

國立臺灣大學醫學院生物化學暨分子生物學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Biochemistry and Molecular Biology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

α -次亞麻油酸和二十碳五烯酸抑制

人類神經瘤細胞株SH-SY5Y之

acyl CoA oxidase基因表現

α -Linolenic acid and eicosapentaenoic acid

down-regulate the expression of acyl CoA oxidase

in human neuroblastoma SH-SY5Y cell line

伍君尹

Chun-Yin Wu

指導教授：呂紹俊 博士

Advisor: Shao-Chun Lu, Ph.D.

中華民國 九十九年六月

June, 2010

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

次亞麻油酸和二十碳五烯酸抑制
人類神經瘤細胞株 SH-SY5Y 之
acyl CoA oxidase 基因表現

α -Linolenic acid and eicosapentaenoic acid
down-regulate the expression of acyl CoA oxidase in
human neuroblastoma SH-SY5Y cell line

本論文係伍君尹君（學號 R97442019）在國立臺灣大學醫學院生物化學暨分子生物學研究所完成之碩士學位論文，於民國九十九年六月三十日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

呂紹俊

（簽名）

（指導教授）

黃伯超

蘇慧敏

蔡青堉

姜安娜

所長

周綠蘋

（簽名）

謝誌

研究所生涯接近尾聲，首先要感謝我的指導教授呂紹俊老師兩年來的指導，解決我實驗上遇到的瓶頸以及修正我錯誤的觀念，及時引導我至正確的方向，使我的碩士論文得以完成。接著感謝黃伯超老師、黃青真老師、姜安娜老師及蘇慧敏老師在百忙之中撥冗審閱論文，並給予我許多建議，讓我能以更多元的角度思考事情，使我獲益良多。

很幸運能進入這間實驗室，擁有一起做實驗的好夥伴。首先，感謝苑怡學姊這兩年來無微不至的照顧，耐心的教我做實驗，總不忘記提醒我很多該注意的小細節，不厭其煩的回答我每一個問題，以後如果有事情找我幫忙不用客氣喔！感謝人睿學姊對我的幫助，那段陪我做實驗、陪我想辦法和聽我訴苦的日子真的很不賴，希望你能夠早日達到自己的夢想。感謝怡潔學姊時常鼓勵我，讓我又充滿自信了，妳的關心總是讓我倍感溫馨，有機會的話再一起享受美食吧！全身充滿笑點的高振壹學長做起事來謹慎不含糊，你給的電影畫質都超棒的，謝謝你教我實驗上的小技巧。小賴學長總是笑口常開又很好相處，感謝你在實驗上對我的一切幫助，雖然我常常對你沒大沒小，但是我是很尊敬你的啦，趕快跟老大結婚吧！子慶學長常常分享自己有趣的人生經驗，祝你們博士班研究順利！

與我相處時間最久的菜菜，每天幾乎見面超過十二個小時，不論是實驗或是生活上的大小事都能跟你分享一起討論並交換意見，很珍惜這段友情，即將邁入各自的人生旅程，我相信我們不會忘記彼此的！小白脾氣真的超好，請原諒我對你很多不合理的要求，謝謝你兩年來的幫忙，我會銘記在心，希望有朝一日可以喝到你的喜酒！陳福來真是個運動好手，謝謝你教我們打籃球以及帶我們去吃美食。黃正忠真是借抗體好管道，我會很懷念我們常常一起吃飯一起八卦的那段時光，謝謝你和小白帶我們嚐盡嗨啾的所有口味。感謝周芳在實驗上給我的幫助，雖然身處在不同實驗室，但是不管多晚都可以在學校看到妳忙碌的身影，有妳在讓我在實驗上安心不少。一起來台北打拼的陳思縈，自從我認識妳來好像常常在

比誰笨誰迷糊，真的很高興擁有你這個外表看似小孩，思考卻十分成熟的心情垃圾桶，研究所的日子雖然讓你歷經滄桑，但是我相信樂觀的你一定不會被打倒的。還有邢郁婷及秀萍學姊，我知道你們一直在遠方替我加油打氣。特別感謝陳佳琪帶我們兩個阿宅全台北走透透。雜貨店老闆娘林偲涵，妳真的很可愛耶，只要我們兩個一起做實驗就會失敗，希望未來可以打破這個魔咒，妳要加油喔！楊惠晴對事情很有主見，我喜歡妳爽朗的個性，毫無原則的我應該要向妳學習才是。人面獸心楊禮禪，希望你可以獲得全世界的雌性生物，正經八百的樣子卻常常有很搞笑的舉動，認識你真的很快樂！獸面人心簡仲豪，聽到你從澳洲凱旋歸來的好消息真替你高興，希望你能保住那一排透天厝的繼承權。黎懷慈跟我一樣對特賣會難以抗拒，所以我們一定要賺大錢！另外新來的林詩珊和羅凱晏歡迎你們加入這個大家庭。

最後，感謝我親愛的家人，越來越年輕的阿爸跟阿母總是常常跑到台北來看我，怕我餓怕我渴怕我冷怕我累，雖然嘴巴上不說但是我知道你們心裡真的很疼愛我，感謝你們的支持，讓我順利讀完研究所，希望我永遠都是令你們感到驕傲的女兒。身在日本與我一起為碩士論文奮鬥的大姊，謝謝妳的關心祝妳順利畢業，也謝謝伍小妹抽空陪我打屁聊天，家裡有妳照顧讓我放心不少。感謝郭小辰七年來的陪伴，包容我的一切壞脾氣，雖然我們相處時間不多，但我知道我們都是為了同一個人生目標在努力，期待有你的未來。

最後僅以本論文獻給我愛的人及愛我的人，將台大碩士學位的榮耀一起分享給你們。

目錄

口試委員會審定書	i
謝誌	ii
中文摘要	viii
英文摘要	x
第一章 緒論	
第一節 文獻回顧	2
第二節 研究動機與實驗目的	11
第二章 材料與方法	
第一節 實驗材料	13
第二節 試劑配製	14
第三節 細胞培養	17
第四節 脂肪酸之配製	17
第五節 脂肪酸組成分析	19
第六節 細胞基因mRNA表現量測定	20
第七節 以西方墨點法(Western blot)進行細胞內蛋白質表現分析	22
第八節 細胞genomic DNA抽取	25
第九節 質體的建構	26
第十節 Reporter gene活性表現分析	30
第三章 實驗結果	
第一節 肝細胞中ALA代謝及DHA合成情形	33
第二節 神經細胞中ALA代謝及DHA合成情形	34
第三節 AOX基因轉錄調控	35
第四節 神經細胞中EPA與PPAR對於影響AOX基因表現的關係	36

第四章 討論	
第一節 肝細胞對於DHA合成率低的原因探討	38
第二節 $\Delta 6$ -desaturase調控機制.....	38
第三節 神經細胞對於DHA合成率低的原因探討	39
第四節 AOX調控機制	40
第五節 EPA影響AOX表現之可能生理意義.....	42
第六節 總結	42
第五章 圖表	44
補充	61
參考文獻	64



圖表目錄

Figure 1.	Changes of ALA, EPA, DPA, and DHA in total lipids of HepG2 cells incubated with increasing amounts of ALA in the medium.....	45
Figure 2.	Effect ALA on the abundance of the hepatic Δ -6 desaturase, AOX and DBP transcripts in HepG2 cells.....	46
Figure 3.	Content of ALA, EPA, DPA, and DHA in total lipids of HepG2 cells incubated in medium supplemented with 10-60 μ M EPA.	47
Figure 4.	Effects of EPA on the mRNA levels of Δ -6 desaturase, AOX and DBP in the HepG2 cells.....	48
Figure 5.	Changes of the ALA, EPA, DHA and DPA in the total lipids from SH-SY5Y cells culture with increasing concentrations of ALA.....	49
Figure 6.	Changes in the neuron abundance of Δ -6 desaturase, AOX and DBP mRNA in response to ALA in SH-SY5Y cells.	50
Figure 7.	Changes of ALA, EPA, DPA, and DHA in total lipids of SH-SY5Y cells after supplementation with increasing concentrations of EPA.	51
Figure 8.	Effect of various concentrations of EPA on mRNA levels of Δ -6 desaturase, AOX and DBP in SH-SY5Y cells.....	52
Figure 9.	Time-course effect of EPA on mRNA expression of AOX in SH-SY5Y cells.	53
Figure 10.	Protein levels of AOX in SH-SY5Y cells treated with EPA for 48h.....	54
Figure 11.	Regulation of the human AOX promoter activity by EPA and ALA in SH-SY5Y cells.....	56
Figure 12.	Protein levels of AOX in HepG2 cells treated with EPA for 48h.....	57
Figure 13.	Regulation of the human AOX promoter by PPAR agonist, EPA or DPA in	

HepG2 cells.....	58
Figure 14. Change of AOX protein level in response to WY14643, L165041 or Rosiglitazone treatment in the SH-SY5Y cells.....	59
Figure 15. Transcription activity of rPPAR by either PPAR agonist or PUFA in SH-SY5Y cells.....	60



摘要

長鏈多元不飽和脂肪酸(Long-chain polyunsaturated fatty acids, PUFAs)包含 AA(arachidonic acid)、EPA(eicosapentaenoic acid)及 DHA(docosahexaenoic acid)，參與許多生理功能，包括腦部的發育、認知、生殖、發炎反應及身體穩定性。DHA 是視網膜及腦部的細胞膜上磷脂質重要的組成份，在嬰兒早期發育過程中會快速累積於這些組織器官。DHA 可直接由飲食中的脂肪提供，或者由它的代謝前驅物 ALA(α -linolenic acid)或 EPA 合成而來。首先，ALA 先在內質網中合成 EPA、DPA(docosapentaenoic acid)及 THA (tetracosahexaenoic acid)，接著 THA 會被運送到過氧化體，經過一次 β -oxidation 作用形成 DHA。肝臟被視為 PUFA 代謝的重要器官，它會將新合成好的 DHA 送至視網膜及腦部以供利用；另一方面，有研究指出腦部會轉換 ALA 成 EPA 及 DHA 以維持其在細胞膜中的濃度。然而，不論是在肝臟或是腦部，從 ALA 或 EPA 轉換來的 DHA 量都非常低，但原因至今並不清楚。

動物細胞中，這些 *n*-3PUFAs 的含量和參與代謝的酵素活性有關，例如 desaturases、elongase、acyl CoA oxidase (AOX)，分別在 ALA 及 EPA 轉換上扮演不同的角色。先前研究指出此代謝途徑在細胞中並不活躍，但其機制尚未被研究透徹，目前推論 Δ -6 desaturase 和 AOX 也許催化途徑中的速率決定步驟。在這個研究中我們使用了兩種細胞株，分別是 HepG2 (human hepatoma cell line)和 SH-SY5Y (human neuroblastoma cell line)，我們想知道給予 ALA 或 EPA，在兩種細胞中 *n*-3PUFA 代謝情形，以及參與此代謝步驟重要酵素之基因表現情況。我們發現在 HepG2，EPA、DPA 和 DHA 的濃度並不會隨著 ALA 給予而增加；但若給予細胞 EPA 時，DPA 的濃度會上升，並且有 dose-response 的情形，但 DHA 的含量並不會提高。在基因表現層次，不論是給予高濃度 ALA 或是 EPA，HepG2 細胞中 Δ -6 desaturase 的基因表現減少。然而，在 SH-SY5Y 中，DPA 的濃度會隨著 ALA 或 EPA 給予而增加，而 DHA 的含量有些微下降，表示從 ALA 代謝到 DPA 的過程較不受限制，但卻代謝到 DHA 的量非常少。由 mRNA 表現來看，ALA 或是 EPA

皆會明顯抑制 AOX 基因表現。接著我們想要了解 SH-SY5Y 隨著 EPA 處理時間延長，AOX 之基因表現是否持續降低，time-course 實驗結果顯示，SH-SY5Y 中 AOX 會持續受 EPA 抑制至 96 小時。而我們利用 Western blot 發現當 EPA 添加濃度增加，AOX 蛋白表現量也呈現減少的趨勢。我們想要探討此抑制作用是否透過 AOX 起動子上 PPRE 序列，將 AOX-promoter Luciferase 報導基因轉染至 SH-SY5Y 中，在加入 EPA 或 ALA，結果顯示 EPA 及 ALA 會降低 luciferase 的活性。但在 HepG2 中，我們發現 EPA 及 PPAR agonist 會促進 AOX 起動子的轉錄活性，而 EPA 也會提高 AOX 蛋白的表現量，顯示在 HepG2 中，PPAR 會受 EPA 及 agonist 活化，促進 AOX 表現。因此，我們想繼續了解 SH-SY5Y 中 AOX 的基因轉錄是否和 HepG2 同樣受 PPAR 調控，以 PPAR α 、 γ 、及 δ 的 agonist 分別添加到 SH-SY5Y 培養液中，發現三種 PPAR agonist 都會些微促進 AOX 蛋白表現；而以 PPAR-luciferase 報導系統的實驗顯示，EPA 會透過到三種 PPARs 提高 Luciferase 活性，但是相較於 PPAR agonists，EPA 活化 PPARs 的能力較差，因此 EPA 應該不是透過 PPAR 抑制 AOX 蛋白表現。綜合以上結果我們推測，HepG2 細胞株中 DHA 合成率低的部分原因可能是因為 ALA 及 EPA 抑制了 Δ -6 desaturase；而 SH-SY5Y 細胞株中由於 ALA 及 EPA 抑制了 AOX 表現，因此可能是導致 DHA 合成受阻的原因之一，我們的結果也顯示 EPA 對於 AOX 抑制作用並不是透過 PPAR。

關鍵詞：ALA 和 EPA 的轉換、DHA、AOX、 Δ -6 desaturase、PPAR

Abstract

Very long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) such as arachidonic acid (AA, C20:4*n*-6), eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5*n*-3), and docosahexaenoic acid (DHA, C22:6*n*-3) are essential for a variety of biological functions including brain development, cognition, reproduction, inflammatory responses, and homeostasis. DHA is an important component of membrane phospholipids in the retina and brain and accumulates rapidly in these tissues during early infancy.

DHA is directly provided by dietary fats or is synthesized from its metabolic precursors, α -linolenic acid (ALA, C18:3*n*-3), and EPA. The conversion of ALA, the essential dietary precursor, occurs in the endoplasmic reticulum (ER), producing the long-chain metabolites EPA, DPA and tetracosahexaenoic acid (THA, C24:6*n*-3). Then THA is transferred to the peroxisomes to be shortened to DHA through one cycle of β -oxidation. Liver has been considered the primary site for the production of long chain PUFAs, and ALA conversion in liver is a major source of newly synthesized DHA for supply to the periphery. In addition, ALA conversion in brain may be important for maintaining membrane EPA and DHA concentrations. However, formation of DHA from ALA or EPA is very low in both liver and brain, and the mechanisms responsible for the low conversion of ALA and EPA to DHA remains unclear.

The content of *n*-3PUFAs in mammalian cells depends on the activity of the desaturases, elongase, and acyl CoA oxidase (AOX), these enzymes also involved in the synthesis of DHA from ALA or EPA. In general, the Δ -6 desaturase and AOX were considered as the rate limiting steps in the conversion. In this study we used HepG2 (human hepatoma cell line) and SH-SY5Y (human neuroblastoma cell line) as in vitro models to examine the conversion of *n*-3 fatty acids after supplementation of ALA or EPA. We also quantified the mRNA levels of gene encoding these enzymes. We found that EPA, DPA, and DHA were not increased when HepG2 cells were cultured with

increasing amount of ALA. In addition, only DPA was linearly increased when EPA was supplemented in the medium. The Δ -6 desaturase mRNA abundance decreased in response to supplementation of ALA or EPA in HepG2 cells. Different from that in HepG2, the content of DPA was increased when SH-SY5Y cells were cultured with addition of ALA or EPA, but DHA was decrease slightly. The results suggest that synthesis of DPA from ALA or from EPA was an active process in SH-SY5Y cells. Our data further show that AOX mRNA was down regulated by both ALA and EPA. Time-course study showed AOX mRNA expression was inhibited by EPA up to 96h. In addition, our data also showed decrease of AOX protein levels by EPA in SH-SY5Y cells. We then investigated the effect of EPA on AOX expression in cells transfected with AOX promoter-Luciferase reporter plasmid. The result showed that luciferase activity was decreased by EPA and ALA in SH-SY5Y cells. But in HepG2 cells, AOX-Luciferase was induced by EPA and by agonist of PPAR α , γ or δ . The AOX protein level was also up regulated by EPA in HepG2 cells. The result support that EPA and PPARs induce AOX expression in HepG2 cells. We further tested if the effect of PPAR agonists on AOX in SH-SY5Y cells. The results show that all agonists of the PPAR α , γ and δ isoforms induce AOX protein expression in SH-SY5Y. These results suggest that EPA down regulates AOX expression is not through a PPAR dependent pathway. Taken together, our data showed that expression of Δ -6 desaturase was inhibited by ALA and EPA in HepG2 cells, and may responsible for the low conversion rate of ALA to longer *n*-3 fatty acids. On the other hand, inhibition of AOX mRNA and protein levels by ALA or EPA in SH-SY5Y cells, may be the reason, at least in part, for the low synthesis of DHA from ALA or DHA. Our results further suggest that the inhibitory effect of EPA on AOX expression is probably through an PPAR independent pathway.

Key words : Conversion of ALA and EPA 、 DHA 、 AOX 、 Δ -6 desaturase 、 PPAR

第一章 緒論



第一節 文獻回顧

一、多元不飽和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acids, PUFA)

在二十世紀初，特定的多元不飽和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFA)在飲食上的重要性已被報導。其中次亞麻油酸(α -linolenic acid, ALA, C18:3 n -3)及亞麻油酸(linoleic acid, LA, C18:2 n -6)因人體缺乏酵素合成，因此需要從飲食攝取中獲得，被稱為必須脂肪酸(essential fatty acids, EFAs) (Lauritzen et al., 2001)。這兩種脂肪酸分別被視為是 n -3 系列脂肪酸及 n -6 系列脂肪酸之前驅物，經由去飽和(desaturation)及延長(elongation)等作用後，會代謝出其他不飽和脂肪酸。這些生化反應需經過一連串的酵素催化，而研究顯示這兩種系列脂肪家族不僅可以由同一種酵素系統作用，更有彼此競爭的情形(Roynette et al., 2004)。大多數的動物沒有將 n -6 系列脂肪酸轉換成 n -3 系列脂肪酸的能力，因此飲食中這兩種脂肪酸佔的比例(ratios of n -3 and n -6 fatty acids)就十分重要，如果失衡可能就會導致相關發炎反應或是心臟方面的疾病(Calder, 2004)。

多元不飽和脂肪酸是神經細胞及視網膜細胞膜上重要的組成分，且在中樞神經系統功能(CNS)上扮演重要的角色(Salem et al., 2001)。有研究指出，在人體大腦皮層灰質中二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic acid, DHA, 22:6 n -3) 佔總脂肪酸組成約 7.2%(Hamano et al., 1996)，佔總磷脂質脂肪酸組成約 30%-40%(Lauritzen et al., 2001)，是神經系統細胞膜中最主要的脂肪酸。而 DHA 具有保護神經系統的功能，除了可以調節神經細胞膜的流動性，也可以藉此調節細胞內的訊息傳遞(Stillwell et al., 2005)，另外也會與核受器結合調控基因表現(Sampath and Ntambi, 2005)，或是影響神經傳導物質的合成及分泌(McNamara and Carlson, 2006)。

二、 n -3 PUFA的代謝轉換及DHA的合成

DHA可以直接由飲食中的魚油和海藻攝取而來，也可以經由代謝前驅物合成，例如：ALA 或 EPA。ALA 會在內質網(endoplasmic reticulum, ER)經

$\Delta 6$ -desaturase、elongase、 $\Delta 5$ -desaturase作用，形成二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA, C20:5n-3)，接著再經由elongase作用，形成二十二碳五烯酸(docosapentaenoic acid, DPA, C22:5n-3)及二十四碳五烯酸(tetracosapentaenoic acid, C24:5n-3)，之後再由 $\Delta 6$ -desaturase第二次催化，形成二十四碳六烯酸(tetracosahexaenoic acid, THA, C24:6n-3)。此時THA會被運送到過氧化體(peroxisome)，由一連串的酵素作用下，會經過一次 β -oxidation，去除兩個碳之後代謝成DHA，這個整過程也可稱為ALA及EPA的轉換(conversion of ALA and EPA) (Figure A) (Langelier et al., 2005)。

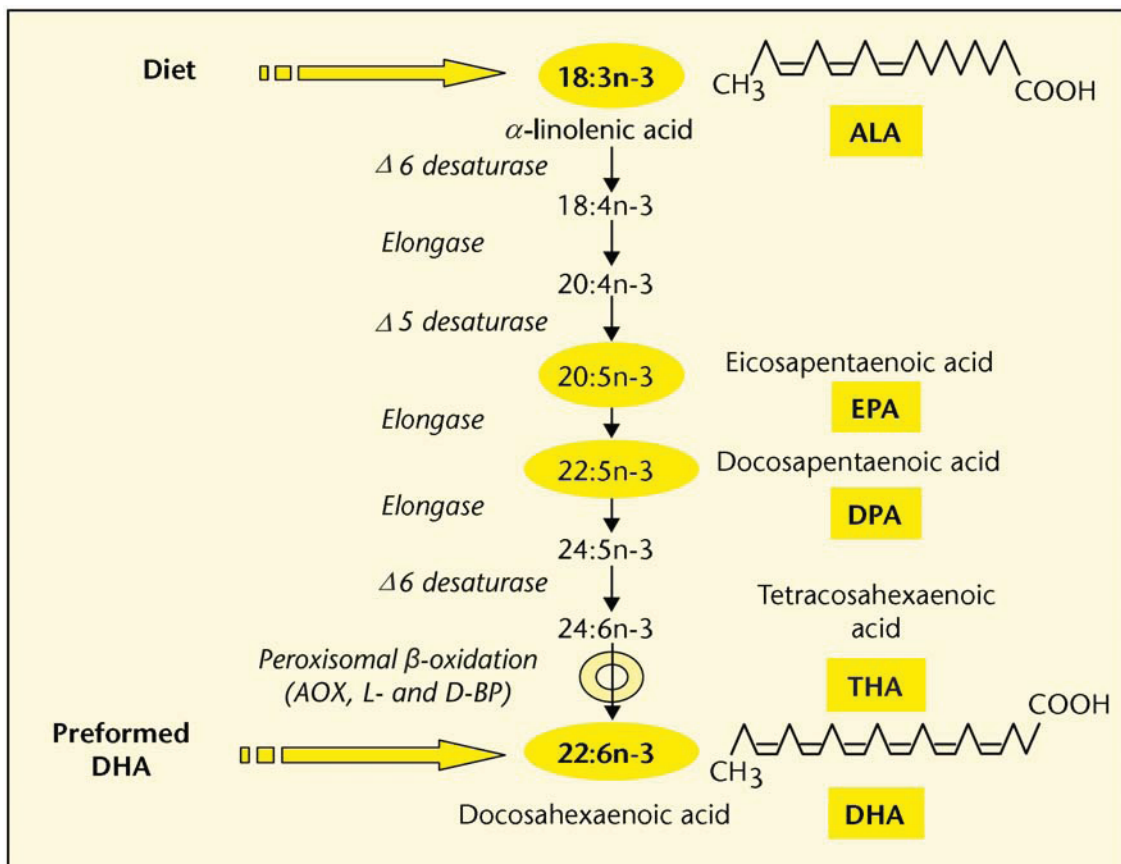


Figure A. DHA合成途徑

n-3 PUFA的轉換在肝臟中扮演之角色

肝臟被視為是脂質合成及代謝中心，在1966年就有學者利用大鼠的肝臟分離出微粒體(microsomes)來研究ALA的代謝過程，結果證明肝臟含有 desaturation 及

elongation所需要的酵素(Brenner and Peluffo, 1966)。嬰兒發育過程中，肝臟會代謝 *n*-3 PUFA生成DHA，經由極低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)運輸，以提供腦部及視網膜細胞膜之合成(Scott and Bazan, 1989)。另外有研究顯示給予成年女性[1-¹³C]ALA持續21天後抽取血液樣本分析，可發現含有放射線標定的EPA及DHA分布在磷脂膽鹼(phosphatidylcholine, PC)上，顯示PC在脂肪酸運輸的必要性。其他周邊組織器官，例如：腎臟及胰臟，因參與*n*-3 PUFA代謝的酵素表現量較低，所以ALA及EPA在肝臟轉換及運輸過程更顯重要(Burdge and Wootton, 2002)。

n-3 PUFA的轉換在神經系統中扮演之角色

在人體的腦部中，ALA及EPA轉換成DHA這個過程是值得探討的，因為這個器官含有高濃度的DHA，但是ALA或者其他的脂肪酸像EPA及DPA，含量則是非常低(Sheaff Greiner et al., 1996)。在1971年有研究指出[1-¹⁴C]ALA會通過血腦障壁(blood-brain barrier)，表示在CNS可能會有ALA轉換成DHA的發生(Dhopeswarkar et al., 1971)。五年後這個研究團隊又再次證明大鼠顱內注射[1-¹⁴C]ALA後，會成功轉換成DHA，表示腦部如同肝臟也會進行desaturation及elongation的作用(Dhopeswarkar and Subramanian, 1976)。而腦部代謝ALA的目的主要是用於維持其細胞膜上EPA及DHA的含量(Burdge and Wootton, 2002)；另外，合成的DHA也可作為神經系統保護的物質(Florent-Bechard et al., 2007)。

三、*n*-3 PUFA的轉換活性

動物實驗

給予ALA或EPA飲食是否能提升組織DHA含量到現在仍有爭議，動物實驗指出，若餵食天竺鼠或大鼠富含ALA之飼料(ALA佔總脂肪酸7%)，DHA會累積在心臟(Abedin et al., 1999; McLennan and Dallimore, 1995)及肝臟的細胞膜(Kim and Choi, 2001)。但是在大鼠的動物模式卻發現，若持續給予ALA飼料(ALA佔總脂肪

酸8.5%)長達八週，肝臟及心臟的DHA不會有顯著的改變(Barcelo-Coblijn et al., 2005)。餵食倉鼠(Fiaccavento et al., 2006)及兔子高ALA飼料(ALA佔總熱量15%及10%)，心臟中只有ALA和EPA的含量會增加(Ander et al., 2004)，動力學研究(kinetic study)顯示心臟不會將[1-¹⁴C]ALA延長成THA(Igarashi et al., 2008)，可能是心臟缺乏elongase-2的表現所致(Wang et al., 2005)。另外，大鼠餵食高ALA飼料(ALA佔總熱量4%)後，會增加ALA在腦部及肝臟的累積，但是無法測量到DHA含量的提升(Bowen and Clandinin, 2000; Spady, 1993)，而另外也有其他研究顯示DHA會累積在餵食ALA飼料的動物腦部(Abedin et al., 1999; Barcelo-Coblijn et al., 2005; Barcelo-Coblijn et al., 2003)。而餵食大鼠富含EPA飼料(EPA佔總脂肪酸4.1%)，其血液及脾臟的白血球細胞中EPA含量提高，但是ALA及DHA濃度並無明顯改變(Peterson et al., 1998)。而餵食小鼠富含EPA飼料(EPA佔總脂肪酸4.4%)，其脾臟磷脂質EPA含量增加，DHA含量則是有些微降低的情形(Kew et al., 2003)。另一大鼠動物模式顯示，飼料中隨著EPA餵食比例增加(EPA佔總脂肪酸1.4-8.1%)，其血液及肝臟磷脂質中的EPA及DPA含量會隨之增加，而DHA僅有些微增加(Nassar et al., 1986)。由兔子取得的平滑肌細胞作初代培養，當給予90 μ M ALA時，其磷脂乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)中僅有ALA含量上升，而EPA、DPA及DHA含量無明顯改變，若給予EPA時，PE中EPA及DPA所佔的比例皆會提升(Morisaki et al., 1985)。這些結果顯示，體內ALA及EPA轉換成DHA的效率仍不確定，需要進一步探討。

人體實驗

由於飲食的差異、試驗執行的時間、試驗個體的配合度及人體組織取得的限制，使得人體試驗較動物試驗更是困難很多。而試驗樣品主要是血液分析，例如：全血、脂蛋白、紅血球及嗜中性白血球中脂肪酸組成的變化。雖然血液分析不適合用來評估腦部的情況，但是它可以大約顯示出肝臟及心臟中代謝的改變。給予

試驗者每天30mL或是27g的亞麻油(flax seed oil)，大約是每天給予14g的ALA，四周後發現血液裡的三酸甘油酯及膽固醇酯中的ALA含量上升5.7倍及4倍，而EPA只有些微的上升，但是完全看不到DHA的改變(Schwab et al., 2006)。給予致動脈粥狀硬化脂蛋白表現型 (atherogenic lipoprotein phenotype)的病患每天15g的ALA補充，血液和紅血球中ALA及EPA的含量會上升，但是DHA濃度卻沒有改變(Wilkinson et al., 2005)。另一實驗顯示，成人每天給予3g的ALA補充持續十二周，可提升血液中EPA及DPA含量，但是不會改變DHA濃度(Harper et al., 2006)。健康成人攝取富含EPA的魚油(EPA佔52.8%)持續四周，血液中EPA含量上升，而ALA及DHA無顯著改變(Kew et al., 2004)。另外也有研究顯示，健康成人每天給予3g的EPA補充三周，血液中EPA含量上升，而DHA無顯著改變(Rambjor et al., 1996)。健康成人每天食用9g EPA-rich oil(含EPA 720mg)，四周後血液磷脂質中EPA與DPA含量上升，而DHA仍無顯著改變(Buckley et al., 2004)。雖然普遍認為人體可以進行ALA和EPA代謝以合成碳鏈數較長的脂肪酸，但是研究證實由前驅物轉換成DHA效率很低，不過因缺乏進一步機制的印證，所以此議題到目前為止還是備受爭議。

四、*n*-3 PUFA的代謝參與酵素之基因研究

Desaturation and elongation in ER

ALA在內質網的代謝過程中，有兩個比較重要的酵素參與，分別是 $\Delta 5$ -desaturase及 $\Delta 6$ -desaturase，1989年就有學者發現肝臟具有此兩種酵素的活性(Scott and Bazan, 1989)。這兩個酵素會因為飲食型態或是荷爾蒙狀態的改變而受到調節，例如：罹患糖尿病的大鼠若給予胰島素的治療，則會提高其肝臟 $\Delta 6$ -desaturase的活性(Igal et al., 1991)。另外，兩種desaturase的起動子上都含有固醇調節序列(sterol regulatory element, SRE)，當中的E-box element會被其結合蛋白(sterol regulatory element-binding proteins-1, SREBP-1)調節(Matsuzaka et al., 2002)。SREBP-1是存在於膜的轉錄因子(membrane-bound transcription factor)，屬於basic

helix-loop-helix leucine zipper family；當其受活化時，此蛋白會進行切割並進入到核內調控與膽固醇或是脂肪酸合成相關的基因轉錄(Brown and Goldstein, 1997)。也有研究顯示出elongase-2 (Elo-2)也是整個代謝過程的關鍵角色(Horton et al., 2003; Wang et al., 2005)，它可以延長16-22個碳的脂肪酸，並且也是受SREBP-1調節(Moon et al., 2001)。

β -oxidation in peroxisome

早在1976年就有研究顯示細胞內 peroxisome 具有類似 mitochondrial 之 β -oxidation 的能力，參與脂質代謝的過程(Lazarow and De Duve, 1976)。Zellweger syndrome 是一種過氧化體生合成的疾病(peroxisome biogenesis disorder)，罹病的病患缺乏 peroxisome 的活性而造成其腦部、視網膜、肝臟及腎臟中DHA的濃度較低(Martinez, 1992)。而有學者利用 newborn PEX5 knockout mice 當作 Zellweger syndrome 動物模式，發現此小鼠腦部DHA含量低於正常小鼠40%(Janssen et al., 2000)。另外，正常人類的纖維母細胞可以將 $[1-^{14}\text{C}]$ ALA代謝成具有放射線標定的THA及DHA，但是罹患Zellweger syndrome病人的纖維母細胞只能將 $[1-^{14}\text{C}]$ ALA代謝成THA，無法代謝到DHA(Moore et al., 1995)。上述的研究皆可證明Peroxisomal β -oxidation是DHA合成的關鍵步驟。

Peroxisomal β -oxidation 具有氧化超長鏈脂肪酸(very long-chain fatty acids, VLCFA)的能力，例如：hexacosanoic acid (C26:0)或tetracosanoic acid (C24:0)。而負責氧化THA的三個酵素分別為 straight-chain acyl-CoA oxidase (AOX)、D-bifunctional protein (DBP)、3-ketoacyl-CoA thiolase 或 sterol carrier protein X (SCPx)。進入 peroxisome 的受質不需要經由carnitine，但是需要藉由ATP-binding cassette transporters運送，例如：ALD protein。而 peroxisomal β -oxidation 不會降解脂肪酸整個碳鏈，只會進行幾個cycle的氧化使其碳鏈縮短，之後可送至粒腺體進行完全的氧化(Hashimoto, 1999)。

五、Acyl CoA oxidase(AOX)

在Peroxisomal β -oxidation過程中，Acyl CoA oxidase(AOX)是第一步驟催化酵素，它為一種黃素蛋白(flavoprotein)，與FAD結合並形成蛋白二聚體(dimer)，和粒線體中的acyl-CoA dehydrogenases屬於同一個超級家族(superfamily)。此家族蛋白結構具有共同的特徵，在中心位置的 β -strand domain連接著 α -helical domain，以提供FAD鍵結(Bhaumik et al., 2005)。酵素催化過程中，電子會藉由蛋白中的FAD直接傳遞給氧而產生過氧化氫(H_2O_2)，同時使受質去氫化(dehydrogenation)。在人體中存在有兩種AOX，分別是AOX1及AOX2，AOX1對於VLCFA-CoA具有特異性，而AOX2主要是作用在支鏈脂肪酸(branched-chain fatty acids)(Vanhove et al., 1993)。

六、Acyl CoA oxidase(AOX)的調控及相關轉錄因子

過氧化體增殖活化受器(peroxisome proliferator activated receptor, PPAR)

過氧化體增殖活化受器(peroxisome proliferator activated receptor, PPAR) 是類固醇荷爾蒙核受器(steroid hormone nuclear receptor)家族的一員，其蛋白質序列也類似於其它核受器，結構上主要是由4個functional domain組成，包括A/B、C、D、E/F。N端的A/B domain具有ligand-independent transactivation的功能，稱之activation function 1(AF-1)；C domain為高度保留的區域，具有type II zinc finger DNA binding motif結構，為DNA binding domain(DBD)；D domain又稱為hinge domain，連接DBD及LBD；C端的E/F domain又稱ligand binding domain(LBD)，具有ligand-dependent transactivation的功能，稱之activation function 2(AF-2)。因此PPAR是受ligand結合活化的轉錄因子，當ligand進入細胞與PPAR結合，活化的PPAR會與另一類固醇荷爾蒙成員9-cis retinoic acid X receptor(RXR)形成heterodimer，共同辨識結合在基因促進區上之DNA特定序列，此序列稱作過氧化體增殖受器反應序列(peroxisome proliferator responsive element, PPRE)，繼而調控PPAR下游的基因表現。

PPAR有三種isoforms，不同isoform之表現具有組織特異性，且具不同之生理

功能(Desvergne and Wahli, 1999)。分別為：

- 1、PPAR α ：主要表現在肝臟及棕色脂肪組織，其次為腎臟、心臟及骨骼肌等，參與脂質代謝調控。
- 2、PPAR δ ：又稱PPAR β ，廣泛表現在各種組織器官，與胚胎發育、腦部功能及皮膚角質分化有關。
- 3、PPAR γ ：可區分為 γ 1及 γ 2，差異在 γ 2的N端較 γ 1多出30個胺基酸；PPAR γ 1於肝臟、心臟、脂肪等組織皆有表現， γ 2則專一表現於脂肪組織，調控脂肪細胞分化。

過氧化體增殖受器反應序列(peroxisome proliferator responsive element, PPRE)

Tugwood等學者利用methylation interference assay的技術，在AOX基因5'啟動子(promoter)上發現一段能與過PPAR結合的序列：TGACCTNTGTCCT(direct repeat, DR-1)，這段序列與其他steroid hormone nuclear receptor已知的反應序列(responsive element)相似，此為第一個被鑑定出來的PPRE (Tugwood et al., 1992)，後經證實，PPAR所活化的下游基因promoter序列中，都具有同質性很高的DR-1。除了AOX之外，目前已知含有PPRE之基因有：高密度脂蛋白 (High density lipoprotein, HDL) 上的apolipoprotein A-I (ApoA-I)、apolipoprotein A-II (ApoA-II)；位於血管內皮上的lipoprotein lipase(LPL)；細胞內的liver fatty acid binding protein (L-FABP)、adipocyte fatty acid bind protein(aP2)、acyl-CoA binding protein(ACBP)、malic enzyme、phosphoenolpyruvate carboxykinase(PEPCK)；peroxisome中的acyl-CoA synthetase (ACS)、3-ketoacyl-CoA thiolase；微粒體中的cytochrome P450 4A(CYP 4A)；粒線體中的acyl-CoA synthetase (ACS)、medium chain acyl-CoA dehydrogenase、HMG-CoA synthase(HMGS)，上述這些酵素或蛋白質的表現皆會受到PPAR的調控(Schoonjans et al., 1996a, b)。

脂肪酸與PPAR、PPRE的關係

研究指出，餵食大鼠高脂飼料(Neat et al., 1980)，和在脂肪酸過多的生理狀態下(Orellana et al., 1992)，會刺激肝臟Peroxisome之 β -oxidation及其增殖。因此脂肪酸被認為可能是PPAR的內生性活化物質，而隨後也有研究顯示，脂肪酸能活化不同的PPAR(Gottlicher et al., 1992; Keller et al., 1993)。另一研究顯示，除了短鏈脂肪酸(碳數小於10)、極長鏈單元不飽和脂肪酸和十二烷酸(dodecanedioic acid)外，幾乎所有脂肪酸均能在transcriptional transactivation assay中活化PPAR(Bocos et al., 1995)。同年，有學者餵食大鼠高脂肪飼料，或是給予primary hepatocytes非代謝性的脂肪酸(nonmetabolized fatty acid) α -bromopalmitate，會使AOX mRNA表現量增加(Berthou et al., 1995)。PPAR α -deficient (PPAR α -/-) 小鼠餵食富含PUFA飼料，會失去促進肝臟AOX mRNA表現的能力(Ren et al., 1997)，上述研究顯示脂肪酸也許是透過PPAR的作用調控基因表現。另外，餵食動物魚油後會促進肝臟peroxisomal β -oxidation之相關基因，例如：AOX，因此可以降低血液中三酸甘油酯濃度(Halminski et al., 1991)，有些證據顯示，EPA和DHA可以活化PPAR α ，促進其標的基因的表現，因此EPA被視為是PPAR α 的agonist(Desvergne, 2007)。

第二節 研究動機與實驗目的

一、研究動機

DHA合成比例的原因到現在還不是很清楚，第一種可能是ALA在代謝過程中，會與C24:5n-3競爭 $\Delta 6$ -desaturase，因為此酵素對於ALA親和力較高，導致C24:5n-3無法順利往下代謝生成DHA(Jensen et al., 1996)。第二種可能是因為ALA比較傾向進入粒線體(mitochondria)行 β -oxidation作用，而減少長鏈脂肪酸的合成，因此也會減少DHA的合成(Burdge, 2006)，曾經有研究指出，腦部有67%的ALA會進行mitochondrial β -oxidation，但是其它脂肪酸，例如AA，則只有30%進行氧化(Golovko et al., 2007)。但是前面兩種假設具有爭議性，因為ALA不論是進入轉換的途徑(conversion pathway)，或是氧化的途徑(oxidative pathway)，皆會導致DHA合成減少，因此就產生了第三種假說，原因是過氧化體途徑(peroxisomal pathway)有可能是整個ALA轉換的過程中的限制步驟，例如THA這個長鏈的不飽和脂肪酸從ER運送到peroxisome的過程中效率較低，或者是參與氧化作用的酵素活性過低所致(Langelier et al., 2005)。

二、研究目的

在本篇研究我們使用了人類神經瘤細胞株(SH-SY5Y)以及人類肝癌細胞株(HepG2)當作細胞模式，給予不同DHA之前驅物ALA及EPA，探討DHA合成的情形，並針這些脂肪酸對酵素 $\Delta 6$ -desaturase及AOX的影響，並更進一步的探討這些酵素基因表現是否與DHA低合成量相關。

第二章 材料與方法



第一節 實驗材料

- 1、Hyclone MEM/EBSS、Hyclone NUTRIENT MIXTURE F-12 HAM's、Hyclone DMEM/High Glucose(Hyclone)
- 2、penicillin/streptomycin、fetal bovine serum(FBS)、non-essential Amino Acid(NEAA) (GibcoBrl/LifeTechnologies)
- 3、Myristic acid(C14:0)、Palmitic acid(C16:0)、Palmitoleic acid(C16:1 n -7)、Oleic acid(C18:1 n -9)、Linoleic acid(C18:2 n -6)、Linolenic acid(C18:3 n -3)、Arachidonic acid(C20:4 n -6)、Eicosapentaenoic acid(C20:5 n -3)、Docosahexaenoic acid(C22:6 n -3) (Nu-Chekperp)
- 4、Methanol、Chloroform、Hexane、2-propanol、Ethanol、1-butanol、Glycerol (J.T.Baker)
- 5、Proteinase inhibitor cocktail tablets (Roche)
- 6、Dimethyl Sulfoxide、Ethidium bromide、Bromophenol blue、CaCl₂、HEPES、MgCl₂、Tris-HCl、B ovine serum albumin(BSA) (Sigma-Aldrich)
- 7、hAOX antibody、Goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology)
- 8、Anti mouse IgG (Cell signaling)
- 9、Primers 由明欣、維昕堂及每得公司合成
- 10、Restriction enzyme、T4 DNA polymerase (New England Biolabs)
- 11、Taq DNA polymerase、dNTP mixture、protein marker、Oligo-dT primer、DNA marker、Total RNA Reagent、plasmid Mini Kit、Easy Pure Genomic DNA Mini Kit、Competent cell、LB broth、Agarose (Biomax)
- 12、PCR Clean up/Gel extraction Kit (Favorgen)
- 13、pGL3-Basic vector、phRLTK plasmid、Dual-Luciferase reporter assay system、M-MLV Reverse Transcriptase、RNase-free DNase (Promega)
- 14、T4 DNA ligase、Lipofectamine2000 (Invitrogen)
- 15、30% acrylamide/Bis solution、Dc protein assay Kit (BioRad)

16、Enhanced-Chemiluminescence、PVDF membrane、0.22 μ m filter (Millipore)

17、Ammonium persulfate、Glacial acetic acid、KCl、NaCl、SDS、TEMED、Tris-base、Phenol(Merck)

18、Ampicillin (生工有限公司)

19、超高速離心管 (Beckman)

第二節 試劑配製

【10X PBS buffer】

藥品	取量
NaCl	80g
Na ₂ HPO ₄	14.4g
KH ₂ PO ₄	2.4g
KCl	2g

補二次水至 800mL 攪拌均勻，並將 pH 值調至 7.4，最後將二次水補至 1000mL，滅菌後稀釋 10 倍即可使用。

【10X SDS running buffer】用於西方墨點法

藥品	取量
Tris base	30.2g
Glycine	144g
SDS	10g

補二次水至 1000mL 攪拌均勻，滅菌後 10 倍稀釋即可使用。

【5X SDS gel-loading buffer】用於西方墨點法

藥品	取量
1M Tris-HCl (pH=6.8)	2.5mL

SDS	1g
bromophenol blue	少許
glycerol	5mL

補滅菌二次水至 10mL，配製後避光保存於室溫下，使用時需加入 10% β -mercaptoethanol。

【20X Transfer buffer】 用於西方墨點法

藥品	取量
Tris base	145g
Glycine	72.5g
SDS	9.25g

補二次水至 800mL 攪拌均勻，並將 pH 值調至 8.3，最後將二次水補至 1000mL，滅菌後取 40mL 稀釋 20 倍至 800mL，並加入 200mL methanol，即為 1X Transfer buffer。

【10X TBST buffer】 用於西方墨點法

藥品	取量
NaCl	81.82g
Tris base	12.11g

補二次水至 1000mL 攪拌均勻，滅菌後稀釋 10 倍加入 0.05% Tween-20 即可使用。

【50X TAE buffer】 用於 DNA 電泳

藥品	取量
Tris base	242g
Glacial acetic acid	57.1mL
0.5 M EDTA (pH=8.0)	100 mL

補滅菌二次水至 1000mL，使用前稀釋 50 倍。

【6X DNA loading dye】 用於 DNA 電泳

藥品	取量
bromophenol blue	0.25%
glycerol	30%
TE buffer 或滅菌二次水	70%

【DEPC-H₂O】 用於 RNA 抽取

2L 的二次水加入 2 ml 的 DEPC (diethylpyrocarbonate, MD Bio, Inc.)，稍微加熱後以磁石攪拌隔夜，滅菌後即可使用。

【Solution I】 用於大量質體抽取

藥品	取量
0.5M Glucose	10mL
0.5M EDTA (pH=8.0)	2mL
1.0M Tris-HCl (pH=8.0)	2.5mL

加入滅菌二次水將體積補至 100mL，放於 4°C 冰箱保存。

【Solution II】 用於大量質體抽取

藥品	取量
10N NaOH	2mL
10% SDS (pH=8.0)	10mL

加入滅菌二次水將體積補至 100mL，室溫下保存。

【Solution III】 用於大量質體抽取

藥品	取量
5M potassium acetate	60mL
Glacial acetic acid	11.5mL

加入滅菌二次水將體積補至 100mL，放於 4°C 冰箱保存。

第三節 細胞培養

一、SH-SY5Y 細胞培養

SH-SY5Y (Human neuroblastoma cell line)為人類神經瘤細胞株，細胞解凍後，離心除去抗凍劑(DMSO)，以 10% FBS、100U/ml penicillin、100U/ml streptomycin 以及 2mM L-glutamine 的 MEM/EBSS 及 NUTRIENT MIXTURE F-12 HAM's(1:1 比例混合)培養液培養在含 5% CO₂、37°C 恆溫細胞培養箱中。細胞貼附於培養皿底部，當細胞長至九成滿時進行繼代培養。

二、HepG2 細胞培養

HepG2(human liver hepatocellular carcinoma cell line)為人類肝癌細胞株，細胞解凍後，離心除去抗凍劑(DMSO)，以 5% FBS、100U/ml penicillin、100U/ml streptomycin、2mM L-glutamine 以及 1X NEAA 的 DMEM/ high glucose 培養液培養在含 5% CO₂、37°C 恆溫細胞培養箱中。細胞貼附於培養皿底部，當細胞長至九成滿時進行繼代培養。

繼代培養時，先吸去原本培養液，以 1X PBS buffer 將殘餘血清洗除，接著加入 1mL 的 0.25% trypsin，搖晃使其可佈滿整個培養皿，放入 37°C 恆溫細胞培養箱一分鐘並觀察細胞是否已經開始飄浮，立即加入含血清之培養液終止反應，將細胞液放入 50mL 離心管並以 1,000rpm 轉速將細胞沉澱下來，倒除上清液後加入乾淨培養液並將細胞打散，以細胞計數盤將適當的細胞數種入六公分培養皿，以供後續實驗。

第四節 脂肪酸之配製

一、皂化反應

將顆粒狀之氫氧化鈉(NaOH)以滅菌二次水配置成終濃度為 0.2N 的氫氧化鈉水溶液。自 -20°C 冰箱取出取出適量體積的脂肪酸於 15mL 離心管，再加入 0.2N 之氫氧化鈉水溶液，使脂肪酸與氫氧化鈉水溶液莫爾數(mole)為 1:1，在此條件下

進行皂化反應。

二、與 Bovine serum albumin 結合

將皂化好的脂肪酸與 Bovine serum albumin(BSA)結合，使脂肪酸鈉鹽與 BSA 的莫爾數為 3：1 比例混合，再加入無血清的培養液後，均勻混合五小時以上。之後以孔徑 0.22 μ m 的過濾器過濾，並分裝到棕色 1.5mL 離心管，存放-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

【1000 μ M fatty acids】

脂肪酸	分子量	取量
飽和脂肪酸		
Myristic acid (C14:0)	256.4	3.42mg
Palmitic acid (C16:0)	228.4	3.84mg
不飽和脂肪酸(密度以 0.9 計算)		
Palmitoleic acid (C16:1n-7)	254.4	4.241 μ L
Oleic acid (C18:1n-9)	282.5	4.708 μ L
Linoleic acid (C18:2n-6)	280.5	4.675 μ L
Linolenic acid (C18:3n-3)	278.5	4.641 μ L
Arachidonic acid (C20:4n-6)	304.5	5.075 μ L
Eicosapentaenoic acid (C20:5n-3)	302.5	5.041 μ L
Docosahexaenoic acid (C22:6n-3)	328.6	5.745 μ L
BSA		0.33g

以無血清的培養液將體積補至 15mL。

第五節 脂肪酸組成分析

一、萃取脂肪酸

將 7×10^5 之 SH-SY5Y 細胞培養於六公分培養皿，加入不同劑量之不同脂肪酸處理，48 小時後進行分析。分析時，將培養液移除，以冰冷的 1X PBS buffer 清洗兩次，用平板刮刀將細胞收下放入 1.5mL 離心管，以 4°C 、3,000rpm 條件下離心，去除上清液後加入 200 μL 1X PBS buffer 重新懸浮細胞。接著將 200 μL 的細胞液置於有蓋螺紋玻璃管中，加入 1.5mL 的【chloroform : methanol = 1 : 2】將細胞打破，使有機溶液層與水層體積比調整至 chloroform : methanol : H₂O = 1 : 2 : 0.4，將上述溶液灌入氮氣 10 秒鐘並震盪混合後，放入 4°C 冰箱 2 小時以上。

取出溶液，加入 0.5mL 的 chloroform(含 BHT 抗氧化劑)和 0.5mL 的 0.7% NaCl，此時有機溶液層與水層體積比為 chloroform : methanol : H₂O = 2 : 2 : 1.8，震盪混勻後，以 2,500rpm 室溫下離心五分鐘。離心完以玻璃滴管直接吸取下層有機層溶液至新的螺紋玻璃管中，用氮氣吹乾，即可得細胞中的總脂肪。

二、甲基化反應(methylation)

對萃取出來的脂肪酸進行甲基酯化，轉化成脂肪酸甲酯以降低其沸點，縮短氣相分析儀檢測時程。加入 1mL 【methanol : methylene chloride = 3 : 1(v/v)】，混勻之後，以邊震盪邊緩緩加入 200 μL Acetyl chloride，避免產生大量熱能造成液體噴濺，震盪混勻後，灌入氮氣十秒鐘即可放入 70°C 烘箱反應一小時。

取出試管於室溫下冷卻後，再加入 4mL 7%K₂CO₃ 劇烈震盪 10 秒鐘，加入 2mL Hexane，再一次劇烈震盪 10 秒鐘，以室溫 2,500rpm 條件下離心 10 分鐘，取上層有機溶液置於新的無蓋平口玻璃試管中，並用氮氣將其吹乾，最後取適量 Hexane 回溶脂肪酸，裝入棕色小瓶(vial)中，存放 -20° 冰箱，以氣相層析分析儀分析細胞中脂肪酸組成。

三、脂肪酸組成分析

使用前先開啟氣體鋼瓶，依序為混合空氣、高純度氮氣(N₂)與氫氣(H₂)。

並開啟氣相層析儀電源，條件參數為：烘箱溫度(Oven temp.)設定為 60°C；注射通道 B 溫度(Injector B temp.)設定為 230°C；探測通道 A 溫度(Detector A temp.)設定為 280°C。按下 Enter 鍵，待紅燈亮起表示開始升溫。

開啟電腦與積分儀電源，點選 SISC-32 層析儀數據機，等紅燈熄滅後，表示溫度已達設定值，確認主機上 AIR 旋鈕是否開到最大，於探測通道 A 點火，同時並逐漸增加氫氣的進氣量，至螢幕上的訊號(Signal 1)顯示由 0 上升至穩定數值，此時緩緩將 H₂ 旋鈕開至最大，保持訊號穩定。於電腦桌面點選 SISC-32 程式，選擇數據擇取項目進入積分儀軟體介面，設定好圖譜檔名之後即可進行樣本分析。自 -20°C 冰箱取出棕色小瓶，用微量注射針吸取 1μL 之甲基化樣本，注入通道 B 的塑膠中隔(septum)，每一樣本分析時間設定為 65 分鐘，待機器溫度回復後即可進行下一樣本分析。

四、數據處理

依照注射脂肪酸標準品(Standard，包括 68A)得到的不同脂肪酸偵測到的時間，對照樣品波峰的時間點，排除積分面積過小的雜訊進行確認分析，以積分面積總合計算各脂肪酸在該樣品中所佔的重量百分比。

第六節 細胞基因mRNA表現量測定

一、細胞總RNA抽取

將 7×10^5 之 SH-SY5Y 細胞培養於六公分培養皿，加入不同劑量之不同脂肪酸處理，48 小時後進行分析。分析時，將培養液移除，以冰冷的 1X PBS buffer 清洗一次，加入 Total RNA Reagent 1mL 溶解細胞，放置搖晃器上 5 分鐘，將液體取出到 1.5 mL 離心管，加入 200μL CIAA (Chloroform : isoamyl alcohol = 24:1)，震盪 10 秒鐘，使溶液混合均勻呈現混濁狀，靜置 2 分鐘待分層出現，接著以 4°C、12,000 rpm 條件下離心 15 分鐘，取上清液約 0.5mL 至新的 1.5mL 離心管，加入 0.5mL isopropanol，混合均勻後置放於 -20°C 冰箱至少 1 小時以上，使 RNA 沉澱出來。

以4°C、12,000 rpm條件下離心15分鐘，倒除上清液後，用75%酒精潤洗沉澱物，完全移除酒精後加入17μL DEPC-H₂O回溶沉澱物，再加入2μL 10X DNase buffer及1μL RNase-free DNase，於37°C下反應30分鐘，去除溶液中的DNA。加入80μL DEPC-H₂O使總體積為100μL，接著加入100μL以DEPC-H₂O飽和過的phenol，震盪離心五分鐘後移除下層phenol，再加入100μL CIAA，震盪離心兩分鐘後取上層約100μL(體積V)的RNA溶液至1.5mL離心管，加入2V體積100%酒精(即200μL 100%酒精)及1/10V體積3M NaOAc(即10μL 3M NaOAc pH5.2)，震盪混勻後放-20°C冰箱至少1小時以上。

以4°C、12,000 rpm條件下離心15分鐘，倒除上清液後，用75%酒精潤洗沉澱物，完全移除酒精後即可加入適量的DEPC-H₂O回溶RNA，並於50°C下水浴槽加熱10分鐘，接著以分光光度計測量O.D.₂₆₀以及O.D.₂₈₀吸光值，定量RNA濃度及純度。

二、第一股 cDNA 合成

定量後的 RNA 溶液，取 5μg RNA 作為模版至於 200μl 離心管中，以 DEPC-H₂O 補至 13μL，再加入 1μL Oligo-dT primer，混合後於 70°C 加熱 10 分鐘後立刻放至冰上。加入 4μL 5X MMLV-RT buffer、1μL dNTP (10mM)，最後加入 1μL MMLV-Reverse transcriptase(200U/μL)。置於 25°C 下 10 分鐘後以 42°C 反應 50 分鐘使反轉錄酶作用，再以 90°C 反應 5 分鐘終止反應，反應結束後迅速放至冰上 10 分鐘。再加入 1μL RNase(2U/μl)於 37°C 下反應 20 分鐘即完成第一股 cDNA 合成。

三、聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

以滅菌二次水將 cDNA 濃度調整為 50ng/μl，取 4μL (200ng) cDNA 為模板，加入 5μL 10X Taq PCR buffer、1μL dNTP mixture (10mM)、5'端引子與 3'端引子 (10μM) 各 1μL 及 0.5μL Taq DNA polymerase (5U/μL)，並以滅菌水將總體積補至 50μL 進行聚合酶連鎖反應，反應結束以 1%洋菜膠體電泳圖譜及 DNA marker 確定產物之序列長度。

【引子序列及反應條件】

基因(GeneBank)	Tm	序列(5'→3')
<i>Acyl CoA oxidase</i> (NM_004035)	5F 55°C 3R	GCTCAAAATCCCTCCTTTCC AGATTTGCGCCACTGCACTCT
<i>Delta-6 desaturase</i> (NM_004265)	5F 55°C 3R	ATCCCTTTCTACGGCATCCT GGACACCCCTCAGAACAAAA
<i>D-bifunctional protein</i> (NM_000414.2)	5F 55°C 3R	CCAAGGTCCAAGAACTGGA CCTTCAGCCTGCCACTAAAG
<i>GAPDH</i> (NM_002046)	5F 55°C 3R	AAAGGATCCACTGGCGTCTTCACCACC GAATTCGTCATGGATGACCTTGGCCAG

四、DNA 洋菜膠電泳

製備1% DNA 洋菜膠體電泳片，秤量1g 洋菜粉末倒入250mL 錐形瓶中，加入1X TAE 緩衝液100mL，於微波爐中反覆加熱，使其完全溶解呈透明清澈狀，待其冷卻至手可觸摸的溫度時，加入1.6 μ L EtBr (10mg/mL)，搖晃均勻後注入鑄膠槽中並插入齒模，在室溫下靜置凝固後再將齒模拔出。將DNA 樣品與DNA marker 加入6X DNA loading dye 後，注入樣品槽(well)中，於含有1X TAE 緩衝液的電泳槽中以120 伏特電壓進行電泳，結束後將膠片致UV 燈下觀察，並比對DNA marker 以確認PCR 產物片段大小。

第七節 以西方墨點法(Western blot)進行細胞內蛋白質表現分析

一、細胞內蛋白質抽取

將7 x 10⁵之SH-SY5Y 細胞培養於六公分培養皿，加入不同劑量之不同脂肪酸處理，48 小時後進行分析。分析時，將培養液移除，以冰冷的1X PBS buffer 清洗兩次，再加入1mL 1X PBS buffer，將細胞刮下吸取至1.5 ml 離心管中，以4°C、3,500 rpm 條件下離心10 分鐘，再將上清液去除後加入適量1X PBS buffer，並加入protease

inhibitor(50倍稀釋)，利用超音波震盪機使細胞破碎後將樣品保存於-80°C冰箱備用。

二、蛋白質濃度測定

使用DC protein assay kit進行定量。先將BSA標準品序列稀釋為1.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、0.35 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、0.175 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 五個濃度，各溶液總體積為20 μL 。另將樣品以適當的稀釋倍數稀釋，總體積同為20 μL 。加入100 μL Reagent A後，再加入800 μL Reagent B，震盪混勻後室溫下靜置15分鐘，以分光光度計測量吸光值(波長655nm)。由BSA的結果可繪製標準曲線，推算出樣品蛋白質濃度。

三、樣品前處理

取60 μg 的樣品蛋白質，以滅菌二次水補至相同體積，與5X SDS gel-loading buffer(需先添加10% β -Mercaptoethanol)作1:4比例混合，於100°C加熱10分鐘後需立即放在冰上，避免蛋白質復性，以供後續實驗使用。

四、SDS-PAGE膠體配製

使用Hofer Mighty Small Mini-Vertical unit鑄膠模組架膠，並以下列藥品比例配置不同體積的膠體。先配置下層分離膠體(Running gel)，加入7mL膠體溶液於鑄膠模組中，並以70%酒精將分離膠體壓平室溫下靜置，待約30分鐘膠體凝固，再注入上層聚焦膠體(Stacking gel)並插入齒模，室溫下靜置15至20分鐘等待凝固，製備好的膠體以濕潤拭鏡紙包好，放入4°C冰箱存放。

【10% Running gel (20mL)】

試劑	取量 (mL)
H2O	7.9
30% Acrylamide mix	6.7
1.5M Tris buffer (pH=8.8)	5.0
10% SDS	0.2

10% Ammonium persulfate	0.2
TEMED	0.008

【5% Stacking gel (6mL)】

試劑	取量 (mL)
H2O	4.1
30% Acrylamide mix	1.0
1.5M Tris buffer (pH=8.8)	0.75
10% SDS	0.06
10% Ammonium persulfate	0.06
TEMED	0.006

五、電泳操作

將膠體上的齒模取出後架設於電泳槽中，加入250mL 1X SDS-PAGE running buffer於膠片與電泳槽間，以及電泳槽底部，將protein marker與蛋白質樣品注入樣品槽中，先以80伏特使樣品堆疊於Stacking gel中，待樣品進入Running gel時再以110伏特進行電泳至結束。

六、半濕式蛋白質轉印

電泳結束後將膠體取出，切下Stacking gel後與另取六張一樣大小的濾紙放置於Transfer buffer中10分鐘，同時取一張大小相同的PVDF membrane浸泡於100%甲醇1分鐘，使表面正電基團活化，回收甲醇後再加入Transfer buffer均勻覆蓋在PVDF membrane上，接著以濾紙(3張)、PVDF membrane、膠體、濾紙(3張)的順序放於Hoefer TE 70 Semiphor Transphor 轉印槽上，需注意PVDF membrane與膠體間不得有氣泡。架設完成後以每平方公分0.8毫安培電流進行蛋白質轉印，以蛋白質大小調整轉印時間。

七、抗體結合

轉印完成後將PVDF membrane取出，先以TBST buffer將殘餘的Transfer buffer洗除，接著再加入Blocking buffer(5% milk in TBST buffer)於室溫下搖晃1個小時。移除Blocking buffer加入適當稀釋的一級抗體，在4°C環境下搖晃16個小時。隔日，將一級抗體回收並用TBST buffer清洗PVDF membrane，室溫下搖晃並每10分鐘更換一次TBST buffer，共計三次。接著根據一級抗體物種來源，加入以Blocking buffer稀釋的二級抗體，於室溫下搖晃1個小時，接著同樣將抗體回收，以TBST buffer清洗三次，每次10分鐘。清洗完成後的PVDF membrane可浸泡在TBST buffer中備用。

八、冷光呈色

將Enhanced-Chemiluminescence(ECL)中之Oxidase Reagent與Enhance Luminol Reagent以1:1比例混合，均勻加至PVDF membrane上反應1分鐘，試劑與二級抗體上的HRP (horse radish peroxidase)反應產生冷光，稍微瀝乾PVDF membrane後將PVDF membrane夾於透明夾，使用富士UVP儀器成像拍照。

第八節 細胞genomic DNA抽取

人類 genomic DNA 由 SH-SY5Y 細胞中抽取，使用 Easy Pure Genomic DNA Mini Kit。前一天先將 2×10^6 的細胞數種植到六公分培養皿，隔天用冰冷 1X PBS buffer 將培養液洗除，之後將細胞刮取下來放入新的 1.5mL 離心管，以 3,000rpm、4°C 條件下離心，倒除上清 1X PBS buffer 後，再重新加入 50 μ L PBS 輕微震盪離心管使細胞重新均勻懸浮，加入 600 μ L 的 Cell Lysis Solution 使細胞破裂，反覆 pipeting 到看不到細胞團塊為止。接著加入 3 μ L RNase Solution 並翻轉離心管使其均勻混合，接著加入 200 μ L Protein Precipitation Solution 到細胞液中，劇烈搖晃 20 秒後以 13,000rpm 離心 3 分鐘將蛋白沉澱下來。小心的將含有 DNA 的上清液移吸取至新的 1.5mL 離心管，加入 600 μ L 的 isopropanol，此時應避免吸到蛋白沉澱，接著溫

和的混勻溶液直到看到白色絲狀 DNA。以室溫 13,000rpm 離心 1 分鐘將 DNA 沉澱下來並小心移除上清液。加入 600μL 70%的酒精潤洗 DNA 沉澱，接著小心移除酒精並將殘餘的酒精揮發掉。接著加入 60μL 滅菌二次水置於 65°C 回溶 DNA 約一個小時，最後將 genomic DNA 存放於 4°C 保存。

第九節 質體的建構

一、Acyl CoA oxidase(AOX) promoter 的引子設計

先於 NCBI 搜尋 AOX 基因之起動子(promoter)序列，找到重要 response element 位置，在前後方設計同時能包含限制酶切點序列的引子，forward primer 的 5'端加入 Kpn I 的切位 GGTACC，reverse primer 的 5'端加入 Bgl II 的切位 AGATCT，以便之後轉移載體之用。

引子：

AOX-P 5F	5' GG GGTACC TATTCTTGTAATTCTCGTGTAAT 3' Kpn I
AOX-P 3R	5' GA AGATCT AGCTGGCAGCGAAGTAAGCA 3' Bgl II

二、Insert 之製備

使用具 proofreading 的酵素 Phusion™ Flash (Finnzyme)，以下列 PCR 條件將 promoter 之片段放大：

98°C 10 秒鐘

98°C 2 秒鐘，63°C 5 秒鐘，72°C 45 秒鐘；3 個循環

98°C 2 秒鐘，60°C 5 秒鐘，72°C 45 秒鐘；3 個循環

98°C 2 秒鐘，57°C 5 秒鐘，72°C 45 秒鐘；3 個循環

98°C 2 秒鐘，65°C 5 秒鐘，72°C 45 秒鐘；30 個循環

72°C 1 分鐘

4°C 終止反應。

三、Insert 之純化

以 PCR clean-up kit 進行純化。首先，加入為樣本 5 倍體積的 FAGX buffer 均勻震盪，接著將 FAGX column 置放於 Collection tube 之上，將混合好的液體加入管柱中。以 13,000rpm 離心 30 秒將 buffer 去除，而 DNA 則結合在 column 的膜上。加入 600 μ L 的 Wash buffer(已添加 ethanol)潤洗膜上的 DNA，之後以 13,000rpm 離心 30 秒將 buffer 去除，接著仍以 13,000rpm 離心三分鐘，將殘餘酒精去除乾淨並瀝乾濾片。之後將 column 放置於新的 1.5mL 離心管之上，在 column 濾片中央加入 7 μ L 的滅菌二次水，室溫靜置 10 分鐘，待 DNA 回溶完全便可將其離心下來，供後續實驗使用。

四、限制酶切割

Vector 和 insert 在 ligation 之前須經由限制酶作用，使其產生相同接位，而本次實驗所使用的 vector 為 pGL3-basic luciferase reporter vector。根據 New England Biolabs (NEB)網站提供的資訊，將上述由 PCR 放大的 insert 片段以及 400ng 的 vector，分別加入 1 μ L 2 號 NEBuffer、1 μ L 10X BSA(1mg/mL)、1 μ L Kpn I 及 1 μ L Bgl II，補滅菌二次水至總體積 10 μ L，於 37°C 下反應 3 小時。

五、Ligation

限制酶作用後用 PCR clean-up kit 進行純化，將所得到的 vector 及 insert 以 1 : 10 的比例均勻混合，加入 2 μ L 5X ligation buffer、1 μ L T4 DNA ligase，補滅菌二次水至總體積 10 μ L。因為兩端切位為 sticky end，因此室溫下靜置 3 小時即可完成反應。

六、1X Luria-Bertani(LB)製備

取 LB Broth Lennox 粉末 20 g，再加入 1L 的二次水，使用磁石攪拌均勻後，調整 pH 值到 7.0，便可拿去滅菌鍋滅菌，最後放入 4°C 冰箱保存。

七、固體瓊脂培養基製備

將 100mL 的 1X LB 中加入 1g Bacto-agar 經微波爐加熱，每三十秒拿出來搖晃均勻再繼續加熱，確保 Bacto-agar 粉末完全溶解，待溫度稍降後，加入 ampicillin(最中濃度為 100 μ g/mL)並均勻混合，每個 dish 倒入約 2/3 面積再晃使其分佈均勻，室溫下凝固後即可使用，或是放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

八、質體轉形(Transformation)

自 -80 $^{\circ}$ C 冰箱取出勝任細胞放置冰上，待溶解後分裝 30 μ L 至新的 1.5mL 離心管，並加入 2.5 μ L 的 ligation mixture(體積須小於勝任細胞的 1/10)，輕拍混勻後置放回冰上，每隔 10 分鐘便重複輕拍的動作，共計三次。之後將其放置 42 $^{\circ}$ C 水浴槽 1 分鐘，立即移置冰上靜置 5 分鐘。加入等體積 2X LB 使勝任細胞處於 1X LB 濃度中，於 37 $^{\circ}$ C 培養箱中搖晃 30 分鐘。取全部的菌液滴在含有 ampicillin 的 1% LB plate 上，由過火的玻璃棒將菌液均勻塗抹，使勝任細胞分散於 LB plate 表面。將 plate 倒置放於 37 $^{\circ}$ C 培養箱培養 12~16 個小時，唯有轉形成功的菌體帶有 ampicillin 的抗性基因，可以生成菌落。

九、小量質體抽取

以 plasmid Mini Kit 進行抽取。選取轉形後培養在固態培養基多個單一菌落，以牙籤挑出並沾至 3mL 1X LB(含 ampicillin)中，並於 37 $^{\circ}$ C 環境震盪培養 16 個小時。取 1.5mL 的菌液加到 1.5mL 離心管，以 13,000rpm 於室溫離心 30 秒將菌體離下，倒除上清液後加入 200 μ L PD1 buffer(含 RNaseA)，高速震盪使菌體重新懸浮。加入 200 μ L PD2 buffer 後來回反轉離心管 10 次，打破菌體因此可以看到溶液混濁轉清澈。最後加入 300 μ L PD3 buffer，立即來回反轉離心管 10 次可見到蛋白質沉澱出來。以 13,000rpm 室溫離心 3 分鐘，取上清液倒有濾片的管柱中，再以 13,000rpm 室溫離心 30 秒離除 buffer，此時質體 DNA 會結合在濾片上，再用 400 μ L W1 buffer 潤洗 DNA，以 13,000rpm 室溫離心 30 秒離除 buffer。接著再加入 600 μ L Wash buffer，並同樣以 13,000rpm 室溫離心 30 秒離除 buffer，最後以 13,000rpm 室溫離

心 3 分鐘瀝乾濾片，並將管柱放置於新的 1.5mL 離心管，在上層管柱濾片上加入 30 μ L 滅菌二次水回溶質體 DNA，靜置 10 分鐘後以 13,000rpm 室溫離心 3 分鐘，將質體 DNA 離下，最後以分光光度計定量 DNA 濃度。

十、定序

將上述得到的質體 DNA 取 200ng 至 500ng，以滅菌二次水將體積補至 5 μ L，接著加入 1 μ L primer(10nM)，此 primer 需位於 vector 上，送至台大醫學院醫學研究部第二共研，進行 DNA 定序分析。

十一、大量質體抽取

以滅過菌的牙籤沾取上述實驗生成的單一菌落，置入 3mL 1X LB(含 ampicillin) 中，置於 37 $^{\circ}$ C 培養箱震盪培養 16 小時，隔日在將此 3mL 的菌液倒入 250mL LB(含 ampicillin) 中，同樣於 37 $^{\circ}$ C 培養箱震盪培養 16 小時。將菌液倒入滅菌過的離心瓶中，使用 JA-14 rotor 於 4 $^{\circ}$ C、4,000rpm 的條件下離心 10 分鐘將所有菌體離下。移除上清液後，加入冰的 10mL Solution I，利用塑膠滴管取一小塊菌體塗抹於離心瓶壁上，在吸取瓶內適量的 Solution I 將壁上的菌體沖散，以此方式重新懸浮菌體。接著加入 20mL Solution II，輕晃混勻後質體倒溶液形成清澈黏稠狀，並置於冰上 10 分鐘使菌體完全破裂。再加入 15mL Solution III 並用力搖晃離心瓶，置於冰上使蛋白質沉澱完全。接著以 4 $^{\circ}$ C、4,000rpm 的條件下離心 15 十分鐘，其上清液經由滅菌紗布過濾至 250mL 錐形瓶中，並用 50mL 離心管測量其體積，最後加入 0.6 倍體積的 isopropanol 混合均勻，置於冰上 10 分鐘使 plasmid DNA 沉澱出來。以 4 $^{\circ}$ C、4,200rpm 的條件下離心 10 分鐘，可看到 DNA 白色沉澱，移除上清液以 70%酒精潤洗沉澱物，利用離心的方式移除酒精後，將此 50mL 離心管倒置於拭鏡紙上晾乾沉澱物，最後回溶於 4mL TE buffer (pH=8.0) 中。精確定量 DNA 溶液體積後，計算 CsCl 所需用量，每 1mL DNA 溶液須加入 1.1g CsCl，震盪使其溶解後，再次定量 DNA/ CsCl 的體積，此時每 10mL 之 DNA/ CsCl 溶液須加入 0.08mL EtBr(10mg/mL)，震盪混勻後以 4 $^{\circ}$ C、4,200rpm 的條件下離心 20 分鐘，以針筒吸取

上清液置入超高速離心管中，將超高速離心管與其 adaptor 平衡後封管。以 20°C、65,000rpm 的條件下離心 16 小時，隔日便以 5mL 針筒抽出 plasmid DNA 部分移至 15mL 離心管，精確定量所得 DNA 溶液，接著以滅菌二次水飽和過的丁醇(1-butanol)萃出 DNA 溶液中的 Etbr，重複萃取使 DNA 溶液呈無色透明狀，之後將 DNA 溶液吸取至新的 15mL 離心管，加入滅菌二次水使其體積為原本 DNA 溶液體積的三倍，再加入目前體積兩倍的 100%酒精，均勻混合後放置冰上 10 分鐘，此時便可看到絲狀 DNA 沉澱出來，以 4°C、4,200rpm 的條件下離心 15 分鐘，倒掉上清液並以 70%酒精潤洗 DNA 沉澱，完全移除酒精後以適量滅菌二次水回溶 DNA，最後以分光光度計定量其濃度，置於-20°C 冰箱保存。

第十節 Reporter gene 活性表現分析

一、沉澱質體 DNA

取適量質體 DNA，補二次水至體積 100 μ L(體積 V)，另外再加入 1/10V 3M NaOAc (pH=5.2)(即 10 μ L)及 2V 100%酒精(即 200 μ L)並震盪混勻。於-20°C 下靜置 1 小時以上。以 4°C、12,000rpm 的條件下離心 15 分鐘，之後在無菌操作台(laminar flow hood)中移除上清液，DNA 沉澱物以 70%酒精潤洗後，以同樣轉速離心 5 分鐘將酒精移除乾淨，再加入適量的無菌二次水，使 DNA 溶液終濃度為 1 μ g/ μ L，於-20°C 冰箱保存。

二、暫時轉染(Transient transfection)

細胞繼代培養於 24 well 培養皿 16 小時至 24 小時後，可以 Lipofectamin2000 進行暫時轉染實驗。先將沉澱好的質體 DNA 與質體 phRLTK 作 5:1 比例混合，取兩個 1.5mL 離心管分別加入無血清之培養液 50 μ L，一管加入 1 μ g DNA 溶液，一管加入 2 μ L Lipofectamin2000，室溫下靜置 5 分鐘後，再將兩種溶液均勻混合，室溫下靜置 30 分鐘，靜置同時可將 24 well 培養皿的培養液移除，加入 200 μ L 無血清之培養液，30 分鐘後將 100 μ L DNA- Lipofectamin 混合液滴入細胞培養液中，輕

輕搖晃使其混合均勻，在 37°C 培養箱靜置 6 小時，再換入 0.5mL 含有血清培養液，18 小時後進行後續實驗。

三、測量 Luciferase 活性

以 Dual-Luciferase Reporter Assay System Kit 進行分析。首先將 5X passive lysis buffer(PLB)以滅菌二次水稀釋成 1X PLB 備用。接著吸去細胞培養液，以冰冷的 1X PBS buffer 清洗細胞兩次，再加入 100 μ L 1X PLB 於室溫下搖晃 15 分鐘使細胞破裂，之後用沖吸的方式打散細胞團塊，將細胞懸浮液移至乾淨的 1.5mL 離心管，以 10,000rpm 室溫下離心 1 分鐘，取上清液放入白色 96 孔盤中，同時解凍原本存放於-80°C 之 Luciferase Assay Reagent 和 Stop & Glo Reagent 兩種試劑，以冷光儀器測定。先加入 100 μ L Luciferase Assay Reagent，測定 firefly luciferase 冷光後，再於同一 well 中加入 100 μ L Stop & Glo Reagent 測定 renilla luciferase 之冷光。



第三章 實驗結果



第一節 肝細胞中 ALA 代謝及 DHA 合成情形

肝臟被視為是脂肪合成及代謝中心，因此為了研究肝臟中 *n*-3PUFA 的代謝情形，我們選用了 HepG2 細胞株來進行實驗。首先，將細胞繼代培養在六公分培養皿 24 小時後，分別給予不同濃度的 ALA，並在 48 小時後收取細胞並藉由氣相層析分析儀(GC)作脂肪酸分析，偵測 EPA、DPA 及其最終產物 DHA 含量。結果顯示，當給予細胞 10 μ M ALA 時，會直接提高細胞內部 ALA 之比例至 1.2%，並且在統計上達顯著差異，而 EPA、DPA 及 DHA 含量並無改變。若將 ALA 終濃度增加至 30 μ M，同樣可以看到細胞內 ALA 比例持續上升至 3.4%，但其代謝產物 EPA、DPA 及 DHA 的比例仍無改變，最後給予 ALA 達到高濃度 60 μ M，細胞內部 ALA 的含量占總脂肪酸的 7.1%，並呈線性劑量關係 (dose-response)，但此時其他脂肪酸 EPA、DPA 及 DHA 的含量仍無明顯改變(Figure 1)。我們接著想了解 ALA 代謝過程中，參與的酵素基因表現情形。以同樣濃度的 ALA 處理細胞 48 小時後將細胞 RNA 取出，並利用 RT-PCR assay 分析。我們探討了途徑第一個催化酵素 Δ -6 desaturase，以及氧化過程中關鍵酵素 AOX 和 DBP。結果顯示 Δ -6 desaturase 的基因表現隨著 ALA 給予濃度增加而下降，在 60 μ M ALA 時下降幅度至 control 組之 38%，顯示此基因會受到 ALA 影響。而 AOX 基因表現在低濃度 ALA 處理下有些微增加，但 ALA 劑量達 30~60 μ M 後基因表現無明顯改變，DBP 的基因表現不論是在高濃度或低濃度 ALA 處理，皆無顯著差異(Figure 2)。因此我們推測，也許是因為過程中第一個催化酵素 Δ -6 desaturase 受 ALA 抑制，導致代謝產物 EPA、DPA 及 DHA 合成受阻。

接著我們想了解，若跳過第一個關鍵酵素作用，給予另一前驅物 EPA，則 DHA 合成是否會因此增加。於是在相同條件下添加不同濃度的 EPA，48 小時後以 GC 分析脂肪酸組成。結果顯示，依序給予 10 μ M、30 μ M 及 60 μ M 的 EPA，其細胞內部的 EPA 濃度會增加，而其直接產物 DPA 比例也隨之提高，皆達統計上顯著差異並呈劑量關係，但 DHA 含量仍無明顯改變(Figure 3)。同樣的，我們便想了解 EPA

如何影響上述參與代謝酵素之基因表現。結果顯示，在給予不同濃度 EPA 時 Δ -6 desaturase 基因表現降低，在 60 μ M EPA 時可下降達約 60%，另外，AOX 基因表現在 30 μ M EPA 處理後提高約 44%，DBP 表現則是受到 EPA 作用而有些微降低(約 20~25%)(Figure 4.)。 Δ -6 desaturase 除了催化途徑中的第一步驟，還會將 C24:5n-3 去飽和形成 THA，使 THA 進入氧化途徑。因此我們推論，EPA 代謝至 DPA 所需酵素 elongase 並不是造成 DHA 合成率低的關鍵酵素，有可能是因為 EPA 抑制了 Δ -6 desaturase 作用，致使 DHA 生成受阻。

第二節 神經細胞中 ALA 代謝及 DHA 合成情形

腦神經系統為 DHA 含量豐富的組織器官，因此為了探討神經中 DHA 的合成情況，我們選用了 SH-SY5Y 作為細胞模式進行實驗，分別給予不同濃度的 ALA，並在培養 48 小時後藉由 GC 分析脂肪酸組成。結果顯示，細胞處理 DHA 前驅物 ALA 時，細胞中 ALA 會累積且比例隨著添加濃度提高而增加，且統計上具有顯著差異。當 ALA 終濃度為 30 μ M 時，細胞中 EPA 及 DPA 比例會增加至 4.5 % 和 5.3 %，並在 ALA 劑量提高至 60 μ M 時約略維持這個含量。而細胞中 DHA 比例則是有些微下降的情形(Figure 5.)。而在 mRNA 的層次來看，60 μ M ALA 會明顯降低 AOX 基因的表現量約 36%，並且也會降低 Δ -6 desaturase 之基因表現約 20%，而 DBP 基因表現在任何濃度下沒有明顯改變(Figure 6.)。因此我們可以推論，在 SH-SY5Y 細胞中 ALA 可以代謝至 DPA，代表 ALA 在內質網的代謝途徑是可以順利進行的，但由於 ALA 會抑制 AOX 的基因表現，也許造成 THA 在 peroxisome 氧化的步驟受阻，因而導致 DHA 合成減少。同樣的給予 DHA 另一前驅物 EPA 並分析脂肪酸產物含量及相關基因表現，結果顯示，不同濃度的 EPA 可以順利轉換成 DPA，且呈劑量關係，但是 DHA 比例並無增加(Figure 7.)。基因表現層次顯示，EPA 作用和 ALA 作用相似，不僅會造成 Δ -6 desaturase 表現下降約 20%，更會抑制 AOX 表現達 60% (Figure 8.)，因此可呼應上述實驗，SH-SY5Y 細胞中 ALA 和 EPA 之產

物 DHA 合成率偏低的原因，不是因為內質網途徑影響，可能是因為過氧化體氧化途徑酵素 AOX 表現受抑制所致。

接著我們想探討 EPA 是否會隨著處理時間的延長而更加抑制 AOX 之基因表現，因此我們分別以 30 μ M 及 60 μ M 之 EPA 處理 SH-SY5Y 細胞，並於 24、48、72、96 小時幾個時間點收取細胞 RNA。結果顯示給予 30 μ M EPA 時，AOX 在 24 小時基因表現開始下降，並在 48 小時達最低至 60%，當處理時間延長至 72 及 96 小時，AOX 基因表現仍受 EPA 所抑制(**Figure 9A.**)。給予 60 μ M EPA，24 小時後 AOX 基因表現下降約 40%，並持續受抑制約 40~50%至 96 小時(**Figure 9B.**)。

在蛋白表現層次上，我們利用了 Western blot assay 分析 EPA 對 AOX 蛋白質含量的影響，以相同的條件下處理 10~60 μ M EPA，並於 48 小時收取細胞中蛋白質。結果顯示，10 μ M EPA 對 AOX 蛋白表現影響不大，而 30 μ M 及 60 μ M EPA 則是抑制了 AOX 蛋白表現達 50%(**Figure 10.**)。

第三節 AOX 基因轉錄調控

由於 PUFA 可當作 ligand，結合在不同的 PPAR isoform 上，接著再共同結合至含有 PPRE 序列之基因起動子上，而 AOX 是第一個被研究出具有 PPRE 序列的基因。因此接下來我們想要探討 SH-SY5Y 細胞株中，EPA 對於 AOX 基因表現的調控，是否透過 PPRE 作用。我們經由 NCBI 網站找到 AOX 之 PPRE 序列(AGGTCA G CTGTCA)，它位於起動子上 -1918 至 -1906 位置，接著我們建構了 -2072 至 +43 之起動子質體 phAOX-Luc，並使用 luciferase assay 分析其表現情形(**Figure 11.**)。我們將此質體暫時轉染到 SH-SY5Y 細胞株中，並添加 60 μ M 的 ALA 及 EPA。結果顯示，給予 60 μ M EPA 時，luciferase 活性可下降約 20%，若給予高濃度 ALA，luciferase 活性則可下降約 25%(**Figure 11C.**)。我們推測，也許這段起動子上的 PPRE 序列或是其他序列部分參與到 ALA 及 EPA 對於 AOX 的調控。

先前研究曾指出，餵食大鼠 PPAR α agonist(WY14643)及 EPA 會增加肝臟中

AOX 的基因表現(Tang et al., 2003)，之後證明出 EPA 是藉由結合 PPAR α 而增加 AOX 基因轉錄(Desvergne, 2007)。因此我們給與 HepG2 細胞不同濃度的 EPA，由 Western blot 實驗結果顯示，10 和 60 μ M EPA 會促進 AOX 的蛋白表現，並且呈線性劑量關係(Figure 12)，接著將上述 phAOX-Luc 質體暫時轉染至 HepG2 細胞株中，並於 24 小時後處理不同的 PPAR agonist 及 PUFA，WY14641 為 PPAR α 的 agonist，L165041 為 PPAR δ 的 agonist、Rosiglitazone 為 PPAR γ 的 agonist。在這些 agonist 作用之下可看到細胞中 luciferase 活性上升了 15%至 20%，而 60 μ M EPA 處理下，luciferase 活性則是增加了約 10%，60 μ M ALA 處理下則無明顯改變(Figure 13)，間接證明 PPAR 會受其 agonist 及 EPA 活化，促進 AOX 基因轉錄。

第四節 神經細胞中 EPA 與 PPAR 對於影響 AOX 基因表現的關係

為了解在神經細胞中，AOX的基因轉錄是否和肝臟同樣受PPAR所調控。給予 SH-SY5Y細胞株不同PPAR agonist處理，以Western blot分析細胞內AOX蛋白表現情形。結果顯示PPAR α 、PPAR δ 、PPAR γ 的agonist皆會促進AOX蛋白表現增加(Figure 14.)，但是先前實驗結果指出EPA會抑制AOX蛋白表現(Figure 10.)。因此，我們想探討EPA與這些PPAR的關係為何，於是我們將含有PPAR ligand binding domain及 Gal4 DNA binding domain的fusion protein與起動子上具有Gal4 binding sequence的 luciferase gene一起暫時轉染到SH-SY5Y細胞株中，再處理不同的PPAR agonist及 EPA並藉 luciferase assay分析。結果顯示不同PPAR的agonist皆會活化相對應的 PPAR，而使 luciferase activity增加，並達顯著差異。而EPA雖然也可以活化這些PPAR isoforms，但是活化的能力遠低於其agonist(Figure 15.)。與Figure 14.結果一起推測，SH-SY5Y細胞株中，PPAR可藉由agonist促進AOX蛋白表現增加，但由於EPA相較於agonist結合至PPAR能力較弱，因此可能不會影響EPA對於AOX蛋白的抑制結果，換句話說，我們推測EPA對於AOX的抑制可能不是透過PPAR的作用，但仍須更多的實驗來驗證。

第四章 討論



第一節 肝細胞對於 DHA 合成率低的原因探討

ALA 延長及去飽和形成 DHA 的過程中，主要的代謝生成產物依序為 EPA、DPA 及 DHA，我們使用 HepG2 細胞株探討肝臟 ALA 轉換成 DHA 效率低的可能原因。給予 HepG2 細胞 ALA 時，我們發現細胞內 ALA 的含量隨著處理 ALA 濃度而增加，但 EPA、DPA 及 DHA 含量並無改變。若給予細胞 EPA 時，只有 DPA 的含量會上升，而 DHA 含量則仍無明顯改變(Figure 1. & 3.)。從 mRNA 層次可發現在肝細胞中，ALA 及 EPA 皆會抑制 $\Delta 6$ -desaturase 的基因表現達約 62%及 57%(Figure 2. & 4.)，因此我們推測 ALA 抑制 $\Delta 6$ -desaturase 表現，使 C18:4 n -3 合成量減少，而 EPA 抑制 $\Delta 6$ -desaturase 表現，減少 C24:5 n -3 合成至 THA，因此可能致使這兩種前驅物代謝至 DHA 受阻。有研究指出，餵食大鼠或小鼠高碳水化合物及無脂肪飲食，但額外補充 n -6 及 n -3PUFA，會降低肝臟 $\Delta 6$ -desaturase 及 $\Delta 5$ -desaturase 基因表現及酵素活性(Cho et al., 1999a; Cho et al., 1999b)。Nuclear run-on assay 顯示給予紅花籽油(富含 18:2 n -6)或魚油的大鼠，會降低肝臟 $\Delta 6$ -desaturase 基因的轉錄速率(Tang et al., 2003)。另有研究使用 AA 的類似物 ETYA (eicosatetraenoic acid)，可抑制小鼠體內 $\Delta 6$ -desaturase 的基因表現，造成其 18:2 n -6 的累積及 AA 合成量減少(Nakamura et al., 2000)。

第二節 $\Delta 6$ -desaturase 調控機制

SREBP-1 和 NF-Y 為轉錄因子，參與一些 lipogenic genes 的基因調控，例如：fatty acid synthase (FAS)和 stearoyl-CoA desaturase-1 等等，而研究顯示 lipogenic genes 的表現會被 PUFA 所抑制(Tabor et al., 1999; Teran-Garcia et al., 2002)。2002 年有學者發現人類 $\Delta 6$ -desaturase promoter 上含有兩個序列，分別是位於-222/-231 的 E-box-like sterol response element 及位於-273/-286 的 NF-Y recognition site (Nara et al., 2002)，這兩個序列被認為與 PUFA 的抑制調控相關。PUFA 會增加 SREBP-1 mRNA 降解的速度因而減少 precursor SREBP-1 protein(Xu et al., 2001)，也會抑制

precursor SREBP-1 的 proteolytic release 之成熟過程(Hannah et al., 2001; Worgall et al., 1998), 導致細胞核中有活性的 SREBP-1 含量減少。但 PUFA 會干擾 NF-Y 作用的機制到現在還不是很清楚, 有可能是透過後轉譯修飾(posttranslational modification)所致。因此, 肝臟中 ALA 轉變成 DHA 效率差的原因之一, 可能是因為其前驅物會抑制 $\Delta 6$ -desaturase, 但此抑制作用並不是 100%, 所以並不能完全解釋 DHA 合成量低的原因, 因此仍可能有其他因素存在。

第三節 神經細胞對於 DHA 合成率低的原因探討

我們使用 SH-SY5Y 細胞株探討神經細胞中 DHA 的合成情形。給予 SH-SY5Y 細胞 ALA 或 EPA 時, 我們的結果皆顯示 DHA 含量增加, 表示 ALA 及 EPA 在內質網的代謝途徑是可以順利進行的(Figure 5. & 7.)。但由於 ALA 及 EPA 會抑制 AOX 的基因表現及蛋白表現(Figure 6.、8. & 10.) , 因此我們推測神經細胞中, *n*-3PUFA 代謝所經的過氧化體氧化途徑受阻而致使 DHA 合成減少。而 ALA 及 EPA 也會些微抑制 $\Delta 6$ desaturase 的基因表現, 這可能是 DHA 合成減少的次要原因。最早認為 DHA 的合成是經由 $\Delta 4$ -desaturase 作用, 但有學者發現過氧化體中的 AOX 可以使極長鏈脂肪酸 THA 做一次 β -oxidation, 漸漸確立 AOX 在 DHA 合成中扮演的角色(Voss et al., 1991)。缺乏 AOX 活性會使病人產生神經方面的疾病, 因此此酵素被認為是 DHA 合成的速率重要步驟(Wanders et al., 2000)。曾經有學者使用 Y79 細胞株進行實驗, Y79 是視網膜瘤(retinoblastoma)細胞株, 視網膜與腦神經皆是人體 DHA 含量最豐富的地方, 在那個實驗作者給予細胞 0 至 70 μ M ALA, 發現 DHA 隨著 ALA 處理濃度增加而降低, 而 70 μ M 的 ALA 會抑制 AOX 的基因表現, 此結果與我們實驗相類似, 但在這篇研究卻發現 7 μ M ALA 會提高 AOX 表現約 2 倍, 但在本篇實驗中給 SH-SY5Y 細胞 10 μ M ALA 並不會影響 AOX 基因表現(Langelier et al., 2003)。Bernoud 等學者將大鼠腦部皮質神經細胞做初代培養, 發現此細胞無法順利將 ALA 延長合成 DHA(Bernoud et al., 1998)。另外, 曾有研究使用大鼠腦部

的星狀細胞(astrocyte)，給予細胞 ALA 或 EPA，同樣看到 DPA 的累積及 DHA 含量下降，但他們發現此現象是由於 DPA 延長過程受阻所致(Innis and Dyer, 2002)。而在我們實驗中，DHA 的合成率低也許跟 AOX 基因及蛋白表現受抑制有關(**Figure 6.、8. & 10.**)。

其他研究顯示，由大鼠海馬迴神經細胞看到 DHA 可由前驅物轉換過來(Kaduce et al., 2008)，另外，若先將大鼠腦部的星狀細胞分化，細胞內 DHA 合成途徑就可進行(Williard et al., 2001)。因此，腦部不同區域的神經細胞及其細胞型態，皆有可能影響 DHA 合成情形，而這些細胞被認為是腦部提供 DHA 的來源。

第四節 AOX 調控機制

PPRE 是 AOX 起動子上被研究最多的序列，一般認為由 PPAR 與 RXR 結合之後可促進下游基因轉錄，動物實驗顯示，餵食大鼠 PPAR α agonist (ciprofibrate)後肝臟中 AOX 基因表現提高，以促進脂肪酸氧化(Reddy et al., 1986)。若小鼠缺乏 PPAR α (PPAR $\alpha^{-/-}$)或是 AOX(AOX $^{-/-}$)，就會降低飢餓(fasting)誘發脂肪酸氧化的能力，而肝臟缺乏 AOX 活性的小鼠，會有脂肪肝的現象產生(Hashimoto et al., 2000)。另外，餵食動物魚油後會促進肝臟 peroxisomal β -oxidation 之相關基因，例如：AOX，因此可以降低血液中三酸甘油酯濃度(Halminski et al., 1991)，這個現象可能是經由 PPAR α 調控。有些證據顯示 EPA 可活化 PPAR α ，促進 PPAR α 標的基因的表現，因此 EPA 被視為是 PPAR α 的 agonist(Desvergne, 2007)。我們實驗顯示，給予肝細胞 ALA 及 EPA，可以些微促進 AOX 的基因表現(**Figure 2. & 4.**)，相似於 PPAR agonist 的作用，EPA 可以促進肝細胞中 AOX promoter 的活性(**Figure 13.**)，EPA 更是可以增加肝細胞中 AOX 的蛋白表現(**Figure 12.**)，與先前研究結果相符。

不同的 PPAR isoform 存在於不同組織器官，除了上述提及 PPAR α 主要存於肝臟外，對腦部系統而言，PPAR δ mRNA 在大鼠 CNS 發育早期含量最多，而 PPAR α 及 PPAR γ mRNA 則是在 CNS 發育晚期短暫的被偵測到(Braissant and Wahli,

1998)。若將大鼠腦部細胞做初代培養，可發現在神經元及星狀細胞皆有 PPAR δ 表現，並且可以由其 agonist(L-165041)活化，促進 acylCoA synthase 2 基因轉錄 (Basu-Modak et al., 1999)。另外，小鼠腦部 glial cell 中，一些參與 oligodendrocytes 分化的蛋白，例如 myelin basic protein 和 proteolipid protein，其基因轉錄皆可被 PPAR δ agonist 促進(Saluja et al., 2001)。而在 1999 年，以純化出 EPA 與 PPAR δ 之 ligand-binding domain 結合的結晶，也由 X - ray crystallographic analysis 分析出結構 (Xu et al., 1999)。另外，其他神經細胞也曾被拿來研究與 PPAR γ 的關係，結果顯示 PPAR γ agonist(15-deoxy- δ prostaglandin J2 和 GW1929) 會降低 LA-N-5 neuroblastoma cell line 的生長，促進其分化或細胞凋亡(Han et al., 2001)，而在 L1 glioblastoma cell line(Cimini et al., 2000)、HPA astrocytic cells 及 T98G astrocytoma cell line 皆有此現象(Chattopadhyay et al., 2000)。而曾有研究顯示 HCT116 colorectal cancer cell line 中，PPAR γ 結合到 AOX 起動子上面 PPRE 序列，且效率較 PPAR δ 好(He et al., 1999)。這些顯示 PPAR α 、 γ 及 δ 都可能透過與 AOX promoter 上 PPRE 結合參與 AOX 基因表現的調節。

一般認為脂肪酸被視為是 PPAR agonists，但是有些文獻卻顯示不同的脂肪酸對於不同的 PPAR 可能存在不同的調控。曾經有報導指出 LA 與 AA 可結合至 *Xenopus* PPAR γ (Kliwer et al., 1997)，但這些脂肪酸卻不會增加 PPAR γ 的轉錄活性(Forman et al., 1997)。在 HepG2 細胞株中，*n*-3 及 *n*-6 系列的 PUFA 皆會促進 PPAR 的活性(Wolfrum et al., 2001)。而在 MCF-7 breast adenocarcinoma cell line 中，只有 *n*-3 PUFA 會去抑制 PPAR 的活性，但是 *n*-6 及 *n*-9 系列 PUFA 則沒有此現象(Thoennes et al., 2000)。

曾有學者使用 3T3-L1 adipose like cell line，藉由 electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 的實驗發現 AA 的類似物 ETYA (eicosatetraenoic acid) 會干擾 PPAR γ 結合到 DNA 上(Long and Pekala, 1996)。在 HCT116 細胞株也看到 DHA 藉由透過干擾 PPAR γ 及 PPAR δ 結合到 AOX 起動子的 PPRE，會抑制 PPAR γ 及 PPAR δ 所促進的基因轉錄(Lee and Hwang, 2002)。

在我們實驗顯示，神經細胞中EPA會抑制AOX基因表現，降低AOX promoter的活性，以及減少AOX蛋白含量。但是PPAR α 、PPAR γ 及PPAR δ agonist皆會些微促進AOX的蛋白表現(Figure 14.)，因此我們認為EPA對AOX的調控可能與PPAR無直接關係。PUFA可藉由多種途徑進行基因調控，除了上面所述可以做為轉錄因子的ligand外，它也可調節一些轉錄因子的基因表現、影響轉錄因子mRNA的穩定度或是調控其蛋白生成步驟。例如：PUFA會降低SREBP-1的基因表現以致降低細胞核內SREBP-1含量，就是其中一個例子。但是可受SREBP-1調控的蛋白多是與脂肪合成相關，因此AOX這種參與脂肪酸氧化的酵素是否也受SREBP-1調控還須更進一步的研究。另一方面，當ALA及EPA處裡濃度增加時，可能會增加他們代謝產物的生成，因此，不論是前驅物或是產物，這些n-3PUFA除了可能會向下調節AOX基因轉錄，也可能影響AOX mRNA的穩定度，也許這是另一個AOX表現被抑制的原因。

第五節 EPA 影響 AOX 表現之可能生理意義

肝臟是脂質代謝中心，存在有很多酵素將脂肪酸氧化產能，在我們實驗中 EPA 會促進肝細胞 AOX 的蛋白表現，已有研究顯示魚油會降低小鼠血中三酸甘油酯(Halminski et al., 1991)。另外，腦部需要很多極長鏈多元不飽和脂肪酸來維持其構造及功能，若含量過低可能會影響腦部發育或是智力發展(Florent-Bechard et al., 2007)，因此 EPA 抑制 AOX 基因表現也許就是一種保護機制，防止重要的多元不飽和脂肪酸走向氧化分解，以維持其在腦部的含量。

第六節 總結

在本篇論文中，我們看到 HepG2 細胞株對於 ALA 及 EPA 轉換成 DHA 的效率皆偏低，可能是因為這些 PUFA 抑制了 $\Delta 6$ -desaturase 的基因表現，而造成 DHA 合成減少。而 EPA 在 HepG2 細胞株可能是透過 PPAR α 的活化，促進 AOX 的基因及

蛋白表現，符合先前研究的結果。但是，SH-SY5Y 細胞株中 ALA 及 EPA 代謝成 DHA 也是有受阻的情形，根據我們的實驗發現，這兩種 PUFA 除了會些微抑制 Δ 6-desaturase 的基因表現外，都會明顯抑制 AOX 的基因表現，可能就是這些抑制作用致使 DHA 合成率偏低。而其中 EPA 減少 AOX promoter 的轉錄活性及降低蛋白表現是我們比較驚訝的地方，這與以往在肝臟觀察到 EPA 會增加 AOX 表現的情形不一樣。由我們的結果推測在神經細胞中 EPA 對於 AOX 的抑制可能不是透過 PPAR 作用，至於何種機制導致這樣的結果還需以後深入探討。

在腦神經系統中存在很多不同型態的神經細胞，對於在 SH-SY5Y 細胞株所看到的現象，是否能代表生物體腦部的運作情形，還需要更進一步用其他細胞驗證。



第五章 圖表



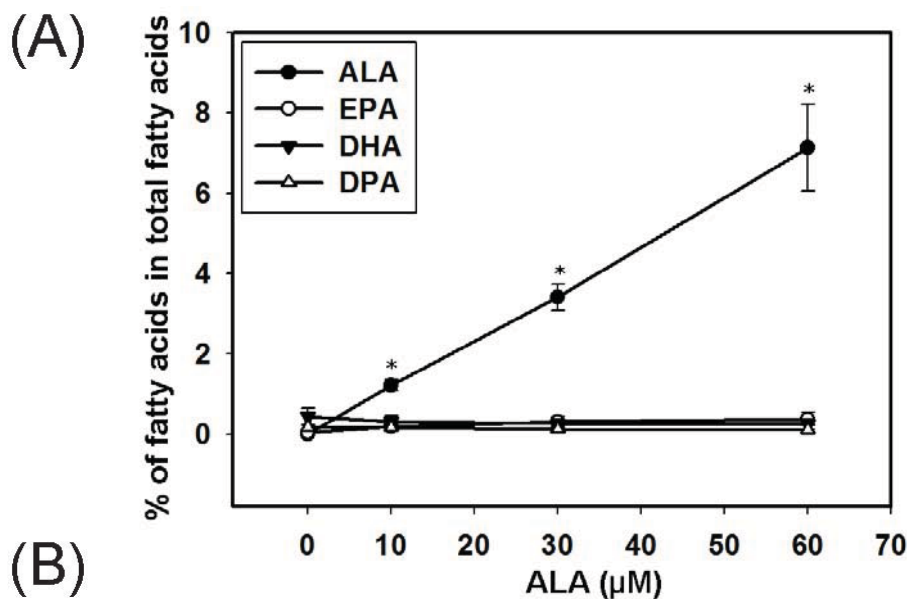


Figure 1. Changes of ALA, EPA, DPA, and DHA in total fatty acids of HepG2 cells incubated with increasing amounts of ALA in the medium.

HepG2 cells were seeded and grown as described in the Methods. At 24h after seeding, the medium was replaced with medium containing 0, 10, 30 or 60 μM ALA and cultured for 48h further. Fatty acid profile in the total lipid of the cells were analyzed by gas chromatography (GC). Values are mean \pm SD of three independent experiments. Values marked with asterisks are significantly different from that of untreated control (no ALA supplementation) ($P < 0.05$).

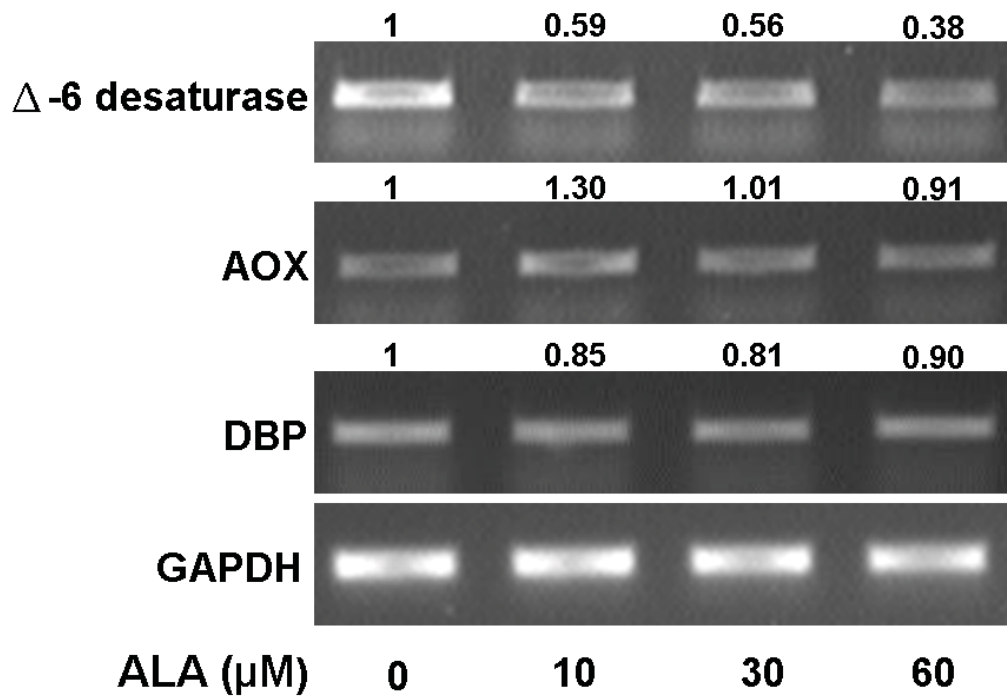


Figure 2. Effect ALA on the abundance of the hepatic Δ -6 desaturase, AOX and DBP transcripts in HepG2 cells.

HepG2 cells were treated with 0, 10, 30 or 60 μ M ALA for 48h as described in figure 1. Total RNA was harvested, and mRNA levels of Δ -6 desaturase, AOX, DBP and GAPDH were determined by RT-PCR assay. Levels of Δ -6 desaturase, AOX, and DBP mRNA levels were normalized to the level of GAPDH and expressed relative to those in the untreated cells (relative value = 1).

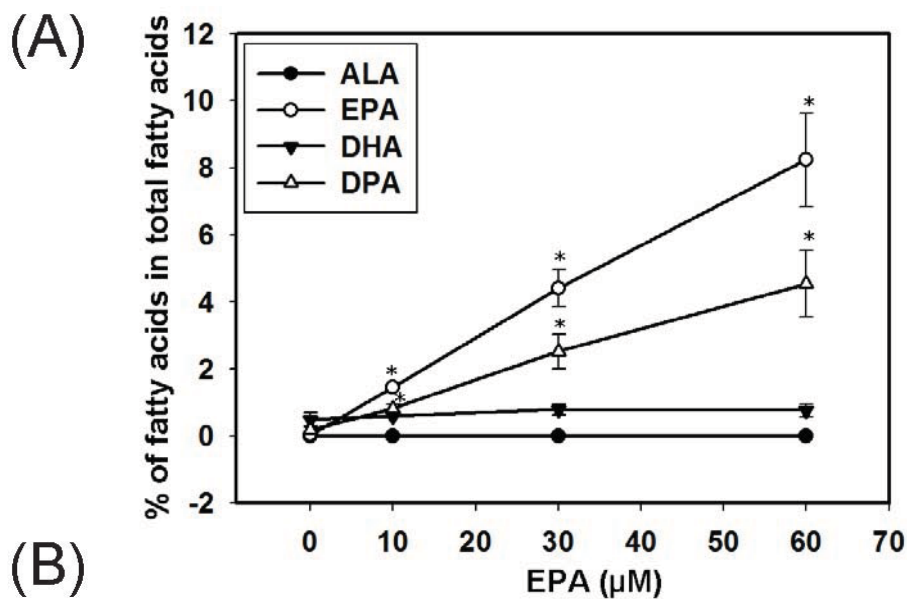


Figure 3. Content of ALA, EPA, DPA, and DHA in fatty acids of HepG2 cells incubated in medium supplemented with 10-60 μM EPA.

HepG2 cells were incubated in medium supplemented with 0 to 60 μM EPA for 48h. Fatty acid compositions were analyzed by GC. Values are mean \pm SD of three independent experiments. Values marked with asterisks are significantly different from that of the untreated control ($P < 0.05$).

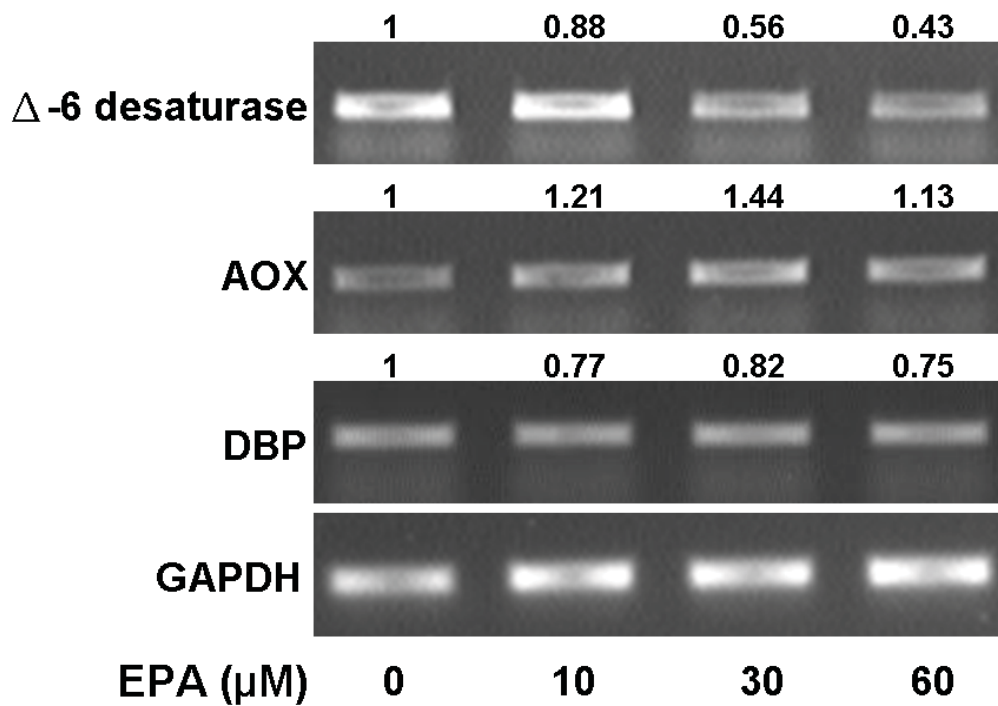


Figure 4. Effects of EPA on the mRNA levels of Δ -6 desaturase, AOX and DBP in the HepG2 cells.

HepG2 cells were grown in the absence (0) or presence of 10, 30, or 60 μ M EPA for 48h as described in figure 3. Total RNA was harvested and the mRNA abundance was analyzed by RT-PCR assay. Level for mRNA abundance were estimated as described in figure 2.

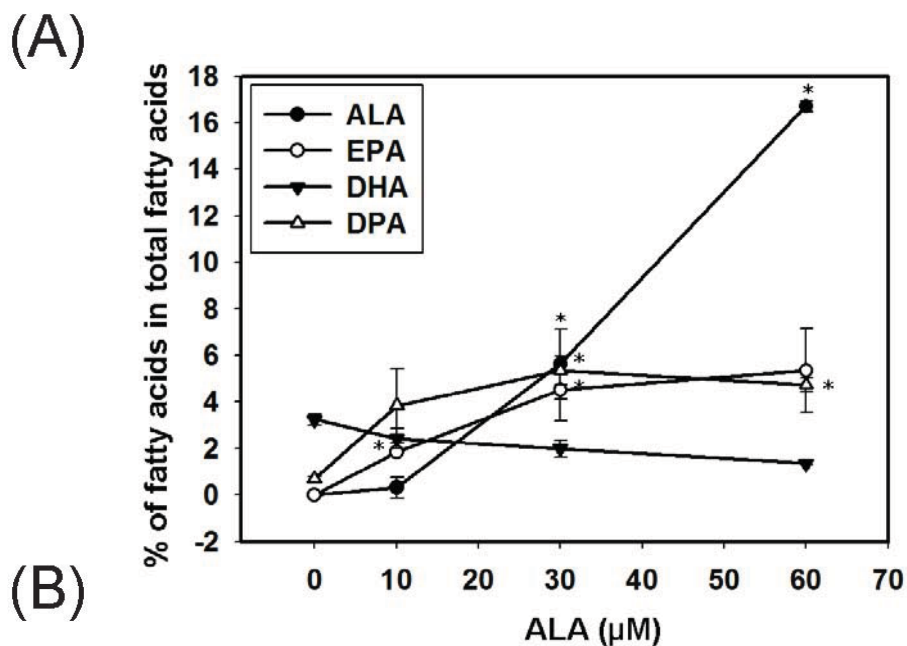


Figure 5. Changes of the ALA, EPA, DHA and DPA in total fatty acids from SH-SY5Y cells culture with increasing concentrations of ALA.

SH-SY5Y cells were cultured as described in Materials and Methods and supplemented with increasing concentrations of ALA (10, 30, or 60 μM) for 48 h. Fatty acids compositions were analyzed by GC. Results are expressed as the percentage of total fatty acids. Values are mean ± SD of three independent experiments. Asterisks indicate that the value is significantly different from that of the untreated control of each fatty acid ($P < 0.05$).

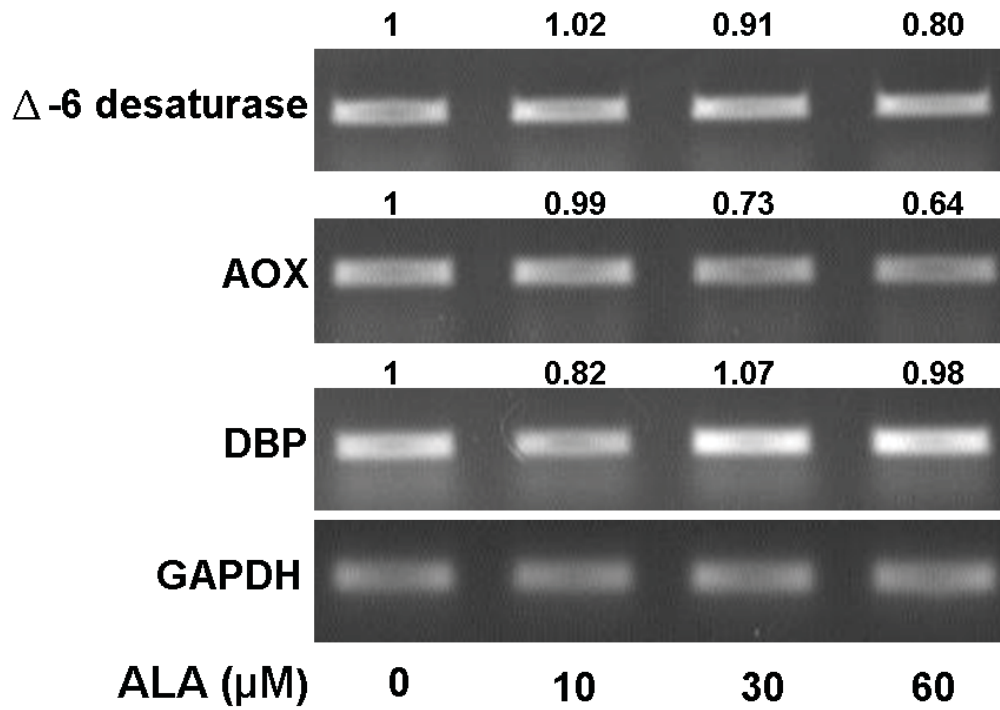
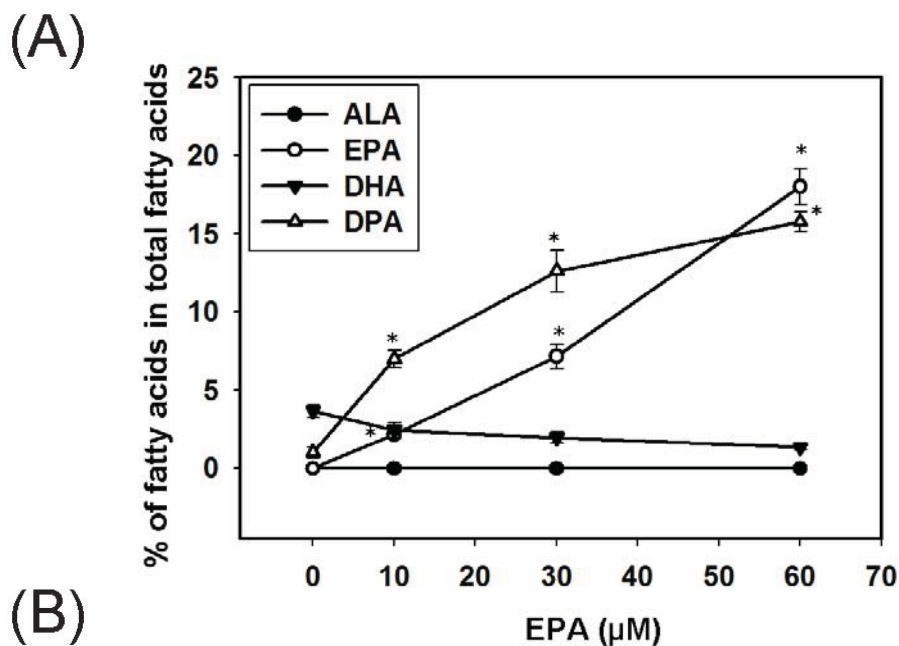


Figure 6. Changes in the neuron abundance of Δ -6 desaturase, AOX and DBP mRNA in response to ALA in SH-SY5Y cells.

Neuron mRNA abundance of Δ -6 desaturase, AOX, DBP, and GAPDH were measured by RT-PCR in SH-SY5Y cell treated with 0 to 60 μ M ALA. Values for mRNA abundance were estimated as described in figure 2.



Fatty acids (% by weight)	EPA (μM)			
	0	10	30	60
Saturated				
C14:0	1.72 ± 0.10	1.72 ± 0.00	1.78 ± 0.02	1.74 ± 0.14
C16:0	23.75 ± 0.07	23.25 ± 0.87	20.55 ± 0.69*	19.57 ± 0.07*
C18:0	22.50 ± 0.60	22.35 ± 1.13	20.60 ± 0.53	19.18 ± 0.58*
Monounsaturated				
C16:1 n -7	2.11 ± 0.02	2.81 ± 0.81	2.56 ± 0.23	1.78 ± 0.55
C16:1 n -9	3.31 ± 0.03	2.76 ± 0.64	2.24 ± 0.13*	1.61 ± 0.23*
C18:1 n -9	22.54 ± 0.47	20.12 ± 1.38	16.73 ± 1.32*	13.86 ± 1.99*
n-6 Polyunsaturated				
C18:2 n -6	0.74 ± 0.17	1.22 ± 0.14	1.33 ± 0.44	1.22 ± 0.04
C20:4 n -6	7.88 ± 0.09	6.30 ± 0.16*	5.92 ± 0.09*	0.00 ± 0.00*
C22:4 n -6	2.84 ± 0.28	1.29 ± 0.16*	0.94 ± 0.11*	0.79 ± 0.04*
C22:5 n -6	0.70 ± 0.06	0.26 ± 0.11*	0.24 ± 0.06*	0.20 ± 0.03*

Figure 7. Changes of ALA, EPA, DPA, and DHA in total fatty acids of SH-SY5Y cells after supplementation with increasing concentrations of EPA.

Cells were incubated in medium containing 0 to 60μM EPA for 48h, fatty acid profile was determined by GC. Each value is the mean ± SD of three independent experiments, and expressed in percentage by weight of total fatty acids. Single asterisk depicts results significantly different from that of the untreated control, P<0.05.

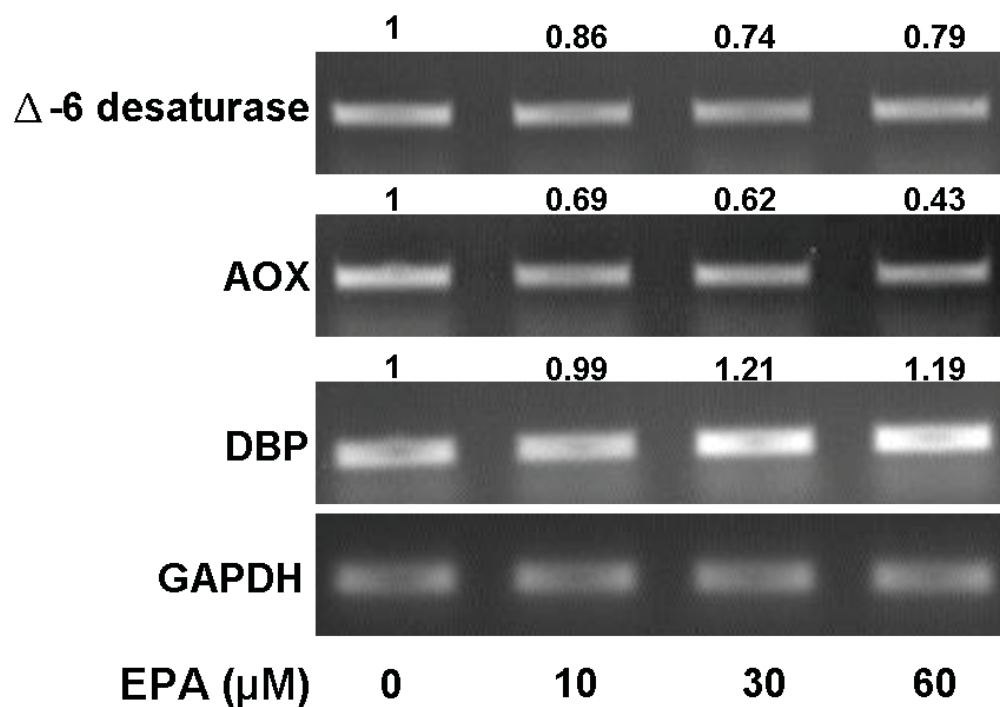


Figure 8. Effect of various concentrations of EPA on mRNA levels of Δ -6 desaturase, AOX and DBP in SH-SY5Y cells.

Confluent SH-SY5Y was cultured for 48h in medium that containing 0 to 60 μ M EPA as described in figure 7. A representative RT- PCR depicting the effect of EPA on the SH-SY5Y abundance of Δ -6 desaturase, AOX, DBP, and GAPDH mRNA. Values for mRNA abundance were estimated as described in figure 2.

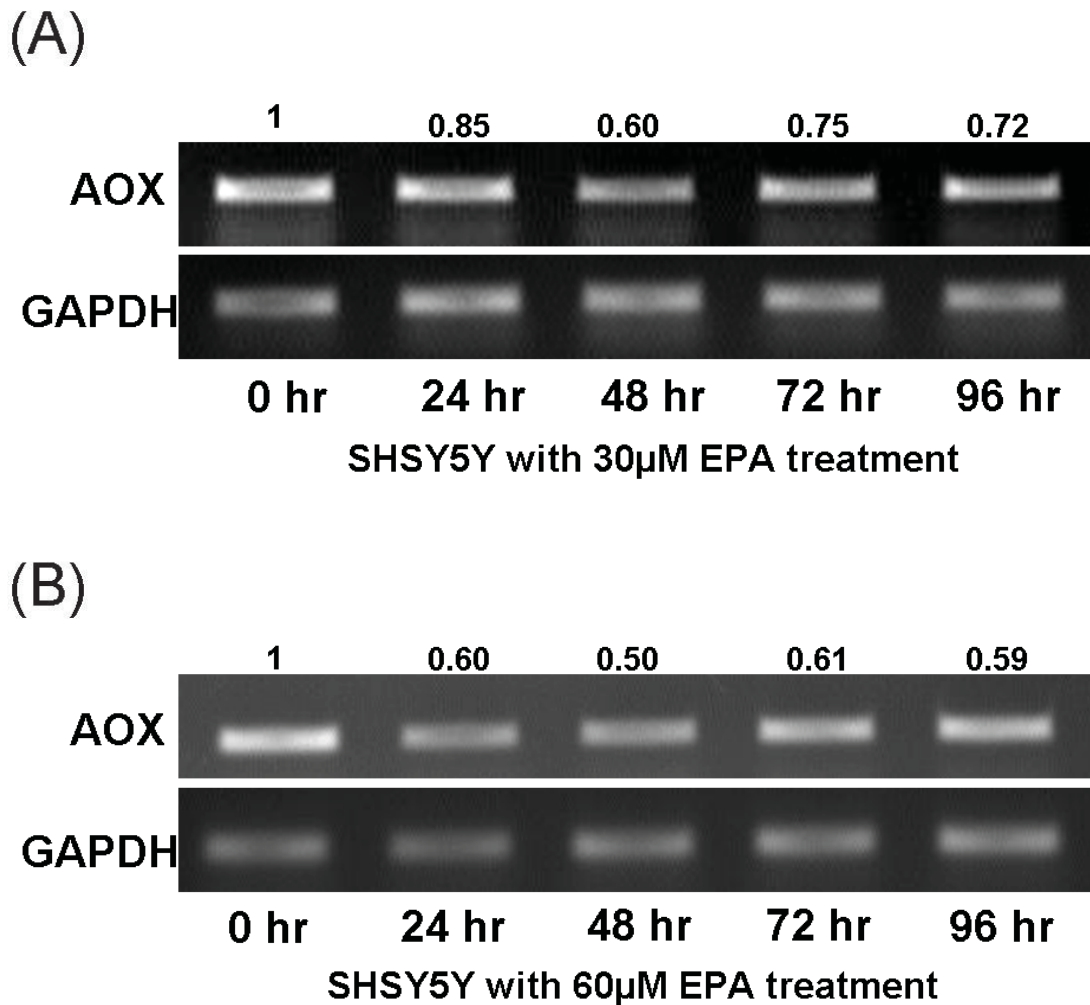


Figure 9. Time-course effect of EPA on mRNA expression of AOX in SH-SY5Y cells.

SH-SY5Y cells were treated without or with 30 μ M EPA (A) or 60 μ M EPA (B) and total RNA were harvested at the time points as indicated, levels of AOX and GAPDH mRNA were determined by RT-PCR. The abundance of mRNA was expressed as fold over the value of control (relative value =1). Values for mRNA abundance were calculated as described in figure 2.

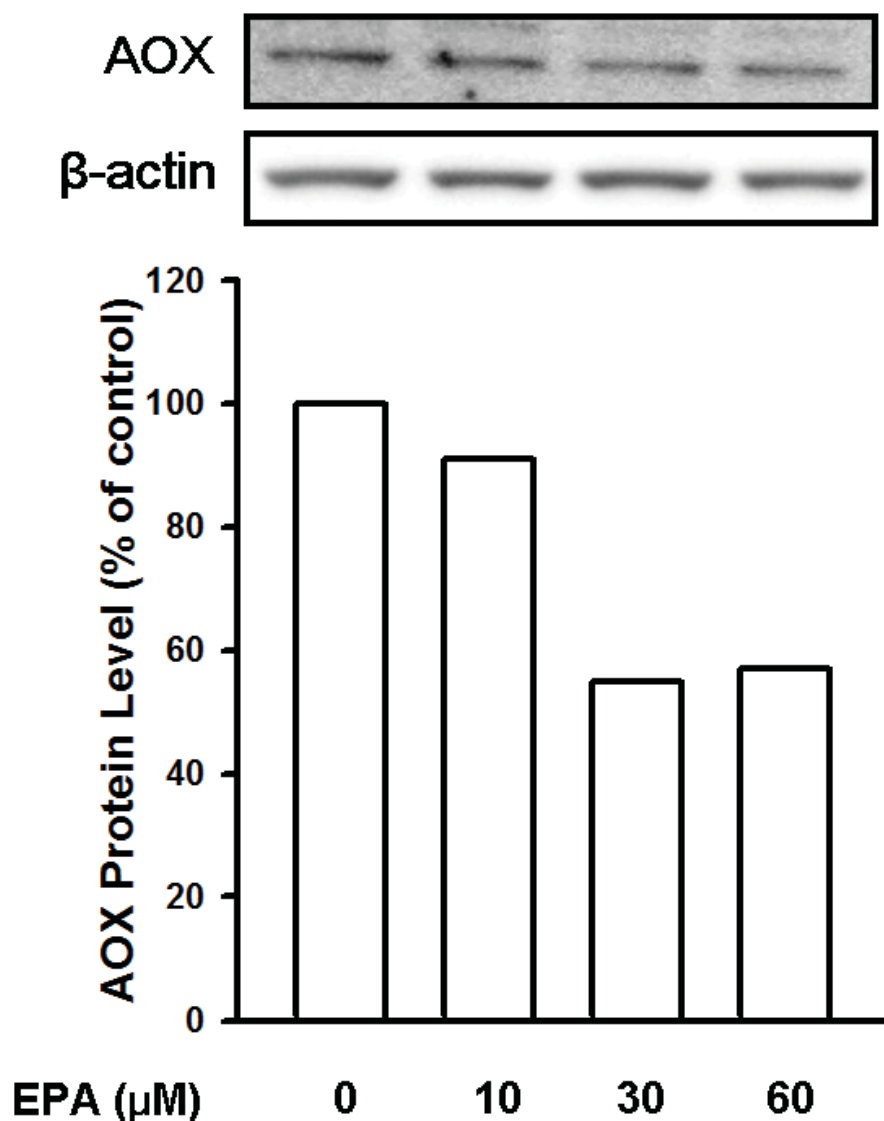


Figure 10. Protein levels of AOX in SH-SY5Y cells treated with EPA for 48h.

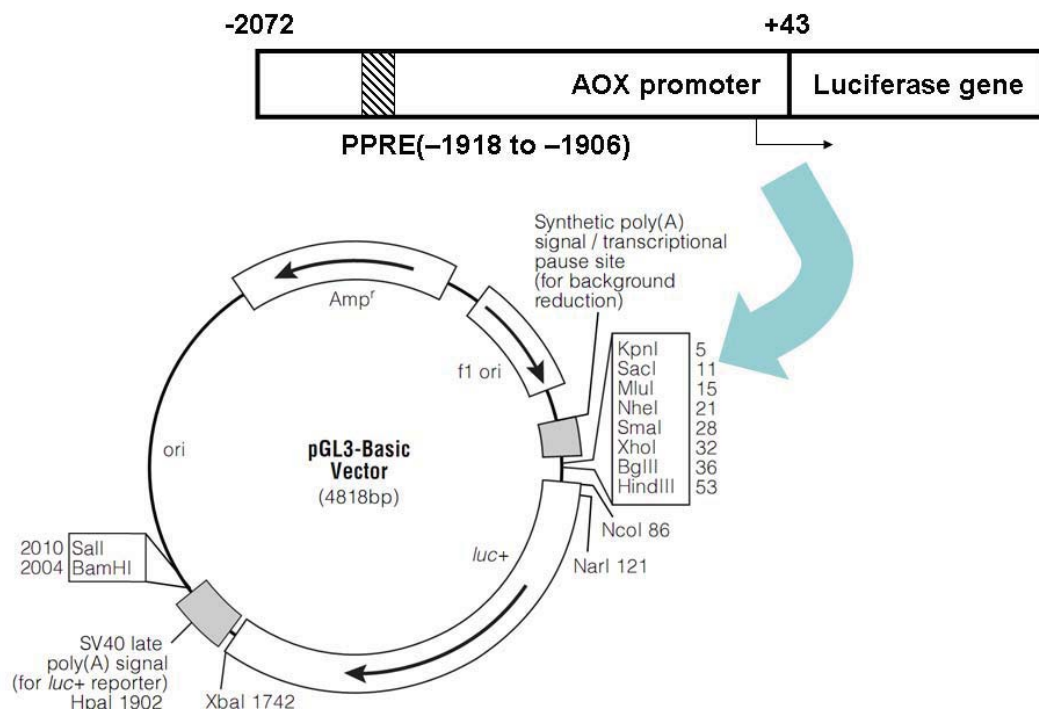
Confluent SH-SY5Y cells maintained for 48 h in a medium that contained 0 to 60μM of EPA as described in figure 7. 60μM protein were loading on each lane, and separated by SDS-PAGE and then blotted with AOX antibody. A representative Western blot depicting the effect of EPA on the SH-SY5Y abundance of AOX and β-actin protein levels. AOX protein levels were normalized to those for β-actin and expressed relative to that in the untreated cell (relative value = 100). Values are mean of two independent experiments.

(A)

-2072 TATTCTTGTA ATTCTCGTGT AAATTTGAAA TTATTTCAAA ATAAAAACTC
-2022 AGCAAATTTA GCTCTTCATC TAAGTCTTTT CTATTCAATG CTAAGTACAC
-1972 CCCTTATCAT TGTTACATTA AGAGCAATTG GTTTCCTAGA ATATTAGAAC
-1922 TAGAAGGTCA GCTGTCAAAGC AGCCATTTGT TCACTCCACA AAGATTTCTT
-1872 GAGCACCTTT AGCGGGGCAG GCACTGTGCC AGGTACAGAG AATAAACTAG
-1822 ACACCCTCTC TGCTGTTGAA GGGGCCTGAG ATCAGCAGCT TAATAAGACA
-1772 AATGAGGATC CTGAGGTCCT AGGGGTTAAG AGTGTGTATT ATAGTTCTAT
-1722 TATTCAAATT ATGAATGTTA TGCATCTCTC GTAGTTTTAC TTCTGAGAAA
-1672 ACCAAAGTCA TAGTATTACA CAGACTACAG ACAGGCTAGG CGCA -1629



(B)



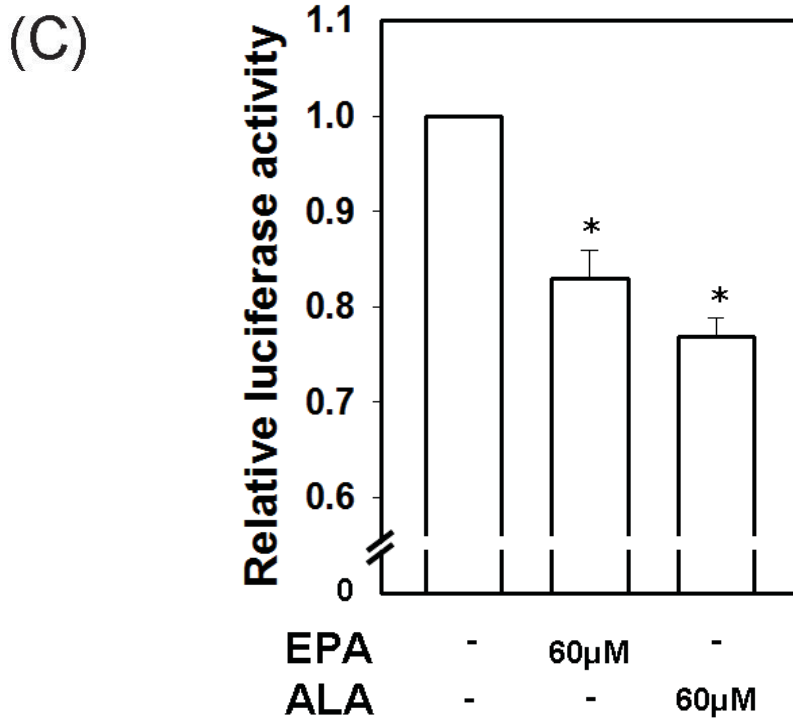


Figure 11. Regulation of the human AOX promoter activity by EPA and ALA in SH-SY5Y cells.

(A) Sequence of the human AOX gene promoter from -2072 to -1629 was shown (accession no. NG_008190). Numbers quoted are relative to the transcriptional start site at +1. Bold underlined sequence indicates the PPRE consisting of the sequence AGGTCA G CTGTCA (-1918 to -1906). (B) Promoter of human AOX gene from -2072 to +43 was cloned into pGL3-basic luciferase. Schematic structure of phAOX-Luc reporter constructs were shown. (C) AOX promoter-luciferase construct (phAOX-Luc) was transiently transfected into SH-SY5Y cells. The phRLTK was co-transfected as reference plasmid. Twenty four hours after transfection, each well was untreated or treated with 60µM EPA or ALA. After 24 h incubation, firefly luciferase activity were measured and normalized to Renilla luciferase activity and relative luciferase are expressed relative to that of the untreated cells (relative value = 100). Values are mean \pm SD of three independent experiments. Asterisks indicate that the values are significantly different from the control ($P < 0.05$).

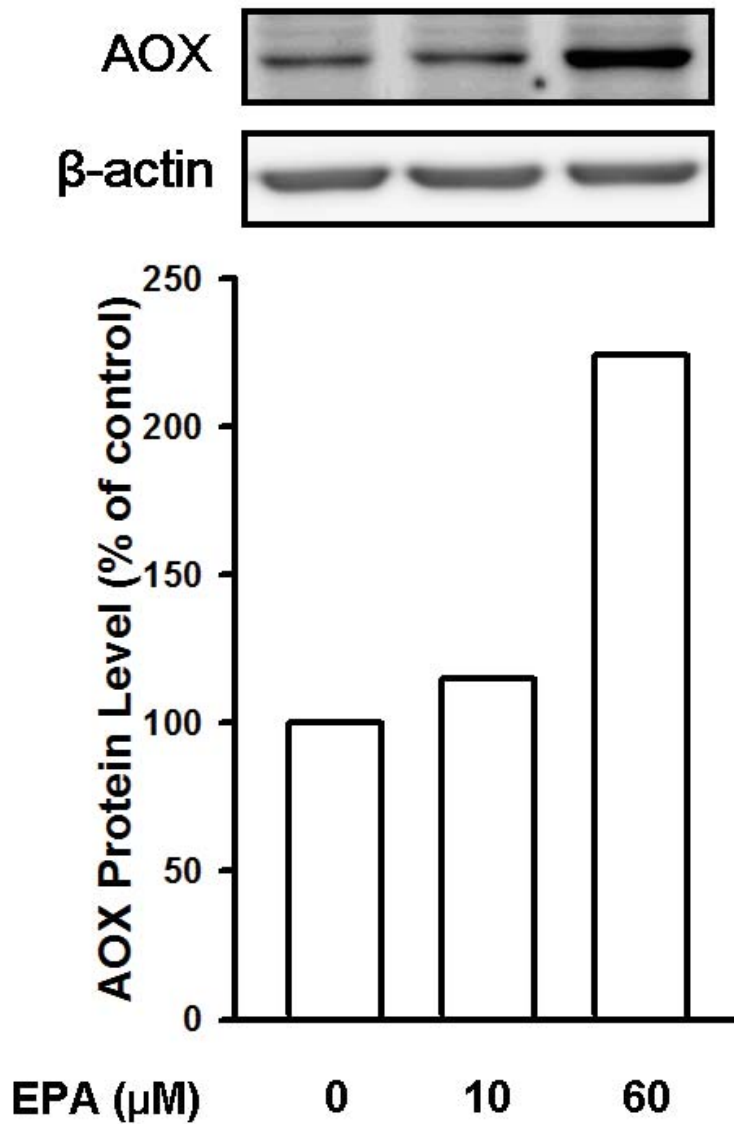


Figure 12. Protein levels of AOX in HepG2 cells treated with EPA for 48h.

HepG2 cells were grown in the absence (0) or presence of 10 or 60μM EPA for 48h as described in figure 3. Total protein was collected and levels of AOX and β-actin were detected by Western blot with specific antibodies. AOX protein levels were normalized with β-actin as described in figure 11. Values are mean of two independent experiments.

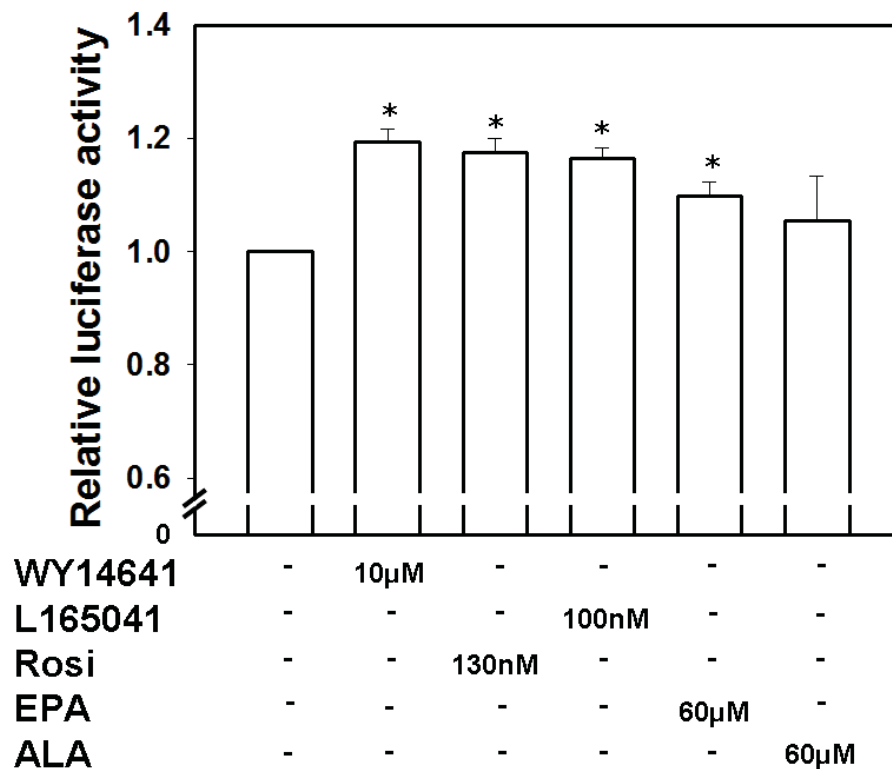


Figure 13. Regulation of the human AOX promoter by PPAR agonists, EPA or ALA in HepG2 cells.

AOX promoter–luciferase construct (phAOX-Luc) and phRLTK were transiently co-transfected into HepG2 cells. At 24h after transfection, each well was treated with either WY14641, L165041, Rosiglitazone, EPA or ALA for 24h. Firefly luciferase activities were measured and normalized as described in Figure 11(C). Values are mean \pm SD of three independent experiments. Asterisks indicate that the values are significantly different from the control ($P < 0.05$).

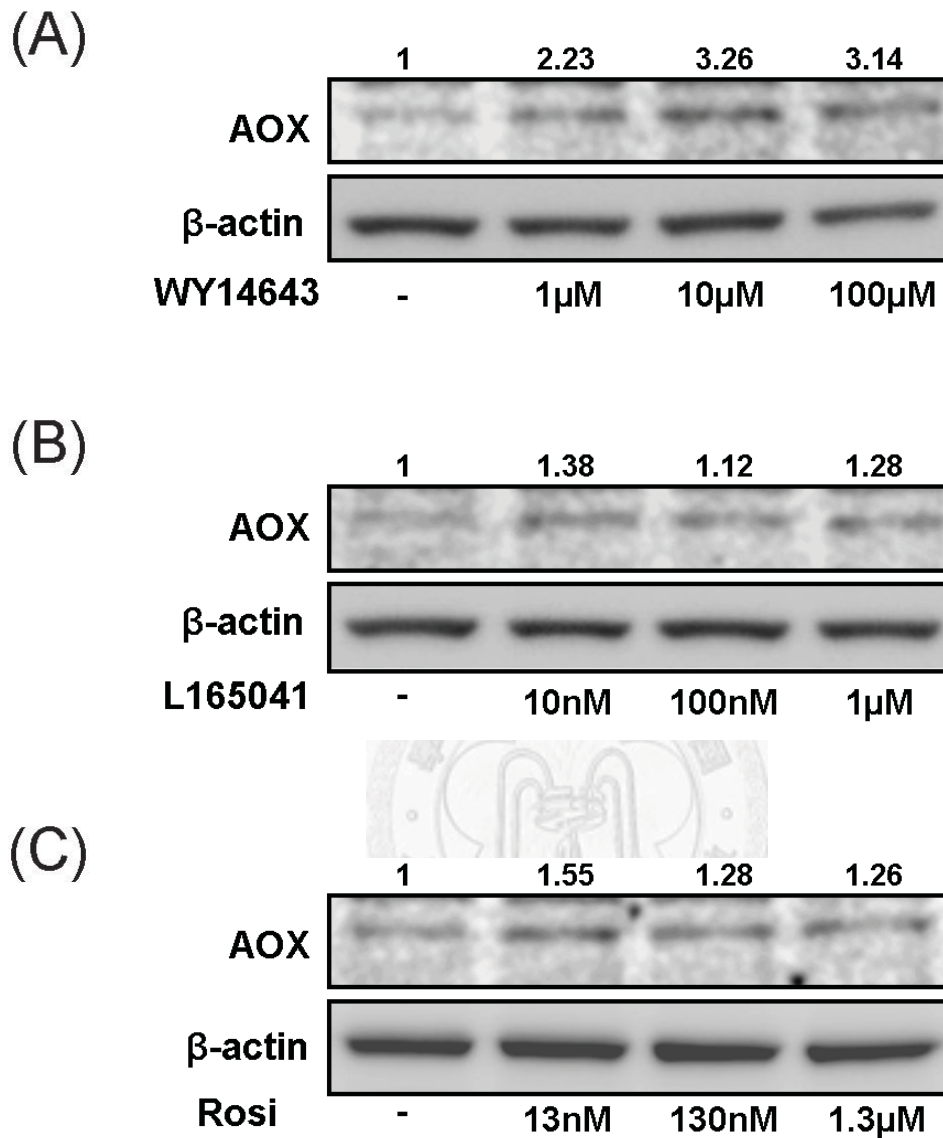


Figure 14. Change of AOX protein level in response to WY14643, L165041 or Rosiglitazone treatment in the SH-SY5Y cells.

SH-SY5Y cells were treated with different PPAR agonist for 24h and the cell lysates were analyzed by Western blot (50 μg total protein/lane) using antibodies that specifically recognize AOX and β-actin. AOX protein levels were estimated as described in figure 11.

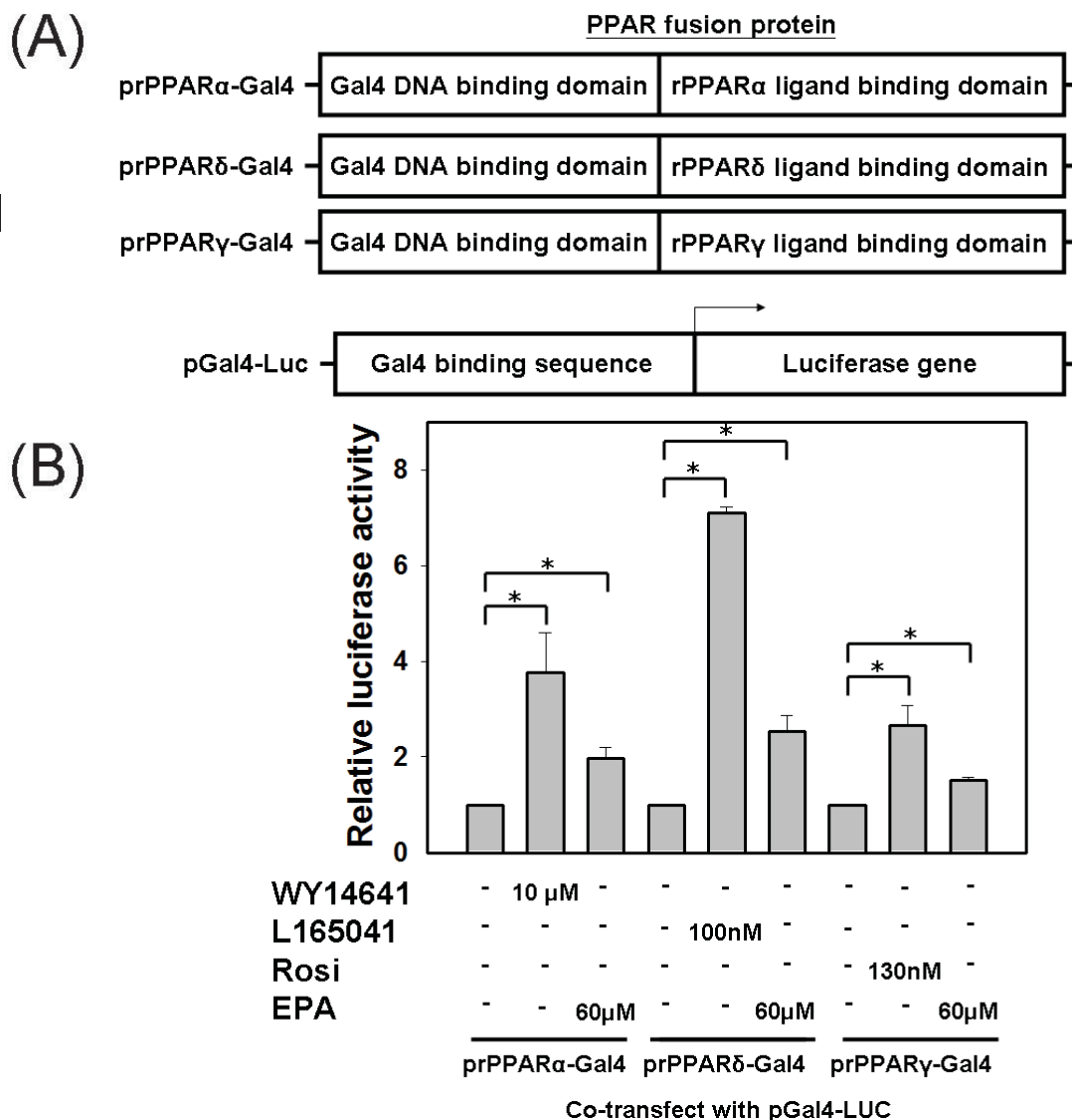
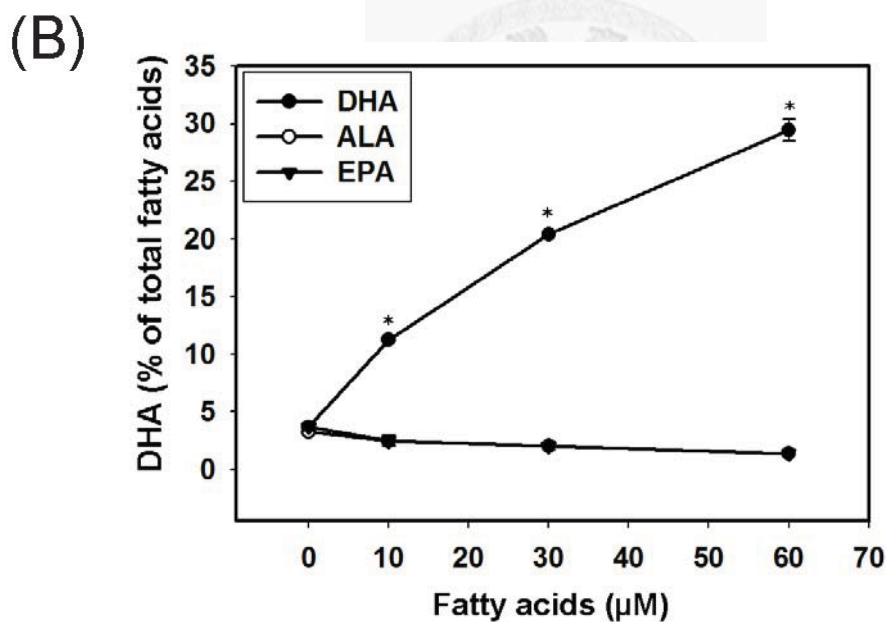
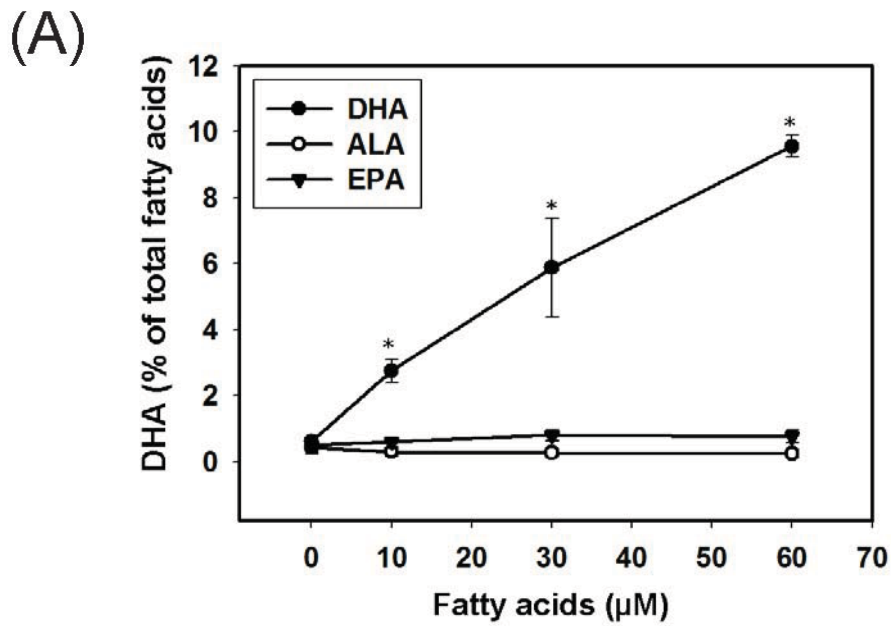


Figure 15. Transcription activity of rPPAR by either PPAR agonist or PUFA in SH-SY5Y cells.

Schematic structure of prPPAR-Gal4 and pGal4-Luc reporter constructs. (B) Reporter plasmid pGal4-Luc and phRLTK were co-transfect into SH-SY5Y with prPPAR α -Gal4, prPPAR δ -Gal4, or prPPAR γ -Gal4 fusion protein expression plasmid (pGal4-Luc: prPPAR -Gal4: phRLTK = 2.5 : 2.5 : 1). After 24h incubation, each well was treated with either PPAR agonist or EPA as indicated. Cells were collected 24h after treatment, and then the luciferase activities were measured and normalized as described in Figure 11(C). Values are mean \pm SD of three independent experiments. Asterisks indicate that the values are significantly different from the control ($P < 0.05$).





Supplementary figure 1. Changes of DHA in total fatty acids of HepG2 cells or of SH-SY5Y cells after supplementation with ALA, EPA or DHA.

HepG2 cells (A) or SH-SY5Y cells (B) were incubated in medium supplemented with ALA, EPA, or DHA for 48h. Fatty acid compositions were analyzed by GC. Values are mean \pm SD of three independent experiments. Values marked with asterisks are significantly different from that of the untreated control ($P < 0.05$).

Fatty acids	FBS (% by weight)	µg fatty acid / mL medium	
		5% FBS	10% FBS
Saturated			
C14:0	0.00	0.00	0.00
C16:0	29.61	5.51	11.01
C18:0	17.03	3.17	6.33
Monounsaturated			
16:1 <i>n</i> -7	3.69	0.69	1.37
16:1 <i>n</i> -9	1.68	0.31	0.62
18:1 <i>n</i> -7	5.70	1.06	2.12
18:1 <i>n</i> -9	18.29	3.40	6.80
<i>n</i>-6 Polyunsaturated			
18:2 <i>n</i> -6	5.68	1.06	2.11
20:4 <i>n</i> -6	8.82	1.64	3.28
22:4 <i>n</i> -6	1.70	0.32	0.63
22:5 <i>n</i> -6	1.49	0.28	0.55
<i>n</i>-3 Polyunsaturated			
18:3 <i>n</i> -3	0.00	0.00	0.00
20:5 <i>n</i> -3	0.54	0.10	0.20
22:5 <i>n</i> -3	0.16	0.03	0.06
22:6 <i>n</i> -3	3.14	0.58	1.17

Supplementary table 1. Fatty acid composition of culture medium



參考文獻

- Abedin, L., Lien, E.L., Vingrys, A.J., and Sinclair, A.J. (1999). The effects of dietary alpha-linolenic acid compared with docosahexaenoic acid on brain, retina, liver, and heart in the guinea pig. *Lipids* 34, 475-482.
- Ander, B.P., Weber, A.R., Rampersad, P.P., Gilchrist, J.S., Pierce, G.N., and Lukas, A. (2004). Dietary flaxseed protects against ventricular fibrillation induced by ischemia-reperfusion in normal and hypercholesterolemic Rabbits. *J Nutr* 134, 3250-3256.
- Barcelo-Coblijn, G., Collison, L.W., Jolly, C.A., and Murphy, E.J. (2005). Dietary alpha-linolenic acid increases brain but not heart and liver docosahexaenoic acid levels. *Lipids* 40, 787-798.
- Barcelo-Coblijn, G., Hogyes, E., Kitajka, K., Puskas, L.G., Zvara, A., Hackler, L., Jr., Nyakas, C., Penke, Z., and Farkas, T. (2003). Modification by docosahexaenoic acid of age-induced alterations in gene expression and molecular composition of rat brain phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11321-11326.
- Basu-Modak, S., Braissant, O., Escher, P., Desvergne, B., Honegger, P., and Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor beta regulates acyl-CoA synthetase 2 in reaggregated rat brain cell cultures. *J Biol Chem* 274, 35881-35888.
- Bernoud, N., Fenart, L., Benistant, C., Pageaux, J.F., Dehouck, M.P., Moliere, P., Lagarde, M., Cecchelli, R., and Lecerf, J. (1998). Astrocytes are mainly responsible for the polyunsaturated fatty acid enrichment in blood-brain barrier endothelial cells in vitro. *J Lipid Res* 39, 1816-1824.
- Berthou, L., Saladin, R., Yaqoob, P., Branellec, D., Calder, P., Fruchart, J.C., Deneffe, P., Auwerx, J., and Staels, B. (1995). Regulation of rat liver apolipoprotein A-I, apolipoprotein A-II and acyl-coenzyme A oxidase gene expression by fibrates and dietary fatty acids. *Eur J Biochem* 232, 179-187.

- Bhaumik, P., Koski, M.K., Glumoff, T., Hiltunen, J.K., and Wierenga, R.K. (2005). Structural biology of the thioester-dependent degradation and synthesis of fatty acids. *Curr Opin Struct Biol* 15, 621-628.
- Bocos, C., Gottlicher, M., Gearing, K., Banner, C., Enmark, E., Teboul, M., Crickmore, A., and Gustafsson, J.A. (1995). Fatty acid activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR). *J Steroid Biochem Mol Biol* 53, 467-473.
- Bowen, R.A., and Clandinin, M.T. (2000). High dietary 18:3n-3 increases the 18:3n-3 but not the 22:6n-3 content in the whole body, brain, skin, epididymal fat pads, and muscles of suckling rat pups. *Lipids* 35, 389-394.
- Braissant, O., and Wahli, W. (1998). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development. *Endocrinology* 139, 2748-2754.
- Brenner, R.R., and Peluffo, R.O. (1966). Effect of saturated and unsaturated fatty acids on the desaturation in vitro of palmitic, stearic, oleic, linoleic, and linolenic acids. *J Biol Chem* 241, 5213-5219.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89, 331-340.
- Buckley, R., Shewring, B., Turner, R., Yaqoob, P., and Minihane, A.M. (2004). Circulating triacylglycerol and apoE levels in response to EPA and docosahexaenoic acid supplementation in adult human subjects. *Br J Nutr* 92, 477-483.
- Burdge, G.C. (2006). Metabolism of alpha-linolenic acid in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75, 161-168.

- Burdge, G.C., and Wootton, S.A. (2002). Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *Br J Nutr* 88, 411-420.
- Calder, P.C. (2004). n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clin Sci (Lond)* 107, 1-11.
- Chattopadhyay, N., Singh, D.P., Heese, O., Godbole, M.M., Sinohara, T., Black, P.M., and Brown, E.M. (2000). Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS) in human astrocytic cells: PPARgamma agonists as inducers of apoptosis. *J Neurosci Res* 61, 67-74.
- Cho, H.P., Nakamura, M., and Clarke, S.D. (1999a). Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase. *J Biol Chem* 274, 37335-37339.
- Cho, H.P., Nakamura, M.T., and Clarke, S.D. (1999b). Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian Delta-6 desaturase. *J Biol Chem* 274, 471-477.
- Cimini, A., Cristiano, L., Bernardo, A., Farioli-Vecchioli, S., Stefanini, S., and Ceru, M.P. (2000). Presence and inducibility of peroxisomes in a human glioblastoma cell line. *Biochim Biophys Acta* 1474, 397-409.
- Desvergne, B. (2007). PPARs special issue: anchoring the present to explore the future. *Biochim Biophys Acta* 1771, 913-914.
- Desvergne, B., and Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20, 649-688.
- Dhopeshiwarkar, G.A., and Subramanian, C. (1976). Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in the developing brain: II. Metabolic transformations of intracranially

administered [3-(14)C] Eicosatrienoic acid, evidence for lack of delta8 desaturase. *Lipids* 11, 689-692.

Dhopeswarkar, G.A., Subramanian, C., and Mead, J.F. (1971). Rapid uptake of (I- 14 C) acetate by the adult rat brain 15 seconds after carotid injection. *Biochim Biophys Acta* 248, 41-47.

Fiaccavento, R., Carotenuto, F., Minieri, M., Masuelli, L., Vecchini, A., Bei, R., Modesti, A., Binaglia, L., Fusco, A., Bertoli, A., *et al.* (2006). Alpha-linolenic acid-enriched diet prevents myocardial damage and expands longevity in cardiomyopathic hamsters. *Am J Pathol* 169, 1913-1924.

Florent-Bechard, S., Malaplate-Armand, C., Koziel, V., Kriem, B., Olivier, J.L., Pillot, T., and Oster, T. (2007). Towards a nutritional approach for prevention of Alzheimer's disease: biochemical and cellular aspects. *J Neurol Sci* 262, 27-36.

Forman, B.M., Chen, J., and Evans, R.M. (1997). Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4312-4317.

Golovko, M.Y., Rosenberger, T.A., Feddersen, S., Faergeman, N.J., and Murphy, E.J. (2007). Alpha-synuclein gene ablation increases docosahexaenoic acid incorporation and turnover in brain phospholipids. *J Neurochem* 101, 201-211.

Gottlicher, M., Widmark, E., Li, Q., and Gustafsson, J.A. (1992). Fatty acids activate a chimera of the clofibrilic acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4653-4657.

Halminski, M.A., Marsh, J.B., and Harrison, E.H. (1991). Differential effects of fish oil, safflower oil and palm oil on fatty acid oxidation and glycerolipid synthesis in rat liver. *J Nutr* 121, 1554-1561.

- Hamano, H., Nabekura, J., Nishikawa, M., and Ogawa, T. (1996). Docosahexaenoic acid reduces GABA response in substantia nigra neuron of rat. *J Neurophysiol* 75, 1264-1270.
- Han, S.W., Greene, M.E., Pitts, J., Wada, R.K., and Sidell, N. (2001). Novel expression and function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human neuroblastoma cells. *Clin Cancer Res* 7, 98-104.
- Hannah, V.C., Ou, J., Luong, A., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2001). Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. *J Biol Chem* 276, 4365-4372.
- Harper, C.R., Edwards, M.J., DeFilippis, A.P., and Jacobson, T.A. (2006). Flaxseed oil increases the plasma concentrations of cardioprotective (n-3) fatty acids in humans. *J Nutr* 136, 83-87.
- Hashimoto, T. (1999). Peroxisomal beta-oxidation enzymes. *Neurochem Res* 24, 551-563.
- Hashimoto, T., Cook, W.S., Qi, C., Yeldandi, A.V., Reddy, J.K., and Rao, M.S. (2000). Defect in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. *J Biol Chem* 275, 28918-28928.
- He, T.C., Chan, T.A., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1999). PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 99, 335-345.
- Horton, J.D., Shah, N.A., Warrington, J.A., Anderson, N.N., Park, S.W., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2003). Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12027-12032.

- Igal, R.A., Mandon, E.C., and de Gomez Dumm, I.N. (1991). Abnormal metabolism of polyunsaturated fatty acids in adrenal glands of diabetic rats. *Mol Cell Endocrinol* 77, 217-227.
- Igarashi, M., Ma, K., Chang, L., Bell, J.M., and Rapoport, S.I. (2008). Rat heart cannot synthesize docosahexaenoic acid from circulating alpha-linolenic acid because it lacks elongase-2. *J Lipid Res* 49, 1735-1745.
- Innis, S.M., and Dyer, R.A. (2002). Brain astrocyte synthesis of docosahexaenoic acid from n-3 fatty acids is limited at the elongation of docosapentaenoic acid. *J Lipid Res* 43, 1529-1536.
- Janssen, A., Baes, M., Gressens, P., Mannaerts, G.P., Declercq, P., and Van Veldhoven, P.P. (2000). Docosahexaenoic acid deficit is not a major pathogenic factor in peroxisome-deficient mice. *Lab Invest* 80, 31-35.
- Jensen, C.L., Chen, H., Fraley, J.K., Anderson, R.E., and Heird, W.C. (1996). Biochemical effects of dietary linoleic/alpha-linolenic acid ratio in term infants. *Lipids* 31, 107-113.
- Kaduce, T.L., Chen, Y., Hell, J.W., and Spector, A.A. (2008). Docosahexaenoic acid synthesis from n-3 fatty acid precursors in rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 105, 1525-1535.
- Keller, H., Dreyer, C., Medin, J., Mahfoudi, A., Ozato, K., and Wahli, W. (1993). Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2160-2164.
- Kew, S., Gibbons, E.S., Thies, F., McNeill, G.P., Quinlan, P.T., and Calder, P.C. (2003). The effect of feeding structured triacylglycerols enriched in eicosapentaenoic or

- docosahexaenoic acids on murine splenocyte fatty acid composition and leucocyte phagocytosis. *Br J Nutr* 90, 1071-1080.
- Kew, S., Mesa, M.D., Tricon, S., Buckley, R., Minihane, A.M., and Yaqoob, P. (2004). Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on immune cell composition and function in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 79, 674-681.
- Kim, H.K., and Choi, H. (2001). Dietary alpha-linolenic acid lowers postprandial lipid levels with increase of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid contents in rat hepatic membrane. *Lipids* 36, 1331-1336.
- Kliwer, S.A., Sundseth, S.S., Jones, S.A., Brown, P.J., Wisely, G.B., Koble, C.S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T.M., Lenhard, J.M., *et al.* (1997). Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4318-4323.
- Langelier, B., Alessandri, J.M., Perruchot, M.H., Guesnet, P., and Laviaille, M. (2005). Changes of the transcriptional and fatty acid profiles in response to n-3 fatty acids in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Lipids* 40, 719-728.
- Langelier, B., Furet, J.P., Perruchot, M.H., and Alessandri, J.M. (2003). Docosahexaenoic acid membrane content and mRNA expression of acyl-CoA oxidase and of peroxisome proliferator-activated receptor-delta are modulated in Y79 retinoblastoma cells differently by low and high doses of alpha-linolenic acid. *J Neurosci Res* 74, 134-141.
- Lauritzen, L., Hansen, H.S., Jorgensen, M.H., and Michaelsen, K.F. (2001). The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res* 40, 1-94.

- Lazarow, P.B., and De Duve, C. (1976). A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 2043-2046.
- Lee, J.Y., and Hwang, D.H. (2002). Docosahexaenoic acid suppresses the activity of peroxisome proliferator-activated receptors in a colon tumor cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 298, 667-674.
- Long, S.D., and Pekala, P.H. (1996). Regulation of GLUT4 gene expression by arachidonic acid. Evidence for multiple pathways, one of which requires oxidation to prostaglandin E2. *J Biol Chem* 271, 1138-1144.
- Martinez, M. (1992). Abnormal profiles of polyunsaturated fatty acids in the brain, liver, kidney and retina of patients with peroxisomal disorders. *Brain Res* 583, 171-182.
- Matsuzaka, T., Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Yoshikawa, T., Hasty, A.H., Tamura, Y., Osuga, J., Okazaki, H., Iizuka, Y., *et al.* (2002). Dual regulation of mouse Delta(5)- and Delta(6)-desaturase gene expression by SREBP-1 and PPARalpha. *J Lipid Res* 43, 107-114.
- McLennan, P.L., and Dallimore, J.A. (1995). Dietary canola oil modifies myocardial fatty acids and inhibits cardiac arrhythmias in rats. *J Nutr* 125, 1003-1009.
- McNamara, R.K., and Carlson, S.E. (2006). Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75, 329-349.
- Moon, Y.A., Shah, N.A., Mohapatra, S., Warrington, J.A., and Horton, J.D. (2001). Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* 276, 45358-45366.

- Moore, S.A., Hurt, E., Yoder, E., Sprecher, H., and Spector, A.A. (1995). Docosaehaenoic acid synthesis in human skin fibroblasts involves peroxisomal retroconversion of tetracosahexaenoic acid. *J Lipid Res* 36, 2433-2443.
- Morisaki, N., Kanzaki, T., Fujiyama, Y., Osawa, I., Shirai, K., Matsuoka, N., Saito, Y., and Yoshida, S. (1985). Metabolism of n-3 polyunsaturated fatty acids and modification of phospholipids in cultured rabbit aortic smooth muscle cells. *J Lipid Res* 26, 930-939.
- Nakamura, M.T., Cho, H.P., and Clarke, S.D. (2000). Regulation of hepatic delta-6 desaturase expression and its role in the polyunsaturated fatty acid inhibition of fatty acid synthase gene expression in mice. *J Nutr* 130, 1561-1565.
- Nara, T.Y., He, W.S., Tang, C., Clarke, S.D., and Nakamura, M.T. (2002). The E-box like sterol regulatory element mediates the suppression of human Delta-6 desaturase gene by highly unsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 111-117.
- Nassar, B.A., Huang, Y.S., Manku, M.S., Das, U.N., Morse, N., and Horrobin, D.F. (1986). The influence of dietary manipulation with n-3 and n-6 fatty acids on liver and plasma phospholipid fatty acids in rats. *Lipids* 21, 652-656.
- Neat, C.E., Thomassen, M.S., and Osmundsen, H. (1980). Induction of peroxisomal beta-oxidation in rat liver by high-fat diets. *Biochem J* 186, 369-371.
- Orellana, M., Fuentes, O., Rosenbluth, H., Lara, M., and Valdes, E. (1992). Modulation of rat liver peroxisomal and microsomal fatty acid oxidation by starvation. *FEBS Lett* 310, 193-196.
- Peterson, L.D., Jeffery, N.M., Thies, F., Sanderson, P., Newsholme, E.A., and Calder, P.C. (1998). Eicosapentaenoic and docosaehaenoic acids alter rat spleen leukocyte

fatty acid composition and prostaglandin E2 production but have different effects on lymphocyte functions and cell-mediated immunity. *Lipids* 33, 171-180.

Rambjor, G.S., Walen, A.I., Windsor, S.L., and Harris, W.S. (1996). Eicosapentaenoic acid is primarily responsible for hypotriglyceridemic effect of fish oil in humans. *Lipids* 31 *Suppl*, S45-49.

Reddy, J.K., Goel, S.K., Nemali, M.R., Carrino, J.J., Laffler, T.G., Reddy, M.K., Sperbeck, S.J., Osumi, T., Hashimoto, T., Lalwani, N.D., *et al.* (1986). Transcription regulation of peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase and enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in rat liver by peroxisome proliferators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 1747-1751.

Ren, B., Thelen, A.P., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., and Jump, D.B. (1997). Polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic fatty acid synthase and S14 gene expression does not require peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem* 272, 26827-26832.

Royonette, C.E., Calder, P.C., Dupertuis, Y.M., and Pichard, C. (2004). n-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clin Nutr* 23, 139-151.

Salem, N., Jr., Litman, B., Kim, H.Y., and Gawrisch, K. (2001). Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids* 36, 945-959.

Saluja, I., Granneman, J.G., and Skoff, R.P. (2001). PPAR delta agonists stimulate oligodendrocyte differentiation in tissue culture. *Glia* 33, 191-204.

Sampath, H., and Ntambi, J.M. (2005). Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* 25, 317-340.

Schoonjans, K., Staels, B., and Auwerx, J. (1996a). The peroxisome proliferator

activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1302, 93-109.

Schoonjans, K., Staels, B., and Auwerx, J. (1996b). Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res* 37, 907-925.

Schwab, U.S., Callaway, J.C., Erkkila, A.T., Gynther, J., Uusitupa, M.I., and Jarvinen, T. (2006). Effects of hempseed and flaxseed oils on the profile of serum lipids, serum total and lipoprotein lipid concentrations and haemostatic factors. *Eur J Nutr* 45, 470-477.

Scott, B.L., and Bazan, N.G. (1989). Membrane docosahexaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2903-2907.

Sheaff Greiner, R.C., Zhang, Q., Goodman, K.J., Giussani, D.A., Nathanielsz, P.W., and Brenna, J.T. (1996). Linoleate, alpha-linolenate, and docosahexaenoate recycling into saturated and monounsaturated fatty acids is a major pathway in pregnant or lactating adults and fetal or infant rhesus monkeys. *J Lipid Res* 37, 2675-2686.

Spady, D.K. (1993). Regulatory effects of individual n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on LDL transport in the rat. *J Lipid Res* 34, 1337-1346.

Stillwell, W., Shaikh, S.R., Zerouga, M., Siddiqui, R., and Wassall, S.R. (2005). Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts. *Reprod Nutr Dev* 45, 559-579.

Tabor, D.E., Kim, J.B., Spiegelman, B.M., and Edwards, P.A. (1999). Identification of conserved cis-elements and transcription factors required for sterol-regulated transcription of stearoyl-CoA desaturase 1 and 2. *J Biol Chem* 274, 20603-20610.

- Tang, C., Cho, H.P., Nakamura, M.T., and Clarke, S.D. (2003). Regulation of human delta-6 desaturase gene transcription: identification of a functional direct repeat-1 element. *J Lipid Res* 44, 686-695.
- Teran-Garcia, M., Rufo, C., Nakamura, M.T., Osborne, T.F., and Clarke, S.D. (2002). NF-Y involvement in the polyunsaturated fat inhibition of fatty acid synthase gene transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 1295-1299.
- Thoennes, S.R., Tate, P.L., Price, T.M., and Kilgore, M.W. (2000). Differential transcriptional activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by omega-3 and omega-6 fatty acids in MCF-7 cells. *Mol Cell Endocrinol* 160, 67-73.
- Tugwood, J.D., Issemann, I., Anderson, R.G., Bundell, K.R., McPheat, W.L., and Green, S. (1992). The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J* 11, 433-439.
- Vanhove, G.F., Van Veldhoven, P.P., Franssen, M., Denis, S., Eyssen, H.J., Wanders, R.J., and Mannaerts, G.P. (1993). The CoA esters of 2-methyl-branched chain fatty acids and of the bile acid intermediates di- and trihydroxycoprostanic acids are oxidized by one single peroxisomal branched chain acyl-CoA oxidase in human liver and kidney. *J Biol Chem* 268, 10335-10344.
- Voss, A., Reinhart, M., Sankarappa, S., and Sprecher, H. (1991). The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. *J Biol Chem* 266, 19995-20000.
- Wanders, R.J., van Grunsven, E.G., and Jansen, G.A. (2000). Lipid metabolism in peroxisomes: enzymology, functions and dysfunctions of the fatty acid alpha- and beta-oxidation systems in humans. *Biochem Soc Trans* 28, 141-149.

- Wang, Y., Botolin, D., Christian, B., Busik, J., Xu, J., and Jump, D.B. (2005). Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases. *J Lipid Res* 46, 706-715.
- Wilkinson, P., Leach, C., Ah-Sing, E.E., Hussain, N., Miller, G.J., Millward, D.J., and Griffin, B.A. (2005). Influence of alpha-linolenic acid and fish-oil on markers of cardiovascular risk in subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. *Atherosclerosis* 181, 115-124.
- Williard, D.E., Harmon, S.D., Kaduce, T.L., Preuss, M., Moore, S.A., Robbins, M.E., and Spector, A.A. (2001). Docosahexaenoic acid synthesis from n-3 polyunsaturated fatty acids in differentiated rat brain astrocytes. *J Lipid Res* 42, 1368-1376.
- Wolfrum, C., Borrmann, C.M., Borchers, T., and Spener, F. (2001). Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2323-2328.
- Worgall, T.S., Sturley, S.L., Seo, T., Osborne, T.F., and Deckelbaum, R.J. (1998). Polyunsaturated fatty acids decrease expression of promoters with sterol regulatory elements by decreasing levels of mature sterol regulatory element-binding protein. *J Biol Chem* 273, 25537-25540.
- Xu, H.E., Lambert, M.H., Montana, V.G., Parks, D.J., Blanchard, S.G., Brown, P.J., Sternbach, D.D., Lehmann, J.M., Wisely, G.B., Willson, T.M., *et al.* (1999). Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell* 3, 397-403.
- Xu, J., Teran-Garcia, M., Park, J.H., Nakamura, M.T., and Clarke, S.D. (2001). Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein-1 expression by accelerating transcript decay. *J Biol Chem* 276, 9800-9807.