

計畫編號：CCMP88-RD-014

行政院衛生署八十八年度科技研究發展計畫

紫雲膏中抗炎成份 naphthoquinones 類對中  
性白血球 NADPH oxidase 活性的影響

委託研究報告

計畫委託機關：行政院國軍退除役官兵輔導委員會

台中榮民總醫院

計畫主持人：王繼平

研究人員：曹羅悌 阮淑玲

執行期間：87年7月1日至88年6月30日

\*\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見\*\*

計畫編號：CCMP88-RD-014

各機關研究計畫基本資料庫之計畫編號：PG88BO-0051

行政院衛生署八十八年度科技研究發展計畫

紫雲膏中抗炎成份 naphthoquinones 類對中  
性白血球 NADPH oxidase 活性的影響

委託研究報告

計畫委託機關：行政院國軍退除役官兵輔導委員會

台中榮民總醫院

計畫主持人：王繼平

研究人員：曹羅悌 阮淑玲

執行期間：87年7月1日至88年6月30日

編號：CCMP88-RD-014

行政院衛生署中醫藥委員會八十八年度  
委託研究計畫成果報告

紫雲膏中抗發炎成份 naphthoquinones 類對中性  
白血球 NADPH oxidase 活性的影響

執行機構：行政院國軍退除役官兵輔導委員會  
台中榮民總醫院

計畫主持人：王繼平

研究人員：曹羅悌，阮淑玲

執行期限：87年7月1日至88年6月30日

\*\* 本研究報告僅供參考，不代表本會意見 \*\*

# 目錄

	頁數
中文摘要	1
英文摘要	2
前言	3
材料及方法	4
結果	6
討論	7
參考文獻	8
圖一	12
圖二	13
圖三	13
圖四	14
圖五	14
圖六	15
圖七	15
圖八	16
表一	16
表二	16

編號：CCMP88-RD-014

# 紫雲膏中抗發炎成份 naphthoquinones 類對 中性白血球 NADPH oxidase 活性的影響

王繼平

行政院國軍退除役官兵輔導委員會  
台中榮民總醫院

## 摘要

在非完整細胞系統中，將 arachidonate (AA) 或 acetylshikonin (Ace) 加入細胞質與細胞膜分割的混合液中，可引起濃度依存性的增加超氧自由基的生成。在 superoxide dismutase (SOD) 存在下或混合液中不補充 NADPH，均可減低生成超氧自由基的能力。在混合液中加入 diphenylene iodonium 或 *p*-chloromercuribenzoic acid (PCMB) 也會抑制 Ace 生成超氧自由基的作用，而 staurosporine 則不影響 Ace 的反應。將混合液中的細胞質分割除去或以 46°C 加熱後的細胞質分割取代正常的細胞質分割，也可顯著的減低 Ace 生成超氧自由基的能力。Ace 可刺激  $p47^{phox}$  的膜轉移作用。依序或同時加入 AA 及 Ace 可增強對 NADPH oxidase 的活化作用。在從 phorbol 12-myristate 13-acetate 活化的中性白血球細胞膜上，分離出來的 flavoprotein 製備液中，加入 Ace 可引起隨濃度的增加來增強 NADPH 依存的 cytochrome *c* 還原作用。此時 PCMB 而非 SOD 可抑制 Ace 促進 cytochrome *c* 還原的作用。另外 flavoprotein 在 NADPH 不存在下，受 Ace 作用引起的 cytochrome *c* 還原，也會被 PCMB 抑制。在 semi-recombinant 系統中加入 Ace，也會引起超氧自由基的生成。以上的結果顯示 Ace 在非完整細胞系統及 semi-recombinant 系統中引起超氧自由基生成的作用，來自於促進具活性的 NADPH oxidase 複合物組成。同時 Ace 也有增進了電子傳遞到 FAD 氧化還原中樞的作用。

關鍵詞：中性白血球，acetylshikonin，NADPH oxidase，超氧自由基

**Effect of naphthoquinones, the anti-inflammatory ingredients of tzu-yun-kao, on the NADPH oxidase activity of neutrophils**

**Jih-Pyang Wang**

**Taichung Veterans General Hospital  
Veterans Affairs Commission  
Executive Yuan**

**ABSTRACT**

In cell-free system (CFS), addition of anionic amphiphile into the plasma membrane and cytosol mixture evokes  $O_2^-$  generation. In this study, effects of acetylshikonin (Ace) on CFS activation of NADPH oxidase was examined. ACE, like arachidonate (AA), stimulation of  $O_2^-$  generation in a concentration-dependent manner. In the presence of superoxide dismutase (SOD) or without supplement of NADPH to the assay mixture, the  $O_2^-$  generation induced by ACE was decrease. Pretreatment of diphenylene iodonium or *p*-chloromercuribenzoic acid (PCMB) greatly reduced the  $O_2^-$  generation caused by Ace, whilst staurosporine had no inhibitory effect. Deletion of cytosol fraction from CFS eliminated the ability of Ace to activate  $O_2^-$  generation. Ace stimulation of  $O_2^-$  generation was also reduced when 46°C heated cytosol replaced the normal cytosol fraction in a CFS. Ace stimulated the p47<sup>phox</sup> membrane translocation. Sequential or simultaneous addition of AA and Ace greatly enhanced the activation of NADPH oxidase. Ace concentration-dependently enhanced the NADPH-dependent cytochrome *c* reduction of the resolved flavoprotein from phorbol 12-myristate 13-acetate-treated neutrophils. Exposure of the resolved flavoprotein to PCMB but not to SOD resulted the inhibition of Ace enhancement of cytochrome *c* reduction. Moreover, the resolved flavoprotein proceeded to reduction of cytochrome *c* in response to Ace in the absence of NADPH, and this effect was inhibited by PCMB. These results suggest that the stimulation of generation by Ace in cell-free and semi-recombinant systems is attributable to the assembly of a functional NADPH oxidase complex and also to the enhancement of electron transfer and reduction of FAD redox center of oxidase.

Keywords : neutrophil , acetylshikonin, NADPH oxidase, superoxide anion

## 壹、前言

中性白血球為一種重要的發炎細胞，其主要的生理功能在殺死及消化侵入的病原菌以達到保護個體的目的。為了要執行這個任務，中性白血球具有趨化作用、吞噬作用、釋放分泌顆粒消化吞噬的病原菌作用、及產生有毒的含氧代謝產物[1, 2]。許多發炎媒介物會刺激中性白血球產生有毒的含氧代謝產物，這些含氧代謝產物包括超氧自由基、過氧化氫、氫氧自由基及次氯酸等[3, 4]。一般認為這些含氧代謝產物在殺死侵入的病原菌上扮演重要角色。因為中性白血球產生含氧代謝產物的功能如果不足，會引起嚴重的病菌感染[5]。但是中性白血球產生含氧代謝產物的功能如果過盛，過多的有毒的含氧代謝產物，也會傷害到周圍的正常組織引起發炎的反應。這種情況可能發生在肺氣腫、腎絲球炎、類風濕性關節炎、和缺血再灌流引起的組織損傷等疾病有關[6-8]。藥物如能適當的調節中性白血球產生有毒含氧代謝產物的功能，有助於增加個體對病菌的抵抗能力，並減少疾病的產生。

中性白血球在受刺激活化產生有毒含氧代謝產物時，其細胞內的訊息傳遞複雜，目前了解有限。已知當細胞受到經由激活細胞膜上接受器的刺激物作用時，會活化 G 蛋白質，進而活化 phospholipase C 生成 inositol trisphosphate 及 diacylglycerol，來分別增加細胞內的游離鈣離子及活化 protein kinase C [9, 10]。此訊息傳遞步驟與活化中性白血球的 NADPH oxidase 複合體，以及生成超氧自由基有關[11]。另外也有報告顯示細胞內的 phospholipase D、tyrosine kinase、mitogen-activated protein kinase、及 phosphatidylinositol 3-kinase 的活性增加與中性白血球 NADPH oxidase 複合體的組合和活化，以及超氧自由基的生成有關[12-14]。在引起 NADPH oxidase 活化的過程裏，位於細胞質中的 oxidase 組成因子 p47<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup>、及 Rac 會轉移至細胞膜上與 cytochrome b<sub>558</sub> 結合，形成一個具有活性的 NADPH oxidase 複合體。此時在 NADPH 存在下，可對氧分子進行單一電子的還原，產生超氧自由基[15]。

紫雲膏用於治療燒傷、凍瘡及痔瘡等疾病。可促進組織肉芽的生長及防止皮膚潰爛。紫雲膏含等量的當歸和紫草。其中紫草就具有抗炎和促進創傷癒合的作用[16]。Acetylshikonin (Ace)為紫草中的重要成份，已知具有解熱、鎮痛、抗血小板凝集、及抑制 DNA topoisomerase 的活性[17-19]。近來我們發現 Ace 在活體動物有抗發炎媒介物引起皮膚血管通透性增大和抑制浮腫等抗發炎作用，在離體中性白血球的實驗裏，可抑制超氧自由基的生成[20,21]。同時 Ace 也有促進組織肉芽

增生的作用，所以 Ace 應該是紫雲膏療效的主要成份。本實驗在進一步探討紫雲膏主成份 Ace 對中性白血球 NADPH oxidase 複合體形成及活性的影響。

## 貳、材料與方法

### 一、材料

新製造及存放一年期的紫雲膏均購自順天堂(台北市)。Acetylshikonin 由中國醫藥學院郭盛助教授提供。Hanks' balanced salt solution 購自 Gibco Life Technologies (Gaithersburg, USA), diphenylene iodonium 購自 RBI (Natick, USA), anti-p47<sup>phox</sup> polyclonal antibody 購自 Transduction (Lexington, USA), 含 p47<sup>phox</sup> cDNA 之 pGEX-4T-1 plasmid、p67<sup>phox</sup> cDNA 之 pGEX-1 $\lambda$ T plasmid 及 Rac2 cDNA 之 pGEX-4T-3 plasmid 由 Dr. Ulla G. Knaus (The Scripps Research Institute, La Jolla, USA) 贈予。其餘藥品購自 Sigma (St. Louis, USA)。

### 二、中性白血球的製備

大鼠(Sprague Dawley, 300-350 g)經麻醉後，在抗凝劑 EDTA 的存在下，從腹動脈抽血。血液與 dextran 混合靜置，以沉澱紅血球。取上層液經 Ficoll-Hypaque 離心，並以低張溶液除去殘留的紅血球[22]。將細胞清洗並懸浮於 Hanks' balanced salt solution 含 10 mM HEPES, pH7.4, 4 mM NaHCO<sub>3</sub> (HBSS) 中成  $1 \times 10^7$  細胞每毫升，置放冰浴中待用。

### 三、分離中性白血球次細胞分劃

中性白血球在經 2.5 mM diisopropyl fluorophosphate 處理後，於 Tris buffer (0.34 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH 7.0, 10 mM benzamidine, 2 mM PMSF) 中以超音波震碎。經 48,000 g 離心後將上清液(細胞質分劃)及沉澱物(細胞膜分劃)分別收集，置於 -70°C 冰箱中待用[23]。分離 flavoprotein 的製備，將中性白血球與 1 $\mu$ g/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 在 HBSS 含 1 mM NaN<sub>3</sub> 溶液中反應後，以超音波震碎。利用 bile salt 抽取法將 flavoprotein 與 cytochrome b 分離[24]，置於 -70°C 冰箱中待用[24]。

### 四、超氧自由基的測量

在中性白血球細胞懸浮液中生成的超氧自由基，利用分光光譜儀在 550 nm 波長偵測 superoxide dismutase (SOD) 可抑制的 ferricytochrome c 還原吸光度變化[22]。在非完整細胞系統中生成的超氧自由基測量，為將細



胞質與細胞膜分割混合於 assay buffer (0.17 M sucrose, 2 mM NaN<sub>3</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 65 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH, pH 7.0) 含 10 μM FAD, 3 μM GTPγS, 0.25 mg/ml cytochrome *c*, 及 50 μM NADPH。對照組多加 6.7 μg/ml SOD, 並利用分光光譜儀在 550 nm 波長偵測 SOD 可抑制的 ferricytochrome *c* 還原吸光度變化[25]。

#### 五、測量 iodonitrotetrazolium violet (INT) 還原

細胞膜分割溶於 solubilization buffer (1 mM NaN<sub>3</sub>, 1.7 μM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM glycine, pH 8.0, 50% glycerol and 1% n-octyl-β-D-glucopyranoside), 經 350,000 g 離心取上清液。反應液含 6.7 μg/ml SOD, 3.3 μg/ml GTPγS, 10 μM FAD, 53 μM INT 及細胞質與細胞膜分割, 在加入 0.1 mM NADPH 引起反應。利用分光光譜儀在 500 nm 偵測吸光度變化[26]。

#### 六、免疫分析

細胞質膜分割經 100,000 g 離心, 除去沉澱物。反應液含細胞質與細胞膜分割, 10 μM GTPγS, 20 μM PMSF, 0.17 M sucrose, 2 mM NaN<sub>3</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA 及 15 μg/ml leupeptin 在 65 mM phosphate buffer, pH 7.0。反應十分鐘後, 將反應液置於 30% sucrose 液層上, 以 200,000 g 離心。沉澱物經 10% SDS-PAGE 展開分離, 並以 anti-p47<sup>phox</sup> 抗體作免疫偵測[25]。

#### 七、分離 flavoprotein 的還原測量

分離的 flavoprotein 置於 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 含 10 μM FAD, 及 0.25 mg/ml cytochrome *c*, 反應在加入 0.25 mM NADPH 開始。利用分光光譜儀偵測 cytochrome *c* 還原的吸光度變化。

#### 八、製備 recombinant p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> 及 Rac2

培養含 p47<sup>phox</sup> cDNA 之 pGEX-4T-1 plasmid、p67<sup>phox</sup> cDNA 之 pGEX-1λT plasmid 或 Rac2 cDNA 之 pGEX-4T-3 plasmid 的 *Escherichia coli*。將 glutathion-S-transferase (GST) 結合的蛋白質以 GSH-agarose 分離。利用 thrombin 將 recombinant p47<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup> 或 Rac2 與 GST 分開, 並通過 CM-Sepharose column 純化[27]。

#### 九、統計分析

統計分析部分, 將數據經 ANOVA 分析後, 再經 Bonferroni *t*-test 分析以判別是否為有意義的差異。P 值小於 0.05 視為有顯著意義的差別。實驗數據以 means ± s.e.mean 表示。

## 參、結果

在中性白血球懸浮液中加入新製造或存放一年期的紫雲膏 DMSO 溶液，可見濃度依存性的抑制 fMLP 引起的超氧自由基生成，但是對 PMA 引起的超氧自由基生成有促進的作用(圖一)。

在非完整細胞系統中 Ace 如同 AA 一樣，可以濃度依存性的引起超氧自由基的生成(圖二)。但 Ace 引起作用的反應速率要較 AA 產生的作用來得快。在 NADPH 不存在下，Ace 和 AA 引起超氧自由基生成的作用明顯的被抑制(圖三)。在兩種 NADPH oxidase 抑制劑 DPI 及 PCMB [28, 29] 存在下，可見顯著的抑制 Ace 和 AA 引起超氧自由基生成的作用(圖四)。但是 protein kinase 的抑制劑 staurosporine [30]，在使用可完全抑制 PMA 刺激中性白血球生成超氧自由基的濃度下，對 Ace 和 AA 在非完整細胞系統中引起超氧自由基生成均不影響。

在非完整細胞系統中除去細胞質分劃，則 Ace 和 AA 都無法引起超氧自由基生成(圖五)。如以經 46°C 加熱後的細胞質取代非完整細胞系統中的正常細胞質，可見明顯的減低了 Ace 和 AA 引起超氧自由基生成的能力。同時此種經 46°C 加熱後的細胞質，在參與非完整細胞系統中受 Ace 和 AA 刺激引起 INT 還原的反應中，也僅能部份取代正常細胞質的功能(表一)。

以免疫分析法偵測 p47<sup>phox</sup> 的膜轉移。在非完整細胞系統中加入 100 μM AA 可見有明顯的 p47<sup>phox</sup> 的膜轉移。而加入 3 μM Ace 到非完整細胞系統中，也會引起 p47<sup>phox</sup> 的膜轉移(圖六)。在細胞膜分化不存在的非完整細胞系統，看不到 p47<sup>phox</sup> 的膜轉移。

在非完整細胞系統中加入低濃的 AA (10 μM) 或 Ace (0.3 μM)，不會引起明顯超氧自由基的生成。但同時加入 10 μM AA 和 0.3 μM Ace 可顯著的增加超氧自由基的生成。並且依序在非完整細胞系統中加入 10 μM AA 和 3 μM Ace 或 0.3 μM Ace 和 30 μM AA 可較分別單獨使用 3 μM Ace 或 30 μM AA 產生超氧自由基的作用來得大(圖七)。

細胞膜分劃經 bile salt 萃取，可得分離 flavoprotein。從 PMA 活化的中性白血球細胞膜分劃獲得的分離 flavoprotein，在 SOD 存在下具有將電子從 NADPH 傳遞到 cytochrome c 上的功能。Ace 可濃度依存性的促進此反應(數據未顯示)，而 PCMB 可抑制此促進作用(圖八)。在 NADPH 不存在下，Ace 本身也能引起 cytochrome c 的還原。從未受刺激細胞得到的分離 flavoprotein，NADPH 並不會引起 cytochrome c 的還原。在 NADPH 不存在下，Ace 本身也不會引起 cytochrome c 的還原。但是在 NADPH 存在下，Ace

會引起 cytochrome *c* 的還原。

將細胞膜分割(約 17  $\mu\text{g}$  protein)與 rp47<sup>phox</sup>、rp67<sup>phox</sup> 及 rRac2 (分別為 7.2, 12, 5.7  $\mu\text{g}$  protein) 混合形成 semi-recombinant 系統。在 FAD、GTP $\gamma$ S、cytochrome *c* 及 NADPH 的存在下,加入 10  $\mu\text{M}$  Ace 及 100  $\mu\text{M}$  AA 至 300  $\mu\text{l}$  的反應液中,均可有意義的 ( $P < 0.05$ ) 促進超氧自由基的生成(表二)。

## 肆、討論

在中性白血球懸浮液中加入紫雲膏 DMSO 淬取溶液,可見濃度依存性的抑制 fMLP,但促進 PMA 引起的超氧自由基生成。此抑制 fMLP 反應的結果與紫草成份 Ace 在中性白血球懸浮液中的反應性質相同[21]。新製造或存放一年期的紫雲膏對於中性白血球懸浮液生成超氧自由基的作用活性,並無差異。表示活性並未改變,因此無須再進一步探討活性成份是否在存放一年期的紫雲膏中有變化。

在非完整細胞系統中,AA 和 Ace 均可引起超氧自由基的生成。由於在細胞質分割不存在的非完整細胞系統中,Ace 並不能引起超氧自由基的生成。而且兩種化學結構不同的 NADPH oxidase 抑制劑 DPI 及 PCMB [28, 29] 可明顯的抑制 Ace 引起超氧自由基生成作用,顯示 Ace 應該是經由活化非完整細胞系統中的 NADPH oxidase,而非自身的氧化還原反應產生的超氧自由基。

過去有報告指出,在非完整細胞系統中,AA 並不會活化蛋白質的磷酸化,所以 protein kinase 抑制劑並不能影響 AA 活化 NADPH oxidase 的作用[31]。磷酸化和 AA 可能引起 p47<sup>phox</sup> 產生相同的立體結構變化,可能是暴露出 p47<sup>phox</sup> 的 SH3 部,或改變 p47<sup>phox</sup> 使容易與細胞膜結合[32, 33]。由於 staurosporine 不能抑制 Ace 在非完整細胞系統中引起超氧自由基生成作用,顯示 Ace 引起的反應也不須要經由 protein kinase 的活化。

已知細胞質中的 oxidase 因子,其中 p67<sup>phox</sup> 在促進電子從 NADPH 傳遞到 FAD,而 p47<sup>phox</sup> 在促進電子從 FAD 傳遞到 heme [34]。而細胞膜上的 cytochrome *b*<sub>558</sub>, 本身具有產生超氧自由基所須要的氧化還原中心。細胞質經 46°C 加熱後,會破壞其中的 p67<sup>phox</sup> [35]。以加熱後的細胞質取代正常的細胞質,可抑制 Ace 引起超氧自由基的生成及 INT 還原的反應。而且 Ace 可引起 p47<sup>phox</sup> 的膜轉移。顯示 Ace 活化非完整細胞系統,是經由促進組合具有活性的 NADPH oxidase。

由於 Ace 與 AA 在非完整細胞系統中,引起超氧自由基生成作用速率

不同，而且可互相增強彼此的作用，可能兩者有不同的作用機制。Ace 可以濃度依存性的促進 NADPH 還原 cytochrome *c* 的作用，而 AA 無此作用。PCMB 可抑制 Ace 的作用。顯示 Ace 可能有促進電子傳遞到 FAD 氧化還原中樞的功能。

在細胞膜分劃與 rp47<sup>phox</sup>、rp67<sup>phox</sup> 及 rRac2 組合的 semi-recombinant 系統中，加入 Ace 或 AA 均可有意義的引起超氧自由基的生成。進一步證實 Ace 有促進組合活性 NADPH oxidase 複合體的能力。

Ace 對 fMLP 刺激完整中性白血球生成超氧自由基，有抑制的作用。但在分離的 NADPH oxidase 複合體有促生成超氧自由基的作用。此種不一致的結果，可能來自於兩種實驗模式不同的特性。刺激完整中性白血球生成超氧自由基的實驗模式，較接近生理狀態。Ace 抑制此實驗模式，可能與影響 NADPH oxidase 複合體活化過程的細胞內訊息傳遞有關 [21]。而分離 NADPH oxidase 複合體的實驗模式，雖然單純化了實驗，但也破壞了正常的活化機制。所以在此兩種不同的實驗模式中，可能出現不同的結果是可以理解的。

## 伍、結論與建議

由過去的實驗結果[20,21]，已可證明紫雲膏中主紫草成份 acetylshikonin 的抗發炎作用。紫雲膏放置一年，並不影響其對中性白血球活性作用。紫雲膏中的主要成份 acetylshikonin 在中性白血球的非完整細胞系統及 semi-recombinant 系統中，均可促進組合具有活性的 NADPH oxidase，並生成超氧自由基。Acetylshikonin 也有促進 FAD 氧化還原中樞電子傳遞的功能。

## 陸、參考文獻

1. Baggiolini M, Deward B. The neutrophil. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985, 76 Suppl. 1:13-20.
2. Borregaard N. The human neutrophil. Function and dysfunction. *Eur J Haematol* 1988, 41:401-413.
3. Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *New Engl J Med* 1978, 298:659-668.
4. Tauber AI, Babior BM. Neutrophil oxygen reduction: the enzymes and the

- products. *Free Radic Biol Med* 1985, 1:265-307.
5. Smith RM, Curnutte JT. Molecular basis of chronic granulomatous disease. *Blood* 1991, 77:673-686.
  6. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990, 186:1-85.
  7. Sibille Y, Reynolds HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis* 1990, 141:471-501.
  8. Lefer AM, Araki H, Okamoto S. Beneficial actions of a free radical scavenger in traumatic shock and myocardial ischemia. *Cir Shock* 1981, 8:273-282.
  9. Di Virgilio F, Vicentini LM, Treves S, Riz G, Pozzan T. Inositol phosphate formation in fMet-Leu-Phe-stimulated human neutrophils does not require an increase in the cytosolic free  $Ca^{2+}$  concentration. *Biochem J* 1985, 229:361-367.
  10. Rossi F. The  $O_2^-$ -forming NADPH oxidase of the phagocytosis: nature, mechanisms of action and function. *Biochim Biophys Acta* 1986, 853:65-89.
  11. Della Bianca V, Grzeskowiak M, Cassatella MA, Zeni L, Rossi F. Phorbol 12-myristate 13-acetate potentiates the respiratory burst while inhibits phosphoinositide hydrolysis and calcium mobilization by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1986, 135:556-565.
  12. Kessels GCR, Krause KH, Verhoeven AJ. Protein kinase C activity is not involved in N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine-induced phospholipase D activation in human neutrophils, but is essential for concomitant NADPH oxidase activation: studies with a staurosporine analogue with improved selectivity for protein kinase C. *Biochem J* 1993, 292:781-785.
  13. Yasui K, Yamazaki M, Miyabayashi M, Tsuno T, Komiyama A. Signal transduction pathway in human polymorphonuclear leukocytes for chemotaxis induced by a chemotactic factor: distinct from the pathway for superoxide anion production. *J Immunol* 1994, 152:5922-5929.
  14. Okada T, Sakuma L, Fukui Y, Hazeki O, Ui M. Blockage of chemotactic

- peptide-induced stimulation of neutrophils by wortmannin as a result of selective inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 1994, 269:3563-3567.
15. Segal AW, Abo A. The biochemical basis of NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biochem Sci* 1993, 18:43-47.
  16. 張蘭昌. 中藥大辭典 第四冊 1981, 12 之 103-111 頁
  17. Motohide H. Pharmacological studies on crude plant drugs. Shikon and Tooki. (II). Shikonin and acetylshikonin. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1977, 74:193-203.
  18. Chang YS, Kuo SC, Weng SH, Jan SC, Ko FN, Teng CM. Inhibition of platelet aggregation by shikonin derivatives isolated from *Arnebia euchroma*. *Planta Med.* 1993, 59, 401-404.
  19. Ahn BZ, Baik KU, Kweon GR, Lim K, Hwang BD. Acetylshionin analogues: synthesis and inhibition of DNA topoisomerase-I. *J Med Chem* 1995, 38:1044-1047.
  20. Wang JP, Raung SL, Chang LC, Kuo SC. Inhibition of hind-paw edema and cutaneous vascular plasma extravasation in mice by acetylshikonin. *Eur J Pharmacol* 1995, 272:87-95.
  21. Wang JP, Tsao LT, Raung SL, Hsu MF, Kuo SC. Investigation of the inhibition by acetylshikonin of the respiratory burst in rat neutrophils. *Br J Pharmacol* 1997, 121:409-416.
  22. Wang JP, Raung SL, Kuo YH, Teng CM. Daphnoretin-induced respiratory burst in rat neutrophils is, probably mainly through protein kinase C activation. *Eur J Pharmacol* 1995, 288:341-348.
  23. Bellavite P, Serra MC, Davoli A, Bannister JV, Rossi F. The NADPH oxidase of guinea pig polymorphonuclear leukocytes. Properties of the deoxycholate extracted enzyme. *Mol Cell Biochem* 1983, 52:17-25.
  24. Gabig TG. The NADPH-dependent  $O_2^-$ -generating oxidase from human neutrophils. *J Biol Chem* 1983, 258:6352-6356.
  25. Wang JP, Tsao LT, Raung SL, Hsu MF, Kuo SC. Inhibition by HAJ11 of respiratory burst in neutrophils and the involvement of protein tyrosine phosphorylation and phospholipase D activation. *Br J Pharmacol* 1997,

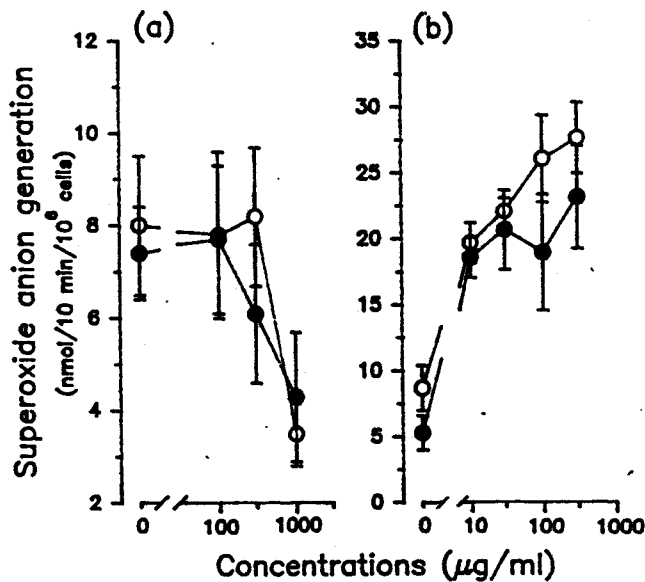
120:79-87.

26. Cross AR, Yarchover JL, Curnutte JT. The superoxide-generating system of human neutrophils possesses a novel diaphorase activity. Evidence for distinct regulation of electron flow within NADPH oxidase by p67phox and p47phox. *J Biol Chem* 1994, 269:21448-21454.
27. Knaus UG, Heyworth PG, Kinsella BT, Curnutte JT, Bokoch GM. Purification and characterization of Rac 2. A cytosolic GTP-binding protein that regulates human neutrophil NADPH oxidase. *J Biol Chem* 1992, 267:23575-23582.
28. Cross AR, Jones OTG. The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. Specific labeling of a component polypeptide of the oxidase. *Biochem J* 1986, 237:111-116.
29. Bellavite P, Corso F, Dusi S, Grzeskowiak M, Della Bianca V, Rossi F. Activation of NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane extracts of pig neutrophils by phosphatidic acid. *J Biol Chem* 1988, 263:8210-8214.
30. Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M, Tomita F. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca<sup>++</sup> dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1986, 135:397-402.
31. Uhlinger DJ, Burnham DN, Lambeth JD. Nucleoside triphosphate requirements for superoxide generation and phosphorylation in a cell-free system from human neutrophils. Sodium dodecyl sulfate and diacylglycerol activate independently of protein kinase C. *J Biol Chem* 1991, 266:20990-20997.
32. Sumimoto H, Kage Y, Nuno H, Sasaki H, Nose T, Fukumaki Y, Ohno M, Minakami S, Takeshige K. Role of Src homology 3 domains in assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:5345-5349.
33. Park JW, Ahn SM. Translocation of recombinant p47phox cytosolic component of the phagocyte oxidase by in vitro phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 1995, 211:410-416.
34. Cross AR, Curnutte JT. The cytosolic activating factors p47phox and p67phox have distinct roles in the regulation of electron flow in NADPH

oxidase. J Biol Chem 1995, 270:6543-6548.

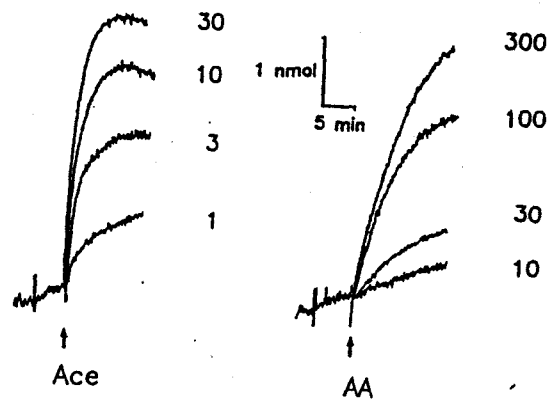
35. Erickson RW, Malawista SE, Garrett MC, Van Blaricom G, Leto TL, Curnutte JT. Identification of a thermolabile component of the human neutrophil NADPH oxidase. A model for chronic granulomatous disease caused by deficiency of the p67-phox cytosolic component. J Clin Invest 1992, 89:1587-1595.

柒、圖、表

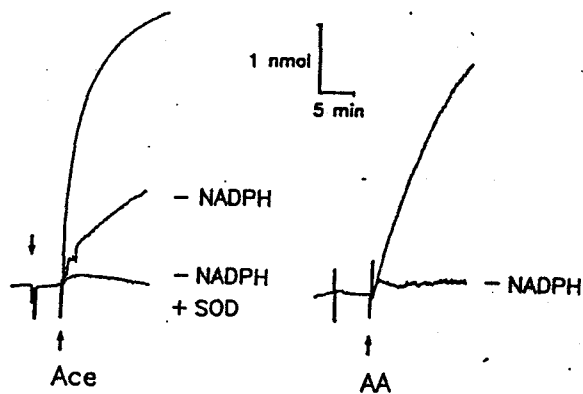


圖一 新製造及存放一年期的紫雲膏對中性白血球生成超氧自由基的影響。中性白血球懸浮液與溶於 DMSO 不同濃度的新製造(●)或存放一年期(○)的紫雲膏溶液共浴三分鐘後加入 (a) 0.3 μM fMLP 和 5 μg/ml CB 或 (b) 0.3 nM PMA 反應。測量超氧自由基的生成。

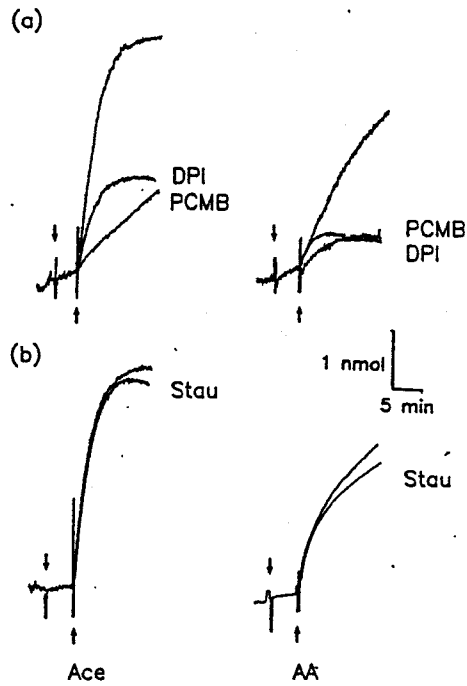




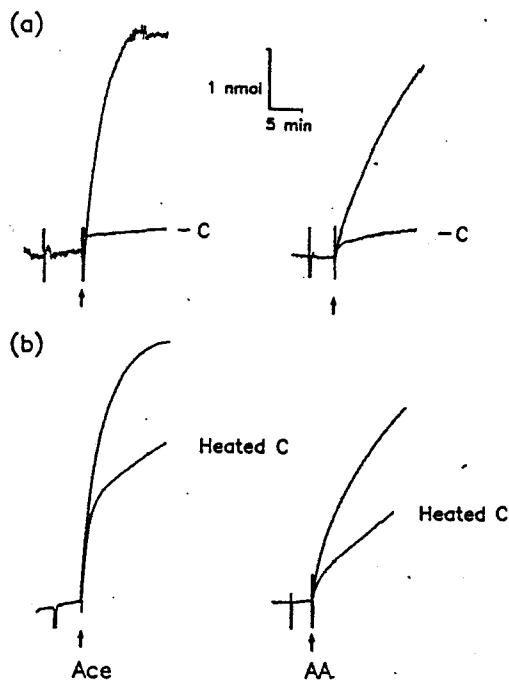
圖二 在非完整細胞系統中 Ace 與 AA 生成超氧自由基的濃度依存性作用。在含細胞質與細胞膜的反應液中加入不同濃度的 Ace 與 AA，測量超氧自由基的生成。



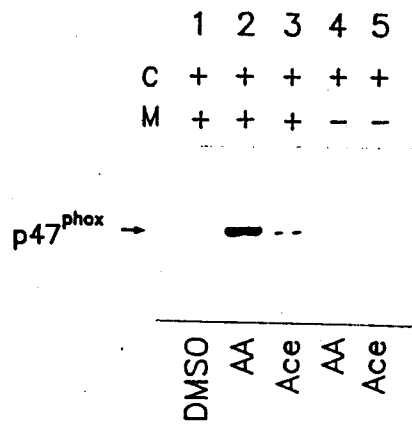
圖三 NADPH 對 Ace 與 AA 在非完整細胞系統中生成超氧自由基的影響。在含細胞質與細胞膜的反應液中加入或不加入 50 μM NADPH 或 6.7 μg/ml SOD，測量 10 μM Ace 與 100 μM AA 生成超氧自由基。



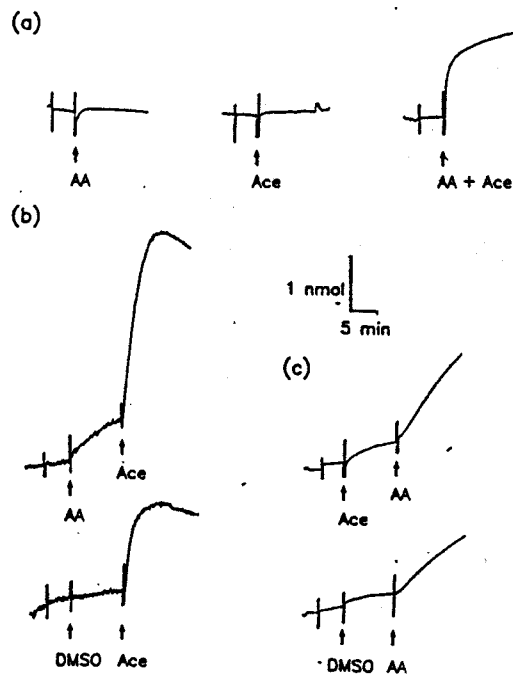
圖四 DPI、PCMB 及 staurosporine 對 Ace 與 AA 在非完整細胞系統中生成超氧自由基的影響。在含細胞質與細胞膜的反應液中加入或不加入  $3 \mu\text{M}$  DPI、 $12.5 \mu\text{M}$  PCMB 或  $1 \mu\text{M}$  staurosporine (Stau)，測量  $10 \mu\text{M}$  Ace 與  $100 \mu\text{M}$  AA 生成超氧自由基。



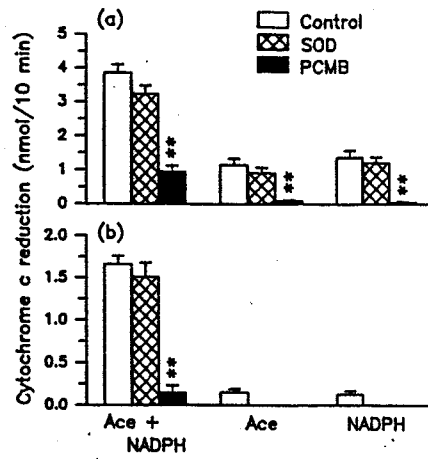
圖五 細胞質經  $46^\circ\text{C}$  加熱後對 Ace 與 AA 在非完整細胞系統中生成超氧自由基的影響。細胞膜在含或不含正常細胞質或以  $46^\circ\text{C}$  加熱後的細胞質取代的反應液中，測量  $10 \mu\text{M}$  Ace 與  $100 \mu\text{M}$  AA 生成超氧自由基。



圖六 非完整細胞系統中 Ace 與 AA 引起 p47<sup>phox</sup> 的膜轉移。細胞質分割在細胞膜分割存在 (lanes 1-3) 或不存在 (lanes 4-5) 的情況下與 3  $\mu$ M Ace 與 100  $\mu$ M AA 反應十分鐘。將沉澱的細胞膜部分以 SDS-PAGE 展開，並加入 anti-p47<sup>phox</sup> 抗體作免疫分析。



圖七 在非完整細胞系統中依次或同時加入 Ace 與 AA 對生成超氧自由基的影響。在含細胞質與細胞膜的反應液中 (a) 加入 10  $\mu$ M AA, 0.3  $\mu$ M Ace 10  $\mu$ M AA plus 0.3  $\mu$ M Ace, 或 (b) 依次加入 10  $\mu$ M AA 和 3  $\mu$ M Ace, 或 (c) 依次加入 0.3  $\mu$ M Ace 和 30  $\mu$ M AA, 測量生成超氧自由基。



圖八 SOD及PCMB對分離flavoprotein還原cytochrome c的影響。從(a)PMA活化的或(b)未刺激的細胞得到的分離flavoprotein，在與10  $\mu\text{g/ml}$  SOD 或100  $\mu\text{M}$  PCMB 共浴後，加入0.2 mM NADPH 及3  $\mu\text{M}$  Ace，測量cytochrome c 還原。

表一 細胞質經46°C加熱後對Ace與AA在非完整細胞系統中還原INT的影響。

Condition	INT reduction (nmol per 15 min)	
	Acetylshikonin	AA
Normal cytosol	3.75 $\pm$ 0.11	1.58 $\pm$ 0.04
46°C heated cytosol	1.82 $\pm$ 0.13*	0.78 $\pm$ 0.10*

表二 Ace與AA在semi-recombinant系統中生成超氧自由基的作用。

	$\text{O}_2^{\cdot-}$ generation (nmol/10 min)	
	Acetylshikonin	Arachidonate
Buffer	0.09 $\pm$ 0.06	0.05 $\pm$ 0.08
Membrane	0.12 $\pm$ 0.07	0.61 $\pm$ 0.08
Membrane + rp47 <sup>phox</sup> , rp67 <sup>phox</sup> , rRac2	0.74 $\pm$ 0.04*	1.25 $\pm$ 0.06*