

附件：封面格式

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

※

※

※ PGE2 調控 cytochrome P450 2B1 表現之機制探討

Investigation of mechanisms involved in cytochrome

2B1 expression by PGE2

※

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 90- 2320 - B- 040 - 037 -

執行期間： 90年 8月 1日至 91年 7月 31日

計畫主持人：陳暉雯

共同主持人：

計畫參與人員：

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：中山醫學大學

中華民國 91年 9月 1日

一、摘要

實驗利用初代肝細胞培養模式(Lii et al., 1993; Sidhu et al., 1993), 分別添加 Butaprost 0.01、0.1、1 μ M, 再以 Phenobarbital (PB) 0.05 mM 誘發 CYP 2B1 表現, 觀察 Butaprost 對 CYP 2B1 表現的影響。以 Western Blot 分析後發現 Butaprost 在 1 μ M 時對 PB 誘發 CYP 2B1 有最強的抑制效果, 這個結果與之前 PGE2 處理細胞的結果是一致的。之後利用 Northern Blot 分析, 也得到相同的結果。綜合以上的結果推測 PGE2 可能透過 EP2 receptor 來調控 CYP 2B1 的表現。另外實驗以 PKA 的抑制劑 H-89 (Chen and Hughes-Fulford, 2000) 7.5 μ M 處理初代肝細胞, 然後以 Western Blot 分析發現 PGE2 對 CYP 2B1 的抑制效果會因 PKA 抑制劑的添加有逆轉現象。這個結果建議, PGE2 影響 CYP 2B1 的表現可能是透過 PKA 的路徑。

二、計畫緣由與目的

先前研究發現 PGE2 可以抑制 PB 誘發 CYP2B1 的表現(Tsai et al., 2001), 本研究目的在探討 PGE2 是透過何種 receptor 來執行抑制效果。因為 PGE2 receptor 有四種 subtype 分別是 EP1、EP2、EP3、EP4 (Coleman et al., 1994), 而 EP2 和 EP4 可透過 GTP-結合蛋白質(Gs)活化 adenylyl cyclase, 進而增加胞內 cAMP 濃度(Honda et al., 1993; Nishigaki et al., 1995)。Sidhu and Omiecinski (1995)提出 cAMP 可以

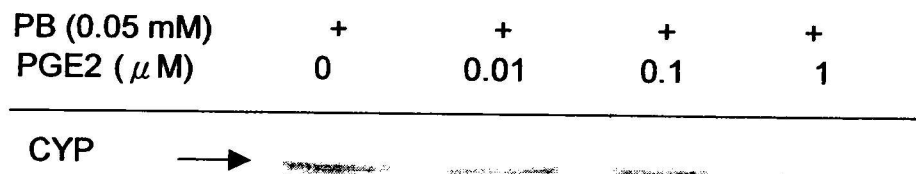
抑制 PB 誘發 CYP2B1 的表現，本實驗目的欲探討 PGE2 透過何種 receptor 來影響 CPY2B1 表現，而 cAMP 與 protein kinase A 是否參與此抑制作用。Butaprost 為 PGE2 的結構相似物 (agonist)，而且對 EP2 receptor 具專一性 (Shibuya et al., 1999)。所以本實驗利用藥理模式來進行此外。

二、實驗方法與材料

以 6~8 週的 SD Rat 為實驗動物，採取二階段膠原蛋白酶肝臟灌流法取得初代肝細胞。初代肝細胞分離後，培養 48 小時，H-89 於 PGE2 或 butaprost 處理前 1 小時添加。以 PGE2 或 butaprost 處理，15 分鐘後再添加 PB。再培養 20 小時，收下細胞，分離 microsome 蛋白質以 Western blot 分析；分離 RNA 以 Northern blot 分析。

三、結果

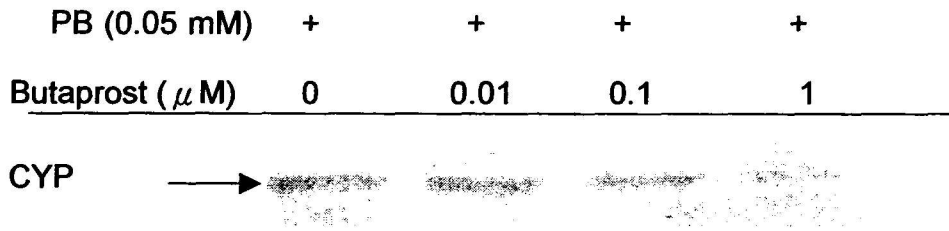
圖一、在不同濃度 PGE2 處理下，對 CYP 2B1 表現的影響



經過 Western Blot 分析後，發現在 PGE2 1 μ M 時，對 CYP 2B1 表現

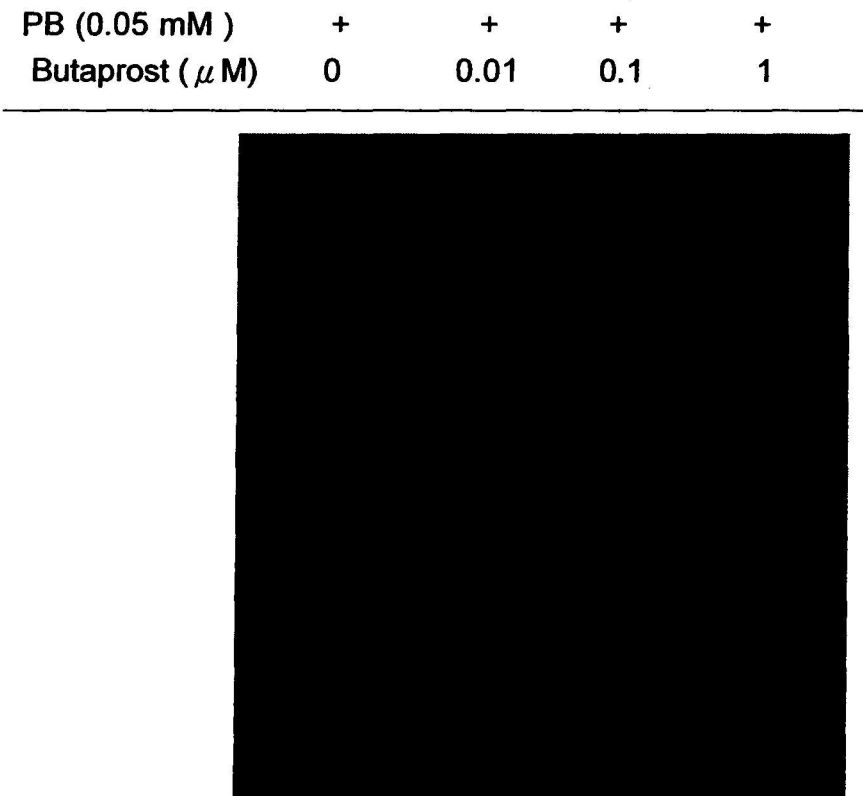
有最強抑制效果。

圖二、在不同濃度 Butaprost 處理下，對 CYP 2B1 表現的影響



經過 Western Blot 分析後，Butaprost 在 1μ M 時，對 CYP 2B1 表現有最強的抑制效果。

圖三、在不同濃度 Butaprost 處理下，對 CYP 2B1 mRNA 表現的影響




表一、添加不同濃度PGE₂ 對胞內cAMP濃度的影響

Treatment	cAMP (%)
Control	100 ^b
PGE ₂ (0.01 μM)	102.3 ^b ± 5.9
PGE ₂ (0.1 μM)	105.2 ^b ± 15.1
PGE ₂ (1 μM)	132.4 ^a ± 16.2

隨著PGE₂濃度增加，胞內cAMP的濃度也隨之上升

圖四、添加H-89後，是否會影響PGE₂抑制CYP 2B1表現

PB (0.05 mM)	+	+	+	+
PGE ₂ (μM)	0.01	0.1	1	1
H-89 (7.5 μM)	-	-	-	+

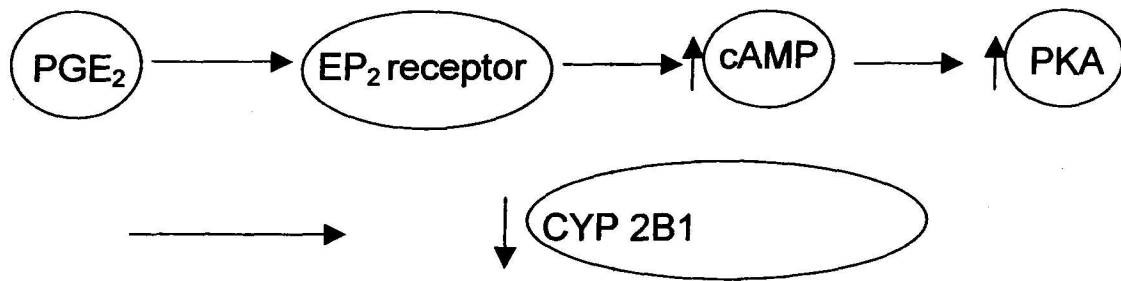
CYP 2B1 → 

Western Blot分析後，結果顯示：

H-89逆轉了PGE₂抑制CYP 2B1表現的效果

四、結論

PGE₂影響CYP 2B1 表現的路徑：



五、計畫結果自評

本計畫已完成，待整理成論文格式即可發表。

六、參考文獻

Chen U, Hughes-Fulford M. (2000) Prostaglandin E2 receptor subtypes in cultured rat microglia and their role in reducing lipopolysaccharide-induced interleukin 1[®] production. *J Neurochem* 72, 565-575.

Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. (1994) International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 46, 205-229.

Honda A, Sugimoto Y, Namba T, Watabe A, Irie A, Negishi M, Narumiya S, Ichikawa A. (1993) Cloning and expression of cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP2 subtype. *J Biol Chem* 268, 7759-7762.

Lii CK, Hendrich S. (1993) Selenium deficiency suppresses the glutathionation of carbonic anhydrase III in rat hepatocytes under oxidative stress. *J Nutr* 123, 1480-1486.

Negishi M, Sugimoto Y, Ichikawa A. (1995) Molecular mechanisms of diverse actions of prostanoid receptors. *Biochim Biophys Acta* 1259, 109-119.

Shibuya I, Tanaka K, Uezono Y, Ueta Y, Toyohira Y, Yanagihara N, Izumi R, Yamashita H. (1999) Prostaglandin E2 induces Ca²⁺ release from Ryanodine/Caffeine-sensitive stores in bovine adrenal medullary cells via EP1-like receptors. *J Neurochem* 73, 2167-2174.

Sidhu JS, Farin FM, Omiecinski CJ. (1993) Influence of extracellular matrix overlay on phenobarbital-mediated induction of CYP2B1, 2B2 and 3A1 genes in primary adult rat hepatocyte culture. *Arch Biochem Biophys* 301, 103-113.

Sidhu JS, Omiecinski CJ (1995) cAMP-associated inhibition of phenobarbital –inducible cytochrome P450 gene expression in primary rat hepatocyte cultures. *J Biol Chem* 270, 12762-12773.

Tsai CF, Lii CK, Yang JJ, Liu K, Lin WL, Chen HW. (2001) Prostaglandin E2 is involved in the increase of cytochrome P-450 2B1 expression by α -tocopherol succinate in primary rat hepatocytes in the presence of phenobarbital. *Nutr Cancer* 41, 188-195.