

R
008.8
2514
87

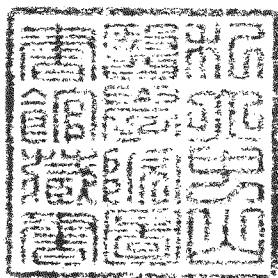
私立中山醫學院生物化學研究所碩士論文

Study of the chemopreventive mechanism of natural products:

The signal transduction pathway of the induction of the gene expression of detoxication enzymes Glutathione S-Transferase

天然物防癌機制之探討：

誘導解毒酵素 Glutathione S-Transferase 基因表現之訊息傳遞路徑



指導教授： 王朝鐘 博士 (Chau-Jong Wang)
周芬碧 博士 (Fen-Pi Chou)

研究生： 朱玉娟 (Yu-chuan Chu)

參考書恕不外借
中華民國六十七年七月

中山醫學院圖書館



C050038

~W2Z2;授權書~W1Z1;
(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 生物化學研究所
_____ 組 86 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱: 天然物防癌機制之探討:誘導解毒酵素 Glutathion S-transferase 基因表現之訊息傳遞路徑

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得重製成電子資料檔後收錄於該單位之網路，並與台灣學術網路及科技網路連線，得不限地域時間與次數，以光碟或紙本重製發行。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請，請將本論文全文延後至民國 __ 年 __ 月後再公開。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限時間與地域，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名: 王朝鐘

研究生簽名: 朱玉娟 學號: R85207
(親筆正楷)

日期: 民國 87 年 7 月 ___ 日

- 備註: 1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。
3. 本授權書已於民國85年4月10日送請著委會修正定稿。

~W2Z2;簽署人須知~W1Z1;

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。
3. 授權人的權利與義務：
在美國授權博碩士論文予UMI公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金 45元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入10%的權利金約美金20元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣 500 元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如 第5項。義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。
4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。
5. 本案聯絡電話：(02)7377746 江守田、王淑貞
地址：台北市和平東路二段106號17樓1702室

研究生姓名：朱心媛 聯絡電話：067-621082

地址：彰化市建和街72號

本論文為中山醫學院授予以理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院生化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

國立台灣大學醫學院
毒理學研究所教授兼所長

翁祖輝

國立台灣大學醫學院
毒理學研究所副教授

郭明良

中山醫學院生物化學研究所
教授兼所長
(本論文指導教授)

王朝銘

中山醫學院生物化學研究所
教授

曾翠華

中山醫學院生物化學研究所
副教授 (本論文指導教授)

周若碧

學生朱玉娟，論文題目為天然物防癌機制之探討:誘導解毒
酵素 Glutathione S-Transferase 其基因表現之訊息傳遞路
徑。其論文已經中山醫學院生物化學研究所論文考試委員
會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授:

王朝鐘	教授	簽名	<u>王朝鐘</u>
周芬碧	副教授	簽名	<u>周芬碧</u>

中華民國八十七年八月

誌謝

離別是為了下次的重逢而準備，而結束是另外一個新的開始。歲月如梭，在中山的兩年生活一下子就溜走了，真的很捨不得離開這個實驗室，而這個實驗室就像一個大家庭，裡面充滿溫馨與快樂。尤其是我們的大家長王朝鐘老師，不論在生活上與論文指導，總不厭其煩的一遍又一遍重複叮嚀。另外感謝周芬碧老師在我每每遇到瓶頸時，總不厭其煩的細心指導我、糾正我，讓我在這兩年的生活中受益匪淺。還有感謝林玉玲老師以及妙真學姐在這兩年中對我的照顧。此外也感謝曾翠華老師、許振東醫師在實驗上的幫助。還有實驗室的伙伴們華彬、怡君、元志、曉薇、滄澤、育英、育津在生活上與實驗上的支持與幫助。

另外特別感謝台大醫學院翁祖輝教授及郭明良博士對本論文的審閱及修正。

最後將此論文獻給我的父母以及伴我成長的明誠，在你們的細心呵護與關照之下，我終能達成此一目標。

目錄

第一章. 前言及緒論.....	5
第二章. 研究動機.....	17
第三章. 實驗材料.....	18
第四章. 實驗方法.....	30
第五章. 結果.....	41
第六章. 討論.....	55
第七章. 圖表.....	62
第八章. 參考資料.....	124

摘要

經由先前許多文獻以及研究報告指出，茶多酚具有許多有益生物體的功能，包括抗氧化、抑癌作用等等。而解毒酵素 Glutathione S-transferase (GST) 在此又扮演了一個很重要的角色。因此我們想去了解是否茶多酚具有誘導解毒酵素 (GST) 的增加以及其基因的表現為何？

本實驗利用了兩個實驗模型。首先利用大白鼠初代培養的肝細胞為工具，探討茶多酚是否具有誘導解毒酵素 GST 活性的增加。結果證實了茶多酚在細胞實驗中確實會誘導 GST 酵素活性的增加。第二是利用動物實驗來證明，探討茶多酚對其解毒酵素 (GST) 活性的變化及其基因的表現。結果顯示，catechin 和 (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) 這兩種茶多酚在動物實驗中確實會誘導 GST 酵素活性的增加。在 time course 的表現上，catechin 誘發 GST 酵素活性最高可達對照組的 12 倍。EGCG 在 24 小時誘發 GST 酵素活性的增加最高可達對照組的 81 倍。而在 dose-response 上也有明顯的增高情形。2 mg 的 catechin 會誘導 GST 活性增加高達對照組的 24 倍，而 10 mg 的 EGCG 會誘導 GST 活性增加高達對照組的 23 倍。而在 mRNA 及蛋白層次上，都有促進 GST 的表現。

綜合而言，catechin 和 EGCG 刺激 GST 活性高度上升，其機制之一可能是透過 PKC pathway，及其蛋白磷酸化的作用來傳遞訊息以刺激 GST 基因的表現。再者，GST 蛋白本身極有可能受到修飾作用，而使活性升高。另外，GST 基因的上游除 AP-1 site 之外，尚

有 ARE 和 XRE sites ，因此這兩種途徑的作用為何，以及這兩種茶多酚對 GST 基因的表現到底是茶多酚直接作用在其基因上，還是茶多酚經過代謝後所產生的代謝產物來刺激 GST 基因的作用，都是我們有興趣知道的。

Abstract

Many previous papers and research report indicated that catechin possesses many functions that are beneficial to biological systems which include anti-oxidation and anti-cancer functions. Detoxication enzymes GST also play an very important role here. Therefor, we wanted to know whether catechin could induce the detoxication enzymes GST and what it is the mechanism of induction of gene expression.

This study used two experimental models. First we used primary culture cells as a tool to examine whether catechin could induce the increase of detoxic enzyme GST activity. Our results confirm that catechin actually could induce the increase of GST activity in primary culture cells. Second, we used animal experiment to testify, and to examine the effects of catechin on the changes of active of detoxic enzyme GST and the expression of it's gene. The results indicated that the two kinds of catechin, catechin and EGCG could indeed induce the increase of GST activity in animal experiment. On the expression of time course , catechin could induce GST activity to as much as twelve times, than that of the control experiment. EGCG induced the increase of GST activity to as much as eighty one times are that of the control experiments at 24 hours. On the dose response, there were also obvious increments 2 mg of catechin could induce the increase of GST activity to 24 times than control experiments, and 10 mg of EGCG could induce the increase of

GST activity to 23 times higher than control. On the levels of mRNA and proteins, they both could facilitate the expression of GST.

In sum, catechin and EGCG stimulate the increase of GST activity, one of its mechanisms could come from PKC pathway, and the action of its phosphorylation of proteins to stimulate the expression of gene on GST. Moreover, GST itself has and is probably influenced by modification, which causes its activity to increase. On the other hand the upstream of GST gene has ARE and XRE sites in addition to AP-1 site. Therefore, what are the actions of these two pathways, and the influence of these two catechin to the expression of GST gene. Is catechin acted diverted on its gene, or catechin is being metabolized to produce a product that can stimulate the action of GST gene. These are what we are interested in.

第一章

前言及緒論

一. 茶的簡介：

茶可說是古今中外均非常普遍的天然飲料，除了生津解渴之外，長久以來，它似乎對人體有著神秘的功能。截至目前為止，科學家的研究證實了茶對人體有著莫大的益處。而茶的種類多的不勝枚舉，但主要的可區分為三大類：分別是不發酵茶（如：綠茶、清茶、龍井茶等），部分(半)發酵茶（如：包種茶、凍頂茶、鐵觀音、烏龍茶）和全發酵茶（如：紅茶）。這三大類最主要的區別是發酵時間的長短。而所謂的發酵是指多酚類氧化酶 (polyphenol oxidase) 作用於多酚類 (polyphenols) 的步驟，發酵的時間愈長，多酚類被氧化的程度愈高。所以茶中多酚類物質隨著發酵程度的增加而減少，取而代之的是以數個單體結合形成存在之聚合物（圖一）。

茶多酚為各種茶葉中非常重要的成分。一般將茶中多酚類成分區分為四大類，即黃烷醇類 (flavanols)、黃酮醇類 (flavonols) 及其配糖物、無色花青素 (leucoanthocyanins) 以及酚酸 (phenolic acid) 和縮酚酸類 (depsides)（附表一）。而黃烷醇類又稱兒茶素類 (catechin)，是茶葉中最主要的多酚類，約佔多酚類總量 75-80%，所以一般描述的茶多酚 (tea polyphenols)，指的就是兒茶素類 (catechin)。六種主要的兒茶素類分別是：(-)-epigallocatechin gallate (EGCG)、(-)-epigallocatechin (EGC)、(-)-epicatechin gallate (ECG)、(-)-epicatechin (EC)、(+)-gallocatechin (GC) 和 (+)-catechin (C)（圖

二)。

二. Tea polyphenolic compounds 的藥理作用:

Tea polyphenolic compounds 為茶葉中最被廣泛研究的物質，目前藥理特性較茶葉中其他物質來的清楚，主要有以下四個方面:

1. 對 catecholamines 代謝的影響

Catecholamines 為 epinephrine 及其 precursors norepinephrine、dopamine 的總稱。在人體內，catecholamines 的作用是多方面的，它與各種器官的活動、肝及骨骼肌糖原的分解、脂肪分解等密切相關，是體內不可缺少的物質。有人指出，flavonols 可對腎上腺-腦垂腺中樞產生影響，因而影響到 epinephrine 和其它 catecholamines 水平，及提高了它們在血液中的濃度。除了刺激 epinephrine 的合成外，flavanols 還可抑制 catecholamines 在體內的降解，因此 polyphenolic compounds 在 catecholamines 的生理調控方面起著一種獨特的作用 (1)。另有報告指出 caffeine metabolites 可以加強 catecholamines 的合成作用 (2)，因此茶對於 catecholamines 的合成與分解具有相當重要的影響力。

2. 抗發炎作用

很早以前就有報告指出茶葉的浸出液具有抗發炎作用 (3,4)。根據文獻報導，catechin compounds 可抑制由 aspirin 所引起之胃黏膜出血，因而顯著的減少潰瘍的現象 (5)，在這些 catechin compounds 中以 EGCG、ECG、EC 的效用較強，因此與綠茶相比，紅茶對於抗發炎的效用不如綠茶要來的好 (6)。目前認為茶中的 flavonols 亦有抗發炎的作用，不過其抗發炎作用則與 epinephrine 之濃度有關

(3)。另外，flavanols 也具有抑制IL-1 α mRNA 表現的能力 (7)，因此，其除了具有抗發炎的功能外，可能也因此具有抑制 tumor promotion 的能力。

3. 抗菌作用

在西元 1951 年日本瘟疫流行期間，茶曾廣泛的應用於防治瘟疫的流行。在治療痢疾等幾種消化道傳染病方面，茶也是一種輔助劑，其中所含的 caffeine metabolites 之利尿作用輔助了 flavanols 的抗菌作用，使的治療的效果大大的增強，此外實驗亦證明綠茶沖泡液在體外對傷寒、痢疾、副痢疾桿菌、金黃色葡萄球菌、傷寒沙門氏菌、霍亂弧菌等均有相當強的抑制作用 (8)。在治療方面，綠茶較紅茶療效高，其中以 EGCG 對傷寒、副傷寒、霍亂和痢疾等具有最佳的治療效果，實驗發現，它們單獨使用濃度為每毫升五至十毫克即有完全的抑菌作用。有研究指出，抗菌強度與茶湯的製造過程有關，泡劑比煎劑的作用強，使用兩克普通綠茶在一百毫升的沸水浸泡五分鐘所得的中性浸泡液，在試管內便能於短期內有效的殺滅霍亂弧菌。另外有人認為，茶的抗菌成分主要是鞣質 (tannin)，茶鞣質具有收斂作用，其可與菌體的蛋白質反應使之變性並導致細菌的死亡 (9)。

4. 抑制 lipid peroxidation

由於許多流行病學的調查報告中發現飲茶風氣較盛行的地區其發生心血管疾病的機率比其它地區來的低 (10)，因此許多學者便開

始針對這個現象進行探討，目前的研究發現茶中所含的 flavanols 成分具有防止血液中 LDL 進行 lipid peroxidation 的能力 (11)，因此茶可以有效的降低粥狀動脈硬化的發生率，進而防止心血管疾病的產生 (12)。

三. 茶多酚作用機制

以上所述皆是茶多酚的人體的益處，探討其作用機制可歸納為五大類。(A).茶多酚具有抗氧化的能力 (13,14)，能將細胞內過多的自由基清除 (如 superoxide anion radical, hydroxy radicals 和 peroxy radicals)；是 metal ions 的螯合者，因此降低 Fenton 及 Haber-Weiss 的反應。(B).茶多酚抑制 nitrosation 的反應。N-nitroso compounds 的量直接影響腫瘤的形成 (15)，而茶多酚會與 nitrosating species 發生反應，因此降低了 N-nitroso compounds 的形成 (16)。(C).茶多酚抑制 microsomal monooxygenase 的活性 (17)。大多數 carcinogens 需要經由 cytochrome P450 等酵素的活化，才具有攻擊巨分子的能力 (18)，而茶多酚可抑制此種酵素的活性，因此降低了 carcinogens 的活化。(D).茶多酚可直接與某些 carcinogens 發生反應，因此降低了 carcinogens 的 level。(E).茶多酚直接抑制癌細胞的增殖。目前的了解是茶多酚藉由抑制 ornithine decarboxylase，protein kinase C，cyclooxygenase 及 lipooxygenase 等酵素的活性或抑制細胞內其它訊息路徑的傳遞，而降低了腫瘤細胞的增生 (19-22)。

癌症的發生有三種可能的外在因素，分別為物理因素、化學因素及輻射的暴露程度。其中以接觸化學的致癌物質而導致癌症的比例最大。而癌症的發生大致需經過三大步驟：1. Initiation (起始): 細胞受到化學致癌物的傷害。2. Promotion (促進): 癌促進物質對已損害細胞的促癌作用。3. Progression: 刺激連續的進行，致使腫瘤的形成。而解毒酵素活性的誘發則是生物體代謝致癌物最主要的保護機制 (23)。這些解毒酵素大致可分成 Phase I 及 Phase II 酵素。Phase I 酵素如 P450，經由氧化的方式加以代謝致癌物；Phase II 酵素如 glutathione S-transferase (GST) 則是會催化 glutathione 和致癌物結合，解毒步驟首先形成 thioethers，最後形成 mercapturic acid 使這些致癌物攻擊物去活化。一旦解毒酵素有缺陷，如 GST 和 N-acetyltransferase (NAT) 酵素有缺陷，則致癌的危險性會隨之增高，如肺癌及膀胱癌都有相關的研究發表 (24)。所以癌症的發生，避免活化型致癌物的攻擊是相當重要的 (25)，因此解毒酵素在此扮演了一個非常重要的角色。

四. Glutathione S-Transferase (GST) 的介紹：

GST 是一種具多功能的蛋白質。它可以和細胞內的生化分子結合，例如 heme、bilirubin、polycyclic aromatic compounds 及 dexamethasone (26,27)，並攜帶運送。另一方面，在解毒過程中它會催化 glutathione 和多種的化學物的活化型結合，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

(28)，以保護細胞免於傷害。GST 是個雙單元體的複合蛋白，以老鼠而言，其中組成 GST 的單元體多達八種 (29)。GST 的八個單元體分別是 $Y\alpha$ ($M_r=244000$)， Y_a ($M_r=25600$)， Y_n ($M_r=26300$)， Y_b ($M_r=27000$)， Y_c ($M_r=28000$)， $Y\beta$ ($M_r=26300$)， $Y\delta$ ($M_r=25000$)，及 Y_p ($M_r=24000$)。由這些相異的單元體組合而成的雙元體並非是隨意配對的，例如由肝臟細胞的細胞質可分離出 Y_aY_c 和 Y_bY_n 的組合體，卻發現不到 Y_bY_a 和 Y_bY_c 的組合體。如果以 anti- Y_b 的抗體作用，只會抓下 Y_b GST，不會和 Y_c GST 有交叉反應的情形出現。同時在 mRNA 方面， Y_a 及 Y_c 的 cDNA 在適當的條件下不會和 Y_b mRNA 雜交。在 cDNA 序列分析方面， Y_b 單元體的和 Y_a 、 Y_c 的 DNA 相似性非常的少，且在蛋白質方面， Y_b 和 Y_a 、 Y_c 只有 28% 的相似性 (29)。所以， Y_b 的序列和其它單元體的序列缺少相似性。

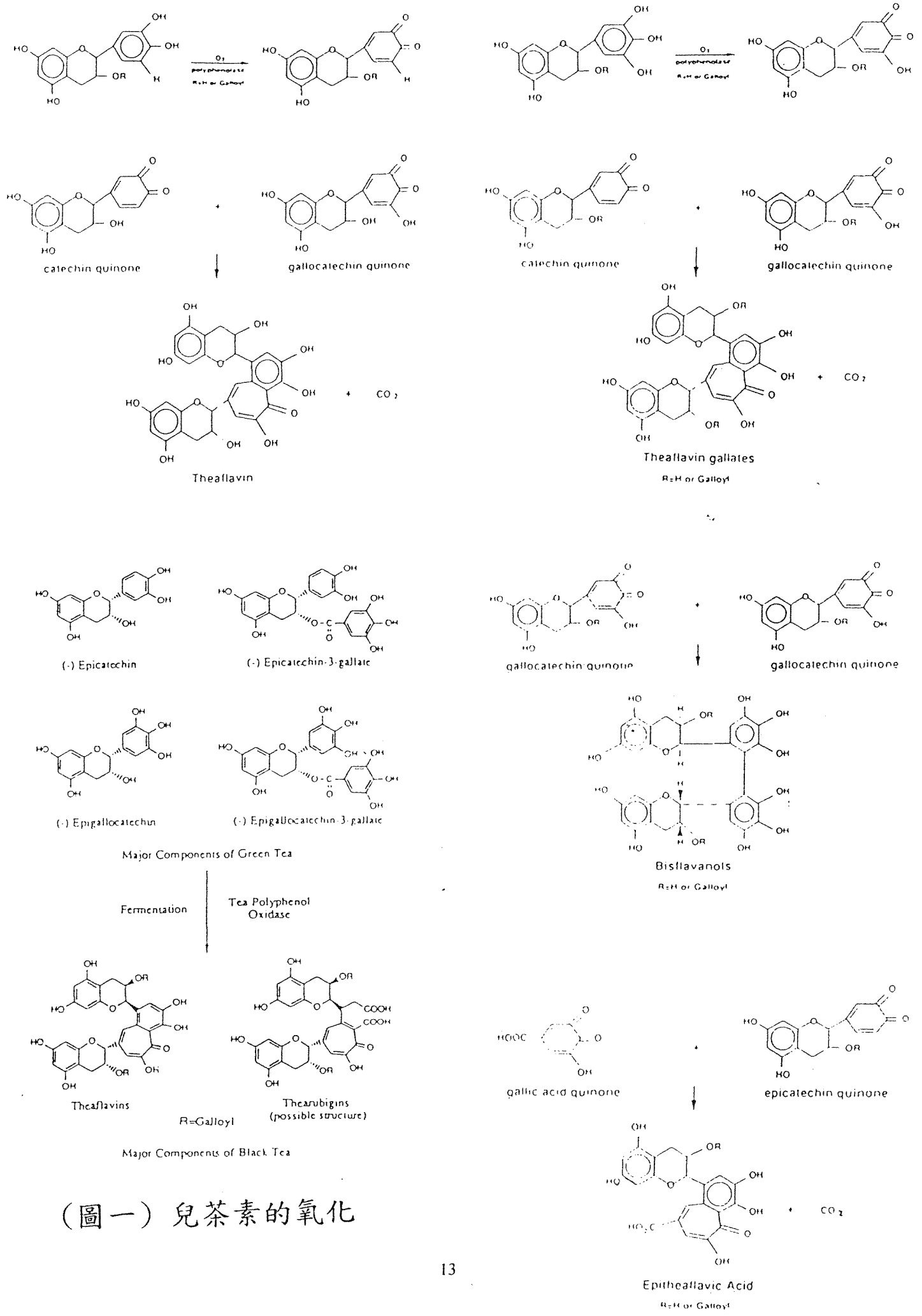
1. GST 的分類:

依 GST 所分佈的位置大致可區分成兩類，其一是結合在細胞膜上的 GST，例如 microsomal GST。另一則是細胞質的 GST，而大部分的 GST 都存在細胞質部分，這些 GST 依其來自不同的基因族 (30)，分別命名為 alpha 族、mu 族、pi 族、sigma 族以及 theta 族。sigma 族和 theta 族 (31) 由於最近才被發現，所以對於它的特性了解不多 (32)。在細胞質以 alpha、mu 及 pi 族的 GST 為主。在酸鹼特性方面，alpha 族屬於鹼性，mu 族偏中性，pi 族則屬於酸性。在 rat、mouse 以及人類中，這三種不同的 GST 在結構方面、酵素方面特性都很類似 (33)。但這三種不同的 GST 的表現往往具組織特異

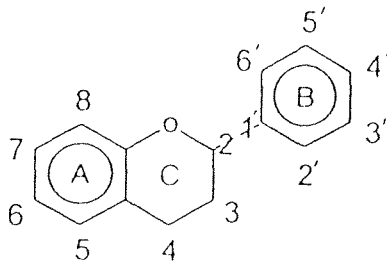
性，以老鼠而言，alpha GST 主要分佈在肝臟、腎臟；mu GST 主要分佈在 testis、心臟、肝臟 (34)；至於 pi GST 在正常的情況之下，除了肝臟之外，均勻的分佈在各個組織器官。且這些不同的 GST，在細胞形成腫瘤當中的不同階段，其表現量也有所改變。以肝細胞為例，在正常的肝細胞中以 alpha 族 GST 為主，mu 族 GST 其次，但是偵測不到 GST-P (35)。在前腫瘤結節中，則 alpha、mu 及 pi 族的 GST 都會過度的表現，但一旦肝細胞變成腫瘤細胞，尤其是化學性的致癌作用，GST-P 則會很明顯且大量的表現 GST-P (36)。過去的 GST 研究大都著重於 GST-P，也是因為 GST-P 有此特性，所以對於 GST-P 的研究，不論是在基因的調節 (37-40)、表現 (41-43) 或是抗藥性的探討 (44) 較透徹。在 alpha 族的 GST，於抗藥性方面多有所研究，特別是發現它會代謝一些抗癌藥物，如 cisplatin、alkylating agent，而抑制了抗癌藥物對於癌症初期的治療 (45-48)。至於 mu 族 GST，對於某些抗癌藥物具有抗藥性，且和組織的發炎有關 (49)。在正常的肝細胞，mu 族 GST 也會表現。一旦肝細胞受到致癌化合物的刺激作用，mu 族 GST 表現也會增加，因此推論 mu 族 GST 在肝細胞中扮演著不可或缺的保護性角色。但是，在過去有關 mu 族 GST 研究不多，所以了解並不深入。事實上，GST 生化功能的調控及發揮是很複雜的，這和遺傳、性別、年齡、組織、種類以及細胞癌化的不同階段都有關連。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的水果中 (30)。

2. GST 的活化:

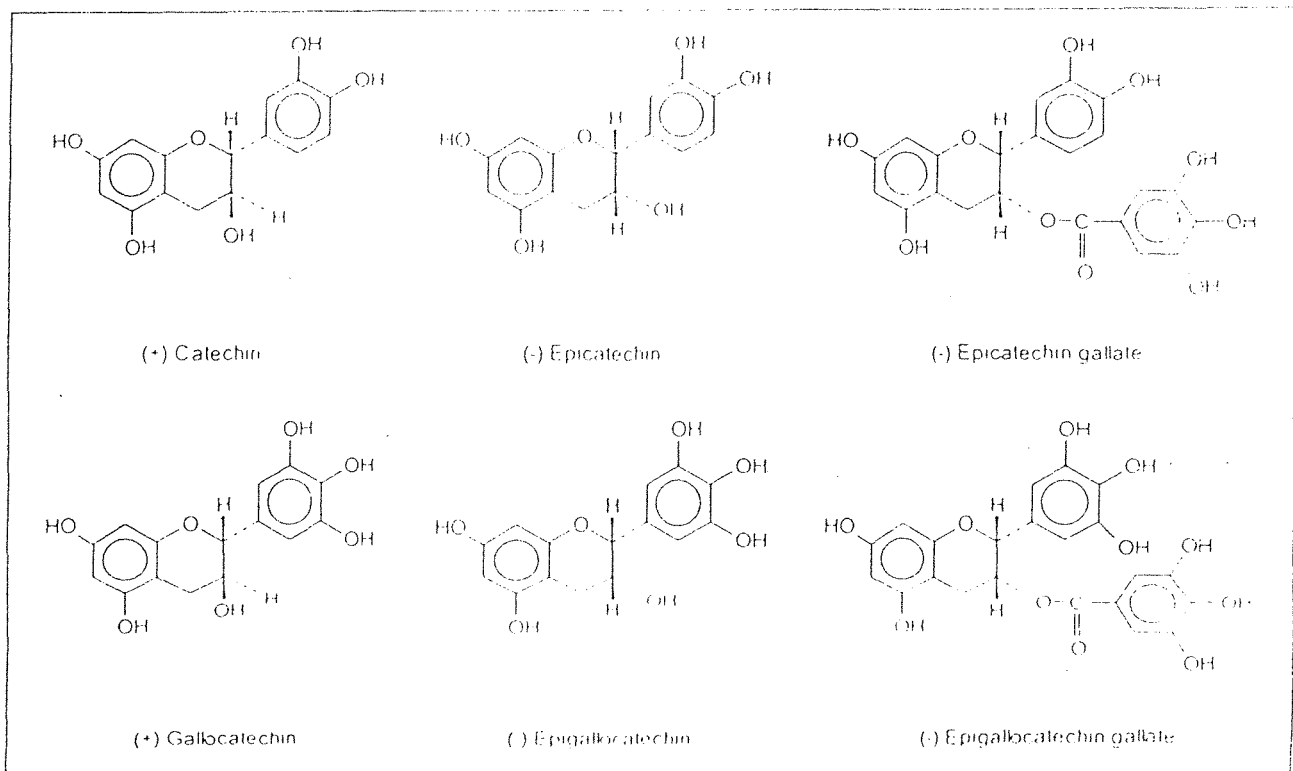
大部分的化合物會間接經由影響 GST 上游基因 (30) 而促進 GST 的表現，這些上游基因有 antioxidant-responsive element (ARE)、xenobiotic-responsive element、GST-P enhancer 1 (GPE)，或者是 glucocorticoid-responsive element (GRE)。AP-1 (jun/fos) 在促進 GST 表現也被廣泛的討論。活化 GST 大量表現的機制包括促進基因的轉錄，穩定 mRNA 及蛋白質，以及基因的放大 (amplification)。



(圖一) 兒茶素的氧化



(圖二) Structures of the six main catechins present in green tea polyphenol



附表一 茶葉中主要多元酚類成分及其含量

	分子式	分子量	含量 (% 乾重)
黃 醇類			
(-)Epicatechin	$C_{15}H_{14}O_6$	290	1-3
(-)Epicatechin gallate	$C_{22}H_{18}O_{10}$	442	3-6
(-)Epigallocatechin	$C_{15}H_{14}O_7$	306	3-6
(-)Epigallocatechin gallate	$C_{22}H_{18}O_{11}$	458	9-13
(+)Catechin	$C_{15}H_{14}O_6$	290	1-2
(+)Gallocatechin	$C_{15}H_{14}O_7$	306	3-4
黃酮醇及其配糖物類			
Quercetin	$C_{15}H_{10}O_7$	302	-
Kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	286	-
Quercetin 3-rhamnoglucoside	$C_{27}H_{30}O_{16}$	610	-
Kaempferol 3-rhamnoglucoside	$C_{27}H_{30}O_{15}$	594	-
Quercetin 3-rhamnodiglucoside	$C_{33}H_{40}O_{21}$	772	-
Kaempferol 3-rhamnodiglucoside	$C_{33}H_{40}O_{20}$	756	-
無色花青素類			2-3
酚酸和縮酚酸類			~5
Gallic acid	$C_7H_6O_5$	170	-
Chlorogenic acids	$C_{16}H_{18}O_9$	354	-
P-Coumarylquinic acids	$C_{16}H_{18}O_8$	333	-
Theogallin	$C_{14}H_{15}O_{10}$	343	~1
Ellagic acid	$C_{14}H_6O_8$	302	-
總多元酚類			25-35

資料來源：Sanderson (1972).

附表二 Approximate chemical composition of young shoots of tea

(Assam variety, Robert, 1962)

<i>Component</i>		<i>% dry weight</i>
<i>Soluble in cold water</i>		
Flavanols:	Epigallocatechin gallate	9-13
	Epigallocatechin	3-6
	Epicatechin gallate	3-6
	Epicatechin	1-3
	Gallocatechin	1-2
	Catechin	1-2
Flavanols and their glycosides		3-4
Leucoanthocyanins		2-3
Phenolic acids:	Theogallin	2
	Other	2
Total phenolics		30
Caffeine		3-4
Amino acids:	Thanine	2
	Other	2
Carbohydrates		4
Organic acids		0.5
Volatile substances		0.01
<i>Partially soluble in hot water</i>		
Polysaccharides:	Starch	2-5
	Other	12
Protein		15
Ash (inorganic material)		5
<i>Insoluble in water</i>		
Cellulose		7
Lignin		6
Lipids		3

For details of chemical structures readers are referred to Appendix

第二章

研究動機

經由先前許多文獻以及研究報告指出，茶多酚具有許多有益生物體的功能，包括抗氧化、抑癌作用等等。而解毒酵素 GST 在此又扮演了一個很重要的角色。因此我們想去了解是否茶多酚具有誘導解毒酵素 (GST) 的增加以及其基因的表現為何？

本實驗利用了兩個實驗模型。首先利用大白鼠初代培養的肝細胞為工具，探討茶多酚是否具有誘導解毒酵素 GST 活性的增加。第二是利用動物實驗來證明：將大白鼠利用部分肝切除手術 (partial hepatectomy) 切除最大葉之肝臟，再將茶多酚 (polyphenol compounds) 從肝門靜脈注射進去，探討茶多酚對其解毒酵素 (GST) 活性的變化及其基因的表現。我們分別探討了 GST 的活性及 mRNA 和蛋白質的層次。在 mRNA 方面，因為 Yb 的序列和 Ya、Yc 相似性較少，可減少交叉反應的發生以提高專一性 GST mRNA 的分析；而且現今對 Yb GST 的作用較不清楚，因此選擇了 Yb GST 去探討茶多酚對解毒酵素在 mRNA 層次上的影響。另外為了解茶多酚促進 GST 活性及基因表現的增加是透過何種上游機制，我們亦針對 GST 的上游基因蛋白如 c-Fos、c-Jun 的表現，PKC 蛋白的濃度及修飾，或者是細胞或組織內總蛋白的磷酸化現象等進行探討，以期對茶多酚的防癌、抑癌機制有整體的了解。

第三章 實驗材料

一. 動物來源: 購自台中榮總動物中心之 Spraque Dawley 係雄性大白鼠

二. 藥品試劑:

購自美國 Sigma 化學公司:

(-)-epigallocatechin gallate (EGCG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin gallate (ECG), (-)-epicatechin (EC), (+)-catechin, Lauryl sulfate (SDS), sodium phosphate, Tris-HCl, Tris-base, morpholinopropane sulfonic acid (MOPS), agarose, EDTA, N-lauroyl sarcosine, maleic acid, sodium chloride, sodium hydroxide, citrate acid, guanidine thiocyanate (GNTC), ethidium bromide, glycerol, chloroform, 37% formaldehyde, formamide, isopropanol, diethyl pyrocarbonate (DEPC), polyoxyethylene-sorbitan monolaurate (Tween 20), bromophenol blue, collagenase, Percall.

購自美國 Boehringer Mannheim(BM) 公司:

Glycogen, NC-membrane, Dig-labeling system.

購自德國 GIBCO 公司:

Fetal calf serum, HEPES, HBSS, William E, penicillin-streptomycin-neomycin (PSN).

購自美國 Promega 公司:

Hpa II, Pst I, BamH I, Hind III.

購自瑞典 Pharmacia 公司:

Microspin column.

購自美國 Amersham 公司:

ECL Kit.

購自德國 BIO-RAD 公司:

Ammonium persulfate, acrylamide, N,N'-methylene-bis-acrylamide.

三.常用儀器材料:

天平: OHAUS

微量天平: Mettler Toledo AB104

水平式電泳槽 (DNA): mupid-2

水平式電泳槽 (RNA): Hoefer Max HE99

電泳轉印槽: TE22 Mighty Small Transphor

電源供應器: BIO-RAD 200/2.0

BIO-RAD Power/PAC 3000

細菌培養箱: Orbital shaking incubator Os1500

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 85β

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

感光夾: Okamoto 8X102

雜交箱: Techne HB-1D Hybridiser

震盪器: Vortex-2 Genin

水平式搖晃器: Orbital shaker OS701

幫浦: Micro tube pump MP-3

數位化影像分析系統: 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

X光感片光軟片: Kodak X-OMAT

-70 °C 冰箱: SANYO Ultra Low

細胞培養箱: NAPCO Model 6100

超音波洗淨機: Branson 8200

乾浴槽: Termolyne Type 17600 Dri-Bath

四. 實驗所需溶液，緩衝液，培養液的配製:

(A). 做 Northern blotting 所需的溶液以及 buffers:

1. Solution D 含:

4 M GNTC , 25 mM sodium citrate pH 7.0

0.5% N-lauroylsarcosine

2. 1X maleic acid 含:

0.1 M maleic acid

0.15 M NaCl

用固態的 NaOH 調 pH 至 7.5

3. 20X SSC 含:

3 M NaCl , 0.3 M sodium citrate , pH 7.0

4. Detection buffer 含:

0.1 M Tris-HCl , 0.1 M NaCl , 調 pH 至 9.5

5. Washing buffer:

1X maleic acid buffer 含 0.3% Tween 20

6. 10X blocking buffer 的配製:

10 g blocking reagent 溶於 100 ml 1X maleic acid buffer , 放入
60 °C 的水浴槽 , 搖晃至溶解為止。

7. 10X MOPS:

200 M morpholinopropansulfonic acid

50 mM sodium acetate

10 mM EDTA

調 pH 至 7.0

8. Running buffer:

900 ml 的 DEPC 水加 100 ml 的 10X MOPS ，攪拌均勻。

9. High SDS concentration hybridization buffer:

7% SDS

50% formamide

2% blocking reagent

5X SSC

50 mM sodium phosphate

0.1% N-lauroylsarcosine

※配製 High SDS buffer 100 ml:

- a. 稱 sodium phosphate 0.71 g ，倒入 25 ml 的 20X SSC 。
- b. 用 NaOH 或 HCl 調 pH 至 7.0 。
- c. 加入 DEPC 25 μ l ，混合均勻，至少靜置 2 hr 再滅菌。
- d. 滅完菌後再加入 50 ml formamide 、 20 ml blocking reagent 、
0.1 g 的 N-lauroylsarcosine 。

- e. 搖晃均勻後再放入 65 °C 的水浴槽內，使之溶解即可。
- f. 然後再拿出來放置室溫儲存即可。若每次要使用前需先放至 65 °C 的水浴槽內處理至溶解。

10. 6X loading buffer:

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

11. DEPC-treat water:

999 ml 的二次水加入 1 ml 的 DEPC，混合均勻，放在室溫至少 2 小時後再拿去滅菌。

(B). 做 Western blotting 所需的溶液以及 buffers:

1. SDS running buffer (1000 ml):

1000 ml glycine 15.18 g，Tris-base 3.18 g，SDS 1.06 g，加二次水至 1000 ml。

2. Electro-transfer buffer (1000 ml):

Tris-base 2.43 g，glycine 11.25 g，甲醇 200 ml，加二次水至 1000 ml。

3. Sample buffer:

1	ml	0.5 M Tris-HCl，pH6.8
1.6	ml	glycerol (10% w/v)

1.7	ml	10% SDS
0.4	ml	β -mercaptoethanol
0.4	ml	0.5% bromophenol blue (in distilled water)
3	ml	distilled water

4. Phosphate-buffer saline-Tween 20 (PBST):

NaCl 8 g , KCl 0.2 g , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.632 g , KH_2PO_4 0.24 g , Tween-20 1 ml , 調 pH 7.4 , 加 distilled water 至 1000 ml 。

5. Blocking buffer:

5%的脫脂奶粉加 0.1%的 Tween-20 , 溶於 PBS buffer 。

6. Buffer A (100 ml):

0.242	g	Tris-HCl , pH 7.4 (20 mM)
67.24	mg	EDTA (2 mM)
10	ml	glycerol (10 %)
11.29	g	sucrose (0.33 M)
349	μl	β -mercaptoethanol (50 mM)
34.8	mg	PMSF (2 mM)
2.5	mg	Leupeptin (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

加 distilled water 至 100 ml , 調 pH 7.4

7. Buffer B (100 ml):

0.242	g	Tris-HCl , pH 7.4 (20 mM)
67.24	mg	EDTA (2 mM)
10	ml	glycerol (10 %)
11.29	g	sucrose (0.33 M)
0.3	ml	Triton X-100 (3%)
349	μl	β-mercaptoethanol (50 mM)
34.8	mg	PMSF (2 mM)
2.5	mg	Leupeptin (25 μg/ml)

加 distilled water 至 100 ml , 調 pH 7.4 。

8. Nuclear extract buffer A:

10 mM HEPES pH 7.9 , 1.5 mM MgCl₂ , 10 mM KCl , 1 mM
DTT

9. Nuclear extract buffer B:

20 mM HEPES pH 7.9 , 25% glycerol , 0.42 M NaCl₂ , 1.5
mM MgCl₂ , 0.2 mM EDTA , 0.5 mM PMSF , 1 mM DTT

10. 8% separating gel (20 ml):

9.3	ml	distilled water
5.3	ml	acrylamide/bis (30% /0.8%)
5	ml	Tris-HCl , pH 8.8

0.2	ml	10% SDS
0.2	ml	10% ammonium persulfate
0.012	μl	TEMED

11. 10% separating gel (20 ml):

7.9	ml	distilled water
6.7	ml	acrylamide/bis (30% /0.8%)
5	ml	Tris-HCl , pH 7.4
0.2	ml	10% SDS
0.2	ml	10% ammonium persulfate
0.08	μl	TEMED

12. 12% separating gel (20 ml):

6.6	ml	distilled water
8	ml	acrylamide/bis (30% /0.8%)
5	ml	Tris-HCl , pH 7.4
0.2	ml	10% SDS
0.2	ml	10% ammonium persulfate
8	μl	TEMED

13. Stacking gel (10 ml):

6.8	ml	distilled water
1.7	ml	acrylamide/bis (30% /0.8%)

1.25	ml	Tris-HCl , pH 7.4
0.1	ml	10% SDS
0.1	ml	10% ammonium persulfate
0.01	ml	TEMED

(C). 測 GST 活性所需的溶液以及 Buffer:

1. Homogenizer Buffer (1000 ml):

6.055	g	Tris-HCl (50 mM)
85.575	g	sucrose (0.25 M)

加 distilled water 至 1000 ml , 並調至 pH 7.5 。

2. GSH substrate buffer (500 ml):

0.3073 g 的 GSH 溶於 500 ml 的 homogenization buffer 。

3. CDNB substrate buffer (500 ml):

0.2025 g 的 CDNB 先溶於 2.5 ml 的 alcohol , 再加 homogenization buffer 至 500 ml 。

(D). 培養液以及其它溶液:

1. William E medium:

取可配一公升的 William E 粉末 , 加入 2.2 g 碳酸氫鈉 , 先溶於小於一公升的二次水 , 調 pH 至 7.3 , 然後補二次水至一公升。
然後再過 minipore 。

2. William E OK medium:

將配好的 William E medium 450 ml 加入 fetal serum 50 ml (10%)、PSN-antibiotic 5 ml (1%)、insulin 1 ml (20 μ g/ml)。

3. Solution A:

取可配至一公升的 HBSS 粉末 (沒有 Ca^{2+} , Mg^{2+}), 加入 2.2 g 碳酸氫鈉, 5.958 g HEPES, 先溶於小於一公升的二次水。秤 0.19 g EGTA, 先溶於 1 ml 的 2N NaOH 至溶解, 再加入。調 pH 至 7.3, 再補二次水至 1000 ml。然後過 minipore。

4. Solution B:

取可配至一公升的 HBSS 粉末(沒有 Ca^{2+} , Mg^{2+}), 加入 2.2 g 碳酸氫鈉, 5.958 g HEPES, 先溶於小於一公升的二次水, 調 pH 至 7.3, 再補二次水至 1000 ml。然後過 minipore。

5. L.B. medium (1000 ml):

10	g	peptone
5	g	yeast extract
5	g	NaCl
1N	1 ml	NaOH

滅菌後儲存於 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

6. 10X HBSS (100 ml):

取可配至 1000 ml 的 HBSS 粉末 (含有 phenol red) 溶於最後
體積 100 ml 的二次水，加碳酸氫鈉 0.22 g，調 pH 至 7.3，
然後過 minipore。

第四章

實驗方法

一. 分離肝細胞及初代培養:

購自台中榮總動物中心之 SD 係大白鼠，體重約 250-300 公克，根據 Butterworth, B.E. 等人之研究方法 (50)，以灌流方式分離肝細胞。首先以腹腔注射 pentobarbitol 麻醉老鼠，給予劑量為 0.2 ml (50 mg/ml) 每 100 g 大白鼠體重。待麻醉後將老鼠四肢固定，由肝門靜脈成 V 字型剪開，達劍突下方。打開腹腔，以 20 GA I.V. catheter/needle 注入肝門靜脈之後立刻拔掉硬針，以軟針固定在肝門靜脈，以事先回溫至約 7 °C 的 50 ml solution A 灌流，並剪斷下腔靜脈，此時將幫浦轉速開至最大，以達完全放血之目的。再以止血鉗夾住下腔靜脈，剪碎心臟，同時以回溫至 37 °C 的 100 ml solution B 灌流，並將幫浦開至中速，待 solution B 用盡之後，小心的取下肝臟，浸於 50 ml 的冰 William E，快速的將肝臟剪碎，並過濾掉較大的組織塊，然後再於 4 °C、以轉速 600 rpm 離心十分鐘。移去上清液，留下下層肝細胞，並加入適量的 William E 和細胞均勻混合，再加入 percoll-10X HBSS (其中 percoll : 10X HBSS = 9:1) 使得細胞+ William E : percoll-HBSS 兩者的比例為 3:2 混合完全，分裝於無菌的離心管，同樣以 4 °C、600 rpm 轉速離 10 分鐘，移去上清液，加入適量的 William E，混合完全，並取少許做細胞計算。

二. Microculture Tetrazolium Assay (MTT)

根據 Michale, C.A. 的研究 (51,52) 得知，活細胞會將 tetrazolium 代謝成藍紫色的結晶，且此藍紫色的結晶可溶於異丙醇，故以測其吸光來得知活細胞的數目。

取 1×10^5 的肝細胞置於 24 well-plate，讓細胞貼壁四個小時，吸乾培養液，換取新鮮的 William E 培養液，加入不同濃度的 (+)-catechin 或 (-)-epigallocatechin gallate (EGCG)，並以 0.02% DMSO 當控制組。繼續培養 18-24 小時後，吸乾培養液，再以 PBS 輕輕的洗兩次。換上新鮮的培養液 2.5 ml，加入 20 μ l tetrazolium (25 mg/ml)。培養 4 小時，移除培養液，加入 1 ml isopropanol，以 pippetman 來回打散均勻，直接吸 1 ml 以波長 563 nm 測吸光。

三. 動物實驗:

將約 100-150 公克重的雄性老鼠以乙醚麻醉，四肢固定，用碘酒消毒胸腔，在胸腔與腹腔之間以手術刀切出約 2-3 公分的傷口，找出肝臟所在位置，並將最外葉的肝臟擠出，用融合線綁緊（但不能使肝臟斷裂），將最外葉的肝臟切除不要，然後找到肝門靜脈，將藥物直接從肝門靜脈注入。之後將老鼠的傷口縫合，分別先將肌肉層縫合起來，再將皮層縫合起來，再打抗生素 penicillin (40000 U/Kg)。將老鼠放置暗處休息，並觀察其狀況。於預定時間，斷頭之後取其肝臟，並將肝臟分成四等分，用不同的溶液去均質，分別是 solution D，用來抽取 RNA；GST homogenizer buffer，用來測 GST 活性；Buffer A 和 buffer B 用來做 PKC 的蛋白變化量；nuclear extract buffer A 用

來萃取 nuclear 部分，用來做 c-Jun、c-Fos 蛋白的變化。

四. Northern Hybridization:

(A). Total RNA 的抽取 (53)

將取得的 100 mg 肝臟用 1 ml solution D 均質，均質完全後再加入 0.1 ml 的 sodium acetate pH 4.0，1 ml phenol，pH 4.0，0.2 ml chloroform-isoamyl alcohol (49:1)，每加入一樣就混合均勻，然後用力震盪 10 秒，之後靜置冰上 15 分鐘。於 4 °C、轉速 10000 g，離心 20 分鐘，離完之後將上清液（即水層）吸取至另一新的離心試管，加入同體積的 isopropanol，混合完全，放入 -20 °C 冰箱中沈澱 2 小時（或 -70 °C 冰箱沈澱 30 分鐘）後，於 4 °C、轉速 10000 g，離心 20 分鐘。倒掉上清液，加入 0.5 ml 的 solution D 以溶解 pellet。放入 -20 °C 冰箱中沈澱 2 小時後，於 4 °C、轉速 10000 g，離心 10 分鐘，倒掉上清液，加入 70% 酒精做來回沖洗，同樣的於 4 °C、轉速 10000 g，離心 10 分鐘。倒乾上清液，蒸乾 pellet，視 pellet 大小加入適量的 DEPC-treated water 溶解。將此樣本存放於 -20 °C 或 -70 °C 冰箱中。

(B). Total RNA 電泳:

1. 1.2% RNA denaturing gel 的製備:

秤 1.8 g 的 agarose，放入乾淨的滅菌燒杯，加入 130.5 ml DEPC-treated water，標上記號以確知原來水量，放在加熱板上加熱至沸騰以溶解 agarose。然後在補足減少的水量，待冷

卻至 60 °C 時加入 15 ml 的 10X MOPS 、 4.5 ml 37% formamide ，混合均勻之後，使其冷卻至手可碰觸的溫度。倒在事先以調好水平的鑄膠槽內讓其凝固。此膠盡量在當天使用。

2. RNA 樣本的處理:

取 5 μ l RNA (2 μ g/ μ l) 的 sample ，加入 2.25 μ l 的 10X MOPS 、 4 μ l 37 % formaldehyde 、 11.25 μ l formamide ，震盪均勻，放在 55 °C 的水浴槽作用 15 分鐘，短暫離心後，立刻至於冰上，loading 前加入 2.5 μ l loading buffer 。

3. 跑膠:

小心的拔掉膠上的齒梳，將膠體至於電泳槽內，倒入 running buffer 使其剛好蓋住膠體，將處理好的 25 μ l RNA sample loading 至齒槽中。以 75 伏特電壓跑三個小時，經 ethidium bromide 染色後，以拍利得相機在紫外線照射下拍攝 RNA 的電泳圖。

(C). RNA 轉漬:

將電泳後的膠體放入 DEPC-treated water 1-2 小時，再浸泡於 50 mM NaOH 20 分鐘，然後換以 50 mM Na₂HPO₄ 20 分鐘，再將膠體放入 transfer solution (10X SSC) 搖晃 20 分鐘，剪取與膠體同樣大小的硝化纖維紙、濾紙以及三條長濾紙 (16 x 35 公

分)，先以 10 X SSC buffer 浸泡，取適當的淺槽以玻璃片橫架於槽上，再將三條長濾紙放置在玻璃片上，兩端垂下接觸到槽底部，在淺槽中倒入 10X SSC buffer，蓋過濾紙下垂的部分，再以玻璃棒將濾紙內的氣泡趕走，放上膠體，正面朝下，背面朝上，同樣的以玻璃棒趕走氣泡，於膠體上方疊上浸濕的硝化纖維紙，再以玻璃棒趕走氣泡，再疊上兩張浸濕的濾紙，再以玻璃棒趕走層層間的氣泡。最後置上折疊好的衛生紙，再用玻璃片將此架好的 sandwich 穩固，並放置約 600 g 重的重物於玻璃片上，在室溫下轉漬 16-17 小時後，以兩張濾紙夾住消化纖維紙，在 120 °C 烘箱烘烤 25 分鐘，保存於室溫乾燥處。

(D). 雜交反應:

將 High SDS buffer 先放置 65 °C 的水浴槽約 15 分鐘，再放入以事先調好溫度的雜交箱至少 30 分鐘，然後將烘烤好的硝化纖維紙放入保鮮盒，倒入已預溫的 High SDS buffer，放入雜交箱中 prehybridization 1-3 小時。

另一方面，吸取適量的探針於沸水中煮沸 10 分鐘使其完全的變性，將煮完後的探針迅速的放置在 ice/NaCl 上 5-10 分鐘，再吸取探針至以預溫的 High SDS buffer，使探針的最終濃度為 50 ng/ml。同樣的也將配好的探針放置在調好溫度的雜交箱至少 30 分鐘。最後倒掉 prehybridization 的 High SDS buffer，加入具探針的 High SDS buffer，繼續在雜交箱中於適當的溫度下反應 12-20 小時。雜交完後，將硝化纖維紙依序放入 2X SSC + 0.1%

SDS 室溫，10 分鐘；0.2X SSC + 0.1 % SDS 42 °C，7 分鐘，搖晃漂洗。最後做免疫偵測及壓片。

(E). 免疫偵測法 (Immunological Detection) 以及壓片:

將漂洗過的硝化纖維紙放入乾淨的保鮮盒，倒入 1X buffer，在室溫下溫和的搖晃作用 30-60 分鐘。倒掉 blocking buffer，加入 anti-Digoxigenin-AP (以 blocking buffer 做 washing buffer 漂洗 1 分鐘以平衡硝化纖維紙，換以 1X blocking 1:10000 的稀釋，溫和的混合均勻)，同樣的在室溫溫和的搖晃 30 分鐘，再用 washing buffer 以微快的搖晃速度漂洗硝化纖維紙兩次，每次 15 分鐘。最後用 detection buffer 平衡達 3 分鐘。在此時可先剪開塑膠袋，攤開塑膠袋，小心避免弄髒袋面，然後小心的將硝化纖維紙由角邊夾起，放入已攤開的塑膠袋其中的一面，正面朝上，並小心的將硝化纖維紙攤平。以 pipetman 吸取適量的 CSPD buffer，加在硝化纖維紙的上面，再慢慢的將塑膠袋的另一面覆蓋上，盡量避免氣泡的產生，然後用面紙以固定方向，輕輕的將硝化纖維紙上的 CSPD buffer 均勻推散開來，讓硝化纖維紙上均勻的覆蓋上 SCPD buffer，然後直接就可以壓片了。

(F). 探針移除:

用滅過菌的燒杯裝 100 ml 的 DEPC-treated water 含 0.1% SDS (即 washing buffer)，放在加熱板上加熱至沸騰，另一方面，事先將已經雜交過的硝化纖維紙先以 DEPC-treated water 洗 5 分

鐘，以去除 CSPD，然後將煮沸的溶液直接倒在硝化纖維紙上，在室溫下劇烈的搖晃 10 分鐘，之後再換以 washing buffer 在室溫搖晃 5 分鐘，則可直接的再進行雜交反應。

五. Glutathione S-transferase activity assay:

將取得的肝臟組織用 homogenization buffer 均質，均質完後以 39000 rpm、4 °C、離心 30 分鐘，離心後吸取上清液當作樣本並儲存於-70 °C。

事先取 1.5 ml 的 GSH substrate buffer 和 1.5 ml CDNB substrate buffer 放入 cuvette 中，再加入 20 µl 的 sample，並迅速混合均勻，在 340 nm 下，scan 三分鐘，並以下列公式去換算活性的變化量:

$$1. C = A/\Delta A \times 1/9.6 \times 1/1$$

2. GST 的活性表示為 nmole/min/mg

六. 西方墨點法分析 GST、Py-20 蛋白的表現:

(A). 蛋白質的定量:

其原理為利用蛋白質可與 coomassie brilliant blue G-250 形成藍色複合物，而這個藍色的複合物於波長 595 nm 會有一個較大的吸光值。利用此原理，我們可以拿來當作蛋白質的定量。首先製備以 BSA (bovin serum albumin) 為標準液的蛋白質溶液，以換算各個樣本肝臟萃取液的蛋白質濃度。取 30 µl 的肝臟萃取液樣本，加入蛋白質定量試劑組 (protein assay dye, Bio-

Rad) 200 μ l，補二次水至 1 ml，於室溫下反應 10 分鐘後，在波長 595 nm 條件下偵測吸光值。

(B). 樣本的處理:

將測 GST 活性剩餘的樣本拿來當來做西方墨點法的 sample。分別各取 50 μ g (或 25 μ g) 的蛋白質樣本，加入等體積的 2X sample buffer，100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 分鐘，煮完後迅速放置冰上至少五分鐘。

(C). 鑄膠:

將電泳玻璃離片洗淨，烘乾，擦乾乾淨後，用厚度 0.75 mm 的 spacer 為間隔裝好電泳片，並架到電泳槽上固定，若預做 GST 蛋白，則配製 12% 的下層 separating gel，若預做 Pyr-20 蛋白則配製 10% 的下層 separating gel (配法見第三章材料與方法)。混合均勻後迅速倒入電泳片中，直到液面離 well 約 1.5 公分處為止，加入二次水覆蓋液面，待膠體凝固後，將上層的二次水吸掉，並配製 stacking gel 倒入，將電泳齒梳插入電泳片中，若有氣泡，則上下移動齒梳，使氣泡離開 stacking gel，待上層膠凝固後，拔掉齒梳，用二次水清洗 well 數次，準備 sample 的 loading。

(D). 跑 SDS-PAGE:

將處理好的蛋白質樣本用 tip 小心的注入 well 中，不可使之溢出來，將 protein standard marker (Bio-Rad) 亦加入其中一個 well

中。用塑膠滴管吸取 SDS-running buffer 小心的將每個 well 填滿，以避免樣本被激出，將上下電泳槽各加入 SDS-running buffer 至電導線被蓋過為止。

將電源供應器與電泳槽相接，打開電源，開始以 70V 的電流跑 stacking gel，直到色帶跑至 stacking gel 與 separating gel 的交界處，調整電流為 150 V，當色帶跑至底線時才停止電泳。

(E). 蛋白質樣本的轉漬 (Electrotransfer):

電泳完畢後將膠體取出，切除上層的 stacking gel 不要，將下層 separating gel 放置在兩張經 transfer buffer 浸濕過的濾紙上面，膠體上面再放上與膠體同樣大小的硝化纖維紙 (硝化纖維紙需事先以 transfer buffer 浸濕)，再放上兩張也是事先用 transfer buffer 浸濕的濾紙，並用玻璃棒趕走夾在其中的氣泡。放入轉漬槽中，將轉漬槽放在冷房中以 100 V 轉漬 50 分鐘。

(F). 免疫墨點法 (Immunoblot):

轉漬完後將硝化纖維紙取出，用 PBS-T buffer 漂洗約 5 分鐘，以 5 % blocking buffer 於室溫下溫和作用 1 小時。倒掉 blocking buffer，再用 PBS-T buffer 快速漂洗三次，依序分別是 5 分鐘、10 分鐘、15 分鐘。換上一級抗體 (primary Ab) 於室溫下溫和作用一小時，再以 PBS-T buffer 快速漂洗 3 次，也是 5 分鐘、10 分鐘、15 分鐘，然後再換上二級抗體 (secondary Ab) 於室溫下溫和作用 1 小時。再以 PBS-T buffer 快速漂洗 3 次，

也是 5 分鐘、10 分鐘、15 分鐘。最後將硝化纖維紙放入透明塑膠套中，用濾紙輕輕的吸掉硝化纖維紙上所殘留下來的 TBS-T buffer，然後將 ECL substrate (1:1 混合均勻)，加到硝化纖維紙上，慢慢蓋上塑膠套使 ECL substrate 覆蓋整個硝化纖維紙，將多餘的 ECL substrate buffer 用面紙擦拭掉。將塑膠套放到感光夾中，以 X 光片感光，將 X 光片利用顯影劑顯影 1 分鐘，換上清水漂洗數下，再換到定影劑中定影 1 分鐘，再用清水清洗乾淨即可。

七. 西方墨點法分析 PKC 的轉位作用:

樣本的處理:

將取得的肝臟組織用 buffer A 均質，均質完後將此均質液在 4 °C 下，以 40000 rpm 的轉速離心 1 小時，離心後所得的上清液先儲存於 -70 °C 冰箱，此即細胞質萃取液 (cytosolic fraction)。

下層沈澱物則加入 2 ml buffer B，用振盪器震盪數次，接著冰浴一小時，期間每隔 5 分鐘震盪一次。然後再以 40000 rpm 的轉速，於 4 °C 下離心 1 小時，所得的上清液部份即為細胞膜萃取液 (membrane or particulate fraction)，亦於 -70 °C 冰箱中保存。有關 Western blotting 的作法與上述的作法皆一樣 (但需配製 8% 的下層 separating gel (配法見第三章材料與方法)。

八. 西方墨點分析 c-Jun 、 c-Fos 蛋白的表現:

樣本的處理:

將取得的肝臟組織用 nuclear extract buffer A 均質，均質完後用兩層以 nuclear extract buffer A 浸濕的紗布過濾，以 770 g 、 4 °C 離心 10 分鐘，倒掉上清液，留下 pellet ，再以 1 ml nuclear extract buffer B 將 pellet 打散均勻，放在冰上作用 15 分鐘，中間需搖晃混合均勻。再以 12000 rpm 、 4 °C 、離心 5 分鐘。上清液為 nuclear extract 。將此樣本存於 -80 °C 儲存。有關 Western blotting 的作法與上述的作法皆一樣（但需配製 10% 的下層 separating gel (配法見第三章材料與方法)。

第五章

結果

一. 茶多酚對肝細胞毒性的測定

為了採用適當的且對細胞無毒性的濃度來進行實驗，分別以 10、50、100、150、250 $\mu\text{g/ml}$ 的 catechin 濃度及 5、10、20、50、100 $\mu\text{g/ml}$ 的 EGCG 濃度處理大白鼠的初代培養肝細胞，觀察不同濃度的 catechin 和 EGCG 對肝細胞存活率的影響。以 MTT assay 來定量 catechin 和 EGCG 的細胞毒性。活細胞會將 MTT 還原成 formazan，以 isopropanol 將 crystal 溶解後，於波長 563 nm 測其吸光值。以無處理 catechin 和 EGCG 之吸光值為 100% 存活率，其餘處理者與之比較。實驗結果發現，如 (圖 1)，以 0.1% 的 DMSO 當作 solvent control，細胞的存活率還有 91%，而分別處理 10、50、100、150、250 $\mu\text{g/ml}$ 的 catechin，細胞的存活率至少都在 90% 以上。所以 catechin 對肝細胞沒有毒性。而 (圖 2) 所示，EGCG 以二次水當作 solvent control，其對肝細胞幾乎是無毒性的，殊有 100% 的存活率。而分別處理 5、10、20、50、100 $\mu\text{g/ml}$ 不同濃度的 EGCG 後，肝細胞的存活率也仍有 90% 以上，所以 EGCG 對肝細胞的毒性作用是很低的。因此我們選擇了 100 $\mu\text{g/ml}$ 的 catechin 和 20 $\mu\text{g/ml}$ 的 EGCG 去處理大白鼠的初代培養肝細胞，觀察處理不同時間 catechin 和 EGCG 對 GST 酵素活性的影響。

二. 茶多酚對 GST 酵素活性的影響

過去的一些研究指出，茶多酚具有許多有益生物體的功能，包括抗氧化、抑癌作用等等。因此在本實驗我們想去了解這些茶多酚是否會去誘導解毒酵素 GST 活性的增加而達到保護作用。

本實驗使用不同的茶多酚，分別是 catechin (100 $\mu\text{g/ml}$)、EGCG (20 $\mu\text{g/ml}$)、epicatechin (100 $\mu\text{g/ml}$)、ECG (10 $\mu\text{g/ml}$)、EGC (10 $\mu\text{g/ml}$) 去處理大白鼠的初代培養肝細胞，在不同的時間去觀察這些茶多酚對 GST 酵素活性的影響。實驗結果顯示，處理 100 $\mu\text{g/ml}$ 的 catechin (如圖 3)，分別於 0、3、6、9、12、24 小時收取細胞觀察 GST 酵素活性，發現 catechin 對 GST 酵素活性分別在 3、6、9、12、24 小時與 0 小時比較，都有被誘發出來，而在 12 小時，GST 酵素活性表現最高。我們將 0 小時當作對照組，12 小時的 GST 酵素活性比對照組增加了 112 倍。處理 20 $\mu\text{g/ml}$ EGCG (如圖 4)，分別於 0、3、6、9、12、24 小時觀察 GST 酵素活性，EGCG 對 GST 酵素活性分別在 3、6、9、12、24 小時與 0 小時比較，也都有被誘發出來，而在 24 小時時，GST 酵素活性表現最高。我們將 0 小時當作對照組，24 小時的 GST 酵素活性比對照組增加了 81 倍左右。處理 100 $\mu\text{g/ml}$ epicatechin (如圖 5)，分別在 0、3、6、9、12、24 小時觀察 GST 酵素活性，發現 epicatechin 對 GST 酵素活性分別在 3、6、9、12、24 小時與 0 小時比較，都有被誘發出來，而在 12 小時，GST 酵素活性表現最高。我們將 0 小時當作對照組，12 小時的 GST 酵素活性比對照組增加了 39 倍左右。處理 10 $\mu\text{g/ml}$ ECG (如圖 6)，分別在 0、3、6、9、12、24 小時觀察 GST

酵素活性，發現 ECG 對 GST 酵素活性分別在 3、6、9、12、24 小時與 0 小時比較，都有被誘發出來，而在 24 小時，GST 酵素活性表現最高。我們將 0 小時當作對照組，24 小時的 GST 酵素活性比對照組增加了 221 倍左右。處理 10 $\mu\text{g/ml}$ EGC (如圖 7)，分別在 0、3、6、9、12、24 小時觀察 GST 酵素活性，發現 EGC 對 GST 酵素活性分別在 3、6、9、12、24 小時與 0 小時比較，都有被誘發出來，而在 24 小時，GST 酵素活性表現最高。我們將 0 小時當作對照組，24 小時的 GST 酵素活性比對照組增加了 48 倍左右。

綜合以上結果，我們以這五種不同的茶多酚誘導 GST 酵素活性增加的能力分別是以 ECG 能力最好，在 24 小時 GST 酵素活性可達將近 70 nmole/min/mg ，而 EGCG、EGC 在 24 小時 GST 酵素活性可達將近 40 nmole/min/mg ，catechin 和 epicatechin 在 12 小時 GST 酵素活性可達將近 16 nmole/min/mg 。

雖然 ECG 誘導 GST 酵素活性增加的能力最好，但我們選擇使用 EGCG 和 catechin 去做動物實驗，因為以前研究報告指出這五種茶多酚中，以 EGCG 的抑癌能力最好 (54)，而且 EGCG 是占綠茶萃取成分中最多者 (見附表二)。另外因為過去的研究也多偏於 catechin 方面，對於 actechin 的了解也比較多，以及 catechin 是綠茶萃取成分中占最少比例者 (見附表二)，因此我們選用了這兩種茶多酚去做動物實驗。

在動物實驗方面，我們將茶多酚從大白鼠的肝門靜脈注射進去，使茶多酚直接到肝臟去對組織細胞作用，在預定的時間到後，

斷頭犧牲大白鼠，並將肝臟取出，去偵測 GST 酵素活性。以 5 mg 的 catechin 注射到大白鼠的肝門靜脈，分在 0、3、6、9、12、24 小時偵測 catechin 對 GST 酵素活性的影響，結果顯示 (圖 8) 在 3、6、9、12、24 小時與 0 小時比較，GST 酵素活性都有增加的趨勢，並在 24 小時有最高的活性表現。我們將 0 小時當作對照組，24 小時的 GST 酵素活性比對照組增加了 12 倍左右。而以 1 mg EGCG 注射到大白鼠的肝門靜脈，分在 0、3、6、9、12、24 小時偵測 EGCG 對 GST 酵素活性的影響，結果顯示 (圖 9) 在 3、6、9、12、24 小時與 0 小時比較，GST 酵素活性都有增加的趨勢，並在 24 小時時也有最高的活性表現。我們將 0 小時當作對照組，24 小時的 GST 酵素活性比對照組增加了 81 倍左右。

因此我們將不同劑量的 catechin 和 EGCG 注射到大白鼠的肝門靜脈，在 24 小時後斷頭犧牲，將肝臟取出，並偵測其 GST 酵素活性的變化。實驗結果顯示 (如圖 10)，分別以 1、2、5、10、15 mg 的 catechin 以及 0.1 % 的 DMSO 當作 solvent control，注射到大白鼠的肝門靜脈，皆有誘導 GST 酵素活性的增加，但以 2 mg 的 catechin 濃度誘導 GST 酵素活性的效果最好，並呈現一個 dose-response 的結果。另外 (如圖 11)，分別以 0.2、0.5、1、5、10 mg 的 EGCG 以及二次水當作 solvent control，注射到大白鼠的肝門靜脈，也皆有誘發 GST 酵素活性的增加，而以 10 mg 的 EGCG 濃度誘導 GST 酵素活性的效果最好，並呈現一個 dose-response 的結果。

三. 茶多酚對 GST mRNA 表現的影響

之前我們探討了茶多酚對 GST 酵素活性的影響，分別以初代肝細胞培養以及動物實驗證明茶多酚確實會誘導 GST 酵素活性的增加，因此我們再進一步的想去了解茶多酚是否會去誘導 GST mRNA 的增加。

我們將 5 mg 的 catechin 注射到大白鼠的肝門靜脈後分別在 0、3、6、9、12、24 小時，斷頭犧牲大白鼠，並從肝臟組織抽取其 total RNA，然後取 10 μ g 的 total RNA 進行北方墨點法實驗。並選擇了與 Ya、Yc 相似性較少的 Yb cDNA 當作探針去偵測 GST Yb mRNA 的變化，而且以 GAPDH mRNA 當作 internal control，來換算出 GST Yb mRNA 的相對含量。結果顯示 (圖 12)，處理 5 mg catechin 在 0、3 小時時並無太大變化，而在 6、9 小時 GST Yb mRNA 很明顯的有增加，在 12、24 小時，看起來也比 0 小時的量還多。我們以 0 小時當作對照組，將 3、6、9、12、24 小時與對照組互相比較，將 GST mRNA 以量化圖表示 (圖 13)，結果很明顯的在 6 小時 RNA 的量是對照組的 2.6 倍，而在 9 小時的 RNA 比對照組增加將近 5 倍。而在 12、24 小時的 RNA 比對照組增加了 2-4 倍左右。

因此我們處理不同濃度的 catechin，分別是 1、2、5、10、15 mg 及一組 solvent control，注射到大白鼠的肝門靜脈，在 12 小時斷頭犧牲大白鼠，並從肝臟組織抽取其 total RNA，然後取 10 μ g 的 total RNA 進行北方墨點法實驗。同樣的以 Yb cDNA 當作探針去偵

測 GST Yb mRNA 的變化，而且以 GAPDH mRNA 當作 internal control，來換算出 GST Yb mRNA 的相對含量。圖 14 為 GST Yb mRNA 及 GAPDH mRNA 的電泳圖，若以 solvent control 當作對照組，將 1、2、5、10、15 mg 與對照組互相比較，將 GST mRNA 的相對含以量化圖表示 (圖 15)，結果發現隨著 catechin 濃度的增加，GST Yb mRNA 也有增加的趨勢，在 2、5 mg 的濃度使得 GST mRNA 與對照組比較增加了 2.5 倍右。

在 EGCG 方面，我們以 1 mg 的 EGCG 注射到大白鼠的肝門靜脈後分別在 0、3、6、9、12、24 小時，斷頭犧牲大白鼠，並從肝臟組織抽取其 total RNA，然後取 10 μ g 的 total RNA 進行北方墨點法實驗。同樣的以 Yb cDNA 當作探針去偵測 GST Yb mRNA 的變化，而且以 GAPDH mRNA 當作 internal control，來換算出 GST Yb mRNA 的相對含量。結果顯示 (圖 16) 在電泳圖上 GST Yb mRNA 在 3、6 小時都比 0 小時的量還多，但在 9、12、24 小時卻有逐漸減少的情形發生。我們同樣的以 0 小時當作對照組，將 3、6、9、12、24 小時與對照組互相比較，將 GST mRNA 以量化圖表示 (圖 17)，在 3、6、小時都增加了 1.5-2 倍左右，但 12、24 小時卻逐漸的降低了。

再來我們處理不同濃度的 EGCG，分別是 0.2、0.5、1、5、10 mg 以及以二次水當作 solvent control，注射到大白鼠的肝門靜脈，在 12 小時斷頭犧牲大白鼠，並從肝臟組織抽取其 total RNA，然後取 10 μ g 的 total RNA 進行北方墨點法實驗。同樣的以 Yb cDNA 當作探針去偵測 GST Yb mRNA 的變化，而且以 GAPDH mRNA 當

作 internal control，來換算出 GST Yb mRNA 的相對含量。圖(18)為 GST Yb mRNA 及 GAPDH mRNA 的電泳圖，若以 solvent control 當作對照組，將 0.2、0.5、1、5、10 mg 與對照組互相比較，將 GST mRNA 的相對含以量化圖表示 (圖 19)，結果發現隨著 EGCG 濃度的增加，GST Yb mRNA 也有增加的趨勢，在 5、10 mg 的濃度使得 GST mRNA 與對照組比較增加了 2 倍右。

四. 茶多酚對 GST 蛋白的表現

經由以前文獻得知，GST 因來自不同的基因族 (30) 可區分成五大類，為 alpha 族、mu 族、pi 族、sigma 族以及 theta 族 (31)。分別分佈在不同的區域以及在生理上也扮演著不同的角色 (參考第一章前言及緒論)。在 alpha 族的 GST 對於代謝抗癌物具有良好的功效以及 mu 族 GST 在肝臟扮演著一個不可獲缺的保護性角色，因此我們想去探討茶多酚對這兩類 GST 蛋白的影響是如何？我們將 5 mg 的 catechin 注射到大白鼠的肝門靜脈，分別在 0、3、6、9、12、24 小時斷頭犧牲大白鼠，取出肝臟，製備組織萃取液，以西方墨點法分析其蛋白的表現，並以 α -tubulin 當作 internal control。電泳圖顯示 (圖 20)，GST Ya 看起來似乎沒有很大的變化。我們把 0 小時當作對照組，將 3、6、9、12、24 小時與對照組互相比較，GST Ya 的相對含量是沒有變化的 (圖 21)。而在 GST Yb1 蛋白方面 (圖 22) 卻實有增加的趨勢。而且在電泳圖上我們似乎可以看到在 GST Yb1 的位置是由兩個 band 結合在一起的。而我們

以 0 小時當作對照組，將 3、9、12、24 小時與對照組互相比較，將 GST Ya 的相對含量以量化圖顯示（圖 23），我們可以很明顯的看到 GST Yb1 蛋白隨著時間的增加而有增加的情形，並在 12 小時的時候增加了約 2.5 倍，隨之在 24 小時稍微減少。而在 GST Yb2 蛋白方面，電泳圖上（圖 24）可以看到在 5 mg catechin 處理下，隨著時間的增加 GST Yb2 蛋白而增加，而在 12 小時後又隨之減少。相同的我們以 0 小時當作對照組，將 3、6、9、12、24 小時與對照組互相比較，將 GST Yb2 的相對含量以量化圖顯示（圖 25），在 3 小時的 GST Yb2 約增加了將近 2 倍，而在 6、9 小時約增加了 2-3 倍左右，隨之慢慢減少。因此 catechin 對 GST Yb1、Yb2 有一個 time course 的影響。

更進一步我們想去知道不同濃度的 catechin 對 GST 蛋白的影響為何？因此我們分別處理不同濃度的 catechin，分別是 1、2、5、10、15 mg 以及一組以 0.1 % DMSO 當作 solvent control，注射到大白鼠的肝門靜脈，分別在 0、3、6、9、12、24 小時斷頭犧牲大白鼠，取出肝臟，製備組織萃取液，以西方墨點法分析其蛋白的表現，並以 α -tubulin 當作 internal control。結果顯示（圖 26），不同濃度的 catechin 對 GST Ya 蛋白在 5、10 mg 的濃度稍有減少。相同的以 0.1 % DMSO 當作 solvent control，並當作對照組，將 1、2、5、10、15 mg 與對照組比較，將 GST Ya 的相對含量以量化圖表示（圖 27），很明顯的不同濃度的 catechin 並不會誘發 GST Ya 蛋白量的增加。而不同濃度的 catechin 對 GST Yb1 蛋白在電泳圖上（圖 28）我們可以看到在 10、15 mg 的濃度對 GST Yb1 有增

加的現象，而且在 GST Yb1 的地方似乎也是有兩個 band 重疊在一起而形成 GST Yb1 的 band。相同我們以 solvent control 當作對照組，將 1、2、5、10、15 mg 與對照組互相比較，將 GST Yb1 相對含量以量化圖顯示（圖 29），我們看到 10、15 mg 濃度的 catechin 與對照組比較，GST Yb1 蛋白增加了約 1.5-2 倍左右。不同濃度的 catechin 對 GST Yb2 蛋白在電泳圖上（圖 30）的量看起來似乎沒有變化。但我們以 solvent control 當作對照組，將 1、2、5、10、15 mg 與對照組互相比較，將 GST Yb1 相對含量以量化圖顯示（圖 31），1 mg 的 catechin 使得 GST Yb2 蛋白約增加了 1.5 倍左右。

在 EGCG 方面，我們將 1 mg 的 EGCG 注射到大白鼠的肝門靜脈，分別在 0、3、6、9、12、24 小時斷頭犧牲大白鼠，取出肝臟，製備組織萃取液，以西方墨點法分析其蛋白的表現，並以 α -tubulin 當作 internal control。結果顯示（圖 32），在電泳圖上我們看到在 9、12 小時 GST Ya 蛋白有增加。相同的以 0 小時當作對照組，將 3、6、9、12、24 小時與對照組互相比較，將 GST Ya 相對含量以量化圖表示（圖 33），在 9 小時增加了約 2 倍左右。而在 GST Yb1 蛋白方面，在電泳圖上（圖 34）看起來似乎也沒有很明顯的變化，但是我們在電泳圖可以看到在 GST Yb1 的位置是由兩個陰影存在，我們覺得這似乎是由兩個 band 重疊在一起而造成的。相同的我們以 0 小時當作對照組，將 3、6、9、12、24 小時與對照組互相比較，將 GST Yb1 相對含量以量化圖表示（圖 35），看起來似乎沒有太大的變化。而在 GST Yb2 蛋白方面，電泳圖上（圖 36）可以看到在 1 mg EGCG 處理下，隨著時間的增加 GST Yb2 蛋白而稍有

增加，相同的我們以 0 小時當作對照組，將 3、6、9、12、24 小時與對照組互相比較，將 GST Yb2 相對含量以量化圖表示 (圖 37)，在 3、6、9 小時的 GST Yb2 比對照組有增加趨勢，9 小時的量為對照組的 2.2 倍。

更進一步我們想去知道不同濃度的 EGCG 對 GST 蛋白的影響為何？因此我們分別處理不同濃度的 EGCG，分別是 0.2、0.5、1、5、10 mg 以及一組以二次水當作 solvent control，注射到大白鼠的肝門靜脈，在 12 小時斷頭犧牲大白鼠，取出肝臟，製備組織萃取液，以西方墨點法分析其蛋白的表現，並以 α -tubulin 當作 internal control。結果顯示 (圖 38)，隨著 EGCG 濃度的增加，GST Ya 蛋白也有增加的趨勢。相同的以二次水當作 solvent control，並當作對照組，將 0.2、0.5、1、5、10 mg 與對照組比較，並以量化圖表示 (圖 39)，在 0.2、0.5 mg 的濃度比對照組增加了約 1.7 倍左右。而不同濃度的 EGCG 對 GST Yb1 蛋白在電泳圖上 (圖 40)，看起來好像有增加的感覺，並以 α -tubulin 當作 internal control 去換算 GST Yb1 的相對含量，GST Yb1 蛋白也有增加的情形，但我們在電泳圖上可以看到 GST Yb1 的地方似乎也是有兩個 band 重疊在一起而形成。相同我們以 solvent control 當作對照組，將 0.2、0.5、1、5、10 mg 與對照組互相比較，並以量化圖顯示 (圖 41)，在 5 mg 的濃度與對照組比較增加了約 1.5 被左右。而不同濃度的 EGCG 對 GST Yb2 蛋白在電泳圖上 (圖 42) 看起來有增加的情形，相同的我們以 solvent control 當作對照組，將 0.2、0.5、1、5、10 mg 與對照組互相比較，並以量化圖顯示 (圖 42) 結果顯示在 5mg

的濃度比對照組約增加了 1.6 倍左右。

五. 茶多酚對 c-Fos 、 c-Jun 蛋白的表現

我們處理了不同濃度的 catechin 及 EGCG 去探討這兩種茶多酚對 c-Fos 、 c-Jun 蛋白的影響。結果顯示 (圖 44) 處理不同濃度的 catechin 分別是 1 、 2 、 5 、 10 、 15 mg ，在電泳圖上看起來似乎沒有變化，相對的我們以 solvent control 當作對照組，將 1 、 2 、 5 、 10 、 15 mg 與對照組互相比較，並以量化圖顯示 (圖 45)，c-Fos 蛋白的相對含量是沒有變化的。在 c-Jun 蛋白方面，處理 1 、 2 、 5 、 10 、 15 mg 的 catechin ，在電泳圖上 (圖 46) 我們可以看到在 2 mg 濃度的 catechin 對 c-Jun 蛋白有增加的現象，相同的以 solvent control 當作對照組，將 1 、 2 、 5 、 10 、 5 mg 與對照組互相比較，並以量化圖顯示 (圖 47)，c-Jun 蛋白在 2mg 的濃度與 control 比較增加了約 1.6 倍，5 mg 的濃度比 control 稍微增加一些，高濃度的 catechin 對 c-Fos 蛋白的表現則有抑制現象。15 mg 的 catechin 其 c-Jun 蛋白為對照組的 25%。

在處理不同濃度的 EGCG 分別是 0.2 、 0.5 、 1 、 5 、 10 mg ，在電泳圖上 (圖 48) 看起來似乎沒有增加，相對的我們以 solvent control 當作對照組，將 0.2 、 0.5 、 1 、 5 、 10 mg 與對照組互相比較，並以量化圖顯示 (圖 49)，c-Fos 蛋白與對照組比較稍微增加了約 1.5 倍左右。在 c-Jun 蛋白方面，處理 0.2 、 0.5 、 5 、 10 mg 的 EGCG ，在電泳圖上 (圖 50) 看起來也有增加的情形，相同的以 solvent control 當作對照組，將 0.2 、 0.5 、 1 、 5 、 10 mg 與對照組互相比

較，並以量化圖顯示 (圖 51)，c-Jun 蛋白與 control 比較約加了 1.5 倍左右。

六. 茶多酚對 PKC- α 蛋白的影響

經由以前文獻以及很多實驗證明 PKC pathway 在細胞內 signal transduction 佔有很重要的影響，因此我們想去了解茶多酚對 PKC pathway 是否有影響？

我們將 5 mg 的 catechin 注射到大白鼠的肝門靜脈，分別在 0、3、6、9、12、24 小時斷頭犧牲大白鼠，取出肝臟，製備其 cytosol 及 particulate fraction 的蛋白，以西方墨點法分析其蛋白的表現，以 brain lysate 正確的指出 PKC- α 的位置，並以 α -tubulin 當作 internal control。結果顯示 (圖 52)，以 0.1 % 的 DMSO 當作 solvent control，在 cytosol 方面，電泳圖上看起來沒有太大的變化，而在 particulate 方面，每一個 band 的量也沒有變化，但是在位置上，control、0、3、6、9 小時的位置，都有往上移的情形發生，而在 12、24 小時的位置又回來到與 brain lysate 的位置相同，我們認為它發生了 shift 的現象。相同的以 0 小時當作對照組，將 3、6、9、12、24 小時與對照組互相比較量上面的變化，並以量化圖方式表示 (圖 53)，在 12 小時，cytosol 的 PKC- α 減少了一半左右，但在 particulate 上 PKC- α 的量並沒有很大的變化，但在 9 小時的時候有稍微的減少，反過來對照電泳圖 (圖 52) 看到 9 小時的位置，比其餘的 band shift 到更高的位置上。

更進一步我們處理不同濃度的 catechin，分別是 1、2、5、10、15 mg 的濃度，注射到大白鼠的肝門靜脈，在 12 小時斷頭犧牲大白鼠，取出肝臟，製備其 cytosol 及 particulate fraction 的蛋白，以西方墨點法分析其蛋白的表現，並以 α -tubulin 當作 internal control。實驗結果顯示，在電泳圖（圖 54）上我們看到不同濃度的 catechin 在 cytosol 上對 PKC- α 的量沒有影響，在 particulate 上，PKC- α 的量也沒有變化。相同的以 solvent control 當作對照組，將 1、2、5、10、15 mg 與對照組互相比較，並以量化圖顯示（圖 55），在 cytosol 上，15 mg 的 catechin 使 PKC- α 蛋白增加約 1.5 倍左右，而 particulate 亦是如此，但在 1、2 mg 低濃度的 catechin 有較少的情形。

另外我們將 1 mg 的 EGCG 注射到大白鼠的肝門靜脈，分別在 0、3、6、9、12、24 小時斷頭犧牲大白鼠，取出肝臟，置備其 cytosol 及 particulate fraction 的蛋白，以西方墨點法分析其蛋白的表現，以 brain lysate 正確的指出 PKC- α 的位置，並以 α -tubulin 當作 internal control。電泳圖顯示（圖 56），以 0 小時當作 control，在 cytosol 方面，別在 0、3、6、9、12、24 小時都比 control 多，但它們之間看起來沒有太大的變化，而在 particulate 方面，每一個 band 的量也沒有變化，但是在 PKC- α 位置上，仔細觀察 band 的地方似乎是有兩個 band 重疊在一起，我們猜測這是 PKC- α 的磷酸化所造成的。相同的以 0 小時當作對照組，將 3、6、9、12、24 小時與對照組互相比較量上面的變化，並以量化圖方式表示（圖 57），24 小時的 PKC- α 經加了約 2.5 倍左

右，在 particulate 方面，9、12 小時增加了約 2-2.5 倍。

更進一步我們處理不同濃度的 EGCG，分別是 0.2、0.5、1、5、10 mg 的濃度，注射到大白鼠的肝門靜脈，在 6 小時斷頭犧牲大白鼠，取出肝臟，製備其 cytosol 及 particulate fraction 的蛋白，以西方墨點法分析其蛋白的表現，並以 β -actin 當作 internal control。實驗結果顯示，在電泳圖（圖 58）上我們看到不同濃度的 EGCG 在 cytosol 上對 PKC- α 的量有加的情形，在 particulate 上，PKC- α 的變化，也有加的情形但增加的較 cytosol 少。相同的以 solvent control 當作對照組，將 0.2、0.5、1、5、10 mg 與對照組互相比較，並以量化圖顯示（圖 59），在 0.2、0.5 mg particulae 上，PKC- α 的量增加了約 1.7 倍。

七. 茶多酚對 phosphotyrosine (py-20) 蛋白的表現

我們處理了不同濃度的 catechin 及 EGCG 去探討這兩種茶多酚對 py-20 蛋白的影響。結果顯示（圖 60）處理不同濃度的 catechin，分別是 0.2、0.5、1、5、10 mg，我們在電泳圖上可以看到蛋白磷酸化的情形並不是有很明顯的變化。

而處理不同濃度的 EGCG，分別是 0.2、0.5、1、5、10、15 mg，結果顯示（圖 61），相同的蛋白磷酸化的情形並不是很明顯的有變化。

第六章

討論

老鼠體內的主要 GST 依其不同的特性大致可分為三種，分別是 GST pi、GST mu、GST alpha。GST pi 的單元體是 Yp，GST alpha 的單元體是 Ya，GST mu 的單元體是 Yb 單元體 (25)，雖然這三種不同族的 GST 在結構方面，酵素方面的特性都很類似，對於某些化合物的代謝，在功能上的發揮，很可能互相重複，但大致上對於代謝哪一種化合物仍具有一定的特異性，而這些特異性的調節可能和個人的體質、組織的分佈、荷爾蒙的影響都有關。而且它們所負責的生理功能也有相異之處。以肝細胞為例，依但肝細胞變成腫瘤細胞，尤其是化學性的致癌作用，GST P 則會很明顯的大量表現，GST alpha 則是主要負責解毒的功作，特別發現它會代謝一些抗癌藥物對癌症初期的治療 (46)。至於 GST mu 有關其報告探討的較少，有報告曾顯示其和組織的發炎有關，在肝臟中扮演著保護性的角色。而之前的很多文獻報告過，茶多酚對人體是有很多的益處，如抗癌、抗氧化等等的功能。因此本研究乃是想去了解茶多酚是否會去誘導體內解毒酵素 GST 的表現，以及茶多酚誘導解毒酵素的表現其機制為何？

至於我們為什麼選擇細胞和動物實驗來做此研究，乃是因為兩者之間可以互相比較而去驗證。我們在細胞實驗和動物實驗中觀察到 catechin 和 EGCG 誘發 GST 酵素活性的增加倍率和動物實驗中，這兩種茶多酚誘發 GST 酵素活性的倍率是不相上下的。因此證明了

細胞和動物實驗結果是一致的。但是考慮到做初代肝細胞培養，每次獲得的細胞數是有限的，不能在一隻老鼠身上同時看到其活性、蛋白、RNA 的表現，為了去除這種老鼠上的個體差異，我們以下的實驗選擇了動物模型來探討 catechin 和 EGCG 對 GST 其活性、基因上的表現是如何的？

在以前的研究報告 (54) 指出，茶多酚不論在老鼠或人體的血漿中均可測到其含量。因此我們直接將茶多酚直接從老鼠的肝門靜脈注射進去，使其直接對肝臟組織細胞作用。我們再將同一隻老鼠的肝臟組織來做各項分析，以減少其個體上的差異並可獲得較多的 sample 來重複實驗的結果，更精確的證明實驗結果。

實驗結果顯示，五種茶多酚分別是 catechin、EGCG、epicatechin、ECG、EGC，在初代培養肝細胞的確會誘導 GST 酵素活性的增加。若以 0 小時當作對照組，catechin 在 12 小時與對照組比較增加了 9 倍，EGCG 在 12 小時與對照組比較增加了 81 倍，epicatechin 在 12 小時與對照組比較增加了 39 倍，ECG 在 24 小時與對照組比較增加了 221 倍，而 EGC 在 24 小時與對照組比較增加了 48 倍。這些倍數的增加代表了茶多酚在細胞實驗中確實會誘導 GST 酵素活性的增加，而且是很有意義的。

在動物實驗方面，若以 0 小時當作對照組，catechin 在 24 小時與對照組比較增加了 12 倍，而 EGCG 在 24 小時與對照組比較增加了 81 倍，這種倍數的增加代表了在動物實驗中，茶多酚具有誘導解毒酵素 GST 活性的增加，而且 EGCG 誘導的 GST 活性的增加效果比 catechin 還好。因此在細胞實驗以及在動物實驗中皆能互相驗證，

茶多酚確實會誘導 GST 酵素活性的增加，而在生理上達到一個保護作用。因此細胞和動物實驗不論 catechin 或 EGCG 誘導 GST 酵素活性的增加倍率是很相同的，不相上下。兩者反應出這兩種實驗模式皆可偵測出茶多酚刺激 GST 活性。只是在動物實驗茶多酚刺激 GST 酵素活性的增加比細胞實驗在時間上有較慢的效果，這是不難理解的。

在 catechin 和 EGCG 刺激 GST mRNA 基因的表現層次探討方面，處理 5 mg 的 catechin，於 9 小時的時候與對照組比較，增加了約 4.2 倍左右。處理不同濃度的 catechin，在 2、5 mg 濃度時，具有較好的能力去誘發 GST mRNA 的增加，與對照組比較增加了約 2.5 倍。而處理 1 mg 的 EGCG，於 3、6 小時與對照組相比較，GST Yb mRNA 增加了約 1.5-1.7 倍。但在作 dose-response 時，我們選擇了 6 小時的時間處理老鼠，再以北方墨點法偵測 GST Yb mRNA 的含量，相同的我們也可以看到隨著 EGCG 濃度的增加，GST Yb mRNA 的量也隨之增加。

而 catechin 和 EGCG 刺激 total GST 活性的增加，其中的一個方式是刺激 GST 基因的表現。而 GST mRNA 增加的倍數不及活性增加的倍數，可能是因為在 mRNA 我們只偵測 GST Yb mRNA 的量，而 Ya、Yp 或者其它的 form，我們並不曉得它們的變化是如何？有鑒於此，我們在 GST 蛋白的偵測上，去觀察 GST Ya、Yb1、Yb2 這三種蛋白的變化。

在不同的時間，發現 catechin 對 GST Ya 蛋白是沒有影響的，但對 GST Yb1、Yb2 蛋白有促使它們增加(詳細結果請看第五章)。

在 6-12 小時與對照組比較，約增加了 2-2.5 倍左右。而不同濃度的 catechin 相同的對 GST Ya 蛋白並沒有促使它增加的情形發生，但對 GST Yb1 蛋白，於 10、15 mg 的 catechin 有誘導 GST Yb1 蛋白的增加，與對照組比較約增加了 1.5-2 倍左右，而在 GST Yb2 蛋白於 1 mg 的濃度與對照組比較增加了 1.5 倍左右。在量上的變化，catechin 確實會誘導 GST Yb1、Yb2 蛋白的增加，但仔細觀察電泳圖上，GST Yb1 蛋白除了量上面的變化，它的 band 似乎有陰影存在感覺是由兩個 band 結合重疊在一起的，這種情形我們猜測可能是 GST Yb1 蛋白被修飾(modification)了，因此除了誘導 GST Yb1、Yb2 蛋白量的增加，另一方面可能是 GST Yb1 蛋白在某種程度上被修飾了。

處理 1 mg EGCG，於不同的時間，觀察 GST Ya、Yb1、Yb2 蛋白的變化，發現 GST Ya 蛋白在 9 小時的時候與對照組比較增加了 2 倍，而 GST Yb1 蛋白似乎沒有變化。相同的在 9 小時的後 GST Yb2 蛋白與對照組比較增加了 2.2 倍左右。在處理不同濃度的 EGCG 於 6 小時的時候觀察 GST Ya、Yb1、Yb2 蛋白的變化，發現隨著 EGCG 濃度的增加，對 GST Ya、Yb1、Yb2 蛋白也有增加的情形。但仔細觀察電泳圖上，GST Yb1 蛋白的 band 似乎是由兩個 band 重疊在一起而形成的，這跟我們之前 catechin 對 GST Yb1 蛋白的猜測是一樣的，可能是 GST Yb1 蛋白在某種程度上被修飾過了。

實驗發現 catechin 和 EGCG 兩者在 immunoblotting 所刺激的蛋白表現並不相同，catechin 以 GST Yb1、Yb2 為主，EGCG 以 Ya、Yb2 為主，因此兩者刺激肝臟細胞解毒酵素基因表現的途徑可能不徑

相同。而且此蛋白的結果亦無法配合所偵測的 GST 酵素活性增加的倍數。這可能是在其它 form 的 GST 我們並沒有去偵測探討，所以很難確定其它 form 的 GST 不參與其表現。而另一項可能如前面所述，GST 蛋白有經過修飾作用了。

雖然以前沒有文獻報告過 GST 蛋白有修飾的情形，但在這裡由電泳圖的結果，我們大膽的猜測 GST 蛋白經刺激後，可能有被修飾，其中最有可能的修飾方式是磷酸化作用。所以往後我們將繼續探討 GST 蛋白是否有被磷酸化？我們可以使用較普遍的 immunoprecipitation 的方法來作證實。

為了了解茶多酚刺激 GST 基因表現的上游機制，我們繼續探討 GST 上游基因的蛋白，如 c-Fos、c-Jun 蛋白，看看茶多酚是否對它們有影響？我們發現 catechin 和 EGCG 對 c-Fos 蛋白是沒有影響的，相同的對 c-Jun 蛋白也是沒有影響的。因此茶多酚並非透過改變 c-Fos、c-Jun 蛋白的表現以形成 AP-1 complex 途徑進行刺激 GST 基因的表現。

而在 1977 年，PKC 首先被 Nishizuka 發現 (55)，隨後即受到廣泛的重視及研究，它是一種鈣和磷酯依賴的蛋白激酶 (56)。進一步的發現，PKC 在細胞內傳遞訊息的作用有關，當 PKC 從細胞質轉移 (translocate) 到細胞膜，此時 PKC 即被活化 (57, 58)。而一擔 PKC 被活化，將進一步促使細胞內許多蛋白的磷酸化，如 Histone (59)、EGF receptor (60) 等等，而引發一連串細胞內的訊息傳遞路徑。

因此我們探討了茶多酚對 PKC- α 的 pathway。catechin 及

EGCG 除改變細胞 PKC- α 的濃度外(如前面結果所述)。另外在電泳圖上觀察到 PKC- α 的 band 有 shift 的現象發生，尤其是 catechin 於 cytosol 的 12 小時 PKC- α 看起來是由兩個 band 連結在一起的。在 particulate 方面，0-9 小時的 band 也有 shift 的現象，而在 12、24 小時的時候又回到與 brain lysate 相同的位置上。我們猜測這種 shift 可能是 PKC- α 發生磷酸化的情形。catechin 對於 cytosol 或 particulate 上的 PKC- α 濃度改變不如 EGCG 對 PKC- α 濃度改變來的大，所以 catechin 對 PKC- α 的作用主要是可能刺激其磷酸化。

處理 1 mg 的 EGCG 於不同時間，PKC- α 量的變化如前面結果所述，在 24 小時的 cytosol，PKC- α 比對照組增加了 2 倍，而在 24 小時的 particulate 上與 9、12 小時相比較，有下降的情形，所以在 24 小時的時候，PKC- α 有被活化而 translocate 到細胞膜上了。所以 PKC- α 在此扮演了部份重要的角色。而在電泳圖上我們可以看到 PKC- α band 的 shift，這與 catechin 對 PKC- α band 的 shift 情形是一樣的。

如果更進一步的探討 PKC 和 GST 之間的作用，我們可以使用 PKC- α 的抑制劑，如 H-7，將 PKC- α 抑制，看看 PKC- α 與 GST 蛋白之間是否有互相影響。

我們繼續探討對這兩種茶多酚對總蛋白的 tyrosin 磷酸化的情形為何?發現這兩種茶多酚對總蛋白的 tyrosin 磷酸化是乎不是有很大的影響，而結果如何，更是以後要探討的。

因此我們將以上結果用圖表顯示，如圖 (62)，而清楚的得知

茶多酚對各個基因蛋白的表現情形。綜合而言，catechin 和 EGCG 刺激 GST 活性高度上升，其機制之一可能是透過 PKC pathway 及其蛋白磷酸化的作用來傳遞訊息以刺激 GST 基因的表現。再者，GST 蛋白本身有極有可能受到修飾作用，而使活性升高。另外，GST 基因的上游除 AP-1 site 之外，上有 ARE 和 XRE sites，因此這兩種途徑的作用為何，以及這兩種茶多酚對 GST 基因的表現到底是茶多酚直接作用在其基因上，還是茶多酚經過代謝後所產生的代謝產物來刺激 GST 基因的作用，都是我們有興趣知道的。

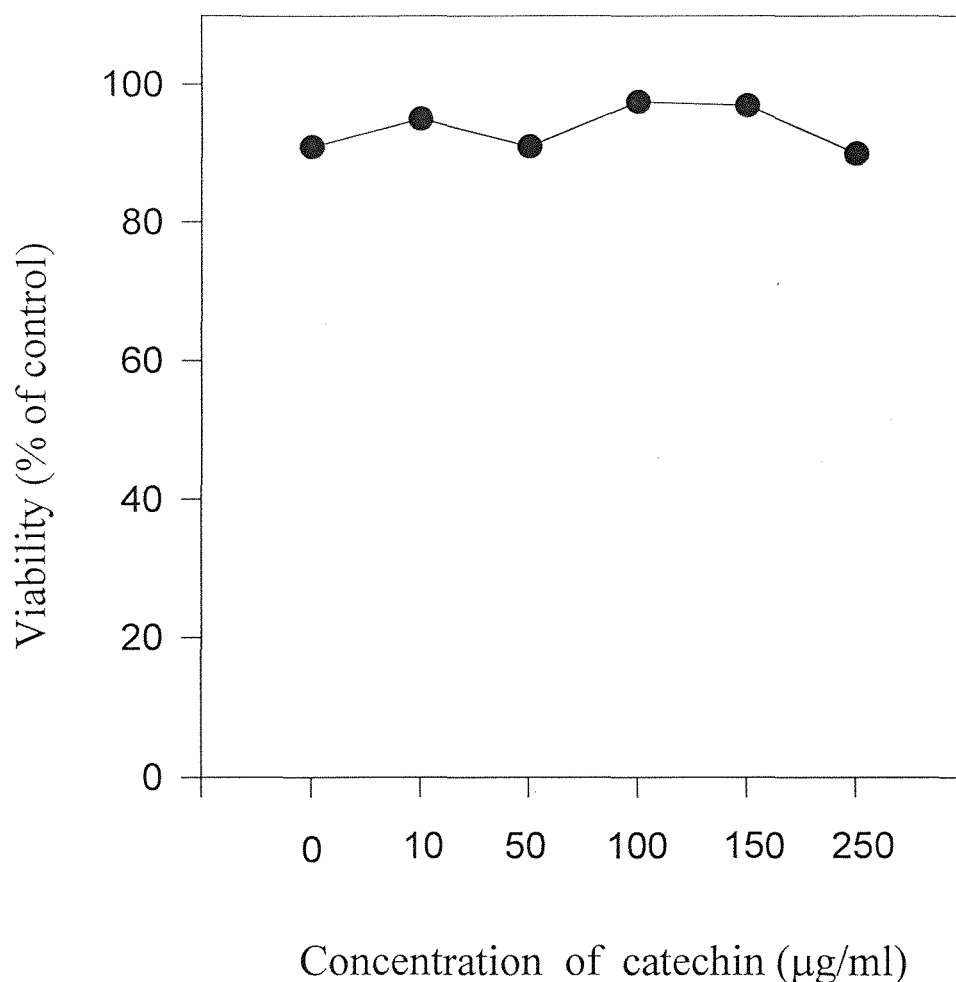


Fig.1 The cytotoxicity of catechin analyzed by MTT assay. The primary culture of rat hepatocyte cells (5×10^5 cells/well) were treated with different concentrations of catechin for 24 hours and, then, were cultured in the present of MTT for 4 hours. The medium was removed, one minililler of isopropanol was added to the cells to dissolve the formazan crystal. The absorbance was determined at 563 nm.

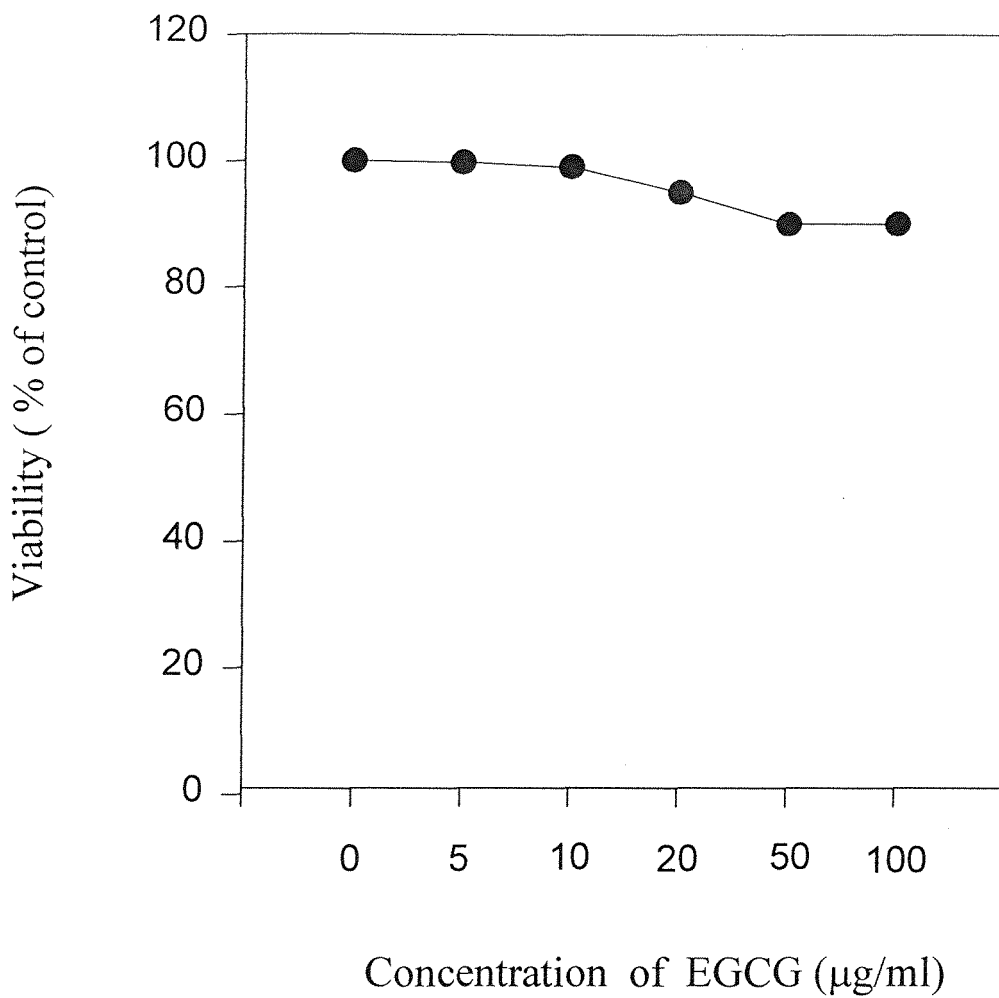


Fig.2 The cytotoxicity of EGCG analyzed by MTT assay. The primary culture of rat hepatocyte cells (5×10^5 cells) were treated with different concentrations of EGCG for 24 hours and, then, were cultured in the present of MTT for 4 hours. The medium was removed, one minililler of isopropanol was added to the cells to dissolve the formazan crystal. The absorbance determed at 563 nm.

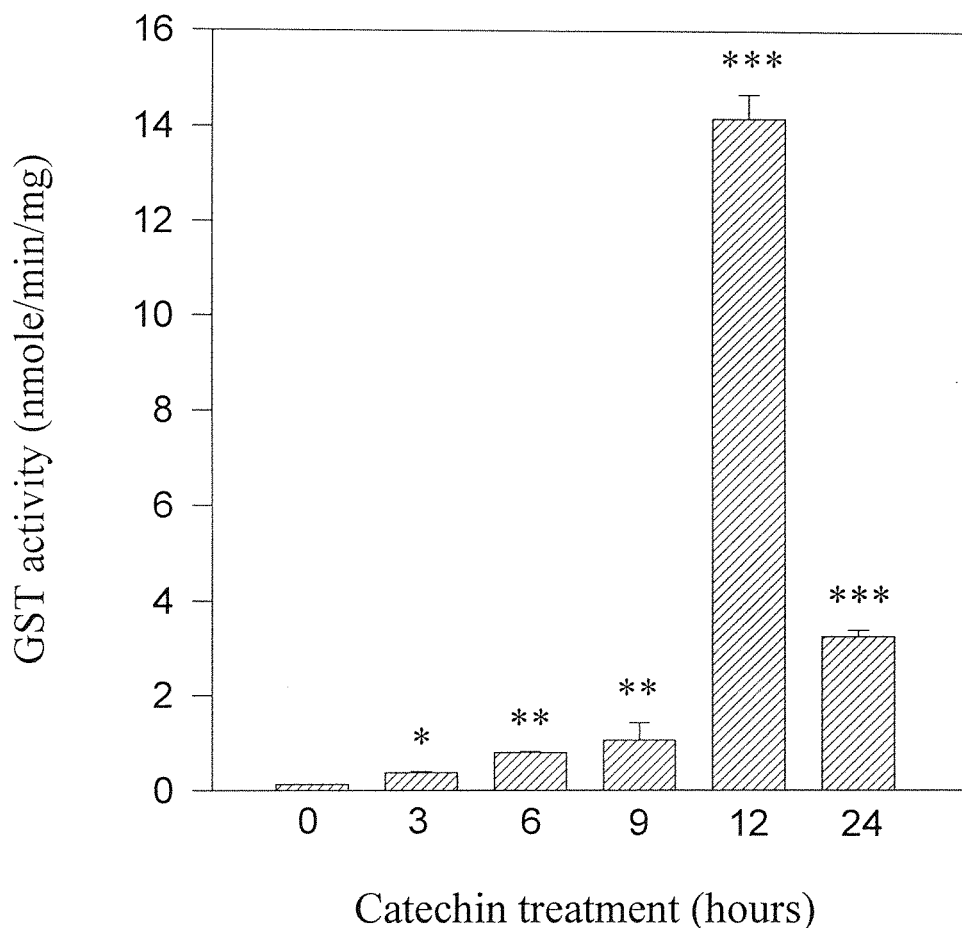


Fig.3 Time course of the effect of catechin on GST enzyme activity in rat hepatocytes. Hepatocytes were incubated with catechin (100 µg/ml) for the time indicated. GST activity was determined spectrophotometrically using CDNB as substrate and was expressed in the unit of nmole/min/mg. Each value represents the mean \pm S.D. of three experiments. Significantly different from control : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

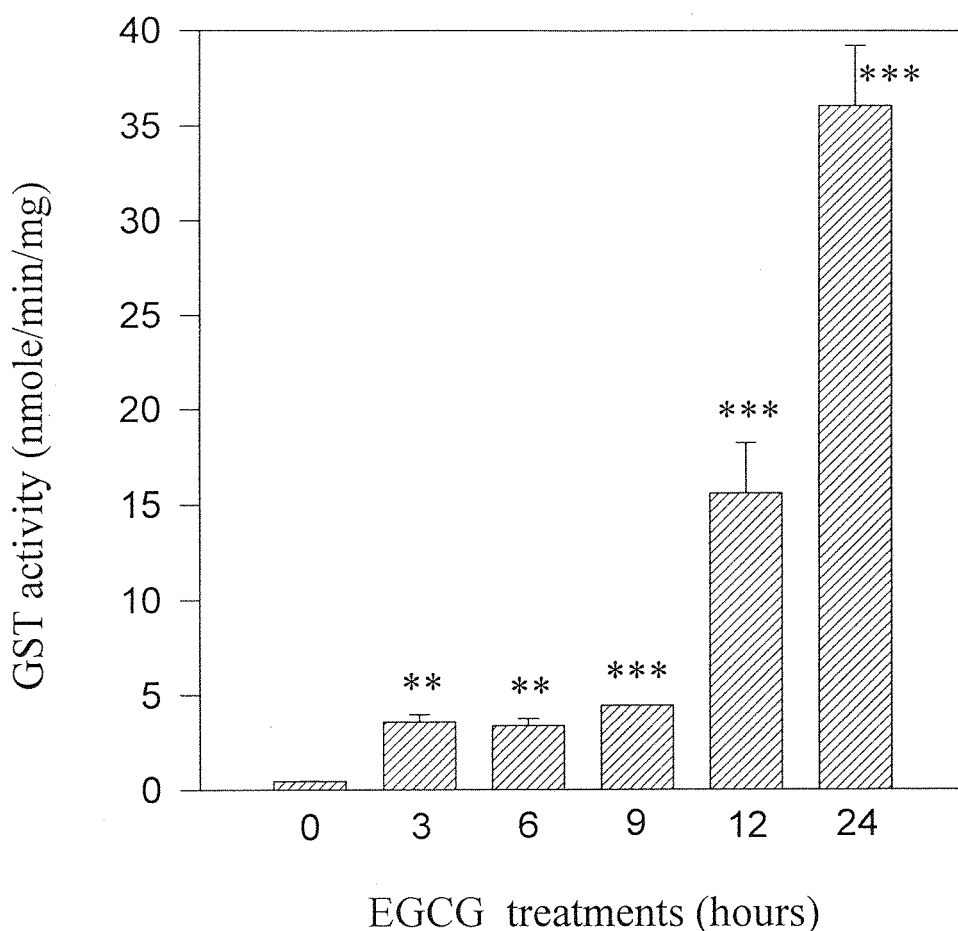


Fig.4 Time course of the effect of EGCG on GST enzyme activity in rat hepatocytes. Hepatocytes were incubated with EGCG (20 $\mu\text{g/ml}$) for the time indicated. GST activity was determined spectrophotometrically using CDNB as substrate and was expressed in the unit nmole/min/mg. Each value represents the mean \pm S.D. of three experiments. Significantly different from control : ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

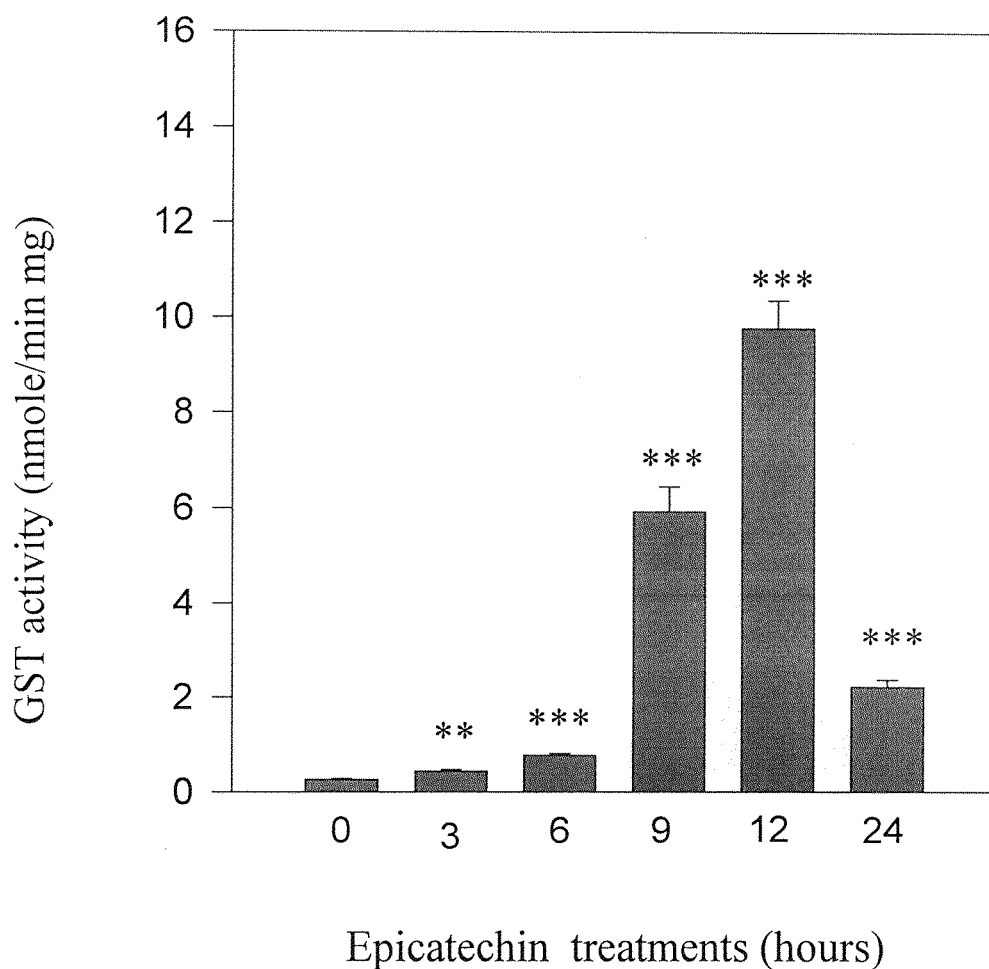


Fig-5. Time course of the effect of epicatechin on GST enzyme activity in rat hepatocytes. Hepatocytes were incubated with epicatechin (100 µg/ml) for the time indicated. GST activity was determined spectrophotometrically using CDNB as substrate and was expressed in the unit of nmole/min/mg. Each value represents the mean \pm S.D. of three experiments. Significantly different from control : ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

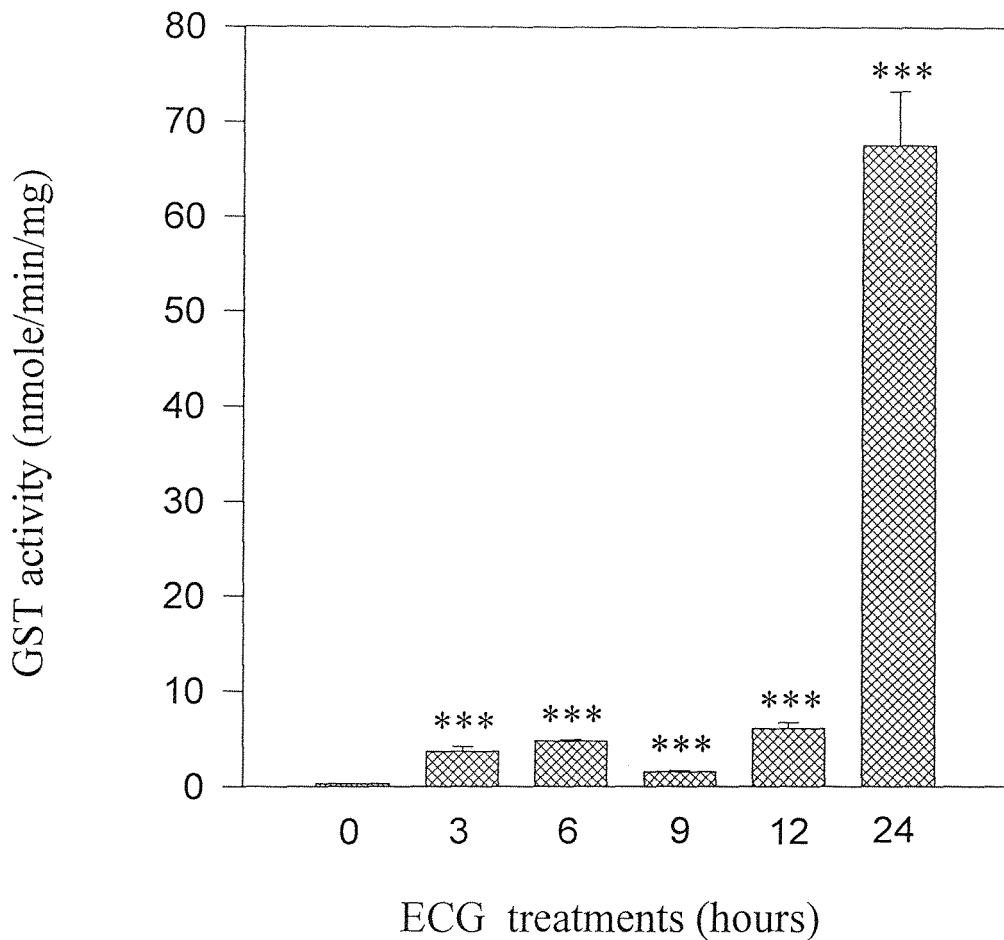


Fig-6. Time course of the effect of ECG on GST enzyme activity in rat hepatocytes. Hepatocytes were incubated with ECG (10 ug/ml) for the time indicated. GST activity was determined spectrophotometrically using CDNB as substrate and was expressed in the unit of nmole/min/mg. Each value represents the mean \pm S.D. of three experiments. Significantly different from control : *** $p < 0.001$.

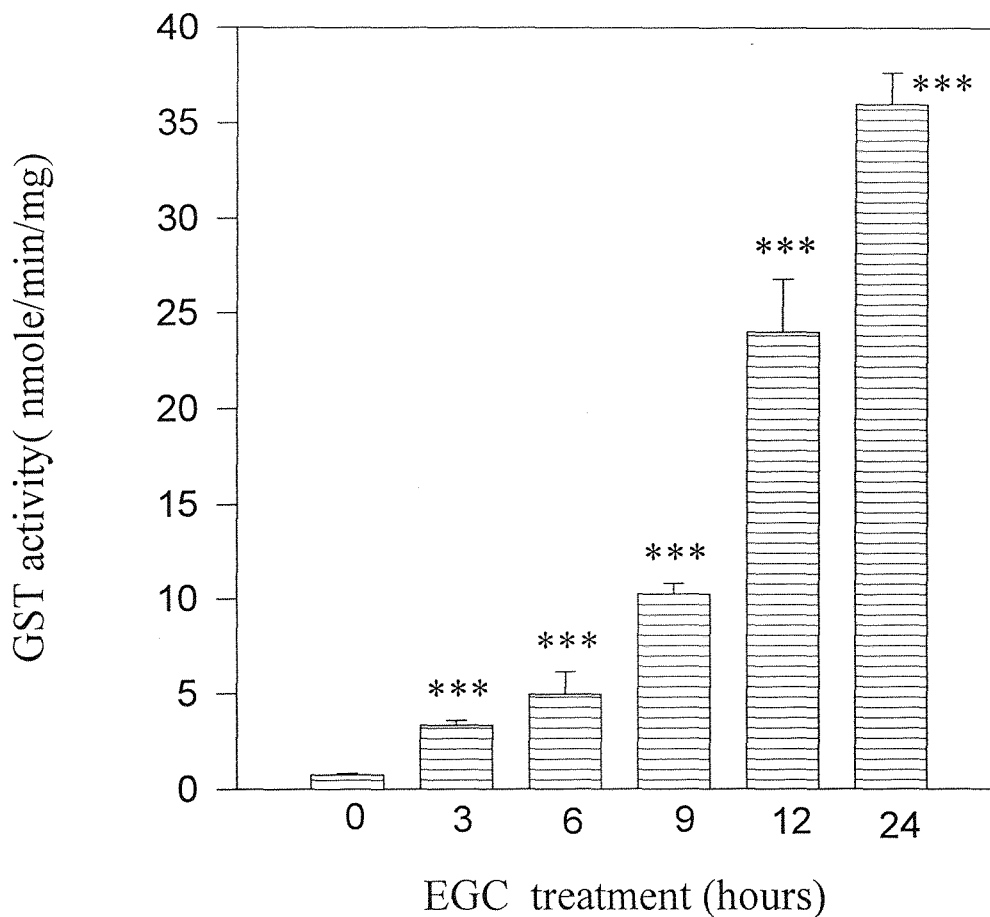


Fig.7 Time course of the effect of EGC on GST enzyme activity in rat hepatocytes. Hepatocytes were incubated with EGC (10 ug/ml) for the time indicated. GST activity was determined spectrophotometrically using CDNB as substrate and was expressed in the unit of nmole/min/mg. Each value represents the mean \pm S.D. of three experiments. Significantly different from control : *** $p < 0.001$.

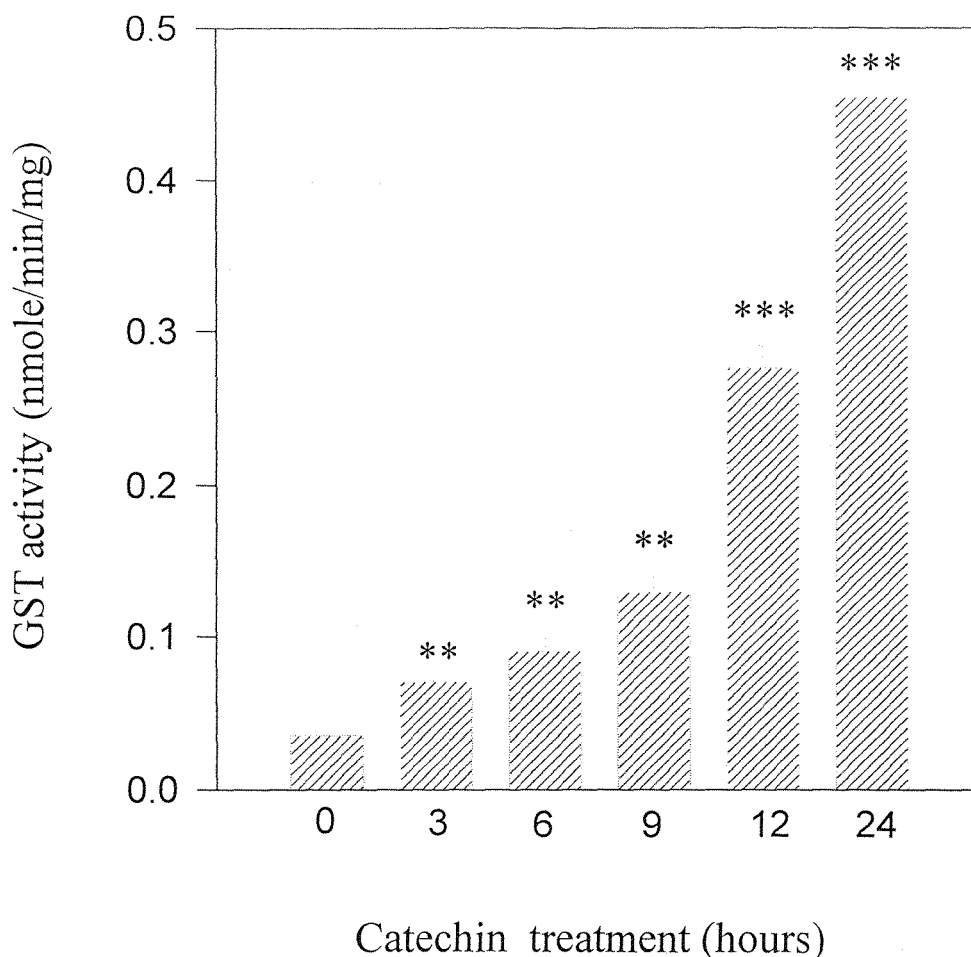


Fig.8 Time course of the effect of catechin on GST enzyme activity in rat liver. Rat were treated with catechin (5 mg) for the time indicated. Tissue homogenates were prepared from each animal and analyzed for GST activity as determined spectrophotometrically using CDNB as substrate and was expressed in the unit of nmole/min/mg. Each value represents the mean \pm S.D. of three experiments. Significantly different from control : ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

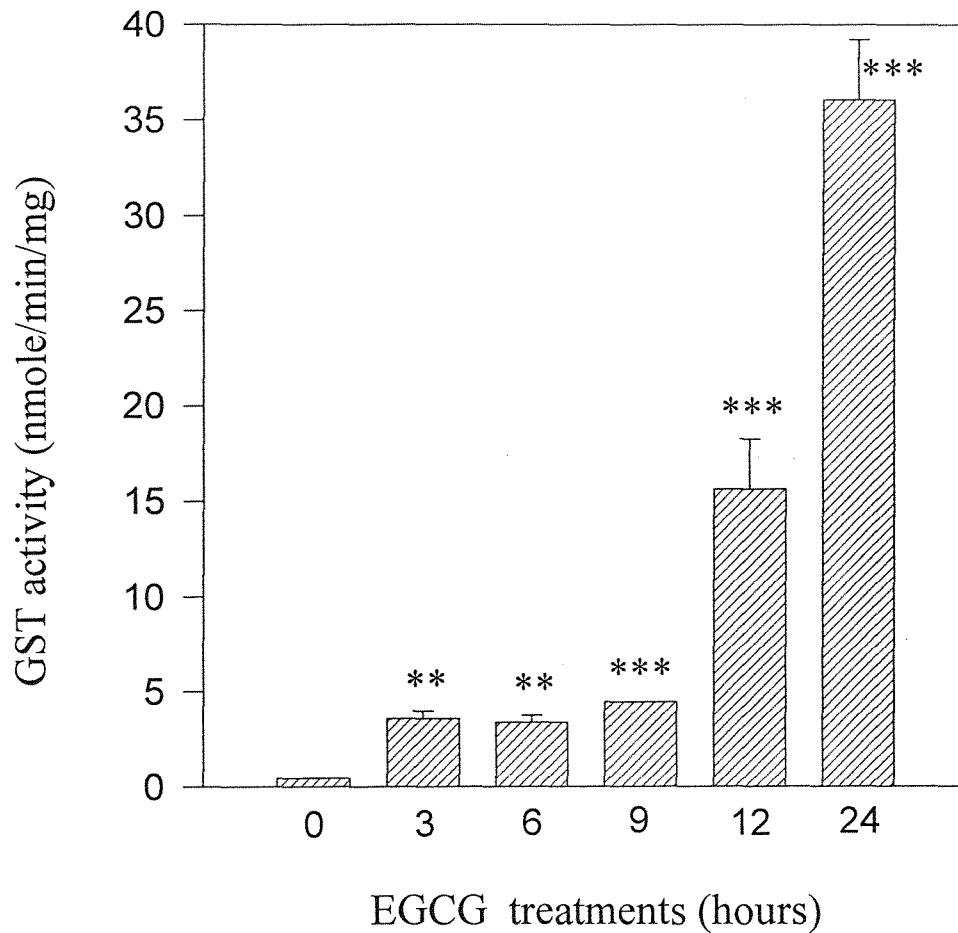


Fig.9 Time course of the effect of EGCG on GST enzyme activity in rat liver. Rat were treated with EGCG (1 mg) for the time indicated. Tissue homogenates were prepared from each animals and analyzed for GST activity as determined spectrophotometrically using CDNB as substrate and was expressed in the unit of nmole/min/mg. Each value represents the mean \pm S.D. of three experiments. Significantly different from control : ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

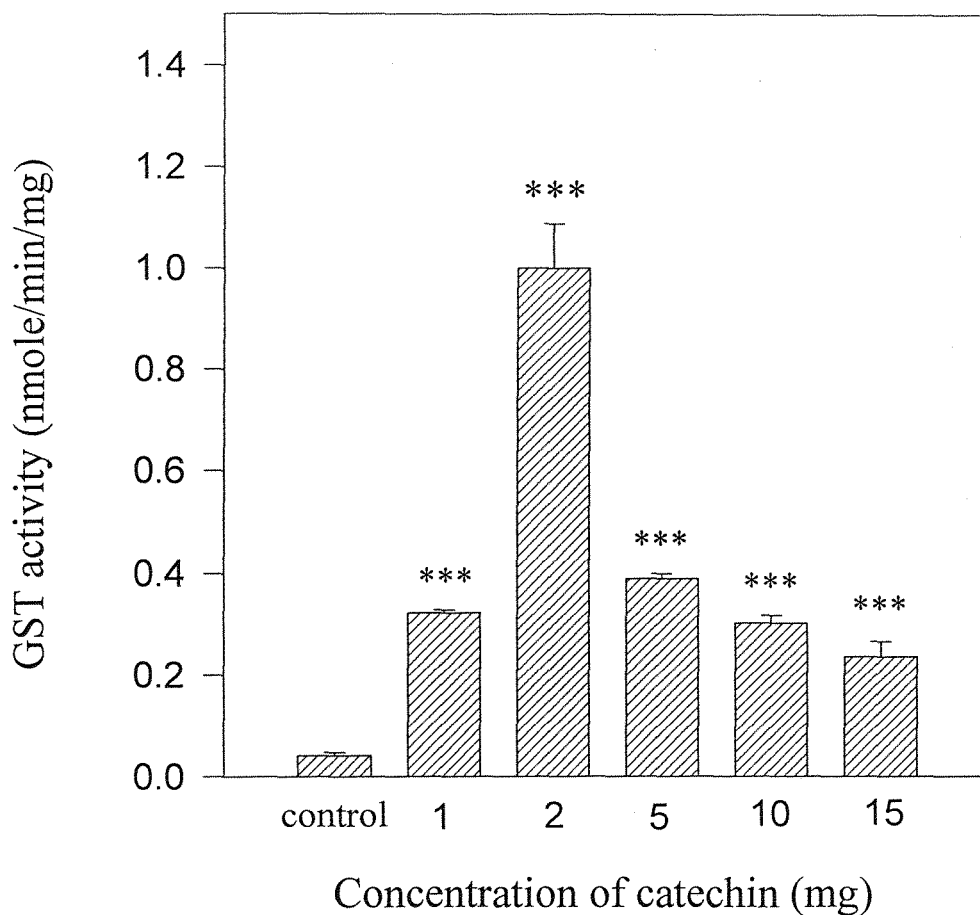


Fig.10 Effects of various concentrations of catechin on GST enzyme activity in rat liver. Rat were treated with different concentrations (0, 1, 2, 5, 10, 15 mg) of catechin for 12 hours. GST activity was determined spectrophotometrically using CDNB as substrates and is expressed in the unit of nmole/min/mg Each value represents the mean \pm S.D. of three experiments. Significantly different from control : *** $p < 0.001$.

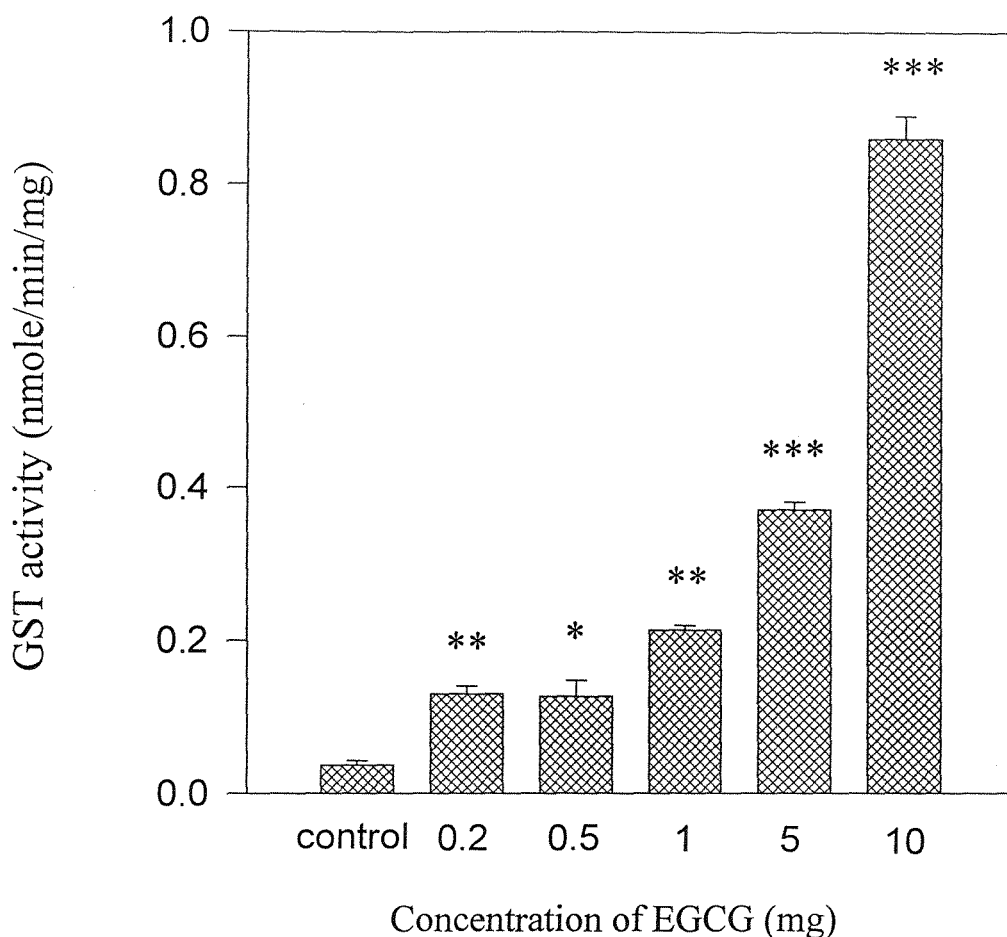


Fig.11 Effect of various concentrations of EGCG on GST enzyme activity in rat liver. Rat were treated with different concentrations (0.2, 0.5, 1, 5, 10 mg) of EGCG for 12 hours. Tissue homogenates were prepared from each animal and analyzed for GST activity as determined spectrophotometrically using CDNB as substrate and was expressed in the unit of nmole/min/mg. Each value represents the mean \pm S.D. of three experiments. Significantly different from control : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

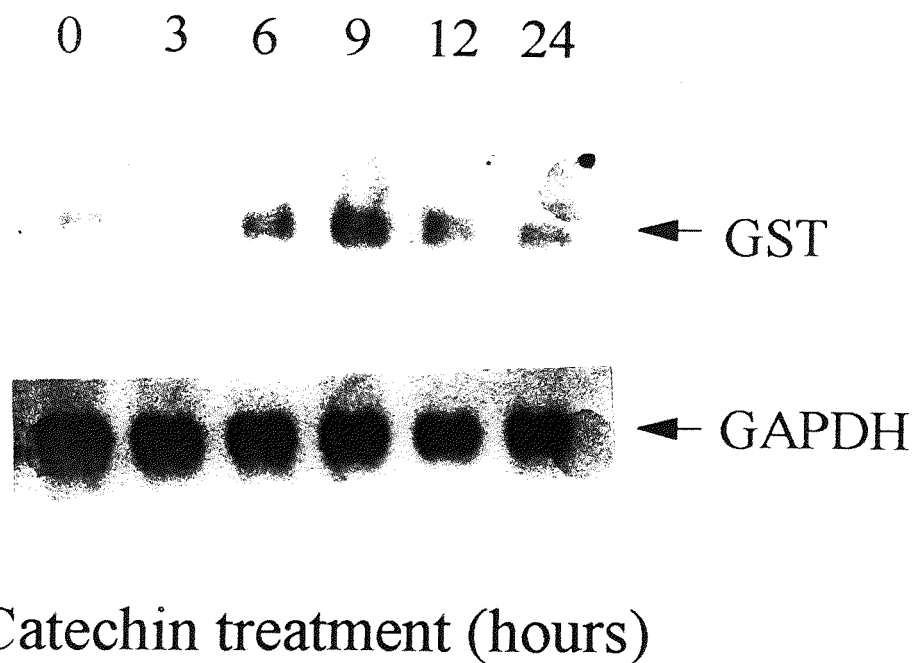


Fig.12 Time course of the effect of catechin on GST mRNA level in rat liver. Rats were treated with catechin (5 mg) for the time indicated. Tissue homogenates were prepared from each animal and analyzed by Northern blotting. GAPDH was used for internal control.

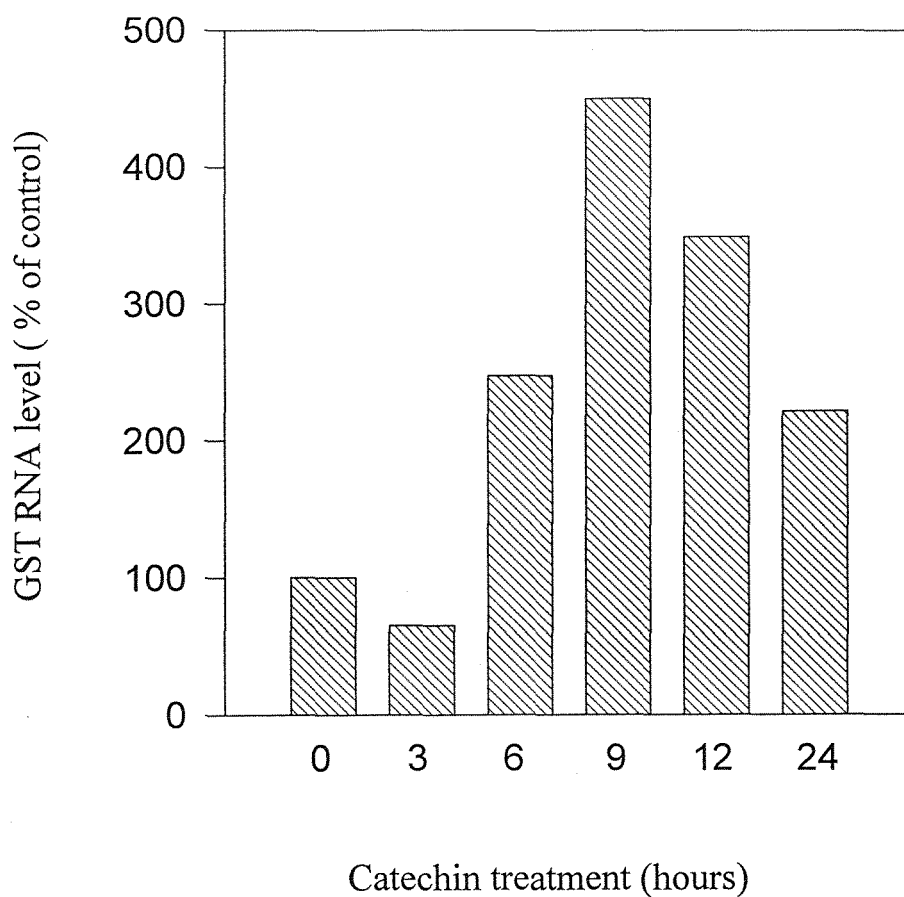


Fig.13 Densitometric measurements of the time course of the effect of catechin on GST mRNA level in rat liver. The data were corrected by the amount of GAPDH of each sample, and expressed as the percentages of control level. (time point 0). Three independent experiments were conducted ; a representative one is shown here.

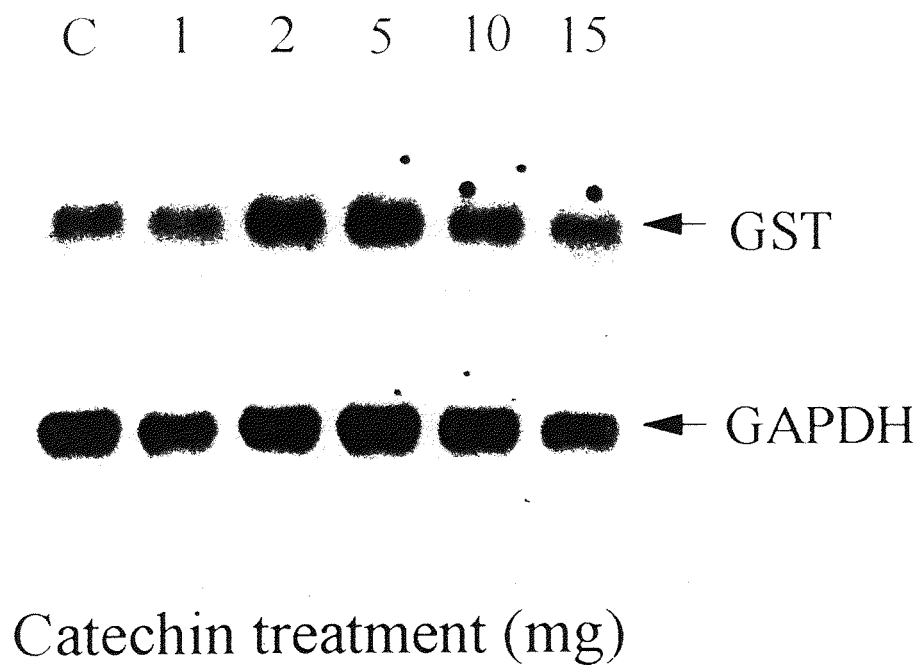


Fig.14 Effect of various concentrations of catechin on GST mRNA level in rat liver. Rats were treated with different concentrations (1, 2, 5, 10, 15 mg) of catechin for 12 hours. Tissue homogenates were prepared from each animal and analyzed by Northern blotting. C was the control animal treated with solvent only. GAPDH was used for internal control.

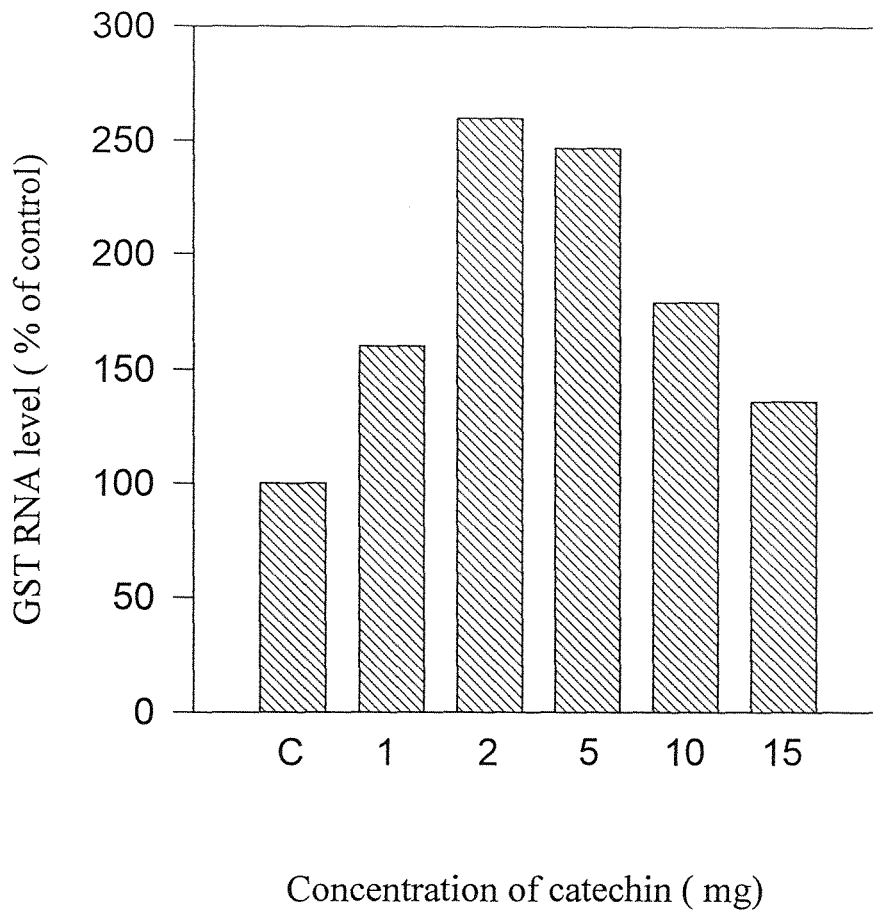


Fig.15 Densitometric measurements of the various concentrations of the effect of catechin on GST mRNA level in rat liver. The data were corrected by the amount of GAPDH of each sample, and expressed as the percentages of control level. (time point 0). Three independent experiments were conducted ; a representative one is shown here.

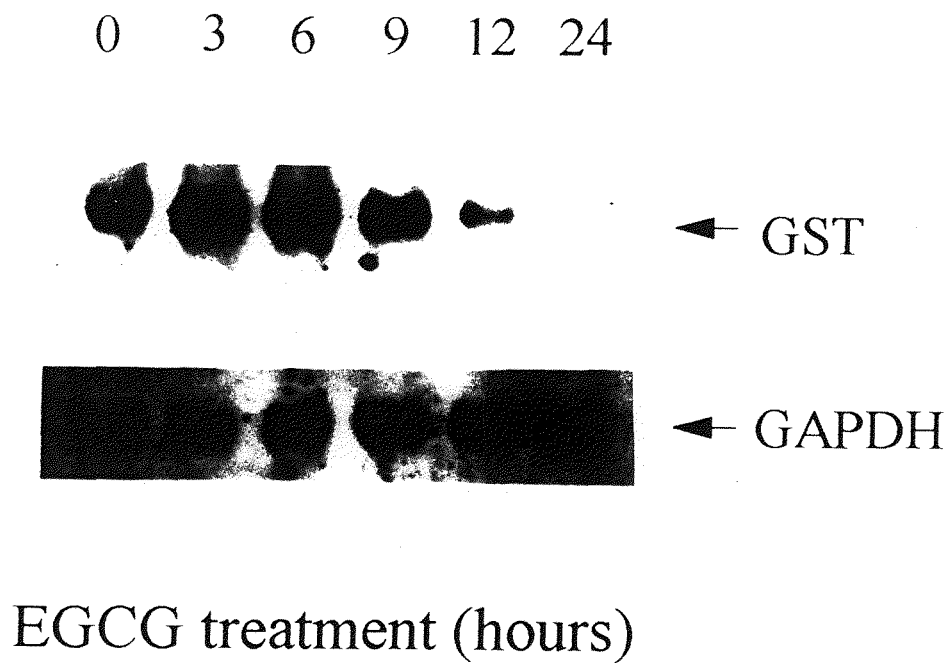


Fig.16 Time course of the effect of EGCG on GST mRNA level in rat liver. Rats were treated with EGCG (1 mg) for the time indicated. Tissue homogenates were prepared from each animal and analyzed by Northern blotting. GAPDH was used for internal control.

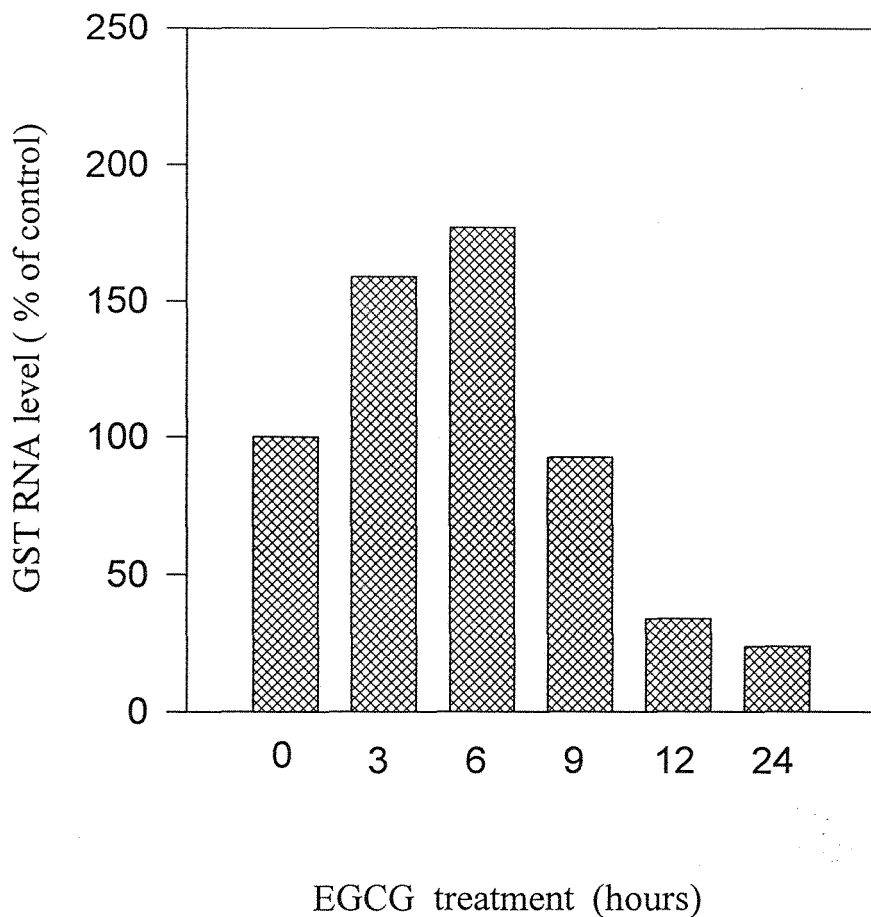


Fig.17 Densitometric measurements of the time course of the effect of EGCG on GST mRNA level in rat liver. The data were corrected by the amount of GAPDH of each sample, and expressed as the percentages of control level. (time point 0). Three independent experiments were conducted ; a representative one is shown here.

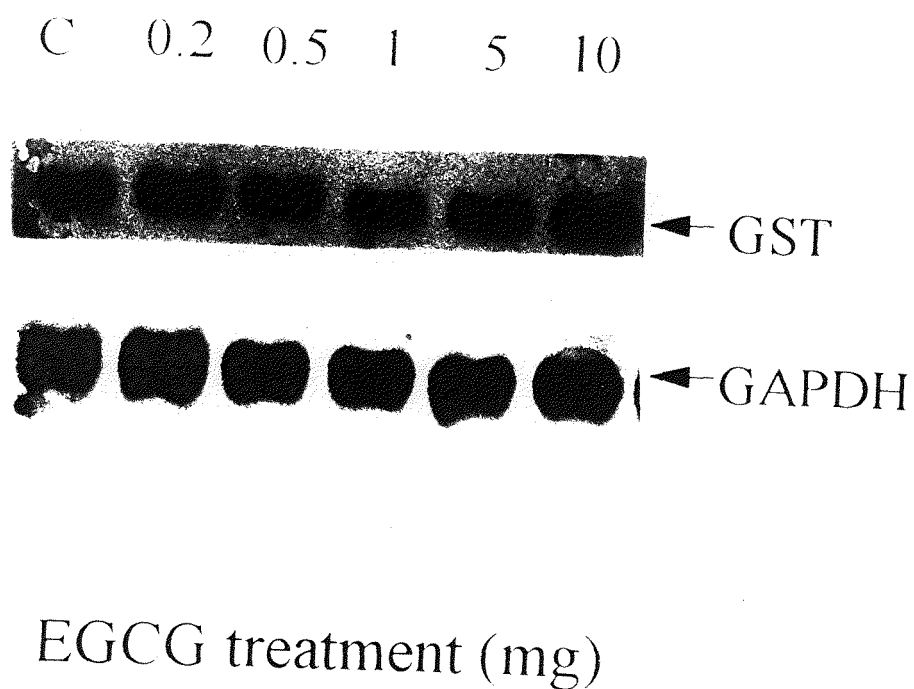


Fig.18 Effect of various concentrations of EGCG on GST mRNA level in rat liver. Rats were treated with different concentrations (0.2, 0.5, 1, 5, 10 mg) of EGCG for 6 hours. Tissue homogenates were prepared from each animal and analyzed by Northern blotting. C was the control animal treated with solvent only. GAPDH was used for internal control.

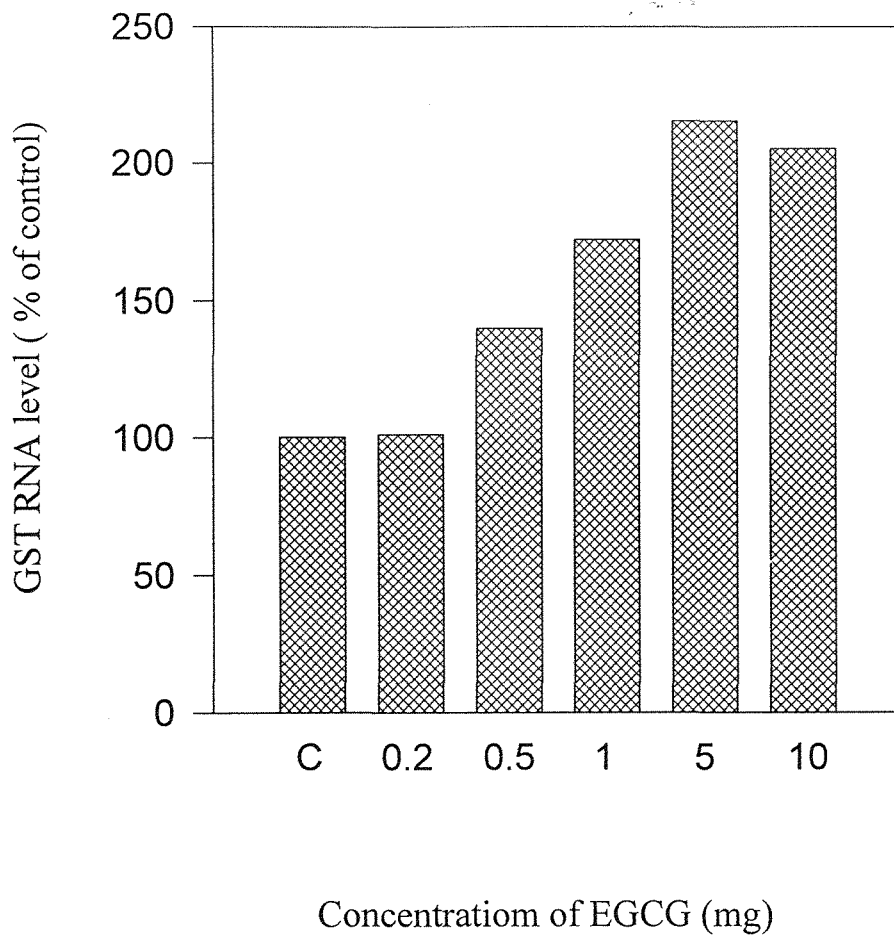
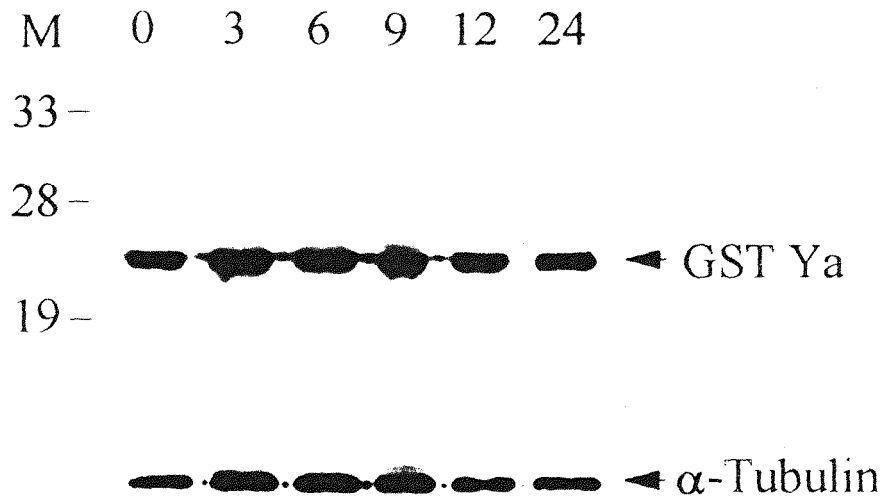


Fig.19 Densitometric measurements of the various concentrations of the effect of EGCG on GST mRNA level in rat liver. The data were corrected by the amount of GAPDH of each sample, and expressed as the percentages of control level. (time point 0). Three independent experiments were conducted ; a representative one is shown here.



Catechin treatment (5 mg)

Fig.20 Time course of the effect of catechin on GST Ya protein level in rat liver. Rat were treated with catechin (5 mg) for the time indicated. Tissue homogenates were prepared from each animal and analyzed by western blotting. Anti- α -tubulin antiserum was used for internal control.

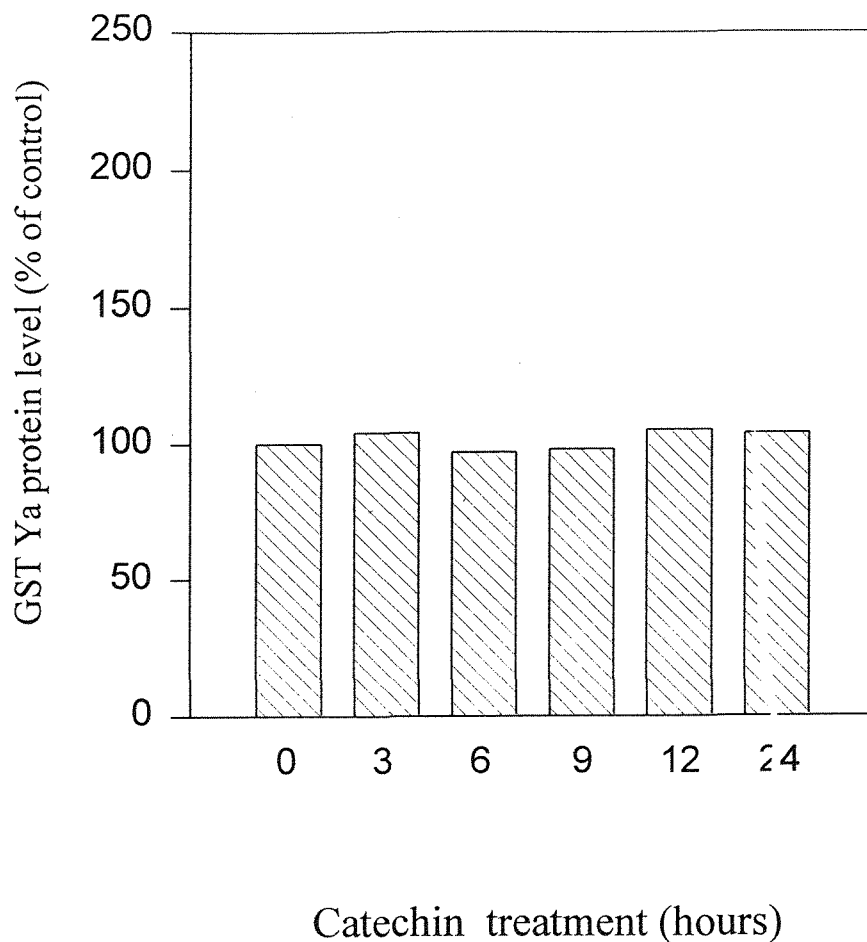


Fig.21 Densitometric measurements of the time course of the effect of catechin on GST Ya protein level in rat liver. The data were corrected by the amount of α -tubulin of each sample, and expressed as the percentages of control level. (time point 0). Three independent experiments were conducted ; a representative one is shown here.

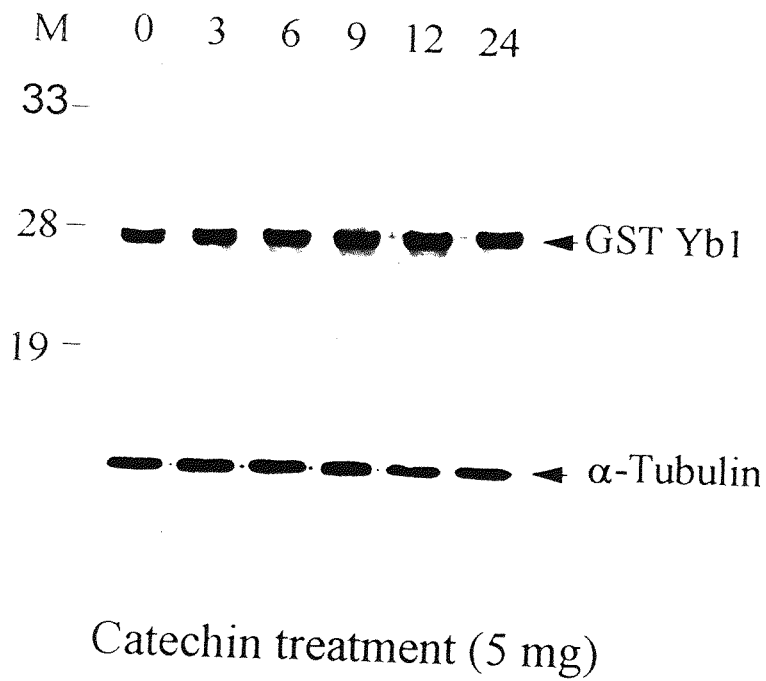


Fig.22 Time course of the effect of catechin on GST Yb1 protein level in rat liver. Rats were treated with catechin (5 mg) for the time indicated. Tissue homogenates were prepared from each animal and analyzed by western blotting. Anti- α -tubulin antiserum was used for internal control.

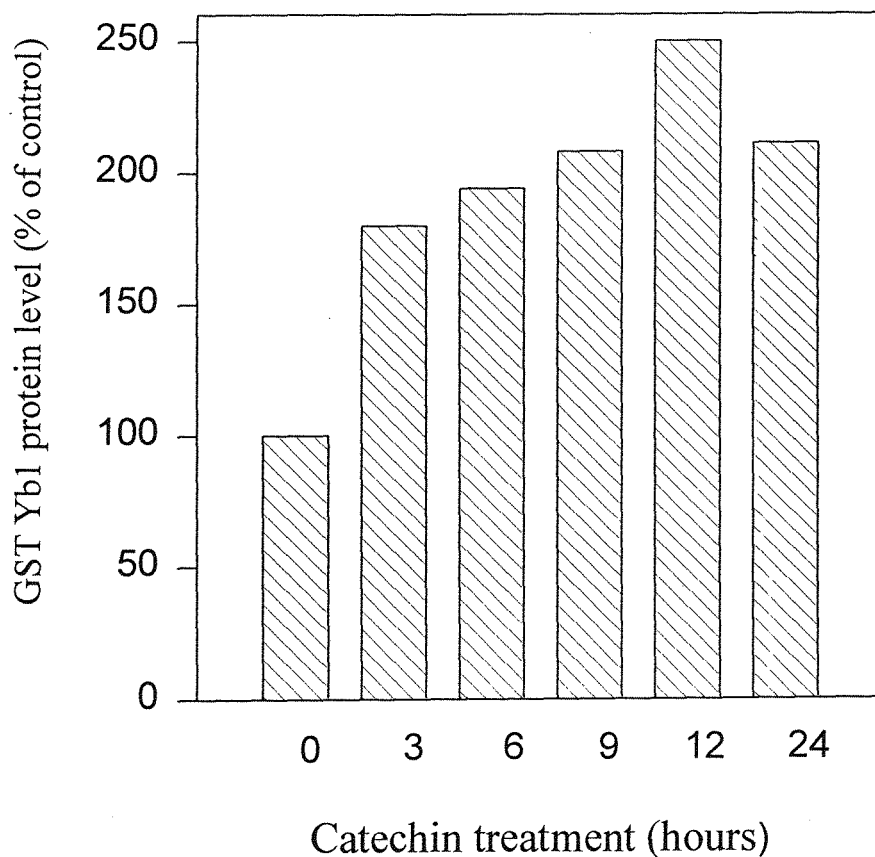
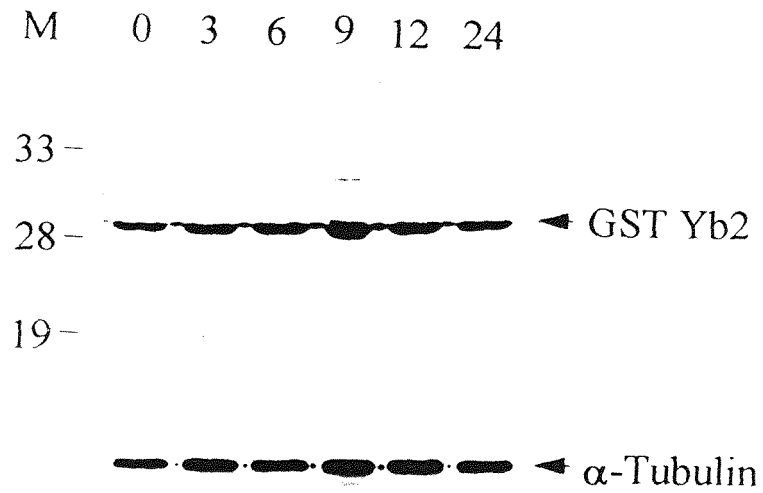


Fig.23 Densitometric measurements of the time course of the effect of catechin on GST Yb1 protein level in rat liver. The data were corrected by the amount of α -tubulin of each sample, and expressed as the percentages of control level. (time point 0). Three independent experiments were conducted ; a representative one is shown here.



Catechin treatment (5 mg)

Fig.24 Time course of the effect of catechin on GST Yb2 protein level in rat liver. Rats were treated with catechin (5 mg) for the time indicated. Tissue homogenates were prepared from each animal and analyzed by western blotting. Anti- α -tubulin antiserum was used for internal control.

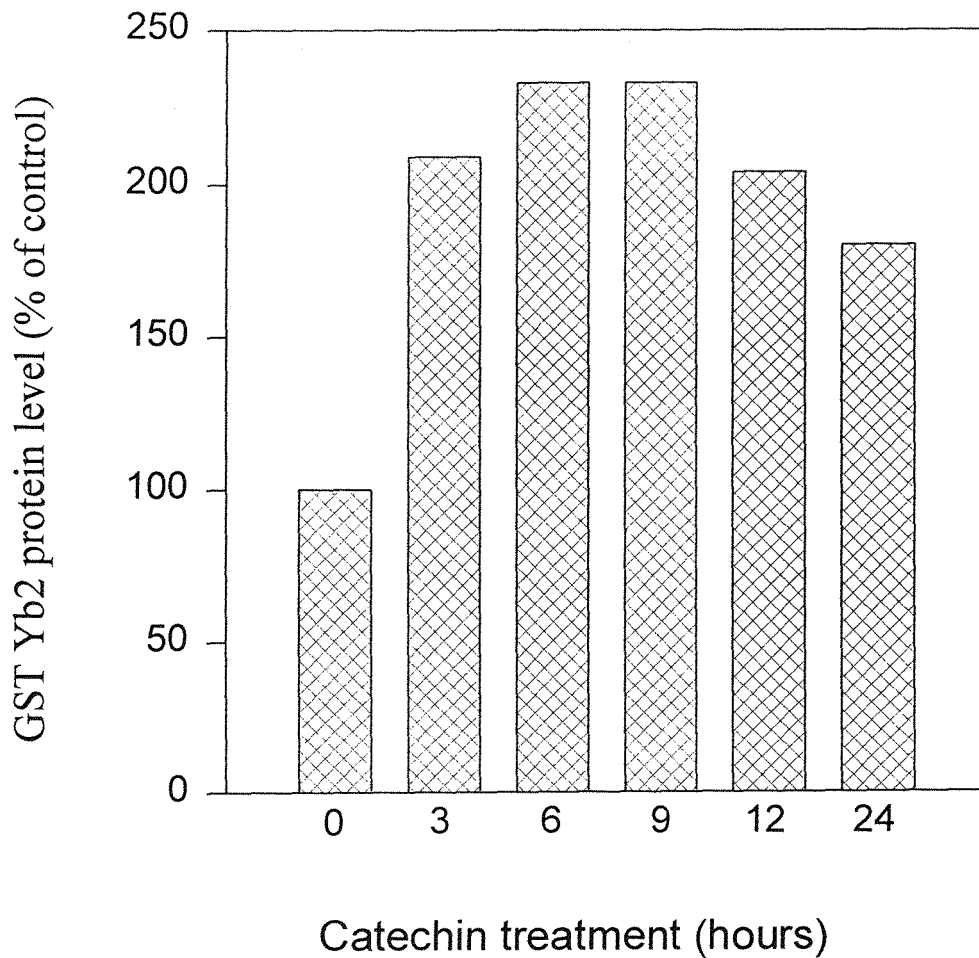


Fig.25 Densitometric measurements of the time course of the effect of catechin on GST Yb2 protein level in rat liver. The data were corrected by the amount of α -tubulin of each sample, and expressed as the percentages of control level. (time point 0). Three independent experiments were conducted ; a representative one is shown here.

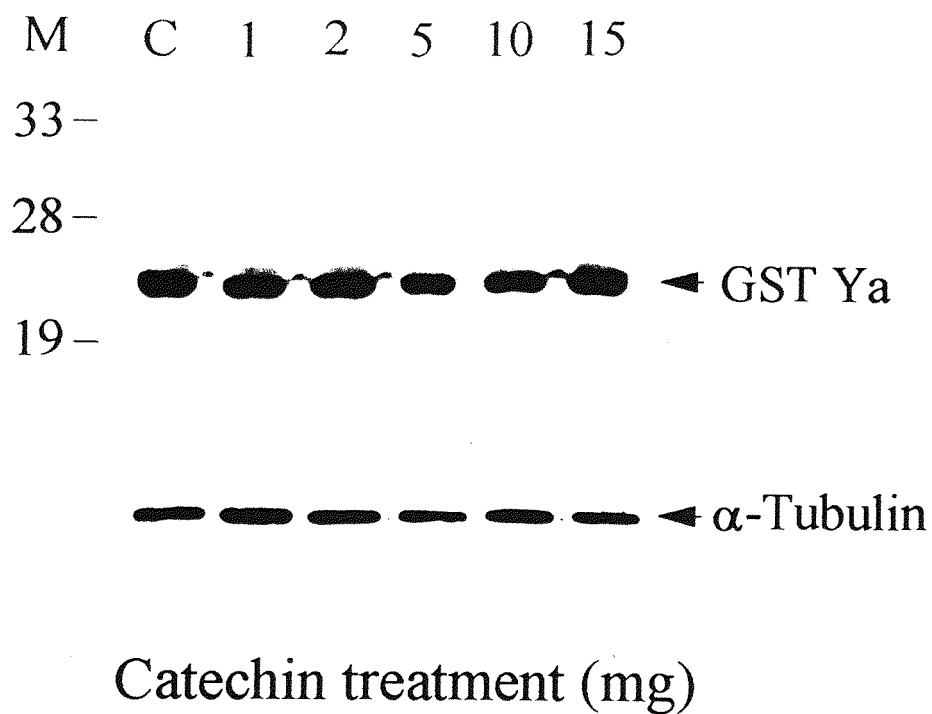


Fig.26 Effect of various concentrations of catechin on GST Ya protein level in rat liver. Rats were treated with different concentrations (1 · 2 · 5 · 10 · 15 mg) of catechin for 12 hours. Tissue homogenates were prepared from each animal and analyzed by western blotting. C was the control animal treated with solvent only. Anti- α -tubulin antiserum was used for internal control.

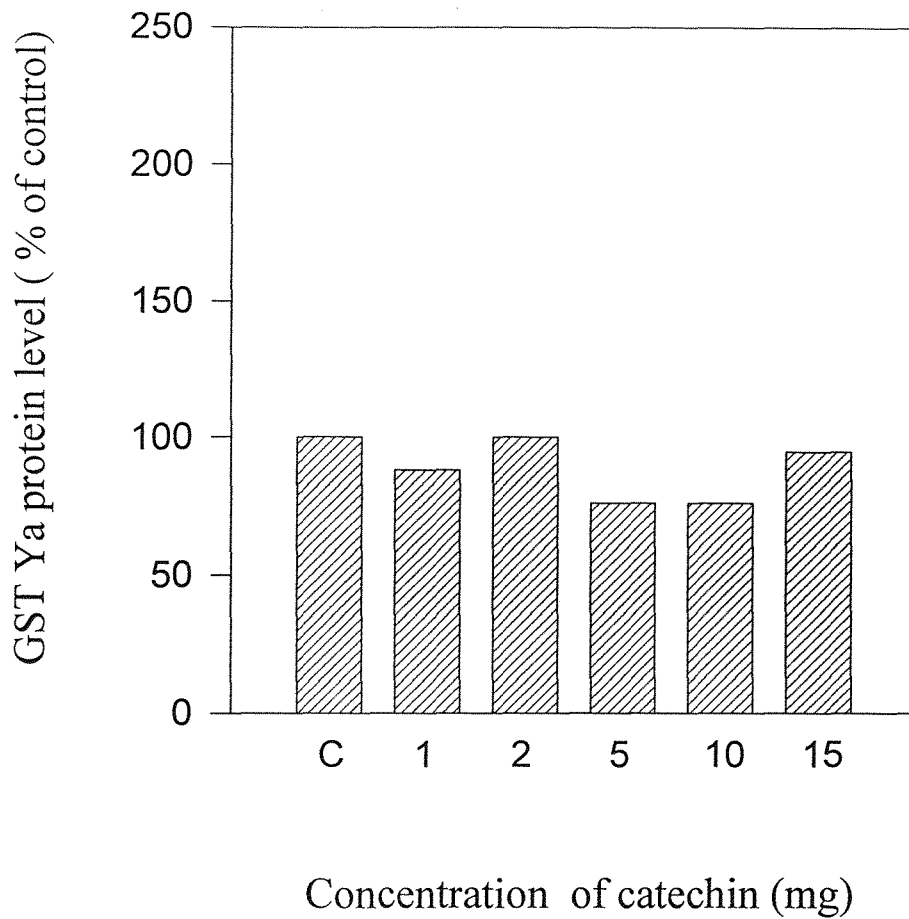


Fig.27 Densitometric measurements of the various concentrations of the effect of catechin on GST Ya protein level in rat liver. The data were corrected by the amount of α -tubulin of each sample, and expressed as the percentages of control level. (time point 0). Three independent experiments were conducted ; a representative one is shown here.

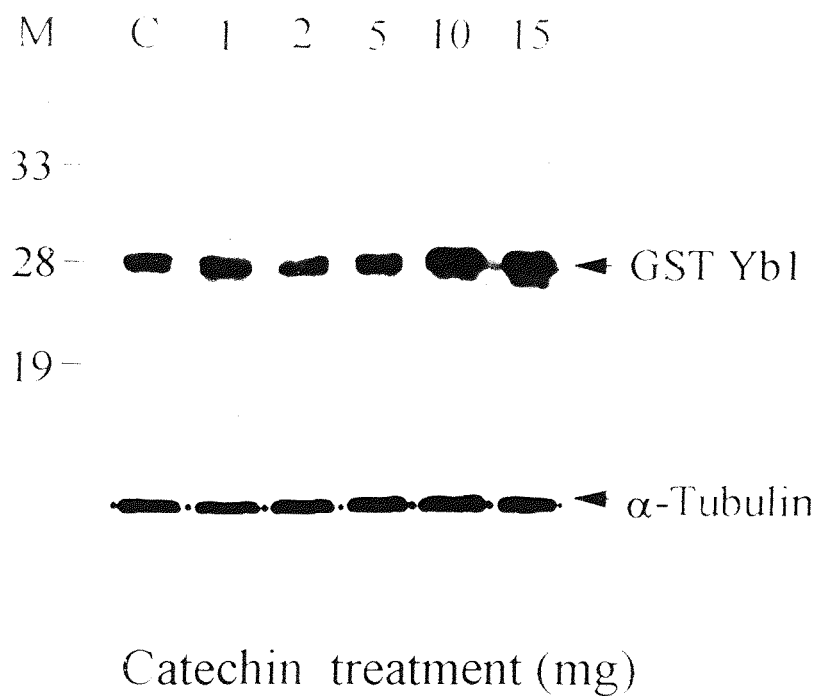


Fig.28 Effect of various concentrations of catechin on GST Yb1 protein level in rat liver. Rats were treated with different concentrations (1、2、5、10、15 mg) of catechin for 12 hours. Tissue homogenates were prepared from each animal and analyzed by western blotting. C was the control animal treated with solvent only. Anti- α -tubulin antiserum was used for internal control.

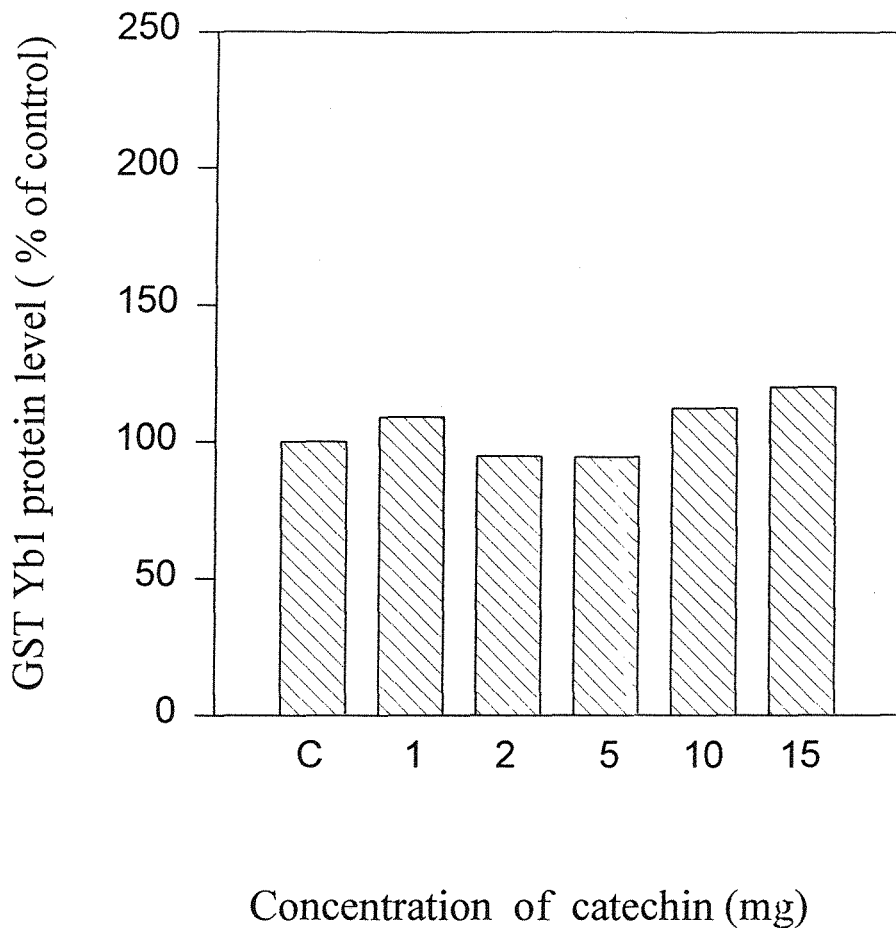


Fig.29 Densitometric measurements of the various concentrations of the effect of catechin on GST Yb1 protein level in rat liver. The data were corrected by the amount of α -tubulin of each sample, and expressed as the percentages of control level. (time point 0). Three independent experiments were conducted ; a representative one is shown here.

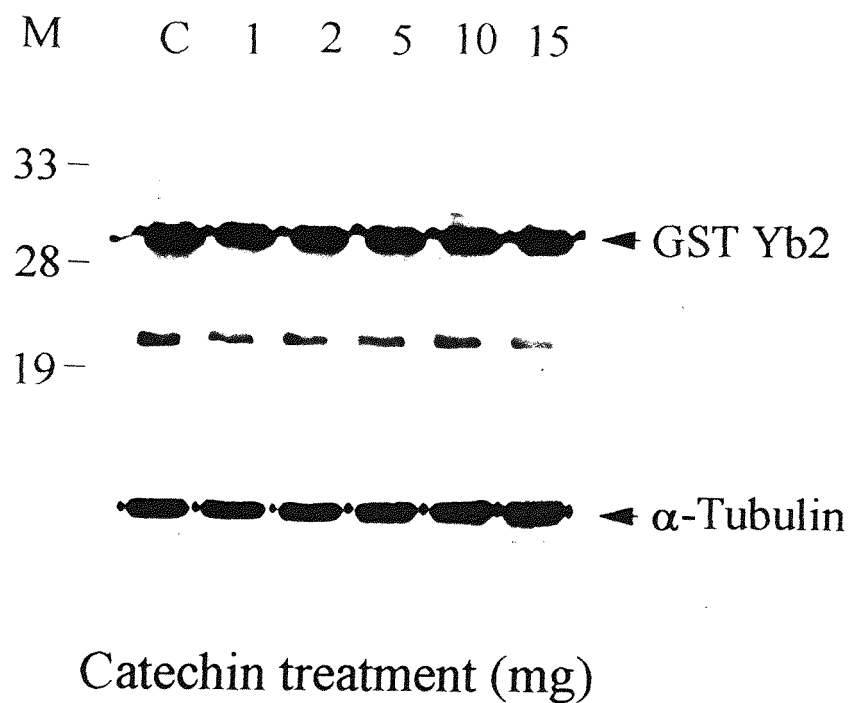


Fig.30 Effect of various concentrations of catechin on GST Yb2 protein level in rat liver. Rats were treated with different concentrations (1、2、5、10、15 mg) of catechin for 12 hours. Tissue homogenates were prepared from each animal and analyzed by western blotting. C was the control animal treated with solvent only. Anti- α -tubulin antiserum was used for internal control.

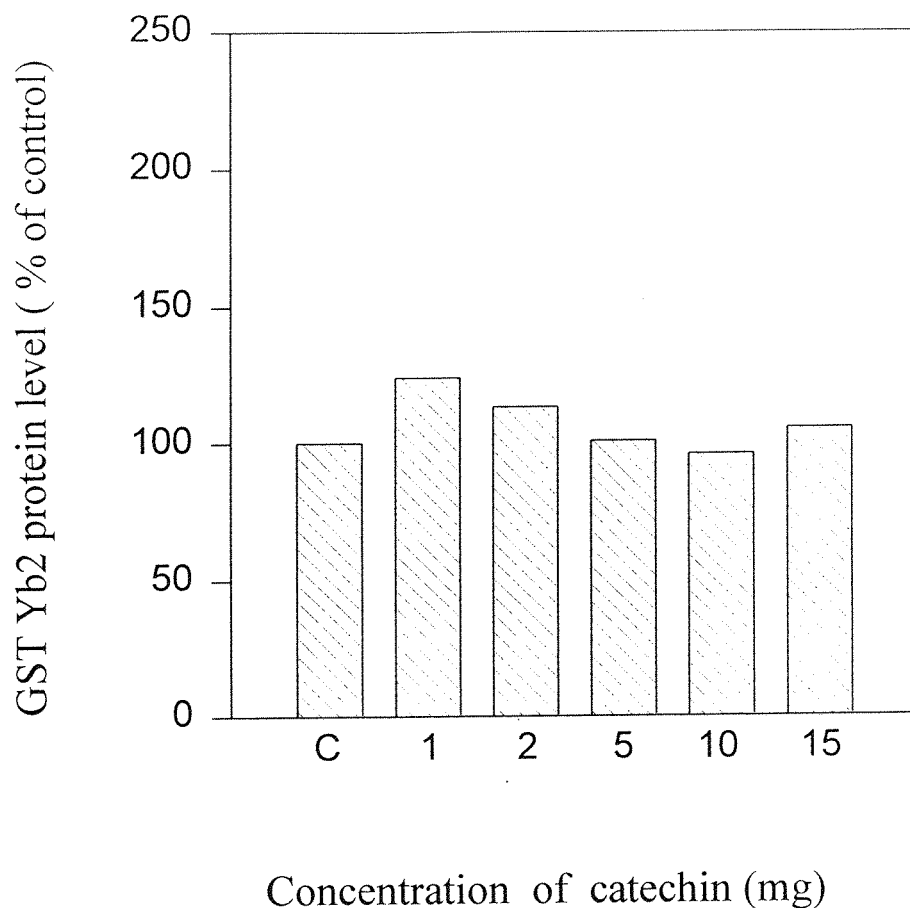


Fig.31 Densitometric measurements of the various concentrations of the effect of catechin on GST Yb2 protein level in rat liver. The data were corrected by the amount of α -tubulin of each sample, and expressed as the percentages of control level. (time point 0). Three independent experiments were conducted ; a representative one is shown here.

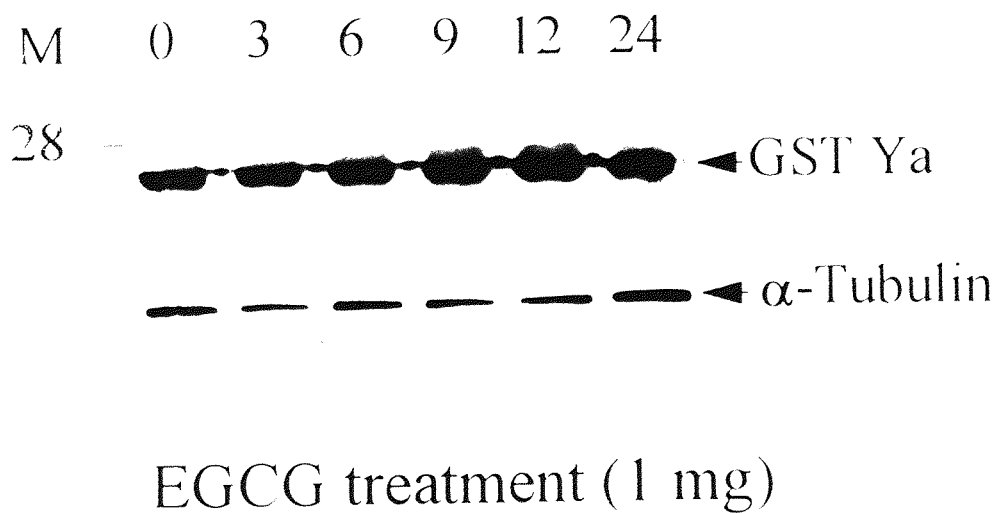


Fig.32 Time course of the effect of EGCG on GST Ya protein level in rat liver. Rats were treated with EGCG (1 mg) for the time indicated. Tissue homogenates were prepared from each animal and analyzed by western blotting. Anti- α -tubulin antiserum was used for internal control.

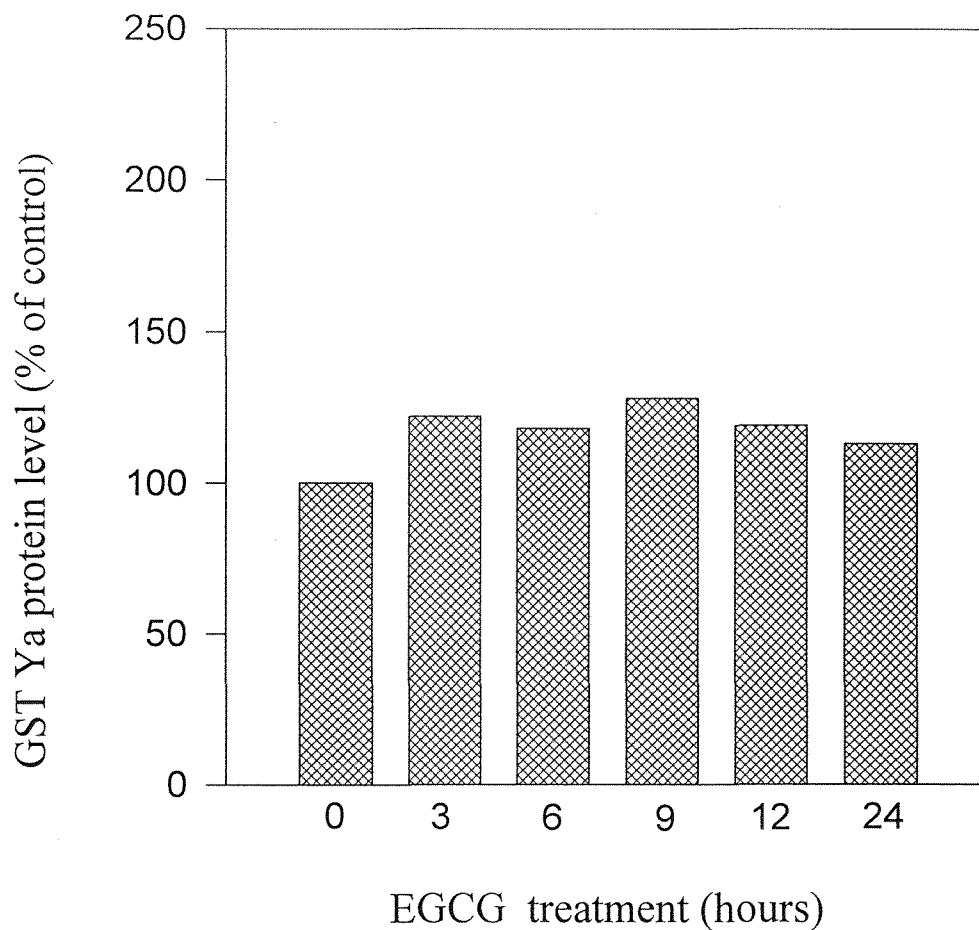


Fig.33 Densitometric measurements of the time course of the effect of EGCG on GST Ya protein level in rat liver. The data were corrected by the amount of α -tubulin of each sample, and expressed as the percentages of control level. (time point 0). Three independent experiments were conducted ; a representative one is shown here.

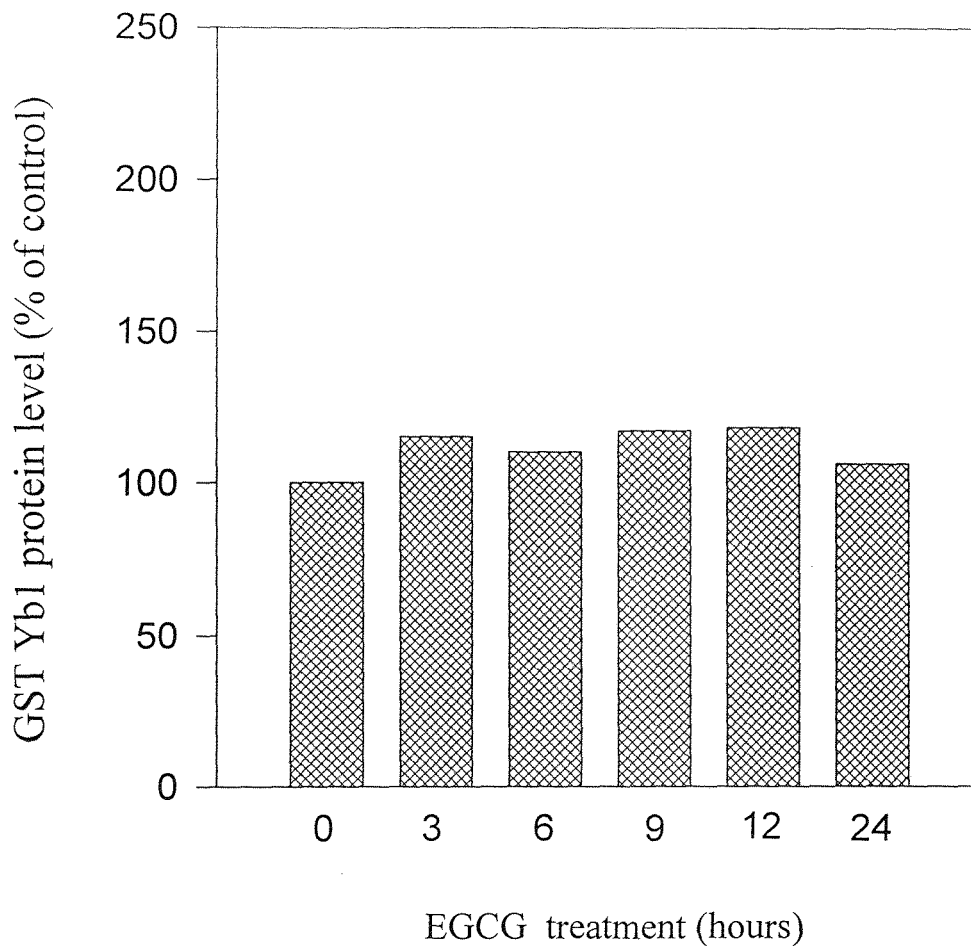
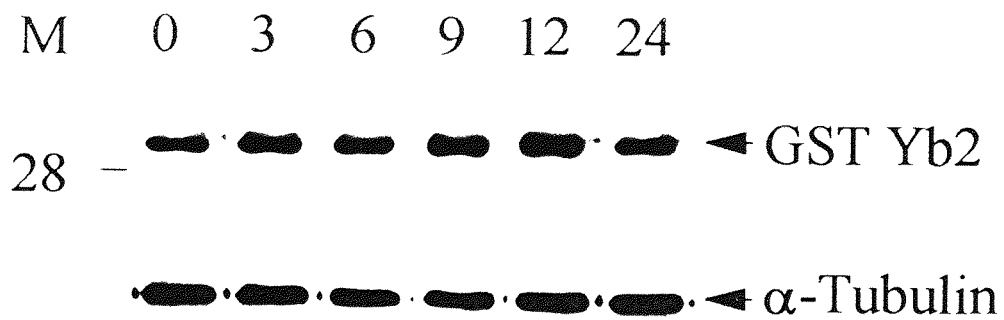


Fig.35 Densitometric measurements of the time course of the effect of EGCG on GST Yb1 protein level in rat liver. The data were corrected by the amount of α -tubulin of each sample, and expressed as the percentages of control level. (time point 0). Three independent experiments were conducted ; a representative one is shown here.



EGCG treatment (1 mg)

Fig.36 Time course of the effect of EGCG on GST Yb2 protein level in rat liver. Rats were treated with EGCG (1 mg) for the time indicated. Tissue homogenates were prepared from each animal and analyzed by western blotting. Anti- α -tubulin antiserum was used for internal control.

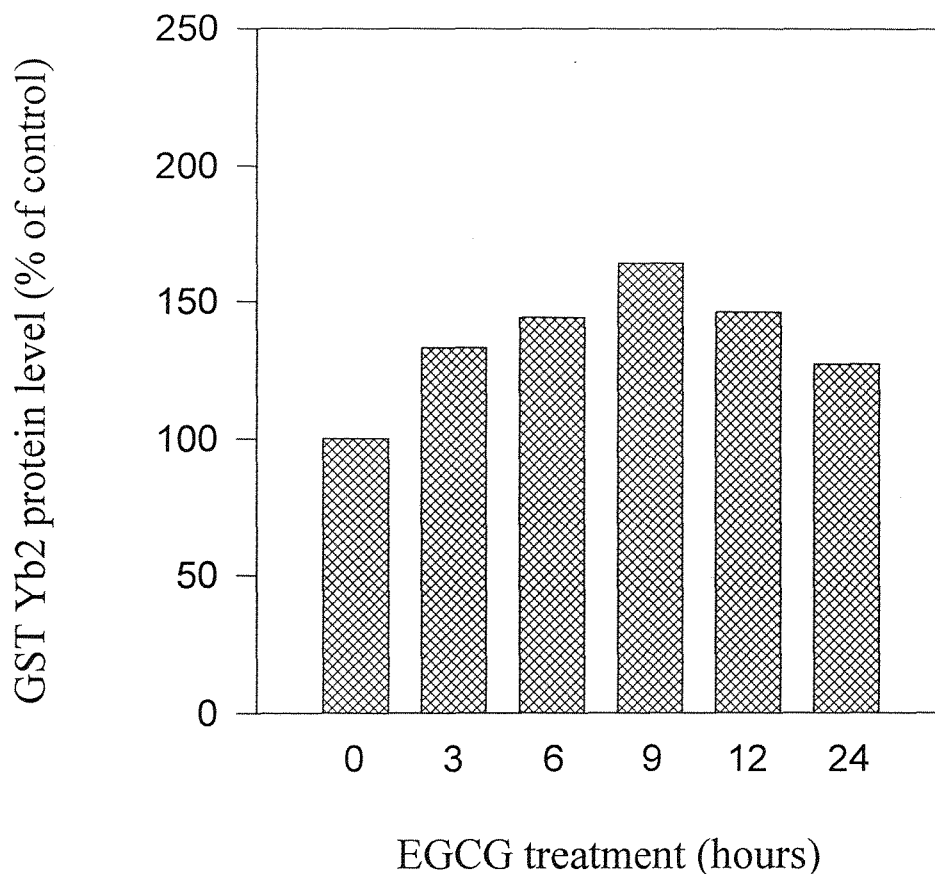


Fig.37 Densitometric measurements of the time course of the effect of EGCG on GST Yb2 protein level in rat liver. The data were corrected by the amount of α -tubulin of each sample, and expressed as the percentages of control level. (time point 0). Three independent experiments were conducted ; a representative one is shown here.

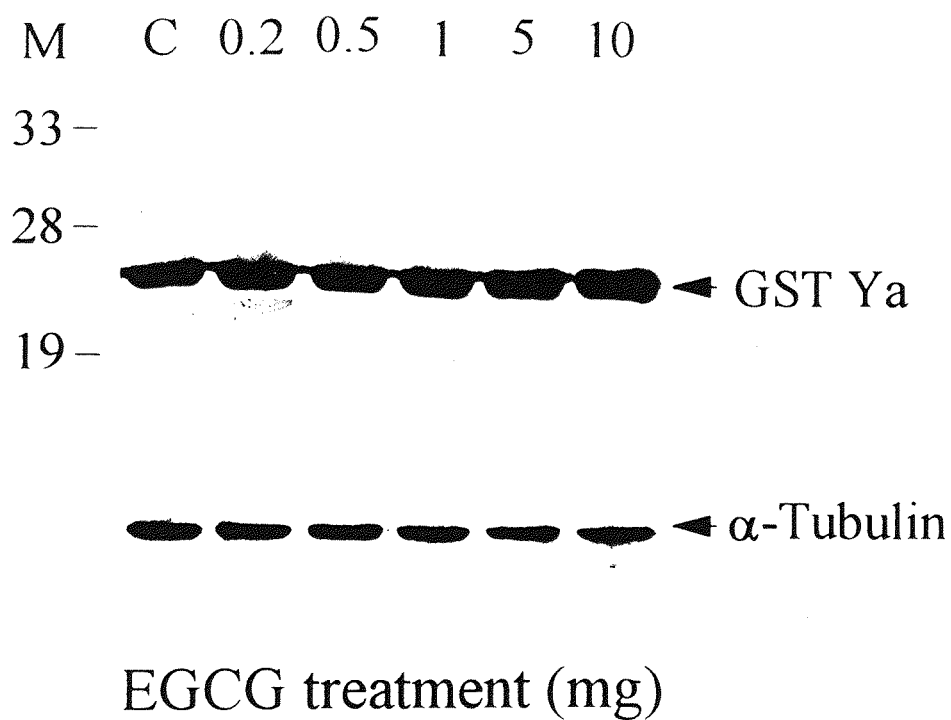


Fig.38 Effect of various concentrations of EGCG on GST Ya protein level in rat liver. Rats were treated with different concentrations (0.2, 0.5, 1, 5, 10 mg) of EGCG for 6 hours. Tissue homogenates were prepared from each animal and analyzed by western blotting. C was the control animal treated with solvent only. Anti- α -tubulin antiserum was used for internal control.

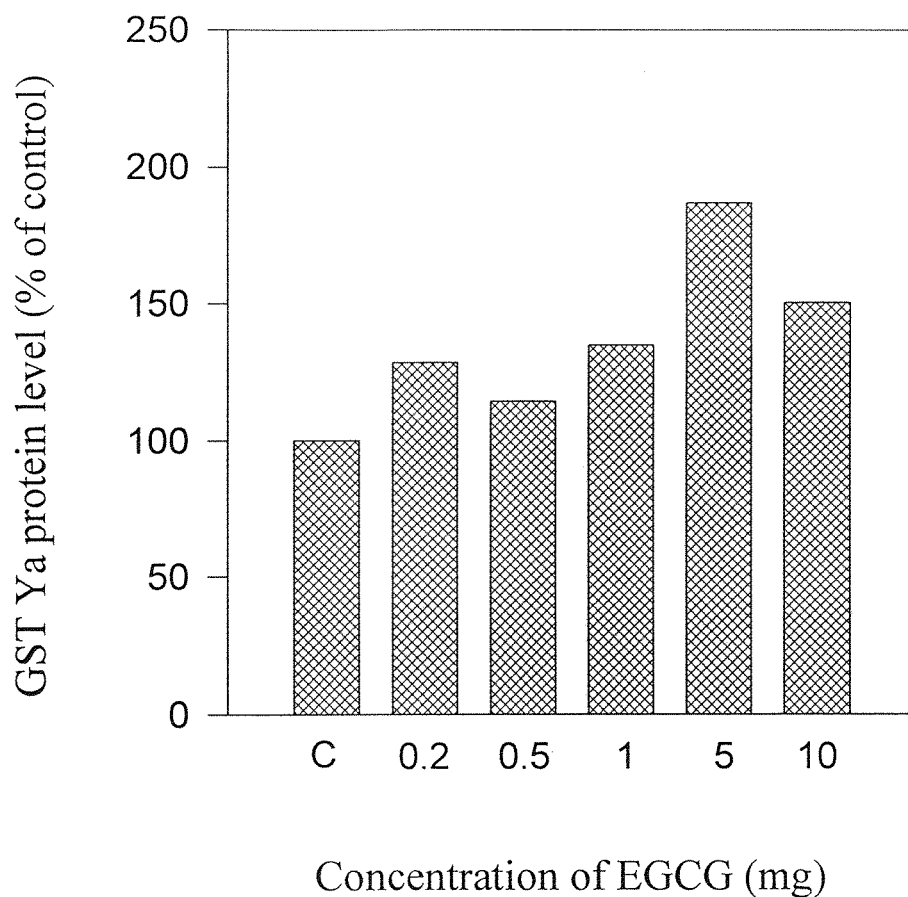


Fig.39 Densitometric measurements of the various concentrations of the effect of EGCG on GST Ya protein level in rat liver. The data were corrected by the amount of α -tubulin of each sample, and expressed as the percentages of control level. (time point 0). Three independent experiments were conducted ; a representative one is shown here.

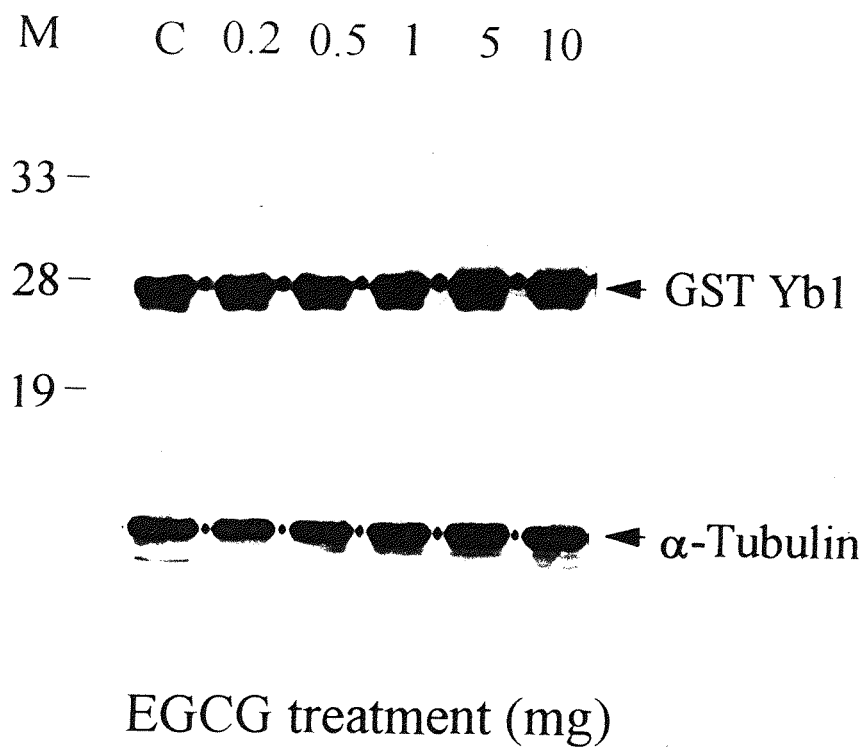


Fig.40 Effect of various concentrations of EGCG on GST Yb1 protein level in rat liver. Rats were treated with different concentrations (0.2, 0.5, 1, 5, 10 mg) of EGCG for 6 hours. Tissue homogenates were prepared from each animal and analyzed by western blotting. C was the control animal treated with solvent only. Anti- α -tubulin antiserum was used for internal control.

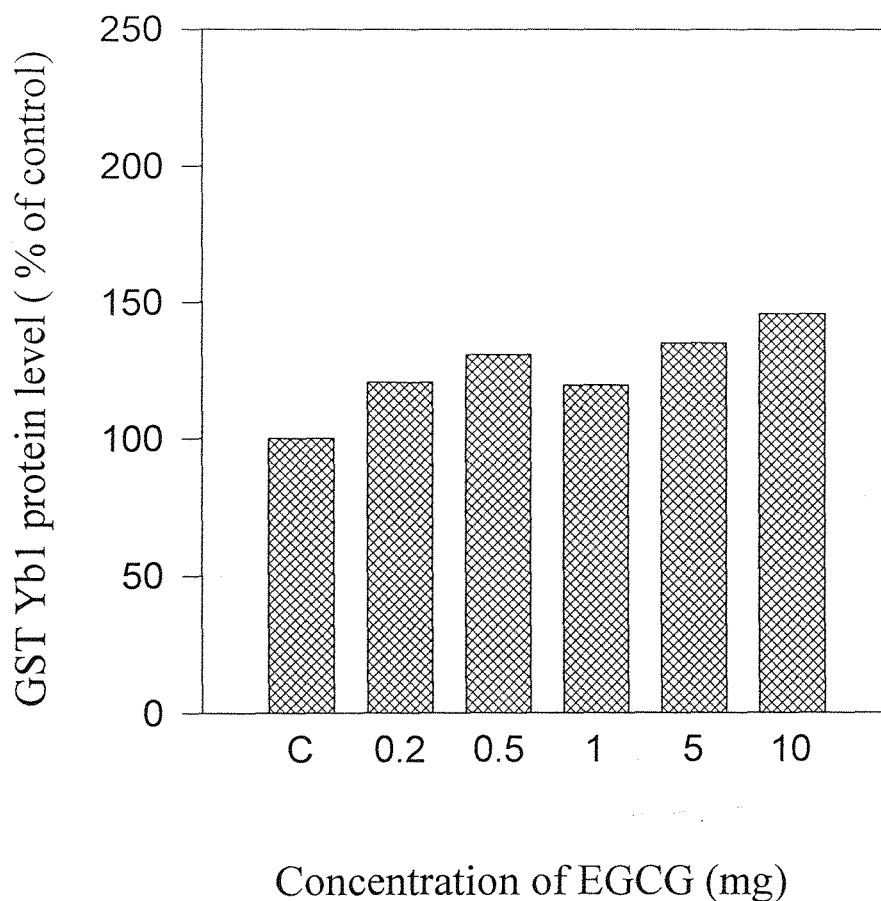


Fig.41 Densitometric measurements of the various concentrations of the effect of EGCG on GST Yb1 protein level in rat liver. The data were corrected by the amount of α -tubulin of each sample, and expressed as the percentages of control level. (time point 0). Three independent experiments were conducted ; a representative one is shown here.

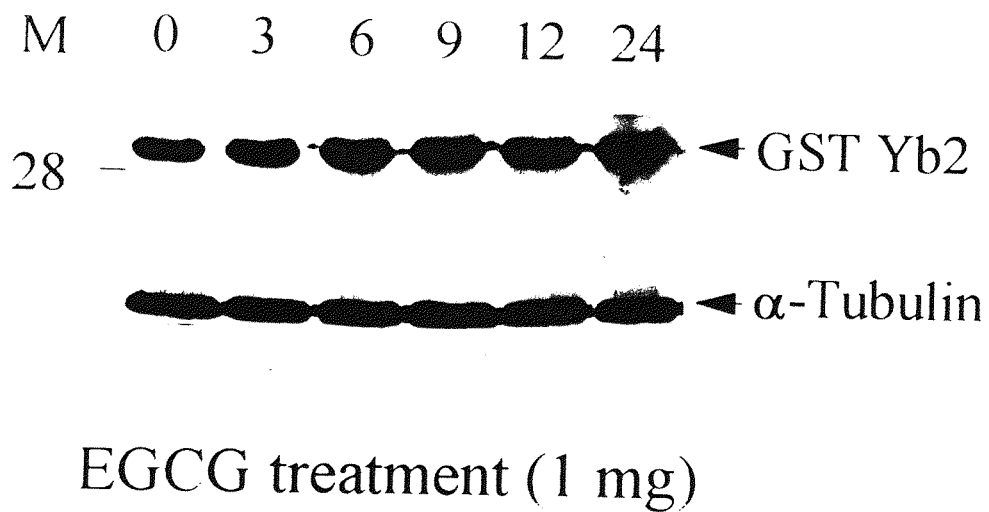


Fig.42 Effect of various concentrations of EGCG on GST Yb2 protein level in rat liver. Rats were treated with different concentrations (0.2, 0.5, 1, 5, 10 mg) of EGCG for 6 hours. Tissue homogenates were prepared from each animal and analyzed by western blotting. C was the control animal treated with solvent only. Anti- α -tubulin antiserum was used for internal control.

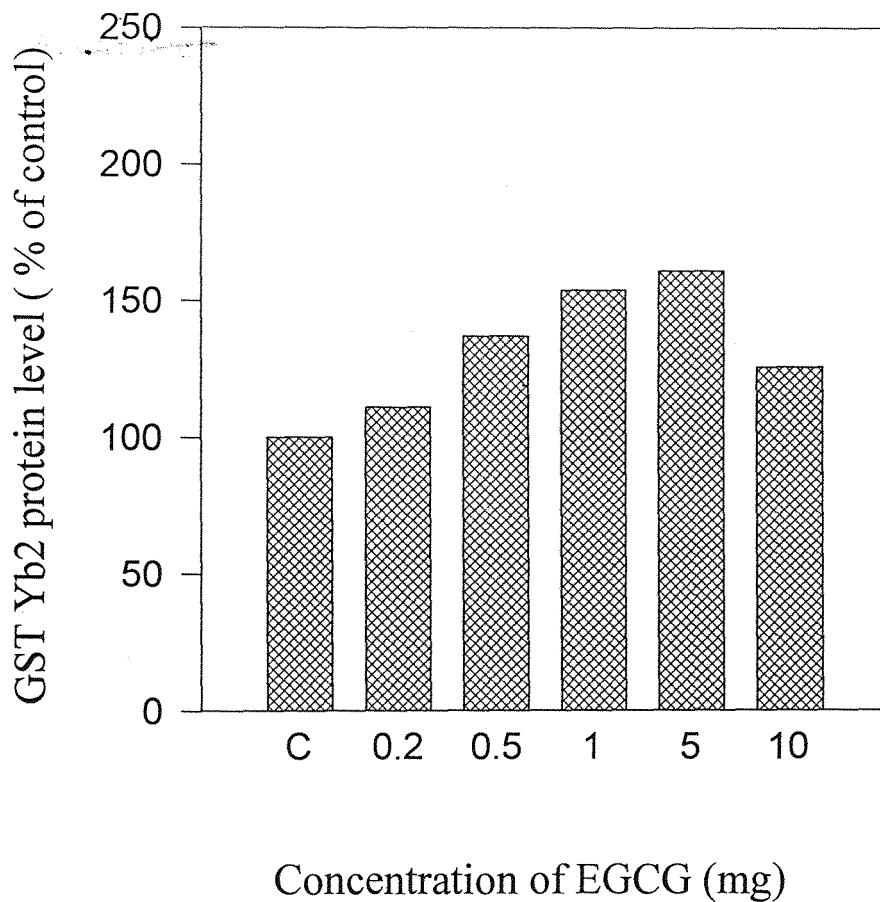


Fig.43 Densitometric measurements of the various concentrations of the effect of EGCG on GST Yb2 protein level in rat liver. The data were corrected by the amount of α -tubulin of each sample, and expressed as the percentages of control level. (time point 0). Three independent experiments were conducted ; a representative one is shown here.

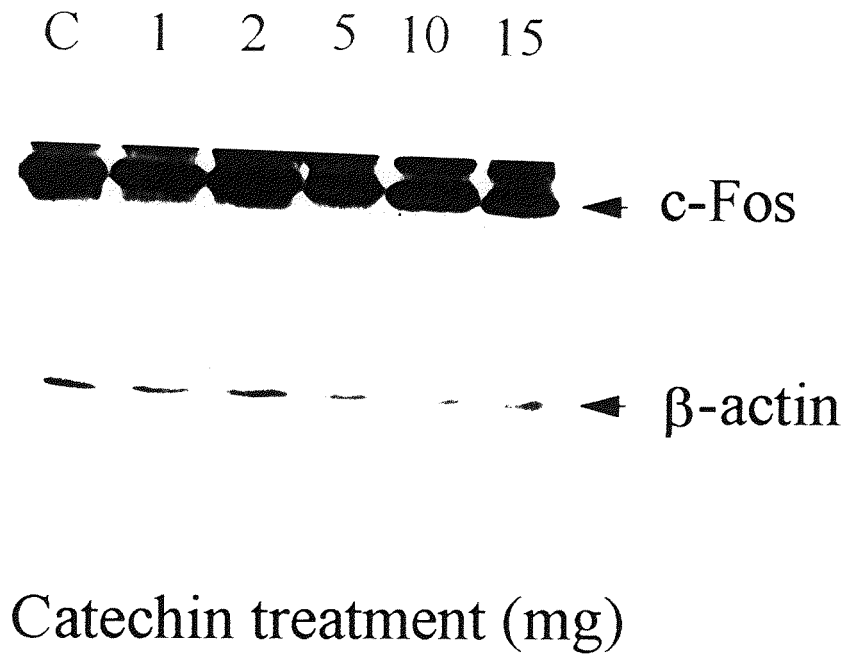


Fig.44 Effect of various concentrations of catechin on c-Fos protein level in rat liver. Rats were treated with different concentrations (1, 2, 5, 10, 15 mg) of catechin for 12 hours. Tissue homogenates were prepared from each animal and analyzed by western blotting. C was the control animal treated with solvent only. Anti-β-actin antiserum was used for internal control.

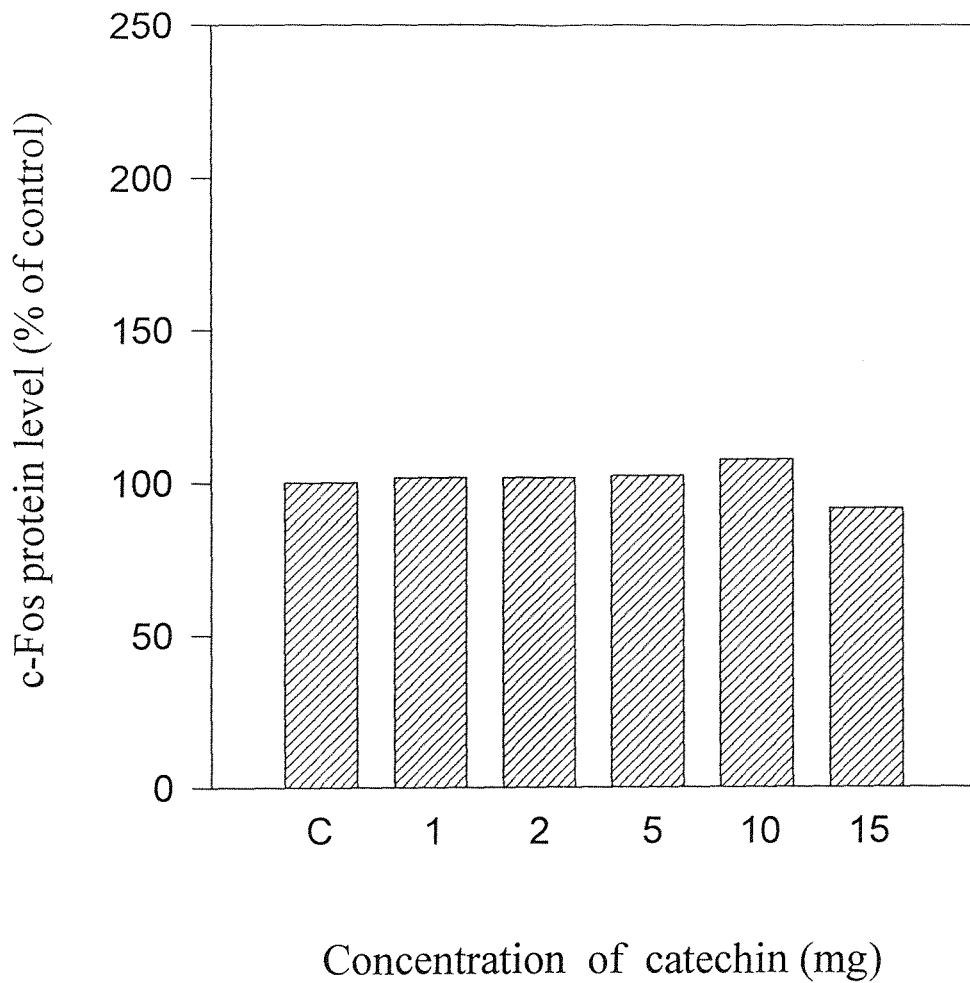


Fig.45 Densitometric measurements of the various concentrations of the effect of catechin on c-Fos protein level in rat liver. The data were corrected by the amount of β -actin of each sample, and expressed as the percentages of control level. (time point 0). Three independent experiments were conducted ; a representative one is shown here.

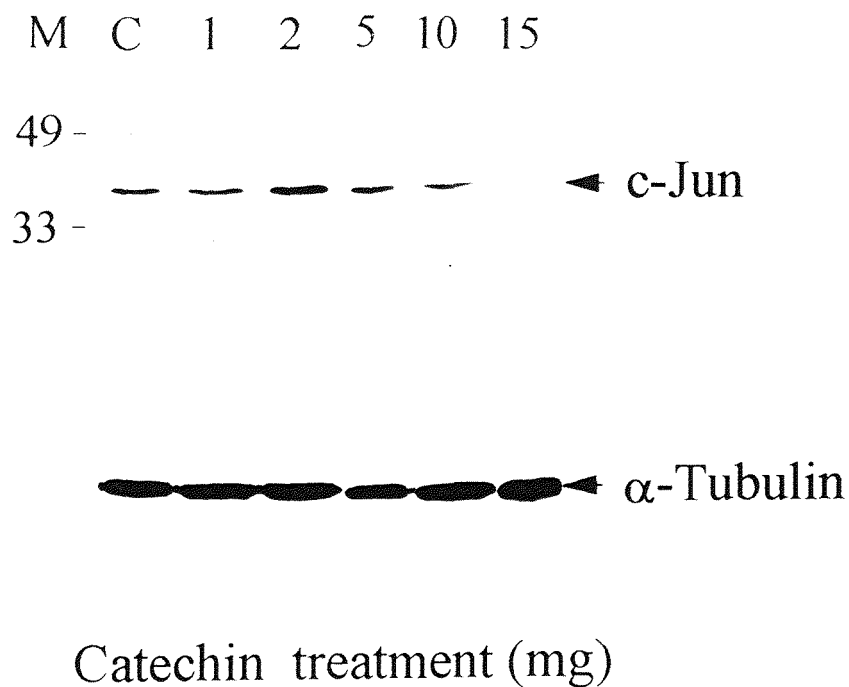


Fig.46 Effect of various concentrations of catechin on c-Jun protein level in rat liver. Rats were treated with different concentrations (1, 2, 5, 10, 15 mg) of catechin for 12 hours. Tissue homogenates were prepared from each animal and analyzed by western blotting. C was the control animal treated with solvent only. Anti- α -tubulin antiserum was used for internal control.

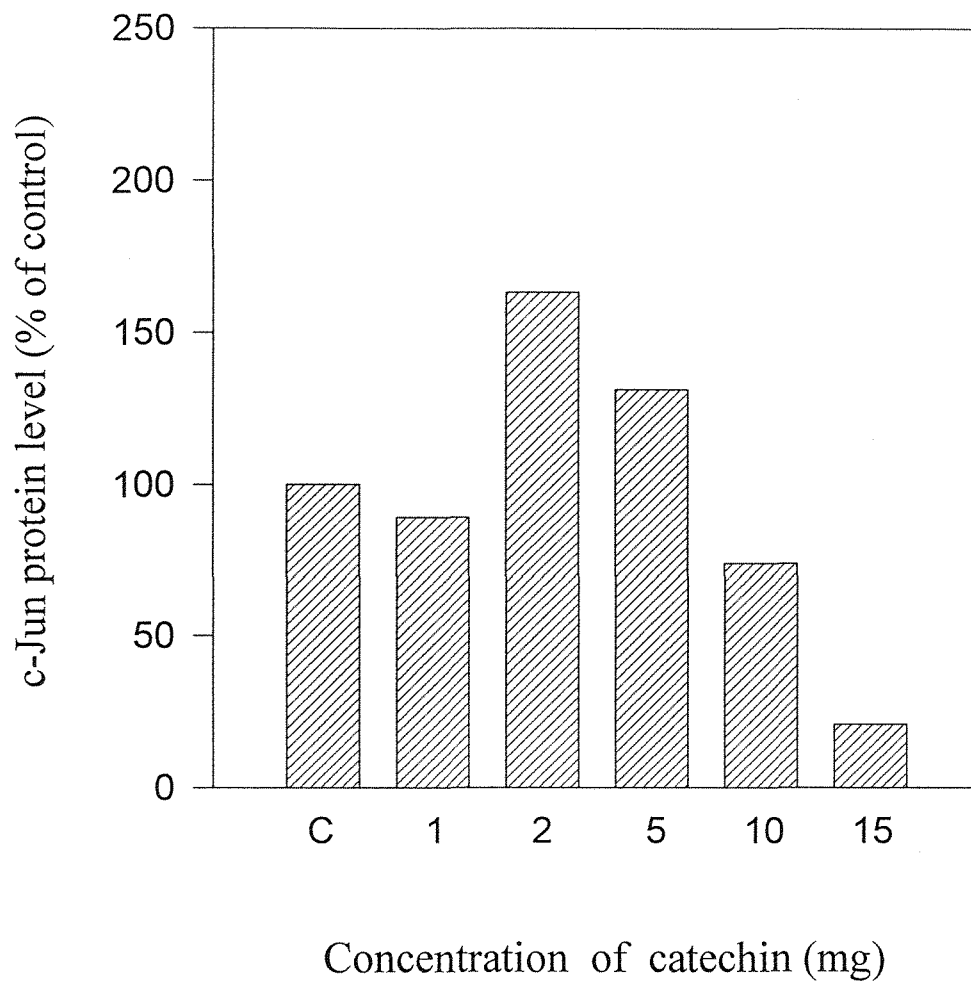


Fig.47 Densitometric measurements of the various concentrations of the effect of catechin on c-Jun protein level in rat liver. The data were corrected by the amount of β -actin of each sample, and expressed as the percentages of control level. (time point 0). Three independent experiments were conducted ; a representative one is shown here.

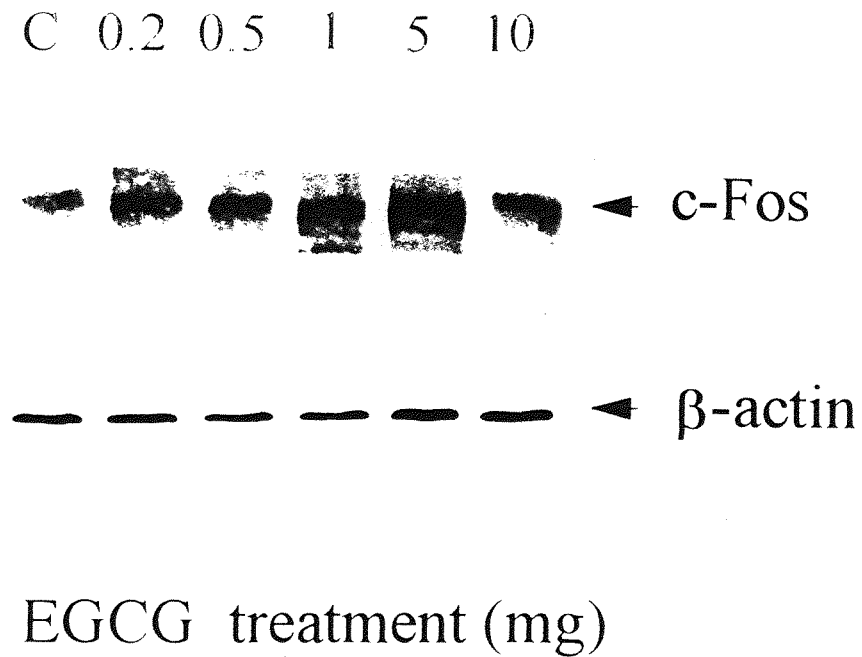


Fig.48 Effect of various concentrations of EGCG on c-Fos protein level in rat liver. Rats were treated with different concentrations (0.2, 0.5, 1, 5, 10 mg) of EGCG for 6 hours. Tissue homogenates were prepared from each animal and analyzed by western blotting. C was the control animal treated with solvent only. Anti- β -actin antiserum was used for internal control.

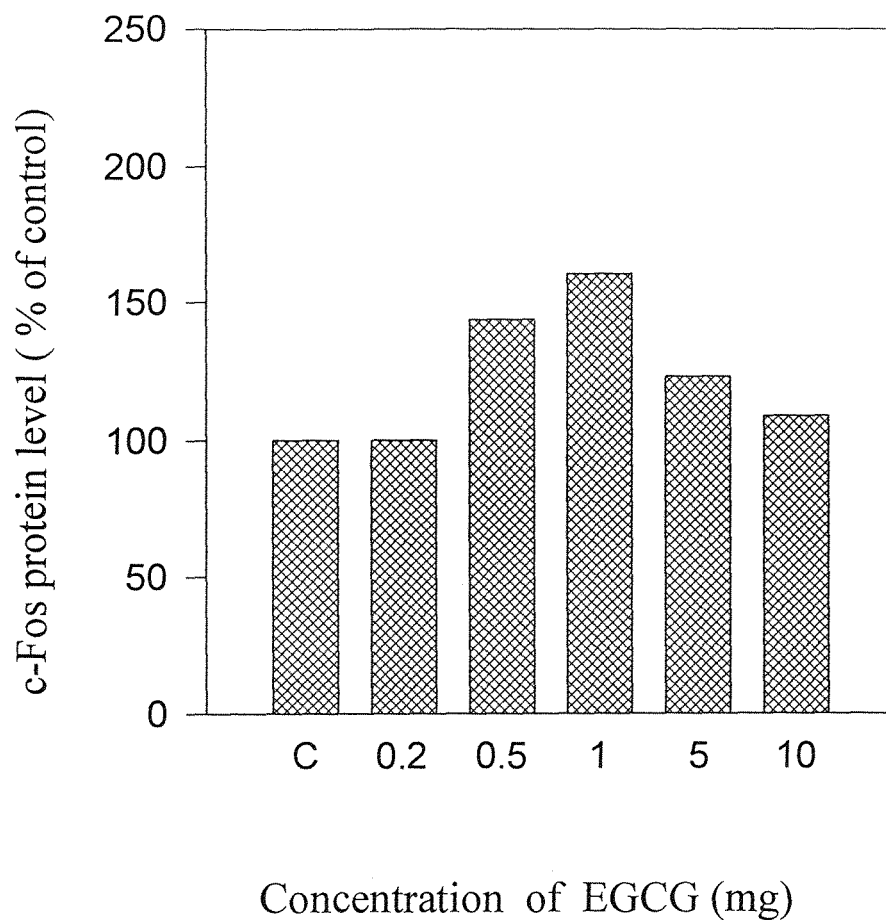


Fig.49 Densitometric measurements of the various concentrations of the effect of EGCG on c-Fos protein level in rat liver. The data were corrected by the amount of β -actin of each sample, and expressed as the percentages of control level. (time point 0). Three independent experiments were conducted ; a representative one is shown here.

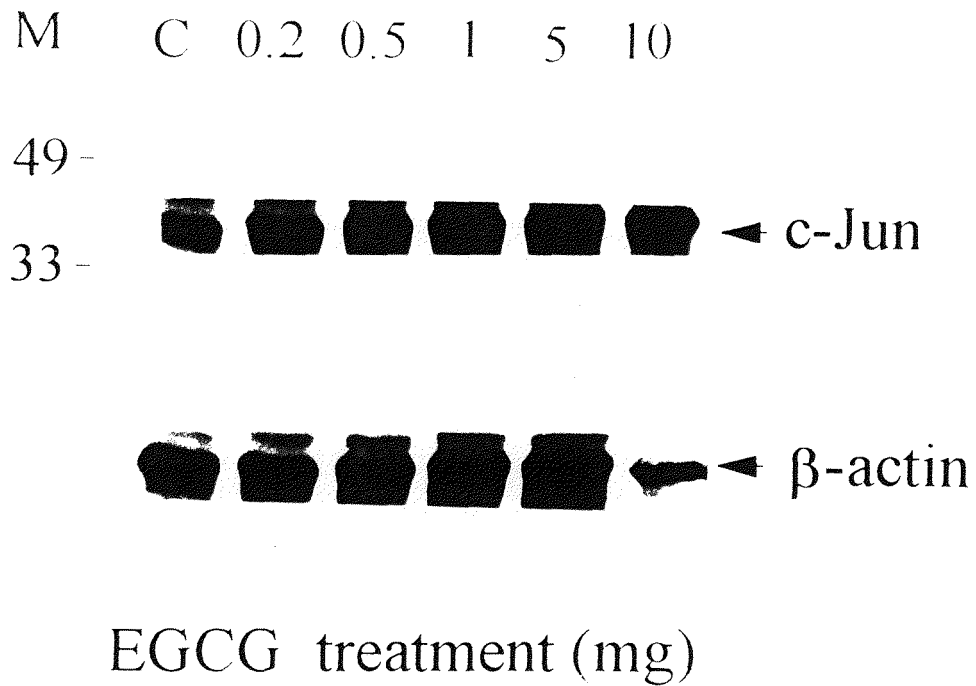


Fig.50 Effect of various concentrations of EGCG on c-Jun protein level in rat liver. Rats were treated with different concentrations (0.2, 0.5, 1, 5, 10 mg) of EGCG for 6 hours. Tissue homogenates were prepared from each animal and analyzed by western blotting. C was the control animal treated with solvent only. Anti- β -actin antiserum was used for internal control.

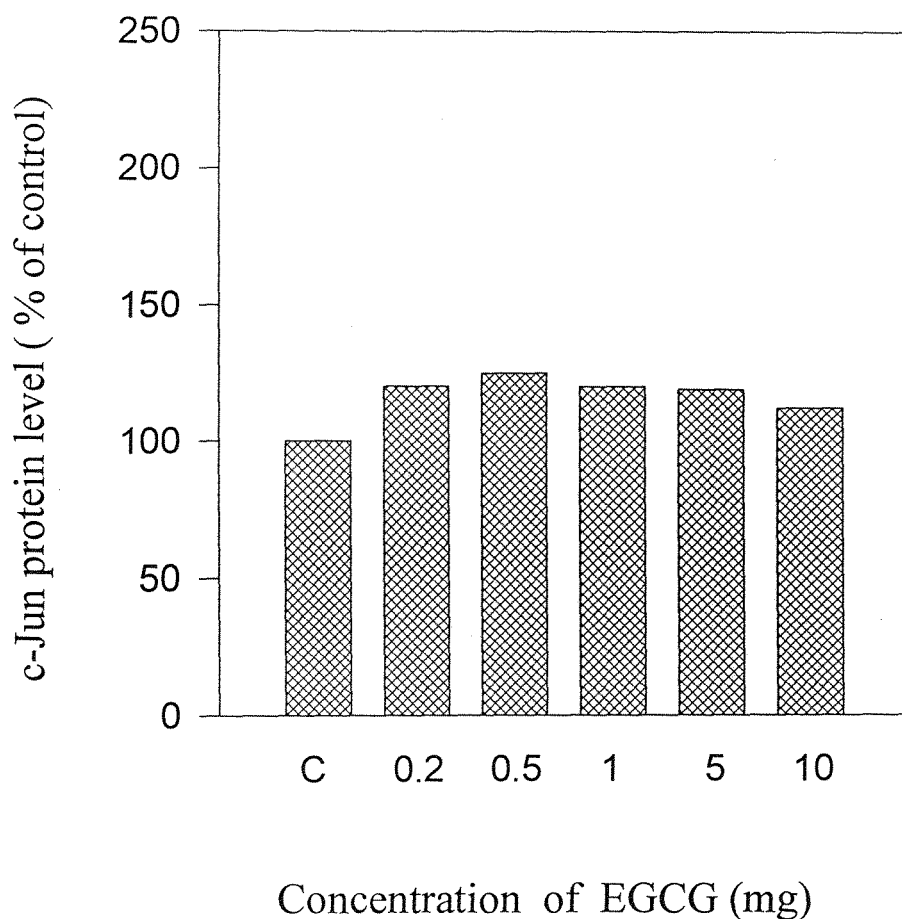


Fig.51 Densitometric measurements of the various concentrations of the effect of EGCG on c-Jun protein level in rat liver. The data were corrected by the amount of β -actin of each sample, and expressed as the percentages of control level. (time point 0). Three independent experiments were conducted ; a representative one is shown here.

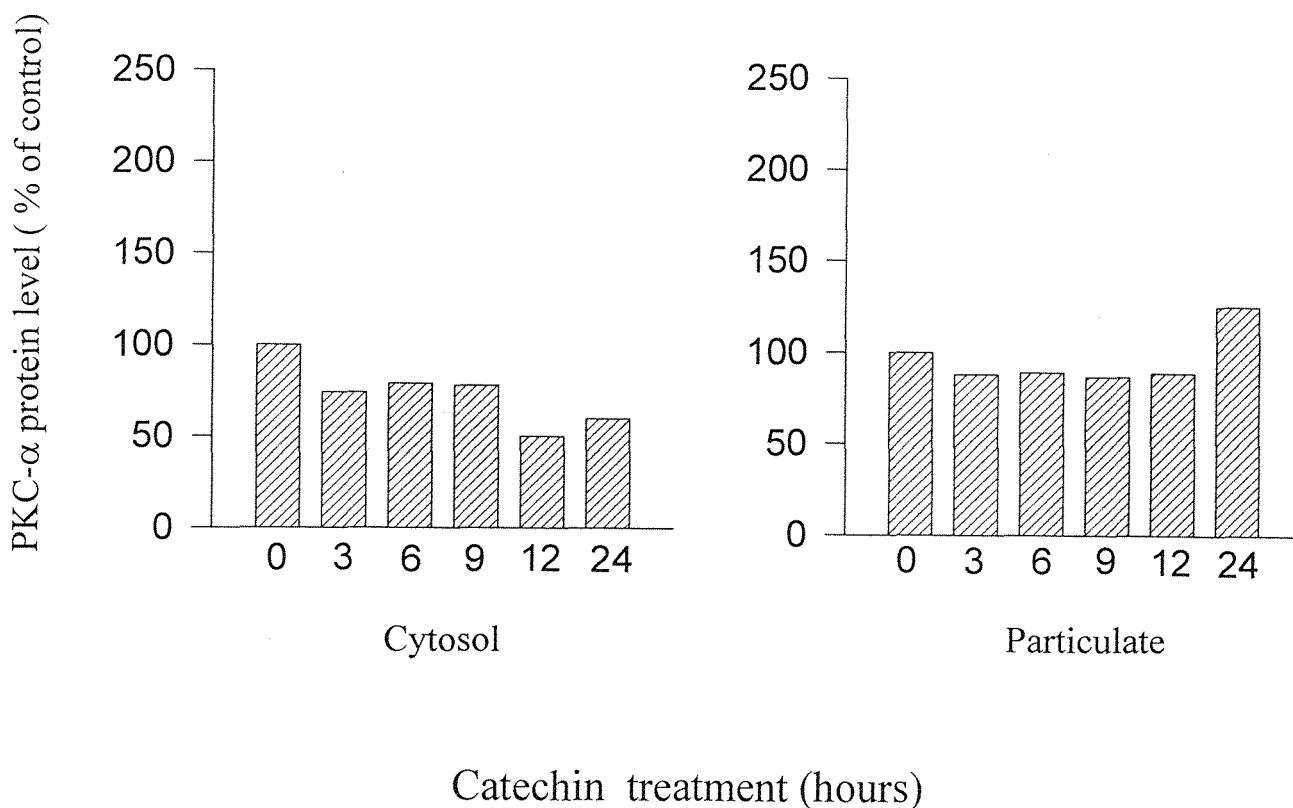


Fig.53 Densitometric measurements of the time course of the effect of catechin on PKC- α protein level in rat liver. The data were corrected by the amount of α -tubulin of each sample, and expressed as the percentages of control level. (time point 0). Three independent experiments were conducted ; a representative one is shown here.

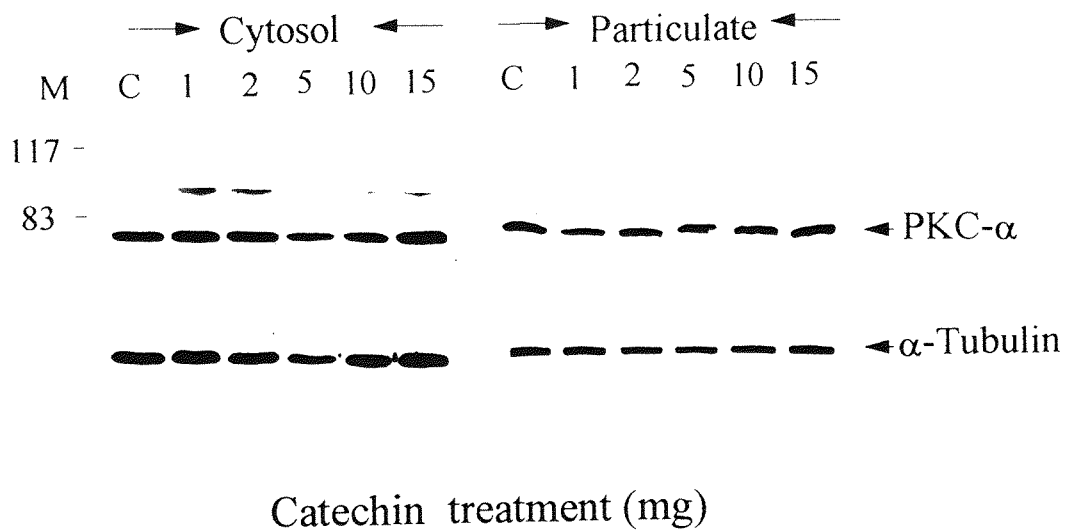


Fig.54 Effect of various concentrations of catechin on PKC- α protein level in rat liver. Rats were treated with different concentrations (1, 2, 5, 10, 15 mg) of catechin for 12 hours. The cytosol and particulate fractions of the liver tissue were prepared according to the procedures described in the method section, and analyzed by western blotting. C was the control animal treated with solvent only. Anti- α -tubulin antiserum was used for internal control.

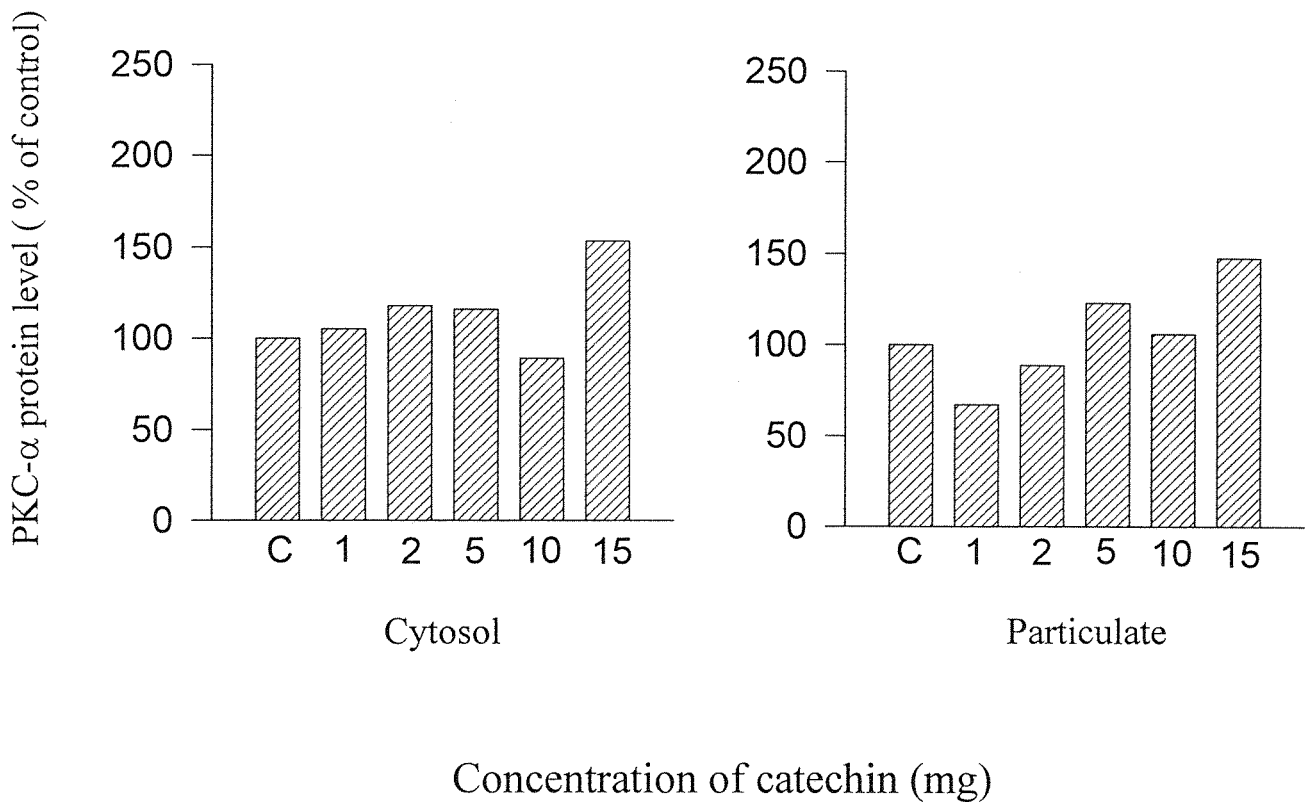


Fig.55 Densitometric measurements of the various concentrations of the effect of catechin on PKC- α protein level in rat liver. The data were corrected by the amount of α -tubulin of each sample, and expressed as the percentages of control level. (time point 0). Three independent experiments were conducted ; a representative one is shown here.

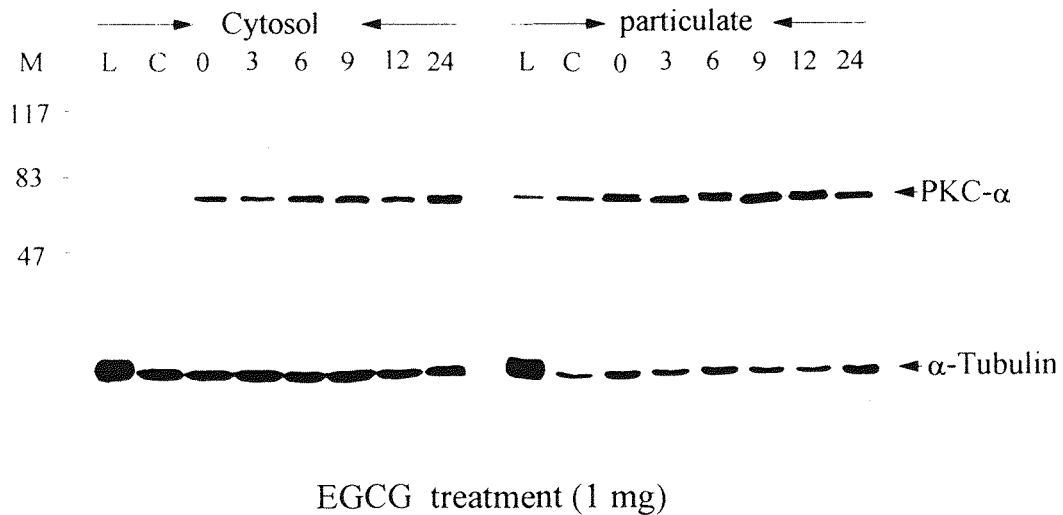


Fig.56 Time course of the effect of EGCG on PKC- α protein level in rat liver. Rats were treated with EGCG (1 mg) for the time indicated. The cytosol and particulate fractions of the liver tissue were prepared according to the procedures described in the method section, and analyzed by western blotting. L was the brain lysate used to indicate the position of PKC- α , C was the control animal treated with solvent only. Anti- α -tubulin antiserum was used for internal control.

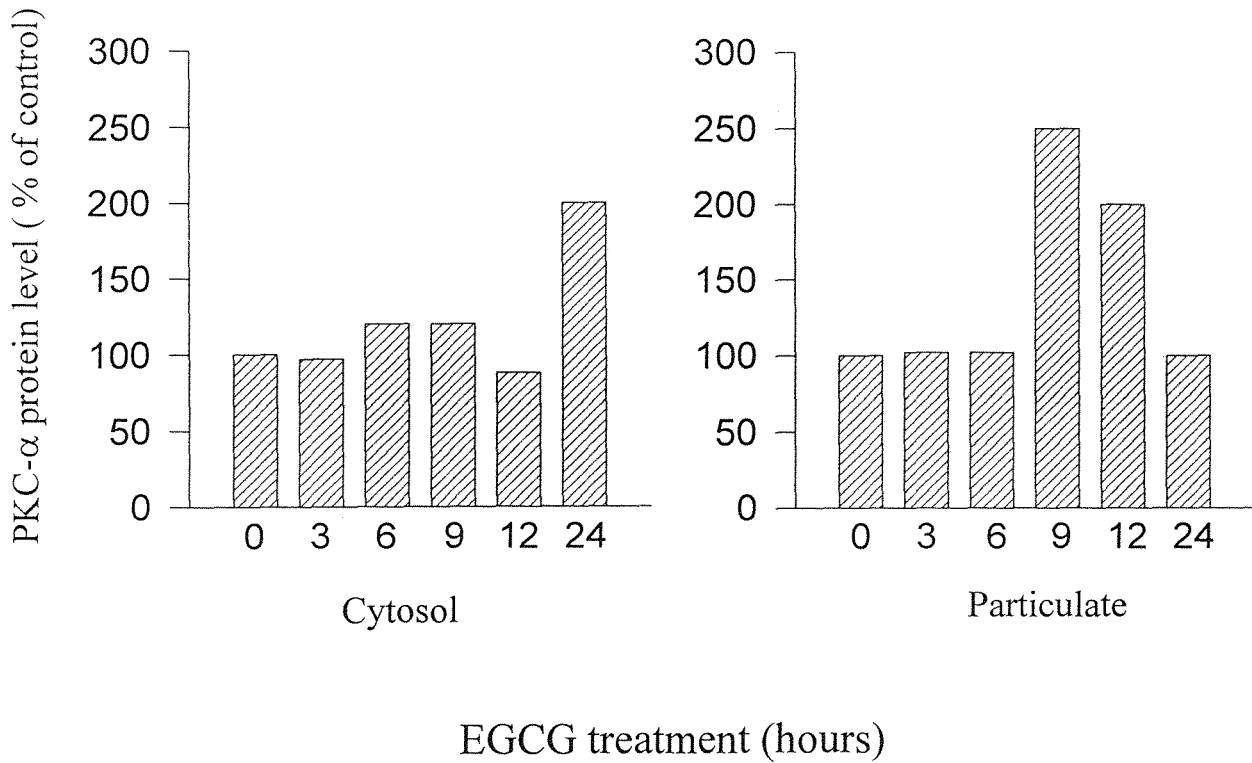


Fig.57 Densitometric measurements of the time course of the effect of EGCG on PKC- α protein level in rat liver. The data were corrected by the amount of α -tubulin of each sample, and expressed as the percentages of control level. (time point 0). Three independent experiments were conducted ; a representative one is shown here.

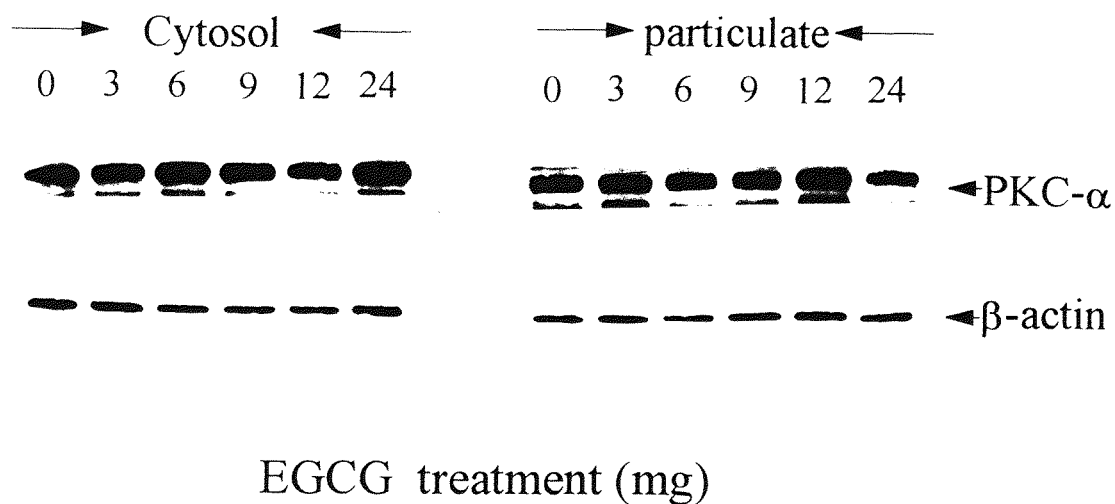


Fig.58 Effect of various concentrations of EGCG on PKC- α protein level in rat liver. Rats were treated with different concentrations (0.2, 0.5, 1, 5, 10 mg) of EGCG for 6 hours. The cytosol and particulate fractions of the liver tissue were prepared according to the procedures described in the method section, and analyzed by western blotting. C was the control animal treated with solvent only. Anti- β -actinantiserum was used for internal control.

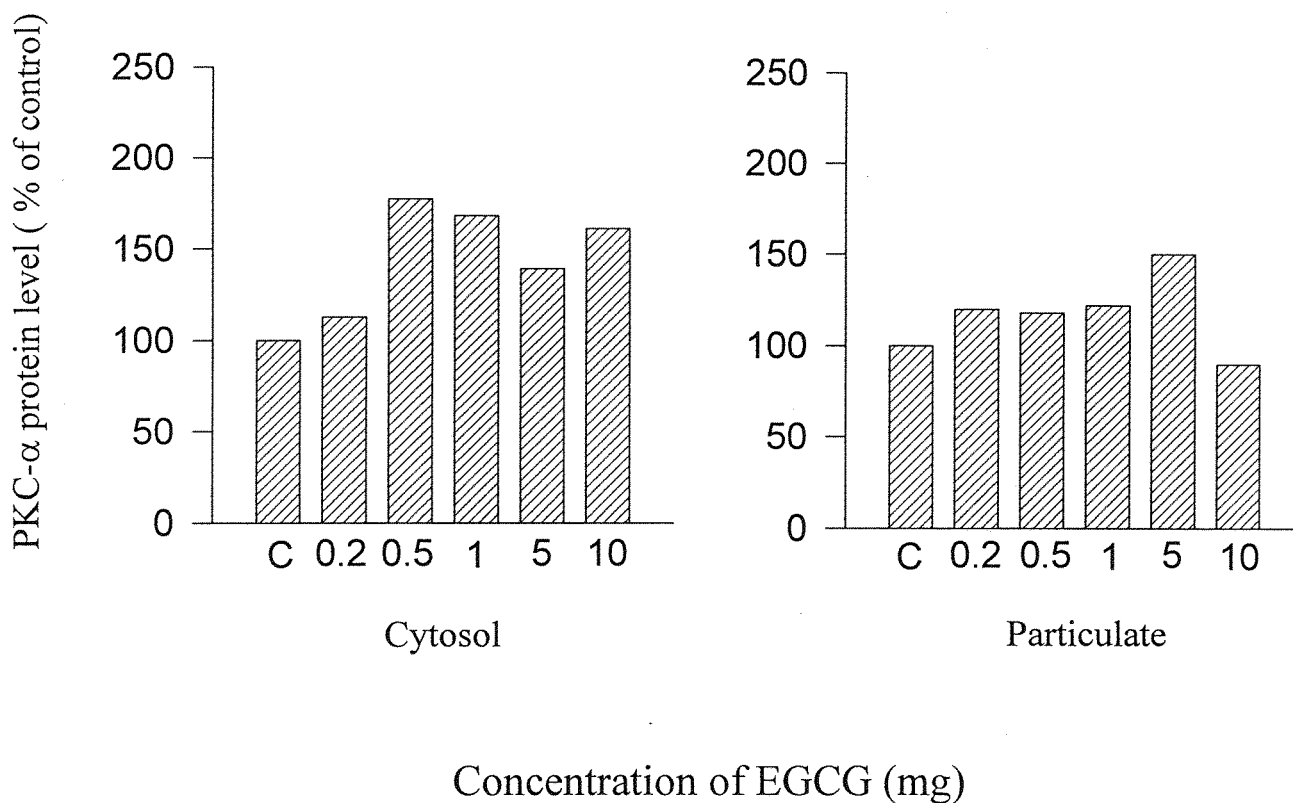
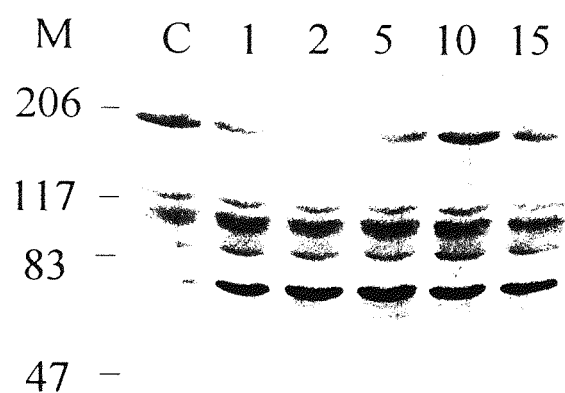
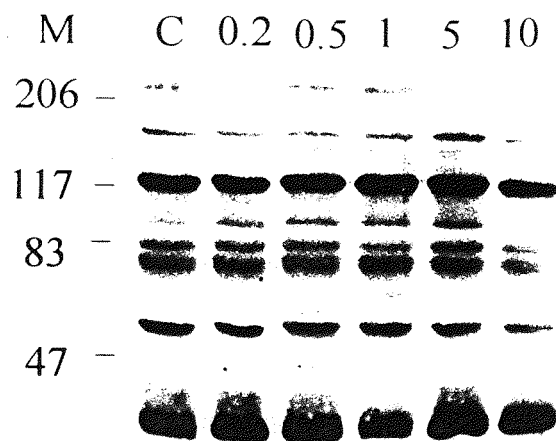


Fig.59 Densitometric measurements of the various concentrations of the effect of EGCG on PKC- α protein level in rat liver. The data were corrected by the amount of β -actin of each sample, and expressed as the percentages of control level. (time point 0). Three independent experiments were conducted ; a representative one is shown here.



Concentration of catechin (mg)
py-20

Fig.60 Effect of various concentrations of catechin on py-20 protein level in rat liver. Rats were treated with different concentrations (1, 2, 5, 10, 15 mg) of catechin for 12 hours. Tissue homogenates were prepared from each animal and analyzed by western blotting. C was the control animal treated with solvent only.



Concentration of EGCG (mg)
py-20

Fig.61 Effect of various concentrations of EGCG on py-20 protein level in rat liver. Rats were treated with different concentrations (0.2, 0.5, 1, 5, 10 mg) of EGCG for 6 hours. Tissue homogenates were prepared from each animal and analyzed by western blotting. C was the control animal treated with solvent only.

圖-(62)

	Catechin	EGCG
GST activity	+	+
GST Yb mRNA	+	+
protein Time course GST Ya GST Yb1 GST Yb2	- + +	+ - +
Dose-response GST Ya GST Yb1 GST Yb2	- + +	+ + +
PKC- α Time course Dose response	- (shift) \pm	- (shift) \uparrow (10 mg)
c-Fos	-	-
c-Jun	\uparrow (2 mg)	-
py-20	\pm	\pm

第八章

參考資料

- (1). Webber, J. and Macdonald, I. A. (1993). Metabolic actions of catecholamines in man. *Baillieres Clinical Endocrinology & Metabolism*. 7, 393-413.
- (2). Graham, t. e. and Spriet, L. l. (1995). Metabolic, catecholamine, and exercise performance response to various to dose of caffeine. *J. of Applied Physiology*. 78, 867-874.
- (3). Matwuo, N., Yamada, K. and Yamashita, K. (1996). Inhibitory effects of tea polyphenols on histamine and leukotriene B4 release from rat peritoneal exude cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 32, 340-344.
- (4). Gabor, M. (1986). Anti-inflammatory and anti-allergic properties of flavonoids. *Progress in Clinical & Biological Res.*, 213, 471-480.
- (5). Maity, S., Vedasiromoni, J. R. and Ganguly, D. K. (1995). Anti-ulcer effect of the hot water extract of black tea. *J. of Dthnopharmacology*. 46, 167-174.
- (6) .Bu-Abbas, A., Nunez, X. and Clifford, M. N. (1996). A comparison of the antimutagenic potential of green, black and decaffeinated teas: contribution of flavanols to the antimutagenic effect. *Mutagenesis*. 11, 597-603.
- (7). Katiyar, R. K., Rupp, C. O. and Korman, N. J. (1995). Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and other skin tumor-promoter-

- caused induction of epidermal interleukin-1 α mRNA and protein repression in SENCAR mice by green tea polyphenol. *J. of Investigative Dermatology*. 105,394-398.
- (8).Takahashi, O., Cai, Z. and Roda, M. (1995). Appereance of antibacterial activity of oxacillin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the presence of catechin. *J. of Japanese Association for Infectious Disease*. 69,1126-1134.
- (9) .Smith, D. G. (1975). Inhibitionof swarming in *Proteus* spp. By tannic acid. *J. of Applied Bacteriololgy*. 38, 29-32.
- (10) .Inoue, M., Tajima, K. and Hirose, K. (1997). Epidemiological features of first-visit outpatients in Japan: comparison with general population and sex, age, and season. *J. of Clinical Epidemiology*. 50, 69-77.
- (11) .Polette, A., Lematire, D. and Lagarde, M. (1996). N-3 fatty acid-induced lipid peroxidation in human platelets is prevented by catechins. *Thrombosis & Haemostasis*. 75,945-949.
- (12) Luo, M., Kannar, K. and Wahlquist, M. L. (1997). Inhibition of LDL oxidation by green tea extract. *Lancet*. 349, 360-361.
- (13) .Suzuki, N. et al. (1991). Reaction rate constants of tea leaf catechins with superoxide: Superoxide-dismutase (SOD)-like activity measured by Cypridina luciferin analogue chemiluminescence. *Chem, Express (Japan)*, 6, 655-658.
- (14) .Osawa, T. and Huang, M. T. et al (1992) Phenolic antioxidants in

- dietary plants as antimutagens. In Phenolic Compounds in Foods and Health II: Antioxidant & Cancer Prevention. Amer. Chem. Soc., 135-149.
- (15) .Yang, C. S. et al. (1990). Effect of nutrition on Carcinogenesis: Mechanisms involving nitrosamines. In Nutrients and Cancer Prevention. New Jersey: Humana Press,53-70.
- (16) .Wang, H. et al. (1990) The blocking effect of Chinese tea on N-nitrosation in vitro and in vivo. In Nutrients and Cancer Prevention. New Jersey: Humana press, 546-549.
- (17) .Wang, Z. Y. et al. (1998) Interaction of epicatechins derived from green tea with rat hepatic cytochrome P-450. Drug Metab. Dispos. Biol. Fate. Chem., 16, 98-103.
- (18) .Conney, A. H. et al. (1982) Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A Clowes Memorial Lecture. Cancer Res., 42,4875-4917.
- (19) .Huang, M. T. et al. (1992) Inhibitory effect of topical application of a green tea polyphenol fraction on tumor initiation and promotion in mouse skin. Carcinogenesis. 13, 947-954.
- (20) .Yoshixawa, S. et al. (1992) Penta-o-galloyl- β -D-glucose and (-)-epigallocatechin gallate: Cancer prevention agent. In Phenolic Compounds in Food and Health II. Antioxidant & Cancer Prevention. Am. Chem. Soc., 316-325.

- (21) .Katiyar, S. et al. (1992) Inhibition of 12-O-tetradecanoyl-phorbol-3-acetate-caused tumorpromotion in 7, 12-dimethyl benz(a) pyrene-initiated SENCAR mouse skin by a polyphenolic fraction isolated from green tea. *Cancer Res.*, 52, 6890-6897.
- (22). Ruch, R. J. et al. (1989) Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10, 1003-1008.
- (23) .Ranuio, H., Husgafuel, P. K., Anttila, S., Hietanen D., Hirvonen A., Pelkonen, O., (1995) Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activation and inactivation enzymes and cancer susceptibility. *Gene*, 159, 113-121.
- (24) Pioto, H. C., Beer, P., Hendirch, S., (1989) Multistage carcinogenesis of the rat hepatocyte. *Banburg Report 25: Nongenotoxic mechanism in carcinogenes*, Cold Spring harbor, New York, 41-53.
- (25) Iucker, (1995) Infulence of glutathione S-transferase B (ligandin) on the intermembrane transfer of billrubin. Implication for the intracellular transport of nonsubstrate ligands in hepatocytes. *J. Clin. Invest.* 96, 1972-1935.
- (26) .Arias, I. M., Fleischner, G., Kirsch, R., Mishkin, S., and Gatmaitan, Z. (1996) in *glutathione: Metabolism and function*, pp.175-188, Raven Press, New York.
- (27) .Mannervik, B.,(1985) The isoenzymes of glutathione transferase.

- Adv. Enzym. Realt. Areas. Molec. Viol. 57,357-417.
- (28). Hui-Chen J, Lui and Chen-Pei D. Tu. (1986) Rat Glutathione S-Transferase Supergene family 261, 13793-13799.
- (29) .Hayes JD, Pulford, D. J. (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and durg resistance. Crit Rev. Biochem. Mol. Biol. 30(6),445-600.
- (30) .Mainwaring (1996) Isolation of a mouse theta-glutathione S-transferase active with methylene chloride. Biochem. J. 314, 445-448.
- (31) .Hayes JD., Stravge RC (1995) Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. Free Radic. Res. 22(3), 193-207.
- (32) . Bengt M., Rer A., Cleas, G., Helgi, J., Warholm, and Hans, J.(1995) Identification of three calsses of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: Correlation between structural deta and enzymatic properties. PNAS, 82, 7202-7206.
- (33) .Sugimoto M. (1995) Glutathione S-transferase. Nippon Rinsho- Japanese Journal of clinical Medicine. 53,1253-1259.
- (34) .Masaharu, S., Yuko, M., Mako N. and Shinzo, N. (1995) Suppresion of Rat Glutathion Transferase P Expression by Peroxisome Proliferator-activated Receptor-Alpha.
- (35) .Tee,(1996) Dual phenotypic expression of hepatocytes and bile

ductular markers in developing and preneoplastic rat liver. *Carcinogenesis* 17,251-259.

- (36) .Dillio C.,(1996) Purification and characterization of three pi class glutathione transferase from monkey (*Macaca fascicularis*) placenta. *Comp. Biochem. Physiol Biochem. Mol. Biol.* 114(4),377-382.
- (37) .Ainbinder, E. (1997) Regulation mechanisms involved in activator-protein-1(AP-1)-mediated activation of glutathione-S-transferase gene expression by chemical agents. *Eur J. Biochem.*243,49-57.
- (38) Imagawa M. (1996) Regulation mechanism of specific expression of tumor marker gene during carcinogenesis. *Yakugaku Zasshi* 116,505-518.
- (39) .Suzuki T., (1996) Activation of regulation transferase P gene by lead requires glutathione transferase P enhancer I. *J. Bio. Chem.* 271, 1626-1632.
- (40) Diccianni MB. (1992) The dyad palindromic glutathione transferase P enhancer binds multiple factors including AP-1. *Nucleic Acids Res.* 20,5153-5158.
- (41).Imai T. (1997) Reduction of glutathione S-transferase P-from mRNA expression in remodeling nodules in rat liver revealed by in situ hybridization. *Carcinogenesis* 18,545-551.
- (42) Imagawa M.(1996) Regulation mechanism of specific expression of tumor marker gene during carcinogenesis. *Yakugaku Zasshi* 116(7), 627-632.

- (43) Sakai M., (1996) Regulation of tumor marker gene expression. *Nippon Rinsho* 54(6), 1560-1567.
- (44) Hayes JD., (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biol.* 30(6), 445-600.
- (45) Ahmad H. (1993) Characterization of two novel subunits of the alpha-class glutathione-S-transferase of human liver. *Biochem. Biophys. Acta.* 1161(2-3), 333-336.
- (46) Waxman DJ., Sundseth SS., Srivastava PK. And Lapenson DP. (1992) Gene-specific oligonucleotide probes for alpha, mu, pi, and microsomal rat glutathione S-transferase: analysis of liver transferase expression and its modulation by hepatic enzyme inducers and platinum anticancer drugs. *Cancer Res.* 52(20):5797-5802.
- (47) Morel F., Fardel O., Meyer DJ. (1993) Preferential increase of glutathione S-transferase class alpha transcripts in cultures human hepatocytes by phenobarbital, 3-methylcholanthrene, and dithiolethiones. *Cancer Res.* 53(2), 231-234.
- (48) .Shea TC., Kelley SL., Henner WD. (1988) Identification of an aninoic form of glutathione transferase present in many human tumor and tumor cell lines. *Cancer Res.* 48(3), 527-533.
- (49) Herterving E., Nilsson A. and Seidegard J. (1994) The expression of

- glutathione transferase mu in patients with inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol* 29(8), 729-735.
- (50) Butterworth B. E., Ashby J., Bermudex E., Casciano D., Mirsalis J., Probst G. and Williams G. (1987) A protocol and guide for the in vitro rat hepatocytes DNA repair assay. *Mut. Res.* 189, 113.
- (51) Alley M. C., Scudiero D. A., Monks A., Hursey M. L., Czerwinski M. J., Fine DL., Abbott B. J., Mauo J. G., Shoemaker R. H. and Boyd M. R., (1998) Feasibility of drug screening with paneks of human tumor cell lines using microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48,589.
- (52) Alley M. C., Pacula-Cox C. M., Hursey M. L., Rubinstein R. and Boyd M. R. (1991) Morphometric and colorimetric analyses of human tumor cell line growth and drug sensitivity in soft agar culture. *Cancer Res.* 51, 1247.
- (53) Xie, W., and Rothblum, L. I. (1991) Rapid, small Scale RNA isolation from tissue culture cells. *Biotech.*,11,no.3:325-327.
- (54) Nakagawa K. and Miyazawa T. (1997) Chemiluminescence-high-performance liquid chromatographic determination of tea catechin, (-)-epigallocatechin 3-gallate, at picomole levels in rat human plasma. *Anal. Biochem.*, 248(1),41-49.
- (55). Inoue, M. Kishimoto, A and Takai, Y. (1197) studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissue. II. Proenzyme and its activation by calcium-

- dependent protease from rat brain. *J. Biol. Chem.*, 252. 7610-7616.
- (56) Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawaahara, Y., Mori, T. and Nishizuka, Y. (1979) Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J. Bio. Chem.*, 254: 3692-3695.
- (57) Nishizuka, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature*, 308: 693-698.
- (58) Nishizuka, Y. (1984) Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science*, 225: 365-1370.
- (59) Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M. and Nishizuka, Y. (1977) Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissue. *J. Biol. Chem.*, 252: 7603-7609.
- (60) Hunter, T., Ling, N. and Cooper, J. A. (1984) Protein kinase C phosphorylation of the EGF receptor at a threonine residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane. *Nature*, 311: 480-483.