

市售稻米提升抗腫瘤免疫功能之評估

研究人員： 陳裕仁 廖慧芬

中文摘要

稻米除了提供基本的營養價值外，更有許多重要的生理活性。本計劃擬評估台灣地區市售稻米於提升抗腫瘤免疫 (Antitumor immunity) 之功能。依照預計進度，已經完成市售稻米之蒐集與成分之萃取，並已建立其抗腫瘤免疫活性之評估方法，包含：人類單核細胞條件培養液之製備、細胞株之培養、細胞生長與分化之功能探討。研究工作依預定項目，正在進行之中。而補助經費之使用，亦視研究之需要，實報實銷。共蒐集了市售稻米與改良後之特殊品種稻米，八種市售的稻米，包括：(1)白米-台中禾山十號；(2)白米-台梗九號；(3)糙米-台梗九號；(4)發芽糙米-台梗八號；(5)白糯米；(6)黑糯米；(7)澳洲越光米；(8)加拿大野生米。其中，第 1-6 項為當年收穫之國產米，第 7-8 項為進口米。加上農業試驗所農藝組王強生組長的鼎力支持，我們得以分析特殊基因轉殖品種的稻米，包括：SA0415、SA0422、SA0461、SA0545、SA0545.11、SA0545.12、SA549、SA2115、

SA1681、SA1683、SA552.1、TNG67、G54、UN，這樣的研究更可以篩選出具有優良活性的國產米，對於提升國產稻米的競爭性有很大的助益。

關鍵辭： 免疫；抗腫瘤；稻米

英文摘要

This study focused on the effect of commercial rice on antitumor immunity. Our work included: I. Commercial rice collection and extratction (1) Collection (2) Extraction. II. Effect of rice on immunomodulation (1) Preparation of MNC-CM (2) Detection of cytokines. III. Effect of rice on antitumor (1) Culture of cell lines (2) Growth inhibition (3) Cytotoxicity assay. IV. Effect of rice on differentiation-induction of human leukemic cells (1) Morphology assay (2) Differentiation assay (3) Determination of cell surface marker. We screened 8 kinds of commmercial rice and 13 clones of genetically modified rice. Only 3 kinds of rice possess immunopotential activity against leukemia.

Key Words: Immune; Antitumor; Rice

前言

稻米為禾本科稻屬植物，亞洲栽培稻學名 *Oryza sativa* L.，長久以來一直為亞洲之重要糧食作物。在台灣，稻米經過不斷的育種與品種改良，已有許多品種陸續上市，例如：梗稻（日本型 Japonica）、秈稻（印度型 Indica）及爪哇稻（爪哇型 Javanica）三種類型。這些米無論在產量、抗病蟲害、耐旱力，乃至口感、外觀、與營養價值上，皆有十足的進展。然而，在我國加入 WTO 後，世界各國的稻米紛紛引進，對於農民的利益影響甚鉅。近來的研究已知，稻米除了提供基本的營養價值外，更有許多重要的生理活性，例如：黃酮類成分可調節 cytochrome P450 的活性 (Noda et al., 2003)、油脂中含有抗真菌的作用 (Paranagama et al., 2003)、以及米麩 (Rice bran) 具有提升免疫的活性 (Rama et al., 2003) 與降低解血液中膽固醇的作用 (Qureshi et al., 2002)，特別是其中特殊的 α -(1, 6)- linkage glucan 成分，能經由口服方式達到對抗實體腫瘤的作用 (Katyama et al., 2002; Takeda et al., 1994)。因此，本計畫擬設計一免疫抗腫瘤之活性評估，藉由市售不同品種的稻米之比較，希望提供消費者在選購稻米時，多一個參考的指標。

研究方法

一、市售稻米之蒐集與萃取成分

(一) 稻米之蒐集

收集市售不同品種之稻米，包含：秈稻（台農秈）、稈稻（台稈、台農）、與糯稻（台稈糯）等。

(二) 萃取稻米成分

將整顆稻米秤重，萃取米中成分，利用冷凍乾燥機將其萃取成分乾燥成粉末狀，計算所回收的產量，並比較這些稻米萃取成份的生物活性。

二、稻米調控免疫之活性評估

(一) 人類單核細胞條件培養液 (MNC-CM) 之製備

取自正常健康捐血者之周邊血液，收集白色單核球細胞層，調整細胞濃度分別加入不同濃度的稻米萃取成分與 PHA，另設一組對照組，置於 37°C 培養，收集各組之培養液，即為 MNC-CM。

(二) 細胞激素含量之測定

利用 ELISA 分析各組的細胞激素的含量。

三、稻米抑制腫瘤細胞生長之探討

(一)細胞株培養

人類白血病細胞株U937 與小鼠大腸癌細胞株CT26 購買自ATCC。細胞株懸浮於培養基中，於倒立顯微鏡下計算其細胞數目。調整濃度培養於 37 °C，5% CO₂生長箱中。利用生長曲線之檢定，確定呈現指數生長狀態，且存活率高達 98% 以上，方可進行後續實驗。

(二)細胞生長之抑制活性

欲測試稻米成分對腫瘤細胞的作用，本實驗包括直接的抑制作用與間接的經由免疫調控二種分析方法。於倒立顯微鏡下計算其細胞存活與死亡數目，並計算其細胞生長抑制率。

(三)MTT 分析

MTT 的方法基本上是利用細胞本身的酵素對受質的作用，產生顏色的變化，再進一步測定其吸光值。利用此原理，也可以來測定細胞的增殖反應。

四、稻米誘導白血病細胞分化之作用

(一)細胞分化之型態學變化

各組細胞收集並計算其數目後，利用細胞離心製片機將細胞固定於載玻片上，風乾並染色，於顯微鏡下觀察，依照形態學特徵將其分化之程度計算其比例。

(二)分化細胞之功能評估

利用 NBT 還原試驗，原理為 Phorbol ester 可刺激成熟的脊髓性細胞產生大量的過氧化物，此過氧化物可將水溶性黃色的 NBT 還原成為藍黑色沈澱之 Formazan。計算含有藍黑色沈澱之細胞的比例，即為 NBT 還原試驗之陽性率。

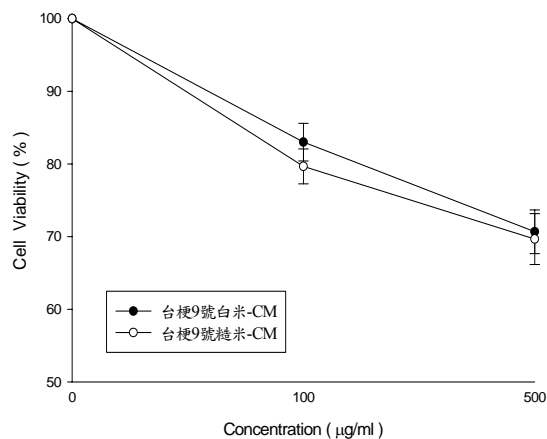
(三)細胞表面抗原的測定

將細胞分別加入單株抗體，冰浴搖盪，洗兩次，再避光加入 FITC-Ab 後洗兩次，在免疫螢光顯微鏡下，CD 陽性率。再以電腦軟體分析。

結果與討論

稻米為我國重要之主食，然而受到 WTO 的衝擊，國產稻米面臨前所未有的困境。為了提升國產稻米的競爭力，本研究評估市售稻米於抗腫瘤免疫力的比較，經過測試下列：台梗 9 號白米、台梗 9 號糙米、台中私 10 號白米、台梗 8 號發芽糙米、白糯米、黑糯米、澳洲越光米、加拿大野生米 及基因轉殖米包括 SA0415、SA0422、SA0461、SA0545、SA0545.11、SA0545.12、SA549、SA2115、SA1681、SA1683、SA552.1、TNG67、G54、UN 後，發現只有台梗 9 號白米、台梗 9 號糙米及 SA0422 具有上述活性。

a) Rice-MNC-CM treatment



(b) Rice extract treatment

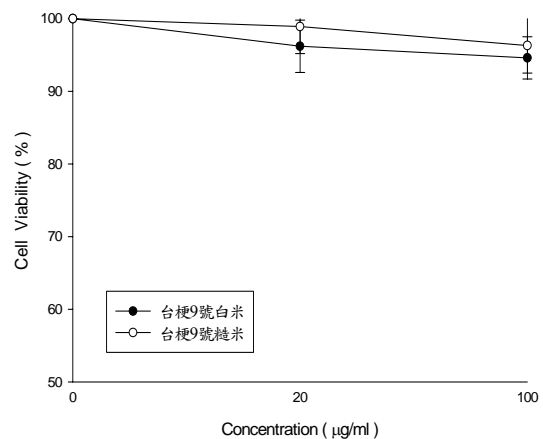
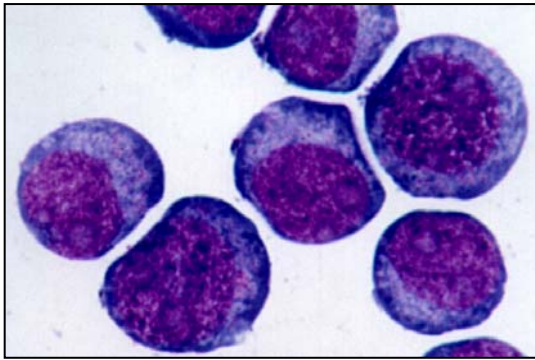


Fig. 1 Cell viability of 5 days culture of human leukemic U937 cells with treatment of (a) Rice-MNC-CM, and (b) Rice extracts.

結果顯示，利用稻米萃提取物活化人類週邊血液單核細胞

(MNC), 製備單核細胞條件培養基 (MNC-CM), 此活化後的 MNC-CM 能有效地抑制白血病 U937 細胞之增殖, 並誘導 U937 細胞分化為單核球或巨噬細胞。進一步評估, 偵測到細胞能表現巨噬細胞所特有的 CD11b、CD14 與 CD68 等細胞表面抗原, 並具有過氧化物生成與吞噬酵母菌的功能。顯示稻米萃取物對於誘導細胞之分化, 不僅是細胞型態的改變, 連細胞相關之化學作用與免疫功能皆有明顯的提升。

(a) Immature blast



(b) Mature

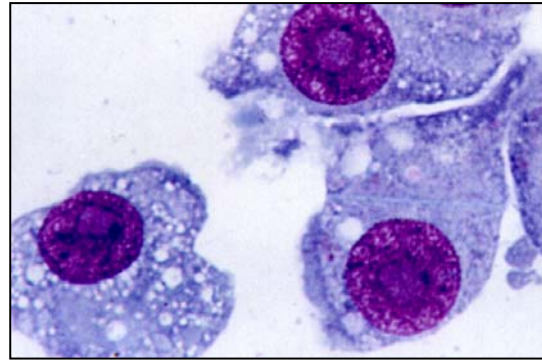


Fig. 2 Morphology of human leukemic U937 cells. (a) Immature blast, and (b) Macrophage.

Table 1. Level of TNF- α in conditioned media collected from the culture of 台梗九號白米 and 台梗九號糙米-treated MNCs

| Concentration ($\mu\text{g/ml}$) | Level of TNF- α (pg/ml) | |
|------------------------------------|--------------------------------|----------|
| | 台梗九號白米 | 台梗九號糙米 |
| 0 | 65.8 | 59.6 |
| 100 | 422.5 | 546.7 |
| 500 | 1025.7 * | 1238.3 * |

藉此研究提供我們對於稻米飲食的信心，特別是國產稻米無論是營養成分，或是抗腫瘤免疫力功能，皆對國人的健康有很大的助益。建議未來繼續鼓勵稻米之相關研究，並加強國產稻米的宣導，提升我國稻米的競爭力。

重要性

- (1) 評估市售稻米，特別是不同品種的稻米對人體抗腫瘤免疫功能的影響。更有助於飲食習慣漸趨於速食食品的現代人，回歸於健康的米食文化。
- (2) 提供農民在種植稻米與消費者選購良質米時，除了口感、外觀等因素外，還可以從稻米活性來做選擇，提升我國稻米的競爭力。
- (3) 本計畫結合了傳統農業與現代醫學之研究，可提供國內發展農產品之另一個思考模式。

Reference

1. Noda H. Koizumi Y. Sterol biosynthesis by symbiotes: cytochrome P450 sterol C-22 desaturase genes from yeastlike symbiotes of rice planthoppers and anobiid beetles. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*. 33(6):649-58, 2003.
2. Paranagama PA. Abeysekera KH. Abeywickrama K. Nugaliyadde L. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. *Letters in Applied Microbiology*. 37(1):86-90, 2003.
3. Rama Rao SV. Praharaj NK. Ramasubba Reddy V. Panda AK. Interaction between genotype and dietary concentrations of methionine for immune function in commercial broilers. *British Poultry Science*. 44(1):104-12, 2003.
4. Qureshi AA. Sami SA. Salser WA. Khan FA. Dose-dependent suppression of serum cholesterol by tocotrienol-rich fraction (TRF25) of rice bran in hypercholesterolemic humans. *Atherosclerosis*. 161(1):199-207, 2002.
5. Katyama M. Yoshimi N. Yamada Y. Sakata K. Kuno T. Yoshida K. Qiao Z. Vihn PQ. Iwasaki T. Kobayashi H. Mori H. Preventive effect

- of fermented brown rice and rice bran against colon carcinogenesis in male F344 rats. *Oncology Reports*. 9(4):817-22, 2002.
6. Takechi T, Nakano K, Uchida J, Mita A, Toko K, Takeda S, Unemi N, Shirasaka T. Antitumor activity and low intestinal toxicity of S-1, a new formulation of oral tegafur, in experimental tumor models in rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997;39:205—211.
 7. Effect of *Cordyceps Sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. Yu-Jen Chen, Ming-Shi Shiao, Shih-Sheng Lee, Sheng-Yuan Wang. *Life Science* 60(25): 2349-59, 1997. (SCI)
 8. Protective effect of tetrandrine on normal human mononuclear cells against ionizing irradiation. Yu-Jen Chen, Mang-Lin Tu, Hsiang-Chi Kuo, Kuo-Hua Chang, Yuen-Liang Lai, Chong-Hung Chung, Mong-Liang Chen. *Biol. Pharm. Bull.* 20(11): 1160-64, 1997. (SCI)
 9. Induction of apoptosis in human leukemic U937 cells by tetrandrine. Yuen-Liang Lai, Yu- Jen Chen, Tsu-Yen Wu, Sheng-Yuan Wang, Kuo-Hua Chang, Chong-Hung Chung, Mong- Liang Chen. *Anti-Cancer Drugs* 9(1): 77-81, 1998. (SCI)
 10. The effect of Tetrandrine and extracts of *Centella asiatica* on acute radiation dermatitis in rats. Yu-Jen Chen, Yu-Shiang Dai, Be-Fong Chen, Anita Chang, hung-Cheng Chen, Ying- Chung Lin, Kou-Hwa Chang, Yuen-Liang Lai, Chang-Hung Chung, Yu-Jun Lai. *Biol. Pharm. Bull.* 22 (7) 703-6, 1999. (SCI)
 11. Comparison of anti-leukemic immunity against U937 cells in atopic asthmatics and healthy controls. Yu-Jen Chen, Shi-Dar Shyur, C.Y. Wang, K.Y. Huang, Y.K. Chao, Pei- Gene Chen. *Neoplasma* 46(5): 304-8, 1999. (SCI)
 12. Comparison of anti-leukemic immunity against U937 cells in endurance athletes versus sedentary controls. Jason Chiang, Mong-Liang Chen, Yu-Wen Huang, Ai-Gen Huang, Yu- Jen Chen*. *International Journal of Sports Medicine* 21: 602-7, 2000. (SCI)
 13. Potential role of tetrandrine in cancer therapy. [review] Yu-Jen Chen. *Acta Pharmacol. Sin.* 23(12): 1102-1106, 2002. (SCI).
 14. Liao HF, Chen YW, Liu JJ, Hsu ML, Shieh HJ, Liao HJ, Shieh CJ, Shiao MS, Chen YJ. The inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion and metastasis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:7907-12, 2003. (SCI)