

中國醫藥大學營養學系碩士班

碩士論文

類黃酮誘發初代肝細胞第一型血基質氧化酶與
麩胱胺合成酶表現之探討

Induction of Flavonoids on Heme Oxygenase-1 and
Glutamate-Cysteine Ligase Expression
in Rat Primary Hepatocyte

研究生：葉鈺雯(Yu-Wen Yeh)

指導教授：李宗貴 博士 (Chong-Kuei Lii, Ph.D.)

中華民國九十九年七月

July, 2010

目錄

目錄.....	i
圖目錄.....	iii
表目錄.....	iv
縮寫表.....	v
中文摘要.....	vi
英文摘要.....	vii
第一章、前言.....	1
第二章、文獻探討.....	2
一、類黃酮(Flavonoids)化合物之簡介.....	2
(一)類黃酮之結構與分類.....	2
(二)類黃酮之消化吸收與代謝.....	6
(三)類黃酮之生理功能.....	6
二、生物體之細胞抗氧化防禦系統 (Cellular antioxidant defense system) ..	8
(一) 酵素性抗氧化防禦系統(Enzymatic antioxidant defenses)	9
(二) 非酵素性抗氧化防禦系統(Non-enzymatic antioxidant defenses) ..	10
(三) 生物轉換酵素系統(Biotransformation enzyme system)	15
三、血基質氧化酶(Heme oxygenase, HO)	16
(一) 血基質氧化酶之類型.....	16
(二) 第一型血基質氧化酶(HO-1)之作用及其產物.....	16
(三) 第一型血基質氧化酶之生理角色.....	18
(四) 第一型血基質氧化酶基因表現之調控.....	19
四、麩胱胺合成酶 (glutamate-cysteine ligase, GCL).....	20
(一) 麩胱胺合成酶之組成.....	21
(二) 麩胱胺合成酶之生理角色.....	22
(三) 麩胱胺合成酶基因表現之調控.....	22
五、調控抗氧化酵素之訊息傳遞路徑.....	23
(一) ARE 在調控抗氧化酵素表現之角色.....	25
(二) Nrf2 的功能.....	25
六、實驗動機與目的.....	26
第三章、實驗材料與方法.....	27
一、研究架構.....	27
二、實驗材料.....	28
(一) 實驗動物.....	28
(二) 化學試劑.....	28
三、實驗方法.....	35
(一) 大白鼠初代肝細胞之分離與培養.....	35

(二) 生化分析	37
1、細胞存活率分析(MTT assay).....	37
2、蛋白質表現分析－西方墨點法(Western blotting assay)	38
3、還原態及氧化態麩胱甘肽【GSH and oxidized GSH (GSSG)】 含量之分析	40
4、Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).....	40
5、Transient transfection / Luciferase activity assay.....	42
6、Electrophoretic mobility shift assay (EMSA).....	43
7、胞內氧化壓力測定	44
四、統計分析	45
第四章、結果	46
一、不同類黃酮對大鼠初代肝細胞存活率之影響	46
二、不同類黃酮對大鼠初代肝細胞還原態和氧化態麩胱甘肽含量之影響.....	46
三、不同類黃酮對大鼠初代肝細胞 GCLC、HO-1 蛋白質表現之影響	47
四、不同類黃酮對大鼠初代肝細胞 GCLC、HO-1 mRNA 表現之影響 ...	47
五、類黃酮對大鼠初代細胞核內 Nrf2 和其 DNA 結合活性之影響.....	48
六、不同類黃酮對 ARE 報導基因活性之影響.....	48
七、預處理類黃酮對 tert-butyl hydroperoxide 誘發 ROS 生成之影響.....	49
第五章、討論	62
第六章、結論	67
第七章、參考文獻	68

圖目錄

文獻探討

圖一、類黃酮基本結構.....	2
圖二、生物體之細胞防禦系統.....	8
圖三、麩胱甘肽(Glutathione)之結構.....	12
圖四、麩胱甘肽之體內恆定.....	13
圖五、GSH 之抗氧化功能.....	14
圖六、HO-1 之作用及其代謝產物.....	18
圖七、調控 HO-1 表現之上游訊息路徑及相關轉錄因子.....	19
圖八、麩胱甘肽合成酶催化 GSH 生合成.....	21
圖九、Chemopreventive compounds 調控抗氧化基因表現之機制.....	24

結果

圖一、不同類黃酮對大鼠初代肝細胞存活率之影響.....	50
圖二、不同查酮對大鼠初代肝細胞 GCLC 蛋白質表現之影響.....	52
圖三、不同黃酮對大鼠初代肝細胞 GCLC 蛋白質表現之影響.....	53
圖四、不同類黃酮對大鼠初代肝細胞 GCLC mRNA 表現之影響.....	54
圖五、不同查酮對大鼠初代肝細胞 HO-1 蛋白質表現之影響.....	55
圖六、不同黃酮對大鼠初代肝細胞 HO-1 蛋白質表現之影響.....	56
圖七、不同類黃酮對大鼠初代肝細胞 HO-1 mRNA 表現之影響.....	57
圖八、類黃酮對大鼠初代細胞核內 Nrf2 (A)和 Nrf2 與 DNA 結合活性(B)之影響.....	58
圖九、不同類黃酮對 ARE 報導基因活性之影響.....	59
圖十、類黃酮對 tert-butyl hydroperoxide 誘發 ROS 生成之影響.....	60
圖十一、類黃酮對初代肝細胞之胞內 ROS 生成之影響.....	61

表目錄

文獻探討

表一、類黃酮分類及其化學結構、特性.....	3
表二、本實驗所使用 5 種不同種類之類黃酮化合物.....	5

實驗材料與方法

表一、逆轉錄聚合酶連鎖反應之寡核苷酸引子序列及反應條件.....	41
----------------------------------	----

結果

表一、不同類黃酮對大鼠初代肝細胞麩胱甘肽(glutathione)含量之影響.....	51
---	----



縮寫表

AP-1	Activator protein-1
ARE	Antioxidant response element
ATF-4	Activating transcription factor-4
DMSO	Dimethyl sulfoxide
GCL	Glutamate-cysteine ligase
GCLC	Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit
GPx	Glutathione peroxidase
GRd	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
GSSG	Oxidanted glutathione
GST	Glutathione S-transferase
GSTP	pi class of Glutathione S-transferase
HO-1	Heme oxygenase-1
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
NAC	N-acetylcysteine
NQO1	NADP(H) : quinone oxidoreductase 1
Nrf2	nuclear factor E2-related factor 2
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PI3K	Phosphoinositide 3-kinases
PPB	potassium phosphate buffer
SFN	sulforaphane
SOD	superoxide dismutase
UGT	UDP-glucuronosyltransferase

中文摘要

過去研究已證實多種植化物(phytochemicals)的生物活性與其調節抗氧化基因表現有關，其中又以類黃酮(flavonoids)受到最多的注意與研究，除了類黃酮本身具有強效的抗氧化能力之外，在活化或抑制訊息傳遞過程中也扮演重要角色，可調控抗氧化酵素及 phase II 酵素表現，而增強細胞防禦系統抵抗氧化壓力。本研究以大鼠初代肝細胞為模式，探討並比較五種類黃酮化合物(apigenin、butein、chrysin、luteolin 和 phloretin)調節肝臟抗氧化酵素表現—第一型血基質氧化酶(heme oxygenase-1, HO-1)和麩胱胺合成酶催化次單元(glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, GCLC)之生理效應。結果顯示：各種類黃酮在 25 μ M 處理濃度下，培養 24 小時，除了 phloretin 不影響 mRNA 表現，其餘類黃酮皆可誘發 HO-1 mRNA 與蛋白質表現，依序為 butein > chrysin > luteolin > phloretin > apigenin；在 GCLC 蛋白質和 mRNA 表現上，除 apigenin 外，其餘類黃酮組表現量皆高於對照組，以 chrysin、butein 和 phloretin 效果最佳，luteolin 次之。在胞內麩胱甘胺(GSH)含量變化方面，類黃酮處理組的胞內還原態 GSH 含量及 GSH/GSSG 比值均高於對照組($p < 0.05$)。進一步探討類黃酮調控抗氧化酵素表現的分子機轉，在查酮類 butein 處理下，細胞核內 Nrf2 的含量以時間效應關係增加，EMSA 也證實 butein、chrysin、apigenin 三者可增加 Nrf2 和 antioxidant-response element (ARE) 的結合效果最佳，利用 3x ARE-Luc reporter plasmid 轉殖實驗，也顯示 butein、chrysin、luteolin 增加 luciferase 活性的效果最好($p < 0.05$)。另外，利用 H₂DCF-DA 測定胞內氧化壓力，觀察到預處理 butein 與 chrysin 可降低 tert-butyl hydroperoxide (tBHP) 誘發 ROS 生成。上述結果證實類黃酮減少胞內 ROS 生成量，可能是透過活化 Nrf2/ARE 路徑向上調節 HO-1 和 GCLC 抗氧化酵素的基因表現，以查酮類 butein 誘發效果最好，黃酮類 chrysin 效果次之；並且此效應可能與增加胞內 GSH 合成有關，這將有助於提升肝細胞的抗氧化保護能力。

關鍵字：類黃酮、第一型血基質氧化酶、麩胱胺合成酶、大鼠初代肝細胞

英文摘要

Previous studies have shown that bioactivity of phytochemicals associated with the regulation on antioxidant gene expression. Flavonoids are phytochemicals attracting the most of attention. In addition to antioxidant activity, flavonoids play an important role in modulation of cell signaling pathway and regulate numerous of antioxidant enzyme and phase II detoxification enzyme expression. In this study, we intend to explore the change on heme oxygenase-1 (HO-1) and glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) gene expression by five flavonoids compounds including two chalcones (butein and phloretin) and three flavones (apigenin, chrysin, and luteolin) in hepatocytes. Primary hepatocytes isolated from rats were treated with various concentrations of each of flavonoids for 24 h, then, HO-1 and GCLC protein and mRNA expression and glutathione (GSH) and GSH disulfide (GSSG) levels, and intracellular ROS production were determined. Results indicated that, with the exception of phloretin, 25 μ M each of the rest flavonoids significantly induced HO-1 protein and mRNA expression ($p < 0.05$). With the GCLC expression, 25 μ M of butein, phloretin, and chrysin significantly increased GCLC protein and mRNA levels ($p < 0.05$). Intracellular GSH contents and GSH/GSSG ratio were also noted to be increased in all flavonoid-treated cells. A time-dependent increase of nuclear Nrf2 content was noted in cells treated with butein. EMSA further revealed that butein, chrysin, and apigenin stimulated the DNA binding activity of Nrf2. Moreover, transient transfection with 3x ARE-Luc reporter, significantly increase of luciferase activity was noted in cells treated with butein, chrysin, and apigenin ($p < 0.05$). By confocal microscopy, ROS production induced by tert-butyl hydroperoxide was suppressed by butein and chrysin. Taken together, results suggest that butein and chrysin are potent on up-regulating HO-1 and GCLC transcription by activating Nrf2/ARE pathway, which results in the enhancement of intracellular antioxidant defense capability.

Keywords : Flavonoids, Glutamate-cysteine ligase, Heme oxygenase-1, Rat primary hepatocyte.

第一章、前言

在生活步調快速、工作節奏緊湊的現代社會，人們常因不良的生活型態、不適當的飲食習慣或暴露於不同環境化學物質等因素，使人體長期處於高壓力的情況下，導致體內自由基生成與氧化壓力累積。而「氧化壓力」被認為是慢性疾病之根源，可能會增加肝臟疾病、糖尿病、心血管疾病、視網膜病變及癌症等疾病罹患的風險。

除了維持良好生活習慣、適當紓壓外，近年來，許多流行病學研究指出，多食蔬果可降低許多疾病之罹患率，可能與其中所含之植物化學物質 (phytochemicals) 有關(朱燕華, 1998)。而廣泛存在於蔬果、種子及飲料(茶、咖啡、啤酒和酒)中的類黃酮(flavonoids)其多樣的生理活性備受注意與研究。因此，若能透過飲食手段，增加植物化學物質之攝取，可能有助於維持體內氧化還原的平衡，可促進健康並減少疾病的發生。在本研究中，我們將探討類黃酮與體內抗氧化防禦系統之相關性，有助於了解其生理機能性在未來保健應用上的潛力。

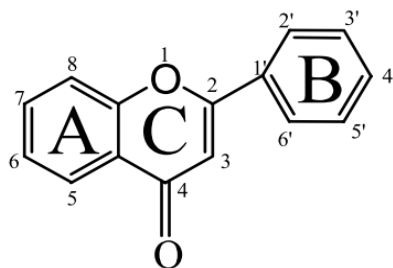
第二章、文獻探討

一、類黃酮(Flavonoids)化合物之簡介

許多流行病學研究顯示，多食蔬果可以減少慢性病的發生，其中的保護作用可能與蔬果含有豐富的生理活性物質有關，除了多種營養素成分的角色外，其他非營養因子，比如類胡蘿蔔素、植物固醇、多酚類、植物雌激素及硫化物等植物化學物質(植化物, phytochemicals)的重要性也常見討論(朱燕華, 1998)。事實上，目前為止已有不少研究指出這些植化物有作為化學預防劑(chemopreventive agent)的潛力(范少怡, 2006)，可以應用在癌症、心血管疾病與其他慢性疾病的預防及延緩進展上。在眾多的植化物中，又以類黃酮(flavonoids)受到最多的注意與研究，其為天然多酚類化合物(polyphenolic compounds)的一種，是植物的二級代謝產物，主要存在於蔬果、種子及飲料(茶、咖啡、啤酒和酒)中，它們含量的多少易受到收成季節、植物成熟度、植物品種等因素的影響，也因各國飲食習慣和文化背景的差异，不同地區民眾日常攝取之類黃酮含量亦有所差异(Hertog et al., 1994)。

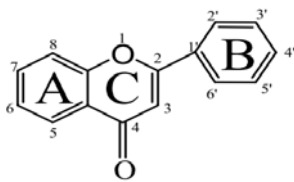
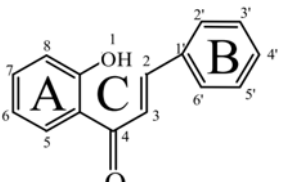
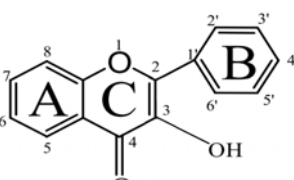
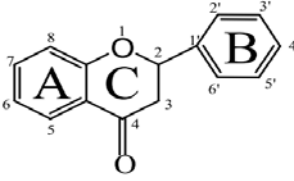
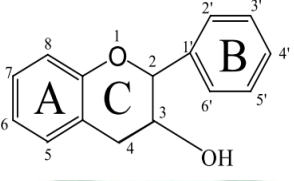
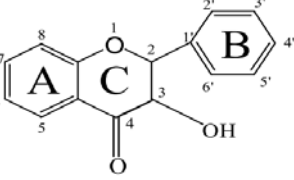
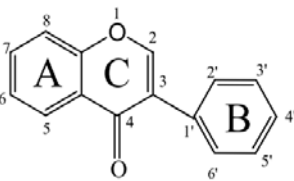
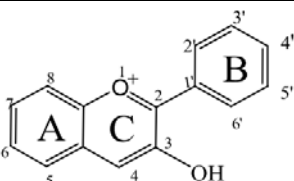
(一)類黃酮之結構與分類

結構式為 2-phenyl-benzo- α -pyrones，是一種 diphenylpropane，主要是以 flavan (黃烷)為核心，由兩個苯環(A 和 B 環)與含氧的 pyran 環(C 環)結合成 C6-C3-C6 的基本骨架(圖一)。在其雜環上，因不同取代基之存在而衍生出約 4000 種不同的衍生物，其種類與含量則隨植物之不同而有差异(Rice-Evans et al., 1996)。



圖一、類黃酮基本結構(陳皓君, 2006)

表一、類黃酮分類及其化學結構、特性

類別	基本結構與特性	取代基位置
黃酮(flavones)		C 環上 C-2 和 C-3 為雙鍵，C-4 位置以羰基(C=O)型式存在，A 環在 C-5 及 C-7 上有 OH 基。
查酮(chalcones)		為 flavone 開環後之結構。
黃酮醇(flavonols)		結構與 flavone 相似，但 C 環之 C-3 位置上的氫以羥基(OH)置換。
黃烷酮(flavanones)		C 環之 C-2 及 C-3 間為單鍵。
黃烷醇(flavanols)		即黃烷酮之C環中C-4位置的C=O基消失，C-3位置之氫以羥基取代，且C-2及C-3間由雙鍵變為單鍵。
黃烷酮醇(flavanonols)		結構與黃烷酮相似，但 C 環 C-3 位置之氫以羥基取代，且 C-2、C-3 位置雙鍵變為單鍵。
異黃酮(isoflavones)		苯環(B 環)不在 C 環之 C-2 位置，而是接在 C-3 位置。
花青素(anthocyanin)		C 環之 C-1、C-2 及 C-3、C-4 位置為雙鍵，且 C-3 位置有羥基取代。

(Cook and Samman, 1996; Hanneken et al., 2006)

類黃酮根據其化學結構可概分為八大類(表一)，分別為黃酮(flavones)、查酮(chalcones)、黃酮醇(flavonols)、黃烷酮(flavanones)、黃烷醇(flavanols)、黃烷酮醇(flavanonols)、異黃酮(isoflavones)及花青素(anthocyanidins) (Martens et al., 2001)。本實驗預計選用的 5 種類黃酮化合物(Apigenin、Butein、Chrysin、Luteolin、Phloretin)則分屬黃酮和查酮兩類(表二)。

1. 黃酮類(Flavones)

由於 C 環的 C-2 及 C-3 間為雙鍵型態，且 C-4 位置以酮基的形式存在，所以稱為黃酮。黃酮是一種黃色色素，廣泛存在於花瓣、葉子和水果中，也是人類飲食中最多的一種類黃酮，主要的食物來源有芹菜、香菜、甜紅椒、檸檬、蔓越莓、蜂膠及橄欖(Moon et al., 2006)等，成員包括 acacetin、apigenin、balicalein、chrysin、diosmetin 及 luteolin 等(Cook and Samman, 1996)。黃酮具有多種生物活性，已知者有抗發炎、抗氧化(Pushpavalli et al., 2010)、抗菌以及抗癌(Jaganathan and Mandal, 2009; Kandaswami et al., 2005)等功能。本實驗預計測試其中三種黃酮化合物，分別為 apigenin (芹素)、luteolin (木犀草素)、chrysin (白楊素)。

2. 查酮類(Chalcones)

為 C 環開鏈結構者，帶有高親電子性的 α,β -unsaturated carbonyl moiety，研究指出具此結構特性者，易活化 Nrf2 及誘發 phase II 解毒酵素的表現(Foresti et al., 2005; Sabzevari et al., 2004)。查酮是一種顏色由黃色到橙色的化合物，主要的食物來源有蘋果皮、相思豆、啤酒及啤酒花(Moon et al., 2006)等。查酮類成員包括 butein、okanin、phloretin、phloridzin 等，本實驗將選測其中兩種，分別為 butein (紫柳花素)和 phloretin (根皮素)。

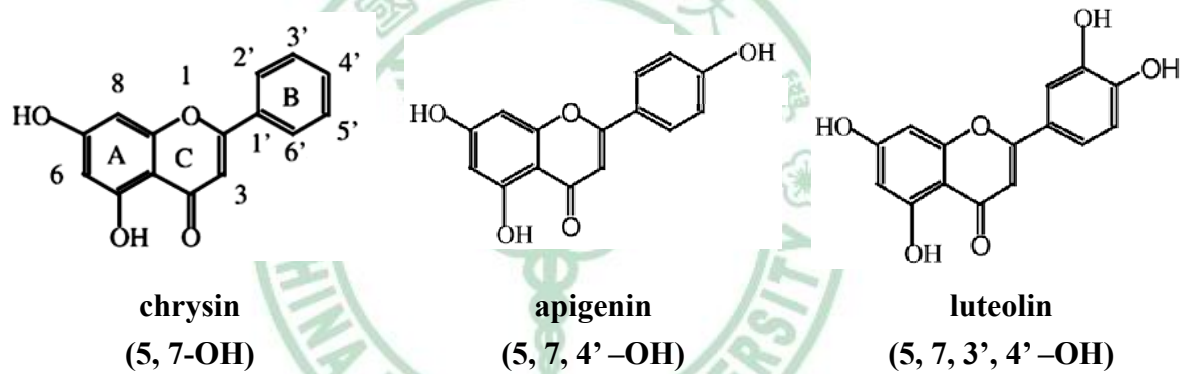
Butein (3,4,2',4'-tetrahydroxychalcone)為 *Rhus verniciflua* Stokes (漆樹，為漆樹科)和 *Dalbergia odorifera* (降香檀，屬豆科植物)植物中主要活性成分之一，常用於治療疼痛、血栓性疾病、胃炎及寄生蟲感染(Kang et al., 2004)等。研究證實

butein 具有抗氧化(Lee et al., 2002)、抑制癌細胞蛋白質激酶活性(Yang et al., 2001)、抗發炎(Lee et al., 2007)、抗肝纖維化(Lee et al., 2003)以及抗癌等生理作用(Lee et al., 2007)。

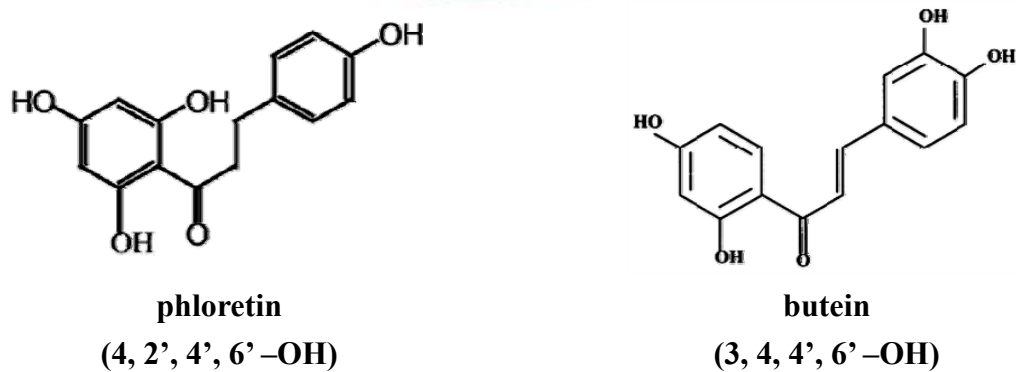
Phloretin (2',4',6',4'-Tetrahydroxydihydrochalcone)則大量存在於蘋果中，尤其是蘋果皮。Phloretin 具有抗氧化、清除過氧化硝酸根(ONOO⁻)及抑制脂質過氧化等作用(Rezk et al., 2002)，Phloretin 也可抑制細胞激素誘發血管內皮細胞黏著分子的表現(Stangl et al., 2005)，被認為有預防心血管疾病的效應。

表二、本實驗所使用 5 種不同種類之類黃酮化合物

■ 黃酮(Flavones)



■ 查酮(Chalcones)



(Cook and Samman, 1996)

(二)類黃酮之消化吸收與代謝

類黃酮主要以游離態之醣苷(glycoside)形式廣泛存在於植物界，經攝入體內後，在腸道中必須先受腸內酵素或腸道微生物水解成較低極性的非醣體(aglycone)，再以被動擴散方式進入體內，所以非醣體型態較醣苷形式易被腸細胞吸收利用。當非醣體進入體內，它們會在腸上皮細胞及肝細胞中進行代謝，又稱為藥物代謝(drug metabolism)或生物轉換作用(biotransformation)，比如氧化、醣醛酸化(glucuronidation)、硫酸化(sulfation)、麩胱甘肽化(glutathionation)及甲基化(methylation)，轉化成高極性的結合態代謝物(Cook and Samman, 1996; Nijveldt et al., 2001)。

(三)類黃酮之生理功能

類黃酮具有多樣的生理機能，已知者有(1)預防心血管疾病：比如降血脂與抑制 LDL 氧化(Stangl et al., 2005)、抑制血小板凝集與抗血栓作用(Nardini et al., 2007; Nijveldt et al., 2001)；(2)抑制發炎反應：比如抑制環氧化酶及脂質氧化酶路徑(Middleton et al., 2000)；(3)抗病毒(antivirus)：比如殺死肺炎之副流行性感冒病毒(PIV)、呼吸道融合病毒(RSV)(Ma et al., 2002)；(4)調節免疫及抗過敏作用(Alexandrakis et al., 2003; Wang and Mazza, 2002)；(5)類雌激素作用，可改善更年期的症狀(Zand et al., 2000)；(6)預防骨質疏鬆(Antiosteoporotic effects)(Di Carlo et al., 1999)；(7)抗癌：促進癌細胞凋亡(Hodek et al., 2002)等。除此之外，類黃酮也是強效的抗氧化分子，而且它們的抗氧化能力的高低與其結構有關(Rice-Evans, 2001; Rice-Evans et al., 1996)。以下即針對類黃酮結構與抗氧化能力進一步介紹。

1. 類黃酮之抗氧化功能

類黃酮所以為抗氧化劑的主要因為：(1)金屬螯合劑：可與鐵、銅離子鍵結，降低其活性；(2)還原劑：因為酚結構上所帶的氫氧基可使其扮演還原劑之角色，能還原氧化態的維生素 E 或 C，有助其再生(regeneration)；(3)活性氧清除

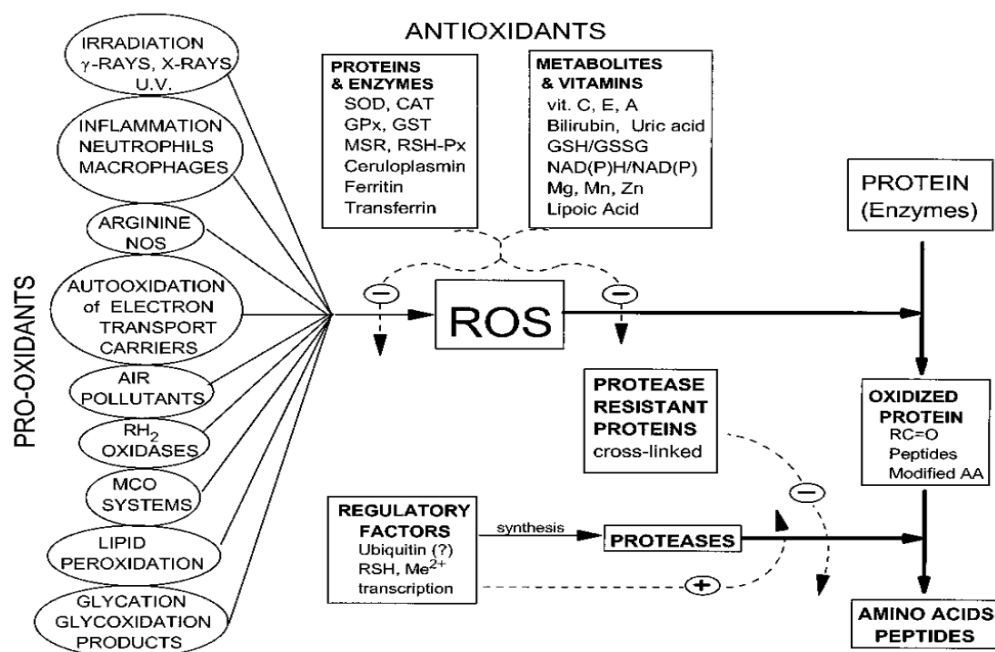
者：直接去除自由基及活性氧分子，終止自由基連鎖反應(Cook and Samman, 1996)；(4)上調抗氧化酵素基因表現，已知部分類黃酮分子可透過細胞訊號路徑，誘發抗氧化酵素及 phase II 解毒酵素表現，增強細胞防禦系統，抵抗氧化壓力，比如 glutathione S-transferase (GST，麩胱甘肽硫轉移酶)、glutamate-cysteine ligase (GCL，麩胱肽合成酶)、heme oxygenase 1 (HO-1，第一型血基質氧化酶)等(Bravo, 1998; Hanneken et al., 2006)。

2. 類黃酮結構與抗氧化能力之關係

如前所述，類黃酮包含兩個苯環及一個含氧酚基，一般認為其羥化作用之位置及程度和它的抗氧化能力強弱有關，文獻指出其中關鍵因子為：(1)羥基數目的多寡：A、B 環上羥基(OH)數目越多者，清除自由基的能力越高，羥基數目減少，則活性快速下降，如比較 Lut、Apg、Chr 三種黃酮類的總抗氧化能力(TEAC)，含有 4 個羥基之 Luteolin 抗氧化活性最強，依序為 Lut > Apg > Chr (Cook and Samman, 1996; Rice-Evans et al., 1996)；(2)羥基的位置：A 環的 C-5 和 C-7 位置、B 環的 C-3 和 C-4' 位置及 C 環的 C-3 位置的羥化作用，顯示與抑制脂質過氧化的活性有正向關係(Cholbi et al., 1991)；(3)C 環上 C-2 和 C-3 間有雙鍵者，有較佳的抗氧化力，若雙鍵被氫化後，將會減弱其抗氧化能力(Joyeux et al., 1995)；(4)C 環 C-4 位置的羰基(C=O)和 C 環的 C-3 或 A 環的 C-5 位置上有羥基的類黃酮，由於可形成分子內氫鍵，具有較強的自由基清除力及螯合鐵離子能力，比如 quercetin 和 rutin (Afanas'ev et al., 1989)；(5)醣基的存在：非醣體(aglycone)如 apigenin、quercetin 和 phloretin 在抑制 MDA (malondialdehyde，丙二醛)生成方面明顯較它們的含醣基化合物(醣苷)為佳，推測這與醣基可能形成立體障礙的緣故有關，因而降低其抗氧化能力。

二、生物體之細胞抗氧化防禦系統 (Cellular antioxidant defense system)

生物體於有氧代謝過程中會自然形成許多活性氧物質(reactive oxygen species)，比如超氧陰離子(superoxide anion radical, $O_2^{\cdot-}$)、過氧化氫(hydrogen peroxide, H_2O_2)、氫氧自由基(hydroxyl radical, $\cdot OH$)、過氧化自由基(peroxyl radical)等，它們除了來自體內的內生性反應—粒腺體電子傳遞鏈、酵素氧化反應、自體氧化外；也有部分活性氧來自外源性—離子輻射、空氣污染、抽煙等。當這些具未成對電子的自由基與活性氧過多時，會和體內許多重要分子如核酸、蛋白質、或生物膜上之多元性不飽和脂肪酸反應，引起生物體氧化性傷害，如未能及時修復，將導致疾病的產生(Valko et al., 2007)。因此在正常情況下，為反制氧化傷害，生物體演化出一套抗氧化防禦系統(圖二)，此系統分由兩子系統所組成，一為由多種抗氧化酵素組成的酵素系統，另一則由非酵素性之抗氧化物質組成的抗氧化分子系統，兩者以交互協同之作用抵抗活性氧分子的生成，達到自我保護的目的(Berlett and Stadtman, 1997)。



圖二、生物體之細胞防禦系統(Berlett and Stadtman, 1997)

(1) 酵素性抗氧化防禦系統(enzymatic antioxidant defenses)：由數種酵素所組成，包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、觸酶(catalase, CAT)與麩胱甘肽過氧化酶、血基質氧化酶、麩胱肽合成酶(Valko et al., 2006)等；(2) 非酵素性抗氧化防禦系統(non-enzymatic antioxidant defenses)，由各類抗氧化分子所組成，包括脂溶性成分如維生素 E、類胡蘿蔔素與水溶性成分如維生素 C (ascorbic acid)、麩胱甘肽(glutathione, GSH)、類黃酮及有機硒等。以及(3) 其他輔助性系統：未直接與活性分子反應，而是間接協助抗氧化分子或酵素的作用，如麩胱甘肽還原酶、葡萄糖-6-磷酸去氫酶和運鐵蛋白(transferrin)等。

(一) 酵素性抗氧化防禦系統(Enzymatic antioxidant defenses)

1. 超氧化物歧化酶(SOD)

因所含金屬離子的不同，SOD 可分為 CuZn-SOD 與 Mn-SOD 二種同功酵素，Cu, Zn-SOD 主要分布於細胞質與粒線體內，Mn-SOD 則只存在於粒線體內。SOD 主要是利用歧化作用(dismutation)將超氧陰離子還原成過氧化氫，隨後過氧化氫再由麩胱甘肽過氧化酶(glutathione peroxidase, GPx)或觸酶(catalase)分解為 H₂O，以減輕 O₂^{-•}可能對細胞產生之傷害(Mates et al., 1999; Young and Woodside, 2001)。

2. 觸酶(CAT)

CAT 主要分佈於各組織細胞(如肝、腎細胞)內的過氧化體與溶小體中，形成一種 Fe³⁺-heme proteins 的四聚體(tetramer)蛋白質，可將細胞氧化所產生的 H₂O₂ 分解成 H₂O 與 O₂(Galecka et al., 2008)。

3. 麩胱甘肽過氧化酶(GPx)

依硒元素的有無，分為硒依賴型(Se-dependent)和非硒依賴型(Se-independent)，硒依賴型麩胱甘肽過氧化酶可藉由活化位置上之硒負責清除體

內過氧化物，即催化還原態 glutathione (GSH)，將 H_2O_2 或 ROOH 還原成 H_2O 或 ROH，而降低細胞內氧化壓力的形成；至於非硒依賴型麩胱甘肽過氧化酶又稱為 GSH S-transferase，僅能藉由 GSH 提供還原力，將有機過氧化物 ROOH 還原為 ROH。

(二) 非酵素性抗氧化防禦系統(Non-enzymatic antioxidant defenses)

提供一個電子給活性氧或自由基、或捕捉自由基的抗氧化分子或結合鐵銅離子的金屬結合蛋白等都數此一非酵素性防禦系統。抗氧化分子成員主要有維生素 E (tocopherol)、類胡蘿蔔素(carotenoids)、維生素 C (ascorbic acid)、麩胱甘肽 (glutathione, GSH) 等 (Valko et al., 2006)；金屬結合蛋白主要有運鐵蛋白 (transferrin)、鐵結合蛋白 (ferritin)、藍漿蛋白 (ceruoplasmin)、metallothionein 等。

1. 維生素 E

維生素 E 又稱為生育醇 (tocopherols)，為脂溶性維生素，自然界存在多種不同活性的同質異構物，包括： α 、 β 、 γ 及 δ 四型，其中以 α -tocopherol 生理活性最強，其抗氧化活性為 $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ (郁凱衡, 1999)。維生素 E 主要存在於細胞膜及各種胞器膜上，可有效阻止膜上不飽和脂肪酸受到自由基的攻擊，降低細胞膜的氧化傷害 (Halliwell and Cross, 1994)。當脂質受到活性氧物質攻擊時，維生素 E 會提供電子給脂質過氧化物自由基，終止自由基連鎖反應；而且隨之生成的維生素 E 自由基再透過維生素 C 或 GSH 的再生，也有助於維持維生素 E 的抗氧化能力 (Packer, 1991)。

2. 維生素 C

維生素 C 為水溶性維生素，又稱為抗壞血酸 (ascorbic acid)，與體內是否能正常製造膠原蛋白等結締組織有關。維生素 C 也可作為氧化劑與還原劑，可提供氫質子來清除活性氧，與自由基作用後形成 semidehydroascorbate，最後生成氧

化型維生素 C-dehydroascorbate，此氧化產物可以在 NADH/NADPH 或 GSH 存在下透過酵素作用還原成維生素 C。在抗氧化防禦網中，維生素 C 也參與維生素 E 再生，在和 Flavonoids 共同作用下，不但有效防止脂蛋白氧化，亦與 GSH 共同保護粒腺體，避免粒腺體氧化損傷(吳柏宏, 2004)。

3. 類胡蘿蔔素(carotenoids)

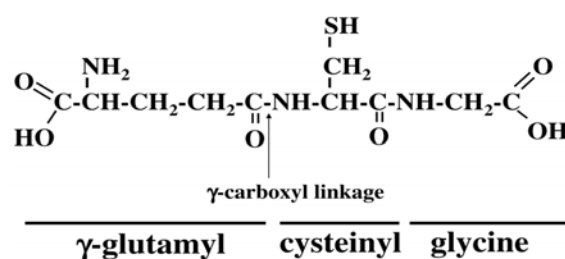
類胡蘿蔔素是一群紅色或黃色的脂溶性天然物質，由重複的共軛雙鍵結合之長鏈多烯構造以異戊二烯(Isoprene)為單位所組成的化合物。體內主要的類胡蘿蔔素為 β -胡蘿蔔素及茄紅素，存在於肝和脂肪組織中，飲食來源包含蔬果、魚肉、蛋類等(朱燕華, 2001)；在生物體內除了作為維生素 A 的前驅物(β -胡蘿蔔素)外，一般認為類胡蘿蔔素具有不錯的螯合單重態氧(singlet oxygen)之能力，它們也可清除白血球吞噬細胞所產生的自由基以及防止 LDL 氧化，因此被認為有助於降低動脈粥狀及心血管疾病的發生(Wang et al., 2008)。

4. 麩胱甘肽(glutathione, GSH)

麩胱甘肽(glutathione, GSH)為胞內重要三肽分子，由麩氨酸(glutamate)、半胱氨酸(cysteine)及甘氨酸(glycine)三個氨基酸所組成(圖三)，分子量為 307.33 kDa，是廣泛分布於生物體內的天然抗氧化物質，它以還原態(glutathione, GSH)及氧化態(glutathione disulfide, GSSG)二種型式存在，然而還原態 GSH 含量卻遠多於氧化態，一般估計超過 90% 的 GSH 是以還原態存在。哺乳動物細胞內 GSH 濃度約介於 5~10 mM 間，以肝臟為例，GSH 濃度即可高達 10 mM (Knapen et al., 1999; Lu, 2009; Lu et al., 1999; Soltaninassab et al., 2000)。

GSH 是胞內重要水溶性抗氧化物質，扮演保護細胞的角色，可協同其他抗氧化物質及抗氧化酵素清除自由基及脂質過氧化產物(Ioannides et al., 1994)，保護其他蛋白質的硫醇基，避免毒性活化產物的攻擊(Ballatori and Rebeor, 1998)，因此，維持胞內 GSH 濃度是細胞能否免於氧化傷害的重要關鍵之一。已知體內

麩胱甘肽的含量受到許多因素的影響，如氧化壓力的增加、放射線的曝曬、疾病的發生、老化等均可改變體內麩胱甘肽的濃度，事實上，增加麩胱甘肽含量已成為保持健康的指標之一。提高體內此一抗氧化分子的含量可藉由(1)增加麩胱甘肽合成時的限制受質半胱胺酸(cysteine)的補充，如補充 N-acetylcysteine、麩胱甘肽酯類(glutathione esters)，或多食蔬果、動物肝臟、酵母、小麥胚芽等食物；(2)提高 GSH 合成酵素的活性及表現(Meister, 1995)。

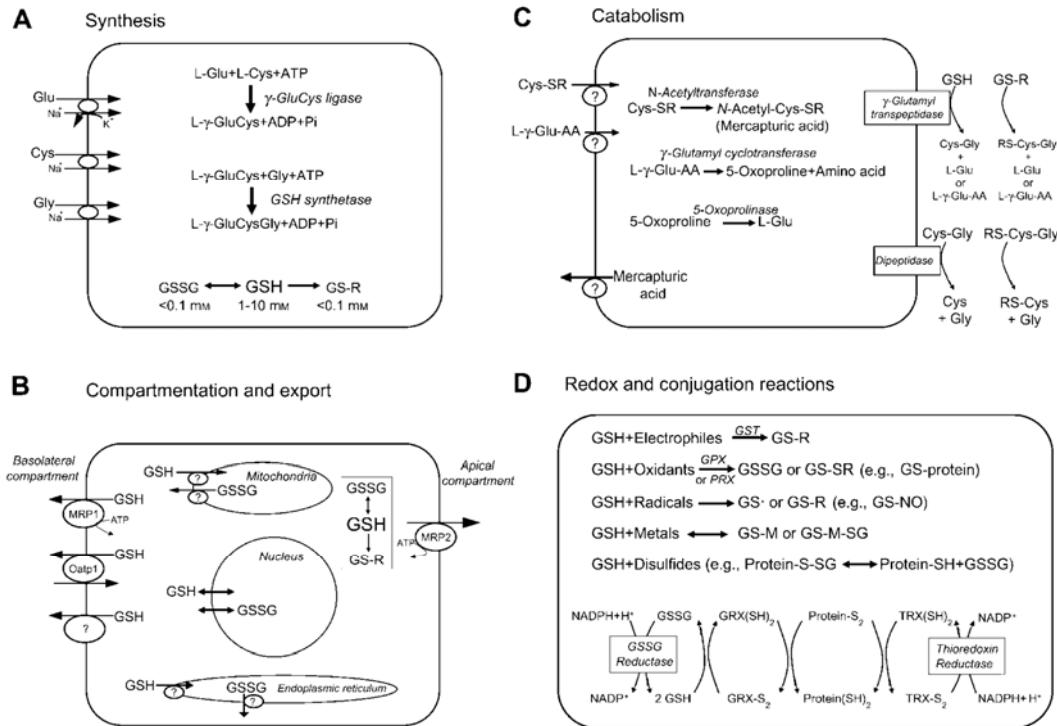


圖三、麩胱甘肽(Glutathione)之結構(Lu, 2009)

(1) GSH 在體內之生成與代謝反應

◆ GSH 生合成反應

分為兩階段酵素反應，分別受到 glutamate-cysteine ligase (GCL)及 glutathione synthetase (GS)兩個 ATP 依賴型酵素所催化調節：第一階段是由 GCL 催化 glutamic acid 與 cysteine 合成為 γ -glutamylcysteine，已知 GCL 是 GSH 生合成反應的限制調節酵素(rate-limiting enzyme)，為決定胞內 GSH 含量多寡的主要酵素，也會受到產物 GSH 的回饋抑制(feedback inhibition) (Franklin et al., 2009)；第二階段是將生成之 γ -glutamylcysteine 藉由 GS 的催化，與 glycine 結合生成 GSH (圖四 A) (Ballatori et al., 2009; Lu, 2009; Lu et al., 1999)。



圖四、麩胱甘肽之體內恆定(Ballatori et al., 2009)

◆ GSH 代謝反應

為維持胞內 GSH 合成所須原料，細胞有一套循環利用麩胺酸、半胱氨酸及甘胺酸的方式(圖四 C)，當胞內 GSH 與 GSSG 離開細胞後，胞外 GSH 可透過 γ -glutamyl transpeptidase 作用，將 GSH 分解為 L-glutamate 或和其他胺基酸(amino acid, AA)形成雙胍肽(L- γ -glutamyl-AA)及 L-cysteinylglycine。L-glutamate 和 L- γ -glutamyl-AA 都可進入胞內，且 L- γ -glutamyl-AA 可再藉由 γ -glutamyl cyclotransferase 的催化，分解為 AA 與 5-oxoproline，AA 直接供細胞利用，5-oxoproline 則在 oxoprolinase 作用後轉變成 glutamate；至於 L-cysteinyl-glycine，則在 dipeptidase 作用下，分解成 cysteine 及 glycine，再次進入胞內作為 GSH 合成或是蛋白質合成的原料(Ballatori et al., 2009; 孫潤伯, 2004)。

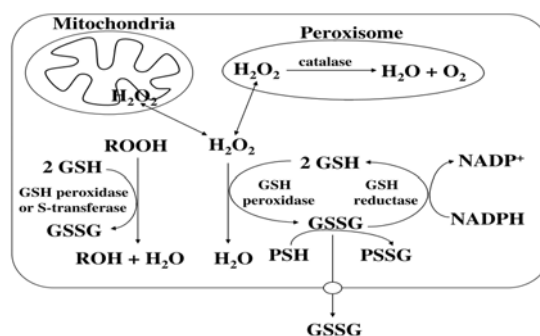
由於肝細胞具有轉硫作用(transsulfuration)，可將 methionine 經由 cystathionine pathway 轉換成 cysteine，所以不同於其他細胞，肝細胞也可利用 methionine 作為 GSH 生合成的原料(Lu, 2009)。

(2) GSH 之生理功能

許多研究證據顯示 GSH 在體內扮演多種生理角色(Fang et al., 2002; Han et al., 1997)，包括：(1)抗氧化作用：清除自由基與過氧化物(Griffith and Mulcahy, 1999; Pompella et al., 2003)；(2)參與外來異物(xenobiotics)的解毒作用；(3)維持蛋白質分子中硫氫基之氧化與還原狀態間的平衡；(4)作為半胱胺酸的儲存及運送型式；(5)參與維生素 E 再生(Halliwell and Cross, 1994)；(6)參與蛋白質與 DNA 合成，調節細胞生長與代謝；(7)增進免疫功能：刺激干擾素 IL-1 (interleukin)及 IL-2 產生(Wu et al., 1994)等，其中又以抗氧化及解毒功能最為重要(圖四)。

◆ GSH 之抗氧化功能

GSH 的抗氧化作用主要與其 cysteine 側鏈的硫氫基(sulfhydryl group)具有高度親核性(nucleophilic)有關，可提供電子給活性氧，將其還原，並終止自由基連鎖反應；GSH 除了直接和活性氧反應外，亦可透過 GSH peroxidase (GPx)的作用，參與胞內过氧化物的還原，因此 GSH 在還原體內过氧化氫與消除自由基中扮演重要角色(圖四 D)。在此等反應過程中，GSH 將形成氧化態的 GSSG，這些 GSSG 經由 GSH reductase (GRd)並在 NADPH 的輔助下，將再還原為 GSH，提供細胞再利用，以維持胞內 GSH 含量的平衡(圖五)。因此，胞內 GSH/GSSG 比值的變化也就被視為抗氧化和氧化壓力間平衡的指標(Knapen et al., 1999; Pompella et al., 2003)。



圖五、GSH 之抗氧化功能(Lu, 2009)

(三) 生物轉換酵素系統(Biotransformation enzyme system)

生物轉換酵素系統又稱為生物體解毒系統或藥物代謝系統，經由代謝(metabolism)、消除(elimination)和解毒(detoxification)作用，負責將親脂性的體內的內生性分子(比如膽固醇、維生素 D 等)和進入體內的化學試劑、藥物、致癌物質等外來異物(xenobiotics)予以代謝，提高其產物的親水性，進而加速其排泄速率。生物轉換酵素系統廣泛存在於各組織器官中，其中又以肝臟的角色最為重要；一般而言，此酵素系統平常的表現量並不高，但會因應生物體代謝外來異物或內生性物質的需要，發生所謂的適應性反應(adaptation response)，而大量表現。依酵素的功能，藥物代謝可區分為 phase I、phase II、phase III 三階段(Liska, 1998; Moon et al., 2006; van Iersel et al., 1999)。

Phase I 酵素系統包括 cytochrome P450s (CYP) 家族、monoamine oxidase、alcohol dehydrogenase 等，透過氧化、還原及水解等反應改變親脂性受質表面極性，提高生成物的親水性，以利排出體外或再進行 phase II 後續代謝(Hollenberg et al., 2008)；Phase II 酵素系統由一群負責催化結合反應(conjugation)的酵素所組成，其中重要者有 UDP glucuronyl transferases (UGT)、GSH S-transferases (GST)、sulphotransferase (SULT)、NAD(P)H:quinine oxidoreductase、amino acid conjugase 等，可直接催化外來異物或間接使 phase I 代謝產物與胞內水溶性 glutathione、sulfate 或 glucuronic acid、taurine 等氨基酸結合，使其生成更具親水性之產物，利於經由尿液或膽汁排出體外(Rushmore and Kong, 2002)；Phase III 酵素系統主要由一群非酵素性的膜上運送蛋白(membrane transporter protein)所組成，包括 P-glycoprotein (P-gp)、multidrug resistance-associated proteins (MRPs) 等，負責將 phase I 及 phase II 代謝後的產物轉移至胞外(Liska, 1998; Xu et al., 2005)。

三、血基質氧化酶(Heme oxygenase, HO)

最早是由 Wise 和 Drabkin 由體外試驗分離出血基質氧化酶，並發現它可將血基質分解，產生膽綠素(biliverdin)(Wise and Drabkin., 1964)。到了 1968 年時，Tenhunen 等人進一步證實血基質氧化酶普遍存在於大鼠的脾臟、肝、腎和骨髓等組織，而且是分佈在胞內的微粒體(microsome)中之酵素(Tenhunen et al., 1968)。

(一) 血基質氧化酶之類型

目前已知有三種類型的血基質氧化酶，分別為第一型血基質氧化酶(HO-1)，分子量約 32 kDa；第二型血基質氧化酶 (HO-2)，分子量約為 34 kDa，以及第三型血基質氧化酶(HO-3)，分子量約為 33kDa。三者可能源自同一基因，所以分子量相近，事實上，HO-1 及 HO-2 二者同源性(homology)約 40%，然而 HO-2 與 HO-3 的同源性則高達 90%。HO-1 屬於誘導表現(inducible)的酵素，多存在於脾臟、肝臟及睪丸組織中(Siow et al., 1999)；HO-2 和 HO-3 則是持續表現(constitutive expression)在各組織細胞中，如腦、神經系統以及心血管組織等，而且表現量相當高。目前已知 HO-3 並不具有催化血基質代謝之活性，雖被認為可能具有感應血基質或與血基質結合的功能(McCoubrey et al., 1997)，但其真正的生理角色還不清楚，尚須要進一步的釐清。

(二) 第一型血基質氧化酶(HO-1)之作用及其產物

由於 HO-1【EC 1.14.99.3】具有被誘發的性質，所以被視為胞內重要的抗氧化酵素蛋白質之一。HO-1 是血基質代謝過程中的速率限制酶，藉由催化血基質(heme)之分解，產生等莫耳數的膽綠素(biliverdin)、鐵離子(Fe^{+2})以及一氧化碳(carbon monoxide, CO) (Farombi and Surh, 2006) (圖六)。HO-1 之代謝產物，具有許多重要的生理功能。詳述如下：

1. 膽綠素(biliverdin)：

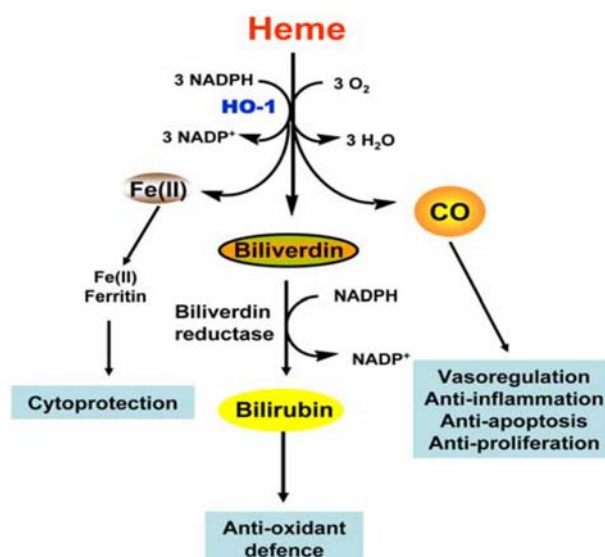
膽綠素生成後，會再經由膽綠素還原酶(biliverdin reductase)轉換為膽紅素(bilirubin)，已有不少體內及體外實驗相繼證實，膽紅素是體內重要的內生性抗氧化分子，具有類似於 α -tocopherol 清除過氧化自由基(Peroxyl Radicals)、抗脂質過氧化之能力，所以有助於降低氧化壓力，減少心血管局部缺氧的傷害、抑制 LPS 誘發黏著分子的表現、降低發炎反應(Baranano et al., 2002; Clark et al., 2000; Stocker and Ames, 1987; Vachharajani et al., 2000)。

2. 一氧化碳(CO)

高濃度一氧化碳雖然對人體有害，然而最新證據顯示一氧化碳具有類似一氧化氮(Nitrite oxide, NO)的功能，可作為訊息傳遞分子，活化胞內 soluble guanylate cyclase (sGC)，增加 cGMP 的生成，因此，CO 也有促使血管舒張、抑制血小板凝集及抑制血管平滑肌增生等作用(Brune and Ullrich, 1987; Piantadosi, 2008)；除此之外，亦有文獻指出 CO 可透過 MAPK pathway 保護纖維母細胞或內皮細胞免於細胞凋亡(Brouard et al., 2000; Otterbein et al., 2003; Piantadosi, 2008)。

3. 鐵離子(Fe^{+2})

鐵離子會誘發攜鐵蛋白(ferritin)的生成，增加鐵儲存的效率，藉此作用維持細胞內鐵離子濃度之恆定，另外，細胞內 ferritin 含量提高時，也有助於減少游離鐵的存在，抵抗氧化性傷害。所以透過 HO-1 產生的鐵離子，將可誘使細胞產生壓力調適作用(stress adaptation)，達到細胞保護之目的(Balla et al., 2005; Eisenstein et al., 1991)。



圖六、HO-1 之作用及其代謝產物(Farombi and Surh, 2006)

(三) 第一型血基質氧化酶之生理角色

許多研究指出，HO-1 會受到許多不同的因子所誘發，已知者有低氧(hypoxia)、血基質(heme)、內毒素、發炎、紫外線(ultraviolet)、局部缺血(ischemia)、熱休克、重金屬(鎘、砷)等，以調控組織細胞因應生理病理的變化(Clark et al., 2000; Gruber et al., 2010; Minamino et al., 2001)。也有其他文獻指出，天然抗氧化物質(phytochemicals)，如 resveratrol、curcumin、quercetin 等類黃酮物質亦可透過調控 HO-1 表現，因應胞內氧化壓力(Farghali et al., 2009)，所以 HO-1 又被稱為誘導性壓力蛋白(inducible stress protein)的原因。由上述證據可以得知，當組織或細胞處於氧化壓力或損傷等情況時，將會誘導 HO-1 的大量表現，達到保護細胞的目的。

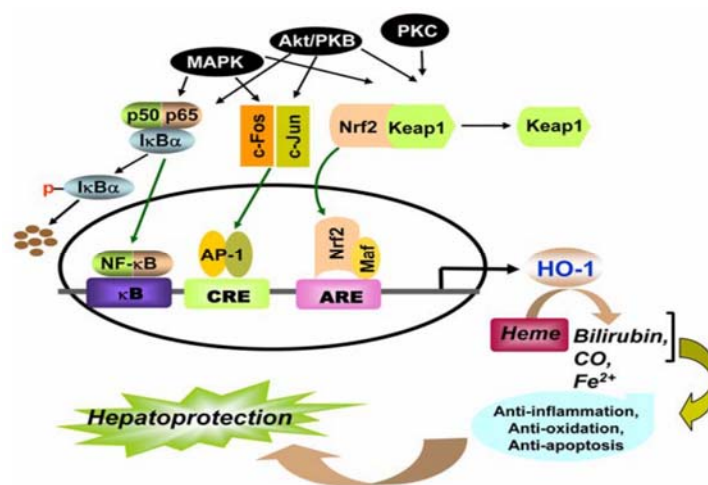
HO-1 具有相當多樣的生理機能，除了藉由本身酵素活性及其反應製造的產物來降低細胞氧化壓力，所呈現的強抗氧化力外，其他還有(1)抗發炎：可以透過降低內皮細胞之黏附因子與趨化因子的表現，直接或間接抑制發炎反應(Minamino et al., 2001; Vachharajani et al., 2000)；(2)抗細胞凋亡：在 TNF- α 誘發小鼠初代肝細胞損傷模式下，上調 HO-1 表現有助於抑制細胞凋亡(Zuckerbraun et al., 2003)；(3)心血管疾病治療之標的(Abraham et al., 2007; Abraham and Kappas,

2008; Idriss et al., 2008)；(4)避免移植排斥：增加 HO-1 活性可防止心血管受到局部缺氧/再灌流(ischemia/reperfusion)的傷害(Yet et al., 2001)。

(四)第一型血基質氧化酶基因表現之調控

HO-1 表現與活性之調控主要是發生在基因轉錄作用上，過去文獻指出，參與誘導 HO-1 基因表現之細胞內訊息傳遞路徑(signal transduction pathways)主要有 MAPK、PI3k/Akt、PKC 等訊息路徑，此外，分析 HO-1 基因的 promoter 區域，發現其中存有許多重要轉錄因子(transcription factor, TF)的結合位置，包括 nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2)、activator protein-1 (AP-1)、nuclear- κ B (NF- κ B)等(圖七)(Alam and Cook, 2007; Farombi and Surh, 2006; Gruber et al., 2010)。

上述訊號傳遞路徑與轉錄因子啟動 HO-1 的轉錄，常發生在細胞受到壓力時，但不同刺激物、不同物種間以及不同細胞型態對於 HO-1 表現的調控並不盡相同。其中尤以屬於 Cap'n'Collar/basic leucine (CNC-bZIP)家族的轉錄因子—nuclear factor-erythroid 2 related factor 2 (Nrf2)為其中最重要的調控者，當 Nrf2 被活化後，會轉移至細胞核內，再與 HO-1 或其他抗氧化酵素基因(比如 glutamylcysteine ligase、glutathione reductase 等)上的調控序列 antioxidant response element (ARE)結合，因而上調它們的轉錄作用(Motohashi et al., 2002)。



圖七、調控 HO-1 表現之上游訊息路徑及相關轉錄因子

(Farombi and Surh, 2006)

Nrf2 在調控 HO-1 基因的重要性，可以由缺 Nrf2 的小鼠(Nrf2-deficient mice) 將喪失其誘發 HO-1 的能力，得到印證(Itoh et al., 1997; Johnson et al., 2008; Khor et al., 2006; Ramos-Gomez et al., 2001)；另外也有學者將 dominant-negative Nrf2 mutant 載入 L929 cells 中，結果也發現鎘、砷誘發 HO-1 表現的能力顯著降低(Alam et al., 1999)。事實上，Nrf2 除了在調控抗氧化酵素基因有重要角色外，它在上調多種 phase II 解毒酵素(UDP-glucuronyl transferase、NAD(P)H:quinine oxidoreductase 1、glutathione S-transferase)也有舉足輕重的地位(Itoh et al., 1997; Ohnuma et al., 2009)。

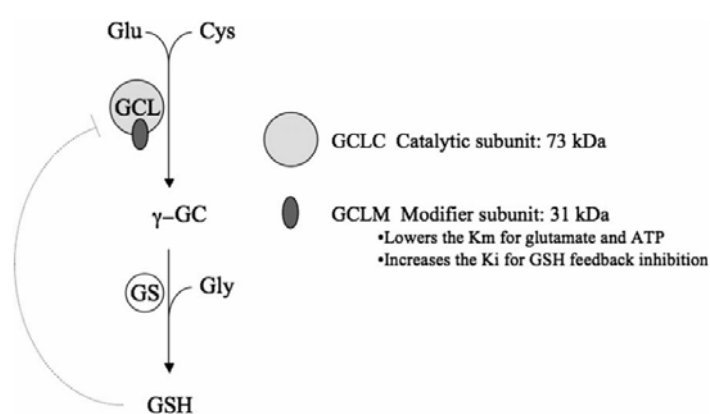
四、麩胱胺合成酶 (glutamate-cysteine ligase, GCL)

麩胱胺合成酶【EC 6.3.2.2】又稱 γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS)，為 GSH 生合成反應之第一步驟，也是決定 GSH 生合成的速率限制酵素(rate-limiting enzyme)。GCL 主要作用為催化 glutamate 上的 γ -羧基(carboxyl group)經由 ATP 的活化，形成醯基磷酸(acyl phosphate)中間產物，再與 cysteine 上 α -胺基形成 γ -glutamylcysteine，此反應為 GSH 合成的速率決定步驟，且會受產物 GSH 的回饋抑制； γ -Glutamylcysteine 形成後，再藉由 GS (glutathione synthetase)的催化，與 glycine 結合為 GSH。

由於 GCL 是決定胞內 GSH 含量多寡的主要酵素，因此在調控體內氧化還原平衡中，扮演著重要角色，所以在多種抗氧化酵素基因中，GCL 基因表現的調節機轉也受到不少的注意。目前證據顯示，調控 GCL 基因表現可能是透過不同層次的影響，除可作用在轉錄與後轉錄階段外，也可作用在後轉譯階段(post-translational modification)。以下將針對 GCL 之組成、生理角色、基因表現之調控分別介紹(Franklin et al., 2009; Lu, 2009)。

(一) 麩胱肽合成酶之組成

在低等生物體中，GCL 是單一基因產物；然而在多數真核生物體中，GCL 為異質二聚體(heterodimer)，由兩個獨立的基因所構成，一為麩胱肽合成酶催化次單元(glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, GCLC)，另一則是負責調節 GCLC 活性的麩胱肽合成酶調節次單元(glutamate-cysteine ligase modifier subunit, GCLM)，兩者共同合作形成具催化效率之 GCL (圖八) (Dalton et al., 2004; Franklin et al., 2009; Seelig et al., 1984)。



圖八、麩胱肽合成酶催化 GSH 生成(Franklin et al., 2009)

麩胱肽合成酶催化次單元(GCLC)分子量約 73 kDa，具有活化 ATP，催化 cysteine 上 α -胺基與 glutamate 上的 γ -羧基形成 γ -glutamylcysteine 之位點。在一般情況下，GCLC 活性受到 GCLM 的調節，但在 GCLC 大量表現時，亦可直接提供 GCL 活性，單獨催化 γ -glutamylcysteine 的生成；當然與 GCLM 形成異質二聚體的催化活性遠較單獨 GCLC 時為強(Chen et al., 2005; Seelig et al., 1984)。

麩胱肽合成酶調節次單元(GCLM)分子量約為 31 kDa，本身並不具酵素活性，但可與 GCLC 交互作用，故在調控 GCL 活性上扮演重要的角色，降低 glutamate 與 ATP 的 K_m 值，增加其與受質之親和力，所以提高 GCL 的催化效率；GCLM 也可提高 GSH 的 K_i 值，降低其迴饋抑制作用(Franklin et al., 2009; Lu, 2009; Yang et al., 2007; Yang et al., 2002)。

(二) 麩胱胺合成酶之生理角色

作為減少細胞氧化傷害之抗氧化分子 GSH 生合成的速率決定酵素，GCL 因此被視為重要的抗氧化酵素，也屬於細胞保護基因(cytoprotective genes)之一。除了抗氧化外，近來 GCL 在解毒代謝、胚胎發育及癌症發生等方面也受到不少的注意，被認為在生理及病理上均有著舉足輕重的角色(Franklin et al., 2009)。事實上，如將小鼠 GCLC 基因剔除，將導致胚胎死亡，可見 GCLC 在胚胎發育過程中之重要性(Dalton et al., 2000)。

(三) 麩胱胺合成酶基因表現之調控

由於 GSH 在抗氧化和解毒代謝有其重要性，所以如何維持胞內 GSH 濃度，變成是生物體求生存的重要手段，已知 GCL 基因的表現受到許多不同外在刺激因子的影響，比如多種氧化劑、重金屬、GSH-conjugating agents、酚類化合物等(Wild and Mulcahy, 2000)。

1. 轉譯後修飾(Post-translational modification)

當細胞處於氧化壓力(oxidative stress)時，GCL 活性會受到(1)兩個次單元的相對量；與(2)轉譯後修飾的調控(Griffith, 1999; Griffith and Mulcahy, 1999; Wild and Mulcahy, 2000)，比如在氧化狀態下，透過 redox switch mechanism，使兩個次單元結合，增加 GCL holoenzyme 的形成，提高 GCL 活性，而還原狀態下則反之。故轉譯後修飾可直接影響單一或兩個 GCL 次單元，促進 GCL 活性(Franklin et al., 2009)。

2. 轉錄調控及其上游路徑和相關轉錄因子

GCL 表現與其活性之調控主要是發生在基因轉錄作用上。文獻指出，參與誘導 GCLC 基因表現之細胞內訊息傳遞路徑(signal transduction pathways)包括

MAPK、PI3k/Akt、PKC 等訊息路徑；進一步分析 GCLC 基因的 promoter 區域，發現在人類、大鼠與小鼠基因之上游 5 端調控區內，保留有 Nrf2、NF- κ B 及 AP-1 的結合序列，顯示 GCL 基因轉錄的上調(up-regulation)極可能與 Nrf2、NF- κ B 及 AP-1 等轉錄因子有關；事實上，上述訊號傳遞路徑與轉錄因子的活化已知常發生在細胞受到包括氧化壓力的各種內生性和外因性的壓力下，當然不可否認地，其間的調控機制在不同刺激物以及不同細胞型態間並不盡然相同(Dahl and Mulcahy, 2001)。

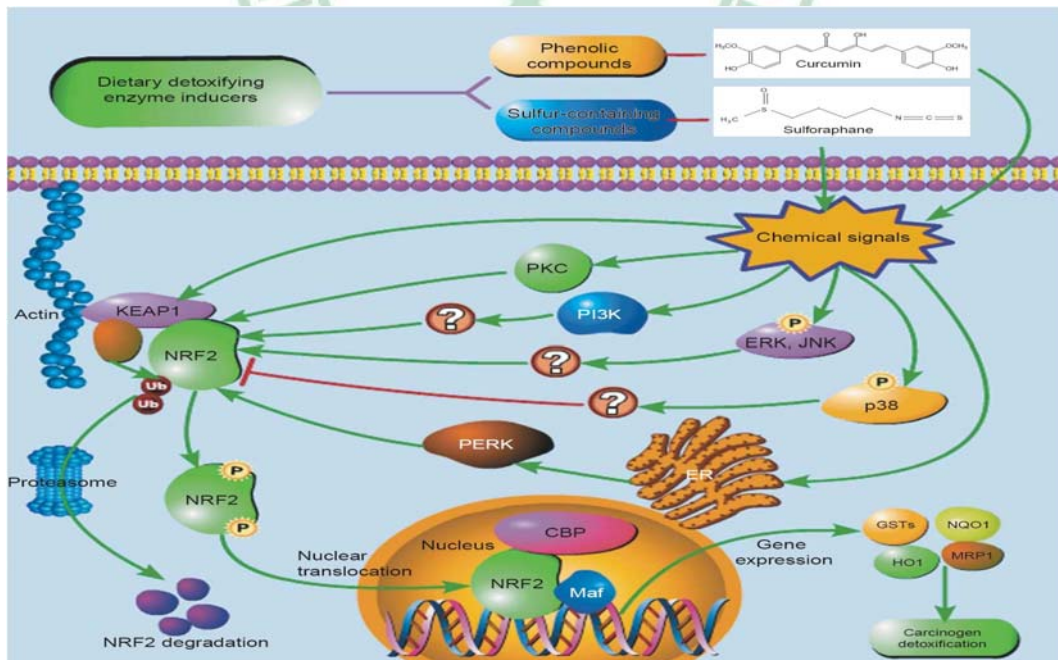
雖 Nrf2、NF- κ B 及 AP-1 等轉錄因子和 GCL 表現有關，其中又以 Nrf2 受到最多重視，其角色也最重要。Nrf2 在調控 GCLC 基因的重要性，可以由缺 Nrf2 的小鼠(Nrf2-null mice)將喪失其 GCLC 被誘發的能力得到印證(Itoh et al., 1997; McMahon et al., 2001; Reisman et al., 2009)。當 Nrf2 被活化，隨即轉移至細胞核內與其下游基因調控區內的特殊 DNA 序列 antioxidant-response element (ARE)結合在一起，因而促進了 GCLC 的轉錄。不僅 GCLC，ARE 也存在許多抗氧化酵素基因上，已知不少具抗氧化力的植物，如酚類化合物(quercetin、revertrol、apigenin 與 EGCG 等)，所以保護細胞免於氧化傷害，即和這些天然物活化了 Nrf2/ARE 路徑有關(Chen et al., 2005; Johnson et al., 2009; Kode et al., 2008; Myhrstad et al., 2001)。

五、調控抗氧化酵素之訊息傳遞路徑

近年來不少學者著力於探討細胞如何因應外在變化或氧化壓力的刺激，產生適應性作用之分子機制，其中，天然化學預防試劑(chemopreventive agents)存在下，透過那些訊息傳遞路徑上調抗氧化酵素基因轉錄作用及其分子機轉，就是其中受到廣泛注意的焦點之一(Williams et al., 2004)，目前證據顯示 MAPK、PKC、PI3K/Akt 活化下游 AP-1、NF- κ B 和 Nrf2 等轉錄因子似乎在其中扮演著關鍵角色。

Nuclear factor-erythroid 2 related factor 2 (Nrf2)是一個對氧化還原敏感

(redox-sensitive)的重要轉錄因子，在 ARE 所驅動的基因表現中扮演一個重要的角色，這可由缺 Nrf2 的小鼠(Nrf2-deficient mice)將喪失其抗氧化酵素如 GCL、HO-1 和 NQO1 被誘發的能力得到充分支持(Reisman et al., 2009)；另外，如使 HepG2 和 COS-1 細胞過度表現 Nrf2，將可顯著增加 tBHQ 誘發 NQO1 基因的表現(Venugopal and Jaiswal, 1996)。近來不少研究指出，Reveratrol、quercetine 和 EGCG 等天然化學預防試劑(chemopreventive agents)所以具有細胞保護之效應，和它們藉由修飾對氧化還原敏感(redox-sensitive)的訊息傳遞分子有關，比如：透過活化 MAPK 促進 Nrf2 活化，轉入核內，進而調控抗氧化酵素基因表現。除了前述酚類化合物外，其他多種酚類化合物和植物性硫化物(比如大蒜硫化物)也有良好的活化 Nrf2 的能力(Bonnesen et al., 2001; Nguyen et al., 2003; Rushmore et al., 1991)。事實上，Nrf2/ARE pathway 參與調控抗氧化基因轉錄的重要性，已在很多的論文中有不少的討論(Alam and Cook, 2007; Chen and Kong, 2005; Itoh et al., 1997; Itoh et al., 2003; Kong et al., 2001; Masella et al., 2005; Surh et al., 2005; Zipper and Mulcahy, 2000)。



圖九、Chemopreventive compounds 調控抗氧化基因表現之機制

(Chen and Kong, 2005)

(一) ARE 在調控抗氧化酵素表現之角色

Antioxidant response element (ARE)為一順向調控因子(cis-acting DNA regulatory element)，位於許多解毒酵素與抗氧化酵素之基因調控區內，比如 GST、NQO1、HO-1 與 GCL 等基因的 5'端啟動區上都具有 [5'-(G/A)TGA(G/C)-nnnGC(G/A)-3'] 這一段調控序列(Rushmore et al., 1991)。當細胞受到外來異物、抗氧化物、重金屬與紫外線刺激下，都可見到活化的 Nrf2 轉錄因子結合到 ARE 的核心序列(5'-TGACNNNGC-3')上，啟動抗氧化酵素基因的轉錄，因而增強細胞的抗氧化防禦力，提高細胞的存活(Kaspar et al., 2009; Nguyen et al., 2003)。

(二)Nrf2 的功能

Nrf2 廣泛存在於各組織器官中，尤其大量表現在解毒器官以及與外界環境接觸的器官中，如肝、腎、皮膚、肺、消化腸道等；Nrf2 為 Cap'n'Collar/basic leucine (CNC-bZIP)家族之轉錄因子，具有 basic leucine zipper (bZip)，此結構提供 Nrf2 與其他轉錄因子如 c-Jun、MafK 等形成 heterodimer 之位置(Klaassen and Reisman, ; Motohashi et al., 2002)。在一般生理狀態下，Nrf2 和它的抑制蛋白質 Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1)結合在一起，因此被侷限於細胞質中，呈現不活化狀態，並隨即被降解；然而當生物體受到氧化壓力或親電子性化合物 (oxidative stress/ electrophilic)刺激時，可經由 MAPK、PKC 或 PI3K/Akt 等訊息路徑修飾磷酸化 Nrf2，或是藉由氧化 Keap1 上的硫醇基(sulfohydryl groups)，形成雙硫鍵，促使 Nrf2-Keap1 分離，因此 Nrf2 得以由細胞質轉移至細胞核內，隨後再與 small Maf family 的成員如 MafK、MafG 及 MafF 等、c-Jun 或 activating transcription factor 4 (ATF4)等轉錄因子結合形成 heterodimer(Itoh et al., 1997; Jaiswal, 2004; Kobayashi and Yamamoto, 2005; Venugopal and Jaiswal, 1998)，此時的 Nrf2 即可結合到 ARE 序列上，進而調控各種參與解毒和抗氧化酵素基因的轉錄作用，比如 GST、NQO1、GCL 和 HO-1 等(Kaspar et al., 2009; Masella et al., 2005; Myhrstad et al., 2002)。

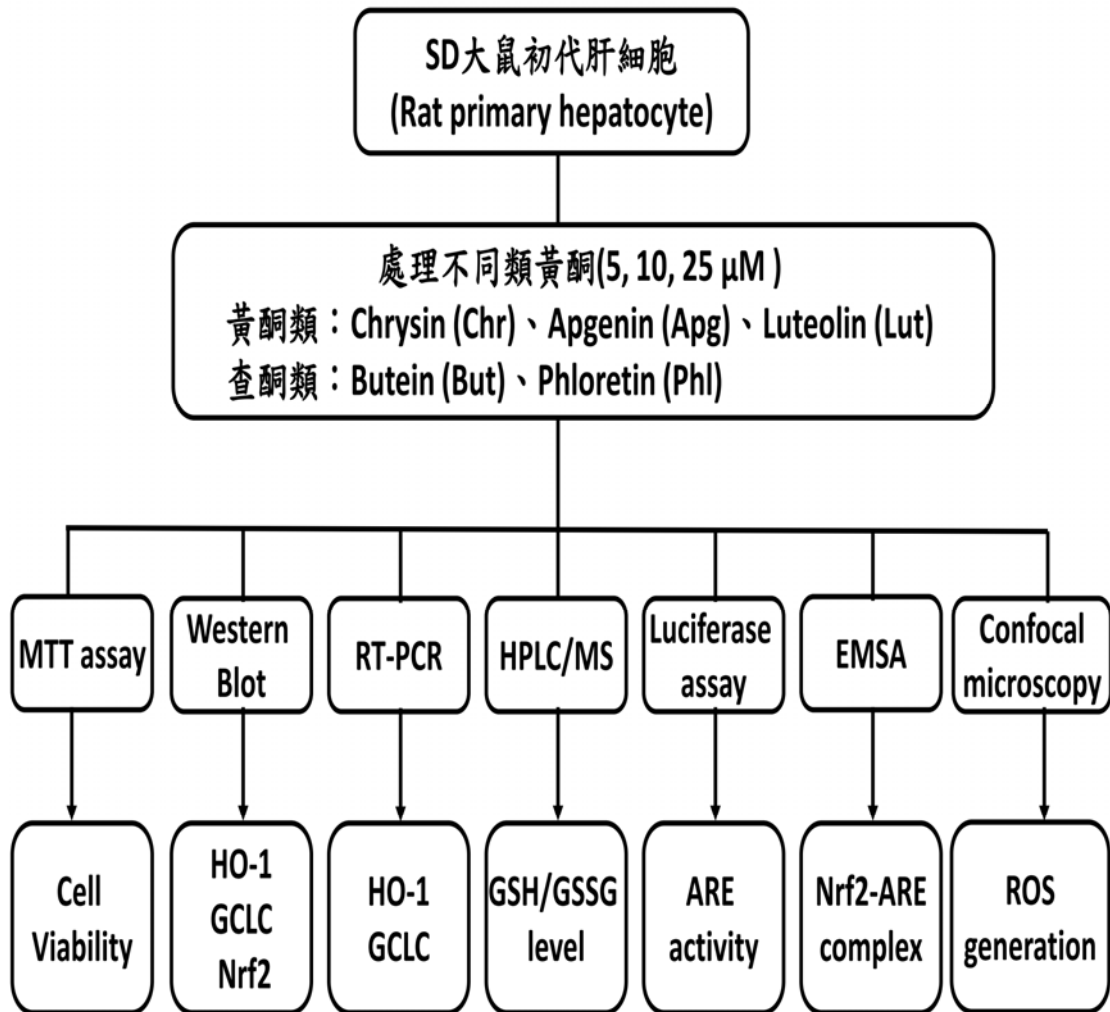
六、實驗動機與目的

已知類黃酮具有多樣的生理活性，尤以其抗氧化能力受到最多的注意與研究，但其分子機轉尚未明瞭。因此，本實驗將以大鼠初代肝細胞作為實驗模式，預計選用分屬黃酮(Apigenin、Chrysin、Luteolin)和查酮(Butein、Phloretin)的 5 種類黃酮化合物，預探討不同類黃酮對肝臟抗氧化酵素 GCLC 與 HO-1 蛋白質、mRNA 以及胞內麩胱甘肽含量之影響；並運用短暫轉染(transiently transfect)與 EMSA 實驗，進一步探討類黃酮調控抗氧化酵素基因表現之機轉為何？此外，亦利用雷射掃描式共軛焦顯微鏡觀察，預處理類黃酮對 tert-butyl hydroperoxide 誘發 ROS 生成之影響，求證類黃酮在調節肝臟抗氧化酵素基因表現中，是否具有保護細胞免於氧化傷害之生理效應。



第三章、實驗材料與方法

一、 研究架構



二、 實驗材料

(一)實驗動物

六週齡雄性 Sprague-Dawley 大鼠由樂斯科生物科技股份有限公司(Bio LASCOTaiwan Co., Ltd)購入。餵養環境的條件控制為室溫 24°C、12 小時晝夜循環、相對濕度 61%，飲食(PMI Feed, St. Louis, MO)暨飲水採隨意進食方式。大鼠於 7-8 週齡時犧牲，進行初代肝細胞分離與培養實驗。

(二)化學試劑

1、 初代肝細胞分離與培養之用藥

- (1) 購自 BD Biosciences (Clontech, CA, USA)

Collagen, type 1, rat tail

ITS+™ Premix

- (2) 購自 GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Sweden)

Percoll™

- (3) 購自 GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, USA)

Insulin

Penicillin/Streptomycin

Cell culture medium (RPMI-1640)

Earle's balanced salt solution (EBSS)

Transferrin (Human)

Trypan blue

- (4) 購自 HyClone (Logan, UT, USA)

Fetal bovine serum (FBS)

- (5) 購自 Merck Chemical Company (Darmstadt, Germany)

Acetic acid

Dimethyl sulfoxide (DMSO)

Sodium chloride (NaCl)

(6) 購自 Sigma Chemical company (St. Louis, MO, USA)

Calcium chloride ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Dexamethasone

Glucose

Magnesium sulfate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Magnesium chloride ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

N-[2-Hydroxyethyl] piperazine- N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES)

Phenol red

Potassium chloride (KCl)

Sodium phosphate dibasic anhydrate, ACS reagent ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Potassium phosphate monobasic anhydrous (KH_2PO_4)

Potassium phosphate dibasic anhydrous (KHPO_4)

Sodium bicarbonate (NaHCO_3)

Sodium selenite (Na_2SeO_3)

(7) 購自 Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan)

Pentobarbital sodium

(8) 購自 Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, NJ, USA)

Collagenase, Type I, CLS I

2、類黃酮：購自 Sigma Chemical company (St. Louis, MO, USA)

Apigenin (> 95%)

Butein

Chrysin (97%)

Luteolin ($\geq 98\%$)

Phloretin ($\geq 99\%$)

3、蛋白質定量

購自 Thermo Fisher Scientific Inc. (Rockford, IL, USA)

Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay Kit

4、細胞存活率分析(MTT assay)

(1) 購自 Merck Chemical Company (Darmstadt, Germany)

Isopropanol

(2) 購自 Sigma Chemical company (St. Louis, MO, USA)

3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)

5、西方墨點法(Western Blotting)

(1) 購自 Abcam (MA, USA)

Anti-GCS polyclonal antibody

(2) 購自 Bio Rad Laboratory (Hercules, CA, USA)

30% Acrylamide/Bis Solution, 29:1

Ammonium persulfate

Bromophenol blue

(3) 購自 Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA, USA)

Anti-PARP monoclonal antibody

(4) 購自 Calbiochem (San Diego, CA, USA)

Anti-HO-1 polyclonal antibody

(5) 購自 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)

- Anti-Nrf2 polyclonal antibody
- (6) 購自 Merck Chemical Company (Darmstadt, German)
- 99.8% Ethanol
- Sodium chloride (NaCl)
- (7) 購自 Millipore Corporation (Beaford, MA, USA)
- ImmobilonTMPVDF (Polyvinylidene fluoride) Transfer Membranes
- (8) 購自 PerkinElmer Life Science (Boston, MA, USA)
- Enhanced Chemiluminescence Reagent (ECL kit)
- (9) 購自 Sigma Chemical company (St. Louis, MO, USA)
- N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine (TEMED)
- Rabbit anti-actin monoclonal antibody
- β-Mercaptoethanol
- Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA)
- Glycine
- Glycerol
- Polyoxyethylenesorbitan monolaurate (TWEEN[®] 20)
- Ponceau S solution
- Potassium chloride (KCl)
- Potassium phosphate dibasic anhydrous, ACS reagent (K₂HPO₄)
- Potassium phosphate monobasic anhydrous, ACS reagent (KH₂PO₄)
- Sodium dodecyl sulfate (for electrophoresis, ≥98.5% (GC))
- (10) 購自 United States Biological (Swampscott, MA, USA)
- Tris-Base (Ultra pure)

6、RNA 純化與 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

分析

(1) 購自 MDBio. Inc. (NJ, USA)

HO-1 primer

GCLC primer

(2) 購自 Cambrex Bio Science Rockland, Inc. (Rockland, ME, USA)

SeaKem[®] LE Agarose

(3) 購自 Merck Chemical Company (Darmstadt, Germany)

Chloroform

99.8% Ethanol

Isopropanol

(4) 購自 Molecular Research Center Inc. (Cincinnati, OH, USA)

TRIzol[®]-reagent

(5) 購自 Promega Company (Madison, WI, USA)

Oligo(dT)15 Primer

dNTP mix

M-MLV Reverse Transcriptase

Recombinant RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor

(6) 購自 GENET BIO (Chungnam, Korea)

Prime Taq DNA Polymerase

(7) 購自 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)

Ethidium bromide (C₂₁H₂₀N₃Br)

7、胞內還原態及氧化態巯胱甘肽【GSH and oxidized GSH (GSSG)】含量之分

析

(1) 購自 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)

Potassium phosphate dibasic anhydrous, ACS reagent (K_2HPO_4)

Potassium phosphate monobasic anhydrous, ACS reagent (KH_2PO_4)

Glutathione, oxidized (GSSG)

Glutathione, reduced (GSH)

5-Sulfosalicylic acid (20%)

Ammonium acetate

Formic acid

(2) 購自 ECHO (Miaoli, Taiwan, ROC)

Acetonitrile (ACN)

8 · Transient transfection/Luciferase activity assay

(1) 購自 BD Biosciences (Clontech, CA, USA)

Luciferase reporter assay kit

(2) 購自 Gibco (Grand Island, NY, USA)

OPTI-MEM

(3) 購自 PAA (Pasching, Austria)

Nanofectin

(4) 購自 Promega (Madison, WI, USA)

Luciferase assay reagent

Lysis buffer

(5) 購自 Sigma Chemical company (St. Louis, MO, USA)

β -Mercaptoethanol

Magnesium chloride ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)

Sodium carbonate (Na_2CO_3)

O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG)

Sodium phosphate ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)

9、 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)分析

(1) 購自 GE Healthcare Bio-Sciences AB. (Uppsala, Sweden)

Nylon membrane (Hybone-N⁺)

(2) 購自 Merck Chemical Company (Darmstadt, Germany)

10X TBE buffer

(3) 購自 Pierce Chemical Company (Rockford, IL)

LightShift™ Chemiluminescent EMSA kit

(4) 購自 Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL, USA)

Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module (Thermo)

(5) 購自 Sigma Chemical Company (St, Louis, MO)

Aprotinin

DL-Dithiothreitol (DTT)

Ethylenediaminetetracetic acid (EDTA)

Leupeptin

Magnesium chloride (MgCl₂)

N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES)

Nonidet P-40 (Nonionic detergent)

Phenyl methylsulfonyl fluoride (PMSF, C₇H₇FO₂S)

Potassium chloride (KCl)

10、胞內 ROS 分析用藥

2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) (Invitrogen, Grand Island, NY, USA)

三、 實驗方法

(一) 大白鼠初代肝細胞之分離與培養

1、 肝細胞之分離 (Hepatocyte isolation)

大白鼠肝細胞分離係依據 Berry 與 Friend (1969)和 Bonney (1974)等人所發表，再經 Lii 與 Hendrich (1993)加以適度修正之方法，採用兩階段膠原蛋白酶灌流法(two-step collagenase perfusion)分離肝細胞。

方法如下：大白鼠以腹腔注射(i.p.) sodium pentobarbital (80 mg/kg body weight)，麻醉後，剪開腹腔，使用頭皮針經由肝門靜脈灌流。第一階段灌流，先以 150 ml 灌流液 I (含 EBSS、0.75 mM EGTA、100,000 unit/L penicillin、100,000 µg/L streptomycin, pH 7.38)，在 25 ml/min 流速下，將肝臟中的血液灌洗出；接著，進入第二階段灌流，使用 200 ml 灌流液 II (含 EBSS、10 mM HEPES、1.8 mM CaCl₂ · 2H₂O、0.8 mM MgCl₂ · 6H₂O、100,000 unit/L penicillin、100,000 µg/L streptomycin 與 50 mg 膠原蛋白酶(Collagenase type I，pH 7.38)，並將灌流的速率降至 20 ml/min，約 10 分鐘灌流消化後，肝臟變軟且失去彈性，細胞間隔也會放大，外觀顏色上則逐漸變淡，此時小心將肝臟剪下，移出體外並置放於過濾尼龍網上(200 µm, Tetko)，以 suspension solution (含 10 mM HEPES、2.6 mM sodium bicarbonate、1µM dexamethasone、1% ITS⁺、100,000 unit/L penicillin、100,000 µg/L streptomycin 之 RPMI-1640, pH 7.37)輕柔攪拌，將肝細胞洗下。

收集之肝細胞懸浮液先以低速離心(150 xg，3 分鐘)分離出細胞後，再將細胞懸浮於 washing solution (不含 ITS⁺之 RPMI-1640 suspension solution)中，低速離心(150 xg，3 分鐘/次)清洗細胞二次。接著，細胞懸浮液中加入等量 percoll 溶液(10X Hank's buffer：Percoll=1：9)，進行等密度梯度離心(250 xg，10 分鐘)，進一步區分肝實質細胞(parenchymal cells)與受傷、死亡細胞或非肝實質細胞(non-parenchymal cells)。最後，所得肝實質細胞再於 washing solution 中以低速離心(150 xg，3 分鐘/次)清洗細胞二次，洗去殘餘的 Percoll 溶液。完成清洗程序

後，將所得肝細胞懸浮於細胞培養液(含 10 mM HEPES、2.6 mM sodium bicarbonate、1 μ M dexamethasone、100,000 unit/L penicillin、100,000 μ g/L streptomycin、2.5% FBS、5 mg/L insulin、5 mg/L transferrin、5 μ g/L Na_2SeO_3 之 RPMI-1640, pH7.37)中。分殖到細胞培養皿前，先取 0.1ml 細胞懸浮液加入 1.5ml 細胞培養液及 0.4ml trypan blue，混勻後，以血球計數板估計存活總細胞數(total viable cells)，最後將細胞密度分別調整為 0.6 百萬/ml。

10X Hank's buffer (pH 7.4)	
	(g/L)
Glucose	10.0
KCl	4.0
KH_2PO_4	0.6
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0
NaCl	80.0
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.9
Phenol red	0.1
NaHCO_3 (add last)	3.5

※配製後，需過濾，並於 4°C 下保存

2、細胞之培養(Hepatocyte culture)

將 2 ml 及 5 ml 細胞懸浮液分別注入到直徑 3.5 公分及 6 公分以預先經膠原蛋白(collagen)處理過的培養皿(Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)中，置於 37°C、5% CO_2 培養箱中培養，4 小時後，先以 37°C 磷酸鹽緩衝液(PBS，含 9 mM Na_2HPO_4 、140 mM NaCl、1 mM NaH_2PO_4 、pH 7.4)清洗一次，並進行第一次培養液(含 10 mM HEPES、2.6 mM sodium bicarbonate、1 μ M dexamethasone、100,000 unit/L penicillin、100,000 μ g/L streptomycin、2.5% FBS、5 mg/L insulin、5 mg/L transferrin、5 μ g/L Na_2SeO_3 之 RPMI-1640, pH 7.37)更換。

3、肝細胞之處理 (Hepatocyte treatment)

大白鼠初代肝細胞分離且經 24 小時培養後，分別加入含有不同濃度類黃酮化合物(apigenin、butein、chrysin、luteolin、phlortin)之培養液，並以 0.1% DMSO 處理組作為控制組，經不同時間培養後，收取、製備樣本供下列分析。

(二) 生化分析

1、細胞存活率分析(MTT assay)

【原理】

本分析參考 Denizot 和 Lang 於 1986 年所發表的方法，MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)為一種淡黃色水溶性的 tetrazolium salt，在活細胞內，可因粒腺體中的 succinate dehydrogenase 之作用，將 MTT 還原成藍紫色非水溶性 formazan，因此藉由藍紫色產物多寡即可作為細胞毒性及細胞存活率的指標(Denizot and Lang, 1986)。

【步驟】

大鼠初代肝細胞(0.4×10^6 cell/well)種植於 12 孔細胞培養皿(Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)中，4 小時後，第一次更換培養液，再培養 20 小時，移除培養液，分別加入含 10 μ M、25 μ M 或 50 μ M apigenin、butein、chrysin、luteolin 或 phloretin 的新鮮細胞培養液，繼續培養 24 小時，移除培養液，以 37°C phosphate buffered saline (PBS)清洗兩次，加入 1 ml 含 0.5 mg/ml MTT 的 RPMI-1640 培養液，放入 37°C、5% CO₂ 之培養箱，3 小時後，移除培養液，加入 1 ml isopropanol，置於迴轉式振盪器(waver shaker)，以 25 rpm 速度均勻搖晃 10 分鐘，即可將藍紫色 formazan 溶出，吸取 isopropanol 溶液，移入 1.5 ml 離心管中，以 10,000 xg 離心 5 分鐘，取 200 μ l 上層液，置於 96 孔盤中，利用酵素免疫分析儀(ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Model 680)以波長 595 nm 測量吸光值，所得吸光值與控制組相比，即可求得細胞相對存活率。

2、蛋白質表現分析—西方墨點法(Western blotting assay)

(1) 細胞質液萃取

肝細胞經不同類黃酮化合物處理 24 小時後，移除培養液，以 4°C (冰的) PBS 清洗兩次，加入 300 µl 細胞均質液(含 7.4 mM K₂HPO₄、2.6 mM KH₂PO₄ 及 154.2 mM KCl, pH 7.4)，刮取細胞至 1.5 ml 離心管中，以超音波震盪器(Micro Ultrasonic Cell Disrupter, KONTES, Vineland, NJ)震碎細胞，功率設定：750 瓦—70%，時間設定：震 5 分鐘(間隔 2 秒/次)，離心 30 分鐘(11,000 xg、4°C)，所得上清液即為細胞質液(cytosolic fraction)，冰存於 -80°C。

(2) 蛋白質定量

參照 Coomassie Plus Protein Assay Kit 方法操作，簡述如下：各取 5 µl BSA 標準品與細胞質液樣本，分別置於 96 孔盤內，加入 150 µl dye reagent (細胞原液：dye reagent=1：30，v/v)，置於迴轉式震盪器上，室溫中均勻搖晃 10 分鐘，試劑將與樣本中蛋白質結合成藍色反應物質，以酵素免疫分析儀(ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Model 680, BD Biosciences)偵測波長 595 nm 吸光值，再與利用 BSA 所求得之蛋白質標準品濃度曲線比照後，即可計算樣品蛋白質的濃度。

(3) 西方墨點法

蛋白質濃度定量後，以 5X 濃度的 sample buffer (含 0.5 M Tris、20% glycerol、10% SDS、0.1% bromophenol blue 及 5% β-mercaptoethanol)及 potassium phosphate buffer (PPB)將樣品蛋白質濃度調整為 0.4 µg/ul，95°C 下加熱乾浴 5 分鐘使蛋白質變性，取適量體積之樣品注入 SDS-PAGE 樣品槽中，以 130 伏特電壓進行電泳。

5X sample buffer (保存於 4°C)	
0.5M Tris	10.0 ml
20% SDS	17.5 ml
β-Mercaptoethanol	2.5 ml
Bromophenol blue (w/v)	0.05 ml
Glycerol	10.0 ml
H ₂ O	8.0 ml

0.5M Tris	10.0 ml
20% SDS	17.5 ml
β-Mercaptoethanol	2.5 ml
Bromophenol blue (w/v)	0.05 ml
Glycerol	10.0 ml
H ₂ O	8.0 ml

Polyacrylamide gel 配方		
	Separating gel 10%	Stacking gel 4%
30% Acrylamide	3.74 ml	0.67 ml
1.5M Tris-HCl (pH8.8)	2.5 ml	
0.5M Tris-HCL (pH8.8)		1.25 ml
H ₂ O	3.66 ml	3.1 ml
20% SDS	50μl	25μl
10% APS	50μl	25μl
TEMED	10μl	10μl
Total	10 ml	5 ml

	Separating gel 10%	Stacking gel 4%
30% Acrylamide	3.74 ml	0.67 ml
1.5M Tris-HCl (pH8.8)	2.5 ml	
0.5M Tris-HCL (pH8.8)		1.25 ml
H ₂ O	3.66 ml	3.1 ml
20% SDS	50μl	25μl
10% APS	50μl	25μl
TEMED	10μl	10μl
Total	10 ml	5 ml

電泳完成後，取下膠體，切除 stacking gel，將 separating gel 浸泡於 transfer buffer (含 80% 25 mM Tris、192 mM glycine 及 20% methanol) 中，同時截取一片與 separating gel 大小相同之 PVDF (polyvinylidene fluoride) 轉漬膜，先將此膜浸泡於 99.5% ethanol 中 5 分鐘，再與膠片、濾紙及海綿一起浸泡於 transfer buffer 約 5 分鐘，依序將海綿、濾紙、膠片、PVDF 膜、濾紙、海綿放置於三明治式塑膠板中，固定後，放入轉漬槽中，以 100 伏特於冰浴中進行轉漬 90 分鐘。

轉漬完成後，取出 PVDF 膜，先以冰冷的 buffer A (25 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、0.3% Tween 20, pH 7.4) 清洗一次，加入 Ponceau S solution 染色並在確定蛋白質分離之位置後，剪裁 PVDF 膜，以冰冷的 buffer A 清洗三次，每次 5 分鐘，隨後將 PVDF 膜浸泡於含 5% 脫脂奶粉 (skim milk) 的 buffer B (含 25 mM Tris-HCl、150 mM NaCl, pH 7.4) 中，置於 4°C 下隔夜或於室溫下 2 小時，進行 blocking 反應。

取出 PVDF 轉漬膜，以冰冷的 buffer A 清洗三次，每次 5 分鐘，接著依一級抗體種類不同，於室溫反應 60 分鐘或 4°C 下反應 overnight，取出後，PVDF 膜再次以冰冷的 buffer A 清洗三次，每次 5 分鐘，隨後加入二級抗體，室溫下反應 40 分鐘後，以冰冷的 buffer A 清洗三次，每次 5 分鐘，最後加入 Enhanced Chemiluminescence Reagent (ECL kit) 呈色，並以冷光數位分析儀(LAS-4000, FUJIFILM, Japan)顯像、存檔，待後續蛋白質表現定量分析。

3、還原態及氧化態巯胱甘肽【GSH and oxidized GSH (GSSG)】含量之分析

本分析參考 Yao 等人於 2003 年所發表的方法(Yao et al., 2003)，肝細胞經不同類黃酮化合物處理 24 小時後，取 100 μ l 細胞質液(cytosolic fraction)與 200 μ l 10 mM Ellman's reagen 震盪均勻後，加入 60 μ l 20% 5-sulfosalicylic acid，混合均勻使蛋白質酸沉澱，離心 10 分鐘(10,000 xg 、4°C)，取 100 μ l 上清液，注入高效液相層析儀／質譜儀(HPLC/MS, High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrophotometer, Hewlett Packard)中，分析樣本內 GSH 及 GSSG 含量。

4、Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

(1) Total RNA 的抽取

肝細胞經不同類黃酮化合物處理不同時間後，移除培養液，以冰冷的 PBS 清洗二次，加入 0.5 ml Trizol reagent，靜置 5 分鐘後，刮取細胞，移入 1.5 ml 離心管中，加入 100 μ l chloroform，均勻震盪 15 秒，室溫靜置 4 分鐘，離心 15 分鐘(11,000 xg 、4°C)，吸取最上層含有 RNA 的上清液至另一乾淨的 1.5 ml 離心管中，加入 250 μ l isopropanol，混合均勻，室溫靜置 10 分鐘使 RNA 沈澱，離心 20 分鐘(11,000 xg 、4°C)，移除上清液，加入 500 μ l 冰的 70% ethanol 清洗殘餘鹽類，離心 5 分鐘(5,000 xg 、4°C)，最後加入 250 μ l 冰的 70% ethanol，並貯存於 -20°C 供後續 RNA 表現分析。

(2) RNA 定量

取出保存於 70 % ethanol 的 RNA 樣品，離心 15 分鐘(11,000 xg、4°C)，倒掉酒精上清液，白色固體的 RNA 置於室溫下略風乾後，加入 50 µl (依沈澱 RNA 量而定)滅菌水，使 RNA 完全溶解，取出 2 µl RNA 溶液，以超微量分光光譜儀(Nanodrop 1000, Thermo, USA)測定 260 nm 吸光值，依此計算 RNA 濃度。

(3) RT-PCR

製備 RT mixture 每管含(PCR buffer、150 µM dNTP、250 ng Oligo dT、40 units RNase inhibitor、50 units reverse transcriptase)於 1.5 ml 離心管中，再分別與 0.2 µg/µl RNA 樣品混合，並加入去離子水至總體積為 20 µl，混合均勻後進行逆轉錄反應(MJ Mino Thermo Cycler, BD Biosciences)，設定條件：42°C 15 分鐘、99°C 5 分鐘、4°C 10 分鐘，製造 cDNA 產物。接著，製備 PCR mixture (含 PCR buffer、10 µM 3' primer、10 µM 5' primer 及去離子水至總體積 30 µl)混合均勻後於 95°C 下加熱乾浴 5 分鐘，加入 Taq polymerase，取 30 µl 加入每管 cDNA 產物，最後每管總體積為 50 µl 進行聚合酶連鎖反應 DNA 複製。逆轉錄聚合酶連鎖反應之寡核苷酸引子序列及反應條件參照表一(¹ Keum et al., 2006；² Yamamoto et al., 2007)。

表一、逆轉錄聚合酶連鎖反應之寡核苷酸引子序列及反應條件

Gene	Primer	Parameters	mRNA product	Cycle number
HO-1 ¹	5'-AGCATGTCCCAGGATTTGTC-3'	94°C, 30sec	454 bp	25
	5'-AAGGCGGTCTTAGCCTCTTC-3'	55°C, 45sec		
		72°C, 45sec		
GCLC ²	5'-CCTTCTGGCACAGCACGTTG-3'	94°C, 60sec	346 bp	25
	5' -TAAGACGGCATCTCGCTCCT-3'	60°C, 60sec		
		72°C, 90sec		
GAPDH	5'-CCATCACCATCTTCCAGGAG	94°C, 30sec	576 bp	25
	3'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG	55°C, 45sec		
		72°C, 45sec		

(4) DNA 電泳

由每管 PCR 產物中取出 10 μ l，加入 2 μ l 6X loading dye，混合均勻後，注入含有 Ethidium bromide (EtBr) 之 1% agarose (SeaKem[®] LE Agarose) 膠中，於電泳槽中以 100 伏特進行電泳，再利用膠片影像分析系統(AlphaImager[®] EC, Alpha Innotech)照相分析 mRNA 表現。

5、 Transient transfection / Luciferase activity assay

將大鼠初代肝細胞(1.2×10^6)種植於 3 公分細胞培養皿(Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)中，4 小時後，更換培養液，再培養 24 小時，以 37°C PBS 清洗細胞一次，加入 1ml OPTI-MEM (無血清培養基)，1 小時後即可進行轉殖(transfection)。步驟簡述如下：取 0.4 μ g 3x ARE-Luc reporter plasmid (5-TGACTCAGCA-3')、0.1 μ g pCMV- β -galactosidase (β -Gal)plasmid、1 μ l Nanofectin[™] agent 及 100 μ l OPTI-MEM，混合均勻，室溫下靜置 50 分鐘，再與 900 μ l OPTI-MEM 混勻。將細胞培養皿中原先的 OPTI-MEM 移除後，加入含報導基因的新鮮製備反應溶液，即可進行轉殖作用。8 小時後，先置換新鮮 RPMI-1640 培養液 2 小時，再開始給與不同類黃酮化合物處理，24 小時後，移除培養液，以冰冷的 PBS 清洗二次，加入 100 μ l lysis buffer，靜置 5 分鐘後，刮取細胞，離心 3 分鐘(11,000 xg 、4°C)，吸取上清液進行 luciferase 活性分析。Luciferase 活性則利用 Luciferase reporter assay kit (BD Bioscience)分析，並以冷光光譜儀測定冷光值，同時也取部分上清液測量 β -galactosidase 活性， β -galactosidase 活性係以 O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG)為反應受質，並以酵素免疫分析儀(ELISA Model 680, BD Biosciences)於 415 nm 波長下測定 ONPG 產物濃度。將僅以 0.1% DMSO 處理的控制組細胞的 luciferase 活性及 β -galactosidase 活性比值視為 1，類黃酮處理組的活性再與之比較以求得相對比值。

6、 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

(1) 核蛋白萃取

肝細胞經不同類黃酮化合物處理 6 小時後，移除細胞培養液，以冰冷的 PBS 清洗兩次，加入 1 ml PBS，刮下細胞，裝入 1.5 ml 離心管中，離心 5 分鐘(20,000 xg、4°C)，去除上清液，加入 200 µl 低張溶液(含 10 mM HEPES、10 mM KCl、1.0 mM EDTA、1.0 mM MgCl₂、0.5 mM DTT、0.2 mM PMSF、4 µg/ml leupeptin、20 µg/ml aprotinin、0.5% NP-40，pH 7.4)，溫和地混合均勻，使細胞懸浮於低張溶液中，冰浴 15 分鐘後，離心 15 分鐘(6000 xg、4°C)，去除上清液。加入 500 µl buffer B (含 10 mM HEPES、10 mM KCl、1.0 mM EDTA、1.0 mM MgCl₂、0.5 mM DTT、0.2 mM PMSF、4 µg/ml leupeptin、20 µg/ml aprotinin)到離心後的細胞核沉澱物，使細胞懸浮在 buffer B 中，離心 15 分鐘(6000 xg、4°C)，吸取上清液，離心後的細胞沉澱物再加入 50 µl 高張溶液(含 10 mM HEPES、1.0 mM MgCl₂、0.5 mM DTT、0.2 mM PMSF、4 µg/ml leupeptin、20 µg/ml aprotinin、10% glycerol、400 mM KCl、0.2 mM EDTA)，室溫下溫和震盪 30 分鐘，離心 15 分鐘(10,000 xg、4°C)，所得上清液即為細胞核蛋白萃取液(nuclear protein extract)。細胞核蛋白萃取液以 Coomassie Plus Protein Assay Kit Coomassie Plus 定量，樣品保存於-80°C 超低溫冷凍櫃，供後續 EMSA 分析使用。

(2) EMSA

製備反應溶液每管含〔50 ng/µl poly (dIdC)、1X binding buffer、2.5% glycerol、5 mM MgCl₂、0.05% NP-40 以及 2 ng biotin 標定之 HO1-ARE 序列【forward: 5'-AACCATGACACAGCATAAAA-3' ; reverse: 5'-TTTTATGCTGTGTCATGGTT-3'】〕，再分別與 4 µg 細胞核蛋白樣品混合，並加入去離子水至總體積 20 µl。混合均勻後，室溫下反應 30 分鐘，隨後每管加入 5 µl 5X loading dye，並使每管總體積為 25 µl，注入到 6% polyacrylamide gels (6% acrylamide solution、1X TBE buffer、1% APS 及 15 µl TEMED)樣品槽中，以 0.5X TBE buffer 為電泳液，在 32

mA 的冰水浴中進行電泳 90 分鐘，隨後以 100 伏特電壓於冰水浴中繼續轉漬 45 分鐘，將 protein-DNA 結合物轉漬至 nylon membrane (HyBond N⁺) 上。轉漬完成後，取出膜置於紙巾上晾乾 10 分鐘，再於紫外光燈下 cross-link 10 分鐘，以 1X wash buffer 清洗 5 分鐘，將膜放入含 10 ml blocking buffer 的容器內均勻搖晃 20 分鐘，隨後加入 10 μ l Streptavidin- Horseradish Peroxidase (HRP)，均勻搖晃 20 分鐘，1X wash buffer 清洗 3 次，每次 5 分鐘，最後加入 Substrate equilibration buffer 平衡 5 分鐘，用 Chemiluminescent Substrate 呈色，利用冷光數位分析儀(LAS-4000, FUJIFILM, Japan)進行分析。

7、胞內氧化壓力測定

【原理】

2,7-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) 是一種脂溶性藥劑，本身不具有螢光且可以通透細胞膜進入細胞，而胞內乙醯酯酶(esterases)會對 H₂DCF-DA 進行去乙醯化作用(deacetylation)，進而形成極性的化合物(H₂DCF)，當細胞內有氧化物質存在時，會使 H₂DCF 氧化形成具有螢光性的 DCF。若細胞內 ROS 產生越多，DCF 的螢光強度也越強，故利用偵測波長 488 nm 激發下的 DCF 螢光強度即可得知胞內 ROS 產生之多寡(Bae et al., 1997)。

【步驟】

將大鼠初代肝細胞(3 百萬)種植於 6 公分細胞培養皿(Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)中，4 小時後，第一次培養液更換，再培養 24 小時後，移除培養液，接著將肝細胞預處理類黃酮(25 μ M)或 N-acetylcysteine (NAC, 2 mM)或 α -tocopherol (VitE, 15 μ M) 24 小時後，再加入 0.5 mM tert-butyl hydroperoxide (tBHP)1 小時誘發氧化傷害，也同時加入 5 μ M H₂DCF-DA 培養後，移除培養液，以 4°C(冰的) PBS 清洗兩次後，利用雷射掃描式共軛焦顯微鏡分析胞內 ROS 生成的情形。

四、統計分析

各組實驗分析所得之數據以平均值加減一個正負標準差(means±SD)表示，實驗統計分析將採用 SAS 統計套裝軟體中之單因子變異數分析(one-way analysis of variance, ANOVA)並配合 Tukey's test (Tukey's multiple comparison test)，當 p 值 < 0.05 代表各組之間有顯著差異。



第四章、結果

一、不同類黃酮對大鼠初代肝細胞存活率之影響

本實驗以 MTT assay 測試 5 種類黃酮化合物(包含 apigenin、butein、chrysin、Luteolin 及 phloretin)對大鼠初代肝細胞存活率的影響。結果如圖一所示，與僅以 0.1% DMSO 處理的細胞(控制組)比較下，細胞在濃度 10-50 μM 類黃酮的處理組下，24 小時後，所有處理組細胞的存活率仍可維持在 90%以上，各組間並無差異，顯示本實驗後續分析使用的 5-25 μM 類黃酮處理劑量所產生的效應並非細胞毒性所致。

二、不同類黃酮對大鼠初代肝細胞還原態和氧化態麩胱甘肽含量之影響

還原態麩胱甘肽(GSH)和氧化態麩胱甘肽(GSSG)在本實驗中是以高效液相層析儀/質譜儀(high performance liquid chromatograph/mass spectrometry, HPLC/MS)進行分析。結果如表一所示，各種類黃酮(Apg、But、Chr、Lut 和 Phl)在 5-25 μM 濃度下培養 24 小時後，胞內還原態 GSH 及總 GSH 含量皆高於對照組($p < 0.05$)，除 luteolin 外，其餘類黃酮處理都呈現劑量關係。類黃酮處理雖不改變 GSSG 含量，然而 GSH/GSSG 比值仍是類黃酮處理組顯著高於對照組細胞。比較類黃酮增加還原態和總 GSH 的程度，黃酮類以 chrysin 最強，apigenin 和 luteolin 次之；至於查酮類的 phloretin 及 butein，兩者對 GSH 的影響相似。如比較黃酮類和查酮類的誘發強弱，apigenin、phloretin、butein、luteolin 四者間並無差異。

三、不同類黃酮對大鼠初代肝細胞 GCLC、HO-1 蛋白質表現之影響

GCLC 蛋白質表現：結果如圖二、三所示，除了 Apigenin 以外，其他類黃酮處理組皆能顯著誘發 GCLC 蛋白質含量，在 25 μ M 處理濃度下，查酮類誘發 GCLC 蛋白質表現強弱，phloretin (2.0 倍)和 butein (1.9 倍)相似(圖二)；至於黃酮類則以 chrysin (2.3 倍)增加最多，luteolin (1.7 倍)次之，apigenin (1.4 倍)再次之(圖三)。如比較五種類黃酮之間誘發強弱，則是 chrysin > phloretin = butein > luteolin > apigenin。

HO-1 蛋白質表現：結果如圖五、六所示，相較對照組細胞，在 5-25 μ M 濃度的 Apg、But、Chr、Lut 和 Phl 培養 24 小時後，胞內 HO-1 蛋白質表現量皆呈現劑量增加($p < 0.05$)，如依查酮類和黃酮類予以區分，在 25 μ M 處理濃度下，查酮類的 HO-1 蛋白質表現依序為 butein (9.5 倍) > phloretin (2.6 倍)；黃酮類則是 chrysin (4.4 倍) > luteolin (2.9 倍) > apigenin (2.0 倍)。

四、不同類黃酮對大鼠初代肝細胞 GCLC、HO-1 mRNA 表現之影響

本實驗進一步以 RT-PCR 分析五種類黃酮是否影響大鼠初代肝細胞中 GCLC 及 HO-1 mRNA 含量的變化。在 GCLC mRNA 的表現方面(圖四)，經 25 μ M 的不同類黃酮培養 8 小時後，相較對照組初代肝細胞，除了 apigenin (0.8 倍)和 luteolin (1.7 倍)外，其他類黃酮誘發 GCLC mRNA 表現依序為 butein (4.2 倍) > phloretin (2.5 倍)；至於黃酮類的 chrysin 則是 2.5 倍。

HO-1 mRNA 的表現如圖七所示，除了 phloretin 以外，其餘四種類黃酮在 5-25 μ M 濃度下，皆能以劑量關係增加胞內 HO-1 mRNA 的含量，且不同類黃酮間 HO-1 mRNA 的表現，最強者為查酮類的 butein (5.1 倍) ($p < 0.05$)，隨之為黃酮類的 chrysin (2.6 倍)、luteolin (2.3 倍)和 apigenin (2.1 倍) ($p < 0.05$)。由 GCLC 和 HO-1 蛋白質與 mRNA 的表現變化看來，結果顯示查酮類的 butein 效果最好，黃酮類的 chrysin 效果次之。

五、類黃酮對大鼠初代細胞核內 Nrf2 和其 DNA 結合活性之影響

結果如圖八(A)，與控制組相較，Butein 處理可以時間效應關係增加細胞核內 Nrf2 的含量，在 1、3、6 小時的處理時間下，增加的幅度以 6 小時最高。根據此一發現，後續 EMSA 實驗也以此為取樣的時間點。

除分析核內 Nrf2 的含量變化外，我們進一步以 EMSA 分析核內 Nrf2 和 DNA 結合的活性是否因類黃酮而改變，結果如圖八(B)所示，大鼠初代肝細胞在不同類黃酮(25 μ M)處理 6 小時後，與控制組相比，butein、chrysin、apigenin 三者皆可增加 Nrf2 與 HO-1 promoter 上 ARE 序列的結合，至於 luteolin 和 phloretin 對活化 Nrf2 和 DNA 結合的效應則較弱。

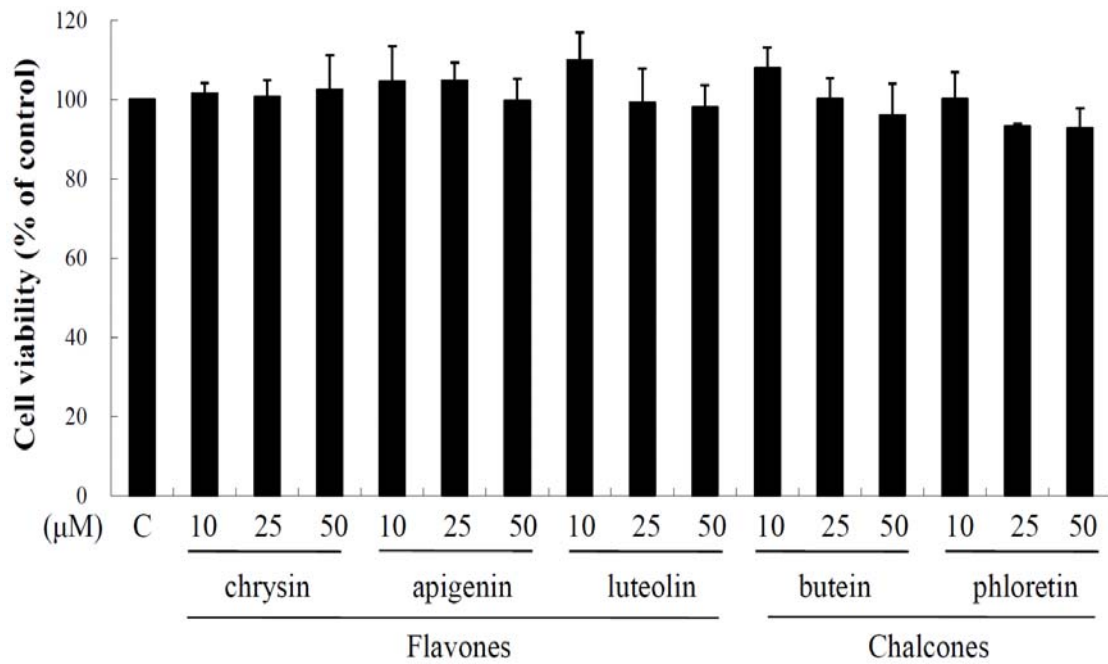
六、不同類黃酮對 ARE 報導基因活性之影響

為了進一步分析類黃酮確實透過活化 ARE (antioxidant response element) 上調 HO-1 和 GCLC 基因的轉錄作用，本實驗使用 3x ARE-Luc reporter plasmid，進行短暫轉染後，加入 25 μ M 的不同類黃酮，培養 8 小時，最後分析 luciferase 活性的變化。結果如圖九，在轉染 3x ARE-Luc reporter plasmid 的細胞中，可以發現除了 apigenin (1.8 倍)及 phloretin (1.4 倍)未達顯著水準外，查酮類的 butein 和黃酮類的 luteolin > chrysin 分別增加了 6.1 倍、6.1 倍、3.4 倍($p < 0.05$)。

七、預處理類黃酮對 tert-butyl hydroperoxide 誘發 ROS 生成之影響

前面實驗發現類黃酮處理可以上調抗氧化酵素基因 HO-1 和 GCLC 的轉錄作用，同時也增加了肝細胞內 GSH 的濃度，顯現這些類黃酮可能具有保護細胞免於氧化傷害的能力，所以接下來我們探討類黃酮(25 μ M)預處理 24 小時後，再加入 0.5 mM tert-butyl hydroperoxide (tBHP)1 小時誘發氧化傷害，最後利用雷射掃描式共軛焦顯微鏡觀察胞內 ROS 生成的情形，並與 N-acetylcysteine (NAC, 2 mM) 或 α -tocopherol (VitE, 15 μ M) 預處理的細胞進行比較。

結果如圖十所示，與 0.1% DMSO (control)相較之下，0.5 mM tBHP 明顯增加胞內綠色螢光的亮度(照片 1 vs. 2)，表示胞內 ROS 生成量確實增加；而在預處理類黃酮組的細胞，即使加入 0.5 mM tBHP，胞內綠色螢光的亮度皆有所減少，其中又以黃酮類的 chrysin 和查酮類的 butein 效果最佳，至於 Agigenin、luteolin 和 phloretin 三者，它們降低胞內 ROS 生成量之效果則較 chrysin 和 butein 差。NAC 為 GSH 合成之前驅物，預處理 NAC 組與 0.5 mM tBHP 組相較之下，NAC 亦可降低胞內 ROS 生成量。綜合上述結果，可以推測類黃酮(尤其是 chrysin 和 butein)減少胞內 ROS 生成量，可能與它們上調 HO-1 和 GCLC 抗氧化酵素基因表現，以及增加胞內 GSH 生合成有關，因而提升肝細胞的抗氧化保護能力。



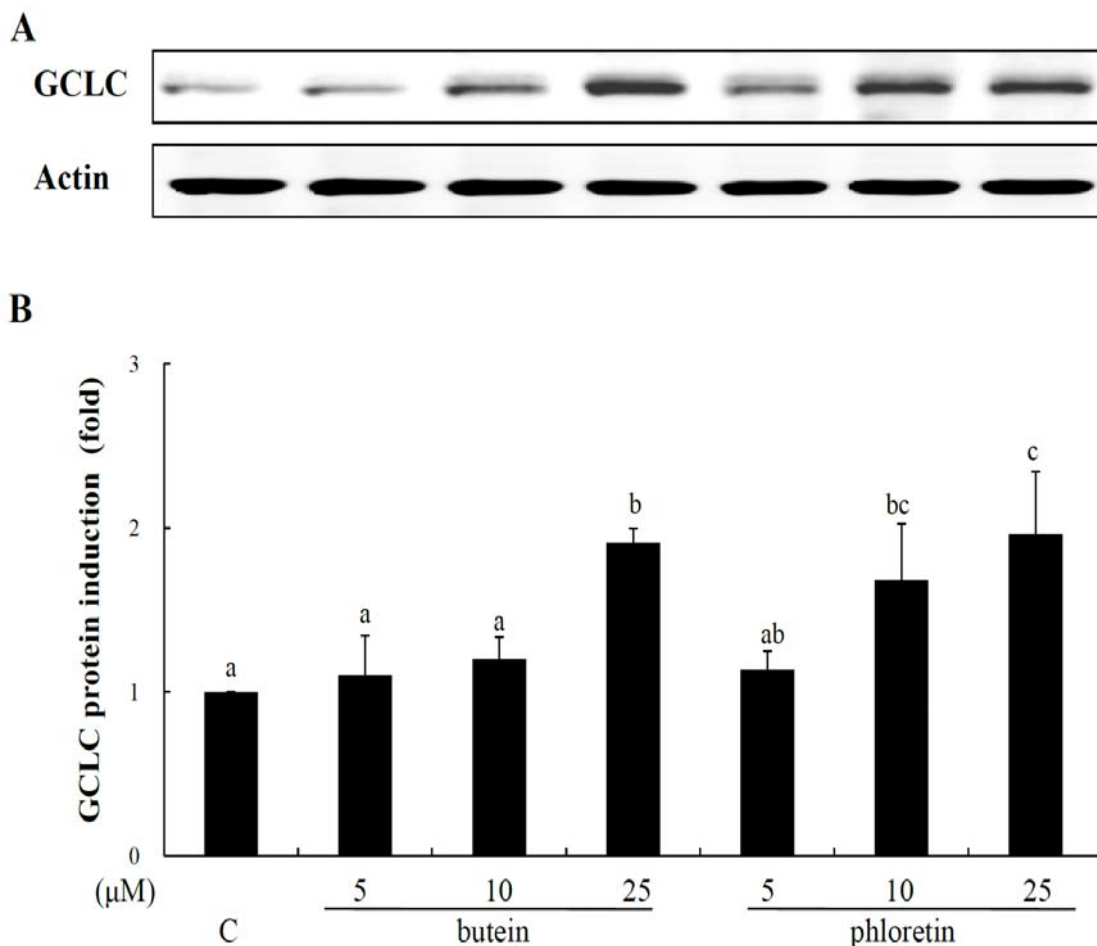
圖一、不同類黃酮對大鼠初代肝細胞存活率之影響

大鼠初代肝細胞分別以 0.1% DMSO (control, C) 或不同類黃酮(10-50 μM) 處理 24 小時後，以 MTT 法進行細胞存活率分析，並以控制組之細胞存活率設定為 100%。Means±SD (n=3~4)。

表一、不同類黃酮對大鼠初代肝細胞巯胱甘肽(glutathione)含量之影響¹

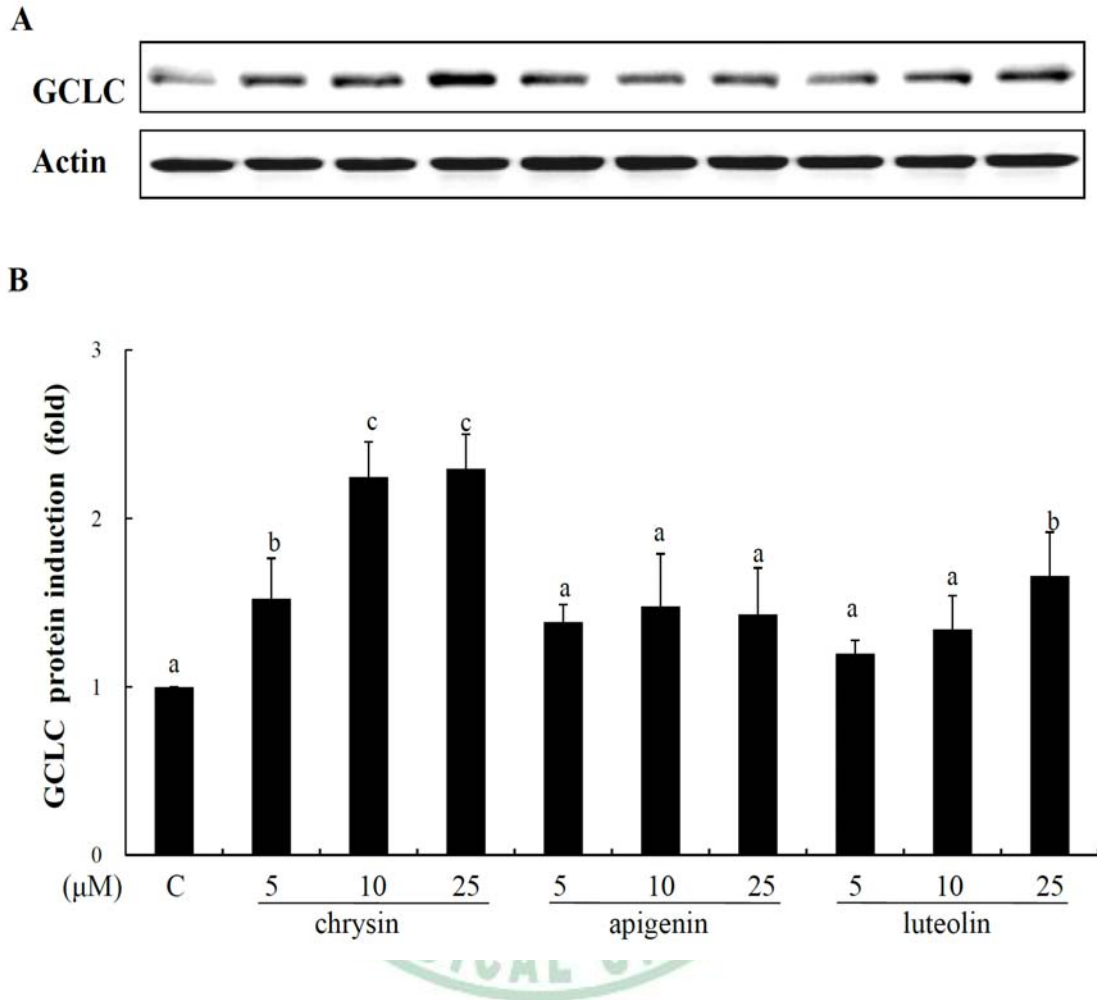
Treatment	dose	GSH	GSSG	total GSH	GSH/GSSG
	(μ M)	nmol/mg protein			
Chrysin	Control	115.2 \pm 21.8 ^a	0.89 \pm 0.1 ^a	116.7 \pm 22.1 ^a	156.6 \pm 22.1 ^a
	5	229.6 \pm 22.6 ^b	0.67 \pm 0.1 ^a	231.4 \pm 22.1 ^b	332.7 \pm 38.0 ^b
	10	256.9 \pm 49.3 ^b	0.81 \pm 0.1 ^a	258.5 \pm 49.0 ^b	372.5 \pm 47.6 ^b
	25	307.1 \pm 35.0 ^b	0.78 \pm 0.1 ^a	308.7 \pm 34.9 ^b	395.1 \pm 75.6 ^b
Apigenin	5	200.5 \pm 8.0 ^b	0.76 \pm 0.0 ^a	202.1 \pm 8.1 ^b	254.6 \pm 24.9 ^{ab}
	10	204.4 \pm 3.9 ^b	0.78 \pm 0.2 ^a	206.1 \pm 4.2 ^b	315.3 \pm 81.2 ^b
	25	222.0 \pm 35.0 ^b	0.78 \pm 0.1 ^a	223.3 \pm 34.9 ^b	326.2 \pm 69.5 ^b
Luteolin	5	215.4 \pm 25.4 ^b	0.63 \pm 0.1 ^a	216.6 \pm 25.4 ^b	314.0 \pm 46.7 ^b
	10	173.5 \pm 9.9 ^b	0.55 \pm 0.1 ^a	195.7 \pm 27.1 ^b	343.3 \pm 38.1 ^b
	25	196.1 \pm 24.9 ^b	0.76 \pm 0.1 ^a	197.6 \pm 25.2 ^b	333.2 \pm 98.3 ^b
Butein	5	154.5 \pm 18.1 ^{ab}	0.80 \pm 0.3 ^a	157.1 \pm 16.0 ^{ab}	254.7 \pm 59.0 ^b
	10	171.1 \pm 15.2 ^b	0.56 \pm 0.1 ^a	172.3 \pm 15.3 ^b	276.5 \pm 16.3 ^b
	25	199.0 \pm 25.1 ^b	0.73 \pm 0.2 ^a	200.5 \pm 25.4 ^b	303.6 \pm 33.8 ^b
Phloretin	5	188.8 \pm 38.9 ^{ab}	0.77 \pm 0.1 ^a	190.4 \pm 38.9 ^{ab}	281.0 \pm 22.8 ^b
	10	200.5 \pm 19.5 ^b	0.67 \pm 0.2 ^a	201.9 \pm 19.4 ^b	369.4 \pm 19.8 ^b
	25	210.2 \pm 28.7 ^b	0.69 \pm 0.2 ^a	211.6 \pm 28.6 ^b	361.9 \pm 71.5 ^b

¹ 大鼠初代肝細胞分別給予 0.1% DMSO (control) 或不同濃度之類黃酮(5-25 μ M) 處理 24 小時，取樣以 HPLC/MS 分析胞內 GSH 和 GSH disulfide (GSSG) 含量，Total GSH=GSH+2 \times GSSG。Means \pm SD (n=3)。^{ab} 個別類黃酮處理分別和對照組比較，各組間未含相同字母者表示顯著差異， $p<0.05$ 。



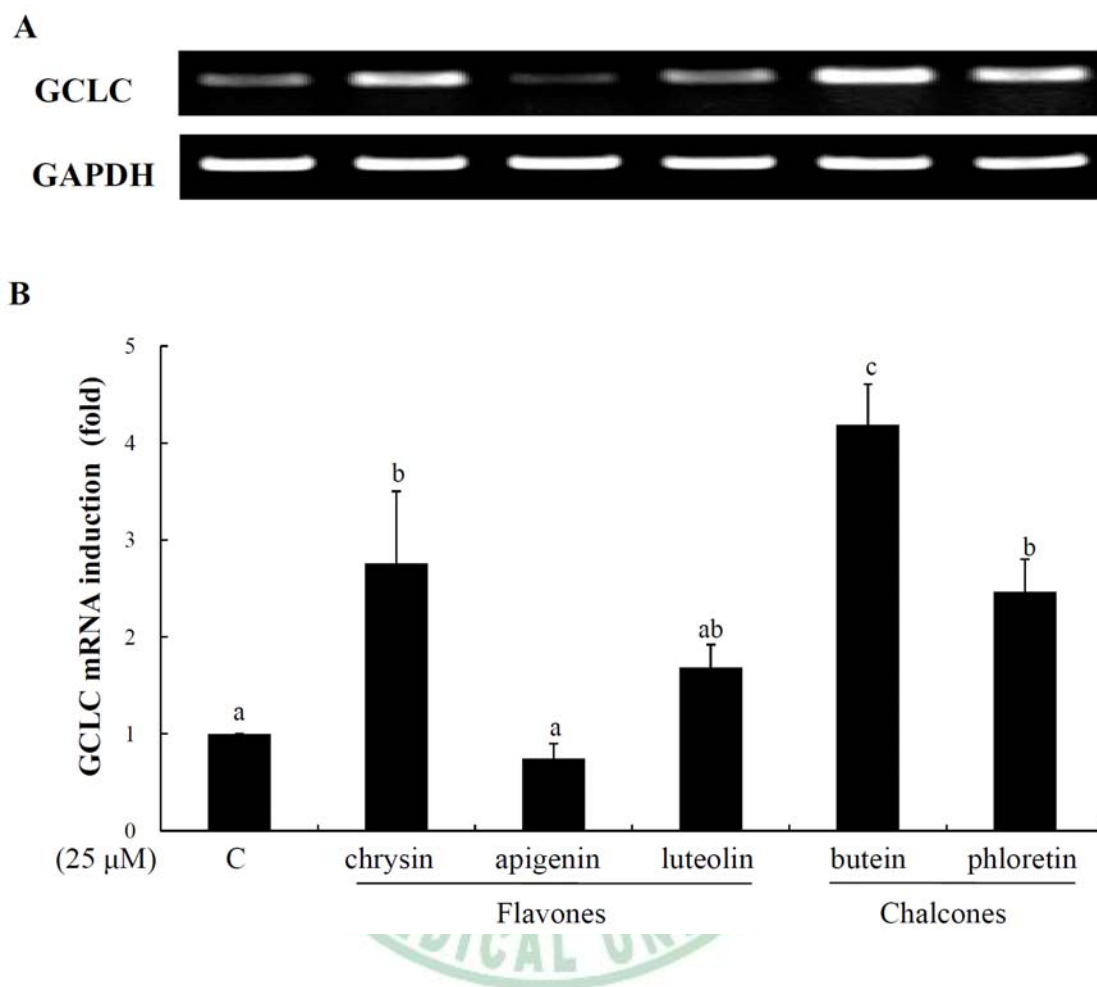
圖二、不同查酮對大鼠初代肝細胞 GCLC 蛋白質表現之影響

大鼠初代肝細胞分別以 0.1% DMSO (control, C) 或不同濃度之 butein 或 phloretin (5-25 μ M) 處理 24 小時，收取細胞質液。(A) 以 Western blot 分析 GCLC 蛋白質表現；(B) 各組 GCLC 蛋白質表現的定量結果，並將控制組的表現量設定為 1。Values are means \pm SD (n=4)，^{abc} 不同查酮處理分別和對照組比較，未含相同字母者表示統計上有顯著差異 ($p < 0.05$)。



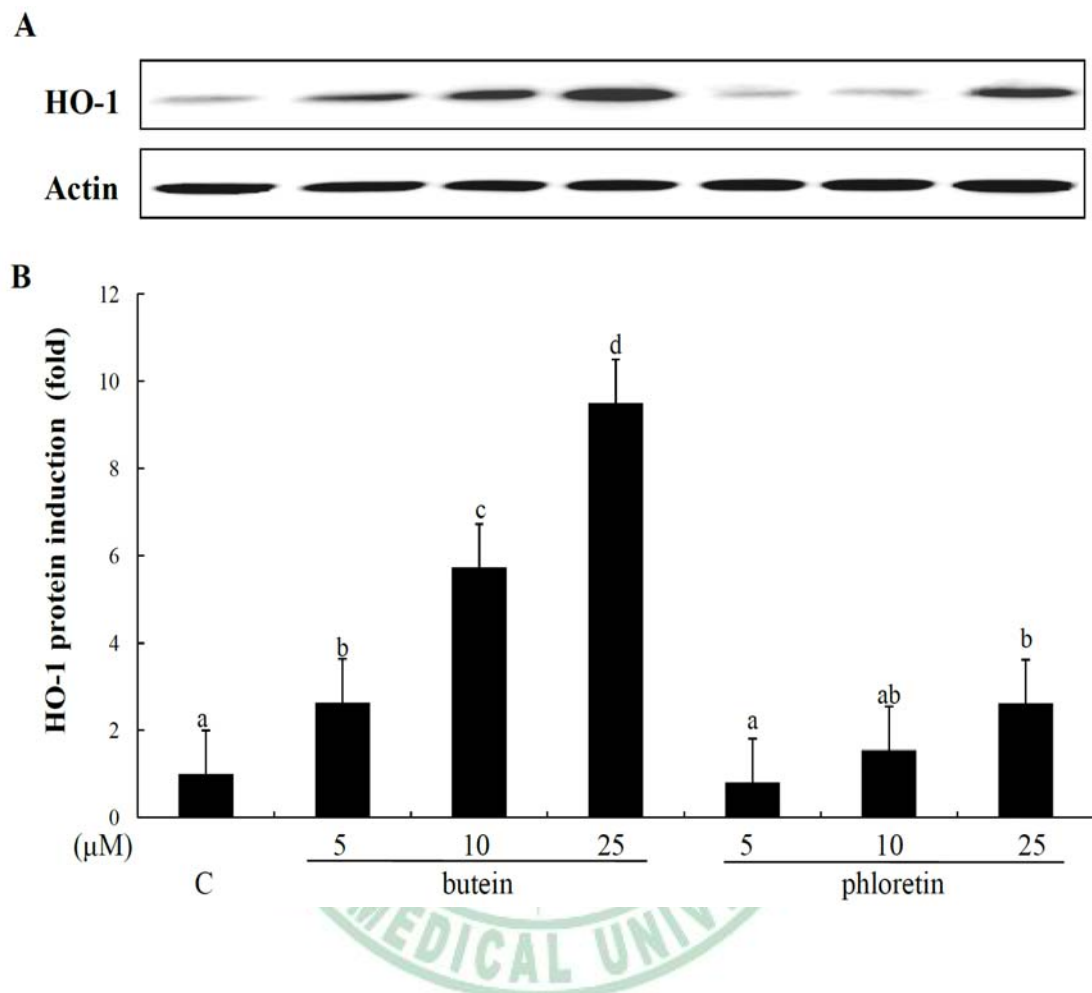
圖三、不同黃酮對大鼠初代肝細胞 GCLC 蛋白質表現之影響

大鼠初代肝細胞分別以 0.1% DMSO (control, C) 或不同濃度 chrysin、apigenin 與 luteolin (5-25 μM) 處理 24 小時，收取細胞質液。(A) 以 Western blot 分析 GCLC 蛋白質表現；(B) 各組 GCLC 蛋白質表現的定量結果，並將控制組的表現量設定為 1。Values are means±SD (n=3~4)。^{abc} 不同黃酮處理分別和對照組比較，未含相同字母者表示統計上有顯著差異 ($p < 0.05$)。



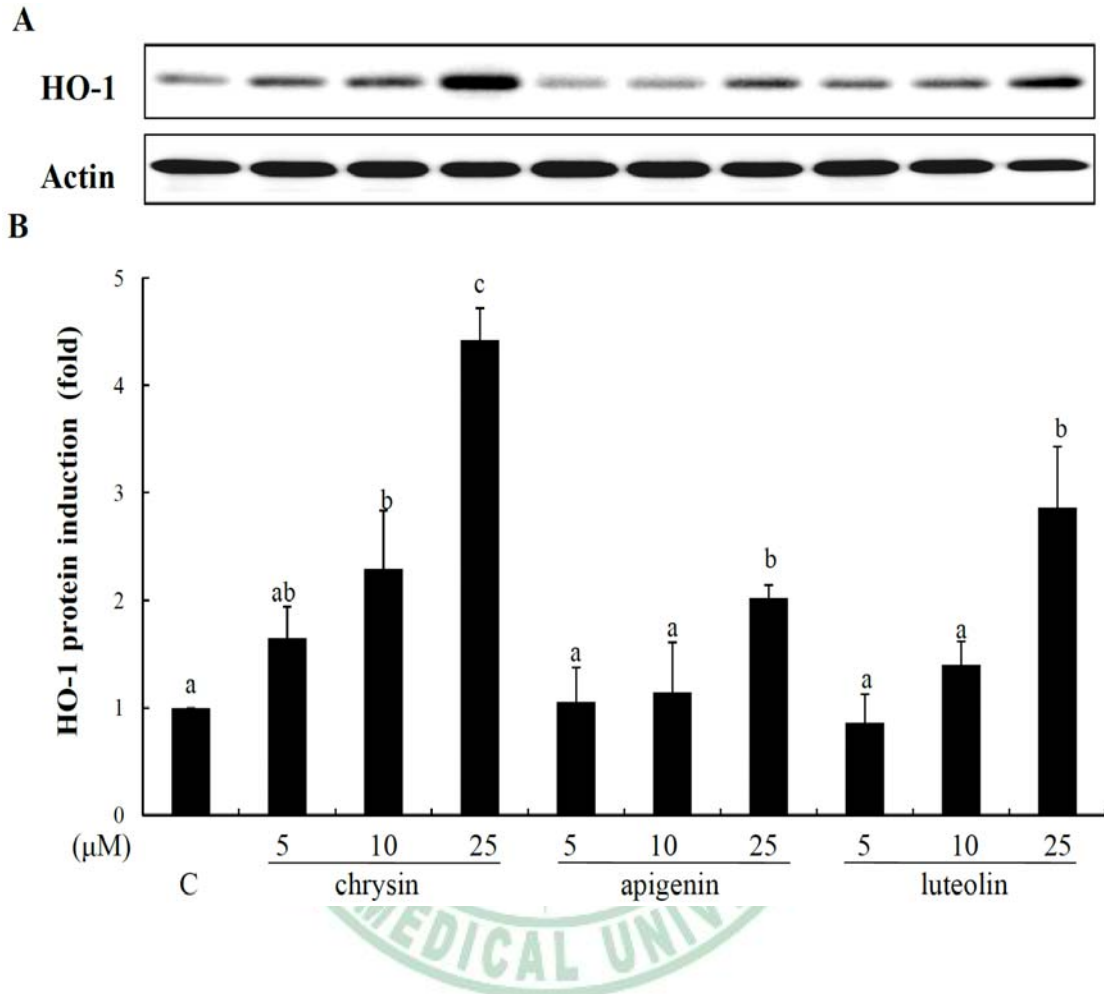
圖四、不同類黃酮對大鼠初代肝細胞 GCLC mRNA 表現之影響

大鼠初代肝細胞分別以 0.1% DMSO (control, C) 或不同類黃酮(25 μM) 處理 8 小時後, 收取 RNA。(A) 以 RT-PCR 分析 GCLC mRNA 表現; (B) 各組 GCLC mRNA 表現的定量結果, 控制組設定為 1。Values are means±SD (n=3)。^{abc} 各組間未含相同字母者表示統計上有顯著差異 ($p < 0.05$)。



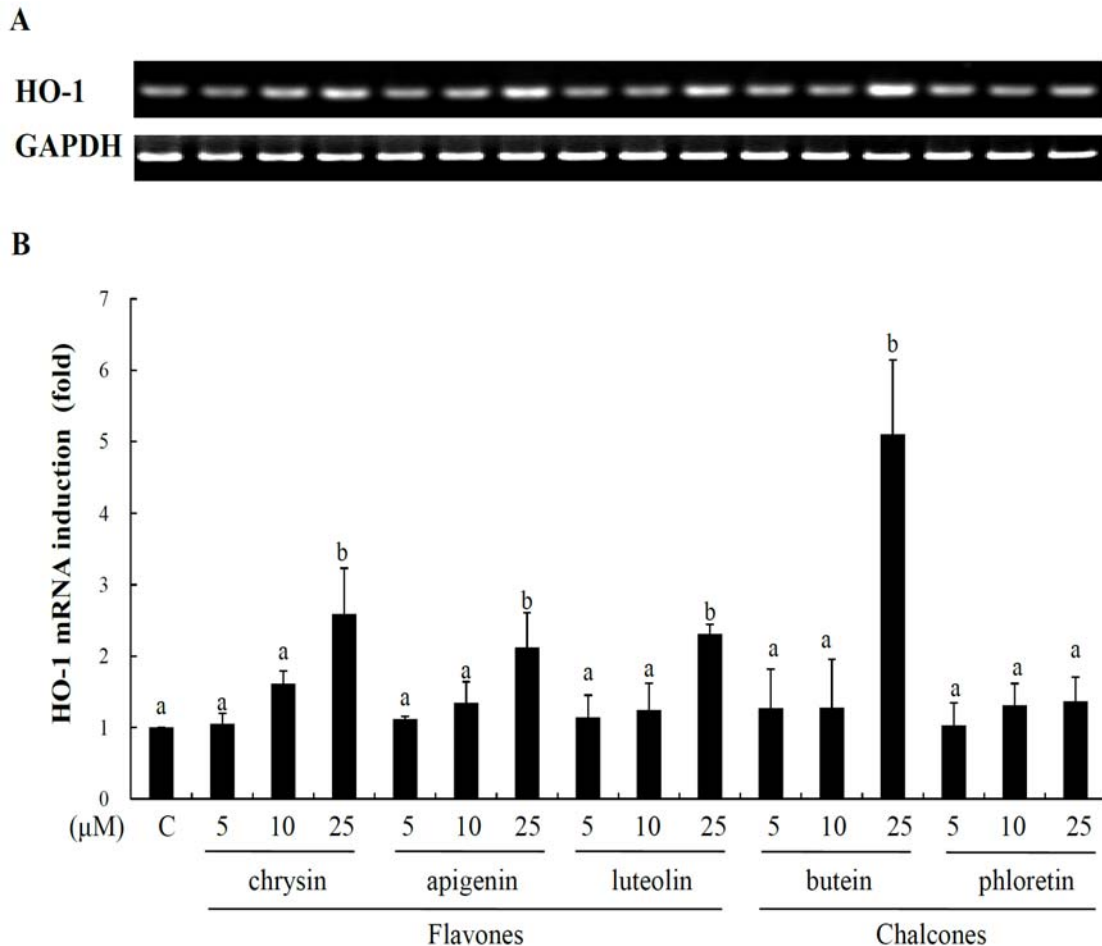
圖五、不同查酮對大鼠初代肝細胞 HO-1 蛋白質表現之影響

大鼠初代肝細胞分別以 0.1% DMSO (control, C) 或不同濃度之 butein 與 phloretin (5-25 μ M) 處理 24 小時後收取細胞質液。(A) 以 Western blot 分析 HO-1 蛋白質表現；(B) 各組 HO-1 蛋白質表現的定量結果，並將控制組的表現量設定為 1。Values are means \pm SD (n=3~4)。^{abcd} 不同查酮處理分別和對照組比較，未含相同字母者表示統計上有顯著差異 ($p < 0.05$)



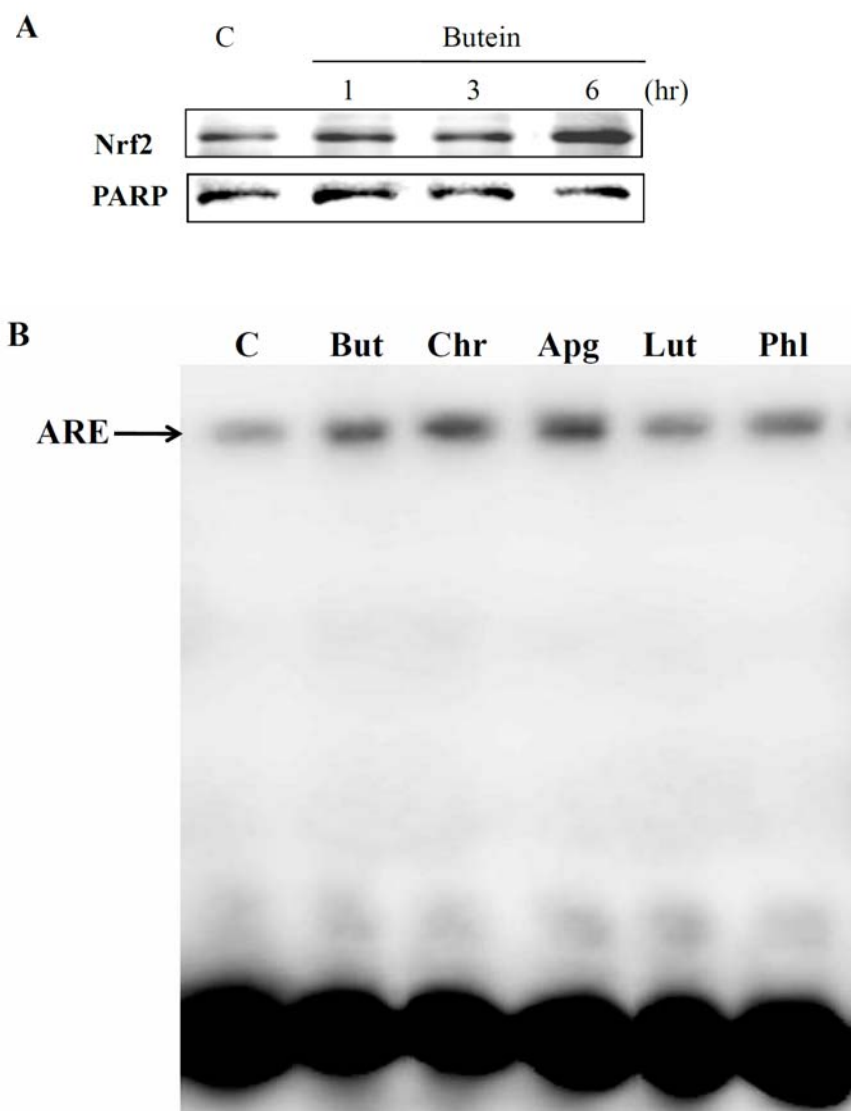
圖六、不同黃酮對大鼠初代肝細胞 HO-1 蛋白質表現之影響

大鼠初代肝細胞分別以 0.1% DMSO (control, C) 或不同濃度之 chrysin、apigenin 與 luteolin 處理 24 小時，收取細胞質液。(A) 以 Western blot 分析 HO-1 蛋白質表現；(B) 各組 HO-1 蛋白質表現的定量結果，並將控制組的表現量設定為 1。Values are means±SD (n=3)，^{abc} 不同黃酮處理分別和對照組比較，未含相同字母者表示統計上有顯著差異 ($p < 0.05$)。



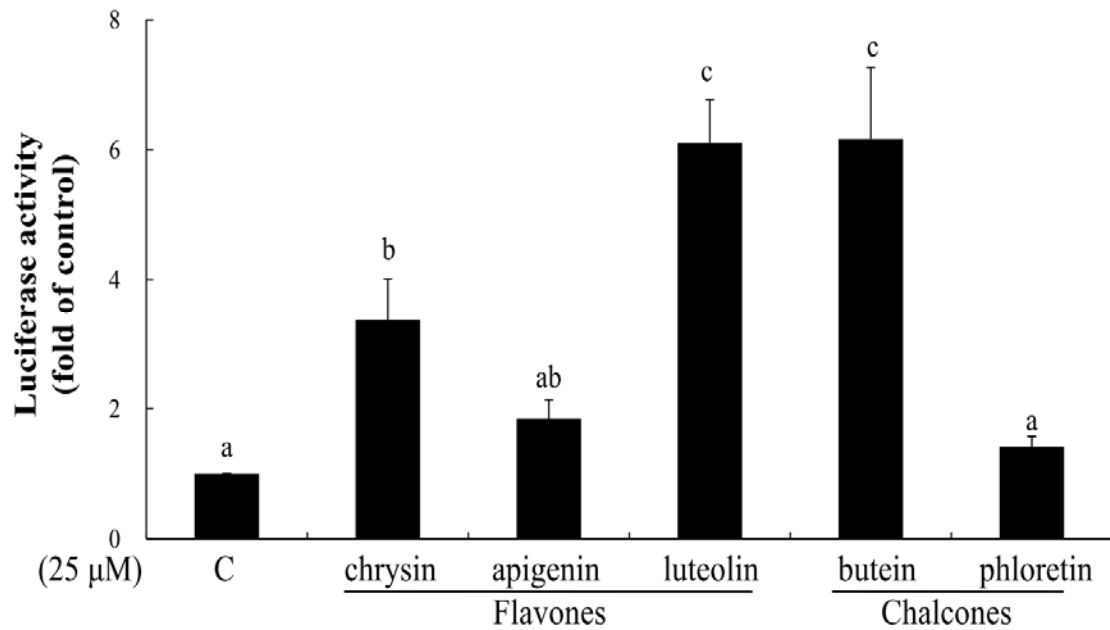
圖七、不同類黃酮對大鼠初代肝細胞 HO-1 mRNA 表現之影響

大鼠初代肝細胞分別以 0.1% DMSO (control, C) 或不同濃度之類黃酮 (5-25 μ M) 處理 24 小時，收取 RNA。(A) 以 RT-PCR 分析 HO-1 mRNA 表現；(B) 各組 HO-1 mRNA 表現的定量結果，並將控制組的表現量設定為 1。Values are means \pm SD (n=3~4)。^{ab} 不同類黃酮處理組分別和對照組進行組間差異分析，組間未含相同字母者表示顯著差異 ($p<0.05$)。



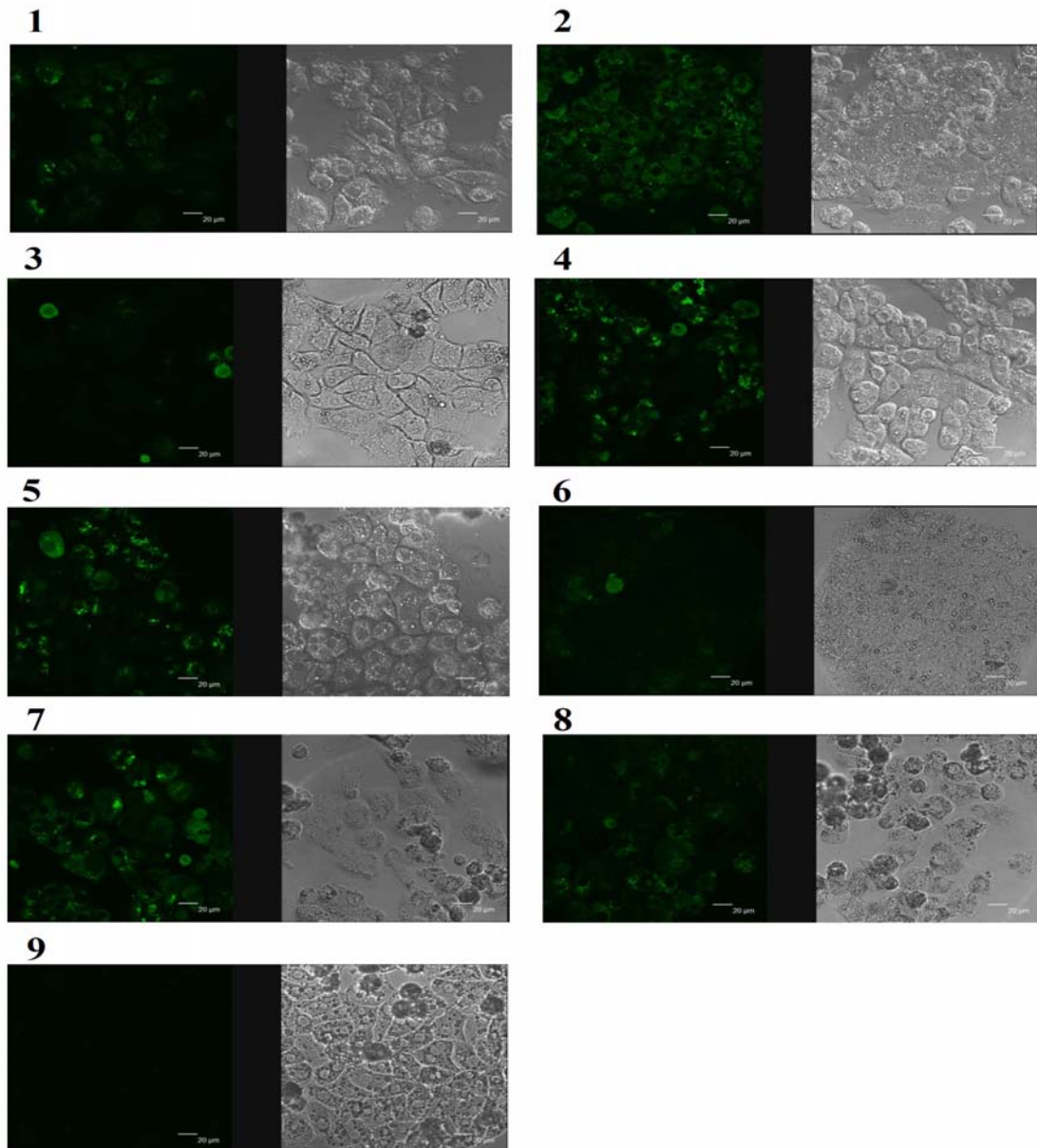
圖八、類黃酮對大鼠初代細胞核內 Nrf2 (A)和 Nrf2 與 DNA 結合活性(B)之影響

大鼠初代肝細胞分別以 0.1% DMSO (control, C)或 25 μ M butein 處理 6 小時，收取核蛋白，以 Western blot 分析核內 Nrf2 的表現(A)，或肝細胞分別予以 0.1% DMSO (control)或 25 μ M butein (But)、chrysin (Chr)、apigenin (Apg)、luteolin (Lut)、phloretin (Phl)處理 6 小時，以 EMSA 分析核蛋白與 HO-1-ARE 結合之情形(B)。



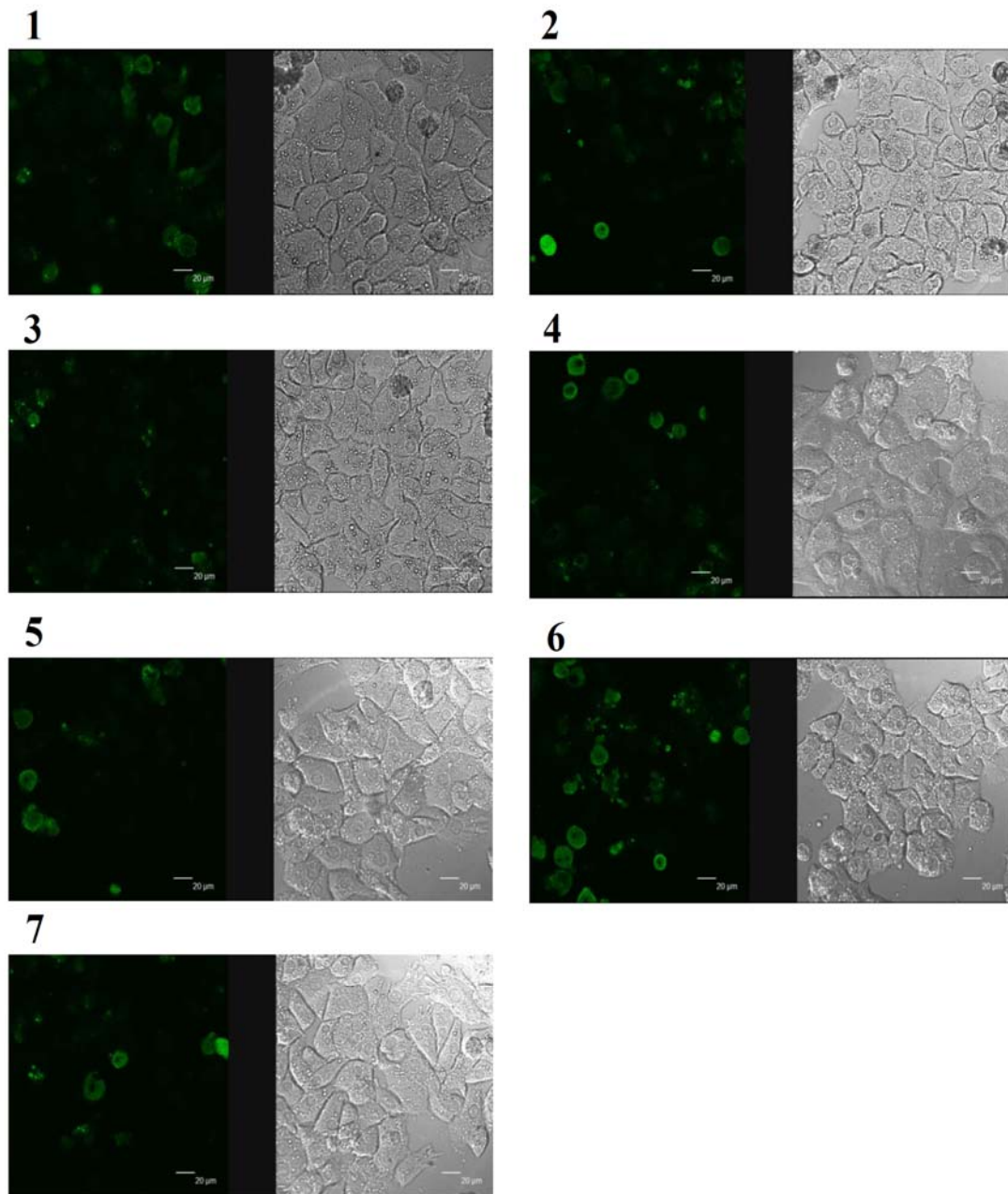
圖九、不同類黃酮對 ARE 報導基因活性之影響

大鼠初代肝細胞利用 3x ARE-Luc reporter plasmid 進行轉染後，分別以 0.1% DMSO (control, C) 或不同類黃酮(25 μ M) 處理 8 小時，分析 luciferase 活性變化。Values are means \pm SD (n=3~4)。^{abc} 各組間未含相同字母者表示統計上有顯著差異 ($p < 0.05$)。



圖十、類黃酮對 *tert*-butyl hydroperoxide 誘發 ROS 生成之影響

大鼠初代肝細胞分別以 0.1% DMSO (control) 或不同類黃酮(25 μ M) 或 N-acetylcysteine (NAC, 2 mM) 或 α -tocopherol (VitE, 15 μ M) 預處理 24 小時，加入 0.5 mM *tert*-butyl hydroperoxide (tBHP)，1 小時後利用雷射掃描式共軛焦顯微鏡觀察胞內 ROS 生成情形。1: control；2: control+tBHP；3: chrysin+tBHP；4: apigenin+tBHP；5: luteolin+tBHP；6: butein+tBHP；7: phloretin+tBHP；8: NAC+tBHP；9: VitE+tBHP；— 20 μ m。



圖十一、類黃酮對初代肝細胞之胞內 ROS 生成之影響

大鼠初代肝細胞分別以 0.1% DMSO (control) 或不同類黃酮(25 μ M) 或 N-acetylcysteine (NAC, 2 mM) 或 α -tocopherol (VitE, 15 μ M) 處理 24 小時，利用雷射掃描式共軛焦顯微鏡觀察胞內 ROS 生成情形。1: Chrysin；2: Apigenin；3: Luteolin；4: butein；5: phloretin；6: NAC；7: VitE；— 20 μ m。

第五章、討論

類黃酮化合物為天然多酚類化合物的一種，廣泛存在於蔬果、種子中，可經由飲食攝入體內，因其具有抗氧化、抑制發炎、調節免疫、類雌激素作用及預防心血管疾病等多樣的生理機能性(Alexandrakis et al., 2003; Middleton et al., 2000; Stangl et al., 2005; Zand et al., 2000)，普遍被認為有作為化學預防劑(chemopreventive agent)的潛力。不少研究指出類黃酮除了可直接作為抗氧化分子，減少 ROS 所導致的氧化損傷之外，也在活化或抑制訊息傳遞過程中扮演重要角色，所以前述類黃酮之多樣生理活性極可能與其調節基因表現之能力有著密切關係(Williams et al., 2004)，在眾多受到類黃酮調節其表現的基因中，抗氧化酵素基因一直是不少學者的焦點之一。已知誘發抗氧化酵素基因表現的上調實為細胞因應內、外在壓力變化之適應性作用，所以與許多疾病的發生率和病程進展呈負相關(Abraham and Kappas, 2008; Ballatori et al., 2009; Farombi and Surh, 2006)，若能提升體內抗氧化力，將有助於降低活性氧對生物體可能造成的氧化傷害，延緩肝臟疾病、心血管疾病與癌症等疾病的發生及進展。因此，本實驗利用大鼠初代肝細胞為實驗模式，探討並比較三種黃酮(apigenin、chrysin 和 luteolin)和兩種查酮(butein 和 phloretin)調節肝臟抗氧化酵素表現之生理效應，並進一步了解其可能機轉。

在正常情況下，為反制氧化傷害，生物體演化出一套抗氧化防禦系統，其中之一為由多種抗氧化酵素包括 HO-1、GCL、GSH peroxidase、superoxide dismutase、catalase 等組成的酵素系統。就其中 HO-1 和 GCL 而言，HO-1 除了藉由本身酵素活性及 heme 反應後的產物，降低細胞氧化壓力外，HO-1 也具有抗發炎、抗細胞凋亡和預防心血管等慢性疾病之生理機能性(Abraham et al., 2007; Vachharajani et al., 2000; Zuckerbraun et al., 2003)；至於 GCL，由於作為減少細胞氧化傷害之抗氧化分子 GSH 生合成的速率決定酵素，GCL 被視為重要的抗氧化酵素，也被歸類於重要的細胞保護基因(cytoprotective genes)之一(Franklin et al.,

2009)，藉由調節胞內 GSH 含量，GCL 將可決定 GSH 在生物體中的參與的抗氧化、藥物代謝、蛋白質代謝、核酸代謝等生理暨代謝反應。所以透過飲食手段上調 HO-1 和 GCL 活性及表現，將有助於生物體的生存力，進而維持健康、減少疾病的發生。

首先，在類黃酮對 HO-1 和 GCL 影響方面，給予不同類黃酮皆可誘發 HO-1 蛋白質表現，且以查酮類 butein 的誘發效果最強，高達 9.5 倍之多(圖五)；其次為黃酮類的 chrysin 的 4.4 倍(圖六)；類似結果也發生在增加 GCLC 蛋白質表現上，除了原先的查酮類的 butein 和黃酮類的 chrysin 外(圖三)，再加上查酮類的 phloretin(圖二)，三者是誘發 GCLC 蛋白質表現最佳的類黃酮分子，增加約 2.3~1.9 倍。所以由 GCLC 和 HO-1 蛋白質與 mRNA 的表現變化看來，五種類黃酮分子中，查酮類 butein 的效果最好，黃酮類 chrysin 的效果次之，這個結果顯示類黃酮對 GCLC 和 HO-1 基因表現的影響似乎和其結構與功能有關。若根據許多針對類黃酮的結構與功能相關性的研究加以探討，類黃酮的抗氧化、清除自由基、螯合鐵離子以及抑制脂質過氧化作用與其結構有關，(1)一般認為 A 及 B 環上所鍵結的羥基(hydroxyl group)數目越多者，清除自由基的能力越高，尤其是 A 環的 C-5 和 C-7 位置、B 環的 C -3'和 C-4' 位置及 C 環的 C-3 位置鍵結羥基者；(2)以及 C 環上 C-2 和 C-3 間有雙鍵；(3)和 C-4 位置有羰基 (C=O) 者，最具影響力 (Cook and Samman, 1996; Hanneken et al., 2006)

本實驗證實 butein 誘發抗氧化酶的效果最佳，推測可能是因 butein 為 C 環開環並具有 α,β -不飽和羰基結構者，可直接調節含 thiol 結構蛋白質，文獻指出具此結構特性者，易活化轉錄因子 Nrf2 (nuclear factor E2-related factor 2)及誘發 phase II 解毒酶的表現(Foresti et al., 2005; Sabzevari et al., 2004)，且在 C-2 和 C-3 間有雙鍵以及 A、B 環鍵結四個羥基，也可能有助於增強 butein 抗氧化能力，但其調控相關分子之機制，仍有待進一步研究。本實驗室先前探討不同類黃酮誘發 pi form of GSH S-transferase (GSTP)蛋白質表現時(童慧珊, 2008)，發現在黃酮類、黃酮醇類、黃烷酮類與查酮類共 14 種類黃酮中，也是以查酮類中的 butein

誘發效果最佳，黃酮類的 chrysin 效果次之。若分別比較查酮與黃酮類誘發抗氧化酵素效果，本研究結果也與先前誘發 GSTP 趨勢相似，依序為黃酮類的 Chrysin > Luteolin > Apigenin；查酮類的 Butein > Phloretin。

此外，過去文獻亦指出，若比較 Lut、Apg、Chr 三種黃酮類的總抗氧化能力 (TEAC)，含有 4 個羥基之 Luteolin 抗氧化活性最強，依序為 Lut > Apg > Chr (Cook and Samman, 1996; Rice-Evans et al., 1996)。但本實驗結果卻是在誘發抗氧化酵素表現上(圖三、六)，Chrysin 誘發能力較 luteolin 及 apigenin 強，但 Chrysin 在 B 環上並無羥基，顯示 B 環的 C-3' 和 C-4' 位置有鄰位雙羥基或鍵結羥基數目並非誘發抗氧化酵素所必須，可能是透過作為訊息傳遞分子影響抗氧化酵素表現。

許多研究證實類黃酮等植化物所以具有化學保護(chemoprotection)與化學預防(chemoprevention)之功效，與其能調節氧化還原敏感之轉錄因子之活性有關，已知者包括了 Nrf2、AP-1 和 NF- κ B 等，因此得以增加體內抗氧化防禦能力或抑制發炎反應 (Bonnesen et al., 2001; Chen and Kong, 2005)。一般生理狀態下，Nrf2 會被 Keap1 侷限於細胞質中，呈現不活化狀態，並隨即被降解；然而當生物體受到氧化壓力或親電子性化合物(oxidative stress/electrophiles)刺激時，會使得 Nrf2 和 Keap1 分離，Nrf2 因此被活化，進入細胞核與 ARE 序列結合，進而調控 GST、NQO1、GCL 和 HO-1 等多種解毒和抗氧化酵素基因的轉錄作用(Kaspar et al., 2009; Masella et al., 2005; Myhrstad et al., 2002)，保護細胞免於氧化傷害並促進相關解毒代謝。而 HO-1 與 GCLC gene promoter 上分別具有 2 個和 4 個 ARE 序列，近年來的研究已證實 ARE 為許多抗氧化酵素基因上一段調控序列，因此，驅動 Nrf2 的活化，乃是啟動抗氧化酵素基因轉錄之關鍵(Kaspar et al., 2009; Nguyen et al., 2003)。

Nrf2/ARE pathway 參與調控抗氧化基因轉錄的重要性，已在許多文獻中被廣泛討論(Alam and Cook, 2007; Chen and Kong, 2005; Itoh et al., 1997; Itoh et al., 2003; Kobayashi and Yamamoto, 2005; Kong et al., 2001; Masella et al., 2005; Surh

et al., 2005)。以十字花科蔬菜所含之蘿蔔硫素(sulforaphane, SFN)為例，其所以被認為是一增強細胞抗氧化防禦力之強效植化物，即和其可活化 Nrf2/ARE 訊號路徑，大量增加正常細胞 NQO1、GST 和 HO-1 的 mRNA 和蛋白質表現有關 (Gopalakrishnan and Tony Kong, 2008)。另外，缺 Nrf2 的小鼠(Nrf2-null mice)將喪失誘發 HO-1 與 GCL 等抗氧化酵素表現的能力，也足見 Nrf2 之重要性(Shen et al., 2005)。

氧化壓力或親電子性化合物如何活化 Nrf2/ARE 是一有趣的議題，曾有文獻指出，Resveratrol、quercetin、curcumin 和 epigallocatechin-3-gallate (EGCG)等類黃酮所以具有細胞保護之效應，和它們藉由修飾對氧化還原敏感(redox-sensitive)的訊息傳遞分子，進而活化 Nrf2 有關，比如：透過活化 MAPK 促進 Nrf2 活化，轉入核內，進而調控抗氧化酵素基因表現(Bonnesen et al., 2001; Nguyen et al., 2003; Rushmore et al., 1991)。

已有研究證實 EGCG 活化 Nrf2 之機制，除了 MAPK 路徑外，也可經由(1) PKC 或 PI3K/Akt 等訊息路徑修飾磷酸化 Nrf2，或是(2)藉由氧化 Keap1 上的硫醇基(sulfhydryl groups)，形成雙硫鍵，促使 Nrf2-Keap1 分離，並活化 Nrf2；(3)此外，EGCG 也會與 GSH 結合，短暫降低胞內 GSH 濃度，此時胞內的氧化還原平衡便會趨向於活化上游 MAPK 等訊息路徑，再促進 Nrf2 磷酸化(Shen et al., 2005; Surh et al., 2005; Wu et al., 2006)。

近年來也有文獻指出，Quercetin 和 resveratrol 等類黃酮也可透過 PI3K/PKB 路徑活化 Nrf2 與 GCLC promoter 上的 ARE 結合，啟動 GCLC 與 HO-1 抗氧化酵素基因之轉錄，並增加胞內麩胱甘肽之含量，以維持胞內氧化還原平衡(Kode et al., 2008; Lee-Hilz et al., 2006; Li et al., 2007; Myhrstad et al., 2002; Surh et al., 2005)。在本實驗中，利用 EMSA 分析，我們發現在 apigenin、butein、chrysin、luteolin、phloretin 處理下，皆可增加 Nrf2 與 HO-1 promoter 上 ARE 核心序列 (5'-TGACACAGCA-3')結合之情形(圖八 B)，證實類黃酮的確是藉由 Nrf2/ARE pathway 啟動抗氧化酵素之基因表現。後續實驗中，針對類黃酮是透過何種上游

訊號路徑促進 Nrf2 之活化，Keap1 分子是否產生硫醇基氧化修飾，將是未來值得我們繼續再深入探討的目標之一。

在本實驗中，類黃酮處理 24 小時，可能透過活化 Nrf2/ARE pathway 誘發 GCLC 基因表現，因而增加 GSH 生合成，顯著增加胞內 GSH 濃度，並提升 GSH/GSSG 比值(表一)；因此，利用雷射掃描式共軛焦顯微鏡觀察胞內 ROS 生成的情形，類黃酮處理組在 4 小時可減少 ROS 生成，但與 tBHP 組相較差異不大；若預處理 24 小時，則可觀察到 ROS 產生的訊號大幅減少(圖十)，顯示類黃酮預處理確實可提升胞內抗氧化能力，可保護細胞免於氧化傷害。

綜合上述討論，不同類黃酮化合物(apigenin、butein、chrysin、luteolin、phloretin)可透過 Nrf2/ARE 誘發肝細胞中抗氧化酵素 HO-1、GCLC 的基因表現，尤其以查酮類 butein 誘發效果最強，黃酮類 chrysin 次之；並且，類黃酮化合物可增加胞內 GSH 生合成，降低胞內氧化壓力，因此，若能進一步釐清其分子機制，將有助於了解它們在細胞抗氧化防禦系統扮演的角色。

第六章、結論

綜合以上結果，類黃酮(apigenin、butein、chrysin、luteolin 和 phloretin)具有增加胞內 GSH 含量及 GSH/GSSG 比值的效應，並保護肝細胞免於氧化傷害，其中尤以查酮 butein 和黃酮 chrysin 兩者效果最佳，其作用機轉應是透過活化 Nrf2 與 ARE 結合，進而上調抗氧化酵素 HO-1 與 GCLC 基因之轉錄作用。

根據分子結構和功能性的相關性(structure-function relationship)，查酮類以 butein 效果最佳的可能原因與 butein 同時具有 C 環開環，C-2 和 C-3 間有雙鍵，且 A、B 環各有兩個羥基有關；至於黃酮類中，Chrysin 誘發抗氧化酵素的作用較 apigenin 和 luteolin 好，但與分子羥基數目或結構似乎並無一定關係，因此，確認分子結構與其調節功能間關係仍有待進一步釐清。



第七章、參考文獻

1. 朱燕華 (1998). 類黃酮之介紹. 食品工業月刊 30(9), 1-6.
2. 朱燕華 (2001). 類胡蘿蔔素簡介. 食品工業月刊 33(4), 1-5.
3. 吳柏宏 (2004). 自由基、老化與抗氧化配方. 食品工業月刊 36(2), 45-51.
4. 范少怡 (2006). 癌症預防與天然化合物. 食品工業月刊 38(9), 17-26.
5. 郁凱衡 (1999). 天然酚類抗氧化物. 食品工業月刊 31(12), 43-51.
6. 孫潤伯 (2004). 麩胱甘肽在人體中所扮演的角色. 食品工業月刊 36(12), 33-41.
7. 陳皓君, 蔡. (2006). 蔬果中類黃酮之抗氧化作用與生物活性. *The Chinese Chem Soc* 64(3), 353-315.
8. 童慧珊 (2008). 不同食材萃出物和類黃酮對大鼠初代肝細胞中 pi 屬麩胱甘肽硫轉移酶表現之探討. (台中, 台灣: 中山醫學大學營養科學研究所碩士論文).
9. Abraham, N.G., Asija, A., Drummond, G., and Peterson, S. (2007). Heme oxygenase -1 gene therapy: recent advances and therapeutic applications. *Current gene therapy* 7, 89-108.
10. Abraham, N.G., and Kappas, A. (2008). Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacological reviews* 60, 79-127.
11. Afanas'ev, I.B., Dorozhko, A.I., Brodskii, A.V., Kostyuk, V.A., and Potapovitch, A.I. (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical pharmacology* 38, 1763-1769.
12. Alam, J., and Cook, J.L. (2007). How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? *American journal of respiratory cell and molecular biology* 36, 166-174.
13. Alam, J., Stewart, D., Touchard, C., Boinapally, S., Choi, A.M., and Cook, J.L. (1999). Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *The Journal of biological chemistry* 274, 26071-26078.
14. Alexandrakis, M.G., Kyriakou, D.S., Kempuraj, D., Huang, M., Boucher, W., Seretakis, D., and Theoharides, T.C. (2003). The isoflavone genistein inhibits proliferation and increases histamine content in human leukemic mast cells. *Allergy Asthma Proc* 24, 373-377.
15. Bae, Y.S., Kang, S.W., Seo, M.S., Baines, I.C., Tekle, E., Chock, P.B., and Rhee, S.G. (1997). Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. In *J Biol Chem*, pp. 217-221.
16. Balla, J., Vercellotti, G.M., Jeney, V., Yachie, A., Varga, Z., Eaton, J.W., and Balla,

- G. (2005). Heme, heme oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Molecular nutrition & food research* 49, 1030-1043.
17. Ballatori, N., Krance, S.M., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K., and Hammond, C.L. (2009). Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biological chemistry* 390, 191-214.
 18. Ballatori, N., and Rebeor, J.F. (1998). Roles of MRP2 and oatp1 in hepatocellular export of reduced glutathione. *Seminars in liver disease* 18, 377-387.
 19. Baranano, D.E., Rao, M., Ferris, C.D., and Snyder, S.H. (2002). Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 16093-16098.
 20. Berlett, B.S., and Stadtman, E.R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* 272, 20313-20316.
 21. Bonnesen, C., Eggleston, I.M., and Hayes, J.D. (2001). Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer research* 61, 6120-6130.
 22. Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews* 56, 317-333.
 23. Brouard, S., Otterbein, L.E., Anrather, J., Tobiasch, E., Bach, F.H., Choi, A.M., and Soares, M.P. (2000). Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *The Journal of experimental medicine* 192, 1015-1026.
 24. Brune, B., and Ullrich, V. (1987). Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Molecular pharmacology* 32, 497-504.
 25. Chen, C., and Kong, A.N. (2005). Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. *Trends in pharmacological sciences* 26, 318-326.
 26. Chen, Y., Shertzer, H.G., Schneider, S.N., Nebert, D.W., and Dalton, T.P. (2005). Glutamate cysteine ligase catalysis: dependence on ATP and modifier subunit for regulation of tissue glutathione levels. *The Journal of biological chemistry* 280, 33766-33774.
 27. Cholbi, M.R., Paya, M., and Alcaraz, M.J. (1991). Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl₄-induced microsomal lipid peroxidation. *Experientia* 47, 195-199.
 28. Clark, J.E., Foresti, R., Sarathchandra, P., Kaur, H., Green, C.J., and Motterlini, R. (2000). Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic

- myocardial dysfunction. *American journal of physiology* 278, H643-651.
29. Cook, N.C., and Samman, S. (1996). Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of nutritional biochemistry* 7, 66-76.
 30. Dahl, E.L., and Mulcahy, R.T. (2001). Cell-type specific differences in glutamate cysteine ligase transcriptional regulation demonstrate independent subunit control. *Toxicol Sci* 61, 265-272.
 31. Dalton, T.P., Chen, Y., Schneider, S.N., Nebert, D.W., and Shertzer, H.G. (2004). Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free radical biology & medicine* 37, 1511-1526.
 32. Dalton, T.P., Dieter, M.Z., Yang, Y., Shertzer, H.G., and Nebert, D.W. (2000). Knockout of the mouse glutamate cysteine ligase catalytic subunit (*Gclc*) gene: embryonic lethal when homozygous, and proposed model for moderate glutathione deficiency when heterozygous. *Biochemical and biophysical research communications* 279, 324-329.
 33. Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A., and Capasso, F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sciences* 65, 337-353.
 34. Eisenstein, R.S., Garcia-Mayol, D., Pettingell, W., and Munro, H.N. (1991). Regulation of ferritin and heme oxygenase synthesis in rat fibroblasts by different forms of iron. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 688-692.
 35. Fang, Y.Z., Yang, S., and Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)* 18, 872-879.
 36. Farghali, H., Cerny, D., Kamenikova, L., Martinek, J., Horinek, A., Kmonickova, E., and Zidek, Z. (2009). Resveratrol attenuates lipopolysaccharide-induced hepatitis in D-galactosamine sensitized rats: role of nitric oxide synthase 2 and heme oxygenase-1. *Nitric Oxide* 21, 216-225.
 37. Farombi, E.O., and Surh, Y.J. (2006). Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection. *Journal of biochemistry and molecular biology* 39, 479-491.
 38. Foresti, R., Hoque, M., Monti, D., Green, C.J., and Motterlini, R. (2005). Differential activation of heme oxygenase-1 by chalcones and rosolic acid in endothelial cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 312, 686-693.
 39. Franklin, C.C., Backos, D.S., Mohar, I., White, C.C., Forman, H.J., and Kavanagh, T.J. (2009). Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Molecular*

aspects of medicine 30, 86-98.

40. Galecka, E., Jacewicz, R., Mrowicka, M., Florkowski, A., and Galecki, P. (2008). [Antioxidative enzymes--structure, properties, functions]. *Pol Merkur Lekarski* 25, 266-268.
41. Gopalakrishnan, A., and Tony Kong, A.N. (2008). Anticarcinogenesis by dietary phytochemicals: cytoprotection by Nrf2 in normal cells and cytotoxicity by modulation of transcription factors NF-kappa B and AP-1 in abnormal cancer cells. *Food Chem Toxicol* 46, 1257-1270.
42. Griffith, O.W. (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free radical biology & medicine* 27, 922-935.
43. Griffith, O.W., and Mulcahy, R.T. (1999). The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* 73, 209-267, xii.
44. Gruber, F., Mayer, H., Lengauer, B., Mlitz, V., Sanders, J.M., Kadl, A., Bilban, M., de Martin, R., Wagner, O., Kensler, T.W., *et al.* (2010). NF-E2-related factor 2 regulates the stress response to UVA-1-oxidized phospholipids in skin cells. *Faseb J* 24, 39-48.
45. Halliwell, B., and Cross, C.E. (1994). Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental health perspectives* 102 Suppl 10, 5-12.
46. Han, D., Sen, C.K., Roy, S., Kobayashi, M.S., Tritschler, H.J., and Packer, L. (1997). Protection against glutamate-induced cytotoxicity in C6 glial cells by thiol antioxidants. *The American journal of physiology* 273, R1771-1778.
47. Hanneken, A., Lin, F.F., Johnson, J., and Maher, P. (2006). Flavonoids protect human retinal pigment epithelial cells from oxidative-stress-induced death. *Investigative ophthalmology & visual science* 47, 3164-3177.
48. Hertog, M.G., Feskens, E.J., Hollman, P.C., Katan, M.B., and Kromhout, D. (1994). Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly Study. *Nutrition and cancer* 22, 175-184.
49. Hodek, P., Trefil, P., and Stiborova, M. (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-biological interactions* 139, 1-21.
50. Hollenberg, P.F., Kent, U.M., and Bumpus, N.N. (2008). Mechanism-based inactivation of human cytochromes p450s: experimental characterization, reactive intermediates, and clinical implications. *Chemical research in toxicology* 21, 189-205.
51. Idriss, N.K., Blann, A.D., and Lip, G.Y. (2008). Hemoxygenase-1 in cardiovascular disease. *Journal of the American College of Cardiology* 52,

- 971-978.
52. Ioannides, C., Lewis, D.F., and Parke, D.V. (1994). The use of computers in the safety evaluation of drugs and other chemicals. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics* *19*, 225-233.
 53. Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., *et al.* (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and biophysical research communications* *236*, 313-322.
 54. Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., O'Connor, T., and Yamamoto, M. (2003). Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells* *8*, 379-391.
 55. Jaganathan, S.K., and Mandal, M. (2009). Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review. *Journal of biomedicine & biotechnology* *2009*, 830616.
 56. Jaiswal, A.K. (2004). Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free radical biology & medicine* *36*, 1199-1207.
 57. Johnson, J., Maher, P., and Hanneken, A. (2009). The flavonoid, eriodictyol, induces long-term protection in ARPE-19 cells through its effects on Nrf2 activation and phase 2 gene expression. *Investigative ophthalmology & visual science* *50*, 2398-2406.
 58. Johnson, J.A., Johnson, D.A., Kraft, A.D., Calkins, M.J., Jakel, R.J., Vargas, M.R., and Chen, P.C. (2008). The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1147*, 61-69.
 59. Joyeux, M., Lobstein, A., Anton, R., and Mortier, F. (1995). Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from Ginkgo and some flavonoids. *Planta medica* *61*, 126-129.
 60. Kandaswami, C., Lee, L.T., Lee, P.P., Hwang, J.J., Ke, F.C., Huang, Y.T., and Lee, M.T. (2005). The antitumor activities of flavonoids. *In vivo (Athens, Greece)* *19*, 895-909.
 61. Kang, D.G., Lee, A.S., Mun, Y.J., Woo, W.H., Kim, Y.C., Sohn, E.J., Moon, M.K., and Lee, H.S. (2004). Butein ameliorates renal concentrating ability in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *Biological & pharmaceutical bulletin* *27*, 366-370.
 62. Kaspar, J.W., Niture, S.K., and Jaiswal, A.K. (2009). Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free radical biology & medicine* *47*, 1304-1309.
 63. Khor, T.O., Huang, M.T., Kwon, K.H., Chan, J.Y., Reddy, B.S., and Kong, A.N.

- (2006). Nrf2-deficient mice have an increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Cancer research* 66, 11580-11584.
64. Klaassen, C.D., and Reisman, S.A. Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicology and applied pharmacology* 244, 57-65.
 65. Knapen, M.F., Peters, W.H., Mulder, T.P., Merkus, H.M., Jansen, J.B., and Steegers, E.A. (1999). Glutathione and glutathione-related enzymes in decidua and placenta of controls and women with pre-eclampsia. *Placenta* 20, 541-546.
 66. Kobayashi, M., and Yamamoto, M. (2005). Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxidants & redox signaling* 7, 385-394.
 67. Kode, A., Rajendrasozhan, S., Caito, S., Yang, S.R., Megson, I.L., and Rahman, I. (2008). Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *American journal of physiology* 294, L478-488.
 68. Kong, A.N., Owuor, E., Yu, R., Hebbar, V., Chen, C., Hu, R., and Mandlekar, S. (2001). Induction of xenobiotic enzymes by the MAP kinase pathway and the antioxidant or electrophile response element (ARE/EpRE). *Drug metabolism reviews* 33, 255-271.
 69. Lee-Hilz, Y.Y., Boerboom, A.M., Westphal, A.H., Berkel, W.J., Aarts, J.M., and Rietjens, I.M. (2006). Pro-oxidant activity of flavonoids induces EpRE-mediated gene expression. *Chemical research in toxicology* 19, 1499-1505.
 70. Lee, J.C., Lim, K.T., and Jang, Y.S. (2002). Identification of Rhus verniciflua Stokes compounds that exhibit free radical scavenging and anti-apoptotic properties. *Biochimica et biophysica acta* 1570, 181-191.
 71. Lee, S.H., Nan, J.X., Zhao, Y.Z., Woo, S.W., Park, E.J., Kang, T.H., Seo, G.S., Kim, Y.C., and Sohn, D.H. (2003). The chalcone butein from Rhus verniciflua shows antifibrogenic activity. *Planta medica* 69, 990-994.
 72. Lee, S.H., Seo, G.S., Jin, X.Y., Ko, G., and Sohn, D.H. (2007). Butein blocks tumor necrosis factor alpha-induced interleukin 8 and matrix metalloproteinase 7 production by inhibiting p38 kinase and osteopontin mediated signaling events in HT-29 cells. *Life sciences* 81, 1535-1543.
 73. Li, M.H., Jang, J.H., Na, H.K., Cha, Y.N., and Surh, Y.J. (2007). Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 in response to nitrosative stress induces expression of glutamate-cysteine ligase in PC12 cells via activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Nrf2 signaling. *The Journal of biological chemistry* 282, 28577-28586.
 74. Liska, D.J. (1998). The detoxification enzyme systems. *Altern Med Rev* 3,

- 187-198.
75. Lu, S.C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Molecular aspects of medicine* 30, 42-59.
 76. Lu, S.C., Bao, Y., Huang, Z.Z., Sarthy, V.P., and Kannan, R. (1999). Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression in retinal Muller cells by oxidative stress. *Investigative ophthalmology & visual science* 40, 1776-1782.
 77. Ma, S.C., Du, J., But, P.P., Deng, X.L., Zhang, Y.W., Ooi, V.E., Xu, H.X., Lee, S.H., and Lee, S.F. (2002). Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus. *Journal of ethnopharmacology* 79, 205-211.
 78. Martens, S., Forkmann, G., Matern, U., and Lukacin, R. (2001). Cloning of parsley flavone synthase I. *Phytochemistry* 58, 43-46.
 79. Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., and Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of nutritional biochemistry* 16, 577-586.
 80. Mates, J.M., Segura, J.M., Perez-Gomez, C., Rosado, R., Olalla, L., Blanca, M., and Sanchez-Jimenez, F.M. (1999). Antioxidant enzymatic activities in human blood cells after an allergic reaction to pollen or house dust mite. *Blood cells, molecules & diseases* 25, 103-109.
 81. McCoubrey, W.K., Jr., Huang, T.J., and Maines, M.D. (1997). Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *European journal of biochemistry / FEBS* 247, 725-732.
 82. McMahan, M., Itoh, K., Yamamoto, M., Chanas, S.A., Henderson, C.J., McLellan, L.I., Wolf, C.R., Cavin, C., and Hayes, J.D. (2001). The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer research* 61, 3299-3307.
 83. Meister, A. (1995). Glutathione metabolism. *Methods in enzymology* 251, 3-7.
 84. Middleton, E., Jr., Kandaswami, C., and Theoharides, T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews* 52, 673-751.
 85. Minamino, T., Christou, H., Hsieh, C.M., Liu, Y., Dhawan, V., Abraham, N.G., Perrella, M.A., Mitsialis, S.A., and Kourembanas, S. (2001). Targeted expression of heme oxygenase-1 prevents the pulmonary inflammatory and vascular responses to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 8798-8803.
 86. Moon, Y.J., Wang, X., and Morris, M.E. (2006). Dietary flavonoids: effects on

- xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In Vitro* 20, 187-210.
87. Motohashi, H., O'Connor, T., Katsuoka, F., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (2002). Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene* 294, 1-12.
 88. Myhrstad, M.C., Carlsen, H., Nordstrom, O., Blomhoff, R., and Moskaug, J.O. (2002). Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free radical biology & medicine* 32, 386-393.
 89. Myhrstad, M.C., Husberg, C., Murphy, P., Nordstrom, O., Blomhoff, R., Moskaug, J.O., and Kolsto, A.B. (2001). TCF11/Nrf1 overexpression increases the intracellular glutathione level and can transactivate the gamma-glutamylcysteine synthetase (GCS) heavy subunit promoter. *Biochimica et biophysica acta* 1517, 212-219.
 90. Nardini, M., Natella, F., and Scaccini, C. (2007). Role of dietary polyphenols in platelet aggregation. A review of the supplementation studies. *Platelets* 18, 224-243.
 91. Nguyen, T., Sherratt, P.J., and Pickett, C.B. (2003). Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annual review of pharmacology and toxicology* 43, 233-260.
 92. Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E., Boelens, P.G., van Norren, K., and van Leeuwen, P.A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition* 74, 418-425.
 93. Ohnuma, T., Komatsu, T., Nakayama, S., Nishiyama, T., Ogura, K., and Hiratsuka, A. (2009). Induction of antioxidant and phase 2 drug-metabolizing enzymes by falcariindiol isolated from *Notopterygium incisum* extract, which activates the Nrf2/ARE pathway, leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Archives of biochemistry and biophysics* 488, 34-41.
 94. Otterbein, L.E., Otterbein, S.L., Ifedigbo, E., Liu, F., Morse, D.E., Fearn, C., Ulevitch, R.J., Knickelbein, R., Flavell, R.A., and Choi, A.M. (2003). MKK3 mitogen-activated protein kinase pathway mediates carbon monoxide-induced protection against oxidant-induced lung injury. *The American journal of pathology* 163, 2555-2563.
 95. Packer, L. (1991). Protective role of vitamin E in biological systems. *The American journal of clinical nutrition* 53, 1050S-1055S.
 96. Piantadosi, C.A. (2008). Carbon monoxide, reactive oxygen signaling, and oxidative stress. *Free radical biology & medicine* 45, 562-569.
 97. Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., and Casini, A.F. (2003).

- The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical pharmacology* *66*, 1499-1503.
98. Pushpavalli, G., Kalaiarasi, P., Veeramani, C., and Pugalendi, K.V. (2010). Effect of chrysin on hepatoprotective and antioxidant status in D-galactosamine-induced hepatitis in rats. *European journal of pharmacology* *631*, 36-41.
 99. Ramos-Gomez, M., Kwak, M.K., Dolan, P.M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P., and Kensler, T.W. (2001). Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 3410-3415.
 100. Reisman, S.A., Yeager, R.L., Yamamoto, M., and Klaassen, C.D. (2009). Increased Nrf2 activation in livers from Keap1-knockdown mice increases expression of cytoprotective genes that detoxify electrophiles more than those that detoxify reactive oxygen species. *Toxicol Sci* *108*, 35-47.
 101. Rezk, B.M., Haenen, G.R., van der Vijgh, W.J., and Bast, A. (2002). The antioxidant activity of phloretin: the disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids. *Biochemical and biophysical research communications* *295*, 9-13.
 102. Rice-Evans, C. (2001). Flavonoid antioxidants. *Current medicinal chemistry* *8*, 797-807.
 103. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology & medicine* *20*, 933-956.
 104. Rushmore, T.H., and Kong, A.N. (2002). Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Current drug metabolism* *3*, 481-490.
 105. Rushmore, T.H., Morton, M.R., and Pickett, C.B. (1991). The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *The Journal of biological chemistry* *266*, 11632-11639.
 106. Sabzevari, O., Galati, G., Moridani, M.Y., Siraki, A., and O'Brien, P.J. (2004). Molecular cytotoxic mechanisms of anticancer hydroxychalcones. *Chemico-biological interactions* *148*, 57-67.
 107. Seelig, G.F., Simonsen, R.P., and Meister, A. (1984). Reversible dissociation of gamma-glutamylcysteine synthetase into two subunits. *The Journal of biological chemistry* *259*, 9345-9347.
 108. Shen, G., Xu, C., Hu, R., Jain, M.R., Nair, S., Lin, W., Yang, C.S., Chan, J.Y., and

- Kong, A.N. (2005). Comparison of (-)-epigallocatechin-3-gallate elicited liver and small intestine gene expression profiles between C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (-/-) mice. *Pharmaceutical research* 22, 1805-1820.
109. Siow, R.C., Sato, H., and Mann, G.E. (1999). Heme oxygenase-carbon monoxide signalling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic actions of bilirubin and carbon monoxide? *Cardiovascular research* 41, 385-394.
110. Soltaninassab, S.R., Sekhar, K.R., Meredith, M.J., and Freeman, M.L. (2000). Multi-faceted regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase. *Journal of cellular physiology* 182, 163-170.
111. Stangl, V., Lorenz, M., Ludwig, A., Grimbo, N., Guether, C., Sanad, W., Ziemer, S., Martus, P., Baumann, G., and Stangl, K. (2005). The flavonoid phloretin suppresses stimulated expression of endothelial adhesion molecules and reduces activation of human platelets. *The Journal of nutrition* 135, 172-178.
112. Stocker, R., and Ames, B.N. (1987). Potential role of conjugated bilirubin and copper in the metabolism of lipid peroxides in bile. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 8130-8134.
113. Surh, Y.J., Kundu, J.K., Na, H.K., and Lee, J.S. (2005). Redox-sensitive transcription factors as prime targets for chemoprevention with anti-inflammatory and antioxidative phytochemicals. *The Journal of nutrition* 135, 2993S-3001S.
114. Tenhunen, R., Marver, H.S., and Schmid, R. (1968). The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 61, 748-755.
115. Vachharajani, T.J., Work, J., Issekutz, A.C., and Granger, D.N. (2000). Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds. *American journal of physiology* 278, H1613-1617.
116. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 44-84.
117. Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions* 160, 1-40.
118. van Iersel, M.L., Verhagen, H., and van Bladeren, P.J. (1999). The role of biotransformation in dietary (anti)carcinogenesis. *Mutation research* 443, 259-270.
119. Venugopal, R., and Jaiswal, A.K. (1996). Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated

- expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 14960-14965.
120. Venugopal, R., and Jaiswal, A.K. (1998). Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene* 17, 3145-3156.
121. Wang, J., and Mazza, G. (2002). Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of agricultural and food chemistry* 50, 850-857.
122. Wang, L., Gaziano, J.M., Norkus, E.P., Buring, J.E., and Sesso, H.D. (2008). Associations of plasma carotenoids with risk factors and biomarkers related to cardiovascular disease in middle-aged and older women. *The American journal of clinical nutrition* 88, 747-754.
123. Wild, A.C., and Mulcahy, R.T. (2000). Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression: insights into transcriptional control of antioxidant defenses. *Free radical research* 32, 281-301.
124. Williams, R.J., Spencer, J.P., and Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free radical biology & medicine* 36, 838-849.
125. Wise, C.D., and Drabkin, D.L. (1964). Degradation of haneoglobin and heme to biliverdin by a new cell-free system obtained from the hemophagous organ of dog placenta. *Fed Proc* 23:323.
126. Wu, C.C., Hsu, M.C., Hsieh, C.W., Lin, J.B., Lai, P.H., and Wung, B.S. (2006). Upregulation of heme oxygenase-1 by Epigallocatechin-3-gallate via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK pathways. *Life sciences* 78, 2889-2897.
127. Wu, D., Meydani, S.N., Sastre, J., Hayek, M., and Meydani, M. (1994). In vitro glutathione supplementation enhances interleukin-2 production and mitogenic response of peripheral blood mononuclear cells from young and old subjects. *The Journal of nutrition* 124, 655-663.
128. Xu, C., Li, C.Y., and Kong, A.N. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of pharmacal research* 28, 249-268.
129. Yang, E.B., Guo, Y.J., Zhang, K., Chen, Y.Z., and Mack, P. (2001). Inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by chalcone derivatives. *Biochimica et biophysica acta* 1550, 144-152.
130. Yang, Y., Chen, Y., Johansson, E., Schneider, S.N., Shertzer, H.G., Nebert, D.W.,

- and Dalton, T.P. (2007). Interaction between the catalytic and modifier subunits of glutamate-cysteine ligase. *Biochemical pharmacology* 74, 372-381.
131. Yang, Y., Dieter, M.Z., Chen, Y., Shertzer, H.G., Nebert, D.W., and Dalton, T.P. (2002). Initial characterization of the glutamate-cysteine ligase modifier subunit Gclm(-/-) knockout mouse. Novel model system for a severely compromised oxidative stress response. *The Journal of biological chemistry* 277, 49446-49452.
132. Yao, M., Zhang, H., Chong, S., Zhu, M., and Morrison, R.A. (2003). A rapid and sensitive LC/MS/MS assay for quantitative determination of digoxin in rat plasma. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 32, 1189-1197.
133. Yet, S.F., Tian, R., Layne, M.D., Wang, Z.Y., Maemura, K., Solovyeva, M., Ith, B., Melo, L.G., Zhang, L., Ingwall, J.S., *et al.* (2001). Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circulation research* 89, 168-173.
134. Young, I.S., and Woodside, J.V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology* 54, 176-186.
135. Zand, R.S., Jenkins, D.J., and Diamandis, E.P. (2000). Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds. *Breast cancer research and treatment* 62, 35-49.
136. Zipper, L.M., and Mulcahy, R.T. (2000). Inhibition of ERK and p38 MAP kinases inhibits binding of Nrf2 and induction of GCS genes. *Biochemical and biophysical research communications* 278, 484-492.
137. Zuckerbraun, B.S., McCloskey, C.A., Mahidhara, R.S., Kim, P.K., Taylor, B.S., and Tzeng, E. (2003). Overexpression of mutated IkappaBalpha inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and intimal hyperplasia formation. *J Vasc Surg* 38, 812-819.