

# 中華民國第 61 屆中小學科學展覽會 作品說明書

---

高級中等學校組 農業與食品學科

第三名

052211

豆渣萃取物抗皮膚發炎之作用及機轉

學校名稱：臺北市私立復興實驗高級中學

作者： 高二 廖珮宇 高二 凌翊涵	指導老師： 張琬琳
-------------------------	--------------

關鍵詞：豆渣萃取物、細胞激素、異位性皮膚炎

## 摘要

豆渣是大豆經萃取或壓榨提油後之副產品，由於豆渣內的異黃酮成分具有抗氧化及抗發炎效用，對於治療皮膚發炎性疾病是個相對無害且較不昂貴的選擇。異位性皮膚炎是一種易復發的慢性發炎皮膚疾病，開發有效及副作用少之藥物是目前重要課題。本研究利用液相層析串聯質譜分析豆渣萃取物(ISO-1)內含的異黃酮成分，再利用  $TNF\ \alpha$  /  $IFN\ \gamma$  刺激人類表皮角質細胞後進行實驗，發現 ISO-1 比常見異黃酮純成分 genistein 更能抑制細胞激素上升。並進一步發現 ISO-1 對異位性皮膚炎致病細胞激素 IL-4、IL-13 造成的細胞發炎反應及其相關 MAPK、JAK-STAT 路徑活化具有保護作用，且可有效抑制組織胺誘導癢感相關蛋白 TSLP 之基因表現。最後以小鼠過敏性癢感行為模式來證實 ISO-1 可降低因卵白蛋白抗原誘導之小鼠癢感行為。

## 壹、研究動機

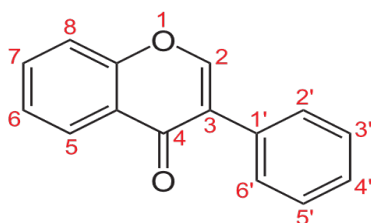
大豆或稱黃豆(soybeans)，是我們日常食用五穀之一。大豆的營養價值極高，含有約 35%~40%的蛋白質和 18~20%的油脂，其油脂含有大量的不飽和脂肪酸。此外，大豆更含有大豆卵磷脂、維他命 E、異黃酮、礦物質及纖維等健康物質。大豆的用途相當廣泛，所衍生出的產品種類也相當豐富，經由加工過程，可分為傳統大豆加工食品、大豆油及大豆蛋白等三大類產品。目前更進一步朝向生化科技及環保的相關應用上發展。「**豆渣**」，又稱「**豆粕**」，壓製成餅狀的又稱「**豆餅**」，是大豆經萃取或壓榨提油後之副產品，還保留許多大豆的營養份和少許油脂，由於豆渣是一種優良的蛋白質來源，被廣泛用於飼料和食品工業等領域。而豆渣再經過溶劑萃取剩餘油脂後，就稱「**大豆粉**」，大豆粉原則上只是去掉油脂，仍保有大部份大豆的營養成份，因此可供作飼料或肥料用。



圖一：豆渣外觀圖

「多酚」(polyphenol)是種天然的結構類，也是種合成或半合成的有機化合物，其特徵在於存在大量的酚結構單元。過去的研究發現許多植物像是綠茶、葡萄及深色的蔬果都含有大量的多酚，常見的多酚化合物有：兒茶素、綠原酸、異黃酮、花青素、可可多酚、薑黃素、檸檬黃素、槲皮素、芸香苷、白藜蘆醇…等，很多「多酚類物質」都具有抗氧化作用。「類黃酮化合物」(flavonoids)，是多酚類中相當重要的一類，被證實具有抗氧化及抗發炎的效用[1]。由於類黃酮化合物分子結構小，具有水溶性，相當益於人體吸收，同時類黃酮化合物沒有累積性，並且可以預防自由基的破壞，因此被認為是對人體有益的物质。

大豆內含有相當豐富類黃酮化合物，而大豆異黃酮(soy isoflavones)是大豆中最重要的類黃酮化合物，其中金雀異黃酮(genistein)跟黃豆昔元(daidzein)是最常見的成分，這些成分被證實有助於降低發炎反應。由於豆渣或黃豆粉在製備過程中能保留大多數的大豆異黃酮，已被證明也是「異黃酮」的豐富來源之一，除此之外豆渣也含有其他像是皂素(saponins)和酚類化合物(phenolic compounds)等功能性成分，因此豆渣被認為具有治療發炎疾病的潛力。在過去的研究發現利用層析法(chromatography)可以從豆渣萃取物中找到4種異黃酮，並發現此豆渣萃取物較傳統的異黃酮有更好的抗氧化作用[2]。



圖二: 異黃酮結構式

異位性皮膚炎(Atopic dermatitis, AD)是種易復發但不具傳染性的慢性皮膚發炎疾病，21世紀以來已開發國家患有異位性皮膚炎的病患比例不斷增加，根據統計，台灣約有三百萬人罹患異位性皮膚炎[3]，其中以孩童和青少年佔大部份。異位性皮膚炎的典型症狀是皮膚乾燥，併隨有嚴重的皮膚瘙癢、紅腫以及皮膚龜裂情形；發炎區域常有清澈液體流出，且液體會隨著發炎時間越久而越嚴重。由於長期搔抓，患者常有睡眠不足、精神不佳，導致專注力下降等情形，進而影響生活品質。

現今異位性皮膚炎的完整致病機轉尚在研究中，但已知涉及表皮屏障基因的缺陷、免疫

**功能異常以及環境因素的影響**。目前的研究顯示，異位性皮膚炎產生之發炎反應是源自於第二型輔助 T 細胞 (T helper cells, Th) 所分泌的**細胞激素 IL-4、IL-13**，這個作用對異位性皮膚炎的致病力而言是不可或缺的。由於病患患部搔癢，會有搔抓的行為。搔抓後使皮膚障壁受損，使得第二型輔助 T 細胞分泌 IL-4、IL-13，促使發炎反應並進一步導致異位性皮膚炎的病發。所以 IL-4、IL-13 皆是參與異位性皮膚炎疾病的相關細胞激素，也證明了細胞激素在異位性皮膚炎中的重要性，更支持了現今的異位性皮膚炎免疫病理機轉[4]。

在細胞信號傳送途徑中，**JAK-STAT 路徑**對於大多數的細胞激素和生長因子是不可或缺的。在人類表皮角質細胞中，IL-4 會啟動 JAK/STAT 路徑之活化，誘發表皮角質細胞中 STAT3 路徑的活化[5]。另外，根據先前的研究，**MAPK (mitogen-activated protein kinase)**的訊息傳導路徑也會參與調節皮膚細胞中訊息路徑下游的各種反應，像是抓癢(Scratch)誘導的 IL-13 受體的表現取決於 ERK1 / 2 和 p38 MAPK2 的信號[6]。除此之外，**胸腺基質淋巴生成素 (Thymic stromal lymphopoietin, TSLP)**是屬於細胞激素家族的蛋白質。近年來研究發現 TSLP 與過敏性發炎疾病包含過敏性皮膚炎、鼻炎和氣喘相關。TSLP 在人類表皮角質細胞中的表現會因為影響輔助 T 細胞的平衡而影響異位性皮膚炎的發病機制。部分 IgE 對自身抗原具有反應性，而 IgE 自身反應性能促進慢性的發炎，使表皮釋放大量 TSLP，從而啟動 Th2 免疫反應。最後，Th2 衍生的 TSLP 會引起癢感[7]。

雖然目前異位性皮膚炎的治療方法很多，但大多無法從根本去解決問題，使用的藥物多為化合物且可能有某些程度的副作用，如何能開發新的天然且無害的藥物是現今主要的課題之一。由於豆渣具有治療發炎疾病的潛力，可以考慮用在皮膚發炎性疾病，是個相對無害且較不昂貴的選擇，然而豆渣在水中不易溶解，在皮膚疾病的使用效果較水溶性產品來的差。因此我們將市面上買到的豆渣利用乙醇跟水來萃取得到豆渣萃取物 ISO-1，含有多種異黃酮，而且是水溶性的，再將 ISO-1 溶解在水用於體外和體內實驗。根據我們過去的研究發現 ISO-1 在皮膚局部應用可抑制 UVB 紫外線誘導的光損傷和 imiquimod 誘導的牛皮癬樣皮膚炎 (psoriasis-like skin inflammation) [8-9]，因此我們認為 ISO-1 對於異位性皮膚炎可能也具有治療的潛力。

## 貳、研究目的

本研究目的主要希望先進行豆渣萃取物 ISO-1 萃取，並用液相層析串聯質譜(LC-MS/MS)去分析 ISO-1 內含的異黃酮成分。接著利用人類表皮角質細胞(normal human epidermal keratinocytes, NHEKs)進行細胞實驗，先進行人類表皮角質細胞的細胞培養及存活率試驗。此外，由於金雀異黃酮(genistein)是大豆內最常見的異黃酮成分，且被證實有助於降低發炎反應，因此我們希望去比較 ISO-1 跟常見異黃酮純成分 Genistein 對 TNF  $\alpha$  /IFN  $\gamma$  刺激人類表皮角質細胞後細胞激素(cytokines) IL1- $\beta$ 、IL-6、IL-8 上升的影響。另外在抗皮膚發炎之作用機轉探討部分，希望去探討豆渣萃取物 ISO-1 是否對致病性的細胞激素 IL-4、IL-13 所造成的發炎反應具有保護的作用，及其可能的背後作用機轉及其相關活化路徑，並探討了利用組織胺誘導人類表皮角質細胞中癢感相關蛋白 Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP)之基因表現，及 ISO-1 對 TSLP 基因表現的影響。最後為證實 ISO-1 是否能降低小鼠被誘發的癢感行為，我們也透過小鼠過敏性癢感行為模式來觀察 ISO-1 對小鼠被誘發的癢感行為之影響，以期未來能將這些成分應用於開發對抗異位性皮膚炎或其他皮膚發炎之製劑。

綜上所述，本實驗之研究目的條列如下：

- 一、用液相層析串聯質譜(LC-MS/MS)去分析 ISO-1 內含的異黃酮成分。
- 二、在 TNF  $\alpha$  /IFN  $\gamma$  刺激人類表皮角質細胞後  
比較 ISO-1 與 genistein 對於細胞激素 IL1- $\beta$ 、IL-6、IL-8 上升的影響。
- 三、探討 ISO-1 是否對 IL-4、IL-13 所造成的發炎反應具有保護作用及其可能機轉。
- 四、探究 ISO-1 對 TSLP 基因表現的影響。
- 五、實證 ISO-1 是否能降低小鼠被誘發的癢感行為。

## 參、研究設備及器材

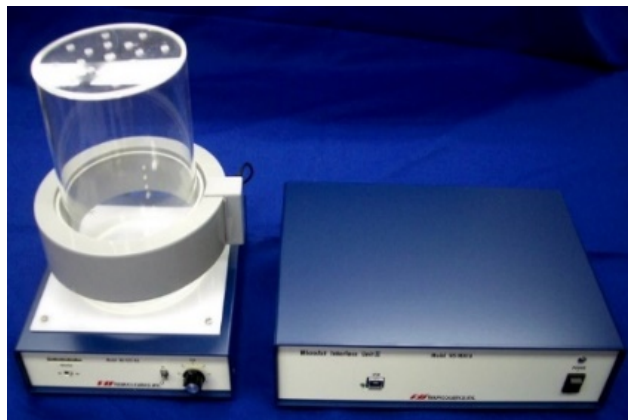
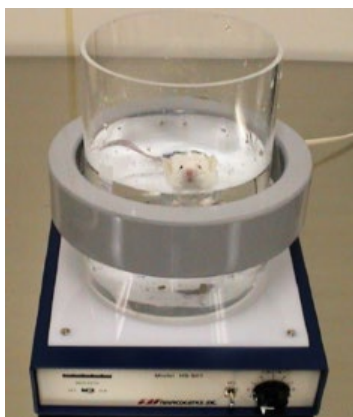
- 一. 離心機 (Hettich zentrifugen, MIKRO 200R)
- 二. 細胞培養箱
- 三. 無菌操作台
- 四. 酵素連結免疫吸附分析儀(enzyme linked immunosorbent assay reader, ELISA reader)



圖三: 酵素連結免疫吸附分析儀

圖四: 液相層析串聯質譜分析儀(LC-MS/MS)

- 五. BCA protein assay kit
- 六. SDS-polyacrylamide gels
- 七. 聚二氟乙烯膜(PVDF membranes)
- 八. 增強型化學冷光(enhanced chemiluminescence, ECL)試劑
- 九. Total RNA isolation kit(GeneDireX®, Vegas, NV)
- 十. First-strand cDNA synthesis kit
- 十一. CFX96™ Real-Time PCR Detection System
- 十二. 液相層析串聯質譜分析儀(liquid chromatography/mass spectrometer, LC-MS/MS)
- 十三. 搔癢測定裝置 (MicroAct®)



圖五: 搔癢測定裝置 (MicroAct®)

## 肆、研究過程或方法

### 一、研究流程圖



圖六：研究流程圖

## 二、豆渣萃取物 ISO-1 萃取

豆渣萃取物 ISO-1 的萃取方法簡要來說，先將 50 克豆渣樣品與 150 毫升乙醇/水（1：1，v / v），在室溫下振搖 2 小時，然後將提取的樣品以 6000 rpm 的轉速離心在 25°C 下 20 分鐘。收集上清液，通過玻璃濾紙，然後在冷凍乾燥系統中乾燥。這樣可以產生約 9.5 克的粉末狀產品，通過高效液相色譜（high-performance liquid chromatographic, HPLC）分析得出的異黃酮的總含量為 43,839 g / g。再將一部分粉末（0.52 克）溶解在 6.9 mL 去離子水(deionized water)中，可以得到的異黃酮的總含量為 3.33 mg / mL。由豆渣中萃取的異黃酮是水溶性的，因此將測試的異黃酮溶解在水用於體外和體內實驗。

## 三、液相層析串聯質譜(liquid chromatography/mass spectrometer, LC-MS/MS)分析豆渣萃取物 ISO-1 內含異黃酮(Isoflavones)成分

質譜儀運用在多反應監測中(multiple reaction monitoring MRM)模式使用每個異黃酮的兩種特定離子對。最強的離子對被用於定量，另一個用作定性。豆渣萃取物 ISO-1 的樣品等分試樣 2.0 克稱重並添加到玻璃小瓶中（15 毫升）含 10 毫升甲醇和 2 mL 的 0.1 M HCl 水溶液。將樣品在室溫下用超聲處理 20 分鐘。然後，分離上清液並過濾通過濾紙，然後是使用注射器進行第二步過濾用 0.45  $\mu$ m PTFE 膜過濾。在低壓下除去溶劑使用旋轉蒸發儀的壓力，以及最終體積調整為 2 mL 甲醇。

## 四、人類表皮角質細胞(normal human epidermal keratinocytes, NHEKs)細胞培養

先將生長至 80-90%飽和度的人類表皮角質細胞(normal human epidermal keratinocytes, NHEKs)以 pH7.4 之磷酸鹽緩溶液(phosphate buffered saline, PBS)清洗，加入胰蛋白酶(TrypLE Express)於細胞培養箱中作用使細胞懸浮，接著將混合之細胞液抽至離心管中，以室溫及轉速 1100 rpm 條件進行離心五分鐘，最後再去除上清液並加入適量 keratinocyte serum free medium (KSFM)，繼代於 75T flask 中，置於條件為 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之細胞培養箱(incubator)中進行細胞培養，每 48 小時更換培養基。



## 五、人類表皮角質細胞(NHEKs)以 ISO-1 處理與細胞激素誘導方式

當細胞生長至八分滿時，始以 ISO-1 處理，作用濃度為 1 µg/mL、3 µg/mL、10 µg/mL，最後將含有 ISO-1 之培養基混合液不同培養盤，控制組則加入相同體積溶劑(ddH<sub>2</sub>O)之培養基混合液於細胞培養箱中。本研究使用作為誘導發炎反應之細胞激素為 IL-4、IL-13，將經過 ISO-1 前處理之人類角質細胞以 PBS 清洗，接著依照實驗條件需求，加入含有細胞激素之混合液，作用濃度為 IL-4 (100 ng/mL)、IL-13 (50 ng/mL)，並於細胞培養箱中培養特定時間，再進行後續分析。

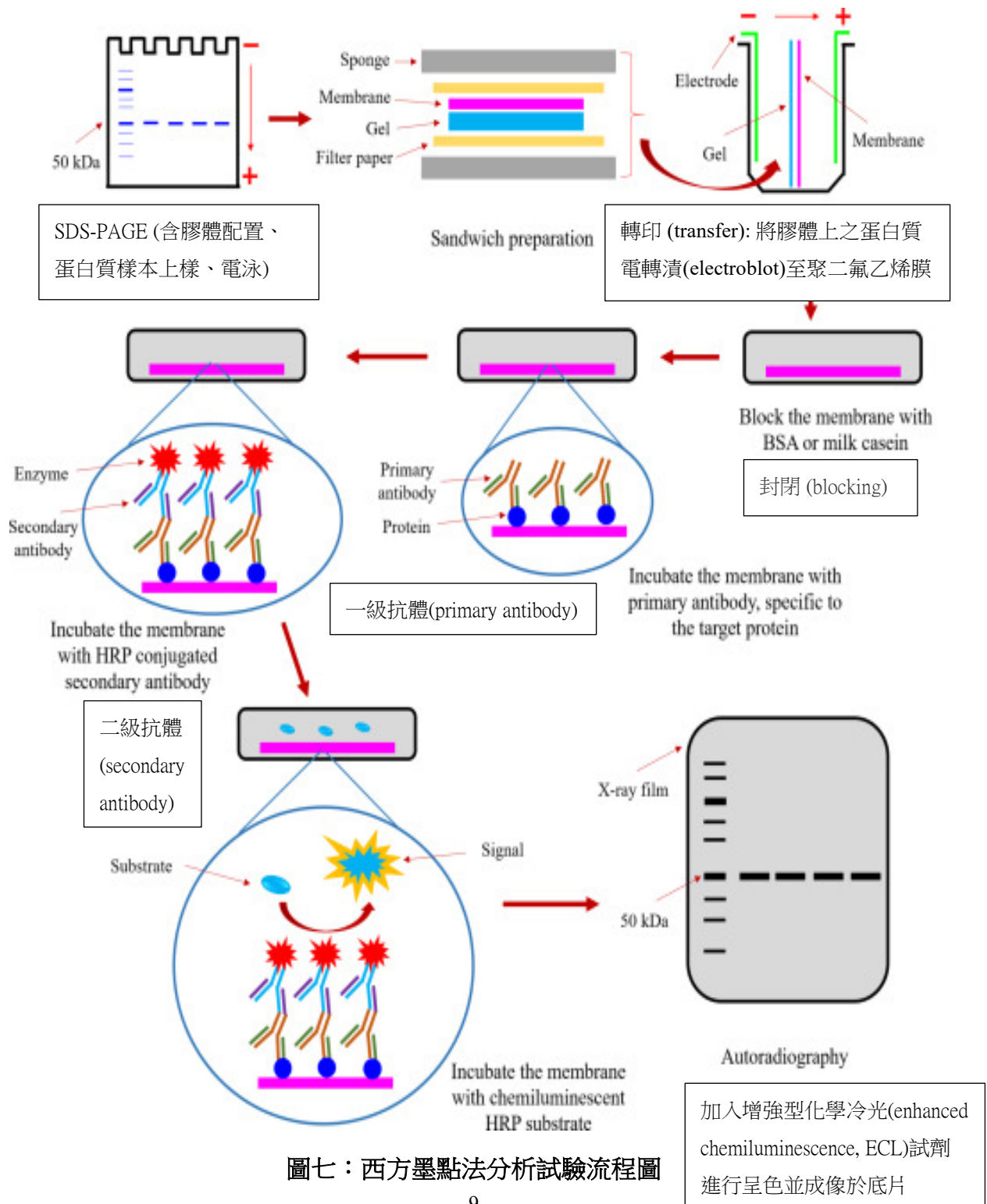
## 六、細胞存活率試驗(Cell viability assays)

將培養好的人類角質細胞以每孔  $3 \times 10^4$  個細胞的數量均勻種入 24 孔培養盤(24 well)中培養 24 小時使細胞貼附於培養盤底，接著分別加入不同濃度的 ISO-1(1µg/mL、3µg/mL、10µg/mL)混合培養基，於條件 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之細胞培養箱中培養，然後以 PBS 清洗，加含 0.5mg/mL MTT 之混合培養基並於細胞培養箱作用 2-4 小時，而後移除液體並加入適量 DMSO 溶解孔盤底部之藍紫色結晶物，接著利用酵素連結免疫吸附分析儀(enzyme linked immunosorbent assay reader, ELISA reader)以 550 nm 之波長測定其吸光值，作為細胞存活率之檢測，確認人類表皮角質細胞在 ISO-1 處理下是否具有細胞毒性(cytotoxicity)。

## 七、西方墨點法分析試驗(Western blotting analysis)

依照實驗設計需求，將不同條件之細胞以 PBS 清洗後，於直徑 35 mm 之培養皿中加入新鮮配置之細胞溶解緩衝液(RIPA lysis buffer)使細胞破解，並置於冰上使用刮勺將細胞刮下在以超音波(sonication)進行均質化(homogenization)，接著將抽取物在 4°C 下以 13200 rpm 之轉數離心 10 分鐘後，抽取上清液，不同樣本取適量體積以 BCA protein assay kit 進行蛋白質濃度測定及定量，再加入 sample buffer，放置在 95°C 水浴加熱 5 分鐘。接下來使用 SDS-polyacrylamide gels (SDS-PAGE)將不同分子量的蛋白質分離，接著將膠體上之蛋白質電轉漬(electroblot)至聚二氟乙烯膜(PVDF membranes)。完成後，將 PVDF membrane 與 blocking buffer 於搖擺機(shaker)上室溫搖盪 1 小時，再以 TBS-T buffer 清洗，爾後加入一級抗體(primary antibody)搖盪，再以

TBS-T buffer 清洗，加入二級抗體(secondary antibody)搖盪進行探針(probe)標記，最後於暗房 (dark room)中加入增強型化學冷光(enhanced chemiluminescence, ECL)試劑進行呈色並成像於底片。隨後使用 stripping buffer 去除膜上原鍵結之一級與二級抗體，以 TBS-T buffer 清洗後，加入特定蛋白質之一級與二級抗體進行特定蛋白質總量之偵測。將所偵測之蛋白質表現強度加以量化分析，藉此評估胞內訊息之傳遞路徑，探討作用機轉。



圖七：西方墨點法分析試驗流程圖

## 八、即時聚合酶鏈式反應 (Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-qPCR)

將細胞經過豆渣萃取物(ISO-1)處理以及組織胺誘導反應後，以 PBS 清洗後，使用胰蛋白酶將細胞懸浮並離心以去除上清液，接著依據 total RNA isolation kit(GeneDireX®, Vegas, NV)操作步驟萃取得 RNA。接著使用分光光譜儀測定吸光值，並以  $A_{260/280}$  之比值預估樣本中之核酸純度及濃度試算。隨後依據 first-strand cDNA synthesis kit 操作步驟合成 cDNA，接著將 cDNA 加入正向引子(forward primer)、反向引子(reverse primer)、螢光定量試劑(SYBR green)與 DEPC 處理水，正反向引子序列如表(表 1)所示；將準備好之樣品放入儀器(CFX96™ Real-Time PCR Detection System)進行 cDNA 基因放大，為了讓 cDNA 模板打開後使 DNA 聚合酶(DNA polymerase)黏附並複製，作用條件如下：DNA 變性(denaturation)於 95°C 作用 3 秒；引子緩冷(annealing)配對於 60°C 作用 20 秒；引子延長(extension)於 95°C 作用 10 秒，一共進行 54 個循環(cycles)，結束後取得樣本之循環閾值(cycles threshold, Ct)，並以管家基因(house-keeping gene)作為參考(reference)基因，最終以 qPCR 相對定量(Relative Quantification, RQ)法，即  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示細胞內基因表現量之差異。

相對定量法分析方式如下：

$$\Delta Ct (\text{target gene}) = Ct (\text{target gene}) - Ct (\text{reference gene})$$

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct (\text{target gene}) - \Delta Ct (\text{target gene of control})$$

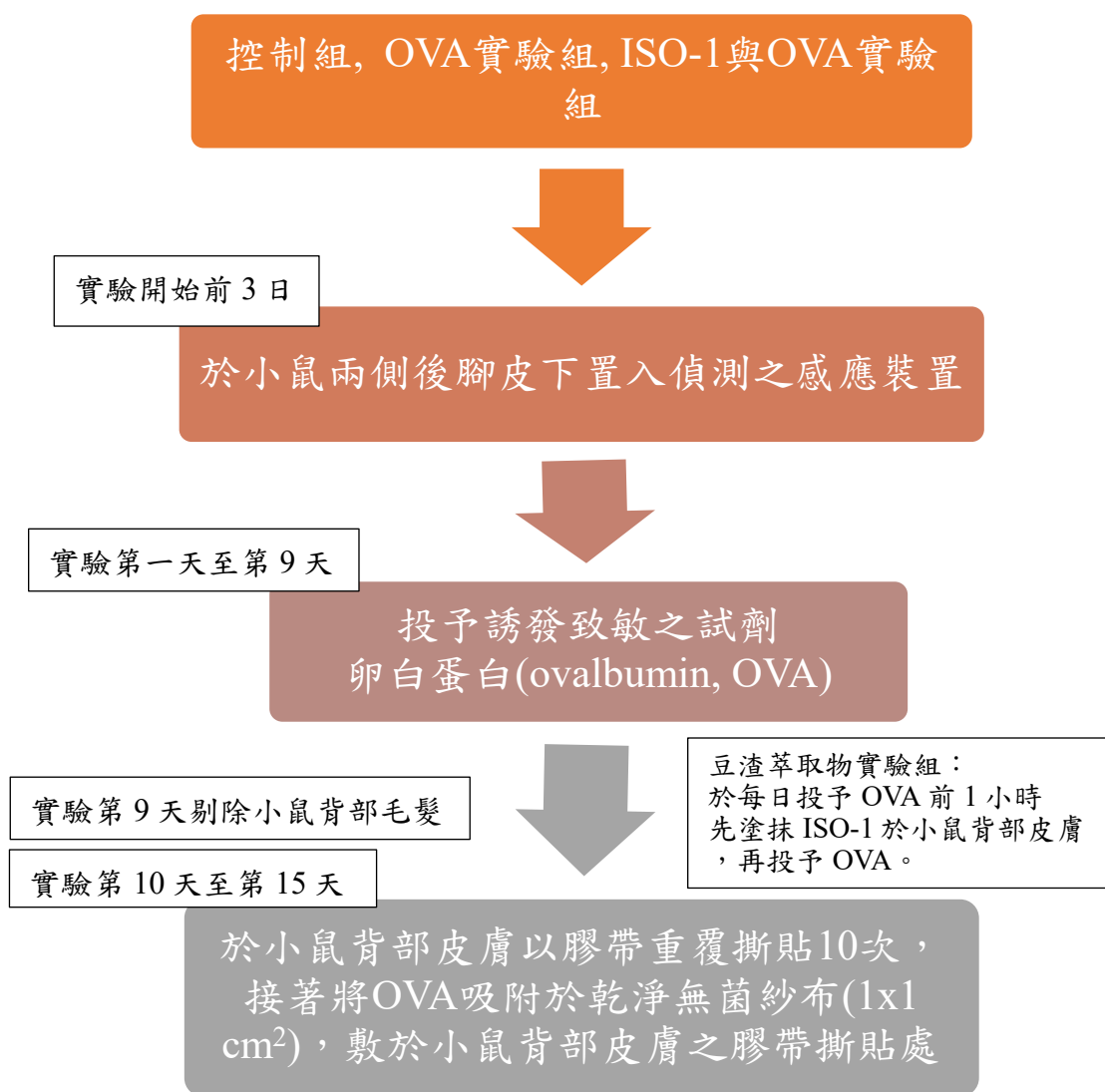
$$\text{Relative Quantity} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Genes	Primers	Sequence (5' -3' )
TSLP (h)	Forward	CATGGAAGTGCTGTCGAAGA
	Reverse	TTTCCGTGACCAATCCTTTC
GAPDH (h)	Forward	CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC
	Reverse	GTAGAGGCAGGGATGTTCT
IL-1 $\beta$	Forward	CTCTCACCTCTCCTACTCACT
	Reverse	ATCAGAATGTGGGAGCGAAT
IL-6	Forward	CGAGCCCACCGGGAACGAAA
	Reverse	GGACCGAAGGCGCTTGTGGAG
IL-8	Forward	ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC
	Reverse	AACCCTCTGCACCCAGTTTTTC

表一、RT-qPCR 檢測之引子序列

## 九、小鼠皮膚癢感行為模式

選用 8-11 週齡之 BALB/c 品系雄性小鼠，首先將小鼠分成三個組別，分別為：控制組、OVA 實驗組、豆渣萃取物 ISO-1 與 OVA 實驗組；本實驗所使用之豆渣萃取物溶於二次過濾純水中，用於塗抹小鼠背部皮膚。實驗開始前三日於小鼠兩側後腳皮下置入偵測之感應裝置，並於。實驗第一天至第九天投予誘發致敏之試劑卵白蛋白(ovalbumin, OVA)，每次 100 $\mu$ l (100 mg/ml)，並於實驗第九天剔除小鼠背部毛髮。實驗第十天，於小鼠背部皮膚以膠帶重覆撕貼 10 次，接著將 OVA 100 $\mu$ l (100 mg/ml) 吸附於乾淨無菌紗布(1x1 cm<sup>2</sup>)，敷於小鼠背部皮膚之膠帶撕貼處，並以防水膠帶固定，每日更換至實驗第十五天結束，豆渣萃取物實驗組於每日投予 OVA 前 1 小時，先塗抹 ISO-1 於小鼠背部皮膚，再投予 OVA。

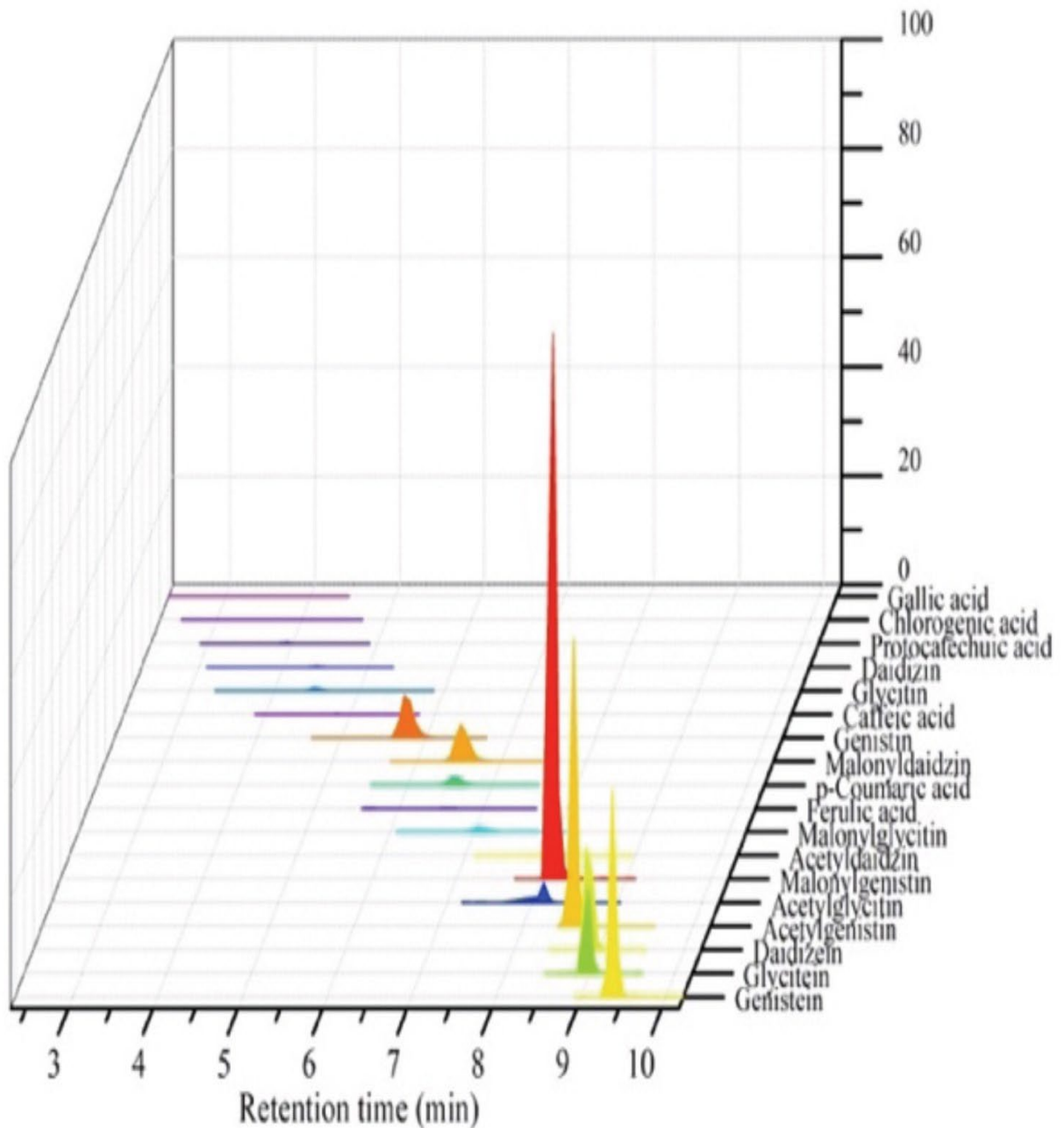


圖八：小鼠皮膚癢感行為模式研究流程圖

## 伍、研究結果

### 一、液相層析串聯質譜(liquid chromatography/mass spectrometer, LC-MS/MS)分析 ISO-1

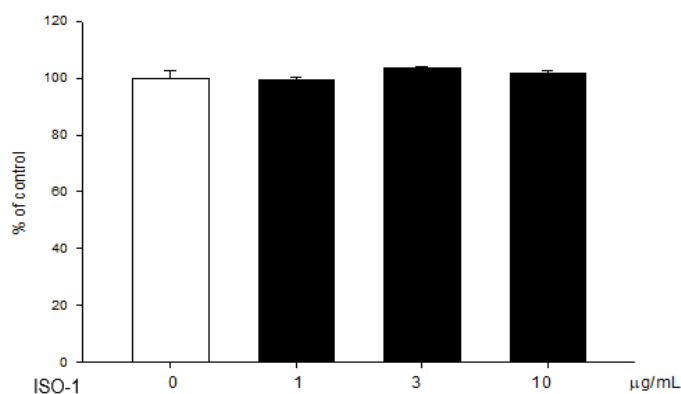
我們利用液相層析串聯質譜(LC-MS/MS)分析豆渣萃取出物 ISO-1，將不同種類的異黃酮依據極性大小於不同的滯留時間依次分離出來，ISO-1 主要的異黃酮為 malonylgenistin (23.28%), genistin (19.30%), malonyldaidzin (16.12%), 以及 acetylgenistin (12.15%)，其中以 malonylgenistin 強度最大(圖九)。



圖九：不同種類的異黃酮依據極性大小於不同的滯留時間依次分離出來

## 二、豆渣萃取物 ISO-1 對於人類表皮角質細胞無細胞毒性

在本篇研究中，我們利用 MTT 還原分析法，檢測人類角質細胞(NHEK)在不同濃度之 ISO-1 的處理下對其存活率之影響，以篩選最適合之作用濃度。首先，本篇研究先將不同濃度之 ISO-1(1  $\mu\text{g/mL}$ 、3  $\mu\text{g/mL}$ 、10  $\mu\text{g/mL}$ )在 NHEK 單獨做預處理，評估 ISO-1 在 1-10 $\mu\text{g/mL}$  的濃度下是否會影響 NHEK 之存活率，對其產生細胞毒性。實驗結果顯示，我們發現透過 MTT 還原分析法，經過不同濃度 ISO-1 處理之組別，在濃度範圍 1-10  $\mu\text{g/mL}$  之間均不會影響 NHEK 之存活率，顯示 ISO-1 在濃度 10  $\mu\text{g/mL}$  以下對於 NHEK 不具細胞毒性，因此在後續的西方墨點法中，我們選擇 1  $\mu\text{g/mL}$ 、3  $\mu\text{g/mL}$ 、10  $\mu\text{g/mL}$  濃度之 ISO-1 作為 NHEK 藥物處理之作用濃度(圖十)。

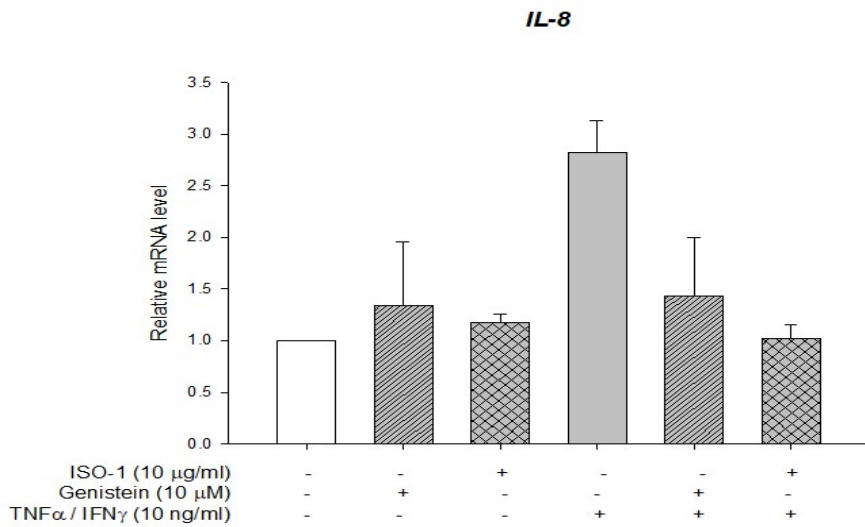
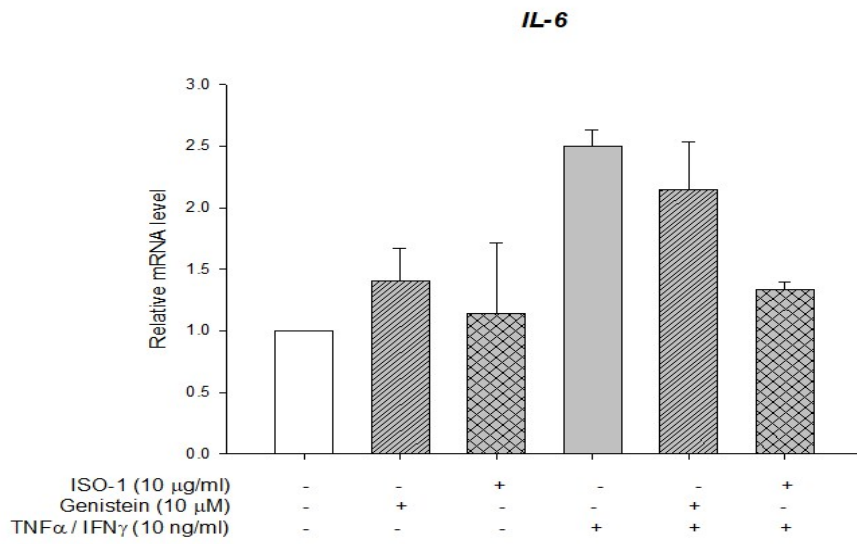
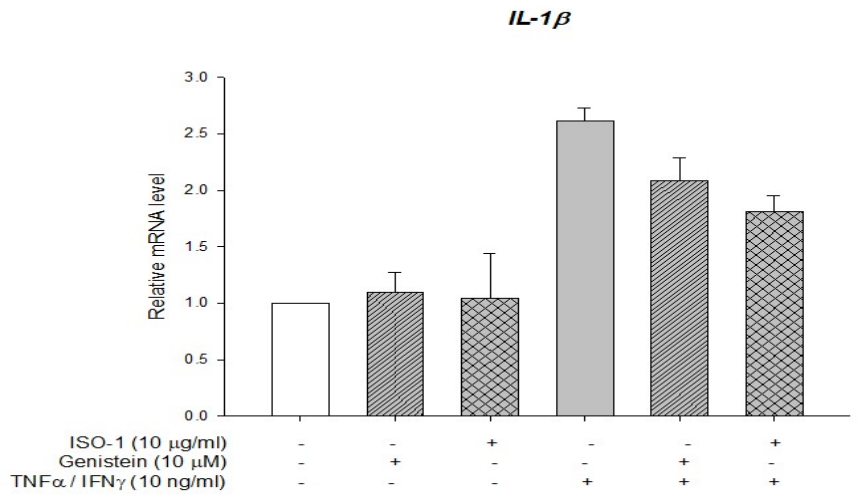


圖十：以 MTT 檢測 ISO-1 於人類角質細胞存活率。

人類角質細胞在不同濃度之 ISO-1(1  $\mu\text{g/mL}$ 、3  $\mu\text{g/mL}$ 、10  $\mu\text{g/mL}$ )培養 24 小時之細胞存活率。數值代表至少三個獨立實驗測得的光密度值(optical density values)的平均值(mean)  $\pm$  平均值標準誤差 (standard error of mean, SEM)

## 三、ISO-1 比常見的 genistein 更能抑制 TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$ 刺激後的細胞激素(IL1- $\beta$ , IL-6, IL-8)上升

由於金雀異黃酮(genistein)是大豆內最常見的異黃酮成分，且被證實有助於降低發炎反應，因此我們利用 quantitative PCR 來定量細胞激素 IL-1  $\beta$ 、IL-6 以及 IL-8，並且去比較 ISO-1 跟 genistein 對 TNF  $\alpha$  /IFN  $\gamma$  刺激人類表皮角質細胞後細胞激素(IL1- $\beta$ 、IL-6、IL-8)上升的保護效果。研究結果顯示 TNF  $\alpha$  /IFN  $\gamma$  刺激人類表皮角質細胞能使 IL1- $\beta$ 、IL-6、IL-8 等細胞激素上升。ISO-1 跟 genistein 都能顯著減少這些細胞激素的上升，而 ISO-1 對這些激素減少的程度明顯比 genistein 來的好(圖十一)。



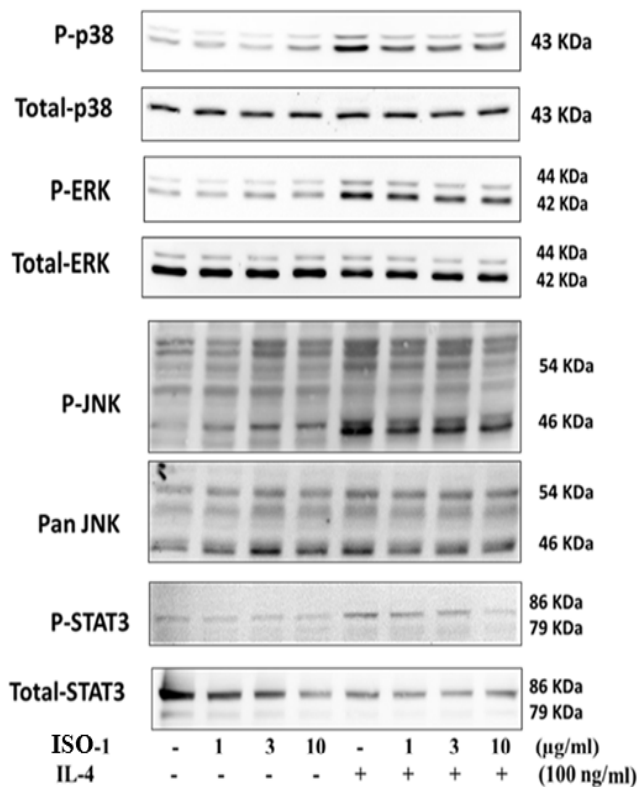
圖十一：TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$  刺激人類表皮角質細胞後的細胞激素(IL1- $\beta$ 、IL-6、IL-8)表現量。



#### 四、ISO-1 抑制人類表皮角質細胞中 IL-4、IL-13 誘導 MAPK 途徑之磷酸化作用

根據先前的研究，在異位性皮膚炎的致病機制中，免疫細胞分泌的細胞激素中，尤其以 IL-4、IL-13 為主要促發炎的細胞激素[4]。因此我們將探討 ISO-1 是否能夠在 NHEK 抑制這些細胞激素並減緩下游反應所造成的病生理現象。MAPK (mitogen-activated protein kinase)的訊息傳導路徑與調節皮膚細胞中訊息路徑下游的各種反應[6]。因此在本篇研究中，我們探討 ISO-1 可能參與調節的訊息傳遞路徑，所以我們使用不同濃度之 ISO-1(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )預處理，再以 IL-4、IL-13 去刺激誘導發炎反應，並透過 Western blot 分析 MAPK 途徑中 ERK、p38 以及 JNK 等蛋白質之磷酸化反應。實驗結果顯示，單獨使用不同濃度之 ISO-1(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )處理 NEHK，MAPK 蛋白無明顯磷酸化表現。

而單獨以 IL-4 處理誘導之 NEHK，發現 ERK, p38 跟 JNK 蛋白受到活化而有明顯的磷酸化表現，而這樣的磷酸化的作用程度則是隨著 ISO-1 之濃度越高而降低，呈現劑量依賴(dose-dependent)之關係(圖十二)，若單獨以 IL-13 處理誘導之 NEHK，發現 ERK 跟 p38 蛋白受到活化而有明顯的磷酸化表現，而這樣的磷酸化的作用程度也會隨著 ISO-1 之濃度越高而降低，呈現劑量依賴(dose-dependent)之關係(圖十三)，這些實驗結果說明 ISO-1 可有效抑制 IL-4、IL-13 所誘導之 MAPK 途徑的磷酸化作用。

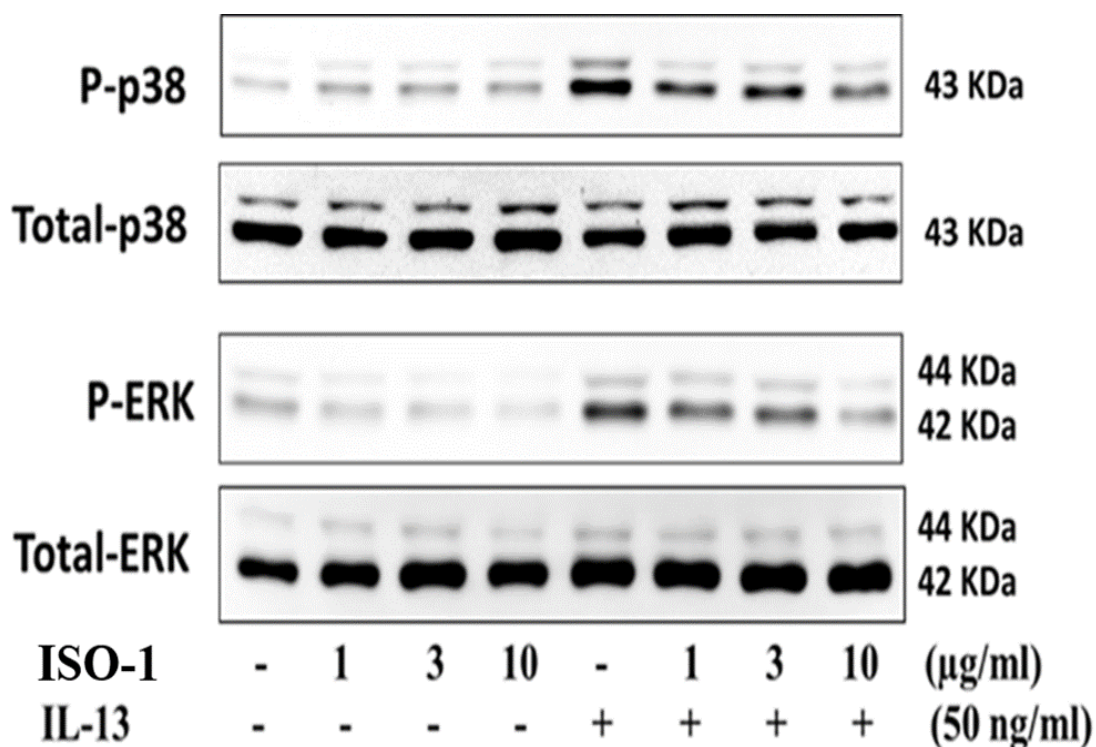


圖十二：ISO-1 及 IL-4 於人類表皮角質細胞內 MAPK 及 JAK/STAT 路徑磷酸化之表現。ISO-1 抑制人類表皮角質細胞中 IL-4 誘導的 MAPK 和 JAK / STAT 途徑的激活。在有或沒有給予 IL-4 的情況下，用 ISO-1 將角質形成細胞處理 24 小時。通過西方墨點法分析 IL-4 誘導的 MAPK 和 JAK / STAT 途徑磷酸化的程度以及內源性 MAPK 和 JAK / STAT 途徑的表現量。總蛋白的量拿來當作對照。



## 五、ISO-1 抑制人類表皮角質細胞中 IL-4 誘導 STAT 途徑之磷酸化作用

JAK-STAT 路徑對於大多數的細胞激素和生長因子是不可或缺的，在皮膚細胞中，IL-4 會啟動 JAK/STAT 路徑之活化，會誘發 NHEK 中 STAT3 的活化[5]。因此我們評估 NHEK 在 ISO-1 的作用下，對於 IL-4 之 JAK/STAT 路徑之機轉探討。我們在 NHEK 中加入 ISO-1(1  $\mu\text{g/mL}$ 、3  $\mu\text{g/mL}$ 、10  $\mu\text{g/mL}$ )預處理，再以 IL-4 誘導發炎反應，並利用 Western Blot 分析 STAT3 等相關蛋白之表現。實驗結果顯示，單獨以 ISO-1 處理 NHEK，不會活化 STAT3 蛋白的表現，單獨以 IL-4 處理之組別則是發現 STAT3 蛋白之磷酸化作用有顯著上調，而在 ISO-1 處理之組別則是可以有效下調 STAT3 蛋白之磷酸化作用，且隨著 ISO-1 作用濃度越高而降低，呈現 dose-dependent 之關係(圖十二)。這些實驗結果說明 ISO-1 可抑制 NHEK 中 IL-4 誘導 JAK/STAT 路徑之磷酸化作用。

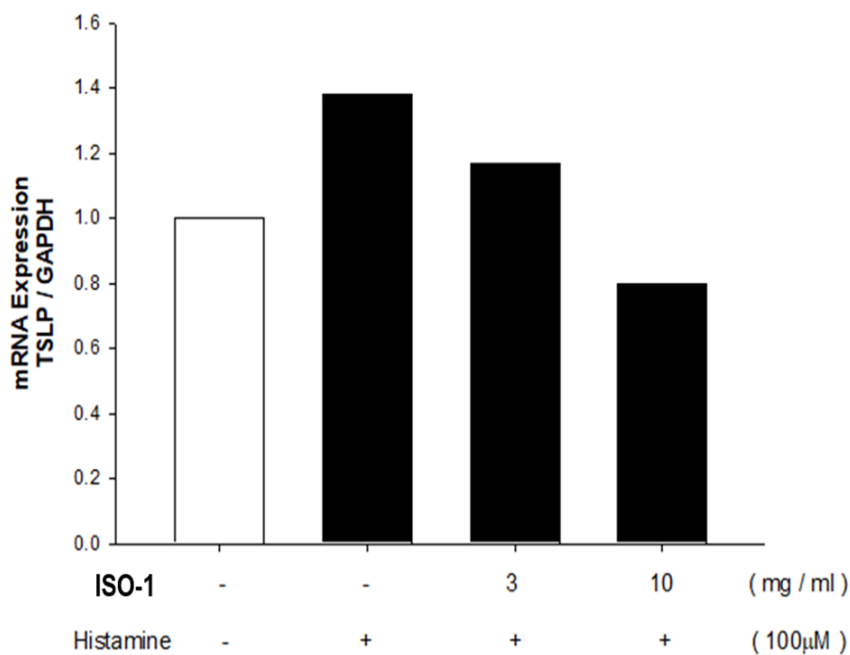


圖十三：ISO-1 及 IL-13 於人類角質細胞內 p38、ERK 磷酸化之表現。

ISO-1 抑制人類角質細胞中 IL-13 誘導的 p38 和 ERK 活化。在有或沒有 IL-13 的情況下，用 ISO-1 將角質形成細胞處理 24 小時。通過西方墨點法分析 IL-13 誘導的 p38 和 ERK 磷酸化的程度和內源性蛋白的表現量。p38 和 ERK 總蛋白的表現量作為對照。

## 六、ISO-1 抑制人類表皮角質細胞中組織胺誘導之 TSLP 的基因表現

胸腺基質淋巴細胞生成素(TSLP)在人類表皮角質細胞中的表現會影響 Th 細胞的平衡去影響異位性皮膚炎的發病機制[7]，一些 IgE 對自身抗原具有反應性，IgE 自身反應性能促進慢性的發炎。活化 ORAI1 鈣通道後，表皮釋放大量 TSLP，從而啟動 Th2 和 Th22 免疫反應。Th2 衍生的 IL-31 和 TSLP 引起癢感。因此在本篇中我們也探討了人類表皮角質細胞在 ISO-1 的作用下對於組織胺誘導之 TSLP 表現的影響。我們在人類角質細胞中加入 ISO-1(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )預處理，再以組織胺誘導癢感反應，並利用 q-PCR 法分析 TSLP 的 mRNA 表現。實驗結果顯示，單獨以組織胺處理之組別可以發現 TSLP 之 mRNA 表現增加之情形，而在 ISO-1 處理之組別則是可以有效降低 TSLP 之表現，且 TSLP 之表現隨著 ISO-1 作用濃度越高而降低，呈現 dose-dependent 之關係(圖十四)。這些實驗結果說明 ISO-1 可抑制人類角質細胞中組織胺誘導之 TSLP 的 mRNA 表現。

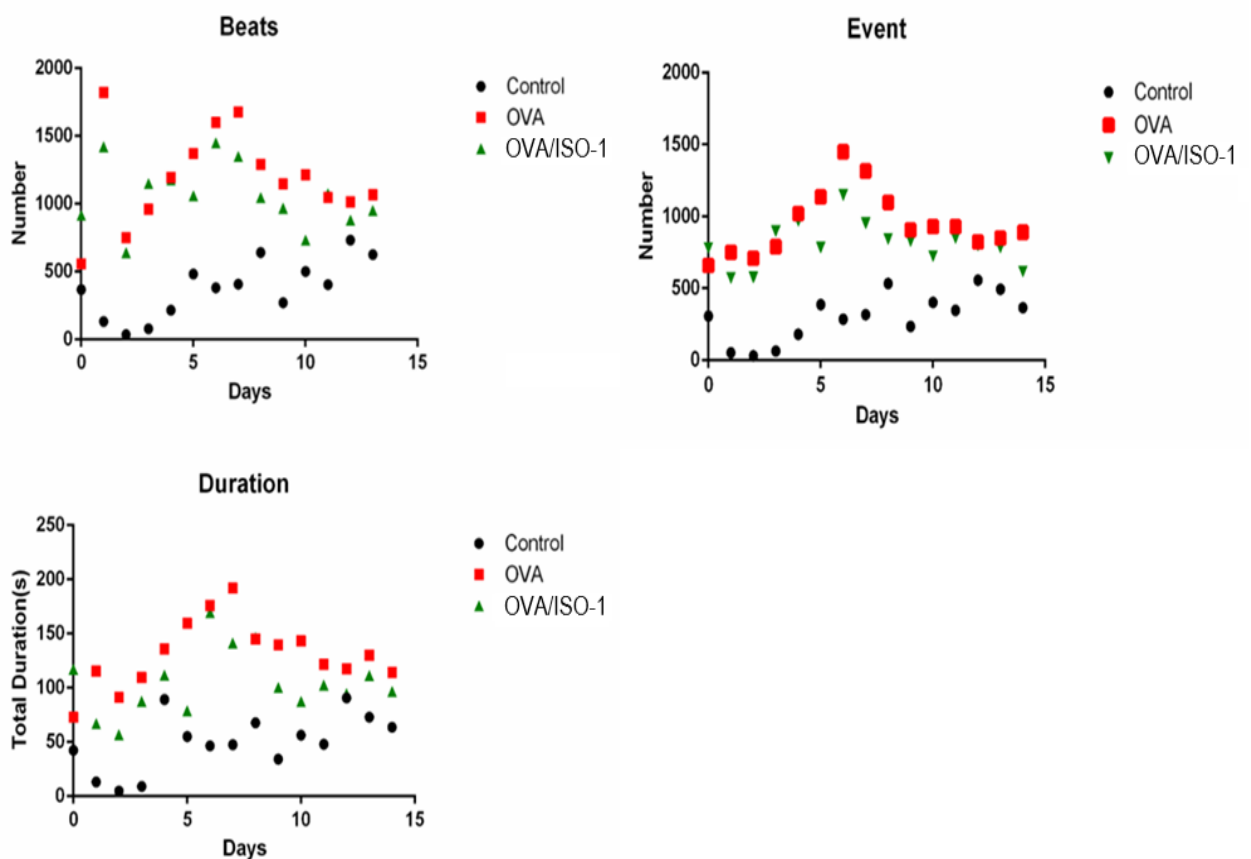


圖十四、豆渣萃取物 ISO-1 及組織胺(Histamine)於人類角質細胞內 TSLP mRNA 之表現 (數值是以相對於未處理之對照組 mRNA 表現量的倍數來呈現)

## 七、ISO-1 改善小鼠背部皮膚卵白蛋白抗原(OVA)誘導之過敏性癢感行為

過敏原在異位性皮膚炎中引起免疫反應，大約 80%的異位性皮膚炎患者血清中的 IgE 濃

度升高，並且有針對各種食物和攝入性過敏原的 IgE 抗體[10]。也有用蟎蟲提取物對磨損的皮膚進行斑貼試驗會導致異位性皮膚炎患者出現濕疹性皮炎[11]。另外，從異位性皮膚炎皮膚病變中分離出來的 T 細胞已顯示出對塵蟎抗原的反應增殖並分泌 IL-4 [11]。上述結果與表皮暴露於過敏原可能在異位性皮膚炎中起了很重要的作用。有兩項最近的研究結果證實表皮過敏會引起 Th2 型免疫反應，其中將卵白蛋白抗原(OVA)應用於小鼠皮膚可誘導抗原特異性 IgE 的產生[12]。我們的實驗結果顯示，單獨以 OVA 誘導的實驗組在進行二週的處理後，在抓癢動作的指標參數節拍快慢 (beats)、次數(event)及持續時間(duration)與控制組相較，有較高的趨勢，顯示 OVA 影響小鼠之過敏性癢感之行為反應；而以豆渣萃取物前處理之 OVA 實驗組，則是可以觀察到抓癢動作的指標參數節拍快慢 (beats)、次數(event)及持續時間(duration)有降低之趨勢，顯示豆渣萃取物具有抑制小鼠癢感之效果(圖十五)。



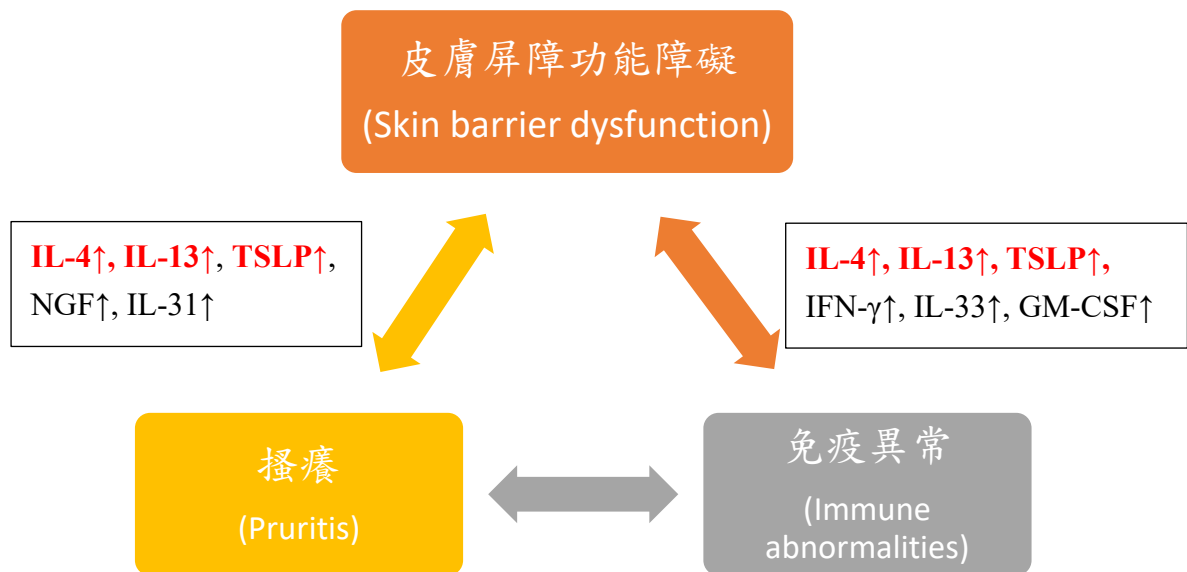
圖十五：ISO-1 及卵白蛋白抗原(OVA)對小鼠過敏性癢感行為之作用。

ISO-1 對卵白蛋白抗原(OVA)誘導的小鼠過敏性癢感行為的影響。首先，用卵白蛋白抗原誘導 Balb / c 小鼠的過敏性癢感反應，然後用大豆提取物 ISO-1 處理，觀察小鼠癢感行為的變化。以豆渣萃取物前處理之 OVA 實驗組，則是觀察到抓癢動作的指標參數節拍快慢 (beats)、次數(event)及持續時間(duration)有降低之趨勢。

## 陸、討論

### 一、異位性皮膚炎及其病生理分子作用運轉

異位性皮膚炎又稱異位性濕疹、過敏性濕疹，是一種會反覆發作的慢性皮膚發炎疾病，但不具有傳染性，主要致病基因是絲聚蛋白(filaggrin)的突變導致角質層功能缺損與免疫失調而引起的免疫發炎反應[13,14] 以及遺傳因素及環境誘發因子有關。異位性皮膚炎這個疾病雖然對生命無立即危險性，但對病患的生活品質造成極大的困擾。目前異位性皮膚炎機制仍尚在釐清，近年來已有研究證實了遺傳性之絲聚蛋白基因突變或後天得到之絲聚蛋白缺損，有促進異位性皮膚炎的發病機制[15]，因涉及先天性的絲聚蛋白基因缺陷，才導致絲聚蛋白功能不全，因此，某些研究指出與遺傳也有相當的關連性[16]，而接下來由免疫介導的下游反應[17]是主要造成患者發炎的原因，目前的報導顯示，異位性皮膚炎產生之發炎反應是源自於第二型輔助 T 細胞所分泌的細胞激素 的原因[4]，這個影響對異位性皮膚炎的致病力而言是不可或缺的作用，由於患部搔癢，搔抓後使皮膚障壁受損，由於第二型輔助 T 細胞分泌的 IL-4、IL-13，促使發炎反應導致異位性皮膚炎的病發，所以 IL-4、IL-13 皆是參與異位性皮膚炎疾病的相關細胞激素，如此證明了細胞激素在異位性皮膚炎中的重要性，更支持了現今的異位性皮膚炎免疫病理機轉[2,18]。



圖十六：異位性皮膚炎免疫病理機轉

## 二、介白素-4 (IL-4)

介白素-4 (Interleukin-4, IL-4)是第二型輔助 T 細胞分泌的細胞激素，其生物作用包括刺激、活化 B 細胞和促進 T 細胞的增殖，可以調節多種細胞的分化和凋亡如造血(haematopoietic)和非造血來源類型的增殖，包括骨髓細胞(myeloid)、肥大細胞(mast cell)、樹突細胞(dendritic cell)、內皮細胞(endothelia cell)，肌肉細胞(muscular cell)和神經元細胞(neuronal cell)[19-21]，而它也在調節體液免疫(humoral immune)和適應性免疫(adaptive immune)中扮演關鍵作用，也可以誘導 B 細胞抗體類別轉換成 IgE 以及上調第二型主要組織兼容性複合體(major histocompatibility complex class II, MHC II)的產生。細胞中 IL-4 濃度增加（與 IFN- $\gamma$  降低有關）也與罹患異位性皮膚炎的風險增加有密切關係[22]。研究證實 IL-4 細胞激素在免疫反應中扮演的重要作用，其可通過 JAK-STAT 路徑進行訊息傳遞，活化多種途徑、具有廣泛的生物學作用。IL-4 主要由活化的 T 細胞產生，其過度表達與過敏有關[23]。在動物模型中已明確證明，過敏性哮喘是一種依賴 Th2 細胞和 Th2 細胞激素，主要是 IL-4 和 IL-13 產生的疾病[24]，因此，IL-4 在這些疾病中做為發炎細胞激素，其被認為是治療過敏性疾病的標靶，以及治療自身免疫性疾病的潛力。

## 三、介白素-13 (IL-13)

介白素-13(interleukin-13, IL-13)是由第二型輔助 T 細胞(Th2)、自然殺手細胞、肥大細胞、嗜鹼性球、嗜酸性球和核細胞分泌的細胞激素[25]，主要調節 IgE 合成，杯狀細胞增生(goblet cell hyperplasia)，黏液分泌過多，氣道反應過度(airway hyperresponsiveness)，纖維化和幾丁質酵素酶的上調，也是過敏性發炎和哮喘等各種疾病的介質。IL-13 表達於 AD 的急性和慢性病變中[26]，經由缺乏 IL-13R  $\alpha 2$  的小鼠的研究，發現 IL-13 在 AD 中的作用是調節人類角質細胞(keratinocytes)中 Th2 細胞激素，誘導受體 IL-13R  $\alpha 2$  的表達[27]。由於 IL-4 和 IL-13 有許多功能重疊，大多數研究都針對 IL-4 和 IL-13 對人類角質細胞的影響。IL-13 與 IL-4 皆可影響 epidermal differentiation complex (EDC)，包括基因絲聚蛋白、兜甲蛋白(loricrin)和內披蛋白(involucrin)減毒表達以及對皮膚纖維母細胞膠原合成。IL-13 可以直接作用於人類角質細胞，

以增強 CCL26 (eotaxin-3)的產生，從而增加發炎表皮嗜酸性球的聚集[28]。經過 IL-13 刺激的人類角質細胞還增加了 CD4<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>皮膚歸巢 T 細胞的遷移[29]，從而促進了發炎反應。

#### 四、豆渣萃取物

大豆(soybean) (*Glycine max* (L.) Merr.)是亞洲膳食中常見的農作物[30]，為豆科大豆屬一年生草本植物。它含有許多營養成分，包括植物蛋白、皂苷(saponins)、植物固醇(phytosterol)、寡醣(oligosaccharides)以及異黃酮(isoflavones)[31,32]，有益於人體健康。根據其化學結構，又可分為以下四大類別，第一類為醣苷(aglycone)，其中含有 daidzein、genistein 和 glycitein；第二類為葡萄糖苷(glucoside)，其中含有 daidzin、genistin 和 glycitin；第三類為乙酰葡萄糖苷(acetylglucoside)，其中含有 acetyldaidzin、acetylgenistin 和 acetylglycitin；以及最後一類的丙二酰基葡萄糖苷(malonylglucoside)，包含 malonyldaidzin、malonylgenistin、malonylglycitin 等[30,33]。這些異構物中，以 genistein 和 daidzein 兩種為異黃酮最主要之成分，而 genistein 則是最被廣泛研究之成分[34,35]。異黃酮為一種植物雌激素(phytoestrogen)，與動物雌激素(oestrogen)有類似的分子結構，這會造成 oestrogen 反應被減弱[35]，可應用於治療更年期症狀(menopausal symptoms)[36]和前列腺癌(prostate cancer)[37]，並且還可以強化骨骼[38]以及降低罹患乳癌之風險[39]。此外，異黃酮還具有抗氧化特性並且可以清除活性氧物質，發揮強烈的抗發炎作用[40-42]。本研究發現豆渣萃取物 ISO-1 內含的異黃酮主要成分包括 malonylgenistin (23.28%), genistin (19.30%), malonyldaidzin (16.12%), 以及 acetylgenistin (12.15%)，其中以 malonylgenistin 強度最大。此外，ISO-1 比常見的金雀異黃酮(genistein)更能抑制 TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$  刺激後的細胞激素(IL1- $\beta$ , IL-6, IL-8)上升，表示 ISO-1 的抗發炎反應理論上應該比金雀異黃酮(genistein)來的好。

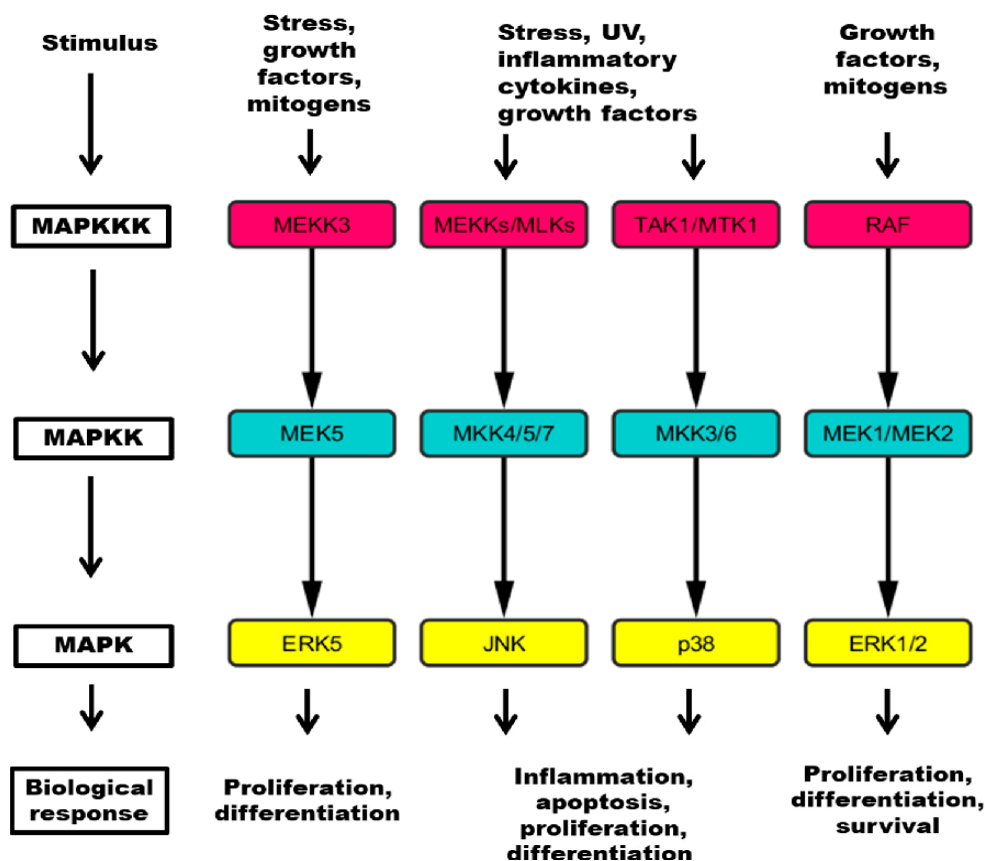
#### 五、絲裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)

是低等原核細胞及哺乳動物的細胞內廣泛存在的一類絲氨酸／蘇氨酸蛋白激酶研究證實，MAPKs 信號傳導通路高度保守，是一種三級激酶之級聯傳遞信號過程。目前已發現多條 MAPK 信號通路，通過相互調控，可將細胞外信號傳導至細胞質及細胞核，調控基因表達、分裂增殖、分化、凋亡、等過程。目前在哺乳類細胞已發現存在三條並行的 MAPKs 信號通



路，即絲裂原活化蛋白激酶的 3 個家族成員，包括 ERK、JNK 及 p38[43]。

本篇研究結果顯示單獨使用不同濃度之 ISO-1 處理 NEHK，MAPK 蛋白無明顯磷酸化表現，而單獨以 IL-4、IL-13 處理誘導之 NEHK，發現 ERK, p38 跟 JNK 蛋白受到活化而有明顯的磷酸化表現，而這樣的磷酸化的作用程度則是隨著 ISO-1 之濃度越高而降低，呈現劑量依賴(dose-dependent)之關係，這些實驗結果說明 ISO-1 可有效抑制 IL-4、IL-13 所誘導之 MAPK 途徑的磷酸化作用。

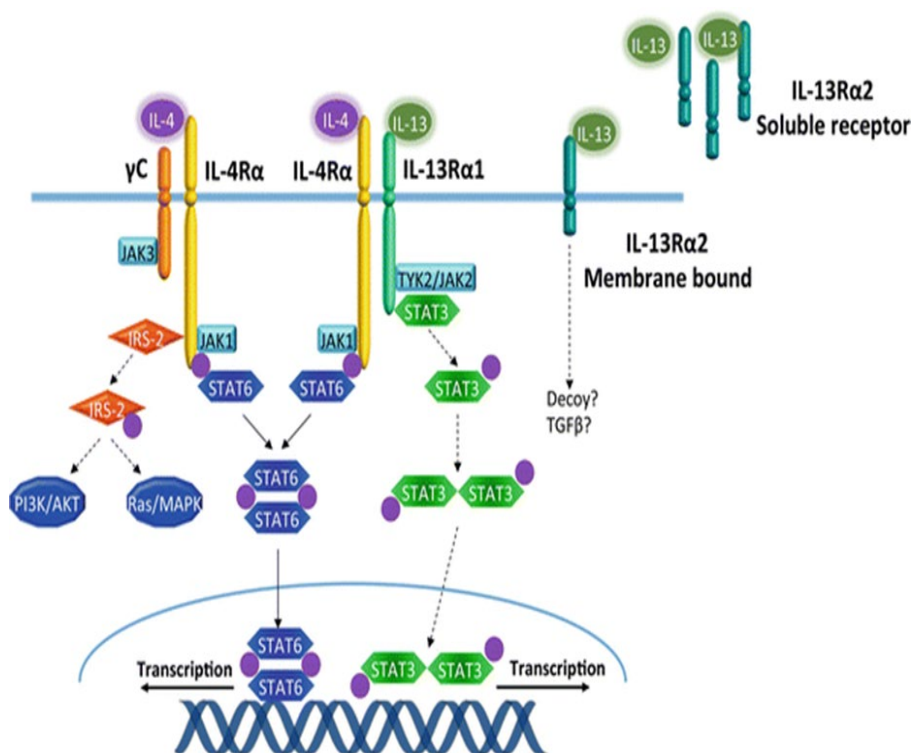


圖十七：目前在哺乳類細胞已發現存在三條並行的 MAPKs 信號通路，即絲裂原活化蛋白激酶的 3 個家族成員，包括 ERK、JNK 及 p38

## 六. JAK-STAT 信號傳送途徑

JAK-STAT 路徑對於大多數的細胞激素和生長因子是不可或缺的[5]，在皮膚細胞中，IL-4 會啟動 JAK/STAT 路徑之活化，會誘發 NHEK 中 STAT3 的活化[6]。使得細胞外的化學信號跨越細胞膜並將信息傳送到細胞核內 DNA 上的基因啟動子上，最終引起細胞中 DNA 轉錄與活性水平發生改變。JAK-STAT 系統是除了第二信使系統外最重要的信號途來自干擾素、白血球介素、生長因子或其它化學信使的信號可以激活此受體；這激活了 JAK 的激酶功能，

導致對其自身的磷酸化（磷酸基團作為蛋白質上的開關）；接下來STAT蛋白結合到被磷酸化的受體上，在此STAT被JAK磷酸化；被磷酸化的STAT蛋白結合到另一個被磷酸化的STAT蛋白上（二聚化）並易位到細胞核中；在細胞核中，它結合到DNA上並啟動轉錄那些響應STAT的基因。哺乳動物中有七種STAT基因，每種都結合到各不相同的DNA序列上。STAT結合到稱為啟動子的DNA序列上，啟動子會控制其它DNA序列表達。這會影響諸如細胞生長、分化及死亡等的基本細胞功能。本篇研究結果顯示 ISO-1 處理之組別則是可以有效下調STAT3 蛋白之磷酸化作用，且隨著 ISO-1 作用濃度越高而降低，呈現 dose-dependent 之關係。這些實驗結果說明 ISO-1 可抑制 NHEK 中 IL-4 誘導 JAK/STAT 路徑之磷酸化作用。



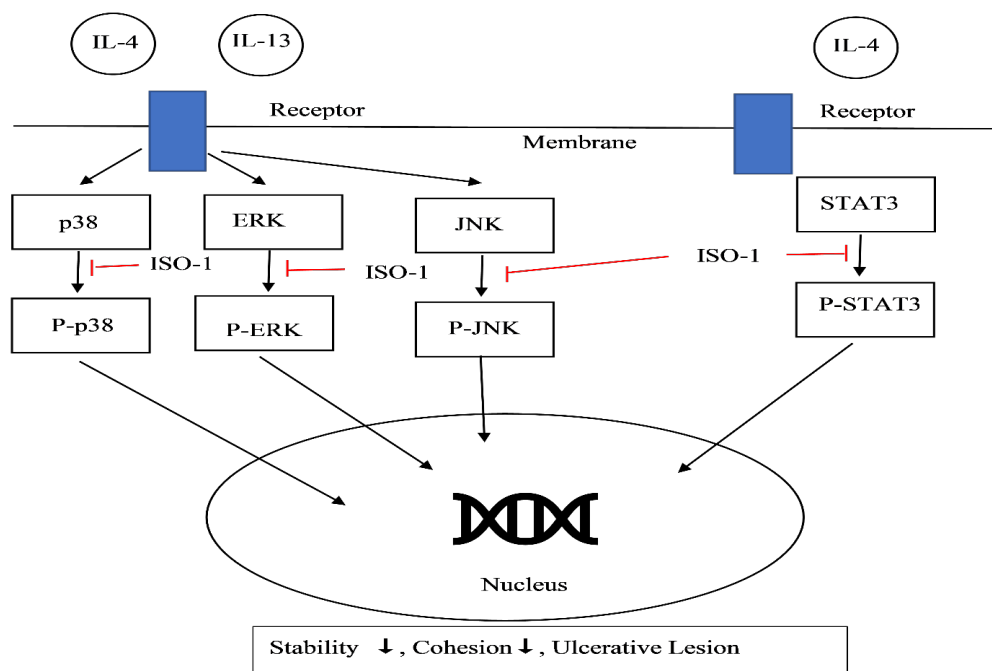
圖十八：JAK-STAT 信號傳送途徑

## 柒、結論

- (一) 實驗結果顯示，利用液相層析串聯質譜(LC-MS/MS)去分析豆渣萃取出物 ISO-1 內含的異黃酮主要成分包括 malonylgenistin (23.28%), genistin (19.30%), malonyldaidzin (16.12%), 以及 acetylgenistin (12.15%)，其中以 malonylgenistin 強度最大。
- (二) 在人類角質細胞的體外實驗中，發現 ISO-1 比常見異黃酮純成分金雀異黃酮(genistein)更能抑制 TNF  $\alpha$  /IFN  $\gamma$  刺激後的細胞激素(IL1- $\beta$ , IL-6, IL-8)上升。

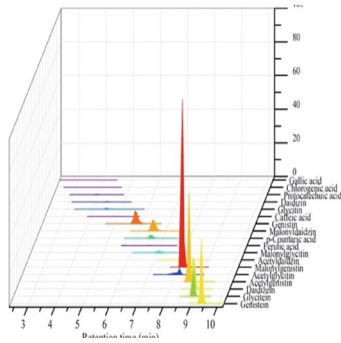


- (三) 在 ISO-1 抗發炎機轉探討部分，造成異位性皮膚炎的細胞激素如 IL-4、IL-13 會誘發 MAPK、JAK/STAT 路徑的磷酸化，進而造成皮膚細胞的發炎反應。在 MAPK 路徑中，我們發現訊息傳遞分子如 ERK、p38、JNK 蛋白的磷酸化作用顯著受到 IL-4、IL-13 的上調。在 JAK/STAT 路徑中，IL-4 也會誘導訊息傳遞分子如 STAT3 蛋白的磷酸化作用使其上調。上述這些路徑的活化在經過 ISO-1 個別的預處理後，發現 p38、ERK、JNK、STAT3 的磷酸化皆被抑制，且呈現劑量依賴之關係。
- (四) 在 ISO-1 對於組織胺誘導之 TSLP 基因表現也有抑制之作用，實驗結果也呈現劑量依賴之關係。
- (五) 在小鼠過敏性癢感行為模式中，也可觀察到 ISO-1 可抑制卵白蛋白抗原 OVA 引起之小鼠的癢感行為。
- (六) 以上結果證明，ISO-1 具有抗異位性皮膚炎活性之功效，有助於抑制皮膚之發炎反應與癢感，以及具有開發作為抗皮膚炎試劑之潛力。其作用機轉主要跟抑制 IL-4、IL-13 誘導之 MAPK、JAK-STAT 路徑的活化以及抑制組織胺誘導癢感相關蛋白 TSLP 之基因表現有關。

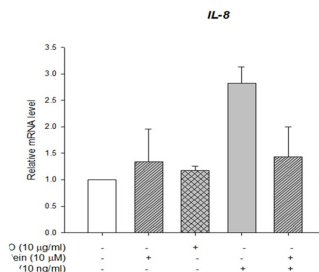


圖十九：在經過 ISO-1 的預處理後，p38、ERK、JNK、STAT3 的磷酸化皆被抑制

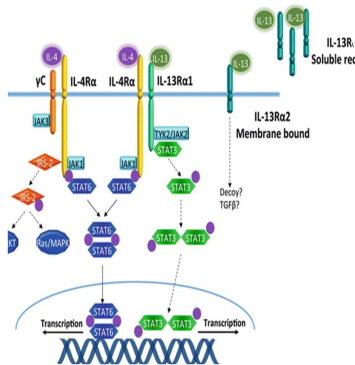
ISO-1具有抗異位性皮膚炎活性，  
有助於抑制皮膚之發炎反應與癢感，  
具有開發作為抗皮膚炎試劑之潛力



ISO-1內含的異黃酮主要成分包括malonylgenistin, genistin, malonyldaidzin, 以及 acetylgenistin, 其中以 malonylgenistin強度最大

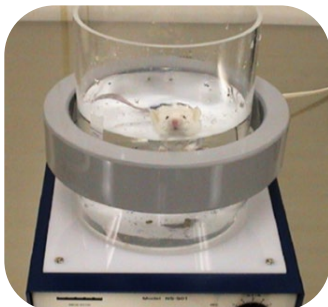


ISO-1比常見異黃酮純成分genistein更能抑制 TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$ 刺激後的細胞激素上升



抗發炎機轉探討

- IL-4、IL-13誘導的訊息傳遞分子如ERK、p38、JNK、STAT3蛋白的的磷酸化在經過ISO-1個別的預處理後皆被抑制
- ISO-1對於組織胺誘導之癢感蛋白TSLP之表現也有抑制之作用



小鼠過敏性癢感行為模式  
可證實ISO-1可抑制  
卵白蛋白抗原OVA  
引起之小鼠的癢感行為

圖二十：ISO-1 抗皮膚發炎之作用及機轉

## 捌、參考文獻資料

1. Panche, A.N.; Diwan, A.D.; Chandra, S.R. Flavonoids: An overview. *Journal of nutritional science* 2016, 5, e47.
2. Kao, T.H., Wu, W.M., Hung, C.F., Wu, W.B., Chen, B.H. Anti-inflammatory effects of isoflavone powder produced from soybean cake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 55, 11068 - 11079
3. 張偉斌, 紀., 潘美連, 宋晏仁, 廖幼婕, 楊建昌, 劉德明. 異位性皮膚炎門診藥費支出分析 drug expense of atopic dermatitis in taiwan *北市醫學雜誌* 2013, 10, 229-243.
4. Gandhi, N.A.; Pirozzi, G.; Graham, N.M.H. Commonality of the il-4/il-13 pathway in atopic diseases. *Expert review of clinical immunology* 2017, 13, 425-437.
5. Seif, F.; Khoshmirsafa, M.; Aazami, H.; Mohsenzadegan, M.; Sedighi, G.; Bahar, M. The role of jak-stat signaling pathway and its regulators in the fate of t helper cells. *Cell communication and signaling : CCS* 2017, 15, 23.
6. Ulzii D, Kido-Nakahara M, Nakahara T, et al. Scratching Counteracts IL-13 Signaling by Upregulating the Decoy Receptor IL-13R  $\alpha$  2 in Keratinocytes. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13):3324.
7. Wilson SR, Thé L, Batia LM, et al. The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch. *Cell.* 2013;155(2):285 - 295
8. Chiu, T.M., Huang, C.C., Lin, T.J., Fang, J.Y., Wu, N.L., Hung, C.F. In vitro and in vivo anti-photoaging effects of an isoflavone extract from soybean cake. *J. Ethnopharmacol.* 2009, 126 (1), 108 - 113.
9. Li, H.J., Wu, N.L., Lee, G.A., Hung, C.F. The therapeutic potential and molecular mechanism of isoflavone extract against psoriasis. *Sci. Rep.* 2018, 8 (1), 6335.
10. Erwin, E.A.; James, H.R.; Gutekunst, H.M.; Russo, J.M.; Kelleher, K.J.; Platts-Mills, T.A. Serum ige measurement and detection of food allergy in pediatric patients with eosinophilic esophagitis. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 2010, 104, 496-502.

11. Mitchell, E.B.; Crow, J.; Chapman, M.D.; Jouhal, S.S.; Pope, F.M.; Platts-Mills, T.A. Basophils in allergen-induced patch test sites in atopic dermatitis. *Lancet (London, England)* 1982, 1, 127-130.
12. Wang, L.F.; Lin, J.Y.; Hsieh, K.H.; Lin, R.H. Epicutaneous exposure of protein antigen induces a predominant th2-like response with high ige production in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 1996, 156, 4077-4082.
13. Zaniboni, M.C.; Samorano, L.P.; Orfali, R.L.; Aoki, V. Skin barrier in atopic dermatitis: Beyond filaggrin. *Anais brasileiros de dermatologia* 2016, 91, 472-478.
14. Boguniewicz, M.; Leung, D.Y. Atopic dermatitis: A disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunological reviews* 2011, 242, 233-246.
15. Cabanillas, B.; Novak, N. Atopic dermatitis and filaggrin. *Current opinion in immunology* 2016, 42, 1-8.
16. Liang, Y.; Chang, C.; Lu, Q. The genetics and epigenetics of atopic dermatitis-filaggrin and other polymorphisms. *Clinical reviews in allergy & immunology* 2016, 51, 315-328.
17. Furue, M.; Chiba, T.; Tsuji, G.; Ulzii, D.; Kido-Nakahara, M.; Nakahara, T.; Kadono, T. Atopic dermatitis: Immune deviation, barrier dysfunction, ige autoreactivity and new therapies. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology* 2017, 66, 398-403.
18. Matsunaga, M.C.; Yamauchi, P.S. Il-4 and il-13 inhibition in atopic dermatitis. *Journal of drugs in dermatology : JDD* 2016, 15, 925-929.
19. Zamorano, J.; Wang, H.Y.; Wang, L.M.; Pierce, J.H.; Keegan, A.D. Il-4 protects cells from apoptosis via the insulin receptor substrate pathway and a second independent signaling pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 1996, 157, 4926-4934.
20. Yanagida, M.; Fukamachi, H.; Ohgami, K.; Kuwaki, T.; Ishii, H.; Uzunaki, H.; Amano, K.; Tokiwa, T.; Mitsui, H.; Saito, H., et al. Effects of t-helper 2-type cytokines, interleukin-3 (il-3), il-4, il-5, and il-6 on the survival of cultured human mast cells. *Blood* 1995, 86, 3705-3714.
21. Lutz, M.B.; Schnare, M.; Menges, M.; Rossner, S.; Rollinghoff, M.; Schuler, G.; Gessner, A. Differential functions of il-4 receptor types i and ii for dendritic cell maturation and il-12 production

- and their dependency on gm-csf. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 2002, 169, 3574-3580.
22. Herberth, G.; Heinrich, J.; Roder, S.; Figl, A.; Weiss, M.; Diez, U.; Borte, M.; Herbarth, O.; Lehmann, I. Reduced ifn-gamma- and enhanced il-4-producing cd4+ cord blood t cells are associated with a higher risk for atopic dermatitis during the first 2 yr of life. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 2010, 21, 5-13.
  23. Hershey, G.K.; Friedrich, M.F.; Esswein, L.A.; Thomas, M.L.; Chatila, T.A. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *The New England journal of medicine* 1997, 337, 1720-1725.
  24. Gour, N.; Wills-Karp, M. Il-4 and il-13 signaling in allergic airway disease. *Cytokine* 2015, 75, 68-78.
  25. Rael, E.L.; Lockey, R.F. Interleukin-13 signaling and its role in asthma. *The World Allergy Organization journal* 2011, 4, 54-64.
  26. Hamid, Q.; Naseer, T.; Minshall, E.M.; Song, Y.L.; Boguniewicz, M.; Leung, D.Y. In vivo expression of il-12 and il-13 in atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1996, 98, 225-231.
  27. David, M.; Ford, D.; Bertoglio, J.; Maizel, A.L.; Pierre, J. Induction of the il-13 receptor alpha2-chain by il-4 and il-13 in human keratinocytes: Involvement of stat6, erk and p38 mapk pathways. *Oncogene* 2001, 20, 6660-6668.
  28. Esche, C.; de Benedetto, A.; Beck, L.A. Keratinocytes in atopic dermatitis: Inflammatory signals. *Current allergy and asthma reports* 2004, 4, 276-284.
  29. David, M.; Bertoglio, J.; Pierre, J. Tnf-alpha potentiates il-4/il-13-induced il-13alpha2 expression. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002, 973, 207-209.
  30. Hartman, G.L.; West, E.D.; Herman, T.K. Crops that feed the world 2. Soybean—worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. *Food Security* 2011, 3, 5-17.

31. Sean O' Keefe, L.B., Jyotsna Sharman. Soybean nutrition. *SM Journal of Nutrition and Metabolism* 2015, 1, 1006.
32. Michel Mozeika Araújo, G.B.F.a.A.L.C.a.H.V. Soybean and isoflavones – from farm to fork. *Soybean - Bio-Active Compounds*, Hany A. El-Shemy, IntechOpen 2013.
33. Nikolić, I.L.; Savić-Gajić, I.M.; Tačić, A.D.; Savić, I.M.J.A.t. Classification and biological activity of phytoestrogens: A review. 2017, 6, 96-106.
34. Sakai, T.; Kogiso, M.J.T.j.o.m.i. Soy isoflavones and immunity. 2008, 55, 167-173.
35. Zhang, H.-Y.; Cui, J.; Zhang, Y.; Wang, Z.-L.; Chong, T.; Wang, Z.-M.J.C.m.j. Isoflavones and prostate cancer: A review of some critical issues. 2016, 129, 341.
36. Coon, J.T.; Pittler, M.H.; Ernst, E.J.P. *Trifolium pratense* isoflavones in the treatment of menopausal hot flashes: A systematic review and meta-analysis. 2007, 14, 153-159.
37. Swami, S.; Krishnan, A.V.; Moreno, J.; Bhattacharyya, R.B.; Peehl, D.M.; Feldman, D.J.T.J.o.n. Calcitriol and genistein actions to inhibit the prostaglandin pathway: Potential combination therapy to treat prostate cancer. 2007, 137, 205S-210S.
38. Yamaguchi, M.J.Y.Z. Regulatory mechanism of food factors in bone metabolism and prevention of osteoporosis. 2006, 126, 1117-1137.
39. Messina, M.; McCaskill-Stevens, W.; Lampe, J.W.J.J.o.t.N.C.I. Addressing the soy and breast cancer relationship: Review, commentary, and workshop proceedings. 2006, 98, 1275-1284.
40. Sirotkin, A.V.; Harrath, A.H.J.E.j.o.p. Phytoestrogens and their effects. 2014, 741, 230-236.
41. Ming, L.G.; Chen, K.M.; Xian, C.J.J.J.o.c.p. Functions and action mechanisms of flavonoids genistein and icariin in regulating bone remodeling. 2013, 228, 513-521.
42. Kładna, A.; Berczyński, P.; Kruk, I.; Piechowska, T.; Aboul-Enein, H.Y.J.L. Studies on the antioxidant properties of some phytoestrogens. 2016, 31, 1201-1206.
43. Johnson GL and Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002, 298, 1911-1912

## 【評語】 052211

1. 本研究分析大豆渣 ISO-1 中之異類黃酮成分分佈，以及 ISO-1 在細胞層次的作用機制，並利用小鼠過敏性癢感行為模式來測試期體內功效。實驗設計完整。
2. 作者等引用了甚多科學文獻來支持每項試驗之結果，這符合學術研究之標準，亦為本研究之優點。此外作者等在每個試驗中，均設置有重複，建議應利用統計方法來加以比較，結果之可信度較高。例如：ISO-1 對抑制小鼠過敏性癢感行為之作用，跟卵白蛋抗原 (OVA)組是否具有統計上的差異？
3. ISO-1 中之異黃酮含量最多的為 Malonylgenistin 佔了 23.28%，但其作用能力並不一定就大於 genistin，除非有文獻支持或其他試驗支持。
4. 萃取豆渣所獲得的異黃酮化合物總含量計算是否正確，請再查證。
5. Western blotting 的實驗數據均沒有 loading control，亦沒有提供量化數據的比較結果，ISO-1 對不同蛋白質表現量之影響無法下結論。
6. 此報告中使用到別人文章中的圖表要標示出處，很重要！參考文獻應依照字母順序排列，且部分文獻書寫較不完整。
7. 是否有實驗動物倫理委員會之同意書？是否有脊椎動物研究切結書？

## 作品簡報



中華民國第61屆中小學科學展覽會

科別：農業與食品學科

組別：高級中等學校組

豆渣萃取物

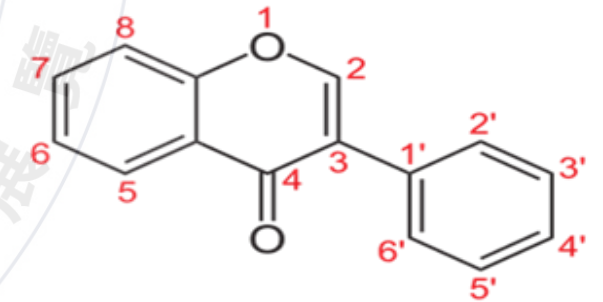
抗皮膚發炎之作用及機轉

# 前言：豆渣

- 又稱「**豆粕**」，壓製成餅狀的又稱「**豆餅**」，是大豆經萃取或壓榨提油後之副產品，可供作飼料或肥料用
- 「**類黃酮化合物**」(flavonoids)，是多酚類中相當重要的一類，被證實具有**抗氧化及抗發炎的效用**。  
**大豆異黃酮(soy isoflavones)**是大豆中最重要類黃酮化合物，其中**金雀異黃酮(genistein)**與**黃豆苷元(daidzein)**是最常見的成分，這些成分被證實有助於降低發炎反應
- 豆渣或黃豆粉在製備過程中能保留大多數的大豆異黃酮，已被證明是「異黃酮」的豐富來源之一，除此之外豆渣也含有其他像是**皂素(saponins)**和**酚類化合物(phenolic compounds)**等功能性成分，因此豆渣被認為具有治療發炎疾病的潛力
- 過去研究發現利用**層析法(chromatography)**可以從豆渣萃取物中找到4種異黃酮，並發現此豆渣萃取物較傳統的異黃酮有更好的抗氧化作用 [1]



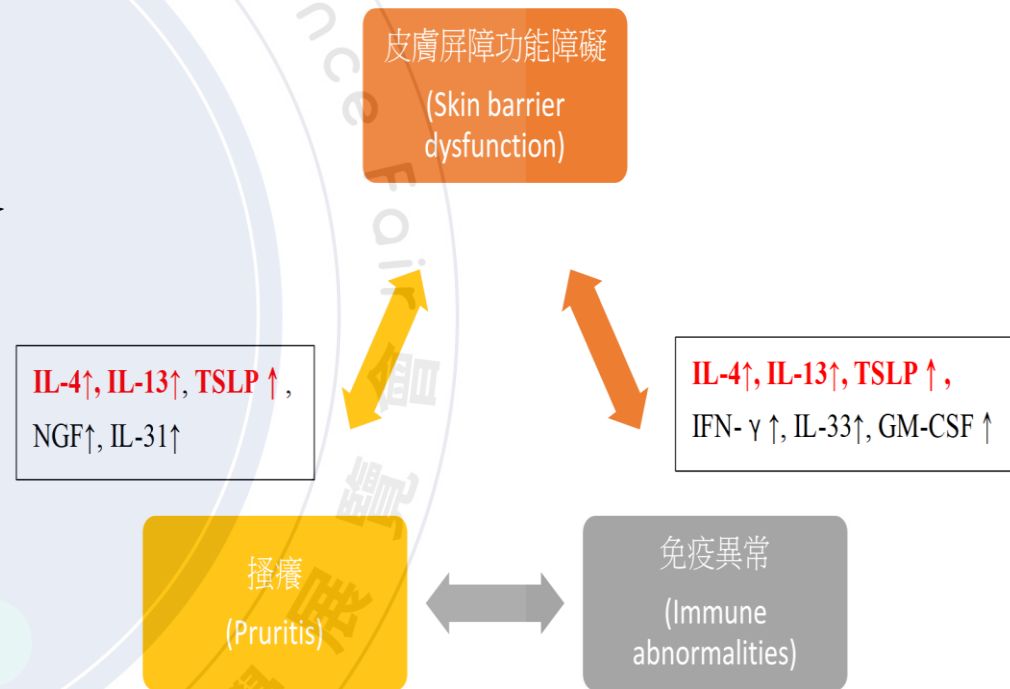
豆渣外觀圖



異黃酮結構式

# 異位性皮膚炎免疫病理機轉

- 異位性皮膚炎致病機轉已知涉及**表皮屏障基因的缺陷**、**免疫功能異常**以及**環境因素**的影響
  - 異位性皮膚炎產生之發炎反應是源自於第二型輔助T細胞 (Th2) 所分泌的**細胞激素IL-4、IL-13**，對異位性皮膚炎的致病力而言是不可或缺的 [2]
  - 在人類表皮角質細胞中，IL-4會誘發**JAK/STAT路徑活化**，像STAT3路徑的活化。**MAPK (mitogen-activated protein kinase)** 的訊息傳導路徑也會參與調節皮膚細胞中訊息路徑下游的各種反應，像是抓癢誘導的IL-13受體表現取決於ERK1 / 2 和p38 MAPK2的信號
- 胸腺基質淋巴生成素(Thymic stromal lymphopoietin, TSLP)** 與過敏性發炎疾病包含過敏性皮膚炎、鼻炎和氣喘相關
  - TSLP**在人類表皮角質細胞中的表現會因為**影響輔助T細胞**的平衡而影響異位性皮膚炎的發病機制
  - 部分IgE對自身抗原具有反應性，而**IgE**自身反應性能促進慢性發炎，使表皮釋放大量TSLP，從而啟動Th2免疫反應。最後，Th2衍生的TSLP會引起癢感 [3]



# 研究目的

- 目前異位性皮膚炎治療方法雖很多，但使用的藥物多為化合物且可能有某些程度副作用，開發**天然且無害的新藥物**是現今主要的課題之一。由於豆渣具有治療發炎疾病的潛力，可以考慮用在皮膚發炎性疾病，是個**相對無害且較不昂貴**的選擇
- 豆渣不易在水中完全溶化，在皮膚疾病的應用性較水溶性產品來的差。因此將市面上買到的豆渣產品利用**乙醇與水**來萃取並過濾乾燥得到**豆渣萃取物ISO-1**，含有**多種異黃酮**且是**水溶性**
- 將**豆渣萃取物ISO-1**溶解在水用於實驗
  - 進行ISO-1內含異黃酮**成分分析**
  - **比較ISO-1與genistein**對於在TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$ 刺激人類表皮角質細胞後細胞激素IL1- $\beta$ 、IL-6、IL-8上升的影響
  - **ISO-1抗皮膚發炎之作用機轉探討**
    - ISO-1是否對致病性細胞激素IL-4、IL-13所造成的發炎反應具有保護的作用及其可能的**相關活化路徑**
    - 利用組織胺誘導人類表皮角質細胞中**癢感相關蛋白TSLP**之基因表現及**ISO-1**對TSLP基因表現的影響
  - **觀察小鼠過敏性癢感行為模式**來**證實ISO-1**對小鼠被誘發的癢感行為之影響
- 以期未來能將這些成分應用於開發對抗異位性皮膚炎或其他皮膚發炎之製劑



# 研究流程圖

豆渣萃取物ISO-1萃取及分析

利用液相層析串聯質譜(LC-MS/MS)分析  
ISO-1內含異黃酮(isoflavones)成分

人類表皮角質細胞(NHEKs)細胞培養及存活率試驗

比較ISO-1跟genistein對TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$ 刺激NHEK  
細胞後cytokine(IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8)上升的影響

利用NHEK細胞實驗探討ISO-1對異位性皮膚炎的治療效果及機轉

透過Western blot分析ERK、JNK、p38  
以及STAT3等蛋白在IL-4、IL-13刺激  
誘導NHEKs發炎反應後之表現

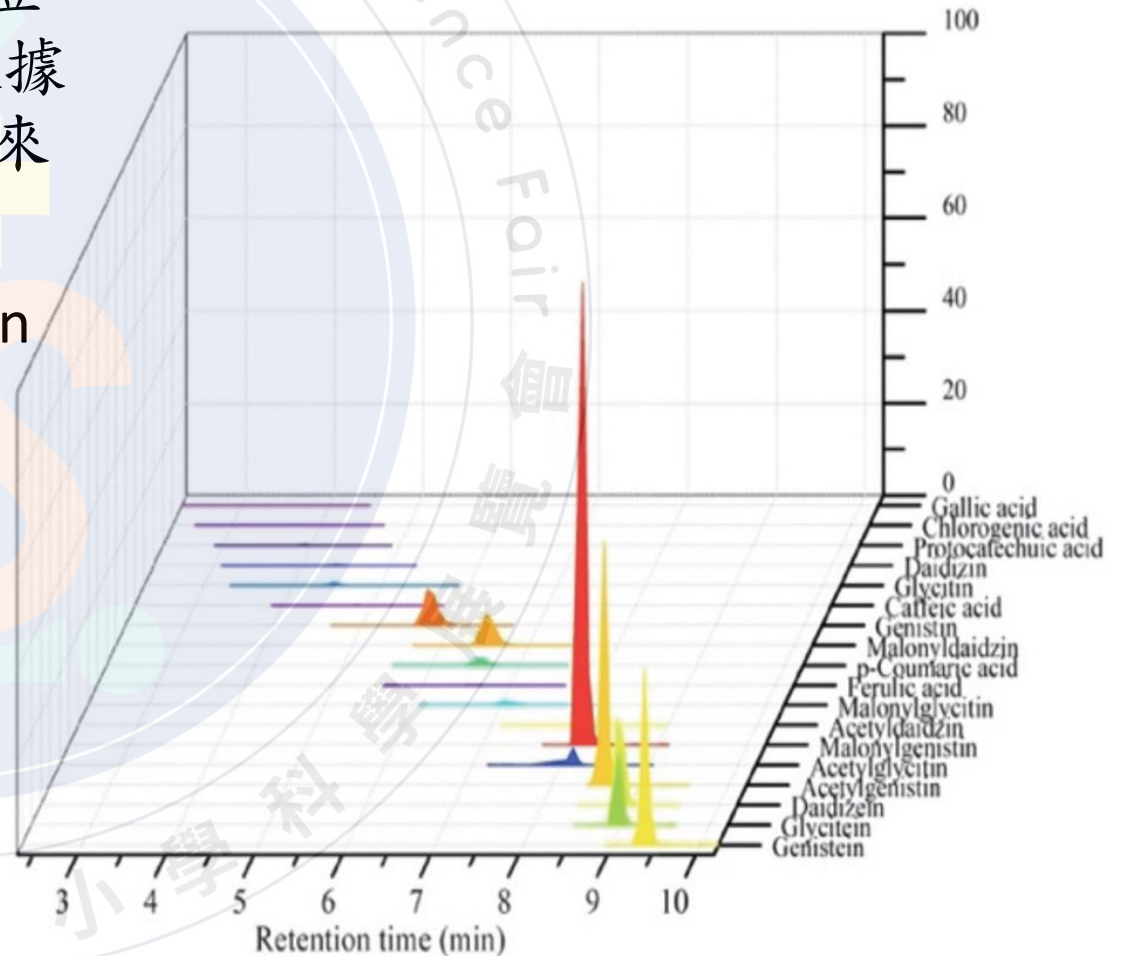
利用RT-qPCR分析  
組織胺誘導NHEKs中  
癢感相關蛋白TSLP之基因表現

動物實驗驗證ISO-1是否能降低被誘發的癢感行為

小鼠背部皮膚卵白蛋白抗原(OVA)誘導之過敏性癢感行為模式

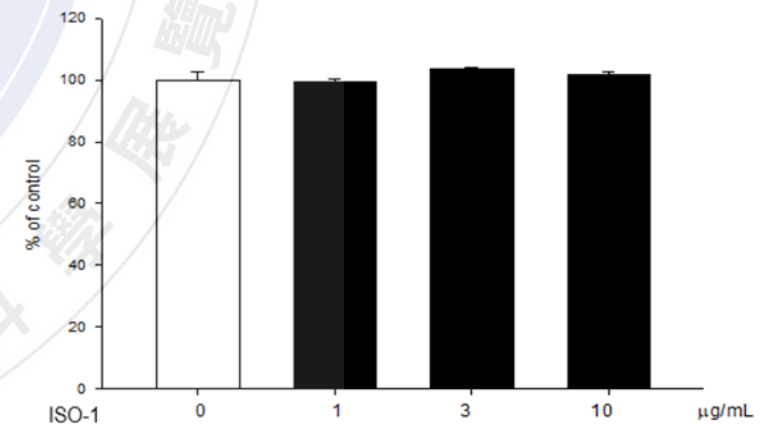
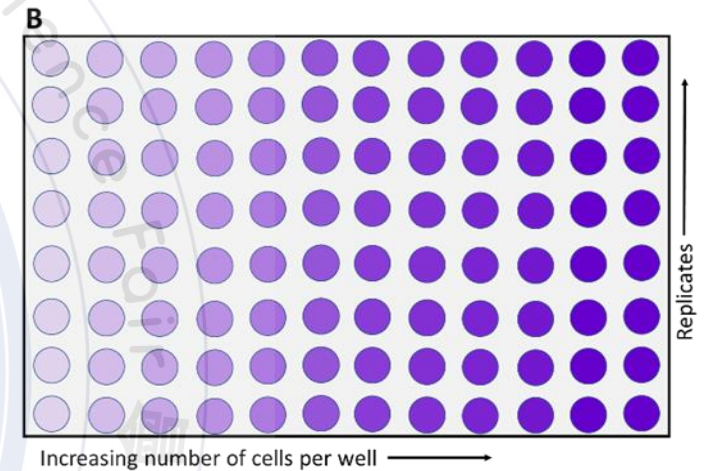
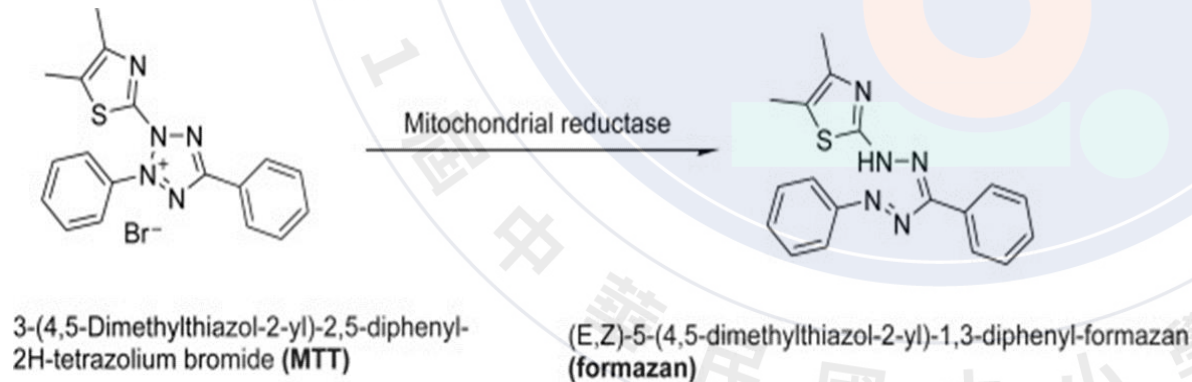
# 結果1：液相層析串聯質譜分析ISO-1 (liquid chromatography/mass spectrometer, LC-MS/MS)

- 利用液相層析串聯質譜(LC-MS/MS)分析豆渣萃萃取物ISO-1，將不同種類的異黃酮依據極性大小於不同的滯留時間依次分離出來
- ISO-1主要的異黃酮為malonylgenistin (23.28%), genistin (19.30%), malonyldaidzin (16.12%), 以及acetylgenistin (12.15%)，其中以malonylgenistin強度最大



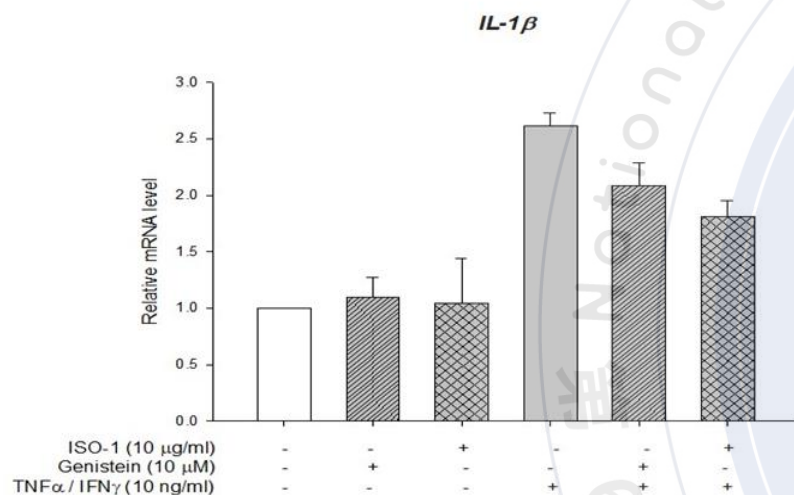
## 結果2：豆渣萃提取物ISO-1對於人類表皮角質細胞無細胞毒性

- **MTT還原分析法**檢測人類角質細胞(NHEK)在不同濃度之ISO-1的處理下對其存活率之影響，以**篩選最適合之作用濃度**
- 將不同濃度之**ISO-1**(1  $\mu\text{g/mL}$ 、3  $\mu\text{g/mL}$ 、10  $\mu\text{g/mL}$ )在NHEK單獨做預處理，評估ISO-1在1-10 $\mu\text{g/mL}$ 的濃度下是否會影響NHEK之存活率，對其產生細胞毒性。
- 經過不同濃度**ISO-1**處理之組別，在濃度範圍1-10  $\mu\text{g/mL}$ 之間均不會影響NHEK之存活率，顯示ISO-1在濃度10  $\mu\text{g/mL}$ 以下對於NHEK**不具細胞毒性**，因此在後續的西方墨點法中，**我們選擇1  $\mu\text{g/mL}$ 、3  $\mu\text{g/mL}$ 、10  $\mu\text{g/mL}$ 濃度之ISO-1**作為NHEK藥物處理之作用濃度

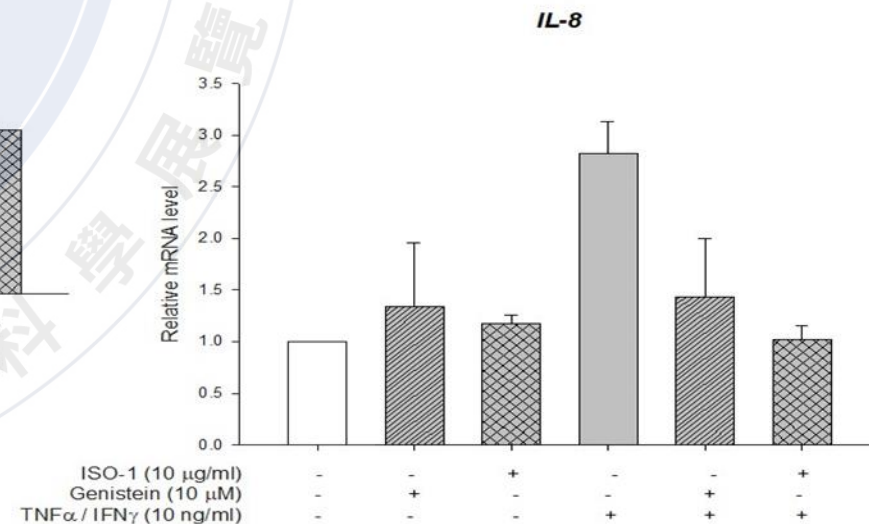
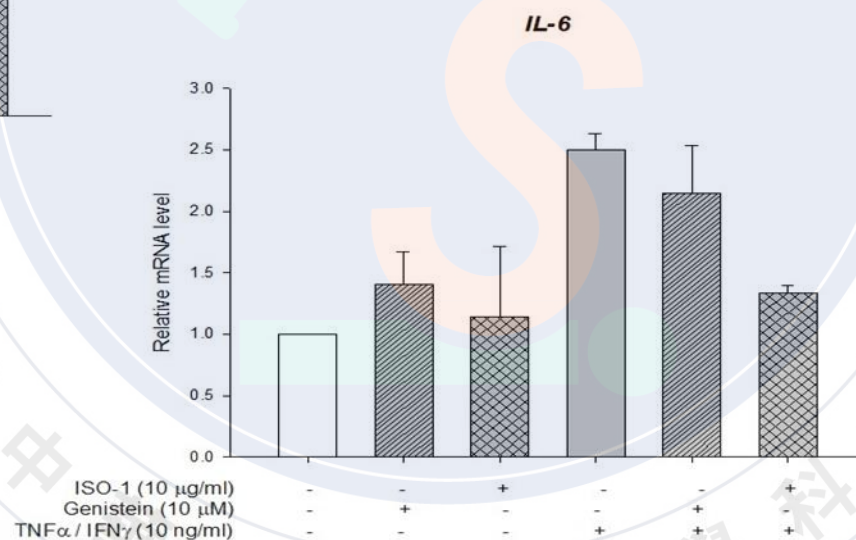




### 結果3：ISO-1比常見的genistein更能抑制 TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$ 刺激後的細胞激素(IL1- $\beta$ ,IL-6, IL-8)上升



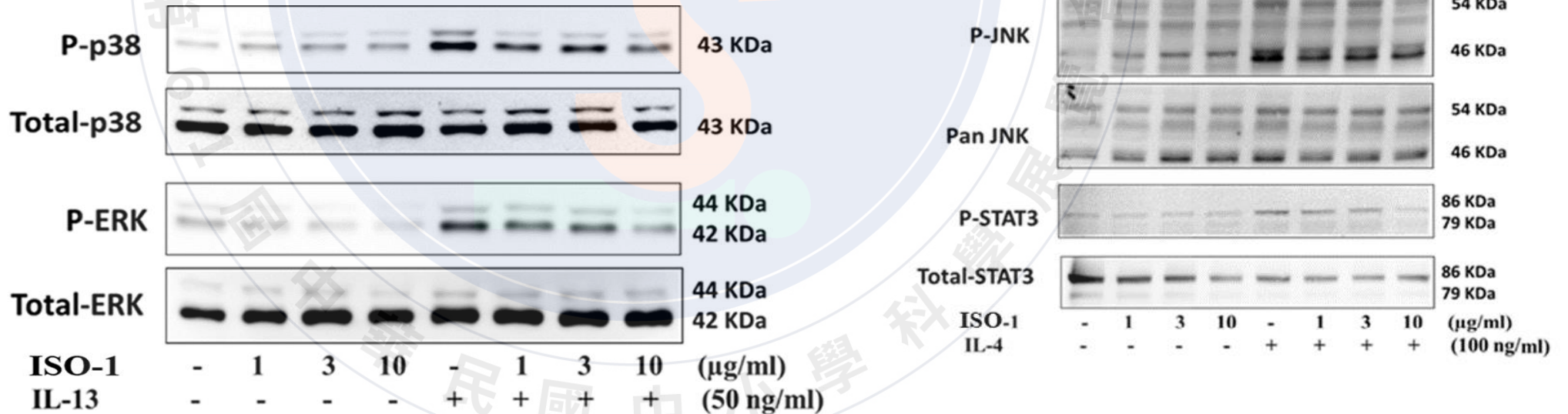
- TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$ 刺激人類表皮角質細胞能使IL1- $\beta$ 、IL-6、IL-8等細胞激素上升
- ISO-1跟genistein都能顯著減少這些細胞激素的上升
- ISO-1 對這些激素減少的程度明顯比genistein來的好





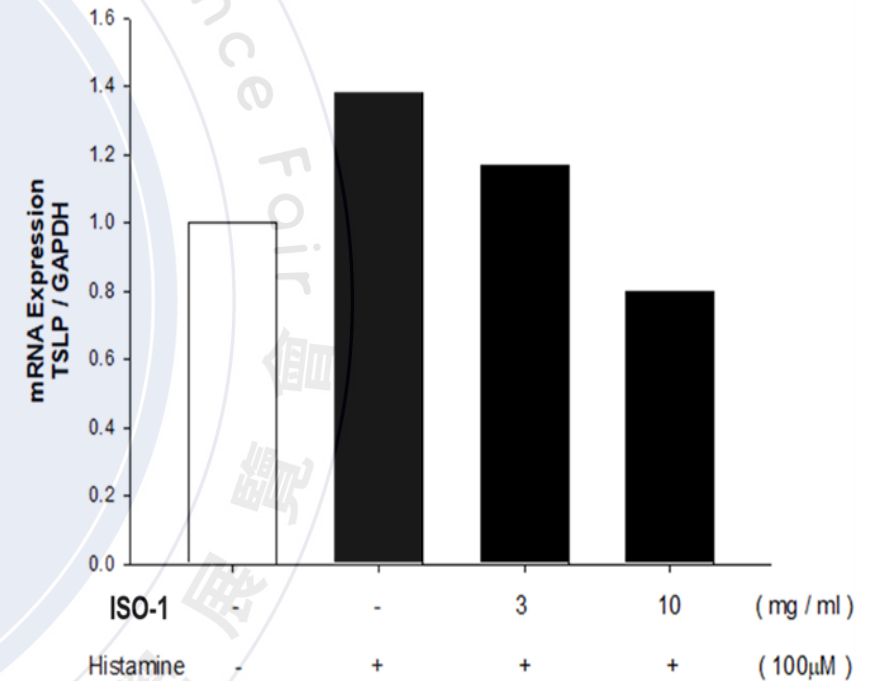
## 結果4：IL-4、IL-13誘導的訊息傳遞分子如ERK、p38、JNK、STAT3蛋白的磷酸化在經過ISO-1個別的預處理後皆被抑制

- **ISO-1**抗發炎機轉探討，造成異位性皮膚炎的細胞激素IL-4、IL-13會誘發MAPK、JAK/STAT路徑的磷酸化，進而造成皮膚細胞的發炎反應
- **MAPK路徑中**，訊息傳遞分子如**ERK、p38、JNK**蛋白的磷酸化作用顯著受到IL-4、IL-13的上調
- **JAK/STAT路徑中**，IL-4也會誘導訊息傳遞分子如**STAT3**蛋白的磷酸化作用
- 上述這些路徑的活化在經過**ISO-1**個別的預處理後，發現p38、ERK、JNK、STAT3的磷酸化皆被**抑制**，且呈現**劑量依賴**之關係



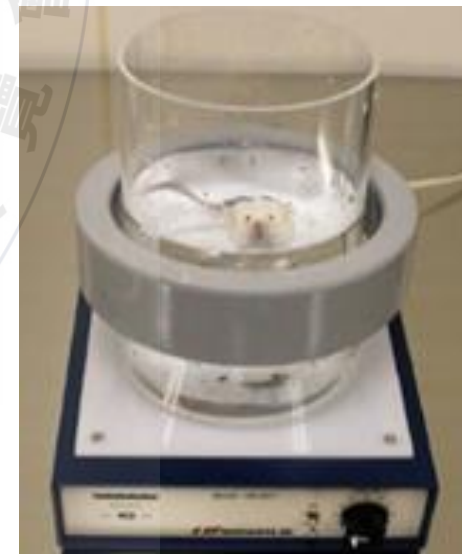
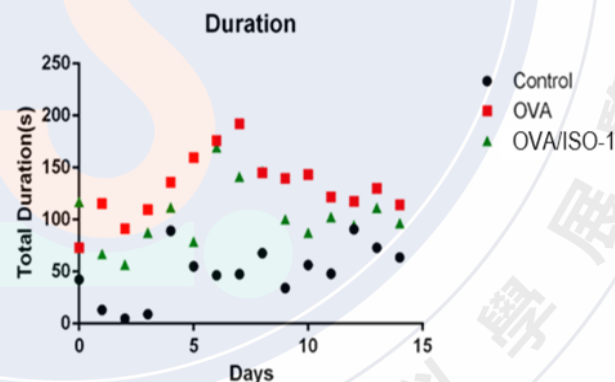
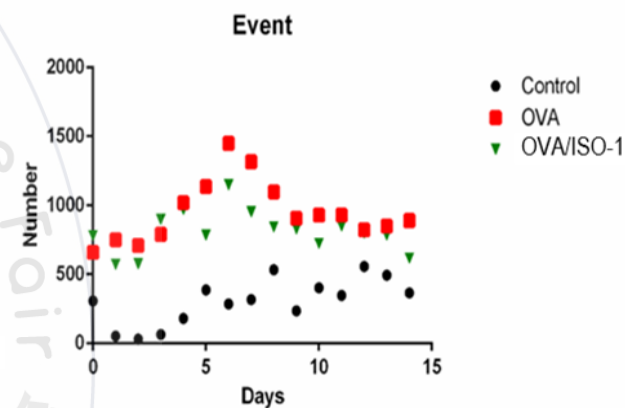
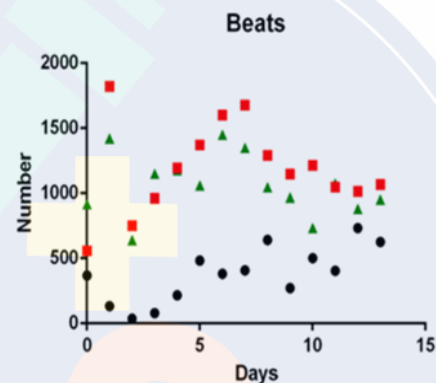
## 結果5：ISO-1抑制人類表皮角質細胞中組織胺誘導之TSLP的mRNA表現

- Th2衍生的TSLP會引起癢感
- 在人類角質細胞中加入ISO-1(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )預處理，再以組織胺誘導癢感反應，並利用q-PCR法分析TSLP的mRNA表現
- 單獨以組織胺處理之組別可以發現TSLP之mRNA表現增加之情形，而在ISO-1處理之組別則是可以有效降低TSLP之表現，且TSLP之表現隨著ISO-1作用濃度越高而降低，呈現dose-dependent之關係



## 結果6：ISO-1改善小鼠背部皮膚 卵白蛋白抗原(OVA)誘導之過敏性癢感行為

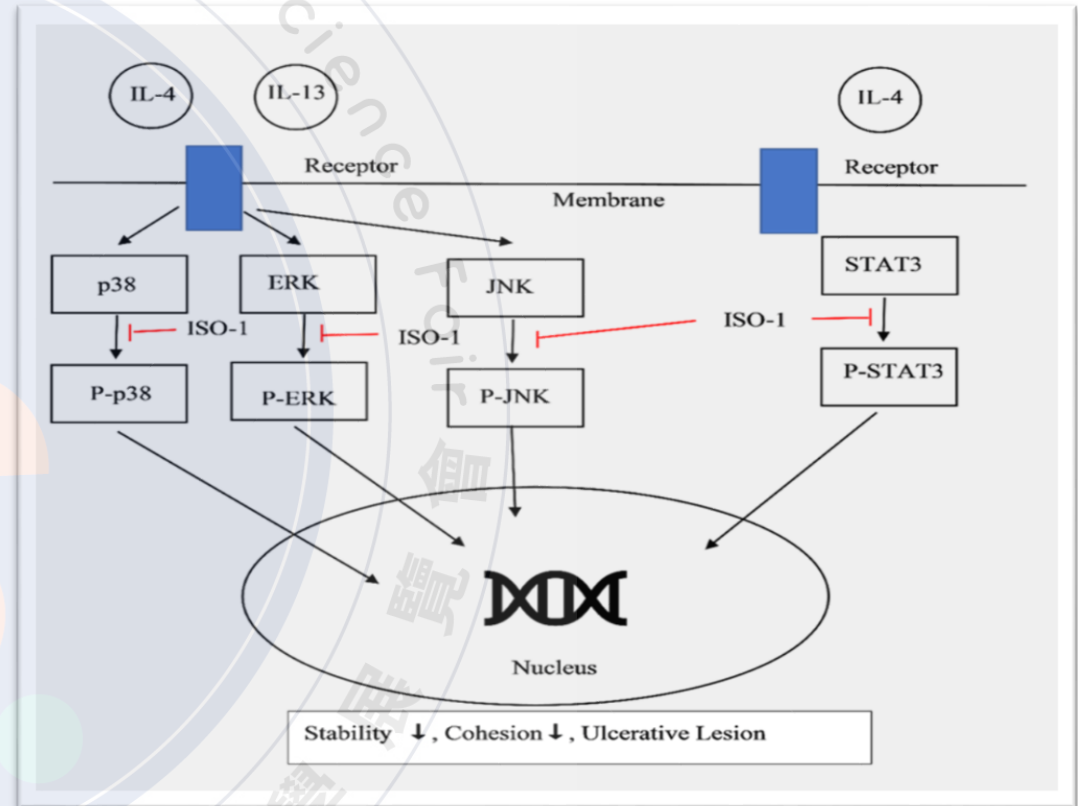
- 單獨以OVA誘導的實驗組在進行二週的處理後，在抓癢動作的指標參數節拍快慢 (beats)、次數(event)及持續時間(duration)與控制組相較，有較高的趨勢，顯示OVA影響小鼠之過敏性癢感之行為反應
- 而以豆渣萃取出物前處理之OVA實驗組，則是可觀察到抓癢動作的指標參數節拍快慢 (beats)、次數(event)及持續時間(duration)有降低之趨勢，顯示豆渣萃取出物具有抑制小鼠癢感之效果





# 結論：ISO-1具有抗異位性皮膚炎活性，有助於抑制皮膚之發炎反應與癢感，具有開發作為抗皮膚炎試劑之潛力

1. ISO-1內含的異黃酮主要成分包括malonylgenistin、genistin、malonyldaidzin、以及acetylgenistin，其中以malonylgenistin強度最大
2. ISO-1比常見異黃酮純成分genistein更能抑制TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$ 刺激後的細胞激素上升
3. 抗發炎機轉探討
  - (1) IL-4、IL-13誘導的訊息傳遞分子如ERK、p38、JNK、STAT3蛋白的磷酸化在經過ISO-1預處理後皆被抑制
  - (2) ISO-1對組織胺誘導之癢感蛋白TSLP表現也有抑制
4. 小鼠過敏性癢感行為模式可證實ISO-1可抑制卵白蛋白抗原OVA引起之小鼠的癢感行為



## 參考文獻：

1. Kao, T.H., Wu, W.M., Hung, C.F., Wu, W.B., Chen, B.H. Anti-inflammatory effects of isoflavone powder produced from soybean cake. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2007, 55, 11068–11079
2. Gandhi, N.A.; Pirozzi, G.; Graham, N.M.H. Commonality of the il-4/il-13 pathway in atopic diseases. Expert review of clinical immunology 2017, 13, 425-437.
3. Wilson SR, Thé L, Batia LM, et al. The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch. Cell. 2013;155(2):285–295