

編號：CCMP95-RD-213

中草藥材對急性發炎動物 細胞激素基因調控之探討

林璧鳳
台灣大學

摘要

穿心蓮 (*Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees) 為爵床科一年生草本植物的全草及葉，有清熱、解毒之效。本實驗探討以分配萃取進行分離純化所得之穿心蓮乙酸乙酯層 (EtOAc, EA) 區分物，對內毒素 (lipopolysaccharide, LPS) 致 BALB/cJ 小鼠急性發炎時所扮演的角色。實驗步驟為將 10 ~ 12 週大之 BALB/cJ 雌鼠分為 LPS 組、PDTC 組、穿心蓮 EtOAc 萃取物高劑量組 (3.125 mg/kg BW)、中劑量組 (1.5625 mg/kg BW)、低劑量組 (0.78125 mg/kg BW) 管餵一週後，以 LPS (15 mg/kg BW) 進行腹腔注射，6 小時後犧牲，分析血清、腹腔巨噬細胞中促發炎性細胞激素含量，以及腦部、肺臟組織中促發炎性細胞激素 mRNA 表現量。結果顯示穿心蓮萃取物可顯著降低發炎小鼠血清、腹腔巨噬細胞中促發炎性細胞激素 TNF- α 、IL-12p40 和化學趨化物質 MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2)、Nitric oxide (NO) 等含量，並降低腦組織中 MIP-2, iNOS 及肺組織中 MIP-2 mRNA 表現量。肺臟組織切片 H.E. stain 結果亦發現穿心蓮 EtOAc 萃取物組，減少肺臟中巨噬細胞浸潤及發炎現象。且以 HPLC 進行定量分析，結果顯示穿心蓮乙酸乙酯層區分物含有主成份 andrographolide 為 250 mg/g，因此更進一步將穿心蓮乙酸乙酯層區分物以不同極性流洗，以純化分離活性成份，實驗結果經 $^1\text{H-NMR}$ 測定已鑑定出經由 50% EA/Hexane 流洗得到純化合物 14-deoxy-11,12-didehydrographolide，而 100% EA/Hexane 流洗得到已知為穿心蓮之主成份的純化合物 andrographolide。

關鍵詞：穿心蓮、敗血症休克、BALB/cJ 小鼠

編號：CCMP95-RD-213

Effects of Chinese medicinal herbs regulate cytokines gene expression in inflammatory mice

Bi-Fong Lin
National Taiwan University

ABSTRACT

Lipopolysaccharide (LPS) has been known to induce endotoxin shock. The effect of traditional Chinese medicine herb (TCMH), *Andrographis paniculata* on septic shock *in vivo* was explored. BALB/cJ mice were orally received the treatment of EtOAc fraction extract of *A. paniculata* at 0.78125, 1.5625 and 3.125 mg/kg BW for one week, then were i.p. injected with LPS (15 mg/kg BW). Mice serum were detected cytokines level and their life span were recorded. The results revealed that *A. paniculata* EtOAc fraction extract can inhibit serum and peritoneal exudate cells TNF- α , IL-12p40, MIP-2 and NO production ($p < 0.05$) and inhibition brain, lung MIP-2 mRNA expression, brain iNOS mRNA expression. The content of andrographolide in EtOAc fraction of *A. paniculata* ethanol extract is 250 mg/g was identified in the HPLC chromatogram. These finding suggest that the major components of *A. paniculata* are the diterpene lactones of which andrographolide that can abrogate the septic shock induced by LPS.

Keywords : *Andrographis paniculata*, septic shock, BALB/cJ mice

壹、前言

在哺乳動物的免疫系統中，轉錄因子 NF- κ B 會因細胞對感染、發炎而迅速活化，它在鄰近細胞因感染而分泌出一些發炎性細胞激素如 TNF- α 、IL-6 時，也會被活化 (1)。因此調控此訊息傳遞路徑被視為是尋找有用天然藥物來抗炎或防癌的重要標的，而具抗氧化與抗發炎活性的天然植物化合物，一般被認為其具有化學預防活性之潛力。

五千年文化所孕育出的中醫藥學，在近年來追求學理驗證的努力下，已逐漸受到西方的重視與肯定。中草藥是一個天然的、巨型的化學分子庫，作用常具有不同結構層次的高度複雜性，其成份的多樣化必然導致作用方式和途徑的多樣化。因此，利用基因技術篩選新的有效成份，不僅可彌補傳統方法的缺陷，也能在中草藥新藥研究領域，建立全新的理念和新穎的研究手法，使中草藥朝現代化發展。而在中草藥的篩選模式中，轉錄因子及其可調控的啟動子區域皆是常被作為篩選的分子指標。因此，中草藥對免疫反應的調控機轉若能藉由影響細胞激素的基因表現，則建立篩選平台，便能更有效的從種類繁多的中草藥篩檢出具調節免疫力、促進健康之中草藥，將有助於保健食品之應用與中藥西醫化的藥物開發。

目前，許多保健產品多以「增強免疫力」作為產品之機能性訴求。例如有些植物性膳食營養補品，稱之為營養藥劑 (Nutraceutical) 的最新形態之膳食補品，是將植物中對人體健康有益之化學成份萃取而得，例如：算素、辣椒素、甘草素等，而多需稱根據研究有提升免疫力等效能。又有報導有些天然之營養補品包括藥用植物如銀杏、人蔘、大蒜、等，若每日食用可提升免疫力，降低致癌危險性、延長壽命等預防疾病功能。而在美國十大暢銷藥草中，多種植物例如紫錐花 (Echinacea) 宣稱可強化免疫系統，在寒冷季節是被廣用來預防感冒的藥草。然而因為免疫系統為人體重要的防禦系統，基本上受到體內各個系統調節而達平衡，何種指標代表「增強免疫力」尚無定論，又宣稱的研究報導在免疫相關實驗上之數據並未完整。免疫相關指標所代表的意義可能因人的身體健康狀況而異，不可不慎。由於此類保健食品的問題，使得政府單位必須尋求管理之道，以維護國人利益與健康。「健康食品管理法」的推行，促使科學證據的探索更為重要，以便對此類食品納入管理。

五千年文化所孕育出的中醫藥學，在近年來追求學理驗證的努力下，已逐漸受到全世界的重視與肯定，目前正是中醫藥學蓬勃發展的

時代。然而，尚有許多中醫藥典記載的中草藥與功能，如許多文獻記載，大多數扶正中藥，屬於免疫促進劑，而扶正中藥又叫滋補強壯藥，是對正氣虛而設的，據中醫辨證，正氣虛有氣虛（肺脾氣虛）、血虛（心脾血虛或肝脾血虛）、陰虛（腎陰虛或肝腎陰虛）、陽虛（腎陽虛或脾腎陽虛）等證。按中藥補氣、補血、補陰、補陽的功能分類，討論其免疫調節作用。總之，補益肺衛之氣的藥如人蔘、黃耆、健脾益氣的黨蔘、靈芝、白朮、茯苓、薏仁、以及菇菌類都有調節免疫系統的功能。常用補血藥如當歸、雞血藤、阿膠、熟地等皆可調節免疫。補陽藥淫陽藿、菟絲子、肉蓯蓉、巴戟天、補骨脂、鎖陽、肉桂等都具免疫調節作用。補陰藥枸杞子、山茱萸、五味子、女貞子、銀耳、冬蟲夏草、桑寄生、黃精、何首烏、石斛等也都有免疫調節作用(2, 3)。綜上所述，補氣、補血、補陰、補陽藥多可提高免疫功能，屬於中藥免疫促進劑。

另外免疫功能出現過高的免疫反應，則會造成生物體損傷而導致免疫性疾病。因此需要抑制此種過度反應，使之趨於正常，達到免疫平衡，亦即中醫的陰陽平衡。而免疫反應是在抗原作用下各種免疫細胞成份相互作用的結果，表現為抗體形成或特異性免疫活化細胞的產生，因此；清除抗原或抑制抗體，或抑制活性免疫細胞的產生，均可達到抑制免疫反應之目的，如清熱解毒類藥物穿心蓮、板藍根、銀花、大青葉、魚腥草、黃連、黃芩、白花蛇舌草、梔子、蒲公英、龍膽草等都可抑制免疫反應，一般說來，去邪類中藥，主要起抑制免疫的作用。所以在中醫辨證原則指導下，調節陰陽，即可從而調節免疫。總之扶正藥主要發揮促進細胞免疫作用，去邪藥主要抑制體液免疫，相輔相成，以增強免疫反應，達到免疫平衡。仍待科學方法加以確定。而建立篩選平台，可否更有效的從種類繁多的中草藥篩檢出調節免疫力、促進健康的中草藥？是值得探討的問題。

免疫系統專一性泛指 T cell 和 B cell 的反應，一般而言，當病原入侵時，會先引起非專一性的免疫反應，包括巨噬細胞及自然殺手細胞。巨噬細胞不需特異性辨識，即可藉由吞噬作用除去外來的入侵者，故為生物體內活化免疫系統、抵抗病原侵略的重要成員之一，亦為生物體之第一道防線，以抵抗外來之感染。巨噬細胞更可由 T 輔助 (T helper, Th) 細胞分泌的細胞激素，Th 細胞可再依其分泌的細胞激素做功能性的區分，Th1 亞群細胞分泌 IFN- γ 及 IL-2，Th1 細胞激素反應伴隨著免疫引發機制而生，這些機制由細胞內的毀損或細胞外細菌、病毒等病原生物引起，藉此刺激細胞毒殺 T 淋巴細胞、NK 細胞

和巨噬細胞的活化作用，並且產生補體結合抗體，Th1 細胞激素同時和許多免疫調節疾病有關，包括 type 1 型糖尿病、類風濕性關節炎、多發性硬化症 (4)。

相對的，Th2 細胞激素反應所伴隨著的免疫機制可促成腸內寄生生物除去及涉及過敏不適症的發病原理。Th2 亞群細胞則分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13，主要作用於清除細胞外病原菌及寄生蟲的免疫反應及過敏反應的調控，為發炎反應的媒介物及革蘭氏陰性菌細胞壁的產物內毒素(lipopolysaccharide, LPS) 所活化。發炎和免疫反應廣泛的由細胞激素調控，常常影響免疫系統中的細胞和免疫反應引起的非免疫細胞的產生、生存和作用。雖然目前已有超過 100 種不同的細胞激素被發現，但其中的 IFN- γ 、IL-4 卻是對免疫學特別重要的，IFN- γ 可藉由多種機制，殺死病原體並且抑制 Th2 細胞的分化及許多 Th2 細胞激素的作用。相反的，IL-4 具有多樣的過敏前驅物影響，也會刺激 Th2 的分化，並且抑制 IFN- γ 的產生和影響 (5)。因此，測量 IFN- γ 和 IL-4 的產生，能有助於描述一個免疫反應或免疫疾病，因為它們分別是阻抗 Th1 和 Th2 反應的初始細胞激素。

細胞激素是一種低分子量 (8~25 kDa) 的醣蛋白，是多樣化的分子，能傳遞訊息給淋巴球、吞噬細胞與體內之其它細胞，調節所有重要的生物性作用，如細胞生長、細胞活化、發炎反應、組織修復、纖維化以及型態發育的過程。如干擾素 (interferon- γ , IFN- γ) 則由一些被活化之 T 細胞所分泌，IFN- γ 能使未感染的組織細胞抵抗病毒感染，且 IFN- γ 可在感染後不久製造產生，是抵抗多種病毒感染的第一道防線。IFN- γ 為巨噬細胞最有效活化者之一，活化的巨噬細胞增加了吞噬力、殺死微生物和病原的能力、活化 T cell 的能力、和分泌發炎性細胞激素 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及 nitric oxide (NO) 的能力。而 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 為多功能的細胞激素，在調節免疫反應、促進血球新生及增強發炎反應方面扮演重要地位 (6, 7)。但在人類及動物實驗中，由 LPS 導致的休克症狀有發燒、低血壓、凝血及多重器官衰竭的表現。而根據近來報告指出，NO 與發炎有關的細胞激素如 TNF- α 和 IL-6，於 LPS 致毒性動物中的許多細胞功能上，扮演一個重要調節者的角色 (8, 9)。

而 TNF- α 是多功能的細胞激素，能誘導細胞進行細胞凋亡 (apoptosis)，激發發炎反應清除病原，也能活化轉錄因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 以刺激組織再生。轉錄因子 NF- κ B 家族，主要由 NF- κ B 1 (p105/p50)、NF- κ B 2 (p100/p52)、RelA (p65)、RelB

和 c-Rel (Rel) 以 homodimer 或 heterodimer 型式所組成，而在大多數細胞中以 RelA (p65)/p50 為主要存在型式，故又稱為 NF- κ B。平時處於未受刺激狀態的 NF- κ B 存在於細胞質，和抑制性的蛋白質 (I κ B) 相結合，一旦受到刺激後會進入細胞核，促進相關的基因表現如 iNOS。目前已知有許多和發炎有關的基因和細胞結合因子前的 promoter 都具有 NF- κ B 結合區域 (10)。而研究發現綠茶中的生物活性因子 EGCG 或薑黃中的 curcumin 皆可透過抑制 LPS 誘發的 I κ B 磷酸化，以抑制 NF- κ B 進入細胞核啟動基因的表現，因此推測 EGCG 或 curcumin 可能具有抗發炎的能力 (11)。

因此，如何利用細胞激素 INF- γ 和 3 \times - κ B-tk 的基因表現調控機制，來建立篩檢具調節免疫力的食材，是值得研究開發的課題。另外，日常飲食中有哪些飲食營養因子或食藥兼用之中草藥可能是透過影響生物體內 T_H1、T_H2 免疫反應之平衡，至今所知不多，且尚未有快速有效的科學方法可進一步有效評估。為了探討此一問題，本研究試圖以系統性之篩選模式從日常飲食中之食材去找尋具有調節免疫反應之中草藥。研究策略乃利用系統生物學進行初代細胞及動物體模式驗證中草药調節免疫的一致性，以驗證迅速篩選之工具之實用性，同時探討中草药對整體免疫調節的作用機制。本計畫之完成俾能利於篩選中草药的抗發炎活性或影響免疫反應之研究，以期建立一個可供天然物、中草药進行大量篩檢的技術平台。

貳、材料與方法

一、中草药材之中藥飲片萃取

以 95% 乙醇 (六合化工) 進行兩次 50°C 熱萃取 3 小時，粗萃取液進行過濾、減壓濃縮 (Vacuum Controller VC-7600. BUCHI 461 water Bath)，得乙醇粗萃取物，先以 90% EtOH/H₂O 回溶後，再以 Hexane 進行分配萃取，即可得 Hexane 層和 90% EtOH/H₂O 層；90% EtOH/H₂O 層經減壓濃縮，以水回溶後，再以 EtOAc 進行分配萃取，即可得 EtOAc 層和 H₂O 層。而本實驗根據之前一系列的實驗 (CCMP93-RD-052, CCMP94-RD-026, CCMP95-RD-105) 所篩選出 EtOAc 層之穿心蓮做為後續動物活體試驗之依據及管餵劑量之參考。

二、BALB/cJ 雌鼠之飼養

自台大動物中心購入四週大之 BALB/cJ 雌鼠約 60 隻，個別飼養於不鏽鋼網籠中，自由攝食飼料和飲水，動物房溫度控制在 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，光照循環各為 12 小時，飼養至 10~12 週大時進行實驗。

三、BALB/cJ 雌鼠 LPS 致急性發炎動物實驗

將 10 ~ 12 週大之 BALB/cJ 雌鼠，管餵中草藥萃取物 0.78125 ~ 3.125 mg/kg 為期一週，進行腹腔 LPS (15 mg/ml) 注射，分別於注射後 2 和 6 小時，進行採血和犧牲，血液靜置 3 小時後，以 12,000 rpm, 4°C ，離心 20 分鐘，取血清於 -70°C 備用，以分析細胞激素含量，以 ELISA kits (R&D system, USA ; Pharmingen, USA) 分析 TNF- α , IL-12p40, MIP-2, total NO 等含量。

四、細胞培養基與藥品

1. TCM™ (serum replacement 50 x concentrate, CELOX, Cat. No.1002)
2. HyQ® RPMI-1640 medium (Hyclone®, Cat. No. SH30255.01)
3. Antibiotic-Antimycotic (PenicillinG sodium-Streptomycin sulfate-Amphotericin B 三合一抗生素, GIBCO™, Invitrogen, Cat. No. 15240-062)
4. TCM-RPMI-1640 medium: 於 RPMI-1640 medium 中加入 10 ml TCM 及 2.5 ml 三合一抗生素。
5. HBSS buffer: 將 HBSS (ATLANTA, Cat. #R32201) 粉末溶於 1L 二次去離子水中，經 121°C ，30 分鐘滅菌冷卻後，加入 2.5 ml 三合一抗生素，再以 7.5% NaHCO_3 調 pH 值，至深紅色。
6. RBC ACK lysis buffer: 將 0.15 M NH_4Cl , 0.1 mM Na_2EDTA ，1 mM KHCO_3 溶於 1L 二次去離子水中，經 121°C ，30 分鐘滅菌。
7. Lipopolysaccharide (LPS, Prod. Num. L2654, Sigma®)
8. Interferon-Gamma (IFN- γ , Prod. Num. I3275, Sigma®)
9. Concanavalin A (Con A, Prod. Num. C5275, Sigma®)
10. 75% 酒精

五、BALB/cJ 雌鼠初代腹腔巨噬細胞 (peritoneal macrophages) 之培養

將 10 ~ 12 週大之 BALB/cJ 雌鼠，管餵中草藥萃取物 0.78125 ~ 3.125 mg/kg 為期一週，進行腹腔 LPS (15 mg/ml) 注射，於注射後 6 小時，將急性發炎小鼠以 CO_2 窒息死亡，在小鼠體表噴灑 75% 酒精，

剪開腹腔外側皮毛，用手呈對角線撕開，使露出整個腹腔，以鑷子輕挑起腹膜，以 5 ml 針筒緩緩注入 HBSS buffer，晃動小鼠身體後，再以 5 ml 針筒將腹腔細胞抽出，反覆 3 次後，將所得約 10 ml 之細胞懸浮液以 1500 rpm 離心 10 分鐘，以 HBSS buffer 洗淨細胞，以 1 ml TCM-RPMI-1640 medium 懸浮細胞，注入 48 well plate (Nunc™) 中，調整細胞密度為 3×10^6 cells/well，於 5 % CO₂, 37°C 培養箱培養 48 小時後收集培養液，於 -70°C 保存，以進行 TNF- α , IL-12p40, MIP-2, total NO 等含量分析。

六、促發炎細胞激素 mRNA 表現量之分析

以 RT-PCR 定量腦組織中 MIP-2 (sense 5'-TGGGTGGGATGTAGCTAGTTCC-3', anti-sense 5'-AGTTTGCC TTGACCCTGAAGC C-3'), iNOS (sense 5'-CTGCAGCACTTGGAT CAGGAACCTG-3, anti-sense 5'-GGGAGTAGC CTGTGTGCACCTG GA A-3') 含量，及肺臟組織中 MIP-2 含量，並以 β -actine (sense 5'-ATGGAG AAAATCTGGCACCA-3', anti-sense 5'-AGT CCATCAC GATGCCAGTG-3') 作為 internal control。

七、非特異性免疫反應

吞噬細胞活性：

吞噬細胞可以分別測定含中性白血球 (neutrophils) 的顆粒球 (granuocytes) 或是單核球 (monocyte) 的吞噬能力，目前可以分別利用吞噬細菌如 *E. coli*、yeast 等方法來加以測定。也可以利用已標記好的 *E. coli* (如螢光)，在細胞吞噬後利用螢光流體計數儀來加以分析。實驗步驟為，將取得之血液各 50 μ l 置於兩管無菌管中冰浴，再加入冰浴中的 10 μ l 已標定的定量菌 *E. coli*-FITC 後，分別在 37°C 和 0°C (空白組) 置放 30 分鐘。然後加入 50 μ l 的 Quenching solution 後，再加入 1 ml 的 washing solution。以 2000 rpm，4°C 離心 5 分鐘，去除上清液。此時加入 100 μ l DNA staining solution 後，以 flow cytometric analysis 分別區分出顆粒球區間與單核球區間，而後以螢光強度計算吞噬細胞吞噬菌體之百分率，以比較巨噬細胞吞噬活性。

八、統計分析

實驗結果均以平均值 \pm 標準偏差 (Mean \pm SD) 表示。以 Student's *t*-test 來檢定兩者間之顯著差異， $p < 0.05$ 即視為有顯著差異 (在本次

實驗中以*表 $p < 0.05$; **表 $p < 0.01$; #表 $p < 0.001$) ; 相關性分析以 Pearson' Correlation , $p < 0.05$ 即視為有顯著差異 , 統計分析係用 SAS 軟體 (SAS/STAT version 8.2; SAS Institute, Cary, NC, USA) 。存活率分析以 Cox's proportional hazards regression test 檢定兩組間之差異顯著性與相對危險性 , 係用 STATA 軟體 (STATA version 9.0; Stata corp., Texas, USA) 。

參、結果

(一) 穿心蓮 EtOAc 萃取物對 LPS 致急性發炎小鼠存活率之影響

本實驗首先於 1 小時前 , 先行腹腔注射抗發炎藥劑 50 mg/kg body weight PDTC (a metal chelator and antioxidant which inhibits I κ B-ubiquitin ligase activity) , 接著再注射 LPS (15 mg/kg BW) 做為負控制組 , 由圖 1 之結果發現 , PDTC 組可顯著延長發炎小鼠之存活率 , 約為 73 % ($p < 0.0001$) 。另外 ; 亦發現低、中、高劑量組之穿心蓮 EtOAc 萃取物組皆可顯著延長發炎小鼠之存活率 , 約為 64 % ($p < 0.05$) ; 但極高劑量組反而降低發炎小鼠之存活時間。

(二) 穿心蓮 EtOAc 萃取物對 LPS 致急性發炎小鼠血清、腹腔細胞中 TNF- α 含量之影響

本實驗結果發現抗發炎藥物 PDTC 可顯著降低 LPS 致急性發炎小鼠血清中 TNF- α 之含量 , 且穿心蓮 EtOAc 萃取物低、中劑量組皆可顯著降低 2 小時血清(A) TNF- α 含量 , 亦可降低腹腔細胞(B)中 TNF- α 含量 , 如圖 2 。

(三) 穿心蓮 EtOAc 萃取物對 LPS 致急性發炎小鼠血清、腹腔細胞中 IL-12p40 含量之影響

本實驗結果發現穿心蓮 EtOAc 萃取物中、高劑量在 LPS 注射後 2 小時 , 皆可顯著降低發炎小鼠血清中 IL-12p40 含量 ($P < 0.05$) , 如圖 3 所示。

(四) 穿心蓮 EtOAc 萃取物對 LPS 致急性發炎小鼠血清、腹腔細胞 MIP-2 分泌量及腦、肺組織中 MIP-2 mRNA 表現量之影響

本實驗結果發現穿心蓮 EtOAc 萃取物中劑量組在 LPS 注射後 2 小時 , 可顯著降低血清 MIP-2 含量 ($p < 0.05$) , 且亦可顯著降低腹腔細

胞中 MIP-2 分泌量 ($p < 0.05$)，同時亦發現能顯著降低發炎小鼠腦、肺臟組織中 MIP-2 mRNA 表現量，且減少肺臟組織中發炎細胞聚集，如圖 4 所示。

(五) 穿心蓮 EtOAc 萃取物對 LPS 致急性發炎小鼠血清、腹腔細胞 NO 分泌量及腦組織中 iNOS mRNA 表現量之影響

在本實驗中，我們進行 LPS 致急性發炎小鼠腦部組織中促發炎性細胞激素基因表現量之探討，實驗結果發現穿心蓮 EtOAc 萃取物中劑量組在 LPS 注射後 6 小時，可顯著降低血清 NO 含量 ($p < 0.05$)，且亦可顯著降低腹腔細胞中 NO 分泌量 ($p < 0.05$)，同時亦發現能顯著降低發炎小鼠腦組織中 iNOS mRNA 表現量，如圖 5 所示。

(六) 穿心蓮 EtOAc 萃取物對吞噬細胞活性的影響

管餵 BALB/c 雌鼠一週後，由血液所測得吞噬細胞活性，主要分析吞噬細胞比例，和在 37°C 時活化的百分比。由表 1 顯示餵食穿心蓮 EtOAc 萃取物的吞噬細胞在 37°C 時的顆粒球細胞數目比例 (Granulocyte %)，及其吞噬活性 (Phagocytic activity) 與未餵食組無顯著差異，顯示穿心蓮 EtOAc 萃取物降低發炎小鼠血清中促發炎性細胞激素 TNF- α 、IL-12p40 和化學趨化物質 MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2) 及 Nitric oxide (NO) 等含量並不影響其血液吞噬細胞的活性。

(七) 穿心蓮 EtOAc 萃取物活性成份分離純化

本實驗以 HPLC 進行定量分析，結果顯示穿心蓮乙酸乙酯層區分物含有主成份 andrographolide 為 250 mg/g (圖 6)；因此更進一步將穿心蓮乙酸乙酯層萃取物以不同極性 (100% Hexane, 5% EA/Hexane, 10% EA/Hexane, 20% EA/Hexane, 30% EA/Hexane, 50% EA/Hexane, 70% EA/Hexane, 100% EA/Hexane, 10% Methnal/EA, 30% Methnal/EA, 50% Methnal/EA) 流洗，以純化、分離活性成份。實驗結果經 $^1\text{H-NMR}$ 測定已鑑定出經由 50% EA/Hexane 流洗得到純化合物 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide 如圖 7 所示；而 100% EA/Hexane 流洗得到已知為穿心蓮之主成份的純化合物 andrographolide 如圖 8 所示。

肆、討論

以注射細菌內毒素的方式，誘發急性期反應是經常採用之急性發炎動物模式之一，而發炎反應會活化巨噬細胞、嗜中性細胞與內皮細胞，釋放大量發炎介質而發生局部和全身性作用，其中內毒素血症所造成之敗血性休克 (septic shock) 是急性發炎反應之一，為生物體感染帶有內毒素的革蘭氏陰性菌或黴菌 (6)。Meisner 等人 (12) 研究指出水溶性低分子量的抗氧化劑 PDTC 可有效抑制 J774A.1 細胞、雌性 NMRI 小鼠腹腔巨噬細胞和人類全血，在 LPS 刺激下 IL-6 之分泌量，但對 TNF- α 之分泌量則只有人類全血具有抑制效果；另外，對於雌性 NMRI 小鼠預先腹腔注射 PDTC 30 分鐘後，再給予 LPS 注射則具有顯著延長生命期及存活率 (48% compared to control 20%) 之作用，此結果和本實驗結果相同。

在 LPS 誘導的發炎反應中，腫瘤壞死因子 (TNF- α) 是一個最早期被誘發的重要細胞激素，主要由巨噬細胞和自然殺手細胞所分泌，能直接毒殺腫瘤細胞，及誘導單核白血球及巨噬細胞分化、活化巨噬細胞、刺激補體及凝血系統、誘導感染區域血管表達黏附分子，促使內皮細胞產生血小板活化因子，以催化血液凝結及局部血管阻塞，防止病原菌擴散，但當其產生量不足或過量時反而會傷害宿主，許多疾病如敗血症、風濕性關節炎、氣喘等皆與 TNF- α 的過量形成有關。TNF- α 亦能藉由活化 NF- κ B 來啟動下游基因的表現，以調節細胞的分化及增生 (13)。

IL-12 是一個由 p35 和 p40 兩個 subunits 所組成之 70-kDa-heterodimeric 細胞激素，主要由巨噬細胞、單核球和樹突狀細胞所製造。IL-12 可活化自然殺手細胞，促進自然殺手細胞製造 IFN- γ ，活化巨噬細胞 (14)。

化學趨化物質 (chemokines) 是一群小分子胜肽，由 70 ~ 130 個胺基酸所組成，分子量約 6 ~ 14 kDa，依其 N-端最後兩個 cystein 排列方式，可分為四類：C, CC, CXC, CX3C，係指一群具有結構相似性、低分子量的細胞激素，可刺激白血球移動和調控白血球由血液移動至發炎組織，其中 CXCL2 (macrophage inflammatory protein-2; MIP-2) 分子量約 6 kDa，常經由 LPS 刺激時由巨噬細胞所釋放 (15)。且有研究顯示 MIP-2 基因上有轉錄因子 NF- κ B 的結合位置 (16)。Tsai 等人研究顯示，穿心蓮內酯可透過抑制巨噬細胞經補體 (C5a) 刺激引起的 ERK1/2 和 PI3k/Akt 訊息傳遞路徑以抑制化學趨化性移動 (17)。另

外，已有研究顯示血液中高濃度之促發炎性細胞激素亦會通過血腦障壁 (Blood Brain barrier) 影響中樞神經系統 (18)。

巨噬細胞內的 NO 是經誘導後才活化，故又稱為誘導型一氧化氮合成酶 (inducible NOS, iNOS)，目前已知與細胞激素相關的訊息傳導機制，如 MAPKs、JAK 以及 NF- κ B 等在炎症相關細胞激素或 LPS 刺激後均會誘導 iNOS 的表現。且研究顯示當發炎反應進行過程中，在肝臟內亦會造成急性期蛋白的製造，且腦部對於發炎反應所引起之紅、腫、熱、痛亦扮演重要角色，研究顯示：血液中高濃度之促發炎性細胞激素會經由迷走神經通過血腦障壁，進而影響腦部組織中細胞激素之表現 (18)。而 Chiou 等人 (19,20) 將 RAW264.7 巨噬細胞與 LPS 和 IFN- γ 及穿心蓮內酯 (andrographolide) 共同培養 24 小時後，測量 NO 分泌量，發現隨穿心蓮內酯添加濃度增加，NO 含量隨之下降。NO 為巨噬細胞所分泌，具毒殺寄生蟲、細菌與病毒等作用，並且主導發炎反應中血管舒張的反應。另外，過量 NO 之生成，與活性氧分子反應會更進一步形成具有毒性之活性氮化合物，進而攻擊一些生物分子，例如血基質蛋白質、含硒蛋白、脂質及 DNA，故被認為與一些慢性發炎性疾病及某些癌症有關。當這些發炎介質適量的表現，可促進免疫反應，以避免感染的擴大；然而，過量或持續生成則會引起紅、腫、熱、痛等炎症發生時常見的生理不適，甚至造成組織傷害。也因此，近年來抗發炎的藥物或食物逐漸引起重視，希望藉由減少不當的發炎反應以延緩慢性疾病的生成。

伍、結論與建議

中草藥已在華人社會使用超過兩千年以上之歷史且治癒無數疾病，並有許多著名之本草著作流傳至今。但就治療人類疾病而言，相較於合成藥物，天然草藥往往欠缺直接之科學實驗證據來支持其治病或調節身體機能之功用與機轉，因而阻礙了天然草藥的被接受性與發展；而目前由於合成藥物面臨發展瓶頸，人類開始尋求由植物來源之可能用於保健或治病的良方，也使得中草藥受到國際社會與華人的重新重視。而由本實驗結果顯示，具清熱、解毒之穿心蓮 EtOAc 萃取物，可顯著延長發炎小鼠之存活率，與其血清、腹腔細胞中 TNF- α 、IL-12 p40、MIP-2、NO 含量顯著降低，及腦、肺臟組織中 MIP-2、iNOS mRNA 表現量降低具有相關性，且經單離、鑑定出 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide 和 andrographolide 為其功能性成份因子。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP95-RD-213 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

1. S. Gerondakis, R. Grumont, I. Rourke and M. Grossmann: The regulation and role of Rel/NF- κ B transcription factors during lymphocyte activation. *Curr. Opin. Immunol.*, (1998) **10**: 353-359.
2. 行政院衛生署中華藥典中藥集編修小組：中華中藥典，行政院衛生署編印，台北市 (2004)。
3. 陳榮福、顏焜熒：中藥藥理學，國立中國醫藥研究所，台北市 (1991)。
4. 鍾金湯、劉仲康。細胞免疫學大師—梅契尼科夫，科學發展月刊 (2005) 385: 50-57。
5. Ginsburg, I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *Lancet infectious Diseases*. (2002) 2(3): 171-179.
6. Annane D, Bellissant E, Cavaillon, JM. Septic shock. *Lancet*. (2005) 365: 63-78.
7. Gins BI. Overview of local and systemic acute inflammatory response. *Lancet infectious disease*. (2002) 2(3): 171-179.
8. LoYC, Tsai PL, Huang YB, Shen KP, Tsai YH, Wu YC, Lai YH. and Chen IJ. San-Huang-Xie-Xin-Tang reduces lipopolysaccharides-induced hypotension and inflammatory mediators. *J. of Ethnopharmacology*. (2005) 96: 99-106.
9. Rao VSN, Paiva LA F, Souza MF, Campos AR, Ribeiro RA, Brito GAC, Teixeira MJ. and Silveira ER. Ternatin, an anti-inflammatory flavonoid, inhibits thioglycolate elicited rat peritoneal neutrophil accumulation and LPS activated nitric oxide production in murine macrophages. *Planta Med*. (2003) 69: 851-853.
10. N. Silverman and T. Maniatis: NF- κ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes dev.*, (2001) 15: 2321-2342.
11. Lin YL. and Lin JK. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction

- of NO synthase by down-regulating LPS activity of NF- κ B. *Mol. Pharmacol.* (1997) 52:465-472.
- 12.Meisner M, Schmidt J, Schywalsky M, Tschaikowsky K. Influence of pyrrolidine dithiocarbamate on the inflammatory response in macrophages and mouse endotoxin shock. *International J. of Immunopharmacology.* (2000) 22: 83-90.
- 13.Tak P, Firestein GS. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.* (2001) 107(1): 7-11.
- 14.An HJ, Jeong HJ, Um JY, Kim HM, Hong SH. *Glechoma hederacea* inhibits inflammatory mediator release in IFN- γ and LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages. *J. of Ethnopharmacology.* (2006) 106: 418-424.
- 15.Kim DS, Han JH, Kwon, HJ. NF- κ B and c-Jun - dependent regulation of MIP-2 gene expression in response to LPS in RAW 264.7 cells. *Molecular Immunology.* (2003) 40: 633-643.
- 16.De Plaen IG, Han XB, Liu X, Hsueh W, Ghosh S, May MJ. LPS induces CXCL2/MIP-2 gene expression in enterocytes via NF- κ B activation: independence from endogenous TNF- α and platelet activating factor. *Immunology.* (2006) 118: 153-163.
- 17.Tsai HR, Yang LM, Tsai WJ, Chiou WF. Andrographolide acts through inhibition of ERK1/2 and Akt phosphorylation to suppress chemotactic migration. *Eur. J. Pharm.* (2004) 498: 45-52.
- 18.Szelenyi J. Cytokines and the central nervous system. *Brain Research Bulletin.* (2001) 54(4): 329-338.
- 19.Chiou WF, Chen, CF. and Lin JJ. Mechanisms of suppression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells by andrographolide. *Br. J. Pharm.* (2000) 129: 1553-1560.
- 20.Batkhuu J, Hattori K, Takano F, Fushiya S, Oshiman KI and Fujimiya Y. Suppression of NO production in activated macrophages *in Vitro* and *ex Vivo* by neoandrographolide isolated from *Andrographis paniculata*. *Biol. Pharm. Bull.* (2002) 25(9): 1169-1174.

柒、圖表

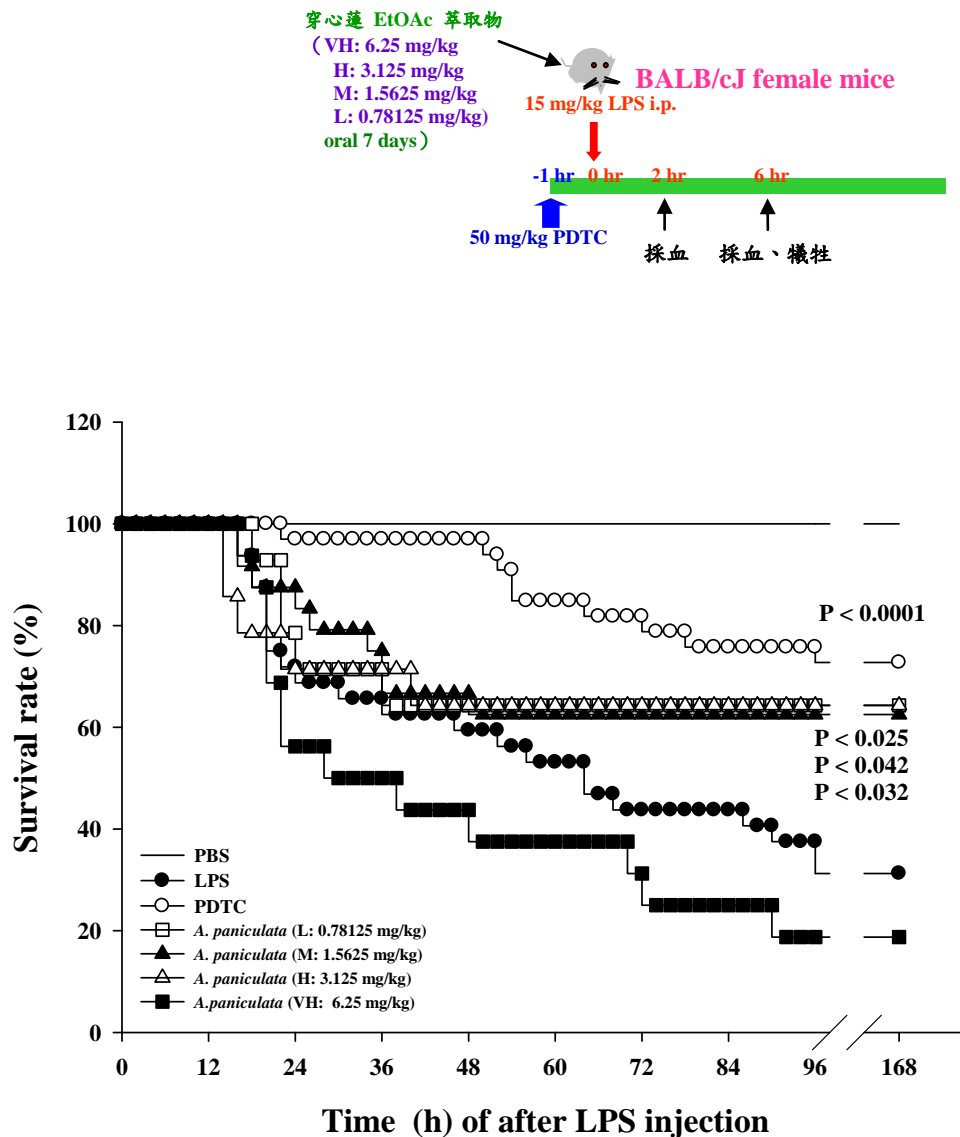
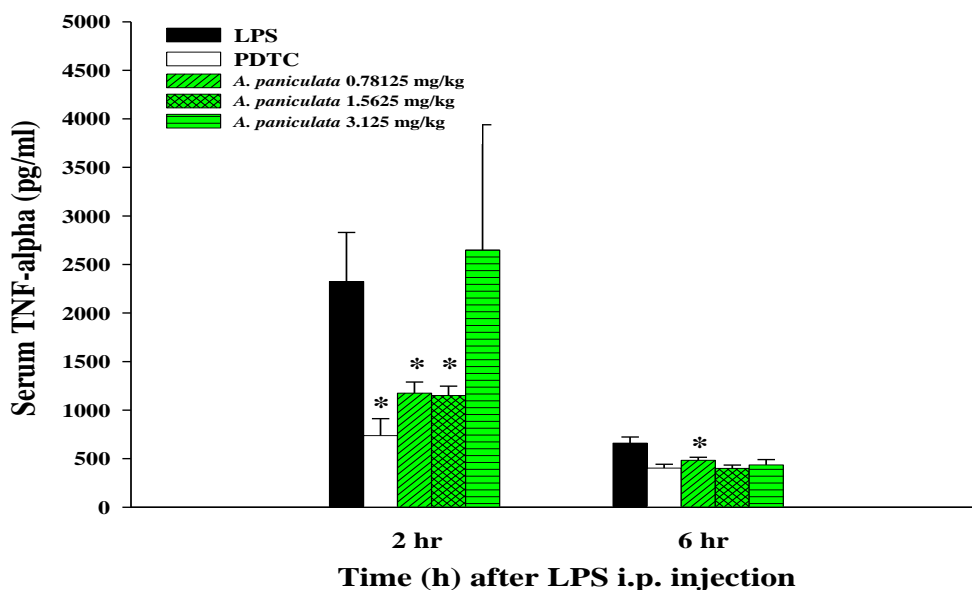


Fig. 1. EtOAc fraction extract of *A. paniculata* significantly protects BALB/cJ mice against lethal endotoxemia. The mice were divided into six groups (*A. paniculata* low dose 0.78125 mg/kg BW, middle dose 1.5625 mg/kg BW, high dose 3.125 mg/kg BW, very high dose 6.25 mg/kg BW, LPS group, 50 mg/kg BW PDTC group) and vehicle (soybean oil based-dosing solution) was administered orally seven days before LPS administration. LPS was i.p. at a single dose of 15 mg/kg, and survival of mice was monitored every 2 h for survival for up to 1 wk. Survival rate was performed using Cox's proportional hazards regression test. Student's *t*-test *: $P < 0.05$ compared to control (LPS).

(A)



(B)

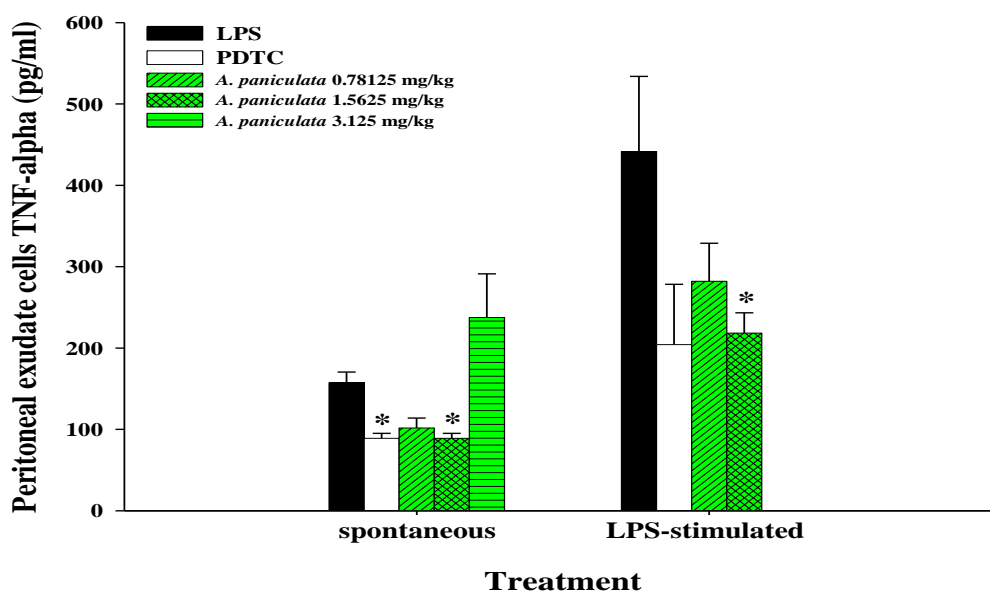
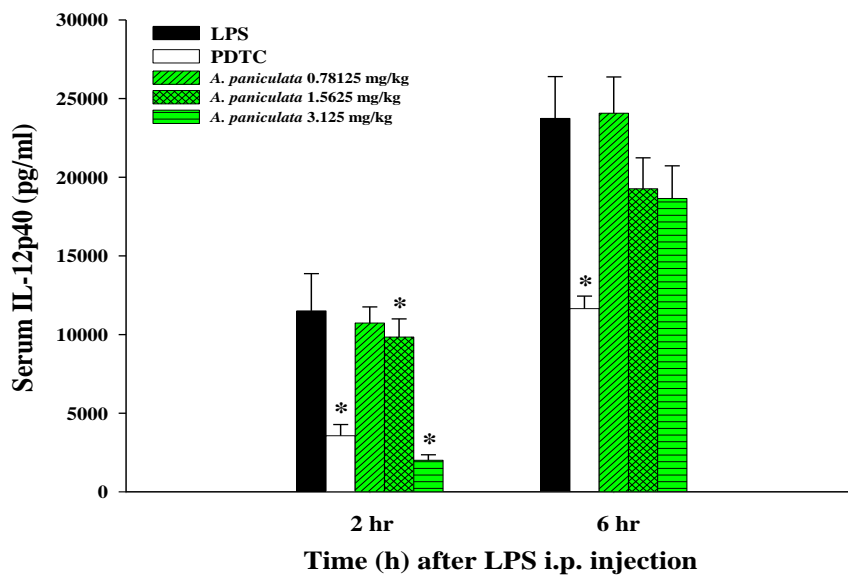


Fig. 2. Effects of EtOAc fraction of *A. paniculata* treatment in serum (A) and peritoneal exudate cells (B) TNF- α production in BALB/cJ mice challenged with LPS. The data are reported as the means \pm S.E.M. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test *: $P < 0.05$ compared to control (LPS).

(A)



(B)

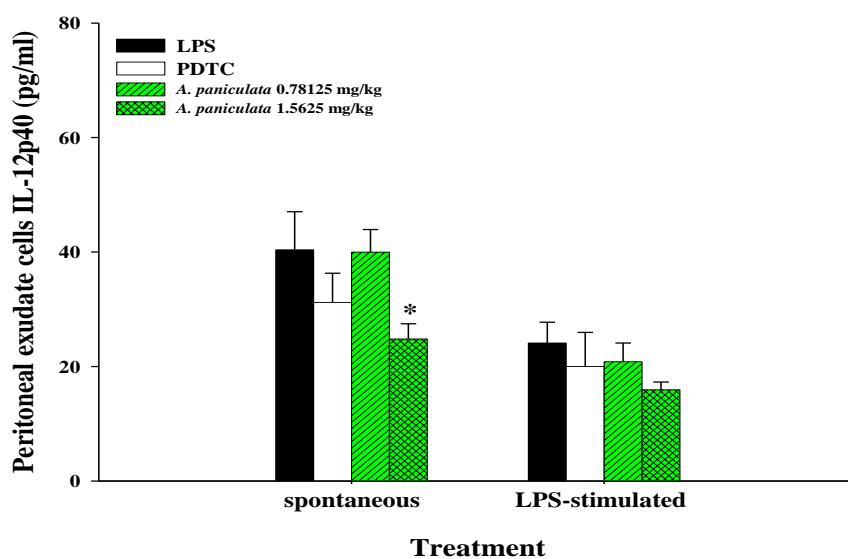
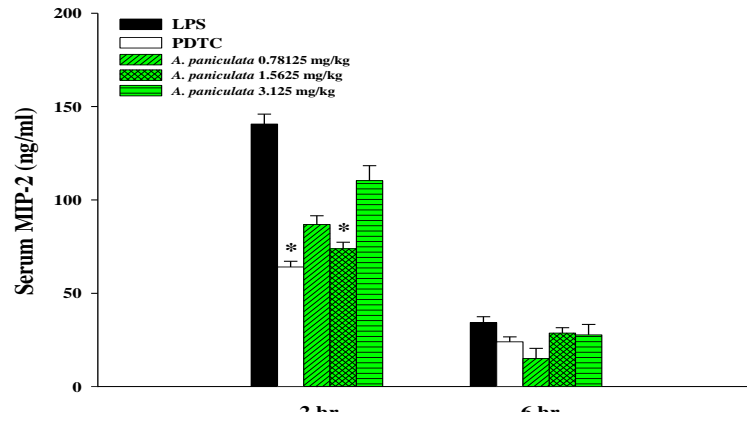
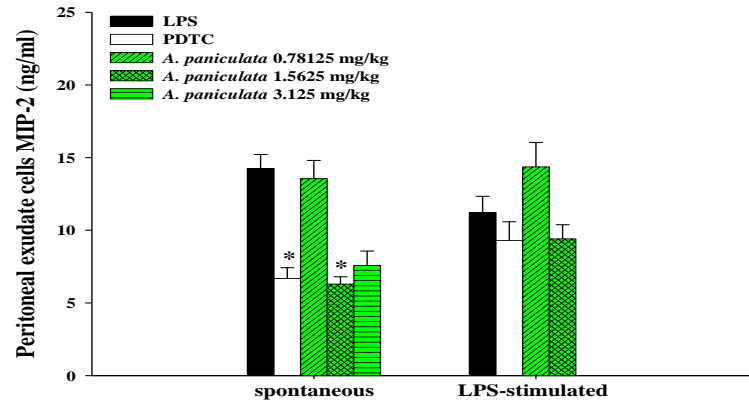


Fig. 3. Effects of EtOAc fraction of *A. paniculata* treatment in serum (A) and peritoneal exudate cells (B) IL-12 p40 production in BALB/cJ mice challenged with LPS. The data are reported as the means \pm S.E.M. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test *: $P < 0.05$ compared to control (LPS).

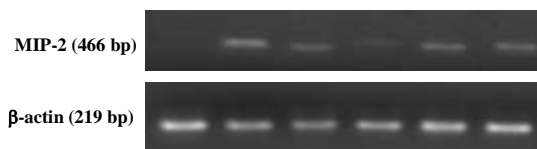
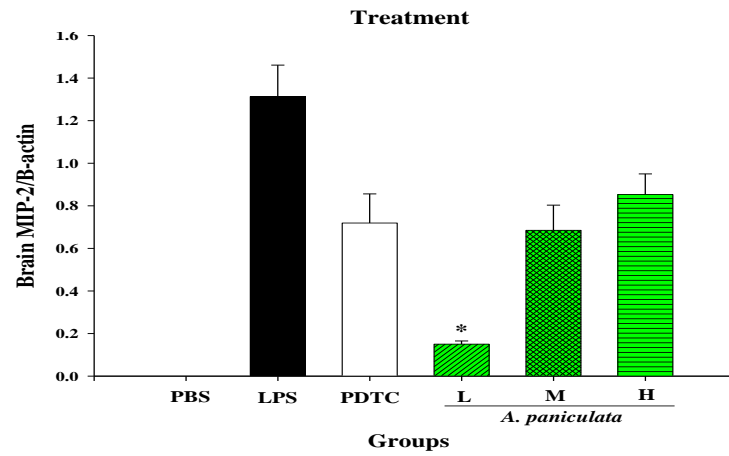
(A)



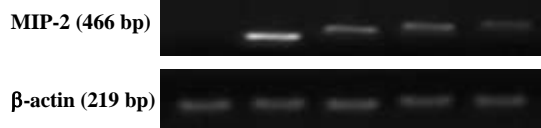
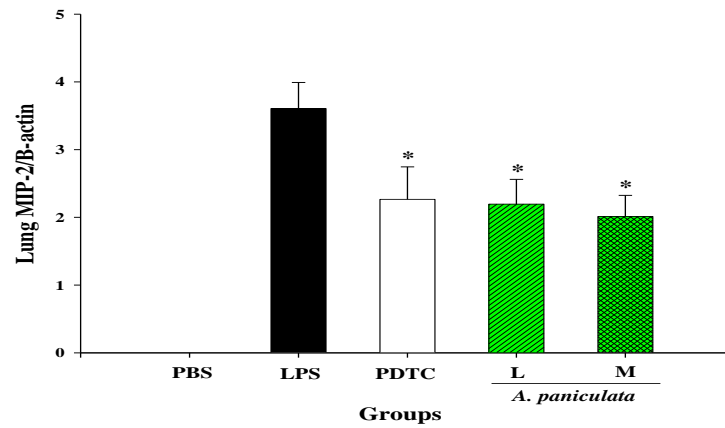
(B)



(C)



(D)



(E)

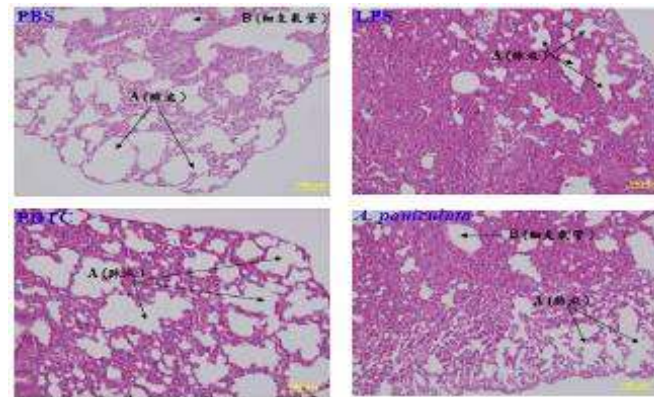
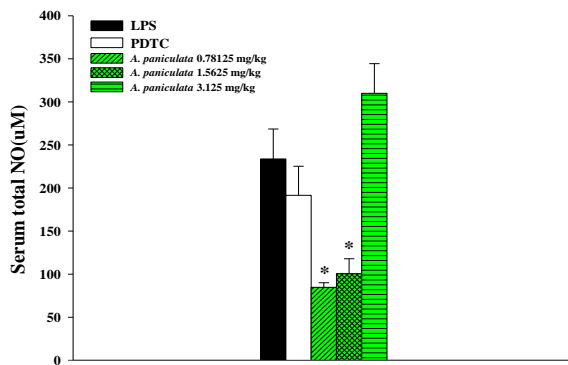
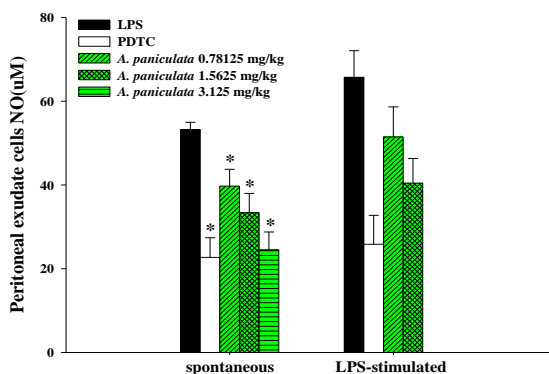


Fig. 4. Effects of EtOAc fraction of *A. paniculata* treatment in serum (A), peritoneal exudate cells (B) MIP-2 production and brain tissue (C), lung tissue (D) MIP-2 mRNA expression in BALB/cJ mice challenged with LPS. The data are reported as the means \pm S.E.M. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test *: $P < 0.05$ compared to control (LPS). Histopathology analysis was determined in hematoxylin and eosin stained (H. E. stain) section of lung at 6 h of LPS administration (E).

(A)



(B)



(C)

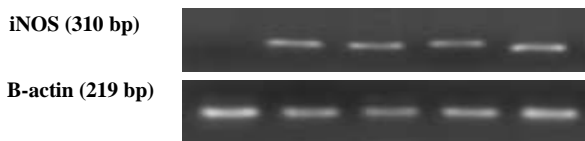
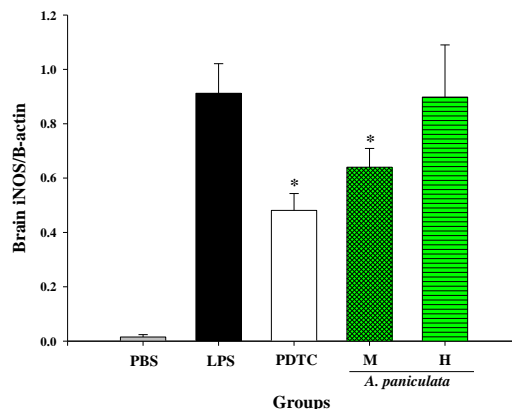


Fig. 5. Effects of EtOAc fraction of *A. paniculata* treatment in serum (A), peritoneal exudate cells (B) NO production and brain tissue (C) iNOS mRNA expression in BALB/cJ mice challenged with LPS. The data are reported as the means \pm S.E.M. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test *: $P < 0.05$ compared to control (LPS).

oil	8	1.35 ± 1.08	27.28 ± 6.35	27.44 ± 7.08	46.59 ± 4.32	
PDTC	8	1.92 ± 1.43	31.40 ± 9.04	31.71 ± 10.5	45.41 ± 10.2	
穿 L	12	1.07 ± 0.60	30.18 ± 6.50	21.34 ± 11.9	46.86 ± 7.80	母
穿 M	12	1.06 ± 0.93	29.58 ± 8.99	20.30 ± 9.55	45.25 ± 8.66	
穿 H	12	2.14 ± 1.48	24.92 ± 5.52	20.43 ± 6.74	42.12 ± 6.41	

Table

A. paniculata (L: 0.78125 mg/kg body weight)
A. paniculata (M: 1.5625 mg/kg body weight)
A. paniculata (H: 3.125 mg/kg body weight)

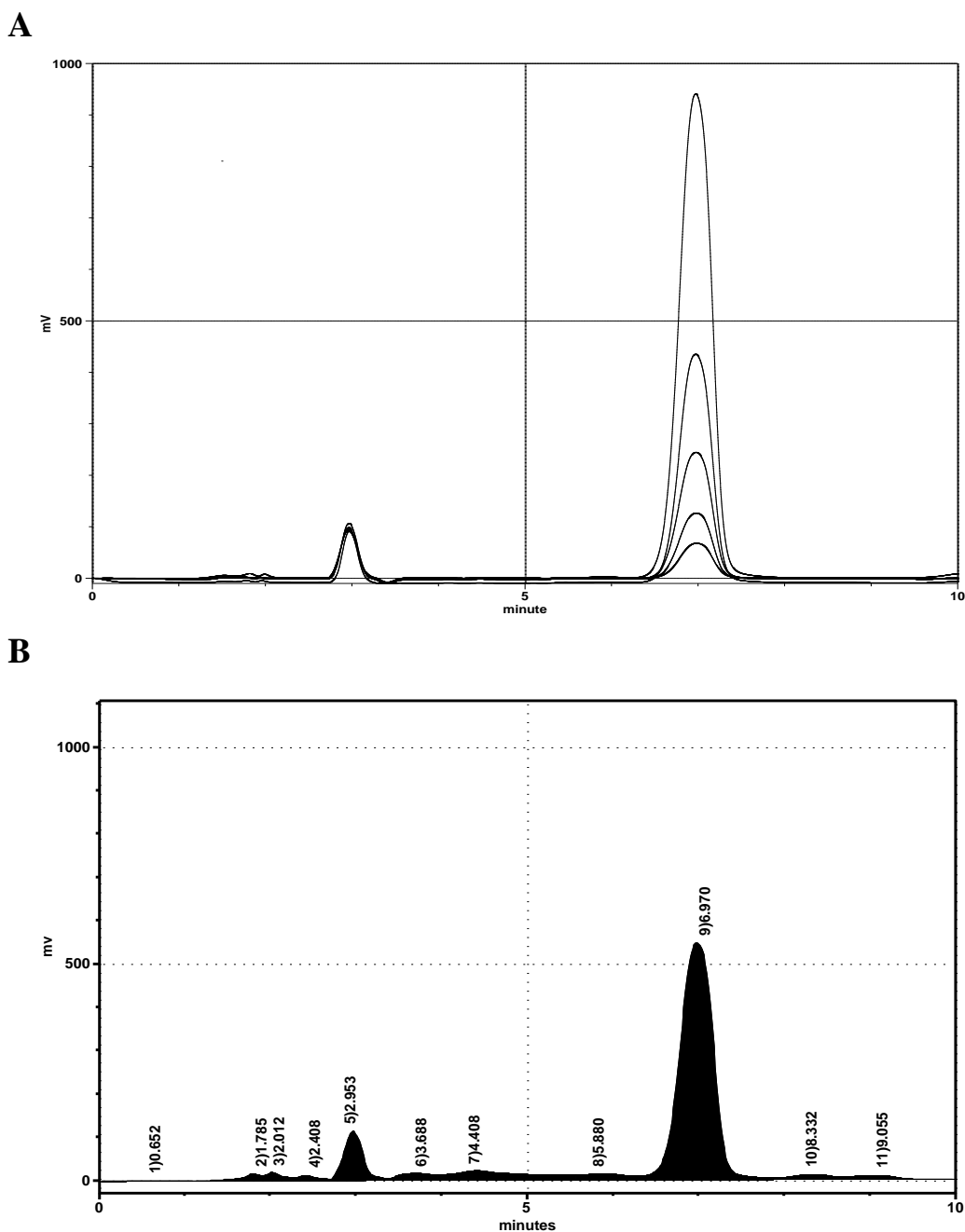


Fig. 6. HPLC analysis of the crude extract and the major components from EtOAc fraction of *A. paniculata* ethanol extract. A. is standards of andrographolide, B. is chemical fingerprinting of *A. paniculata* EtOAc fraction extract. Chromatography was carried out with a linear gradient program. Solvents were methanol-water-acetonitrile (50:50:10). The flow rate of mobile phase was kept constant at 0.7 ml/min, the injection volume was 10 μ l, temperature at 30 $^{\circ}$ C. Andrographolide in *A. paniculata* EtOAc fraction extract retention time is 6.97 min. HPLC fingerprints at an absorbance of 230 nm.

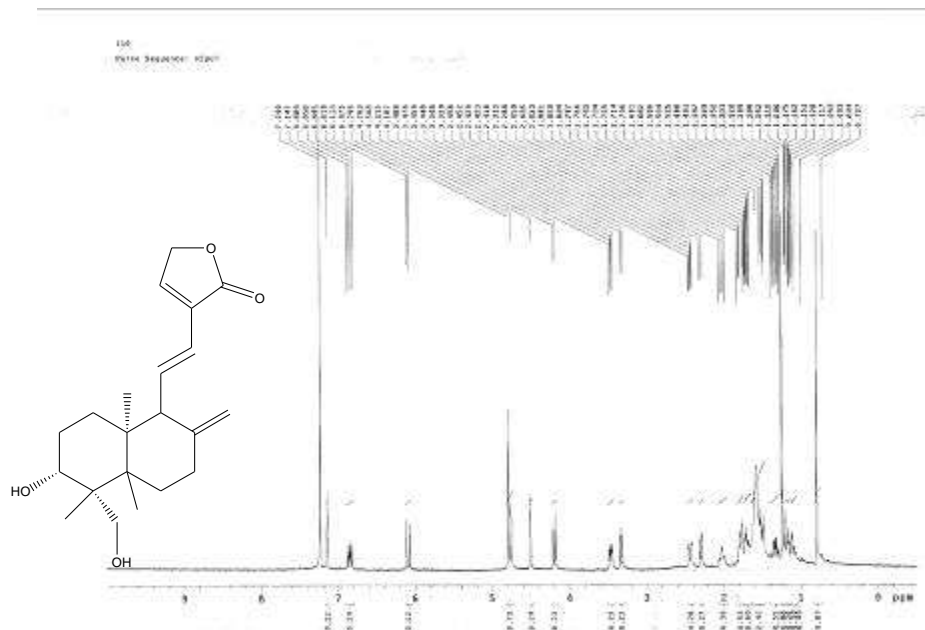


Fig. 7. The $^1\text{H-NMR}$ spectrum of diterpenoids in *A. paniculata* is 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide.

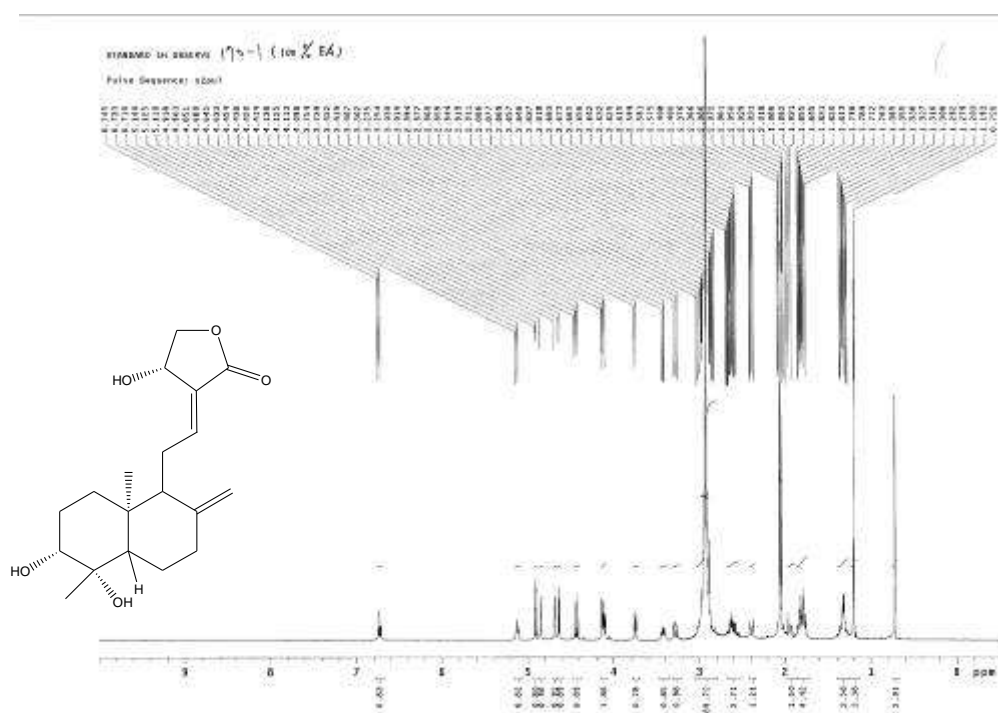


Fig. 8. The $^1\text{H-NMR}$ spectrum of diterpenoids in *A. paniculata* is andrographolide.

