

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

大蒜組成分生物活性之探討--DNA 晶片之應用

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2320-B-040-030-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：中山醫學大學營養學系

計畫主持人：李宗貴

計畫參與人員：王瑞筠、雷燕萍、黎慶

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 31 日

摘要

生物面對外界環境的改變或挑戰時，為了生存，得有能快速因應變化的機轉，就基因層次而言，因此，勢必伴隨有一群相關基因的轉錄與轉譯作用同步發生增減現象。囿於傳統上，基因轉錄的分析方法，無法同時且快速的偵測大量基因產物，結果詮釋時常有以管窺天之憾。由於 cDNA 晶片具有快速、靈敏、微小化的特性，可大量篩檢基因產物，在生物醫學的應用也因此日益普遍。本實驗因此嘗試開發 cDNA 晶片，並將之應用於探討食品機能成分對基因的調控，並以大蒜有機硫成分作為研究材料。經 E. Coli 培養、cDNA 萃出、PCR 複製，共得 6400 個有效產物，並點置於尼龍膜上。目前完成分析的有 DATS 對人類肝癌細胞株(HepG2)及巨噬細胞株(RAW264.7)的效應，其餘大蒜有機硫成分之作用則由於資料數量太大，仍積極整理中。就 DATS 部份所獲得結果，顯示：在 HepG2 方面，200 μ M DATS 正調控基因（與對照組相較，表現比值 >1.5 以上者）計有 7 個；而負調控基因（與對照組相較，表現比值 <0.5 以下者）計有 18 個。在 RAW264.7 方面，LPS 與 200 μ M DATS 共同處理下，相較單獨 LPS 組，正調控的基因（表現比值 >3.0 ）計有 96 個；而負調控的基因（表現比值 <0.33 ）計有 60 個；按基因功能分類，和細胞基質 / 結構蛋白、訊號傳遞、一般代謝相關基因數量最多，這三類基因數目在 DATS 正或負調控中分別有 11、10、11 與 5、5、5 個，除此外，96 個 DATS 正調控基因中，另有 4 個與蛋白質合成 / 轉譯有關，4 個與轉錄 / 染色質有關。這些結果顯示：DATS 生理作用在基因層次的多樣性，這些基因個別的或整合的作用值得深入探討。

緣由與目的

廣義而言，生物晶片(Biochip)是指利用化學共價結合或物理性吸附原理將活體生物或其組成構成元件(例如單股 DNA 分子)固定在玻璃、耐侖膜(nylon membrane)、矽晶片或其他固態載體上，並結合感光器、擴大器、鑑定儀，再經訊號轉換器和數位處理分析系統所生產應用於生物化學分析之檢驗產品，相較於傳統生物技術檢驗法，往往僅侷限於一個或少數幾個基因表現之研究，生物晶片除了具有快速且同時監看成千上萬種基因表現之優點外，其他特點包括分析時間短、靈敏度高且僅需少量試劑和樣品，此外也具有微小化、省時、省力、成本低，並可大量生產之優點(Khan *et al.*, 1999; Vo-Dinh, 1998)，因此已廣泛應用於生物醫學領域中，如法醫鑑定、新基因之發現、基因突變及多型性之測定、新藥研發、藥物安全性及毒性測定、單一核甘酸多型性(single nucleotide polymorphism, SNP)測定、癌症分類、疾病診斷與治療及臨床醫學診斷等(Jain, 2000)，是一深具發展潛力的檢驗工具(David *et al.*, 1999)。

近年來，資訊科技日新月異，物質生活提昇，隨著生活及飲食型態改變，國人外食人口與日巨增，飲食逐漸西化，癌症、心血管疾病、糖尿病、高血壓等文明病的好發率也日益嚴重，因此，在享受美食之餘，食材所能提供的附加價值漸受消費大眾重視，目前市面上即充斥著許多標榜具有調節生理機能、預防改善疾病的保健食品，然而這些食品品質良莠不齊，除了需有完善的相關法規管理外，其生理效用及作用機制均待學者專

家釐清。生物晶片應用於機能性食品，探討其作用機轉及其作用標的基因，相信在保健食品機能性的鑑定與發展上，提供了一良好的分析檢驗工具。Chen 等人(2001)即利用 cDNA 基因晶片研究發現 isoflavone genistein 可能藉由調節細胞週期或訊息傳遞相關基因的表現來抑制膀胱癌；此外，Narayanan 等人於 2001 年發表的文獻中也以 cDNA 晶片篩選分析 DHA(docosahexaenoic acid)降低結腸癌發生之危險率，是由於 DHA 可調節某些細胞凋亡(apoptosis) 相關基因和轉錄因子的表現，比如 anitapotic Bcl-2 family genes 或 peroxisome proliferators(PPAR- 及 PPAR-)...等，進而促進結腸癌細胞的細胞凋亡。前列腺癌的研究中，3000 點 cDNA 基因晶片分析的結果也發現，1- α ,25-dihydroxyvitamin D3 可調節 24 個代謝酵素和脂肪酸合成酵素相關基因的表現，比如 fatty acid synthase 基因表現即受到抑制，進一步抑制前列腺癌 LNCaP 細胞之增生(Qiao *et al.*, 2003)。

大蒜 (Garlic)，學名 *Allium sativum* L.，具有獨特風味，遠古以來即被視為日常飲食烹調中不可缺的辛香調味品；除此用途外，大蒜也具有多重生理活性，更是藥膳中常見的食療材料。大蒜已知的生理機能性包括：降血脂、血膽固醇(Agarwal, 1996, Berthold *et al.*, 1998)、抗癌與抑制腫瘤生成(Chinthalapally *et al.*, 1995, Haim *et al.*, 2001)、抗發炎 (Verena and Angelika, 2001) 抗氧化(Chen *et al.*, 2003; Sheen *et al.*, 1999, Wu *et al.*, 2001)、免疫調節功能(Kim *et al.*, 2001)、降血壓(Steiner *et al.*, 1996)及預防改善粥狀動脈硬化 (Juline *et al.*, 2001, Nagatoshi and Benjamin, 2001)等。這些多樣的生理活性，事實上，與大蒜擁有的特殊含硫成分有極密切關係，因此大蒜有機硫成分在未來醫療保健的應用上不容輕忽。

Sparnins 等人 (1988) 的研究報告中即指出分離自新鮮大蒜的油溶性有機硫成分—diallyl sulfide (DAS)及 diallyl trisulfide (DATS)可有效抑制 benzo(a)pyrene (BP)誘發 A/J 小鼠的肺癌與胃癌發生，由後熟大蒜(aged garlic)中分離出的水溶性 S-allyl cysteine (SAC) 和 S-allylmercaptocysteine (SAMC)等成分，也證實具有抑制前列腺癌及乳癌發生的效果 (Pinto and Rivlin, 2001)；Haim 等人 (2001) 更進一步證實 SAMC 的抑癌效應可能與其活化 caspase-3-like 活性，增加腫瘤細胞的細胞凋亡(apoptosis)；體外細胞培養模式中，Carrie 等人(1992)也指出 SAC 可抑制人類神經母細胞瘤細胞增生，因而具有化學預防及抗腫瘤之效應。除前述大蒜硫成分外，也有其他大蒜成分，比如，Alliin、ajoene、allyl isothiocyanate 及 diallyl disulfide (DADS)等，也已先後被證實擁有不等程度的抗癌與抑制腫瘤效用。在抑制動脈粥狀硬化上，也有不少實驗證實，Lau 於 2001 年即指出 alliin、N-acetyl-S-allylcysteine (N-Ac-SAC)、SAC 及 SAMC 可抑制 LDL 氧化，因而有利於減少動脈粥狀硬化之發生；減少氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, Ox-LDL)生成，應與大蒜中含硫成分抑制巨噬細胞內誘發型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)活性、抑制過氧化物質(peroxides)產生、預防內皮細胞胞內 glutathione (GSH)消耗、增加過氧化物質清除有關(Ide and Lau, 1999, Lau, 2001)；Ide and Lau (2001)及 Kim 等人 (2001) 更進一步證實後熟大蒜水萃物與 SAC 抑制 iNOS 蛋白表現係透過抑制 H₂O₂ 產生或抑制 TNF- α 活化 nuclear factor- κ B (NF- κ B)所致。這些證據也顯示，大蒜經由調節發炎反應，而表現出其抗動脈粥狀硬化之機能性 (Kim *et al.*, 2001)。

雖不少基因已知是大蒜之標的基因，然而限於傳統方法每次只能針對單一或有限基因進行研究，如此，難免對大蒜及其有機硫化物的整體生理機能無法作全面性探討。為了改善此一缺憾，我們計畫採用 cDNA 基因晶片作為檢驗工具，希望透過可能大蒜標的基因之廣泛性篩選，對大蒜生理活性有較全面瞭解。事實上，2000 年時，Frantz 等人即利用 cDNA 基因晶片分析大蒜水萃出物對 HT-29 腺癌細胞之細胞週期中可能標的基因，結果顯示大蒜水萃出物抑制 HT-29 腺癌細胞生長，的確與其調控細胞週期相關基因有關；但該實驗中，Frantz 等人所使用晶片上的基因數目相當有限，且只限於細胞週期/細胞增殖相關基因。本研究因此利用含 6400 點 cDNA 之生物晶片探索大蒜含硫成分—DAS、DADS 和 DATS 在人類臍帶靜脈內皮細胞株、人類肝癌細胞株(HepG2)與小鼠巨噬細胞株 RAW264.7 中可能之標的基因，期望由此篩選出具有重要生化功能且尚待深入研究之基因，作為後續研究對象，以期能對大蒜多樣化生理調控作用之機轉有更全面性瞭解。

材料與方法

cDNA 基因晶片生產

製作方法簡述如下(Chen *et al.*, 1998)，將載入含有不同 cDNA 序列的 *E. coli* (由中研院白果能教授實驗室取得)自 -80°C 冷凍櫃中取出，分別培養於含 50 μ l LB medium(1% peptone、0.5% yeast extract、1% NaCl 及 60 μ g/ml ampicillin)之 96 孔盤中，於 37°C 震盪培養 12-16 小時，以 loop 分別點取菌液後，於含 ampicillin 之 LB agar plates 表面塗出單一菌落(single colony)，經 37°C 培養 16 小時後，將單一菌落轉殖置含 0.5ml LB medium 中，並再次於 37°C 培養 12-16 小時，取出菌液，抽取質體，所得質體即可進行聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)，增產擴大 cDNA。PCR 設定條件為 94°C 變性(denature) 30 秒、57°C 黏合(annealing) 30 秒、72°C 延長(extending) 1 分 30 秒，共計進行 40 個循環。隨後取 1 μ l PCR 產物利用 1.2% agarose gel 電泳分離，並以 EtBr 呈色，若 cDNA 與預期長度一致，則利用影像定量軟體定量所得 cDNA 濃度，同時估計總產量，每一 cDNA 最少需 10 μ g。將 PCR 所得之 cDNA 轉置於 96 孔盤中，以 95°C 將溶劑揮發，溶於 loading solution 後，即可點置於尼龍膜上。cDNA 點置機(Array 03, Wittech Co., Taipei, Taiwan)將設定每一點 10 ng cDNA，而每一點直徑約 100 μ m，點距約為 15 μ m，每一 cDNA 晶片共計為 6400 點。

細胞株培養與處理

採用人類臍帶靜脈內皮細胞株、人類肝癌細胞株(HepG2)與巨噬細胞株(RAW264.7)。人類臍帶靜脈內皮細胞株解凍後培養於預先經 gelatin 處理之培養皿中，培養液為含 20% fetal bovine serum、50 μ g/ml endothelium cell growth supplement、50 μ g/ml heparin、100 U penicillin/ 100 μ g streptomycin 之 M199 培養基；人類肝癌細胞株培養在含 10% fetal bovine serum 與 100 U penicillin/ 100 μ g streptomycin 的 DMEM 培養液

中；巨噬細胞則培養於含 10% fetal bovine serum 及 100 U penicillin/ 100 μ g streptomycin 之 RPMI 1640 培養液中。待細胞生長至 85-90% 滿盤時，除 RAW2647 細胞株同時加入 1 μ g/ml lipopolysaccharide (LPS)外，細胞均以 200 μ M DATS 處理，24 小時後，PBS 清洗兩次，加入 1ml Trizol reagent，刮取細胞，隨後加入 0.2ml CHCl_3 ，溫和搖晃混合均勻後以 12,000g 離心 10 分鐘，吸取上清液至新的微量離心小管中，加入等量之 isopropanol，混合均勻後靜置 10 分鐘使 RNA 沉澱，再以 12,000g 離心 10 分鐘，吸除 isopropanol 並加入 70% ethanol，經離心後所得之 RNA 利用 OligotexTM mRNA kit 純化 mRNA，mRNA 定量後即可進行與 cDNA-chip 之雜交反應。

cDNA 探針製作與標定

cDNA 探針製作參考 Chen 等人(1998)方法，簡述如下：取 1 μ g 經定量之 mRNA，加入 50 μ l 含有 6 μ M random primer、0.5 U/ μ l RNase inhibitor、0.5mM each of dATP、dCTP、dGTP 及 40 μ M dTTP、1mM biotin-16-dUTP 與 200U reverse transcriptase 之反應混合液，利用反轉錄作用將 mRNA 反轉錄為標定有生物素之 cDNA，之後將 cDNA 探針於 ammonium acetate 及 70% ethanol 中沉澱。

CDNA 晶片雜交反應

取出已點置有特定基因之 cDNA 晶片，先於 60°C 下含 10X SSC、0.1% N-lauroylsarcosine sodium、10% SDS、5% BM blocking reagent (Boehringer Mannheim)、800 μ g/ml 單股鮭魚精 DNA 之雜交反應液中預雜交(prehybridization) 90 分鐘，隨後將適量標定含生物素之 cDNA 探針加至的雜交反應液中，於 63°C 進行雜交反應 12 小時，取出晶片於 58°C 下含 0.1% SDS 的 0.1X SSC 中清洗 2 次，於室溫下將晶片浸泡於 1% blocking reagent 和 2% dextran sulfate 的溶液中 90 分鐘，之後於含 β -galactosidase-cojugated streptavidin、1% blocking reagent 及 0.3% BSA 之 1X TBS 緩衝液中反應 1 小時，最後加入含 1.2 mM X-gal、1 mM MgCl_2 、3 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、3 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 之 1X TBS 緩衝液，於 37°C 下反應 60 分鐘，所得藍色斑點再以高解析度之掃描器掃描，並以 GAPDH、 β -actin 及 hypoxanthine phosphoribosyl transferaseI 此三種 housekeeping genes 的表現結果最為內標進行影像定量分析(Chen *et al.*, 2001b)。

結果與討論

cDNA 晶片與 HepG2 細胞株之 mRNA 經雜交反應及顯色後之結果如圖 1 所示，每一基因產物多寡所呈現藍色小點之深淺將有所不同，變深者表示 mRNA 產物濃度增加，反之，則是 mRNA 產物濃度減少，標準化後，即可將各點顏色深淺之變化予以數量化並換算成比值。在 HepG2 中，增加或減少比值分別大於 1.5 或小於 0.5 者，才納入統計；至於，RAW264.7 實驗所採計標準則修正為大於 3.0 或小於 0.33 者。

如表 1 所示：DATS 處理後，mRNA 表現增加者共有 7 個，其中有 2 個屬於細胞週

期 / 細胞增殖 / 發炎反應相關基因，1 個屬於細胞凋亡，1 個屬於代謝 / 氧化壓力相關基因；至於，mRNA 表現受到 DATS 抑制者（表 2），則有 18 個，其中，9 個與細胞增殖 / 發炎反應相關，3 個屬於代謝 / 氧化壓力相關基因，1 個屬於細胞基質 / 骨架蛋白相關基因。就這些細胞週期 / 細胞增殖 / 發炎反應相關基因而言，增加的 2 個，分別是 Rho-associated-coiled-coil containing protein kinase 2 (ROCK-II, 為 Rho/Rac 家族中細胞激素活化之 small GTPase 之下游 effector, 在細胞骨架蛋白動態變化中扮演重要角色) 與 Sjogren syndrom antigen B (RNA binding protein), 反之, 受到 DATS 抑制者卻高達 9 個, 其中包括了 protein tyrosine phosphatase-receptor type c polypeptide (與免疫細胞成熟、活化、遷移有關) lymphocyte antigen 64 homolog-radioprotective-105 kDa spleen tyrosine kinase (與免疫細胞增殖、分化、噬菌作用有關) microphthalmia-associated transcription factor (MITF, 抑制 Smad3-mediated mMCP-7 轉錄, 在黑色素細胞之生存或分化中扮演重要角色)等; 除此外, DATS 也降低 human cytoskeleton associated protein (CG22) mRNA 之生成。由這些受調控之標的基因所扮演角色, 可推論 DATS 似乎傾向抑制細胞增殖或發炎反應。

RAW264.7 小鼠細胞株常被作為探討巨噬細胞在發炎反應時扮演角色之替代模式, 因此本計畫除 HepG2 外, 也使用此細胞株, 比較在 LPS 活化下, 那些基因表現受到影響? 這些受 LPS 調控之基因, 在 DATS 同時處理時, 又發生那些改變? 如表 3 所示: 總計 LPS 正調控的基因數量有 150 個, 如按基因功能分類, 屬於細胞間質 / 結構蛋白相關基因最多, 共有 21 個, 比如, Dynein (Dncic2)、annexin 6 (Anxa6)、protocadherin (Pcdh7) 等; 其次, 19 個與訊號傳遞有關, 包括 Janus kinase 1 (Jak1)、cathepsin L (Ctsl)、induced in liver dystrophy 2 (Ild2)等, 也有 12 個基因與能量 / 代謝有關, 6 個基因與熱休克有關 (osmotic stress protein 94 kDa (Osd94); sequestosome 1; heat shock 70 kDa protein 5 (Hspa5 等); 至於, LPS 負調控的 129 個基因中 (表 4), 也有 16 個與能量 / 代謝有關, 7 個屬於細胞間質 / 結構蛋白, 訊號傳遞有關者則有 8 個, 與轉錄 / 染色質相關基因有 6 個, 細胞週期相關基因也有 7 個(比如, cyclin A2, cyclin D1, replication factor C)。除了 LPS 外, 當細胞同時也加入 DATS 共同處理時, 則分別有 96 與 60 個基因表現受到正或負調控 (表 5、6), 經交叉比對, 發現受 LPS 調控的全部 279 個基因中, 有 23 個重複出現在 90 個 DATS 正調控基因清單中, 也有 13 個重複出現在 DATS 負調控清單中, 這顯示其餘的 243 個受到 LPS 調控的基因, 在加入 DATS 下, 表現回復至正常水準; 另外不受 LPS 影響, 卻出現在 DATS 清單的基因, 也分別有 67 與 47 個, 顯示他們只受 DATS 調控的可能性。但更有趣的則是, 我們也發現在 LPS 模擬發炎條件下, 共有 21 個 mRNA 濃度由 LPS 的負調控轉為 DATS 處理時的正調控, 比如屬於能量 / 代謝基因的 lysozyme, 其比值由 0.32 躍增為 7.1, 與蛋白質合成有關的 Sfrs3 和 Hnrpa2b1 也分別由 0.26 與 0.29 增為 3.4 與 3.3, 與細胞週期有關的 cyclin D1 也由 0.2 轉為 4.2。至於 DATS 與 LPS 同時處理時, 由 LPS 的正調控轉為負調控的基因也有 13 個之多, 熱休克的 Hspa5 表現比值即由 7.3 轉為 0.30, 細胞間質 / 結構蛋白的 Ern1 也由 4.00 降為 0.13, 轉錄 / 染色質的 Zfp216 則由 5.18 減為 0.24, Atf4 則是 8.53 轉為 0.17。這些因 DATS 作用而逆轉 LPS 效應的基因的生理意義, 將是我們下一波研究重點。

生物晶片的確提供了豐富的生物資訊，但要由此龐大資料中整理歸納出有用資訊，並不是一件簡單任務，因此除了 DATS 外，整理其他大蒜硫成分的標的基因的，也正處理中，短期內尚無法得到有系統結論，但值得繼續努力加把勁。無論如何，生物晶片的應用，的確在探索食品機能成分的可能生理作用或其作用機轉，提供了一有力的工具。

參考文獻

- Agarwal, K.C. (1996) Therapeutic actions of garlic constituents. *Med. Res. Rev.* 16: 111-124.
- Bertilsson, G., Heidrich, J., Svensson, K., Asman, M., Jendeberg, L., Sydow-Backman, M., Ohlsson, R., Postlind, H., Blomquist, P. and Berkenstam, A. (1998) Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 12208-12213.
- Block, E., Ahmad, S., Jain, M.K., Crecely, R.W., Apitz, C.R. and Cruz, M.R. (1984) (E,Z)-Ajoene: a potent antithrombotic agent from garlic. *J. Am. Chem. Soc.* 106: 8295-8296.
- Carrie, W., Laura, L. and Neil, S. (1992) Antiproliferative effect of the garlic compound S-allyl cysteine on human neuroblastoma cells in vitro. *Cancer Lett.* 63: 211-219.
- Chen, C.-C., Shieh, B., Jin, Y.-T., Laiu, Y.-E., Huang, C.-H., Liou, J.-T., Wu, L.-W., Huang, W., Young, K.-C., Lai, M.-D., Liu, H.-S. and Li, C. (2001) Microarray profiling of gene expression patterns in bladder tumor cells treated with genistein. *J. Biomed. Sci.* 8: 214-222.
- Chen, H.W., Tsai, C.W., Yang, J.J., Liu, C.T., Kuo, W.W. and Lii, C.K. (2003) The combined effects of garlic oil and fish oil on the drug-metabolism and antioxidation systems of the rats. *British Journal of Nutrition* 89:189-200.
- Chen, J.J.W., Wu, R., Yang, P.-C., Huang, J.-U., Sher, Y.-P., Han, M.-H., Wu, C.-K. and Peck, K. (1998) Profiling expression patterns and isolating differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection. *Genomics* 51: 313-324.
- Chinthalapally, V.R., Abraham, R., Barbara, S., Edith, Z., Gary, K., Vernon, S. and Bandaru, S.R. (1995) Chemoprevention of colon carcinogenesis by sulindac, a nonsteroidal anti-inflammatory agent. *Cancer Res.* 55: 1464-1472.
- David, G., Thomas, R. and Thomas, C.C. (1999) DNA chips: promising toys have become powerful tools. *Trends Biochem. Sci.* 24: 168-173.
- DeRisi, J., Penland, L., Brown, P.O., Bittner, M.L., Meltzer, P.S., Ray, M., Chen, Y., Su, Y.A. and Trent, J.M. (1996) Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature Genet.* 14: 367-70
- Frantz, D.J., Hughes, B.G., Nelson, D.R., Murray, B.K., and Christensen, M.J. (2000) Cell cycle arrest and differential gene expression in HT-29 cells exposed to an aqueous garlic

- extract. *Nutr Cancer*. 38:255-64.
- Haim, S., John, T.P., Yuichi, K., Jae-Won, S., Thomas, D., Steven, F.M., Vundavalli, M., Richard, S.R., Peter, R.H. and Weinstein, I.B. (2001) Antiproliferative effects of S-allylmercaptocysteine on colon cancer cells when tested alone or in combination with sulindac sulfide. *Cancer Res*. 61: 725-731.
- Ide, N. and Lau, B.H. (1999) Aged garlic extract attenuates intracellular oxidative stress. *Phytomed*. 62: 125-131.
- Ide, N. and Lau, B.H. (2001) Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor- κ B activation. *J. Nutr*. 131: 1020S-1026S.
- Jain, K.K. (2000) Applications of biochip and microarray systems in pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*. 1: 289-307.
- Julie, H.C., Johnny, L.E., Nicole, J.S. and Gordon, R.C. (2001) Molecular basis by which garlic suppresses atherosclerosis. *J. Nutr*. 131: 1006S-1009S .
- Kim, K.M., Chen, S.B., Koo, M.S., Choi, W.J., Kim, T.W., Kwon, Y.G., Chung, H.T., Billiar, T.R. and Kim, Y.M. (2001) Differential regulation of no availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine. *Free Rad. Biol. Med*. 30: 747-756.
- Khan, J., Saal, L.H., Bittner, M.L., Chen, Y., Trent, J.M. and Meltzer, P.S. (1999) Expression profiling in cancer using cDNA microarrays. *Electrophoresis* 20: 223-229.
- Lau, B.H. (2001) Suppression of LDL oxidation by garlic. *J. Nutr*. 131: 985S-988S.
- Marton, M.J., DeRisi, J.L., Bennet, H.A., Iyer, V.R., Meyer, M.R., Roberts, C.J., Stroughton, R., Burchard, J., Slade, D., Dai, H., Bassett, D.E. Jr., Hartwell, L.H., Brown, P.O. and Friend, S.H. (1998) Drug target validation and identification of secondary drug target effect using DNA microarrays. *Nature Med*. 4: 1293-1301.
- Narayanan, B.A., Narayanan, N.K. and Reddy, B.S. (2001) Docosahexaenoic acid regulated genes and transcription factors inducing apoptosis in human colon cancer cells. *Int J Oncol*. 19:1255-62.
- Okuda, T., Sumiya, T., Muzutani, K., Tago, N., Miyata, T., Tanabe, T., Kato, H., Katsuya, T., Higaki, J., Ogihara, T., Tsujita, Y. and Iwai, N. (2002) Analyses of differential gene expression in genetic hypertensive rats by microarray. *Hypertensim Res*. 25: 249-55.
- Pinto, J.T., and Rivlin, R.S. (2001) Antiproliferative effects of allium derivatines from garlic. *J. Nutr*. 131:1058S-1060S
- Qiao, S., Pennanen, P., Nazarova, N., Lou, Y.R., and Tuohimaa, P. (2003) Inhibition of fatty acid synthase expression by 1alpha,25-hydroxyvitamin D3 in prostate cancer cells. *J Syeroid Biochem Mol Biol*. 85:1-8.
- Sheen, L.Y., Chen, H.W., Kung, Y.L., Liu, C.T. and Lii, C.K. (1999) Effects of garlic oil and its organosulfur compounds on the activities of hepatic drug-metabolizing and antioxidant enzymes in rats fed high- and low-fat diets. *Nutr. Cancer* 35: 160-166.

- Sparins, V. L., Barnay, G. and Wattenberg, L. W. (1988) Effects of organosulfur compounds from garlic and onion on benzo[a]pyrene-induced neoplasia and glutathione S-transferase activity in the mouse. *Carcinogenesis* 9:131-134.
- Steiner, M., Khan, A.H., Holbert, D. and Lin, R.I. (1996) A double-blind crossover study in moderately hypercholesterolemic men that compared the effect of aged garlic extract and placebo administration on blood lipids. *Am. J. Clin. Nutr.* 64: 866-870.
- Verena, M.D. and Angelika, M.V. (2001) Ajene, a natural product with non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-like properties? *Biochem. Pharmacol.* 61: 587-593.
- Vo-Dinh, T. (1998) Development of a DNA biochip: principle and applications. *Sensors Actuators B* 51: 52-59.
- Wu, C.C., Sheen, L.Y., Chen, H.W., Tsai, S.J. and Lii, C.K. (2001) Effects of organosulfur compounds from garlic oil on the antioxidation system in rat liver and red blood cells. *Food Chem. Toxicol.* 39: 563-569.

圖、表

Table 1. Gene up-regulated with the treatment of 200 μ M DATS in HepG2 human hepatoma cells (ratio >1.5) .

Category	Name	Number
Cell Cycle/Cell Proliferation Inflammation	Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)	2
	Rho-associated- coiled-coil containing protein kinase 2	
Apoptosis	ubiquitin specific protease 16	1
Metabolism/Oxidative Stress/ Stress Enzymes	Cytochrome c oxidase VIIc subunit	1
Others	40S ribosomal protein S15A; Ribosomal protein L26 Zinc finger protein 91	3
Total		7

Table 2. Gene down-regulated with the treatment of 200 μ M DATS in HepG2 human hepatoma cells (ratio <0.5).

Category	Name	Number
Cell Proliferation/Inflammation	Protein tyrosine phosphatase-receptor type c polypeptide; Glutamate receptor-metabotropic 3; Microphthalmia-associated transcription factor; Gonadotropin releasing hormone; Lymphocyte antigen 64 homolog-radioprotective-105 kD; Spleen tyrosine kinase; etc.	9
Metabolism/Redox Enzymes	Xanthine dehydrogenase; Flavin-containing monooxygenase 1; H. sapiens mRNA for glutamine cyclotransferase	3
Matrix/structural proteins	Human cytoskeleton associated protein (CG22) mRNA	1
Others		5
Total		18

Table 3. Gene up-regulated in the presence of 1 µg/ml LPS in RAW264.7 macrophages (ratio > 3).

Category	Name	Number
Apoptosis	Pea15--phosphoprotein enriched in astrocytes 15; Fcgr1--Fc receptor, IgG, high affinity	2
Cell cycle	Adfp--adipose differentiation related protein	1
Protein Synthesis/Translational Control	Psma6--proteasome (prosome, macropain) Ctsc--cathepsin C; etc.	7
Signal Transduction	Ifld2--induced in fatty liver dystrophy 2 Ctsl--cathepsin L Il18—interleukin 18 Jak1—Janus kinase 1; etc.	19
Transcription/Chromatin	Litaf-pendin--LPS-induced TNF-alpha fa Nfkb1a--nuclear factor of kappa light; etc.	10
Inflammation	Ly6e--lymphocyte antigen 6 complex;	1
Energy/Metabolism	Asns--asparagine synthetase Glut1-Glucose transporter 1 Odc--ornithine decarboxylase, structure; etc.	12
Heat Shock/Stress	Hspa5—heat shock 70kDa protein 5; Osp94--osmotic stress protein 94 kDa; Sqstm1—sequestosome 1; etc.	6
Matrix/Structural Proteins	Dncic2--dynein Pcdh7—protocadherin 7; Anaxa6—annexin A6; etc.	21
Redox/Stress	Hif1a--hypoxia inducible factor 1, alpha; Glx1--glutaredoxin 1 (thioltransferase); Mt2--metallothionein 2	3
Drug metabolism	Por--P450 (cytochrome) oxidoreductase	1
EST		7
Others/Unknown	Tip39-pendin--tuftelin-interacting protein Ier3--immediate early response 3; etc.	60
Total		150

Table 4. Gene down-regulated in the presence of 1 ̱g/ml LPS in RAW264.7 macrophages (ratio < 0.33).

Category	Name	Number
Apoptosis	Pdcd5--programmed cell death 5;	2
Cell Cycle	Adam17--a disintegrin and metalloprote	7
	Ccna2--cyclin A2;	
	Tnk2--tyrosine kinase, non-receptor, 2; cyclin D1; Recc1--replication factor C, 140 kDa; etc.	
Protein Synthesis/Translation Control	Kars--lysyl-tRNA synthetase; Cugbp2--CUG triplet repeat, RNA binding protein; Sfrs3--splicing factor, arginine/serine; Hnrpa2b1--heterogeneous nuclear ribonu	4
Signal Transduction	Rgs2—regulator of G-protein signaling; Fin16--fibroblast growth factor inducible; Igf1--insulin-like growth factor 1; etc.	8
Transcription/Chromatin	Nfatc4--nuclear factor of activated T-cell 4; Scml1--sex comb on midleg-like 1; etc.	6
Drug Metabolism	Ugt1a1--UDP-glucuronosyltransferase 1; Gstm2--glutathione S-transferase, mu 2	2
Inflammation	Cmkar4--chemokine (C-X-C) receptor 4 Lsp1--lymphocyte specific 1; Il10ra--interleukin 10 receptor, alpha	3
DNA replication	Eps15--epidermal growth factor receptor	1
Energy/Metabolism	Mus musculus adult male medulla oblong; Hadh—hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase; Lyzs—lysozyme; etc.	16
Matrix/Structural Proteins	Gsn—gelsolin; Lpl--lipoprotein lipase; etc.	7
EST		9
Others/Unknown	H2afx--H2A histone family, member X; etc.	65
Total		129

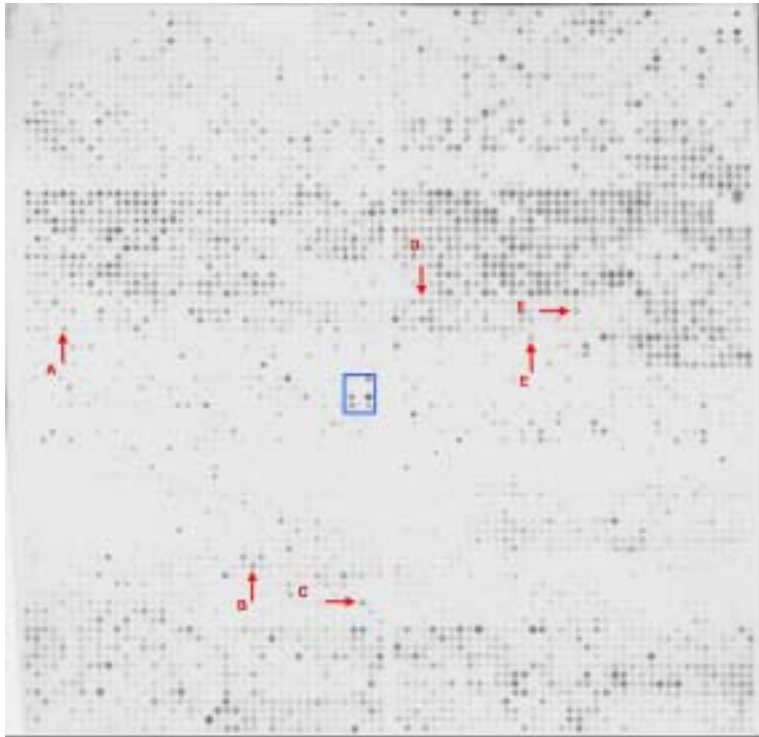
Table 5. Gene expression increased with 200 μ M DATS exposure in RAW264.7 macrophages in the presence of LPS (ratio > 3).

Category	Name	Number
Cell Cycle	RIKEN cDNA 5730591C18 gene; cyclin D1; Pcna--proliferating cell nuclear antigen	3
Protein Synthesis/Translational Control	Hnrpa2b1--heterogeneous nuclear ribonuclease; Cugbp2—CUG triplet repeat, RNA binding protein 2; Sfrs3--splicing factor, arginine/serine; etc.	4
Signal Transduction	Igf1--insulin-like growth factor 1; Cish3--cytokine inducible SH2-containing 3; Ctsl--cathepsin L; Calm1—calmodulin 1; etc.	10
Transcription/Chromatin	Hdac1--histone deacetylase 1; Hmga2--high mobility group AT-hook 2; etc.	4
Drug Metabolism	Gus-s--beta-glucuronidase structural	1
Energy/Metabolism	Odc--ornithine decarboxylase, structure; Mus musculus, clone MGC:6545 IMAGE:265; Lyzs—lysozyme; Fasn—fatty acid synthase; etc.	10
Heat Shock/Stress	Mus musculus, clone MGC:19199 IMAGE:42;	2
Matrix/Structural Proteins	Gsn—gelsolin; Tuba2--tubulin alpha 2; Crtap—cartilage associated protein; etc.	11
Redox	Cas1--catalase 1; Gpx1--glutathione peroxidase 1	2
EST		5
Other/Unknown	AI317193--expressed sequence AI317193; Dnase2a--deoxyribonuclease II alpha; Tip39-pendin--tuftelin-interacting protein; Ier3--immediate early response 3; etc.	44
Total		96

Table 6. Gene expression decreased with 200 μ M DATS exposure in RAW264.7 macrophages in the presence of LPS (ratio < 0.33).

Category	Name	Number
Apoptosis	Traf1--Tnf receptor-associated factor	1
Protein Synthesis/Translational Control	Mus musculus, clone MGC:6827 IMAGE:264; Hnrpc--heterogeneous nuclear ribonucle C85417--expressed sequence C85417	3
Signal Transduction	Ifld2--induced in fatty liver dystrophy 2; Ppm1a—protein phosphatase 1A, magnesium; Thra--thyroid hormone receptor alpha; etc.	5
Transcription/Chromatin	Atf4--activating transcription factor 4; Zfp216--zinc finger protein 216; Klf4--Kruppel-like factor 4 (gut); etc.	5
DNA Replication	Isg20--interferon-stimulated protein	1
Energy/Metabolism	Asns--asparagine synthetase; Phgdh—3-phosphoglycerate dehydrogenase; Pdxk—pyridoxal kinase; etc.	5
Heat Shock/Stress	Hspa5--heat shock 70kD protein 5	1
Matrix/Structural Proteins	Ern1--endoplasmic reticulum (ER) to nucleus signalling 1; Gla--galactosidase, alpha; etc.	5
EST		6
Others/Unknown	Nupr1--nuclear protein 1; Mus musculus, clone MGC:7535 IMAGE:349; Fem1b--feminization 1 homolog b; etc.	28
Total		60

A : -DATS



B : +DATS

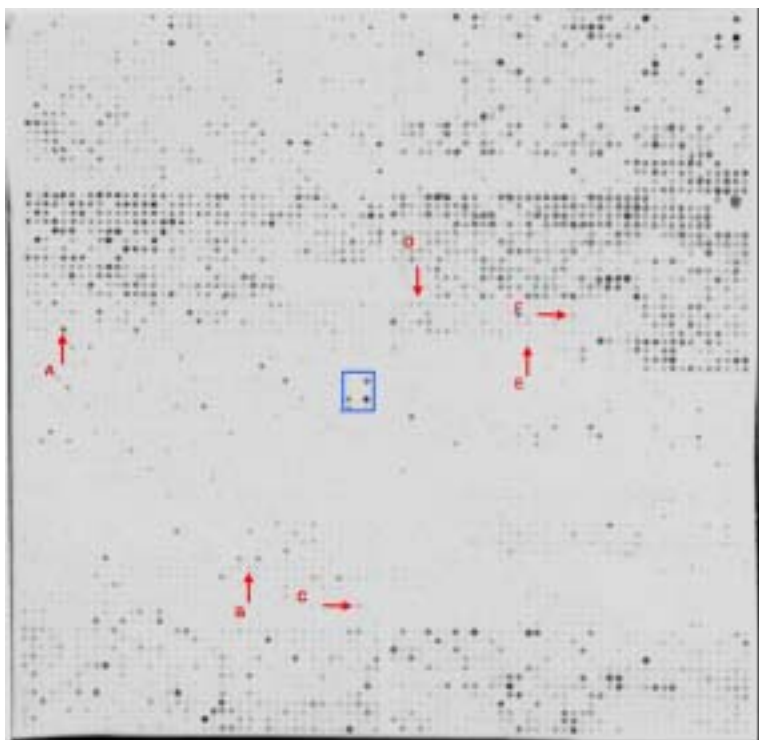


Fig 1. Microarray expression analysis of treat with or without 200 μ M DATS in HepG2 human hepatoma cell .

Up-regulated

A: cytochrome c oxidase subunit VIIc

Down-regulated

B: cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 (liver)

C: apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein 1)

D: peroxiredoxin 2

E: malate dehydrogenase 2

F: succinate dehydrogenase complex subunit C, integral membrane protein, 15 KD