

กลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลของชาทรากอินเอสต่อการตายแบบอะพอพโทสิส
ในเซลล์พืช 12



นางสาว พรรณี หนูช่อตรง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาเภสัชศาสตร์ชีวภาพ

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-4474-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MOLECULAR MECHANISM OF SATRATOXIN H-INDUCED APOPTOSIS
IN PC12 CELLS

Miss Punnee Nusuetrong

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biopharmaceutical Sciences
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2005
ISBN 974-17-4474-9

481810

Thesis Title MOLECULAR MECHANISM OF SATRATOXIN H-
INDUCED APOPTOSIS IN PC12 CELLS


By Miss Punnee Nusuetrong

Field of study Biopharmaceutical Sciences


Thesis Advisor Associate Professor Duangdeun Meksuriyen, Ph.D.

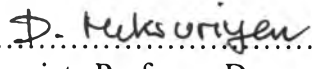
Thesis Co-advisor Professor Norimichi Nakahata, Ph.D.
Associate Professor Thitima Pengsuparp, Ph.D.

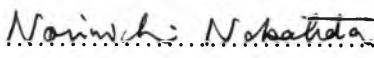
Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn
University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctor's Degree

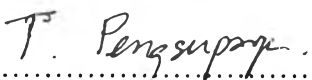

.....Dean of Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.)

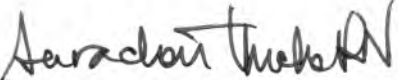
THESIS COMMITTEE

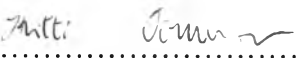

.....Chairman
(Associate Professor Mayuree Tantisira, Ph.D.)



.....Thesis Advisor
(Associate Professor Duangdeun Meksuriyen, Ph.D.)


.....Thesis Co-advisor
(Professor Norimichi Nakahata, Ph.D.)


.....Thesis Co-advisor
(Associate Professor Thitima Pengsuparp, Ph.D.)


.....Member
(Assistant Professor Surachai Unchern, Ph.D.)


.....Member
(Kitti Torrungruang, Ph.D.)


.....Member
(Assistant Professor Banthit Chetsawang, Ph.D.)

พรรณิ หนูชื่อตรง: กลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลของซาตราทอกซินเอชต่อการตายแบบอะพอพโทสิสในเซลล์พีซี 12 (MOLECULAR MECHANISM OF SATRATOXIN H-INDUCED APOPTOSIS IN PC12 CELLS) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร. ดวงเดือน เมฆสุริยพันธ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : PROF. NORIMICHI NAKAHATA และ รศ.ดร. ธิติมา เฟ็งสุภาพ, 100 หน้า, ISBN 974-17-4474-9

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลของซาตราทอกซินเอชต่อการตายแบบอะพอพโทสิสในเซลล์พีซี 12 และศึกษาฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในการปกป้องเซลล์ที่ได้รับซาตราทอกซินเอช จากผลการศึกษาพิษของซาตราทอกซินเอชต่อเซลล์โดยวิธี MTT พบว่าการให้ซาตราทอกซินเอชทำให้เซลล์ตายเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วน โดยตรงกับความเข้มข้นของสารและระยะเวลาที่เซลล์ได้รับสาร โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 50 นาโนโมลาร์ จึงนำมาศึกษารูปแบบการตายของเซลล์ด้วยวิธีต่าง ๆ ดังนี้ การวิเคราะห์ด้วยวิธี Hoechst 33342 พบว่าเซลล์ตายแบบอะพอพโทสิสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญภายหลังได้รับซาตราทอกซินเอชเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ DNA fragmentation ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยสังเกตเห็น DNA ladder ได้อย่างชัดเจนภายหลังที่เซลล์ได้รับซาตราทอกซินเอชในอาหารที่ไม่มีซีรัมเป็นเวลานาน 1 วัน หลังจากนั้นแถบ DNA ladder จางลง สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะว่าเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทสิสเปลี่ยนเป็นเนโครสิส อย่างไรก็ตามเมื่อให้ซาตราทอกซินเอชในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมเป็นเวลานานถึง 3 วัน จะสังเกตเห็นแถบ DNA ladder ผลการเกิดอะพอพโทสิสที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองที่ย้อมเซลล์ด้วย propidium iodide และวัดผลด้วยวิธี flow cytometry กล่าวคือ เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่ไม่มีซีรัมพบว่าปริมาณดีเอ็นเอที่เกิดอะพอพโทสิสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญภายหลังได้รับซาตราทอกซินเอชเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีซีรัมพบว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่เกิดอะพอพโทสิสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญภายหลังได้รับซาตราทอกซินเอชเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์พีซี 12 ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีซีรัมมีความไวต่อซาตราทอกซินเอชมากกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีซีรัมโดยสามารถสังเกตผลภายใน 24 ชั่วโมงได้อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น ในการศึกษา กลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลของซาตราทอกซินเอช จึงทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่ไม่มีซีรัมโดยให้เซลล์ได้รับซาตราทอกซินเอชความเข้มข้น 50 นาโนโมลาร์ จากนั้นย้อมเซลล์ด้วยวิธี DCFH-DA เพื่อนำมาวัดปริมาณอนุมูลอิสระโดยวิธี flow cytometry และวัดปริมาณ MDA โดยวิธี TBARS พบว่าปริมาณอนุมูลอิสระและปริมาณ MDA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 6 ชั่วโมง และ 36 ชั่วโมง ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวอาจเป็นไปได้ว่า การเกิดอะพอพโทสิสเกิดจากการกระตุ้นอนุมูลอิสระส่งผลต่อเนื่องให้เกิด lipid peroxidation ซึ่งเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบเนโครสิสตามมา เป็นที่ทราบกันดีว่าวิถีการส่งสัญญาณภายในเซลล์ MAPKs เป็นวิถีที่มักเกิดค่อเนื่องจากการกระตุ้นอนุมูลอิสระ จึงได้นำมาเป็นสมมติฐานของการศึกษาค้นคว้านี้โดยนำเซลล์ที่ได้รับซาตราทอกซินเอชมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน MAPKs โดยวิธี Western blot พบว่าซาตราทอกซินเอชกระตุ้นการเกิด phosphorylation ของโปรตีน p38 MAPK และ JNK ที่เวลา 3-6 ชั่วโมงและ ERK1/2 ตั้งแต่ 0.5-6 ชั่วโมง เพื่อยืนยันผลดังกล่าวจึงนำเซลล์ที่ได้รับสาร SB203580 เพื่อยับยั้งการเกิด phosphorylation ของ p38 MAPK หรือที่ได้รับสาร SP600125 เพื่อยับยั้งการเกิด phosphorylation ของ JNK เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนได้รับซาตราทอกซินเอชต่ออีกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสารยับยั้งดังกล่าวมีผลเพิ่มอัตราการอยู่รอดของเซลล์พีซี 12 ได้อย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองดังกล่าวได้ว่าวิถีการส่งสัญญาณภายในเซลล์ผ่านทางโปรตีน p38 MAPK และ JNK ร่วมกับวิถีการรักษาสมดุลของอนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญทำให้เซลล์พีซี 12 ที่ได้รับซาตราทอกซินเอชตายแบบอะพอพโทสิส เมื่อศึกษาฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในการปกป้องเซลล์ที่ได้รับพิษจากซาตราทอกซินเอช พบว่าเซลล์ที่ได้รับซาตราทอกซินเอชร่วมกับสารต้านอนุมูลอิสระ GSH, NAC หรือ trolox นั้นไม่สามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอดของเซลล์ ไม่สามารถลดอัตราการตายแบบอะพอพโทสิส และไม่สามารถลดการเกิด lipid peroxides ได้ อย่างไรก็ตามเมื่อให้ GSH ในความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ร่วมกับซาตราทอกซินเอชเป็นเวลา 6 ชั่วโมงพบว่าสามารถลดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สรุปได้ว่าเซลล์พีซี 12 ที่ได้รับซาตราทอกซินเอชสามารถชักนำให้เพิ่มระดับอนุมูลอิสระเพื่อไปกระตุ้นปฏิกิริยา phosphorylation ในวิถี p38 MAPK และ JNK เป็นผลให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทสิส ส่งผลให้เกิด lipid peroxides และทำให้เซลล์ตายแบบเนโครสิสตามมา อย่างไรก็ตามการให้สารต้านอนุมูลอิสระไม่สามารถปกป้องเซลล์ที่ได้รับพิษจากซาตราทอกซินเอชได้เลย

ภาควิชา.....ลายมือชื่อนิสิต.....พรรณิ หนูชื่อตรง
 สาขาวิชา...เภสัชศาสตร์ชีวภาพ.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา...Dr. Par
 ปีการศึกษา.....2548.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม...Norimichi Nakahata
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม...T. Pengsuporn.....

4476958333: BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES

KEY WORDS: TRICHOHECENE / SATRATOXIN H / APOPTOSIS / ROS / LIPID PEROXIDATION / MAPK / PC12 CELL / ANTIOXIDANT

PUNNEE NUSUETRONG: MOLECULAR MECHANISM OF SATRATOXIN H-INDUCED APOPTOSIS IN PC12 CELLS, THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. DUANGDEUN MEKSURIYEN, Ph. D., THESIS CO-ADVISOR: PROF. NORIMICHI NAKAHATA, Ph. D., ASSOC. PROF. THITIMA PENGSUPARP, Ph. D. 100 PAGES. ISBN 974-17-4474-9

The purpose of this study was to elucidate the molecular mechanism of satratoxin H, and the protective effect of antioxidants on satratoxin H-induced apoptosis in PC12 cells. Treatment with satratoxin H decreased cell viability in a concentration- and time-dependency measured by MTT assay with the IC_{50} of approximately 50 nM. We evaluated the type of cell death. Hoechst 33342 assay showed a significant increase in apoptosis after 24 h-incubation of satratoxin H. DNA fragmentation by agarose gel electrophoresis confirmed that DNA ladder was entirely found after 1 day-incubation in serum-free medium, and then the band began fade suggesting that apoptosis might change to secondary necrosis. In contrast, the cells in serum-containing medium showed DNA ladder after 3 day-incubation. The result was supported by flow cytometry using propidium iodide that apoptotic cells were significantly augmented after 24 h- and 48 h-incubation in serum-free and in serum-containing medium, respectively. The results suggested that incubation of cells in serum-free medium was more sensitive to satratoxin H. The molecular mechanism of satratoxin H-induced apoptosis was therefore examined under the condition in serum-free medium. Treatment with satratoxin H showed a significant increase in the ROS level (6 h) and MDA content (36 h) detected by flow cytometry using DCFH-DA and by TBARS, respectively. It was implied that satratoxin H-induced apoptosis might be through the generation of ROS. Since lipid peroxidation occurred during the decrement of apoptosis, lipid peroxides may further induce necrosis. MAPKs, a well-known downstream of ROS, were determined by Western blot analysis. Treatment with satratoxin H increased the phosphorylation of p38 MAPK as well as JNK at 3-6 h and ERK1/2 at 0.5-6 h. The activation of MAPKs was confirmed by using MAPKs inhibitors. Preincubation with SB203580, a p38 MAPK inhibitor or SP600125, a JNK inhibitor for 1 h following by 48 h-incubation of satratoxin H significantly increased cell viability. The results indicated that p38 MAPK and JNK pathways were involved in satratoxin H-induced apoptosis. We demonstrated whether antioxidants could protect satratoxin H-treated cells. The coincubation of the antioxidants GSH, NAC, or trolox with satratoxin H resulted in no significant change the percentage of cell viability, the percentage of apoptosis, and the production of lipid peroxides. Meanwhile GSH (1 mM) significantly reduced the generation of ROS after 6 h-coincubation. It was suggested that ROS may play a role in satratoxin H-induced apoptosis and GSH exhibited low potential in protection of satratoxin H-induced apoptosis in PC12 cells. In conclusion, satratoxin H-induced apoptosis was mediated through the generation of ROS coincident with the activation of p38 MAPK and JNK. These events led to the production of lipid peroxides, which may involve in satratoxin H-induced necrosis. However, antioxidants did not protect satratoxin H-induced the ROS generation and production of lipid peroxides.

Department.....-.....Student's signature *Punnee Nusuetrong*
 Field of study..Biopharmaceutical Sciences..Advisor's signature *D. Meksuriyen*
 Academic year.....2005.....Co-advisor's signature *Norimichi Nakahata*
 Co-advisor's signature...T. *Pingsuparp*

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deep appreciation to my advisor, Associate Professor Duangdeun Meksuriyen and co-advisor, Associate Professor Thitima Pengsuparp for their invaluable advice, supervision, and encouragement throughout this study.

I would like to special thank to Professor Norimichi Nakahata, my co-advisor, for giving a chance to perform experiments at Tohoku University, Japan, giving advices, and providing PC12 cells. His kindness and helpfulness are also appreciated.

I would like to express my sincere gratitude to Associate Professor Makoto Yoshida of the Department of Cellular Signaling, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, for his valuable advice, and for his help during my experimental study in Japan. I also would like to special thank to Professor Yoshiteru Oshima and his colleagues in Department of Natural Products Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, for providing satratoxin H.

Also, we are indebted to Associate Professor Kiat Ruxrungtham, Head of Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for providing flow cytometry and Ms. Supanee Buranapraditkun for her excellent technical assistance in flow cytometric techniques.

I would like to thank to the personals of the Department of Cellular Signaling, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Japan, and the Department of Biochemistry, Department of Pharmacology, as well as Department of Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Thailand, for their friendship and help during my dissertation work.

The poster presentation in PSWC2004 at Kyoto, Japan was kindly supported by the Organizing Committee of PSWC2004 for the Student Travel Grant.

The present work was partly supported by Grants-in-Aid for Scientific Research grants from the Postgraduate Education Development for the Development of Higher Education (PED) from the Commission of Higher Education, Thailand, from the Graduate Research Funds from the Ministry of University Affairs, and from the Graduate School, Chulalongkorn University.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT IN THAI.....	iv
ABSTRACT IN ENGLISH.....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	x
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xii
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II LITERATURE REVIEW.....	6
III MATERIALS AND METHODS.....	18
IV RESULTS.....	26
V DISCUSSION AND CONCLUSION.....	55
REFERENCES.....	67
APPENDICES.....	82
VITA.....	100

LIST OF TABLES

Table	Page
1. The percentage of cytotoxicity of satratoxin H–treated PC12 cells in concentration-dependent manner for 24 h.....	87
2. The percentage of cytotoxicity of satratoxin H at the concentration of its IC ₅₀ (50 nM)–treated PC12 cells at various time points (time dependency).....	87
3. The percentage of fragmented DNA, detected by Hoechst 33342 assay induced by satratoxin H at the concentration of 50 nM in PC12 cells at various time points (time dependency).....	88
4. The percentage of fragmented DNA in PC12 cells by flow cytometry using propidium iodide, induced by satratoxin H at the concentration of 50 nM at various time points (time dependency).....	88
5. The relative intensity in PC12 cells quantitated by a flow cytometry using DCFH-DA induced by satratoxin H (50 nM) and incubated in serum-free medium at various time points (time dependency).....	89
6. The MDA content of satratoxin H (50 nM)–treated PC12 cells in time-dependency incubated in serum–free medium.....	89
7. The percentage of cytotoxicity of satratoxin H – treated PC12 cells with and without MAPKs inhibitors; SB203580 p38 MAPK inhibitor, SP600125 JNK inhibitor, and PD98059 ERK1/2 inhibitor.....	90
8A. The percentage of cytotoxicity of satratoxin H–treated PC12 cells with and without antioxidant glutathione (GSH) for 6 h in serum-free medium.....	90
8B. The percentage of cytotoxicity of satratoxin H–treated PC12 cells with and without antioxidant glutathione (GSH) for 12 h in serum-free medium.....	91
8C. The percentage of cytotoxicity of satratoxin H–treated PC12 cells with and without antioxidant glutathione (GSH) for 18 h in serum-free medium.....	91
8D. The percentage of cytotoxicity of satratoxin H – treated PC12 cells with and without antioxidant glutathione (GSH) for 24 h in serum-free medium.....	92
8E. The percentage of cytotoxicity of satratoxin H–treated PC12 cells with and without antioxidant <i>N</i> -acetylcysteine (NAC) for 6 h in serum-free medium.....	92

Table	Page
8F. The percentage of cytotoxicity of satratoxin H–treated PC12 cells with and without antioxidant <i>N</i> -acetylcysteine (NAC) for 12 h in serum-free medium.....	93
8G. The percentage of cytotoxicity of satratoxin H–treated PC12 cells with and without antioxidant <i>N</i> -acetylcysteine (NAC) for 18 h in serum-free medium.....	93
8H. The percentage of cytotoxicity of satratoxin H–treated PC12 cells with and without antioxidant <i>N</i> -acetylcysteine (NAC) for 24 h in serum-free medium.....	94
8I. The percentage of cytotoxicity of satratoxin H–treated PC12 cells with and without antioxidant trolox for 24 h in serum-free medium.....	94
8J. The percentage of cytotoxicity of satratoxin H–treated PC12 cells with and without antioxidant trolox for 36 h in serum-free medium.....	95
8K. The percentage of cytotoxicity of satratoxin H–treated PC12 cells with and without antioxidant trolox for 48 h in serum-free medium.....	95
9. The percentage of antioxidant–treated PC12 cells in satratoxin H-free medium.....	96
10. The percentage of fragmented DNA in PC12 cells by flow cytometry using propidium iodide, induced by satratoxin H (50 nM) and antioxidants (GSH or NAC) at indicated concentration for 24 h.....	97
11. The relative fluorescence intensity in PC12 cells quantitated by a flow cytometry using DCFH-DA, cocultivated with or without satratoxin H (50 nM) and antioxidant (GSH or NAC) or antioxidant alone at indicated concentration for 6 h.....	98
12. The MDA content of satratoxin H-treated PC12 cells incubated with indicated concentration of glutathione (GSH) or trolox in serum-free medium for 48 h.....	99

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Proposed diagram of signaling pathways of trichothecene-induced apoptosis.....	4
2. The general structure, numbering system, and variable side groups of the tetracyclic trichothecene nucleus (A); and structures of type A-trichothecene (T-2 toxin) (B), type B-trichothecene (vomitoxin) (C), and the macrocyclic trichothecene (saratroxin H) (D).....	6
3. Basic reaction sequence of lipid peroxidation.....	12
4. Major MAP kinase cascades in mammalian cells.....	13
5. Hallmarks of the apoptotic cell death process.....	16
6. Saratroxin H-induced cytotoxicity of PC12 cells.....	27
7. Morphological analysis of nuclear chromatin in PC12 cells stained with Hoechst 33342 using fluorescence microscope.....	29
8. Induction of DNA fragment laddering by saratroxin H (50 nM).....	31
9. Flow cytometric analysis showing the effects of saratroxin H-induced apoptosis in PC12 cells.....	34
10. Time-dependent ROS formation in saratroxin H-treated PC12 cells.....	36
11. Effect of saratroxin H treatment on the production of MDA in PC12 cells.....	38
12. Saratroxin H-induced phosphorylation of p38 MAPK, JNK, and ERK1/2 in PC12 cells.....	40
13. Effects of SB203580 at 30 μ M, PD98059 at 30 μ M and SP600125 at 10 μ M on saratroxin H-induced cytotoxicity.....	41
14. Effect of p38 inhibitor SB203580 (A), and ERK1/2 inhibitor PD98059 (B) on saratroxin H-induced p38 MAPK, and ERK1/2 activation	43
15. Effect of reduced glutathione (GSH) or <i>N</i> -acetyl-L-cysteine (NAC) or 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (trolox) on saratroxin H-induced cytotoxicity in PC12 cells.....	48
16. Flow cytometric analysis for the effects of antioxidants on saratroxin H-treated PC12 cells.....	50
17. Effects of GSH (17A) and NAC (17B) on the generation of ROS induced by saratroxin H.....	52

Figure	Page
18. Influence of GSH (A), and trolox (B) on the production of lipid peroxides in satratoxin H-treated PC12 cells.....	54
19. Hypothetical signaling pathways of satratoxin H-induced cell death in PC12 cells.....	65

LIST OF ABBREVIATIONS

ADP	adenosine diphosphate
AETD	4-acetyl-12, 12-epoxyl-9-trichothecene-3, 15-diol
ANOVA	analysis of variance
AP-1	transcription factor activator protein 1
Apaf-1	the initiating apoptosis protease activating factor 1
ASK1	apoptosis signal-regulating kinase 1
ATP	adenosine triphosphate
Bax	a pro-apoptotic Bcl-2 family
Bcl2	an anti-apoptotic Bcl-2 family
CAD	caspase-activated DNase
CED-4	an adenosine triphosphate-binding protein in the nematode <i>Caenorhabditis elegans</i> which is identified as Apaf-1
CO ₂	carbon dioxide
DCF	2', 7' -dichlorofluorescein
DCFH-DA	2', 7' -dichlorofluorescein diacetate
DCFH2	2', 7' -dichlorodihydrofluorescein
°C	degree Celsius (centigrade)
DFF-40/CAD	DNA fragmentation factor-40/caspase-activated DNase
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DPP	dipeptidylpeptidase
ECL	an enhanced chemiluminescence detection reagent
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
ERK	extracellular signal-regulated protein kinase
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , and others
FCS	fetal calf serum
g	gram
GR	glutathione reductase
GSH	glutathione
γGT	gamma-glutamyl transpeptidase

HCl	hydrochloric acid
4-HNE	4-hydroxynonenal
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide
h	hour
HS	horse serum
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
Ig	immunoglobulin
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDA	malondialdehyde
mg	milligram (s)
µg	microgram (s)
µl	microlitre (s)
min	minute (s)
MIP-2	macrophage inflammatory protein-2
mm	millimeter (s)
mM	millimolar
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
NAC	<i>N</i> -acetylcysteine
NaCl	sodium chloride
NAD ⁺	oxidized nicotinamide adenosine dinucleotide
NADH	reduced nicotinamide adenosine dinucleotide
NaF	sodium fluoride
NaN ₃	sodium azide
nM	nanomolar
OD	optical density
p38 MAPK	MAPK involved in stress response in higher eukaryotes
PARP	a poly(ADP-ribose) polymerase
PBS	phosphate-buffered saline
%	percentage
pH	the negative logarithm of hydrogen ion concentration
PI	propidium iodide

PVDF	polyvinylidene fluoride
RNase	ribonuclease
ROS	reactive oxygen species
SAPK	stress-activated protein kinase
SEK1	SARK/ERK kinase 1 (MKK4, JNKK)
SEM	standard error of mean
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SPSS	statistical package for social sciences
TBARS	thiobarbituric acid-reactive substances
TBST	Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20
TE	Tris base-EDTA
TNF α	tumor necrosis factor alpha
Trx	thioredoxin
UV	ultraviolet
V	volt
v/v	volume by volume