

大豆異黃酮 genistein 與 daidzein 對 α 腫瘤 壞死因子所誘導人類主動脈內皮細胞發炎 反應之影響

Effect of Genistein and Daidzein on Inflammatory Response in TNF- α -treated Human Aortic Endothelial Cells

洪志宏^{1*} Chih-Hung Hung
元培科技大學醫學檢驗生物技術系

陳蓓蓉² Pei-Jung Chen
台大醫院竹東分院檢驗醫學科

王淑芬³ Shu-Fen Wang
台北榮總病理檢驗部

王海龍¹ Hai-Lung Wang
元培科技大學醫學檢驗生物技術系

¹ Department of Medical Laboratory Science and Biotechnology, Yuanpei University

² Laboratory Medicine Division, National Taiwan University Hospital Chu-dong Branch

³ Department of Pathology & Laboratory Medicine, Taipei Veterans General Hospital

摘要： 氧壓與發炎反應是影響動脈粥狀硬化形成最重要的因素與促進者，由於影響血管內皮黏附分子的表現，在動脈粥狀硬化形成和慢性發炎中扮演重要角色。許多研究顯示膳食補充大豆食品可降低心血管疾病，尤其是大豆含有豐富的異黃酮，主要以genistein、daidzein為主，具有良好的抗氧化能力。本研究主要探討大豆異黃酮genistein和daidzein對前發炎細胞激素腫瘤壞死因子（TNF- α ）誘導人類主動脈內皮細胞(human aortic endothelial cells；HAECs)發炎反應的影響。隨著HAECs處理genistein和daidzein的濃度增加，而能明顯的抑制TNF- α 誘發HAECs對單核球(U937)的吸附能力，濃度為150 μ M genistein時，吸附能力只剩48.2 \pm 8.0%；濃度為150 μ M daidzein時，為47.2 \pm 4.9%；利用西方墨點法(western blot)分析HAECs黏附分子的表現，當處理genistein濃度為100 μ M及150 μ M時，TNF- α 誘發HAECsVCAM-1表現量為49.9 \pm 6.3%及34.6 \pm 6.0%，當daidzein濃度為100 μ M及150 μ M時，VCAM-1表現量為93.7 \pm 1.1%及88.5 \pm 1.7%；而在genistein濃度為100 μ M及150 μ M時，ICAM-1表現量為71.5 \pm 3.3%及37.1 \pm 4.7%，daidzein濃度為100 μ M及150 μ M時，ICAM-1為70.9 \pm 4.6%及68.9 \pm 0.1%。綜合研究顯示genistein及daidzein能有效的抑制TNF- α 誘發HAECs表現黏附分子，因而降低HAECs對單核球的吸附能力，有助於減緩發炎反應及動脈粥狀硬化的進展。

*Corresponding author



關鍵字： genistein、daidzein、黏附分子、 α 腫瘤致死因子、主動脈內皮細胞

Abstract: Oxidative stress and inflammation are regarded as crucial contributors and promoters of arteriosclerosis. In addition, the altered expression of cell-adhesion molecules by the arterial endothelium plays a major role during arteriosclerosis and chronic inflammation. Several studies have demonstrated that including soy-based foods as part of dietary intakes is associated with reduced cardiovascular risk. Specifically, soybeans are rich in isoflavones (genistein and daidzein). Antioxidants may modulate oxidative stress, which in turn may trigger intracellular signaling pathways that can influence the expression and atherogenesis gene and adhesion molecules. Anti-inflammatory research has indicated that TNF- α can induce the production of human aortic endothelial cells (HAECs), resulting in an inflammatory reaction. Investigations into the effect of adhesion to the HAECs by genistein and daidzein in monocytes (U937) indicated that the adhesion of monocytes on HAECs was inhibited, and the genistein and daidzein concentrations increased. Western blot was used to analyze genistein and daidzein in HAECs on TNF- α to induce the production of cell-adhesion factors VCAM-1 and ICAM-1. The results suggested that the inhibition effect of genistein is more effective than that of daidzein. Both genistein and daidzein showed adhesion-factor performance, as induced by anti-oxidation and anti-inflammatory reactions. These isoflavones could therefore have a substantial effect on the prevention of arteriosclerosis, and play a prominent role in further research into the anti-inflammatory mechanism.

Keywords: Genistein; Daidzein; Anti-oxidation; Anti-inflammatory

1. 前言

大豆富含抗氧化物質，包括異黃酮(isoflavones)、大豆皂素(saponin)、花青素、維生素 E 等，另外 genistein 和 daidzein 是大豆中主要的異黃酮，由於異黃酮的化學結構，使其具有雌激素、抗黴菌、抗癌的特性。其中以 genistein 抗癌效果最好(Adlercreutz et al., 1993 ; Morton et al., 1994) ，其抗癌機制是抑制酪胺酸激酶(tyrosine kinase)及 DNA topoisomerase 的活性(Boos and Stopper, 2000)。

攝取過量的飽和脂肪酸或膽固醇，蓄積在血管內容易引起高血壓、高血脂症、動脈硬化、心肌梗塞等心血管疾病。異黃酮可提高 LDL受體的活性，促進 LDL中膽固醇的代謝，利於降低血清膽固醇(Jenkins et al., 2002)，並且可抑制 ox-LDL所導致內皮的損傷(Chin-Dusting et al., 2001) 以降低心血管疾病之危險因子，預防心血管疾病(Tikkanen and Adlercreutz, 2000; van der Schouw et al., 2000)。根據研究顯示genistein可阻止膽固醇氧化，血小板凝集、平滑肌細胞的增殖及抑制動脈粥狀硬化脂肪斑的形成(Murphy et al., 1993)。此外，在動物實驗中，添加配糖基(aglycone)形式的異黃酮，可減少餵食含1% 膽固醇食物的兔子動脈粥狀硬化的發生，減少血管粥狀硬化的病灶處、抑制 ox-LDL及降低血漿中丙二醛(malondialdehyde)的濃度(Yamakoshi et al., 2000)。

被活化的巨噬細胞釋放 TNF- α 後便會開啓發炎反應，造成內皮細胞活化(Zhang et al.,



2009)、增加血管的通透性(Brett et al., 1989)、黏附分子的表現(Fu et al., 2011)、誘導細胞激素和生長因子的產生(Nawroth et al., 1986; Hajjar et al., 1987)、自由基的形成(Paoletti et al., 2009)、以及血管的生成(angiogenesis);其結果會導致內皮的功能受損而促進栓塞、血管痙攣和閉塞(Densem et al., 2001);此外, TNF- α 也會趨附至平滑肌細胞和淋巴球而促使動脈粥狀硬化和發炎反應的發生 (Jovinge et al., 1997)。

當組織受傷或受微生物侵入時, 會引起發炎反應(inflammation), 造成微血管擴張、血流加速、血管通透性增加及白血球遷移至發炎部位, 進而吞噬或稀釋病原體及受傷組織。TNF- α 是在發炎過程中, 由巨噬細胞、單核球、T 淋巴球、B 淋巴球與纖維母細胞分泌的細胞激素之一, 主要受細菌內毒素(如脂多醣類:lipopolysaccharide, LPS)、病毒、氧化自由基或缺氧狀態之刺激而產生。TNF- α 是一種促發炎細胞激素(pro-inflammatory cytokines), 會導致血管內皮通透性增加, 發炎反應的生理效應會活化訊號階梯(signaling cascades), 啓動特定基因表現, 其中包括活化 NF- κ B (nuclear factor-kappa B)路徑來增加發炎基因之表現, 這些基因包括: ICAM-1(intercellular adhesion molecule-1)、VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1) 或 E-selectin(endothelial cells-selectin)等(Kempe et al., 2005), 影響血球細胞內皮細胞之黏著。

在動脈粥狀硬化的病理過程中, 最明顯的特徵為損傷的初期, 受傷的內皮層會大量增加黏附的單核球細胞, 接著會因為內皮層的通透性改變而使單核球穿透血管壁, 而這些過程跟內皮細胞的發炎息息相關, 其中細胞表面的黏附分子則扮演一個重要角色(Langston et al., 2007)。將血液中循環的單核球吸附至動脈內皮表面上是導致動脈粥狀硬化形成過程中最早發生的步驟(Ross, 1999)。許多的研究也發現在人類動脈粥狀硬化的損傷部位有黏附分子過量表現的情形(Printseva et al., 1992)。在動脈內皮與淋巴球和巨噬細胞的相互作用上更觀察到 ICAM-1 與 E-selectin 均有大量的增加(Wal et al., 1992), 而牽涉到心血管病理過程主要有三群黏附分子包括: selectins、integrins 以及免疫蛋白基因超家族(immunoglobulin superfamily) 如 ICAM-1、VCAM-1 及血小板內皮細胞黏附分子(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1)。

目前對動脈粥狀硬化相關疾病的醫療方式, 已逐漸由治療醫學轉向預防醫學為重。本研究主要探討大豆異黃酮genistein及daidzein對人類動脈內皮細胞之細胞毒性, 螢光顯微鏡觀察內皮細胞-單核球黏附分析, 最後利用西方墨點法(western blot)測定genistein及daidzein處理人類動脈內皮細胞(human aortic endothelial cells), 對於 TNF- α 誘發下其細胞表現黏附分子的情形。進而達到預防動脈硬化等疾病, 並可提昇大豆的營養價值與保健應用。

2. 材料與方法

2.1 Genistein 和 Daidzein:

genistein 購自 Sigma-Aldrich, Inc., Cas. No. 446-72-0 和 daidzein 購自 Sigma-Aldrich, Inc., Cas. No. 486-66-8。

2.2 細胞培養

人類主動脈內皮細胞株 (human aortic endothelial cells, HAECs) (購自 Cascade Biologics, Inc., U.S.A., Cat. No. C-006-5C)。使用 M 200 培養液 (購自 Cascade Biologics, Inc., U.S.A., Cat. No.



64 大豆異黃酮 genistein 與 daidzein 對 α 腫瘤壞死因子所誘導人類主動脈內皮細胞發炎反應之影響

M-200-500)、添加低血清生長因子 (low serum growth supplement; LSGS; 購自 Cascade Biologics, Inc., U.S.A., Cat. No. S-003-10)、10%胎牛血清(FBetal Bovine serum; FBS; 購自 JRH biosciences, Inc., Cat. No. 12203-500M)和抗生素 (antibiotic-antimycotic; 購自 Gibco Co., Cat. No. 15240-062)之混合液態培養基, 在含 5% CO₂ 及飽和水蒸氣的 37°C 培養箱中培養, 且每 72~96 小時更換一次培養液, 並於confluence時做次培養。培養期間定期以倒立顯微鏡觀察細胞形態之完整性及生長速度。

人類單核球細胞株 (monocytic cell line) U937 (購自 ATCC., ATCC No. CRL-1593.2™) 含 5% CO₂ 及飽和水蒸氣的 37°C 培養箱中培養於 RPMI 1640 含 2.05 mM L-glutamine (購自 Gibco Co., Cat. No. 51501) 培養液, 使用前添加 10% FBS 和 HEPES buffer solution (購自 Gibco Co., Cat. No. 15630-080), 於confluence時做次培養。培養期間定期以倒立顯微鏡觀察細胞形態之完整性及生長速度。

2.3 細胞毒性試驗

在 24-well 培養盤中, 每個 well 接種 2×10^5 個 HAECs, 待 24 小時後細胞附著, 吸去培養液並換入 2 ml 新鮮培養液, 培養液中分別加入不同濃度的 genistein 和 daidzein (0 μ M、25 μ M、50 μ M、100 μ M、150 μ M 和 200 μ M) 處理細胞, 培養 24 小時或 48 小時後, 分別吸取培養液和細胞層, 檢測培養液中乳酸脫氫酶 (lactose dehydrogenase; LDH) 活性和以 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide, a tetrazole) method 檢測細胞層相對數量。每個濃度進行三重複。

2.3.1 MTT method

MTT assay 常被運用於檢測細胞增殖、存活率或毒性試驗。主要是依賴活性細胞粒線體內之琥珀酸去氫酶 (mitochondrial dehydrogenases), 能將黃色 MTT 還原成紫色的脂溶性 MTT formazan 且堆積在細胞中, 再以 DMSO 溶解並測其吸光值, 所以當活細胞越多時, 吸光值會越高。培養過的細胞, 吸去培養基後, 分別加入 200 μ l MTT 溶液 (濃度為 0.5 mg/mL) 於培養箱中並反應 4 小時後, 再加入 200 μ l DMSO 反應 5 分鐘, 以溶解細胞, 使用 ELISA reader 在 530/690 nm 讀取吸收光度, 並以未加 genistein 或 daidzein 處理的細胞層之吸光值為對照組, 並以含 genistein 或 daidzein (25 μ M、50 μ M、100 μ M、150 μ M 和 200 μ M) 處理的細胞層之吸光值除以未加 genistein 和 daidzein 對照組之吸光值, 計算出細胞之相對百分比 (Green et al., 1984)。

2.3.2 LDH release assay

乳酸脫氫酶 (lactose dehydrogenase; LDH) 可以將 lactate 氧化成 pyruvate, 同時將 NAD⁺ 還原成 NADH, NAD⁺ 還原成 NADH 之速率就相當於 LDH 濃度, 用雙波長測定 (340 及 383nm)。當細胞膜破損或死亡後, 細胞質所含的 LDH 會被釋放至細胞外而溶入培養液中, 故將培養液以全自動生化分析儀 (Dade Dimension RXL) 檢測 LDH 的含量, 即可反應細胞膜破損之情況 (Bao et al., 2005)。本實驗之正的控制組 (positive control) 為以 500 M H₂O₂ 處理細胞。

2.4 內皮細胞/單核球細胞粘附試驗 (Endothelial Cells/Monocyte Adhesion Assay)



首先將U937 標記BCECF-AM (2',7'-bis(2- carboxyethyl)- 5(6) carboxyfluoresceinacetoxymethyl ester, Sigma Co., Cat. No. B8806), 做法如下:將U937 細胞移至離心管, 以 1,600 rpm 離心 5 分鐘, 再以不含血清的 RPMI 1640 培養基清洗 cell pellet 三次, 最後將 cell pellet 懸浮於 2 ml 不含血清的 RPMI 1640 medium, 接著加入 16 μ l BCECF-AM (1 mg/ml), 於 37°C 培養箱中培養 1 小時後, 以 1,600 rpm 離心 5 分鐘, 再以含 10% FBS RPMI 1640 培養基清洗 cell pellet 三次, 最後將 cell pellet 懸浮於 10% FBS RPMI 1640 培養基, 最後濃度調整為 1×10^6 /ml 之細胞懸浮液。

HAECs 以不同濃度的 genistein 和 daidzein (0 μ M、25 μ M、50 μ M、100 μ M 和 150 μ M) 及 negative control 處理細胞 18 小時, 接著以 10ng/ml TNF- α 反應 6 小時, 除去培養液, 分別加入 1 ml 已被 BCECF-AM 標記 U937 細胞懸浮液, 並放置於 37°C 培養箱中均勻搖晃 1 小時。移除未黏附的 U937 單核球細胞後, 以 HBSS (w/w Ca²⁺, Mg²⁺) buffer solution 洗三次。移除 HBSS 後加入 400 μ l cell lysis buffer (0.1% Tween 20 and 20% EtOH in PBS)。使用螢光測定儀以 excitation: 485nm; emission: 525 nm 測定其螢光量。

2.5 西方轉漬法

HAECs 於 100 mm 培養皿中培養, 約 8 分滿時, 加入不同濃度之 genistein 和 daidzein 到培養基中, 分別為每毫升培養液含 genistein 或 daidzein 的濃度為 0 μ M、25 μ M、50 μ M、100 μ M 和 150 μ M, 培養細胞 18 小時後, 在每個孔洞中加入 10ng/ml TNF- α 反應 6 小時, 吸去培養皿中之培養液, 並以冰的 PBS 清洗兩次後, 加入 150 μ l 細胞溶解液(含 1% proteinase inhibitor), 再以刮杓將細胞刮下, 移至離心小管, 以震盪器混合均勻, 以 12,000 rpm, 4°C 離心 10 分鐘再抽取上清液。以 BCA method 測定蛋白質濃度。蛋白質利用 10% SDS-PAGE 分析後, 再轉漬於 PVDF 膜上, PVDF 膜以 blocking solution(含 5% 脫脂奶粉、TTBS solution 及 0.04% NaN₃)於室溫下作用 1 小時, 再以 TTBS wash 2 次, 每次 5 分鐘, 加入一級抗體(mouse anti-human VCAM-1 or ICAM-1 1:1000, 含 5% 脫脂奶粉或 BSA)室溫作用 1 小時, 以 TTBS wash 3 次, 每次 10 分鐘, 再加入二級抗體(goat anti-mouse IgG 1:3000, 含 5% 脫脂奶粉)室溫作用 1 小時, 以 TTBS wash 3 次, 每次 10 分鐘。之後, 加入適量的 chemiluminescence reagent(購自 PerkinElmer Inc; reagent A: reagent B =1:1)至 PVDF 膜上顯影。使用 GeneSnap 影像系統 (GeneSnap Image Acquisition software, Copyright©1993-2007 Synoptics Ltd., Version: 7.01.06) 擷取西方墨點之蛋白質電泳影像圖片及利用 Gene tools (Gene Tools from SynGene, Copyright©1997-2006 Synoptics Ltd., Version: 3.07.03) 分析西方墨點之蛋白質電泳影像圖片之蛋白質相對濃度。

2.6 統計分析

本實驗結果所有數據均採用平均值 \pm 標準誤差(mean standard error)表示, 每次比較的差異性, 依實驗性質採用 pair-test 或 ANOVA, 比較結果時當 P<0.05 方具有統計意義。

3. 實驗結果

3.1 Genistein 及 Daidzein 對 HAECs 之細胞毒性試驗

3.1.1 MTT assay



偵測 genistein 及 daidzein 對於 HAECs 的細胞毒性，分別以不同濃度的 genistein 和 daidzein (0 μ M、25 μ M、50 μ M、100 μ M、150 μ M 和 200 μ M)處理細胞 24hr，將培養液吸取到 eppendorf 留做 LDH release assay，細胞層則加入 MTT solution (0.5mg/ml)37 $^{\circ}$ C 反應 4 小時，移除 MTT solution 後，以 DMSO 溶解，使用 ELISA reader 於 540 nm 測吸光值。結果顯示於圖 1，以沒有處理異黃酮之吸光值作為 100%，計算出分別以濃度為 25 μ M、50 μ M、100 μ M、150 μ M 和 200 μ M 的 genistein 及 daidzein 處理的 HAECs，細胞存活率分別為 98.9 \pm 5.1%、97.5 \pm 3.5%、97.2 \pm 6.7%、92.3 \pm 0.5% 和 76.1 \pm 7.9% 及 98.1 \pm 2.6%、98.3 \pm 4%、94.1 \pm 2.7%、90.2 \pm 0.1% 和 57.3 \pm 7.5%，其顯示 genistein 與 daidzein 濃度為 200 μ M 時，對 HAECs 具有毒性，故接下來的實驗皆以 0 μ M、25 μ M、50 μ M、100 μ M 和 150 μ M 的濃度進行。接著以 LDH release assay 作為細胞膜受損程度的檢測。

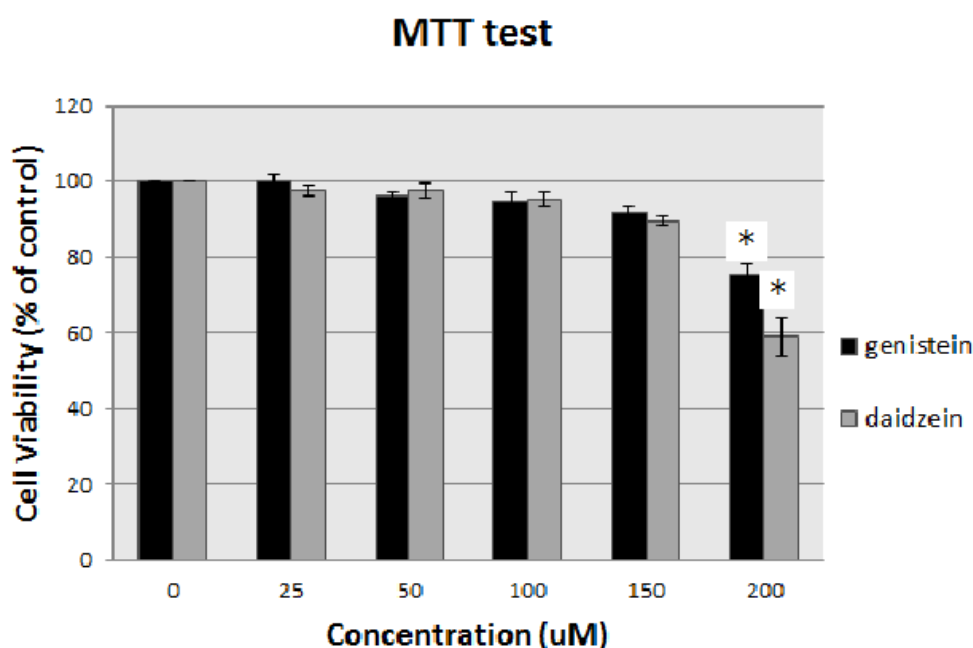


圖 1 利用 MTT assay 檢測 genistein 與 daidzein 對 HAECs 之細胞毒性分析。將 HAECs 細胞次培養到 24-well plate，細胞量為 2×10^5 cells /well，培養於 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂16 小時使細胞附著，以不同濃度的 genistein 和 daidzein (0 μ M、25 μ M、50 μ M、100 μ M、150 μ M 和 200 μ M)處理細胞 24 小時，以 ELISA reader 在 540nm 測吸光值，每個濃度進行三重複。各濃度 genistein 和 daidzein 的吸光值與濃度為 0 μ M 的吸光值做比較，計算細胞相對量百分比。*P < 0.05。

3.1.2 LDH release Assay

LDH 主要存在於組織細胞中，極少存在於週邊血液中，所以當細胞膜受損或破壞時，細胞質中的 LDH 會被釋放到血液中。本實驗利用此特性，檢測 genistein 及 daidzein 是否會對 HAEC 細胞膜造成受損，當 HAEC 細胞膜受到破壞時，LDH 會釋放到培養基中，藉分析培養基中 LDH 的含量，可得知細胞膜損傷情況。將 MTT assay 培養基(HAECs 經 genistein 或 daidzein 以 0 μ M、25 μ M、50 μ M、100 μ M、150 μ M 和 200 μ M 處理 24 小時後，所吸取的培養基)，以全自動生化分析儀檢測 LDH 含量，positive control 為 HAECs 以 500 μ M H₂O₂ 處理，並以顯微鏡確認 HAECs 全數死亡，將各濃度 genistein 或 daidzein 0 μ M、25 μ M、50 μ M、100 μ M、150 μ M 和 200 μ M 所測



得 LDH 的含量，除以 positive control 的 LDH 含量，求出細胞損傷百分比。結果顯示於圖 2，以 0 μ M、25 μ M、50 μ M、100 μ M、150 μ M 和 200 μ M genistein 或 daidzein 處理 24 小時後，細胞損傷百分比分別為 4.8%、2.1%、3.8%、13.3%、7.6% 和 2.9% 及 1.9%、5.7%、6.7%、8.6%、4.8% 和 6.7%。由此結果可知 genistein 及 daidzein 對 HAECs 的細胞膜受損程度低，所以 MTT assay 中顯示的細胞毒性是抑制 HAECs 生長，而不會使 HAECs 細胞膜受損或破壞。

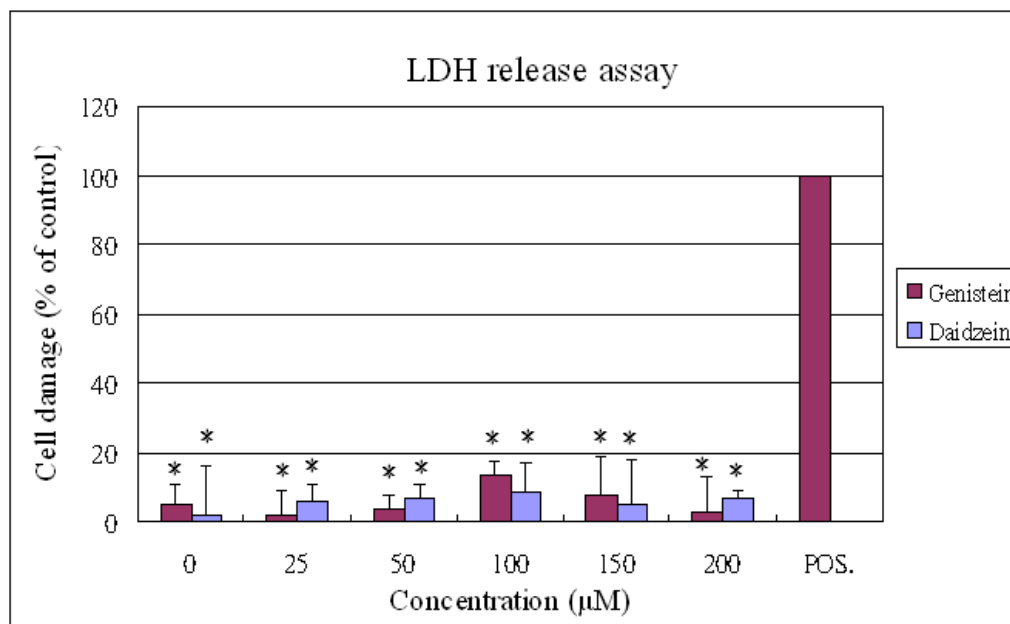


圖 2 以 LDH release assay 分析 genistein 與 daidzein 對 HAECs 生長之影響。分別以不同濃度的 genistein 和 daidzein (0 μ M、25 μ M、50 μ M、100 μ M、150 μ M 和 200 μ M)及 positive control 處理細胞 24 小時，以全自動生化分析儀(Dade Dimension RXL)在 340nm /383nm 偵測培養液中 LDH 的含量。本實驗之 positive control 為 500 μ M H₂O₂，並以顯微鏡觀察細胞全數死亡。每個濃度進行三重複。X 軸為 genistein 和 daidzein 之濃度，Y 軸為細胞損傷率(%)，以 positive control 作為 100%，進而計算出不同濃度的 genistein 和 daidzein 與 positive control 的百分比。*P < 0.05。

3.2 內皮細胞/單核球細胞粘附試驗(Endothelial Cells/Monocyte Adhesion Assay)

以 10ng/ml TNF- α 刺激細胞產生發炎反應，作為誘發動脈硬化之模型，評估 genistein 及 daidzein 對於人類單核球吸附到內皮細胞的影響。HAEC 以濃度 0 μ M、25 μ M、50 μ M、100 μ M 和 150 μ M 之 genistein 及 daidzein 處理 18 小時之後，再以 10ng/ml TNF- α 反應 6 小時，誘發 HAEC 產生發炎反應，表現黏附分子(如：VCAM-1 和 ICAM-1)，使得標記 BCECF-AM 螢光染劑的 U937 吸附在 HAECs 的細胞膜上。圖 3(A、B)分別是 HAECs 先分別以 0 μ M、50 μ M 和 150 μ M genistein 及 daidzein 處理 18 小時後，再以 TNF- α 刺激處理 6 小時後，加入標記 BCECF-AM 的 U937，反應 1 小時後，以 HBSS 緩衝溶液洗細胞三次後，移除未吸附的 U937，置於螢光顯微鏡下觀察，可以發現隨著處理 genistein 及 daidzein 的濃度增加，U937 的吸附明顯減少。圖 3(C)為將細胞以 lysis buffer 溶解後以螢光測定儀測定吸附標記 BCECF-AM-U937 螢光量，吸附能力是將不同濃度之 genistein 及 daidzein 測得的螢光量除以未經 genistein 及 daidzein 處理(0 μ M)之螢光量的百分比。處理 genistein 0 μ M、25 μ M、50 μ M、100 μ M 和 150 μ M，HAECs 對 BCECF-AM-U937 之吸附



68 大豆異黃酮 genistein 與 daidzein 對 α 腫瘤壞死因子所誘導人類主動脈內皮細胞發炎反應之影響

能力，分別為 100%、86.7±0.48%、59.7±2.6%、53.2±4.3%和 48.2±8.0%。處理 daidzein 0 μ M、25 μ M、50 μ M、100 μ M 和 150 μ M，HAECs 對 BCECF-AM-U937 之吸附能力，分別為 100%、73.5±0.6%、61.9±0.8%、62.8±1.4%和 47.2±4.9%。

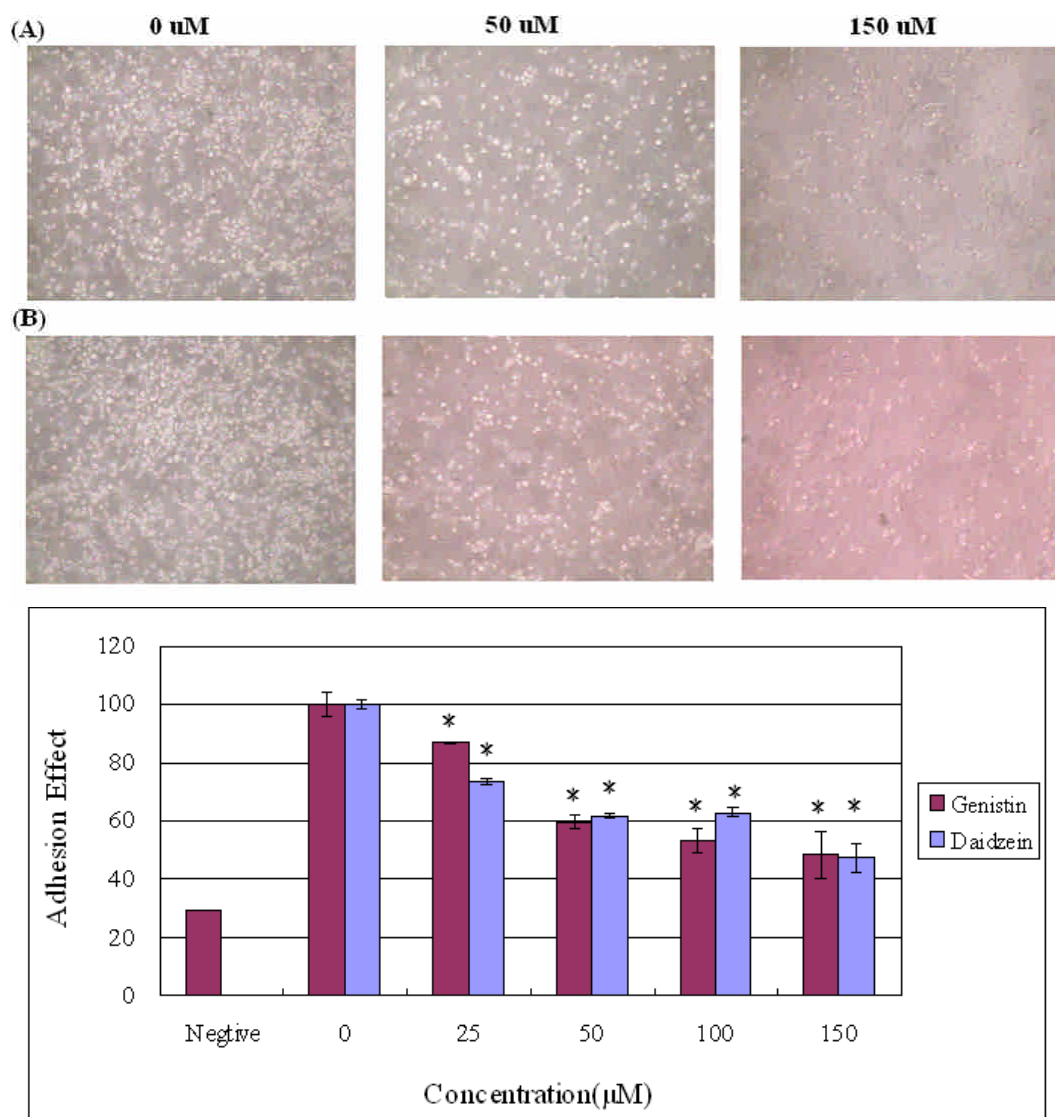


圖 3 genistein 與 daidzein 抑制 TNF- α 誘導單核球吸附 HAECs 之能力分析。上圖(A)為以不同濃度的 genistein 處理 HAECs 18 小時再以 10ng/mg TNF- α 誘導發炎反應，以螢光顯微鏡觀察 U937 吸附 HAECs 之能力，螢光圓形細胞為 U937，梭狀細胞為 HAECs。(B)以不同濃度 daidzein 處理 HAECs 18 小時再以 10ng/mg TNF- α 誘導發炎反應，以螢光顯微鏡觀察 U937 吸附 HAECs 之能力。(C) Negative control 為 HACEs 未處理 TNF- α 及 isoflavones。X 軸為 genistein 和 daidzein 之濃度。Y 軸為處理 HACEs 不同濃度之 genistein 和 daidzein 與未加 genistein 和 daidzein(0 μ M)的螢光值百分比(%)。每實驗進行三重複。* P<0.05。

3.3 以西方墨點法分析 Genistein 及 Daidzein 對 HAECs 黏附分子表現之影響



利用西方墨點法分析 genistein 及 daidzein 處理 HAECs 後，再經由 TNF- α 誘導發炎反應，其對 HAECs 表現黏附分子 VCAM-1 和 ICAM-1 之影響。以 0 μ M、25 μ M、50 μ M、100 μ M 和 150 μ M genistein 及 daidzein 處理 HAECs 18 小時後，再以 10ng/ml TNF- α 誘發發炎反應 6 小時，萃取蛋白質進行西方墨點法分析，圖 4 結果顯示 VCAM-1 蛋白質隨著 HAECs 處理 genistein 和 daidzein 的濃度增加而表現量減少，其表現量與 0 μ M 作比較，換算出蛋白質表現量之百分比(%)分別為 100%、83.4 \pm 7.4%、63.6 \pm 5.0%、49.9 \pm 6.3%和 34.6 \pm 6.0% 及 100%、97.4 \pm 1.7%、98.4 \pm 1.2%、93.7 \pm 1.1% 和 88.5 \pm 1.7%。

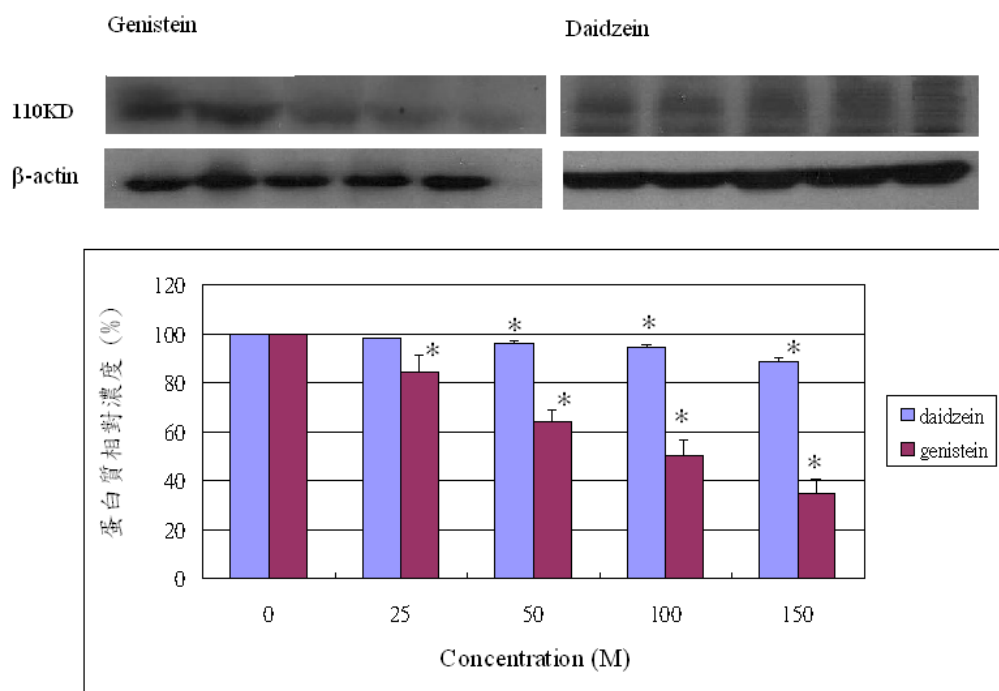


圖 4 genistein 與 daidzein 抑制 TNF- α 誘導 HAECs 表現黏附分子 VCAM-1。分別以 0 μ M、25 μ M、50 μ M、100 μ M 和 150 μ M genistein 及 daidzein 處理 18 小時後，再以 10ng/ml TNF- α 誘發發炎反應 6 小時，萃取蛋白質進行西方墨點法，其 VCAM-1 蛋白質相對濃度百分比，分別為 100%、83.4 \pm 7.4%、63.6 \pm 5.0%、49.9 \pm 6.3%和 34.6 \pm 6.0% 及 100%、97.4 \pm 1.7%、98.4 \pm 1.2%、93.7 \pm 1.1%和 88.5 \pm 1.7%。* P < 0.05。

ICAM-1 蛋白質表現則顯示於圖 5，處理不同濃度的 genistein (0 μ M、25 μ M、50 μ M、100 μ M 和 150 μ M)後，蛋白質相對表現量分別為 100%、97 \pm 5.9%、89.1 \pm 5.7%、71.5 \pm 3.3%和 37.1 \pm 4.7%，處理不同濃度 daidzein (0 μ M、25 μ M、50 μ M、100 μ M 和 150 μ M)的結果為 100%、93.7 \pm 6.3%、77.5 \pm 3.4%、70.9 \pm 4.6%和 68.9 \pm 0.1%。綜合以上結果顯示，在相同濃度之下，genistein 比 daidzein 對由 TNF- α 誘發 HAECs 表現 VCAM-1 和 ICAM-1 有較明顯抑制作用，可能的原因在於 genistein 與 daidzein 結構上的差異，genistein 碳 5 上接羥基(OH)而 daidzein 碳 5 上接氫(H)(Yen and Lai, 2003)，因此異黃酮結構上羥基的數量與抑制 TNF- α 誘發 HAECs 表現 VCAM-1 和 ICAM-1 呈現正相關性。



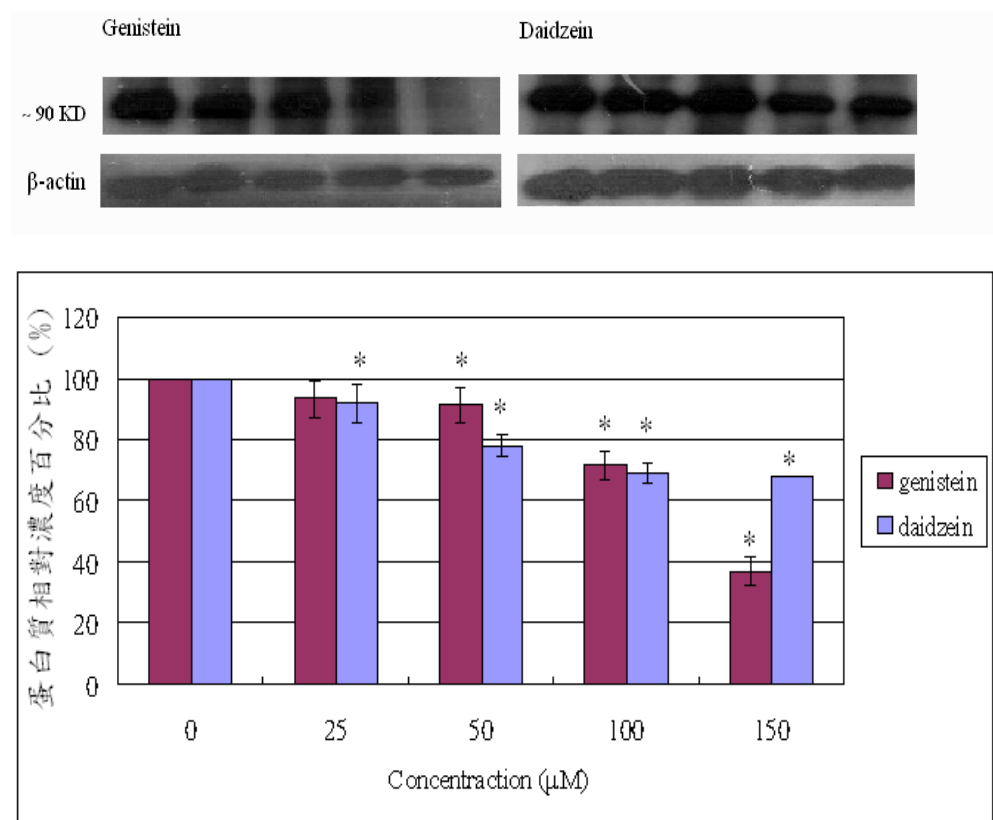


圖 5 genistein 與 daidzein 抑制 TNF- α 誘導 HAECs 表現黏附分子 ICAM-1。分別以 0 μ M、25 μ M、50 μ M、100 μ M 和 150 μ M genistein 及 daidzein 處理 18 小時後，再以 10ng/ml TNF- α 誘發發炎反應 6 小時，萃取蛋白質進行西方墨點法。其 ICAM-1 蛋白質相對濃度百分比，分別為 100%、97 \pm 5.9%、89.1 \pm 5.7%、71.5 \pm 3.3%和 37.1 \pm 4.7% 及 100%、93.7 \pm 6.3%、77.5 \pm 3.4%、70.9 \pm 4.6%和 68.9 \pm 0.1%。* $P < 0.05$ 。

4. 討論:

依據行政院衛生署死亡人數的統計，心血管疾病一直高居台灣十大死因的前三位。同時，由於飲食的精緻化和平均壽命的延長，對於動脈粥狀硬化等慢性心血管相關疾病之治療和預防，世界上各衛生主管機構均十分重視。異黃酮存在於許多的植物當中，如大豆、紅花苜蓿、棗椰、石榴和紅三葉草等，由於大豆中的含量最多，故普遍又稱之為大豆異黃酮。雖然大豆中含有十二種以上的異黃酮異構物，其中以 genistein 的含量最多，其次是 daidzein 和 glycitein，主要具有生理意義的異黃酮，又以 genistein 被研究的最為透徹(Beavers, 2009)。大豆異黃酮已有研究發現具有抗氧化(antioxidant)、抗發炎(anti-inflammatory)、恢復血管功能、降低膽固醇、抗癌(anti-cancer)作用及顯著的抑制細胞黏附分子的表現及功能 (Bito et al., 2000)。

VCAM-1 的功能是將單核球黏附於內皮細胞上，早期動脈粥狀硬化和初期損傷形成的主要決定於內皮細胞 VCAM-1(Cybulyky et al., 2001)的表現量，O'Brien 等人(1993)研究指出在人類冠

狀動脈硬化的 plaques 內偵測到 VCAM-1 的大量表現。ICAM-1 的作用主要是使單核球與內皮細胞緊密結合並將其遷移進入血管壁。TNF- α 可以誘發細胞及組織產生 reactive oxygen species，進而活化氧壓反應性基因(oxidative stress-responsive genes) (Larrick and Wright, 1990)，黏附分子是其中之一。由研究結果可知 genistein 及 daidzein 均可抑制 TNF- α 誘導 HAECs 表現黏附分子 VCAM-1 及 ICAM-1，透過抑制內皮細胞黏附分子的表現，而減少免疫細胞或單核球細胞吸附內皮細胞發炎位置，可降低動脈粥狀硬化的進展。在相同濃度下 genistein 較 daidzein 的抑制效果較好，原因可能是在相同濃度下 genistein 增強抗氧化劑的網路系統(antioxidant network system)活性較 daidzein 強(Rimbach et al., 2004)，抗氧化作用機制包含經由誘導酵素(如：catalase、superoxide dismutase、glutathione peroxidase 及 glutathione reductase)增加細胞抗氧化的能力(Suzuki et al., 2002)，及能增加細胞內還原型 glutathione 濃度等。

動脈硬化形成的關鍵在於內皮細胞中 NF- κ B 的活化作用，NF- κ B 的活化作用會增強發炎反應和動脈硬化相關的基因表現，如：細胞表面接受器和黏附因子。NF- κ B 是一個以 p50 和 p65 subunit 所組成的二聚體，在細胞未受刺激時，NF- κ B 的 p50 及 p65 會與 I- κ B (inhibitory protein kappa B)穩定結合，以非活化狀態存在於細胞質中。但當細胞受到刺激時，protein kinase C 活化造成 I- κ B 磷酸化，並與 NF- κ B 脫離、分離，被活化之游離 NF- κ B (p50 及 p65)會穿過細胞膜進入細胞核內，並與基因序列中啓動子(promoter)的 κ B 位置結合，而活化轉錄出相關 mRNA 及製造出所屬蛋白質(Kempe et al., 2005)。所以當血管細胞(如：內皮細胞、平滑肌細胞和巨噬細胞)中 NF- κ B 活化，會牽涉許多基因表現，如：細胞激素、白血球黏附因子、COX-2 和 iNOS (Berliner et al., 1995)。相關的研究指出，大豆異黃酮抑制 CAM 的表現是經由抑制 NF- κ B 的活化(Davis et al., 2001; Sarkar and Li, 2004)，因此 genistein 和 daidzein 可降低 TNF- α 刺激內皮細胞時 VCAM-1 及 ICAM-1 的表現量，其原因可能是抑制 TNF- α 對細胞中 NF- κ B 的活化所造成。

藉由飲食來抑制發炎反應，以減輕動脈粥狀硬化等疾病的形成，一直是科學界研究的重點。大豆所含的成份中，大豆皂素、大豆固醇(soy β -sitosterol)、大豆異黃酮 (Maes et al., 2011) (genistein 和 daidzein 是大豆中主要的異黃酮)都具有抗氧化(洪志宏等，2012)、抗發炎和抗凝血的能力，及 Kunitz-type 大豆胰蛋白酶抑制劑 (soybean trypsin inhibitor) 也具有清除自由基的能力(洪志宏等，2008)，因此多食用大豆食品能做為國人預防心血管相關疾病及抗癌之健康保健食品(Nestel, 2004; Chin-Dusting et al., 2001; Wong et al, 1998)。

參考文獻

- [1] 洪志宏、王淑芬、蔡慧思、蔡文翔、黃兆君、王海龍，「大豆胰蛋白酶抑制劑之抗氧化能力分析」，元培學報，第 15 期，民國 97 年，25-36 頁。
- [2] 洪志宏、陳蓓蓉、王淑芬、王海龍，「大豆異黃酮 genistein 與 daidzein 抗氧化能力之研究」，健康管理學刊，第 10 卷第 2 期，民國 101 年，138-148 頁。
- [3] Adlercreutz, H., Bannwart, C., Wähälä, K., Mäkelä, T., Brunow, G., Hase, T., Arosemena, P. J., Kellis, J. T. Jr. and Vickery, L. E., "Inhibition of Human Aromatase by Mammalian Lignans and Isoflavonoid Phytoestrogens," *Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology*, Vol. 44, 1993, pp. 147-153.



- [4] Bao, J. F., Wu, R. G., Zhang, X. P., Song, Y. and Li, C. L., "Melatonin Attenuates 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced PC12 Cell Death," *Acta Pharmacologica Sinica*, Vol. 26, 2005, pp. 117-123.
- [5] Beavers, K. M., Jonnalagadda, S. S. and Messina, M. J., "Soy Consumption, Adhesion Molecules, and Pro-inflammatory Cytokines: a Brief Review of the Literature," *Nutrition Reviews*, Vol. 67, 2009, pp. 213-221.
- [6] Berliner, J. A., Navab, M., Fogelman, A. M., Frank, J. S., Demer, L. L. and Edwards, P.A., "Atherosclerosis: Basic Mechanisms. Oxidation, Inflammation, and Genetics," *Circulation*, Vol. 91, 1995, pp. 2488-2496.
- [7] Bito, T., Roy, S., Sen, C. K. and Packer, L., "Pine Bark Extract Pycnogenol Down Regulates IFN-gamma-induced Adhesion of T cells to Human Keratinocytes by Inhibiting Inducible ICAM-1 Expression," *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 28, 2000, pp. 219-227.
- [8] Boos, G. and Stopper, H., "Genotoxicity of Several Clinically Used Topoisomerase II Inhibitors," *Toxicology Letter*, Vol. 116, 2000, pp. 7-16.
- [9] Brett, J., Gerlach, H., Nawroth, P., Steinberg, S., Godman, G. and Stern, D., "Tumor Necrosis Factor/Cachectin Increases Permeability of Endothelial Cell Monolayers by a Mechanism Involving Regulatory G Proteins," *Journal of Experimental Medicine*, Vol. 169, 1989, pp. 1977-1991.
- [10] Chin-Dusting, J. P. R., Fisher, L. J., Lewis, T. V., Piekarska, A., Nestel, P. J. and Husband, A., "The Vascular Activity of Some Isoflavone Metabolites: Implication for a Cardioprotective Role," *British Journal Pharmacology*, Vol. 133, 2001, pp. 595-605.
- [11] Cybulsky, M. I., Iiyama, K., Li, H., Zhu, S., Chen, M., Iiyama, M., Davis, V., Gutierrez-Ramos, J. C., Connelly, P. W. and Milstone, D. S., "A Major Role for VCAM-1, but Not ICAM-1, in Early Atherosclerosis," *Journal of Clinical Investigation*, Vol. 107, 2001, pp. 1255-1262.
- [12] Davis, J. N., Kucuk, O., Djuric, Z. and Sarker, F. H., "Soy Isoflavones Supplementation Healthy Men Prevents NF-kappa B by TNF- α in Blood Lymphocytes," *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 30, 2001, pp. 1293-1302.
- [13] Densem, C. G., Hutchinson, I. V., Yonan, N. and Brooks, N. H., "Influence of Tumor Necrosis Factor alpha Gene-308 Polymorphism on the Development of Coronary Vasculopathy After Cardiac Transplantation," *Journal of Heart Lung Transplant*, Vol. 20, 2001, pp. 1265-1273.
- [14] Fu, R., Chen, Z., Wang, Q., Guo, Q., Xu, J. and Wu, X., "XJP-1, a Novel ACEI, with Anti-inflammatory Properties in HUVECs," *Atherosclerosis*, Vol. 219, 2011, pp. 40-48.
- [15] Green, L. M., Reade, J. L. and Ware, C.F., "Rapid Colorimetric Assay for Cell Viability: Application to the Quantitation of Cytotoxic and Growth Inhibitory Lymphokines," *Journal of Immunology Methods*, Vol. 70, 1984, pp. 257-268.
- [16] Hajjar, D. P., Pomerantz, K. B., Falcone, D. J., Weksler, B. B. and Grant, A. J., "Herpes Simplex Virus Infection in Human Arterial Cells. Implications in Arteriosclerosis," *Journal of Clinical Investigation*, Vol. 80, 1987, pp. 1317-1321.



- [17] Jenkins, D. J., Kendall, C. W., Jackson, C. J., Connelly, P. W., Parker, T., Faulkner, D., Vidgen, E., Cunnane, S. C., Leiter, L. A. and Josse, R.G., "Effects of High- and Low-isoflavone Soy Foods on Blood Lipids, Oxidized LDL, Homocysteine, and Blood Pressure in Hyperlipidemic Men and Women," *American Journal of Nutrition*, Vol. 76, 2002, pp. 365-372.
- [18] Kempe, S., Kestler, H., Lasar, A. and Wirth, T., "NF-kB Controls the Global Pro-inflammatory Response in Endothelial Cells: Evidence for the Regulation of a Pro-atherogenic Program," *Nucleic Acids Research*, Vol. 33, 2005, pp. 5308-5319.
- [19] Langston, W., Chidlow, J. H. Jr., Booth, B. A., Barlow, S. C., Lefer, D. J. and Patel, R. P., "Regulation of Endothelial Glutathione by ICAM-1 Governs VEGF-A-mediated eNOS Activity and Angiogenesis," *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 42, 2007, pp. 720-729.
- [20] Larrick, J. W. and Wright, S. C., "Cytotoxic Mechanism of Tumor Necrosis Factor- α ," *FASEB Journal*, Vol. 4, 1990, pp. 3215-3223.
- [21] Maes, M., Galecki, J.P., Chang, Y. S. and Berk, M., "A Review on the Oxidative and Nitrosative Stress (O&NS) Pathways in Major Depression and Their Possible Contribution to the (neuro) Degenerative Processes in That Illness," *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, Vol. 29, 2011, pp. 676-92.
- [22] Morton, M.S., Wilcox, G., Wahlqvist, M.L. and Griffiths, K., "Determination of Lignans and Isoflavonoids in Human Female Plasma Following Dietary Supplementation," *Journal of Endocrinology*, Vol. 142, 1994, pp.251-259.
- [23] Murphy, C. T., Kellie, S. and Westwick, J., "Tyrosine-kinase Activity in Rabbit Platelets Stimulated with Platelet-activating Factor. The Effect of Inhibiting Tyrosine Kinase with Genistein on Platelet-signal-molecule Elevation and Functional Responses," *European Journal of Biochemistry*, Vol. 216, 1993, pp. 639-651.
- [24] Nestel, P., "Isoflavones: Effects on Cardiovascular Risk and Functions," *International Congress Series*, Vol. 1262, 2004, pp. 317-319.
- [25] O'Brien, K. D., Allen, M. D., McDonald, T. O., Chait, A., Harlan, J. M., Fishbein, D., Mccarty, J., Furgerson, M., Hudkins, K., Benjamin, C. D., Lobb, R. and Alpers, C. E., "Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Is Expressed in Human Coronary Atherosclerotic Plaques," *Journal of Clinical Investigation*, Vol. 92, 1993, pp. 945-951.
- [26] Paoletti, T., Fallarini, S., Gugliesi, F., Minassi, A., Appendino, G. and Lombardi, G., "Anti-inflammatory and Vascular Protective Properties of 8-Prenylapigenin," *European Journal of Pharmacology*, Vol. 620, 2009, pp. 120-130.
- [27] Printseva, O. Y., Peclo, M. M. and Grwn, A., "Various Cell Types in Human Atherosclerotic Lesions Express ICAM-1," *American Journal of Pathology*, Vol. 140, 1992, pp. 889-896.
- [28] Rimbach, G., Weinberg P. D., de Pascual-Teresa, S., Alonso, M. G., Ewins, B. A., Turner, R., Minihane, A. M., Botting, N., Fairley, B. and Matsugo, S., "Sulfation of Genistein Alters Its Antioxidant Properties and Its Effect on Platelet Aggregation and Monocyte and Endothelial Function," *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1670, 2004, pp. 229-237.



- [29] Ross, R., "Mechanisms of Disease: Atherosclerosis: an Inflammatory Disease," *New England Journal of Medicine*, Vol. 340, 1999, pp. 115-126.
- [30] Sarkar, F. H. and Li, Y., "Soy Isoflavones and Disease Prevention - a Mechanistic Approach," *Nutrition Abstracts and Reviews Series*, Vol. 74, 2004, pp.1N-13N.
- [31] Suzuki, K., Koike, H., Matsui, H., Ono, Y., Hasumi, M. and Nakazato, H., "Genistein, a Soy Isoflavone, Induces Glutathione Peroxidase in the Human Prostate Cancer Cell Lines LNCaP and PC-3," *International journal of Cancer*, Vol. 99, 2002, pp. 846-852.
- [32] Tikkanen, M. J. and Adlercreutz, H., "Dietary Soy-derived Isoflavone Phytoestrogens. Could They Have a Role in Coronary Heart Disease Prevention?," *Biochemical Pharmacology*, Vol. 60, 2000, pp. 1-5.
- [33] van der Schouw, Y. T., de Kleijn, M. J., Peeters, P. H. and Grobbee, D. E., "Phyto-oestrogens and Cardiovascular Disease Risk," *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*, Vol. 10, 2000, pp.154-167.
- [34] Wal, A. C., van der Das, P. K., Tigges, A. J. and Becker, A. E., "Adhesion Molecules on the Endothelium and Mononuclear Cells in Human Atherosclerotic Lesions," *American Journal of Pathology*, Vol. 141, 1992, pp. 1427-1433.
- [35] Wong, W., Smith, E., Stuff, J., Hachey, D., Heird, W. and Pownell, H., "Cholesterol-lowering Effect of Soy Protein in Normocholesterolemic and Hypercholesterolemic Men," *American Journal Clinical Nutrition*, Vol. 68, 1998, pp. 1385S-1389S.
- [36] Yen, G. C. and Lai, H. H., "Inhibition of Reactive Nitrogen Species Effects in Vitro and in Vivo by Isoflavones and Soy-based Food Extracts," *Journal Agriculture and Food Chemistry*, Vol. 51, 2003, pp.7892-7900.
- [37] Yamakoshi, J., Piskula, M. K., Izumi, T., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Obata, A. and Kikuchi, M., "Isoflavone Aglycone-rich Extract Without Soy Protein Attenuates Atherosclerosis Development in Cholesterol-fed Rabbits," *Journal of Nutrition*, Vol. 130, 2000, pp. 1887-1893.
- [38] Zhang, H., Park, Y., Wu, J., Chen, X. P., Lee, S., Yang, J., Dellsperger, K. C. and Zhang, C., "Role of TNF-alpha in Vascular Dysfunction," *Clinical Science (Lond)*, Vol. 116, 2009, pp. 219-312.

