

編號：CCMP95-RD-105(2-2)

## 以啟動子轉殖細胞株篩檢調節免疫力之 中藥的動物實驗評估 (2-2)

林壁鳳

台灣大學

### 摘要

本研究試圖以系統性之篩選模式找尋具有調節免疫反應之中草藥。因此，首先利用轉染(transfection)，分別建構能表現  $T_H-1$  的細胞激素 IFN- $\gamma$  或 NF- $\kappa$ B 啟動子連接報導基因 luciferase 作為檢測之細胞株，例如 RAW 264.7 巨噬細胞株、EL-4 T 淋巴球細胞株等，以作迅速篩選之工具，再分別以初代腹腔細胞和脾臟細胞利用 *in-vitro* 給予中草藥材方式，以及以 *in-vivo* 餵食動物方式對腹腔細胞、脾臟細胞分泌發炎性介質之變化，最後再利用腹腔注射 LPS 誘發急性發炎動物模式，以便確認此快速篩選模式的有效性，並且了解抑制發炎反應對免疫調節有否影響，期望對建立快速篩選既能抗發炎又能增強免疫力之中草藥有正面效果，將來能進一步分析並鑑定功能性成份因子。利用脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS 15 mg/kg) 致 BALB/cJ 小鼠急性發炎動物模式，試圖由日常飲食中之食材當歸 (*A. sinensis*)、穿心蓮 (*A. paniculata*) 以系統性之篩選模式去探討其調節免疫反應之機制。結果顯示：管餵 1.5 mg/kg 低劑量之穿心蓮乙酸乙酯萃取物能有效降低其腹腔細胞中促發炎細胞激素，如 TNF- $\alpha$ 、化學趨化物質 MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2) 和 NO 等含量，及降低腹水抽出液中 IL-12p40 之含量，但不影響脾臟細胞中 IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-10 等含量，但管餵 3.125 mg/kg 高劑量之當歸和穿心蓮乙酸乙酯萃取物卻顯著增加小鼠小腸內 peyer's patch IgA 含量。由上述之實驗結果顯示，當歸、穿心蓮乙酸乙酯萃取物，可抑制 LPS 致急性發炎小鼠血清中經由 NF- $\kappa$ B 所活化生成之促發炎細胞激素如 TNF- $\alpha$ 、IL-12p40、IL-6、MIP-2 和 NO 等含量，而達到延長發炎小鼠之存活率，顯示本實驗所

篩選之當歸和穿心蓮具有發展的潛力，值得更進一步進行分離、純化鑑定其功能性成份因子。

關鍵詞： BALB/cJ mice、LPS、當歸、穿心蓮

編號：CCMP95-RD-105(2-2)

## **Evaluation of promoter-based immune regulatory Chinese herbal medicine on immune responses in murine animal models (2-2)**

**Bi-Fong Lin**  
**National Taiwan University**

### **ABSTRACT**

The purpose of this project is to establish a screening system for Traditional Chinese medicinal herbs (TCMHs), which may exert regulatory effects on immune and inflammatory responses. Therefore, the effects of TCMHs on transient transfection were compared with those on BALB/c primary cells. The scheme for the screening system is to construct plasmids containing reporter gene luciferase with promoter sequence either of Nuclear Factor- $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B) or interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). These reporter plasmids were transiently transfected into RAW 264.7 cell or EL-4 T cell to test for luciferase activity. TCMHs were also added to lipopolysaccharide / interferon- $\gamma$  (LPS/IFN- $\gamma$ )-activated peritoneal macrophages and Concanavalin A (Con A)-activated spleen cells. The effect of CMHs, *Angelicae sinensis* (a popular Chinese herb, also known as Dang Quai) and *Andrographis paniculata* on septic shock in vivo was explored. BALB/cJ mice were orally received the treatment of EtOAc fractions of *A. sinensis* and *A. paniculata* at 1.5 and 3.125 mg/kg for one week, then were i.p. injected with 15 mg/kg LPS. Mice sera were detected cytokine level and their life span were recorded. The results revealed that *A. paniculata* EtOAc fraction extract low dose group inhibit peritoneal exubate cells TNF- $\alpha$ , MIP-2 and NO production. And inhibit peritoneal exubate fluids IL-12p40 production. But didn't change spleen cells IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 secretion. On the other hand, *A. sinensis* and *A. paniculata* high dose group significantly increase peyer's patch IgA contents. These

finding suggest that *A. sinensis* and *A. paniculata* contain some components that can inhibit the activation of NF- $\kappa$ B and abrogate the septic shock induced by LPS.

Keywords: BALB/cJ mice, LPS, septic shock, *A. sinensis*, *A. paniculata*

## 壹、前言

目前，許多保健產品多以「增強免疫力」作為產品之機能性訴求。例如有些植物性膳食營養補品，稱之為營養藥劑 (Nutraceutical) 的最新形態之膳食補品，是將植物中對人體健康有益之化學成份萃取而得，例如：算素、辣椒素、甘草素等，而多需稱根據研究有提升免疫力等效能。又有報導有些天然之營養補品包括藥用植物如銀杏、人蔘、大蒜、等，若每日食用可提升免疫力，降低致癌危險性、延長壽命等預防疾病功能。而在美國十大暢銷藥草中，多種植物例如紫錐花 (Echinacea) 宣稱可強化免疫系統，在寒冷季節是被廣用來預防感冒的藥草。然而因為免疫系統為人體重要的防禦系統，基本上受到體內各個系統調節而達平衡，何種指標代表「增強免疫力」尚無定論，又宣稱的研究報導在免疫相關實驗上之數據並未完整。免疫相關指標所代表的意義可能因人的身體健康狀況而異，不可不慎。由於此類保健食品的問題，使得政府單位必須尋求管理之道，以維護國人利益與健康。「健康食品管理法」的推行，促使科學證據的探索更為重要，以便對此類食品納入管理。

五千年文化所孕育出的中醫藥學，在近年來追求學理驗證的努力下，已逐漸受到全世界的重視與肯定，目前正是中醫藥學蓬勃發展的時代。然而，尚有許多中醫藥典記載的中草藥與功能，如許多文獻記載，大多數扶正中藥，屬於免疫促進劑，而扶正中藥又叫滋補強壯藥，是對正氣虛而設的，據中醫辨證，正氣虛有氣虛（肺脾氣虛）、血虛（心脾血虛或肝脾血虛）、陰虛（腎陰虛或肝腎陰虛）、陽虛（腎陽虛或脾腎陽虛）等證。按中藥補氣、補血、補陰、補陽的功能分類，討論其免疫調節作用。總之，補益肺衛之氣的藥如人蔘、黃耆、健脾益氣的黨蔘、靈芝、白朮、茯苓、薏仁、以及菇菌類都有調節免疫系統的功能。常用補血藥如當歸、雞血藤、阿膠、熟地等皆可調節免疫。補陽藥淫陽藿、菟絲子、肉蓯蓉、巴戟天、補骨脂、鎖陽、肉桂等都具有免疫調節作用。補陰藥枸杞子、山茱萸、五味子、女貞子、銀耳、冬蟲夏草、桑寄生、黃精、何首烏、石斛等也都有免疫調節作用。綜上所述，補氣、補血、補陰、補陽藥多可提高免疫功能，屬於中藥免疫促進劑。另外免疫功能出現過高的免疫反應，則會造成生物體損傷而導致免疫性疾病。因此需要抑制此種過度反應，使之趨於正常，達到免疫平衡，亦即中醫的陰陽平衡。而免疫反應是在抗原作用下各種免疫細胞成份相互作用的結果，表現為抗體形成或特異性免疫活化細

胞的產生，因此；清除抗原或抑制抗體，或抑制活性免疫細胞的產生，均可達到抑制免疫反應之目的，如清熱解毒類藥物穿心蓮、板藍根、銀花、大青葉、魚腥草、黃連、黃芩、白花蛇舌草、梔子、蒲公英、龍膽草等都可抑制免疫反應，一般說來，去邪類中藥，主要起抑制免疫的作用。所以在中醫辨證原則指導下，調節陰陽，即可從而調節免疫。總之扶正藥主要發揮促進細胞免疫作用，去邪藥主要抑制體液免疫，相輔相成，以增強免疫反應，達到免疫平衡。仍待科學方法加以確定。而建立篩選平台，可否更有效的從種類繁多的中草藥篩檢出調節免疫力、促進健康的中草藥？是值得探討的問題。

免疫系統專一性泛指 T cell 和 B cell 的反應，一般而言，當病原入侵時，會先引起非專一性的免疫反應，包括巨噬細胞及自然殺手細胞。巨噬細胞不需先刺激，即可藉由吞噬作用除去外來的入侵者，故為生物體內活化免疫系統、抵抗病原侵略的重要成員之一，亦為生物體之第一道防線，以抵抗外來之感染。巨噬細胞更可由 T 輔助 ( T helper, Th ) 細胞分泌的細胞激素，Th 細胞可再依其分泌的細胞激素做功能性的區分，Th1 亞群細胞分泌 IFN- $\gamma$  及 IL-2，Th1 細胞激素反應拌隨著免疫引發機制而生，這些機制由細胞內的毀損或細胞外細菌、病毒等病原生物引起，藉此刺激細胞毒殺 T 淋巴細胞、NK 細胞和巨噬細胞的活化作用，並且產生補體結合抗體，Th1 細胞激素同時和許多免疫調節疾病有關，包括 type 1 型糖尿病、類風濕性關節炎、多發性硬化症。相對的，Th2 細胞激素反應所伴隨著的免疫機制可促成腸內寄生物除去及涉及過敏不適症的發病原理。Th2 亞群細胞則分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13，主要作用於清除細胞外病原菌及寄生蟲的免疫反應及過敏反應的調控，為發炎反應的媒介物及革蘭氏陰性菌細胞壁的產物內毒素(lipopolysaccharide, LPS) 所活化。發炎和免疫反應廣泛的由細胞激素調控，常常影響免疫系統中的細胞和免疫反應引起的非免疫細胞的產生、生存和作用。雖然目前已有超過 100 種不同的細胞激素被發現，但其中的 IFN- $\gamma$ 、IL-4 卻是對免疫學特別重要的，IFN- $\gamma$  可藉由多種機制，殺死病原體並且抑制 Th2 細胞的分化及許多 Th2 細胞激素的作用。相反的，IL-4 具有多樣的過敏前驅物影響，也會刺激 Th2 的分化，並且抑制 IFN- $\gamma$  的產生和影響。因此，測量 IFN- $\gamma$  和 IL-4 的產生，能有助於描述一個免疫反應或免疫疾病，因為它們分別是阻抗 Th1 和 Th2 反應的初始細胞激素。

細胞激素是一種低分子量 ( 8~25 kDa ) 的醣蛋白，是多樣化的分子，能傳遞訊息給淋巴球、吞噬細胞與體內之其它細胞，調節所有

重要的生物性作用，如細胞生長、細胞活化、發炎反應、組織修復、纖維化以及型態發育的過程。如干擾素（interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ）則由一些被活化之 T 細胞所分泌，IFN- $\gamma$ 能使未感染的組織細胞抵抗病毒感染，且 IFN- $\gamma$ 可在感染後不久製造產生，是抵抗多種病毒感染的第一道防線。IFN- $\gamma$ 為巨噬細胞最有效活化者之一，活化的巨噬細胞增加了吞噬力、殺死微生物和病原的能力、活化 T cell 的能力、和分泌發炎性細胞激素 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 及 nitric oxide (NO) 的能力。而 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 為多功能的細胞激素，在調節免疫反應、促進血球新生及增強發炎反應方面扮演重要地位<sup>(1,2)</sup>。但在人類及動物實驗中，由 LPS 導致的休克症狀有發燒、低血壓、凝血及多重器官衰竭的表現。而根據近來報告指出，NO 與發炎有關的細胞激素如 TNF- $\alpha$  和 IL-6，於 LPS 致毒性動物中的許多細胞功能上，扮演一個重要調節者的角色<sup>(3)</sup>。

而 TNF- $\alpha$ 是多功能的細胞激素，能誘導細胞進行細胞凋亡（apoptosis），激發發炎反應清除病原，也能活化轉錄因子 nuclear factor- $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B) 以刺激組織再生。轉錄因子 NF- $\kappa$ B 家族，主要由 NF- $\kappa$ B 1 (p105/p50)、NF- $\kappa$ B 2 (p100/p52)、RelA (p65)、RelB 和 c-Rel (Rel) 以 homodimer 或 heterodimer 型式所組成，而在大多數細胞中以 RelA (p65)/p50 為主要存在型式，故又稱為 NF- $\kappa$ B。平時處於未受刺激狀態的 NF- $\kappa$ B 存在於細胞質，和抑制性的蛋白質 (I $\kappa$ B) 相結合，一旦受到刺激後會進入細胞核，促進相關的基因表現如 iNOS。目前已知有許多和發炎有關的基因和細胞結合因子前的 promoter 都具有 NF- $\kappa$ B 結合區域。而研究發現綠茶中的生物活性因子 EGCG 或薑黃中的 curcumin 皆可透過抑制 LPS 誘發的 I $\kappa$ B 磷酸化，以抑制 NF- $\kappa$ B 進入細胞核啟動基因的表現，因此推測 EGCG 或 curcumin 可能具有抗發炎的能力<sup>(4,5)</sup>。因此，如何利用細胞激素 INF- $\gamma$ 和 3 $\times$ - $\kappa$ B-tk 的基因表現調控機制，來建立篩檢具調節免疫力的食材，是值得研究開發的課題。另外，日常飲食中有哪些飲食營養因子或食藥兼用之中草藥可能是透過影響生物體內 T<sub>H</sub>1、T<sub>H</sub>2 免疫反應之平衡，至今所知不多，且尚未有快速有效的科學方法可進一步有效評估。為了探討此一問題，本研究試圖以系統性之篩選模式從日常飲食中之食材去找尋具有調節免疫反應之中草藥。研究策略乃利用系統生物學進行初代細胞及動物體模式驗證中草药調節免疫的一致性，以驗證迅速篩選之工具之實用性，同時探討中草药對整體免疫調節的作用機制。本計畫之完成俾能利於篩選中草药的抗發炎活性或影響免疫反應之研究，以期建立一

個可供天然物、中草藥進行大量篩檢的技術平台。

## 貳、材料與方法

### 一、中草藥材之中藥飲片萃取

以 95%乙醇（六合化工）進行兩次 50°C 熱萃取 3 小時，粗萃取液進行過濾、減壓濃縮（Vacuum Controller VC-7600, BUCHI 461 water Bath），得乙醇粗萃取物，先以 90% EtOH/H<sub>2</sub>O 回溶後，再以 Hexane 進行分配萃取，即可得 Hexane 層和 90% EtOH/H<sub>2</sub>O 層；90% EtOH/H<sub>2</sub>O 層經減壓濃縮，以水回溶後，再以 EtOAc 進行分配萃取，即可得 EtOAc 層和 H<sub>2</sub>O 層。而本實驗根據之前一系列的實驗（CCMP93-RD-052, CCMP94-RD-026, CCMP95-RD-105）所篩選出 EtOAc 層之當歸、穿心蓮做為後續動物活體試驗之依據及管餵劑量之參考。

### 二、BALB/cJ 雌鼠之飼養

自台大動物中心購入四週大之 BALB/cJ 雌鼠約 60 隻，個別飼養於不鏽鋼網籠中，自由攝食飼料和飲水，動物房溫度控制在 25±2°C，光照循環各為 12 小時，飼養至 8~12 週大時進行實驗。

### 三、BALB/cJ 雌鼠 LPS 致急性發炎動物實驗

將 10~12 週大之 BALB/cJ 雌鼠，管餵中草藥萃取物 1.5~3.125 mg/kg 為期一週，進行腹腔 LPS (15 mg/ml) 注射，分別於注射後 2 和 6 小時，進行採血和犧牲，血液靜置 3 小時後，以 12,000 rpm, 4°C，離心 20 分鐘，取血清於 -70°C 備用，以分析細胞激素含量；並培養腹腔巨噬細胞與脾臟細胞和小腸 peyer's patch 內抗體含量。

### 四、細胞培養基與藥品

1. TCM™ (serum replacement 50 x concentrate, CELOX, Cat. No.1002)
2. HyQ® RPMI-1640 medium (Hyclone®, Cat. No. SH30255.01)
3. Antibiotic-Antimycotic (PenicillinG sodium-Streptomycin sulfate-Amphotericin B 三合一抗生素, GIBCO™, Invitrogen, Cat. No. 15240-062)
4. TCM-RPMI-1640 medium: 於 RPMI-1640 medium 中加入 10 ml TCM 及 2.5 ml 三合一抗生素。
5. HBSS buffer: 將 HBSS (ATLANTA, Cat. #R32201) 粉末溶於 1L 二

- 次去離子水中，經 121°C，30 分鐘滅菌冷卻後，加入 2.5 ml 三合一  
 抗生素，再以 7.5% NaHCO<sub>3</sub> 調 pH 值，至深紅色。
6. RBC ACK lysis buffer：將 0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA，1 mM  
 KHCO<sub>3</sub> 溶於 1L 二次去離子水中，經 121°C，30 分鐘滅菌。
  7. Lipopolysaccharide (LPS, Prod. Num. L2654, Sigma<sup>®</sup>)
  8. Interferon-Gamma (IFN- $\gamma$ , Prod. Num. I3275, Sigma<sup>®</sup>)
  9. Concanavalin A (Con A, Prod. Num. C5275, Sigma<sup>®</sup>)
  10. 75%酒精

## 五、統計分析

實驗結果均以平均值  $\pm$  標準偏差 (Mean  $\pm$  SD) 表示。以 Student' s *t*-test 來檢定兩者間之顯著差異， $p < 0.05$  即視為有顯著差異 (在本次實驗中以\*表  $p < 0.05$ ；\*\*表  $p < 0.01$ ；#表  $p < 0.001$ )；相關性分析以 Pearson' Correlation， $p < 0.05$  即視為有顯著差異，統計分析係用 SAS 軟體 (SAS/STAT version 8.2; SAS Institute, Cary, NC, USA)。存活率分析以 Cox' s proportional hazards regression test 檢定兩組間之差異顯著性與相對危險性，係用 STATA 軟體 (STATA version 9.0; Stata corp., Texas, USA)。

## 參、結果與討論

### (一) 當歸和穿心蓮 EtOAc 萃取物對 BALB/cJ 品系小鼠生長之影響

由表 1 結果顯示，管餵當歸和穿心蓮 EtOAc 萃取物 1.5 ~ 3.125 mg/kg 為期一週，對於 BALB/cJ 品系小鼠各組間之體重變化並無顯著性差異，且一週後犧牲時之各組織重量亦無差異。

### (一) 當歸和穿心蓮 EtOAc 萃取物對 LPS 致急性發炎小鼠腹腔巨噬細胞中 TNF- $\alpha$ 含量之影響

將 10 ~ 12 週大之 BALB/cJ 雌鼠，管餵中草藥當歸和穿心蓮 EtOAc 萃取物 1.5 ~ 3.125 mg/kg 為期一週，進行腹腔 LPS (15 mg/ml) 注射，於注射後 6 小時，進行採血和犧牲，培養腹腔巨噬細胞，於 48 小時收集細胞培養液分析細胞激素含量。結果顯示低劑量穿心蓮 EtOAc 萃取物可顯著降低腹腔巨噬細胞 TNF- $\alpha$  含量，如圖 1 所示。在 LPS 誘導的發炎反應中，腫瘤壞死因子 (TNF- $\alpha$ ) 是一個最早期被誘發的重要細胞激素，主要由巨噬細胞和自然殺手細胞所分泌，能直接

毒殺腫瘤細胞，及誘導單核白血球及巨噬細胞分化、活化巨噬細胞、刺激補體及凝血系統、誘導感染區域血管表達黏附分子，促使內皮細胞產生血小板活化因子，以催化血液凝結及局部血管阻塞，防止病原菌擴散，但當其產生量不足或過量時反而會傷害宿主，許多疾病如敗血症、風濕性關節炎、氣喘等皆與 TNF- $\alpha$  的過量形成有關。TNF- $\alpha$  亦能藉由活化 NF- $\kappa$ B 來啟動下游基因的表現，以調節細胞的分化及增生。

## (二) 當歸和穿心蓮 EtOAc 萃取物對 LPS 致急性發炎小鼠腹腔巨噬細胞中 IL-6 含量之影響

IL-6 曾經被稱為 B cell 分化因子，或是肝臟細胞刺激因子，在肝臟中亦會造成急性期蛋白的製造，IL-6 是由巨噬細胞、T 細胞、內皮細胞及纖維母細胞所分泌，可刺激 T 細胞和 B 細胞的增生分化及急性期蛋白質增加，是急性發炎的重要細胞激素之一。而在本實驗中發現，當歸和穿心蓮 EtOAc 萃取物在 LPS 注射，並無顯著降低腹腔巨噬細胞 IL-6 含量，如圖 2。

## (三) 當歸和穿心蓮 EtOAc 萃取物對 LPS 致急性發炎小鼠腹腔巨噬細胞中 MIP-2 含量之影響

化學趨化物質 (chemokines) 是一群小分子胜肽，由 70~130 個胺基酸所組成，分子量約 6~14 kDa，依其 N-端最後兩個 cystein 排列方式，可分為四類：C, CC, CXC, CX3C，係指一群具有結構相似性、低分子量的細胞激素，可刺激白血球移動和調控白血球由血液移動至發炎組織，其中 CXCL2 (macrophage inflammatory protein-2; MIP-2) 分子量約 6 kDa，常經由 LPS 刺激時由巨噬細胞所釋放，且有研究顯示 MIP-2 基因上有轉錄因子 NF- $\kappa$ B 的結合位置。Tsai 等人研究顯示，穿心蓮內酯可透過抑制巨噬細胞經補體 (C5a) 刺激引起的 ERK1/2 和 PI3k/Akt 訊息傳遞路徑以抑制化學趨化性移動此外；目前許多研究指出 Toll-like receptor (TLR) family，和稱為 Toll 的果蠅蛋白為同質性的蛋白質，Toll 是保護果蠅對抗感染必需的蛋白質，而 TLR 對微生物不同的組成份具特異性，例如，其中的 TLR4 為 LPS 活化訊息傳遞的受體，TLR 是一穿膜蛋白，存在巨噬細胞、樹突狀細胞及淋巴細胞上，可藉由此活化下游訊息傳遞路徑，如 NF- $\kappa$ B, AP-1 等，刺激細胞激素和其他參與活化吞噬細胞抗微生物功能之蛋白質的製造。而 Asehnoune 等學者亦發現，抗氧化劑如  $\alpha$ -tocopherol 和 N-acetylcysteine

可抑制 LPS 透過 TLR4 引起噬中性白血球促發炎細胞激素 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及 MIP-2 之分泌，且此過程主要透過 NF- $\kappa$ B 路徑。而本實驗中之 PDTC 組和穿心蓮 EtOAc 萃取物組在 LPS 注射後，可顯著降低腹腔巨噬細胞 MIP-2 含量 ( $p < 0.05$ )，如圖 3，顯示其延長發炎小鼠存活率及降低血清中 MIP-2 含量之機制，主要是經由抑制 NF- $\kappa$ B 轉錄活性來達成。

#### (四) 當歸和穿心蓮 EtOAc 萃取物對 LPS 致急性發炎小鼠腹腔巨噬細胞中 Nitric oxide (NO) 含量之影響

將 10 ~ 12 週大之 BALB/cJ 雌鼠，管餵中草藥當歸和穿心蓮 EtOAc 萃取物 1.5 ~ 3.125 mg/kg 為期一週，進行腹腔 LPS (15 mg/ml) 注射，於注射後 6 小時，進行採血和犧牲，培養腹腔巨噬細胞，於 48 小時收集細胞培養液分析細胞激素含量。結果顯示低劑量穿心蓮 EtOAc 萃取物可顯著降低腹腔巨噬細胞 NO 含量，如圖 4 所示。當生物體受到內毒素刺激時，會活化巨噬細胞生成發炎介質以抵禦感染，這些介質包括 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-12 等，其中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 在急性發炎反應中為主要調節者；另外也會伴隨 Nitric oxide (NO) 及 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 的產生，其中 NO 的生成會加強活化巨噬細胞分泌 IL-1 $\beta$ 的能力；IL-1 $\beta$  與 TNF- $\alpha$ 則會促進 IL-6 的分泌，並誘發 PGE<sub>2</sub> 的生成 (Gins, 2002)。而 Chiou 等人將 RAW264.7 巨噬細胞與 LPS 和 IFN- $\gamma$ 及穿心蓮內酯 (andrographolide) 共同培養 24 小時後，測量 NO 分泌量，發現隨穿心蓮內酯添加濃度增加，NO 含量隨之下降 (Chiou et al, 2000)。NO 為巨噬細胞所分泌，具毒殺寄生蟲、細菌與病毒等作用，並且主導發炎反應中血管舒張的反應。另外，過量 NO 之生成，與活性氧分子反應會更進一步形成具有毒性之活性氮化合物，進而攻擊一些生物分子，例如血基質蛋白質、含硒蛋白、脂質及 DNA，故被認為與一些慢性發炎性疾病及某些癌症有關 (Berg, 2001)。

#### (五) 當歸和穿心蓮 EtOAc 萃取物對 LPS 致急性發炎小鼠腹腔巨噬細胞中 IL-12p40 含量之影響

IL-12 是一個由 p35 和 p40 兩個 subunits 所組成之 70-kDa-heterodimeric 細胞激素，主要由巨噬細胞、單核球和樹突狀細胞所製造。IL-12 可活化自然殺手細胞，促進自然殺手細胞製造 IFN- $\gamma$ ，活化巨噬細胞 (An et al, 2006)。本實驗結果發現低劑量穿心蓮 EtOAc

萃取物在 LPS 注射後可顯著降低發炎小鼠腹水抽出液 IL-12p40 含量 ( $P < 0.05$ )，如圖 5 所示。

#### (六) 當歸和穿心蓮 EtOAc 萃取物對 LPS 致急性發炎小鼠腹腔細胞 (CD14/CD40, CD80/CD86) 的免疫細胞族群分布的影響

目前常以單株抗體鑑定這些免疫細胞的表面蛋白來加以區分，對這些表面蛋白的標準命名法是用分化集群(cluster of differentiation, CD) 加上數字做為名稱，被用來描述表面蛋白，而這些表面蛋白可以定義特定的細胞種類或細胞分化的階段，和被某集群或某類抗體所辨識。其中 CD14 主要存在於單核球、巨噬細胞和顆粒球，在血清為可溶性形式，與 LPS 和 LPS 結合蛋白鍵結，為 LPS 誘發巨噬細胞活化所必需；CD40 主要表現的細胞為巨噬細胞、樹突狀細胞、內皮細胞和 B 細胞，而本實驗結果顯示低劑量穿心蓮 EtOAc 萃取物與 PDTC 組具有相同結果，皆可顯著減少 LPS 致急性發炎小鼠腹腔細胞 CD14/CD40 之免疫細胞族群分布，如表 2 所示；但對於發炎小鼠脾臟細胞 CD14/CD40 之免疫細胞族群分布，則無顯著差異性，如表 4 所示。

CD80 (B7-1)/CD86(B7-2)主要表現的細胞為活化的巨噬細胞和 B 細胞及樹突狀細胞，其為 T 細胞活化的協同刺激分子。本實驗結果顯示發炎小鼠腹腔細胞和脾臟細胞 CD80/CD86 之免疫細胞族群分布，各組間皆無顯著差異性，如表 3, 5 所示。

#### (七) 當歸和穿心蓮 EtOAc 萃取物對 LPS 致急性發炎小鼠脾臟細胞中 IFN- $\gamma$ 含量之影響

干擾素 (interferon, IFN) 為細胞所分泌的醣蛋白分子，它也屬於細胞激素的一種，其共有三種類型，分別為 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ ，而當細胞被病毒感染時，這些被感染的細胞會釋放 IFN，以抵抗病毒的侵襲。此外；IFN- $\gamma$  也會由 T<sub>H</sub>-1 細胞所分泌，其生理功能除活化巨噬細胞外，也促進細胞毒殺的能力，且也會抑制 T<sub>H</sub>-2 的活性。在本次實驗中當歸和穿心蓮 EtOAc 萃取物對急性發炎小鼠脾臟細胞中 IFN- $\gamma$  分泌量並無顯著差異性，如圖 6，顯示對於適應性免疫反應無影響，主要參與的是以巨噬細胞為主的發炎反應。

#### (八) 當歸和穿心蓮 EtOAc 萃取物對 LPS 致急性發炎小鼠脾臟細胞中 IL-10 含量之影響

目前許多研究發現 IL-10 是一抗發炎性細胞激素，其可抑制促發

炎性細胞激素於發炎反應中之過度反應，進而延長存活率。然在本實驗中 LPS 致急性發炎小鼠脾臟細胞中 IL-10 含量並無顯著增加，如圖 7；但在先前實驗中已發現，當歸和穿心蓮 EtOAc 萃取物對 LPS 致急性發炎小鼠卻可顯著延長其存活率，此結果值得更進一步探討，或許還有其他更重要的角色扮演於其中。

#### (九) 當歸和穿心蓮 EtOAc 萃取物對 LPS 致急性發炎小鼠小腸 peyer's patch 細胞中 IgA 含量之影響

腸道免疫力也是者幾年免疫學研究很熱門的一個領域，因此在本次實驗中亦將發炎小鼠腸道 peyer's patch 細胞取出進行培養，分析其粘液性抗體 IgA 含量，結果如圖 8 顯示，我們發現在管餵當歸和穿心蓮 EtOAc 萃取物 1.5 ~ 3.125 mg/kg 為期一週，其高劑量組皆會增加發炎小鼠腸道 peyer's patch 細胞中 IgA 含量，似乎意味著中草藥萃取物對腸道免疫具有一些尚未知的影響，值得再探討。而本實驗也分析發炎小鼠小腸 peyer's patch 細胞免疫細胞族群 (B220) 分布，則無顯著差異性，如表 6 所示。

### 肆、結論

由上述 *in vivo* 之實驗結果顯示，當歸、穿心蓮 EtOAc 萃取物，可抑制 NF- $\kappa$ B 轉錄活性，進而抑制 LPS 致急性發炎小鼠腹腔巨噬細胞中經由 NF- $\kappa$ B 所活化生成之促發炎細胞激素如 TNF- $\alpha$ 、IL-12p40、IL-6、MIP-2 和 NO 等含量，而達到延長發炎小鼠之存活率，顯示本實驗所篩選之當歸和穿心蓮具有發展的潛力，值得更進一步進行分離、純化鑑定其功能性成份因子。

表 管銀不同中草藥之 12 週大 BALB/c 小鼠其組織相對重量百分比 (%) 的影響

Group	Spleen	Liver	Lung	Brain (半顆)
LPS	0.35 ± 0.10	4.22 ± 0.52	0.74 ± 0.13	1.25 ± 0.29
PDTC	0.40 ± 0.08	4.25 ± 0.36	0.73 ± 0.13	1.12 ± 0.16
當歸 L	0.32 ± 0.06	4.24 ± 0.56	0.73 ± 0.06	1.10 ± 0.22
當歸 H	0.32 ± 0.07	4.33 ± 0.05	0.72 ± 0.15	1.02 ± 0.17
穿心蓮 L	0.32 ± 0.08	4.37 ± 0.41	0.71 ± 0.05	1.11 ± 0.18
穿心蓮 H	0.28 ± 0.08	4.46 ± 0.95	0.77 ± 0.12	1.00 ± 0.19

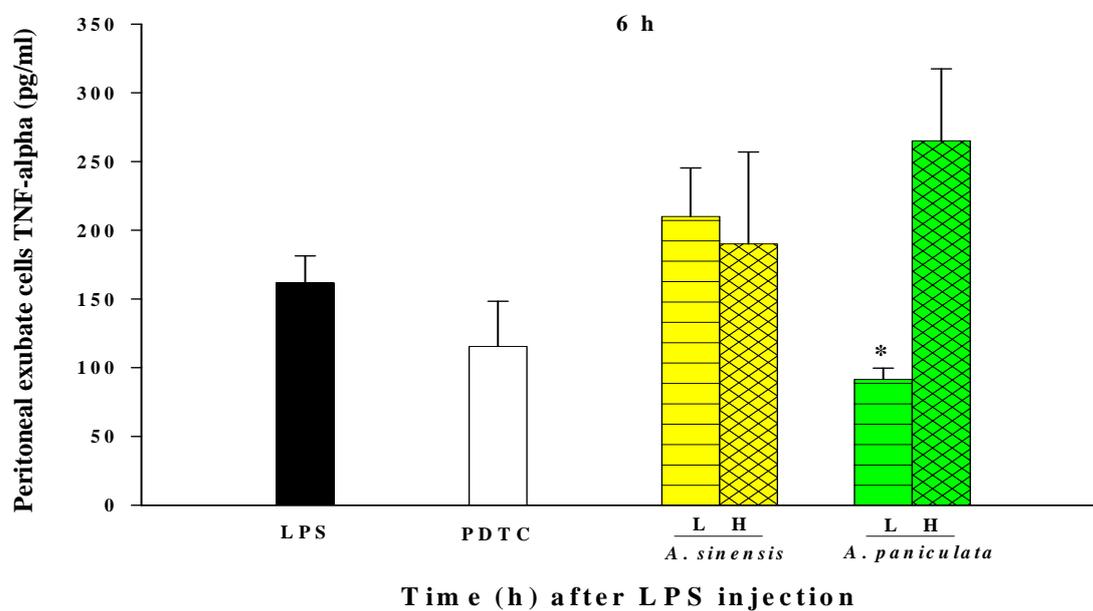


圖 1. 當歸和穿心蓮 EtOAc 萃取物對 LPS 致急性發炎小鼠腹腔巨噬細胞中 TNF-α 含量之影響

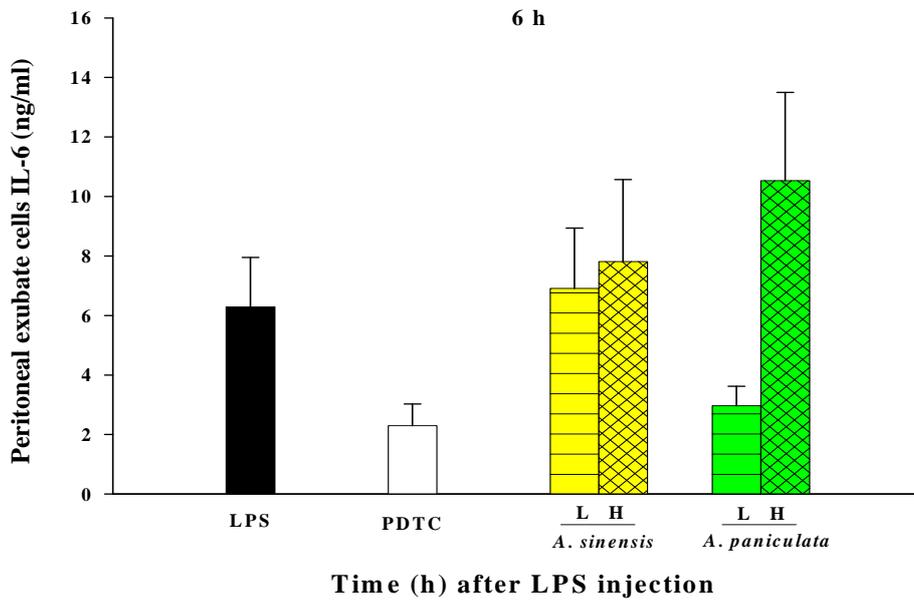


圖 2. 當歸和穿心蓮 EtOAc 萃取物對 LPS 致急性發炎小鼠腹腔巨噬細胞中 IL-6 含量之影響

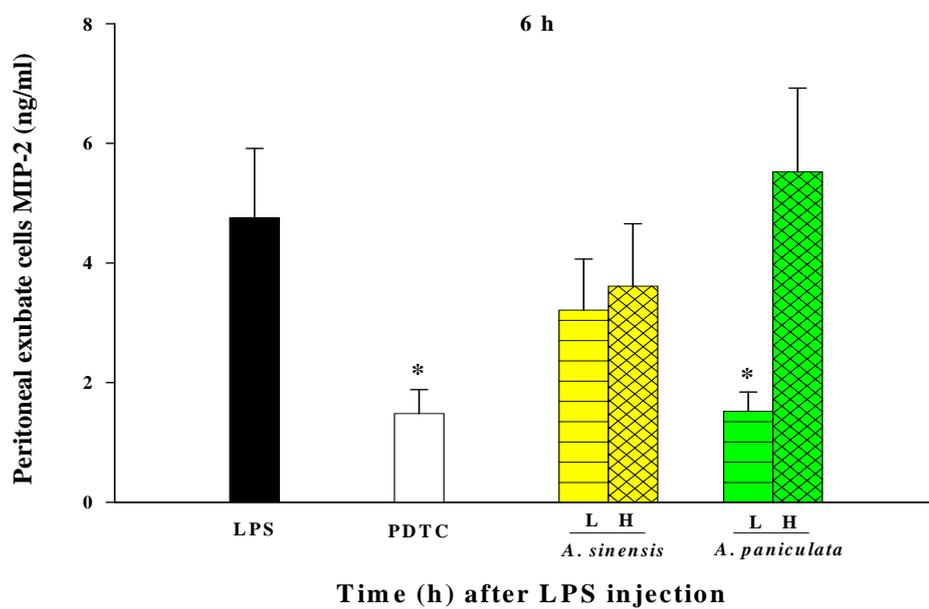


圖 3. 當歸和穿心蓮 EtOAc 萃取物對 LPS 致急性發炎小鼠腹腔巨噬細胞中 MIP-2 含量之影響

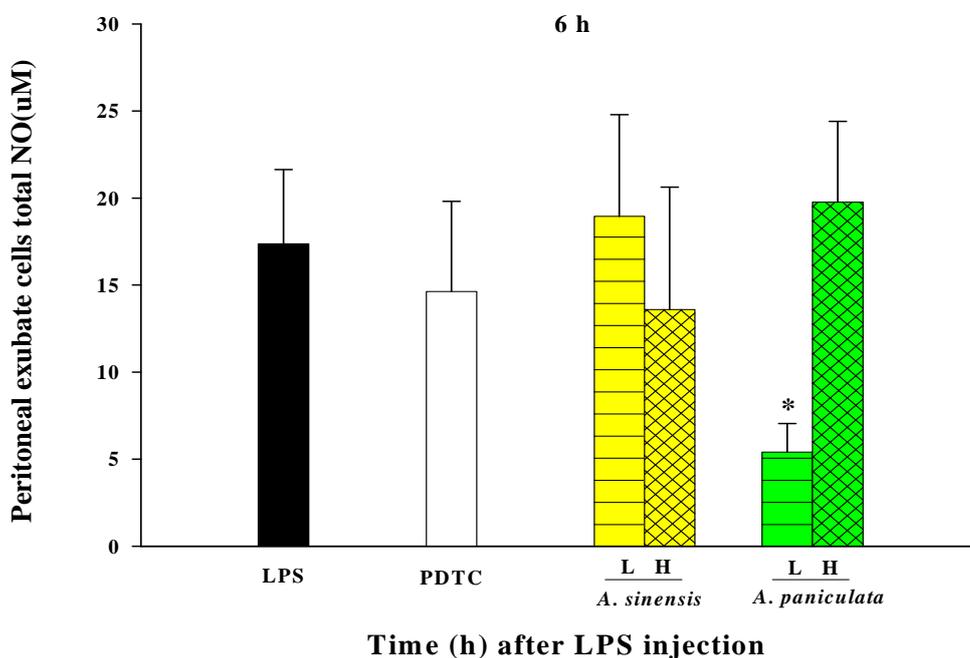


圖 4. 當歸和穿心蓮 EtOAc 萃取物對 LPS 致急性發炎小鼠腹腔巨噬細胞中 NO 含量之影響

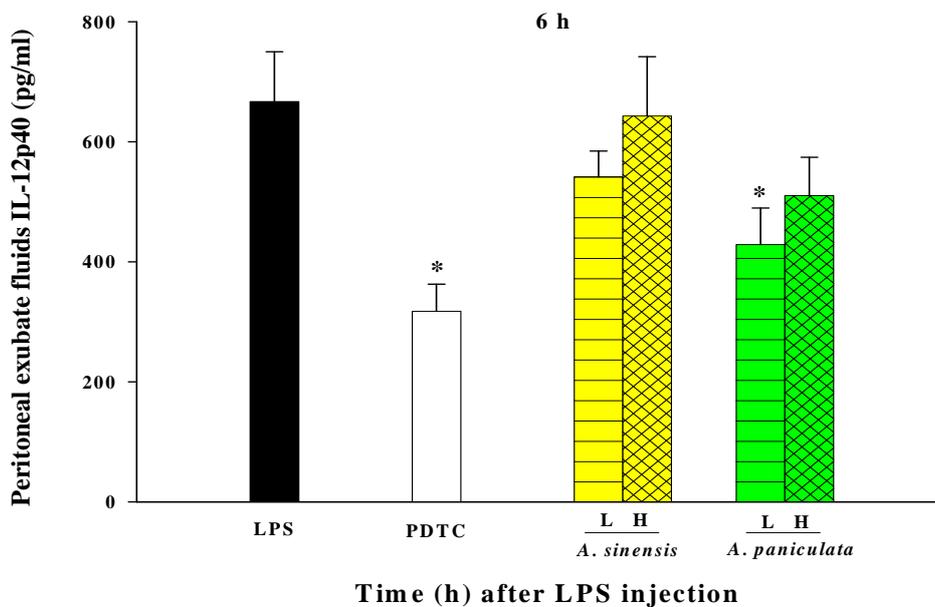


圖 5 當歸和穿心蓮 EtOAc 萃取物對 LPS 致急性發炎小鼠腹水抽出液中 IL-12p40 含量之影響

## 表 2.

表 管餵不同中草藥之 12 週大 BALB/c 小鼠腹腔細胞的免疫細胞族群分布的影響

表 管餵不同中草藥之 12 週大 BALB/c 小鼠腹腔細胞的免疫細胞族群分布的影響

	(CD80 <sup>+</sup> )	(CD86 <sup>+</sup> )	(CD80 <sup>+</sup> /CD86 <sup>+</sup> )
	% of surface marker expression		
PBS	12.6 ± 3.21	3.49 ± 1.75	10.88 ± 3.06
LPS	40.68 ± 10.02	7.99 ± 2.59	38.57 ± 13.76
PDTC	26.76 ± 7.80	7.36 ± 3.50	34.81 ± 11.57
當歸 L	36.88 ± 15.56	7.95 ± 5.75	28.41 ± 17.73
當歸 H	35.56 ± 6.40	8.32 ± 3.65	32.85 ± 12.44
穿心蓮 L	31.93 ± 14.12	6.52 ± 3.78	26.89 ± 18.20
穿心蓮 H	34.04 ± 10.19	9.15 ± 6.43	35.25 ± 6.97

實驗結果是以平均值±標準差(mean±SD)表示

\*與控制組 (LPS) 進行統計分析有顯著差異(\* $P < 0.05$ , Student's t test)

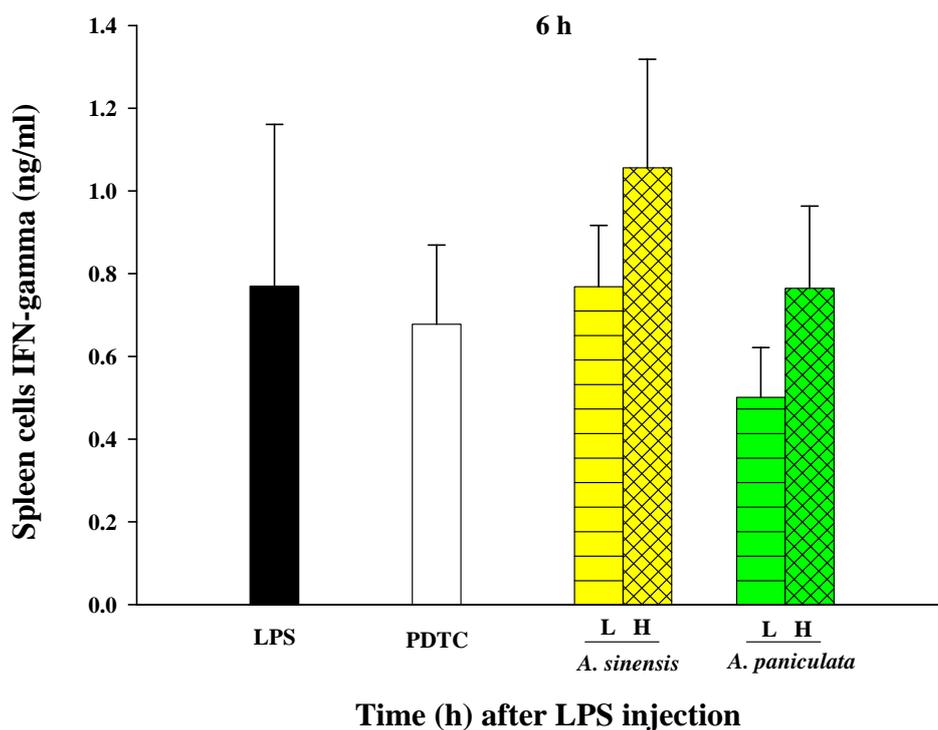


圖 6. 當歸和穿心蓮 EtOAc 萃取物對 LPS 致急性發炎小鼠脾臟細胞中 IFN- $\gamma$  含量之影響

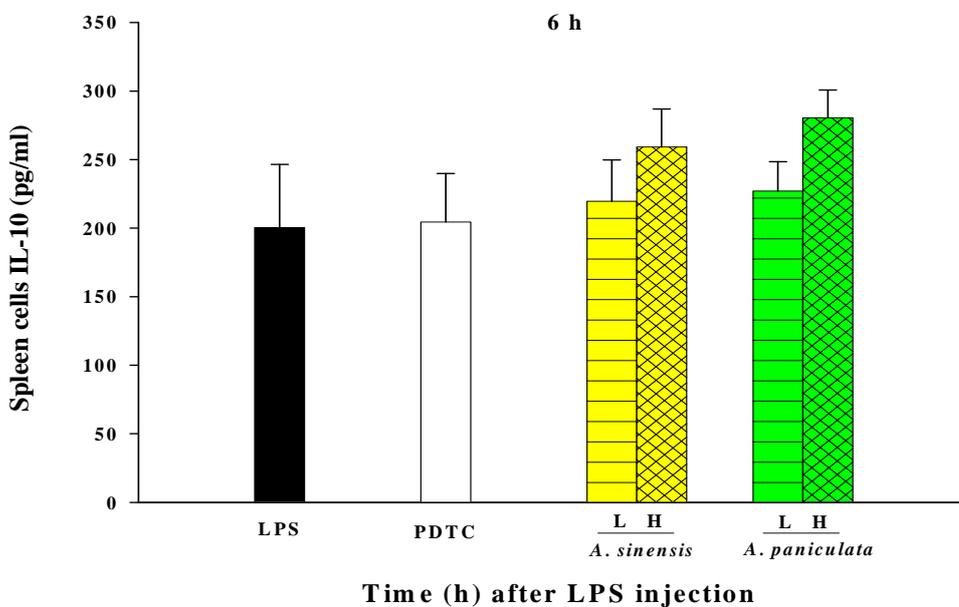


圖 7. 當歸和穿心蓮 EtOAc 萃取物對 LPS 致急性發炎小鼠脾臟細胞中 IL-10 含量之影響

當歸 H	0.57 ± 0.180	50.55 ± 12.65	2.04 ± 1.02
穿心蓮 L	0.49 ± 0.20	48.08 ± 7.03	1.52 ± 0.48
穿心蓮 H	0.55 ± 0.30	44.02 ± 10.11	2.40 ± 2.25

3 冊

表

實驗結果是以平均值±標準差(mean±SD)表示

\*與控制組 (LPS) 進行統計分析有顯著差異(\* $P < 0.05$ , Student's t test)

表 管餵不同中草藥之 12 週大 BALB/c 小鼠脾臟細胞的免疫細胞族群分布的影響

	(CD80 <sup>+</sup> )	(CD86 <sup>+</sup> )	(CD80 <sup>+</sup> /CD86 <sup>+</sup> )
	% of surface marker expression		
PBS	3.47 ± 0.68	17.12 ± 7.40	8.47 ± 1.94
LPS	5.80 ± 3.71	40.24 ± 14.52	13.25 ± 4.09
PDTC	5.74 ± 2.50	38.18 ± 8.11	10.74 ± 3.31
當歸 L	5.14 ± 0.62	40.61 ± 4.37	12.44 ± 2.07
當歸 H	5.21 ± 1.87	43.44 ± 7.42	13.02 ± 2.53
穿心蓮 L	5.36 ± 2.06	39.41 ± 6.52	11.35 ± 3.82
穿心蓮 H	4.85 ± 0.70	40.83 ± 4.13	10.22 ± 1.37

表

實驗結果是以平均值±標準差(mean±SD)表示

\*與控制組 (LPS) 進行統計分析有顯著差異(\* $P < 0.05$ , Student's t test)

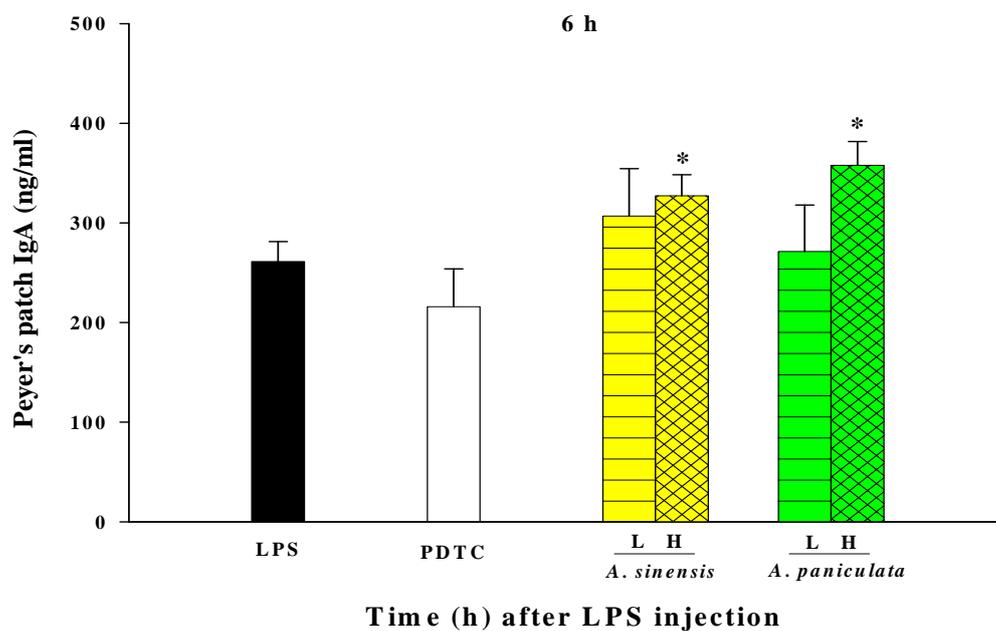


圖 8. 當歸和穿心蓮 EtOAc 萃取物對 LPS 致急性發炎小鼠小腸 peyer's patch 細胞中 IgA 含量之影響

表 6.

表 管餵不同中草藥之 12 週大 BALB/c 小鼠 Peyer's patch 細胞的免疫細胞族群分布的影響

	(B220)
	% of surface marker expression
PBS	58.50 ± 3.82
LPS	62.41 ± 7.56
PDTC	60.74 ± 4.57
當歸 L	59.42 ± 4.53
當歸 H	62.42 ± 4.04
穿心蓮 L	62.94 ± 6.03
穿心蓮 H	62.28 ± 4.11

實驗結果是以平均值±標準差(mean±SD)表示

\*與控制組 (LPS) 進行統計分析有顯著差異(\* $P < 0.05$ , Student's t test)

## 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 CCMP95-RD-105 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 伍、參考文獻

- 1.許鴻源。簡明藥材學。新醫藥出版社。1985.
- 2.李沐勳、李威著。常用中草藥手冊。國立中國醫藥研究所出版。2001.
- 3.行政院衛生署中醫藥委員會。中華中藥典。行政院衛生署編印。2004.
- 4.邱文慧、周正仁、柯漢傑、陳介甫。在巨噬細胞探討六種抗發炎中草藥對 LPS/IFN- $\gamma$  所誘發一氧化氮生成之影響。J. Chin. Med. 2000; 11(2): 87-94.
- 5.洪永瀚、林璧鳳。以巨噬細胞株分泌發炎介質篩選抗發炎作用的模式評估。中華民國營養學會雜誌 2004a；29(3): 159-167.
- 6.洪永瀚、林璧鳳。稻苗草榨汁對抑制發炎反應的功能研究。台灣農業化學與食品科學 2004b；42(6): 456-465.
- 7.梁佳玟、賴怡君、朱燕華。中草藥對於促發炎細胞激素生之影響。J. Chin. Med. 2004；15(4): 293-304.
- 8.蔡德豐、謝瓊慧、林意森、蔡維人、郭育綺。當歸補血湯抽出物促進人類周邊血單核細胞之細胞增殖與細胞激素產生。J. Chin. Med. 2004; 12(3): 191-202.
- 9.Amin A, Nanji KJ, Andrew JD. Curcumin prevents alcohol-induced liver disease in rats by inhibiting the expression of NF- $\kappa$ B-dependent genes. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver physiol. 2003; 284: G321-G327.
- 10.Batkhuu J, Hattori K, Takano F, Fushiya S, Oshiman KI and Fujimiya Y. Suppression of NO production in activated macrophages *in Vitro* and *ex Vivo* by neoandrographolide isolated from *Andrographis paniculata*. Biol. Pharm. Bull. 2002; 25(9): 1169-1174.
- 11.Bedir E, Pugh N, Calis I, Pasco DS and Khan IA. Immunostimulatory effects of cycloartane type triterpene glycosides from *Astragalus* species. Biol. Pharm. Bull.2000; 23(7): 834-837.
- 12.Batkhuu J, Hattori K, Takano F, Fushiya S , Oshiman KI and

- Fujimiya .Y. Suppression of NO production in activated macrophages *in Vitro* and *ex Vivo* by neoandrographolide isolated from *Andrographis paniculata*. *Biol. Pharm. Bull.* 2002; 25(9): 1169-1174.
13. Calixto JB, Otuki MF and Santos ARS. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, NO and NF- $\kappa$ B. *Planta Med.* 2003; 69: 973-983.
  14. Calixto JB, Campos MM, Otuki MF. and Santos ARS. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med.* 2004; 70: 93-103.
  15. Crichton RR, Wilmet S, Legssyer R, Ward RJ. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J. inorganic Biochemistry.* 2002; 91: 9-18.
  16. Chang SC, Chiang BL, Wu WM, Lin BF. Different dietary fats influence serum and tissue lipids and anti-ardiolipin antibody levels in autoimmune-prone NZB/W F1 mice. *Brit. J. Nutr.* 1999; 81: 331-340.
  17. Chen YC, Yang LL. and Lee TJF. Oroxylin A inhibition of lipopolysaccharide induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of nuclear factor- $\kappa$  B activation. *Biochemical Pharmacology.* 2000; 59: 1445-1457.
  18. Chiou WF, Chen, CF. and Lin JJ. Mechanisms of suppression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells by andrographolide. *Br. J. Pharm.* 2000; 129: 1553-1560.
  19. Gins BI. Overview of local and systemic acute inflammatory response. *Lancet infectious disease.* 2002; 2(3): 171-179.
  20. Hsieh CC, Lin WC, Lee MR, Hsu SL, Liu HS, Kao ST. and Hsieh MT. Dang-Gui-Bu-Xai-Tang modulated the immunity of tumor bearing mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology.* 2003; 25(2): 259-271.
  21. Ho SC. and Tsai PJ. Comparison of the effects of Hot and Cold Chinese medicinal plants on the production of inflammatory mediators by RAW 264.7 cells. *J. of Food and Drug analysis.* 2004; 12(2): 120-127.
  22. Huang CJ. and Wu MC. Differential effects of foods traditionally regarded as heating and cooling on prostaglandin E<sub>2</sub> production by a

- macrophage cell line. J. Biomed. Sci. 2002; 9: 596-606.
23. Kiemer AK, Muller C, Vollmar AM. Inhibition of LPS-induced nitric oxide and TNF- $\alpha$  production by  $\alpha$ -lipoic acid in rat Kupffer cells and in RAW 264.7 murine macrophages. Immunol. Cell Biol. 2002; 80(6): 550-557.
24. Kamdem RE, Sang S. and Ho CT. Mechanism of the superoxide scavenging activity of Neoandrographolide—a natural product from *Andrographis paniculata* Nees. J. Agric. Food Chem. 2002; 50: 4662-4665.
25. Kumar RA, Sridevi K, Kumar NV, Nanduri S. and Rajagopal S. Anticancer and immunostimulator compounds from *Andrographis paniculata*. J. of Ethnopharmacology. 2004; 92: 291-295.
26. Lee YS, Han OK, Yoo WK. and Kim HJ. Immunomodulatory effects of aqueous-extracted *Astragali* radix in methotrexate-treated mouse spleen cells. J. of Ethnopharmacology. 2003a; 84: 193-198.
27. Lin YL. and Lin JK. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of NO synthase by down-regulating LPS activity of NF- $\kappa$ B. Mol. Pharmacol. 1997; 52:465-472.
28. LoYC, Tsai PL, Huang YB, Shen KP, Tsai YH, Wu YC, Lai YH. and Chen IJ. San-Huang-Xie-Xin-Tang reduces ipopolysaccharides-induced hypotension and inflammatory mediators. J. of Ethnopharmacology. 2005; 96: 99-106.
29. Rao VSN, Paiva LA F, Souza MF, Campos AR, Ribeiro RA, Brito GAC, Teixeira MJ. and Silveira ER. Ternatin, an anti-inflammatory flavonoid, inhibits thioglycolate elicited rat peritoneal neutrophil accumulation and LPS activated nitric oxide production in murine macrophages. Planta Med. 2003; 69: 851-853.
30. Tammela T, Enholm B, Alitalo K. and Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. Cardiovascular Research. 2005; 65: 550-563.
31. Tseng J. and Chang JG. Suppression of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6 and granulocyte-monocyte colony stimulating factor secretion from human monocyte by an extract of *Poria cocos*. 1992; 25: 1-11.
32. Tsai HR, Yang LM, Tsai WJ. and Chiou WF. Andrographolide acts

- through inhibition of ERK1/2 and Akt phosphorylation to suppress chemotactic migration. *Eur. J. Pharm.* 2004; 498: 45-52.
33. Ukiya M. Inhibition of tumor-promoting effects by poricoic acids G and H and other lanostane-type triterpenes and cytotoxic activity of poricoic acid A and G from *Poria cocos*. *J. Nat. prod.* 2002; 65: 462-465.
34. Wallace JM. Nutritional and botanical modulation of the inflammatory cascade- eicosanoids, cyclooxygenases, and lipoxygenase-as an adjunct in cancer therapy. *Integrative Cancer Therapies.* 2002; 1(1): 7-37.
35. Xia YF, Ye BQ, Li YD, Wang JG., He XJ, Lin X, Yao X, Ma D, Slungaard A, Hebbel RP, Key NS. and Geng JG. Andrographolide attenuates inflammation by inhibition of NF- $\kappa$ B activation through covalent modification of reduced cysteine 62 of p50. *J. Immunol.* 2004; 173(6): 4207-4217.
36. Yang F, Villiers W, McClain C. and Varilek G. Green tea polyphenols block endotoxin induced tumor necrosis factor production and lethality in a murine model. *J. Nutr.* 1998; 128: 2334-2340.