

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

beta-胡蘿蔔素促氧化作用及類黃酮之保護作用

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2314-B-040-028-

執行期間：91年12月01日至92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：胡淼琳教授，王維譽

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 92 年 10 月 27 日

## 類黃酮抑制 UVA 照射引起 $\beta$ -胡蘿蔔素對 C3H10T1/2 細胞的促氧化性

### 一、摘要

補充類胡蘿蔔素是否能減少紫外光對皮膚的傷害，臨床試驗的結果並不一致。而近來有體外試驗發現  $\beta$ -胡蘿蔔素在 UVA 的照射下會促進細胞 HO-1 的基因表現，顯示  $\beta$ -胡蘿蔔素增加了細胞內的氧化壓力。幾個大型臨床實驗中給予抽菸者補充  $\beta$ -胡蘿蔔素造成肺癌的發生及死亡率上升，與流行病學研究發現攝食富含  $\beta$ -胡蘿蔔素的深色蔬菜水果會減少抽菸者肺癌的發生相矛盾。因此有學者認為單獨補充  $\beta$ -胡蘿蔔素可能並不安全，建議由多攝食蔬菜水果補充  $\beta$ -胡蘿蔔素。因為深色蔬菜水果中除  $\beta$ -胡蘿蔔素外，亦含有大量類黃酮等抗氧化物質，因此類黃酮是否能保護  $\beta$ -胡蘿蔔素，避免其氧化造成的促氧化性，是一項相當值得研究的課題。本研究的目的是為探討在 UVA 照射下，類黃酮是否能抑制  $\beta$ -胡蘿蔔素發生促氧化的現象。做法為：將大鼠胚胎細胞(C3H 10T1/2)與  $\beta$ -胡蘿蔔素及類黃酮預培養一小時之後以 PBS 洗兩次，加入 HBSS 緩衝液培養，再以 UVA 照射(照射劑量為  $7.6 \text{ kJ/m}^2$ )，之後分析細胞 DNA 彗星影像，評估氧化傷害程度。結果顯示本實驗所選用的三種類黃酮 naringin、quercetin、rutin 的確可以降低  $\beta$ -胡蘿蔔素促氧化作用，效果依序為 naringin > rutin > quercetin。進一步分析類黃酮對 UVA 的吸收光譜，發現在 UVA 波長範圍的吸收量大小依序為 quercetin > rutin > naringin。另外以 HPLC 分析 UVA 照射下  $\beta$ -胡蘿蔔素在細胞內的消耗量，結果以 naringin 較能減少  $\beta$ -胡蘿蔔素氧化，而 quercetin、rutin 效果較差。以上結果顯示某些類黃酮確能抑制 UVA 對  $\beta$ -胡蘿蔔素的氧化，而其效果不只來自對 UVA 的遮蔽作用，亦可能來自於類黃酮在細胞內對  $\beta$ -胡蘿蔔素氧化產物或其他 UVA 誘發的 ROS 作用而減少  $\beta$ -胡蘿蔔素被 UVA 氧化，進而抑制 UVA 誘發的  $\beta$ -胡蘿蔔素對細胞 DNA 促氧化現象。

關鍵詞： $\beta$ -胡蘿蔔素、類黃酮、UVA、DNA 傷害。

### Abstract

Inconsistent results have been reported regarding the effect of  $\beta$ -carotene on UV-induced skin damage. Recently, an in vitro studies show that  $\beta$ -carotene enhanced the expression of HO-1 in cells induced by ultraviolet-A (UVA), i.e.,  $\beta$ -carotene increased the oxidative stress in cells exposed to UVA. Several clinical trails show that  $\beta$ -carotene supplementation is ineffective or detrimental in smokers. In contrary, epidemiologic studies have shown inverse relationship between the intake of fruits and vegetables, which are rich in  $\beta$ -carotene, and the incidence of

lung cancer in smokers. It has been suggested that  $\beta$ -carotenoids itself is instable and using combination of antioxidants could be an appropriate way to reduced oxidative stress. Flavonoids are another group of natural antioxidants ubiquitously found in fruits and vegetables. Some clinical studies suggest that the intake of flavonoids is inversely associated with the risk of lung cancer in smokers. Thus, the aim of the present study was to investigate if flavonoids decrease the prooxidative effects of  $\beta$ -carotene induced by UVA irradiation in cell culture and the possible mechanisms. The C3H10T1/2 cells, a cell line of mouse embryo fibroblasts, were first incubated with  $\beta$ -carotene and/or flavonoids for 1 hr followed by irradiation with UVA ( $7.5\text{KJ}/\text{m}^2$ ). DNA damage was examined (measured as comet assay) as a marker for oxidative stress. The results showed that  $\beta$ -carotene enhanced the DNA damage after irradiation with UVA by about 35%. The flavonoids employed in this study, naringin, quercetin, rutin, significantly decrease the raise of DNA damage induced by UVA with or without  $\beta$ -carotene. Flavonoids protect against DNA damage and the loss of  $\beta$ -carotene induced by UVA in the same order, i.e., naringin, rutin and quercetin. In contrary, the absorption of UVA (320-380 nm) was in the order quercetin, rutin and naringin. Together, these results suggest that  $\beta$ -carotene was unstable exposed to UVA and the presence of flavonoids decrease the loss and inhibit the prooxidative activity of  $\beta$ -carotene. The effects of the three flavonoids are not only attributed to sunscreen effect, but may major to the antioxidative activity of flavonoids. Flavonoids as antioxidants prevented autoxidation, and then prooxidation of  $\beta$ -carotene induced by UVA irradiation.

Keywords:  $\beta$ -carotene, flavonoids, UVA, DNA damage

## 二、前言

流行病學調查顯示，多攝取深綠色蔬菜可以降低癌症及心臟血管疾病的發生機率，對抽煙者尤其顯著 (Astorg, 1997; Pryor et al., 2000)。這樣的效果一般歸因於類胡蘿蔔素的抗氧化性，特別是  $\beta$ -胡蘿蔔素。然而近來有兩個著名的臨床試驗 (The alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study group 1994; Omenn et al., 1996.) 卻有出乎意料的發現：抽煙者補充  $\beta$ -胡蘿蔔素不但不能減少癌症的發生率，反而會增加受試者的肺炎發生率及致死率。對於這些矛盾的結果，學者提出的可能推論之一是：由於抽煙者肺部有大量促氧化物，造成補充  $\beta$ -胡蘿蔔素者肺部有較多氧化物的產生，因而進一步形成氧化傷害及癌症的發生。許多體外試驗也發現  $\beta$ -胡蘿蔔素在某些氧化條件下的確會發生促氧化性 (Obermuller-jevic et al., 1999; Black, 1998)，而且氧化後的  $\beta$ -胡蘿蔔素也經實驗證實會經由產生活性氧來誘發小牛胸腺 DNA 傷害 (Yeh and Hu,

2002 )

在深綠色蔬菜中，除了類胡蘿蔔素 ( carotenoids ) 外，尚含有許多類黃酮 ( flavonoids ) 及 Phytochemicals

。類黃酮中含有多種有效成份，常被用以研究其抗氧化性( Pierpoint,1986; Bors et al., 1997 ) 及與各種疾病的關係 ( Bors et al.,1990; Cao et al., 2002 )。有報告指出攝食較多類黃酮可以減少肺癌及心臟血管疾病的發生 ( Hirvonen et al., 2001; Knekt et al., 2002 )。另有報告指出茄紅素-與  $\beta$ -胡蘿蔔素同為類胡蘿蔔素，其油性粹取物(含 6% 茄紅素，0.1%  $\beta$ -胡蘿蔔素，1%維生素 E，及多酚類)在抑制 CuSO<sub>4</sub> 所誘發 LDL 氧化傷害方面，其抑制效果較純茄紅素強達五倍以上(97% V.S 22%)( Fuhrman et al., 2000 ) 故類黃酮與 Carotenoids 間是否存在交互作用以致降低  $\beta$ -胡蘿蔔素可能產生的促氧化性是一個非常重要而有趣的課題。本研究擬以大鼠胚胎纖維母細胞(C3H 10T1/2)為模式，以 UVA 誘發氧化傷害，之後分析細胞 DNA 彗星影像，評估氧化傷害程度。探討在 UVA 照射下，類黃酮是否能抑制  $\beta$ -胡蘿蔔素發生促氧化的現象，並探討其可能機制。

### 三、材料與方法

#### 1. 細胞培養

C<sub>3</sub>H 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<sub>3</sub>、兩種抗生素 ( penicillin 100 units/ml, streptomycin 100  $\mu$ g/ml ) 細胞在含有 5% CO<sub>2</sub> 之 37 恆溫培養箱中培養。當細胞生長至滿盤，約 10<sup>6</sup> cells/dish 時使用來進行實驗之各項處理和分析

#### 2. $\beta$ -胡蘿蔔素與類黃酮併入細胞

當 10 cm dish 的細胞生長至滿盤 ( 10<sup>6</sup> cells/dish )，倒掉培養基以 PBS buffer 洗兩次，加入 10 ml BME ( 10% FBS )，再加入 THF-carotenoid ( 終濃度 20  $\mu$ M ) 分別與類黃酮 naringin、quercetin、rutin ( 終濃度 10、23 $\mu$ M；類黃酮的選擇是參考試管試驗的結果 ( data not shown ) ) 共同培養於 37 黑暗中培養 1 小時，倒掉 BME 培養液，以 PBS buffer 洗兩次，去掉未併入細胞之  $\beta$ -胡蘿蔔素及類黃酮

#### 3. UVA 照射

預培養  $\beta$ -胡蘿蔔素同時共同或未共同預培養類黃酮，置於 37 培養相黑暗中培養 1 小時，倒掉 BME 培養液，以 PBS buffer 洗兩次，去掉未併入細胞之  $\beta$ -胡蘿蔔素及類黃酮，加入 10ml HBSS buffer 浸潤，再分別照射 UVA 3.8、7.6 KJ/m<sup>2</sup>。

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

將細胞以 1 $\times$ TE ( trypsin-EDTA buffer)切下後，經三層封膠，將 slice 片浸置於 lysing solution (2.5 M NaCl，100 mM Na<sub>2</sub>EDTA，10 mM Tris pH=10，1 % sodium sarcosinate with 1 % Triton X-100 and DMSO)、4 小時，1 小時。經去離子水輕輕洗過

後放入電泳槽(電泳液:1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 300 mM NaOH),靜置 15 分鐘使 DNA Unwinding, 電泳 20 分鐘(25 V、300 mA、4 )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。

#### 5.β-胡蘿蔔素含量分析 (Rundhaug et al., 1988)

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(600xg, 5 分鐘)。取正己烷層,以進行 HPLC 分析, HPLC 分析條件如下:

管柱:C-18 column, 4.6 mm × 150 mm

移動相:Methanol:Toluene = 75:25

流速:1.5 ml/min

偵測器:Hitachi L-4200 UV-VIS Detector (450 nm)

## 四、結果

### 1. 彗星影像分析

- a. 許多研究顯示 UVA 在體外模式會造成細胞的 DNA 傷害,本研究以 Comet assay 來分析 DNA 斷裂的程度,用 tail moment 值來定量傷害程度。以 UVA 劑量 7.6 KJ/M<sup>2</sup> 照射 C3H 細胞可造成 tail moment 值約達 40,但 β-carotene-riched 細胞照光後 tail moment 值可達 55,經統計分析具有顯著差異 (P < 0.05) (圖一)。這結果顯示 β-carotene 在 UVA 的照射下不但沒有保護 DNA 的效果,β-carotene 反而具有促氧化性,增加了 DNA 傷害的程度。而這樣的促氧化傷害在 β-carotene 與類黃酮共同培養的情形下,DNA 傷害的程度顯著降低,效果依序為 naringin > rutin > quercetin,並且具有濃度效應,naringin 的保護效果比同濃度下維生素 C 好 (P < 0.05) 而與維生素 E 的效果相似。在以 3.8 KJ/m<sup>2</sup> UVA 處理細胞時也具有相同的趨勢。
- b. 以類黃酮預培養 1 小時後再以相同劑量的 UVA 照射,結果類黃酮本身即具有保護 DNA 傷害的能力,可顯著降低 DNA 傷害的程度(圖二)。

### 2. β-carotene 的消耗速率測定

C<sub>3</sub>H 細胞以 20 μM 的 β-carotene 預培養 1 小時,β-carotene 的攝入量可達 10.6 μg,在 UVA 照射 3.8 KJ/m<sup>2</sup> 後 β-carotene 只剩約 50%,顯示在 UVA 照射時 β-carotene 會快速消耗。若預培養 β-carotene 時分別與類黃酮 naringin、rutin 共同預培養,則在 UVA 照射下的消耗速率可顯著減緩,照射 3.8 KJ/m<sup>2</sup> 後 β-carotene 殘存量可分別達 73%、60% (data not shown)。進一步以 naringin 進行不同 UVA 照射劑量下對 β-胡蘿蔔素保護分析,結果顯示照射劑量達 7.6KJ/m<sup>2</sup>,其細胞中 β-胡蘿蔔素含量仍明顯高於不含 naringin 組(圖三)

### 3. 類黃酮對 UVA 的吸收光譜

以分光光度計分析類黃酮 naringin、quercetin、rutin 在 UVA 波長 (320-380 nm) 下的吸光光譜 (圖四)。本實驗使用波長 365nm 之 UV 燈，來比較類黃酮對 UVA 吸光強弱，發現三種類黃酮對 365nm 吸光強度依序為 quercetin > rutin > naringin，而在 320nm-380nm 的範圍，naringin 幾乎沒有吸光。

## 五、討論

本實驗的結果可以證實  $\beta$ -胡蘿蔔素在 UVA 的照射下的確具有促氧化性，造成細胞 DNA 傷害程度顯著增加，而類黃酮 naringin、quercetin、rutin 也確實能降低 DNA 傷害的程度，減少  $\beta$ -胡蘿蔔素的促氧化性。許多研究也顯示  $\beta$ -胡蘿蔔素在 UVA 照射下會增加細胞的氧化壓力，包括 HO-1 的基因表現以及脂質過氧化的程度 (Bar-Natan et al., 1996)。本實驗所選用的三種類黃酮 naringin、quercetin、rutin 均可以顯著的降低細胞 DNA 傷害程度，其可能的機制包括 1.類黃酮對 UVA 的遮蔽效應；2.類黃酮清除活性氧及自由基來抑制  $\beta$ -胡蘿蔔素的氧化；3.與  $\beta$ -胡蘿蔔素的自由基反應，減少連鎖反應發生；4.還原  $\beta$ -胡蘿蔔素自由基。由類黃酮對 UVA 的吸收光譜可以發現抑制 DNA 傷害最有效的 naringin 對 UVA 的吸收反而最弱，而抑制 DNA 傷害效果最差的 quercetin 對 UVA 的遮蔽效應卻最強，這樣的結果顯示類黃酮降低 DNA 傷害與類黃酮對 UVA 的遮蔽應只有部分相關。

我們以 HPLC 來測定  $\beta$ -胡蘿蔔素的消耗速率，發現三種類黃酮對減少  $\beta$ -胡蘿蔔素的消耗速率與降低 C3H 細胞 DNA 傷害具相關性，亦即減少  $\beta$ -胡蘿蔔素消耗效果越好，其降低 DNA 傷害的效果也越好，顯示類黃酮很有可能是經與 UVA 所引起的 ROS 反應，因此抑制了  $\beta$ -胡蘿蔔素的氧化，或是阻斷了  $\beta$ -胡蘿蔔素氧化產物產生連鎖氧化反應，或是還原  $\beta$ -胡蘿蔔素自由基，因而降低細胞 DNA 傷害。已許多研究顯示類黃酮可以藉由清除 ROS、增加細胞內 GSH 等機制來降低細胞內的氧化壓力 (Ishige et al., 2001)，本實驗結果也顯示，單獨以類黃酮與細胞培養，即能顯著降低 UVA 所引起之 DNA 傷害。而由圖三  $\beta$ -胡蘿蔔素的下降曲線看來，不論有無 naringin 存在， $\beta$ -胡蘿蔔素的損耗率皆相同，並無明顯延遲損耗情形，因此類黃酮可以還原  $\beta$ -胡蘿蔔素的可能性極低。至於類黃酮是否能直接與  $\beta$ -胡蘿蔔素自由基反應，減少其自由基引起的鏈反應則仍須進一步實驗證明。

$\beta$ -胡蘿蔔素的氧化安定性越來越受到質疑 (Offord et al., 2002)，有些學者建議  $\beta$ -胡蘿蔔素結合其他抗氧化劑一起使用，可能較具有保護 UVA 氧化傷害的功效，因為有研究顯示增加蕃茄醬的攝取可減少日曬所造成之傷害 (Stahl et al., 2001)，而體外實驗也顯示結合 Vit.E 與  $\beta$ -胡蘿蔔素能加強細胞對 UVA 及 UVB 的抵抗能力，因而減少細胞的氧化壓力及死亡 (Bohm et al., 1998；Offord et al., 2002)。在我們實驗中合併使用類黃酮與  $\beta$ -胡蘿蔔素，在 UVA 照射下也顯著降低  $\beta$ -胡蘿蔔素的促氧化性。在混合抗氧化營養素中， $\beta$ -胡蘿蔔素的角色是否仍為抗氧化劑，或是其他的生理功能，例如促進 gap junction communication，才是  $\beta$ -胡蘿蔔素身本身真正之生理功能，是值得進一步釐清的。

## 六、結論

由本實驗結果可以看出，某些類黃酮確能抑制 UVA 對  $\beta$ -胡蘿蔔素的氧化，而其效果不只來自對 UVA 的遮蔽作用，可能多來自於類黃酮在細胞內對  $\beta$ -胡蘿蔔素氧化產物或其他 UVA 誘發的 ROS 作用而減少  $\beta$ -胡蘿蔔素被 UVA 氧化，進而抑制 UVA 誘發的  $\beta$ -胡蘿蔔素對細胞 DNA 促氧化現象。

## 七、參考文獻

- Astorg P. Food carotenoids and cancer prevention: an overview of current research. *Trends Food Sci Tech* 8, 406-413, 1997.
- Bors W. Heller W. Michel C. Saran M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 186, 343-355, 1990.
- Bors W. Michel C. Stettmaier K. Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors.* 6, 399-402, 1997.
- Bar-Natan R. Lomnitski L. Sofer Y. Segman S. Neeman I. Grossman S. Interaction between beta-carotene and lipoxygenase in human skin. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 28, 935-41, 1996.
- Black HS. Radical interception by carotenoids and effects on UV carcinogenesis. *Nutr. Cancer.* 31, 212-7, 1998.
- Bohm F. Edge R. Lange L. Truscott TG. Enhanced protection of human cells against ultraviolet light by antioxidant combinations involving dietary carotenoids. *Journal of Photochemistry & Photobiology. B - Biology.* 44(3), 211-5, 1998 Jul 31.
- Cao Y. Bors W. Michel C. Stettmaier K. Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors.* 6, 399-402, 1997.
- Cao R. Brakenhielm E. Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols. *J. Nutri. Biochem.* 13, 380-390. 2002.
- Collins, AR. Ma AG. Duthie SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells. *Muta. Res.*, 336, 69-77, 1995.
- Fuhrman B. Volkova N. Rosenblat M. Aviram M. 2000. Lycopene synergistically inhibits LDL oxidation in combination with vitamin E, glabridin, rosmarinic acid, caromonic acid, or garlic acid. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2(3), 491-506.
- Hirvonen T. Virtamo J. Korhonen P. Albanes D. Pietinen P. Flavonol and flavone intake and the risk of cancer in male smokers (Finland). *Cancer Causes Control.* 12,789-96, 2001
- Ishige K. Schubert D. Sagara Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biology & Medicine.* 30(4), 433-46, 2001 Feb 15.
- Knekt P. Kumpulainen J. Jarvinen R. Rissanen H. Heliovaara M. Reunanen A.

- Hakulinen T. Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 560-8, 2002 .
- The alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study group: The effect of vitamin E and beta-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Eng J Med* 330, 1029-1035, 1994.
- 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. *N Eng J Med* 334, 1150-1155, 1996.
- 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(12), 1293-303, 2002 Jun 15.
- Obermuller-Jevic UC. Francz PI. Frank J. Flaccus A. Biesalski HK. Enhancement of the UVA induction of haem oxygenase-1 expression by beta-carotene in human skin fibroblasts *FEBS Letters.* 460(2), 212-6, 1999 Oct 29.
- Pryor WA. Stahl W. Rock CL. Beta-carotene: from biochemistry to clinical trials. *Nutr Rev* 58, 39-53, 2000.
- Pierpoint WS. Flavonoids in the human diet. *Progre. Clin. l & Biolo. Res.* 213, 125-140, 1986.
- Rundhaug JE. Pung A. Read, CM. and Bertram, JS. Uptake and metabolism of beta-carotene and retinal by C3H/10T1/2. *Carcinogenesis* 9, 1541-1545, 1988.
- 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.* 175, 184-191, 1988.
- Stahl W, Heinrich U, Wiseman S, Eichler O, Sies H, Tronnier H. Dietary tomato paste protects against ultraviolet light-induced erythema in humans. *J Nutr.* 131, 1449-51. 2001.
- Wamer WG. Wei RR. Matusik JE. Kornhauser A. Dunkel VC. beta-Carotene uptake, metabolism, and distribution in BALB/c 3T3 cells. *Nutrition & Cancer.* 19, 31-41, 1993.
- Yeh SL. Yang TH. Huang CH. Hu ML. Exposure of calf thymus DNA to autoxidized -carotene results in the formation of 8-oxo-deoxyguanosine. *Food chem.*, 81, 439-445, 2003.



## 八、圖

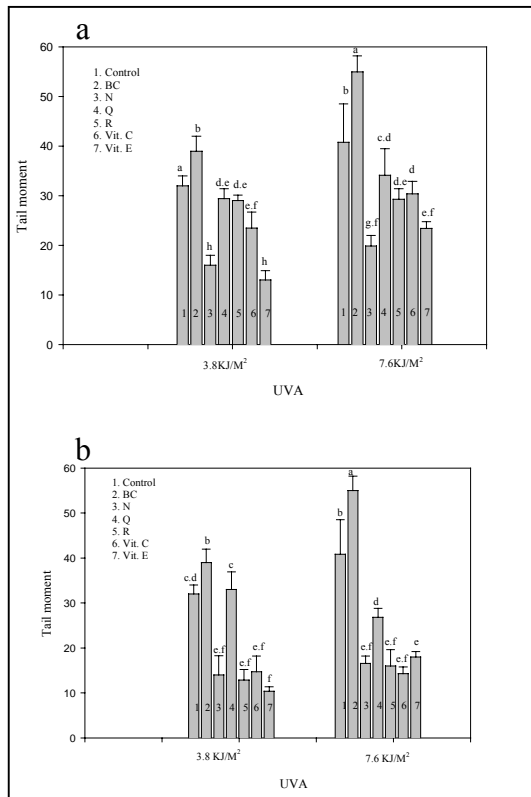


Figure 1. Effect of flavonoids , vitamin C (vitC) or vitamin E (vit E) at ( a ) 10 $\mu$ M and ( b ) 23 $\mu$ M on DNA damage in  $\beta$ -carotene-riched C3H cells irradiated with UVA at 3.8 and 7.6 KJ/m<sup>2</sup>. Cells were pre-incubated in the dark at 37 with 20 $\mu$ M  $\beta$ -carotene (BC) and naringin ( N ) , quercetin ( Q ) rutin ( R ) or vitamin for 1hr , followed by washing with PBS. Control contain 0.002% THF. The value (means $\pm$  S.D., N=3) at the same dose of UVA irradiation sharing a common letter are not significantly different ( $P > 0.05$ ).

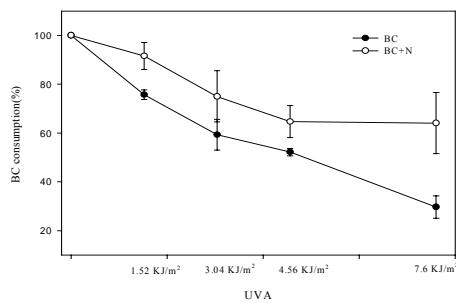


Figure 3. Effect of 23  $\mu$ M naringin (N) on the consumption of incorporated  $\beta$ -carotene (BC) in C3H cells irradiated with UVA. The values are means $\pm$  S.D, N=3.

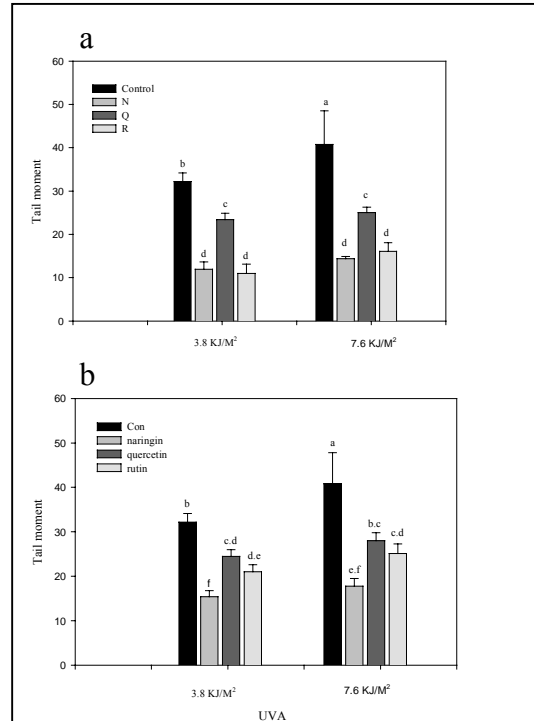


Figure 2. Effect of flavonoids at ( a ) 10 $\mu$ M and ( b ) 23 $\mu$ M on DNA damage in C3H cells irradiated with UVA 3.8 and 7.6 KJ/m<sup>2</sup> .Cells were pre-incubated in the dark at 37 with naringin ( N ) , quercetin ( Q ) or rutin ( R ) for 1hr in BME, followed by washing with PBS. The value (means $\pm$  S.D., N=3) at the same dose of UVA irradiation sharing a common letter are not significantly different ( $P > 0.05$ ).

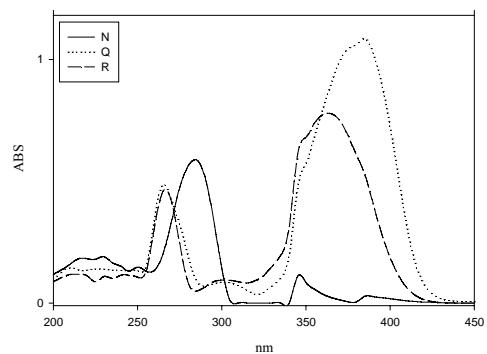


Figure 4. Absorption spectra of naringin ( N ) , quercetin ( Q ) , rutin ( R ) .

## 九、計畫成果自評

研究內容與原計畫大致相符，探討 UVA 作用下，類黃酮對β-胡蘿蔔素促氧化作用的抑制性，在實驗初期共用了五種類黃酮，經試管試驗篩選了三種對β-胡蘿蔔素保護效果較佳之類黃酮進行細胞試驗。實驗結果發現三種類黃酮的確具有抑制β-胡蘿蔔素在細胞中促氧化的情況，我們並且探討了一部份可能作用機制。實驗顯示這兩類營養素合併存在的價值，並對流行病學補充富含β-胡蘿蔔素的蔬菜水果，與單獨補充β-胡蘿蔔素之介入型試驗相矛盾的結果提供了一個可能合理的解釋，現階段的發現已約具發表雛形及應用性，將來預計進一步深入探討類黃酮及β-胡蘿蔔素在各種情形下所扮演的角色及生理活性。