

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

國科會專題研究計畫成果報告撰寫格式說明

Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC 90-2320-B-041-019

執行期限：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

主持人：康志強 嘉南藥理科技大學保健營養系

共同主持人：李 輝 中山醫學大學毒理學研究所

一、中文摘要

已知 benzo[a]pyrene (B[a]P) 可經由 aryl hydrocarbon receptor (AhR) 與 AhR nuclear translocator (Arnt) 誘導 CYP1A1 之基因表現。因此本研究進而探討槲皮酮是否會經由多環芳香烴感受器路徑調控 CYP1A1 之基因表現，而由 gel retardation assay 的結果獲知，槲皮酮會有效抑制 B[a]P 誘發之 AhR-Arnt 複合體結合到 DRE(dioxin receptor element)的能力。另外以免疫沉澱法探討槲皮酮是否會改變參與多環芳香烴感受器路徑之三個主要蛋白-AhR, HSP90 和 Arnt 之間的交互作用，接果發現 AhR-HSP90 複合體之含量會顯著的受到槲皮酮的影響，而穩定地大量留在細胞質中，尤其是在以槲皮酮單獨處理而無 B[a]P 的 HepG2 細胞質中。更有趣的是此 AhR-HSP90 複合體的含量是負控制組的 7.3 倍之多。相對的在細胞核中之 AhR-Arnt 複合體之含量會顯著地受到槲皮酮的抑制。因此 AhR-Arnt 複合體結合到 DRE 之機會亦隨之減少。綜合以上結果顯示，推測槲皮酮可在基因轉錄之層次上藉由穩定 AhR-HSP90 複合體，而減少活化型之 AhR 進入細胞核中與 Arnt 蛋白結合而阻斷訊號傳遞路徑，而抑制 CYP1A1 之表現。

關鍵詞：槲皮酮、多環芳香烴感受器路徑、細胞色素 P4501A1

Abstract

It is well-known that B[a]P induces CYP1A1 gene expression via the activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). Therefore, we further studied the effects of quercetin on aryl hydrocarbon

receptor activation by B[a]P in HepG2 cells, and we found that quercetin inhibited B[a]P-induced AhR activation evaluated by gel retardation assay. The immunoprecipitation assay was performed to evaluate the interaction between AhR and HSP90, or AhR and Arnt. Our results showed that the level of AhR-HSP90 complex in cytosol were increased by quercetin treatment in the dose-dependent manner. In contrast, AhR-Arnt complex levels in nucleus were decreased by quercetin. These results suggested that the decrease in the AhR-Arnt complex in nucleus may be due to the increase in AhR-HSP90 complex in cytosol. Furthermore, the AhR-HSP90 complex levels in cytosol were remarkably increased by the treatment of quercetin alone. From the above findings, we conclude that quercetin suppresses B[a]P-induced DNA damage in human HepG2 cells may be mediated through increasing the stability of AhR-HSP90 complex in the cytosols.

Keywords: quercetin, aryl hydrocarbon receptor pathway, cytochrome P4501A1

二、緣由與目的

槲皮酮(quercetin)為存在於自然界植物中超過 4000 種以上酚類化合物(phenolics)之一。最早由 Szent-Gyorgyi 於 1936 年分離鑑定(Harborne, 1986)。據估計美國人每天約食入 1 克的類黃酮，其中約含有 25 ~ 50 毫克之槲皮酮(Kuhnau, 1976)。目前已知槲皮酮具有化學預防癌症之發生歸因於：(1)抑制致癌物之代謝活化和促進解毒酵素(detoxifying enzyme)之活性，(2)與致癌物形成無法代謝之複合物

和 (3)促進發炎及免疫反應而抑制腫瘤之形成。Kato 等人 (1983) 即發現槲皮酮會有效抑制 Wistar 大鼠表皮脂肪加氧 (lipoxygenase) 之活性和 TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) 所促進的鳥胺酸去羧 (ornithine decarboxylase) 活性, 而抑制 Wistar 大鼠表皮腫瘤之形成。蛋白激酶 C (protein kinase C) 是 TPA 的一個接受器, 被認為與細胞增殖的調控有關。在體外實驗, 活化的蛋白激酶 C 會刺激人類之嗜中性白血球 NADPH 氧化酵素 (neutrophil NADPH oxidase) 和增進超氧陰離子自由基的釋放。而槲皮酮可抑制 TPA 所誘發的蛋白激酶 C 之活性 (Huang and Ferraro, 1992)。Chae 等人 (1991) 發現不同之類黃酮對誘發的微粒體酵素, 有不同的抑制性, 因此對 B[a]P 代謝活化有不同的影響。Verma (1992) 發現在飼料添加含有 2~5% 之槲皮酮餵食 Wistar 大鼠, 可有效抑制 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) 所引起的皮膚腫瘤及 TPA 所誘發之腫瘤促進作用。Avila 等人 (1994) 指出槲皮酮可抑制人類乳癌細胞株-MDA-MB468 之細胞增生 (cell proliferation) ($IC_{50}=7 \mu g/ml$), 使細胞停留在 G2-M 期, 而無法繼續增生。

細胞色素 P450 (Cytochrome P450, 簡稱 CYP450) 是生物體代謝外來物包括藥物、食品添加物、致癌物及環境污染物重要的酵素之一。CYP450 蛋白代謝外來物會將外來物的極性加高, 以便於加速排出體外, 而降低其對生物體之毒性。但有時 CYP450 在代謝過程, 會將外來物代謝為具有致突變性、致癌性或致畸胎性的活化代謝物, 因此 CYP450 在代謝過程中, 同時扮演解毒及代謝活化的雙重角色。有關 CYP450 基因的調控機轉具有多樣性, 包括了基因轉錄、RNA 處理修飾 (processing)、穩定及轉譯, 酵素穩定等階層, 不同組織或細胞之 CYP450 基因會經由一種或多種階層調控, 而使其有不同的表現 (Porter and Coon, 1991; Okey, 1990)。在所有 CYP450 基因調控機轉的研究, 以 CYP1A1 的基因調控研究最多。主要是因為 CYP1A1 是生物體暴露環境污染物的

第一道防禦系統, 在毒理學研究上具有重要之意義。在多環芳香烴 (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH) 環境污染物的誘導下, 首先被誘發的 CYP450 基因即是 CYP1A1 (Guengerich, 1992; Gonzalez and Gelboin, 1994)。CYP1A1 基因調控主要是經由多環芳香烴感受器 (aryl hydrocarbon receptor, AhR) 路徑或戴奧辛 (TCDD) 感受器路徑誘發表現。最近研究顯示 AhR 感受器在細胞質會和熱休克蛋白 90 (heat shock protein 90, HSP90) 結合成一不具誘導 CYP1A1 能力的複合體 (complex), 當 TCDD 或 B[a]P 配位體 (ligand) 進入細胞時, 會與 AhR-HSP90 複合體上之配位體結合位 (ligand binding site) 結合, 而造成 HSP90 和 AhR 的 N 端之 bHLH 序列之結合力降低, 此步驟是形成活化型之 AhR 的重要過程。此活化型之 AhR 才能進入細胞核內與另一 Ah receptor nuclear translocator (Arnt) 結合成為 AhR-Arnt 複合體。而 AhR-Arnt 複合體才具有和 CYP1A1 基因 5' 上游的促進區 (enhancer region) 之 xenobiotic responsive element (XRE) 結合的功能 (Gonzalez, et al., 1993), 而啟動 CYP1A1 的轉錄作用。

CYP1A1 是生物體內代謝外來物質包括藥物、食品添加物、致癌物及環境污染物最重要的酵素之一。且 CYP1A1 調控機轉具有多樣性, 在許多階段包括基因轉錄、RNA 處理修飾 (processing)、穩定及轉譯, 酵素穩定, 都有一種或多種 CYP1A1 經由這種機轉而調控其不同組織或細胞表現 (Porter and Coon, 1991; Okey, 1990)。在先前的研究中我們發現, 黃酮 (flavone) 可藉由直接抑制肝臟微粒體酵素活性, 而達到抑制 IQ 及 Trp-P-2 之致突變性 (Lee and Tsai, 1991)。另外黃酮在甘胺酸/肌酸酐/葡萄糖 (glycine/creatine/glucose) 中可呈劑量關係地抑制 MeIQ_x 及 7,8-DiMeIQ_x 之形成 (Lee, et al., 1992)。本研究室在之前的研究中也發現槲皮酮會抑制以 Aroclor 1254 誘發之大白鼠肝臟微粒體中 CYP1A1-EROD 及 CYP1A2-ECD 的酵素活性, 因此抑制 IQ 的致突變性 (Lee, et al., 1994)。然而槲皮酮除了在酵素層次上具有抑制 CYP1A1

的酵素活性外，槲皮酮是否會經由調控 CYP1A1 之基因轉錄而達到其化學預防之目的呢？因此，本研究報告主要是以人類肝癌細胞株 (HepG2) 為模式系統，以 B[a]P 為 CYP1A1 之誘發劑，探討槲皮酮在分子層次上經由多環芳香烴感受器路徑調控 CYP1A1 之機轉表現，以期能進一步提供槲皮酮在化學預防上之學理基礎。

三、結果與討論

槲皮酮對 AhR 複合物與 DRE 結合之影響

為探討在 HepG2 細胞中 B[a]P 活化 AhR 複合物與 DRE 結合促進 CYP1A1 基因表現之 DRE 的結合能麗是否會受到槲皮酮的影響？首先將 HepG2 細胞種於 10 公分培養皿，待長至七、八分滿時加入 $10 \mu\text{M}$ B[a]P 及不同濃度之槲皮酮培養 18 小時，將細胞刮下並抽取核蛋白 (nuclear protein) 後，以 gel retardation assay 方法偵測 AhR 複合物與 DRE 鍵結之能力，結果發現 HepG2 細胞經 $10 \mu\text{M}$ B[a]P 處理後，在底片上出現具有 ^{32}P 放射性之蛋白-DNA 複合物，此複合物可被 200 倍濃度之非放射性 oligo DRE 競爭而消失，顯示其為經 B[a]P 活化後之 AhR 複合物與 DRE 形成專一性之鍵結。此專一性之鍵結物會隨著槲皮酮濃度之增加呈現劑量關係地被抑制，當 $10 \mu\text{M}$ 槲皮酮與 B[a]P 同時處理時，其抑制百分比達 60%。然而槲皮酮本身並不會活化 AhR 複合物。由本試驗可知 quercetin 在基因轉錄之層次上可藉由抑制 AhR 複合物與 DRE 之鍵結進而使細胞色素 P450 1A1 mRNA 之表現受到抑制。

槲皮酮對細胞質中 HSP90 蛋白之影響

Carver, L.A. et al., (1994) 指出 HSP90 在 Ah receptor pathway 中所扮演之角色為維持 Ah 受體具有一定之構型 (conformation) 使其能與激動劑 (agonist) (ex.. TCDD 或 B[a]P) 或拮抗劑 (antagonist) ($-\text{NF}$) 結合。Hansen, R.K. et al., (1997) 利用 $100 \mu\text{M}$ 槲皮酮處理人類乳癌細胞株—MDA-MB-231，結果發現槲皮酮能抑制 HSP27 及 HSP70 之蛋白表現。因此，我們推測槲皮酮在 HepG2 細

胞中可能是透過抑制 HSP90 之表現，使得 B[a]P 與 Ah 受體結合之機會降低，進而導致形成可與 DRE 結合之 AhR 複合物減少。HepG2 細胞經 B[a]P 及槲皮酮處理 18 小時後，依照前述之方法製備細胞質層 (cytosolic)，再以西方墨點轉漬法分析其所含之 HSP90 蛋白量。結果發現在所有之處理組中皆可偵測到 HSP90 蛋白之表現，然而槲皮酮之存在與否並不影響 HSP90 之蛋白質含量。由以上結果可知，槲皮酮在 HepG2 細胞中並不會經由改變細胞質中 HSP90 之蛋白量，導致 AhR 複合物與 DRE 結合能力之改變。

槲皮酮對細胞質層中 AhR-HSP 90 複合物形成之影響

已知 Ahr-Arnt 複合物之形成必須先有活化之 AhR 蛋白，才可進入細胞核內和 Arnt 結合成具有和 DRE 結合的 Ahr-Arnt 複合物，因此要形成活化型之 AhR 必須探討細胞質中，槲皮酮是否會影響 B[a]P 與 AhR 之配為體結合位 (ligand binding site) 結合，而造成 AhR-HSP90 複合體之不穩定而釋放出 HSP90，形成活化型之 AhR。因此以不同濃度之槲皮酮 ($0.1 \sim 10 \mu\text{M}$) 與 $10 \mu\text{M}$ B[a]P 處理 HepG2 細胞株 2 小時後，將 $500 \mu\text{g}$ 製備好之細胞質萃取液加入 HSP 90 抗體，於 4℃ 下緩慢搖動 2 小時後，加入 protein A-Sepharose CL-4B 於 4℃ 下緩慢搖動 1 小時以進行免疫沉澱，將所得之沉澱物溶在適量體積之 50 mM HEPES buffer 中，並加入等體積之 $2\times$ sample buffer 於 100°C 加熱 5 分鐘使蛋白變性，最後以 AhR 抗體進行西方墨點轉漬法分析。結果發現當 B[a]P 與槲皮酮同時處理時， 1 及 $10 \mu\text{M}$ 之槲皮酮分別增加了 AhR-HSP90 複合物中之 AhR 蛋白量達 1.2 及 2.0 倍，至於低濃度 $0.1 \mu\text{M}$ 之槲皮酮則無顯著改變。但單獨添加槲皮酮時亦能呈現劑量關係地增加 AhR-HSP90 複合物中之 AhR 蛋白量，分別增加了 4.6、6.2 及 7.3 倍。為了確定槲皮酮對 AhR-HSP90 複合物形成之影響，進一步以 $1 \mu\text{M}$ 之槲皮酮處理 HepG2 細胞 0, 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120 分鐘，同樣以上述之免疫沉澱法分析單獨之槲皮酮是否會隨著時間之增加而穩定 AhR-HSP90 複

合物之形成。結果發現經過 40 分鐘處理後, $1\mu\text{M}$ 之槲皮酮即可增加 AhR-HSP90 複合物中之含量, 且隨者時間之延長而有漸漸增加之趨勢。

由以上免疫沉澱所得之結果, 說明了槲皮酮在細胞質中可顯著地穩定 AhR-HSP90 複合物之形成, 使得 AhR 與 B[a]P 結合之機會降低, 而造成減低形成活化型之 AhR 轉移至細胞核內和 Arnt 結合形成 AhR-Arnt 複合物。

四、參考文獻

1. Harborne, J.B. (1986) Nature, distribution and function of plant flavonoids. In *Progress in Clinical and Biological Research*. Vol. 213. Edited by V. Cody, E. Middleton, Jr. and J.B. Harborne. pp. 15-24. Alan R. Liss, New York.
2. Kuhrau, J. (1976) The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet*, 24:117-170.
3. Kato, R., Nakadate, T., Tamamoto, S. and Sugimura, T. (1983) Inhibition of 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induced tumor promotion and ornithine decarboxylase activity by quercetin: possible involvement of lipoxygenase inhibition. *Carcinogenesis*, 4(10): 1301-1305.
4. Huang, N.T. and Ferraro, T. (1992) Phenolic compounds in food and cancer prevention, In "Phenolic Compounds in Food and Their Effect on Health II: Antioxidants & Cancer Prevention", pp. 8-34. American Chemical Society, Washington, DC.
5. Chae, Y.-H., Marcus, C.B., Ho, D.K., Cassady, J.M. and Baird, W.M. (1991) Effects of synthetic and naturally occurring flavonoids on benzo[a]pyrene metabolism by hepatic microsomes prepared from rats treated with cytochrome p-450 inducers. *Cancer Lett.* 60:15-24.
6. Verma, A.K. (1992) Modulation of mouse skin carcinogenesis and epidermal phospholipid biosynthesis by the flavonol quercetin, In "Phenolic Compounds in Food and Their Effect on Health II: Antioxidants & Cancer Prevention" eds. Hung, M.T., Ho, C.T. and Lee, C.Y. pp. 251-264. American Chemical Society, Washington, DC.
7. Avila, M.A., Velasco, J.A., Cansado, J. and Notario, V. (1994) Quercetin mediates the down-regulation of mutant P53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. *Cancer Res.*, 54: 2424-2428.
8. Okey, A.B. (1990) Enzyme induction in the cytochrome P-450 system. *Pharmac. Ther.* 45: 241-298.
9. Porter, T.D. and Coon, M.J. (1991) Cytochrome P450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* 266: 13469-13472.
10. Guengerich, F.P. (1992) Metabolic activation of carcinogens. *Pharmac. Ther.* 54: 17-61.
11. Gonzalez, F.J. and Gelboin, H.V. (1994) Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab. Rev.* 26: 165-183.
12. Gonzalez, F.J., Liu, S.-Y. and Yano, M. (1993) Regulation of cytochrome P450 genes: molecular mechanism. *Pharmacogenetics* 3: 51-57.
13. Lee, H. and Tsai, S.-J. (1991) Detection of IQ-type mutagens in canned roasted eel. *Food & Chemical Toxicology*, 29: 517-522.
14. Lee, H., Jiaan, C.-Y. and Tsai, S.-J. (1992) Flavone inhibits mutagen

formation during heating in a glycine/creatine/glucose model system. Food Chem., 45: 235-238.

15. Lee, H., Wang, H.-W., Su, H.-Y. and Hao, N.J. (1994) The structure activity relationships of flavonoids as inhibitors of cytochrome P-450 enzymes in rat liver microsomes and the mutagenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. Mutagenesis, 9: 101-106.
16. Carver, L.A., Jackiw, V. and Bradfield, C.A. (1994) The 90-kDa heat shock protein is essential for Ah receptor signaling in a yeast expression system. J. Biol. Chem. 269(48): 30109-30112.
17. Hansen, R.K., Oesterreich, S., Lemieux, P., Sarge, K.D. and Fugua, S.A.W. (1997) Quercetin inhibits heat shock protein induction but not heat shock factor DNA-binding in human breast carcinoma cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 239: 851-856.

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

槲皮酮經由多環芳香警感受器路徑條控細胞色素 P4501A1
基因表現之分子機轉研究

Molecular mechanisms of quercetin on inhibition of cytochrome
P4501A1 gene expression by aryl hydrocarbon receptor pathway

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC90 - 2320 - B - 041 - 019

執行期間： 90 年 8 月 1 日 至 91 年 7 月 31 日

計畫主持人：康志強

共同主持人：李 輝

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：嘉南藥理科技大學保健營養系

中 華 民 國 九 十 一 年 十 月 三 十 日

