

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

GST isoforms 於正常肝細胞及肝癌細胞中生理功能之探討
及其對防抗癌天然物開發之應用

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2320-B-040-058-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：中山醫學大學生化暨生物科技研究所

計畫主持人：周芬碧

計畫參與人員：楊舜傑,林惠美,彭佩鈴

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

GST isoforms 於正常肝細胞及肝癌細胞中生理功能之探討及其對防抗癌天然物

開發之應用

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 93-2320-B-040-058-

執行期間：2004年08月01日至2005年07月31日

計畫主持人：周芬碧

共同主持人：

計畫參與人員：楊舜傑、林惠美、彭佩鈴

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生化暨生物科技研究所

中華民國 94年 10月 28日

中文摘要

Glutathione S-transferases (GSTs) 是一類具多功能的蛋白質，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。雖然在正常肝細胞內扮演解毒及保護細胞的角色，可是近年來對於肝癌的研究發現肝臟解毒酵素 GSTs 的異常表現可能與肝癌的形成有密切的關係，若是某些族的 GSTs 發生異常改變，則可能造成癌症或是抗藥性的形成。然而至今對於不同族之 GSTs 的差異表現與不同因素所導致的肝癌或是抗藥性的發生之間的關聯仍然不是很清楚。

因此本實驗利用 GST 短暫殖入系統探討 GSTs 對人類肝癌細胞 Hep G2、Hep 3B 及 Chang liver 細胞生長、型態及其對致癌物反應之影響。結果顯示，將 rGSTYb1 殖入 Chang liver 細胞後，再以 AFB1 處理細胞，細胞的存活率比轉殖入 pEGFP 載體之細胞來的高，且肝細胞毒性指標 GOT 及 GPT 的活性較低，而 GSTA1 及 GSTPi 的活性則沒有顯著差異，表示 rGSTYb1 的表現可保護 Chang liver 細胞並減緩 AFB1 對 Chang liver 細胞的傷害。而將 rGSTYb1 殖入 Hep G2 細胞、人類 GST A2 轉殖入 Chang liver 細胞及 Hep 3B 細胞後，再以 AFB1 處理細胞，卻得到相反的結果；細胞的存活率比轉殖入 pEGFP 載體之細胞低，且肝細胞毒性指標 GOT 及 GPT 的活性較高，表示 rGSTYb1、hGST A2 的表現並未減緩 AFB1 對肝癌細胞 Hep G2、Hep 3B 及 Chang liver 的傷害。rGSTYb1 選擇性的保護 Chang liver 細胞，並加速肝癌細胞 Hep G2 的死亡；而 hGST A2 則會加速 Chang liver 及 Hep 3B cell 死亡，研究結果反應不同之 GST isoforms 在不同的細胞扮演了不同的角色及生理功能。

關鍵字：麩胱甘肽硫轉移酶，短暫轉殖，肝癌細胞，生理功能

英文摘要

Glutathione S-transferase (GSTs) are a family of enzymes with several functions. Although they play a role in detoxification and protection in normal liver cell, some papers reported that over-expression or down-regulation of certain GSTs might be one of the causes that lead to the formation of hepatoma or the development of drug resistance. However, it is still not clear what the relationship is between the differential expression of GST isoforms and the causes and drug resistance of hepatoma.

In this study, the effects of rat GST Yb1, human GST Ya2 at the growth, the morphology change and the response to carcinogens of hepatoma cells (Hep G2, Hep 3B) and hepatocytes (Chang liver) were investigated by the transient transfection system. Chang liver cells were transfected with rGSTYb1 plasmid, and then treated with AFB1. The results showed that the percentage of survival cells was higher, and the activities of GOT and GPT were lower in these cells than the vector control. There was no difference in the activities of GST alpha and GST pi between the GSTYb1-transfected cells and the vector control. The data indicated that the expression of rGSTYb1 was able to protect normal hepatocytes (Chang liver cells) against the damage of AFB1. When Hep G2 and Hep 3B cells were transfected with rGSTYb1 and hGSTYa2, Chang liver cells were transfected with hGSTYa2, and then treated with AFB1, the results were opposite to that of Chang liver cells. The percentage of survival cells were lower and the activities of GOT and GPT were higher in the rGSTYb1, hGSTYa2-transfected and AFB1-treated cells than the vector control. The activities of GST alpha and GST pi were not affected by the expression of rGSTYb1 and hGSTYa2. The data indicated that the expression of rGSTYb1 and hGSTYa2 was not able to protect hepatoma cells against the damage of AFB1.

In conclusion, the expression of rGSTYb1 and hGSTYa2 showed differential effects in different cell lines by protecting normal hepatocytes and, on the other hand, promoting the cells death of cancerous liver cells. Therefore, in addition to its important role in the protection function of normal liver, rGSTYb1 and hGSTYa2 might be also involved in some pathway that leads to the death of cancer cells.

Key words: GST isoforms, transition transfection, hepatoma cells, physical function.

前言

肝癌的發生與解毒酵素系統之關聯：

肝病主要分為病毒性肝癌與非病毒性肝癌或稱為化學性肝癌兩大類。化學物質的入侵為致癌的主因，化學藥劑能在人體中引發癌症的證據已累積兩個世紀之久。若能將化學物質有效的代謝，便可降低癌症的發生率。這些外來物質、化學物質大多為脂溶性，必須藉由特定之代謝作用提昇其水溶性，以利於排出體外。此一轉換系統即為生物體解毒酵素系統或生物轉換酵素系統 (Biotransformation enzyme system) (1)。此系統之化學性代謝包含了 Phase I 及 Phase II 兩個階段 (2)。

Glutathione S-transferase (GST)之簡介：

麩胱甘肽硫轉移酶(Glutathione-S-transferase, GST), (EC 2.5.1.18)是生物轉換酵素系統 Phase II 中重要的酵素之一(3, 4)，屬於複合酵素家族(multi-enzyme family)，於西元 1961 年，自老鼠肝中被發現 (5, 6)，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 (7)。已知生物體內有兩大類的 Supergene family 所合成的蛋白質具有 GST 活性；第一，至少有十六種基因所合成的 GST 蛋白表現於細胞質 (cytosol)，第二，至少六種基因所合成的 GST 蛋白表現於細胞膜 (membrane)，而少部分則存在於粒線體 (mitochondrial) (8, 9)。

GST 之催化功能：

GST 是一種具多功能的蛋白質，在解毒過程中它會催化 glutathione 和多種的化學物（包括各種外來化學物質及一些毒性致癌物或是 Phase I 酵素的代謝產物）的活化型結合，這些化合物可能是內生性也可能來自外在，進而進入 mercapturic acid 路徑加以代謝 (8)，最後代謝成硫醚尿酸 (mercapturic acid)，可經由腎臟排出體外；除腎臟途徑外，GSH-Xenobiotics 也可直接經由膽汁系統注入十二指腸中排出體外 (10, 11, 12)，以減少對組織和細胞的傷害。不同族的 GST 各具有不同的催化活性，對不同的致癌物也各有專一性。

GST 參與的訊息傳遞作用：

近幾年來研究發現，GST 除了藉由生物轉換系統代謝有毒物質以保護細胞外，GST 也參與了細胞內訊息傳遞之作用，而決定細胞之命運。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

(25)； GSTA1, 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 (13)； hGSTA2 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；GSTP1 可與 JNK 結合，使 JNK 無法與下游之標的基因 c-jun 結合，也因此抑制 apoptosis signal。

在 2002 年有學者指出 mouse 肝細胞之粒腺體內也有 GST 的存在，有 GST A1-1，GST A4-4，GST M1-1，粒腺體內的 GST 可以催化 GSH 有效代謝 ROS，以減緩 ROS 對細胞所造成的毒害 (14)。

GST 在抗癌過程中扮演的角色：

近年來許多學者致力於 GST 與癌症相關性之研究，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。不同族的 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 Alpha 族 GST 為主，Mu 族 GST 其次，但偵測不到 Pi 族 GST (15)。在前腫瘤結節中，Alpha、Pi 及 Mu 族 GST 都會過度表現。一旦肝細胞轉化成腫瘤細胞，尤其是化學的致癌作用，GST Pi 會大量表現 (16)。

因此，臨床上，GST 活性也被當作腫瘤發生或是癌症治療過程中癌細胞對化學治療試劑產生抗藥性的指標 (16)。雖然流行病學報告及臨床證據均支持 GST 基因多態性與癌症發生的敏感性有關，但詳細的分子機轉尚不明確，甚至仍存在有一些相反的例證，因此仍然必須進一步研究並深入探討，以釐清 GST isoform 之生理功能。

研究目的

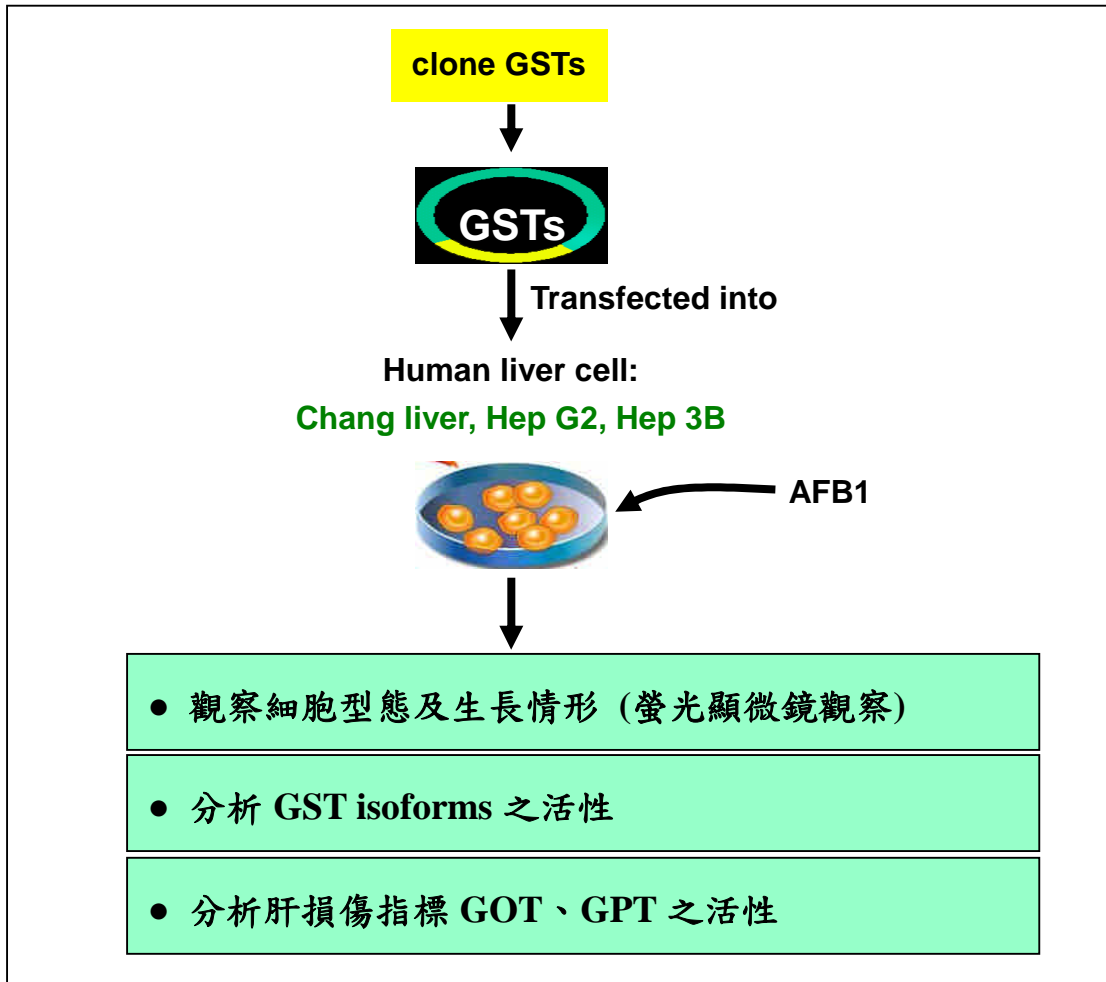
近年來科學家的研究指出，肝臟解毒酵素 Glutathione S-transferases (GST)的異常表現可能與肝癌的形成有密不可分的關係。在前腫瘤結節中，alpha、mu 及 pi 族的 GST 都會過度的表現，一旦肝細胞變成腫瘤細胞（尤其是化學性肝癌），GST Pi 則會明顯且大量的表現；於抗藥性方面的研究發現 GST A1 會代謝一些抗癌藥物，因而抑制了初期化療的效果；此外，當肝細胞受到致癌化合物的刺激時，GST Mu 的表現會增加，且 GST Mu 基因有缺陷或不表達的情況下，癌症的罹患率明顯的增加。近年來有許多研究報告指出 GST 的基因多態性與癌症發生的敏感性有關。影響改變不同 GST isoforms 的表現，可能是肝癌形成過程中致病機制之一。

本研究室以往即朝著天然防癌(chemoprevention)及保肝的方向發展，探討抗、防癌藥物的分子作用機制。近期的研究亦發現某些具有抗氧化功能的抑癌物質，對不同族 GST 表現的影響具有專一性，如綠茶的多酚成份之一 EGCG (epigallocatechin gallate)會專一的誘導肝臟中 GSTMu 的表現上升，而茶多酚的另一成份 catechin 則無此效果。而檳榔的添加物老葉的萃取物則可專一的抑制 GSTA1 的表現，不影響 GSTMu 和 GSTPi 的表現。過去本實驗室已建立了 rGST Mu (Yb1) 之轉殖系統，並且已證實經短暫轉殖 GFP-rGST Yb1 的大白鼠初代肝細胞及人類正常肝細胞 (chang liver)抵抗 Aflatoxin B₁ 毒害的能力有提昇的現象，因此推論 GST Mu 在保護正常肝細胞以避免受到致癌物質攻擊的作用及過程中扮演了相當關鍵的角色，但其詳細分子機轉仍不清楚。

本實驗計劃建立完善的 GST isoforms 之短暫殖入系統，並利用其探討不同的 human 及 rat GST isoforms 對正常肝細胞或肝癌細胞之生長情形、型態及細胞對致癌物反應的影響，並深入探討詳細之分子機制，以釐清不同族的 GST 在肝臟中之生理功能及癌化過程中其所扮演的角色。

研究方法

GST isoforms 之 cloning 並探討其對正常肝細胞及肝癌細胞生長、存活率之影響及對致癌物之反應



結果與討論

一、rGST Mu (Yb1)之轉殖對人類肝癌細胞 Hep G2 及人類肝細胞 Chang liver 生長，型態及對致癌物反應之影響：

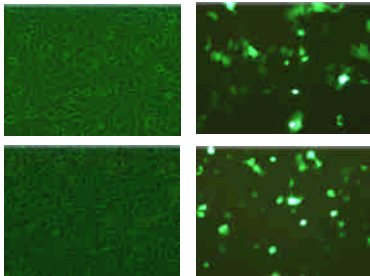
本計畫將 pEGFP 載體及 GFP-rGST Yb1 轉殖入 Hep G2 及 Chang liver 細胞中，轉殖效率於轉殖後 48 小時達到最高；Hep G2: pEGFP 之轉殖效率約 15 %，GFP-rGST Yb1 之轉殖效率約 10 %。Chang liver: pEGFP 之轉殖效率約 55 %，GFP-rGST Yb1 之轉殖效率約 50 %。於轉殖 48 小時後，兩組細胞均以 0.1 % DMSO (Solvent control), 0.002 mM, 0.01 mM, 0.05 mM AFB1 處理。藥物處理 12 及 24 小時後，以螢光顯微鏡觀察細胞生長情形 (Fig. 1A)。

rGST Yb1 之轉殖對人類肝癌細胞 Hep G2 之影響：

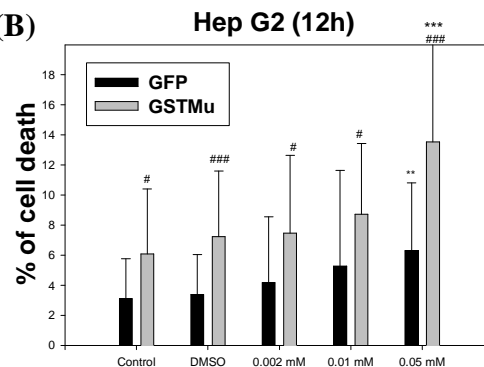
轉殖 pEGFP 載體或 GFP-rGST Yb1 之 Hep G2 細胞，隨著處理 AFB1 濃度的增加，細胞死亡的比例也明顯的增加。無論處理 AFB1 與否，轉殖 GFP-rGST Yb1 之細胞死亡的比例均比轉殖 pEGFP 載體之細胞來的高 (Fig. 1B)。於藥物處理 24 小時後再次進行計數，得到相同的結果 (Fig. 1C)。將 pEGFP 載體及 GFP-rGSTYb1 轉殖入 Hep G2 細胞之後，在不同濃度之 AFB1 刺激之下，Hep G2 細胞中 GST Mu 的活性都有增加的情形，(Fig. 1D)。過去曾有學者證實，一旦肝細胞受到致癌化合物的刺激，GST Mu 的表現會增加。然而，無論是否處理 AFB1，轉殖 GFP-rGST Yb1 之細胞中 GST Mu 的活性都比轉殖入 pEGFP 載體之細胞來的高，表示送入細胞中的 rGST Yb1 確實有表達。

Figure 1

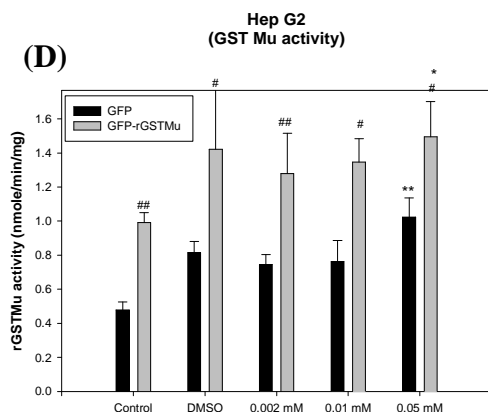
(A)



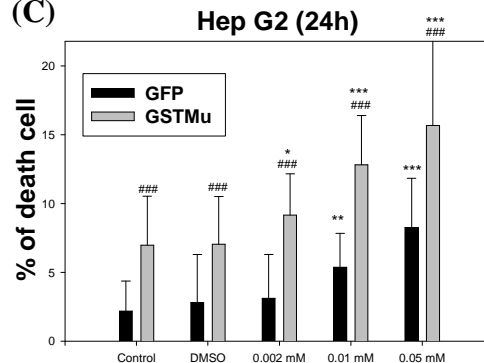
(B)



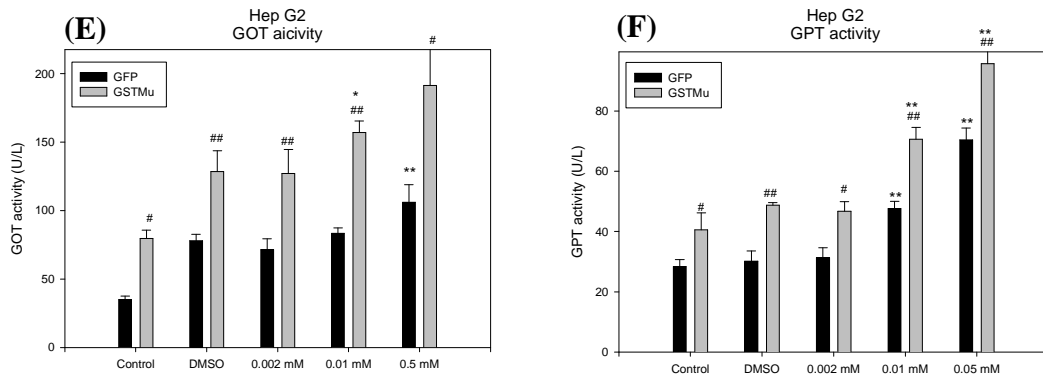
(D)



(C)



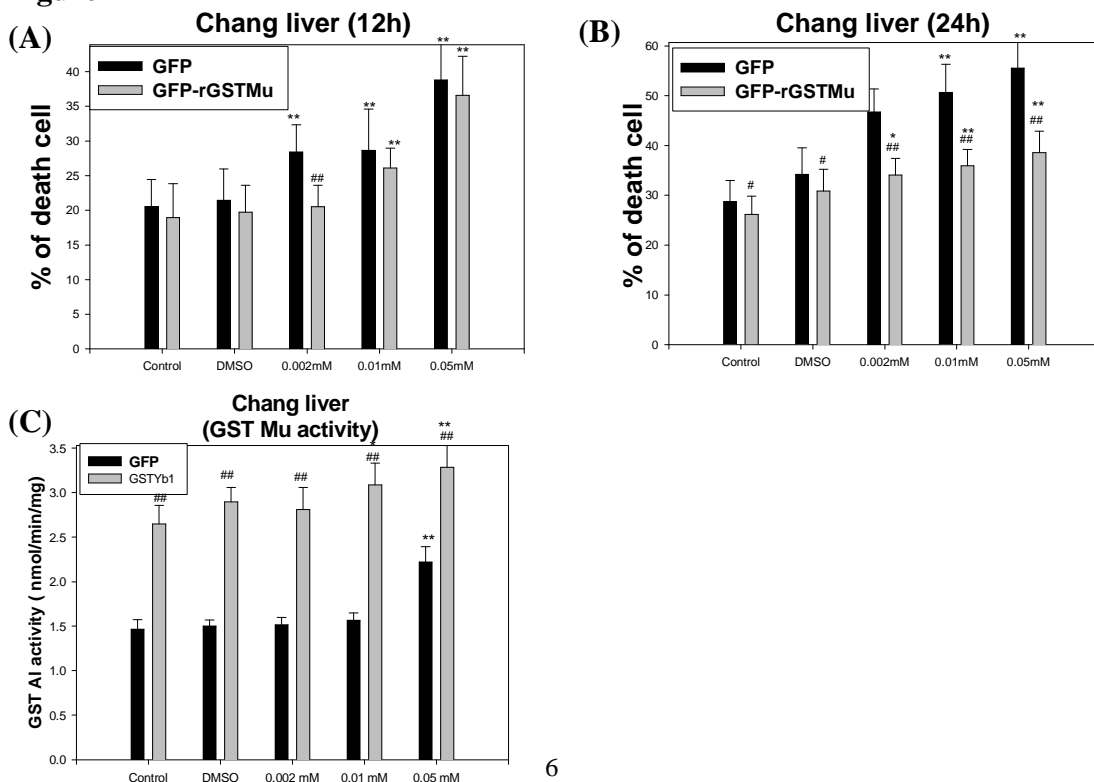
無論是否處理藥物，轉殖 GFP-rGST Yb1 之細胞中 GOT 及 GPT 的活性都比控制組 (轉殖入 pEGFP 載體) 細胞來的高。與未處理任何藥物的細胞比較， AFB1 刺激之下，兩組細胞中 GOT、GPT 活性都有顯著增加的現象(Fig. E,F)。表示 AFB1 確實可誘發肝細胞毒害，然而，GFP-rGST Yb1 轉殖入 Hep G2 後，rGST Yb1 並未保護肝癌細胞 Hep G2 或提昇其抵抗 AFB1 之能力。

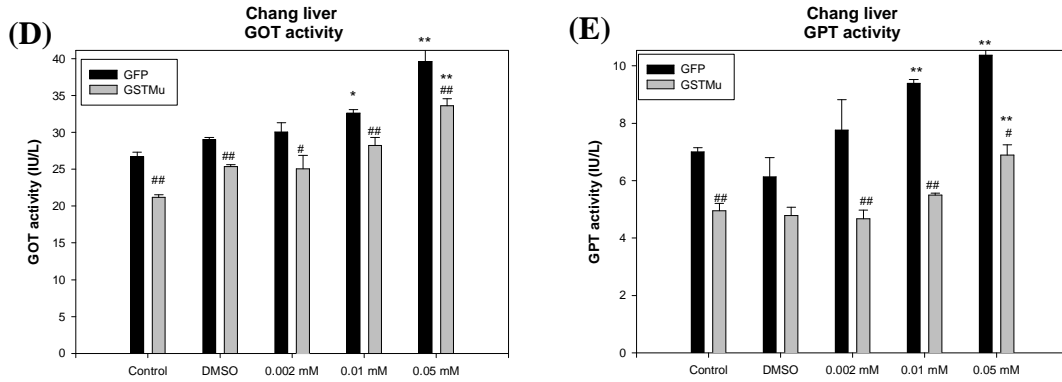


rGST Yb1 之轉殖對人類肝細胞 Chang liver 之影響：

轉殖 pEGFP 載體或 GFP-rGST Yb1 之 Chang liver 細胞，隨著處理 AFB1 濃度的增加，細胞死亡的比例也明顯的增加。但與 Hep G2 細胞不同的是，無論處理 AFB1 與否，轉殖 GFP-rGST Yb1 之細胞死亡的比例均比轉殖 pEGFP 載體之細胞低 (Fig. 2A)。於處理 AFB1 24 小時後再次進行計數，結果顯示，無論低濃度或高濃度 AFB1 刺激之下，轉殖 GFP-rGST Yb1 之細胞死亡的比例均比轉殖 pEGFP 載體之細胞來的低，並具有顯著差異 (Fig. 2B)。無論是否處理 AFB1，轉殖 GFP-rGST Yb1 之細胞中 GST Mu 的活性都比轉殖入 pEGFP 載體之細胞來的高，表示送入 Chang liver 細胞中的 rGST Yb1 確實有表達 (Fig. 2C)。

Figure 2





無論是否轉殖 rGST Yb1，與處理 0.1 % DMSO (Solvent control)的細胞比較，在藥物刺激之下，Chang liver 細胞中 GOT、GPT 的活性都有增加的現象，並且呈現「Dose-dependent」的趨勢。然而，無論是否處理藥物，轉殖 GFP-rGST Yb1 之細胞中 GOT 的活性都比控制組 (轉殖入 pEGFP 載體)細胞來的低，表示 rGST Yb1 可減緩 AFB1 對 Chang liver 所誘發之肝毒害作用 (Fig. 2D,E)。

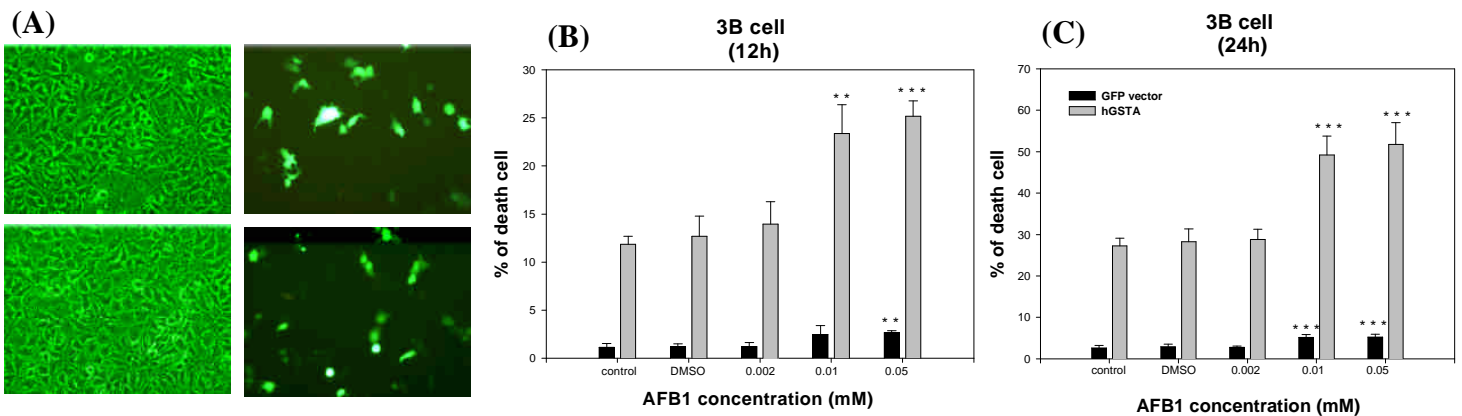
二、hGSTA2 之轉殖對人類肝癌細胞 Hep 3B 及人類肝細胞 Chang liver 生長，型態及對致癌物反應之影響：

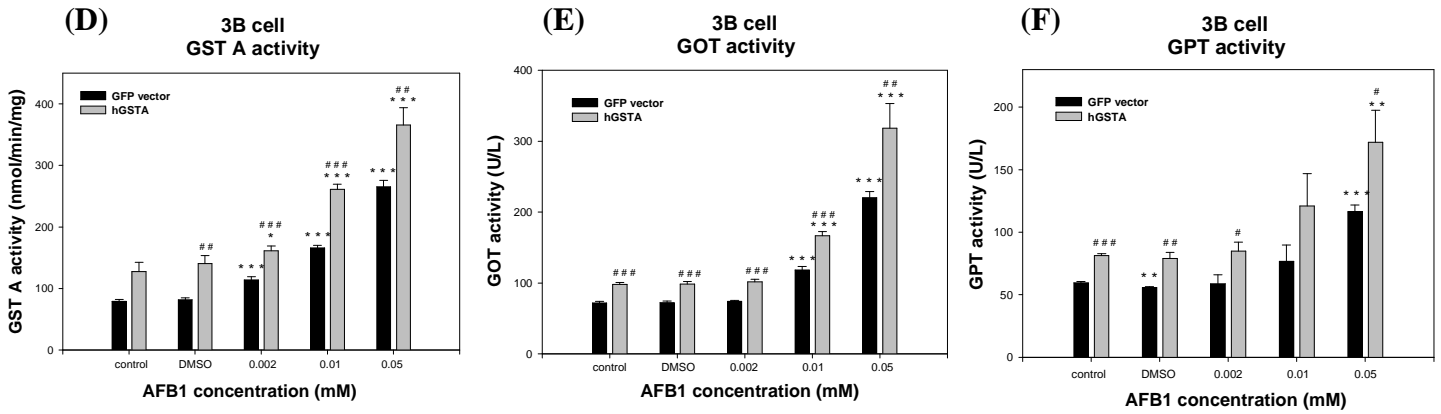
於轉殖 pEGFP 載體或 GFP-hGST A2 48 小時後，兩組細胞均以 AFB1 處理，於藥物處理 12 及 24 小時後，計數所有具綠色螢光之細胞中，死亡的細胞所佔的百分比。

hGSTA2 之轉殖對人類肝癌細胞 Hep 3B 之影響：

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. 3A-C)。轉殖 GFP-hGST A2 之 3B 細胞，發現無論是否處理藥物，轉殖 GFP-hGST A2 之細胞中 GSTA 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 hGSTA2 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 GSTA 的活性都有增加的情形，並且呈現 dose-depend 的現象 (Fig. D)。

Figure 3



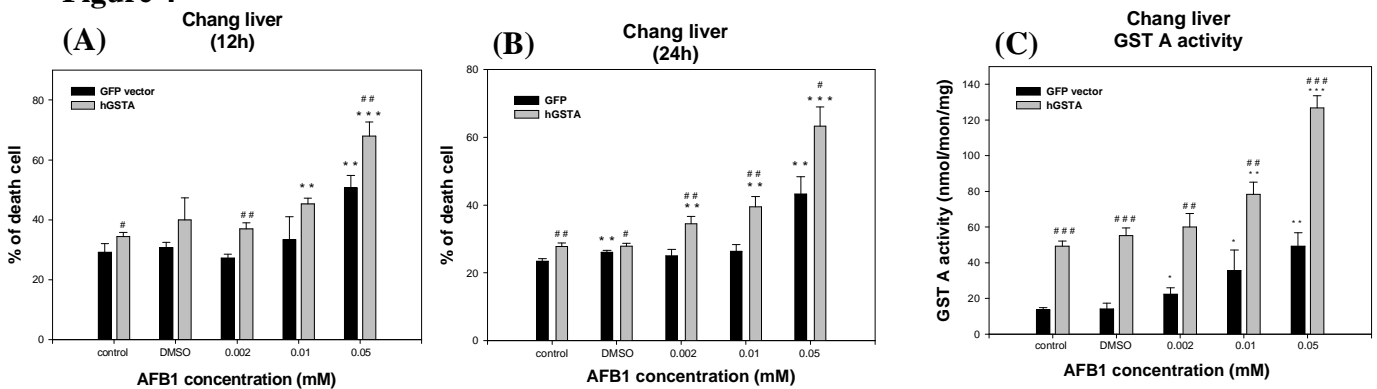


無論是否處理藥物，轉殖 GFP-hGST A2 之細胞中，GOT、GPT 的活性皆比控制組（轉殖入 pEGFP 載體）細胞來的高，且皆具有顯著差異；與未處理任何藥物的細胞相比較，在 0.01 mM 及 0.05 mM AFB1 刺激之下，兩組細胞其 GOT 活性都有顯著增加的現象。表示 AFB1 確實可誘發肝細胞毒害，此外，GFP-hGST A2 轉殖入 Hep 3B 細胞後，未能提昇人類肝癌細胞 Hep 3B 抵抗 AFB1 之能力 (Fig.3 E,F)。

hGST A2 之轉殖對人類肝細胞 Chang liver 之影響：

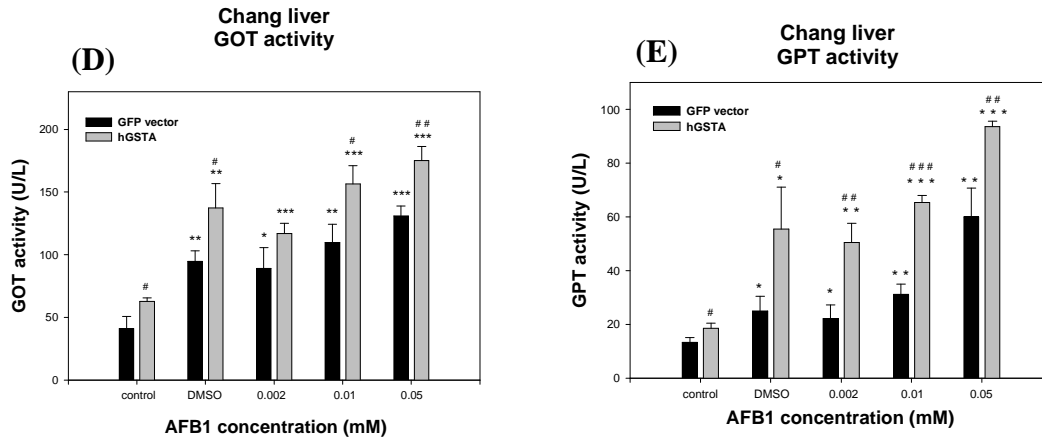
轉殖 GFP-hGST A2 12 小時之 Chang liver 細胞發現，無論處理藥物與否，轉殖 GFP-hGST A2 之細胞死亡的比例均比轉殖 pEGFP 載體之細胞高，但其差異並沒有 Hep 3B 細胞來的明顯。於藥物處理 24 小時後再次進行計數，得到相同的結果 (Fig. 4AB)。證明 hGST A2 並不具有保護細胞對抗 AFB1 的能力。無論是否處理藥物，轉殖 GFP-hGST A2 之細胞中，GST A 的活性都比控制組（轉殖入 pEGFP 載體）細胞來的高，且皆有顯著差異，表示送入細胞中的 hGST A2 確實有表達。此外，與未處理任何藥物的細胞比較，在 AFB1 藥物刺激之下，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 (Fig. 4C)。

Figure 4



無論是否處理藥物，轉殖 GFP-hGST A2 之細胞中，GOT、GPT 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。



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。

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。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。

Reference :

1. Wormhoude, L. W., Commandeur, J. N. M., Nico, P. E. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathion-S-transferase, and epoxide hydrolase enzyme: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Crit. Rev. Toxicol* 29:59-124, 1999.
2. Blaauboer, B. M., Niesink, J. M., Vries, J., Hollinger, M. A. Biotransformation: detoxication and bioactivation. In *Toxicology CRC press London* 41-45, 1996.
3. Cabelguenne, A., Lorient, M. A., Stucker, I., Blons, H., Koum-Besson, E., Brasnu, D., Beaune, P., Laccourreye, O., Laurent-Puig, P., and Waziers, I. D. Glutathione-associated enzymes in head and neck squamous cell carcinoma and response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy. *Int. J. Cancer* 93: 725-730.
4. Dusinska, M., Ficek, A., Horska, A., Raslova, K., Petrovska, H., Vallova, B., Drlickova, M., Wood, S. G., Stupakova, A., Gasparovic, J., Bobek, P., Nagyova, A., Kovacikova, Z., Blazicek, P., Liegebel, U., Collin, A. R. Glutathione S-transferase polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage and antioxidant protection in humans. *Mutation Res.* 482: 47-55, 2001.
5. Booth J. Boyland E. Sims P. An enzyme from rat liver catalyzing conjugation with glutathione. *Biochem J.* 79: 516-24, 1961.
6. Combes B. Stakelum GS. A liver enzyme that conjugates sulfobromophthalein sodium with glutathione. *J Clin Invest.* 40: 981-8, 1961.
7. Sundberg AG. Nilsson R. Appelkvist EL. Dallner G. Immunohistochemical localization of alpha and pi class glutathione transferases in normal human tissues. *Pharmacol Toxicol.* 72:321-31, 1993.
8. Rahman, I., Antonicelli, F. and MacNee, W. Molecular mechanism of the regulation of glutathione synthesis by tumor necrosis factor- α and dexamethasone in human alveolar epithelial cells. *J Biol. Chem.* 274:5088-5096, 1999.
9. Strang, R. C., Spiteri, M. A., Ramachandran, S., Fryer, A. A. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutation Res.* 482: 21-26, 2001.
10. 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: 445-600, 1995.
11. Lu, S. C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: Current concepts and controversies. *FASEB J.* 13: 1169-1183, 1999.

12. Josephy, P. D. *Molecular toxicology*. Oxford, New York. 1997. Jousse, C., Bruhat, A., Ferrara, M. and Fafournoux, P. Evidence for multiple signalling pathways in the regulation of gene expression in human cell lines. *J. Nutri.* 130: 1555-1560, 2000.
13. Stine, K. E. and Brown, T.M. *Biotransfor principles of toxicology*. CRC Press. U. S. A., 1996.
14. Cho, S. G., Lee, Y. H., Park, H. S., Ryoo, K., Kang, K. W., Park, J., Eom, S. J., Kim, M. J., Chang, T. S., Choi, S. Y., Shim, J., Kim, Y., Dong, M. S., Lee, M. J., Kim, S. G., Ichijo, H., and Choi, E. J.. Glutathione S-transferase Mu modulates the stress-activated signal by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1. *J. Biol. Chem.* 276: 12749-12755, 2001.
15. Gliot, D., Loyer, P., Corlu, A., Glaise, D., Lagadic-Gossmann, D., Atfi, A., Morel, F., Ichijo, H., and 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: 49220-49229, 2002.
16. Raza, H., Robin, M-A., Fang, J. K., and Avadhani, N. G.. Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress. *Biochem. J.* 366: 45-55, 2002.
17. 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.
18. 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.

計畫成果自評

本實驗室於計畫執行期間已成功自大白鼠肝臟中選殖出 rat GSTYb1, rat GSTYb2, rat GSTYa, rat GSTPi, 於人類肝細胞選殖出 human GSTYb1, human GSTYb4, human GSTYa2, human GSTPi, 並以確認這些 construct 均可成功的在正常肝細胞及肝癌細胞中表達。分別將 GFP-GSTYa2, GFP-GSTYb1, 轉殖 (transfect) 入人類正常肝細胞 (Chang liver) 及肝癌細胞 (Hep G2, Hep 3B) 中, 在投予或不投予致癌物質處理之下, 利用螢光顯微鏡觀察 GSTA1, GSTMu (Yb1), 之大量表達 (over-expression) 對正常肝細胞及肝癌細胞之生長情形、型態及其對致癌物反應之影響。結果顯示, 不同的 GST isoform 在不同的肝細胞株中, 確實扮演了不同的生理功能。rGSTYb1 及 hGSTYa2 之大量表達分別可以促進肝癌細胞 Hep G2 及 Hep 3B, Chang liver 死亡, 但詳細分子機轉仍待進一步釐清, 確認不同 GST isoforms 於特定癌細胞之生理功能及詳細分子機轉。

未來須延續此實驗, 進一步探討 rGSTYb1 及 hGSTYa2 之大量表達促進肝癌細胞 Hep G2 及 Hep 3B, Chang liver 死亡之詳細分子機轉, 此外, 另須探討所選殖的其它 GST isoforms 於正常肝細胞及肝癌細胞之生理功能。並藉以尋找具有抗氧化、抗癌及防癌效果之天然物質, 提昇細胞之生理活性, 或降低抗癌藥物之抗藥性, 以進一步達到化學預防 (Chemoprevention) 或降低抗藥性以輔助治療癌症之效果。