

中山醫學大學生物化學研究所碩士論文
**Master Thesis, Institute of Biochemistry,
Chung Shan Medical University**

建立短暫殖入 *gst* 系統(Transient Transfection)，探討 human
Glutathione S-transferase alpha 對人類肝細胞抵抗致癌物之影響

Set up a transient expression system of *gst* to study how the
overexpression human alpha class Glutathione s-transferase
effects attacks of carcinogen in human hepatocytes.

指導教授：周芬碧 博士 (Fen-Pi Chou, Ph. D.)

研究生：錢宣竹 (Hsuan-Chu Chien)

中華民國九十二年七月

目 錄

縮寫表	1
中文摘要	3
英文摘要	4
緒論	
癌症	5
體內解毒酵素系統或生物轉換酵素系統	6
GST 之性質及功能	8
GST 之分類、結構及命名	10
GST 與癌症	12
GST 與 chemoprevention 間之關係	15
黃麴毒素 B1 (Aflatoxin B1)	15
動機	17
實驗材料	19
實驗設備	22
實驗方法	24
結果	55
討論	70
實驗結果圖表與說明	74
參考文獻	110

縮寫表

AFB1	Aflatoxin B1
AFBO	Aflatoxin B1-exo-8,9-epoxide
ARE	Antioxidant Response Element
BME	Basal Medium Eagle
BSA	Bovine Serum Albumin
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene
DCNB	1,2-dichloro-4-nitrobenzene
DEPC	dimethyl sulfoxide
DMF	Dimethylformamide
DMSO	Diethyl pyrocarbonate
EA	ethacrynic acid
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EtBr	Ethidium Bromide
FBS	Foetal Bovine Serum
G site	GSH binding site
GNTC	Guanidine Thiocyanate
GOT	glutamate oxaloacetate transaminase
GPT	glutamate pyruvate transaminase
GSH	glutathione
GST	glutathione S-transferase
GST A	Alpha class of glutathione S-transferase
GST P	Pi class of glutathione S-transferase
GST M	Mu class of glutathione S-transferase
H site	Hydrophobic ligand binding site
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
MDR	multidrug-resistant
MEM	Minimum Essential Medium
MOPS	Morpholinopropansulfonic acid
MSH	2-Mercaptoethanol
MTT	3 -[4,5 – Dimethylthiazol -2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide
NBD-CL	4-chloro-7-nitrobenzofur
NCBI	National center for biotechnology information
NEAA	Non-essential amino acid
PBS	Phosphate Buffered Saline

PCR	Polumerase Chain Reaction
PSN	Penicillin Streptomycin
RT	Reverse Transcription
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
UDPGA	UDP-glucuronic acid
UGT	UDP-glucuronyl transferases
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-D-B-galactopyranoside
XRE	Xrenobotic Response Element
4-HNE	4-hydroxynonenal

中文摘要

Glutathione S-transferase (GST) 為哺乳動物細胞中一重要的解毒酵素，它可以催化 GSH 與攻擊 DNA 的親電性外來物質結合，並將之代謝排出體外。近年來針對 GST 的研究，認為 GST 的異常表現，可能與肝癌的形成有密切的關係，但對其中 GST 的生化功能及分子機制尚不清楚。過去本實驗室，證實轉殖老鼠 GST M1，可選擇性的保護肝細胞，並加速肝癌細胞的死亡。由於老鼠與人類之生物體不同，GST 在序列及功能上也有些許的差異，因此本實驗利用短暫殖入 GST 系統，探討人類 GST 對人類正常肝細胞及肝癌細胞抵抗致癌物質之影響。結果顯示，將人類 GST A2 轉殖入 Chang liver 及 Hep 3B 細胞後，再以黃麴毒素 B1 處理，兩株細胞的存活率皆比控制組(轉殖 GFP 載體)來的低；且轉殖入的 hGST A2 會造成 GST Alpha 及 total GST 活性顯著的增加，而用來評估肝功能之 GOT 及 GPT 的活性也有增加的現象。這些結果，一方面意謂著 AFB1 確實可對肝細胞造成毒性，導致細胞死亡，另一方面，則初步證實 hGST A2 並不具有保護肝細胞對抗 AFB1 的能力。與過去轉殖 rGST M1 並未得到相同的結果。也許是因為不同之 GST isoform 在不同的組織所扮演的角色、提供的生理功能不同；又或者是因為老鼠與人類之生物體不同，導致 GST 功能性之差異。

英文摘要

Glutathione S-transferase (GST), an important detoxification enzyme in mammalian cells, catalyzes the conjugation of GSH with electrophilic xenobiotics to facilitate their excretion from the body. Recently, some papers reported that an over-expression or down-regulation of certain GSTs might be one of the causes that lead to the formation of hepatoma. However, the biochemical function and molecular mechanism of GST isoforms remain to be clarified. In one previous study, we demonstrated that the transfection of rat GST M1 displayed differential effects on different cell lines by protecting normal hepatocytes and, on the other hand, promoting cell death of cancerous liver cells. In this study, using a transient expression system. We studied how the overexpression human GST A2 affected the response of human normal and cancerous cells against carcinogen. Chang liver and Hep 3B cells were transfected with a construct carrying hGST A2 cDNA, and then treated with Aflatoxin B1. The results showed that the expression of GSTA2 lead to a lower survival rate of both cell lines as compared to the control (transfected with GFP vector). The activities of GST Alpha and total GST were significant higher in the cells transfected with GST A2 than the vector control, so were GOT and GPT activities. These data indicated that hGST A2 was not able to protect hepatocytes against the damage of AFB1. These results are different from these of previous rat GST M1 study, suggesting that different GST isoforms may have different roles in their biological function, or they may participate differentially in physiological function in different species (rat and human).

緒論

癌症

古人有“談虎色變”之說，而今人則為“談癌色變”，癌症已成為台灣頭號殺手，嚴重的威脅到人們的生命。癌症的英文“cancer”，源自於拉丁文“cancrum”，有螃蟹的意思，至於為什麼螃蟹與癌症扯上關係？有一種說法，當時認為癌好發於婦女的乳房上，中間突起，血管向四周擴張，恰似一隻螃蟹。另一說法則是當時已觀察到癌的生長及擴散的能力，有如螃蟹之橫行無忌 (1)。

人體的各種細胞在正常情況下總是不斷的新生、成長、衰老及死亡，按照既定的規律進行新陳代謝，在總數約六十兆個細胞中，其中某個細胞發生突變，進行增殖，形成一個大型細胞塊，這就是癌症的發生，而引起突變的細胞，則稱為“癌細胞”，體內的癌細胞會入侵相鄰的正常細胞，或轉移至較遠的內臟器官，逐漸侵蝕人體。而癌細胞可能發生於身體的任何器官或組織，因所在位可分為肝癌、肺癌、腸癌、乳癌等等，超過 100 種 (2)。

美國科學雜誌指出，過去二十五年來，雖然在癌症研究方面持續的努力，但對於癌症治療及發生率仍然進展有限，目前許多研究，希望針對飲食或藥物，改變體內代謝解毒酵素系統之平衡，以期預防癌症的發生。

體內解毒酵素系統或生物轉換酵素系統

(Biotransformation enzyme systems)

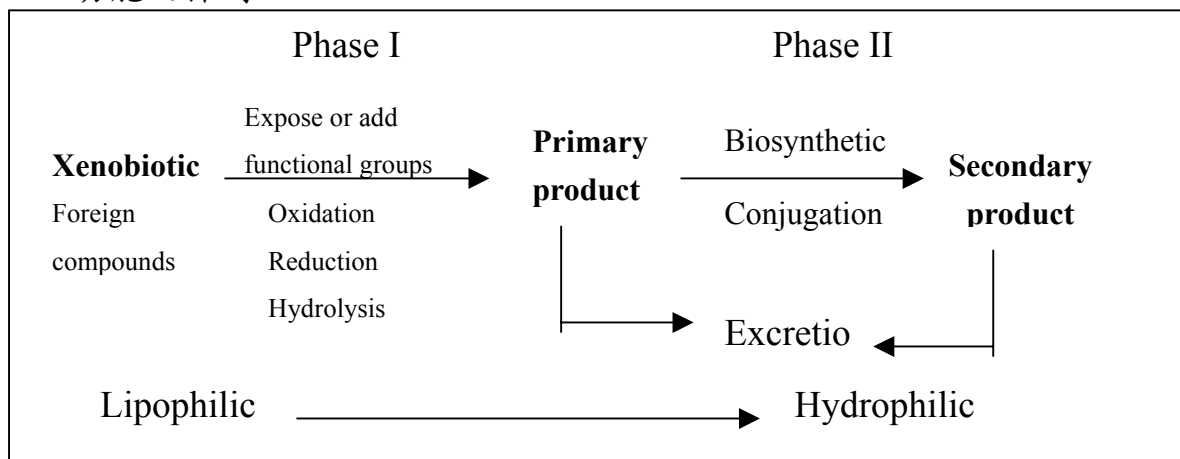
生物體內具有一解毒酵素系統或稱生物轉換酵素系統，可代謝外來的異種物質(Xenobiotics)，例如化學藥物、脂溶性致癌物、環境毒物與代謝廢物、農藥等等 (3)，使其由親脂性轉變為親水性，進而排出體外。在這代謝的過程中，可分為 phase I 及 phase II 兩個階段 (附圖一)。

phase I，主要是 Cytochrome P450s 這一類的酵素 (4, 5)，透過氧化 (oxidation)、還原 (reduction) 以及水解作用 (hydrolysis)，改變 Xenobiotics 的官能基，提高生成物的親水性，以利排出體外，或促使其產物進入 phase II。phase II 則主要是由多種結合酵素所組成，其中包含 Glutathione S-transferase (GST)、UDP-glucuronyl transferases (UGT)、sulfotransferase、N-acetyl transferase 等等。Phase II 主要是針對 phase I 的產物，結合具有高水溶性的小分子，例如 Glutathione (GSH)、UDP-glucuronic acid (UDPGA)、sulfate 等等 (3, 6)。其反應包括有乙醯化反應 (acetylation)、醣醛酸化反應 (glucuronidation)、硫酸化反應 (sulfation) 等等。例如，GST 可將 phase I 解毒酵素代謝的生成產物，加上 GSH，使其轉換成更具水溶性的物質，再由尿液排出體外。

過去的研究發現，phase I 解毒酵素除了可代謝致癌物，但也可能活化某些致癌物，例如黃麴毒素，則需 Cytochrome450 酵素催化，使其具有攻擊 DNA 的能力。然而，phase II 的解毒酵素則不會致癌，因此認

為，phase II 解毒酵素活性的增加，通常可加速致癌物的排除，進而預防癌症的發生 (7)。這兩類酵素的基因上游均含有 Xrenobotic Response Element (XRE)的核酸序列，外來的致癌物質可藉由 XRE 來誘導解毒酵素的表現。而過去的研究也發現，一些 Phase II 酵素的基因上游含有一 Antioxidant Response Element (ARE)的核酸序列，可提供一些具有抗氧化能力之外來物進行反應 (8, 9, 10)，因此專一調控 ARE，也成為目前熱門的研究方向之一。

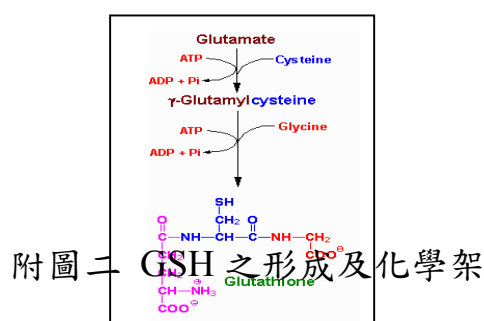
在這一系列的解毒過程中，這些轉換酵素主要存在肝臟，肝臟為動物體內進行代謝解毒的主要器官，因此提升肝臟解毒系統保護細胞機制之研究，便成為重要的課題，本論文主要著重於肝臟解毒酵素 GST 生理功能之探討。

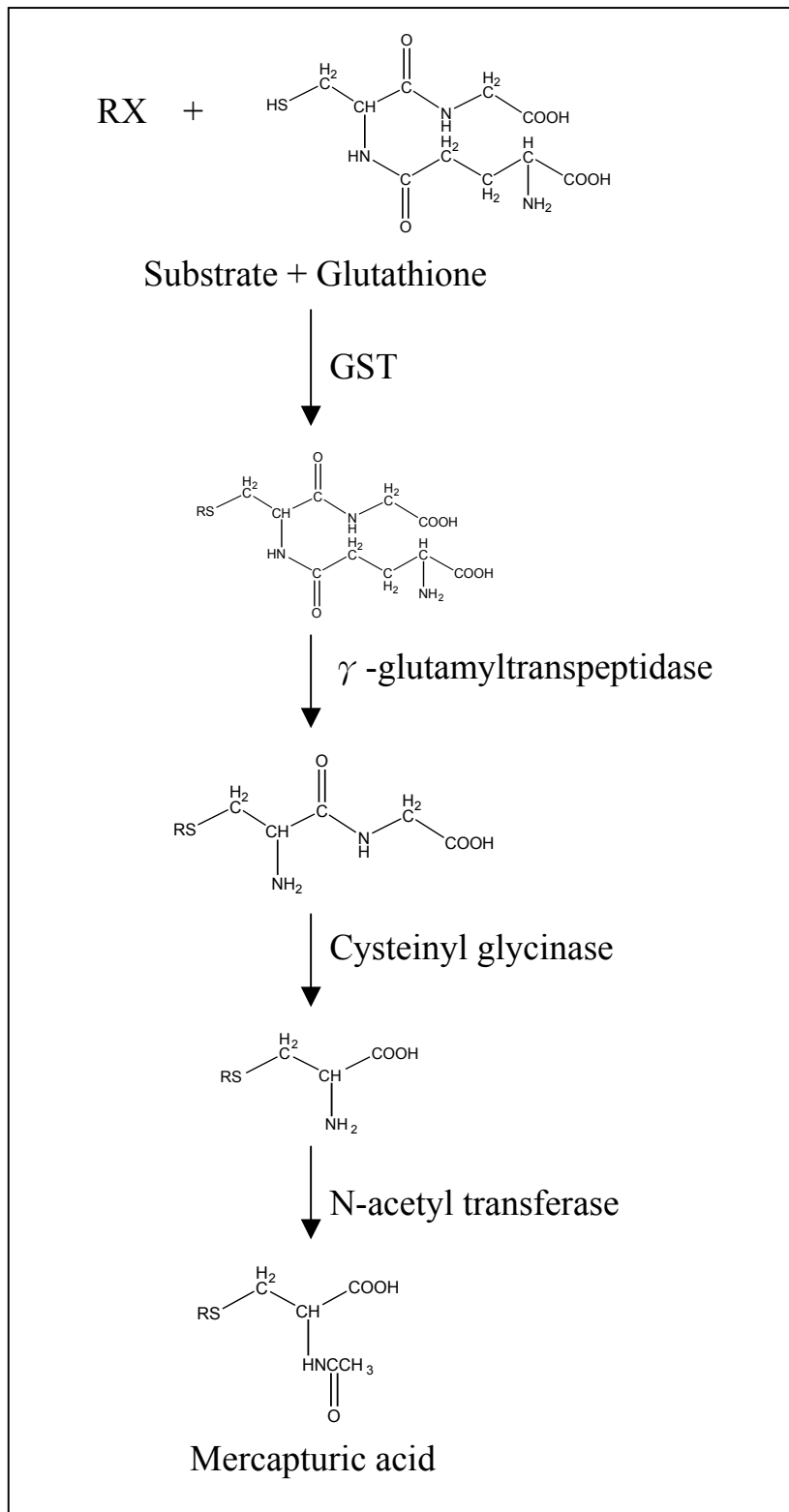


附圖一 生物轉換酵素系

GST 之性質及功能

GST (EC 2.5.1.18) 屬於複合酵素家族 (multirzyme family) (11)，於西元 1961 年，自老鼠肝中被發現 (12, 13)，在哺乳動物中，存在於大部分的器官，例如肝臟、肺、小腸、腎臟、紅血球、表皮等等，尤其以肝臟最多 (14)。在生物轉換酵素系統中，為 Phase II 解毒酵素之一 (15)，主要是催化 GSH 與一些具有親電性、疏水性、會攻擊 DNA 的 Xenobiotic 進行結合，提高化學物質的水溶性，進而排出體外。GSH 是由三個氨基酸所組成的蛋白質，其分別為 Glutamate、Cysteine 以及 Glycine (附圖二)，為細胞內含量最豐富的低分子量硫醇(thiol)，人類細胞中，GSH 的含量約為 2mM，而在肝細胞中，則可高達 10mM。其解毒反應途徑則為 GSH 會與外來之 Xenobiotic 結合，透過 GST 的催化，依序將 Glutamate 及 Glycine 移除，剩下的 Xenobiotic 與 Cysteine 所形成的 compound，會透過 N-乙醯轉移酵素(N-acetyl transferase)轉變成硫醚氨酸(Mercapturic acid)，由尿液排出體外(附圖三) (16)。





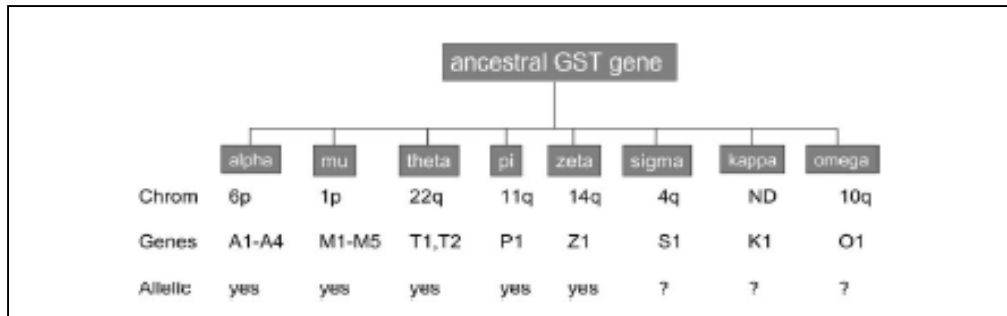
附圖三 GST 解毒反應途徑

GST 之分類、結構及命名

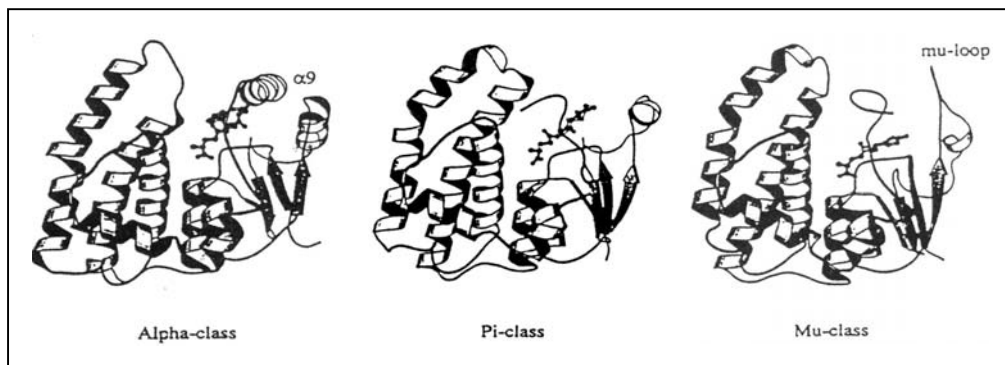
生物體內有兩大類的 supergene families 所 encode 的蛋白質具有 GST 的活性，其中至少有十六種基因所 encode GST 蛋白表現於細胞質 (cytosolic GST)；此外，至少有六種基因所 encode GST 蛋白表現於細胞膜(membrane-bound GST) (17)，主要是存在內質網 (endoplasmic reticulum)或是粒線體 (mitochondria)的外膜上。而大部分的 GST 都存在於細胞質中，為水溶性，至於本論文所用之 GST 也是屬於 cytosolic GST。

GST 具有多種同分異構酶(isoenzyme)及多種不同的次單元體 (subunit)，依據物理結構特性、化學、氨基酸序列的相似性和免疫交叉試驗，可將哺乳類動物 cytosolic GST 分成八大類，其分別為 alpha、mu、theta、pi、zeta、sigma、kappa 以及 omega (17, 18, 19)，附圖四標示著這八類的 GST 所存在的染色體位置，及其所再細分之 isoform。不同 isoform GST 之表現有組織特異性 (20)，細胞質中的 GST 主要以 A、P、M 三族為主，而這三個也為目前研究最為廣泛之 isoform，其分別由 221、209 以及 217 個氨基酸所組成 (21, 22)；在酸鹼特性方面，A 族屬於鹼性，M 族為中性，P 族則為酸性；在三級結構上，非常的類似，如圖五。在四級結構上，一般的情況下，GST 是以 monomer 的型式存在，而在活化的情況下，cytosolic GST 是以 homodimer 或是 heterodimer 存在，而 microsomal GST 則是以 trimer 的型式存在，在結構中，GST 具有二個活

化位(activity site)，其一為 GSH binding site (G site)，也就是提供 GSH 結合的位置；另一則為 Hydrophobic ligand binding site (H site)，其可提供一些疏水性，會攻擊 DNA 的親電性物質進行結合作用(interaction)；不同類的 GST 同功酵素，其蛋白質有一共同的特徵，皆具有兩個 domain 結構，其一為 N-terminal domain，是由 3 個 α -helices 及 4 個 β -sheet 所組成，組成的順序為 $\beta \alpha \beta \alpha \beta \beta \alpha$ ，N-terminal domain (22, 23) 主要包含 G site；另一個 domain 為 C-terminal domain，是由 4~6 個 α -helices 所組成，其主要包含 H site (21)，兩個 domain 之間由一個 loop 連結。在命名上，不同的次單元(subunit)或是 isoenzyme type 則用阿拉伯數字標示 (23)，例如 homodimer of type 1 mu subunits，則標示為 GST M1-1；heterodimer of type 1 and 2 alpha subunits，則標示為 GST A1-2。至於 isoenzymes 之對偶基因不同時，則利用英文字母小寫來標示，例如 GST M1a-1b，表示 GST M hybrid of 1a and 1b alleles(18)。



附圖四 GST 之 supergene family



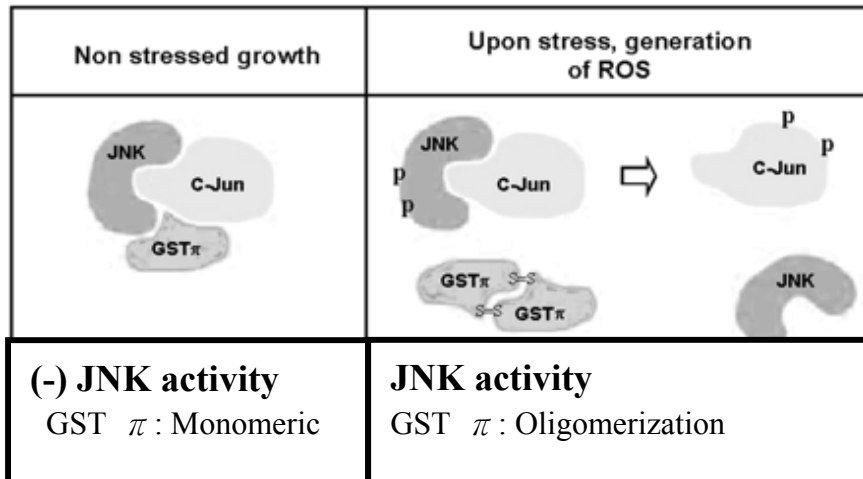
附圖五 GST A, P, M 之結構

GST 與癌症

GST 和 carcinogenes 的代謝非常有關，由於 GST 的代謝方式通常是生物不活化作用，因此毒性物質或是致癌物一旦成為 GST 受質被代謝後，並不會活化成毒性更強的物質，因此 GST 和癌症之間應有著密不可分的關係，近年來許多學者致力於 GST 與癌症相關性之研究，不同的 GST isoform 對不同的癌症皆扮演著不同的角色 (20)，過去對於 GST 的研究大多著重於 GSTP，在許多的癌症中，GSTP 會有過度表現，例如直腸癌、卵巢癌、口腔癌、淋巴癌、頭頸部鱗狀上皮細胞癌等等 (24, 25)。因此 GSTP 可應用做為腫瘤指標(tumor marker)，而近年來也發現，攝護腺癌的病人其 GSTP 的 promoter 被過度甲基化(hypermethylation) (26, 27,

28), 所以不會表現, 以往是利用 PSA 來檢測, 然而 PSA 並無法檢測出早期的攝護腺癌, 2000 年有學者利用 GST P 檢測早期之攝護腺癌, 其檢出率高達 94%。所以 GST P 並非表現在所有的癌細胞, 而是有組織特異性的。而在 1999 年發現, GST P1 可與 JNK 結合, 使 JNK 無法與下游之標的基因 c-jun 結合, 在氧化壓力的刺激下, 可透過大量表現 GST P, 抑制了 JNK 活性 (30), 使細胞免於因氧化壓力所造成的死亡 (附圖六) (31), 同時, 他們也發現, 三種主要的 GST isofome (GST A、GST P、GST M) 在 monomer 的型態時, 都具有抑制 JNK 活性的功能, 而其中又以 GST P 的抑制能力最強。而 GST P 對於 ethacrynic acid (EA) 或是鹼基物質 (thymine 和 uracil propenal) 的解毒作用, 具有高度之活性 (32); hGSTP-1 可以有效的代謝 benzo(a)pyrene (BOPE) (33), 此外, GST P 會大量表現在 multidrug-resistant (MDR) 細胞 (25,34), 對大部份的抗癌藥具有抗藥性 (25), 同樣的, GST A 也會代謝一些抗癌藥, 例如 cisplatin、alkylating agent 等等, 近年來針對 GST A 的研究, 發現 GSTA 不僅具有 GST 本身的催化活性, 且還具有 GSH peroxidase 的活性, 可將 ROS 所造成的 Lipid hydroperoxides 代謝還原成 Lipid alcohols, 進而達到保護的作用 (35, 36, 37, 38, 39, 40)。2002 年有學者發現, 在 2002 年有學者發現, 在肝臟新生的過程中, GST A4 透過 TNF α 、IL6、EGF 調控, 經由 PI3K 或是 MAPK pathway, 使細胞走向增生 (Survival / Proliferation) 的途

徑 (41)。而 M 族 GST 對於某些抗癌藥物也具有抗藥性，且與組織發炎有關 (42, 43, 44)。在正常的肝細胞，M 族 GST 也會表現，一旦肝細胞受到致癌化合物之刺激，其表現量會明顯增加，因此推論 M 族 GST 在肝細胞中亦扮演著不可或缺的保護角色 (19, 45)。而近年來也發現，mGSTM1-1 為 Ask1 內生性之抑制劑，並透過抑制 Ask1 來調節 cytokines 及 stresses 所誘發之 JNK/SAPK 及 p38 之活性，使細胞存活下來，免於走向死亡的命運 (46)。此外，GST M 可氧化 trans-stilbene，並在 polycyclic aromatic hydrocarbon epoxides 和 diolepoxides 的轉換過程中具有高度的催化能力。在過去有關 M 族 GST 研究不多，所以了解並不深入。生物體藉由不同族的 GST 有效的代謝外源性或內生性的毒性化合物，以防禦這些毒性物質之侵害，使自身存活下來。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。



附圖六 monomer 的型態的 GST P，具有抑制 JNK 活性的能力(31)

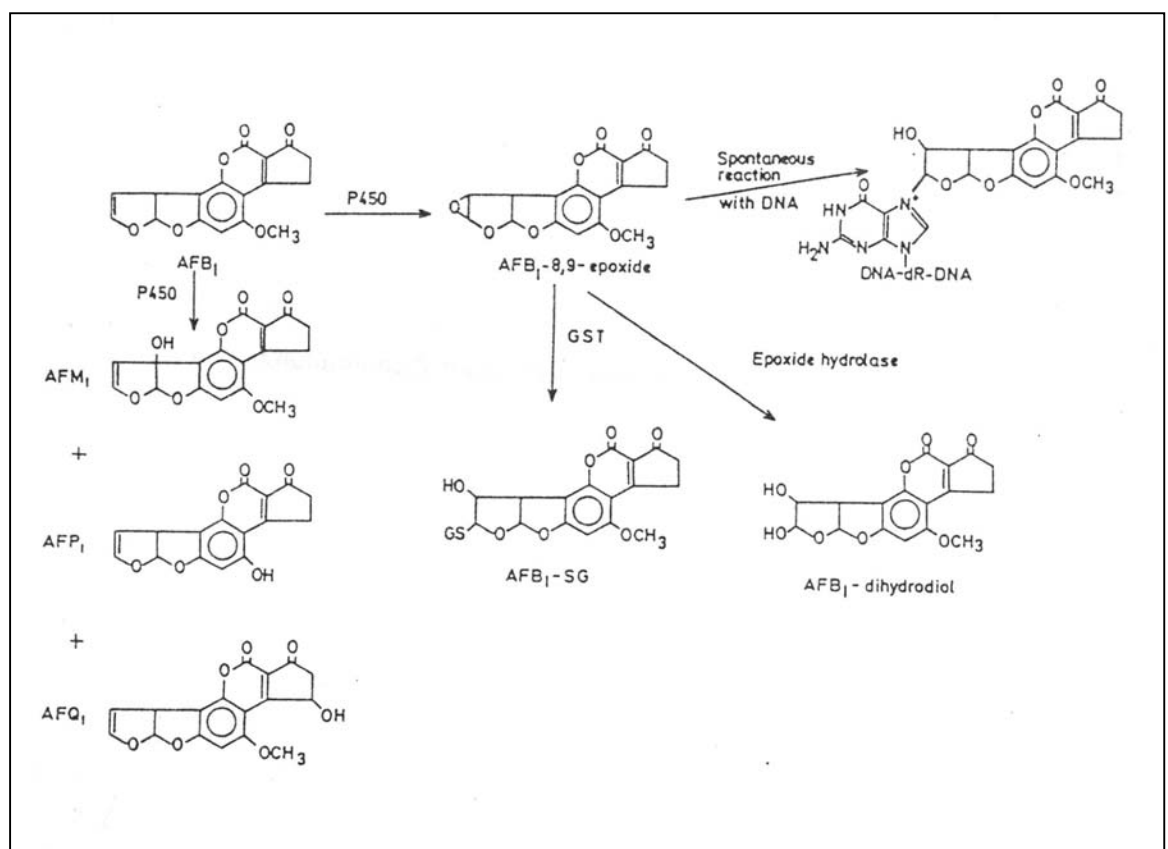
GST 與 chemoprevention 間之關係

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 (33, 43, 44)。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 (49)。

黃麴毒素 B1 (Aflatoxin B1)

黃麴毒素(Aflatoxin)是黴菌在生長後期產生的有毒代謝物，主要存在於五穀類(特別是花生)，屬於真菌毒素(mycotoxin)，黃麴毒素 B1、B2、G1 以及 G2 都是香豆素(coumarin)的衍生物，其中以 Aflatoxin B1(AFB1)含量最多且最具致癌性，常導致人類及動物的肝臟病變。AFB1 經 cytochrome P450 作用後，可經由兩個途徑代謝，其一為去毒作用，可產生 Aflatoxin M1、Aflatoxin P1 以及 Aflatoxin Q1，使其達到去毒作

用；而另一途徑則為產生 Aflatoxin B1-exo-8,9-epoxide (AFBO)，而這個化合物具有基因毒性，會攻擊 DNA 的鳥票呤(guanine)，不過此化合物也可經由兩個路徑而達到去毒性作用，一為經由 Epoxide hydrolase 代謝成 AFB1-dihydrodiol；另一則為經由 GST 代謝成 AFB1-SG，而達到去毒作用 (50)(附圖七)。



附圖七 黃麴毒素 B1 之代謝途徑

動機

過去二十五年來，雖然在癌症研究方面持續的努力，但對於癌症治療及降低發生率仍然進展有限。近年來許多科學家希望針對飲食或藥物，改變體內代謝解毒酵素系統之平衡，以期預防癌症的發生。過去許多的研究，認為肝臟解毒酵素 GST 可能與肝癌的形成有密不可分的關係。GST 具有多種同分異構酶，在哺乳動物中，主要以 A、P、M 這三族為主，而這三個也為目前研究最為廣泛之 isoform，例如 GST A 被認為在治療癌症時，對多數抗癌藥物具有抗藥性，此外，GST A 除了具有 GST 本身的催化活性外，還具有 GSH peroxidase 的活性，可以將脂質過氧化反應 (Lipid peroxidation) 所產生的 Lipid hydroperoxides 代謝還原成 Lipid alcohols；GST P，在許多癌細胞中經常有過度表現 (overexpression) 的現象，可應用做為一個腫瘤指標 (tumor marker)；GST M，對某些抗癌藥物具有抗藥性，且和組織的發炎有關，GST M 基因的缺陷，可能會增加癌症的罹患率。雖然 GST 早在 1961 年即被發現，然而，GST 生化功能的調控以及詳細之分子機制尚不明確。過去本實驗室，已證實經短暫轉殖 rGST M1，大白鼠初代肝細胞及人類肝細胞 Chang liver 對抵抗 AFB1 毒害的能力有提昇的現象，可減緩 AFB1 所誘發之毒性，而此現象並不發生在人類肝癌細胞 Hep G2。由於老鼠與人類之生物分類不同，GST 在序列及功能上也有些許的差異，因此本篇論文以人

類之 GST gene 對 Hep 3B 及 Chang liver 細胞進行短暫轉殖實驗，探討 GST A 對人類正常肝細胞及肝癌細胞的影響，以進一步釐清 GST 之生理功能以及詳細之分子機制。

實驗材料

- 一、 人類肝組織：由台中榮總一般外科提供
- 二、 實驗細胞 (Hep 3B、Chang liver)：購自食品工業發展研究所菌種中心/國家衛生研究院細胞庫。
- 三、 藥品來源：

1. RNA 之萃取

Guanidine Thiocyanate (GNTC)---Sigma
Sodium citrate---Sigma
N-lauroylsarcosine---Sigma
 β -Mercaptoethano---Sigma
Morpholinoproparsulfonic acid---Boehringer Ingelheim
Bioproducts partnership
Sodium acetate---Sigma
EDTA---Pharmacia Biotech
DEPC---MD Bio
Formamide---Sigma
Formaldehyde---Sigma
Phenol pH4.0---Amersham
Chloroform---Sigma
Isopropanol----日本和光純藥工業株式會社
Ethanol---Nihon shiyaku

2. RT-PCR

MMLV Reverse transcriptase---Promega
MMLV Reverse 5x Buffer---Promega
Recombinant Rnasin Ribonuclease Inhibitor---Promega
dNTPs---生工有限公司
Primer---生工有限公司

3. DNA gel 及電泳

Agarose---Amersham
Tris base---Amersham
Glacial acetic acid---TEDIA
Bromophenol blue---Sigma
Xylene cyanol FF---Sigma

4. 基因選殖

Ligase I ---Takara
EcoRI---Boehringer mannheim
Xba I---Boehringer mannheim
Sal I ---Transgenomic
PstI ---Krameil Biotech

5. 細菌培養

Agar---GIBCO
Pepton---AMRESCO
Yeast extract---GIBCO

NaCl---日本昭和化學株式會社

X-gal---STRATAGENE
IPTG---MD Bio
DMF---J. T. Baker

6. 質體 DNA 之萃取

Glucose---Sigma
SDS---Pharmacia Biotech
Potassium acetate---Sigma

Phenol Ph 8.0---生工有限公司

7. Cell culture

PBS---Gibco
MEM---Gibco
BME---Bio WEST
NEAA.---GIBCO
PSN---GIBCO
Glutamin---GIBCO

DMSO---MERCK

FBS---GIBCO

Calf serum--- GIBCO

Trypsin-EDTA---GIBCO

Sodium bicarbonate--- 日本和光純藥工業株式會社

8. GST 活性之測定

NBD-CL---Biochemica (Fluka)

GSH---Sigma

DCNB---MERCK

Potassium phosphate---OSAKA

Ethanol absolute---Scharlau

9. MTT 之測定

MTT---Sigma

Isopropanol---- 日本和光純藥工業株式會社

10.Kit

Gel extraction system---Viogen

Plasmid DNA extraction kit--- GIBCO

DNA ligation kit---TakaRa

Lipophetamine--- GIBCO

實驗設備

天秤	OHAUS
微量天秤	Mettler Toledo AB104
水平是電泳槽 (DNA)	Mupid-2
水平是電泳槽 (RNA)	Hoefer Max HE99
細菌培養箱	Orbital shaking incubator Os 1500
加熱攪拌器	Corning Stirrer/Hot plate
微量高速離心機	Eppendorf centrifuge 5415C
高速離心機	Sigma 2K15
超高速離心機	Hitach, himac CP 85 β Beckman L-80
分光光度計	Beckman DU640 Spectrophotometer
PH meter	Jenco modle 6200
無菌操作台	NuAIR class 2 Type a/B3
震盪器	Vortex-2 Genin
數位影像分析系統	Alphar Imager 2000
無菌操作台	海天 Laminar Flow
組織均質機	EYELA MAZELAZ
震盪水浴槽	TIHDERN Water Bath, Model BT-15

烘箱	Memmert
-70°C 冰箱	SANYO UltraLow
細胞培養箱	NAPCO Model 6100
超音波洗淨機	Branson 8200
螢光顯微鏡	Nikon

實驗方法

一、RNA 之純化

(一) RNA 之抽取：

[步驟]

將人的肝臟組織(由台中榮總提供)，加入適量的 Solution D-MSH，將組織研磨成黏稠均勻透明狀，將黏稠液倒至 25 ml 的離心管中依次加入適量 2M Sodium acetate (pH4.0)，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 12000 g、4 °C、離心 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 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 overnight。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 μ l 的 glycogen，混合均勻，放入-20°C 沉澱，2 小時至 overnight。於 4 °C，以轉速 12000 g 離心 20 分鐘，用 pipette 抽乾液體，加入 1 ml 70%的酒精清洗(pipette 跳起來才表示有洗到)，於 4 °C，轉速 12000 g 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。

[藥品製備]

《DEPC-treated water》

成分	重量 / 體積
d ₂ H ₂ O	1998 ml
DEPC	2 ml
室溫靜置 2 小時以上 (避光)	
Autoclaved	
Store at room temperature	

《Solution D》

成分	重量 / 體積
d ₂ H ₂ O	50 ml
Guanidine Thiocyanate (GNTC)	47.28 g
Sodium citrate	0.735 g
Adjust pH to	pH 7.0
N-lauroylsarcosine (sarcosyl)	0.5 g
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	99.9 ml
DEPC	100 µl
Store at 4 °C	

《2 M Sodium acetate》

成分	重量 / 體積
DEPC-treated water	75 ml
Sodium acetate	16.41 g
Adjust pH to	pH 4.0
Add DEPC-treated water until total volume is	100 ml
Filter	
Store at 4 °C	

《TE buffer》

成分	重量 / 體積
Tris-HCl	0.1576 g
EDTA	0.037 g
Adjust pH to	pH 8.0
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	100 ml
Store at 4 °C	

(二) RNA 電泳：

[步驟]

1. 1.2% RNA denaturing gel 之製備：

稱 0.36 g 的 agarose，並加入 26.1 ml DEPC-treated water，微波加熱至沸騰後，待冷卻至約 60 °C，加入 3 ml 10X MOPS，0.9 ml 37% formamide，混合均勻後，倒入模板中，凝固後使用。

2. RNA 樣本的處理：

取 5 µg RNA，加入 2.25 µl 的 10X MOPS、4 µl 37% formaldehyde、11.25 µl formamide，混合均勻後，於 55 °C 的水浴作用 15 分鐘，並馬上置於冰上，加入 2.5 µl 的 10X RNA Loading dye。

3. RNA 電泳：

將處理過的 RNA sample 注入齒槽中，倒入 RNA electrophoresis running buffer，於電壓 100 伏特進行電泳半小時左右，利用 Ethidium Bromide (EtBr) 染色及 DEPC-treated water 退染，並以拍立得照相機在紫

外線的照射下拍攝 RNA 的電泳圖。

(三) RNA 之定量：

[步驟]

利用 DEPC-treated water 將抽出的 RNA 稀釋 100 倍，以分光光度計測定溶液之 OD₂₆₀ 及 OD₂₈₀，進而計算 RNA 之濃度及純度。

[計算]

$$\frac{260 \text{ nm 吸光值}}{25} \times 100 \text{ (稀釋倍數)} = ? \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

[藥品製備]

《1.2 % RNA agarose gel》

成分	重量 / 體積
Agarose	0.36 g
DEPC-treated water	26.1 ml
Heated	
10X MOPS	3 ml
37 % formamide	0.9 ml
Fresh prepared	

《10X MOPS》

成分	重量 / 體積
DEPC-treated water	800 ml
MOPS	41.8 g
Sodium acetate	6.805 g
0.5 M EDTA	20 ml
Adjust pH to	pH 7.0
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	1000 ml
Store at room temperature (in the dark)	

《0.5 M EDTA》

成分	重量 / 體積
D ₂ H ₂ O	70 ml
EDTA	18.61 g
Adjust pH to	pH 8.0
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	100 ml
Store at 4 °C	

《RNA electrophoresis running buffer》

成分	重量 / 體積
10X MOPS	40 ml
DEPC-treated water	360 ml
Fresh prepared	

二、. RT-PCR

(一) Reverse Transcription (RT)

[步驟]

將 GST A2 或 GST P1 之 RNA 反轉錄為 cDNA。做法為：取 5 μ g 的 RNA 加上 DEPC-treated water，以溫度循環機 70 °C 進行 5 分鐘，去除 RNA 之髮夾 (hairpin) 結構，立即置於冰上，避免 RNA 之二級結構再度形成，加入 10 μ l 的 5X Reverse Transcription buffer、4 μ l 的 2.5 mM dNTP、2.5 μ l oligo dT (50 pmole/ μ l)，mix 均勻後，放入溫度循環機，以 42 °C 預熱 5 分鐘，再加上 0.5 μ l 的 Reverse Transcriptase (200 U/ μ l)，進行反轉錄作用，其條件為：42 °C 1 小時，99 °C 5 分鐘。RT 完成之後儲存在 4 °C 或 -20 °C。

(二) Polymerase Chain Reaction (PCR)

[步驟]

取 17 μl (GST A2)或 18.8 μl (GST P1) DEPC H₂O, 4 μl (GSTA2)或 5 μl (GST P1)10X PCR buffer, 3.2 μl 2.5 mM dNTP (final 濃度為 0.2 mM), 4.8 μl (GSTA2)或 2 μl (GST P1)25 mM MgCl₂ (final 濃度為 3 mM), 5 μl 5' 端的 primer(10 pmole/ μl)及 5 μl 3' 端的 primer (10 pmole/ μl), 加上 10 μl 的 cDNA (RT 產物), 輕輕 mix 均勻, spindown 後, 加一滴礦物油, 以溫度循環機, 94 °C 預熱 5 分鐘, 加 Taq (5u / μl) 1 μl , 然後在 94 °C, 2 分鐘, 55 °C (GSTA2)或 56 °C (GST P1), 1 分鐘, 72 °C, 2 分鐘, 進行 35 cycle, 最後 72 °C, 20 分鐘。PCR 完成後儲存在 4 °C 或 -20 °C。

(三) DNA 之電泳：

[步驟]

1. 1.5% DNA gel 之製備：

稱 1.5g 的 agarose, 並加入 98.5 ml 1X TAE buffer, 微波加熱至沸騰後, 待冷卻至約 40 °C, 倒入模板中, 凝固後使用。

2. DNA 電泳：

取 5 μl 的 PCR 產物加入 1 μl 之 6X DNA loading dye 混合均勻, 於電壓 100 伏特進行電泳半小時左右, 利用 EtBr 染色及二次水退染, 並以拍立得照相機在紫外線的照射下拍攝 DNA 的電泳圖。

[藥品製備]

《1.5 % Agarose gel》

成分	重量 / 體積
Agarose	1.5 g
1X TAE buffer	98.5 ml
Store at 4 °C	

《50X TAE buffer》

成分	重量 / 體積
Tris-base	48.4 g
Glacial acetic acid	11.42 ml
0.5 M EDTA (pH8.0)	20 ml
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	200 ml
Store at 4 °C	

《DNA 6X loading dye》

成分	重量 / 體積
Bromophenol blue	0.025 g
Xylene cyanol FF	0.025 g
Glycerol	3 ml
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	10 ml
Store at 4 °C	

三、人類 GST A2 及 GST P1 之 clone

(一) 膠體中 DNA 片段之純化

純化的方法是使用 VIOGENE 之 gel extraction miniprep kit

[步驟]

將跑完 DNA 電泳，含有 DNA 的膠切下並稱重(約 50~300 mg)，置入 1.5 ml 之 micro-tube 中，加入 0.5 ml Buffer GEX，於 60°C 作用 10 分鐘，使其完全溶解後，將 gel extraction column 置入 collection tube 中，把溶解的膠體混合液置入 column 中，以 12000 rpm 之轉速離心 45 秒，丟棄過濾的液體，並於 column 中加入 0.5 ml 之 wash I buffer，以 13000 rpm 之轉速離心 45 秒，丟棄過濾的液體，之後，於 column 中加入 0.7 ml 之 wash II buffer，以 12000 rpm 之轉速離心 45 秒，丟棄過濾的液體，再以 12000 rpm 之轉速離心 3 分鐘，去除多餘的酒精，最後將 column 移到新的 micro-tube 中，並加入 20 µl TE buffer 靜置一分鐘，以 12000 rpm 之轉速離心 2 分鐘，將 DNA 沖提出來，定量或進行電泳後，儲存於 -20 °C 冰箱中。

(二) 大量質體 (plasmid) DNA 之萃取

[步驟]

取 100µl 菌液 (pGEM 或 pEGFP 或 pCDNA3) 接種於 2 ml 的 LB 培養液，於 37°C 200 rpm 培養隔夜，再將 2 ml 菌液接入相同培養液 100 ml，並加入適當適量之抗生素，同樣條件下培養至 O.D. 值為 1。將菌液分裝於離心管中，以 3500 rpm 轉速 4 °C 離心 10 min，倒掉上清液，加入 2 ml 50 mM Tris，pH8.0，將 pellet 完全打散，再加入 0.5 ml lysozyme

(40mg/ml)，置放於冰上 15 分鐘後，加入 333.75 μ l 250mM EDTA，pH8.0，混合均勻後，靜置在冰上 15 分鐘。加入 3.35 ml solution II，輕輕混合均勻，靜置於冰上 5 min，加入 2.35 ml 的 solution III 混合均勻，靜置於冰上 5 分鐘。以 12000 rpm 轉速 4 $^{\circ}$ C 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 3500 rpm 轉速 4 $^{\circ}$ C 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 3500 rpm 轉速 4 $^{\circ}$ C 離心 10 分鐘。同樣的吸取最上層至另一新試管，加入 1/10 體積之 3M sodium acetate (PH7.0)，混合後加入等體積冰的 99% 的酒精，放在-20 $^{\circ}$ C 冰箱中 24 小時。以轉速 12000 rpm 轉速 4 $^{\circ}$ C 離心 10 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 1 ml 的 TE buffer (PH8.0)，並分裝成二管 1.5 ml 之 micro-tube，每管加入 1 μ l RNase (10mg/ml)，放入 37 $^{\circ}$ C 的水浴槽 30 分鐘，每管加入 1 ml 的 phenol (pH8.0)，在室溫下，來回溫和地搖晃 5 分鐘，12000 rpm 轉速 4 $^{\circ}$ C 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，3500 rpm 轉速 4 $^{\circ}$ C 離心 10 分鐘。小心地吸取上清液，至另一新管子，再次加入 1 ml 之

chloroform，以同樣條件離心，然後加入 1/10 體積之 3M sodium acetate (PH7.0)，先混和，再加入同體積之 99%酒精，放入-20°C 沉澱隔夜。以 12000 rpm 之轉速 4°C 離心 10 分鐘，倒乾上清液，加入 70%酒精，來回溫和地晃動幾次。再以 12000rpm，4°C 離心 10 分鐘，倒乾上清液，蒸乾 pellet。加入適量之 TE buffer (pH 8.0)溶解 DNA，定量並進行 DNA 電泳。

[藥品製備]

《LB broth》

成分	重量 / 體積
d ₂ H ₂ O	190 ml
Peptone	2 g
Yeast extract	1 g
NaCl	1 g
Adjust pH to	pH 7.0
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	200 ml
Autoclaved	
Store at 4 °C	

*Ampicillin: 100 g / ml

*Kanamycin: 60 g / ml

《Ampicillin stock: 20 mg / ml》

成分	重量 / 體積
Ampicillin powder	400 mg
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	20 ml
Store at -20 °C	

《Lysozyme》

成分	重量 / 體積
Lysozyme	40 mg
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	1 ml
Fresh prepared	

《Solution II》

成分	重量 / 體積
NaOH (0.2M)	0.8 g
1% SDS	10 ml
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	100 ml
Store at room temperature (in the dark)	

《Solution III》

成分	重量 / 體積
5 M Potassium acetate	60 ml
Glacial acetic acid	11.5 ml
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	100 ml
Store at 4 °C	

《3 M Sodium acetate, pH 7.0》

成分	重量 / 體積
Sodium acetate	24.609 g
Adjust pH to	PH 7.0
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	100 ml
Store at 4 °C	

(三) DNA 之定量

[步驟]

利用無菌水或 TE buffer 將抽出的 DNA 稀釋 100 倍，以分光光度計測定溶液之 OD₂₆₀ 及 OD₂₈₀，進而計算 RNA 之濃度及純度。

[計算]

$$\frac{260 \text{ nm 吸光值}}{20} \times 100 (\text{稀釋倍數}) = ? \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

(四) vector 與 cDNA 之切割(digestion)

[步驟]

取 vector 或 cDNA，加入適當及適量的限制酶及反應 buffer，並以無菌水補足體積，以溫度循環機 37°C 作用 3 小時進行切割作用，之後於 70°C 作用 10 分鐘，使限制酶失去活性，終止切割作用，將檢體儲存於 -20 °c 冰箱中。

(五) 接合作用(Ligation)

使用 TakaRa 之 DNA ligation kit

[步驟]

取已經用 restriction enzyme 作用的 cDNA 及 vector (莫耳濃度約 1:1~4:1)，加入適量的 ligation buffer I，混合均勻後，以溫度循環機 11 °C，作用 16 小時以上。

[條件]

GST A2

1. GST A2—pGEM

(1) digestion of GST A2 cDNA

成分	重量 / 體積
GST A2 cDNA	2 µg

ECORI	0.5 µl
XbaI	0.5 µl

H buffer	1 µl
滅菌水	補至總體積 10 µl
Total	10 µl

(2) digestion of pGEM vector

成分	重量 / 體積
pGEM vector	2.2 µg

ECORI	0.5 µl
--------------	--------

<i>XbaI</i>	0.5 µl
H buffer	1 µl
滅菌水	補至總體積 10 µl
Total	10 µl

(3) ligation of GST A2 cDNA and pGEM vector

[計算]

GST A2 cDNA : pGEM
200 ng / 0.752 kb : 220 ng / 3.2 kb = 3.89 : 1

[條件]

成分	重量 / 體積
GST A2 cDNA	1 μ l (200 ng)
pGEM vector	1 μ l (220 ng)
ligation buffer I	2 μ l

2. GST A2 (from GST A2-pGEM) -- pEGFP

(1) digestion of GST A2-pGEM

成分	重量 / 體積
GST A2-pGEM	27 μ g

ECoRI		3 μ l
<i>Sall</i>		3 μ l
H buffer		6 μ l
滅菌水		補至總體積 60 μ l
Total		60 μl

進行 digestion 之後，將產物進行 DNA 電泳，再利用 VIOGENE

之 gel extraction miniprep kit 將膠體中 GST A2 DNA 片段純化回收之。

(2) digestion of pEGFP vector

成分	重量 / 體積
pEGFP vector	1.4 μ g

ECoRI		0.7 μ l
<i>Sall</i>		0.7 μ l
H buffer		1.5 μ l
滅菌水		補至總體積 15 μ l
Total		15 μl

(3) ligation of GST A2 cDNA from GSTA2-pGEM and pEGFP vector

[計算]

GST A2 cDNA : pEGFP

$$98.36 \text{ ng} / 0.752 \text{ kb} : 205 \text{ ng} / 4.7 \text{ kb} = 3 : 1$$

[條件]

成分	重量 / 體積
GST A2 cDNA	2 μ l (98.36 ng)
pEGFP vector	2.2 μ l (205 ng)
ligation buffer I	4.2 μ l

3. GST A2 (from GST A2-pGEM)—pcDNA3

(1) digestion of GST A2-pcDNA3

成分	重量 / 體積
GST A2-pcDNA3	27 μ g

	ECoRI	3 μ l
<i>Xba</i> I		3 μ l
H buffer		6 μ l
滅菌水		補至總體積 60 μ l
Total		60 μ l

進行 digestion 之後，將產物進行 DNA 電泳，再利用 VIOGENE 之 gel extraction miniprep kit 將膠體中 GST A2 DNA 片段純化回收之。

(2) digestion of pcDNA3 vector

成分	重量 / 體積
pcDNA3	1.28 μg

	ECoRI	0.6 μl
	XbaI	0.6 μl
H buffer	1.2 μl	
滅菌水	補至總體積 12 μl	
Total	12 μl	

(3) ligation of GST A2 cDNA from GST A2-pGEM and pcDNA3 vector

[計算]

GST A2 cDNA : pcDNA3
 $58.5 \text{ ng} / 0.752 \text{ kb} : 200 \text{ ng} / 5.4 \text{ kb} = 2.1 : 1$

[條件]

成分	重量 / 體積
GST A2 cDNA	1.5 μl (58.5 ng)
pGEM vector	2 μl (200 ng)
ligation buffer I	3.5 μl

GST P1

1. GST P1—pGEM

(1) digestion of GST P1 cDNA

成分	重量 / 體積
GST P1 cDNA	0.8 μg

	ECoRI	0.4 μl
<i>PstI</i>	0.4 μl	

H buffer	1.2 μ l
滅菌水	補至總體積 12 μ l
Total	12 μl

(2) digestion of pGEM vector

成分	重量 / 體積
pGEM vector	2.2 μ g

ECoRI		0.5 μ l
<i>PstI</i>	0.5 μ l	
H buffer	1 μ l	
滅菌水	補至總體積 10 μ l	
Total	10 μl	

(3). ligation of GST P1 cDNA and pGEM vector

[計算]

GST P1 cDNA : pGEM

167.5 ng / 0.692 kb : 220 ng / 3.2 kb = 3 : 1

[條件]

成分	重量 / 體積
GST P1 cDNA	2.5 μ l (167.5 ng)
pGEM vector	1 μ l (220 ng)
ligation buffer I	3.5 μ l

(六) 轉殖 (transformation)

1. Competent cell 的製備：

[步驟]

從-20 °C 取出 JM109 的菌種，放至 2 ml 的 LB 培養液中，在 37 °C 培養過夜。隔天取 1 ml 至 100 ml 新鮮的 LB 培養液，放在 37 °C 中，劇烈搖晃 (200 rpm) 培養至 600 nm 的波長下，吸光值為 0.4~0.5 左右。然後，在 4 °C，以 4500 rpm 離心 10 分鐘，倒乾上層液，留下 pellet，每管加入 10 ml 的冰 50 mM CaCl₂ (含 10 mM Tris-HCl)，將 pellet 打散，靜置於冰上 30 分鐘。在 4 °C，以 4500 rpm 離心 10 分鐘，倒乾上清液，加入 2 ml 的冰 CaCl₂ (含 10 mM 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-80 °C，如要做 transformation，即可馬上使用。

[藥品製備]

《50 mM CaCl₂, 內含 10 mM Tris-HCl》

成分	重量 / 體積
CaCl ₂	0.3675 g
Tris-HCl	0.0788 g
Adjust pH to	pH 7.5
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	50 ml
Autoclaved	
Store at 4 °C	

2. Transformation

[步驟]

將上述之 ligation 產物與 200 μ l 的 competent cell 混合，於冰上作用 30 分鐘，於 37 °C，3 分鐘熱處理(heat shock)後，立即放回冰上，儘速添加 0.5 ml 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、X-gal 及 IPTG 的 LB 培養盤上(pGEM 或 pcDNA3)，或是含有 Kanamycin 的 LB 培養盤上(pEGFP)。隔天挑白色的菌落。

[藥品製備]

《LB agar》

成分	重量 / 體積
d ₂ H ₂ O	190 ml
Peptone	2 g
Yeast extract	1 g
NaCl	1 g
Adjust pH to	pH 7.0
Agar	3 g
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	200 ml
Autoclaved	
Store at 4 °C	

*Ampicillin: 50 g / ml *Kanamycin: 30 g / ml

《2 % X-gal》

成分	重量 / 體積
X-gal	0.02 g
DMF	1 ml
Store at -20 °C (in the dark)	

《IPTG: 25 mg / ml》

成分	重量 / 體積
IPTG	25 mg
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	1 ml
過濾	
Store at -20 °C	

(七) 快速篩選法 (rapid screen)

[步驟]

以經過滅菌處理之 Tip，挑選單一白色菌落，接種於含有適當抗生素之 LB 平版培養盤中，37 oc 培養 24 小時，再利用經過滅菌處理之 Tip 取菌，混合於 20 µl 之 loading dye 中(內含 1% SDS)，劇烈震盪，使其完全打散，再加入 10 µl 的 phenol (pH 8.0)及 chloroform，於 4oc 以 12000 rpm 離心 5 分鐘，吸取 10 µl 上清液進行 DNA 電泳分析，並將僅含載體菌落的樣本一同進行 DNA 電泳分析，作為對照，電泳結果可快速篩選較載體大的構築質體，再從之前的平版培養基中將其篩選出，做進一步的分析確認。

[藥品製備]

《6X Loading dye, 1 % SDS》

成分	重量 / 體積
Bromophenol blue	0.025 g
Xylene cyanol FF	0.025 g
Glycerol	3 ml
10 % SDS	1 ml

Add d ₂ H ₂ O until total volume is	10 ml
Store at room temperature	

(八) 抽小量的質體 DNA：

[步驟]

經快速篩選後，認為有成功接合構築之質體，利用經滅菌處理之 Tip，取其菌的 pellet，並加入 100 µl 冰的 solution I，用力振盪均勻，加上 200 µl 的 solution II，上下輕輕的混合至透明(不可振盪)，再加上 150 µl 冰的 solution III，上下輕輕的混合，放在冰上靜置 3~5 分鐘，於 4°C，12000 g 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，12000 g 離心 5 分鐘，吸上清液至另一個 eppendorf，用兩倍體積的 95%酒精沉澱 DNA，-20 °C 靜置二小時。於 4 °C，12000 g 離心 5 分鐘，丟棄上清液，用 70 %的酒精洗 pellet，於 4 °C，12000 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 的 size 是正確的。

[藥品製備]

《Solution I》

成分	濃度
Glucose	50 mM
Tris-HCl (pH 8.0)	25 mM
EDTA (pH 8.0)	10 mM
Store at 4 °C	

(九) 定序

將抽好的 plasmid DNA，用 restriction enzyme 切下，回收 cDNA 後，送去定序。

四、人類 GSTA2 基因之轉殖 (transfection)

[目的]

將基因送到真核細胞內表達。

(一) 大量質體 DNA 之萃取—for transfection

萃取的方法是使用 GiBoCo 的 High Purity Plasmid Midiprep System kit

[步驟]

取 100 μ l 的菌液養在 2 ml 的 LB 培養液，於 37 °C 培養隔夜，再將其養至 50 ml 含抗生素之 LB 培養液中，放在 37 °C 培養箱中，劇烈搖晃，培養至 600 nm 之 O.D.值 1.5，而後收細菌，於 4 °C 以轉速 3500 rpm 離心 10 分鐘。

在此時先用 10 ml 的平衡液體 (E4)，平衡 column。細菌離心後倒掉上清液，加入 4 ml 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 10000 rpm，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 10 ml 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 3.5 ml 的 isopropanol，混合均勻，放入-20°C 沉澱 DNA，隔天再以 10000 rpm，4°C 離 30 分鐘，小心的移除上清液，用 3 ml 70%的酒精洗 DNA pellet，再以 10000 rpm 4°C 離 5 分鐘，小心的移除上清液，在空氣中乾 10 分鐘，再以適量的滅菌水溶解 DNA pellet。此抽好之質體 DNA 即可應用於 transfection 實驗。

(二) 細胞培養

[培養方式]

1. Hep 3B: Human hepatocellular carcinoma cell

使用的培養液為 MEM + 10% FBS + 1% PSN + 1% sodium pyruvate + 1% non essential amino acids。細胞培養條件為 37oc，5% CO2 之培養箱，細胞 subculture 至 cm (6 well)的 dish，至 7~8 分滿時，

進行 transfection 實驗，並觀察細胞生長情形。

2. Chang liver: Human normal liver cell

使用的培養液為 BME + 10% Calf serum + 1% PSN。細胞培養條件為 37 °C，5% CO₂ 之培養箱，細胞 subculture 至 3.5cm (6 well) 的 dish，長至 7~8 分滿時，進行 transfection 實驗，並觀察細胞生長情形。

[藥品製備]

《MEM》—二瓶量

成分	重量 / 體積
d ₂ H ₂ O	800 ml
MEM powder	9.5 g (1package)
Sodium bicarbonate	2.2 g
Adjust pH to	PH 7.25~7.35
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	880 ml
Filter	
Store at 4 °C	

《BME》—二瓶量

成分	重量 / 體積
d ₂ H ₂ O	800 ml
BME powder	9.5 g (1package)
Sodium bicarbonate	2.2 g
Adjust pH to	PH 7.25~7.35
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	880 ml
Filter	
Store at 4 °C	

《PBS》—二瓶量

成分	重量 / 體積
d ₂ H ₂ O	950 ml

PBS powder	9.6 g (1package)
Adjust pH to	PH 7.4
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	1000 ml
Filter	
Store at 4 °C	

(三) 轉殖 (transfection)

[步驟]

於 3.5 公分的培養皿 (6 well) 中，種 1.5×10^5 的細胞，並以完整的生長培養液培養，當細胞長至 7-8 分滿時作 transfection。

準備兩個滅過菌的 eppendorf，每一管各加入 100 ul 不含抗生素及血清之 MEM (Hep 3B) 或 BME (Chang liver)，其中一管加入 2 ug 的 DNA，另一管加入 6 ul 的 LIPOFECTAMINE reagent。將這兩管混合在一起，充分混合均勻(利用 tip 吸放至少 60 次以上，增加碰撞機率)。然後在室溫靜置 45 分鐘，讓 DNA 和 liposome 形成 complex。

此時將細胞培養液置換成 2 ml 同樣不含抗生素及血清之 MEM (Hep 3B) 或 BME (Chang liver)，放入 37 °C 的培養箱中備用。

當 DNA 和 liposome 作用時間到時，將 dish 中的細胞培養液吸走，加入 0.8 ml 不含抗生素及血清的 MEM (Hep 3B) 或 BME (Chang liver) 及 DNA 和 liposome complex 產物 (利用剪去尖端的 1ml tip 吸起)，放入 37 °C 的培養箱中培養，進行轉殖 (transfection) 作用。

Transfection 12 小時後，加入 1ml 含 20 % FBS 之 MEM (Hep 3B) 或 BME (Chang liver) [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，即可進行觀察。

[注意事項]

1. 細胞要健康。
2. DNA 和 liposome 須混合均勻(用 tip mix 至少 60 次以上，增加碰撞機率)。
3. DNA 和 liposome 比例須適當，DNA 和 liposome 太多會對細胞造成毒害。
4. DNA 和 liposome 形成 complex 的時候，不可有血清及抗生素的干擾。
5. DNA 須高純度，用 kit (GiBco BRL) 萃取。
6. liposome 需事先分裝，並儲藏於 4°C，避免多次開蓋而造成氧化。

五、加藥處理

[步驟]

transfection 48 小時後，分別以 DMSO、0.002 mM、0.01 mM 及 0.05 mM aflatoxin B1 處理細胞，並觀察細胞狀態。

六、MTT 細胞毒性分析(MTT assay)

[原理]

根據 Alley 等人發表於 1988 年的 Cancer research 期刊 (51)，其原理是利用活細胞能經由粒腺體 dehydrogenase 的作用，將 MTT 由黃色代謝還原成紫色的 formazan crystal，並在波長 570nm 有特殊吸光。

[步驟]

將細胞處理藥 24 小時後，吸除培養液，以 PBS 緩衝液沖洗細胞後，每一 well 加入 4.5 ml 培養基，其內含 450 μ l MTT (5mg/ml)，反應 4 小時後，除去培養基，最後以 6 ml 的 isopropanol 將紫色的 formazan 結晶溶解，並於波長 570 nm 下測定吸光值 (O.D.)，比較實驗組與對照組吸光值的差異。

七、GST 酵素活性之分析

[原理]

受質 (substrate)會與外加入的 GSH，透過 GST 的催化，形成複合物 (complex)，再由吸光值的測定，進而推測分析 GST 的活性。

[步驟]

依 Habig 等人 (52)之方法修飾使用，將細胞處理藥 24 小時後，吸除培養液，以 PBS 緩衝液清洗細胞，加入適量之 homogenization buffer，用刮棒把細胞刮落，於冰上以超音波震盪器打破細胞，於 4 °c 以 13000 rpm 轉速離心 30 分鐘，取 80 µl 上清液，加入 60 µl 的受質及 60 µl GSH，均勻混合後，以分光光度計計錄於適當波長下 3 分鐘的吸光值變化。得到的活性結果，再以 bovine serum albumin (BSA)標準品所得標準曲線換算其樣品蛋白質含量。

(一) GST isoforms 活性之分析

1. Total GST activity

[條件]

成分	final 濃度
3.3 mM GSH in 0.1M Potassium phosphate	1 mM
3.3 mM CDNB in 2 ml EtOH in 0.1M Potassium phosphate	1 mM
25°c , PH 6.5 , O.D. 340 nm	

[藥品配製]

《0.1 M Potassium phosphate》

成分	重量 / 體積	濃度
K ₂ HPO ₄	8.75 g	
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	500 ml	0.1 M
KH ₂ PO ₄	6.85 g	
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	500 ml	0.1 M
二者互調 pH to	PH 6.5	

[計算]

$$\frac{(\text{樣品的斜率} - \text{空白組的斜率}) / 9.6}{\text{sample } (\mu\text{l}) \times \text{protein } (\mu\text{g}/\mu\text{l})} \times 10^6$$

[單位]

結果以 nmole CDNB-GSH conjugate formed / min / mg protein 表示之。

2. GST A activity

[條件]

成分	final 濃度
1.66 mM GSH in 0.1M Sodium acetate	0.5 mM
0.66 mM NBD-CL in 2 ml EtOH in 0.1M Sodium acetate	0.2 mM
25°C, PH 5.0, O.D. 419 nm	

[藥品配製]

《0.1 M Sodium acetate》

成分	重量 / 體積
Sodium acetate	5.1268 g

Add d ₂ H ₂ O until total volume is	500 ml
Adjust pH to	PH 5.0
Store at 4 °C	

[計算]

$$\frac{(\text{樣品的斜率}-\text{空白組的斜率}) / 14.5}{\text{sample } (\mu\text{l}) \times \text{protein } (\mu\text{g}/\mu\text{l})} \times 10^6$$

[單位]

結果以 nmole NBD-CL-GSH conjugate formed / min / mg protein 表示之。

3. GST P1 activity

[條件]

成分	final 濃度
0.83 mM GSH in 0.1M Potassium phosphate	0.25 mM
0.66 mM EA in 2 ml EtOH in 0.1M Potassium phosphate	0.2 mM
25°C, PH 6.5, O.D. 270 nm	

[計算]

$$\frac{(\text{樣品的斜率}-\text{空白組的斜率}) / 5}{\text{sample } (\mu\text{l}) \times \text{protein } (\mu\text{g}/\mu\text{l})} \times 10^6$$

[單位]

結果以 nmole EA-GSH conjugate formed / min / mg protein 表示之。

4. GST M activity

[條件]

成分	final 濃度
16.6 mM GSH in 0.1M Potassium phosphate	5 mM

3.3 mM DCNB in 2 ml EtOH in 0.1M Potassium phosphate	1 mM
25°C, PH 7.5, O.D. 345 nm	

[藥品配製]

《0.1 M Potassium phosphate》

成分	重量 / 體積	濃度
K ₂ HPO ₄	8.75 g	
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	500 ml	0.1 M
KH ₂ PO ₄	6.85 g	
Add d ₂ H ₂ O until total volume is	500 ml	0.1 M
二者互調 pH to	PH 7.5	

[計算]

$$\frac{(\text{樣品的斜率} - \text{空白組的斜率}) / 8.5}{\text{sample } (\mu\text{l}) \times \text{protein } (\mu\text{g}/\mu\text{l})} \times 10^6$$

[單位]

結果以 nmole DCNB-GSH conjugate formed / min / mg protein 表示之。

(二) 蛋白質定量

[藥品配製]

《Standard solution》

成分	重量 / 體積
(1) Solution A	
Bovine serum albumine	8 mg
d ₂ H ₂ O	1 ml
(2) Solution B	

Solution A	50 μl
$\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$	1550 μl

Standard	Solution B	$\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$
1.00 $\mu\text{g} / 100 \mu\text{l}$	40 μl	960 μl
2.50 $\mu\text{g} / 100 \mu\text{l}$	100 μl	900 μl
5.00 $\mu\text{g} / 100 \mu\text{l}$	100 μl	400 μl
10.0 $\mu\text{g} / 100 \mu\text{l}$	100 μl	150 μl
12.5 $\mu\text{g} / 100 \mu\text{l}$	100 μl	100 μl
25.0 $\mu\text{g} / 100 \mu\text{l}$	100 μl	

八、GOT、GPT 活性之分析

[步驟]

將細胞處理藥 24 小時後，取 100 μl 之細胞培養液，與 10 μl GOT 或 GPT reagent 迅速混合均勻後，在 340nm 之下，利用分光光度計 scan 3 分鐘，並以下列公式換算活性之變化量。

[計算]

$$U/L = (\Delta A/\text{min} \times TV \times 1000) / 6.22 \times SV \times LP$$

TV = Total reaction volume in ml

SV = Sample volume in ml

6.22 = millimolar absorption coefficient of NADPH at 340 nm

LP = Cuvet path length in cm

1000 = Conversion of units per ml to units per liter

結果

一、Primer 的設計與 RT-PCR：

本實驗室於過去，以 Sprague Dawley 系大白鼠為模式 (model)，建立老鼠(rat) GST isoforms 之轉殖系統，並且已證實經短暫轉殖 GFP-rGST M (Yb1)，大白鼠初代肝細胞及人類肝細胞 Chang liver 對抵抗 AFB1 毒害的能力有提昇的現象，可減緩 AFB1 所誘發之毒性。由於老鼠與人類之 GST 在序列及功能上有些許的差異，因此本實驗室改以人類之 GST 基因設計，針對哺乳動物細胞中最主要的三種 GST isoforms: A、P、M 進行選殖 (Cloning)，建立人類 GST isoforms 之轉殖系統。本篇論文則主要針對 GST A2 及 P1 進行選殖工作。首先自 National center for biotechnology information (NCBI)之基因庫進行搜尋，獲得人類肝臟 GST A2、P1 之 cDNA 序列，分別設計其 5 端及 3 端的引子 (Primer)；而這些 primer 的序列中均含有特定之限制酵素切點 (Restriction enzyme site)，以便被特定的限制酵素所辨識、切割 (Fig. 1)，並能與所選用之載體 pGEM (Fig. 2)、pCDNA3 (Fig. 3)、pEGFP (Fig. 4)，進行接合作用 (Ligation)。

另一方面，取得人類肝臟組織後(由台中榮總一般外科提供)，並純化其 RNA，定量並進行 RNA 電泳，以確認 RNA 之品質 (Fig. 5)，可明顯觀察到 5S、18S 及 28S rRNAs。利用反轉錄作用(RT)將 mRNA 反轉錄

成 cDNA，再利用所設計的 GST A2 及 GST P1 之 primer，分別以 55°C 及 56°C 進行聚合酵素鏈鎖反應 (PCR) 35 個循環 (cycle)，大量複製 cDNA。PCR 產物以 1.5 % 洋菜膠凝膠電泳 (gel electrophoresis) 進行分析。結果，以 DNA ladder 為 marker，可在約 752 鹼基對 (base pair) (Fig. 6) 及 692 base pair (Fig. 7) 的位置附近觀察到明顯單一的 Band，其分別推測為 hGST A2 及 hGST P1 之 cDNA。

二、 hGST A2 或 hGST P1 之選殖：

將所有 hGST A2 或 hGST P1 之 PCR 產物，以 1.5 % agarose gel 進行電泳。利用小刀切割 agarose gel 中之 hGST A2 或 hGST P1 單一 band，並以 gel extraction system kit 純化、回收並定量。回收的產物與 pGEM cloning vector (Fig. 2)，皆以相同特定的限制酵素進行切割 [hGST A2 (*EcoRI* 及 *XbaI*) 或 hGST P1 (*EcoRI* 及 *PstI*)]，並以一比三的莫耳數比例混和，加入接合酵素進行接合反應 (ligation)，並利用勝任細胞 (competent cell) 轉殖 (Transformation) 至 JM 109 *E. coli* 中，再將 *E. coli* 培養於含有 ampicillin 之培養基 (agar plate) 中，以 X-gal、IPTG 系統 (Selection system) 進行菌落之篩選。

將白色的單一轉型株菌 (clonies) 挑起，重新培養 24-36 小時後，進行快速篩選，以 1.0 % 洋菜膠凝膠進行電泳分析。由 Fig. 8 可知，其中以第四、五、六、七、八行之質體 DNA，與載體 DNA (pGEM) 相比 (第

二行)，其 bend 皆有明顯往上移動 (shift) 的現象，所以推測這些單一菌落可能接合成功，被轉殖入 hGST A2，而第三行的 bend 則沒有 shift 的現象，所以認為並沒有接合成功。hGST P1 選殖亦然 (Fig9)。為了確認質體 DNA 內所含 insert 為 hGST A2 或 hGST P1 之 cDNA，於是與接合反應相同之限制酵素 *EcoRI* 及 *XbaI* (hGST A2) 或 *EcoRI* 及 *PstI* (hGST P1) 進行切割反應(digestion)，產物以 1.5% 洋菜膠進行電泳，結果顯示 (Fig. 10, 11)，第三行質體 DNA 經切割後，由第四行可發現各有兩條 band，位置分別在 3200bp 及 600~800bp 附近，hGST A2 及 hGST P1 之 cDNA 經限制酵素切割後的大小為分別為 752 bp 及 692 bp，所以初步確定這兩組質體 DNA 為成功接合的質體，並命名為 pGEM-hGST A2 或 pGEM-hGST P1。

為了更進一步確定此質體 DNA 所含的 cDNA 為 hGST A2 或 hGST P1，所以大量萃取此質體，進行 DNA 定序。結果序列和 Gene bank 所提供的 hGST A2 或 hGST P1 序列是一致的。[(pGEM-hGST A2) (Fig. 12) 或 (pGEM-hGST P1) (Fig. 13)]

本論文完成 pGEM-hGST A2 及 pGEM-hGST P1 之 constructs，為了將 hGST A2 cDNA 短暫殖入人類肝細胞，所以須將其再轉接至 pcDNA3 (Fig. 3) 或 pEGFP (Fig. 4) 載體上。

三、 AFB1 處理下，對人類肝癌細胞 Hep 3B 及人類肝細胞 Chang liver 之 MTT 分析：

本實驗室在過去已證實經短暫轉殖 GFP-rGST M1 的大白鼠初代肝細胞，抵抗 AFB1 毒害的能力有提昇的現象，並且可專一減緩 AFB1 對人類肝細胞 Chang liver 所誘發之毒性，而此能力並不會發生在人類肝癌細胞 Hep G2。由於老鼠與人類之 GST 在序列及功能上有些許的差異，因此本篇論文以人類之 GST A2 cDNA 同樣利用短暫殖入系統 (Transfection)，將 hGST A2 殖入人類肝癌細胞(Hep 3B)及人類肝細胞 (chang liver)中，並以 pEGFP 載體為控制組 (Control)，探討細胞在遭受致癌物質 AFB1 攻擊之下，hGST A2 對細胞生長、型態之影響。在進行轉殖實驗 (Transfection)之前，首先以 MTT assay 觀察人類肝癌細胞 Hep 3B 及人類肝細胞 Chang liver 在 AFB1 處理下，細胞的存活狀態。

(一) AFB1 之處理對人類肝癌細胞 Hep 3B 之存活率影響

結果顯示 (Fig. 14)，當 Hep 3B 細胞處理 0.1 % DMSO (Solvent control)時，細胞存活率減少了約 2%，但當處理 0.002 mM AFB1 時，細胞幾乎沒死亡，與 control 組相似，其後，隨著 AFB1 劑量的增加，細胞的存活率有著 dose-depend 的減少，而當處理 0.05 mM 及 0.25 mM AFB1 時，細胞存活率約只剩下 85%及 75.5%，由此結果，我們取用 0.002 mM ~ 0.05 mM 這個範圍的 AFB1，應用在以下之 transfection 實驗，以觀察

轉殖入 hGST A2 gene 後，人類肝癌細胞 Hep 3B 對 AFB1 所誘發毒性之影響。

(二) AFB1 之處理對人類肝細胞 Chang liver 之存活率影響

結果顯示 (Fig. 15)，當 Chang liver 細胞處理 0.1 % DMSO (Solvent control) 時，細胞存活率減少了約 7%，但當處理 0.002 mM AFB1 時，細胞存活率只減少了約 2%，也許低濃度之 AFB1 具有促進細胞增生的能力，其後，隨著 AFB1 劑量的增加，細胞的存活率有著 dose-depend 的減少，而當處理 0.05 mM 及 0.25 mM AFB1 時，細胞存活率約只剩下 82% 及 75%，由此結果，我們同樣也取用 0.002 mM ~ 0.05 mM 這個範圍的 AFB1，應用在以下之 transfection 實驗，以觀察轉殖入 hGST A2 後，人類肝細胞 Chang liver 對 AFB1 所誘發毒性之影響。

四、hGST A2 之轉殖對人類肝癌細胞 Hep 3B 及人類肝細胞 Chang liver

之 MTT 分析：

利用短暫轉殖 (Transfection) 系統，以 pEGFP 載體為控制組 (Control)，GFP-hGST A2 為實驗組，轉殖入人類肝癌細胞 Hep 3B 及人類肝細胞 Chang liver 中，轉殖效率於轉殖後 48 小時達到最高；Hep 3B：pEGFP 之轉殖效率約 25 %，GFP-hGST A2 之轉殖效率約 16 % (Fig. 16)。Chang liver：pEGFP 之轉殖效率約 70 %，GFP-hGST A2 之轉殖效率約 60 % (Fig. 17)，而造成兩株細胞轉殖效率之差異，在於細胞型態之不同，

肝癌細胞 Hep 3B 在生長時，一如癌細胞之生長特性，會產生聚集現象 (Fig. 18)，因此細胞暴露於外界之表面積較小；而肝細胞 chang liver，細胞型態似紡垂狀，較具延展性，生長時並不太會有聚集現象 (Fig. 18)，相對的，細胞暴露於外界之表面積較大，因此在進行 transfection 實驗時，接觸包覆 DNA 之 liposome 的機率也較大，所以轉殖效率當然也就高。以螢光顯微鏡觀察細胞生長情形，結果顯示 (Fig. 16, 17)，螢光表現均勻分佈於細胞質內 (cytoplasm)，細胞型態大多以舒展開來為主，但有少數細胞呈現圓而亮的型態，螢光亮度較強，之後圓而亮的細胞會因死亡而飄起，而 Hep 3B 及 chang liver 這二株細胞在轉殖 hGSTA2 所發現這些小小圓圓亮亮的細胞較轉殖 GFP 要明顯，推測轉殖 hGSTA2 後，也許會增加 AFB1 對肝細胞造成的傷害。於是在轉殖 48 小時後，兩組細胞均以 AFB1 處理，並在藥物處理 24 小時後，進行 MTT 分析，所得之數據以 transfection 效率校正。

(一) hGST A2 之轉殖對人類肝癌細胞 Hep 3B 存活率之影響

以轉殖 pEGFP 載體當作 100%，觀察細胞的存活率。統計結果顯示 (Fig. 19)，無論轉殖 pEGFP 載體或 GFP-hGST A2 之 Hep 3B 細胞，隨著藥物處理濃度的增加，細胞存活的比例也明顯的降低，呈現 dose-depend 的現象。同時也發現，無論處理藥物與否，轉殖 GFP-hGST A2 之細胞存活的比例均比轉殖 pEGFP 載體之細胞來的低，而當處理

0.05 mM AFB1 時，轉殖 pEGFP 載體及轉殖 GFP-hGST A2 細胞存活率分別只剩下 53%及 36%；B 圖則是根據 A 圖之結果，再分別以 pEGFP 載體或 GFP-hGST A2 的控制組當作 100%，所得到之數據。結果顯示，當處理 0.002 mM、0.01 mM 以及 0.05 mM AFB1 時，轉殖 pEGFP 載體及轉殖 GFP-hGST A2 細胞存活率相較之下，有顯著的差異。

(二) hGST A2 之轉殖對人類肝細胞 Chang liver 存活率之影響

以轉殖 pEGFP 載體當作 100%，觀察細胞的存活率，結果發現 (Fig 20)無論處理藥物與否，轉殖 GFP-hGST A2 之細胞存活的比例均比轉殖 pEGFP 載體之細胞來的低，且皆有顯著差異，當處理 0.05 mM AFB1 時，轉殖 pEGFP 載體或 GFP-hGST A2 細胞存活率分別只剩下 83%及 60%；B 圖則是根據 A 圖之結果，再分別以 pEGFP 載體或 GFP-hGST A2 的控制組當作 100%，所得到之數據。結果顯示，轉殖 pEGFP 載體及轉殖 GFP-hGST A2 細胞存活率相較之下，並沒有顯著的差異。

本實驗在轉殖 pEGFP 及 GFP-hGST A2 至 Hep 3B 及 chang liver 細胞中，由 MTT 分析得知 (Fig. 19, 20)，無論處理 AFB1 與否，這兩株細胞轉殖 GFP-hGST A2 之細胞存活的比例均比轉殖 pEGFP 載體之細胞來的低，於此，初步證實 hGST A2 並不具有保護肝細胞對抗 AFB1 的能力。

五、hGST A2 之轉殖對人類肝癌細胞 Hep 3B 及人類肝細胞 Chang liver

生長，型態及對致癌物反應之影響：

於轉殖 pEGFP 載體或 GFP-hGST A2 48 小時後，兩組細胞均以 AFB1 處理，於藥物處理 12 及 24 小時後，計數所有具綠色螢光之細胞中，死亡的細胞所佔的百分比。

(一) hGST A2 之轉殖對人類肝癌細胞 Hep 3B 之影響：

統計結果顯示 (Fig. 21)，轉殖 GFP-hGST A2 之 Hep 3B 細胞，隨著藥物處理濃度的增加，細胞死亡的比例也明顯的增加；同時也發現，無論藥物處理與否，轉殖 GFP-hGST A2 之細胞死亡的比例均比轉殖 pEGFP 載體之細胞高，且有顯著差異。於藥物處理 24 小時後再次進行計數，得到相同的結果 (Fig. 22)，而此時的結果在統計學上更具意義。B 圖則是根據 A 圖之結果，再分別以 pEGFP 載體或 GFP-hGST A2 的控制組為 100%，所得到之數據。結果顯示，轉殖 pEGFP 載體及轉殖 GFP-hGST A2 細胞中，具綠色螢光之細胞的死亡率，並沒有顯著的差異。

(二) hGST A2 之轉殖對人類肝細胞 Chang liver 之影響：

統計結果顯示 (Fig. 23)，轉殖 GFP-hGST A2 之 Chang liver 細胞發現，無論處理藥物與否，轉殖 GFP-hGST A2 之細胞死亡的比例均比轉殖 pEGFP 載體之細胞高，但其差異並沒有 Hep 3B 細胞來的明顯。於藥物處理 24 小時後再次進行計數，得到相同的結果 (Fig. 24)，而此時的結果在統計學上更具意義。B 圖則是根據 A 圖之結果，再分別以 pEGFP 載體或 GFP-hGST A2 的控制組為當作 100%，所得到之數據，結果顯示，

當處理 0.002 mM 或 DMSO、0.01 mM AFB1 時，轉殖 pEGFP 載體及轉殖 GFP-hGST A2 其細胞之死亡率分別在處理 AFB1 12 小時及 24 小時之後，有顯著的差異。

Hep 3B 及 chang liver 這兩株細胞，不論 AFB1 處理與否，轉殖 GFP-hGST A2 之細胞死亡的比例均比轉殖 pEGFP 載體高，與 MTT assay 得到一致的結果 (Fig. 19, 20)，再次證明 hGST A2 並不具有保護細胞對抗 AFB1 的能力。

此外，針對轉殖 pEGFP 載體至 Hep 3B 及 chang liver 細胞去進行分析，當不處理 AFB1 藥物時，也就是 transfection 60 小時後，在 Hep 3B (Fig. 21)及 chang liver (Fig. 23)細胞，所有具綠色螢光之細胞中，死亡的細胞分別佔了 1.15%及 29.15%，將近 25 倍的差距，推測是因為肝細胞 chang liver 生命力較肝癌細胞 Hep 3B 來得低，在 transfection 的過程中，必須將血清及抗生素移除，而 liposome 及 DNA 的加入，對細胞也是一種傷害，由結果證明，肝癌細胞 Hep 3B 對環境的耐受性確實比肝細胞 chang liver 要高。

針對 Fig. 21, 22, 23, 24 進一步的分析，在轉殖至 Hep 3B 的實驗中發現，不論有無處理 AFB1，當轉殖 GFP-hGST A2 所造成的細胞死亡率約是轉殖 GFP 載體的 10 倍，而在 chang liver 細胞中，同樣的處理及分析，卻只有約 1.4 倍，如此的差距，是否意謂著轉殖的 hGST A2 gene 可

稍微減緩 AFB1 對肝細胞 chang liver 所誘發的毒性；又或者是轉殖的 hGST A2 gene 可增加 AFB1 對肝癌細胞 Hep 3B 的毒性？這些疑點也是本實驗室日後的研究方向。

六、hGST A2 的轉殖對人類肝癌細胞 Hep 3B 及人類肝細胞 Chang liver 之 GST isoforms 活性的影響：

於轉殖 pEGFP 載體或 GFP-hGST A2 48 小時及藥物作用 24 小時後，分別以適當的 buffer 收集 Cell lysate，分析 GST isoforms 活性之變化。

(一)hGST A2 之轉殖對人類肝癌細胞 Hep 3B 及人類肝細胞 Chang liver

其 GST A 活性變化之影響：

[Hep 3B 其 GST A 活性之變化]

統計結果顯示 (Fig 25)，轉殖 GFP-hGST A2 之 Hep 3B 細胞，發現無論是否處理藥物，轉殖 GFP-hGST A2 之細胞中 GST A 的活性都比控制組 (轉殖入 pEGFP 載體)細胞來的高，且有顯著差異，表示送入細胞中的 hGST A2 確實有表達。此外，與未處理任何藥物的細胞比較，在 AFB1 藥物刺激之下，Hep 3B 細胞中 GST A 的活性都有增加的情形，並且呈現 dose-depend 的現象。B 圖則是根據 A 圖之結果，再分別以 pEGFP 載體或 GFP-hGST A2 的控制組為 100%，所得到之數據。結果顯示，當處理 0.002 mM AFB1 時，轉殖 pEGFP 比轉殖 pEGFP-hGST A2 載體其細

胞之 GST A 活性之百分比來得高，且有顯著的差異。

[Chang liver 其 GST A 活性之變化]

統計結果顯示 (Fig. 26)，無論是否處理藥物，轉殖 GFP-hGST A2 之細胞中，GST A 的活性都比控制組 (轉殖入 pEGFP 載體)細胞來的高，且皆有顯著差異，表示送入細胞中的 hGST A2 確實有表達。此外，與未處理任何藥物的細胞比較，與 Hep 3B 一樣，在 AFB1 藥物刺激之下，Chang liver 細胞中 GST A 的活性都有增加的情形，並且同樣也呈現 dose-depend 的現象。B 圖則是根據 A 圖之結果，再分別以 pEGFP 載體或 GFP-hGST A2 的控制組為 100%，所得到之數據，結果顯示，當處理 0.05 mM AFB1 時，轉殖 pEGFP 比轉殖 pEGFP-hGST A2 載體其細胞之 GST A2 活性百分比有顯著的差異。

(二)hGST A2 之轉殖對人類肝癌細胞 Hep 3B 及人類肝細胞 Chang liver 其 total GST 活性變化之影響：

無論是否處理藥物，轉殖 GFP-hGST A2 之細胞中，total GST 的活性都比控制組 (轉殖入 pEGFP 載體)細胞來的高 (Fig. 27, 28)，尤其是 Chang liver 細胞 (Fig. 28)，皆有顯著差異，表示送入細胞中的 hGST A2 可增加 total GST 的活性。

(三)hGST A2 之轉殖對人類肝癌細胞 Hep 3B 及人類肝細胞 Chang liver 其 GST P 活性變化之影響：

[Hep 3B 其 GST P 活性之變化] (Fig. 29)

無論是否處理藥物，轉殖 GFP-hGST A2 之 Hep 3B 細胞中，GST P 的活性與控制組 (轉殖入 pEGFP 載體)細胞比較，並沒有明顯差異。然而，與未處理任何藥物的細胞比較，在不同濃度 AFB1 刺激之下，Hep 3B 細胞 GST P 的活性皆有增加的情形。

[Chang liver 其 GST P 活性之變化] (Fig. 30)

無論是否處理藥物，轉殖 GFP-hGST A2 之細胞中，GST P 的活性都比控制組 (轉殖入 pEGFP 載體)細胞來的高，尤其是當處理 DMSO、0.002、0.05 mM 濃度時，有些許的差異，B 圖則是根據 A 圖之結果，再分別以 pEGFP 載體或 GFP-hGST A2 當作 100%，所得到之數據，結果顯示，當處理 DMSO、0.05 mM AFB1 時，轉殖 GFP-hGST A2 之 GST P 活性百分比率比 pEGFP 載體來得高，且有顯著的差異。表示送入細胞中的 hGST A2，在 Chang liver 細胞中，可能增加 GST P 的活性，這種現象，也許是有細胞的特異性。。

(四)hGST A2 之轉殖對人類肝癌細胞 Hep 3B 及人類肝細胞 Chang liver 其 GST M 活性變化之影響：

無論是否處理藥物，轉殖 GFP-hGST A2 之 Hep 3B (Fig. 31)及 Chang liver (Fig. 32)細胞中 GST M 的活性與控制組 (轉殖入 pEGFP 載體)細胞比較，並沒有明顯差異。表示送入細胞中的 hGST A2，並不會影響

GSTM 的活性。

七、hGST A2 的轉殖對 AFB1 所誘發的肝毒害之影響

人體中主要有兩種轉氨酶：麩氨酸草醯乙酸轉氨酶(GOT)及麩氨酸丙酮酸轉氨酶(GPT)，此兩者為目前臨床用來評估肝功能檢察中重要項目之一。因此實驗設計將 pEGFP 及 GFP-hGST A2 轉殖入 Hep 3B 及 Chang liver 細胞中 48 小時後，兩組細胞均以 0.1 % DMSO (Solvent control), 0.002 mM, 0.01 mM, 0.05 mM AFB1 處理。藥物作用 24 小時後，收集培養基 (medium)，藉由 GOT 及 GPT 活性變化情形，分析細胞毒害之影響。

(一)hGST A2 之轉殖對人類肝癌細胞 Hep 3B 及人類肝細胞 Chang liver

GOT 活性變化之影響：

[Hep 3B GOT 活性之變化] (Fig. 33)

無論是否處理藥物，轉殖 GFP-hGST A2 之細胞中，GOT 的活性皆比控制組 (轉殖入 pEGFP 載體)細胞來的高，且皆具有顯著差異；與未處理任何藥物的細胞相比較，在 0.01 mM 及 0.05 mM AFB1 刺激之下，兩組細胞其 GOT 活性都有顯著增加的現象。表示 AFB1 確實可誘發肝細胞毒害，此外，GFP-hGST A2 轉殖入 Hep 3B 細胞後，未能提昇人類肝癌細胞 Hep 3B 抵抗 AFB1 之能力。

[Chang liver GOT 活性之變化] (Fig. 34)

無論是否處理藥物，轉殖 GFP-hGST A2 之細胞中，GOT 的活性皆比控制組 (轉殖入 pEGFP 載體)細胞來的高；與未處理任何藥物的細胞相比較，處理任何濃度之 AFB1，其 GOT 活性都有顯著增加的現象，表示 AFB1 確實可誘發肝細胞毒害，而 GFP-hGST A2 的殖入，未能提昇人類肝細胞 Chang liver 抵抗 AFB1 之能力。

(二)hGST A2 之轉殖對人類肝癌細胞 Hep 3B 及人類肝細胞 Chang liver GPT 活性變化之影響：

[Hep 3B GPT 活性之變化] (Fig. 35)

無論是否處理藥物，轉殖 GFP-hGST A2 之細胞中，GPT 的活性皆比控制組 (轉殖入 pEGFP 載體)細胞來的高，尤其在 control 組或是當處理 DMSO、0.002、0.05mM 之 AFB1 時，具有顯著差異；表示 GFP-hGST A2 轉殖入 Hep 3B 細胞後，未能提昇人類肝癌細胞 Hep 3B 抵抗 AFB1 之能力。

[Chang liver GPT 活性之變化] (Fig. 36)

無論是否處理藥物，轉殖 GFP-hGST A2 之細胞中，GPT 的活性皆比控制組 (轉殖入 pEGFP 載體)細胞來的高，皆具有顯著差異；與未處理任何藥物的細胞相比較，處理任何濃度之 AFB1，其 GPT 活性都有顯著增加的現象，表示 AFB1 確實可誘發肝細胞毒害。B 圖則是根據 A 圖之結果，再分別以 pEGFP 載體或 GFP-hGST A2 當作 100%，所得到之

數據，結果顯示，當處理 0.002 mM 及 0.01mM AFB1 時，轉殖 pEGFP-hGST A2 比轉殖 pEGFP 載體其細胞之 GPT 活性百分比來得高，且有顯著的差異。

轉殖 pEGFP 載體及 pEGFP-hGST A2 至人類肝癌細胞 Hep 3B 及人類肝細胞 Chang liver，並以 AFB1 處理細胞後，GOT 及 GPT 的活性均有明顯增加的現象，表示 AFB1 確實可對肝細胞造成毒性，導致細胞死亡。此外，無論是否處理藥物，轉殖 GFP-hGST A2 之細胞中，GOT 及 GPT 的活性都比控制組 (轉殖入 pEGFP 載體)細胞來的高，表示送入細胞中的 hGST A2，並無法減緩細胞因 AFB1 所造成的傷害。

討論

本篇論文已完成人類 GST A2 及 GST P1 之基因選殖，並且利用短暫殖入系統，將 hGST A2 殖入人類肝癌細胞(Hep 3B)及人類正常肝細胞(chang liver)中，探討細胞在遭受致癌物質 AFB1 攻擊之下，hGST A2 對細胞生長、型態之影響。結果顯示，轉殖 hGST A2 基因後，並不具有保護肝細胞對抗 AFB1 的能力。AFB1 為一致癌物質，其透過 cytochrome P450 作用所轉變成的 AFBO，可經由 GST 的催化，使其與 GSH 結合(conjugates)，達到解毒的機制 (53)。過去有研究發現，雖然 mouse GST Yc 與 rat GST Yc1 在序列上有高達 86%的相似性，但當同時表現於 bacterial expression system 時，mouse GST Yc 對 AFBO 的催化活性高於 rat GST Yc1 100 倍 (54)。而本篇所殖入人類 GST A2，由結果得知，並無法幫助細胞抵抗 AFB1 之毒害，也許這也就是人類與 rat 及 mouse 之間物種的差異性所造成不同的結果。

以往認為 GST A 會大量表現在多重抗藥性 (MDR)細胞中，對大部份的抗癌藥具有抗藥性，例如 GST A 會代謝一些抗癌藥：cisplatin、alkylating agent 等等。而近年來，針對 GST A 的研究，則大多著重在 GST A4 這個 isoform，因為它除了具有 GST 本身的活性之外，還具有 GSH peroxidase 的活性，可避免 lipid peroxidation 對細胞所造成的傷害，將 lipid hydroperoxides 還原成 lipid alcohols (35, 36, 37, 38)。而研究中也

發現，GST A4 可有效的代謝 4-hydroxynonenal (4-HNE) 這個脂質過氧化反應的產物 (55)，因此許多在 GST 活性測定的實驗中，利用 4-HNE 當作 substrate，用來偵測 GST A4 的活性表現。此外，除了 GST A4 具有 GSH peroxidase 的活性之外，也有研究發現，GST A1 及 A2 也可有效的代謝哺乳類動物體內之脂質過氧化作用的產物，例如：GST A1 及 GST A2 可專一的代謝 fatty acid hydroperoxides、phospholipid hydroperoxides 以及 cumene hydroperoxide，而這個能力又以 GST A2 較高 (39)。2001 年有 Yang Y 等人指出，在 K562 細胞大量表現 GST A2，在氧化壓力的情況下，與控制組相比，細胞對 H₂O₂ 所造成細胞毒性的抵抗能力，增加了 1.5 倍 (40)，因此認為 GST A 對細胞內脂質過氧化反應之產物濃度的調節，佔了非常重要的角色。

另一方面，2002 年有研究指出，GST A4 也參與肝臟新生(liver regeneration)過程，當肝臟受損時，肝細胞會有再生的能力，在 liver regeneration 的過程中，GST A4 會被誘導出來，而這些 GST A4 可以抑制因肝臟受損所造成過多的 ROS，使細胞免於因 ROS 所造成的死亡，使細胞可以增生，由此可見，GST A 在抗氧化方面扮演著不可或缺的角色；而這些 GST A4 的產生，則是透過 TNF- α 、IL-6 這兩個 cytokines 以及 EGF growth factor 所調控，並且經由 PI3K 及 MAPK pathway，使細胞走向 survival 的途徑 (41)。GST A 也參與了細胞內訊息傳遞之作

用，進而決定細胞之命運，GST A1, P1 或 M1 轉殖入大白鼠之肝細胞中，可抑制 TNF- α 所誘發之 caspase 的活性及 ASK1/JNK pathway，而保護肝細胞免於走向 apoptosis 的命運(56)；hGST A2 轉殖入人類之 erythroleukemia cells，可減緩 H₂O₂ 所誘發的 JNK/SAPK 活化作用及 caspase 3 所主導的 PARP 切割作用，進而保護細胞以抵抗 H₂O₂ 所引發的細胞毒害作用(40)。

有關 GST A 的所在位置有許多不同的說法，過去認為 GST A 主要存在細胞質(cytosol)中，而本實驗所萃取的 GST 也是取自細胞質，後來有學者發現，GST A 除了存在細胞質外，也有可能存在於粒線體(mitochondria)當中 (57)；但也有學者認為，GST A 只存在粒線體中，而不存在細胞質 (58)；2002 年更有實驗證實，GST A 主要是存在 plasma membrane 或是其周圍 (59)。針對 GST A 所在位置的說法眾多紛紜，本實驗在進行大量表現 GST A2 時，由螢光視野的觀察中，發覺似乎 GST A2 也存在細胞核中，但這還需要更多的實驗來輔以證明。

近年來有關 GST 與癌症相關性之研究很多，由於 GST 的代謝方式通常是生物不活化作用，因此毒性物質或致癌物一旦成為 GST 受質被代謝後，並不會被活化成毒性更強的物質，所以 GST 活性的高低被認為在抑制癌症發生的機制中扮演著重要的角色。不同 isoform 的 GST 於腫瘤形成過程的各個階段中，其表現量會有所不同。以肝細胞為例，在

正常的肝細胞中 GST 之含量以 GST A 為主， GST M 其次，但偵測不到 GST P (60)。

雖然 GST 早在 1961 年即被發現，然而 GST 生化功能的調控及機制尚不清楚，本實驗室在過去已證實經短暫轉殖 GFP-rGST M1，大白鼠初代肝細胞及人類肝細胞 Chang liver 對抵抗 AFB1 毒害的能力有提昇的現象。而由本篇論文之實驗，短暫轉殖 GFP-hGST A2 並未得到相同的結果。由過去的研究得知，不同之 GST isoform 在不同的組織所扮演的角色、提供的生理功能，也有所不同，過去推測可能 rGST M1 之轉殖及表達，啟動了肝癌細胞 Hep G2 之死亡訊息，但此機制並未啟動 chang liver 細胞，而 hGST A2 之轉殖，是否對 Hep 3B 及 chang liver 細胞皆啟動了死亡訊息，又或者是因為老鼠與人類之生物體不同，導致 GST 功能性之差異。由於 GST M1 之基因表現屬於多型性 (polymorphism)，有些人 GST M 的表現不足，甚至是無效的(null)，因此在進行人類 GST M 之選殖時 (cloning)，碰到了一些問題，而目前本實驗室已努力排除這些疑難，進行人類 GST M 之選殖，以進一步的去釐清 GST 生化功能的調控以及詳細之分子機制。

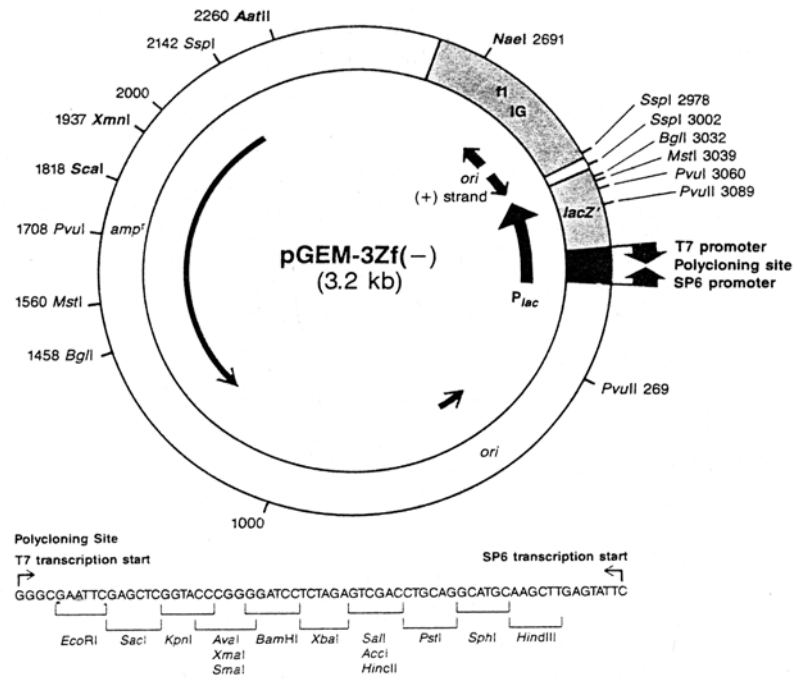
實驗結果圖表與說明

Oligonucleotides	Restriction Enzyme	Annealing temperature	Thermal cycles
hGSTA cDNA 5'-primer 5'- GCTTAGAGAATTCTCCAGGA- 3'	<i>EcoRI</i>	55°C	35
hGSTA cDNA 3'-primer 5'- GCAAAACTCTAGAACATTGG- 3'	<i>XbaI</i>		
hGSTP cDNA 5'-primer 5'- TTCGCCGCCGAATTCTTCGC- 3'	<i>EcoRI</i>	56°C	35
hGSTP cDNA 3'-primer 5'- CAAACTCTGCAGCCCGCTCA- 3'	<i>PstI</i>		

The sequences of the primers of hGSTA2, P1, the designed restriction enzyme sites, and the cycling conditions used for RT-PCR.

Figure 1

(A)



(B)

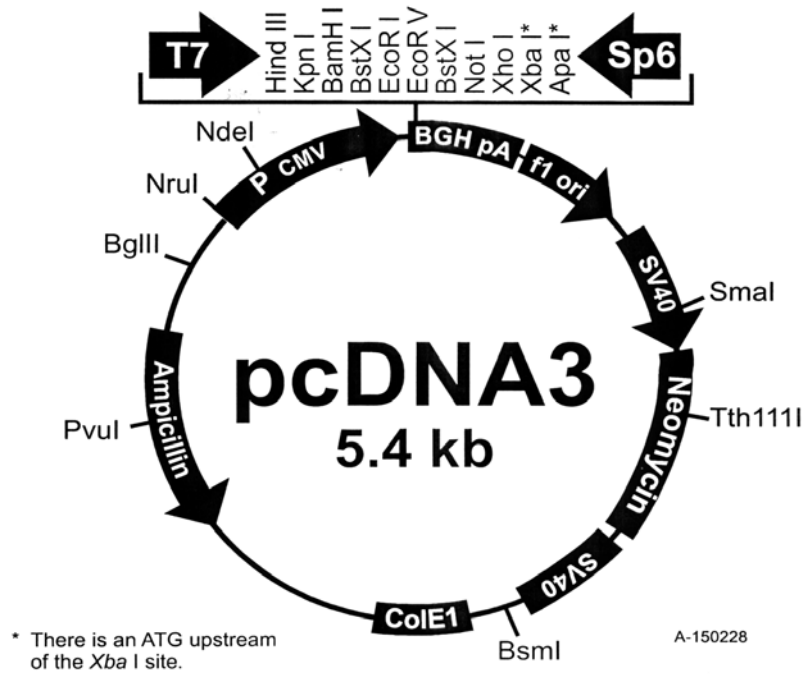


Figure 2

(A) The map of pGEM.

(B) Plasmid DNA of pGEM vector. Lane 1: λ phage *Hind III* (marker). Lane 2: pGEM vector.

(A)



(B)

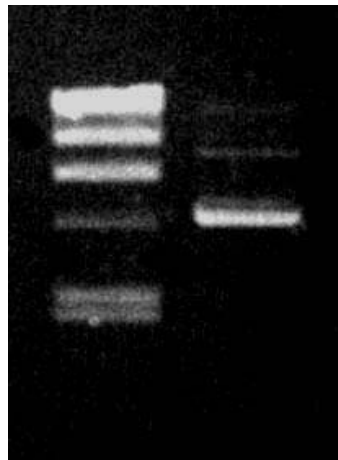
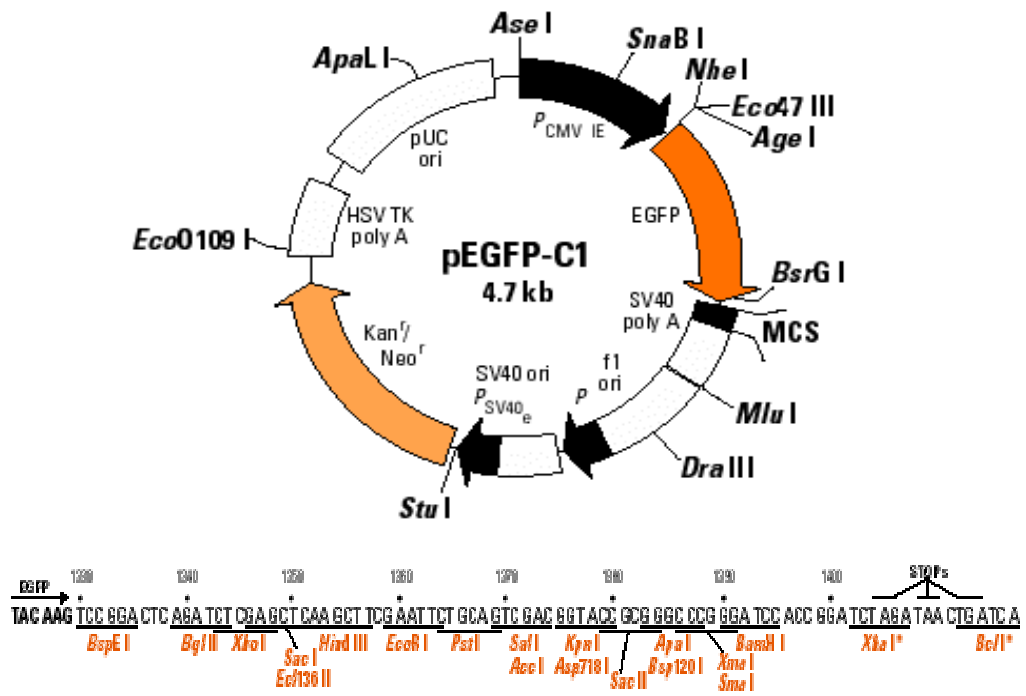


Figure 3

(A) The map of pcDNA3.

(B) Plasmid DNA of pcDNA3. Lane 1: λ phage *Hind III* (marker). Lane 2: pcDNA3 vector.

(A)



(B)



Figure 4

- (A) The map of pEGFP.
- (B) Plasmid DNA of pEGFP vector. Lane 1: λ phage *Hind III* (marker). Lane 2: pcDNA3 vector

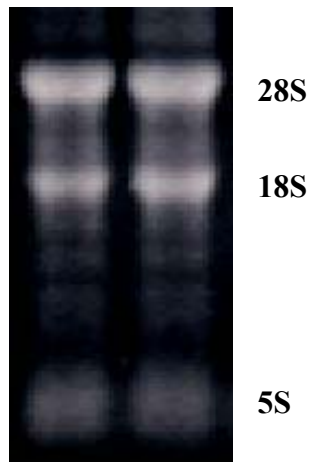


Figure 5

Total RNA isolated from human liver.

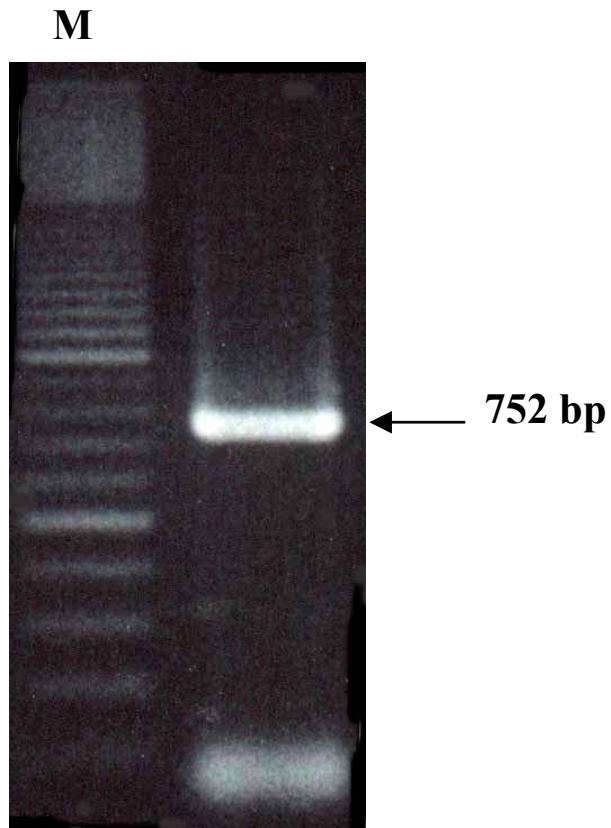


Figure 6

RT-PCR products of hGST-A2. Total RNA (5 μ g) was reverse-transcribed using oligo *d*T, then amplified by PCR for 35 cycles. Product was separated on a 1.5% agarose gel. The expected 752 bp band was shown.

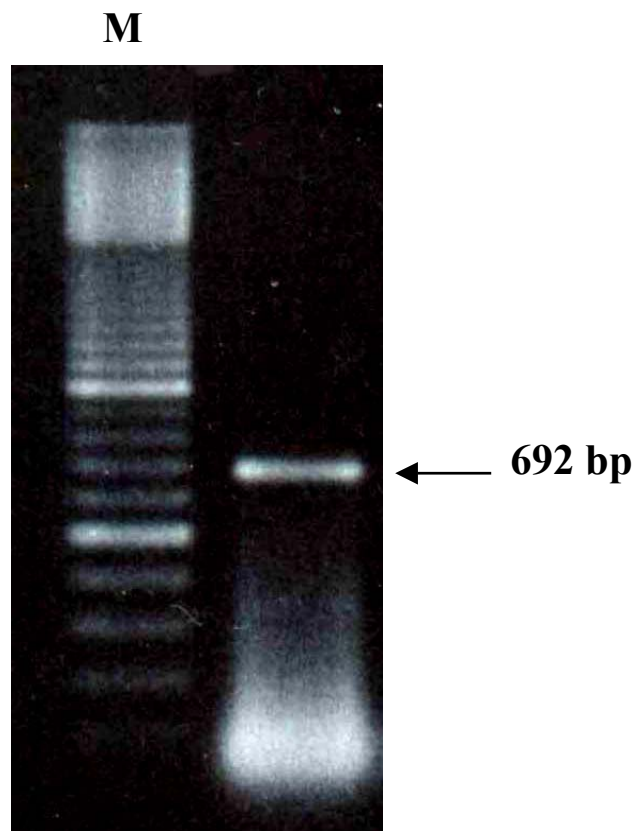


Figure 7

RT-PCR products of hGST-P1. Total RNA (5 μ g) was reverse-transcribed using oligo *d*T, then amplified by PCR for 35 cycles. Product was separated on a 1.5% agarose gel. The expected 692 bp band was shown.

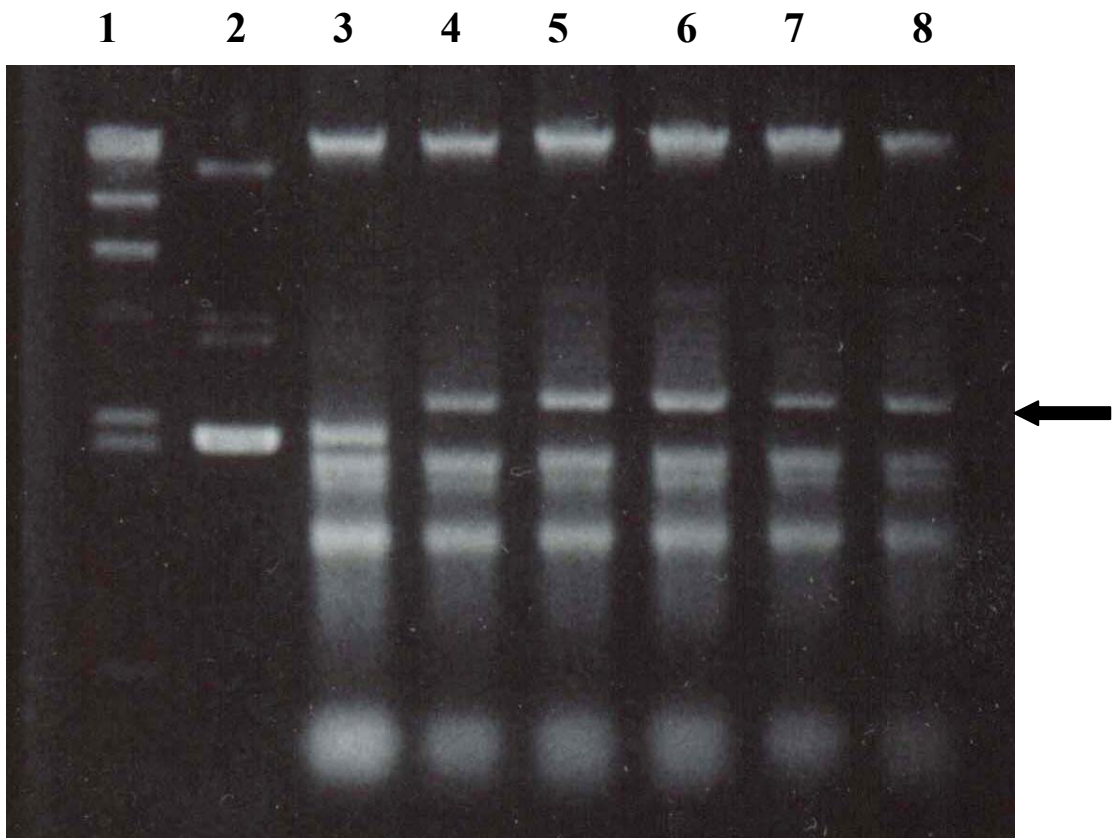


Figure 8

Screening of the *E. coli* colonies transformed with hGST A2.

Plasmids were prepared from the white *E. coli* colonies and analyzed by electrophoresis in a 1.0% agarose gel. Lane 1: λ phage Hind III marker. Lane 2: pGEM vector. Lane 3-8: plasmid was prepared from white *E. coli* colonies.

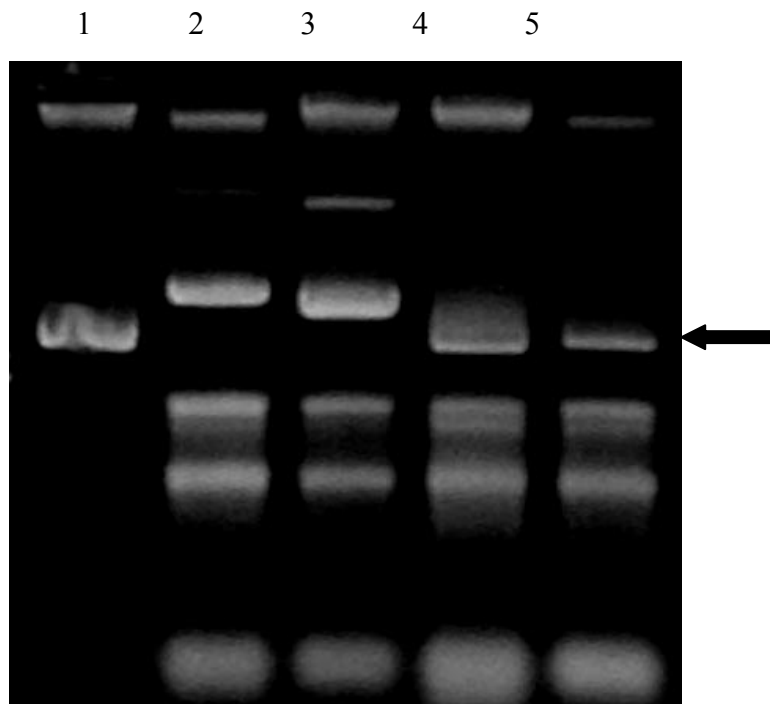


Figure 9

Screening of the *E. coli* colonies transformed with hGST P1.

Plasmids were prepared from the white *E. coli* colonies and analyzed by electrophoresis in a 1.0% agarose gel. Lane 1: pGEM vector. Lane 2-5: plasmid was prepared from white *E. coli* colonies.

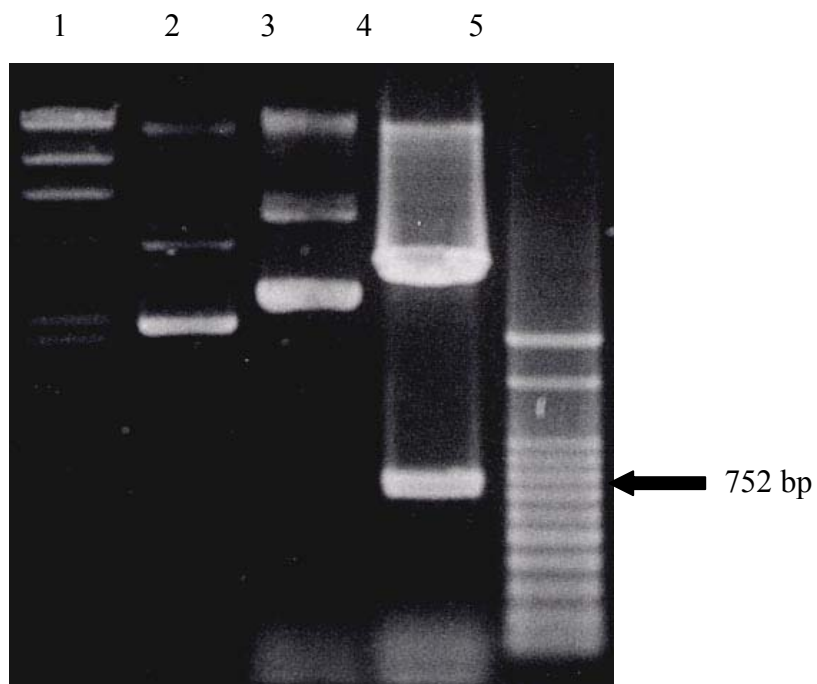


Figure 10

Screening of the *E. coli* colonies transformed with pGEM-hGST A2 plasmid. Plasmids were prepared from the white *E. coli* colonies digested with *EcoRI*, *XbaI* and analyzed by electrophoresis in a 1.0% agarose gel. Lane 1: λ phage Hind III marker. Lane 2: pGEM vector. Lane 3: pGEM-hGSTA. Lane 4: pGEM-hGSTA plasmid digested with *EcoRI* and *XbaI*. Lane 5: DNA ladder (marker). The expected 752 bp band was shown.

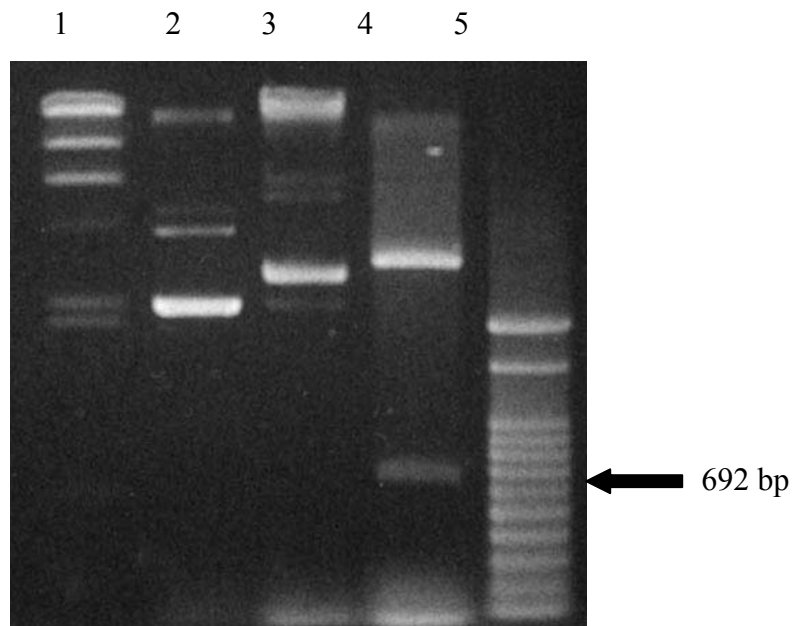


Figure 11

Screening of the *E. coli* colonies transformed with pGEM-hGST P1 plasmid. Plasmids were prepared from the white *E. coli* colonies, digested with *EcoRI*, *PstI* and analyzed by electrophoresis in the 1.0% agarose gel. Lane 1: λ phage Hind III marker. Lane 2: pGEM vector. Lane 3: pGEM-hGSTP. Lane 4: pGEM-hGSTP plasmid digested with *EcoRI* and *PstI*. Lane 5: DNA ladder (marker). The expected 692 bp band was shown.

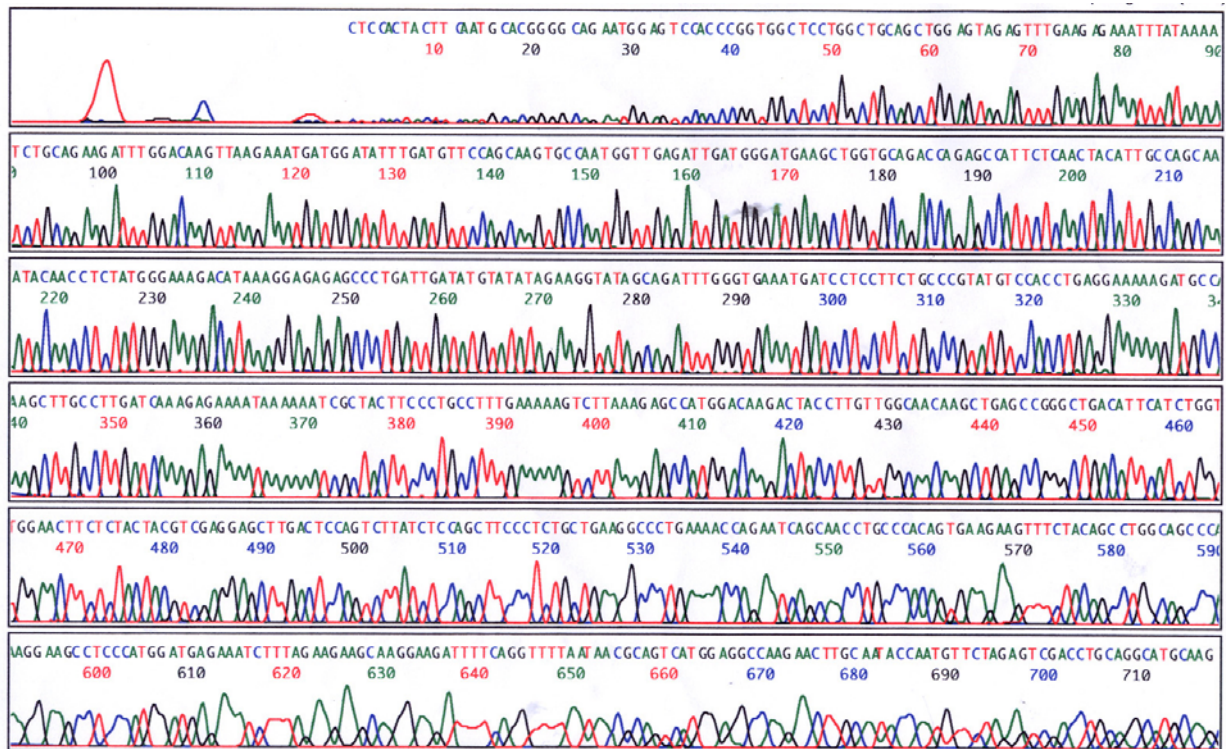


Figure 12

Sequence of hGST A cDNA analyzed by autosequencer.

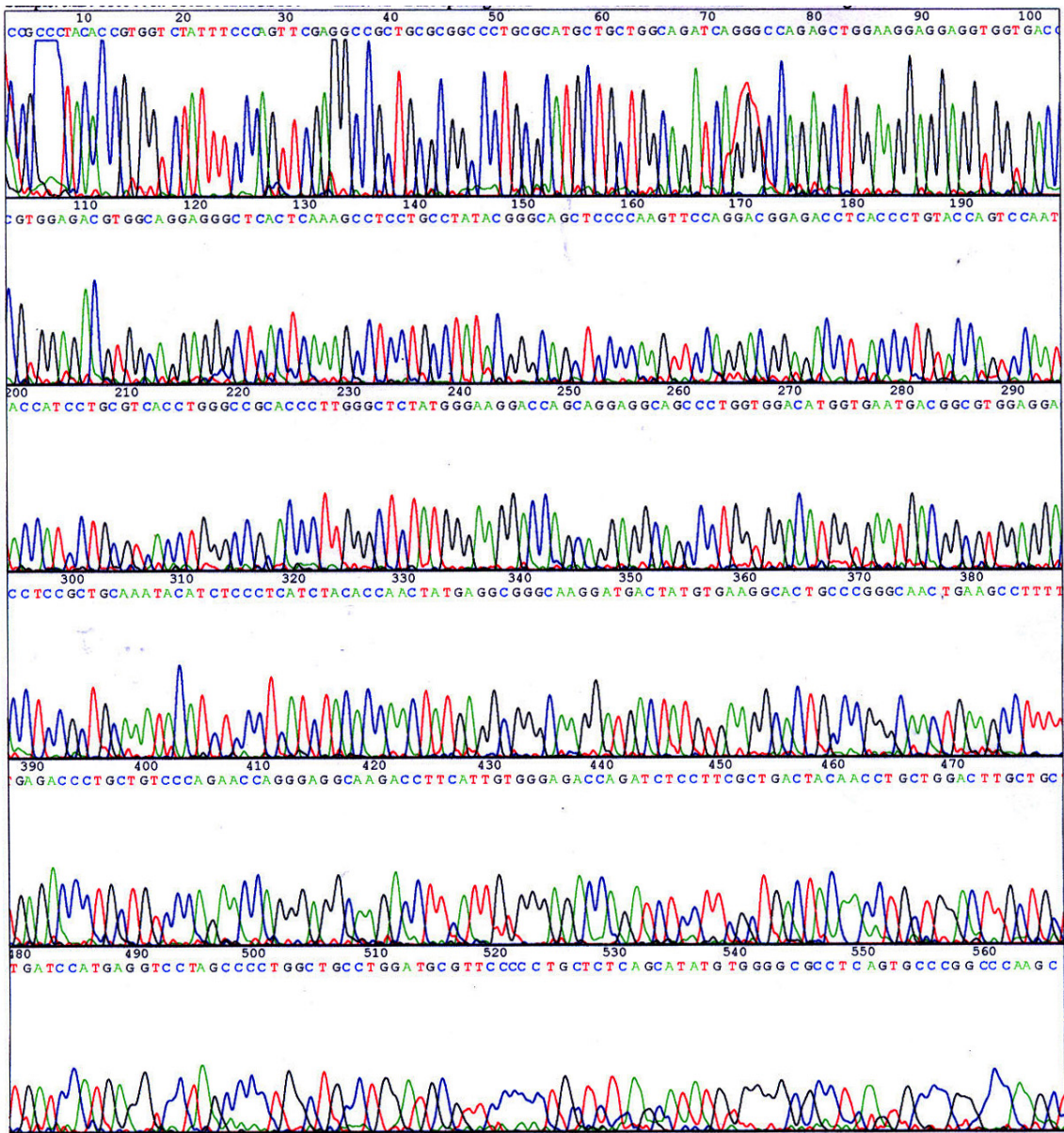


Figure 13

Sequence of hGST P cDNA analyzed by autosequencer.

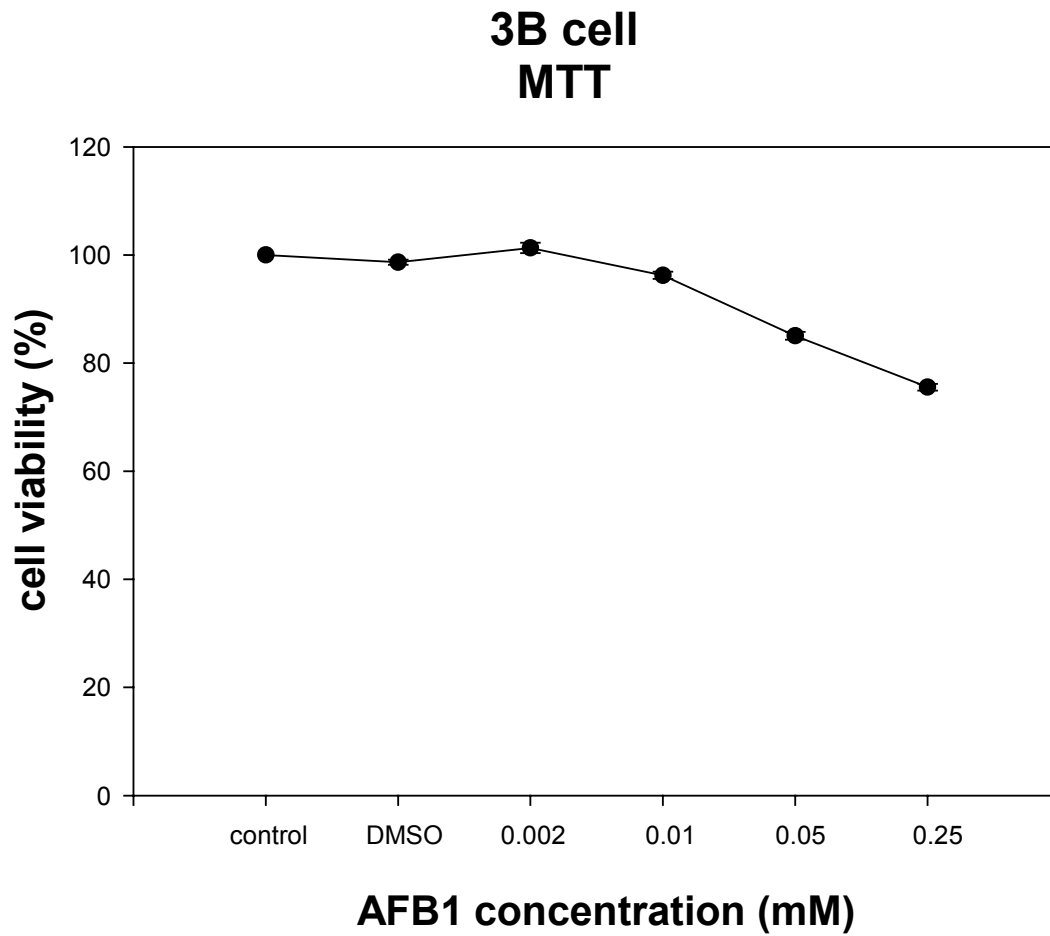


Figure 14

Detection of cell viability by MTT assay in Hep 3B cell.

Hep 3B cells were treated with AFB1 or 0.1% DMSO for 24 hours, or remained untreated as controls.

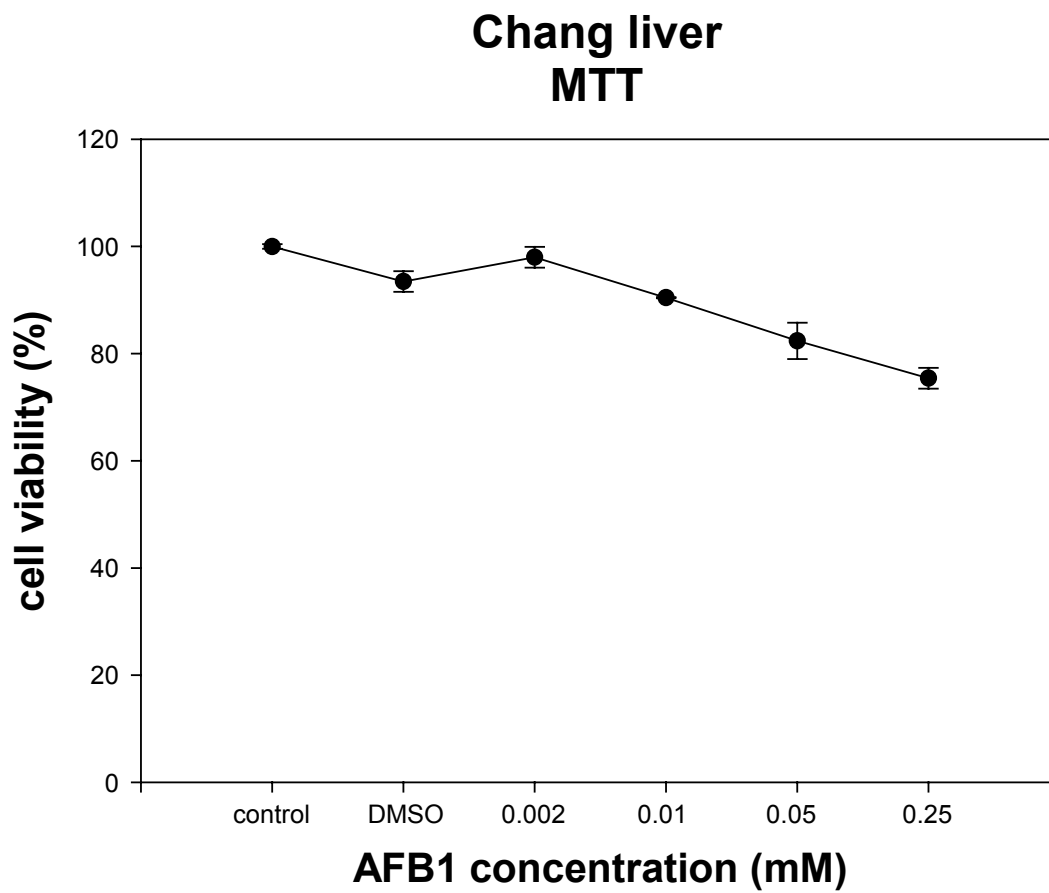


Figure 15

Detection of cell viability by MTT assay in Chang liver cell.

Chang liver cells were treated with AFB1 or 0.1% DMSO for 24 hours, or remained untreated as controls.

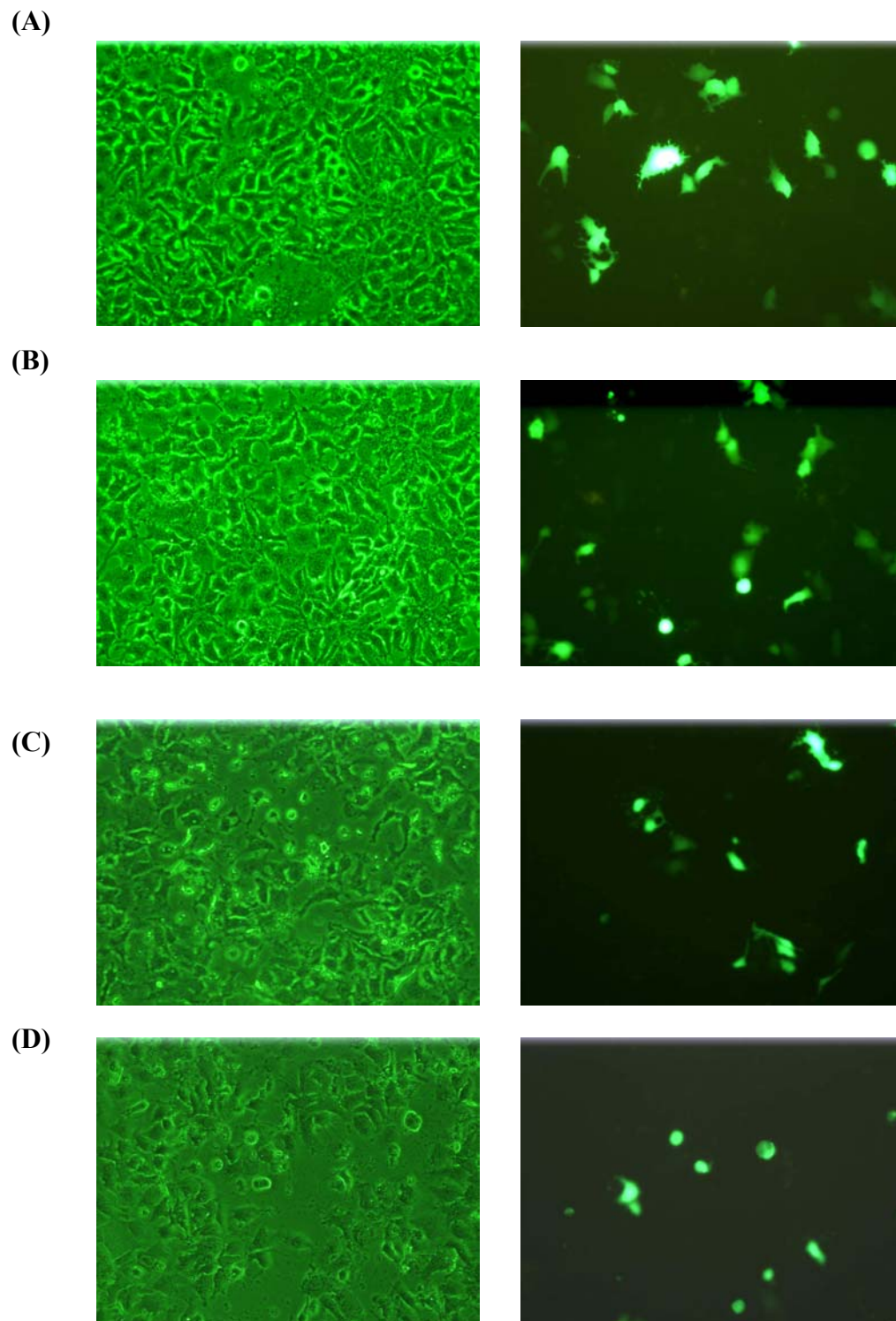


Figure 16

The effect of hGST A2 overexpression on cell morphology in Hep 3B cell.

(A) Hep 3B cells transfected with GFP.

(B) Hep 3B cells transfected with GFP-GST A2.

(C) Hep 3B cells transfected with GFP and treated 0.05mM AFB1.

(D) Hep 3B cells transfected with GFP-GST A2 and treated 0.05mM AFB1.

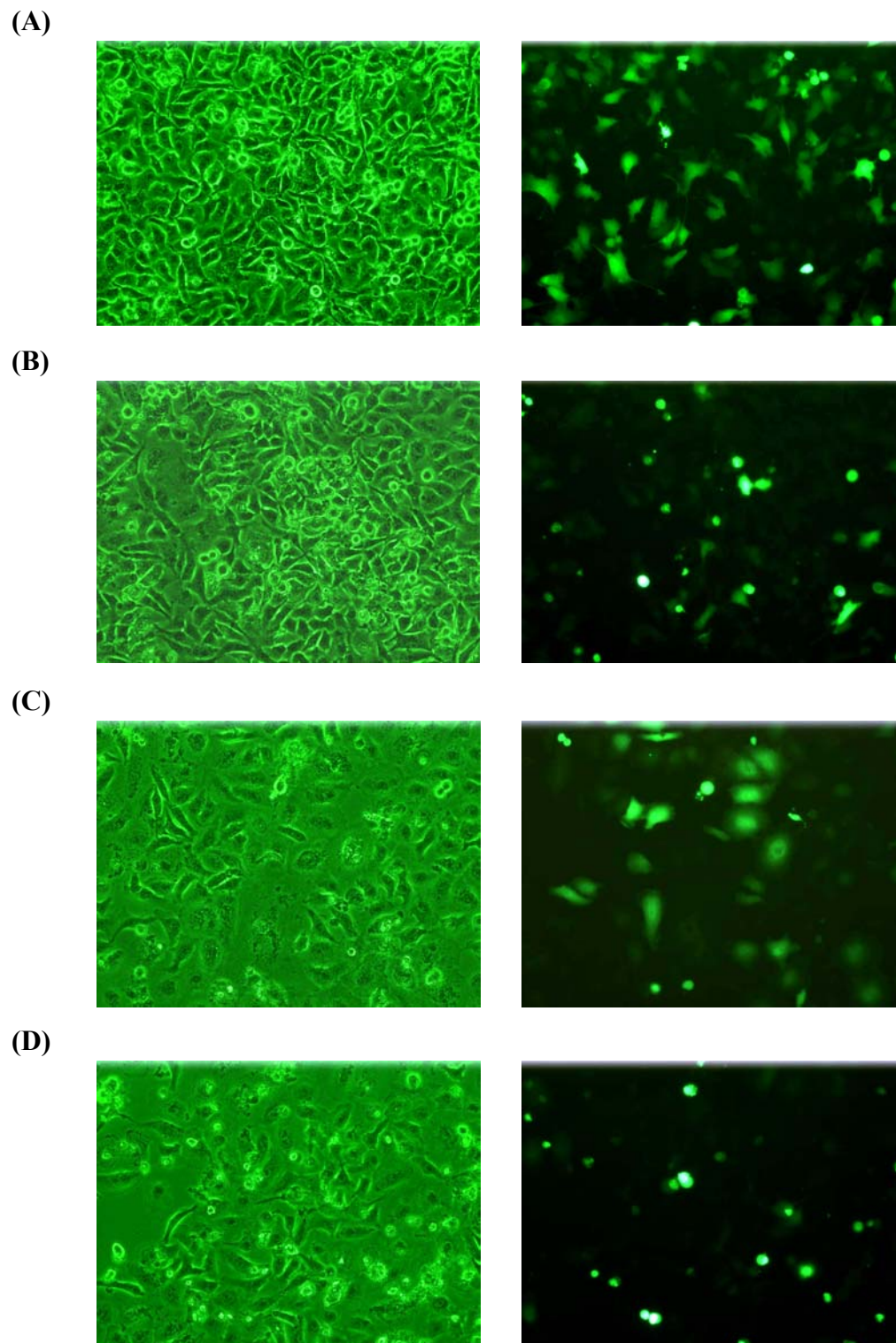


Figure 17

The effect of hGST A2 overexpression on cell morphology in chang liver cell.

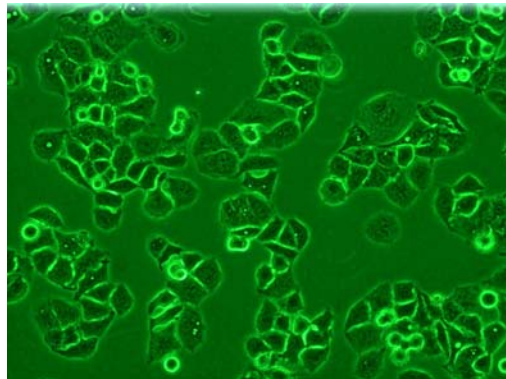
(A) Chang liver cells transfected with GFP.

(B) Chang liver cells transfected with GFP-GSTA.

(C) Chang liver cells transfected with GFP and treated 0.05mM AFB1.

(D) Chang liver transfected with GFP-GSTA and treated 0.05mM AFB1.

(A)



(B)

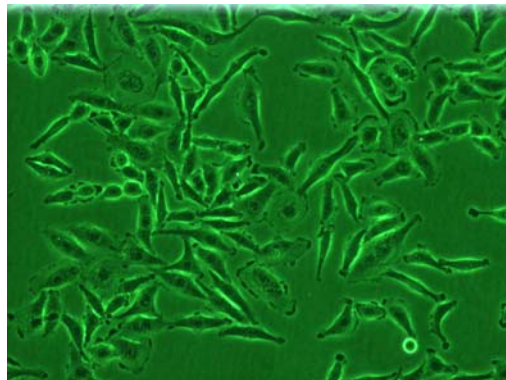


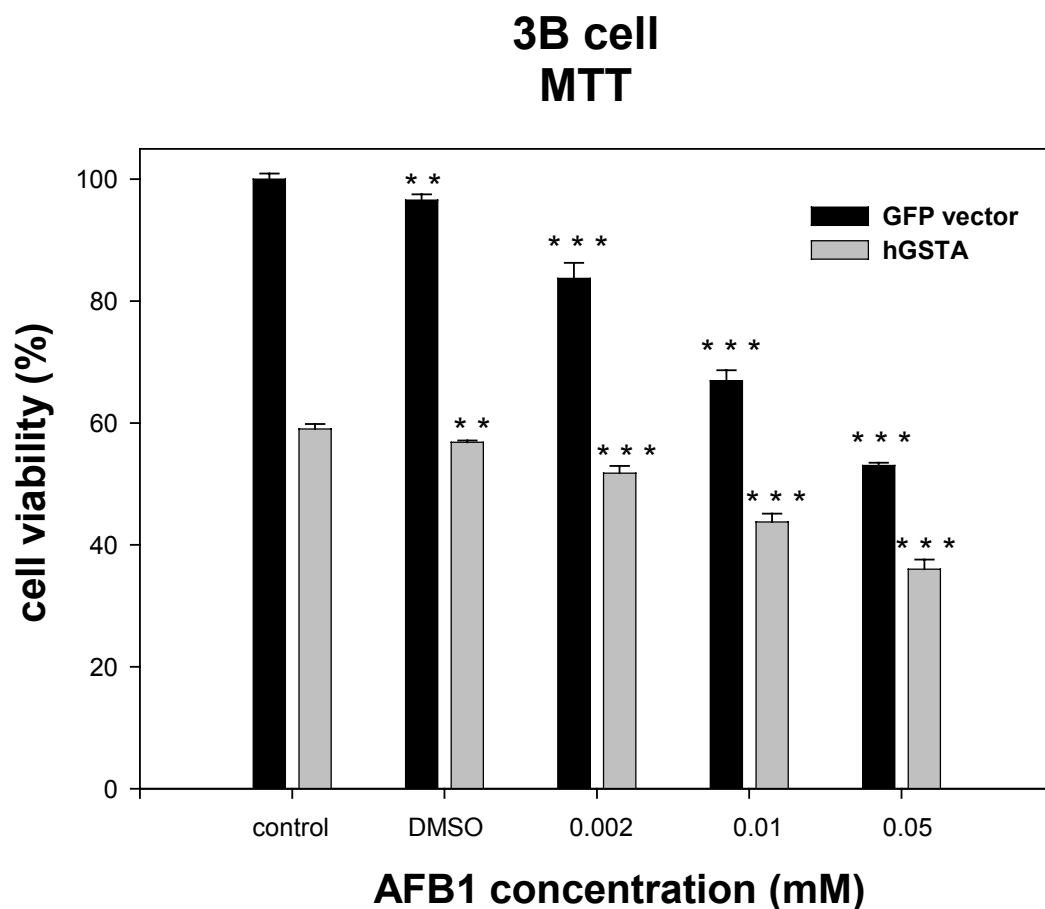
Figure 18

Cell morphology of Hep 3B cell and Chang liver cell.

(A) Hep 3B cell.

(B) Chang liver cell.

(A)



(B)

	Control	DMSO	0.002	0.01	0.05
GFP vector	100	97	84 *	67 **	53 **
hGSTA	100	96	88	74	61

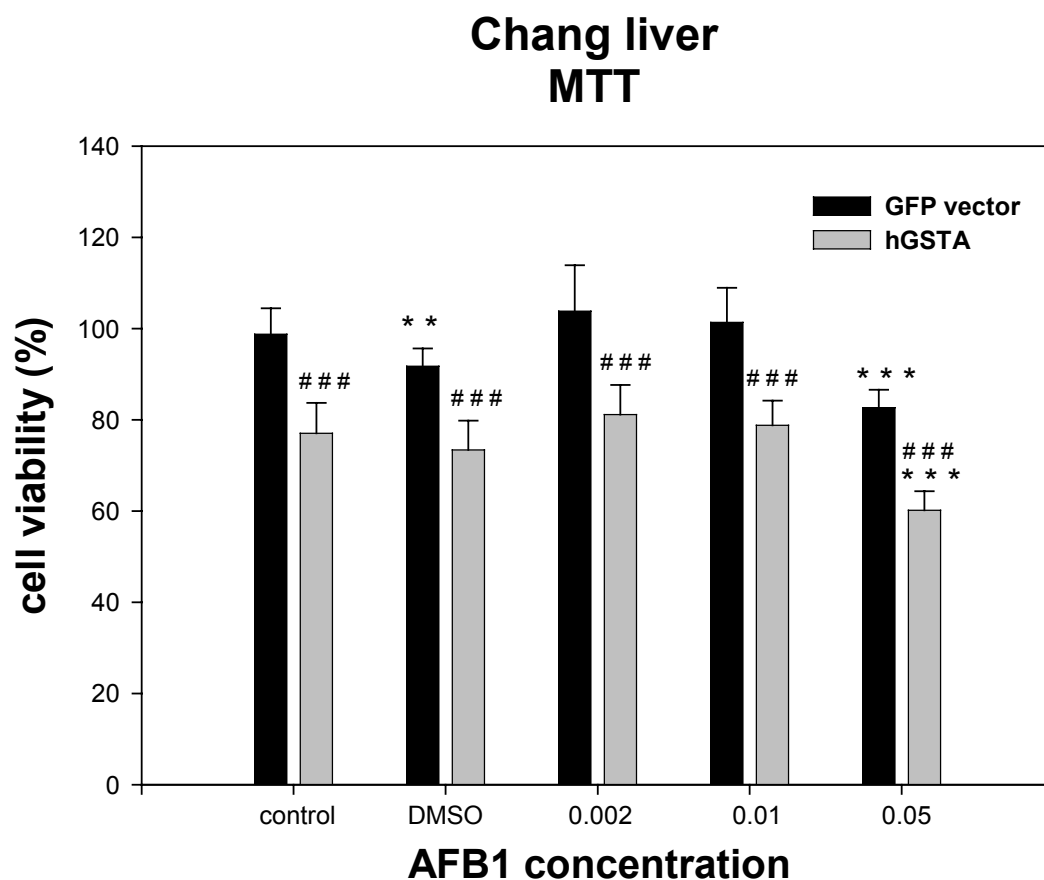
Figure 19

Effect of hGST A2 overexpression on cell viability by MTT assay in Hep 3B cell.

(A) Hep 3B cells were transfected with the indicated plasmids. After transfection for 48 hours, cells were treated with AFB1 or 0.1% DMSO for 24 hours, or remained untreated as controls. Means \pm S.D. of four experiments (** and *** indicate significant differences as compared to the control with $p < 0.01$ and 0.001).

(B) The data in A are presented as the percentages of control. (* and ** indicates significant differences between the hGST A2-transfected and control vector-transfected cells under the same treatment condition with $p < 0.05$ and 0.01).

(A)



(B)

	Control	DMSO	0.002	0.01	0.05
GFP vector	100	93	105	103	84*
hGSTA	100	95	105	102	78

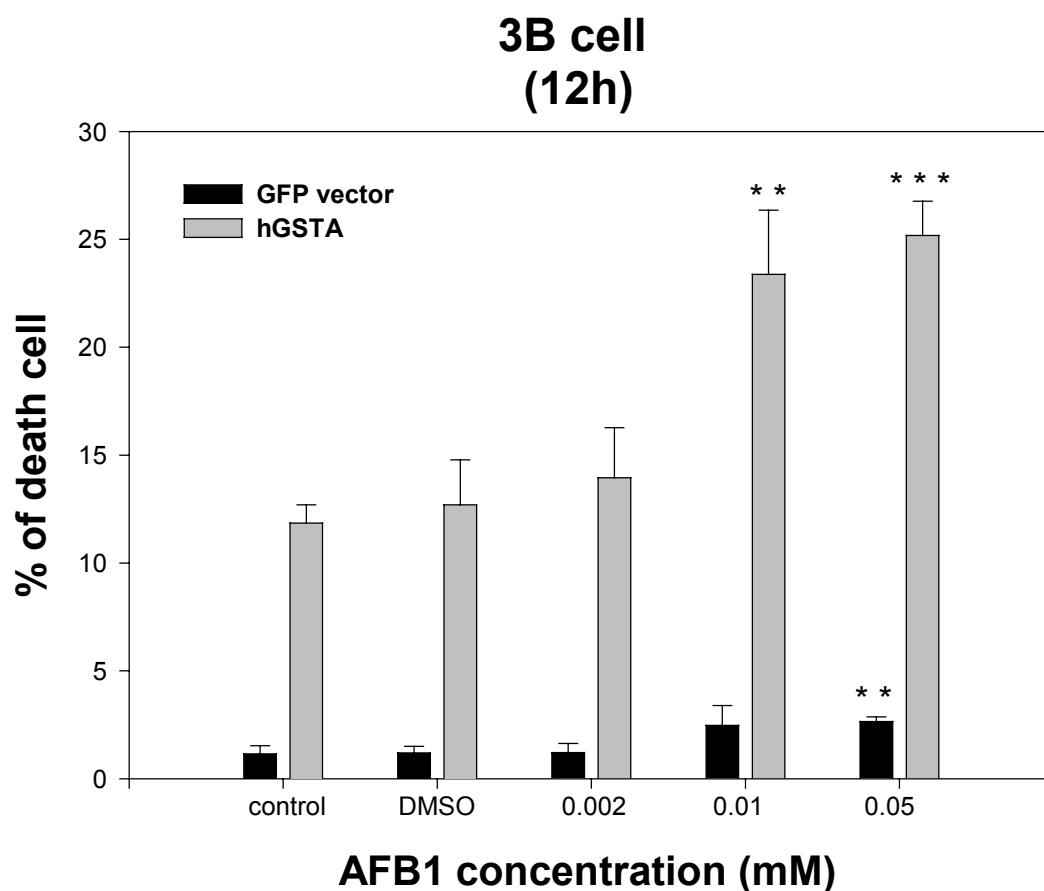
Figure 20

Effect of hGST A2 overexpression on cell viability by MTT assay in Chang liver cell.

(A) Chang liver cells were transfected with the indicated plasmids. After transfection for 48 hours, cells were treated with AFB1 or 0.1% DMSO for 24 hours, or remained untreated as controls. Means \pm S.D. of three experiments (** and *** indicate significant differences as compared to the control with $p < 0.01$ and 0.001 ; ### indicate significant differences between the hGST A2-transfected and control vector-transfected cells under the same treatment condition with $p < 0.001$).

(B) The data in A are presented as the percentages of control.

(A)



(B)

	Control	DMSO	0.002	0.01	0.05
GFP vector	100	104	105	215	230
hGSTA	100	107	118	197	212

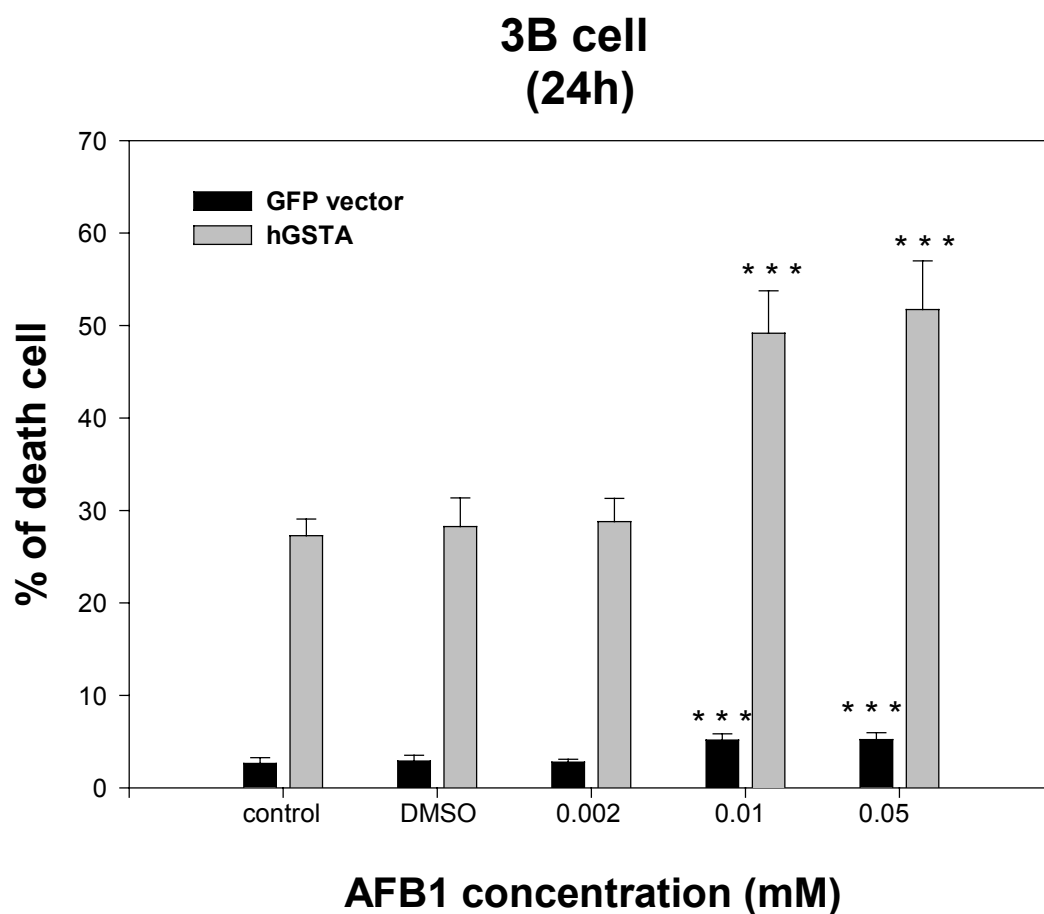
Figure 21

Effect of hGST A2 overexpression and AFB1 treatment on cell death in Hep 3B cell.

(A) Hep 3B cells were transfected with the indicated plasmids. After transfection for 48 hours, cells were treated with AFB1 or 0.1% DMSO for 12 hours, or remained untreated as controls. Means \pm S.D. of three experiments (** and *** indicate significant differences as compared to the control with $p < 0.01$ and 0.001).

(B) The data in A are presented as the percentages of control.

(A)



(B)

	Control	DMSO	0.002	0.01	0.05
GFP vector	100	109	105	196	198
hGSTA	100	104	106	180	190

Figure 22

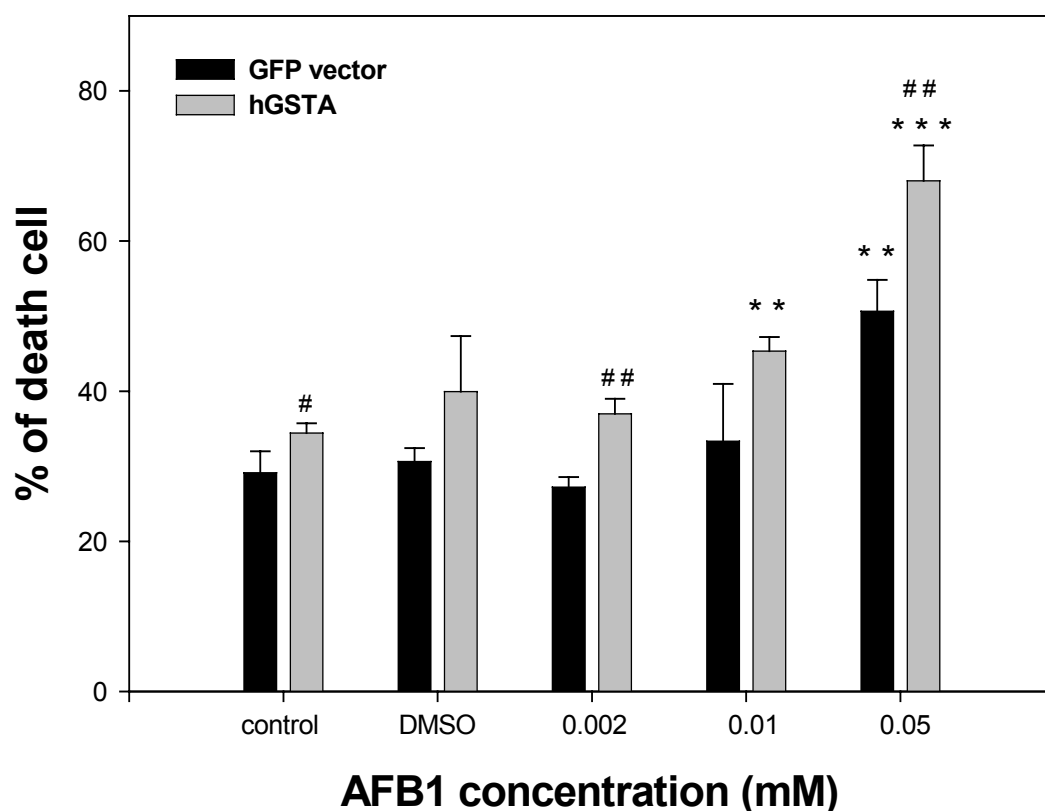
Effect of hGST A2 overexpression and AFB1 treatment on cell death in Hep 3B cell.

(A) Hep 3B cells were transfected with the indicated plasmids. After transfection for 48 hours, cells were treated with AFB1 or 0.1%DMSO for 22 hours, or remained untreated as controls. Means \pm S.D. of five experiments (*** indicate significant differences as compared to the control with $p < 0.001$).

(B) The data in A are presented as the percentages of control.

(A)

Chang liver (12h)



(B)

)

	Control	DMSO	0.002	0.01	0.05
GFP vector	100	105	93 *	114	174
hGSTA	100	116	107	132	198

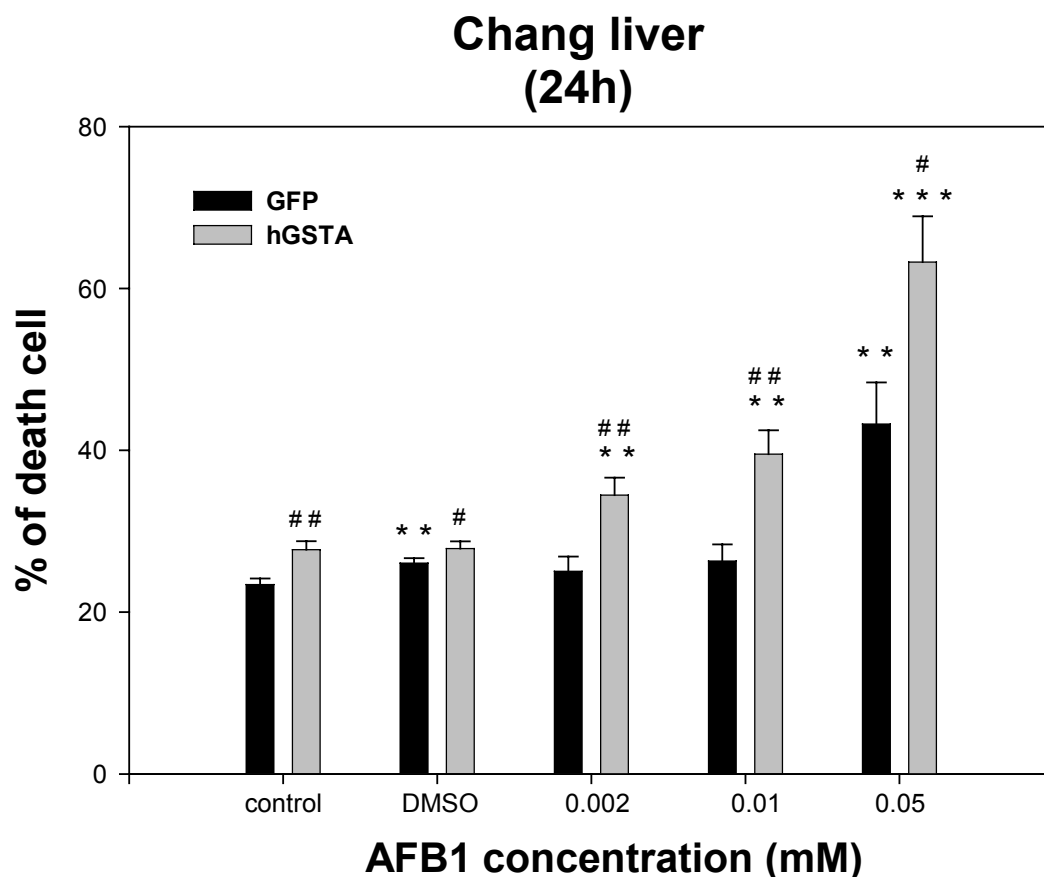
Figure 23

Effect of hGST A2 overexpression and AFB1 treatment on cell death in Chang liver cell.

(A) Chang liver cells were transfected with the indicated plasmids. After transfection for 48 hours, cells were treated with AFB1 or 0.1% DMSO for 12 hours, or remained untreated as controls. Means \pm S.D. of three experiments (** and *** indicate significant differences as compared to the control with $p < 0.01$ and 0.001 ; # and ## indicate significant differences between the hGST A2-transfected and control vector-transfected cells under the same treatment condition with $p < 0.05$ and 0.01)

(B) The data in A are presented as the percentages of control. (* indicates significant differences between the hGST A2-transfected and control vector-transfected cells under the same treatment condition with $p < 0.05$).

(A)



(B)

	Control	DMSO	0.002	0.01	0.05
GFP vector	100	111 *	107	112 *	185
hGSTA	100	100	124	143	228

Figure 24

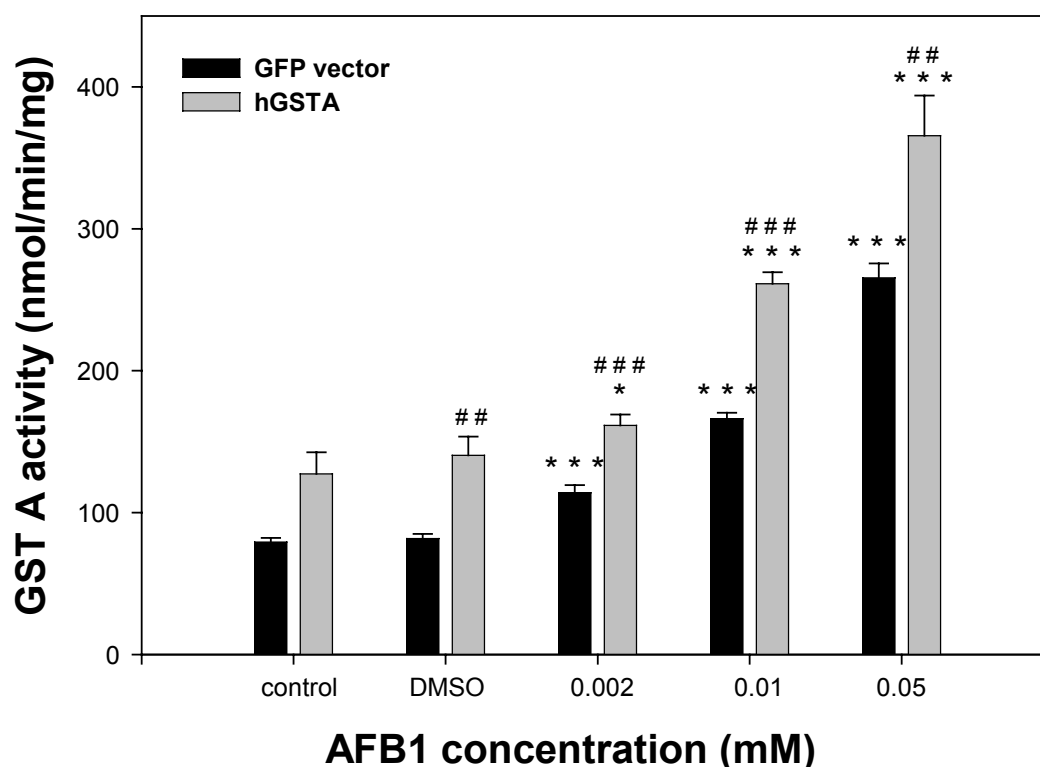
Effect of hGST A2 overexpression and AFB1 treatment on cell death in Chang liver cell.

(A) Chang liver cells were transfected with the indicated plasmids. After transfection for 48 hours, cells were treated with AFB1 or 0.1% DMSO for 22 hours, or remained untreated as controls. Means \pm S.D. of three experiments (** and *** indicate significant differences as compared to the control with $p < 0.01$ and 0.001 ; # and ## indicate significant differences between the hGST A2-transfected and control vector-transfected cells under the same treatment condition with $p < 0.05$ and 0.01).

(B) The data in A are presented as percentages of control. (* indicates significant differences between the hGST A2-transfected and control vector-transfected cells under the same treatment condition with $p < 0.05$).

(A)

3B cell GST A activity



(B)

	Control	DMSO	0.002	0.01	0.05
GFP vector	100	103	144 *	210	335
hGSTA	100	110	127	205	287

Figure 25

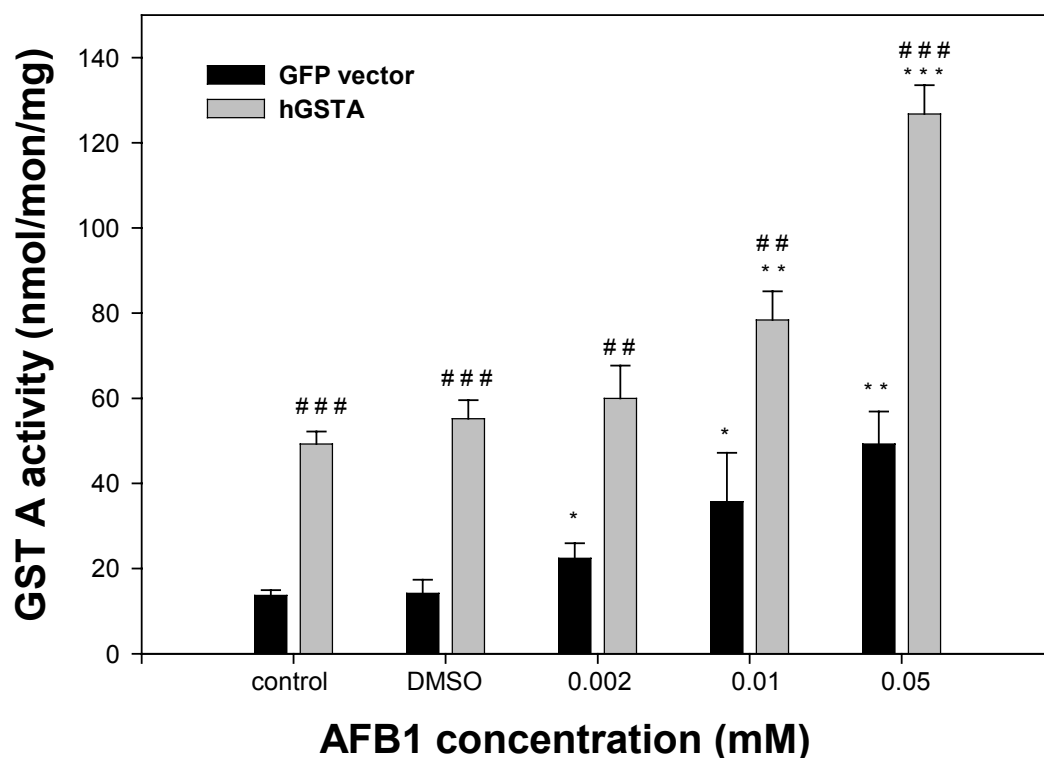
Effect of hGST A2 overexpression and AFB1 treatment on GST A activity in Hep 3B cells.

(A) Hep 3B cells were transfected with the indicated plasmids. After transfection for 48 hours, cells were treated with AFB1 or 0.1% DMSO for 24 hours, or remained untreated as controls. Means \pm S.D. of three experiments (* and *** indicate significant differences as compared to the control with $p < 0.05$ and 0.001 ; ## and ### indicate significant differences between the hGST A2-transfected and control vector-transfected cells under the same treatment condition with $p < 0.01$ and 0.001).

(B) The data in A are presented as percentages of control. (* indicates significant differences between the hGST A2-transfected and control vector-transfected cells under the same treatment condition with $p < 0.05$).

(A)

Chang liver GST A activity



(B)

	Control	DMSO	0.002	0.01	0.05
GFP vector	100	103	164	261	360*
hGSTA	100	112	122	159	257

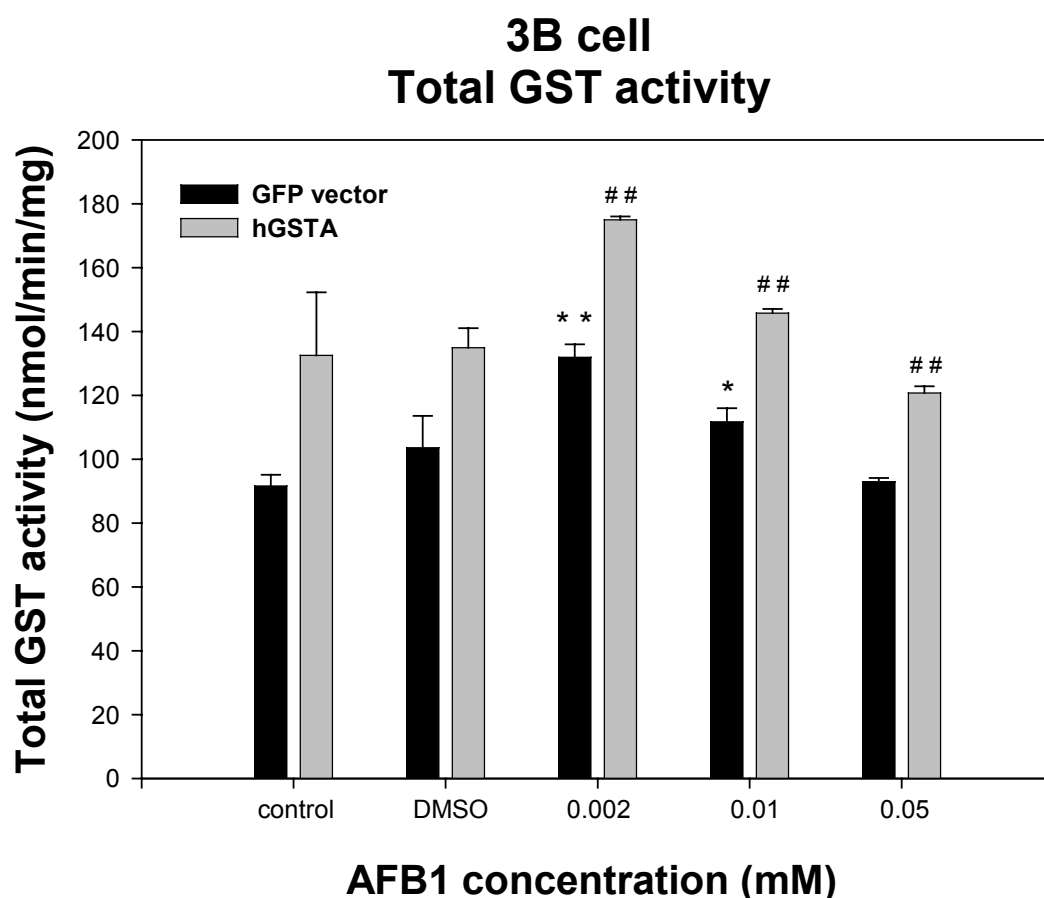
Figure 26

Effect of hGST A2 overexpression and AFB1 treatment on GST A activity in Chang liver cells.

(A) Chang liver cells were transfected with the indicated plasmids. After transfection for 48 hours, cells were treated with AFB1 or 0.1% DMSO for 24 hours, or remained untreated as controls. Means \pm S.D. of three experiments (*, ** and *** indicate significant differences as compared to the control with $p < 0.05$, 0.01 and 0.001 ; #, ## and ### indicate significant differences between the hGST A2-transfected and control vector-transfected cells under the same treatment condition with $p < 0.01$ and 0.001).

(B) The data in A are presented as percentages of control. (* indicates significant differences between the hGST A2-transfected and control vector-transfected cells under the same treatment condition with $p < 0.05$).

(A)



(B)

	Control	DMSO	0.002	0.01	0.05
GFP vector	100	113	144	122	102 *
hGSTA	100	102	132	110	91

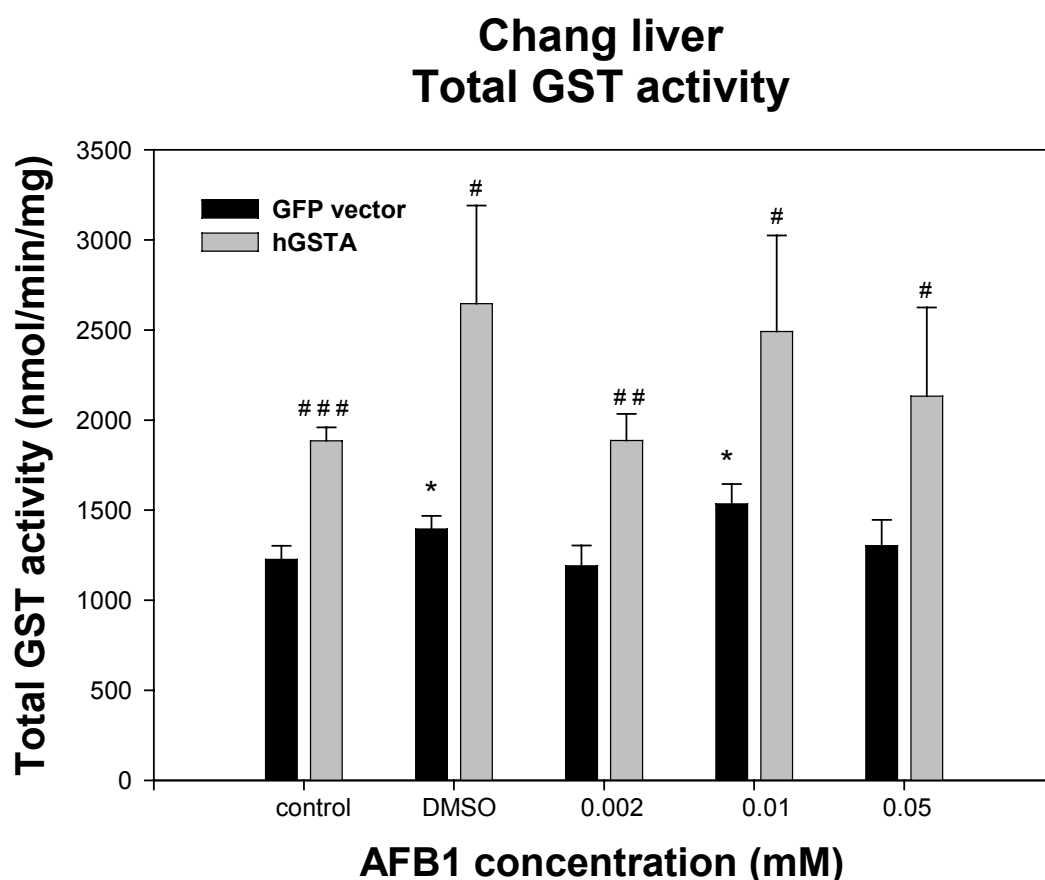
Figure 27

Effect of hGST A2 overexpression and AFB1 treatment on total GST activity in Hep 3B cells.

(A) Hep 3B cells were transfected with the indicated plasmids. After transfection for 48 hours, cells were treated with AFB1 or 0.1% DMSO for 24 hours, or remained untreated as controls. Means \pm S.D. of two experiments (* and ** indicate significant differences as compared to the control with $p < 0.05$ and 0.01 ; ## indicate significant differences between the hGST A2-transfected and control vector-transfecteds cell under the same treatment condition with $p < 0.01$).

(B) The data is A are presented as the percentages of control.(* indicates significant differences between the hGST A2-transfected and control vector-transfected cells under the same treatment condition with $p < 0.05$).

(A)



(B)

	Control	DMSO	0.002	0.01	0.05
GFP vector	100	114	97	125	106
hGSTA	100	140	100	132	113

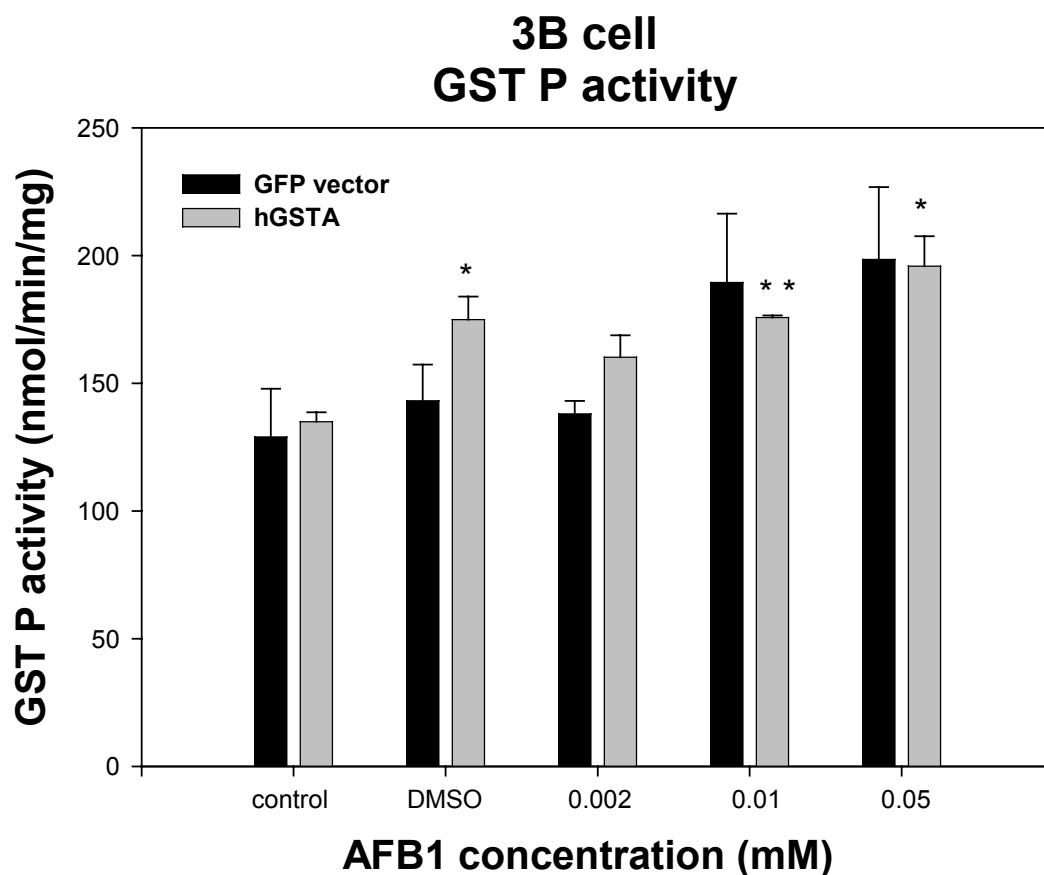
Figure 28

Effect of hGST A2 overexpression and AFB1 treatment on total GST activity in Chang liver cells.

(A) Chang liver cells were transfected with the indicated plasmids. After transfection for 48 hours, cells were treated with AFB1 or 0.1% DMSO for 24 hours, or remained untreated as controls. Means \pm S.D. of three experiments (* indicate significant differences as compared to the control with $p < 0.05$; #, ## and ### indicate significant differences between the hGST A2-transfected and control vector-transfected cells under the same treatment condition with $p < 0.05$, 0.01 and 0.001)

(B) The data in A are presented as the percentages of control.

(A)



(B)

	Control	DMSO	0.002	0.01	0.05
GFP vector	100	111	107	147	154
hGSTA	100	130	119	130	145

Figure 29

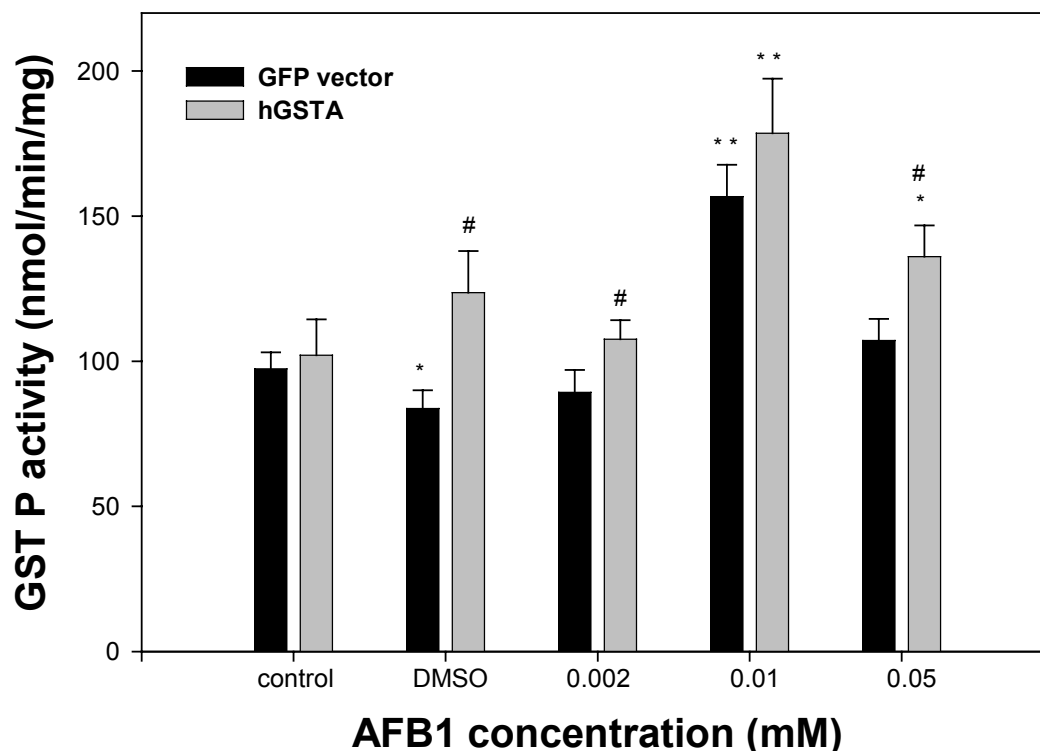
Effect of hGST A2 overexpression and AFB1 treatment on GST P activity in Hep 3B cells.

(A) Hep 3B cells were transfected with the indicated plasmids. After transfection for 48 hours, cells were treated with AFB1 or 0.1% DMSO for 24 hours, or remained untreated as controls. Means \pm S.D. of two experiments (* and ** indicate significant differences as compared to the control with $p < 0.05$ and 0.01).

(B) The data in A are presented as the percentages of control.

(A)

Chang liver GST P activity



(B)

	Control	DMSO	0.002	0.01	0.05
GFP vector	100	86 *	92	161	110 *
hGSTA	100	121	105	175	133

Figure 30

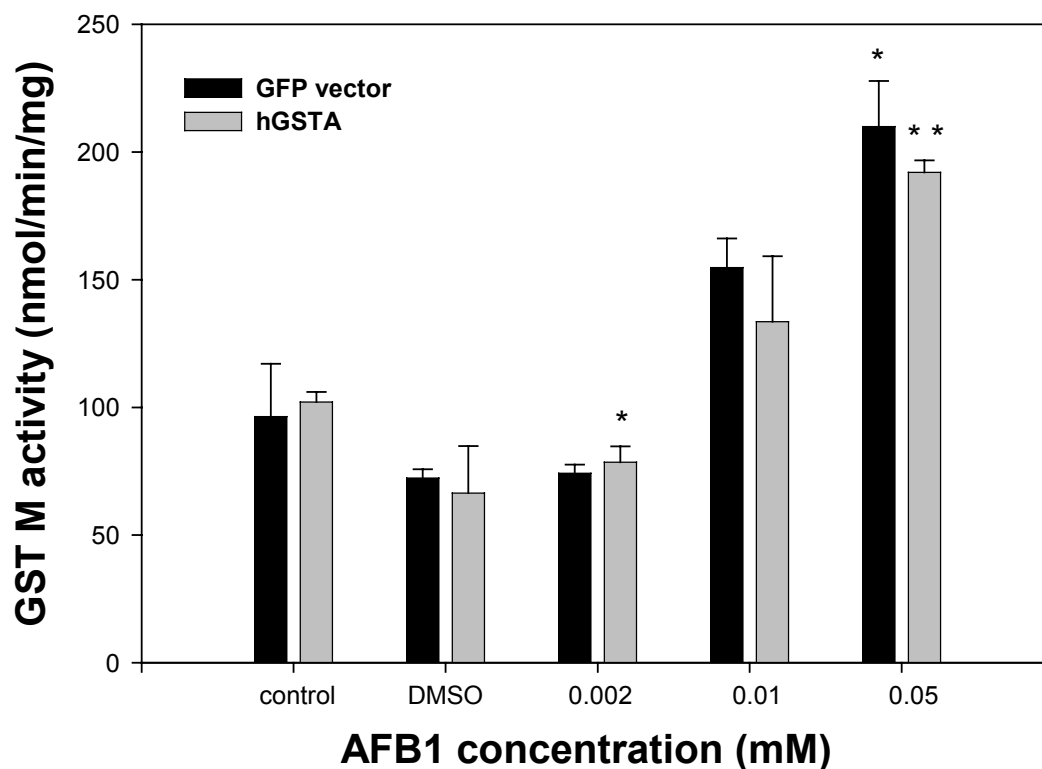
Effect of hGST A2 overexpression and AFB1 treatment on GST P activity in Chang liver cells.

(A) Chang liver cells were transfected with the indicated plasmids. After transfection for 48 hours, cells were treated with AFB1 or 0.1% DMSO for 24 hours, or remained untreated as controls. Means \pm S.D. of three experiments (* and ** indicate significant differences as compared to the control with $p < 0.05$ and 0.01 ; # indicate significant differences between the hGST A2-transfected and control vector-transfected cells under the same treatment condition with $p < 0.05$).

(B) The data in A are presented as the percentages of control. (* indicates significant differences between the hGST A2-transfected and control vector-transfected cells under the same treatment condition with $p < 0.05$).

(A)

3B cell GST M activity



(B)

	Control	DMSO	0.002	0.01	0.05
GFP vector	100	75	77	160	218
hGSTA	100	65	77	131	188

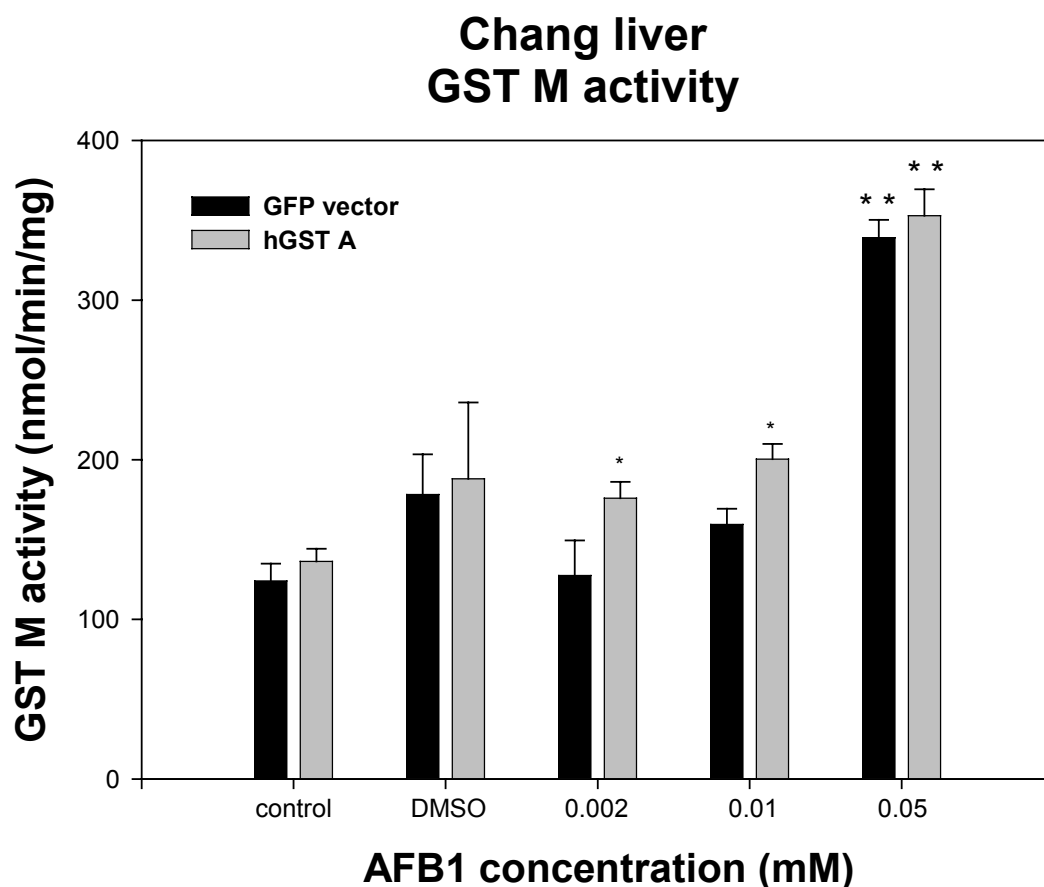
Figure 31

Effect of hGST A2 overexpression and AFB1 treatment on GST M activity in Hep 3B cells.

(A) Hep 3B cells were transfected with the indicated plasmids. After transfection for 48 hours, cells were treated with AFB1 or 0.1% DMSO for 24 hours, or remained untreated as controls. Means \pm S.D. of two experiments (* and ** indicate significant differences as compared to the control with $p < 0.05$ and 0.01).

(B) The data in A are presented as the percentages of control.

(A)



(B)

	Control	DMSO	0.002	0.01	0.05
GFP vector	100	144	103	129	273
hGSTA	100	138	129	147	259

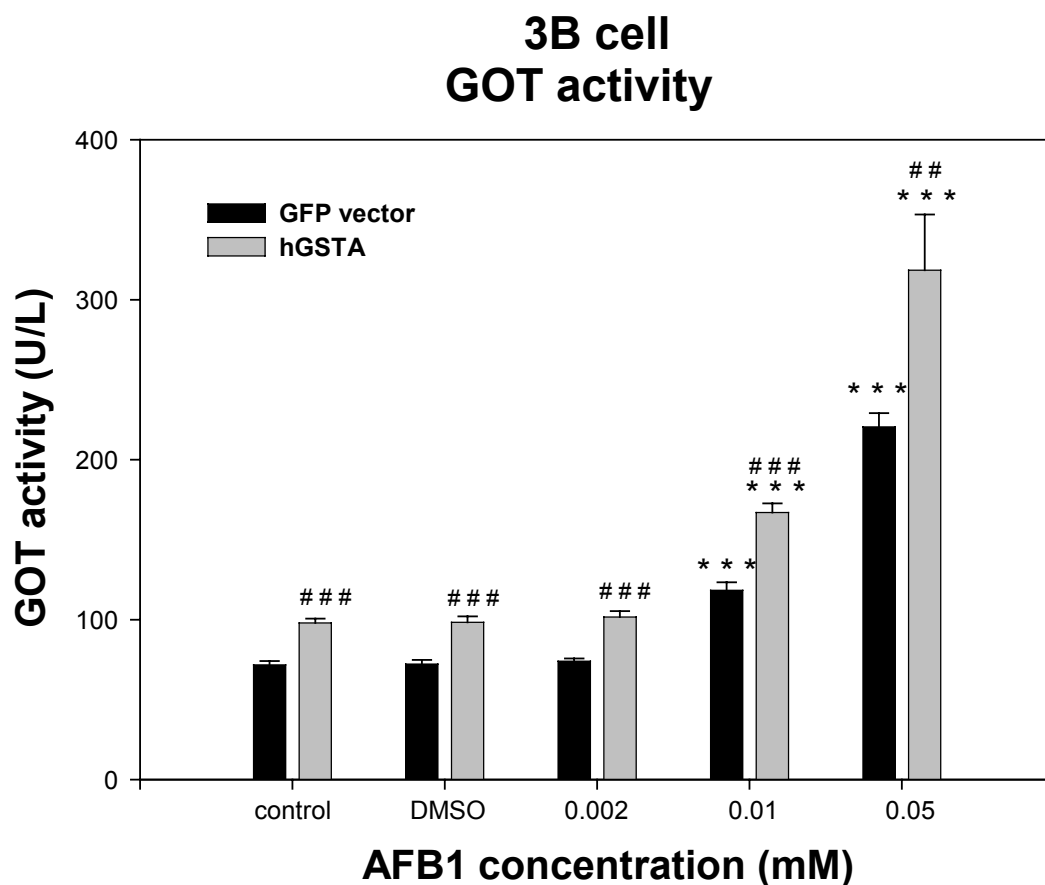
Figure 32

Effect of hGST A2 overexpression and AFB1 treatment on GST M activity in Chang liver cells.

(A) Chang liver cells were transfected with the indicated plasmids. After transfection for 48 hours, cells were treated with AFB1 or 0.1% DMSO for 24 hours, or remained untreated as controls. Means \pm S.D. of two experiments (* and ** indicate significant differences as compared to the control with $p < 0.05$ and 0.01).

(B) The data in A are presented as the percentages of control.

(A)



(B)

	Control	DMSO	0.002	0.01	0.05
GFP vector	100	101	103	165	308
hGSTA	100	100	104	171	325

Figure 33

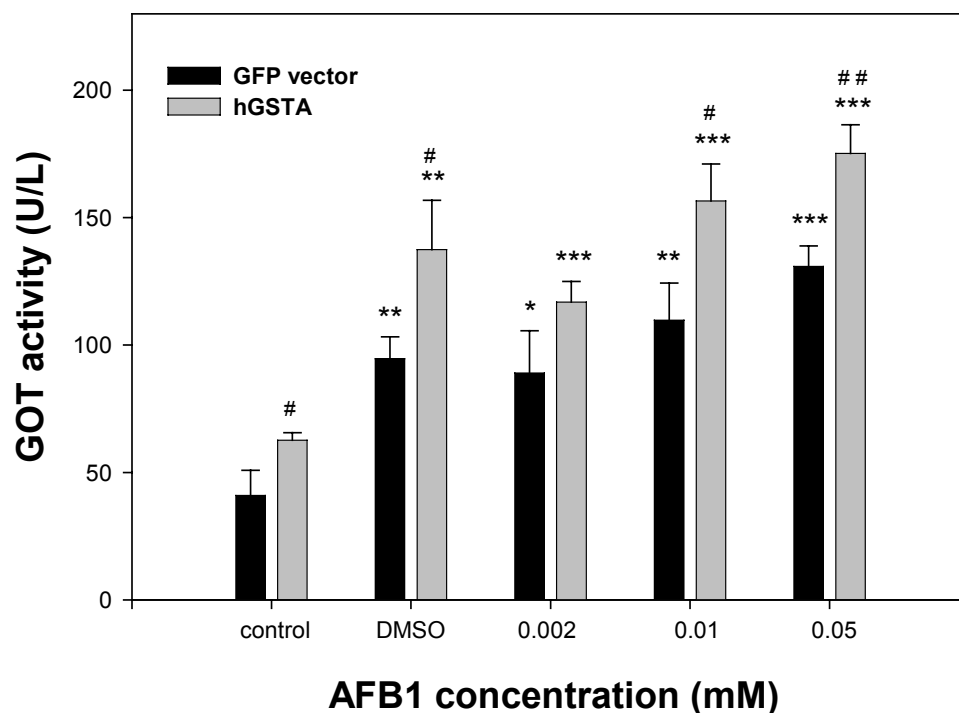
Effect of hGST A2 overexpression and AFB1 treatment on GOT activity in Hep 3B cells.

(A) Hep 3B cells were transfected with the indicated plasmids. After transfection for 48 hours, cells were treated with AFB1 or 0.1% DMSO for 24 hours, or remained untreated as controls. Means \pm S.D. of four experiments (*** indicate significant differences as compared to the control with $p < 0.001$; ## and ### indicate significant differences between the hGST A2-transfected and control vector-transfected cells under the same treatment condition with $p < 0.01$ and 0.001).

(B) The data in A are presented as percentages of control.

(A)

Chang liver GOT activity



(B)

	Control	DMSO	0.002	0.01	0.05
GFP vector	100	231	217	268	320
hGSTA	100	219	186	250	279

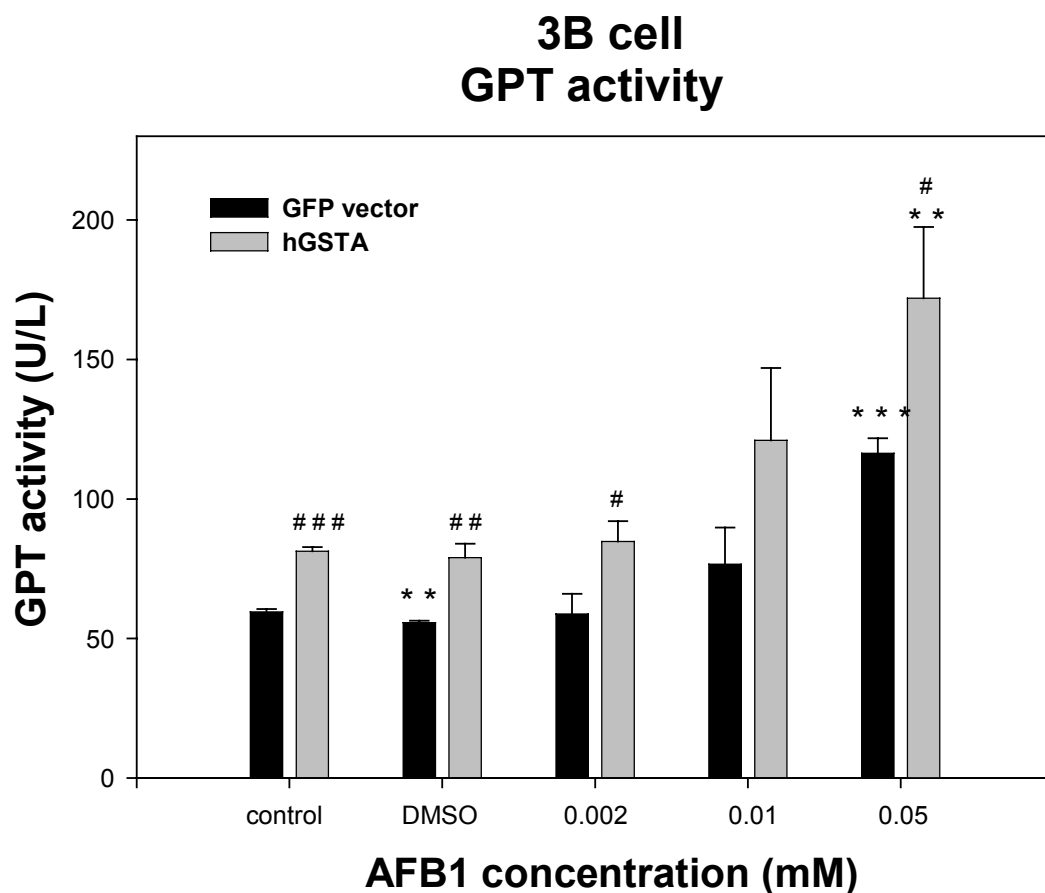
Figure 34

Effect of hGST A2 overexpression and AFB1 treatment on GOT activity in Chang liver cells.

(A) Chang liver cells were transfected with the indicated plasmids. After transfection for 48 hours, cells were treated with AFB1 or 0.1% DMSO for 24 hours, or remained untreated as controls. Means \pm S.D. of three experiments (*, ** and *** indicate significant differences as compared to the control with $p < 0.05$, 0.01 and 0.001; # and ## indicate significant differences between the hGST A2-transfected and control vector-transfected cells under the same treatment condition with $p < 0.05$ and 0.01).

(B) The data in A are presented as the percentages of control.

(A)



	Control	DMSO	0.002	0.01	0.05
GFP vector	100	94	99	129	196
hGSTA	100	97	104	149	212

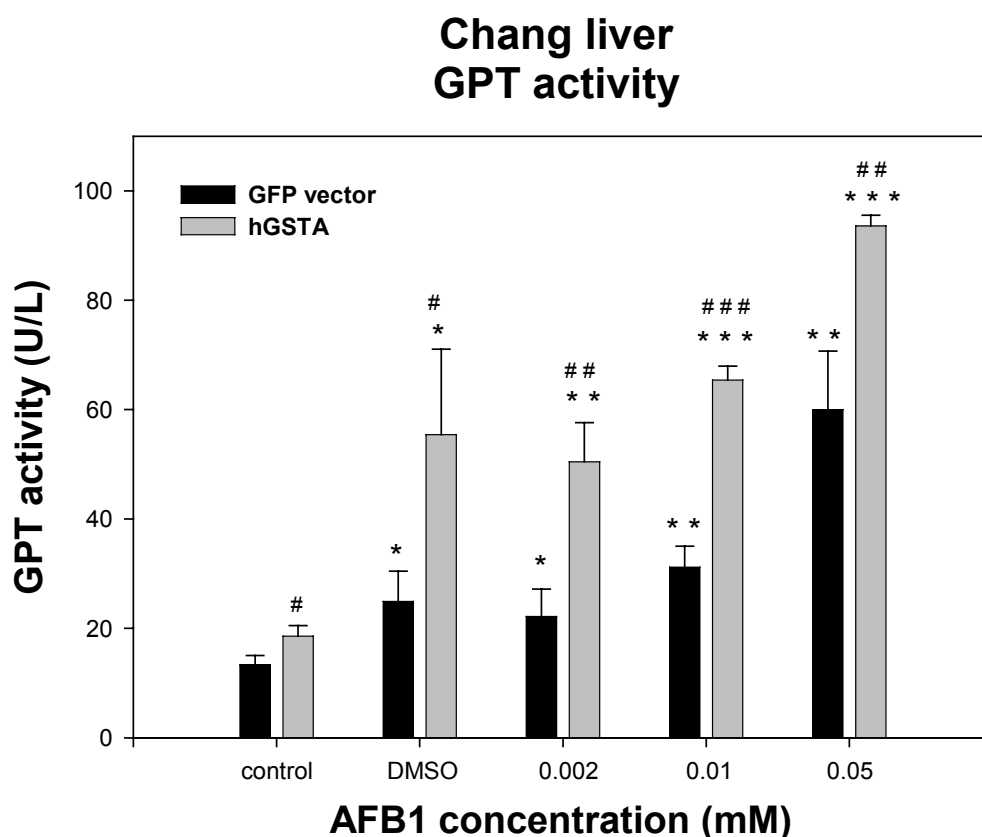
Figure 35

Effect of hGST A2 overexpression and AFB1 treatment on GPT activity in Hep 3B cells.

(A) Hep 3B cells were transfected with the indicated plasmids. After transfection for 48 hours, cells were treated with AFB1 or 0.1% DMSO for 24 hours, or remained untreated as controls. Means \pm S.D. of three experiments (** and *** indicate significant differences as compared to the control with $p < 0.01$ and 0.001 ; #, ## and ### indicate significant differences between the hGST A2-transfected and control vector-transfected cells under the same treatment condition with $p < 0.05$, 0.01 and 0.001).

(B) The data in A are presented as the percentages of control.

(A)



(B)

	Control	DMSO	0.002	0.01	0.05
GFP vector	100	187	167 *	235 **	451
hGSTA	100	298	272	352	504

Figure 36

Effect of hGST A2 overexpression and AFB1 ntreatment on GPT activity in Chang liver cells.

(A) Chang liver cells were transfected with the indicated plasmids. After transfection for 48 hours, cells were treated with AFB1 or 0.1% DMSO for 24 hours, or remained untreated as controls. Means \pm S.D. of three experiments (*, ** and *** indicate significant differences as compared to the control with $p < 0.05$, 0.01 and 0.001; #, ## and ### indicate significant differences between the hGST A2-transfected and control vector-transfected cells under the same treatment condition with $p < 0.05$, 0.01 and 0.001).

(B) The data in A are presented as the percentages of control. (*and** indicates significant differences between the hGST A2-transfected and control vector-transfected cells under the same treatment condition with $p < 0.05$ and 0.01).

參考文獻

1. 李權益,高樹嫻,分子醫學,合記圖書出版社 1997.
2. 藤原利男,癌症預防與治療,輕舟出版社 1998.
3. van Iersel ML, Verhagen H, van Bladeren PJ. The role of biotransformation in dietary (anti)carcinogenesis. *Mutat Res.* 443(1-2):259-70. 1999.
4. Guengerich FP. Human cytochrome P-450 enzymes. *Life Sci.* 50(20):1471-8. 1992.
5. Blaauboer BM. Niesink JM. Vries J. Hollinger MA. Biotransformation: detoxication and bioactivation. In Toxicology CRC press London 41-5. 1996.
6. Commandeur JN. Stijntjes GJ. Vermeulen NP. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacoll Rev.* 47(2):271-330. 1995.
7. Prochaska HJ. Talalay P. Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. *Cancer Res.* 48(17):4776-82. 1988.
8. Steinkellner H, Rabot S, Freywald C, Nobis E, Scharf G, Chabicovsky M, Knasmuller S, Kassi F. Effects of cruciferous vegetables and their

- constituents on drug metabolizing enzymes involved in the bioactivation of DNA-reactive dietary carcinogens. *Mutat Res.* 480-481:285-97. 2001.
9. 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. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 30(6):445-600.1995.
 10. Kensler TW. Chemoprevention by inducers of carcinogen detoxication enzymes. *Environ Health Perspect.* 105:965-70. 1997.
 11. Mannervik B. Danielson UH. Glutathione transferases--structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem.* 23(3):283-337. 1988.
 12. Booth J. Boyland E. Sims P. An enzyme from rat liver catalyzing conjugation with glutathione. *Biochem J.* 79, 516-24. 1961.
 13. Combes B. Stakelum GS. A liver enzyme that conjugates sulfobromophthalein sodium with glutathione. *J Clin Invest.* 40, 981-8. 1961.
 14. Sundberg AG. Nilsson R. Appelkvist EL. Dallner G. Immunohistochemical localization of alpha and pi class glutathione transferases in normal human tissues. *Pharmacol Toxicol.* 72(4-5):321-31. 1993.

15. Dusinska M, Ficek A, Horska A, Raslova K, Petrovska H, Vallova B, Drlickova M, Wood SG, Stupakova A, Gasparovic J, Bobek P, Nagyova A, Kovacikova Z, Blazicek P, Liegebel U, Collins AR. Glutathione S-transferase polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage and antioxidant protection in humans. *Mutat Res.* 482(1-2):47-55. 2001.
16. Stine KE, Brown TM. Biotransformation principles of toxicology. CRC Press. U. S. A. 1996.
17. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat. Res.* 482(1-2):21-6. 2001.
18. 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. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 30(6):445-600. 1995.
19. Strange RC, Fryer AA. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. *IARC Sci Publ.* 148:231-49. 1999.
20. Salinas AE, Wong MG. Glutathione S-transferases--a review. *Curr Med*

- Chem.* 6(4):279-309. 1999.
21. Vuilleumier S. Bacterial glutathione S-transferases: what are they good for? *J Bacteriol.* 179(5):1431-41. 1997.
22. Garcia-Saez I. Parraga A. Phillips MF. Mantle TJ. Coll M. Molecular structure at 1.8 Å of mouse liver class pi glutathione S-transferase complexed with S-(p-nitrobenzyl)glutathione and other inhibitors. *J Mol Biol.* 237(3):298-314. 1994.
23. Armstrong RN. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Resin Toxicol.* 10(1):2-18. 1997.
24. Millar DS. Paul CL. Molloy PL. Clark SJ. A distinct sequence (ATAAA)_n separates methylated and unmethylated domains at the 5'-end of the GSTP1 CpG island. *J Biol Chem.* 275(32):24893-9. 2000.
25. Tew KD. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res.* 54(16):4313-20. 1994.
26. Lin X. Tascilar M. Lee WH. Vles WJ. Lee BH. Veeraswamy R. Asgari K. Freije D. van Rees B. Gage WR. Bova GS. Isaacs WB. Brooks JD. DeWeese TL. De Marzo AM. Nelson WG. GSTP1 CpG island hypermethylation is responsible for the absence of GSTP1 expression in human prostate cancer cells. *Am J Pathol.* 159(5):1815-26. 2001.

27. Lee WH. Morton RA. Epstein JI. Brooks JD. Campbell PA. Bova GS. Hsieh WS. Isaacs WB. Nelson WG. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(24):11733-7. 1994.
28. Lee WH. Isaacs WB. Bova GS. Nelson WG. CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic carcinoma cells detected using the polymerase chain reaction: a new prostate cancer biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 6(6):443-50. 1997.
29. Esteller M, Corn PG, Urena JM, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res*. 58(20):4515-8. 1998.
30. Yin Z. Ivanov VN. Habelhah H. Tew K. Ronai Z. Glutathione S-transferase p elicits protection against H₂O₂-induced cell death via coordinated regulation of stress kinases. *Cancer Res*. 60(15):4053-7. 2000.
31. Adler V. Yin Z. Fuchs SY. Benezra M. Rosario L. Tew KD. Pincus MR. Sardana M. Henderson CJ. Wolf CR. Davis RJ. Ronai Z. Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J*. 18(5):1321-34. 1999.

32. Awasthi S, Srivastava SK, Ahmad F, Ahmad H, Ansari GA. Interactions of glutathione S-transferase-pi with ethacrynic acid and its glutathione conjugate. *Biochim Biophys Acta*. 1164(2):173-8 1993.
33. 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. *Biochem Biophys Res Commun*. 18;235(2):424-8. 1997
34. Ramachandran C. Yuan ZK. Huang XL. Krishan A. Doxorubicin resistance in human melanoma cells: MDR-1 and glutathione S-transferase pi gene expression. *Biochem Pharmacol*. 45(3):743-51. 1993.
35. 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. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 30(6):445-600. 1995.
36. Singhal SS. Saxena M. Ahmad H. Awasthi S. Haque AK. Awasthi YC.

- Glutathione S-transferases of human lung: characterization and evaluation of the protective role of the alpha-class isozymes against lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 299(2):232-41. 1992.
37. Krengel U. Schroter KH. Hoier H. Arkema A. Kalk KH. Zimniak P. Dijkstra BW. Crystal structure of a murine alpha-class glutathione S-transferase involved in cellular defense against oxidative stress. *FEBS Letters.* 422(3):285-90. 1998.
38. Singh SP. Janecki AJ. Srivastava SK. Awasthi S. Awasthi YC. Xia SJ. Zimniak P. Membrane association of glutathione S-transferase mGSTA4-4, an enzyme that metabolizes lipid peroxidation products. *J Biol Chem.* 277(6):4232-9. 2002.
39. Zhao T. Singhal SS. Piper JT. Cheng J. Pandya U. Clark-Wronski J. Awasthi S. Awasthi YC. The role of human glutathione S-transferases hGSTA1-1 and hGSTA2-2 in protection against oxidative stress. *Arch Biochem Biophys.* 367(2):216-24. 1999.
40. Yang Y. Cheng JZ. Singhal SS. Saini M. Pandya U. Awasthi S. Awasthi YC. Role of glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation. Overexpression of hGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and

- caspase 3 activation. *J Biol Chem.* 276(22):19220-30. 2001.
41. Fabienne Desmots, Mary Rissel, David Gilot, Dominique Lagadic-Gossmann, Fabrice Morel, Christiane Guguen-Guillouzo, André Guillouzo, and Pascal Loyer. Pro-inflammatory Cytokines Tumor Necrosis Factor α and Interleukin-6 and Survival Factor Epidermal Growth Factor Positively Regulate the Murine GSTA4 Enzyme in Hepatocytes. *J Biol. Chem.*, 277, 17892-17900, 2002
42. 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. *J Biol Chem.* 266(18):11632-9. 1991.
43. 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. *J Biol Chem.* 269(18):13656- 62. 1994.
44. 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). *Mol Med.* 1(7):827-37. 1995.
45. Lear JT, Heagerty AH, Smith A, Bowers B, Payne CR, Smith CA, Jones PW, Gilford J, Yengi L, Aldersea J, Fryer AA, Strange RC. Multiple cutaneous basal cell carcinomas: glutathione S-transferase (GSTM1, GSTT1) and cytochrome P450 (CYP2D6, CYP1A1) polymorphisms influence tumour numbers and accrual. *Carcinogenesis.* 17(9):1891-6. 1996.
46. Cho SG, Lee YH, Park HS, Ryoo K, Kang KW, Park J, Eom SJ, Kim MJ, Chang TS, Choi SY, Shim J, Kim Y, Dong MS, Lee MJ, Kim SG, Ichijo H, Choi EJ. Cho SG, Lee YH, Park HS, Ryoo K, Kang KW, Park J, Eom SJ, Kim MJ, Chang TS, Choi SY, Shim J, Kim Y, Dong MS, Lee MJ, Kim SG, Ichijo H, Choi EJ. Glutathione S-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biol Chem.* 20;276(16):12749-55. 2001
47. Morel F, Langouet S, Maheo K, Guillouzo A. The use of primary hepatocyte cultures for the evaluation of chemoprotective agents. *Cell Biol Toxicol.* 13(4-5):323-9. 1997.
48. 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.
49. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89(2):668-72. 1992.
50. Hayes JD, Judah DJ, McLellan LI, Neal GE. Contribution of the glutathione S-transferases to the mechanisms of resistance to aflatoxin B1. *Pharmacol Ther*. 50(3):443-72. 1991.
51. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res*. 48 (3): 589-601. 1988.
52. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*. 249(22):7130-9. 1974.
53. Eaton DL, Gallagher EP. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology*. 34: 135-72. 1994.

54. Buetler TM, Slone D, Eaton DL. Comparison of the aflatoxin B1-8,9-epoxide conjugating activities of two bacterially expressed alpha class glutathione S-transferase isozymes from mouse and rat. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 188(2): 597-603. 1992.
55. He NG, Singhal SS, Chaubey M, Awasthi S, Zimniak P, Partridge CA, Awasthi YC. Purification and characterization of a 4-hydroxynonenal metabolizing glutathione S-transferase isozyme from bovine pulmonary microvessel endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1291(3): 182-8. 1996.
56. Gilot D, Loyer P, Corlu A, Glaise D, Lagadic-Gossmann D, Atfi A, Morel F, Ichijo H, Guguen-Guillouzo C. Liver protection from apoptosis requires both blockage of initiator caspase activities and inhibition of ASK1/JNK pathway via glutathione S-transferase regulation. *J Biol Chem*. 277(51): 49220-9. 2002.
57. Bhagwat, S. V., Vijayasathy, C., Raza, H., Mullick, J., and Avadhani, N. G. Preferential effects of nicotine and 4-(N-methyl-N-nitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone on mitochondrial glutathione S-transferase A4-4 induction and increased oxidative stress in the rat brain. *Biochem*.

- Pharmacol.* 56: 831-839. 1998.
58. Gardner, J. L., and Gallagher, E. P. Development of a peptide antibody specific to human glutathione S-transferase alpha 4-4 (hGSTA4-4) reveals preferential localization in human liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 390: 19-27. 2001.
59. Singh SP. Janecki AJ. Srivastava SK. Awasthi S. Awasthi YC. Xia SJ. Zimniak P. Membrane association of glutathione S-transferase mGSTA4-4, an enzyme that metabolizes lipid peroxidation products. *J Biol Chem.* 277(6): 4232-9. 2002.
60. 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.