

KESAN PERLAKUAN γ -TOKOTRIENOL DAN α -TOKOFEROL KE ATAS
LANGKAH PENGISYARATAN TRANSDUKSI DALAM
SEL KANSER HEPAR



TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEH IJAZAH
DOKTOR FALSAFAH



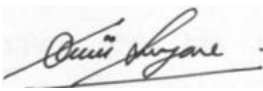
FAKULTI PERUBATAN
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA
KUALA LUMPUR

2004

PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang tiap-tiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

11 Mac 2004



AINI SUZANA ADENAN
P14206

PENGHARGAAN

Saya ingin memanjatkan kesyukuran kehadiran Allah SWT di atas kemudahan dan keizinanNya untuk saya menyempurnakan penyelidikan ini dan juga kerana menganugerahkan saya dengan seorang penyelia yang amat berdedikasi dan amat saya kagumi iaitu Profesor Doktor Wan Zurinah Wan Ngah. Melalui geran IRPA 06-02-02-0013 dan 06-02-02-0076 beliau telah membiayai segala keperluan kajian saya sehingga berjaya. Segala tunjuk ajar, bimbingan, jasa dan dorongan kuat dari beliau tidak akan terbalas oleh saya dengan keterbatasan seorang insan. Hanya Allah SWT yang mampu membalas segala jasa baik beliau ... AMIN.

Tidak lupa juga saya rakamkan penghargaan terhadap semua kakitangan dan rakan-rakan seperjuangan di Jabatan Biokimia, Fakulti Perubatan UKM di atas segala bantuan dan persahabatan yang dicurahkan. Kalian telah mengindahkan hari-hari yang dilalui sepanjang penyelidikan ini.

Akhirnya, saya amat menghargai segala dorongan dan sokongan padu dan jitu dari kedua ibubapa dan adik-beradik tersayang, sahabat yang setia Zurida dan terutama sekali pengorbanan dan kasih sayang dari suami dan anak yang tercinta, Zulkarnain dan Ummi Natasha.

ABSTRAK

Kesan perlakuan dua vitamin E kelapa sawit, γ -tokotrienol (GTT) dan α -tokoferol (ATF) ke atas sel kanser hepar HepG2 telah dikaji. Dua kaedah penyediaan vitamin E (0-750 μ M) sebagai rawatan ke atas sel telah digunakan iaitu vitamin E tanpa dan dengan preinkubasi serum anak lembu (FCS). Kandungan vitamin E, perubahan viabiliti, proliferasi, sitotoksiti dan apoptosis sel ditentukan. Perubahan ekspresi, fosforilasi dan aktiviti protein-protein yang terlibat di dalam tapak jalan proliferasi dan apoptosis turut diselidik bagi memperincikan mekanisme tindakan vitamin E tersebut. Perlakuan GTT dan ATF tanpa preinkubasi dengan FCS (nGTT dan nATF) tidak mengubah kadar viabiliti atau sitotoksiti sel HepG2. GTT dengan preinkubasi FCS (iGTT) didapati telah merencatkan 50% viabiliti sel pada dos 153 μ M dan meningkatkan sitotoksiti manakala perlakuan ATF dengan preinkubasi FCS (iATF) pula hanya berjaya menurunkan sedikit (16%) kadar viabiliti sel HepG2. Paras proliferasi sel telah direncatkan oleh kedua-dua nGTT dan nATF dengan IC_{50} 582 μ M bagi nGTT dan IC_{40} 500 μ M bagi nATF. iGTT pula memberikan kesan yang lebih ketara iaitu dengan IC_{50} 134 μ M sedangkan iATF menghasilkan kesan antiproliferasi yang setara dengan nATF. Penentuan kadar fragmentasi DNA secara ELISA menunjukkan kadar apoptosis ditingkatkan sebanyak 7 kali ganda hasil perlakuan 150 μ M nGTT manakala 3 kali ganda bagi nATF pada kepekatan 300 μ M. Menariknya, perlakuan iGTT menghasilkan kadar peningkatan apoptosis yang sama manakala iATF langsung tidak mengubah kadar apoptosis. Namun secara morfologi, perlakuan iGTT mengakibatkan bilangan sel apoptosis yang paling tinggi (93%) berbanding perlakuan nGTT (24%), nATF (15%) atau iATF yang langsung tidak sekali-kali menunjukkan ciri-ciri sel yang mengalami apoptosis. Keputusan morfologi ini adalah seiring dengan penentuan apoptosis secara elektroforesis gel agaros yang menghasilkan anak tangga DNA apabila berlaku apoptosis. Kajian HPLC menunjukkan preinkubasi FCS meningkatkan kandungan GTT di dalam sel sehingga 113 kali ganda manakala ATF hanya ditingkatkan sebanyak 14 kali ganda. Kandungan GTT yang banyak di dalam sel mungkin menyebabkan kesan iGTT yang paling hebat berbanding yang lain. Bagi mengenalpasti mekanisme tindakan vitamin E, perubahan di dalam pengisyratan transduksi dikenalpasti. Perlakuan nGTT dan nATF meningkatkan aktiviti keseluruhan/total enzim tirosin kinase sebanyak 18% dan 9% masing-masing manakala peningkatan akibat perlakuan iGTT adalah amat besar iaitu 286%. Ekspresi protein ERK1 dan MEK2 pula diturunkan setelah 6 jam perlakuan nGTT dan nATF. Manakala ekspresi protein kinase C α matang ditingkatkan pada perlakuan 12- dan 24-jam. Malangnya kadar pengaktifan yang dikesan menerusi kadar fosforilasi protein didapati tidak berubah. Protein-protein lain yang didapati tidak berubah dari segi ekspresi adalah STAT3, JNK, p38, ras, Jun, Fas, p53, c-Myc, Bcl2, Bax, kaspase 3 dan kaspase 8. Seterusnya, perlakuan iGTT tidak mengubah mana-mana protein yang dikaji melainkan p53 dan kaspase 8 yang ekspresinya ditingkatkan mulai 15 minit dan 2 jam masing-masing. Sejajar dengan perubahan ekspresi, aktiviti kaspase 8 didapati meningkat sebanyak 2.6-kali selepas perlakuan 3-jam dan memuncak sehingga 3.3 kali ganda pada perlakuan 12-jam. Perubahan-perubahan ini mencadangkan bahawa iGTT mengaruhkan apoptosis dengan pengaktifan pangkal pengisyratan transduksi dan bukan pada hujungnya. Kesimpulannya, kesan antiproliferasi GTT yang melibatkan pengaruh apoptosis adalah lebih ketara berbanding ATF dan preinkubasi dengan FCS menggandakan kesan GTT tersebut. Penentuan kepekatan GTT yang optima bagi merencatkan sel kanser secara spesifik adalah kritikal dan perlu dikaji.

EFFECTS OF γ -TOCOTRIENOL AND α -TOCOPHEROL ON SIGNAL TRANSDUCTION IN HEPATIC CANCER CELLS

ABSTRACT

Effects of palm oil vitamin E isoforms, γ -tocotrienol (GTT) and α -tocopherol (ATF), on HepG2 hepatoma cells were determined. Two preparation methods of vitamin E (0-750 μ M) i.e. with and without fetal calf serum (FCS) preincubation were used as treatments. Changes in cellular vitamin E levels, cell viability, proliferation, cytotoxicity and apoptosis were assessed together with alterations in the proliferative and apoptotic signaling protein expressions, activations and activities. Treatment with normal GTT (nGTT) and ATF (nATF) at a concentration as high as 750 μ M did not alter either viability or cytotoxicity of HepG2 cells. However, FCS preincubated GTT (iGTT) treatment profoundly inhibited cell viability by 50% at 153 μ M and enhanced cytotoxicity while treatment with FCS preincubated ATF (iATF) resulted in a slight decrease (16%) in HepG2 cell viability. Cell proliferation was inhibited by both nGTT and nATF with IC_{50} of 582 μ M and IC_{40} of 500 μ M respectively. In contrast, a more severe effect was observed with iGTT treatment (IC_{50} of 134 μ M) while iATF antiproliferative effect was similar to nATF. DNA fragmentation indicated that apoptosis rate was enhanced 7-fold and 3-fold after treatment with 150 μ M nGTT and 300 μ M nATF respectively. Interestingly iGTT treatment caused a comparable apoptotic rate while iATF treatment had no effect on apoptosis. Despite the similarity in fold increase, morphologically iGTT treatment resulted in higher (93%) number of apoptotic cells compared to nGTT (24%), nATF (15%) or iATF (none). These morphological evaluations were comparable to the apoptotic DNA laddering as detected by agarose gel electrophoresis. HPLC analysis indicated that FCS conjugation enhanced GTT levels in the cells by 113-fold while ATF levels was enhanced by 14-fold. Thus, higher vitamin E content in the cells may account for the greater overall iGTT effects. To elucidate the vitamin E mechanism of action, changes in cell signal transduction were examined. nGTT and nATF treatments increased total tyrosine kinase enzymes activity by 18% and 9% respectively but iGTT enhanced these enzyme activities by 286%. Treatments with nGTT and nATF resulted in a transient decrease in ERK1 and MEK2 protein expression after 6 hours, as detected by western blotting analysis. Additionally the mature form of protein kinase C α expression was increased after 12- and 24-hour. Paradoxically, despite alterations in expression levels, phosphorylation was unaffected. Other signaling proteins which were unaltered include STAT3, JNK, p38, ras, Jun, Fas, p53, c-Myc, Bcl2, Bax, caspase 3 and caspase 8. No change in protein expression or phosphorylation were observed after iGTT treatment except for p53 and the active caspase 8 whose protein expression was enhanced at 15 minutes and 2 hours of treatment respectively. In agreement, caspase 8 enzyme activity was enhanced and peaked (3.3-fold) at 12 hours of treatments. Changes in these signaling profiles may suggest that iGTT induces apoptosis by activating the upstream apoptotic signaling cascade rather than the downstream pathways. In conclusion, these results suggest that GTT is superior compared to ATF as an antiproliferative agent by the induction of apoptosis and FCS preincubation augmented GTT effects. Further research to determine the optimum cellular concentration of GTT is crucial for precise elimination of tumour cells.

KANDUNGAN

	Halaman
PENGAKUAN	ii
PENGHARGAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KANDUNGAN	
SENARAI RAJAH	ix
SENARAI JADUAL	xiii
SENARAI SINGKATAN	xiv

BAB I PENGENALAN

1.1	Hipotesis kajian	3
1.2	Objektif kajian	3

BAB II KAJIAN PERPUSTAKAAN

2.1	Vitamin E	5
2.1.1	Sejarah	5
2.1.2	Struktur kimia	5
2.1.3	Sumber vitamin E	
2.1.4	Serapan dan taburan vitamin E di dalam badan	
2.1.5	Kepentingan vitamin E	9
2.2	Kanser hepar	13
2.3	Hepatokarsinogenesis	13
2.4	Proliferasi	16
2.4.1	Pengenalan	16
2.4.2	Pengisyaratan transduksi proliferasi	19
2.4.3	Tapak jalan MAPK	19
2.4.4	Tapak jalan JAK dan STAT	21
2.4.5	Tapak jalan PKC	23
2.4.6	Myc	24
2.4.7	p53	24
2.5	Apoptosis	26
2.5.1	Pengenalan	26
2.5.2	Tapak jalan pengisyaratan transduksi apoptosis	30
2.6	Vitamin E dan pengisyaratan transduksi	34

BAB III BAHAN DAN KAEDAH

3.1	Bahan	36
3.1.1	Bahan kimia	36
3.1.2	Alat radas	40
3.2	Kaedah	46
3.2.1	Penyediaan alat radas kultur sel	46
3.2.2	Penyediaan media kultur	46
3.2.3	Pengkulturan sel berterusan	47
3.2.4	Pengiraan dan penentuan viabiliti sel	48
3.2.5	Pengawetan sel (Kriopreservasi)	48
3.2.6	Penyahbekuan dan pengkulturan semula sel	49
3.2.7	Penyediaan vitamin E	49
3.2.8	Penentuan kandungan vitamin E dalam sel	50
3.2.9	Asai viabiliti	51
3.2.10	Asai proliferasi	53
3.2.11	Asai sitotoksiti	54
3.2.12	Analisis apoptosis menggunakan kaedah pengesanan fosfolipid fosfatidilserin	55
3.2.13	Analisis apoptosis dengan kaedah ELISA	56
3.2.14	Analisis apoptosis secara morfologi	58
3.2.15	Analisis apoptosis melalui pengesanan anak tangga DNA	59
3.2.16	Penyediaan lisat protein	60
3.2.17	Penentuan kepekatan protein	61
3.2.18	Asai aktiviti tirosin kinase	61
3.2.19	Analisis pemblotan Western	62
3.2.20	Analisis densitometri	67
3.2.21	Asai aktiviti kaspase 8	67
3.2.22	Analisis statistik	68

BAB IV HASIL

4.1	Kesan vitamin E terhadap sel kanser hepar	69
4.1.1	Kandungan vitamin E di dalam sel	69
4.1.2	Perubahan viabiliti sel kanser hepar	71
4.1.3	Perubahan proliferasi sel	73
4.1.4	Perubahan kadar sitotoksiti	73
4.1.5	Perubahan kadar apoptosis sel	73
4.1.5.1	Pengesanan apoptosis dengan kaedah ELISA	76
4.1.5.2	Pengesanan awal apoptosis melalui kedudukan fosfatidil serin	76
4.1.5.3	Pengesanan apoptosis menerusi analisis morfologi	79
4.1.5.4	Pengesanan apoptosis dengan kehadiran anak tangga DNA	79
4.2	Kesan vitamin E terhadap tapak jalan pengisyratan transduksi sel kanser hepar	82

4.2.1	Kesan vitamin E terhadap aktiviti tirosin kinase	82
4.2.2	Perubahan dalam tapak jalan proliferasi	84
4.2.2.1	Tapak jalan JAK dan STAT	84
4.2.2.2	Tapak jalan MAPK	84
4.2.2.3	Tapak jalan PKC	89
4.2.2.4	Myc	92
4.2.3	Perubahan dalam tapak jalan apoptosis	92
4.2.3.1	p53	92
4.2.3.2	Molekul pengisyarat transduksi apoptosis	95
4.2.3.3	Aktiviti kaspase 8	95
4.3	Kesan vitamin E terhadap sel hepar normal	101
4.3.1	Kesan perlakuan vitamin E ke atas sel Chang	101
4.3.2	Kesan perlakuan vitamin E ke atas sel WRL68	106

BAB V PERBINCANGAN DAN KESIMPULAN

5.1	Kesan perlakuan vitamin E terhadap sel kanser hepar	113
5.2	Kesan perlakuan vitamin E ke atas tapak jalan pengisyarat transduksi sel kanser hepar	120
5.2.1	Tapak jalan proliferasi	120
5.2.2	Tapak jalan apoptosis	128
5.3	Kesan perlakuan vitamin E terhadap sel hepar normal	133
5.4	Kesimpulan	134
5.5	Cadangan penyelidikan lanjutan	135

RUJUKAN

SENARAI RAJAH

No. Rajah		Halaman
2.1	Struktur isomer-isomer vitamin E.	6
2.2	Proses hepatokarsinogenesis.	15
2.3	Kitar sel dan sebahagian molekul yang terlibat dalam pengawalaturannya.	17
2.4	Tapak jalan pengisyaratan transduksi famili MAPK yang disusun dalam modul tiga hiraki iaitu MAPKKK, MAPKK dan MAPK.	20
2.5	Pengisyaratan transduksi proliferasi melalui tapak jalan ras/ERK, JAK/STAT dan PKC.	22
2.6	Model dua isyarat yang dirangsangkan oleh Myc.	25
2.7	Perubahan morfologi sel yang berlaku dalam proses apoptosis.	29
2.8	Pengisyaratan transduksi apoptosis.	31
2.9	Model interaksi ahli famili Bcl2 dalam regulasi apoptosis.	33
3.1	Contoh kromatogram analisis HPLC bagi sampel standard.	52
3.2	Penanda-penanda berat molekul protein yang digunakan bagi menentukan saiz jalur protein yang dicerap menerusi analisis pemblotan Western.	65
4.1	Penentuan kandungan vitamin E di dalam sel HepG2 setelah perlakuan iGTT, nGTT, iATF dan nATF selama 24 jam ditentukan menggunakan kaedah HPLC.	70
4.2	Kesan ke atas viabiliti sel HepG2 dengan perlakuan pelbagai dos nGTT, nATF, iGTT dan iATF selama 48 jam.	72
4.3	Perubahan kadar proliferasi sel HepG2 yang ditentukan melalui asai proliferasi setelah 48 jam diperlakukan dengan pelbagai dos iGTT, nGTT, iATF dan nATF.	74
4.4	Kesan sitotoksiti akibat perlakuan pelbagai dos iGTT, nGTT, iATF dan nATF selama 48 jam ke atas sel HepG2.	75

4.5	Analisis kadar apoptosis sel HepG2 secara kaedah ELISA.	77
4.6	Pengesanan apoptosis dengan kaedah pelabelan Annexin V-Fluo terhadap peptid fosfatidil serin di atas permukaan sel.	78
4.7	Penentuan apoptosis secara morfologi dengan pengamatan bentuk nukleus sel yang ditandakan dengan propidium iodida menggunakan mikroskop fluoresen.	80
4.8	Pengesanan apoptosis dengan menentukan kehadiran anak tangga DNA secara elektroforesis agaros di dalam sel HepG2 yang diperlakukan dengan nGTT, nATF(A) dan iGTT (B) pada masa yang berbeza.	81
4.9	Aktiviti enzim tirosin kinase total di dalam sel HepG2 yang diperlakukan dengan dos nGTT, nATF dan iGTT selama 48 jam ditentukan menggunakan asai tirosin kinase.	83
4.10	Pengesanan perubahan ekspresi protein STAT3(A) dan ras(B) di dalam sel HepG2 dengan perlakuan 150 μ M nGTT, 300 μ M nATF dan 150 μ M iGTT pada masa yang berbeza melalui kaedah pemblotan Western.	85
4.11	Pengesanan perubahan ekspresi dan fosforilasi protein MEK2 di dalam sel HepG2 tanpa perlakuan (A) dan dengan perlakuan 150 μ M nGTT (B), 300 μ M nATF (C) dan 150 μ M iGTT (D) pada masa yang berbeza melalui kaedah pemblotan Western.	86
4.12	Pengesanan perubahan ekspresi dan fosforilasi protein ERK1 dan ERK2 pada masa yang berbeza di dalam sel HepG2 tanpa perlakuan (A) dan dengan perlakuan 150 μ M nGTT (B), 300 μ M nATF (C) dan 150 μ M iGTT (D) melalui kaedah pemblotan Western.	88
4.13	Pengesanan perubahan ekspresi protein JNK (A), Jun (B) dan p38 (C), di dalam sel HepG2 yang diperlakukan dengan 150 μ M nGTT, 300 μ M nATF dan 150 μ M iGTT melalui kaedah pemblotan Western.	90

4.14	Pengesanan perubahan ekspresi dan fosforilasi protein PKC pada masa yang berbeza di dalam sel HepG2 tanpa perlakuan (A) dan dengan perlakuan 150 μ M nGTT (B), 300 μ M nATF (C) dan 150 μ M iGTT (D) melalui kaedah pemblotan Western.	91
4.15	Pengesanan perubahan ekspresi protein Myc di dalam sel HepG2 yang diperlakukan dengan 150 μ M nGTT, 300 μ M nATF dan 150 μ M iGTT melalui kaedah pemblotan Western.	93
4.16	Pengesanan perubahan ekspresi protein p53 pada masa yang berbeza di dalam sel HepG2 tanpa perlakuan (A) dan dengan perlakuan 150 μ M nGTT (B), 300 μ M nATF (C) dan 150 μ M iGTT (D) melalui kaedah pemblotan Western.	94
4.17	Pengesanan perubahan ekspresi protein Fas di dalam sel HepG2 yang diperlakukan dengan 150 μ M nGTT, 300 μ M nATF dan 150 μ M iGTT melalui kaedah pemblotan Western.	96
4.18	Pengesanan perubahan ekspresi protein Bcl2 dan Bax di dalam sel HepG2 yang diperlakukan dengan 150 μ M nGTT, 300 μ M nATF dan 150 μ M iGTT menggunakan kaedah pemblotan Western.	97
4.19	Pengesanan perubahan ekspresi protein kaspase 3 di dalam sel HepG2 yang diperlakukan dengan 150 μ M nGTT, 300 μ M nATF dan 150 μ M iGTT melalui kaedah pemblotan Western.	98
4.20	Pengesanan perubahan ekspresi protein kaspase 8 di dalam sel HepG2 yang diperlakukan dengan 150 μ M nGTT, 300 μ M nATF, dan 150 μ M iGTT melalui kaedah pemblotan Western.	99
4.21	Penentuan aktiviti enzim didalam kaspase 8 di dalam sel HepG2 yang diperlakukan dengan iGTT selama 48 jam ditentukan menggunakan asai kaspase 8.	100
4.22	Penentuan kandungan vitamin E akibat perlakuan vitamin E selama 24 jam di dalam sel Chang.	102
4.23	Perubahan kadar viabiliti sel Chang setelah 48 jam diperlakukan dengan pelbagai dos nGTT, nATF, iGTT dan iATF.	103

4.24	Perubahan kadar proliferasi sel Chang setelah 48 jam Diperlakukan dengan pelbagai dos nGTT, nATF, iGTT dan iATF.	104
4.25	Perubahan kadar sitotoksiti (A) dan apoptosis dalam sel Chang setelah diperlakukan dengan pelbagai dos iGTT dan iATF.	105
4.26	Penentuan apoptosis secara morfologi di dalam sel Chang dengan pengamatan bentuk nukleus sel yang ditandakan dengan propidium iodida menggunakan mikroskop fluoresen.	107
4.27	Penentuan kandungan vitamin E akibat perlakuan vitamin E selama 24 jam di dalam sel WRL68.	109
4.28	Perubahan kadar viabiliti (A) dan proliferasi (B) dalam sel WRL68 setelah diperlakukan dengan pelbagai dos iGTT dan iATF selama 48 jam.	110
4.29	Perubahan kadar sitotoksiti (A) dan apoptosis (B) dalam sel WRL68 setelah diperlakukan dengan pelbagai dos iGTT dan iATF.	111
4.30	Penentuan apoptosis secara morfologi di dalam sel WRL68 dengan pengamatan bentuk nukleus sel yang ditandakan dengan propidium iodida menggunakan mikroskop fluoresen.	112
5	Model interaksi dan pengaktifan faktor transkripsi Myc.	127

SENARAI JADUAL

No. Jadual		Halaman
2	Perbezaan di antara apoptosis dan nekrosis	27
3.1	Senarai dan perincian antibodi yang telah digunakan	41
3.2	Kandungan gel poliakrilamid bagi penyediaan satu gel besar berukuran 20 x 20 cm dengan ketebalan 1.5 mm	64



SENARAI SINGKATAN

A	Adenosine
AP-1	Activator Protein-1
ATCC	American Type Culture Collection
ATF	Alfa Tokoferol
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated
α -TTP	α -Tokoferol transfer protein
C	Cytidine
CDC	Cell division cycle
CDK	Cyclin dependent kinase
DAG	Diasilgliserol
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNA SSB	Deoxyribonucleic acid single stranded band
DTT	Dithiotrietol
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EMEM	Minimum essential medium eagle with Earles salts
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
Erk	Extracellular signal-regulated kinase, MAPK
FADD	Fas associated death domain
FS	Fosfatidil serin
G	Guanosine
GAP	GTPase-activating protein
GDP	Guanosine diphosphate
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanosine triphosphate
GTT	Gamma Tokotrienol
HBV	Virus Hepatitis B
HCC	Karsinoma hepatoselular
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
iATF	α -tokoferol dengan preinkubasi FCS

IETD- <i>p</i> NA	Poliipeptid dengan jujukan amino asid isoleusin (I), asid glutamik (E), treonin (T) dan asid aspartik (D) yang dilabel dengan kromofor <i>p</i> -nitroanilid
iGTT	γ -tokotrienol dengan preinkubasi FCS
IU	International Unit
JAK	Janus kinase
JNK	Jun N-terminal kinase
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MAPKK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase
MAPKKK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase
MEK	MAPK/ Erk Kinase, MAPKK
MKK	MAPK kinase
MPOB	Malaysian Palm Oil Board
NaHCO ₃	Sodium hydrogen carbonate
nATF	Normal α -tokoferol
NF κ B	Nuclear factor kappa B
nGTT	Normal γ -tokotrienol
PKC	Protein kinase C
PLC γ	Phosfolipase C γ
PMSF	Phenylmethysulfonyl fluoride
RDA	Recommended Dietary Allowance
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOS	Son of sevenless guanine nucleotide exchange factor
SR-B1	Scavenger receptor B1
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
T	Thymidine
TAB1	Transforming growth factor- β -activated protein kinase 1-binding protein 1
TAP	Tocopherol-associated protein
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGF- β 1	Transforming growth factor beta1

BAB I

PENGENALAN

Karsinoma hepatoselular adalah salah satu kanser yang lazim di dunia dengan insidens yang tinggi di negara-negara Asia Tenggara. Ia adalah penyebab kematian sekitar 1 juta orang setiap tahun di seluruh dunia (Montesano et al. 1997) disebabkan oleh sifatnya yang agresif dan prognosis yang buruk. Kajian di United Kingdom mendapati bahawa walaupun insidens kanser hepar primari hanyalah 0.5% dari kesemua jenis kanser (Key et al. 1997), kadar survival 5 tahunnya adalah kosong. Kementerian Kesihatan Malaysia pula mencatatkan peningkatan insidens kanser ini melebihi 100% dalam tempoh 10 tahun iaitu dari 907 kes pada tahun 1991 kepada 1967 kes pada tahun 2001. Ia juga adalah penyebab kematian ketiga teratas iaitu sebanyak 8% dikalangan kematian disebabkan kanser, selepas kanser paru-paru dan kanser payu dara di Malaysia. Pembedahan atau reseksi dan pemindahan hepar adalah diantara rawatan yang dijalankan namun kejayaan lebih memihak kepada saiz kanser yang kecil dan bersifat setempat. Kaedah kemoterapi, kemohormonal dan radioterapi didapati tidak berkesan terhadap karsinoma hepatoselular (Qian et al. 2000). Ini menunjukkan betapa pentingnya kajian terhadap kanser ini bagi menentukan prognosis yang lebih baik. Pelbagai kajian epidemiologi dan intervensi (Odin 1997 dan Poppel et al. 1997) mencadangkan vitamin E sebagai agen antikanser yang memberikan perlindungan terhadap pembentukan dan merencatkan kanser menerusi sifat antioksidannya. Namun, kajian terkini mendapati bahawa tindakan vitamin E sebagai agen antikanser tidak terbatas sebagai bahan antioksidan malah sebagai molekul pengisyarat transduksi (Azzi et al. 2000, 2001 dan 2002; Kline et al. 2001; McIntyre 2000; Nakamura et al. 1998; Turley et al. 1997; Zhao et al. 1997).

Penyelidikan ini bertujuan menentukan kesan perlakuan vitamin E terhadap sel kanser hepar dan kesan ke atas tapak jalan pengisyarat transduksi di dalam sel bagi

mengkaji mekanisme tindakannya. Dua isomer vitamin E dari minyak kelapa sawit iaitu γ -tokotrienol (GTT) dan α -tokoferol (ATF) digunakan sebagai perlakuan terhadap sel kanser hepar HepG2 dan dua sel normal hepar Chang dan WRL 68 untuk perbandingan. Penggunaan sel kultur berterusan ini membolehkan kajian kesan vitamin E terhadap sel kanser atau normal secara berasingan dan tanpa intervensi sel lain seperti di dalam kajian *in vivo*. Dua kaedah penyediaan vitamin E digunakan untuk menambahkan keterlarutan molekul larut lemak ini di dalam larutan akueus media kultur dan satu siri dos yang berbeza kedua-dua vitamin E telah digunakan. Memandangkan sel kanser dicirikan sebagai sel yang telah mengalami transformasi genetik sehingga berjaya memproliferasi di luar kawalan serta dapat mengelak proses pembunuhan semulajadi sel secara apoptosis, sesuatu agen terapeutik yang bersifat antiproliferatif dan penggalak apoptosis amatlah ideal. Oleh yang demikian, kesan vitamin E terhadap viabiliti, proliferasi, sitotoksiti dan apoptosis sel serta kandungan vitamin E di dalam sel ditentukan. Kesan-kesan ini akan menentukan samada GTT dan ATF bertindak sebagai agen antikanser yang ideal.

Perubahan kadar proliferasi dan apoptosis sel dikawal selia menerusi pengisyaratan transduksi oleh faktor pencetus dan penindas pertumbuhan yang tertentu. Oleh yang demikian, sesuatu agen terapeutik jika bertindak sebagai molekul pengisyaratan transduksi akan memanipulasikan tapak jalan proliferasi atau apoptosis sel. Dengan itu, perubahan pada protein-protein pengisyaratan transduksi di dalam tapak jalan proliferasi dan apoptosis dikaji untuk menentukan mekanisme tindakan vitamin E. Protein-protein pengisyaratan transduksi ini dipilih berdasarkan kepentingan mereka di dalam kedua-dua tapak jalan. Bagi tapak jalan proliferasi kadar pengekspresan protein yang ditentukan adalah protein Erk 1, Erk 2, Mek 2, PKC α , JAK 3, STAT 3, STAT 5a, Myc dan ras, manakala tapak jalan apoptosis dikaji menerusi protein-protein p53, Bcl2, Bax, Fas, JNK, p38, Jun, kaspase 3 dan kaspase 8. Fosforilasi protein Erk 1, Erk 2, Mek 2 dan PKC α membayangkan kadar pengaktifan protein, maka perubahan pada kadar fosforilasi protein-protein ini juga dikajikan. Perubahan aktiviti enzim-enzim tirosin kinase dan kaspase 8 turut dianalisa bagi memperincikan lagi perubahan pada tapak jalan pengisyaratan transduksi di dalam sel akibat perlakuan vitamin E.

Bagi memahami dengan lebih mendalam kaitan vitamin E, kanser dan fungsi protein pengisyaratan transduksi, kajian perpustakaan memperkenalkan vitamin E dengan lebih terperinci sebelum membincangkan proses hepatokarsinogenesis. Proses pembentukan kanser hepar ini dapat lebih difahami apabila proses kawalselia atau homeostasis pertumbuhan sel secara normal diperhalusi. Ini melibatkan perincian kitar sel dan penglibatan proses apoptosis atau kematian sel secara terprogram. Penekanan terhadap protein pengisyaratan transduksi yang terlibat dalam pengawalseliaan proses proliferasi dan apoptosis dibuat. Seterusnya ulasan kajian yang menunjukkan mekanisme tindakan vitamin E melalui sifat bukan antioksidan dan yang mengaitkan vitamin E dengan pengisyaratan transduksi dibincangkan.

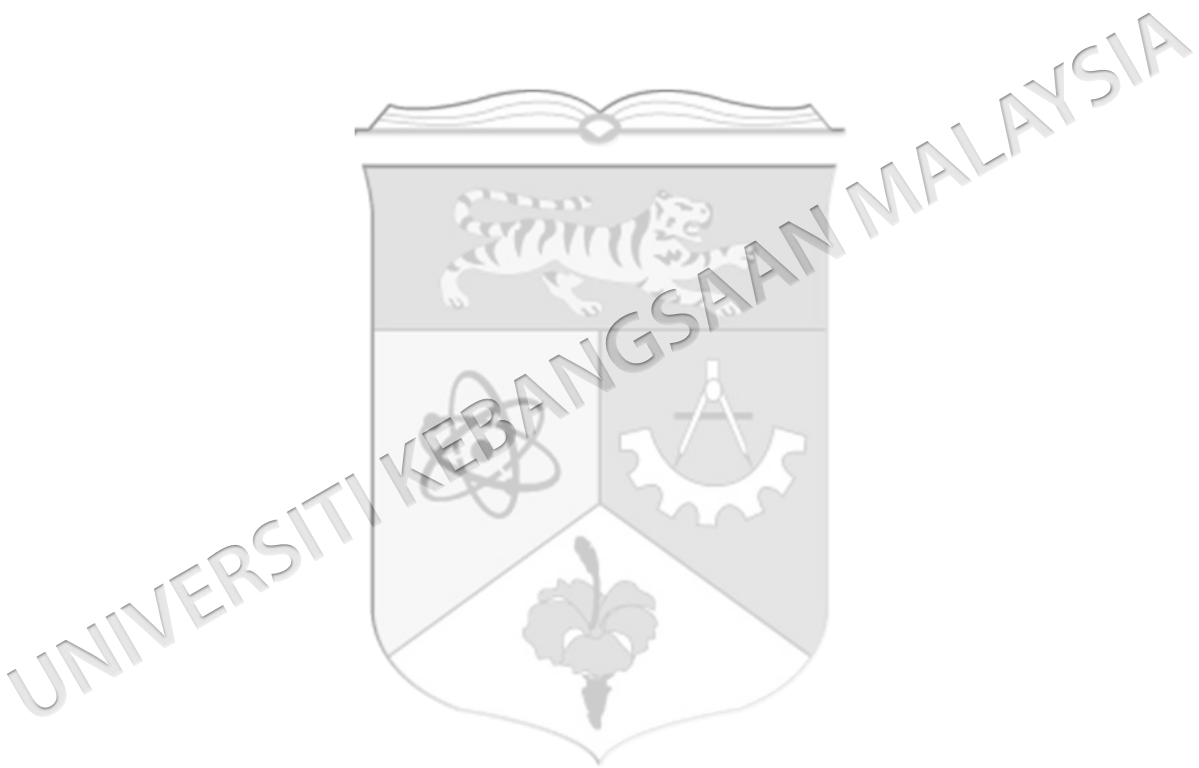
1.1 HIPOTESIS KAJIAN

γ -Tokotrienol dan α -tokoferol mempunyai kesan anti proliferasi terhadap sel kanser hepar menerusi peningkatan apoptosis dan pengaktifan protein pengisyaratan transduksi. Seterusnya kesan antiproliferasi γ -tokotrienol adalah lebih baik berbanding α -tokoferol dan preinkubasi vitamin E dengan FCS mengandakan kesan antiproliferasi ini.

1.2 OBJEKTIF KAJIAN

1. Mengkaji kesan isoform vitamin E kelapa sawit iaitu γ -tokotrienol dan α -tokoferol dengan dan tanpa preinkubasi FCS ke atas kandungan vitamin E di dalam sel kanser hepar HepG2 dan sel normal Chang.
2. Mengkaji kesan vitamin E di atas ke atas viabiliti, proliferasi, sitotoksiti dan kadar apoptosis sel kanser hepar HepG2 dan sel normal Chang.
3. Mengenalpasti perubahan terhadap ekspresi protein-protein pengisyaratan transduksi proliferasi (JAK, STAT, ras, MEK2, ERK1, PKC dan Myc) di dalam sel kanser hepar HepG2 akibat perlakuan γ -tokotrienol dan α -tokoferol.

4. Mengenalpasti perubahan ekspresi protein-protein pengisyarat transduksi apoptosis (Fas, JNK, Jun, p38, p53, Bcl-2, Bax, kaspase 3 dan kaspase 8) di dalam sel kanser hepar HepG2 akibat perlakuan γ -tokotrienol dan α -tokoferol kelapa sawit.
5. Menentukan sama ada protein-protein yang dikenalpasti di atas berada dalam bentuk terfosforilasi atau sebaliknya.
6. Menentukan aktiviti enzim tirosin kinase total dan kaspase 8.



RUJUKAN

- Alison, M., Golding, M., & Sarraf, C. 1994. Cell proliferation and cell death in the liver: patterns, mechanisms and measurements. Dlm Skouteris, G.G. (pnyt.). *Liver carcinogenesis*, hlm. 197-214. Berlin: Springer-Verlag.
- Anthony, P.P., Macsween R.N.M. & Scheuer P.J. 1979. *Pathology of the Liver*, London: Churchill Livingstone.
- Apps, D.K., Cohen, B.B. & Steel, C.M. 1992. *Biochemistry*. London: Bailliere Tindall.
- Azzi, A., Breyer, I., Feher, M., Ricciarelli, R., Stocker, A., Zimmer, S. & Zingg, J.M. 2001. Nonantioxidant functions of α -tocoferol in smooth muscle cells. *J. Nutr.* **131** : 378S-381S.
- Azzi, A., Boscoboinik, D., Chatelain, E., Ozer, N.K. & Stauble, B. 1993. d- α -Tocopherol control of cell proliferation. *Molec. Aspects Med.* **14**: 265-271.
- Azzi, A., Boscoboinik, D., Marilley, D., Ozer, N.K., Stauble, B. & Tasinato, A. 1995. Vitamin E: a sensor and an information transducer of the oxidation state. *Am. J. Clin. Nutr.* **62** (suppl): 1337S-1346S.
- Azzi, A. & Stocker, A. 2000. Vitamin E: non-antioxidant roles. *Progress in Lipid Research* **39**: 231-255.
- Baker, S.J. & Curran T. 1997. Oncogenic transcription factors : FOS, JUN, MYC, MYB and ETS. Dlm Peters, G. & Vousden, K.H. (pnyt.) *Oncogenes and tumour suppressors*, hlm. 155-184. Oxford: Oxford University Press.
- Bertram, J.S. 2001. The molecular biology of cancer. *Molec Aspects Med.* **21** : 167-223.
- Bhunja, A.K., Han, H., Snowden, A. & Chatterjee, S. 1996. Lactosylceramide stimulates ras-GTP loading, kinases (MEK, raf), p44 Mitogen-activated protein kinase, and c-fos expression in human aortic smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry* **18**: 10660-10666.
- Bittorf, T., Jaster R. & Brock J. 1994. Rapid activation of the MAP kinase pathway in hematopoietic cells by erythropoietin, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *Cellular Signalling* **6**: 305-315.
- Blode, G.C., Stribling, S., Obeid, L.M. & Hannun, Y.A. 1996. Protein Kinase C Isoenzymes: regulation and function. *Cancer Surveys.* **27**: 213-247.

- Borner, C., Filipuzzi, I., Wartmann, M., Eppenberger, U. & Fabbro, D. 1989. Biosynthesis and posttranslational modifications of protein kinase C in human breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry* **264** (23): 13902-13909.
- Boscoboinik, D., Szewczyk, A., Hensey, C. & Azzi, A. 1991. Inhibition of cell proliferation by α -tocopherol. *The Journal of Biological Chemistry* **266** (10): 6188-6194.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analyt. Biochem.* **50**: 249-243.
- Bressac, B., Galvin, K.M., Liang T.J., Isselbacher K.J., Wands J.R. & Ozturk, M. 1989. Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 1973-1977.
- Bringold, F. & Serrano, M. 2000. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Experimental Gerontology* **35**: 317-329.
- Carroll, K.K., Nesaretnam, K., Guthrie, N. & Chamber, A.F. 1995. Effect of tocotrienols on the growth of a human breast cancer cell line in culture. *Lipids*. **30**: 1139-1183.
- Claycombe, K.J. & Meydani, S.N. 2001. Vitamin E and genome stability. *Mutation Research* **475**: 37-44.
- Clurman, B.E. & Roberts, J.M. 1998. Cell cycle control: an overview. Dlm. Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. (pnyt.). *The Genetic basis of human cancer*, hlm. 175-191. New York: McGraw-Hill.
- Darnell, J.E., Kerr, I.M. & Stark, G.R. 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signalling proteins. *Science* **264**: 1415-1421.
- Darzynkiewicz, Z., Bedner, E. & Li, X. 1999. Analysis of cell death by flow and laser-scanning cytometry. Dlm Studzinski, G.P. (pnyt.). *Apoptosis : a practical approach*, hlm. 57-80. Oxford: Oxford University Press.
- Davis, R.J. 1993. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *The Journal of Biological Chemistry* **268** (15): 14553-14556.
- Diplock, A.T. 1991. Antioxidant, nutrients and disease prevention: an overview. *Am. J. Clin. Nutr.* **27**: 265-296.
- Diplock, A.T. 1994. Antioxidant, and disease prevention. *Molec Aspects Med.* **15** : 293-376.

- Diplock, A.T. 1997. Will the 'good fairies' please prove to us that vitamin E lessens human degenerative disease. *Free Radical Research*. **27**: 511-532.
- Elmore, L.W. & Harris, C.C. 1998. Hepatocellular carcinoma. Dlm. Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. (pnyt.). *The Genetic basis of human cancer*, hlm. 681-689. New York: McGraw-Hill.
- Engeland, M.N., Schutte, B., Hopman A.H.N., Ramaekers, F.C.S. & Reutelingsperger, C.P.M. 1999. Cytochemical detection of cytoskeletal and nucleoskeletal changes during apoptosis. Dlm Studzinski, G.P. (pnyt.). *Apoptosis : a practical approach*, hlm. 125-140. Oxford: Oxford University Press.
- Evan, G.I., McCarthy, N., Whyte, M., Brown, L., Kauffman-Zeh, A. & Ulrich, E. 1997. Coupled control of cell proliferation and cell viability by oncogenes and cytokines. Dlm. Ruffolo, R.R., Poste, G. & Metcalf, B.W. (pnyt.). *Cell cycle regulation*, hlm. 13-24. Netherlands: Harwood Academic Publishers.
- Eyster K.M. 1998. Introduction to signal transduction. *Biochemical Pharmacology* **55**: 1927-1938.
- Force, T. & Bonventre, J.V. 1998. Growth factors and mitogen-activated kinases. *Hypertention* **31** (1): 152-161.
- Franks, L.M. & Teich, N.M. 1997. *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer*. Oxford: Oxford University Press.
- Freshney, R.I. 2000. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. Ed. ke-4. New York: Wiley-Liss Inc.
- Gangopadhyay, S.B., Abraham, J., Yun, P.L. & Benchimol, S. 1997. The tumour suppressor gene p53. Dlm. Peters G. & Vousden K.H. (pnyt.). *Oncogenes and tumour suppressors*, hlm. 106-132. Oxford: Oxford University Press.
- Garrington, T.P. & Johnson, G.L. 1999. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Current Opinion in Cell Biology*. **11**: 211-218.
- Gorman, A., McCarthy, J., Finucane, D., Reville, W. & Cotter, T. 1996. Morphological assessment of apoptosis. Dlm. Cotter, T.G. & Martin, S.J. (pnyt.). *Techniques in apoptosis*, hlm. 1-20. London: Portland Press Ltd.
- Guthrie, N., Gapor, A., Chambers, A.F. & Carroll, K.K. 1997. Inhibition of proliferation of estrogen receptor-negative MDA-MB-435 and -positive MCF-7 human breast cancer cells by palm oil tocotrienols and tamoxifen, alone and in combination. *J. Nutr.* **127**: 544S-548S.

- Hall, P.A., Coates, P.J., Ansari, B. & Hopwood, D. 1994. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: The importance of apoptosis. *Journal of Cellular Science* **107**: 3569-3577.
- Harper, S.J. & LoGrasso, P. 2001. Signalling for survival and death in neurons: The role of stress-activated kinases, JNK and p38. *Cellular Signalling* **13**: 299-310.
- Hayden, G.H. & Hayes, P.C. 1995. Hepatocellular carcinoma. *British Journal of Hospital Medicine* **52**: 74-80.
- Hayes, K. C., Pronczuk, A. & Liang, J. A. 1993. Differences in the plasma transport and tissue concentrations of tocopherols and tocotrienols: observations in humans and hamsters. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **202**: 353-359.
- Heinonen, O.P., Albanes, D., Virtamo, J., Taylor, P.R., Huttunen, J.K., Hartman, A.M., Haapakoski, J., Malila, N., Rautalahti, M., Ripatti, S., Maenpaa, H., Teerenhovi, L., Koss, L., Virolainen, M. & Edwards, B.K. 1998. Prostate cancer and supplementation with α -tocopherol and β -carotene: incidence and mortality in a controlled trial. *Journal of the National Cancer Institute*. **90**: 440-446.
- Hetts, S.W. 1998. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* **279** (4): 300-307.
- Hodis, H.N., Mack W.J. & LaBree L. 1995. Serial coronary angiographic evidence that antioxidant vitamin intake reduces progression of coronary artery atherosclerosis. *JAMA*. **273**: 1849-1854.
- Hueber, A., Zornig, M., Lyon, D., Suda, T., Nagata, S. & Evan, G.I. 1997. Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis. *Science* **278**: 1305-1309.
- Hunter, T. 1991. Protein kinase classification. Dlm. Hunter, T. & Sefton, B.M. (pnyt.). *Protein phosphorylation*, hlm. 3-37. California: Academic Press Inc.
- Ihle, J.N. 1995. Cytokine receptor signalling. *Nature*. **377**: 591-594.
- Israel, K., Yu, W., Sanders, B.G. & Kline, K. 2000. Vitamin E succinate induces apoptosis in human prostate cancer cells: role for Fas in vitamin E succinate-triggered apoptosis. *Nutrition and cancer* **36** (1): 90-100.
- Jee, S.H., Shen, S.C., Tseng, C.R., Chiu, H.C. & Kuo, M.L. 1998. Curcumin induces a p53-dependent apoptosis in human basal cell carcinoma cells. *Journal of Investigative Dermatology*. **111**: 656-661.

- Jiang, M., Yang-Yen, H. Lin, J. & Yen, J.J. 1996. Differential regulation of p53, c-Myc, Bcl-2 and Bax protein expression during apoptosis induced by widely divergent stimuli in human hepatoblastoma cells. *Oncogene* **13**: 609-616.
- Johnson, D.G. & Walker, L. 1999. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**: 295-312.
- Johnson, G. 2002. Scaffolding proteins - more than meets the eye. *Science* **295**: 1249-1250.
- Kaptein, A., Paillard, V. & Saunders, M. 1996. Dominant negative Stat3 mutant inhibits interleukin-6-induced Jak-STAT signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry* **271** (11): 5961-5964.
- Key, T., Forman, D. & Pike, M.C. 1997. Epidemiology of Cancer. Dlm. Franks, L.M. & Teich, N.M. (pnyt.). *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer*, hlm. 34-59. Oxford: Oxford University Press.
- Kinloch R.A., Treherne J.M., Furness L.M. & Hajimohamadreza I. 1999. The pharmacology of apoptosis. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**: 35-42.
- Klingmuller, U., Lorenz, U., Cantley, L.C., Neel, B.G. & Lodish, H.F. 1995. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* **8**: 729-738.
- Kushi. L.H., Foldom. A.R. & Prineas. R.J. 1996. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N Eng J Med* **334**: 1156-1162.
- Lundberg, A.S. & Weinberg, R.A. 1999. Control of the cell cycle and apoptosis. *European Journal of Cancer* **35** (14): 1886-94.
- Macdonald, S.G. & McCormick, F. 1997. The ras/raf/ERK signal transduction pathway. Dlm Peters, G. & Vousden, K.H. (pnyt.). *Oncogenes and tumour suppressors*, hlm. 121-154. Oxford: Oxford University Press.
- Makpol, S., Shamaan, N.A., Jarien, Z., Md Top, A.G., Khalid, B.A.K. & Wan Ngah, W.Z. 1997. Different starting times of α -tocopherol and γ -tocotrienol supplementation and tumor marker enzyme activities in the rat chemically induced with cancer. *Gen. Pharmac.* **28**: 589-592.
- Matthai, J. 1996. Vitamin E updated. *Indian J Pediatr* **63**: 242-253.
- McConkey, D.J., Zhivotovsky, B. & Orrenius, S. 1996. Apoptosis - Molecular Mechanisms and Biomedical Implications. *Molecular Aspects of Medicine*. **17** (1): 1-110.

- Meek, D.W. 1998. Multisite phosphorylation and the integration of stress signals and p53. *Cell Signalling*. **10** (3): 159-166.
- Miura, O., Nakamura, N., Qualle, F.W., Witthuhn, B.A., Ihle, J.N. & Aoki, N. 1994. Erythropoietin induces association of the JAK2 protein tyrosine kinase with the erythropoietin receptor in vivo. *Blood* **84** (5): 1501-1507.
- Miyazaki, M. & Namba, M. 1994. Hepatocellular Carcinomas. Dlm. Hay, R.J., Park, J. & Gadzar, A. (pnyt.). *Atlas of human tumor cell lines*, hlm. 185-212. California: Acedemic Press Inc.
- Montesano, R., Hainaut, P. & Wild, C.P. 1997. Hepatocellular Carinoma : From Gene to Public Health. *Journal of the National Cancer Institute*. **89** : 1844-1851.
- Muller, M., Strand, S., Hug, H., Heinemann, E., Walczak, H., Hofmann, W.J., Stremmel, W., Krammer, P.H. & Galle, P.R. 1997. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J. Clin. Invest.* **99**: 403-413.
- Nakamura, T., Goto, M., Matsumoto, A. & Tanaka, I. 1998. Inhibition of NF- α B transcriptional activity by α -tocopheryl succinate. *Biofactors* **7**: 21-30.
- Newton, A.C. 1995. Protein Kinase C: structure, function, and regulation. *The Journal of Biological Chemistry*. **270** (48) : 28945-28498.
- Ockner, R.K. 2001. Apoptosis and liver diseases: recent concepts of mechanism and significance. *Gastroenterology and Hepatology* **16** (3): 248-260.
- Odin, A.P. 1997. Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. *Mutation Research*. **386**: 39-67.
- Oren, M. 1999. Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *The Journal of Biological Chemistry* **274** (51): 36031-36034.
- Packer, L. & Traber, M.G. 1995. Vitamin E: beyond antioxidant funtion. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**: 1501S-1509S.
- Packer, L. & Weber, S.U & Rimbach, G. 2001. Molecular aspects of α -tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *J. Nutr.* **131**: 369S-373S.
- Packer, L. 1991. Protective role of vitamin E in biological systems. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**: 1050S-1055S.
- Palmer, H.J. & Paulson, K.E. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. *Nutrition Reviews*. **55**: 353-361.
- Pardee, A.B. 1989. G₁ events and regulation of cell proliferation. *Science* **246**: 603-608.

- Patel, T., Roberts, L.R., Jones, B.A. & Gores, G.J. 1998. Dysregulation of Apoptosis as a Mechanism of Liver Disease: An Overview. *Seminars in Liver Disease*. **18** (2):105-114.
- Pitot, H.C. 1998. Hepatocyte Death in Hepatocarcinogenesis. *Hepatology*. **28**: 1-5.
- Pongracz, J., Tuffley, W., Johnson G.D., Deacon, E.M., Burnett, D., Stockley, R.A. & Lord, J.M. 1995. Changes in protein kinase C isoenzyme expression associated with apoptosis in U937 myelomonocytic cells. *Experimental Cell Research* **218**: 430-438.
- Poppel, G. & Berg, H. 1997. Vitamins and cancer. *Cancer Letters* **114**: 195-202.
- Qian, M., Kravola, J., Yu, W., Bose, H.R.Jr., Dvorak, M., Sanders, B.G. & Kline, K. 1997. c-Jun involvement in vitamin E succinate induced apoptosis of reticuloendotheliosis virus transformed avian lymphoid cells. *Oncogene* **15** (2): 223-230.
- Qian, M., Sanders, B.G. & Kline, K. 1996. RRR-alpha-tocopheryl succinate induces apoptosis in retrovirus-transformed lymphoid cells. *Nutrition and Cancer* **25** (1): 9-26.
- Qin, Z., Wang, Y., Kikly, K.K., Sapp, E., Kegel, K.B., Aronin, N. & DiFiglia, M. 2001. Pro-caspase-8 is predominantly localized in mitochondria and released into cytoplasm upon apoptotic stimulation. *The Journal of Biological Chemistry* **276** (11): 8079-8086.
- Reed, J.C. 1997. Bcl-2 family proteins in cancer : regulators of cell death involved in resistance to therapy. Dlm. Ruffolo, R.R., Poste, G. & Metcalf, B.W. (pnyt.). *Cell cycle regulation*, hlm. 151-167. Netherlands : Harwood Academic Publishers.
- Ricciarelli, R., Zingg, J.M. & Azzi, A. 2001. Vitamin E: protective role of a janus molecule. *FASEB J.* **15**: 2314-2325.
- Robertson J, Donner AP, Trevithick JR. 1989. Vitamin E intake and risk of cataracts in humans. *Ann NY Acad Sci.* **570**: 372-382.
- Rudin, C.M. & Thompson, C.B. 1997. Apoptosis and cancer. Dlm. Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. (pnyt.). *The genetic basis of human cancer*, hlm. 193-204. New York: McGraw-Hill.
- Ryan, K.M., Phillips, A.C. & Vousden, K.H. 2001. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Current Opinion in Cell Biology* **13**: 332-337.
- Sanders, B.G. & Kline, K. 1995. Nutrition, immunology and cancer: an overview. *Advances in Experimental Medicine & Biology* **369**: 185-194.

- Sato, Y., Arai, H., Miyata, A., Tokita, S., Yamamoto, K., Tanabe, T., & Inoue, K. 1993. Primary structure of α -tocopherol transfer protein from rat liver. Homology with cellular retinaldehyde-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry* **268** (24): 17705-17710.
- Sato, Y., Hagiwara, K., Arai, H. & Inoue, K. 1991. Purification and characterization of the α -tocopherol transfer protein from rat liver. *FEBS* **288**: 41-45.
- Schimke, R.T. 1988. Gene amplification in cultured cells. *The Journal of Biological Chemistry*. **13**: 5989-5992.
- Schmidt, C.M., McKillop, I.H., Cahill, P.A. & Sitzmann, J.V. 1997. Increased MAPK Expression and Activity in Primary Human Hepatocellular Carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **236**: 54-58.
- Schwartz, J. & Shklar, G. 1992. The selective cytotoxic effect of carotenoids and alpha-tocopherol on human cancer cell lines in vitro. *J Oral Maxillofac Surg*. **50**: 367-373.
- Scaffidi, C., Fulda, Simone., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K., Krammer, P.H. & Peter, M.E. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO Journal* **6**: 1675-1687.
- Sheehy, T. & Morrissey, P.A. 1999. Tocopherols. *Encyclopedia of nutrition 2E*, hlm.1-11. California: Academic Press Inc.
- Shklar, G. & Schwartz, J.L. Trickler, D.P. & Reid, S. 1990. Prevention of experimental cancer and immunostimulation by vitamin E (immunosurveillance). *J Oral Pathol Med*. **19**: 60-64.
- Shuai, K., Horvath, C.M., Huang, L.H. Qureshi, D. & Darnell, J.E. 1994. Interferon activation of the transcription factor STAT involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interaction. *Cell*. **76**: 821-826.
- Sorrentino, D., Potter, B.J. & Berk, P.D. 1990. From albumin to the cytoplasm: the hepatic uptake of organic anions. *Progress in Liver Disease*. **9**: 203-224.
- Stahelin, H.B., Rosel, F., Buess, E. & Brubacher, G. 1984. Cancer, vitamins and plasma lipids: prospective Basel study. *J. Natl. Cancer Inst*. **73**: 1463.
- Stephens, N., Parsons, A., Schofield, P., Kelly, F., Cheeseman, K. & Mitchinson, M. 1996. Randomized controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* **347**: 781-786.
- Studzinski, G.P. 1999. Overview of apoptosis. Dlm Studzinski, G.P. (pnyt.). *Apoptosis : a practical approach*, hlm. 1-17. Oxford: Oxford University Press.

Sylvester, P.W., McIntyre, B.S., Gapor, A. & Briski, K.P. 2001. Vitamin E inhibition of normal mammary epithelial cell growth is associated with a reduction in protein kinase C α activation. *Cell Prolif.* **34**: 347-357.

Taylor, P.R., Li, B., Dawsey, S.M., Li, J., Yang, C.S., Guo, W., Blot, W.J. & the Linxian Nutrition Intervention Trials Study Group 1994. Prevention of esophageal cancer: the nutrition intervention trials in Linxian, China. *Cancer Res.* **54** (Suppl): 2029S-2031S.

Tilbrook, P.A., Bittorf, T., Callus, B.A., Busfield, S.J., Ingle, E. & Klinken, S.P. 1996. Regulation of the erythropoietin receptor and involvement of JAK2 in differentiation of J2E erythroid cells. *Cell Growth and Differentiation.* **7**: 511-520.

The ATBC Cancer Prevention Study Group. 1994. The effects of vitamin E and β -carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med.* **330**: 1029-1035.

Theriault, A., Chao J.T., Wang Q., Gapor A. & Adeli, K. 1999. Tocotrienol : A review of its therapeutic potential. *Clinical Biochemistry* **32** (5): 309-319.

Thorgeirsson, S.S., Teramoto T. & Factor V.M. 1998. Dysregulation of Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma. *Seminars in Liver Disease.* **18**: 115-122.

Thornberry, N. A., Rano, T.A. & Peterson, E.P. 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B: functional relationships established for key mediators of apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 17907-17911.

Turley, J.M., Fu, T., Ruscetti, F.W., Mikovits, J.A., Bertolette III, D.C. & Birchenall-Roberts, M.C. 1997. Vitamin E succinate induces Fas-mediated Apoptosis in estrogen receptor-negative human breast cancer cells. *Cancer Research* **57**: 881-890.

Vaux, D.L. & Strasser, A. 1996. The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 2239-2244.

Verbsky, J.W., Bach, E.A., Fang, Y., Yang, L., Randolph, D.A. & Fields, L.E. 1996. Expression of Janus kinase 3 in human endothelial and other non-lymphoid and non-myeloid cells. *The Journal of Biological Chemistry* **271** (24): 13976-13980.

Vousden, K.H. 2000. p53: Death star. *Cell* **103**: 691-694.

Wang, Y., Huang, D.S., Eskelson, C.D. & Watson, R.R. 1994. Long-term dietary vitamin E retards development of retrovirus-induced dysregulation in cytokine production. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **72**: 70-75.

- Wang, X., Martindale, J.L. & Holbrook, N.J. 2000. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* **275** (15): 39435-39443.
- Wang, X. & Quinn, P.J. 1999. Vitamin E and its function in membranes. *Progress in Lipid Research* **38**: 309-336.
- Wan Ngah, W.Z., Jarien, Z., San, M.M., Marzuki, A., Md Top, G., Shamaan, N.A. & Kadir, K.A. 1991. Effect of tocotrienols on hepatocarcinogenesis induced by 2-acetylaminofluorene in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**: 1076S-1081S.
- Wasan, H.S. & Bodmer, W.F. 1997. Inherited susceptibility to Cancer. Dlm. Franks, L.M. & Teich, N.M. (pnyt.). *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer*, hlm. 60-91. Oxford: Oxford University Press.
- Wilson, J.W. & Potten, C.S. 1999. Morphological recognition of apoptotic cells. Dlm. Studzinski, G.P. (pnyt.). *Apoptosis : a practical approach*, hlm. 19-39. Oxford: Oxford University Press.
- Yu, W., Simmons-Mechaca, M., Gapor, A., Sanders, B.G. & Kline, K. 1999. Induction of Apoptosis in Human Breast Cancer Cells by Tocopherols and Tocotrienols. *Nutrition and Cancer*. **33**: 26-32.
- Yokoyama, A., Karasaki, H., Urushibara, N., Nomoto, K., Imai, Yoko., Nakamura, K., Mizuno, Y., Ogawa, K. & Kikuchi, K. 1997. The characteristic gene expression of MAPK phosphatases 1 and 2 in hepatocarcinogenesis, rat ascites hepatoma cells, and regenerating rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **238**: 746-751.
- Yoshida, H., Yusin, M., Ren, I., Kuhlenkamp, J., Hirano, T., Stolz, A. & Kaplowitz, N. 1992. Identification, purification, and immunochemical characterization of a tocopherol-binding protein in rat liver cytosol. *Journal of Lipid Research*. **33**: 343-350.
- Zhao, B., Yu, W., Qian, M., Simmons-Menchaca, M., Brown, P., Birrer, M.J., Sanders B.G. & Kline, K. 1997. Involvement of activator protein-1 (AP-1) in induction of apoptosis by vitamin E succinate in human breast cancer cells. *Molecular Carcinogenesis* **19** (3) : 180-90.
- Zhang, D., Okada, S., Yu, Y., Zheng, P., Yamaguchi, R., Ksai, H. 1997. Vitamin E inhibits apoptosis, DNA modification, and cancer incidence induced by iron-mediated peroxidation in Wistar rat kidney. *Cancer Research* 1997. **57** (12): 2410-2414.