

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

類黃酮與 beta-類胡蘿蔔素對細胞 GJIC 及 BaP、NNK 誘發
Cytochrome P450 表現的影響

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2320-B-040-031-

執行期間：92 年 08 月 01 日至 93 年 07 月 31 日

執行單位：中山醫學大學營養學系

計畫主持人：葉妹蘭

計畫參與人員：胡淼琳中興大學食科系、王維譽中興大學食科系、吳舒璿中山
醫學大學營養系

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 93 年 11 月 3 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC92-2320-B-040-031

執行期間：92年8月1日至93年7月31日

計畫主持人：葉姝蘭 中山醫學大學營養學系

計畫參與人員：胡淼琳 中興大學食品科學系

王維譽 中興大學食品科學系

吳舒璿 中山醫學大學營養學系

一、中文摘要

本研究以 NNK 誘發人類肺癌細胞 A549 之 DNA 傷害為模式，探討 β -胡蘿蔔素及類黃酮分別及共同作用對 DNA 傷害的影響，並探討其可能機制。做法為：將 A549 細胞與 β -胡蘿蔔素及類黃酮分別或共同預培養 1 小時之後，以 PBS 洗掉，再加入 NNK 於 HBSS 緩衝液繼續培養 4 小時，之後分析細胞 DNA 彗星影像，評估 DNA 傷害程度。此外我們也以活性氧的捕捉劑、DCFH-DA 分析法及 CYP450 酵素的抑制劑來分析活性氧及 CYP450 酵素在 NNK 所誘發傷害的角色。結果顯示 NNK 會誘發細胞 DNA 傷害並具劑量關係。而 β -胡蘿蔔素本身並不會造成 DNA 傷害，但會顯著增加 NNK 所誘發的 DNA 傷害達 1.9 倍，其機制應包含 β -胡蘿蔔素的氧化及增加 CYP450 酵素活性。反之，naringin、quercetin、rutin 可以顯著降低 NNK 誘發的 DNA 傷害，其效果依序為 quercetin > naringin > rutin，quercetin 有最佳之抑制效果。以 DCFH-DA 分析，可以看到這些類黃酮明顯抑制 NNK 誘發活性氧產生，並且與抑制 DNA 傷害有一致的效果順序。我們更進一步觀察到，這些類黃酮亦能抑制暴露於 NNK 下， β -胡蘿蔔素的促傷害作用，其抑制效果仍與前面一致，quercetin 的效果最好，這可能與其具較佳的抗氧化性及對 CYP450 酵素具抑制效果有關。

關鍵詞： β -胡蘿蔔素、類黃酮、NNK

Abstract

The aim of this part was to investigate the individual and combined effects of β -carotene and certain common flavonoids, naringin, quercetin and rutin, on DNA damage in A549 cells induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), a potent tobacco-related carcinogen in humans. In addition, we investigated the possible mechanisms. A549 cells were first pre-incubated with either β -carotene, flavonoid, or both of them for 1h, followed by incubation with NNK for 4 h. The DNA damage was determined by comet assay (single-cell DNA gel electrophoresis). In addition, using some reactive oxygen species (ROS) scavengers, DCFH-DA assay and one cytochrome P450 (CYP) inhibitor, we investigated the role of ROS and CYP in NNK-induced DNA damage. NNK induced DNA damage in A549 cells in a dose dependent manner. β -Carotene significantly increased DNA damage induced by NNK up to 1.9-fold. The mechanisms likely included the increase in oxidation of β -carotene and the increased activity of CYP by β -carotene. In contrast, naringin, quercetin, rutin individually enriched

in cells significantly inhibited NNK-induced DNA damage. The inhibitive effects of flavonoids were in an order quercetin, naringin and rutin. The flavonoids markedly inhibited the formation of ROS (determined by DCFH assay) induced by NNK in cells in an order as mentioned above. Furthermore, the flavonoids suppressed the enhancing effect of β -carotene on NNK-induced DNA damage. The effects of flavonoids may be attributed to the antioxidant activity and possibly, the suppression of CYP.

Keywords: β -carotene, flavonoids, NNK

二、前言與目的

1960 至 1970 年間許多流行病學調查結果顯示，攝取富含 β -胡蘿蔔素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，其中對降低抽煙者的肺癌發生率尤為明顯(Peto et al., 1981; Ziegler et al., 1996)，一般將此種效應歸因於 β -胡蘿蔔素的抗氧化性(Cooper et al., 1999)。但 1994 年著名的人體試驗- ATBC study (The alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study group, 1994)卻發現，抽菸者補充 β -胡蘿蔔素，不僅未能減少各種心臟血管疾病、癌症的發生，甚至增加肺癌的發生率，1996 年 CARET (Omenn et al., 1996)及 The physician health study (Hennekens et al., 1996)也都得到類似補充 β -胡蘿蔔素沒有效用的結論。對於這些矛盾的結果，已有不少的解釋被提出討論 (Cooper et al., 1999; Paolini et al., 2001)，其中之一則是認為 β -胡蘿蔔素，必須與食物中的其他抗氧化成分共同存在，才能避免 β -胡蘿蔔素氧化而發揮其生理功能 (Offord et al., 2002)。

深色蔬菜水果除富含類胡蘿蔔素外，也富含多種 phytochemicals，例如類黃酮 (Ziegler et al., 1996)。類黃酮廣泛地存在各種蔬菜水果中，一般的西方飲食型態每日約可提供 1 克的類黃酮(Kuhnau, 1976)，由於類黃酮的酚基結構可穩定電子，已有許多研究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)，因此類黃酮的抗氧化力被認為與其保護心臟血管及降低癌症等功能有關(Depeint et al., 2002)。類黃酮是否有可能與 β -胡蘿蔔素具交互作用，減少 β -胡蘿蔔素的氧化分解，而降低其可能造成的氧化傷害，因而能發揮其他生理功能，或此二者對某些生理功能具加乘作用，目前並不清楚。因此本研究以細胞模式，探討暴露於香菸中主要致癌成分之一，4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) 中， β -胡蘿蔔素及類黃酮對 DNA 傷害的影響及類黃酮是否能抑制 β -胡蘿蔔素發生促氧化或增加傷害的現象，並試著探討可能的機制。

三、方法

A549 細胞培養與處理

人類肺癌株化細胞 (human lung carcinoma cells, A549)，購自國家衛生研究院細胞庫，培養於 BME 培養液，其中含有 10% (v/v) 胎牛血清 (FBS)，0.37% (w/v) NaHCO_3 、100 units/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin，細胞在含有 5% CO_2 之 37 $^\circ\text{C}$ 恆溫培養箱中培養。當細胞生長至九分滿時，約 5×10^6 cells/10cm dish 時，去掉原培養液後，以 PBS buffer 洗兩次，加入 10 ml 新鮮培養液，再加入 THF- β -carotene (終濃度 20 μM)、naringin、quercetin 或 rutin (終濃度 10、23 μM)，分別或共同培養

於 37°C 黑暗中 1 小時，去掉 BME 培養液，以 PBS buffer 洗兩次，以洗掉未併入細胞之 β -胡蘿蔔素或類黃酮。培養後之細胞去掉培養液，加入 10ml HBSS buffer 浸潤，再加入 700 μ M NNK 繼續培養 4 小時，控制組則於 HBSS buffer 中培養相同時間。

DNA 傷害測定-Comet assay (single cell gel electrophoresis assay)

將細胞以 1X TE 收集下來後，放在載玻片上經三層封膠【第一層為 140 μ l 1% normal melting temperature agarose (NMA, 溶於 PBS)；第二層為含有細胞之 agarose，將細胞以 1X TE 處理下來後，約取 1/10 medium，經離心 (600 g , 5 分鐘)，去除上清液，此時細胞數約為 10^5 個。與 300 μ l 之 1% low melting temperature agarose (LMA, 溶於 PBS) 混合均勻，取 130 μ l 含細胞之 LMA 覆蓋於第一層上；第三層為 140 μ l 1% NMA，每層封膠過程都要經過冰溫下固化】後，將 slice 片浸置於 lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris pH=10, 1% sodium sarcosinate with 1% Triton X-100 and 10% DMSO)、4°C, 1 小時。經去離子水輕輕洗過後放入電泳槽 (電泳液: 1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH), 靜置 15 分鐘使 DNA unwinding, 電泳 20 分鐘 (25 V、300 mA、4°C) 後，放入 Tris buffer 中和 (0.4 M Tris, pH 7.5) 5 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 (Singh et al., 1988; Birnboim, 1990)。當 DNA 受到傷害後，細胞核內之 DNA unwinding 導致 DNA 滲漏，形成拖尾 (tailing) 的現象，DNA 受損程度以 tail moment (TMOM) 來表示。TMOM = % of DNA in tail \times tail distance。

β -胡蘿蔔素含量分析

取 1 ml cell lysate (或 liposome 混和液) 與 2 ml 無水酒精及正己烷 (含 0.0025% BHT) 混合液 (1:2, v/v) 混合，以超音波震盪器破碎細胞，萃取細胞內之 β -carotene 之後，離心 (600 g , 5 分鐘)。取正己烷層，以進行 HPLC 分析，並在 450nm 偵測 (Rundhaug et al., 1988)。

流式細胞分析法測定細胞中 ROS (reactive oxygen species) 含量

利用 DCFH-DA fluorescence 分析細胞內氧化壓力的程度。細胞與類黃酮分別預培養 1 小時後以 PBS 洗去，再加入 700 μ M NNK 以及 10 μ M DCFH-DA 於 PBS 中共同培養 15 分鐘，以 1X TE 切下收集細胞後，再以 PBS 懸浮細胞並將濃度調為每毫升 1×10^5 個細胞並以流式細胞儀 (flow-cytometer; FACSCalibur™ system) 測量單位細胞內 DCF fluorescence 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，並經由流式細胞儀計算單一細胞所含的螢光強度來代表細胞中 ROS 的多寡 (Black et al., 1974)。

Cytochrome P 1A2 含量

收集處理過的細胞進行 western blotting assay。

四、結果討論

NNK 誘發之 DNA 傷害

A549 細胞與 NNK 共同培養 4 個小時後，DNA 明顯受到傷害而拖尾，如圖一顯示，NNK 的確會誘發 A549 細胞產生 DNA 傷害並且具有濃度關係。當濃度達 1 mM 時，DNA 損害程度嚴重，TMOM 值達 40，已達彗星影像辨識極限，由於 700 μ M NNK 所誘發的傷害較適中，因此後續實驗均選用此濃度。將細胞與數種自由基清除劑分別預培養 1 小時後，再與 700 μ M NNK 共同培養 4 小時，結果顯示自由基清除劑

包括 BHT、catalase、DMSO、以及 SOD 皆能降低 NNK 所造成的傷害，DNA 的 TMOM 值分別是 NNK 單獨處理組的 24%、56%、48% 以及 76%，其中 BHT 及 DMSO 抑制效果較好，而 NaN_3 則無抑制效果(表一)。由此可見，NNK 造成 DNA 傷害應與其代謝過程中 ROS 的形成有關，而以清除劑的效果來判斷，這些 ROS 可能以 $\text{ROO}\cdot$ 及 $\text{OH}\cdot$ 為主。

β -胡蘿蔔素對 DNA 傷害的促進及類黃酮的抑制

20 μM β -胡蘿蔔素與細胞預培養後，以 PBS 洗去，再與 NNK 共同培養。結果發現 β -胡蘿蔔素單獨存在時並不會造成 DNA 傷害，但與 NNK 培養後卻顯著增加 NNK 所誘發的 DNA 傷害達 1.8 倍(圖二)。反之，以 23 μM 的類黃酮 naringin、quercetin、rutin 以及維生素 C、E 與細胞預培養，再與 700 μM NNK 共同培養，結果皆能抑制 NNK 所造成的傷害(圖二)，類黃酮的抑制效果依序為 quercetin > naringin > rutin，其中 quercetin 的抑制能力甚至比同濃度的維生素 C 還強。若進一步將三種類黃酮分別與 β -胡蘿蔔素共同預培養，如圖三的結果顯示， β -胡蘿蔔素促傷害的效應明顯被抑制，而其效應與抑制 NNK 的傷害有相同的趨勢，順序亦為 quercetin > naringin > rutin，此結果顯示類黃酮能避免 β -胡蘿蔔素在 NNK 存在下所產生的促傷害效應。

細胞中 β -胡蘿蔔素含量

我們分析 NNK 及類黃酮對細胞內 β -胡蘿蔔素消耗速率之影響，利用 HPLC 測定細胞內的 β -胡蘿蔔素。細胞內 β -胡蘿蔔素的濃度會隨著培養的時間逐漸降低，4 個小時後已經剩下約 52%，而暴露於 NNK 雖會增加 β -胡蘿蔔素的消耗，但只在第 4 個小時才與控制組有顯著的差異 (data not shown)，此結果顯示 NNK 並未大量增加 β -胡蘿蔔素的消耗，因此 β -胡蘿蔔素增加 NNK 傷害的機制可能不單是經由 β -胡蘿蔔素的氧化而造成。而三種類黃酮在 NNK 的存在下，均能降低細胞中的 β -胡蘿蔔素氧化速率，其效果與前面抑制 DNA 傷害有相同的趨勢，預培養 quercetin、naringin 及 rutin 組以 NNK 培養了 4 個小時後， β -胡蘿蔔素的濃度分別還有 90%、89% 以及 79%，顯示類黃酮的確能減少 β -胡蘿蔔素的消耗(表二)。

1-aminobenzotriazole (ABT) 抑制 β -胡蘿蔔素促傷害性

由前一結果瞭解，暴露於 NNK，並未大量增加細胞內 β -胡蘿蔔素損耗，為了解 β -胡蘿蔔素促傷害效應與 cytochrome P450 系統是否有關聯，我們加入非專一性的 cytochrome P450 抑制劑 ABT 和 β -胡蘿蔔素與細胞共同預培養，結果發現(表三)，ABT 能顯著抑制 NNK 單獨及 β -胡蘿蔔素與 NNK 共同作用所造成的 DNA 傷害。由 TMOM 值的消長可看出 ABT 與 β -胡蘿蔔素對 NNK 的共同影響並非只是單純相加作用，表示 β -胡蘿蔔素的促傷害效應也牽涉到 cytochrome P450 對 NNK 的代謝作用。

類黃酮抑制 ROS 產生及 CYP1A2

已知 NNK 傷害至少部分與 ROS 的產生有關，為觀察類黃酮是否影響細胞中 ROS 的程度，我們以 DCFH-DA 來偵測細胞中 ROS 的增減。從流式細胞儀分析的結果顯示(圖四)，NNK 與細胞共同培養 15 分鐘後即明顯增加細胞內的 ROS，與前面以 ROS 清除劑結果一致，而 A549 細胞若經過類黃酮的預培養，則明顯能抑制 NNK 所產生的 ROS，其抑制 ROS 能力的趨勢與抑制 NNK 誘發的 DNA 傷害相同，皆為

quercetin > naringin > rutin, 此結果進一步說明類黃酮抑制 NNK 傷害應與抑制了 ROS 的產生有關。此外, 圖五顯示類黃酮亦能抑制 CYP1A2 的表現, 因此類黃酮降低 NNK 誘發的 DNA 傷害, CYP450 酵素反應的改變應該也是其中機制之一。

五、參考文獻

- Bear WL. 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 Research*. 20:3323-3329, 2000.
- Bhagwat SV. Vijayasathy C. Raza H. Mullick J. Avadhani NG. Preferential effects of nicotine and 4-(N-methyl-N-nitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone on mitochondrial glutathione S-transferase A4-4 induction and increased oxidative stress in the rat brain. *Biochemical Pharmacology*. 56:831-9, 1998.
- Bilodeau J. Wang M. Chung F. Castonguay A. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on oxidative pathways in A/J mice. *Free Radical Biology and Medicine*. 18:47-54, 1995.
- Birnboim HC. Fluorometric analysis of DNA unwinding to study strand breaks and repair in mammalian cells. *Methods in Enzymology*. 186:550-5, 1990.
- Black HS. Radical interception by carotenoids and effects on UV carcinogenesis. *Nutrition & Cancer*. 31:212-7, 1998.
- Bors W. Michel C. Stettmaier K. Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors*. 6:399-402, 1997.
- Cooper DA. Eldridge AL. Peters JC. Dietary carotenoids and lung cancer: a review of recent research. *Nutrition Reviews*. 57:133-145, 1999.
- Depeint F. Gee JM. Williamson G. Johnson IT. Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proceedings of the Nutrition Society*. 61:97-103, 2002.
- Foster KA. Oster CG. Mayer MM. Avery ML. Audus KL. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Experimental Cell Research*. 243:359-366, 1998.
- Hennekens C. Buring J. Manson J. Stampfer M. Rosner B. Belanger C. LaMotte F. Gaziano J. Ridker P. Willet W. Peto R. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine*. 334: 1145-1149, 1996.
- Huynh HT. Teel RW. Effects of pycnogenol on the microsomal metabolism of the tobacco-specific nitrosamine NNK as a function of age. *Cancer Letters*. 132:135-9, 1998.
- Kim PM. Wells PG. Genoprotection by UDP-glucuronosyltransferases in peroxidase-dependent, reactive oxygen species-mediated micronucleus initiation by the carcinogens 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and benzo[a]pyrene. *Cancer Research*. 56:1526-1532, 1996.
- Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Review of Nutrition Diet*. 24:117-191, 1976.
- Nachiappan V. Mufti SI. Chakravarti A. Eskelson CD. Rajasekharan R. Lipid peroxidation and

ethanol-related tumor promotion in Fischer-344 rats treated with tobacco-specific nitrosamines. *Alcohol & Alcoholism*. 29:565-74, 1994.

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 Radical Biology & Medicine*. 32:1293-303, 2002.

Omenn GS. Goodman GE. Thoenquist MD. Balmes J. Cullen MR. et al. Effects of a combination of beta-carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine*. 334:1150-1155, 1996.

Paolini M. Cantelli-Forti G. Perocco P. Pedulli GF. Abdel-Rahman SZ. Legator MS. Co-carcinogenic effect of beta-carotene. *Nature*. 398:760-1, 1999.

Paolini M. Antelli A. Pozzetti L. Spetlova D. Perocco P. Valgimigli L. Pedulli GF. Cantelli-Forti G. Induction of cytochrome P450 enzymes and over-generation of oxygen radicals in beta-carotene supplemented rats. *Carcinogenesis*. 22:1483-95, 2001.

Peto R. Doll R. Buckley JD. Sporn MB. Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? *Nature* 290:201-8, 1981.

Pierpoint WS. Flavonoids in the human diet. *Progress in Clinical & Biological Research*. 213:125-40, 1986.

Rundhaug JE. Pung A. Read CM. Bertram JS. Uptake and metabolism of beta-carotene and retinal by C3H/10T1/2 cells. *Carcinogenesis*. 9:1541-5, 1988.

Salgo MG. Cueto R. Winston GW. Pryor, WA. Beta carotene and its oxidation products have different effects on microsome mediated binding of benzo[a]pyrene to DNA. *Free Radical Biology & Medicine*. 26:162-173. 1999.

Singh NP. McCoy MT. Tice RR. Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 175:184-91, 1988.

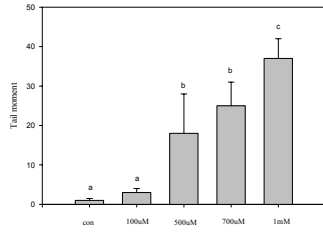
Smith TJ. Guo ZY. Thomas PE. Chung FL. Morse MA. Elkind K. Yang CS. Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in mouse lung microsomes and its inhibition by isothiocyanates. *Cancer Research*. 50:6817-22, 1990.

The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Prevention Study Group. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smoker. *New England Journal of Medicine*. 330:1029-1035. 1994.

Ziegler RG. Mayne S. Swanson CA. Nutrition and lung cancer. *Cancer Causes & Control*. 7:157-177, 1996.

王維譽。以 β -胡蘿蔔素對及誘發之傷害的促進作用以及類黃酮的抑制作用。國立中興大學食品科學研究所碩士論文。2004年。(依本計畫一部份進行之論文)

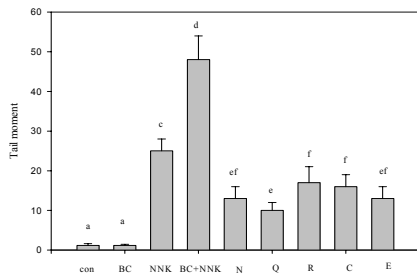
六、圖、表



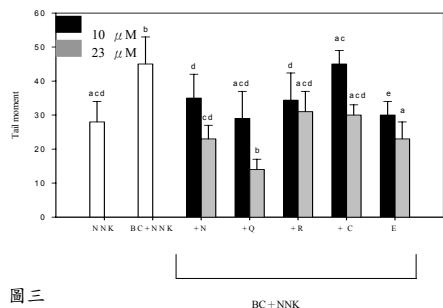
圖一
Fig 1 Effect of NNK on DNA damage in A549 cells . The cells were incubated with NNK in HBSS buffer for 4 hr.

表一
Table 1. Effects of free radical scavengers on DNA damage in A549 cells induced by NNK. The Cells were pre-incubated with free radical scavengers for 1hr, followed by washing with PBS before incubated with 700 µM NNK in HBSS buffer for 4 hr.

Treatments	Conc.	TMOM	TMOM(%)
NNK	700 µM	25 ± 3	100 ^a
+BHT	50 µM	6 ± 3	26 ^b
+Catalase	50 U/ml	14 ± 2	60 ^c
+DMSO	50 mM	12 ± 3	49 ^c
+NaN ₃	50 mM	26 ± 2	104 ^a
+SOD	50 U/ml	19 ± 2	78 ^d



圖二
Fig 2. Effect of β-carotene, flavonoids, vitamin C and vitamin E on DNA damage induced by NNK. Cells were pre-incubated in the dark at 37°C with either β-carotene (BC), naringin (N), quercetin (Q) rutin (R), vitamin C or vitamin E for 1 hr, followed by washing with PBS before incubated with 700 µM NNK in HBSS buffer for 4 hr..



圖三
Fig 3. Effect of flavonoids, vitamin C and vitamin E on DNA damage induced by a combination of β-carotene and NNK. Cells were pre-incubated with 20 µM β-carotene (BC) combined with either 10 µM or 23 µM of naringin (N), quercetin (Q), rutin (R), vitamin C or vitamin E for 1hr, followed by washing with PBS before incubated with 700 µM NNK in HBSS buffer for 4 hr.

表二

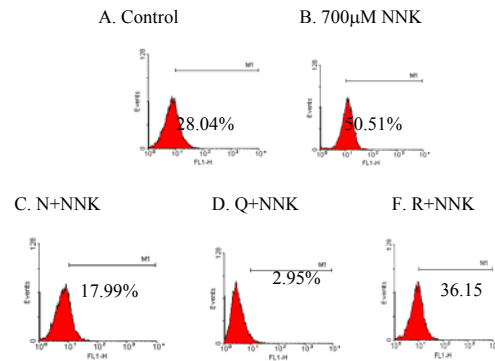
Table 2 Effects of flavonoids on the consumption of β-carotene incorporated in cells¹.

Treatments	BC concentration (nmol/10 ⁶ cells)	(%)
Original point ²	2.89±0.09 ^d	100±3
BC	1.47±0.09 ^a	51±3
BC+NNK	1.21±0.12 ^a	42±4
N+BC+NNK	2.57±0.09 ^{bc}	89±3
Q+BC+NNK	2.60±0.06 ^{cd}	90±2
R+BC+NNK	2.28±0.14 ^b	79±5

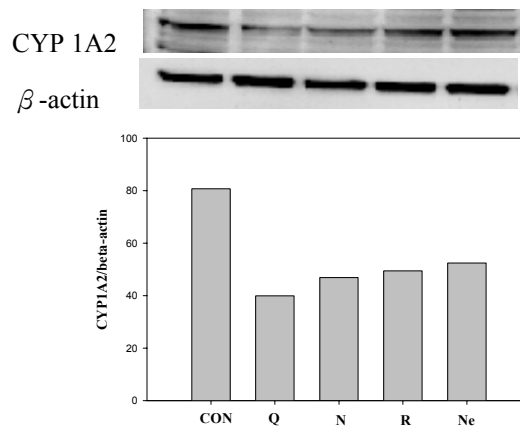
表三

Table 3. Effects of ABT on DNA damage in A549 induce by NNK combined with or without β-carotene (BC). Cells were pre-incubated with 1-aminobenzotriazole (ABT) for 1hr, followed by washing with PBS before incubated with 700 µM NNK in HBSS buffer for 4 hr.

Treatment	Conc.	TMOM	TMOM(%)
NNK	700 M	25 ± 3	100%
BC+NNK	20 µM +700 µM	45 ± 6	100%
ABT+NNK	1mM+700 M	12 ± 4	50%
ABT+BC+NNK	1mM+20 µM+700 µM	18 ± 2	60%



圖四
Fig 4. The DCFH assay for ROS in A549 cells induced by NNK. Cells were pre-incubated with 23 µM naringin (N), quercetin (Q), rutin (R), for 1hr, followed by washing with PBS, and then incubated with 700 µM NNK and DCFH-DA in PBS buffer for 15 min and assayed by flow cytometer.



圖五
Fig.5. Western blots showing the effect of 23 µM flavonoids on the expression of CYP1A2 protein in A549 cells. Cells were incubated with 23 µM of naringin (N), quercetin (Q), rutin (R), and naringenin(Ne) for 1hr.

計畫成果自評

1. 本研究按計畫執行，針對在細胞模式中，BaP 及 NNK 兩種香菸煙霧中致癌成分作用下， β -胡蘿蔔素及類黃酮調控細胞中活性氧及 Cytochrome P 的活性情況的研究，已獲得具體結果，此結果相信對未來抗氧化營養素之製備使用，具實際參考價值。
2. 本計畫所提供經費訓練兩位碩士班學生在此領域的研究，其中一位已於今年 6 月取得碩士學位，另一位仍就此計畫中衍生之相關問題繼續深入探討。
3. 本計畫之研究成果，預計可發表 2 篇論文於國內外學術期刊。