

編號：DOH91-TD-158、CCMP92-RD-112、CCMP93-RD-102

從基因體學的層面探討雷公藤和漢防己甲素對 T 淋巴球活化的調節作用總報告

賴振宏

國防醫學院

摘 要

在治療自體免疫疾病的中藥中，首推雷公藤和漢防己甲素在動物和人體的實驗中做得最為透徹。除了治療關節炎，漢防己甲素也被證實可有效的治療矽土沉著病 (silicosis)。這兩種中藥雖然已被廣泛的用於臨床上治療病人，但一般醫藥學的研究者和社會大眾對它們的作用機轉並不十分清楚。過去幾年，我個人實驗室針對雷公藤和漢防己甲素對 T 淋巴球的免疫抑制作用機轉作了研究，而這部分的研究成果已被陸續刊登 (Ho et al., *Journal of Rheumatology*, 26:14-24, 1999; Ho et al., *European Journal of Pharmacology*, 367:389-398, 1999; Lai et al., *Transplantation*, 68:1383-1392, 1999; Lai et al., *Journal of Immunology* 166:6914-6924, 2001)。近幾年基因醫藥的發展日新月異，一個小小的基因晶片便可將許許多多的訊息囊括其中。因此，在後續的實驗計畫中，我們準備探討在眾多 T 淋巴球活化後表現的基因中，有哪些基因可被雷公藤和漢防己甲素所抑制。我們研究發現，漢防己甲素可以抑制至少數十種腫瘤壞死因子所活化的 T 淋巴球基因，以 RT/PCR 的方法也進一步證實這項發現。此外，我們也同時以分子生物學的方法 (譬如 electrophoresis mobility shift assay or EMSA) 分析漢防己甲素對不同刺激所導致 T 淋巴球活化的抑制機轉，實驗發現，漢防己甲素抑制的對象主要是 NF- κ B，西方墨點試驗的結果也顯示漢防己甲素能抑制活化 T 淋巴球中 I κ B α 的 degradation，而此現象主要是經由抑制 I κ B α kinase 的活性所造成。基因傳送的實驗也得到一致的結果。這部分研究成果已刊登在英國藥學雜誌。

其次，依評審委員的建議，第三年的研究計畫我們把重點放在探討雷公藤

的藥效和作用機轉上。這部分的研究證實雷公藤能很有效的抑制 T 淋巴球的活化，其中 NF- κ B 和 AP-1 扮演著同等重要的角色。

綜觀我們過去三年的研究成果有些許的進展，目前已有兩篇文章接受刊登（*Current Drug Metabolism* 2004；5：181-192；*British Journal of Pharmacology* 2004；143：919-927.）。此外另一篇文章也正在撰寫中，目前在猶豫是否要做得再深入些以便試投如 *Journal of Biological Chemistry* 或 *Molecular Pharmacology* 類的雜誌。

關鍵詞：漢防己甲素、人類 T 淋巴球、免疫調節效應、DNA 微陣列

Number: DOH91-TD-158、CCMP92-RD-112、CCMP93-RD-102

Investigation of the Immunomodulatory Effects of TWHf and Tetrandrine on T Lymphocytes Using Genomic Approaches

Jenn-Haung Lai

National Defense Medical Center

ABSTRACT

Among the Chinese herbs prescribed for rheumatic patients, tripterygium wilfordii Hook f and plant alkaloid tetrandrine are the two that received most extensive attentions from basic and clinical researchers. Aside from the treatment for arthritis, tetrandrine is also used for the therapy of silicosis. Although these two drugs are extensively used, their immunosuppressive mechanisms are far from understood. In past few years, we have been working on examining the molecular mechanisms of these two drugs on human peripheral blood T cells, the most important regulators in our immune system. The accomplishment of these works have been published in several renown journals (Ho et al, *J. Rheumatology*, 26:14-24, 1999; Ho et al, *Eur. J. Pharmacol.*, 367:389-398, 1999; Lai et al, *Transplantation*, 68:1383-1392, 1999; Lai et al., *J. Immunol.* 166:6914-6924, 2001). Since genomic medicine has become one of the major fields in both clinical and basic research, we sought to use microarray analysis to identify the genes regulated by tetrandrine and TWHf in activated human peripheral blood T cells. The information on the immunoregulatory effect of these drugs on specific T cell genes may provide further implication of the development of new drugs targeting the autoimmune diseases and graft rejections.

Keywords : tetrandrine, T cells, immunomodulation, genes, TWHf

壹、前言

自體免疫疾病的發生，到目前為止原因並不清楚。要完全根除有其困難。遠近的研究證實自體免疫疾病的發生與身體免疫系統異常的活化有關，活化的免疫反應，遂造成種種器官的破壞，如腎臟（紅斑性狼瘡、硬皮症）、肺臟（紅斑性狼瘡、硬皮症）、關節（如類風濕性關節炎、紅斑性狼瘡）、淚腺（修格連氏症候群）等。重要的是，得到自體免疫疾病後，就如同買了一張單程的車票，器官的破壞是只會越來越嚴重，而治療自體免疫疾病，目前僅能使用的藥物除了所謂的 DMARD（能調整疾病病程的抗風濕藥物）外就是類固醇，但效果依然有限。反之，中藥治療自體免疫疾病卻也有相當不錯的效果，比之西藥毫不遜色。

在治療自體免疫疾病的中藥中，首推雷公藤和漢防己甲素在動物和人體的實驗中做得最為透徹。雖然這兩種抗風濕中藥已被廣泛的用於臨床上治療病人，但一般醫藥學的研究者對它們的作用機轉並不十分清楚。雷公藤可以很有效的治療紅斑性狼瘡、類風濕性關節炎、乾癬性關節炎和其他的自體免疫疾病。過去幾年，我個人實驗室針對雷公藤對 T 淋巴球的免疫抑制作用機轉作了研究，我們發現，雷公藤能很有效的抑制 T 淋巴球的活化，在高濃度時也能導致 T 淋巴球的自然死亡，而這部分的研究成果已被陸續刊登⁽¹⁾。除了我們自己的研究證明雷公藤的效用外，國外也有相當多的研究肯定它在治療關節炎和用在抗移植排斥反應上的潛力。

漢防己甲素（Han-Fang-Chi），另一種傳統的抗風濕中藥，是由瓜巴藤類植物 *S.tetrandra* 的根部所取得，而漢防己甲素（tetrandrine）則是其主要具有生物效能的純化物質⁽²⁾。漢防己甲素的結構式 $C_{38}H_{42}O_6N_2$ 是一種 622.73 daltons 的藥物。它對鈣離子通道阻斷（calcium channel blocker）的功能已被廣泛的研究過⁽³⁾。除了漢防己甲素外，另有三種與它結構式相類似的藥物也有被分析過⁽⁴⁻⁶⁾。漢防己甲素被用來治療關節炎和矽土沉著症已有數十年的歷史，這兩種疾病都可以在其病兆處發現有免疫反應細胞浸潤的現象⁽⁷⁻¹⁰⁾。就矽土沉著症的療效機轉而言，漢防己甲素能抑制肺纖維母細胞的增生⁽¹¹⁾，減少肺泡第二型細胞粒線體的 ATP 合成⁽¹²⁾和對肺泡吞蝕細胞的毒殺作用⁽¹³⁾。就自體免疫疾病而言，漢防己甲素的療效可証實它對 B 淋巴球、吞噬細胞、單核球、中性球和巨大細胞的抑制作用⁽¹⁴⁻¹⁸⁾。我們的研究也顯示，漢防己甲素對於 T 淋巴球的抑制具有特異性，因為它只抑制 protein kinase C 的訊息傳導效應⁽¹⁹⁾。

進一步的剖析漢防己甲素及其三種結構相似物在自體免疫疾病及移植免疫的應用，我們的研究證實，這些藥物能有效的抑制 T 淋巴球 CD28 訊息刺激的效應，且與抗排斥的西藥環孢靈素 (cyclosporin A) 具有相當不錯的協同作用。尤有甚者，我們發現在漢防己甲素及其三種結構相似物中，Dauricine 的藥效最佳。因此，在未來治療自體免疫疾病及移植免疫的排斥反應中，這類中藥萃取物將有相當重要的潛力⁽²⁰⁾。

T 淋巴球的活化會刺激相當多分子的表現，經由這些分子的協同作用，最後導致 T 淋巴球的增生和釋放相當多種類的細胞間素。若能有效的抑制這些分子的活化，自然而然的就能抑制 T 淋巴球的活化，典型的例子是 Cyclosporin A、FK506 (抑制 Calcineurin) 和 Rapamycin (抑制 RAFT，進而抑制第二介白質導致 T 淋巴球的增生)。有鑑於 T 淋巴球活化的分子種類繁多，且有相當多分子的功能並不十分瞭解，以致於對藥物研發的進程產生不少的阻力。最近幾年基因晶片的快速發展對這個領域的研究產生了催化作用。因此，在這個計畫裡，我們想探討兩種免疫調節中藥漢防己甲素和雷公藤對 T 淋巴球活化分子的的影響，經由基因晶片的幫助，我們應能更進一步的瞭解這兩種藥物是如何調節 T 淋巴球的功能，作用的對象又是哪些？經由這些實驗的安排，我們也可以瞭解漢防己甲素及其類似結構的純化物在臨床免疫上的實用價值。藉由分析其結構式與免疫抑制作用間的關係，我們也希望進而能找到一種最有效能且副作用最少的漢防己甲素的類似結構物。這種藥物作用訊息的取得對未來藥物的研發，用於治療自體免疫疾病和減輕器官移植的排斥反應將能提供相當有力的證據。使用一些我們所相當熟悉的 *in vitro* 和 *in vivo* 的方法可以很有效的幫助我們解答這些問題。

我們研究最終的目的是想把有實用價值的中藥介紹給世人，並讓它融入西藥的治療計畫中。由於目前對自體免疫疾病係採用數種不同作用機轉的抗風濕藥物合併使用的方式治療，我們的結果確實顯示合併這些不同機轉的抗風濕中西藥物的治療應能得到協同的效果 (Lai et al., *Journal of Immunology* 166 : 6914-6924, 2001)。

貳、材料與方法

一、T細胞的分離

T細胞分離的方法已明載在我們已刊登的文章上⁽²⁰⁾。簡單來說，全血在經過 Ficoll-Hypaque 分離後，T細胞可經由負選擇的方法純化出來，此種方法可得到大於百分之九十五純化的 T細胞。

二、基因微陣列

這一部份的實驗基本上將在本院基因研發中心陳振漢主任醫師及 ABC 基因生化科技公司的協助下完成（如附圖）。簡單的實驗過程如下。將包括將近五萬個不同基因的 cDNA clones 很平均的點在晶片上。在經過前置雜交（prehybridization）的過程後，由 RNA 中轉錄取得且經標誌的 cDNA 探針將與此晶片上的 cDNA 作用，經過陸續的清洗過程後，不同程度表現的基因將可經由儀器的判讀中找出其差異。

三、細胞間素的測定

在經過刺激後的細胞上清液，我們將予收集，以 ELISA 的方法測定細胞間素的量，此法已在本實驗室中順利的發展出來（如刊登的文章，Ref. 21）。

四、細胞質和細胞核內的蛋白質的分離

細胞質和細胞核內的蛋白質的分離如 Dignam 等人所述而其詳細的做法也已詳錄在我們曾經刊登的文章上^(22, 23)。簡單而言，細胞在緩衝溶液 A（10mM HEPES, pH 7.9, 10mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 1mM Dithiothreitol (DTT), 1mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 3.3μg/mL Aprotinin）約 15 分鐘，經每分鐘 14,000 轉的轉速離心後收集其上清液便得細胞質內的蛋白質。在經過清洗後，在離心後的沉澱物中加入緩衝溶液 C（20mM HEPES, pH 7.9, 420mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 25% Glycerol, 1mM DTT, 0.5mM PMSF, and 3.3 μg/mL Aprotinin）約 30 分鐘，經每分鐘 14,000 轉的轉速離心後收集其上清液便得細胞核內的蛋白質。

五、西方墨點試驗（Western Blotting）

測試 Rel/NF-κB 在細胞質和細胞核內的活動情形和 ERK 活性的方法除了免疫沉澱激活分析法外，也可用 ECL 西方墨點試驗。ECL

西方墨點試驗是依據我們曾經刊登的文章⁽²⁴⁾。簡單的描述，細胞質和細胞核內的蛋白質經過電泳分析 (SDS-PAGE) 後予以依不同的分子量而分離，這些蛋白質分子將被移送 (Transfer) 至 Nitrocellulose 濾紙，將抗 Rel/NF- κ B 或 I κ B α 或 ERK 的抗體加入浸有濾紙的緩衝液中，依 ECL 製造公司的指示，在加入受質 (Substrate) 後顯影於 X 光片。

六、電泳移動法 (Gel-shift assay)

這方法已詳載在我們以前所刊登的文章中⁽²⁵⁾，簡單的說，在經過細胞核與細胞質成分分離的手續後，細胞核的蛋白質將與 ³²P 放射線標記的去氧核糖核酸片段混合在一起，在經過作用後，混合物會被電泳分析的方法予以分隔開來，如果混合的細胞核蛋白質中含有可與標誌的去氧核糖核酸結合的成分，我們便可以偵測到一移動較為緩慢的 band。

七、反轉錄酶/聚合酶鏈反應 (RT/PCR)

RT/PCR 的方法將被用來半定量訊息核糖核酸 (mRNA) 的量，這方法本實驗室已相當熟悉 (如我們已刊登的文章上, ref. 21)，簡單的說，RNA 將以自 Gibco 購買來的 kit 從細胞中分離出來，依照廠商所提供的操作手冊，一些細胞間素如 IL-4、IL-10、IL-12、INF- α 和 TNF- α 的兩側 (5'端與 3'端) primer 將被用來放大 (amplify) 這些細胞間素的訊息核糖核酸在經過約 30-35 cycle 的放大後將以 agarose gel 和 ethidium bromide 染色來分析其強弱。

八、流式細胞儀的測定

這方法已詳載在我們刊登的文章中⁽²⁶⁾。簡言之，細胞表面和細胞裡面的蛋白分子可以用帶有螢光染劑的專一抗體予以標誌，其表現量的多寡可以用流式細胞儀加以測定。

參、結果與討論

綜觀我們過去三年的研究成果有些許的進展，目前已有兩篇文章接受刊登 (Current Drug Metabolism 2004; 5: 181-192; British Journal of Pharmacology 2004;143:919-927.)。此外另一篇文章也正在撰寫中，目前在猶豫是否要做得再深入些以便試投如 Journal of Biological Chemistry 或 Molecular Pharmacology 類的雜誌。

這一系列的研究除了延續我們早期對漢防己甲素及雷公藤對 T 細胞的細胞層次的效應外，我們也進一步剖析這個藥物對細胞內重要的訊息傳導物質的效用及作用的機轉，此外，經由基因體層面的分析更有助於讓我們了解漢防己甲素及雷公藤是如何經由調控這許許多多的 T 細胞活化相關的因子，進而達到它治療的目的和效用，我們分析這些基因的調控，除了更讓我們了解與 T 細胞活化的因子有關的一些蛋白質外，也更讓我們了解中藥在未來治療人體免疫疾病的潛在效力。

肆、結論與建議

研究本身必須有其持續性，建議可以考慮依國科會的模式，以連續型的計畫為主，一旦通過，不需每年都要申請，計畫期間，每年以繳報告的形勢為之，如此可減少計畫主持人的負荷，讓計畫主持人間接有較充裕的時間增加其產能。

此外，雖是中藥的計畫，但考量文章的發表，建議計畫和報告也可考慮接受以英文書寫，增進效能。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP93-RD-102 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. Ho, L.J., C. D.M., M.L. Chang, S.Y. Kuo, and J.H. Lai. 1999. Mechanism of immunosuppression of antirheumatic herb TWHf in human T cells. *J. Rheumatol.* 26: 14-24.
2. Feng, Y.X. and H. Chen. 1985. Pharmacognostic and chemical identification of Fang Ji (*Stephania tetrandra*). *Chin. J. Pharm. Anal.* 5: 28-31.
3. Kwan, C.Y. 1996. Tetrandrine: an anti-hypertensive drug with Ca^{2+} antagonistic action: effects on vascular smooth muscle and adrenal gland. In *Adrenal glands, vascular system and hypertension*, eds. GP Vinson and DC Anderson. *J. Endocrinol. Ltd, Bristol, UK*, p 103-114, 1996.
4. Leung, Y.M., C.Y. Kwan, and T.T. Loh. 1994. Dual effects of tetrandrine on cytosolic calcium in human leukaemic HL-60 cells: intracellular calcium release and calcium entry blockade. *Br. J. Pharmacol.* 113: 767-774.
5. Low, A.M., M. Berdik, L. Sormaz, S. Gataiance, M.R. Buchanan, C.Y. Kwan, and E.E. Daniel. 1996. Plant alkaloids, tetrandrine and hernandezine, inhibit calcium-depletion stimulated calcium entry in human and bovine endothelial cells. *Life Sci.* 58: 2327-2335.
6. Leung, Y.M., Y.J. Ou, C.Y. Kwan, and T.T. Loh. 1997. Specific interaction between tetrandrine and Quillaja saponins in promoting permeabilization of plasma membrane in human leukemic HL-60 cells. *Biochim. et Biophys. Acta.* 1325: 318-328.
7. Li, Q.L., Y.H. Xu, Z.H. Zhon, X.W. Chen, X.G. Huang, S.L. Chen, and C.X. Zhan. 1981. The therapeutic effect of tetrandrine on silicosis. *Chin. J. Tuberc. Res. Dis.* 4: 321-328.
8. Castranova, V., J.H. Kang, M.D. Moore, W.H. Pailles, D.G. Frazer, and D. Schwegler-Berry. 1991. Inhibition of stimulant-induced activation of phagocytic cells with tetrandrine. *J. Leukoc. Biol.* 50: 412-422.
9. Kang, J.H., D.M. Lewis, V. Castranova, Y. Rojanasakui, D.E. Banks, J.Y.C. Ma, and J.K.H. Ma. 1992. Inhibitory action of tetrandrine on macrophage production of interleukin 1 (IL-1)-like activity and thymocyte proliferation. *Exp. Lung Res.* 18: 719-733.

10. Chang, H.M. and P.H. But. 1987. Pharmacology and application of chinese materia medica (Vol. I & II). World Scientific Publishing Co. Ltd. Singapore/Philadelphia PA. USA.
11. Reist, R.H., R.D. Dey, J.P. Durham, Y. Rojanasakul, and V. Casiranova. 1993. Inhibition of proliferative activity of pulmonary fibroblasts by tetrandrine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 122: 70-76.
12. Miles, P.R., L. Bowman, J.K.H. Ma, and J.Y.C. Ma. 1993. Alterations in alveolar type II cell metabolism induced by tetrandrine and other alkaloids. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 119: 142-149.
13. Pang, L. and J.R.S. Hoult. 1997. Cytotoxicity to macrophages of tetrandrine, an antisilicosis alkaloid, accompanied by an overproduction of prostaglandins. *Biochem. Pharmacol.* 53: 773-782.
14. Seou, W.K., S.Y. Li, and Y.H. Thong. 1986. Inhibitory effects of tetrandrine on human neutrophil and monocyte adherence. *Immunol. Lett.* 13: 83-88.
15. Seou, W.K., A. Ferrante, D.B.H. Goh, A.H. Chambers, S.Y. Li, and Y.H. Thong. 1988. In vitro immunosuppressive properties of the plant alkaloid tetrandrine. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 85: 410-415.
16. Teh, B.S., W.K. Seou, A.H. Chambers, S. Playford, B. Ioannoni, and Y.H. Thong. 1988. Inhibition of histamine release from rat mast cells by the plant alkaloid tetrandrine. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 86: 220-224.
17. Ferrante, S., W.K. Seou, B. Rowan-Kelly, and Y.H. Thong. 1990. Tetrandrine, a plant alkaloid, inhibits the production of tumor necrosis factor-alpha (cachectin) by human monocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 80: 232-235.
18. Chang, D.M., W.Y. Chang, S.Y. Kuo, and M.L. Chang. 1997. The effects of traditional antirheumatic herbal medicines on immune response cells. *J. Rheumatol.* 24: 436-441.
19. Ho, L.J., D.M. Chang, T.C. Lee, M.L. Chang and J.H. Lai. 1999. Plant alkaloid tetrandrine downregulates protein kinase C-dependent signaling pathway in T cells. *Eur. J. Pharm.* 367/2-3: 389-398.
20. Lai, J.H., L.J. Ho, C.Y. Kwan, D.M. Chang and T.C. Lee. 1999. Plant alkaloid and its analog block CD28 costimulation in human peripheral blood T cells: Potential immunosuppressant in transplantation immunology. *Transplantation*

- 68: 1383-1392.
21. Ho, L.J., J.J. Wang, M.F. Shaio, C.L. Kao, D.M. Chang, and J.H. Lai. 2001. Induction of maturation and inhibition of cytokine production in human dendritic cells infected by dengue virus. *J. Immunol.* 166: 1499-1506.
 22. Lai, J.H., G. Horvath, Y. Li, and T.H. Tan. 1995. Mechanisms of enhanced nuclear translocation of transcription factors c-Rel and NF- κ B by CD28 costimulation in human T lymphocytes. *Ann. New York Aca. Sci.* 760: 220-223.
 23. Bryan, R. G., Y. Li, J.H. Lai, M. Van, N. R. Rice, R. R. Rich, and T.H. Tan. 1994. The effect of CD28 signal transduction on c-Rel in human peripheral blood T cells. *Mol. Cell. Biol.* 14: 7933-7942.
 24. Lai, J.H. and T.H. Tan. 1994. CD28 signaling causes a sustained down-regulation of I κ B α which can be prevented by the immunosuppressant rapamycin. *J. Biol. Chem.* 269: 30077-30080.
 25. Lai, J.H., G. Horvath, J. Subleski, J. Bruder, P. Ghosh, and T.-H. Tan. 1995. RelA is a potent transcriptional activator of the CD28 response element within the interleukin 2 promoter. *Mol. Cell. Biol.* 15: 4260-4271.
 26. Ho, L.J., K.C. Lu, H.C. Lin, D.M., Chang, S.H. Han, and J.H. Lai. 2001. Western and Chinese antirheumatic drug-induced T cell apoptosis involves utilization of different caspase-dependent pathways and is independent of Fas/Fas ligand interaction. *J. Immunol.* 166: 6914-6924.