

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

植物動情素影響細胞生長及釋放發炎媒介物質之作用機制  
研究(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2314-B-002-343-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院檢驗醫學科

計畫主持人：蔡克嵩

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國92年5月26日

行政院國家科學委員會專題研究計畫期中進度報告  
植物動情素影響細胞生長及釋放發炎媒介物質之作用機制研究(1/2)  
The mechanism(s) of effect of phytoestrogens on the cell proliferation and  
inflammatory factors release

計畫編號：NSC 91-2314-B-002-343

執行期限：91年8月1日至92年7月31日

主持人：蔡克嵩 台大醫學院檢驗醫學部

共同主持人：楊榮森 台大醫學院骨科

共同主持人：劉興華 台大醫學院毒理所

### 一、中文摘要

植物動情素(phytoestrogens)是一種天然來源的植物化學物。一般來說其可分類為isoflavones、coumestans及lignans等類。它們之所以被稱為植物動情素是因其化學結構類似於內生性動情素(endogenous estrogens)，且也會結合到動情素受體- $\alpha$ 及 $\beta$ (對於動情素受體- $\beta$ 有較高的親和力)，因而具有表現動情素樣活性(estrogen-like activity)之能力。相較於其它系統，植物動情素對於免疫系統方面的研究是比較少的。本研究計畫即計畫以巨噬細胞及腎絲球環間膜細胞實驗模式來探討植物動情素影響細胞生長及對於發炎媒介物質的合成及釋放作用，以及可能之分子機制，並且研究動情素受體在其中的角色，進而評估其對於免疫系統可能具有的病理生理學意義。本年度我們的試驗結果發現植物動情素 $\beta$ -sitosterol、resveratrol及genistein在低劑量範圍會促進巨噬細胞及腎絲球環間膜細胞增生。 $\beta$ -sitosterol、resveratrol及genistein亦具有促進巨噬細胞及腎絲球環間膜細胞對於COX-2蛋白及mRNA表現的能力，且可觀察到前列腺素PGE<sub>2</sub>釋放增加；但並不會影響COX-1蛋白表現。而這些植物動情素的作用會受到動情素拮抗劑ICI182780的部份拮抗。因此，植物動情素對於免疫系統可能具有某種程度的影響。

**關鍵字：**植物動情素；巨噬細胞；腎絲球環間膜細胞；二型環氧酵素。

#### Abstract

Phytoestrogens are naturally occurring plant compounds that are present primarily in soybeans as isoflavones and in flaxseed as lignans. These plant chemicals display

estrogen-like activity because of their structural similarity to human estrogens and exhibit high affinity binding for the estrogen receptor beta. Few, if any, studies have been made on the impact of these phytoestrogens on the immune system. The aims of this study, therefore, are twofold. The first goal is to verify the effects of phytoestrogens on the modulation of the cell proliferation and release of inflammatory mediators in macrophages and glomerular mesangial cell. The role of estrogen receptor in these responses is also investigated. Second, we try to investigate the possible molecular mechanism(s) involving in the effect of phytoestrogens on the macrophages and glomerular mesangial cell. In this year's works, we found that low concentration range (3-100 nM) of phytoestrogens ( $\beta$ -sitosterol, resveratrol and genistein) were capable of increasing cell proliferation and inducing the cyclooxygenase-2 protein and mRNA expression in macrophage and glomerular mesangial cell line, which could be partially inhibited by selective estrogen receptor antagonist ICI182780. The expression of COX-1 protein did not affected by these phytoestrogens. These results imply that there are some influences by phytoestrogens in immune system.

**Keywords:** phytoestrogens; macrophages; mesangial cells; cell proliferation; cyclooxygenase-2;

## 二、緣由與目的

植物動情素廣泛存在於食物當中，例如穀類、豆類、水果類及堅果類。有許多的研究顯示，植物動情素可能具有多樣的藥理或保健方面的作用，例如 isoflavones 類物質可能在癌症預防上扮演角色，尤其是受內分泌調控的腫瘤(乳癌、前列腺癌或其它腫瘤)(Sirtori, 2001；Setchell, 2001；Wagner et al.,2001)。另外大豆 isoflavones 也被認為可能具有降血膽固醇、預防或治療停經後症候群或骨質疏鬆症等之效果(Atkinson and Ward, 2001；Sirtori, 2001；Wagner et al.,2001)。

相較於其它系統，植物動情素對於免疫系統方面的研究是比較少的。曾有研究報告發現，植物動情素 genistein 與內毒素(lipopolysaccharide)在促進巨噬細胞株對於interleukin-1 $\beta$  基因啟動區活性(promotor activity)表現上有相加乘作用(正對照組為estradiol，且使用動情素受體拮抗劑可以對抗)(Ruh et al.,1998)，但作用機轉並不清楚。此外，也有文獻指出，植物動情素 daidzein、genistein、equol 及 coumestrol 於體外實驗系統具有刺激微粒體前列腺素H生成酵素活性的能力(Degen,1990)，但並未探討對完整細胞cyclooxygenase-2 (COX-2)蛋白表現情形。巨噬細胞在免疫反應中扮演重要的角色，當其受到外來刺激例如細菌內毒素感染時，巨噬細胞除了會減少本身 colony-stimulating factor-1 receptor (CSF-1R)的數目，降低增生的能力外，亦會釋放許多與免疫防禦有關的物質，例如一氧化氮自由基(NO，透過第二型一氧化氮生成酵素(iNOS))、白三烯素、前列腺素和 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 等 cytokine 以及一些 soluble cytokine receptor，這些調節因

子已知與許多免疫反應相關的疾病有直接的相關性(Evans, 1996 ; Baccarini et al., 1992)。目前已有許多研究指出核轉錄因子 $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B, NF $\kappa$ B)及phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/ Akt protein kinase 相關之訊息傳遞路徑，可能在細胞生長及發炎媒介物質釋放上皆扮演重要的角色(Hinz et al.1999; Jeon et al., 1996; Romashkova and Makarov,1999)另一方面，腎臟的腎絲球環間膜細胞(glomerular mesangial cells)被認為是腎臟中的清道夫，具有類似巨噬細胞的性質，當受到如LPS刺激時亦會釋放許多與免疫防禦有關的物質，例如NO、白三烯素、前列腺素和cytokine等。腎小球環間膜細胞的過度增生被認為與某些腎病如腎小球腎炎有關(Horii et al.,1993)。本研究計畫即計畫以巨噬細胞及腎絲球環間膜細胞實驗模式(在細菌內毒素存在或不存在情形下)來探討植物動情素影響細胞生長及對於發炎媒介物質的合成及釋放作用及可能之分子機制，並且研究動情素受體在其中的角色，進而評估其對於免疫系統可能具有的病理生理學意義。

### 三、結果

我們的試驗結果發現植物動情素 $\beta$ -sitosterol、resveratrol 及genistein 在低劑量範圍(3-100 nM)會促進巨噬細胞(RAW264.7 cells)及腎絲球環間膜細胞(mouse mesangial cells, MES-13 cells)增生(proliferation)。 $\beta$ -sitosterol、resveratrol 及genistein (3-100 nM)亦具有促進巨噬細胞及腎絲球環間膜細胞對於COX-2蛋白及mRNA表現的能力，且可觀察到前列腺素PGE<sub>2</sub>釋放增加；但並不會影響COX-1蛋白表現。而這些植物動情素的作用會受到動情素拮抗劑ICI182780的部份拮抗。因此，植物動情素對於免疫系統可能具有某種程度的影響。

### 四、自評

本年度研究計劃之執行成果使我們對於植物動情對免疫細胞或相關細胞生長之影響及環氧酵素(COX-2)的可能之訊息角色有更進一步的瞭解。我們希望能以此為基礎，而能在未來對於植物動情素的生理病理甚至治療評估上有所助益。

### 五、參考文獻

- Baccarini M., Sbarba P.D., Buscher D., Bartocci A. and Stanley E.R. (1992) IFN- $\gamma$ /lipopolysaccharide activation of macrophages is associated with protein kinase C-dependent down-modulation of the colony-stimulation factor-1 receptor. *J. Immunol.* 149:2056-2661.
- Baker V.A., Hepburn P.A., Kennedy S.J., Jones P.A., Lea L.J., Sumpter J.P. and Ashby J. (1999) Safety evaluation of phytosterol esters. Part 1. Assessment of oestrogenicity using a combination of in vivo and in vitro assays. *Food Chem. Toxicol.* 37:13-22.
- Bowers J.L., Tyulmenkov V.V., Jernigan S.C. and Klinge C.M. (2000) Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 141:3657-3667.

- Degen G.H.** (1990) Interaction of phytoestrogens and other environmental estrogens with prostaglandin synthase in vitro. *J. Steroid. Biochem.* 35:473-479.
- Evans, T. J.** (1996) The role of macrophages in septic shock. *Immunobiol.* 195: 655-659.
- Hinz M. et al.** (1999) NF $\kappa$ B function in growth control: regulation of cyclin D expression and G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-to-S-phase transition. *Mol. Cell Biol.* 19:2690-2698.
- Horii Y, Iwano M., Hirata E., Shiiki M., Fujii Y., Dohi K and Ishikawa H.** (1993) Role of interleukin-6 in the progression of mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int. (Suppl.)* 39:S71-75.
- Jeon Y. J., Yang K.H., Pulaski J. T., and Kaminski N. E.** (1996) Attenuation of inducible nitric oxide synthase gene expression by  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol is mediated through the inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B/Rel activation. *Mol. Pharmacol.* 50: 334-341.
- Liu S.H., Tzeng H.P., Kuo M.L., Lin-Shiau S.Y.** (1999) Inhibition of inducible nitric oxide synthase by beta-lapachone in rat alveolar macrophages and aorta. *Br. J. Pharmacol.* 126:746-750.
- Malini T. and Vanithakumari G.** (1993) Effect of beta-sitosterol on uterine biochemistry: a comparative study with estradiol and progesterone. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 31:659-668.
- Romashkova J.A. and Makarov S.S.** (1999) NF $\kappa$ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signaling. *Nature* 401:86-90.
- Ruh M.F., Bi Y., Cox L., Berk D., Howlett A.C. and Bellone C.J.** (1998) Effect of environmental estrogens on IL-1 $\beta$  promoter activity in a macrophage cell line. *Endocrine* 9:207-211.
- Setchell K.D.** (2001) Soy isoflavones—benefits and risks from nature’s selective estrogen receptor modulators (SERMs). *J. Am. Coll. Nutr.* 20 (5 Supp;1):354S-362S.
- Singh S.U., Casper R.F., Fritz P.C., Sukhu B., Ganss B., Girard B Jr, Savouret J.F. and Tenenbaum H.C.** (2000) Inhibition of dioxin effects on bone formation in vitro by a newly described aryl hydrocarbon receptor antagonist, resveratrol. *J. Endocrinol.* 167:183-195.
- Sirtori C.R.** (2001) Risks and benefits of soy phytoestrogens in cardiovascular diseases, cancer, climacteric symptoms and osteoporosis. *Drug Saf.* 24:665-682.
- Wagner J.D., Anthony M.S. and Cline J.M.** (2001) Soy phytoestrogens: research on benefits and risks. *Clin. Obstet. Gynecol.* 44:843-852.
-