

國科會精簡成果報告

一、前言

由於體內維生素 E 含量受到組織保留能力與氧化需求及代謝速率各方面所共同影響，因此若是有某些藥物或食物成分會干擾維生素 E 的代謝途徑便有可能間接影響維生素 E 的營養狀況。由於維生素 E 的代謝機制方面的研究較少，雖然目前對於維生素 E 的相關代謝產物已經被分離出來，但是對於參與的酵素與活化機制仍未確定。

維生素 E 在尿液中的主要產物是 Carboxyethyl hydroxychromans (CEHC)，目前認為維生素 E 先經 CYPs 進行 ω -氧化後，再進行 β -氧化作用，最後經過共軛反應後便自尿液 (Brigelius-Flohe & Traber 1999) 或膽汁 (Kiyose et al. 2001) 排出。HepG2 細胞得研究皆指出參與各種維生素 E 代謝的 CYP 酵素以 3A 為主 (Parker et al. 2000, Birringer et al. 2001)；許多證據都顯示 PXR 是 CYP3A 酵素的主要轉錄調控因子 (Kliewer 2003) 既然 CYP3A 受到 PXR 所活化，因此維生素 E 代謝可能會透過 PXR 之活化並誘導其下游基因蛋白質(如 CYP3A)之表現來進行。但是目前尚未有動物實驗證明此點。PXR 受到各種固醇類和外來物質所活化，如抗生素 rifampicin、糖皮質固醇或 dexamethasone、pregnenolone 16 α -carbonitrile (PCN) 以及 RU486 而上述這些化合物都是誘導 CYP3A 表現的典型成分。

二、目的

本實驗首先以動物實驗來證明 PXR (Pregnane X receptor) 及 CYP (Cytochrome P450) 是參與維生素 E 代謝的重要因子。因為 PCN 是專一性對大鼠 PXR 具有活化並誘導 CYP3A 表現的誘導劑 (Rifampicin 則是針對小鼠和人類才有作用) 所以選用 PCN 作為正控制組。

三、研究方法

(一) 動物分組與飼養

自樂斯科生技公司購買鼠齡三至四週大的 Wistar 雄鼠，初始體重平均為 92.85 公克時依飼料分為兩大組：控制組(正常維生素 E 50ppm)和高維生素 E (500ppm) 組。飼養兩週後，連續三天每日對大鼠予以腹腔注射 PCN(75mg/kg/d) 或注射 DMSO，因此分成四小組：EC 組(控制組+DMSO)、EP 組(控制組+PCN)、HC 組(高維生素 E+DMSO)、HP 組(高維生素 E 組+PCN)，並置於代謝籠收集三天尿液。犧牲前一天晚上移去飼料盒，當天抽血分離血漿。於無菌操作下取 0.1 克肝臟供 RNA 抽取，其餘肝臟取適量製備肝均質液供 TBARS 與維生素 E 之測定。部分肝均質液經離心取得去粒線體上清液與肝微粒體。

飼料配方將依據 AIN-76 予以修飾配製。所有大鼠皆餵養於溫度及日照時間控制的環境中，任其自由攝食及飲水，每週記錄體重及飼料攝取。

(二)尿液中 α -CEHC 代謝產物與肌酸酐含量之測定

取 1 mL 尿液加入 6M HCl 酸化，以 9 mL 乙醚萃取，離心後取出定量有機層進行乾燥，再以 200 μ L 移動相回溶，由 HPLC-ECD 偵測維生素 E 代謝產物 (α -CEHC) 的含量，並以 α -CEHC 外部標準曲線來計算濃度。

(三)細胞色素 P450 3A1 與 3A2 蛋白質量之測定

肝微粒體經過適當稀釋後測定蛋白質含量。以 7.5% SDS-PAGE 進行電泳，轉印至 PVDF 後，分別以 3A1、3A2 之專一性抗體進行免疫反應，最後以 ECL 試劑(Amersham)進行冷光反應，由 mini-camera 拍攝冷光照片，再以電腦分析個別色帶冷光強度。

(四)維生素 E 濃度與 TBARS 測定

取得血漿或肝臟均質液加入酒精後再以 n-hexane 萃取，以 HPLC 分析維生素 E 含量。另以 Thiobarbiturate method 測定 TBARS 作為脂質過氧化指標。

(五)血漿脂質與白蛋白測定

以市售測定試劑測定血漿白蛋白、三酸甘油酯與膽固醇含量。

(六)肝臟 Glutathione-S-Transferase 活性測定

取細胞質上清液與還原態 GSH 作用，透過 CDNB-GSH 產物之生成來計算 GST 活性。活性單位為 $\mu\text{mol CDNB-GSH conjugated form}/\text{min}/\text{mg protein}$ 。

四、結果與討論

動物的初始體重平均為 92.85 公克，分成正常與高維生素 E 兩大組飼養兩週後(在施打 PCN 之前)平均體重增加為 252 公克，如表一所示，四組老鼠的體重、飼料攝取量與飼料效率皆無顯著差異，表示維生素 E 之添加不影響動物體重，而且在施打 PCN 前的各組均體重皆相當。

動物施打 PCN 三天後，各器官的重量以及器官相對體重百分比的結果列於表二，其中只有肝臟的器官重量或相對體重百分比顯著受到 PCN 注射所影響 (Two way ANOVA)，所以 EP、HP 兩注射組顯著高於 EC、HC 兩對照組。Guo 等人(2002) 也發現在注射 SD 大鼠 PCN(75mg/kg/d)後，不管是雄鼠或母鼠，鼠齡 30 至 90 天皆出現注射後的肝重與肝臟相對體重比率顯著高於玉米油注射的老鼠。由於 PCN 會誘導大鼠肝臟總 P450 活性 (Lake et al. 1998)、內質網增生、肝細胞增生、進而增加肝臟重量 (Garg et al. 1975, Silz et al. 1976)，所以是造成肝臟腫大的原因。當測定血漿白蛋白、三酸甘油酯與膽固醇濃度時，四組間並無顯著差異，表示 PCN 之注射雖然影響肝臟重量，但是並未影響蛋白質營養以及脂質代謝作用(請見表三)。

PCN 注射後，肝臟 CYP 3A1 與 CYP 3A2 蛋白質表現量皆明顯大量表現(數據未列出)，此外屬於肝臟解毒酵素系統 Phase II 的 Glutathione-S-Transferase (GST) 活性亦顯著受到 PCN 誘導而增加 (見表四)，且以 EP 組顯著最高，其餘三組無顯著差異；然高維生素 E 組經 PCN 注射後所誘導的 GST 活性則不顯著(HC 與 HP 組間沒有差異)。雖有報告指出高量維生素 E 會使肝臟 GST 活性增加(Chen et al. 1998)，由於該劑量為 1500ppm，約為本實驗(500ppm)的三倍，且飼養期八週約為本實驗的四倍時間，所以是上述差異造成本實驗未顯出維生素 E 與 PCN 對 GST 之加成誘導作用。

肝臟維生素 E 與血漿維生素 E 含量不但受飼料維生素 E 添加量所影響，亦明顯受到 PCN 注射所影響(見表四)，至於 PCN 使肝臟維生素 E 濃度下降的可能原因可能有兩個層面：一、維生素 E 的消耗量：由於 CYP 450 酵素系統活性增加造成脂質過氧化增加，從 TBARS 顯著受到 PCN 注射而增加的結果，推測肝臟對維生素 E 的消耗量有所增加。二、維生素 E 的代謝狀況：由於 CYP 3A1 與 CYP 3A2 活性增加，增加對維生素 E 的代謝速率。

至於維生素 E 的代謝途徑是否因為 CYP3A 被 PCN 誘導而加速，可由尿液的維生素 E 代謝產物排出量來觀察。從表五得知各組三天的尿液排出總量於四組間皆無顯著差異；尿液中維生素 E 代謝產物(即 α -CEHC)不管以每日排出量、每毫升尿液或是每克肌酸酐來表示，皆受到飼料維生素 E 添加以及 PCN 注射所影響，然而 α -CEHC 排出量並非如預期因 PCN 之注射而增加，反之以 HC 組排出量顯著最高，HP 組次之，EP 和 EC 組最低，而 EP 組的 α -CEHC 排出量亦顯著較 EC 組少。推其原因，可能參與維生素 E 代謝的酵素很多，並不僅侷限於 CYP 3A，是否有其他參與的 CYP 酵素活性反而受到 PCN 所抑制則需進一步探討。例如由 PPAR α 所調控的 CYP4A 亦與維生素 E 代謝有關，此外除了肝臟外，腎臟亦有 CYP 活性，雖然腎臟的 CYP 活性約只有肝臟的 1/100，但是其調控上是否有組織特異性則值得探討。所以雖然許多文獻證明 CYP3A 對 γ -Tocopherol 的代謝為決定性的酵素，但是對於 α -Tocopherol 的代謝或許不是那麼具有決定性或全面性，這將是本研究將要繼續深入探討的部分。

肝臟維生素 E 濃度或血漿維生素與每毫升尿液 α -CEHC 濃度成現正相關性， R^2 分別為 0.442 ($p < 0.01$) 和 0.459 ($p < 0.01$)。表示體內維生素 E 含量越高，代謝產物的排出量也越多。由此推測，動物體內有一個恆定的代謝維生素 E 的酵素系統，似乎可以代謝一定比例的維生素 E 以排出體外，究竟是怎樣的調控系統？以及其生理意義為何？都是直得進一步探討的議題。

五、參考文獻

- Birringer M, Drozan D & Brigelius-Flohe R (2001) Tocopherols are metabolized in HepG2 cells by side chain ω -oxidation and consecutive β -oxidation. *Free Radic Biol Med* 31:226-232
- Brigelius-Flohe R, Traber MG (1999) Vitamin E: function and

metabolism. *FASEB J* 13:1145-1155

- Chen HW, Lii CK, Sung WC, Ko YJ, 1998, Effect of vitamin E on rat hepatic cytochrome P-450 activity. *Nutr Cancer* 31(3):178-183
- Garg BD, Kovacs K, Tuchweber B, Khandekar JD (1975) Effect of pregnenolone-16-alpha-carbonitrile, a microsomal enzyme inducer, on the regenerating rat liver. *Acta Anat (Basel)* 91:161-174
- Guo GL, Johnson DR, Klaassen CD, 2002, Postnatal expression and induced by pregnenolone-16 α -carbonitrile of the organic anion-transporting polypeptide 2 in rat liver. *Am Soc Pharmacol Exp Ther* 30 (3)283-288
- Kiyose C, Saito H, Kaneko K, Hamamura K, Tomioka M, Ueda T, Igarashi O (2001) Alpha-tocopherol affects the urinary and biliary excretion of 2,7,8-trimethyl-2 (2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman, gamma-tocopherol metabolite, in rats. *Lipids*. 2001 May;36(5):467-472
- Kliwer SA, Goodwin B, Willson TM (2002) The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr Rev* 23:687-702
- Lake BG, Renwick AB, Cunninghame ME, Price RJ, Surry D, Evans DC (1998) Comparison of the effects of some CYP3A and other enzyme inducers on replicative DNA synthesis and cytochrome P450 isoforms in rat liver. *Toxicology* 131:9-20
- Parker RS, Sontag TJ, Swanson JE (2000) Cytochrome P4503A-dependent metabolism of tocopherol and inhibition by sesamin. *Biochem Biophys Res Commun* 277:531-534
- Silz S, Valet G, Tongendorff J, Strecker W, Ruhstroth-Bauer G (1976) Effect of pregnenolone-16-alpha-carbonitrile on rat liver. *Acta Hepatogastroenterol (Stuttg)* 23: 255-261

六、附表：請參考檔案「附表」

七、成果自評

許多細胞培養的結果皆指出 PXR、細胞色素 P450 3A 與維生素 E 之代謝有關係。但是透過 PXR 誘導劑之動物實驗的驗證結果發現，維生素 E 代謝產物確實受到 PCN 藥物所影響，然而結果並未如預期會因為 PCN 之注射而增加，這應該是因為動物體內酵素代謝與種類的複雜性使然。但是 PCN 為何反而使維生素 E 代謝產物下降？反而成為接下來要探討的問題，因此本實驗此時要考慮其他指標或實驗設計來闡明 PCN(PXR 誘導劑)在維生素 E 代謝的角色，亦即 PXR 及其下游基因(如 CYP 3A)參與維生素 E 代謝的可能機制(抑制或促進)。