

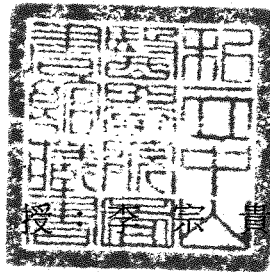
R
508.8
1043

中山醫學院醫學研究所

碩士論文

Paraquat 和 Diquat 對老鼠肝中脂質過氧化及蛋白質
glutathionation 的影響

The effect of paraquat and diquat on rat liver lipid
peroxidation and protein S-glutathionation



指導教授 王世宗 博士

研究生：王世宗

中山醫學院圖書館



C029656

中華民國八十四年元月

本論文為中山醫學院授與理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院醫學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

私立中山醫學院院長

蕭松瑞 博士

蕭松瑞

私立中國醫藥學院副教授

沈立言 博士

沈立言

私立中山醫學院副教授
(論文指導教授)

李宗貴 博士

李宗貴

中華民國八十四年元月十八日

誌 謝

本論文承蒙指導教授李宗貴博士悉心指導，稿成復蒙多次詳加閱改，始得順利完成付梓，感謝之意，難以言表。文稿初成，並蒙蕭松瑞院長以及沈立言博士指正疏漏之處，並提供改進意見，使論文更臻完整，特誌卷首，謹致衷心謝忱。

本次論文承蒙怡鈞、琴惠、智宏、崇德協助，才能順利完成，於此深誌誠摯之謝意。

實驗期間，承蒙主任的關懷，更感謝徐老師的愛護及系上老師與助教們的關心，在此一併誌謝。

最後，感謝父親及家人的支持與關心，更要感謝我的至愛--杏君，對我的關懷與包容，願以此微薄之成就與他們共享。

目 錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
第壹章序論.....	1
第貳章.....	8
一、材料.....	8
二、方法.....	9
第參章實驗結果.....	20
第肆章討論.....	24
第伍章總結.....	28
參考文獻.....	29
結果圖表.....	35
附錄.....	47

摘 要

為應用一可準確分析蛋白質與GSH發生mixed-disulfides (glutathionation)的方法於動物實驗(in vivo)中,來分析當老鼠處於過氧化緊迫(oxidative stress)時蛋白質的變化。本計畫利用等電點電泳法(isoelectric focusing)可分離不同等電點蛋白質的特性,結合免疫西方墨點法(Immuno-Western blotting)的敏感性及專一性,提供一較傳統方法準確且省時的選擇。Carbonic anhydrase III (CA III)是一在雄性老鼠肝細胞中含量高且可發生glutathionation的細胞質蛋白質,所以在本實驗中被選為指標分子。過氧化緊迫分別以兩種廣效性殺草劑 paraquat (PQ)和diquat (DQ)經腹腔注射誘發。首先,CA III利用兩步驟的DEAE-trisacryl M ionexchange chromatography純化出,其純度最少95%。其次,CA III抗血清則經由兔子來生成。經測試,利用此方法偵測CA III的靈敏度可達20ng。老鼠在經PQ以20或40mg/kg bw或DQ以85或170mg/kg bw的劑量腹腔注射5、15、40、120、240分後分別犧牲取樣。Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS)均於PQ或DQ注射後顯著增加並呈現time-dependent response。血漿glutamate pyruvate transaminase (PGPT)活性,則分別在低劑量DQ注射後240分鐘或高劑量DQ注射後40分鐘開始顯著上升($p < 0.05$),至於接受PQ處理老鼠,其PGPT則僅於高劑量PQ (40mg/kg bw)處理240分鐘後,顯著較對照組為高($p < 0.05$)。肝細胞內GSSG濃度則不受PQ或DQ影響。還原態GSH及total GSH濃度在PQ高劑量處理240分鐘後顯著較對照組為低($p < 0.05$),在高劑量DQ處理組則經120分鐘後,肝細胞內還原態GSH及total GSH濃度也顯著較低($p < 0.05$)。CA III glutathionation在所有處理組中均無顯著差異。由TBARS增加結果顯示,PQ和DQ確實在肝細胞中誘發氧化傷害,至於無法偵測到CA III glutathionation的發生,根據我們先前實驗結果(Lii,1993),可能是由於glutathionated CA III發生dethiolation的緣故,導致glutathionated CA III在本實驗中無法偵測到有增加情形。

關鍵詞: rats, glutathione, protein glutathionation, paraquat, diquat

§ ABSTRACT §

A newly developed method which combining isoelectric focusing (IEF) and immunostaining is successful in analyzing protein-GSH mixed disulfides formation (protein glutathionation) in rat hepatocytes under oxidative stress. So far, several methods are widely used in determining protein mixed disulfide formation, such as radioisotope-based method and sodium borohydride reduction method, but they may limit in sensitivity, specificity, and/or be a time consuming work. Therefore, this new method provides us an alternative and a powerful tool in this area. In the present study, we try to apply this technique to measure carbonic anhydrase III (CA III)-GSH mixed disulfide formation in rat liver by administrating PQ and DQ to induce oxidative stress. Firstly, CA III was purified from rat liver by a two steps DEAE-trisacyl M ion-exchange chromatography and the final purity was at least 95%. Then, CA III antiserum was produced by immunization of rabbits with this purified CA III. By this method, as little as 20ng of CA III could be clearly identified. Rats were given intraperitoneally either prarquat at 20 or 40 mg/kg bw or diquat at 85 or 170 mg/kg bw and sacrifice was performed 5, 15, 40, 120 and 240 min, respectively, after administration. PQ and DQ significantly increased the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) production and showed a time-dependent response. The significant effect on plasma glutamate-pyruvate transaminase(GPT) activity was also obtained and depended on time and dosage. GPT leakage was significantly increased ($p < 0.05$) at 240 min in rats dosed with 85 mg/kg bw of DQ or beginning at 40 min

in those dosed with 170 mg/kg of DQ. However, this significant increase of GPT by PQ was only seen at animals treated with 40mg/kg bw at 240 min. Hepatic cellular GSSG content was tended to decrease with PQ and DQ treatments. A significant decrease of reduced GSH and total GSH were observed in rats dosed with high dosage of DQ at 120 min and dosed with high dosage of PQ after 40 min. In spite of the fact of increasing oxyradicals generation as indicated by TBARS. No detectable change of CA III glutathionation was observed. Based on the dethiolatable characteristic of S-glutathionated CA III (Lii and Hendich, 1993), we, thus, propose that the occurrence of S-glutathionation of CA III was probably offsetted by this reversible reaction and resulted in this protein modification nondetectable.

Key words: rats, glutathione, protein mixed-disulfides, paraquat, diquat.

第壹章序論

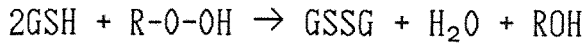
一、Glutathione (GSH):

GSH是一種由三個氨基酸所組成的小分子(γ -Glu-Cys-Gly)，廣泛分佈在動物、植物、微生物細胞中；在動物細胞內，濃度更可高達0.5mM到10mM(Kosower and Kosower, 1978)，因此在細胞內是非常重要的非蛋白質硫氫(non-protein thiols)；在很多細胞中，GSH經估計佔有total non-protein sulfhydryl compounds 90%以上(Demaster et al., 1984)。

GSH的生理功能有多種，Kosower and Kosower (1978)及Meister (1989)等人報告指出，GSH的功能主要有：(一)GSH可預防過氧化物的毒性作用，本身當作受質(substrate)利用GSH過氧化酵素(GSH peroxidase)來移除hydrogen peroxide或其它organic hydroperoxides；(二)GSH可與多種外來毒物(xenobiotics)或內生性反應物結合，達到解毒(detoxification)及促進排泄(excretion)的目的；(三)GSH維持細胞膜(cell membrane)的結構完整(structure integrity)及保護膜內胞器等。

在正常或健康的細胞中，其細胞內prooxidants與antioxidants間是維持在一種平衡的關係，然而當這種平衡被擾亂而傾向prooxidants時，即發生所謂氧化緊迫(oxidative stress)的現象(Sies; 1984)；目前已知很多化學物質均能誘使細胞產生氧化緊迫，例如paraquat、diquat、nitrofuratoin及admiramycin等。在細胞內，這些物質經酵素及非酵素作用可產生多種具有很強生化活性的reactive oxygen species (ROS)，例如superoxide anion、hydrogen peroxide、hydroxyl radical等。細胞在正常狀況下，其防衛機制能代謝或移除這些產物，相反地，如這些產物過多無法順利清除而造成不可逆氧化傷害(irreversible oxidative damage)時，將使細胞受損或死亡。氧化緊迫時GSH即扮演一抗氧化劑角色，GSH藉由glutathione過氧化酵素催化來移除ROS，同時本身轉變成glutathione disulfide (GSSG)，然後GSSG再由GSH reductase將其還原

disulfide(GSSG)，然後GSSG再由GSH reductase將其還原回GSH(Meister, 1989)。GSH在去毒作用(detoxification)裏，與過氧化氫和有機過氧化物反應式如下：



以紅血球為例(Mills, 1957)，GSH即有維持紅血球的正常結構，並且保持血紅蛋白的亞鐵狀態的功能。

還原態GSH由於擁有一個硫氫基，所以它同時也是一個硫氫根緩衝劑(sulfhydryl buffer)，主要是用來保持紅血球之半胱胺酸(cysteine)殘基和其它紅血球蛋白質於還原態。除此之外，GSH也可以調節細胞代謝與生長，並保持細胞的正常生理功能。甚且Stall等人於1992年報告中更指出，T cells中的GSH濃度與HIV的感染有關。

二、蛋白質 S-thiolation (Protein S-thiolation)：

當細胞處於氧化緊迫時，蛋白質內具有活性的硫氫基(reactive sulfhydryls)可和細胞內許多低分子量硫醇(low molecular weight thiols)例如GSH、cysteamine及胱氨酸(cysteine)等反應形成protein S-thiolation，又可稱為mixed-disulfide exchange，此反應為一可逆性(reversible)反應，在許多報告中被認為是當細胞處於氧化緊迫時的一種蛋白質修飾(modification)作用(Brigelius, 1985; Ziegler, 1985)，其功能為調節細胞內酵素的活性(Gilbert, 1982; Ziegler, 1985)或保護細胞內蛋白質免於氧化緊迫時所導致的破壞(Brigelius, 1985)。

在前述細胞內低分子量硫醇間，其中又以GSH的濃度最高，可達毫莫耳濃度(Kosower and Kosower, 1978)，遠超過cysteamine和cysteine甚多(Carcia, 1988; Demaster, 1984)，所以在論及protein S-thiolation時，大多認為發生在protein sulfhydryls及GSH間是最重要的一種，因此本文討論protein S-thiolation時，主要是針對此種反應，因此又稱為protein S-glutathionation。

蛋白質S-thiolation對酵素活性調節的重要性，可以葡萄糖代謝調節作用為例(Brigelius,1985)，當細胞處於氧化緊迫時，葡萄糖-6-磷酸脫氫酵素(glucose-6-phosphate dehydrogenase)之活性可被mixed-disulfide exchange所激化(Brigelius,1985)，故葡萄糖代謝將偏向磷酸五碳醣路徑(pentose phosphate-pathway)，以產生足量的NADPH來配合GSH還原酵素(GSH reductase)作用，以保護細胞內蛋白質免受氧化緊迫所致的不可逆傷害。反之，利於糖解(glycolysis)的酵素比如磷酸果糖激素(phosphofructokinase)(Gilbert,1982)及丙酮酸激素(pyruvate kinase)(vanBerkel et al.,1973)活性則被抑制。

雖然,protein S-thiolation的可能重要性已被廣泛述及(Brigelius,1985)，但囿於其傳統分析方法並不夠靈敏且不夠專一，因此在進行這方面研究時，常會受到一些限制，所以本實驗室利用一種最近被設計出同時兼具專一性且靈敏度的方法(Lii & Hendric,1993;Lii et al.,1994)，來探討蛋白質在過氧化緊迫可能發生的修飾作用。其原理乃利用GSH在正常生理pH狀況下，攜有一淨負電荷(Glutamate上有一個 NH_3^+ 和 COO^- ，在glycine則有一個 COO^-)。所以當GSH和蛋白質形成mixed-disulfides時，將造成蛋白質多帶一負電荷，因而改變其等電點；且越多GSH分子與蛋白質反應，將導致更進一步改變蛋白質的淨電荷，因此glutathionated protein與原先未和GSH反應的蛋白質，將可被IEF所區分，而且結合不同GSH分子數目的蛋白質將分別沈澱在不同位置上。此時，如能更進一步把IEF區分後之蛋白質，使用西方墨點法(Western blotting)轉移到醋酸纖維膜上，再利用免疫抗體的專一性來染色，將是研究protein-GSH mixed disulfides非常有效的實驗方法。

三Carbonic anhydrase III (CA III):碳酸酐酵素

Carbonic anhydrase是本實驗中被選為探討protein S-thiolation的指標分子。Carbonic anhydrase於1935年由F.Wroughton首先在肌肉組織中發現；至目前為止，已有多種CA的異構物(isoforms)被分離出(Tashian,1987),其中僅有CA I、II、III的特性較被確定。CA是體內負責CO₂水解(CO₂+ H₂O \leftrightarrow HCO₃⁻ + H⁺),達到促進血液運送及排除二氧化碳目的的主要酵素。其中CA II存於大部份組織中,因具有最高轉換數(turnover number)(1×10⁶mole/sec)所以是CA isoforms中擁有最大活性的一種(Tashian,1989);CA I主要存於紅血球中,其活性大約是CA II的16%。CA III則直到1977年才從雞和羊的骨骼肌細胞中被分離出(Holmes,1977),此後,CA III也分別於不同組織和細胞中被確認出(Tashian,1989),但是只有肝臟及紅肌肉(red skeletal muscle)(type I fiber)含量最豐富(Holmes,1977)。Carter等人於1981年則發現老鼠肝中CA III濃度存有極大的性別差異,公老鼠肝中CA III(Carter et al.,1981)含量可佔全部可溶性細胞質蛋白質(total soluble cytosolic protein)的5~8%,而母老鼠肝中的CA III則僅有公老鼠的3~7%(Shiel et al.,1983);CA III的活性經估計約只有CA II活性的1~2%(Tashian,1989; Holmes,1977),因為如此低活性,才造成CA III必需在肌肉及肝中大量合成,但是為何肝細胞不去使用具高活性的CA II,而利用CA III呢?是否表示CA III在肝中尚有其它角色,目前有報告指出CA III可能在維持酸鹼平衡(acid-base homeostasis)上有重要角色(Carter,1987);除此外,對CA III的生理及生化角色,目前則尚未完全清楚。

由於,CA III在公鼠肝中大量存在與低活性的事實,加上CA III又可以發生一可逆性的S-thiolation/dethiolation(Chai et al.,1991),因此,CA III是否可能在氧化緊迫防禦系統(oxidative stress defense system)中扮演某種角色,經由與GSH或GSSG的合作來補捉ROS,進而降低這些ROS對細胞造成更嚴重的傷害。

四、paraquat和diquat：

paraquat (1,1-dimethyl-4,4-bipyridilium chloride, PQ) 和 diquat (1,1-ethylene-2,2-bipyridilium chloride, DQ) 此兩種類似物，均屬於目前仍廣泛使用于全世界的廣效性除草劑，由於曾有誤食中毒與自殺死亡的報告 (Smith et al., 1966; Bullivant, 1976)，才被人注意到其對人体的毒性。但是，到目前為止，其毒性產生機制仍未完全被確認。一般認為，其氧化還原循環 (redox cycling) 特性是最可能的原因。

曝露在此兩者化合物高劑量中，會對肺、肝、腎造成傷害 (Smith & Health, 1976)，例如；PQ 主要對肺產生傷害 (由於其選擇性堆積)，也可能對肝膽產生不良後果，另一方面 DQ 主要造成肝毒性，尤其在 Vit E 和硒缺乏動物 (Burk et al., 1980)。PQ 和 DQ 在細胞內經 cytochrome p450 代謝時，透過 redox cycling 能快速轉換一個電子與 O₂ 結合而產生 superoxide anion (Bus and Gibson, 1984)，進而刺激脂質發生 peroxidation (Bus et al., 1975; Burk et al., 1980)，造成細胞傷害。除此外，其它經 PQ 或 DQ 造成的傷害，尚包括抑制 DNA 合成、細胞骨骼擾亂 (Li & Chou, 1987) 及降低脂肪酸合成 (Keeling et al., 1980) 等；然而，在一些研究報告中也曾指出經 PQ 處理後，並未發現會增加 lipid peroxidation 的產生速率。

由於 GSH 是細胞內重要的抗氧化分子，因此 PQ 或 DQ 投與後，與 GSH 間的互動關係，曾引起多人興趣。根據 Brigelius 等人 (1982) 研究指出，經 PQ 處理後，PQ 對 GSH 造成的作用有以下可能：(一) 降低肝中 GSH 濃度；(二) 增加 GSSG 釋放至膽汁中；(三) 增加與蛋白質形成 mixed disulfides。然而 PQ 或 DQ 造成的氧化緊迫是否影響 protein S-thiolation，在眾多報告中並不一致，Brigelius 等人 (1982) 指出 PQ 在利用肝灌注方式 (liver perfusion) 下，可增加蛋白質 S-thiolation 發生有 50% 之多，Nakagawa 等人 (1992) 則報告說肝細胞如果先以 GSH reductase 抑制劑 BCNU (1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea) 處理，再曝露於 DQ 下，則可以增加胞內蛋白質發生 S-thiolation，然而也有其它研究指出，DQ 並不能導致蛋白質發生

S-thiolation，縱使以BCNU預先處理，結果也一樣(Rikan & Cai,1992)。

Lii等人(1992)曾針對PQ對CA III-GSH mixed disulfides的影響進行實驗，他們利用老鼠以腹腔注射方式給予10mg/kg body weight的PQ，8小時後，取出肝臟來分析。結果發現，在此劑量下經8小時處理，並無CA III-GSH mixed disulfides增加的現象。他們認為可能原因有二：(1)由於PQ的主要目標器官(target tissue)是肺臟並不是肝臟，經投與後可能大部份的PQ將貯積肺中，因此減少肝細胞受PQ的影響，尤其在此低劑量投與時。同一實驗中，此結果與PQ對肝細胞脂質過氧化物(TBARS)及GSSG濃度的影響是一致的，即沒有氧化緊迫產生。(2)蛋白質-GSH mixed disulfides的形成是有可能發生，但由於它是一早期發生的反應，發生在注射後不久，所以在經過8小時處理後，可能大部分早期形成的CA III-GSH mixed disulfides已被還原。據Chai等(1991)報告指出，CA III-GSH mixed disulfides的形成是可逆的。

鑑於先前實驗結果，本實驗因此將PQ劑量提高至20或40mg/kg body weight，如此將和其它人研究PQ毒性時所使用劑量較為接近(Burk et al.,1980; Keeling et al.,1982)，另外，目標器官在肝細胞的DQ也將同時加以測試，且在注射後的不同時間(0,5,15,40,120,240分)分析CA III的變化。

五、CA III 與等電點電泳法(isoelectric focusing, IEF)和免疫西方墨點法(Immuno-Western blotting)

近來，利用IEF並結合Immunoblotting已成功的被利用來偵測 glutathionated carbonic anhydrase III (Lii and Hendrich, 1993); 此法乃基於IEF可分離不同等電點蛋白質的特性，結合Immuno-Western blotting的專一性(specificity)和敏感性(sensitivity)，並經證實此方法較傳統還原法和硫同位素法，可更準確進行定量和定性分析，利用此法，僅須極低量的CA III 就可被準確偵測出。由於CA III 具有二個硫氫基，因此其Glutathionated form計有兩型：一為partially modified form，另一為fully modified form，其等電點分別由還原態的7.0改變至partially或fully的6.4或6.1(Rukutan et al., 1989)，因此在IEF下可以被明確分離。

由於CA III 擁有活性的硫氫基可與GSH形成mixed disulfides，且公鼠肝細胞又有大量的CA III 存在。因此，本實驗即利用CA III 為實驗對象，利用等電點電泳法結合免疫西方墨點法，進行探討CA III 於老鼠接受PQ或DQ處理後，是否發生蛋白質glutathionation?並進一步了解此反應之發生與GSH狀態間之交互關係。

第 貳 章 材料和方法

一、材料(materials)：

Paraquat, iodoacetamide (IAM), benzamidine, leupeptin 及 phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) 購買自Sigma Chemical Co. (USA); diquat dibromide 購自Chem. Service (USA); Peroxidase anti-rabbit IgG kit 來自Vector Laboratories (USA); Ampholytes 購自Pharmacia LKB (USA); Gel Bond 來自FMC CO. (USA); NetFix 購自Serva Biochem Inc. (USA); 1,1,3,3-tetramethoxy-propane 來自aldrich Chemical Co. (USA)。其它所有藥品皆為試藥級 (reagent grade)

二、方法(Methods)：

(一)、Carbonic anhydrase III (CA III)的純化

雄性Sprague-Dawley老鼠肝被用為分離CA III的來源，純化方法係根據Chai等在1991年所發表，為一分兩階段的DEAE-trisacryl M 離子交換層析法(DEAE-trisacryl M ionexchange chromatography)。雖然利用此法僅有10%左右的CA III可被純化出來，但由於肝中含有大量此蛋白質，所以其產量足夠抗血清的生產及其它用途。

(二)、免疫血清的生產：

300微克的純化CA III先以1：1比例與Freund's complete adjuvant 混合成1.5ml，分別經背部皮下注射入三隻六月齡的雄性New Zealand白兔，經二週後，再以等量的CA III與Freund's incomplete adjuvant (1.5ml)以1：1比例混合，進行補強注射(booster injection)。抗血清則於補強注射二週後，以每二週一次的方式，分別從兔子耳靜脈採集。C其中A III抗體的力價(titer)利用點免疫分析法(dot immunoassay)來測驗(Obata & Cheng, 1988)。抗體的專一性(specificity)則以純化CA III及商業生產的人類紅血球CA I及CA II來檢驗。

(三)、老鼠氧化緊迫(oxidative stress)的誘發及樣品準備

八週齡雄性Sprague-Dawley老鼠由成大醫學院提供，留置一週後，分別由腹腔注射20或40mg/kg body weight的Paragat以及85或170 mg/kg body weight的Diquat，控制組則予生理食鹽水注射。老鼠分別於注射後5, 15, 40, 120或240分鐘，以乙醚(ether)麻醉(每組4隻，由頸靜脈(jugular vein)取血5ml；肝臟則經肝門脈以4°C生理食鹽水灌洗方式洗出血液後取出。血液收集於含抗凝血劑(tetrasodium EDTA; 1mg/ml blood)的試管中，並於3000rpm下離心15分鐘，血漿將用來分析glutamate-pyruvate transaminase(GPT)活性。肝臟則一取出後馬上在液態氮中予以Freeze-clamped並磨碎，然後置於-80°C冷凍櫃中，直至分析。用於分析脂質過氧化物(TBARS)或GSH/GSSG濃度的樣本，將取0.5g磨碎的肝臟均質於5ml 50mM potassium phosphate buffer(pH7.0)中。分析CA III-GSH mixed disulfides的樣品，則是以0.5g磨碎的肝臟均質於10ml HEPES Buffer(pH7.4)中，此buffer並含有5mM EDTA，5mM EGTA，0.1mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF)，1mM benzamidine，4ug/ml leupeptine及50mM iodoacetamide (IAM)，至於將以DTT(dithiothretol)處理的樣品則不含IAM。樣品中蛋白質的濃度均以Lowry等報告的方法來測試(1951)。

(四)、CA III S-thiolation (glutathionation) 分析

0.5g 肝臟加入 5ml 20mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4)，內含 5mM EDTA、5mM EGAT、0.1mM PMSF、1mM Benzamidine 及 4ug/ml leupeptin，以 Teflon-glass homogenizer 均質後，取出適當量分別馬上加入 500mM IAM 或 300mM dithiothreitol (DTT) 以 10:1 比例混合，前者置暗處反應 15 分鐘，後者則在 30°C 水浴 30 分鐘，隨後兩者於 4°C 下以 10000xg 離心 15 分鐘，取出上層液，經蛋白質分析後，把等量蛋白質依 Lii and Hendrich (1992) 之方法，利用等電點電泳法分離還原態及與 GSH 形成 mixed disulfides 的 CA III。

等電點電泳法描述如下：將厚度為 0.8mm 的電泳膠片 (含 4% acrylamide 及 2% LKB ampholytes，其中 ampholyte 是以 5 份 pH 5-8 的 ampholyte 混以 1 份 pH 4-6 ampholyte)，準備在附有 NetFix 的 GelBond 上。設好電壓電流後，先預跑十分鐘，再將樣品加入 sample Wells 內，接著跑五十分鐘 (電壓設定在 1500V；電流及功率則依膠片大小，分別以 2.75mA/cm 及 1.125w/cm gel width 設定)；五十分鐘後，停止電泳並將 gel 放入 cold 0.7% acetic acid 溶液中，與醋酸纖維膜密合，隨後再以 0.7% acetic acid (4°C) 為移轉緩衝液，在 100 伏特固定電壓條件下跑 100 分鐘。隨後取下醋酸纖維膜，利用 anti-CA III antiserum 及 peroxidase anti-rabbit IgG kit 依免疫染色法 (Lii et al., 1993) 來顯色。首先以 blocking buffer (normal goat serum) 在 37°C 下水浴 1hr，然後用 buffer A (含 0.15mM NaCl, 0.1% Tween-20 及 25mM Tris) 洗四次後，再依次分別用 CA III 抗血清、biotinylated secondary antibody 及 avidin-peroxidase complex 在 37°C 下培養 1hr；每次處理間並用 buffer A 洗四次，一次 5 分鐘。最後則以含 0.012% H₂O₂ 及 0.01% 3,3-diaminobenzidine 的溶液來顯色。顯色後每一代表不同 CA III 形式的條帶，其顏色增減，即可利用 image analysis system 來測試，並依此計算出 CA III 於氧化緊迫時，有否形成 CA III-GSH mixed disulfides。

(五)、脂質過氧化(lipid peroxidation)

A、原理：

利用脂質過氧化產物malondialdehyde(MDA),在酸性環境下，可與二分子thiobarbituric acid(TBA)縮合成一紅色物質，在excitation 515nm及emission 555nm下，利用螢光光譜儀測量MDA的濃度。

B、方法：(Fraga et al.,1988)

- (1)Standard:首先將1,1,3,3-tetramethoxypropane(TMP)調配成濃度為100uM，並取適當量如C所述。
- (2)樣品:0.5g肝臟均質於5ml 50mM potassium phosphate buffer (pH7.0)中，取0.1ml均質液加上0.4ml 50mM potassium phosphate buffer使成0.5ml。
- (3)(1)及(2)分別依次加入0.5ml 3% SDS、2.0ml 0.1N HCl、0.3ml 10% phosphotungstic acid及1ml 0.7% thiobarbituric acid並混合均勻。
- (4)在沸水中30分鐘。
- (5)冷卻後，加入5ml 1-butano萃取MDA。
- (6)以3000rpm離心15分鐘，取上層液。
- (7)在excitation 515nm及emission 555nm測其濃度。
- (8)濃度以每mg蛋白質有多少nmole MDA產生來表示。

C、標準曲線:利用100uM TMP來製備

50mM PPI(ul)	:	0	400	450	475	495	497.5	499.5
100uM TMP(ul)	:	500	100	50	25	5	2.5	0.5
nmole	:	50	10	5	2.5	0.5	0.25	0.05

(六)、GSH/GSSG分析：(Reed et al.,1980)

A、原理：

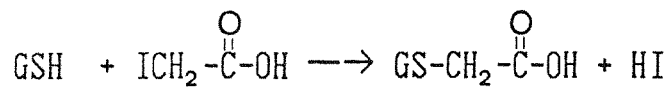
(1)Perchloric acid(PCA)的反應

先利用PCA使細胞蛋白質沈澱，如此酸溶解的GSH及GSSG即溶於PCA溶液中，將PCA溶液取出即可用來分析GSH。PCA之所以被使用於酸液，是由於還原態GSH在PCA溶液中較不易自行氧化成GSSG。

(2)Phenanthroline可將鐵去除，避免GSH氧化。

(3)Iodoacetic acid(IAA)的反應：

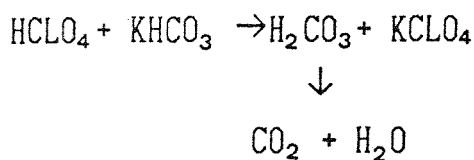
與GSH結合後，給予GSH帶一負電荷，使其在HPLC中能比GSSG早分離出來。



(4)FDNB的反應：

可與硫氫反應，再利用UV detector偵測。

(5)KHCO₃反應：中和酸液成微鹼性



B、標準品準備：

- (1)稱取GSH 0.0017g或GSSG 0.0036g。
- (2)溶於100ul 5%PCA(含2.5mM Phenanthroline)中。
- (3)取(2)溶液10ul溶於490ul 5%PCA。
- (4)取(3)溶液100ul溶於900ul 5%PCA。
- (5)GSH與GSSG最終濃度則為50uM。

C、樣品準備：

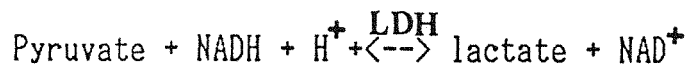
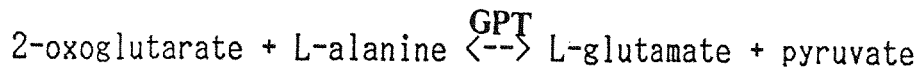
- (1) 取0.5g肝臟均質於5ml 50mM potassium phosphate buffer (pH7.0) 中。
- (2) 取400ul肝臟均質液以1:1比例與10% PCA(含2.5mM Phenanthroline) 混合，靜置15-30分鐘。
- (3) 以4000-5000rpm離心3分鐘。
- (4) 取上層液。

D方法：

- (1) 取standard或sample400ul。
- (2) 加入40ul IAA(240mg/ml)。
- (3) 緩慢加入potassium bicarbonate直到不起泡為止。
- (4) 置於暗處15分鐘後，取出加入440ul 3%FDNB(溶於100% ethanol中) 並振盪混合。
- (5) 冷藏至少8小時。
- (6) 取出並於5000rpm下離心3分鐘。
- (7) 取上層液並以syringe filter過濾。
- (8) 以HPLC分析。

(七)、Glutamate-pyruvate transaminase(GPT)活性分析

(A)、原理：



(B)、方法：

(1)從老鼠頸靜脈抽取血液5ml，並收集於含抗凝血劑(tetrasodium EDTA;1mg/ml blood)試管中，置於室溫2小時後，以3000rpm離心15分鐘後，取出血漿。

(2)利用GPT assay kit(Sigma Chemical CO.)來測定。

Reagent A:

L-alanine(1040mmole/L)、phosphate buffer pH7.4(104mmole/L)
、NADH(0.234mmole/L)、LDH(1560 U/L)

Reagent B:

2-oxoglutarate(234mmole/L)

(3)以d.d.H₂O作blank。

(4)將2.5ml reagent A、0.25ml reagent B及0.5ml plasma混合，在25°C恆溫下於340nm測定四分鐘。

(5)利用下列公式算出血漿中GPT活性：

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

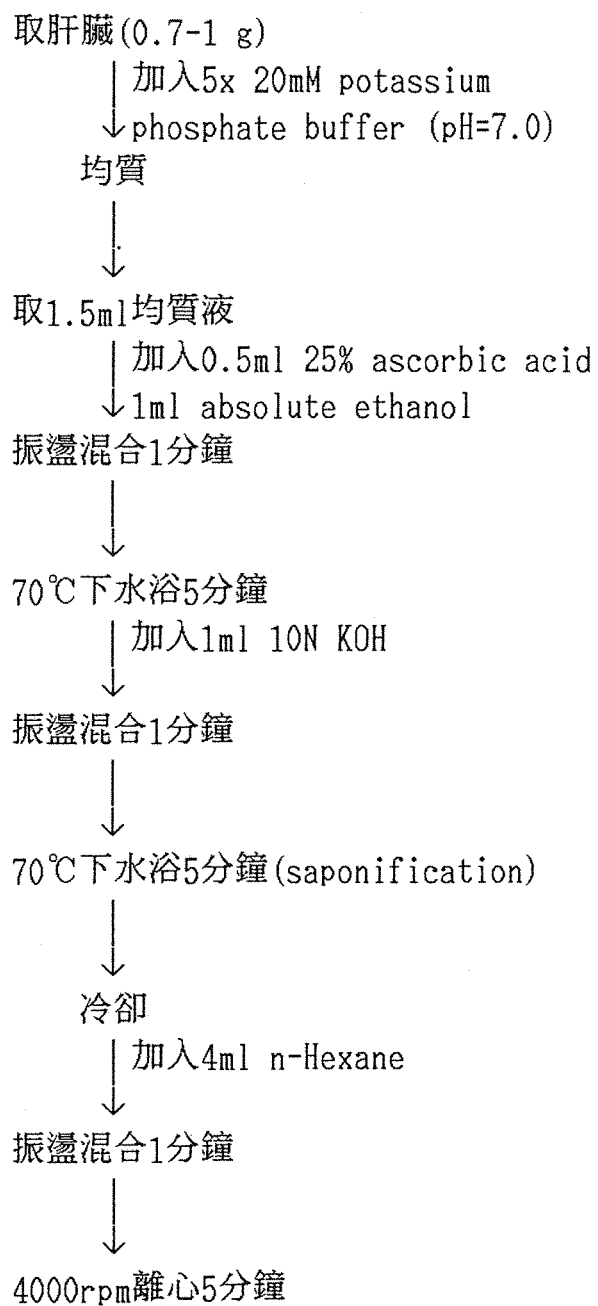
TV: total volume(ml), SV=sample volume(ml)

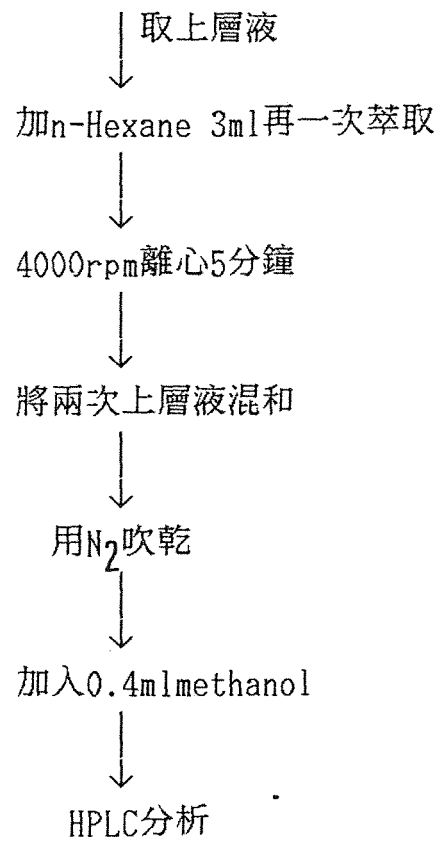
6.22: 在 340nm 時, NADH的millimolar absorptivity

LP: light path(1 cm)

$$\begin{aligned} \text{GPT(U/L)} &= (\Delta A/\text{min} \times 3.25 \times 1000) / (6.22 \times 1.0 \times 0.5) \\ &= (\Delta A/\text{min}) \times 1045 \end{aligned}$$

(八) 肝中 α -Tocopherol 測定





(九)、蛋白質濃度測定：以Lowry(1951)等報告的方法來分析

A、樣品來源：

- (1)取0.5g肝臟加入5ml 50mM potassium phosphate buffer(pH7.0)並均質。
- (2)取30ul均質液加入等量10% Trichloric acid(TCA)，靜置30分鐘。
- (3)以10,000rpm離心3分鐘。
- (4)捨去上層液，加入1ml 1N NaOH將沉澱蛋白質溶解。

B、標準曲線製備：

- (1)稱取BSA(bovine serum albumin)使在d.d.H₂O中成1mg/ml。
- (2)在280nm下測其吸光值，現假設其吸光值為0.493。
- (3)BSA之 $\epsilon_{1\text{cm}}^{280} = 0.667$
則先前所調配BSA溶液為實際濃度 $0.493/0.667 = 0.77\text{mg/ml}$ 。
- (4)取875ul BSA溶液加入125ul 8N NaOH使成為1N NaOH-BSA溶液，此時BSA濃度將為0.65mg/ml。
- (5)最後再以濃度為0.65mg/ml的BSA溶液772.2ul加上227.8ul的1N NaOH溶液，使BSA最後濃度成為每ml含有0.5mg。

(6) 標準曲線：

1N NaOH (ul)	100	96	92	88	84	80	76	72	68	64
BSA(ul, 0.5mg/ml)	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36
BSA (ug)	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18

C、蛋白質濃度測定：

- (1) Standard依標準曲線製備，蛋白質樣品則取適量，但最終體積則為100ul，如不足100ul則以1N NaOH來調整。
- (2) 加入200uld.d.H₂O。
- (3) 加入100ul如下混合液：25% Na₂CO₃、2% Na-K-tartrate、1% CuSO₄分別以8:1:1比例混合。
- (4) 室溫靜置十分鐘。
- (5) 加1ml Folin reagent(Folin:H₂O=1:19.5)。
- (6) 37°C水浴20分鐘。
- (7) 室溫下冷卻。
- (8) 用分光光譜儀，於波長660nm下測其吸光值。

(十)、統計分析：

統計分析將以analysis of variance(ANOVA)來分析，並以Student's t-test來測試處理間顯著差異效果(p<0.05)。

第 參 章 實 驗 結 果

一、CA Ⅲ 抗血清靈敏度之分析：

本實驗使用不同劑量(2.5-240ng)的純化CA Ⅲ，首先利用等電點電泳法(IEF)將蛋白質分離後，再以西方墨點法(Western blotting)將之轉移到醋酸纖維膜上，並利用CA Ⅲ antiserum來偵測(圖一)。結果指出僅需20ng的CA Ⅲ便可偵測出。

二、CA Ⅲ 發生glutathionation後在電泳膠片上移動型態：

不同S-glutathionated CA Ⅲ 型態，在電泳下的移動型態及位置如圖二所示，lane 1及2使用純化CA Ⅲ，lane 3~5則是肝臟均質液，從圖形明顯看出CA Ⅲ 在兩種不同來源下，在IEF gel上移動型態完全一致；換言之，在20mM GSSG處理下，reduced CA Ⅲ 可轉變成partially及fully S-glutathionated型態(由於glutathionation導致pI值改變)，至於肝臟均質液如用GSSG處理後再以DTT還原(lane 5)，則原先為partially及fully S-glutathionated CA Ⅲ 均消失不見，而reduced CA Ⅲ 則恢復原狀，並與lane 3未經任何處理者完全相同。在本實驗中亦觀察到以GSSG處理的純化CA Ⅲ (lane 2)，在partially S-thiolated位置上，共出現兩條bands，其中一個較淡，一個較深，此兩種partially s-thiolated bands的出現，指出CA Ⅲ 擁有兩個有活性的硫氫基，並且這兩個硫氫基活性並不相同，其中一個硫氫基較另一個硫氫基活性為高(Chai et al., 1991)。

三、PQ或DQ脂質過氧化(lipid peroxidation)作用(圖三):

在肝臟中，不論是用PQ或DQ處理，均可誘發thiobarbituric acid-reactive substances(TBARS)增加，其中DQ處理組(圖三B)，在40分鐘後，脂質過氧化無論高或低劑量皆明顯較對照組為高($p < 0.05$)。

- PQ處理組(圖三A)，脂質過氧化則在120分鐘後才顯著增加($p < 0.05$)
- 至於不同劑量PQ間對TBARS的比較，則僅在處理240分鐘後，高劑量PQ處理組其TBARS生成明顯較低劑量PQ組為高($p < 0.05$)。不同劑量DQ對TBARS的生成則無差異。

在肺臟中，不論使用PQ或DQ處理(圖四)，脂質過氧化情形與其在肝臟相似，均隨時間增加而增加，與肝臟結果不同者，為PQ在肺臟所造成的傷害較DQ為高。

心臟方面則與肝臟結果相似(圖五)，DQ的脂質傷害較PQ為高。

四、PQ或DQ對血漿中glutamate-pyruvate transaminase (PGPT)活性之影響:

GPT leakage是肝臟受損程度的一種指標；結果指出，在高劑量PQ(圖六A, 40mg/kg bw)處理240分鐘後，PGPT較對照組顯著增加($p < 0.05$)，而低劑量PQ(圖六A, 20mg/kg bw)雖也增加PGPT的活性但並無顯著差異；而高劑量DQ(圖六B；170mg/kg bw)則在40分鐘處理後，即顯著較對照組老鼠有較高PGPT活性；低劑量DQ則在240分鐘處理後，才顯著增加血漿中GPT活性($P < 0.05$)。

雖然PQ或DQ處理對PGPT的活性的影響與其對TBARS的影響有相似結果，但是，對增加GPT leakage的程度而言，DQ效果雖也較PQ為高，但兩者之差異並不顯著，不似DQ對肝中TBARS的作用明顯較PQ為高。

五、PQ或DQ對Vit E濃度之影響:

DQ處理後TBARS明顯增加，且增加的程度較PQ來得顯著(圖三)，因此我們以經DQ注射後老鼠肝中Vit E濃度變化情形，來印證Vit E消耗與TBARS產生的相關性。結果顯示，老鼠在DQ處理後，其肝中Vit E濃度確有降低現象，而且在高劑量DQ處理120分鐘後(表一)，VIT E濃度即顯著低於對照組老鼠肝中濃度($p < 0.05$)。

六、PQ或DQ對GSH狀態(GSH status)之影響

對肝臟而言，在低劑量PQ處理下(表二)，reduced GSH及總GSH濃度並未受到明顯影響，而高劑量PQ在240分鐘的處理後，reduced GSH及總GSH濃度則明顯較對照組為低($p < 0.05$)；至於DQ的作用則與PQ類似，雖不同劑量的DQ均有降低reduced GSH及總GSH濃度的現象，但僅在高劑量處理120分鐘下，才有顯著效果($p < 0.05$)。在GSSG濃度影響方面，PQ或DQ不但沒有增加GSSG濃度反而有減少傾向。至於對GSH/GSSG比值方面而言，除了高劑量DQ處理40分鐘有顯著增加($p < 0.05$)外，其它則與對照組相似。

對肺臟或心臟GSH status而言，PQ或DQ處理後的影響與在其肝中的影響是一致的，PQ或DQ可降低reduced GSH及總GSH濃度，對GSH/GSSG比值則無明顯作用，對GSSG濃度也有降低傾向(表三、表四)。

七、PQ或DQ對CA III S-glutathionation之影響

近來，IEF結合Immunoblotting已經成功被利用來分析初代培養肝細胞中CA III在過氧化緊迫時是否發生S-glutathionation(Lii and Hendrich, 1993; Li et al., 1994)，本實驗則更進一步利用此法來偵測老鼠在接受PQ(圖七)或DQ(圖八)處理後，肝中CA III可否發生S-glutathionation。結果指出，CA III在PQ或DQ處理前後，其位於partially或fully S-thiolated位置上的濃度並未能發現有改變。除此以外，我們也觀察到部份停留在partially S-thiolated band上的蛋白質，並未能因DTT的處理而使之完全還原為還原態CA III (lane 1)。

第四章 討論

PQ及DQ經由redox cycling產生reactive oxygen species(如: superoxide anion, H_2O_2 及hydroxyl radical等), 進而誘發脂質過氧化, 已被廣泛接受是造成細胞傷害的主要機轉(Bus & Gibson, 1984; Sandy et al., 1976), 無論是直接分析老鼠呼出氣體中ethane或pentane成份或是分析細胞中MDA或lipid hydroxy acids濃度等, 均可得到類似的結論。

Burk等人(1980)發現老鼠以PQ(78 $\mu\text{mol/kg bw}$)或DQ(19.5 $\mu\text{mol/kg bw}$)處理後, 可增加呼出氣體中ethane及pentane的產生(ethane及pentane分別被認為是n-3或n-6不飽和脂肪酸過氧化產物, 因此也可做為指標), 尤其在硒缺乏老鼠更是明顯; Smith(1987)在另一動物實驗中, 也證實老鼠在DQ以0.1mmole/kg(35 mg/kg)劑量處理1h後, 其ethane及pentane生成較對照組增加有5倍之多; Smith等人(1985)於另一動物實驗中, 以相同劑量0.1mmole/kg處理, 結果老鼠肝中的脂肪過氧化物, lipid hydroxy acids也有大量增加。以上結果, 均明確指出DQ或PQ的確在投與老鼠後, 可導致肝中脂質過氧化發生。此結論與本實驗結果相符合, PQ或DQ處理後明顯可增加TBARS的生成, 並且呈現time-dependent反應(圖三)。雖然也有其它報告指出, DQ或PQ增加脂肪過氧化作用, 僅顯著發生在當動物是缺乏Vit E或Se的狀態下, 或預先以BCNU或diethyl maleate處理的動物中(Bus & Gibson, 1984; Sandy et al., 1986; Rikan et al., 1993; Cagen et al., 1977), 但不管如何, PQ及DQ經由redox cycling產生ROS是無庸置疑的。在本實驗中也明顯看出肝中TBARS的產生, DQ均較PQ顯著(圖三), 而此結果與DQ及PQ對GPT leakage的影響不謀而合, 即DQ造成GPT leakage的程度較PQ為高, 但兩者差異尚未達到顯著效果(圖六)。相反的, 肺中TBARS產生的程度, 卻是PQ高於DQ, 這可能是由於PQ在肺細胞中的利用吸收及堆積, 存有一個特殊但目前尚未清楚的機制所致(Suleimen & Stevens, 1987)。

在前述中，我們了解PQ和DQ確實能在肝細胞誘發氧化傷害，然而它們對GSH的影響又是如何呢？在前面我們曾提到過GSH在肝中存在有毫莫耳濃度之高(Kosower and Kosower, 1978)，並且在肝中扮演藥物代謝，解毒及維持細胞膜完整的重要角色；當有ROS存在時，GSH經由GSH peroxidase作用氧化為GSSG的同時可將ROS還原，而後此生成的GSSG再經由GSH reductase作用還原回GSH。因此，一般認為肝細胞在受到PQ或DQ作用後，細胞內GSSG濃度應會增加。但是，在很多實驗中卻指出細胞內GSSG濃度並未因PQ或DQ的處理而有增加的情形，根據Bus等人(1976)及Smith等人(1976)的實驗報告指出，老鼠肝中GSH reductase活性並不會受到PQ或DQ的影響，因此PQ或DQ誘發產生的GSSG有可能因快速受到GSH reductase作用還原回GSH而未能在肝中堆積。另有一種可能是，受PQ或DQ作用產生的GSSG從肝細胞中被排至膽汁中(Lauterburg et al., 1984; Smith et al., 1985; Smith, 1987)。事實上，PQ或DQ是否誘發GSSG的產生，可由BCNU預先處理的老鼠得到證實，如前所述BCNU是GSH reductase抑制劑，因此如GSSG真有增加，則GSSG將累積在肝細胞內而無法還原回GSH。結果發現，老鼠如先以BCNU處理再給予DQ，膽汁中GSSG濃度的確可顯著增加。本實驗中，我們發現使用高劑量(170mg/kg bw)DQ處理120分鐘後，明顯降低肝細胞內GSH濃度(18.1±8.5 VS 41.0±8.7nmole/mg protein)，即可能是增加GSSG efflux到膽汁的結果。Brigelius等人(1982)利用肝灌注模式(paraquat-perfused rat liver)進行PQ處理，結果亦使肝中GSH量降低，且GSSG由膽汁排出量增加，他們認為肝中GSH濃度的減少，除了膽汁中GSSG排出增加外，改變細胞還原力(例如：降低NADPH濃度)或是刺激protein S-glutathionation形成也可能與此有關。

在肺臟中，不論使用DQ或PQ處理，TBARS增加的情形與其在肝臟造成的結果相似(圖四)，均隨時間增加而增加，與肝臟不同者，為PQ在肺臟所造成傷害較DQ高。在心臟方面則與肝臟結果相似(圖五)，DQ在心臟所造成傷害較PQ高。對心或肺臟中GSH status而言(表三、四)，PQ或DQ處理後的影響與在肝臟影響是一致的，reduced GSH、GSSG及總GSH濃度

有下降情形，至於對GSH/GSSG比值無明顯作用。

前面我們曾提及細胞內GSH濃度減少的可能原因中，有一可能是因為部份GSH與蛋白質發生S-glutathionation的緣故，在本實驗中，我們觀察到高劑量DQ處理後，GSH的確有減少的情形，是否有可能是因為形成S-glutathionated protein？

之前，我們曾介紹蛋白質S-glutathionation機轉是GSSG與protein sulfhydryls groups發生mixed-disulfide exchange所致(Brigelius, 1985)，此一論點，乃根據total protein glutathionation的程度與GSSG/GSH比值有很強相關性。儘管如此，Thomas等人(1990)基於其他發現，隨後提出另一可能機制，因為他們發現S-glutathionation產生時並不一定伴隨有GSSG濃度的改變，例如當巨噬細胞(macrophages)利用phorbol ester處理後，雖GSH氧化並未發生，但protein S-thiolation依舊可見(Rokutan et al., 1991)。因此，他們認為另外一個機制—oxyradical-initiated process是可能的。在此機制下，蛋白質sulfhydryl因受oxyradical直接攻擊而轉變成thiyl radical，而此thiyl radical再與GSH直接作用，而發生S-glutathiolation。此外，Lii and Hendrich(1993)利用selenium-deficient肝細胞為實驗模式，經t-butyl hydroperoxide或menadione處理後發現，CA III S-glutathionation在Se-deficient肝細胞發生的程度比硒充足的肝細胞來得低，在與對照組相較下，僅增加25%，而硒充足的肝細胞內CA III S-glutathionation則增加有90%之多。硒缺乏肝細胞雖然由於其GSH peroxidase活性受到抑制，進而GSH的氧化受到抑制，但仍有部份CA III可與GSH發生反應，由此可見oxyradical-initiated S-glutathionation是可能的。由以上種種結果顯示，本實驗中，PQ或DQ處理後雖未能真正觀察到GSSG濃度的增加，但由TBARS增加的結果可知oxyradical確有產生，CA III因此發生S-glutathionation是可期待的。可是結果卻顯示，在經PQ或DQ處理後，S-glutathionated CA III並未能增加，我們推測可能是由於肝細胞內S-glutathionation發生的同時伴隨有dethiolation所致。

雖然很多報告指出無論利用動物(Keeling, 1982)或分離細胞(Sandy, 1988)或組織(Brigelius et al., 1982), PQ或DQ處理後是可誘發protein S-thiolation, 然而這個結果與其它報告並不是完全一致, 我們認為這可能就是因為protein S-glutathionation產生時, 同時會自發性發生dethiolation所致。Lii等人(1993, 1994)曾觀察到肝細胞在經t-butyl hydroperoxide處理3分鐘後, 所誘發的S-glutathionated CA III 即有dethiolation情形。因此除非S-glutathionation 能被大量誘發, 導致S-glutathionated protein無法有效被還原, 或是在PQ或DQ處理後能快速去偵測S-glutathionated protein的形成, 或是把dethiolation抑制住, 否則可能無法有效觀察到S-glutathionation發生。這或許可以解釋為什麼有些報告中指出, 蛋白質S-glutathionation可在預先以BCNU處理的動物或肝細胞中發現, 一來BCNU可抑制GSSG還原, 因此會有較多GSSG與蛋白質反應, 二來BCNU可能抑制dethiolase活性(Miller et al., 1991)。近來, Nakagawa等人(1992)即報告, 肝細胞經DQ處理後, 確實可提高CA III S-glutathionation, 但是此反應僅于細胞事前先以BCNU處理的才發生。因此PQ或DQ處理後, S-glutathionated CA III 是有可能在初期發生dethiolation。曾經有人提出, S-glutathionated protein的dethiolation有二種方式: 一為經由mixed disulfide exchange自發性產生, 另一為經由dethiolase的酵素反應(Thomas et al., 1990), 比較此二種方式, 後者比前者更有效率(Chai et al., 1991), 因此, 本實驗未能偵測出S-glutathionation有可能是由於dethiolation所致。

至目前為止, 傳統上研究蛋白質形成mixed disulfide方法有:(1) 還原法(Brigelius et al., 1982), 只能就測量的樣品中, 分析利用sodium borohydride還原後所釋出的總低分子量硫醇來判斷, 但是本法缺乏專一性。(2) 硫同位素法(³⁵S)(Collison et al., 1986), 需有抑制蛋白質合成的前置處理, 因此活體內實驗將受到限制。(3) 蛋白質染色等電點電泳法(Coomassie blue-stained IEF gels), 則受限於其染色劑的敏感度。雖然本次實驗未能利用IEF/immunoblotting有效觀察到CA III S-glutathionation發生, 但是相信由於此方法同時兼具專一性與敏感度, 在探討蛋白質S-glutathionation上應是一具有潛力的工具。

第五章 Conclusion (總結) :

- 一、Lipid peroxidation是肝臟受損的重要指標；在本實驗中，PQ或DQ處理確實可使TBARS生成增加。
- 二、本實驗未能偵測出CA III發生S-glutathiolation，可能是由於PQ或DQ所誘發的S-glutathiolation程度，並不是很巨量加上可能同時伴隨有dethiolation所致。
- 三、提供一個兼具專一性與敏感度之有效方法—IEF/immunoblotting，來偵測protein S-glutathiolation發生。本實驗雖未觀察到CA III在PQ或DQ處理下，發生S-glutathiolation，但我們相信此方法仍是個相當有潛力的工具，可用來探討不同蛋白質在過氧化緊迫時，是否發生S-glutathiolation及此反應對蛋白質功能的影響。

§ 參考文獻:

1. Brigelius, R., Lenzen, R., and Sies, H. (1982) Increased in hepatic mixed disulfide and glutathione disulfide levels elected by paraquat. *Biochem. Pharmacol.* 31,1637-1641.
2. Brigelius, R. (1985) Mixed disulfides: Biological functions and increase in oxidative stress. in *Oxidative Stress*. (Sies, H., ed.), pp 243-272. Academic Press, New York.
3. Burk, R.F., Lawrence, R.A., and Lane, J.M. (1980) Liver necrosis and lipid peroxidation in the rat as the result of paraquat and diquat administration; Effects of selenium deficiency. *J. Clin. Invest.* 65,1024-1031
4. Bullivant, C. (1976) Accidental poisoning by paraquat: Report of two cases in man. *Br. Med. J.* 1,1272-1273.
5. Bus, J.S., Aust, S.D., and Gibson, J.E. (1975) Lipid peroxidation : A possible mechanism for paraquat toxicity. *Res. Commun. Pathol. Pharmacol.* 11,31-38
6. Bus, J.S., Cagen, S.Z., Olgaard, M., and Gibson, J.E. (1976) A mechanism of paraquat toxicity in mice and rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 35,501-513.
7. Bus, J.S., and Gibson, J.E. (1984) Paraquat: Model for oxidant-initiated toxicity. *Environ. Health Perspect.* 55,37-46.
8. Cagen, S.Z., and Gibson, J.E. (1977) Liver damage following paraquat in selenium-deficient and diethyl maleate-pretreated mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 40,193-200.
9. Carter, N.D., Hewett-Emmette, D., Jeffery, S., and Tashian, R.E. (1981) Testosterone-induced sulfonamide-resistant carbonic anhydrase isoenzyme of rat liver is indistinguishable from skeletal muscle carbonic anhydrase III. *FEBS Lett.* 128,114-118.

10. Carter, N.D., Jeffery, S., Legg, R., Wistrand, P., and Lonnerholm, G. (1987) Expression of hepatocyte carbonic anhydrase isoenzymes in vitro and in vivo. *Biochem. Soc. Trans.* 15,667-668.
11. Chai, Y.-C., Jung, C.-H., Lii, C.-K., Ashraf, S. S., Hendrich, S., Wolf, B., Sies, H., and Thomas, J. A. (1991) Identification of an abundant S-thiolated protein as carbonic anhydrase III: Characterization of S-thiolation and dethiolation reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* 384,270-278.
12. Collison, M., Beidler, D., Grimm, L.M., and Thomas, J.A. (1986) A comparison of protein S-thiolation (protein mixed-disulfide formation) in heart cells treated with t-butyl hydroperoxide or diamide. *Biochim. Biophys. Acta* 885,58-67.
13. Demaster, B.G., Shirota, F.N., Redfern, B., Goon, D.J.W., and Nagasawa, H.T. (1984) Analysis of hepatic reduced glutathione, cysteine and homocysteine by cation ion-exchange high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatog.* 308,83-91.
14. Garcia, R.G., Hirschberger, L.L., and Stipanuk, M.H. (1988) Measurement of cyst(e)amine in physiological samples by high performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 170,432-440.
15. Holmes, R.S. (1977) Purification, molecular properties and ontogeny of carbonic anhydrase isoforms; Evidence for A, B and C isoenzymes in avian and mammalian tissues. *Eur. J. Biochem.* 78,511-520.
16. Keeling, P.L., Smith, L.L., and Aldridge, W.N. (1982) The formation of mixed disulfides in rat lung following paraquat administration; Correlation with changes in intermediary metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 716,249-257.

17. Kosower, N.S. and Kosower, E.M. (1978) The glutathione status of cells. *Intl. Rev. Cytol.* 54,109-160.
18. Lauterburg, B.H., Smith, C.V., Hughes, H., and Mitchell, J.R. (1984) Biliary excretion of glutathione and glutathione disulfide in the rat. Regulation and response to oxidative stress. *J. Clin. Invest.* 73,124-133.
19. Li, W., Zhao, Y., and Chou, I.-N. (1987) Paraquat-induced cytoskeletal injury in cultured cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 91,96-106.
20. Lii, C.-K., and Suzanne Hendrich (1992) Western blotting of isoelectric focusing gels: A method to detect S-thiolation of carbonic anhydrase III in vivo and in vitro during oxidative stress. PhD Dissertation, Iowa State University, USA.
21. Lii, C.-K., and Hendrich, S. (1993) Selenium deficiency suppresses the S-glutathionation of carbonic anhydrase III in rat hepatocytes under oxidative stress. *J. Nutr.* 123,1480-1486.
22. Lii, C.-K., Chai, Y.-C., Zhao, W., Thomas, J.A., and Hendrich, S. (1994) Effect of S-thiolation and irreversible oxidation of sulfhydryls on carbonic anhydrase III during oxidative stress: A method for studying protein modification in intact cells and tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 309,231-239
23. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193,265-275
24. Meister, A. (1989) Metabolism and function of glutathione. in *Glutathione: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects.* (Dolphin, D., Poulson, R., and Avramovic, O., eds), pp 367-474, part A. John Silley & Sons Inc, New York.

25. Miller, R.M., Park, E.-M., and Thomas, J.A. (1991) Reduction (dethiolation) of protein mixed-disulfides; Distribution and specificity of dethiolating enzymes and N,N'-bis (2-chloroethyl)-N-nitrosourea inhibition of an NADPH-dependent cardiac dethiolase. *Arch. Biochem. Biophys.* 287,112-120.
26. Mills, G.C. (1957) Hemoglobin catabolism, glutathione peroxidation, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* 229,189-197
27. Murray, R.E., and Gibson, J.E. (1972) A comparative study of paraquat intoxication in rats, guinea pigs, and monkeys. *Exp. Mol. Pathol.* 17,313-325.
28. Nakagawa, Y., Moldeus, P., and Cotgreave, I.A. (1992) The S-thiolation of hepatocellular protein thiols during diquat metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 43,2519-2525.
29. Obata, T., and Cheng, S.-Y. (1988) Strip-comb dot immunobinding: A rapid, easy, and sensitive method to screen monoclonal antibodies. *Biotech.* 6,299-303
30. Fraga, C.G., Leibovetz, B.E., and Tappel, A.L. (1988) Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: Characterization and comparison between homogenates and microsomes. *Free Radical Biol. Med.* 4,155-161.
31. Reed, D.J., Babson, J.R., Beatty, P.W., Brodie, A.E., Ellis, W.W., and Potter, D.W. (1980) High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Anal. Biochem.* 106,55-62.
32. Rikans, L.E., and Cai, Y. (1993) Diquat-induced oxidative damage in BCNU-pretreated hepatocytes of mature and old rats. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 118,263-270.

33. Rokutan, K., Thomas, J.A., and Sies, H. (1989) Specific S-thiolation of a 30-kDa cytosolic protein from rat liver under oxidative stress. *J. Biochem.* 179,233-239.
34. Rokutan, K., Thomas, J.A., and Johnston, R.B. Jr. (1991) Phagocytosis and stimulation of the respiratory burst by phorbol diester initiate S-thiolation of specific proteins in macrophages. *J. Immunol.* 147,260-264.
35. Sandy, M.S., DiMonte, D., and Smith, M.T. (1988) Relationship between intracellular vitamin E, lipid peroxidation and chemical toxicity in hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 93,288-297.
36. Sandy, M.S., DiMonte, D., Ross, D., and Smith, M.T. (1986) Role of redox cycling and lipid peroxidation in bipyridyl herbicide cytotoxicity: Studies with a compromised isolated hepatocytes model system. *Biochem. Pharmacol.* 35,3095-3101.
37. Shiel, A., Jeffery, S., Phillips, I.R., Shephard, E.R., Wilson, C.A., and Carter, N.D. (1983) Androgen-linked control of rat liver carbonic anhydrase III. *FEBS Lett.* 128,114-118.
38. Sies, H. (1985) Oxidative stress: Introductory remarks. in *Oxidative Stress*. (Sies, H. ed.), pp 1-8. Academic Press, New York.
39. Smith, C.V. (1987) Effect of BCNU pretreatment on diquat-induced oxidant stress and hepatotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144,415-421.
40. Smith, C.V., Hughes, H., Lauterburg, B.H., and Mitchell, J.R. (1985) Oxidant stress and hepatic necrosis in rats treated with diquat. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 235,172-177.
41. Smith, P., and Health, D. (1976) Paraquat. *Crit. Rev. Toxicol.* 4,411-415.

42. Smith, C.V. (1987) Evidence for participation of lipid peroxidation and iron in diquat-induced hepatic necrosis in vivo. *Mol. Pharmacol.* 32,417-422.
43. Staal, F.J.T., Roederer, M., Israelski, D.M., Bubb, J., Mole, L.A., McShane, D., Deresinski, S.C., Ross, W., Sussman, H., Raju, P.A., Anderson, M.T., Moore, W., Ela, S. W., Herzenberg, L.A., and Herzenberg, L.A. (1992) Intracellular glutathione levels in T cells subsets decrease in HIV-infected individuals. *AIDS Res. Human Retroviruses* 8,305-311.
44. Suleiman, S.A., and Stevens, J.B. (1987) Bipyridylum herbicide toxicity: Effects of paraquat and diquat on isolated hepatocytes. *J. Environ. Toxicol. Oncol.* 7,73-84.
45. Tashian, R.E. (1989) The carbonic anhydrase: Widening perspectives on their evolution, expression, and function. *BioEssays* 10,186-192.
46. Thomas, H.B., Park, E.-M., Chai, Y.-C., Brooks, R., Rokuton, K., and Johnston, R.B. Jr. (1990) S-thiolation of protein sulfhydryls. in *Biological Reactive Intermediate IV; Molecular and Cellular Effects, and Human Impact.* (Synder, R., and Sipes, G., eds), pp95-102. Plenum Publishing Co. New York.
47. vanBerkel, T.J.C., Koster, J.F., and Hulsmam, W.C. (1973) Distribution of L type and M type pyruvate kinase EC-2,7,1,40 between parenchymal and kupffer cells of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 293,118-124.
48. Ziegler, D.M. (1985) Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiol-disulfides in metabolic regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 54,305-329.



Figure 1. The detection of different amounts of CA III by IEF/immunoblotting. Different amounts of purified CA III were applied to IEF gels and immunoblotting were performed as described in Materials and Methods.

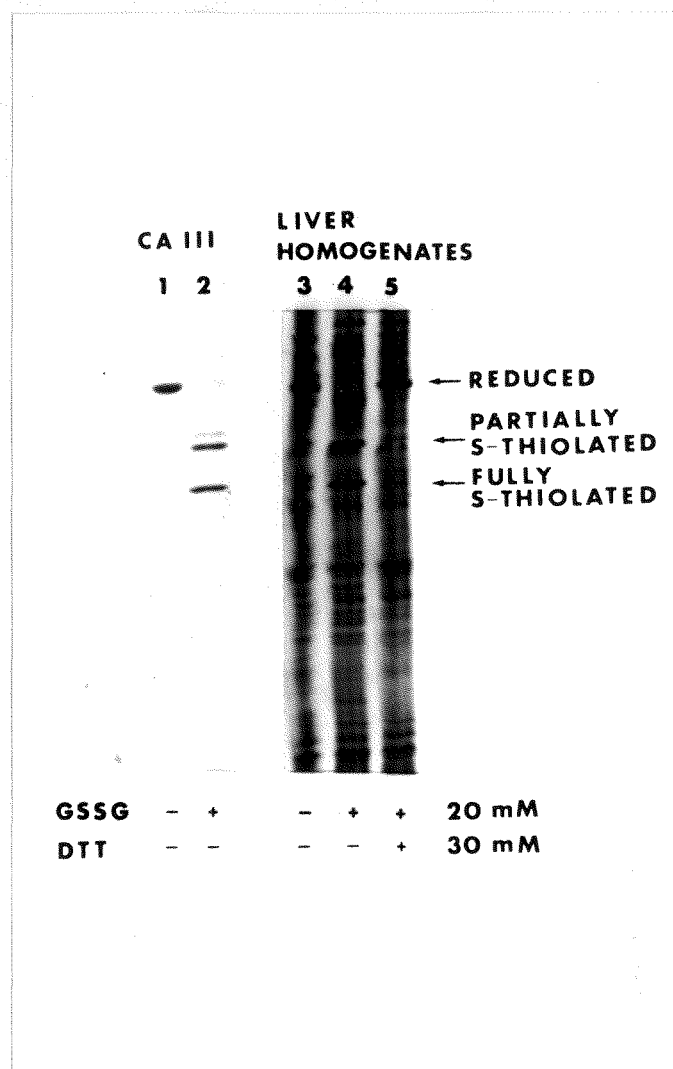


Figure 2. Pattern of CA III S-thiolation (glutathionation) on Coomassie-blue stained IEF gel. Protein glutathionation and IEF were performed as described in Materials and Methods. In each sample, 2 μ g of purified CA III or 80 μ g of total soluble protein from rat liver homogenates were applied to gels, respectively. Lane 1 and 2 show the position of purified CA III before and after incubated with 20 mM GSSG at 30 $^{\circ}$ C for 30 min. Lane 3 to 5 show the migration of CA III bands in liver homogenates. Lane 3 shows the untreated homogenate. Lane 4 shows the homogenate treated with 20 mM GSSG at 30 $^{\circ}$ C for 30 min. Lane 5 shows the homogenate treated with GSSG followed by treatment with 30 mM DTT for an additional 30 min.

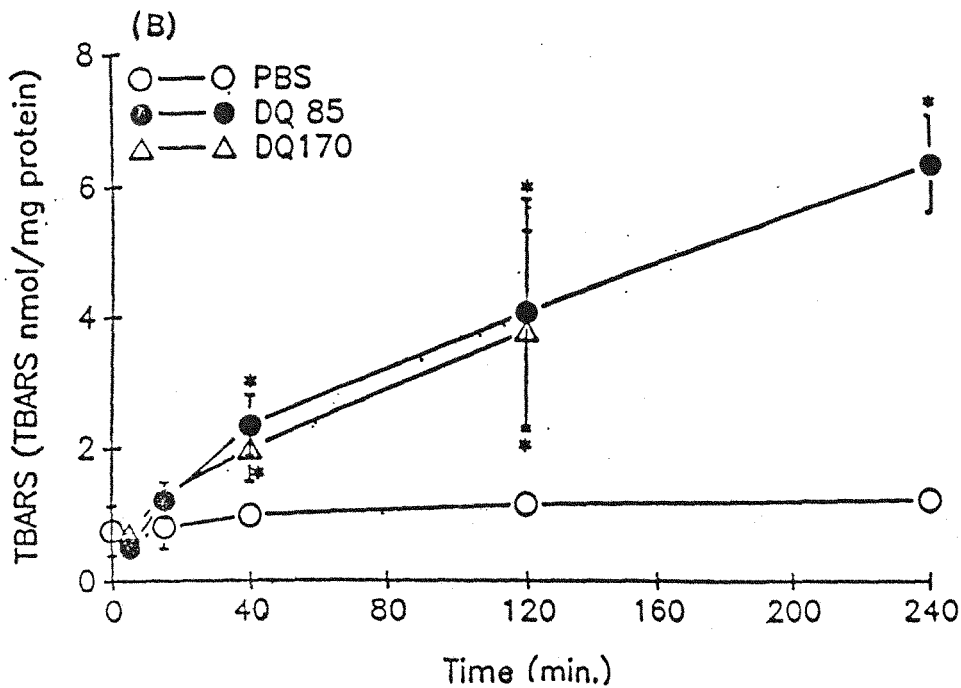
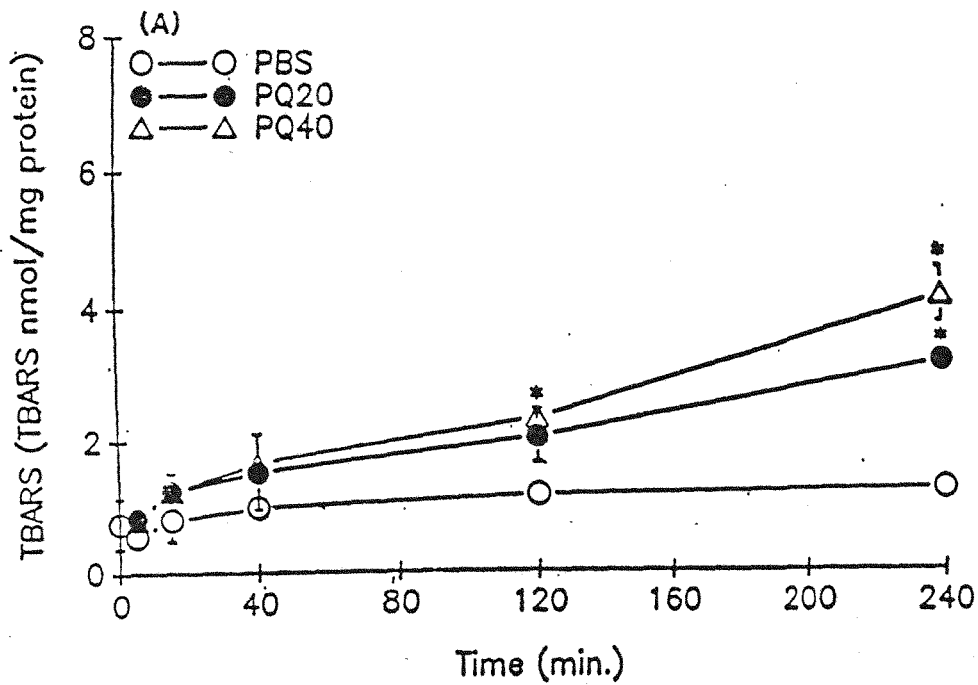


Figure 3. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in rat liver after paraquat (PQ) or diquat (DQ) administration. Samples were collected at 5, 15, 120, or 240 min after injection. See details in Materials and Methods. (A) Rats were administered either 20mg PQ/kg bw, -●-, or 40mg PQ/kg bw, -△-, respectively. (B) Rats were administered either 85mg DQ/kg bw, -●-, or 170mg DQ/kg bw, -△-, respectively. Rats were treated with PBS only, -○-. Each point was average from 4 rats, except groups that treated with 85mg DQ/kg for 240 min and 170mg DQ/kg for 120 min were from 3 rats. *Significant difference of herbicide-treated animals vs. control animals ($p < 0.05$).

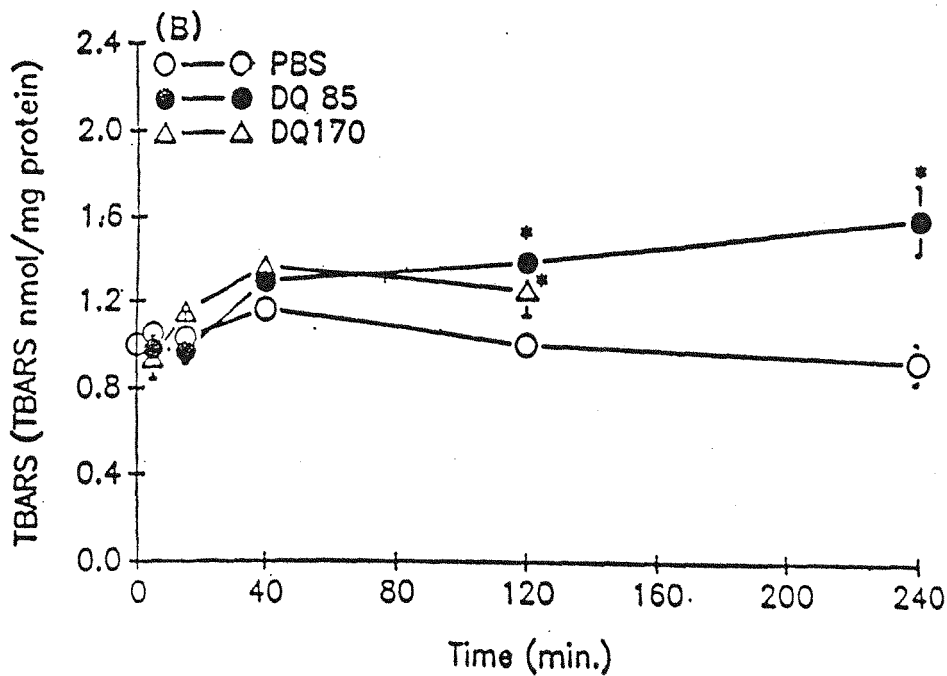
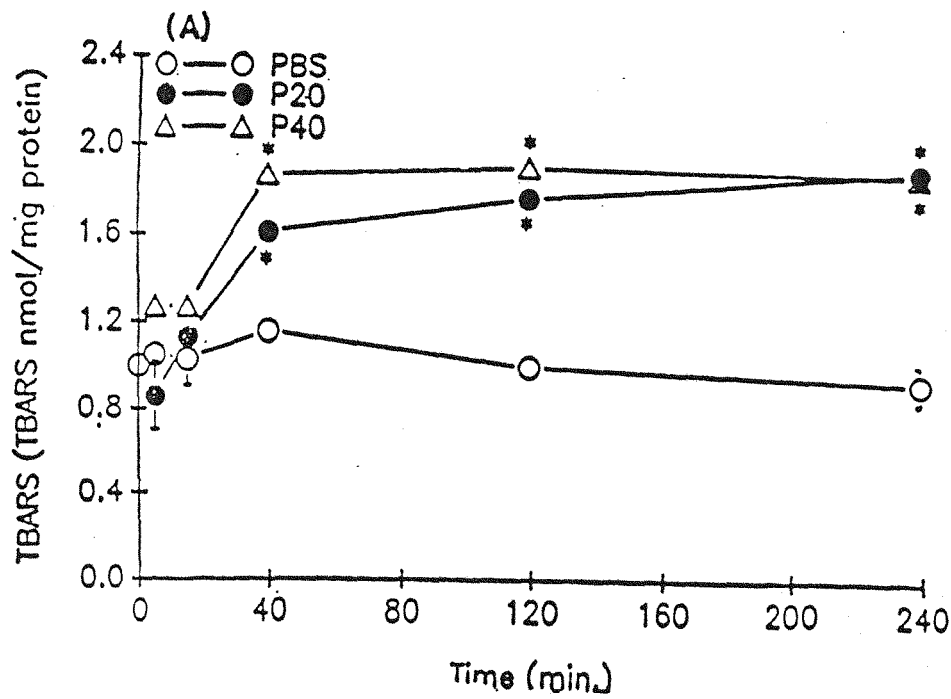


Figure 4. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in rat lung after paraquat (PQ) or diquat (DQ) administration. Samples were collected at 5, 15, 120, or 240 min after injection. See details in Materials and Methods. (A) Rats were administered either 20mg PQ/kg bw, -●-, or 40mg PQ/kg bw, -△-, respectively. (B) Rats were administered either 85mg DQ/kg bw, -●-, or 170mg DQ/kg bw, -△-, respectively. Rats were treated with PBS only, -○-. Each point was average from 4 rats, except groups that treated with 85mg DQ/kg for 240 min and 170mg DQ/kg for 120 min were from 3 rats. *Significant difference of herbicide-treated animals vs. control animals ($p < 0.05$).

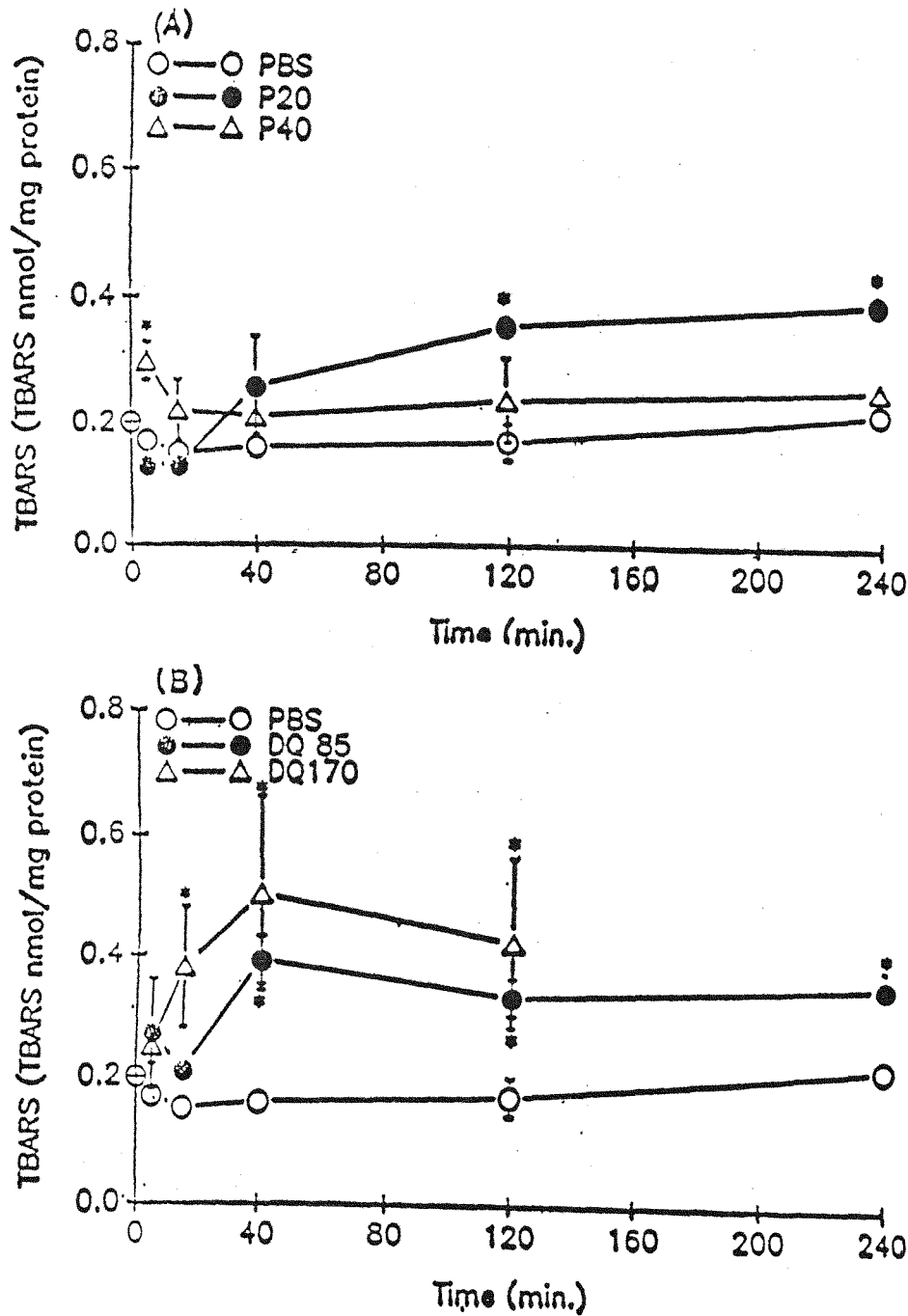


Figure 5. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in rat heart after paraquat (PQ) or diquat (DQ) administration. Samples were collected at 5, 15, 120, or 240 min after injection. See details in Materials and Methods. (A) Rats were administered either 20mg PQ/kg bw, -●-, or 40mg PQ/kg bw, -△-, respectively. (B) Rats were administered either 85mg DQ/kg bw, -●-, or 170mg DQ/kg bw, -△-, respectively. Rats were treated with PBS only, -○-. Each point was average from 4 rats, except groups that treated with 85mg DQ/kg for 240 min and 170mg DQ/kg for 120 min were from 3 rats. *Significant difference of herbicide-treated animals vs. control animals ($p < 0.05$).

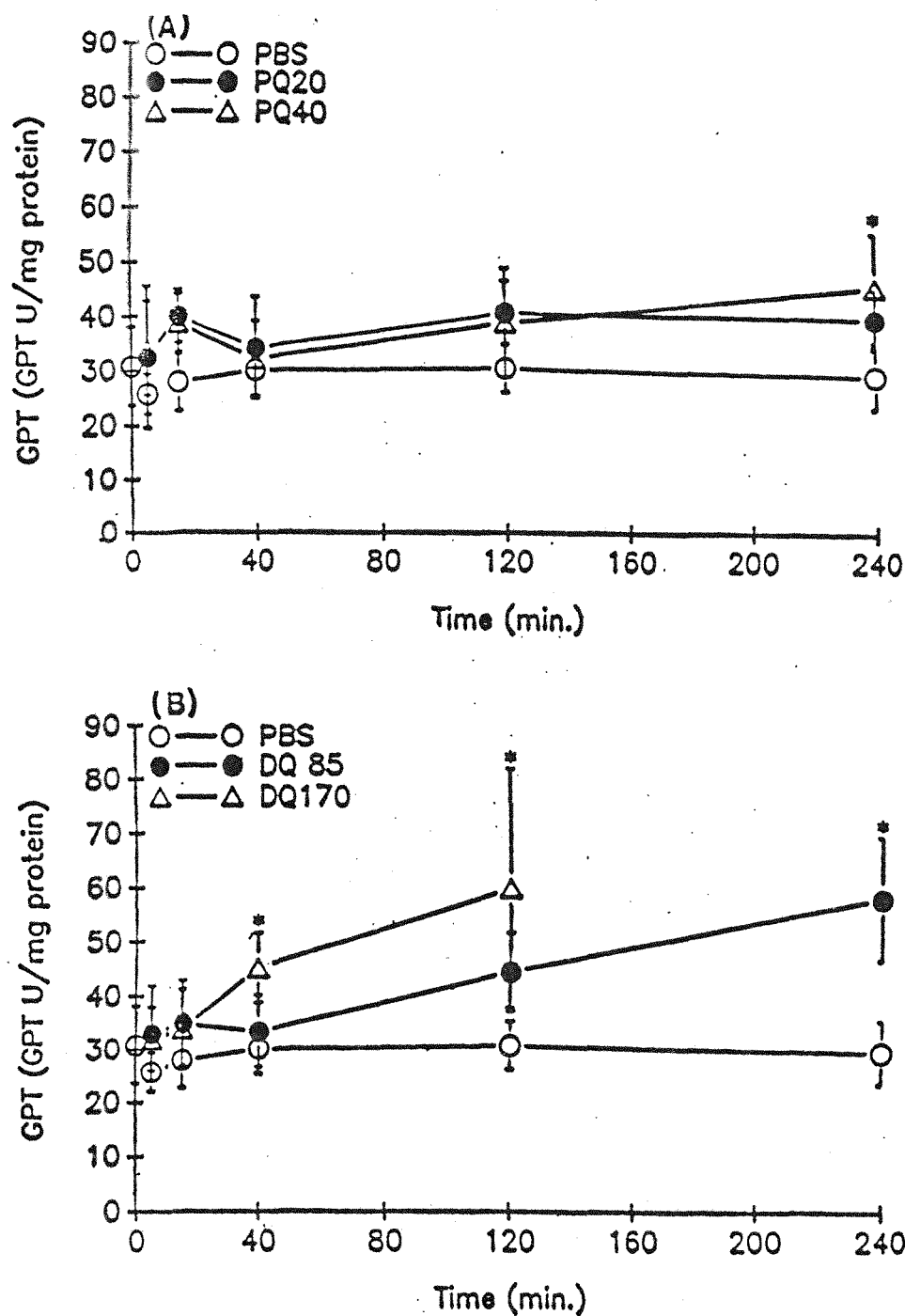


Figure 6. Glutamate-pyruvate (GPT) activity in rat plasma after paraquat (PQ) or diquat (DQ) administration. Samples were collected at 5, 15, 120, or 240 min after injection. See details in Materials and Methods. (A) Rats were administered either 20mg PQ/kg bw, ●-; or 40mg PQ/kg bw, -△-, respectively. (B) Rats were administered either 85mg DQ/kg bw, ●-; or 170mg DQ/kg bw, -△-, respectively. Rats were treated with PBS only, ○-. Each point was average from 4 rats, except groups that treated with 85mg DQ/kg for 240 min and 170mg DQ/kg for 120 min were from 3 rats. One unit of GPT activity represented one μ mole of NADH was oxidized per min per liter of plasma. *Significant difference of herbicide-treated animals vs. control animals ($p < 0.05$).

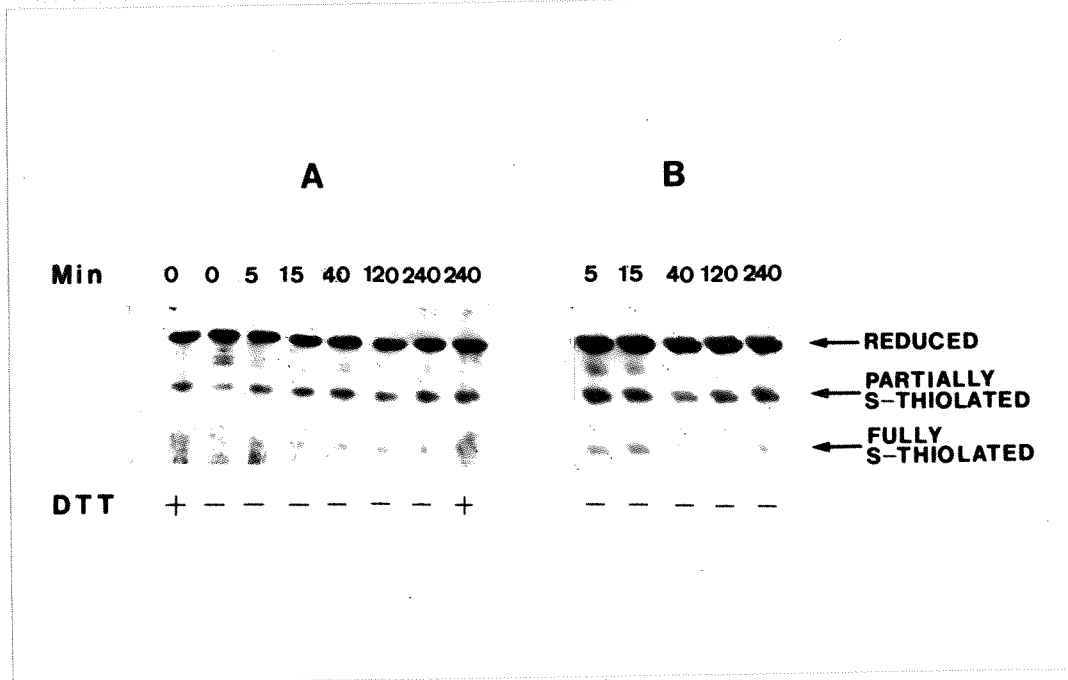


Figure 7. Western blotting of isoelectric focusing (IEF) gels in detecting the modification of carbonic anhydrase III in paraquat-treated rats. Rats were administered intraperitoneally with (A) 20 or (B) 40 mg/kg of body weight for time as indicated. S-thiolation was analyzed as described in Materials and Methods. For each sample, 1.6 μ g of soluble protein from rat liver was applied to an IEF gel. Dithiothreitol (DTT) was used as a reducing agent in designating samples.

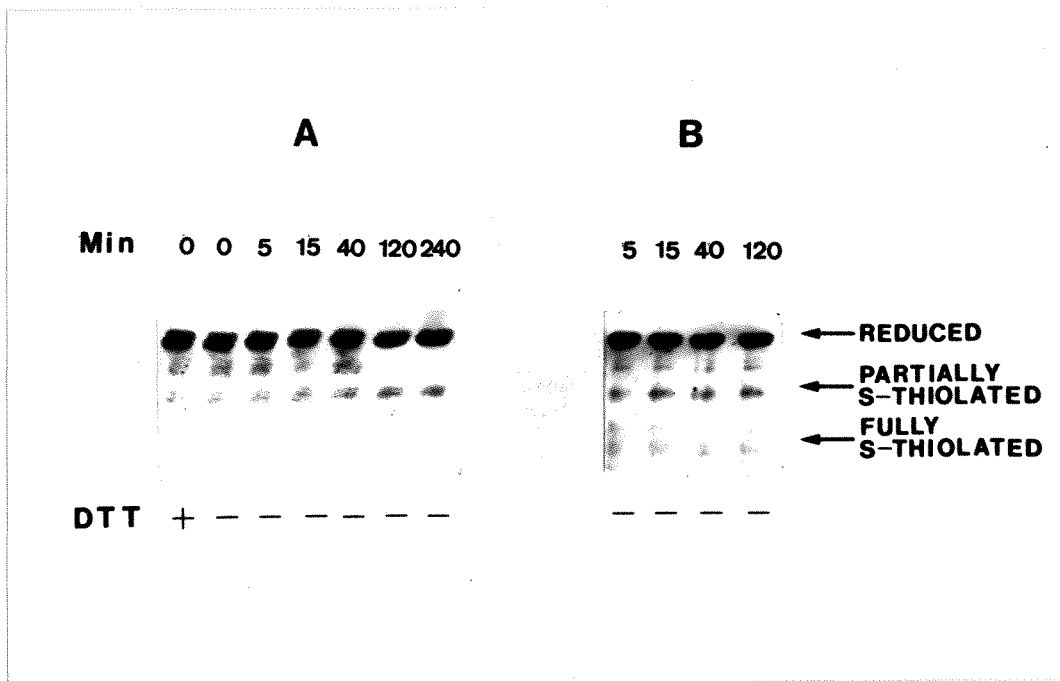


Figure 8. Western blotting of isoelectric focusing (IEF) gels in detecting the modification of carbonic anhydrase III in diquat-treated rats. Rats were administered intraperitoneally with (A) 85 or (B) 170 mg/kg of body weight for time as indicated. S-thiolation was analyzed as described in Materials and Methods. For each sample, 1.6 μ g of soluble protein from rat liver was applied to an IEF gel. Dithiothreitol (DTT) was used as a reducing agent in designating samples.

Table 1. Effect of diquat at different dosage on hepatic vit E level at various time after administration^a.

Time	Chemical	Dosage	n	Vit. E
min		mg/kg bw		ug/g liver
0	PBS		4	19.9 ± 2.4
5			4	20.1 ± 1.4
15			4	20.6 ± 2.6
40			4	18.7 ± 4.9
120			4	22.9 ± 1.1
240			4	21.8 ± 1.6
5	DQ	85	4	19.0 ± 3.8
15			4	17.5 ± 2.9
40			4	19.8 ± 4.5
120			4	19.3 ± 4.3
240 ^c			3 ^b	18.4 ± 2.6
5	DQ	170	4	19.9 ± 5.6
15			4	22.4 ± 3.5
40			4	19.9 ± 1.9
120			3 ^b	16.4 ± 2.8*
240 ^c				

^a10 Week old male rats were given intraperitoneally with diquat for time as indicated. See details in Materials and Methods. Data are expressed as means ± standard deviation. DQ=diquat.

^bone of four rats died before complete study.

^cno rats survived for 240 min.

*DQ-treated-animals vs. PBS-treated animals at correspondent time, p<0.05.

Table 2. Effect paraquat or diquat at different dosage on hepatic GSH, GSSG, and GSH/GSSG ratio at various time after administration^a.

Time	Chemical	n	GSH	GSSG	GSH/GSSG ratio	Total
			nmole/mg protein			
min						
0	PBS	4	37.1 ± 8.4	0.99 ± 0.30	38.3 ± 4.4	30.01 ± 9.0
5		4	31.9 ± 3.9	1.22 ± 0.19	28.3 ± 2.8	34.4 ± 4.2
15		4	35.8 ± 6.7	1.21 ± 0.12	30.1 ± 8.8	38.0 ± 6.5
40		4	33.3 ± 5.7	1.14 ± 0.22	29.5 ± 2.8	35.5 ± 6.1
120		4	37.0 ± 5.0	1.20 ± 0.21	31.2 ± 2.5	39.4 ± 5.4
240		4	41.0 ± 8.7	1.25 ± 0.25	33.0 ± 1.8	43.4 ± 6.2
5	dQ85	4	31.4 ± 7.9	0.89 ± 0.21	35.3 ± 6.5	32.8 ± 8.2
15		4	35.8 ± 8.8	0.96 ± 0.29	42.7 ± 6.7	37.5 ± 9.2
40		4	28.3 ± 9.6	0.73 ± 0.33*	39.1 ± 3.6*	29.9 ± 10.0
120		4	26.5 ± 5.7	1.00 ± 0.31	28.0 ± 9.3	28.5 ± 5.8
240 ^c		3 ^b	30.2 ± 10.8	0.84 ± 0.39	43.1 ± 10.8	31.9 ± 6.5
5	DQ170	4	25.1 ± 2.5	0.82 ± 0.19*	32.3 ± 8.6	26.8 ± 2.1
15		4	28.3 ± 3.0	0.81 ± 0.11*	35.1 ± 0.5	29.9 ± 3.2
40		4	28.3 ± 7.2	0.84 ± 0.08	34.0 ± 9.0	29.9 ± 7.3
120		3 ^b	18.1 ± 8.5*	1.21 ± 0.40	20.1 ± 10.9	20.1 ± 8.2
240 ^c						
5	PQ20	4	31.8 ± 11.0	0.89 ± 0.21	33.6 ± 7.2	33.7 ± 11.2
15		4	32.3 ± 4.1	0.95 ± 0.15	34.2 ± 3.8	34.2 ± 1.5
40		4	33.1 ± 10.7	1.00 ± 0.10	35.1 ± 5.8	35.1 ± 5.8
120		4	30.8 ± 9.9	0.89 ± 0.11*	32.6 ± 5.2	32.6 ± 5.2
240		4	28.5 ± 10.1	0.79 ± 0.17*	30.1 ± 5.5	30.1 ± 5.5
5	PQ40	4	32.8 ± 10.5	1.00 ± 0.17	34.8 ± 10.5	34.8 ± 10.3
15		4	31.4 ± 1.6	1.23 ± 0.27	33.5 ± 1.5	33.5 ± 1.5
40		4	25.4 ± 5.5	0.81 ± 0.21	27.0 ± 5.4	27.0 ± 5.4
120		4	27.6 ± 4.1	0.85 ± 0.22*	29.3 ± 4.0	29.3 ± 4.0
240		4	26.7 ± 5.3*	0.94 ± 0.19	28.4 ± 5.5	28.4 ± 3.2*

^a10 Week old male rats were given intraperitoneally with paraquat or diquat for time as indicated. See details in Materials and Methods. Data are expressed as means ± standard deviation. PQ=paraquat; DQ=diquat.

^bone of four rats died before complete study.

^cno rats survived for 240 min.

*DQ or PQ-treated-animals vs. PBS-treated animals at correspondent time, p<0.05.

Table 3. Effect paraquat or diquat at different dosage on pulmonary GSH, GSSG, and GSH/GSSG ratio at various time after administration^a.

Time	Chemical	n	GSH	GSSG	GSH/GSSG ratio	Total
min	nmole/mg protein					
0	PBS	4	17.03±0.79	0.73±0.15	24.39±5.94	18.53±0.82
5		4	20.31±1.55	1.02±0.18	19.43±3.41	22.49±2.03
15		4	20.41±6.30	1.05±0.22	18.99±2.10	22.51±3.39
40		4	22.07±1.17	0.98±0.09	22.71±1.30	24.03±1.02
120		4	20.13±1.39	1.02±0.03	19.88±1.89	22.17±1.33
240		4	22.20±2.74	1.00±0.14	22.63±3.87	24.20±2.76
5	DQ85	4	20.80±1.61	0.94±0.23	23.18±4.58	22.69±1.97
15		4	14.27±1.43*	0.51±0.05*	28.28±4.09*	15.39±1.29*
40		4	16.72±2.29*	0.62±0.12*	27.22±1.50	17.96±2.52*
120		4	15.95±3.00	0.71±0.12*	22.81±4.38	17.37±3.12
240 ^c		3 ^b	16.00±2.00*	0.63±0.15	22.81±2.40	15.26±2.28*
5	DQ170	4	17.73±0.35	0.59±0.07*	27.31±5.03	18.91±0.22
15		4	16.37±4.71	0.60±0.28*	24.68±3.44	17.57±5.28
40		4	20.05±3.59	0.84±0.37	24.03±5.24	21.74±4.08
120		3 ^b	17.02±0.38*	0.59±0.34*	21.33±4.22	18.20±0.56*
240 ^c						
5	PQ20	4	17.42±0.60	0.67±0.11*	25.84±3.84	18.77±0.82
15		4	16.43±2.46	0.65±0.09*	24.15±5.54	17.73±2.58
40		4	18.48±0.44	0.83±0.19	21.27±4.26	20.14±0.44
120		4	17.74±0.76	0.99±0.03	18.80±1.10	19.72±0.81
240		4	17.50±0.45*	0.80±0.12	22.64±3.85	19.11±0.41
5	PQ40	4	20.41±1.98	1.06±0.02*	17.94±0.63	22.54±2.03
15		4	19.88±0.56	1.04±0.17	19.70±3.51	21.96±0.71
40		4	16.35±2.42*	0.61±0.05*	23.27±3.05	15.54±2.49
120		4	16.82±2.10*	0.88±0.08	16.94±2.24	16.57±2.17*
240		4	16.60±1.98*	0.93±0.18	16.32±3.88	16.45±1.99*

^a10 Week old male rats were given intraperitoneally with paraquat or diquat for time as indicated. See details in Materials and Methods. Data are expressed as means ± standard deviation. PQ=paraquat; DQ=diquat.

^bone of four rats died before complete study.

^cno rats survived for 240 min.

*DQ or PQ-0treated-animals vs. PBS-treated animals at correspondent time, p<0.05.

Table 4. Effect paraquat or diquat at different dosage on cardio GSH, GSSG, and GSH/GSSG ratio at various time after administration^a.

Time	Chemical	n	GSH	GSSG	GSH/GSSG ratio	Total
nmole/mg protein						
min						
0	PBS	4	13.68±0.73	0.88±0.03	15.59±0.28	15.43±0.28
5		4	13.13±0.80	1.09±0.20	12.31±1.85	15.40±1.31
15		4	12.01±0.76	0.92±0.04	12.69±1.16	13.80±0.68
40		4	11.92±1.14	1.01±0.07	11.85±1.29	13.94±1.16
120		4	12.46±2.30	0.90±0.12	13.70±2.54	13.93±2.82
240		4	12.78±1.40	1.13±0.16	11.40±0.43	15.03±1.72
5	DQ85	4	11.89±0.78	0.97±0.05	12.24±0.24	13.83±0.87
15		4	9.16±1.70	0.95±0.14	10.12±3.32	11.06±1.43
40		4	10.60±0.09	0.98±0.14	11.10±1.69	12.56±0.29
120		4	9.59±0.45	0.66±0.12	14.85±2.23	10.92±0.67
240 ^c		3 ^b	11.34±3.69	0.90±0.13	12.80±4.72	13.15±3.72
5	DQ170	4	12.67±0.82	0.88±0.21	15.41±4.07	14.42±1.10
15		4	14.94±0.63	1.00±0.19	15.48±2.58	16.93±1.01
40		4	12.60±0.76	0.75±0.04*	16.75±0.96*	14.10±0.81
120		3 ^b	11.19±2.26	0.87±0.08	12.85±1.79	12.92±2.39
240 ^c						
5	PQ20	4	11.76±1.41	0.65±0.05*	18.05±1.23	13.06±1.50
15		4	10.18±1.74	0.59±0.05*	17.04±1.51	11.37±1.83
40		4	11.37±1.00	0.67±0.05*	16.87±0.32	12.72±1.10
120		4	13.41±3.24	0.72±0.11	18.57±3.74	14.85±3.37
240		4	9.27±0.24*	0.66±0.12	14.44±2.19	10.58±0.65*
5	PQ40	4	11.48±1.77	0.70±0.13	16.50±0.63	12.88±2.03
15		4	12.66±1.04	0.73±0.15	17.80±2.49*	14.06±1.36
40		4	12.47±1.19	0.67±0.07*	18.60±1.51*	13.82±1.28
120		4	11.48±0.31	0.63±0.09*	18.58±2.67*	12.74±0.22
240		4	10.57±1.19	0.57±0.05*	18.86±3.63*	11.71±1.11

^a10 Week old male rats were given intraperitoneally with paraquat or diquat for time as indicated. See details in Materials and Methods.

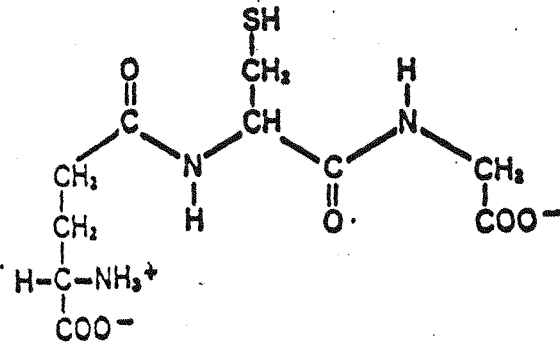
Data are expressed as means ± standard deviation. PQ=paraquat; DQ=diqua

^bone of four rats died before complete study.

^cno rats survived for 240 min.

*DQ or PQ-treated-animals vs. PBS-treated animals at correspondent time, p<0.05.

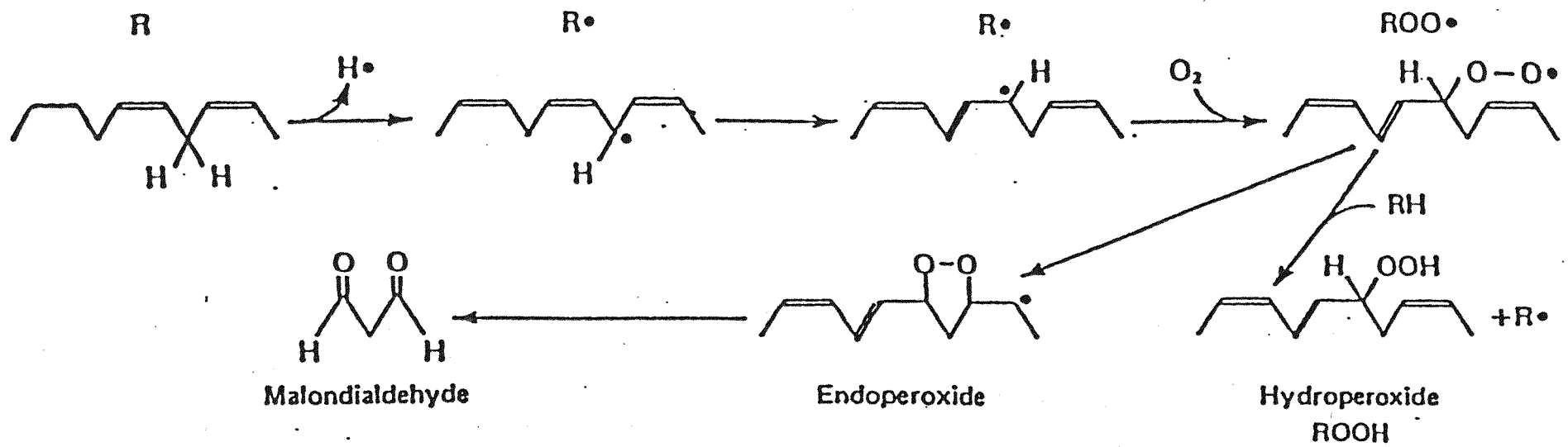
附錄



Glutathione (γ -glutamyl-cysteinyl-glycine).

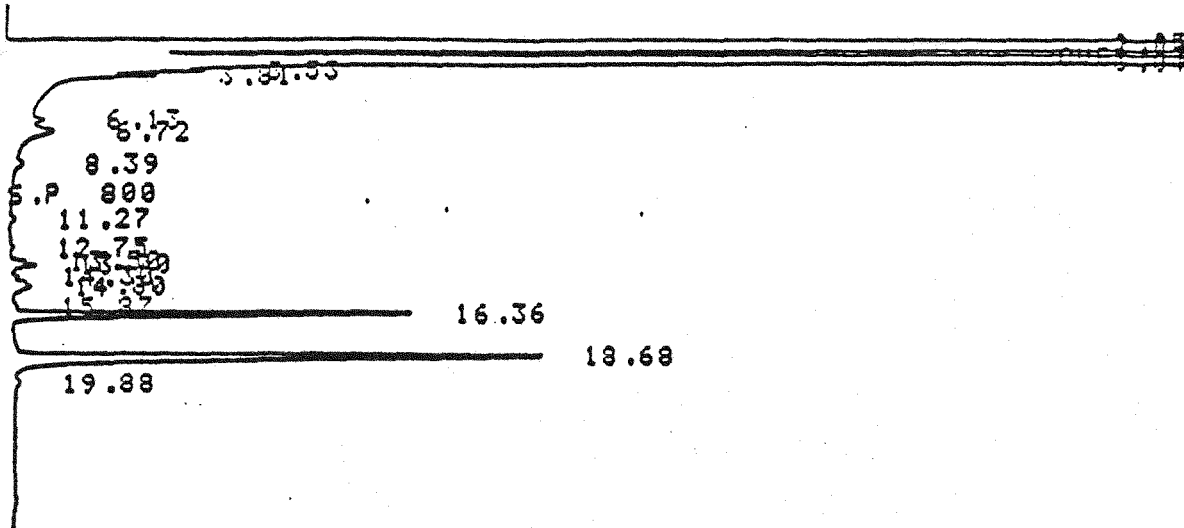
圖 4-6 穀胱甘肽(glutathione)的構造式。

(來源:Haper's Biochemistry, Murray,R.K. et al.,1988)



附圖五、脂質過氧化產生自由基的過程。

(來源:Haper's Biochemistry, Murray,R.K. et al.,1988)



D-2500

05/21/94 04:50

METHOD: TAG: . 2 CH: 1

FILE: 9 CALC-METHOD: AREA% TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC
1	1.95	2942194	9.415	BU
2	2.04	3333913	10.669	UU
3	2.20	3349944	10.720	UU
4	3.04	20618556	65.983	UU
5	3.53	12201	0.039	TBB
6	3.81	20921	0.067	TBB
7	6.13	9802	0.031	TBU
8	6.72	44607	0.143	TUB
9	8.39	7088	0.023	TBB
10	11.27	4976	0.016	BB
11	12.75	1418	0.005	BB
12	13.50	2660	0.009	BB
13	13.70	6583	0.021	BB
14	14.30	1829	0.006	BB
15	14.80	20961	0.067	BB
16	15.87	1407	0.005	BB
17	16.36	290644	0.930	BB
18	18.68	573949	1.837	BB
19	19.88	4812	0.015	BB

TOTAL 31248465 100.000

PEAK REJ : 1000

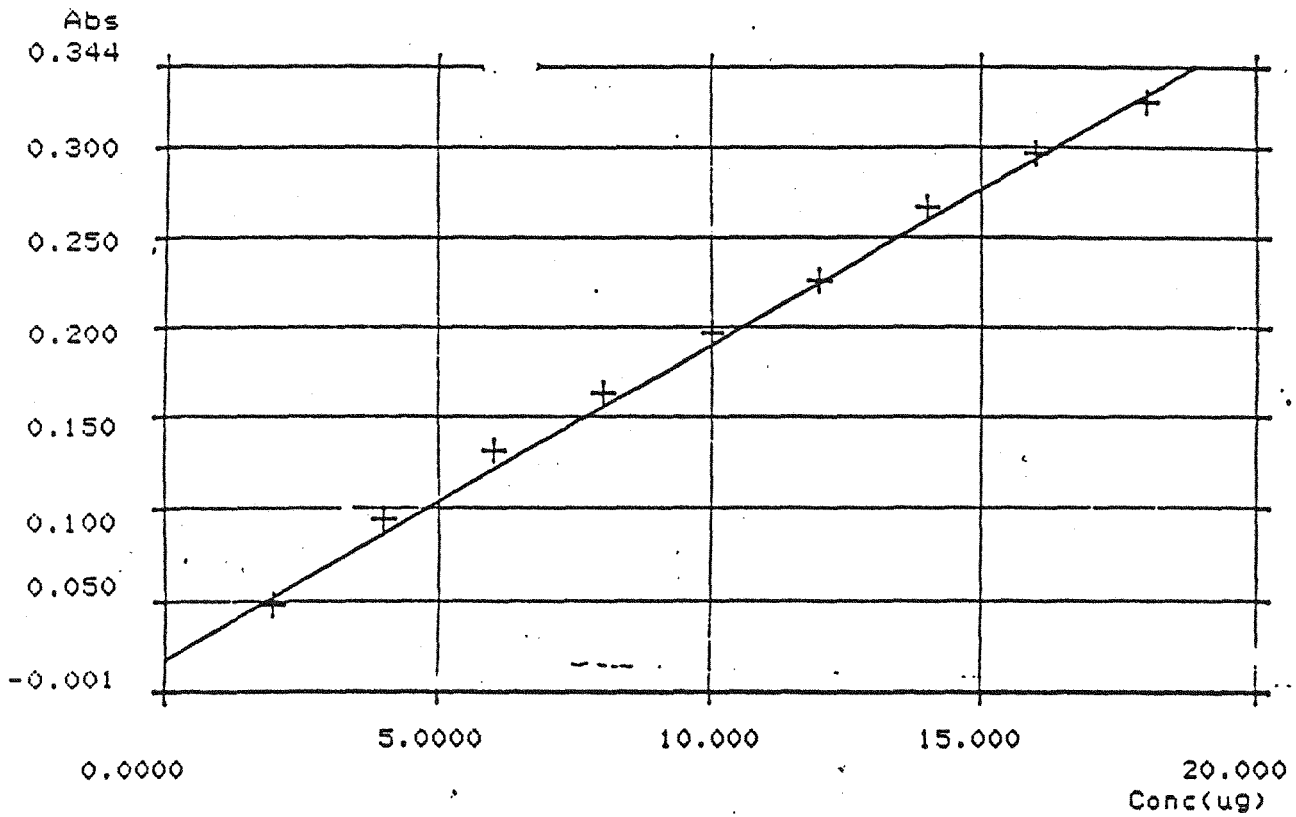
RAW DATA STORAGE NO. 2

GSH standard(50ul)

Lowry 標準曲線

1st Order

93/07/24 04:57



No.	Conc	Abs	No.	Conc	Abs
1	0.0000	-0.0006	11	20.000	0.3441
2	2.0000	0.0482			
3	4.0000	0.0944			
4	6.0000	0.1315			
5	8.0000	0.1636			
6	10.000	0.1970			
7	12.000	0.2263			
8	14.000	0.2669			
9	16.000	0.2968			
10	18.000	0.3248			

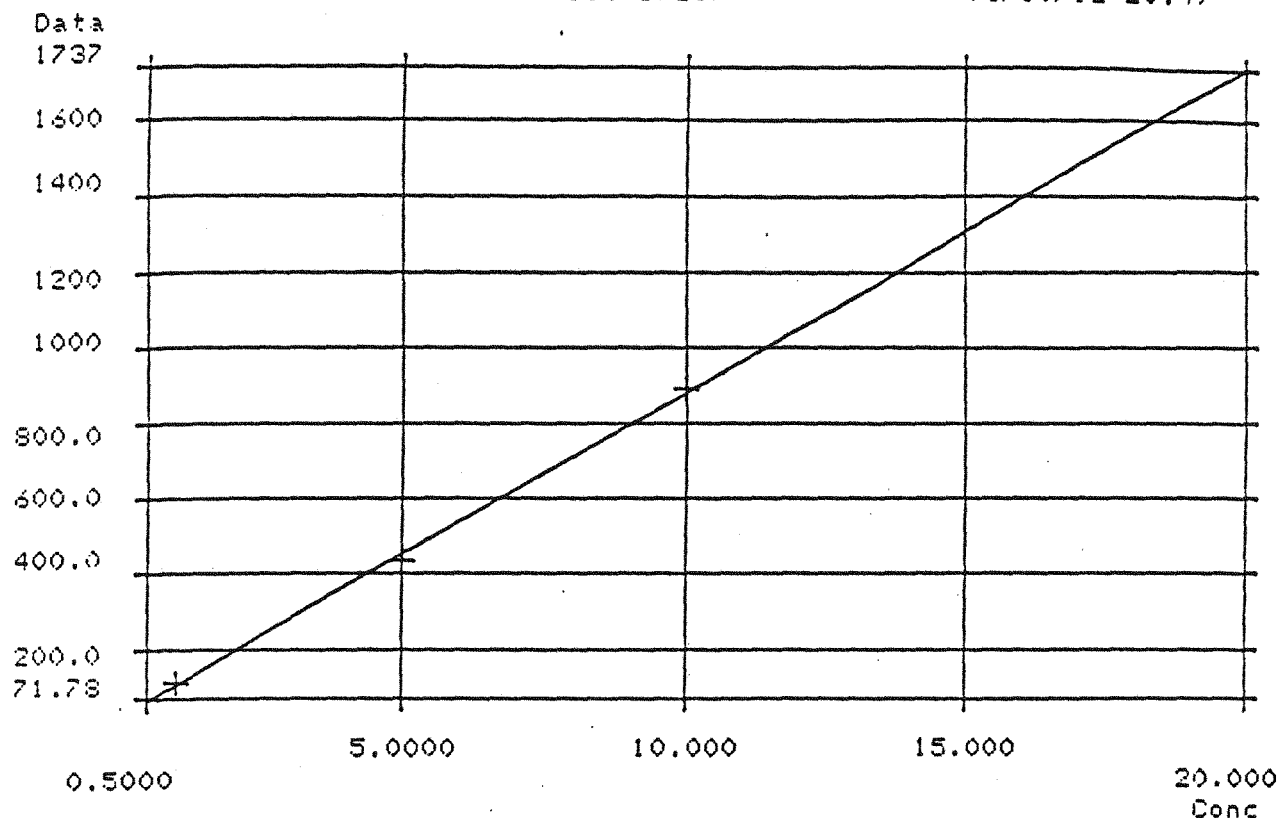
(Conc = K1×Abs + K0)
 K1=57.976 K0=-1.0123 CD=0.9919

Sample : wang's sample
 Comment : Protein level for GSH/GSSG
 WL : 660.00 nm
 Slit : 2.0 nm

TBARS 標準曲線

1st Order

93/10/12 20:49



No.	Conc	Data
1	0.5000	71.78
2	1.0000	116.6
3	5.0000	434.9
4	10.000	893.0
5	20.000	1737

(Conc = K1 * Data + K0)

K1= 0.0117 K0=-0.2959 CD=0.9997

Sample : PQ/DQ
 Comment : TBAR

EX Wavelength : 515.0 nm
 No. of Wavelength : 1 (EM)
 Wavelength1 : 555.0 nm
 Slit(EX/EM) : 5.0 nm / 5.0 nm PMT Voltage : 700 U