

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

-胡蘿蔔素 視網酸或 -apo-8'-carotenal 對巨噬細胞分泌細胞激素及活性氧的影響

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2320-B-040-036-

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：中山醫學大學營養學系

計畫主持人：葉姝蘭

計畫參與人員：葉姝蘭、鄭妃吟

報告類型：精簡報告

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 95 年 10 月 31 日

中文摘要

慢性發炎在許多疾病的發展扮演重要角色。維生素 A, β -胡蘿蔔素及維生素 E 均被報導可能抑制發炎反應,但也有研究顯示這些營養素可能促發炎。因此我們比較 β -胡蘿蔔素、retinoic acid、 β -8'-apo-carotenal 及維生素 E 單獨或合併作用對發炎反應的影響。BALB/c 小鼠巨噬細胞 RAW264.7 細胞,在培養基分別在有 10 μ M α -tocopherol 與 2 μ M 的 β -胡蘿蔔素、retinoic acid 或 β -8'-apo-carotenal 單獨或合併存在下,以 lipopolysaccharide (LPS) 活化 24 小時,之後分別收集細胞培養基和細胞測試其中促發炎介質 (proinflammatory mediators) NO 和 TNF- α 及 ROS 的形成量,並進一步將與 RAW264.7 細胞培養過的條件培養液 (30%,v/v) 與 C3H10T1/2 細胞培養,以檢測發炎細胞對周邊細胞的 DNA 傷害情形。結果顯示,單獨 2 μ M β -胡蘿蔔素、retinoic acid 及 β -8'-apo-carotenal 輕微增加或沒有影響 LPS-條件培養基誘發的 C3H10T1/2 細胞 DNA 傷害,而維生素 E 則可顯著抑制 LPS 條件培養基的傷害作用,合併 retinoic acid 可顯著增加維生素 E 的效果。retinoic acid 及維生素 E 單獨或合併使用時,抑制 LPS 誘發 RAW264.7 細胞產生 NO, TNF- α 及 ROS 的生成可能是重要的機制。綜合以上結果顯示,維生素 E 的存在,可能增加 β -胡蘿蔔素、retinoic acid 及 β -8'-apo-carotenal 的穩定性,而合併維生素 E 與 β -胡蘿蔔素或 retinoic acid 可能較單獨使用有較佳的抗發炎效果。

關鍵詞： β -胡蘿蔔素、視網酸、 β -apo-8'-carotenal、維生素 E、發炎反應

Abstract

Chronic inflammatory reaction plays an important role in the development of several diseases in human. It has been suggested that β -carotene and retinoic acid may play as anti-inflammatory agents. However, contradictory findings exist. In the present study, we compared the individual and combined effects of β -carotene, retinoic acid, β -8'-apo-carotenal and α -tocopherol on inflammation. RAW264.7 cells were activated by lipopolysaccharide (LPS) for 24 h with the presence of 2 μ M of β -carotene, retinoic acid, β -apo-8'-carotenal or 10 μ M of α -tocopherol alone or in combination in the medium. Then, the media were collected to determine the secretion of proinflammatory mediators, NO and TNF- α , and the RAW264.7 cells were collected to determine the intracellular reactive oxygen species (ROS). Furthermore, 30 % (v/v) conditioned medium was incubated with C3H10T1/2 cells to investigate the effect of inflammatory reaction on DNA damage. The results showed that β -carotene, retinoic acid and β -8'-apo-carotenal alone slightly enhanced or had no effect on DNA damage of C3H10T1/2 induced by LPS-conditioned medium, while vitamin E significantly decreased the LPS-conditioned medium-induced DNA damage. However, in combination of β -carotenoid or retinoic acid with vitamin E enhanced the protective effect of vitamin E alone. The inhibition of retinoic and vitamin E,

alone or in combination on the increase of NO, TNF- α and intracellular ROS induced by LPS in RAW264.7 cells may play the key role. Taken together, the presence of vitamin E may increase the stability of β -carotene or retinoic acid. In combination of vitamin E and β -carotenoid or retinoic acid may have better effects on anti-inflammation than that of each alone.

Key words: β -carotene, retinoid acid, β -apo-8'-carotenal, inflammatory reaction

一、前言

慢性發炎的疾病，其組織病理的發展跟發炎媒介分子，及氧化壓力有密切關係，組織巨噬細胞活化並且釋放促發炎介質，例如細胞激素，protease，活性氧成分及脂質媒介物 PGE2 等，而導致局部或全身性作用(Nathan, 1987)。各種營養素及 phytochemicals 是否具抑制發炎反應而能減緩疾病病程的進行，是近來相當受重視的課題之一 (Daga et al., 2003; Culpitt et al., 2003; Barnes and Hansel, 2004)。

二、研究目的

為了進一步瞭解 β -胡蘿蔔素、維生素 A 與維生素 E 對發炎反應的影響及 carotenoids 與維生素 E 對抗發炎是否具有交互作用，本研究以 LPS 誘發 RAW264.7 細胞活化發炎反應為模式，比較 β -胡蘿蔔素、retinoic acid、 β -胡蘿蔔素之氧化產物， β -8'-apo-carotenal，及維生素 E 單獨或合併作用對發炎介質，ROS 生成及對周邊細胞 DNA 傷害的影響。

三、文獻探討

包括維生素 A 及 β -胡蘿蔔素的一些營養素及抗氧化劑被報導具抗發炎的效果，它們抗發炎的機制可能是抗氧化，或是減少其他促發炎趨化物的產生或增加抗發炎物質 (Reifen, 2002; Pang et al., 2003)。Pang B et al.(2003)給予大鼠 15 mg/Kg β -胡蘿蔔素，結果顯示可以顯著抑制香煙煙霧所誘發的血清中 IL-6, IL-8 含量的增加，不過大鼠並不是一種會堆積 β -胡蘿蔔素的動物 (Lee, 1999)，此作用是否來自維生素 A 的作用有待進一步探討。另有研究指出類胡蘿蔔素能降低嗜中性球的 H₂O₂ 釋出量，而減少細胞 DNA 及細胞膜的傷害 (Walrand et al., 2004)，研究中同時指出，此結果與其轉變成維生素 A 的能力無關。為了避免 β -胡蘿蔔素氧化而能發揮其可能的生理功能，有學者建議類胡蘿蔔素需合併其他抗氧化劑共同使用，以期達到真正的功能(Offord et al., 2002)。另外，體內重要的抗氧化劑維生素 E，特別是 α -tocopherol，亦被認為與抗發炎有關，例如 COPD 的病人在急性期的時候，會有氧化壓力上升，維生素 A 和維生素 E 消耗的情形 (Sadowska et al., 2006)。但有研究發現，血液透析的病人每天口服 100 mg 的維生素 E，並不能降低氧化壓力的提高和輕微的發炎(Hodkova et al., 2006)。因此維生素 E 是否能抗發炎，及其可能機制為何並不清楚。有研究顯示，合併各種營養素包括，維

生素 C、維生素 E、 β -胡蘿蔔素、鋅和硒等的抗氧化劑到過早衰老鼠的飼料中，發現可降低老鼠的 TNF- α 、一氧化氮 (nitric oxide; NO)、malondialdehyde (Alvarado et al, 2006)。

四、材料與方法

(一)實驗藥品

β -胡蘿蔔素、retinoic acid、 β -8'-apo-carotenal、 α -tocopherol、lipopolysaccharide (LPS)皆購自 Sigma。配製藥品時： β -胡蘿蔔素、retinoic acid 或 β -8'-apo-carotenal 溶於 tetrahydrofuran (THF)之中，配成濃度為 10 mM 之 stock； α -tocopherol 溶於 99.5%的乙醇，配成濃度為 50 mM 之 stock；而 lipopolysaccharide (LPS)則是溶於 PBS，配成 1 mg/mL 之 stock。實驗時，再將 stock 加至培養液中配成終濃度各為 2 μ M β -胡蘿蔔素、2 μ M retinoic acid、2 μ M β -8'-apo-carotenal、10 μ M α -tocopherol、1 μ g/mL LPS。

(二)細胞株與細胞培養

(1) RAW264.7 巨噬細胞

本計畫以細胞作為實驗模式，使用一種 BALB/c 小鼠細胞 RAW264.7 細胞(購自食品工業研究所細胞庫)，培養在含 10%FBS 之 PRMI1640 之培養液，其中還添加了 2 mM glutamine、1 mM sodium pyruvate、抗生素(100 U/mL 的 penicillin 和 100 U/mL 的 Streptomycin)。RAW264.7 細胞是一種經常以 lipopolysaccharide (LPS)誘發作為發炎模式的小鼠巨噬細胞 (洪永翰、林璧鳳，2004)。

(2) C3H10T1/2 胚胎纖維母細胞

C3H10T1/2 是小鼠胚胎纖維母細胞，培養在 PRMI1640 的培養液，包含了 10%FBS、2 mM glutamine、1 mM sodium pyruvate、抗生素(100 U/mL 的 penicillin 和 100 U/mL 的 Streptomycin)。

(3) 細胞培養：在長滿 RAW264.7 小鼠巨噬細胞的 75T flask，先用 PBS 洗 2 次，再用 1 mL 的 trypsin-EDTA 切下細胞後，加入 9 mL 含 10%FBS 的 PRMI1640 培養液去中和 trypsin-EDTA。將細胞植入 24 孔，植入密度為 1×10^5 cells/mL，培養 12 小時後，更新培養液，新培養液中含有單獨或合併的 2 μ M retinoic acid、 β -胡蘿蔔素、 β -8'-apo-carotenal 或 10 μ M α -tocopherol，並加入 LPS (1 μ g/mL)共同培養 24 小時，之後以 trypan blue 染色，評估細胞存活率，並收集培養基進行各種分析，詳細步驟如以下。

(三)Nitric oxide (NO)量的測定

此方法是 Green 等學者在 1982 年所提出的 Griess reaction (Green et al., 1982)。巨噬細胞所分泌的含氮化合物包含了一氧化氮(NO)，是 NO synthase 的產物，NO 在生成後會很快地轉變成較穩定的 NO_2^- 或 NO_3^- 。因此測量樣品的 NO_2^- (nitrite)含量代表 NO 生成量。在 24 孔盤中植入細胞密度為 1×10^5 cells/mL 的

RAW264.7 細胞 12 小時後，加藥處理 24 小時後再收集上清液分析 Nitrite。以 Griess reagent (購買自 Sigma) 來測量培養液中的 NO 含量。先在 96 孔盤中，逐一加入 100 μ l 的樣品上清液，再加入等量的 Griess reagent 振盪混合 30 分鐘，於 540nm 波長下測定吸光值。Nitrite 的濃度是以 Sodium nitrite 作為標準品，因此將讀得的吸光值代入 NaNO_2 濃度標準曲線，即可換算成 NO_2^- 。

(四)測量細胞激素 TNF- α 的量

收集細胞培養液以 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (購自 BMS) 及 ELISA reader 分析。這些細胞激素中 TNF α 與促進發炎有關，在 COPD 病患的治療策略上，經常被作為控制標的 (Barnes, 2004; Barnes and Hansel, 2004)。

(五)DNA 傷害分析 (comet assay, DNA 斷裂指標) (Singh et al., 1988; Collins et al., 1995)

在 24 孔盤中植入細胞密度為 1×10^5 cells/mL 的 RAW264.7 細胞 12 小時後，加藥處理 24 小時後再收集上清液。在 6 孔盤中植入細胞密度為 1×10^5 cells/mL 的 C3H10T1/2 細胞 12 小時後，用 PBS 洗 2 次，加入含 30% 前述培養過 RAW264.7 細胞上清液之培養液，培養一天，再將 C3H10T1/2 細胞以 $1 \times \text{TE}$ (trypsin-EDTA buffer) 切下後，經三層封膠：第一層 170 μ l NMA，第二層 130 μ l 含細胞的 LMA，第三層 170 μ l NMA。將 slice 片浸置於 lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA , 10 mM Tris pH=10, 1% sodium sarcosinate with 1% Triton X-100 and DMSO) 4 $^\circ\text{C}$ ，1 小時。經去離子水輕輕洗過後放入電泳槽 (電泳液: 1 mM Na_2EDTA , 300 mM NaOH)，靜置 15 分鐘使 DNA unwinding，電泳 20 分鐘 (25 V、300 mA、4 $^\circ\text{C}$) 後，放入 Tris buffer 中和 (0.4 M Tris, pH 7.5) 10 分鐘，再以 ethidium bromide 染色，以螢光顯微鏡觀察 DNA 拖尾情況，並加以定量。

(六)流式細胞分析法測定細胞中 ROS 含量 (Royall and Ischiropoulos, 1993)

利用 DCFH-DA fluorescence 分析細胞內氧化壓力的程度。細胞經待測試劑分別或共同預培養，或同時再加入活化劑 LPS (1 μ g/mL) 培養 30 分鐘後，以 PBS 洗 2 次，以 $1 \times \text{TE}$ 切下收集細胞後，離心 1000g 5 分鐘後去除上清液，再加入 10 μ M 螢光試劑 DCFH-DA 於不含血清的 RPMI1640 培養液中共同培養 15 分鐘，離心 1000g 5 分鐘去除上清液後，以 PBS 懸浮細胞，再利用細胞過濾篩 (購買自 BD) 來過濾細胞，並將濃度調為每毫升 1×10^5 個細胞再以流式細胞儀 (flow-cytometer; FACSCaliburTM system) 測量單位細胞內之螢光強度。其測定原理為：DCFH-DA 進入細胞後經過轉酯酶分解，與細胞內的 ROS 反應成 DCF，DCF 可在 488nm 被激發並在 525nm 附近產生散射光。

分析條件：

microwave frequency: 9.78GHz, power: 20mW, modulation amplitude: 1.6G,

modulation frequency: 1000KHz, time constant: 163.84ms, scan time: 167s, receiver

gain: 8.93 e, center field setting: 3483 G

(七)統計分析

本實驗結果皆經由至少 3 次的獨立實驗結果得到平均值及標準偏差。並用 SPSS 電腦統計軟體進行分析。各實驗值間以 Duncan's multiple range test 進行差異性分析，兩組間則以 t-test 進行比較， $p < 0.05$ 則具有顯著性差異。

五、結果與討論

(一)RAW264.7 巨噬細胞的形態

當小鼠巨噬細胞 RAW264.7 暴露在內毒素下，例如 LPS，會刺激細胞產生發炎反應，釋放出一些發炎媒介因子包括 nitric oxide、prostaglandin E2、tumor necrosis factor- α 來促進發炎的生成 (Penglis et al., 2000; Yamashita et al., 2000)。此外，有報導指出 LPS 會顯著地抑制 RAW264.7 小鼠巨噬細胞的增殖 (Raschke et al., 1978)，及明顯改變了 RAW264.7 細胞的形態 (Saxena et al., 2003)。本研究結果亦發現，正常的 RAW264.7 細胞型態較圓 (圖一 A)；經過 LPS 刺激的 RAW264.7 細胞，形態會轉變成樹突狀 (dendritic cells)，且有細胞核變大的情形 (圖一 B)，在顯微鏡下即可清楚看到 2 種細胞的形態是大不相同。

經過 β -胡蘿蔔素 (2 μ M)、retinoic acid (2 μ M) 或 β -apo-8'-carotenal (2 μ M) 的處理，同時添加或不添加 LPS (1 μ g/mL) 於培養液下培養一天後，收集細胞以 trypan blue 染色。本研究結果發現經 LPS 激活的 RAW264.7 細胞的增殖速度與 Control 組相比是差不多的 (表一)，但是在其他如 β -胡蘿蔔素等有合併 LPS 處理之組別與單獨只加 β -胡蘿蔔素等的組別，細胞增殖速度有稍微變慢，這可能需要再拉長培養時間來觀察細胞增殖的情況。

(二)發炎介質(NO 和 TNF- α)的分泌

在急性或慢性發炎過程中，激活的巨噬細胞會產生大量的 NO 和 TNF- α 而造成一些疾病，例如類風濕性關節炎 (Manjeet and Ghosh, 1999)。細胞在經過 LPS 誘發 NO 產生後，利用 Griess 反應來測量 nitrite 的生成量。在本研究中，發現在 LPS 誘發下，NO 的生成比 control 組增加 2.44 倍，而單獨以 10 μ M α -tocopherol 預培養不會抑制 LPS 對 NO 的誘發作用 (表二)。單獨加入 2 μ M β -胡蘿蔔素、retinoic acid 或 β -apo-8'-carotenal，皆會增加 NO 的生成，各為 control 組的 2.87、3.35、2.8 倍，但與 10 μ M α -tocopherol 共同培養下，卻有抑制 LPS 誘發 NO 生成的情形，但未達顯著差異。

在 TNF- α 方面，單純加入 β -apo-8'-carotenal 會增加 TNF- α 的分泌， β -胡蘿蔔素對 TNF- α 的分泌則和 control 組沒有顯著差異，而 retinoic acid 則是會稍微促進 TNF- α 的分泌 (表三)。在 LPS 誘發下，TNF- α 的分泌量約達 control 組的 4.3 倍，經 2 μ M retinoic acid 處理後會顯著下降 TNF- α 。而 10 μ M α -tocopherol 與 2 μ M β -胡蘿蔔素、retinoic acid 或 β -apo-8'-carotenal 共同作用，均能顯著降

低 LPS 所誘發 TNF- α 的分泌。

(三) 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的生成

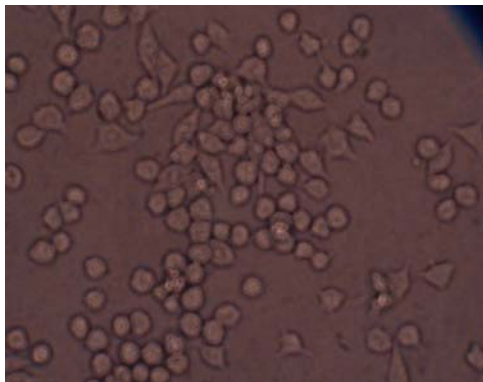
巨噬細胞受 LPS 刺激後透過 membrane-bound NADPH oxidase 的活化而產生 ROS (Bokoch and Knaus, 2003)，此一作用對巨噬細胞毒殺侵入之微生物上扮演一個不可缺少的角色，但過量的 ROS 也可能造成周邊組織的傷害 (Maeng et al., 2004)。在本研究中，有添加 LPS 的組別 ROS 量有微量增加，若是合併有 retinoic acid 的共同培養，有降低 ROS 生成的效果，但皆未達顯著水準 (表四)。細胞若單獨只添加 2 μ M β -胡蘿蔔素，反而有稍稍促進 ROS 產生的。

(四) 條件培養液 (conditioned medium) 對於 C3H10T1/2 細胞的影響

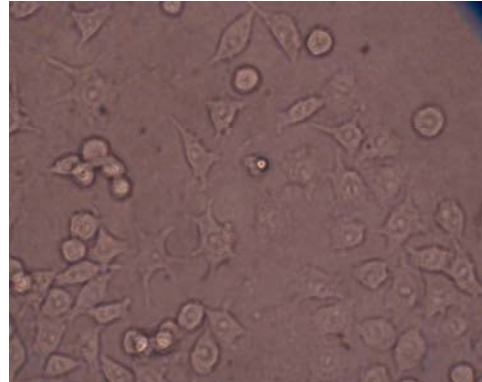
從前面幾個實驗可知道，經由 LPS 刺激之後的 RAW264.7 巨噬細胞，會明顯增加 NO、TNF- α 和 ROS 分泌，另外也可能增加 IL-1 β 和 PGE₂ 的產生 (Bai et al., 2005)。在本研究中，加 30% (v/v) RAW264.7 培養液至 C3H10T1/2 胚胎纖維母細胞培養液中培養一天，明顯增加 C3H10T1/2 胚胎纖維母細胞的傷害 (表五)。經 LPS 激活的 RAW264.7 細胞有 2 μ M retinoic acid 及 10 μ M α -tocopherol 共同處理後之條件培養液會明顯降低條件培養液對 C3H10T1/2 細胞的傷害，使 C3H10T1/2 細胞的傷害顯著降低至 control 組的水準，而經 β -胡蘿蔔素或 β -apo-8'-carotenal 與 α -tocopherol 共同處理後，對 C3H10T1/2 細胞的傷害也是有顯著下降。

由以上結果可發現，retinoic acid 及 α -tocopherol 可能藉由調控發炎介質及 ROS 的產生而降低發炎細胞對周邊細胞的傷害，且二者共同作用的結果較單獨作用佳。這些營養素在體內是否也能如此加成性的抑制發炎反應的傷害，需進一步研究。

A.



B.



圖一、比較正常的 RAW264.7 細胞(A)和經 LPS 誘發成樹突狀細胞(B)的形態。細胞在加或不加 LPS (1 μ g/mL)到培養液中，培養 2 天，此為在 200X 顯微鏡下所觀察得到。

表一、RAW264.7 細胞增殖情形¹。

Treatment (μM)	細胞數 ² ($\times 10^4$ cells/mL)
Control	9.85 \pm 0.64
2 BC	12.55 \pm 1.06
2 RA	10.3 \pm 1.56
2 AC	12.5 \pm 1.27
LPS	9.95 \pm 2.62
LPS+10E	8.85 \pm 1.48
LPS+2 BC	11.25 \pm 3.26
LPS+2 RA	11.2 \pm 2.69
LPS+2 AC	7.85 \pm 3.89
LPS+10 E+2 BC	11.85 \pm 1.48
LPS+10 E+2 RA	11.1 \pm 1.56
LPS+10 E+2 AC	9.2 \pm 3.68

¹ RAW264.7 細胞以 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 活化 24 小時，培養基中同時單獨添加 2 μM β -胡蘿蔔素 (BC)、retinoic acid (RA) 或 β -apo-8'-carotenal (AC) 或合併有 10 μM 維生素 E，之後，收集細胞以 trypan blue 染色來數細胞。

² 數值是以 mean \pm SD 來表示。

表二、RAW264.7 細胞 NO 產生的情形¹。

Treatment (μM)	相對 NO 量 ² (%)
Control	100 \pm 0 ^a
2 BC	287 \pm 195 ^b
2 RA	335 \pm 132 ^b
2 AC	280 \pm 137 ^b
LPS	244 \pm 131 ^{a*}
LPS+10E	262 \pm 179 ^a
LPS+2 BC	542 \pm 159 ^b
LPS+2 RA	511 \pm 258 ^b
LPS+2 AC	142 \pm 75 ^a
LPS+10 E+2 BC	161 \pm 85 ^a
LPS+10 E+2 RA	130 \pm 42 ^a
LPS+10 E+2 AC	169 \pm 65 ^a

¹ RAW264.7 細胞以 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 活化 24 小時，培養基中同時單獨添加 2 μM β -胡蘿蔔素 (BC)、retinoic acid (RA) 或 β -apo-8'-carotenal (AC) 或合併有 10 μM 維生素 E，之後，收集培養過的細胞上清液分析 NO 的產生量。以 Control 組的分泌量當作 100%。

² 數值是以 mean \pm SD 來表示。在有，或沒有 LPS 誘發的同一組別，數值上有不同字母表示具顯著差異 ($p < 0.05$)。

* 表示經過 t-test 比較與控制組達顯著差異 ($p < 0.05$)。

表三、RAW264.7 細胞分泌 TNF- α 的情形¹。

Treatment (μ M)	相對 TNF- α 分泌量 ²
Control	100 \pm 0 ^a
2 BC	106 \pm 27 ^a
2 RA	126 \pm 43 ^{ab}
2 AC	180 \pm 48 ^a
LPS	433 \pm 2 ^{d*}
LPS+10E	241 \pm 43 ^{bc}
LPS+2 BC	274 \pm 135 ^c
LPS+2 RA	151 \pm 14 ^{ab}
LPS+2 AC	214 \pm 18 ^{abc}
LPS+10 E+2 BC	138 \pm 62 ^{ab}
LPS+10 E+2 RA	160 \pm 31 ^{ab}
LPS+10 E+2 AC	127 \pm 10 ^a

¹ RAW264.7 細胞以 LPS (1 μ g/mL)活化 24 小時，培養基中同時單獨添加 2 μ M β -胡蘿蔔素 (BC)、retinoic acid (RA)或 β -apo-8'-carotenal (AC)或合併有 10 μ M 維生素 E，之後，收集培養過的細胞上清液分析 TNF- α 的產生量。以 Control 組的分泌量當作 100%。

² 數值是以 mean \pm SD 來表示。在有，或沒有 LPS 誘發的同一組別，數值上有不同字母表示具顯著差異 ($p < 0.05$)。

* 表示經過 t-test 比較與控制組達顯著差異 ($p < 0.05$)。

表四、RAW264.7 細胞產生 ROS 的情形¹。

Treatment (μ M)	相對螢光密度 ² (%)
Control	20.1
2 BC	28.3
2 RA	19
2 AC	16.3
LPS	28.3
LPS+10E	22.9
LPS+2 BC	28.9
LPS+2 RA	15.6
LPS+2 AC	22.5
LPS+10 E+2 BC	22.4
LPS+10 E+2 RA	18.4
LPS+10 E+2 AC	19.7

¹ RAW264.7 細胞以 LPS (1 μ g/mL)活化 24 小時，培養基中同時單獨添加 2 μ M β -胡蘿蔔素 (BC)、retinoic acid (RA)或 β -apo-8'-carotenal (AC)或合併有 10 μ M 維生素 E，之後，收集培養過的細胞上清液分析 ROS 的產生量。以 Control 組的分泌量當作 100%。

表五、培養過 RAW264.7 細胞之條件培養液對於 C3H10T1/2 細胞 DNA 的傷害¹。

Treatment (μM)	% DNA in tail ²
Control	11 \pm 8 ^{a*}
2 BC	16 \pm 15 ^b
2 RA	15 \pm 11 ^b
2 AC	16 \pm 15 ^b
LPS	19 \pm 17 ^{de**}
LPS+10E	15 \pm 11 ^{bc}
LPS+2 BC	21 \pm 15 ^e
LPS+2 RA	17 \pm 13 ^{cd}
LPS+2 AC	19 \pm 16 ^{de}
LPS+10 E+2 BC	13 \pm 12 ^b
LPS+10 E+2 RA	10 \pm 8 ^a
LPS+10 E+2 AC	15 \pm 12 ^{bc}

¹ RAW264.7 細胞以 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 活化 24 小時，培養基中同時單獨添加 2 μM β -胡蘿蔔素 (BC)、retinoic acid (RA) 或 β -apo-8'-carotenal (AC) 或合併有 10 μM 維生素 E，之後，收集培養過的細胞上清液，添加 30% (v/v) 於 C3H10T1/2 細胞培養基中。

² 數值是以 mean \pm SD 來表示。在有，或沒有 LPS 誘發的同一組別，數值上有不同字母表示具顯著差異 ($p < 0.05$)。

* 以 t-test 比較與 Control 組比較具顯著差異 ($p < 0.05$)。

參考文獻

- 洪永翰、林壁鳳。以巨噬細胞株分泌發炎物質篩選抗發炎作用的模式。Nutr Sci J 2004 29:1-13.
- Alvarado C, Alvarez P, Puerto M, Gausseres N, Jimenez L, De la Fuente M. Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice. Nutri. 2006 22:767-77.
- Bai SK, Lee SJ, Na HJ, Ha KS, Han JA, Lee H, Kwon YG, Chung CK, Kim YM. beta-Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF-kappaB activation. Exp Mol Med. 2005 37:323-34.
- Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. Pharmacol Rev. 2004 56:515-48.
- Barnes PJ, Hansel TT. Prospects for new drugs for chronic obstructive pulmonary disease. Lacet. 2004 364:985-96.
- Bokoch G.M, Knaus UG. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore!. Trends Biochem Sci. 2003 28:502-8.
- Collins AR, Ma AG, Duthie SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage

- (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res.* 1995 336:69-77.
- Culpitt SV, Rogers DF, Fenwick PS, Shah P, De Matos C, Russell RE, Barnes PJ, Donnelly LE. Inhibition by red wine extract, resveratrol, of cytokine release by alveolar macrophages in COPD. *Thorax.* 2003 58:942-6.
- Daga MK, Chhabra R, Sharma B, Mishra TK. Effects of exogenous vitamin E supplementation on the levels of oxidants and antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease. *J Biosci.* 2003 28:7-11.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982 126:131-8
- Hodkova M, Dusilova-Sulkova S, Kalousova M, Soukupova J, Zima T, Mikova D, Malbohan IM, Bartunkova J. Influence of oral vitamin E therapy on micro-inflammation and cardiovascular disease markers in chronic hemodialysis patients. *Ren Fail.* 2006 28:395-9.
- Lee CM, Boileau AC, Boileau TW, Williams AW, Swanson KS, Heintz KA, Erdman JW Jr. Review of animal models in carotenoid research. *J Nutr.* 1999 129:2271-7.
- Maeng O, Kim YC, Shin HJ, Lee JO, Huh TL, Kang KI, Kim YS, Paik SG, Lee H. Cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase protects macrophages from LPS-induced nitric oxide and reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 317:558-64
- Manjeet KR, Ghosh B. Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophages. *Int J Immunopharmacol* 1999 21:435-43.
- Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest.* 1987 79:319-26.
- Offord EA, Gautier JC, Avanti O, Scaletta C, Runge F, Kramer K, Applegate LA. Photoprotective potential of lycopene, beta-carotene, vitamin E, vitamin C and carnosic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. *Free radic Biol Med.* 2002 32:1293-1303.
- Pang B, Wang C, Weng X, Tang X, Zhang H, Niu S, Mao Y, Xin P, Huang X, Zhang H, Zhu J. Beta-carotene protects rats against bronchitis induced by cigarette smoking. *Chin Med J (Engl).* 2003 116:514-6.
- Penglis PS, Cleland LG, Demasi M, Caughey GE, James MJ. Differential regulation of prostaglandin E2 and thromboxane A2 production in human monocytes: implications for the use of cyclooxygenase inhibitors. *J Immunol.* 2000 165:1605-11
- Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* 1978 15:261-7.

- Reifen R. Vitamin A as an anti-inflammatory agent. *Proc Nutr Soc.* 2002 61:397-400.
- Royall JA, Ischiropoulos H. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys.* 1993 302:348-55.
- Sadowska AM, Luyten C, Vints AM, Verbraecken J, Ranst DV, Backer WA. Systemic antioxidant defences during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology.* 2006 11:741-7.
- Saxena RK, Vallyathan V, Lewis DM. Evidence for lipopolysaccharide-induced differentiation of RAW264.7 murine macrophage cell line into dendritic like cells. *J Biosci.* 2003 28:129-34.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988 175:184-91.
- Walrand S, Farges MC, Dehaese O, Cardinault N, Minet-Quinard R, Grolier P, Bouteloup-Demange C, Ribalta J, Winklhofer-Roob BM, Rock E, Vasson MP. In vivo and in vitro evidences that carotenoids could modulate the neutrophil respiratory burst during dietary manipulation. *Eur J Nutr.* 2004 (in press).
- Yamashita T, Kawashima S, Ohashi Y, Ozaki M, Ueyama T, Ishida T, Inoue N, Hirata K, Akita H, Yokoyama M. Resistance to endotoxin shock in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2000 101:931-7.

計畫成果自評

本研究是依計畫執行，研究內容大致與計畫相符。我們的研究發現，維生素 E 與 β -胡蘿蔔素、retinoic acid 及 β -8'-apo-carotenal 共同存在下，可增加個別的抗發炎效果，這可能與維生素 E 可增加 β -胡蘿蔔素、retinoic acid 及 β -8'-apo-carotenal 穩定性有關，本研究可提供抑制慢性發炎的營養補充上重要參考，預期具國際期刊發表價值。