

## 以啟動子轉殖細胞株篩檢調節免疫力之中藥的模式建立

趙文婉<sup>1</sup> 郭悅雄<sup>2,3</sup> 林璧鳳<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 台灣大學生化科技學系暨微生物與生化學研究所營養科學組

<sup>2</sup> 台灣大學化學系暨研究所

<sup>3</sup> 中國醫藥大學藥學院

(接受刊載日期: 中華民國九十六年五月十四日)

本研究目的欲以系統性之篩選模式篩選具有調節免疫反應之中草藥。利用NF- $\kappa$ B與Luciferase報導基因結合所建構之質體，短暫轉染 (transient transfection) 至RAW264.7巨噬細胞株，進行抗發炎與免疫調節相關中草藥的快速篩選，並探討對促發炎介質IL-6、TNF- $\alpha$ 、NO、PGE<sub>2</sub>等分泌量的影響。結果顯示22種中草藥材之乙醇萃取物經hexane, ethyl acetate (EtOAc) 和water分配萃取所得之各區分物，其中以EtOAc層區分物對抑制NF- $\kappa$ B Luciferase活性最顯著，尤以桑寄生、當歸在LPS/IFN- $\gamma$ 刺激下顯著抑制NF- $\kappa$ B Luciferase活性 ( $p < 0.05$ )。白花蛇舌草EtOAc萃取區分物可顯著抑制IL-6分泌量。桑寄生、紅棗hexane萃取區分物和當歸、穿心蓮EtOAc萃取區分物可顯著抑制NO之分泌量。且杜仲葉、桑寄生、紅棗hexane萃取區分物和當歸、紅棗、甘草、黃耆、桑寄生、女貞子、穿心蓮、板藍根EtOAc萃取區分物可顯著抑制PGE<sub>2</sub>之分泌。因此，桑寄生、當歸、穿心蓮、板藍根、白花蛇舌草等中草藥材區分物可能含有具有抗發炎和調節免疫成份，值得更進一步探討。

**關鍵字:** 短暫轉染, NF- $\kappa$ B, RAW 264.7巨噬細胞株, 中草藥材。

## Construction of Promoters Based Immunity Screening System and its Application on the Study of Traditional Chinese Medicine Herbs

Wen-Wan Chao<sup>1</sup>, Yueh-Hsiung Kuo<sup>2,3</sup> and Bi-Fong Lin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemical Science and Technology, Institute of Microbiology and Biochemistry, College of Life Science, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

<sup>2</sup>Department of Chemistry, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

<sup>3</sup>Tsuzuki Institute for Traditional Medicine, College of Pharmacy, China Medical University, Taichung, Taiwan

(Accepted for publication: May 14, 2007)

The purpose of this study is to establish a screening system for traditional Chinese medicine herbs, which may exert regulatory effects on immune and inflammatory responses. The scheme for the screening system is to transiently transfect reporter gene luciferase with 3x-NF- $\kappa$ B binding site into RAW 264.7 cells to test for luciferase activity induced or suppressed by various traditional Chinese medicine herbs. The ethanol extract of these traditional Chinese medicine herbs was further fractionated with hexane, ethyl acetate (EtOAc) and water. The results showed that most of these three fractions of the traditional Chinese medicine herbs suppressed luciferase activity through NF- $\kappa$ B luciferase activity in LPS/IFN $\gamma$ -activated RAW cells. EtOAc fraction of *Taxilli chinensis*, *Angelica sinensis* decreased in NF- $\kappa$ B luciferase activity ( $p < 0.05$ ). EtOAc fraction of *Hedyotis diffusa* Willd. significantly decrease IL-6 production. Hexane fraction of *Taxilli chinensis*, *Jujubae fructus* and EtOAc fraction of *Angelica sinensis*, *Andrographis paniculata* significantly decrease NO secretion. Hexane fraction of *Eucommia ulmoides* Oliv., *Taxilli chinensis*, *Jujubae fructus* and EtOAc fraction of *Angelica sinensis*, *Jujubae fructus*, *Glycyrrhizae radix*, *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge., *Taxilli chinensis*, *Ligustri lusidi fructus*, *Andrographis paniculata*, *Isatidis radix* significantly decrease PGE<sub>2</sub> secretion. Therefore these herbs with anti-inflammatory effect or immunomodulatory are worthy of further study to investigate NF- $\kappa$ B on immune regulation.

**Key words:** Transfection, NF- $\kappa$ B, RAW264.7 cell, Traditional Chinese medicine herbs.

\* Corresponding author. E-mail: bifong@ntu.edu.tw



## 前 言

Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)最初的發現，是因它在B細胞對編譯出抗體輕鏈的基因具有活化轉錄作用的效果，現已被認為是哺乳動物免疫系統中最重要轉錄調節者<sup>(1)</sup>。NF- $\kappa$ B平時位於細胞質，被抑制性蛋白質I $\kappa$ B所結合，而阻止了NF- $\kappa$ B進入細胞核。一旦細胞接觸到促發炎細胞激素、化學趨化物質或細菌內毒素、病毒感染、UV、放射線和自由基等刺激後，活化protein tyrosine kinase，使I $\kappa$ B蛋白質被I $\kappa$ B kinases磷酸化後降解，而釋出NF- $\kappa$ B，即能進入細胞核行使基因調控作用<sup>(2)</sup>。

目前已知許多和發炎有關基因的啟動子都具有NF- $\kappa$ B結合區域，同時NF- $\kappa$ B也參與調節促發炎細胞激素如TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-2、IL-6、IL-12，和化學趨化物質如IL-8、MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2)，以及急性期蛋白質如iNOS、COX-2、xanthine dehydrogenase等之表現，因此，生物體中轉錄因子NF- $\kappa$ B在免疫反應、發炎反應及細胞增生、分化、癌化等生理過程中，皆扮演重要且複雜的角色<sup>(3,4)</sup>。哺乳動物的免疫系統中，轉錄因子NF- $\kappa$ B會因細胞對感染、發炎而迅速活化，受鄰近細胞因感染而分泌出一些發炎性細胞激素如TNF- $\alpha$ 、IL-6時，也會被活化<sup>(5)</sup>。因此，調控此訊息傳遞路徑被視為是尋找有用天然藥物來抗炎或防癌的重要標的<sup>(6)</sup>。

中國醫藥學的產生是在人類謀生尋找食物時，發現也能用於預防、治療疾病例如：茯苓、粟米、山藥、麻仁等，因而產生了「藥、食同源」或「醫、食同源」的觀念。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，已逐漸受到西方的重視與肯定。中草藥是一個天然的、巨型的化學分子庫，作用常具有不同結構層次的高度複雜性，其成份的多樣化必然導致作用方式和途徑的多樣化。因此，利用基因技術篩選新的有效成分，在中草藥新藥研究領域，建立全新的理念和研究手法，使中草藥朝現代化發展。另外；由於中草藥成份的多樣化，因此利用不同極性之溶劑進行分配萃取(partition extraction)可達到提高藥效及品管控制的目的。

在中草藥的篩選模式中，轉錄因子及其可調控的啟動子區域常被作為篩選的分子指標。因此，中草藥對免疫反應的調控機轉若能藉由影響細胞激素的基因表現，則建立篩選平台，便能更有效的從種類繁多的中草藥篩檢出具調

節免疫力之中草藥。日常飲食中有哪些食藥兼用之中草藥可能是透過影響生物體內免疫反應之平衡，至今所知不多。因此，本研究欲以系統性之篩選模式去找尋具有調節免疫反應之中草藥，期能建立一個可供篩檢有效樣品的篩檢平台及作用機制探討並能進一步分析鑑定功能性成份因子，將有助於保健食品之應用與中藥西醫化的藥物開發。

## 材 料 與 方 法

### 一、中草藥材之來源

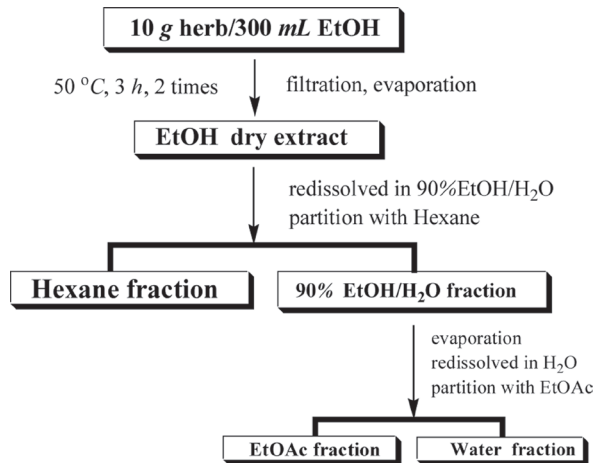
根據『中藥大辭典』<sup>(7)</sup>、『簡明藥材學』<sup>(8)</sup>、『中藥藥理學』<sup>(9)</sup>、『中華中藥典』<sup>(10)</sup>等之分類進行本次試驗樣品之挑選。包括(1)清熱類：金銀花(*Lonicerae flos*)、地骨皮(*Lycii radices Cortex*)、牡丹皮(*Moutan radices cortex*)、夏枯草(*Prunellae spica*)、板藍根(*Isatidis radix*)、穿心蓮(*Andrographis paniculata*)、白花蛇舌草(*Hedyotis diffusa* Willd.)。(2)解表類：菊花(*Chrysanthemi flos*)、柴胡(*Bupleuri radix*)。(3)理血類：牛膝(*Achyranthis radix*)、槐花(*Sophorae (Immaturus) flos*)。(4)祛風濕類：桑寄生(*Taxilli chinensis*)。(5)補虛類：黃耆(*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.)、當歸(*Angelica sinensis radix*)、何首烏(*Polygoni multiflori radix*)、女貞子(*Ligustri lusidi fructus*)、甘草(*Glycyrrhizae radix*)、黃精(*Polygonati rhizoma*)、刺五加(*Eleutherococcus senticosus* (Ruper. et Maxim.)、杜仲葉(*Eucommia ulmodes* Oliv.)。(6)其他類：紅棗(*Jujubae fructus*)、枸杞子(*Lycii fructus*) (購自台北市迪化街永盛藥行)。

### 二、中草藥材之中藥飲片萃取

中藥飲片以95%乙醇進行兩次50℃熱萃取三小時，粗萃取液進行過濾、減壓濃縮，得乙醇萃取物(如圖一所示)。以90% EtOH/H<sub>2</sub>O回溶後，再以hexane進行分配萃取，可得hexane層和90% EtOH/H<sub>2</sub>O層。90% EtOH/H<sub>2</sub>O層再經減壓濃縮，以水回溶後，再以乙酸乙酯(EtOAc)進行分配萃取，可得EtOAc層和水層。

### 三、短暫轉染及Luciferase activity分析

#### 1. RAW 264.7巨噬細胞株之培養



圖一 中草藥材之中藥飲片萃取流程

Fig. 1. The process of extraction in traditional Chinese medicine herbs.

RAW 264.7巨噬細胞株(簡稱RAW細胞)購自食品工業發展研究所(ATCC: TIB-71),以10% FBS-DMEM培養液(Gibco, USA)培養於5% CO<sub>2</sub>, 37°C培養箱,利用刮勺由T-25 flask (Falcon Plastics, Los Angeles, CA)收集細胞懸浮液,經1,000 × g,五分鐘離心,以含10% FBS-DMEM培養液懸浮細胞,調整細胞密度為5 × 10<sup>4</sup> cells/500 μL/well。

## 2. RAW細胞株之短暫轉染

將3x-κB binding site luciferase質體<sup>(11)</sup>,部份參考Masumi等人<sup>(12)</sup>之方法進行短暫轉染,首先配置0.1 μg/μL pRL-tk vector (作為internal control)與0.3 μg/μL p3xκB-Luciferase vector溶於150 mM NaCl溶液,添加ExGen 500 *in vitro* transfection reagent (Fermentas, Hanover, MD)於室溫下反應10分鐘。取出隔夜附著之RAW細胞,去除舊培養液,加入上述混合液,置入培養箱反應10分鐘後,加入10% FBS-DMEM培養液,培養約48小時。取出轉染後之細胞,去除舊培養液,先以2 μg/mL之hexane、EtOAc、H<sub>2</sub>O層中草藥萃取物或NF-κB-DNA binding inhibitor Helenalin (Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego)預培養一小時,再以含中草藥萃取物與LPS (100 ng/mL, Sigma, St. Louis, MO)/IFN-γ (1000 units/mL, Sigma)的培養液處理細胞,培養八小時後收集培養液,於-80°C保存,待日後進行IL-6、TNF-α、NO、PGE<sub>2</sub>等含量分析。轉染細胞則以Dual-Glo™ Luciferase assay system (Promega Corp., Madison, WI)室溫下反應10分鐘,以Wallac Victor2 plate reader (Perkin Elmer Corp.,

Norwalk, CT)測試Luciferase activity。

## 四、以MTT染色法測定細胞存活率

此法原理為活細胞粒線體中dehydrogenase,可將MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenylterazolium bromide, Thiazolyl blue, Sigma)之tetrazolium環打斷形成formazan,使MTT由黃色變成深藍色,再以0.04 N-HCl isopropanol將formazan溶出,測540 nm吸光值,以計算活細胞數目<sup>(13)</sup>。吸除培養液後加入55 μL MTT (0.5 mg/mL)溶液,於5% CO<sub>2</sub>、37°C培養箱培養三小時,再加入100 μL 0.04 N HCl-isopropanol溶液,緩慢搖盪30分鐘,以ELISA reader測定540 nm吸光值。

## 五、IL-6, TNF-α促發炎細胞激素含量之測定

細胞激素測定是採用ABC系統(avidin-biotin conjugates system)酵素連結免疫分析法(ELISA)。於96-well plate (Nunc., Roskilde, Denmark)中加入溶於coating buffer中適當稀釋之單株抗體(mouse IL-6 ELISA kit, PharMingen, San Diego, CA) (mouse TNF-α ELISA kit, R&D system, Minneapolis, MN, USA) 100 μL/well,置於室溫或4°C過夜。以PBST wash buffer洗,以去除未結合之單株抗體,加入blocking buffer 200 μL/well或300 μL/well,以減少非特異性之結合,於室溫反應一小時後,以PBST wash buffer洗後,再加入已知濃度之標準品或待測樣品100 μL/well,於室溫反應二小時,以PBST wash buffer洗後,再加入biotinylated二級抗體100 μL/well,於室溫反應一或二小時,以PBST wash buffer洗後,加入avidin-peroxidase 100 μL/well,於室溫反應一小時,以PBST wash buffer洗後,最後加入受質反應約20分鐘,以ELISA reader測定吸光值,以濃度標準曲線換算求得IL-6, TNF-α之濃度。

## 六、Nitric oxide (NO)含量之測定

原理為1982年Green等提出的Griess反應<sup>(14)</sup>,巨噬細胞分泌的含氮化合物包括NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NO<sub>2</sub>與NO,因此偵測樣品懸浮液的NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (nitrite)含量代表NO生成量。先在96-well plate添加50 μL/well的待測樣品或各標準濃度NaNO<sub>2</sub>,然後添加100 μL/well的Griess reagent (reagent A: 1% sulfanilamide/2.5% phosphoric

acid, reagent B: 0.1% N-1-naphthylethylene diamide dihydrochloride/2.5% phosphoric acid, 1:1 mix) (Sigma) 反應五分鐘後，以 ELISA reader 測定 540 nm 吸光值，代入  $\text{NaNO}_2$  濃度標準曲線，求得  $\text{NO}_2^-$  之濃度。

## 七、 $\text{PGE}_2$ 含量之測定

利用 competitive immunoassay 的原理，以待測  $\text{PGE}_2$  與已知固定濃度的 alkaline phosphatase  $\text{PGE}_2$  conjugate 競爭有限的  $\text{PGE}_2$  單株抗體，採用 Correlate-EIA prostaglandin E2 kit (Assay Designs, Inc., Ann Arbor, MI) 進行分析，在 96-well plate 內加入經適當稀釋之樣品，於室溫反應二小時，此時  $\text{PGE}_2$  單株抗體與連結在 plate 底部的 goat anti-mouse IgG Fc antibody 結合，以 wash buffer 洗去未結合的物質，加入基質 (P-nitrophenyl phosphate, p-Npp) 進行呈色反應，於室溫反應一小時，以 ELISA reader 測定 405 nm 吸光值，代入  $\text{PGE}_2$  濃度標準曲線，以求得  $\text{PGE}_2$  之濃度。

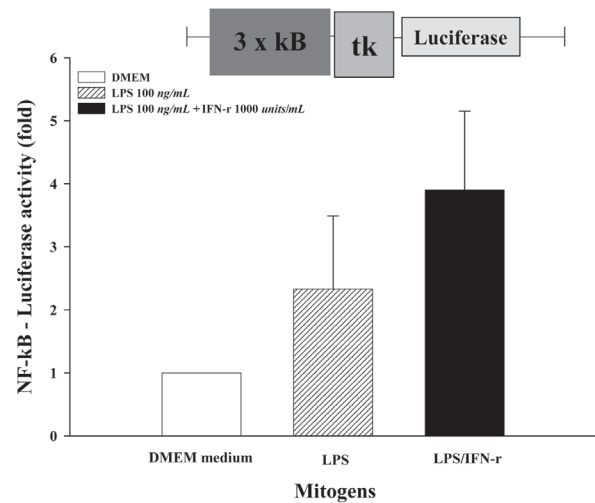
## 八、統計分析

試驗結果均以平均值  $\pm$  標準偏差 (Mean  $\pm$  SD) 表示。以 Student's t-test 來檢定樣品和對照組 (LPS/ $\text{IFN-}\gamma$ ) 之顯著差異， $p < 0.05$  為有顯著差異 (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; #  $p < 0.001$ )；相關性分析以 Pearson's Correlation  $p < 0.05$  有顯著差異性，統計分析係用 SAS 軟體 (SAS/STAT version 8.2; SAS Institute, Cary, NC, USA)。

## 結果與討論

### 一、p3 $\times$ kB-Luciferase 短暫轉染模式之建立

為探討含 3 $\times$ -kB binding site luciferase 質體，短暫轉染的 Raw 細胞在何種刺激下有較高的活化效果，分別以 LPS (100 ng/mL) 或 LPS/ $\text{IFN-}\gamma$  (100 ng/mL, 1,000 units/mL) 刺激，測試 Luciferase 活性。結果如圖二所示，單獨只添加 LPS 者之 Luciferase 活性約 2 倍；LPS/ $\text{IFN-}\gamma$  共同刺激時，對 NF- $\kappa$ B-Luciferase activity 之活化倍數與未添加刺激劑者相比較可達約 4 倍之多。因此，在本試驗中所選擇之刺激劑即 LPS/ $\text{IFN-}\gamma$ 。



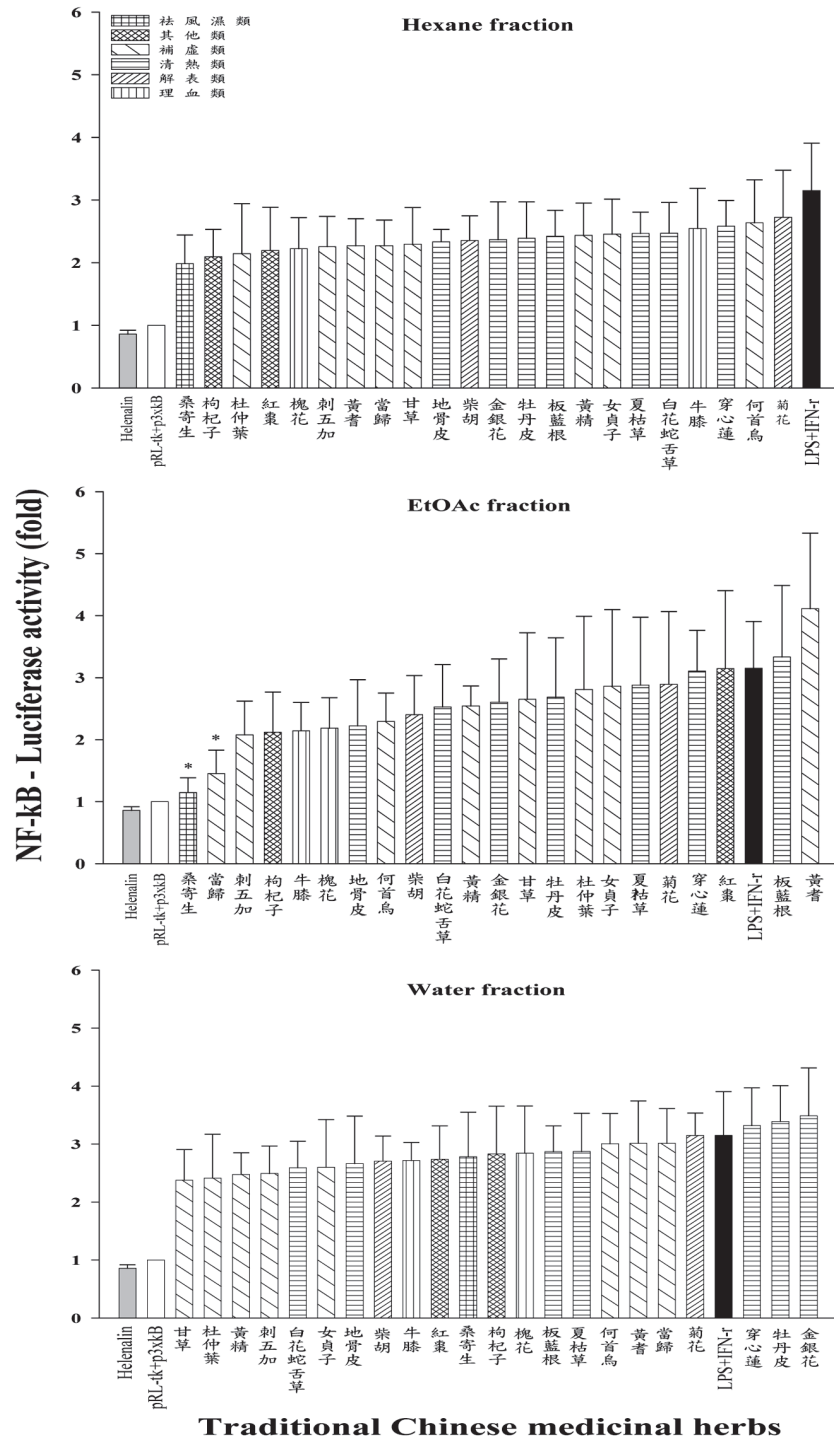
圖二 裂殖素對短暫轉染的 RAW 264.7 細胞 NF- $\kappa$ B-luciferase 質體表現其活性的影響

Fig. 2. The NF- $\kappa$ B luciferase reporter plasmid was transiently co-transfected into RAW 264.7 cells with the pRL-tk control plasmid and then stimulated with mitogens. Each result represents the mean  $\pm$  S.D. of data from three independent experiments.

### 二、中草藥各區分物對 NF- $\kappa$ B Luciferase 表現活性的影響

本試驗各中草藥測試劑量，先以細胞存活率 MTT 測試，得知中草藥各區分物對 RAW 細胞之劑量為 2  $\mu\text{g/mL}$  時，並不會造成細胞毒性，當濃度增加為 10  $\mu\text{g/mL}$  時，牡丹皮、穿心蓮、板藍根、金銀花、地骨皮、黃耆、當歸、女貞子、甘草等，皆具有細胞毒性，故選擇中草藥處理濃度均為 2  $\mu\text{g/mL}$  作為篩選劑量。另外，在本次試驗中亦以 Helenalin (NF- $\kappa$ B inhibitor) 做為負控制組，其結果顯示 Helenalin 確實可顯著抑制 NF- $\kappa$ B luciferase 活性，結果如圖三所示。

圖三是 22 種中草藥 hexane、EtOAc、水層萃取物預培養之抑制效果，數據以抑制 NF- $\kappa$ B luciferase 活性之倍數進行排序，由結果顯示，EtOAc 層可顯著抑制 LPS/ $\text{IFN-}\gamma$  活化之 NF- $\kappa$ B luciferase 活性，其中又以祛風濕類藥材桑寄生、補虛類藥材當歸與正控制組 (LPS/ $\text{IFN-}\gamma$ ) 達顯著差異 ( $p < 0.05$ )，而 hexane 及水層萃取物對 NF- $\kappa$ B luciferase 活性抑制效果較不顯著。同時亦發現清熱類藥材地骨皮、白花蛇舌草、金銀花、牡丹皮、夏枯草、穿心蓮和解表類藥材柴胡、菊花等 EtOAc 萃取區分物，對抑制 NF- $\kappa$ B luciferase 活性雖有較低之

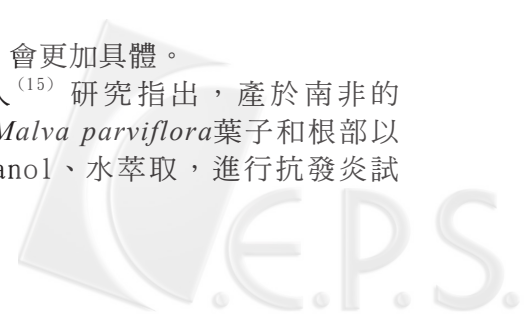


圖三 中草藥各區分物對NF-κB luciferase表現活性的影響  
 Fig. 3. NF-κB-transcriptional activity on LPS/IFN-γ stimulated RAW 264.7 macrophage cells treated with hexane, EtOAc and water fractions from ethanol extract of traditional Chinese medicine herbs. Each result represents the mean ± S.D. of data from three to five experiments. \*, Difference from the positive control (LPS/IFN-γ) by Student's t-test ( $p < 0.05$ ).

趨勢，但本試驗欲利用短暫轉染的RAW細胞NF-κB luciferase質體表現其活性來對歷代本草所記載之各類藥材進行區分，並沒有完全符合其論述；或許應配合其他促發炎性細胞激素分泌

量作全盤評估，會更加具體。

Shale等人<sup>(15)</sup> 研究指出，產於南非的一種藥用植物 *Malva parviflora* 葉子和根部以 hexane、methanol、水萃取，進行抗發炎試



驗，結果顯示葉子和根部hexane萃取物具有最大之抑制效果，水萃取物之抑制效果最差。相同地；本試驗水層中草藥萃取物對NF- $\kappa$ B luciferase活性的抑制效果也是最差。目前已知NF- $\kappa$ B調控下游基因大多數與發炎反應有關，多酚類化合物是許多中草藥的主要成份之一，其中flavonoids如quercetin、resveratrol和myricetin於抗發炎研究方面顯示，對LPS刺激巨噬細胞NO、TNF- $\alpha$ 的產生和iNOS基因的表現，是經由抑制NF- $\kappa$ B的作用<sup>(16)</sup>。有研究指出EGCG (Epigallocatechin-3-gallate)透過抑制LPS誘發的I $\kappa$ B磷酸化，以抑制NF- $\kappa$ B進入細胞核啟動基因的表現，因此，推測EGCG可能具有抗發炎的能力<sup>(17)</sup>。EGCG也具有清除hydroxy radical和抑制NO的能力<sup>(18)</sup>。Yun等人<sup>(19)</sup>的研究發現，panduratin A是分離自*Kaempferia pandurata* (Zingiberaceae)，可抑制I $\kappa$ B的磷酸化和NF- $\kappa$ B的活化，進而影響巨噬細胞NO和PGE<sub>2</sub>的分泌量，顯示NF- $\kappa$ B與NO和PGE<sub>2</sub>存有相關性。

### 三、中草藥各區分物對LPS/IFN- $\gamma$ 活化之RAW細胞分泌IL-6的影響

IL-6是由巨噬細胞、T細胞、內皮細胞及纖維母細胞所分泌，可刺激T細胞和B細胞的增生分化，與急性期蛋白質增加，是感染時急性發炎的重要細胞激素之一。圖四是將預先分別給予hexane、EtOAc或水層的中草藥萃取物培養一小時後，以LPS/IFN- $\gamma$ 與中草藥刺激測細胞激素IL-6含量，數據以抑制IL-6分泌量由低至高進行排序，結果顯示當歸、白花蛇舌草EtOAc萃取區分物可顯著降低IL-6分泌量，也發現清熱類藥材夏枯草、金銀花、板藍根、牡丹皮等EtOAc萃取區分物，對IL-6分泌量有較低之趨勢。且中草藥各區分物的NF- $\kappa$ B luciferase活性與分泌之IL-6含量之相關性分析，顯示中草藥對NF- $\kappa$ B luciferase活性抑制越多與IL-6之分泌量越低，相關性達顯著差異 ( $p = 0.019$ ,  $r = 0.48$ )，如表一所示。

當歸收錄於『神農本草經』上、中、下品藥的中品(上品藥指抗老神仙藥，中品藥為養生藥，下品藥為治疾之藥)，中品藥120種為臣，主養性以應人，無毒有毒，斟酌其宜，是中草藥運用史上最早出現的藥物分類法，因其功能調氣養血，因產地不同品種稍有差異<sup>(8)</sup>。Wang等人<sup>(20)</sup>研究顯示，以85°C水煮四小時之當歸水萃物，含分子量約 $< 10$  kDa之水溶性化

表一 NF- $\kappa$ B luciferase表現活性與促發炎細胞激素之相關性

Table 1. The correlation between NF- $\kappa$ B luciferase activity and pro-inflammatory mediators secretion from RAW264.7 cells

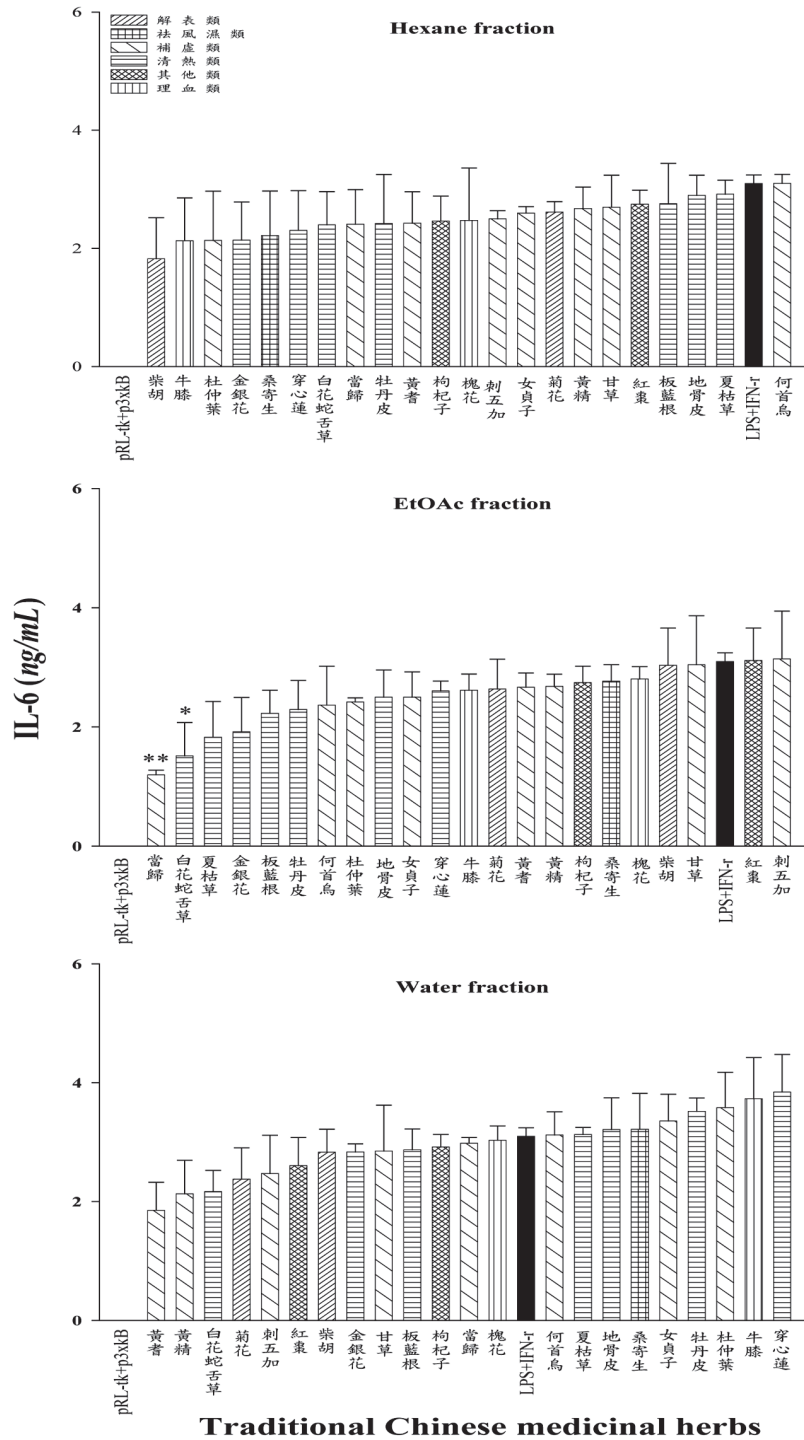
Mediators	NF- $\kappa$ B Luciferase activity (fold)	
	r	P
IL-6 (ng/mL)	0.48	0.019
NO ( $\mu$ M)	0.58	0.004

合物可有效緩和LPS (15 mg/kg)所引發的BALB/c小鼠致命性的敗血症休克，主因於能顯著降低血清HMGB-1 (high mobility group box-1)含量，而延長存活時間。Han等人<sup>(21)</sup>的研究發現，由韓國產當歸*A. gigas* Nakai (Chamdangui)分離出的酸性多醣體，對接種B16F10黑色素瘤細胞的BDF1小鼠，顯著抑制腫瘤細胞轉移到肺臟，並延長其存活率。Kim等人<sup>(22)</sup>發現此種當歸之酸性多醣體，可透過Toll-like receptor 4 (TLR4)使樹突狀細胞(dendritic cell)成熟，增加吞噬抗原的能力。梁等人<sup>(23)</sup>的試驗顯示，當歸乙醇萃取物對小鼠巨噬細胞株J774A.1有抑制IL-6、TNF- $\alpha$ 之作用，與本試驗之當歸EtOAc萃取區分物顯著降低IL-6之分泌結果相同。

另外；歷代本草未見有關白花蛇舌草之記載，該藥材亦稱珠仔草、龍吐珠、蛇舌草，白花蛇舌草為台灣民間常用生藥之一，因具解毒、抗癌及保肝等功能，而常用於肝臟相關疾病之治療，臨床應用常與半枝蓮合用治療病毒性肝炎。Lu等人<sup>(24)</sup>研究顯示，由白花蛇舌草新發現的化合物acyl flavonol di-glycoside具有抗氧化作用，包括抑制xanthine oxidase活性和脂質過氧化產物TBA-MDA之形成。白花蛇舌草屬性寒，味苦，主治清熱解毒、保肝等作用的中草藥，在本試驗中亦可降低RAW細胞分泌IL-6的能力，值得進一步研究。曾有研究指出清熱解毒這類中草藥，例如虎耳草(*Saxifraga stolonifera* Curt.)會降低RAW細胞分泌IL-6與NO的能力<sup>(25)</sup>。另外；許多研究已指出慢性發炎過程中IL-6濃度會增加，當歸抑制促發炎性細胞激素IL-6的作用有開發潛力。

### 四、中草藥各區分物對LPS/IFN- $\gamma$ 活化之RAW細胞分泌TNF- $\alpha$ 的影響

腫瘤壞死因子(TNF- $\alpha$ )分泌量之測定結果如圖五所示，結果顯示hexane、EtOAc、水層

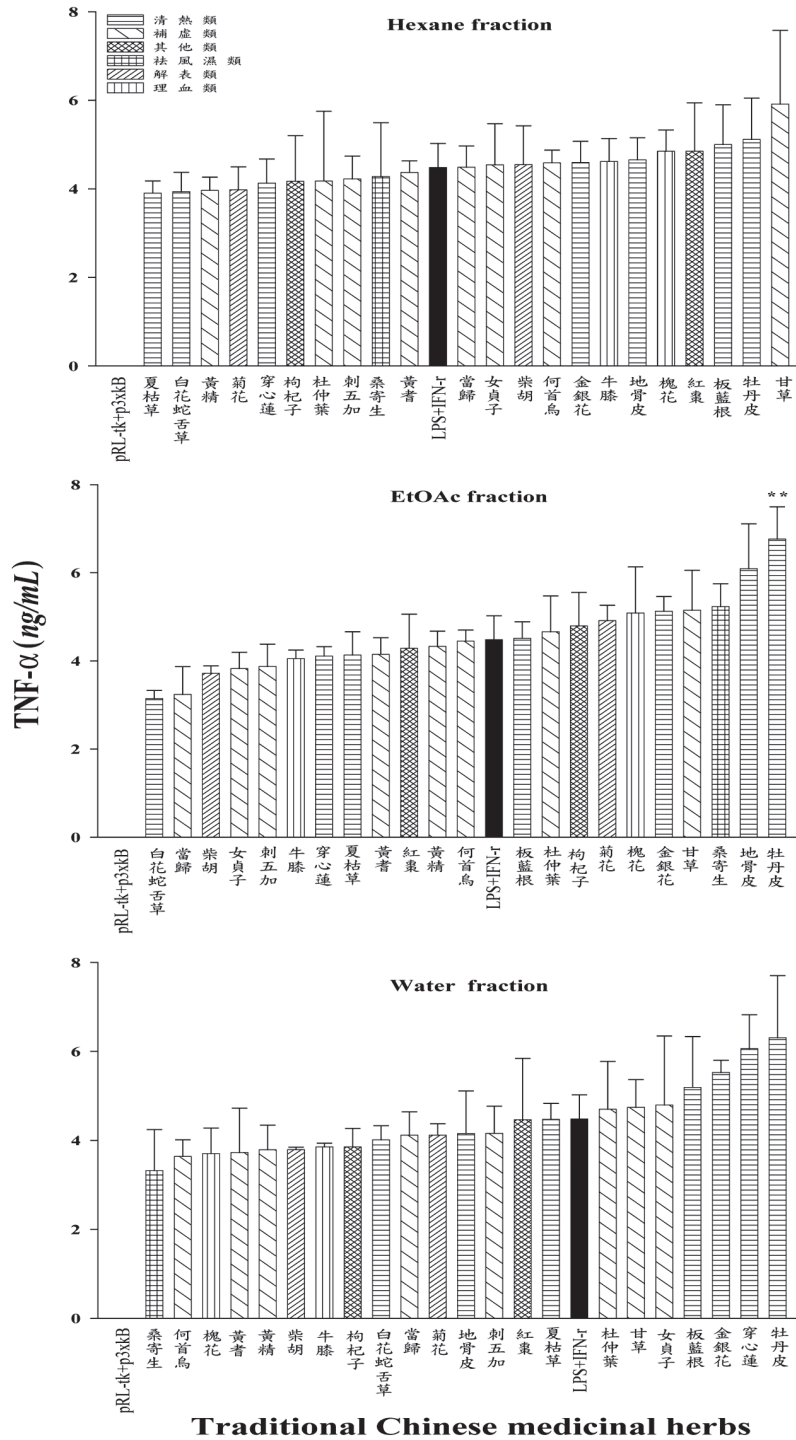


圖四 中草藥各區分物對LPS/IFN-γ活化RAW264.7 cells分泌IL-6之影響  
 Fig. 4. Effects of IL-6 secretion from LPS/IFN-γ activated RAW264.7 cells treated with hexane, EtOAc and water fractions from ethanol extract of traditional Chinese medicine herbs. Each result represents the mean ± S.D. of data from three to five experiments. \*, Difference from the positive control (LPS/IFN-γ) was analyzed by Student's t-test ( $p < 0.05$ ). \*\*, ( $p < 0.01$ ).

的中草藥萃取物，對TNF-α之分泌量不具顯著抑制效果，但白花蛇舌草和當歸EtOAc萃取區分物有分泌較低TNF-α之趨勢；另外，試驗結果發現，牡丹皮EtOAc萃取區分物卻會顯著促

進TNF-α之分泌。在LPS誘導的發炎反應中，TNF-α是一個最早期被誘發的重要細胞激素，主要由巨噬細胞和自然殺手細胞所分泌，能直接毒殺腫瘤細胞，及誘導單核細胞及巨噬細胞

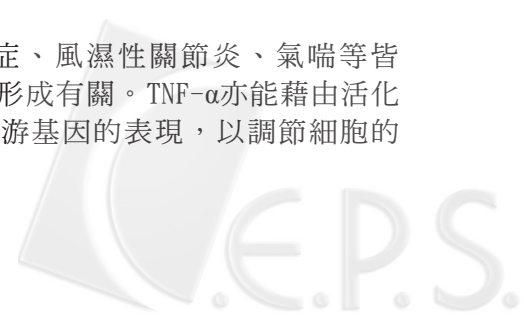




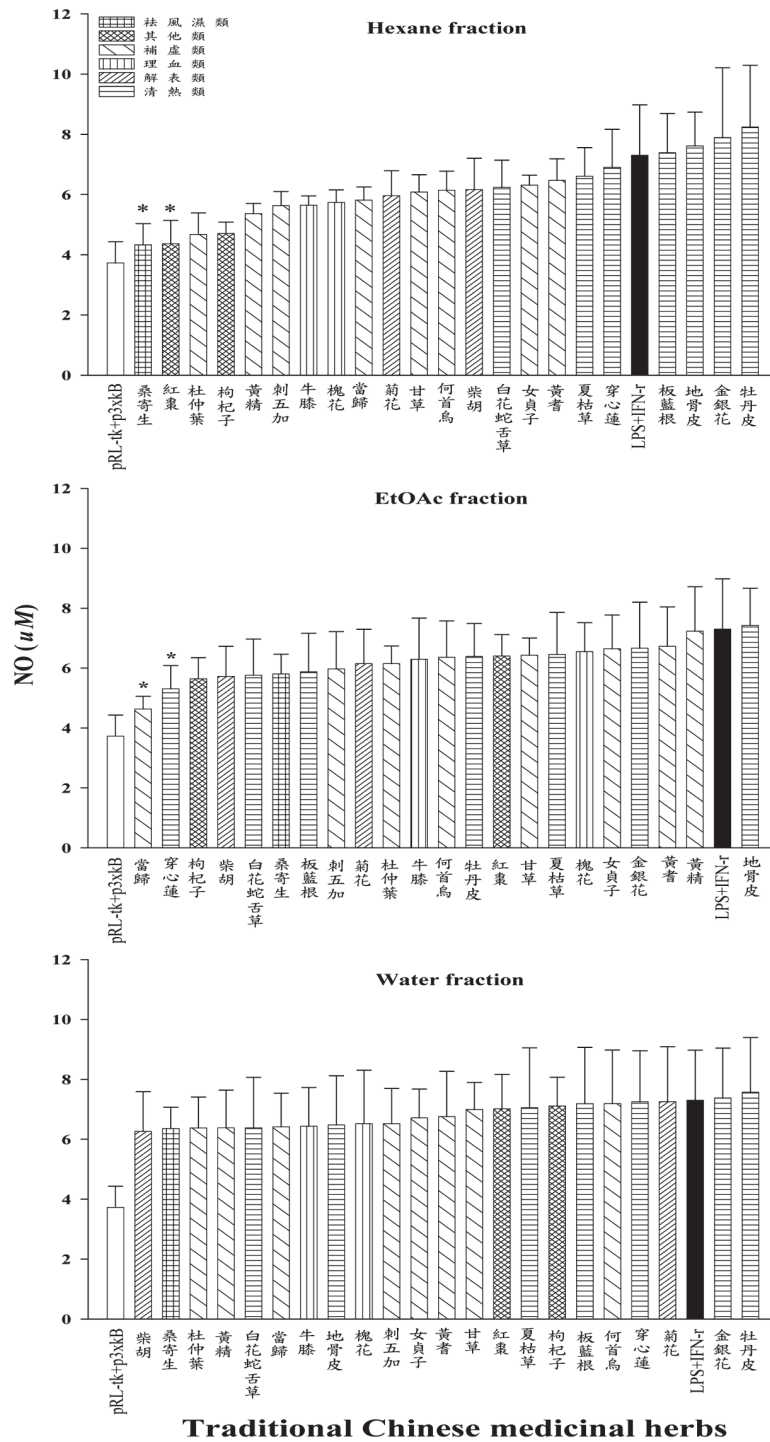
圖五 中草藥各區分物對LPS/IFN- $\gamma$ 活化RAW264.7 cells分泌TNF- $\alpha$ 之影響  
 Fig. 5. Effects of TNF- $\alpha$  secretion from LPS/IFN- $\gamma$  activated RAW264.7 cells treated with hexane, EtOAc and water fractions from ethanol extract of traditional Chinese medicine herbs. Each result represents the mean  $\pm$  S.D. of data from three to five experiments. \*\*, Difference from the positive control by Student's t-test ( $p < 0.01$ ).

分化、活化巨噬細胞、刺激補體及凝血系統、誘導感染區域血管表現黏附分子，促使內皮細胞產生血小板活化因子，以催化血液凝結，但當其產生量不足或過量時反而會傷害宿主，許

多疾病如敗血症、風濕性關節炎、氣喘等皆與TNF- $\alpha$ 的過量形成有關。TNF- $\alpha$ 亦能藉由活化NF- $\kappa$ B來啟動下游基因的表現，以調節細胞的分化及增生<sup>(26)</sup>。







圖六 中草藥各區分物對LPS/IFN- $\gamma$ 活化RAW264.7 cells分泌NO之影響

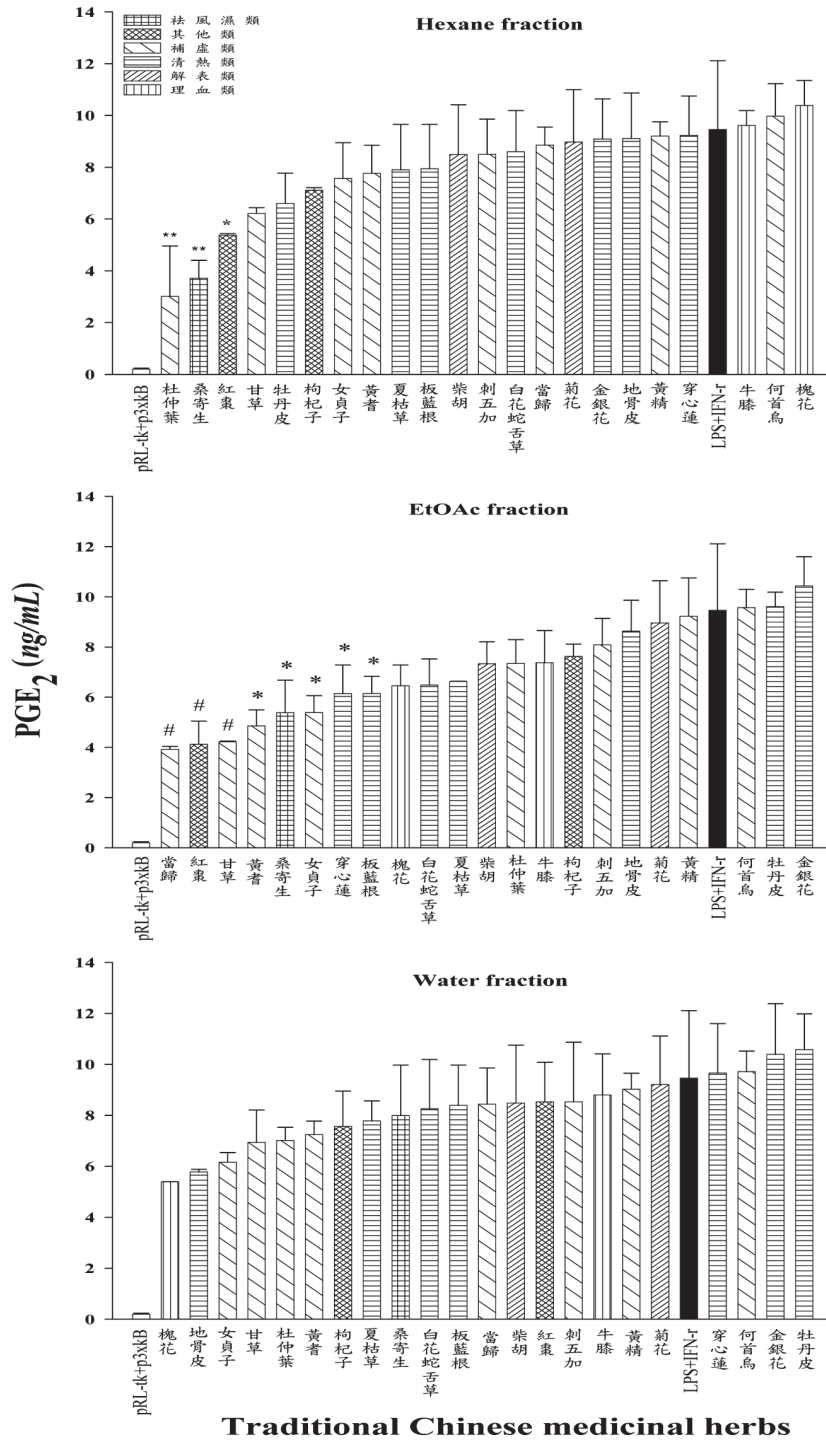
Fig. 6. Effects of NO secretion from LPS/IFN- $\gamma$  activated RAW264.7 cells treated with hexane, EtOAc and water fractions from ethanol extract of traditional Chinese medicine herbs. Each result represents the mean  $\pm$  S.D. of data from three to five experiments. \*, Difference from the positive control by Student's t-test ( $p < 0.05$ ).

### 五、中草藥各區分物對LPS/IFN- $\gamma$ 活化之RAW細胞分泌NO的影響

巨噬細胞內的NO合成酶是經誘導後才活化，又稱為誘導型一氧化氮合成酶(inducible

NOS, iNOS)，目前已知與細胞激素相關的訊息傳導機制，如MAPKs、JAK以及NF- $\kappa$ B等在炎症相關細胞激素或LPS刺激後均會誘導iNOS的表現<sup>(27)</sup>。圖六是預先分別給予hexane、EtOAc、水層的中草藥萃取物培養一小時後，以LPS/

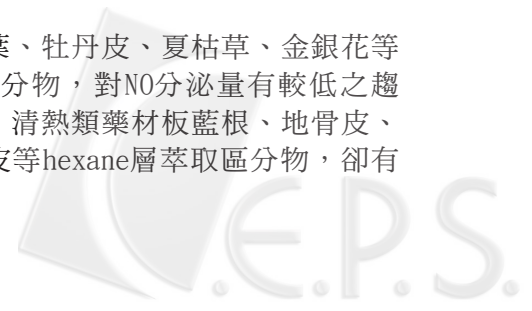




圖七 中草藥各區分物對LPS/IFN-γ活化RAW264.7 cells分泌PGE<sub>2</sub>之影響  
 Fig. 7. Effects of PGE<sub>2</sub> secretion from LPS/IFN-γ activated RAW264.7 cells treated with hexane, EtOAc and water fractions from ethanol extract of traditional Chinese medicine herbs. Each result represents the mean ± S.D. of data from three to five experiments. \*, Difference from the positive control (LPS/IFN-γ) by Student's t-test ( $p < 0.05$ ). \*\*,  $p < 0.01$ . #,  $p < 0.001$ .

IFN-γ與中草藥刺激NO的分泌量，結果顯示桑寄生、紅棗hexane層萃取區分物和當歸、穿心蓮EtOAc層萃取區分物對NO具顯著抑制效果 ( $p < 0.05$ )。亦發現清熱類藥材白花蛇舌草、

板藍根、杜仲葉、牡丹皮、夏枯草、金銀花等EtOAc層萃取區分物，對NO分泌量有較低之趨勢；但相反地；清熱類藥材板藍根、地骨皮、金銀花、牡丹皮等hexane層萃取區分物，卻有



增加NO分泌量之趨勢。且中草藥各區分物的NF- $\kappa$ B luciferase活性與分泌之NO含量之相關性分析，顯示中草藥對NF- $\kappa$ B luciferase活性抑制越多與NO之分泌量越低，相關性達顯著差異( $p = 0.004, r = 0.58$ )，如表一所示。

桑寄生原名桑上寄生，因寄生在桑樹者多，故桑寄生種類很多。至少包括有懈寄生與桑寄生等。桑寄生為桑寄生科*Taxillus chinensis* Danser.的乾燥帶葉莖枝，一般認為具有行血，壯筋骨，降血壓之效。邱等人<sup>(28)</sup> 探討六種民間常用抗發炎中草藥的作用機轉是否與干擾發炎物質NO的生合成有關，結果顯示以大葉桑寄生(*Taxillus liquidambaricolus*, TI)及青脆枝(*Nothapodytes foetida*, Nf)之乙醇萃取物(2-100  $\mu\text{g/mL}$ )，可明顯抑制由LPS/IFN- $\gamma$ 誘發RAW細胞NO之生成量。

Saha等人<sup>(29)</sup> 針對抗氧化和抑制NO活性進行探討，結果顯示藥用植物*Lea indica*與*Spermacoce articularis*甲醇萃取物可顯著抑制DPPH自由基生成並且亦可抑制LPS/IFN- $\gamma$ 引起RAW細胞NO之產生，此證據顯示抗自由基和抗發炎之間存在某種程度之相關性。Chiou等人<sup>(30)</sup> 將RAW細胞與LPS/IFN- $\gamma$ 及穿心蓮內酯(andrographolide)共同培養24小時後，發現隨穿心蓮內酯添加濃度增加，NO含量隨之下降。NO為巨噬細胞所分泌，具毒殺寄生蟲、細菌與病毒等作用，並且參與發炎反應中血管舒張的反應。另外，過量NO之生成，與活性氧分子反應會更進一步形成具有毒性之活性氮化合物，進而攻擊例如血基質蛋白質、含硒蛋白、脂質及DNA等生物分子，故被認為與一些慢性發炎性疾病及某些癌症有關<sup>(31)</sup>。

## 六、中草藥各區分物對LPS/IFN- $\gamma$ 活化之RAW細胞分泌PGE<sub>2</sub>的影響

前列腺素(prostaglandins)是eicosanoid中的一類，由20碳多元不飽和脂肪酸進行cyclooxygenase pathway氧化形成prostaglandin G (PGG)，再經peroxidase作用形成prostaglandin H (PGH)，而PGH為各種prostanoids合成酵素的受質，經各種不同酵素作用形成各種具有生物活性的prostanoids，已知PGE<sub>2</sub>的分泌會增加血管通透性、痛覺接受器敏感性與促進bradykinin的作用，而產生發熱、疼痛與水腫等發炎反應的症狀，且當生物體內過度的發炎反應最後會引起發燒、敗血性休克、甚至器官衰竭等症狀

<sup>(32)</sup>。Lee等人<sup>(33)</sup> 發現以LPS刺激巨噬細胞產生prostaglandins、thromboxanes，是經由選擇性表現COX-2所致，故在巨噬細胞中PGE<sub>2</sub>為一重要促發炎介質之一。圖七結果顯示，當歸、紅棗、甘草EtOAc萃取區分物可顯著降低PGE<sub>2</sub>含量( $p < 0.001$ )，黃耆、桑寄生、女貞子、穿心蓮、板藍根EtOAc萃取區分物亦可顯著降低PGE<sub>2</sub>含量( $p < 0.05$ )。

Huang和Wu<sup>(34)</sup> 的研究顯示，大豆異黃酮區分物、菊花、洋蔥、苦瓜、蓮子心等水萃取物具有抑制活化的RAW細胞生成PGE<sub>2</sub>，而龍眼、荔枝、桂圓及芹菜水萃取物則有促進RAW細胞生成PGE<sub>2</sub>及COX-2蛋白質。認為傳統中醫所謂降火或上火食物，可以對PGE<sub>2</sub>的抑制或促進作用作為生化指標，亦可能為發炎反應的介質而值得進一步探討。

本試驗之穿心蓮(*Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees)的全草及葉，有清熱、瀉火解毒、消腫止痛及治毒蛇咬傷的功效<sup>(8)</sup>。板藍根其味苦，性寒，歷代本草記載其功效具清熱解毒，由本次RAW細胞株之短暫轉染篩選系統驗證此敘述。目前許多研究顯示，過度或異常活化COX-2或iNOS的活性和人類特定發炎性疾病和癌症有相關性，因此調控與這兩種重要生物因子有關的訊息傳遞路徑被視為是尋找有用天然藥物來對抗或防癌的重要標的<sup>(35,36)</sup>。Lampe研究<sup>(37)</sup> 指出Ginger和curcumin能抑制COX-2進而減少PGE<sub>2</sub>之產量，而降低數種癌症，如腸癌、乳癌、膽囊癌之危險性，可知這些植物天然物分離出之成份都是具顯著的抗氧化與抗發炎活性，且這些活性均與癌症化學預防活性有極高關聯性。因此，由本試驗中EtOAc層所篩選出之當歸、黃耆、桑寄生、穿心蓮、板藍根值得進一步探討研發新的植物類化學物質。

## 結 論

由本試驗之NF- $\kappa$ B-Luciferase活性及相關發炎介質分析結果顯示，EtOAc層的中草藥萃取物可較顯著地抑制經LPS/IFN- $\gamma$ 活化之NF- $\kappa$ B-Luciferase活性，其中又以當歸、桑寄生可顯著抑制NF- $\kappa$ B-Luciferase活性及PGE<sub>2</sub>分泌量。紅棗、甘草、黃耆、女貞子、穿心蓮、板藍根EtOAc萃取區分物可顯著降低PGE<sub>2</sub>含量，當歸和白花蛇舌草的EtOAc萃取區分物可顯著降低IL-6含量。因此，上述之中草藥萃取物或許具有抗發炎之潛力，值得更進一步以初代腹腔巨噬細胞和脾臟細胞評估其抗發炎和免疫調節作

用。

## 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。

## 參 考 文 獻

- (1) S. Gerondakis, R. Grumont, I. Rourke and M. Grossmann: The regulation and role of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors during lymphocyte activation. *Curr. Opin. Immunol.*, **10**: 353-359 (1998).
- (2) Y. Yamamoto and R. B. Gaynor: I B kinases: Key regulators of the NF- $\kappa$ B pathway. *Trends Biochem. Sci.*, **29**: 72-79 (2004).
- (3) S. Ali and D. A. Mann: Signal transduction via the NF- $\kappa$ B pathway: a targeted treatment modality for infection, inflammation and repair. *Cell Biochem. Funct.*, **22**: 67-79 (2004).
- (4) Y. Yamamoto and R. B. Gaynor: Therapeutic potential of inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Invest.*, **107**: 135-141 (2001).
- (5) N. Silverman and T. Maniatis: NF- B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes dev.*, **15**: 2321-2342 (2001).
- (6) J. B. Calixto, M. F. Otuki and A. R. S. Santos: Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, NO and NF- $\kappa$ B. *Planta Med.*, **69**: 973-983 (2003).
- (7) 盧宏民：中藥大辭典，五洲出版社，台北市 (1972)。
- (8) 許鴻源、陳玉盤、許順吉、許照信、陳建志、張憲昌：簡明藥材學，新醫藥出版社，台北市 (1984)。
- (9) 陳榮福、顏焜熒：中藥藥理學，國立中國醫藥研究所，台北市 (1991)。
- (10) 行政院衛生署中華藥典中藥集編修小組：中華中藥典，行政院衛生署編印，台北市 (2004)。
- (11) F. Takashi, N. Garry, G. Sanker and B. David: Independent modes of transcriptional activation by the p50 and p65 subunits of NF- $\kappa$ B. *Genes dev.*, **6**: 775-787 (1992).
- (12) A. Masumi, S. Tamaoki, I.-M. Wang, K. Ozato and K. Komura: IRF-8/ICSBP and IRF-1 cooperatively stimulate mouse IL-12 promoter activity in macrophages. *FEBS Lett.*, **531**: 348-353 (2002).
- (13) J. Carmichael, R. J. Fergusson, C. R. Wolf, F. R. Balkwill and J. F. Synth: Augmentation of cytotoxicity of chemotherapy by human  $\alpha$ -interferons in human non-small cell lung cancer xenografts. *Cancer Res.*, **46**: 4916-4920 (1986).
- (14) L. Green, D. Wagner, J. Glogowski, P. Skipper, J. Wishnok and S. Tannenbaum: Analysis of nitrate, nitrite and  $^{15}$ N nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, **126**: 131-138 (1982).
- (15) T. L., Shale, W. A., Stirk and J. V., Staden: Variation in antibacterial and anti-inflammatory activity of different growth forms of *Malva parviflora* and evidence for synergism of the anti-inflammatory compounds. *J. Ethnopharmacol.*, **96**: 325-330 (2005).
- (16) Y. C. Liang, Y. T. Huang, S. H. Tsai, S. Y. Lin-Shiau, C. F. Chen and J. K. Lin: Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophage. *Carcinogenesis*, **20**: 1945-1952 (1999).
- (17) Y. L. Lin and J. K. Lin: (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) block the induction of nitric oxide synthase (NOS) by down-regulating lipopolysaccharide induced activity of transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). *Mol. Pharmacol.*, **52**: 465-472 (1997).
- (18) Y. S. Lin, S. S. Wu and J. K. Lin: Determination of tea polyphenols and caffeine in tea flowers (*Camellia sinensis*) and their hydroxyl radical scavenging and nitric oxide (NO) suppressing effects. *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 975-980 (2003).
- (19) J. M. Yun, H. Kwon and J. K. Hwang: In vitro anti-inflammatory activity of Panduratin A isolated from *Kaempferia pandurata* in RAW264.7 cells. *Planta Med.*, **69**: 1102-1108 (2003).
- (20) H. Wang, W. Li, J. Li, B. Rendon-Mitchell, M. Ochani, M. Ashok, L. Yang, H. Yang, K. J. Tracey, P. Wang and A. E. Sama: The aqueous extract of a popular herbal Nutrient supplement, *Angelica sinensis*, protects mice against lethal endotoxemia and sepsis. *J. Nutr.*, **136**: 360-365 (2006).
- (21) S. B. Han, Y. H. Kim, C. W. Lee, S. M. Park, H. Y. Lee, K. S. Ahn, I. H. Kim and H. M. Kim: Characteristic immunostimulation by angelan isolated from *Angelica gigas* Nakai. *Immunopharmacology*, **40**: 39-48 (1998).
- (22) J. Y. Kim, Y. D. Yoon, J. M. Ahn, J. S. Kang, S. K. Park, K. Lee, K. B. Song, H. M. Kim and S. B. Han: Angelan isolated from *Angelica gigas* Nakai induces dendritic cell maturation through toll-like receptor 4. *Int. J. of Immunopharmacol.*, **7**: 78-87 (2007).
- (23) 梁佳玟、賴怡君、朱燕華：中草藥對於促發炎細胞激素生之影響，*中醫藥雜誌*，**15**: 293-304 (2004)。
- (24) C. M. Lu, J. J. Yang, P. Y. Wang and C. C. Lin: A New acylated flavonol glycoside and antioxidant effects of *Hedyotis diffusa*. *Planta Med.*, **66**: 374-377 (2000).
- (25) M. Meisner, J. Schmidt, M. Schywalsky and K. Tschalkowsky: Influence of pyrrolidine dithiocarbamate on the inflammatory response in macrophages and mouse endotoxin shock. *Int. J. Immunopharmacol.*, **22**: 83-90 (2000).
- (26) P. Tak and G. S. Firestein: NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.*, **107**: 7-11 (2001).
- (27) Ginsburg, I: Role of lipoteichoic acid infection and inflammation. *Lancet Infect. Dis.*, **2**: 171-179 (2002).
- (28) 邱文慧、周正仁、柯漢傑、陳介甫：在巨噬細胞探討六種抗發炎中草藥對LPS/IFN- $\gamma$ 所誘發一氧化氮生成之影響，*中醫藥雜誌*，**11**: 87-94 (2000)。
- (29) K. Saha, N. H. Lajis, D. A. Israf, A. S. Hamzah, S. Khozirah, S. Khamis and A. Syahida: Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, **92**: 263-267 (2004).
- (30) W. F. Chiou, C. F. Chen and J. J. Lin: Mechanisms of suppression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells by andrographolide. *Br. J. Pharm.*, **129**: 1553-1560 (2000).
- (31) R. Berg, G. R. M. M. Haenen, H. Berg and A. Bast: Transcription factor NF- $\kappa$ B as a potential biomarker for

- oxidative stress. *Br. J. Nutr.*, **86**: 121-127 (2001).
- (32) W. L. Smith, D. L. DeWitt and R. M. Garavito: Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**: 145-182 (2000).
- (33) S. H. Lee, E. Soyoola, P. Chanmugam, S. Hart, W. Sun, H. Zhong, S. Liou, D. Simmons and D. Hwang: Selective expression of Mitogen inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.*, **267**: 25934-25938 (1992).
- (34) C. J. Huang and M. C. Wu: Differential effects of foods traditionally regarded as heating and cooling on prostaglandin E<sub>2</sub> production by a macrophage cell line. *J. Biomed. Sci.*, **9**: 596-606 (2002).
- (35) J. B. Calixto, M. F. Otuki and A. R. S. Santos: Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, NO and NF- $\kappa$ B. *Planta Med.*, **69**: 973-983 (2003).
- (36) J. B. Calixto, M. M. Campos, M. F. Otuki and A. R. S. Santos: Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med.*, **70**: 93-103 (2004).
- (37) J. W. Lampe: Spicing up a vegetarian diet: chemopreventive effects of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutri.*, **78**: s579-s583 (2003).

