

編號：CCMP94-RD-028

蓮子有效成分對於自體性免疫疾病老鼠 之免疫藥理活性評估

郭育綺

輔仁大學

摘 要

淋巴細胞為免疫系統的主要份子，主要負責後天性免疫（acquired immunity），也對多樣性（diversity）、專一性（specificity）、記憶（memory）與辨認性（recognition）做出免疫上的貢獻。但是如同所有機器一樣，免疫系統總是有機會出問題，當免疫耐受性（self-tolerance）出錯時會產生攻擊自體組織的不適當免疫反應，這稱為自體免疫（autoimmunity）。自體免疫疾病在已開發國家約為第三大疾病，僅次於腦血管疾病與癌症，單在美國，一年估計有兩千萬人罹患此類疾病。目前對於自體免疫疾病的形成原因尚未完全清楚，已知與基因或環境有關。不論自體免疫疾病是如何開始，它都會導致對抗自體組織的慢性發炎的現象且伴隨著發炎因子的釋放、自體抗體（autoantibodies）的產生、免疫複合體的形成、以及 T 細胞的活化。全身性紅斑性狼瘡是種發炎性的自體免疫疾病，常見的原因是過量且不受控制的 T 細胞產生大量細胞激素（cytokines）來促進 B 細胞分化和產生 autoantibodies。在紅斑性狼瘡患者體內也發現 IL-2、L-10、IFN- γ 等 cytokines 皆會大量產生而造成發炎反應的進行，臨床症狀主要是主要表現全身性發炎反應、血管炎（vasculitis）、淋巴腺疾病（lymphadenopathy）、免疫複合物沈積以及威脅生命的腎絲球腎炎（glomerulonephritis）。Corticosteroids、cyclophosphamide、azathioprine 或是 cyclosporin A 等都是臨床常使用的治療 SLE 的藥物，雖然其真正的作用機轉並不完全清楚，最主要的目的都是用來抑制淋巴細胞的作用。但是使用這些藥物常常會有嚴重的副作用，以致常常限制了這些藥物的使用。傳統的中草藥常因為具免疫調控或抗病毒的能力而作為食療或醫療上的使用，蓮子常為中藥複方其中的一味，雖然蓮子自古即被認為具有健脾止瀉之功效，但目前並無直接

的科學證據證實蓮子具有免疫調控活性。根據本實驗室所發表的文獻指出，蓮子的粗抽物具有抑制人類週邊血單核球細胞（PBMCs）增生的能力，而在其中發現(S)-armepavine 具有最強的抑制活性。因此，本研究計畫將探討(S)-armepavine 是否具有改善自體免疫疾病的能力，希望建立蓮子在調控免疫功能上的認知，並提供蓮子在中醫藥臨床使用的科學證據，以作為治療紅斑性狼瘡抑或是其他自體免疫性疾病的輔助使用。

本研究計畫以會產生類似人類紅斑性狼瘡症狀的 MRL-*lpr/lpr* 小鼠為體內試驗模式，每天口服投予(S)-armepavine，針對小鼠的腎功能、免疫功能和肝功能進行探討，以瞭解(S)-armepavine 是否具有改善自體免疫疾病的能力。再以 PBMCs 為體外模式，針對細胞的增生、cytokine 基因的表現以及 cytokine 的產生來評估藥物的藥理機轉為何。

In vivo 模式實驗結果顯示，(S)-armepavine 可藉由改善 MRL-*lpr/lpr* 小鼠的腎功能（抑制蛋白尿的產生、減緩 mesangial hypercellularity 的現象以及減少免疫複合體的沈積）而增加小鼠的存活率。再者實驗也發現(S)-armepavine 可降低 autoantibodies (anti-double stranded DNA 抗體與 anti-Sm 抗體) 的產生。另外，在小鼠免疫功能方面發現，(S)-armepavine 可抑制淋巴結腫大、脾臟細胞的增生與 cytokines mRNA 的表現以及抑制血清中由 T 細胞所主導的 cytokines (IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-10) 的產生。在 *in vitro* 模式則發現(S)-armepavine 可抑制 PHA 所活化的 PBMCs 的增生、cytokines (IL-2 與 IFN- γ) 的產生與 cytokines mRNA 的表現。由此結果發現(S)-armepavine 可藉由調控 T 細胞所主導的免疫反應因而可降低 MRL-*lpr/lpr* 小鼠疾病的進行，因此推論(S)-armepavine 可在臨床上作為免疫調控劑來治療 SLE 等自體免疫疾病抑或是輔助使用。

關鍵詞：紅斑性狼瘡、(S)-armepavine、MRL-*lpr/lpr*、腎功能、自體抗體、細胞激素

Number: CCMP94-RD-028

Evaluation of Pharmacological Activity of Bioactive Component from *Nelumbo Nucifera* on Autoimmune Disease Mice

Yuh-Chi Kuo

Fu Jen University

ABSTRACT

Lymphocytes are the central cells in immune system, responsible for acquired immunity and the immunologic attributes of diversity, specificity, memory, and self/nonsel self recognition. But the immune system could go awry. While mechanisms of self-tolerance are failure, it results in an inappropriate response of the immune system against self-components, and that is termed autoimmunity. Autoimmune disease comprise a heterogeneous group of poorly understood that are controlled by genetic and environmental factors. No matter how autoimmunity is initiated, it results in a chronic inflammatory response against self-tissue with the release of inflammatory mediators, the production of autoantibodies, the formation of immune complexes and the activation of T lymphocytes. Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease involving inappropriate inflammatory responses to result in multi-organs dysfunction that includes vasculitis, lymphadenopathy, immune complexes deposition, and life-threatening glomerulonephritis. Although its pathogenesis is not well known, aberrant immune responses that excessive and uncontrolled T cells help in the differentiation and activation of B cells to produce pathogenic autoantibodies such as anti-double stranded DNA (anti-dsDNA) and anti-small nuclear ribonuclear protein (anti-Sm) antibodies. The pathogenesis of SLE is also regulated by several T cells-mediated cytokines, such as interleukin-2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ), interleukin-4 (IL-4),

and interleukin-10 (IL-10). Effective immunosuppressive drugs for SLE include corticosteroids, cyclophosphamide, azathioprine, or cyclosporin A. Although the mechanisms by which these agents exert their effects on SLE are not fully understood, their inhibitory effects against T and B lymphocytes are strongly implicated. However, the uses of these agents are still accompanied by serious complications that limit their administration and overall clinical benefit. *Nelumbo nucifera* is a useful edible and medicinal plant for the treatment of diarrhea, tissue inflammation, and hemostasis. In our studies, we found that the ethanolic extracts of *N. nucifera* inhibited cell proliferation and cytokines production in primary human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) activated by phytohemagglutinin (PHA). The data indicated that (S)-armepavine is a major active principle for reduction of T cells proliferation. The present study examined the ability of (S)-armepavine to improve autoimmune disease to realized the immunomodulatory function of (S)-armepavine. We hope to offer scientific evidences of *N. nucifera* to treat SLE or accessory benefits for other autoimmune diseases.

The present study chose MRL-lpr/lpr mice for in vivo model. By examining kidney, immune, and liver function to investigate the ability of (S)-armepavine for improving SLE. Otherwise, we also used PBMCs for in vitro model, by studying cell proliferation, cytokine secretion, and cytokine mRNA expression to investigate the pharmacological mechanism of (S)-armepavine.

The in vivo study showed that (S)-armepavine prevented lymphadenopathy and elongated life span of MRL -lpr/lpr mice. It seemed to be mediated by inhibition of splenocytes proliferation, suppression of IL-2, IFN- γ , IL-4, and IL-10 genes expression, reduction of glomerular hypercellularity and immune complexes deposition, and decrease of urinary protein and anti-double stranded DNA autoantibody production. Furthermore, the in vitro data demonstrated (S)-armepavine PBMCs proliferation by impairing IL-2 and IFN- γ transcript and production. The study found that (S)-armepavine could modified T cell-mediated immune response to improve MRL-lpr/lpr mice disease progression. We suggest that (S)-armepavine may be an immunomodulator for autoimmune diseases.

Keywords: SLE, (S)-armepavine, MRL-lpr/lpr mice, Kidney function, Autoantibody, Cytokine

壹、前言

免疫系統是指脊椎動物體內用來對抗外來致病性微生物和癌症的防禦系統，它可以辨別個體和外來物的差異。當發現入侵物時，它會召集免疫細胞或分子作適當的反應。淋巴細胞則為這個系統的主要份子，它佔所有白血球的 20-40%，主要負責後天性免疫 (acquired immunity)，也對多樣性 (diversity)、專一性 (specificity)、記憶 (memory) 與辨認性 (recognition) 做出免疫上的貢獻 (Goldsby et al., 2000)。當 T 淋巴細胞接觸到抗原或植物凝集素 (phytohemagglutinin, PHA) 時常會引起一連串的生化反應及基因的表現而造成 T 淋巴細胞進行細胞週期 (cell cycle)、增生和分化 (Favero and Lafont, 1998)。植物凝集素和伴刀豆凝集素 A (Concanavalin A, Con A) 都是屬於植物 lectin，它們可以藉由結合細胞表面的接受器如 CD2, CD3, CD4, CD8 等來造成 T 淋巴細胞活化、增生及釋放細胞激素 (cytokine) (Kilpatrick, 1999)。

但是如同所有機器一樣，免疫系統總是有機會出問題，而且年紀越大，發生的機會就越高。早在 20 世紀初，Paul Ehrlich 就發現免疫系統也會出錯地攻擊自體抗原 (self-antigen)。當免疫耐受性 (self-tolerance) 出錯時會產生攻擊自體組織的不適當免疫反應，這稱為自體免疫 (autoimmunity) (Goldsby et al., 2000)。而全世界大約有 5-7% 的人口罹患這些自體免疫疾病如紅斑性狼瘡 (system lupus erythematosus, SLE)、風濕性關節炎或胰島素依賴型糖尿病等。目前對於自體免疫疾病的形成原因尚未完全清楚，已知與基因或環境有關 (Marrack et al., 2001; Ermann and Fathman, 2001; O'Shea et al., 2002)。這些疾病通常可見到自體活化的 (self-reactive) T 和 B 淋巴細胞，而且產生細胞性 (cell-mediated) 及體液性 (humoral) 免疫來對抗自體抗原。大部分的自體免疫疾病都會產成自體反應性的 CD4⁺ T 淋巴細胞，而這類的細胞主要被區分為 Th1 和 Th2 兩大類。Th1 細胞會分泌 interferin- γ (IFN- γ)、interleukin-2 (IL-2)、tumor necrosis factor- α (TNF- α) 等 cytokines，而 Th2 細胞則會分泌 IL-4、IL-5、IL-10、IL-13 等 cytokines (Falcone and Sarvetnick, 1999; Liblau et al., 1995; Tian et al., 1998)。除了生理功能外，CD4⁺ T 淋巴細胞也和病理的免疫反應有關。過量的 Th1 細胞與自體免疫疾病有關；而過量的 Th2 細胞則參與了異位性體質 (atopy) 和過敏性氣喘 (allergic asthma) (Szabo et al., 2003)。雖然有臨床症狀的不同，但是各種自體免疫疾病仍然具有病理過程上的相似性，且藉由 cytokine 及其他重要物質的產生來調控發炎反應、組織破壞和修復機制 (O'Shea et al., 2002; Falcone and Sarvetnick,

1999; Andreakos et al., 2002)。目前普遍的看法是當自體反應性的 T 淋巴細胞產生 cytokine 偏向於發炎性的 Th1 形式時，疾病的症狀會偏向於自體免疫疾病 (Liblau et al., 1995; Tian et al., 1998)。但是免疫疾病的產生並不完全依照 Th1 或 Th2 來分類，例如，人類紅斑性狼瘡是種自體免疫疾病，但是它主要是由 Th2 細胞所主導產生 (Gor et al., 2003)。

自體活化的 T 或 B 細胞以及其所媒介的細胞性或體液性免疫反應通常對引起自體免疫疾病扮演重要的角色。不論自體免疫是如何發生的，它通常會產生對抗自體組織的慢性發炎反應，伴隨著發炎物質的釋放、自體抗體 (autoantibody) 的產生、免疫複合物的形成以及 T 淋巴細胞的活化 (Corrigan and Kay, 1992)。現今在自體免疫疾病已經有證據顯示藉由 T 淋巴細胞分泌的 cytokine 如 IL-2、IFN- γ 與組織破壞有確切的關連性 (Szabo et al., 2003)。例如在風濕性關節炎患者的關節滑液中發現 T 淋巴細胞、巨噬細胞及發炎性的細胞激素 IL-2、IL-6、IFN- γ 和 TNF- α 都會明顯的提升，這透露 T 淋巴細胞和 cytokine 可能扮演的病理角色 (Szabo et al., 2003; Feldmann and Maini, 2001; Corrigan and Kay, 1992)。雖然還可看見可溶性 (soluble) TNF- α 接受器、IL-1 接受器的拮抗劑和免疫調節細胞激素 IL-10 的增加，但這仍不足控制發炎反應的進行 (Feldmann and Maini, 2001)。另外，在克隆氏症 (Crohn's disease) (Schreiber et al., 1995) 和紅斑性狼瘡 (Theofilopoulos and Lawson, 1999) 也都可發現促發炎 (pro-inflammatory) 及抗發炎 (anti-inflammatory) cytokines 大量增加的現象。故減緩局部發炎反應的發生亦是治療自體免疫疾病的方式之一，而減緩發炎反應通常指的是阻斷 T 淋巴細胞的活化、增生，以及抑制 cytokine 的產生 (Szabo et al., 2003)。

全身性紅斑性狼瘡是種發炎性的自體免疫疾病，它主要產生大量的抗體 (anti-Sm、anti-Ro、anti-La、anti-nRNP、anti-DNA 抗體) 去攻擊細胞核。臨床症狀主要是表現全身性發炎反應、血管炎 (vasculitis)、淋巴腺疾病 (lymphadenopathy)、免疫複合物沈積以及威脅生命的腎絲球腎炎 (glomerulonephritis) (Mok and Lau, 2003)。產生紅斑性狼瘡真正原因尚不清楚，也是跟基因或環境有關。在眾多可能造成紅斑性狼瘡的原因當中，免疫功能的異常可說是其中極為重要的因子。這其中包括 T、B 細胞和巨噬細胞的異常導致多株型 (polyclonal) B 細胞的活化，喪失辨識自我抗原的能力而產生自體抗體，使得免疫複合物沈積來破壞組織。在這病理形成的過程中，最常見的途徑是過量且不受控制的 T 細胞產生大量 cytokines 來促進 B 細胞分化和產生 autoantibodies (Mok and

Lau, 2003)。在紅斑性狼瘡患者體內也發現 IL-2、L-10、IFN- γ 等 cytokines 皆會大量產生而造成發炎反應的進行 (Horwitz et al., 1994; Llorente et al., 1993)。由於人類的遺傳結構在許多方面和小鼠非常接近，尤其在基因組成及功能上約有 80% 左右是相同的，因此小鼠順理成章地成為生醫學者研究人類遺傳和疾病的理想模式。動物模式的建立對於研究自體免疫疾病是很有幫助的，藉由跟實際疾病有著相似的臨床與病理特徵，它們可幫助瞭解自體免疫疾病是如何形成，也可以藉由動物模式來尋找可供應用治療的藥物。MRL-*lpr/lpr* 老鼠因為第 19 對染色體上 Fas 基因的異常而產生與人類紅斑性狼瘡症狀 (autoantibodies 的產生、淋巴腺疾病和腎絲球腎炎等) 類似的自體免疫疾病 (Cohen and Eisenberg, 1991)，常被當作研究自體免疫的動物模式。如同前述，免疫耐受性的引發對於避免自體反應性是很重要的 (Kilpatrick, 1999)，但因為 Fas 基因的異常，使得胸腺篩選 (thymic selection) 或是週邊篩選 (peripheral selection) 失敗的淋巴細胞無法經由細胞凋亡 (apoptosis) 的機制來刪除，進而產生許多的 autoreactive 淋巴細胞來分泌大量的 cytokines，使得發炎反應進行 (Nagata, 1998)。目前並無證據顯示人類 SLE 的形成與 Fas 有關，但根據研究指出，在人類的 Fas 基因上發現至少有 17 個變異，這些變異會導致 Canale-Smith syndrome (Nagata, 1998; Drappa et al., 1996)，而具有類似 SLE 的症狀，如 autoantibodies 的產生和淋巴腺疾病等。基於與 SLE 或 Canale-Smith syndrome 有著相似的病理特徵，MRL-*lpr/lpr* 小鼠也常被當作研究自體免疫或是藥物開發的動物模式。

Corticosteroids、cyclophosphamide、azathioprine 或是 cyclosporin A 等都是臨床常使用的治療 SLE 的藥物，雖然其真正的作用機轉並不完全清楚，最主要的目的都是用來抑制淋巴細胞的作用 (Fox and McCune, 1994)。但是使用這些藥物常常會有嚴重的副作用，如 cyclosporin A 常會導致牙齦增生、多毛症、高血壓或是高血脂，若長期使用還可能會有腎毒性 (Serkova and Christians, 2003; Burdmann et al., 2003)，而且 cyclosporin A 還會抑制 cytochrome P450 而增加其他藥物的血中濃度而具有複雜的藥物交互作用的問題 (Graham, 1994)。Corticosteroids 會導致臉部浮腫或變圓、長臉毛、粉刺 (面皰)、體重增加、糖尿病、白內障、骨質疏鬆、胃潰瘍、感染，長期服用有可能會導致骨髓抑制的問題 (Bijlsma et al., 2002)。Cyclophosphamide 則是會導致貧血、噁心、嘔吐以及嚴重的白血球減少的情形 (Dutz and Ho, 1998)。因為這些藥物的嚴重副作用以致常常限制了這些藥物的使用 (Zimmerman et al., 2001)。

蓮子 (Semen nelumbinis)，別名藕實、水芝丹、蓮蓬子，為睡蓮科植物蓮 (*Nelumbo nucifera* G.) 的果實或種子。性味甘、澀、平，歸脾、腎、心經。健脾止瀉、益腎固經、養心益神。鮮者甘平，乾者甘溫，不去皮才有固澀之功，去皮蓮子則專主補脾。主治脾虛腹瀉、腎虛遺精、失眠多夢、婦人崩漏帶下 (中藥大辭典, 1995; 中國本草圖錄, 1989)。蓮子長久以來即為多種中藥處方之一味，國人亦將之用於健康食療。根據文獻報導，有關蓮的藥理成分活用如下：一、蓮的萃取成分具有解熱 (Sinha et al., 2000)、抗發炎 (Mukherjee et al., 1997) 的作用，也可以用來治療高血糖 (Mukherjee et al., 1997)、下痢 (Talukder and Nessa, 1998)、高血脂 (Ia Cour et al., 1995) 等疾病。二、從蓮萃取出來的 dauricine 和 neferine 具有阻斷心臟細胞膜上的鈉、鉀、鈣等離子流動 (Qian, 2002)。三、Neferine 具有明顯抑制兔子血小板凝集的能力 (Yu and Hu, 1997)。雖然蓮子自古即被認為具有健脾止瀉之功效，但目前並無直接的科學證據證實蓮子具有免疫調控活性。

在本實驗室篩選具免疫調控活性之中草藥過程，發現一系列的蓮子的粗抽物具有抑制由 PHA 所造成人類週邊血單核細胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 增生的活性，這其中以 NN-B-4 為具效果。由已發表的文獻可知，蓮子粗抽物 NN-B-4 可藉由抑制 cyclin-dependent kinase 4 (cdk4) mRNA 表現使得細胞週期停止於 G₀/G₁ 期，也可抑制 IL-2、IL-4、IL-10、IFN- γ 的 mRNA 和蛋白質表現，最後抑制週邊血單核細胞增生 (Liu et al., 2004)。根據一連串藥物生物活性的追蹤，由其中純化出有效成分 (S)-armepavine (C₁₉H₂₃O₃N; MW.313)。(S)-Armepavine 最早是由 *Uvaria chamae* 所萃取出來的 isoquinoline 類的生物鹼 (alkaloid)，目前僅知其對於 L929 細胞具有毒殺作用而不影響老鼠胸線細胞 (thymocyte) 的活性 (Philipov et al., 2000)。另外，armepavine oxalate 可促人類急性白血病淋巴母細胞細胞株 (human acute lymphoblastic leukemia cell line; CCRF-CEM) 的細胞凋亡 (Jow et al., 2004)。但目前並無直接的科學證據證實蓮子具有免疫調控活性。因此，本實驗將 (S)-armepavine 應用於動物體內 (*in vivo*) 模式，MRL-*lpr/lpr* 老鼠餵食 (S)-armepavine，分別偵測脾臟的腎功能、免疫功能、肝功能以及 autoantibodies 與細胞激素的產生，探討 (S)-armepavine 是否可以抑制 MRL-*lpr/lpr* 老鼠疾病的進行。另外，在體外 (*in vitro*) 模式，本計畫將持續探討 (S)-armepavine 是否具有對於人類週邊血單核細胞的免疫調控作用，探討這樣的免疫調控作用是否經由調控 cytokine 的產生而來的。在後基因體時代的來臨時，根據此連續且有系統性的中草藥研究計畫

(體內及體外試驗)，希望建立蓮子在調控免疫功能上的認知，並提供蓮子在中醫藥臨床使用的科學證據，以作為治療紅斑性狼瘡抑或是其他自體免疫性疾病的輔助使用。

貳、材料與方法

一、實驗動物的來源

4 週大的 MRL-*lpr/lpr* 小鼠購於台灣大學實驗動物中心，於實驗動物房飼養至 12 週大，方進行實驗。

二、(S)-armepavine 的配製與實驗動物的分組與餵食

以玉米油 (Corn oil) 為溶劑，將(S)-armepavine 分別配製成低劑量 (5mg/kg/day) 與高劑量 (10mg/kg/day) 兩種。實驗動物則隨機分成四組，分別為對照組、低劑量實驗組、高劑量實驗組與正對照組 (cyclosporin A; 20mg/kg/day)，每天定時以餵管餵食，共餵食 6 週。

三、MRL-*lpr/lpr* 小鼠尿液的採集與腎功能的分析

由於 MRL-*lpr/lpr* 小鼠小便量少取得不易，以生化代謝籠收集 24 小時取得尿液檢體並放在 -20°C 冰箱等待尿液分析。腎功能的判定採用血尿中氮 (Blood Urea Nitrogen, BUN)、尿中肌酐酸 (Urinary creatinine) 和尿中的蛋白質的數值分析，以富士生化試片和生化分析儀 (DRICHEM-3000) 與 Bio-Rad DC Protein Assay kit 及 ELISA reader 分析。

四、MRL-*lpr/lpr* 小鼠血液的採集與肝功能的分析

在犧牲小鼠之前，以心臟採血方式取得小鼠全血，以轉速 700×g 離心 10 分鐘取得血清部分，所有血清先凍在 -20°C 冰箱等待檢驗。以富士生化試片和生化分析儀分析 AST (aspartate aminotransferase) 和 ALT (alanine aminotransferase) 來判定肝功能的好壞。

五、MRL-*lpr/lpr* 小鼠淋巴結的取得與脾臟細胞 (splenocyte) 的製備

待小鼠犧牲後，直接取其前肢腋下淋巴結秤重，以評估藥物對淋巴結腫大的影響。

將小鼠脾臟在 RPMI-1640 中以磨砂玻片磨碎，將之置於 50ml 離心管靜置 10 分鐘，收集上清液，以 750×g 離心 10 分鐘。再以 9ml 無菌水將紅血球漲破，並迅速加入 1ml 的 10 倍 HBSS 維持細胞滲透壓。以含 2% 之 RPMI-1640 調整細胞濃度，培養於 37°C、5% 的二氧化碳培養箱中。

六、MRL-*lpr/lpr* 小鼠脾臟細胞 (splenocyte) 的增生

將對照組、低劑量實驗組、高劑量實驗組與正對照組小鼠的脾臟細胞培養於 96 孔平底培養盤中，以 medium 或 Con A (5、10 μ M) 共同培養 72 小時。然後加入 1 μ Ci 的氘-胸腺嘧啶 (3 H-Thymidine) 以標定新合成之 DNA，經過 16 小時的培養後，利用細胞收集器將細胞收集到玻璃纖維過濾膜上，並加入含 2ml 液態閃爍計數液於計數瓶中，以閃爍計數器測定放射性強度，並與對照組相比，以上述公式計算出抑制活性。

七、MRL-*lpr/lpr* 小鼠脾臟細胞 (splenocyte) 的 cytokine mRNA 的表現

將取得的小鼠的脾臟細胞置於微量離心管中磨碎，抽取 RNA 的步驟與下述抽取 PBMC 的 RNA 方式相同。將取得的 RNA 以下述 RT-PCR 的方式來驗證藥物是否影響脾臟細胞的 cytokine mRNA 的表現。實驗中所採用的引子序列陳列於表一。

八、MRL-*lpr/lpr* 小鼠血清中自體抗體 (autoantibody) 的表現

將小鼠血清送予醫捷生技公司，檢測 anti-dsDNA 與 anti-Sm 抗體的含量。

九、MRL-*lpr/lpr* 小鼠腎絲球腎炎的檢測

(一) 蘇木紫-伊紅 (Hematoxylin-eosin, H&E) 染色

將取得的小鼠腎臟以 3.7% 福馬林固定，再以冷凍切片機將標本切成 4 μ m 厚度的切片，將組織切片以蘇木紫染色 10 分鐘後，水洗 30 秒。再浸以 0.25% 的氫水液 10 秒，充分水洗 3 分鐘後，再施以伊紅染色 30 秒，最後以 95% 酒精脫水。經過二甲苯的處理後，即可封片。在顯微鏡下觀察腎絲球腎炎。

Mesangial hypercellularity 之半定量方式是分別對 40 或更多的腎絲球中的 mesangial area 內的細胞核數目作為半定量給分依據。0 分代表具正常至些微程度的 hypercellularity，每個 mesangial area 中含有 2 至 3 個細胞核；1 分代表輕度的 hypercellularity，每個 mesangial area 中含有 4 至 6 個細胞核；2 分代表中度的 hypercellularity，大部分 mesangial area 中含有 4 至 6 個細胞核，而少數 mesangial area 中含有 7 個或更多的細胞核；3 分代表嚴

重程度的 hypercellularity，每個 mesangial area 中含有 7 個或更多的細胞核。

(二) 螢光免疫組織化學染色法 (Fluorescence immunohistochemistry)

將已固定的小鼠腎臟組織切片以 0.2% Triton X-100 作用 10 分鐘在細胞膜上穿孔，再經 PBS 沖洗三次後，加入含 1% BSA 與 0.1% Tween-20 的磷酸緩衝液，在 4°C 情況下浸泡搖動至隔天。經 PBS 沖洗三次後加入 1:100 倍標定有異硫氰酸螢光素之抗體 (mouse IgG conjugated with fluorescein isothiocyanate; FITC; Jackson) 培養 90 分鐘，經 PBS 沖洗三次後，風乾後以封片膠封片，並以螢光顯微鏡，於 20 倍鏡頭下進行觀察，並以 Axio Vision LE Rel 4.2 分析軟體進行螢光強度的分析，所得的結果以 fluorescence unit / μm^2 來呈現。

十、人類週邊血單核細胞 (PBMCs) 的製備

以抗凝劑 (heparin; 1000IU/ml) 濕潤過的無菌塑膠針筒 (Terumo-syringe) 抽取健康人之上臂週邊靜脈血，在無菌環境下以 800×g、4°C，離心 15 分鐘。去除血清部分後，加入等倍體積的磷酸緩衝液於血球部分。混合均勻後，接著以 Ficoll-Paque Plus (Pharmacia; density = 1.077) 密度梯度的方法，以 420×g、室溫，離心 30 分鐘。收集中間 PBMC 層並加入適量的磷酸鹽緩衝液，經 4°C、750×g，離心 10 分鐘後，以 9 ml 無菌水將紅血球漲破，並迅速加入 1ml 的 10 倍 Hank's balanced salt solution (HBSS; Hyclone) 維持細胞滲透壓。以含 2% 之 RPMI-1640 調整細胞濃度，培養於 37°C、5% 的二氧化碳培養箱中。

十一、淋巴細胞增殖試驗

將 PBMC (2×10^5 cells/well) 培養於 96 孔平底培養盤 (cellstar) 中，加入 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO) 或不同濃度的 (25、50、100 μM) (S)-armepavine，以 medium 或 PHA 共同培養 72 小時。然後加入 1 μCi 的氚-胸腺嘧啶 (^3H -Thymidine) 以標定新合成之 DNA，經過 16 小時的培養後，利用細胞收集器 (automatic cell harvester; Multimash 2000; Dynastech, USA) 將細胞收集到玻璃纖維過濾膜 (glass microfiber; Whatman) 上，並加入含 2ml 液態閃爍計數液 (FluoranSafe 2; VMR International) 於計數瓶中，以閃爍計數器 (β -counter; LS6000IC;

Beckman, USA) 測定放射性強度 (count per minute; CPM) , 並與對照組相比, 以下列公式計算出抑制活性:

$$\text{抑制百分比 (\%)} = \frac{\text{對照組 (CPM)} - \text{實驗組 (CPM)}}{\text{對照組 (CPM)}} \times 100$$

十二、細胞存活率測試

將 PBMC (2×10^5 cells/well) 培養於 96 孔平底培養盤中, 加入 0.1% DMSO 或 100 μ M (S)-armepavine, 於二氧化碳培養箱中共同培養 0 到 72 小時。加入 10% alamarBlue (BioSource International Inc.; Camarillo, CA) 培養 3 小時, alamarBlue 會接受電子, 由靛藍色變成粉紅色, 因此可在 570 和 600nm 的波長下測定其吸光值, 並以下列公式計算細胞存活率:

$$\text{細胞存活率 (\%)} = \frac{\text{實驗組 (570nm - 600nm)}}{\text{對照組 (570nm - 600nm)}} \times 100$$

十三、細胞激素的測定

將 PBMCs (2×10^5 cells/well) 培養於 96 孔平底培養盤中, 分別以 0.1% DMSO 或各不同濃度 (25、50、100 μ M) 之 (S)-armepavine, 以 medium 或 PHA 共同培養 72 小時, 收集上清液並保存在 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中。利用酵素連結免疫吸附測定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 進行細胞激素 (IL-2 和 IFN- γ) 測定。

十四、全量細胞核糖核酸 (Total cellular RNA) 之製備

將 PBMCs (5×10^6 cells/well) 培養於 6 孔平底培養盤中, 未活化或同時以 5 μ g/ml PHA 活化之細胞分別以 0.1% DMSO 或不同濃度 (25、50、100 μ M) 之 (S)-armepavine 處理細胞, 於二氧化碳培養箱中, 共同培養 18 小時。以 4 $^{\circ}$ C、500 \times g 離心 10 分鐘以收集細胞。加入 1 ml RNA-Bee (CS-104B; Tel-test, Inc.), 混合均勻後再加入 200 μ l 氯仿 (chloroform) 混合震盪 15 至 30 秒, 置於冰上 5 分鐘, 以 4 $^{\circ}$ C、12000 \times g, 離心 15 分鐘, 加入等體積之異丙醇 (isopropanol) 於上層水溶液, 混合均勻後置 -20 $^{\circ}$ C 下一小時以沈澱 RNA。再 RNA 用 1ml 之 75% 酒精洗去鹽分, 於 4 $^{\circ}$ C、7500 \times g 離心 5 分鐘, 倒掉上清液, 於真空抽氣機 (Milli-Dry; Peroseptive Biosystems, USA) 將全量細胞核糖核酸空氣乾燥 2 至 3 分鐘, 並將其溶於適量經 0.1% 焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate; DEPC) 處理過之水中。接著利用紫外線分光光度計 (UV-Visible Spectrophotometer; CECIL, England) 在波長

260nm 和 280nm 下測吸光值，並估算全量細胞核糖核酸濃度及純度，最後儲存於-80°C 冰箱中以備用。

十五、反轉錄-聚合酶連鎖反應 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

本實驗以 Advantage RT-for-PCR Kit (Clontech) 進行，先取 1 μg 全量 RNA 於 0.5ml 微量離心管內，利用 DEPC 水補足體積至 12.5 μl ，加入 20 μM 的 Oligo (dT)₁₈ 引子，於 70°C 加熱 2 分鐘後立刻置入冰中，再加入 6.5 μl 的反應緩衝液，溶液中含有最終濃度為 50mM Tris hydrochloride (Tris-HCl; pH 8.3)、75mM KCl、3mM MgCl₂、0.5mM dNTPs、1 unit/ μl RNase inhibitor 和 200units/ μl 鼠白血病毒反轉錄酵素 [Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase]，接著於 42°C 反應 1 小時以合成 cDNA (complementary DNA)，94°C 反應 5 分鐘以終止反應，加入 80 μl 的 DEPC 水以稀釋新合成之 cDNA 濃度，最後儲存於-20°C 冰箱中備用。於 25 μl 的聚合酶連鎖反應溶液中含有 5 μl 的反轉錄酶產物、1X 反應緩衝液 [含 2mM Tris-HCl, (pH 8.0); 0.01mM 乙二胺四醋酸 Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA); 0.1mM Dithiothreitol (DTT); 0.1% Triton X-100; 5% 甘油 (Glycerol); 2.0mM MgCl₂]、0.2mM dNTPs、0.75 μM 的各對引子 (IL-2、IFN- γ) 和 2.5 units 的 Taq DNA 聚合酶 (Viogene)。實驗中所採用的引子序列陳列於表一。利用溫度循環控制器 (Peltier Thermal Cycler; MJ Research, Inc.) 進行之聚合酶連鎖反應，反應條件為 94°C 45 秒、58°C 45 秒、72°C 1 分鐘，共進行 30 個週期。將所得之 IL-2 和 IFN- γ 細胞激素和甘油磷酸脫氫酶 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 聚合酶連鎖反應產物，1.8% 洋菜膠 (Agarose; Invitrogen) 進行電泳分析。再將洋菜膠以溴乙烷 (Ethidium bromide, EtBr) 染色，並用紫外線照光裝置 (UV Box; Hoefer UV-25; Pharmacia Biotech, USA) 呈色觀察後，以化學冷光與螢光影像照相分析系統照相 (ImageMaster VDS; Pharmacia Biotech) 並擷取影像後，以影像密度分析軟體 (ImageMaster 1D Elite; Pharmacia Biotech)，並分析每一條帶 (Band) 之亮度，將其數值化之後，與 GAPDH 數值相比對應之比值，用以定量 PBMCs 中各細胞激素 mRNA 之表現。

十六、統計方法

本研究計畫所得之數據以平均值±標準偏差 (mean±SD) 來表示，以 Student's *t* test 或 One-Way ANOVA test 來分析比對， $p < 0.05$ 則視為具有統計學上的意義。

參、結果

一、(S)-Armepavine 對於 MRL-*lpr/lpr* 小鼠存活率之影響

經過餵食 6 週的小鼠 (18 週大)，在對照組 (corn oil) 其存活率為 $18.3 \pm 2.4\%$ ，而餵食 (S)-armepavine (5 或 10mg/kg/day) 之實驗組則分別可提高小鼠存活率至 $31.3 \pm 8.8\%$ 或 $64.6 \pm 2.9\%$ ，而正對照組 cyclosporin A (20mg/kg/day) 亦可明顯提高小鼠存活率至 $70.8 \pm 5.9\%$ 。若與對照組相比，不論是 (S)-armepavine 或是 cyclosporin A 所提升的存活率皆具有顯著的統計意義 ($p < 0.05$)。

二、(S)-Armepavine 對於 MRL-*lpr/lpr* 小鼠腎功能的影響

MRL-*lpr/lpr* 小鼠發病末期常會產生致命的腎絲球腎炎，為了評估 (S)-armepavine 是否可改善 MRL-*lpr/lpr* 小鼠的腎功能，從經過藥物處理 6 週的小鼠取得尿液來分析尿液中的 creatinine、BUN 與蛋白質。結果如圖一 A 與 B 所示，(S)-armepavine 可明顯的抑制尿液中 creatinine 與 BUN 的產生，尤其當劑量到達 10 mg/kg/day 時，creatinine 與 BUN 分別為 74.0 ± 24.8 mg/dl 與 3.3 ± 0.8 g/dl。蛋白尿的表示則是以所得的尿中蛋白質除以尿液中的 creatinine，由圖一 C 可知，(S)-armepavine 會抑制蛋白尿的產生 ($p < 0.01$)，且呈現劑量相關性。在正對照組實驗中可發現，給予免疫抑制劑 cyclosporin A 也減少尿液中的 creatinine、BUN 與蛋白質，因此可推測 MRL-*lpr/lpr* 小鼠腎功能的惡化可能與免疫功能有關。因此本研究計畫推論 (S)-armepavine 會經由抑制尿液中的 creatinine、BUN 與蛋白質的含量來改善 MRL-*lpr/lpr* 小鼠腎功能。

三、(S)-Armepavine 對於 MRL-*lpr/lpr* 小鼠 glomerular hypercellularity 的影響

在 MRL-*lpr/lpr* 小鼠腎功能惡化的過程中，常可發現大量的免疫細胞浸潤在腎絲球內來引起 humoral immunity 及 cellular immunity，最後引起更嚴重的發炎反應。因此本計畫以 H&E 染色法來觀察腎絲球內細胞聚集的狀況，再以 mesangial hypercellularity 之半定量方式來評估累積於腎絲球內細胞的程度。由圖二 A，panel a 可得知，18 週大之 MRL-*lpr/lpr* 小鼠其腎絲球內聚集了大量的細胞 (glomerular hypercellularity)，這可能包括原本就存在於腎絲球的細胞增生的結果以及浸潤的免疫細胞。餵食 (S)-armepavine (5 及 10mg/kg/day) 的

小鼠則可抑制明顯抑制這種 glomerular hypercellularity 的現象 (panels b 與 c)，相似的結果也可發現在以 cyclosporin A 處理的正對照組 (panel d)。若以半定量方式針對 mesangial area 內的細胞核數目來給分，則可發現不論是(S)-armepavine 或是 cyclosporin A 皆可抑制 glomerular hypercellularity (圖二 B； $p < 0.01$)。半定量給分的所得的結果亦可符合 H&E 染色的結果，這也說明(S)-armepavine 的確可抑制 MRL-*lpr/lpr* 小鼠所形成的 glomerular hypercellularity 的現象。

四、(S)-Armepavine 對於 MRL-*lpr/lpr* 小鼠免疫複合體 (immune complexes) 沈積的影響

當免疫複合體沈積於腎絲球時，會導致補體的活化而引起更嚴重的發炎反應，因此本計畫以 anti-total IgG 抗體來觀察腎絲球內 IgG 免疫複合體沈積的狀況。由圖三 A 可得知，18 週大之 MRL-*lpr/lpr* 小鼠其腎絲球內聚集了大量 IgG 免疫複合體 (panel a)，當小鼠餵食 cyclosporin A 後可明顯的抑制 IgG 免疫複合體沈積的現象 (panel d)。經(S)-armepavine 處理的小鼠，其腎絲球內 IgG 免疫複合體沈積的現象亦可明顯的減少 (panels b 及 c)。而由分析軟體進行螢光強度的分析可得知，不論是(S)-armepavine 或是 cyclosporin A 均可明顯的抑制 IgG 免疫複合體的沈積 ($p < 0.05$ ；圖三 B)。

五、(S)-Armepavine 對於 MRL-*lpr/lpr* 小鼠 autoantibodies 產生的影響

Anti-dsNDA 抗體與 anti-Sm 抗體是 SLE 患者體內最常發現的 autoantibodies，而 autoantibodies 的產生對於腎絲球腎炎亦扮演重要的角色。由上述實驗結果得知，抑制免疫複合體的沈積提供了(S)-armepavine 會減少 autoantibodies 產生的可能性，因此本計畫測定血清中的 anti-dsNDA 抗體與 anti-Sm 抗體的含量，來評估(S)-armepavine 是否會抑制 autoantibodies 的形成。由圖四 A 與 B 的結果顯示當 MRL-*lpr/lpr* 小鼠於 18 週時，體內的 anti-dsNDA 抗體與 anti-Sm 抗體的含量都明顯的增加，而 cyclosporin A 可明顯的抑制 autoantibodies 的產生 ($p < 0.01$)。當小鼠餵食(S)-armepavine 時，anti-dsNDA 抗體的產生會明顯的被抑制。而當(S)-armepavine 劑量達到 10 mg/kg/day 時，anti-Sm 抗體的產生也可顯著的被抑制達 34.3%。因此(S)-armepavine 可藉由減少 autoantibodies 的產生來抑制 MRL-*lpr/lpr* 小鼠之 SLE 疾病症狀如腎絲球腎炎。

六、(S)-Armpavine 對於 MRL-*lpr/lpr* 小鼠淋巴結腫大之影響

MRL-*lpr/lpr* 小鼠因為過度的免疫反應，常會發現具有淋巴結腫大的現象。如圖五所示，餵食(S)-armepavine 或是 cyclosporin A 的小鼠皆呈現抑制淋巴結腫大的能力。因此，本計畫推測(S)-armepavine 可能如同 cyclosporin A 具有抑制免疫功能的能力。

七、(S)-Armpavine 對於 MRL-*lpr/lpr* 小鼠脾臟細胞增生之影響

為了探究(S)-armepavine 是否真的具有抑制免疫反應的效果，本研究計畫以 Con A (5 或 10 μ g/ml)刺激脾臟細胞增生，以 $[^3\text{H}]$ thymidine uptake 的方式來評估(S)-armepavine 是否會影響淋巴增生。如圖六所示，未給予任何藥物處理之小鼠其脾臟細胞明顯的會被 Con A 所刺激而增生，而 Con A 刺激 18 週大之小鼠脾臟細胞增生的程度約為 3 至 6 倍。當給予(S)-armepavine 後會發現脾臟細胞增生的現象被抑制，當(S)-armepavine 的劑量達到 10mg/kg/day 時，幾乎完全抑制脾臟細胞的增生。而作為免疫抑制劑的 cyclosporin A 也可抑制 Con A 所誘導的脾臟細胞增生。故推測(S)-armepavine 也如同 cyclosporin A 具有抑制淋巴增生的能力，而抑制 MRL-*lpr/lpr* 小鼠不當的免疫反應。

八、(S)-Armpavine 對於 MRL-*lpr/lpr* 小鼠脾臟細胞 cytokine mRNA 表現的影響

如同緒論所言，cytokines 的表現會影響細胞增生的狀況，因此，本計畫亦使用 RT-PCR 的方式來偵測脾臟細胞 IL-2、IFN- γ 、IL-4 與 IL-10 mRNA 的表現。由實驗結果得知，若與對照組相比，經過處理的 18 週大之小鼠其脾臟細胞所有 cytokines mRNA 的表現會明顯被正對照組 (cyclosporin A) 所抑制 (圖七 7A, Lanes 1 及 4; 圖七 B)，這也證明 MRL-*lpr/lpr* 小鼠於發病年齡所產生 cytokines 增加之現象可能是由於過度免疫反應所導致。(S)-Armpavine (5 和 10mg/kg/day) 呈現劑量相關性的抑制脾臟細胞 IL-2 與 IFN- γ mRNA 的表現，而 IL-4 與 IL-10 mRNA 的表現則會在高劑量的(S)-armepavine 處理下被抑制 (圖七 A, Lanes 2 及 3; 圖七 B)。同時，本實驗之統計結果除了以 Student's *t* test 來分析，亦同時使用 One Way ANOVA test 來確認，結果顯示(S)-armepavine 及 cyclosporin A 的確可抑制 MRL-*lpr/lpr* 小鼠脾臟細胞 cytokine mRNA 的表現 ($p < 0.05$)。

九、(S)-Armepravine 對於 MRL-*lpr/lpr* 小鼠 cytokines 產生的影響

根據緒論所言，SLE 的產生主要是因為產生過量且不受控制的 T 細胞導致過度的免疫反應。根據上述實驗結果得知(S)-armepavine 會經由抑制脾臟細胞的增生與 cytokines mRNA 的表現或減輕淋巴結腫大的現象來抑制 MRL-*lpr/lpr* 小鼠的過度免疫反應。因此本計畫接著偵測血清中主要由 T 細胞所產生的 cytokines (IL-2、IFN- γ 、IL-4 與 IL-10) 含量是否會受到(S)-armepavine 的影響，藉此來釐清(S)-armepavine 是否藉由調控 T 細胞所主導的免疫反應來抑制 MRL-*lpr/lpr* 小鼠疾病的進行。由圖八可得知，18 週大之 MRL-*lpr/lpr* 小鼠其血清中會產生大量的 cytokines (IL-2: 83.9 ± 5.1 pg/ml; IFN- γ : 44.3 ± 4.4 pg/ml; IL-4: 75.3 ± 5.7 pg/ml; IL-10: 160.0 ± 30.7 pg/ml)，而在正對照組中則可發現 cyclosporin A 可抑制所有 cytokines 的產生。這也顯示在本實驗模式中，當 T 細胞的過度活化的確會引起 MRL-*lpr/lpr* 小鼠產生大量的 cytokines 來導致疾病的進行。而(S)-armepavine 口服餵食 6 週後，則會呈現劑量相關性的抑制所有 cytokines 的產生。尤其當(S)-armepavine 劑量達到 10mg/kg/day 時，IL-2、IFN- γ 、IL-4 與 IL-10 的含量分別只剩 54.5 ± 4.7 pg/ml、 12.0 ± 1.3 pg/ml、 23.6 ± 3.8 pg/ml 與 24.8 ± 5.9 pg/ml。故(S)-armepavine 可能會經由調控 T 細胞所主導的免疫反應來減少 autoantibodies 的產生，降低免疫複合體沈積於腎絲球以及抑制 hypercellular glomeruli，最後因而改善腎功能而減緩 SLE 疾病的進行。

十、(S)-Armepravine 對於 MRL-*lpr/lpr* 小鼠肝功能的影響

本研究計畫亦同時測量血清中 AST 與 ALT 含量來評估(S)-armepavine 是否具有肝毒性。由實驗結果得知(圖九)，不論是在對照組、實驗組或是正對照組，所有的 AST 與 ALT 數值皆呈現無顯著差異的現象($p > 0.05$)，因此推論(S)-armepavine 或是 cyclosporin A 都不具有明顯的肝毒性。

十一、(S)-Armepravine 對於 PBMCs 增生的影響

根據 *in vivo* 模式得知，(S)-armepavine 具有免疫調控的能力而能抑制 SLE 疾病的進行，而這種免疫調控能力可能是經由抑制 T 細胞而來的。因此本研究計畫以 PBMCs 為模式，以 PHA 為刺激劑，探討(S)-armepavine 是否會影響 T 細胞的作用，進而探討其作用機轉。

首先以 [³H]thymidine uptake 的方式來探討(S)-armepavine 是否會影響 PBMCs 的增生，結果如圖十 A 所示，當細胞以 PHA (5 μg/ml) 處理 72 小時後，[³H]thymidine uptake 大約會增加 26 倍(331±10.6cpm vs. 8858±220cpm; $p < 0.05$)。DMSO (0.1%)無論在細胞未活化(331±10.6cpm vs. 264±26cpm; $p > 0.05$)或是以 PHA 活化(8858±220cpm vs. 7512±596cpm; $p > 0.05$)的狀態下並不會影響細胞的增生，而在未給予 PHA 的狀況下，單獨處理(S)-armepavine 也不會對 PBMCs 增生有任何影響(331±10.6cpm vs. 264±26cpm; $p > 0.05$)。而(S)-armepavine 則會抑制經由 PHA 活化所造成 PBMCs 增生的現象，且呈現濃度相關性。在(S)-armepavine 25、50 與 100μM 所呈現的抑制百分比分別為 88.9±1.1%、98.1±0.5%與 98.5±0.6%，其 IC₅₀ 約為 11.9μM (圖十 B)。

十二、(S)-Armepavine 對於 PBMCs 存活率的影響

基於上述實驗得知，(S)-armepavine 具有抑制細胞增生的能力。因此本計畫接著檢測細胞存活率來探討(S)-armepavine 抑制細胞增生的能力是否經由直接的細胞毒殺而來的。以 100μM (S)-armepavine 直接加入 PBMCs 中分別處理 0、2、12、16、24、36、48 與 72 小時，再以 AlamarBlue test 來評估細胞存活率。結果如圖十一所示，各個時間點所測得的細胞存活率分別為 84.7±9.8%、78.2±10.2%、84.9±14.6%、74.5±9.6%、81.9±11.6%、92.8±8.7%、92.3±9.5%與 97.4±7.0%，各組之間以統計學相比並無明顯的差異($p > 0.05$)。藉由此實驗得知，(S)-armepavine 並不是經由直接毒殺細胞來抑制 PBMCs 的增生。

十三、(S)-Armepavine 對於 PBMCs 中 cytokines 產生的影響

根據緒論所言，cytokines 的產生除了可影響 T 細胞分化，也可促進 T 細胞增生。再根據上述實驗得知，(S)-armepavine 可能會抑制 cytokines 的產生，因此，本計畫以不同濃度之(S)-armepavine (25、50 和 100μM) 處理未活化或以 PHA 活化的細胞，於 72 小時後偵測 IL-2 與 IFN-γ 的含量來評估(S)-armepavine 是否會影響 cytokines 的產生。由實驗結果得知(圖十二與十三)，當 PHA 刺激細胞 72 小時後，會使 PBMCs 產生大量的 IL-2 (331.3±11.1 pg/ml vs. 0.0±3.6pg/ml; $p < 0.01$) 與 IFN-γ (967.6±20.9pg/ml vs. 23.9±6.9 pg/ml; $p < 0.01$)。不同濃度的(S)-armepavine 並不會對未活化的 PBMCs 有任何影響，而(S)-armepavine 則會呈現濃度相關性地抑制以 PHA 活化後 IL-2 與

IFN- γ 的產生，當藥物濃度達到 100 μ M 時，幾可使得 IL-2 (0.0 \pm 5.6pg/ml) 與 IFN- γ (37.6 \pm 10.1pg/ml) 降低至如同未活化狀態。(S)-Armpavine 抑制 IL-2 與 IFN- γ 的產生的 IC₅₀ 分別為 20.9 μ M 與 6.3 μ M。因此，(S)-armepavine 可藉由減少 cytokines 的產生來抑制 PBMCs 的增生現象。

十四、(S)-Armpavine 對於 PBMCs 中 cytokines mRNA 表現的影響

為了探討(S)-armepavine 抑制 IL-2 與 IFN- γ 的產生是否經由影響其基因的表現，將經過(S)-armepavine 處理 18 小時的 PBMCs 的全量細胞內 RNA 抽出，以 RT-PCR 來評估 mRNA 是否受影響。由圖十四 A 知，當細胞處於未活化狀態時，完全沒有 cytokines mRNA 的表現，不論是 DMSO (0.1%) 或是(S)-armepavine (100 μ M) 皆不會影響未活化細胞的 cytokine mRNA 的表現。在 PHA 作用下，IL-2 與 IFN- γ mRNA 的表現則分別會增加 29.5 與 79.0 倍。而在不同濃度(25、50 與 100 μ M) 的(S)-armepavine 作用下，經由 PHA 所活化產生的 IL-2 與 IFN- γ mRNA 則會呈現不同程度的抑制現象(圖十四 B)，其對於 IL-2 mRNA 的抑制百分比分別為 29%、39%與 71%，而對 IFN- γ mRNA 的抑制百分比則分別為 32%、49%與 64%。因此，(S)-armepavine 可能會經由影響基因的表現而減少 cytokines 的產生。

肆、討論

目前對於引起紅斑性狼瘡的機轉並不完全清楚，基於下述理由可知 T 細胞所主導的免疫反應在其中扮演重要角色。一、在紅斑性狼瘡患者體內發現，大量的 CD4⁺ T 細胞會聚集於受到攻擊的組織 (Rozzo et al., 1994)。二、在 CD4⁺ T 細胞或是 MHC class II 缺乏的小鼠發現除了會產生淋巴結腫大的現象，並不會發生自體免疫的腎臟疾病，也不會產生自體抗體 (Koh et al., 1995)。三、給予 anti-CD4⁺ 單株抗體可以改善 SLE 的疾病症狀 (Jabs et al., 1992)。根據實驗室之前發表的論文指出，從蓮子萃取的(S)-armepavine 在體外試驗具有抑制 T 細胞增生的能力 (Liu et al., 2004; Wang et al., 2004)。因此，本研究計畫以體內模式 MRL-*lpr/lpr* 小鼠為研究目標，評估(S)-armepavine 治療 SLE 的可行性，另外以 PBMCs 為體外模式，探討(S)-armepavine 的作用機轉為何。

MRL-*lpr/lpr* 小鼠的 T 細胞在成熟的過程並不會經過篩選而死亡，這也意味著 Fas 在成熟的過程中扮演著重要的角色 (Nagata, 1998)。雖然目前的研究指出 Fas 主要參與在 peripheral selection 的過程 (Singer and Abbas, 1994)，但是仍然有證據指出 negative selection 過程也發現 Fas 與 Fas ligand 的存在 (Castro et al., 1996)。而 T 細胞的大量增生與其自體免疫疾病的症狀息息相關，因而導致 MRL-*lpr/lpr* 小鼠發生嚴重的症狀 (Mok and Lau, 2003)。雖然臨床症狀的不同，但是各種自體免疫疾病仍然具有病理過程上的相似性，且藉由 cytokine 及其他重要物質的產生來調控發炎反應、組織破壞和修復機制 (Andreaskos et al., 2002)。原則上，過量的 Th1 細胞會參與組織的破壞而導致自體免疫疾病，過量的 Th2 細胞則與過敏與氣喘有關 (Szabo et al., 2003)。但是，在 SLE 形成的過程中，不論是 Th1 或 Th2 所分泌產生的 cytokines 都扮演著重要的角色 (Horwitz et al., 1994; Llorente et al., 1994; Mok and Lau, 2003)。Cytokines 在 T 細胞所媒介的疾病病理形成過程中主要是在調控淋巴細胞的活化與增生 (Falcone & Sarvetnick, 1999)。而在本計畫中，我們發現(S)-armepavine 可抑制 MRL-*lpr/lpr* 小鼠脾臟細胞的增生與減少脾臟細胞中的 Th1 cytokines (IL-2 與 IFN- γ) 與 Th2 cytokines (IL-4 與 IL-10) 的基因表現。同時也發現(S)-armepavine 可降低 MRL-*lpr/lpr* 小鼠淋巴結腫大以及減少血清中 cytokines (IL-2、IFN- γ 、IL-4 與 IL-10) 的分泌。因此，我們判斷(S)-armepavine 可調控在 MRL-*lpr/lpr* 小鼠中不正常的 T 細胞主導的免疫反應，藉此來改善疾病的進行。

B 細胞在 SLE 中是產生 autoantibodies 來攻擊細胞膜上或是細胞核內的自體抗體 (Tsokos et al., 2003)。將 T 細胞與具有自體反應性的 B 細胞以各種不同的條件培養在一起會發現可增加 autoantibodies 的產生，這也說明了 T 細胞會直接與 B 細胞產生交互作用來活化 B 細胞 (Greidinger et al., 2004)。除此之外，T 細胞也可藉由 cytokines 的分泌來調控 B 細胞的功能 (Shlomchik et al., 2001)。Anti-dsDNA 與 anti-Sm 抗體是在 SLE 患者體內所特有的 autoantibodies (Tan et al., 1982)，根據研究指出 anti-DNA 抗體的產生與腎絲球腎炎有著絕對的關係 (Ehrenstein et al., 1995)。藉由 IgG 免疫球蛋白上的 Fc 接受器補體或自體抗體的結合來導致許多造成組織破壞的物質的分泌與加劇發炎反應 (Nydegger, 1985; Clynes et al., 1999)。在本計畫中我們可以在 MRL-lpr/lpr 小鼠的血清中發現 anti-dsDNA 抗體的存在，同時在腎臟切片中也可發現 hypercellular glomeruli 的現象以及 IgG 免疫複合體的沈積。而大量的蛋白尿的發現也意味著腎功能的惡化 (Perez de Lema et al., 2004)。藉由 cyclosporin A 的結果可知，MRL-lpr/lpr 小鼠腎功能的惡化與其不正常的免疫功能有著極大的關係。在實驗中我們證明(S)-armepavine 可以減少自體抗體的產生，抑制 glomerular hypercellularity 的發生與減輕免疫複合體的沈積，因此證明(S)-armepavine 可藉由抑制上述的病理現象來改善 MRL-lpr/lpr 小鼠的腎絲球腎炎。

Cyclosporin A 是種免疫抑制劑，它是藉由影響 nuclear factor of activated T cells (NF-AT) 的活化來抑制 T 細胞分泌 cytokines，也因此可用來治療紅斑性狼瘡 (Zimmerman et al., 2001)。雖然在臨床上，cyclosporin A 並不是第一線用藥，但是它只會影響活化的 T 細胞而不會影響未活化的細胞，因此可避免全面性的抑制免疫反應 (Goldsby et al., 2001)。如同緒論所言，cyclosporin A 因為其副作用如高血壓、牙齦增生、多毛症或是腎毒性而在臨床上的使用常常受到了限制 (Radhakrishnan et al., 1994)。從實驗室已發表的論文指出 cyclosporin A 會抑制 PBMCs 的增生 (Kuo et al., 2002)。在本計畫則發現 cyclosporin A 會呈現免疫抑制功能來抑制 MRL-lpr/lpr 小鼠脾臟細胞的增生與 cytokines 基因的表現，它同時也會減少血清中的自體抗體與 cytokines 的產生。但是在實驗中卻沒發現腎毒性的產生，根據研究報導指出，小鼠腹腔注射 cyclosporin A (50 及 80mg/kg/day) 才會產生腎毒性 (Hong et al., 2004)。因此在本計畫中口服給予 cyclosporin A (20mg/kg/day) 有可能不會產生腎毒性。

根據文獻的回顧發現 armepavine 也具有其他的功能，包括它可造成 L929 transformed cells 的毒殺作用 (Philipov et al., 2000)，它也是神經元的 nicotinic acetylcholine receptor 的非選擇性拮抗劑 (Exley et al., 2005)，同時它也會經由活化 caspase-3 與抑制 bcl-2 來造成 leukemia cell line (CCRF-CEM) 的細胞凋亡 (Jow et al., 2004)。但是，本研究計畫乃是第一次將(S)-armepavine 應用於免疫細胞與自體免疫疾病的體內動物模式。根據實驗結果得知，(S)-armepavine 並無明顯的細胞毒性同時也不具有肝毒性，這也呼應了其他文獻所報導的(S)-armepavine 並不會對 thymocyte 有毒殺作用 (Philipov et al., 2000)。雖然(S)-armepavine 在本計畫中只應用於 MRL-*lpr/lpr* 小鼠尚未應用於其他的動物實驗，由實驗結果也發現如同 cyclosporin A，(S)-armepavine 只會抑制已活化的細胞並不會影響未活化的細胞，因此(S)-armepavine 在實驗動物體內應不致於影響全面性的免疫功能。而所有的自體免疫疾病都有著發炎的相似性，藉由抑制 T 細胞的免疫反應，(S)-armepavine 也提供了治療其他自體免疫疾病的可能性。根據其他文獻報導，結構為 isoquinoline 的生物鹼(alkaloids)例如口服給予 moexipril(30mg/kg/day)，腹腔注射 BU98008 (20mg/kg) 或是靜脈注射 drotaverine (80mg) 常會引起低血壓、體溫過低、眩暈、噁心與嘔吐等副作用 (Friehe and Ney, 1997; Cambridge and Robinson, 2005; Romics et al., 2003)。(S)-Armepavine 的結構同樣是屬於 isoquinoline 的生物鹼，由於是口服給予且劑量較上述藥物為低(5 和 10 mg/kg/day)，因此我們推論(S)-armepavine 應不具上述的副作用，但是是否有其他的副作用則需要更進一步的實驗證明。

伍、結論與建議

根據體內實驗結果發現，MRL-*lpr/lpr* 小鼠口服(S)-armepavine 6 週，在腎功能的評估中可發現，(S)-armepavine 可藉由抑制 glomerular hypercellularity 的現象與減少免疫複合體的沈積來抑制尿液中 creatinine、BUN 與蛋白質的含量而改善 MRL-*lpr/lpr* 小鼠腎功能惡化的狀況。在免疫功能的評估中則發現(S)-armepavine 可以抑制 Con A 所誘導的脾臟細胞的增生，減少脾臟細胞的 cytokines 基因的表現，抑制淋巴結的腫大現象，以及降低血清中的 cytokines 與自體抗體的含量。因此由體內試驗可推論(S)-armepavine 可能是經由抑制 cytokines 與自體抗體的產生來抑制 MRL-*lpr/lpr* 小鼠 SLE 的病理形成過程。在體外試驗則發現，(S)-armepavine 可抑制 PHA 所誘導的 PBMCs 的增生，而這抑制現象並不是經由細胞毒殺作用而來的。另外也發現(S)-armepavine 可減少 PBMCs 的 cytokines 的產生與 cytokines mRNA 的表現。由此我們可以推論(S)-armepavine 的確是會抑制 T 細胞的活化與增生。因此本研究計畫推論(S)-armepavine 可經由調控 MRL-*lpr/lpr* 小鼠體內的不正常 T 細胞的免疫反應來抑制 SLE 疾病的進行。但是在 SLE 所造成的腎絲球腎炎中會發現 mesangial cells 會大量的增生以及產生大量的 mesangial matrix (Cruse et al., 2000)，是否(S)-armepavine 也會經由抑制 mesangial cells 的功能則需要更進一步的實驗才能證明。

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-028 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. 江蘇新醫學院編。中藥大辭典。上海科學技術出版社出版，1995。
2. 蕭培根編，中國本草圖錄。台灣商務印書館股份有限公司出版，1989。
3. Andreakos ET, Foxwell BM, Brennan FM, Maini RN, Feldmann M.: Cytokines and anti-cytokine biologicals in autoimmunity: present and future. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 299-313.
4. Bijlsma JW, Van Everdingen AA, Huisman M, De Nijs RN, Jacobs JW.: Glucocorticoids in rheumatoid arthritis: effects on erosions and bone. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966: 82-90.
5. Burdmann EA, Andoh TF, Yu L, Bennett WM.: Cyclosporine nephrotoxicity. *Semin Nephrol* 2003; 23: 465-76.
6. Cambridge N, Robinson ESJ.: Effect of BU98008, an imidazoline1-binding site ligand, on body temperature in mice. *Eur J Pharmacol* 2005; 519: 86-90.
7. Castro JE, Listman JA, Jacobson BA, Wang Y, Lopez PA, Ju S, Finn PW, Perkins DL.: Fas modulation of apoptosis during negative selection of thymocytes. *Immunity* 1996; 5: 617-627.
8. Clynes R, Maizes JS, Guinamard R, Ono M, Takai T, Ravetch JV.: Modulation of immune complex induced inflammation in vitro by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors. *J Exp Med* 1999; 189: 179-186.
9. Cohen PL, Eisenberg RA.: *Lpr* and *gld*: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 243-269.
10. Corrigan CJ, Kay AB.: T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Immunol Today* 1992; 13: 501-507.
11. Cruse JM, Lewis RE, Dilioglou S.: Fate of immune complexes, glomerulonephritis, and cell-mediated vasculitis in lupus-prone MRL/Mp lpr/lpr mice. *Exp Mol Pathol* 2000; 69: 211-222.
12. Drappa J, Vaishnav AK, Sullivan KE, Chu JL, Elkon KB.: Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. *N Engl J Med* 1996; 335: 1643-1649.

13. Dutz JP, Ho VC.: Immunosuppressive agents in dermatology. *An update. Dermatol Clin* 1998; 16: 235-251.
14. Ehrenstein MR, Katz DR, Griffiths MH, Papadaki L, Winkler TH, Kalden JR, Isenberg DA.: Human IgG anti-DNA antibodies deposit in kidneys and induce proteinuria in SCID mice. *Kidney Int* 1995; 48:705-711.
15. Ermann J, Fathman CG.: Autoimmune diseases: genes, bugs and failed regulation. *Nat Immunol* 2001; 2: 759-761.
16. Exley R, Iturriaga-Vasquez P, Lukas RJ, Sher E, Cassels BK, Bermudez I.: Evaluation of benzyltetrahydroisoquinolines as ligands for neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Br J Pharmacol* 2005; 146: 15-24.
17. Falcone M, Sarvetnick N.: Cytokines that regulate autoimmune responses. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 670-676.
18. Favero J, Lafont V.: Effector pathways regulating T cell activation. *Biochem Pharmacol* 1998; 56: 1539-1547.
19. Feldmann M, Maini RN.: Anti-TNF therapy of -rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 163-196.
20. Fox DA, McCune WJ.: Immunosuppressive drug therapy of systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 1994; 20: 265-299.
21. Friehe H, Ney P.: Pharmacological and toxicological studies of the new angiotensin converting enzyme inhibitor moexipril hydrochloride. *Arzneimittelforschung* 1997; 47: 132-144.
22. Goldsby R, Kindt TJ, Osborne BA. Kuby Immunology 4th. W.H. freeman and company. New York. 2000.
23. Gor DO, Rose NR, Greenspan NS.: T_H1-T_H2: a procrustean paradigm. *Nat Immunol* 2003; 4: 503-505.
24. Graham RM.: Cyclosporine: mechanisms of action and toxicity. *Cleve Clin J Med* 1994; 61: 308-313.
25. Greidinger EL, Gazitt T, Jaimes KF, Hoffman RW.: Human T cell clones specific for heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 autoantigen from connective tissue disease patients assist in autoantibody production. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2216-2222.

26. Hong F, Lee J, Piao YJ, Jae YK, Kim YJ, Oh C, Seo JS, Yun YS, Yang CW, Ha J, Kim SS.: Transgenic mice overexpressing cyclophilin A are resistant to cyclosporin A-induced nephrotoxicity via peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 1073-1080.
27. Horwitz DA, Wang H, Gray JD.: Cytokine gene profile in circulating blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus: increased interleukin-2 but not interleukin-4 mRNA. *Lupus* 1994; 3: 423-428.
28. Ia Cour B, Molgaard P, Yi Z.: Traditional Chinese medicine in treatment of hyperlipidaemia. *J Ethnopharmacol* 1995; 46: 125-129.
29. Jabs DA, Burek CL, Hu Q, Kupperts RC, Lee B, Prendergast RA.: Anti-CD4 monoclonal antibody therapy suppresses autoimmune disease in MRL/MpJ-lpr/lpr mice. *Cell Immunol* 1992; 141: 496-507.
30. Jow GM, Wu YC, Guh JH, Teng CM.: Armpavine oxalate induces cell death on CCRF-CEM leukemia cell linethrough an apoptotic pathway. *Life Sci* 2004; 75: 549-557.
31. Kilpatrick DC.: Mechanisms and assessment of lectin-mediated mitogenesis. *Mol Biotechnol* 1999; 11: 55-65.
32. Koh DR, Ho A, Rahemtulla A, Fung-Leung WP, Griesser H, Mak TW.: Murine lupus in MRL/lpr mice lacking CD4 or CD8 T cells. *Eur. J. Immunol* 1995; 25: 2558-2562.
33. Kuo YC, Huang YL, Chen CC, Lin YS, Chuang KA, Tsai WJ.: Cell cycle progression and cytokine gene expression of human peripheral blood mononuclear cells modulated by *Agaricus blazei*. *J Lab Clin Med* 2002; 140: 176-187.
34. Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO.: Th1 and Th2 CD4⁺ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* 1995; 16: 34-38.
35. Liu CP, Tsai WJ, Lin YL, Liao JF, Chen CF, Kuo YC.: The extracts from *Nelumbo nucifera* suppress cell cycle progression, cytokine genes expression, and cell proliferation in human peripheral blood mononuclear cells. *Life Sci* 2004; 75: 699-716.
36. Llorente L, Richaud-Patin Y, Fior R, Alcocer-Varela J, Wijdenes J, Fourrier BM,

- Galanaud P, Emilie D.: In vivo production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjogren's syndrome, and systemic lupus erythematosus. A potential mechanism of B lymphocyte hyperactivity and autoimmunity. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1647-55.
37. Llorente L, Richaud-Patin Y, Wijdenes J.: Spontaneous production of interleukin-10 by B lymphocytes and monocytes in systemic lupus erythematosus. *Eur Cytokine Netw* 1993; 4: 421-427.
38. Marrack P, Kappler J, Kotzin BL.: Autoimmune disease: why and where it occurs? *Nat Med* 2001, 7: 899-905.
39. Mok CC, Lau CS.: Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 2003; 56: 481-490.
40. Mukherjee PK, Saha K, Das J, Pal M, Saha BP.: Studies on the anti-inflammatory activity of rhizomes of *Nelumbo nucifera*. *Planta Med* 1997; 63: 367-369.
41. Mukherjee PK, Saha K, Pal M, Saha BP.: Effect of *Nelumbo nucifera* rhizome extract on blood sugar level in rats. *J Ethnopharmacol* 1997; 58: 207-213.
42. Nagata S.: Human autoimmune lymphoproliferative syndrome, a defect in the apoptosis-inducing Fas receptor: A lesson from the mouse model. *J Hum Genet* 1998; 43: 2-8.
43. Nydegger UE.: A place for soluble immune complexes in clinical immunology. *Immunol Today* 1985; 6: 80-82.
44. O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P.: Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 37-45.
45. Perez de Lema G, Lucio-Cazana FJ, Molina A, Luckow B, Schmid H, de Wit C, Moreno-Manzano V, Banas B, Mampaso F, Schlondorff D.: Retinoic acid treatment protects MRL/lpr lupus mice from the development of glomerular disease. *Kidney Int* 2004; 66: 1018-1028.
46. Philipov S, Ivanovska N, Istatkova R, Tuleva P.: Phytochemical study and cytotoxic activity of alkaloids from *Uvaria chamae* P. *Beauv Pharmazie* 2000; 55: 688-689.
47. Qian J.: Cardiovascular pharmacological effects of bisbenzylisoquinoline alkaloid derivatives. *Acta Pharmacol Sin* 2002; 23: 1086-1092.

48. Radhakrishnan J, Kunis CL, D'Agati V, Appel GB.: Cyclosporine treatment of lupus membranous nephropathy. *Clin. Nephrol* 1994, 42: 147-154.
49. Romics I, Molnar DL, Timberg G, Mrklic B, Jelakovic B, Koszegi G, Blasko G.: The effect of drotaverine hydrochloride in acute colicky pain caused by renal and ureteric stones. *BJU Int* 2003; 92: 92-96.
50. Rozzo SJ, Drake CG, Chiang BL, Gershwin ME, Kotzin BL.: Evidence for polyclonal T cell activation in murine models of systemic lupus erythematosus. *J. Immunol* 1994; 153: 1340-1351.
51. Schreiber S, Heining T, Thiele HG, Raedler A.: Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995; 108: 1434-1444.
52. Serkova N, Christians U.: Transplantation: toxicokinetics and mechanisms of toxicity of cyclosporine and macrolides. *Curr Opin Investig Drugs* 2003; 4: 1287-96.
53. Shlomchik MJ, Craft JE, Mamula MJ.: From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 147-153.
54. Singer GG, Abbas AK.: The Fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1994; 1: 365-371.
55. Sinha S, Mukherjee PK, Mukherjee K, Pal M, Mandal SC, Saha BP.: Evaluation of antipyretic potential of *Nelumbo nucifera* stalk extract. *Phytother Res* 2000; 14: 272-274.
56. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH.: Molecular mechanisms regulating TH1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 713-758.
57. Talukder MJ, Nessa J.: Effect of *Nelumbo nucifera* rhizome extract on the gastrointestinal tract of rat. *Bangladesh Med Res Counc Bull* 1998; 24: 6-9.
58. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ.: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271-1277.
59. Theofilopoulos AN, Lawson BR.: Tumor necrosis factor and other cytokines in murine lupus. *Ann Rheum Dis* 1999; 58 (suppl 1): 149-155.

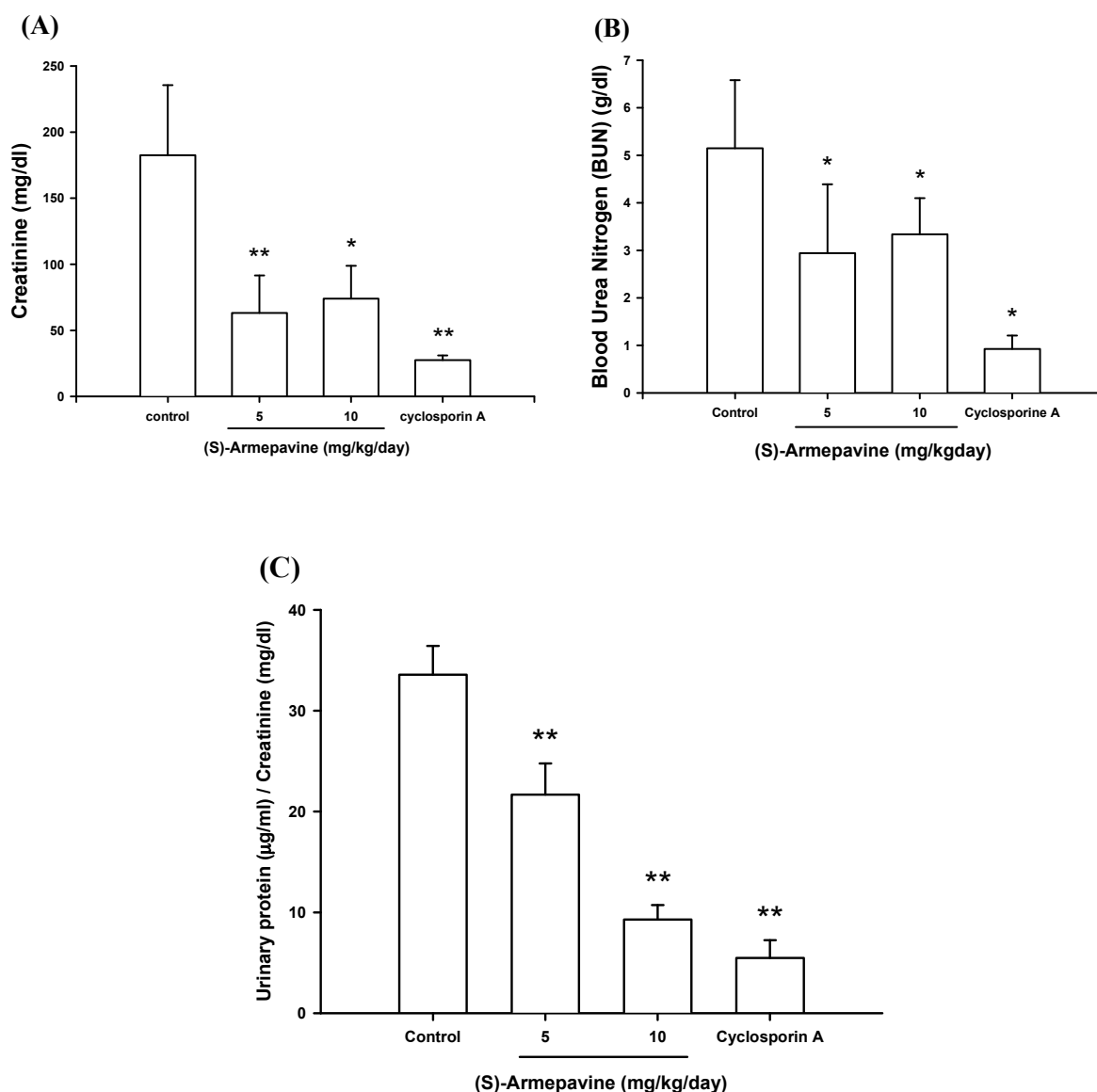
60. Tian J, Olcott AP, Hanssen LR, Zekzer D, Middleton B, Kaufman DL.: Infectious Th1 and Th2 autoimmunity in diabetes-prone mice. *Immunol Rev* 1998; 164: 119-127.
61. Tsokos CG, Nambiar MP, Tenbrock K, Juang, YT.: Rewiring the T-cell: signaling defects and novel prospects for the treatment of SLE. *Trends Immunol* 2003; 24: 259-263.
62. Wang WY, Liu CP, Kuo YC, Lin YL.: Anti-lymphoproliferative alkaloids from plumula nelumbinis. *Chinese Pharmaceut J* 2004; 56: 25-30.
63. Yu J, Hu WS.: Effects of neferine on platelet aggregation in rabbits. *Yao Xue Xue Bao* 1997; 32:1-4.
64. Zimmerman R, Radhakrishnan J, Valeri A, Appel G.: Advances in the treatment of lupus nephritis. *Annu Rev Med* 2001; 52: 63-78.

柒、圖表

表一 各對引子的核酸序列

Genes	Mouse primer sequences (5' to 3') (bp ^a)	Predicted size
IL-2	TGCTCCTTGTC AACAGCG TCATCATCGAATTGGCACTC	391
IFN- γ	TGAACGCTACACACTGCATCTTGG CGACTCCTTTTCCGCTTCCTGAG	460
IL-4	ATGGGTCTCAACCCCCAGCTAGT GCTCTTTAGGCTTTCCAGGAAGTC	399
IL-10	TCAAACAAAGGACCAGCTGGACAACATACTGC CTGTCTAGGTCCTGGAGTCCAGCAGACTCAA	420
GAPDH	TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC	983
Genes	Human primer sequences (5' to 3') (bp ^a)	Predicted size
IL-2	GCTACAAACAGTGCACCTAC CCCTGGGTCTTAAGTGAAAG	262
IFN- γ	GCAGAGCCAAATTGTCTCCT ATGCTCTTCGACCTCGAAAC	290

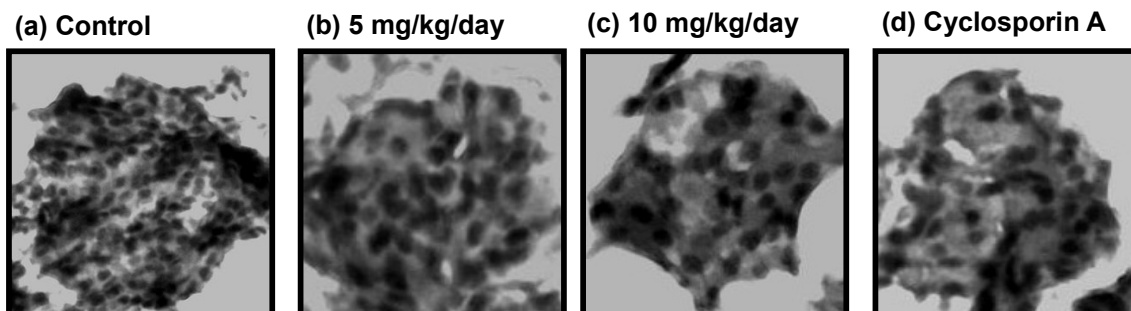
^a bp = base pairs



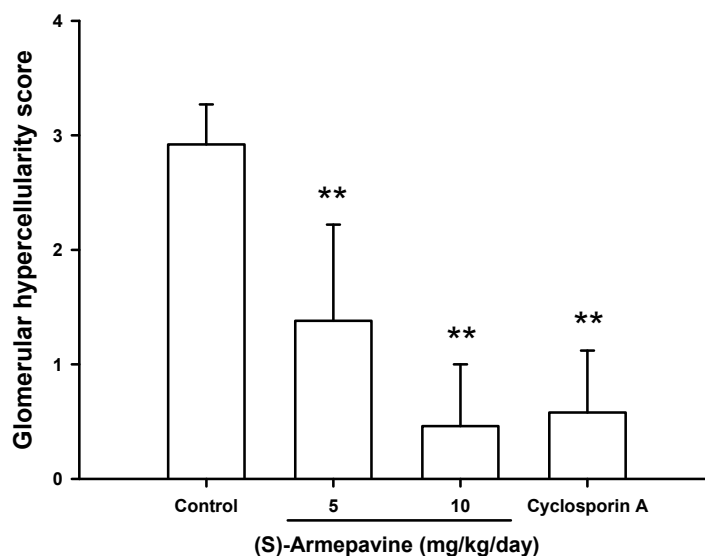
圖一 (S)-armepavine 可改善 MRL-lpr/lpr 小鼠的腎臟功能

MRL-lpr/lpr 小鼠口服餵食玉米油 (對照組)、(S)-armepavine (5 或 10 mg/kg/day; 實驗組) 或是 cyclosporin A (20mg/kg/day; 正對照組) 6 週。收集小鼠 24 小時尿液測定其中的(A)creatinine、(B)BUN 與(C)尿蛋白的含量來評估藥物對其腎功能的影響。實驗數值以平均值±標準偏差來表示。* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ 是指經藥物處理的實驗組，正對照組分別與對照組相比較之統計學結果。

(A)

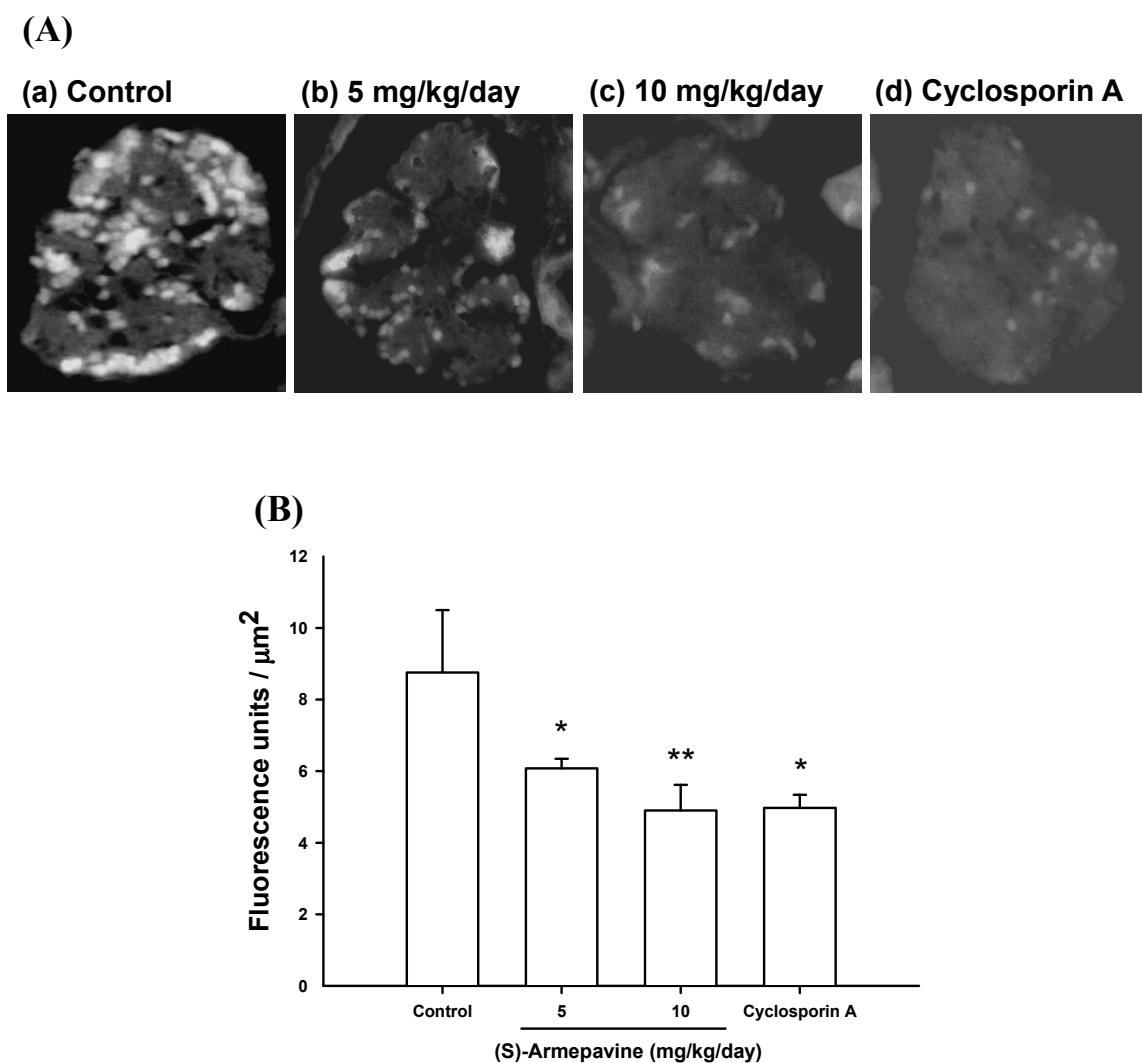


(B)

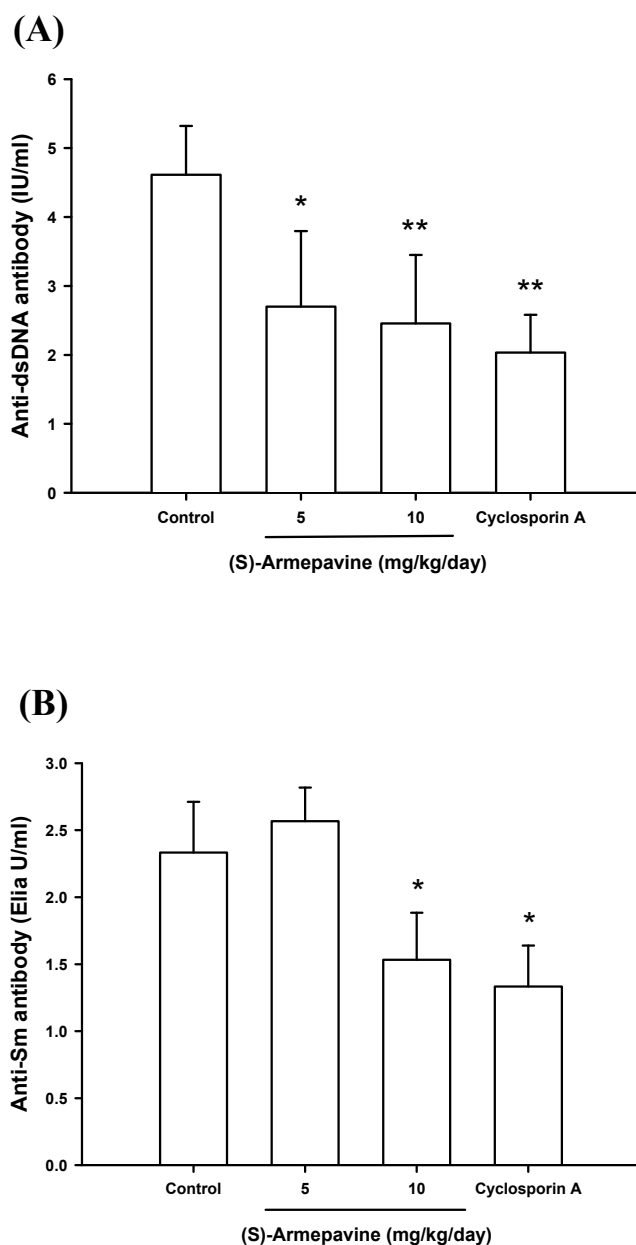


圖二 (S)-armepavine 可抑制 MRL-*lpr/lpr* 小鼠的 glomerular hypercellularity 的現象

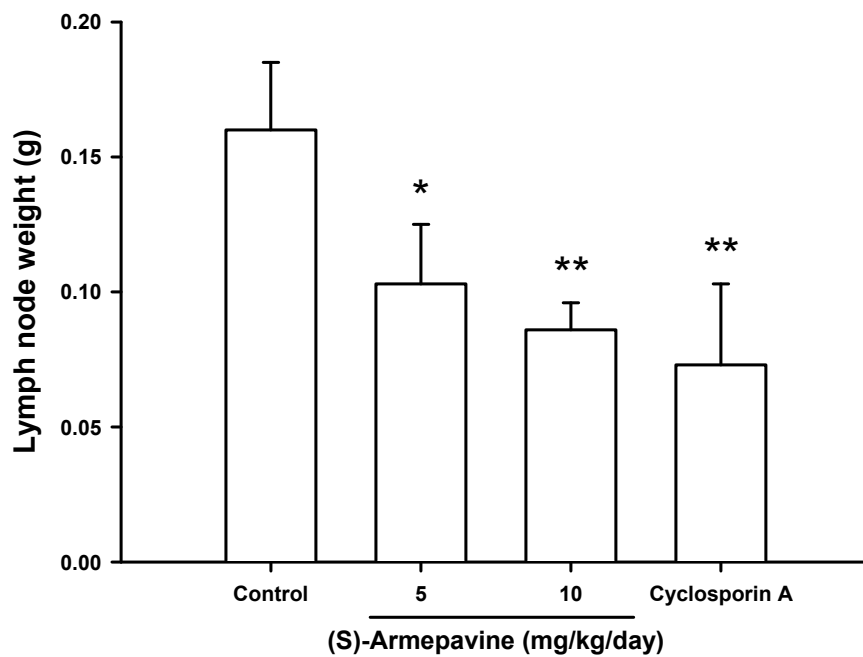
MRL-*lpr/lpr* 小鼠口服餵食玉米油 (對照組)、(S)-armepavine (5 或 10 mg/kg/day; 實驗組) 或是 cyclosporin A (20mg/kg/day; 正對照組) 6 週。(A)取腎臟做冷凍切片，以 H&E 染色，觀察其腎絲球內細胞核數目的變化。(B)再以實驗方法中所敘述的半定量方式對於 mesangial 區域中的細胞核數目來給分，實驗數值以平均值±標準偏差來表示，**： $p < 0.01$ 是指經藥物處理的實驗組，正對照組分別與對照組相比較之統計學結果。



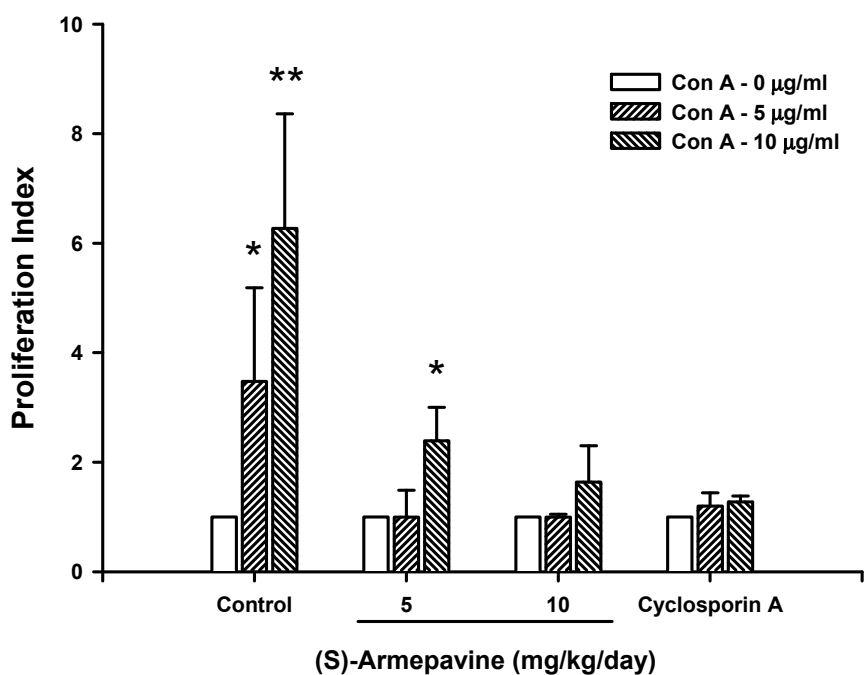
圖三 (S)-armepavine 可減少 MRL-*lpr/lpr* 小鼠免疫複合體沈積的現象
 MRL-*lpr/lpr* 小鼠口服餵食玉米油 (對照組)、(S)-armepavine (5 或 10 mg/kg/day; 實驗組) 或是 cyclosporin A (20mg/kg/day; 正對照組) 6 週。(A)取腎臟做冷凍切片，以免疫螢光染色，觀察其腎絲球內 IgG 免疫複合體沈積的狀況。(B)再以 Axio Vision LE Rel 4.2 分析軟體進行螢光強度的分析，所得的結果以 fluorescence unit/ μm^2 來呈現，實驗數值以平均值±標準偏差來表示，*： $p < 0.05$ ，**： $p < 0.01$ 是指經藥物處理的實驗組，正對照組分別與對照組相比較之統計學結果。



圖四 (S)-armepavine 可抑制 MRL-*lpr/lpr* 小鼠的自體抗體的產生
MRL-*lpr/lpr* 小鼠口服餵食玉米油 (對照組)、(S)-armepavine (5 或 10 mg/kg/day; 實驗組) 或是 cyclosporin A (20mg/kg/day; 正對照組) 6 週。經由心臟採血在離心後取得小鼠血清，以 ELISA 測量其中的 (A)anti-dsDNA 抗體與(B)anti-Sm 抗體的含量。實驗數值以平均值±標準偏差來表示，*： $p < 0.05$ ，**： $p < 0.01$ 是指經藥物處理的實驗組，正對照組分別與對照組相比較之統計學結果。



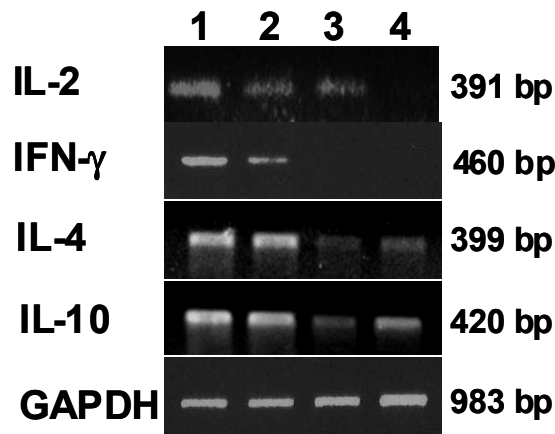
圖五 (S)-armepavine 可減輕 MRL-*lpr/lpr* 小鼠的淋巴結腫大的現象
MRL-*lpr/lpr* 小鼠口服餵食玉米油 (對照組)、(S)-armepavine (5 或 10 mg/kg/day; 實驗組) 或是 cyclosporin A (20mg/kg/day; 正對照組) 6 週。取其前肢腋下的淋巴結秤重，實驗數值以平均值±標準偏差來表示，*： $p < 0.05$ ，**： $p < 0.01$ 是指經藥物處理的實驗組，正對照組分別與對照組相比較之統計學結果。



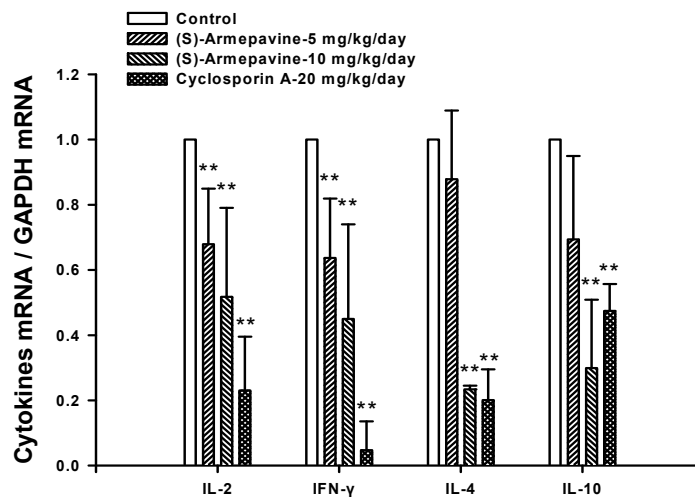
圖六 (S)-armepavine 可抑制 MRL-*lpr/lpr* 小鼠脾臟細胞的增生

MRL-*lpr/lpr* 小鼠口服餵食玉米油 (對照組)、(S)-armepavine (5 或 10 mg/kg/day; 實驗組) 或是 cyclosporin A (20mg/kg/day; 正對照組) 6 週。待取得小鼠脾臟細胞後以 Con A (5 或 10μg/ml) 作用 3 天來刺激細胞增生，再加入 tritiated thymidine (1μCi/well) 共同培養 16 小時，以細胞攝取 tritiated thymidine 的多寡來評估藥物是否會影響脾臟細胞的增生。實驗數值以平均值±標準偏差來表示，*： $p < 0.05$ ，**： $p < 0.01$ 是指經藥物處理的實驗組，正對照組分別與對照組相比較之統計學結果。

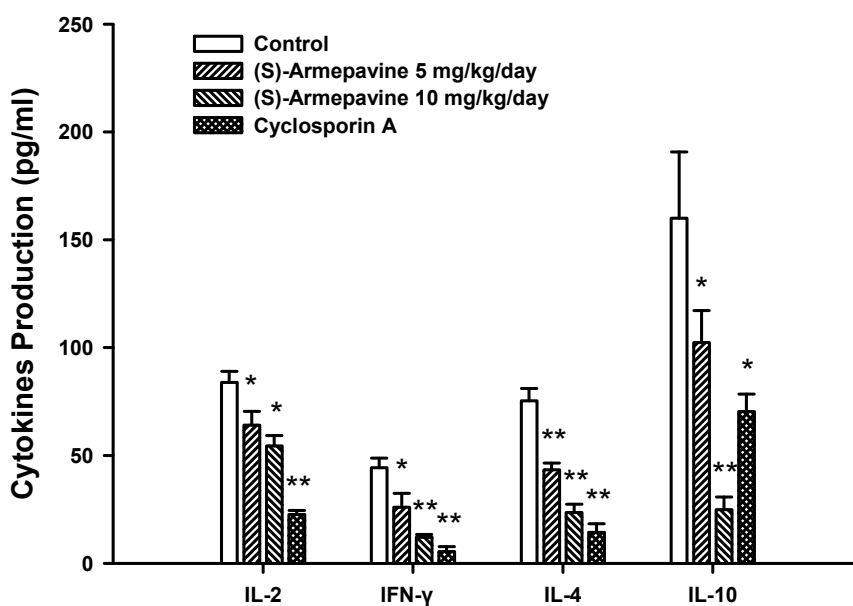
(A)



(B)

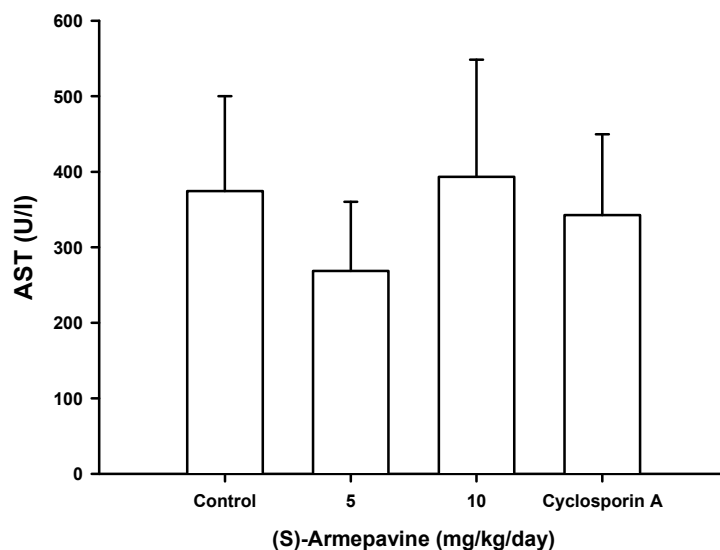


圖七 (S)-armepavine 可抑制 MRL-*lpr/lpr* 小鼠脾臟細胞 cytokines mRNA 的表現 MRL-*lpr/lpr* 小鼠口服餵食玉米油 (對照組)、(S)-armepavine (5 或 10 mg/kg/day; 實驗組) 或是 cyclosporin A (20mg/kg/day; 正對照組) 6 週。(A)根據實驗方法取得全量 RNA 與進行 RT-PCR，接著以 1.8% agarose gel 進行電泳，第一欄：對照組；第二欄：(S)-armepavine 5mg/kg/day；第三欄：(S)-armepavine 10 mg/kg/day；第四欄：cyclosporin A 20mg/kg/day。(B)所得的結果以影像密度分析儀定量，並以 GAPDH 為 internal control，分析各組實驗中 cytokine mRNA 與 GAPDH mRNA 標準化後的表現量。*: $p < 0.05$ 是指經藥物處理的實驗組，正對照組分別與對照組相比較之統計學結果。

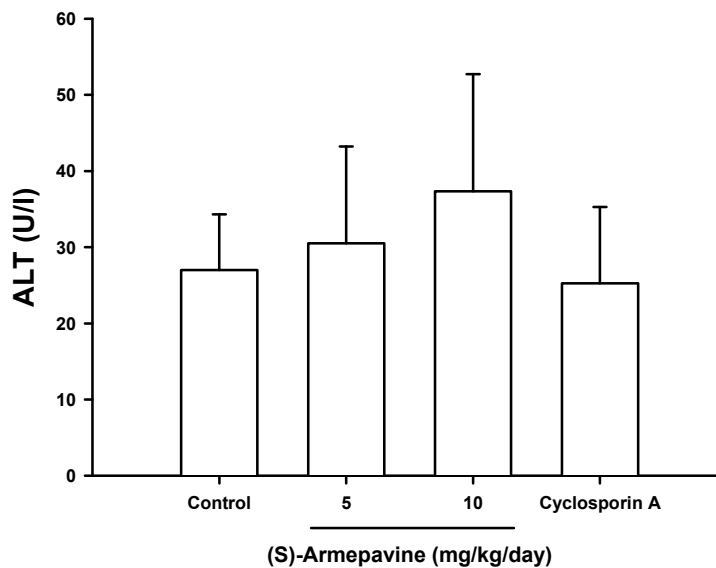


圖八 (S)-artemepavine 可減少 MRL-*lpr/lpr* 小鼠的 cytokines 的產生
MRL-*lpr/lpr* 小鼠口服餵食玉米油 (對照組)、(S)-artemepavine (5 或 10 mg/kg/day; 實驗組) 或是 cyclosporin A (20mg/kg/day; 正對照組) 6 週。經由心臟採血在離心後取得小鼠血清，以 ELISA 測量其中的 IL-2、IFN- γ 、IL-4 與 IL-10 的含量。實驗數值以平均值 \pm 標準偏差來表示，*： $p < 0.05$ ，**： $p < 0.01$ 是指經藥物處理的實驗組，正對照組分別與對照組相比較之統計學結果。

(A)

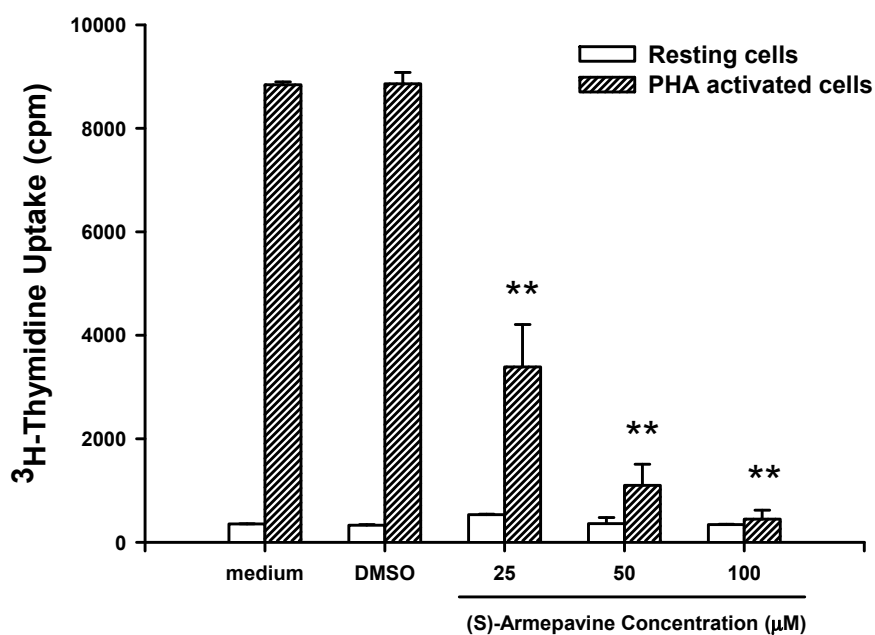


(B)



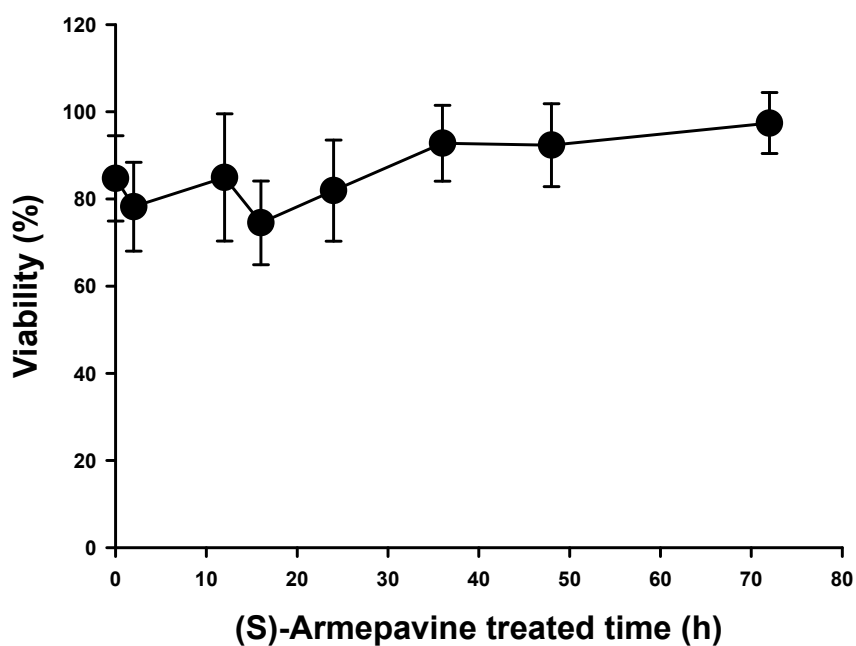
圖九 (S)-armepavine 不影響 MRL-*lpr/lpr* 小鼠的肝功能

MRL-*lpr/lpr* 小鼠口服餵食玉米油 (對照組)、(S)-armepavine (5 或 10 mg/kg/day; 實驗組) 或是 cyclosporin A (20mg/kg/day; 正對照組) 6 週。經由心臟採血在離心後取得小鼠血清，以富士生化試片和生化分析儀來分析血清中的 AST (A)和 ALT (B)，藉此來評估藥物是否會影響肝功能。實驗數值以平均值±標準偏差來表示。



圖十、(S)-arnepavine 會抑制 PBMCs 的增生

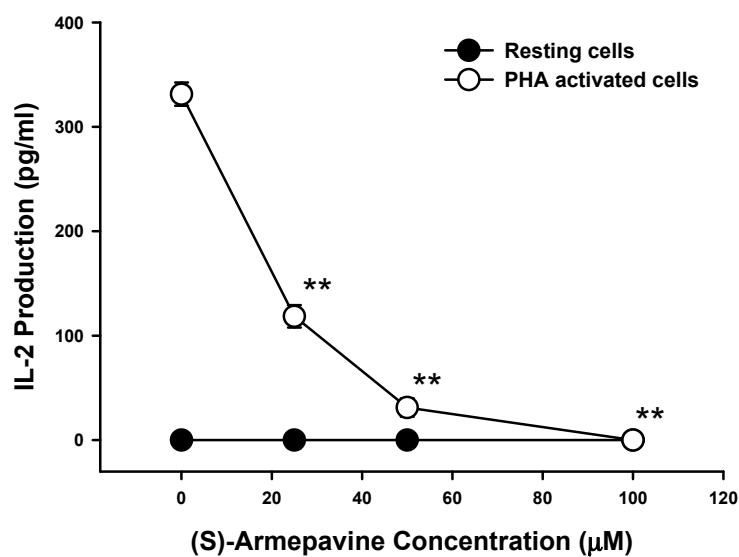
PBMCs (2×10^5 /well) 以不同濃度的(S)-arnepavine (25、50 與 100 μ M) 與 PHA (5 μ g/ml) 或是 medium 共同培養 3 天，以 tritiated thymidine (1 μ Ci/well) 共同培養 16 小時來標定新合成的 DNA。收集細胞後以閃爍計數液測定其放射線的強度。實驗數值以平均值 \pm 標準偏差來表示，**： $p < 0.01$ 是指經藥物處理的組別分別與 PHA+DMSO 組相比較之統計學結果。



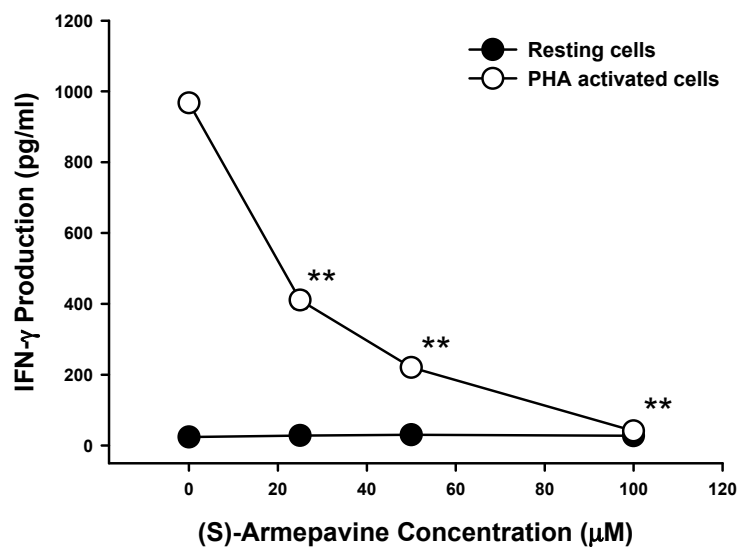
圖十一 (S)-artemepavine 不會影響 PBMCs 的存活率

PBMCs (2×10^5 /well) 與 $100\mu\text{M}$ 的(S)-artemepavine 共同培養 0、2、12、16、24、36、48 與 72 小時，再以 AlamarBlue™ 作用 3 小時於波長 570 和 600nm 測定吸光值，根據實驗方法中的公式來計算細胞存活率。實驗數值以平均值±標準偏差來表示。

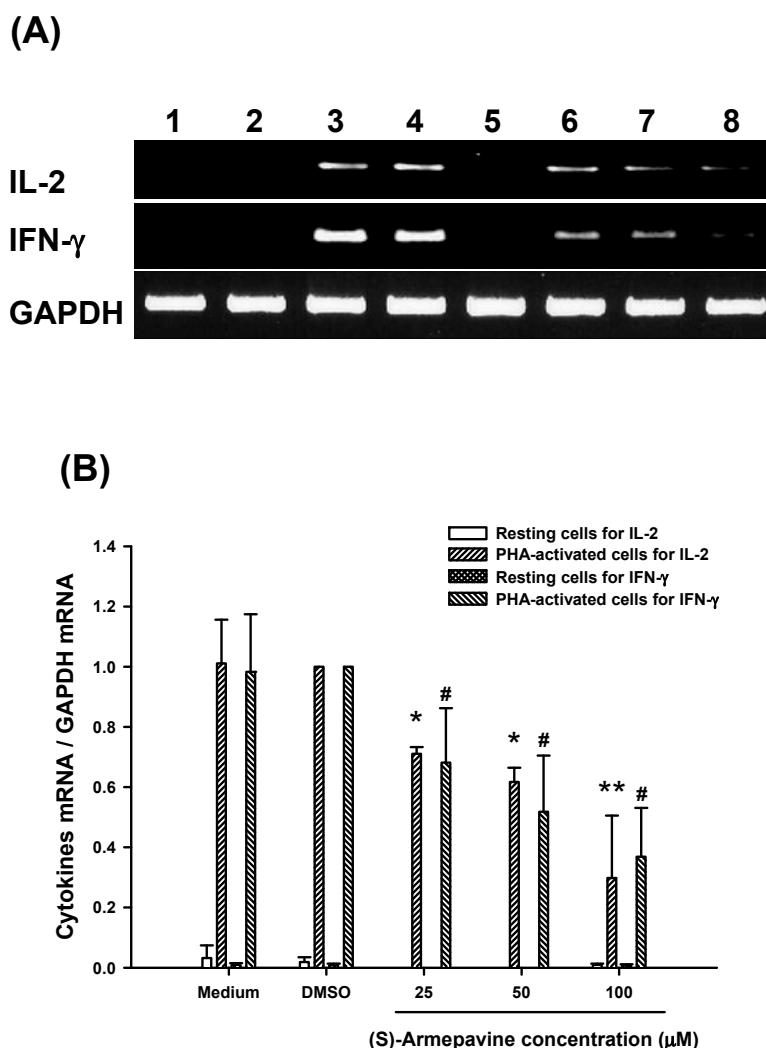
(A)



(B)



圖十二 (S)-artemepavine 會減少 PBMCs 的 cytokines 的產生
 PBMCs (2×10^5 /well) 以不同濃度的 (S)-artemepavine (25、50 與 100 µM) 與 PHA (5µg/ml) 或是 medium 共同培養 3 天，收集上清液以 ELISA 來測定 IL-2 (A) 與 IFN-γ (B) 的含量。實驗數值以平均值±標準偏差來表示，**：p < 0.01 是指經藥物處理的組別分別與 PHA+DMSO 組相比較之統計學結果。



圖十三、(S)-armepavine 會降低 PBMCs 的 cytokines mRNA 的表現

(A) PBMCs (5×10^6 cells)以不同濃度的(S)-armepavine (25、50 與 100 μM) 前處理 30 分鐘，再以 PHA 或是 medium 作用 18 小時，接著根據實驗方法取得全量 RNA 與進行 RT-PCR，接著以 1.8% agarose gel 進行電泳，第一欄：medium；第二欄：DMSO；第三欄：PHA 及 medium；第四欄：PHA 及 DMSO；第五欄：(S)-armepavine 100 μM ；第六欄：PHA 及(S)-armepavine (25 μM)；第七欄：PHA 及(S)-armepavine (50 μM)；第八欄：PHA 及(S)-armepavine (100 μM)。(B) 所得的結果以影像密度分析儀定量，並以 GAPDH 為 internal control，分析各組實驗中 cytokine mRNA 與 GAPDH mRNA 標準化後的表現量。*： $p < 0.05$ ，**： $p < 0.01$ 是指各實驗組分別與 PHA+DMSO 組比較之 IL-2 統計學結果。#： $p < 0.05$ ，##： $p < 0.01$ 是指各實驗組分別與 PHA+DMSO 組比較之 IFN- γ 統計學結果。

