

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

植物雌激素對發炎反應與雌激素相關免疫疾病的影響(1/3)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC92-2321-B-002-013-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學生化科技學系

計畫主持人：林璧鳳

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 5 月 12 日

一、摘要：

豆類食品中含豐富的植物雌激素尤其是異黃酮類，近年來關於植物雌激素的免疫調節功能開始受到注目，因此本研究欲探討黑豆萃取液對調節發炎反應的影響。在本階段實驗利用初代腹腔巨噬細胞與脾臟細胞在裂殖素 LPS 或刀豆素 ConA 活化下，可分泌發炎介質與細胞激素的特性，添加黑豆萃取液樣品，分析樣品對於活化細胞分泌這些介質物的影響，以作為初步評估其免疫調節功能之用。本研究共有低異黃酮黑豆、發酵零天黑豆與發酵五天黑豆等三種樣品，以此三種黑豆萃取樣品處理 lipopolysaccharide(LPS)活化之初代腹腔巨噬細胞或 Concanavalin A(ConA)活化之脾臟細胞，結果顯示 48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 發酵五天黑豆萃取液顯著降低活化巨噬細胞分泌 IL-6 與 IL-1 β 的能力，並能抑制活化脾臟細胞分泌 IFN- γ 的作用，但是卻增加 IL-5 的分泌；另外增生試驗發現發酵五天的黑豆萃取液具促進脾臟細胞增殖之能力。因此，本部分結果說明經發酵的黑豆發酵液具有降低發炎介質分泌的能力，此與 RAW264.7 巨噬細胞株試驗一致，並且發現它具有影響 Th1/Th2 細胞激素平衡與促進脾臟細胞增生等免疫調節功能。

關鍵字：異黃酮、黑豆、LPS、ConA、免疫調節

二、研究緣由與目的

本計劃配合『功能性保健食品之綜合評估』整合型計畫，利用本研究室建立之篩選具有降低發炎介質與影響急性發炎能力的方法，探討黑豆萃取液對於發炎反應的影響。在前一階段的細胞測試實驗，發現經發酵後的相較於未經發酵的黑豆萃取液，更顯著抑制活化之 RAW264.7 巨噬細胞株分泌 IL-6 的作用；因此，接續的實驗利用小鼠取得的腹腔巨噬細胞測試黑豆樣品，以探討對於初代巨噬細胞分泌發炎介質的影響，並比較細胞株與初代細胞影響的一致性；另外再以初代脾臟細胞測試樣品，評估黑豆樣品對於 Th1/Th2 細胞激素平衡與脾臟細胞增殖的影響。

三、材料與方法

1. 材料

(1)黑豆:為黑豆台南三號(台南、學甲),本研究共有低異黃酮黑豆、發酵零天黑豆與發酵五天黑豆等三種樣品,因為樣品為甲醇萃取溶液,故經減壓濃縮並抽乾後,以 dimethyl sulfoxide(DMSO)溶解樣品,經 $0.22\mu\text{m}$ 濾膜過濾後,作為處理初代細胞用。

(2)試劑:LPS、ConA 皆購自美國 Sigma Chem.Co.

2. 實驗方法

(1)細胞:自 8~12 週大的 BALB/c 雌鼠取得初代細胞,包括腹腔巨噬細胞與脾臟細胞,於實驗流程中分別以 LPS 或 ConA 刺激下,體外添加黑豆萃取液樣品,分析它們對於活化細胞分泌發炎介質與細胞激素的影響。

(2)分析: IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-2、IFN- γ 、IL-4 和 IL-5 等細胞激素分泌量以 sandwich-ELISA 的方法測定,另外脾臟細胞增生試驗以 $^3\text{[H]}$ incorporation法測定之。

四、結果與討論

1. 黑豆樣品對活化之腹腔巨噬細胞的影響

圖一、二、三為黑豆萃取液對 $10\mu\text{g/mL}$ LPS 活化之腹腔巨噬細胞分泌 IL-1 β 、TNF- α 與 IL-6 等發炎介質的影響,結果發現添加發酵五天的黑豆萃取液會降低發炎介質的分泌,其中 IL-1 β 與 IL-6 的降低呈現顯著差異性,但是 TNF- α 則未達統計差異($p=0.1$);本研究室在前一階段的細胞株實驗發現,經發酵的黑豆樣品具降低 IL-6 的分泌,故在此說明樣品的處理於巨噬細胞株與初代細胞的影響呈現一致性,也更顯示經過發酵五天的黑豆萃取液具降低發炎介質分泌的作用。

2. 黑豆與 genistein 對活化之腹腔巨噬細胞影響之比較

為比較黑豆樣品與異黃酮對於發炎介質的影響,細胞實驗加入 genistin 與 genistein 的處理,結果(圖一、二、三)發現 genistein 顯著抑制 IL-1 β 與 TNF- α 的分泌,但是卻增加 IL-6 的分泌;由上述結果得知發酵黑豆樣品與 genistein,對

於 IL-6 分泌呈現相反的趨勢，故我們認為發酵後的黑豆樣品除具有異黃酮的生物活性外，可能還具有未知活性物質影響發炎介質的生成。

3. 黑豆樣品脾臟細胞增生的影響

本研究進一步以初代脾臟細胞，檢測黑豆樣品是否具促脾臟細胞增生之能力，結果如圖四所示，經發酵處理的黑豆樣品具有促進脾臟細胞增生的能力。

4. 黑豆樣品對活化之脾臟細胞的影響

實驗接續探討黑豆萃取液對於 5 $\mu\text{g/mL}$ ConA 活化之脾臟細胞分泌 Th1 與 Th2 細胞激素的影響，本實驗測定的 Th1 細胞激素為 IL-2 與 IFN- γ ，Th2 細胞激素為 IL-4 與 IL-5。圖五結果顯示，經發酵的黑豆樣品與 genistein 會抑制活化之脾臟細胞 IFN- γ 的分泌，但不影響 IL-2 之分泌。在圖六結果則發現 genistein 顯著降低活化之脾臟細胞 IL-4 的分泌，而未發酵與發酵的黑豆樣品也具有降低 IL-4 分泌的能力，不過未達統計差異；另外，圖六也顯示發酵的黑豆樣品會增加 IL-5 的分泌，但是未經發酵的黑豆樣品與 genistein 卻未影響 IL-5 的生成。因此說明經發酵處理的黑豆與 genistein 對於 Th1 與 Th2 細胞激素生成，呈現類似的作用，唯對於 IL-5 展現不同的影響。

5. 黑豆樣品對 Th1/Th2 細胞激素平衡的影響

為了解黑豆樣品對於 Th1/Th2 細胞激素平衡的影響，將 IL-2 或 IFN- γ 分泌量分別除以 IL-4 和 IL-5 分泌量，結果如圖七所示，genistein 顯著增加 IL-2/IL-4 比值，而未發酵與發酵的黑豆樣品也具有增加 IL-2/IL-4 比值的作用，不過未達統計差異；而樣品對於 IL-2/IL-5 比值並無顯著影響。另一方面，由於發酵的黑豆樣品與 genistein 會抑制 IFN- γ 分泌量，因此兩者對於 IFN- γ /IL-4 或 IFN- γ /IL-5 比值，顯現降低的趨勢，結果如圖八所顯示。

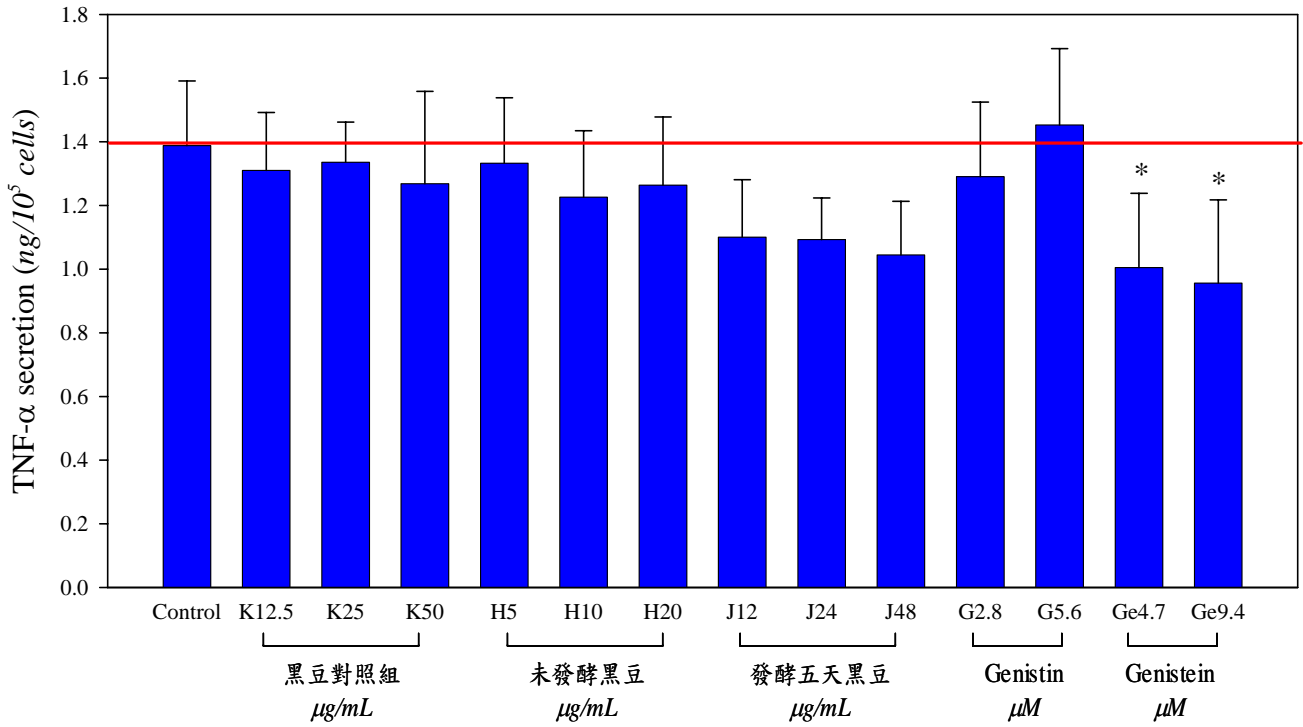
五、計畫成果自評

本研究依據計畫大綱，依序完成 (1) RAW264.7 細胞株篩選黑豆樣品與 (2) 初代腹腔巨噬細胞驗證巨噬細胞株影響指標的一致性；並在階段性實驗發現經發

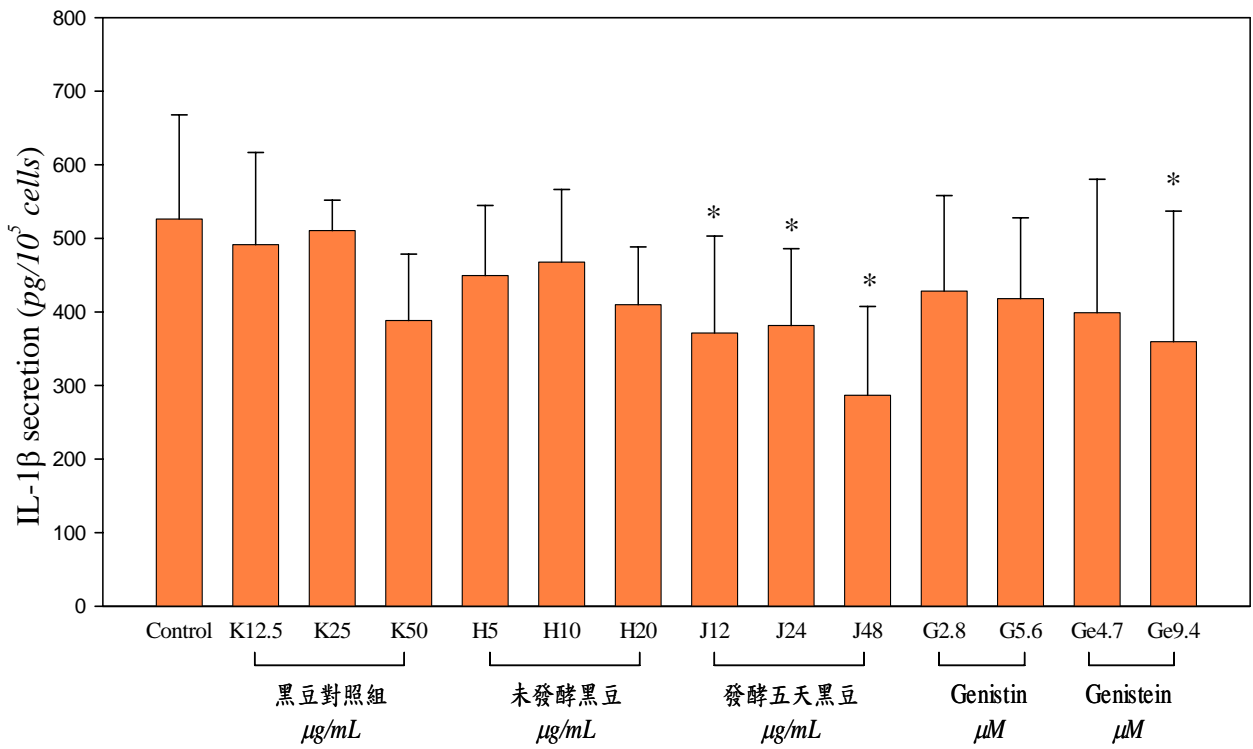
酵的黑豆樣品具降低活化之脾臟細胞 IFN- γ 的分泌，因此更肯定發酵黑豆樣品對於降低發炎反應的潛力，目前研究工作進度順利，對後續之研究深具信心，希冀大力支持。

五、參考文獻

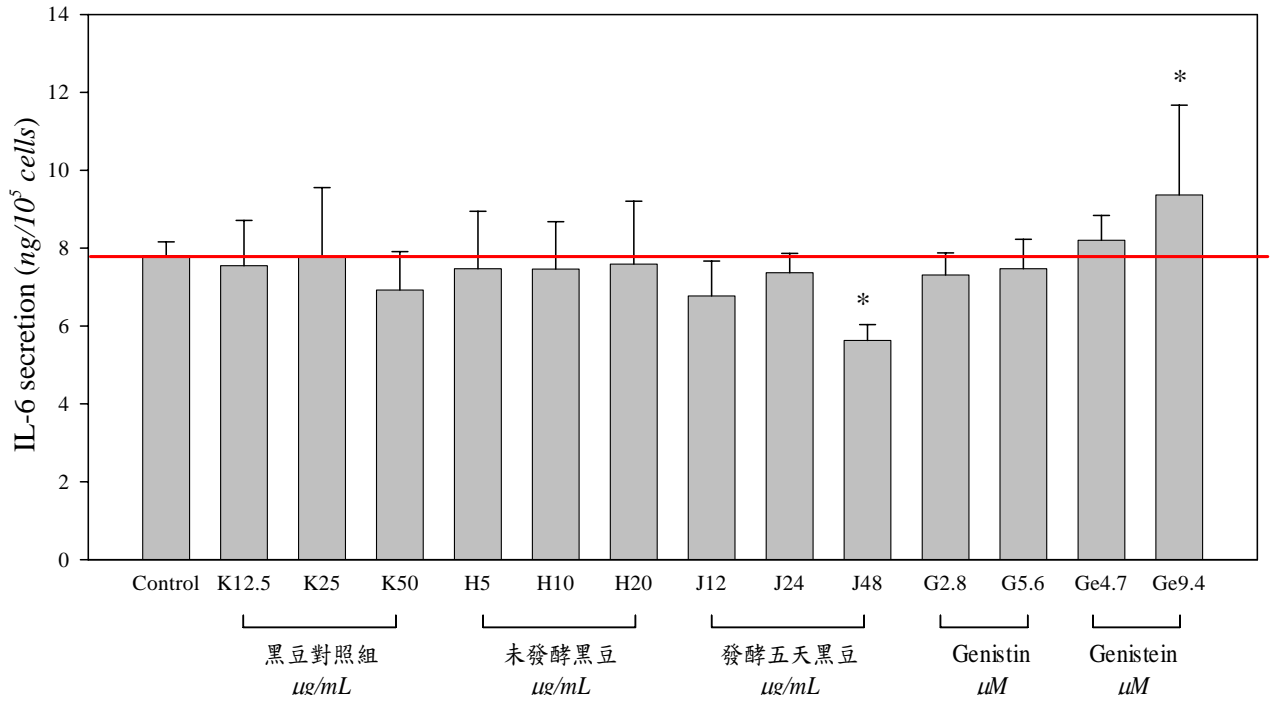
1. Claudia R. Cavaglieria, Anita Nishiyamab, Luis Claudio Fernandesb, Rui Curic, Elizabeth A. Milesd, Philip C. Calderd(2003): Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. *Life Sciences* 73 1683–1690
2. Julie R. Osterg, Shannon L Taylor, Heinz Baumann and Elizabeth A. Repasky (2000): Regulatory effects of fever-range whole-body hyperthermia on the LPS-induced acute inflammatory response. *Leukocyte Biol* 68: 815~820
3. Karen O Klein, Mona J, Jeffery A. Wong and Jeffery Chang (2002): Estrogen bioactivity in Fo-Ti and Other herbs used for their estrogen-like effects as determined by a recombinant cell bioassay. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88(9): 4077–4079
4. Markus W. Knöferl, Martin K. Angele, Martin G. Schwacha, Anantha Samy, Kirby I. Bland, and Irshad H. Chaudry(2003): Immunoprotection in proestrus females following trauma-hemorrhage: the pivotal role of estrogen receptors. *Cellular Immunology* 222: 27–34
5. Yasuhiro Takahata, Mayumi Ohnishi Kameyama, Shu Furuta, Masakazu Takahashi and Ikuo Suda(2001): Highly polymerized procyanidins in brown soybean seed coat with a high radical-scavenging activity *J. Agric. Food Chem* 49: 5843-5847



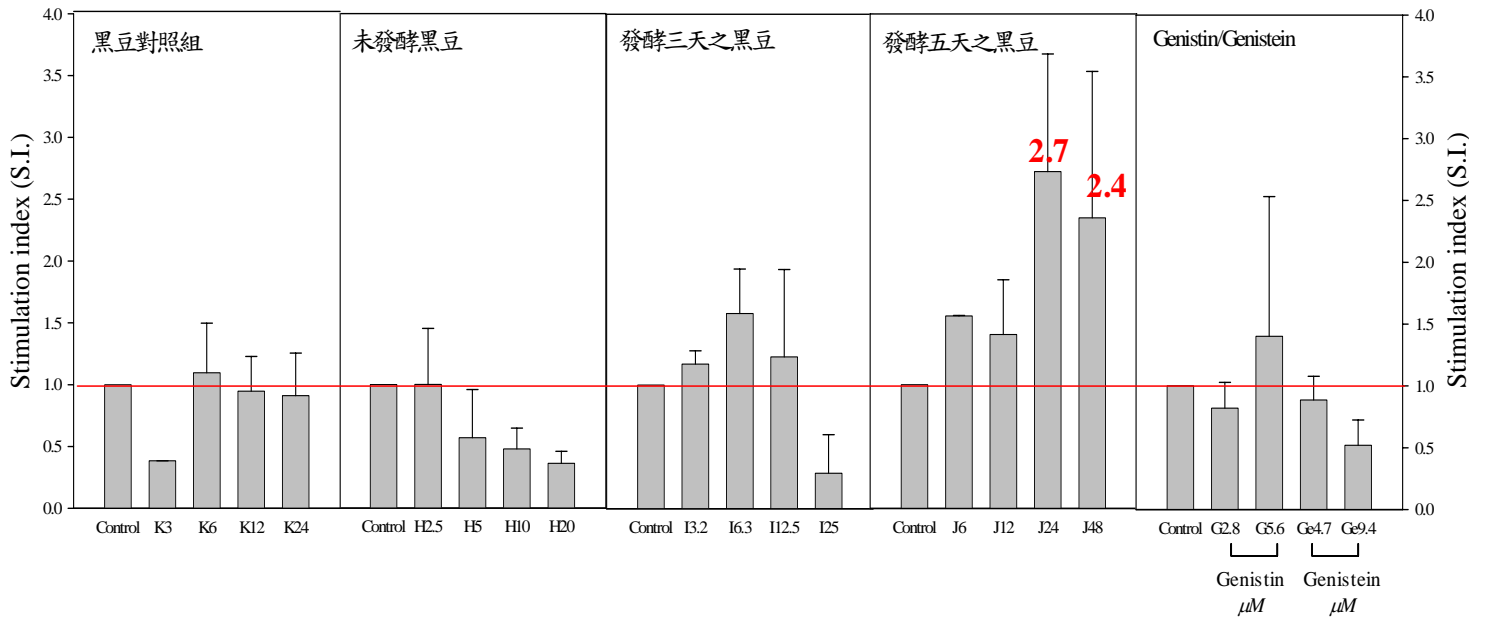
圖一、試驗樣品對活化之腹腔巨噬細胞分泌 TNF- α 的影響



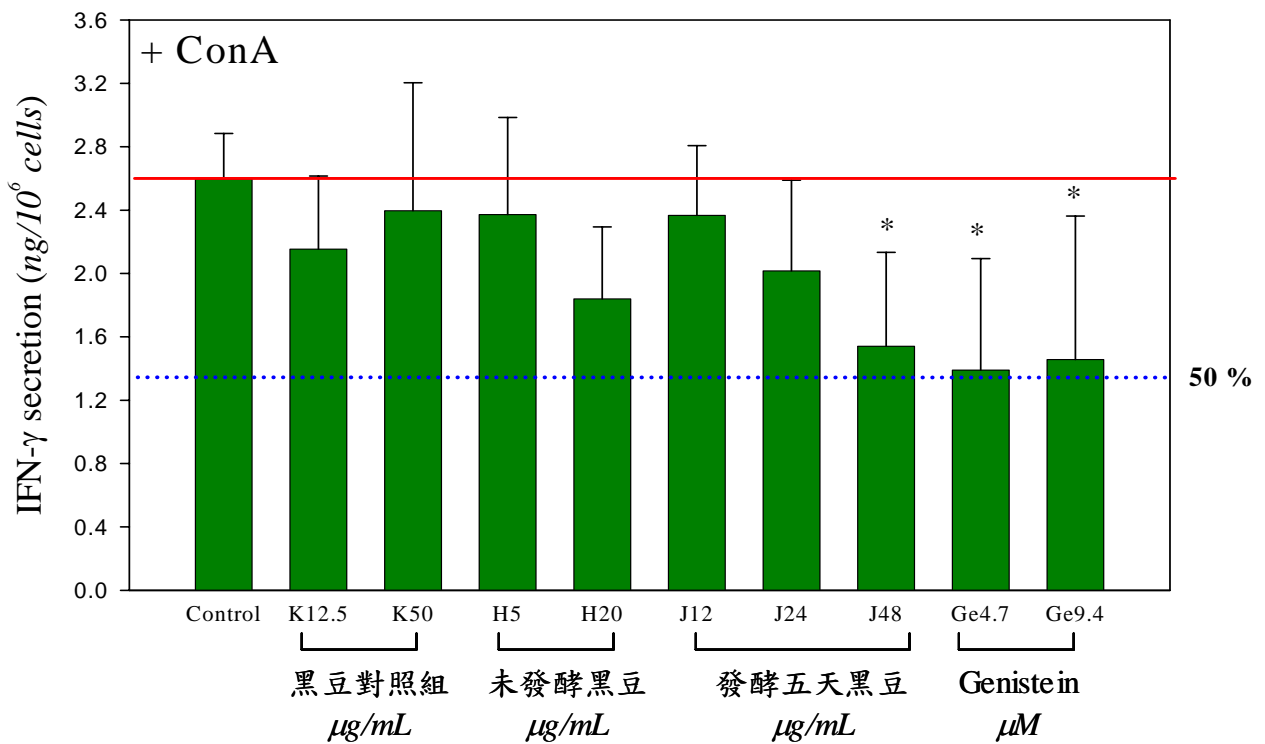
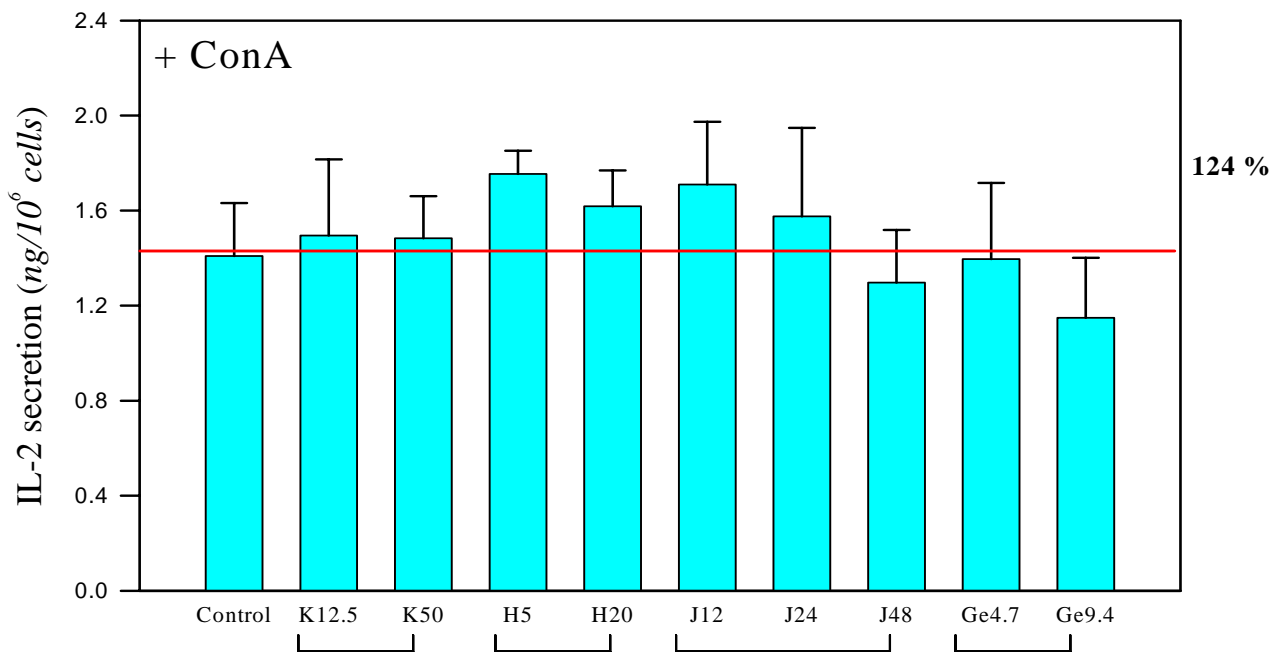
圖二、試驗樣品對活化之腹腔巨噬細胞分泌 IL-1 β 的影響



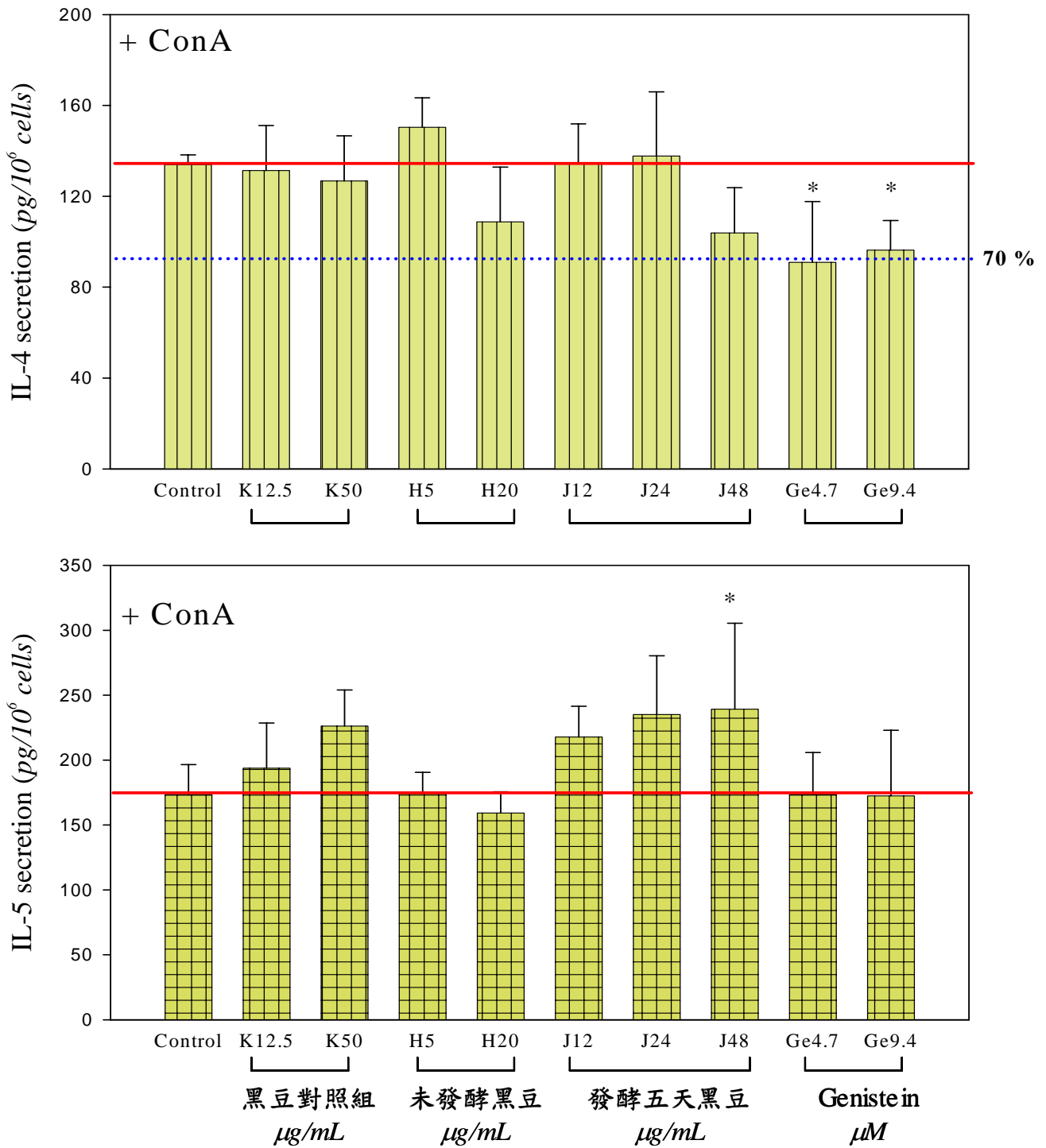
圖三、試驗樣品對活化之腹腔巨噬細胞分泌 IL-6 的影響



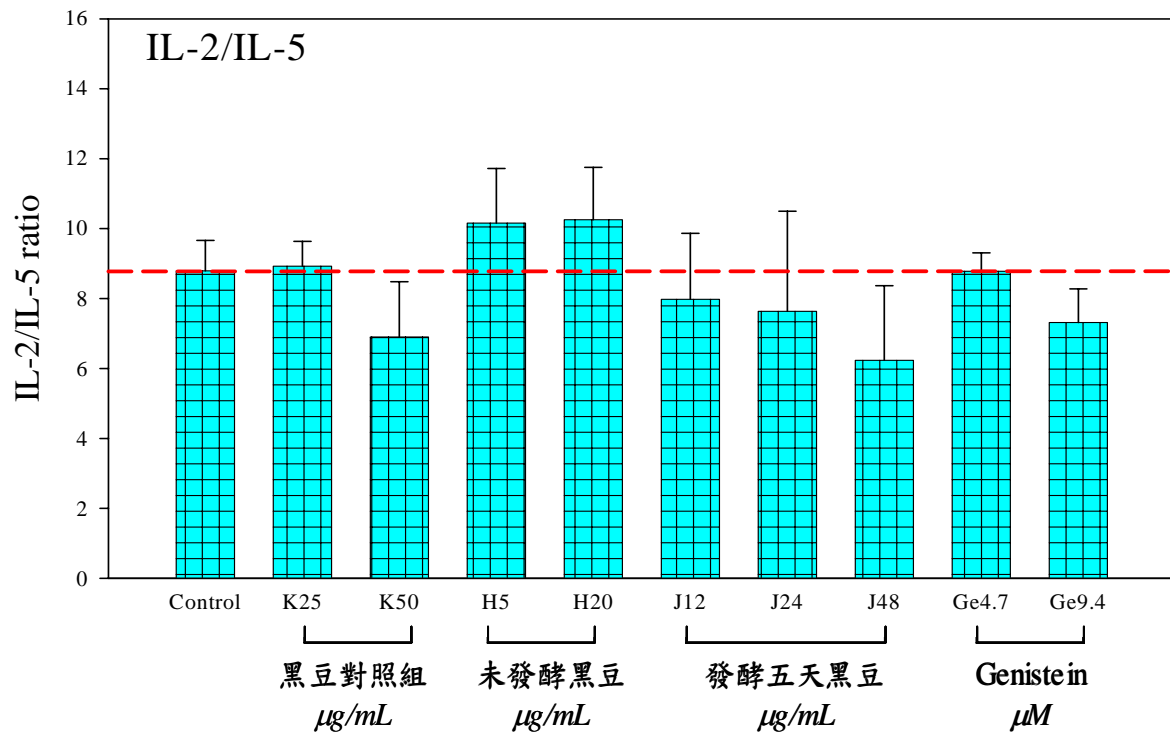
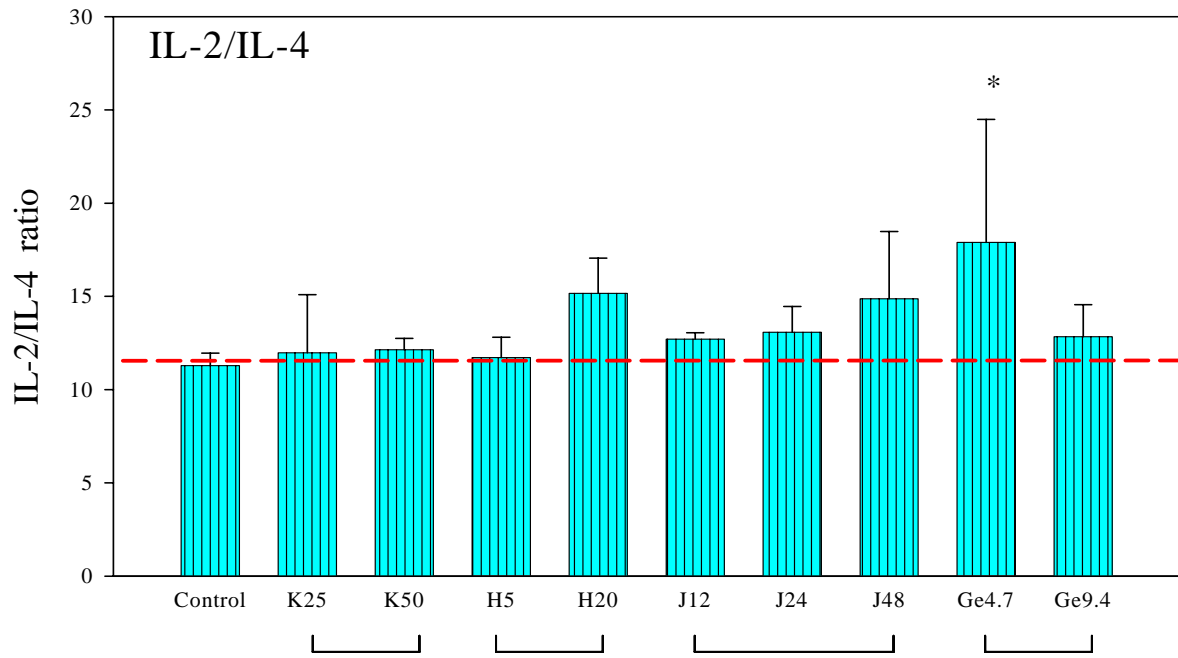
圖四、試驗樣品對於脾臟細胞增殖的影響



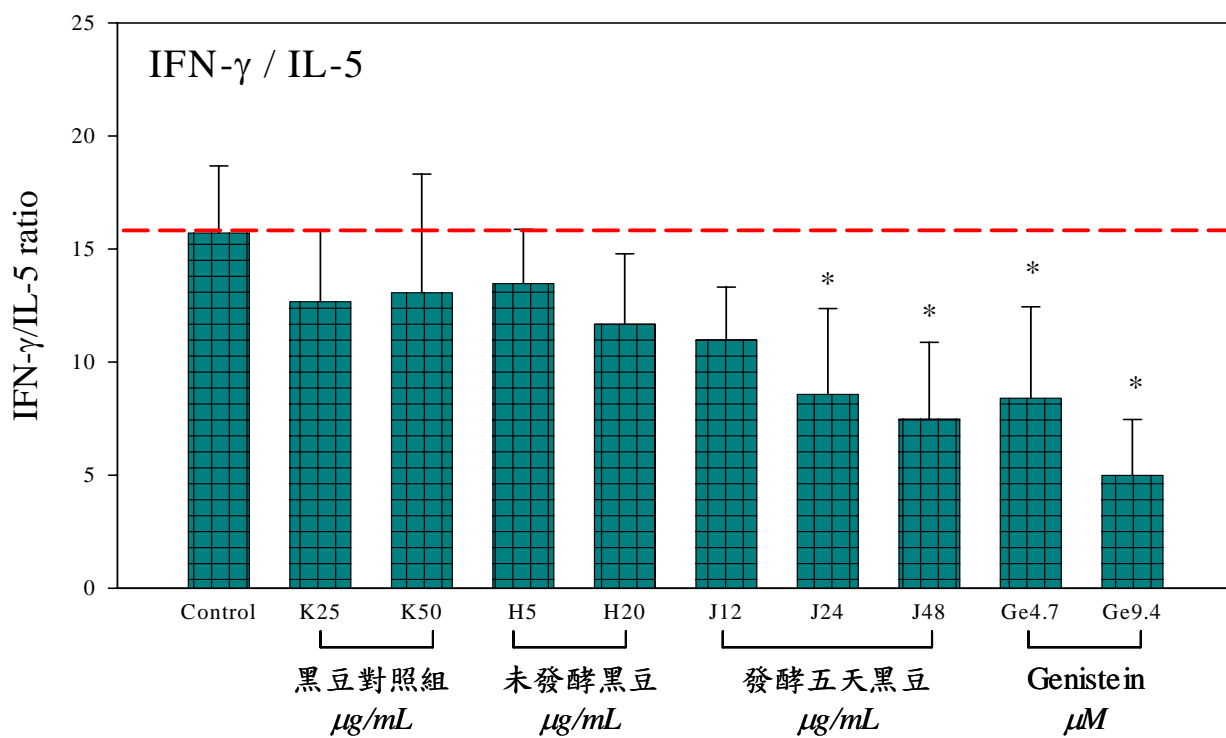
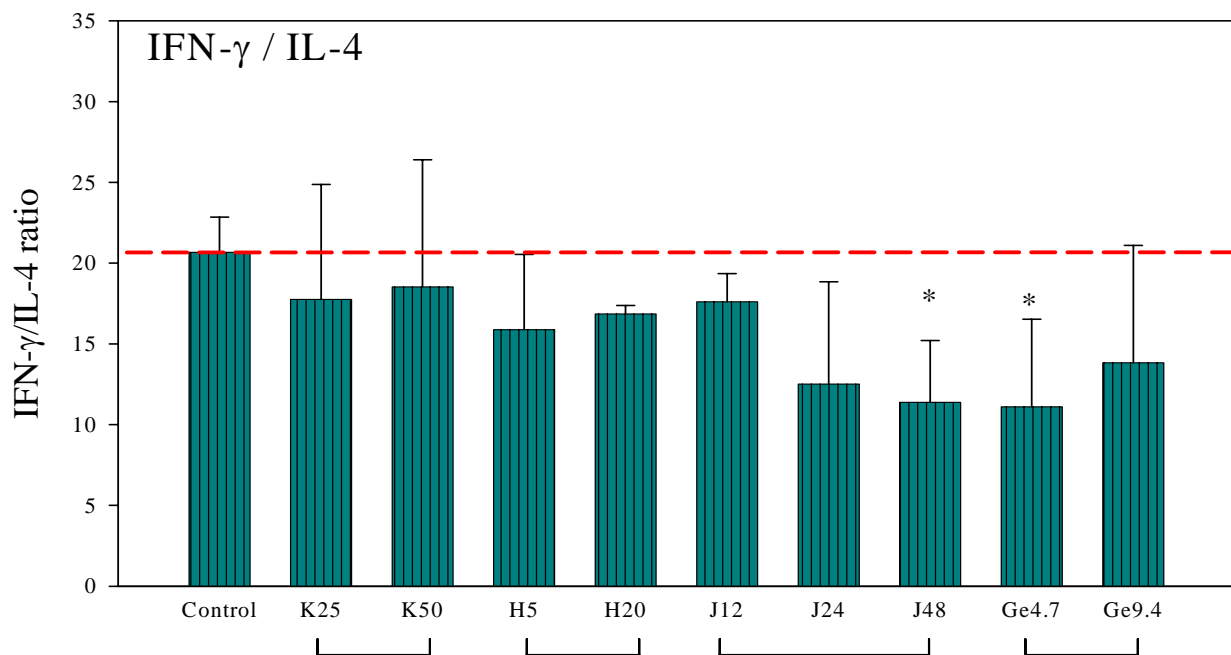
圖五、試驗樣品對 ConA 活化之脾臟細胞分泌 IL-2 與 IFN- γ 的影響



圖六、試驗樣品對 ConA 活化之脾臟細胞分泌 IL-4 與 IL-5 的影響



圖七、試驗樣品對 ConA 活化之脾臟細胞 IL-2/IL-4 與 IL-2/IL-5 比值的影響



圖八、試驗樣品對 ConA 活化之脾臟細胞 IFN- γ /IL-4 與 IFN- γ /IL-5 比值的影響