

編號：CCMP95-RD-104

# 中草藥之抗發炎與免疫增強活性的系統生物學研究

楊寧蓀

中央研究院生物農業科學研究所籌備處

## 摘要

祖傳藥草和健康功能性的密切聯繫，我們認為可藉由各種中草藥萃取物或純化之植化物對人類免疫細胞或系統反應的研究獲得較更真確之體會。系統生物學是科學的新領域，它開啟了以系統性或全局整合性的角度來定量地闡述體內或細胞內各組成部分之間的交互作用。本計畫之目的擬利用生命科學領域中發展迅速的系統生物學以探討純化之植化物對人體免疫系統的影響。免疫系統既有複雜性又有專一性。因此本計畫乃藉由一系列免疫學、細胞學和分子生物學等研究策略或方法，利用純化之植化物對細胞激素及轉錄因子基因啟動子的活性抑制作用，或對及樹突狀細胞與 T 細胞 (DC-TC) 間的交互反應等各項篩檢及分析以探討純化之植化物對人體免疫系統的影響。在評估植化物對樹突狀細胞成熟及功能上的影響測試中，我們發現植化物 CP 可以有效抑制因 LPS 所刺激表現的成熟標記(CD40、CD80 及 CD86)，並且可降低樹突狀細胞因 LPS 刺激而分泌 IL-12 之表現量及維持樹突狀細胞內噬作用之活性。植化物 CP 可抑制細菌毒素 (LPS) 刺激成熟的樹突狀細胞 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 IL-6 的表現量。植化物 CP 可抑制由細菌毒素 (LPS) 刺激引發樹突狀細胞的 NF- $\kappa$ B p65 的核轉移活性，在植化物對抗原呈現細胞活化 T 細胞影響評估上，植化物 CP 可削弱因 LPS 處理後之成熟樹突細胞所引發 T 細胞增生反應及第一型輔助細胞 (Th1) 的分化比例。由目前我們所得到的結果使我們相信植化物 CP 可能具有抑制免疫活性並且可能具有朝免疫抑制劑之發展價值。

**關鍵詞：**抗發炎、植化物、系統生物學

編號：CCMP95-RD-104

# **Systems biology study on the bio-activity of anti-inflammation and immune stimulation of phytochemicals from medicinal herbs**

Ning-Sun Yang

Institute of BioAgricultural Sciences (IBS) , Academia Sinica

## **ABSTRACT**

The possible correlations between the appropriate use of traditional medicinal herbs and good human health care are the ultimate goal for investigation of this study project. This aim is pursued by evaluating the specific effect on human immune cells or systems as a response to treatment with a variety of traditionally used herbal medicines or the derived phytochemicals. In this study, we are employing the tools of systems biology, immunobiology, and molecular biology to evaluate specific immune modulatory effects of phytochemicals on the maturation human dendritic cell (DCs) and T cell differentiation. We demonstrate that phytochemical CP can reduce the expression of LPS-induced DC surface makers and inhibit the secretion of IL-12 in test DCs. In addition, CP can effectively maintain the immature status of DCs with good endocytic capacity. Furthermore, our studies on signaling pathways showed that CP decreased significantly the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B in LPS-stimulated, mature DCs. With the allogeneic mixed lymphocyte reaction (MLR) assay, we observed that cytopiloyne treatment shifted the DC-polarizing capacity from Th1 to Th2. Together, our results strongly suggest that CP can suppress the maturation of DCs and the differentiation of T cells. This phytochemical may therefore be usefully employed as a molecular modifier for immuno-modulatory activities, and for potential clinical applications as an immuno-therapeutic agent.

Key words: anti-inflammation, phytochemical, systems biology

## 壹、前言

各種草藥在人類社會使用已有數千年的歷史，傳統療法、互補/另類醫療 (complementary and alternative medicine, CAM) 或搭配西醫，中西合璧的治療方式在世界各地皆受到普遍的重視與討論(1-2)。在歐美草藥的銷售市場中，這類的產品以健康食品 (health food)、膳食補充品 (dietary supplement) 或藥品 (drug) 的方式在市面上販售，更帶來巨大的商機，甚至有些地區能申請健康保險的金額來支付，而東方的中國大陸、台灣及日本，更是廣泛地使用中草藥及其複方產品。美國許多卓越的醫藥研究機構，如：國家健康院 (NIH)、食品及藥品管理局 (FDA) 以及哈佛、耶魯等主要醫學院等正著手於草藥產品的研發與臨床測試，FDA 更於 2000 年 8 月 10 日公告「植物性藥品規範草案」(Guidance for Industry-Botanical Drug Products- Draft Guidance)，使得中草藥及植化藥物更具發展的前景(3-7)。

由於中草藥國際市場之發展潛力無窮，各界對中醫藥的需求日益殷切，政府乃將中草藥列為國家重要政策之一，在 2000 年，行政院擬定「中草藥產業技術發展五年計畫」，期以產、官、學界結合方式，提升國內中藥劑的品質(8)；而國內多所研究單位，如中研院基因體中心、農業生物科技研究中心及國防大學等大專院校亦具體化提出發展植物性天然藥物及植化物，並做為未來藥物或食品之研究目標，研究中醫藥的現代化、科學化與國際化已形成現今的研究趨勢。

在東方，中草藥經幾千年的「類人體試驗」，證明其具有抗發炎或增強免疫力的能力，坊間的中草藥或其製劑常被宣稱具有抗發炎或可增強免疫的功效，然而大多仍缺乏科學客觀、直接的證據來加以佐證；或是每個療法間，無法做有效的重複試驗，以致於彼此欠缺一致及系統性的評估方式。故若建立一套可篩檢中草藥抗發炎以及增強免疫力的模式，並利用可定性、定量及高再現性的評估方法，在開發中草藥之抗發炎及增強免疫力的功效，以及提升中草藥的現代化、科學化與國際化是一非常重要的發展策略。

中草藥之推動發展、現代化及科學化在基礎研究、經濟及社會層面上都是屬於非常重要的議題，以往中草藥之藥材品質常良莠不齊，再加上成分不明確又缺乏符合現代醫學的篩選平台來加以檢測臨床試驗以證實其療效，難以被歐美等國際所接受；故而在中草藥科學化上乃應提升中草藥的品質及穩定掌控其成分，以現代醫學方式建立篩選平台並進行臨床療效來進行評估。

補中益氣類的中草藥，被認為對體弱或體虛的人有很好的「虛補」療效；推測這些藥草中，可能含有提昇免疫力的成分。很多病症（如：感染性疾病、癌症、糖尿病及阿茲海默症等）常伴隨著局部或全身性的發炎反應，此時經常使用抗發炎藥物來降低局部或全身性的發炎反應，這與清熱解毒類的中草藥有類似的部分，因此我們認為補中益氣和清熱解毒類的中草藥成分對人體之免疫反應具有調節的作用。

免疫系統乃是一複雜、相互關聯的網絡系統；這其中包含著先天性及後天性免疫之兩類免疫系統。此系統透過表皮細胞、單核細胞、巨噬細胞、自然殺手細胞、B 細胞、T 細胞和樹突狀等免疫細胞之交互作用，以及細胞分泌的細胞激素和趨化物質的協同作用下，共同保護宿主免於遭受微生物的感染及自發性細胞轉移的危害以維持宿主生理上的恆定。

樹突狀細胞已知是人體內最主要的抗原呈現細胞，在免疫細胞交互作用中位居樞紐的角色。依功能、來源及位置有不同的分類。其幾乎都來自血液循環中的先驅細胞，經過特定細胞激素刺激之後會進行分化，以未成熟 (immature) 的樹突狀細胞形式停留在皮膚、黏膜、肺臟與脾臟等器官。未成熟樹突狀細胞可以利用細胞表面受體或直接利用胞飲作用將入侵者吞噬，將病毒或細菌以溶酶體(lysosome) 包覆，並將其水解成其他數種免疫細胞可辨認的分子片段，再利用「主要組織相容性複合體」(MHC) 將抗原呈現在細胞表面，進一步與 T 細胞作用。

分子結構上，MHC 是一種叉狀的分子，抗原就安插在 MHC 分子的叉齒間。MHC 有第一型與第二型兩類，這兩類分子的形狀不同，從樹突狀細胞內取得抗原的方式也不同。未成熟樹突狀細胞較缺乏幫助表現抗原給淋巴細胞 (lymphocyte) 的細胞表面分子，因此抗原表現能力仍然不強。當未成熟樹突狀細胞在處理抗原並準備呈現的同時，常會因為受到外來致病源所產生的訊號，如：一、細菌或病毒本身組成的分子。如格蘭氏陰性細菌細胞壁上的脂多醣 (LPS)、DNA 或 RNA 等。二、發炎作用所引起產生的細胞激素（如 IL-1 $\beta$  或 TNF- $\alpha$ ）。三、T 淋巴細胞上與樹突狀細胞特定蛋白質結合的受體分子(Ligand)，引發未成熟樹突狀細胞進入成熟 (mature) 階段，而未成熟樹突狀細胞會隨著血液來到脾臟，或經由淋巴液遷移到淋巴結中。到達特定淋巴組織之後，樹突狀細胞會成熟，並將載有抗原的 MHC 分子呈現給從未接觸過這些抗原的輔助者 T 細胞。樹突狀細胞它們細胞表面有一種「協同刺激分子」(co-stimulatory molecular)，會幫助樹突狀細胞與 T 細胞

表面相對應的受體結合。輔助者 T 細胞一旦認識了這些抗原，就會促使 B 細胞去製造專一性極高能辨認特殊抗原的抗體或促進細胞毒性 T 細胞(cytotoxic T)大量增生，並產生能毒殺外來生物的毒素。

這種精確的適應性 (adaptive) 免疫反應常能確保體內不易出現危害健康的致病源；此外，樹突狀細胞與輔助者 T 細胞也會啟動殺手 T 細胞 (NK cell)，去殺死遭微生物感染的細胞。某些受樹突狀細胞指導過的細胞還會變成「記憶細胞」，持續留在體內數年，可在極短的時間內有效消滅未來再度出現的入侵者。身體以抗體或殺手細胞的方式來回應入侵者，似乎部份取決於樹突狀細胞的傳達訊號(如分泌 IL-10 或 IL-12 等)，以及它們讓輔助者 T 細胞製造出了哪種細胞激素(cytokine)。已知控制適應性免疫的細胞激素共有兩型。第一型細胞激素較能召集殺手細胞，對付已遭其他細菌或病毒感染的細胞；第二型細胞激素能促使體內產生抗體用以對付寄生蟲或某些感染體內的細菌。如果樹突狀細胞引發的細胞激素種類不對，身體免疫機制就可能出錯，例如產生自體免疫性疾病 (autoimmune diseases)。免疫系統乃是一複雜、相互關聯的網絡系統；其中包含著先天性及後天性免疫之兩類免疫系統。此系統透過表皮細胞、單核細胞、巨噬細胞、自然殺手細胞、B 細胞、T 細胞和樹突狀等免疫細胞之交互作用，以及細胞分泌的細胞激素和趨化物質的協同作用下，共同保護宿主免於遭受微生物的感染及自發性細胞轉移的危害以維持宿主生理上的恆定。

從人體產生樹突狀細胞的過程來看，樹突狀細胞的主要生成來源一般認為是來自骨髓性 (myeloid) 路徑中的先驅細胞。而在此生成途徑當中，單核細胞(monocyte) 被認為可能是樹突狀細胞的主要先驅細胞。由單核細胞分化為樹突狀細胞的過程需要特定細胞激素參與。目前已知在體外可以使用由人類週邊血中的單核性細胞 (PBMC) 利用免疫磁性珠(immuno-magnetic beads)或貼壁的方式分離得到 CD14+單核細胞外加人類 GM-CSF 或 IL-4 培養 6~7 日產生未成熟樹突狀細胞。而不僅單核細胞的分離容易，同時獲得的數目也較其他的樹突狀細胞的先驅細胞多(如 CD34+幹細胞)。由單核細胞生成的樹突狀細胞，一般認為和體內原有的樹突狀細胞在功能、形態及表面分子標記(CD marker)的表現上都很接近。而且培養得到的未成熟樹突狀細胞再經過一到三天給予 LPS 或 TNF- $\alpha$  或 IL-1 $\beta$  都會促使未成熟樹突狀細胞進一步轉變為成熟的樹突狀細胞。

我們計畫利用這樣培養的系統，在不同階段外加中草藥萃取物，評估這些萃取物對樹突狀細胞分化或成熟的影響。最後再利用樹突狀

細胞和不同比例的 T 細胞共同培養 (co-culture)，來檢測藥草萃取物處理對樹突狀細胞功能的影響。我們可利用流式細胞儀精確地偵測數種表面分子標記，以探討植物萃取物對樹突狀細胞分化及成熟生化過程的影響。同時我們也要評估未成熟細胞於加入植物萃取物後，吞噬特定外來抗原的能力，以及未成熟細胞受到植物萃取物處理後刺激 T 細胞的能力，用以評估其抗原表現功能受到植物萃取物調控的影響。

在免疫系統中已知有一群免疫調節蛋白因子，也就是細胞激素，很多（成千上萬）的西方文獻指出細胞激素可增強許多先天免疫的生物活性（6），細胞激素也已廣泛使用於傷口癒合及致命性疾病等治療上，在免疫系統中細胞激素扮演一個重要的調節角色，各項免疫反應皆須要許多不同激素的參與；舉例來說，GM-CSF、TNF- $\alpha$ 、IL-12 及 IL-1 $\beta$  這些激素皆被認為與發炎反應有關。簡單摘選如下：【1】Granulocyte-macrophage-colony stimulatory factor (GM-CSF) 可在不同程度的免疫刺激反應中測得其參與，並與恆定性有關（9, 10），GM-CSF 還被認為是重要前發炎反應的細胞激素，故而廣泛的使用在傷口癒合（11）及癌症的治療上（12）；【2】Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 細胞激素可刺激感染部位補充嗜中性球及單核白血球並增強細胞活性，以消滅侵入的病原體（13）；然而 TNF- $\alpha$  在不適當或過度表現也常是風濕病、關節炎、SARS 及敗血症等之重要特徵（14）；【3】Interleukin-12 (IL-12) 為初期先天性免疫反應主要傳遞者並且可抑制許多種類腫瘤的生長（15）；【4】IL-1 $\beta$  是由 IFN  $\alpha\beta$  所引發之促發炎反應的主要細胞激素（16），它含有抗病毒能力。因此以測定細胞激素活性的變化作為篩檢中草藥是否可抗發炎或能增強免疫力的功能可以說是一直接客觀有效的方法，欲檢測細胞激素在組織體液中之濃度及活性/功能可方法上，使用 RT-PCR、ELISA 及 Flow cytometry 等方式來檢測細胞激素的表現量，但這些方法因使用上太花費金錢及時間而受到限制。目前已有許多細胞激素的啟動子如 GM-CSF、TNF- $\alpha$ 、IL-12 及 IL-1 $\beta$  等接到含有螢光酵素 (luciferase) 或是鹼性磷酸酵素 (alkaline phosphatase) 為報導基因的載體上，並以轉染方式 (transfection) 或是基因轉殖方式 (transgenic) 送入培養的細胞內或動物體內，作為 *in vitro* 及 *in vivo* 細胞激素啟動子活性的檢測方法。

除了細胞激素一類作為篩檢中草藥是否可抗發炎或能增強免疫力的方法外，測定 NF- $\kappa$ B 轉錄因子活性，則為另一套實驗上可行之方法，在免疫系統中，NF- $\kappa$ B 是一高誘導性的轉錄因子，不管是先天性免疫或是後天性免疫系統中皆扮演著非常重要的角色（17）；在免

疫反應刺激上，病原體的侵入、化學毒物的碰觸及物理上的損傷或是組織的創傷，皆可誘導 NF- $\kappa$ B 的表現，目前已知 NF- $\kappa$ B 在發炎反應有相當的關聯性 (18)；在慢性發炎疾病，可測得 NF- $\kappa$ B 維持相當高的活性，在發炎性腸疾病 (IBD) 及急性肝炎反應中皆已測得高活性 NF- $\kappa$ B 的臨床症狀 (19)，而活化的 NF- $\kappa$ B 轉錄因子可控制許多基因的表現，包括參與發炎反應多種細胞激素、化學趨素及許多免疫系統之受體，NF- $\kappa$ B 可謂是免疫系統之中心樞紐 (20)，為免疫系統一重要指標，在新藥的開發產業上，也以 NF- $\kappa$ B 作為 *in vitro* 系統作篩選新藥的工具，故檢測 NF- $\kappa$ B 活性可作為篩檢中草藥是否抗發炎或能增強免疫力功能的直接可行方法。

本計畫乃是希望以結合現代免疫學、細胞學、分子生物學及系統生物學之觀點，建立一套可篩檢和評估中草藥抗發炎反應及增強免疫力之技術平台，利用轉殖外來細胞激素及轉錄因子基因啟動子進入到培養的細胞內及老鼠皮膚組織內，並直接而有效地探討植物萃取物或純化植化物，對細胞激素及轉錄因子基因啟動子的活化或抑制作用。

近兩年來，本所研究室在這方面研究工作，已獲得突破性研究成果發表了多篇研究論文包括 J. Biol. Chem.、Carcinogenesis、J. Gen. Mol. Biol. 及其他 Conference Papers (21-23)。在此計畫中，我們將數種已知的細胞激素及轉錄因子基因啟動子 (promoter) 分別以分子重組接到具有螢光酵素 (luciferase)、綠螢光蛋白 (green fluorescent protein) 或是鹼性磷酸酵素 (alkaline phosphatase) 為報導基因的載體上，再分別把這些"重組合成" (recombinant) 的質體以轉染方式轉進到細胞體內，或以基因槍直接轉殖入老鼠皮膚組織，並以培養或以塗抹、注射或以餵食等方式，將待測之植物萃取物或植化物送入體內，藉由檢測細胞培養液、皮膚組織或血清中的螢光強度，我們可以準確定量評估植物萃取液對基因啟動子的調節效果，從而建立 *in vitro* 及 *in vivo* 的實驗系統；並藉由流式細胞儀 (flow cytometry) 及 ELISA 方式分析單核和樹突狀細胞內細胞激素之活性，以確認我們所建構之篩選技術平台，具專一性且高穩定性地評估中草藥抗發炎及篩檢增強免疫力之功能。目前我們已經累積一些初步的結果，顯示此篩選評估平台是具體可行的 (請見執行成果概要)，且初步受到國際學術界的認同。如果實驗順利，我們將利用一系列生物有機化學的方法，分析或鑑定植物萃取物中與免疫調節生物活性相關的主要成份或指標成分，這就是此一創新計劃之技術面背景。

## 貳、材料與方法

### 一、定量評估純化之植化物在體外系統中，基因轉染及測量報導基因的表現強度

將各別建構好的細胞激素啟動子載體以 lipofectin 試劑 (invitrogen) 轉染到免疫細胞，將載體與 lipofectin 試劑混合後與培養細胞共同培養 6 小時後，加入待測中草藥萃取物。以 luminescence assay kit (Promega) 檢測螢光酵素表現強度以分析轉染的細胞激素啟動子在細胞體內的表現活性，並以螢光酵素標準品作濃度曲線，實驗使用之冷光儀靈敏度可達 ng。

### 二、樹突狀細胞活化及免疫調節的活性

#### 1. 樹突狀細胞及 T 細胞的分離培養

利用周邊血單核球細胞 (PMBC) 純化技術，自健康捐贈者取得人類周邊血液白血球濃厚液，以 Ficol-Paque 溶液分離出 PBMC，再以高專一性單株抗體，配合磁珠得到高純度的單核細胞或 T 細胞 (目前我們實驗室已建立起此套細胞分離系統)，進一步利用外加人類細胞激素 GM-CSF 與 IL-4 的方式培養單核細胞 6-7 天，可得到未成熟樹突狀細胞。再利用外加 LPS 處理 1-3 天，可以促進未成熟樹突細胞轉變為成熟的樹突細胞。其培養過程中可以加入植化物，以評估其對免疫細胞的影響。

#### 2. 利用流式細胞儀測定樹突狀細胞及免疫活性

利用免疫螢光染劑 (如：fluorescein isothiocyanate (FITC) 及 phycoerythrin(PE)) 去標定各項免疫標記 (CD marker)，分辨加藥處理 DC 之 CD1a、CD14、CD32、CD80、CD83、CD86 及 HLA-DR 等標記，並測定是否有特定細胞激素的釋放 (如白介素 10 或白介素 12 等)，來判定其所發生的免疫調節活性。

#### 3. 未成熟樹突狀細胞內噬作用活性測試

植化物處理未成熟樹突狀細胞 12 小時，再與 LPS (1ng/ml) 共同培養 24 小時後，加入 100 $\mu$ g/ml FITC-labeled dextran 作為抗原，在 37 $^{\circ}$ C 下培養 0.5、1 及 1.5 小時，再以流式細胞儀 (flow cytometry) 測定樹突狀細胞的內噬作用活性。

### 三、混合淋巴細胞培養反應 MLR (mixed lymphocyte reaction)

在混合淋巴細胞培養反應中，利用以成熟的樹突狀細胞來刺



激 T 細胞，作為一種方便的體外免疫反應評估模式。利用 X ray (30Gry) 十分鐘處理受中草藥處理過的 DC 與步驟 E 分離出來的 T 細胞做混合培養，經過 4 天培養後，加入 1  $\mu\text{Ci/well}$  的  $^3\text{H-thymidine}$ 。十八小時後，收成細胞，並測定其  $^3\text{H-thymidine}$  值，評估中草藥萃取物對抗原呈現細胞活化 T 細胞影響。

#### 四、ELISA 分析

酵素免疫分析，是利用抗原及抗体間專一性反應而測試，來偵測樹突狀細胞介白素 12 表現量。簡言之，96 格微滴定盤加入細胞培養液，以 FBS 填充格底，加入一次抗體，二次抗體-酵素連結體 (2nd Ab-Enz) 後呈色，以 ELISA 讀值機偵測特定波長下的吸光值。

#### 五、T 細胞分化反應測試

T 細胞分化反應測試將利用混合淋巴球反應 (mixed lymphocyte reaction, MLR)，共同培養樹突狀細胞及輔助者 T 細胞，利用免疫螢光染劑 (如：fluorescein isothiocyanate (FITC) 及 phycoerythrin(PE)) 去標定分化後 T 細胞細胞內細胞激素 (如  $\text{INF-}\gamma$ , IL-4)，並利用流式細胞儀 (flow cytometry) 來測定解輔助者 T 細胞細胞內細胞激素的表現情形，以了解輔助者 T 細胞中 Th1/Th2 的比例。

#### 六、西方轉漬分析 (Western blotting)

對於 NF- $\kappa\text{B}$  的核轉移 (nuclear translocation) 及 MAPKs 的磷酸化之評估，我們藉由西方轉漬分析 (Western Blotting) 來完成。利用 hypotonic buffer (buffer A) 萃取樹突狀細胞之細胞質蛋白，以 nuclear extraction buffer (buffer C) 萃取核內蛋白。以 SDS-PAGE 解析並轉印至 PVDF 膜，並以 anti-kinase Ab 加以偵測。

#### 七、動物疫苗模式

##### 1. 第一型糖尿病老鼠 (NOD mouse) 動物模式：

我們選擇第一型糖尿病老鼠，培養老鼠骨髓細胞，並外加老鼠 GM-CSF 或 IL-4 培養 8~9 天後，利用免疫磁性珠 (immuno-magnetic beads) 分離得到老鼠樹突狀細胞。將中草藥或植物化處理過之樹突狀細胞作為疫苗，藉由注射等方式將樹突狀細胞送老鼠體內。再利用偵測胰島素之數值及細胞激素表現，以評估中

草藥或植化物是否有調節樹突狀細胞之免疫功效及作為自體免疫疫苗佐劑之可行性。

## 2. 黑色素瘤老鼠動物模式：

我們選擇 C57BL/6J 品種之老鼠，配合基因疫苗的操作模式，在接種 B-16 黑色素細胞之前或之後，將我們選擇特定的植化物以注射或餵食的方式送入老鼠體內，並測量黑色素瘤大小及老鼠存活時間等，期間並測量抗體力價，細胞激素之釋放等，以推測可能的免疫調節的作用。

## 參、結果

本年度計畫乃延續 94 年度「中草藥之抗發炎與免疫增強活性的系統生物學研究」計畫，乃希望藉由一系列免疫學、細胞學和分子生物學等研究方法，利用純化之植化物對細胞激素及轉錄因子基因啟動子的活化或抑制作用及樹突狀細胞與 T 細胞 (DC-TC) 間的交互反應等各項篩檢分析以探討純化之植化物對人體免疫系統的影響。在 94 年度中，本實驗室已建立自周邊血單核球細胞 (PMBC) 純化技術，以 Ficol-Paque 溶液分離出 PBMC，再以高專一性單株抗體，配合磁珠得到高純度的單核細胞或 T 細胞，進一步利用外加人類細胞激素 GM-CSF 與 IL-4 的方式培養單核細胞 6-7 天，可得到未成熟樹突狀細胞。再利用外加 LPS 處理 1-3 天，可以促進未成熟樹突細胞轉變為成熟的樹突細胞。其培養過程中加入純化之植化物，以評估其對免疫細胞的影響。我們先前初步結果顯示，shikonin 與 emodin 先行以適當濃度處理未成熟樹突狀細胞 12 小時，在與 LPS 共同培養 24 小時下，純化之植化物可以有效抑制樹突狀細胞成熟標記 CD40, CD80, CD83, CD86 及 HLA-DR 的表現，並且可降低樹突狀細胞因 LPS 刺激而分泌 IL-12 之表現量，顯示這些純化之植化物可抑制 LPS 刺激樹突狀細胞成熟的活性。在樹突狀細胞的內噬作用活性的測試上，shikonin 與 emodin 是有稍許增加的內噬作用活性，因此看出 shikonin 與 emodin 可相當程度維持樹突狀細胞未成熟狀態。在混合淋巴細胞培養反應 MLR (mixed lymphocyte reaction) 測試上，顯示 emodin 可削弱因 LPS 處理後之成熟樹突細胞所引發 T 細胞增生反應。在本年度裡，利用我們所建立的樹突狀細胞免疫活性測試平台測試其他植化物，結果顯示，分離自大花咸豐草的植化物 CP 具有免疫調節活性，

相較於 shikonin 與 emodin，植化物 CP 可以更有效的抑制 LPS 刺激樹突狀細胞成熟的活性；此外，本研究中心楊文欽老師其相關研究顯示，在第一型糖尿病老鼠 (NOD mouse) 動物模式中，植化物 CP 可以抑制第一型 T 輔助細胞 (Th1) 的分化以達到預防或控制糖尿病的發生 (24)，因此，在本年度我們選定植化物 CP 為研究題材，並逐一地來加以探討其免疫調節活性。

### 樹突狀細胞成熟標記表現測試

在評估純化之植化物在樹突狀細胞之適當作用濃度後，我們進行樹突狀細胞成熟標記表現測試。植化物 CP 以 1 $\mu$ M 至 40 $\mu$ M 濃度與 LPS (100ng/ml) 共同培養 2 未成熟樹突狀細胞 24 小時後，收集細胞並利用免疫螢光染劑 (如：fluorescein isothiocyanate (FITC) 及 phycoerythrin(PE)) 去標定各項免疫標記 (CD marker)，再以流式細胞儀 (flow cytometry) 測定樹突狀細胞成熟標記 (CD40, CD80, CD83, CD86 及 HLADR) 的表現活性。結果顯示植化物 CP 在 40 $\mu$ M 濃度下，可以有效抑制因 LPS 所刺激表現的成熟標記 CD40、CD80、CD83 及 CD86 (圖一)，其抑制成熟標記表現程度與與內生性免疫抑制劑 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (簡稱 Vit D<sub>3</sub>) 在 1nM 抑制表現程度相當。除此之外，植化物 CP 在 40 $\mu$ M 濃度下，處理未成熟樹突狀細胞 24 小時後，與未經處理之未成熟樹突狀細胞相比，結果顯示植化物 CP 也可抑制成熟標記 CD40、CD80、CD83、CD86 及 HLADR 的表現活性。這些結果顯示植化物 CP 可相當程度抑制未成熟樹突狀細胞的成熟。在樹突狀細胞的成熟及功能評估上，除偵測成熟免疫標外，細胞激素的分泌也是一重要評估指標，樹突狀細胞除藉由共刺激分子 (costimulator factors) (如，CD80、CD86、CD40) 來活化 T 細胞外，樹突狀細胞還分泌細胞激素來活化 T 細胞等免疫細胞，其中介白素 12 (IL-12) 被認為是活化第一型 T 輔助細胞 (Th1) 反應及與發炎有密切相關之重要細胞激素。

### 介白素12酵素免疫分析

為了評估植化物對樹突狀細胞介白素 12 分泌的影響，我們利用酵素免疫分析 (ELISA)，藉由抗原及抗体間專一性反應而測試，來偵測樹突狀細胞介白素 12 分泌表現量。植化物 CP 以 1 $\mu$ M 至 40 $\mu$ M 濃度與 LPS (100ng/ml) 共同培養未成熟樹突狀細胞 24 小時後，收集細胞培養液，藉由 IL-12p70 專一抗體加以偵測分析。結果顯示植化物

CP 可降低樹突狀細胞因 LPS 刺激而分泌 IL-12 之表現量 (圖二), 與只處理 LPS 分泌之 IL-12 表現量相比, 植化物 CP 在 40 $\mu$ M 表現量約為 10%。其抑制程度於濃度成現依存性(Dose-dependent)。

### 未成熟樹突狀細胞內噬作用活性測試

未成熟樹突狀細胞具有內噬分解外來病原的能力, 最後將抗原呈現在表面 MHC 上, 藉此將訊息傳遞給 T 細胞辨識。樹突狀細胞在未成熟階段具有高的內噬作用 (endocytic capacity) 活性, 隨著樹突狀細胞成熟過程中, 其內噬作用將逐漸消失。因此, 在評估樹突狀細胞功能狀態中, 測量樹突狀細胞的內噬作用活性是一項重要評估指標。在此項目中, 植化物 CP 以 1 $\mu$ M 至 50 $\mu$ M 濃度與 LPS (100ng/ml) 共同培養未成熟樹突狀細胞 24 小時後, 加入 100 $\mu$ g/ml FITC-labeled dextran 作為抗原, 在 37 $^{\circ}$ C 下培養 0.5, 1 及 1.5 小時, 再以流式細胞儀 (flow cytometry) 測定樹突狀細胞的內噬作用活性。結果顯示隨培養時間的增長, 樹突狀細胞內噬抗原的含量也隨之增加。在與處理 LPS 的未成熟樹突狀細胞相比, 植化物 CP 可增加稍許的內噬作用活性 (圖三), 植化物 CP 在在 40 $\mu$ M 作用濃度下, 可增加約 50%, 以此看出植化物 CP 可相當程度維持樹突狀細胞之未成熟狀態。

### 前發炎細胞激素及介白素 12 mRNA 表現量測試

樹突狀細胞在自身的活化成熟及在免疫調節上, 細胞激素的釋放是扮演一相當重要角色。細胞可藉由細胞激素對單核細胞 (monocytes)、巨噬細胞 (macrophages)、樹突狀細胞 (dendritic cell, DC)、B 細胞和 T 細胞等免疫細胞刺激其分化、成熟和活化等影響。在中藥草對樹突狀細胞前發炎細胞激素 (proinflammatory cytokine) 的調控上, 目前已知, LPS 可刺激樹突狀細胞前發炎細胞激素 TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6 及 IL-1 $\beta$  的表現。在此實驗中, 植化物 CP 以 1 $\mu$ M 至 50 $\mu$ M 濃度與 LPS (100ng/ml) 共同培養未成熟樹突狀細胞 6 小時後, 萃取細胞 RNA 並利用 RT-PCR 來測定樹突狀細胞表現量。我們的初步結果顯示, 植化物 CP 可降低樹突狀細胞因 LPS 刺激產生之 TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 IL-1 $\beta$  的表現量。而在 IL-8 表現上, 植化物 CP 則無抑制的效果 (圖四)。在介白素 IL-12 的表現上, 目前已知 LPS 可刺激介白素 IL-12 次單元 IL-12 p40 的表現, 我們結果顯示, 植化物 CP 可抑制 IL-12 p40 mRNA 的表現並與作用濃度呈現依存性的抑制效果 (Dose-dependent) (圖五), 此一結果與先前 IL-12 p70 表現量 (圖二)

所得吻合，顯示植化物 CP 是藉由抑制 IL-12 p40mRNA 的表現以達到抑制介白素 IL-12 的表現量。

### **NF- $\kappa$ B轉錄因子核轉移(nuclear translocation)轉錄因子活性測試**

在本年度中，為了探討樹突狀細胞中草藥免疫調節之分子作用機制，我們利用西方轉漬分析(Western Blotting)方法，首先探討 NF- $\kappa$ B 訊息傳遞路徑。在此實驗中，植化物 CP 以適當濃度處理未成熟樹突狀細胞 45 分鐘，再與 LPS 共同培養 15 分鐘及 30 分鐘後，萃取細胞核蛋白，測定 NF- $\kappa$ B p65 核轉移活化情形，我們的初步結果顯示，與 LPS 單獨處理相比，植化物 CP 與 LPS 共同處理細胞下，NF- $\kappa$ B p65 核位移活化情形受到抑制(圖六)，顯示植化物 CP 可抑制 LPS 刺激之 NF- $\kappa$ B p65 核位移活性。

### **輔助者T細胞分化反應測試**

在評估樹突狀細胞調節之 T 細胞分化反應上，輔助者 T 細胞經由樹突狀細胞的刺激下，可分化出第一型 T 輔助細胞 (Th1) 及第二型 T 輔助細胞 (Th2)，並因而誘導出細胞免疫反應及體液免疫反應。為了解中草藥或植化物對樹突狀細胞 (dendritic cell, DC) 之活化和 T 細胞分化之影響。我們利用混合淋巴球反應 (mixed lymphocyte reaction, MLR) 並利用流式細胞儀 (flow cytometry) 來測定解輔助者 T 細胞細胞內細胞激素的表現情形 (如 IFN- $\gamma$ , IL-4) 以了解輔助者 T 細胞中 Th1/Th2 的比例。在此實驗中，植化物 CP 以 40 $\mu$ M 濃度與 LPS (100ng/ml) 共同培養未成熟樹突狀細胞 24 小時後，以 PBS 清洗後，再與 T 細胞共同培養 5 天。我們的初步結果顯示，與 LPS 單獨處理相比，樹突狀細胞在植化物 CP 及 LPS 共同處理下，可抑制第一型 T 輔助細胞 (Th1) 的分化比例，植化物 CP 單獨處理下與未處理之樹突狀細胞相比，亦可抑制第一型 T 輔助細胞 (Th1) 的分化比例並稍許提高第二型 T 輔助細胞 (Th2) 的分化比例(圖七)。

## **肆、討論**

在樹突狀細胞中草藥免疫調節之分子作用機制的探討上，目前已知 NF- $\kappa$ B 的活化，在樹突狀細胞的成熟上扮演一非常重要的角色。目前我們也已知革蘭氏陰性菌細胞壁的脂多醣 (lipopolysaccharide, 簡

稱為 LPS) 是一種很強的內毒素及促發炎物質，它可活化 NF- $\kappa$ B 及 MAPKs 並且刺激前發炎細胞激素 (proinflammatory cytokine) 的釋放。在本年度中，為了探討植化物 CP 在樹突狀細胞中，其分子作用機制，我們利用西方轉漬分析 (Western Blotting) 方法，首先探討 NF- $\kappa$ B p65 核轉移活化情形。顯示植化物 CP 可抑制 LPS 刺激之 NF- $\kappa$ B p65 核位移活性。目前在樹突狀細胞的免疫調節信息傳導研究已顯示包含樹突狀細胞協同刺激分子 (co-stimulatory molecular) (CD40, CD80, CD83 及 CD86) 及多種免疫調節細胞激素的表現，如：前發炎細胞激素 TNF- $\alpha$ ，IL-6 及 IL-1  $\beta$ ，介白素 IL-12 等重要細胞激素皆直接或間接地受到 NF- $\kappa$ B 轉錄因子的調控；而由我們所得結果，植化物 CP 可抑制樹突狀細胞協同刺激分子 (CD40, CD80, CD83 及 CD86) 及前發炎細胞激素 TNF- $\alpha$ ，IL-6 及 IL-1  $\beta$  的表現看來，植化物 CP 可能藉由抑制 NF- $\kappa$ B 訊息傳導途徑以達到抑制樹突狀細胞成熟及免疫調節活性。此外，相關文獻指出，介白素 IL-12 p40 的轉錄是受到 NF- $\kappa$ B 轉錄因子的調控，我們所得結果，植化物 CP 可抑制 IL-12 p40 mRNA 的表現及介白素 IL-12 的分泌量更是說明此以情形。

在免疫系統中，細胞激素的分泌扮演一個重要的調節角色。各項免疫反應皆需要許多不同激素的參與。TNF- $\alpha$ ，IL-8，IL-6 及 IL-1  $\beta$  這些激素皆被認為與發炎反應有關。目前已知 LPS 的刺激下，樹突細胞可分泌上述細胞激素來活化相關免疫細胞。Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) 細胞激素可刺激感染部位補充嗜中性球及單核白血球並增強細胞活性以消滅侵入的病原體；然而 TNF- $\alpha$  在不適當或過度表現也常是風濕病、關節炎、SARS 及敗血症等之重要特徵，在第一型糖尿病的相關研究亦指出 TNF- $\alpha$  的過度表現可能辦現一重要因素。IL-8 則有化學趨向性 (Chemotaxis) 的功能，IL-8 的分泌可吸引嗜中性球的參與。IL-6 是一種廣效性細胞激素，功能包括有免疫調節、調節急性發炎反應與促進血球生成等。我們的初步結果顯示，植化物 CP 可抑制樹突狀細胞因 LPS 刺激產生之 TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 IL-1  $\beta$  的表現量。此一結果可提供未來植化物 CP 朝上述細胞激素過度表現，所引發疾病的預防或治療應用研究一初步的基礎證據。

樹突狀細胞藉由「協同刺激分子」(co-stimulatory molecules)，及細胞激素的釋放，以活化輔助者 T 細胞，並促使輔助者 T 細胞進行分化及大量增生。欲評估植化物是否有削弱促發炎物質 LPS 所帶來的影響，並調節樹突狀細胞的免疫反應。混合淋巴細胞培養反應 MLR (mixed lymphocyte reaction) 測試，即是利用以成熟的樹突狀細胞來刺

激輔助者 T 細胞，作為一種方便的體外免疫反應評估模式。一般而言，輔助者 T 細胞被刺激分化成第一型輔助者 T 細胞，則輔助者 T 細胞會大量增生；反之，若第一型輔助者 T 細胞反應被削弱，則 T 細胞增生反應可能將會削弱。我們研究結果顯示，與 LPS 單獨處理相比，樹突狀細胞在植化物 CP 及 LPS 共同處理下，可抑制第一型 T 輔助細胞 (Th1) 的分化比例，植化物 CP 單獨處理下與未處理之樹突狀細胞相比，亦可抑制第一型 T 輔助細胞 (Th1) 的分化比例並稍許提高第二型 T 輔助細胞 (Th2) 的分化比例。文獻指出，介白素 IL-12 是刺激產生第一型 T 細胞反應中最重要的細胞激素之一，對照先前實驗以 ELISA 方法測量 IL-12 的分泌的結果顯示，植化物 CP 可以有效抑制 IL-12 的表現量看來。植化物 CP 可能藉由抑制 IL-12 的表現以達到抑制第一型 T 輔助細胞 (Th1) 的分化比例。由於第一型糖尿病的相關研究顯示第一型 T 輔助細胞 (Th1) 的過度分化是造成發第一型糖尿病發病原因之重要原因，而由我們所的結果並對照先前本研究中心楊文欽博士，對於植化物 CP 可以抑制第一型 T 輔助細胞 (Th1) 的分化以達到預防或控制糖尿病的發生的相關研究，我們相信我們相信植化物 CP 具有抑制免疫活性並且未來可朝向預防或治療免疫失調相關疾病之發展價值。

## 伍、結論與建議

承蒙衛生署中醫藥委員會提供經費贊助 93 年度「建立抗發炎和增強免疫力的中草藥篩選技術平台」、94 年度 95 年度「中草藥之抗發炎與免疫增強活性的系統生物學研究」，本計劃之初擬建立之研究中草藥抗發炎和免疫調節生物活性的幾項分析技術平台，來篩檢抗發炎與增強特定免疫力的中草藥植化物 (phytochemicals)，並探討相關藥用植化物的生物活性得以完成。具體而言，本實驗室已建立經由轉染外來細胞激素或轉錄因子基因啟動子進入培養的細胞內及老鼠皮膚組織內，來探討植物萃取物或純化之植化物對細胞激素及轉錄因子基因啟動子的活化或抑制作用之篩選平台；另外，利用人類周邊血分離出人類單核球細胞，分化出的未成熟樹突狀細胞，藉由分析樹突狀細胞的分化、成熟及細胞激素活性的圖譜組成 (profilings)，吞噬特定外來抗原的能力，活化輔助者 T 細胞並促使輔助者 T 細胞進行分化增生的能力以進一步評估中草藥或其植化物之免疫調節能力。

本計畫之目的擬將系統生物學與中醫藥學之免疫調節作用（亦為全身性及整合型生理功能）相互配合，進行系統化及具體的研究，並且有助於 well quality control 之中藥或方劑作用之研究，以協助中醫藥現代化的目標，並期許本篇研究對中醫藥現代化能有所貢獻。

### 誌謝

本研究計畫成蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP95-RD-104 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。



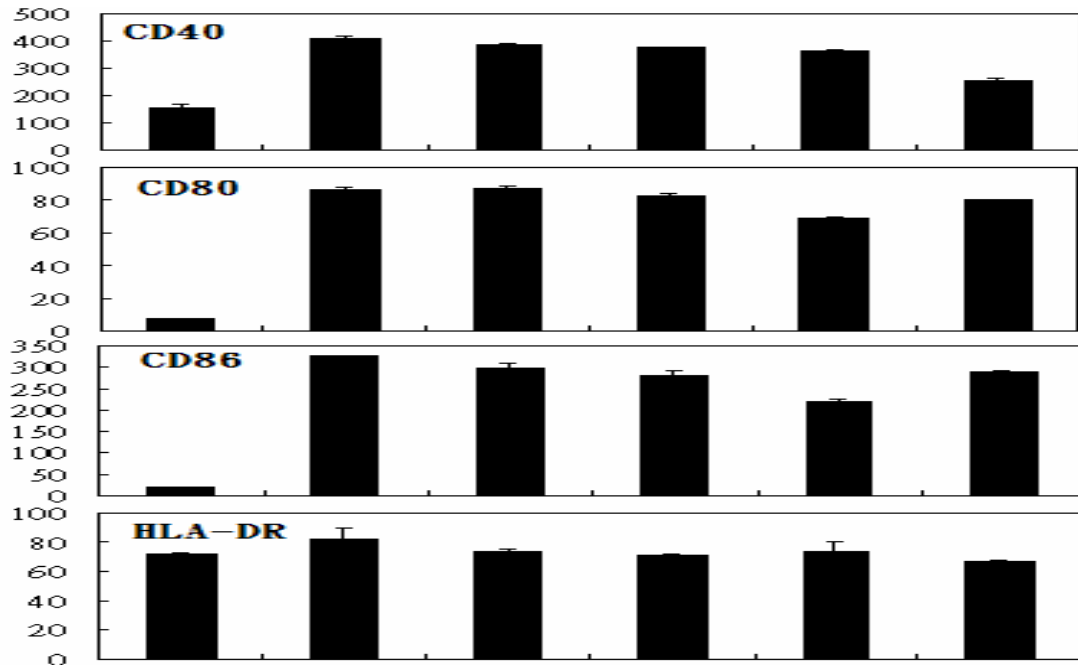
## 陸、參考文獻

1. Koop, CE. The Future of Medicine. 2002; *Science* 295:233-233.
2. 台灣中醫藥願景—行政院衛生署中醫藥委員會簡介〈VCD〉
3. Yuan R, Lin Y. Traditional Chinese medicine: an approach to scientific proof and clinical validation. 2000; *Pharmacol. Therapeutics* 86:191-198.
4. Gorman C. 1997. Power sprouts: they're even better than broccoli at fighting cancer. *Time. September 29.*
5. Galloway JA. 1998. Everyday food may contain hidden health benefits. *UM, Wadison State Journal, Feb. 28 research by Jennifer A.*
6. Edmund LA. 1997. In Germany, humble herb is a rival to prozac. *The New York Times Tuesday, September 9.*
7. Roitt I, Brostoff J, Male D. 1998. *Immunology*. Mosby, London.
8. 中醫行政要覽
9. Mellstedt H, Fagerberg J, Frodin JE, Henriksson L, Hjelm Skoog AL, Liljefors M, Ragnhammar P, Shetye J, Osterborg A. Augmentation of the immune response with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other hematopoietic growth factors. *Curr Opin Hematol.*1990; 6:169-175.
10. Dranoff G, Crawford AD, Sadelain M, Ream B, Rashid A, Bronson RT, Dickersin GR, Bachurski CJ, Mark EL, Whitsett JA. Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science.* 1994; 264:713-716.
11. Groves RW, Schmidt-Lucke AJ. Recombinant human GM-CSF in the treatment of poorly healing wounds. *Adv Skin Wound Care* 2000; 13:107-112.
12. Hogge GS, Burkholder JK, Culp J, Albertini MR, Dubielzig RR, Yang NS, MacEwen EG. Preclinical development of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transfected melanoma cell vaccine using established canine cell lines and normal dogs. *Cancer Gene Ther.*1999; 6:26-36.
13. Beutler B. TNF,immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. *J Invest Medicine* 1998; 43:227-235.
14. Anderson D.L. CE CREDIT TNF Inhibitors: A New Age in Rheumatoid Arthritis Treatment. *Am J Nurs.* 2004; 104:60-68.
15. Chehimi J, Valiante NM, D'Andrea A, Rengaraju M, Rosado Z,

- Kobayashi M, Perussia B, Wolf SF, Starr SE, Trinchieri G. Enhancing effect of natural killer cell stimulatory factor (NKSF/interleukin-12) on cell-mediated cytotoxicity against tumor-derived and virus-infected cells. *European J Immunol.* 1993; 23:1826-1830.
16. Tian Z, Shen X, Feng H, Gao B. IL-1 $\beta$  Attenuates IFN- $\alpha$ / $\beta$ -Induced Antiviral Activity and STAT1 Activation in the Liver: Involvement of Proteasome-Dependent Pathway. *J Immunol* 2000; 165:3959-3965.
17. Karin M. The beginning of the end: I $\kappa$ B kinase (IKK) and NF- $\kappa$ B activation. *J Biol Chem.* 1999; 274:27339-27342.
18. Chen F, Demers LM, Shi X. Upstream signal transduction of NF- $\kappa$ B activation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2002; 1:137-149.
19. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- $\kappa$ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med.* 1997; 336:1066-1071.
20. Xiaoxia L, Start GR. NF- $\kappa$ B-dependent signaling pathways. *Experimental Hematology.* 2002; 30:285-296.
21. Staniforth V, Wang SY, Shyur LF, Yang NS. Shikonins, phytochemicals from *Lithospermum erythrorhizon*, inhibit the transcriptional activation of human TNF- $\alpha$  promoter in vivo. *J Biol Chem.* 2004; 279: 5877-5885.
22. Staniforth V, Chiu LT, Yang NS. Caffeic acid suppresses UVB radiation-induced expression of interleukin-10 and activation of mitogen-activated protein kinases in mouse. *Carcinogenesis.* 2006 March doi:10.1093/carin/bg1006.
23. Wang JH, K. Lin KF, Benson SA, Sun SJ, Cheng WM, Wang SY, Shyur LF, Yang, NS. Tissue array transgene expression system for the evaluation of effect of medicinal herbs on wound-healing. *J Genetics Mol Bio.* 2003; 14:133-144.
24. Chang SL, Chang CL, Chiang YM, Hsieh RH, Tzeng CR, Wu TK, Sytwu HK, Shyur LF, Yang WC. Polyacetylenic compounds and butanol fraction from *Bidens pilosa* can modulate the differentiation of helper T cells and prevent autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Planta Med.* 2004; 70:1045-51.

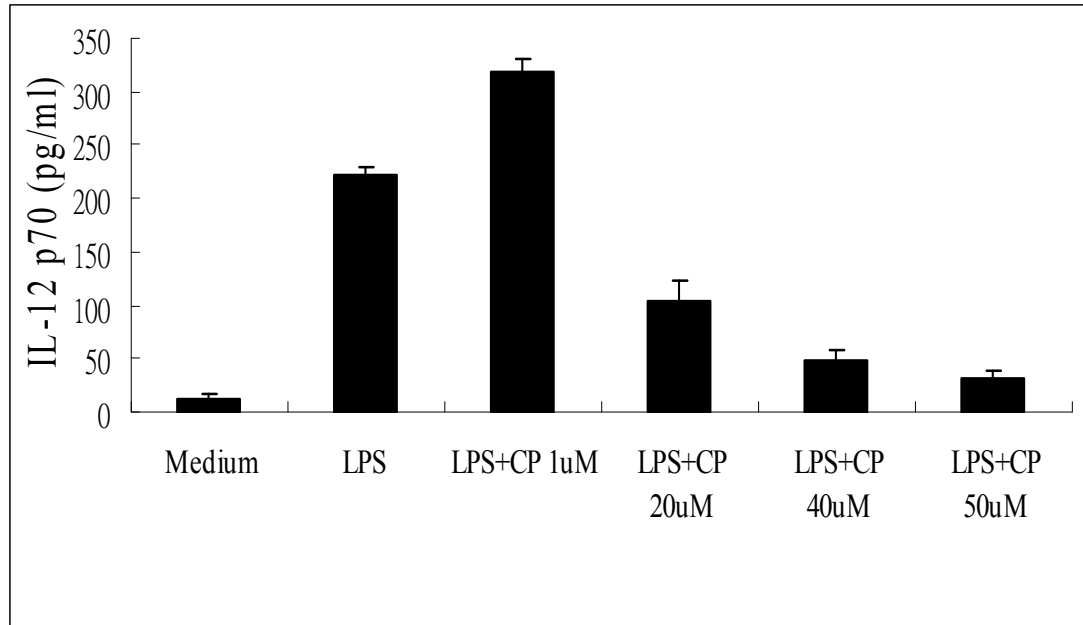
圖、表

圖一 植化物 CP 可抑制細菌毒素 (LPS) 刺激樹突狀細胞成熟標記的表現量



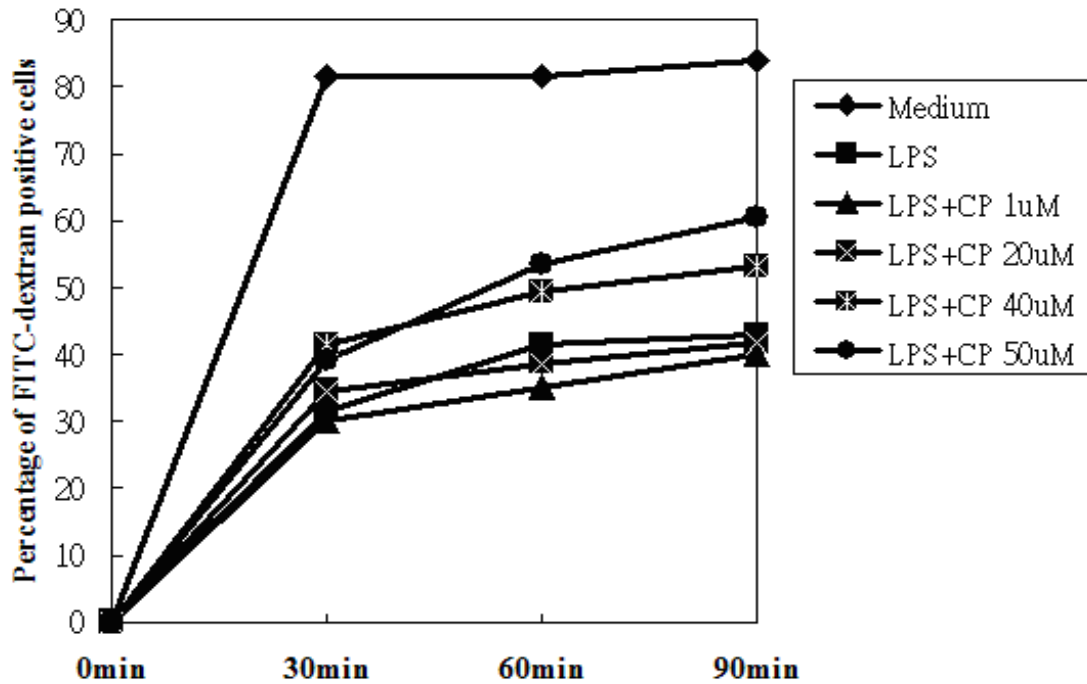
**Figure 1.** Expression of surface markers on DCs that were co-incubated LPS for 24h in the presence with 1-40uM cytopiloyne, followed by analysis for expression of various surface markers. The expression levels are expressed as MFI, determined by flow cytometry, and the data shown as mean for two experiments  $\pm$  SD

圖二 植化物 CP 可有效抑制細菌毒素 (LPS) 刺激成熟的樹突狀細胞 IL-12p70 的表現量



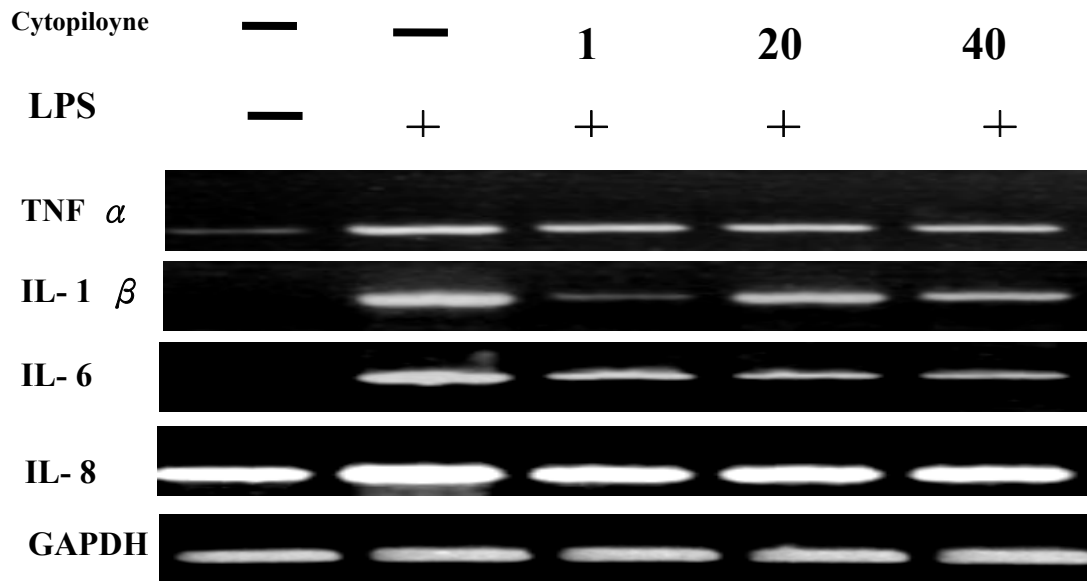
**Figure 2.** CP impairs the secretion of IL-12 p70 in DCs post-treated with LPS for maturation. Immatured DC were co-treated cytopiloyne and LPS (100ng/ml) for 24hr. Culture supernatants were collected and kept frozen until using. IL-12 p70 in supernatants were determined using standard sandwich ELISA.

圖三 植化物 CP 可維持樹突狀細胞的吞嚥能力



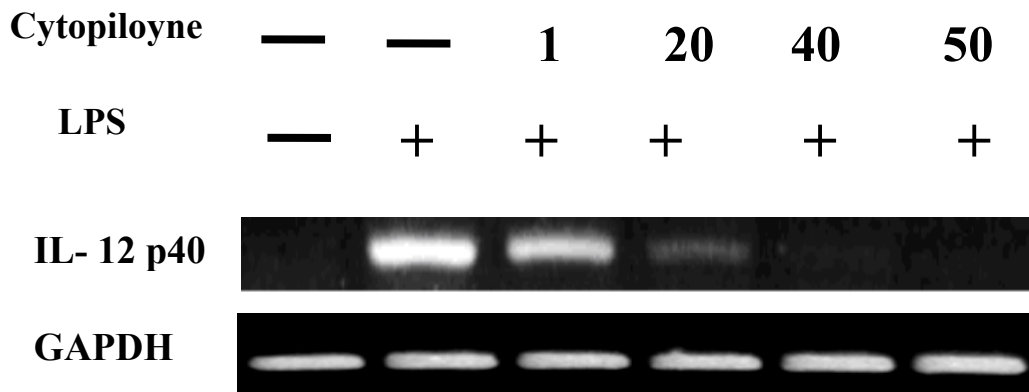
**Figure 3.** Effects of CP on endocytosis of FITC-labeled dextran. Immatured DC were co-incubated with cytopiloyne and LPS for 24h. DCs were incubated with  $100 \mu\text{g/ml}$  FITC-labeled dextran for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ . Uptake of the same concentration of FITC-labeled dextran at  $4^\circ\text{C}$  were used as a negative control, and cells analyzed by a flow cytometry.

圖四 植化物 CP 可抑制由細菌毒素 (LPS) 刺激引發之前發炎細胞激素的表現量



**Figure 4.** CP inhibits the LPS-induced mRNA expression of TNF  $\alpha$  in DCs, IL-1  $\beta$  and IL-6 but not that of IL-8. Immatured DC were co-treated cytopolyene and LPS (100ng/ml) for 6hr. Cell were collected and total RNA were extracted. TNF  $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-6, and IL-8 expression level were determined by using RT-PCR assay.

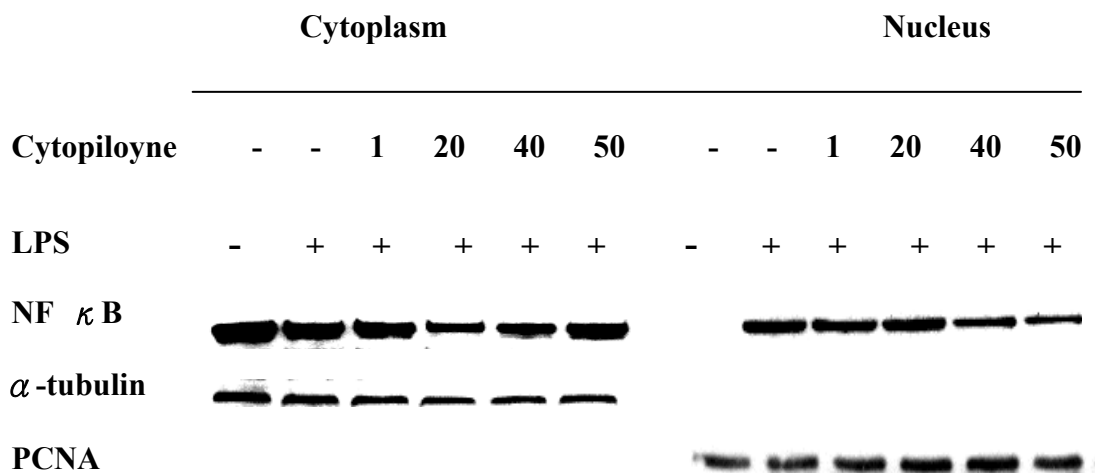
圖五 植化物 CP 可抑制由細菌毒素 (LPS) 刺激引發之介白素 IL-12 p40 的表現量



**Figure 5.** CP inhibits LPS-induced mRNA expression of IL-12 p40 in DCs. Immatured DC were co-treated cytopoliene and LPS (100ng/ml) for 6hr. Cell were collected and total RNA were extracted. IL-12 p40 expression level were determined by using RT-PCR assay.

圖六 植化物 CP 可抑制由細菌毒素 (LPS) 刺激引發樹突狀細胞

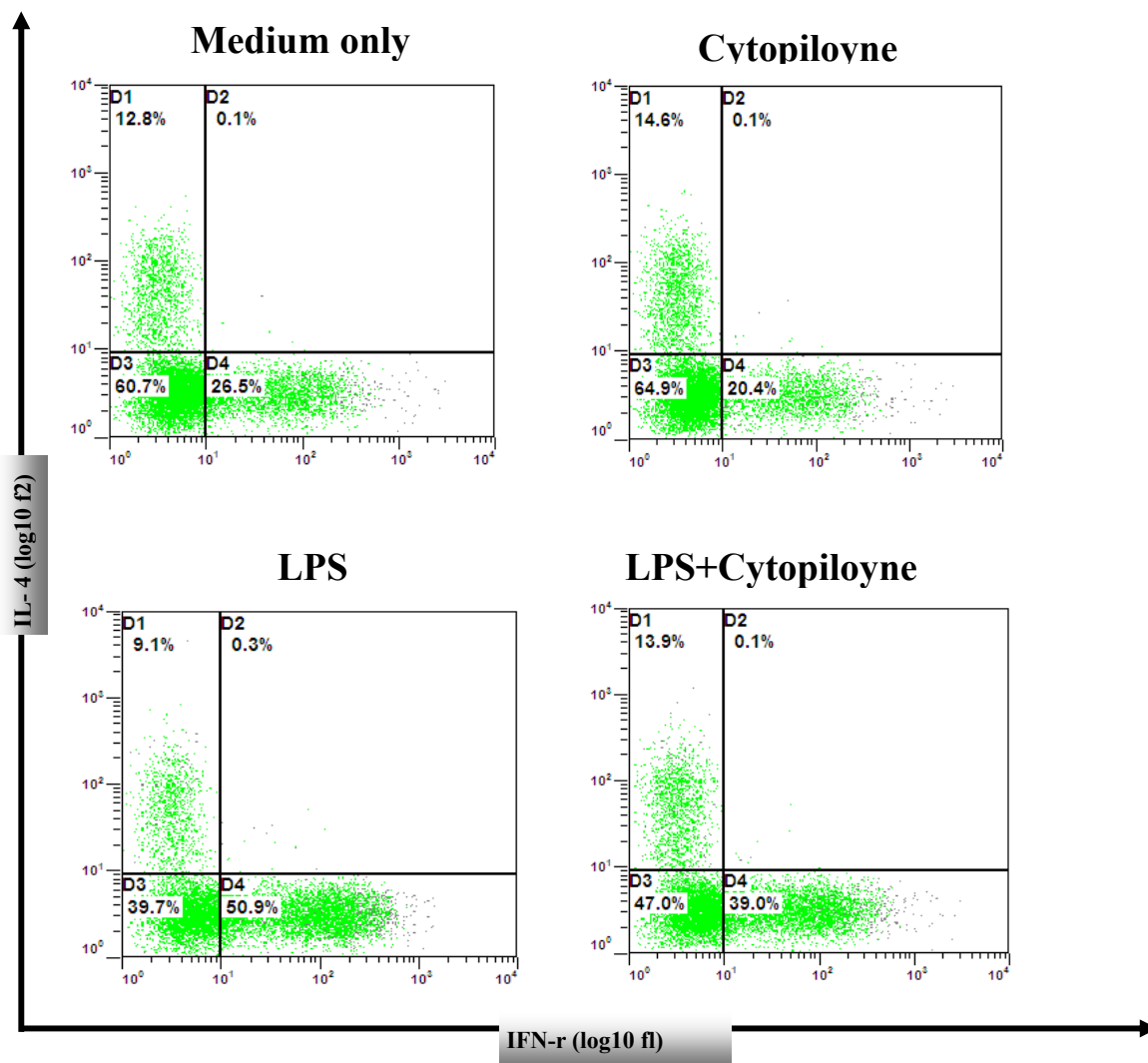
### 的 NF- $\kappa$ B p65 的核轉移活性



**Figure 6.** Effects of CP on NF- $\kappa$ B translocation in LPS-stimulated mature DCs. Immatured DC were pre-incubated with cytopiloyne for 45min, then stimulated with LPS (100ng/ml) for 30min. Nuclear extract were prepared and the nuclear translocated NF- $\kappa$ B p65 was measured by Western blot using anti-p65 Ab. A quantitative analysis of the western blot signal was used by image analysis and GenDoc



圖七 樹突狀細胞在 cytopiloyne 及 LPS 共同處理下，可抑制第一型 T 輔助細胞 (Th1) 的分化



**Figure 7.** DCs treated with CP display impaired ability to induce Th1 responses in vitro. Immature DCs were co-treated cytopiloyne and LPS for 24hrs. Test DCs were washed, and then co-cultured with T cells for 8 days. T cell polarization was determined by analyzing the levels of intracellular IFN- $\gamma$  and IL-4 accumulation via flow cytometry analysis. During the last 2 h of stimulation, test cells were re-stimulation with PMA and ionomycin in the presence of brefeldin A.