

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

異甘草素對緩解全身性紅斑性狼瘡病情指標之機制探討 (A03)(第2年)

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 103-2629-B-214-001-MY2
執行期間：104年08月01日至105年10月30日
執行單位：義守大學營養學系

計畫主持人：洪永瀚
共同主持人：王世緯
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：呂勁逸

中華民國 106 年 02 月 01 日

中文摘要：全身性紅斑狼瘡 (systemic lupus erythematosus, SLE) 為女性好發之自體免疫疾病，體內具有自我反應性T細胞、自體抗體和異常分泌細胞激素(cytokine)，造成患者皮膚病變與腎臟損傷。先前研究指出異甘草素(Isoliquiritigenin, ISL) 為抗發炎以及雌激素受器調節劑分子，具探討緩解SLE的價值。本實驗將12週齡MRL-lpr/lpr雌鼠分成控制組(Ctrl)及ISL組，每週收集尿液檢測尿蛋白含量，於第18週齡管餵給予 ISL(10 mg/kgBW)，餵食6週後犧牲，收集血液、免疫細胞及腎臟進行分析。結果顯示ISL組相較Ctrl組，其尿蛋白發生率較低；腹腔細胞有偏低之IL-6 和TNF- α 分泌量；脾臟細胞在 Con A 刺激下IFN- γ 分泌量下降趨勢。此外，本研究再利用SLE患者血液周邊單核細胞探討ISL影響的可能機轉，發現10 μ M ISL同樣顯著抑制因狼瘡病情升高的IL-6、IL-10以及IFN- γ 的分泌量；但是卻可以增加些許TGF- β 1生成量。微陣列q-PCR檢視96項基因表現，ISL影響之基因層次與上述影響蛋白質層次具相關性，對於JAK2與 SOCS1/3 路徑的向下調節尤其顯著，現正專注ISL在自體免疫模式中拮抗JAK訊息傳導路徑之探討。上述結果說明ISL可以透過調節狼瘡相關細胞激素達到緩解疾病發展之作用。

中文關鍵詞：全身性紅斑性狼瘡、異甘草素、細胞激素

英文摘要：Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic inflammatory autoimmune disease which has an abnormal T and B cells activation to cause the exceed secretion of disease-related cytokines and immune complex, leading to tissue damages. Isoliquiritigenin (ISL) is a kind of chalcone and has been indicated to have potential to chemopreventive from cancer and inhibit the production of inflammatory cytokines. However, there are no studies to discuss the effects of ISL on the improvement of inflammatory illness in SLE condition. To investigate whether ISL can modulate lupus-related cytokines, this study collects peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of SLE patients to examine the potential of ISL. In cytokines assay, The results showed 10 μ M ISL significantly inhibit the production of IL-6, IL-10 and IFN- γ in Con A-stimulated PBMCs. Moreover, the production of TGF- β 1 is slightly augmented by ISL, in a trend of dose-dependent manner. In the assay of q-PCR array, ISL can inhibit the expressions of IL-6, IFN-, IL-10 and IL-17 that are the same effect to the level of protein. In addition, effects of ISL on cytokines modulation is supposed to be through the reduction of JAK2 and SOCS1/3 pathway. In conclusion, this study reveals that ISL has the potential to alleviate SLE disease severity through the regulation of lupus-related cytokines.

英文關鍵詞：Systemic lupus erythematosus, Isoliquiritigenin, Cytokine

目錄

一、前言	p 1
二、研究目的	p 1
三、文獻探討	p 1
四、研究方法	p 2
1.實驗設計:第 1 年和第 2 年	p 2
2.人類 PBMC (Peripheral blood mononuclear cells) 細胞之分離	p 3
3.細胞激素測定	p 3
4.脾臟細胞細胞表面抗原分析	p 4
5.定量型 PCR array	p 4
6.統計方法	p 4
五、結果與討論(含結論與建議)	p 4
1.異甘草素改善紅斑性狼瘡小鼠的腎臟發炎	p 4
2.異甘草素抑制紅斑性狼瘡小鼠體內免疫細胞的促發炎細胞激素分泌量	p 6
3.異甘草素調整與紅斑性狼瘡患者病情相關細胞激素之分泌量	p 8
4.異甘草素調整透過 JAK 及 STAT 路徑調整狼瘡病情相關細胞激素之分泌量	p10
5.本計畫期末成果	p12
六、參考文獻	p13

一、前言

紅斑性狼瘡(systemic lupus erythematosus, SLE)為全身性自體免疫疾病之代表；台灣每年的全身性紅斑狼瘡新增病例數在 900-1,400 人之間，盛行率為每十萬人有 29.46-79.42 人，且呈現逐年升高的趨勢，在過去 12 年間增加了 170% [1]。而美國自體免疫疾病相關協會(AARDA)指出美國有五千萬人罹患自體免疫疾病，其中 75% 為女性，尤以育齡期婦女為主；女性在自體免疫疾病罹患比例上高於男性，因此對於女性族群健康威脅重大；世界衛生組織也協同 AARDA 組織稱自體免疫疾病為婦女健康議題之重點，並舉出對策略[2-3]。SLE 是全身性自體免疫疾病的典型代表，好發於 15 至 50 歲的女性，即育齡期的婦女；女性與男性患者比例為 10:1。據健保局統計，過敏免疫風濕疾病已是國人門診第三常見疾病，尤其罹患 SLE 與類風濕關節炎 (rheumatoid arthritis) 患者人數，相較亞洲其他國家人數明顯較高。此種免疫性疾病屬於健保局重大傷病，經常引發腎臟損傷而須洗腎，故醫療支出與社會成本龐大。

SLE 患者最初因臉頰產生蝴蝶形狀的紅疹，類似狼頭的外貌而被描述為紅斑狼瘡，由於紅疹症狀為全身性而命名『全身性紅斑狼瘡』，紅疹是免疫複合體 (immune complex) 沉積於皮膚下層引起的發炎反應，除紅疹外，常見症狀還有絲球體腎炎 (glomerulonephritis)、關節炎 (arthritis) 與血管炎。SLE 血液特徵為循環中大量自體抗體(autoantibodies)，例如抗雙股 DNA (anti-dsDNA) 以及抗磷脂 (anti-phospholipid) 抗體，這些自體抗體會引起發炎反應，並活化補體系統而更加劇發炎作用。因此，SLE 為慢性發炎疾病，異常分泌之發炎媒介物(mediators)是造成身體組織損傷的主因，許多 SLE 患者會引發腎衰竭或腦病變。故調節發炎媒介物的產出為治療 SLE 重要策略。目前針對 SLE 藥物治療需確認組織發炎是因異常免疫反應造成的，例如免疫複合體 (immune complex) 的形成、細胞激素的產生以及細胞凋亡的發生。而此種異常免疫反應強弱不等，因此對於治療藥物的選擇會有所差異；藥物包括腎上腺皮質類固醇 (adrenal corticosteroid)、免疫抑制藥物、非類固醇抗發炎藥物 (NSAIDs)、抗瘧疾藥物以及生物製劑，這些藥物雖能降低免疫或發炎反應，卻也經常抑制體內正常免疫反應而造成副作用，因此尋求能夠調節自體免疫反應而不影響正常生理之策略，為 SLE 患者改善病情和維持生活品質之重點。自體免疫過程中發炎的調節與雌激素受器 subtype 的轉錄活化關係密切，可能作為調節目標性免疫反應的策略，一些研究已指出選擇性雌激素受器調節劑 (selective estrogen receptor modulator, SERM) 可以做為 SLE 病情緩解的試劑，然而並無更深入之探討。一些研究已報告異甘草素 (isoliquiritigenin) 具調節發炎性介質物及雌激素受器之能力，本實驗團隊亦發現異甘草素，可以調節異常細胞激素和雌激素受器調節的作用，故該天然化合物值得探討對於狼瘡病程之緩解效果。

二、研究目的

目前仍未有相關文獻測試異甘草素在自體免疫疾病模式中，對於慢性發炎或異常免疫作用之影響，因此第一年以細胞和動物試驗分析異甘草素對於 SLE 病情指標降低之效果，並初步探討影響機轉。藉本研究能對 SLE 患者，尤其是女性患者，能做到病情改善和提升生活品質之貢獻。

三、文獻探討

本人於博士班期間測試苜蓿芽乙酸乙酯萃取物的補充可以降低 MRL-*lpr/lpr* 小鼠活化的 T 細胞族群、絲球體腎炎狀態、血清 IL-6 生成量，而且延長牠們生命期[4,5]；並由該萃取物中分離出五個純化合物，其中，異甘草素經分析後具有抑制發炎之潛力，也具有選擇性活化雌激素受器之功能，與苜蓿芽乙酸乙酯萃取物具較高活化 ER β 能力有關係。

目前異甘草素 (isoliquiritigenin, 後面簡稱 ISL) 可作為癌症的化學預防試劑[6]。ISL 也具有調節一些發炎性分子的作用, 例如 Kwon 等學者指出 ISL 可以抑制人類臍靜脈內皮細胞(umbilical vein endothelial cells)在 TNF- α 刺激下的 VCAM 與 E-selectin 的表現量, 同時降低 THP-1 單核球黏附到人類臍靜脈內皮細胞的能力, 其作用有透過抑制 I κ B α 降解反應而阻止 NF- κ B 的活化[7]。另篇文獻顯示分離自甘草的 ISL 會透過抑制 NF- κ B 的活化與 MAPK 訊息傳遞路徑, 降低 LPS 活化之 RAW264.7 巨噬細胞分泌促發炎細胞激素的能力[8] ; 另外, ISL 也可以透過抑制 receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)活化的機制, 降低噬骨細胞生成反應, 並減少發炎性介質物的生成而改善發炎性的骨質解離作用[9]。ISL 也還能活化雌激素受器(ER), 具有 ER agonist 的特性[10]; 進一步利用 transactivation 分析發現 ISL 對於 ER β 有較高的選擇性活化作用, 其 EC50 濃度為 0.6 μ M [11]。SLE 的病因包括許多因子, 其中, 雌激素(estrogen)為重要之狼瘡發展的促進因子, 雌激素調控功能和與它結合之雌激素受器(ER)關係緊密, 目前 ER 有 ER α 、ER β 、ER γ , 它們會同時存在同一個組織中, 表示各自扮演著不同的調控角色。許多研究指出 MRL-*lpr/lpr* 與 NZB/W F1 品系之狼瘡鼠, 牠們體內皆含有雌激素受器。另, SLE 患者的 ER α 的基因多型性會影響 IL-4、IL-10 與 IFN- γ 的表現, 而這些細胞激素分泌量的增加會促進 SLE 病程的發展 [12]。然而, 越來越多研究顯示, 選擇性活化的雌激素不同受器所調控的基因及蛋白質表現, 對於自體免疫病情不一定是促進作用, 反而有抑制效應。Inui 等學者比較健康者與 SLE 患者週邊血液單核細胞的差異, 結果發現 SLE 患者 ER α mRNA 表現量較高, 而 ER β mRNA 表現量較低, 而 SLE 活躍度 (SLEDAI) 分數與 ER β mRNA 表現量呈現負相關[13], 顯示病情發展可能與雌激素受器的選擇性作用關聯。

天然植物中一些生物活性分子具有雌激素活性, 其中少部分分子具有選擇性雌激素受器調節劑 (selective estrogen receptor modulator, SERM)SERM 功能, 即可以選擇性轉錄活化 ER α 或 ER β 分子, 因而影響不同基因的表現量, 這種分子的影響可能對於與雌激素相關的自體免疫病程有緩和的作用。

四、研究方法

1.實驗設計:第 1 年和第 2 年

以下為第 1 年動物實驗流程。由於 MRL-*lpr/lpr* 小鼠繁殖力較不足, 故由國家動物中心代為繁殖, 且每批小鼠約為 10 左右。

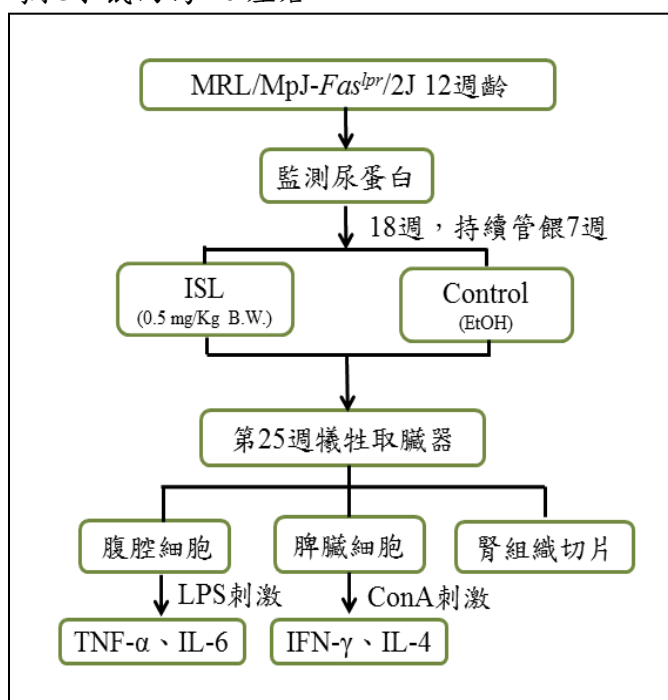
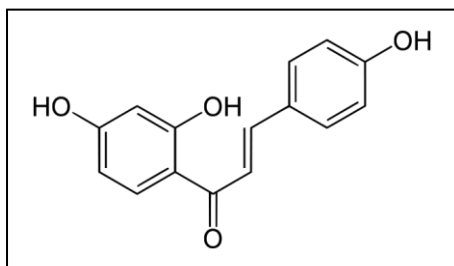


圖 1、動物實驗設計

※開始試驗後, 每週量秤體重; 每兩週收集尿液, 檢測尿意蛋白質含量; 每四週採集血液量測自體抗體。

至計畫執行完成，共約進行 6 批試驗 (每組隻數至少 20 隻)；小鼠約 11-12 週進來後，即開始監測體重以及蛋白尿數值。待至 16-18 週齡分為控制組(Control)以及 ISL 組 (0.5 mg/kg BW)，皆為管餵補充方式給予，每次給予液體體積為 200 μ l。

樣品給 7 週後(25 週齡)，以 CO₂ 方式吸入犧牲，然後採集血液、腹腔巨噬細胞、脾臟細胞、肝臟、腎臟、脾臟等組織進行免疫相關分析；腎臟切片進行 H&E 染色。



SLE患者與健康者周邊血液單核細胞(PBMCs)

SLEDAI分數 3-14

IRB (EMRP-103-040)

各濃度ISL(1-10 μ M)前處理細胞後以ConA刺激T細胞活化

N=3-8 (獨立試驗)

刺激培養
24小時

1. 上清液分析細胞激素量
2. 微陣列qPCR之基因表現
3. 生物資訊找出機制路徑

圖 2、SLE 受試者 PBMC 實驗設計

2. 人類 PBMC (Peripheral blood mononuclear cells) 細胞之分離

取 2 mL 的 Human Lymphocyte Separation 加入等量 Hanks 用毛細吸管吸吹稀釋後的血液，使其混勻後，吸取血液沿試管壁緩緩加到含有 2 mL Ficoll-Hypaque，應注意保持兩者介面清晰，在 18°C-20°C 下，用水平離心機以 2000 rpm/min，離心 30 min。用毛細吸管輕輕插到混濁帶，沿管壁輕輕吸出此層細胞，移入另一支離心管中。即要吸取所有單核細胞，又要避免吸取過多的分層液或血漿，以免混入其他細胞成分。用五倍的 Hanks 液洗滌細胞 3 次。第一次 2000 rpm / min，10 min；第 2-3 次 1500 rpm/min，10 min，可去掉大部分混雜的血小板。計數細胞，將沉澱細胞懸於培養基中備用。

3. 細胞激素測定

購買 for 小鼠和人類的 ELISA 抗體試劑組。細胞激素測定採用 ABC 系統 (avidin-biotin conjugates system) 酵素連結免疫分析法。於平底 96-well plate (Nunc-Immuno plate) 中加入以 coating buffer 適量稀釋的抗細胞激素單株抗體 100 μ L/well，置於 4°C 反應過夜。以 PBST buffer 清洗 3 次，沖去未結合的單株抗體後，為減少非特異性的結合，加入 blocking solution 200 μ L/well，於室溫反應 1 小時。再以 PBST buffer 洗 3 次，加入已知濃度之標準品或待測上清培養液或血清 100 μ L/well，室溫反應 2 小時後，以 PBST buffer 洗 5 次，接著加入連結生物素 (biotin) 的抗細胞激素二級抗體 100 μ L/well，室溫反應 2 小時，以 PBST buffer 洗 6 次，加入連結卵白素 (avidin) 的 peroxidase 100 μ L/well，室溫下避光反應 30 分鐘，最後加入 ABTS 100 μ L/well，待作用呈色約 20 分鐘，直接用 ELISA reader 讀取 405 nm 或 620 nm 吸光值，或加入 50 μ L/well 的 2%

H₂SO₄ 終止呈色反應，再以 ELISA reader 讀取 450 nm 吸光值。偵測的細胞激素包括 IL-4、IL-6、IL-10、TNF- α 、IFN- γ 、TGF- β 1。

4.脾臟細胞表面抗原分析

螢光活化細胞分離儀 (Fluorescence-activated cell sorter) 是利用細胞表面抗體抗原之不同，加入含有不同標記螢光的單株抗體，藉以區分不同的細胞族群。將細胞懸浮液與帶有特定螢光的單株抗體 FITC-(fluorescein isothiocyanate-)或 PE-(phycoerythrin-) conjugated monoclonal antibody 作用，此抗體會專一性辨認某一細胞表面抗原，因此，由螢光抗體結合的細胞數目，計算出全部細胞中帶有此特定表面抗原的細胞族群所佔的比例。將腹腔或脾臟細胞懸浮液細胞數目調整至 3×10^6 cells/mL，取 100 μ L 的細胞懸浮液，加入 2 μ L 的不同螢光單株抗體，於 4°C 下反應 30 分鐘，加入 2 mL 的 FCAScan buffer 離心 1500 rpm 10 分鐘，洗去多餘未結合之抗體，倒掉上清後，再加入 0.5 mL FCAScan buffer，完成染色。若不能立即分析，可以用 2% paraformaldehyde (PFA) 進行細胞固定，於 4°C 下可存放一週。

5.定量型 PCR array

配製 DNA sample：加入 ddH₂O 將 DNA sample 濃度稀釋為 50 ng/5 μ L。接著再配製 5 μ M Forward primer：取 9 μ L ddH₂O 至 eppendorf，再加入 1 μ L 50 μ M Forward primer stock；以及配製 5 μ M Reverse primer：取 9 μ L ddH₂O 至 eppendorf，再加入 1 μ L 50 μ M Reverse primer stock。接續配製好適當濃度的 dNTP 後即可做 Mixture solution 混合液 (此處 Mixture solution 為一個 well 的量，請視實際 loading 的 well 數做調整)。取出 96 孔盤，每個 well 依序加入 5 μ L Mixture solution；每個 well 依序加入稀釋後的 DNA sample 5 μ L。將 96 孔盤放至冰上，至 -20°C 冰箱取出 SYBR Green Master Matrix，vortex 後每個 well 依序加入 10 μ L SYBR Green Master Matrix。取出封膜黏貼於 96 孔盤上，黏貼完全後即可上機。Real-Time PCR 循環溫度如下：Stage1 50°C 反應 2 分鐘；Stage2 95°C 反應 10 分；Stage3 95°C 反應 15 秒、60°C 反應 1 分，共 40 個 Repeat。本方法參照商業方法並作部分條件調整。

6.統計方法

實數值以平均值 \pm 標準偏差或標準誤差(mean \pm SD or SEM)表示。除小鼠存活率的數據外，其它數據皆利用 SAS 軟體 (SAS/STAT version 8.2, SAS Institute, Cary, NC, USA) 運算，以 Duncan's multiple range test 或 Student's *t* test 統計方法，檢測各組間的差異或與 Control 組間的差異。同時，也利用 SAS 軟體的 Simple correlation 方法檢測小鼠的存活時間與血清細胞激素量之相關性，以相關係數 (correlation coefficient, *r* 值) 代表兩者關聯。本實驗將顯著水準設定在 ** $P < 0.05$ 與 ** $P < 0.01$ 。若有趨勢，則會以 # ($0.05 < P < 0.1$) 表示

五、結果與討論(含結論與建議)

1.異甘草素改善紅斑性狼瘡小鼠的腎臟發炎

實驗結果顯示，給予 MRL-*lpr/lpr* 狼瘡小鼠異甘草素 (ISL, 0.5 mg/kgBW) 不影響小鼠體重。兩組的小鼠隻數各為 20 隻。另外，犧牲小鼠後，收集兩組器官組織，量秤並計算相對組織器官重量，發現 ISL 組小鼠心臟相對重量明顯低於 Control 組 ($P = 0.036$)；在腎臟相對重量也有發現降低之趨勢

($P=0.071$)。該結果可以和圖 3 腎臟組織切片對應，ISL 給予有較低的間質細胞增生或纖維化，因此可能有較輕的相對重量。而針對脾臟而言，該品系狼瘡鼠會有脾臟自體細胞不正常增生，會有腫大情況，但 ISL 給予並無影響。

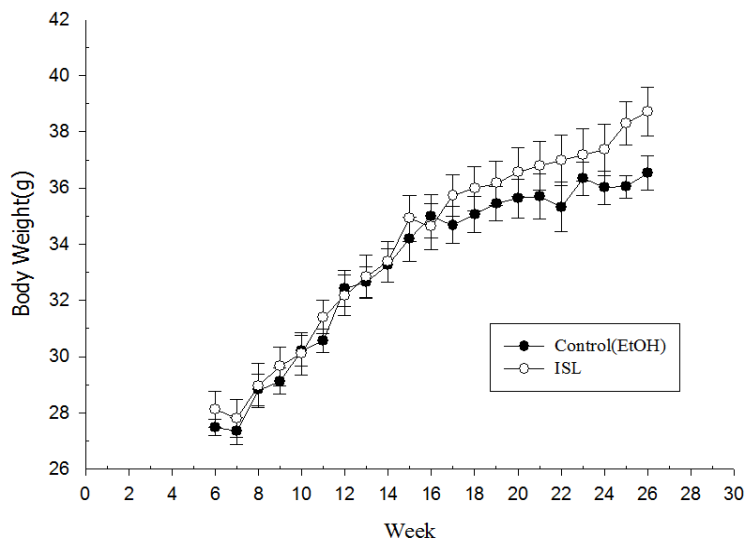


圖 3、ISL 對 MRL-*lpr/lpr* 小鼠體重之影響。

表 1、ISL 對 MRL-*lpr/lpr* 小鼠體重之影響

器官	組織器官相對重量，% (組織重/體重 x100%) ¹						
	脾臟	肝臟	腎臟	肺臟	心臟	脂肪	子宮
Control	0.51±0.21	5.48±0.58	1.21±0.14	0.82±0.40	0.52±0.06	1.78±0.93	0.71±0.13
ISL	0.55±0.16	5.24±0.54	1.12±0.13#	0.72±0.20	0.47±0.07*	1.92±0.95	0.62±0.25

¹ISL v.s. Control，#表示 $0.05 < P < 0.1$ ；而*表示 $P < 0.05$ 。

MRL-*lpr/lpr* 狼瘡小鼠自 12 週齡後，尿液蛋白質含量逐漸增加，已經達到尿蛋白(proteinuria)狀態，而本次實驗樣品-異甘草素(ISL)於已發病時期-16-18 週齡開始給予，結果發現，在小鼠 18 週齡之後，尿液蛋白質濃度皆有降低之趨勢，經統計分析，在 22 以及 25 週齡呈現明顯降低的效果(參考圖 4)。而圖 4B 是尿蛋白發生率繪圖，雖 ISL 有降低蛋白質濃度的效果，但仍未低於 10 mg/mL 之標準，故以百分比計算%，未有統計顯著性。

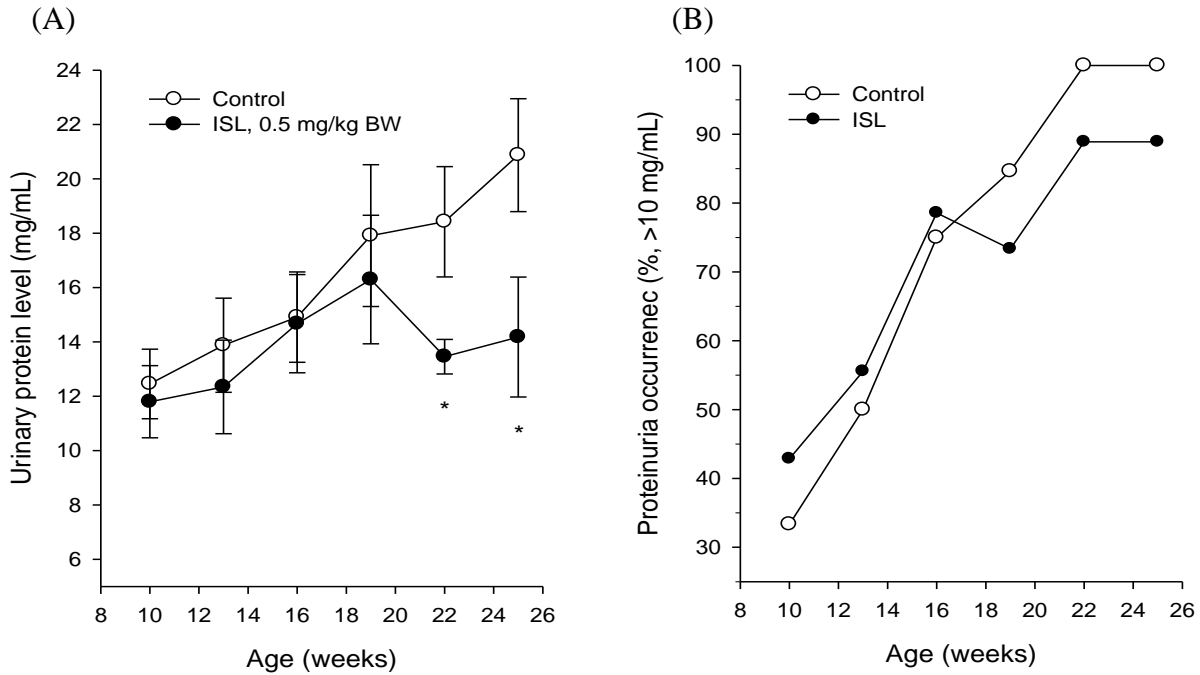


圖 4、ISL 對 MRL-*lpr/lpr* 小鼠尿蛋白含量(A)之尿蛋白發生率(B)之影響

2. 異甘草素抑制紅斑性狼瘡小鼠體內免疫細胞的促發炎細胞激素分泌量

本計劃預實驗觀察到 MRL 小鼠隨週齡上升，脾臟細胞以及腹腔細胞會有分泌愈多的抗發炎細胞激素，例如 IL-6 與 IFN- γ 。因此本實驗在小鼠犧牲後取初代細胞(primary cells)做分析。結果如圖表示，ISL 組小鼠的腹腔細胞分泌顯著偏低的 IL-6 與 TNF- α (Spon. 未利用內毒素 LPS 再刺激細胞)，此兩種細胞激素皆屬於促發炎的介質物。當這些細胞再以 LPS 刺激，ISL 組的 IL-6 依然偏低，顯示 ISL 的給予具緩和狼瘡小鼠周邊組織發炎狀態之能力。

實驗過程也收集脾臟細胞，欲探討自體免疫狀態下活化 T 細胞是否也受 ISL 介入的調節。結果如圖 5，ISL 些微降低脾臟細胞的 IFN-g 分泌量 (無論在有無 Con A 的刺激培養條件下)。然而，ISL 卻會增加 IL-10 的分泌量，尤其是細胞在 Con A 刺激培養下的分泌量呈現顯著上升。雖然 IL-10 具有活化 B 細胞的能力，屬於 Th2 類型的細胞激素，然，它在調節型 T 細胞作用上更為重要，因此推論 ISL 可能透過增加 IL-10，調節自體免疫體內 T 細胞的活化或抑制發炎反應。本計劃實驗小鼠隻數為 n=20。

本次動物實驗，於小鼠 24-25 週齡間犧牲，犧牲除收集免疫細胞外，也收集各臟器，其中，腎臟做切片染色，評量腎絲球體發炎是否因樣品給予而改善。由於 SLE 病情發展致絲球體發炎而有間質細胞不正常增生，會使絲球體腫大(參考 diameter of glomerulus)，且有發炎細胞浸潤的病理特徵，故若觀察這些病理點有改善情況，則樣品有降低狼瘡腎炎的潛力。結果如圖 6 顯示，圖 6(A)為控制組與 ISL 給予組的腎臟 H&E 染色圖(200X 以及 400X 顯示圖)，表示給予 ISL 組小鼠腎絲球體較小，增生與發炎情況有減少趨勢，我們將兩項-絲球體大小和間質空隙(表達增生高低)量化於圖 6(B)，皆發現 ISL 有緩解絲球體發炎之效。

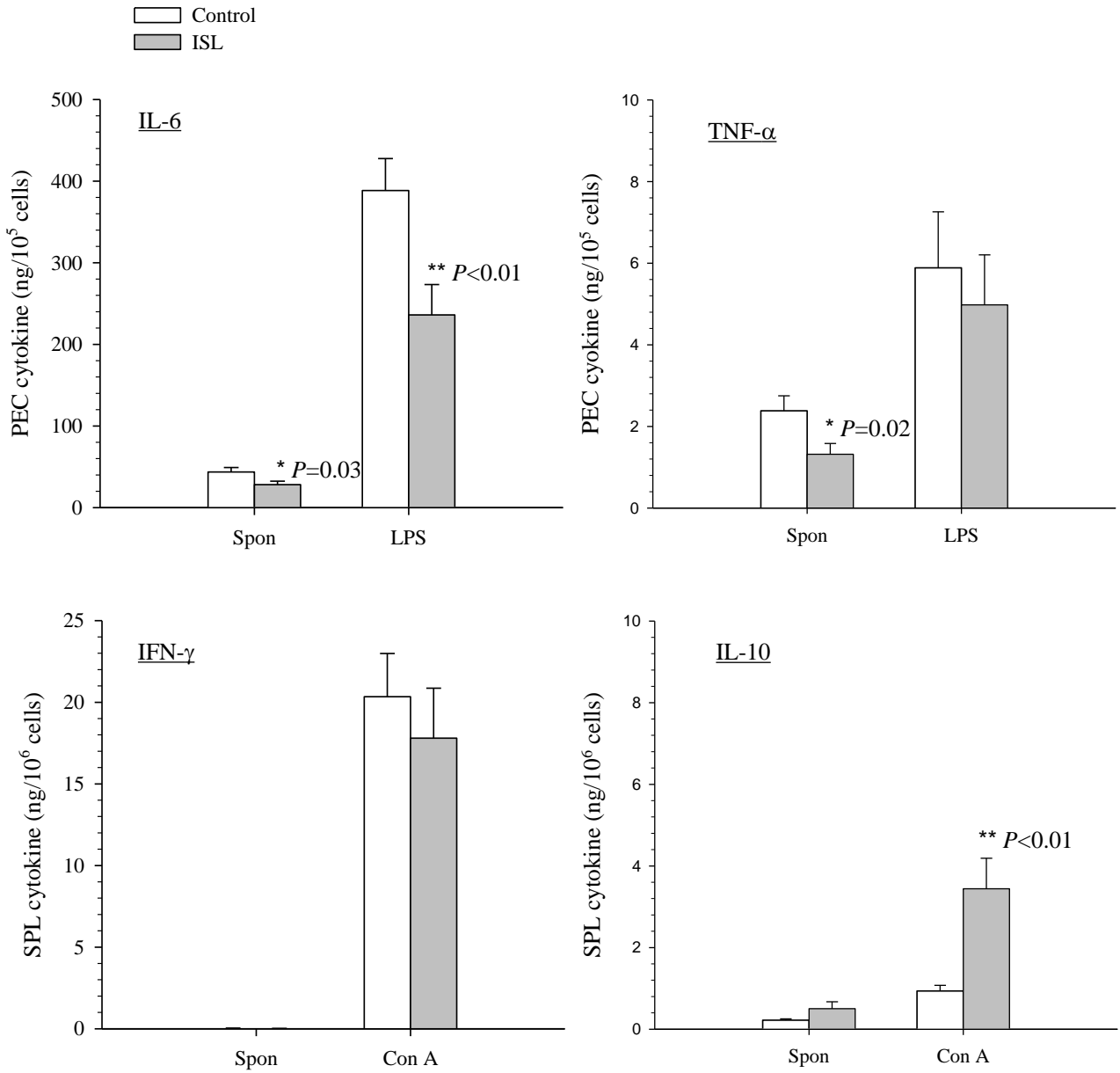


圖 5、異甘草素對 MRL-*lpr/lpr* 小鼠腹腔細胞與脾臟細胞分泌細胞激素之影響

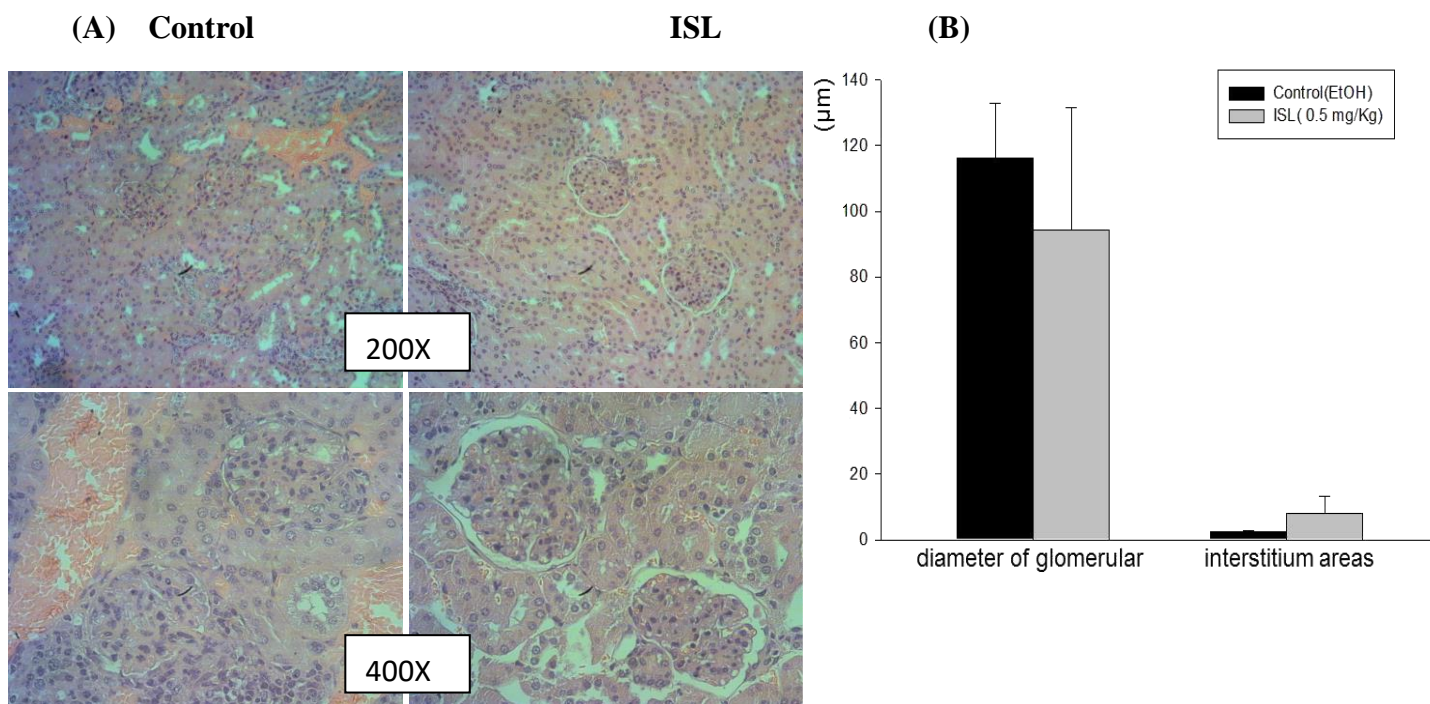


圖 6、兩組 MRL-*lpr/lpr* 小鼠腎臟切片(A)和腎絲球體腎炎量化數據(B)之比較

3. 異甘草素調整與紅斑性狼瘡患者病情相關細胞激素之分泌量

我們於第一年也進行 SLE 患者週邊血液單核細胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)生成病情相關的細胞激素之探討。檢測 SLE 患者與健康者的 PBMC，如表 2 顯示 SLE 患者相較於健康者 PBMCs 的 IL-6 量 ($P=0.007$) 以及 IFN- γ 量($P=0.001$)明顯增加許多；IL-10 的分泌量差異不大；而調節性細胞激素-TGF- β 1 卻明顯下降($P=0.001$)。本結果顯示 IL-6、IFN- γ 、TGF- β 1 與自體病情關係密切，若透過調節其生成量將有能力改善狼瘡自體病程。

表 2、健康者與 SLE 患者週邊血液單核細胞分泌狼瘡相關細胞激素之不同

細胞激素	IL-6	IFN- γ	IL-10	TGF- β 1
	(ng/mL)			
健康者	5.11±1.05	0.60±0.10	0.44±0.06	2.75±0.37
SLE 患者	30.6±14.8**	4.61±0.55**	0.41±0.05	0.04±0.03**

¹SLE 患者 v.s. 健康者生成細胞激素量之差異，**表示 $P<0.01$ 。N=4-6。

因此，接續分析以不同濃度 ISL 前處理 SLE 患者 PBMC 細胞，分析是否調節這些細胞激素之能力。結果如圖 4 顯示，ISL 在濃度 5 μM 開始即具有顯著降低 IL-6 與 IFN- γ ；以及些微調升 TGF- β 1 生成量之能力；在 10 μM 也具有同樣效果。

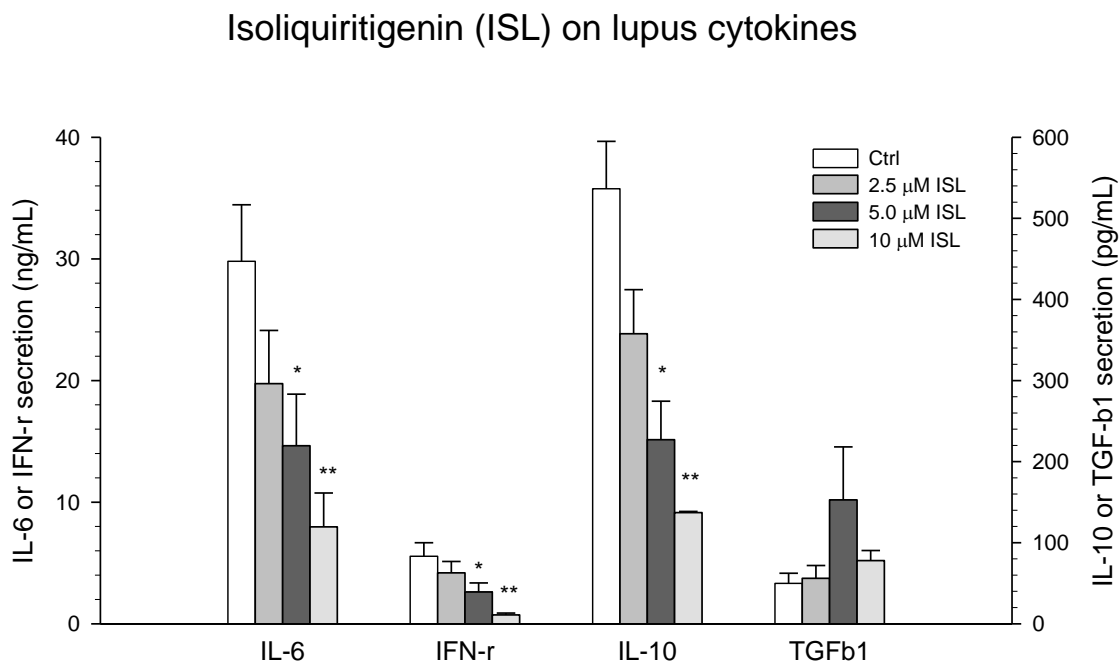


圖 7、ISL 對於 SLE 患者週邊血液單核細胞分泌病情相關細胞激素之影響

表 3、Effects of ISL on immuno-regulatory and inflammatory genes expression in SLE condition

Gene	Ctrl	ISL	Down or Up	Immuno-regulatory effects
TNF	15.8	11.0	↓	Inflammation
IL-6	9.8	1.3	↓	Inflammation, Th2
IL-12RB2	9.8	4.9	↓	Inflammation
IL-17F	169.2	9.1	↓	Th17, inflammation
IL-2	153.5	21.9	↓	Th1
IFN-γ	252.8	112.8	↓	Th1, inflammation
IL-10	4.1	-3.1	↓	Th2
IL-13	144.8	13.1	↓	Th2
IL-21	181.5	38.5	↓	Autoimmune
IL-27	78.6	17.6	↓	Autoimmune
IL-7R	-3.1	-1.2	↑	Autoimmune
TGF-β	-1.1	-1.3	- - -	Regulatory T cells
IRF4	15.6	7.0	↓	Signal transduction
JAK2	5.1	2.1	↓	Signal transduction
SOCS1/3	4.0/2.4	1.7/-1.4	↓	Signal transduction

4. 異甘草素調整透過 JAK 及 STAT 路徑調整狼瘡病情相關細胞激素之分泌量

由 qPCR 三次結果可以得知，對照蛋白質層次的分析(ELISA 數據)，**ISL 會向下調節狼瘡小鼠升高的 IL-6、IFN- γ 、IL-10 的 mRNA 表現量**；另外，也觀察到會明顯下降發炎相關的 TNF 以及 IL-17F RNA 表現量，與抑制 Th17 可能有關。

目前已知 IL-17F 與 IL-17A 類似，兩都在同一條染色體上，都是促進發炎反應的發炎因子，除了 Th17 能分泌它們外，還有好幾種 innate immune cells 能產生 IL-17A 和 IL-17F，例如，iTh17、 $\gamma\delta$ T cells、lymphoid tissue inducer cells、natural killer 等，這些細胞分泌 IL-17A 和 IL-17F 主要是為了對抗早期細菌的感染。IL-17F 與 IL-17A 比較，IL-17F 能在後期發炎反應中扮演著較重要的角色。而 IL-17A 和 IL-17F 過多會使身體產生自體免疫作用。此外，**我們也發現 ISL 也抑制 IL-21 的 mRNA 表現量**。IL-21 位於第 4 號染色體，它的作用會使巨噬細胞、自然殺手細胞以及毒殺型 T 細胞活化、分化、增生；也會使 B cells 產生 IgG I 和 IgG II，與促進自體免疫疾病和慢性發炎性疾病有關。而從與細胞活化的細胞傳訊分子表現來觀察，ISL 有效降低 JAK2 以及 SOCS1/3 的 mRNA 表現量。

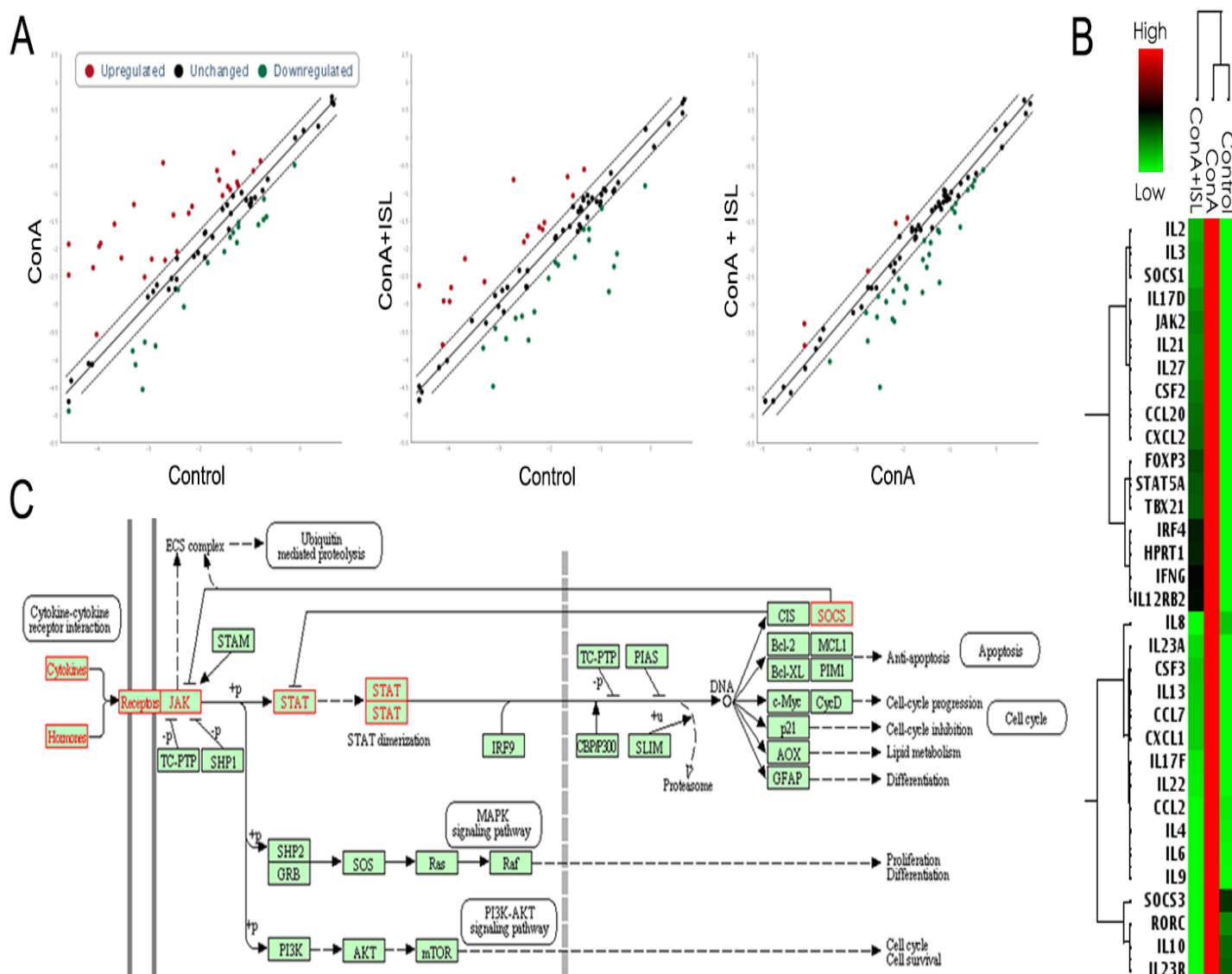


圖 8、ISL 對 SLE 患者 PBMC 細胞基因表現之影響。各項基因向上/下調節趨勢之迴歸線性(A)與顏色異同(B)之表達。資訊彙整 ISL 緩解病情之路徑(C)

其中，JAK2 是與 JAK1 一起的，可與 IFN- γ 或 G-CSF 給合，令 STAT1 磷酸化，可以促進細胞生長、與增生。另外，SOCS (suppressor of cytokine signaling) 1 作用為通過 JAK/STAT3 pathway，抑制細胞因子的產生，可與 JAK 結合抑制其活性；並可透過 IL-2、IL-3 erythropoietin (EPO)、GM-CSF 以及 IFN- γ 誘導 SOCS1 與 JAK 2 或生長因子接受器或 CD117 產生交互作用。再者，SOCS3 同樣具有抑制 JAK2 kinase 作用，而該分子也受到細胞激素的刺激而大量產生，包括 IL-6、IL-10 和 IFN- γ 會誘導 SOCS3 而表現增加。由此，我們利用生物資訊學，分析出 ISL 的影響路徑，如圖 8 顯示，透過 JAK 的拮抗，使 STAT 的磷酸化受影響，而導致下游基因表現被抑制，例如 SOCS 分

子。ISL 透過 JAK 路徑抑制下游發炎性基因表現，也在最近幾項研究團隊的成果提出[14, 15]，後續我們需更精確來探討該路徑的抑制是否有助於狼瘡的治療，並加入性別的可能差異。

5. 本計畫成果以及討論

1. 異甘草素經動物實驗驗證，於MRL-*lpr/lpr*狼瘡小鼠發病初期給予0.5 mg/kgBW，具有改善腎臟絲球體腎炎狀態之潛力(腎臟腫大以及體積有較小之結果)，因此降低尿液中蛋白質含量而有緩解尿蛋白效果。此外，由病情的細胞激素來分析，ISL組小鼠有較低的 IL-6 和 IFN- γ 分泌量，顯示可能透過降低發炎性細胞激素量達緩解發炎狀態之效。
2. 第一年度本研究也初步試驗ISL對於SLE病人血液細胞生成病情細胞激素之影響；結果顯示，10 μ M ISL明顯抑制 SLE 患者週邊血液單核細胞之IL-6、IFN- γ 、IL-10生成量；且些微提升TGF- β 1生成量。這些病情細胞激素中，SLE患者中IL-6和IFN- γ 量明顯高於健康者；而TGF- β 1則低於健康者，由此可知，ISL處理有使細胞激素生成量趨於正常，故具調節自體免疫功能的作用。
3. 第二年探討ISL調節自體免疫之機轉，發現與雌激素受器 (estrogen receptors)的關聯性不高；但與控制免疫細胞活化或發炎的基因表現卻具高度相關，抑制促發炎細胞激素基因層次表現；並且得知可能透過JAK路徑，影響下游基因層次的表現抑制免疫基因表現之關係。
4. 感謝學門之支持，我們將持續努力，期許能對於女性號發之SLE能提供緩解及改善病症的策略。

六、參考文獻

1. 徐均宏、白瑞聰、王晴祺。台灣地區紅斑性狼瘡的流行病學分析研究。2009年國際健康與管理研討會(臺灣健康管理學會)研討會論文。
2. Michelle Bloomquish. Chronic neuroimmune diseases-fighting a mystery disease. **2014.01**. (<http://www.anapsid.org/cnd/diagnosis/ai1.html>)
3. World Health Organization. Women and health: Today's evidence, tomorrow's agenda, in WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. **2009** (ISBN 9789241563857), Chapter 4-5.
4. Hong YH, Huang CJ, Wang SC, Lin BF. The ethyl acetate extract of alfalfa sprout ameliorates disease severity of autoimmune-prone MRL-*lpr/lpr* mice. *Lupus* **2009**; 18: 206-215.
5. Hsieh CC, Lin BF. Dietary factors regulate cytokines in murine models of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity Review* **2011**; 11(1):22-27.
6. Ohno H, Araho D, Uesawa Y, Kagaya H, Ishihara M, Sakagami H, Yamamoto M. Evaluation of cytotoxicity and tumor-specificity of licorice flavonoids based on chemical structure. *Anticancer Research* **2013**; 33(8):3061-3068.
7. Kwon JM, Choi YJ, Choi JS, *et al.* Blockade of cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression by licorice isoliquiritigenin through NF- κ B signal disruption. *Exp Biol Med* **2007**; 232: 235-245.
8. Kim YW, Zhao RJ, Park SJ, *et al.* Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF-kappaB-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production. *Br J Pharmacol* **2008**; 154(1): 165-173.
9. Zhu L, Wei H, Wu Y, Yang S, Xiao L, Zhang J, Peng B. Licorice isoliquiritigenin suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis *in vitro* and prevents inflammatory bone loss *in vivo*. *Int J Biochem Cell Biol* **2012**; 44(7):1139-1152.
10. Choi SY, Ha TY, Ahn JY, *et al.* Estrogenic activities of isoflavones and flavones and their structure-activity relationships. *Planta Med* **2008**; 74: 25-32.
11. Hong YH, Wang SC, Hsu C, Lin BF, Kuo YH, Huang CJ. Phytoestrogenic compounds in alfalfa sprout (*Medicago sativa*) beyond coumestrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**; 59: 131-137.
12. Lu ZM, Wang ZE, Liu YQ, *et al.* Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with cytokine genes expression in systemic lupus erythematosus. *Croat Med J* **2009**; 50(2): 117-123.
13. Svenson JL, EuDaly J, Ruiz P, Korach KS, Gilkeson GS. Impact of estrogen receptor deficiency on disease expression in the NZM2410 lupus prone mouse. *Clin Immunol* **2008**; 128(2):259-268.
14. Wu S, Xue J, Yang Y, Zhu H, Chen F, Wang J, Lou G, Liu Y, Shi Y, Yu Y, Xia C, Hu Y, Chen Z. Isoliquiritigenin inhibits interferon- γ -inducible genes expression in hepatocytes through down-regulating activation of JAK1/STAT1, IRF3/MyD88, ERK/MAPK, JNK/MAPK and PI3K/Akt Signaling Pathways. *Cell Physiol Biochem*. **2015**; 37(2): 501-514.
15. Wu Y, Chen X, Ge X, Xia H, Wang Y, Su S, Li W, Yang T, Wei M, Zhang H, Gou L, Li J, Jiang X, Yang J. Isoliquiritigenin prevents the progression of psoriasis-like symptoms by inhibiting NF- κ B and proinflammatory cytokines. *J Mol Med (Berl)* **2016**; 94(2): 195-206.

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2017/01/30

科技部補助計畫	計畫名稱: 異甘草素對緩解全身性紅斑性狼瘡病情指標之機制探討(A03)
	計畫主持人: 洪永瀚
	計畫編號: 103-2629-B-214-001-MY2 學門領域: 性別主流科技計畫
無研發成果推廣資料	

103年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：洪永瀚			計畫編號：103-2629-B-214-001-MY2					
計畫名稱：異甘草素對緩解全身性紅斑性狼瘡病情指標之機制探討(A03)								
成果項目			量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)			
國內	學術性論文	期刊論文		0	篇	第42屆台灣營養年會研討會論文發表		
		研討會論文		1				
		專書		1			本	營養生化學(ISBN 978-986-362-282-6)
		專書論文		0			章	
		技術報告		0			篇	
		其他		0			篇	
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	1	件	經由該計畫支持，延伸該計畫做跨領域合作，案子自第一年開始跑，欲透過檢測婦女疾病或不同生命期之特定細胞(包括紅斑性紅斑狼瘡)。專利案號為I512285、I522039、I546535	
				已獲得	3			
			新型/設計專利	0				
		商標權		0				
		營業秘密		0				
		積體電路電路布局權		0				
		著作權		0				
		品種權		0				
		其他		0				
		技術移轉	件數		0			件
	收入		0	千元				
	國外	學術性論文	期刊論文		2	篇	2016年發表於期刊名稱為""Natural Product Communications""之11(1)卷期，頁數為pp. 81-82。另一篇發表於""BioMed Research International""期數為2016(special issues)，編號為7368797。另有兩篇文章審查中。	
			研討會論文		0			
			專書		0		本	
專書論文			0	章				
技術報告			0	篇				
其他			0	篇				
智慧財產權及成果		專利權	發明專利	申請中	0	件		

		已獲得	0		
		新型/設計專利	0		
		商標權	0		
		營業秘密	0		
		積體電路電路布局權	0		
		著作權	0		
		品種權	0		
		其他	0		
	技術移轉	件數	0	件	
		收入	0	千元	
參與計畫人力	本國籍	大專生	2	人次	培育兩位義守大學營養系學生，分別是劉00以及陳00，透過本計畫的研究工作，學習許多，該歷程也使兩位同學甄試進到台大生化科技系(所)與台大生命科學所碩士班攻讀碩士班。該兩位同學並未支領本計畫人事費，係由主持人個人及系所支應的人事費，但他們實質參與學習型研究工作。
		碩士生	1		與屏東科技大學共同指導呂00同學
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)		藉計畫也進行跨領域合作計畫，參與2015年國家新創獎，並取得學研優勝獎			

科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以200字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）

將再一步探討異甘草素透過JAK2-STAT路徑的專一性，而有利於未來開發自體免疫疾病的治療策略，例如藥物或飲食富含異甘草素需注意飲食原則

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： 否 是，建議提供機關

（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）

本研究具影響公共利益之重大發現： 否 是

說明：（以150字為限）