

編號：CCMP93-RD-002

建立抗發炎和增強免疫力的 中草藥篩選技術平台

楊寧蓀

中央研究院生物農業科學研究所籌備處

摘要

中藥的特色之一是具有既能抗發炎又能增強免疫力的生物活性，本研究建立了一套合適的細胞與動物評估模式，能篩檢抗發炎與增強免疫力的中草藥。本計畫採用常用之報導基因系統，作為最初同時篩選中草藥抗發炎和免疫調節生物活性的方法。我們利用基因槍 (gene gun) 和微脂體 (lipofectin) 基因轉殖技術，將特定質體 (plasmid) 轉殖到細胞或實驗老鼠的身體上，目前本實驗室已經成功建構與發炎反應和免疫調節相關的細胞激素啟動子報導基因質體 (TNF- α 、GM-CSF、IL-1 β 、IL-2、IL-13 和 IL-18)，並測試其與發炎反應之關係，GM-CSF 與 TNF- α 這兩個促發炎細胞激素 (pro-inflammatory cytokine) 之啟動子報導對 croton oil 所引起的皮膚發炎反應有較強的反應。在各種不同的中草藥萃取物分層，包括正己烷萃取層 (H)、甲醇萃取層 (M) 和水萃取層 (W) 依照其對 NF- κ B 轉錄活性影響的結果，可大約區分為八種模式。在不同水層萃取物對於 B-16 cell (為老鼠黑色素瘤細胞) 之 NF- κ B 活性影響的實驗結果顯示：C15, C52, C56, C94, C72 及 C105 中草藥水層萃取物相較於其他的草藥，NF κ (B 活性的表現量增加，比加入 LPS 的刺激更強。在老鼠脾臟細胞初級培養實驗中，C3W、C15W、C52W、C56W、C58W、C60W，具有個別刺激老鼠脾臟細胞增生的活性。本實驗室亦進行動物模型試驗，利用老鼠 DNA 腫瘤疫苗模式來評估 R4、R6、R9、R30、R34、R36、R42 及 R43 等八種抗發炎之純植物化合物對於老鼠體內免疫反應的刺激及是否能有佐劑的功效。結果以處理 R4 和 R34 化合物組別之老鼠所形成之腫瘤明顯較小，且處理 R4 化合物組別之老鼠平均存活時間較長。本計畫所建立的篩選平台，可以以快速、系統化並具標準化的

評估方式來篩選各種中草藥的生物活性，將有助於初步了解中草藥抗發炎及調節免疫功能的藥理作用或機制。

關鍵詞：抗發炎、中草藥、基因轉殖技術、細胞激素

Number : CCMP93-RD-002

To establish a screening platform technology for evaluating the activity of herbal medicines on anti-inflammation and immuno-modulation

Ning-Sun Yang

Institute of BioAgricultural Sciences (IBS), Academia Sinica

ABSTRACT

One of the most important significant pharmacology of many medicinal herbs is that they have both anti-inflammation and immuno-modulation activities. The objective of the study is to build the possible molecular basis for the anti-inflammatory and immuno-modulatory activity of traditional herbal medicines. We used gene gun and lipofectin technologies and have demonstrated that the current in vivo transgenic promoter assay can be effectively employed for research into the mechanisms of known or target topical immuno-modulators or phytochemicals on cytokine gene expression. Our data showed that GM-CSF and TNF-alpha had stronger skin inflammatory responses that was induced by croton oil. Based on the transcriptional activities of NF-kB, different extract fractions, including hexane, methanol and water, the herbs might be classified into 8 models. The results of B-16 cells (mouse melanoma cells) among different water fraction treatments, showed that C15, C52, C56, C94, C72 & C105 fractions could more increased the activities of NF-kB than LPS did. At the mouse splenocytes primary culture system, the C3W, C15W, C52W, C56W, C58W & C60W fractions could stimulate the cell proliferations. We also established the animal tests, using DNA vaccine model to evaluate the anti-tumor effects of R4, R6, R9, R30, R34, R36, R42 & R43 pure

phytochemicals, the results showed that the R4 and R34 phytochemicals treated mice had smaller tumors than others, and the R4 treated mice had longer survival rate. We therefore have effectively developed the evaluation system for herbal crude extracts and phytochemicals, it will help us to further explore the mechanisms of immune and pharmacological modulatory bio-activities.

Keywords: anti-inflammation, herbal medicine, transgenic technology, cytokines

壹、前言

「中草藥醫療」或西方所謂的「另類醫療」已經愈來愈能夠為中/西方社會大眾所接受，並對醫藥科學的研究人員產生多重衝擊(1)。以植株或其萃取物作為「健康食品」的商品已經廣泛地在美國、歐洲及亞洲各國被當作營養補充品(如美國)或藥品(如德國，台灣，中國大陸)使用。中草藥可抗發炎或增強免疫力乃為人所深信，為數眾多的中草藥中常被宣稱具有抗發炎或可增強免疫的功效，然而大多缺乏科學性的佐證。因此，若能建立一套可篩檢中草藥抗發炎能力又能篩檢增強免疫力的評估方法，尤其使用以分子及細胞學為基礎(Molecular Biology and Cell-Based)之西方認可的方法，在開發中草藥之抗發炎及增強免疫力的功效是一項非常重要的發展策略。

在免疫系統中已知有一群免疫調節、蛋白因子，也就是細胞激素，許多(成千上萬)的西方文獻指出細胞激素可增強許多先天免疫的生物活性(2)，細胞激素也已廣泛使用於傷口癒合及致命性疾病等治療上，在免疫系統中細胞激素扮演一個重要的調節角色，各項免疫反應皆須要許多不同激素的參與；舉例來說，GM-CSF、TNF- α 、IL-12 及 IL-1 β 這些激素皆被認為與發炎反應有關。簡單摘選如下：【1】Granulocyte-macrophage-colony stimulatory factor (GM-CSF) 可在不同程度的免疫刺激反應中測得其參與，並與恆定性有關(3,4)，GM-CSF 還被認為是重要前發炎反應的細胞激素，故而廣泛的使用在傷口癒合(5)及癌症的治療上(6)；【2】Tumor necrosis factor- α (TNF- α) 細胞激素可刺激感染部位補充嗜中性球及單核白血球並增強細胞活性以消滅侵入的病原體(7)，然而 TNF- α 在不適當或過度表現也常是風濕病、關節炎、SARS 及敗血症等之重要特徵(8)；【3】Interleukin-12 (IL-12) 為初期先天性免疫反應主要傳遞者並且可抑制許多種類腫瘤的生長(9)；【4】IL-1 β 是由 IFN α β 所引發的前發炎反應主要的細胞激素(10)，它含有抗病毒能力。

因此以測定細胞激素活性的變化作為篩檢中草藥是否可抗發炎或能增強免疫力的功能可以說是一直接客觀有效的方法，在檢測細胞激素在組織體液中之濃度及活性/功能可方法上可使用 RT-PCR、ELISA 及 Flow cytometry 等方式來檢測細胞激素的表現量，但這些方法在使用上皆因太貴及太花時間而有所限制，目前已有許多細胞激素的啟動子如 GM-CSF、TNF- α 、IL-12 及 IL-1 β 等結到含有螢光酵素(luciferase)或是鹼性磷酸酵素(alkaline phosphatase)為報導基因的載體上，並以轉染方式(transfection)或是基因轉殖方式(transgenic)送入培養的細胞內或動物體內作為 *in vitro* 及 *in vivo* 細胞激素啟動子活性的檢

測方法。

除了細胞激素一類作為篩檢中草藥是否可抗發炎或能增強免疫力方法外，測定 NF- κ B 轉錄因子活性則為另一套實驗上可行之方法，在免疫系統中，NF- κ B 是一高誘導性的轉錄因子，不管是先天性免疫或是後天性免疫系統中皆扮演著非常重要的角色 (11)；在免疫反應刺激上，病原體的侵入、化學毒物的碰觸，物理上的損傷或是組織的創傷皆可誘導 NF- κ B 的表現，目前已知 NF- κ B 在發炎反應有相當的關聯性 (12)；在慢性發炎疾病，可測得 NF- κ B 維持相當高的活性，在發炎性腸疾病 (IBD) 及急性肝炎反應中皆已測得高活性 NF- κ B 的臨床症狀 (13)，而活化的 NF- κ B 轉錄因子可控制許多基因的表現，包括參與發炎反應多種細胞激素、化學趨素及許多免疫系統之受體，NF- κ B 可謂是免疫系統之中心樞紐 (14)，為免疫系統一重要指標，在新藥的開發產業上，也以 NF- κ B 作為 *in vitro* 系統作篩選新藥的工具，故檢測 NF- κ B 活性作為篩檢中草藥是否可抗發炎或能增強免疫力方法也是一個直接可行的方法。

本計畫乃是希望以結合現代免疫學，細胞學及分子生物學觀點，建立一套可同時篩檢中草藥抗發炎反應及增強免疫力之篩檢平台，利用轉殖外來細胞激素或轉錄因子基因啟動子進入到培養的細胞內及老鼠皮膚組織內，直接而有效的探討植物萃取物或純化的植化物對細胞激素及轉錄因子基因啟動子的活化或抑制作用。

近兩年來，本所研究室在這方面研究工作，已獲得突破性研究成果發表了多篇研究論文包括 *J. Biol. Chem.*, *J. Gen. Mol. Biol.* 及 conference papers (15-17)。在此計畫中，我們將數種已知的細胞激素及轉錄因子基因啟動子 (promoter) 分別以分子重組技術接到具有螢光酵素 (luciferase)、綠螢光蛋白 (green fluorescent protein) 或是鹼性磷酸酵素 (alkaline phosphatase) 為報導基因的載體上，再分別把這些「重組合成」(recombinant) 的質體以轉染 (transfection) 方式轉進到細胞體內或以基因槍直接轉殖入老鼠皮膚組織中，將待測植物萃取物，植化物 (phytochemical) 與細胞共同培養或是採用塗抹、注射、餵食等方式將待測植物萃取物，植化物送入實驗老鼠的體內，藉由檢測細胞培養液、細胞、皮膚組織或血清中的基因表現強度，我們可以準確定量評估植物萃取液或植化物對基因啟動子的調節效果，從而建立 *in vitro* 及 *in vivo* 的實驗系統；並藉由流式細胞儀 (Flow cytometry) 及 ELISA 或其他方式分析細胞內細胞激素的活性，以再確認我們所建構的篩選平台可專一性和高穩定性的篩檢中草藥抗發炎及篩檢增強免疫力之功能。

在之前的研究中，我們已選定幾種傳統中藥常被宣稱具有抗發炎及具有免疫調節或具免疫相關活性之中草藥，例如，紫草是常被使用之中藥，並以抗發炎，癒合傷口功效著稱(18)，我們已選用其具免疫活性的萃取物及植物化合物作為我們初步之研究；又如，山藥也是很普遍使用的中藥材，常被做為保健食品及治療免疫調節相關疾病(19-21)，另外我們還選用台灣本土著名藥草，台灣金線蓮，治療抗發炎的刀傷草及咸豐草及西方常拿來治療感冒，傷口癒合等症狀的紫錐菊(22, 23)及其他三到四種中草药。由之前的相關研究計劃中，我們目前已經累積一些初步的結果，顯示此篩選平台是具體可行的，且初步受到國際學術界的認同，因此擬在今年的計畫中，擴大中草药的種類，以確定此技術平台的實用性，評估未來是否可應用在臨床上。如果實驗順利，我們將利用一系列生物有機化學的方法，分析或鑑定植物萃取物中與免疫調節生物活性相關的主要成份或指標成分，將兩者的關係作一探討。

本計畫實驗所建立的篩選平台，預期可以以快速、系統化並具標準化的評估方式來篩選各種中草药的生物活性，將有助於了解中草药抗發炎及調節免疫功能的藥理作用或機制，我們也希望此研究結果對於將來研究發展中草药應用在人類及其他動物調節免疫系統上具有創造指標的作用。

貳、材料與方法

一、準備中草藥萃取物

實驗材料

- 中藥乾品：

紫草、山藥、甘草、金銀花、狗脊、桑寄生、連翹、大黃、仙鶴草等近七十餘種免疫相關中藥乾品。

- 中草藥鮮品：

穿心蓮、紫錐菊、刀傷草、咸豐草、台灣金線蓮、三葉五加、白花益母草、蜈蚣草、山蘇、山葡萄、過山龍等四十餘種中草藥新鮮全草。

萃取物製備

中草藥乾品及鮮品打碎均勻後，以水浸泡後，為水層萃取物。中草藥殘渣再分別以甲醇及正己烷溶劑浸泡，超音波震盪二小時後，濃縮後分別為甲醇及正己烷萃取物。

部分以上草藥萃取物已經獲得，並可立即測試。

二、建構細胞激素啟動子載體

細胞激素啟動子序列皆已公開發表在文獻上或是可經由 NCBI 等基因庫中取得 (29-34)。細胞激素啟動子序列取得是以人類淋巴細胞染色體 DNA 作為模板，以 PCR 增幅細胞激素啟動子序列。將 PCR 增幅出的細胞激素啟動子序列個別接到含有螢光酵素 (luciferase) 或是鹼性磷酸酵素 (alkaline phosphatase) 為報導基因的 pGL-3 (Promega) 載體上。

目前我們已經成功建構出 GM-CSF、GM-CSF, IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , IL-12 p35 次單元及 IL-18 細胞激素啟動子以螢光酵素 (luciferase) 為報導基因的載體 (35)。

三、分離培養人類免疫細胞

自健康捐贈者取得人類周邊血液白血球濃厚液以 Ficol-Paque 溶液分離出 PBMC，再以高專一性單株抗體配合磁珠得到高純度的單核細胞或 T 細胞 (目前我們實驗室已建立起此套細胞分離系統)，進一步可利用外加細胞激素 GM-CSF 與 IL-4 的方式培養單核細胞，可得到及樹突狀細胞。

四、基因轉染及測量報導基因在免疫細胞的表現強度

各別建構好細胞激素啟動子載體以 lipofectin 試劑 (invitrogen) 轉染到免疫細胞，將載體與 lipofectin 試劑混合後與培養細胞共同培養 6 小時後，加入待測中草藥萃取物。以 luminescence assay kit (Promega) 檢測螢光酵素表現強度以分析轉染的細胞激素啟動子在細胞體內的表現活性，並以螢光酵素標準品作濃度曲線，實驗使用之冷光儀靈敏度可達 ng。

五、轉殖基因及測定報導基因在實驗動物的表現強度

將各別建構好細胞激素啟動子載體以基因槍轉殖技術 (36) 轉直到實驗老鼠皮膚組織，待測中草藥萃取物以皮膚塗抹，餵食及注射方式送入實驗老鼠體內，16 小時後，取老鼠皮膚測量螢光酵素，測量方式與步驟 D 相同。

參、結果

本計畫之研究目的擬建立合適的細胞與動物評估模式，同時能篩檢抗發炎與增強免疫力的中草藥及特殊植化物。我們認為如何能快速、具標準化的評估各種中藥對於關鍵指標相對強度變化應有一客觀的評比策略，以加速中草藥指標成分之鑑定。目前轉殖基因技術已相當成熟，許多報導基因已廣泛應用在植物或動物之細胞和組織上，並有很好的基礎研究和臨床試驗結果。本計畫採用常用之報導基因系統，作為最初同時篩選中草藥抗發炎和免疫調節生物活性的方法。此報導基因之載體含有與發炎反應與免疫反應有關的基因轉錄因子（如 NF- κ B 與 AP-1）和細胞激素基因啟動子（如 GM-CSF、IL-12 與 TNF- α 等），利用基因槍（gene gun）和微脂體（lipofectin）基因轉殖技術，將上述特定質體（plasmid）轉殖到細胞或實驗老鼠的身體上。所加入的中草藥如能影響基因轉殖過的細胞或實驗老鼠，經由報導基因之表現量則可精確比對中草藥萃取物或化合物對特定基因表現的影響，再經由相對活性的高低則可作為判斷該種中草藥可能之抗發炎和免疫調節的生物活性。

目前本實驗室已經成功建構與發炎反應和免疫調節相關的細胞激素啟動子報導基因質體（TNF- α 、GM-CSF、IL-1 β 、IL-2、IL-13 和 IL-18），並測試其與發炎反應之關係，如圖一所示，IL-1 β 、IL-2、IL-13、IL-18 之啟動子報導對 croton oil 所引起的皮膚發炎反應較無明顯的活性表現，而 GM-CSF 與 TNF- α 這兩個促發炎（pro-inflammatory cytokine）細胞激素則有較強的反應。此結果說明皮膚發炎反應與細胞激素間具有特定的反應性。

我們實驗室已建立統一的中草藥萃取流程，依不同溶劑來製備三百種萃取物分層進行初步的篩選工作，希望能區分這些中草藥萃取物分層對於引起發炎反應指標：即測定 NF- κ B 轉錄因子活性的影響。由於在免疫系統中，NF- κ B 是一高誘導性的轉錄因子，不管是先天性免疫或是後天性免疫系統中皆扮演著非常重要的角色。本實驗室利用測定 NF- κ B 轉錄因子活性，可以釐清這些中草藥在不同的溶劑萃取下的不同特性。

如圖二所示，各種不同的萃取物分層，包括正己烷萃取層（H）、甲醇萃取層（M）和水萃取層（W）依照其對 NF- κ B 轉錄活性影響的結果，可區分為促進（+）和抑制（-）兩類。我們發現依照相對活性的高低來排序，綜合而言，水萃取層對促進 NF- κ B 活性的種類較多，而且活性也較高；正己烷萃取層和甲醇萃取層對促進或抑制 NF- κ B 活性的種類則幾乎各半；甲醇萃取層對促進 NF- κ B 活性介於水萃取層和正己烷萃取層。吾人再進一步根據中草藥在三種萃

取層所得的 NF- κ B 活性，區分成八種組合模式：即+++、++-、+-+、-++、---、--+、-+-、-+- 標示於圖三的右上方)。分析此結果，我們推測這些萃取層可能含有某些種特定的化合物組成，故形成我們所觀察到某種特定的活性模式(圖三)。

除此之外，本實驗室亦選定 66 種植化物，依上述相同初步選選作業進行 NF- κ B 活性測試並且依照相對活性的高低來排序，結果顯示，在選定的植化物中對抑制 NF- κ B 的活性的種類較多(圖四)。

為了進一步評估中草藥萃取物抑制 NF- κ B 活性的能力，我們針對正己烷萃取層(H)、甲醇萃取層(M)，在初步篩選中具有抑制 NF- κ B 的活性的種類及 66 種選定的植化物，我們加入 LPS 共同培養後並加以測定 NF- κ B 表現活性，結果顯示正己烷萃取層(H)、甲醇萃取層(M)及 66 種選定的植化物，大多數種類皆具有抑制 LPS 影響的能力(圖五)

我們選取了數種具增強免疫力的中草藥，探討中草藥不同萃取法的萃取物中是否有些成分可以與 Toll-like Receptor (TLR) 結合，進而影響細胞內部的免疫反應。文獻報導多醣類 (polyliposaccharides) 結合 TLR4 後可引發 NF- κ B 轉錄因子的活化，進而誘導 IL-8 及 TNF-alpha 的表現。圖六顯示不同中草藥水層萃取物對於 B-16 cell (為老鼠黑色素瘤細胞) 之 NF- κ B 活性的影響。結果顯示 C15, C52, C56, C94, C72 及 C105 中草藥水層萃取物相較於其他的草藥，NF- κ B 活性的表現量增加，比加入 LPS 的刺激更強。

另外細胞內的 IL-8 及 TNF-alpha 為重要的促發炎細胞激素，我們藉由觀察細胞內 IL-8 及 TNF-alpha 的表現量作為指標，評估不同中草藥萃取物對於免疫力調節的影響。從圖七中可以看出，利用不同中草藥水層萃取層混和物作用於 THP1 cell line (為人類單核球白血病細胞)，C94 及 C15 較其他中草藥萃取物，如同 LPS 的刺激效果，具有刺激 IL-8 及 TNF-alpha 表現量的產生。

在老鼠脾臟細胞初級培養實驗中(圖八)，個別加入中草藥水層萃取物、LPS 及 IL2 於老鼠脾臟細胞培養 2 天後，利用胸腺嘧啶標幟法 (3 H-thymidine incorporation) 以 TopCount·NXT (偵測細胞放射線強度 (CPM)) 以評估萃取物在刺激老鼠脾臟細胞增生的活性。結果顯示中草藥水層萃取物 C3W、C15W、C52W、C56W、C58W、C60W，在 1ug/ml、10ug/ml 及 50ug/ml 三個濃度，未含有致裂源如 phyto-hemagglutinin (PHA), concanavalin A (Con A) or cytokines 的存下，具有個別刺激老鼠脾臟細胞增生的活性；其中，C3W、C15W、C56W、C58W 呈現劑量相關效應。在所有測試水層萃取物中，以 C15W 在 50ug/ml 濃度下有最高的活性並高於 IL2 (2ng/ml) 5 倍之多。

我們亦利用 IL-4 及 PMA 或是 IL-4 及中草藥水層萃取物刺激 THP1 cell，誘導其產生類樹突狀細胞 (DC-like cell)，用來評估單核球分化成為類樹突細胞上一些 DC markers 的表現。我們發現 C94 對於 DC-SIGN 及 CD86 這兩個表面標記有促進其表現的效果。此結果說明這些選出較能促進 NF-kB 活性的草藥冷水抽出物，似乎都可以刺激 THP-1 細胞 DC-SIGN 及 CD86 的表現。已知 DC-SIGN 和樹突狀細胞抗原的攫取和抗原呈現有關，而 CD86 這種輔助免疫調控分子則是樹突狀細胞成熟的指標分子之一。

由圖十的結果則說明這些選出較能促進 NF-kB 活性的草藥冷水抽出物，和 IL-4 一起處理 THP-1 細胞時，似乎都可以增加 THP-1 細胞吞噬作用的進行，其中 C94 這種植物的水抽出物能較明顯刺激 THP-1 細胞吞噬 DEXTRAN 分子。所以推測在所有選擇的植物中，其可能最具有促進人類單核細胞分化為樹突狀細胞。

另外，本實驗室亦進行動物模型試驗，利用老鼠 DNA 腫瘤疫苗模式來評估 R4、R6、R9、R30、R34、R36、R42 及 R43 等八種抗發炎之純植物化合物對於老鼠體內免疫反應的刺激及是否能有佐劑的功效。老鼠於接種 B16 - gp100 黑色素瘤細胞後，第 7、9、15 及 18 天以測量尺直接測量老鼠腫瘤發生之大小，由圖十一結果得知，以處理 R4 和 R34 化合物組別之老鼠所形成之腫瘤明顯較小；而處理其它化合物之老鼠組別所形成的腫瘤大小跟對照組相比，大多沒有明顯之差異，但處理 R43 化合物組別的老鼠所形成之腫瘤比對照組還大。此外由老鼠平均存活比率來看 (圖十二)，處理 R9、Blank 及對照組之老鼠組別於 B16 - gp100 黑色素瘤細胞接種後 32 天全數死亡，而以處理 R4 化合物組別之老鼠平均存活時間較長。

肆、討論

中草藥具可抗發炎或增強免疫力乃為人們所深信，為數眾多的中草藥常被宣稱具有抗發炎或可增強免疫的功效，然而大多仍無科學客觀，直接的證據來加以驗證；故而若能建立一套可篩檢中草藥抗發炎能力又能篩檢增強免疫力的評估方法，在開發中草藥之抗發炎及增強免疫力的功效是一非常重要的發展策略。

在免疫系統中，NF- κ B 在發炎反應有相當的關聯性；活化的 NF- κ B 轉錄因子可控制許多基因的表現，包括參與發炎反應多種細胞激素、化學趨素及許多免疫系統之受體，NF- κ B 可謂是免疫系統之中心樞紐，為免疫系統一重要指標，在新藥的開發產業上，也以 NF- κ B 作為 in vitro 系統作篩選新藥的工具，故檢測 NF- κ B 活性作為本計畫擬建立之中草藥抗發炎反應及增強免疫力之篩檢平台的第一步活性篩選項目乃是合理、直接可行的方法。

在中草藥萃取物對 NF- κ B 活性測試上，我們發現在不同的萃取物分層，包括正己烷萃取層 (H)、甲醇萃取層 (M) 和水萃取層 (W) 中，以水萃取層對促進 NF- κ B 活性的種類較多，而且活性也較高。大體來說，以水萃取中草藥所得成分中應含有大量的多糖類，目前研究顯示，許多中草藥所含的多糖類具有免疫調節的功用，如靈芝多糖體，許多文獻指出其具有可強化 T 細胞的細胞激素，抑制腫瘤細胞的生長 (24)、甘草多醣能誘生 γ -干擾素，有免疫調節作用、本實驗室研究亦顯示，山藥多糖類具有促進老鼠脾臟細胞增生及老鼠骨髓細胞恢復再生的活性，另外一些大陸研究報導也顯示大多數的中藥多糖類具有激活巨噬細胞、T 細胞和 B 細胞，促進干擾素 (IFN) 的生成等功效；上述所言多糖類所具有的免疫調節活性皆與 NF- κ B 的活化有著密切的關聯性，這也可說明我們在 NF- κ B 活性測試所得到中草藥水層萃取物對促進 NF- κ B 活性的種類較多，而且活性也較高的結果，我們也將挑選對 NF- κ B 有較高促進活性的水萃取層進行更進一步免疫調節活性等測試。

另外針對正己烷萃取層、甲醇萃取層及測試的植化物中對 NF- κ B 有抑制活性的中草藥，我們再以 LPS 共同培養加以確認其抑制 NF- κ B 的活化。由於革蘭氏陰性菌細胞壁的脂多醣 (lipopolysaccharide, 簡稱為 LPS) 是一種很強的內毒素及促發炎物質，它可活化 NF- κ B，並刺激前發炎細胞激素 (proinflammatory cytokine) 的釋放，因此可做為活化 NF- κ B 的刺激物。我們可以從結果發現，在初步篩選中對 NF- κ B 有抑制活性的中草藥，與 LPS 共同培養後，各層大都種類也具有抑制 LPS 所影響的能力，各層種類比例為 (M 層：

89%，H 層：79%，phyto: 88%）。目前許多研究顯示 LPS 是藉由與細胞 TLR-4 的受體結合經過訊號傳導而使 NF- κ B 被活化，進而刺激前發炎細胞激素而引發發炎反應，而先前研究也指出在慢性發炎疾病，可測得 NF- κ B 維持相當高的活性，在發炎性腸疾病（IBD）及急性肝炎反應中皆已測得高活性 NF- κ B 的臨床症狀，這使的我們相信能有效抑制 LPS 所引發 NF- κ B 被活化的中草藥萃取層，可能藉由抑制 TLR-4 訊號傳導進而可能抑制發炎的效果，故而我們也將朝向抗發炎的研究方向進行。

值得一提的是我們曾將典籍所記載中草藥性味（熱、溫、涼、寒）與我們所測得 NF- κ B 活性加以對照，試圖找出是否具有關聯性，不過到目前並未能歸納出其中的關聯性；推測可能為中草藥典籍所提及之性味具相當多重的考量，恐怕並不能僅藉由 NF- κ B 轉錄因子的活化與否來加以推論。

我們進一步評估有促進免疫反應的數種中草藥水層萃取物。在中草藥之水萃取層對於 B-16 細胞之 NF- κ B 活性影響的實驗中，我們發現數種中草藥皆有類似 LPS 的刺激作用，啟動了 NF- κ B 的轉錄活性。另外我們除了觀察中草藥水萃取層對於 TPH1 細胞之 IL-8 及 TNF- α 表現的影響，也進行了中草藥甲醇萃取層混和物對於 IL-8 及 TNF- α 表現的評估，發現在甲醇萃取層的混和物，似乎看不出較顯著性促進 IL-8 及 TNF- α 的表現量。這個發現也許提供我們一個訊息：即利用不同溶劑萃取相同的中草藥，有刺激免疫活性的成分可能存在於不同的萃取層中。

由於脾臟是老鼠重要的免疫細胞生成器官，在老鼠脾臟細胞初級培養實驗中，我們選取幾種具有有效促進 NF- κ B 活性的中草藥水層萃取物用以評估中草藥對老鼠脾臟細胞增生影響情形。結果顯示中草藥水層萃取物 C3W、C15W、C52W、C56W、C58W、C60W，具有刺激老鼠脾臟細胞增生的活性；在免疫調節活性評估上，是否具有刺激老鼠脾臟細胞增生的活性是相當重要一項活性，而此項結果並參照古籍所記載及先前研究結果，使我們相信我們所建構之篩選平台，是可以很有效的將中草藥調節免疫之功效加以評估並予以量化之平台。

另外我們亦利用 THP-1 cell 誘導生成 DC-like cell，旨在評估抗原呈現細胞之抗原呈現效果。從以上結果可以看出，其中 C94 這種植物的水抽出物因為能夠較明顯和 IL-4 一起刺激 THP-1 細胞表現 DC-SIGN 及 CD86，所以推測在所有選擇的植物當中，其可能最具有促進人類單核細胞分化為樹突狀細胞或幫助未成熟樹突狀細胞進一步的成熟。因此我們推測其可能具有促進人類免疫系統抗原呈現的效果。

已知相對於其前趨細胞或其他免疫細胞，抗原呈現細胞對於特定的外來分

子具有較高的吞噬能力，而吞噬能力增加則可能代表可能具有較高的抗原呈現的能力，目前也認為這可以視為免疫能力的增加。其中 C94 這種植物的水抽出物能較明顯刺激 THP-1 細胞吞噬 DEXTRAN 分子，所以推測在所有選擇的植物中，其可能最具有促進人類單核細胞分化為樹突狀細胞，因此我們推測其可能具有促進人類免疫系統抗原呈現的效果。在本研究中我們使用 THP-1 細胞株來進行實驗，比起 primary cell culture 的耗時耗錢，THP-1 cell 相當經濟，關於此系統的優缺點我們仍在持續評估中。

而在老鼠 DNA 腫瘤疫苗模式實驗中，觀察各組老鼠所形成之腫瘤大小及平均存活率的結果得知，R4、R6、R9、R30、R34、R36、R42 及 R43 等八種抗發炎之純植物化合物中，以 R4 的效果為最佳，其可能提昇老鼠體內之免疫反應，並可作為佐劑抑或是能與佐劑 (IFA) 相輔相成，進而促進所轉入之 DNA 的表現量，也減緩腫瘤之形成。另外，其它七種的純植物化合物之抑制效果並不佳，原因可能是這些抗發炎之純植物化合物能降低佐劑 (IFA) 所引起的發炎反應，進而造成腫瘤的增生現象。

伍、結論與建議

本研究擬建立一套抗發炎和增強免疫力的中草藥篩選技術平台，利用前述的研究方式，我們發現本研究室所篩選的三百多種不同的中草藥萃取物，確有不少具有抗發炎或增強免疫力的效果。在促進發炎反應方面，我們發現此現象可能為特定免疫細胞透過 TLR (Toll-like Receptor) 分子來接受植物萃取物中特定分子的刺激，進而利用 NF- κ B 訊息傳導途徑達到增強免疫反應的結果。而此種關係可以利用本實驗室已建立的免疫細胞評估系統來篩選可能具有增強免疫能力的天然萃取物。在抑制發炎反應方面，我們所建立的動物模式顯示，若與 DNA 疫苗同時搭配某些純的植化物作為佐劑，似乎有抑制腫瘤生長大小的情況，同樣亦可用來評估中草藥對於抑制發炎反應的影響。

雖然我們已建立一套篩選的流程，歸納出八種不同萃取層對於 NF-B 的活性模式，但若欲更深入瞭解中草藥萃取物或植化物對於抗發炎與增強免疫力所參與的機制，則需更進一步建立評估不同免疫反應的系統，才能獲致更深入的結論。另外本研究結果和傳統典籍對於中草藥之「熱、溫、涼、寒」特性的描述尚未發現有關連之處，可能受限於本測驗的實驗方法，這部分我們亦希望於新一年的計畫中來進行系統生物學的研究。

目前我們已從初步篩選中獲致不錯的結果，發現中草藥在不同溶劑的萃取物中會得到不同的免疫刺激效果的植化物（例如：水層多為促發炎的物質；有機層則促發炎與抗發炎各半），但是仍值得進一步利用更有效的分析系統例如：HPLC、NMR 或 GC-mass 等儀器進行分析，探討中草藥的主要組成分子（profiling），以利探討 ligand 與 receptor 的反應機制，同時有關八種不同模式的中草藥在三萃取層是否含有 common action factors，亦值得進一步探索，這將有賴結合細胞學、免疫學或分子生物學做有系統的實驗設計，才能深入免疫或藥理學機制研究的探討。

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-002 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. Koop CE. The future of medicine. *Science* 2002; 295: 233.
2. Roitt, I., J. Brostoff, and D. Male. 1998. *Immunology*. Mosby, London.
3. Mellstedt H, Fagerberg J, Frodin JE, Henriksson L, Hjelm-Skoog AL, Liljefors M, Ragnhammar P, Shetye J and Osterborg A. Augmentation of the immune response with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other hematopoietic growth factors. *Curr Opin Hematol* 1999; 6: 169-175.
4. Dranoff G, Crawford AD, Sadelain M, Ream B, Rashid A, Bronson RT, Dickersin GR, Bachurski CJ, Mark EL, Whitsett JA and et al. Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science* 1994; 264: 713-716.
5. Groves RW and Schmidt-Lucke JA. Recombinant human GM-CSF in the treatment of poorly healing wounds. *Adv Skin Wound Care* 2000; 13:107-112.
6. Hogge GS, Burkholder JK, Culp J, Albertini MR, Dubielzig RR, Yang NS and MacEwen EG. Preclinical development of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transfected melanoma cell vaccine using established canine cell lines and normal dogs. *Cancer Gene Ther* 1999; 6: 26-36.
7. Beutler, B. TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. *J. Invest. Medicine* 1998; 43:227.
8. Anderson DL. TNF inhibitors: a new age in rheumatoid arthritis treatment. *Am J Nurs* 2004; 104:60-8; quiz 68-9.
9. Chehimi J, Valiante NM, D'Andrea A, Rengaraju M, Rosado Z, Kobayashi M, Perussia B, Wolf SF, Starr SE and Trinchieri G. Enhancing effect of natural killer cell stimulatory factor (NKSF/interleukin-12) on cell-mediated cytotoxicity against tumor-derived and virus-infected cells. *Eur J Immunol* 1993; 23: 1826-1830.
10. Tian Z, Shen X, Feng H and Gao B. IL-1 beta attenuates IFN-alpha beta-induced antiviral activity and STAT1 activation in the liver: involvement of proteasome-dependent pathway. *J Immunol* 2000; 165: 3959-3965.
11. Karin M, The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB

- activation. *J Biol Chem* 1999; 274: 27339-27342.
12. Chen F, Demers LM and Shi X. Upstream signal transduction of NF-kappaB activation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002; 1: 137-149.
 13. Barnes PJ and Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066-1071.
 14. Li X and Stark GR, NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp Hematol* 2002; 30: 285-296.
 15. Staniforth V, Wang SY, Shyur LF and Yang NS, Shikonins, phytochemicals from *Lithospermum erythrorhizon*, inhibit the transcriptional activation of human tumor necrosis factor alpha promoter in vivo. *J Biol Chem* 2004; 279: 5877-5885.
 16. Wang, J. H., K. F. Lin, Spencer A. Benson, Show Jane Sun, Wei Ming Cheng, Sheng-Yang Wang, Lie Fen Shyur, Yang, N. S. Tissue array transgene expression system for the evaluation of effect of medicinal herbs on wound-healing. *J. Genetics Mol. Bio.* 2003; 14:133.
 17. Yang NS, Wang JH and Turner J, Molecular strategies for improving cytokine transgene expression in normal and malignant tissues. *Gene Ther* 2004; 11: 100-108.
 18. Skein T, Kojima K, Matsumoto T, and Nagai T. Preparation and evaluation of shikonin ointment for wound healing effectiveness in an experimental wound healing model in rats. *Pharma. Sci.* 1998; 8:249.
 19. Araghiniknam M, Chung S, Nelson-White T, Eskelson C and Watson RR, Antioxidant activity of dioscorea and dehydroepiandrosterone (DHEA) in older humans. *Life Sci* 1996; 59: PL147-157.
 20. Norton SA, Useful plants of dermatology. III. Corticosteroids, Strophanthus, and Dioscorea. *J Am Acad Dermatol* 1998; 38(2 Pt 1): 256-259.
 21. Okpuzor J and Omidiji O, Peroxidase-polyphenol oxidase association in *Dioscorea esculenta*. *Z Naturforsch [C]* 1998; 53: 957-560,.
 22. Bauer R 1999. Chemistry, analysis and immunological investigations of Echinacea phytopharmaceuticals. In *Immunomodulatory agents from plants*. H. Wagner, ed. Birkhauser Verlag, Basel, p. 41.

23. Zoutewelle G, and Van Wijk R. Effects of Echinacea purpurea extracts on fibroblast populated collagen lattice contraction. *Phytotherapy Res.* 1990; 4:77.
24. Chen HS, Tsai YF, Lin S, Lin CC, Khoo KH, Lin CH and Wong CH, Studies on the immuno-modulating and anti-tumor activities of Ganoderma lucidum (Reishi) polysaccharides. *Bioorg Med Chem* 2004; 12: 5595-5601.

[\(5-09 圖\)--CCMP93-RD-002.doc](#)