

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

beta-胡蘿蔔素及類黃酮對 A549 細胞在 NNK 及 PMA-激發之巨  
噬細胞共同誘發 DNA 傷害下的影響

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2320-B-040-037-

執行期間：93 年 08 月 01 日至 94 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

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 94 年 10 月 31 日

## 中文摘要

本研究的目的是想探討  $\beta$ -胡蘿蔔素單獨或與類黃酮共同作用，對 monocyte/macrophage 釋放細胞激素，產生活性氧及對肺細胞傷害的影響。HL-60 細胞與  $\beta$ -胡蘿蔔素單獨或合併類黃酮共同預培養 1 小時，再與 phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) 或 PMA + 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) 培養兩天。之後收集培養基進行 IL-8, TNF- $\alpha$  及脂質過氧化分析 (TBARS assay)，HL-60 細胞則收集分析 DNA 股斷裂情形及細胞內活性氧含量或及一步與 A549 細胞共同培養 1 天。結果顯示 20  $\mu$ M  $\beta$ -胡蘿蔔素會促進 PMA 或 PMA + NNK 活化的 HL-60 細胞分泌 IL-8, TNF- $\alpha$  及 TBARS 和細胞內活性氧的生成。此外，20  $\mu$ M  $\beta$ -胡蘿蔔素亦增加被激活的 HL-60 細胞對 A549 細胞 DNA 的傷害。相反的，2  $\mu$ M  $\beta$ -胡蘿蔔素顯著抑制被激活的 HL-60 細胞對 A549 細胞 DNA 的傷害。20  $\mu$ M  $\beta$ -胡蘿蔔素合併 20  $\mu$ M quercetin, naringenin 或 vitamin E 與 HL-60 細胞預培養，會抑制  $\beta$ -胡蘿蔔素對被激活的 HL-60 細胞 IL-8, TNF- $\alpha$ , TBARS 和細胞內活性氧的生成之促進作用。其中 quercetin 在 TNF- $\alpha$  及 ROS 的生成抑制效果上最強。以上體外實驗結果顯示高濃度的  $\beta$ -胡蘿蔔素可能增加發炎反應對肺細胞的傷害而類黃酮，quercetin 及 naringenin，則可能抑制此有害效果。

## Abstract

The aims of this study were to investigate the effects of  $\beta$ -carotene alone or in combination with flavonoid on the release of cytokines, the formation of reactive oxygen species (ROS) of stimulated-monocyte/macrophage and the DNA damage in lung cells induced by stimulated-monocyte/macrophage. HL-60 cells were pre-incubated with  $\beta$ -carotene alone or in combination with flavonoid for 1 h, followed by incubated with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) or PMA + 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) for 2 days. Then, the media were collected for IL-8, TNF- $\alpha$  and lipid peroxidation assay (TBARS assay), and the treated HL-60 cells were determined the DNA strand breaks, the formation of cellular ROS or were incubated with A549 cells for 1 day. The results demonstrated that 20  $\mu$ M of  $\beta$ -carotene enhance the release of IL-8 and TNF- $\alpha$  as well as the formation of TBARS and intracellular ROS in PMA or PMA+NNK-activated HL-60 cells. In addition, 20  $\mu$ M of  $\beta$ -carotene also increased the DNA strand breaks in A549 cells induced by stimulated-HL-60 cells. Contrastively, 2  $\mu$ M of  $\beta$ -carotene significantly decreased A549 cells DNA strand breaks induced by stimulated-HL-60 cells. Pre-incubation of HL-60 cells with 20  $\mu$ M

$\beta$ -carotene in combination with each of 20  $\mu$  M quercetin, naringenin or vitamin E suppressed the enhancing effect of  $\beta$ -carotene on the release of IL-8 and TNF- $\alpha$  as well as the formation of TBARS and the intracellular ROS in PMA or PMA+ NNK-stimulated cells. Quercetin had the strongest ability to inhibit the TNF- $\alpha$  release and the ROS formation in stimulated HL-60 cells. These in vitro study results suggest high doses of  $\beta$ -carotene may increase the damage in lung cells induced by inflammation reaction. Flavonoids, quercetin and naringenin, may suppress such effects.

Keywords :  $\beta$ -carotene, flavonoids, DNA damage, NNK, inflammation reaction

### 一、背景及目的

許多流性病學研究發現，攝食較多富含 $\beta$ -胡蘿蔔素（BC）的蔬菜水果可減少許多癌症及慢性疾病的發生，對於抽煙者尤其顯著(Ref)，自1994年著名的人體試驗，ATBC study (The alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study group, 1994)發現給抽菸者單獨補充 $\beta$ -胡蘿蔔素，不僅未能減少各種心臟血管疾病、癌症的發生，甚至可能增加肺癌的發生。此外越來越多的體內外實驗發現 $\beta$ -胡蘿蔔素在體外的抗氧化性並不穩定或者有促氧化性(Palozza et al., 1997; Wang and Russell, 1999; Yeh and Hu, 2000)。為了避免 $\beta$ -胡蘿蔔素氧化以發揮其他可能生理功能，因此有學者認為未來類胡蘿蔔素應合併其他抗氧化劑共同使用以期達到真正的功效，(Offord et al., 2002)。

深色蔬菜水果中所富含的另一phytochemical-類黃酮，具有酚基結構可穩定電子，許多研究已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)，一般認為類黃酮抗氧化力應與其保護心臟血管功能有關(Depeint et al., 2002)。另外有研究指出這些類黃酮等phytochemicals具抗癌效果(Bors et al., 1990; Cao et al., 2002)。但不同的類黃酮對於不同的疾病效應並不一致(Knekt et al., 2002)。雖然對類黃酮的研究已有五十年，其生理活性所包含的分子機制尚不清楚(Depeint et al., 2002)，其中可能包括抗氧化及對許多酵素活性的調控作用，而可抑制發炎或致癌物質活化(Cao, 2002; Bear and Teel, 2000)。類黃酮與類胡蘿蔔素間的交互作用情形文獻報導的不多，類黃酮是否能減少類胡蘿蔔素的氧化，並加乘其某些生理作用，是相當值得探討的問題。

抽煙導致的肺部傷害，除了大量活性物質及自由基直接傷害細胞外，這些物質誘發的發炎反應也是上皮細胞傷害的導因之一(Weitberg and Coverse, 1997)。香菸煙霧中的自由基及許多致癌成分會引起吞噬細胞及肺上皮細胞增加趨化素(chemoattractant chemokine) interleukin-8 (IL-8) 等之分泌，IL-8會吸引更多嗜中性球滲入肺細胞，並引起呼吸道進一步的慢性發炎反應(Hoidal and Niewodhner, 1982)。抽煙或高氧壓所造成肺部傷害，嗜中性球的浸潤即是初期肺組織傷害成因之一，而此一發炎現象

則可能導致更多活性氧及自由基而增加肺部細胞DNA傷害。體外研究顯示，4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)，香菸煙霧中一種具二級胺結構的致癌成分之一(Hecht et al., 1988)，與激發的巨噬細胞共同作用可顯著增加肺上皮細胞的傷害，而vitamin E及綠茶素可顯著抑制此傷害(Weitberg and Corvese, 1997; Weitberg and Corvese, 1999)。另外有ex vivo研究指出，不論是否以phorbol myristate acetate (PMA)或細菌誘發，年輕的抽煙者其肺泡巨噬細胞均會較同年齡者釋放較多超氧陰離子，且巨噬細胞數亦增加(Hodial and Niewoehner, 1982)。

由於抽煙除本身會增加肺部細胞的氧化壓力外，還會誘發發炎反應進而增加肺部活性氧量， $\beta$ -胡蘿蔔素在此雙重壓力下的抗氧化、促氧化性以及是否促進發炎反應並不清楚，有報導指出 $\beta$ -胡蘿蔔素的代謝產物retinoic acid 會增加人類肺monocyte細胞株的IL-8表現 (Svecova et al., 1998)。另外類黃酮是否可能與 $\beta$ -胡蘿蔔素產生交互作用，而影響其作用，亦有待進一步研究。因此本研究參考Hjort等(2003)及Weitberg and Coverse (1999)之方法，將 $\beta$ -胡蘿蔔素單獨或與類黃酮合併與HL-60細胞預培養後，再加入PMA或PMA + NNK刺激HL-60細胞分化，以探討 $\beta$ -胡蘿蔔素對HL-60分化為monocyte/macrophage的影響，在有無NNK的作用下是否增加吞噬細胞IL-8，TNF- $\alpha$ ，TBARS及活性氧(reactive oxygen species; ROS)的分泌，並瞭解類黃酮對 $\beta$ -胡蘿蔔素作用的影響。

## 二、研究方法

### 1. 細胞培養 (Hjort et al., 2003)

#### 1) HL-60細胞

HL-60細胞以含10%FBS之PRMI培養基培養。取 $2 \times 10^5$  cells/mL 細胞於新鮮培養基中，單獨加入BC (2, 20  $\mu$ M) 或合併有20  $\mu$ M quercetin, naringenin或vitamin E共同培養1小時，之後離心去掉培養基，以PBS清洗2次後，加入等量新鮮培養基，內含0.01 M phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)或0.01MPMA + 0.7 Mm NNK，培養細胞2天後，離心(5000rpm, 10分鐘)，取培養基凍於-80°C冰箱，以便進行IL-8，TNF- $\alpha$ 及TBARS分析。而處理過的細胞一部份進行comet分析，一部份則與A549細胞進行共同培養。

#### 2) A549細胞

$7 \times 10^4$  cells/mL A549細胞以含10%FBS之PRMI1640培養基培養一天後，去除培養基，培養皿加入等量之新鮮PRMI1640培養基(FBS 0.024%)，其中含有處理過之HL-60細胞( $2 \times 10^5$  cells/mL)，二者共同培養一天後，去掉培養基，以PBS洗兩次後，接著再以trypsin 將盤上的細胞切下，離心收集，進行comet分析。

#### 細胞分離

A549細胞及HL-60細胞共同培養後，吸出培養基，在培養盤內加入0.5ml細胞分離緩衝液(CDB, Invitrogen Corp., Grand Island, NY)，此緩衝液是一等滲透壓非酵素性細胞分離液，可使細胞自不同的細胞表面分離，因此首先會分離到HL-60細胞，接著再以trypsin 將盤上的A549細胞切下，也同樣離心收集。這樣收集到的細胞純度約為

93%( Hjort et al., 2003)。

## 2.HL-60細胞分化情形

以光學顯微鏡觀察細胞分化情況，亦即觀察HL-60細胞是否會變得扁平且貼盤，並以抗體(PE-labeled CD11b antibody, FITC-labeled CD14 antibody; Biolegend, USA)測定細胞CD11b、CD14抗原的表現，經flow cytometer檢測，定量細胞分化情形。CD11b是leukocyte 的專一性marker，利用此一marker可區分上皮細胞及leukocyte，而CD14則為細胞分化為macrophage的指標。

## 3.IL-8、TNF- $\alpha$ 分析

細胞培養基以人類enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit(Biosource, USA)分析。

## 4.TBARS含量之測定(Buege and Aust, 1987; Yagi, 1984 )

取1 ml反應過的上清液加入BHT (終濃度為0.5 mM) 以終止反應，並防止在強酸中加熱時所造成的脂質過氧化。其後分別加入1 ml之2.8% TCA與1 ml之0.7% TBA，混合後於沸水中加熱10分鐘。待冷卻後，加入等量的n-butanol萃取出MDA，離心(600xg, 10分鐘)，以螢光分光光度計分析 (Ex: 515 nm, Em: 555 nm)。本實驗將1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP)以1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>作用後所生成之MDA當作標準品，將反應所生成的TBARS換算為nmol/mg protein。

5.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×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°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<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°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。

## 6.ROS的測定- Flow cytometry assay

HL-60 細胞單獨加入 BC (2, 20  $\mu$ M) 或合併有 20  $\mu$ M quercetin, naringinin 或 vitamin E, 以及 PMA 或 PMA + NNK2 小時後，離心去掉培養基，以 PBS 懸浮之，加入 DCFH-DA (終濃度 10  $\mu$ M) 培養 15 分鐘，之後以 Flow cytometer 偵測 ROS 的產生量。

## 三、結果討論

### (一) BC對IL-8, TNF- $\alpha$ 分泌的影響

為確定HL-60細胞以PMA刺激分化之情形，我們檢測細胞表面抗原CD11b、CD14表現情形。結果如圖一所示，經PMA培養，細胞分化情形隨培養時間增加，兩天後約有71%的細胞有CD11b 抗原，而約60%的細胞產生CD14抗原，顯示60%以上細胞

被PMA誘發分化為Macrophage/monocyte，若細胞預先以2或20 $\mu$ M BC預培養再以PMA誘發分化，細胞分化情況與PMA單獨培養沒有顯著差異(data not shown)。

HL-60與2或20 $\mu$ MBC預培養後，再分別加入NNK、PMA、PMA+NNK誘發IL-8分泌結果顯示BC本身並不會誘發IL-8分泌(圖二)，單獨給予NNK刺激，會顯著增加IL-8分泌，2  $\mu$ M BC可以顯著抑制NNK的刺激作用，但20  $\mu$ MBC則無此效果。而細胞以PMA培養後，如預期的會使IL-8大量生成，約達控制組的10倍，2或20  $\mu$ MBC 預培養都會增加PMA所誘發的IL-8生成，但不達顯著水準。而以PMA+NNK同時刺激細胞時，IL-8生成比單獨以PMA誘發，有明顯的上升，2  $\mu$ MBC預培養稍微抑制此一上升現象，但經20 $\mu$ MBC預培養的細胞，則會顯著增加PMA+NNK所誘發的IL-8生成量。

至於TNF- $\alpha$ 生成方面，由圖三結果可發現，BC與NNK本身不會誘發TNF- $\alpha$ 生成。但細胞加入PMA後，會顯著誘發TNF- $\alpha$ 產生達380 pg/10<sup>5</sup> cells，而2  $\mu$ MBC預培養，細胞可以顯著減少TNF- $\alpha$ 生成。反之，先以20 $\mu$ MBC預培養的細胞，反而顯著增加TNF- $\alpha$ 生成。在PMA+NNK共同作用下，TNF- $\alpha$ 生成量較PMA單獨作用下顯著增加，相似的，2 $\mu$ MBC預先培養可以顯著抑制TNF- $\alpha$ 生成，而20  $\mu$ MBC則促進細胞會TNF- $\alpha$ 生成(但未達顯著水準)。

以上結果顯示BC預培養，不論高低劑量，並不會影響PMA誘發HL-60細胞的分化。但高劑量(20  $\mu$ M) BC會促進PMA或PMA+NNK誘發細胞激素IL-8及TNF- $\alpha$ 的分泌，低劑量(2  $\mu$ M) BC 則可能有抑制效果。

### (二) BC對TBARS及ROS生成的影響

在無添加PMA的情況下，BC及 NNK單獨或共同作用，都不會增加細胞TBARS的生成量(圖四)。細胞加入PMA培養後，則顯著增加TBARS的生成達2.5倍，以BC預培養細胞會顯著增加TBARS的生成，並且與BC成劑量關係。PMA+NNK共同作用，TBARS的生成較PMA單獨作用下多(但不達顯著水準)，而以BC預培養仍然會顯著促進TBARS的生成且具劑量關係。

以flow cytometer測定細胞中ROS產生量，結果如圖五所示，BC與NNK單獨或共同作用不會顯著影響ROS生成量。但細胞以PMA培養後，ROS生成量顯著增加，而BC預培養則隨劑量增加，顯著促進ROS生成。相同的NNK也會增加PMA對ROS的誘發，BC預培養，也會隨劑量增加而增加誘發量，但不論2或20  $\mu$ MBC均未達顯著水準。

### (三) HL-60與A549細胞共同培養對A549細胞的DNA傷害

HL-60細胞本身不論是否與BC預培養，經PMA及NNK單獨或共同培養並不會造成DNA的傷害(data not shown)。而HL-60細胞經PMA及NNK單獨或共同培養後，再與A549細胞共同培養，都會顯著增加A549細胞 DNA strand 斷裂，其傷害大小依序為NNK+PMA>PMA>NNK(圖六)。HL-60若經過2 $\mu$ MBC預培養，會顯著減少HL-60

細胞經PMA及NNK單獨或共同培養對A549細胞 DNA傷害情形，但20uMBC預培養則增加PMA+NNK培養之HL-60細胞對A549細胞DNA的傷害。

#### (四) 類黃酮及維生素E的抑制作用

已知20  $\mu$ MBC會增加HL-60細胞在PMA單獨或與NNK共同作用下產生TBARS、IL-8、TNF $\alpha$ 、ROS，以及對A549細胞DNA的傷害。為瞭解類黃酮使否抑制20uMBC的促進作用，我們加入20  $\mu$ M的quercetin或naringinin或與20  $\mu$ MBC共同預培養，同時也以20  $\mu$ M vitamin E進行比較。

結果顯示，如前面敘述20  $\mu$ M BC與細胞預培養會顯著增加PMA或PMA+NNK所誘發之TNF- $\alpha$ 、IL-8、TBARS及ROS的生成，但如果同時加上20  $\mu$ M類黃酮或VitE與細胞共同預培養，則會顯著抑制20  $\mu$ M BC的促進效果（圖七）。其中對TNF- $\alpha$ 及ROS的生成，quercetin的抑制效果較好，其他則quercetin，naringinin與vitamin E相似。

#### 四、結論

- (一) 本研究結果顯示，20  $\mu$ M BC會促進PMA或PMA+NNK所誘發的HL-60細胞，分泌細胞激素IL-8及TNF- $\alpha$ ，以及ROS及TBARS的產生，同時也會增加PMA或PMA+NNK激發後的HL-60細胞對A549細胞 DNA傷害，顯示20  $\mu$ M BC可能促進macrophage的發炎反應，增加活性氧的產生，而增加周邊細胞的傷害。但相反的，低劑量亦即2  $\mu$ M BC 則可能有助於抑制發炎反應，而減少細胞傷害。
- (二) 類黃酮quercetin 及naringinin與高劑量（20  $\mu$ M）的BC共同培養時，可能抑制BC對PMA及PMA+NNK誘發的細胞激素及活性氧產生的促進作用，因而可能降低發炎對細胞的傷害。

#### 五、參考文獻

- Andlauer W, Stumpf C, Furst P: Intestinal absorption of rutin in free and conjugated forms. *Biochem Pharm.* 2001, 62:369-374.
- Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia.* 1991; 47:22-31.
- 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 Res.* 2000, 20:3323-3329.
- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M: Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 1990, 186:343-355.
- Bors W, Michel C, Stettmaier K. Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors.* 1997, 6:399-402.
- Buege AJ, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 1987, 52:302-310.
- Cao Y, Cao R, Brakenhielm E: Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols. *J. Nutri Biochem.* 2002, 13:380-390.
- Chang DH, Angelin-Duclos C, Calame K. BLIMP-1: trigger for differentiation of myeloid

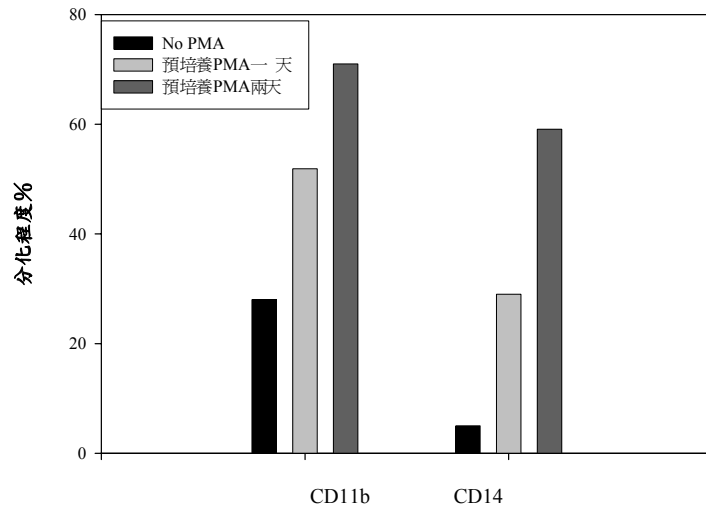
- lineage. Nature America Inc. 2000, vol 1 no 2(8):169-176
- Chen YY, Chang HM, Antiproliferative and differentiating effects of polysaccharide fraction from fu-ling (*Poria cocos*) on human leukemic U937 and HL-60 cells. *Food Chem Toxicol.* 2004 May;42(5):759-69
- Collins AR, Ma AG, Duthie SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells. *Muta Res.* 1995, 336:69-77.
- Depeint F, Gee JM, Williamson G, Johnson IT: Evidence for consistent patterns between flavonoids structures and cellular activities. *Proc Nutr Soc.* 2002, 61:97-103.
- 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. *Exp Cell Res.* 1998, 243:359-66.
- Fuhrman B, Volkova N, Rosenblat M, Aviram M: Lycopene synergistically inhibits LDL oxidation in combination with vitamin E, glabridin, rosmarinic acid, caromonic acid, or garlic acid. *Antioxid Redox Signal.* 2000, 2: 491-506.
- 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. *N Engl J Med.* 1996, 334:1145-1149.
- Hecht SS, Hoffmann D. Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis.* 1988, 9:875-84.
- Hecht SS, Abbaspour A, Hoffman D. A study of tobacco carcinogenesis. XLII. Bioassay in A/J mice of some structural analogues of tobacco-specific nitrosamines. *Cancer Lett.* 1988, 42:141-145.
- Brown G, Drayson MT, Durham J, Toellner MK, Philip JH, Choudhry MA, Taylor DR, Bird R, Michell RH. HL60 cells halted in G1 or S phase differentiate normally. *Cell Res.* 2002 Nov 15;281(1):28-38.
- 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.* 2001, 12:789-96.
- Hjort MR, Brenyo AJ, Finkelstein JN, Frampton MW, LoMonaco MB, Stewart JC, Johnston CJ, D'Angio CT. Alveolar epithelial cell-macrophage interactions affect oxygen-stimulated interleukin-8 release. *Inflammation.* 2003, 27:137-145.
- Hoidal JR, Niewoehner DE. Lung phagocyte recruitment and metabolic alterations induced by cigarette smoke in humans and in hamsters. *Am Rev Respir Dis.* 1982, 126: 548-52
- Hsiu SL, Huang TY, Hou YC, Chin DH, Chao PD: Comparison of metabolic pharmacokinetics of maringin and naringenin in rabbits. *Life Sci.* 2002, 70:1481-1489.
- Hughes DA. Effects of carotenoids on human immune function. *Proc Nutr Soc.* 1999, 58:713-718.
- Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen



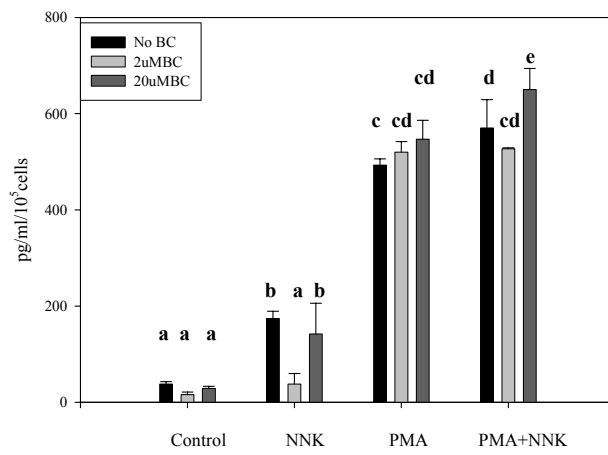
T,

- Aromaa A: Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr.* 2002, 76:560-568.
- Lebel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 1992; 5:227-31.
- 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 carnosis acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. *Free Radic Biol Med.* 2002, 32:1293-1303.
- 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. 1996, 334:1150-1155.
- Palozza P, Luberto C, Calviello G, Ricci P, Bartoli GM: Antioxidant and prooxidant role of  $\beta$ -carotene in murine normal and tumor thymocytes: effects of oxygen partial pressure. *Free Radic Biol Med.* 1997, 22:1065-1073.
- Pierpoint WS. Flavonoids in the human diet. *Progre Clini & Biolo Res.* 1986, 213:125-140.
- Rundhaug JE, Pung A, Read CM, Bertram JS. Uptake and metabolism of beta-carotene and retinal by C3H/10T1/2. *Carcinogenesis.* 1988, 9:1541-1545.
- Schwende H, Fitzke E, Ambs P, Dieter P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J Leukoc Biol.* 1996, 59:555-561.
- 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, 175:184-191.
- Svecova D, Kawashima T, Ohkawara A. Production of IL-8 by the THP-1 monocyte cell line is regulated differently by cyclosporin and retinoic acid *Bratisl Lek Listy.* 1998, 99:48-53.
- 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.* 1994, 330:1029-1035.
- Wang X-D, Russell RM: Procarcinogenic and anticarcinogenic effects of  $\beta$ -carotene. *Nutr Rev.* 1999, 57:263-272.
- Weitberg AB, Corvese D. Effect of vitamin E and beta-carotene on DNA strand breakage induced by tobacco-specific nitrosamines and stimulated human phagocytes. *J Exp Clin Cancer Res.* 1997, 16:11-14.
- Weitberg AB, Corvese D. The effect of epigallocatechin galleate and sarcophytol A on DNA strand breakage induced by tobacco-specific nitrosamines and stimulated human phagocytes. *Exp Clin Cancer Res.* 1999, 18:433-437.
- Yagi K. Assay for blood plasma or serum. *Meth Enzymol.* 1984, 105:328-331.
- Yeh S-L, Hu M-L. Antioxidant and pro-oxidant effects of lycopene in comparison with  $\beta$ -carotene on oxidant-induced damage in Hs 68 cells. *J Nutr Biochem.* 2000, 11:548-554. .

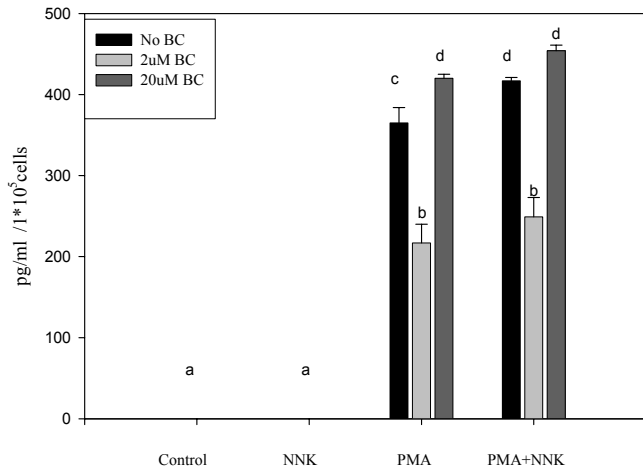
六、圖表



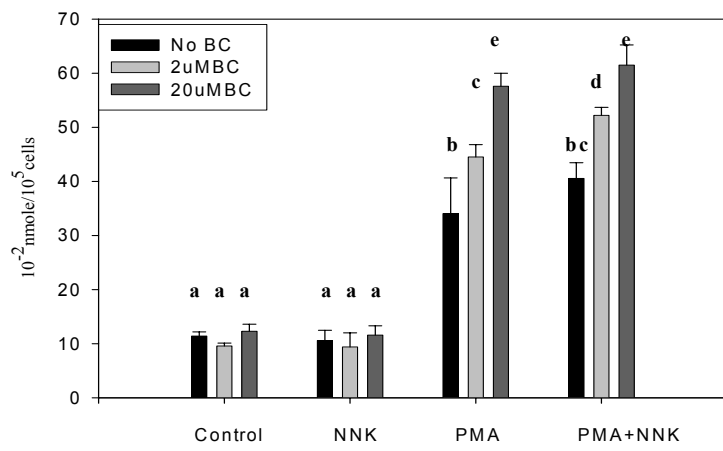
圖一、PMA 誘發 HL-60 細胞 CD11b、CD14 抗原表現



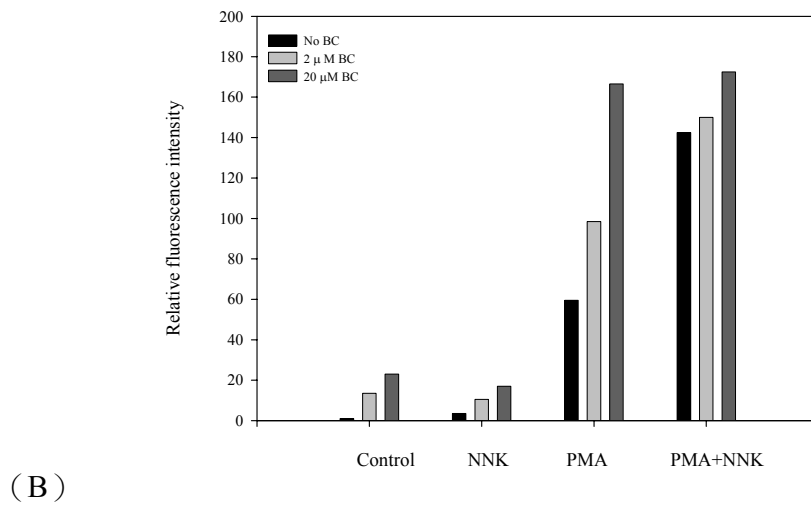
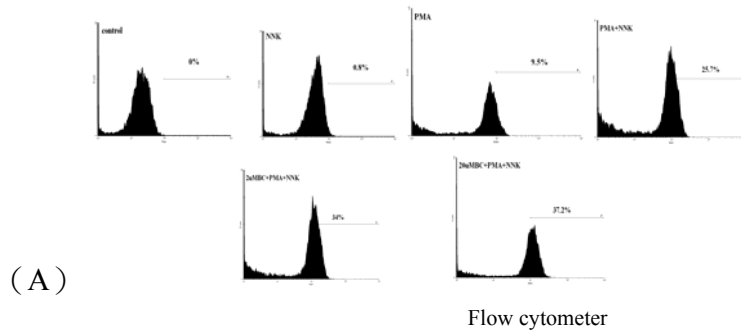
圖二、BC 對 HL-60 細胞分泌 IL-8 的影響



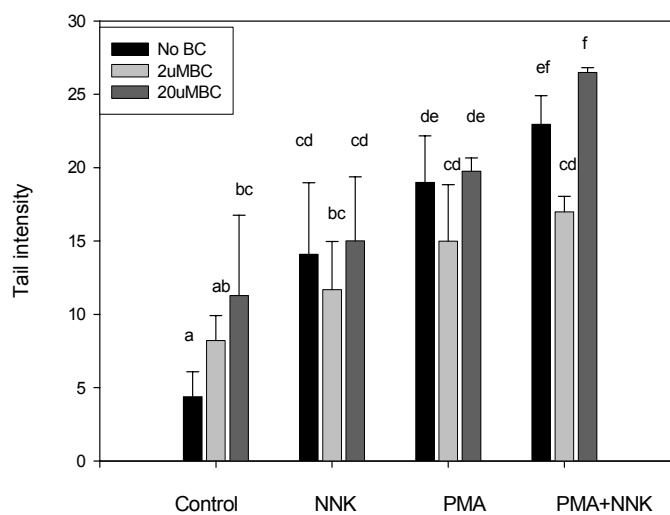
圖三、BC 對 HL-60 細胞分泌 THF- $\alpha$  的影響



圖四、BC 對 HL-60 細胞產生 TBARS 的影響

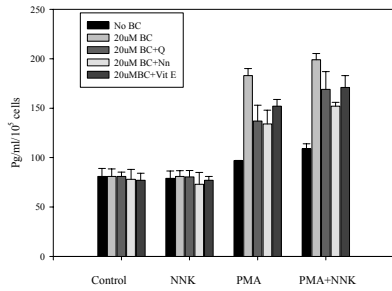


圖五、BC 對 HL-60 細胞產生 ROS 的影響。(A) flow cytometry 分析的結果 (B) 相對螢光強度。

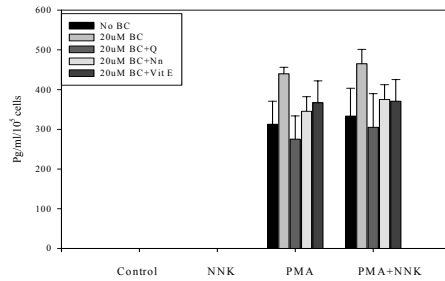


圖六、BC 對各種處理下 HL-60 細胞誘發 A549 細胞 DNA 傷害的影響

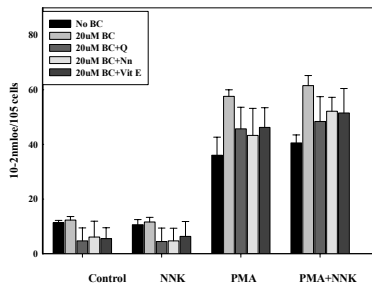
(A)



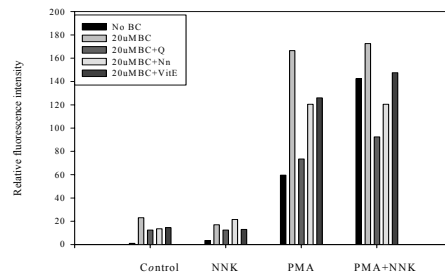
(B)



(C)



(D)



圖七、BC 合併 quercetin (Q), naringenin (Nn) 及 vitamin E (vit E) 對 PMA 或 PMA + NNK 誘發 HL-60 細胞產生 (A) IL-8、(B) TNF- $\alpha$ 、(C) TBARS 及 (D) ROS 的影響。

### 計畫成果自評

1. 本研究按計畫執行，針對在細胞模式中，BC 對 PMA 或 PMA + NNK 誘發的 HL-60 細胞，分泌細胞激素 IL-8 及 TNF- $\alpha$ ，ROS 及 TBARS 的產生，以及激發後的 HL-60 細胞對 A549 細胞 DNA 傷害作用進行研究。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。