

厚朴對細菌內毒素感染狀態下細胞之影響

Effect of Houpo on the induction of inflammatory mediators induced by bacterial endotoxin

行政院衛生署桃園醫院

何 豐 名

摘 要

儘管抗生素的使用及特殊照護療法的改進，敗血症(sepsis)仍具有很高的死亡率。在瑞典及芬蘭的研究曾指出抗生素的使用對於某些感染性疾病引起的死亡率並沒有顯著的改善。另外，也有報告指出使用高劑量的皮質類固醇並不能有效降低全身性敗血症所導致的死亡率。因此，新抗敗血症或抗發炎藥物的開發是迫切而需要的課題。厚朴(*Magnolia officinalis* Rehd et Wils 或 *Magnolia obovata* Thunb)於中醫藥典籍記載為味苦、辛、溫，治反胃、嘔吐、宿食不消、痰飲喘咳、寒溼瀉痢。近代藥理學研究顯示厚朴萃取物或其中之厚朴酚(magnolol)、和厚朴酚(honokiol)具有鎮痙、健胃、抗菌、降血壓或中樞神經抑制作用。和厚朴酚亦具有抑制大鼠嗜鹼性球釋放白三烯素(leukotriene)之能力，故被認為可能具有抗發炎活性，但詳細藥理作用及機制和應用，仍有待進一步研究。本研究是以體外細胞實驗模式來探討厚朴對模擬細菌感染狀態下細胞的影響。終極目標為瞭解厚朴的抗發炎或抗敗血症活性及可能臨床之應用。本年度計劃為先期研究乃藉由厚朴酚及和厚朴酚對受 LPS 或 LPS+interferon γ 刺激之巨噬細胞或腎小球環間膜細胞引發發炎媒介物質釋放反應之影響，以瞭解厚

朴的可能的抗發炎或抗敗血症活性。研究結果摘述如下：成功培養鼠類 RAW264.7 巨噬細胞及鼠類 MES13 腎小球環間膜細胞。內毒素(10 µg/ml)處理的巨噬細胞或內毒素合併干擾素(interferon- γ , 100 U/ml)處理的腎小球環間膜細胞之一氧化氮生成量明顯增加，而厚朴酚及和厚朴酚具有抑制效果；但粗略比較來說，兩種藥物的作用於腎小球環間膜細胞的效果大於巨噬細胞。因本研究計劃時程較短，我們選擇和厚朴酚於腎小球環間膜細胞的作用，做進一步的研究。內毒素合併干擾素處理的腎小球環間膜細胞之一氧化氮生成酵素(iNOS)及第二型環氧酵素(COX-II)蛋白有表現情形，而給予和厚朴酚處理，則可見抑制效果。在本研究中所用到的厚朴酚及和厚朴酚劑量，本身不具細胞毒性。本研究結果顯示厚朴相關成份可能具有抗發炎活性。進一步的藥理機轉研究值得繼續探討，且由此先期研究結果亦可使我們進一步設計厚朴或相關成份於動物體之抗發炎或抗敗血症活性之研究，以及未來可能臨床應用之評估。

關鍵詞：和厚朴酚，腎小球環間膜細胞，一氧化氮生成酵素，第二型環氧酵素

Tao-Yuan General Hospital

Ho Fong-Ming

Abstract

Although the introduction of antibiotics more than 50 years ago resulted in a decline of sepsis-induced mortality from 55 % to approximately 35 %, there has been no significant reduction in the mortality of patients with sepsis since the introduction of antibiotics. With regard to treatment modalities for sepsis and septic shock, glucocorticoids have been used for a long period to treat sepsis. However, it should be noted that the conclusion of studies of VASSCSG (1987) and Bone et al. (1987) has shown that the use of high-dose glucocorticoid therapy did not reduce mortality significantly in patients with systemic sepsis. Therefore, the development of new

anti-sepsis strategies or new anti-inflammatory agents is an encouraging job. Houpo, a Chinese herb, has been used in the treatment of abdominal fullness and chest tightness. Recent reports indicated that honokiol, a major phenolic constituent of Houpo, has antioxidant and anti-inflammatory effects. However, the real pharmacological mechanism and *in vivo* effect is still unclear. Therefore, the potential of honokiol and magnolol to develop as an anti-inflammatory or anti-sepsis agent is valuable to investigate. The main item to be performed in this research project: To investigate the effects of honokiol and magnolol on the regulation of effects of lipopolysaccharide (LPS) or/and γ -interferon in the synthesis and release of inflammatory mediators in macrophages and mesangial cells. The results show that the production of nitric oxide (NO) induced by LPS (10 μ g/ml) in RAW264.7 or LPS+ γ -interferon (100 unit) in mesangial cell was markedly inhibited by honokiol and magnolol. The efficacy in honokiol treatment is more than in magnolol. Furthermore, the induction of inducible NO synthase (iNOS) and cyclooxygenase-II (COX-II) proteins triggered by LPS+ γ -interferon in mesangial cells, was markedly inhibited by honokiol. The dosage of magnolol and honokiol using in this study did not induce cytotoxicity in macrophages and mesangial cells. These results imply that the active constituent of houpo, honokiol, may have potential to develop into a novel anti-inflammatory agent or anti-sepsis drug.

Keywords : honokiol, mesangial cells, inducible NO synthase, cyclooxygenase-II

壹、前言

儘管抗生素的使用及特殊照護療法的改進，敗血症(sepsis)仍具有很高的死亡率(Chaudry,1999)。Hemminki and Paakkulainen (1976)在瑞典及芬蘭的研究曾指出抗生素的使用對於某些感染性疾病引起的死亡率並沒有顯著的改善。另外，也有報告指出使用高劑量的皮質類固醇並不能有效降低全身性敗血症所導致的死亡率(VASSCSG,1987;Bone et al.,1987)。因此，新抗敗血症或抗發炎藥物

的開發是迫切而需要的課題。 據統計約有 70 % 的敗血性休克(septic shock)是由格蘭氏陰性菌所引起(Natanson,1994)，格蘭氏陰性菌細胞膜上的脂多醣體(內毒素, lipopolysaccharide, LPS)具有很強的致病能力，侵入人體後會啟動免疫系統，活化許多與免疫有關的細胞，及釋放出自由基、cytokines、脂溶性調節因子等活性物質，以殺死外物和作為彼此之間溝通的訊息(Rietschel et al., 1994)。但是當感染過於嚴重時，會從原來只是體溫增高，心跳、呼吸加快，和白血球增加的全身性發炎反應症狀(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)，擴展到菌血，腎、肝、肺等多器官衰竭，和低血壓等病症，最終造成全身性的敗血性休克，甚至死亡(Natanson et al.,1994，Mayeux, 1997)。巨噬細胞在此扮演重要的角色，LPS 對巨噬細胞和單核球而言為很強的活化劑，受 LPS 活化的巨噬細胞除了會減少本身 colony-stimulating factor-1 receptor (CSF-1R)的數目，降低增生的能力外，亦會釋放許多與免疫防禦有關的物質，例如一氧化氮自由基(NO)、白三烯素、前列腺素和 TNF- α 、IL-1、IL-6 等 cytokine 以及一些 soluble cytokine receptor，這些調節因子已知與敗血性休克有直接的相關性(Evans, 1996；Baccarini et al., 1992)。

另一方面，腎臟的腎小球環間膜細胞(mesangial cells)被認為是腎臟中的清道夫，具有類似巨噬細胞的性質，當受到如 LPS 刺激時亦會釋放許多與免疫防禦有關的物質，例如一氧化氮自由基(NO)、白三烯素、前列腺素和 cytokine 等。腎小球環間膜細胞的過度增生被認為與某些腎病如腎小球腎炎有關。因此，對於巨噬細胞或腎小球環間膜細胞受細菌內毒素影響的研究是可用為探討新抗發炎藥物的有利工具。

厚朴(*Magnolia officinalis* Rehd et Wils 或 *Magnolia obovata* Thunb)於中醫藥典籍記載為味苦、辛、溫，治反胃、嘔吐、宿食不消、痰飲喘咳、寒溼瀉痢。近代藥理學研究顯示厚朴萃取物或其中之厚朴酚(magnolol) 和厚朴酮(honokiol)具有鎮痙、健胃、抗菌、降血壓或中樞神經抑制作用(許鴻源,1985；顏焜熒,1985；Watanabe et al.,1983)。和厚朴酚亦具有抑制大鼠嗜鹼性球釋放白三烯素(leukotriene)之能力(Hamasaki et al.,1996)，故被認為可能具有抗發炎活性，但詳細藥理作用及機制和應用，仍有待進一步研究。本研究是以體外細胞實驗模式

來探討厚朴對模擬細菌感染狀態下細胞的影響。終極目標為瞭解厚朴的抗發炎或抗敗血症活性及可能臨床之應用。本年度計劃為先期研究乃藉由厚朴酚及和厚朴酚對受 LPS 或 LPS+interferon γ 刺激之巨噬細胞或腎小球環間膜細胞引發發炎媒介物質釋放反應之影響，以瞭解厚朴的可能的抗發炎或抗敗血症活性。

貳、材料與方法

一、細胞存活率之測定：

為瞭解測試物質是否對細胞具有毒性而進行此測試。參考 Mosmann (1983)的方法，培養密度為 $10^5/200\ \mu\text{l}$ 的細胞(鼠類 RAW264.7 巨噬細胞及鼠類 MES13 腎小球環間膜細胞)，經過投藥(厚朴酚及和厚朴酚)處理一定時間後，抽掉上清液，再加 $100\ \mu\text{l}$ medium 後，再處理 $0.025\ \text{mg/ml}$ MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide])反應 4 小時，抽掉上清液，加入 DMSO 劇烈震盪，以分光光度計測波長 $570\ \text{nm}$ 的吸光值。由於活細胞的粒腺體仍具有活性，能將黃色 MTT 還原呈藍紫色 formazon 結晶，再以 DMSO 劇烈震盪，使結晶均勻溶解，因此藍紫色愈深可表示活細胞愈多。

二、一氧化氮 (Nitric Oxide, NO) 釋放量之測定：

一氧化氮及 $\text{TNF-}\alpha$ 是細菌內毒素感染時重要之發炎媒介物質，為瞭解測試物質是否會抑制細胞釋放此等發炎媒介物質而進行此測試。細胞經過投藥處理後，取培養液 $200\ \mu\text{l}$ ，加入 $10\ \mu\text{l}$ Griess reagent 之 A 液(0.33% sulfanilamide 溶於 15% acetic acid)，反應 3 分鐘後再加入 $10\ \mu\text{l}$ Griess reagent 之 B 液(0.133% NED [N-(1-naphthyl)-ethylene diamine dihydrochloride])，在 10 分鐘內以分光光度計測波長 $550\ \text{nm}$ 之吸光值，再對照標準品即可求得 nitrite 的含量。由於 NO 的半衰期很短，迅速會被氧化成 nitrite，再進一步才會被氧化成 nitrate，因此在短時間內，可使用 Griess reagent 測定 nitrite 的量，來間接地表示 NO 的釋放量。

三、第二型一氧化氮生成酵素 (iNOS) mRNA 分析：

為瞭解測試物質是否會藉由抑制第二型一氧化氮生成酵素(iNOS)基因表現而造成發炎媒介物質 NO 及前列腺素生成減少，此亦可使我們瞭解或推測測試物質作用的可能機制。

利用 RT-PCR 方法分析 iNOS mRNA 的表現。RT-PCR 所用之 primer 乃購自國外廠商(CLONTECH, U.S.A.)，並依照其所附實驗條件進行。細胞(約 3×10^6)經 LPS (10 $\mu\text{g/ml}$)處理或合併處理測試藥物(1-4.5 μM) 6小時，以 Trizol reagent (GIBCO-BRL)處理並分離 total RNA，然後在 SuperScript II reverse transcriptase (GIBCO)存在下以(dT) primers 合成第一股 cDNA。以此 cDNA 為模板，在 AmpliTaq (GIBCO)、4 種 dNTPs、 MgCl_2 及 primer (macrophage iNOS amplimer set, CLONTECH)存在下，於 Perkin Elmer DNA Thermal Cycler Model 480 反應。此 PCR 產物再進行電泳分析並呈色(ethidium bromide staining)。

四、Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) 釋放量的測定

肺泡巨噬細胞 LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) 處理或合併處理測試藥物 (0.2-10 μM) 2 及 6 小時，將培養液中上清液取出，以 1:3 稀釋，取 50 μl sample volume 再以 rate TNF- α ELISA kit (R & D system) 測試 TNF- α 量。

五、西方墨點法 (Western Blot) 測試第二型一氧化氮生成酵素 (iNOS) 及第二型環氧酵素(COX-II)表現：

為瞭解測試物質是否會藉由抑制第二型一氧化氮生成酵素(iNOS)及第二型環氧酵素(COX-II)蛋白表現而造成發炎媒介物質 NO 及前列腺素生成減少。

- 1.細胞溶解物(cell lysate)的萃取: **A. Total cell lysate:** 將肺泡巨噬細胞以 $1.2-1.5 \times 10^5$ cell/dish 的密度培養在 6 公分培養皿上，細胞經過投藥處理後，抽掉培養液，以冰冷的 PBS 清洗一次，加入 60 μl RIPA buffer，以 policeman rubber 刮下細胞並收集至 eppendorff tube 中，在冰上反應 20 分鐘後，以 $10,000 \times g$ 、4 離心 5 分鐘，取上清液用 BCA protein assay kit 定量，將萃取液保存於-70 備用。**B. Membrane fraction & cytosol fraction of cell lysate:** 參考 Fujihara 等人(1994)的方法，將肺泡巨噬細胞以 4×10^6 cell/dish 的密度培養於 10 公分培養皿

中，細胞經過處理後，用冰冷的 PBS 清洗一次，以 $1\times$ trypsin-EGTA 處理 3 分鐘打下細胞，加入 lysis buffer for PKC，馬上以 $100,000\times g$ 、4 離心 32 分鐘，取上清液為 cytosol fraction，再將沈澱部份加入含 1 % triton X-100 lysis buffer for PKC 處理 20 分鐘後，以 $14,000\times g$ 、4 離心 11 分鐘，取上清液為 membrane fraction。萃取液用 BCA protein assay kit 定量，保存於 -70°C 備用。

2. 西方墨點法: 取 30-100 μg cell lysate，加入約 1/10 體積的 $10\times$ SDS / protein loading dye， 100°C 煮沸 10 分鐘後，將 sample 小心地加入以固定於垂直電泳槽內的 stacking gel 的 well 內，以避免 sample 溢出，並且加入 protein marker，以確認蛋白之分子量。接下來，加滿 protein electrophoresis running buffer，固定電壓為 65 mV 跑完 stacking gel，再將電壓調至 85-125 mV，直至色帶跳海為止。然後進行 Sample 的轉印: 在具有海綿網的轉印夾上放置一層 3 MM paper，再放上 gel，取一張與 gel 同等大小的 N.C. membrane 覆蓋於 gel 上方，輕輕地趕走氣泡，再放上一層 chromatography paper 和海綿網，夾緊轉印夾，將之置於已裝滿 protein electrophoresis transfer buffer 的轉印槽內，固定電流為 400 mA，轉印 2 小時。將已轉印好的 N.C. membrane 用 Amidoblack 檢測是否有轉印成功。然後即可接著進行免疫墨點法(Immunoblot): 將轉印成功的 N.C. membrane 以 3 % BSA in 0.1 % PBST (blocking buffer) 處理 50 分鐘，加入 primary antibody (monoclonal 第二型一氧化氮生成酵素(iNOS), 第二型環氧酵素(COX-II))， 4°C 溫柔地振盪隔夜後，以 0.1 % PBST 清洗 15 分鐘 3 次，再處理 secondary antibody 室溫 1 小時，以 0.1 % PBST 清洗 10 分鐘 7 分鐘 5 分鐘。迅速至暗房，加入 ECL substrate (A 液:B 液=1:1) 於 N.C. membrane 上，以 X-film 顯影。

六、統計方法：

數據表示方式為 $\text{mean}\pm\text{SEM}$ ，n 值為 6。統計方法採用 Students' T-test， $P<0.05$ 為有意義指標。

參、結果

培養鼠類 RAW264.7 巨噬細胞及鼠類 MES13 腎小球環間膜細胞從事實驗 內毒素(LPS, 10 $\mu\text{g/ml}$)合併干擾素(interferon- γ , 100 U/ml)處理 18 小時的腎小球環間膜細胞(圖 1)或 LPS(10 $\mu\text{g/ml}$)處理 18 小時的巨噬細胞之一氧化氮生成量明顯增加(圖 2)，而同時給予和厚朴酚(0.25-1 μM)或厚朴酚(1 μM)則具有抑制效果；但粗略比較來說，兩種藥物的作用於腎小球環間膜細胞的效果大於巨噬細胞，而和厚朴酚似乎較厚朴酚作用好。另外，內毒素(10 $\mu\text{g/ml}$)處理的巨噬細胞 TNF- α 生成量明顯增加(圖 3)，但厚朴酚及和厚朴酚作用尚不明確。因本研究計劃時程較短，我們選擇和厚朴酚於腎小球環間膜細胞的作用，做進一步的研究。內毒素(10 $\mu\text{g/ml}$)合併干擾素(100 U/ml)處理的腎小球環間膜細胞之一氧化氮生成酵素(iNOS) mRNA 和蛋白(圖 4)及第二型環氧酵素(COX-II)蛋白有明顯表現情形(圖 5)，而給予和厚朴酚處理，則可見抑制效果。在本研究中所用到的厚朴酚及和厚朴酚劑量，本身不具細胞毒性；而內毒素合併干擾素處理會誘導腎小球環間膜細胞增生，和厚朴酚亦會抑制此現象(圖 6)。本研究結果顯示厚朴相關成份可能具有抗發炎活性。進一步的藥理機轉研究值得繼續探討，且由此先期研究結果亦可使我們進一步設計厚朴或相關成份於動物體之抗發炎或抗敗血症活性之研究，以及未來可能臨床應用之評估。

肆、討論

LPS 對巨噬細胞和單核球而言為很強的活化劑，受 LPS 活化的巨噬細胞除了會減少本身 colony-stimulating factor-1 receptor (CSF-1R)的數目，降低增生的能力外，亦會釋放許多與免疫防禦有關的物質，例如一氧化氮自由基(NO)、白三烯素、前列腺素和 TNF- α 、IL-1、IL-6 等 cytokine 以及一些 soluble cytokine receptor，這些調節因子已知與敗血性休克有直接的相關性(Evans, 1996 ; Baccarini et al., 1992)。另一方面，腎臟的腎小球環間膜細胞(mesangial cells)被認為是腎臟中的清道夫，具有類似巨噬細胞的性質，當受到如 LPS 刺激時亦會釋放許多與免疫防禦有關的物質，例如一氧化氮自由基(NO)、白三烯素、前列腺素和 cytokine 等(Trachtman et al.,1995)。腎小球環間膜細胞的過度增生被認為與

某些腎病如腎小球腎炎有關。因此，對於巨噬細胞或腎小球環間膜細胞受細菌內毒素影響的研究是可用為探討新抗發炎藥物的有利工具。在本研究進行之初，曾遭遇鼠類 MES13 腎小球環間膜細胞培養過程中發生培養失敗情形，經向原細胞供應商洽詢及討論後，已解決問題並成功培養。厚朴是傳統中藥，近代藥理學研究顯示和厚朴酚(honokiol) 具有抑制大鼠嗜鹼性球釋放白三烯素(leukotriene)之能力(Hamasaki et al.,1996)，故被認為可能具有抗發炎活性，但詳細藥理作用及機制和應用，仍有待進一步研究。本研究是以體外細胞實驗模式來探討厚朴有效成份對模擬細菌感染狀態下細胞的影響。由此先期研究結果可知厚朴酚或和厚朴酚對受 LPS 或 LPS+interferon γ 刺激之巨噬細胞或腎小球環間膜細胞引發一氧化氮生成或 iNOS 及 COX-II 蛋白表現反應之影響，推測厚朴中的某些有效成份具有抗發炎或抗敗血症活性。而在本研究中，就比較巨噬細胞及腎小球環間膜細胞來說，兩種藥物的作用於腎小球環間膜細胞的效果大於巨噬細胞，而和厚朴酚似乎較厚朴作用好。另外，我們也發現 LPS+interferon γ 會刺激腎小球環間膜細胞的過度增生，而和厚朴酚具有明顯抑制效果，故推測可應用於某些腎病如腎小球腎炎的治療，但此方面有待日後進一步的研究。

伍、結論與建議

由此先期研究結果可知厚朴酚或和厚朴酚對受 LPS 或 LPS+interferon γ 刺激之巨噬細胞或腎小球環間膜細胞引發一氧化氮生成或 iNOS 及 COX-II 蛋白表現反應之影響，推測厚朴中的某些有效成份具有抗發炎或抗敗血症活性。進一步的藥理機轉研究值得繼續探討，且由此先期研究結果亦可使我們進一步設計厚朴或相關成份於動物體之抗發炎或抗敗血症活性之研究，以及未來可能臨床應用之評估。

陸、參考文獻

1. Bone RC, Fishser CJ Jr, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. A control clinical trial of high-dose methylprednesolone in the treatment of severe sepsis

- and septic shock. *N Engl J Med* 1987, 317:653-658.
2. Burnet AR, Thomson RH. Naturally occurring quinones. Part X. The quinonoid constituents of *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae). *J Chem Soc Sect C* 1962,2100-2104.
 3. Chaudry IH. Sepsis: Lessons learned in the last century and future directions. *Arch Surg* 1999,134:922-929.
 4. Evans T J. The role of macrophages in septic shock. *Immunobiol* 1996,195: 655-659.
 5. Frydman B, Marton LJ, Sun JS, Neder K, Witiak DT, Liu AA, Wang HM, Hamasaki Y, Muro E, Miyajima S, Yamamoto S, Kobayashi I, Sato R, Zaitu Matsuo M, Ichimaru T, Tasaki H, Miyazaki S. Inhibition of leukotriene synthesis by honokiol in rat basophilic leukemia cells. *Int Arch Allergy Immunol* 1996,110:278-281.
 6. Hambleton J, Weinstein SL, Lem L, Defranco L. Activation of c-jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996,93: 2774-2778.
 7. Lima OG, D'Albuquerque IC, Lima CG, Maia MHD. Substancias antimicrobianas de plantas superiores. *Rev Inst Antibiot* 1962,4: 3-17.
 8. Mayeux PR. Pathobiology of lipopolysaccharide. *J Toxicol Environ Health* 1996,51: 415-435.
 9. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 1983,65: 55-63.
 10. Novogrodsky A, Vanichkin A, Patya M, Gazit A, Osherov N, Levitzki A. Prevention of lipopolysaccharide-induced lethal toxicity by tyrosine kinase inhibitors. *Science* 1994,264: 1319-1322.
 11. Paul A, Pendreigh RH, Ito N, Suzuki T. Protein kinase C and tyrosine kinase pathway regulate lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase activity in

- RAW 264.7 murine macrophage. Br J Pharmacol 1994,114: 482-488.
12. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zahringer U, Seydel U, Padova FD, Schreier M, Brade H. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. FASEB J. 1994,8: 217-225.
 13. Watanabe K, Watanabe H, Goto Y, Yamaguchi M, Yamaoto N, Hagino K. Pharmacological properties of magnolol and honokiol extracted from *Magnolia officinalis*: central depressant effects. Planta Med 1983,49:103-108.
 14. 許鴻源，簡明藥材學，新醫藥出版社，台北，1985.
 15. 顏焜熒，原色生藥學，南天書局，台北，1985.

柒、圖、表

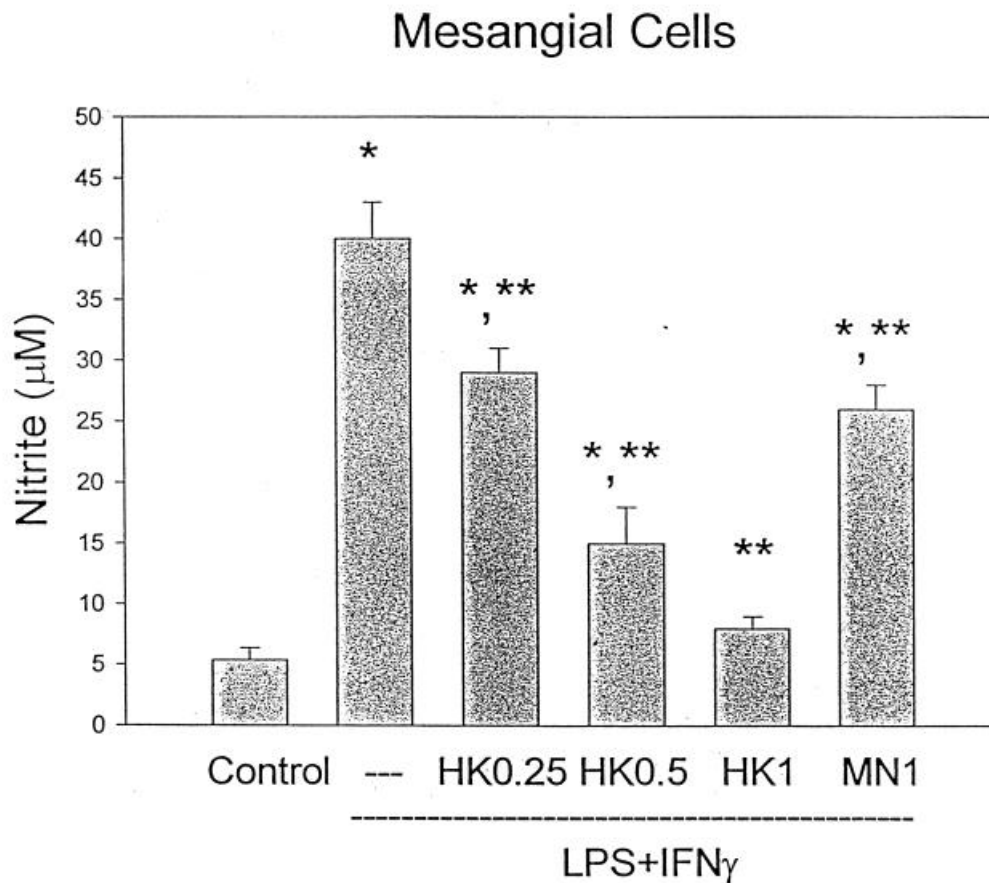


圖 1. 內毒素合併干擾素處理的腎小球環間膜細胞之一氧化氮生成量變化。腎小球環間膜細胞以內毒素(LPS, 10 $\mu\text{g/ml}$)合併干擾素($\text{IFN}\gamma$, 100 U/ml)處理 18 小時，或同時給予和厚朴酚(HK, 0.25-1 μM)或厚朴酚(MN, 1 μM)處理，觀察一氧化氮生成量變化。以 nitrite 生成量表示一氧化氮生成量。*：P<0.05：與對照組比較；**：P<0.05：與 LPS+ $\text{IFN}\gamma$ 組比較。

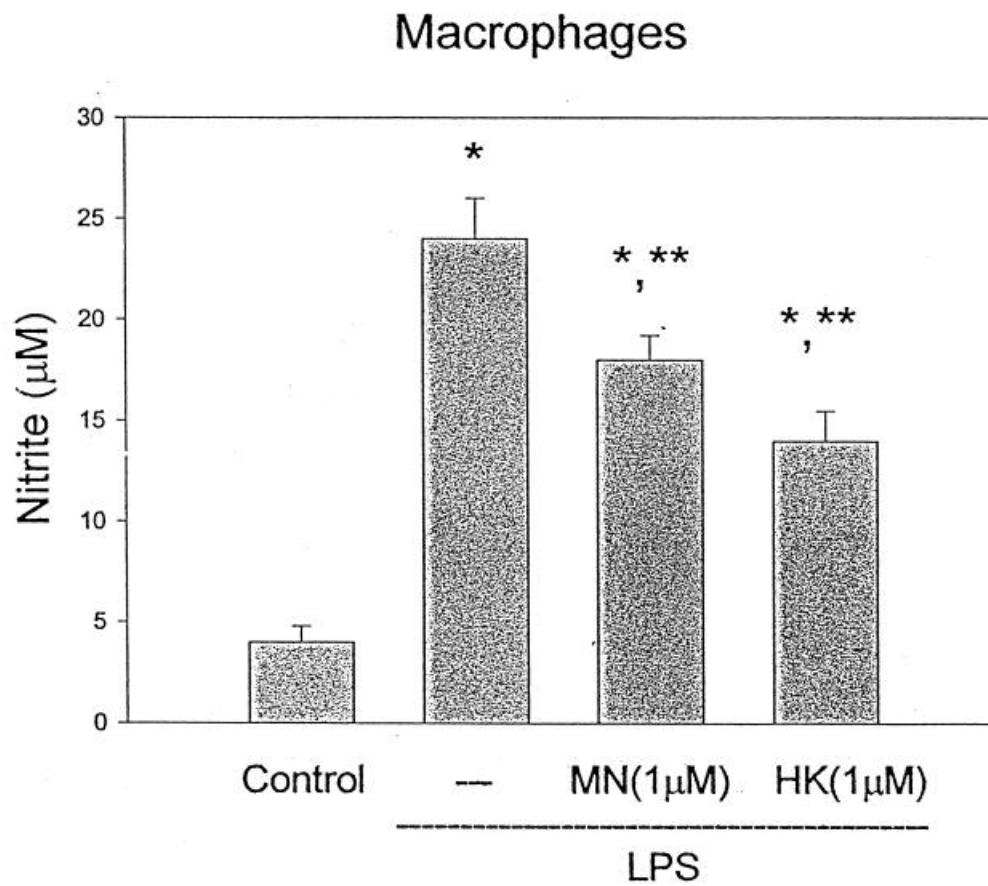


圖 2. 內毒素處理的巨噬細胞之一氧化氮生成量變化。巨噬細胞以內毒素(LPS, 10 $\mu\text{g/ml}$)處理 18 小時，或同時給予厚朴酚(HK, 1 μM)或厚朴酚(MN, 1 μM)處理，觀察一氧化氮生成量變化。以 nitrite 生成量表示一氧化氮生成量。*：P<0.05：與對照組比較；**：P<0.05：與 LPS 組比較。

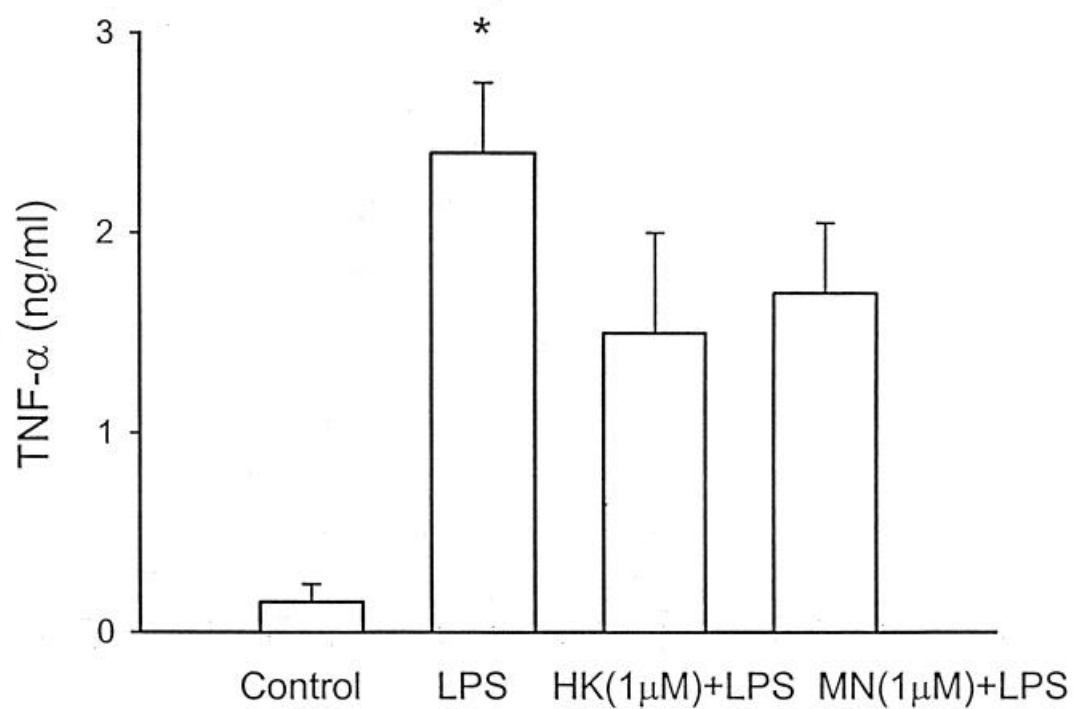


圖 3. 內毒素處理的巨噬細胞之 TNF- α 生成量變化。巨噬細胞以內毒素(LPS, 10 μ g/ml)處理 18 小時，觀察 TNF- α 生成量變化，或同時給予和厚朴酚(HK, 1 μ M)或厚朴酚(MN, 1 μ M)處理，*：P<0.05：與對照組比較。

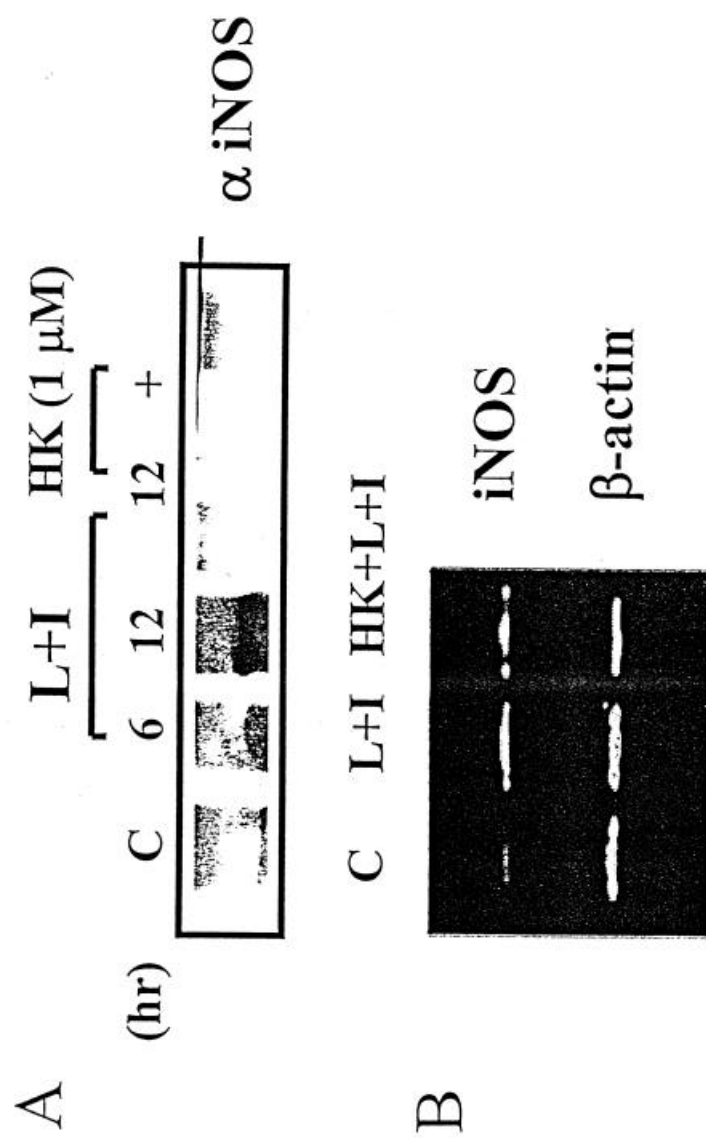


圖 4. 內毒素合併干擾素處理的腎小球環間膜細胞之一氧化氮生成酶素(iNOS)mRNA 及蛋白表現情形。腎小球環間膜細胞以內毒素(L, 10 μ g/ml)合併干擾素(I, 100 U/ml)處理 6 (B)或 18(A)小時，或同時給予和厚朴酚(HK, 1 μ M)處理，以觀察 iNOS mRNA (A)及蛋白(B)變化。

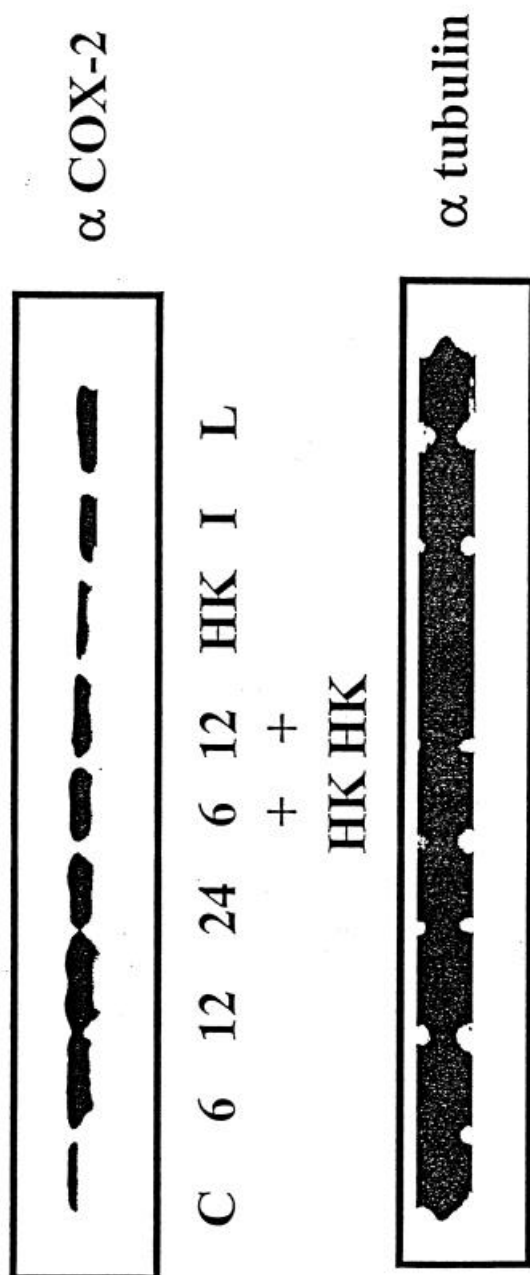


圖 5. 內毒素合併干擾素處理的腎小球環間膜細胞之第二型環氧酵素 (COX-II) 蛋白表現情形。腎小球環間膜細胞以內毒素(L, 10 μ g/ml) 合併干擾素(I, 100 U/ml) 處理 6-24 小時, 或同時給予和厚朴酚(HK, 1 μ M) 處理, 以觀察酵素變化。

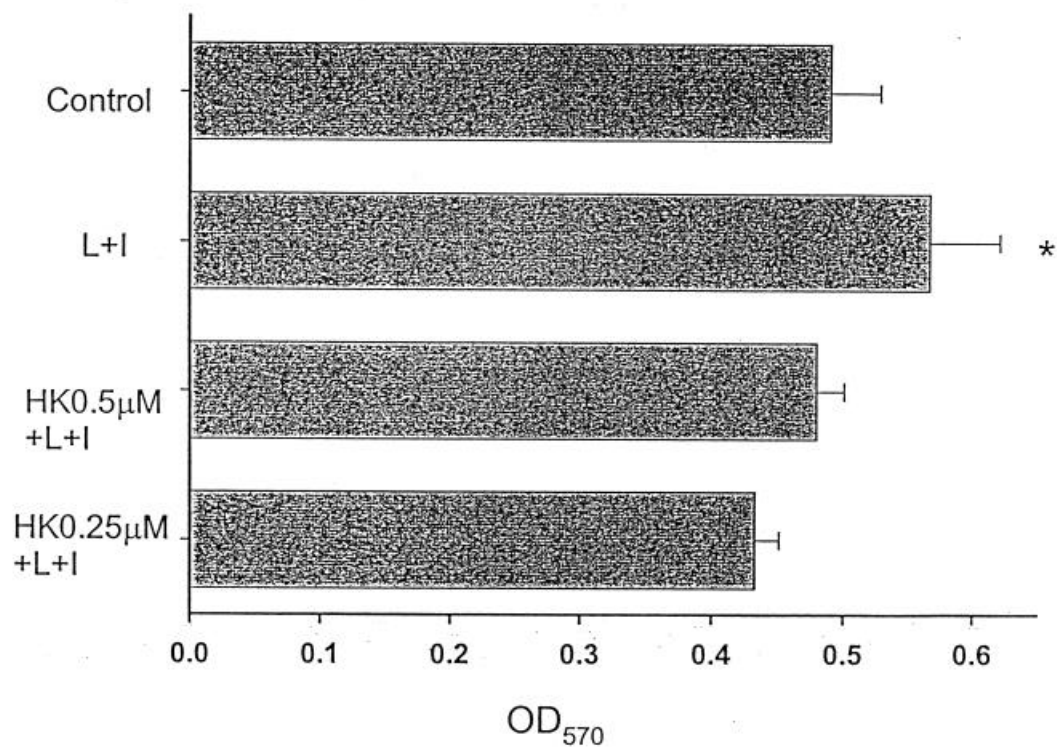


圖 6. 內毒素合併干擾素處理的腎小球環間膜細胞之細胞增生情形。腎小球環間膜細胞以內毒素(LPS, 10 µg/ml)合併干擾素(IFN γ , 100 U/ml)處理 24 小時，或同時給予厚朴酚(HK, 0.25 及 0.5µM)處理，以觀察細胞增生情形。*：P<0.05：與對照組比較；**：P<0.05：與 LPS+IFN γ 組比較。