

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

複方保健植物飲料免疫調節功能之研究(2/3)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC93-2321-B-002-015-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：國立臺灣大學園藝學系暨研究所

計畫主持人：許輔

計畫參與人員：郭肇凱

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 5 月 26 日

總計畫：「複方保健植物飲料之開發研究」

子計畫(二)：「複方保健植物飲料免疫調節功能之研究」

一、摘要

本子計畫(二)「複方保健植物飲料免疫調節功能之研究」與整合型計畫配合，研究保健植物樣本與原型產品的蛋白質組成與免疫調節活性。利用山防風、白鶴靈芝、山葡萄、荔枝草、砂仁、雞血藤和大棗等保健植物來開發保健飲料。本期進度包括以體外試驗(*in-vitro*)評估七種保健植物樣本對小鼠脾臟細胞的免疫調節活性與各樣本凝集血球的能力，以及體內試驗(*in-vivo*)評估餵食各保健植物樣本之小鼠體內特異性與非特異性免疫調節試驗。

山防風、白鶴靈芝、山葡萄、荔枝草、砂仁、雞血藤與大棗等七種保健植物材料分別經加熱萃取、冷凍乾燥後得到粉末，並以 PBS 回溶至各試驗所需之濃度。在體外生理活性試驗方面，MTT assay 發現雞血藤、荔枝草、大棗三種樣本有提高小鼠脾細胞增生的作用；而在 BrdU assay 中，則發現山防風、白鶴靈芝、大棗三種樣本具提高小鼠脾細胞增生的活性；而山防風、山葡萄、砂仁、荔枝草等四種保健植物樣本可以顯著提高處理後小鼠脾細胞的干擾素 IFN- γ 的分泌量($p < 0.05$)，其中以山防風的效果最佳。

在體內非特異性免疫試驗方面，三次體內試驗發現餵食砂仁、山葡萄及大棗樣本之小鼠，其脾貼附細胞與腹腔細胞於 LPS 之刺激活化下，相較於 control 組 PBS 產生 NO 及 TNF- α 則相對降低，表示餵食此些樣本保健植物可能可以某種程度抑制發炎反應；而餵食荔枝草樣本之小鼠，其腹腔巨噬細胞受 LPS 之刺激活化後，可以產生顯著($p < 0.05$)之 TNF- α ，可能可以進一步活化巨噬細胞。在體內特異性免疫試驗方面，MTT 與 BrdU 分析法有一致性結果表示餵食山防風與荔枝草可提高小鼠之 OVA 特異性 IgG 產生，以及 OVA 特異性脾細胞增生，有助於提高特異性免疫反應。

關鍵詞：保健植物、複方、保健飲料、保健食品、免疫調節

Abstract

This present study “Subproject (2): Immunomodulatory properties of a tonic herbal drink based on several medicinal plants” is aimed to develop a multi-ingredient functional beverage using the herbs such as *Salvia plebeia*, *Ampelopsis brevipedunculata*, *Amomi fructus*, *Rhinacanthus nasutus*, *Echinops grijssii*, *Millcttia reticulata*, and *Zizyphus jujube*, which are traditionally used for both the medicinal and food purposes. This report includes the experimental results obtained from December, 2004 to May, 2005.

In vitro experiments showed that the extracts of *Salvia plebeia*, *Millettia reticulata*, and *Zizyphus jujube* were capable to increase the cell proliferation of mouse splenocytes, which was determined by means of MTT assay. On the other hand, *Zizyphus jujube*, *Echinops grijsii* and *Rhinacanthus nasutus* were capable to increase the cell proliferation of mouse splenocytes, which was determined by means of BrdU assay. In addition, *Salvia plebeia*, *Ampelopsis brevipedunculata*, *Amomi fructus* and *Echinops grijsii* could increase the IFN-gamma secretion by mouse splenocytes. These results suggested that those herb extracts could activate immune cells.

In vivo experiments were taken place to investigate the activity toward both innate and adaptive immunity. Oral administration of *Amomi fructus*, *Ampelopsis brevipedunculata* and *Zizyphus jujube* was found to decrease nitric oxide (NO) and TNF-alpha production by the peritoneal cells of Balb/C mouse, while the cells were co-stimulated with endotoxin LPS. However, oral administration of *Salvia plebeia* was found to increase NO and TNF-alpha production by the peritoneal cells of Balb/C mouse, while the cells were co-stimulated with endotoxin LPS. Moreover, oral administration of *Echinops grijsii* and *Ampelopsis brevipedunculata* could increase the OVA-specific IgG levels in the serum. Furthermore, oral administering of *Echinops grijsii* and *Ampelopsis brevipedunculata* also increased OVA-specific splenocyte proliferation. These results suggested that oral uptaking could help to activate the innate and adaptive immunity of the host.

Keywords: Medicinal plants, multi-ingredient herbal formula, protein analysis, functional beverage, functional foods, immunomodulation.

二、計畫緣由與目的

近年由於傳統中藥醫療對養生保健與慢性疾病的療效及用藥獨特理論和豐富的臨床經驗逐漸受到重視與肯定，並且可補西方醫學之不足，西藥強調具單一效果，並以治癒該疾病為目的，但中藥則以多重療效，並以預防為主，因此，西藥在病理上注重一個疾病或身體的局部來治療，反觀中藥，則著重於全身的各方面調節來達到預期的效果，這方面二者可說是有大大的不同，因此民間醫療配方及老祖宗偏方了新的替代療法。目前，歐美各國多盛行利用單一草藥以膳食補充劑或健康食品的方式作為保健與疾病防治之選擇，然而各中藥中含有多種不同的成分，假若有效地將兩種以上的草藥以「複方」形式混合使用，傳統的臨床證據顯示可以提高與促進療效，以適應複雜多變的病情。

本總計畫“複方保健植物飲料之開發研究”是希望以新概念來開發保健食

品，與傳統製藥不同，研究之基本理念是希望能真正提供一個產品，讓消費者長期慢慢使用後，能達到長期有益健康之功效。總計畫分別由四個子計畫進行以下之研究，包括：子計畫(一)「複方保健植物飲料抗氧化和護肝功能之研究」、子計畫(二)「複方保健植物飲料免疫調節功能之研究」、子計畫(三)「複方保健植物飲料對調節血脂、血糖及腸道功能之研究」、子計畫(四)「複方保健植物飲料之抗發炎功能 and 安全性評估」。各子計畫之間有共同聯合的實驗，同時計畫間的任務、互動和分工明確，各計畫所獲得的研究成果均對最終產品有著決定性的影響，形成一個密不可分的群體關係，不存在個別單兵作戰。

本計畫利用荔枝草 (*Salvia plebeia* R. Brown)、山葡萄 (*Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv.)、砂仁 (*Amomi fructus*)、白鶴靈芝 (*Rhinacanthus nasutus* L. Kurz)、山防風 (*Echinops grijsii*)、雞血藤 (*Millcttia reticulata* Benth) 及大棗 (*Zizyphus jujube* Mill.) 等天然保健植物，針對其單方及不同複方組合進行實驗。研究團隊參考合作中醫師的多年臨床經驗，透過長期的討論和資料收集，最後決定利用這些保健植物作為材料，並向衛生署食品衛生處查證確認這些植物皆可作為機能性保健食品之用途，屬一般藥膳和民間食療用料，在中醫學及民俗療法上具有臨床生理活性或特殊保健功效，有關這些保健植物的相關研究和資料，可參閱總主持人進度報告的附表。這些保健植物單一時用時具有其獨特的保健功效，不過這些植物在傳統上很少以單方使用，在中醫治療上頗為常用，多以複方形式使用，而從開發多功效保健飲料的角度的來看，各保健植物的混合使用將可能同時提供多項生理活性功能。一般而言，在研究單方中草藥時，因為只用單一材料，通常只能預期達到某一項特定的活性，產品的功能和使用範圍較少；而在複方中草藥研究方面，概念上就像「雞尾酒療法」，藉著多項材料之間互相發揮效果，所以潛在的生理活性往往不只一項，因此各項活性之間可能出現的相互影響和相乘作用很值得深入探討；本計畫使用了多種保健植物，並同時參考了合作中醫師的臨床使用經驗，希望利用複方的配合及特質，集合數種保健植物的優點，四個子計畫分別從四個不同的領域和角度進行生理活性的研究，期待這些材料的配合能給予多功能的保健效果，較理想和特出的活性功能可作為產品的主要訴求，可檢測但較不明顯的活性功能則可作為輔助功能，大大增加可塑性和成功率，這也是複方中草藥的產品特性。

依本子計畫(二)「複方保健植物飲料免疫調節功能之研究」依照原先設計的工作目標和進度進行。到目前為止，已完成了各保健植物樣品的體外活性篩檢試驗，取各保健植物粉末樣品，以小鼠脾臟細胞為體外試驗模式，評估各保健植物活化小鼠脾臟細胞的活性，實驗成果作為接續體內生理活性研究所需資料，以餵食小鼠各保健植物樣品之體內試驗模式，並以特異性與非特異性免疫來評估各免疫調節活性，期間總共各重複了三次餵食試驗流程，並已獲得相當之成果。

本研究所用的保健植物並非季節性採收的植物，所以較不受季採收節的影響。

響；同時，在第一期的工作項目中，已統一製備大量的粉末樣品，藉此確保整個研究團隊及各項實驗之間的樣品材料達到一致性。因為本計畫屬於整合性的性質，統一的樣品來源對各子計畫間數據、發現和結果的交換和討論頗為重要，能減少差異性，對數據的整合和未來產品的統一開發相當重要。

三、材料與方法

1. 血球凝集試驗

將 7.5 g 之 EDTA 溶於 100 mL 之 PBS 中，並以 0.2 μm 之濾膜過濾作為 buffer，取 100 μL 之 buffer 滴入數滴小鼠血液並混合均勻，離心選取血球部分溶於 PBS 中成為 5% 之血球溶液 (RBC solution)，於 U bottom 之 ELISA 盤中每 well 加入 50 μL 之血球溶液，並加入 50 μL 之序列稀釋(20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 mg/mL)待測樣品，需同時作 positive control (FIP-*five*)與 negative control (PBS)以作為對照，靜置約一小時後觀察血球是否凝集。

2. 小鼠脾細胞的取得

從 Balb/c 小鼠取出脾臟，以載玻片磨碎脾臟取出脾細胞，置於裝有 6 mL PBS 培養基中，在室溫下以 300 xg 離心 5 分鐘，去掉上清液並將 pellet 拍散，加入 RBC lysis buffer 來回吸放細胞 1 分鐘後，靜置約 2 分鐘，再以 300 xg 離心 5 分鐘，去上清拍散 pellet，再加入 10 mL DMEM 培養基，進行細胞計數並調整適當之細胞數後，備用。

3. 小鼠脾細胞增生活性分析 (MTT assay)

將分離好之淋巴球，培養於 DMEM 培養基中，將細胞數目調整至 5×10^6 /mL，取 0.1 mL 細胞懸浮液接種於 96 well 培養皿中。添加序列稀釋之不同濃度樣品 50 μL ，於 96 well 培養皿中與脾細胞共同培養 72 h 後，加入 20 μL 之 MTT 溶液，反應 5 h 後離心移除上層液後，再加入等量移除上層液之 DMSO 於暗室反應 5 min，而後以 ELISA microplate reader 測定 540 nm 之吸光值。

4. 小鼠脾細胞增生活性分析 (BrdU assay)

利用 Roche Brd-U cell proliferation 套組進行分析。將分離好之淋巴球，培養於 DMEM 培養基中，將細胞數目調整至 5×10^6 /mL，取 0.1 mL 細胞懸浮液接種於 96 well 培養皿中。將小鼠脾細胞與序列稀釋之不同濃度樣品 50 μL 於 96 well 培養皿中與脾細胞共同培養 48 h 後，每 well 加入 10 μL 之 10 mM BrdU，24 h 後以 300 xg 離心 5 min 使細胞沉澱在分析盤底部，移除培養液後以 PBS 清洗乾淨，每 well 加入 fix denate solution 150 μL ，室溫下放置 30 min 後移除並加入 anti-BrdU-peroxidase 100 μL 抗體，室溫下放置 90 min，清洗後於每 well 加入 TMB substrate solution 100 μL ，室溫下放置 30 min 後加

入 stop solution (1M H₂SO₄) 25 μL，最後以 ELISA microplate reader 測定 450 nm 之吸光值。

5. 細胞培養液中 IFN-γ 的定量

將分離好之淋巴球，培養於 DMEM 培養基中，將細胞數目調整至 5x10⁶ /mL，取 0.1 mL 細胞懸浮液接種於 96 well 培養皿中。添加序列稀釋之不同濃度樣品 50 μL，於 96 well 培養皿中與脾細胞共同培養 72 h 後收取細胞液，利用 BD Pharmingen IFN-gamma OptEIA™ Set 套組進行分析。

預先 coating 稀釋於緩衝溶液之抗體 100 μL 於 4 °C 放置隔夜，清洗後加入 200 μL 之 blocking solution 於室溫下反應 1 h，清洗後再置入各細胞液樣品並以 diluent solution 製作標準曲線，室溫下反應 2 h，清洗後再置入 100 μL 之 detection antibody 及 avidin-HRP，並於室溫下反應 1 h，清洗後加入 ABTS substrate solution 50 μL，反應約 30 min 後以 ELISA microplate reader 測定 450 nm 之吸光值。

6. 體內餵食試驗設計

將各保健植物樣本分別以 PBS 調配成 20 mg/mL，並以 PBS 作為對照組。非特異性方面，以管餵法隔日餵食小鼠 200 μL (4 mg/mouse) 共 4 次，休息一週後再隔日餵食小鼠共 4 次，便可進行後續試驗；而特異性方面，以管餵法隔日餵食小鼠 200 μL (4 mg/mouse) 共 4 次，而後休息一週再隔日餵食小鼠共 4 次，其中並於第1、3、5週之第一天以腹腔注射法(intraperitoneal, i.p.) 進行OVA免疫，注入輔以佐劑 (20 % KAl(SO₄)₂·12H₂O) 混合濃度為 500 μg/mL 之 OVA 100 μL (50 μg/mouse) 作為特異性抗原，而後再進行後續之試驗。

7. 小鼠腹腔細胞的取得

將完成非特異性餵食試驗之 Balb/c 小鼠麻醉後腹腔注射 thioglycolate 2 mL，約 72 小時後待其腹腔局部發炎而引發腹腔周邊巨噬細胞聚集。將小鼠頸椎脫臼後以針筒吸取 PBS 10 mL 徐徐注入腹腔內，提起鼠尾上下抖動促使巨噬細胞均勻懸浮在 PBS 中，而後抽出先前注入之 PBS 緩衝液，在室溫下以 300 xg 離心 5 分鐘，去掉上清液並將 pellet 拍散，加入 RBC lysis buffer 來回吸放細胞 1 分鐘後，靜置約 2 分鐘，再以 300 xg 離心 5 分鐘，去上清液後拍散 pellet，再加入 5 mL DMEM 培養基，進行細胞計數並調整適當之細胞數後，備用。

8. 小鼠脾貼附細胞之取得

將完成非特異性餵食試驗之 Balb/c 小鼠取出脾臟，以潤濕 PBS 之載玻片磨碎脾臟取出脾細胞，置於裝有 6 mL PBS 培養基中，在室溫下以 300 xg 離心 5 分鐘，去掉上清液並將 pellet 拍散，加入 RBC lysis buffer 來回吸放細胞 1 分鐘後，靜置約 2 分鐘，再以 300 xg 離心 5 分鐘，去上清後拍散 pellet，再加入 10 mL DMEM 培養基備用。而後將細胞液依適當濃度接種於不同大小之微量分

析孔盤，於 37 °C，5% CO₂ 培養箱內靜置培養 2 小時後，更換 DMEM 培養基，而仍吸附在微量分析孔盤者即為脾貼附細胞。

9. 刺激小鼠巨噬細胞產生一氧化氮(NO) 試驗

根據 Sheu F.(2001) 之方法，將小鼠腹腔之巨噬細胞與脾貼附細胞 (10⁵ cells/well) 100 μL 以 96 孔培養盤，並加入 1 mg/mL 之 LPS 或 DMEM medium 100 μL，於 37 °C，5 % 二氧化碳培養箱中培養約 24 小時，取細胞培養液 140 μL，加入 Griess reagent (0.05 % N-(1-naphthyl)ethyl-enediamine hydrochloride, 0.5 % sulfanilamide, 2.5 % orthophosphoric acid) 140 μL，在酸性溶液中亞硝酸根與 Griess reagent 反應形成紫紅色 azo dye 產物，在 540 nm 處具有最大吸光值。以佰歐瑞(Bio-Rad)公司之 Bio-Rad Model 3550-UV ELISA Reader 測定 540 nm 之吸光值，並由 nitrite 標準曲線計算樣品亞硝酸根濃度。

10. 細胞激素 TNF-alpha 的測定

小鼠巨噬細胞養液中 TNF- alpha 的定量利用必帝公司 (BD Pharmingen) 之 TNF- alpha OptEIA Set 進行。將小鼠之巨噬細胞與脾貼附細胞 (10⁵ cells/well) 100 μL 於 96 孔微量分析孔盤中培養，並加入 1 mg/mL 之 LPS 或 DMEM medium 100 μL，於 37 °C，5 % CO₂ 培養箱中培養約 24 小時。

預先 coating 稀釋於緩衝溶液之抗體 100 μL，清洗後加入 200 μL 之 blocking solution 於室溫下反應 1 h，清洗後再置入樣品並以 diluent solution 製作標準曲線，室溫下反應 2 h，清洗後再置入 100 μL 之 detection antibody 及 advin-HRP，並於室溫下反應 1 h，清洗後加入 ABTS substrate solution 50 μL，反應約 30 min 後以 ELISA microplate reader 測定 450 nm 下之吸光值。每次實驗皆有三重複並與標準曲線比對，以測得樣品濃度來計算其產生量。

11. 小鼠脾細胞的取得

將完成特異性餵食試驗之 Balb/c 小鼠取出脾臟，以載玻片潤濕磨碎脾臟取出脾細胞，置於裝有 6 mL PBS 培養基中，在室溫下以 300 xg 離心 5 分鐘，去掉上清液並將 pellet 拍散，加入 RBC lysis buffer 來回吸放細胞 1 分鐘後，靜置約 2 分鐘，再以 300 xg 離心 5 分鐘，去上清液後拍散 pellet，再加入 6 mL DMEM 培養基，備用。

12. 小鼠脾細胞增生活性分析 (MTT assay)

將餵食各組保健植物樣本小鼠已分離好之脾細胞，培養於 DMEM 培養基中，將細胞數目調整至 5x10⁶ /mL，取 0.1 mL 細胞懸浮液接種於 96 well 培養皿中，並添加原來之刺激抗原 OVA 50 μL，於 96 well 培養皿中與脾細胞共同培養 72 h 後，加入 20 μL 之 MTT 溶液，反應 5 h 後離心移除上層液後，再加入等量移除上層液之 DMSO 於暗室反應 5 min，以 ELISA microplate reader 測定 540 nm 之吸光值。

13. 小鼠脾細胞增生活性分析 (BrdU assay)

利用 Roche Brd-U cell proliferation 套組進行分析。將飼食各組保健植物樣本小鼠已分離好之脾細胞，培養於 DMEM 培養基中，將細胞數目調整至 5×10^6 /mL，取 0.1 mL 細胞懸浮液接種於 96 well 培養皿中，並添加原來之刺激抗原 OVA 50 μ L，於 96 well 培養皿中與脾細胞共同培養 48 h 後，每 well 加入 10 μ L 之 10 mM BrdU，24 h 後以 300 xg, 5 min 之離心使細胞沉澱在分析盤底部，移除培養液後以 PBS 清洗乾淨，每 well 加入 fix denate solution 150 μ L，室溫下放置 30 min 後移除，清洗後再加入 200 μ L 之 blocking solution 於室溫放置 90 min，並加入 anti-BrdU-peroxidase 抗體 100 μ L，室溫下放置 90 min，清洗後於每 well 加入 TMB substrate solution 100 μ L，室溫下放置約 3 min 後加入 stop solution (1M H₂SO₄) 25 μ L，最後以 ELISA microplate reader 測定 450 nm 之吸光值。

14. OVA 特異性之抗血清效價測定

將完成飼食實驗以及 OVA 免疫三次之 Balb/C 小鼠，以 20 % Acepromazine Maleate 麻醉後照光數十分鐘以促進血液循環，遂進行尾部採血約取 200 μ L，待血液沉降 10 分鐘後以桌上型簡易離心機進行離心以獲得血清，存於 4 °C 中暫放，備用。預先 coating 之 1mg/mL OVA 50 μ L 以及不同濃度之 mouse IgG 50 μ L 作為標準品，於 4 °C 中放置一晚，而後以 wash buffer 清洗三次後加入 blocking buffer 150 μ L 於室溫下放置 2 小時，此時，於預先 coating OVA 者加入預設濃度之抗血清 50 μ L，至於預先 coating mouse IgG 者則是繼續加入 blocking buffer 共 2 小時，以 wash buffer 清洗五次後每 well 加入二級抗體 goat anti-mouse IgG-AP 50 μ L 放置 2 小時，再以 wash buffer 清洗五次後加入酚氨磷酸反應液 (PnPP)：PnPP tablet + Tris buffer tablet 完全溶於 20 mL 之 DI，每 well 加入 50 μ L，於黑暗中反應呈色完全後(金黃色) 以佰歐瑞(Bio-Rad)公司初品之 Bio-Rad Model 3550-UV ELISA Reader 測其在 405 nm 的吸光值。每次實驗皆有三重複並與標準曲線比對，以測得樣品各吸光值後求得各 IgG 濃度。

四、執行進度及成果

1. 血球凝集試驗

藉由血球凝集試驗，可以判斷此些樣品是否含有凝集活性之血球凝集素 (hemagglutinin)。實驗上以 FIP-five (一種已知具凝血活性的金針菇親醣蛋白)作為 positive control，而以 PBS 作為 negative control，將樣本與血球共同靜置一小時後，具凝集活性之樣本處理之血球會呈現一片紅底，而其他不具凝集活性

之樣品則是呈圈餅狀(doughnut)。

實驗結果如 Fig. 1 所示，山防風、白鶴靈芝、山葡萄、荔枝草、砂仁、雞血藤、大棗等七種保健植物樣本中，僅雞血藤樣本具凝集小鼠血球之特性，其有效濃度為 5-20 mg/mL。

2. 保健植物樣本對小鼠脾細胞增生效應的影響 (體外試驗)

此部份研究欲以體外實驗，探討山防風、白鶴靈芝、山葡萄、荔枝草、砂仁、雞血藤、大棗等七種保健植物樣本對小鼠脾細胞增生效應的影響。實驗上，自健康小鼠取得脾細胞，將脾細胞分別與七種保健植物樣本於 200 $\mu\text{g/mL}$ 下共同培養 72 h，之後分別以 MTT assay 分析樣本處理後小鼠脾細胞的代謝活性，以及利用 ELISA BrdU assay 分析樣本處理後，小鼠脾細胞的 DNA 複製效應，探討各種樣本對小鼠脾細胞的免疫調節作用。

MTT 分析是利用活細胞的胞內酵素將 MTT(methyl-thiazolyltetrazolium salt) 轉換成藍紫色之 formazan 產物，由於此作用僅在活細胞中進行並堆積在細胞內，而 formazan 之形成量與細胞數量呈正相關性，故細胞還原 MTT 之能力代表粒線體之活性，如此可作為細胞存活率之指標。

實驗結果如 Fig. 2 所示，雞血藤、荔枝草、大棗三種保健植物樣本對小鼠脾細胞的 MTT 代謝活性具顯著的促進作用 ($p < 0.05$)，其中雞血藤樣品在 200 $\mu\text{g/mL}$ 時具有最高之細胞還原 MTT 之能力，顯示有促進小鼠脾細胞增生的效果。

由於雞血藤樣本身具深褐色的色澤，或有可能干擾可能會影響 MTT 分析之結果之準確性，因此，我們輔以 BrdU 法，探討保健樣本是否提高小鼠脾細胞的核酸複製。BrdU 分析是利用溴尿苷, Br-Uridine (BrdU) 取代胸腺嘧啶(thymidine)作為細胞合成 DNA 之材料，讓分裂中的細胞自由攝取 BrdU，之後再以 BrdU 之特異性抗體辨識被細胞攝取、利用之 Brd-U 分子，藉由偵測定量來推斷細胞之增生活性。

ELISA BrdU assay 的結果如 Fig. 3 所示，結果發現山防風、白鶴靈芝、大棗三種樣本對小鼠脾細胞的 BrdU 攝取具顯著的促進作用($p < 0.05$)，顯示經此三種樣本處理後之小鼠脾細胞，具較高之細胞分裂率，其中，以大棗樣本的效果最高。

比較 MTT assay 與 BrdU assay 的結果，我們發現在 MTT assay 與 BrdU assay 的結果不完全一致，在 MTT 中，我們發現雞血藤、荔枝草、大棗三種樣本有提高小鼠脾細胞增生的作用；而在 BrdU assay 中，則發現山防風、白鶴靈芝、大棗三種樣本具提高小鼠脾細胞增生的活性。與 conA 處理之正控制組相較，這些保健植物促進小鼠脾細胞增生的效應僅約 conA 的 10% 左右 (data not shown)，因此這些保健植物樣本不屬於裂殖素 (mitogen)，但具免疫調

節的活性。

3. 保健植物樣本對小鼠脾細胞分泌干擾素 IFN- γ 的影響 (體外試驗)

當小鼠脾細胞到刺激活化後，受活化的 T 細胞和 NK 細胞便會產生 IFN- γ ，可增加抗原呈現細胞的功能，以及干擾病毒複製，並可抑制腫瘤細胞的生長，因此 IFN- γ 是免疫系統抵禦病原菌入侵、病毒複製、腫瘤生長的最重要細胞激素之一。此部份研究欲以體外實驗，探討山防風、白鶴靈芝、山葡萄、荔枝草、砂仁、雞血藤、大棗等保健植物樣本對小鼠脾細胞分泌干擾素 IFN- γ 的影響。

實驗上，自健康小鼠取得脾細胞，將脾細胞分別與七種保健植物樣本於 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下共同培養 72 h，之後以 ELISA assay 分析樣本處理後，計算各組細胞培養液中 IFN- γ 的濃度。

由 Fig. 4 中可發現山防風、山葡萄、砂仁、荔枝草等四種保健植物樣本均能顯著提高處理後小鼠脾細胞的干擾素 IFN- γ 的分泌量 ($p < 0.05$)，其中以山防風的效果最佳，經其處理後的小鼠脾細胞培養液中，IFN- γ 的濃度可達 1,805 pg/mL ，為對照組的 100 倍以上，而荔枝草的活性次之。

進一步探討不同濃度的山防風與荔枝草樣本對小鼠脾細胞分泌干擾素 IFN- γ 的影響，結果發現在 0 - 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度下，山防風與荔枝草提高小鼠脾細胞的干擾素 IFN- γ 分泌的活性具劑量效應 (Fig. 5)，且最適濃度約介於 250 - 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。這些結果顯示山防風、山葡萄、砂仁、荔枝草均具有提高小鼠脾細胞分泌干擾素 IFN- γ 的免疫調節活性。

4. 脾貼附細胞之活化 (體內試驗)

餵食試驗流程如 Fig. 6 所示，則以餵食荔枝草保健植物樣本之小鼠，犧牲後取其脾貼附細胞以 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 之刺激活化，於 37°C 之 CO_2 培養箱中培養 24 小時後，取其細胞培養液作分析，發現相較於 control 組 PBS 可以顯著 ($p < 0.05$) 產生 NO 及 TNF- α 。NO 可為巨噬細胞所產生的免疫活性物質，是一種短暫存在之自由基，也是多用途之訊息傳導分子；而 TNF- α 則是對機體有保護作用，包括對免疫細胞之活化、促進增殖和分化作用等，因此餵食荔枝草保健植物樣本可能可以進一步活化巨噬細胞。

餵食白鶴靈芝、砂仁、山葡萄及大棗樣本之小鼠，其脾貼附細胞於 LPS 之刺激活化下，相較於 control 組 PBS 產生 NO 及 TNF- α 則相對降低，表示餵食此些樣本保健植物可能可以某種程度抑制發炎反應，結果如 Fig. 7 及 Fig. 8 所示。餵食保健植物樣本以活化脾貼附細胞之實驗雖已有初步之結果，但為了避免可能是小鼠本身個體差異之故，仍須要再重複多次試驗以確定其再現性。

5. 腹腔巨噬細胞之活化 (體內試驗)

餵食試驗流程如 Fig. 6 所示，則以餵食荔枝草樣本之小鼠，犧牲後取其腹腔細胞以 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 之刺激活化下，於 37°C，5 % CO_2 之培養箱中培養 24 小時後，相較於 control 組 PBS 可以產生顯著 ($p < 0.05$) 之 NO，因為腹腔細胞中以巨噬細胞占多數，而巨噬細胞受到 LPS 之激活後會大量表現一氧化氮合成酶，因此分析 NO 的產量是評估腹腔細胞受到活化程度的重要指標之一，因此餵食荔枝草保健植物樣本可能可以進一步活化巨噬細胞。

而餵食砂仁、山葡萄及大棗樣本之小鼠，其腹腔巨噬細胞於 LPS 之刺激活化下，相較於 control 組 PBS 產生 NO 則是降低，表示餵食此些保健植物樣本可能可以某種程度抑制發炎反應，結果如 Fig. 9 所示。另外，餵食荔枝草樣本之小鼠，其腹腔巨噬細胞以 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 之刺激活化 24 小時後，相較於 control 組 PBS 可以產生顯著 ($p < 0.05$) 之 TNF-alpha，而 TNF-alpha 可以加強巨噬細胞之吞噬作用，並誘生多種免疫調節物質等，所以可能可以進一步活化巨噬細胞。其他餵食山防風、白鶴靈芝、砂仁、山葡萄及大棗樣本之小鼠，其腹腔巨噬細胞於 LPS 之刺激活化下，相較於 control 組 PBS 產生 TNF-alpha 則相對降低，表示餵食此些保健植物樣本可能可以某種程度抑制發炎反應，結果如 Fig. 10 所示。

然而，餵食保健植物樣本以活化脾貼附細胞之實驗雖已有初步之結果，為了避免可能是小鼠本身個體差異之故，仍須再重複多次試驗以確定其再現性。

6. 經餵食保健植物樣本之 OVA 特異性小鼠脾細胞增生活性分析 (體內試驗)

MTT 分析是利用活細胞的胞內酵素將 MTT(methyl-thiazolyltetrazolium salt) 轉換成藍紫色之 formazan 產物，由於此作用僅在活細胞中進行並堆積在細胞內，而 formazan 之形成量與細胞數量呈正相關性，故細胞還原 MTT 之能力代表粒線體之活性，如此可作為細胞存活率之指標。

小鼠餵食試驗共進行三次。由 Fig. 11 可知，餵食各保健植物樣品對於特定抗原 OVA 之活化小鼠脾細胞，其細胞增生的能力相較於餵食控制組(PBS)並無顯著之提升，但是，若將各處理組以 OVA 活化試驗組之吸光值減去各控制組，所得結果相對於餵食控制組(PBS)換算為百分增生率，則發現山防風、山葡萄、荔枝草、白鶴靈芝與砂仁，可顯著促進 OVA 特異之脾細胞增生 ($p < 0.05$)，其增生率分別提高 103 %、48 %、38 %、38 % 與 37 %，而又以餵食山防風處理者最佳(Fig. 12)。

上述結果顯示餵食山防風、山葡萄、荔枝草、白鶴靈芝與砂仁，可提高小鼠之 OVA 特異性脾細胞增生，有助於提高特異性免疫反應。

BrdU 分析是利用溴尿苷, Br-Uridine (BrdU) 取代胸腺嘧啶 (thymidine)作為細胞合成 DNA 之材料，讓分裂中的細胞自由攝取 BrdU，之後再以 BrdU 之

特異性抗體辨識被細胞攝取、利用之 Brd-U 分子，藉由偵測定量來推斷細胞之增生活性。

小鼠餵食試驗共進行三次。由 Fig. 13 可知，餵食各保健植物樣品對於特定抗原 OVA 之活化小鼠脾細胞，其細胞增生的能力相較於餵食控制組(PBS)並無顯著之提升，但是，若將各處理組以 OVA 活化試驗組之吸光值減去各控制組，所得結果相對於餵食控制組(PBS)換算為百分增生率，則發現山防風、荔枝草與雞血藤具有較顯著($p < 0.05$)之百分增生率(Fig. 14)，其增生率分別提高 41%、35%與 26%。

上述結果顯示餵食山防風、荔枝草與雞血藤，可提高小鼠之 OVA 特異性脾細胞增生，有助於提高特異性免疫反應。其中，餵食山防風與荔枝草處理者在 MTT 與 BrdU 具有一致性刺激細胞增生之效應。

然而，餵食保健植物樣本以活化脾臟細胞之實驗雖已有初步之結果，但為了避免可能是小鼠本身個體差異之故，仍須再重複多次試驗以確定其再現性。

7. 血清中 OVA 特異性 IgG 之抗血清效價 (體內試驗)

餵食各種保健植物樣本與 PBS 之小鼠，以腹腔注射 OVA 作為抗原，測定血清中抗 OVA 之 IgG 效價。

將小鼠的血清以 serum diluent 稀釋 200 倍後以 ELISA 方法分析，再經過與標準曲線比較後，測定餵食各保健植物樣本之小鼠中含 OVA 特異性抗體 IgG 之含量，結果發現腹腔注射 OVA 之小鼠血清中抗 OVA 之 IgG 濃度較 naive 小鼠明顯提升，而未經腹腔注射 OVA 之小鼠，其血清中幾乎偵測不到 IgG 之含量，因此，結果顯示經注射特異性抗原後而餵食保健植物樣本之小鼠，可以刺激 B 細胞大量產生對外來抗原具專一性之抗體。

此外，餵食山防風及山葡萄樣本之小鼠，相較於對照組 (餵食 PBS) 有顯著差異 ($p < 0.05$)，結果如 Fig. 15 所示，表示食用山防風及山葡萄保健植物樣本時，對於外來抗原可以提升血清中抗體 IgG 之濃度，而提高特異性免疫反應，至於其他保健植物樣品雖亦能提升血清中抗體 IgG 之濃度，但是相較於 control 組 PBS 則是不顯著 ($p > 0.05$)。

五、計畫成果自評：

進度符合預期，並已開始著手進行體內試驗中，其他 cytokines 測定之相關實驗，如 IFN- γ 、IL-1 β 、IL-4 與 IL-6 等，以及評估餵食各保健植物樣品之免疫細胞吞噬能力表現等。

六、參考文獻：

- Chen J, Ding P, Xu X, Xu H. A resource investigation and commodity identification of *Fructus Amomi*. *Zhong Yao Cai*. 2001 Jan;24(1):18-9.
- Ding Y, Kinjo J, Yang CR, Nohara T. 1991. Triterpenes from *Mucuna birdwoodiana*. *Phytochemistry*. 1991;30(11):3703-7.
- Kernan MR, Sendl A, Chen JL, Jolad SD, Blanc P, Murphy JT, Stoddart CA, Nanakorn W, Balick MJ, Rozhon EJ. 1997. Two new lignans with activity against influenza virus from the medicinal plant *Rhinacanthus nasutus*. *J Nat Prod*. 1997 Jun;60(6):635-7.
- Kodama O, Ichikawa H, Akatsuka T, Santisopasri V, Kato A, Hayashi Y. 1993. Isolation and identification of an antifungal naphthopyran derivative from *Rhinacanthus nasutus*. *J Nat Prod*. 1993 Feb;56(2):292-4.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lee H, Lin JY. 1988. Antimutagenic activity of extracts from anticancer drugs in Chinese medicine. *Mutat Res*. 1988 Feb;204(2):229-34.
- Lin CC, Yen MH, Chiu HF, Chang CH. 1990. The pharmacological and pathological studies on Taiwan folk medicine (IV): The effects of *echinops grijisii* and *e. Latifolius*. *Am J Chin Med*. 1990;18(3-4):113-20.
- Sendl A, Chen JL, Jolad SD, Stoddart C, Rozhon E, Kernan M, Nanakorn W, Balick M. 1996. Two new naphthoquinones with antiviral activity from *Rhinacanthus nasutus*. *J Nat Prod*. 1996 Aug;59(8):808-11.
- Sheu, F., Lai, H. H. and Yen, G. C. 2001. Suppression effect of soy isoflavones on nitric oxide production in RAW 264.7 Macrophages. *J. Agric. Food Chem*. 49(4): 1767-1772.
- Shi TY, Kim HM. 2002. Inhibition of immediate-type allergic reactions by the aqueous extract of *Salvia plebeia*. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2002 May;24(2):303-14.
- Shou C, Feng Z, Wang J, Zheng X. 2002. The inhibitory effects of jujuboside A on rat hippocampus in vivo and in vitro. *Planta Med*. 2002 Sep;68(9):799-803.
- Southgate, D. A. T. The non-starch polysaccharide methods. In *Dietary Fiber Analysis*; Southgate, D. A. T., Ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, U. K., 1995; p 87-118.
- Srivastava, R.; Kulshreshtha, D. K. *Phytochem*. 1999, 28:2877.
- Wang WK, Bau JG, Hsu TL, Wang YY. 2000. Influence of spleen meridian herbs on the harmonic spectrum of the arterial pulse. *Am J Chin Med*. 2000;28(2):279-89.
- Wu TS, Hsu HC, Wu PL, Leu YL, Chan YY, Chern CY, Yeh MY, Tien HJ. 1998. Naphthoquinone esters from the root of *Rhinacanthus nasutus*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1998 Mar;46(3):413-8.
- Wu TS, Hsu HC, Wu PL, Teng CM, Wu YC. 1998. Rhinacanthin-Q, a naphthoquinone from *Rhinacanthus nasutus* and its biological activity. *Phytochemistry*. 1998 Dec;49(7):2001-3.

- Xu Z, Liu X, Xu G. R. 1995. [Chemical constituents of roots of *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim) Trautv.] *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 1995 Aug;20(8):484-6, 512.
- Yabe N, Matsui H. 1997. *Ampelopsis brevipedunculata* (Vitaceae) extract stimulates collagen synthesis through superoxide generation in the serum-free cultures of rat dermal fibroblasts and Ito cells. *J Ethnopharmacol*. 1997 Mar;56(1):67-76.
- Yabe N, Matsui H. 1997. Effects of *Ampelopsis brevipedunculata* (Vitaceae) extract on hepatic M cell culture: function in collagen biosynthesis. *J Ethnopharmacol*. 1997 Mar;56(1):31-44.
- Yabe N, Matsui H. 2000. *Ampelopsis brevipedunculata* (Vitaceae) extract inhibits a progression of carbon tetrachloride-induced hepatic injury in the mice. *Phytomedicine*. 2000 Dec; 7(6):493-8.
- Yabe N, Tanaka K, Matsui H. 1998. An ethanol-extract of *Ampelopsis brevipedunculata* (Vitaceae) berries decreases ferrous iron-stimulated hepatocyte injury in culture. *J Ethnopharmacol*. 1998 Jan;59(3):147-59.
- Yang LL, Yen KY, Kiso Y, Hikino H. 1987. Antihepatotoxic actions of Formosan plant drugs. *J Ethnopharmacol*. 1987 Jan-Feb;19(1):103-10.
- Yu J, Sun L, Zhou L, Luo X, Guo J, Liu C, Cong P. 1997. Chemical constituents of fructus *Amomi*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 1997 Apr;22(4):231-2, 255.
- Zeng Y, Hu D, Din P, Chen J, Xu H. 1999. Studies on quality standard of *Fructus Amomi*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 1999 Nov;24(11):651-3, 701.

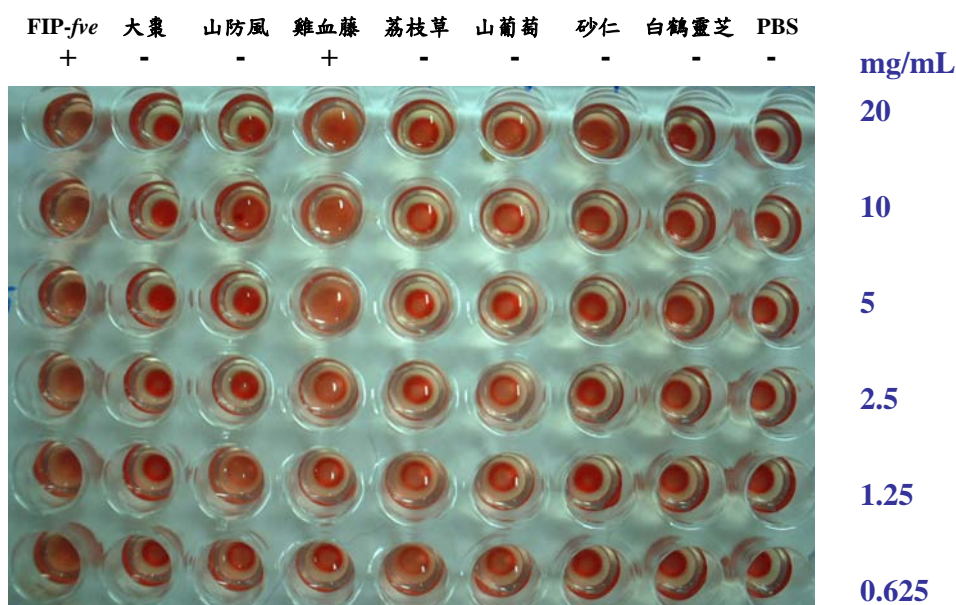


Figure 1. Hemagglutination assay of different sample (20 - 0.625 mg/mL) on BALB/C mouse red blood cells.

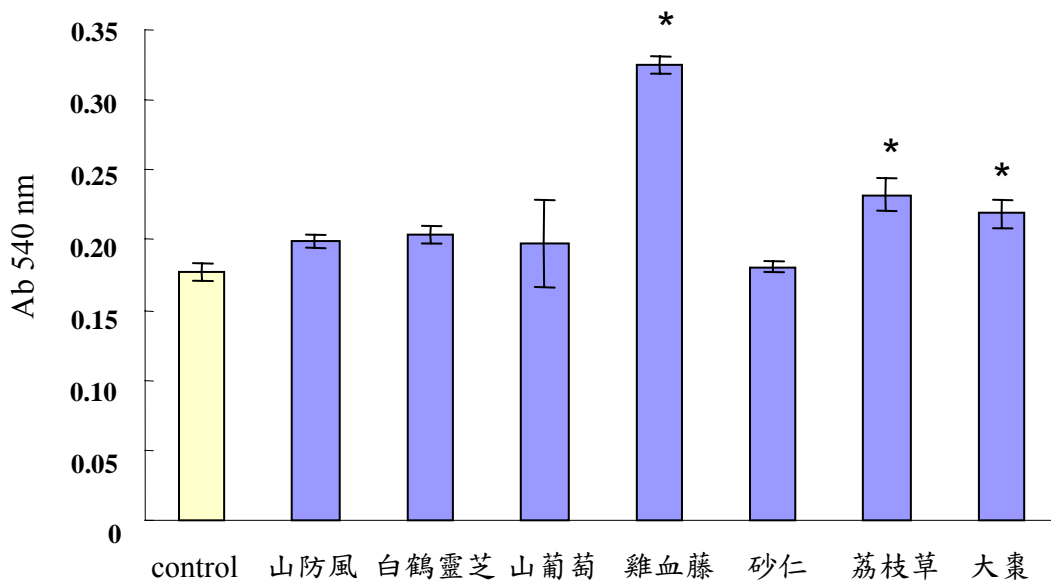


Figure 2. Effect of herbal samples on the proliferation of mouse splenocytes. Mouse splenocytes were cultured in the presence of different sample at 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 72 h. MTT metabolization of the cells were determined to evaluate their viability. Data are shown as mean \pm S.D (n = 3).

* : Data is significantly different to the control (p < 0.05).

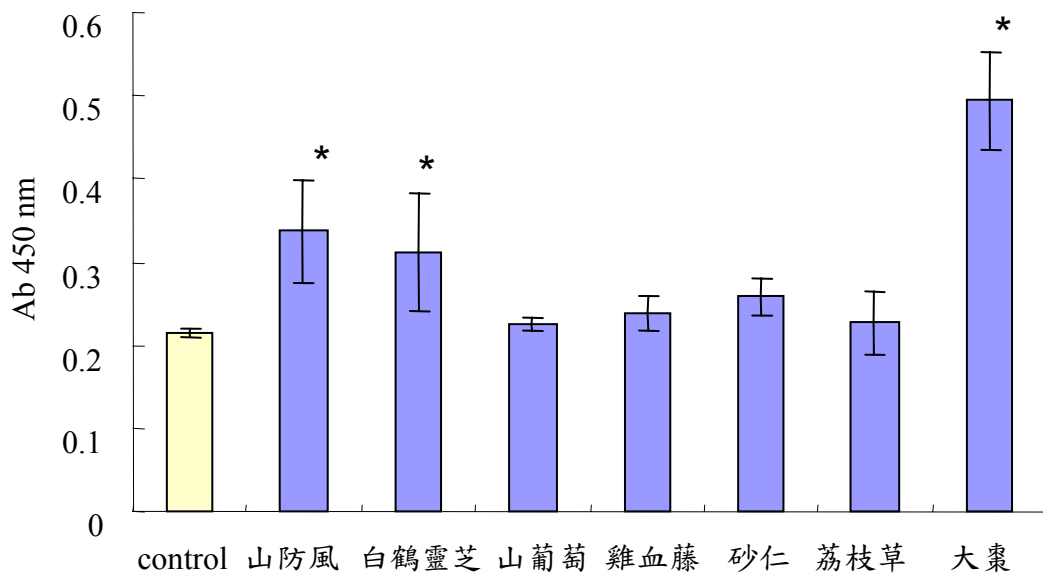


Figure 3. Effect of herbal samples on the proliferation of mouse splenocytes. Mouse splenocytes were cultured in the presence of different sample at 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h. Then BrdU (10 mM) was added to each well and the culture was continued for another 24 h. Cell proliferation of each treatment was further determined by means of ELISA BrdU assay. Data are shown as mean \pm S.D (n = 3).

* : Data is significantly different to the control (p < 0.05).

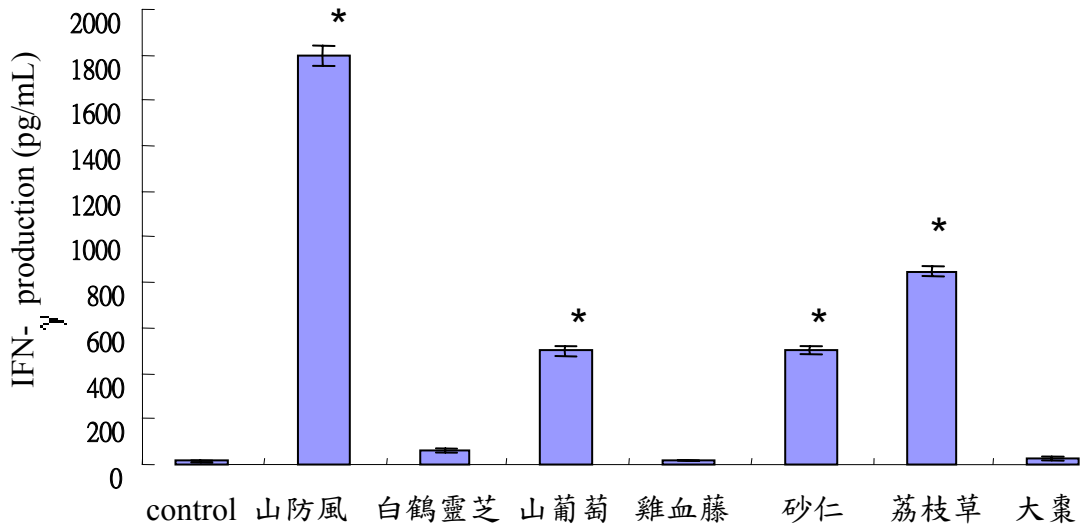


Figure 4. Effect of herbal samples on the secretion of gamma-interferon (IFN- γ) by mouse splenocytes. Mouse splenocytes were cultured in the presence of different sample at 250 $\mu\text{g/mL}$ for 72 h. IFN- γ levels of the cultured soup were measured using sandwich ELISA. Data are shown as mean \pm S.D (n = 3).

* : Data is significantly different to the control (p < 0.05).

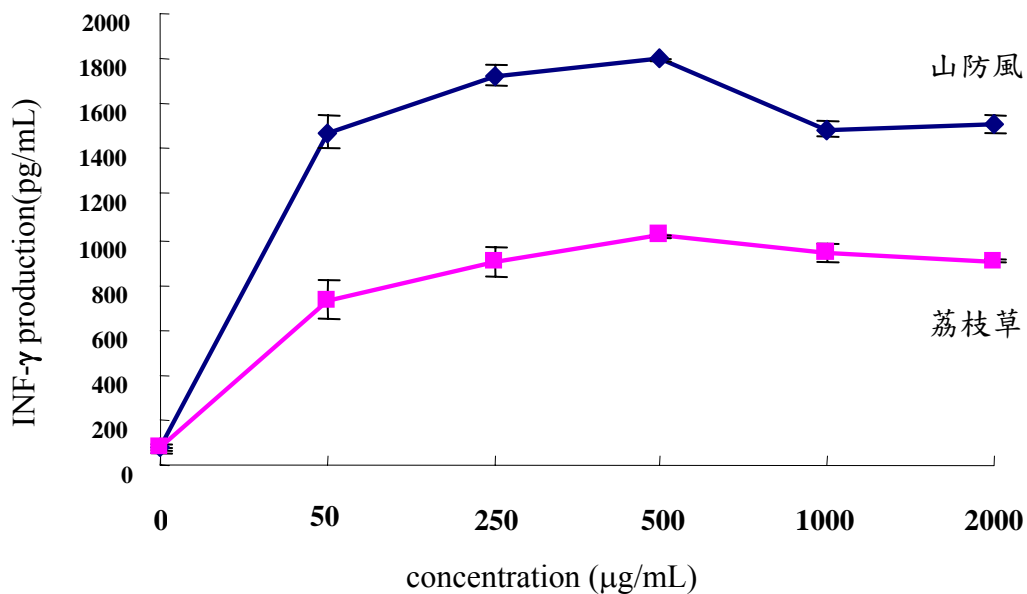


Figure 5. Effect of herbal samples on the secretion of gamma-interferon (IFN- γ) by mouse splenocytes. Mouse splenocytes were cultured in the presence of different sample at 250 $\mu\text{g/mL}$ for 72 h. IFN- γ levels of the cultured soup were measured using sandwich ELISA. Data are shown as mean \pm S.D (n = 3).

* : Data is significantly different to the control (p < 0.05).

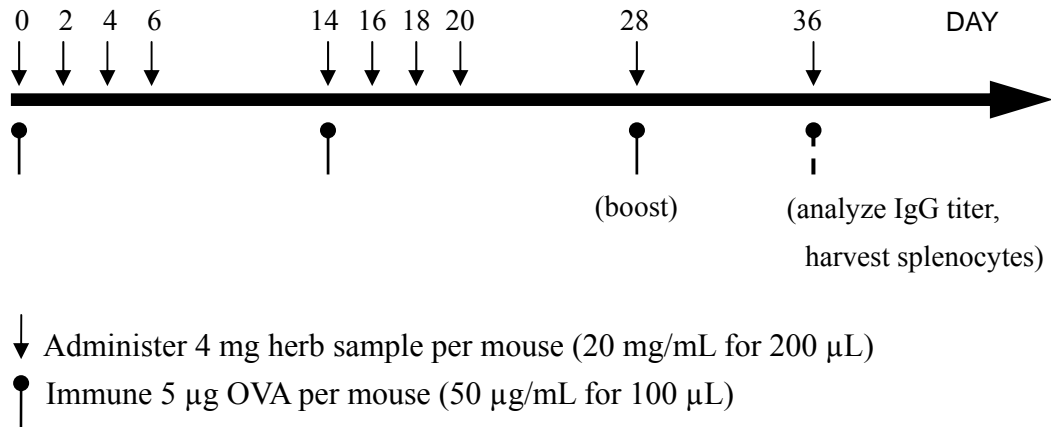


Figure 6. Administration protocol. The procedures of administration and i.p. injection were described in the section of materials and methods. The schedules of administration and experiments are shown.

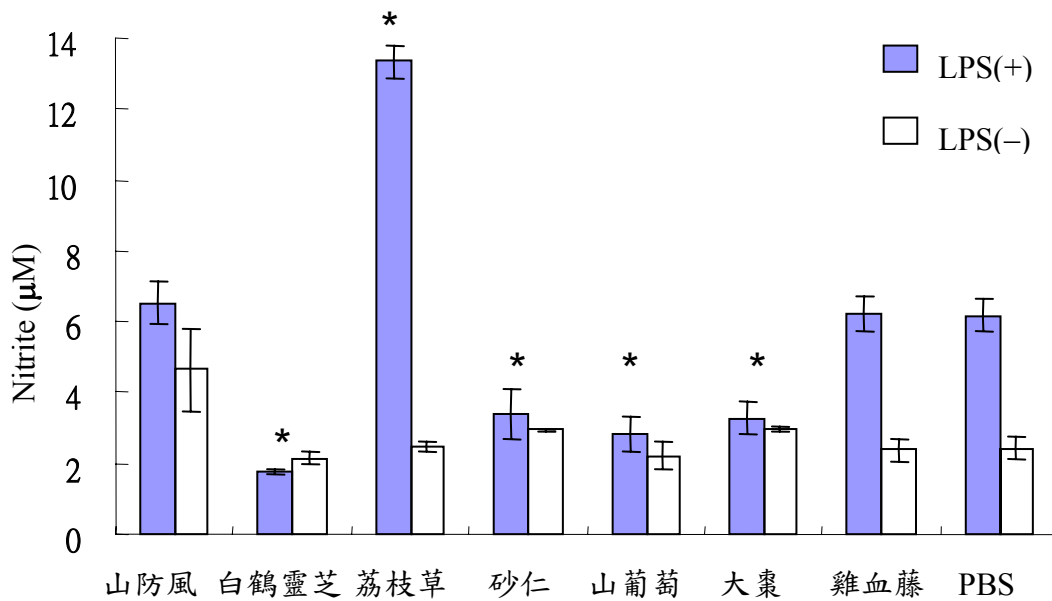


Figure 7. Effect of feeding herbal samples on the secretion of NO by mouse adherent splenocytes. Mouse adherent splenocytes were cultured in the presence 5 µg/mL LPS for 24 h or not. NO level of the cultured soup were measured using Griess reagent. Data are shown as mean ± S.D (n = 3).

* : Data is significantly different to the control (p < 0.05).

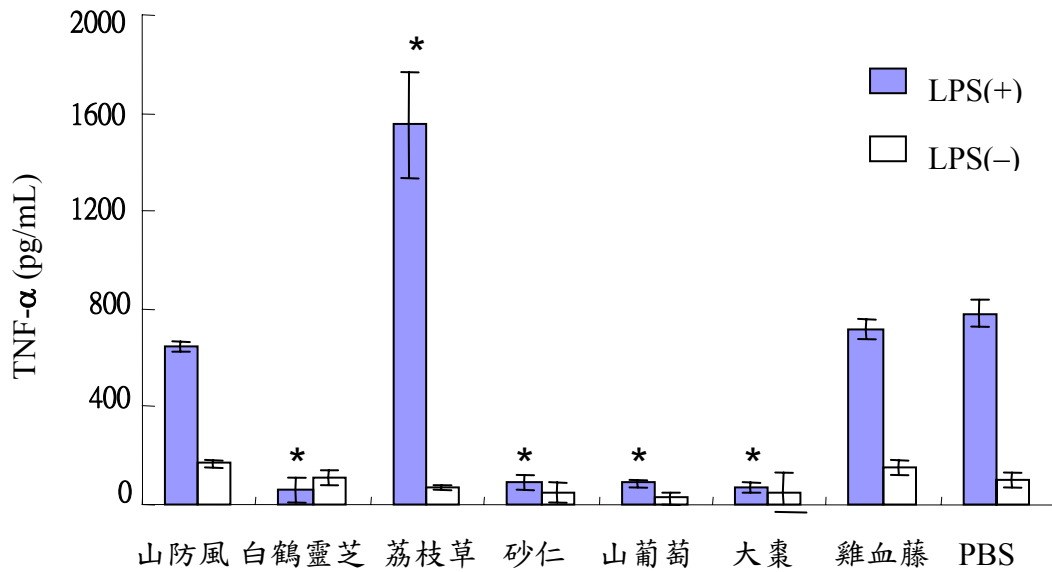


Figure 8. Effect of feeding herbal samples on the secretion of TNF- α by mouse adherent splenocytes. Mouse adherent splenocytes were cultured in the presence 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS for 24 h or not. TNF- α level of the cultured soup were measured using sandwich ELISA. Data are shown as mean \pm S.D (n = 3).

* : Data is significantly different to the control (p < 0.05).

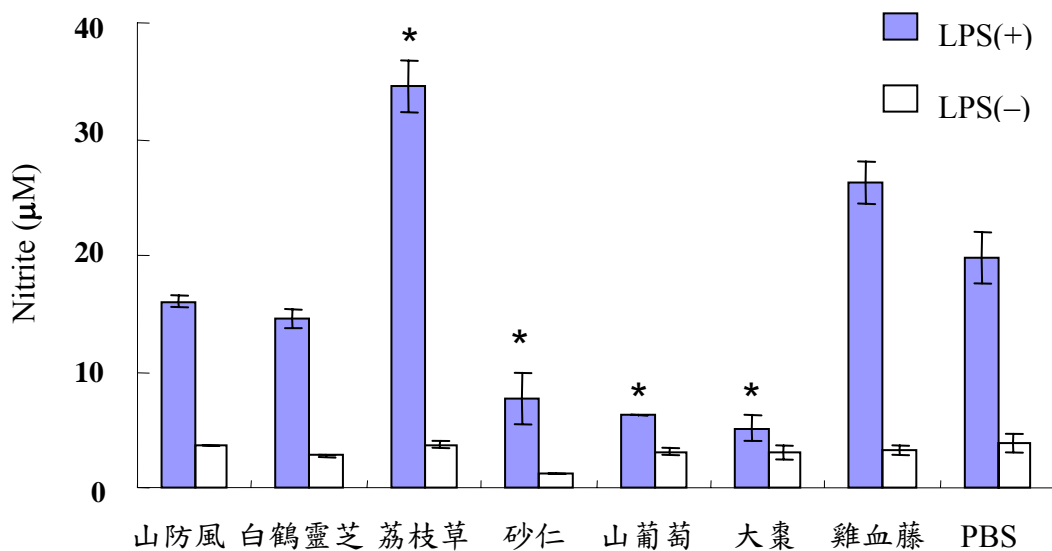


Figure 9. Effect of feeding herbal samples on the secretion of NO by mouse peritoneal cells. Mouse peritoneal cells were cultured in the presence 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS for 24 h or not. NO levels of the cultured soup were measured using Griess reagent. Data are shown as mean \pm S.D (n=3).

* : Data is significantly different to the control (p < 0.05).

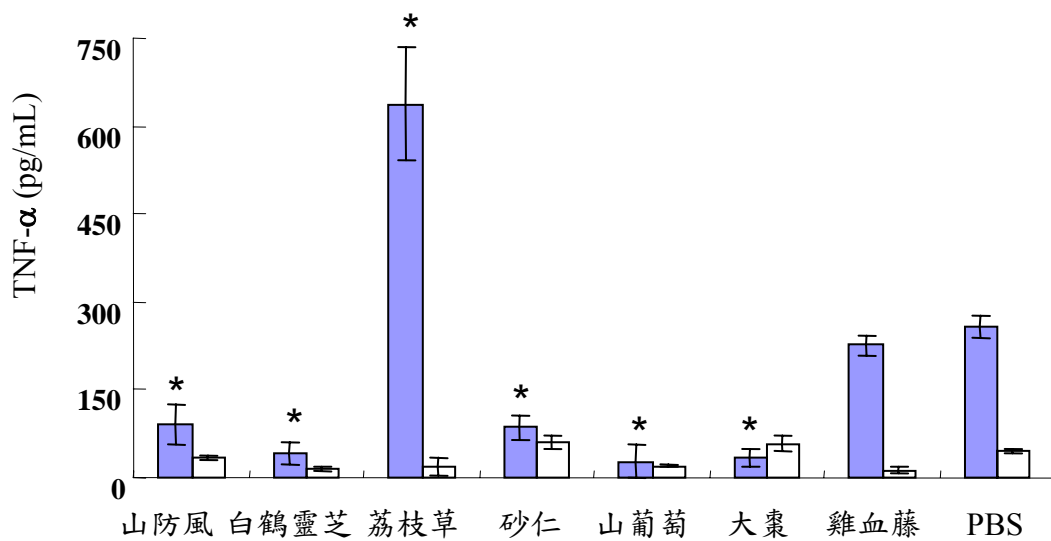


Figure 10. Effect of feeding herbal samples on the secretion of TNF- α by mouse peritoneal cells. Mouse peritoneal splenocytes were cultured in the presence 5 μ g/mL LPS for 24 h or not. TNF- α level of the cultured soup were measured using sandwich ELISA. Data are shown as mean \pm S.D (n = 3).

* : Data is significantly different to the control (p < 0.05).

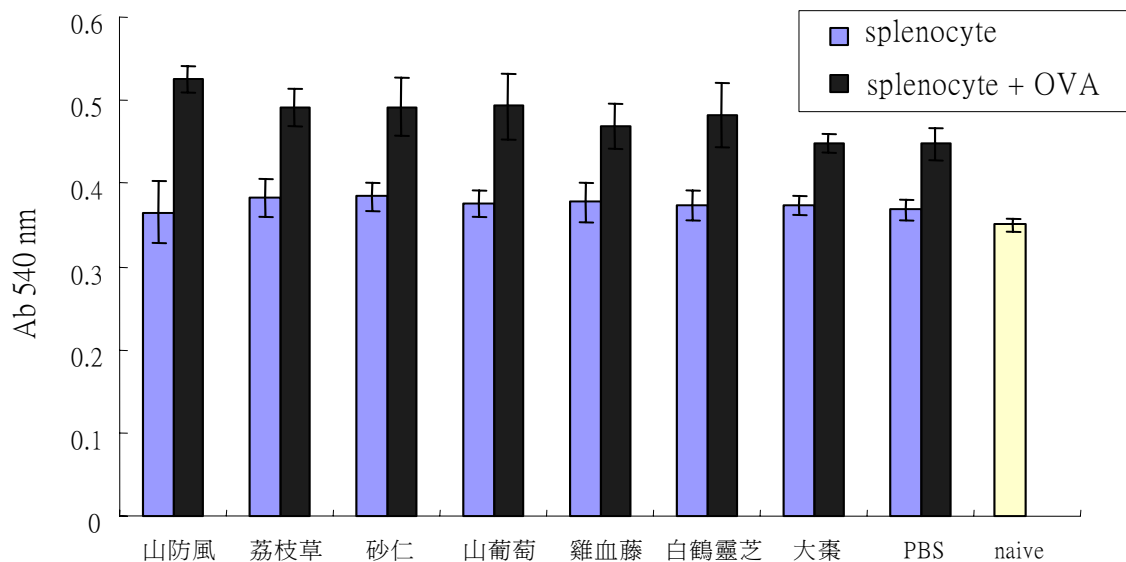


Figure 11. Effects of oral administrating herbal extracts from *Salvia plebeia*, *Ampelopsis brevipedunculata*, *Amomi fructus*, *Rhinacanthus nasutus*, *Echinops grijsii*, *Millcttia reticulata*, and *Zizyphus jujube* on OVA - specific cell proliferation by Balb/C mouse splenocytes. Cell viability was determined using MTT assay.

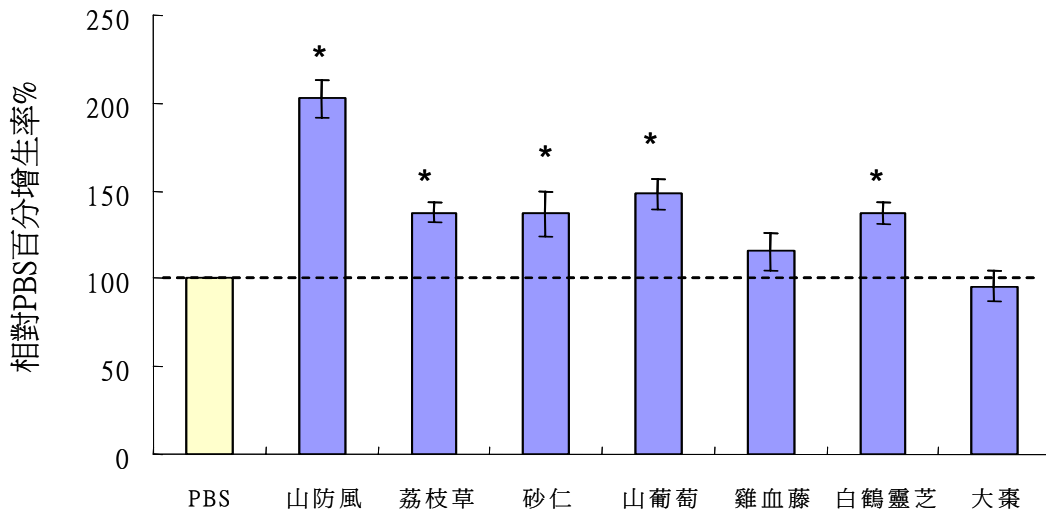


Figure 12. Relative OVA-specific cell proliferation of herbal samples of *Salvia plebeia*, *Ampelopsis brevipedunculata*, *Amomi fructus*, *Rhinacanthus nasutus*, *Echinops grijsii*, *Millcttia reticulata*, and *Zizyphus jujube* to the PBS control. Cell proliferation was measured using MTT assay. * : Data is significantly different to the control ($p < 0.05$).

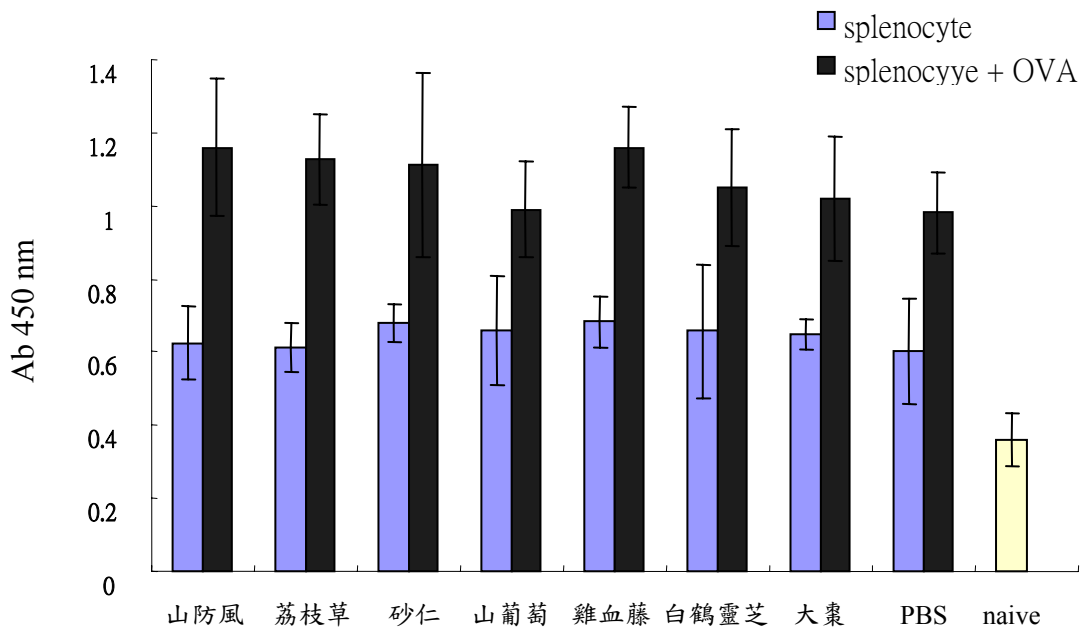


Figure 13. Effects of oral administering herbal extracts from *Salvia plebeia*, *Ampelopsis brevipedunculata*, *Amomi fructus*, *Rhinacanthus nasutus*, *Echinops grijsii*, *Millcttia reticulata*, and *Zizyphus jujube* on OVA – specific cell proliferation by Balb/C mouse splenocytes. Cell viability was determined using BrdU assay.

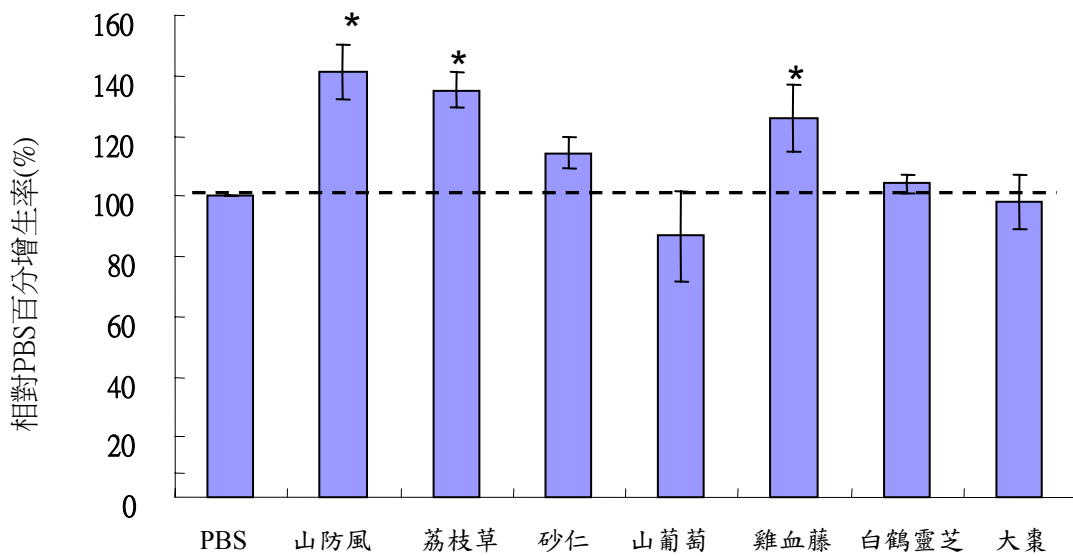


Figure 14. Effect of feeding herbal samples on the secretion of TNF- α by mouse peritoneal cells. Mouse peritoneal splenocytes were cultured in the presence 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS for 24 h or not. TNF- α level of the cultured soup were measured using sandwich ELISA. Data are shown as mean \pm S.D (n = 3).

* : Data is significantly different to the control (p < 0.05).

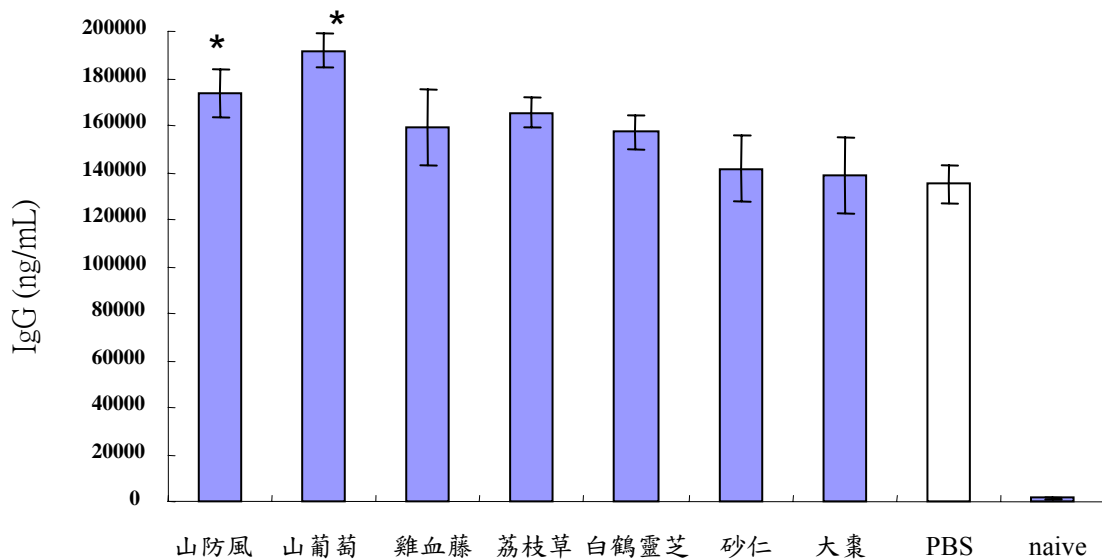


Figure 15. Effects of oral administrating herbal extracts from *Salvia plebeia*, *Ampelopsis brevipedunculata*, *Amomi fructus*, *Rhinacanthus nasutus*, *Echinops grijsii*, *Millcttia reticulata*, and *Zizyphus jujube* on the OVA-specific IgG production by Balb/C mouse.

* : Data is significantly different to the control (p < 0.05).