

編號：CCMP94-RD-026

以啟動子轉殖細胞株篩檢調節免疫力 之中藥的動物實驗評估

林璧鳳

台灣大學

摘 要

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_H-1 、 T_H-2 免疫反應之平衡，至今所知不多。為了探討此問題，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。研究策略乃利用轉染 (transfection)，分別建構能表現 T_H-1 的細胞激素 IFN- γ 或 T_H-2 的細胞激素 IL-4 或 NF- κ B 啟動子連接報導基因 luciferase 作為檢測之細胞株，例如 RAW 264.7 巨噬細胞株、EL-4 T 淋巴球細胞株等，以作迅速篩選之工具，再分別以初代腹腔細胞和脾臟細胞利用 *in-vitro* 給予中草藥材方式，以及以 *in-vivo* 餵食動物方式對腹腔細胞、脾臟細胞分泌發炎性介質之變化，探討轉染之細胞株結果是否與動物模式的結果一致，以便確認此快速篩選模式的有效性，並且了解抑制發炎反應對免疫調節有否影響。最後以餵食動物中草藥的脾臟細胞與腹腔細胞的免疫指標評估轉染細胞株之應用價值。期望對建立快速篩選既能抗發炎又能增強免疫力之中草藥有正面效果，將來能進一步分析並鑑定功能性成分因子，有助於保健食品之開發。首先利用轉染之細胞株進行細胞培養，當作篩選抗發炎活性中草藥之工具，探討待測樣品對表現 IFN- γ 、IL-4 免疫細胞分子層次調控的影響。結果顯示桑寄生乙酸乙酯萃取物可顯著降低 NF- κ B 和 IFN- γ luciferase activities、脾臟細胞 IFN- γ 分泌，同時對 RAW 264.7 巨噬細胞株及初代腹腔細胞皆具抑制 PGE₂ 分泌的能力。另外；當歸乙酸乙酯萃取物可顯著降低 NF- κ B luciferase activities 及抑制初代腹腔細胞 PGE₂ 的分泌能力。而利用腹腔注射 LPS 誘發急性發炎動物模式中，於初步實驗結果已找到合適 LPS LD₅₀ 劑量為 15mg/kg BW，且實驗結果顯示發炎小鼠血清中

TNF- α 含量高其存活率越低。將來將更進一步以桑寄生、當歸等乙酸乙酯萃取物測試其於急性發炎動物模式之效用，俾能利於篩選中草藥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、中草藥進行發炎反應研究之不同種類細胞實驗模式。

關鍵詞：短暫轉染、IFN- γ 、NF- κ B、RAW 264.7 巨噬細胞株、EL-4 T 細胞株、BALB/cJ mice、初代腹腔巨噬細胞、初代脾臟細胞、中草藥

Number: CCMP94-RD-026

Construction of Promoters Based Immunity Screening System and Its Application on the Study of Chinese Traditional Herbs

Bi-Fong Lin

National Taiwan University

ABSTRACT

The purpose of this project is to establish a screening system for Traditional Chinese medicinal herbs (TCMHs), which may exert regulatory effects on immune and inflammatory responses. Therefore, the effects of TCMHs on transient transfection were compared with those on BALB/c primary cells. The scheme for the screening system is to construct plasmids containing reporter gene luciferase with promoter sequence either of Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) or interferon- γ (IFN- γ). These reporter plasmids were transiently transfected into RAW 264.7 cell or EL-4 T cell to test for luciferase activity. TCMHs were also added to lipopolysaccharide / interferon- γ (LPS/IFN- γ)-activated peritoneal macrophages and Concanavalin A (Con A)-activated spleen cells. The methanol extracts of these TCMHs were further fractionated with hexane and ethyl acetate (EtOAc). The results showed that EtOAc fraction of *Taxilli ramulus* significantly decreased NF- κ B and IFN- γ luciferase activities and spleen cell IFN- γ secretion ($P < 0.05$), it also significantly decreased PGE₂ secretion of transiently transfected RAW 264.7, which was consistent to its effects on primary peritoneal macrophages. *Angelicae sinensis radix* significantly decreased NF- κ B luciferase activity and PGE₂ secretion from transiently transfected RAW 264.7 ($P < 0.05$), which was consistent to that

from peritoneal macrophages. Thus, the consistent results in transient transfection system and primary cells showed by *Taxilli ramulus* and *Angelicae sinensis radix*, suggests there TCMHs may be a potential anti-inflammatory effects that worthy of further study. On the other hand Lipopolysaccharide (LPS) has been known to induce endotoxin shock. The high mortality from sepsis is in part mediated by bacterial endotoxin which stimulates macrophages to secrete large amount of inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-12 (IL-12) and nitric oxide (NO). Preliminary data showed that serum levels of TNF- α readily increase and peak at 2 h after the intraperitoneal (i.p.) administration of 15 mg/kg LPS in BALB/cJ mice. Additionally the negative correlation between serum levels of TNF-a and survival span in LPS-challenged mice was observed. The effect of traditional Chinese medicinal herbs (TCMHs), *Taxilli ramulus* and *Angelicae sinensis* (a popular Chinese herb, also known as Dang Quai), on septic shock in vivo will be explored.

Keywords: transfection, RAW264.7 macrophage cell line, EL-4 cell line, IFN- γ , NF- κ B, BALB/cJ mice, peritoneal macrophages, spleen cells, LPS, septic shock

壹、前言

中國醫藥學的產生是在人類謀求生存而尋找食物的同時，發現了也能用於預防、治療疾病的原料，如：茯苓、粟米、山藥、麻仁等，因而產生了「藥、食同源」或「醫、食同源」的思想觀念，並在長期的親身體會中，認識到「攝生」與「治病」的辨證關係和它們之間的內在聯繫。由「食物本草」的形成為始，逐漸發展成為「食養」和「食療」的專門學科，並成為中國醫藥學的一個獨特分支（許，1985）。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：蒜素、辣椒素、甘草素等，而多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。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，仍待確定。因此，根據中醫藥委員會曾提出的重點，中藥功能性篩選模式的建立，以及中醫藥基因體研究重點項目「研究中藥對基因表現之效應」，中草藥對免疫反應的調控機轉是否藉由影響細胞激素的基因表現？如是，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。

而在合成藥物未開發之前的年代裡，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。因此，利用基因技術篩選新的有效成份，不僅是為了彌補傳統方法的缺陷，更重要的是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，使中草藥現代化真正進入一個寬廣的良性發展軌道。在中草藥開發上，調控免疫和發炎相關中草藥的篩選是非常重要的，且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，近年來許多研究都朝這領域發展。且目前已知，過度或異常活化 COX-2 或 iNOS 的活性和人類特定發炎性疾病和癌症有相關性，已知 vascular endothelial growth factor (VEGF) family 中之 VEGF-C mRNA transcription 會被 PGE₂ 活化，而進行 lymphangiogenesis (Tammela, 2005)。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，其中敗血症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。生物體為抵抗入侵的感染源，須藉由免疫系統的作用。當受到內毒素刺激的巨噬細胞，會生成發炎介質以抵禦感染，這些介質包括：一、蛋白質類如細胞激素，通常是 interleukin 如 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-13 等，其中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 為促發炎細胞激素，在急性發炎反應中扮演重要角色，這三種細胞激素會增加血管通透性，因而導致紅、腫、熱、痛等發炎反應，為發炎反應之主要調節者 (Gins, 2002; Hanada and Yoshimura, 2002)。二、高反應性活性氧物質 (Reactive Oxygen Species, ROS) 如 NO、O₂⁻、與 OONO⁻、H₂O₂ 等。三、脂質衍生物，包括血小板活化因子及 cyclooxygenase 和 lipooxygenase 代謝花生四烯酸 (arachidonic acid) 所生成之發炎分子如白三烯素 (leukotrienes, LTA₄、LTC₄)、前列腺素 (prostaglandins, PGE₂) 及血栓凝集素 (thromboxan, TXA₂)，這些發炎介質相互影響，如 NO 的生成會加強活化的巨噬細胞分泌 IL-1 β 的能力；IL-1 β 與 TNF- α 則會促進 IL-6 的分泌，而誘發 PGE₂ 的生成。當這些介質適量的表現，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。因此調控這兩種重要生物因子有關的訊息傳遞路徑被視為是尋找有用天然藥物來對抗或防癌的重要標的，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 (Wallace, 2002; Calixto et al, 2003 and 2004)。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。

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。研究策略乃利用生物技術進行轉染 (transfection)，分別建構能表現 T_H-1 的細胞激素 IFN- γ 或 T_H-2

的細胞激素 IL-4 或 3x- κ B-tk 啟動子連接報導基因 luciferase 作為檢測之細胞株，例如 RAW 264.7 巨噬細胞株、EL-4 T 淋巴球細胞株等，以作迅速篩選之工具，俾能利於篩選中草藥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、中草藥進行大量篩檢的技術平台及研究不同種類細胞實驗之模式。並探討轉染之細胞株基因表現與初代細胞分泌細胞激素的一致性。另外；由於初代細胞具有比細胞株更接近生物體之優點，且初代細胞對免疫反應更具敏感性，因此本實驗將第一階段短暫轉染篩選出之八種中草藥（包括 EtOAc 層之桑寄生、白皮耆、當歸、穿心蓮、板藍根、杜仲葉及 Hexane 層之桑寄生、牛膝、柴胡），再進一步以初代細胞培養模式加以篩選，探討這八種中草藥對免疫細胞的影響並評估此兩種細胞模式結果之一致性，以做為將來動物活體試驗之依據及管餵劑量之參考。最後再以動物體模式驗證中草藥調節免疫的一致性。

貳、材料與方法

一、中草藥材之中藥飲片萃取

以 95%乙醇（藥用酒精，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。將這三層萃取物經減壓濃縮後即可得 Hexane 層、EtOAc 層、H₂O 層乾燥萃取物，Hexane 層、EtOAc 層以 99.8 % EtOH (Merck) 回溶後，-20°C 保存備用；而 H₂O 層乾燥萃取物，以二次去離子水回溶後，再以 0.2µm filter 過濾，-20°C 保存備用。

而本實驗將去年第一階段利用短暫轉染所篩選出之八種中草藥（包括 EtOAc 層之桑寄生、白皮者、當歸、穿心蓮、板藍根、杜仲葉及 Hexane 層之桑寄生、牛膝、柴胡），再進一步以初代細胞培養模式加以篩選，探討這八種中草藥對免疫細胞的影響，以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 40 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±2°C，光照循環各為 12 小時，飼養至 8~12 週大時進行實驗。

三、細胞培養基與藥品

(一) TCM™ (serum replacement 50 x concentrate, CELOX, Cat. No.1002)

(二) HyQ® RPMI-1640 medium (Hyclone®, Cat. No. SH30255.01)

(三) Antibiotic-Antimycotic (PenicillinG sodium-Streptomycin sulfate-Amphotericin B 三合一抗生素, GIBCO™, Invitrogen, Cat. No. 15240-062)

(四) TCM-RPMI-1640 medium：於 RPMI-1640 medium 中加入 10ml TCM 及 2.5ml 三合一抗生素。

(五) 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 2.5ml 三合一抗生素，再以 7.5% NaHCO₃ 調 pH 值，至深紅色。

(六) RBC ACK lysis buffer：將 0.15M NH₄Cl, 0.1 mM Na₂EDTA, 1mM KHCO₃ 溶於 1L 二次去離子水中，經 121°C，30 分鐘滅菌。

(七) Lipopolysaccharide (LPS, Prod. Num. L2654, Sigma[®])

(八) Interferon-Gamma (IFN- γ , Prod. Num. I3275, Sigma[®])

(九) Concanavalin A (Con A, Prod. Num. C5275, Sigma[®])

(十) 75%酒精

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

將 8 ~ 12 週大之 BALB/cJ 雌鼠以 CO₂ 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 5ml 針筒緩緩注入 HBSS buffer，晃動小鼠身體後，再以 5ml 針筒將腹腔細胞抽出，反覆 3 次後，將所得約 10ml 之細胞懸浮液以 1500 rpm 離心 10 分鐘，以 HBSS buffer 洗淨細胞，以 1ml TCM-RPMI-1640 medium 懸浮細胞，注入 96 well plate (Nunc[™]) 中，調整細胞密度為 2×10^5 cells/200 μ l/well，於 5% CO₂，37°C 培養箱經 3 小時細胞附著後，吸除舊培養液及未附著之懸浮細胞，在 96 well plate 內只剩下趴附型之腹腔巨噬細胞，先以各濃度之中草藥萃取物進行預培養 1 小時，再以同時含中草药萃取物與 LPS/IFN- γ (10 μ g/ml + 50 units/ml) 的培養液處理細胞，培養 48 小時後收集培養液，於 -70°C 保存，以進行 NO、PGE₂、IL-6、TNF- α 等含量分析，細胞則以 MTT 進行細胞存活率測試。

五、BALB/cJ 雌鼠初代脾臟細胞 (spleen cells) 之培養

將 8 ~ 12 週大之 BALB/cJ 雌鼠之脾臟取出置於已加入 TCM-RPMI-1640 medium 之 3cm petri dish (FALCON[®]) 內，以無菌針筒的尾端將脾臟磨碎，反覆 3 次後，使成約 10ml 之細胞懸浮液，靜置 5 分鐘後，吸取上清液以 1500rpm 離心 10 分鐘，倒掉上清液並輕輕拍散細胞，加入 1ml RBC ACK lysis buffer 反應 2 分鐘，使紅血球溶解，迅速加入 HBSS buffer 中和之，再以 1500rpm 離心 7 分鐘，以 HBSS buffer 洗淨細胞，此步驟反覆 3 次，再以 1ml TCM-RPMI-1640 medium 懸浮細胞，注入 48 well plate (Nunc[™]) 中，調整細胞密度為

2.5×10^6 cells/250 μ l/well，先以各濃度之草藥萃取物進行預培養 1 小時，再以同時含有中草藥萃取物與 Con A (5 μ g/ml)的培養液處理細胞，於 5% CO₂，37 $^{\circ}$ C 培養箱培養 24 小時後，經 1500rpm，10 分鐘離心收集培養液，於 -70 $^{\circ}$ C 保存，以進行 IL-2、IFN- γ 等含量分析，細胞則以 MTT 進行細胞存活率測試。

六、急性發炎之動物模式建立

目前經常採用之急性發炎動物模式，可分為多重細菌感染與單一細菌感染的急性期反應，其中單一細菌感染的實驗，則以注射細菌內毒素的方式，誘發急性期反應。1990 年代 Masferrer 等學者給予小鼠腹腔注射 LPS，發現其腹腔巨噬細胞的 COX 活性會顯著增加，再予以注射抗發炎類固醇藥物 dexamethasone (DEX)，則可顯著抑制其 COX 活性。而 2000 年 Meisner 等人研究指出水溶性低分子量的抗氧化劑 pyrroline-dithiocarbamate (PDTC) 可有效抑制 J774A.1 cell、female NMRI mice peritoneal macrophage 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 female NMRI mice 預先腹腔注射 (i.p.) PDTC 30 分鐘後，再給予 LPS 注射所造成之 endotoxin shock，具有顯著延長生命期及存活率 (48% compared to control 20%) 之作用。且亦有研究指出，綠茶中的生物活性因子 EGCG 可降低 TNF- α 產生並延長敗血症之小鼠生命期 (Yang, 1998)。因此，本次實驗所篩選出具抗發炎與抗氧化之 EtOAc 層桑寄生和當歸萃取物，是否具相同效果？相當值得更進一步探討。

故本實驗將已分別經短暫轉染及初代細胞篩選後之中草藥材桑寄生、當歸，再以 LPS 致小鼠急性發炎的動物模式探討飼養動物中草藥的免疫指標，探討與前兩種細胞模式結果之一致性，及評估轉染細胞株之應用價值，以確實評估抗發炎潛力之中草藥。

七、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)。

參、結果與討論

一、初代腹腔巨噬細胞分泌 NO、PGE₂、IL-6、TNF- α 的影響

首先以 MTT 測試初代細胞之存活率，因此在初代細胞的實驗中使用的劑量為 2 ~ 10 μ g/ml。

將經 transient transfection 篩選出之 EtOAc 層中草藥萃取物桑寄生、白皮者、當歸、穿心蓮、北板藍根、杜仲葉及 Hexane 層之桑寄生、牛膝、北柴胡，進行初代腹腔巨噬細胞之培養，進行預培養 1 小時，再以含中草藥萃取物與 LPS/IFN- γ (10 μ g/ml + 50 units/ml) 的培養液處理細胞，培養 48 小時後收集培養液，以進行 NO、PGE₂、IL-6、TNF- α 等含量分析。結果顯示 EtOAc 層中草藥萃取物之桑寄生、當歸、白皮者和穿心蓮於濃度 2 ~ 10 μ g/ml μ g/ml 時，皆可顯著抑制初代腹腔巨噬細胞 NO 之分泌 ($p < 0.05$)，如圖 1 所示。

而 EtOAc 層中草藥萃取物之桑寄生、當歸、白皮者、穿心蓮、北板藍根、杜仲葉及 Hexane 層之桑寄生於濃度 2 ~ 10 μ g/ml μ g/ml 時，皆可顯著抑制初代腹腔巨噬細胞 PGE₂ 之分泌 ($p < 0.05$)，如圖 2 所示。

EtOAc 層中草藥萃取物之桑寄生在濃度 10 μ g/ml 時，可顯著抑制 IL-6 之分泌量 ($p < 0.05$)，如圖 3 所示。

對於 TNF- α 分泌量方面，EtOAc 層中草藥萃取物之白皮者可顯著抑制 TNF- α 之分泌量 ($p < 0.05$)，如圖 4 所示。在 LPS 誘導的發炎反應中，TNF- α 是一個最早期被誘發的重要細胞激素，其次誘發 IL-1、IL-6 及 IL-8 的產生，進而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，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。而在 2000 年日本學者 Bedir 等人利用 NF- κ B 轉錄因子以短暫轉染至巨噬細胞的實驗模式，發現黃耆中之 astragaloside I 可以增加 NF- κ B-directed luciferase 表現約 65%，同時也提高促發炎細胞激素 IL-1 β 、TNF- α 等 m-RNA 之表現。

將上述初代腹腔巨噬細胞上清液所分泌之各種促發炎性介質進行相關性分析，其結果發現 NO 與 PGE₂ 之分泌量呈正相關性，達 $p =$

0.0001, $r = 0.52$, 如圖 5, 且亦發現 IL-6 與 PGE₂ 之分泌量呈正相關性, 達 $p = 0.0003$, $r = 0.38$, 如圖 5 所示。

2000 年, 邱等學者探討 6 種民間常用抗發炎中草藥的作用機轉是否與干擾發炎物質 NO 的生合成有關, 結果顯示以大葉桑寄生 (*Taxillus liquidambaricolus*, TI) 及青脆枝 (*Nothapodytes foetida*, Nf) 之乙醇萃取物 (2~100 μ g/ml), 其中大葉桑寄生在濃度 10~100 μ g/ml 時, 皆可明顯抑制由 LPS/IFN- γ 誘發 RAW264.7 NO 之生成量。由表 1 結果顯示, 在本次實驗中無論短暫轉染篩選系統或初代腹腔巨噬細胞培養模式中, EtOAc 層中草藥萃取物之桑寄生、當歸皆發現對抑制 NO 和 PGE₂ 之分泌具顯著抑制效果, 亦即具一致之結果。另一方面, Hexane 層桑寄生, 可顯著抑制初代腹腔巨噬細胞 PGE₂ 之分泌 ($p < 0.05$), 如圖 1 所示, 此結果與本次 RAW 264.7 巨噬細胞株之短暫轉染篩選系統具一致性, 同時亦與 EtOAc 層桑寄生之結果相同, 對此我們認為桑寄生無論 Hexane 層或 EtOAc 層, 都應該進一步以活體動物試驗加以探討其抗發炎之作用機制。而 2003 年, Rao 等人的實驗顯示, 一種來自 *Egletes viscosa* Less 的類黃酮成份 ternatin, 若預先給予 male Wistar rats 25, 50mg/kg 1 小時後, 再給予腹腔注射 3% thioglycolate, 4 天後犧牲可觀察到明顯降低噬中性球 migration; 另外對 male Swiss mice 先行腹腔注射 Freund's adjuvant 5 天後, 再給予 ternatin 25, 50mg/kg 2 小時後, 取腹腔巨噬細胞以 LPS 刺激培養 24 小時後, 收集培養液分析 NO 分泌量, 結果顯示 ternatin 25mg/kg 可顯著降低 *ex vivo* 培養之 NO 分泌量, 證明其可抑制噬中性球之 migration 與 macrophage function。Rao 等人的實驗與本實驗之方法雖然不盡相同, 但由實驗結果可觀察到 EtOAc 層桑寄生、當歸可顯著抑制初代腹腔巨噬細胞 NO 之分泌, 與 Rao 等人的實驗結果相同, 因此; 我們推測 EtOAc 層桑寄生、當歸對於抑制 NO 之分泌, 或許也含有和 *Egletes viscosa* Less 的類黃酮成份 ternatin 相似之化合物, 值得對於當歸內類黃酮等多酚類化合物進行檢測。

二、初代脾臟細胞分泌 IL-2、IFN- γ 的影響

將經 transient transfection 篩選出之 EtOAc 層中草藥萃取物桑寄生、白皮耆、當歸、穿心蓮、北板藍根、杜仲葉及 Hexane 層之桑寄生、牛膝、北柴胡, 進行初代脾臟細胞之培養, 預培養 1 小時, 再以含中草藥萃取物與 Con A (5 μ g/ml) 的培養液處理細胞 24 小時後, 經 1500 rpm, 10 分鐘離心收集培養液, 以進行 IL-2、IFN- γ 等含量分析。EtOAc

層中草藥萃取物寄生於濃度 2 ~ 10 $\mu\text{g/ml}$ 時，可顯著抑制初代脾臟細胞 IFN- γ 、IL-2 之分泌 ($p < 0.05$)，如圖 6、7 所示。此結果亦與本次 EL-4 T 細胞株之短暫轉染篩選系統結果相同，可顯著降低 pIFN- γ -Luciferase activity。

EtOAc 層中草藥萃取物白皮者和當歸對 IL-2、IFN- γ 之分泌不具顯著影響，如圖 8 所示。此結果亦與本次 EL-4 T 細胞株之短暫轉染篩選系統具相似之結果，晉者在 pIFN- γ -Luciferase activity 具有增加之趨勢，但對 IL-2 分泌量不具顯著影響。而在 2005 年日本學者 Yesilada 等人以甲醇萃取黃耆及其同屬近緣植物 (*Astragalus cephalotes*, *Astragalus oleifolius*, *Astragalus trojanus*) 之乾燥根萃取物，利用健康成年人週邊全血為實驗模式，分別以 lipopolysaccharide (LPS) 和 phorbolacetate (PHA) 刺激後添加或不添加黃耆及其同屬近緣植物之萃取物，分析其細胞激素如 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、IL-2、IL-4、IFN- γ 等分泌量，實驗結果顯示，黃耆三帖類皂素能顯著增加 IL-2 細胞激素分泌量，作者認為此可能是黃耆具有免疫調節之機制。而蔡等人以當歸 (*Angelica sinensis*) 和黃耆 (*Astragalus membranaceus*) 所組成之當歸補血湯，處理人類周邊單核細胞，結果顯示其能促進 PHA 所引起之細胞增殖，且其增殖作用與調控 IL-2、IL-3、IFN- γ 之生成有關。但在本次實驗中 EtOAc 層中草藥萃取物白皮者和當歸，對 IL-2 和 IFN- γ 之分泌並不具顯著影響。

另一方面，EtOAc 層中草藥萃取物穿心蓮、杜仲葉可顯著抑制初代脾臟細胞 IL-2 之分泌 ($p < 0.05$)，如圖 6 所示。

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。且目前已知，過度或異常活化 COX-2 或 iNOS 的活性和人類特定發炎性疾病和癌症有相關性，已知 vascular endothelial growth factor (VEGF) family 中之 VEGF-C mRNA transcription 會被 PGE₂ 活化，而進行 lymphangiogenesis (Tammela, 2005)，因此調控這兩種重要生物因子有關的訊息傳遞路徑被視為是尋找有用天然藥物來對抗或防癌的重要標的，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 (Wallace, 2002; Calixto et al, 2003 and 2004)。已有許多研究指出，草本植物的根、莖、葉中，富含多醣體、類黃酮與多酚類等生理活性物質，而這些草本植物萃取物，可能具有免疫調節作用，包括抗發炎、抗過敏和抗氧化等功能，而根據 2002 年 Huang 和 Wu 研究顯示，傳統中醫的降火食物如菊花 (Chrysanthemum flower)、苦瓜 (Bitter gourd)、蓮子心 (Lotus seed plumule)、綠茶等，而上火食物如龍眼 (Longan)、荔枝 (Litchi)、桂圓 (Dried longan) 等，對巨噬細胞株 RAW264.7 分泌 PGE₂ 的抑制作用，意即降火或上火的敘述，作者認為或許可以作為發炎反應介質之評估指標。此外；2004 年 Ho 等學者，亦以性冷的中草藥材黃連 (*Coptis chinensis*)、黃芩 (*Scutellaria baicalensis*) 和性熱的中草藥材乾薑 (*Zingiber officinale*)、肉桂 (*Cinnamomum cassia*) 利用 RAW264.7 巨噬細胞生成 PGE₂ 的作用來探討傳統中醫的降火或上火的敘述。

故在本次實驗中，不論短暫轉染篩選系統或初代腹腔巨噬細胞培養模式中均具有降低 NO、PGE₂ 的中草藥如 EtOAc 層中草藥萃取物桑寄生、當歸是否可以作為抗發炎之中草藥？確實相當值得更進一步以活體急性發炎動物模式加以評估及釐清。而其中桑寄生 EtOAc 層萃取物可顯著降低 NF- κ B luciferase activity ($p < 0.05$)，且也顯著降低初代腹腔巨噬細胞之 NO、PGE₂ 和 IL-6 之分泌量，亦可顯著降低 pIFN- γ -Luciferase activity ($p < 0.01$)；而在初代脾臟細胞培養模式中可顯著降低 IL-2 及 IFN- γ 分泌量。另外，EtOAc 層中草藥萃取物當歸可顯著降低 NF- κ B luciferase activity ($p < 0.05$)，且也顯著降低初代腹腔巨噬細胞之 NO 和 PGE₂ 之分泌量，因此；將 EtOAc 層中草藥萃取物桑寄生和當歸優先列為未來即將進行，以 LPS 致 BALB/cJ 雌鼠急性發炎模式的動物研究之首選中藥材。

三、急性發炎動物模式建立之初步結果

以 10~12 週大之 BALB/cJ 雌鼠為實驗對象，分別給予腹腔注射 LPS 劑量為 5, 10, 15, 20, 30, 50mg/kg BW，觀察存活率如圖 8 所示，並於第二和第九小時進行眼窩採血，分析其血清中促發炎細胞激素，TNF- α , IL-6, IFN- γ 及 NO 含量，如圖 9, 10, 11, 12 所示。其結果顯示隨 LPS 注射劑量增加，BALB/cJ 雌鼠存活率越低，且血清中促發炎細胞激素 IL-6, TNF- α , IFN- γ 含量越高，呈顯著負相關性如圖 13, 14, 15 所示。另外；亦以抗發炎藥物 PDTC 做為正對照組，實驗結果以

腹腔注射 LPS 劑量 15mg/kg BW 進行急性發炎的動物模式以探討中草藥材之影響，如圖 16, 17, 18, 19 所示。

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-026 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

肆、參考文獻

1. 許鴻源：簡明藥材學。新醫藥出版社，1985。
2. 李沐勳、李威著：常用中草藥手冊。國立中國醫藥研究所出版，2001。
3. 行政院衛生署中醫藥委員會。中華中藥典。行政院衛生署編印，2004。
4. 邱文慧、周正仁、柯漢傑、陳介甫：在巨噬細胞探討六種抗發炎中草藥對 LPS/IFN- γ 所誘發一氧化氮生成之影響。*J. Chin. Med.* 2000; 11(2)：87-94。
5. 洪永瀚、林璧鳳：以巨噬細胞株分泌發炎介質篩選抗發炎作用的模式評估。*中華民國營養學會雜誌* 2004a；29(3)：159-167。
6. 洪永瀚、林璧鳳：稻苗草榨汁對抑制發炎反應的功能研究。*台灣農業化學與食品科學* 2004b；42(6)：456-465。
7. 梁佳玟、賴怡君、朱燕華：中草藥對於促發炎細胞激素生之影響。*J. Chin. Med.* 2004；15(4)：293-304。
8. 蔡德豐、謝瓊慧、林意森、蔡維人、郭育綺：當歸補血湯抽出物促進人類周邊血單核細胞之細胞增殖與細胞激素產生。*J. Chin. Med.* 2004；12(3)：191-202。
9. Amin A, Nanji KJ, Andrew JD.: Curcumin prevents alcohol-induced liver disease in rats by inhibiting the expression of NF- κ B-dependent genes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver physiol.* 2003; 284: G321-G327.
10. 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.
11. Bedir E, Pugh N, Calis I, Pasco DS and Khan IA.: Immunostimulatory effects of cycloartane type triterpene glycosides from *Astragalus* species. *Biol. Pharm. Bull.* 2000; 23(7): 834-837.
12. 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.
13. Calixto JB, Otuki MF and Santos ARS.: Anti-inflammatory compounds of plant

- origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, NO and NF- κ B. *Planta Med.* 2003; 69: 973-983.
14. Calixto JB, Campos MM, Otuki MF. and Santos ARS.: Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med.* 2004; 70: 93-103.
 15. Crichton RR, Wilmet S, Legssyer R, Ward RJ.: Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J. inorganic Biochemistry.* 2002; 91: 9-18.
 16. Chang SC, Chiang BL, Wu WM, Lin BF.: Different dietary fats influence serum and tissue lipids and anti-ardiolipin antibody levels in autoimmune-prone NZB/W F1 mice. *Brit. J. Nutr.* 1999; 81: 331-340.
 17. Chen YC, Yang LL. and Lee TJF.: Oroxylin A inhibition of lipopolysaccharide induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of nuclear factor- κ B activation. *Biochemical Pharmacology.* 2000; 59: 1445-1457.
 18. 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.
 19. Gins BI.: Overview of local and systemic acute inflammatory response. *Lancet infectious disease.* 2002; 2(3): 171-179.
 20. Hsieh CC, Lin WC, Lee MR, Hsu SL, Liu HS, Kao ST. and Hsieh MT.: Dang-Gui-Bu-Xai-Tang modulated the immunity of tumor bearing mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology.* 2003; 25(2): 259-271.
 21. Ho SC. and Tsai PJ.: Comparison of the effects of Hot and Cold Chinese medicinal plants on the production of inflammatory mediators by RAW 264.7 cells. *J. of Food and Drug analysis.* 2004; 12(2): 120-127.
 22. Huang CJ. and Wu MC.: Differential effects of foods traditionally regarded as heating and cooling on prostaglandin E₂ production by a macrophage cell line. *J. Biomed. Sci.* 2002; 9: 596-606.
 23. Kiemer AK, Muller C, Vollmar AM.: Inhibition of LPS-induced nitric oxide and TNF- α production by α -lipoic acid in rat Kupffer cells and in RAW 264.7 murine macrophages. *Immunol. Cell Biol.* 2002; 80(6): 550-557.
 24. Kamdem RE, Sang S. and Ho CT.: Mechanism of the superoxide scavenging

- activity of Neoandrographolide — a natural product from *Andrographis paniculata* Nees. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 4662-4665.
25. Kumar RA, Sridevi K, Kumar NV, Nanduri S. and Rajagopal S.: Anticancer and immunostimulator compounds from *Andrographis paniculata*. *J. of Ethnopharmacology.* 2004; 92: 291-295.
26. Lee YS, Han OK, Yoo WK. and Kim HJ.: Immunomodulatory effects of aqueous-extracted *Astragali* radix in methotrexate-treated mouse spleen cells. *J. of Ethnopharmacology.* 2003a; 84: 193-198.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. Tammela T, Enholm B, Alitalo K. and Paavonen K.: The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovascular Research.* 2005; 65: 550-563.
31. Tseng J. and Chang JG.: Suppression of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , interleukin-6 and granulocyte-monocyte colony stimulating factor secretion from human monocyte by an extract of *Poria cocos*. 1992; 25: 1-11.
32. Tsai HR, Yang LM, Tsai WJ. and Chiou WF.: Andrographolide acts through inhibition of ERK1/2 and Akt phosphorylation to suppress chemotactic migration. *Eur. J. Pharm.* 2004; 498: 45-52.
33. Ukiya M.: Inhibition of tumor-promoting effects by poricoic acids G and H and other lanostane-type triterpenes and cytotoxic activity of poricoic acid A and G from *Poria cocos*. *J. Nat. prod.* 2002; 65: 462-465.
34. Wallace JM.: Nutritional and botanical modulation of the inflammatory cascade-eicosanoids, cyclooxygenases, and lipoxygenase-as an adjunct in cancer therapy. *Integrative Cancer Therapies.* 2002; 1(1): 7-37.

35. Xia YF, Ye BQ, Li YD, Wang JG., He XJ, Lin X, Yao X, Ma D, Slungaard A, Hebbel RP, Key NS. and Geng JG.: Andrographolide attenuates inflammation by inhibition of NF- κ B activation through covalent modification of reduced cysteine 62 of p50. *J. Immunol.* 2004; 173(6): 4207-4217.
36. Yang F, Villiers W, McClain C. and Varilek G.: Green tea polyphenols block endotoxin induced tumor necrosis factor production and lethality in a murine model. *J. Nutr.* 1998; 128: 2334-2340.

伍、圖

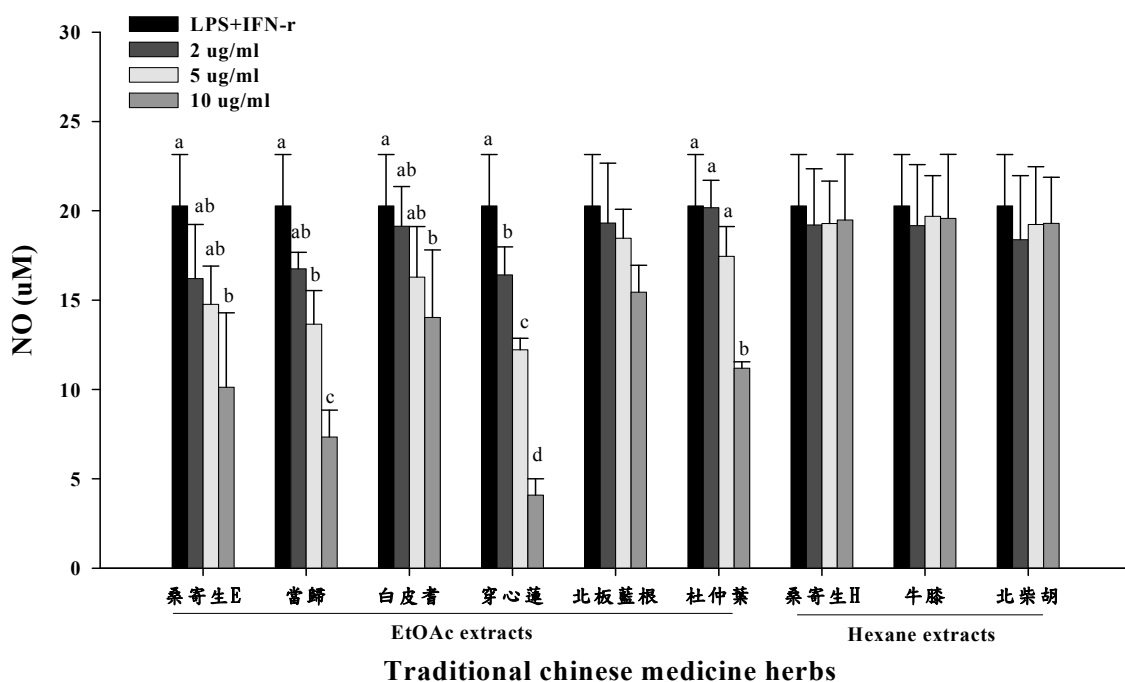


圖 1 中草藥對 LPS+IFN- γ 活化的 BALB/c 小鼠初代腹腔細胞分泌 NO 之影響

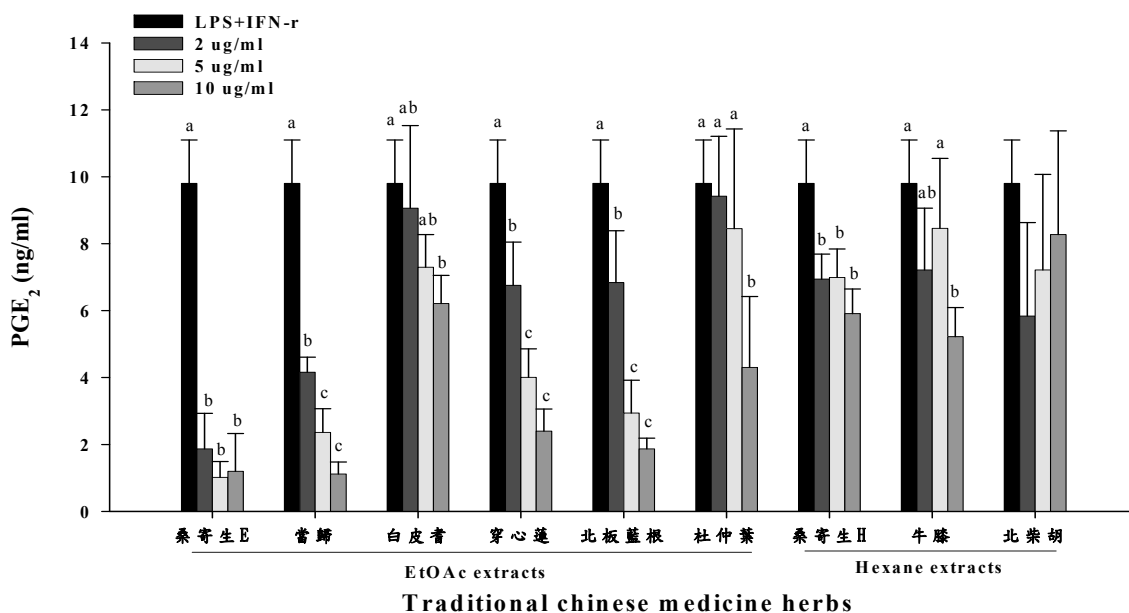


圖 2 中草藥對 LPS+IFN- γ 活化的 BALB/c 小鼠初代腹腔細胞分泌 PGE₂ 之影響

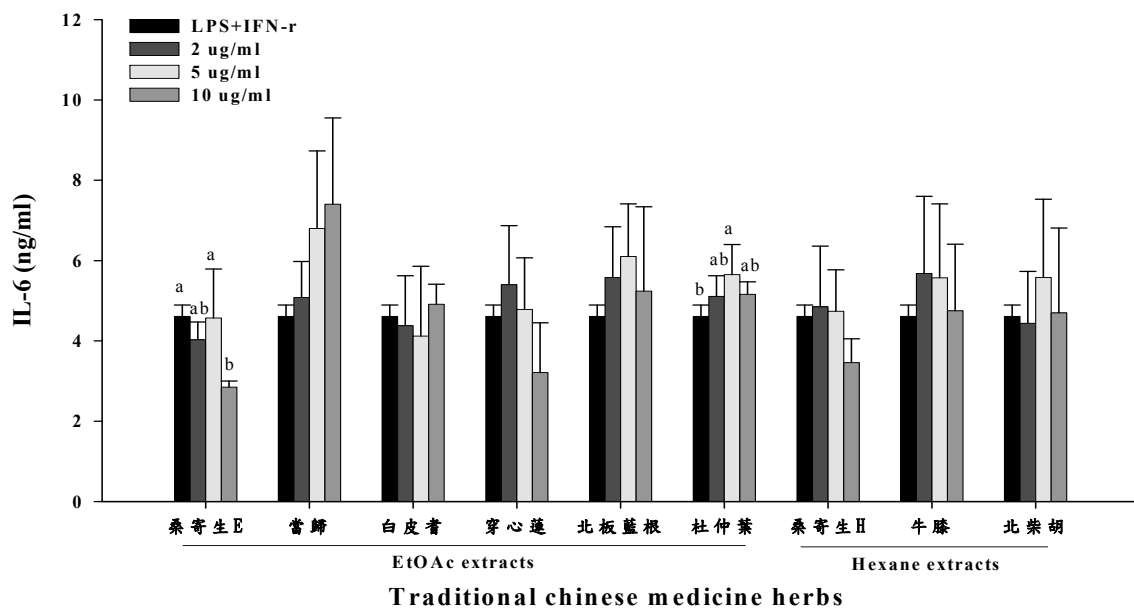


圖 3 中草藥對 LPS+IFN- γ 活化的 BALB/c 小鼠初代腹腔細胞分泌 IL-6 之影響

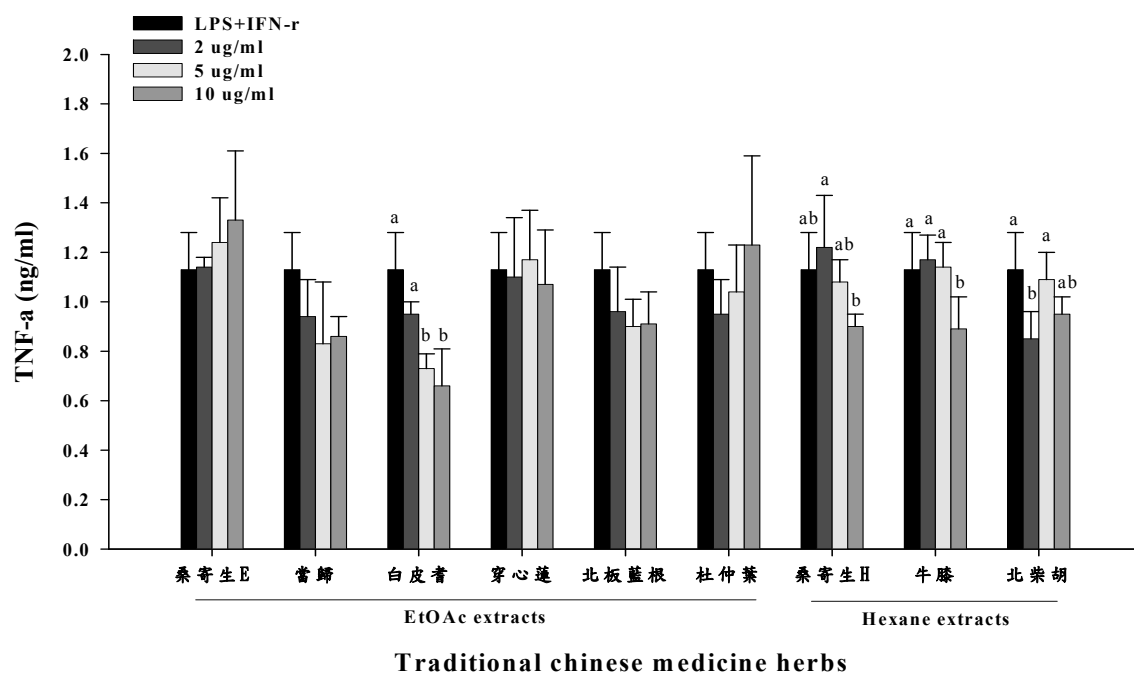


圖 4 中草藥對 LPS+IFN- γ 活化的 BALB/c 小鼠初代腹腔細胞分泌 TNF- α 之影響

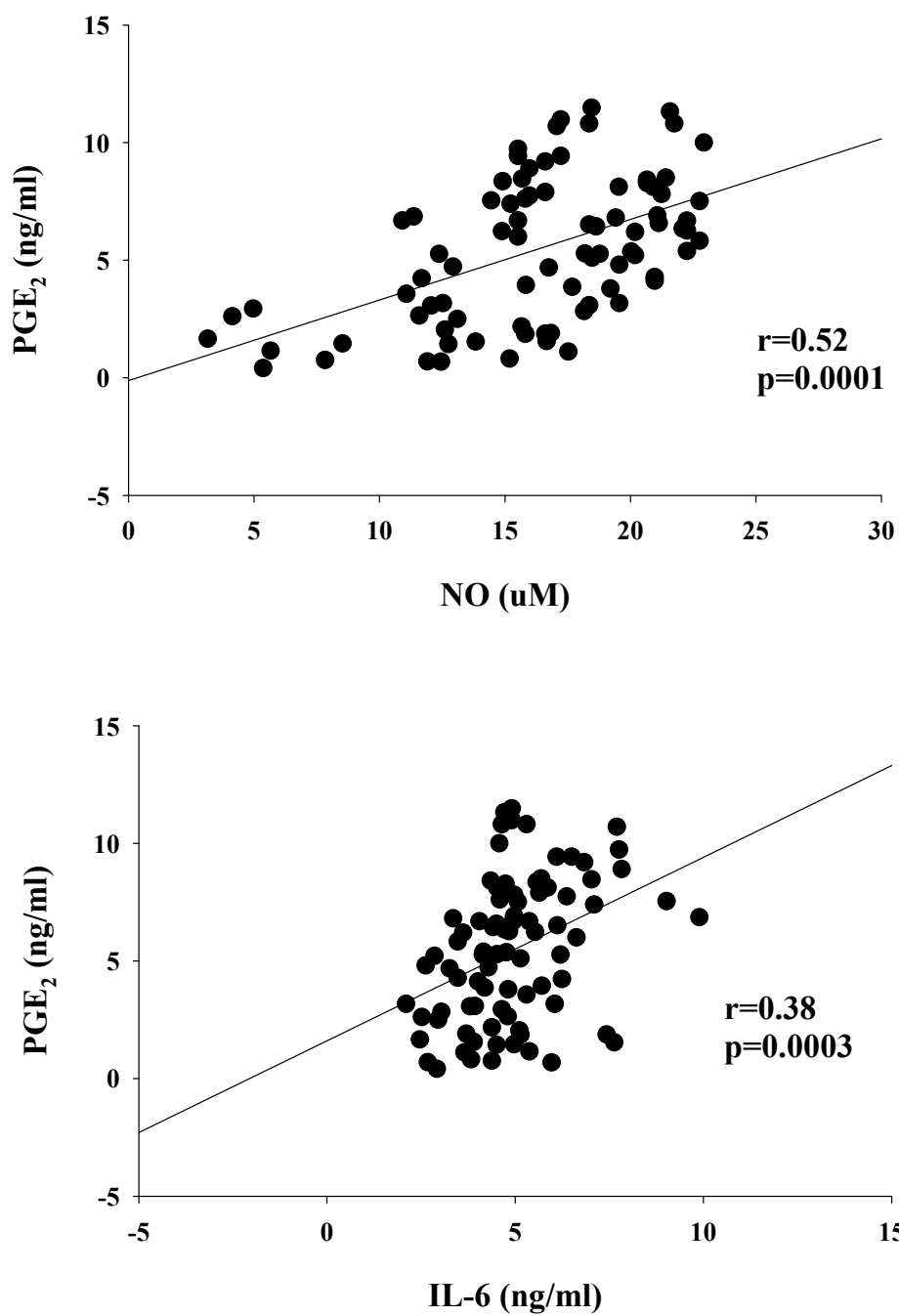


圖5 中草藥對LPS+IFN- γ 活化下BALB/c小鼠初代腹腔細胞NO; IL-6和PGE₂分泌量之相關性

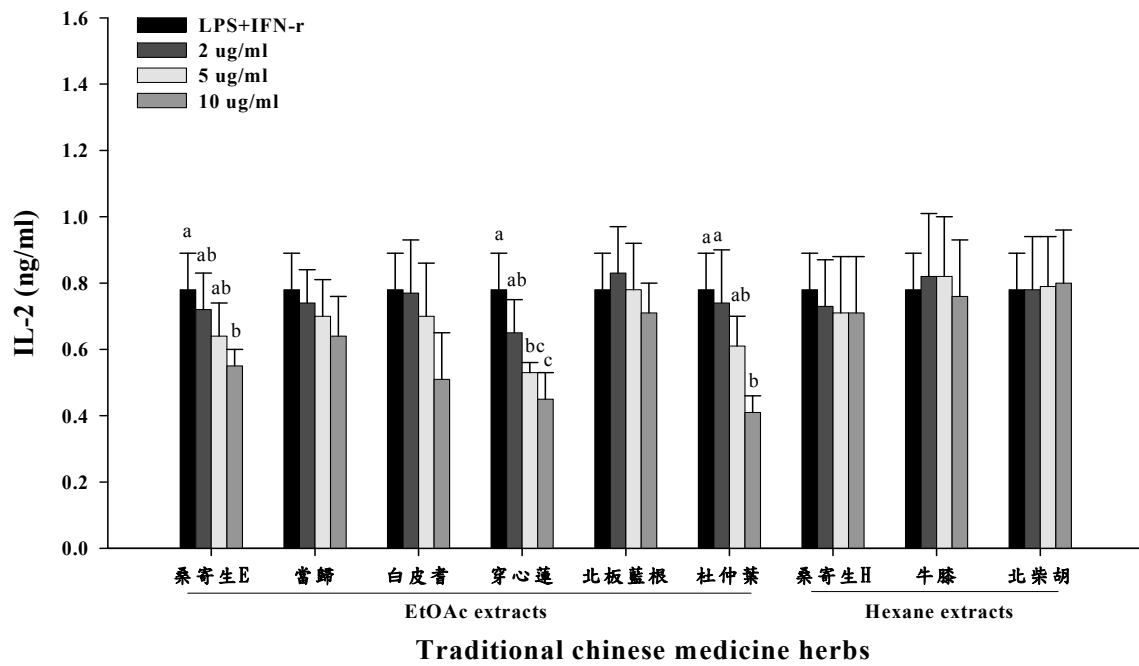


圖 6 中草藥對 Con A 活化的 BALB/c 小鼠脾臟細胞分泌 IL-2 之影響

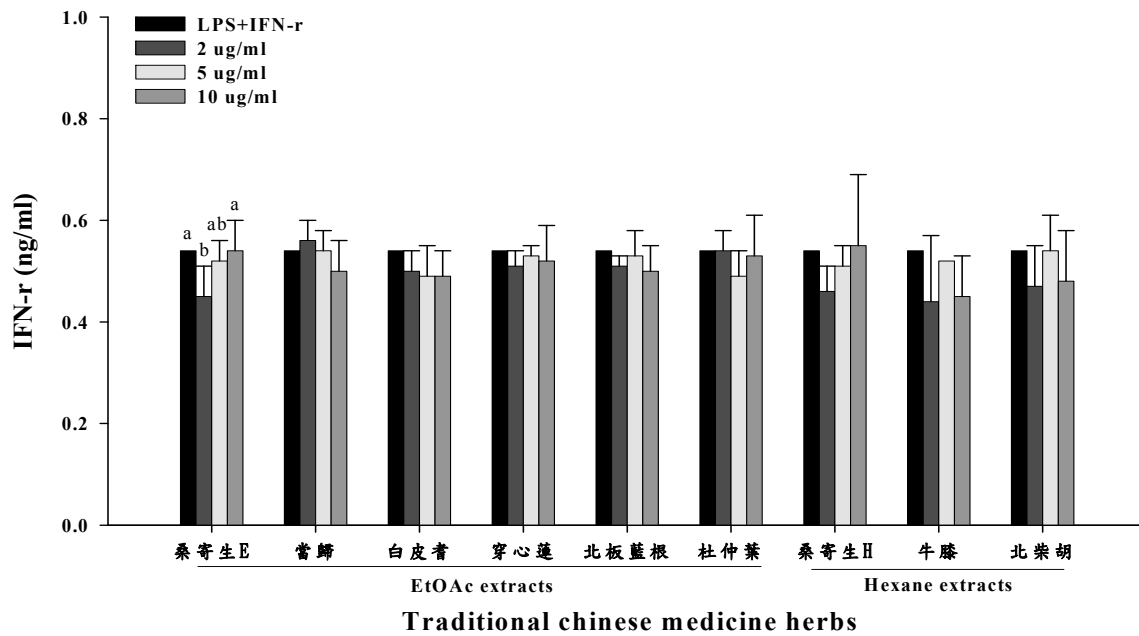


圖 7 中草藥對 Con A 活化的 BALB/c 小鼠脾臟細胞分泌 IFN- γ 之影響

Table 1. The consistent of the TCMH between the transient transfection system and primary cell culture system.

EtOAc fraction	Transient transfection								Peritoneal cells				Spleen cells		
	pNF-kB	pIFN-r	NO	IL-6	TNF-a	PGE2	IL-2	IL-10	NO	IL-6	TNF-a	PGE2	IL-2	IFN-r	IL-10
TR E	↓ 2, 5, 10	↓ 2, 5, 10	↓ 2, 5, 10	↓ 2, 5, 10	↓ 5, 10	↓ 2, 5, 10	—	↓ 5, 10	↓ 10	↓ 10	—	↓ 2, 5, 10	↓ 10	↓ 2	—
AR	—	↑ 5, 10	↓ 2, 5, 10	↓ 2, 5, 10	—	↓ 2, 5, 10	—	↓ 2, 10	↓ 10	—	↓ 5, 10	↓ 10	—	—	—
ASR	↓ 5, 10	—	↓ 2, 5, 10	↓ 2, 5, 10	↓ 2, 5, 10	↓ 10	—	↓ 2, 5, 10	↓ 5, 10	—	—	↓ 2, 5, 10	—	—	—
AH	↓	—	↓ 2, 5, 10	↓ 2, 5, 10	↓ 2, 5, 10	↓ 2, 5, 10	—	↓ 2, 5, 10	↓ 2, 5, 10	—	—	↓ 2, 5, 10	↓ 5, 10	—	—
IR	↓	—	↓ 2, 5, 10	↓ 2, 5	↓ 2, 5, 10	↓ 10	—	↓ 2, 5, 10	—	—	—	↓ 2, 5, 10	—	—	—
EUO	↓	—	↓ 2, 5, 10	↓ 2, 5, 10	↓ 10	↓ ↑2	—	↓ 2, 5, 10	↓ 10	↑ 5	—	↓ 10	↓ 10	—	—
Hexane fraction															
TR H	—	—	—	—	—	↑ 2	—	↓ 2, 5, 10	—	—	↓ 10	↓ 2, 5, 10	—	—	—
Ar	—	—	—	—	—	—	—	↓ 10	—	—	↓ 10	↓ 10	—	—	—
BR	—	—	—	—	—	—	—	↓ 2, 5, 10	—	—	↓ 2	—	—	—	—

—: had no effect ↑: increase ↓: decrease p<0.05
concentration: 2, 5, 10 µg/ml

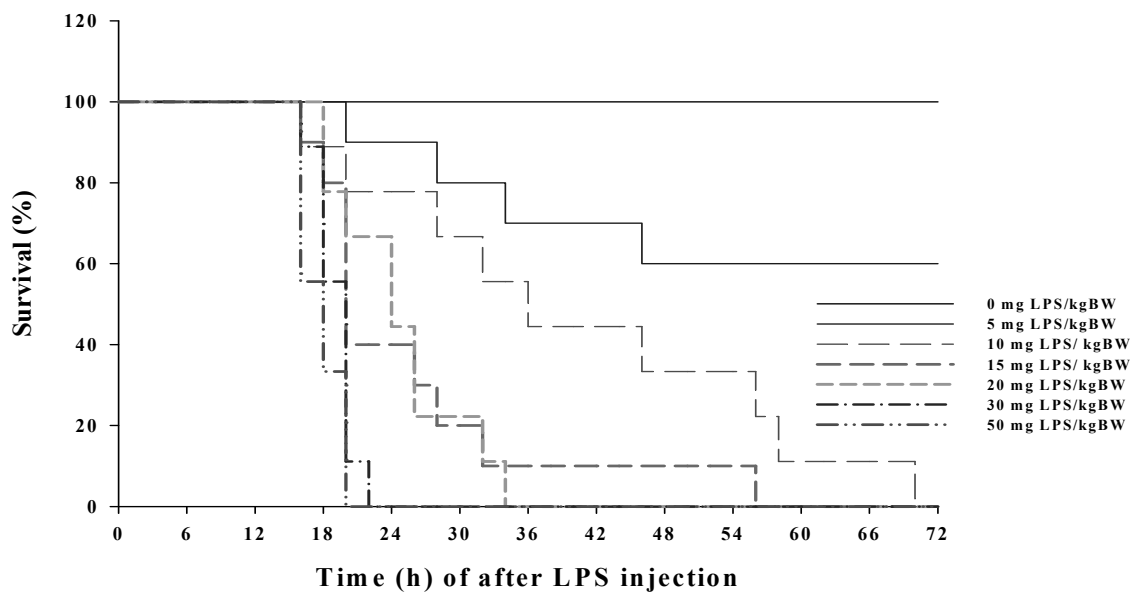


圖 8 不同劑量之 LPS 對 BALB/c 小鼠存活率之結果

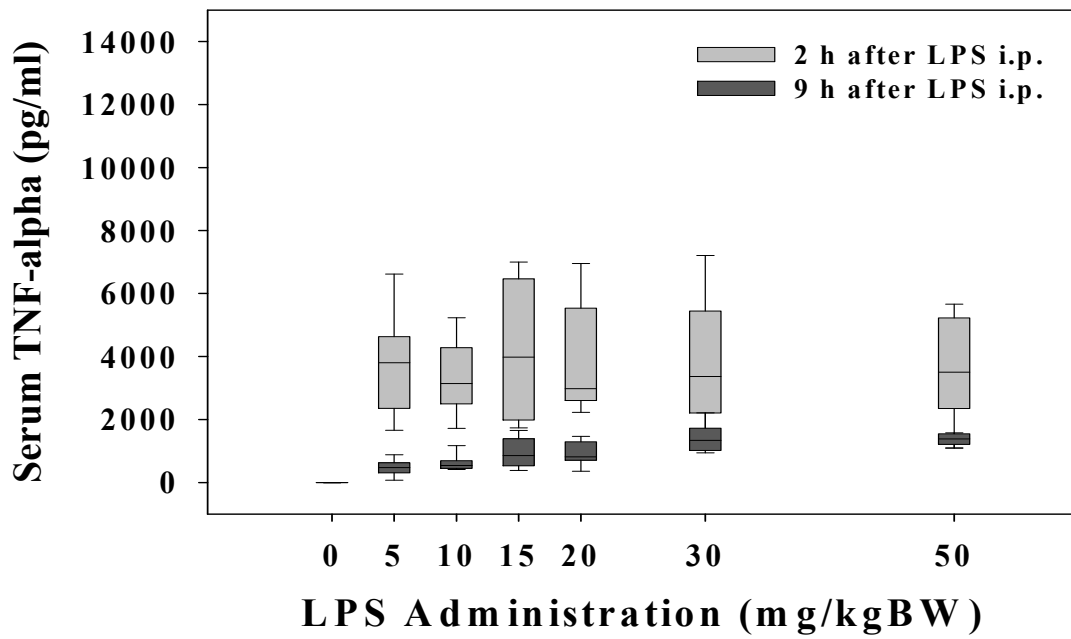


圖 9 不同劑量之 LPS 對 BALB/c 小鼠於第二和第九小時血清 TNF- α 之分泌量

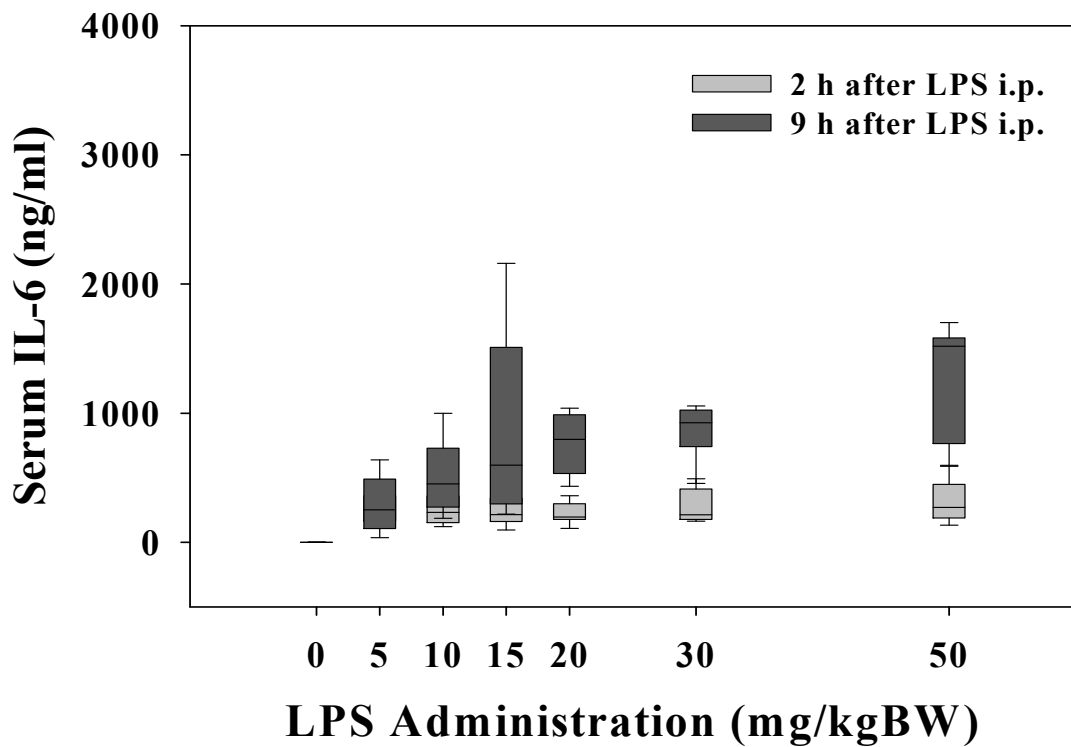


圖 10 不同劑量之 LPS 對 BALB/c 小鼠於第二和第九小時血清 IL-6 之分泌量

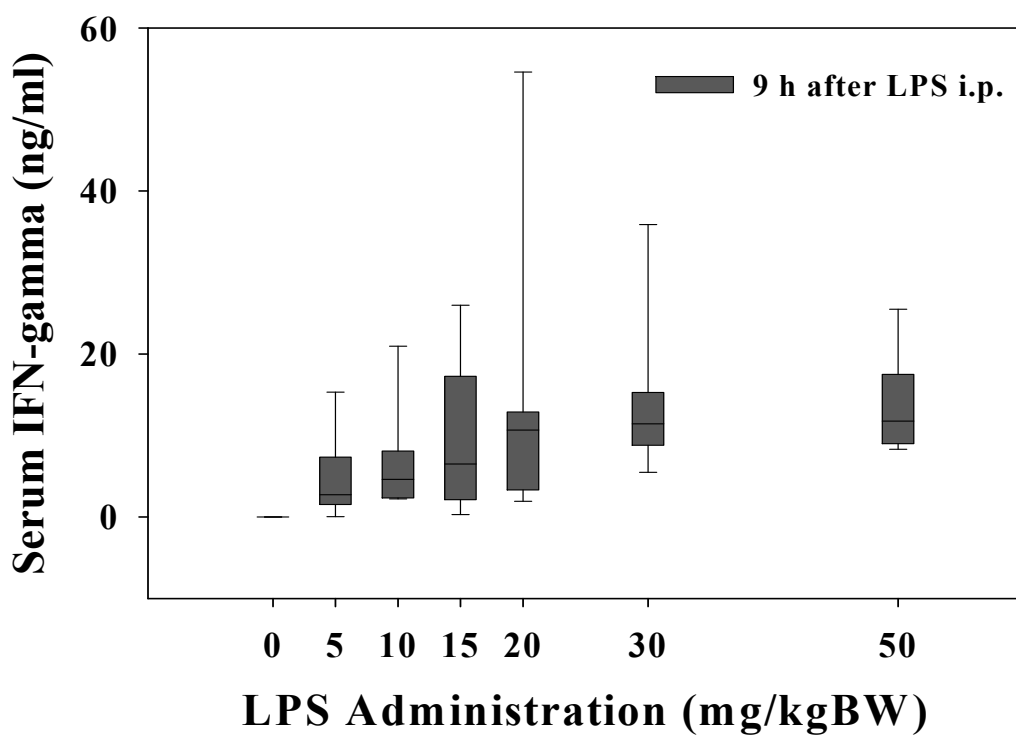


圖 11 不同劑量之 LPS 對 BALB/c 小鼠於第九小時血清 IFN- γ 之分泌量

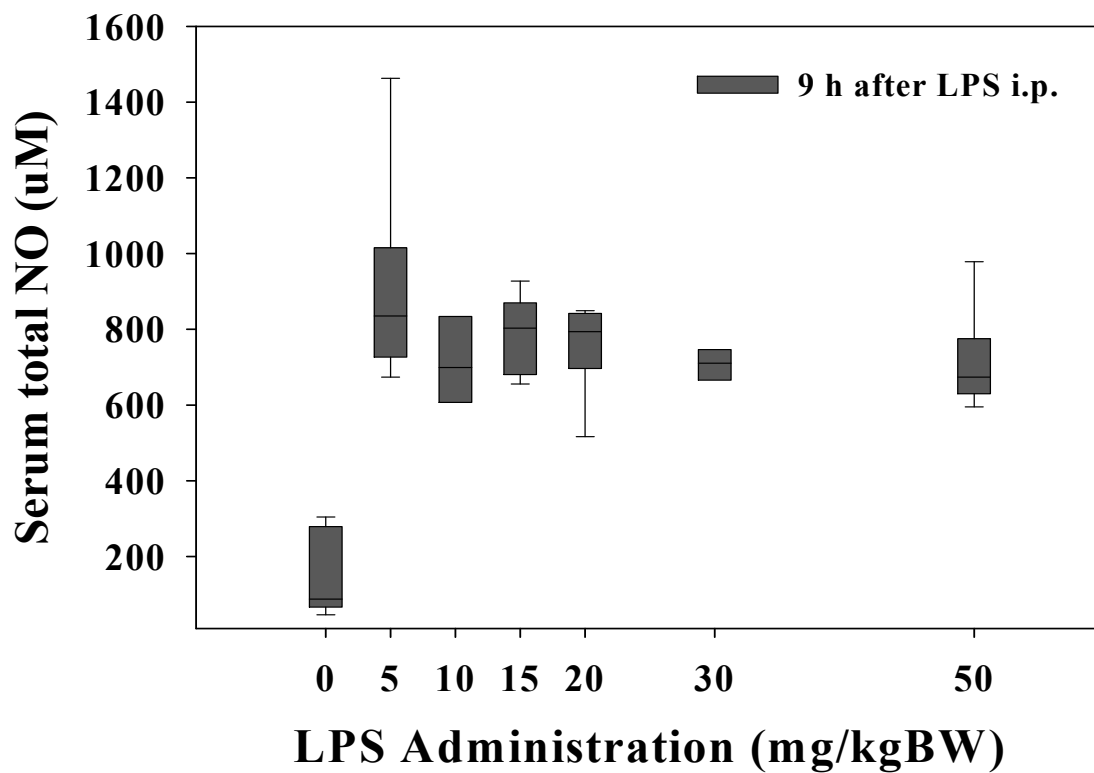


圖 12 不同劑量之 LPS 對 BALB/c 小鼠於第九小時血清 NO 分泌量

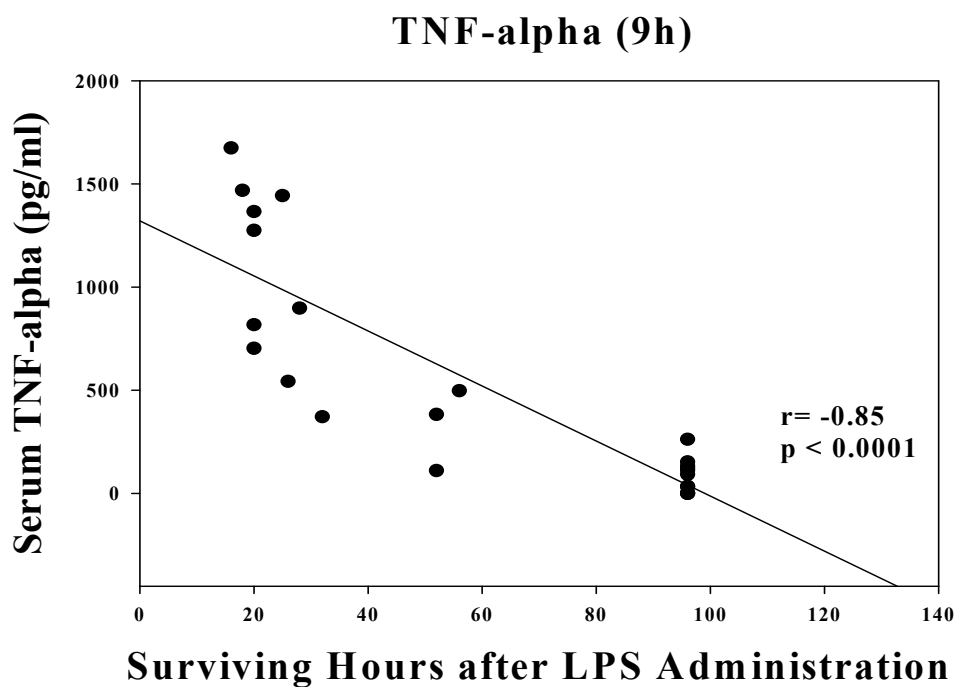


圖 13 發炎小鼠血清 TNF- α 含量與存活率呈顯著負相關

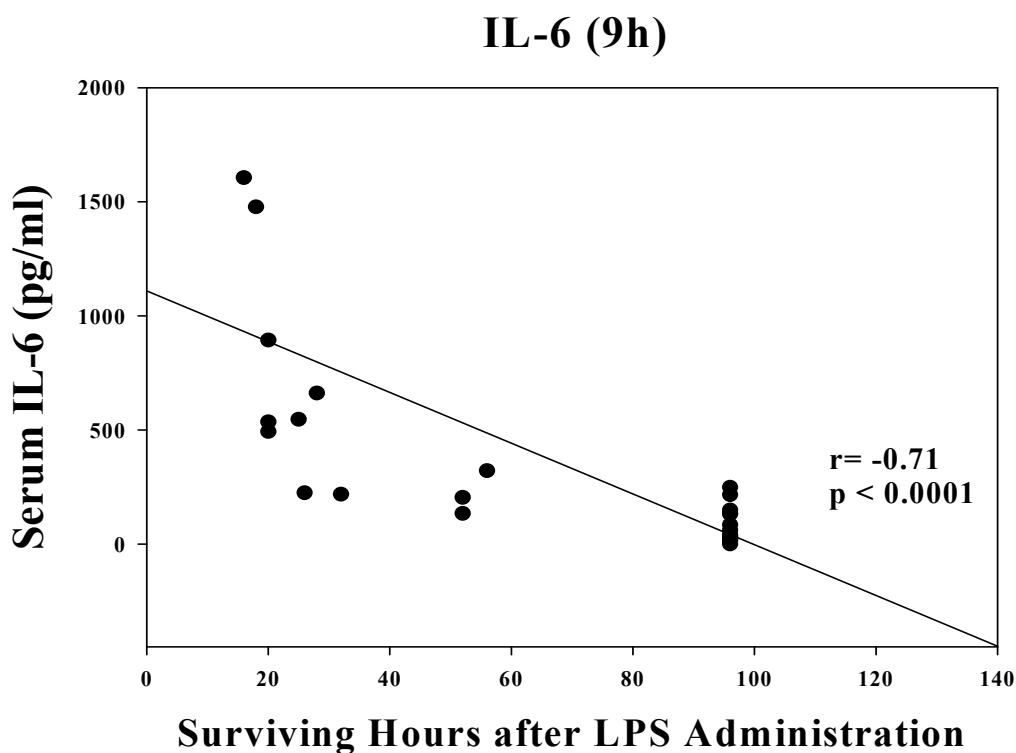


圖 14 發炎小鼠血清 IL-6 含量與存活率呈顯著負相關

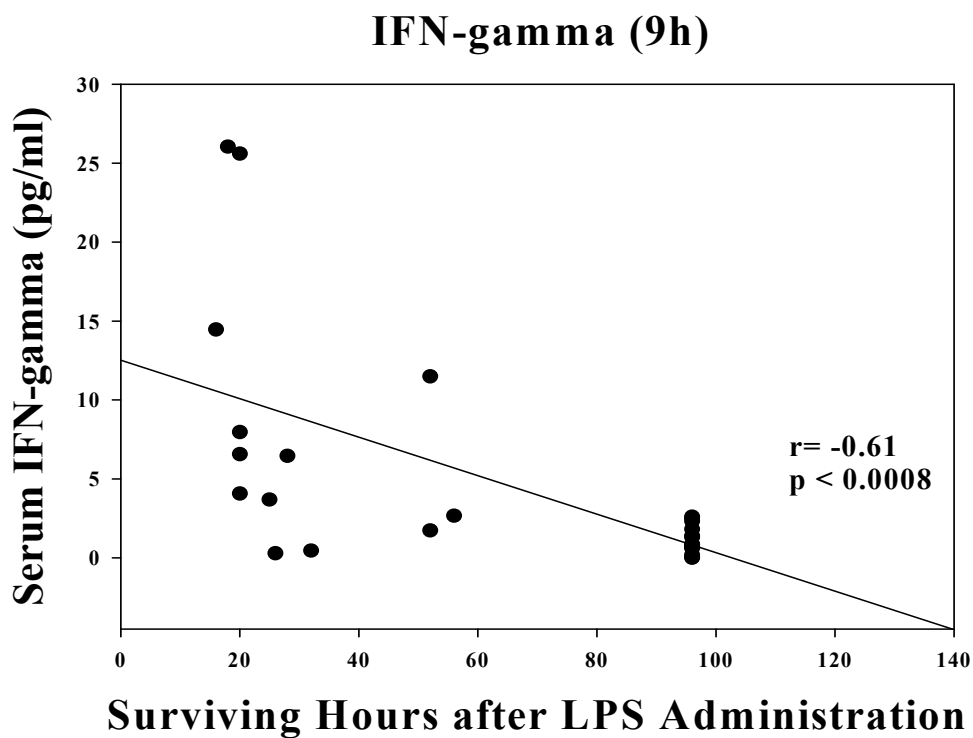


圖 15 發炎小鼠血清 IFN- γ 含量與存活率呈顯著負相關

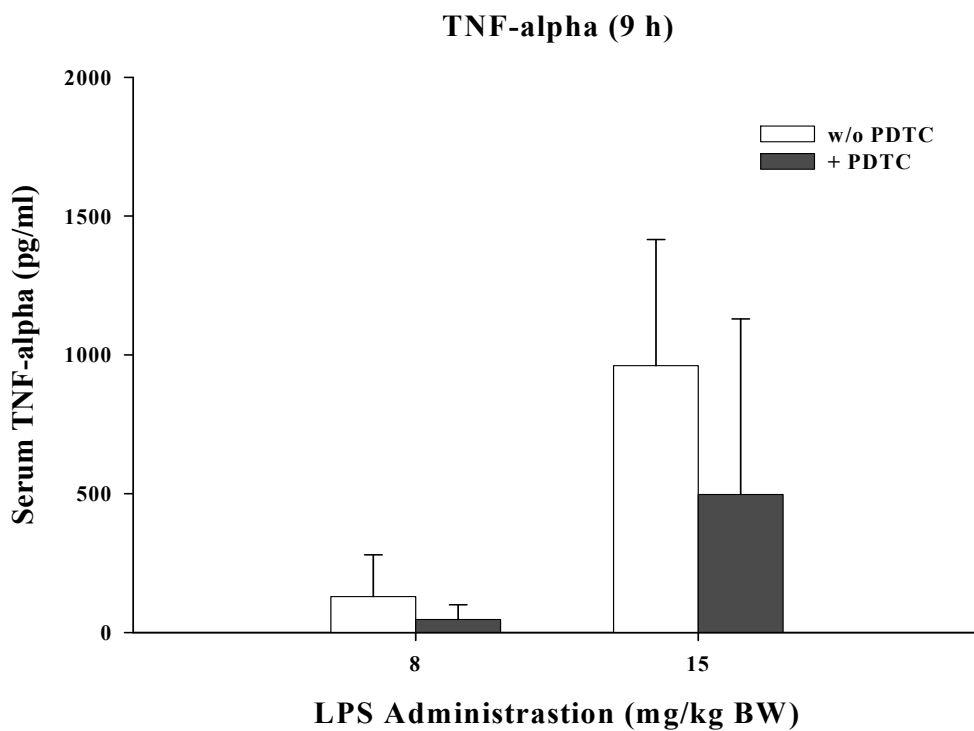


圖 16 發炎小鼠血清 TNF- α 含量

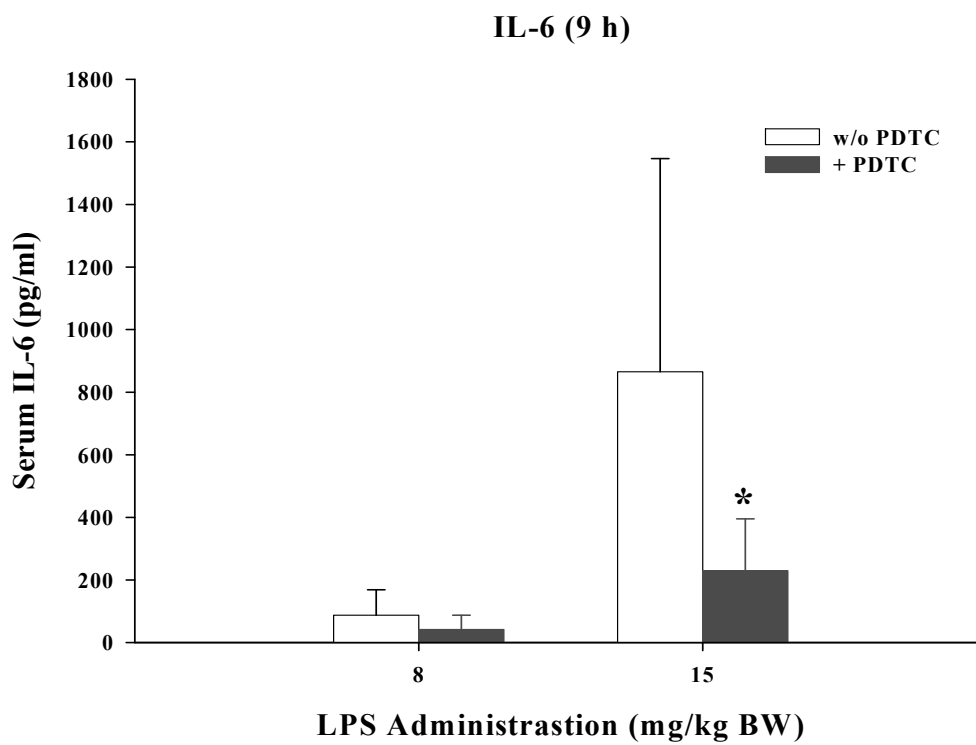


圖 17 發炎小鼠血清 IL-6 含量

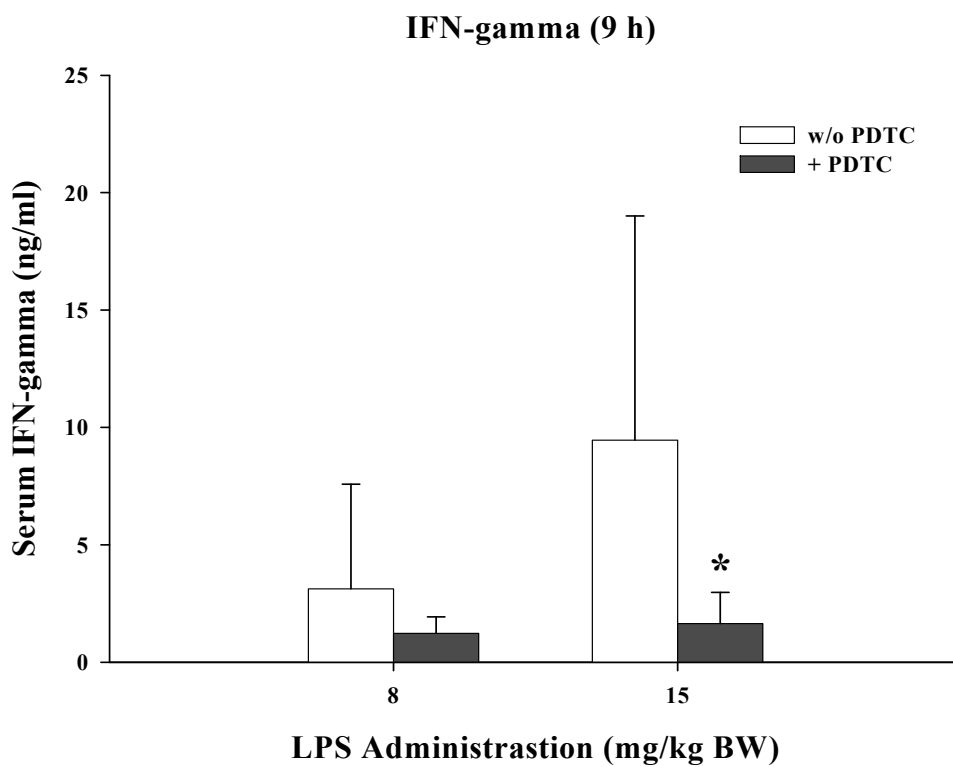


圖 18 發炎小鼠血清 IFN- γ 含量

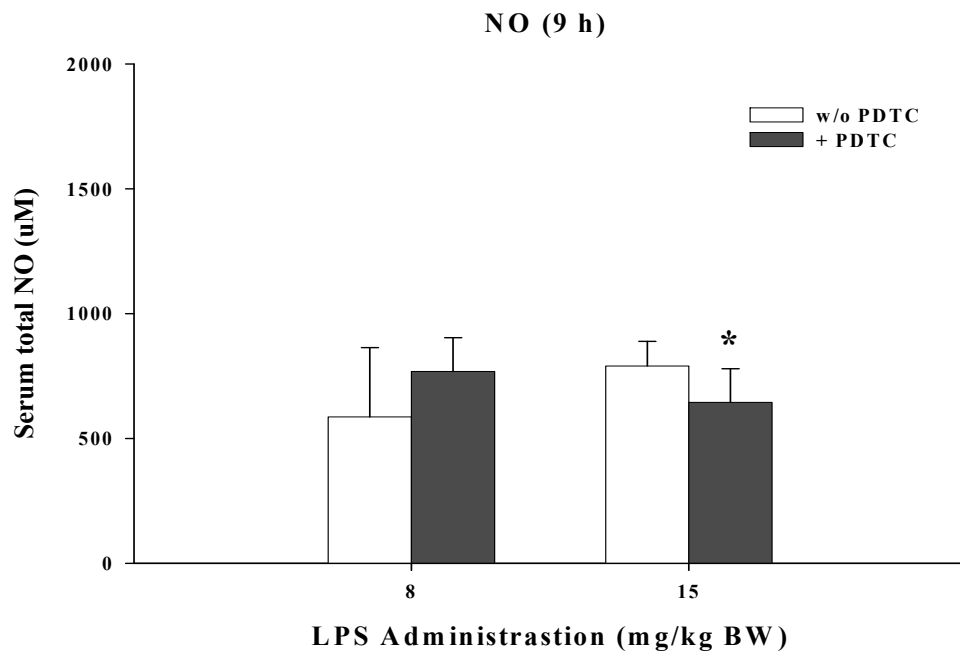


圖 19 發炎小鼠血清 NO 含量