

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

十字花科蔬菜衍生物與一氧化氮相關性的研究(2/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC90-2320-B-038-039-

執行期間：90年08月01日至92年07月31日

執行單位：臺北醫學大學保健營養學研究所

計畫主持人：陳玉華

計畫參與人員：劉惠菁

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 10 月 30 日

中文摘要

本研究主要以小老鼠巨噬細胞 RAW 264.7 為實驗模式，探討十字花科蔬菜衍生物 β -phenylethyl isothiocyanate (PEITC) 與 indole-3-carbinol (I3C) 對以 lipopolysaccharide (LPS) 所誘導之細胞激素與其抑制一氧化氮(nitric oxide, NO) 生成相關性的影響。同時其對另一發炎相關因子 PGE₂ 的影響亦被探討。結果顯示 PEITC 與 I3C 可抑制由 LPS 所誘導之 NO 的生成。同時 PEITC 可抑制由 LPS 所誘導之 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 與 interleukin (IL)-10 的生成，對 IL-1 β 的生成則沒有影響；I3C 亦可抑制由 LPS 所誘導之 TNF- α 、IL-10 的生成，但可促進 IL-1 β 的生成。除此之外，PEITC 可抑制由 LPS 所誘導之 PGE₂ 的生成，而高濃度之 I3C 則有促進 LPS 所誘導之 PGE₂ 的作用。且 PEITC 與 I3C 具直接清除 NO 的作用。綜言之，十字花科蔬菜衍生物 PEITC 可抑制由 LPS 所誘導之 NO、PGE₂ 的生成；I3C 可抑制由 LPS 所誘導之 NO 的生成，但增加 PGE₂ 的生成。此過程伴隨著 TNF- α 與 IL-10 生成的抑制。另一方面，PEITC 與 I3C 非藉由抑制 iNOS 基因的表現而抑制 LPS 誘導之 NO 生成，而是藉由直接清除 NO 之作用，而降低培養基中 NO 之濃度。

關鍵詞：十字花科蔬菜、細胞激素、腫瘤壞死因子- α 、一氧化氮、前列腺素 E₂

Abstract

In this study, the effects of bioactive compounds derived from cruciferous vegetables including β -phenylethyl isothiocyanate (PEITC) and indole-3-carbinol (I3C), on the effects of various cytokines and PGE₂ production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells were studied. The results indicated that PEITC and I3C inhibited LPS-induced NO production. Besides, both PEITC and I3C suppressed LPS-induced productions of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin (IL)-10, and I3C also enhanced IL-1 β production. Furthermore, PEITC inhibited LPS-induced PGE₂ production, whereas I3C, at higher concentrations, enhanced PGE₂ production. Finally, PEITC and I3C did not act through suppressing iNOS expression to reduce LPS-induced NO production, but act through direct NO scavenging activity.

Keywords: cruciferous vegetable, cytokines, tumor necrosis factor- α , nitric oxide, prostaglandin E₂

前言與研究目的

癌症已連續 19 年高居國人十大死因之第一位⁽¹⁾，所以如何預防癌症的發生已是目前重要的研究課題。流行病學研究顯示，增加蔬菜水果的攝取，例如十字花科蔬菜，可減少癌症的發生機會⁽²⁾。此外研究也指出，因誘導型一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 過度活化而產生過量之一氧化氮 (nitric oxide, NO) 與致癌過程有密切關連⁽³⁾。本研究室曾指出十字花科蔬菜萃取物 PEITC 與 I3C 可藉由抑制 iNOS mRNA 與 iNOS 蛋白質而抑制 LPS 與 interferon- γ (IFN- γ) 誘導之 NO 的生成⁽⁴⁾。而實驗亦指出十字花科蔬菜萃取物可促進動物體內細胞激素 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 與 interleukin-1 (IL-1) 的生成⁽⁵⁾；由於 TNF- α 與 IL-1 亦可促進 iNOS 催化之 NO 生成，因此本研究主要利用細胞培養之模式探討十字花科蔬菜衍生物 PEITC 與 I3C 抑制 LPS 誘導之 NO 生成是否與細胞激素有關，進而釐清十字花科蔬菜抑制 NO 之可能機制，同時並了解其在預防癌症或慢性發炎反應上扮演之可能作用。

研究方法

本研究是選用以 LPS 誘導活化之小鼠巨噬細胞株 RAW 264.7 為實驗模式，進行以下之分析。首先以 Griess reagent 確認 PEITC 與 I3C 同樣亦具 NO 抑制之作用後，再利用 ELISA kit 分析 PEITC 與 I3C 對 prostaglandin E₂ (PGE₂) 與細胞激素之影響，所測之細胞激素包括 IL-1 β 、IL-10 與 TNF- α ，而 Western blot 亦將用來分析 iNOS 與 cyclooxygenase-2 (COX-2) 蛋白質之表現。除此之外，PEITC 與 I3C 對於 NO 之直接清除力亦被評估。所有實驗結果均利用 SAS 軟體進行統計分析。以 One-way ANOVA 並以 Fisher's test 比較組間差異，結果以 mean \pm SD 表示之，p < 0.05 表示具有統計上的意義。

結果與討論

結果顯示，於小鼠巨噬細胞中添加細菌內毒素 lipopolysaccharide (LPS) 可明顯誘導細胞中 NO 的產生及釋放，而十字花科蔬菜衍生物 PEITC 與 I3C 可顯著抑制因此誘導所生成之 NO。同時，結果亦顯示 PEITC 與 I3C 對於 LPS 誘導之不同細胞激素的生成有不同影響，其中 PEITC 與 I3C 皆可抑制因 LPS 誘導之 TNF- α 與 IL-10 之分泌，但 PEITC 對 LPS 所誘導 IL-1 β 的生成沒有顯著影響，而 I3C 在高濃度 (5×10^{-5} M 與 10^{-4} M) 時則可促進 LPS 所誘導之 IL-1 β 的生成。由於巨噬細胞在受被活化時可釋放出一些細胞激素，其中促發炎性的細胞激素，如 TNF- α 及 IL-1 β 會促進 iNOS 基因的表現，而增加 NO 的生成⁽⁶⁾。而抗發炎性的細胞激素，如 IL-1 則會抑制 iNOS 基因的表現，而降低 NO 的生成。由於 PEITC 與 I3C 同時抑制 TNF- α 與 IL-10 之分泌，推測這可能因抗發炎性細胞激素與促發炎性細胞激素相互拮抗的結果。同時顯示 PEITC 與 I3C 抑制 NO 之生成。似乎與抑制 TNF- α 之分泌之間有較為明顯的相關性。

前列腺素(prostaglandin)也是與發炎反應關係密切的因子。當細胞受到刺激時，會使 COX-2 活化而增加 PGE₂ 的生成，同時也與 NO 的生成有密切關連⁽⁷⁾，在發炎反應中扮演著重要的角色。由於 PEITC 與 I3C 在某些濃度可抑制由 LPS 所誘導之 NO 生成，因此本實驗欲進一步觀察 PEITC 與 I3C 對由 LPS 所誘導的 PGE₂ 生成之影響。結果顯示，PEITC 可抑制 LPS 所誘導之 PGE₂ 的生成；而 I3C 則在高濃度反而會促進由 LPS 所誘導之 PGE₂ 的生成。因此，PEITC 與 I3C 對於由 LPS 所誘導之 NO 與 PGE₂ 生成的影響不同，而這是否因其受不同細胞激素的調節之故，則需要更進一步研究的確認。

十字花科蔬菜衍生物可影響因 LPS 所誘導之 NO 及 PGE₂ 的生成而其分別為 NOS 及 COX 蛋白質作用之產物，而以 Western blot 分析結果顯示，PEITC 與 I3C 對於 LPS 所誘導之 iNOS 蛋白質表現無明顯的影響。而高濃度之 PEITC 與 I3C 則可促進 COX-2 蛋白質的表現，PEITC 與 I3C 可能非藉由調節基因之表現抑制因 LPS 所誘導之 NO 與 PGE₂ 之生成。這與我們之前以 LPS+IFN- 誘導之研究結果⁽⁴⁾不同，而這也顯示 LPS 與 LPS+IFN- 誘導 NO 與 PGE₂ 機制上有些許差異。

由於 PEITC 與 I3C 不是藉由影響 iNOS 基因的表現而抑制 NO 之生成，因而我們以 in vitro 之實驗顯示 PEITC 與 I3C 可直接與 NO 作用，進而降低反應液中 NO 的含量，因此顯示，PEITC 與 I3C 可藉由其直接清除 NO 的作用而降低細胞培養液中因 LPS 而誘導出的 NO。

總而言之，十字花科蔬菜衍生物 PEITC 可抑制由 LPS 所誘導之 NO、PGE₂ 的生成；I3C 可抑制由 LPS 所誘導之 NO 的生成，但增加 PGE₂ 的生成。此過程伴隨著 TNF- α 與 IL-10 生成的抑制。另一方面，PEITC 與 I3C 非藉由抑制 iNOS 基因的表現而抑制 LPS 誘導之 NO 生成，而是藉由直接清除 NO 之作用，而降低培養基中 NO 之濃度。

計畫成果自評

有關十字花科蔬菜於抗癌機制方面之文獻非常多，但本計畫成果首先發現除已報導之機制外，其衍生物亦具有抑制 NO 生成的作用，此第一年計劃之成果已發表於 *Planta Med* (reference 4)，而第二年之研究結果亦顯示，此 NO 之抑制作用與細胞激素之間有密切的關係。由於計畫執行期間細胞的不穩定之故，故延期了一年，因而進度較預期之落後。又由於經費之刪減，故有關 constitutive NOS 之部份未得以分析，除此之外，本計畫之成果大多與原計畫相符。

參考文獻

- [1] 中華民國公共衛生概況，2000。行政院衛生署。臺北。
- [2] Graham S, Dayal S, Swanson M, Mittleman A and Wilkinson G (1978) Diet in the epidemiology of cancer of the colon and rectum. *J Natl Cancer Inst* 61: 709-714.
- [3] Tamir S and Tannenbaum SR (1996) The role of NO in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta* 1288:F31-F36.
- [4] Chen YH, Dai HJ and Chang HP (2003) suppression of nitric oxide production by indole and isothiocyanate derivatives from *Brassica* plants in stimulated macrophages. *Planta Med* 69:696-700.
- [5] Komatsu W, Yagasaki K, Miura Y and Funabiki R (1997) Stimulation of tumor necrosis factor and interleukin-1 productivity by the oral administration of cabbage juice to rats. *Biosci Biotech Biochem* 61:1937-1938.
- [6] Marks-Konczalik J, Chu SC and Moss J (1998) cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor kB-binding sites. *J Biol Chem* 273 (35): 22201-22208.
- [7] Raso GM, Meli R, Di Carlo G, Pacilio M and Di Carlo R (2001) Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J744A.1. *Life Sci* 68: 921-931