D. 值為 1。將菌液分裝於離心管中, 以 4000 rpm 離心 10 min, 倒掉上清液, 加入 3 ml 50 mM Tris, pH8.0, 將 pellet 完全打散, 再加入 800 $\mu$ l lysozyme (40mg/ml), 置放於冰上 15 分鐘後, 加入 500 $\mu$ l 250mM EDTA, pH8.0, 混合均勻後, 靜置在冰上 15 分鐘。加入 5ml solution II, 輕輕混合均勻, 靜置於冰上 5min, 加入 3.5ml 的 solution III 混合均勻, 靜置於冰上 5 分鐘。以 12000rpm 轉速離心 20 分鐘後, 小心吸取上清液至另一新的試管(phenol-resistant), 加入同體積的 phenol(pH 8.0), 於室溫下, 輕輕來回搖晃 5 分鐘。以 3500rpm 離心 10 分鐘, 此時可以看見試管內的溶液分成三層, 吸取最上層至另一新試管, 加入同體積的 phenol: chloroform(1:1), 於室溫下溫和的來回搖晃 5 分鐘, 以 3500rpm 離心 10 分鐘。同樣的吸取最上層至另一新試管, 加入 1ml 3M sodium acetate (PH7.0), 混合後加入冰的 99% 的酒精。放在 -20 冰箱中過夜或 -70 中 30 分鐘。以轉速 12000rpm, 4 下, 離心 20 分鐘, 移除上清液, 加入 70% 酒精, 溫和的來回搖晃幾下, 同樣條件離心, 移除上清液。Pellet 蒸發乾後溶於 1ml 的 TE buffer (PH8.0)。加入 5 $\mu$ l RNase (10mg/ml), 放入 37 的水浴槽 30 分鐘, 加入同體積的 phenol(pH8.0), 在室溫下, 來回溫和地搖晃 5 分鐘, 3500rpm 離心 10 分鐘。小心地

吸取上清液至另一新的管子(注意不要碰到中下層), 加入同體積的 phenol : chloroform (1:1) 在室溫下, 來回溫和地搖晃 5 分鐘, 3500rpm 離心 10 分鐘。小心地吸取上清液, 至另一新管子, 加入 3M sodium acetate (PH7.0), 先混和, 再加入 2.5ml 99% 酒精, 放入 -20 沉澱隔夜或 -70 30min。以 12000 rpm 4 離心 20 分鐘, 倒乾上清液, 加入 70% alcohol, 來回溫和地晃動幾次。再以 12000rpm, 4 離心 20 分鐘, 倒乾上清液, 蒸乾 pellet。

\*抽取細胞內質體 DNA 的試劑:

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

## 六、定序

將抽好的 plasmid DNA, 用 restriction enzyme 切下, 回收 cDNA 後, 送去學校貴儀室定序。

## 七、轉殖(Transfection)

目的: 將基因送到真核細胞內表達。作法: 在 3.5 公分的培養皿中, 種  $2 \times 10^5$  的細胞(以完整的生長培養液), 養細胞至 7-8 分滿時作

transfection。

準備兩根滅過菌的 eppendorf, 每一管各加入 100ul 之 DMEM(Hep 3B)或 F-12K(Clone 9 cell)[不含抗生素及血清], 其中一管加入 1-2ug 的 DNA, 另一管加入 5ul 的 LIPOFECTAMINE reagent。將這兩管混合在一起, 混合均勻(用 yellow tip mix 至少 60 次以上, 增加碰撞機率)。然後在無菌培養箱靜置 45 分鐘(室溫), 讓 DNA 和 liposome 形成 complex。

當 complex 形成的時候, 用 2ml 的 DMEM(Hep 3B)或 F-12K(Clone 9 cell) [不含抗生素及血清] 浸潤細胞, 放入 37°C 的培養箱中。當時間到時, 吸走培養皿中的 DMEM(Hep 3B)或 F-12K(Clone 9 cell), 且加入 0.8ml 的 DMEM(Hep 3B)或 F-12K(Clone 9 cell) [不含抗生素及血清] 至 complex 的那一管, 用剪過的 1ml tip 吸起, 加至培養皿中, 放入 37°C 的培養箱中培養。

Transfection 之 12 小時後, 加入 1ml 含 20 % FBS 之 DMEM(Hep 3B)或 F-12K(Clone 9 cell) [不含抗生素], 24 小時後, 換成完整的生長培養液培養。transfection 之 12 小時後, 即可觀察結果。

#### \*Transfection 之注意事項

- 1.kit reagent: LIPOFECTAMINE (LiFE ,TECNOLOGIES<sub>TM</sub>)
- 2.細胞要健康。
- 3.DNA 和 liposome 須混合均勻(用 yellow tip mix 至少 60 次以上, 增加碰撞機率)。
- 4.DNA 和 liposome 比例須適當, DNA 和 liposome 太多會對細胞造成毒害。
- 5.DNA 和 liposome 形成 complex 的時候, 不可有血清的干擾。
- 6.整個 transfection 的過程, 不可有抗生素的干擾。

7. DNA 須高純度，用 kit(GiBco BRL)抽，再通 column 純化。

#### 八、抽質體 DNA(用 kit 抽)

前一天先將菌落養在 2ml 的 LB 培養液，培養隔夜，隔天早上再養至錐形瓶 25ml。取 1ml 至 25ml 新鮮的 LB 培養液中，加抗生素(最終濃度 100ug/ml)，放在 37°C 培養箱中，劇烈搖晃，培養至 OD 值 >1 以上，而後收細菌，以轉速 3500rpm，10 分鐘，4°C 離心。

在此時先用 10ml 的平衡液體(E4)，平衡 column。細菌離心後倒掉上清液，加入 4ml 的細胞懸浮的溶液(E1)含有 RNase A，震盪至 pellet 散開成均勻狀，之後加 4ml 的細胞溶解液體(E2)，輕輕的混合均勻，不可 vortex，在室溫放 5 分鐘直到全部呈半透明均勻狀，之後加 4ml 的中和液體(E3)，立即混合均勻，不可 vortex，直到白色蛋花狀的樣子形成較緊密的結構。之後離心，轉速 10000rpm，室溫 10 分鐘(不可在 4°C 離心)。接著將上清液通入已平衡好的 column，靠重力，將流下來的液體丟掉。用 10ml 的 wash buffer(E5)清洗 column，洗 2 次，將流下來的液體丟掉。然後換乾淨的管子用 5ml 的 Elution buffer(E6)把 DNA 沖下來。再加 3.5ml 的 isopropanol，混合均勻，放入 -20°C 沉澱 DNA，隔天再以 10000rpm，4°C 離 30 分鐘，小心的移除上清液，用 3ml 70% 的酒精洗 DNA pellet，再以 10000rpm 4°C 離

5 分鐘，小心的移除上清液，在空氣中乾 10 分鐘，再以 100ul 的 TE buffer 溶解 DNA pellet。

此抽好之質體 DNA 即可拿來作 transfection 實驗。

## 九、TUNEL 實驗

作完轉殖實驗(transfection)52hr 後，作 TUNEL 實驗：將細胞用固定液固定一小時，用 PBS 清洗細胞；在冰上浸潤細胞 2 分鐘，用 PBS 清洗細胞；加入 TUNEL 試劑、反應一小時(37<sup>0</sup>C)，用 PBS 清洗細胞；用螢光顯微鏡觀察結果(570-620nm 激發光，紅光)。

### \*TUNEL 之注意事項

1. 固定液：Paraformaldehyde [2% in PBS, pH 7.4]，新鮮配製。
2. 清洗液：PBS, pH 7.4
3. 浸潤液：Triton X-100 [0.1% in 0.1% sodium citrate]
4. Blocking buffer：PBS, 0.1% Triton X-100, 0.5% bovine serum albumine
5. TUNEL 試劑：In situ cell death detection kit, TMR red [Roche]
6. TUNEL 混合液：TUNEL 試劑 1(含酵素)，取 5ul；TUNEL 試劑 2 [label buffer(10X)]，取 45ul。要用時立即混合。還未使用時暫時放



在冰上。

7. 加入 TUNEL 試劑、反應一小時(37<sup>0</sup>C) , 須避光且在潮濕的環境中反應。
8. 用螢光顯微鏡觀察結果 [570-620nm 激發光(紅光)], 可見紅色螢光

#### IV. 結果

實驗首先設計 5 端及 3 端的 primer，如圖 4，以 RT-PCR 的方式大量複製 cDNA。為了之後將 cDNA 接到載體，所以 primer 上設計了限制酵素認識的位置。mCA I：5 端的 primer 有 *Hind III* 認識的位置，3 端的 primer 有 *Bam HI* 認識的位置；mCA II：5 端的 primer 為 blunt end，3 端的 primer 有 *Bam HI* 認識的位置；mCA III：5 端的 primer 為 blunt end，3 端的 primer 有 *Hind III* 認識的位置；hCA II：5 端的 primer 有 *Kpn I* 認識的位置，3 端的 primer 為 blunt end。之後抽老鼠肝組織及人(病人的組織切塊)之 RNA，可明顯的看到 28s 及 18s rRNA，如圖 5。再以 RT-PCR 的方法複製 cDNA，產物經 1.2% 洋菜膠分離後可以看到在 898 bp 附近有一明顯的 band，為 mCA I；在 895 bp 附近有一明顯的 band，為 mCA II；在 938 bp 附近有一明顯的 band，為 mCA III；在 922 bp 附近有一明顯的 band，為 hCA II，如圖 6。

為了大量生產 cDNA 以利於後面實驗用，所以讓 *E.coli* 之質體來製造。因此首先製備載體 pGEM 3Z(f)+，圖譜如圖 7，載體 pGEM 3Z(f)+ 為 ampicillin resistant，*lac Z* 基因上有 polycloning site；製備如圖 8。然後自洋菜膠將此 cDNA 片段利用 GeneClean III 的方法純化出來以限制酵素作用，再經由相同限制酵素作用過的 pGEM 3Z(f)+ 載體

接合之後，送入 JM 109 E.coli 中，利用 X-gal 及 IPTG 呈色系統篩選。由於 cDNA 接入 pGEM 的 *lac Z* 基因，所以一旦接合成功即會破壞 *lac Z* 基因，而不能產生酵素代謝 X-gal，因此菌落之顏色為白色，而不呈現藍色。自白色菌落抽小量的質體 DNA，跑膠篩選，見圖 9，有接合成功之質體，band 和 pGEM 之 band 比會上移(因 pGEM 接上 cDNA size 較大)。而其它未接合成功，但菌落能仍為白色的可能原因為：載體(pGEM)在自我連接的過程裏，可能使得 reading frame 出錯，而不能產生酵素代謝 X-gal，因此菌落之顏色為白色。為了確定內含所送入質體的 cDNA，所以再用當初接合的限制酵素(*Kpn I* & *Sma I*)切下，跑 1.2% 洋菜膠分離 DNA，發現有兩條 band，位置在 3200 bp 及 922 bp 附近，而 pGEM 3Z(f)+ 的大小是 3199 bp，所以初步確定是所要的質體，並命名為 pGEM-HCA II，見圖 10。為了更確定此質體所含的 cDNA 為 HCA II，所以抽大量的質體 DNA；用限制酵素(*Kpn I* & *Sma I*)切下，然後自洋菜膠將此 cDNA 片段利用 GeneClean III 的方法純化出來，送去本校貴儀室用自動定序儀定序，結果序列和 gene bank 所提供的 HCA II 序列是一致的，見圖 11。另外也接好另一質體命名為 pGEM-MCA I，初步確定見圖 12，定序結果，序列和 gene bank 所提供的 MCA I 序列是一致的，見圖 13。

為了將此 HCA II gene 送入細胞，探討在細胞表現的情形，所以

作轉殖實驗。但此質體必須能在細胞內表達，所以首先換細胞用的載體為 pcDNA3，圖譜如圖 14，pcDNA3 載體為 ampicillin resistant，neomycin resistant。然後自洋菜膠將 HCA II 片段利用 GeneClean III 的方法純化出來以限制酵素作用，再經由相同限制酵素作用過的 pcDNA3 載體接合之後，送入 JM 109 E.coli 中。無法利用 X-gal 及 IPTG 呈色系統篩選，所以隨機挑白色菌落抽小量的質體 DNA，跑膠篩選，見圖 15；同時用限制酵素(*Xba I* & *EcoR I*)切下，跑膠確認 cloning 的結果，見圖 16。另外、為方便觀察(螢光)，所以將 HCA II 接到 GFP 載體，圖譜如圖 17，GFP 載體為 kanamycin resistant，neomycin resistant，且本身帶有 *gfp* 基因，會製造綠色螢光蛋白，以螢光顯微鏡觀察，可見綠色螢光。同樣的跑膠篩選後，用限制酵素(*Xba I* & *EcoR I*)切下確認 cloning 的結果，見圖 18。

以人之肝癌細胞(Hep 3B)作轉殖實驗，以 GFP 當 control，GFP-HCA II 當實驗組。DNA 取 2ug，liposome 取 5，結果在 24 小時 GFP 的轉殖效率為 7.42%，GFP-HCA II 的轉殖效率為 6.36%；40 小時 GFP 的轉殖效率為 17.44%，GFP-HCA II 的轉殖效率為 10.46%；48 小時 GFP 的轉殖效率為 25.30%，GFP-HCA II 的轉殖效率為 10.78%；66.5 小時 GFP 的轉殖效率為 37.75%，GFP-HCA II 的轉殖效率為 15.28%；72 小時 GFP 的轉殖效率為 34.55%，GFP-HCA II 的

轉殖效率為 8.15%。結果：隨著時間的增加轉殖效率也增加，直到 66.5 小時後，轉殖效率才下降。以 GFP-HCA II 的轉殖效率除以 GFP 的轉殖效率乘以 100，結果發現 GFP-HCA II 的轉殖效率有下降的趨勢，見圖 19。再作一次肝癌細胞的轉殖實驗，結果也有相似的情形，如圖 20。另外，以螢光顯微鏡觀察，送入 GFP-HCA II 之細胞發出綠色螢光型態與 control 組(送入 GFP)有一些不同。送入 GFP，螢光表現隨細胞型態而整個分佈於細胞，細胞型態多是舒展的，且螢光亮度較亮。送入 GFP-HCA II，細胞發出綠色螢光型態為圓形的較多；有的細胞螢光型態為又圓又亮，之後圓亮的細胞會飄起死亡；也有一些細胞發出綠色螢光呈現許多小小圓圓的形狀，疑是 apoptotic body；大體而言，送入 GFP-HCA II 比送入 GFP，螢光亮度較暗。觀察結果見幻燈片(圖 25)。

另一方面，實驗考慮須有對照組，所以以正常的大白鼠肝細胞 (clone 9) 作轉殖的實驗。DNA 取 2ug，liposome 取 5，原始結果：在 24.5 小時兩盤 GFP 的轉殖效率分別為 19.77%、37.76%，三盤 GFP-HCA II 的轉殖效率分別為 44.29%、18.27%、24.93%；37.5 小時兩盤 GFP 的轉殖效率分別為 9.15%、11.73%，三盤 GFP-HCA II 的轉殖效率分別為 18.67%、11.57%、11.73；46 小時兩盤 GFP 的轉殖效率分別為 7.86%、10.91%，三盤 GFP-HCA II 的轉殖效率分別為

15.39%、8.31 %、7.84% ; 62.5 小時兩盤 GFP 的轉殖效率分別為 3.99%、7.23% , 三盤 GFP-HCA II 的轉殖效率分別為 2.59%、4.0%、2.77% ; 72 小時兩盤 GFP 的轉殖效率為 3.20%、4.44% , 三盤 GFP-HCA II 的轉殖效率分別為 4.50%、2.23%、1.92% , 如圖 21 , 發現 GFP 與 GFP-HCA II 曲線走向相似 , 在 37.5 小時後 , 曲線都趨於和緩。以 GFP-HCA II 的轉殖效率除以 GFP 的轉殖效率乘以 100 , 結果發現 GFP-HCA II 的轉殖效率也有下降的趨勢 , 如圖 22。再作一次正常大白鼠肝細胞(clone 9) 的轉殖實驗 , 如圖 23、24 , 結果發現 GFP-HCA II 的轉殖效率有下降的趨勢。另外 , 以螢光顯微鏡觀察 clone 9 細胞的螢光型態 , 送入 GFP 與送入細胞 GFP-HCA II 還是有差異。GFP 細胞的螢光型態為細胞核很明顯 , 細胞質的螢光擴散出去 , 就像是荷包蛋的樣子且螢光較亮。GFP-HCA II 細胞的螢光型態較不擴散 , 也較暗 , 可觀察到細胞發出綠色螢光呈現許多小小圓圓的形狀。觀察結果見幻燈片(圖 26)。

另外 , 我們做 TUNEL 實驗 , 發現轉殖 GFP-HCA II 細胞 , 在螢光顯微鏡下以 570-620 nm 激發 , 呈現紅色螢光反應 , 表示細胞可能有 apoptosis 的現象(圖 27、圖 28)。

## V. 討論

過去十年，科學家很努力地想發現 CA 在腫瘤形成過程中所扮演的角色，是一個 biomarker 或是腫瘤相關的蛋白？科學家發現細胞外的酸性環境，有助於腫瘤細胞的侵入，而提供此酸性環境，是由 CA 來催化，已經知道在一些癌症，CA 會過度表現，以利於癌細胞的侵入，當加入 CA 的抑制劑則會鎮壓癌細胞的侵入 (in vitro) (39)。在很多的腫瘤細胞和細胞株，CA I 和 CA II 的表現經常被研究，可以在胰臟腫瘤看到 CA I、CA II 的表現(40)。目前在正常和不同的惡性細胞很難清楚去釐清 CA isozymes 的表現，因為同一種 CA isozyme 的表現量在正常和惡性細胞並非有明顯差異；且不同的惡性細胞因不同組織器官，CA isozymes 表現也不同。同時沒有證據指出惡性腫瘤的形成和 CA 有直接的關係，目前只有 CA IX 和 CA XII 的表現被認為和腫瘤的形成有關。CA IX 的功能被認為和酸鹼平衡，細胞內的連繫和細胞增生有關(41)。在一些上皮的腫瘤如直腸大腸癌可以看到 CA IX 的過度表現(42)，另外也可在大多數的直腸癌看到 CA XII 不正常的表現。過度表現，可以明確的當警告標誌，並可用於組織病理學的檢查(40)。令人意外的，在大腸直腸癌發現 CA I, CA II 的表現，明顯的下降，在大腸直腸癌 CA I, CA II 的表現和細胞增生指數呈現負相關。另外，CA IX 在正常胃黏膜有發現，而在胃癌 CA IX 的表現減

少或消失，推論 CA IX 在正常細胞扮演細胞生長負控制的角色。在此 CA 在腫瘤中所扮演的角色究竟是如何呢？仍然有待於研究，以達到預癌症的目的。

CA 在細胞質所扮演的角色仍不完全清楚，但是潛在的角色就是促進 CO<sub>2</sub> 從細胞內擴散到細胞外(35)。之前本實驗室的研究發現，接種 sarcoma cell 的老鼠肝臟中的 CA，隨接種時間的增加而 CA 逐漸消失，是何原因造成此現象並不清楚？因此大膽假設可能是 1. 癌細胞不需要此酵素。2. 此酵素對癌細胞有毒害。3. 此酵素會影響癌細胞的生長。之前的報告指出在大腸癌發現 CA I、II 有消失的現象；在胃癌發現 CA IX 有消失的現象，有科學家認為 CA 在正常細胞所扮演的角色，可能是一個生長負調控的角色(43)。

我們將 CA 送入肝癌細胞及正常大白鼠肝細胞，觀察轉殖的效率。發現 CA 的曲線經校正後有下降的趨勢；且在螢光顯微鏡下，轉殖 GFP-HCA II 的細胞形狀與轉殖 GFP 的細胞形狀有些不同。轉殖 GFP-HCA II 的細胞隨時間增加形狀呈現圓形的增多，且綠色螢光亮度增強，此圓亮的細胞最後會死亡。做 TUNEL 實驗，發現轉殖 GFP-HCA II 細胞，在螢光顯微鏡下以 570-620 nm 激發，呈現紅色螢光反應，表示細胞可能有 apoptosis 的現象；另外也可看到一顆細胞有許多小小圓圓的亮點，作 TUNEL 實驗，可能是 apoptotic bodies。



這些結果顯示 CA 可能對細胞造成傷害，使細胞有 apoptosis 的現象。

探討 CA 的曲線經校正後有下降的趨勢，會是因質體(GFP-HCA II) 在細胞內表達為一個融合蛋白較不穩定，易被分解，造成細胞死亡？還是真的是 CA II 酵素的作用，造成細胞死亡？如果真的是 CA II 酵素的作用，為何轉殖 CA II 對癌細胞有傷害？是如科學家認為 CA II 在正常細胞所扮演的角色，可能是一個生長負調控的角色，所以大量表現的 CA II 讓細胞生長緩慢甚至死亡；還是大量表現的 CA II 使得細胞內環境 pH 改變太大，而導致細胞死亡。這些問題有待於釐清。

我們重新檢視  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \xrightleftharpoons{\text{CA}} \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ ，科學家發現，在水溶液、生理性的 pH 值狀況下， $\text{HCO}_3^-$  的濃度是  $\text{CO}_2$  的 20 倍。在必要代謝路徑的一些 enzymes 如 carboxylating enzymes，會利用這些極性的  $\text{HCO}_3^-$  當 substrate 進行 carboxylation 反應。在肝臟、腎臟、脂肪組織： $\text{HCO}_3^-$  可和 pyruvate carboxylase，形成葡萄糖； $\text{HCO}_3^-$  可和 carbamoyl phosphate I 結合，形成 pyrimidines； $\text{HCO}_3^-$  可和 carbamoyl phosphate II 結合，而走 urine cycle； $\text{HCO}_3^-$  可和 acetyl CoA carboxylase 結合，形成脂肪酸(43)。

Carbonic anhydrase 可加速  $\text{CO}_2$  及  $\text{HCO}_3^-$  的轉換，提供  $\text{HCO}_3^-$  為 carboxylation 步驟之 substrate，有利於細胞的生長(包括癌細胞)。但在大腸直腸癌卻發現 CA I，CA II 的表現，明顯的下降，表示 CA 可

能有另外的角色還未被發現，初步認為 CA 在正常細胞所扮演的角色，可能是一個生長負調控的角色，所以大量表現的 CA II 可能直接調控細胞生長，讓細胞生長緩慢甚至死亡或者透過上述代謝路徑間接調控細胞生長。此外過度表現的 CA 可能不斷的提供酸，酸化癌細胞可能對癌細胞造成毒害[因有報告指出數種抗癌藥酸化癌細胞造成細胞毒害(44)]。

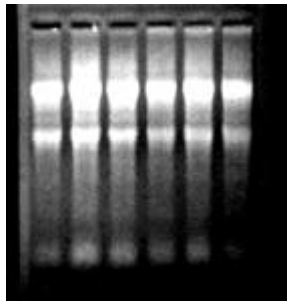
總結以上的論點，適量的 CA 可促進細胞的生長，但過度表現的 CA 可能：1、不斷的提供酸，酸化癌細胞可能對癌細胞造成毒害。2、CA 所扮演的角色，可能是一個生長負調控的角色，所以大量表現的 CA II 讓細胞生長緩慢甚至死亡。

利用短暫性植入 CA 的系統，以了解 CA 和癌症的關係，又因 CA 在癌症出現時會下降及消失，期望藉此能以 CA 當一檢驗 marker，以期提早發現及治療，達到預防癌症的目的。

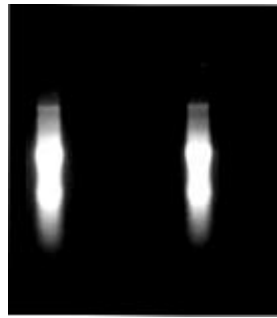
Oligonucleotide	C <sup>0</sup> /time(sec)	Cycles
mCA I cDNA amplification (898 bp )	94 <sup>0</sup> /120	40
mCA I-5':5'-TCTCTGAAGCTTAATCACAAC-3'	60 <sup>0</sup> /60	
mCA I-3':5'-CTTAATCGGGATCCCTTTATT-3'		
mCA II cDNA amplification (895 bp )	94 <sup>0</sup> /120	40
mCA II-5':5'-CCAATCACCGGCGTGA-3'	63 <sup>0</sup> /60	
mCA II-3':5'-GCGAGTCGGGATCCAA-3'		
mCA III cDNA amplification (938 bp )	94 <sup>0</sup> /120	40
mCA III-5':5'-TGGGTGACTGCAGCAAGAAAG-3	60 <sup>0</sup> /60	
mCA III-3':5'-GTTCGTCGGAAAGCTTGGAGT-3'		
hCA II cDNA amplification (922 bp )	94 <sup>0</sup> /120	40
hCA II-5':5'-CCAGATCGGTACC GATTCCT-3'	68 <sup>0</sup> /60	
hCA II-3':5'-GCAACCAGGATCCAAATCAC-3'		
<b>restriction enzyme site:</b>		
mCA I-5':5'-TCTCTGAAGCTTAATCACAAC-3'	(Hind III)	
mCA I-3':5'-CTTAATCGGGATCCCTTTATT-3'	(Bam HI)	
mCA II-5':5'-CCAATCACCGGCGTGA-3'	(Blunt end)	
mCA II-3':5'-GCGAGTCGGGATCCAA-3'	(Bam HI)	
mCA III-5':5'-TGGGTGACTGCAGCAAGAAAG-3	(Blunt end)	
mCA III-3':5'-GTTCGTCGGAAAGCTTGGAGT-3'	(Hind III)	
hCA II-5':5'-CCAGATCGGTACCGATTCCT-3'	(Kpn I)	
hCA II-3':5'-GCAACCAGGATCCAAATCAC-3'	(Blunt end)	

Figure 4

Sequences of the 5' primers and 3' primers

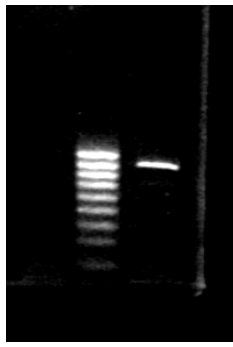


(a)



(b)

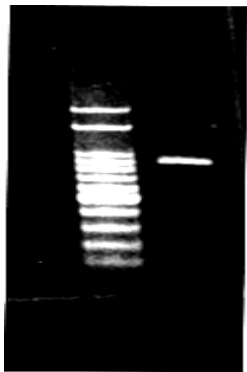
Figure 5. Total RNA isolated from (a) mouse, (b) human.



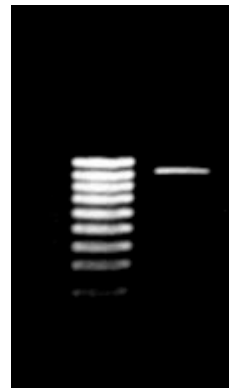
(A)



(B)



(C)



(D)

Figure 6  
RT-PCR products of (A) m CA I, 898 bp; (B) m CA II, 895 bp;  
(C) m CA III, 938 bp; (D) h CA II , 922 bp.

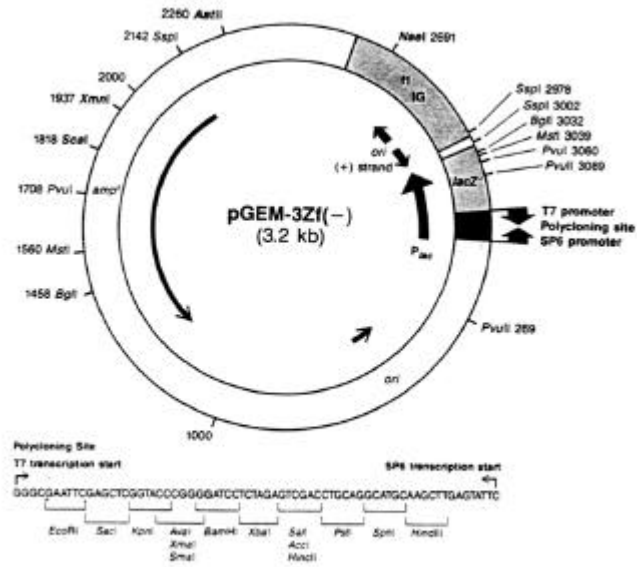


Figure 7. Map of pGEM 3Z(f)+ vector.

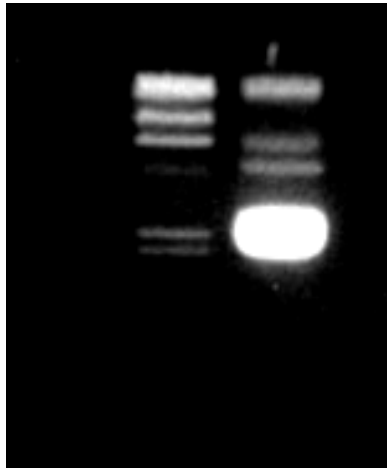


Figure 8. Large preparation of pGEM.

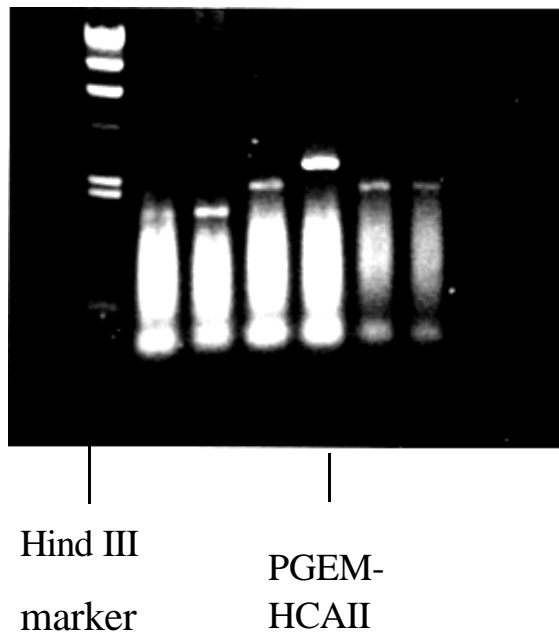


Figure 9  
Screening of the *E. coli* clones with pGEM-HCAII plasmid.  
Plasmids prepared from the white *E. coli* colonies were analyzed  
by electrophoresis in a 1.2 % agarose gel.



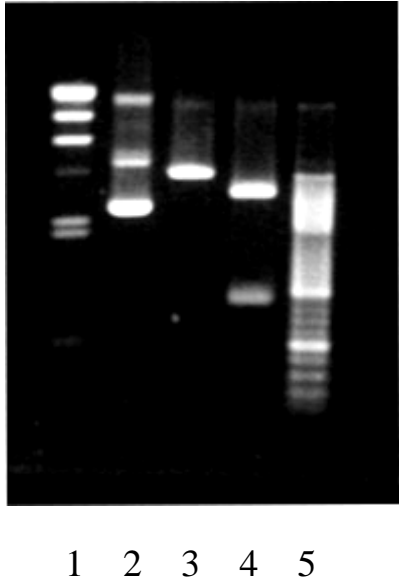


Figure 10  
Confirmation of pGEM-HCA II plasmid by digestion with restriction enzymes. Lane 1: *Hind* III marker. Lane 2: pGEM-HCA II. Lane 3: plasmid digested with *Kpn* I. Lane 4: plasmid digested with *Kpn* I and *Sma* I. Lane 5: DNA ladder (marker).

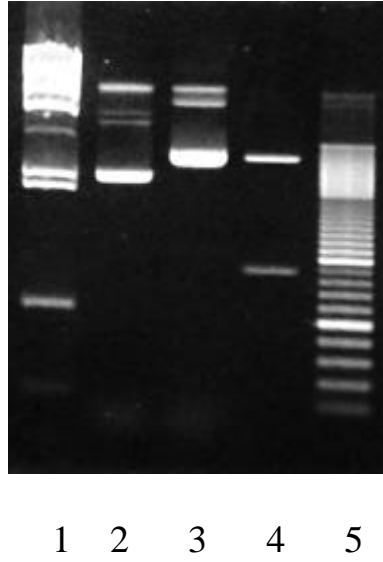


Figure 12

Confirmation of pGEM-MCA I plasmid by digestion with restriction enzymes. Lane 1: *Hind III* marker. Lane 2: pGEM-MCA I. Lane 3: plasmid digested with *Hind III*. Lane 4: plasmid digested with *Hind III* and *Bam HI*. Lane 5: DNA ladder (marker).

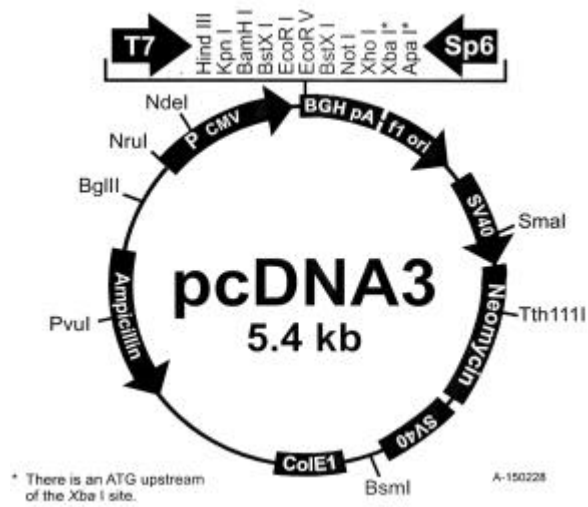
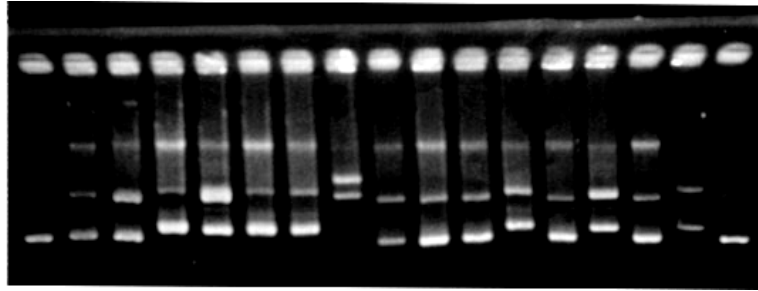
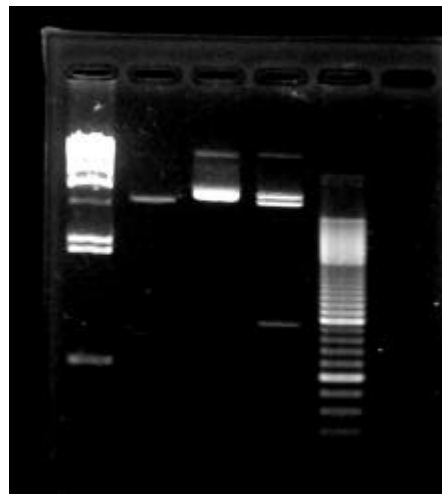


Figure 14. Map of pcDNA3 vector.



1 2 3 4 5 6 7

Figure 15  
Screening of the *E. coli* clones with pcDNA-HCAII plasmid.  
Plasmids prepared from the white *E. coli* colonies were analyzed  
by electrophoresis in 1.2 % agarose gel. Numbers 1, 2, 3, 4, 5, 6,  
and 7 were pcDNA-HCAII plasmids.



1 2 3 4 5

Figure 16

Confirmation of pcDNA-HCA II plasmid by digestion with restriction enzymes. Lane 1: *Hind III* marker. Lane 2: pcDNA-HCA II. Lane 3: plasmid digested with *Eco RI*. Lane 4: plasmid digested with *Xba I* and *Eco RI*. Lane 5: DNA ladder (marker).

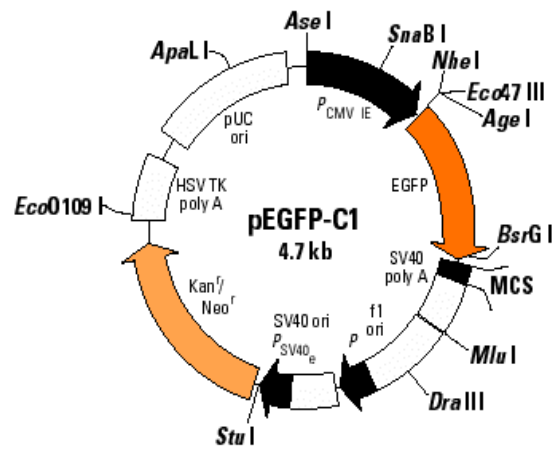


Figure 17. Map of pEGFP-CL vector.

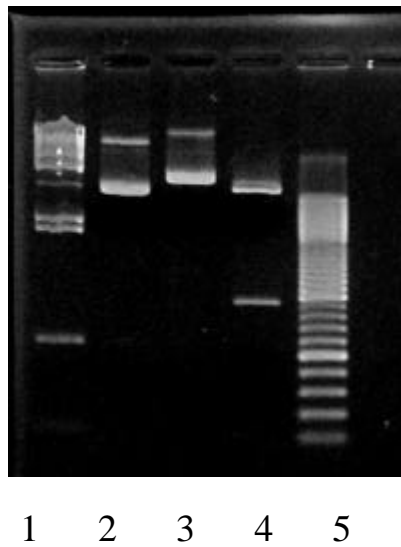


Figure 18  
Confirmation of pEGFP-HCA II plasmid by digestion with restriction enzymes. Lane 1: *Hind III* marker. Lane 2: pEGFP-HCA II. Lane 3: plasmid digested with *Eco R I*. Lane 4: plasmid digested with *Xba I* and *Eco R I*. Lane 5: DNA ladder (marker).

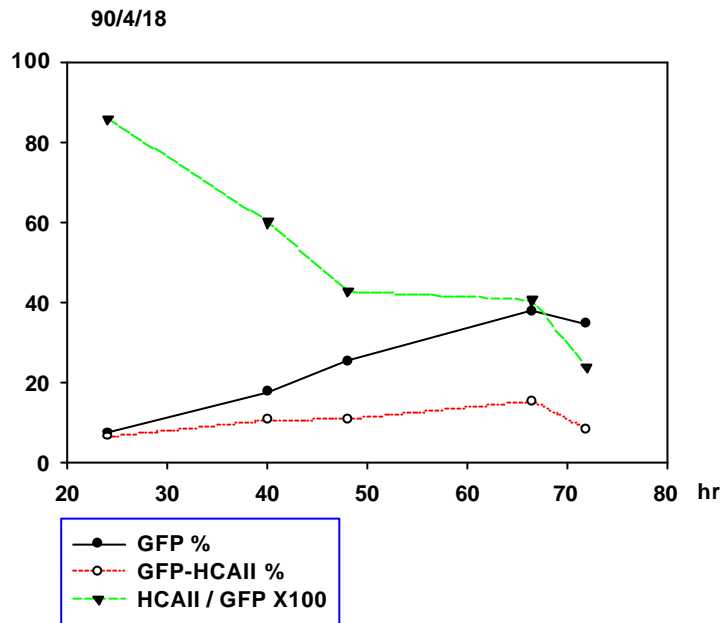


Figure 19

Time course of the numbers of Hep 3B cells transfected with GFP-HCA II. Hep 3B cells were transfected with GFP-HCAII or GFP plasmids, and the percentage of cells show green fluorescence were calculated at the indicated time points. The percentage of the cells transfected with GFP-HCA II was further normalized by one of control cells (GFP).



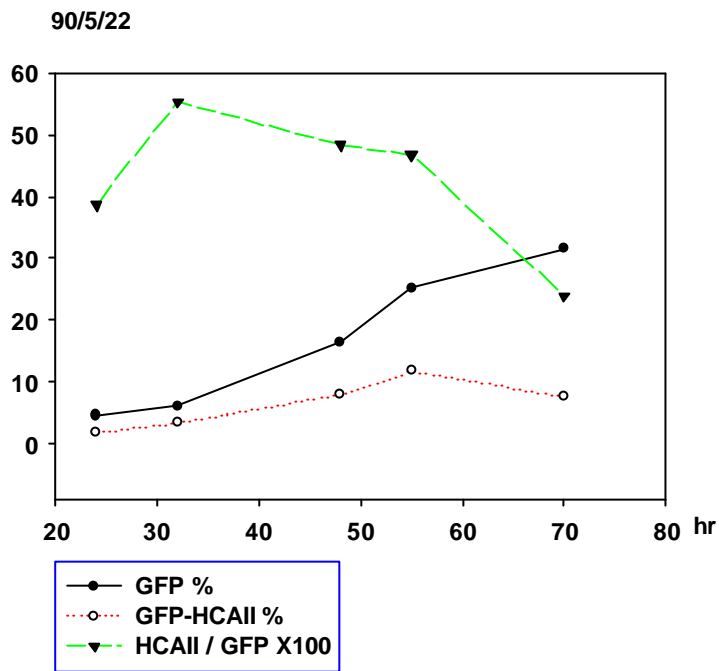


Figure 20

Time course of the numbers of Hep 3B cells transfected with GFP-HCA II. Hep 3B cells were transfected with GFP-HCAII or GFP plasmids, and the percentage of cells show green fluorescence were calculated at the indicated time points. The percentage of the cells transfected with GFP-HCA II was further normalized by one of control cells (GFP).

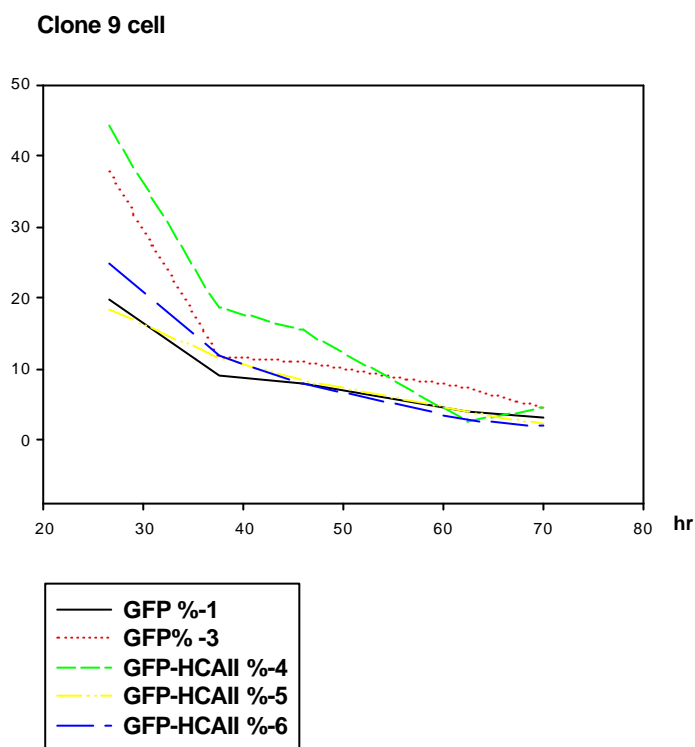


Figure 21

Time course of the numbers of clone 9 cells transfected with GFP-HCA II. Clone 9 cells were transfected with GFP-HCAII or GFP plasmids, and the percentage of cells show green fluorescence were calculated at the indicated time points.

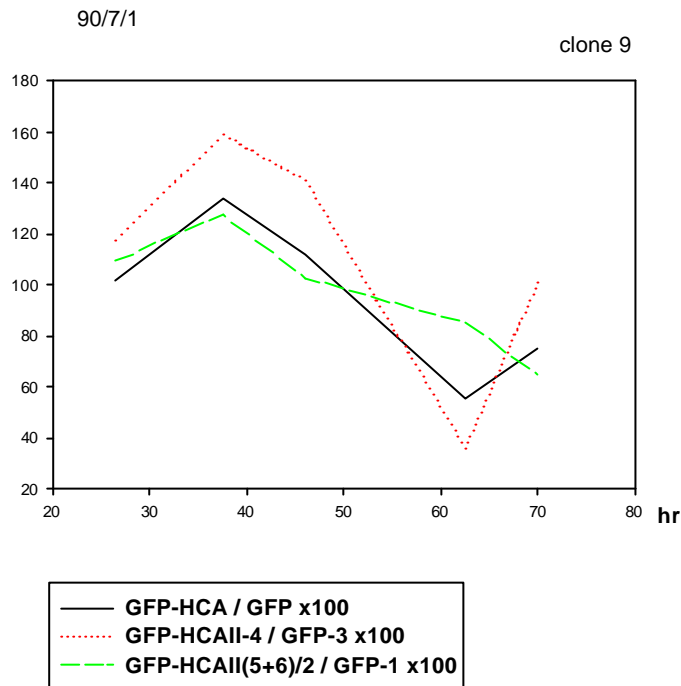


Figure 22

Time course of the numbers of clone 9 cells transfected with GFP-HCA II. Clone 9 cells were transfected with GFP-HCAII or GFP plasmids, and the percentage of cells show green fluorescence were calculated at the indicated time points. The percentage of the cells transfected with GFP-HCA II was further normalized by one of control cells (GFP).

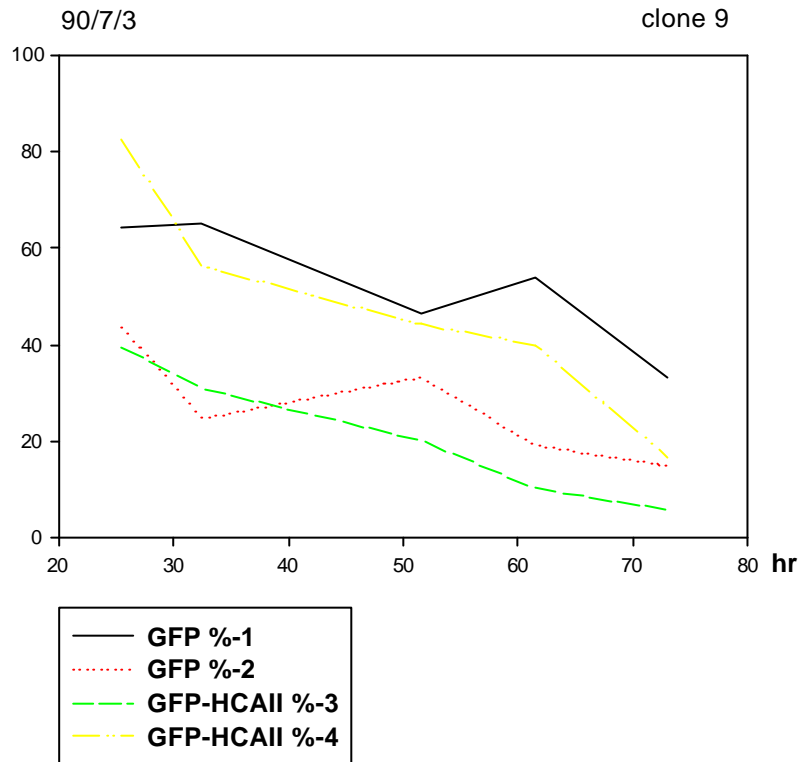


Figure 23

Time course of the numbers of clone 9 cells transfected with GFP-HCA II. Clone 9 cells were transfected with GFP-HCAII or GFP plasmids, and the percentage of cells show green fluorescence were calculated at the indicated time points.

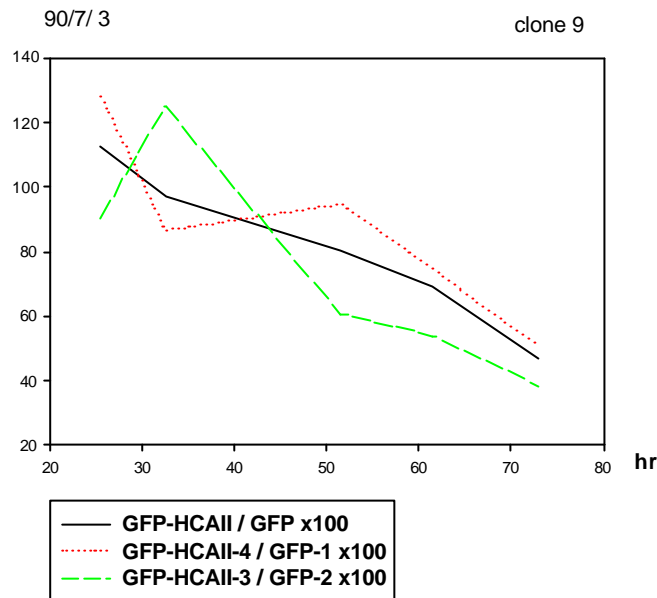
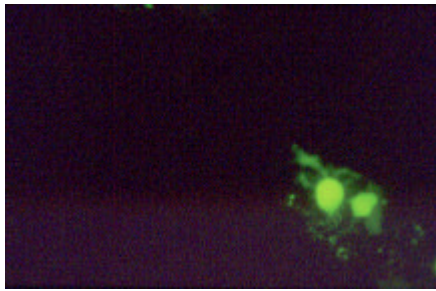


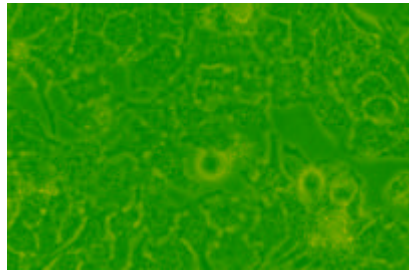
Figure 24

Time course of the numbers of clone 9 cells transfected with GFP-HCA II. Clone 9 cells were transfected with GFP-HCAII or GFP plasmids, and the percentage of cells show green fluorescence were calculated at the indicated time points. The percentage of the cells transfected with GFP-HCA II was further normalized by one of control cells (GFP).

Figure 25. Hep 3B cells transfected with GFP-HCA II.

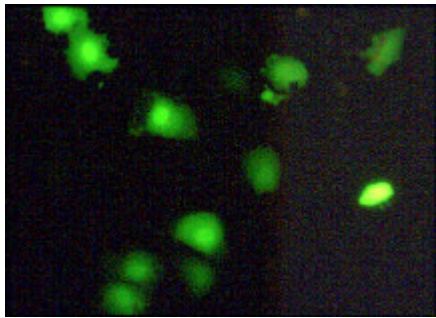


GFP-HCAII (200x)

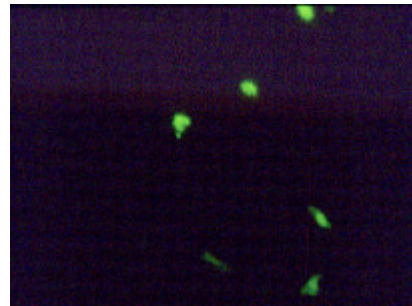


GFP-HCAII (200x)

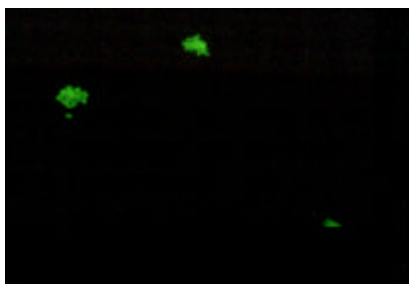
Figure 26. Clone 9 cells transfected with GFP or GFP-HCA II.



GFP (200x)



GFP-HCAII (100x)



GFP-HCAII (100x)

Figure 27. TUNEL assay (Hep 3B cells transfected with GFP-HCA II).

[TUNEL assay (red fluorescence) 200x]

[green fluorescence (200x)]

[light microscopy (200x)]

Figure 28. TUNEL assay (Hep 3B cells transfected with  
GFP-HCA II).

[light microscopy (200x)]



[TUNEL assay (red fluorescence) 200x]

[green fluorescence (200x)]

## VI. Refferences :

- 1 Iverson TM. Alber BE. Kisker C. Ferry JG. Rees DC.  
A closer look at the active site of gamma-class  
carbonic anhydrases: high-resolution crystallographic  
studies of the carbonic anhydrase from  
Methanosarcina thermophila. *Biochemistry*.  
39(31):9222-31, 2000.
- 2 McCall KA. Huang C. Fierke CA. Function and mechanism of zinc  
metalloenzymes. [Review] [115 refs] *Journal of Nutrition*. 130(5S  
Suppl):1437S-46S, 2000.
- 3 Iverson TM. Alber BE. Kisker C. Ferry JG. Rees DC. A closer look at the  
active site of gamma-class carbonic anhydrases: high-resolution  
crystallographic studies of the carbonic anhydrase from *Methanosarcina*  
*thermophila*. *Biochemistry*. 39(31):9222-31, 2000.
- 4 Sly WS. Hu PY. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase  
deficiencies. [Review] [177 refs] *Annual Review of Biochemistry*. 64:375-401,  
1995.
- 5 Parkkila AK. Parkkila S. Serlo W. Reunanen M. Vierjoki T. Rajaniemi H. A  
competitive dual-label time-resolved immunofluorometric assay for  
simultaneous detection of carbonic anhydrase I and II in cerebrospinal fluid.  
*Clinica Chimica Acta*. 230(1):81-9, 1994.
- 6 Parkkila S. Parkkila AK. Juvonen T. Rajaniemi H. Distribution of the carbonic  
anhydrase isoenzymes I, II, and VI in the human alimentary tract. *Gut*.  
35(5):646-50,
- 7 Juvonen T. Parkkila S. Parkkila AK. Niemela O. Lajunen LH. Kairaluoma MI.  
Peramaki P. Rajaniemi H. High-activity carbonic anhydrase isoenzyme (CA II)  
in human gallbladder epithelium. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*.  
42(10):1393-7, 1994.
- 8 Henry RP. Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and  
metabolism. [Review] [108 refs] *Annual Review of Physiology*. 58:523-38,  
1996.

- 9 Cabisco E. Levine RL. Carbonic anhydrase III. Oxidative modification in vivo and loss of phosphatase activity during aging. *Journal of Biological Chemistry*. 270(24):14742-7, 1995.
- 10 Williams RJ. Energised (entatic) states of groups and of secondary structures in proteins and metalloproteins. [Review] [76 refs] *European Journal of Biochemistry*. 234(2):363-81, 1995.
- 11 Saarnio J. Parkkila S. Parkkila AK. Waheed A. Karttunen T. Sly WS. Cell-specific expression of mitochondrial carbonic anhydrase in the human and rat gastrointestinal tract. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 47(4):517-24, 1999.
- 12 Kivela J. Parkkila S. Parkkila AK. Leinonen J. Rajaniemi H. Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI. [Review] [64 refs] *Journal of Physiology*. 520 Pt 2:315-20, 1999.
- 13 Kivela J. Parkkila S. Parkkila AK. Rajaniemi H. A low concentration of carbonic anhydrase isoenzyme VI in whole saliva is associated with caries prevalence. *Caries Research*. 33(3):178-84, 1999.
- 14 Kivela J. Parkkila S. Waheed A. Parkkila AK. Sly WS. Rajaniemi H. Secretory carbonic anhydrase isoenzyme (CA VI) in human serum. *Clinical Chemistry*. 43(12):2318-22, 1997.
- 15 Parkkila S. Parkkila AK. Lehtola J. Reinila A. Sodervik HJ. Rannisto M. Rajaniemi H. Salivary carbonic anhydrase protects gastroesophageal mucosa from acid injury. *Digestive Diseases & Sciences*. 42(5):1013-9, 1997.
- 16 Kivela J. Parkkila S. Metteri J. Parkkila AK. Toivanen A. Rajaniemi H. Salivary carbonic anhydrase VI concentration and its relation to basic characteristics of saliva in young men. *Acta Physiologica Scandinavica*. 161(2):221-5, 1997.
- 17 Parkkila S. Parkkila AK. Kaunisto K. Waheed A. Sly WS. Rajaniemi H. Location of a membrane-bound carbonic anhydrase isoenzyme (CA IV) in the human male reproductive tract. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 41(5):751-7, 1993.
- 18 Fleming RE. Parkkila S. Parkkila AK. Rajaniemi H. Waheed A. Sly WS. Carbonic anhydrase IV expression in rat and human gastrointestinal tract regional, cellular, and subcellular localization. *Journal of Clinical Investigation*. 96(6):2907-13, 1995.
- 19 Pastorekova S. Parkkila S. Parkkila AK. Opavsky R. Zelnik V. Saarnio J. Pastorek J. Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts. *Gastroenterology*. 112(2):398-408, 1997.

- 20 Saarnio J. Parkkila S. Parkkila AK. Haukipuro K. Pastorekova S. Pastorek J. Kairaluoma MI. Karttunen TJ. Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation. [see comments]. *American Journal of Pathology*. 153(1):279-85, 1998.
- 21 Liao SY. Brewer C. Zavada J. Pastorek J. Pastorekova S. Manetta A. Berman ML. DiSaia PJ. Stanbridge EJ. Identification of the MN antigen as a diagnostic biomarker of cervical intraepithelial squamous and glandular neoplasia and cervical carcinomas. *American Journal of Pathology*. 145(3):598-609, 1994.
- 22 McKiernan JM. Buttyan R. Bander NH. Stifelman MD. Katz AE. Chen MW. Olsson CA. Sawczuk IS. Expression of the tumor-associated gene MN: a potential biomarker for human renal cell carcinoma. *Cancer Research*. 57(12):2362-5, 1997.
- 23 Tureci O. Sahin U. Vollmar E. Siemer S. Gottert E. Seitz G. Parkkila AK. Shah GN. Grubb JH. Pfreundschuh M. Sly WS. Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95(13):7608-13, 1998.
- 24 Karhumaa P. Parkkila S. Tureci O. Waheed A. Grubb JH. Shah G. Parkkila A. Kaunisto K. Tapanainen J. Sly WS. Rajaniemi H. Identification of carbonic anhydrase XII as the membrane isozyme expressed in the normal human endometrial epithelium. *Molecular Human Reproduction*. 6(1):68-74, 2000.
- 25 Tureci Ö Sahin U. Vollmar E. Siemer S. Göttert E. Seitz G. Parkkila A. Shah GN. Grubb J. H. Pfreundschuh M. Sly WS. Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc. 95(3):7608-7613, 1998.
- 26 Sly WS. Grubb JH. Shah G. Tureci O. Rajaniemi H. Expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase isozyme XII in normal human gut and colorectal tumors. *American Journal of Pathology*. 156(2):577-84, 2000.
- 27 Saarnio JM. Parkkila S. Parkkila AK. Haukipuro K. Pastoreková S. Pastorek J. Kairaluoma MI. Karttunen TJ. Immunohistochemical Study of Colorectal Tumors for expression of a novel trans membrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation. *American Journal of Pathology*. 153(4):279-285, 1998.

- 28 Mori K. Ogawa Y. Ebihara K. Tamura N. Tashiro K. Kuwahara T. Mukoyama M. Sugawara A. Ozaki S. Tanaka I. Nakao K. Isolation and characterization of CA XIV, a novel membrane-bound carbonic anhydrase from mouse kidney. *Journal of Biological Chemistry*. 274(22):15701-5, 1999.
- 29 Botre F. Gros G. Storey BT. *Carbonic anhydrase: From Biochemistry and Genetics to Physiology and Molecular Genetics*. New York: Plenum. 1991.
- 30 Christianson DW. Cox JD. Catalysis by metal-activated hydroxide in zinc and manganese metalloenzymes. [Review] [85 refs] *Annual Review of Biochemistry*. 68:33-57, 1999.
- 31 Tashian RE. The carbonic anhydrases: widening perspectives on their evolution, expression and function. [Review] [42 refs] *Bioessays*. 10(6):186-92, 1989.
- 32 Cameron JN. Excretion of CO<sub>2</sub> in water-breathing animals: a short review. *Marine of Biological Letter*. 1:3-13, 1979
- 33 Liljas A. Hakansson K. Jonsson BH. Xue Y. Inhibition and catalysis of carbonic anhydrase. Recent crystallographic analyses. [Review] [69 refs] *European Journal of Biochemistry*. 219(1-2):1-10, 1994.
- 34 Gay CV. Role of microscopy in elucidating the mechanism and regulation of the osteoclast resorptive apparatus. [Review] [74 refs] *Microscopy Research & Technique*. 33(2):165-70, 1996.
- 35 Sundaram V. Rumbolo P. Grubb J. Strisciuglio P. Sly WS. Carbonic anhydrase II deficiency: diagnosis and carrier detection using differential enzyme inhibition and inactivation. *American Journal of Human Genetics*. 38(2):125-36, 1986.
- 36 Sundaram V. Rumbolo P. Grubb J. Strisciuglio P. Sly WS. Carbonic anhydrase II deficiency: diagnosis and carrier detection using differential enzyme inhibition and inactivation. *American Journal of Human Genetics*. 38(2):125-36, 1986.
- 37 Kiechle FL. Diagnostic molecular pathology in the twenty-first century. [Review] [84 refs] *Clinics in Laboratory Medicine*. 16(1):213-22, 1996.
- 38 盧秀琴. 接種肉瘤細胞(Sarcoma 180)老鼠各臟器之蛋白質及 gelatinase 活性變化分析. 私立中山醫學院生化研究所碩士論文, 135, 1999
- 39 Parkkila S. Rajaniemi H. Parkkila AK. Kivela J. Waheed A. Pastorekova S. Pastorek J. Sly WS. Carbonic anhydrase inhibitor suppresses invasion of renal cancer cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(5):2220-4, 2000.
- 40 Parkkila S. Parkkila AK. Juvonen T. Lehto VP. Rajaniemi H. Immunohistochemical demonstration of the carbonic anhydrase isoenzymes I

- and II in pancreatic tumours. *Histochemical Journal*. 27(2):133-8, 1995.
- 41 Kairaluoma MI. Karttunen TJ. Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation. [see comments]. *American Journal of Pathology*. 153(1):279-85, 1998.
- 42 Kivela A. Parkkila S. Saarnio J. Karttunen TJ. Kivela J. Parkkila AK. Waheed A. Sly WS. Grubb JH. Shah G. Tureci O. Rajaniemi H. Expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase isozyme XII in normal human gut and colorectal tumors. *American Journal of Pathology*. 156(2):577-84, 2000.
- 43 Nogradi A. The role of carbonic anhydrases in tumors. [letter; comment]. *American Journal of Pathology*. 153(1):1-4, 1998.

## 摘要

Glutathione S-transferase ( GST ) 體內的解毒酵素在化學預防中扮演了重要的角色。由於當某些癌症形成時，GST pi form 有明顯的大量表現，而治療癌症時 GST alpha form 又與藥物產生抗藥性有關，所以使用天然藥物能降低(抑制)GST pi 及 GST alpha form 的表現，對於治療癌症是有益的，可使得抗癌藥的效果增強而達到治療癌症的目的。

在本實驗中是利用肝癌細胞(Hep G2 3B cell), 以 Western blotting 及 RT-PCR 的方法探討 silibinin , EGCG , PCA , geniposide 等天然藥物對於 Glutathione-S Transferase 基因表現的影響，結果 G2 及 3B 細胞以 EGCG 和 silibinin 處理後，發現 GST alpha mRNA 的量都是下降的, 且 GST mu mRNA 的量是上升的(3B 細胞)。另外以 silibinin 處理，GST alpha mRNA 的量呈現 dose-dependent , time-dependent。

所以初步認為 silibinin 在預防及治療癌症上是不錯的天然藥物。進一步還須合併抗癌藥，證明 silibinin 的確可以幫助癌症的治療。

## Abstract

Glutathione S –transferases are detoxifying enzymes and play important roles in chemoprevention. However, the expression of GST pi subunits were linked to the development of several cancers, and the increases in GST alpha subunits were related to the drug-resistance of cancers. Therefore, a compound that could decrease the expression of GST pi or alpha would be beneficial in treating cancers, such as enhancing the efficiency of anticancer drugs by decreasing drug-resistance.

In this study, we tested the effect of several natural compounds, including silibinin, EGCG, PCA and geniposide on the gene expressions of GST subunits. Using Western blotting and RT-PCR analyses, we found that the treatment of EGCG and silibinin on hepatoblastoma cells (Hep G2 and 3B) reduced the mRNA levels of GST alpha in both cell lines, and increased the transcripts of GST mu in 3B cells. The reduction of GST alpha mRNA level by silibinin was dose- and time-dependent.

These results suggested that silibinin would be advantageous in cancer treatment.

Further study using combination of silibinin and anticancer drug will be needed to demonstrate the actual effect of the compound in helping cancer treatment.



## I. 背景簡介

### 一、GST 的簡介

Glutathione-S-transferase (GSTs)屬於 supergene family，是數量豐富的 protein，為可溶性的、dimer 的形式。每一個 subunit 都含有 active sites 可以結合 glutathione 和 hydrophobic ligands，可以對抗內生性或外生性的化學物質(1、2、3)。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，例如：heme、bilirubin、polycyclic aromatic compounds 及 dexamethasone (4)，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 和多種內生性或外在的活化型化學物結合，進而進入 mercapturic acid 路徑加以代謝 (5、6)，以保護細胞免受傷害。

#### 1. 分類與命名：

人類的 GST 分為五個 class，有 Alpha (A)，mu (M)，pi (Pi)，theta (T) (7、8)，和一個新的 class zeta (Z)(9)，Alpha form 的 subfamily 又分為 A1，A2，A3，A4，分子量約為 25.6~26 kDa 之間。A1 與 A2 主要出現的組織是肝臟。Mu (M1)的 subfamily 有 M1 (M1a、M1b)，M2，M3，M4，M5，分子量約為 26 左右，M1 主要出現的組織是肝臟。Pi form 的 subfamily 為 P1 (P1a、P1b、P1c、P1d)分子量為 23 左

右，主要出現的組織是腦。Theta 的 subfamily 為 T1 和 T2，分子量為 27kDa，主要出現的組織是腎。

Rat 的分類及命名為：Alpha form 的 subfamily 分為 rGSTA1 (Ya1), rGSTA2 (Ya2), rGSTA3 (Yc1), rGSTA4 (Yk), rGSTA5 (Yc2)。 Mu (M1)的 subfamily 有 rGSTM1 (Yb1), rGSTM2 (Yb2), rGSTM3 (Yb3), rGSTM4 (Yb4), rGSTM5 (Yn2), rGSTM6 (Yo)。 Pi form 的 subfamily 為 rGSTP1 (Yf, Yp)。 theta form 的 subfamily 為 rGSTT1, rGSTT2, rGSTT3。

Mouse 的分類及命名為：Alpha form 的 subfamily 為 mGSTA1 (Ya1), mGSTA2 (Ya2), mGSTA3 (Yc), mGSTA4 (Yk)。 Mu form 的 subfamily 為 mGSTM1 (Yb1), mGSTM2 (Yb2), mGSTM3(Yb3), mGSTM4(Yb5), mGSTM5(Yb4)。 Pi form 的 subfamily 為 mGSTP1(Yf1), mGSTP2 (Yf2)。 Thetam form 的 subfamily 為 GSTT1, mGSTT2 (Yrs)(10, 11)。

## 2. 催化功能：

GST 主要扮演解毒的角色，GST 可催化一般的反應：

$$\text{GSH} + \text{R-X} \xrightarrow{\text{GST}} \text{GSR} + \text{HX}$$
  
GST 的功能就是將 substrate 帶入靠近 GSH，然後活化 GSH 的 sulfhydryl group，使得 GSH 和親電性的 substrate (xenobiotics) 結合，而使 substrate 不活化，同時促進

它們排出體外(12)。GST 的 substrates 有很多種，如環境中的 carcinogens 或 toxicants 包括 aromatic 和 aliphatic organic compounds，如 Benzo(a)pyrene (BPDE)，aflatoxin B (AFB)，epoxide ring openings，nucleophilic aromatic substitution, peroxidase, ， -unsaturated aldehydes 和 ketones。對所有的 GST 而言，CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzen); DCNB (1,2-dichloro-4-nitrobenzene)可以當作是所有標準的 substrate，唯有 GST theta 不能催化這些反應(13)。

因著 GST 的催化，GSH 的 cysteine 會和親電性 substrate 形成 thioether bond，結果造成了更低的反應和更多水溶性的物質，所以 GST 通常扮演解毒功能。GST 的解毒功能會因為在標的器官和物種表現專一性的 isoform 的不同，而顯得更重要。例如：持續表現 mGSTA3-3 會抵抗 aflatoxin B1 (AFB)(14)；hGSTP-1 可以有效的解毒 benzo(a)pyrene (BPDE)(15)；hGSTM1-1 可以獨特的結合 stilbene oxide (TSO)(16)。

### 3. GST 的抑制劑：

到目前為止，in vivo 活化的 GSTs inhibitors 是 ethacrynic acid 和許多源自 glutathione 的結構(17)。In vitro 的 inhibitors 包括 ethacrynic acid 和 antibiotic calvatic acid，curcumin，haloenol lactone, disulfiram 和 organotin compounds(18)。

#### 4. GST 的轉錄調節和誘導：

細胞質 GST 的調節受至於內生性和外生性的參數，內生性的參數包括發育，性和組織專一性因子；外生性的參數 xenobiotics，包含 polycyclic aromatic hydrocarbons，phenolic antioxidants，isothiocyanates，glucocorticoids(7)。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。Rat GSTA2 上游基因 gene 包含一個 GRE (glucocorticoid-response element)，一個 XRE (xenobiotic-response element)和一個 ARE (antioxidant-response element)(7)。Glucocorticoids 如：dexamethasone 可以經由 GRE 誘導，而 aromatic hydrocarbons 如：dioxin 可以經由 XRE 誘導 GST，另外 phenolic antioxidants 如：BHA 可以經由 ARE 誘導 GST(19)。

#### 5. GST 的特性：

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，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、酵素方面等特異性都很類似(20)。

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 主要分佈在心臟、肝臟 (21)；至於 pi GST 在正常的情形下，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，但是都偵測不到 GST-P (22)。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，尤其是化學的致癌作用，GST-P 會很明顯且大量的表現 (23)。

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 (24、25、26)。就 alpha 族 GST 的研究，多注重於其抗藥性方面，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 (27、28、29)。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 (30)。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聯。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 (31)。

#### 6. 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，故進來有許多研究皆偏向於 chemoprevention 的方向，希望藉此提高 GST 活性，以增加細胞之抗癌效果，進而達到 chemoprevention 之目的(32)。

## 二、Silibinin 的簡介

Silymarin 源自 milk thistle (*silybum marianum*)植物。*Silybum marianum* 屬於 Aster family 的一員，包含雛菊和薊(thistle)(33)。thistle (薊)，為蘇格蘭的國花，通常為木植，莖、葉、外皮有刺，開紫色球形頭狀花。milk thistle 生長在有陽光且排水良好的地方(34)。

Silymarin 被用來天然的治療肝及膽道的疾病已有兩千年之久，自古希臘一位植物學家記載，milk thistle seeds 之茶可以治療蛇毒咬傷(35)。一五九六年，Gerarde 認為 milk thistle 是抗習慣性憂鬱和黑膽很好的治療藥(34)。在一七八七年，Culpepper 注意到 milk thistle 是治療肝脾極好的治療藥(35)。而目前 silymarin 在臨床上的應用可以有效的改善急性和慢性的病毒性肝炎、酒精性肝炎、毒素所引起的肝炎、cirrhosis、ischemic injury 及放射性的毒害(36、37、38)。

Milk thistle 的活性萃取物是 silymarin，是 flavonolignans (包含 silydianin, silychristine 和 silybin)的混合物(39、40)。silymarin 的濃度在植物的果實或種子、球根、塊莖的地方最多，傳統上用 95% 的 ethyl alcohol 萃取，會產生黃棕色的液體，所以命名為 flavonoid，意義是指黃色(34、41)。

Silymarin 的功能：silymarin 和它的活性組成分子 silybin 被報

告出擔任抗氧化的工作，清除自由基和抑制脂質過氧化。silybin 可以快速的和自由基作用(OH-和 HOCL)(42)，和抑制 hepatocyte、microsomal 和紅血球膜上的脂質過氧化(43、44)，穩定肝細胞膜(45、46)。Silybin 可以藉於刺激 ribosomal RNA polymerase 增加肝細胞蛋白的合成(47)，silybin 可以降低肝和粒腺體 glutathione 的氧化(48)。它可降低 tumor promoter 的活化(49)和 mast cell 的穩定(抗發炎)(50)，保護身體免於遺傳的傷害。

Silybinin 的結構如圖 1。

### 三、EGCG 的簡介

茶多酚為各種茶葉中非常重要的成分。一般將茶中多酚類成分區分為四大類，即 flavanols、flavonols、leucoanthocyanins、phenolic acid。而 flavanols 又稱兒茶素類(catechin)，是茶葉中最主要的多酚類，約佔多酚類總量 75-80%，所以一般描述的茶多酚，指的就是兒茶素類(catechin)。六種主要的兒茶素類分別是：(-)-epigallocatechin gallate (EGCG)、(-)-epigallocatechin (EGC)、(-)-epicatechin gallate (ECG)、(-)-epicatechin (EC)、(+)-gallocatechin (GC) 和 (+)-catechin(C)。

茶多酚有抗發炎作用，抗菌作用，抑制 lipid peroxidation。茶多酚作用機制有五大類：一、茶多酚具有抗氧化能力，能將細胞內過多的自由基清除(58 59)。二、茶多酚抑制 nitrosation 的反應 N-nitroso compounds 的量直接影響腫瘤的形成(60)，而茶多酚會與 nitrosating species 發生反應，因此降低了 N-nitroso compounds 的形成(61)。三、茶多酚可抑制 microsomal monooxygenase 的活性(62)，因此降低了 carcinogenes 的活化。四、茶多酚可直接與某些 carcinogenes 發生反應，因此降低了 carcinogenes 的 level。五、茶多酚可直接抑制癌細胞的增殖。目前的了解是茶多酚可藉由抑制 ornithine decarboxylase，protein kinase C，reverse transcriptase，DNA TOP II，urokinase 等酵素的活性或抑制細胞內其它訊息傳遞路徑，而降低癌細胞的增殖(63、64、65、



66)。

EGCG 的結構如圖 2。

#### 四、原兒茶酸(protocatechuic acid : PCA)的簡介

原兒茶酸(protocatechuic acid : PCA)廣佈於蔬菜、水果和胡桃中，為一結構簡單的多酚類化合物，是從 *Hibiscus sabdariffa L.* 中所分離出來的，在中醫上用來解熱及治療高血壓、肝疾病。雖然對其藥理及生化效應並不清楚，但已有報告指出原兒茶酸具有很強的抗氧化能力(51)，而生化所其它研究室過去在洛神花成分及活性分析中亦發現並證實其具有清除自由基的能力，對於 t-BHP 引起之鼠肝細胞毒性具有保護作用(52)。

先前已有人證明存在於水果蔬菜與核果中的 PCA 可以有效降低 diethylnitrosamine 對肝臟(53)、4-nitroquinoline 1-oxide 對口腔(54)、azoxymethane 對直腸(55)、N-methyl-N-nitrosurea 對胃腺體組織(56)與 N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine(BBN)對膀胱(57)造成的致癌效應。但是 PCA 抑制化學致癌物質的機制仍是未知。

PCA 的結構如圖 3。

## 五、去氫梔子甘(geniposide)簡介

去氫梔子甘是梔子中之主要成分，為 iridoid 型之配醣體(67)；梔子為茜草科 Rubiaceae 植物，多分佈於印度之那、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，尤其在中藥方劑多達 47 個。

就 geniposide 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 geniposide 在動物體內胃腸消化系統中可被轉化成其去醣體(68)，同時有證據顯示其藥理作用可能來自其去糖體(69)；另外也有報告證實 geniposide 具有利膽作用，以胃管灌食老鼠，發現 geniposide 能刺激膽汁之分泌，但以腹腔注射則不具有此作用(70、71、72)；也有研究顯示 geniposide 經由人體的腸內細菌代謝後會形成一種新物質- genipinine (73)，這是各含有 nitrogen 的化合物。至於 geniposide 在生理生化功能上所扮演的角色則仍不清楚。

至於毒性研究方面，當老鼠以高劑量(320mg/kg)餵食，24 小時後血清中轉氨酵素會顯著的上升，同時肝中 GSH 含量亦隨之下降(74)；也有報告指出以 geniposide 餵食老鼠，會有肝毒性的現象(75)。但另一方面，也有保肝作用的研究報告指出，以 geniposide(240mg/kg)連續處理三天，其肝中結合性酵素如  $\alpha$ -naphthol-glucuronosyl-transferase 及 Glutathione-S-transferase 之活性會顯著增加，也有研究證實，當老鼠以 0.1g/kg/day 的 geniposide 連續餵食四天後，其肝中 glutathione 及 GST 之活性皆有增加(76)。

最近的研究證實 geniposide 對於 aflatoxin B1 所導致的肝毒性及基因毒性有一定的抑制作用(77、78)。另外研究證實 geniposide 對於 TPA 促癌化作用有抑制效果(79)。亦可降低因為高量輻射所造成的傷害。

Geniposide 的結構如圖 4。

Figure 1. Structure of silibinin.



Figure 2. Structure of epigallocatechin gallate (EGCG).

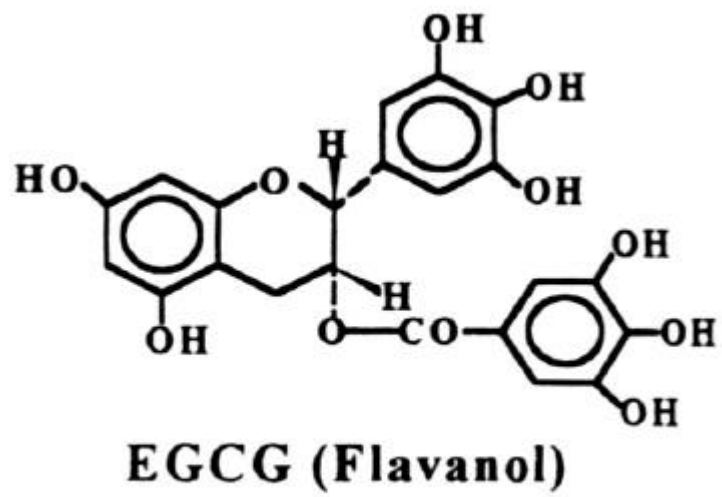


Figure 3. Structure of protocatechuic acid (PCA).

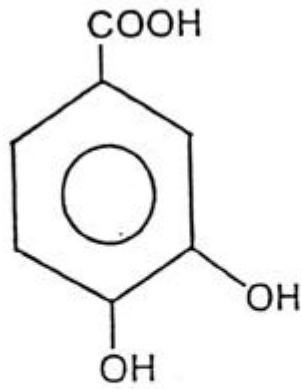
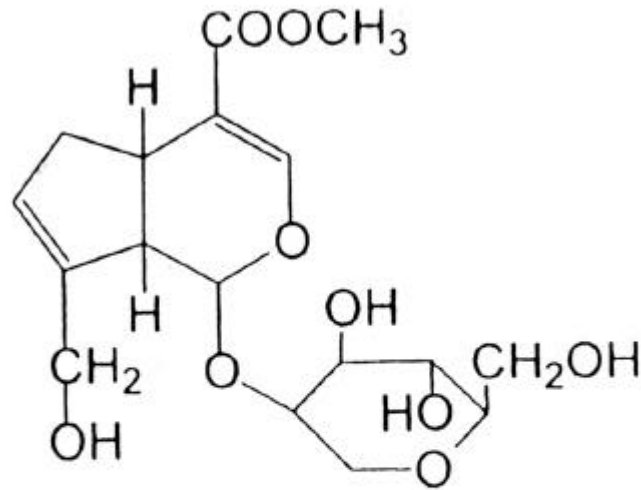


Fig.3 Protocatechuic acid (PCA)的結構

Figure 4. Structure of geniposide.



Structure of geniposide.



## II. 研究動機

由於科技的發展，生活的提昇，以致許多工業的升級，帶來的結果使的生物體接觸致癌物的機會增加，相同的癌症的發生率也漸漸的提昇，所以許多科學家致力於尋找抗癌藥物的研究。而在大自然中植物是最好而且無副作用的治病材料，所以科學家希望能由天然物中單離萃取其中的成分分析，以找出具有抗癌、防癌效果的物質，以提昇細胞的生理活性，或降低對治療癌症的抗藥性，進一步達到化學預防（chemoprevention）或治療癌症之效果。

而在體內的解毒酵素則在化學預防中扮演了重要的角色，最普遍存在體內就是 Glutathione S-transferase (GST), GST 存在體內的許多地方，量最多的就是在肝，它能使體內的毒素經由酵素催化後變成無毒的物質排出體內，所以我們想探討經由一些天然物的刺激來觀察其 GST 表現之機制。

在本實驗中則是利用 Hep G2、3B cell (肝癌細胞)，探討 silibinin, EGCG, PCA, geniposide 對於 Glutathione-S Transferase 基因表現的影響，是否能提高 GST mu 的量？或降低對抗癌藥有抗藥性 GST alpha 的量？以達到化學預防（chemoprevention）或治療癌症之效果。

### III. 實驗方法

#### 一、Western blotting

##### 1.sample:

將 sample 定量後，取 15  $\mu$ g 或 20  $\mu$ g 蛋白質，加上 5 倍的 protein loading dye，混合均勻，煮 5~10 分鐘，使蛋白質變性，煮完後放冰上。

##### 2.gel:

下層膠依蛋白質分子量不同，而泡不同的下層膠；分子量 29kDa 的左右，泡 12%~13% 的膠，上層膠為 5%。

##### 3.running:

上層用 130V，下層用 150V。

##### 4.transfer:

中片膠之 transfer，使用 nitrocellulose membrane [Hybond<sup>TM</sup> ECL<sup>TM</sup>] 條件為 100mA(16-17 hr)或 400mA(4 hr)。

##### 5.blocking:

5% 的脫脂奶粉加上 0.1% 的 Twell-20，溶於 1 倍之 PBS buffer，blocking 的時間為 1~12 小時，轉速為 50rpm。

##### 6.washing:

使用 1 倍之 PBS buffer，含 0.1% 的 Tween-20，washing 3 次，時間間隔為 5 分鐘、10 分鐘、15 分鐘。

##### 7.first-Ab:

-actin 之 Ab , CA I,II 之 Ab (1:1000)或 GST 、  $\mu$ 、 之 Ab (1:1000) , 溶於 1 倍之 PBS buffer 含 0.1% 的 Tween-20 , 時間 1~2 小時 , 轉速 50rpm。

8.washing:

使用 1 倍之 PBS buffer , 含 0.1% 的 Tween-20 , washing 3 次 , 時間間隔為 5 分鐘、 10 分鐘、 15 分鐘。

9.secondary Ab:

anti-mouse Ab (1:2000) ; anti-rabbit Ab (1:2000)溶於 1 倍之 PBS buffer 含 0.1% 的 Tween-20 , 時間 1~2 小時 , 轉速 50rpm。

10.washing:

使用 1 倍之 PBS buffer , 含 0.1% 的 Tween-20 , washing 3 次 , 時間間隔為 5 分鐘、 10 分鐘、 15 分鐘。

11.壓片或呈色:

壓片將 ECL 之 reagent (ENHANCED LUMINOL:OXIDIZING =1:1)混合倒在 membrane 上 , 拿底片進暗房壓片;呈色用 0.3% 的 DAB 加上 10ml 的 substrate buffer(Tris+NaCl) + 5 的 30% $H_2O_2$  , 直接在膜上呈色。

\*Western blotting 之試藥配製:

(1). running buffer (1X,1L):

Glycine	15.18 g
Tris-base	3.18 g
SDS	1.06 g
<hr/>	
ddH <sub>2</sub> O 加至	1L

(2). Transfer buffer (1X,1L):

Glycine	11.25 g
Tris-base	2.43 g
methanol	200ml
<hr/>	
ddH <sub>2</sub> O 加至	1L

(3). PBS (1X,1L):

NaCl	8 g
g	
KCl	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g
ml	
or (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O) 3.632 g	
0.3 ml	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g
<hr/>	
ddH <sub>2</sub> O 加至	1L

調 pH 為 7.4

(4). protein loading buffer (5X,10ml):

DTT(Dithiothreitol)	0.77
g	
SDS	1 g
1M Tris-HCl (PH6.8)	4
ml	
0.5% Bromophenol blue	
100% glycerol	5 ml
<hr/>	
total	10 ml

稱 Bromophenol blue 0.0025 g 溶

於 0.5ml ddH<sub>2</sub>O , glycerol 最後加。

(5). western 之 washing buffer:

1X PBS
0.1% Tween-20

(6).blocking solution 5%

脫脂牛奶	5 g
Tween-20	100 µl

---

1X PBS	100 ml
total	100 ml

(7). SDS-PAGE staining dye  
( 0.1% coomassie blue)

(8). transfer 完後之紅色染液

coomassie blue G-250	1 g	0.5% Ponceaus S
Acetic acid	100 ml	0.5% acetic acid
methanol	400 ml	TBS 1 L
ddH <sub>2</sub> O	500 ml	tween-20 1 ml
<hr/>		
total	1000 ml	

待 coomassie blue 溶解後，過濾。

(9). TBS

Tris-base	24.2 g
NaCl	80 g
<hr/>	

調 pH 為 7.6

(10). Acrylamide(30%) , 100ml

Acrylamide	29.2g
Bis	0.8g

## 二、細胞培養

1. Hep 3B: Human hepatocellular carcinoma cells

所需要的培養基為 DMEM + 10% FBS + 1% PSN + 1% sodium pyruvate + 1% non essential amino acids。培養在 5% CO<sub>2</sub> 培養箱，細胞 subculture 至 10cm 的 dish，至 8 分滿時，加藥處理，經 12 小時收細胞，做實驗( Western blotting or RT-PCR)。

## 2. Hep G2: Human hepatoblastoma cells

所需要的培養基為 DMEM + 10% FBS + 1% PSN + 1% non essential amino acids。培養在 5% CO<sub>2</sub> 培養箱，細胞 subculture 至 10cm 的 dish，至 8 分滿時，加藥處理，經 12 小時收細胞，做實驗( Western blotting or RT-PCR)。

### \*細胞培養之注意事項：

(1). 血清瓶的處理：首先泡在 0.1-0.05N 的 HCl 的溶液裏，24 小時後用清潔劑刷洗乾淨後滅菌，用濕滅的方式(121<sup>0</sup>C，30 分鐘，15 lb.)，之後烘乾，蓋子與瓶子分別用錫箔紙包好。瓶子拿去乾滅(200<sup>0</sup>C，4hr)，而蓋子再濕滅烘乾。

(2). 配製 DMEM 培養基：準備 1800ml 的 ddH<sub>2</sub>O，加上二包的 DMEM，再加上 NaHCO<sub>3</sub> [7.4 g (3.7 g/1L)]，調 pH 值為 7.2~7.4，過 millipore 即可。

(3). pipette 的處理：

第一天-將棉花沖走，放於洗 pipette 的筒子，沖洗至隔夜。

第二天-用 dH<sub>2</sub>O 加清潔劑，於超音波的機器震 30 分鐘，再放入 pipette 的筒子，沖 6 小時或隔夜。

第三天-用 ddH<sub>2</sub>O 於超音波的機器，震 30 分鐘，共兩次，之後烘乾(60°C，隔夜)。

第四天-於 pipette 尾端塞棉花，乾滅(200°C，4 小時)。

### 三.RNA 純化

#### 1. Total RNA 的抽取：

將 3B cells 或 G<sub>2</sub> cells 養在培養皿中至八分滿，換新鮮的培養液，加藥處理，12 小時後收細胞。

首先，吸乾培養液，用冰的 PBS 小心的沖洗兩次，加入 0.5ml 的 Solution D-mercaptoethanol，將細胞 lysis 成黏稠均勻透明狀，將黏稠液吸至研磨管研磨，之後倒入 eppendorf (1.5ml)中，依次加入 2M sodium acetate (pH4.0)[1 : 0.1]、chloroform[1 : 0.2]、phenol(pH4.0)[1 : 1]，1 指 Solution D 的體積。上下混合均勻成同一層狀態，放到冰上靜置一分鐘，重覆這樣的步驟達 20 分鐘，使其能充分作用，最後放到冰上作用 5 分鐘，轉速 12000g、4°C、離 20 分鐘。將上層吸取至另一个新的 eppendorf，以 chloroform 及 phenol (1:1)的混合液和 RNA 水

層(1:1)上下混合，重覆上面混合、靜置、離心步驟，重覆萃取 2~3 次，直到在水層和 phenol 之間沒有看到白白的蛋白質。吸水層到新的 eppendorf，加入同體積的 isopropanol，混合完全，放入-20°C 冰箱中，沉澱二小時或隔夜，之後於 4°C、轉速 12000g 離心 20 分鐘，用 pipette 抽乾液體，加入 0.5ml 的 solution D 溶解 pellet，加入 2 $\mu$ l 的 glycogen，混合均勻，放入-20°C 沉澱，2 小時至隔夜。於 4°C，以轉速 12000g 離心 20 分鐘，用 pipette 抽乾液體，加入 1ml 70%的酒精清洗(pellet 跳起來才表示有洗到)，於 4°C，轉速 12000g 離心 20 分鐘，用 pipette 抽乾液體，倒乾液體，蒸乾 pellet，視 pellet 大小加入適量的 DEPC water 溶解，存放於-20°C 或-70°C 中。

#### \*RNA isolation 試藥的配製

(1). Solution D：4M GNTC [Guanidine Thiocyanate (F.W.118.2)]，25mM sodium citrate pH7.0 (F.W.294.1)，0.5% N-Lanroylsarcosine (Sarcosyl)

(a) 需避光，所以先將容器用錫箔紙包起來。

(b) 倒入 ddH<sub>2</sub>O 約 50ml。

(c) 稱 GNTC 47.28g。

(d) 稱 sodium citrate 0.735g，調 pH7.0。



(e) 稱 sarcosyl 0.5g , 攪拌均勻(會釋熱) , 補 ddH<sub>2</sub>O 至 100ml , 加 100ul 的 DEPC 靜置 2 小時 , 再滅菌。

(2). sodium acetate 2M , pH=4.0

泡好之後 , 再用 DEPC 處理 (0.1~0.2%) 混合均勻 , 靜置 2 小時 , 再滅菌。

(3). DEPC H<sub>2</sub>O : DEPC 的含量為 0.1~0.2%

泡 2 升的 DEPC H<sub>2</sub>O , 用棕色瓶 , 取二次水 2 升 , 加入 2ml 的 DEPC , 上下混合均勻 , 靜置兩小時 , 再滅菌。

2. Total RNA 電泳 :

(1). 1.2% RNA denaturing gel 之製備

稱 0.36g 的 agarose 加 26.1ml DEPC 水 , 加熱至沸騰 , 冷卻至約 60°C , 加入 3ml 10X MOPS , 0.9ml 37% formamide , 混合均勻之後 , 使其冷卻至手可碰觸之溫度 , 倒膠 , 當天使用。

(2). RNA 樣本的處理

取 2.22 $\mu$ l RNA (2 $\mu$ g /  $\mu$ l) , 加入 7.78 $\mu$ l RNA-denaturing buffer , 震盪均勻 , 在 55°C 的水浴槽 , 作用 15 分鐘 , 馬上置於冰上 , 再短暫離心後 , 加上 1.1 $\mu$ l 的 RNA Loading buffer (10X)。

(3). 跑膠

將 11.1 $\mu$ l 的 RNA sample 注入齒槽中 , 倒入 1X running buffer ,

以 100 伏特跑半小時左右，以拍立得照相機於紫外線的照射下拍攝 RNA 的電泳圖。

\*Total RNA 電泳試藥的配製：

(a). 1X 的 running buffer：

315ml 的 DEPC water + 35ml 的 10X MOPS

(b). 6X 的 loading buffer：

0.25% bromophenol blue , 0.25% xylene cyanol , 30% glycerol

(c). RNA denaturing buffer：

Sample:	2.22ul	5ul
10X MOPS：	1ul	2.25ul
37% formaldehyde：	1.78ul	4ul
formamide(CH <sub>3</sub> NO)：	<u>5ul</u>	<u>11.25ul</u>
	10ul	22.5ul

(d). 10X MOPS (1L)：

0.2M MOPS , 50mM sodium acetate , 10mM EDTA , pH7.0 。

取 800ml 的 DEPC 水，加上 41.8g 的 MOPS，再 6.805g 的 sodium acetate 再加上 20ml 0.5M EDTA 8.0，調 pH=7，滅菌。

#### 四. RT-PCR

##### 1. Reverse Transcription (RT) :

將 RNA 反轉錄為 cDNA。做法為：取 5 $\mu$ g 的 total RNA 加上 DEPC H<sub>2</sub>O，以溫度循環機，70 $^{\circ}$ C 預熱 5 分鐘，除去 RNA 之二級結構後，馬上放在冰上，避免 RNA 二級結構回復，加入 2 $\mu$ l RNAase inhibitor (可不加)，加 10 $\mu$ l 的 5X Reverse Transcription buffer，加上 2.5mM dNTP 4 $\mu$ l，加上 2.5 $\mu$ l oligo dT (50 pmole/ $\mu$ l)，輕輕的 mix 均勻，放入溫度循環機，42 $^{\circ}$ C 預熱 5 分鐘，再加上 0.5 $\mu$ l 的 Reverse Transcriptase (200u /  $\mu$ l) [Promega]，進行 RT 反應。RT 的條件為，42 $^{\circ}$ C，1hr  $\rightarrow$  99 $^{\circ}$ C，5 分鐘。RT 完成之後於 4 $^{\circ}$ C 短暫離心，儲存在 4 $^{\circ}$ C 或 -20 $^{\circ}$ C。

##### 2. Polymerase Chain Reaction (PCR) :

取 13.8 $\mu$ l DEPC H<sub>2</sub>O，4 $\mu$ l 10X PCR buffer，3.2 $\mu$ l 2.5mM dNTP (final-0.2mM)，8 $\mu$ l 15mM MgCl<sub>2</sub> (final-3mM)，5 $\mu$ l 5 端的 primer (10pmole/ $\mu$ l)及 5 $\mu$ l 3 端的 primer (10pmole/ $\mu$ l)，加上 10 $\mu$ l 的 cDNA (RT 產物)，輕輕 mix 均勻，短暫離心後，加一滴礦物油，以溫度循環機，94 $^{\circ}$ C 預熱 5 分鐘，加 Taq (5u /  $\mu$ l) 1  $\mu$ l，然後在 94 $^{\circ}$ C，2 分鐘，67 $^{\circ}$ C，1 分鐘，72 $^{\circ}$ C，2 分鐘，進行 40 cycle，第 20 cycle 之 94 $^{\circ}$ C 補 Taq 1 $\mu$ l，最後 72 $^{\circ}$ C，20 分鐘 PCR 完成後儲存在 4 $^{\circ}$ C

或-20°C。

### 3. DNA 電泳：

跑 DNA 電泳，以確認 RT-PCR 結果是否正確。

\*DNA 電泳試藥之配製：

(1). sample : PCR 後之 cDNA, 取 5 $\mu$ l, 加 6X 的 DNA Loading buffer

(2). gel : 1.2% 的 agarose gel (用 1X 的 TAE buffer 泡)

(3). running buffer : 1X 的 TAE buffer :

(4). 6X 的 DNA Loading buffer

0.25% bromophenol blue , 0.25% xylene cyanol , 30% glycerol,

(5). TAE buffer(50x) :

Tris base (242g) , glacial acetic acid(57.1ml) , 0.5 M EDTA(pH8.0)

[100ml]

#### IV. 結果

實驗想要探討一些藥物對於 Glutathione-S Transferase 基因表現的影響。首先了解 GST 蛋白在肝癌細胞的表現情形。使用三株肝癌細胞分別為 3B、G2 和 Hu7：3B 細胞是三株裏最惡性的，它是 p53-independent；G2 細胞是三株裏第二惡性的，它是 p53-dependent；Hu7 細胞是三株裏較不惡性的。我們作 Western blotting，使用 GST  $\alpha$ 、 $\mu$  的抗體：GST  $\alpha$  form 的分子量為 26 kDa，GST  $\mu$  form 的分子量為 23 kDa，GST  $\mu$  form 的分子量為 26 kDa；發現 GST  $\alpha$  form 在 G2 細胞表現較明顯，在 3B 細胞表現微弱，在 Hu7 細胞幾乎沒有看到。GST  $\mu$  form 在 Hu7 細胞表現非常明顯，但在 G2 及 3B 細胞表現微弱。GST  $\mu$  form 的表現不管是在 3B、G2 和 Hu7 細胞，均非常微弱，如圖 5。接著為方便以後實驗探討一些藥物對於 Glutathione-S Transferase 基因表現的影響，是否影響在 RNA 的層次，所以設計了 primer，以用來作 RT-PCR，如表 1。

進入實驗，首先用 G2 細胞探討 geniposide、EGCG、silibinin 及 PCA 對 GST isoforms 的影響。以下實驗除圖 16 及圖 17 外，所用的藥物濃度都是固定的，geniposide 最終濃度 100 $\mu$ M；EGCG 最終濃度 50 $\mu$ M；silibinin 最終濃度 20 $\mu$ g/ml；PCA 最終濃度 0.1mM (100 $\mu$ M)。圖 6 是先看藥物影響 GST isoforms 的表現，是否影響在蛋白的層次？

G2 細胞用 geniposide , EGCG 和 silibinin 處理後 12 小時收細胞 , 分別用 GST  $\alpha$  、  $\mu$  的抗體來偵測。結果 GST  $\alpha$  、  $\mu$  這些 isoforms , 蛋白量均沒有變化。另外也看藥物(geniposide , EGCG 和 silibinin)是否影響 G2 細胞 CA I,II 蛋白的表現?如圖 7 , 發現藥物處理 CA I,II 蛋白的表現下降 , 而以 EGCG 和 silibinin 處理下降較明顯。

接著看藥物影響 G2 細胞 GST isoforms 的表現,是否影響在 RNA 的層次?圖 8 , G2 細胞用 EGCG 和 silibinin 處理後 12 小時收細胞 , 分別用 GST  $\alpha$  、 GST  $\mu$  和 GAPDH 的 primers 來作 RT-PCR。結果發現以 EGCG 和 silibinin 處理和 control 組相比 , GST  $\alpha$  form RNA 的量明顯的下降 , 尤其以 silibinin 處理下降最明顯。GST  $\mu$  form RNA 的量就沒有什麼變化。圖 9 是 G2 細胞用 geniposide 、 PCA 處理後 12 小時收細胞 , 同樣分別用 GST  $\alpha$  、 GST  $\mu$  和 GAPDH 的 primers 來作 RT-PCR。結果以 geniposide 處理 : GST  $\alpha$  form RNA 的量上升 , GST  $\mu$  form RNA 的量下降。以 PCA 處理 : GST  $\alpha$  form RNA 的量沒有變化 , GST  $\mu$  form RNA 的量下降。AC5-GP 因藥物一接觸細胞培養液即產生結晶 , 無法溶解 , 所以不列入其結果。

由以上結果可知藥物影響 G2 細胞 GST isoforms 的表現 , 不是影響在蛋白的層次 , 而是影響在 RNA 的層次 , 但並不是所有 GST isoforms , 藥物都影響在 RNA 的層次。

另外換其它細胞株(3B 細胞)來探討 geniposide、EGCG、silibinin 和 PCA 對 GST isoforms 的影響。圖 10 是先看藥物影響 GST isoforms 的表現，是否影響在蛋白的層次？3B 細胞用 geniposide，EGCG 和 silibinin 處理後 12 小時收細胞，分別用 GST  $\alpha$ 、 $\pi$ 、 $\mu$  的抗體來偵測。結果 GST  $\alpha$ 、 $\pi$ 、 $\mu$  這些 isoforms，蛋白量均沒有變化。另外也看藥物(geniposide，EGCG 和 silibinin)是否影響 3B 細胞 CA I,II 蛋白的表現？如圖 11，發現藥物處理，CA I,II 蛋白的表現沒有甚麼變化，而以 silibinin 處理 CA I,II 蛋白的表現有些微上升。

接著看藥物影響 3B 細胞 GST isoforms 的表現，是否影響在 RNA 的層次？圖 12，3B 細胞用 EGCG 和 silibinin 處理後 12 小時收細胞，分別用 GST  $\alpha$ 、GST  $\pi$  和 GAPDH 的 primers 來作 RT-PCR。結果發現以 EGCG 和 silibinin 處理和 control 組相比，GST  $\alpha$  form RNA 的量明顯的下降，尤其以 silibinin 處理下降最明顯。GST  $\pi$  form 和 control 組相比，RNA 的量也有明顯的下降。圖 13 是 3B 細胞用 EGCG 和 silibinin 處理後 12 小時收細胞，分別用 GST  $\mu$ 、HCA II 和 GAPDH 的 primers 來作 RT-PCR。結果以 EGCG 處理，GST  $\mu$  form RNA 的量上升約二倍多，HCA II RNA 的量則是下降的；以 silibinin 處理，GST  $\mu$  form RNA 的量上升約二倍，HCA II RNA 的量也是上升的。由圖 11 及圖 13，發現 3B 細胞以 silibinin 處理 HCA II 蛋白質及 RNA

的量都是上升的，蛋白層次及 RNA 層次結果相符。圖 14 是 3B 細胞用 geniposide、PCA 處理後，收細胞，分別用 GST、GST  $\mu$  和 GAPDH 的 primers 來作 RT-PCR。結果以 geniposide 處理：GST form RNA 的量上升約二倍，GST  $\mu$  form RNA 的量些微下降。以 PCA 處理：GST form RNA 的量有些微上升，GST  $\mu$  form RNA 的量些微下降。圖 15，是 3B 細胞用 geniposide、PCA 處理後 12 小時收細胞，分別用 GST form、HCA II 和 GAPDH 的 primers 來作 RT-PCR。結果 GST form RNA 的量沒有變化，以 geniposide 處理後，HCA II RNA 的量是上升約二倍。

由圖 10 至圖 15，結果可知藥物影響 3B 細胞 GST isoforms 的表現，不是影響在蛋白的層次，而是影響在 RNA 的層次，但並不是所有 GST isoforms，藥物都影響在 RNA 的層次。

由以上 G2 及 3B 細胞的加藥實驗，我們發現一件有趣的事，它們之間有共同處。以 geniposide、EGCG 和 silibinin 處理後，GST、 $\mu$  這些 isoforms，蛋白量均沒有變化。但 G2 及 3B 細胞以 EGCG 和 silibinin 處理後作 RT-PCR，發現 GST form RNA 的量都是下降的，尤其以 silibinin 處理下降最明顯。另外 G2 及 3B 細胞以 geniposide 處理後，發現 GST form RNA 的量都是上升的，尤其以 geniposide 處理，最明顯。由於在癌症治療上 GST form 和抗藥性有關，所以



肝癌細胞加藥之後，GST form RNA 的量下降(被抑制)，而不產生抗藥性，是比較符合我們的目標。也因為以 silibinin 處理 GST form RNA 的量下降較明顯，所以往下探討 silibinin 影響 GST form RNA 的量是否和加藥之劑量或加藥之時間有關聯。以 3B 細胞加上不同濃度的 silibinin[0, 5, 10, 20, 40, 80, 100 (ug/ml)] 處理後，收細胞，分別用 GST、GST $\mu$  和 GAPDH 的 primers 來作 RT-PCR。結果發現 GST form RNA 的量呈現 dose-dependent, 如圖 16, 而 GST $\mu$  form RNA 的量則沒有甚麼規則，如圖 17。另以 3B 細胞加上 silibinin 處理不同時間[0, 3, 6, 9, 12, 24 (hr)] 後，收細胞，分別用 GST 和 GAPDH 的 primers 來作 RT-PCR，結果發現 GST form RNA 的量呈現 time-dependent，如圖 18。統整結果如表 2。

## V. 討論

GST 依其不同的特性大致可分為三種，分別是 GST alpha、GST pi、GST mu，雖然這三種不同族的 GST 在結構方面，酵素方面的特性都很類似，對於某些化合物的代謝，在功能上的發揮，很可能互相重覆，但大致上對於代謝那一種化合物仍具有一定的特異性，而這些特異性的調節可能和個人的體質、組織的分佈，荷爾蒙的影響都有關。而且它們所負責的生理功能也有相異之處。以肝細胞為例，一旦肝細胞變成腫瘤細胞，尤其是化學性的致癌作用，GST pi 則會很明顯的大量表現，GST alpha 則是主要負責解毒的工作，特別發現它會代謝一些抗癌物質，如 cisplatin、alkylating agent，而抑制了抗癌藥物對癌症初期的治療(82)。至於 GST mu 有關及其報告探討較少，有報告曾經顯示其和組織的發炎有關，在肝臟中扮演著保護性的角色。

GST 在預防癌症方面:由統計學上的資料得知 GST M1 基因在人體中是屬於多形性的(polymorphic)，GST M1 基因的缺陷往往和癌症(肺癌、大腸癌、膀胱癌)的發生有關聯(80、81)。所以我們希望加入天然藥物能夠誘導出 GST M1 的活性，達到預防癌症的目的。

GST 在治療癌症方面:由於當癌症形成時，GST pi 會很明顯的大量表現，而治療癌症時 GST alpha 與藥物產生抗藥性有關，所以我們希望加入天然藥物能降低(抑制)GST pi 及 GST alpha 的表現，使得抗

癌藥的效果增強而達到治療癌症的目的。

本實驗想要探討一些藥物對於 GST 基因表現的影響。因實驗的材料是肝癌細胞(3B 和 Hep G2), 所以實驗的目的是與治療癌症有關。

實驗一開始, 先看肝癌細胞(3B 和 Hep G2)裏原本內生性 GST 蛋白的含量。GST alpha 的量, 在 G2 細胞表現較明顯, 在 3B 細胞表現微弱; GST pi 及 GST mu 的量, 在 G2 及 3B 細胞表現微弱。然後用 G2 和 3B 細胞探討 geniposide、EGCG、silibinin 和 PCA 對 GST isoforms 的影響是在蛋白的層次? 還是影響在 RNA 的層次?

在蛋白質的電泳分析實驗, 不管是 G2 和 3B 細胞加了藥物處理後, GST alpha、pi、mu 這些 isoforms, 蛋白量均沒有變化(圖 6 及圖 10)。在 RT-PCR 的實驗, G2 及 3B 細胞以 EGCG 和 silibinin 處理後, 發現 GST alpha mRNA 的量都是下降的, 尤其以 silibinin 處理下降最明顯(圖 8 及圖 12), 且 GST mu mRNA 的量在 G2 細胞沒有改變, 在 3B 細胞卻是上升的(約兩倍)(圖 8 及圖 13), 。另外 G2 及 3B 細胞以 geniposide 處理後, 發現 GST alpha mRNA 的量都是上升的, 約兩倍多(圖 9 及圖 14)。結果可知藥物影響 G2 及 3B 細胞 GST isoforms 的表現, 不是影響在蛋白的層次, 而是影響在 RNA 的層次, 但並不是所有 GST isoforms, 藥物都影響在 RNA 的層次。

由於在癌症治療上 GST alpha 與藥物產生抗藥性有關, 所以肝癌

細胞加藥之後，GST alpha mRNA 的量下降(被抑制)，而不產生抗藥性，是比較符合我們的目標。也因為以 silibinin 處理 GST alpha mRNA 的量下降較明顯，所以往下探討 silibinin 影響 GST alpha mRNA 的量是否和加藥之劑量或加藥之時間有關聯。實驗以 3B 細胞為材料，結果發現 GST alpha mRNA 的量呈現 dose-dependent(圖 16)，time-dependent(圖 18)。

我們發現天然的保肝藥 silibinin 可使肝癌細胞(3B 和 Hep G2) GST alpha mRNA 的量下降且提高 GST mu mRNA 的量(3B 細胞)。Silibinin 是 silymarin 的活性組成分子，源自 milk thistle (silybum marianum)植物，被用來天然的治療肝及膽道的疾病已有兩千年之久，目前 silymarin 在臨床上的應用可以有效的改善急性和慢性的病毒性肝炎、酒精性肝炎、毒素所引起的肝炎、cirrhosis、ischemic injury 及放射性的毒害(36、37、38)。silymarin 治病機轉：擔任抗氧化的工作，清除自由基和抑制脂質過氧化。silybin 可以快速的和自由基作用(OH-和 HOCL)(42)，和抑制 hepatocyte、microsomal 和紅血球膜上的脂質過氧化(43、44)，穩定肝細胞膜(45、46)。Silybin 可以藉於刺激 ribosomal RNA polymerase 增加肝細胞蛋白的合成(47)，silybin 可以降低肝和粒腺體 glutathione 的氧化(48)。它可降低 tumor promoter 的活化(49)和 mast cell 的穩定(抗發炎)(50)，保護身體免於遺傳的傷

害。

然而卻沒有報告指出使用 silymarin 來治療癌症病人，沒有理由不用且 silymarin 的副作用是微乎其微(45)，也許需要更多的證據來支持。

未來的方向：一、silibinin 應合併抗癌藥加入肝癌細胞(3B 和 Hep G2)，看是否真能降低抗癌藥之濃度。二、探討 silibinin 調節 GST alpha 及 GST mu mRNA 的作用機制。三、因以 EGCG 處理 GST alpha mRNA 的量也是下降且 GST mu mRNA 的量提高(3B 細胞)，所以同樣可以探討 EGCG 調節 GST alpha 及 GST mu mRNA 的作用機制。藉由天然藥物更多的研究期望能為治療癌症打開另一方向。

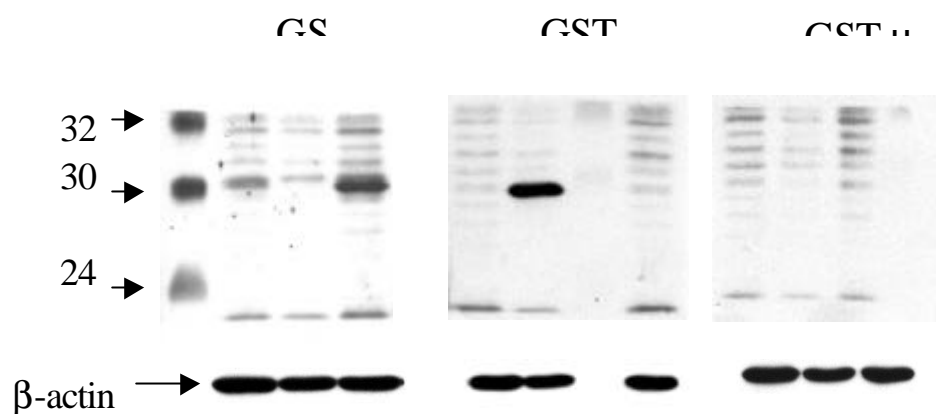


Figure 5  
Western blots of total proteins prepared from  
Hep 3B, Hep G2 and Hu7 cells using  
anti-GST $\alpha$ , GST  $\pi$ , and GST  $\mu$  antibodies.

**Table 1.**

**Oligonucleotides and cycling condition used for hCA II and hGST A2, P1, M1 and hGAPDH transcripts by RT-PCR**

<b>Oligonucleotides</b>	<b>/min cycle</b>	
<b>hCA II cDNA amplification (922 bp )</b>		
<b>5'-CCAGATCGGTACC GATTCCT</b>	<b>68/1</b>	<b>40</b>
<b>3'-GCAACCAGGATCCAAATCAC</b>		
<b>hGAPDH cDNA amplification (451 bp )</b>		
<b>5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC</b>	<b>65/1</b>	<b>35</b>
<b>3'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA</b>		
<b>hGST A2 cDNA amplification (738bps)</b>		
<b>5'-GCGTTTAAACAAAGCTTAGAG</b>	<b>65/1</b>	<b>40</b>
<b>3'-AAGTTGTTGAGCTCCATGACT</b>		
<b>hGST P1 cDNA amplification (693bps)</b>		
<b>5'-TTTCGCCGCTGCAGTCTTCG</b>	<b>68/1</b>	<b>40</b>
<b>3'-CAAACCTCTGCAGCCCGCTCA</b>		
<b>hGST M1 cDNA amplification (713bps)</b>		
<b>5'-CCAACCAGCACCATGCCCATG</b>	<b>65/1</b>	<b>40</b>
<b>3'-CAGAGTATGGGATCCTCACTCC</b>		

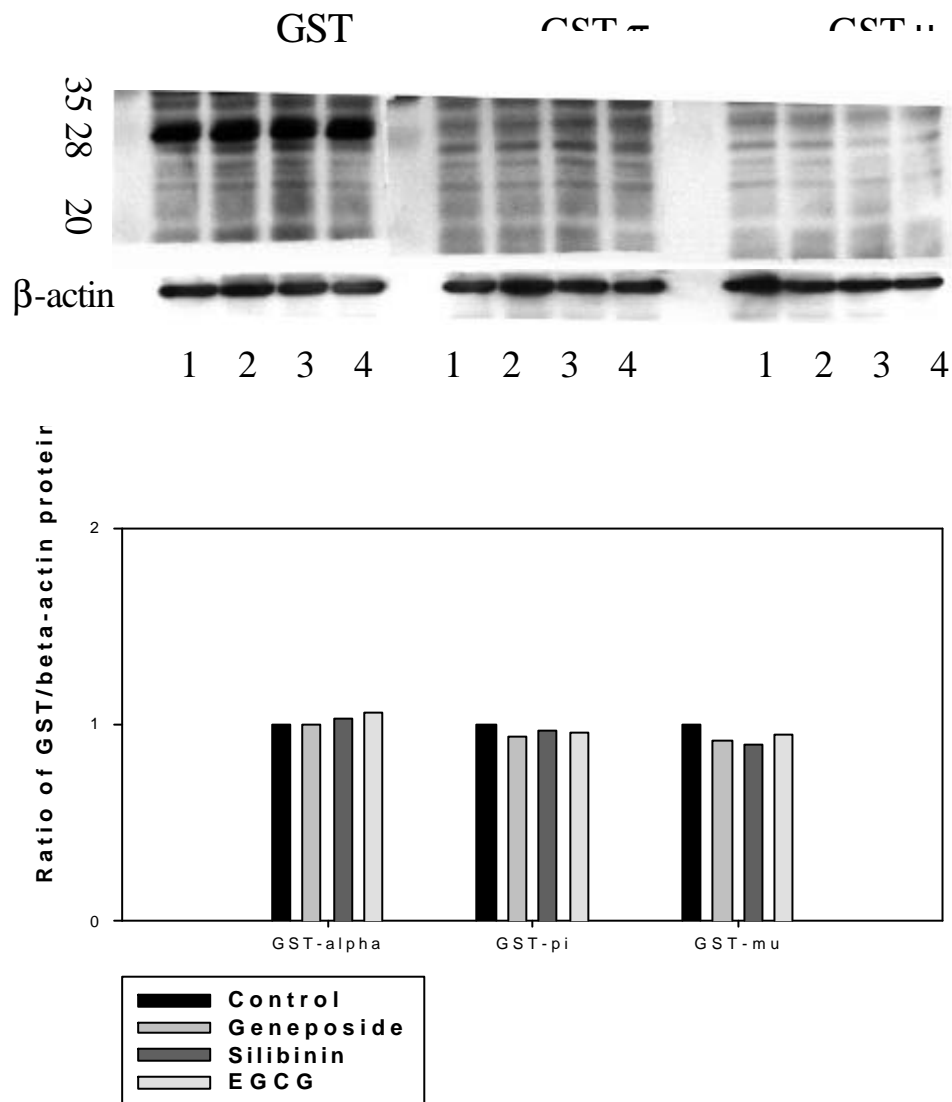


Figure 6

The effects of eniposide, EGCG and silibinin on the GST- $\alpha$ ,  $\pi$ ,  $\mu$  proteins levels in G2 cells. Lane1: G2 cells were treated with PBS (control), 12hr. Lane2: G2 cells were treated with geniposide (final concentration: 100uM), 12hr. Lane3: G2 cells were treated with silibinin (final concentration: 20ug/ml), 12hr. Lane4: G2 cells were treated with EGCG (final concentration: 50uM), 12hr.



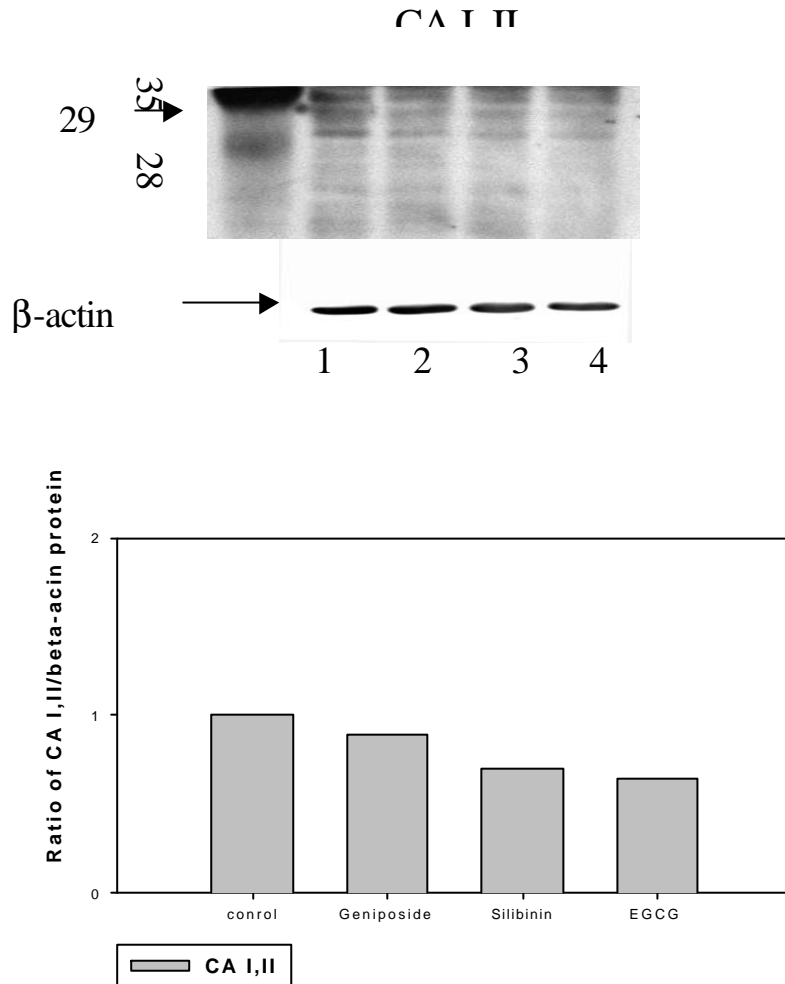
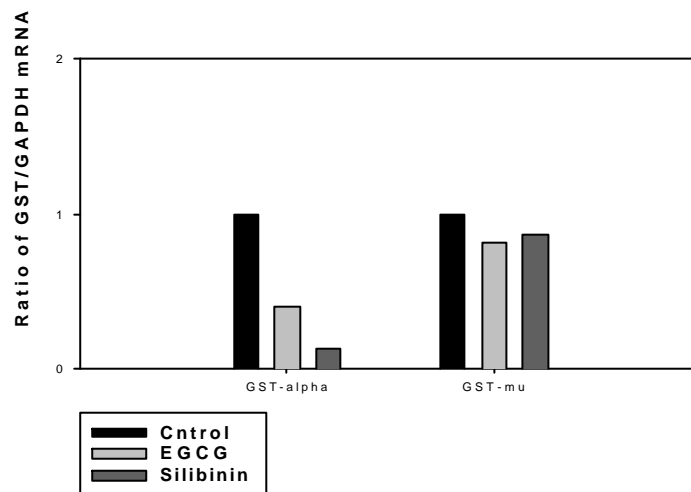
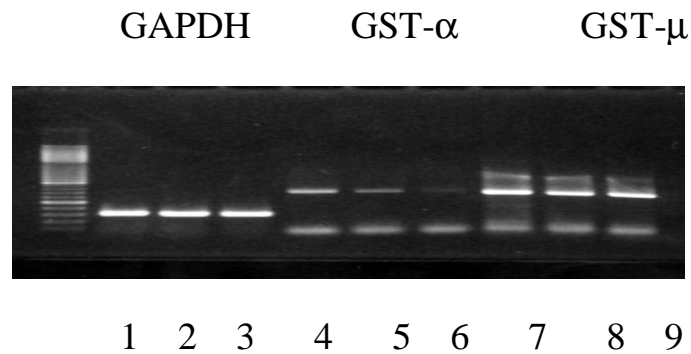


Figure 7

The effects of geniposide, EGCG and silibinin on the HCA II protein level in G2 cells. Lane1: G2 cells were treated with PBS (control). Lane2: G2 cells were treated with geniposide (final concentration: 100uM), 12hr. Lane3: G2 cells were treated with silibinin (final concentration: 20 ug/ml), 12hr. Lane4: G2 cells were treated with EGCG (final concentration: 50uM), 12 hr.



**Figure 8**

The effects of EGCG and silibinin on the GST- $\alpha$  and  $\mu$  mRNAs levels in G2 cells. RT-PCR products of the total RNAs isolated from G2 cells using GAPDH, GST-  $\alpha$  and GST- $\mu$  primers. Lane1, 4, 7: G2 cells were treated with PBS (control). Lane2, 5, 8: G2 cells were treated with EGCG (final concentration: 50uM), 12 hr. Lane3, 6, 9: G2 cells were treated with silibinin (final concentration: 20 ug/ml), 12hr.

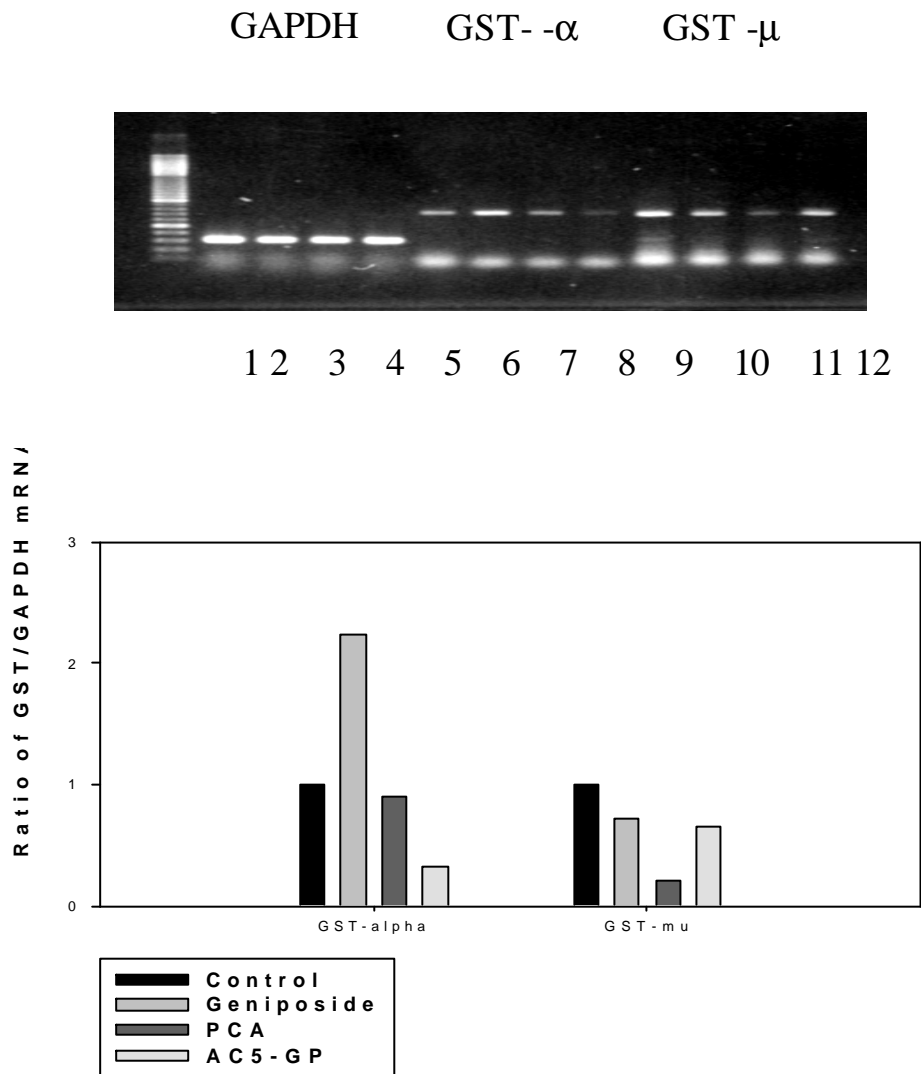


Figure 9

The effects of geniposide, PCA and AC5-GP on the GST- $\alpha$  and  $\mu$  mRNAs levels in G2 cells. RT-PCR products of the total RNAs isolated from G2 cells using GAPDH, GST-  $\alpha$  and GST- $\mu$  primers. Lane1, 5, 9:G2 cells were treated with PBS (control). Lane2, 6, 10: G2 cells were treated with PCA (final concentration: 100uM), 12hr. Lane3, 7, 11: G2 cells were treated with AC5-GP (final concentration: 0.3mM), 12hr.

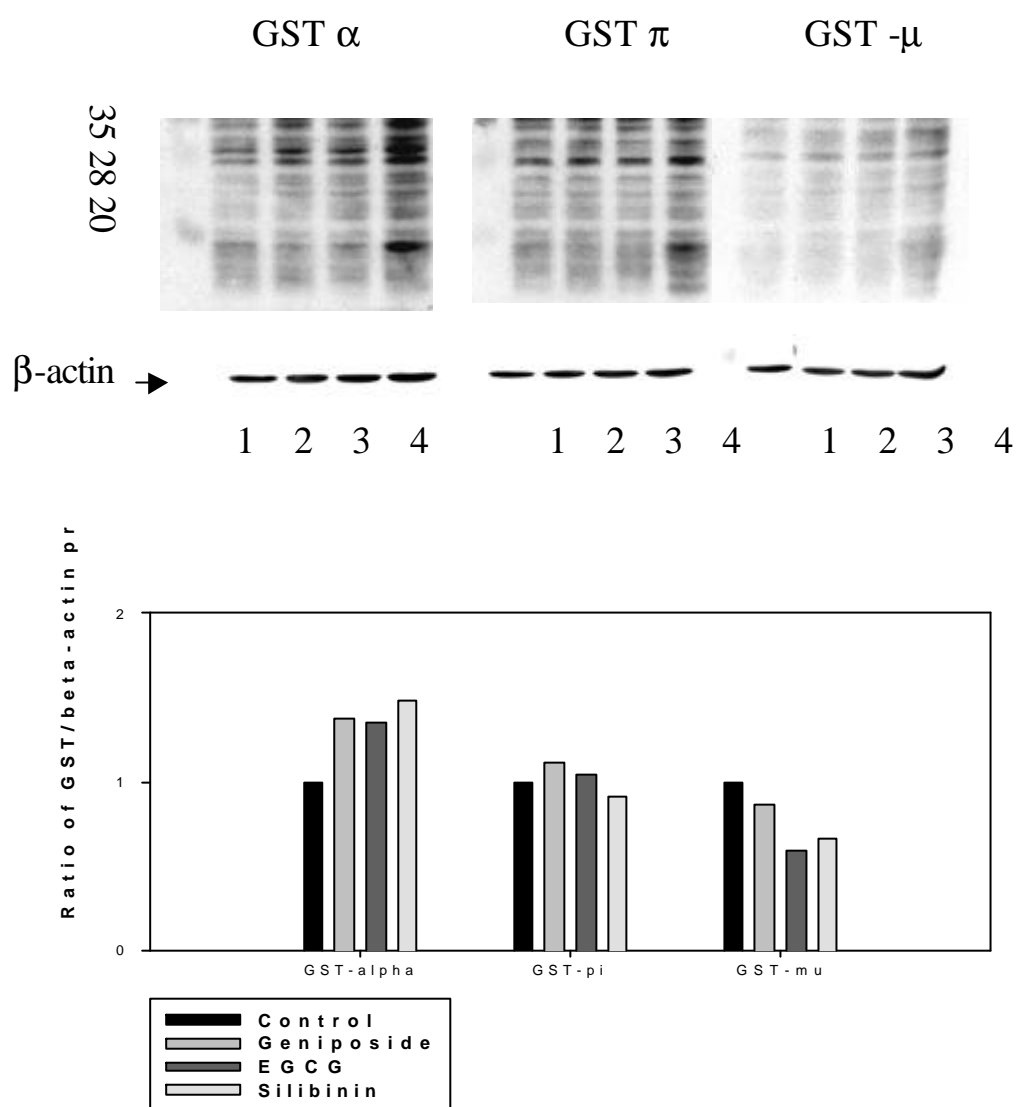


Figure 10

The effects of geniposide, EGCG and silibinin on the GST- $\alpha$ ,  $\pi$ ,  $\mu$  proteins levels in 3B cells. Lane1: 3B cells were treated with PBS (control). Lane2: 3B cells were treated with geniposide (final concentration: 100uM), 12hr. Lane3: 3B cells were treated with EGCG (final concentration: 50uM), 12 hr. Lane4: 3B cells were treated with silibinin (final concentration: 20 ug/ml), 12hr.

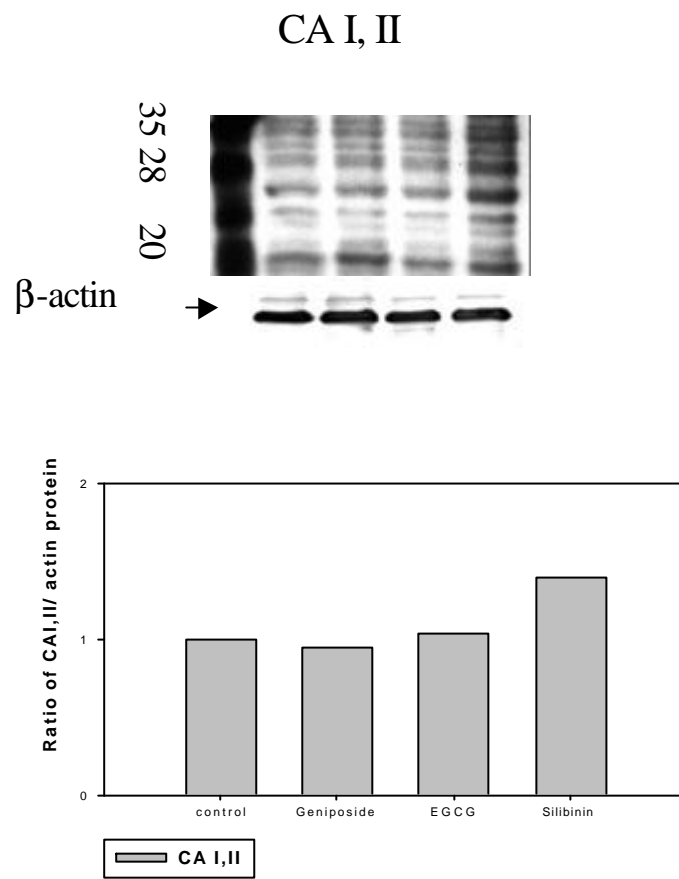


Figure 11

The effects of geniposide, EGCG and silibinin on the HCA II protein level in 3B cells. Lane1: 3B cells were treated with PBS (control). Lane2: 3B cells were treated with geniposide (final concentration: 100uM), 12hr. Lane3: 3B cells were treated with EGCG (final concentration: 50uM), 12hr. Lane4: 3B cells were treated with silibinin (final concentration: 20 ug/ml), 12hr.

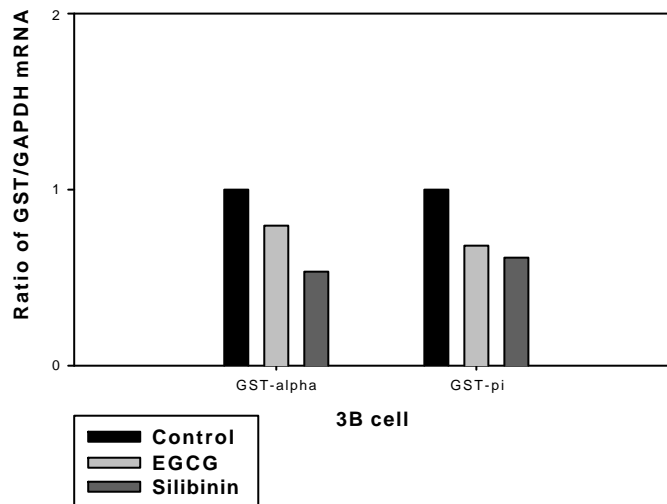
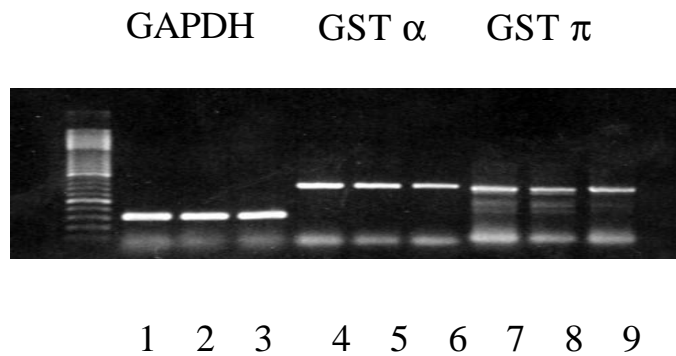


Figure 12

The effects of EGCG and silibinin on the GST- $\alpha$  and  $\pi$  mRNAs levels in 3B cells. RT-PCR products of the total RNAs isolated from 3B cells using GAPDH, GST-  $\alpha$  and GST- $\pi$  primers. Lane1, 4, 7:3B cells were treated with PBS (control). Lane2, 5, 8: 3B cells were treated with EGCG (final concentration: 50uM), 12hr. Lane3, 6, 9: 3B cells were treated with silibinin (final concentration: 20 ug/ml), 12hr.

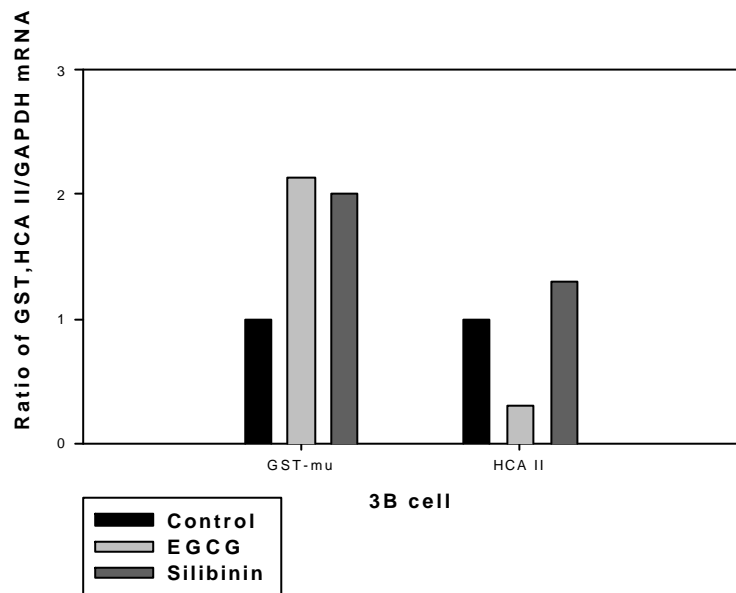
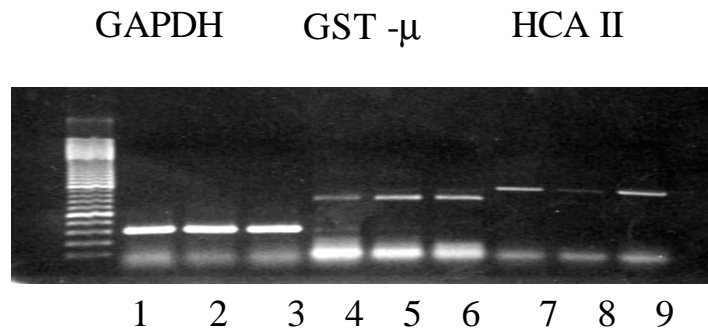


Figure 13

The effects of EGCG and silibinin on the GST- $\mu$  and HCA II mRNAs levels in 3B cells. RT-PCR products of the total RNAs isolated from 3B cells using GAPDH, GST- $\mu$  and HCA II primers. Lane1, 4, 7:3B cells were treated with PBS (control). Lane2, 5, 8: 3B cells were treated with EGCG (final concentration: 50uM), 12hr. Lane3, 6, 9: 3B cells were treated with silibinin (final concentration: 20 ug/ml), 12hr.

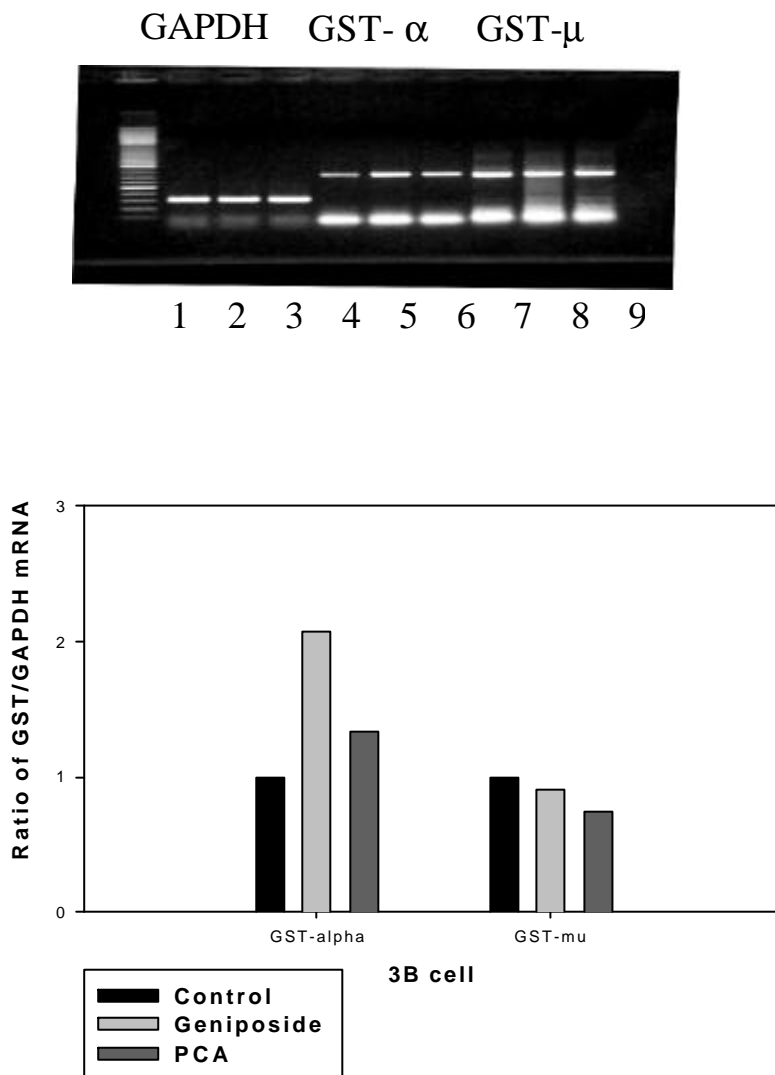


Figure 14

The effects of geniposide and PCA on the GST- $\alpha$  and  $\mu$  mRNAs levels in 3B cells. RT-PCR products of the total RNAs isolated from 3B cells using GAPDH, GST-  $\alpha$  and GST- $\mu$  primers. Lane1, 4, 7:3B cells were treated with PBS (control). Lane2, 5, 8: 3B cells were treated with geniposide (final concentration: 100uM), 12hr. Lane3, 6, 9: 3B cells were treated with PCA (final concentration: 100uM), 12hr.



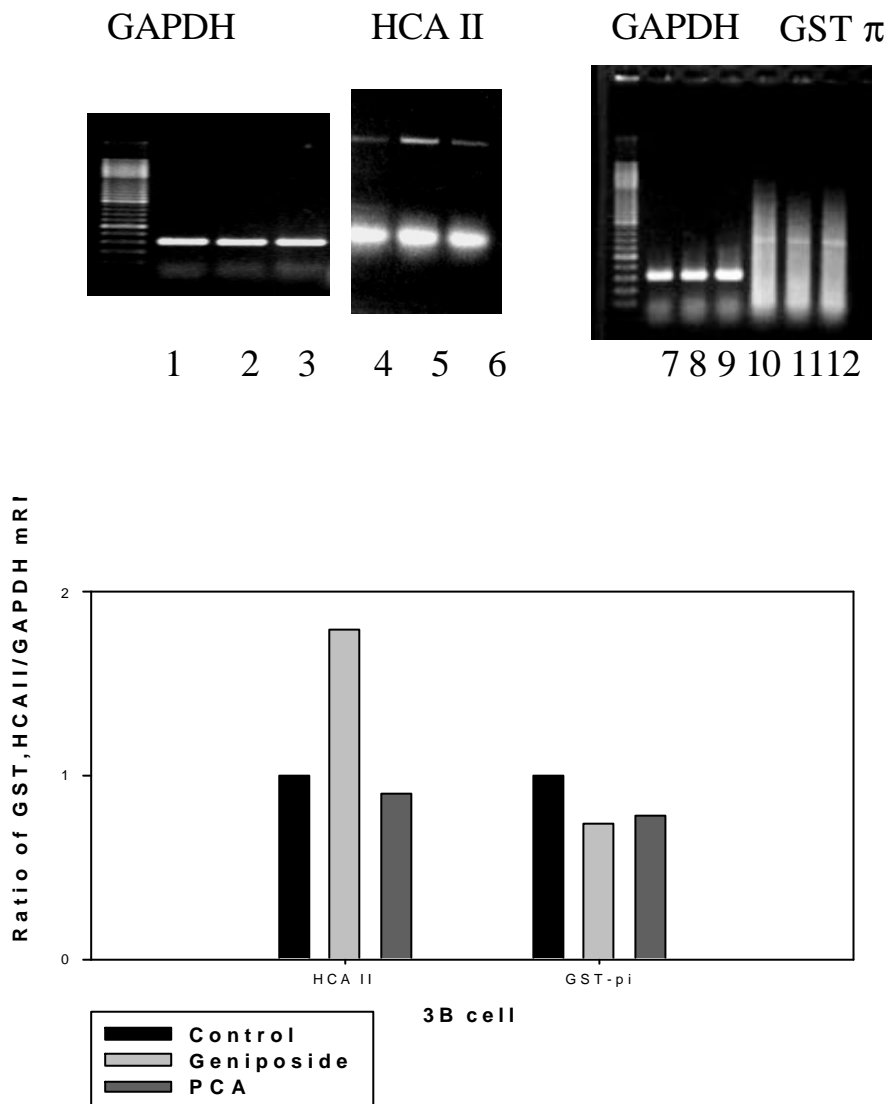
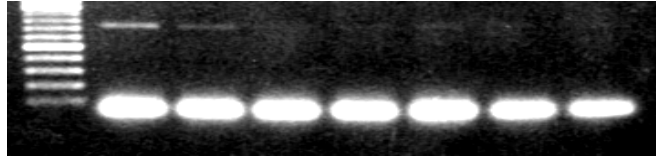


Figure 15

The effects of geniposide and PCA on the GST- $\pi$  and HCA II mRNAs levels in 3B cells. RT-PCR products of the total RNAs isolated from 3B cells using GAPDH, HCA II and GST- $\pi$  primers. Lane1, 4, 7, 10:3B cells were treated with PBS (control). Lane2, 5, 8, 11: 3B cells were treated with geniposide (final concentration: 100 $\mu$ M), 12hr. Lane3, 6, 9, 12: 3B cells were treated with PCA (final concentration: 100 $\mu$ M), 12hr.

GST  $\alpha$



GAPDH

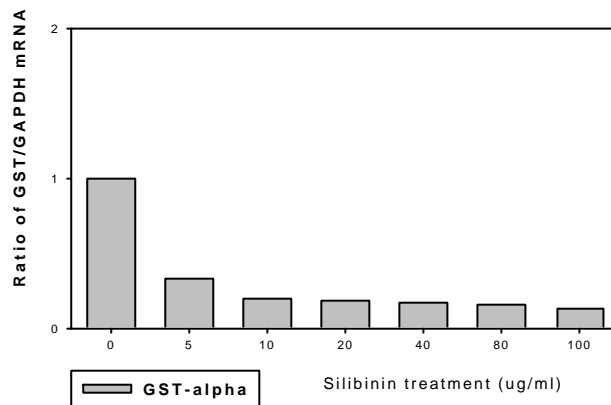
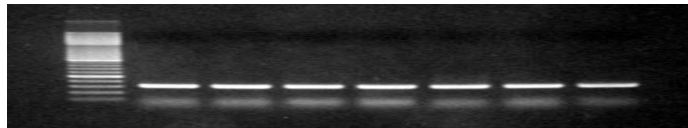


Figure 16

Dose response of the effect of silibinin on the GST- $\alpha$  RNA level. 3B cells were treated with different concentrations [0, 5, 10, 20, 40, 80, 100 (ug/ml)] of silibinin. RT-PCR products of the total RNAs isolated from 3B cells using GAPDH, GST- $\alpha$  primers.

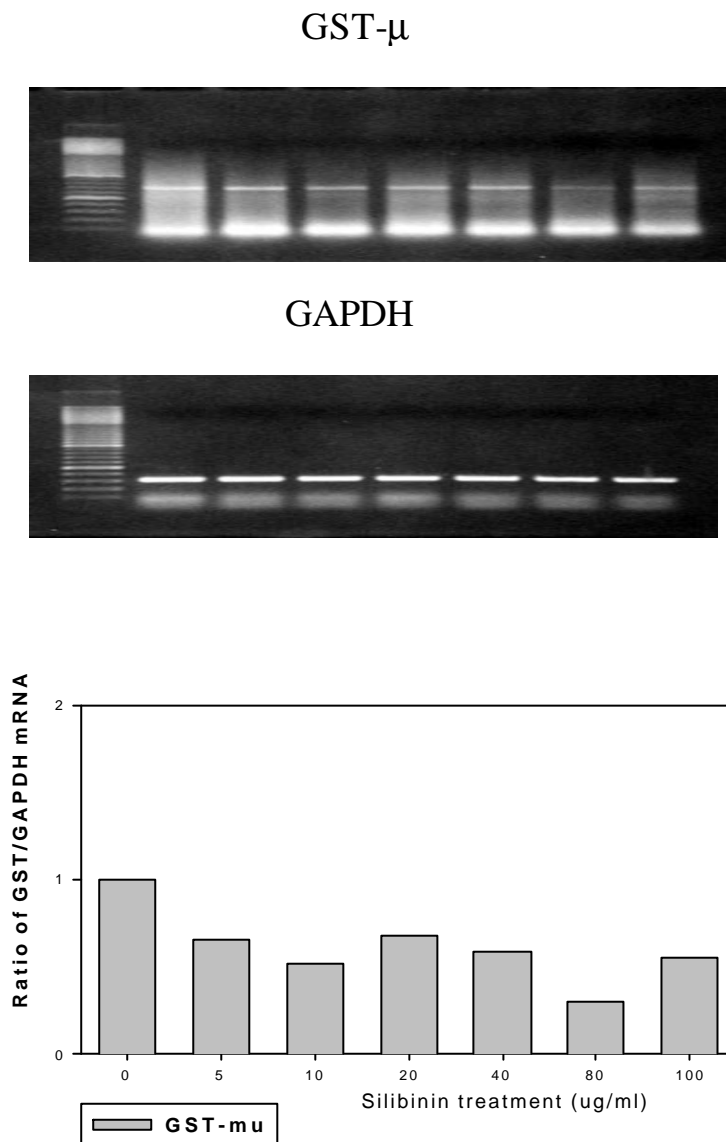


Figure 17

Dose response of the effect of silibinin on the GST- $\mu$  RNA level. 3B cells were treated with silibinin by different concentrations [0, 5, 10, 20, 40, 80, 100 (ug/ml)]. RT-PCR products of the total RNAs isolated from 3B cells using GAPDH, GST- $\mu$  primers.

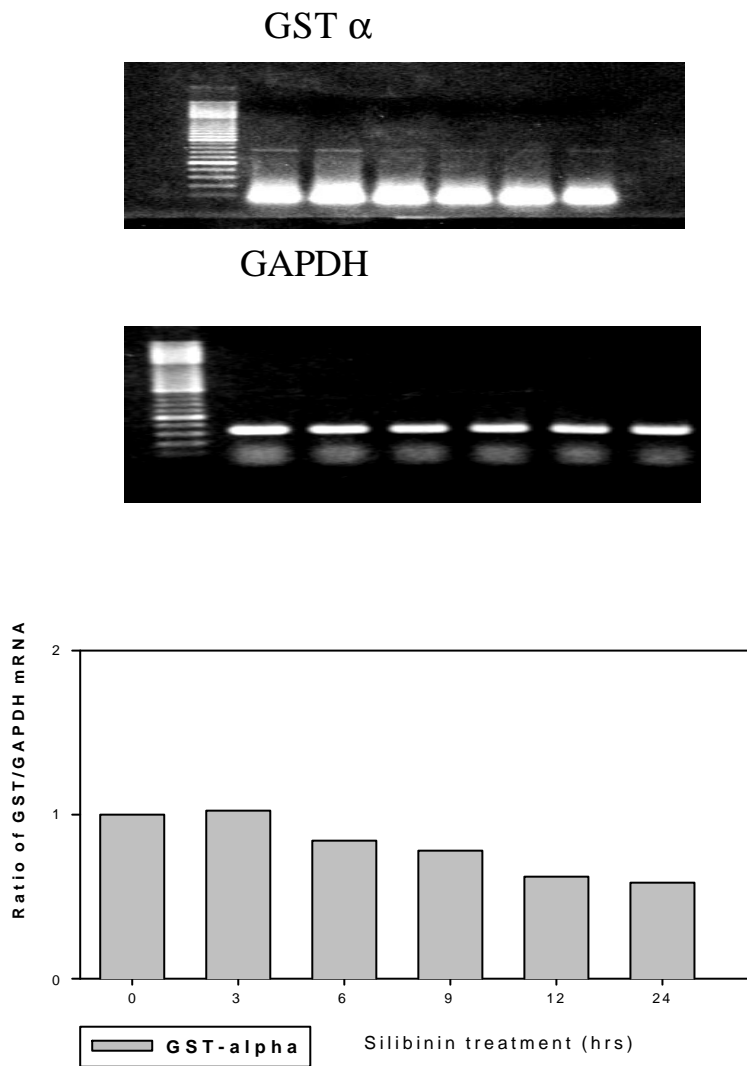


Figure 18  
Time course of the effect of silibinin on the GST- $\alpha$  RNA level in 3B cells. 3B cells were treated with silibinin at the indicated time point.

**Table 2.**

		GST alpha	GST mu	GST pi	HCAII
<b>G2</b> cells	<b>Silibinin:</b>	↓	→		
	<b>EGCG:</b>	↓	→		
	<b>Geniposide:</b>	↑	↓		
	<b>PCA:</b>	↓	→		
<b>3B</b> cells	<b>Silibinin:</b>	↓	↑	↓	↑
	<b>EGCG:</b>	↓	↑	↓	↓
	<b>Geniposide:</b>	↑	→	↓	↑
	<b>PCA:</b>	↑	→	↓	→

## VI. References:

1. Edwards R. Dixon DP. Walbot V. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. [Review] [36 refs] *Trends in Plant Science*. 5(5):193-8, 2000.
2. Strange RC. Jones PW. Fryer AA. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. [Review] [30 refs] *Toxicology Letters*. 112-113:357-63, 2000.
3. Strange RC. Fryer AA. Chapter 19. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. [Review] [99 refs] IARC Scientific Publications (Lyon). (148):231-49, 1999.
4. Mainwaring GW. Nash J. Davidson M. Green T. Isolation of a mouse theta glutathione S-transferase active with methylene chloride. *Biochemical Journal*. 314 ( Pt 2):445-8, 1996.
5. Iucker k. Influence of glutathione S-transferase B (ligandin) on the intermembrane transfer of bilirubin. *Journal of Clinical Investigation*. 110:1935-1972, 1996.
6. Hayes JD. Strange RC. Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. [Review] [87 refs] *Free Radical Research*. 22(3):193-207, 1995.
7. Hayes JD. Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. [Review] [779 refs] *Critical Reviews in Biochemistry & Molecular Biology*. 30(6):445-600, 1995.
8. Mannervik B. Awasthi YC. Board PG. Hayes JD. Di Ilio C. Ketterer B. Listowsky I. Morgenstern R. Muramatsu M. Pearson WR. Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochemical Journal*. 282 ( Pt 1):305-6, 1992.
9. Board PG. Baker RT. Chelvanayagam G. Jermini LS. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochemical Journal*. 328 ( Pt 3):929-35, 1997.
10. Bass NM. Kirsch RE. Tuff SA. Marks I. Saunders SJ. Ligandin heterogeneity : evidence that the two non-identical subunits are the monomers of two distinct proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 492(1):163-75, 1977.
11. Jakoby WB. Ketterer B. Mannervik B. Glutathione transferases: nomenclature. *Biochemical Pharmacology*. 33(16):2539-40, 1984.
12. Armstrong RN. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the

- glutathione transferases. [Review] [121 refs] *Chemical Research in Toxicology*. 10(1):2-18, 1997.
13. Awasthi S. Srivastava SK. Ahmad F. Ahmad H. Ansari GA. Interactions of glutathione S-transferase-pi with ethacrynic acid and its glutathione conjugate. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1164(2):173-8, 1993.
  14. Eaton DL. Gallagher EP. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. [Review] [186 refs] *Annual Review of Pharmacology & Toxicology*. 34:135-72, 1994.
  15. Hu X. O'Donnell R. Srivastava SK. Xia H. Zimniak P. Nanduri B. Bleicher RJ. Awasthi S. Awasthi YC. Ji X. Singh SV. Active site architecture of polymorphic forms of human glutathione S-transferase P1-1 accounts for their enantioselectivity and disparate activity in the glutathione conjugation of 7beta,8alpha-dihydroxy-9alpha,10alpha-oxo-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 235(2):424-8, 1997.
  16. Seidegard J. Pero RW. Stille B. Identification of the trans-stilbene oxide-active glutathione transferase in human mononuclear leukocytes and in liver as GST1. *Biochemical Genetics*. 27(3-4):253-61, 1989.
  17. Morgan AS. Ciaccio PJ. Tew KD. Kauvar LM. Isozyme-specific glutathione S-transferase inhibitors potentiate drug sensitivity in cultured human tumor cell lines. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology*. 37(4):363-70, 1996.
  18. van Iersel ML. Ploemen JP. Lo Bello M. Federici G. van Bladeren PJ. Interactions of alpha, beta-unsaturated aldehydes and ketones with human glutathione S-transferase P1-1. *Chemico-Biological Interactions*. 108(1-2):67-78, 1997.
  19. Kensler TW. Chemoprevention by inducers of carcinogen detoxication enzymes. [Review] [55 refs] *Environmental Health Perspectives*. 105 Suppl 4:965-70, 1997.
  20. Imagawa M. [Regulation mechanism of specific expression of tumor marker gene during carcinogenesis]. [Review] [29 refs] [Japanese] *Yakugaku Zasshi - Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 116(7):505-18, 1996.
  21. Sakai M. Nakabayashi H. [Regulation of tumor marker gene expression]. [Review] [26 refs] [Japanese] *Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine*. 54(6):1560-7, 1996.
  22. Ahmad H. Singhal SS. Saxena M. Awasthi YC. Characterization of two

- novel subunits of the alpha-class glutathione S-transferases of human liver. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1161(2-3):333-6, 1993.
23. Waxman DJ. Sundseth SS. Srivastava PK. Lapenson DP. Gene-specific oligonucleotide probes for alpha, mu, pi, and microsomal rat glutathione S-transferases: analysis of liver transferase expression and its modulation by hepatic enzyme inducers and platinum anticancer drugs. *Cancer Research*. 52(20):5797-802, 1992.
  24. Morel F. Fardel O. Meyer DJ. Langouet S. Gilmore KS. Meunier B. Tu CP. Kensler TW. Ketterer B. Guillouzo A. Preferential increase of glutathione S-transferase class alpha transcripts in cultured human hepatocytes by phenobarbital, 3-methylcholanthrene, and dithiolethiones. *Cancer Research*. 53(2):231-4, 1993.
  25. Hertvig E. Nilsson A. Seidegard J. The expression of glutathione transferase mu in patients with inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 29(8):729-35, 1994.
  26. Manson MM. Ball HW. Barrett MC. Clark HL. Judah DJ. Williamson G. Neal GE. Mechanism of action of dietary chemoprotective agents in rat liver: induction of phase I and II drug metabolizing enzymes and aflatoxin B1 metabolism. *Carcinogenesis*. 18(9):1729-38, 1997.
  27. Rushmore TH. Morton MR. Pickett CB. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *Journal of Biological Chemistry*. 266(18):11632-9, 1991.
  28. Nguyen T. Rushmore TH. Pickett CB. 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. *Journal of Biological Chemistry*. 269(18):13656-62, 1994.
  29. Prester T. Talalay P. Alam J. Ahn YI. Lee PJ. Choi AM. Parallel induction of heme oxygenase-1 and chemoprotective phase 2 enzymes by electrophiles and antioxidants: regulation by upstream antioxidant-responsive elements (ARE). *Molecular Medicine*. 1(7):827-37, 1995.
  30. Rushmore TH. King RG. Paulson KE. Pickett CB. Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87(10):3826-30, 1990.



31. Friling RS. Bergelson S. Daniel V. Two adjacent AP-1-like binding sites form the electrophile-responsive element of the murine glutathione S-transferase Ya subunit gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89(2):668-72, 1992.
32. Yu R. Jiao JJ. Duh JL. Gudehithlu K. Tan TH. Kong AN. 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):451-6, 1997.
33. Flora K. Hahn M. Rosen H. Benner K. Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. [see comments]. [Review] [51 refs] *American Journal of Gastroenterology*. 93(2):139-43, 1998.
34. Hobbs C. Milk thistle: the liver herb. Capitola, CA: Botanical Press. 1992.
35. Greive M. A morden herbal, vol. 2. New York: Dover Publication. 1981.
36. Bass NM. Is there any use for nontraditional or alternative therapies in patients with chronic liver disease?. [Review] [55 refs] *Current Gastroenterology Reports*. 1(1):50-6, 1999.
37. Patrick L. Hepatitis C: epidemiology and review of complementary/alternative medicine treatments. [Review] [120 refs] *Alternative Medicine Review*. 4(4):220-38, 1999.
38. Luper S. A review of plants used in the treatment of liver disease: part 1. [Review] [87 refs] *Alternative Medicine Review*. 3(6):410-21, 1998.
39. Skottova N. Krecman V. Silymarin as a potential hypocholesterolaemic drug. [Review] [61 refs] *Physiological Research*. 47(1):1-7, 1998.
40. Rui YC. Advances in pharmacological studies of silymarin. [Review] [12 refs] *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 86 Suppl 2:79-85, 1991.
41. Harnisch G. Stolze H. *Silybum marianum*. Mariendistel. In: *Bewaehrte pflanzendrogen in Wissenschaft und Medizin*. Notamed Verlag. 203-15, 1983.
42. Mira L. Silva M. Manso CF. Scavenging of reactive oxygen species by silibinin dihemisuccinate. *Biochemical Pharmacology*. 48(4):753-9, 1994.
43. Bosisio E. Benelli C. Pirola O. Effect of the flavanolignans of *Silybum marianum* L. on lipid peroxidation in rat liver microsomes and freshly isolated hepatocytes. *Pharmacological Research*. 25(2):147-54, 1992.

44. Carini R. Comoglio A. Albano E. Poli G. Lipid peroxidation and irreversible damage in the rat hepatocyte model. Protection by the silybin-phospholipid complex IdB 1016. *Biochemical Pharmacology*. 43(10):2111-5, 1992.
45. Grossmann M. Hoermann R. Weiss M. Jauch KW. Oertel H. Staebler A. Mann K. Engelhardt D. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma. [see comments]. [Review] [28 refs] *American Journal of Gastroenterology*. 90(9):1500-3, 1995.
46. Ramellini G. Meldolesi J. Stabilization of isolated rat liver plasma membranes by treatment in vitro with silymarin. *Arzneimittel-Forschung*. 24(5):806-8, 1974.
47. Takahara E. Ohta S. Hirobe M. Stimulatory effects of Silibinin on the DNA synthesis in partially hepatectomized rat liver:Non-response in hepatoma and other malignant cell lines. *Biochem Pharmacol*. 35:538-41, 1986.
48. Pietrangelo A. Borella F. Casalgrandi G. Montosi G. Ceccarelli D. Gallesi D. Giovannini F. Gasparetto A. Masini A. Antioxidant activity of silybin in vivo during long-term iron overload in rats. *Gastroenterology*. 109(6):1941-9, 1995.
49. Agarwal R. Katiyar SK. Lundgren DW. Mukhtar H. Inhibitory effect of silymarin, an anti-hepatotoxic flavonoid, on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced epidermal ornithine decarboxylase activity and mRNA in SENCAR mice. *Carcinogenesis*. 15(6):1099-103, 1994.
50. Lecomte J. [General pharmacologic properties of silybine and silymarine in the rat]. [French] *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*. 214(1):165-76, 1975.
51. Huang MT. Ferrano T. Phenolic compounds in food and cancer prevention. In :Huang MT. Ho CT. Lee CY. Phenolic compounds in food and cancer prevention: Antioxidants and cancer prevention. *American Chemical Society Symposium Series 507*:8-34, 1992.
52. Tseng TH. Wang CJ. Kao ES. Chu HY. Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*. 101(2):137-48, 1996.
53. Tanaka T. Kojima T. Kawamori T. Yoshimi N. Mori H. Chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid protocatechuic acid in rats. *Cancer Research*.

- 53(12):2775-9, 1993.
54. Tanaka T. Kawamori T. Ohnishi M. Okamoto K. Mori H. Hara A. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary protocatechuic acid during initiation and postinitiation phases. *Cancer Research*. 54(9):2359-65, 1994.
  55. Kawamori T. Tanaka T. Kojima T. Suzui M. Ohnishi M. Mori H. Suppression of azoxymethane-induced rat colon aberrant crypt foci by dietary protocatechuic acid. *Japanese Journal of Cancer Research*. 85(7):686-91, 1994.
  56. Tanaka T. Kojima T. Kawamori T. Mori H. Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid. *Cancer*. 75(6 Suppl):1433-9, 1995.
  57. Hirose Y. Tanaka T. Kawamori T. Ohnishi M. Makita H. Mori H. Satoh K. Hara A. Chemoprevention of urinary bladder carcinogenesis by the natural phenolic compound protocatechuic acid in rats. *Carcinogenesis*. 16(10):2337-42, 1995.
  58. Suzuki N. Reaction rate constants of tea leaf catechins with superoxide: Superoxide-dismutase (SOD)-like activity measured by *Cypridina* luciferin analogue chemiluminescence. *Chemistry of Expression (Japan)*. 6:655-58, 1991.
  59. Osawa T. Huang MT. Phenolic antioxidants in dietary plants as antimutagens. In *Phenolic Compounds in foods and health II: Antioxidant and cancer prevention*. American Journal of Chemical Society. 135-49, 1992.
  60. Yang CS. Effect of nutrition on carcinogenesis: Mechanisms involving nitrosamines. In *Nutrients and Cancer Prevention*. New Jersey: Humana Press:53-70, 1990.
  61. Wang H. The blocking effect of Chinese tea on N-nitrosation in vitro and in vivo. In *Nutrients and Cancer Prevention*. In *Nutrients and Cancer Prevention*. New Jersey: Humana Press:53-70, 1990.
  62. Wang ZY. Interaction of epicatechins derived from green tea with rat hepatic cytochrome P-450. *Drug Metabolism*. 16:98-103, 1998.
  63. Huang MT. Ho CT. Wang ZY. Ferraro T. Finnegan-Olive T. Lou YR. Mitchell JM. Laskin JD. Newmark H. Yang CS. Inhibitory effect of topical application of a green tea polyphenol fraction on tumor initiation and promotion in mouse skin. *Carcinogenesis*. 13(6):947-54, 1992.
  64. Yoshizawa S. Penta-o-galloyl- $\beta$ -D-glucose and (-)-epigallocatechin

- gallate: Cancer prevention agent. In Phenolic Compounds in foods and health II: Antioxidant and cancer prevention. American Journal of Chemical Society. 316-325, 1992.
65. Katiyar S. Inhibition of 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-caused tumor promotion by 12-dimethyl benz(a) pyrene-initiated SENCAR mouse skin by a polyphenolic fraction isolated from green tea. *Cancer Research*. 52:6890-6897, 1992.
  66. Ruch RJ. Cheng SJ. Klaunig JE. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*. 10(6):1003-8, 1989.
  67. Inouye H. Ueda S. Aoki Y. Takeda Y. [On the biosynthesis of iridoid glucosides]. [German] *Tetrahedron Letters*. 28:2351-4, 1969.
  68. Aburada M. Takeda S. Shibata Y. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*. 81-88, 1980 .
  69. Aburada M. Takeda S. Sakurai M. Harada M. Pharmacological studies of gardenia fruit. V. Mechanisms of inhibitory effect of genipin on gastric acid secretion and its facilitatory effect on bile secretion in rats. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*. 3(8):423-33, 1980.
  70. Aburada M. Sasaki H. Harada M. [Pharmacological studies of *Gardenia fructus*. II. Contribution of the constituent crude drugs to choleric activity of "Inchinko-to" in rats (author's transl)]. [Japanese] *Yakugaku Zasshi - Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 96(2):147-53, 1976.
  71. Harada M. Tenmyo N. Aburada M. Endo T. [Pharmacological studies of *Gardenia fructus*. I. Effect of geniposide and genipin on the biliary excretion, the gastric juice secretion, and the gastric contraction, and other pharmacological actions (author's transl)]. [Japanese] *Yakugaku Zasshi - Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 94(2):157-62, 1974.
  72. Takeda S. Yuasa K. Endo T. Aburada M. Pharmacological studies on iridoid compounds. II. Relationship between structures and choleric actions of iridoid compound. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*. 3(10):485-92, 1980.
  73. Kawata Y. Hattori M. Akao T. Kobashi K. Namba T. Formation of nitrogen-containing metabolites from geniposide and gardenoside by human intestinal bacteria. *Planta Medica*. 57(6):536-42, 1991.
  74. Yamauchi K. Fujimoto N. Kuwano S. Inouye H. Inoue K. The mechanism of purgative action of geniposide, an iridoid glucoside of

- the fruit of Gardenia, in mice. *Planta Medica*. 30(1):39-47, 1976.
75. Yamano T. Tsujimoto Y. Noda T. Shimizu M. Ohmori M. Morita S. Yamada A. Hepatotoxicity of geniposide in rats. *Food & Chemical Toxicology*. 28(7):515-9, 1990.
  76. Kang JJ. Wang HW. Liu TY. Chen YC. Ueng TH. Modulation of cytochrome P-450-dependent monooxygenases, glutathione and glutathione S-transferase in rat liver by geniposide from Gardenia jasminoides. *Food & Chemical Toxicology*. 35(10-11):957-65, 1997.
  77. Wang CJ. Wang SW. Lin JK. Suppressive effect of geniposide on the hepatotoxicity and hepatic DNA binding of aflatoxin B1 in rats. *Cancer Letters*. 60(2):95-102, 1991.
  78. Wang SW. Lai CY. Wang CJ. Inhibitory effect of geniposide on aflatoxin B1-induced DNA repair synthesis in primary cultured rat hepatocytes. *Cancer Letters*. 65(2):133-7, 1992.
  79. Lee MJ. Hsu JD. Wang CJ. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-caused tumor promotion in benzo[a]pyrene-initiated CD-1 mouse skin by geniposide. *Anticancer Research*. 15(2):411-6, 1995.
  80. Fontana X. Peyrotte I. Valente E. Rossi C. Ettore F. Namer M. Bussiere F. [Glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1): susceptibility gene of breast cancer]. [Review] [56 refs] [French] *Bulletin du Cancer*. 84(1):35-40, 1997.
  81. Aktas D. Ozen H. Atsu N. Tekin A. Sozen S. Tuncbilek E. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism in bladder cancer patients. a marker for invasive bladder cancer?. *Cancer Genetics & Cytogenetics*. 125(1):1-4, 2001.
  82. Puchalski RB. Fahl WE. Expression of recombinant glutathione S-transferase pi, Ya, or Yb1 confers resistance to alkylating agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87(7):2443-7, 1990.