

編號：CCMP96-RD-024、CCMP97-RD-111

# 龍膽瀉肝湯對紅斑性狼瘡小鼠之調控機制 研究（全程總報告）

李宗諺  
長庚大學

## 摘 要

全身性紅斑性狼瘡是一種慢性、多器官侵蝕、系統的發炎性，它和免疫系統失調及廣泛性地免疫複合體沈積有關，同時可以見到細胞激素和發炎細胞共同產生的炎症反應。其病理機轉最主要是導因於身體所產生不同種類的自體抗體，以致於造成身體各個系統及器官的功能喪失會危及生命的疾病。

龍膽瀉肝湯是中醫臨床最常用的清熱瀉火劑之一，原為瀉肝膽實火、清下焦溼熱而設，但目前所使用的範圍則越來越廣，既廣被報導具有抑制脂質過氧化的作用，又兼具免疫調節的功能，但真正在實驗性紅斑性狼瘡的作用機制卻一直缺乏科學性的探討。

本計劃以 MRL lpr/lpr 小鼠為自發性的自體免疫疾病動物模式，小鼠在長大的過程中會出現類似人類全身性紅斑性狼瘡的症狀。實驗動物與以餵食龍膽瀉肝湯與龍膽草正丁醇萃取物二週後，收集血液與腎臟組織進行病理檢驗與免疫分析。實驗結果發現，龍膽瀉肝湯可以降低紅斑性狼瘡小鼠體內的氧化壓力，也確實改善了紅斑性狼瘡小鼠外觀脫毛潰爛發炎的現象。龍膽瀉肝湯對改善 MRL 小鼠有嚴重的腎臟增生，腎臟組織 IgG 染色沉積較輕。蛋白質體研究各組間有變化的標誌蛋白與腎臟滲透壓調控有密切的關係。有趣的是龍膽瀉肝湯治療後整個腎臟組織氧化壓力下降，抗氧化能力明顯提升。MRL 小鼠呈現明顯的脾臟腫大的現象，餵食龍膽瀉肝湯的小鼠脾臟明顯縮小，我們分析此作用與脾臟中調節性 T 細胞的表現有關。這項優勢也表現在龍膽瀉肝湯介入紅斑性狼瘡小鼠 MRL-lpr/lpr 治療，顯著降低血中 Anti-dsDNA、TNF- $\alpha$  與 IFN- $\gamma$  的濃度。上述之研究結果在龍膽草正丁醇萃取物餵食組有類似的表現。

藉由此研究，我們希望能進一步評估龍膽瀉肝湯具有治療人類全身性紅斑性狼瘡的潛力。

關鍵詞：龍膽瀉肝湯、紅斑性狼瘡、調節性 T 細胞

# **Modulated effects of Longdan Xiegan Tang on Systemic Lupus Erythematosus of MRL lpr/lpr Mice (Final Report)**

Lee Tzung-Yan  
Chang Gung University

## **ABSTRACT**

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic multisystem disorder of presumed autoimmune origin in which cytotoxic antibodies, or circulating immune complexes, give rise to tissue damage often resulting in end organ disease and even mortality.

Longdan Xiegan Tang (LXT) is a herbal medicine with purge gandanshihou (瀉肝膽實火) and clear xiajiaoshire (清下焦濕熱) effects. In addition, which has significant effect on oxygen free radicals and lipid peroxidation. In the present study we investigate its immunomodulatory effect on inhibiting autoimmune disease in MRL lpr/lpr mice. MRL lpr/lpr mice treats daily with LXT or 1-butanol extract of Gentianae Radix for 2 weeks. Histologic analysis of kidney tissue indicated that LXT could inhibit the mesangial proliferation that was evident in lupus nephritis. In addition LXT could promote antioxidant enzyme levels in kidney tissue of MRL mice. LXT restored cellular reduced glutathione levels, thereby limit the oxidative stress which is overproduction in MRL/lpr mice. In addition, LXT activated Treg and eliminated activated T lymphocytes responsible for lymphoproliferation and skin and kidney lesions, leading to significantly prolonged survival rates. This treatment also markedly reduced anti-ds-DNA autoantibody, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IgG immune-complex deposition in kidney tissue. The protein expression profiles in kidney tissue that are associated with the physiological and pathological change of osmotic pressure during SLE progression be analyzed by two-dimension gel electrophoresis and image analysis. Similar therapeutic effects also response to 1-butanol extract of Gentianae Radix treatment mice.

The study would fill a long-existing gap in Chinese medicine in the pathophysiological disorder of SLE. It may also lead to the discovery of potentially useful herb drugs for treating SLE in human patients.

Keywords: Longdan Xiegan Tang, SLE, Treg

## 壹、前言

全身性紅斑性狼瘡(systemic lupus erythematosus, SLE)是一種慢性、多器官侵蝕、系統的發炎性疾病，它和免疫系統失調(immune dysregulation)及廣泛性的免疫複合體形成有關<sup>1,2</sup>，同時可以見到細胞激素和發炎細胞共同產生的炎症反應以及大量的血球細胞凋亡(apoptosis)的現象<sup>3-6</sup>。其病理機轉至今仍不是很清楚，但已知最主要則是導因於免疫系統失調，產生不同種類的自體抗體(autotantibodies)，引發大量的免疫複合體以及過量的凋亡細胞(apoptotic cells)沈積等，無法被適當的清除，以致造成身體各系統及器官的功能損傷，甚而危及生命。

目前治療紅斑狼瘡病人仍多使用細胞毒性藥物如 cyclophosphamide 或是減少發炎反應藥物如類固醇(corticosteroids)等，然而這些藥物各有其副作用<sup>7</sup>。其中類固醇因為作用快、藥效強，是治療紅斑狼瘡最主要且最常用的藥物<sup>7,8</sup>。然而在台灣地區因為病患不能接受類固醇之副作用，而有高達 77.4% 的患者在病程中，會採取中、西醫併用方式，同時做醫療處理<sup>9</sup>。所以藉由科學實證的方法，進行評估中醫藥對 SLE 的療效，可說是當務之急。

研究發現紅斑狼瘡病人的細胞比正常人的細胞容易凋亡，不論 T 淋巴球、B 淋巴球或嗜中性細胞(neutrophil)乃至於巨噬細胞(macrophage)都比正常人進行更大量細胞凋亡(apoptosis)，而且與疾病嚴重度相關<sup>10-12</sup>。正常情況下，人體細胞凋亡之內容物本來不會刺激免疫系統產生抗體，凋亡細胞通常很快會被鄰近“非專業”(non-professional)吞噬細胞(phagocytic cells)例如鄰近細胞(neighboring cells)與“專業”(professional)的吞噬細胞例如巨噬細胞(macrophage)所吞噬而清除<sup>13</sup>。即使在 SLE 動物模式也發現，隨著病程的發展，凋亡細胞的清除能力亦隨著下降<sup>14</sup>。於是當細胞大量凋亡且又無法被鄰近吞噬細胞所清除的情況下，這些凋亡細胞(apoptotic cells)在晚期將無法維持其細胞膜完整性(plasma membrane integrity)而形成破裂的壞死細胞，即所謂「二度壞死細胞」(secondary necrotic cells)，進而釋放出其內容物，包含導致發炎的有毒物質與訊息，於是引發自體免疫反應(autoimmune reaction)而產生疾病<sup>15</sup>。這些抗體(免疫球蛋白)因為是對抗人體本身所誤認為外來物質的抗原，故稱為自體抗體(autoantibody)。紅斑性狼瘡病人所產生的自體抗體可以和細胞內巨分子結合，最常見的是產生抗 ds-DNA 及 ss DNA 抗體。而其中抗 ds-DNA 抗體更是美國風濕病醫學會診斷 SLE 的 11 項依據之一<sup>16</sup>。

除了上述這些自體抗體引起之症狀較明顯之外，尚有其他未研究清楚之致病自體抗體，不同自體抗體會辨認各種不同的細胞、器官和組織，進行免疫系統的破壞作用，或是和自體抗原形成免疫複合物(immune-complex)，這些免疫複合體會活化補體系統而引起發炎反應，並沉

積在組織間及血管壁，使組織受到傷害，進而造成蝴蝶斑(malar rash)、關節炎(arthritis)和腎臟異常(renal disorder)，較嚴重的結果是引起腎絲球腎炎。研究發現，同時出現 Anti-dsDNA 及 Anti-ribosomal P 之自體抗體，則與狼瘡腎炎(lupus nephritis)有強烈的關聯，病人有可能因腎衰竭而死於尿毒症<sup>17</sup>。

處於本病機轉核心位置的 T 細胞，即是藉由輔助性 T 細胞所分泌的細胞激素來調控 B 細胞分泌抗體。紅斑性狼瘡病人 T 淋巴細胞功能出現障礙(T cell dysfunction)，包括 T 細胞亞族群失衡(imbalance of T cell subsets)，特別是主要的兩大亞群中，CD4 輔助性 T 細胞的強化表現(enhanced)及 CD8 抑制性/毒殺性 T 細胞(T suppressor/cytotoxic cells, Ts/c)的弱化表現(diminished)，導致 T 淋巴細胞無法適當抑制 B 淋巴細胞分泌免疫球蛋白<sup>18</sup>。人體中的 CD4 輔助性 T 細胞(CD4 T helper cells, Th)可依照其所分泌的細胞激素種類而分為四種細胞，Th1 細胞可分泌 IL2, interferon  $\gamma$ (INF- $\gamma$ )及 tumor necrosis factor  $\alpha$ (TNF $\alpha$ )，Th2 細胞則是分泌 IL4,IL5,IL6,IL10 及 IL13 等。Th3 細胞可分泌 transforming growth factor  $\beta$ (TGF $\beta$ )、IL4 和 IL10，另外 Th0 細胞則可分泌以上三種細胞所產生的細胞激素<sup>19</sup>。這些細胞在功能上有重要的不同之處，例如 Th1 細胞可以促進細胞媒介免疫反應(cell-mediated immunity)與巨噬細胞的活化，而 Th2 細胞則與體液性免疫反應(humoral immunity)與刺激 B 細胞產生抗體有關。由於紅斑性狼瘡病人表現以 B 細胞活化與大量自體抗體的製造為主要特色，所以相關 Th1/Th2 失衡的現象，近年來廣被學者們研究與討論<sup>20</sup>。Amel-Kashipaz 等人研究發現紅斑性狼瘡病人 Th1 細胞減少而 Th2 細胞表現增強<sup>21</sup>。Funauchi 等也有相似的報導，認為 Th1/Th2 偏移至以 Th2 細胞表現為主(Th2 predominate)，致使許多導致 B 細胞分化(differentiation)、增生(proliferation)與刺激分泌免疫球蛋白的細胞激素分泌增加，例如 IL-10 等<sup>22</sup>。

機體為避免氧化損傷，具有一套完整的抗氧化反應系統。自 1996 年起，脂質過氧化的產物 8-epi PGF2 $\alpha$  被認為是測量體內氧化壓力極具敏感性的指標<sup>23</sup>。1997 年 Luigi 等人首度探討了紅斑性狼瘡病人體內的氧化壓力，從 SLE 病人尿液分析中發現 8-epi PGF2 $\alpha$  較正常人高，而認為紅斑性狼瘡病人體內有較高的氧化壓力<sup>24</sup>。目前瞭解粒腺體(mitochondria)為體內細胞最重要的自由基產生的來源，其主要自由基產物為超氧化陰離子(superoxide anion, O $_2^{\cdot-}$ )與一氧化氮(NO)，其他還有過氧化氫離子(hydrogen peroxide, H $_2$ O $_2$ )與 peroxynitrite 等。研究發現當體內氧化壓力升高時，超氧化陰離子(superoxide anion, O $_2^{\cdot-}$ )與一氧化氮(NO)與反應生成 peroxynitrite，該物質會刺激粒腺體內細胞色素 c (cytochrome c) 的釋放，進一步誘導細胞凋亡(apoptosis)<sup>25</sup>。

紅斑狼瘡在中醫學中多屬於“陰陽毒”、“赤丹”、“蝴蝶斑”、“周痺”等範



疇<sup>26</sup>。雖然本病在中醫古籍中無確切的病名，但有許多相關的描述。後世各家學說陸續有蝴蝶丹、馬纓丹、鬼臉瘡、流皮漏諸稱，特別是宋末竇漢卿著《瘡瘍經驗全書》<sup>27</sup>、清代陳士鋒《外科秘錄》<sup>28</sup>注意到皮損經烈日曝曬後，斑疹加重而稱為「日晒瘡」。這些都是與紅斑性狼瘡症狀表現極為接近的描述。近代大陸學者路志正、焦樹德指出，初期的 SLE 患者以「陰虛內熱」為最常見，並在中晚期常由「陰虛內熱」轉為氣陰兩虛、脾腎兩虛、陰陽兩虛<sup>29</sup>。吳文祥等藉由 1,784 筆紅斑性狼瘡有效資料統計中研究發現，「熱」為最常發生之辨證病症，次數有 1,773 次，其次為「陰虛」，次數有 1,744 次，第三為「濕」，次數有 1652 次，以上三項均佔相對次數百分比達 90% 以上。另有鐘嘉熙等<sup>30</sup>從中醫陰虛化熱的病機觀點出發，探討紅斑狼瘡可能的發病機制，認為「化熱」是免疫系統與自身成分反應的過程，與淋巴細胞凋亡、淋巴細胞亞群失衡及自身成分抗原性改變有關，而「化熱」就是免疫系統與自身成分反應的過程。

龍膽瀉肝湯方中龍膽草瀉肝膽實火；黃芩、梔子上行而清熱，下行而利濕，協助龍膽草清肝膽實火；澤瀉、車前子、木通協助龍膽草清利肝經濕熱，使其從小便而出；當歸、生地養血益陰以柔肝，與清熱藥相配伍，意在瀉中有補，疏中有養，使邪去而不傷正；甘草和藥調中，不使胃腸受損；柴胡瀉肝膽之熱，調達肝郁之氣，又可引藥入經，各藥合用，共奏瀉肝火、清濕熱的功效<sup>31</sup>。龍膽瀉肝湯原雖為肝膽溼熱而設，但目前所使用的範圍則日漸增廣。例如，類風濕性關節炎<sup>32,33</sup>、溼熱型銀屑病<sup>34</sup>、帶狀疱疹<sup>35,36</sup>等均曾被發表以龍膽瀉肝湯治療具有良好的療效。

龍膽瀉肝湯方中君藥龍膽草瀉肝膽實火；龍膽草根據《本草備要》的記載，性味：大苦大寒。功能：(1)沈陰下行，益肝膽而瀉火。(2)兼入膀胱腎經，除下焦之濕熱，與防己同功。(3)酒浸亦能外行上行。主治：(1)治骨蒸熱，驚癇邪氣，時氣溫熱，熱痢疽黃。(2)寒濕腳氣，咽喉風熱，赤睛胬肉，癰疽瘡疥。本品係龍膽科(*Gentianaceae*)植物龍膽草 *Gentiana scabra* Bunge 或三花龍膽 *Gentiana triflora* Pall. 的乾燥根部 (張和蔡, 1989)。龍膽草屬於多年生草本植物，主要分佈於中國大陸東北地區，其有效成分主要為龍膽苦甙，研究發現龍膽草對大鼠急性肝損傷具有保護效用<sup>37</sup>；對四氯化碳、D-半乳糖所致急性肝損傷的小白鼠，龍膽草能明顯降低血清 SGPT 和 SGOT，顯示龍膽草有護肝作用<sup>38</sup>。

## 貳、材料和方法

### 一、藥材與分析

龍膽瀉肝湯由台灣知名 GMP 藥廠提供。龍膽草藥材以正丁醇萃取後經減壓濃縮至乾躁後，所得化合物以 HPLC 進行主要成分鑑定。以 gentiopicoside 為標準品。

### 二、紅斑狼瘡之小鼠模型 (MRL lpr/lpr 小鼠)

全身性紅斑狼瘡之動物模式提供了研究此疾病致病機轉非常重要的訊息。lpr 的意思是淋巴增生(lymphoproliferation)。這種老鼠會出現淋巴腺病變及脾臟腫大，且產生大量抗 DNA 抗體及類風濕因子等自體免疫抗體，大約 5 個月大時，這些老鼠會因腎臟炎或其他併發症而死亡。

### 三、MRL lpr/lpr 小鼠及藥物的餵食模式

MRL lpr/lpr 小鼠是得自 Jackson Laboratories 動物中心。這些小鼠在進入本實驗時都是十二週大，且都已出現淋巴結腫大、掉毛、血管炎及蛋白尿的症狀。小鼠進入實驗之初的腎臟組織已有嚴重增生性的腎絲球腎炎，其病變和 class IV 的狼瘡性腎炎相類似。我們將老鼠隨意分組。在實驗之前，我們給予龍膽瀉肝湯(250 mg/kg)或龍膽草正丁醇萃取物(50 mg/kg)以胃管餵食二週，於二十一週犧牲，收集血清、脾臟組織與腎臟組織做後續之分析。

### 四、血清分析：

取小鼠年齡 21 週與給藥處理組的小鼠血清來作 Th1 與 Th2 細胞激素和 anti-ds-DNA 自體抗體的 ELISA 分析。

### 五、螢光流式細胞計數儀(flow cytometry)分析細胞表面抗原

不同的細胞其表面帶有的抗原也有所差異，利用含有不同表面標誌的螢光染劑與細胞結合再用流式細胞儀分析，即可得知血液或組織中不同細胞含量的百分比。將組織用均質機均質後清洗，加入不同表面標誌的抗體；或是將血液中的紅血球打破後取紅血球以外的細胞，加入不同表面標誌的抗體，利用流式細胞儀分析帶有不同表面抗原的細胞數。因此以螢光標地之抗體，結合到細胞表面分子上後，再透過 FACS (fluorescence activation cell sorter) 機器，對細胞表面分子進一步分析。我們用來做細胞分群的表面分子為 T cell: CD3, CD4, CD8；B cell: B220, CD19；Treg: CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>。

### 六、腎臟組織切片：

所有的小鼠均於 21 週大時以二氧化碳麻醉的方法犧牲。收取小鼠的腎臟組織，作組織切片檢查及螢光顯微鏡檢查。邀請一位病理判讀專家做病理切片的判讀。至於螢光顯微鏡檢查，冷凍切片先自然風乾，再以丙酮於室溫中固定十分鐘後用 PBS 沖洗。每個標本的不同切片分別用 fluorescein-isothiocyanate- conjugated goat anti-mouse、IgG 染色，再以螢光顯微鏡

(Olympus)觀察。判讀的方式是仍然根據如前所述的計分方法。

#### 七、二維電泳分析與質譜分析

二維膠電泳的技術是利用了兩種蛋白質的特性進行蛋白質分離：一是依照蛋白質的等電點不同而分離，稱之為等電點聚焦(isoelectric focusing，簡稱 IEF)；另一個分離的機制是依照蛋白質的分子量大小不同，利用凝膠電泳(sodium dodecyl sulfate -polyacrylamide gel electrophoresis，簡稱 SDS-PAGE)分離。藉由二維膠電泳的方法，比較正常與疾病組織或代測檢體之間的蛋白質表現差異，確定出某些與疾病相關的蛋白質指標(protein marker)。在蛋白質體學中，主要的過程是經過二維凝膠電泳來分離蛋白質。接著再利用質譜儀(Mass spectrometer)來鑑別、辨識蛋白質。主要步驟有(一)、Solubilise protein from tissue，(二)、2D-gel electrophoresis，(三)、Image analysis of gel，(四)、Isolation of spots of interest，(五)、Trypsin digestion of protein，(六)、Mass spectrometry of tryptic fragments，(七)、Identification of proteins。收集腎臟組織，在-20°C進行蛋白質沉澱，離心去除上清液，使用 Protein Assay Kit 定量。取蛋白質和 rehydration buffer 混和，進行一維電泳 isoelectric focusing (IEF)，條件如下：20°C進行 rehydration 12 小時，接下來 focusing 步驟分三階段，500V 進行 1 小時、1000V 進行 1 小時、8000V 進行 6 小時，接著進行 12.5% SDS-PAGE，條件為 25W/gel 進行 30 分鐘，40mA/gel 進行 6 小時，最後進行 coomassie blue stain，影像使用 Z3 High Throughput 2D-Gel analysis system V2.0 (Compugen)分析，找出 up-regulated、down-regulated、constant 表現的點，在 37°C 下進行 in-gel trypsin digestion 16 小時，經 ZipTip 做蛋白質萃取純化後，進一步做基質輔助雷射脫附離子化-飛行時間(MALDI-TOF) 質譜儀分析，來對腎組織進行進一步的研究。以 Mass Spectrometry 的圖譜加以搜尋比對，符合者則定義為生物標誌蛋白。配合 Genomics / Protein Sequence Databank 的資料庫，利用 Bioinformatics Program 加以轉譯及計算後，儲存後得到新的資料庫。

#### 八、統計分析

實驗結果以單向變異數分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA)來決定多組間差異。若具顯著性，則再進行 Student Newman-Keuls 之多變性分析來決定差異之所在。兩組間的差異則以學生氏(Student's) *t* 值之統計方式分析組間差異的顯著性。實驗數據以平均值±標準差(standard error of mean)表示。顯著性以 *p* 值小於 0.05 表示。蛋白質體實驗部分將三次重複實驗組與對照組的點體積相除的比值，取對數，同時算出幾何平均數。並算出此組數據在 95% 信賴區間的上下界限值。若這兩個界限值同時大於或同時小於幾何平均數，表示此組比值有顯著差異，顯著性以 *p* 值小於 0.05 表示。



## 參、結果

- 一、MRLlpr/lpr小鼠不餵食藥物與餵食龍膽瀉肝湯250 mg/kg存活率分析顯示，餵食龍膽瀉肝湯的組別小鼠存活率較佳。傳統中醫在辨證論治的基礎上，針對紅斑性狼瘡疾病的治療，採取分期分型以不同的方劑介入，臨床上可見到具體療效。我們以此病症分型中最常出現的陰虛濕熱症，嘗試以中醫方劑，藉由活體動物實驗的分析，探討中醫方劑調控的機制，從我們的實驗結果發現，中醫方劑可以降低紅斑性狼瘡小鼠體內的氧化壓力，也確實改善了紅斑性狼瘡小鼠外觀脫毛潰爛發炎的現象（圖一），這對於紅斑性狼瘡病人的治療，可提供一個可能的方向。實驗結果顯示，在此類疾病在發展的過程，產生許多未知因數變化，MRL小鼠呈現明顯的脾臟腫大的現象，餵食龍膽瀉肝湯的小鼠脾臟明顯縮小（圖一），因此可能有抑制T細胞增生或減少發炎的反應存在。中醫方劑的使用則有較良好的癒後效果。也說明中醫方劑傳統中醫辨證分期治療有其必要與價值。此外，中醫方劑的餵食雖然在實驗結果的證明上，均一性很高，為中醫方劑在紅斑性狼瘡小鼠的作用機制提供更明確的證據。（圖一）。
- 二、MRL小鼠呈現明顯的脾臟腫大的現象，餵食龍膽瀉肝湯的小鼠脾臟明顯縮小，因此我們繼續分析脾臟中CD11b、CD3、CD4、CD8（圖二），與血液與脾臟中調節性T細胞的表現（圖三）餵食龍膽瀉肝湯小鼠在上述分析項目皆有良好的表現。相對於正常的Bal/C小鼠，MRL組CD4+T細胞(14±1% vs 9±1%)、CD8+T細胞(10±0.8% vs 7±0.5%)呈現明顯下降。給予藥物治療後MRL組與龍膽瀉肝湯餵食組CD4+T細胞(10±0.8% vs 18±1%)、CD8+T細胞(9±1% vs 15±1%)呈現上升。有趣的現象也在巨噬細胞(macrophage)出現，與正常的Bal/C小鼠比較，MRL組CD11b(7.8±0.7% vs 4.2±1%)呈現明顯下降，給予藥物治療後(4.2±1% vs 8.0±0.7%)顯著回升（圖二）。MRL小鼠明顯缺乏調節性T細胞細胞群；在龍膽瀉肝湯餵食調節性T細胞群數量在血液(0.50±0.11% vs 0.84±0.12%)與脾臟(0.34±0.07% vs 0.92±0.12%)中明顯提升(圖三)。
- 三、中醫方劑對Anti-dsDNA有顯著改變。有關Anti-dsDNA的產生，受到許多複雜因素的影響，包括：B細胞活化的閾值、抗原形成的量多寡、抗原呈現細胞的交互反應、T細胞輔助型細胞等多因素的調控。本實驗所使用的龍膽瀉肝湯，對Anti-dsDNA的變化，據此推論中醫方劑龍膽瀉肝湯的作用與上述各種因數應有密切相關。此結果提示SLE發病時調節性T細胞處於低表達，可能導致機體自身免疫抑制功能減弱，細胞免疫功能平衡失調及B細胞功能亢進，出現多種自身抗體(Anti-dsDNA)，從而加重了腎臟系統的損害。從我們的動物實驗結果顯示，調節性T細胞(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞)可阻止產生抗ds-DNA抗體的B細胞活化，抑制B細



胞自身抗體的產生。(圖四)

- 四、過去的文獻有關中醫方劑對於抗發炎及用於各種發炎性疾的治療有許多的報導，馮亦穎等人曾提出中醫方劑瀉肝膽實火、清下焦濕熱的機理可能與其清除氧自由基和抗脂質過氧化作用有關。本實驗初步成果顯示龍膽瀉肝湯介入紅斑性狼瘡小鼠MRL-lpr/lpr治療，顯著血中降低了TNF- $\alpha$ 與IFN- $\gamma$ 的濃度(圖四)的同時也改變了MRL紅斑性狼瘡小鼠血中IL-4 與IL-5低落的現象，提供了中醫方劑治療紅斑性狼瘡機轉探討免疫調控的基礎。MRL lpr/lpr組和龍膽瀉肝湯治療組血清細胞激素的變化將實驗動物分為正常組、MRL組、龍膽瀉肝湯治療組，分別比較血清TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 、IL-4、IL-5的表現，進行三組間多重比較，分析發現血清特定細胞激素在組間差異均有顯著性意義( $p < 0.01$ )。結果顯示，MRL 組TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 的表現明顯高於正常對照組( $p < 0.01$ )，同時MRL組IL-4、IL-5的表現明顯低於正常組( $P < 0.01$ )。龍膽瀉肝湯治療組使上述異常表現的細胞激素血清值都回復至接近正常組。
- 五、龍膽瀉肝湯對紅斑性狼瘡小鼠MRL腎臟組織病理變化的影響。圖七顯示MRL小鼠有嚴重的腎膈增生，在經龍膽瀉肝湯治療後可見明顯的組織病理變化，腎臟腎絲球結構較完整，MRL/lpr腎絲球萎縮，腎絲球系膜細胞增生，毛細血管基底膜增厚，致使細胞外基質增多，龍膽瀉肝湯治療組使腎絲球大小及型態改變，這些改變可以推測藥物的處理可能經由防止免疫複合物在腎臟的堆積，進而改善腎臟損傷。腎臟組織IgG染色較輕微。我們也進一步以蛋白質體研究各組間腎臟組織(圖五)，這些有變化的標誌蛋白與腎臟滲透壓調控有密切的關係(圖八、表一)。有趣的是龍膽瀉肝湯治療後整個腎臟組織氧化壓力下降，抗氧化能力明顯提升(圖七)。

從我們的實驗結果發現，龍膽草正丁醇萃取物可以降低紅斑性狼瘡小鼠體內的氧化壓力，也確實改善了紅斑性狼瘡小鼠脾臟腫大的現象，這對於紅斑性狼瘡病人的治療，可提供一個可能的方向。實驗結果顯示，在此類疾病在發展的過程，產生許多未知因數變化，MRL小鼠呈現明顯的脾臟腫大的現象，餵食龍膽草正丁醇萃取物的小鼠脾臟明顯縮小(圖十二)，因此可能有抑制T細胞增生或減少發炎的反應存在。

圖十龍膽草正丁醇萃取物對紅斑性狼瘡小鼠MRL腎臟組織病理變化的影響。顯示MRL小鼠有嚴重的腎膈增生，在經龍膽草正丁醇萃取物治療後可見明顯的組織病理變化，腎臟腎絲球結構較完整，MRL/lpr腎絲球萎縮，腎絲球系膜細胞增生，毛細血管基底膜增厚，致使細胞外基質增多，龍膽草正丁醇萃取物治療組使腎絲球大小及型態改變，這些改變可以推測藥物的處理可能經由防止免疫複合物在腎臟的堆積，進而改善腎臟損傷。腎臟組織IgG染色較輕微。我們也進一步以

蛋白質體研究各組間腎臟組織(圖十五、十六)，這些有變化的標誌蛋白與腎臟滲透壓調控有密切的關係。有趣的是龍膽瀉肝湯治療後整個腎臟組織氧化壓力下降，抗氧化能力明顯提升(圖十四 Western blot 證據)。

圖十一龍膽草正丁醇萃取物對紅斑性狼瘡小鼠 MRL 前肢淋巴結增生情形的影響。圖顯示 MRL 小鼠有明顯的淋巴結增生，在經藥物治療後可見數目及大小均明顯減少。

圖十二 MRL 小鼠呈現明顯的脾臟腫大的現象，餵食龍膽草正丁醇萃取物的小鼠脾臟明顯縮小，因此我們分析血液與脾臟中調節性 T 細胞的表現(圖十二)。繼續分析脾臟中 B 細胞(圖十三)、CD11b、CD3+CD4+、CD3+CD8+ (圖十三)，餵食龍膽草正丁醇萃取物小鼠在上述分析項目皆有良好的表現。相對於正常的 Bal/C 小鼠，MRL 組 CD4+T 細胞、CD8+T 細胞呈現明顯下降。給予藥物治療後 MRL 組與龍膽草正丁醇萃取物餵食組 CD4+T 細胞、CD8+T 細胞呈現上升。有趣的現象也在巨噬細胞(macrophage)出現，與正常的 Bal/C 小鼠比較，MRL 組 CD11b 呈現明顯下降，給予藥物治療後顯著回升。MRL 小鼠明顯缺乏調節性 T 細胞細胞群；在龍膽草正丁醇萃取物餵食調節性 T 細胞群數量在血液與脾臟中明顯提升。四、過去的文獻有關抗發炎及用於各種發炎性疾的治療有許多的報導，本實驗初步成果顯示龍膽草正丁醇萃取物介入紅斑性狼瘡小鼠 MRL-lpr/lpr 治療，顯著血中降低了 TNF- $\alpha$  與 IFN- $\gamma$  的濃度(圖十三)的同時也改變了 MRL 紅斑性狼瘡小鼠血中 IL-4 與 IL-5 低落的現象，提供了龍膽草治療紅斑性狼瘡機轉探討免疫調控的基礎。MRL lpr/lpr 組和龍膽草正丁醇萃取物治療組血清細胞激素的變化將實驗動物分為正常組、MRL 組、龍膽草正丁醇萃取物治療組，分別比較血清 TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 、IL-4、IL-5 的表現，進行三組間多重比較，分析發現血清特定細胞激素在組間差異均有顯著性意義( $p < 0.05$ )。結果顯示，MRL 組 TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$  的表現明顯高於正常對照組( $p < 0.01$ )，同時 MRL 組 IL-4、IL-5 的表現明顯低於正常組( $P < 0.01$ )。

圖十四有關 Anti-dsDNA 的產生，受到許多複雜因素的影響，包括：B 細胞活化的閾值、抗原形成的量多寡、抗原呈現細胞的交互反應、T 細胞輔助型細胞等多因素的調控。本實驗所使用的龍膽草正丁醇萃取物，對 Anti-dsDNA 的變化，據此推論龍膽草正丁醇萃取物的作用與上述各種因數應有密切相關。此結果提示 SLE 發病時調節性 T 細胞處於低表達，可能導致機體自身免疫抑制功能減弱，細胞免疫功能平衡失調及 B 細胞功能亢進，出現多種自身抗體(Anti-dsDNA)，從而加重了腎臟系統的損害。從我們的動物實驗結果顯示，調節性 T 細胞(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞)可阻止產生抗 ds-DNA 抗體的 B 細胞表現，抑制細胞自身抗體的產生。

## 肆、討論

紅斑性狼瘡的治療由於病因不明，且臨床表現極為複雜，近十年雖然類固醇、免疫抑制劑、抗生素的廣為使用，加上腎臟透析技術的進步，其存活率已有改善<sup>39,40</sup>，但至今仍被視為極為棘手的疾病。許多學者開始注意到降低紅斑性狼瘡病人血脂及體內氧化的壓力，可減少紅斑性狼瘡心血管疾病的發生率，因而改善其死亡率，被認為是在紅斑性狼瘡疾病治療的新契機<sup>41-44</sup>。

傳統中醫在辨證論治的基礎上，針對紅斑性狼瘡疾病的治療，採取分期分型以不同的方劑介入，臨床上可見到具體療效。我們以此病症分型中最常出現的陰虛溼熱症，嘗試以龍膽瀉肝湯治療獲得正面的寶貴意見，在本計畫中則以君藥龍膽草進行後續活體動物實驗的分析，評估龍膽草調控的機制，評估治療人類紅斑性狼瘡疾病的潛力。從我們的實驗結果發現，龍膽草正丁醇萃取物可以降低紅斑性狼瘡小鼠腎臟的氧化壓力，也確實改善了紅斑性狼瘡小鼠 anti-ds DNA，這對於紅斑性狼瘡病人的治療，乃提供一個可能的方向。

我們推測龍膽草正丁醇萃取物治療組使 MRL 原本表現低落的調節性 T 細胞產生變化，進而影響到 T 細胞的產生和成熟，並且影響巨噬細胞的表現增加其移行(migration)到脾臟進行吞噬細胞凋亡小體的功能，這也可能是為何龍膽草正丁醇萃取物治療可以有效降低脾臟腫大的因素之一。調節性 T 細胞對自身抗原、細胞和分子的免疫系統都存在著精密的調節產生的平衡機制，以維持機體的穩定狀態。動物實驗說明調節性 T 細胞是通過分泌某些抑制性細胞激素而發揮其調節作用的。然而，在不同的動物模式則會有不同種類的細胞激素表現。SLE 是一種累及多器官、多系統的自身免疫性疾病。但調節性 T 細胞是否參與 SLE 的發病目前尚不明確。曾有學者用流式細胞儀檢測了 30 例 SLE 患者(包括 10 例活動期患者)和 10 名健康人周邊血發現，與非活動期 SLE 患者和健康對照組相比，活動期 SLE 患者中 T 細胞已被啟動，但卻沒有誘導出免疫調節性 T 細胞。活動期 SLE 患者體內缺乏調節性 T 細胞可能會導致機體抑制自身免疫反應的功能減弱，與 SLE 發生有關。同時調節性 T 細胞表現下降造成缺乏樹突狀細胞、巨噬細胞、等細胞環境和細胞激素的刺激，進而影響到了 T 細胞的產生和成熟，產生的細胞數便減少。這些理論的推衍模式，與我們目前的研究成果在 CD4+、CD8+T 與調節性 T 細胞表現低落現象吻合。

Th1-Th2 理論已被應用在感染性、癌症、移植、自體免疫相關領域，Th1 促進細胞調節免疫，Th2 影響體液免疫反應，雖然 Th1-Th2 平衡理論並無法解釋所有的免疫現象，但確實與免疫調控方向有密切相關，我們可從 T



細胞分泌不同細胞激素的變化，判別 Th1 或 Th2 的傾向，例如氣喘病人 Th1/Th2 失衡，傾向 Th2 反應，因此研究方向著重改變其 Th1/Th2 的傾向。相對於正常組 Bal/C 小鼠在細胞激素的表現，MRL 狼瘡小鼠呈現，Th1 (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ )明顯增高、Th2(IL-4, IL-5)明顯低落的現象，說明這種傾向於 Th1 的反應。實驗結果，我們推測龍膽草正丁醇萃取物治療組使 MRL 原本表現低落的調節性 T 細胞產生變化，改善紅斑性狼瘡小鼠的 Th1/Th2 細胞激素的表現，目前已知，Th1/Th2 細胞激素的表現對於促進紅斑性狼瘡體內細胞的凋亡與氧化壓力有極大的影響。體內在氧化壓力高的環境下，將促使細胞激素所活化的發炎或免疫反應所形成的複雜機制與自由基進一步的反應進而造成細胞凋亡。因此我們認為龍膽草正丁醇萃取物改善紅斑性狼瘡小鼠的 Th1/Th2 細胞激素的表現，同時也改善體內部分氧化壓力的負擔，因此減少進一步的傷害，此部分仍需進一步的實驗證明。但從我們過去實驗發現，龍膽瀉肝湯如果以較高劑量(500mg/kg/day)連續八週予以，並沒有見到較好的療效，除了反應出單一藥物在長期及大劑量的使用，對於複雜的免疫疾病，可能產生不利的影響外，也意味著此類疾病在發展的過程，產生許多未知的因子變化，僅以單一的藥物，並不易達到理想的治療目標，這也說明 cyclophosphamide 可能的副作用。也說明了傳統中醫辨證分期治療有其必要與價值。

根據報導，巨噬細胞是紅斑性狼瘡病人體內，細胞凋亡釋放出核苷酸(nucleosome)抗原產生的主要關鍵。因此我們推論龍膽草正丁醇萃取物抗發炎反應的機制之一，可能與抑制細胞的凋亡有關，對於減少體內凋亡負擔(apoptotic load)，應具有貢獻。因此，龍膽草正丁醇萃取物是否可能經由減少紅斑性狼瘡體內巨噬細胞凋亡，或促進巨噬細胞吞噬作用能力增強，藉此減緩紅斑性狼瘡病情進展，值得進一步研究。

TNF- $\alpha$ 主要產生細胞是單核/巨噬細胞和 T 細胞，受 LPS 和免疫複合物的刺激亦可產生。TNF- $\alpha$  參與機體發炎和免疫反應，是 SLE 組織損傷的重要介質。TNF- $\alpha$  變化有助於檢測狼瘡活動和腎損害程度，TNF- $\alpha$  參與了 LN(狼瘡性腎炎)的發病過程，導致白血球在發炎部位堆積，刺激白血球(如單核細胞)產生蛋白質分解酶、氧自由基等損害物質，還可活化 T 細胞和刺激 B 細胞產生抗體。我們研究結果顯示，血清 TNF- $\alpha$  濃度在龍膽草正丁醇萃取物治療後明顯降低，顯示龍膽草正丁醇萃取物可能透過抑制單核/巨噬細胞產生 TNF- $\alpha$  而達到療效。本研究結果，MRL 小鼠脾臟 CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T 細胞明顯降低，經過龍膽草正丁醇萃取物治療後，外周血 CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T 細胞分佈及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值明顯升高。正常免疫反應過程有賴於各種免疫細胞，特別是各種 T 細胞亞群之間的相互作用及相互制約。若某一 T 細胞亞群的數量和功能發生異常，機體就出現免疫紊亂，並發生一系列病理變

化。SLE 存在免疫調節紊亂，T 細胞可調節 B 細胞的功能，B 細胞的高度活化與調節性 T 細胞對其調節紊亂有關本研究說明龍膽草正丁醇萃取物可升高 MRL 小鼠 CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T，同時影響調節性 T 細胞的表現達到治療 SLE 目的。調節性 T 細胞抑制其他淋巴細胞活化的機制之一就是通過分泌的細胞激素或誘導其它細胞分泌細胞激素，在 SLE 的發生發展過程中，各種免疫細胞、細胞激素和抗體之間相互作用，形成了非常複雜的細胞和體液免疫過程。IgG 的自身抗體生成增加，形生成免疫複合物在各臟器沉積，啟動補體造成補體消耗，導致臟器受累，加速狼瘡疾病的發展。本計畫分析了調節性 T 細胞細胞在 MRL *lpr/lpr* 組與 INF- $\gamma$ 、IL-4 變化之間的關聯，發現隨調節性 T 細胞細胞數值的減少，IL-4 的表現也呈下降的趨勢。有研究發現調節性 T 細胞細胞可抑制 Th1 及 Th2 型細胞的分化及其功能表達，並且發現這種調節性 T 細胞對由 Th1 及 Th2 型細胞激素所介導的疾病有很好的治療作用。龍膽草正丁醇萃取物對於紅斑性狼瘡的治療，可能藉由調整紅斑性狼瘡病患 Th1/Th2 之偏移至以 Th2 細胞表現為主(Th2 predominate) 的不利情形，以及降低 ROS 與阻止 SLE 淋巴細胞的凋亡，而具有其正面的貢獻。有關 Anti-dsDNA 的產生，受到許多複雜因子的影響，包括；B 細胞活化的閾值、抗原形成的量多寡、抗原呈現細胞的交互反應、T 輔助型細胞等多因素的調控。本實驗所使用龍膽草正丁醇萃取物，顯著影響 Anti-dsDNA 的變化，據此推論其作用與上述各種因子應有相關。此結果提示 SLE 發病時調節性 T 細胞處於低表達，可能導致機體自身免疫抑制功能減弱，細胞免疫及 B 細胞功能失調，出現多種自身抗體(Anti-dsDNA)，從而加重了腎臟系統的損害。龍膽草正丁醇萃取物在 anti -dsDNA 抗體的產生上較優於免疫抑制劑 cyclophosphamide 的表現。這方面的結果除了表現在腎臟組織切片染色證據外，也可從二維蛋白質體學證據得到解釋。

在 21 週齡大 MRL *lpr/lpr* 的腎臟組織有嚴重腎膈增生情形，PPAR $\gamma$  的表現可能與此病理變化有相關。給予 PPAR $\gamma$  活化劑可用來治療自體免疫疾病，但是過去並沒有針對調節性 T 細胞的免疫提升效用與紅斑性狼瘡小鼠腎臟 PPAR $\gamma$  之間的表現做過相關性研究。本計畫結果顯示，在龍膽瀉肝湯或龍膽草正丁醇組的腎臟組織僅有輕微腎膈增生情形。可能與 PPAR $\gamma$  表現及 Treg 細胞數目比例的調控有關。是第一發現。

在龍膽瀉肝湯或龍膽草正丁醇組治療不僅減少 MRL *lpr/lpr* 小鼠腎臟組織中 iNOS 蛋白質表現，並且也降低 IgG 抗體的沈積。在本實驗結果中發現，MRL *lpr/lpr* 小鼠腎臟組織內 GSH 的含量與疾病嚴重度有關，也與過去研究結果相符合<sup>45</sup>。過去研究發現 MRL *lpr/lpr* 小鼠的腎臟組織抗氧化能力是下降的<sup>46</sup>。在本實驗中，首次發現龍膽瀉肝湯可以藉由提升腎臟組織內 GSH 的含量及降低組織的氧化壓力來達到細胞保護的效果，這可能是跟增加組

織內 Mn-SOD 及 SMP30 的蛋白質表現有相關，這現象與龍膽草正丁醇組類似。MRL *lpr/lpr* 小鼠腎臟組織中的 SMP30 含量下降，可能使得腎臟組織對於遭受傷害的敏感性增加進而導致腎臟惡化。MRL *lpr/lpr* 小鼠給予中藥治療後提升 SMP30 蛋白質表現，可能因而維持細胞內鈣離子的穩定及降低腎臟組織內氧化壓力。是另一重要發現。

Alpha-enolase 是存在於各種組織中的糖分解酵素<sup>47</sup>，尤其在腎臟及胸線含量最多<sup>48</sup>。過去研究發現，在紅斑性狼瘡病人的腎臟組織穿刺結果中，Alpha-enolase 的過度表現與疾病嚴重度有密切關係<sup>49</sup>。在二維電泳蛋白實驗結果中，MRL *lpr/lpr* 小鼠給予龍膽瀉肝湯或龍膽草正丁醇治療後，在此一標誌蛋白有其一致性。

另外，龍膽瀉肝湯或龍膽草正丁醇治療後，有一標誌蛋白是不同的就是 Phosphoglycerate kinase (PGK) 蛋白質的表現，PGK 是一種 mRNA 結合蛋白並參與 urokinase-type plasminogen activator receptor 轉錄後調控<sup>50</sup>。過去臨床研究報導，PGK 的缺乏可能會造成溶血性貧血、智能障礙、尿蛋白及橫紋肌溶解症等<sup>51,52</sup>。根據 Luan 團隊研究，anti-dsDNA 的產生可能與 PGK-1 減少有相關<sup>53</sup>，紅斑性狼瘡病人身上發現溶血性貧血及腦性病變也與這因子變化有關聯。本實驗結果中，龍膽瀉肝湯降低 anti-dsDNA 的含量與增加 PGK 蛋白質表現結果是一致的，這與過去研究結果相似。但這現象並未在龍膽草正丁醇出現。



## 伍、結論

本實驗則是首次以中藥介入紅斑性狼瘡小鼠 MRL-lpr/lpr 治療，提供了龍膽瀉肝湯治療紅斑性狼瘡機轉探討之基礎。然而，有關本方對免疫功能影響的研究尚需深入研究。

## 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 CCMP96-RD-024、CCMP97-RD-117 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. Humes, H. David, et al. Kelley's Textbook of Internal Medicine, 4<sup>th</sup> Edition, 2000.
2. John A. Mills, "Systemic Lupus Erythematosus", *The New England Journal of Medicine*, 330, pp.1871-1879, 1994.
3. Mariana J. Kaplan, "Apoptosis in systemic lupus erythematosus" *Clinical Immunology*, 112, pp.210-218, 2004.
4. Woodruff Emlen, JoAnn Niebur, and Richard Kadera, "Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus", *Journal of Immunology*, 152, pp.3685-3692, 1994.
5. A Perniok, F Wedekind, M Herrmann, C Specker and M Schneider, "High levels of circulating early apoptotic peripheral blood mononuclear cells in systemic lupus erythematosus", *Lupus*, 7, pp.113-118, 1998.
6. L.E.Munoz, U.S.Gaipl, S.Franz, A.Sheriff, R.E.Voll, J.R.Kalden and Martin Herrmann, "SLE-a disease of clearance deficiency", *Rheumatology*, 44, pp.1101-1107, 2005.
7. Green, Gopa B. et al., 《The Washington Manual of Medical Therapeutics》, 31<sup>st</sup> Edition, Lippincott Williams & Wilkins, U.S.A., 2004.
8. 林文香, 楊文山, 林孝義, <全身性紅斑狼瘡患者之求醫行為及其影響因素探討>, 《公共衛生》, 第二十卷第三期, 頁 265~276, 1993.
9. 蔡肇基, 《全身性紅斑狼瘡》, 初版, 台北, 王溢嘉發行, 民國九十三年。
10. Yi Ren, Jinling Tang, M.Y.Mok, Albert W. K.Chan, Adrian Wu, and C.S. Lau, "Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic lupus erythematosus", *Arthritis & Rheumatism*, 48, pp.2888-2897, October 2003.
11. P A Courtney, A D Crockard, k Williamson, A E Irvine, RJ Kennedy, A L Bell, "Increased apoptotic peripheral blood neutrophils in systemic lupus erythematosus: relations with disease activity, antibodies to double stranded DNA, and neutropenia", *Ann Rheum Dis*, 58, pp.309-314, 1999.
12. Ou Jin, Ling-yun Sun, Kang-xin Zhou, Sin-su-Zhang, Xue-bing Feng, Mo-yin Mk, Chak-sing Lau, "Lymphocyte apoptosis and macrophage function: correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus". *Clin Rheumatol*, 24, pp.107-110, 2005.

13. Chau-Ching Liu, Jeannine S. Navratil, Janice M. Sabatine, Joseph M. Ahearn, "Apoptosis, Complement and Systemic Lupus Erythematosus: A Mechanistic View.", *Curr Dir Autoimmun.*, 7, pp.49-86, 2004
14. R. Licht, J.W.C. Dieker, C.W.M. Jacobs, W.J.M. Tax, and J.H.M. Berden, "Decreased phagocytosis of apoptotic cells in diseased SLE mice.", *Journal of Autoimmunity*, 22, pp.139-145, 2004.
15. Udo S. Gaipl, Reinhard E. Voll, Ahmed Sheriff, Sandra Franz, Joachim R. Kalden, Martin Herrmann, "Impaired clearance of dying cells in systemic lupus erythematosus", *Autoimmunity Review*, 4, pp.189-194, 2005.
16. M. Petri and L. Magder, "Classification criteria for systemic lupus erythematosus: a review.", *Lupus*, 13, pp.829-837, 2004
17. Morris Reichlin and Marianne Wolfson-Reichlin, "Correlations of anti-dsDNA and anti-ribosomal P autoantibodies with lupus nephritis.", *Clinical Immunology*, 108, pp.69-72, March 2003.
18. Gary M. Kammer, Andras Per., Bruce C. Richardson, and George C. Tsokos, "Abnormal T Cell Signal Transduction in Systemic Lupus Erythematosus", *Arthritis & Rheumatism*, 46, pp.1139-54, May 2002.
19. Gillian S. Dean, Jonathan Tyrrell-Price, Esther Crawley and David A. Isenberg, "Cytokines and systemic lupus erythematosus", *Ann Rheum Dis*, 59, pp.243-251, 2000.
20. Mitsuteru Akahoshi, Histoshi Nakashima, Yosute Tanaka, Tsutomu Kohsaka, Shuji Nagano, Eiichi Ohgami, Yojiro Arinobu, and Yoshiyuki Niho, "Th1/Th2 balance of peripheral T helper cells in systemic lupus erythematosus", *Arthritis & Rheumatism*, 42, pp.1644-48, August 1999
21. M.R. Amel-Kashipaz, M.L. Huggins, P. Lanyon, A. Robins, I. Todd and R.J. Powell, "Quantitative and Qualitative Analysis of the Balance Between Type 1 and Type 2 Cytokine-producing CD8- and CD8+ T cells in SLE" *Journal of Autoimmunity*, 17, pp.155-163, 2001.
22. M. Funauchi, S. Ikoma, H. Enomoto, and A. Horiuchi, "Decreased Th1-like and Increased Th2-like Cells in SLE", *Scand J Rheumatol*, 27, pp.219-224, 1998.
23. Delanty N, Reilly M, Praico D, Fitzgerald DJ, Lawson JA, FitzGerald GA, "8-Epi PGF2 alpha: specific analysis of an isoeicosanoid as an index of oxidant stress in vivo", *Br J Clin Pharmacol*, 42, pp.15-9, 1996.



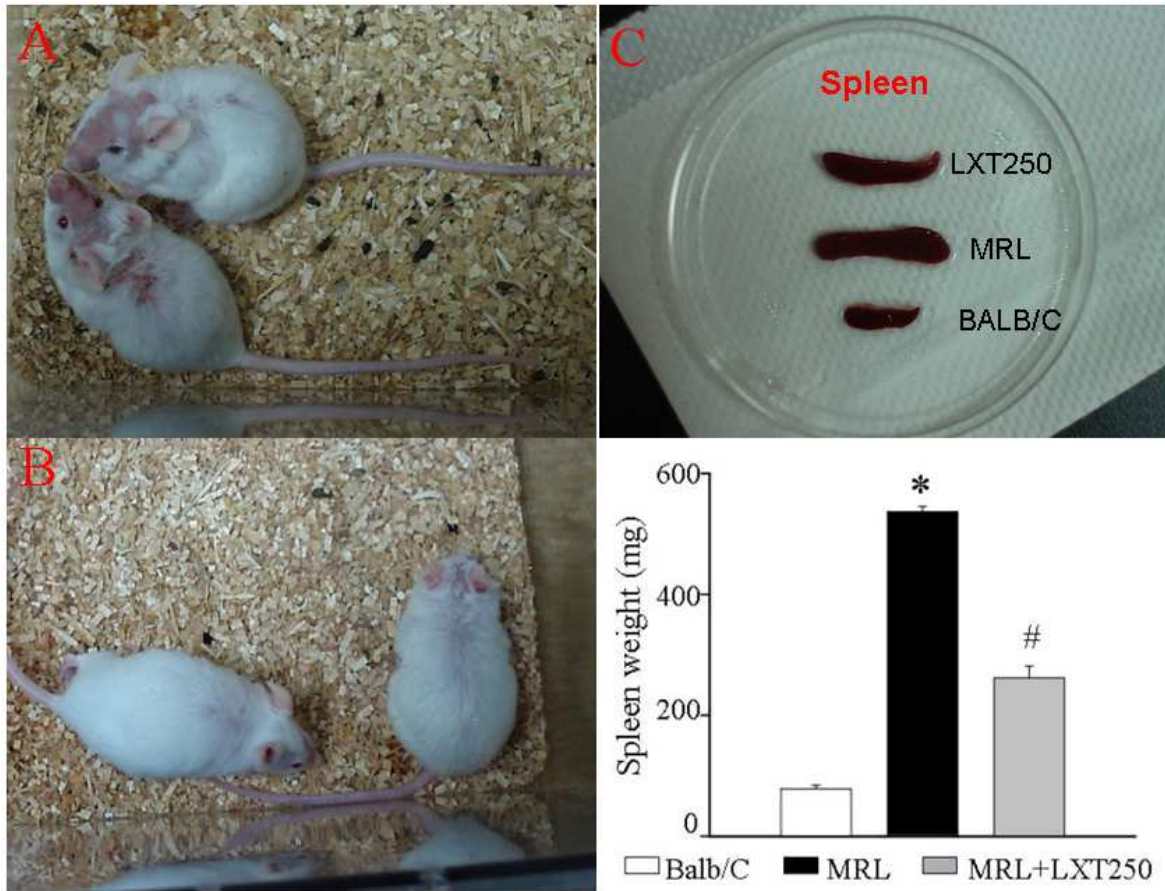
24. Luigi Iuliano, Domenico Pratico, Domenico Ferro, Valerio Pittoni, Guido Valesini, John Lawson, Garret A. FitzGerald, and Francesco Violi, "Enhanced lipid peroxidation in patients positive for antiphospholipid antibodies", *Blood*, 90, pp.3931-3935, November 1997.
25. Jim C. Oates, and Gary S. Gilkeson, "Nitric oxide induces apoptosis in spleen lymphocytes from MRL/lpr mice", *Journal of Investigative Medicine*, 52, pp.62-71, January 2004.
26. 劉秉昭等, <路志正教授運用經方治療紅斑狼瘡>, 《中國中醫藥信息雜誌》, 第八卷第十一期, 頁 72, 2001
27. 竇漢卿, 《瘡瘍經驗全書》, 宋
28. 陳士鋒, 《外科秘錄》, 清
29. 路志正, 焦樹德, 《實用中醫風濕病學》, 人民衛生出版社, 北京, 1996
30. 鐘嘉熙, 吳智兵, <陰虛化熱對系統性紅斑狼瘡發病機制研究的啟示>, 《中國中醫基礎醫學雜誌》, 第五卷第六期, 頁 30-33, 1999
31. 吳玉豐, <龍膽瀉肝湯臨症應用淺析>, 《中醫藥學刊》, 第 22 卷第 4 期, 頁 718, 2004
32. 何維英, 許超, 季衛鋒, <龍膽瀉肝湯治療類風濕關節炎 62 例臨床報告>, 《中醫正骨》, 第十七卷第四期, 頁 49~50, 2005
33. 季衛鋒, 厲駒, 武中慶, 童培建, <龍膽瀉肝湯治療濕熱瘀阻型類風濕關節炎療效觀察>, 《中醫正骨》, 第十六卷第十一期, 頁 7~8, 2004
34. 李繼榮, <龍膽瀉肝湯治療濕熱型銀屑病 50 例>, 《時珍國醫國藥》, 第十二卷第九期, 頁 791, 2001
35. 尹劍平, <龍膽瀉肝湯配合刺絡拔罐法, 治療帶狀疱疹>, 《實用中西醫結合臨床》, 第四卷第三期, 頁 53~54, 2004
36. 梁冬梅, <龍膽瀉肝湯治療常見皮膚病>, 《湖北中醫雜誌》, 第二十七卷第六期, 頁 44, 2005
37. 張學武, 崔長旭, 李蓮花, <龍膽草水提物對大鼠肝損傷的保護作用>, 《四川中醫》, 第二十三卷第五期, 頁 18, 2005
38. 崔長旭, 柳明洙, 李天洙, 張學武, <龍膽草水提物對急性大鼠肝損傷的保護作用>, 《Journal of Medical Science Yanbian University》, 第二十八卷第一期, 頁 20-22, 2005
39. Uramoto KM, Michet CJ Jr, Thumboo J, Sunku J, O'Fallon WM, Gabriel SE, "Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus", *Arthritis Rheum*, 42, pp.46-50, 1999

40. Andrea T. Borchers, Carl L. Keen, Yehuda Shoenfeld, M. Eric Gershwin, "Surviving the butterfly and the wolf: Mortality trends in systemic lupus erythematosus", *Autoimmunity Reviews*, 3, pp.423-453, 2004
41. Mary J. Roman, Beth-Ann Shanker et al., "Prevalence and Correlates of Accelerated Atherosclerosis in Systemic Lupus Erythematosus", *N Engl J Med*, 349, PP.2399-2406, 2003
42. S. L. Nuttal, S. Heaton, M. K. Piper, U. Martin and C. Gordon, "Cardiovascular risk in systemic lupus erythematosus-evidence of increased oxidative stress and dyslipidaemia", *Rheumatology*, 42, pp.758-762, 2003
43. Tamar Aprahamian, Ian Rifkin, Ramon Bonegio, Benedicte Hugel, Jean-Marie Freyssinet, Kaori Sato, John J. Castellot, Jr., and Kenneth Walsh, "Impaired clearance of apoptotic cells promotes synergy between atherogenesis and autoimmune disease", *J. Exp. Med.*, 199, pp.1121-1131, 2004
44. I. N. Bruce, "'Not only...but also': factors that contribute to accelerated atherosclerosis and premature coronary heart disease in systemic lupus erythematosus", *Rheumatology*, 44, pp.1492-1502, 2005
45. P. E. Morgan, A. D. Sturgess, and M. J. Davies, M. J. "Increased levels of serum protein oxidation and correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus", *Arthritis Rheum*, 52, pp. 2069-2079, 2005
46. J. T. Venkatraman, B. Chandrasekar, J.D Kim, J. D., and G. Fernandes, "Genotype effects on the antioxidant enzymes activity and mRNA expression in liver and kidney tissues of autoimmune-prone MRL/MpJ-lpr/lpr mice", *Biochim Biophys Acta*, 1213, pp.167-175, 1994
47. V. Pancholi, "Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases", *Cell Mol Life Sci*, 58, pp. 902-920, 2001
48. A. Sabbatini, M. P. Dolcher, B. Marchini, D. Chimenti, S. Moscato, F. Pratesi, et al. "Alpha-enolase is a renal-specific antigen associated with kidney involvement in mixed cryoglobulinemia", *Clin Exp Rheumatol*, 15, pp. 655-658, 1997
49. P. Migliorini, F. Pratesi, F. Bongiorno, S. Moscato, M. Scavuzzo, and S. Bombardieri, "The targets of nephritogenic antibodies in systemic autoimmune disorders", *Autoimmun Rev*, 1, 168-173. 2002
50. S. Shetty, M. Ganachari, M.C. Liu, A. Azghani, H. Muniyappa, and S. Idell,

- “Regulation of urokinase receptor expression by phosphoglycerate kinase is independent of its catalytic activity”, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 289, pp. L591-598. 2005
51. R. Rosa, C. George, M. Fardeau, M.C. Calvin, M. Rapin, and J. Rosa, “A new case of phosphoglycerate kinase deficiency: PGK Creteil associated with rhabdomyolysis and lacking hemolytic anemia” *Blood*, 60, 84-91.1982
52. G. Turner, J. Fletcher, J. Elber, Y. Yanagawa, V. Dave, and A. Yoshida, A. “Molecular defect of a phosphoglycerate kinase variant associated with haemolytic anaemia and neurological disorders in a large kindred”, *Br J Haematol*, 91, pp. 60-65. 1995
53. H.Y. Luan, S.J. Tang, W. Yang, C.Y. Tsai, G.H. Sun, and K.H. Sun, “Monoclonal anti-double-stranded DNA antibodies cross-react with phosphoglycerate kinase 1 and inhibit the expression and production of IL-2 in activated Jurkat T cell line”, *Clin Immunol*, 120, pp. 326-334. 2006

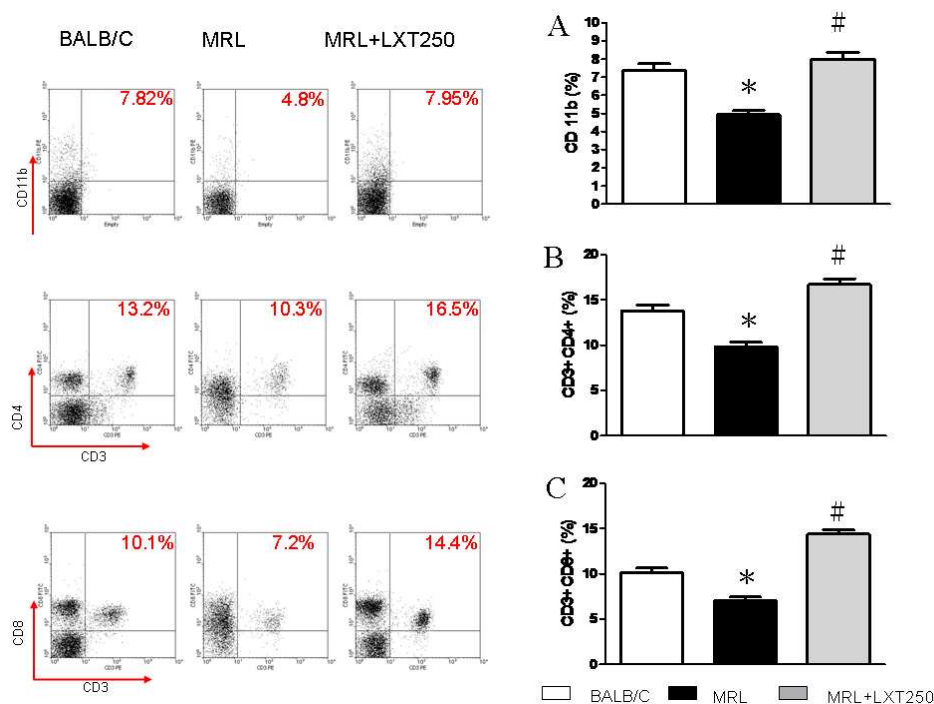


柒、圖、表

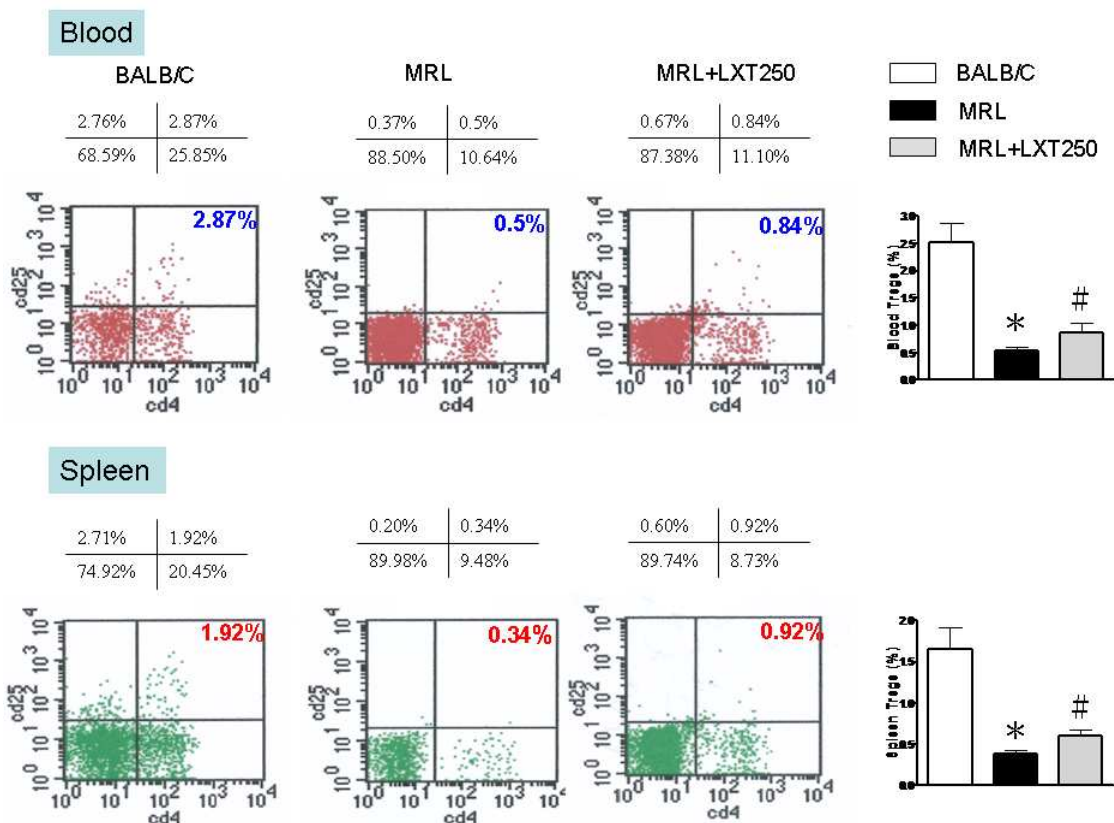


圖一、龍膽瀉肝湯降低紅斑性狼瘡小鼠體內的氧化壓力，也確實改善了紅斑性狼瘡小鼠外觀脫毛潰爛發炎的現象。MRL 小鼠呈現明顯的脾臟腫大的現象，餵食龍膽瀉肝湯的小鼠脾臟明顯縮小，因此可能有抑制 T 細胞增生或減少發炎的反應存在。

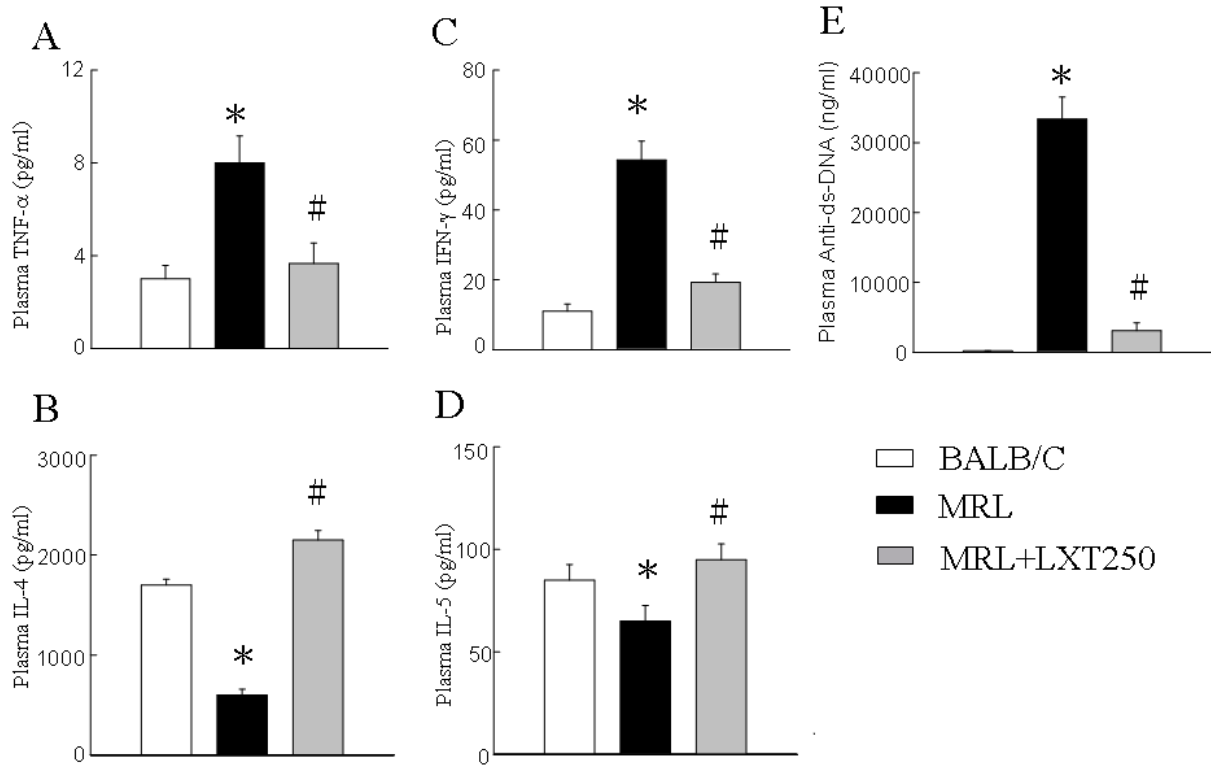
圖二



圖三

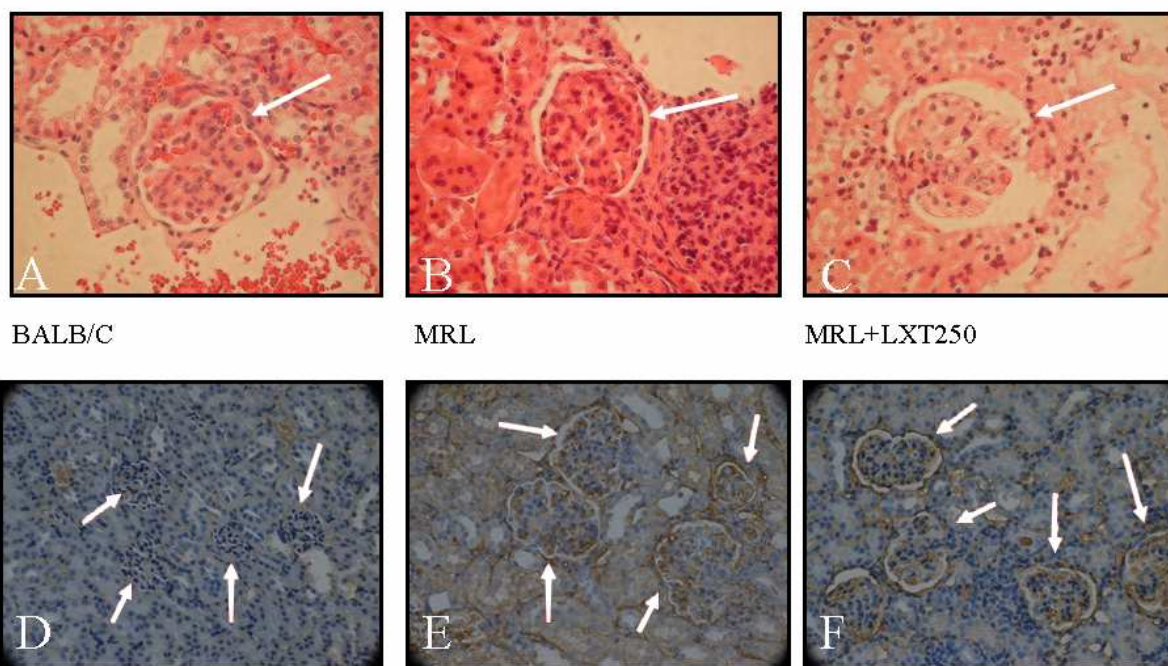


MRL 小鼠呈現明顯的脾臟腫大的現象，餵食龍膽瀉肝湯的小鼠脾臟明顯縮小，因此我們繼續分析脾臟中 CD11b (圖二 A)、CD3+CD4+(圖二 B)、CD3+CD8+ (圖二 C)，與血液與脾臟中調節性 T 細胞的表現 (圖三) 餵食龍膽瀉肝湯小鼠在上述分析項目皆有良好的表現。



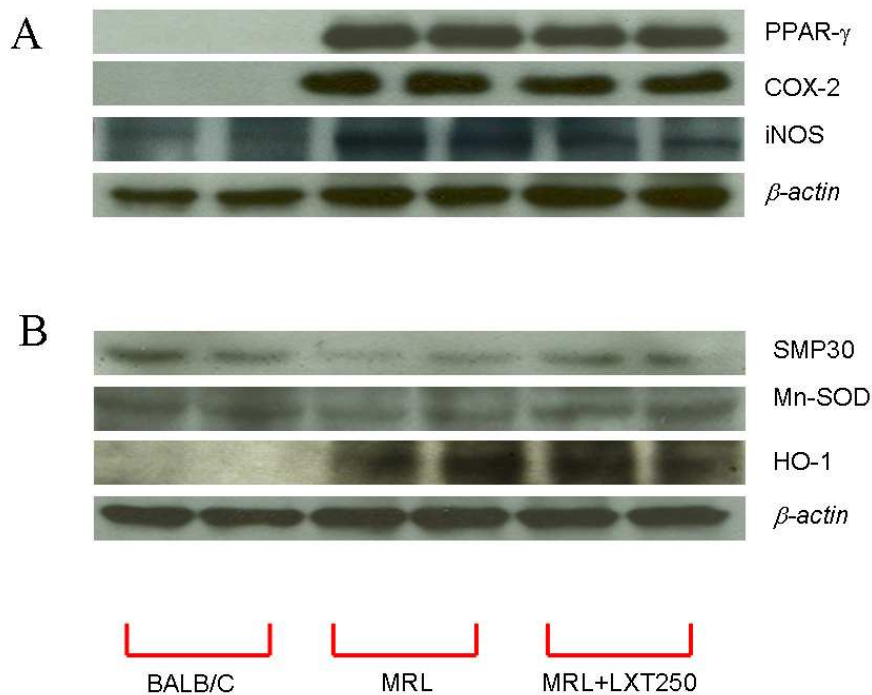
圖四、龍膽瀉肝湯介入紅斑性狼瘡小鼠 MRL-lpr/lpr 治療，顯著血中降低了 TNF- $\alpha$  (A) 與 IFN- $\gamma$ (C)的濃度的同時也改變了 MRL 紅斑性狼瘡小鼠血中 IL-4 (B)與 IL-5(D)低落的現象，提供了中醫方劑治療紅斑性狼瘡機轉探討免疫調控的基礎。有關 Anti-dsDNA 的產生，受到許多複雜因素的影響，包括：B 細胞活化的閾值、抗原形成的量多寡、抗原呈現細胞的交互反應、T 細輔助型細胞等多因素的調控。龍膽瀉肝湯，對 Anti-dsDNA 的變化(E)，據此推論其作用與上述各種因數應有密切相關。

### H&E stain



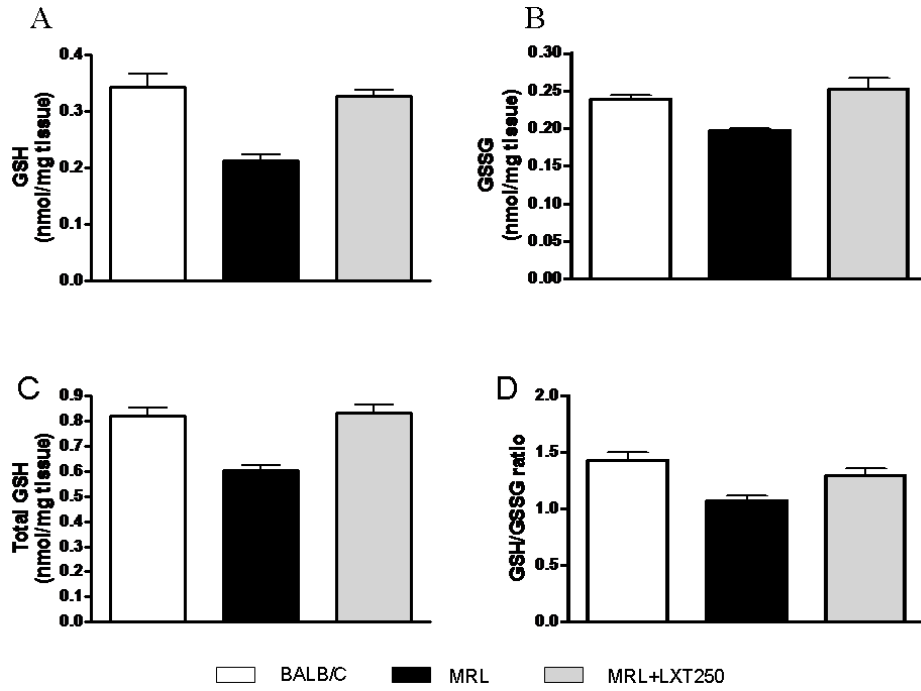
### IHC IgG stain

圖五、龍膽瀉肝湯對紅斑性狼瘡小鼠 MRL 腎臟組織病理變化的影響。顯示 MRL 小鼠有嚴重的腎臟增生，在經龍膽瀉肝湯治療後可見明顯的組織病理變化，腎臟腎絲球結構較完整，腎臟組織 IgG 染色較輕微。

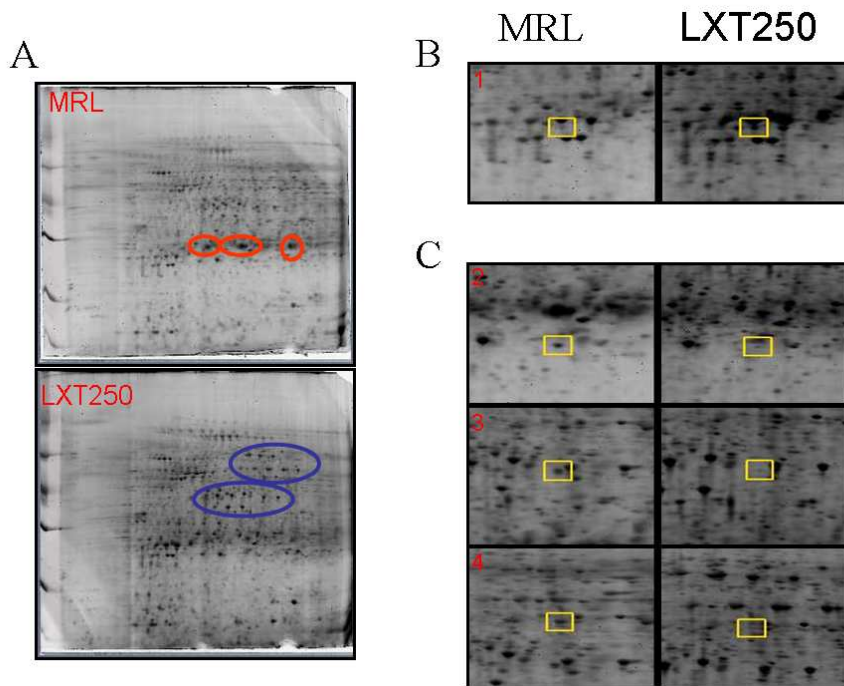


圖六、Western blot 結果抗氧化蛋白(SMP-30、MnSOD)，發炎反應相關蛋白(COX-2、iNOS、PPAR $\gamma$ )的調節有關。





圖七、龍膽瀉肝湯治療後整個腎臟組織氧化壓力下降，抗氧化能力明顯提升。

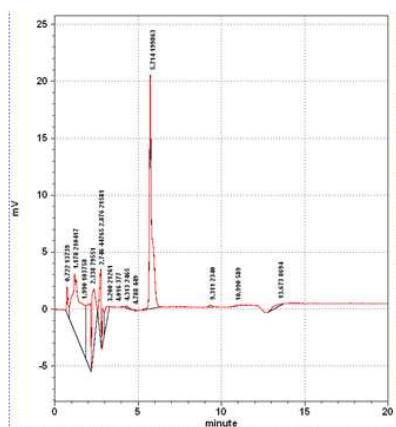


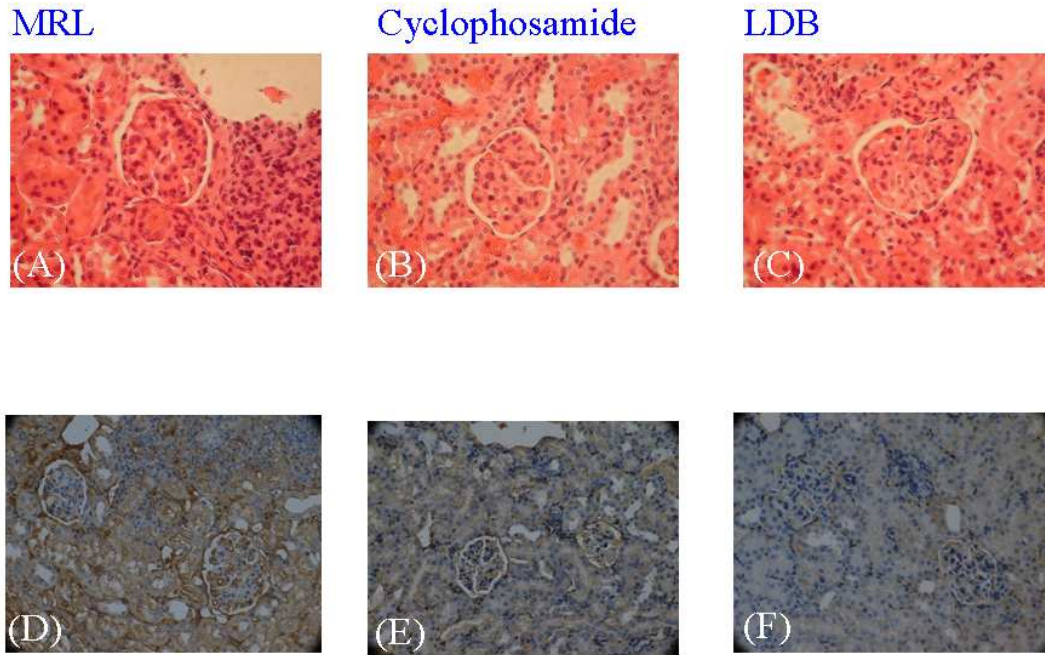
圖八、龍膽瀉肝湯對紅斑性狼瘡小鼠MRL腎臟組織病理變化的影響。我們以蛋白質體研究各組間腎臟組織。

表一、紅斑狼瘡小鼠給予龍膽瀉肝湯後腎臟組織二維電泳蛋白質體分析

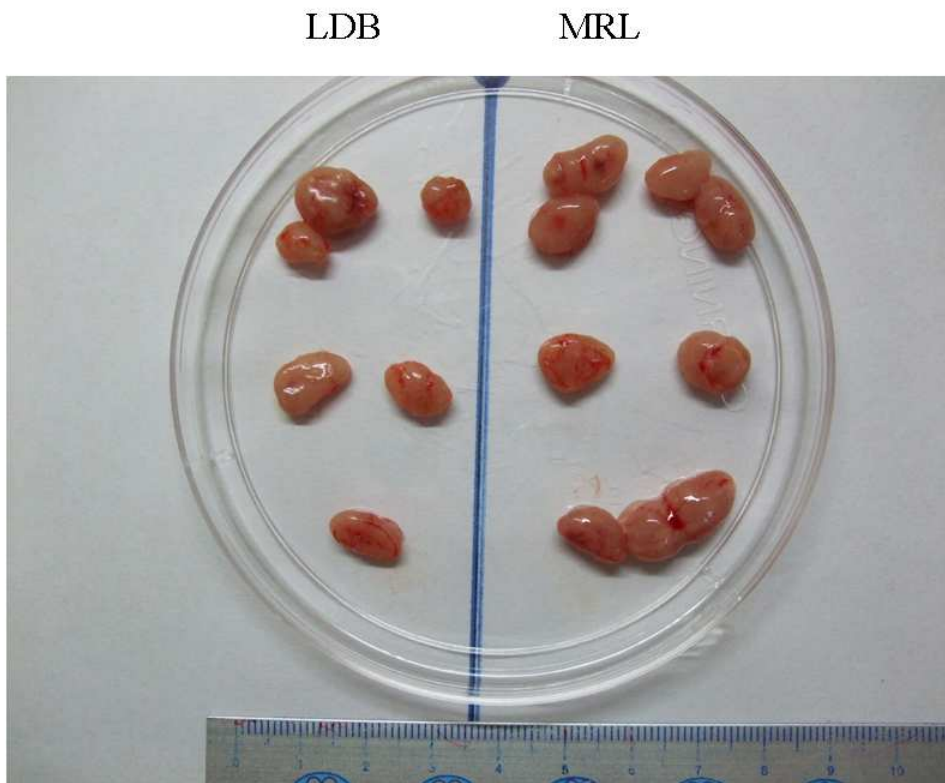
NO.	Accession no.	protein name	MRL vs. Exp (fold-changes)	Funtion
1	P09411	Phosphoglycerate kinase 1	-4.00	Carbohydrate degradation; glycolysis
2	P29391	Ferritin light chain 1	4.00	Stores iron in a soluble, non-toxic, readily available form. Important for iron homeostasis. Iron is taken up in the ferrous form and deposited as ferric hydroxides after oxidation
3	Q63836	Selenium-binding protein 2	4.00	bind selenium and acetaminophen
4	P17182	Alpha-enolase	4.00	Multifunctional enzyme that, as well as its role in glycolysis, plays a part in various processes such as growth control, hypoxia tolerance and allergic responses (By similarity). May also function in the intravascular and pericellular fibrinolytic system due to its ability to serve as a receptor and activator of plasminogen on the cell surface of several cell-types such as leukocytes and neurons

(A)

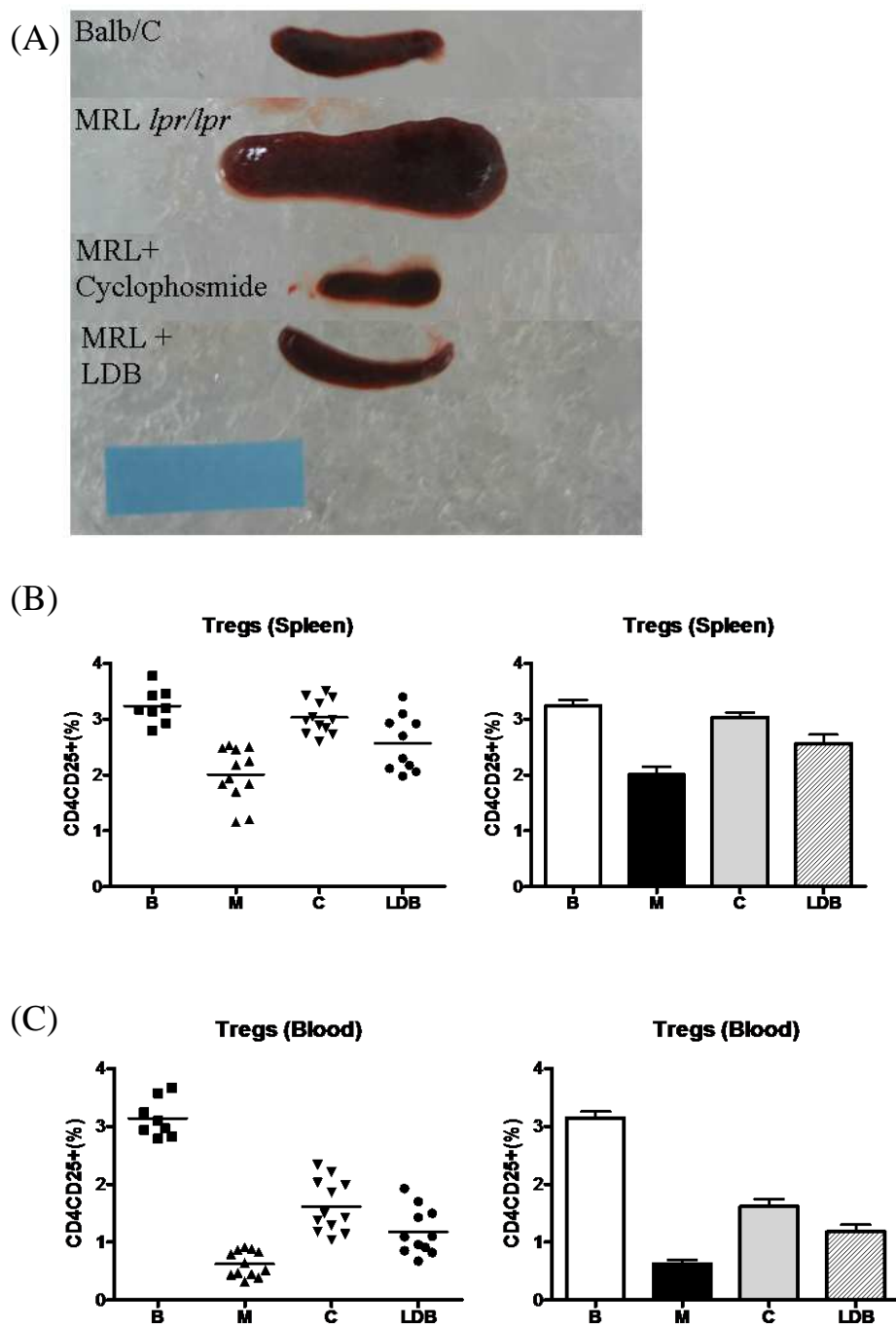




圖十、龍膽草正丁醇萃取物對紅斑性狼瘡小鼠 MRL 腎臟組織病理變化的影響。圖顯示 MRL 小鼠有嚴重的腎膈增生，在經藥物治療後可見明顯的組織病理變化，腎臟腎絲球結構較完整，腎臟組織 IgG 染色較輕微。

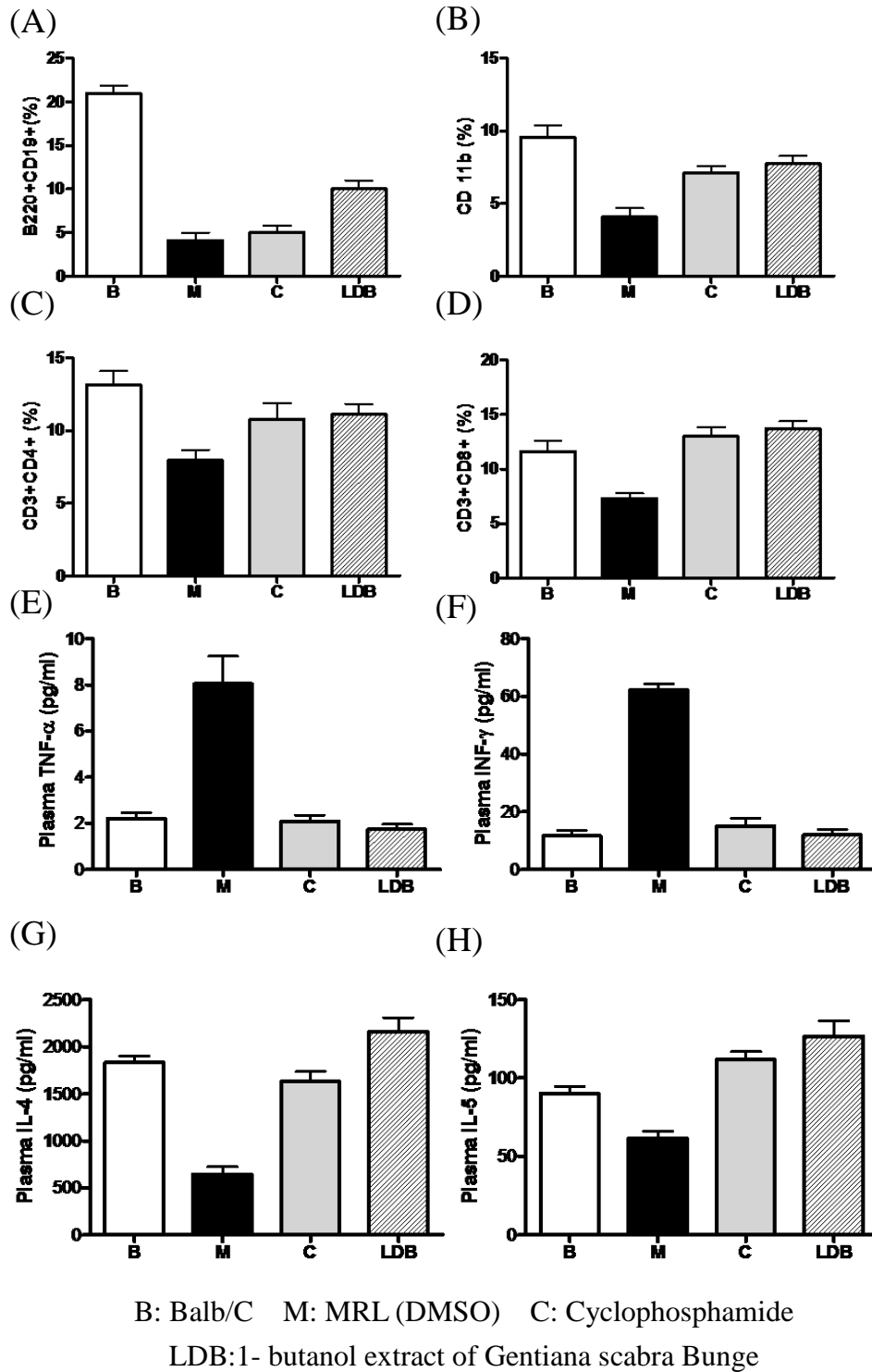


圖十一、龍膽草正丁醇萃取物對紅斑性狼瘡小鼠 MRL 前肢淋巴結增生情形的影響。圖顯示 MRL 小鼠有明顯的淋巴結增生，在經藥物治療後可見數目及大小均明顯減少。



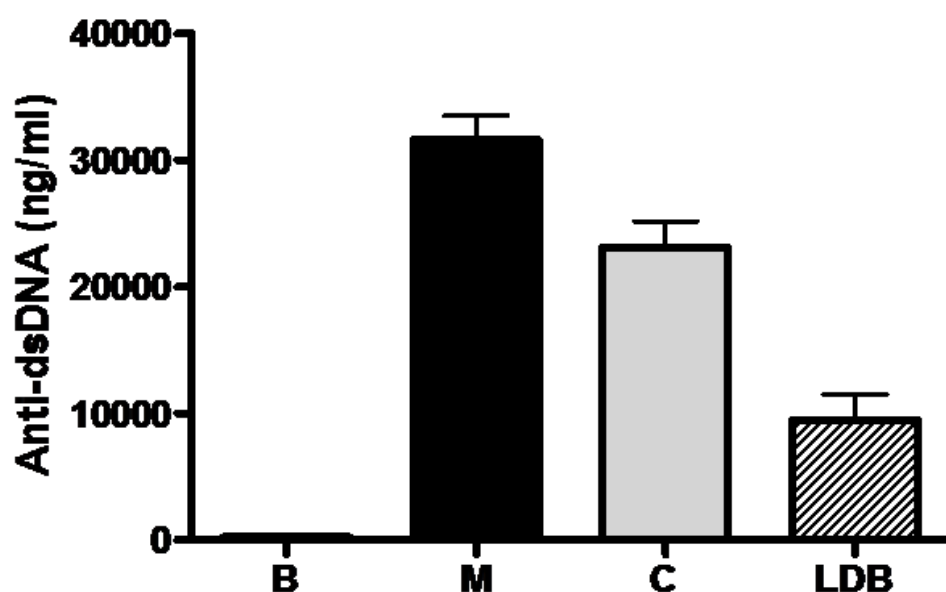
圖十二、龍膽草正丁醇萃取物降低紅斑性狼瘡小鼠體內的氧化壓力，也確實改善了紅斑性狼瘡小鼠的脾臟腫大的現象，此機制可能與調節性T細胞的反應有關。



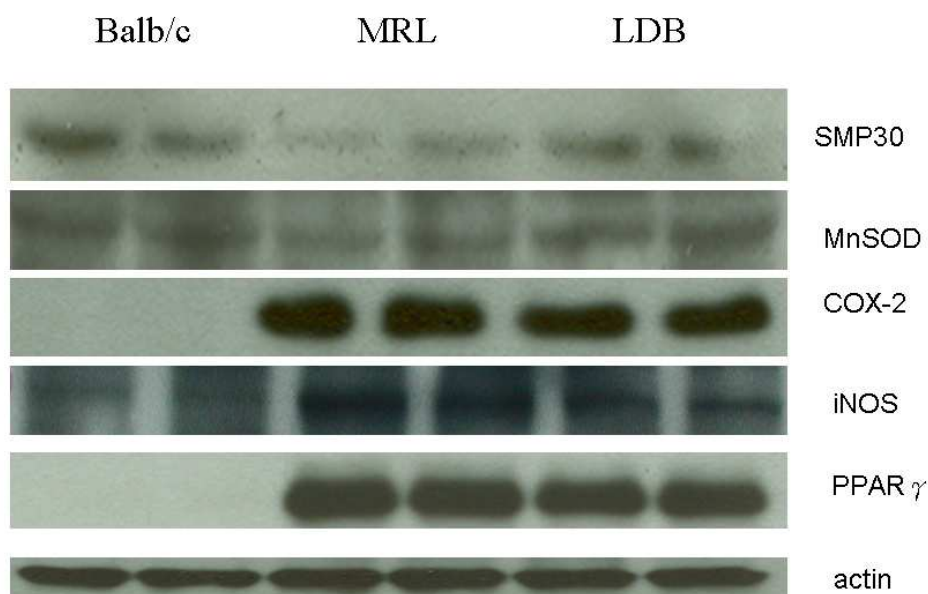


圖十三、龍膽草正丁醇萃取物降低紅斑性狼瘡小鼠體內的氧化壓力，也確實改善了紅斑性狼瘡小鼠的脾臟腫大的現象，此機制可能與調節性T細胞的反應有關。其次也與B細胞(B220+CD19+)、macrophage (CD11b)、Th (CD3+CD4+)、Tc(CD3+CD8+)的調控有關。並顯著血中降低了TNF- $\alpha$ 與INF- $\gamma$ 的濃度(E,F)的同時也改變了MRL紅斑性狼瘡小鼠血中IL-4 與IL-5低落的現象(G, H)，提供了中藥治療紅斑性狼瘡機轉探討免疫調控的基礎。

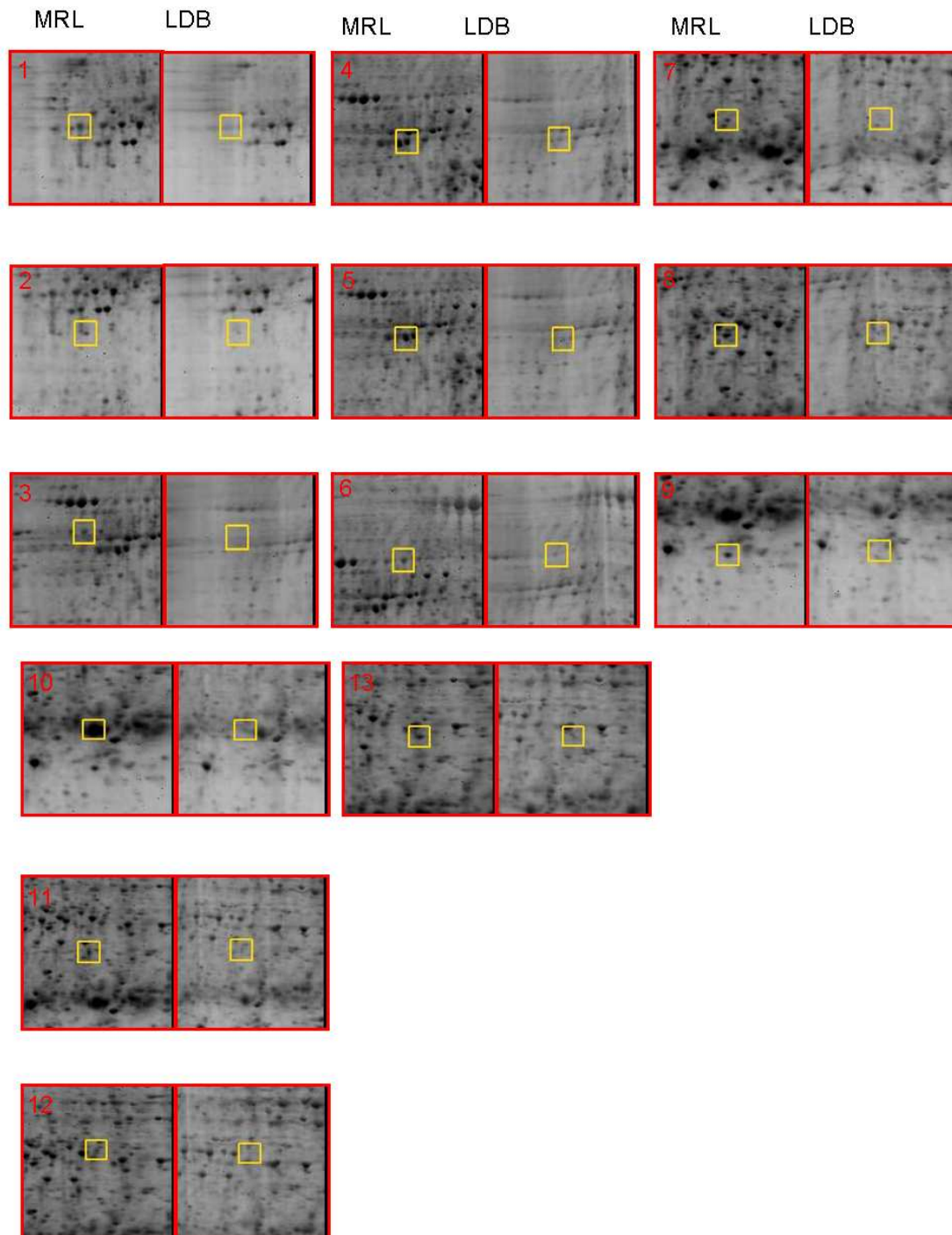
(A)



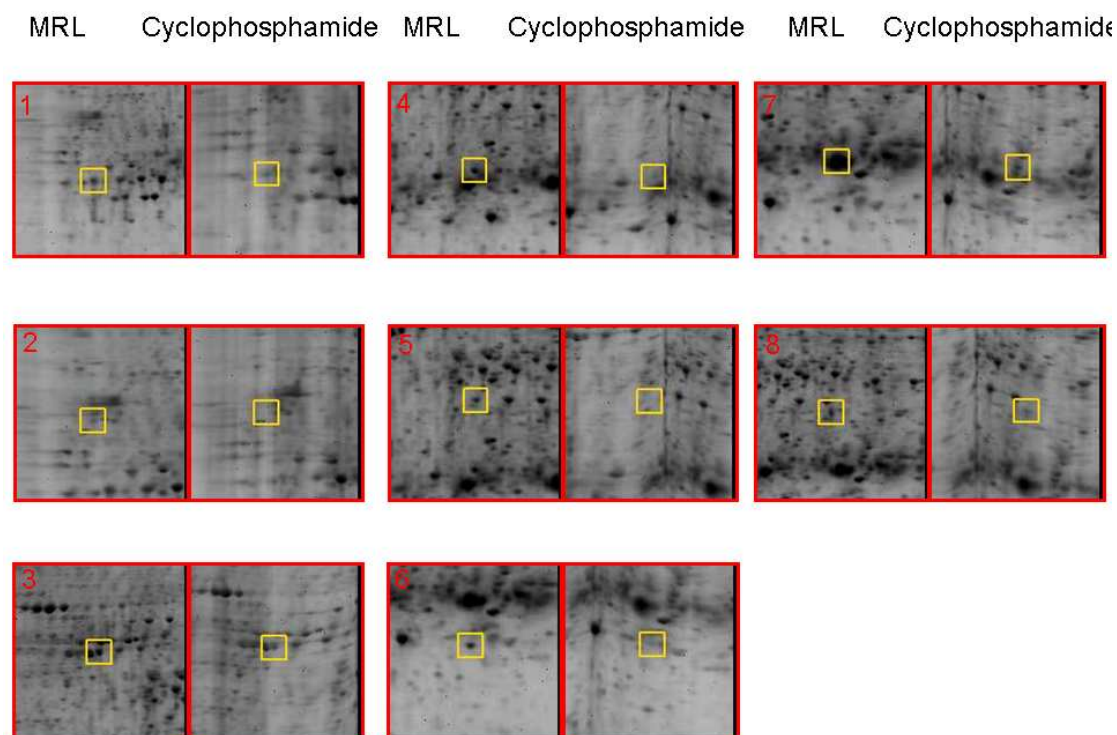
(B)



圖十四、有關Anti-dsDNA的產生，受到許多複雜因素的影響，包括：B細胞活化的閾值、抗原形成的量多寡、抗原呈現細胞的交互反應、T細胞輔助型細胞等多因素的調控。龍膽草正丁醇萃取物對Anti-dsDNA的變化，據此推論其作用與上述各種因數應有密切相關(A)。這些調控的因子也分別與抗氧化蛋白(SMP-30、MnSOD)，發炎反應相關蛋白(COX-2、iNOS、PPAR $\gamma$ )的調節有關(B)。



圖十五、龍膽草正丁醇萃取物對紅斑性狼瘡小鼠MRL腎臟組織病理變化的影響。我們以蛋白質體研究各組間腎臟組織，這些有變化的標誌蛋白與腎臟滲透壓調控有密切的關係(點6, serum albumin)。有與腎臟氧化壓力調控有關(點8, pyruvate dehydrogenase E1; 點3, ATP synthase subunit beta; 點13, malate dehydrogenase)，有與紅斑性狼瘡疾病嚴重度有關的蛋白(點5, alpha-enolase; 點7, serum amyloid P)。有與腎臟代謝功能有關(點11, S100-A5; 點1, GM2 activator; 點12, pyridoxal kinase)。



圖十六、Cyclophosphamide 對紅斑性狼瘡小鼠 MRL 腎臟組織病理變化的影響。我們以蛋白質體研究各組間腎臟組織，這些有變化的標誌蛋白與腎臟滲透壓調控有密切的關係(點 3, serum albumin)。有與腎臟氧化壓力調控有關(點 4, pyruvate dehydrogenase E1)，有與紅斑性狼瘡疾病嚴重度有關的蛋白(點 5, serum amyloid P)。有與腎臟代謝功能有關(點 8, S100-A5; 點 1, GM2 activator)。



表二、紅斑狼瘡小鼠給予龍膽草正丁醇萃取物後腎臟組織二維電泳蛋白質體分析

NO	Accession no.	protein name	MRL vs. Gentio (fold-changes)	Function
1	Q60648	Ganglioside GM2 activator	4.00	Binds gangliosides and stimulates ganglioside GM2 degradation. It stimulates only the breakdown of ganglioside GM2 and glycolipid GA2 by beta-hexosaminidase A. It extracts single GM2 molecules from membranes and presents them in soluble form to beta-hexosaminidase A for cleavage of N-acetyl-D-galactosamine and conversion to GM3
2	P28076	Proteasome subunit beta type 9	4.00	The proteasome is a multicatalytic proteinase complex which is characterized by its ability to cleave peptides with Arg, Phe, Tyr, Leu, and Glu adjacent to the leaving group at neutral or slightly basic pH. The proteasome has an ATP-dependent proteolytic activity. This subunit is involved in antigen processing to generate class I binding peptides.
3	P56480	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	4.00	Produces ATP from ADP in the presence of a proton gradient across the membrane. The beta chain is the catalytic subunit.
4	P60710	Actin, cytoplasmic 1	4.00	Actins are highly conserved proteins that are involved in various types of cell motility and are ubiquitously expressed in all eukaryotic cells
5	P17182	Alpha-enolase	4.00	Multifunctional enzyme that, as well as its role in glycolysis, plays a part in various processes such as growth control, hypoxia tolerance and allergic responses (By similarity). May also function in the intravascular and pericellular fibrinolytic system due to its ability to serve as a receptor and activator of plasminogen on the cell surface of several cell-types such as leukocytes and neurons
6	P07724	Serum albumin	4.00	regulation of the colloidal osmotic pressure of blood.
7	P12246	Serum amyloid P-component	4.00	Binds 2 calcium ions per subunit
8	Q9D051	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	4.00	The pyruvate dehydrogenase complex catalyzes the overall conversion of pyruvate to acetyl-CoA and CO(2). It contains multiple copies of three enzymatic components: pyruvate dehydrogenase (E1), dihydrolipoamide acetyltransferase (E2) and lipoamide dehydrogenase (E3)
9	P29391	Ferritin light chain 1	4.00	Stores iron in a soluble, non-toxic, readily available form. Important for iron homeostasis. Iron is taken up in the ferrous form and deposited as ferric hydroxides after oxidation
10	P01644	Ig kappa chain V-V region HP R16.7	4.00	Anti-arsenate hybridoma protein
11	P63084	Protein S100-A5	4.00	Binds calcium, zinc and copper. Binds 2 calcium ions and copper ions per molecule and 1 zinc ion per molecule
12	Q8K183	Pyridoxal kinase	4.00	Required for synthesis of pyridoxal-5-phosphate from vitamin B6
13	P14152	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	4.00	(S)-malate + NAD+ = oxaloacetate + NADH

表三、紅斑狼瘡小鼠給予 cyclophosamide 後腎臟組織二維電泳蛋白質體分析

NO	Accession no.	protein name	MRL vs. Cyclo (fold-changes)	Function
1	Q60648	Ganglioside GM2 activator	4.00	Binds gangliosides and stimulates ganglioside GM2 degradation. It stimulates only the breakdown of ganglioside GM2 and glycolipid GA2 by beta-hexosaminidase A. It extracts single GM2 molecules from membranes and presents them in soluble form to beta-hexosaminidase A for cleavage of N-acetyl-D-galactosamine and conversion to GM3
2	P60710	Actin, cytoplasmic 1	4.00	Actins are highly conserved proteins that are involved in various types of cell motility and are ubiquitously expressed in all eukaryotic cells
3	P07724	Serum albumin	4.00	regulation of the colloidal osmotic pressure of blood.
4	Q9D051	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	4.00	The pyruvate dehydrogenase complex catalyzes the overall conversion of pyruvate to acetyl-CoA and CO(2). It contains multiple copies of three enzymatic components: pyruvate dehydrogenase (E1), dihydrolipoamide acetyltransferase (E2) and lipoamide dehydrogenase (E3)
5	P12246	Serum amyloid P-component	4.00	Binds 2 calcium ions per subunit
6	P29391	Ferritin light chain 1	4.00	Stores iron in a soluble, non-toxic, readily available form. Important for iron homeostasis. Iron is taken up in the ferrous form and deposited as ferric hydroxides after oxidation
7	P01644	Ig kappa chain V-V region HP R16.7	4.00	Anti-arsenate hybridoma protein
8	P63084	Protein S100-A5	4.00	Binds calcium, zinc and copper. Binds 2 calcium ions and copper ions per molecule and 1 zinc ion per molecule

