

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 植物雌激素對肺腫瘤及正常細胞增生及 benzo(a)pyrene-誘發細胞傷害的影響 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 95-2320-B-040-036-  
執行期間：95年08月01日至96年07月31日  
執行單位：中山醫學大學營養學系

計畫主持人：葉姝蘭  
共同主持人：陳曉鈴  
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：陳佩樺

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 96 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

Genistein、daidzein 及 ICI182,780 單獨或合併對肺腫瘤及  
正常細胞增生的影響

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫  
計畫編號：NSC95-2320-B-040-036-  
執行期間：95年8月1日至96年7月31日

計畫主持人：葉姝蘭  
共同主持人：  
計畫參與人員：陳佩樺

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢  
 涉及專利或其他智慧財產權， 一年  二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學營養學系

中華民國 96 年 10 月 31 日

## 摘要

Genistein 及 daidzein 均是一種植物雌激素(phytoestrogen)，可能藉由許多機制抑制癌細胞。而 ICI182,780 (ICI)，一種抑制雌激素之類固醇化合物，是目前臨床上常給予治療乳癌的藥物。此二者均可藉由 estrogen receptors (ER) 調節基因表現及細胞生長，ER 表現型的差異，即表現 ER  $\alpha$  及/或 ER  $\beta$  會影響乳癌對藥物（包括 ICI），此外有研究指出 ER 表現的差異亦可能影響肺癌的發展及其對治療的反應。因此本實驗使用不同 ERs 表現型之肺癌細胞株 A549, NCI-H460 及正常肺纖維母細胞 IMR-90，研究單獨及合併 phytoestrogen 及 ICI 對肺癌及正常細胞增生的影響。結果顯示，genistein 單獨作用只對 A549 細胞具生長抑制作用，daidzein 則可抑制 NCI-H460 細胞生長達 18%，而 ICI 也只對 NCI-H1640 細胞生長具顯著抑制作用，抑制率達 12%。另外 1  $\mu$ M ICI 及 2  $\mu$ M daidzein 對 IMR 細胞亦具生長抑制作用。合併 1  $\mu$ M ICI 合併 2  $\mu$ M genistein 或 daidzein 顯著抑制 A549 及 NCI-H460 細胞生長，跟各個成分單獨作用相比，其抑制效果增強，且抑制 NCI-H460 細胞生長的效果大於 A549。有趣的是，合併處理降低了 ICI 對正常細胞，IMR-90，生長抑制的效果。進一步以流式細胞計數法分析細胞週期，結果顯示 ICI 具有使細胞週期停滯在 G0/G1 期的趨勢。以上結果顯示不同的 ER 表現型肺癌細胞，的確對 phytoestrogen 及 ICI 有不同敏感度，且合併處理會增加對肺癌生長抑制效果。

關鍵字: 植物雌激素，ICI182,780，肺癌，雌激素接受器

## Abstract

Genistein and daidzein, two phytoestrogens, may inhibit the growth of cancer cells by several possible mechanisms. ICI182,780(ICI) is a steroidal anti-estrogen used in chemotherapies of breast cancer. They can regulate gene expression and cell growth through estrogen receptors (ER). The variation of ER expression, ER $\alpha$  and/or ER $\beta$ , has been found affect the sensitivity of breast cancer cells to chemotherapy including ICI. In addition, some studies suggest that the variation of ER expression in lung tumor cells may also influence the progression of lung cancer and responses to therapy. Therefore, using two human lung tumor cell lines with different expressive type of ERs (NCI-H460 and A549) and one human fetal lung fibroblast (IMR-90), we investigate the individual and combined effects of genistein, daidzein and ICI on the cell growth of these three cell lines. The results showed that 2  $\mu$ M genistein alone only inhibited the growth of A549 cells; 2  $\mu$ M daidzein alone only inhibited the growth of NCI-640 cells by 18%; 1  $\mu$ M ICI alone also inhibited the growth of NCI-H640 cells rather than A549 cells by 12%. Individual of 1  $\mu$ M ICI and 2  $\mu$ M daidzein also inhibited the growth of IMR-90. The combination of 1  $\mu$ M ICI and 2  $\mu$ M genistein or daidzein significantly inhibited the growth of both A549 and NCI-640 and enhanced the growth-inhibitory effects as compared with each compound. Such an effect in NCI-H640 was stronger than that in A549 cells. Interestingly, the combination of ICI and genistein or daidzein decreased the inhibitory effect of ICI on IMR-90 cell growth. Furthermore, using flow cytometry, we found that ICI alone tent to induce the G0/G1 arrest in three cell lines. Taken together, these results showed that the lung cancer cell with different phenotype of ERs had different responses to each phytoestrogen and ICI. The combination of ICI and a phytoestrogen enhanced the

growth-inhibitory effect of each compound in lung cancer cells.

**Key words:** phytoestrogen, ICI182,780, lung cancer, estrogen receptors

## 一 前言

惡性腫瘤自 1982 年至今，一直是台灣地區十大死亡之首因。而其中 15 - 20% 是因肺癌 (Lung Cancer) 而死亡。肺癌是目前國內女性因癌症死亡的第一名；國內男性的第二名。肺癌經各種治療後，平均五年生存率約只有 5%，因此如何有效治療肺癌仍是一個全球性的重要議題。

植物雌激素(phytoestrogen)是一種存在於植物中的化學物質，其結構與天然的雌性激素非常類似，因此具有 estrogen-like 的作用，其類別之一的酚類雌性激素- isoflavones，因富含於大豆中，又被稱為大豆異黃酮，大致可分類為：(1)有糖基(glycosides): genistin 與 daidzin。(2)無糖基(aglycones): genistein 與 daidzein。(3) Biochanin A 與 Formononetin。(4) Glycitein。在美國最近進行的一個 case-control study (Schabath et al., 2005)即指出多攝食含植物雌激素，特別是 isoflavones 之 genistein、daidzein、enterolactone 及 enterodiol 的食物或補充劑，會降低肺癌發生的危險。許多亞洲區流行病學研究，發現多攝食 phytoestrogen 可降低肺癌發生率 (Wakai et al., 1999；Seow et al., 2002)。芬蘭的前瞻性研究顯示 isoflavones 及 flavonoids 和肺癌發生成逆相關(Hirvonen et al., 2001)。有研究指出植物雌激素其抑癌發生的機制可能包括：抑制酵素的活性(例如：aromatase 及  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase) (Brooks and Thompson, 2005)、抗氧化效果、對 cell cycle 的調控、抑制細胞生長、抑制癌細胞的侵入及轉移和誘發細胞凋亡等(Schabath et al., 2005；Omoni and Aluko, 2005)。例如人體試驗顯示，isoflavones 可減少體內 DNA 及 lipid 氧化傷害情形(Djuric et al., 2001；Wiseman et al., 2000)。另外有研究顯示膳食異黃酮及雌激素會減少 azoxymethan 所誘發的小鼠 colon cancer，研究人員認為經由 cytochrome P450 酵素代謝的 E1、E2 及異黃酮的產物，可能會藉由 estrogen receptor independent 的機制達到 chemopreventive 的效果(Guo et al., 2004)。

Estrogen receptors (ERs)是一種 nuclear receptor，主要有兩類：estrogen receptor  $\alpha$  (ER  $\alpha$ )及 estrogen receptor  $\beta$  (ER  $\beta$ )。ERs 媒介 estrogen 調控基因表現(Nilsson et al., 2001)，在乳癌以荷爾蒙/抗荷爾蒙治療時，ERs 的表現對藥物治療效果扮演重要角色(Normanno et al., 2005)。近來的研究顯示：性別、肺組織正常與否會影響 ERs 的表現(Fasco et al., 2002; Stabile et al., 2002; Mollerup et al., 2002；Lai et al., 2005)。文獻發現 ER  $\beta$  在大多數的肺組織細胞及細胞株均會表現，但 ER  $\alpha$  則否 (Stabile et al., 2002; Mollerup et al., 2002)。Kawai 等(2005)研究 132 個從非小細胞肺癌得到的切片，發現若細胞的 ER 的表現行為 ER  $\alpha$  (-) ER  $\beta$  (+) 的情況，則病患有較佳的癒後情形。另外，Wu 等(2005) 的研究也觀察到在非小型肺細胞癌病患組織具有 ER  $\beta$  over expression 情形者，手術後有較佳的癒後情形(Wu et al., 2005)。

除了 estrogen，另有一群分子，即所謂的選擇性雌性激素接受器調節劑 selective estrogen receptor modulator (SERMs)可藉由 ER 調節基因表現及細胞生長，這些分子同時具有雌性激素促進劑(estrogen agonist)與抑制劑(estrogen antagonist)之功用，其作用視標的 promoter、組織與內生性雌性激素濃度之不同而不同，植物雌激素及乳癌治療藥物-tamoxifen 及

ICI182,780 (ICI)均是一種 SERM。而 ICI 是一種抑制雌激素之類固醇化合物，是目前臨床上常給予治療乳癌及乳癌高危險患者的 SERMs 藥物(Gradishar et al.,2003)。其作用原理與另一治療乳癌的非類固醇化合物- tamoxifen 作用路徑不同(Horwitz et al., 1980)，Tamoxifen 的作用是抑制雌激素活性；ICI182,780 的作用則是使 ER  $\alpha$  降解(Lanvin et al.,2007)，並將 histone deacetylase 1 及 ER  $\alpha$  脫離 Sp1 sites 而大量誘發 p21<sup>waf1</sup> 表現，使細胞週期停滯在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期，降低癌細胞的生長作用(Varshochi et al., 2005)。

## 二 研究目的

由以上文獻可知，phytoestrogen 及抗癌藥物 ICI 均屬 SERMs，可能因乳癌組織或細胞 ER 表現型不同而有不同影響，由於肺癌細胞亦具有不同 ER 表現型，是否會有類似結果並不清楚，而 phytoestrogen 是否會促進或抑制 ICI 的作用？目前也不清楚。因此本實驗使用不同 ERs 表現型之肺癌細胞株 A549：ER  $\alpha$  (-) ER  $\beta$  (+), NCI-H460：ER  $\alpha$  (+) ER  $\beta$  (+)及正常細胞株 IMR-90：ER  $\alpha$  (-) ER  $\beta$  (+)，研究單獨及合併 phytoestrogen 及對肺癌及正常細胞增生的影響。

## 三. 材料與方法

### 1. 藥品

由 Sigma 購買之 genistein、daidzein，其配製法分別為：genistein 溶於 99.5% ethanol 中，配製成濃度為 10 mM 的 stock；daidzein 溶於 DMSO 中，配製成濃度為 10 mM 的 stock；由 Tocris 購買之 ICI 182,780 溶於 99.5% ethanol 中，配製成濃度為 0.1 mM 的 stock，stock 皆儲存於 -80°C。實驗時，再將 stock 溶至培養基中，使其配成終濃度為 2 $\mu$ M genistein、2 $\mu$ M daidzein 及 1 $\mu$ M ICI 182,780。

### 2. 細胞株及細胞培養

此計劃選用之細胞株 A549、NCI-H460 均為非小細胞肺癌 non-small cell lung cancer 細胞株，A549 細胞是一種不具 ER  $\alpha$  只具有 ER  $\beta$  表現的細胞，而 NCI-H460 則同時具有兩種 ERs 表現(Mollerup et al., 2002)，而 IMR-90 則為 human fetal lung fibroblast，是一種正常細胞株，只會有 ER  $\beta$  表現。

A549、NCI-H460 及 IMR-90 均購自食品工業研究所細胞庫，皆為貼盤細胞。A549 及 NCI-H460 培養於 90 % RPMI1640 培養基中，此培養基仍需包含 2mM glutamine、10 mM HEPES、1 mM sodium pyruvate、4.5g/L glucose、抗生素(100U/mL 的 penicillin 和 100U/mL 的 streptomycin) 及 10% fetal bovine serum (FBS)。培養條件為 37°C、5%CO<sub>2</sub>。冷凍培養基包含 93% culture medium 及 7% DMSO。

IMR-90 人類胚胎肺纖維母細胞(human fetal lung fibroblast)，具有 ER  $\beta$ ，培養在 90 % Minimum essential medium Eagle (MEM)培養基中，此培養基包含 2mM L-glutamine、Earle's BSS、1.5g/L sodium bicarbonate, 0.1 mM non-essential amino acid、1 mM sodium pyruvate、抗生素(100U/mL 的 Penicillin 和 100U/mL 的 streptomycin)及 10% fetal bovine serum (FBS)。培養條件為 37°C、5% CO<sub>2</sub>。冷凍培養基包含 93% culture medium 及 7% DMSO。

如欲進行各種實驗分析，細胞處理參考 Mollerup 等(2002)方法，將三種細胞分別種於 24-well 中，濃度以 2.5 $\times$ 10<sup>4</sup> 以 10%FBS 培養 overnight 後，以 PBS 洗兩次，接著加入含 2%FBS

之新培養基，其中分別單獨含(genistein、daidzein 濃度各為 0.2, 2 $\mu$ M)或 antiestrogen (ICI 濃度 1 $\mu$ M)與細胞共同培養 24、48 及 72 小時，之後即可收集細胞進行實驗分析。另一部分實驗則在相同培養基及培養時間中，同時加入 phytoestrogen 及 antiestrogen 與細胞一同培養，以評估其交互作用情形。

### 3. RT-PCR 分析基因表現

ERs 基因以 RT-PCR 來測定，並以 GAPDH 基因表現量作為表現量標準。細胞 RNA 以 PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA Purification System kit (Invitrogen, U.S.A)試劑萃取出來後，以 one-step RT-PCR kit (Invitrogen, U.S.A)在 RT-PCR 機進行反應，並以 oligo-p (dT)<sub>15</sub> 作為 primer，其序列如下，PCR 產物進行電泳並以電腦軟體做定量分析。

ER  $\alpha$  forward : 5'-AATTCAGATAATCGACGCCAG  
reverse : 5'-GTGTTTCAACATTCTCCCTCCTC

ER  $\beta$  forward : 5' -TAGTGGTCCATCGCCAGTTAT  
reverse : 5' -GGGAGCCACACTTCACCAT

GAPDH forward : 5'-ACACATGCCATCACTGCC  
reverse : 5'-GCCTGCTTCACCACCTTCTTG

### 4. 細胞存活率分析

[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenol tetrazolium bomide] MTT 為 tetrazolium salt，經細胞內粒線體去氫酶(dehydrogenase)的分解，由透明無色產生藍色 formazan 晶體。將細胞置於 24-well 中，每 well 中含 1ml 新鮮培養液及 2.5 $\times$ 10<sup>4</sup> cells，待培養 overnight 後，經不同處理後再進行細胞存活率測定。再測定前，先將 MTT 以未含 FBS 的細胞培養基將 MTT 稀釋成 0.2mg/ml，在每 well 中加入 1ml，於 37 $^{\circ}$ C 作用 2 小時後，於倒立顯微鏡下可觀察細胞內藍紫色結晶生成。將 24-well 中培養基移除，加入 1ml isopropyl alcohol 異丙醇加以溶解，搖晃 5 分鐘直至藍紫色結晶完全溶解後，在 595nm 讀取其吸光值。

### 5. Flow cytometer 分析細胞 Apoptosis 及細胞週期

Propidium iodide (PI)碘化丙啶，是一種細胞核螢光染劑，可進入細胞核內鑲嵌於雙股 DNA 中，且在 488nm 激發光下會發紅色螢光。由於細胞發生凋亡後會造成染色質濃縮及形成凋亡小體，因此利用 PI 染色與流式細胞儀偵測下可觀察細胞內 DNA 情形與細胞週期狀態，再以 WinMDI2.8 軟體分析得到 sub-G1(apoptosis)、G1、S、G2/M 不同細胞週期% (Sonnemann et al., 2006; Hatayama et al., 2007)。

將 A549 細胞以 2.5 $\times$ 10<sup>4</sup>/mL 細胞密度培養在 25cm<sup>2</sup> Flask 中，待 24 小時細胞貼盤後，以 1xPBS 清洗細胞兩次後單獨或合併加入 phytochemicals 及 anti-estrogen，分別培養 24、48 及 72 小時。每 24 小時更換一次含有藥物新培養液，並收集舊培養液與細胞以 300 $\times$ g、5 分鐘離心條件進行離心。去除上清液後，以冰的 1x PBS 清洗一次後再以 300 $\times$ g、5 分鐘進行第二次離心，去除上清後加入 3mL 70% ice alcohol 固定細胞並儲存於 4 $^{\circ}$ C 中等待分析。

進行 PI 染色前，將 4 $^{\circ}$ C 以 70% alcohol 固定後細胞以 300 $\times$ g、5 分鐘條件離心，去除上層

酒精後加入 1mL 1xPBS wash 後移至 2 c.c.ENDORF 再以 2500rpm、5 分鐘離心，去除上清後將細胞重新懸浮於含有 4 µg/mL PI、0.5 mg/mL RNase A 的 1 mL PBS buffer 中，於 37°C 水浴槽中培養 30 分鐘後以流式細胞儀(Flow-cytometer；FACSCalibur™ system)分析，每個組別分別收取 15000 個細胞數進行分析，所得結果以 WinMDI 2.8 軟體處理。

## 6. 統計分析

本實驗結果經由三次個別實驗結果得到平均值與標準偏差，實驗數據以 mean ± SD 表示，並用 SPSS 電腦統計軟體進行變方分析(Analysis of variance, ANOVA)。各實驗值間以 Duncan's multiple range test 進行差異性分析，兩組間則以 t-test 進行比較， $p < 0.05$  則視為有顯著性差異。

## 四. 結果與討論

### 1. 各種細胞株之 ERs 表現型

ERs 基因表現以 RT-PCR 來測定，並以 GAPDH 基因表現量作為內標。在 anneal 溫度 51°C 及 RNA 1µg 的條件下，如圖一所示，僅有 NCI-H460 細胞株有 ER  $\alpha$  的表現 (345 bp)，而 A549 及 IMR-90 則無。此結果與 Mollerup (2002) 結果相符合。而在 ER  $\beta$  表現型方面，A549、NCI-H460 及 IMR-90 此三株細胞皆會表現 (393 bp)。

### 2. 單獨及合併 Phytoestrogen 及 ICI 對 A549 細胞增生的影響

對 A549 細胞株，單獨處理 2 µM genistein 72h 後顯著抑制細胞生長，與控制組比較，抑制率達 29%。daidzein 在 24h、48h 有顯著抑制作用並呈現劑量關係。ICI 處理 72h 後則顯著促進細胞生長(濃度 0.1 µM 增加 19%，1µM 增加 7%) (圖二 A)。在 phytoestrogen 合併 ICI 1µM 情形下，2µM genistein 及 daidzein 合併 ICI 作用 48h、72h 後，對細胞生長產生抑制作用 (圖二 B)。

對 NCI-H460 細胞株，genistein 及 ICI 0.1 µM 單獨處理 48h、72h 後，顯著的促進細胞生長。反之，2 µM daidzein 及 1 µM ICI 處理 72 h 顯著的抑制細胞生長，與控制組相比下抑制率分別達 18%、12% (圖三 A)。在 phytoestrogen 合併 1 µM ICI 情形下，ICI 合併 2 µM genistein 作用 48h 及 daidzein 作用 48h、72h 後，抑制效果顯著比 ICI 單獨作用更大 (圖三 B)。

對 IMR-90 細胞株，單獨處理 0.2 µM genistein 72h 顯著的促進細胞生長(增加 8%)，而 2 µM daidzein 及 ICI 1 µM 則顯著的抑制細胞生長，抑制率達 11%、18% (圖四 A)。而 1 µM ICI 在合併 phytoestrogen 情形下，作用 72h 後，合併 genistein 及 daidzein 能降低 ICI 單獨作用對細胞生長的抑制性。

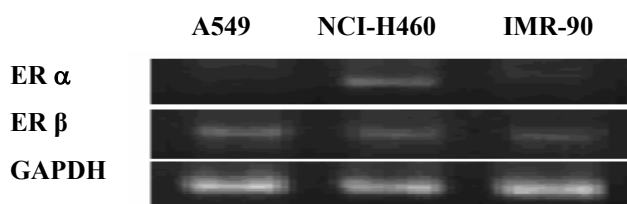
以上數據顯示，不同的植物雌激素單獨在較高濃度下 (2 µM) 對不同 ER 型癌細胞有不同的抑制作用，ICI 則需在 1 µM 時才對 NCI-H460 肺癌細胞具生長抑制作用，對 A549 細胞則無作用，而同時給予 2µM phytoestrogen 及 1 µM ICI 時，能加強 ICI 的作用，且對兩株肺癌

細胞生長的抑制效果亦為 NCI-H460 > A549，顯示具有 ER  $\alpha$  表現型的癌細胞對 ICI 單獨或合併植物雌激素處理較敏感。而 ICI 亦對正常細胞株 IMR-90 亦具生長抑制作用，但 phytoestrogen 具有保護正常細胞的作用。

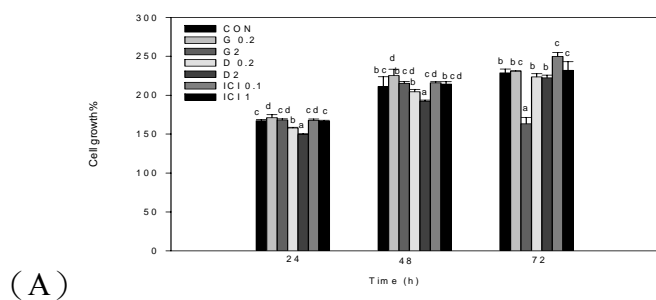
### 3. Phytoestrogen 及 ICI 單獨對細胞週期的影響

由表一可知，phytoestrogen 本身對細胞週期並無影響，而 ICI 則具使三株細胞生長週期停滯於 G0/G1 期的趨勢，此結果與 Varchochi 等(2005)的研究一致，他們的研究發現，ICI 可誘發 p21 基因 transcription 而使 MCF-7 乳癌細胞停滯於 G0/G1 期。由於我們前面的結果顯示 phytoestrogen 及 ICI 合併會比 ICI 單獨作用能更進一步抑制細胞生長，因此 phytoestrogen 及 ICI 合併有可能進一步使細胞週期停滯於 G0/G1 期，或者會停滯於其他週期，不過這仍需進一步的研究證實。

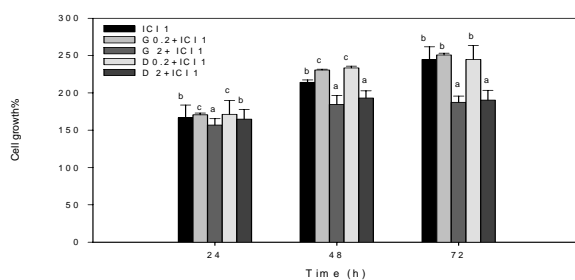
### 五、圖表



圖一. A549, NCI-H460 及 IMR-90 細胞株之 ERs mRNA 表現，以 GAPDH 基因表現為內標(Anneal 溫度 51°C 及 RNA 1 $\mu$ g)。



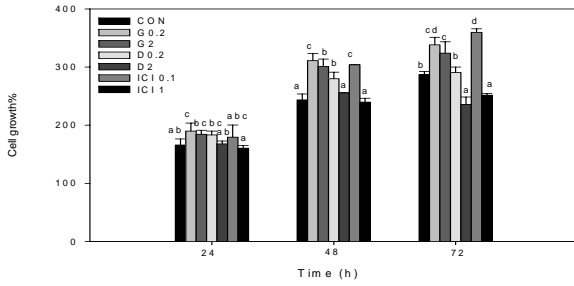
(A)



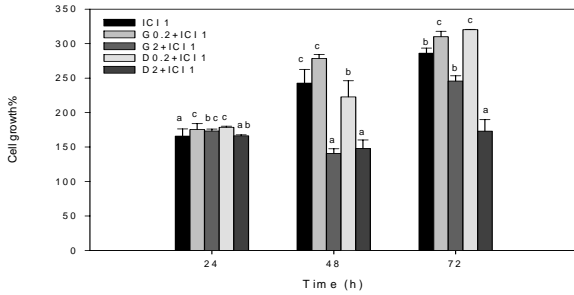
(B)

圖二、genistein、daidzein 及 ICI 單獨 (A) 或合併 (B) 對 A549 細胞株生長的影響。A549 細胞與濃度 0.2 $\mu$ m、2 $\mu$ m 之 genistein (G0.2, G2) 及 daidzein (D0.2, D2) 或濃度 0.1 $\mu$ m、1 $\mu$ m ICI (ICI0.1, ICI1) 單獨或合併培養 24-72 小時，之後分析細胞生長情形，並以 control 組 0 小時之細胞數作為 100%。



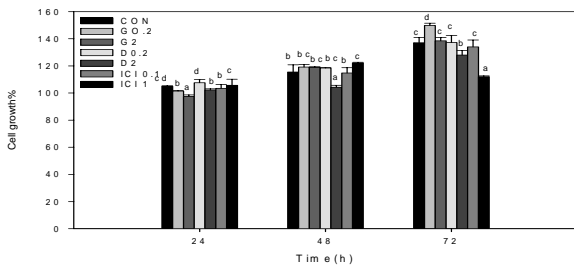


(A)

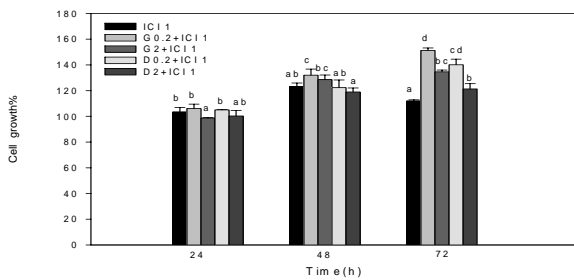


(B)

圖三、genistein、daidzein 及 ICI 單獨 (A) 或合併 (B) 對 NCI-H460 細胞株生長的影响。NCI-H460 細胞與濃度 0.2 $\mu$ m、2 $\mu$ m 之 genistein (G0.2, G2) 及 daidzein (D0.2, D2) 或濃度 0.1 $\mu$ m、1 $\mu$ m ICI (ICI0.1, ICI1) 單獨或合併培養 24-72 小時，之後分析細胞生長情形，並以 control 組 0 小時之細胞數作為 100%。



(A)



(B)

圖四、genistein、daidzein 及 ICI 單獨 (A) 或合併 (B) 對 IMR-90 細胞株生長的影响。IMR-90 細胞與濃度 0.2 $\mu$ m、2 $\mu$ m 之 genistein (G0.2, G2) 及 daidzein (D0.2, D2) 或濃度 0.1 $\mu$ m、1 $\mu$ m ICI (ICI0.1, ICI1) 單獨或合併培養 24-72 小時，之後分析細胞生長情形，並以 control 組 0 小時之細胞數作為 100%。

表一、genistein、daidzein 及 ICI 單獨對細胞週期的影響<sup>1</sup>。

Cell phase	A549			NCI-H460			IMR-90		
	24H	48H	72H	24H	48H	72H	24H	48H	72H
<i>Control</i>									
sub-G1	0.65	0.64	0.61	0.46	0.39	0.4	0.6	1.98	1.33
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	52.51	55.22	61.71	63.32	66.06	69.02	52.64	49.83	58.15
S	25.4	28.81	21.69	15.7	15.91	15.7	24.45	25.3	20.77
G <sub>2</sub> /M	22.16	14.93	15.67	20.1	17.7	14.95	22.5	23.15	19.87
<i>Genistein</i>									
sub-G1	0.61	0.36	0.38	0.21	0.5	0.48	1.13	1.6	1.3
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	52.99	53.26	59.87	61.62	61.63	67.61	52.14	50.78	58.38
S	26.52	28.43	22.87	14.36	17.13	14.49	24.59	25.17	17.92
G <sub>2</sub> /M	19.84	18.01	16.69	23.61	20.97	17.36	22.38	22.66	22.58
<i>Daidzein</i>									
sub-G1	0.49	0.47	0.56	0.34	0.33	0.55	0.31	1.12	1.13
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	63.08	54.47	59.45	60.45	64.58	68.09	51.52	53.76	61.56
S	21.64	26.37	24.95	17.3	14.79	14.42	24.42	25.59	18.36
G <sub>2</sub> /M	14.73	18.54	15.28	21.97	20.25	16.89	23.76	19.97	19.03
<i>ICI</i>									
sub-G1	0.49	0.56	0.5	0.65	0.51	0.32	0.35	0.9	3.05
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	63.08	63.98	68.17	64.33	75.55	77.16	62.38	73	72.68
S	21.64	22.84	19.4	13.4	8.44	9.22	16.77	11.7	7.01
G <sub>2</sub> /M	14.73	12.48	12.02	21.69	15.58	13.17	20.62	14.65	17.25

<sup>1</sup> 各種細胞與濃度 2 $\mu$ m 之 genistein 及 daidzein 或濃度 1 $\mu$ m ICI 單獨併培養 24-72 小時，之後以流式細胞計數儀分析細胞週期，各細胞週期細胞分佈以百分比 (%) 表示。

## 六、參考文獻

- Brooks, J. D., Thompson, L. U. Mammalian lignans and genistein decrease the activities of aromatase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in MCF-7 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005, 94:461-467.
- Djuric, Z., Chen, G., Doerge, D. R., Heilbrun, L. K., Kucuk, O. Effect of soy isoflavone supplementation on markers of oxidative stress in men and women. *Cancer Lett.* 2001, 172:1-6.
- Fasco, M. J., Hurteau, G. J., Spivack, S. D. Gender-dependent expression of alpha and beta estrogen receptors in human nontumor and tumor lung tissue. 2002, 188:125-140.
- Guo, J. Y., Li, X., Browning, J. D., Jr., Rottinghaus, G. E., Lubahn, D. B., Constantinou, A., Bennink, M., MacDonald, R. S. Dietary soy isoflavones and estrone protect ovariectomized ER $\alpha$ KO and wild-type mice from carcinogen-induced colon cancer. *J Nutr.* 2004, 134:179-182.
- Hirvonen, T., Virtamo, J., Korhonen, P., Albanes, D., Pietinen, P. Flavonol and flavone intake and

- the risk of cancer in male smokers (Finland). 2001, 12: 789-796.
- Lai, J. C., Cheng, Y. W., Chiou, H. L., Wu, M. F., Chen, C. Y., Lee, H. Gender difference in estrogen receptor alpha promoter hypermethylation and its prognostic value in non-small cell lung cancer. 2005, 117: 974-980.
- Lanvin, O., Bianco, S., Kersual, N., Chalbos, D., Vanacker, J. M. Potentiation of ICI182,780 (Fulvestrant)-induced estrogen receptor-alpha degradation by the estrogen receptor-related receptor-alpha inverse agonist XCT790. 2007, 282: 28328-28334.
- Masuda, H., Kalka, C., Takahashi, T., Yoshida, M., Wada, M., Kobori, M., Itoh, R., Iwaguro, H., Eguchi, M., Iwami, Y., Tanaka, R., Nakagawa, Y., Sugimoto, A., Ninomiya, S., Hayashi, S., Kato, S., Asahara, T. Estrogen-mediated endothelial progenitor cell biology and kinetics for physiological postnatal vasculogenesis. 2007, 101: 598-606.
- Mollerup, S., Jorgensen, K., Berge, G., Haugen, A. Expression of estrogen receptors alpha and beta in human lung tissue and cell lines. 2002, 37: 153-159.
- Normanno, N., Di Maio, M., De Maio, E., De Luca, A., de Matteis, A., Giordano, A., Perrone, F. Mechanisms of endocrine resistance and novel therapeutic strategies in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2005, 12: 721-747.
- Omoni, A. O., Aluko, R. E. Soybean foods and their benefits: potential mechanisms of action. *Nutr Rev*. 2005, 63: 272-283.
- Schabath, M. B., Hernandez, L. M., Wu, X., Pillow, P. C., Spitz, M. R. Dietary phytoestrogens and lung cancer risk. 2005, 294: 1493-1504.
- Seow, A., Poh, W. T., Teh, M., Eng, P., Wang, Y. T., Tan, W. C., Chia, K. S., Yu, M. C., Lee, H. P. Diet, reproductive factors and lung cancer risk among Chinese women in Singapore: evidence for a protective effect of soy in nonsmokers. *Int J Cancer*. 2002, 97: 365-371.
- Stabile, L. P., Davis, A. L., Gubish, C. T., Hopkins, T. M., Luketich, J. D., Christie, N., Finkelstein, S., Siegfried, J. M. Human non-small cell lung tumors and cells derived from normal lung express both estrogen receptor alpha and beta and show biological responses to estrogen. *Cancer Res*. 2002, 62: 2141-2150.
- Varshochi, R., Halim, F., Sunters, A., Alao, J. P., Madureira, P. A., Hart, S. M., Ali, S., Vigushin, D. M., Coombes, R. C., Lam, E. W. ICI182,780 induces p21Waf1 gene transcription through releasing histone deacetylase 1 and estrogen receptor alpha from Sp1 sites to induce cell cycle arrest in MCF-7 breast cancer cell line. *J Biol Chem*. 2005, 280: 3185-3196.
- Wakai, K., Ohno, Y., Genka, K., Ohmine, K., Kawamura, T., Tamakoshi, A., Lin, Y., Nakayama, T., Aoki, K., Fukuma, S. Risk modification in lung cancer by a dietary intake of preserved foods and soyfoods: findings from a case-control study in Okinawa, Japan. *Lung Cancer*. 1999, 25:147-159.
- Wang, M. M., Traystman, R. J., Hurn, P. D., Liu, T. Non-classical regulation of estrogen receptor-alpha by ICI182,780. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004, 92: 51-62.
- Webb, P., Nguyen, P., Kushner, P. J. Differential SERM effects on corepressor binding dictate ERalpha activity in vivo. *J Biol Chem*. 2003, 278: 6912-6920.

- Wiseman, H., O'Reilly, J. D., Adlercreutz, H., Mallet, A. I., Bowey, E. A., Rowland, I. R., Sanders, T. A. Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F(2)-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *Am J Clin Nutr.* 2000, 72:395-400.
- Wong, J. K., Le, H. H., Zsarnovszky, A., Belcher, S. M. Estrogens and ICI182,780 (Faslodex) modulate mitosis and cell death in immature cerebellar neurons via rapid activation of p44/p42 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci.* 2003, 23: 4984-4995.
- Wu, C. T., Chang, Y. L., Shih, J. Y., Lee, Y. C. The significance of estrogen receptor beta in 301 surgically treated non-small cell lung cancers. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005, 130: 979-986.

## 七、計畫成果自評

本研究內容大致與計畫相符。研究發現，不同的 ER 表現型的肺癌細胞，的確對 phytoestrogen 及 ICI 有不同敏感度，不論單獨或合併處理 ICI 及 daidzein 均對 ER $\alpha$  及 ER $\beta$  都表現的 NCI-H460 有較強的生長抑制作用，且合併處理會增加對肺癌細胞生長抑制效果。有趣的是，合併處理降低了 ICI 對正常細胞，IMR-90，生長抑制的效果。對於造成此一結果的機制，未來會繼續探討。本體外實驗結果可提供肺癌治療體內實驗參考依據，預期具國際期刊發表價值。