

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

山藥及其他食物材料中具雌激素活性化合物或區分物之篩選與功能性研究(1/3)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC92-2321-B-002-011-

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：黃青真

共同主持人：陳曉鈴，郭悅雄

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 11 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫第二次期中進度報告
針對停經後婦女保健之功能性食品成份開發-山藥及其他食物材料中具
雌激素活性化合物或區分物之篩選與功能性研究(1/3)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 92— 2321—B002 — 011 — —

執行期間： 92 年 8 月 1 日至 93 年 7 月 31 日

計畫主持人：黃青真

共同主持人：郭悅雄，陳曉玲

計畫參與人員： 鄭瑋宜

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

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

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：**國立臺灣大學生化科技學系**

中 華 民 國 93 年 04 月 05 日

(一)摘要：

婦女停經後因體內不再分泌雌激素，而產生更年期症狀、骨質疏鬆且心血管疾病危險率大大提高。此外，雌激素之作用會促進雌激素依賴性癌細胞增生，而與乳癌、子宮內膜癌(男性攝護腺癌)等有密切關係。流行病學調查、介入性人體實驗以及細胞、動物之實驗研究指出有些食物含『植物性雌激素』成分，對上述與雌激素作用有關之症狀或疾病具有預防效果。含植物雌激素之食材，乃具有開發為保健食品之潛力。

國內推動山藥研究已有相當成果。其中吳文惠教授(師大)之停經後婦女人體試驗、應靜雯教授(東吳)之乳癌細胞實驗，以及翁祖輝教授之乳癌細胞結合實驗，提供了山藥具『植物雌激素』活性之證據。本三年計畫擬建立細胞與分子層次之『植物雌激素』活性分析方法並配合動物實驗，以詳細探討山藥『植物雌激素』之活性成分與區分物，提供山藥發展為停經後婦女保健食品之基礎。此外，所建立之細胞與分子層次之篩選模式，一方面不但可提供給其他子計畫，自黑豆、發酵黑豆與其他豆類、穀、豆與其他種子苗或芽等研發具植物雌激素活性之保健食品，另一方面亦可選擇其他本土性食物材料廣泛篩選，期能找出更多具植物雌激素活性潛力之材料。

第一年計畫擬建立分子與細胞層次之雌激素活性篩選模式。執行頭四個月(92/8/1~92/11/1，第一次期中報告)已建立MCF-7細胞培養及其對雌二醇(17beta-Estradiol, E₂)之反應，發現其生長狀況對E₂之反應敏感度不佳，不適合成為雌激素活性之指標。接著乃自行選殖出hER α cDNA，並自瑞典Dr. Gustafson之實驗室取得hER β cDNA，用以製備pBKCMV GAL4-ER α LBD質體，並建立將該等chimeric receptor與(UAS)₄-Alkaline phosphatase reporter共同短暫轉染CHOK1細胞，以測試具雌激素活性化合物藉hER α transactivate基因表現之活性。至第二次期中報告期間(92/12/5-93/4/5)，我們以已知植物雌激素，三種黃豆異黃酮標準化合物，測試我們所建立之ER α 與ER β transactivation assay之有效性。結果如下表，E₂對ER α 之活化大於ER β ，但三

種異黃酮，則對ER β 之活化大於ER α 。與文獻所述相符。

EC ₅₀	ER α	ER β
17- β estradio	8.79 $\times 10^{-6}$ nM	2 $\times 10^{-5}$ nM
Genistein	298.49 nM	3.41 nM
Daizein	874.86 nM	31.81 nM
Genistin	726.03 nM	13.41nM

因此，我們所建構之transactivation assay確可應用於雌激素活性篩選，將陸續篩選由農試所劉新裕博士所提供之山藥樣品，以及其他子計畫所得發酵黑豆樣品。

(二)報告內容：

前言：

國內推動山藥研究已有相當成果。尤其在品系篩選、栽培及推廣方面，目前幾乎所有市場均可買到各式各樣山藥。國人的接受程度也相當高。而山藥之保健功效方面，由於被列入『跨部會保健食品推動計畫』重點食材之一，也有一些不錯之成果。例如：抗氧化、調節腸道功能等。其中最值得注意的是：吳文惠教授(師大)之停經後婦女人體試驗、應靜雯教授(東吳)之乳癌細胞實驗，以及翁祖輝教授之乳癌細胞結合實驗，提供了山藥具『植物雌激素』活性之證據。印證幾年前婦產科醫師報導一位更年期婦女因為連續數週以山藥為主食，而出現如停經前之生理現象，而懷疑山藥具有類似雌激素之功能。植物雌激素為近年非常熱門的研究主題，例如黃豆異黃酮在預防乳癌、更年期症狀及骨質疏鬆症方面受到相當的重視。在保健食品市場具有相當潛力。

本計畫之目的在探討山藥『植物雌激素』之活性成分與區分物，以提供山藥發展為停經後婦女保健食品之基礎，並協助其他子計畫自黑豆、發酵黑豆與其他豆類、穀、豆與其他種子苗或芽等研發具植物雌激素活性之保健食品，同時亦自其他可能具『植物雌激素活性』之食材或豆科植物中藥材粗萃物篩選更多具植物雌激素活性潛力之食品材料。

(二)報告內容：

前言：

本三年研究計畫之內容依實驗性質大致分為二部分：一為分子、細胞層次之活體外實

驗(第一、二年);二為以鼠類為模式之活體動物實驗(第二、三年)。本年度(第一年)研究重點在第一部份:『以細胞及分子之雌激素活性分析法篩選高雌激素活性山藥品系及其中活性成分之區分與化學鑑定』當中之

第一年 建立分子與細胞層次之植物雌激素活性分析法 (92/12/5~93/4/5)

材料與方法:

1. 細胞增生試驗:

此部分所用的細胞株為 MCF-7 細胞株(ATCC, HTB-22) 購自 ATCC。MCF-7, 為人類乳癌細胞株 (human breast adenocarcinoma), 含有高量 estrogen receptor 的表現, 組織來源為: mammary gland; breast; metastatic site: pleural effusion; adenocarcinoma。其培養採用之培養基為含 10% 胎牛血清 (FBS) 及 Minimum essential medium (Eagle) 培養液, 約每二至三天長滿需繼代培養。實驗進行時, 分別以細胞計數法、MTT 法及 BrdU 標定方法觀察細胞數目。實驗中所用的 positive control 為 17 β -estradiol (購自 Sigma 公司, 產品編號為 E2758)。

2. Transactivation Assay

(1) 細胞株:

此部分所用的細胞株為 CHO-K1 細胞株(ATCC, CCL 61) 購自食品工業研究所菌種中心/國家衛生研究院細胞庫, 菌種中心編號: CCRC60006, 組織來源: ovary, Chinese hamster, Cricetulus grise。其培養採用之培養基為含 10% 胎牛血清 (FBS) 及 Ham's F12 nutrient mixture (GIBCOBRL® 11765-054) 培養液, 約每二至三天長滿需繼代培養。

(2) 試劑:

實驗中所用的 positive control 為 17 β -estradiol (購自 Sigma 公司, 產品編號為 E2758)。Genistein、Daidzein 及 Genistin 購自 Sigma 公司。

(3) 構築含 GAL4-ER β LBD Chimeric receptors 之 cDNA:

人類 ER β 的引子是依據 NCBI 中人類之 ER β cDNA 序列 (accession number 為 NM_001437) 設計而成, 由 Maggiolini Marcello 等人 (2002) 研究指出, ER β 的

ligand binding domain (LBD) 位於 c-terminal 287 amino acids, 即為 732-1593 bp, 長度為 861 bp。所以本實驗設計的 primer 由 cDNA 之 721 bp 開始到 1593 bp, 長度為 872 bp; 並在 5' 端及 3' 端分別加上 Hind III 及 Xba I 限制酶切位。以 Dr. Gustaffson 實驗室所提供之 pSG5-hER β plasmid 為模板, 利用上述引子進行 PCR 實驗。之後先將此片段以 T&A cloning 方式接入 pGEMT cloning vector 中, 再利用 Hind III 及 Xba I 將此片段切下, 與含有 Gal4 DNA binding domain 之 pBKCMV vector 進行 ligation 及 transformation。得到含 GAL4-ER β LBD Chimeric receptors 之 Expression vector, 最後進行定序, 確認序列的正確性。

(4) 以 CHO-K1 細胞進行 transactivation assay:

a. 含 receptor 與 reporter 之質體製備:

含 GAL4-ER α (或 β) LBD Chimeric receptors cDNA 之 pBKCMV (mammalian cell Expression vector) 質體, 由上述實驗得之; 含 (UAS)₄-Alkaline phosphatase Reporter gene cDNA 之 pBKCMV, 自 Dr. Gustaffson 之實驗室取得。用以轉型大腸菌 XL1blue, 經篩選後, 挑出有表現之菌株, 大量培養並抽取質體 DNA。

b. 細胞培養:

CHO-K1 細胞購自新竹食工所細胞庫取得, 以含 10% 牛血清之 HAM-12 培養液培養。MCF-7 細胞購自 ATCC, 以含 10% 牛血清之 MEM 培養液培養, 並添加 bovine insulin (Final 0.01 mg/mL)。

c. 轉染實驗:

進行轉染實驗前一天將長至 confluence 之細胞植入 96 孔培養盤, 當天將含血清之培養基洗除乾淨。將兩種質體 DNA 定量加入 lipofectamineTM 2000 轉染劑及轉染專用培養基使形成 DNA-liposome complex 再加入上述洗淨之細胞中, 轉染 5 小時。

d. 活化實驗:

吸除含轉染劑之轉染培養基, 加入已知的 ER activators, 培養 2 天後, 吸取定量培養基測定 Alkaline phosphatase (AP) 活性。AP 活性係以會產生冷光 luminescence 之 CSPD 基質於 96 孔微盤中測定。已知之 ER 活化劑以 17 β -estradiol 為正對照。

結果與討論：

1. 細胞增生實驗：

MTT standard curve 如圖一所示，可發現隨細胞數的增加，OD_{540 nm} 吸光值亦隨之增加，但到細胞數為約 40000 cells/well 時，漸趨平緩。於是取其直線區域作為 MTT standard curve。

不同細胞數於不同時間點測得之 MTT 結果如圖二所示。若以時間與 log of cell number 做圖，可計算出其 Doubling Time 約為 46.3 ~ 53.76 小時，與 paper 所查到的 52.8 小時差不多，但 ATCC 所測出的為 29 小時，相差甚遠。

圖三顯示以數細胞法測量細胞增生的結果，在六組的處理中，發現以活性碳處理血清【CS-FBS】取代原本使用隻胎牛血清【FBS】會些微的降低細胞生長速率；另外，以 100 nM Estradiol 組會增加 MCF-7 細胞數目，而添加 10 μ M E₂ 組則抑制細胞生長，兩者之間的差距在第六天時達到最大，約相差 13.64 倍。由此可知，低濃度 E₂ 對於 MCF-7 細胞有促進此細胞增生的效果。但若將 10%CS-FBS 與 100 nME₂ 組第六天的數據比較，只有相差 1.47 倍，不甚理想。

若以 MTT 法測量細胞數目，可發現在有胰島素的存在下，添加不同濃度的 E₂ 會些微的促進細胞生長，如圖四所示，在 E₂ 濃度為 100nM 時達最大值，但也只有 control 的 1.8 倍。

之後採用靈敏度較高的 BrdU 法標定細胞中的 DNA，以偵測細胞數目。結果如圖五所示，發現在起始濃度為 5000 cells / well 的條件下，添加不同濃度 E₂ 培養 46 小時後可些微增加細胞數目，到 10⁻² nM 有最大值，約為控制組的 1.81 倍。

綜上所述，發現無論用最基本的細胞計數，或是靈敏度較高的 BrdU 法，皆無法有效的看出 Estradiol 對 MCF-7 細胞增生的影響，可能是因為在培養液中有其餘無法排除的生長因子影響所致，故認為用細胞增生法看雌激素或植物雌激素效應，並非為一良好判定方法。之後希望能建立偵測下游基因的表現量的方法，來評估所篩選出之樣品雌激素活性！

2. Transactivation Assay

(1) 構築含 GAL4-ER β LBD Chimeric receptors 之 cDNA：

所構築出來的 GAL4-ER β LBD pBKCMV 表現質體經由定序。與基因庫比對結果，有 99.54% 的相似性。仔細比對發現只有二個 base 不同，進一步比對氨基酸序列，發現只有一個氨基酸不同，為 a.a. 236 (Ile \rightarrow Thr)。經由參考文獻中 LBD 作用位置，皆非此兩個氨基酸，故可用此建構之質體，進行以下轉染實驗。

(2) pBKCMV-ER α (或 β) Transactivation assay 之條件尋找：

以不同 receptor 與 reporter 比例找出最大活化倍數，結果如圖一所示。在 CHO-K1 細胞轉染 pBKCMV-ER α 中，以 receptor/reporter=5/1，加入 1nM E₂ 後活化倍數達最大 (5.14 倍)；而在 ER β 方面則用 receptor/reporter=4/1 加入 1nM E₂ 後活化倍數達最大 (5.82 倍)，故兩種 receptor 分別以其最適當之 receptor 與 reporter 比例進行後續實驗。

(3) 17 β -estradiol 對 ER α 與 ER β 之活化效果：

CHO-K1 細胞經共同短暫轉染 pBKCMV GAL4-ER α 與 pBKCMV (UAS)₄-AP 後對 17- β estradiol (E₂) 之劑量反應曲線如圖二所示，可看出隨 E₂ 濃度增加，AP 活性亦隨之增加，到 10⁻³nM E₂ 達最大值，活化倍數為 4.7 倍，EC₅₀ 為 8.79 \times 10⁻⁶nM。

在 ER β 方面，17- β estradiol (E₂) 之劑量反應曲線如圖三所示，可看出隨 E₂ 濃度增加，AP 活性亦隨之增加，到 10⁻¹nM E₂ 達最大值，活化倍數為 6.97 倍，EC₅₀ 為 2 \times 10⁻⁵nM。

由此結果可知，在此系統中，E₂ 對於 ER α 與 ER β 的活化 EC₅₀ 以 ER α 優於 ER β ，即需要較低的濃度就可達到活化 ER α 的效果。

(4) 驗證各種不同 Phytoestrogen 對 ER α 與 ER β 之活化效果：

本實驗採用已知有雌激素活性之 isoflavone Genistein, Daidzein 及 Genistin 進行實驗，以驗證我們所建立 transactivation 之有效性(validation)。

在 ER α 方面，所得之結果如圖四所示。結果顯示，隨著此三種 phytoestrogen 濃度增加，AP 活性亦隨之增加，其 EC₅₀ 分別為 Genistein ~ 298.49 nM、Daidzein ~ 874.86 nM

及 Genistin ~ 726.03nM。由此可看出，以 Genistein 的活化效果較佳，至 500 nM 即達最大值，並有統計差異。而在 Genistin 因有糖基的存在，故效果比 free form 的 Genistein 差，需要 10 μ M 才有活化最大值。

在 ER β 方面，所得之結果如圖五所示。結果顯示，隨著此三種 phytoestrogen 濃度增加，AP 活性亦隨之增加，其 EC₅₀ 分別為 Genistein ~ 3.41 nM、Daidzein ~ 31.81 nM 及 Genistin ~ 13.41nM。

綜合比較三種 phytoestrogen 對 ER α 與 ER β 的活化效果，發現對 ER β 的活性優於 ER α 。若由 Genistein 的 EC₅₀ 來比較，發現兩者相差 87.6 倍，此與許多文獻上所證明的：phytoestrogen 對 ER β 有較好的結合與活化效果相符。

EC ₅₀	ER α	ER β
17- β estradiol	8.79 $\times 10^{-6}$ nM	2 $\times 10^{-5}$ nM
Genistein	298.49 nM	3.41 nM
Daizein	874.86 nM	31.81 nM
Genistin	726.03 nM	13.41nM

以上結果顯示，我們所建立之 transactivation assay，確可應用於 SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator) 之篩選。

自評:

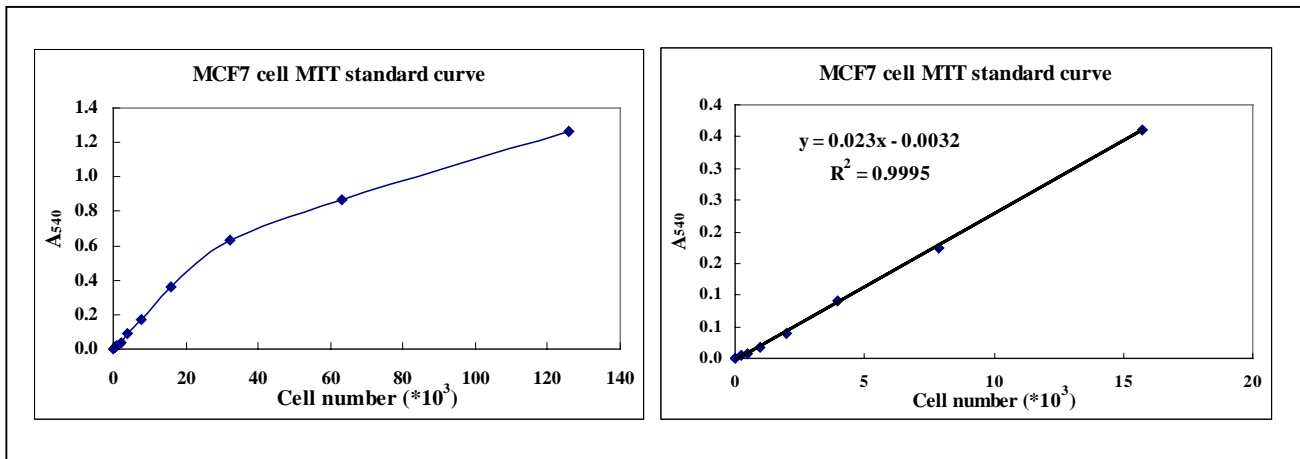
第一次期中報告之前實驗結果顯示，無論以何種檢測方式，由不同管道取得之 MCF-7 人類乳癌細胞株隻生長對培養液中雌二醇含量均不敏感。乃積極建立 ER transactivation assay, 以人類子宮組織萃取 RNA 反轉錄出 cDNA 為模板，設計引子以 PCR 放大 ER 之 cDNA。結果順利得到 ER α ，但得不到 ER β 。只好向瑞典 Dr. Gustaffson 要來全長 ER β cDNA 為模板，終於得到正確之 ER β 。並精剪接，將兩者之 LBD(Ligand Binding Dmain) 取代我們原用之 PPAR α ，得到 chimeric receptor construct。經序列分析，知為正確後，利用已知之黃豆異黃酮標準化合物，驗證其對植物雌激素反應之正確性。結果與文獻報告吻合，確認我們建立之 transactivation assay 確可用於植物雌激素活性之篩選。

我們已自農試所劉新裕博士取得 6 個特性明顯不同之山藥樣品，進行粗萃。目前正進行兩種 ER 活化能力分析。此外，也將另一子計

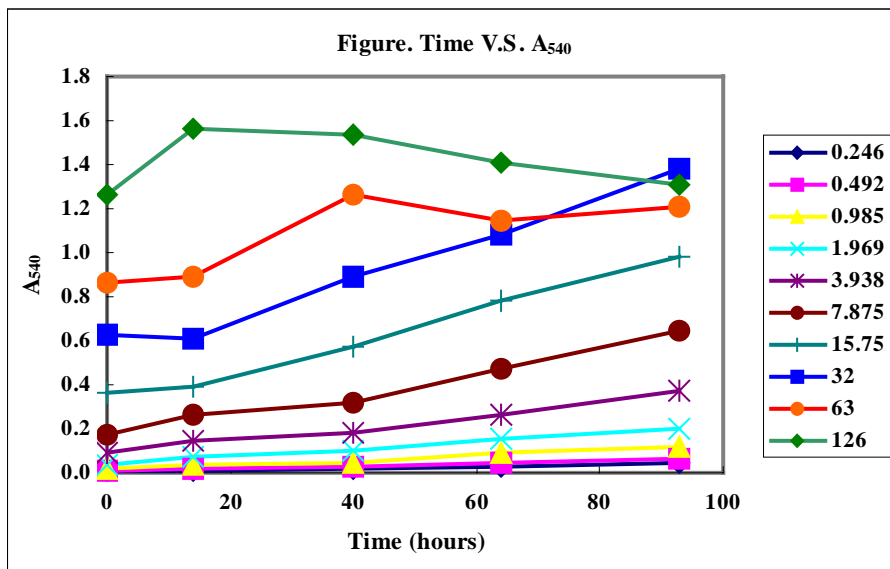
畫所得黑豆發酵樣品萃取物進行分析。

計畫進度符合預期。本年度應可找到可能具 SERM 特質之食物材料，供第二年進行活性化合物分離及動物實驗。

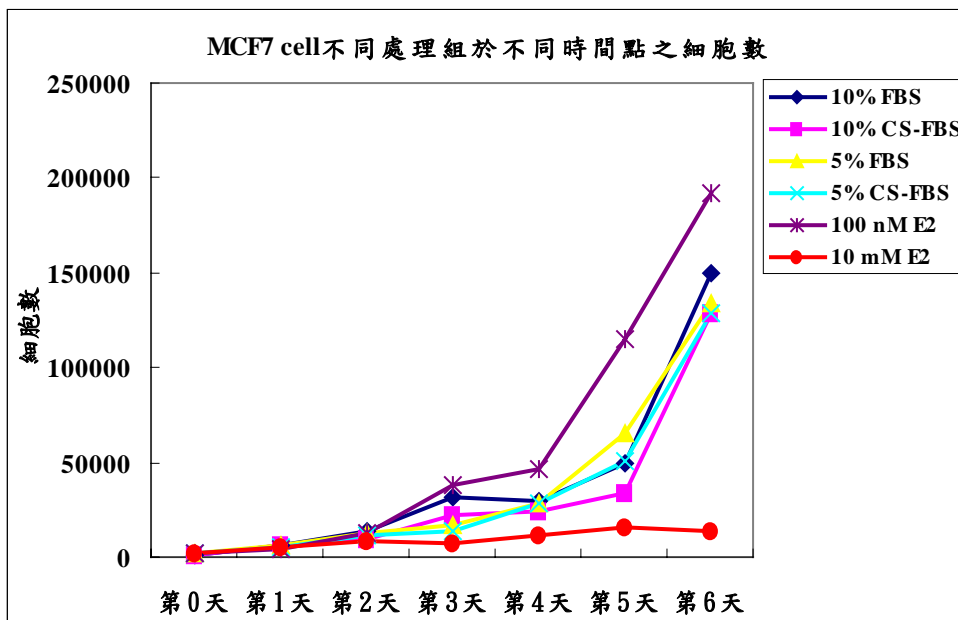
圖一、MCF-7 細胞株 MTT standard curve



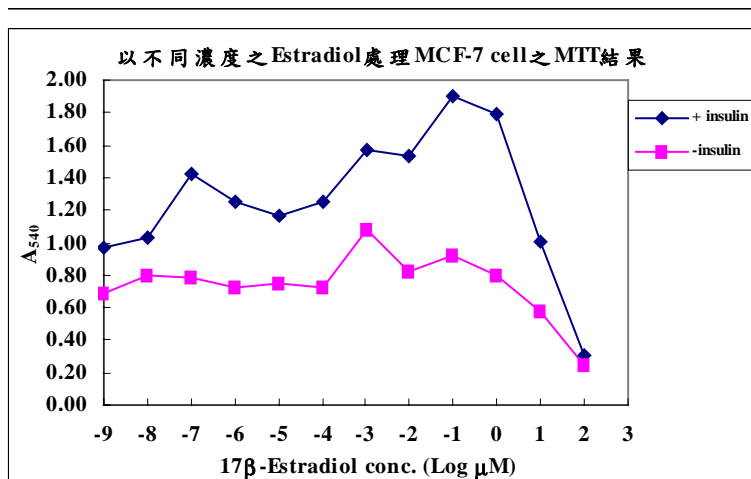
圖二、不同細胞數於不同時間點測得之 MTT 結果



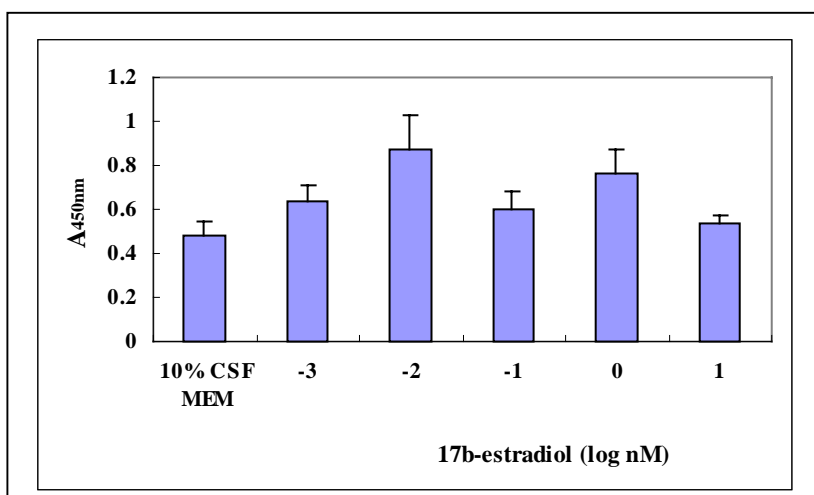
圖三、以數細胞方法探討不同血清及不同 Estradiol 濃度對 MCF-7 細胞增生之影響



圖四、以 MTT 法探討不同 Estradiol 濃度對 MCF-7 細胞增生之影響

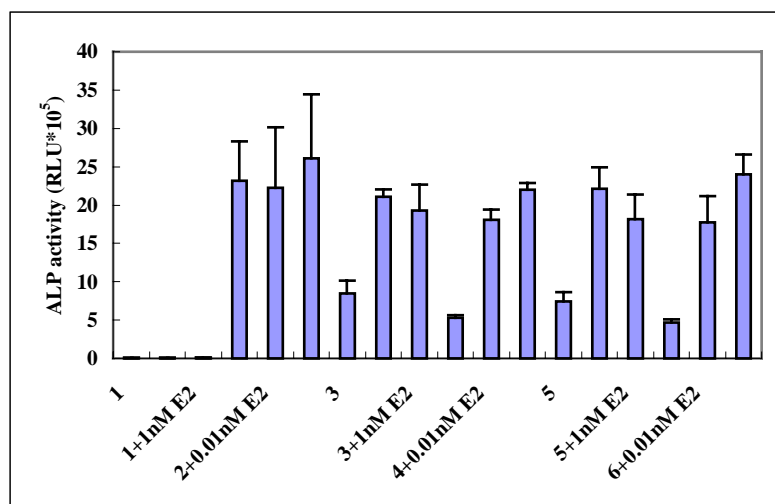


圖五、以 BrdU 法探討不同 Estradiol 濃度對 MCF-7 細胞增生之影響



圖六、CHO-K1 細胞經共同短暫轉染不同比例之 (A) pBKCMV GAL4-ER α 與 pBKCMV(UAS)4-AP ; (B) pBKCMV GAL4-ER β 與 pBKCMV(UAS)4-AP 後對 17 β -estradiol 之反應效果

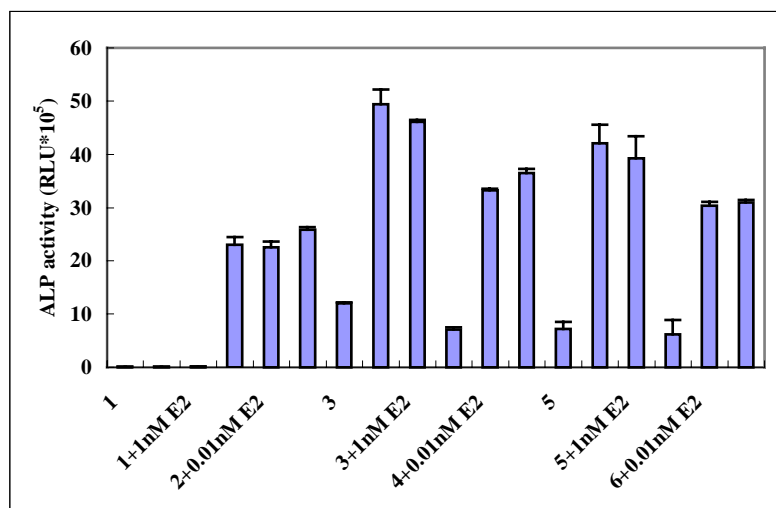
A



CHO-K1 cell (ER α)

- 1: receptor/reporter= 0/0
- 2: receptor/reporter= 0/0.3
- 3: receptor/reporter= 2/1
- 4: receptor/reporter= 3/1
- 5: receptor/reporter= 4/1
- 6: receptor/reporter= 5/1

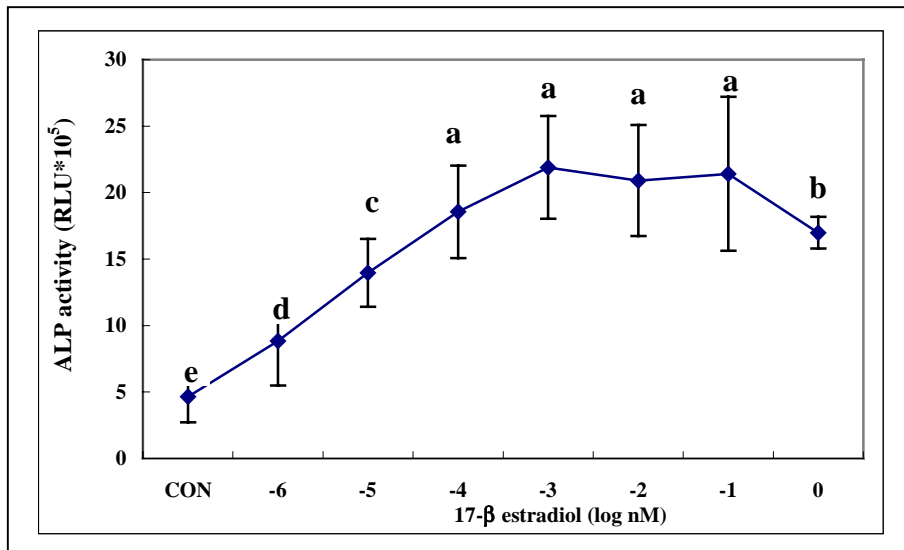
B



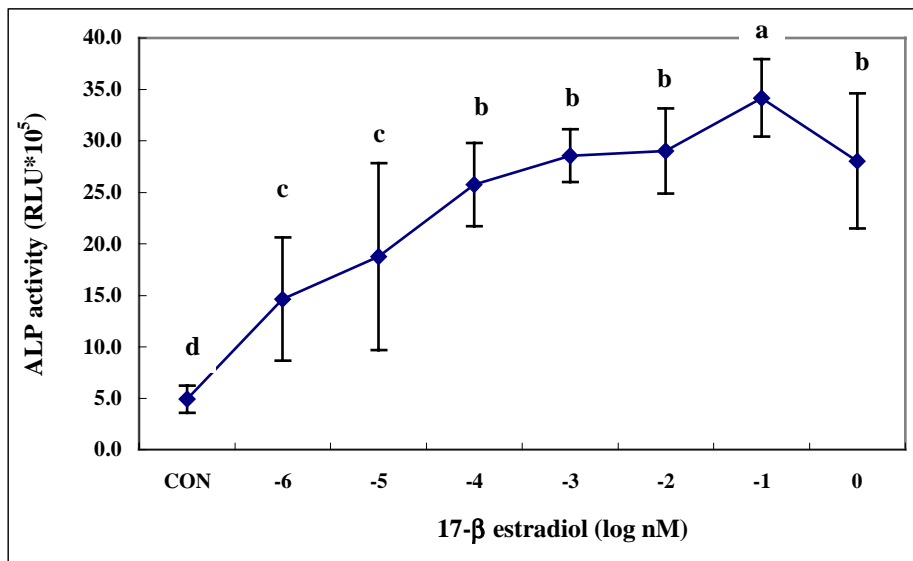
CHO-K1 cell (ER β)

- 1: receptor/reporter= 0/0
- 2: receptor/reporter= 0/0.3
- 3: receptor/reporter= 2/1
- 4: receptor/reporter= 3/1
- 5: receptor/reporter= 4/1
- 6: receptor/reporter= 5/1

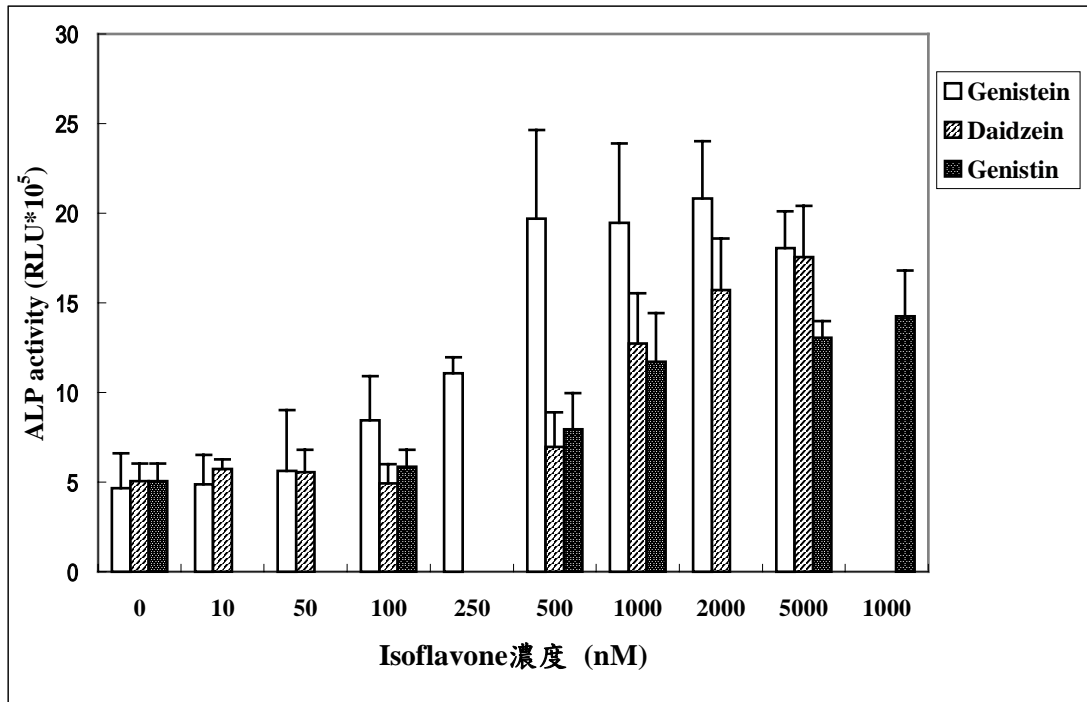
圖七、CHO-K1 細胞經共同短暫轉染 pBKCMV GAL4-ER α 與 pBKCMV(UAS)4-AP 後對 17 β -estradiol 之劑量反應曲線



圖八、CHO-K1 細胞經共同短暫轉染 pBKCMV GAL4-ER β 與 pBKCMV(UAS)4-AP 後對 17 β -estradiol 之劑量反應曲線



圖九、CHO-K1 細胞經共同短暫轉染 pBKCMV GAL4-ER α 與 pBKCMV(UAS)4-AP 後對不同 phytoestrogen 之劑量反應曲線



圖十、CHO-K1 細胞經共同短暫轉染 pBKCMV GAL4-ER β 與 pBKCMV(UAS)4-AP 後對不同 phytoestrogen 之劑量反應曲線

