

編號：CCMP93-RD-052

以啟動子轉殖細胞株篩檢調節免疫力之 中藥的模式建立

林璧鳳

國立台灣大學

摘 要

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。研究策略乃以分配萃取進行 22 種中草藥材部份純化所得之各區分物，利用 NF- κ B 啟動子及 IFN- γ 啟動子與報導基因 (Luciferase) 結合所建構之質體，分別短暫轉染 (transient transfection) 至 RAW264.7 巨噬細胞株、EL-4 T cell，進行抗發炎與免疫調節相關中草藥的快速篩選，並探討其促發炎介質 NO、TNF- α 、IL-6、PGE2 與 Th1 細胞激素 IL-2 等分泌量，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、中草藥進行發炎反應研究之不同種類細胞實驗模式。結果顯示不同的萃取方法所萃得之分子極性不同，有不同的效果，其中以 EtOAc 層區分物同時對 NF- κ B 及 IFN- γ Luciferase activity 皆具影響，其中桑寄生可同時對 LPS/IFN- γ 共同活化刺激下 NF- κ B Luciferase activity 及 Con A 活化刺激下 IFN- γ 、Luciferase activity 皆具顯著抑制作用 ($p < 0.05$)。反之，晉耆則同時促進 NF- κ B 及 IFN- γ Luciferase activity。當歸可抑制 NF- κ B Luciferase activity，且其亦可顯著抑制 IL-6、PGE2 之分泌量；但對 IFN- γ Luciferase activity 不具影響。杜仲葉、板藍根可抑制 IFN- γ Luciferase activity，但不影響 NF- κ B Luciferase activity。而穿心蓮皆不影響 NF- κ B 及 IFN- γ Luciferase activity。故桑寄生、晉耆、當歸、杜仲葉、板藍根、穿心蓮等中草藥材區分物可能含有具有抗發炎和調節免疫成份，值得進一步探討。

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、中草藥

Number: CCMP93-RD-052

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 dietary factors including Chinese Traditional herbs, which may exert regulatory effects on immune and inflammatory responses. The screening system is based on the mechanisms by which the component or extract from Chinese Traditional herbs can activate or suppress the promoter of inflammatory activator NF- κ B, Th1 cytokine IFN- γ . The scheme for the screening system is to construct plasmids containing reporter gene luciferase with promoter sequence either of NF- κ B, IFN- γ . These reporter plasmids were transiently transfected RAW 264.7 cell and EL-4 T cell to test for luciferase activity induced or suppressed by various Chinese Traditional herbs. The methanol extract of these Chinese Traditional herbs was further fractionated with hexane, ethyl acetate (EtOAc). The results showed that each fraction extract of most of the Chinese Traditional herbs suppressed luciferase activity through NF- κ B promoter in LPS+IFN γ -activated RAW 264.7 cell. EtOAc fraction of *Taxilli ramulus* decreased in NF- κ B and IFN- γ reporter gene luciferase activity. *Astragali radix* fraction increased luciferase activity. Therefore these herbs with opposite effects on NF- κ B and IFN- γ activity will be used for further study to investigate NF- κ B and IFN- γ activity on immune regulation.

Keywords : transfection, RAW264.7 macrophage cell line, EL-4 cell line, IFN- γ , NF- κ B

壹、前言

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，而多需稱根據研究有提升免疫力等效能。又有報導有些天然之營養補品包括藥用植物如銀杏、人蔘、大蒜、等，若每日食用可提升免疫力，降低致癌危險性、延長壽命等預防疾病功能。而在美國十大暢銷藥草中，多種植物例如紫錐花 (Echinacea) 宣稱可強化免疫系統，在寒冷季節是被廣用來預防感冒的藥草。然而因為免疫系統為人體重要的防禦系統，基本上受到體內各個系統調節而達平衡，何種指標代表「增強免疫力」尚無定論，又宣稱的研究報導在免疫相關實驗上之數據並未完整。免疫相關指標所代表的意義可能因人的身體健康狀況而異，不可不慎。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。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 3 \times - 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。並探討穩定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，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、中草藥之選擇：根據中國古籍「中藥大辭典」、「中藥藥理學」、「中醫藥免疫學」、「神奇的抗病毒中草藥」等之分類進行本次實驗樣品之挑選。清熱類：金銀花、地骨皮、牡丹皮、夏枯草、板藍根、穿心蓮、白花蛇舌草。解表類：菊花、柴胡。理血類：牛膝、槐花。祛風濕類：桑寄生。補虛類：黃耆、當歸、何首烏、女貞子、甘草、黃精、刺五加、杜仲葉。其他類：紅棗、枸杞子（購自迪化街仁濟蔘藥行）。
- 二、中草藥之製備（一）：本次實驗先以 50%乙醇（50% EtOH）進行 80°C 熱萃取 3 小時，粗萃取液進行過濾、減壓濃縮、冷凍乾燥，得 50%乙醇萃取物。冷凍乾燥成品再以乙酸乙酯（EtOAc）進行分配萃取，得 EtOAc 萃取物，以進行測試。（二）：第二次實驗則以 100% 甲醇進行兩次 50°C 熱萃取 3 小時，粗萃取液進行過濾、減壓濃縮，得甲醇萃取物，以 90% MeOH/H₂O 回溶後，再以 Hexane 進行分配萃取，即可得 Hexane 層和 90% MeOH/H₂O 層；90% MeOH/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。以進行測試。
- 三、50%乙醇萃取物及 EtOAc 萃取和分配萃取之中草藥樣品測試濃度之選定：以細胞存活率（MTT）測試，發現 50%乙醇萃取物及 EtOAc 萃取之中草藥對 RAW 264.7 巨噬細胞之安全劑量為 0.02mg/mL。另外；分配萃取之中草藥樣品不論 Hexane 層、EtOAc 層或 H₂O 層，其安全劑量為 0.002mg/mL。
- 四、IFN- γ promoter 與 pGL₃-Basic vector 來源：IFN- γ promoter 連接 pUC18 主要由 Fox, H. S. et al 所建構，再由陽明大學微免所謝世良教授贈與。而 PGL₃-Basic vector (luciferase) 購自 promega 公司，由本實驗室進行 direction cloning，以構築日後進行 transfection 所需之質體。
- 五、NF- κ B promoter 來源：NF- κ B promoter 由台大醫學院江伯倫教授贈與。
- 六、RAW264.7 macrophage cell line 來源：購自食品工業研究所細胞株。
- 七、NF- κ B promoter transient transfection 至 RAW 264.7 macrophage cell：以 ExGen 500 *in vitro* transfection reagent 將 0.3 μ g/ μ L p3x-tk-

luciferase plasmid DNA、0.1 μ g/ μ L pRL-tk plasmid DNA 與 5×10^4 cells/500 μ L/well 之 RAW 264.7 cell 進行 transient transfection，培養 3 小時後，給予含 10% FBS-DMEM medium 培養 24-48 小時後，進行中草藥萃取物之處理，8 小時之後即可進行報導基因 Luciferase activity (Dual-Glo™ Luciferase assay system) 之分析。

八、EL-4 T cell line 來源：購自食品工業研究所細胞株。

九、IFN- γ promoter transient transfection 至 EL-4 cell：以 Lipofectamine 2,000 reagent 將 0.9 μ g/ μ L p IFN- γ -luciferase plasmid DNA、0.1 μ g/ μ L pRL-tk plasmid DNA 與 4×10^5 cells/500 μ L/well 之 EL-4 cell 進行 transient transfection，培養 5 小時後，給予含 10% FBS-DMEM medium 培養 24 小時，再進行中草藥萃取物之處理，24 小時之後即可進行報導基因 Luciferase activity (Dual-Glo™ Luciferase assay system) 之分析。

十、NO 藥品

十一、TNF- α (mouse TNF- α , R&D systems, DY410) 藥品

十二、IL-6 (Recombinant mouse IL-6, PharMingen systems) 藥品

十三、PGE₂ (Correlate-EIA™ kit)

十四、IL-2 (Recombinant mouse IL-2, PharMingen systems) 藥品

參、結果與討論

- 一、由圖 1 結果顯示，第一次中草藥萃取之 50%乙醇萃取物其抑制 NF- κ B 活性，以預先給予中草藥萃取物培養一小時後，再同時添加刺激劑 LPS+IFN- γ 時，其抑制效果較同時給予中草藥萃取物和刺激劑者佳，推測其中可能涉及細胞內訊息傳遞等生化代謝反應路徑。另外；亦發現以桑寄生、刺五加、何首烏、杜仲葉、枸杞子等較顯著。
- 二、圖 2 是將預先給予中草藥 50%乙醇萃取物培養一小時後，再同時添加刺激劑 LPS+IFN- γ 後，所收集之上清液進行細胞激素分泌量之分析結果，發現對 NO、IL-6、TNF- α 皆具抑制效果，而其中以穿心蓮、甘草、牡丹皮、何首烏、板藍根等對 NO 之分泌抑制效果較顯著。而 2004 年有研究顯示，穿心蓮可透過抑制 ERK1/2 和 Akt phosphorylation 以抑制化學趨化性移動，而其中化學趨化物質亦包括 NO。因此我們由本實驗結果也可看到穿心蓮 50%乙醇萃取物可有效抑制 NO 之生合成。
- 三、圖 3 是將抑制 NF- κ B 啟動子之活性與上清液所分泌之細胞激素含量進行相關性分析，其結果發現只有和 TNF- α 含量具相關性，達 $r=0.414$ 。
- 四、第一次中草藥萃取之 EtOAc 萃取物其抑制 NF- κ B 活性，同樣以預先給予中草藥萃取物培養一小時者抑制效果較佳。且發現白花蛇舌草、穿心蓮、甘草、刺五加、當歸之效果更顯著。
- 五、圖 5 是將預先給予中草藥 EtOAc 萃取物培養一小時後，再同時添加刺激劑 LPS+IFN- γ 後，所收集之上清液進行細胞激素分泌量之分析結果，發現對 NO、IL-6、TNF- α 皆具抑制效果，而其中以穿心蓮在對抑制 NO、IL-6、TNF- α 分泌量皆具一致性。
- 六、圖 6 是將抑制 NF- κ B 啟動子之活性與上清液所分泌之細胞激素含量進行相關性分析，其結果發現和 NO、IL-6 含量具相關性，分別達 $r=0.58$ 、 $r=0.48$ 。
- 七、由第一次中草藥萃取物經測試後之結果發現，不同的萃取方法所萃得之分子極性不同，有不同的免疫活性，其中以 EtOAc fraction 抑制 NF- κ B 效果較佳，可由圖 4 結果發現。因此；中草藥的成份純化是必須的。因為有可能這些中草藥中含有更強效的化學成份，如果我們仍然繼續使用混合物的中草藥而不做更深入的探究，除了使

得藥物療效不顯著外，而且可能埋沒了這些更優秀的化學成份。也因此本實驗進行第二次中草藥之分配萃取進行部份純化。另一方面，本次結果也顯示預先給予中草藥萃取物培養一小時後，其抑制 NF- κ B 效果更顯著。

- 八、由第二次中草藥之分配萃取進行部份純化之結果發現，圖 7 是 Hexane、EtOAc、H₂O 層預培養之抑制效果，結果顯示：EtOAc 層可顯著抑制經 LPS+IFN- γ 活化之 NF- κ B luciferase activity，以桑寄生、當歸、刺五加、枸杞子、牛膝等，其中經 t-test 統計分析結果發現又以桑寄生、當歸與正控制組（LPS+IFN- γ ）達顯著差異（ $p < 0.05$ ）。而 Hexane 及 H₂O 層中草藥萃取物對 NF- κ B luciferase activity 抑制效果較不顯著。而單獨給予 Hexane、EtOAc、H₂O 層中草藥萃取物皆不會活化 NF- κ B 啟動子。且在第二次實驗中，我們以 Helenalin（NF- κ B inhibitor）做為負控制組進行 transient transfection，其結果顯示 Helenalin 確實抑制 NF- κ B luciferase activity，也證明我們的 transient transfection 是成功的結果。
- 九、圖 8 是將預先給予 Hexane、EtOAc、H₂O 層中草藥萃取物培養一小時後，再同時添加刺激劑 LPS+IFN- γ 後，所收集之上清液進行 NO 分泌量之結果，結果顯示大部份 Hexane 層中草藥萃取物以桑寄生、紅棗對 NO 具顯著抑制效果（ $p < 0.05$ ）。另外一方面，亦發現 Hexane 層之板藍根、地骨皮、金銀花、牡丹皮及 EtOAc 層之地骨皮和 H₂O 層之金銀花、牡丹皮卻有促進分泌量之趨勢，但未達統計差異。將抑制 NF- κ B 啟動子之活性與上清液所分泌之 NO 含量進行相關性分析，其結果發現 EtOAc 層之中草藥抑制 NF- κ B luciferase activity 與 NO 之分泌量具相關性，達 $p = 0.003$ ， $r = 0.3$ 。
- 十、圖 9 是將預先給予 Hexane、EtOAc、H₂O 層中草藥萃取物培養一小時後，再同時添加刺激劑 LPS+IFN- γ 後，所收集之上清液進行細胞激素 IL-6 含量之測定結果，結果顯示 EtOAc 層之當歸、白花蛇舌草可顯著降低 IL-6 之分泌量（ $p < 0.01$ ； $p < 0.05$ ），亦進行相關性分析，其結果發現 IL-6 之分泌量與 NO 含量具相關性，達 $p = 0.025$ ， $r = 0.2$ 。
- 十一、圖 10 是 TNF- α 含量之測定結果，結果顯示 Hexane、EtOAc、H₂O 層中草藥萃取物，對 TNF- α 之分泌量不具顯著抑制效果。
- 十二、圖 11 是將預先給予 Hexane、EtOAc、H₂O 層中草藥萃取物培養

一小時後，再同時添加刺激劑 LPS+IFN- γ 後，所收集之上清液進行 PGE₂ 含量之測定結果，結果顯示 EtOAc 層之當歸、紅棗、甘草可顯著降低 PGE₂ 含量 ($p < 0.001$)，而晉耆、桑寄生、女貞子、穿心蓮、板藍根亦可顯著降低 PGE₂ 含量 ($p < 0.05$)。進行相關性分析，其結果發現其結果發現 PGE₂ 含量和 TNF- α 含量具相關性，達 $p = 0.0047$ ， $r = 0.23$ 。

十三、圖 12 和圖 13 是本實驗室建構啟動子 pIFN- γ -Luciferase 之限制酵素圖譜確認之結果。

十四、本實驗另一啟動子 pIFN- γ -Luciferase 之實驗結果如圖 14 所示，將預先給予 Hexane、EtOAc、H₂O 層中草藥萃取物培養一小時後，再同時添加刺激劑 PMA+Ionomycin 後培養至 24 小時，利用化學冷光儀器測試 IFN- γ -Luciferase activity，結果顯示：EtOAc 層桑寄生可顯著抑制經 PMA+Ionomycin 活化之 IFN- γ -Luciferase activity ($p < 0.01$)。而 EtOAc 層之夏枯草、甘草和晉耆則有促進 IFN- γ -Luciferase activity 之趨勢。

十五、圖 15 是將預先給予 Hexane、EtOAc、H₂O 層中草藥萃取物培養一小時後，再同時添加刺激劑 PMA+Ionomycin 後，所收集之上清液進行細胞激素 IL-2 含量之測定結果，結果顯示 EtOAc 層之桑寄生可顯著抑制經 PMA+Ionomycin 活化之 IFN- γ -Luciferase activity，且也同時促進 IL-2 之分泌量 ($p < 0.001$)，此結果非常值得更進一步探討其機轉。而在 Hexane 層中草藥萃取物中以桑寄生有增加 IL-2 分泌量之趨勢；另外 H₂O 層中草藥萃取物以當歸、枸杞子、夏枯草、桑寄生、何首烏也有增加 IL-2 分泌量之趨勢，但未達顯著差異。

肆、結論與建議

由於本實驗於期末報告繳交完畢後才陸續完成全部之分析結果，因此這次的報告是最新出爐之結果，內容也做了大幅之修改，首先謝謝貴會給予我們再次修正實驗結果及思考討論的機會。

所以由本次實驗的篩選模式中，我們發現以 EtOAc 層中草藥萃取物不論在抑制或活化 NF- κ B luciferase activity、IFN- γ -Luciferase activity 等結果方面，皆具較顯著之結果，其中我們篩選出同時皆可抑制 NF- κ B luciferase activity、IFN- γ -Luciferase activity 之桑寄生；和同時皆可活化 NF- κ B luciferase activity、IFN- γ -Luciferase activity 之晉耆；可抑制 NF- κ B luciferase activity 但對 IFN- γ -Luciferase activity 不具影響之當歸；對 NF- κ B luciferase activity 不具影響但可抑制 IFN- γ -Luciferase activity 之杜仲葉；及對 NF- κ B luciferase activity、IFN- γ -Luciferase activity 皆不具影響之穿心蓮。值得進一步以初代巨噬細胞和脾臟細胞評估其抗發炎和免疫調節作用是否和 transient transfection 之篩選結果具一致性，並更進一步以動物實驗進行活體試驗評估。

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 CCMP93-RD-052 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

伍、參考文獻

1. Gins BI. Overview of local and systemic acute inflammatory response. *Lancet infectious disease*. 2002, 2(3): 171-179.
2. 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.
3. 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.
4. Lin YL, 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.
5. Amin A, Nanji Kalle Jokelainen, Andrew J. Dannenberg. 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.
6. 食品工業發展研究所(民90年)食品市場資訊-食藥用菇專輯 90(5): 1-16。
7. 藥膳保健食品研討會(民90年)中國醫藥學院。
8. Tseng J. Fu – Ling, A Chinese herbal drug, modulates cytokine secretion by human peripheral blood monocytes. *Int. J. Immunopharmac*. 1996, 18(1): 37-44.
9. Tseng J, Chang Jan-gowth. Suppression of tumor necrosis factor- α , interleukin- 1β , interleukin-6 and granulocyte-monocyte colony stimulating factor secretion from human monocyte by an extract of *Poria cocos*. 1992, 25: 1-11.
10. 張賢鴻 (2002) 藥材養生事典, p.151。
11. 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.
12. Liou CJ, Li ML, Tseng JM. Regulatory effect of Fu-Ling on Th1 and Th2-type cytokine-induced immune response. *BioFormosa*. 2002, 37(1): 37-44.
13. 王謙(2002)茯苓的發酵研究及動物免疫學觀察中國食用菌 21(2): 41-42。

14. Chang SC, Chiang BL, Wu WM, Lin BF. Different dietary fats influence serum and tissue lipids and anti-cardiolipin antibody levels in autoimmune-prone NZB/W F1 mice. *Brit. J. Nutr.* 1999, 81: 331-340.
15. Hsu HY, Lin BF, Lin JY, Kuo CC, Chiang W. Suppression of allergic reactions by dehulled adlay in association with the balance of Th1/Th2 cell responses. *J Agric Food Chem.* 2003, 51: 3763-3769.
16. Lin BF, Huang CC, Chiang BL, Jeng SJ. "Dietary fat influences Ia antigen expression, cytokines and prostaglandin E2 production in autoimmune-prone NZBxNZW F1 mice" *British J. Nutrition.* 1996, 75: 711-722.
17. Lin BF, Huang CC, Chiang BL. Dietary frying oil influences immune regulation in autoimmune-prone NZBxNZW F1 mice. *Journal of Chinese Microbiology and Immunology.* 1996, 29: 123-133.
18. Lin BF, Kim JS, Hsu JC, Osborne C, Lowe K, Garrow T, Shane B. Molecular biology in nutrition research: Modeling of folate metabolism. *Advances in Food and Nutrition Research.* 1996, 40: 95-105.
19. Lin BF, Jeng SJ, Chiang BL, Huang CC. Dietary fat affects lipids and anti-cardiolipin antibody levels in autoimmune-prone NZB/W F1 mice. *British J. Nutrition.* 1997, 77: 657-669.
20. Lin BF, Wu IR, Chiang BL, Liu, JF, Huang CJ. Effects of dietary oxidized frying oil on immune responses of spleen cells in rats. *Nutrition Research.* 1997, 17: 729-740.
21. Lin BF, Jeng SJ. Effects of dietary frying oil on lipids and anti-cardiolipin antibody levels in autoimmune-prone NZB/W F1 mice. *Nutrition Research.* 1997, 17: 1047-1052.
22. Lin BF, Lin RF, Yeh WT, Pan WH. The Folate Status in Taiwanese Population from the NAHSIT 1993-1996. *Nutritional Sciences Journal.* 1999, 24: 99-117.
23. Lin JY, Lin BF. Effects of the sensitization protocols on the animal model of allergic disease. *Food Science and Agricultural Chemistry.* 2000, 2: 165-171.
24. Lin BF, Lai CC, Lin KW, Chiang BL. Dietary oxidized frying oil influence the levels of type 2 T helper cell-related antibody and inflammatory mediators in mice. *Brit. J. Nutr.* 2000, 84: 911-917.

25. Dang-Gui-Bu-Xai-Tang Modulated the immunity of tumor bearing mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 2003, 25(2) :259-271.
26. Association of cellular apoptosis with anti-tumor effects of the Chinese herbal complex in endocrine-resistant cancer cell line. *Cancer Detection and Prevention*. 2003, 27: 147-154.
27. Effects of Astragali Radix extract on carcinogenesis, cytokine production and cytotoxicity in mice treat with a carcinogen, BBN. *Cancer Investigation*. 1999, 17(1): 30-35.
28. Suppression of rat Neutrophil reactive oxygen species production and adhesion by the diterpenoid lactone Andrographolide. *Planta Medica*. 2000, 66: 314-317.
29. Andrographolide acts through inhibition of ERK1/2 and Akt phosphorylation to suppress chemotactic migration. *European J. Pharmacology*. 2004.
30. A new acylated flavonol Glycoside and antioxidant effects of *Hedyotis diffusa*. *Planta Med*. 2000, 66: 374-377.
31. The inhibitory effects of Jujuboside A on rat Hippocampus *in vitro* and *in vivo*. *Planta Med*. 2002, 68: 799-803.

陸、圖

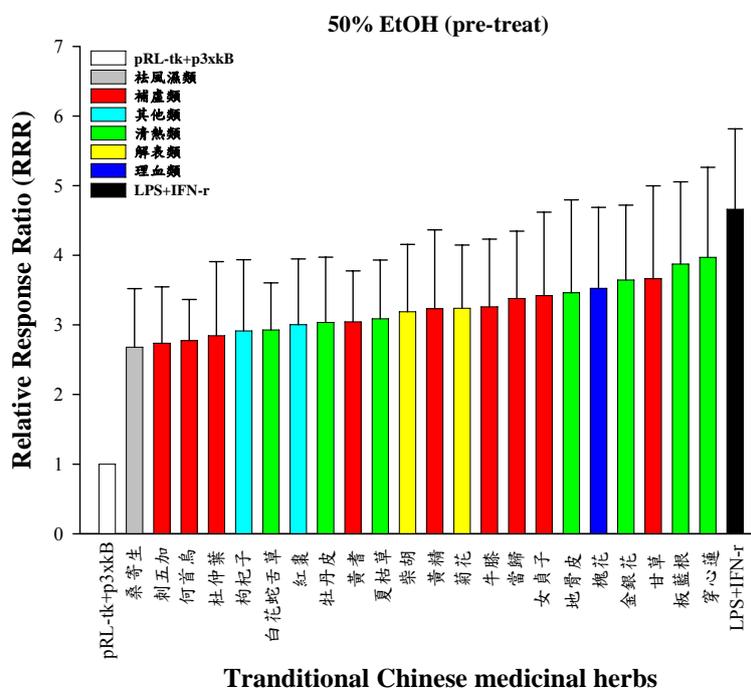
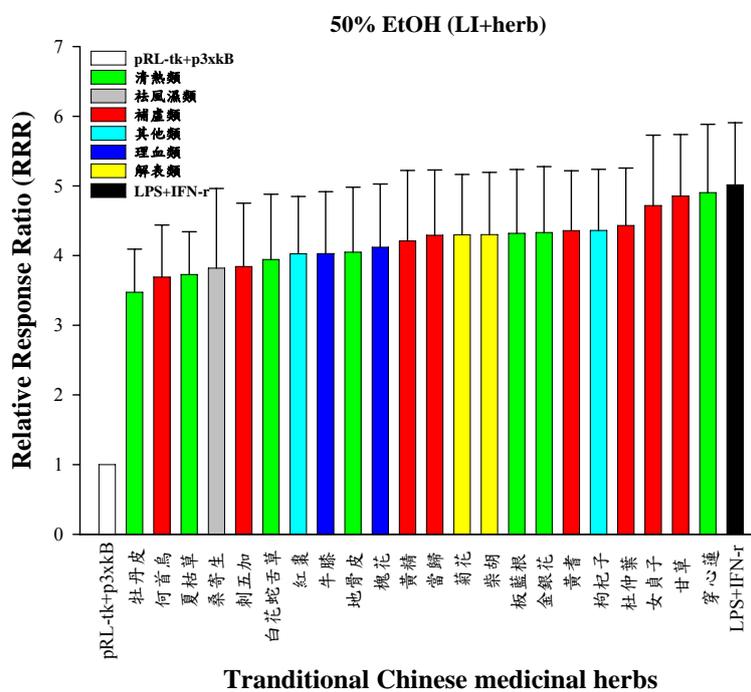


圖 1 50% EtOH fraction 之中草藥對含 NFκB 啟動子質體之 luciferase 表現活性的影響

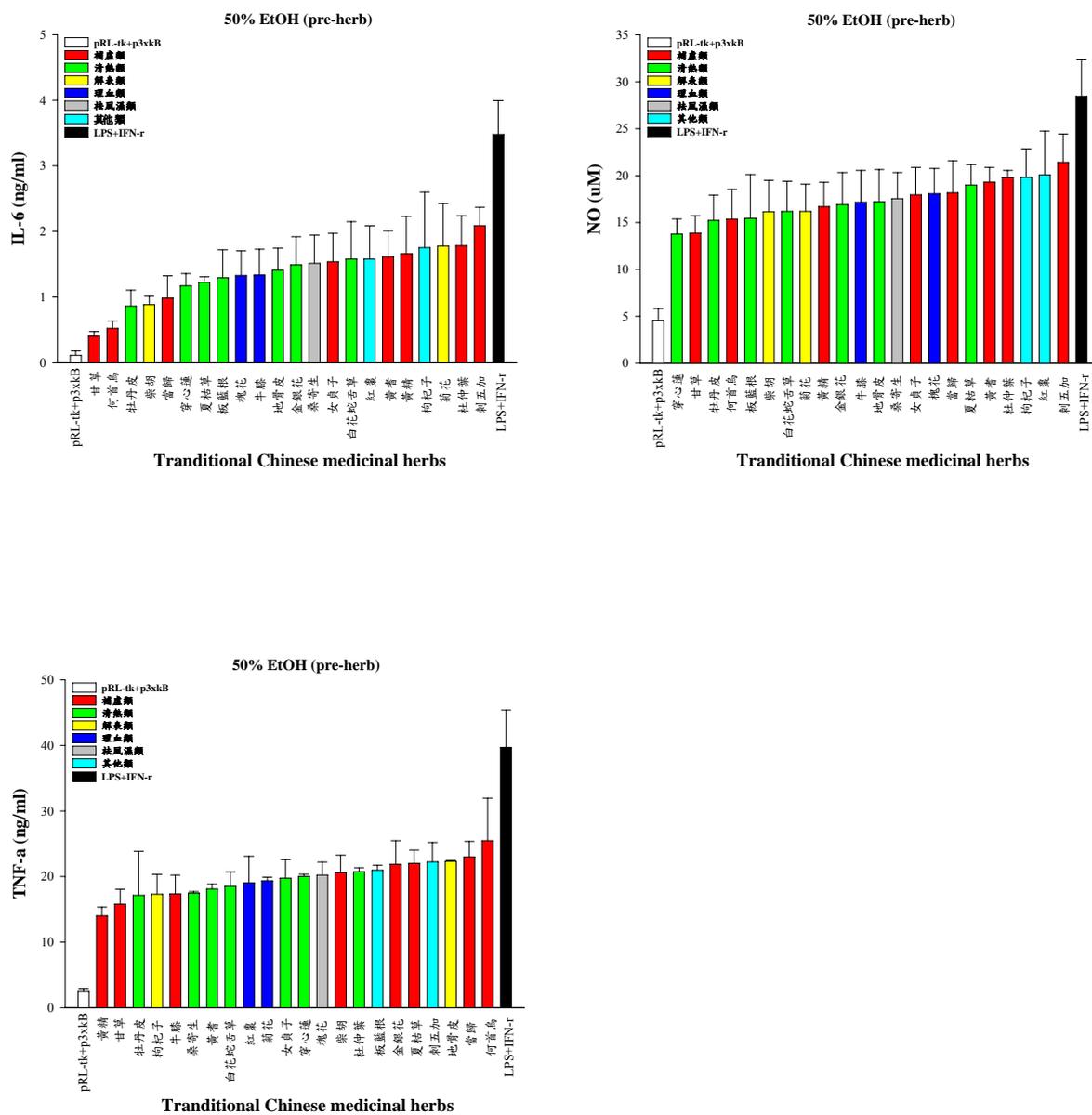


圖 2 50% EtOH fraction (pre-herb) 之中草藥對 LPS+IFN- γ 活化的 RAW264.7 巨噬細胞株分泌 NO、IL-6、TNF- α 之影響

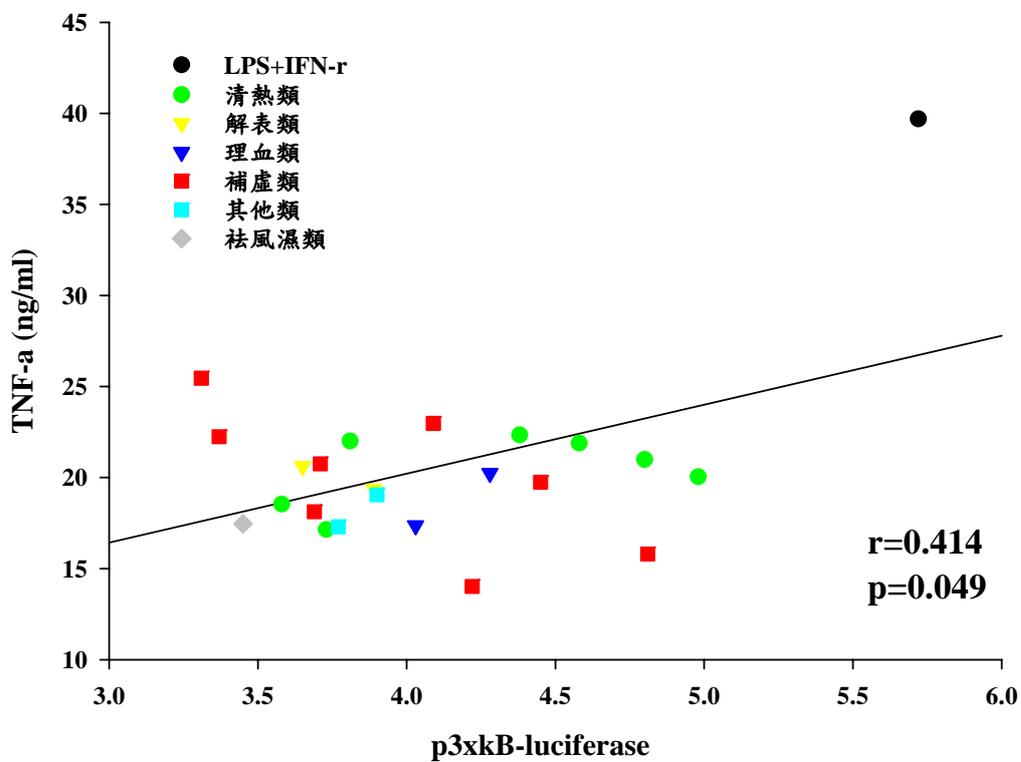


圖 3 50% EtOH fraction (pre-herb) 之中草藥對 LPS+IFN- γ 活化下 luciferase 表現活性與 RAW 264.7 巨噬細胞 NO、IL-6 和 TNF- α 分泌量之相關性

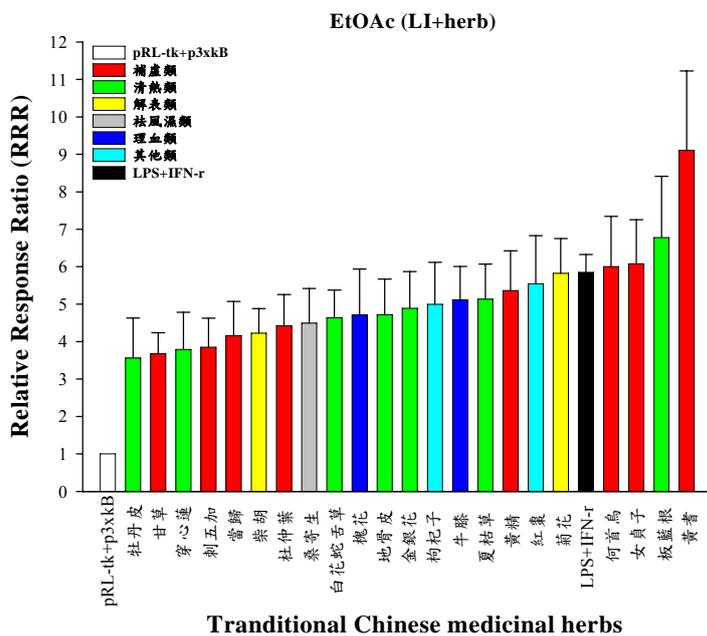
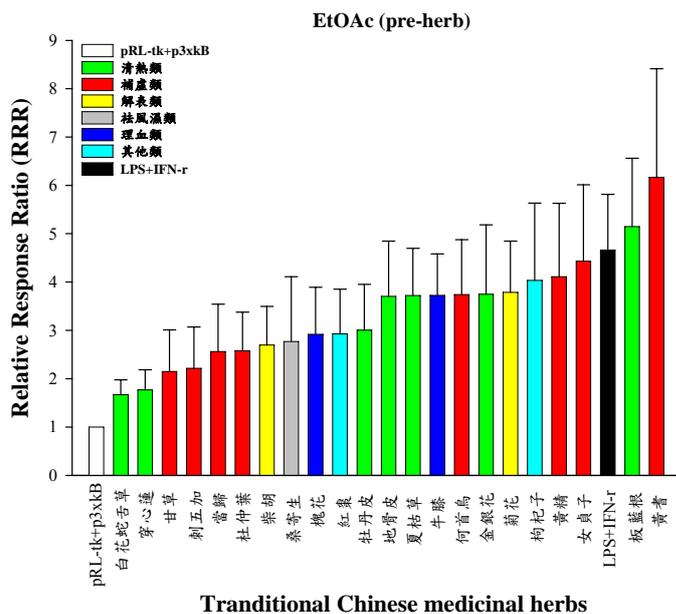


圖 4 EtOAc fraction (pre-herb) 之中草藥對含 NF-κB 啟動子質體之 luciferase 表現活性的影響

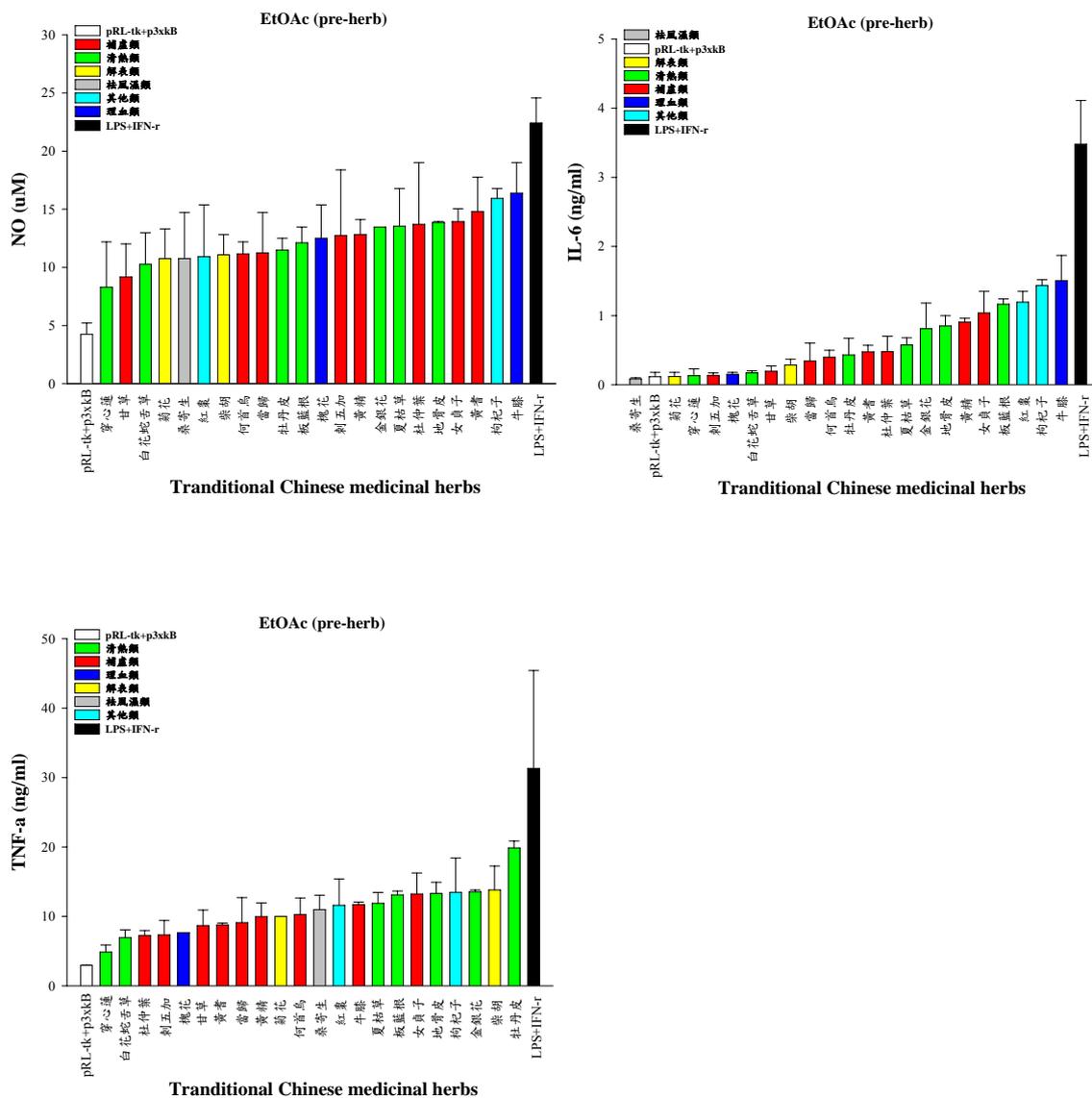


圖 5 EtOAc fraction (pre-herb) 之中草藥對 LPS+IFN- γ 活化的 RAW 264.7 巨噬細胞株分泌 NO、IL-6、TNF- α 之影響

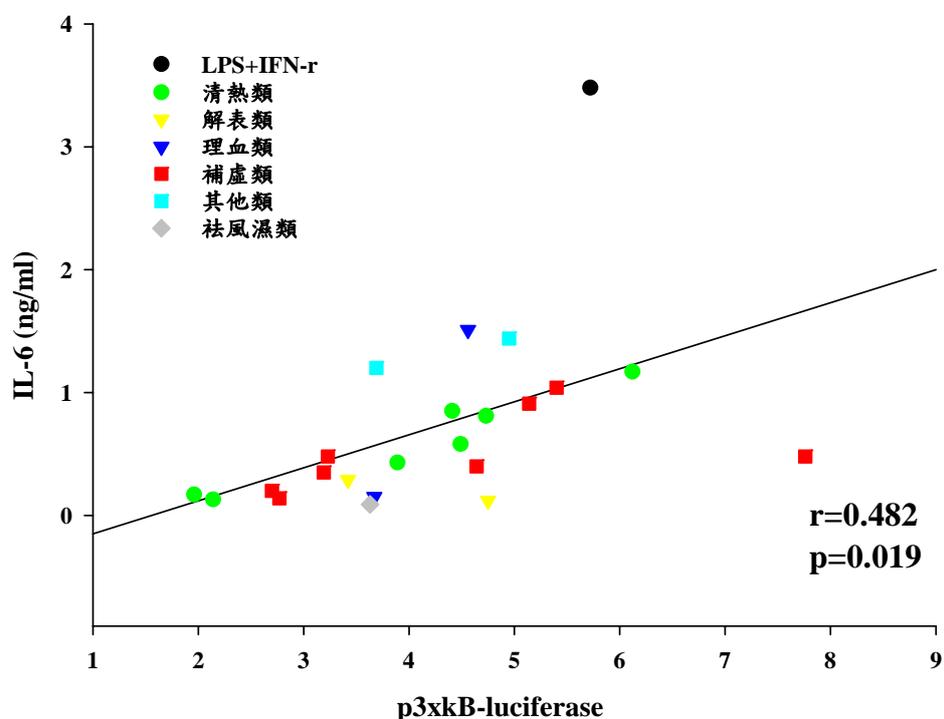
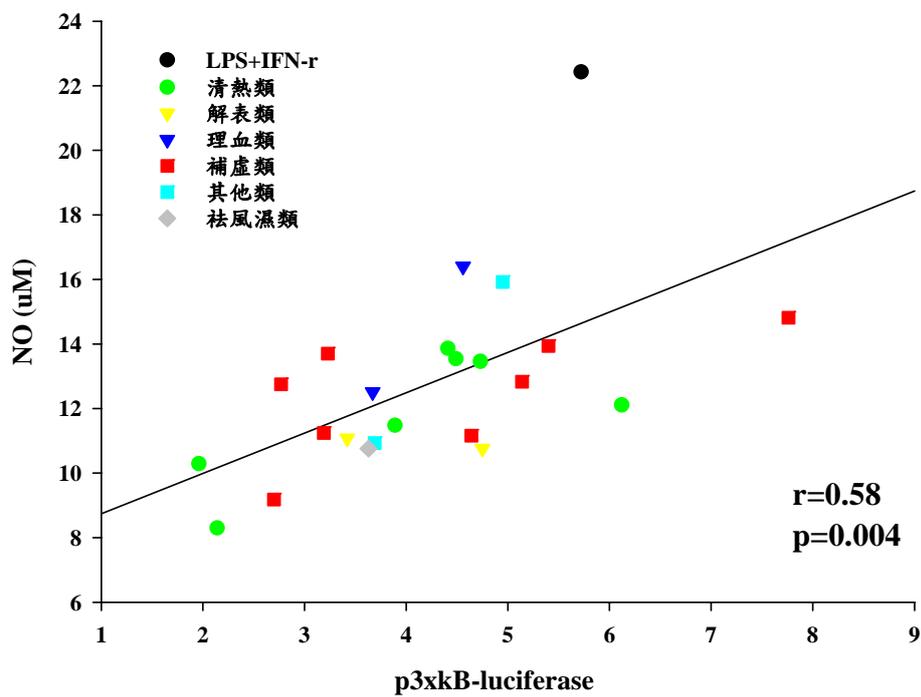
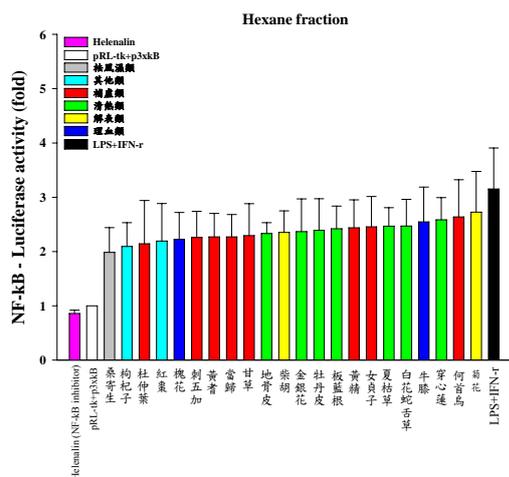
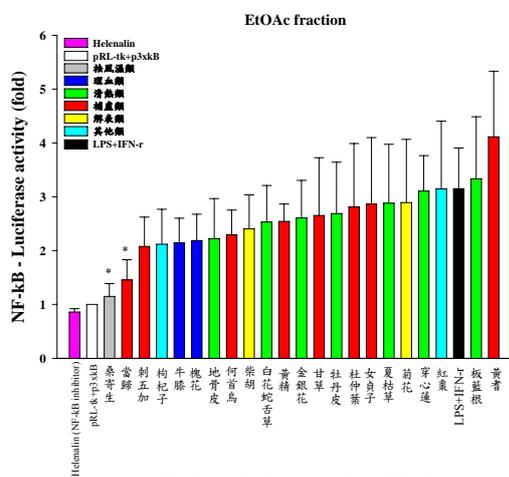


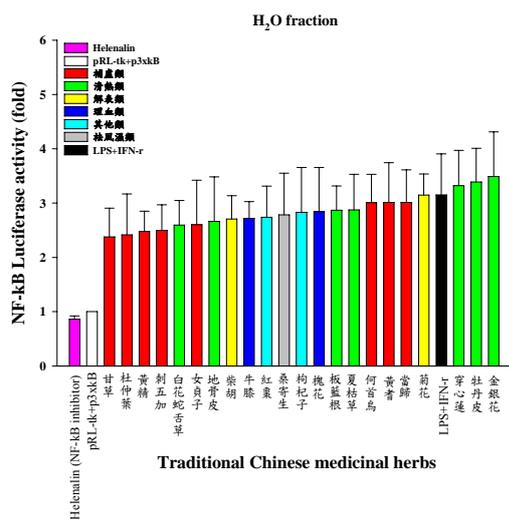
圖 6 EtOAc fraction (pre-herb) 之中草藥對 LPS+IFN- γ 活化下 luciferase 表現活性與 RAW 264.7 巨噬細胞 NO、IL-6、和 TNF- α 分泌量之相關性



Traditional Chinese medicinal herbs



Traditional Chinese medicinal herbs



Traditional Chinese medicinal herbs

圖 7 Hexane、EtOAc、H₂O fraction 之中草藥對含 NF-κB 啟動子質體之 luciferase 表現活性的影響

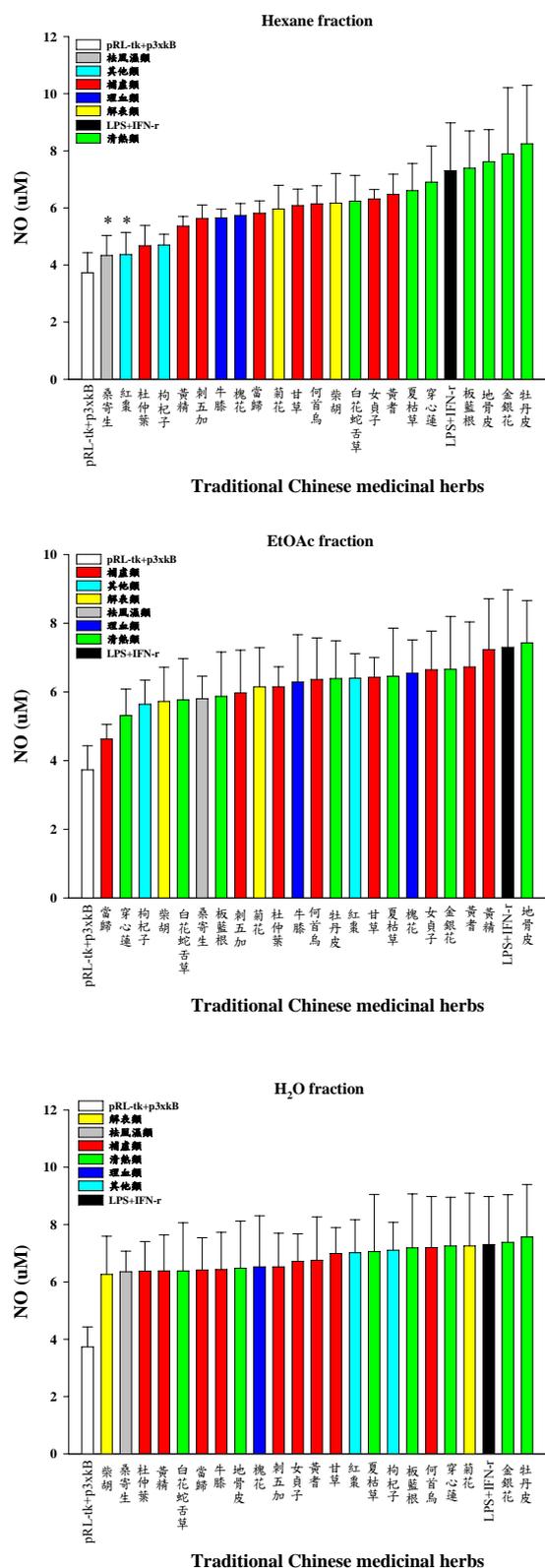
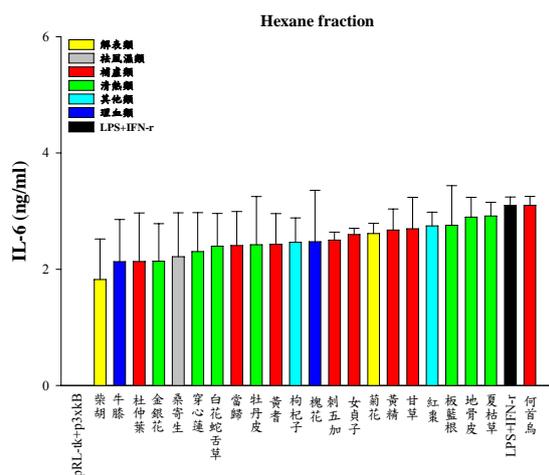
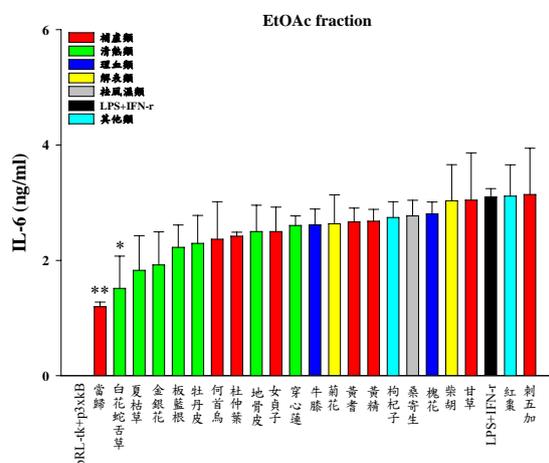


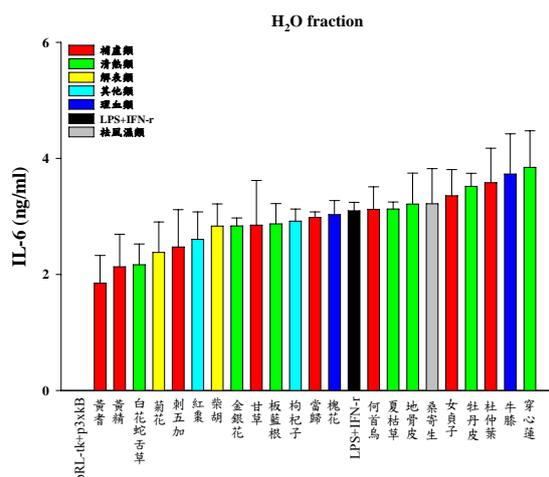
圖 8 Hexane、EtOAc、H₂O fraction fraction 之中草藥對 LPS+IFN-γ 活化的 RAW 264.7 巨噬細胞株分泌 NO 之影響



Traditional Chinese medicinal herbs



Traditional Chinese medicinal herbs



Traditional Chinese medicinal herbs

圖 9 Hexane、EtOAc、H₂O fraction fraction 之中草藥對 LPS+IFN- γ 活化的 RAW 264.7 巨噬細胞株分泌 IL-6 之影響

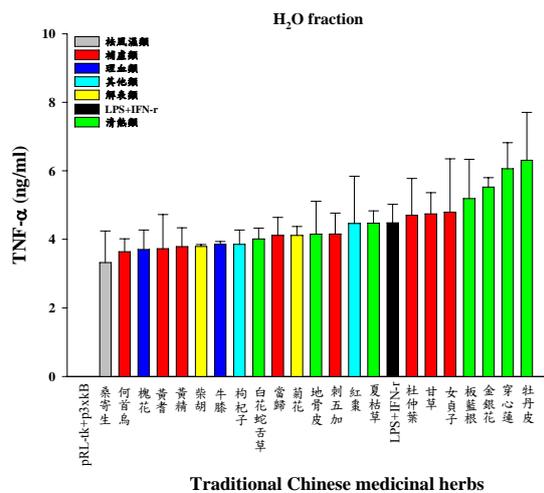
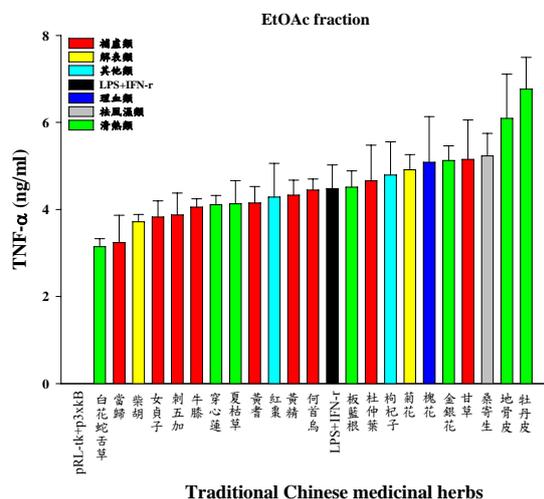
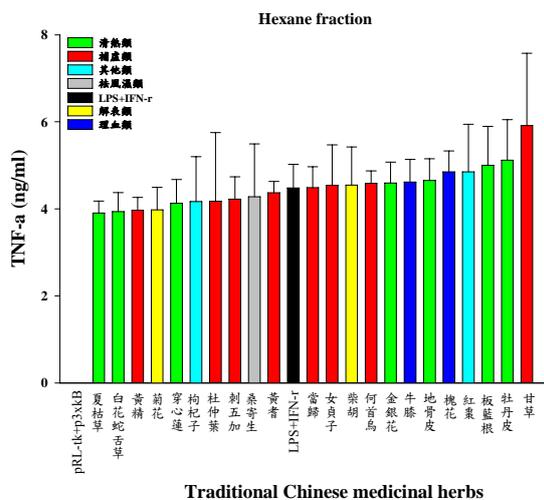


圖 10 Hexane、EtOAc、H₂O fraction fraction 之中草藥對 LPS+IFN-γ 活化的 RAW 264.7 巨噬細胞株分泌 TNF-α 之影響

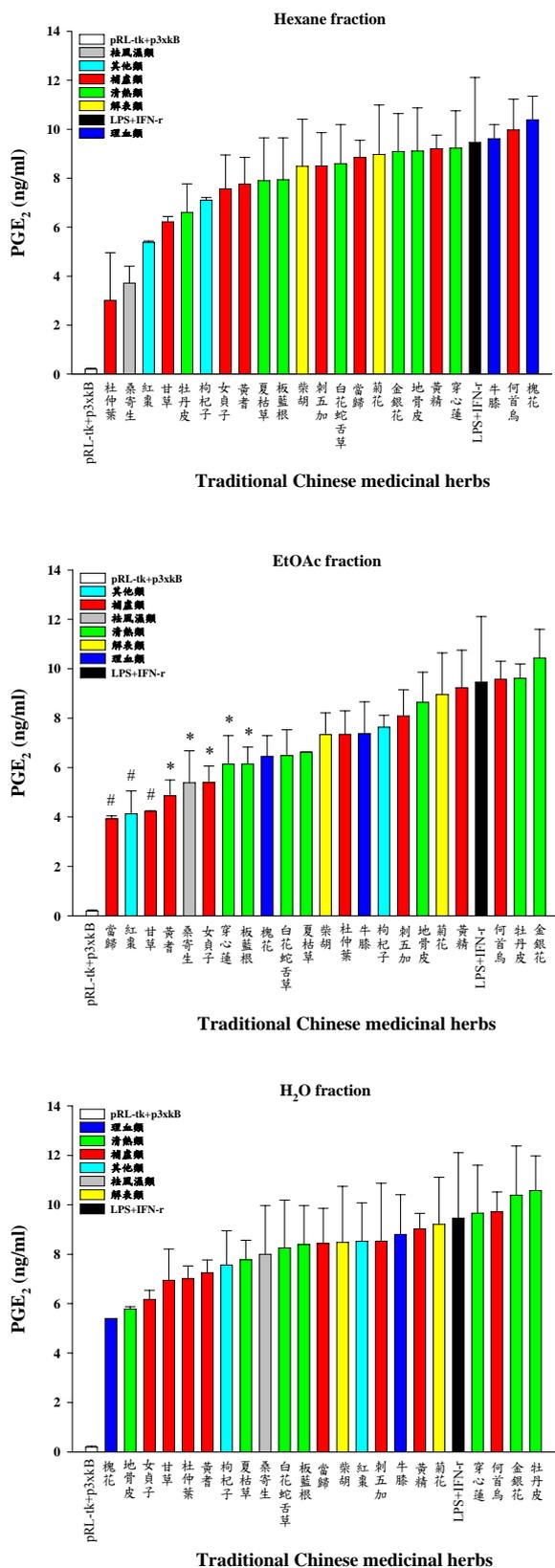


圖 11 Hexane、EtOAc、H₂O fraction fraction 之中草藥對 LPS+IFN- γ 活化的 RAW 264.7 巨噬細胞株分泌 PGE₂ 之影響

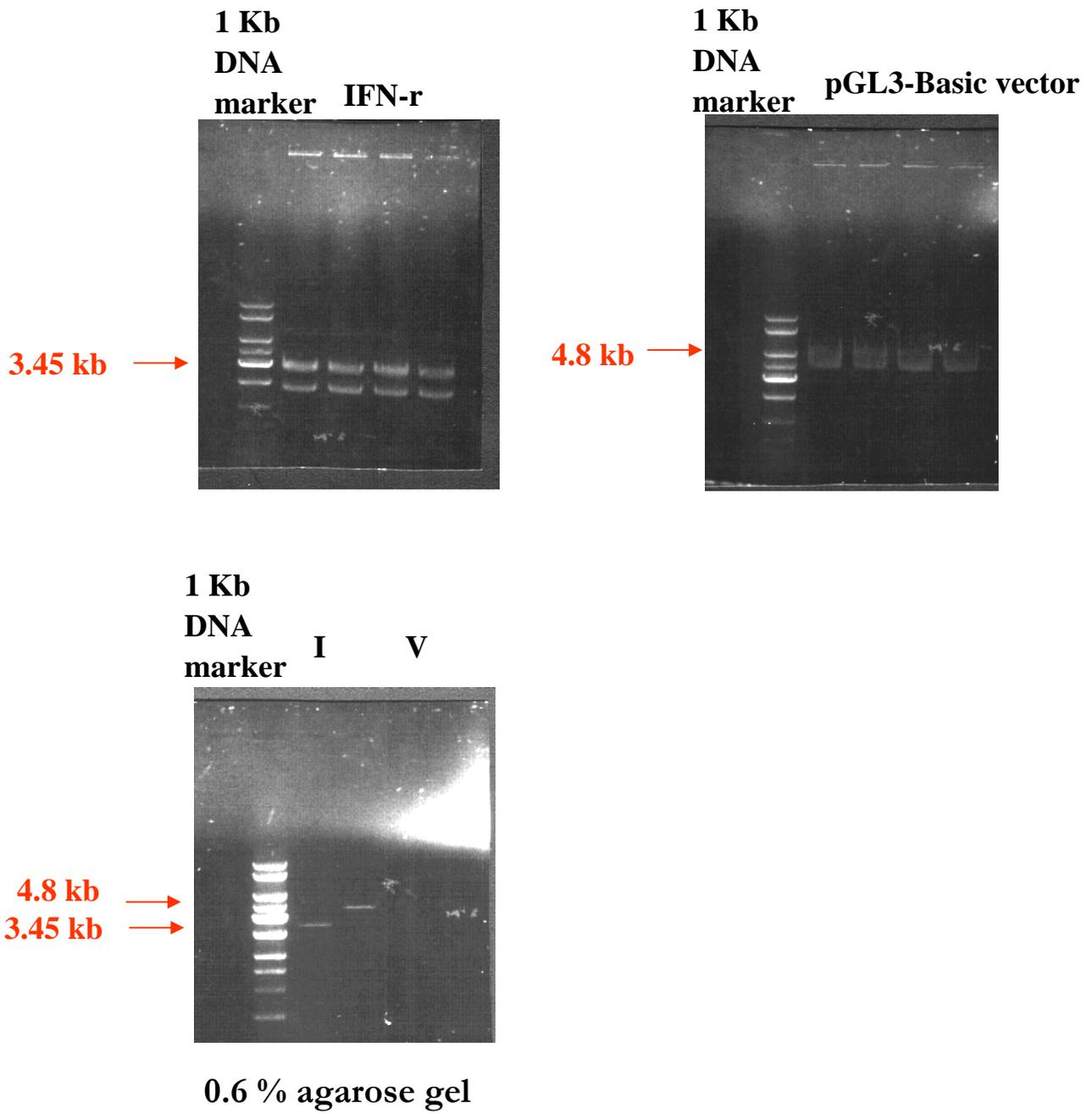


圖 12 pIFN- γ -Luciferase 之建構

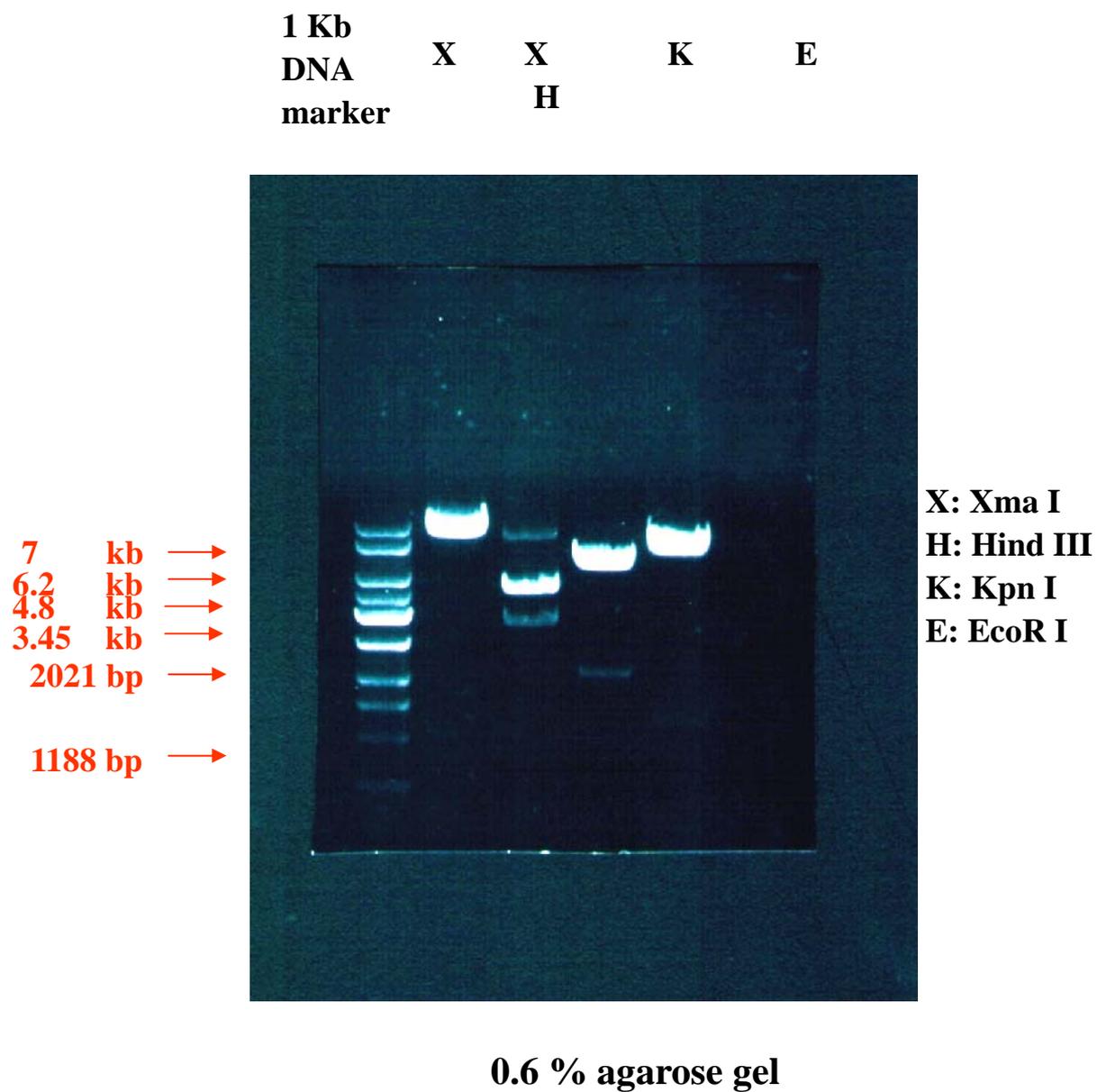


圖 13 pIFN- γ -Luciferase 限制酶圖譜之確認

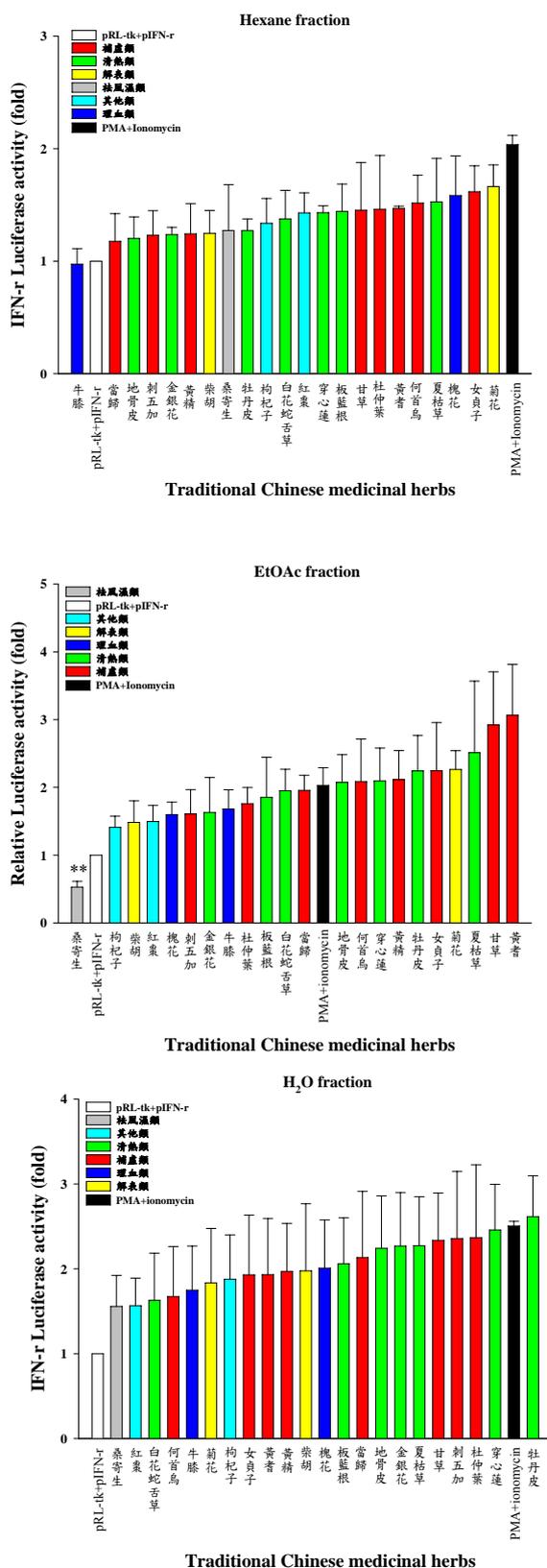


圖 14 Hexane、EtOAc、H₂O fraction 之中草藥對含 IFN- γ 啟動子質體之 luciferase 表現活性的影響

