

編號：CCMP93-RD-005

# 應用專一高效能之人類白血球功能 檢驗法評估具抗發炎及免疫增強作用之 中草藥並以動物試驗確認藥效

沈郁強

國立中國醫藥研究所

## 摘 要

本計畫以人類白血球建立專壹高效能之抗發炎及抗氧化細胞評估方法，快速驗證具抗發炎之中草藥，可進一步研究藥物標的或機轉，或再以動物試驗確認藥效。方法是以分離之人類嗜中性球 (PMN) 或單核球 (MNC) 探討單複方中 (草) 藥可否抑制體外人類 PMN 及 MNC 之活化，包括製造活性氧屬自由基 (reactive oxygen species; ROS)、細胞緊密黏著 (firm adhesion)、黏著分子 (Mac-1) 表現、細胞鈣離子內流 (calcium influx) 等。評估之中草藥包括清熱燥濕之黃芩、黃連、黃柏，抗病毒之金銀花、板藍根，含黃芩之複方包括：黃連解毒湯、龍膽瀉肝、普濟消毒飲及不含黃芩之玉女煎、知柏地黃丸等共 10 種中藥濃縮製劑。我們分離之 PMN 及 MNC 純度分別可達 95% 及 85% 以上。於抗 ROS 之實驗中，不管是對接受體依賴型 (fMLP-induced) 或是蛋白激酶 C 依賴型 (PMA-mediated) 之 PMN 及 MNC 活化，皆以黃芩、普濟消毒飲、黃連解毒湯三方之抑制能力最強， $IC_{50}$  約為 5-10  $\mu\text{g/ml}$ 。正對照標準品 baicalein (黃芩素) 之  $IC_{50}$  約為 7-11  $\mu\text{g/ml}$ 。對照複方成份之普濟消毒飲、黃連解毒湯接含黃芩，因此黃芩、普濟消毒飲、黃連解毒湯三方抗 ROS 之作用應與 baicalein 含量正相關。清熱滋陰之玉女煎、知柏地黃丸之  $IC_{50}$  較高為 20-30  $\mu\text{g/ml}$ 。板藍根 (10-50  $\mu\text{g/ml}$ ) 對 MNC 之 ROS 製造反而有促進之作用，因此對提升刺激免疫發炎反應有促進作用。金銀花則無此免疫促進作用。進一步分析 PMN 之緊密黏著及黏著分子 Mac-1 表現，發現確實可以反

應上述黃芩、普濟消毒飲、黃連解毒湯三方之抗發炎作用，它們在 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  都可顯著抑制 (50-80%) PMN 之緊密黏著及黏著分子 Mac-1 表現。以 Fura2 及 Fura3 研究這 10 種藥方對細胞鈣離子內流之影響，結果並不一致。因為藥方多為黃色，因 Fura3 較不受顏色影響，因此依據 Fura3 之結果我們認為這些藥方單獨會提升細胞鈣離子內流；黃芩及板藍根可抑制發炎刺激物 fMLP 誘發之細胞鈣離子內流。結論我們成功建立系列人類白血球發炎篩選藥物模式包括活性氧屬自由基 (ROS)、細胞緊密黏著、黏著分子 (Mac-1) 表現、活化鈣離子之細胞內流。比較三種 ROS 偵測方式 (冷光、螢光、可見光) 以冷光方式最為敏感，適合研究抗發炎作用。應用於分析臨床方劑，研究對清熱燥濕藥之分析顯示它們對人類白血球發炎自由基及緊密黏著、黏著分子表現有較一致之抑制效果，並與已發表之結果吻合 (baicalein/黃芩)。另外篩選得本所分離抗發炎新成份包括乳藤、牛樟芝及一些野生磨菇類成份約 10 餘種。

關鍵詞：嗜中性球、單核球、活性氧屬自由基、黏著分子、黃芩素、黃連解毒湯、普濟消毒飲

Number:CCMP93-RD-005

# **Evaluation and Mechanism(s) Studies of the Principles or Extracts Isolated from Traditional Chinese Medicine for the Anti-inflammatory and Immuno-modulating Potential by Specific and High Performance Cellular and Animal Model**

Yuh-Chiang Shen

National Research Institute of Chinese Medicine

## **ABSTRACT**

In the present project we set up series of *in vitro* specific and high-performance functional assays by human leukocyte as acute inflammatory cellular models for the elucidation of anti-inflammatory drugs from natural products and traditional Chinese medicine (TCM). These models include reactive oxygen species (ROS) production, firm adhesion, adhesion molecule (e.g., Mac-1) up-expression, and intracellular calcium mobilization. All of which were important inflammatory responses by human leukocytes. Based on these models, we could either screen/select potential herb or components easily, or study the mechanisms of action in mediating the anti-inflammatory effect by the TCM or natural products. First of all, we have successfully purified human neutrophils (PMN) and mononuclear cells (MNC) from peripheral whole blood with purity more than 95% and 85%, respectively. Six TCM remedies, either single or multiple component(s), with heat-clearing and damp-drying (清熱燥濕) activity

were selected including *Radix Scutellariae* (黃芩), *Rhizoma Coptidis* (黃連), *Cortex Phellodendri* (黃柏), Pu-chi-siou-du-in (普濟消毒飲), Hung-lian-gia-du-tan(黃連解毒湯), and Long-dan-shae-gan-tan(龍膽瀉肝湯). Two herbal drugs with anti-virus activity—*Radix Isatidis* (板藍根) and *Lonicerae Flos* (金銀花), and two TCM remedies for nourishing Yin and falling fire (滋陰降火)—*Yu-nue-gen* (玉女煎) and *Zu-po-di-huang-wan* (知柏地黃丸) were also included as reference drugs. For the anti-ROS activity, *Radix Scutellariae* (黃芩), Pu-chi-siou-du-in (普濟消毒飲), and Hung-lian-gia-du-tan (黃連解毒湯) were all effective in the inhibition of fMLP (receptor-mediated) - and PMA (PKC-activated) -induced ROS production both in PMN and MNC with 50% inhibition concentration ( $IC_{50}$ ) around 5-10  $\mu\text{g/ml}$ . Baicalein, a known active standard from *Radix Scutellariae* as a positive control, also significantly prevents fMLP- and PMA-induced ROS production by PMN and MNC with  $IC_{50}$  around 7-11  $\mu\text{g/ml}$ . Since *Radix Scutellariae* (黃芩), Pu-chi-siou-du-in (普濟消毒飲), and Hung-lian-gia-du-tan (黃連解毒湯) all contain baicalein, it is possible that baicalein plays a dominant role in the inhibition of ROS production by human leukocytes. Actually, we have previously reported that baicalein could interfere leukocyte activity through a G-protein dependent calcium influx pathway. The remedies for nourishing Yin and falling fire—*Yu-nue-gen* (玉女煎) and *Zu-po-di-huang-wan* (知柏地黃丸) -were relative less effective than the above mentioned heat-clearing and damp-drying drugs with  $IC_{50}$  more than 20  $\mu\text{g/ml}$ . Notably, the anti-virus drug—*Radix Isatidis* (板藍根), but not *Lonicerae Flos* (金銀花), could enhance the ROS production by MNC illustrating that the immuno-enhancing activity of *Radix Isatidis* may correlate with its ROS promoting activity by MNC. Furthermore, anti-firm adhesion and anti-Mac-1 up-expression studies also reveals that *Radix Scutellariae* (黃芩), Pu-chi-siou-du-in (普濟消毒飲), and Hung-lian-gia-du-tan (黃連解毒湯) all exhibit promising effect in these two models at 50  $\mu\text{g/ml}$  examined. For intracellular calcium signaling, we did not find good correlation of the anti-inflammatory effect by these effective drugs in fMLP-induced intracellular calcium mobilization model, either estimated by Fura2- or by Fura3-loaded PMN. In conclusion, we have successfully set up series of specific inflammatory models for the evaluation of TCM remedies and herbal or natural drugs. Based on these models, especially the ROS production detected by a chemi-luminescence-enhanced method, we could properly predict the anti-inflammatory potential of TCM remedies. The anti-inflammatory activity of the heat-clearing and damp-drying (清熱燥濕) drugs could be explained by their active component-baicalein, which has been reported to be an effective anti-

inflammatory drug in our previous study. We also find 10 more new fractions/components from *Antrodia camphorata* (牛樟芝) and *Parsonsia laevigata* (乳藤) by these methods.

Keywords : neutrophil, mononuclear cell, inflammation, reactive oxygen species (ROS) , baicalein

## 壹、前言

中醫藥 (traditional Chinese medicine; TCM) 及天然物為本國特有之資產，不僅有其特殊醫療地位與療效，更逐漸為國際瞭解與重視，身為中醫藥研究之一份子，吾人有責任把中醫藥之內容去蕪存菁，把最科學可經驗證之一面重新研究整理以符現代科學之精神。本計畫擬以多年之經驗於上述兩大主題先從篩選有效藥方包括單複方藥物，再深入尋求可能分子機制或標的。本研究室於此方面已有多年經驗及良好研究模式基礎，並有相關國際著作多篇發表受肯定，相信持續於此目標繼續努力，當可拋磚引玉，令中醫藥及天然物之研究更為國際重視及欣然接受。本計畫擬研究之中草藥包括：

- 一、清熱燥濕類：單味藥如黃芩、黃連、黃柏等；複方如：黃連解毒湯、普濟消毒飲、龍膽瀉肝湯。
- 二、滋陰降火類：玉女煎、知柏地黃丸。
- 三、抗病毒類：如金銀花、板藍根。
- 四、本所研究員特別提供研發類：牛樟芝 (*Antrodia. camphorata*)、乳藤 (*Ecdysanthera utilitis*) 等。
- 五、具抗發炎中藥之已知主成份：如 baicalein (黃芩)、quercetin、taxifolin、tetrandrine (防己)、sinomenin (青風藤)、andrographolide (穿心蓮)、apocynin (胡黃連) 等植物性抗氧化/抗發炎劑做正對照標準品。

由於最近回顧文獻指出 (Middleton et al., 2000) 來自天然物之許多純化物確實對人類之發炎、心血管疾病、以及癌症具有預防治療作用，亦可驗證於分子機制 (molecular mechanisms)。本人研究人類白血球細胞之免疫調節及發炎機制多年，發現許多天然藥用植物及傳統中藥之粗抽成份及其純化物能強化或修正 (平衡) 免疫系統，很有潛力對免疫失調之病症提供預防及治療之新方向。透過設計指標性反應 (specific response as a marker) 之相關細胞實驗及動物實驗，可有效分析並檢驗出具研究開發之中藥或天然物。近期 Nature 文獻壹系列報導指出發炎 (inflammation) 與諸多疾病如癌症 (cancer) (Coussens & Werb, 2002)、動脈粥狀病變 (atherosclerosis) (Libby, 2002)、中樞神經退化 (Weiner & Selkoe, 2002) 及敗血症 (sepsis) (Cohen, 2002) 等彼此密切相關，足見免疫失調所衍生之病症是複雜、系統性的非只單純 anti-inflammation 可解決。本研究室擬建立系列相關之研究模式包括：(1) 免疫抑制抗發炎之細胞及動物研究模式及 (2) 免疫提升抗癌之細胞研究模式，除深入探討上述病症與發炎之關係及關鍵機制 (key mechanism)，並期望從

中藥或天然物中找到有效之免疫調理成份，以對上述疾病有所助益。

多形核嗜中性白血球（簡稱嗜中性球；PMN）為宿主重要防禦者，其正常浸潤（infiltrate）發炎區是宿主抵禦細菌感染的重要程序之一，但當發炎物質排除時此發炎機制應受到控制而使發炎反應解除（resolution），若此控制機制失當則造成過度發炎反應，導致組織傷害毀損及許多嚴重的發炎疾病，例如成人呼吸窘迫症候群（adult respiratory distress syndrome; ARDS）、系統性血管炎（systemic vasculitis）、缺氧再灌注性傷害（ischemia/reperfusion injury; I/R injury）等（Hellewell & Williams, 1994）。嗜中性球浸潤作用之重要性可由白血球黏著不全症（leukocyte adhesion deficiency; LAD）加以說明，這種病人因白血球缺乏黏著分子（adhesion molecule）CD11/CD18（Mac-1）而無法有效浸潤發炎區，結果導致病人致命之細菌重複感染（Anderson & Springer, 1987）。黏著與黏著分子於發炎之角色（Role of firm adhesion and adhesion molecules）：嗜中性球要能由血液循環進入發炎組織，決定於它是否感應得到組織之趨化物質如 PAF、LTB<sub>4</sub>（Rossi & Hellewell, 1994），因趨化物質可活化嗜中性球令其產生趨化運動（chemotaxis）——亦即嗜中性球在快速血液循環中（嗜中性球每秒移動 1-2 mm）能「貼（adhere）」上血管內皮細胞，接著與內皮細胞進行緊密黏著（firm adhesion），藉由改變細胞骨架形態然後變形（deformability），由內皮細胞間隙中滲出逆著（migration up）趨化物質濃度梯度遷徙到發炎區域（Edwards, 1994a）。嗜中性球  $\beta_2$  integrins（CD18）的重要性： $\beta_2$  integrin 在嗜中性球各種活性表現中扮演極關鍵的角色，尤其是 Mac-1（CD11b/CD18），可由白血球黏著不全症（LAD）這種疾病再加以說明；此疾病患者因染色體缺陷位置不同又可分為 LAD-1 及 LAD-2 兩型（Fischer et al., 1988）。LAD-1 是染色體 21q22.3 的突變引起，發生機率約百萬分之一。突變結果造成 CD18（integrin  $\beta$  次單元）無法正常製造，可能原因是不能製造 CD18 的 mRNA，或是不能進行轉譯後 CD18 的修飾（post-translational modification），使得 CD18 結構不穩定，連帶影響 CD11 無法以穩定單體（monomer）存在，故 LAD-1 病人的白血球也無法偵測到 CD11，因此病人的嗜中性球根本無法進行緊密黏著（Malech & Nauseef, 1997）。LAD-2 基因缺陷之位置不明，主要生化缺陷是細胞膜蛋白無法進行醣化（glycosylation），無法合成與 selectin 結合之對等接受體醣基部份，最後影響嗜中性球滾動（rolling）（Malech & Nauseef, 1997）。若此兩類黏著分子缺陷，皆使得嗜中性球無法黏著及轉移到發炎區，若嚴重  $\beta_2$  integrin 缺陷（嗜中性球表現  $\beta_2$  integrin 小於 10%），病人四分之三將於十歲前死於細菌感染（Anderson et al., 1985）。嗜中性球之呼吸暴增現象（respiratory burst）：1932 年 Baldrige 及 Gerard 兩位學者首先觀察到嗜中性球吞噬細菌的過程會伴隨著周遭液體溶氧消耗暴增現象他們稱為

「呼吸暴增」(Baldrige & Gerard, 1933)。後證實此呼吸暴增現象乃由於致發炎物質 (e.g., fMLP or PMA) 活化了嗜中性球細胞膜上之氧化酶 (oxidase) 而把大量氧分子還原成超氧陰離子 (superoxide anion) 時所耗掉 (Sbarra & Karnovsky, 1959); 此酶已證實是 NADPH oxidase (Rossi, 1986), 並普遍存在吞噬性細胞如嗜中性球 (PMN)、單核球 (MNC)、巨噬細胞 (macrophage)、嗜酸性球以及少部份未成熟的 B 淋巴球 (Maly et al., 1988)。

我們先前以人類 PMN or MNC 進行免疫抑制抗發炎作用機制探討, 已得知 baicalein 對 fMLP、PMA 誘發 PMN 緊密黏著 (firm adhesion) 及黏著蛋白 Mac-1 ( $\beta 2$  integrin) 表現有顯著抑制。進一步確認此黏著作用與「ROS 產生」及「calcium mobilization」密切相關, 此二訊息皆是造成 Mac-1 表現增加之重要機制。baicalein 可抑制此二訊息, 故能抑制 PMN 之 Mac-1-dependent 之 firm adhesion。baicalein 之作用亦與 G 蛋白 (G protein) 抑制有關, 可能經由其抑制白血球 ROS 產生, 而抑制 Mac-1 表現及黏著作用, 達其抗發炎作用 (Shen et al., 2001; 2003)。我們也已證實 tetrandrine (TTD) 及 andrographolide (Agp) 能抑制白血球 ROS 產生等發炎作用 (Shen et al., 1999; 2002)。本年度計畫擬透過這些發炎指標性反應 (specific inflammatory responses as markers) 之相關細胞實驗, 包括: 由人類白血球分離嗜中性球 (PMN) 及單核球 (MNC)、中藥抗活性氧屬自由基 (ROS)、中藥抗嗜中性球緊密黏著、中藥抗 Mac-1 黏著分子表現、中藥抗鈣離子內湧有效分析並檢驗出具研究開發之中藥或天然物。



## 貳、材料與方法

### 嗜中性球 (PMN) 及單核球 (MNC) 之的製備

從健康成人志願者採集靜脈血液，以肝素 (20 unit/ml) 當抗凝血劑。嗜中性球的分離採用 Ficoll 梯度離心法，離心後以低張溶液把殘留的紅血球漲破去除 (Boyum, 1974)。簡述如下：於 50 ml 離心管混合等體積之血液及 3% dextran，室溫中靜置 20-30 分鐘待大部分紅血球沉降後，小心收集上層富含白血球之血漿在 4°C，250 × g 離心 15 分鐘，收集細胞沉澱物打散以 PBS 重新懸浮 (約 8 ml)。把此細胞懸浮液輕輕注入事先裝有 6 ml，密度為 1.077 g/ml 之 Ficoll 溶液 (Histopaque 1077, Sigma) 上層，注意此二層溶液不能稍有混雜，以免後續白血球分離不完全。再於 20°C，400 × g 連續離心 40 分鐘，去除上層所有液體，所留下之細胞沉澱物便是嗜中性白血球，參雜些許紅血球。打散細胞沉澱物以 6 ml 的 0.2% NaCl 加以懸浮 30 秒，迅速加入 6 ml 的 1.8% NaCl 使溶液回復等張，此時紅血球幾乎完全漲碎，再於 20°C，120 × g 離心 3 分鐘，所得細胞沉澱物以 PBS 清洗一次，最後取 1-2 萬顆細胞用細胞離心製片機 (cytospin) 打片經，Giemsa 溶液染色，在顯微鏡下觀察細胞型態，做細胞純度檢驗，幾乎完全是多核的嗜中性球，純度一般大於 95%。經製備好之嗜中性球最後懸浮於 HBSS 溶液中備用，一般細胞濃度調整為  $1-2 \times 10^6$ /ml。單核球 (MNC) 則由二層溶液中間之 buffy coat 層分離出後經 PBS 清洗後備用。以下所有實驗除特別說明外，藥物與細胞懸浮液反應的體積比為 1:100 (10  $\mu$ l 藥液 in 1.0 ml 細胞懸浮液)。

### 白血球 ROS (reactive oxygen species) 產量的測量

細胞外超氧離子 ( $O_2^{\cdot -}$ ) 含量的測量方法乃是根據實驗室先前報告吸光值的方法 (Shen et al., 2001) — 以待測顆粒或 PMA (2.5  $\mu$ g/ml) 或 fMLP (1  $\mu$ M) 誘發白血球產生的超氧離子可以藉由計算「超氧歧化酶可抑制的細胞色素 c 之還原 [superoxide dismutase- (SOD) inhibitable cytochrome c (80  $\mu$ M) reduction] 而得。當我們分別在有或無 SOD (133 U/ml) 存在的狀態下去計算 550 nm 吸光值的變化 ( $\Delta OD_{550}$ ) 時，細胞外超氧離子 ( $O_2^{\cdot -}$ ) 含量可以表示為  $O_2^{\cdot -}$  nmol/ $2 \times 10^5$  cells，cytochrome c 所使用的莫爾係數 (molar extinction coefficient) 為  $2.1 \times 10^4$  L/mole/cm，所用之路徑長度 (path length) 為 8 mm。

或以冷光 (chemiluminescence) 方法測量 — 加 10  $\lambda$  待測顆粒 (1-100  $\mu$ g/ml) 於 96-well plate 中 (control 及 PMA/FMLP 則以 10  $\lambda$  HBSS 取代之)，加 50  $\lambda$

PBMC or PMN cell ( $1 \times 10^7/\text{ml}$ ) 於 96-well plate 中 (細胞須事先回溫), RT mix 15min 加 50  $\lambda$  lucigenin, RT mix 10min 加 50  $\lambda$  PMA/FMLP 於 96-well plate 中 (control 不加之, 以 50  $\lambda$  HBSS 取代之) 於冷光偵測機 (Orion<sup>TM</sup>, Germany) 測冷光值。

或以螢光之方法—根據 Robinson 等學者 (1994) 所發表以流式細胞儀分析細胞內活性氧屬 (包括  $\text{O}_2^{\cdot-}$  及  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 的測定。取 1.5 ml 細胞懸浮液 ( $2 \times 10^6/\text{ml}$ ) 與 1.5  $\mu\text{l}$  之 20 mM DCFH-DA (Molecular Probe) 於 37°C 培浴 5 分鐘, 接著加入 1.5  $\mu\text{l}$  之 10 mM HE (Molecular Probe) 繼續培浴 15 分鐘。DCFH-DA 可穿透細胞膜進入細胞, 其乙醯殘基可被酯解 切除留下不能穿透細胞膜之 DCFH, 當 DCFH 與  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用會氧化成 DCF, 經流式儀激發後可在波長 525 nm (FL1) 接收到螢光。HE 本身可直接進入細胞, 當被超氧離子氧化形成 EB 時會嵌入 DNA, 可於波長 590 nm (FL2) 偵測到螢光。經上述 DCFH-DA 及 HE 標示過之細胞, 以厚朴酚預處理 10 分鐘, 再經 PMA 激發而產生大量之  $\text{H}_2\text{O}_2$  及  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , 藉由上述反應產生 DCF 及 EB, 由螢光強度變化之監測來反推  $\text{H}_2\text{O}_2$  及  $\text{O}_2^{\cdot-}$  的相對含量, 以流式細胞儀偵測之螢光峰值表示。

### 嗜中性球黏著 (firm adhesion) 之測定

嗜中性球黏著為其活化之特性, 以 PMA 活化嗜中性球黏著測定如下: 先用 250  $\mu\text{l}$  纖維蛋白原 (fibrinogen) (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  溶於 PBS 中) 置入 24 孔的組織培養盤中, 於室溫中約培置兩小時後使纖維蛋白原覆蓋於盤面, 吸除上層多餘液體以 HBSS 清洗一次, 用 1% BSA 做盤面 blocking 處理, 以免細胞與盤面產生非選擇性黏著。經 blocking 一小時後以含 0.1% tween-20 之 HBSS 清洗二次, 不含 tween-20 之 HBSS 清洗一次, 如此便完成培養盤之前處理。製備好之嗜中性球懸浮液 1.0 ml ( $5 \times 10^5/\text{ml}$ )。輕輕加入培養盤中, 預先和待測藥品 (最終濃度 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 於 37°C 培置 10 分鐘, 再與 PMA (100 ng/ml) 於 37°C 反應 15 分鐘。將未黏著細胞完全吸除, 並輕輕以 500  $\mu\text{l}$  溫 PBS (含 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) 清洗兩次。黏著在盤面的細胞用 0.25% 之 rose bengal (Jeng et al., 1996) 溶液於室溫中染色 10 分鐘。吸除多餘的染色液, 盤面以 PBS 清洗兩次, 最後用 250  $\mu\text{l}$  之 50% 乙醇溶液於 37°C 培置 30 分鐘溶出吸附於細胞之 rose bengal 染劑, 待所有染劑已完全溶出後, 取 200  $\mu\text{l}$  於 96 孔盤中以 micro-plate reader (EL311sx) 於波長 570 nm 測定溶液 OD 值, 扣除溶液背景吸光值即為測定值, 最後以  $\text{OD}_{570} \times 100$  當成細胞黏著程度之量化指標。

## 嗜中性球表面黏著分子 Mac-1 表現之測量

嗜中性球之黏著主要依賴表面黏著分子 Mac-1 之表現，Mac-1 的表現是採 Endemann 等學者 (1996) 的方法略微修改後加以應用。經厚朴酚處理過之嗜中性球細胞懸浮液以 PMA (100 ng/ml) 作用 15 分鐘，離心取細胞沉澱物，重新懸浮於 1 ml 冰的並含有 10% 經熱去活化之胎牛血清及 10 mM sodium azide PBS 中。以下進行 Mac-1 之螢光染色所有步驟完全在冰上進行。把上述細胞懸浮液與 Mac-1 初級抗體 (mouse anti-human CD11b, IgG<sub>1</sub>; Pharmingen) 培置 60 分鐘，或是以非專一性抗體 (IgG<sub>1</sub>, Sigma) 取代 Mac-1 初級抗體當做抗體背景值對照用。以冰 PBS-FBS-azide 清洗兩次，帶有 Mac-1 初級抗體之細胞再與 FITC 螢光標示之二級抗體 (goat anti-mouse, IgG) 避光作用 30 分鐘。用含 5% 胎牛血清之 PBS 清洗二次。最後細胞懸浮於 1% 之 para-formaldehyde 流式細胞專用緩衝液 (sheath fluid) 中，用流式細胞儀 (FACSsort; Becton Dickinson) 分析細胞 Mac-1 之表現量。數據是以測得之螢光峰值 (peak channel fluorescence) 代表 Mac-1 含量，並在 Cell Quest<sup>®</sup> 軟體輔助下計算。

## 測試藥物對細胞內鈣離子濃度的影響

白血球懸浮液先與 5  $\mu$ M 之 Fura-2/AM or Fluo-3/AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 於 37°C 溫浴 45 分鐘；因 Fura-2/AM or Fluo-3/AM 為酯化物非常容易進入細胞，當被酯解酶水解成 Fura-2 後失去脂溶性，便無法再穿透任何胞器或細胞膜而蓄積在細胞質內。溫浴後以無鈣、含待測物或對照組空白溶液之 HBSS 清洗二次，再以含鈣 (2 mM) 之 HBSS 重新懸浮，並調整細胞數目為  $2 \times 10^6$ /ml，在 5 分鐘之後，取此細胞懸浮液 1 ml 置入四面透光之樣杯 (cuvettes) 中 (Sarstedt, Germany)，移入配備避光、恆溫、及自動攪拌裝置之螢光偵讀機 (Hitachi F-4500; Hitachi Instruments, CA) 回溫 5 分鐘。隨後再加入刺激劑  $\text{AlF}_4^-$  (10 mM NaF plus 30  $\mu$ M  $\text{AlCl}_3$ ) 或 thapsigargin (1  $\mu$ M) 或 fMLP (1  $\mu$ M) 以激發細胞內  $\text{Ca}^{2+}$  的釋放。Fura-2 本身與細胞內釋放出的  $\text{Ca}^{2+}$  結合於適當波長激發下產生螢光，以螢光偵讀機記錄螢光變化。偵讀機在測定螢光時可自光源幾乎同時連續發出波長 340 nm ( $E_{340}$ ) 及 380 nm ( $E_{380}$ ) 之激發光 (for Fluo-3: 480 nm)，於波長 510 nm ( $E_{510}$ ) (for Fluo-3: 530 nm) 每 0.2 秒記錄一次螢光。用 F-4500 軟體自動將連續記錄所得之螢光強度換算成比值 (R)，並根據 Grykiewicz (1985) 等人導出的公式，自動計算細胞內  $\text{Ca}^{2+}$  的真實濃度，公式如下： $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d (R - R_{\min}) (S_{f380}) / (R_{\max} - R) (S_{b380})$ ； $K_d$  為 224 nM (for Fluo-3:  $K_d$  為 325 nM)，即 Fura-2

於 37°C 之解離常數。R 為檢品於  $E_{340}$  及  $E_{380}$  激發光下之螢光強度比值。 $R_{\max}$  為加入 0.2 % digitonin 溶解細胞膜使 Fura-2 與溶液中所有鈣離子結合所測得的螢光強度比值。 $R_{\min}$  為加入 25 mM EGTA 去除所有溶液中鈣離子後 Fura-2 成自由態時測得之螢光強度比值。 $S_{f380}$  為  $E_{380}$  激發自由態 Fura-2 產生之螢光強度常數。 $S_{b380}$  為  $E_{380}$  激發結合態 Fura-2 產生之螢光強度常數。

## 參、結果

### 一、中藥對白血球 ROS ( reactive oxygen species ) 產量的抑制作用：

白血球之純度影響 ROS ( reactive oxygen species ) 之產量。我們分離之 PMN 及 MNC 純度分別可達 95% 及 85% 以上。

於抗 PMN 之 ROS 之實驗中，蛋白激酶 C 依賴型 ( PMA-mediated ) 之 PMN 活化，以黃芩、普濟消毒飲、黃連解毒湯三方之抑制能力最強， $IC_{50}$  分別約為 4, 8, 12  $\mu\text{g/ml}$  ( 圖-1 )。其他方劑 ( 黃連、黃柏、玉女煎、龍膽瀉肝湯、知柏地黃丸 ) 之  $IC_{50}$  為 18-50  $\mu\text{g/ml}$  ( 圖-1 )。金銀花與板藍根則無  $IC_{50}$ ，亦未能依濃度相關 ( concentration-dependent ) 抑制 ROS 產生，最大效果 ( 50  $\mu\text{g/ml}$  ) 只能抑制 20-45% 之 ROS 產生 ( 圖-2 )。

於抗 PMN 之 ROS 之實驗中，接受體依賴型 ( fMLP-induced ) 之 PMN 活化，仍以黃芩、普濟消毒飲、黃連解毒湯三方之抑制能力最強， $IC_{50}$  分別約為 2.2, 5.6, 4.6  $\mu\text{g/ml}$  ( 圖-3 )。其他方劑 ( 黃連、金銀花、龍膽瀉肝湯、知柏地黃丸 ) 之  $IC_{50}$  為 10-27  $\mu\text{g/ml}$  ( 圖-3 )。黃柏、板藍根與玉女煎則無  $IC_{50}$  ( 圖-4 )，亦未能依濃度相關 ( concentration-dependent ) 抑制 ROS 產生，除黃柏 ( 50  $\mu\text{g/ml}$  ) 可達 55% 抑制以外，最大效果 ( 50  $\mu\text{g/ml}$  ) 只能抑制 40% 之 ROS 產生 ( 圖-4 )。

於抗 MNC 之 ROS 之實驗中，蛋白激酶 C 依賴型 ( PMA-mediated ) 之 MNC 活化，亦以黃芩、普濟消毒飲、黃連解毒湯三方之抑制能力最強， $IC_{50}$  分別約為 2.3, 4.6, 3.5  $\mu\text{g/ml}$  ( 圖-5 )。其他方劑 ( 黃連、黃柏、龍膽瀉肝湯、玉女煎、知柏地黃丸 ) 之  $IC_{50}$  為 12-35  $\mu\text{g/ml}$  ( 圖-5 )。金銀花與板藍根則無  $IC_{50}$ ，亦未能依濃度相關 ( concentration-dependent ) 抑制 ROS 產生，金銀花最大效果 ( 50  $\mu\text{g/ml}$  ) 只能抑制 48% 之 ROS 產生 ( 圖-6 )。板藍根在高濃度 ( 10-50  $\mu\text{g/ml}$  ) 則會刺激 MNC 之 ROS 產生，低濃度 ( 1.0  $\mu\text{g/ml}$  ) 則可抑制 MNC 之 ROS 產生 ( 圖-6 )。

於抗 MNC 之 ROS 之實驗中，接受體依賴型 ( fMLP-induced ) 之 MNC 活化，仍以黃芩、普濟消毒飲、黃連解毒湯三方之抑制能力最強， $IC_{50}$  分別約為 2.1, 4.3, 6.5  $\mu\text{g/ml}$  ( 圖-7 )。其他方劑 ( 黃連、黃柏、金銀花、龍膽瀉肝湯、知柏地黃丸 ) 之  $IC_{50}$  為 10.2-52.5  $\mu\text{g/ml}$  ( 圖-7 )。板藍根與玉女煎則無  $IC_{50}$ ，亦未能依濃度相關 ( concentration-dependent ) 抑制 ROS 產生 ( 圖-8 )。玉女煎 ( 50  $\mu\text{g/ml}$  ) 可達 38% 抑制。板藍根在

濃 10.0 ( $\mu\text{g/ml}$ ) 則會刺激 MNC 之 ROS 產生，1.0 與 50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) 則可抑制 (<20%) MNC 之 ROS 產生 (圖-8)。

另外我們亦發現分離自牛樟芝及乳藤的一些成份 (no. 1-no 10) 有顯著之抗 ROS 作用 (圖-9)，其中以 no. 1, no. 4, no. 5, no. 8 最好  $\text{IC}_{50}$  <5 ( $\mu\text{g/ml}$ )。效果都優於 NOX 之抑制劑 (apocynin; Apo) (圖-9)。而這些天然物之作用並無顯著細胞毒性，細胞死亡率與控制組差不多 (~5%) 如圖-10。

## 二、中藥對白血球緊密黏著 ( firm adhesion ) 的抑制作用：

於抗白血球 (PMN) 緊密黏著之實驗中，蛋白激酶 C 依賴型 (PMA-mediated) 之 PMN 活化黏著，亦以黃芩、普濟消毒飲、黃連解毒湯三方之抑制能力最強，於 50  $\mu\text{g/ml}$  分別抑制達 65%, 60%, 55% (圖-11)。其他方劑 (黃連、黃柏、金銀花、龍膽瀉肝湯、玉女煎、板藍根、知柏地黃丸) 之抑制為 15-36% (圖-11)。

另外我們亦發現分離自牛樟芝及乳藤的一些成份 (no. 1-no 10) 能依濃度相關 (concentration-dependent) 抑制白血球 (PMN) 緊密黏著 (表 1)，其中以 no. 1, no. 4, no. 5, no. 8 最好  $\text{IC}_{50}$  5-10 ( $\mu\text{g/ml}$ )。蛋白激酶 C 之抑制劑 (pertussis toxin; PTX 及 staurosporine; stau) 亦顯著抑制白血球 (PMN) 緊密黏著 (表 1)。

## 三、中藥對白血球黏著分子 Mac-1 ( CD11b/CD18 ) 的抑制作用：

抗白血球 (PMN) 緊密黏著作用主要與抑制 Mac-1 (CD11b/CD18) 之表現有關。蛋白激酶 C 依賴型 (PMA-mediated) 之 PMN 之 Mac-1 (CD11b/CD18) 表現，亦以黃芩、普濟消毒飲、黃連解毒湯三方之抑制能力最強，於 50  $\mu\text{g/ml}$  分別抑制達 55%-80% (圖-12)。其他方劑 (黃連、黃柏、金銀花、龍膽瀉肝湯、玉女煎、板藍根、知柏地黃丸) 之抑制為 20% 左右 (圖-12)。

## 四、中藥對白血球細胞內鈣離子內流的抑制作用：

白血球細胞內鈣離子內流為其發炎活化之重要訊號。能抑制鈣離子內流亦為抗白血球 (PMN) 緊密黏著作用及抑制 Mac-1 (CD11b/CD18)

表現之機制之一。接受體依賴型 (fMLP-induced) 之 PMN 之細胞內鈣離子內流抑制作用，以黃柏、普濟消毒飲較最強 (圖-13)。其他方劑 (黃連、金銀花、龍膽瀉肝湯、玉女煎、板藍根、知柏地黃丸) 則無顯著之抑制作用 (圖-13)。而這些藥物本身亦有增加細胞內鈣離子內流之作用 (圖-14, 圖-15)，但結果並不完全吻合 (圖-14, 圖-15)。

## 肆、討論

本計畫成功的以人類白血球建立專一高效能之抗發炎及抗氧化細胞評估方法，可快速驗證具抗發炎之中草藥，可進一步研究藥物標的或機轉，或再以動物試驗確認藥效。主要方法是以分離之人類嗜中性球 (PMN) 或單核球 (MNC) 探討單複方中 (草) 藥可否抑制體外人類 PMN 及 MNC 之活化，我們認為以人類白血球所呈現之結果最接近臨床，因為依據我們以前之研究結果發現藥物於老鼠及人類之白血球反應並不完全一致 (Shen et al., 1998-2003)。故我們認為以人類白血球建立之專一抗發炎及抗氧化細胞評估模式較合乎臨床之需求。

活化之人類白血球發炎反應包括製造活性氧屬自由基 (reactive oxygen species; ROS)、細胞緊密黏著 (firm adhesion)、黏著分子 (Mac-1) 表現、細胞鈣離子內流 (calcium influx) 等。用上述四種細胞模式評估之中草藥包括清熱燥濕之黃芩、黃連、黃柏，抗病毒之金銀花、板藍根，含黃芩之複方包括：黃連解毒湯、龍膽瀉肝、普濟消毒飲及不含黃芩之玉女煎、知柏地黃丸等共 10 種中藥濃縮製劑。我們分離之 PMN 及 MNC 純度分別可達 95% 及 85% 以上。於抗 ROS 之實驗中，不管是對接受體依賴型 (fMLP-induced) 或是蛋白激酶 C 依賴型 (PMA-mediated) 之 PMN 及 MNC 活化，皆以黃芩、普濟消毒飲、黃連解毒湯三方之抑制能力最強， $IC_{50}$  約為 5-10  $\mu\text{g/ml}$ 。正對照標準品 baicalein (黃芩素) 之  $IC_{50}$  約為 7-11  $\mu\text{g/ml}$ 。對照複方成份之普濟消毒飲、黃連解毒湯接含黃芩，因此黃芩、普濟消毒飲、黃連解毒湯三方抗 ROS 之作用應與 baicalein 含量正相關，亦與我們之前之研究吻合 (Shen et al., 2003)。另外清熱滋陰之玉女煎、知柏地黃丸作為對照，發現它們之  $IC_{50}$  較高為 20-30  $\mu\text{g/ml}$ ，顯示這類藥物之主要作用不在抑制急性發炎 ROS 之產生。抗病毒藥物板藍根 (10-50  $\mu\text{g/ml}$ )，對 MNC 之 ROS 製造反而有促進之作用，因此對提升刺激免疫發炎反應有促進作用，說明抗 SARS 期間其受中醫應用之可能原因。同為抗病毒藥物金銀花則無此免疫促進作用，表示另有其他抗病毒之機制，例如直接抑制病毒之複製。

我們進一步分析這些藥物對 PMN 之緊密黏著及黏著分子 Mac-1 表現，發現確實可以反應上述黃芩、普濟消毒飲、黃連解毒湯三方之抗發炎作用，它們在 50  $\mu\text{g/ml}$  都可顯著抑制 (50-80%) PMN 之緊密黏著及黏著分子 Mac-1 表現。故與我們先前之研究認為 ROS 不僅是發炎分子，更扮演活化發炎細胞之訊息傳遞角色不謀而合 (Shen et al., 1998)。這也提供另一證明，確實 ROS 引發之發炎反應可能會造成許多臨床相關疾病包括癌症、神經退化等



(Middleton et al., 2000)，而抗 ROS 之作用於臨床逐漸受重視。

我們以 Fura2 及 Fura3 兩種鈣離子螢光指示劑研究這 10 種藥方對細胞鈣離子內流之影響，結果並不完全一致。因為藥方多為黃色，而因 Fura2 易受顏色影響，Fura3 較不受顏色影響，因此依據此結果是否這些藥方單獨會提升細胞鈣離子內流仍待進一步探討；黃芩及板藍根則可抑制發炎刺激物 fMLP 誘發之細胞鈣離子內流。

## 伍、結論與建議

結論我們成功建立系列人類白血球發炎篩選藥物模式包括活性氧屬自由基 (ROS)、細胞緊密黏著、黏著分子 (Mac-1) 表現、活化鈣離子之細胞內流。比較三種 ROS 偵測方式 (冷光、螢光、可見光) 以冷光方式最為敏感，適合研究抗發炎作用。應用於分析臨床方劑，研究對清熱燥濕藥之分析顯示它們對人類白血球發炎自由基及緊密黏著、黏著分子表現有較一致之抑制效果，並與已發表之結果吻合 (baicalein/黃芩)。另外篩選得本所分離抗發炎新成份包括乳藤、牛樟芝及一些野生磨菇類成份約 10 餘種。

我們建議中藥商或中醫管理部門可依此外模式建立藥物活性之品質管制平台。另外應用於臨床之方劑組合之藥效評估或藥理機轉探討或針對臨床病人個別作藥效反應分析都是很值得推廣及應用。

## 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-005 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. Anderson DC and Springer TA. Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. *Ann Rev Med* 1987; 38:175-194.
2. Anderson DC, Schmalsteig FC, Finegold MJ, Hughes BJ, Rothlein R, Miller LJ, Kohl S, Tosi MF, Jacobs RL, and Waldrop TC. The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1 deficiency: their quantitative definition and relation to leukocyte dysfunction and clinical features. *J Infect Dis* 1985; 152:668-689.
3. Baldrige CW and Gerard RW. The extra respiration of phagocytosis. *Am J Physiol* 1933; 103:235-236.
4. Boyum A. Separation of blood leukocytes, granulocytes, and lymphocytes. *Tissue Antigens* 1974; 4:269-274.
5. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420:885-891.
6. Coussens LM and Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420:860-867.
7. Edwards SW. Neutrophils and host defence: the fight against infection. In: *Biochemistry and Physiology of the Neutrophil*, Edwards SW(ed), Cambridge University, Cambridge, pp 1-32; 1994.
8. Endemann G, Feng Y, Bryant CM, Hamilton GS, Perumattam J, Mewshaw RE and Liu DY. Novel anti-inflammatory compounds prevent CD11b/CD18,  $\alpha_M\beta_2$  (Mac-1)-dependent neutrophil adhesion without blocking activation-induced changes in Mac-1. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 276:5-12.
9. Fischer A, Lisowska-Grospierre B, Anderson DC, Springer, and TA. Leukocyte adhesion deficiency: molecular basis and functional consequences. *Immunodeficiency Rev* 1988; 1:39-54.
10. Grynkiewicz G, Poenie M, and Tsien RY. A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260: 3440-3450.
11. Hellewell PG and Williams TJ. The neutrophil. In: *Immunopharmacology of Neutrophils*, Hellewell PG and Williams TJ(eds), Academic Press, San Diego, pp 1-3; 1994.
12. Hoffman RA and Hansen WP. Immunofluorescent analysis of blood cells by flow cytometry. *Int J Immunopharmacol* 1981; 3:249-254.

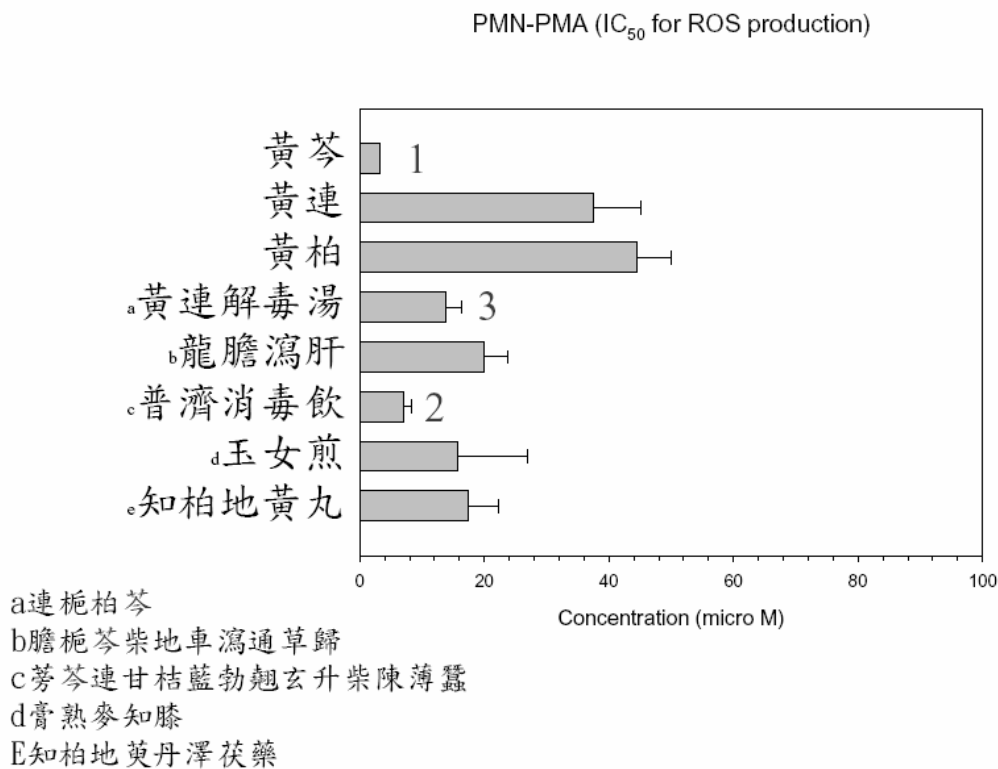
13. Holmes B, Quie PG, Windhorst DB, and Good RA. Fatal granulomatous disease of childhood. An inborn abnormality of phagocytic function. *Lancet* 1966; 1:1225-1228.
14. Jeng JR, Chang CH, Shieh SM, and Chiu HC. Oxidized low-density lipoprotein enhances monocyte-endothelial cell binding against shear-stress-induced detachment. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1178:221-227.
15. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*; 2002 420:868-874.
16. Liou KT, Shen YC, CF Chen, CM Tsao, SK Tsai. Honokiol protects rat brain from focal cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting neutrophil infiltration and reactive oxygen species production, *Brain Res* 2003; 992, 159-166.
17. Liou KT, Shen YC, CF Chen, CM Tsao, SK Tsai. The anti-inflammatory effect of honokiol on neutrophils: mechanisms in the inhibition of reactive oxygen species production, *Eur J Pharmacol* 2003; 475:19-27.
18. Malech HL and Nauseef WA. Primary Inherited Defects in Neutrophil Function: Etiology and Treatment Neutrophil pathophysiology. *Sem in Hematol* 1997; 34:279-290.
19. Maly FE, Cross AR, Jones OT, Wolf-Vorbeck G, Walker C, Dahinden CA, and De Weck AL. The superoxide generating system of B cell lines. *J Immunol* 1988; 140: 2334-2339.
20. Middleton et al. The effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000; 52:673-751.
21. Molony L, Ng-Sikorski J, Hellberg C, and Andersson T. Inhibitors of farnesyl and geranylgeranyl methyltransferases prevent beta 2 integrin-induced actin polymerization without affecting beta 2 integrin-induced  $Ca^{2+}$  signaling in neutrophils *Biochem Biophys Res Co* 1996; 223:612-617.
22. Robinson PJ, Carter WO, and Narayanan PK. Oxidative product formation analysis by flow cytometry. In: *Flow Cytometry*, Darzynkiewicz Z, Robinson JP, and Crissman HA (eds), Academic Press, San Diego, pp 437-442; 1994.
23. Rossi AG and Hellewell PG. Mechanism of neutrophil accumulation in tissues. In: *Immunopharmacology of Neutrophils*, Hellewell PG and Williams TJ(eds), Academic Press, San Diego, pp 223-243; 1994.
24. Rossi F. The  $O^{2-}$ -forming NADPH oxidase of the phagocytes: nature, mechanisms of activation and function. *Biochim Biophys Acta* 1986; 853: 65-89

25. Sbarra AJ and Karnovsky ML. The biochemical basis of phagocytosis: metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 1959; 234:1355-1362.
26. Shen YC. Studies on the mechanisms of the Chinese herbal principles, tetrandrine and magnolol, in the inhibition of neutrophil adhesion and the amelioration of myocardium ischaemic/reperfusion-induced injury in the rats, Ph.D. Dissertation; 1999.
27. Shen YC and Sung YJ. Tetrandrine inhibits Mac-1-dependent polymorphonuclear neutrophil adhesion by the suppression of reactive oxygen species production and calcium influx, *FASEB A760p*, 1998.
28. Shen YC, Chao Y, Chen LL and Huang TS. Distinct roles of JNK, p38 and ERK in paclitaxel-induced apoptosis, *The 5th Joint Annual Conference of Cancer Research*, 155p.; 2000.
29. Shen YC, Chen CF and Chiou WF. Scavenging effect of andrographolide on active oxygen radical production by human neutrophils: possible mechanism involved in its anti-inflammatory effect, *Br J Pharmacol* 2002; 135: 399-406.
30. Shen YC, Chen CF, and Chiou WF. Suppression of rat neutrophil reactive oxygen production and adhesion by diterpenoid lactone andrographolide, *Planta Medica* 2000; 66: 314-317.
31. Shen YC, Chen CF, and YJ Sung. Tetrandrine ameliorates ischaemia-reperfusion injury of rat myocardium through inhibition of neutrophil priming and activation, *Br J Pharmacol* 1999; 128:1593-601.
32. Shen YC, Chen CF, TT Chang and CJ Chou. Evaluation of the anti-inflammatory activity of zhankuic acids isolated from the fruiting bodies of *Antrodia camphorata*, *Planta Medica* 2003; 70: 310-314.
33. Shen YC, Chen CF, Wang SY, and Sung YJ. Impediment to calcium influx and reactive oxygen production accounts for the inhibition of neutrophil Mac-1 upregulation and adhesion by tetrandrine, *Mol Pharmacol* 1999; 55:186-193.
34. Shen YC, Chiou WF, Chou YC, and Chen CF. Mechanisms in mediating the anti-inflammatory effects of baicalin and baicalein in human leukocytes *Eur J Pharmacol* 2003; 465: 171-181.
35. Shen YC, CJ Chou, WF Chiou and Chen CF. Anti-inflammatory effects of the partial purified extract of *Radix Stephaniae tetrandrae*: Comparative studies with its active principles Tetrandrine and Fangchinoline on human polymorphonuclear leukocyte functions, *Mol Pharmacol* 2001; 60:1083- 1090.

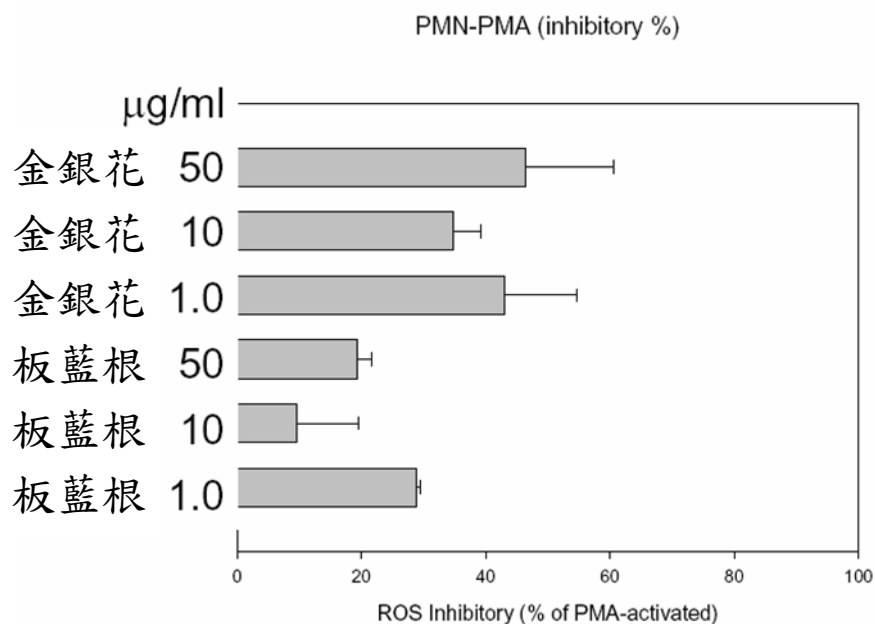
36. Shen YC, CJ Chou, YH Wang, CF Chen, YC Chou, and Lu MK. Anti-inflammatory activity of the extracts from mycelia of *Antrodia camphorata* cultured with water-soluble fraction from five different *Cinnamomum* genera *FEMS Letter* 2004; 231: 137-143.
37. Shen YC, Sung YJ, and Chen CF. Magnolol inhibits Mac-1 (CD11b/CD18) -dependent neutrophil adhesion: relationship with its antioxidant effect, *Eur J Pharmacol* 1998; 343:79-86.
38. Shen YC, WF Chiou, GJ Wang, CJ Chou, and Chen CF (2003) Chapter II. Modernization of traditional Chinese herbal medicine, In: *Oriental Foods and Herbs*, CT Ho, JK Lin, and QY Zheng (eds) , American Chemical Society: USA, ( Book chapter, in press ) .
39. Shen YC, WY Wang, YH Wang, YC Hou, YC Chou, and CF Chen. Impairment of NADPH oxidase activity by interfering p38 MAPK and PKC, and antagonism of G protein-mediated calcium influx account for the prevention of Mac-1 dependent neutrophil firm adhesion by taxifolin, *Biochem Pharmacol*, 2003; 67: 2251-2262.
40. Shen YC, Yang LA, Chen CF, and Sung YJ. Mechanisms involved in the anti-inflammation effect of tetrandrine: the role of reactive oxygen species production and calcium influx in Mac-1 expression, *The 13th Joint Annual Conference of Biomedical Science*, 158p; 1998.
41. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76:301-314.
42. Vaporciyan AA, Jones ML, and Ward PA. Rapid analysis of leukocyte-endothelial adhesion. *J Immunol Methods* 1993; 159:93-100.
43. Wardlaw AJ and Walsh GM. Neutrophil adhesion receptors. In: *Immunopharmacology of Neutrophils*, Hellewell PG and Williams TJ(eds) , Academic press, San Diego, pp 134-157; 1994.
44. Weiner H and Selkoe DJ. Inflammation and therapeutic vaccination in CNS diseases. *Nature* 2002; 420:879-884.
45. Williams FM. Role of neutrophils in reperfusion injury. In: *Immunopharmacology of Neutrophils*, Hellewell PG and Williams TJ (eds) , Academic press, San Diego, pp 245-257; 1994.
46. Zimmerman BJ and Granger DN Oxygen free radicals and the gastrointestinal tract: role in ischemia-reperfusion injury. *Hepato- Gastroenterol.* 1994; 41:337-342.

## 柒、圖、表

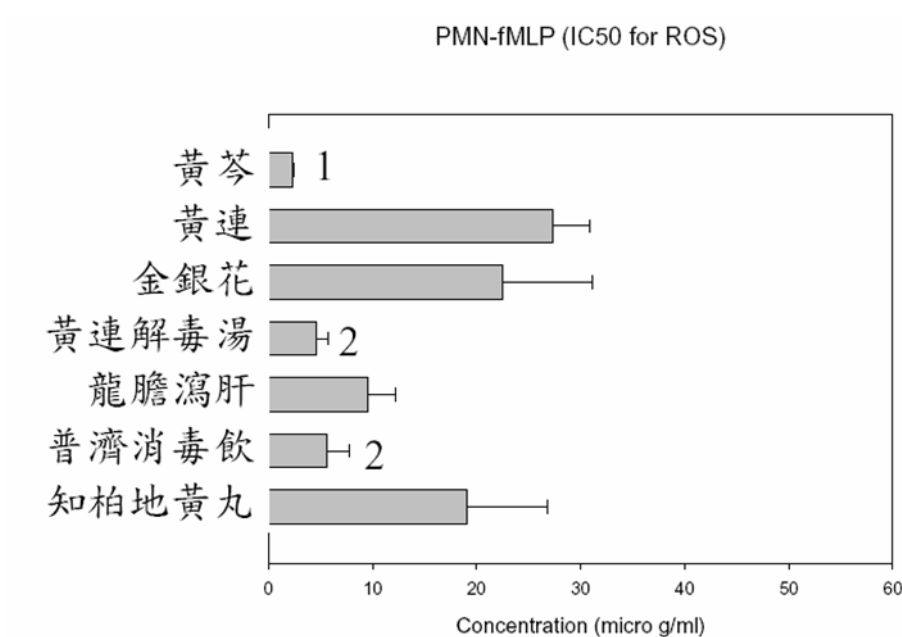
圖一 中藥對 PMA 誘發之 PMN 白血球 ROS 產量的抑制作用 (IC<sub>50</sub>)



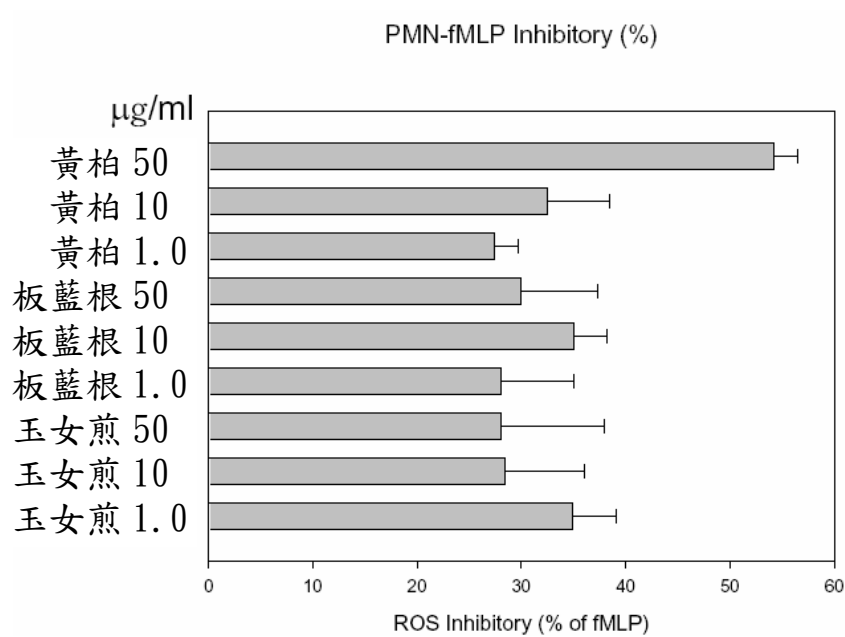
圖二 中藥對 PMA 誘發之 PMN 白血球 ROS 產量的抑制百分比



圖三 中藥對 fMLP 誘發之 PMN 白血球 ROS 產量的抑制作用 (IC<sub>50</sub>)

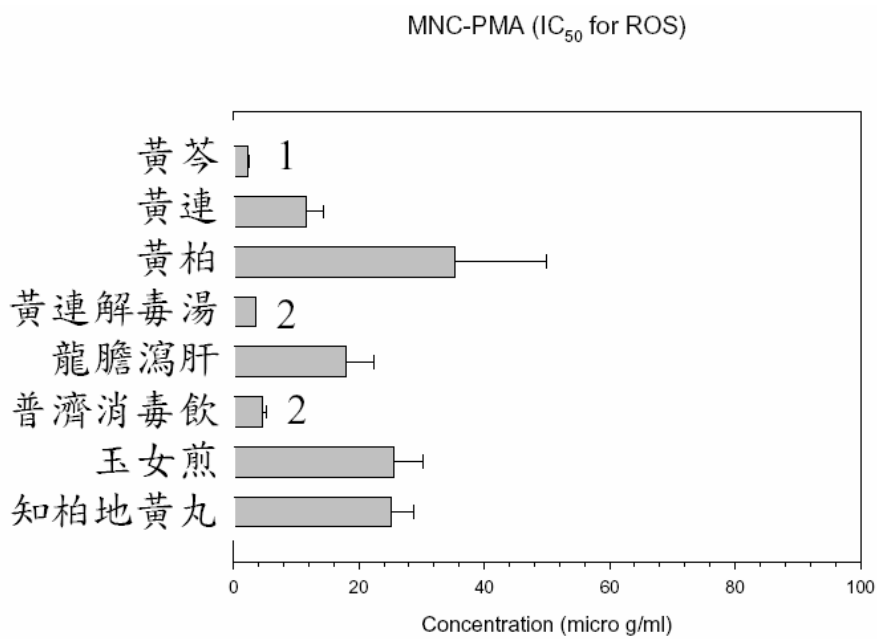


圖四 中藥對 fMLP 誘發之 PMN 白血球 ROS 產量的抑制百分比

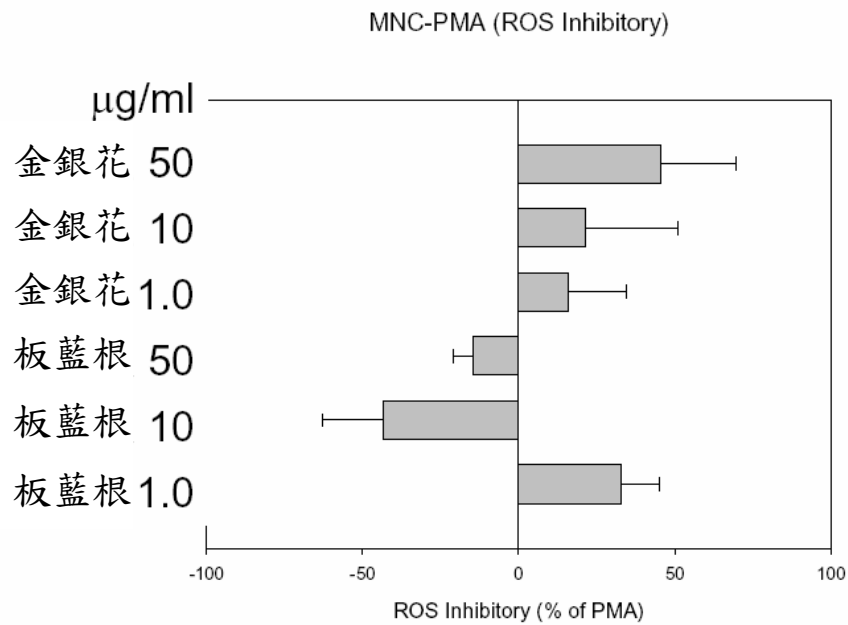




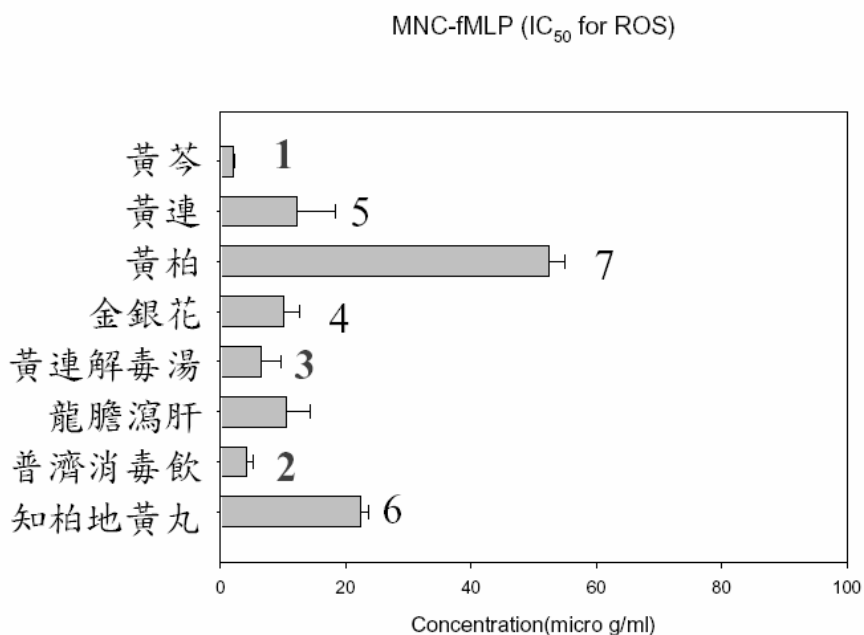
圖五 中藥對 PMA 誘發之 MNC 白血球 ROS 產量的抑制 IC<sub>50</sub>



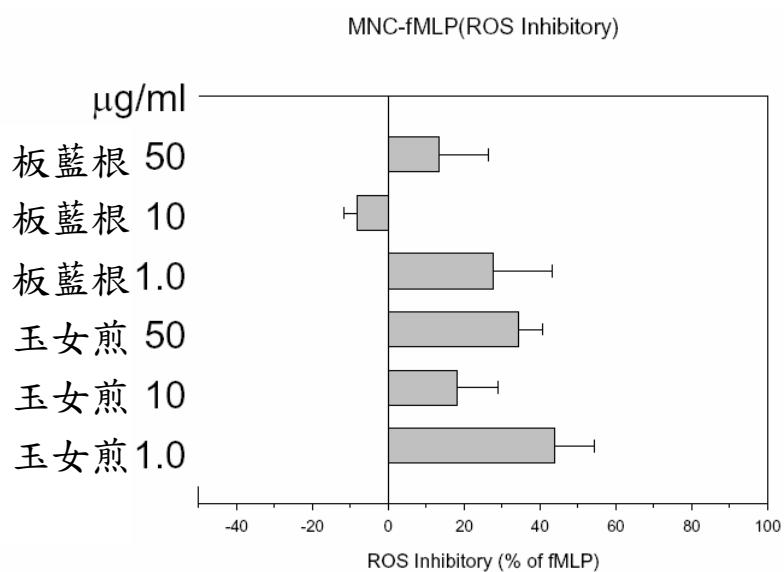
圖六 中藥對 PMA 誘發之 MNC 白血球 ROS 產量的抑制百分比



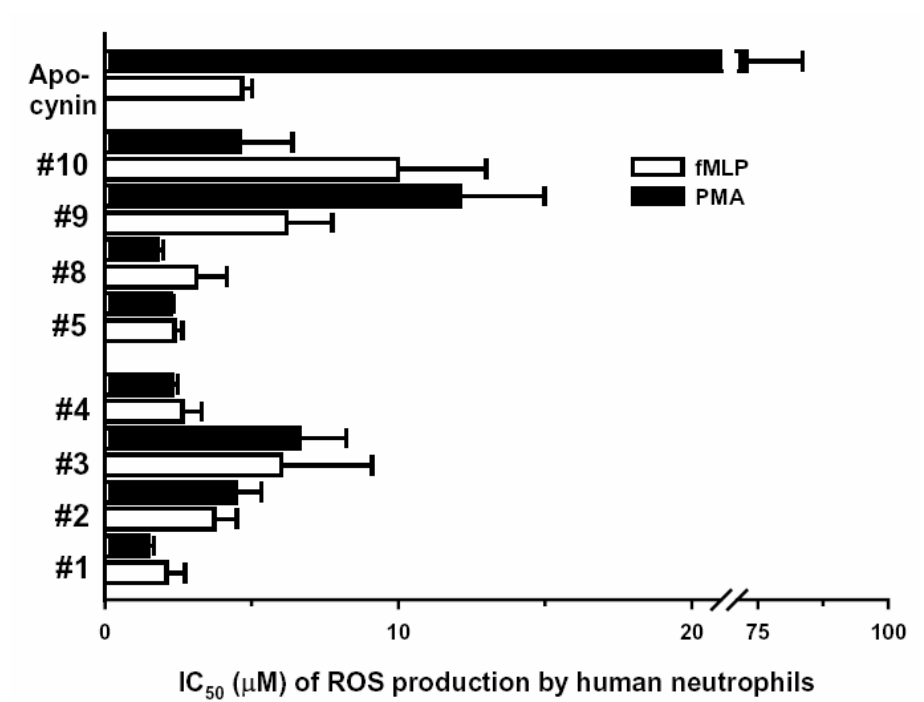
圖七 中藥對 fMLP 誘發之 MNC 白血球 ROS 產量的抑制 IC<sub>50</sub>



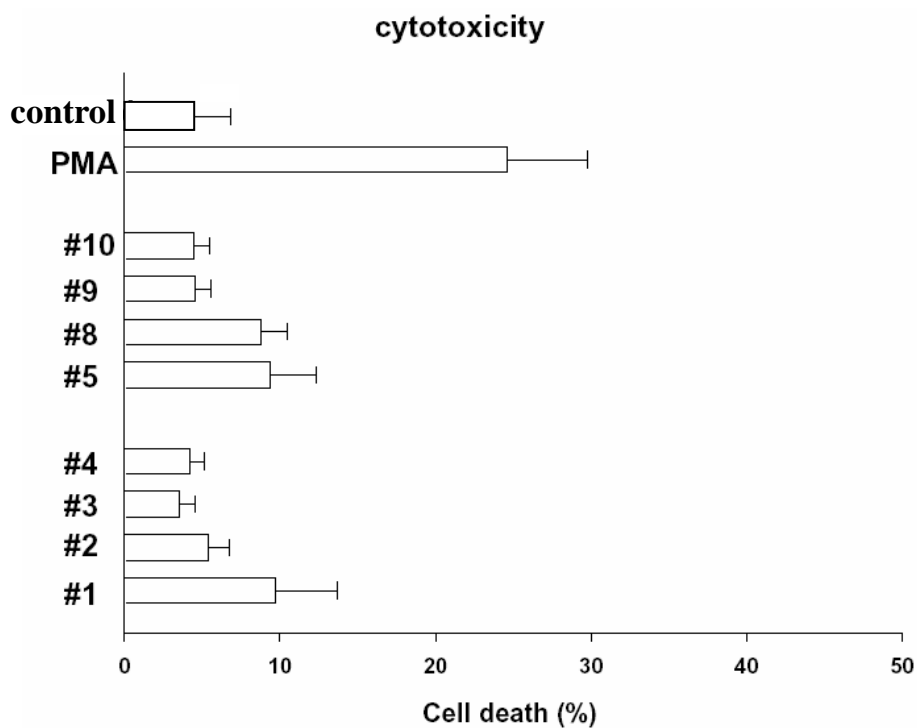
圖八 中藥對 fMLP 誘發之 MNC 白血球 ROS 產量的抑制百分比



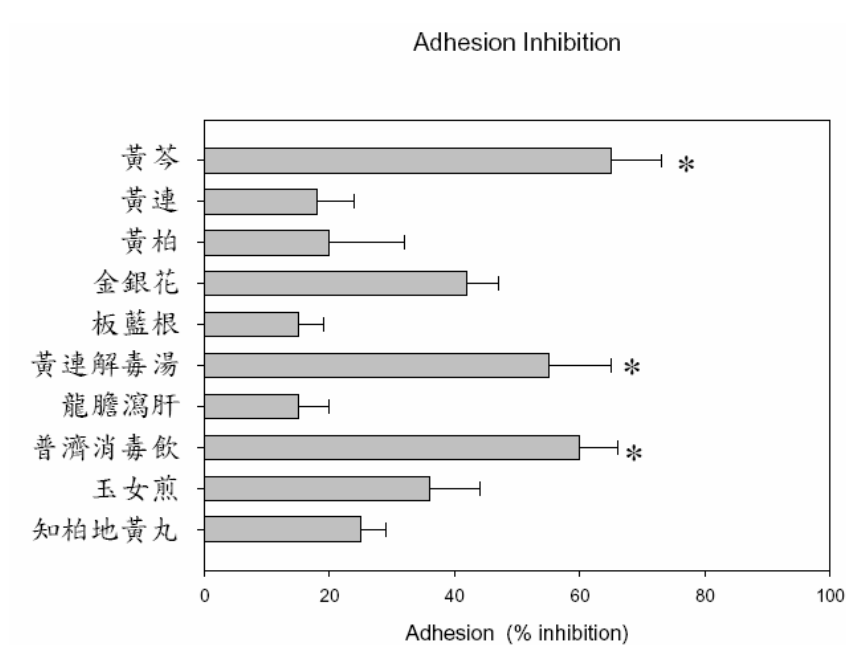
圖九 其他中藥對 fMLP 和 PMA 誘發之 MNC 白血球 ROS 產量的抑制 IC<sub>50</sub>



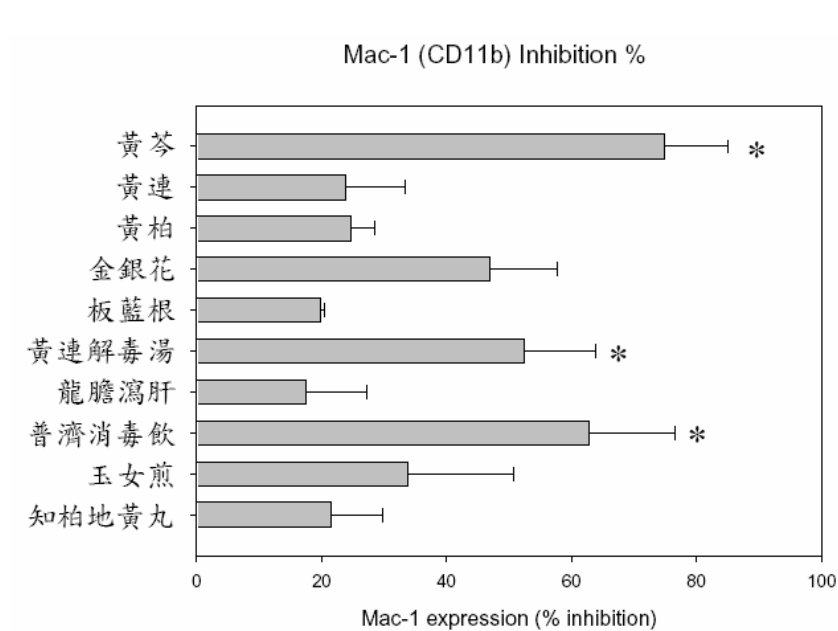
圖十 其他中藥對 PMN 之細胞毒性



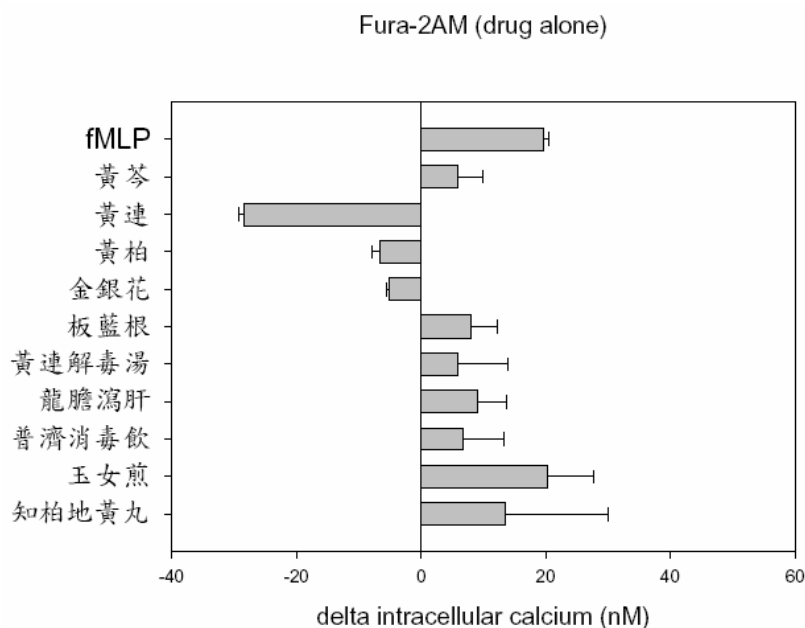
圖十一 中藥對 PMA 誘發 PMN 白血球之緊密黏著之影響



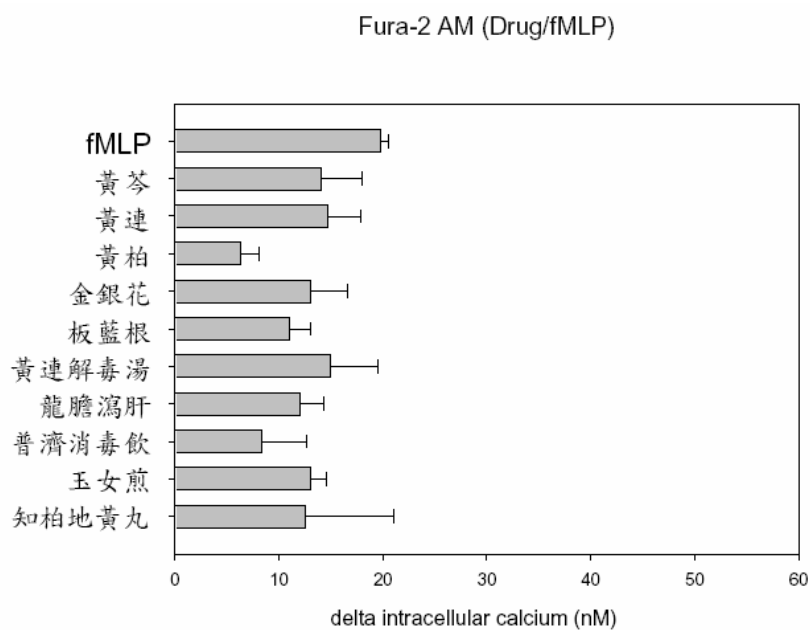
圖十二 中藥對 PMA 誘發 PMN 白血球之緊密黏著分子 Mac-1 之影響



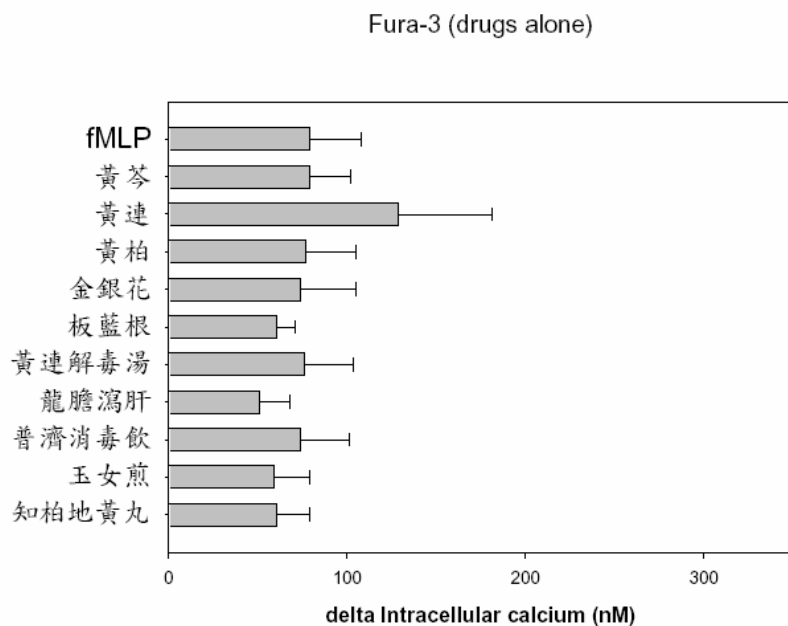
圖十三 中藥對 fMLP 誘發 PMN 白血球細胞內鈣之影響 (Fura-2)-drug alone



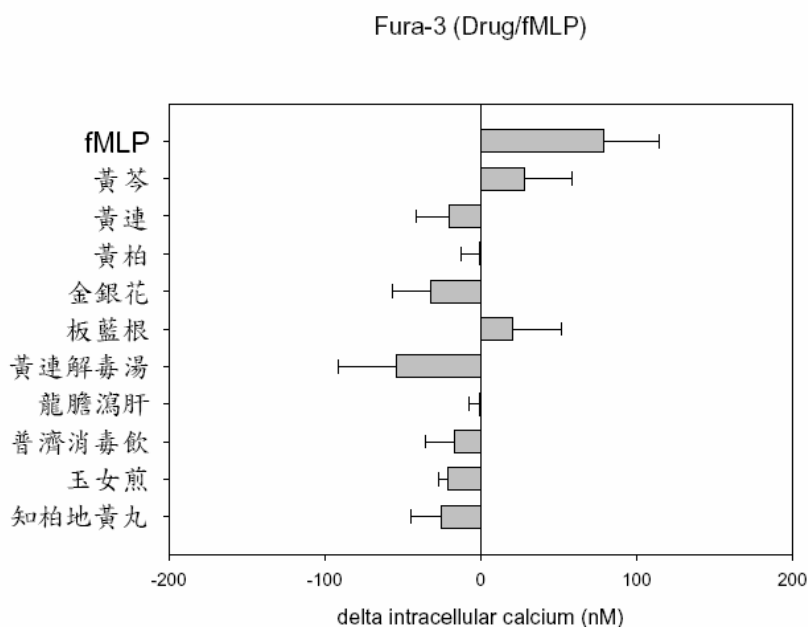
圖十四 中藥對 fMLP 誘發 PMN 白血球細胞內鈣之影響 (Fura-2) drug with fMLP



圖十五 中藥對 fMLP 誘發 PMN 白血球細胞內鈣之影響 (Fura-3) drug alone



圖十六 中藥對 fMLP 誘發 PMN 白血球細胞內鈣之影響 (Fura-3) drug with fMLP



圖十七 其他中藥（牛樟芝）對 fMLP 和 PMA 誘發 MNC 白血球 ROS 產量的抑制 IC<sub>50</sub>

IC <sub>50</sub> (µg/ml) in mononuclear cell/MNC	PMA	fMLP
PLMB-Ea-Bu-	1.7±0.1	2.0±0.1
PLM-M-R-Et-	1.7±0.1	1.9±0.2
PLM-M-W-	8.5±2.5	7.6±3.4
PG-Et-Bu-	1.6±0.1	1.9±0.5
PG-Et-DM-	1.9±0.2	2.3±0.5
PG-Et-H2O	2.9±0.4	6.4±4.0

Data are expressed as means±S.E.M., n=3

表一、乳藤活性成份對 fMLP 及 PMA 誘發 PMN 白血球之緊密黏著之 IC<sub>50</sub>

Anti-adherent effects of some purified-compounds in human leukocytes induced by PMA or fMLP

PMN firm adhesion (% inhibition at 10 or 50 µg/ml)	fMLP		PMA	
	10 µg/ml	50 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml
UtiA3452-B2 (Epicatechin-4 β -8)	30.2±5.0	38.0±4.2	47.4±3.0	53.1±3.6
UtiA33411 (procyanidinB)	19.4±2.4	24.8±3.6	10.2±3.4	11.0±2.8
UtiA3343 (Epicatechin)	6.0±2.0	19.4±2.4	ND	ND
UtiA344 (Epi-4 β )	1.0±2.5	10.2±3.5	ND	ND
UtiA3-6P (Proantho)	34.8±8.8	63.5±5.8	19.9±2.9	47.4±4.8
PTX or Stau	85.3±6.5		93.5±6.5	

Pertussis toxin (PTX, 0.5 µg/ml) and staurosporine (Stau, 0.2 µM) were used as positive controls for negating the effect of fMLP and PMA, respectively. Data are expressed as means±S.E.M., n=3-5. ND, data not detectable.

