

計畫編號：DOH93-TD-F-113-018

行政院衛生署九十三年度科技研究計畫

飲食油脂與腫瘤-脂肪酸調控解毒酵素之探討

研究報告

執行機構：中山醫學大學營養科學研究所

計畫主持人：陳暉雯

研究人員：李健群

執行期間： 93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見

目 錄

頁 碼

封面

目錄

摘要

中文摘要 (2—3)

英文摘要 (4—5)

本文

(1) 前言 (6—13)

(2) 材料與方法 (14—18)

(3) 結果 (19—21)

(4) 討論 (22—24)

(5) 結論與建議 (25)

(6) 參考文獻 (26—31)

(7) 圖、表 (32—39)

附錄

計畫名稱：飲食油脂與腫瘤－脂肪酸調控解毒酵素之探討

計畫編號：DOH93-TD-F-113-018

執行機構：中山醫學大學營養科學研究所

計畫主持人：陳暉雯

計畫主持人服務單位：中山醫學大學

計畫主持人職稱：教授

中文摘要

飲食油脂除了能夠提供生物體所需能量外，也是構成細胞膜磷脂質、合成前列腺素及白三烯素不可或缺的原料。許多研究顯示 n-3、n-6 多元不飽和脂肪酸 (PUFA) 可直接或間接調控基因表現，影響細胞生長、代謝及分化。本實驗室先前研究結果已知 n-3 及 n-6 PUFA 皆能抑制 PB 誘發 CYP 2B1 的表現，不論在 protein 或 mRNA level 中皆以花生四烯酸 (Arachidonic acid) 的抑制效果最強，但此一抑制作用機制仍不清楚。已知 Arachidonic acid 可經由環氧化酶 (COX) 代謝成 PGE₂；此外，PGE₂ 可透過 EP2 receptor 誘發胞內 cAMP 增加，進而活化 cAMP-dependent PKA 達到抑制 PB 誘發 CYP 2B1 的作用機制也在先前實驗中被證實。因此，本研究目的在探討 Arachidonic acid 抑制 PB 誘發 CYP2B1 的表現是否透過 COX 代謝成 PGE₂，進而活化 cAMP-dependent PKA pathway。在 PB 誘發大鼠初代肝細胞表現 CYP2B1 實驗模式下，添加 100 μmol/L Arachidonic acid 觀察其對 PB 誘發 CYP2B1 的影響，並利用藥理模式添加 adenylylase 抑制劑 (SQ22536) 及 PKA 抑制劑 (H-89) 觀察 Arachidonic acid 的抑制作用。此外，以 RT-PCR 觀察細胞中 COX 的表現。結果發現 Arachidonic acid 明顯抑制 CYP2B1 的表現，如預處理 SQ22536 或 H-89 則可逆轉此抑制效果。RT-PCR 可偵測到

肝細胞中有 COX-1 的表現但卻無法發現 COX-2。綜合上述實驗結果，推測 Arachidonic acid 可能利用 COX-1 代謝成 PGE₂，進而活化 cAMP-dependent PKA pathway 達到抑制 PB 誘發 CYP2B1 的表現。

關鍵詞：PUFA、Arachidonic acid、PB、CYP2B1、Cytochrome P-450 2B1、EP₂、hepatocytes

Project Title: Dietary fat and tumor-The effects of dietary fatty acids on the expression of detoxification enzymes

Project Number: DOH93-TD-F-113-018

Executing Institute: Chun Shan Medical University

Principal Investigator (P.I.): Haw-Wen Chen

P.I. Position Title: Professor

P.I. Institute: Chun Shan Medical University

Abstract:

Cytochromes P-450 are an important bioactivation-detoxification system in vivo. Its expression is regulated by foreign chemicals and dietary factors, and lipids have been found to regulate its gene expression. We showed previously that PGE₂ decreases CYP2B1 expression in the presence of phenobarbital in rat primary hepatocytes through EP₂ and that cAMP and the downstream cAMP-dependent PKA pathway are involved in this down-regulation. The objective of the present study was to determine the effects of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on PB inducible-CYP2B1 gene expression in rat primary hepatocytes and to determine whether the n-6 fatty acid-arachidonic acid regulated CYP2B1 expression in the presence of phenobarbital in rat primary hepatocytes through its metabolite-PGE₂ and that cAMP and the downstream cAMP-dependent PKA pathway are involved in this down-regulation. We used a primary rat hepatocyte culture model in which EP₂ was present to test our hypothesis. Both n-3 and n-6 PUFA were found to down-regulate the induction of CYP2B1 expression by phenobarbital. The cyclooxygenase inhibitor-indomethacin significantly reversed the down-regulatory effect of arachidonic acid (AA). In the present study, the PGE₂ concentration in primary rat hepatocytes was significantly higher in hepatocytes treated with 100 μmol AA/L than hepatocytes treated with

LA, EPA or DHA. Treatment with 100 $\mu\text{mol AA/L}$ significantly increased formation of PGE_2 than treatment with 1 or 10 $\mu\text{mol AA/L}$ in primary rat hepatocytes, and 20 $\mu\text{mol indomethacin/L}$ (COX inhibitor) decreased 50 % PGE_2 formation of hepatocytes treated with 100 $\mu\text{mol AA/L}$. SQ22536, an adenylate cyclase inhibitor, reversed the down-regulation by AA, as did H-89, a protein kinase A inhibitor. These results suggest that EP_2 and the downstream pathways of cAMP and protein kinase A are involved in the down-regulation of CYP2B1 expression by AA metabolite- PGE_2 in the presence of phenobarbital.

Keywords: PUFA 、 Arachidonic acid 、 PB 、 CYP2B1 、 Cytochrome P-450 2B1 、 EP_2 、 hepatocytes

前言

飲食油脂在生物的成長發育過程中扮演著重要的角色，它不但是能量的來源、細胞膜磷脂質的原料，也可以透過調控基因的表現而影響細胞的代謝、生長以及分化。所以，飲食油脂的生理意義已不再只是傳統上所認為的重要能源或是必須脂肪酸的提供者而已。但過量的油脂攝食卻是體重過重甚且是肥胖的重要原因之一，肥胖又與多種慢性病好發率有著高度相關性，比如糖尿病 (Chen et al., 2003; Stoll, 2002)、高血壓與心血管疾病 (Lev-Ran, 2001)、腫瘤 (Adebamowo et al., 2003; Stoll, 2002) 等；其中，越來越多證據也顯示飲食油脂或脂肪酸的攝取極可能與前列腺癌、乳癌、直腸癌等腫瘤發生有關 (Chen and Hughes-Fulford, 2000; Marnett, 1992; Rose, 1997)。除了間接由流行病學探討此課題外，直接藉由分子生物學方法研究油脂或脂肪酸對脂肪細胞 (adipocytes)、肝細胞、免疫細胞、腫瘤細胞或其它細胞中荷爾蒙/生長因子/神經傳導物質的活性或分泌之影響，或對細胞發育、分化、能量代謝、癌化相關基因的調控等，事實上，已是近年來的主要研究方向 (Korner and Aronne, 2003; Yang et al., 2003)。

飲食油脂影響基因表現的例子中，可簡單的由生物體在攝取不同種類及不等含量油脂時所表現出來的適應現象得到印證。目前為止，特殊脂肪酸所調控的轉錄因子已經在細菌、兩棲類以及哺乳動物中被確認。在哺乳動物中，與脂肪酸相關的轉錄因子至少包括 peroxisome proliferator-activated receptor α , β , γ (PPAR- α , - β , - γ)、HNF4 α 、NF- κ B 及 SREBP1c 等。雖然至目前為止，脂肪酸調控基因表現的機制尚未完全釐清，但已被提出的則有 (Jump and Clarke, 1999)：1) 脂肪酸、fatty acid-coenzyme A 或是氧化脂肪酸直接與胞內轉錄因子結合；2) 脂肪酸代謝物透過與 G-protein 相連結的細胞膜接受器，活化訊息傳遞路徑，影響核內基因表現；3) 氧化脂肪酸(比如：

前列腺素)透過調控胞內鈣離子濃度，進而影響細胞訊息傳遞路徑，而影響核內基因表現。至於在細胞的層次，已知不同的細胞對脂肪酸的反應也有不同，這應與下列因素有關，1) 不同細胞所攝入油脂量的高低以及持續的時間並不相同；2) 細胞是否具有特殊的脂肪酸代謝系統；3) 細胞是否擁有特殊的膜上及胞內接受器；4) 細胞是否具有特殊的轉錄因子。

近來，脂肪酸與基因調控此一研究課題，可說是以多元不飽和脂肪酸與 PPARs 兩者間的關係受到最多的注意，這些年來也有不少突破(Jump, 2002)。Ren 等人(1997)在 PPAR- α -null mice 模式中，證實多元不飽和脂肪酸可促進肝臟過氧化體和微小體中脂肪酸的氧化速率，其中，微小體 cytochrome P450 (CYP)4A2 及過氧化體 acyl-CoA oxidase 兩者的表現需要 PPAR- α 的存在，相對的，脂肪酸合成基因—S14 或 fatty acid synthase (FAS) 的表現則受到多元不飽和脂肪酸的抑制，而且此抑制現象與 PPAR- α 無關，這結果說明了多元不飽和脂肪酸調控肝臟基因表現至少透過二種不同的路徑，一條與 PPAR- α 有關 (PPAR- α dependent)，另一條則與 PPAR- α 無關 (PPAR- α independent)。在以 3T3-L1 脂肪細胞為對象的實驗中，花生四烯酸 (arachidonic acid, 20:4, n-6) 和 eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5, n-3)可抑制 S14 mRNA 的表現(Jump et al., 1993)，且花生四烯酸抑制 S14 的表現受到 cyclooxygenase (COX)抑制劑的阻斷，因此推論花生四烯酸對 S14 mRNA 表現的影響應與前列腺素有關；隨後，Mater 等人(1998)也證實在 3T3-L1 脂肪細胞中，PGE₂、PGF₂ 的確可以抑制 S14 的表現，而且與 pertussis toxin-sensitive Gi/Go 訊息傳遞路徑有關。雖然在 3T3-L1 脂肪細胞中，花生四烯酸調控 S14 基因表現與 COX 及前列腺素有關，但對肝細胞而言，則不盡然相同，PGE₂ 也同樣可以抑制肝細胞脂肪合成基因的表現，且應是 PGE₂ 透過其膜蛋白接受器—EP3 所致，但是花生四烯酸抑制 S14 基因的表現則不

受 COX 抑制劑的影響，顯示花生四烯酸在肝細胞中的效應可能與 COX-1 或是 COX-2 路徑無關(Mater et al., 1999)。進一步利用 S14-CAT 基因轉殖技術，Jump 等人(1999)稍後指出在初代肝細胞，花生四烯酸抑制脂質合成的作用中，PPAR- α 與 DNA 作用的位置是在 thyroid hormone response element 上(-2.8/-2.5 kb)，但是花生四烯酸代謝產物—PGE₂ 所調控的因子卻是作用在 promoter 近端處(-150/-80 bp)。這些結果顯示多元不飽和脂肪酸影響肝臟基因轉錄至少可能透過三種路徑，1) PPAR- α dependent pathway; 2) prostanoid-dependent pathway; 3) PPAR- α and prostanoid-independent pathway。

除了前述直接參與脂肪酸氧化或脂肪酸合成的相關基因受到調控外，事實上，也有不少擔負其他功能基因的表現也可受到飲食油脂的影響，例如，花生四烯酸可藉由穩定 I κ B/NF- κ B complex，抑制 NF- κ B 轉移到細胞核中，而影響前發炎基因 (pro-inflammatory genes) 表現(Stuhlmeier et al., 1997)；Lee 等人 (2001, 2003a,b) 也指出飽和 (lauric acid) 與不飽和脂肪酸 (EPA and DHA) 雖然一樣是透過 Toll-like receptor /PI3K/AKT 調控 RAW 264.7 巨噬細胞株 COX-2 基因的表現，但 lauric acid 的影響是誘發 COX-2 的表現，而 EPA 與 DHA 卻是抑制其表現，此一結果或許也可解釋為何不同飲食油脂與慢性發炎相關疾病的發生有關。COX 和其代謝產物—PGE₂ 在生物體內的免疫反應中，扮演著相當關鍵角色，比如 PGE₂ 即是一個免疫抑制分子 (immunosuppressor)、參與第一型與第二型細胞激素分泌的平衡調控 (Snijdewint et al., 1993; Stolina et al., 2000)、與腫瘤血管生成有關 (Rozic et al., 2001)。近來，Sonoshita 等人 (2001) 與 Yang 等人 (2003) 直接利用基因轉殖鼠 (EP2^{-/-})，分別證實 PGE₂ 接受器 EP2 與腫瘤血管生成及細胞型免疫反應 (cellular immune responses) 和 dendritic cells 的分化有關。目前已有 EP1-4 四型 PGE₂ 接受器在不同細胞被發現，以 EP2 為例，它

與 B 細胞分化 (Fedyk and Phipps, 1996)、T 細胞發生 (Rocca et al., 1999)、巨噬細胞細胞激素分泌 (Nataraj et al., 2001)、樹枝神經細胞 (dendritic cells) 分化 (Yang et al., 2003) 有關。利用 RT-PCR 分析，我們也初步證實大鼠肝細胞中可表現 EP2 與 EP4 mRNA。

本實驗室先前研究也指出 phase I 與 phase II 解毒酵素活性與表現也與飲食油脂含量及種類有關，當大鼠給與不同含量與種類飲食油脂時，大鼠肝臟 pentoxyresorufin O-dealkylase (PROD) 和 N-nitrosodimethylamine demethylase (NDMAD) 解毒酵素活性並不相同 (Chen et al., 1997)，相較於牛油、橄欖油和玉米油飲食組，攝食富含 n-3 PUFA 的 linseed oil 或魚油的大鼠其肝臟 PROD 和 NDMAD 活性均明顯較高 (Chen et al., 1997)，且 PROD 活性變化可由 CYP2B1 蛋白質及 mRNA 表現受到飲食油脂的調控加以解釋 (Chen et al., 2001)；CYP 1A1 和 3A1 及另一重要解毒酵素- π 型麩甘氨酸硫轉移酶 (π form of glutathione S-transferase, PGST) 的表現也一樣是魚油組高於玉米油組，高玉米油組高於低玉米油組 (Chen et al., 2001)，Diethylnitrosamine-PB 誘發肝癌動物模式中，肝前癌細胞 (hepatic preneoplastic foci) 發生也是魚油組少於玉米油組 (Lii et al., 2000)。就脂肪酸調控 CYP 表現機轉而言，目前為止，可以 CYP4A 與 PPAR- α 彼此間的關係表現為代表，相關研究也較多，因為 CYP4A 與長鏈不飽和脂肪酸氧化有關，相對的，就 CYP 2B 家族而言，相關研究則相當少見。

哺乳動物解毒代謝系統主要由混合功能氧化酶 (mixed-function oxidases) 及多種結合酶 (conjugases) 所組成。混合功能氧化酶包括多種 CYP 酵素和 NAD(P)H-CYP 還原酶。雖然在哺乳動物身上至少已發現 50-60 種不同基因，但它們均屬於同一超級基因家族 (super gene family)，依其 DNA 序列相似性可分屬 17 種 CYP 基因家族 (Nelson, 1999)，其中，第 1 至第 4 基因家

族主要負責表現肝臟中混合功能氧化酶活性，不但負責藥物、環境化學物質、以及其它外來毒物的解毒作用，在內生性脂溶性物質的生物轉化作用 (biotransformation) 中也有重要角色。CYP 存在於細胞內平滑內質網膜中，是平滑內質網膜中的主要蛋白質，約佔其蛋白質總量的 5-25%。它們作用的受質非常廣泛，雖仍有一定的受質專一性，但酵素專一性遠較其它胞內代謝酵素差(Gonzalez, 1988)。在 CYP 第 1 至第 4 家族中，一般認為大部分藥物的代謝主要是由第 1、2、3 家族所負責，至於第 4 家族則負責內生性受質的生物轉化作用(Wrighton and Steven, 1992)。CYP 雖名為解毒酵素，但它們同時也參與致癌物的活化，是致癌物所以致癌的必要條件(Guengerich, 1991a,b)，以 CYP 第二家族中的 2B 次家族(subfamily)為例，它不但催化單脂酮、花生四烯酸、月桂酸及多種治療藥物和環境化學物質的氧化作用，也是黃麴毒素 B1 和 benzo[a]pyrene 等致癌物的活化酵素 (Guengerich, 1986)。因此，腫瘤的發生與 CYP 解毒酵素的活化的確存有相當密切的因果關係(Clapper, 2000; Hecht, 2000)。CYP 活性的高低關係到動物的藥物代謝能力，但他們的活性與表現則受到荷爾蒙、性別、物種、營養狀態、食物因子、藥物等多重因子的調控(Waxman and Azaroff, 1992)。

在各種 CYP2B 活化劑中，苯乙基巴比妥酸(Phenobarbital, PB)是最常見的一種，對肝臟 CYP 2B1 的誘發效果可高達 50-100 倍以上 (Waxman and Azaroff, 1992)。除了苯乙基巴比妥酸外，過去數年，本實驗室從動物實驗中，也陸續證實 CYP2B1 的表現受到多種飲食因子的影響，比如脂肪酸(n-3 vs. n-6 不飽和脂肪酸)、維生素 E (α -tocopherol)、大蒜有機硫成分 (二烯丙基硫化物, diallyl sulfide) (Chen et al., 1997, 1998, 2001; Lii et al., 1998)。利用動物活體檢驗肝臟藥物代謝作用或是毒性反應常見於各種實驗設計中，但動物體由於同時存在著複雜性與不易控制性，易導致結果詮釋時出

現模糊地帶，因此不利於分子生物機轉的研究，例如基因調控或訊息傳遞等，此時，細胞模式也就成為最佳替代選擇。在解毒酵素基因各種作用機轉探討上，自然地，培養分離自活體的初代肝細胞就是一個不錯的選擇。目前本實驗室已成功的建立了可表現 CYP2B1 的初代肝細胞模式，對後續探討飲食因子調控 CYP2B1 的表現機制提供了有利的實驗工具。本計畫擬以初代肝細胞為研究模式，探討 n-6 與 n-3 多元不飽和脂肪酸對於 CYP2B1 基因表現的影響及其調控是否與 COX 及 PGE₂ 有關。

一般認為飲食油脂或不同脂肪酸調控基因表現機轉的釐清，在降血脂、抑制腫瘤或慢性發炎相關疾病上將有一定的應用價值，但目前為止，研究進展似乎離目標仍有一段距離，有待繼續努力。就以調控機制較清楚的脂肪氧化或合成相關基因而言，比如 CYP 4A、acyl-CoA oxidase、S14、FAS 等，如前面討論，至少已有 1) PPAR- α dependent pathway; 2) prostanoid pathway; 3) PPAR- α and prostanoid-independent pathway 等機制被提出 (Jump et al., 1999, 2002)。相較於此，脂肪酸在調控 CYP 2B1 表現方面，則少有文獻發表，就現有數據看來，至少可預期 CYP2B1 基因表現應與 PPAR 無關，因為 2B1 基因序列上並未發現 PPAR-responsive element 的存在，因此，我們假設脂肪酸影響 CYP 2B1 基因表現極可能與其代謝產物—前列腺素 E₂ 有關，也就是透過 prostanoid-dependent pathway。CYP 2B1 基因序列上有二個 DNase I-hypersensitive sites—HS1 和 HS2 (Luc et al., 1996)，PB-response element module (PBREM) 即位於 HS2 上 (Trottier et al., 1995)，至於 HS1 上則有 Barbie box、CCAAT box、C/EBP-binding site 和其他核蛋白質結合位置，除了 HS1 及 HS2 這二個重要調控區外，出現在其他調控區中的 glucocorticoid response element (GRE)、activation protein-1 (AP-1) 和 NF- κ B site 也都是可能對象 (Lee et al., 2000; Sueyoshi and Negishi, 2001)。真核細

胞中基因的表現受到眾多轉錄因子的控制，這些蛋白質轉錄因子與目標基因上調控區的特定核苷酸序列結合後，將加速或是減緩轉錄速率，當然轉錄因子的活性則是受到胞內訊號傳遞路徑 (signal transduction pathways) 的控制(Tran-Thi et al., 1995)。已有文獻指出當 human promonocytic cell line U937 以 n-6 花生四烯酸處理時，NF- κ B 的核轉移作用明顯增加，但是 n-3 eicosapentaenoic acid 則無此活化效果(Camandola et al., 1996)；Maziere 等人 (1999)也指出多元不飽和脂肪酸可透過胞內氧化壓力的增加，而活化 AP-1 和 NF- κ B 與 DNA 的結合，且此作用可因抗氧化分子—vitamin E 和 N-acetyl cysteine 的添加而受到抑制，顯示多元不飽和脂肪酸透過胞內氧化壓力的變化調控 AP-1 和 NF- κ B 活化。所以除了 prostanoid-mediated signal pathway 外，當然，透過氧化壓力的變化活化 AP-1 和 NF- κ B，進而改變 CYP2B1 表現之可能性也不能排除，不過本計畫將以 PGE₂-mediated signal pathway 為主要研究對象。

細胞中前列腺素是不飽和脂肪酸透過 COX-1 和 COX-2 作用所生成(Kawamori et al., 1998; Sheng et al., 1997)。雖然 Mater et al. (1999)曾指出初代肝細胞並不表現 COX-1 和 COX-2，但本實驗室利用 RT-PCR 分析，初步資料顯示初代肝細胞中雖無 COX-2，卻能表現 COX-1 mRNA，此一結果將可支持我們先前推論維生素 E 增加 PB 誘發 CYP2B 酵素活性與表現之能力，可能與維生素 E 減少肝臟或肝細胞合成 PGE₂ 有關(Chen et al., 1998; Tsai et al., 2002)，但要釐清不同 n-3 或 n-6 脂肪酸對肝細胞 CYP2B1 基因表現之影響，並證實 PGE₂ 的確在此過程中扮演重要角色，更完整之實驗設計與資料收集仍屬必要，如此，較完整圖像之獲得方屬可能。因此，本計畫預計先以 RT-PCR 分析 COX-1 mRNA 表現，並利用北方墨點法或是西方墨點法加以確認，隨後，再分析不同脂肪酸處理下，肝細胞 PGE₂ 濃度與 CYP2B1

蛋白及 mRNA 表現之變化，除此外，本計畫也將直接添加 PGE₂ 或 PGE₂-receptor (EP2) agonist-butaprost，或間接利用 COX 抑制劑 -indomethacin、adenylate cyclase inhibitor-SQ22536、protein kinase A inhibitor-H89 驗證 PGE₂-mediated pathway 在 n-3 與 n-6 脂肪酸影響肝細胞 CYP2B1 基因表現中扮演的角色。

我們相信透過本計畫執行將可證實 PGE₂-mediated signal pathway 是否在油脂或脂肪酸調控肝細胞 CYP2B1 基因表現中扮演關鍵角色，此一結果也將增進我們對不同油脂與解毒酵素表現間甚或與腫瘤發生間之相關機轉更進一步瞭解。

材料與方法

1. SD 大鼠初代肝細胞分離

肝細胞分離採二階段灌流方式(Lii et al., 1993)，但為使細胞能於培養期間正常表現 CYP 活性，培養條件將做部份修改(Sidhu et al., 1993)。方法如下：6-8 週齡的雄性 SD 大鼠先以腹腔注射(i.p.) sodium pentobarbital (80 mg/kg body weight) 麻醉，剪開腹腔後，以頭皮針經肝門靜脈灌洗，第一階段先以內含 0.75 mM EGTA、100 units/ml penicillin 和 1 mg/ml streptomycin 之 calcium-free Earle's balanced salt solution (EBSS, pH 7.4) 將肝中血液灌洗出(25 ml/min)。再以 200 ml 含 100 units/ml penicillin、1 mg/ml streptomycin、1.8 mM CaCl₂、0.8 mM MgCl₂ 及 50 mg 膠原蛋白酶(collagenase IV)之 EBSS (pH 7.4) 進行第二次灌洗，流速將減為每分鐘 20 ml。大約十分鐘消化可使得肝臟變軟且組織失去彈性，此時即可將肝臟取出體外，放置於過濾用的尼龍網上(200 μm, Tetko)，輕柔攪拌於含 10 mM HEPES、2 mM L-glutamine、100 units/ml penicillin、1 mg/ml streptomycin、1 μM dexamethasone 及 ITS⁺ (6.25 μg/ml insulin、6.25 μg/ml transferrin、6.25 ng/ml selenious acid、1.25 mg/ml BSA 及 5.35 μg/ml linoleic acid)之 RPMI-1640 (pH 7.4) 中，將肝細胞磨出並以 50 g 低速離心 2 mins。分離後的細胞再以上述不含 ITS⁺ 之 RPMI-1640 清洗二次(50 g，2 mins)，即可完成肝細胞的清洗工作。為了更有效分離健康之肝實質細胞，將細胞懸浮液中加入等量 percoll 溶液(percoll：10X Hank's buffer=9：1)，進行一次等密度離心(350 g，10 mins)。隨後細胞再以上述 RPMI-1640 (不含 ITS⁺)清洗二次(50 g，2 mins)。完成清洗過程後，將所得肝細胞懸浮於同磨取肝細胞之 RPMI-1640 培養液中。利用 0.4% trypan blue 計算細胞存活率，再將細胞密度調整成 6×10⁵/ml，分別將 5 ml 細胞懸浮液注入直徑 60 mm 已預先以 collagen 處理過的培養皿

上，然後置於 37 °C 含 5 % CO₂ 的培養箱中。3 小時後，更換培養液，並將細胞培養液所含之 dexamethasone 降為 0.1 μM，一小時後再加入 Matrigel (5 mg/ml)，最終濃度為 233 μg/ml (Sidhu et al.,1993)，之後每天更換一次新鮮培養液，並依實驗做不同處理。

2. 脂肪酸製備：

加入細胞培養的脂肪酸製備方式參考 Mater 等人(1999)所提的方法。實驗中所使用之 arachidonic acid (AA)、linoleic acid (LA)、docosahexaenoic acid (DHA)及 eicosapentaenoic acid (EPA)均購自 Cayman Chemical Co.，製備方法簡述如下：脂肪酸預先溶於乙醇中，並將濃度調整成 100 mM，每一樣本同時加入 20 μM α-tocopherol 及 0.1% BHT 以防止脂質過氧化。脂肪酸使用前，加入牛血清白蛋白(BSA) 調製 FA-BSA complex，FA：BSA 比例(molar ratio)為 6：1。

3. RT-PCR：

利用 RT- PCR 觀察 COX-1 及 COX-2 mRNA 在肝細胞中表現，同時 CYP 2B1 Northern blot 分析所用探針也將以此 RT-PCR 製備。COX-1 基因所設計的兩條引子分別為：5'-CTTCCGTGTGCCAGATTACCC-3' (nucleotides 1795 to 1815 bp) 和 5'-GGCTGGCCTAGAACTCACTGC-3' (nucleotides 2248 to 2268 bp) (GeneBank™ accession number U03388)；COX-2 基因所設計的兩條引子分別為：5'-TCTCCCTGAAACCTTACACAT-3' (nucleotides 1367 to 1387 bp) (GeneBank™ accession number L20085)和 5'-GTTGAACGCCTTTTGATTAGT-3' (nucleotides 1805 to 1785 bp);而 CYP 2B1 二條引子分別為 5'-GGATGGGAAAGAGGAGTGTGGA-3'和 5'-CTGG AGGATGGTGGTGAAGAAG-3'，PCR 條件分別為 94°C denature 3 分鐘，

後接著 40 個循環，每個循環分別是 94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒，最後再於 72°C 中 7 分鐘。

4. 肝細胞處理：

肝細胞離體培養 48 小時後，加入新鮮配製之 50 μ M、100 μ M、200 μ M 不等濃度之 n-3 或 n-6 脂肪酸，控制組則只含相同濃度之 BSA、vitamin E 和 BHT，乙醇的最終濃度為 0.15 % ；部分肝細胞則是加入脂肪酸前先以 20 μ M indomethacin、1-1000 nM PGE₂、10-1000 nM butaprost (PGE₂ receptor-EP2 agonist)、0.1-1.0 mM SQ22536 (adenylate cyclase inhibitor)、7.5 μ -MH89 (protein kinase A inhibitor)預處理 30 min。脂肪酸處理 4 小時後，再加入 0.1 mM PB，20 小時後，收集胞外液分析 PGE₂ 濃度，或收取細胞樣本，分別以 GC 分析胞內脂肪酸攝入情形，Western blot 及 Northern blot 分析不同脂肪酸對 PB 誘發 CYP 2B1 表現的影響。

5. 肝臟脂肪酸分析(Chen et al., 1997)：

肝細胞清洗後，加入 potassium phosphate buffer (7.4 mM K₂HPO₄、2.6 mM KH₂PO₄ 及 1.15 % KCl, pH 7.4)，刮取細胞，加入 2 ml methanol/benzene 混合液 (v/v 4:1) 萃取脂質，經皂化、甲基化處理後，以氣相層析儀(gas chromatograph, GC)進行脂肪酸組成之分析。分析之條件：採用日本日立氣相層析儀 (Hitachi GC, G-3000)，配有火焰離子偵測器 (flame ionization detector, FID)，裝有毛細管柱(SP 2330 fused silica capillary column, 30 m X 0.32 mm I.D.)；初溫 150°C，維持 8 分鐘，再以每分鐘 3°C 計畫升溫到 190 °C，然後維持恆溫；載送氣體 (carrier gas) 採用氮氣，1.68 ml/min；樣品注入區(injection port) 與偵測區(detection port)溫度為 220°C，樣品注入方式採 split mode, split ratio 為 1 : 20；積分儀(Chromato-Integrator)採用日本日

立公司 D-2500 進行成分峰(peak)之積分工作。

6. PGE₂ 分析：

胞外液 PGE₂ 濃度將以商業套件 (Cayman, MI) 分析。

7. Microsome 製備及 Western blot：

肝細胞以 PBS 清洗二次，加入 0.01 M phosphate buffer (7.4 mM K₂HPO₄、2.6 mM KH₂PO₄ 及 1.15 % KCl, pH 7.4)，刮取細胞，以超音波震破，9,000 g 離心 30 分鐘，取上清液，再於 105,000 g 下離心 1 小時，即可取得肝細胞微小體。將微小體懸浮於含 35 mM K₂HPO₄、15 mM KH₂PO₄ 及 1 mM EDTA 之緩衝液(pH 7.7) 中，蛋白質濃度測定後(Lowry et al., 1951)，將每一樣本蛋白質濃度調整為 0.5 mg/ml。取 7.5μg 蛋白質於 10 % SDS-PAG 中電泳分離(Laemmli, 1972)，再轉印到 PVDF membrane 上，先以 5 % 脫脂奶粉溶液行 blocking，加入 CYP 2B1 polyclonal antibody，室溫下進行一小時反應，反應完成後以 20 mM Tris-HCl/140 mM NaCl/0.2% Tween-20 緩衝液(pH 7.4)清洗二次，再與 HRP-conjugated rabbit anti-goat IgG 反應一小時，清洗二次後，即可加入 diaminobenzidine (DAB)及 H₂O₂ 使之呈色。

8. RNA 萃取及 Northern blot (Chen et al., 2001)

肝細胞的 total RNA 將採用 Trizol reagent 抽取，方法如下：細胞先以冰浴的 phosphate-buffered saline (PBS)清洗二次，加入 1 ml Trizol reagent，靜置 5 分鐘後刮取細胞，移入 1.5 ml 微量試管中，加入 100 μl chloroform 充分混合，靜置於室溫 2~5 分鐘，以 4°C、11,000g 離心 10 分鐘，吸取含 RNA 的上層液並加入 250 μl isopropanol 混合均勻，靜置 10 分鐘使 RNA 沉澱，

再以 4°C、11,000g 離心 10 分鐘，倒除上層液，加入 1 ml 70 % ethanol 清洗殘餘的鹽類，再於 4°C 以 5,000g 離心 5 分鐘，RNA 沉澱物浸泡於 1 ml 70 % ethanol 中，即可保存於 -20°C 或直接加入 50 μ l 的無菌 ddH₂O 溶解 RNA，進行定量。RNA 定量後，取 20 μ g RNA 溶於 20 ml 新鮮配製之 RNA sample buffer (50 % Formamide、6 % Formaldehyde、1X MOPS buffer 及 0.1 mg/ml EtBr) 中，以 75°C 加熱 5 mins，冷卻後即可點置於洋菜膠(1 % agarose、1X MOPS、6% Formaldehyde) 樣品槽中，於 25 伏特下電泳，隔天早上取出洋菜膠，將 RNA 轉印至 Hybond[®]-N nylon membrane 上，24 小時後，取下 nylon membrane，完成 RNA 與 membrane 的 cross-linking 反應後可供作雜交反應之用。

方法如下：³²P 標定探針製備(NEB Random Priming Reaction kit)，步驟簡述如下：將含有 25 ng 之 template DNA (CYP 2B1、iNOS) 溶於 33 μ l 二次水中，先置於 95°C 中 denature 5 mins，再冰浴 5 mins，依序加入 5 μ l 10X labeling buffer、2 μ l dATP、2 μ l dTTP、2 μ l dGTP、5 μ l ³²P dCTP (3,000 Ci/mmol)、1 ml DNA polymerase，於 37°C 下反應 120 mins，加入 200 μ l TE buffer 終止反應，取出探針混合液，以 Sephadex G25 管柱分離，將通過管柱之溶液收集起來，以 95°C denature 5 mins，再冰浴 5 mins，至此即完成探針製備。取出轉印後的 nylon membrane，浸泡於 10 ml prehybridization buffer (5X SSPE、10X Denhardt's、100 μ g/ml single-strand DNA、2 % SDS 及 50 % formamide)，於 42°C 下 blocking 2 小時，加入先前製備好的探針，再置於 42°C 中反應一個晚上。隔天，取出 membrane，先後以 2X SSC/0.05 % SDS 溶液及 0.1X SSC/0.1 % SDS 溶液清洗，並以蓋格計數器偵測膜上放射線的變化，壓片後即可定量 mRNA 表現。

結果

一、RT-PCR 分析肝細胞 COX 之表現

結果如圖一所示，以 RT-PCR 分析發現 SD 大鼠初代肝細胞中僅表現環氧化酶-1(cyclooxygenase-1, COX-1) mRNA，以 LPS 處理肝細胞後則無表現誘發型(inducible) COX-2 mRNA。

圖二、RT-PCR 分析肝細胞 EP₂ 之表現

本實驗主要觀察 SD 大鼠初代肝細胞是否表現 prostaglandin E2 receptor (EP₂)，由圖二結果顯示，肝細胞中確實表現 EP₂ (lane 2)，其 RT-PCR 產物大小為 408 base pairs。Lane 3 及 Lane 4 PCR products 分別來自 SD 大鼠腎臟及脾臟組織，在本實驗中作為 negative control 及 positive control。

圖三、PGE₂ 對 PB 誘發 CYP 2B1 protein 及 mRNA 表現之影響

本實驗室先前研究已證實，PGE₂ 具有抑制 PB 誘發 CYP2B1 基因表現之現象，此實驗再次利用 Western blot 及 Northern blot 分析此抑制作用，結果顯示(如圖三)，無論在蛋白質 level (A)或 mRNA level (B)，PGE₂ 皆可抑制 PB 誘發 CYP2B1 表現，其中以 1 μmol/L PGE₂ 抑制效果最顯著。

圖四、Butaprost 對 PB 誘發 CYP 2B1 protein 及 mRNA 表現之影響

先前研究已發現 PGE₂ 需要透過特殊 PGE₂ receptor (EP)執行胞內相關訊息傳遞之基因調控，本實驗利用 EP₂ 專一性促進劑-butaprost 探討 EP₂ 是否在 PGE₂ 抑制 CYP2B1 表現過程中扮演重要角色。結果顯示(圖四)，butaprost 可抑制 PB 誘發 CYP2B1 表現，此抑制作用隨 butaprost 劑量呈現正相關。

圖五、Adenylate cyclase inhibitor 對 PGE₂ 抑制 CYP2B1 mRNA 表現之影響

先前研究發現，cAMP-dependent protein kinase A 訊號途徑參與調控多種 PB 誘發型細胞色素 P450 基因表現，本實驗欲探討 PGE₂ 是否透過活化 cAMP 達到抑制 CYP2B1 基因表現，由圖五結果顯示，無論在蛋白質 level (A) 或 mRNA level (B)，預處理 adenylate cyclase 抑制劑皆可逆轉 PGE₂ 抑制 CYP2B1 表現，此抑制呈現劑量關係。

圖六、Protein kinase A inhibitor 對 PGE₂ 抑制 CYP2B1 mRNA 表現之影響

本實驗欲探討 PGE₂ 是否透過活化 PKA 達到抑制 CYP2B1 基因表現，由圖六結果顯示，無論在蛋白質 level (A) 或 mRNA level (B)，預處理 protein kinase A 抑制劑皆可逆轉 PGE₂ 抑制 CYP2B1 表現，此抑制呈現劑量關係。

圖七、在 PB 處理下，COX inhibitor 對 PUFA 調控 CYP2B1 mRNA 表現之影響

本實驗欲探討多不飽和脂肪酸(PUFA)對 PB 誘發 CYP2B1 基因表現之影響，並利用 COX 抑制劑觀察 PGE₂ 在此調控過程中扮演何種角色。圖七結果顯示，不同 PUFA 皆會抑制 PB 誘發 CYP2B1 mRNA 表現，其中以花生四烯酸(arachidonic acid, AA)及 DHA (docosahexaenoic acid)抑制效果最顯著，如預處理 20 μmol/L COX 抑制劑-indomethacin 則阻斷 PUFA 之抑制作用。

圖八、不同 PUFA 對肝細胞分泌 PGE₂ 之影響

本研究進一步觀察不同種類 PUFA 對肝細胞分泌 PGE₂ 之影響，結果發現以 AA 處理肝細胞 24 小時後，其細胞 PGE₂ 分泌量顯著高於 LA (linoleic

acid)、EPA (eicosapentaenoic acid)和 DHA 處理組。

圖九、不同濃度 AA 對肝細胞分泌 PGE₂ 之影響

分別以不同濃度 AA (1, 10 and 100 $\mu\text{mol/L}$)處理肝細胞 24 小時後發現，100 $\mu\text{mol/L}$ AA 高濃度處理組之肝細胞 PGE₂ 分泌量明顯高於控制組(未添加 AA)，而其它兩 AA 低濃度組(1 and 10 $\mu\text{mol/L}$)與控制組並無顯著差異。

圖十、COX inhibitor 對 AA 誘發肝細胞分泌 PGE₂ 之影響

已知 AA 為 PGE₂ 之先驅物(precursor)，其可透過環氧化酶(COX)作用產生，由本實驗結果顯示，預處理 COX 抑制劑-indomethacin 確實明顯抑制 AA 高濃度(100 $\mu\text{mol/L}$)誘發肝細胞分泌 PGE₂，此抑制效果約達 50%。

圖十一、Adenylate cyclase inhibitor 對 AA 抑制 CYP2B1 mRNA 表現之影響

本實驗欲探討 PGE₂ 之先驅物 AA 是否也是透過活化 cAMP 達到抑制 CYP2B1 基因表現，由圖十一(A)結果顯示，AA 高濃度(100 $\mu\text{mol/L}$)明顯抑制 CYP2B1 mRNA 表現，如預處理 0.4 mmol/L adenylate cyclase-SQ22536 抑制劑則可逆轉 PGE₂ 抑制 CYP2B1 mRNA 表現。圖十一(B)為 CYP2B1 mRNA 表現之量化圖(以 18S rRNA 作為 internal control)。

圖十二、Protein kinase A inhibitor 對 AA 抑制 CYP2B1 mRNA 表現之影響

本實驗欲探討 PGE₂ 之先驅物 AA 是否也是透過活化 protein kinase A 達到抑制 CYP2B1 基因表現，由圖十二(A)結果顯示，AA 高濃度(100 $\mu\text{mol/L}$)明顯抑制 CYP2B1 mRNA 表現，如預處理 7.5 $\mu\text{mol/L}$ protein kinase A 抑制劑-H89 則可逆轉 PGE₂ 抑制 CYP2B1 mRNA 表現。圖十二(B)為 CYP2B1 mRNA 表現之量化圖(以 18S rRNA 作為 internal control)。

討論

先前研究已經證實 cAMP-PKA pathway 參與調控許多細胞生理反應，例如細胞代謝、增生及基因轉錄作用，此外也有其它研究證實 cAMP 和 PKA 活化物可抑制 PB 誘發 CYP2B1/2 及 CYP3A1 基因表現。然而本實驗室先前研究發現，在 SD 大鼠初代肝細胞實驗模式下，PGE₂ 會抑制 PB 誘發 CYP2B1 基因表現，但此一抑制作用機制仍有待釐清。PGE₂ 執行生理、生化反應必須透過膜上 G-protein coupled receptor (prostanoid EP receptor, EP)，啟動二級訊息傳遞進而調控相關基因表現。目前已有四種 EP 被發現，分別為 EP1, EP2, EP3, EP4，此四種 EP 具有不同的功能且有組織特異性。

本研究中發現，PGE₂ 會抑制 PB 誘發 CYP2B1 基因表現(圖三)，其可能透過具 cAMP-stimulated 之 EP2 作用，故利用 RT-PCR 偵測 SD 大鼠初代肝細胞中是否表現 EP2，結果證實肝細胞中確實會表現 EP2(圖二)，此一結果與 Fennekohl 等人研究結果有異，其認為在萃取大鼠肝細胞(hepatocytes)過程中會夾雜有 0.1~1% kupffer cells，此 kupffer cells 會表現 EP2，而肝細胞本身並不會表現 EP2；為了排除本實驗室所萃取之肝細胞中夾雜有 kupffer cells，利用 LPS 可大量誘發 kupffer cells 表現 COX-2 基因的特性，將 LPS 處理本實驗之肝細胞萃取液後，以 RT-PCR 偵測 COX-2 表現，結果發現(圖一)，肝細胞液中並無 COX-2 表現，此一結果正時肝細胞本身確實可表現 EP2；其它文獻 (Melien, 1988)也指出，不同的細胞培養環境及藥物誘發也可能影響 EP 的表現。

文獻證實，PGE₂ 所誘發之 cAMP 在調控許多細胞生理反應中扮演重要角色。Sidhu and Omiecinski (1995)發現，增加 cAMP 生成可抑制 PB 誘發 CYP2B1 基因表現，因此，本實驗也利用不同濃度 PGE₂ 處理肝細胞，發現胞內 cAMP 生成量隨 PGE₂ 處理濃度的增加而增加，其中以 1 μmol/L PGE₂

誘發 cAMP 生成效果最顯著(表一)，此已結果可以反映出 1 $\mu\text{mol/L}$ PGE₂ 對抑制 CYP2B1 明顯大於 0.01 與 0.1 $\mu\text{mol/L}$ PGE₂ 處理組。由以上證據顯示，PGE₂ 抑制 PB 誘發 CYP2B1 基因表現可能透過 cAMP，故本實驗利用 EP2 專一性促進劑(agonist)-butaprost 觀察其是否參與此抑制作用，結果發現(圖四)，butaprost 抑制 PB 誘發 CYP2B1 基因，此抑制效果與 PGE₂ 相似(圖三)。推測 EP2 確實參與 PGE₂ 抑制 CYP2B1 表現。

許多證據顯示，cAMP-dependent PKA 參與抑制 PB 誘發 CYP 相關基因表現，由本實驗結果證實，添加 0.4 mmol/L adenylyl cyclase-SQ22536 抑制劑可逆轉 PGE₂ 抑制 CYP2B1 mRNA 及蛋白表現且預處理 7.5 $\mu\text{mol/L}$ protein kinase A 抑制劑-H89 亦可逆轉 PGE₂ 抑制 CYP2B1 mRNA 及蛋白表現。由以上結果推測 PGE₂ 可能透過 EP2 receptor，進而活化 cAMP-dependent PKA 訊息傳遞途徑達到抑制 PB 誘發 CYP2B1 基因表現。

本實驗欲探討多不飽和脂肪酸(PUFA)對解毒代謝酵素 CYP2B1 基因表現之影響。由圖七結果顯示，n-3 (EPA, DHA)及 n-6 PUFA (AA, LA)皆能抑制 PB 誘發 CYP 2B1 的表現，其中以 AA 及 DHA 的抑制效果最顯著。根據先前研究證實 PGE₂ 可抑制 CYP2B1 基因表現，推測 AA 抑制 CYP2B1 基因表現可能是透過 COX 代謝成 PGE₂ 所影響。如果欲處理 COX 抑制劑則會阻斷 AA 抑制 CYP2B1 mRNA 表現(圖七)。本實驗利用不同 AA 濃度，分別為 1, 10 and 100 $\mu\text{mol/L}$ 處理肝細胞 24 小時後發現，100 $\mu\text{mol/L}$ AA 明顯增加肝細胞 PGE₂ 分泌量(圖九)，顯示給予較高濃度 AA，可經由肝細胞 COX-1 產生較高量的 PGE₂，此一 AA 濃度才可達到顯制抑制效果，如預先給予 COX 抑制劑-indomethacin 後再添加 AA，則明顯降低肝細胞 PGE₂ 的生成量(圖十)，由以上結果可確知 AA 抑制 CYP2B1 基因表現主要透過其代謝產物 PGE₂。由圖八可知，DHA 並非為 PGE₂ 之先驅物，然而 DHA 也可明顯抑制 CYP2B1

mRNA 表現(圖七)，推測 DHA 抑制 PB 誘發 CYP2B1 基因表現之機制可能並非透過 PGE₂。

先前研究已證實 PGE₂ 透過活化 cAMP-dependent PKA 訊息傳遞途徑達到抑制 PB 誘發 CYP2B1 基因表現。本實驗為再次確認 AA 抑制 CYP2B1 基因表現主要透過其代謝物 PGE₂ 活化 cAMP-dependent PKA 訊息傳遞途徑所致，分別處理 0.4 mmol/L adenylyl cyclase-SQ22536 抑制劑及 7.5 μmol/L protein kinase A 抑制劑-H89，結果發現 SQ22536 與 H89 確實可逆轉 AA 抑制 CYP2B1 mRNA 表現，此一結果與 SQ22536 及 H89 影響 PGE₂ 抑制作用結果一致，證實 AA 抑制 CYP2B1 基因表現主要透過其代謝物 PGE₂ 活化 cAMP-dependent PKA 訊息傳遞途徑所致。

結論與建議

AA 抑制 CYP2B1 基因表現主要透過其代謝物 PGE₂ 經 EP2 receptor 活化 cAMP-dependent PKA 訊息傳遞途徑所致。然而除了 AA 外，其它多不飽和脂肪酸也可能透過其它訊息傳遞途徑調控 CYP2B1 基因表現。

參考文獻

Adebamowo CA, Ogundiran TO, Adenipekun AA, Oyeseun RA, Campbell OB, Akang EE, Rotimi CN, Olopade OI: Waist-hip ratio and breast cancer risk in urbanized Nigerian women. *Brest Cancer Res* 2003; 5: 18-24.

Camandola S, Leonarduzzi G, Musso T, Varesio L, Carini R, Scavazza A, Chiarpotto E, Baeuerle PA, Poli G: Nuclear factor- κ B is activated by arachidonic acid but not by eicosapentaenoic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 229: 643-647.

Chen HC, Jensen DR, Myers HM, Eckel RH, Farese RV Jr: Obesity resistance and enhanced glucose metabolism in mice transplanted with white adipose tissue lacking acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1. *J Clin. Invest* 2003; 111: 1715-1722.

Chen HW, Lii CK, Wu MH, Ou CC, Sheen LY: Amount and type of dietary lipid modulate rat hepatic cytochrome P-450 activity. *Nutr and Cancer* 1997;29: 174-180.

Chen HW, Lii CK, Sung WC, Ko YJ: Effect of vitamin E on rat hepatic cytochrome P-450 activity. *Nutr and Cancer* 1998; 31:178-183.

Chen HW, Yang JJ, Tsai CW, Wu JJ, Sheen LY, Ou CC, Lii CK: Dietary fat and garlic oil independently regulate hepatic cytochrome P450 2B1 and the placental form of glutathione S-transferase expression in rats. *J Nutr* 2001;131: 1438-1443.

Chen Y and Hughes-Fulford M: Prostaglandin E2 and the protein kinase A pathway mediate arachidonic acid induction of s-fos in human prostate cancer cells. *Br J Cancer* 2000;82: 2000-2006.

Clapper ML: Genetic polymorphism and cancer risk. *Curr Oncol Rep* 2000;2: 251-256.

Fedyk ER, Phipps RP: Prostaglandin E2 receptors of the EP2 and EP4

subtypes regulate activation and differentiation of mouse B lymphocytes to IgE-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93: 10978-10983.

Gonzalez FJ: The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol Rev* 1988;40: 243-288.

Gonzalez FJ, Peters JM, Cattley RC: Mechanism of action of the nongenotoxic peroxisome proliferators: role of the peroxisome proliferator-activator receptor alpha. *J Natl Cancer Inst* 1998;90: 1702-1709.

Guengerich FP: in Mammalian Cytochrome P-450 (Guengerich FP, ed.) 1986;Vol. 1, pp. 1-54, CRC Press, Boca Raton, FL.

Guengerich FP: Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem Res Toxicol* 1991a; 4:391-407.

Guengerich FP: Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. *J Biol Chem* 1991b; 266: 10019-10022.

Hecht SS: Inhibition of carcinogenesis by isothiocyanates. *Drug Metab Rev* 2000;32: 395-411.

Jump DB: Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene expression. *Curr Opin Lipidol* 2002;13: 155-164.

Jump DB, Clarke SD: Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu Rev Nutr* 1999;19: 63-90.

Jump DB, Clarke SD, MacDougald O, Thelen A: Polyunsaturated fatty acids inhibit S14 gene transcription in rat liver and cultured hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90: 8454-8458.

Jump DB, Thelen A, Mater M: Dietary polyunsaturated fatty acids and hepatic gene expression. *Lipids* 1999; 34: S209-S212.

Kawamori T., Rao CV, Seibert K, Reddy BS: Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1998;58: 409-412.

Korner J, Aronne LJ: The emerging science of body weight regulation and

its impact on obesity treatment. *J Clin Invest* 2003;111: 565-570.

Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 1970;277: 680-685.

Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D: Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001;276: 16683-16689.

Lee JY, Plakidas A, Lee WH, Heikkinen A, Chanmugam P, Bray G, Hwang DH: Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 2003a ;44: 479-486.

Lee JY, Ye J, Gao Z, Youn HS, Lee WH, Zhao L, Sizemore N, Hwang DH: Reciprocal modulation of TLR4-signaling pathways involving MyD88 and PI3K/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 2003b; 278: 37041-37051.

Lee SH., Wang XI, DeJong J: Functional interactions between an atypical NF- κ B site from the rat CYP2B1 promoter and the transcriptional repressor RBP-J κ /CBF1. *Nucleic Acid Res* 2000;28: 2091-2098.

Lev-Ran A: Human obesity: an evolutionary approach to understanding our bulging waistline. *Diabetes Metab Res Rev* 2001;17: 347-362.

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

Lii CK, Ou CC, Liu KL, Liu JY, Lin WL, Chen HW: Suppression of altered hepatic foic development by a high fish oil diet compared with a high corn oil diet in rats. *Nutr and Cancer* 2000;38: 50-59.

Lii CK, Sung WC, Ko YJ, Chen HW: α -Tocopherol acetate supplementation enhances rat hepatic cytochrome PROD activity in the presence of phenobarbital induction. *Nutr and Cancer* 1998;32: 37-42.

Lowry O, Rosebrough N, Farr N, Randall R: Protein measurement with the

Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193: 265-275.

Luc PV, Adesnik M, Ganguly S, Shaw PM: Transcriptional regulation of the CYP 2B1 and CYP 2B2 genes by C/EBP-related proteins. *Biochem Pharmacol* 1996;51: 345-356.

Marnett LJ: Aspirin and the potent role of prostaglandins in colon cancer. *Cancer Res* 1992;52: 5575-5589.

Mater MK, Pan DA, Bergen WG, Jump DB: Arachidonic acid inhibits lipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes through a prostanoid pathway. *J Lipid Res* 1998;39: 1327-1334.

Mater MK, Thelen AP, Jump DB: Arachidonic acid and PGE₂ regulation of hepatic lipogenic gene expression. *J Lipid Res* 1999;40: 1045-1052.

Melien O, Winsnes R, Refsnes M, Gladhaug IP, Christoffersen T: Pertussis toxin abolishes the inhibitory effects of prostaglandins E1, E2, I2 and F2 alpha on hormone-induced cAMP accumulation in cultured hepatocytes. *Eur J Biochem* 1988; 172: 293-297.

Nataraj C, Thomas DW, Tilley SL, Nguyen MT, Mannon R, Koller BH, Coffman TM: Receptors of prostaglandin E₂ that regulate cellular immune responses in the mouse. *J Clin Invest* 2001;108: 1229-1235.

Nelson D: Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys* 1999;369: 1-10.

Pawar A, Jump DB: Unsaturated fatty acids regulation of PPAR activity in rat primary hepatocytes. *J Biol Chem* 2003; 278:35931-35939.

Ren B, Thelen AP, Peters JM, Gonzalez FJ, Jump DB: Polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic fatty acid synthase and S14 gene expression does not require peroxisome proliferator-activated receptor α . *J Biol Chem* 1997;272: 26827-26832.

Rocca B, Spain LM, Ciabattoni G, Patrono C, FitzGerald GA: Differential expression and regulation of cyclooxygenase isozymes in the thymic stromal

cells. *J Immunol* 1999;162: 4589-4597.

Ross DP: Dietary fatty acids and cancer. *Am J Clin Nutr* 1997;66: 998S-1003S.

Rozic JG, Chakraborty C, Lala PK: Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis. *Int J Cancer* 2001;93: 497-506.

Shaw PM, Edigkauer M, Doehmer J, Adesnik M: Sequence of the rat PB-inducible CYP2B1 promoter. *Biochim Biophys Acta* 1996;1305: 54-58.

Sheng H, Shao J, Kirkland SC, Isakson P, Coffey RJ, Morrow J, Beauchamp RD, DuBois RN: Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 1997;99: 2254-2259.

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

Smirlis D, Muangmoonchai R, Edwards M, Phillips IR, Shephard EA: Orphan receptor promiscuity in the induction of cytochromes P450 by xenobiotics. *J Biol Chem* 2001;276: 12822-12826.

Snijdewint FG, Kalinski P, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg ML: Prostaglandin E2 differentially regulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *J Immunol* 1993;150: 5321-5329.

Sonoshita M, Takaku K, Sasaki N, Sugimoto Y, Ushikubi F, Narumiya S, Oshima M, Taketo MM: Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor E2 in ApcDelta716 knockout mice. *Nat Med* 2001;7: 1048-1051.

Stolina M, Sharma S, Lin Y, Dohadwala M, Gardner B, Luo J, Zhu L, Kronenberg M, Miller PW, Portanova J, Lee JC, Dubinett SM: Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor activity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *J Immunol* 2000;163: 361-370.

Stoll BA: Upper abdominal obesity, insulin resistance and breast cancer risk. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26: 747-753.

Stuhlmeier KM, Kao JJ, Bach FH: Arachidonic acid influences proinflammatory gene induction by stabilizing the inhibitor- κ B/nuclear factor- κ B (NF- κ B) complex, thus suppressing the nuclear translocation of NF- κ B. *J Biol Chem* 1997; 272: 24679-24683.

Sueyoshi T, Negishi M: Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41: 123-143.

Tran-Thi TA, Decker K, Baeuerle PA: Differential activation of transcription factors NF- κ B and AP-1 in rat liver macrophages. *Hepatology* 1995;22: 613-619.

Trottier E, Belzil A, Stoltz C, Anderson A: Localization of a phenobarbital-responsive element (PBRE) in the 5-flanking region of the rat CYP2B2 gene. *Gene* 1995;158: 263-268.

Tsai CF, Lii CK, Yang JJ, Liu K, Lin WL, Chen HW: Prostaglandin E₂ is involved in the increase of cytochrome P450 2B1 expression by α -tocopheryl succinate in primary rat hepatocytes in the presence of phenobarbital. *Nutr Cancer* 2001;41: 188-195.

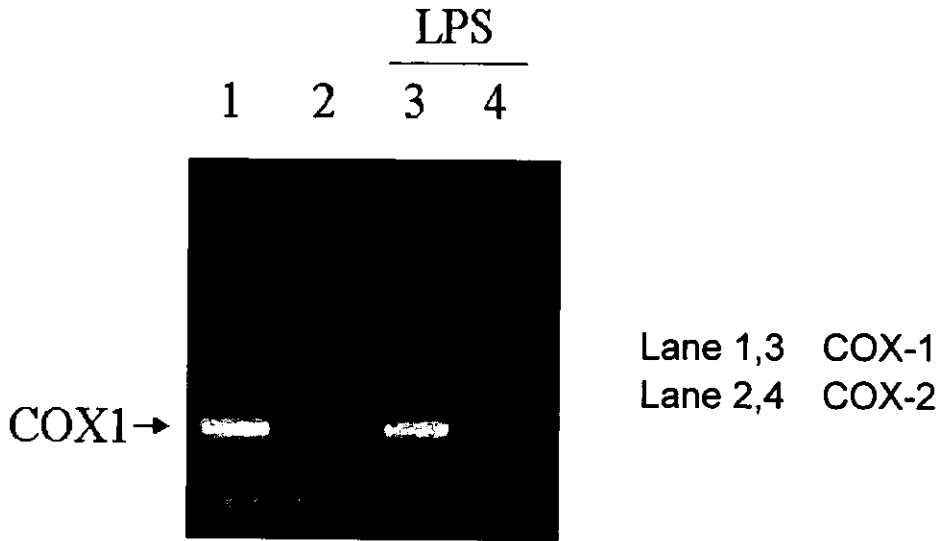
Waxman DJ, Azaroff L: Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem J* 1992;281: 577-592.

Wrighton SA, Stevens JC: The human hepatic cytochrome P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol* 1992;22: 1-22.

Yang L, Yamagata N, Yadav R, Brandon S, Courtney RL, Morrow JD, Shyr Y, Boothby M, Joyce S, Carbone DP, Breyer RM: Cancer-associated immunodeficiency and dendritic cell abnormalities mediated by prostaglandin EP2 receptor. *J Clin Invest* 2003;111: 727-725.

圖、表

圖一、RT-PCR 分析肝細胞 COX 之表現



圖二、RT-PCR 分析肝細胞 EP₂ 之表現

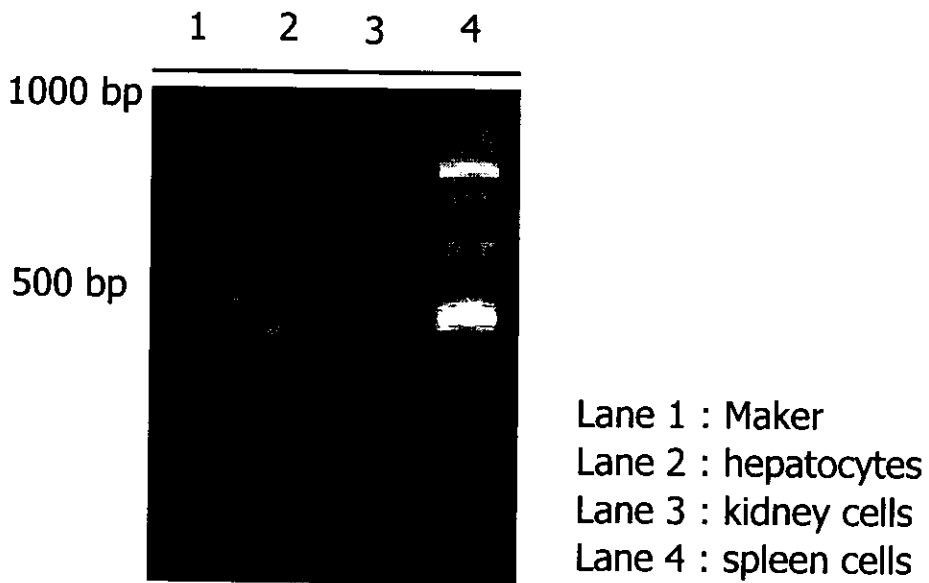


TABLE 1Effect of PGE₂ on the intracellular cAMP concentration ¹

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

¹ Values are means ± SD, *n* = 3. Forty hours after attachment, hepatocytes were incubated with various concentrations of PGE₂ for 20 h. No PGE₂ was added to the control. The cells were then washed twice with cold PBS and lysed and scraped into 800 mL of ice-cold 70% ethanol. Cell debris was pelleted at 2,000 × *g*, and the resulting supernatant fluid was lyophilized and stored at -20°C until analyzed. cAMP concentrations in the control are expressed as 100% , and the concentrations in the other groups were calculated in comparison with the control. Values not sharing a superscript letter are significantly different (*P* < 0.05).

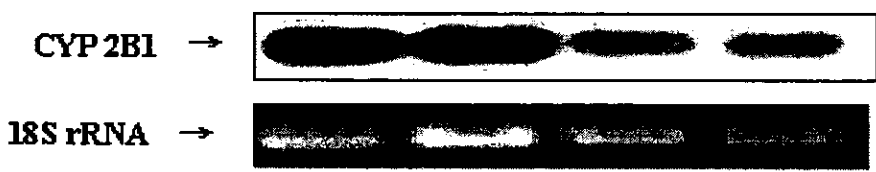
圖三、PGE₂ 對 PB 誘發 CYP 2B1 protein (A)及 mRNA (B)表現之影響

(A)

PB (0.05 mM)	+	+	+	+
PGE ₂ (μM)	0	0.01	0.1	1

CYP 2B1 →

(B)



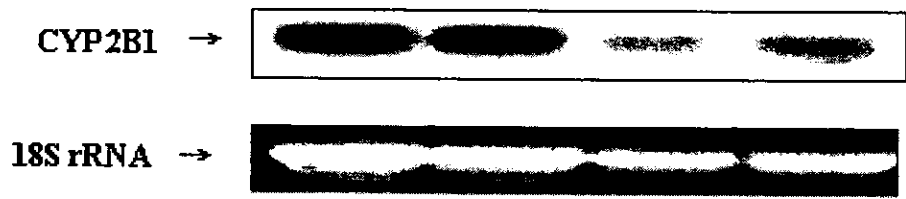
圖四、Butaprost 對 PB 誘發 CYP 2B1 protein (A)及 mRNA (B)表現之影響

(A)

PB (0.05 mM)	+	+	+	+
Butaprost (μM)	0	0.01	0.1	1

CYP 2B1 →

(B)



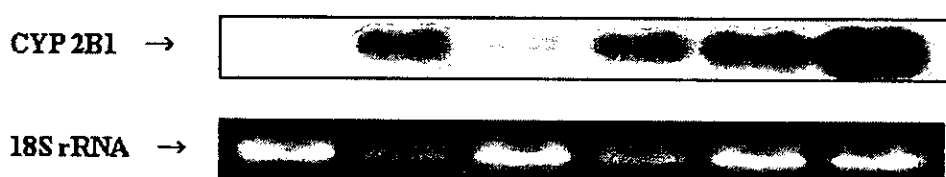
圖五、Adenylate cyclase inhibitor 對 PGE₂ 抑制 CYP2B1 mRNA 表現之影響

(A)

PB (0.05 mmol/L)	-	+	+	+	+	+
PGE ₂ (1 μmol/L)	-	-	+	+	+	+
SO22536 (mmol/L)	-	-	-	0.1	0.4	0.8

CYP 2B1 →

(B)



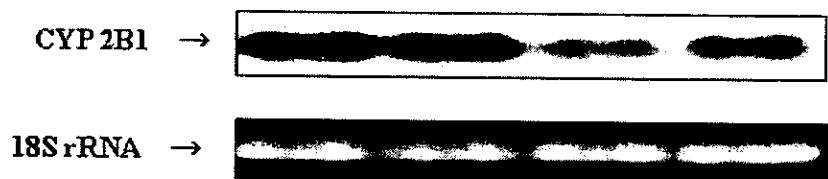
圖六、PKA inhibitor 對 PGE₂ 抑制 CYP2B1 mRNA 表現之影響

(A)

PB (0.05 mmol/L)	+	+	+	+
PGE ₂ (μmol/L)	0.01	0.1	1	1
H-89 (7.5 μmol/L)	-	-	-	+

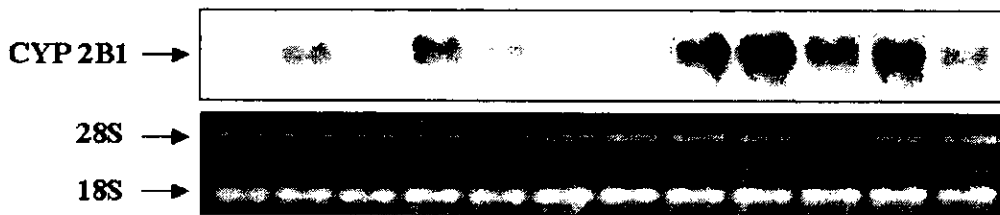
CYP 2B1

(B)

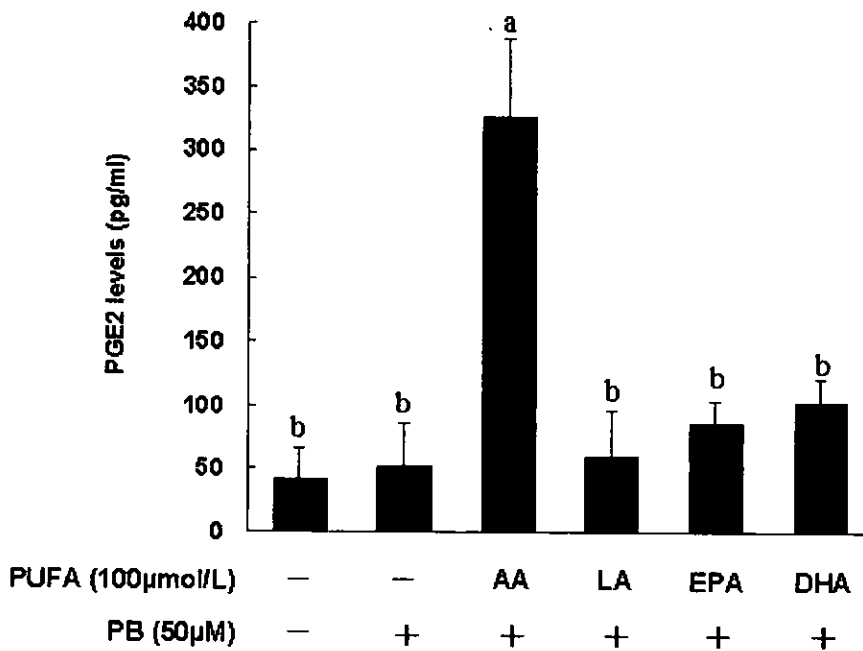


圖七、在 PB 處理下，COX inhibitor 對 PUFA 調控 CYP 2B1 mRNA 表現之影響

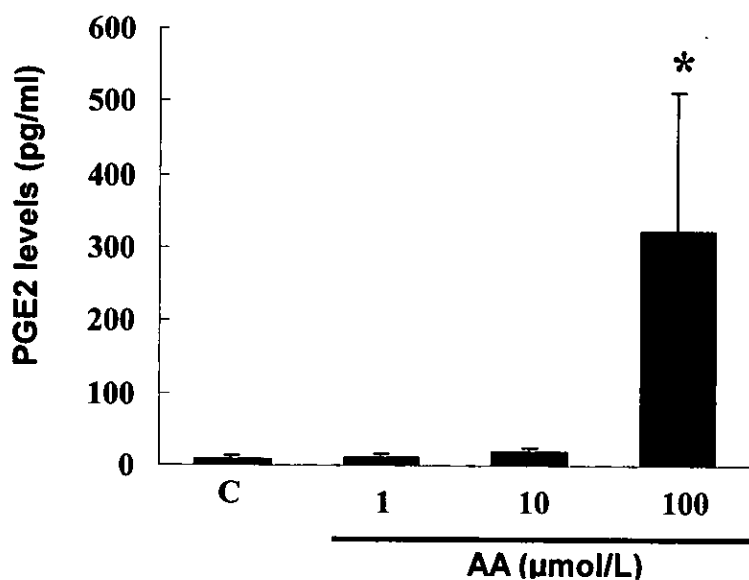
Indomethacin (20 $\mu\text{mol/L}$)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
PUFA (100 $\mu\text{mol/L}$)	-	-	AA	LA	EPA	DHA	-	-	AA	LA	EPA	DHA	DHA
PB (50 $\mu\text{mol/L}$)	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+



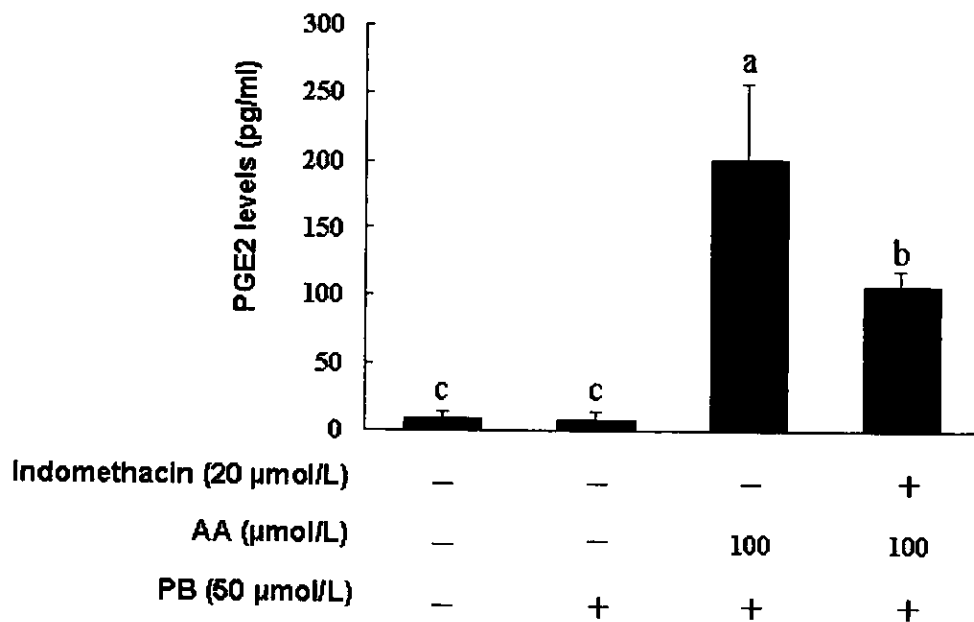
圖八、不同 PUFA 對肝細胞分泌 PGE₂ 之影響



圖九、不同濃度 AA 對肝細胞分泌 PGE₂ 之影響

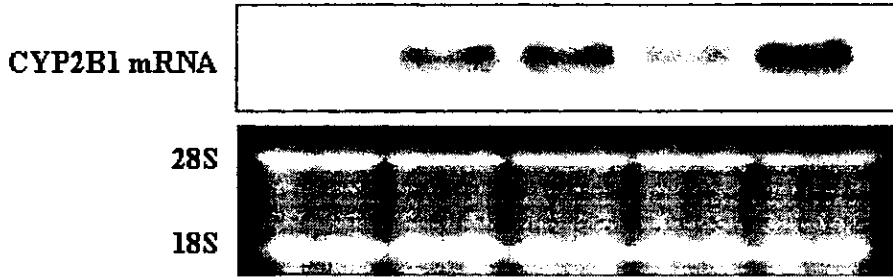


圖十、COX inhibitor 對 AA 誘發肝細胞分泌 PGE₂ 之影響

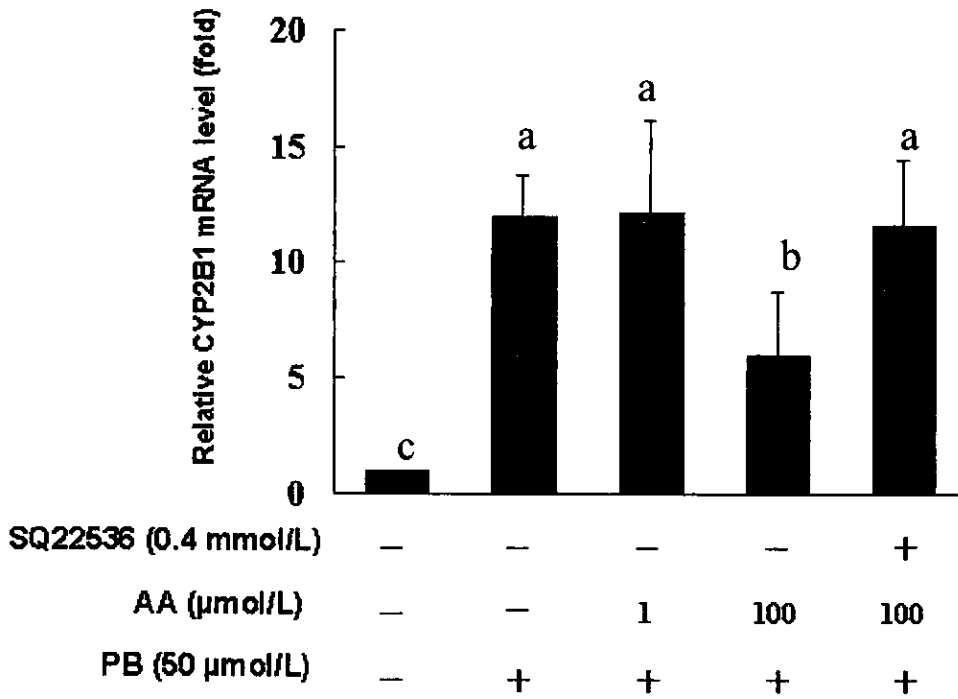


圖十一、Adenylate cyclase inhibitor 對 AA 抑制 CYP2B1 mRNA 表現之影響

A

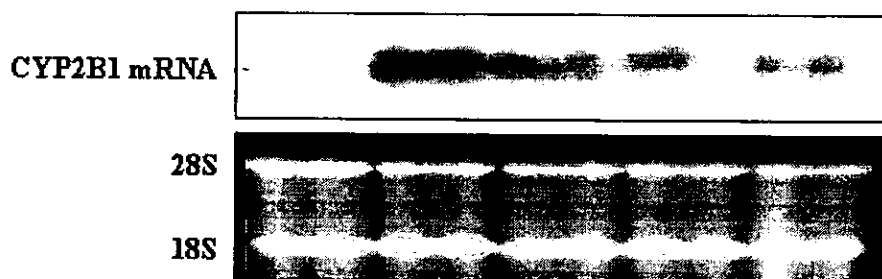


B

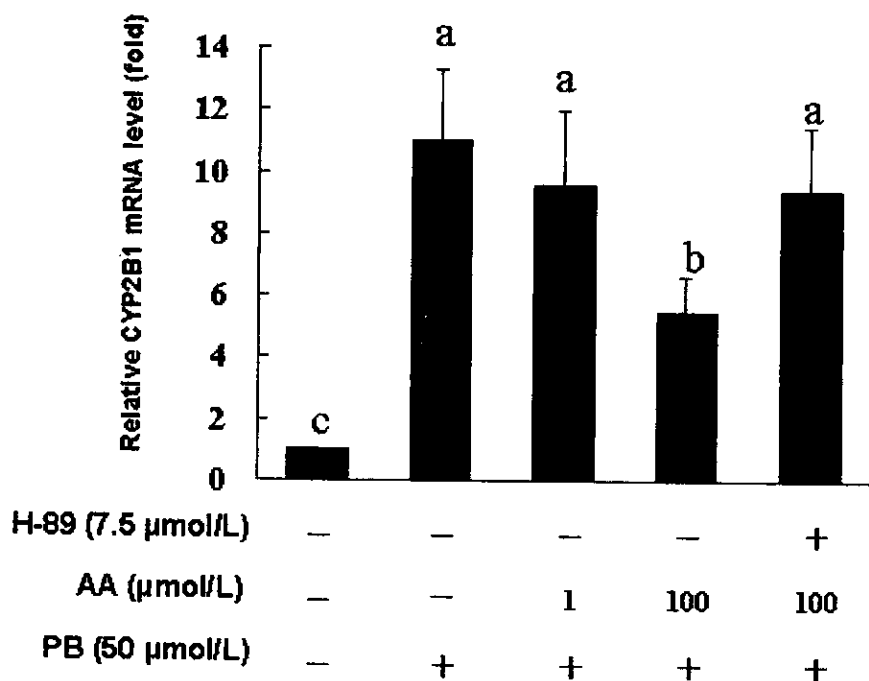


圖十二、PKA inhibitor 對 AA 抑制 CYP2B1 mRNA 表現之影響

A



B



附錄：研究調查問卷、法規及其他重要資料均應列為成果報告附錄