

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

槲皮酮與其代謝產物單獨或合併 beta-胡蘿蔔素體內外抗發炎及抗致腫瘤劑的效果(第 3 年)
研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 96-2320-B-040-029-MY3
執行期間：98 年 08 月 01 日至 99 年 07 月 31 日
執行單位：中山醫學大學營養學系(所)

計畫主持人：葉妹蘭

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：林曉君
碩士班研究生-兼任助理人員：詹淑婷
碩士班研究生-兼任助理人員：陳佩樺
碩士班研究生-兼任助理人員：黃碩彥
碩士班研究生-兼任助理人員：楊盈芝

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

中華民國 99 年 10 月 29 日

目 錄

中文摘要	II
英文摘要	III
一、 前言	1
二、 研究目的	1
三、 文獻探討	1
四、 研究方法	5
五、 結果	5
六、 討論	7
七、 圖表	9
八、 參考文獻	14
九、 計畫成果自評	15

摘要

Quercetin是一種廣泛存在於蔬果中的黃酮醇(flavonols)，在體外具有抗氧化及抗發炎作用，然而卻有研究發現人體食用富含quercetin的食物後，在其血液中並幾乎測不到quercetin aglycone，反之血液中卻能測到其代謝產物，亦即其與methyl, sulfate或glucuronic acid的接合物，但這些代謝產物的生理功能還不清楚。因此這三年期的研究分為三部分，探討人類肺癌細胞株A549細胞及沙鼠體內BaP或BaP+ β -胡蘿蔔素(BC)的刺激下，quercetin代謝產物的保護作用。

第一部份

此部份為體外試驗，利用人類肺癌細胞株A549為細胞模式，將A549細胞以quercetin -3-glucuronide (Q3G)、quercetin -3'-sulfate (Q3'S)及isorhamnetin (I)分別以2,5,10 μ M單獨或合併20 μ M BC預培養4小時後，再以20 μ M benzo[a]pyrene (BaP)刺激後，進行DNA斷裂分析、cytochrome P450 (CYP) CYP1A1/1A2的表現分析(西方墨點法)及測定細胞內ROS產生量，其結果並與quercetin的結果進行比較。另外我們探討quercetin的代謝產物對於在Fe/NTA氧化下BC消耗的影響。結果顯示，個別的quercetin代謝產物均對BaP或BaP+BC誘發的DNA傷害有顯著的抑制效果且與quercetin效果相似。Quercetin的代謝產物也會減少BaP或BaP+BC誘發的CYP1A1/1A2表現其中也以Q3G與Q3'S效果較好，然而只有10 μ M Q3'S及Q3G有抑制BaP刺激的ROS生成。而Q3G及quercetin對Fe/NTA作用下BC的耗損有相似的抑制效果。更進一步的，我們發現三種代謝產物混合對於在BaP或BaP+BC作用下有抑制細胞傷害或減少CYP1A1/1A2表現。

第二部份

此部份為ex vivo試驗。給予gerbil 餵食quercetin (100mg/kgw/week)之後，收集富含quercetin代謝產物之血漿(QP)，單獨或合併BC，與A549細胞預培養4小時，A549細胞再經BaP刺激一段時間後，之後再進行各項分析。QP是在gerbil管餵quercetin 2小時後進行採血所獲得，血漿中quercetin代謝產物顯著的增加，其中包含了quercetin-3-glucuronide, quercetin-3'-sulfate及methylquercetin，而其總濃度約為5 μ M。結果顯示QP可顯著的降低BaP單獨或合併BC所造成的細胞DNA斷裂情形及促發炎激素的分泌，且其效果與2 μ M及5 μ M quercetin的功用相似，QP也能降低細胞經BaP或BaP+BC誘發的c-Jun及JNK的磷酸化作用。

第三部份

此部分試驗為體內試驗，以gerbil為實驗model。給予gerbil單獨或合併管餵BC (10 mg/kg bw、3 次/week)、quercetin (100 mg/kg bw、3 次/week)及BaP (8 μ mole/次、2 次/week) 6個月，之後犧牲動物並進行各項分析。我們收集bronchoalveolar lavage fluid (BALF)檢測總細胞數、macrophages、lymphocytes及neutrophils數目，利用ELISA檢測BALF及血漿中TNF- α (tumor necrosis factor- α)及IL-1 β (Interleukin-1 β)的含量，並利用Western blot分析肺臟中c-Jun及JNK (Jun

N-terminal kinase) 蛋白表現的變化。結果顯示BaP可顯著的增加BALF免疫細胞的聚集及促發炎激素的含量，另外血漿中促發炎激素的含量亦會增加，給予BC會促進BaP此一效果，相反的，管餵quercetin可顯著的降低BaP或BaP+BC誘發的免疫細胞的聚集，及TNF- α 及IL-1 β 的表現，在肺臟中quercetin對於BaP或BaP +BC所誘發的c-Jun及JNK磷酸化作用也有明顯的抑制作用。

縱合以上實驗，第一部份及第二部份的實驗證實Quercetin代謝產物個別或合併會抑制BaP或BaP+BC誘發的細胞傷害，其機制可能包含調節氧化壓力、代謝酵素及導致促發炎相關的訊號路徑。而第三部份的體內試驗結果支持第二部分 ex vivo 試驗的結果顯示quercetin經代謝後亦能抑制 β -carotene對BaP誘發IL-1 β 、TNF- α 及JNK、c-Jun磷酸化的促進作用。以上三部分結果顯示quercetin的代謝產物具有多種生物活性，並能與BC產生交互作用。

Abstract

Quercetin, a flavonoid, is found ubiquitously in the vegetables and fruits. It possesses antioxidant and anti-inflammatory activity *in vitro*. However, the conjugated metabolites rather than quercetin aglycone are present in blood in human after consumption of foods rich in quercetin. Whether the metabolites of quercetin possess the beneficial effects as their parent compound remains unclear. Therefore, this three-year study was divided into three parts to investigate the preventive effects of the metabolites of quercetin on A549 cells and gerbils with benzo[a]pyrene (BaP) or BaP+ β -carotene (BC) exposure

Part 1.

In the *in vitro* study, the A549 cells were pre-incubated with 2, 5 or 10 μ M quercetin-3-glucuronide (Q3G), quercetin-3'-sulfate (Q3'S) and isorhamnetin (I) alone or in combination with 20 μ M BC for 4 hours, followed by incubation with 20 μ M benzo[a]pyrene (BaP) for 24 hours. Then, the cell DNA damage, the expression of CYP 1A1/1A2 and the production of intracellular reactive oxygen species (ROS) were examined. We also compared the results with that of quercetin. In addition, we investigated the preventive effect of those quercetin metabolites on the consumption of BC induced by the oxidant, Fe/NTA. The results showed that Q3G, Q3'S and I significantly inhibited the DNA damage induced by BaP or BaP+BC. The efficiencies of those metabolites were similar to that quercetin itself. Those metabolites also decreased the expression of CYP1A1/1A2 induced by BaP or BaP+BC in the order Q3'S, Q3G \geq quercetin, I. However, only Q3G and Q3'S at 10 μ M decreased the production of ROS induced by BaP. Q3G and quercetin had a similar effect on decreasing the consumption of BC induced by Fe/NTA. Furthermore, we found the mixture of quercetin metabolites tended to additively decrease the cytotoxicity and the expression of CYP1A1/1A2 induced by BaP or BaP+BC.

Part 2.

In the *ex vivo* study, the A549 cells were preincubated with quercetin or the quercetin-metabolite-enriched plasma (QP; 10%), alone or combined with 20 μ M BC for 4 h, and then, the cells were treated with 20 μ M of BaP indicated time. The QP was obtained from gerbils at 2 h after fed with quercetin at 100 mg/kgw/week, while the control plasma was obtained from gerbils administered vehicle only. Several quercetin metabolites rather than quercetin aglycone were observed in QP, including quercetin-3-glucuronide, quercetin-3'-sulfate and methylquercetin. At 2 h after oral administration of quercetin, the total quercetin concentration of the plasma in gerbils was significantly increased and reached to a maximum (\sim 5 μ M). QP significantly decreased DNA damage and suppressed the secretion of pro-inflammatory cytokines induced by BaP or BaP+BC in A549 cells, and the efficiency of QP was similar to those of quercetin at 2 and 5 μ M. QP also significantly decreased the ratio of phospho-c-Jun/total c-Jun and phospho-JNK/total JNK in A549 cells incubated with BaP or BaP+ BC.

Part 3.

In the *in vivo* study, we fed gerbils by gavage with BC (10 mg/kgw, 3 time/week), quercetin (100 mg/kgw, 3 time/week) and BaP (8 μ mole/time, 2 time/week) alone or combined for 6 months. After sacrificed, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and plasma were collected to determine cell profile or/and the levels of pro-inflammatory cytokine, TNF- α (tumor necrosis factor- α) and IL-1 β (Interleukin-1 β). The activation of c-Jun and JNK (Jun N-terminal kinase) proteins in lung was also determined by western blotting. The results showed BaP significantly increased the numbers of total cell and the macrophage as well as the levels of pro-inflammatory cytokine in BALF. BC-administration significantly enhanced such an effect; in contrast, quercetin- administration significantly decreased the pro-inflammatory effects of BaP or BaP+ BC. BaP also significantly increased the ratio of phospho-c-Jun/total c-Jun and that of phospho-JNK/total JNK in lung in gerbils. Similarly, BC -administration significantly enhanced such an effect while quercetin- administration had a significant suppressed effect.

In conclusion, the results of part I and part II studies demonstrated that the metabolites of quercetin individual or combined protect cells against the damages induced by BaP or BaP + BC through several mechanisms including the regulation of oxidative stress, the metabolic enzymes, and the proinflammatory associated signal pathway. The in vivo study in part III supported those findings in Part II. These results suggest that the metabolites quercetin possess several bioactivities and interact with BC.

一、前言

Quercetin 是一種廣泛存在於蔬果中的黃酮醇 (flavonols)，具有抗氧化及抗發炎作用，然而卻有研究發現人體食用富含 quercetin 的食物後，在其血液中並未能測到或僅能測到很低的 quercetin aglycone，反之血液中卻能測到其代謝產物，亦即其與 methyl sulfate 或 glucuronic acid 的接合物，目前對於 quercetin 代謝產物的生理活性及意義所知不多，但要瞭解 quercetin 的生理、藥理重要性，實有必要對其代謝產物的生理活性多有研究，因為 quercetin 在體內可能多以代謝後的形式存在。此外，我們先前的細胞研究發現 quercetin 可藉由不同的機制，如抗氧化、抑制 cytochrome P450 酵素活性或抑制發炎介質的產生，而 Benzo[a]pyrene (BaP) 抑制 β -carotene (BC) 的促氧化或促進細胞傷害的作用，但其代謝產物是否有此效果，及其可能的作用機制為何，這些都是需要進一步研究的問題。

二、研究目的

由前述可知 quercetin 本身的生理效果及作用機制已有相當廣泛的研究，而其各個代謝產物的生理意義及重要性則所知有限，但後者的重要性卻可能更大

(Williamson et al., 2005)，因此本三年計畫，分為三個部分，主要的目的分別敘述如下：

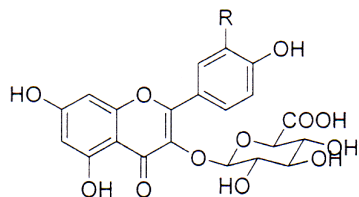
1. 比較 quercetin 及其幾種主要的代謝產物 (quercetin-3-glucuronide, quercetin-3'-sulfate, isohamnetin) 單獨或合併使用，抑制 benzo[a]pyrene (BaP) 或 BaP 合併 β -carotene 傷害，CYP1A1/1A2 表現以及細胞內 ROS 生成量的影響並與 quercetin 進行比較。另外，我們也探討混合的代謝產物對上述標的效應是否具有加乘效果(林，2009)。
2. 餵食沙鼠 quercetin (100 mg/kg b.w./week)，之後收集血漿和 BC 與 A549 細胞共同培養，以此 ex vivo 模式探討 quercetin 代謝產物，是否對 BaP 或 BaP + BC (20 μ M) 刺激下的細胞具有保護作用(詹，2009)。
3. 給予沙鼠管餵 BaP、quercetin 及 BC，探討在體內 quercetin 與 BC 對 BaP 誘發肺部傷害的影響及 quercetin 與 BC 交互作用的情形(詹，2009)。

三、文獻探討

1. Quercetin

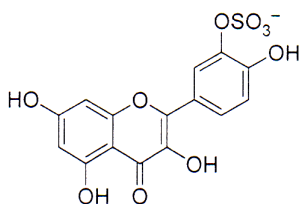
Quercetin 是蔬菜水果中所富含的一種類黃酮 (Knekt et al., 2002)，具有酚基結構可穩定電子，許多研究已證實類黃酮在體外具有清除單重態氧、超氧陰離子及脂質過氧化自由基等之能力 (Pierpoint, 1986; Bors et al., 1997)。有研究指出膳食中的類黃酮如 quercetin, kaempferol, myricetin, hesperitin 及 naringenin 等 phytochemicals 具抗癌及降低心臟血管疾病、呼吸道疾病等多種退化疾病效果 (Hirvonen et al., 2001; Cao et al., 2002; Depeint et al., 2002; Knekt et al., 2002)，這些類黃酮具生理保護效應的機制可能包括抗氧化及對許多酵素活性的調控作用，因而抑制發炎或致癌物質活化(Bear and Teel, 2000)，我們自己過去的體外研究也發

現 quercetin 可能藉由抗氧化或抑制 cytochrome P450 酵素的活性而降低 NNK 對細胞的傷害，並抑制 β -胡蘿蔔素的促氧化性 (Yeh et al., 2006)，此外 quercetin 在體外模式中也具抗發炎效果 (Yeh, 2009)。不過由於 quercetin 於體內濃度非常低甚至不存在，因此其體內的生理意義，一直受到質疑 (Williams et al., 2004)。近年來，對多酚類的吸收及代謝瞭解的越來越清楚，以 quercetin 為例，人體研究發現攝食富含 quercetin 的食品後，會很快的被 phase II 的酵素代謝成 methyl, sulfate 及 glucuronic acid 接合物(conjugates) (Day et al., 2001; Mullen et al., 2006)，其中幾種主要代謝產物結構如下圖所示。



R=OH: quercetin-3-glucuronid

R=OMe: isorhamnetin-3-glucuronid



quercetin-3'-sulfate

在給與 quercetin 或富含 quercetin 的食物後，人體血漿中這些接和物的總和最大可達 1-5 μmol aglycone equivalents /L plasma (Williamson and Manach, 2005; Williamson et al., 2005)，近來有動物實驗顯示，餵食高劑量的 quercetin 給予 rat，quercetin 及其代謝產物會廣泛的分佈到許多組織，當中肺部的濃度最高 (3.98 及 15.3 nmol/g tissue 分別對含 0.1and 1 % quercetin 的飲食)，而腦部及脾臟含量則最少 (de Boer et al., 2005)，作者並發現雖然組織中主要的型式為 methyl, sulfate 及 glucuronic acid 接合物，但不能排除存在有游離型式的 quercetin，特別是在肺、肝及腎臟等有高去接合 (deconjugation) 的活性的組織，這些組織具有高 β -glucuronidase 活性。

由於 quercetin conjugated metabolites 是 quercetin 存在體內主要的形式，因此對其生理活性的研究越來越受到重視。研究顯示不同的接合物及接合位置會影響 quercetin 捕捉捕捉超氧陰離子的能力 (Cano et al., 2002)。Day 等 (2001) 的人體試驗發現，攝取洋蔥 1.5 小時後，血漿中主要的代謝產物為 quercetin-3-glucuronide, 3'-methyl-quercetin-3-glucuronide 及 quercetin-3'-sulfate，作者認為接合在 B 或 C 環上不同的情況會影響其生理活性，例如 quercetin-3-glucuronide 雖可捕捉自由基(Moon et al., 2001)，但卻不像 quercetin 具抑制 xanthin oxidase 及 lipoxygenase 的能力(Day et al., 2000)，反之，quercetin-3'-sulfate 則可能仍具此效果(Day et al., 2001)。另有研究顯示，甲基化

的 quercetin 代謝物，isorhamnetin and tamarixetin 較 quercetin 本身更具抑制人類 colorectal cancer cell line(HCA-7) cyclooxygenase-2 的能力 (Jones et al., 2004)。Bao and Lou (2006) 發現 isorhamnetin(50-12.5 μ M)可以抑制 LDL 誘發的細胞傷害，其機制包括抗氧化(抑制 ROS 產生，及 SOD 的損耗)及調控 signaling pathway (降低 ox-LDL 活化 p38MAPK, NF-kappaB nuclear translocation, e NOS 表現)。另有學者發現不同的 quercetin conjugate 對血管心生作用可能有抑制或促進兩種不同的影響 (Donnini et al., 2006)。有研究指出當 B 環上 o-dihydroxyl (catechol group)的結構，對 quercetin 捕捉自由基的能力很重要，因此，在小腸吸收過程，所產生的 quercetin 代謝物可能會影響其抗氧化力(Terao, 2009)。Suri 等(2008) 發現 quercetin-3-glucuronide 可以降低趨化劑所誘發的鈣離子流入嗜中性球的情況，但 quercetin 及 quercetin-3'-sulfate 則無此效果。另有研究顯示，甲基化的 quercetin 代謝物，isorhamnetin 及 tamarixetin 較 quercetin 本身更具抑制人類 colorectal cancer cell line(HCA-7) 表現 cyclooxygenase-2 的能力(Jones et al., 2004)。

2. β -胡蘿蔔素 (β -carotene; BC)

BC 是一黃色的脂溶性分子，除了可作為維生素 A 前趨物，BC 可能還具有多種生理功能及抗氧化性，因此被認為與預防老化疾病及癌症的發生有關 (Peto et al., 1981)。許多流行病學調查結果顯示，攝取富含 BC 之深色蔬菜水果可以減少心臟血管疾病與多種癌症的發生，此種效果對減少抽煙者的肺癌尤為明顯 (Peto et al., 1981; Ziegler et al., 1996)。但兩個著名的人體試驗 (The alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study group, 1994; Omenn et al., 1996)，卻發現給抽菸者補充 BC (30 mg/d)，不僅未能減少各種心臟血管疾病、癌症的發生，甚至可能增加肺癌的發生。對於 BC 增加抽菸者傷害的可能原因，有一假說是：在抽菸者的肺部，由於香菸煙霧及其所誘發之發炎反應中所含的活性氧及自由基成分，導致 BC 氧化，高劑量補充的結果會導致許多氧化裂解產物產生，而造成促氧化及促進傷害反應(Duffield-Lillico and Begg, 2004)。許多的體內實驗結果，支持這個假說 (Wang et al., 1999; Kim et al., 2006)。另一方面，越來越多研究顯示 BC 與其他抗氧化劑共同使用，可增加其安全性及生理效應，例如，Liu et al. (2004) 體外試驗顯示，在香菸煙霧誘發下，維生素 C 及 E 減少白鮑肺組織 BC 轉變為 β -apo-carotenal 而增加 retinoids 的生成，維生素 C 及 E 可能由於減少氧化分解的 pathway，因此有助於 retinoic acid 的生成。Kim et al. (2006) 的動物研究發現，合併 BC (生理劑量，相當於人 12 mg/d)、ascorbic acid 及 α -tocopherol 的使用，可減少香菸煙霧及 NNK 注射共同誘發的白鮑肺損傷 (lesion) 及肺腫瘤形成的情況。

3. quercetin 與 BC 的交互作用

有一些體外研究的結果顯示酚類化合物與 BC 間可能具交互作用的能力，例如，Trombino et al. (2004)發現 ferulic acid，一種廣泛存在於自然界的酚類化合物，可以減少 BC 在氧化壓力下的損耗，及氧化產物的生成。而我們先前的研究亦發現

高劑量 (20 μM) 的 BC 與 A549 細胞 (一種人類肺癌細胞株, 特性類似肺上皮細胞) 預培養, 會促進香菸煙霧中的致癌活性成分 NNK 及 Benzo[a]pyrene (BaP) 所誘發的細胞 DNA 傷害, 低劑量 (0.2-2 μM) 則不具促進作用, 雖未達顯著水準 ($P>0.05$), 但具輕微抑制 BaP 傷害的作用, 而在幾種測試的類黃酮中, quercetin 抑制 BC 的促氧化或促傷害性效果最好 (Yeh et al., 2006; Yeh and Wu, 2006)。另外我們也發現高劑量 BC 會促進 PMA 所誘發的發炎反應, 相反的低劑量則有抑制作用, 而 20 μM quercetin 除可抑制高劑量 BC 的促發炎性, 與低劑量 BC 共同作用時可以相加或相成性的抑制一些發炎激素的產生 (Yeh et al., 2009), 但低劑量的 quercetin 及其謝產物是否有相同效果則不清楚, 另外我們之前的研究均以細胞株進行觀察, 在體內, quercetin 是否可抑制 BC 的損耗而抑制其傷害性或增加其生理功效亦不清楚。

4. Benzo[a]pyrene (BaP)

抽煙是造成肺癌的主要危險因子之一, 這與香菸煙霧或焦油成份中含有許多致癌分子有關。多環香煙類化合物 polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) 即其存在於香菸焦油中, 已知是一種致癌物質, 尤其是 PAHs 中的 BaP、anthracenes、methylcholanthrene 等 (Revel et al., 2003), 由於 BaP 的強致癌性及強致突變性, 因而特別引起學者探討的興趣。BaP 的代謝活化過程, 通常藉由 AhR (AhR, 一個 ligand-activated transcription factor), 它可與一些 planar aromatic compounds 結合 (Landers and Bunce, 1991; Elferink et al., 1990), 而 BaP 就是它其中一個, 當 AhR 與其 ligand 結合形成活化形式的複合體後, 此複合體會進入核中與核內的 AhR nuclear translocator (Arnt) 結合, 形成 ligand-AhR/Arnt heterodimer, 此 dimmer 藉由結合到 DNA enhancer sequence 上的 xenobiotic-responsive element (XRE), 因而上調 (up-regulate) 多種 cytochrome P450 酵素基因表現。BaP 可藉由 cytochrome P450 代謝活化生成 (\pm)-trans-7, 8-dihydroxy-7, 8-dihydrobenzo[a]pyrene, 然後再繼續氧化成 anti-7, 8-dihydroxy-9, 10-epoxy-7, 8, 9, 10-epoxy-7, 8, 9, 10-tetrahydrobenzo[a]pyrene 最終代謝物。這些 BaP 具有高反應活性, 它會攻擊 DNA 的 guanine 之 N_2 位置及 adenine 之 N_6 位置, 與之形成鍵結 (Cheng et al., 1989; Rubin, 2001), 而使 DNA 受到傷害, 造成突變。BPDE 已知不只會造成 DNA 傷害 (Nebert et al., 2000; Tokiwa et al., 1993), 也會透過增加轉錄因子 p53 的活化 (Ueno et al., 1998), 使得細胞週期停止, 而發生細胞凋亡, 有研究指出在 BaP 的刺激下 mitogen-activated-protein kinase (MAPK) 會調節 p53 的磷酸化作用而導致細胞凋亡 (Lin et al., 2008)。研究指出在小鼠體內注射或管餵 24 μmole BaP 八週後, 會誘發小鼠肺臟形成腫瘤 (Hecht et al., 1994)。在 1996 年 Li 等發現癌症病人的 neoplastic tissue 有較高的 BaP-like DNA adduct。由以上結果可發現 BaP 確實會引起人類或動物基因發生突變, 進而導致癌症發生。有研究指出給予 ferret 低劑量的 β -carotene, 可調節 MAPK 的表現, 而抑制了 BaP 代謝後所造成 DNA 傷害及致癌性 (Liu et al., 2004)。

四、研究方法

1. 第一部分：

A549 細胞分別與自行合成的 quercetin -3-glucuronide (Q3G)、quercetin -3'-sulfate (Q3'S)(按 Day 等 (2001) 的方法)isorhamnetin (I)單獨 (或混合) 合併 20 M β -胡蘿蔔素(BC)預培養 4 小時後,再以 20 μ M benzo[a]pyrene (BaP)刺激 24 小時後,進行細胞 DNA 斷裂分析、cytochrome P450 (CYP) 1A1/1A2 的表現量分析 (西方墨點法) 及測定細胞內 ROS 分泌量,此外也以試管試驗檢測 quercetin 三種代謝產物在 Fe/NTA 誘發下對 BC 損耗的保護情形,並將其效果與 quercetin 的效果進行比較。

2. 第二部分：

Quercetin (100mg/kgw/week) 餵食 gerbil 之後,收集富含 quercetin 代謝產物之血漿(QP),單獨或合併 BC 與 A549 細胞預培養 4 小時,再經香菸中致癌成份 BaP 刺激 24 小時,分析細胞 DNA 傷害、促發炎激素 TNF- α (tumor necrosis factor- α)及 IL-1 β (Interleukin-1 β)的分泌及 c-Jun 及 JNK (Jun N-terminal kinase) 蛋白表現的變化,其結果也與 quercetin 的效果進行比較。

3. 第三部分：

給予 gerbil 單獨或合併管餵 BC (10 mg/kg bw、3 次/week)、quercetin (100 mg/kg bw、3 次/week)及 BaP (8 μ mole/次、2 次/week) 6 個月後,犧牲動物並進行各項分析。分析項目包括:收集 bronchoalveolar lavage fluid (BALF)檢測總細胞數、macrophages、lymphocytes 及 neutrophils 數目,利用 ELISA 檢測 BALF 及血液中 TNF- α 及 IL-1 β 的含量,並利用 Western blot 分析肺臟中 c-Jun 及 JNK 蛋白表現的變化。

五 結果

1. 第一部份 (林, 2009)

按 Day 等人 (2001) 的方法進行 quercetin-3-glucuronide 及 quercetin-3'-sulfate 合成純化後,以 HPLC 及質譜進行分析鑑定後,我們將純化所得分子單獨或合併 β -carotene 與 A549 細胞預培養後,再以 BaP 暴露 24 小時誘發細胞傷害,以 comet assay 分析 DNA 斷裂,結果發現,BaP 會顯著增加 DNA 傷害的情形,而 quercetin 與其代謝產物則顯著抑制 BaP 所誘發的細胞 DNA 斷裂($P < 0.05$)(圖一 A)。接著進一步將 quercetin 與各種代謝產物合併 BC 預培養後,再以 BaP 刺激,可發現 BC 單獨預培養會顯著增加 BaP 所誘發的 DNA 傷害(圖一 B),Q3'S 與 Q3G 可顯著抑制 BaP+BC 所誘發的傷害,且效果具劑量效應,而 I 只在 2 具抑制 DNA 傷害的效果。

以西方墨點法分析 CYP1A1 的表現量,結果顯示 I、Q3'S 及 Q3G 個別均可以顯著減少 BaP 誘發的 CYP1A1 的表現(圖二 A),其中似乎以 Q3'S, Q3G 效果甚至較 quercetin 好。當 quercetin 與各種代謝產物合併 BC 預培養時, BC 亦增加 BaP 誘發的 CYP1A1 的表現,10 μ M Q3G, Q3'S 可顯著減少 BaP+BC 所誘發的 CYP1A1 表現,且效果與 quercetin 相似 (圖二 B)。G 對於 CYP1A2 的表現量

的影響情形，趨勢大致與對 CYP1A1 表現的影響相似（圖三 A、B）。

上面的結果顯示，quercetin 各種代謝產物會抑制 BaP 及 BaP+BC 所誘發的細胞傷害及減少 CYP1A1 及 1A2 的表現量。我們接著檢測這些代謝產物，是否也會減少 BaP 誘發的氧化壓力，結果發現 10 μ M 的 Q3'S 及 Q3G 可抑制 BaP 誘發的 ROS 生成，且達顯著水準($P<0.05$) (圖四)。本研究利用體外試管試驗分析 quercetin 與各種代謝產物是否可減少促氧化劑(Fe/NTA)對 BC 的消耗。結果顯示 10 μ M quercetin 與 Q3G 會顯著抑制 BC 的消耗 (圖五)。

若將 quercetin 代謝產物 Q3G、Q3'S、I 以 2:2:1 混合，結果發現混合物對 BaP 及 BaP+BC 誘發的 DNA 傷害、CYP1A1/2 蛋白質表現及 Fe/NTA 誘發的 BC 的損耗均有顯著的抑制作用，我們比較混合物與各種代謝產物單獨的作用效果，發現只有在抑制 BC 的消耗上混合產物的觀測值較估算值顯著較低外，在其餘參數上，觀測值與估算值不具顯著差異，顯示混合代謝產物在這些參數的體外預防效果具有相加性(表一)。

2. 第二部分 (詹, 2009)

以 HPLC 分析 quercetin 經代謝後的產物的分佈，結果如圖六所示，控制組的血漿中，並無 quercetin 及其任何的代謝產物的存在 (圖六 A)，而給予 quercetin 後，血漿中雖沒有 quercetin aglycone 的存在，但 quercetin 的代謝產物 quercetin-3-glucuronide (QG), methyl-quercetin (I&T) 及 quercetin-3'-sulfate (Q3S) 明顯的出現在血漿當中 (圖六 B)，而血漿經酵素 β -glucuronidase/sulfatase 培養後，QG 及 Q3S 的表現量明顯下降，而 quercetin aglycone 的 peak 則明顯上升 (圖六 C)。另外 gerbil 經管餵 quercetin 後之 1、2、3、4、6 及 72 小時後之血漿並分別 β -glucuronidase/sulfatase 培養後，總 quercetin 濃度顯示如圖。血漿中 quercetin 總濃度在灌食後 2 小時達到最高點 (圖七)，可達 5 μ M，而灌食後的 72 小時血漿濃度則降至灌食前的濃度。為更進一步了解長期管餵 quercetin 的 gerbil 其血漿 quercetin 變化情形，我們每週管餵 1 次，並於管餵後 2 小時採血，連續 6 週，由圖八可得知，gerbil 血漿中 quercetin 的濃度在管餵第三週後開始達到一個穩定的濃度，其濃度約為 5 μ M。因此接下來細胞實驗所需的血漿皆以第三週後，餵食 quercetin 後 2 小時所獲得的血漿 (QP) 進行。我們的結果顯示 QP 能顯著抑制 BaP (圖九 A) 或 BaP+BC (圖九 B) 所造成的傷害，且效果與 2 μ M 或 5 μ M 的 quercetin 相當 (圖九)。BaP 或 BaP+BC 亦增加促發炎激素 TNF α (圖十 A) 及 IL-1 β (圖十 B) 的表現，QP 顯著抑制 BaP 或 BaP+BC 的促發炎效果，5 μ M quercetin 本身及 JNK 抑制劑 SP600125 亦具有同樣的效果 (圖十)。我們進一步以 western blot 觀察 A549 細胞 c-Jun 及 JNK 磷酸化情形，結果發現 BaP 及 BaP+BC 能誘發 c-Jun (圖十一 A) 及 JNK (圖十一 B) 磷酸化的現象，而 QP 則可顯著降低 BaP 或 BaP+BC 所造成的兩種蛋白磷酸化的表現且效果與 5 μ M 的 quercetin 相似 (圖十一)。

3. 第三部分結果 (詹, 2009)

gerbil 經管餵 quercetin、BC 和 BaP 刺激 6 個月後，犧牲後收集

bronchoalveolar lavage fluid (BALF)，觀察肺臟中免疫細胞數量及比例變化情形，由表二可得知，gerbil 的肺臟在 BaP 刺激下，BALF 總細胞數顯著增加，其中 macrophage 及 lymphocyte 的細胞數亦顯著增加，而餵食 BC 組總細胞數顯著較 BaP 單獨處理組多，除了 macrophage 及 lymphocyte，餵食 BaP+BC 組其 neutrophils 數亦較控制組多，而管餵 quercetin 則顯著的降低 BaP 或 BaP+ β -carotene 所誘發的免疫細胞滲入的情形。

利用 ELISA 分析 gerbil 血漿中或肺部促發炎性細胞激素含量，結果發現經 BaP 刺激下，gerbil 血漿及 BALF 中 TNF- α 的含量顯著的高於 control 組（圖十二），而管餵 β -carotene 組則會顯著增強加 BaP 的效應，管餵 quercetin 可顯著的降低 BaP 或 BaP+ β -carotene 所誘發的 TNF- α 。至於 gerbil 血漿及肺中 IL-1 β 含量，結果與 TNF- α 一致（圖十三）。

我們進一步以 western blot 分析肺臟中 c-Jun 及 JNK 的蛋白表現，由圖十四、十五可得知，管餵 BaP 組，肺臟中的磷酸化 Jun 及 JNK 蛋白比值顯著的較 control 高，而管餵 β -carotene 會增加 BaP 此一效應，而 quercetin 可顯著的降低 BaP 所誘發 c-Jun 及 JNK 的磷酸化作用。

註：這些研究主要由本人研究室兩位碩士班學生林曉君及詹淑婷執行，因此大部分的研究結果分別於他們兩位的碩士論文中，有詳細的敘述及討論。

六、討論

我們先前的研究顯示 20 μ M quercetin 可以抑制 BaP 對 A549 細胞 DNA 的傷害及高濃度的 BC 在 BaP 誘發下的促傷害性(Yeh and Wu, 2006)，但其代謝產物是否也有這樣的效果並不清楚，綜合以上三部分體內外研究顯，不論是合成 quercetin 代謝產物或於裸鼠體內代謝而來的代謝產物混合物，對於 BaP 單獨或合併 BC 的所造成細胞 DNA 傷害及促發炎效應皆有抑制的作用，且效果與 quercetin 相似或較好。

Quercetin 代謝產物的保護作用，可能透過多種機制達成，首先，我們於第一部份研究發現，它們可能透過減少 CYP1A1/1A2 表現而抑制 BaP 的傷害，因為 BaP 可以被 CYP 活化成對 DNA 具攻擊性的物質(Cheng et al., 1989; Rubin, 2001)，因此抑制 CYP 活化可以抑制這類分子對 DNA 的傷害(Yeh et al., 2005)。動物試驗發現 quercetin 以及其他類黃酮可以抑制致癌物質誘發的腫瘤 (Le Marchand et al., 2000)，可能的機制是抑制某些 CYP 酵素。而我們的結果顯示，quercetin 代謝產物 Q3'S-Q3G 會顯著減少 BaP 或 BaP+BC 誘發的 CYP1A1/1A2 表現且效果與 quercetin 相似或較好，所以前面動物試驗(Le Marchand et al., 2000) 所顯示 quercetin 體內效果，極有可能是因為這些代謝產物的作用。

其次我們的 ex vivo 及 in vivo 的研究均顯示，quercetin 於體內代謝後，能顯著的抑制 A549 細胞或 gerbil 的肺臟經 BaP 或 BaP+BC 刺激所誘發 JNK 磷酸化的表現，進而影響其下游的轉錄因子 c-Jun 的磷酸化作用，研究顯示當細胞或組

織受到刺激或是傷害時，JNK/c-Jun 訊號路徑的活化，會增加細胞促發炎激素的轉錄作用，而引發發炎反應 (Glossop et al, 2009)。在 ex vivo 的研究中，我們發現 JNK 的抑制劑，具有抑制 BaP 或 BaP+BC 誘發促發炎激素產生的作用，顯示 quercetin 體內代謝產物對次一訊號傳遞路徑的調節作用，應是其抑制發炎激素產生的重機制之一。

此外，quercetin 的代謝產物亦可能藉由其抗氧化力而發揮各種生理功能。本研究第一部份的結果顯示 10 μ M 的 Q3G 及 Q3'S 具有降低 BaP 誘發 ROS 生成的情況，Cano 等(2002)的研究顯示 Q3G 具有有效的捕捉超氧陰離子的能力，反之 quercetin(濃度 0.5-10 μ M)卻有點促氧化的情形，而在 Terao(2009)的研究也顯示 Q3G 具有良好的抗氧化力。至於 Q3'S 雖然構造上不具 B 環上 O-dihydroxyl 的結構，此一結構對 quercetin 捕捉自由基的能力可能貢獻很大(Cano et al., 2002)，但本研究中，仍發現 Q3'S 抑制 BaP 誘發 ROS 生成的效果，且此效果優於 quercetin，對此一現象，我們認為有可能是因為 CYP 代謝 BaP 過程中超氧陰離子是主要的 ROS (Halliwell and Gutteridge, 2007)，而我們先前的研究 Yeh 等(2005)及 Cano 等(2002)的研究，均顯示 quercetin 捕捉超氧陰離子的作用較其醣體差。不過此部分仍需進一步證實。另外我們的是管試驗顯示 Q3G 對於抑制 Fe/NTA 誘發的 BC 氧化作用效果較佳，並且與 quercetin 相似，再一次證實 Q3G 具有良好的抗氧化效果。而於體內試驗，我們也發現 quercetin 可以降低肺臟及肝臟中 BaP 暴露造成的 BC 損耗 (曾，2010)

綜合以上，我們研究的結果提供明確的證據顯示，無論是合成的 quercetin 代謝產物，或是經動物體內代謝產生的混合代謝產物，均對 BaP 暴露誘發的 DNA 傷害或促發炎作用有抑制作用，也會降低 BC 在 BaP 誘發下的有害反應，其可能的機制包括抑制 CYP1A1 酵素、抑制 JNK/c-Jun pathway 及抗氧化。這些結果提供明確的證據顯示，膳食中的 quercetin 經代謝後可影響 β -carotene 的效應，而這兩種分子都是蔬果中富含的 phytochemical，這或許可以部份解釋為何專一補充 β -carotene 的效果和多攝取蔬果的效果不同。

七、圖表

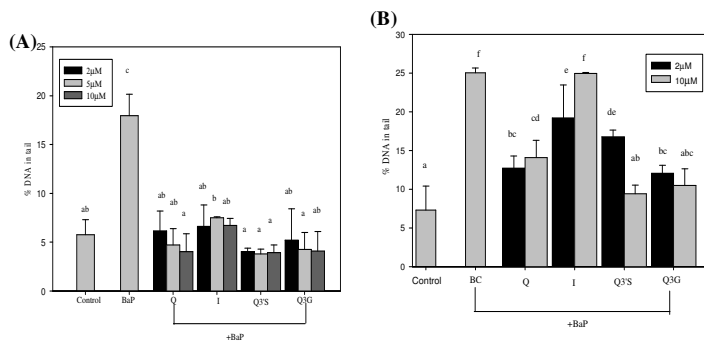


Fig. 1. The effects of quercetin and its metabolites on the DNA strand breaks induced by BaP (A) or in combination with β -carotene (BC) (B) in A549 cells. The cells were pre-incubated with 0, 2, 5 or 10 μ M quercetin (Q), isorhamnetin (I), quercetin-3'-sulfate (Q3'S) and quercetin-3-glucuronide (Q3G) for 4 hrs and 20 μ M BC for 4 hrs, followed by exposed to 20 μ M BaP for 24 hr. Values (means \pm SD, n=3) not sharing a common letter are significantly different ($P < 0.05$).

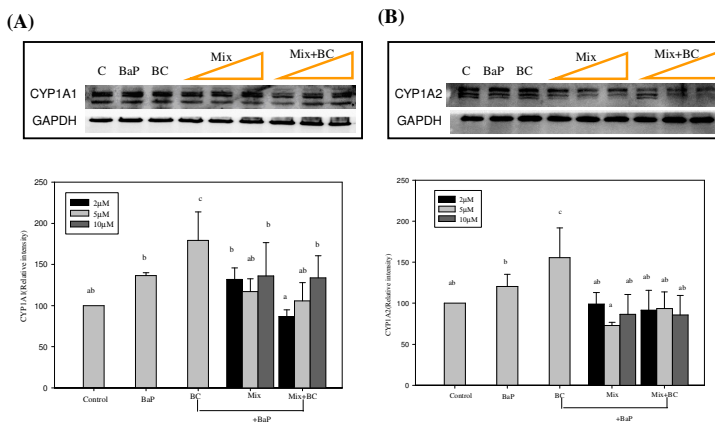


Fig. 2. The effects of metabolites of quercetin were mixed on the expression CYP1A1 (A) or CYP1A2 (B) induced by BaP in combination with β -carotene (BC) in A549 cells. The cells were pre-incubated with 0, 2, 5 or 10 μ M mixtures (Mix) and 20 μ M BC for 4 hrs, followed by washed with PBS before incubated with 20 μ M BaP for 24 hrs. Values (means \pm SD, n=3) not sharing a common letter are significantly different ($P < 0.05$).

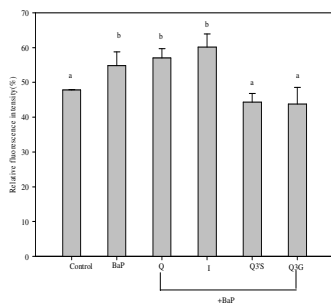


Fig. 3. The effects of quercetin and its metabolites on the production of reactive oxygen species induced by BaP in A549 cells. The cells were pre-incubated with 10 μ M quercetin (Q), isorhamnetin (I), quercetin-3'-sulfate (Q3'S) and

quercetin-3-glucuronide (Q3G) for 4 hrs, followed by exposed to 20 μ M BaP for 30 mins. Values (means \pm SD, n=3) not sharing a common letter are significantly different ($P < 0.05$).

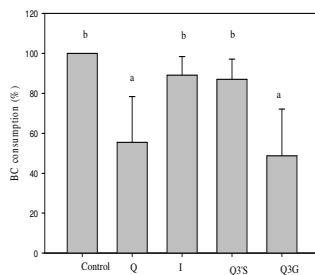


Fig. 4. The effects of quercetin and its metabolites on the consumption of β -carotene (BC) induced by Fe/NTA. Each of quercetin (Q), isorhamnetin (I), quercetin-3'-sulfate (Q3'S) and quercetin-3-glucuronide (Q3G) at 10 μ M incubated with 14 μ M BC in the present of Fe/NTA at 37°C for 4 hrs.

表一、quercetin 三種代謝產物混合效果的比較

Parameters	Calculated value	Observed value	P value
cell viability(%)	97.60	98.15±15.85	0.958
DNA damage (% DNA in tail)	4.56	5.30±1.68	0.525
CYP1A1 (relative intensity)	101.50	136±40.7	0.280
CYP1A2 (relative intensity)	94.23	86.66±24.02	0.640
ROS	47.26	52.93±6.59	0.275
relative fluorescence intensity(%)			
BC consumption (%)	72.13	38.29±7.15	0.015*

Table 1.

Calculated value = \sum exp. value \times ratio value

Q3'S:Q3G:I=2:2:1

*denotes a significant difference between the calculated value and the observed value of the same parameter ($P < 0.05$).

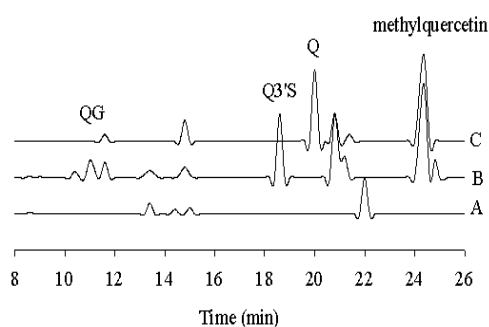


Fig. 5. Plasma profiles of gerbils. (A) The control plasma; (B) the quercetin-enriched plasma (QP); (C) the quercetin-enriched plasma incubated with the mixture of β -glucuronidase and sulfatase for 2 h. Q : quercetin ; Q3G : quercetin-3-glucuronide ; Q3S : quercetin-3'-sulfate methyl-quercetin : Isorhamnetin and Tamarixetin.

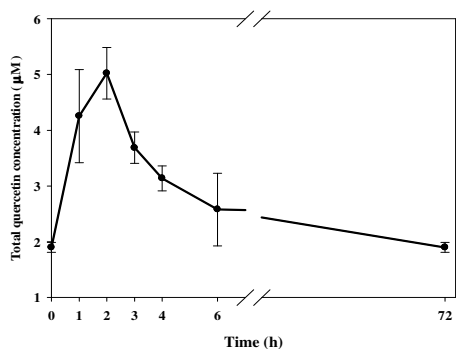


Fig. 6. Time course study on concentration of total quercetin in plasma of gerbils after oral administration of quercetin (100mg/kg body weight).

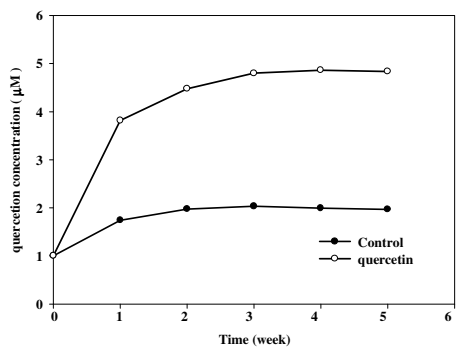


Fig. 7. Quercetin concentrations in the plasma of gerbils after supplementation with quercetin at 100mg/kg body weight/week for 5 weeks.

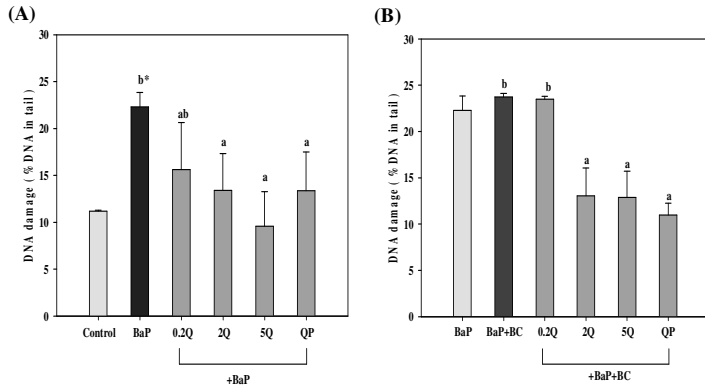


Fig. 8. Effect of quercetin and quercetin-enriched plasma (QP) or in combination with β -carotene (BC) on the DNA damage of A549 cells induced by BaP. The cells were pre-incubated with quercetin at 0.2, 2 or 5 μ M (0.2Q, 2Q and 5Q, respectively) or QP for 4 hr, followed by exposed to 20 μ M BaP for 24 hr. Values (means \pm SD, n=3) among BaP-treated groups not sharing a common letter are significantly different ($P < 0.05$). *denotes the value is significantly different from the control.

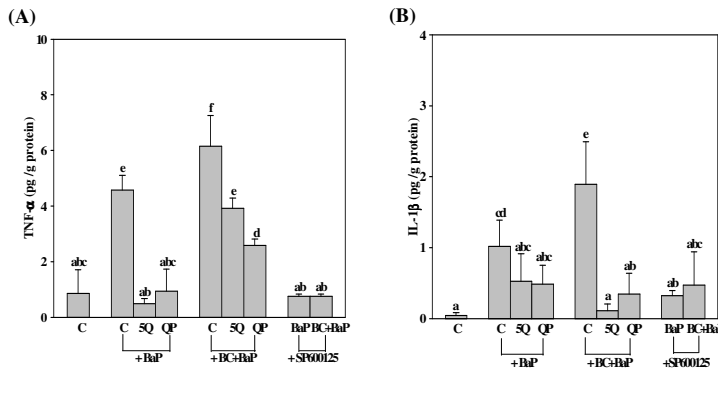


Fig. 9. The secretion of TNF- α (A) and IL-1 β (B) in A549 cells. The cells were pre-incubated with 0.5, 2, 5 μ M (0.5Q, 2Q and 5Q, respectively) and QP alone or in combination with 20 μ M β -carotene (BC) for 4 hr. In some experiment the cells were pretreated with 10 μ M of SP600125 for 1 h followed by exposed to 20 μ M BaP for 24 hr. Values (means \pm SD, n=3) not sharing a common letter are significantly different ($P < 0.05$).

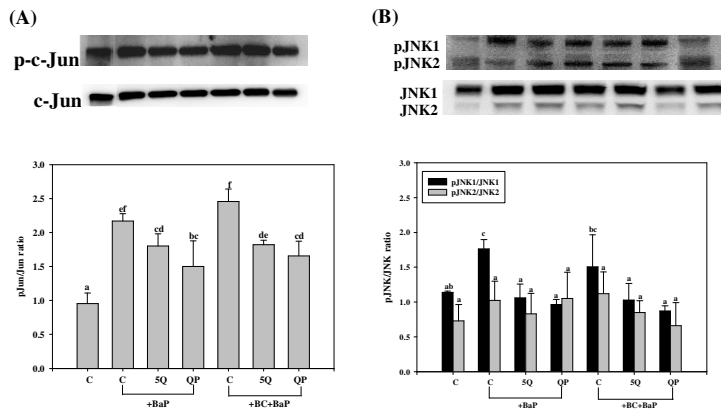


Fig. 10. The levels of phospho-c-Jun (p-c-Jun)/total c-Jun (c-Jun) ratio (A) and phospho-JNK (pJNK)/total JNK (JNK) ratio (B) induced by BaP in A549 cells. The cells were pre-incubated with 5Q and QP alone or in combination with 20 μ M β -carotene (BC) for 4 hr, followed by washed with PBS before incubated with 20 μ M BaP for 1 hr. Values (means \pm SD, n=3) not sharing a common letter are significantly different ($P < 0.05$).

Table 2 The cell profile in bronchoalveolar lavage fluid (BALF)

Group	Cell numbers (1×10^3 / total BALF)			
	Total cells	Macrophages	Lymphocytes	Neutrophils
Control	4.41 \pm 1.63 ^a	1.18 \pm 0.01 ^a	3.81 \pm 0.07 ^b	0.07 \pm 0.02 ^a
BaP	6.72 \pm 1.54 ^b	3.25 \pm 1.14 ^{b,c}	5.27 \pm 0.15 ^d	0.06 \pm 0.04 ^a
BC+BaP	11.02 \pm 0.813 ^c	4.27 \pm 1.75 ^c	6.51 \pm 0.39 ^e	0.28 \pm 0.07 ^b
Q+BaP	4.30 \pm 1.23 ^a	1.03 \pm 0.44 ^a	3.18 \pm 0.60 ^a	0.03 \pm 0.04 ^a
Q+BC+BaP	5.83 \pm 1.47 ^{ab}	2.42 \pm 0.04 ^{ab}	4.59 \pm 0.27 ^c	0.21 \pm 0.01 ^b

Gerbils were administered with β -carotene (BC), quercetin (Q) and BaP alone or combined by gavage for 6 months. The control group was administered with lard (the vehicle) only. Values (means \pm SD, n=10) not sharing a common letter are significantly different ($P < 0.05$).

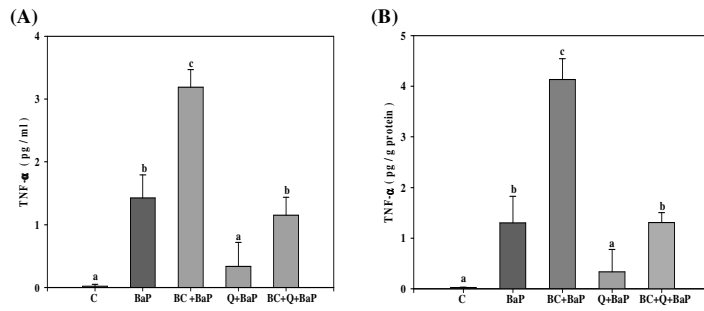


Fig. 11. The level of TNF- α in plasma (A) and in bronchoalveolar lavage fluid (B) of gerbils. Gerbils were administered with β -carotene (BC), quercetin (Q) and BaP alone or combined by gavage for 6 months. The control group was administered with lard (the vehicle) only. Values (means \pm SD, n=9) not sharing a common letter are significantly different (P<0.05).

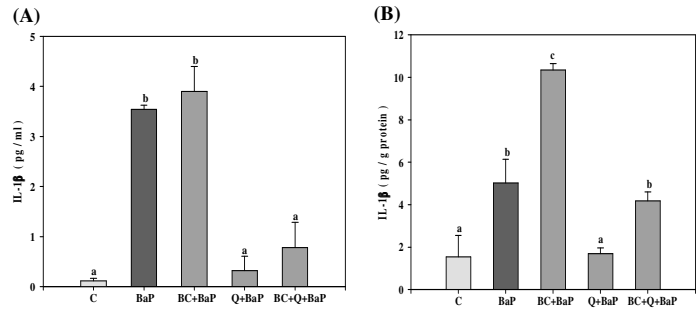


Fig. 12. The level of IL-1 β in plasma (A) and in bronchoalveolar lavage fluid (B) of gerbils. Gerbils were administered with β -carotene (BC), quercetin (Q) and BaP alone or combined by gavage for 6 months. The control group was administered with lard (the vehicle) only. Values (means \pm SD, n=9) not sharing a common letter are significantly different (P<0.05).

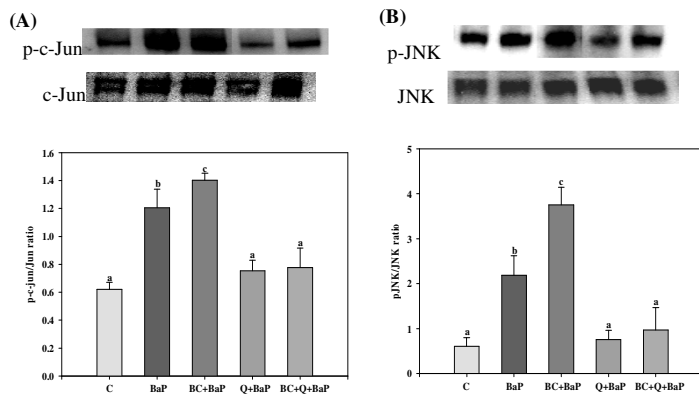


Fig. 13. The levels of phospho-c-Jun (p-c-Jun)/total c-Jun (c-Jun) ratio (A) and phospho-JNK (pJNK)/total JNK (JNK) ratio (B) in lungs of gerbils. Gerbils were administered with β -carotene (BC), Quercetin (Q) and BaP alone or combined by gavage for 6 months. The control group was administered with lard (the vehicle) only. Values (means \pm SD, n=9) not sharing a common letter are significantly different (P<0.05).

八、參考文獻

- Bao M, Lou Y. Isorhamnetin prevent endothelial cell injuries from oxidized LDL via activation of p38MAPK. *Eur J Pharmacol.* 2006, 547:22-30.
- Bear WL and Teel RW. Effects of citrus phytochemicals on liver and lung cytochrome P450 activity and on the in vitro metabolism of the tobacco-specific nitrosamine NNK. *Anticancer Res.* 2000, 20:3323-3329.
- Bors W, Michel C, Stettmaier K. Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors.* 1997, 6:399-402.
- Cao Y, Cao R, Brakenhielm E. Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols. *J. Nutri Biochem.* 2002, 13:380-390
- Cano A, Arnao MB, Williamson G, Garcia-Conesa MT. Superoxide scavenging by polyphenols: effect of conjugation and dimerization. *Redox Rep.* 2002,7:379-383.
- Cheng SC, Hilton BD, Roman JM, Dipple A. DNA adducts from carcinogenic and noncarcinogenic enantiomers of benzo[a]pyrene dihydrodiol epoxide. *Chem Res Toxicol.* 1989, 2:334-40.
- Day AJ, Bao Y, Morgan MR, Williamson G. Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radic Biol Med.* 2000, 29:1234-43.
- Day AJ, Mellon F, Barron D, Sarrazin G, Morgan MR, Williamson G. Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radic Res.* 2001, 35:941-952.
- De Boer VC, Dihal AA, van der Woude H et al. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *J Nutr.* 2005, 135:1617-8.
- Depeint F, Gee JM, Williamson G, Johnson IT. Evidence for consistent patterns between flavonoids structures and cellular activities. *Proc Nutr Soc.* 2002, 61:97-103.
- Donnini S, Finetti F, Lusini L et al. Divergent effects of quercetin conjugates on angiogenesis. *Br J Nutr.* 2006, 95:1016-1023.
- Elferink CJ, Gasiewicz TA, Whitlock JP Jr. Protein-DNA interactions at a dioxin-responsive enhancer. Evidence that the transformed Ah receptor is heteromeric. *J Biol Chem.* 1990, 265:20708-12.
- Glossop JR, Cartmell SH. Effect of fluid flow-induced shear stress on human mesenchymal stem cells: Differential gene expression of IL1B and MAP3K8 in MAPK signaling. *Gene Expr Patterns.* 2009, 9:381-8.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 4 th ed. New York: Oxford University Press; 2007.
- Hecht SS, Isaacs S, Trushin N. Lung tumor induction in A/J mice by the tobacco smoke carcinogens 4-(methylnitrosamino)-1 -(3-pyridyl)- 1 - butanone and benzo[a]pyrene: a potentially useful model for evaluation of chemopreventive agents. *Carcinogenesis.* 1994, 15:2721-5.
- Hirvonen T, Virtamo J, Korhonen P et al. Flavonol and flavone intake and the risk of cancer in male smokers (Finland). *Cancer Causes Control.* 2001, 12:789-796.
- Jones DJ, Lamb JH, Verschoyle RD et al. Characterisation of metabolites of the putative cancer chemopreventive agent quercetin and their effect on cyclo-oxygenase activity. *Br J Cancer.* 2004, 91:1213-1219.
- Kim HR, Kim EJ, Yang SH et al. Trichostatin A induces apoptosis in lung cancer cells via simultaneous activation of the death receptor-mediated and mitochondrial pathway? *Exp Mol Med.* 2006, 38:616-624.
- Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr.* 2002, 76:560-568.
- Landers, J. P., and Bunce, N. J. The Ah receptor and the mechanism of dioxin toxicity. *Biochem J.* 1991, 276:273-287.
- Le Marchand L, Murphy SP, Hankin Jh et al. Intake of flavonoids and lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2002, 92: 154-160.
- Lin T, Mak NK, Yang MS. MAPK regulate p53-dependent cell death induced by

- benzo[a]pyrene: involvement of p53 phosphorylation and acetylation. *Toxicology*. 2008, 247:145-53.
- Liu C, Russell RM, Wang XD. Alpha-tocopherol and ascorbic acid decrease the production of beta-apo-carotenals and increase the formation of retinoids from beta-carotene in the lung tissues of cigarette smoke-exposed ferrets in vitro. *J Nutr*. 2004, 134:426-30
- Mullen W, Edwards CA, Crozier A. Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. *Br J Nutr*. 2006, 96:107-116.
- Moon JH, Tsushida T, Nakahara K, Terao J. Identification of quercetin 3-O-beta-D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radic Biol Med*. 2001, 30:1274-85.
- Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ et al. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem Pharmacol*. 2000, 59:65-85.
- Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 1996, 334:1150-5.
- Peto R, Doll R, Buckley JD, Sporn MB. Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? *Nature* 1981, 290:201-208.
- Pierpoint WS. Flavonoids in the human diet. *Prog Clin Biol Res*. 1986, 213:125-40
- Revel, A., Raanani, H., Younglai, E et al. Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects lung from DNA damage and apoptosis caused by benzo[a]pyrene. *J Appl Toxicol*. 2003, 23:255-261.
- Rubin H. Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates. *Carcinogenesis*. 2001, 22:1903-30.
- Suri S, Taylor MA, Verity A, Tribolo S, Needs PW, Kroon PA, Hughes DA, Wilson VG. A comparative study of the effects of quercetin and its glucuronide and sulfate metabolites on human neutrophil function in vitro. *Biochem Pharmacol*. 2008, 76:645-53.
- Terao J. Dietary flavonoids as antioxidants. *Forum Nutr*. 2009,61:87-94
- The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. *Ann Epidemiol*. 1994, 4:1-10.
- Tokiwa H, Sera N, Horikawa K et al. The presence of mutagens/carcinogens in the excised lung and analysis of lung cancer induction. *Carcinogenesis*. 1993, 14:1933-8.
- Trombino S, Serini S, Di Nicuolo F, Celleno L, Ando S, Picci N, Calviello G, Palozza P. Antioxidant effect of ferulic acid in isolated membranes and intact cells: synergistic interactions with alpha-tocopherol, beta-carotene, and ascorbic acid. *J Agric Food Chem*. 2004, 52:2411-2420.
- Ueno Y, Mikawa M, Matsuda A. Nucleosides and nucleotides. 170. Synthesis and properties of oligodeoxynucleotides containing 5-[N-[2-[N,N-bis(2-aminoethyl)-amino]ethyl]carbamoyl]-2'-deoxyuridine and 5-[N-[3-[N,N-bis(3-aminopropyl) amino]propyl]carbamoyl]-2'-deoxyuridine. *Bioconjug Chem*. 1998, 9:33-9.
- Wang XD, Liu C, Bronson RT et al. Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given beta-carotene supplements and exposed to tobacco smoke. *J Natl Cancer Inst*. 1999, 91:60-66.
- Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? *Free Radic. Biol. Med*. 2004, 36:838-849.
- Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr*. 2005, 81:243S-255S.
- Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med*. 2005, 1;36:838-49.
- Yeh SL, Wang WY, Huang CH, Hu ML. Pro-oxidative effect of beta-carotene and the interaction with flavonoids on UVA-induced DNA strand breaks in mouse

- fibroblast C3H10T1/2 cells. *J Nutr Biochem*. 2005, 16:729-35.
- Yeh SL and Wu SH. Effects of quercetin on beta-apo-8'-carotenal-induced DNA damage and cytochrome P1A2 expression in A549 cells. *Chem Biol Interact*. 2006, 163:199-206.
- Yeh SL, Wang HM, Chen PY et al. Interactions of beta-carotene and flavonoids on the secretion of pro-inflammatory mediators in an in vitro system. *Chem Biol Interact*. 2009, 15;179:386-93.
- Ziegler RG, Mayne ST, Swanson CA. Nutrition and lung cancer. *Cancer Causes Control*. 1996, 7:157-177.
- 林曉君。各種 quercetin 代謝產物對 Benzo[a]pyrene 單獨或合併 β -carotene 誘發的 A549 細胞傷害及 Cytochrome P4501A1/1A2 表現之抑制作用。2009。中山醫學大學營養科學研究所碩士論文。
- 詹淑婷。Quercetin 代謝產物抑制 benzo[a]pyrene 單獨或合併 β -胡蘿蔔素所誘發的傷害: ex vivo 及體內試驗。2009。中山醫學大學營養科學研究所碩士論文。
- 曾妙如。Quercetin 及 β -carotene 在沙鼠肝及肺臟中的濃度與抗氧化性。2010。中山醫學大學營養科學研究所碩士論文。

九、計畫成果自評

1. 本計畫大致按申請計畫執行，不過為了深入探討所觀察的結果背後的機制，及每年計畫彼此的可連結性，因此在誘發傷害的方法上，統一以 BaP 進行。
2. 本三年計畫主要由兩位研究生執行，除計畫已如期完成，兩位碩士班的學生也各自完成碩士論文撰寫及口試。
3. 目前已有部分結果預備發表在 SCI 期刊：
 - (1) Shu-Ting Chan¹, Cheng-Hung Chuang², Chiao-Lin Yeh², Kai-Li Liu¹, Jiunn-Wang Liao³, and Shu-Lan Yeh^{1*}. Quercetin supplementation suppresses the secretion of pro-inflammatory cytokines in the lungs of Mongolian gerbils and in A549 cells exposed to benzo[a]pyrene alone or in combination with β -carotene: in vivo and ex vivo studies. *Journal of Nutritional Biochemistry* (revised).
 - (2) Shu-Lan Yeh¹, Shu-Ting Chan¹, Chiao-Lin Yeh² and Cheng-Hung Chuang^{2*}. Plasma rich in quercetin metabolites induces G₂/M arrest ex vivo by up-regulating PPAR- γ expression in human A549 lung cancer cells. *Planta Medica* (revised).

無衍生研發成果推廣資料

96 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：葉妹蘭		計畫編號：96-2320-B-040-029-MY3				計畫名稱：槲皮酮與其代謝產物單獨或合併 beta-胡蘿蔔素體內外抗發炎及抗致腫瘤劑的效果	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	80%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	4	4	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	2	0	100%	人次	
		博士生	1	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	3	80%	篇	兩篇期刊已在 revised
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		章/本
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	4	4	100%	人次	
		博士生	1	1	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p style="text-align: center;">其他成果</p> <p>(無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	無
---	---

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

1. 本計畫大致按申請計畫執行，不過為了深入探討所觀察的結果背後的機制，及每年計畫彼此的可連結性，因此在誘發傷害的方法上，統一以 BaP 進行。

2. 本三年計畫主要由兩位研究生執行，除計畫已如期完成，兩位碩士班的學生也各自完成碩士論文撰寫及口試。

3. 目前已有部分結果預備發表在 SCI 期刊：

(1) Journal of Nutritional Biochemistry (revised).

(2) Planta Medica (revised)