

編號：CCMP94-RD-034

## 關節炎治療之研究： 中藥萃取物（威靈仙等）之運用

謝銘勳

臺北醫學大學

### 摘 要

本計畫全程為兩年，第一年以建立「人類軟骨細胞初代培養之系統」，以作為篩選治療關節炎之中草藥平台，具活性之中草藥繼續探討其作用機轉。第二年再建立「關節炎之動物模式」，探討威靈仙等中草藥，開發成治療關節炎之潛力。本年度結果顯示：一、可有效率從人類軟骨分離得軟骨細胞，其生長速度緩慢，單離約 14~20 天後，方可進行實驗。二、雷公藤內脂醇為雷公藤中之主要活性成分，諸多文獻已報導其具有抑制關節之發炎反應，因此選其作為本實驗之正對照組。三、篩選在許多中草藥後，發現以丙酮萃取之威靈仙，具有明顯抑制以脂多醣（LPS）誘導初代人類軟骨細胞之 NO，PGE<sub>2</sub>，MMP-3 及 MMP-13 等釋放，而 IL-1 $\beta$ 誘導者，則較無明顯變化。在蛋白質表現亦相同，以 LPS 誘導之 COX-2 抑制較為明顯。而雷公藤內脂醇在 200nM 下即具有明顯之抑制作用，則再以 SW1353 人類軟骨細胞株進行機轉之探討，結果顯示：可明顯 MMP-13 之基因表現，phospha-ERK 及 phospho-I $\kappa$ B $\alpha$ 的表現。綜合結果，雷公藤內脂醇及丙酮萃取之威靈仙皆具有開發治療關節炎之潛力。

關鍵詞：雷公藤、威靈仙、關節炎、間質分解酵素

Number: CCMP94-RD-034

# **Research of Study on the Molecular Mechanism of Anti-arthritis by Chinese Herbal (Triptolide and Clematidis Radix)**

Ming-Shium Hsieh

Taipei Medical University

## **ABSTRACT**

In the first year of this study, we establish an in vitro model using primary human chondrocytes (PHC) and SW1353 human chondrosarcoma cell lines to find out potential anti-arthritic herbs and to explore the mechanism involved. Herbs that could interfere with the cartilage-degrading mechanisms will be further examined using in vivo model in the second year. The results of our first part of study are as followed: (1) PHC could be effectively obtained and established, though the confluent growth of chondrocytes takes about 2 to 3 weeks; (2) Triptolide is a documented active cartilage protective natural compound from *Tripterygium wilfordii* Hook F (TWHF) and it is used as positive control within this study; (3) the acetonitrile extracted *C. chinensis* showed significant and dose dependent inhibitory effect on NO, PGE<sub>2</sub>, MMP-3, -13, and production by LPS-induced PHC, while the inhibitory effect was less obvious in IL-1-induced PHC. The acetonitrile extracted *C. chinensis* also showed significant inhibitory effect on COX-2 expression by LPS-stimulated PHC, comparable to that of triptolide. Triptolide inhibited the expression of MMP-13, phospho-ERK and phospho-IκBα in SW1353 cells. the above results imply chondroprotective effect of *C. chinensis* and triptolide on inflammatory arthritis.

Keywords: osteoarthritis, Clematidis Radix, hyaluronic acid, MMPs, TNF, IL-1, Triptolide

## 壹、前言

### 一、骨關節炎 (osteoarthritis, OA) 介紹

骨關節炎又稱為退化性關節炎，是一種常見的關節病變，通常發生於常動關節及承重關節，可能是關節長期載重和撕裂所引起，與發炎反應沒有直接關係。骨關節炎是軟骨本質改變所引起的一種疾病，軟骨是包覆在關節面末端的一種平滑纖維組織，隨著軟骨的退化，關節處的骨骼兩端組織會增生，使關節失去作用，關節處會僵直、疼痛，而軟骨的損壞也可能引起關節發炎。過度使用關節的運動家、從事工作需要大量活動關節、關節處骨骼接合不良、先天關節畸形或體重過重的人都是罹患骨關節炎的高危險群，但也有些骨關節炎可能有家族遺傳性。骨關節炎與軟骨的斷裂有關，如年齡漸長，軟骨會出現某種程度的退化。軟骨細胞 (chondrocyte) 是構成關節的唯一一種細胞，藉由合成軟骨間質及分泌間質分解酵素來調控關節間質的恆定狀態。軟骨細胞可合成關節間質成分，如第二型膠原蛋白 (type II collagen)、proteoglycan 以及其他間質蛋白。軟骨大部分是由水和膠原蛋白 (collagen) 所組成，軟骨內沒有血管，無法自行補給養分，但其吸收力極大，可吸收關節內關節液的養分而維持。骨關節炎患者的軟骨會變得較正常平滑的軟骨鬆軟、晦暗且失去彈性，表面會因摩擦而變薄，骨頭與骨頭相互摩擦，使得骨頭上出現小洞及裂縫。骨關節炎可分為原發性和續發性兩種。原發性骨關節炎是正常老化過程中軟骨斷裂的一種疾病，隨著人體的漸漸老化，會出現某種程度的原發性關節炎，到目前尚未建立一明確的致病機轉而被認為是一種自發性的疾病。偶爾在年輕族群可以觀察到原發性關節炎與家族性遺傳的傾向，從這些具血緣家族性關節炎病人中，發現第二型膠原蛋白 (collagen type II) 的基因產生突變。而續發性關節炎與軟骨斷裂或扭傷改變關節功能的發炎症狀有關。Eotaxin 為對嗜酸性白血球具有選擇性趨化作用的蛋白質，屬於 CC 趨化激素，而其唯一的接受體為 CCR3，但也有部份研究顯示 Eotaxin 也可能與 CCR2、CCR5 結合。人類 eotaxin mRNA 主要存在於正常小腸和大腸中，少部分存在於心、腎、脾、肝、胸腺和肺中。小腸、大腸產生 eotaxin，其主要功能是吸引嗜酸性白血球抵抗蠕蟲的感染。

### 二、間質分解酵素 (Matrix metalloproteinase, MMPs) 介紹

間質分解酵素是一群含有鋅的 peptidase，主要的功能為分解細胞外間質，進行間質組成份轉換 (turnover)，目前被發現的間質分解酵素已超過 26 種，根據其主要受質及型態的不同，可將間質分解酵素分為五群：

- (一) Collagenases — 此類的間質分解酵素的受質主要為 helical collagen，包括 MMP-1、MMP-8、MMP-13、MMP-18... 等
- (二) Gelatinases — 此類的間質分解酵素的受質主要為 gelatin、elastin，包括 gelatinase A (MMP-2) 及 gelatinase B (MMP-9)
- (三) Stromelysins — 此類的間質分解酵素主要為 aggrecan，包括 MMP-3、MMP-7、MMP-10 等
- (四) Membrane-type MMPs — 此類的間質分解酵素多具有 hydrophobic domain，且結合在細胞的表面上，包括 MMP-14、MMP-15、MMP-24.... 等。
- (五) Others — 包括 MMP-12、MMP-19、MMP-20、MMP-23... 等

所有的間質分解酵素皆是以酶原的形式 (未活化態) 由細胞分泌出來，未活化的間質分解酵素包含三個主要的部份 — propeptide domain、catalytic domain 及 substrate-binding carboxy terminal domain；在典型的活化過程中，先將 propeptide domain 切除後，再由一個酵素，通常是藉由一個間質分解酵素，進行最後的切割而形成活化態的間質分解酵素。間質分解酵素參與許多細胞的作用，包括正常生理作用如：胚胎發育、傷口癒合、神經的生長、細胞凋亡... 等，及一些病理的過程如關節炎、腫瘤細胞的侵入 (invasion)、肝臟纖維化... 等。之前有許多文獻指出，在骨關節炎的病患其滑液膜組織及軟骨中具有較高含量的間質分解酵素。間質分解酵素-3 (MMP-3)，又稱為 stromelysin-1，之前的研究指出，在骨關節炎的病人其血液及滑液膜組織中，MMP-3 的表現量多於正常人，且 MMP-3 除了可以分解軟骨組織的主要成分外，還可以活化許多其他的 collagenase 如 MMP-8、MMP-13.. 等，因此 MMP-3 在骨關節炎的病程中扮演很重要的角色。過度表現間質分解酵素會導致軟骨間質的流失，造成軟骨的降解。而在這些間質分解酵素中，較受到重視的主要為 collagenase 及 stromelysin 這兩類的酵素，因為他們可以專一性的分解 native collagens 和 proteoglycan (軟骨間質的主要成份)，所以本計畫將先只著重於雷公藤內脂醇對間質分解酵素-3, 13 的影響。

### 三、I $\kappa$ B kinase (IKK) 介紹

IKK complex 包含了三個次單位—IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$ 、IKK $\gamma$ ，其中 IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$  為 catalytic subunit，在哺乳類動物細胞內通常以 heterodimer 的形式存在，而 IKK $\gamma$  為 regulation subunit，可藉由聚集 IKK 的上游活化因子，如 IKK-kinase，進而促成 IKK 的活化 (Michael K., 1999)。轉錄因子 NF- $\kappa$ B 的活化在免疫、發炎、細胞凋亡..等反應過程中扮演著重要的角色，而 NF- $\kappa$ B 在平時主要與 I $\kappa$ B 結合，存在於細胞質中，當細胞受到外來的刺激如 IL-1、TNF..等，會啟動一系列活化 NF- $\kappa$ B 的訊息。此時 I $\kappa$ B 就會被磷酸化及降解而後 NF- $\kappa$ B 被釋放出並 translocation 到核內，促進細胞反應物基因的轉錄 (Alain I., 2001)。而 IKK complex 最主要的功能為造成 I $\kappa$ B 磷酸化，當細胞受到如 IL-1、TNF $\alpha$ ..等的外來刺激時，IKK 也會被活化，因此在 NF- $\kappa$ B 活化過程中，IKK 的活化是一個重要調控。此外，在部份上皮的形成及分化，IKK $\alpha$  也扮演重要的角色。綜合以上可知 IKK pathway 在生理及病理上是重要的調控路徑。

### 四、Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 介紹

MAPK 是一種 serine-threonine 的 protein kinase，它具有接受外界刺激而調節生理反應的功能 (Robinson et al., 1997)。MAPK 可分成三大類，包括：(一)p38 MAPK；(二)p54 SAPK $\alpha/\beta$ / JNK2, p46 SAPK $\gamma$ / JNK1；(三)p44 / 42 MAPK，ERK1 / 2。p38 經由 MKK3 及 MKK6 活化 (Ensien et al., 1998)，p46 / 54 JNK 被 MKK4 / SEK-1 和 MKK7 活化，而 ERK1/2 被 MEK 和 MEKK1 磷酸化，MAPK 活化後可經由細胞內 protein kinase 及 transcription factors 調控細胞生長及分化 (Davis et al., 1994)。當細胞受到外來刺激時，MAPKase 很容易被活化。如巨噬細胞受到 LPS 刺激，活化 Raf-1，增加 MAPK 活性，而導致 COX-2 表現。所以 MAPK pathway 在病理及生理上是非常重要的調控路徑，所以我們推測 MAPK pathway 及 IKK pathway 有可能參與雷公藤內脂醇對間質分解酵素-3, 13 影響軟骨細胞的訊息傳遞作用機制中。

### 五、祛風濕藥應用於關節炎之開發

傳統中醫藥之「祛風濕藥」可應用於治療關節炎之中藥萃取物，包括威靈仙、雷公藤、秦艽、獨活、五加皮、木瓜、羌活、細辛、吳茱萸、小茴香、丁香、高良薑、川芎、丹參、菝葜、紅花、桑寄生、

蛇床子、附子、烏頭、肉桂等種類。本實驗決定使用：(一)威靈仙；(二)雷公藤。

## 六、威靈仙介紹

「威靈仙」是一種常用安全的中藥，味辛、鹹、性溫，屬於肝、腎二經，使用部位為乾燥根及根莖，含有三萜類皂苷（triterpenoid saponins）。在中醫藥典籍中，其具有風濕痺痛、關節屈伸不利、腰膝關節酸痛以及諸骨梗喉等症。目前它也是治療類風濕關節炎及其他慢性關節炎常選用之藥物。然而威靈仙的藥理作用機轉至今仍不十分清楚明確，只略知其具有鎮痛、抗菌、抗組織胺...等藥理作用。由於國內外學者專家已對雷公藤作許多關於關節炎的研究，因此我們想藉著相關的基礎來深入研究威靈仙對於骨關節炎所扮演的角色，及其藥理作用，以俾利於臨床的使用。

## 七、雷公藤介紹

「雷公藤」屬中草藥的一種，全株植物均有毒。但在中藥記載其具有祛風去濕、活血消腫、消炎止痛等功用。中醫常將其運用在人體免疫機能過度表現的疾病。目前它已是治療類風濕關節炎的熱門藥物之一，此外它亦具有治療其他慢性關節炎的功用。目前科學家已從雷公藤萃取出上百種化合物，發現其中含有許多有效成份具有抑制過份活躍的免疫細胞、阻止感染、殺死癌細胞的能力，而其中最有效的成分之一是雷公藤內脂醇（Triptolide）。研究證實雷公藤內脂醇能夠阻止蛋白質 NF- $\kappa$ B 與 DNA 結合，而阻斷許多免疫重要性基因表現，而其作用比其他免疫抑制劑作用更強大。此外，中國浙江中醫學院的研究者也發現雷公藤內脂醇能明顯抑制腎小管細胞中腫瘤壞死因子（TNF $\alpha$ ）誘發 C3 mRNA 和蛋白質表現。由以上結果可知雷公藤內脂醇可抑制免疫反應。雖然雷公藤具有抑制 T 淋巴球活性，抑制白血球的過度活動，且功效很強，可是其生物鹼具有累積性、長期服用雷公藤會導致急性腎損害，所以研究雷公藤的作用機理是刻不容緩的工作。

## 八、因此本年度計畫將完成下列實驗目標

- (一) 建立軟骨細胞培養系統。
- (二) 利用細胞實驗探討雷公藤內脂醇及威靈仙等對軟骨細胞之間質分解酵素之影響。

(三) 探討何種機制參與雷公藤內脂醇及威靈仙等調控軟骨細胞之間質分解酵素表現。



## 貳、材料與方法

威靈仙第一年以細胞培養為主（包括自行培養及組胞組）：

### 目標一、威靈仙對人類軟骨細胞（primary culture 及 SW1353）產生間質分解酵素 MMPs 表現量的測定

#### RT-PCR：觀察 MMP-3, 13 mRNA 表現情形

#### ELISA：觀察 MMP-3, 13 蛋白質表現量

#### 一、材料

RNAzol B, Chloroform, MMLV, DTT, MMLV buffer, dNTP mix, oligo dT, Taq polymerase, Taq buffer, specific primers,

##### (一) MMP-3

Sense 5'-CCTCTGATGGCCCAGAATTGA-3'

Antisense 5'-GAAATTGGCCACTCCCTGGGT-3'

##### (二) MMP-13

Sense 5'-GACTTCACGATGGCATTGCTG-3'

Antisense 5'-GCATCAACCTGCTGAGGATGC-3'

##### (三) GAPDH

Sense 5'-CTGCCGTCTAGAAAAACC-3'

Antisense 5'-CCAAATTCGTTGTCATACC-3'

Biotrak (h)MMP-3, 13 ELISA system

#### 二、方法

將  $5 \times 10^5$  個人類軟骨細胞種至 6 公分培養盤中，加入不同劑量 eotaxin-1 分別作用不同時間，將所有 RNA 萃取出來經過純化，加入 MMPs 及 GAPDH 之 primer 進行 RT-PCR。取適量 RT-PCR 產物與 1/5 體積的 loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 40% sucrose) 混合均勻後注入 1.8% agrose gel (內含 ethidium bromide ; EtBr) well 中，以 100volt 電泳約 40 分鐘後，在紫外光下拍照觀察 MMPs mRNA 表現的情形。

將軟骨細胞給予藥劑處理適當時間後，取細胞上清液至微量離心管中，於-20°C下保存。取 100ml primary antibody 加入 96 孔盤，置於 4°C，隔夜後使用。將適量血清加入已事先 coating 有 primary antibody 的 96 孔盤，室溫下反應 2 小時。清洗 5 次後，加入 100ml secondary antibody，室溫下反應 1 小時。清洗 7 次後，加入 100ml TMB 作用 30 分鐘，再加入 50ml stop solution 停止反應。30 分鐘內以 450nm 讀取吸光值。

## 目標二、探討 MAPK pathway 在威靈仙影響人類軟骨細胞 (primary culture 及 SW1353) 產生間質分解酵素 MMPs 之訊息傳遞路徑中扮演的角色

### 西方墨點法：觀察 MAPK kinase 活化的情形

#### 一、材料

protein assay dye, specific antibodies, rabbit anti- human globulin NBT/BCIP

#### 二、方法

軟骨細胞用藥劑處理一段時間之後，將培養液倒乾淨，用冰的 PBS 清洗三次，加入適量的 lysis buffer (137mM NaCl, 20mM Tris pH 7.9, 10mM NaF, 5mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM PMSF, 10µg/ml aprotinin, 5µg/ml leupeptin, 1% Triton X-100) 後將細胞刮下，吸到微量離心管中，於冰上作用 30 分鐘。在 4°C 下 14000 轉離心 30 分鐘，取出上清液。

將萃取出來的蛋白質定量，再將蛋白質分裝成 40µg 的蛋白質樣本。在每一個蛋白質樣本之中，加入等體積的 2 X SDS/protein loading buffer，於攝氏 95°C 下作用 5 分鐘後，置於冰上冷卻，再將蛋白質樣本加到每個 loading well 中，以 10% SDS-PAGE gel 進行蛋白質分離的實驗。先將電壓調整為 80 伏特 (voltage)，直到蛋白質樣本跑到 stacking gel 與 separating gel 的界面時，才將電壓調整至 120 伏特 (voltage)，待適當時間後，停止電泳並進行蛋白質的轉印。先將 PVDF membrane 先以 methanol 浸潤使其去極化，連同二張 3M paper 放入 transfer buffer 中浸濕。操作時，重疊的順序由下而上依序為 3M paper, PVDF membrane, SDS-PAGE gel, 3M paper，並使用玻璃棒趕走夾在 PVDF membran 及 SDS-PAGE gel 之中的氣泡，將以上裝置

放入轉印槽中，且轉印槽置於攝氏 4<sup>0</sup>C 冰櫃中，以 999mA 轉印，轉印結束後，取出 PVDF membrane 以 1% BSA blocking solution 室溫作用 1 hr，倒掉 blocking solution，加入 MAPK、phosphorylated-MAPK、 $\alpha$  tubulin 等的 specific antibodies 室溫作用 2 小時，以 TBST 洗四次，然後加入 anti-mouse IgG conjugated alkaline phosphatase 或 anti-goat IgG conjugated alkaline phosphatase 室溫作用 1 小時，再以 TBST 洗四次，最後以 NBT/BCIP 呈色劑呈色。

**目標三、探討 IKK pathway 在威靈仙影響人類軟骨細胞 (primary culture 及 SW1353) 產生間質分解酵素 MMPs 之訊息傳遞路徑中扮演的角色**  
**酵素動力分析法 (Kinase assay)：觀察 IKK 活化的情形**

**一、材料**

specific antibody、substrate

軟骨細胞用藥劑處理一段時間之後，將培養液倒乾淨，用冰的 PBS EDTA, 1mM EGTA, 1mM PMSF, 10 $\mu$ g/ml aprotinin, 5 $\mu$ g/ml leupeptin, 1% Triton X-100) 後將細胞刮下，吸到微量離心管中，於冰上作用 30 分鐘。在 4<sup>0</sup>C 下 14000 轉離心 30 分鐘，取出上清液。

**二、方法**

將萃取出來的蛋白質定量，加入 specific antibody，將蛋白質液中的 IKK 免疫沉澱出來，在加入受質作用一段時間後，進行電泳，藉著受質被分解的情形，觀察 IKK 活化的情形。

**目標四、探討轉錄因子 (transcription factor) NF- $\kappa$ B、AP-1 在威靈仙影響人類軟骨細胞 (primary culture 及 SW1353) 之訊息傳遞路徑中扮演的角色**  
**Electrophoretic Mobility Shift assay (EMSA)：觀察 AP-1 及 NF- $\kappa$ B 活化的情形**

**一、材料**

(<sup>32</sup>P) ATP-labeled oligonucleotide probe、extraction buffer、protein assay dye

(<sup>32</sup>P) ATP-labeled oligonucleotide probe、extraction buffer、protein assay dye

## 二、方法

將細胞加入 eotaxin-1 處理適當時間，以冰冷的 PBS 洗滌兩次後，加入適量的 extraction buffer A，將細胞刮下並收集於離心管中，置於冰上 15 分鐘後，加入 0.6% NP-40 並強烈震搖 10 秒鐘，以 4°C 14000 rpm 離心 30 分鐘後，取出上清液。在沉澱物中加入 extraction buffer B，置於冰上 15 分鐘，以 4°C 14000rpm 離心 5 分鐘，所得之上清液即為 nuclear fraction。將 nuclear fraction 6~10μg 加入 reaction mixture 中，其組成為：poly (dI-dC)，poly L-lysine, ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P) ATP-labeled oligonucleotide，在室溫下反應 15 分鐘後，再置於冰上停止反應 10 分鐘，以 6% polyacryamide gels 在 150V 下電泳分析 50 分鐘，之後將 gel 置於 3M paper 上，用 gel dryer 烘乾並以 Hyperfilm 感光顯像。

雷公藤內脂醇第一年細胞培養計畫之目標一、目標二、目標三、目標四均如同威靈仙之步驟進行研究。

威靈仙第二年計畫之目標及方法為動物實驗(以由紐西蘭大白兔實驗 NWZ，n=50 隻，10 隻控制組，40 隻實驗組)。

目標：以中藥(威靈仙)之成分，測試動物紐西蘭大白兔之效果。

## 參、結果

### 一、人類軟骨細胞初代培養之系統建立

取得病人膝軟骨後，在無菌環境中，將其切碎，再利用 pronase (10g/l) 於 37°C 下作用 30 分鐘，再以 collagenase type IV (10g/l) 作用 3 小時，軟骨即會分解成軟骨細胞（步驟如圖一）。細胞存活率依骨組織的來源不同而有極大之差異，由 0%~100%，但根據目前結果顯示：病人的年紀不是主要的因素，但是女性的組織存活率有顯著較高。細胞形成後，並以是否釋放 PGE<sub>2</sub> 作為活性指標。其細胞之存活率與活性，會隨著繼代培養的次數而下降，亦會隨著組織來源的不同有所差異，圖二顯示其細胞生長之型態變化。分離完成之細胞成圓球狀，次日活細胞將會慢慢貼附於培養盤底（圖二 A），約一星期後細胞成熟（圖二 B），即可進行繼代培養。當人類軟骨細胞繼代培養至 8 代以後細胞質內呈現空洞（◀），且形態變細長（◀），此時細胞以無法誘導出 PGE<sub>2</sub>。因此本實驗以繼代培養 3 至 6 次的細胞，進行藥物對細胞質分解酶（Marrix metallopro- teinase, MMPS）之影響。

### 二、威靈仙之萃取

市售購得威靈仙之原藥材，經鑑別無誤後，以 H<sub>2</sub>O, 50% MeO, MeOH, 50% EtOH, 95% EtOH, 70% Acetone, Acetone 之 20 倍體積萃取，並以矽膠管柱進行部分分離，目前已完成。

### 三、雷公藤內脂醇 (Triptolide) 及威靈仙萃取物對人類軟骨細胞株之影響

#### (一) 人類初代軟骨細胞

已建立完成人類初代軟骨細胞培養系統，以 LPS 及 IL-1 (作為誘導劑，檢測雷公藤內脂醇 (Triptolide) 及威靈仙之各種溶媒萃取物之抗發炎效果。

結果顯示：雷公藤內脂醇及以威靈仙丙酮萃取物對 LPS 及 IL-1 $\beta$  誘導產生之 PGE<sub>2</sub> 具最顯著之抑制作用（圖三），且以 LPS 誘導者，威靈仙丙酮萃取物具濃度依存性（圖四），但以雷公藤內脂醇抑制作用較為明顯，且對 COX-2 表現具顯著之抑制作用（圖五）。另其檢測樣品之對人類初代軟骨細胞之 MMP 影響，發現雷公藤內脂醇及以威靈仙丙酮萃取物對 LPS 及 IL-1 $\beta$  誘導產生之 MMP-3 及 13 具抑制作用，且以 LPS 誘導者抑制最為明顯

(圖六)。

## (二) 人類軟骨細胞株 (SW1353)

因雷公藤內脂醇 (Triptolide) 對人類初代軟骨細胞，之發炎作用抑制較為明顯，因此先進行對 SW13535 之間質分解酵素-3 (MMP-3) 等機轉之探討。結果顯示：雷公藤於高劑量下可明顯 MMP-13 之基因表現 (圖七)，phospha-ERK (圖八) 及 phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  的表現 (圖九)。

## 肆、討論

- 一、IL-1 $\beta$  比 LPS 更容易誘導人類初代軟骨細胞分泌 PGE<sub>2</sub>。
- 二、丙酮萃取之威靈仙只對 LPS 誘導人類初代軟骨細胞之發炎反應具明顯之抑制作用，而雷公藤內脂醇則兩種誘導劑皆具抑制作用，其作用機制之差異值得再深入探討。
- 三、丙酮萃取威靈仙之產率很低，但對抑制 IL-1 $\beta$  或 LPS 人類初代軟骨細胞發炎作用最為明顯，推測其有效成分應偏低極性或油脂類等活性成分。

## 伍、結論與建議

- 一、雷公藤內脂醇 (Triptolide) 的作用比威靈仙萃取物明顯，因此先進行其作用機轉之探討，以期作為探討威靈仙機轉之參考。
- 二、前實驗已顯示：雷公藤內脂醇可能是透過抑制 phospho-I $\kappa$ B $\alpha$ 及 phospho-ERK，間接抑制 MMP-13 之基因表現。

## 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 CCMP94-RD-034 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

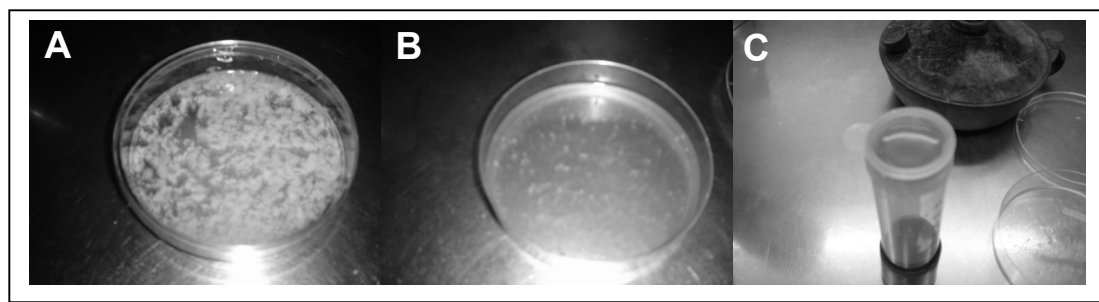
1. 王萌：中西醫結合治療關節病型銀屑病 1 例，陝西省寶雞市人民醫院皮膚科，陝西寶雞 721000。
2. 寇秋愛，房定亞：類風濕沖劑治療急性期類風濕性關節炎 34 例臨床療效觀察。《中醫雜誌》1995；35(9)：537。
3. 黃迪君；類風濕劑治療 RA 臨床觀察。《成都中醫藥大學學報》1995；18(3)：20。
4. 許得盛，沈自尹，盧葦...等：類風濕劑治療類風濕性關節炎的臨床與實驗研究[J]。《中國中西醫結合雜誌》1996；(1)：14。
5. 趙南，李建強，陳燕河；中藥免疫調節治療類風濕性關節炎 36 例[J]。《中國中醫藥資訊雜誌》1996；(4)：31。
6. Chen, B.J.: Triptolide, A Novel Immunosuppressive and Anti- Inflammatory Agent Purified from A Chinese Herb *Tripterygium Wilfordii* Hook F. *Leukemia and Lymphopna* 2000; 42(3): 253-265.
7. Tao, X., Lipsky, P.E.: The Chinese anti-inflammatory and immunosuppressive herbal remedy *Tripterygium wilfordii* Hook F. *Rheum. Dis. Clin. North Am* 2000; 26: 29-50. viii.
8. Mao, Y.P., Tao, X.L., Lipsky, P.E.: Analysis of the stability and degradation products of triptolide. *J. Pharm. Pharmacol* 2000; 52: 3-12.
9. Qiu, D., Zhao, G., Aoki, Y., Shi, L., Uyei, A., Nazarian, S., Ng, J.C., Kao, P.N.: Immunosuppressant PG490 (triptolide) inhibits T-cell interleukin-2 expression at the level of purine-box/nuclear factor of activated T-cells and NF-kappaB transcriptional activation. *J. Biol. Chem* 1999; 274: 13443-13450.
10. Chang, W.T., Kang, J.J., Lee, K.Y., Wei, K., Anderson, E., Gotmare, S., Ross, J.A., Rosen, G.D.: Triptolide and chemotherapy cooperate in tumor cell apoptosis: a role for the p53 pathway. *J. Biol. Chem* 2000;
11. Wang, J., Xu, R., Jin, R., Chen, Z., Fidler, J.M.: Immunosuppressive activity of the Chinese medicinal plant *Tripterygium Wilfordii*, I. Prolongation of rat cardiac and renal allograft survival by the4 PG27 extract and immunosuppressive synergy in combination therapy with cyclosporine. *Transplantation* 2000; 70: 477-455.
12. Ho, L.J., Chang, D.M., Chang, M.L., Kuo, SY., Lai, J.H.: Mechanism of

- immunosuppression of the antirheumatic herb TWHf in human T cells. *J. Rheumatol* 1999; 26: 14-24.
13. Cavaillon, J-M, Duff, G.: Cytokines and the cellular mechanism of inflammation, In *The Cytokine Network and Immune Response*, edited by J. Theze, 251-261 New York Oxford University Press, 1999;
  14. Maekawa, K., Yoshikawa, N., Du, J., Nishida, S., Kitasato, H., Okamoto, K., Tanaka, H., Mizushima, Y., Kawai, S.: The molecular mechanism of inhibition of interleukin-1 beta-induced cyclooxygenase-2 expression in human synovial cells by *Tripterygium wilfordii* Hook F extract. *Inflamm. Res.* 1999; 48: 575-581.
  15. Chang, D.M., Kuo, S.Y., Lai, J.H., Chang, M.L.: Effects of anti- rheumatic herbal medicines on cellular adhesion molecules. *Ann. Rheum. Dis.* 1999; 58: 366-371.
  16. Lee, K.Y., Chang, W., Qiu, D., Kao, P.N., Rosen, G.D.: PG490 (triptolide) cooperates with tumor cells. *J. Biol. Chem* 1999; 274: 13451-13455.
  17. Tengehaisri, T., Chawengkirttikul, R., Rachaphaew, N., Reutrakul, V., Sangsuwan, R., Sirisinha, S.: Antitumor activity of triptolide against cholangiocarcinoma growth in vitro and in hamsters. *Cancer Lett.* 1998; 133: 169-175.
  18. Lang, Y., Liu, Z., Tolosa, E., Yang, J., Li, Li: Triptolide induces apoptotic death of T lymphocyte. *Immunopharmacology* 1998; 40: 139-149.
  19. Gu, W.Z., Brandwein, S.R.: Inhibition of type II collagen-induced arthritis in rats by triptolide. *Int. J. Immunopharmacol* 1998; 20: 389-400.
  20. Ushiro, S., Ono, M., Nakayama, J., Fujiwara, T., Komatsu, Y., Sugimachi, K., Kuwano, M.: New nortriterpenoid isolated from anti-rheumatoid arthritic plant, *Tripterygium wilfordii*, modulates tumor growth and neovascularization. *Int. J. Cancer* 1997; 72; 657-663.
  21. Lipsky, P.E., Tao, X.L.: A potential new treatment for rheumatoid arthritis: thunder god vine. *AR* 1997; 26: 713-723.
  22. Alain I.: The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF- $\kappa$ B. *Trend in Cell biology* 2000; 10: 129-133. Review
  23. Baggiolini, M., Dewald, B., and Moser, B.: Interlukin-8 and related chemotactic

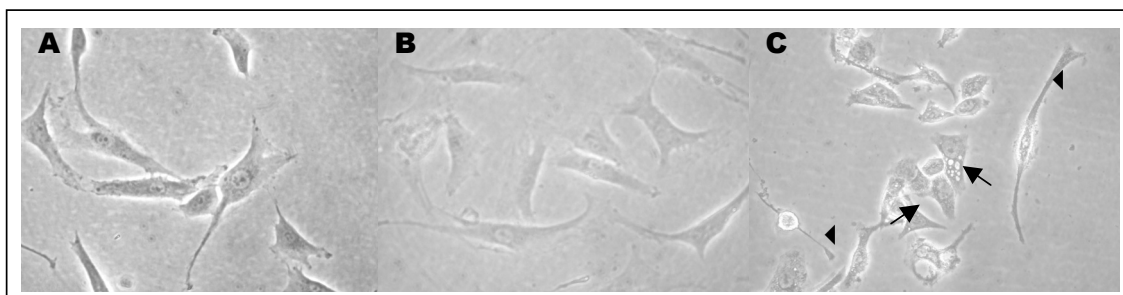
- cytokines- CXC and CC chemokines. *Adv Immunol.* 1994; 55: 97-179. Review
24. Baggiolini, M., Dewald, B., and Moser, B.: Human chemokines: an update. *Annu. Rev. Immunol.* 1997; 15: 675-705. Review
25. Baud, V., Liu Z-G, Bennett B., Suzuki N., Xia Y. and Karin M.: *Genes Dev.* 1999;13: 1297-1308.
26. Davis, R.J.: MAPKs: New JNK expands the group. *Trends Biochem. Sci.* 1994; 19: 470-473.
27. Ensien, H., Raingeaud, J. and Davis, R.J.: Selective Activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 1741-1748.
28. Gita, T.K., Susan, S., Tetsuya, A., Tan, J., Sha, Q.J., Andrew, G., Per, S.S., Lars, K.P., and Rafeul, A.: Eotaxin induces degranulation and chemotaxis of eosinophils through the activation of ERK2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *Blood* 2000; 95: 1911-1917.
29. Hambleton, J., Weinstein, S.L., Lem, L. and Defranco, A.L.: Activation of c-jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc. Natl. Sci. Acad.* 1996; 93: 2774-2778
30. Hideaki, N., J. Frederick Woessner, Jr.: Matrix metalloproteinases *J. Bio. Chem.* 1999; 274: 21491-21494. Review
31. Linda L, J., Richard, D., and Donald J, H.: Matrix metalloproteinases *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1999; 2: 466-471. Review
32. Mary, B.G.: The role of chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1916-1926. Review
33. Michael, K.: How NF- $\kappa$ B is activated: the role of the I $\kappa$ B kinase (IKK) complex. *Oncogene.* 1999; (18): 6867-6874. Review.
34. Michael, K., and Mireille D.: The I $\kappa$ B kinase (IKK) and NF- $\kappa$ B: key elements of proinflammatory signaling. *Seminar in immunol.* 2000; 12: 85-98. Review
35. Naito K., Takahashi M., Kushida K. et al.: Measurement of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in patients with knee osteoarthritis: comparison with generalized osteoarthritis. *Rheumatology* 1999; 38: 510-5.

36. Pelletier JP, Caron JP, Evans C, Robbins PD, Georgescu HI, Jovanovic D, Fernandes JC, Martel-Pelletier J.: In vivo suppression of early experimental osteoarthritis by interleukin-1 receptor antagonist using gene therapy. *Arthritis Rheum* 1997; 40(6): 1012-9.
37. Rossi, D., and Zlotnik, A.: The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 2000; 18: 217-42. Review.
38. Schall, T.J., and Bacon, K.B.: Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* 1994; 6: 865-73.
39. Wang, J., Xu, R., Jin, R., Chen, Z., Fidler, J.M.: Immunosuppressive activity of the Chinese medicinal plant *Tripterygium wilfordii*, II Prolongation of hamster-to-rat cardiac xenograft survival by combination therapy with the PG27 extract and cyclosporine. *Transplantation* 2000; 70: 456-464.
40. Ramgolam, V., Ang, S.G., Lai, Y.H., Loh, C.S., Yap, H.K.: Traditional Chinese medicines as immunosuppressive agents, *nn. Acad. Med. Singapore* 2000; 27: 11-16.
41. Lu, H., Hachida, M., Enosawa, S., Li, X.K., Suzuki, S., Koyanagi, H.: Immunosuppressive effect of triptolide in vitro. *Transplant., Proc.* 1999; 31: 2056-2057.

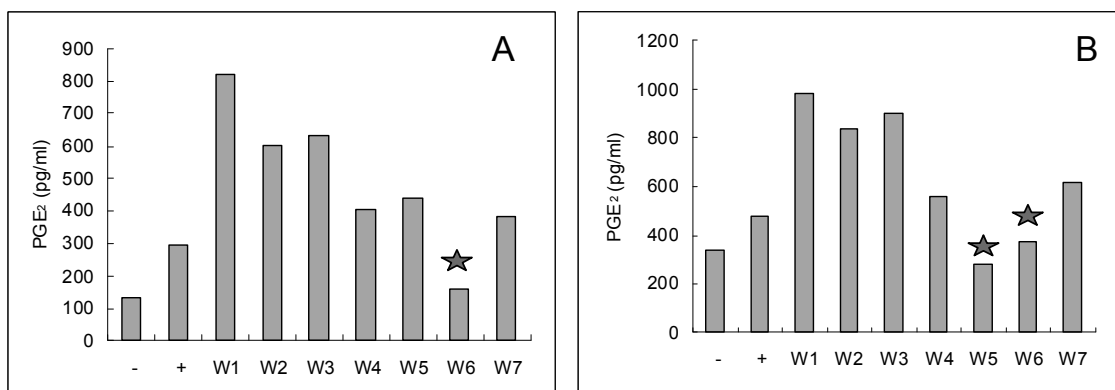
## 柒、圖



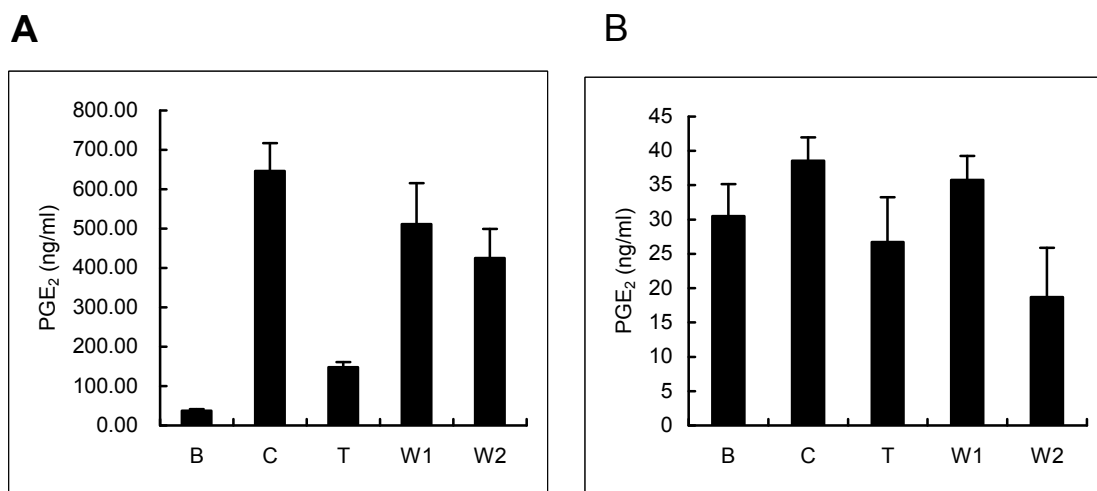
圖一 軟骨分解成軟骨細胞之步驟。A：將組織切碎至約  $3\text{mm}^3$ 。B：酵素反應 3 小時，分解完成。C：將水解後之溶液過濾(100 $\mu\text{M}$  孔徑過濾膜)。



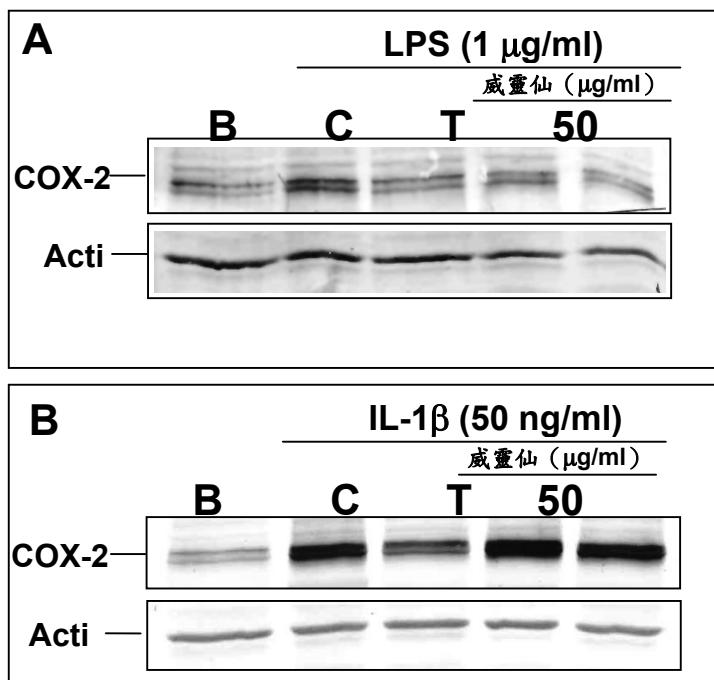
圖二 初代培養人類軟骨細胞之細胞形態。A：第一代細胞。B：成熟之細胞。C：老化之細胞(細胞空泡形成←，纖維變長↗)(400X)。



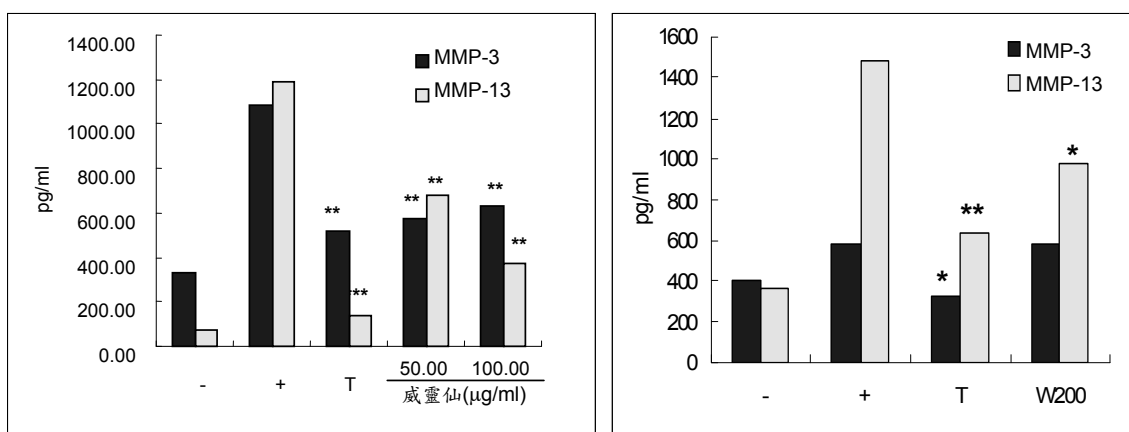
圖三 雷公藤內脂醇及以丙酮萃取之威靈仙，對 LPS 及 IL-1β 誘導初代培養人類軟骨細胞產生之 MMP-3 及 13 表現之抑制作用。(A)以 LPS 誘導(B)以 IL-1β 誘導，-：cell only，+：LPS 1μg/ml 或 IL-1β 50ng/ml。W1: H<sub>2</sub>O 萃取物，W2: 50% MeOH 萃取物，W3: 50% EtOH 萃取物，W4: MeOH 萃取物，W5: EtOH 萃取物，W6: Acetone 萃取物，W7: 70% Acetone 萃取物。W1~7 等萃取物 200μg/ml 與誘導劑共同處理。



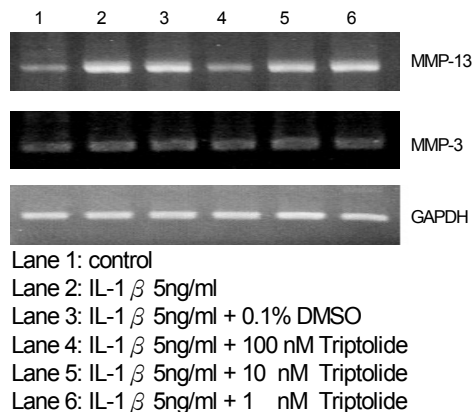
圖四 雷公藤內脂醇及以丙酮萃取之威靈仙，對 LPS 及 IL-1β 誘導初代培養人類軟骨細胞產生之 PGE<sub>2</sub> 具抑制作用。(A)以 IL-1β 誘導，B：cell only，C：IL-1β 50ng/ml，T：IL-1β 50ng/ml +20μM Triptolide，W1：IL-1β 50 ng/ml +100μg/ml 威靈仙 W2：IL-1β 50 ng/ml +200μg/ml 威靈仙。(B)以 LPS 誘導，B：cell only，C：LPS 1μg/ml，T：LPS 1μg/ml +20μM Triptolide，W1：LPS 1μg/ml +200μg/ml 威靈仙 W2：LPS 1μg/ml +400μg/ml 威靈仙。



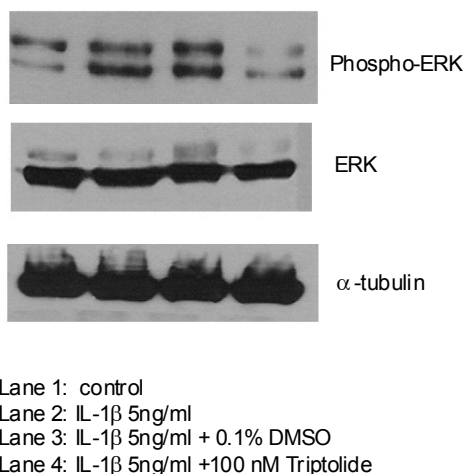
圖五 雷公藤內脂醇及以丙酮萃取之威靈仙，對 LPS 及 IL-1β 誘導產生之 COX-2 表現之抑制作用。(A)以 LPS 誘導，B: cell only, C: LPS 1µg/ml, T: LPS 1µg/ml +200nM Triptolide (B)以 IL-1β 誘導，B: cell only, C: IL-1β 50ng/ml, T: IL-1β 50ng/ml +200nM Triptolide, W1: IL-1β 50ng/ml +100µg/ml 威靈仙 W2: IL-1β 50ng/ml +200µg/ml 威靈仙。



圖六 雷公藤內脂醇及以丙酮萃取之威靈仙，對 LPS 及 IL-1β 誘導產生之 COX-2 表現之抑制作用。(A)以 LPS 誘導，B: cell only, C: LPS 1µg/ml, T: LPS 1µg/ml +200nM Triptolide (B)以 IL-1β 誘導，B: cell only, C: IL-1β 50ng/ml, T: IL-1β 50ng/ml +200nM Triptolide, W200: IL-1 (50ng/ml) +200(g/ml)威靈仙。

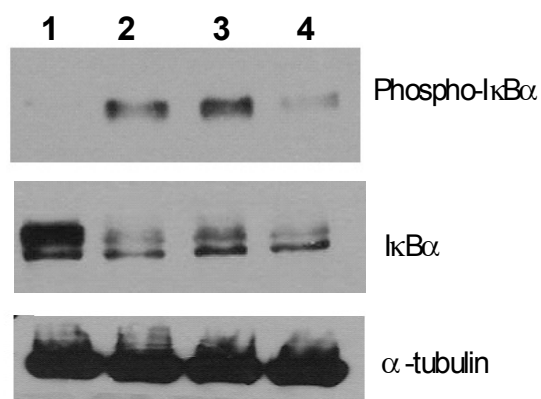


圖七 雷公藤內脂醇對 IL-1 誘導 SW1353 細胞 MMP-3 及 MMP-13 基因表現之影響。Total RNA was extracted from SW1353 cells treated with or without 5 ng/ml IL-1 and various concentrations of triptolide for 6 hours. MMP-3 and MMP-13 mRNA levels were determined by RT-PCR. GAPDH was as a control.



圖八 雷公藤內脂醇對 IL-1 誘導 SW1353 細胞活化 ERK1/2 表現之影響。Total protein was extracted from SW1353 cells treated with or without 5 ng/ml IL-1 and various concentrations of triptolide for 1 hour. Lysates were subjected to Western analysis for phosphor-ERK1/2, total ERK1/2, and  $\alpha$ -tubulin levels. Shown are representative blots of three repeats.





Lane 1: control  
Lane 2: IL-1 $\beta$  5ng/ml  
Lane 3: IL-1 $\beta$  5ng/ml + 0.1% DMSO  
Lane 4: IL-1 $\beta$  5ng/ml +100 nM Triptolide

**圖九** 雷公藤內脂醇對 IL-1 $\beta$  誘導 SW1353 細胞 I $\kappa$ B $\alpha$  降解之影響。Total protein was extracted from SW1353 cells treated with or without 5 ng/ml IL-1 $\beta$  and various concentrations of triptolide for 1 hour. Lysates were subjected to Western analysis for phosphor- I $\kappa$ B $\alpha$ , total I $\kappa$ B $\alpha$ , and  $\alpha$ -tubulin levels. Shown are representative blots of three repeats.

