

計畫編號：CCMP89-RD-020

行政院衛生署八十九年度科技研究發展計畫

龍膽瀉肝湯免疫機轉研究(2-2)

委 託 研 究 報 告

計畫委託機關：台大醫學院藥理學研究所

計畫主持人：鄧哲明教授

執行期間：88 年 7 月 1 日至 89 年 12 月 31 日

****本研究報告僅供參考，不代表本署意見****

計畫編號：CCMP89-RD-020

各機關研究計畫基本資料庫之計畫編號：

行政院衛生署八十九年度科技研究發展計畫

龍膽瀉肝湯免疫機轉研究(2-2)

委 託 研 究 報 告

計畫委託機關：台大醫學院藥理學研究所

計畫主持人：鄧哲明教授

執行期間：88 年 7 月 1 日至 89 年 12 月 31 日

編號：CCMP88-RD-026
CCMP89-RD-020

行政院衛生署中醫藥委員會八十八、八十九年度委託
研究計畫 全程執行總報告

龍膽瀉肝湯免疫機轉研究

執行機構 台大醫學院藥理學研究所
計畫主持人 黃慧貞、鄧哲明教授

執行期限：民國 87 年 7 月 1 日至民國 89 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表本會意見

目錄

目次	頁碼
封面	1
目錄	2
中文摘要	3
英文摘要	5
前言	7
材料與方法	8
結果	13
討論	19
結論與建議	27
圖、表	27
參考文獻	28
自我評估表	47

編號：CCMP89-RD-020

龍膽瀉肝湯免疫機轉研究(2-2)

鄧哲明

台大醫學院藥理學研究所

中文摘要

在本篇論文中，我們以源自人類肝細胞株-Hep3B 為實驗模式，並以 Transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) 來引發細胞的凋亡作用 (apoptosis)，以此來探討龍膽瀉肝湯的作用。此外，龍膽瀉肝湯的五種主藥成分，即 gentiopicroside, baicalein, geniposide, alisol B monoacetate 及 saikosaponin-d (分別來自龍膽草，黃芩，梔子，澤瀉及柴胡)，其對於 Hep3B 細胞的作用也加以深入探討。首先我們以形態的鑑定及 annexin V 的螢光標定確認 TGF- β_1 所引發的細胞死亡為凋亡作用。龍膽瀉肝湯以濃度有關的方式抑制了 TGF- β_1 所引發的凋亡作用；進一步分析其主要成分的作用，發現 gentiopicroside 及 baicalein 也能有效的抑制此凋亡作用，但 geniposide 卻沒有抑制作用；然而，alisol B monoacetate 及 saikosaponin-d 本身即對 Hep 3B 細胞造成死亡作用。alisol B monoacetate 是造成細胞凋亡作用，而 saikosaponin-d 則是造成細胞壞死(necrosis)。此外，我們也探求了 caspase-3 的酵素活性，由實驗結果得知，TGF- β_1 會明顯的增加 caspase-3 的活性，gentiopicroside 及 baicalein 都能有效的抑制 caspase-3 的活性，而 geniposide 則沒有任何抑制作用；經由更進一步的分析細胞凋亡與 Caspase-3 的活性發現，細胞凋亡的程度與 caspase-3 的活性成正相

關，其相關係數 r 值為 0.94，可見 caspase-3 的活性調控在 TGF- β_1 引發細胞凋亡及中藥成分抑制凋亡的機轉中，扮演了一個很重要的角色。在上述的主成分中，baicalein 是效果最好的成分，因此，我們將 baicalein 的作用做一詳細的探討。在此，我們以一些藥理作用劑，例如 α -hydroxyfarnesyl phosphoric acid、PD098059 以及 wortmannin 都不能有效的抑制 baicalein 的作用，暗示著 baicalein 抗凋亡作用並不經由 Ras/Raf-1/MAPK 及 PI 3-kinase 的相關路徑。然而，很有趣的一點是 baicalein 及 baicalein 加上 TGF- β_1 都能明顯的增加內生性 H_2O_2 的生成，再則，TGF- β_1 會明顯降低細胞 NF- κ B 的 nuclear translocation，而 baicalein 本身便能很明顯的增加 NF- κ B 的 nuclear translocation，進而消除掉 TGF- β_1 在這方面的作用。由此看出 NF- κ B 的 nuclear translocation 在這凋亡/抗凋亡的作用扮演了非常重要的角色。因此，綜合以上所述，龍膽瀉肝湯對於 TGF- β_1 所引起的細胞凋亡有保護作用，而其中 baicalein 是最有效的主要成分，且 baicalein 之抗細胞凋亡作用主要是增加 NF- κ B 的 nuclear translocation。

關鍵詞：龍膽瀉肝湯；TGF- β ；Hep3B cells；Hydrogen peroxide；NF- κ B

CCMP89-RD-020

**Study on the immunological mechanisms of therapeutic
effect of Long-dan-tan(2-2)**

Che-Ming Teng

**Pharmacological Institute, College of Medicine, National
Taiwan University**

Abstract

In the present study, we have found that Long-dan-tan (Chinese name), one of the most common traditional herbal drugs in Chinese people with chronic liver diseases, exhibits the inhibitory effect on TGF- β_1 -induced apoptosis in human liver-derived cell line Hep 3B. We examined the antiapoptotic action of Long-dan-tan and its five major ingredients, such as gentiopicroside, baicalein, geniposide, alisol B monoacetate and saikosaponin-d. Firstly, we confirmed the TGF- β_1 -induced apoptosis by cell morphology identification and *in situ* labeling of annexin V-reaction techniques. Long-dan-tan mixture showed a concentration- dependent inhibition on TGF- β_1 -mediated apoptosis. Furthermore, the ingredients, gentiopicroside and baicalein, but not geniposide, effectively prevented TGF- β_1 -induced apoptosis. By contrast, alisol B monoacetate and saikosaponin-d themselves without TGF- β_1 caused the cytotoxicity in Hep 3B cells. We then determined the caspase-3 activity in the present study. It showed that TGF- β_1 -induced a profound increase in caspase-3 activity;

gentiopicroside and baicalein, but not geniposide, had a significant suppression on this TGF- β_1 -induced caspase-3 activity. To further correlate the functional apoptosis and caspase-3 activity, a good coefficient (r value) of 0.94 was obtained suggesting the central role of the regulation of caspase-3 activity in TGF- β_1 -induced effect and the antiapoptotic action of these herbal ingredients. Among these ingredients, baicalein showed the most effective one in the present work. The detailed investigation was therefore carried out. Several pharmacological agents, such as α -hydroxyfarnesyl- phosphoric acid, PD098059, and wortmannin, were examined to have little influence on baicalein-mediated antiapoptotic effect suggesting baicalein action is independent of the Ras/Raf-1/MAPK- and PI3-kinase pathways. Interestingly, baicalein alone as well as baicalein plus TGF- β_1 significantly stimulated the formation of H_2O_2 . Furthermore, baicalein alone profoundly induced the nuclear translocation of NF- κ B. On the contrary, TGF- β_1 almost completely suppressed this translocation suggesting the crucial role of NF- κ B translocation on the apoptotic/antiapoptotic regulation. We conclude that Long-dan-tan has a protective effect on TGF- β_1 -induced cell apoptosis. Baicalein is the most effective ingredient among Long-dan-tan mixture. Furthermore, baicalein exerts the antiapoptotic action via activation of NF- κ B nuclear translocation.

Key words : Long-dan-tan ; TGF- β ; Hep3B cells ; Hydrogen peroxide ; NF- κ B

前言

中國傳統醫學目前正漸漸取得今日世界醫壇的認識與重視，可輔助或加強西方醫學的不足，地位有日漸上昇之勢。且現在於許多先進國家中，正在使用已被科學化或標準化的中草藥。然而，直到目前為止，中草藥的作用、組成與劑量仍尚未科學地評估。我們的目的即在檢查中國傳統的方劑及其多種主成分之作用，以找出其中主要藥效之成分，並評估它的作用機轉。

肝炎是一個遍及全球的傳染病，在臺灣地區是更是慢性病毒性肝炎的盛行區。由於肝炎病毒的感染，常導致急、慢性肝炎的發作，並因此進入肝硬化、肝癌的三部曲，且肝癌、肝炎與肝硬化常年列為台灣地區十大死因之一。因而如何進一步提高肝炎的臨床療效，預防肝炎的發生與傳播，保障人類的身體健康，是醫學界面臨的重要課題之一。

根據臨床中醫實用的結果，發現龍膽瀉肝湯對於慢性發炎病人的治療有顯著的效果。然而在人類肝細胞的研究中，一直缺乏著此方劑的藥理作用與科學化藥效評估，因此，本計畫便針對此方劑及其五種主要成分，做其藥理藥效評估及詳細的機轉探討。在各種慢性肝炎病人的血清及肝臟內，皆可觀察到 TGF- β 1 的表現明顯增加，且發現 TGF- β 1 會造成肝臟纖維化，與肝細胞的死亡。因此，我們觀察龍膽瀉肝湯對於 TGF- β 1 所引起的肝細胞凋亡作用之影響，以及決定龍膽瀉肝湯中主要藥效之成分。並希望由此研究，決定各個成分的作用之後，對於此方劑中的組成和劑量可以再重新評估，以達到最大的治療效果。甚至可根據主要藥效之成分的結構與作用機轉，而發展出類似西藥模式的藥品，可更廣泛的用於社會大眾。

材料與方法

一、實驗材料

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、0.1 % trypsin- 0.04 % EDTA solution、fetal bovine serum (FBS)、HBSS (Hank's Salt Solution) 和抗生素 (penicillin G 及 streptomycin) 購自 GIBCO (Grand Island, NY, USA)。3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)、propidium iodide (PI)、RNase A、baicalein、hydrogen peroxide (H_2O_2)、PDTC、catalase、PMA、Wortmannin、 α -hydroxyfarnesylphosphonic acid、EDTA (disodium salt)、leupeptin、dithiothreitol (DTT)、phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、 β -mercaptoethanol、12-, 15-hydroxyeicosatetraenoic acid(12-, 15-HETE)、和 staurosporine 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)。Long-dan tan 購自 Sun Ten Pharmaceutical Co. (Taipei, Taiwan)。gentiopicoside、geniposide、alisol B monoacetate、和 saikosaponin-d 購自 Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)。PD98059、SB203580、和 Ro318220 購自 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)。6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid (Trolox) 購自 Aldrich (St. Louis, MO, USA)。2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) 與 chloromethyl xarosamine (MitoTracker (CMXRos)) 購自 Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA)。TGF- β 1、Caspase-3 Activity Assay Kit 與 Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit 購自 R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, USA)。[^3H]-thymidine 購自 Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NY)。Bio-Rad protein assay kit、bis-acrylamide、prestained standard molecular weight markers 和 polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)購自 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)。[^{32}P]-ATP 購自 New England Nuclear(Boston, MA, USA)。T₄ polynucleotide kinase、T₄ kinase 10X buffer 和 Gel Shift Binding 5X Buffer 購自 Promega (Madison, WI, USA)。

二、細胞培養

Hep3B 購自 ATCC (Rockville, MD, USA)。將 Hep3B cells (人類肝癌細胞株) 培養於 75cm² 培養瓶中，加入含有 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum；FBS) 及抗生素 (100 U/ml penicillin 與 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin) 的 DMEM 培養液，放入細胞培養

恆溫箱，維持 37°C, 5% CO₂ 每隔 2 至 3 天更換一次培養液。待細胞長滿 (confluence) 後，以 trypsin 將細胞打下，然後再以 1:4 到 1:5 的比例稀釋，進行繼代培養 (subculture)，或改將細胞種在培養盤中進行後續實驗。

三、實驗方法

1. In-situ labeling of Annexin V

本實驗是使用 Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (R&D System)。將細胞種在 chamber slide 上，隔天待細胞完整附著後，加入 TGF- β 1 或藥物反應一段時間後，以冰的 PBS 清洗兩次。吸乾之後，加入 100 μ l 的 Annexin V Incubation Reaction (內含 Annexin V-FITC, Propidium Iodide in Binding Buffer)，在暗室下室溫反應 15 分鐘。使用 1 $\times$ Binding Buffer 清洗兩次之後，即可在螢光顯微鏡下觀察並拍照。

2. 細胞計數

將培養瓶中的細胞以 0.05% trypsin 收集，懸浮於含 10% FCS 的 DMEM 培養液中，將細胞懸浮液加入 0.4 % trypan blue，以 1:1 的比例充分混合均勻，取 10 μ l 利用血球計數器 (hemocytometer) 計算細胞數目，每次計算必須重複兩次取其平均值。

3. 細胞存活率的測定 (MTT 偵測法)

細胞存活率的測定是參照 Monsmann (1983) 發表的 MTT 偵測法。利用 MTT 在活細胞中會被粒腺體的酵素 (dehydrogenase) 作用，而產生紫色的 formazan 產物的特性來測定細胞存活率。細胞在培養瓶中長滿後，以 trypsin 收集細胞並離心，將收集的細胞以 2×10^4 cells/well 的密度將細胞種在 96-well 的細胞培養盤中。加入 TGF- β 1 與待測試藥物處理 24 小時後，改換為 100 μ l 含有 0.5 mg/ml MTT solution 的 culture medium，於 37 °C 的細胞培養恆溫箱中作用 1 小時。然後以 DMSO 於室溫下作用 10 分鐘，使用 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader 讀取波長 550 nm 吸光值的變化。其吸光值的數據依據細胞數標準曲線 (standard curve) 求出細胞存活數目。與對照組比較之百分比即為細胞存活率。

4. 流式細胞儀 (flow cytometry) 測定細胞凋亡與細胞週期

細胞以 TGF- β 1 或藥物處理後，將收集的細胞以冰的 70 % v/v ethanol 再懸浮 (resuspension) 後放置於 -20°C，30 分鐘以上。細胞在室溫下加入 0.2 ml DNA 萃取液 (0.2 M Na₂HPO₄- 0.1 M citric acid buffer (pH 7.8)) 30 分鐘後離心，再加入 1 ml DNA 染色液—propidium iodide staining buffer (0.1 % Triton X-100, 100 μ g/ml RNase A, 80 μ g/ml propidium iodide (PI) in PBS)，避光下染色 30 分鐘。將細胞過濾後跑流式細胞儀，以 FACScan 和 CellQuest program (Becton Dickinson) 分析細胞週期。同時，分析 DNA 含量低於 G₀/G₁ peak (2N) 的區域，代表細胞凋亡所造成的 DNA 斷裂。每個樣本皆收集 10000 個細胞來分析結果。

5. Caspase-3 activity 之測定

本實驗是使用 Caspase-3 Activity Assay Kit (R&D System)。細胞加入藥物處理 24 小時後，將細胞刮下，以 300g 離心 5 分鐘，丟棄上清液。加入 25 μ l 冰冷的 cell lysis buffer，冰浴 (4°C) 10 分鐘後，於 4°C 以 10000 $\times$ g 超高速離心 1 分鐘。抽取上清液，cell lysate 中蛋白質濃度約為 2-4 mg/ml。然後將所得 cell lysate 加至 96-well 的培養盤中，加入反應所需的等體積的 2X Reaction Buffer, DTT 以及 Caspase-3 colorimetric substrate (DEVD-pNA)，充分混合均勻，在 37°C 下反應 1-2 hr。利用 microplate reader 讀取波長 405 nm 的吸光值。

6. 粒腺體電位 ($\Delta\Psi_m$) 的測定

粒腺體電位 (mitochondrial transmembrane potential, $\Delta\Psi_m$) 是由於膜內外電子分配不均，造成膜內側有較高的負電性所形成的。而許多帶正電、脂溶性、會發出螢光的染劑會快速且選擇性的被吸引在粒腺體的膜上；但當膜電位喪失時，這些染劑就會離開。而我們使用 MitoTracker (CMXRos) 以流式細胞儀來分析。將 Hep3B 細胞置換成 serum-free medium 再加入藥物刺激後，在收集細胞的時間前 20 分鐘，再加入 CMXRos (反應濃度為 30 nM) 於 37 °C 的細胞培養恆溫箱中作用 20 分鐘，須避光。以 trypsin 收集細胞，使用 PBS 再懸浮 (resuspension) 之後以流式細胞儀分析。每個樣本皆收集 10000 個細胞來分析結果。

7. Reactive oxygen Species (ROS) 的測定

將 Hep3B 細胞改換成 serum-free medium，加入 DCFH-DA (最後反應濃度 5 μ M) 於 37 °C 的細胞培養恆溫箱中避光作用 30 分鐘後，再以 TGF- β 1、藥物或 H₂O₂

處理所需時間後，以 trypsin 收集細胞。其中， H_2O_2 當作 positive control。使用 PBS 再懸浮之後以流式細胞儀 FACSscan 和 CellQuest program (Becton Dickinson) 分析。每個樣本皆收集 10000 個細胞來分析結果。

8. DNA 合成的測定

以 [3H]thymidine 攝入量來測定細胞中 DNA 合成量 (Huang et al., 1992; Watabe et al., 1984)。Hep3B 細胞在培養瓶中長滿後，以 0.25 % trypsin in HBSS 收集之，經離心 (250 g) 5 分鐘後，再以含 10 % FBS/DMEM 稀釋細胞，以 10^4 cells/well 的密度將細胞種在 96-well 的細胞培養盤中。做實驗前以 DMEM 靜止細胞生長 48 小時後，加入待測藥物，在收集細胞前 16 小時加入 [3H]thymidine ($2 \mu Ci/well$)，藥物加入 24 小時後將細胞收集 (harvest)，並以閃爍計數器 (liquid scintillation counter) 測定細胞對 [3H]thymidine 攝入的量，代表細胞 DNA 合成的多寡。

9. DNA 探針之製備

取雙股 DNA ($1.75 \mu M$) $10 \mu l$ 、 T_4 polynucleotide kinase ($5-10 U/\mu l$) $5 \mu l$ 、 T_4 kinase 10X buffer $5 \mu l$ 及 [^{32}P] γ -ATP ($10 mCi/ml$) $15 \mu l$ ，之後水補充至 $50 \mu l$ ，在 $37^\circ C$ 反應 45 分鐘。再於 $65^\circ C$ 反應 5 分鐘將其去活化 (inactivation) 後，置於已 packing 的 G-50 column 中，離心 2,000 rpm, 2 分鐘，使已標示 ^{32}P 之 DNA 探針收集在離心管中。本實驗所用雙股 DNA 為 NF- κB (購於 Promega)，其序列如下：NF- κB , 5'-AGTTGAGGGGATCC CCCCAGGC。

10. Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs)

先將細胞均勻散佈在低張溶液 buffer A ($10mM$ HEPES (pH7.9), $1.5mM$ $MgCl_2$, $10mM$ KCl, $0.5mM$ DTT 及 $1mM$ PMSF) 中，劇烈震盪 10 秒鐘。靜置冰上 10 分鐘後，離心 3,000 rpm 3 分鐘以收集細胞核。再將細胞核均勻散佈在更低張溶液 buffer C ($20mM$ HEPES (pH7.9), 25% glycerol, $420mM$ NaCl, $1.5mM$ $MgCl_2$, $0.5mM$ EDTA, $0.5mM$ DTT 及 $1mM$ PMSF) 中，以 pipette 打 30 下，靜置冰上 20 分鐘，離心 13,000 rpm 5 分鐘，取上清液即為核萃取液，將之存於 $-70^\circ C$ 備用。取核萃取液 ($10 \mu g$ protein) 進行 EMSA 實驗，將 ^{32}P 放射性標誌的 DNA 探針放入核萃取液、Gel Shift Binding 5X Buffer 與 Nuclease-Free Water 組成的反應液中，室溫下反應 30 分鐘。之後加入 10X sample buffer 終止反應，利用 4 % polyacrylamide gel

電泳分析，以分離 protein-DNA complex 及 free probe。用 gel dryer 將 gel 於 80⁰C 下乾燥 1 小時又 20 分鐘，於 -70⁰C 壓片後，以自動放射顯像。

11. 資料分析

所有實驗結果以平均值±標準誤差 (mean ± s. e. mean) 表示，並使用 Student's *t*-test 來做統計分析，當 $P < 0.05$ 時即視為其有統計上之意義。

結 果

第一部份

一、Hep3B 細胞中，檢視 TGF- β 1 引起濃度相依性之細胞凋亡

首先，為了確定 TGF- β 1 的作用，利用光學顯微鏡觀察細胞型態，以及 *in situ* labeling of Annexin V-reaction 的方法觀察螢光染色的情形；若染上 Annexin V 的細胞會發出綠色螢光，則代表細胞走向 apoptosis，而染上 propidium iodide 的細胞發出紅色螢光，則代表 necrosis。在正常細胞，可看到完整的細胞形狀 (Fig. 1-1A)，且幾乎看不到有染上 Annexin V 的細胞 (Fig. 1-1C)；然而，在經過 TGF- β 1 處理 24 小時的細胞，可看到類似 apoptosis 的型態 (Fig. 1-1B)，且很明顯的染上 Annexin V (Fig. 1-1D)，因此可認為是 TGF- β 1 會引起 Hep3B 細胞凋亡。

接著，利用 MTT 檢測法 (Fig. 1-2A) 與流式細胞儀 (Fig. 1-2B) 的方法來定量。因 MTT 可被活細胞的粒腺體代謝成紫色 formazan 的特性，來當作偵測細胞存活的指標；收集的細胞使用 propidium iodide (PI) 染色後，以流式細胞儀分析 DNA 含量 (即細胞週期)，來評估細胞凋亡所佔的百分比。TGF- β 1 所引起的 Hep3B 細胞凋亡的作用呈現濃度相依性。另外，根據這個結果，我們分別選用 3 與 10 ng/ml 的 TGF- β 1 來測試龍膽瀉肝湯及其組成成份的效果。

二、龍膽瀉肝湯對於 TGF- β 1 引起細胞凋亡的效果

為了研究龍膽瀉肝湯之藥效，首先檢測龍膽瀉肝湯的混合物有無作用。利用 MTT 檢測法，可看到龍膽瀉肝湯的混合物 (10-300 μ g/ml) 可抑制 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡，且呈現濃度相依性 (Fig. 1-3)。在 TGF- β 1 3 與 10 ng/ml 的作用下，可完全抑制 TGF- β 1 作用之混合物的濃度分別是 100 與 300 μ g/ml。本實驗亦以流式細胞儀分析法來印證，同樣可得到這個結果 (數據未列)。

三、龍膽瀉肝湯之主要組成成份的效果

為了決定龍膽瀉肝湯之藥效主成份，在本研究，我們檢查龍膽瀉肝湯中五種藥材之主成份：gentiopicroside (來自龍膽草), baicalein (黃芩), geniposide (梔子), alisol B monoacetate (澤瀉), saikosaponin-d (柴胡)。結果顯示，gentiopicroside 與 baicalein 可有效的抑制 TGF- β 1 引起的細胞凋亡，因此可觀察到細胞形態較完整 (分別於 Fig. 1-4C

及 1-4D) 及染上 Annexin V 的細胞明顯減少(分別於 Fig. 1-4C 及 1-4D 之插入方格)。然而, geniposide 幾乎沒有作用, 仍然可看到細胞形狀十分不完整 (Fig. 1-4E), 以及呈現 Annexin V 螢光 (Fig. 1-4E 之插入方格)。相反的, 在不含 TGF- β 1 的情況下, alisol B monoacetate 與 saikosaponin-d 本身即會引起大量的細胞死亡。處理 alisol B monoacetate 的細胞, 可觀察到類似 apoptosis 的形態 (Fig. 1-4F) 及明顯染上 Annexin V (Fig. 1-4F 之插入方格); 處理 saikosaponin-d 的細胞, 則觀察到類似 necrosis 的形態 (Fig. 1-4G) 及明顯染上 propidium iodide, 而非 Annexin V (Fig. 1-4G 之插入方格)。

我們更進一步地使用 MTT 檢測法來定量分析, 發現 gentiopicroside 與 baicalein 對於 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡皆存有濃度相依性的抑制作用 (分別於 Fig. 1-5A 及 1-5B), 而 baicalein 的作用強度約是 gentiopicroside 的十倍。而 geniposide 則沒有抑制作用 (Fig. 1-5C); 相反的, 還會稍微增加 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡。值得注意的是, baicalein 除了有抑制細胞凋亡的作用, 在高濃度 ($\geq 100 \mu\text{M}$) 下會促進細胞的增生 (Fig. 1-5B)。然而, alisol B monoacetate 與 saikosaponin-d 本身在這個細胞株就會導致細胞毒性, 且呈濃度相依性 (分別於 Fig. 1-5D 及 1-5E); 而 saikosaponin-d 的作用強度是 alisol B monoacetate 的十倍。另外, 本實驗亦有使用流式細胞儀來印證此定量分析, 也得到類似的結果 (數據未列)。

四、Caspase-3 like 活性之測量

目前已知細胞凋亡的過程當中, caspases 的活化扮演必要的角色。很多文獻報告指出, 在不同的刺激下, caspase-3 的活化在 caspase cascade 中是最主要之一。因此, 我們測量 caspase-3 like 的活性。TGF- β 1 很明顯的增加 caspase-3 like 活性 (Fig. 1-6)。Gentiopicroside ($300 \mu\text{M}$) 與 baicalein ($100 \mu\text{M}$) 分別有顯著及完全的抑制 TGF- β 1 所引起的 caspase-3 like 的活性增加, 而 geniposide 只有稍微影響 TGF- β 1 的作用, 但沒有統計意義 (Fig. 1-6)。Alisol B monoacetate 單獨本身會引起適度的 caspase-3 like 的活性增加, 而 saikosaponin-d 則不會 (Fig. 1-6)。再進一步分析 TGF- β 1 及這些成份 apoptosis 的百分比與 caspase-3 like activity 的結果, 呈現正向的線性回歸, 其相關係數 (correlation coefficient, r 值) 為 0.94 (Fig. 1-7)。

五、Alisol B monoacetate 對於 cdc2 kinase 之影響

因為之前利用流式細胞分析法觀察細胞的細胞週期, 發現加入尚未引起細胞大量

死亡的高濃度(30 μM)之 Alisol B monoacetate 時，會增加 G_2/M phase 的百分比(Fig. 1-8)，因此懷疑 Alisol B monoacetate 是否有使細胞 arrest 在 G_2/M phase 的能力。而文獻指出，使細胞停留在 G_2/M phase 的酵素主要是 cdc2 kinase (Lundberg and Weinberg, 1999)，因此，我們加入 cdc2 kinase inhibitor, olomoucine (60 μM)，再來觀察細胞週期。結果在 olomoucine 的存在下，加入 Alisol B monoacetate 後，無論是 apoptosis 或 G_2/M phase 的百分比都沒有改變(數據未列)。故我們認為 Alisol B monoacetate 的作用應該沒有經由 cdc2 kinase 的訊息傳遞而來的。

第二部分

一、Baicalein 的抗凋亡作用：

因為在第一部分時發現 baicalein 可以百分之百完全抑制 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡，所以我們再仔細探討 baicalein 的作用機轉。利用 PI 染色跑流式細胞儀，觀察 DNA 含量變化，以測定細胞週期 (cell cycle) 的進行，而 DNA 含量低於 G_0/G_1 phase (2N) 的區域則代表細胞凋亡所造成的 DNA 斷裂。與第一部份的結果一致，加入 TGF- β 1 會引起細胞凋亡，而 baicalein 可濃度相依性的抑制這個作用 (Fig. 2-1A)，且在濃度 100 μM 可完全抑制。有趣的是，細胞週期中代表 DNA 正處於複製狀態的 S 與 G_2/M phase，也隨著 baicalein 濃度增加而增加 (Fig. 2-1B)，代表 baicalein 會促使細胞進入細胞週期。關於這部份，我們之後會有更進一步的實驗討論。

二、粒腺體膜電位之變化：

文獻報告指出，在細胞凋亡的早期，可觀察到粒腺體功能失調 (mitochondria dysfunction) 因此，我們利用 MitoTracker Red (CMXRos) 染劑，來偵測粒腺體的電位 ($\Delta\Psi_m$)。它是帶正電的脂溶性之螢光染劑。當細胞正常時，會維持一定的負電位，此時細胞會染上染劑發出螢光；否則，粒腺體中電位喪失，螢光強度便減少。如圖所示，正常細胞可維持 $\Delta\Psi_m$ (Fig. 2-2A)，而 TGF- β 1 可濃度相依性的使 $\Delta\Psi_m$ 喪失 (Fig. 2-2B and 2-2C)。Baicalein 在濃度 10 與 30 μM 時，明顯阻止 TGF- β 1 之 $\Delta\Psi_m$ 的喪失 (Fig. 2-2D and 2-2E)，符合 baicalein 抑制細胞凋亡的作用。有趣的是，在功能性試驗中 baicalein (100 μM) 能夠完全抑制 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡；但是，TGF- β 1 加上 baicalein (100 μM) 卻會造成更大的 $\Delta\Psi_m$ 喪失 (Fig. 2-2F)。進一步發現，baicalein (100 μM) 本身就會造成 $\Delta\Psi_m$ 喪失 (Fig. 2-2G)。這個現象與 baicalein

抑制細胞凋亡的結果並不符合，值得更深入的探討。

三、Baicalein 的抗凋亡作用是否因抑制 lipoxygenase 的作用而來：

已知 baicalein 為 lipoxygenase 抑制劑 (Sekiya et al., 1982)，為了了解 baicalein 的抑制細胞凋亡作用是否經由抑制 lipoxygenase (LOX) 而來，我們使用 LOX 的主要代謝產物 (metabolites)，15-HETE 與 12-HETE。若是經由 LOX 抑制劑的作用而來，則 TGF- β 1 加 baicalein 之後，再加入 15-HETE, 12-HETE，或是直接加入 15-HETE, 12-HETE，應該會引起細胞凋亡。我們的實驗結果發現兩個主要產物在高濃度 (300 μ M) 下，皆不會引起細胞凋亡 (Fig. 2-3)。因此，baicalein 抑制細胞凋亡的作用並不是經由 LOX 抑制的作用而來。

四、Baicalein 的 anti-apoptosis 作用是否經 MAPK cascade 或 PI3 Kinase 而來：

已知 insulin/insulin-like growth factor 會完全抑制 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡，且其作用是經由 mitogen-activated protein kinase cascade (Ras/Raf-1/MEK/ERK pathway) 及 phosphatidylinositol-3 kinase/Akt (Chen et al., 1998)。因此，我們想了解 baicalein 抑制 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡之作用，是否亦經由活化 ERK pathway 或 PI3 kinase 而來。因 PD98059 為 MEK inhibitor，可抑制 ERK 的活化； α -hydroxyfarnesyl phosphonic acid 為 Ras/Raf inhibitor；而 wortmannin 為 PI3 kinase inhibitor。結果發現，不論是 PD98059 (30 μ M)， α -hydroxyfarnesyl phosphonic acid (10 μ M) 或 wortmannin (1 μ M) 皆無法抑制 baicalein 的保護作用，且四組均無明顯差異 (Fig. 2-4)。所以，baicalein 的作用並不是經由活化 ERK pathway 或 PI3 kinase 而來。

五、Baicalein 的 anti-apoptosis 是否經 p38 而來：

P38 SAPKinase 在肝臟再生能力中，扮演十分重要的角色 (Spector et al., 1997)。因此，使用 P38 抑制劑-SB203580，來測試對 baicalein 作用的影響。結果顯示，baicalein 完全抑制 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡之作用並沒有被 SB203580 (3 或 10 μ M) 所影響 (Fig. 2-5)，故 baicalein 抑制細胞凋亡之作用與 P38 無關。

六、探討 ROS 的參與：

有文獻報告指出，TGF- β 1 所引起的細胞凋亡與 reactive oxygen species (ROS) 有關，且 baicalein 為很強的抗氧化劑。因此我們想觀察 ROS 在此所扮演的角色。首先，

使用 Trolox (水溶性的維他命 E) 高到濃度 3mM, 僅可部份抑制 TGF- β 1 引起的細胞凋亡 (Fig. 2-6), 而 baicalein 同樣可完全抑制 (Fig. 2-6)。由此, 我們認為 TGF- β 1 的作用與 ROS 之間的關係可能不是直接的相關。

接著, 利用 DCFH-DA 染色, 來偵測細胞內 ROS 的含量。DCFH-DA 進入細胞後, 會被水解成 DCFH, DCFH 遇到 ROS 會產生有螢光的 DCF。因此, 有 ROS 出現時, 螢光強度便會增強, 它是一個常用於偵測 ROS 之 marker。結果發現, 加入 TGF- β 1 並不會增加 ROS (Fig. 2-7A), 但是 TGF- β 1 加 baicalein 反而會增加 ROS, 且隨著 baicalein 濃度增加而增加 (Fig. 2-7B and 2-7C)。更進一步發現, baicalein 本身就會明顯增加 ROS 的表現 (Fig. 2-7D and 2-7E)。這個結果相當令人意外; 造成細胞凋亡的 TGF- β 1 測不到 ROS 產生, 而保護細胞免於凋亡的 baicalein 卻測到大量的 ROS 表現。不禁令人懷疑, 在這個實驗模式裡, 對 DCFH-DA 敏感的 ROS 是否並不是有害的, 甚至為有益於細胞存活的呢?

七、對 NF- κ B 之影響:

已有許多文獻報告指出, 過氧化氫 (H_2O_2) 會導致 NF- κ B 的活化, 且加入 catalase 將過氧化氫轉變成水和氧之後, 便抑制 NF- κ B 的活性。而 NF- κ B 活化會促進細胞增生及抑制細胞凋亡。為了解 baicalein 增加細胞內過氧化氫, 與其保護細胞作用之間的角色, 利用 EMSA 來分析這個轉錄因子的活性。如 Fig. 2-8 所示, 細胞在一般狀況下即存有基本的 NF- κ B 活性, 以維持正常的生理功能。加入 TGF- β 1 刺激一小時, 明顯抑制 NF- κ B 活化; 與 baicalein 同時存在下, 則 NF- κ B 活性不減反增, 而 baicalein 單獨作用下即有明顯的 NF- κ B 表現 (Fig. 2-8), 表示 baicalein 可導致 NF- κ B 的活化。其中 NF- κ B 與探針 (probe) 結合後所在的位置可由加入十倍未標定 P^{32} 的 NF- κ B 探針, 或添加 p65, p50 的抗體, 來加以確認。

接著再利用 DCFH-DA 染色, 可觀察到 baicalein 在一小時之內即會引起過氧化氫 (Fig. 2-9), 表示 baicalein 引起過氧化氫的時間在 NF- κ B 之前。Catalase 4000 U/ml 抑制 baicalein 與 baicalein 加 TGF- β 1 所引起的 ROS 表現 (Fig. 2-9), 但無法完全抑制, 且本身對於對照組並無作用 (Fig. 2-9)。再看 Fig. 8 EMSA 的結果, catalase 本身對 NF- κ B 表現也沒有影響, 但卻可以抑制 baicalein 與 baicalein 加 TGF- β 1 所引起的 NF- κ B 活化 (Fig. 2-8)。由上述結果, 我們推論 baicalein 所產生的過氧化氫應該有參與 NF- κ B 的活化, 進而保護細胞, 抑制細胞凋亡。

八、TGF- β 1 與 PKC 之關係：

利用 PI 染色，我們發現加入 PKC 抑制劑，Ro-318220 (1 or 3 μ M) 與 staurosporine (0.1 μ M)，幾乎可以完全抑制 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡 (Fig. 2-10)。表示 TGF- β 1 引起的細胞凋亡，PKC 在其中扮演十分重要的角色。是否 TGF- β 1 的作用主要是有 PKC 的參與；若是的話，有兩種可能性，一是因 PKC 的活化來造成細胞的凋亡，另一是因 PKC 活化之後的去活化 (inactivation) 來造成的。因此，加入 PKC 的活化劑 PMA，刺激 24 小時，無論低濃度 30 nM 促進 PKC 活化，或高濃度 1 μ M 造成 PKC 去活化，兩個結果都不會引起細胞凋亡 (Fig. 2-11)。

九、Baicalein 的細胞增生作用：

由 Fig. 2-1 觀察細胞週期，可發現 baicalein 除了可降低 TGF- β 1 引起的細胞凋亡，S/G₂/M phase 的百分比也明顯增加。因此，再測定 [³H]-thymidine incorporation，以 [³H]-thymidine 的攝入量來偵測細胞中 DNA 合成的量，並以此代表細胞增生 (cell proliferation) 的程度，來印證 baicalein 的細胞增生作用。結果證實，baicalein 確實有細胞增生的作用，並呈現濃度相依性 (Fig. 2-12)。而且，由 MTT 結果看到的 baicalein 加 TGF- β 1 的細胞數增加的現象，是由於 baicalein 本身即有的細胞增生作用而來。因此，baicalein 除了有抑制細胞凋亡的作用之外，還會造成細胞增生。

十、Baicalein 細胞增生作用之因素：

為了探討 baicalein 的細胞增生之作用，我們使用 wortmanine (PI3K 的抑制劑)，Ro-318220 (PKC 抑制劑)，PD98059 (MEK/ERK 抑制劑)， α -hydroxyfarnesylphosphonic acid (Ras/Raf 抑制劑)，SB203580 (p38 抑制劑) 來觀察 baicalein 增加 S/G₂/M phase 作用之影響。結果並沒有任何改變 (Fig. 2-13)。因此，baicalein 細胞增生作用的途徑並沒有經由 PI3K，PKC，P38 或 Ras/Raf/ERK cascade 而來。

討 論

第一部份

龍膽瀉肝湯是常用的傳統中藥方劑之一，用來治療慢性肝炎病人，可改善病人的肝功能及不適的症狀。然而，它的作用原理直到目前為止，仍尚未被建立。本篇論文的目的即是來評估龍膽瀉肝湯的藥理作用，以保護肝細胞免於死亡的角色，來說明其在臨床應用上的可能潛在功能。

首先，Yoo et al.發現在感染 B 型肝炎病毒 (HBx) 的早期，會增加 TGF- β 1 的表現，而認為 TGF- β 1 在 B 型肝炎病毒所引起的病理現象中伴演重要的角色 (Yoo et al., 1996)。且慢性 B 型肝炎病人 (Liu et al., 1999)、慢性 C 型肝炎病人 (Roulot et al., 1999; Nelson et al., 1997)、慢性病毒性肝炎病人 (Zhang et al., 1999)、肝硬化 (Liu et al., 1999; Tsai et al., 1997)、猛爆性肝炎中 (Nakamura et al., 2000; Miwa et al., 1997)，皆可觀察到 TGF- β 1 的 protein 或 mRNA 大量表現，且隨著病情惡化而增加，因此認為 TGF- β 1 可能反應了肝臟發炎的嚴重度，及導致之後的肝臟纖維化及肝硬化。當干擾素 (interferon- α) 治療過後，則 TGF- β 1 的量即明顯下降 (Grungreiff et al., 1999; Tsushima et al., 1999)。

TGF- β 1 是一個發炎反應有關的細胞激素 (cytokine)，可刺激細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 的合成與調控肝細胞的生長 (Milani et al., 1991)。在組織細胞的修護過程中，扮演重要的角色 (Singer and Clark, 1999)。但是，若過度活化，則會造成肝臟纖維化，甚至肝硬化 (Border and Noble, 1994) 以及引起肝細胞的死亡 (Patel et al., 1998)。而肝細胞的死亡，與許多肝臟病理情況及肝功能惡化有密切相關 (Patel and Gores, 1995; Alison, 1994)。

因此，我們使用 TGF- β 1 於人類肝臟的細胞株 Hep3B 引起細胞凋亡，當作一個指標，來評估龍膽瀉肝湯的保肝作用。結果顯示，其混合物可有效抑制 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡。為了決定其中有效成分，我們選出 5 個主要成分來分析。其中，gentiopicroside 與 baicalein 可抑制 TGF- β 1 的作用，如此可說明龍膽瀉肝湯的抑制細胞凋亡作用，而 geniposide 則沒有作用。且 baicalein 的作用強度遠大於 gentiopicroside，因此推測在龍膽瀉肝湯中，baicalein 應為主要有效成分。在中國藥材學中 (謝明村等著，1988) 也記載了『黃芩對各類型肝炎所出現之黃疸有良效。在肝

炎早期，尤其黃芩尤需重用，利膽消黃效果迅速』更證實了黃芩或 baicalein 的重要性。關於這個結果，與前人的動物實驗結果一致。

1. 口服 gentiopicoside 30-60mg/kg/day 於小鼠(mice)，可部分抑制 CCl₄、lipopolysaccharide(LPS)/bacillus Calmette-Guerin(BCG) (Kondo et al., 1994) 與 D-galactosamine/LPS (Hase et al., 1997) 所引起的肝發炎情形，降低肝功能指數(GOT、GPT)。
2. 小柴胡湯方劑藉由升高 hepatocyte growth factor (HGF) 與降低 TGF- β 1 的產生而增加肝臟再生能力。其中於大鼠肝臟中可發現大量 baicalein、baicalin 存在 (Ono et al., 2000)。且同時有實驗證實，小柴胡湯方劑的抗肝纖維化作用可能主要是因為 baicalein 的作用 (Inoue and Jackson, 1999)。
3. 雖然 geniposide 並沒有抑制 TGF- β 1 的作用，但值得注意的是 Yamamoto et al. 發現 in vivo 實驗中，geniposide 只有在口服時，才可抑制由 Fas 引起的肝細胞凋亡作用，i.p.注射則無效；而 geniposide 被腸內細菌水解而成的 genipin，則無論是口服或注射皆可抑制肝細胞凋亡作用，推測 genipin 才是真正有效產物 (Yamamoto et al., 2000)。且 Wang et al. (1991) 發現大鼠口服 geniposide 連續三天有保肝作用，可明顯減少 aflatoxin B1 的肝毒性。因此，未來還需要更進一步的研究 geniposide 的水解產物 genipin，是否可有效抑制 TGF- β 1 引起的細胞凋亡。

已知細胞凋亡需要許多細胞內訊息傳遞物質的參與。其中，最重要的是 cysteine proteases (caspases) 的活化。許多不同作用機制的細胞凋亡刺激劑，最後都會殊途同歸地活化 caspases (Wyllie, 1997)。直到目前為止，已經找出十幾種不同的人類 caspases (Thomberry and Lazebnik, 1998)。其中 caspases-3 的活化，扮演非常重要的角色，為細胞凋亡的執行者 (Stennicke and Salvesen, 1998)。而且，有參與在 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡中 (Inayat-Hussain et al., 1997; Hung et al., 1998)。本篇論文亦證實，無論在 TGF- β 1 引起的細胞凋亡或 gentiopicoside、baicalein 的抑制細胞凋亡作用中，皆可看到 caspases-3 平行的活性增加或減少，其相關係數為 0.94，顯示 caspase-3 在 TGF- β 1 所引起的 apoptosis 與這些中草藥成份的 anti-apoptosis 的訊息傳遞中扮演十分重要的角色。即 caspases-3 的活化，在本實驗模式下，可能扮演執行細胞凋亡的角色。當然，我們仍無法排除其他 caspases 亦有參與其中。

Alisol B monoacetate 與 saikosaponin-d 本身皆會造成 Hep3B 細胞的死亡，但兩者的作用機制是不同的。alisol B monoacetate 的細胞毒性較溫和，需要反應時間較長，且細胞變圓，染上 Annethin-V，推測為細胞凋亡 (apoptosis) 的死亡。而 saikosaponin-d 處理一小時，即會引起細胞毒性，且細胞整片整片的漂浮在培養液中，染上 propidium iodide，推測為細胞壞死 (necrosis) 的死亡。同樣地，saikosaponin-d 在其他人類肝癌細胞株中，亦有細胞毒性，如在 HuH-7 細胞株中會造成細胞壞死 (Qian et al., 1995)；在 PLC/PRF/5 及 HepG2 細胞株中，會抑制細胞生長 (Motoo and Sawabu, 1994)。

臨床實驗與動物實驗中，柴胡與 saikosaponins 可有效改善慢性肝炎及 CCL₄ 或 D-galactosamine 引起的肝毒性。實驗發現無論給予 saikosaponins 或小柴胡湯 3 個月以上，症狀與肝功能 GOT、GPT、 γ -globulin 均有改善 (生藥柴胡與柴胡方劑, 林俊清, 1990)。在這裡我們推測 saikosaponins 在 in vivo 及 in vitro 的作用不同，可能為：

1. Human hepatoma cell line 與 Primary human liver cell 的不同。雖然我們使用的是分化良好接近正常肝細胞的肝癌細胞細胞株，但也許 saikosaponin-d 非常敏感，甚至可以說它可能為一有選擇性的抗癌藥物。在 human hepatoma cell line 中，saikosaponin 需要較高濃度來抑制細胞生長 (Motoo and Sawabu, 1994)
2. saikosaponins 需要被代謝成有效代謝物之後才有保肝作用。因此，造成 in vivo 及 in vitro 的作用不同。目前也發現 saikosaponin a 在腸胃道會被代謝成幾種分別有不同藥理作用的代謝物 (Fujiwara and Ogihara, 1986)

另外，在龍膽瀉肝湯之混合物中，即使高達 300 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度，仍未造成細胞死亡的情形。在中國醫學的方劑中，所選擇的藥物有君、臣、佐、使之分，『君』是主藥，『臣』是輔藥，『佐』是治療兼症或監制之藥，消除某些藥物毒性及調和某些藥物偏性的藥物，『使』是引經的或起調和作用之藥物。因此，或許在龍膽瀉肝湯的混合方劑中，含有可消除 saikosaponin-d 毒性之『佐』藥，而未來我們可以更進一步的研究。

除此之外，alisol B monoacetate 可藉由抑制由 LPS 刺激的巨噬細胞 nitric oxide(NO) 的合成 (Matsuda H., 1999; Kim NY., 1999) 及抑制補體的活化 (Matsuda et al., 1998) 來達到抗發炎的作用。Saikosaponins 亦可經由抑制 cyclooxygenase 與 lipooxygenase 活性，及抑制嗜中性細胞分泌出 platelet-activating factor (PAF)，而觀

察到 *in vivo* 或 *in vitro* 皆有消炎作用 (Bermejo Benito et al., 1998; Recio et al., 1995; Nakamura et al., 1993), 且有部分抑制病毒活性的能力 (Ushio and Abe, 1992)。或許 alisol B monoacetate 與 saikosaponins 在龍膽瀉肝湯治療肝發炎的效果中, 並不是因為直接抑制肝細胞的死亡, 而是因為他們間接的抗發炎作用而來。

TGF- β 1 在 *in vivo* 或 *in vitro* 都是一個很強的肝細胞生長抑制劑, 可調控正常生理狀況與參與終止肝細胞再生的過程。因為可刺激 ECM 的增加而幫助傷口的癒合。然而, 在許多肝臟疾病中, 如慢性肝炎等, TGF- β 1 的作用反而是不受歡迎的, 它會使得肝臟組織纖維化及抑制肝細胞生長, 而惡化了肝臟功能。所以在肝細胞中, 抑制 TGF- β 1 引起的肝細胞死亡, 對於肝臟發炎的情況, 應該會有保護作用。基於這點, 我們觀察龍膽瀉肝湯及其組成成分的作用, 發現混合物與 gentiopicroside 與 baicalein 皆可有效抑制 TGF- β 1 引起的細胞凋亡。這個抑制作用應該為龍膽瀉肝湯可治療肝病的作用機制之一。

第二部分

由於在第一部份中, 我們使用 TGF- β 1 在 Hep3B 細胞引起細胞凋亡的實驗模式, 來觀察龍膽瀉肝湯及其主要組成成份是否有抑制細胞凋亡的作用。因為這個作用應該為龍膽瀉肝湯治療肝炎病人的作用機轉之一(請參閱第一部份)。我們由 MTTdata 發現 baicalein 可以完全抑制 TGF- β 1 引起的細胞凋亡, 甚至在高濃度 (100 μ M) 時, baicalein 會增加細胞存活數。由於這個特別的作用, 我們很有興趣地來仔細探討 baicalein 的作用機轉。

已知 baicalein 為專一的 LOX 抑制劑。它抑制血小板 LOX 的 IC_{50} 為 0.12 μ M, 而抑制 COX 的 IC_{50} 為 830 μ M (6917 倍) (Sekiya and Okuza, 1982)。對 LOX 之抑制主要是 12-LOX 與 15-LOX (Ghosh and Myers, 1998; Nishio and Watanabe, 1997)。人類有三種 LOX, 5-, 12-與 15-LOX, 而 LOX 的反應, 可以啟動訊息傳遞分子的合成, 影響細胞的結構與代謝, 因單一脂肪酸氧化的形成, 對於訊息的傳遞是很重要的 (Brash, 1999)。LOX 的代謝產物為 HETEs (Cho et al., 1991), 而 HETE 的功能很多, 關於細胞生長的調節方面, 絕大部份的實驗顯示 12-HETE 與 15-HETE 有細胞增生的作用, 在血管平滑肌細胞 (Nishio and Watanabe, 1997), 動脈內皮細胞 (Setty et al., 1987), 肌纖維母細胞 (Kiran Kumar et al., 1993), 淋巴球母細胞 (Maddox et al., 1991), 晶狀體上皮細胞 (Lysz et al., 1994) 及 *in vivo* 中的天竺鼠表皮細胞 (Chan et al., 1985)

中皆可觀察到。但是 Smith et al. 發現 12-HETE 在兔子主動脈平滑肌細胞與小鼠黑色瘤細胞中，有很強的抗增生作用，而 5-HETE 則無效 (Smith et al., 1984)。另外，在人類臍動脈平滑肌細胞中，5-, 12-, 15-HETE 皆可抑制細胞增生，且血清含量越低，抑制能力愈強 (Brinkman et al., 1991)。但是我們加入 LOX 代謝物，12-HETE 與 15-HETE 並沒有看到與 baicalein 相反的作用，即不會造成細胞凋亡。在這裡看不到作用應該不是因為濃度不夠的關係，因為我們從 30 nM (數據未列) 逐漸增加到濃度 300 nM，已高於細胞內訊息傳遞中可能產生的量，皆不會引起細胞凋亡。也許我們應該再將 12-HETE 加入 baicalein 與 TGF- β 1 實驗組，以排除 LOX 與其他訊息傳遞分子間的協同作用，但是，baicalein 這兩個作用所需濃度差異很大，在血小板中抑制 LOX 作用的 IC₅₀ 為 0.12 μ M，在人類胎盤絨毛膜 (Kisch et al., 1997) 及大鼠腎皮質切片與近腎絲球細胞 (juxtaglomerular-like cells) 中，baicalein 1 μ M 皆可完全抑制 angiotensin II 所引起的 12-HETE 增加 (Antonipillai et al., 1989)。這些濃度對於 TGF- β 1 的作用完全沒有任何影響。因此，初步排除 TGF- β 1 引起的細胞凋亡，與 baicalein 的抑制作用是經由 LOX 而來的。

Cytokines (如 TNF- α) 及 growth factors 在 in vivo 或培養的肝細胞中，都可以調控細胞增生與細胞凋亡 (Michalopoulos and Defrances, 1997; Fausto et al., 1995; Thorgeirsson et al., 1998)。Growth factors (如 IGF 與 EGF) 不但是有絲分裂因子 (mitogenic factors)，在 in vivo 或 in vitro 亦可保護細胞免於死亡 (Baserga, 1994; Michalopoulos and Defrances, 1997; Fabregat et al., 1996)。Hung et al. (1993) 發現 insulin (10^{-7} M) 可以完全抑制 TGF- β 1 (6 ng/ml) 刺激 48 小時，在 Hep3B 細胞所引起的細胞凋亡。IRS-1 (insulin receptor substrate 1) 為 insulin/IGF receptor tyrosine kinase activity 的受質，亦可調控正常細胞生長 (Sasaki et al., 1993) 及抑制 TGF- β 1 於 Hep3B 細胞引起的細胞凋亡，且同時看到 MAPK 與 PI3K 的活化 (Tanaka and Wands, 1996)。Epidermal growth factor (EGF) 與 IGF 類似，同樣藉由 PI3K 與 ERK 來達到抑制 TGF- β 1 於大鼠肝細胞的細胞凋亡作用 (Robert et al., 2000)。而 TNF- α 抑制 TGF- β 1 所引起大鼠肝細胞的凋亡，不須 PI3K 參與而是活化了 ERK 及 p38 SAPK (Robert et al., 2000)。但是在本篇實驗中，我們發現 baicalein 的抑制細胞凋亡作用與 growth factors 類及 cytokine 類的作用機制不同，並不是經由 MAPK cascade, PI3K 或 p38 而來的。

由於 PKC 在細胞的生理功能中扮演很重要的角色，可調控細胞增生 (Rind and Whittemore, 1999; Lee and Yea, 2000; Piacentini et al., 2000; Yano et al., 1999; Yoshiji

et al., 1999 ; Lijnen and Petrov, 1999)、抗增生 (Takahashi et al., 2000 ; Kruger et al., 1998 ; Shizukuda et al., 1999 ; Sun and Rotenberg, 1999)、細胞分化 (Wang et al., 1997 ; Macfarlane and Manzel, 1994 ; Myklebust et al., 2000)、抑制細胞分化 (Dlugosz et al., 1994 ; Taoka et al., 1990 ; Rind and Whittemore, 1999)、細胞凋亡 (Pongracz et al., 1999 ; Li et al., 1999 ; Basu and Akkaraju, 1999 ; Yahata et al., 1999)、抑制細胞凋亡 (Amin et al., 2000 ; Gomez-Angelats et al., 2000 ; Balci et al., 1999 ; Leirdal and Sioud, 1999)。所以，想來看看 TGF- β 1 引起的細胞凋亡中是否有 PKC 的參與。結果發現 PKC 抑制劑可以完全抑制 TGF- β 1 的作用，但是 PKC 活化劑從低濃度到高濃度皆無法模擬 TGF- β 1 的作用。因此，我們認為在 TGF- β 1 引起的細胞凋亡中，PKC 扮演重要的調控 (modulation) 之角色，而非必要 (essential) 角色，可能還同時需要其他的因子 (factors) 參與來調控 TGF- β 1 的作用。

由於文獻報告指出 TGF- β 1 所產生的細胞凋亡與 ROS 有關 (Sanchez et al., 1996 ; Ribeiro et al., 1999)。在本篇實驗中，我們無法看到 TGF- β 1 在 Hep3B 細胞中所引起的 H_2O_2 產生，卻發現 baicalein 這個抗氧化劑會產生大量的 H_2O_2 。同時也有使用 dihydroethidium (DHE) 觀察 superoxide，結果顯示不論是 TGF- β 1 或 baicalein 皆不會產生 superoxide (數據未列)。關於 TGF- β 1 與 ROS 的關係，也許是 TGF- β 1 在 Hep3B 細胞中產生 ROS 的量太少，而低於 DCFH-DA 的敏感性。且由於 Trolox (水溶性維他命) 非常高濃度 3 mM 仍只能些微抑制 TGF- β 1 的作用，我們認為 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡與 ROS 並沒有很大的關係。

目前已經有很多文獻報告說， H_2O_2 會促進 NF- κ B 的活化 (Schreck et al., 1991 ; Meyer et al., 1993)。在這裡我們也發現 baicalein 本身在細胞中會產生 H_2O_2 而且導致 NF- κ B 的活化；TGF- β 1 則會抑制 NF- κ B 活化，再加入 baicalein 之後即恢復 NF- κ B 活性。因為 NF- κ B 有抑制細胞凋亡的作用 (Cahir-McFarland et al., 2000 ; Kim et al., 2000 ; Kawai et al., 1999)，且在肝細胞中是負責細胞存活的基因 (Arsura et al., 1997)。因此，推測 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡作用主要是經由抑制 NF- κ B 的活性而來，而非經由 ROS 的產生，同時 Arsura et al. (1997) 也發現 TGF- β 1 在老鼠的正常肝細胞株當中，因為抑制 NF- κ B 的活化，而導致肝細胞凋亡。且 baicalein 之所以能抑制 TGF- β 1 的作用是因為活化了 NF- κ B，而阻止了 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡。我們也發現 catalase 可減弱昇高的 NF- κ B 活性，雖然並未完全抑制，但是 baicalein 產生大量的 H_2O_2 可能與它的保護作用有關，不過也許還有與其它的物質共同來調控 NF- κ B，未

來還需要更進一步研究。

粒腺體膜電位 ($\Delta\Psi_m$) 的喪失是細胞凋亡的現象之一 (Marzo et al., 1998), 在許多細胞皆可觀察到, 如胸腺細胞 (Castedo et al., 1995; Macho et al., 1996)、T 細胞、B 細胞 (Zamzami et al., 1995)、肝細胞 (Zamzami et al., 1996)、及已變性的腫瘤細胞株 (Decaudin et al., 1997; Metivier et al., 1998)。在處理 TGF- β 1 的細胞中, 可觀察到濃度相依性的 $\Delta\Psi_m$ 之喪失, 而且加入粒腺體電子傳遞鏈 complex I 的抑制劑 (rotenone), 會明顯抑制 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡 (數據未列), 表示粒腺體膜電位與 TGF- β 1 引起的細胞凋亡有關。但是很有趣的是, 雖然 baicalein 低濃度可恢復 TGF- β 1 使 $\Delta\Psi_m$ 喪失的作用, 在高濃度時 baicalein 本身即會引起很強的 $\Delta\Psi_m$ 喪失作用, 這個現象與高濃度 baicalein 能完全抑制細胞凋亡的結果並不符合。我們推測 baicalein 抑制細胞凋亡的作用點主要是在粒腺體的下游, 也就是活化了 NF- κ B, 因此雖然會造成 $\Delta\Psi_m$ 的喪失, 但是活化的 NF- κ B 卻可以抑制 $\Delta\Psi_m$ 喪失所造成的毒性。不過, 真正的原因我們並不清楚。目前有些文獻報導, peroxisome proliferators 會活化 NF- κ B, 而有促進肝細胞增生、及抑制細胞凋亡的作用 (Goll et al., 1999; Roberts et al., 2000; Hasmall et al., 2000; Rusyn et al., 2000; Yeldandi et al., 2000), 而且同時也觀察到 $\Delta\Psi_m$ 的喪失 (Zhou and Wallace, 1999), 也許在 peroxisome proliferators 的訊息傳遞中, $\Delta\Psi_m$ 的喪失並不代表著細胞凋亡, 而是扮演其他的功能。而 baicalein 與 peroxisome proliferators 之間的關係未來還需要更進一步的實驗來確定。

關於 baicalein 的功能在細胞生長的調節方面, 直到目前為止, 文獻中只發現 baicalein 有促進癌細胞凋亡 (Ding et al., 1999; Ikemoto et al., 2000) 與抑制細胞增生的作用 (Kuntz et al., 1999; Ikemoto et al., 2000; Huang et al., 1994)。主要都是減少細胞數目。但是我們發現 baicalein 除了有保護肝細胞免於死亡的作用之外, 還有促進肝細胞增生的作用, 無論是使用 MTT 偵測法、流式細胞儀分析細胞週期、或 [3 H]-thymidine 攝入法, 都可發現細胞數增加或 DNA 合成的作用。由參考文獻中發現, baicalein 在其他的人類肝癌細胞株中, 血清存在下有造成細胞死亡的作用 (Matsuzaki et al., 1996; Motoo and Sawabu, 1994), 但是所使用的濃度為 185 ~ 370 μ M, 非常的高, 在 in vivo 情況下幾乎不可能達到。不過, 在 Hep3B 細胞中, 即使使用 300 μ M 的濃度, 仍可觀察到更強的細胞增生作用。在這裡的矛盾之處, 也許是細胞特異性, 也許是血清濃度不同的影響。未來我們還需要再使用 primary 肝細胞或 in vivo 實驗, 與不同的血清的濃度來進一步證實。但是在動物實驗上可見慢性肝炎的病

理組織呈現血液流動減緩，可知血瘀為慢性肝炎之重要病機之一。且依據中醫的觀點，瘀血亦與黃疸有關。因此，慢性肝炎的病理狀況下，血清的含量應該較平時不足。故中國藥材學（謝明村等著，1988）中表示『黃芩利膽消黃效果迅速』。

結論與建議

由這本篇研究証明龍膽瀉肝湯對於 TGF- β_1 所引發的肝細胞凋亡有保護作用；且挑選出的五種主要組成成分中，gentiopicoside 與 baicalein 可有效抑制 TGF- β_1 所引起的細胞凋亡，geniposide 沒有作用，而 alisol B monoacetate 與 saikosaponin-d 則有細胞毒性。但是，兩者的細胞毒性作用不同，alisol B monoacetate 主要是引起細胞凋亡，saikosaponin-d 則是引起細胞壞死。其中，baicalein 則是抗凋亡作用中最強的主要成分，其抗凋亡作用主要是來自其活化 NF- κ B 的 nuclear translocation。因此，龍膽瀉肝湯的保肝作用應該是因 baicalein 而來的。

圖、表(見 Fig for power point)

參考文獻

- Alison, MR. and Sarraf, CE. Liver cell death: patterns and mechanisms. *Gut*. 1994;35:577-81.
- Amin, HM., Ergin, M., Denning, MF., Quevedo, ME. and Alkan, S. Characterization of apoptosis induced by protein kinase C inhibitors and its modulation by the caspase pathway in acute promyelocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2000;110:552-62.
- Antonipillai, I., Horton, R., Natarajan, R. and Nadler, J. A 12-lipoxygenase product of arachidonate metabolism is involved in angiotensin action on renin release. *Endocrinology*. 1989;125:2028-34.
- Arsura, M., FitzGerald, MJ., Fausto, N. and Sonenshein, GE. Nuclear factor-kappaB/Rel blocks transforming growth factor beta1-induced apoptosis of murine hepatocyte cell lines. *Cell Growth & Differentiation*. 1997; 8:1049-59.
- Babior, BM. and Woodman, RC. Chronic granulomatous disease. *Seminars in Hematology*. 1990;27:247-59.
- Baeuerle, PA. and Henkel, T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annual Review of Immunology*. 1994;12:141-79.
- Balci, A., Sahin, FI. and Ekmekci, A. 1 induced apoptosis in the human promyelocytic leukemia cell line HL 60. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 1999;189:51-7.
- Baserga, R. Oncogenes and the strategy of growth factors. *Cell*. 1994;79:927-30.
- Basu, A. and Akkaraju, GR. Regulation of caspase activation and cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cell death by protein kinase C. *Biochemistry*. 1999;38:4245-51.
- Bedossa, P. and Paradis, V. Transforming growth factor-beta (TGF-beta): a key-role in liver fibrogenesis. *Journal of Hepatology*. 1995;22 Suppl 2:37-42.

- Beg, AA. and Baldwin, AS Jr. The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes & Development*. 1993;7:2064-70.
- Benedetti, A., Di Sario, A., Svegliati Baroni, G. and Jezequel, AM. Transforming growth factor beta 1 increases the number of apoptotic bodies and decreases intracellular pH in isolated periportal and perivenular rat hepatocytes. *Hepatology*. 1995;22:1488-98.
- Bermejo Benito, P., Abad Martinez, MJ., Silvan Sen, AM., Sanz Gomez, A., Fernandez Matellano, L., Sanchez Contreras, S. and Diaz Lanza, AM. In vivo and in vitro antiinflammatory activity of saikosaponins. *Life Sciences*. 1998;63:1147-56.
- Bissell, DM., Wang, SS., Jarnagin, WR. and Roll, FJ. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *Journal of Clinical Investigation*. 1995;96:447-55.
- Blobe, GC., Schiemann, WP. and Lodish, HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *New England Journal of Medicine*. 2000;342:1350-8.
- Border, WA. and Noble, NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *New England Journal of Medicine*. 1994;331:1286-92.
- Brash, AR. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:23679-82.
- Breuer, W., Epsztejn, S. and Cabantchik, ZI. Dynamics of the cytosolic chelatable iron pool of K562 cells. *FEBS Letters*. 1996;382:304-8.
- Brinkman, HJ., van Buul-Wortelboer, MF. and van Mourik, JA. Selective conversion and esterification of monohydroxyeicosa-tetraenoic acids by human vascular smooth muscle cells: relevance to smooth muscle cell proliferation. *Experimental Cell Research*. 1991;192:87-92.
- Burdon, RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radical Biology & Medicine*. 1995;18:775-94.
- Burdon, RH. Control of cell proliferation by reactive oxygen species. *Biochemical Society*

- Transactions. 1996;24:1028-32.
- Burdon, RH. and Rice-Evans, C. Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation. *Free Radical Research Communications*. 1989;6:345-58.
- Butenko, IG., Gladchenko, SV. and Galushko, SV. Anti-inflammatory properties and inhibition of leukotriene C4 biosynthesis in vitro by flavonoid baicalein from *Scutellaria baicalensis* georgy roots. *Agents & Actions*. 1993;39 Spec No:C49-51.
- Cahir-McFarland, ED., Davidson, DM., Schauer, SL., Duong, J. and Kieff, E. NF-kappa B inhibition causes spontaneous apoptosis in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97:6055-60.
- Cain, K., Inayat-Hussain, SH., Couet, C. and Cohen, GM. A cleavage-site-directed inhibitor of interleukin-1 beta-converting enzyme-like proteases inhibits apoptosis in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochemical Journal*. 1996;314:27-32.
- Castedo, M., Macho, A., Zamzami, N., Hirsch, T., Marchetti, P., Uriel, J. and Kroemer, G. Mitochondrial perturbations define lymphocytes undergoing apoptotic depletion in vivo. *European Journal of Immunology*. 1995;25:3277-84.
- Chan, CC., Duhamel, L. and Ford-Hutchison, A. Leukotriene B4 and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid stimulate epidermal proliferation in vivo in the guinea pig. *Journal of Investigative Dermatology*. 1985;85:333-4.
- Chen, RH., Su, YH., Chuang, RL. and Chang, TY. Suppression of transforming growth factor-beta-induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Oncogene*. 1998;17:1959-68.
- Chen, ZJ., Parent, L. and Maniatis, T. Site-specific phosphorylation of IkappaBalpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell*. 1996;84:853-62.
- Cho, H., Ueda, M., Tamaoka, M., Hamaguchi, M., Aisaka, K., Kiso, Y., Inoue, T., Ogino, R., Tatsuoka, T. and Ishihara, T. et al. Novel caffeic acid derivatives: extremely potent inhibitors of 12-lipoxygenase. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1991;34:1503-5.

- Chuang, LY., Hung, WC., Chang, CC. and Tsai, JH. Characterization of apoptosis induced by transforming growth factor beta 1 in human hepatoma cells. *Anticancer Research*. 1994;14:147-52.
- Chung, CP., Park, JB. and Bae, KH. Pharmacological effects of methanolic extract from the root of *Scutellaria baicalensis* and its flavonoids on human gingival fibroblast. *Planta Medica*. 1995;61:150-3.
- Date, M., Matsuzaki, K., Matsushita, M., Sakitani, K., Shibano, K., Okajima, A., Yamamoto, C., Ogata, N., Okumura, T., Seki, T., Kubota, Y., Kan, M., McKeehan, WL. and Inoue, K. Differential expression of transforming growth factor-beta and its receptors in hepatocytes and nonparenchymal cells of rat liver after CCl₄ administration. *Journal of Hepatology*. 1998;28:572-81.
- Decaudin, D., Geley, S., Hirsch, T., Castedo, M., Marchetti, P., Macho, A., Kofler, R. and Kroemer, G. Bcl-2 and Bcl-XL antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Research*. 1997;57:62-7.
- Dethlefsen, SM., Shepro, D. and D'Amore, PA. Arachidonic acid metabolites in bFGF-, PDGF-, and serum-stimulated vascular cell growth. *Experimental Cell Research*. 1994;212:262-73.
- Ding, XZ., Kuszynski, CA., El-Metwally, TH. and Adrian, TE. Lipooxygenase inhibition induced apoptosis, morphological changes, and carbonic anhydrase expression in human pancreatic cancer cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1999;266:392-9.
- Dlugosz, AA., Cheng, C., Williams, EK., Dharia, AG., Denning, MF. and Yuspa, SH. Alterations in murine keratinocyte differentiation induced by activated rasHa genes are mediated by protein kinase C-alpha. *Cancer Research*. 1994;54:6413-20.
- Fabregat, I., Sanchez, A., Alvarez, AM., Nakamura, T. and Benito, M. Epidermal growth factor, but not hepatocyte growth factor, suppresses the apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocytes in primary culture. *FEBS Letters*.

1996;384:14-8.

Fan, G., Ma, X., Kren, BT. and Steer, CJ. The retinoblastoma gene product inhibits TGF-beta1 induced apoptosis in primary rat hepatocytes and human HuH-7 hepatoma cells. *Oncogene*. 1996;12:1909-19.

Fausto, N., Laird, AD. and Webber, EM. Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB Journal*. 1995; 9:1527-36.

Feldmann, G. Liver apoptosis. *Journal of Hepatology*. 1997;26 Suppl 2:1-11.

Fridovich, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*. 1995;64:97-112.

Fujiwara, K. and Ogihara, Y. Pharmacological effects of oral saikosaponin a may differ depending on conditions of the gastrointestinal tract. *Life Sciences*. 1986;39:297-301.

Ghosh, J. and Myers, CE. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95:13182-7.

Gill, JH., James, NH., Roberts, RA. and Dive, C. The non-genotoxic hepatocarcinogen nafenopin suppresses rodent hepatocyte apoptosis induced by TGFbeta1, DNA damage and Fas. *Carcinogenesis*. 1998;19:299-304.

Goll, V., Alexandre, E., Viollon-Abadie, C., Nicod, L., Jaeck, D. and Richert, L. Comparison of the effects of various peroxisome proliferators on peroxisomal enzyme activities, DNA synthesis, and apoptosis in rat and human hepatocyte cultures. *Toxicology & Applied Pharmacology*. 1999;160:21-32.

Gomez-Angelats, M., Bortner, CD. and Cidlowski, JA. Protein kinase C (PKC) inhibits fas receptor-induced apoptosis through modulation of the loss of K⁺ and cell shrinkage. A role for PKC upstream of caspases. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275:19609-19.

Grande, JP. Role of transforming growth factor-beta in tissue injury and repair.

- Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine. 1997;214:27-40.
- Gressner, AM., Lahme, B., Mannherz, HG. and Polzar, B. TGF-beta-mediated hepatocellular apoptosis by rat and human hepatoma cells and primary rat hepatocytes. *Journal of Hepatology*. 1997;26:1079-92.
- Grilli, M., Chiu, JJ. and Lenardo, MJ. NF-kappa B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *International Review of Cytology*. 1993;143:1-62.
- Grungreiff, K., Reinhold, D. and Ansorge, S. Serum concentrations of sIL-2R, IL-6, TGF-beta1, neopterin, and zinc in chronic hepatitis C patients treated with interferon-alpha. *Cytokine*. 1999;11:1076-80.
- Halestrap, AP., Doran, E., Gillespie, JP. and O'Toole, A. Mitochondria and cell death. *Biochemical Society Transactions*. 2000;28:170-7.
- Halliwell, B. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochemical Society Transactions*. 1996;24:1023-7.
- Hase, K., Li, J., Basnet, P., Xiong, Q., Takamura, S., Namba, T., and Kadota, S. Hepatoprotective principles of *Swertia japonica* Makino on D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced liver injury in mice. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1997;45:1823-7.
- Hasmall, SC., James, NH., Macdonald, N., Gonzalez, FJ., Peters, JM. and Roberts, RA. Suppression of mouse hepatocyte apoptosis by peroxisome proliferators: role of PPARalpha and TNFalpha. *Mutation Research*. 2000;448:193-200.
- Heldin, CH., Miyazono, K. and ten Dijke, P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 1997;390:465-71.
- Huang, HC., Hsieh, LM., Chen, HW., Lin, YS. and Chen, JS. Effects of baicalein and esculetin on transduction signals and growth factors expression in T-lymphoid leukemia cells. *European Journal of Pharmacology*. 1994a268:73-8.
- Huang, HC., Wang, HR. and Hsieh, LM. Antiproliferative effect of baicalein, a flavonoid

- from a Chinese herb, on vascular smooth muscle cell. *European Journal of Pharmacology*.1994b; 251:91-3.
- Hung, WC., Chang, HC. and Chuang, LY. Transforming growth factor beta 1 potently activates CPP32-like proteases in human hepatoma cells. *Cellular Signalling*. 1998;10:511-5.
- Hung, WC., Chuang, LY., Tsai, JH. and Chang, CC. Effects of insulin on TGF-beta 1-induced cell growth inhibition in the human hepatoma cell lines. *Biochemistry & Molecular Biology International*.1993;30:655-63.
- Ikemoto, S., Sugimura, K., Yoshida, N., Yasumoto, R., Wada, S., Yamamoto, K. and Kishimoto, T. Antitumor effects of *Scutellariae radix* and its components baicalein, baicalin, and wogonin on bladder cancer cell lines. *Urology*. 2000;55:951-5.
- Inayat-Hussain, SH., Couet, C., Cohen, GM. and Cain, K. Processing/activation of CPP32-like proteases is involved in transforming growth factor beta1-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology*. 1997;25:1516-26.
- Inoue, T. and Jackson, EK. Strong antiproliferative effects of baicalein in cultured rat hepatic stellate cells. *European Journal of Pharmacology*. 1999;378:129-35.
- Iqbal, J., Clerch, LB., Hass, MA., Frank, L. and Massaro, D. Endotoxin increases lung Cu,Zn superoxide dismutase mRNA: O₂ raises enzyme synthesis. *American Journal of Physiology*. 1989;257:L61-4.
- Janssen, YM., Van Houten, B., Borm, PJ. and Mossman, BT. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Laboratory Investigation*. 1993;69:261-74.
- Kawai, H., Yamada, Y., Tatsuka, M., Niwa, O., Yamamoto, K. and Suzuki, F. Down-regulation of nuclear factor kappaB is required for p53-dependent apoptosis in X-ray-irradiated mouse lymphoma cells and thymocytes. *Cancer Research*. 1999;59:6038-41.
- Kerr, JF. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *Journal of Pathology*. 1971;105:13-20.

- Kim, JY., Lee, S., Hwangbo, B., Lee, CT., Kim, YW., Han, SK., Shim, YS. and Yoo, CG. NF-kappaB activation is related to the resistance of lung cancer cells to TNF-alpha-induced apoptosis. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 2000;273:140-6.
- Kim, NY., Kang, TH., Pae, HO., Choi, BM., Chung, HT., Myung, SW., Song, YS., Sohn, DH. and Kim, YC. In vitro inducible nitric oxide synthesis inhibitors from *Alismatis Rhizoma*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 1999;22:1147-9.
- Kiran Kumar, YV., Raghunathan, A., Sailesh, S., Prasad, M., Vemuri, MC. and Reddanna, P. Differential effects of 15-HPETE and 15-HETE on BHK-21 cell proliferation and macromolecular composition. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1993;1167:102-8.
- Kirilova, I., Chaisson, M. and Fausto, N. Tumor necrosis factor induces DNA replication in hepatic cells through nuclear factor kappaB activation. *Cell Growth & Differentiation*. 1999;10:819-28.
- Kisch, ES., Jaffe, A., Knoll, E. and Stern, N. Role of the lipoxygenase pathway in angiotensin II-induced vasoconstriction in the human placenta. *Hypertension*. 1997;29:796-801.
- Kondo, Y., Takano, F. and Hojo, H. Suppression of chemically and immunologically induced hepatic injuries by gentiopicoside in mice. *Planta Medica*. 1994;60:414-6.
- Kren, BT., Trembley, JH., Krajewski, S., Behrens, TW., Reed, JC. and Steer, CJ. Modulation of apoptosis-associated genes bcl-2, bcl-x, and bax during rat liver regeneration. *Cell Growth & Differentiation*. 1996;7:1633-42.
- Kruger, EA., Blagosklonny, MV., Dixon, SC. and Figg, WD. UCN-01, a protein kinase C inhibitor, inhibits endothelial cell proliferation and angiogenic hypoxic response. *Invasion & Metastasis*. 1998;18:209-18.
- Kuntz, S., Wenzel, U. and Daniel, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European Journal of Nutrition*. 1999;38:133-42.

- Leirdal, M. and Sioud, M. Ribozyme inhibition of the protein kinase C α triggers apoptosis in glioma cells. *British Journal of Cancer*. 1999;80:1558-64.
- Li, PF., Maasch, C., Haller, H., Dietz, R. and von Harsdorf, R. Requirement for protein kinase C in reactive oxygen species-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 1999;100:967-73.
- Lijnen, P. and Petrov, V. Proliferation of human peripheral blood mononuclear cells during calcium entry blockade. Role of protein kinase C. *Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology*. 1999;21:253-9.
- Lin, JK. and Chou, CK. In vitro apoptosis in the human hepatoma cell line induced by transforming growth factor beta 1. *Cancer Research*. 1992;52:385-8.
- Liu, F., Li, B. and Nan, Y. The effect of serum TGF β 1 of patients with chronic hepatitis B in liver fibrosis formation. *Chung Hua Kan Tsang Ping Tsa Chih*. 1999;7:196-8.
- Lotz, G., Nagy, P., Patonai, A., Kiss, A., Nemes, B., Szalay, F., and Schaff TGF- β 1 and apoptosis in human hepatocellular carcinoma and focal nodular hyperplasia. *Journal of Hepatology*. 1998;28:175A
- Lundberg, AS. and Weinberg, RA. Control of the cell cycle and apoptosis. *European Journal of Cancer*. 1999;35:531-9.
- Macfarlane, DE. and Manzel, L. Activation of beta-isozyme of protein kinase C (PKC β) is necessary and sufficient for phorbol ester-induced differentiation of HL-60 promyelocytes. Studies with PKC β -defective PET mutant. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269:4327-31.
- Macho, A., Decaudin, D., Castedo, M., Hirsch, T., Susin, SA., Zamzami, N. and Kroemer, G. Chloromethyl-X-Rosamine is an aldehyde-fixable potential-sensitive fluorochrome for the detection of early apoptosis. *Cytometry*. 1996;25:333-40.
- Maddox, JF., Cao, YZ., Mastro, AM., Scholz, RW., Hildenbrandt, G. and Reddy, CC. Increased 12-HETE production in bovine lymphocytes during selenium deficiency. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1991;181:389-95.

- Maly, FE. The B lymphocyte: a newly recognized source of reactive oxygen species with immunoregulatory potential. *Free Radical Research Communications*. 1990;8:143-8.
- Marzo, I., Brenner, C. and Kroemer, G. The central role of the mitochondrial megachannel in apoptosis: evidence obtained with intact cells, isolated mitochondria, and purified protein complexes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 1998;52:248-51.
- Massague, J., Hata, A. and Lui, F. TGF- β signalling through the Smad pathway. *Trends Cell Biol* 1997;7:187-192
- Matsuda, H., Kageura, T., Toguchida, I., Murakami, T., Kishi, A. and Yoshikawa, M. Effects of sesquiterpenes and triterpenes from the rhizome of *Alisma orientale* on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages: absolute stereostructures of alismaketones-B 23-acetate and -C 23-acetate. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 1999;9:3081-6.
- Matsuda, H., Tomohiro, N., Yoshikawa, M. and Kubo, M. Studies on *Alismatis Rhizoma*. II. Anti-complementary activities of methanol extract and terpene components from *Alismatis Rhizoma* (dried rhizome of *Alisma orientale*). *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 1998;21:1317-21.
- Matsuzaki, Y., Kurokawa, N., Terai, S., Matsumura, Y., Kobayashi, N. and Okita, K. Cell death induced by baicalein in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Japanese Journal of Cancer Research*. 1996;87:170-7.
- Metivier, D., Dallaporta, B., Zamzami, N., Larochette, N., Susin, SA., Marzo, I. and Kroemer, G. Cytofluorometric detection of mitochondrial alterations in early CD95/Fas/APO-1-triggered apoptosis of Jurkat T lymphoma cells. Comparison of seven mitochondrion-specific fluorochromes. *Immunology Letters*. 1998;61:157-63.
- Meyer, M., Schreck, R. and Baeuerle, PA. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO Journal*. 1993;12:2005-15.
- Michalopoulos, GK. and DeFrances, MC. Liver regeneration. *Science*. 1997;276:60-6.

- Miller, SA., Selzman, CH., Shames, BD., Barton, HA., Johnson, SM. and Harken, AH. Chlamydia pneumoniae activates nuclear factor kappaB and activator protein 1 in human vascular smooth muscle and induces cellular proliferation. *Journal of Surgical Research*. 2000;90:76-81.
- Miwa, Y., Harrison, PM., Farzaneh, F., Langley, PG., Williams, R. and Hughes, RD. Plasma levels and hepatic mRNA expression of transforming growth factor-beta1 in patients with fulminant hepatic failure. *Journal of Hepatology*. 1997;27:780-8.
- Motoo, Y. and Sawabu, N. Antitumor effects of saikosaponins, baicalin and baicalein on human hepatoma cell lines. *Cancer Letters*. 1994;86:91-5.
- Murawaki, Y., Ikuta, Y., Nishimura, Y., Koda, M. and Kawasaki, H. Serum markers for fibrosis and plasma transforming growth factor-beta 1 in patients with hepatocellular carcinoma in comparison with patients with liver cirrhosis. *Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 1996;11:443-50.
- Myklebust, JH., Smeland, EB., Josefsen, D. and Sioud, M. Protein kinase C-alpha isoform is involved in erythropoietin-induced erythroid differentiation of CD34(+) progenitor cells from human bone marrow. *Blood*. 2000;95:510-8.
- Nakamura, T., Kuriyama, M., Kosuge, E., Ishihara, K. and Ito, K. Effects of saiboku-to (TJ-96) on the production of platelet-activating factor in human neutrophils. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1993;685:572-9.
- Nakamura, T., Tomita, Y., Hirai, R., Yamaoka, K., Kaji, K. and Ichihara, A. Inhibitory effect of transforming growth factor-beta on DNA synthesis of adult rat hepatocytes in primary culture. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1985;133:1042-50.
- Nakamura, T., Ushiyama, C., Suzuki, S., Shimada, N., Ebihara, I., Suzaki, M., Takahashi, T. and Koide, H. Effect of plasma exchange on serum tissue inhibitor of metalloproteinase 1 and cytokine concentrations in patients with fulminant hepatitis. *Blood Purification*. 2000;18:50-4.

- Nelson, DR., Gonzalez-Peralta, RP., Qian, K. Xu, Y., Marousis, CG., Davis, GL. and Lau, JY. Transforming growth factor-beta 1 in chronic hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis*. 1997;4:29-35.
- Nishio, E. and Watanabe, Y. Role of the lipoxygenase pathway in phenylephrine-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *European Journal of Pharmacology*. 1997;336:267-73.
- Oberhammer, F., Bursch, W., Parzefall, W., Breit, P., Erber, E., Stadler, M. and Schulte-Hermann, R. Effect of transforming growth factor beta on cell death of cultured rat hepatocytes. *Cancer Research*. 1991;51:2478-85,.
- Oberhammer, F., Bursch, W., Tiefenbacher, R., Froschl, G., Pavelka, M., Purchio, T. and Schulte-Hermann, R. Apoptosis is induced by transforming growth factor-beta 1 within 5 hours in regressing liver without significant fragmentation of the DNA. *Hepatology*. 1993;18:1238-46.
- Oberhammer, FA., Pavelka, M., Sharma, S., Tiefenbacher, R., Purchio, AF., Bursch, W. and Schulte-Hermann, R. Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor beta 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89:5408-12.
- Ohno, K., Ammann, P., Fasciati, R. and Maier, P. Transforming growth factor beta 1 preferentially induces apoptotic cell death in rat hepatocytes cultured under pericentral-equivalent conditions. *Toxicology & Applied Pharmacology*. 1995;132:227-36.
- Ono, M., Miyamura, M., Kyotani, S., Saibara, T., Ohnishi, S. and Nishioka, Y. Effect of Sho-saiko-to extract on HGF and TGF-beta levels of intraorgans in liver-injured rats after partial hepatectomy. *Journal of Pharmacy & Pharmacology*. 2000;52:111-8.
- Orrenius, S., McConkey, DJ., Bellomo, G. and Nicotera, P. Role of Ca²⁺ in toxic cell killing. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1989;10:281-5.
- Patel, T. and Gores, GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology*.

1995;21:1725-41.

Patel, T., Roberts, LR., Jones, BA. and Gores, GJ. Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: an overview. *Seminars in Liver Disease*. 1998;18:105-14.

Piacentini, L., Gray, M., Honbo, NY., Chentoufi, J., Bergman, M. and Karliner, JS. Endothelin-1 stimulates cardiac fibroblast proliferation through activation of protein kinase C. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 2000;32:565-76.

Plumpe, J., Malek, NP., Bock, CT., Rakemann, T., Manns, MP. and Trautwein, C. NF-kappaB determines between apoptosis and proliferation in hepatocytes during liver regeneration. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal & Liver Physiology*. 2000;278:G173-83.

Ponchel, F., Puisieux, A., Tabone, E., Michot, JP., Froschl, G., Morel, AP., Frebourg, T., Fontaniere, B., Oberhammer, F. and Ozturk, M. Hepatocarcinoma-specific mutant p53-249ser induces mitotic activity but has no effect on transforming growth factor beta 1-mediated apoptosis. *Cancer Research*. 1994;54:2064-8.

Pongracz, J., Webb, P., Wang, K., Deacon, E., Lunn, OJ. and Lord, JM. Spontaneous neutrophil apoptosis involves caspase 3-mediated activation of protein kinase C-delta. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:37329-34.

Qian, L., Murakami, T., Kimura, Y., Takahashi, M. and Okita, K. Saikosaponin A-induced cell death of a human hepatoma cell line (HuH-7): the significance of the 'sub-G1 peak' in a DNA histogram. *Pathology International*. 1995;45:207-14.

Recio, MC., Just, MJ., Giner, RM., Manez, S., Rios, JL. and Hostettmann, K. Anti-inflammatory activity of saikosaponins from *Heteromorpha trifoliata*. *Journal of Natural Products*. 1995;58:140-4.

Rind, HB. and Whittemore, SR. Protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase regulate the neuronal differentiation of immortalized raphe neurons. *Journal of Neuroscience Research*. 1999;56:177-88.

Roberts, RA., James, NH. and Cosulich, SC. The role of protein kinase B and

- mitogen-activated protein kinase in epidermal growth factor and tumor necrosis factor alpha-mediated rat hepatocyte survival and apoptosis. *Hepatology*. 2000;31:420-7.
- Roberts, RA., James, NH., Hasmall, SC., Holden, PR., Lambe, K., Macdonald, N., West, D., Woodyatt, NJ. and Whitcome, D. Apoptosis and proliferation in nongenotoxic carcinogenesis: species differences and role of PPARalpha. *Toxicology Letters*. 2000;112-113:49-57.
- Roulot, D., Sevcsik, AM., Coste, T., Strosberg, AD. and Marullo, S. Role of transforming growth factor beta type II receptor in hepatic fibrosis: studies of human chronic hepatitis C and experimental fibrosis in rats. *Hepatology*. 1999;29:1730-8.
- Russell, WE., Coffey, RJ Jr., Ouellette, AJ. and Moses, HL. Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85:5126-30.
- Rusyn, I., Yamashina, S., Segal, BH., Schoonhoven, R., Holland, SM., Cattley, RC., Swenberg, JA. and Thurman, RG. Oxidants from nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase are involved in triggering cell proliferation in the liver due to peroxisome proliferators. *Cancer Research*. 2000;60:4798-803.
- Sanchez, A., Alvarez, AM., Benito, M. and Fabregat, I. Apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocyte primary cultures: involvement of reactive oxygen intermediates. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271:7416-22.
- Sanchez, A., Alvarez, AM., Benito, M. and Fabregat, I. Cycloheximide prevents apoptosis, reactive oxygen species production, and glutathione depletion induced by transforming growth factor beta in fetal rat hepatocytes in primary culture. *Hepatology*. 1997;26:935-43.
- Sanderson, N., Factor, V., Nagy, P., Kopp, J., Kondaiah, P., Wakefield, L., Roberts, AB., Sporn, MB. and Thorgeirsson, SS. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92:2572-6.

- Sarafian, TA. and Bredesen, DE. Is apoptosis mediated by reactive oxygen species?. *Free Radical Research*. 1994; 21:1-8.
- Sasaki, Y., Zhang, XF., Nishiyama, M., Avruch, J. and Wands, JR. Expression and phosphorylation of insulin receptor substrate 1 during rat liver regeneration. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268:3805-8.
- Schmidt, KN., Amstad, P., Cerutti, P. and Baeuerle, PA. The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B. *Chemistry & Biology*. 1995;2:13-22.
- Schreck, R., Rieber, P. and Baeuerle, PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO Journal*. 1991;10:2247-58.
- Schulze-Osthoff, K., Bauer, MK., Vogt, M. and Wesselborg, S. Oxidative stress and signal transduction. *International Journal for Vitamin & Nutrition Research*. 1997;67:336-42.
- Sekiya, K. and Okuda, H. Selective inhibition of platelet lipoxygenase by baicalein. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1982;105:1090-5.
- Setty, BN., Graeber, JE. and Stuart, MJ. The mitogenic effect of 15- and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid on endothelial cells may be mediated via diacylglycerol kinase inhibition. *Journal of Biological Chemistry*. 1987;262:17613-22.
- Shao, ZH., Li, CQ., Vanden Hoek, TL., Becker, LB., Schumacker, PT., Wu, JA., Attele, AS. and Yuan, CS. Extract from *Scutellaria baicalensis* Georgi attenuates oxidant stress in cardiomyocytes. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1999;31:1885-95.
- Shimizu, I. Sho-saiko-to: Japanese herbal medicine for protection against hepatic fibrosis and carcinoma. *Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2000;15 Suppl:D84-90.
- Shimizu, I., Ma, YR., Mizobuchi, Y., Liu, F., Miura, T., Nakai, Y., Yasuda, M., Shiba, M., Horie, T., Amagaya, S., Kawada, N., Hori, H. and Ito, S. Effects of Sho-saiko-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats. *Hepatology*. 1999;29:149-60

- Shirai, Y., Kawata, S., Tamura, S., Ito, N., Tsushima, H., Takaishi, K., Kiso, S. and Matsuzawa, Y. Plasma transforming growth factor-beta 1 in patients with hepatocellular carcinoma. Comparison with chronic liver diseases. *Cancer*. 1994;73:2275-9.
- Shizukuda, Y., Tang, S., Yokota, R. and Ware, JA. Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase Cdelta activity. *Circulation Research*. 1999;85:247-56.
- Singer, AJ. and Clark, RA. Cutaneous wound healing. *New England Journal of Medicine*. 341:738-46.
- Smith, DL., Willis, AL. and Mahmud, I. Eicosanoid effects on cell proliferation in vitro: relevance to atherosclerosis. *Prostaglandins Leukotrienes & Medicine*. 1984;16:1-10.
- So, FV., Guthrie, N., Chambers, AF. and Carroll, KK. Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen. *Cancer Letters*. 1997;112:127-33.
- Spector, MS., Auer, KL., Jarvis, WD., Ishac, EJ., Gao, B., Kunos, G. and Dent, P. Differential regulation of the mitogen-activated protein and stress-activated protein kinase cascades by adrenergic agonists in quiescent and regenerating adult rat hepatocytes. *Molecular & Cellular Biology*. 1997;17:3556-65.
- Stennicke, HR. and Salvesen, GS. Properties of the caspases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998;1387:17-31.
- Sun, XG. and Rotenberg, SA. Overexpression of protein kinase Calpha in MCF-10A human breast cells engenders dramatic alterations in morphology, proliferation, and motility. *Cell Growth & Differentiation*. 1999;10:343-52.
- Takahashi, T., Kamimura, A., Shirai, A. and Yokoo, Y. Several selective protein kinase C inhibitors including procyanidins promote hair growth. *Skin Pharmacology & Applied Skin Physiology*. 2000;13:133-42.

- Tanaka, S. and Wands, JR. Insulin receptor substrate 1 over-expression in human hepatocellular carcinoma cells prevents transforming growth factor beta1-induced apoptosis. *Cancer Research*. 1996;56:3391-4.
- Taoka, T., Tokuda, M., Tasaka, T., Hatase, O., Irino, S. and Norman, AW. Induction of differentiation of HL-60 cells by protein kinase C inhibitor, K252a. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1990;170:1151-6.
- Thorgeirsson, SS., Teramoto, T. and Factor, VM. Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Seminars in Liver Disease*. 1998;18:115-22.
- Thornberry, NA. and Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998;281:1312-6.
- Traenckner, EB., Pahl, HL., Henkel, T., Schmidt, KN., Wilk, S. and Baeuerle, PA. Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *EMBO Journal*. 1995;14:2876-83.
- Tsai, JF., Jeng, JE., Chuang, LY., Chang, WY. and Tsai, JH. Urinary transforming growth factor beta1 levels in hepatitis C virus-related chronic liver disease: correlation between high levels and severity of disease. *Hepatology*. 1997;25:1141-6.
- Tsushima, H., Kawata, S., Tamura, S., Ito, N., Shirai, Y., Kiso, S., Doi, Y., Yamada, A., Oshikawa, O. and Matsuzawa, Y. Reduced plasma transforming growth factor-beta1 levels in patients with chronic hepatitis C after interferon-alpha therapy: association with regression of hepatic fibrosis. *Journal of Hepatology*. 1999;30:1-7.
- Ushio, Y. and Abe, H. Inactivation of measles virus and herpes simplex virus by saikosaponin d. *Planta Medica*. 1992;58:171-3.
- Wakabayashi, I. Inhibitory effects of baicalein and wogonin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in macrophages. *Pharmacology & Toxicology*. 1999;84:288-91.
- Wang, CJ., Wang, SW. and Lin, JK. Suppressive effect of geniposide on the hepatotoxicity and hepatic DNA binding of aflatoxin B1 in rats. *Cancer Letters*. 1991;60:95-102

- Wang, S., Desai, D., Wright, G., Niles, RM. and Wright, GL. Effects of protein kinase C alpha overexpression on A7r5 smooth muscle cell proliferation and differentiation. *Experimental Cell Research*. 1997;236:117-26.
- Wyllie, AH. Apoptosis: an overview. *British Medical Bulletin*. 1997;53:451-65.
- Wyllie, AH., Kerr, JF. and Currie, AR. Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology*. 1980;68:251-306.
- Yahata, T., Abe, N., Yahata, C., Ohmi, Y., Ohta, A., Iwakabe, K., Habu, S., Yagita, H., Kitamura, H., Matsuki, N., Nakui, M., Sato, M. and Nishimura, T. The essential role of phorbol ester-sensitive protein kinase C isoforms in activation-induced cell death of Th1 cells. *European Journal of Immunology*. 1999;29:727-32.
- Yamamoto, M., Fukuda, K., Miura, N., Suzuki, R., Kido, T. and Komatsu, Y. Inhibition by dexamethasone of transforming growth factor beta1-induced apoptosis in rat hepatoma cells: a possible association with Bcl-xL induction. *Hepatology*. 1998;27:959-66.
- Yamamoto, M., Miura, N., Ohtake, N., Amagaya, S., Ishige, A., Sasaki, H., Komatsu, Y., Fukuda, K., Ito, T. and Terasawa, K. Genipin, a metabolite derived from the herbal medicine Inchin-ko-to, and suppression of Fas-induced lethal liver apoptosis in mice. *Gastroenterology*. 2000;118:380-9.
- Yano, K., Bauchat, JR., Liimatta, MB., Clemmons, DR. and Duan, C. Down-regulation of protein kinase C inhibits insulin-like growth factor I-induced vascular smooth muscle cell proliferation, migration, and gene expression. *Endocrinology*. 1999;140:4622-32.
- Yeldandi, AV., Rao, MS. and Reddy, JK. Hydrogen peroxide generation in peroxisome proliferator-induced oncogenesis. *Mutation Research*. 2000;448:159-77.
- Yoo, YD., Ueda, H., Park, K., Flanders, KC., Lee, YI., Jay, G. and Kim, SJ. Regulation of transforming growth factor-beta 1 expression by the hepatitis B virus (HBV) X transactivator. Role in HBV pathogenesis. *Journal of Clinical Investigation*. 1996;97:388-95.
- Yotsumoto, H., Yanagita, T., Yamamoto, K., Ogawa, Y., Cha, JY. and Mori, Y. Inhibitory

effects of oren-gedoku-to and its components on cholesteryl ester synthesis in cultured human hepatocyte HepG2 cells: evidence from the cultured HepG2 cells and in vitro assay of ACAT. *Planta Medica*. 1997;63:141-5.

Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, JL., Petit, PX. and Kroemer, G. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 1995;181:1661-72.

Zamzami, N., Susin, SA., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M. and Kroemer, G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*. 1996;183:1533-44.

Zhang, M., Zhang, L. and Long, J. Expression of TGFb1 and its mRNA in liver tissues of patients with chronic viral hepatitis. *Chung Hua Kan Tsang Ping Tsa Chih*. 1999;7:193-5.

Zhou, S. and Wallace, KB. The effect of peroxisome proliferators on mitochondrial bioenergetics. *Toxicological Sciences*. 1999;48:82-9.

行政院
衛生署中醫藥委員會八十九年度委辦研究計畫成果報告自我評估表

計畫名稱	龍膽瀉肝湯免疫機轉研究	計畫編號	CCMP89-RD-020
執行機構	台大醫學院藥理學科	主持人	鄧哲明

自我評估項目：

一、研究方法是否與原計畫之設計相同

☒ 完全相同 ☐ 少部分不同 ☐ 大部分不同 ☐ 完全不同

未"完全相同"者請說明不同之項目與原因：

二、研究成果內容與原計畫書目的之相符程度

☒ 完全相符 ☐ 少部分不符 ☐ 大部分不符 ☐ 完全不符

未"完全相符"者請說明不符之項目與原因：

三、研究成果是否達成預期目標

☐ 已達成且超過預期目標 ☒ 已達成預期目標 ☐ 部分未達成 ☐ 均未達成

均請說明，未達成目標請務必說明原因：

四、對該研究成果應用價值之自我評估：(可複選)

☐ 可列為中醫師或中藥師在職繼續教育專題演講之內容

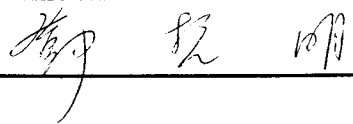
☐ 具出版專籍參考之價值

☒ 具發表於學術期刊之價值

☐ 具備申請專利或技術移轉之潛力

☐ 其他 _____

五、其他

計畫主持人簽章		日期	90.3.12
---------	---	----	---------

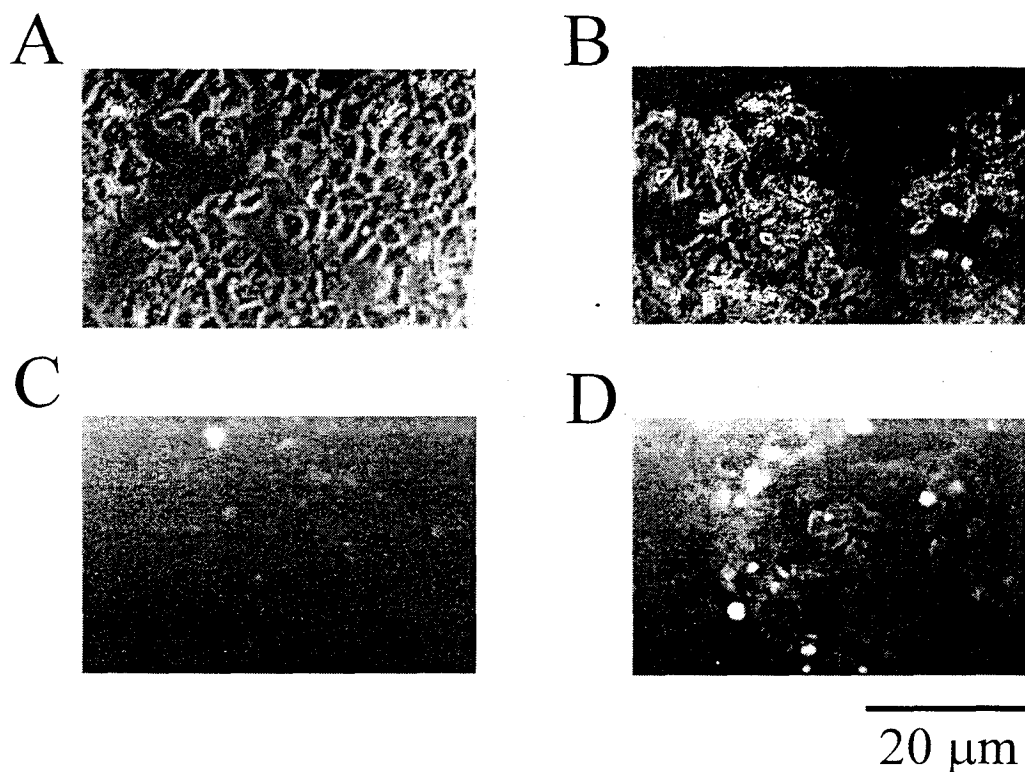


Fig. 1-1. TGF- β_1 在 Hep 3B 細胞中引起的細胞凋亡情形. Cells were incubated in the absence (A and C) or presence (B and D) of medium. Then, cell morphology was observed using a regular microscopic stain (A and B) or immunostained with annexin V (C and D) for the detection of apoptosis as described in Experimental Procedures.

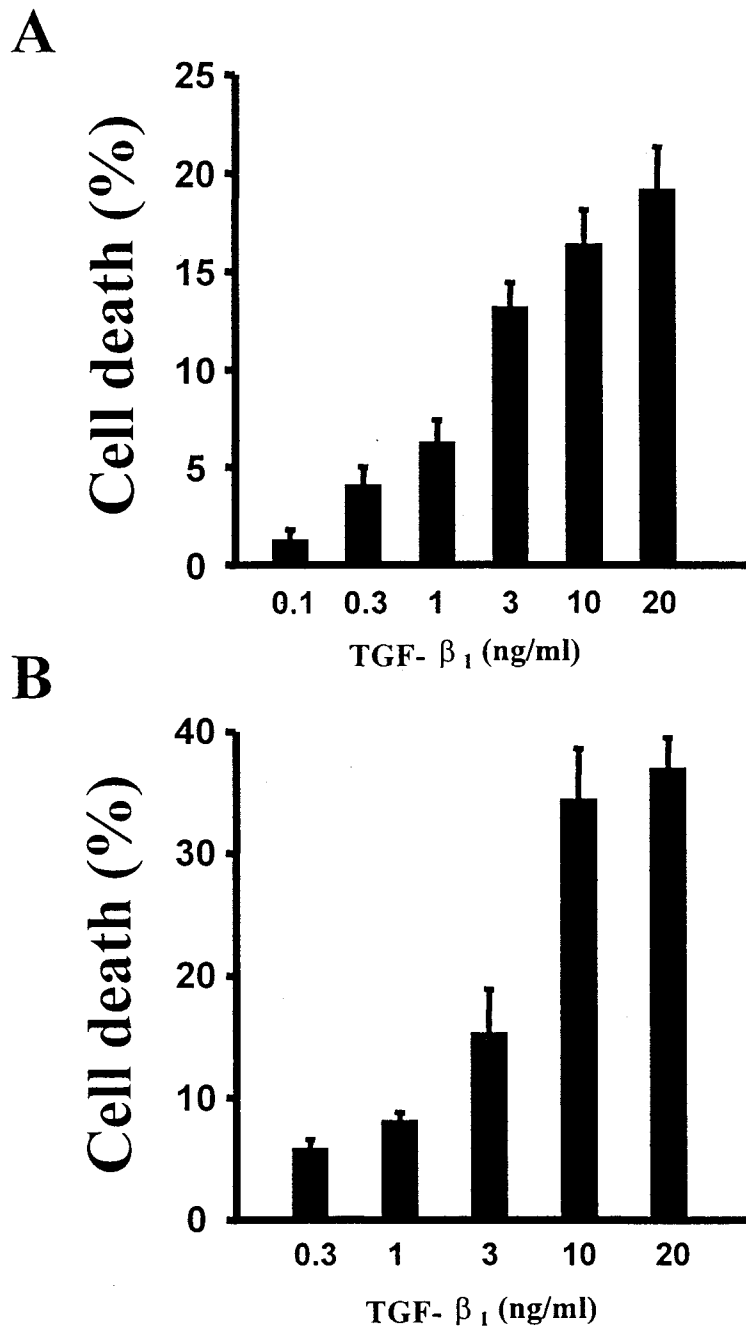


Fig. 1-2. TGF- β_1 在Hep 3B 細胞中引起的細胞凋亡作用 . Cells were treated with TGF- β_1 in several concentrations, and then the apoptotic response was assessed using MTT assay (A) or flow cytometric method (B) as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means $\pm$ SEM of three to five determinations.

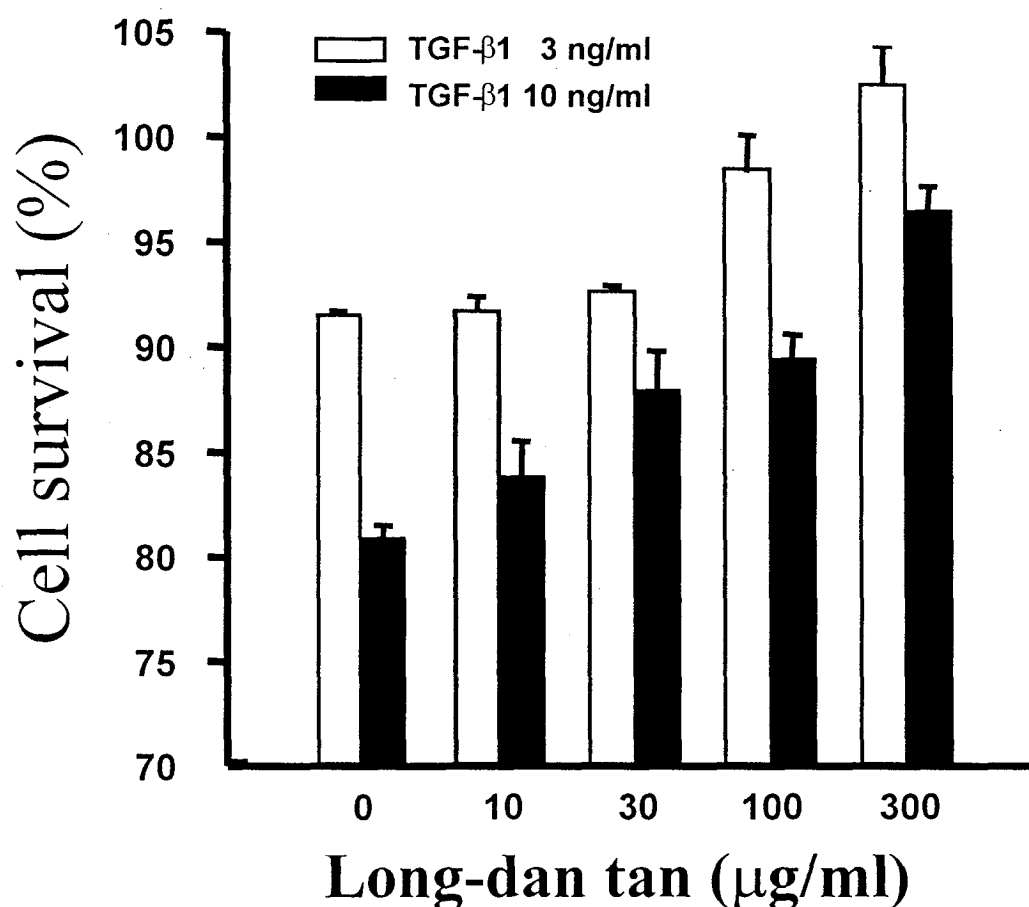


Fig. 1-3. 龍膽瀉肝湯對於 TGF- β_1 引起細胞凋亡作用之影響. Cells were preincubated in the absence or presence of various concentrations of Long-dan-tan, and then cell apoptosis was detected using MTT assay method as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means $\pm$ SEM of three determinations.

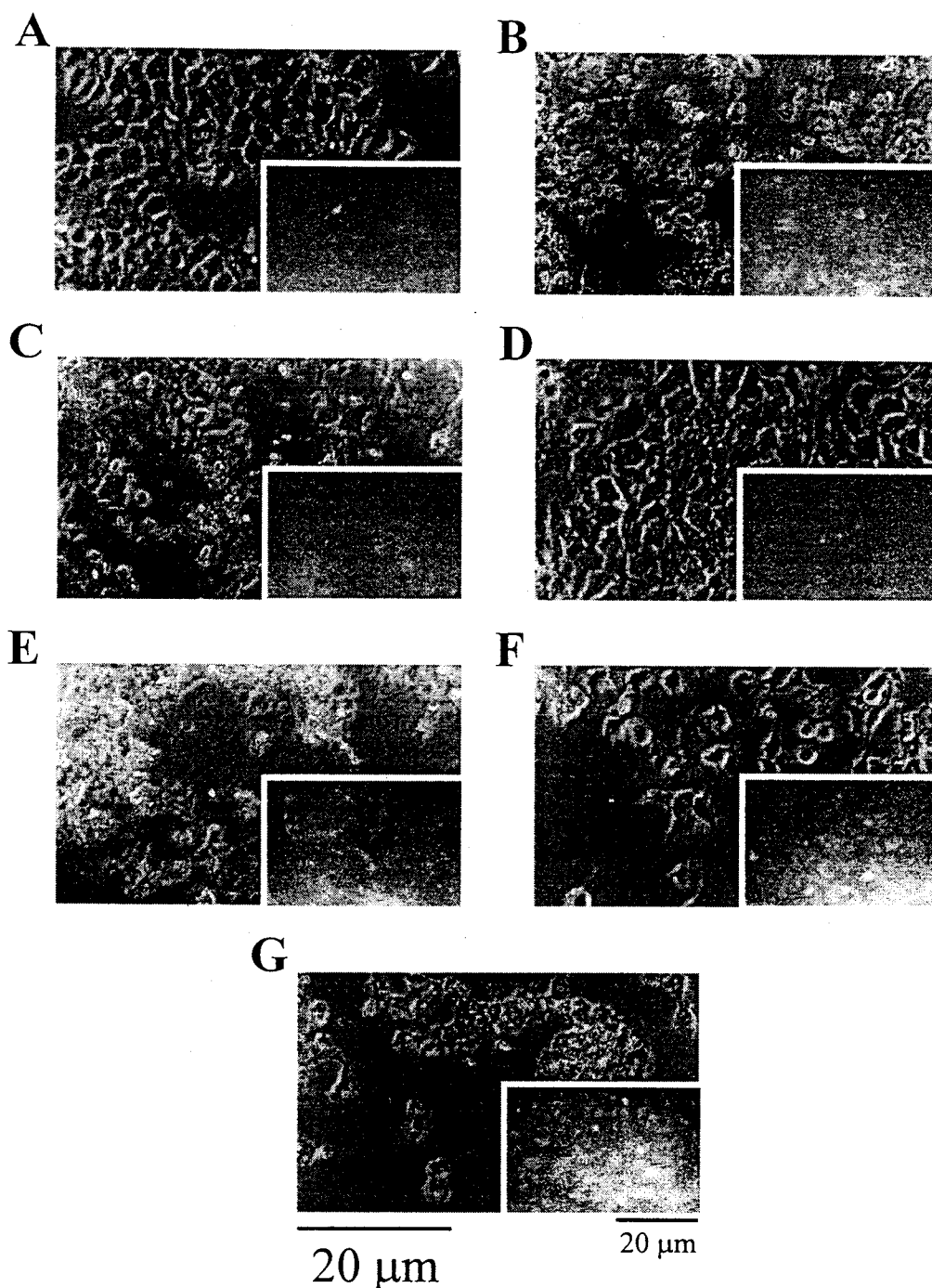


Fig. 1-4. 龍膽瀉肝湯的主要組成成分調控細胞死亡的作用. Cells were preincubated in the absence or presence of gentiopicoside (300 μ M, C), baicalein (100 μ M, D) or geniposide (300 μ M, E) for 30 min, and then TGF- β_1 (10 ng/ml, B, C, D and E), alisol B (50 μ M, F) or saikosaponin-d (5 μ M, G) was added to induce cell death. The cell morphology or immunostaining (Inset) with annexin V (green fluorescence) or propidium iodide (orange fluorescence) was detected as described in Experimental Procedures.

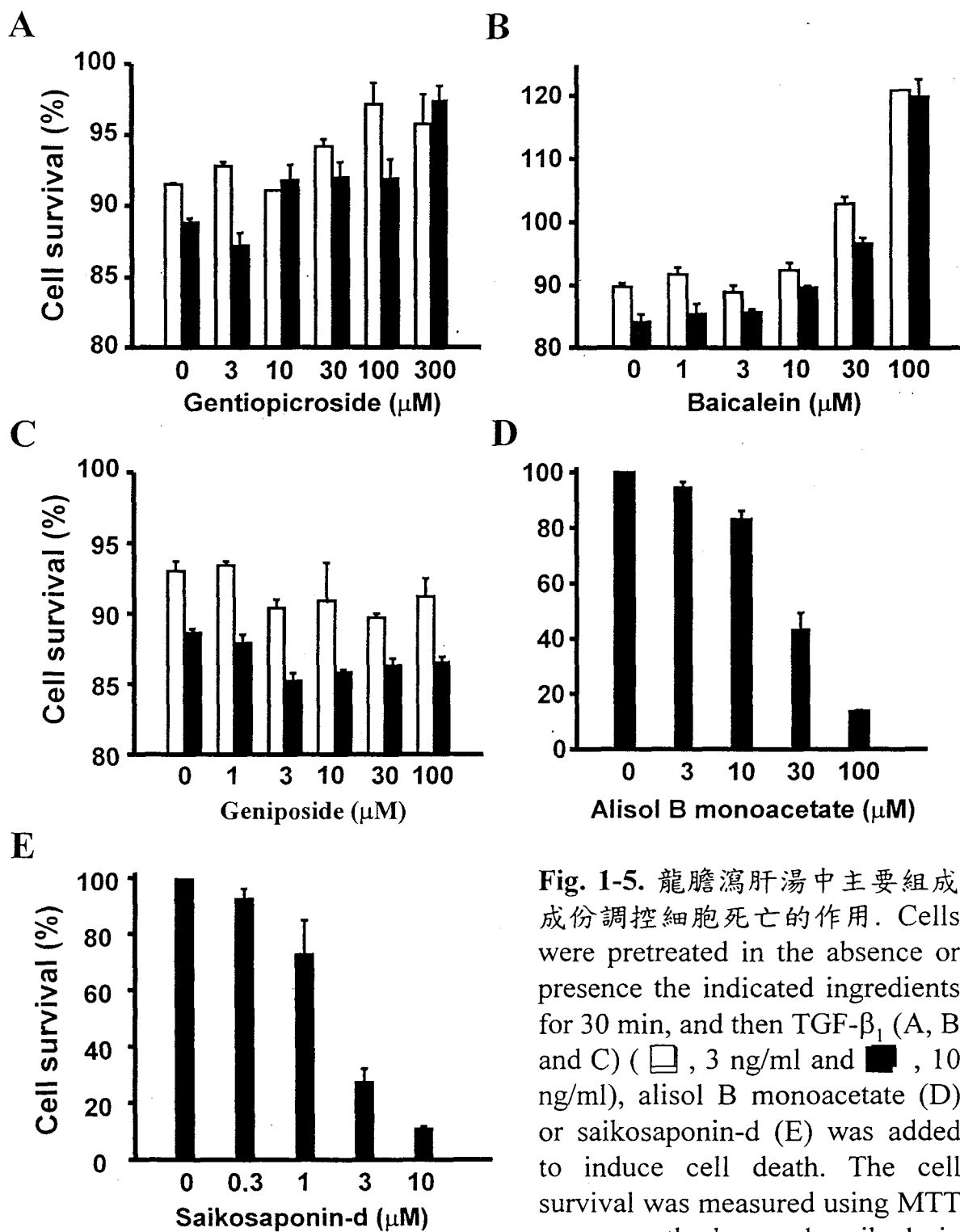


Fig. 1-5. 龍膽瀉肝湯中主要組成成份調控細胞死亡的作用. Cells were pretreated in the absence or presence the indicated ingredients for 30 min, and then TGF- β_1 (A, B and C) ($\square$, 3 ng/ml and $\blacksquare$, 10 ng/ml), alisol B monoacetate (D) or saikosaponin-d (E) was added to induce cell death. The cell survival was measured using MTT assay method as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means $\pm$ SEM of three determinations (each in triplicate).

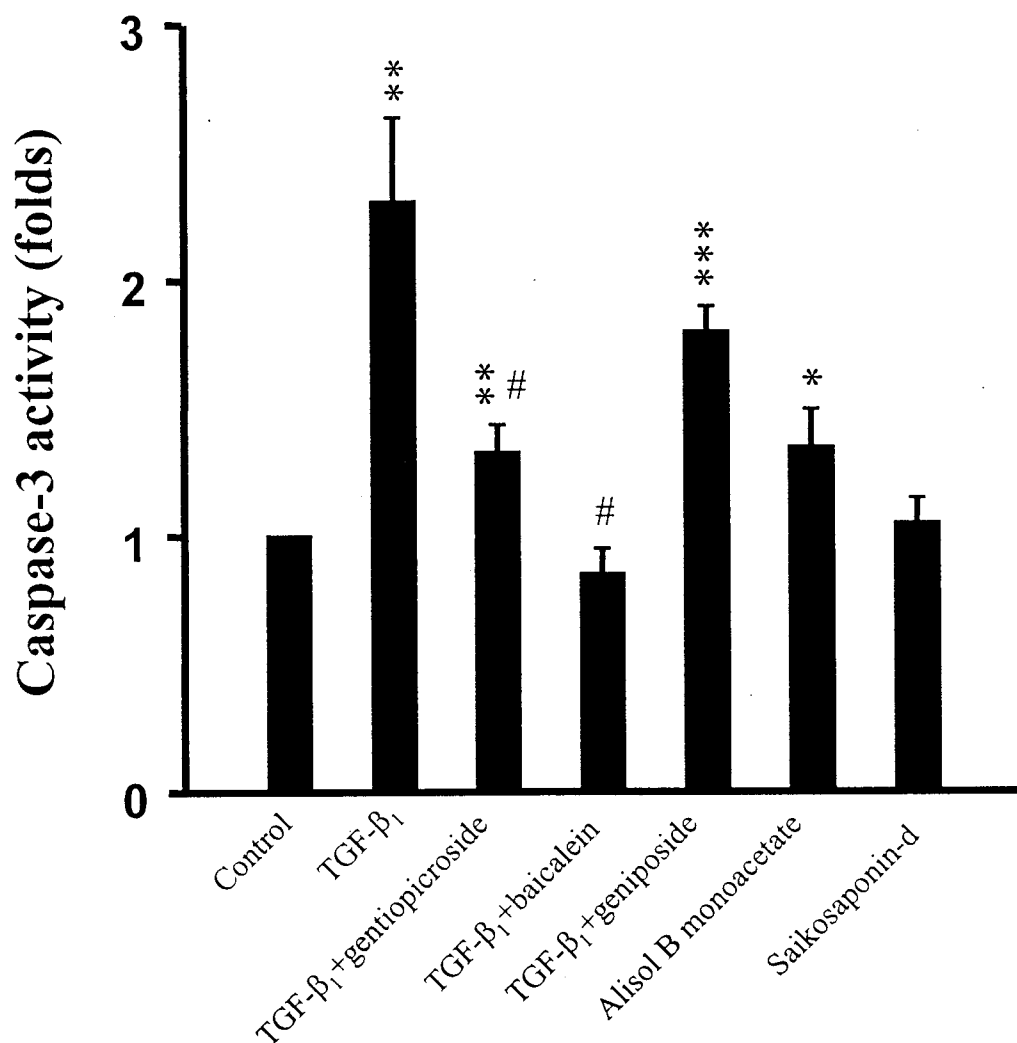


Fig. 1-6. 龍膽瀉肝湯中的主要組成成份對於 caspase-3 活性之影響. Cells were preincubated in the absence or presence of the indicated ingredient for 30 min, and then TGF- β_1 , alisol B monoacetate or saikosaponin-d was added for 16 hr and cells were lysed for the detection of caspase-3 activity as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means $\pm$ SEM of three determinations. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 and # P < 0.05 as compared with control and TGF- β_1 alone, respectively.

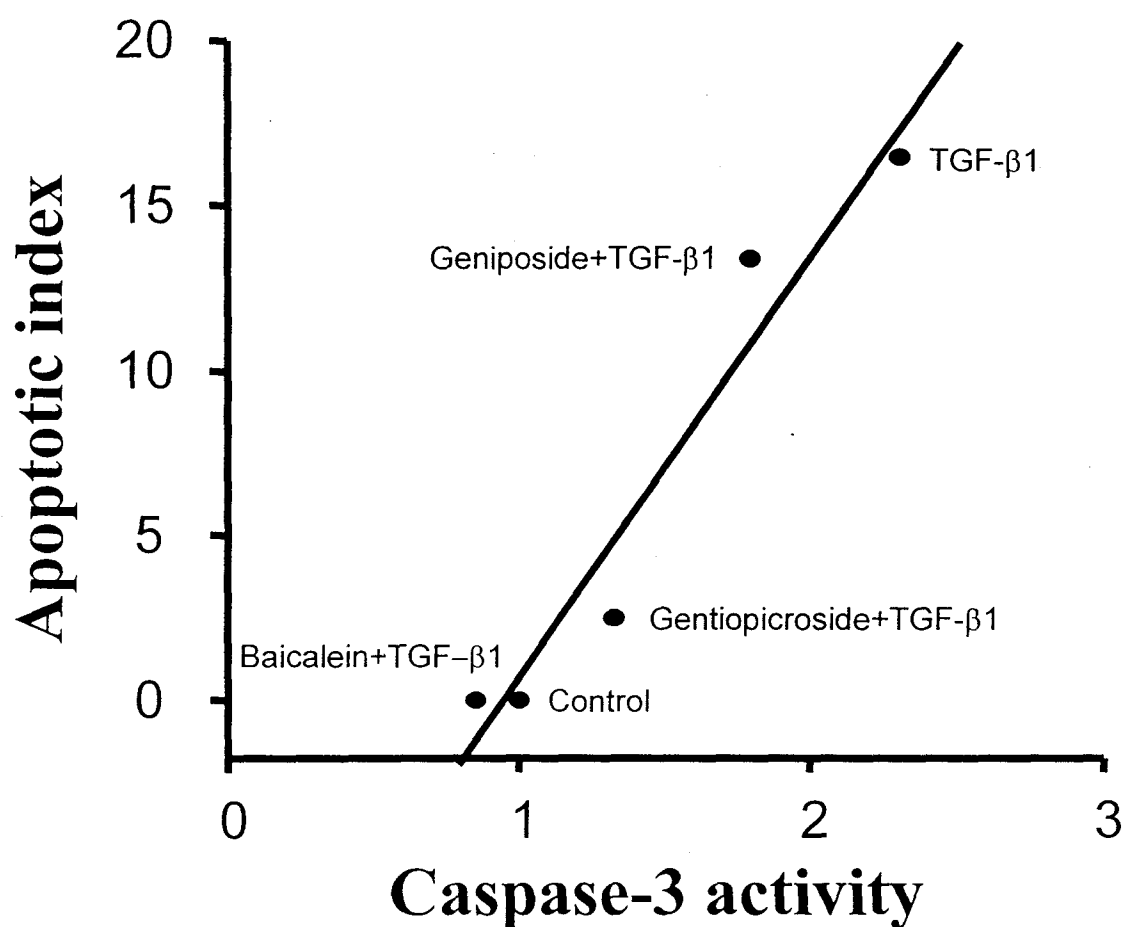


Fig. 1-7. 細胞凋亡作用與 caspase-3 活性的相關性. The apoptotic effect of gentiopicroside, baicalein and geniposide were examined using MTT assay method. Then, the apoptotic index were correlated with the caspase-3 activity as shown in Fig. 6. A good correlation coefficient of 0.94 was obtained.

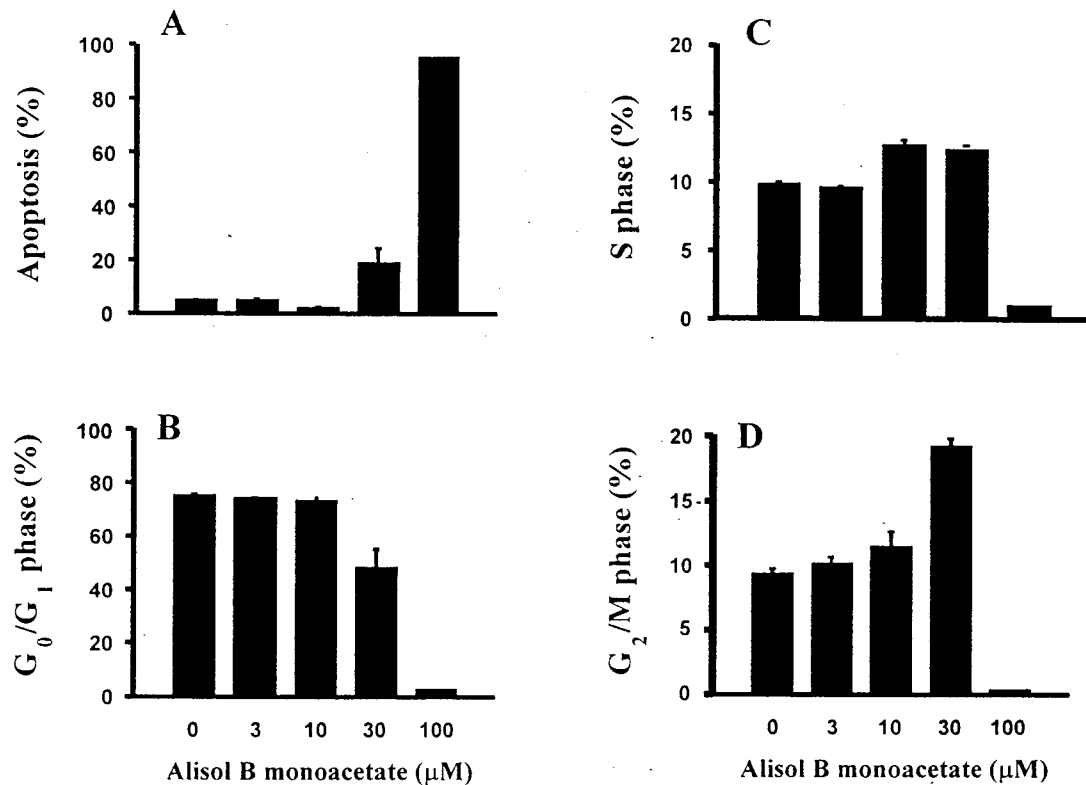


Fig. 1-8. Alisol B monoacetate 促進細胞週期的進行. Cells were preincubated in the absence or presence of alisol B monoacetate for 24hr, and then cells were washed and harvested for the detection of cell cycle progression using flow cytometric method as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means $\pm$ SEM of three determinations.

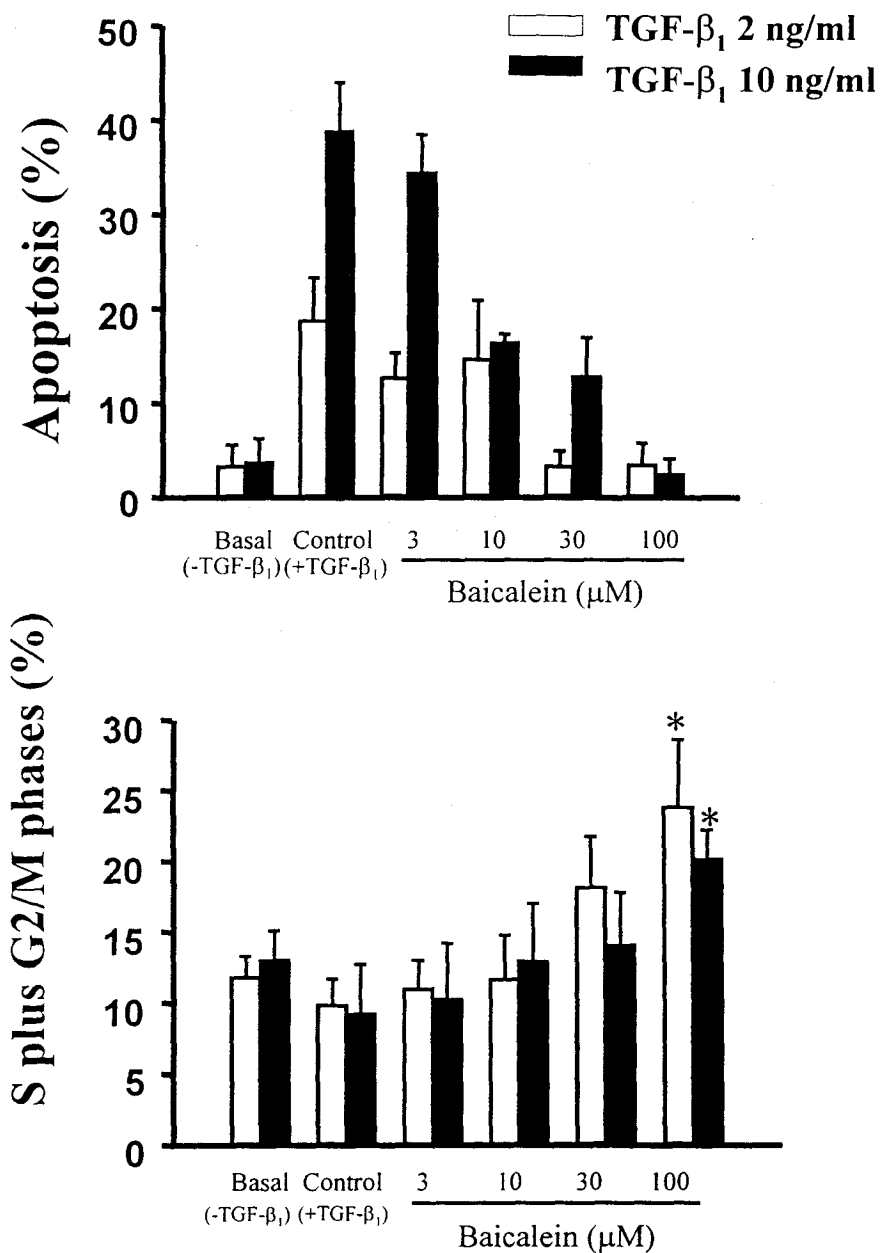


Fig. 2-1. Baicalein 對 TGF-β₁ 引起的細胞凋亡作用之影響. Cells were preincubated in the absence or presence of several concentrations of baicalein for 30 min, and then TGF-β₁ was added to induce cell apoptosis. The apoptosis was measured using flow cytometric method. Data are expressed as means ± SEM of five determinations.

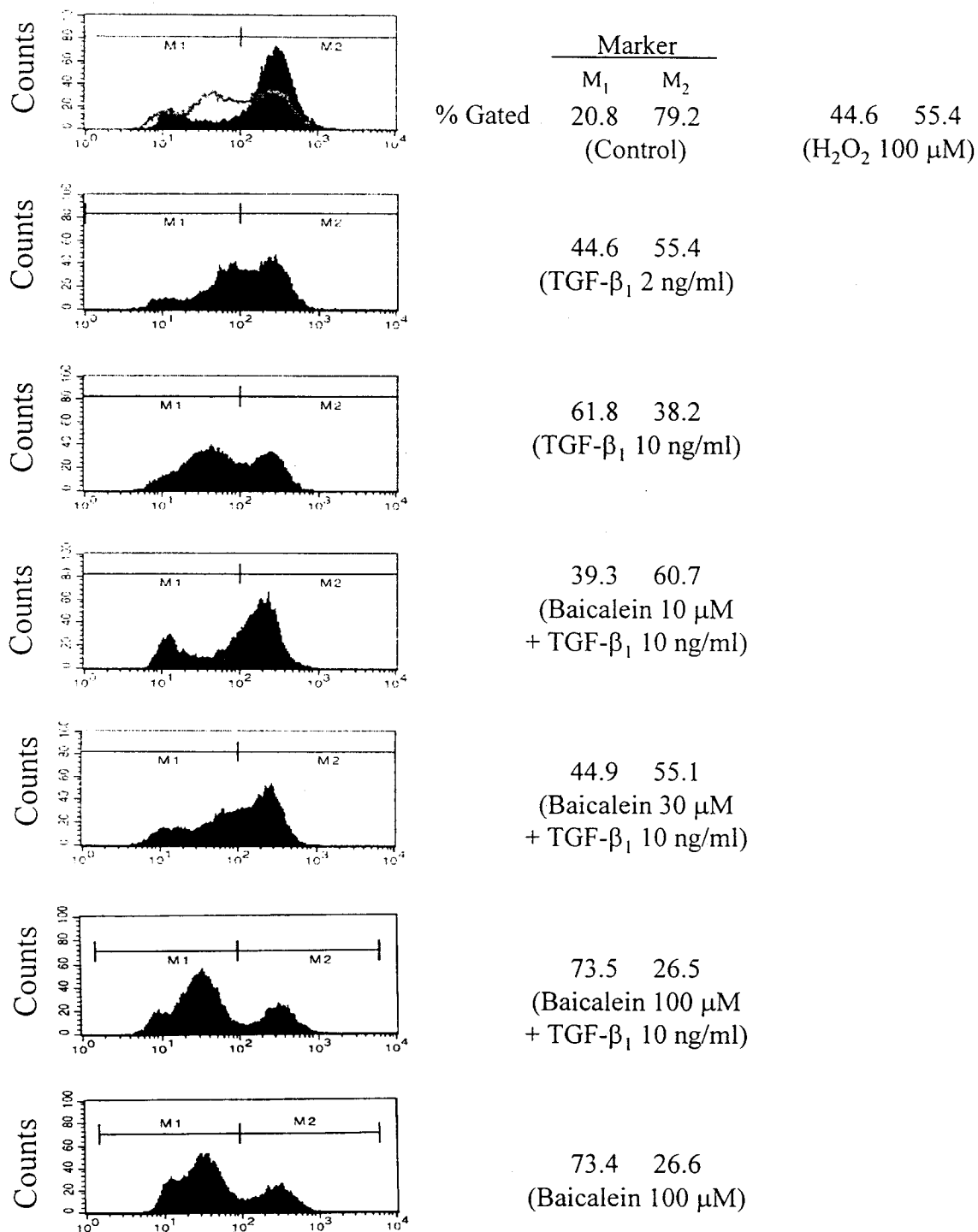


Fig. 2-2. Baicalein對TGF-β₁引起的粒腺體膜電位 ($\Delta\psi_m$)改變之影響. Cells were pretreated with or without baicalein, and then vehicle or TGF-β₁ was added to induce the changes of $\Delta\psi_m$ as described in Experimental Procedures.

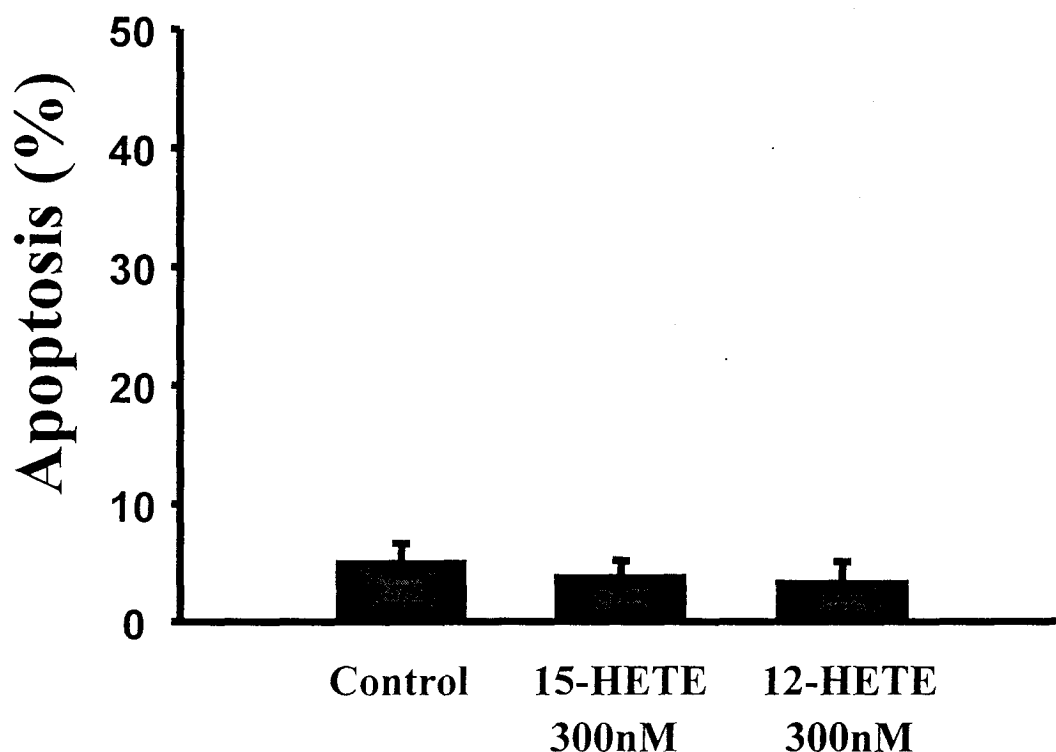
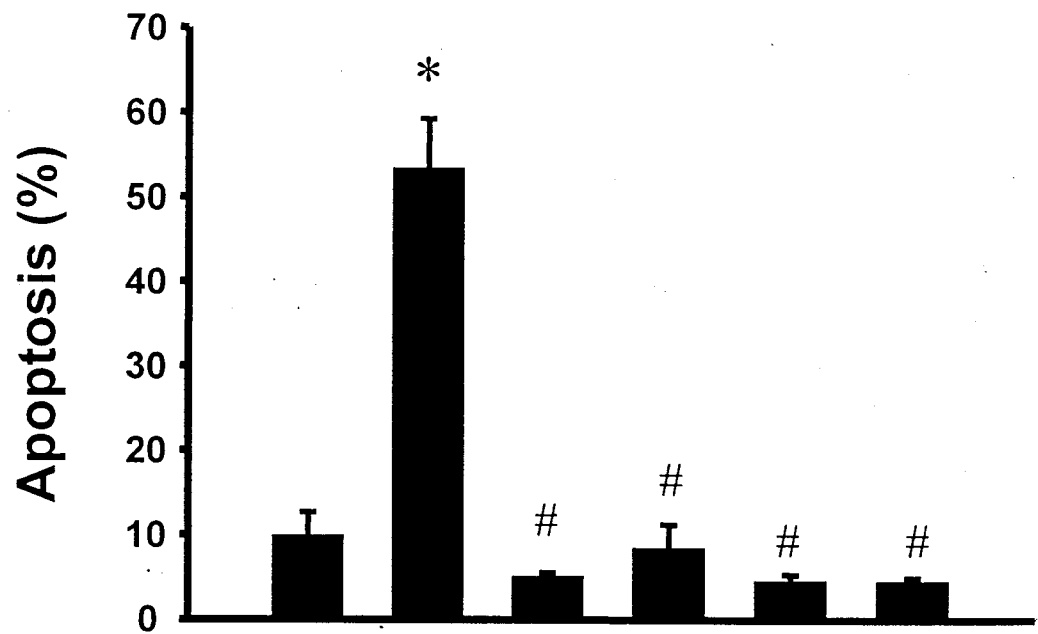


Fig. 2-3. 15-HETE 與 12-HETE 對於細胞凋亡之作用. Cells were preincubated in the absence or presence of 12-HETE or 15-HETE to induce apoptotic response. The apoptosis was assayed using flow cytometric method as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means $\pm$ SEM of three determinations.



TGF- β_1 (10 ng/ml)	-	+	+	+	+	+
Baicalein (100 μ M)	-	-	+	+	+	+
α -Hydroxyfarnesyl-phosphonic acid (10 μ M)	-	-	-	+	-	-
PD098059 (30 μ M)	-	-	-	-	+	-
Wortmannin (1 μ M)	-	-	-	-	-	+

Fig. 2-4. 各種抑制劑對 baicalein 抑制細胞凋亡作用之影響
Cells were pretreated with or without α -hydroxyfarnesyl-phosphonic acid or PD098059 or wortmannin, and then TGF- β_1 alone or TGF- β_1 plus baicalein was added to induce apoptotic/antiapoptotic effect. The apoptosis was determined using flow cytometric method as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means $\pm$ SEM of four determinations. * P < 0.05 and # P < 0.05 as compared with control and TGF- β_1 control, respectively.

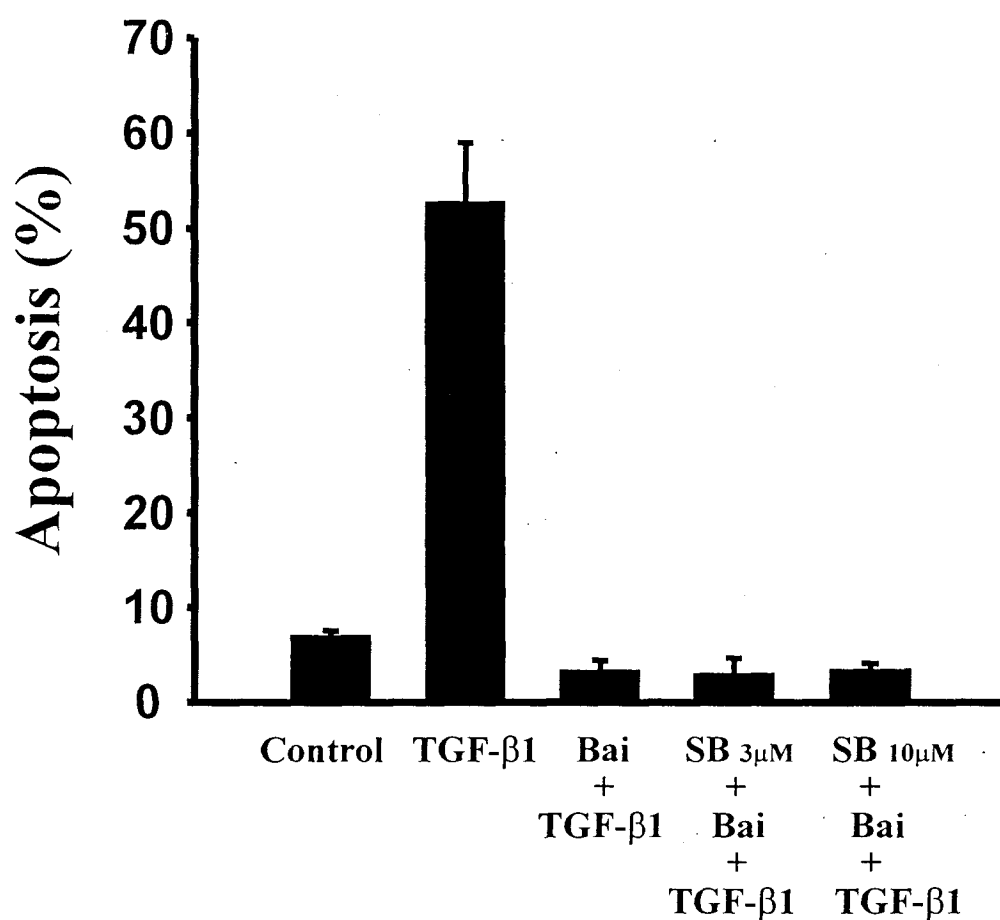


Fig. 2-5. SB203580 (SB) 對於baicalein抑制細胞凋亡作用之影響. Cells were pretreated with or without SB203580, and then TGF- β ₁ alone or TGF- β ₁ plus baicalein was added to induce apoptotic/antiapoptotic effect. The apoptosis was determined using flow cytometric method as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means $\pm$ SEM of four determinations.

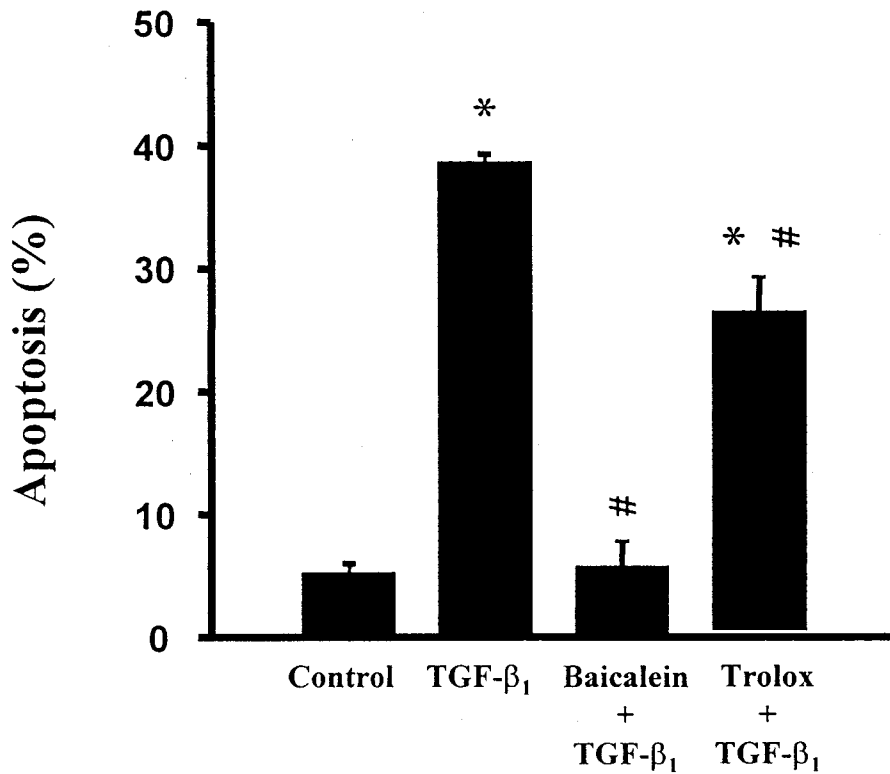


Fig. 2-6. Baicalein 與 trolox對於TGF- β_1 引起細胞凋亡之作用. Cells were pretreated with or without baicalein or trolox (3mM), and then TGF- β_1 was added to induce the cell apoptosis. The cell apoptosis was determined using flow cytometric method as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means $\pm$ SEM of three determinations. * $P < 0.05$ and # $P < 0.05$ as compared with control and TGF- β_1 control, respectively.

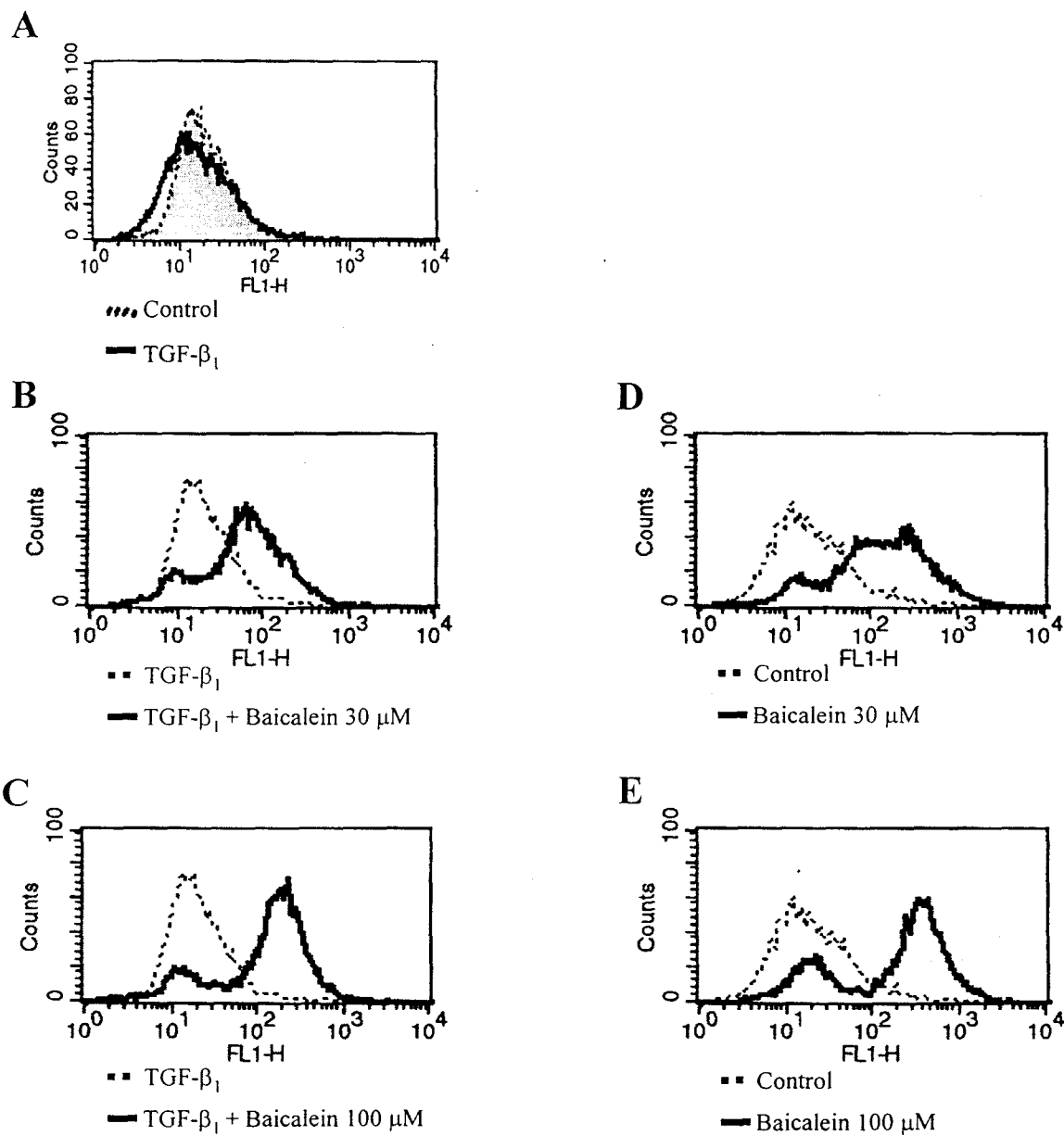
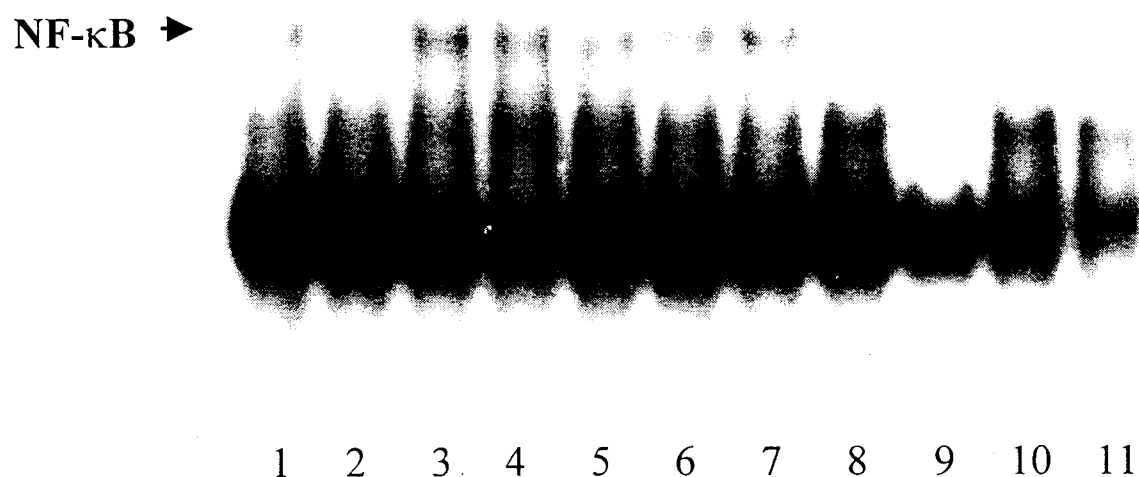


Fig. 2-7. TGF- β_1 與 baicalein 促進細胞凋亡作用之影響。Cells were incubated in the absence or presence of TGF- β_1 or baicalein or both for 4hr, and then the H_2O_2 formation was detected using DCFH-DA fluorescent probe as described in Experimental Procedures.



Lane 1: Control	Lane 5 : PDTC+Bai+TGF	Lane 9 : NF- κ B competitor
Lane 2: TGF	Lane 6 : Cat	Lane 10: P65 Ab
Lane 3: Bai	Lane 7 : Cat+Bai	Lane 11: P50 Ab
Lane 4: Bai+TGF	Lane 8 : Cat+Bai+TGF	

Fig. 2-8. 測量轉錄因子 NF- κ B 的活性. Cells were incubated in the absence or presence of the indicated agents, and then cells were prepared and nuclei were extracted for the detection of NF- κ B nuclear translocation by EMSA technique as described in Experimental Procedures. (Bai, baicalein; Cat, catalase; TGF, TGF- β_1)

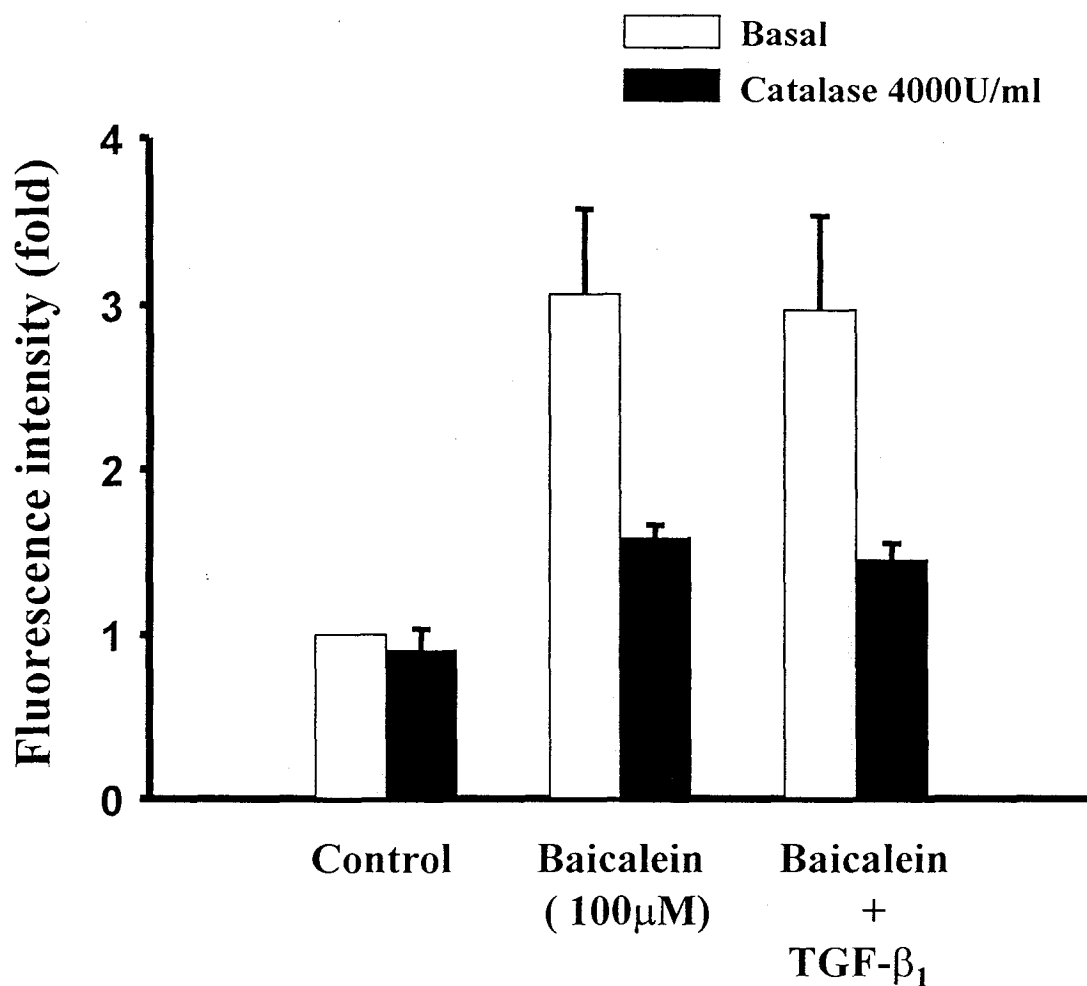


Fig. 2-9. Catalase 對於細胞內過氧化氫形成之作用. Cells were incubated with or without catalase for 1 hr, and then vehicle, baicalein alone or TGF-β₁ plus baicalein was added. The H₂O₂ formation was detected using DCFH-DA fluorescent probe as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means ± SEM of three determinations.

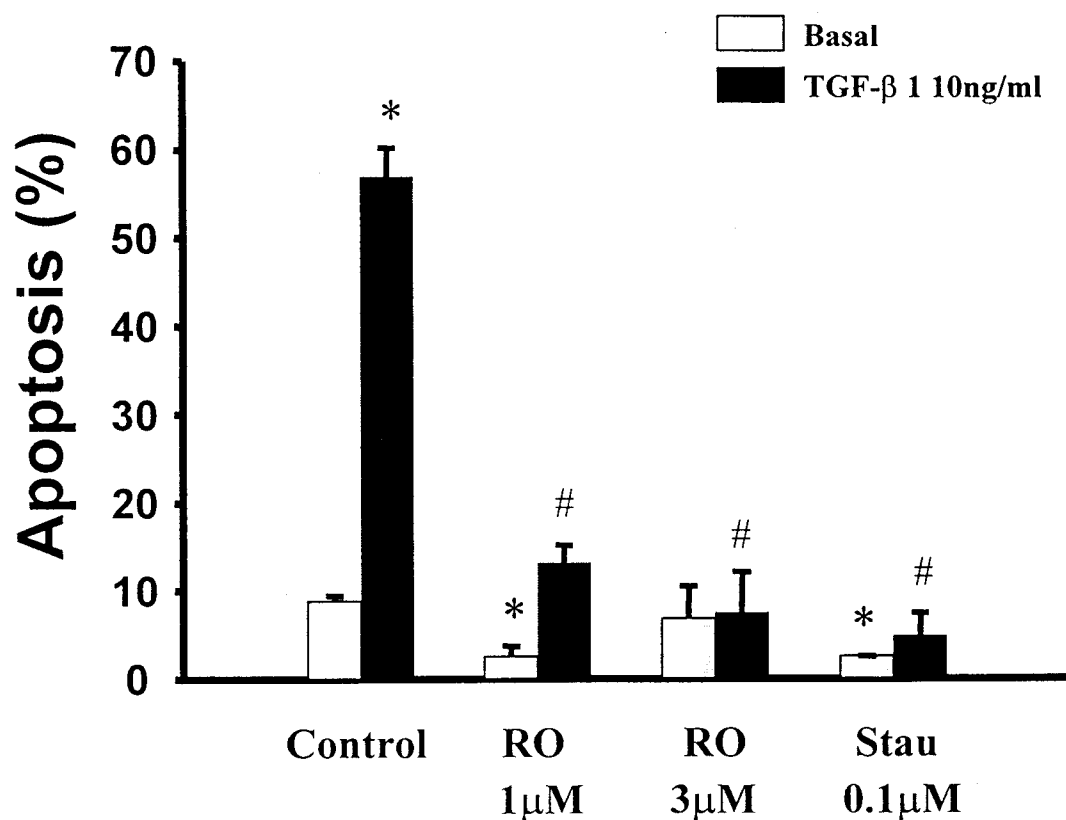


Fig. 2-10. PKC 抑制劑對於TGF- β_1 所引起的細胞凋亡作用之影響. Cells were preincubated in the absence or presence of the indicated agent (RO, Ro 318220; Stau, staurosporine), and then TGF- β_1 was added to induce the apoptotic response. The cell apoptosis was detected using flow cytometric method as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means $\pm$ SEM of three determinations. * P < 0.05 and # P < 0.05 as compared with control and TGF- β_1 control, respectively.

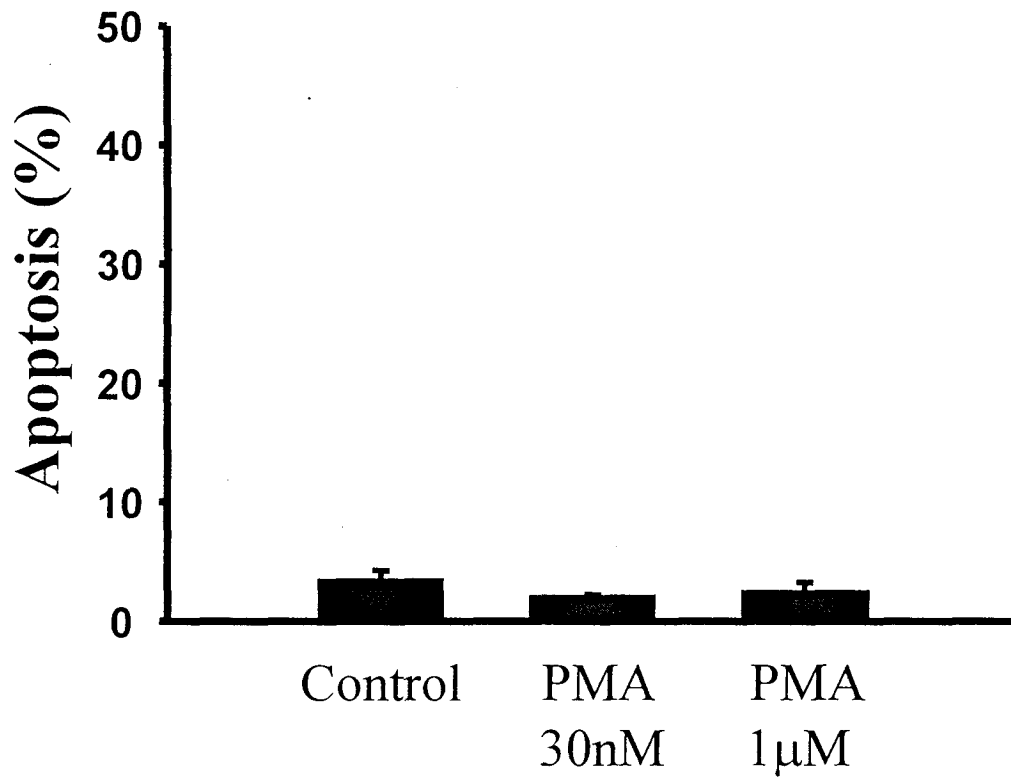


Fig. 2-11. PMA 在 Hep3B 中關於細胞凋亡之作用. Cells were treated with or without PMA for 24hr and then harvested for the detection of apoptosis using flow cytometric method as described as means $\pm$ SEM of three determinations.

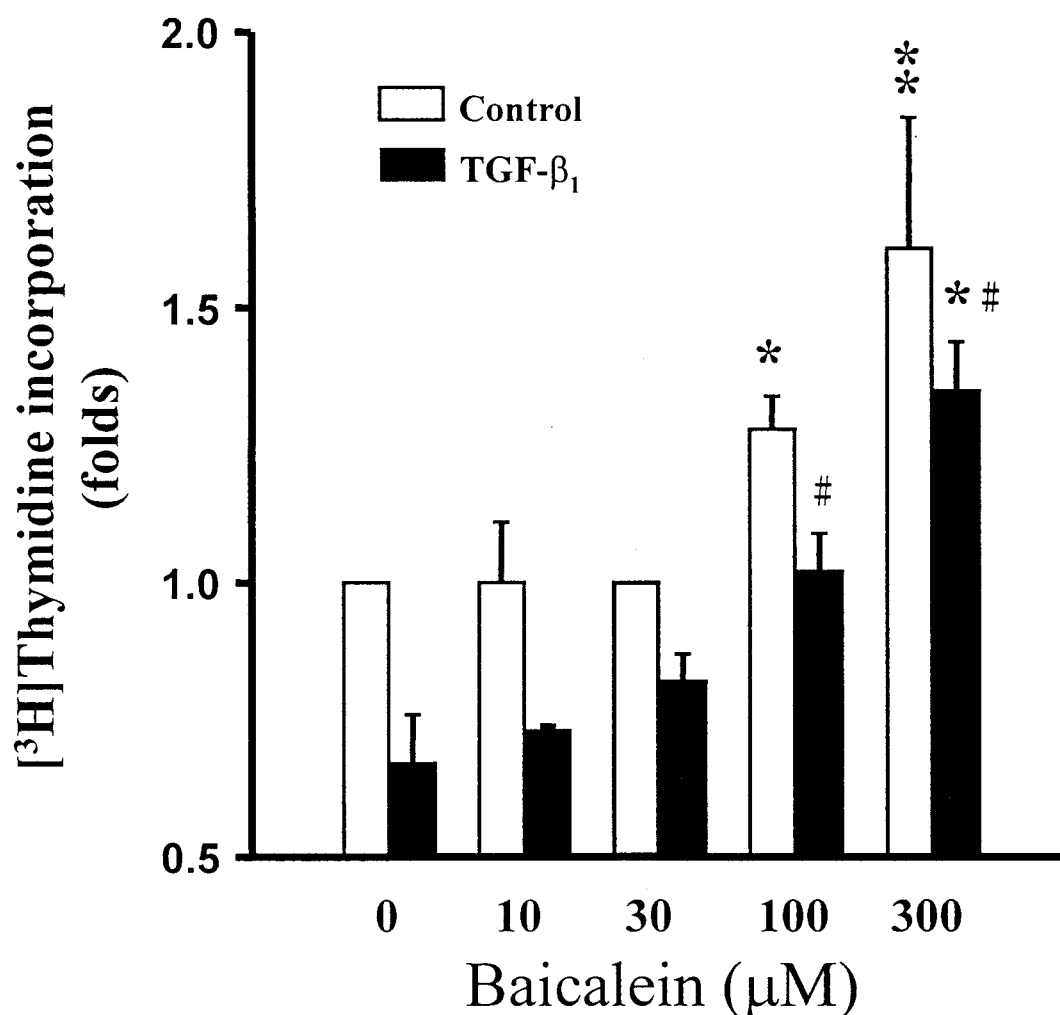


Fig. 2-12. Baicalein 促進DNA 合成的作用. After the pretreatment of cells with or without baicalein for 30 min, vehicle or TGF- β_1 was added for 18 hr, and then [^3H]-thymidine was added to the cells for another 6 hr for the measurement of DNA synthesis as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means $\pm$ SEM of three determinations. * $P < 0.05$ and # $P < 0.05$ as compared with control and TGF- β_1 control, respectively.

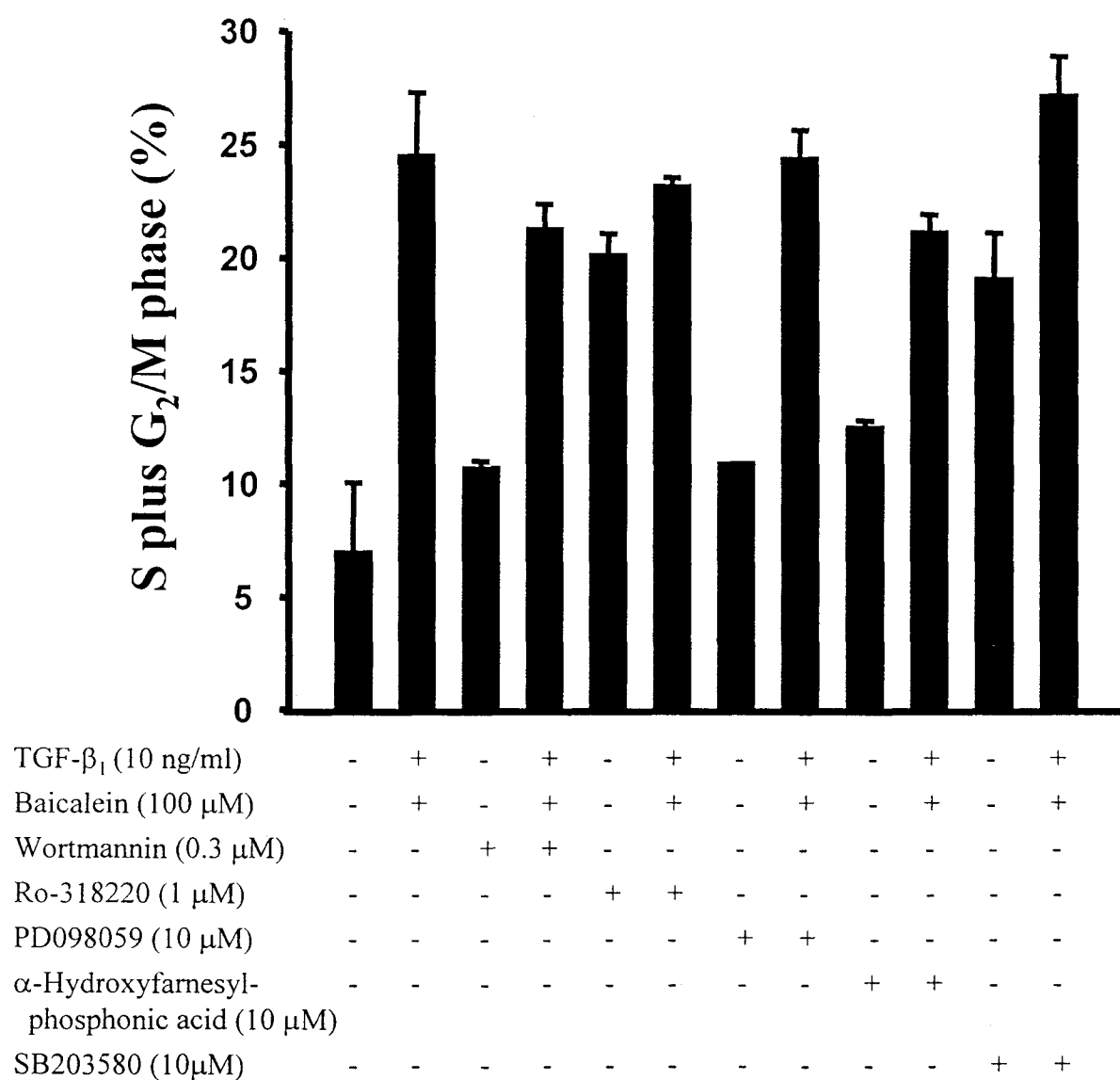


Fig. 2-13 各種訊息傳遞抑制劑對於baicalein在TGF- β_1 細胞週期的調控作用. After the pretreatment of cells with or without the indicated agents for 30min, TGF- β_1 plus baicalein were added for 24hr and the cell cycle progression was measured using flow cytometric method as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means $\pm$ SEM of three determinations.

國立台灣大學醫學院

藥理學研究所

PHARMACOLOGICAL INSTITUTE

TEL: 886-2-23123456 EXT.8310
FAX: 886-2-23221742

COLLEGE OF MEDICINE
NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY

台北市仁愛路一段一號
NO.1, JEN-AI RD., SEC. 1,
TAIPEI, TAIWAN

謝謝審查委員之意見，已將研究計畫成果報告依提供意見修改，並回覆如下：

一、資料分析

1. Fig. 1-2, Fig. 1-3 及 Fig.1-5 主要是看作用之劑量-反應關係，不一定要統計比較。
2. Fig. 1-6 之 Alisol B 與 saikosaponin-d 二組均無加 TGF- β_1 ，因此非漏寫，統計亦無錯誤。
3. Fig. 2-2 之 H₂O₂ 圖譜為第一圖之虛線部份。
4. Fig. 2-4 之第 4、5、6 組與第 3 組比較無差異，怕圖太複雜，只寫在 text 中。
5. Fig. 2-6 之統計說明已補填上。
6. 已修改。
7. 本論文統計意義均只選一項($p < 0.05$)為基準。

二、其它

1. 研究重點著重在 baicalein，有關 gentiopicroside 之作用機轉是否相同，有待再進一步探討。
2. 已將二年成果及摘要合併。

計畫編號：CCMP88-RD-026

CCMP89-RD-020

行政院衛生署八十八、八十九年度
科技研究發展計畫

龍膽瀉肝湯免疫機轉研究

全程計畫執行總報告

計畫委託機關：台大醫學院藥理學研究所

計畫主持人：黃慧貞、鄧哲明教授

執行期間：87 年 7 月 1 日至 89 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見

計畫編號：CCMP88-RD-026

CCMP89-RD-020

各機關研究計畫基本資料庫之計畫編號：

行政院衛生署八十八、八十九年度
科技研究發展計畫

龍膽瀉肝湯免疫機轉研究

全程計畫執行總報告

計畫委託機關：台大醫學院藥理學研究所

計畫主持人：黃慧貞、鄧哲明教授

執行期間：87 年 7 月 1 日至 89 年 12 月 31 日

編號：CCMP89-RD-020

行政院衛生署中醫藥委員會八十九年度委託研究計畫成果報告

龍膽瀉肝湯免疫機轉研究(2-2)

執行機構

台大醫學院藥理學研究所

計畫主持人

鄧哲明教授

執行期限：民國 88 年 7 月 1 日至民國 89 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表本會意見

目錄

目次	頁碼
封面	1
目錄	2
中文摘要	3
英文摘要	6
前言	9
材料與方法	11
結果	19
討論	28
結論與建議	39
圖、表	39
參考文獻	42
自我評估表	62

編號：CCMP88-RD-026

CCMP89-RD-020

龍膽瀉肝湯免疫機轉研究

黃慧貞、鄧哲明

台大醫學院藥理學研究所

摘 要

本研究探討龍膽瀉肝湯及其中活性成分對於 CEM lymphocytes 淋巴細胞之增生及 TGF- β 1 處理 Hep3B cells 肝臟細胞毒性具有保護作用。第一年研究發現龍膽瀉肝湯複方及其中活性成分 baicalein, saikosaponin, alisol 能抑制 CEM lymphocytes 淋巴細胞之增生。

Saikosaponin-d 是中藥材柴胡中一種 triterpene saponin，本研究對其能在人類 CEM lymphocytes 引起細胞死亡抑制增生之作用機轉進一步探討並與 dexamethasone 之作用機轉比較。Saikosaponin-d (10^{-8} to 10^{-5} M) 能劑量相依性的抑制血清刺激引起的 [3 H]thymidine 攝入量。Dexamethasone (3×10^{-7} M) 也能抑制血清刺激引起的 [3 H]thymidine 攝入量。以 trypan blue dye exclusion 方法測定細胞活性，不受 10^{-6} M saikosaponin-d 影響。但在較高濃度 saikosaponin-d (10^{-5} - 10^{-4} M)，活細胞數有意義的被降至比基礎值低。Dexamethasone (3×10^{-7} M, 48 h) 處理也能有意義的降低活細胞數至比基礎值低。以 flow cytometry 分析 propidium iodide 染色細胞，saikosaponin-d (10^{-5} - 10^{-4} M) 處理後在凋亡區之細胞數增加。Dexamethasone (3×10^{-7} M, 48 h) 也能有意義的增加凋亡細胞比例。活細胞以 propidium iodide 及 annexin V 染色顯示 saikosaponin-d (10^{-5} - 10^{-4} M) 引起細胞凋亡 apoptosis 及壞死 necrosis。Saikosaponin-d (3×10^{-6} - 10^{-4} M, 48 h) 引起細胞凋亡的作

用也以 TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) analysis 法及 DNA laddering 法來顯示。Dexamethasone (3×10^{-7} M, 48 h) 也有類似結果。Saikosaponin-d (3×10^{-6} - 10^{-5} M) 減少 DNA 合成不受 Z-VAD-FMK 影響，Z-VAD-FMK 是一種 fluoromethylketone 為 caspases 抑制劑。顯示 saikosaponin-d 引起之細胞凋亡並不經過 caspases 活性。以 reverse transcription-polymerase chain reaction 分析 *c-myc* 及 *p53* mRNA 之量能有意義的被 saikosaponin-d (10^{-5} M) 增加，而 *bcl-2* mRNA 能有意義的被減少。Dexamethasone (3×10^{-7} M) 不能有意義的改變 *c-myc*, *p53*, 及 *bcl-2* mRNA 之量。Saikosaponin-d 引起細胞凋亡的作用可能部分經由增加 *c-myc* 及 *p53* mRNA 量，減少 *bcl-2* mRNA 量，由此可知 saikosaponin-d 具有免疫調節作用。第二年，我們以源自人類肝細胞株-Hep3B 為實驗模式，並以 Transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) 來引發細胞的凋亡作用 (apoptosis)，以此來探討龍膽瀉肝湯的作用。龍膽瀉肝湯的五種主藥成分，即 gentiopicrside, baicalein, geniposide, alisol B monoacetate 及 saikosaponin-d (分別來自龍膽草，黃芩，梔子，澤瀉及柴胡)，其對於 Hep3B 細胞的作用也加以深入探討。首先我們以形態的鑑定及 annexin V 的螢光標定確認 TGF- β_1 所引發的細胞死亡為凋亡作用。龍膽瀉肝湯以濃度有關的方式抑制了 TGF- β_1 所引發的凋亡作用；進一步分析其主要成分的作用，發現 gentiopicrside 及 baicalein 也能有效的抑制此凋亡作用，但 geniposide 卻沒有抑制作用；然而，alisol B monoacetate 及 saikosaponin-d 本身即對 Hep 3B 細胞造成死亡作用。alisol B monoacetate 是造成細胞凋亡作用，而 saikosaponin-d 則是造成細胞壞死 (necrosis)。此外，我們也探求了 caspase-3 的酵素活性，由實驗結果得知，TGF- β_1 會明顯的增加 caspase-3 的活性，gentiopicrside 及 baicalein 都能有效的抑制 caspase-3 的活性，而 geniposide 則沒有任何抑制作用；經由更進一步的分析細胞凋亡與 Caspase-3 的活性發現，細胞凋亡的程度與 caspase-3 的活性成正相關，其相關係數 r 值為 0.94，可見 caspase-3 的活性調控在 TGF- β_1 引發細胞凋亡及中藥成分抑制凋亡的機轉中，扮演了一個很重要的角色。在上述的主成分中，baicalein 是效果最好的成分，因此，我們將 baicalein 的作用做一詳細的探討。在此，我們以一些藥理作用劑，例如 α -hydroxyfarnesyl phosphoric acid、PD098059 以及 wortmannin 都不能有效的抑制 baicalein 的作用，暗示著 baicalein 抗凋亡作用並不經由 Ras/Raf-1/MAPK 及 PI 3-kinase 的相關路徑。然而，很有趣的一點是 baicalein 及 baicalein 加上 TGF- β_1 都能明顯的增加內生性 H_2O_2 的生成，再則，TGF- β_1 會明顯降低細胞 NF- κ B 的 nuclear translocation，而 baicalein 本身

便能很明顯的增加 NF- κ B 的 nuclear translocation，進而消除掉 TGF- β_1 在這方面的作用。由此看出 NF- κ B 的 nuclear translocation 在這凋亡/抗凋亡的作用扮演了非常重要的角色。因此，綜合以上所述，龍膽瀉肝湯對於 TGF- β_1 所引起的細胞凋亡有保護作用，也就是所謂的保護肝臟作用，而其中 baicalein 是最有效的主要成分，且 baicalein 之抗細胞凋亡作用主要是增加 NF- κ B 的 nuclear translocation。

關鍵詞：龍膽瀉肝湯， CEM lymphocytes 淋巴細胞， *p53*, *bcl-2* mRNA， Hep 3B cells， TGF- β_1 ， NF- κ B

CCMP88-RD-026

CCMP89-RD-020

Study on the immunological mechanisms of therapeutic effect of Long-dan-tan

Huei-Chen Huang, Che-Ming Teng

Department of Pharmacology, College of Medicine, National Taiwan
University

ABSTRACT

The protective effect of crude Long-Dan-Tan and its active components against the proliferation of CEM lymphocytes and TGF- β 1-induced apoptosis in Hep3B cells were investigated in this study.

In the first year of this project, the possible mechanisms involved in the effect of saikosaponin-d, a triterpene saponin from *Bupleurum falcatum* L., on cell death were studied in human CEM lymphocytes and compared with those of dexamethasone. DNA synthesis was determined by tritiated thymidine uptake. Saikosaponin-d (10^{-8} to 10^{-5} M) inhibited the serum-stimulated [3 H]thymidine incorporation in a concentration-dependent manner. Dexamethasone (3×10^{-7} M) also inhibited serum-stimulated [3 H]thymidine incorporation. Cell viability, determined by the trypan blue dye exclusion, was unaffected by 10^{-6} M saikosaponin-d. However, at higher saikosaponin-d concentrations (10^{-5} - 10^{-4} M), the number of viable cells was significantly reduced to lower than the basal value. Dexamethasone treatment (3×10^{-7} M, 48 h) also significantly reduced the number of viable cells. Following saikosaponin-d (10^{-5} - 10^{-4} M) treatment, flow cytometry analysis of propidium iodide-stained cells showed a significant increase in the percentage of cells in the apoptotic region. Dexamethasone (3×10^{-7} M, 48 h) also significantly increased the percentage of apoptotic cells. The supravital exposure to propidium iodide and annexin V labeling demonstrated that saikosaponin-d (10^{-5} - 10^{-4} M) induced apoptosis

and also necrosis. The apoptotic effect of saikosaponin-d (3×10^{-6} - 10^{-4} M, 48 h) was also demonstrated by TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) analysis and DNA laddering. Similar results were seen with dexamethasone (3×10^{-7} M, 48 h). The DNA synthesis reduced by saikosaponin-d (3×10^{-6} - 10^{-5} M) was unaffected by treating cells with Z-VAD-FMK, a cell-permeable fluoromethylketone inhibitor of caspases, indicating that saikosaponin-d-induced apoptosis is not mediated by caspase activity. Levels of *c-myc*, *p53*, and *bcl-2* mRNA were analyzed by the reverse transcription-polymerase chain reaction. Levels of *c-myc* and *p53* mRNA were significantly increased and the level of *bcl-2* mRNA significantly decreased by saikosaponin-d (10^{-5} M) treatment. Dexamethasone (3×10^{-7} M) did not significantly change *c-myc*, *p53*, and *bcl-2* mRNA level. It is suggested that the apoptotic effect of saikosaponin-d may be partly mediated via an increase in *c-myc* and *p53* mRNA levels and a decrease in *bcl-2* mRNA level.

In the second year of this project, we have found that Long-dan-tan (Chinese name), one of the most common traditional herbal drugs in Chinese people with chronic liver diseases, exhibits the inhibitory effect on TGF- β_1 -induced apoptosis in human liver-derived cell line Hep 3B. We examined the antiapoptotic action of Long-dan-tan and its five major ingredients, such as gentiopicroside, baicalein, geniposide, alisol B monoacetate and saikosaponin-d. Firstly, we confirmed the TGF- β_1 -induced apoptosis by cell morphology identification and *in situ* labeling of annexin V-reaction techniques. Long-dan-tan mixture showed a concentration-dependent inhibition on TGF- β_1 -mediated apoptosis. Furthermore, the ingredients, gentiopicroside and baicalein, but not geniposide, effectively prevented TGF- β_1 -induced apoptosis. By contrast, alisol B monoacetate and saikosaponin-d themselves without TGF- β_1 caused the cytotoxicity in Hep 3B cells. We then determined the caspase-3 activity in the present study. It showed that TGF- β_1 -induced a profound increase in caspase-3 activity; gentiopicroside and baicalein, but not geniposide, had a significant suppression on this TGF- β_1 -induced caspase-3 activity. To further correlate the functional apoptosis and caspase-3 activity, a good coefficient (r value) of 0.94 was obtained suggesting the central role of the regulation of caspase-3 activity in TGF- β_1 -induced effect and the antiapoptotic action of these herbal ingredients. Among these ingredients, baicalein showed the most effective one in the present work. The detailed investigation was therefore carried out. Several

pharmacological agents, such as α -hydroxyfarnesyl- phosphoric acid, PD098059, and wortmannin, were examined to have little influence on baicalein-mediated antiapoptotic effect suggesting baicalein action is independent of the Ras/Raf-1/MAPK- and PI3-kinase pathways. Interestingly, baicalein alone as well as baicalein plus TGF- β_1 significantly stimulated the formation of H_2O_2 . Furthermore, baicalein alone profoundly induced the nuclear translocation of NF- κ B. On the contrary, TGF- β_1 almost completely suppressed this translocation suggesting the crucial role of NF- κ B translocation on the apoptotic/antiapoptotic regulation. We conclude that Long-dan-tan has a protective effect on TGF- β_1 -induced cell apoptosis. Baicalein is the most effective ingredient among Long-dan-tan mixture. Furthermore, baicalein exerts the antiapoptotic action via activation of NF- κ B nuclear translocation.

Keywords : Long-Dan Tan, saikosaponin, CEM lymphocytes, *c-myc*, *p53*, *bcl-2* mRNA. TGF- β ; Hep3B cells ; Hydrogen peroxide ; NF- κ B

前 言

Saikosaponin-d 是從三島柴胡(*Bupleurum falcatum* L)中所萃取出的一种植物皂素，Saikosaponin-d 具有許多藥理活性，除了抗發炎外，有報告指出 Saikosaponin-d 也具有降血脂、減輕肝傷害、慢性肝炎(Ohuchi *et al.*, 1985)的作用，並且是中藥小柴胡湯(日本名: sho-saiko-to)的主成份之一，Yamamoto 等人 (1975) 有報告指出 saikosaponin-a 和 saikosaponin-d, 但不是 saikosaponin-c, 具有抗發炎和降血脂的作用。Saikosaponin-d 也被報導具有細胞種類依賴性(cell type-dependent)的免疫調控作用(Kato *et al.*, 1995)。最近，我們發現 saikosaponin-d 會抑制 CEM 淋巴球細胞和血管平滑肌細胞 DNA 的合成並引發細胞凋亡。有報告指出人蔘皂素(ginseng saponin)之一的 ginsenoside Rh2, 在人類肝癌細胞也會引發細胞凋亡(Park *et al.*, 1997)。細胞凋亡(Apoptosis)，也就是程序性的細胞死亡(programmed cell death)，在正常發育過程或是不同組織的病理狀態都扮演著重要的角色，細胞凋亡的結果會使細胞核內的核染色質濃染(nuclear condensation), 細胞質收縮(cytoplasmic shrinkage), 和造成 DNA 斷片 (DNA fragmentation) (Jacobson *et al.*, 1997; Nagata, 1997)。細胞凋亡是由細胞所接受到的死亡和生存訊息間的平衡所調控(Musci *et al.*, 1997)。近幾年來，細胞週期的調控和細胞凋亡引起大家的重視並可能藉此過程來減少過度增生的細胞。在組織細胞層次的免疫防禦(immune defense) 和發炎過程中包含了一些增生的反應，因此 saikosaponin-d 可能可以作為發展新的免疫抑制劑(immunosuppressive)及抗發炎劑(anti-inflammatory agents)的一種模板，動脈硬化和血管成型術後再增生的病理狀態都包括不正常的血管平滑肌細胞、發炎細胞、胞外間質蛋白的過度增生堆積 (Ross, 1993; Lundergan *et al.*, 1991)。Saikosaponin-d 不僅在淋巴細胞也會在血管平滑肌細胞引發細胞凋亡的作用，或許可用來研究或治療和動脈硬化或血管再增生相關的病理變化。本研究是利用人類 CEM 淋巴球細胞(CEM cells)來探討 saikosaponin-d 引發淋巴球細胞凋亡的可能作用機轉。由細胞膜至細胞核的訊息傳遞包含許多不同的路徑，我們先前證明 curcumin 的細胞凋亡作用是藉由抑制 *c-myc* 和 *bcl-2* mRNA 的表現而來(Chen & Huang, 1998)，因此我們也有興趣研究 saikosaponin-d 對於基因表現的影響，一些 proto-oncogenes 如 *bcl-2* 和 *c-myc*, 或 tumor suppressor gene 如 *p53*, 都曾被報導具有調控細胞增生或細胞凋亡的作

用 (Hale *et al.*, 1996)。在本研究中，將探討 saikosaponin-d 引起 CEM 細胞凋亡的分子作用機轉中是否有基因表現的參與，因為這些化合物都具有類似類固醇(steroid-like)的結構，所以它們可能具有部份類固醇相關(steroid-related)的藥理活性，因為 Glucocorticoid 是一般熟知的可導致 T-淋巴球細胞凋亡的藥物 (Brunetti *et al.*, 1995)，所以本實驗將比較 saikosaponin-d 與 dexamethasone 引發細胞凋亡的作用及機制。

中國傳統醫學目前正漸漸取得今日世界醫壇的認識與重視，可輔助或加強西方醫學的不足，地位有日漸上昇之勢。且現在於許多先進國家中，正在使用已被科學化或標準化的中草藥。然而，直到目前為止，中草藥的作用、組成與劑量仍尚未科學地評估。我們的目的即在檢查中國傳統的方劑及其多種主成分之作用，以找出其中主要藥效之成分，並評估它的作用機轉。

肝炎是一個遍及全球的傳染病，在臺灣地區是更是慢性病毒性肝炎的盛行區。由於肝炎病毒的感染，常導致急、慢性肝炎的發作，並因此進入肝硬化、肝癌的三部曲，且肝癌、肝炎與肝硬化常年列為台灣地區十大死因之一。因而如何進一步提高肝炎的臨床療效，預防肝炎的發生與傳播，保障人類的身體健康，是醫學界面臨的重要課題之一。

根據臨床中醫實用的結果，發現龍膽瀉肝湯對於慢性發炎病人的治療有顯著的效果。然而在人類肝細胞的研究中，一直缺乏著此方劑的藥理作用與科學化藥效評估，因此，本計畫便針對此方劑及其五種主要成分，做其藥理藥效評估及詳細的機轉探討。在各種慢性肝炎病人的血清及肝臟內，皆可觀察到 TGF- β 1 的表現明顯增加，且發現 TGF- β 1 會造成肝臟纖維化，與肝細胞的死亡。因此，我們觀察龍膽瀉肝湯對於 TGF- β 1 所引起的肝細胞凋亡作用之影響，以及決定龍膽瀉肝湯中主要藥效之成分。並希望由此研究，決定各個成分的作用之後，對於此方劑中的組成和劑量可以再重新評估，以達到最大的治療效果。甚至可根據主要藥效之成分的結構與作用機轉，而發展出類似西藥模式的藥品，可更廣泛的用於社會大眾。

材 料 與 方 法

材 料

Saikosaponin-d (Figure 1)購自 Nacalai Tesque (Kyoto, Japan). Human CEM lymphocytes (CEM cells; human lymphoblastoid leukemia cells)購自 American Type Culture Collection (Rockville, MD). Foetal calf serum, penicillin, streptomycin, RPMI 1640 培養液。Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、0.1 % trypsin- 0.04 % EDTA solution、fetal bovine serum (FBS)、HBSS (Hank's Salt Solution) 購自 Gibco Lab. (Grand Island, NY)。3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)、propidium iodide (PI)、RNase A、baicalein、hydrogen peroxide (H_2O_2)、PDTC、catalase、PMA、Wortmannin、 α -hydroxyfarnesylphosphonic acid、EDTA (disodium salt)、leupeptin、dithiothreitol (DTT)、phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、 β -mercaptoethanol、12-, 15-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-, 15-HETE)、和 staurosporine 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)。Long-dan tan購自 Sun Ten Pharmaceutical Co. (Taipei, Taiwan)。gentiopicroside、geniposide、alisol B monoacetate、和 saikosaponin-d購自 Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)。PD98059、SB203580、和 Ro318220 購自 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)。6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl -chroman-2-carboxylic acid (Trolox) 購自 Aldrich (St. Louis, MO, USA)。2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) 與 chloromethyl xarosamine (MitoTracker (CMXRos)) 購自 Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA)。TGF- β 1、Caspase-3 Activity Assay Kit 與 Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit購自 R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, USA)。 $[^3H]$ -thymidine購自 Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NY)。Bio-Rad protein assay kit、bis-acrylamide、prestained standard molecular weight markers 和 polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 購自 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)。 $[^{32}P]$ -ATP 購自 New England Nuclear (Boston, MA, USA)。T₄ polynucleotide kinase、T₄ kinase 10X buffer 和 Gel Shift Binding 5X Buffer購自 Promega (Madison, WI, USA)。

方法

DNA 合成的測定

DNA的合成以 $[^3\text{H}]$ thymidine 攝入量來測定(Huang *et al.*, 1992; Watabe *et al.*, 1984). 人類 CEM 淋巴球細胞 (CEM cells; human lymphoblastoid leukemia cells) 置於 25cm^2 培養瓶中,加入含有10 % v/v 胎牛血清(foetal calf serum; FCS)的RPMI 培養液(內含100 u/ml penicillin及1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin)培養細胞. CEM細胞先以0.5 % v/v FCS/RPMI靜止生長48小時(每24小時換一次培養液). 再以 3×10^3 cells/well的密度種在96-well培養盤。隨後以5 % v/v FCS/RPMI刺激細胞生長48小時, 實驗組加入saikosaponin-d或dexamethasone對照組則加入等體積的PBS代之。細胞在harvested前24小時加入 $[^3\text{H}]$ thymidine (1 $\mu\text{Ci}/\text{well}$) 並以閃爍計數器測定細胞之 $[^3\text{H}]$ thymidine 攝入量, 代表細胞DNA合成的多寡。實驗結果以c.p.m表示。並計算每次實驗結果的% of control及50 % maximal inhibition (IC_{50})。每個實驗皆重覆操作五到六次。

細胞存活力(Cell viability)以trypan blue dye exclusion method測定.細胞以藥物處理48小時後,以PBS再懸浮(resuspension)並以0.1% w/v trypan blue in saline染色。再利用計數器(hemocytometer)以顯微鏡觀察並計算出存活細胞數目。

流式細胞儀分析(Flow cytometric analysis)

細胞先以 0.5 % FCS/RPMI 靜止生長48小時將大部分細胞停留在 G_0 期,再以 5 % FCS/RPMI刺激細胞生長進行細胞週期。然後以流式細胞儀分析不同時間細胞的細胞週期分佈 (Chen & Huang, 1998; Sherwood & Schimke, 1995). 以藥物處理後,將CEM 細胞(5×10^6 cells/sample)離心收集,以PBS (pH 7.4)沖洗二次,再以冰的70 % v/v ethanol再懸浮(resuspension)後放置於 -20°C , 隔夜。CEM細胞在室溫下加入0.4 ml phosphate-citric acid buffer (pH 7.8) 包括 5×10^{-2} M Na_2HPO_4 , 2.5×10^{-2} M citric acid and 0.1 % Triton X-100, 5 分鐘後,以1.5 ml propidium iodide staining buffer (0.1 % Triton X-100, 1×10^{-8} M PIPES, 1×10^{-1} M NaCl, 2×10^{-3} M MgCl_2 , 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ propidium iodide (PI))染色,須避光。超過30分鐘後細胞先以nylon mesh filter過濾後以FACScan和Cellquest program(Becton Dickinson)分析。每個實驗皆重覆操作五到六次。

凋亡的細胞另外也以propidium iodide 和 Annexin V 染色(Zamai *et al.* (1996) ; Boersma *et al.* (1996)). 細胞在37 °C下進行雙染色(double labelling) 如下: 細胞培養液加入propidium iodide (50 µg/ml)和 Annexin V (2 µg/ml)兩小時。染色完後馬上以FACScan 分析。Annexin V 是一種會和phosphatidylserine結合的蛋白質,而phosphatidylserine在細胞凋亡時會暴露在細胞表面,正常細胞不會有此現象,在健康的細胞中,phosphatidylserine groups是排列在細胞膜的內側,當細胞凋亡時,會失去這種排列對稱性,而使得phosphatidylserine暴露在細胞外側。Annexin V 染色因此被用來當作一種細胞凋亡的生化標記(biochemical marker)。細胞膜完整性和功能的部份喪失有助於分辨細胞是處於凋亡(apoptotic)、壞死(necrotic)還是存活(living)狀態。

The terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay for apoptosis

將修飾過的核酸嵌入細胞 DNA 的 3'-OH 端的方法是參閱 Gavrieli 等人的報告(Chen & Huang, 1998; Gavrieli *et al.* 1992)。以藥物處理細胞後,將 CEM 細胞離心收集,利用 cytospin 將細胞固定在玻片後再以冰冷的 95 % v/v ethanol 固定細胞,將玻片以 blocking solution(0.3 % v/v H₂O₂ in methanol)處理 30 分鐘來抑制內生性 peroxidase 的作用。DNA 斷裂處是以 in situ cell death detection kit 來測定(Boehringer Mannheim),然後將玻片以 TUNEL reaction mixture containing enzyme solution (terminal deoxynucleotidyl transferase; TdT)和 label solution (modified nucleotide mixture in reaction buffer)在 37°C 下處理一小時。以 PBS 沖洗終止反應後加入 Converter-POD (Anti-fluorescein antibody conjugated with horse-radish peroxidase, POD), 30 分鐘,以 3,3'-diaminobenzidine 染色 10 min 再以 5 % w/v methyl green in 0.1 M sodium acetate solution (pH 4.0)做 counterstaining 最後利用光學顯微鏡觀察、照相。Negative control 則是步驟相同,但在以 TUNEL reaction mixture 處理的過程中只加入 label solution 而未加入 enzyme solution。Positive control 則是在做 TUNEL 之前,在室溫下先以 DNase I (1 µg/ml in 40 mM Tris-HCl, 6 mM MgCl₂, pH 7.5)處理 10 分鐘(Chen & Huang, 1998)。

DNA laddering

CEM細胞先以0.5 % v/v FCS/RPMI靜止生長48小時(每24小時換一次培養液)後,再以5 % v/v FCS/RPMI刺激細胞生長,實驗組加入saikosaponin-d或dexamethasone對照組則加入等體積的PBS代之。48小時之後將CEM細胞(10^7

cells/sample) 離心收集，以 PBS 沖洗，以 cell lysis buffer (內含 Tris, EDTA 和 sodium dodecyl sulphate)，將細胞溶解後加入 RNase A (0.6 u/ml)，在 37°C 水浴 30 分鐘，加入 Protein precipitation solution (ammonium acetate) 使蛋白質沈澱而不致於污染 DNA，離心 (2,000g) 10 分鐘。取上清液加入 100 % isopropanol 使 DNA 沈澱出來，離心 (2,000g) 10 分鐘。DNA 再以 70 % v/v ethanol 沖洗後溶解於 DNA hydration buffer (內含 Tris 和 EDTA)。DNA 的濃度可利用分光光度計 (spectrophotometry) 測 260nm 波長之吸光度即可得知。取 20 µg 的 DNA 將其 loading 在 1 % w/v agarose gel (含 0.5 µg/ml ethidium bromide)。維持在 20V 的電壓跑電泳。經 14 小時後將 gel 置於 UV transilluminator 上，在 254nm 波長照射下，以 Polaroid type 667 底片感光而得結果。再以 image analyzer 分析。

細胞培養

Hep3B 購自 ATCC (Rockville, MD, USA)。將 Hep3B cells (人類肝癌細胞株) 培養於 75cm² 培養瓶中，加入含有 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum; FBS) 及抗生素 (100 U/ml penicillin 與 100 µg/ml streptomycin) 的 DMEM 培養液，放入細胞培養恆溫箱，維持 37°C, 5% CO₂ 每隔 2 至 3 天更換一次培養液。待細胞長滿 (confluence) 後，以 trypsin 將細胞打下，然後再以 1:4 到 1:5 的比例稀釋，進行繼代培養 (subculture)，或改將細胞種在培養盤中進行後續實驗。

In-situ labeling of Annexin V

本實驗是使用 Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (R&D System)。將細胞種在 chamber slide 上，隔天待細胞完整附著後，加入 TGF-β1 或藥物反應一段時間後，以冰的 PBS 清洗兩次。吸乾之後，加入 100 µl 的 Annexin V Incubation Reaction (內含 Annexin V-FITC, Propidium Iodide in Binding Buffer)，在暗室下室溫反應 15 分鐘。使用 1× Binding Buffer 清洗兩次之後，即可在螢光顯微鏡下觀察並拍照。

細胞計數

將培養瓶中的細胞以 0.05% trypsin 收集，懸浮於含 10% FCS 的 DMEM 培養液中，將細胞懸浮液加入 0.4 % trypan blue，以 1:1 的比例充分混合均勻，取 10 µl 利用血球計數器 (hemocytometer) 計算細胞數目，每次計算必須重複兩次取其平均值。

細胞存活率的測定 (MTT 偵測法)

細胞存活率的測定是參照 Monsmann (1983) 發表的 MTT 偵測法。利用 MTT 在活細胞中會被粒腺體的酵素 (dehydrogenase) 作用，而產生紫色的 formazan 產物的特性來測定細胞存活率。細胞在培養瓶中長滿後，以 trypsin 收集細胞並離心，將收集的細胞以 2×10^4 cells/well 的密度將細胞種在 96-well 的細胞培養盤中。加入 TGF- β 1 與待測試藥物處理 24 小時後，改換為 100 μ l 含有 0.5 mg/ml MTT solution 的 culture medium，於 37 °C 的細胞培養恆溫箱中作用 1 小時。然後以 DMSO 於室溫下作用 10 分鐘，使用 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader 讀取波長 550 nm 吸光值的變化。其吸光值的數據依據細胞數標準曲線 (standard curve) 求出細胞存活數目。與對照組比較之百分比即為細胞存活率。

流式細胞儀 (flow cytometry) 測定細胞凋亡與細胞週期

細胞以 TGF- β 1 或藥物處理後，將收集的細胞以冰的 70 % v/v ethanol 再懸浮 (resuspension) 後放置於 -20°C，30 分鐘以上。細胞在室溫下加入 0.2 ml DNA 萃取液 (0.2 M Na₂HPO₄- 0.1 M citric acid buffer (pH 7.8)) 30 分鐘後離心，再加入 1 ml DNA 染色液—propidium iodide staining buffer (0.1 % Triton X-100, 100 μ g/ml RNase A, 80 μ g/ml propidium iodide (PI) in PBS)，避光下染色 30 分鐘。將細胞過濾後跑流式細胞儀，以 FACScan 和 CellQuest program (Becton Dickinson) 分析細胞週期。同時，分析 DNA 含量低於 G₀/G₁ peak (2N) 的區域，代表細胞凋亡所造成的 DNA 斷裂。每個樣本皆收集 10000 個細胞來分析結果。

Caspase-3 activity 之測定

本實驗是使用 Caspase-3 Activity Assay Kit (R&D System)。細胞加入藥物處理 24 小時後，將細胞刮下，以 300g 離心 5 分鐘，丟棄上清液。加入 25 μ l 冰冷的 cell lysis buffer，冰浴 (4°C) 10 分鐘後，於 4°C 以 10000 $\times$ g 超高速離心 1 分鐘。抽取上清液，cell lysate 中蛋白質濃度約為 2-4 mg/ml。然後將所得 cell lysate 加至 96-well 的培養盤中，加入反應所需的等體積的 2X Reaction Buffer, DTT 以及 Caspase-3 colorimetric substrate (DEVD-pNA)，充分混合均勻，在 37°C 下反應 1-2 hr。利用 microplate reader 讀取波長 405 nm 的吸光值。

粒腺體電位 ($\Delta \Psi_m$) 的測定

粒腺體電位 (mitochondrial transmembrane potential, $\Delta\Psi_m$) 是由於膜內外電子分配不均，造成膜內側有較高的負電性所形成的。而許多帶正電、脂溶性、會發出螢光的染劑會快速且選擇性的被吸引在粒腺體的膜上；但當膜電位喪失時，這些染劑就會離開。而我們使用 MitoTracker (CMXRos) 以流式細胞儀來分析。將 Hep3B 細胞置換成 serum-free medium 再加入藥物刺激後，在收集細胞的時間前 20 分鐘，再加入 CMXRos (反應濃度為 30 nM) 於 37 °C 的細胞培養恆溫箱中作用 20 分鐘，須避光。以 trypsin 收集細胞，使用 PBS 再懸浮 (resuspension) 之後以流式細胞儀分析。每個樣本皆收集 10000 個細胞來分析結果。

Reactive oxygen Species (ROS) 的測定

將 Hep3B 細胞改換成 serum-free medium，加入 DCFH-DA (最後反應濃度 5 μ M) 於 37 °C 的細胞培養恆溫箱中避光作用 30 分鐘後，再以 TGF- β 1、藥物或 H_2O_2 處理所需時間後，以 trypsin 收集細胞。其中， H_2O_2 當作 positive control。使用 PBS 再懸浮之後以流式細胞儀 FACSscan 和 CellQuest program (Becton Dickinson) 分析。每個樣本皆收集 10000 個細胞來分析結果。

DNA 探針之製備

取雙股 DNA (1.75 μ M) 10 μ l、T₄ polynucleotide kinase (5-10 U/ μ l) 5 μ l、T₄ kinase 10X buffer 5 μ l 及 [³²P] γ -ATP (10 mCi/ml) 15 μ l，之後水補充至 50 μ l，在 37°C 反應 45 分鐘。再於 65 °C 反應 5 分鐘將其去活化 (inactivation) 後，置於已 packing 的 G-50 column 中，離心 2,000 rpm, 2 分鐘，使已標示 ³²P 之 DNA 探針收集在離心管中。本實驗所用雙股 DNA 為 NF- κ B (購於 Promega)，其序列如下：NF- κ B, 5'-AGTTGAGGGGATCC CCCCAGGC。

Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs)

先將細胞均勻散佈在低張溶液 buffer A (10mM HEPES (pH7.9), 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.5mM DTT 及 1mM PMSF) 中，劇烈震盪 10 秒鐘。靜置冰上 10 分鐘後，離心 3,000 rpm 3 分鐘以收集細胞核。再將細胞核均勻散佈在更低張溶液 buffer C (20mM HEPES (pH7.9), 25% glycerol, 420mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.5mM EDTA, 0.5mM DTT 及 1mM PMSF) 中，以 pipette 打 30 下，靜置冰上 20 分鐘，離心 13,000 rpm 5 分鐘，取上清液即為核萃取液，將之存於 -70°C 備用。取核萃取液 (10 μ g protein) 進行 EMSA 實驗，將 ³²P 放射性標誌的 DNA

探針放入核萃取液、Gel Shift Binding 5X Buffer 與 Nuclease-Free Water 組成的反應液中，室溫下反應 30 分鐘。之後加入 10X sample buffer 終止反應，利用 4 % polyacrylamide gel 電泳分析，以分離 protein-DNA complex 及 free probe。用 gel dryer 將 gel 於 80⁰C 下乾燥 1 小時又 20 分鐘，於 -70⁰C 壓片後，以自動放射顯像。

逆轉錄-聚合酵素連鎖反應(reverse transcription-polymerase chain reaction ; RT-PCR)測定 *c-myc*, *p53* 和 *bcl-2* mRNA 的量

c-myc, *p53*, 和 *bcl-2* mRNA 的表現是利用逆轉錄-聚合酵素連鎖反應(reverse transcription-polymerase chain reaction ; RT-PCR) 的方法來測定 (Huang *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1989)。CEM細胞先以 0.5 % v/v FCS/RPMI 靜止生長 48 小時(每 24 小時換一次培養液)後，再以 5 % v/v FCS/RPMI 刺激細胞生長，實驗組加入 saikosaponin-d 或 dexamethasone 對照組則加入等體積的 PBS 代之。12 小時之後將 CEM 細胞離心收集，細胞 RNA 是利用 acid guanidinium thiocyanate 萃取 (Chomczynski & Sacchi, 1987)，取 1 µg total RNA 至 microtube，加入 2 µg oligo (dT) primer 在 65 °C 下加熱 10 分鐘，以破壞 RNA 的二級結構(secondary structure)並將 oligo (dT) primer 結合至 mRNA 上。再加入 RT buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 40 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM spermidine), 1.25 mM deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), 4 mM sodium pyrophosphate, 10 units of RNase inhibitor, and 5 units of AMV (avian myeloblastosis virus) 至最後體積為 20 µl。經 42 °C，1 小時處理再加熱至 95 °C，5 分鐘後，立即冰浴，即合成 cDNA。取 0.5 到 5 µl first strand complementary DNA(cDNA) 加入 10×PCR buffer (500mM KCl、15mM MgCl₂、100mM Tris-HCL、0.1% gelatin)、0.25mM dNTP、2.5 unit *Taq* DNA polymerase (HT Biotech) 及待測之 GAPDH、*c-myc*、*p53* 和 *bcl-2* 之 5'、3'-primer 各 0.4µM 至最後體積為 50µl。再將 microtubes 置於 Perkin-Elmer thermal cycler (GeneAmp PCR System 9600) 進行 cDNA 之基因放大，其 cycle 進行之條件如下：denaturation : 94 °C，45 秒；annealing : 60 °C，45 秒；DNA extension : 72 °C，2 分鐘，如此進行 30 個循環。最後在 72 °C，7 分鐘處理後，即得放大之 DNA 產物。取 10-30 µl 放大之 PCR 產物，將其 loading 在 1.5% agarose gel (含 5×10⁻⁷ g/ml ethidium bromide)，維持在 95V 的電壓，經兩小時後，如預期可以看到 *c-myc*, *p53*, 和 *bcl-2* band 位在 479、371、235 bp 的位置。將 gel 置於 UV transilluminator 上，在 254nm 波長照射下，以 Polaroid type 667 底片感光後，再利用影像分析儀(image analyzer)

分析相對灰度(gray level)而將結果數據化，並以GAPDH作為internal standard。每個實驗的negative control步驟相同，但未加入reverse transcriptase。最後結果再以Northern blotting (Sambrook *et al.*, 1989)加以確認。在起初實驗中，我們取不同量的RT反應產物，進行PCR反應並分析代測的PCR產物，發現在0.5 到 5 μ l的cDNA產物會和其所進行PCR得到的產物成一比例關係，所以之後的實驗，我們都在這線性範圍內取代測mRNA的量，來確定RT-PCR產物的量能真實反應出原始sample中代測mRNA的量。

資料分析

所有實驗結果以平均值 $\pm$ 標準誤差 (mean $\pm$ s. e. mean) 表示，並使用 Student's *t*-test 來做統計分析，當 $P < 0.05$ 時即視為其有統計上之意義。

結 果

對細胞DNA合成的影響

本實驗是利用細胞在合成DNA時攝取 [^3H]-thymidine量來判斷是否有抑制DNA合成的作用。以5%FCS/RPMI刺激CEM細胞(3×10^3 cells/well)，經48小時之後測得 [^3H]-thymidine 的攝入量。對照組為 $9,205 \pm 945$ c.p.m./well。以saikosaponin-d (10^{-8} - 10^{-5} M)處理CEM細胞會發現saikosaponin-d對CEM細胞DNA合成的抑制作用是呈濃度相依性(concentration-dependent manner) (n=5) (圖二)。Saikosaponin-d 的 IC_{50} 值是 $3.1 \pm 0.4 \times 10^{-6}$ M，而saikosaponin-d濃度為 10^{-5} M時即可達到 100.0 ± 0.0 %的最大抑制效果(n=5)。在此實驗中dexamethasone (3×10^{-7} M)對In this study, dexamethasone (3×10^{-7} M) [^3H]-thymidine攝入量的抑制則可達到 93.0 ± 3.3 % (圖二) (n=5)。

對細胞存活力(Cell viability)的影響

細胞存活力是以trypan blue dye exclusion方法來測定，加入 10^{-6} M saikosaponin-d並不會影響CEM細胞存活力(n=5) (圖三)，而且存活的細胞數大於基準值(2×10^5 cells)。當加入 10^{-5} 到 10^{-4} M的saikosaponin-d時，則可有意義地降低細胞存活率(n=5)。在此實驗中，dexamethasone (3×10^{-7} M)也可有意義的降低細胞存活率(n=5)。

對細胞凋亡的影響

以saikosaponin-d (3×10^{-6} - 10^{-4} M) 處理CEM細胞24小時和48小時會引起細胞凋亡，可觀察到部份細胞縮小，核染色質濃染和突起(blebbed)的apoptotic bodies。部份存活細胞的形態也有一定程度的改變，這些細胞凋亡的現象分別以flow cytometry, TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 和DNA laddering來分析。

以Flow cytometry分析CEM細胞凋亡的現象：

以藥物引起CEM細胞凋亡所佔的百分比進一步以flow cytometry (圖四)分析。細胞先以 0.5 % FCS/RPMI 靜止生長48小時將大部分細胞停留在 G_0 期，再以5 % FCS/RPMI刺激細胞生長進行細胞週期。在不同時間收集細胞再以

propidium iodide 染色後以 flow cytometry 分析。Figure 4 顯示 saikosaponin-d 會以時間及濃度相依性的作用引起細胞凋亡。以 3×10^{-6} M saikosaponin-d 處理 48 小時後會造成凋亡細胞的區域 (Ap, sub-G₀/G₁ peak, subdiploid peak) 有意義的增加至 $5.1 \pm 0.6\%$ (圖四) (n=3)。在 10^{-5} M (48 小時), saikosaponin-d 引起細胞凋亡的百分比增加至 $22.2 \pm 1.9\%$ 。在本實驗中, 3×10^{-7} M 的 dexamethasone (48 小時) 引起細胞凋亡的百分比也會有意義增加至 $11.5 \pm 0.8\%$ (圖四) (n=6)。

在 A7r5 細胞, saikosaponin-d (10^{-5} M, 48 小時) 會有意義地增加凋亡細胞百分比至 $41.0 \pm 1.1\%$ (n=3)。

我們利用 propidium iodide (PI) 和 Annexin V 雙染色來測定細胞凋亡的現象, Annexin V⁺PI⁺ (右上象限) 或 Annexin V⁺PI⁻ (右下象限) 通常都可觀察到 (圖五), 以 3×10^{-6} - 10^{-5} M 的 saikosaponin-d 處理過的細胞主要是 Annexin V⁺ 並呈現兩種不同染色程度: Annexin V⁺ 的細胞但仍然 PI⁻, 和早期的凋亡細胞有關, 另一則是 Annexin V⁺⁺ 的細胞但也 PI⁺, 和進一步的凋亡細胞和壞死細胞有關。我們的結果顯示 saikosaponin-d 在 10^{-5} to 10^{-4} M 的濃度下不僅會引起細胞凋亡也會有細胞壞死的現象。

Terminal deoxyribonucleotide transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL assay)

以 TUNEL 方法染細胞核包括產生裂痕的 DNA (早期細胞凋亡的特徵) (圖六)。未處理或以 10^{-6} M saikosaponin-d 處理的細胞沒有細胞凋亡的現象 (圖六d 和六a)。這些細胞 (TUNEL-negative, green-colored) 的細胞核並未藉由 TUNEL 染色, 並以 methyl green 做 counterstaining 染成綠色。但在 48 小時的 saikosaponin-d (3×10^{-6} - 10^{-4} M) 處理下, 可以看到大部分核內呈棕色的細胞 TUNEL-positive (brown) (n=3) (圖六b 和六c 分別表示 10^{-5} 和 10^{-4} M, respectively)。TUNEL-positive 的細胞也可在 3×10^{-7} M dexamethasone 處理後看到 (n=3) (圖六e)。

DNA laddering

DNA 退化 (degadation) 成特殊的斷片是細胞凋亡的特徵之一, 和壞死細胞比較, 凋亡細胞的 genomic DNA 被 endonuclease 以規則的間隔切除後會產生約 200bp 大小的 mono- 或 oligonucleosomal DNA, 也就是所謂的 DNA 斷片 (fragmentation), 可利用電泳觀察到 DNA ladder 的現象。在以 saikosaponin-d 或 dexamethasone 處理

CEM細胞48小時後，將細胞的genomic DNA分離出來跑電泳 (n=3) (圖七)，在 10^{-4} M saikosaponin-d組可看到清楚的DNA ladder的現象 (n=3) (圖七, lane 4); 這種現象在 3×10^{-6} , 10^{-5} M saikosaponin-d 或 3×10^{-7} M dexamethasone組較不明顯 (n=3) (圖七, lanes 3 和 5 分別表示 10^{-5} M saikosaponin-d 和 3×10^{-7} M dexamethasone)。而在對照組或 10^{-6} M saikosaponin-d組則看不到DNA斷片的現象(n=3) (圖七, lanes 1 和 2)。

caspase inhibitor 的影響

Saikosaponin-d (3×10^{-6} - 10^{-5} M)抑制DNA合成(利用tritiated thymidine uptake測定)的作用並不會被Z-VAD-FMK (10^{-4} M, 4小時)所影響，而Z-VAD-FMK是一種cell-permeable fluoromethylketone 的caspase抑制劑 (27.0 ± 3.2 % vs. 28.0 ± 5.6 % for 3×10^{-6} M saikosaponin-d, n=5)。

對*c-myc*, *p53*, and *bcl-2* mRNA表現的影響

在以血清刺激生長的CEM細胞中，利用RT-PCR的方法來測定對照組或實驗組細胞內*c-myc*, *p53*, 和 *bcl-2* mRNA 的表現量(圖八)。這些待測基因和GAPDH的表現強度都以image analyzer量化(quantified)。這些待測基因相對於GAPDH的表現量記錄於Figure 8 (圖八下行)。這三個基因在有血清存在下的CEM細胞中都會表現，在最初的實驗，我們由CEM細胞以saikosaponin-d 處理之time course，可知在12小時*c-myc* 及 *p53* mRNA的表現為最大值。因此在接下來的實驗，我們都以12小時的時間點來測定待測基因的表現量，而以saikosaponin-d (10^{-5} M)處理CEM細胞12小時之後，*c-myc* mRNA的表現會有意義的增加(3.5 ± 0.8 fold increase, n=3) (lane 2), *p53* mRNA 的表現也會有意義的增加(6.1 ± 1.1 fold increase, n=3) (lane 5), 而*bcl-2* mRNA 則會有意義的減少 (0.73 ± 0.03 fold inhibition, n=3) (lane 8)。以Dexamethasone (3×10^{-7} M)同樣處理CEM細胞12小時之後則會使*p53* mRNA的表現稍微增加，*c-myc* 和 *bcl-2* mRNA的表現稍微減少 (lane 3, 6 和 9) (n=3); 但卻都不具統計上的意義。saikosaponin-d 對細胞mRNA的影響都再以Northern blotting進行確認。

Hep3B 細胞中，檢視TGF- β 1 引起濃度相依性之細胞凋亡

首先，為了確定TGF- β 1的作用，利用光學顯微鏡觀察細胞型態，以及in situ labeling of Annexin V-reaction 的方法觀察螢光染色的情形；若染上Annexin V的

細胞會發出綠色螢光，則代表細胞走向 apoptosis，而染上 propidium iodide 的細胞發出紅色螢光，則代表 necrosis。在正常細胞，可看到完整的細胞形狀 (Fig. 1-1A)，且幾乎看不到有染上 Annexin V 的細胞 (Fig. 1-1C)；然而，在經過 TGF- β 1 處理 24 小時的細胞，可看到類似 apoptosis 的型態 (Fig. 1-1B)，且很明顯的染上 Annexin V (Fig. 1-1D)，因此可認為是 TGF- β 1 會引起 Hep3B 細胞凋亡。

接著，利用 MTT 檢測法 (Fig. 1-2A) 與流式細胞儀 (Fig. 1-2B) 的方法來定量。因 MTT 可被活細胞的粒腺體代謝成紫色 formazan 的特性，來當作偵測細胞存活的指標；收集的細胞使用 propidium iodide (PI) 染色後，以流式細胞儀分析 DNA 含量 (即細胞週期)，來評估細胞凋亡所佔的百分比。TGF- β 1 所引起的 Hep3B 細胞凋亡的作用呈現濃度相依性。另外，根據這個結果，我們分別選用 3 與 10 ng/ml 的 TGF- β 1 來測試龍膽瀉肝湯及其組成成份的效果。

龍膽瀉肝湯對於 TGF- β 1 引起細胞凋亡的效果

為了研究龍膽瀉肝湯之藥效，首先檢測龍膽瀉肝湯的混合物有無作用。利用 MTT 檢測法，可看到龍膽瀉肝湯的混合物 (10-300 μ g/ml) 可抑制 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡，且呈現濃度相依性 (Fig. 1-3)。在 TGF- β 1 3 與 10 ng/ml 的作用下，可完全抑制 TGF- β 1 作用之混合物的濃度分別是 100 與 300 μ g/ml。本實驗亦以流式細胞儀分析法來印證，同樣可得到這個結果 (數據未列)。

龍膽瀉肝湯之主要組成成份的效果

為了決定龍膽瀉肝湯之藥效主成份，在本研究，我們檢查龍膽瀉肝湯中五種藥材之主成份；gentiopicroside (來自龍膽草), baicalein (黃芩), geniposide (梔子), alisol B monoacetate (澤瀉), saikosaponin-d (柴胡)。結果顯示，gentiopicroside 與 baicalein 可有效的抑制 TGF- β 1 引起的細胞凋亡，因此可觀察到細胞形態較完整 (分別於 Fig. 1-4C 及 1-4D) 及染上 Annexin V 的細胞明顯減少 (分別於 Fig. 1-4C 及 1-4D 之插入方格)。然而，geniposide 幾乎沒有作用，仍然可看到細胞形狀十分不完整 (Fig. 1-4E)，以及呈現 Annexin V 螢光 (Fig. 1-4E 之插入方格)。相反的，在不含 TGF- β 1 的情況下，alisol B monoacetate 與 saikosaponin-d 本身即會引起大量的細胞死亡。處理 alisol B monoacetate 的細胞，可觀察到類似 apoptosis 的形態 (Fig. 1-4F) 及明顯染上 Annexin V (Fig. 1-4F 之插入方格)；處理 saikosaponin-d 的細胞，則觀察到類似 necrosis 的形態 (Fig. 1-4G) 及明顯染上

propidium iodide，而非 Annexin V (Fig. 1-4G 之插入方格)。

我們更進一步地使用 MTT 檢測法來定量分析，發現 gentiopicroside 與 baicalein 對於 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡皆存有濃度相依性的抑制作用（分別於 Fig. 1-5A 及 1-5B），而 baicalein 的作用強度約是 gentiopicroside 的十倍。而 geniposide 則沒有抑制作用 (Fig. 1-5C)；相反的，還會稍微增加 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡。值得注意的是，baicalein 除了有抑制細胞凋亡的作用，在高濃度 ($\geq 100 \mu\text{M}$) 下會促進細胞的增生 (Fig. 1-5B)。然而，alisol B monoacetate 與 saikosaponin-d 本身在這個細胞株就會導致細胞毒性，且呈濃度相依性（分別於 Fig. 1-5D 及 1-5E）；而 saikosaponin-d 的作用強度是 alisol B monoacetate 的十倍。另外，本實驗亦有使用流式細胞儀來印證此定量分析，也得到類似的結果（數據未列）。

Caspase-3 like 活性之測量

目前已知細胞凋亡的過程當中，caspases 的活化扮演必要的角色。很多文獻報告指出，在不同的刺激下，caspase-3 的活化在 caspase cascade 中是最主要之一。因此，我們測量 caspase-3 like 的活性。TGF- β 1 很明顯的增加 caspase-3 like 活性 (Fig. 1-6)。Gentiopicroside ($300 \mu\text{M}$) 與 baicalein ($100 \mu\text{M}$) 分別有顯著及完全的抑制 TGF- β 1 所引起的 caspase-3 like 的活性增加，而 geniposide 只有稍微影響 TGF- β 1 的作用，但沒有統計意義 (Fig. 1-6)。Alisol B monoacetate 單獨本身會引起適度的 caspase-3 like 的活性增加，而 saikosaponin-d 則不會 (Fig. 1-6)。再進一步分析 TGF- β 1 及這些成份 apoptosis 的百分比與 caspase-3 like activity 的結果，呈現正向的線性回歸，其相關係數 (correlation coefficient, r 值) 為 0.94 (Fig. 1-7)。

Alisol B monoacetate 對於 cdc2 kinase 之影響

因為之前利用流式細胞分析法觀察細胞的細胞週期，發現加入尚未引起細胞大量死亡的高濃度 ($30 \mu\text{M}$) 之 Alisol B monoacetate 時，會增加 G_2/M phase 的百分比 (Fig. 1-8)，因此懷疑 Alisol B monoacetate 是否有使細胞 arrest 在 G_2/M phase 的能力。而文獻指出，使細胞停留在 G_2/M phase 的酵素主要是 cdc2 kinase (Lundberg and Weinberg, 1999)，因此，我們加入 cdc2 kinase inhibitor, olomoucine ($60 \mu\text{M}$)，再來觀察細胞週期。結果在 olomoucine 的存在下，加入 Alisol B

monoacetate 後，無論是 apoptosis 或 G₂/M phase 的百分比都沒有改變（數據未列）。故我們認為 Alisol B monoacetate 的作用應該沒有經由 cdc2 kinase 的訊息傳遞而來的。

Baicalein 的抗凋亡作用：

因為在第一部分時發現 baicalein 可以百分之百完全抑制 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡，所以我們再仔細探討 baicalein 的作用機轉。利用 PI 染色跑流式細胞儀，觀察 DNA 含量變化，以測定細胞週期（cell cycle）的進行，而 DNA 含量低於 G₀/G₁ phase (2N) 的區域則代表細胞凋亡所造成的 DNA 斷裂。與第一部份的結果一致，加入 TGF- β 1 會引起細胞凋亡，而 baicalein 可濃度相依性的抑制這個作用 (Fig. 2-1A)，且在濃度 100 μ M 可完全抑制。有趣的是，細胞週期中代表 DNA 正處於複製狀態的 S 與 G₂/M phase，也隨著 baicalein 濃度增加而增加 (Fig. 2-1B)，代表 baicalein 會促使細胞進入細胞週期。關於這部份，我們之後會有更進一步的實驗討論。

粒腺體膜電位之變化：

文獻報告指出，在細胞凋亡的早期，可觀察到粒腺體功能失調 (mitochondria dysfunction) 因此，我們利用 MitoTracker Red (CMXRos) 染劑，來偵測粒腺體的電位 ($\Delta\Psi_m$)。它是帶正電的脂溶性之螢光染劑。當細胞正常時，會維持一定的負電位，此時細胞會染上染劑發出螢光；否則，粒腺體中電位喪失，螢光強度便減少。如圖所示，正常細胞可維持 $\Delta\Psi_m$ (Fig. 2-2A)，而 TGF- β 1 可濃度相依性的使 $\Delta\Psi_m$ 喪失 (Fig. 2-2B and 2-2C)。Baicalein 在濃度 10 與 30 μ M 時，明顯阻止 TGF- β 1 之 $\Delta\Psi_m$ 的喪失 (Fig. 2-2D and 2-2E)，符合 baicalein 抑制細胞凋亡的作用。有趣的是，在功能性試驗中 baicalein (100 μ M) 能夠完全抑制 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡；但是，TGF- β 1 加上 baicalein (100 μ M) 卻會造成更大的 $\Delta\Psi_m$ 喪失 (Fig. 2-2F)。進一步發現，baicalein (100 μ M) 本身就會造成 $\Delta\Psi_m$ 喪失 (Fig. 2-2G)。這個現象與 baicalein 抑制細胞凋亡的結果並不符合，值得更深入的探討。

Baicalein 的抗凋亡作用是否因抑制 lipoyxygenase 的作用而來：

已知 baicalein 為 lipoyxygenase 抑制劑 (Sekiya et al., 1982)，為了解 baicalein 的抑制細胞凋亡作用是否經由抑制 lipoyxygenase (LOX) 而來，我們使用 LOX

的主要代謝產物 (metabolites), 15-HETE 與 12-HETE。若是經由 LOX 抑制劑的作用而來, 則 TGF- β 1 加 baicalein 之後, 再加入 15-HETE, 12-HETE, 或是直接加入 15-HETE, 12-HETE, 應該會引起細胞凋亡。我們的實驗結果發現兩個主要產物在高濃度 (300 μ M) 下, 皆不會引起細胞凋亡 (Fig. 2-3)。因此, baicalein 抑制細胞凋亡的作用並不是經由 LOX 抑制的作用而來。

Baicalein 的 anti-apoptosis 作用是否經 MAPK cascade 或 PI3 Kinase 而來 :

已知 insulin/insulin-like growth factor 會完全抑制 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡, 且其作用是經由 mitogen-activated protein kinase cascade (Ras/Raf-1/MEK/ERK pathway) 及 phosphatidylinositol-3 kinase/Akt (Chen et al., 1998)。因此, 我們想了解 baicalein 抑制 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡之作用, 是否亦經由活化 ERK pathway 或 PI3 kinase 而來。因 PD98059 為 MEK inhibitor, 可抑制 ERK 的活化; α -hydroxyfarnesyl phosphonic acid 為 Ras/Raf inhibitor; 而 wortmannin 為 PI3 kinase inhibitor。結果發現, 不論是 PD98059 (30 μ M), α -hydroxyfarnesyl phosphonic acid (10 μ M) 或 wortmannin (1 μ M) 皆無法抑制 baicalein 的保護作用 (Fig. 2-4)。所以, baicalein 的作用並不是經由活化 ERK pathway 或 PI3 kinase 而來。

Baicalein 的 anti-apoptosis 是否經 p38 而來 :

P38 SAPKinase 在肝臟再生能力中, 扮演十分重要的角色 (Spector et al., 1997)。因此, 使用 P38 抑制劑-SB203580, 來測試對 baicalein 作用的影響。結果顯示, baicalein 完全抑制 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡之作用並沒有被 SB203580 (3 或 10 μ M) 所影響 (Fig. 2-5), 故 baicalein 抑制細胞凋亡之作用與 P38 無關。

探討 ROS 的參與 :

有文獻報告指出, TGF- β 1 所引起的細胞凋亡與 reactive oxygen species (ROS) 有關, 且 baicalein 為很強的抗氧化劑。因此我們想觀察 ROS 在此所扮演的角色。首先, 使用 Trolox (水溶性的維他命 E) 高到濃度 3mM, 僅可部份抑制 TGF- β 1 引起的細胞凋亡 (Fig. 2-6), 而 baicalein 同樣可完全抑制 (Fig. 2-6)。由此, 我們認為 TGF- β 1 的作用與 ROS 之間的關係可能不是直接的相關。

接著, 利用 DCFH-DA 染色, 來偵測細胞內 ROS 的含量。DCFH-DA 進入細胞後, 會被水解成 DCFH, DCFH 遇到 ROS 會產生有螢光的 DCF。因此, 有 ROS

出現時，螢光強度便會增強，它是一個常用於偵測 ROS 之 marker。結果發現，加入 TGF- β 1 並不會增加 ROS (Fig. 2-7A)，但是 TGF- β 1 加 baicalein 反而會增加 ROS，且隨著 baicalein 濃度增加而增加 (Fig. 2-7B and 2-7C)。更進一步發現，baicalein 本身就會明顯增加 ROS 的表現 (Fig. 2-7D and 2-7E)。這個結果相當令人意外；造成細胞凋亡的 TGF- β 1 測不到 ROS 產生，而保護細胞免於凋亡的 baicalein 卻測到大量的 ROS 表現。不禁令人懷疑，在這個實驗模式裡，對 DCFH-DA 敏感的 ROS 是否並不是有害的，甚至為有益於細胞存活的呢？

對 NF- κ B 之影響：

已有許多文獻報告指出，過氧化氫 (H_2O_2) 會導致 NF- κ B 的活化，且加入 catalase 將過氧化氫轉變成水和氧之後，便抑制 NF- κ B 的活性。而 NF- κ B 活化會促進細胞增生及抑制細胞凋亡。為了解 baicalein 增加細胞內過氧化氫，與其保護細胞作用之間的角色，利用 EMSA 來分析這個轉錄因子的活性。如 Fig. 2-8 所示，細胞在一般狀況下即存有基本的 NF- κ B 活性，以維持正常的生理功能。加入 TGF- β 1 刺激一小時，明顯抑制 NF- κ B 活化；與 baicalein 同時存在下，則 NF- κ B 活性不減反增，而 baicalein 單獨作用下即有明顯的 NF- κ B 表現 (Fig. 2-8)，表示 baicalein 可導致 NF- κ B 的活化。其中 NF- κ B 與探針 (probe) 結合後所在的位置可由加入十倍未標定 P^{32} 的 NF- κ B 探針，或添加 p65, p50 的抗體，來加以確認。

接著再利用 DCFH-DA 染色，可觀察到 baicalein 在一小時之內即會引起過氧化氫 (Fig. 2-9)，表示 baicalein 引起過氧化氫的時間在 NF- κ B 之前。Catalase 4000 U/ml 抑制 baicalein 與 baicalein 加 TGF- β 1 所引起的 ROS 表現 (Fig. 2-9)，但無法完全抑制，且本身對於對照組並無作用 (Fig. 2-9)。再看 Fig. 8 EMSA 的結果，catalase 本身對 NF- κ B 表現也沒有影響，但卻可以抑制 baicalein 與 baicalein 加 TGF- β 1 所引起的 NF- κ B 活化 (Fig. 2-8)。由上述結果，我們推論 baicalein 所產生的過氧化氫應該有參與 NF- κ B 的活化，進而保護細胞，抑制細胞凋亡。

TGF- β 1 與 PKC 之關係：

利用 PI 染色，我們發現加入 PKC 抑制劑，Ro-318220 (1 or 3 μ M) 與 staurosporine (0.1 μ M)，幾乎可以完全抑制 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡 (Fig. 2-10)。表示 TGF- β 1 引起的細胞凋亡，PKC 在其中扮演十分重要的角色。是否 TGF- β 1 的作用主要是有 PKC 的參與；若是的話，有兩種可能性，一是因 PKC

的活化來造成細胞的凋亡，另一是因 PKC 活化之後的去活化(inactivation) 來造成的。因此，加入 PKC 的活化劑 PMA，刺激 24 小時，無論低濃度 30 nM 促進 PKC 活化，或高濃度 1 μ M 造成 PKC 去活化，兩個結果都不會引起細胞凋亡(Fig. 2-11)。

Baicalein 的細胞增生作用：

由 Fig. 2-1 觀察細胞週期，可發現 baicalein 除了可降低 TGF- β 1 引起的細胞凋亡，S/G₂/M phase 的百分比也明顯增加。因此，再測定 [³H]-thymidine incorporation，以 [³H]-thymidine 的攝入量來偵測細胞中 DNA 合成的量，並以此代表細胞增生 (cell proliferation) 的程度，來印證 baicalein 的細胞增生作用。結果證實，baicalein 確實有細胞增生的作用，並呈現濃度相依性 (Fig. 2-12)。而且，由 MTT 結果看到的 baicalein 加 TGF- β 1 的細胞數增加的現象，是由於 baicalein 本身即有的細胞增生作用而來。因此，baicalein 除了有抑制細胞凋亡的作用之外，還會造成細胞增生。

Baicalein 細胞增生作用之因素：

為了探討 baicalein 的細胞增生之作用，我們使用 wortmanine (PI3K 的抑制劑)，Ro-318220 (PKC 抑制劑)，PD98059 (MEK/ERK 抑制劑)， α -hydroxyfarnesylphosphonic acid (Ras/Raf 抑制劑)，SB203580 (p38 抑制劑) 來觀察 baicalein 增加 S/G₂/M phase 作用之影響。結果並沒有任何改變 (Fig. 2-13)。因此，baicalein 細胞增生作用的途徑並沒有經由 PI3K，PKC，P38 或 Ras/Raf/ERK cascade 而來。

討 論

由這些實驗結果，首度證明saikosaponin-d會抑制人類CEM細胞之DNA合成和引起CEM細胞凋亡，Saikosaponin-d是三島柴胡(*Bupleurum falcatum* L.)中的活性成份之一，而柴胡被廣泛應用在許多中藥處方中，包括小柴胡湯(xiao-chai-hu-tang)等，且有報告指出 saikosaponin-d 具有 hepatoprotective、hypolipidemic 和 anti-allergic 的作用(Yen *et al.*, 1991; Yamamoto *et al.*, 1975)。柴胡含有活性 triterpene 成份，包括saikosaponin-a, -c, -d 和其相關代謝物。Saikosaponins-a 和-d 被報告具有降低膽固醇(cholesterol-lowering)和抗發炎(anti-inflammatory)的作用(Yamamoto *et al.*, 1975)。Saikosaponin可降低因餵食高膽固醇動物體內所升高的膽固醇(Yamamoto *et al.*, 1975)。動脈硬化和血管成型術後再增生的病理狀態都包括不正常的血管平滑肌細胞、發炎細胞、胞外間質蛋白的過度增生堆積 (Ross, 1993; Lundergan *et al.*, 1991)。血管平滑肌細胞和單核球細胞的增生反應在動脈硬化和血管成形術後再增生的病理過程中扮演重要角色，我們發現saikosaponin-d會抑制淋巴球和血管平滑肌細胞的DNA合成和引起兩種細胞凋亡，因此 saikosaponin-d 將有助於應用在研究或治療動脈硬化和再增生的病理狀態，除了引起凋亡，在利用annexin-V 染色的實驗中也發現，saikosaponin-d在高濃度下($>10^{-5}$ M)也會引起細胞壞死的現象，Saikosaponin-d也被報告具有細胞種類依賴性的免疫調控作用 (Kato *et al.*, 1995)。Saikosaponin-d本身並不具有促進細胞增生的活性，但會減少脾臟細胞(spleen cell)對T細胞mitogen的增生反應，卻增加其對B細胞mitogen的增生反應(Ushio & Abe, 1991)；這些作者也證明saikosaponin-d 可能會刺激活化體內免疫淋巴球細胞的功能，部份藉由活化特定巨噬細胞(macrophage)功能而來(Ushio *et al.*, 1991)。

細胞凋亡(Apoptosis)，是組織形態發育或恆定過程中的一種程序性的細胞死亡(programmed cell death)，細胞凋亡的結果會使細胞核內的核染色質濃染(nuclear condensation)，細胞質收縮(cytoplasmic shrinkage)，和造成DNA斷片(DNA fragmentation)。除了抑制DNA的合成，saikosaponin-d (3×10^{-6} - 10^{-4} M)也會引起CEM淋巴球細胞凋亡(由流式細胞儀、TUNEL和DNA laddering分析證明)，Saikosaponin-d在高濃度下抑制細胞tritiated thymidine攝取量的作用可能部份經

由其細胞凋亡作用而來，有證據顯示，當細胞無法進行凋亡時可能和一些人類疾病如癌症、自體免疫疾病、病毒感染有關，除此之外，有許多疾病其特徵是細胞的不正常減少如神經退化性病變(neurodegenerative disorders)、AIDS、骨質疏鬆等可能導因於加速生理狀態下的細胞死亡過程。因此針對特定細胞種類，加速或減少其細胞凋亡的速度可能可以作為治療許多人類疾病的基本模板(Thompson, 1995)。

Saikosaponin-d的免疫調控作用已被Kato等人證實(Kato *et al.*, 1994)，Kato證實saikosaponin-d 會特異的調控T淋巴球的功能，而且至少有一個作用點是位於或*c-fos* 基因轉譯之前，並伴隨著T細胞/CD3媒介的protein tyrosine kinase 活化，我們先前的研究證明，curcumin(一種植物酚類)的細胞凋亡作用部份是經由減少*c-myc* 和 *bcl-2* mRNA表現而來(Chen & Huang, 1998)。一些oncogenes 和 oncosuppressor在細胞週期或是細胞凋亡過程中扮演重要角色，引起細胞凋亡的訊息有許多，而相同的訊息在不同環境下可能卻會引起細胞分化或增生，有些已知在細胞增生和分化中佔重要地位的基因，對於控制細胞凋亡也是非常重要，一些這類的基因如：proto-oncogene(*c-myc*)，或是 tumor suppressor gene(*p53*)。然而有些訊息傳遞路徑對於控制細胞的死亡具有特別的意義，和*bcl-2*相關的基因就屬於這類基因(Hale *et al.*, 1996)，我們利用RT-PCR的方法測定saikosaponin-d對於*c-myc*, *p53*, 和 *bcl-2* mRNA表現量的影響，在saikosaponin-d (10^{-5} M) 存在下，*c-myc* 和 *p53* mRNA 的表現有意義的增加，而*bcl-2* mRNA 的表現卻有意義的減少，然而dexamethasone對於*p53* and *bcl-2* mRNA表現的影響卻未達有意義的程度，因此，saikosaponin-d對基因表現的影響可能和其細胞凋亡作用只有某種程度的關連性，在哺乳類動物，Myc在細胞增生中具有主要調控者的地位並且串連著胞外訊息和細胞週期的機制，它也會因起細胞凋亡，除非細胞激素或致癌基因提供的訊息阻擋其凋亡的訊息傳遞路徑，最近研究發現調控Myc功能和表現的因子和Myc在細胞週期中的標的細胞(target cell)相當複雜不明，推測可能存在一條新的訊息傳遞路徑負責同時控制細胞凋亡和增生 (Desbarats *et al.*, 1996)。腫瘤抑制基因*p53* 藉著使細胞停在細胞週期中的G₁ 期和引起細胞凋亡的機制來控制DNA受損後細胞的生長(Velculescu & El-Deiry, 1996; Yonish-Rouach, 1996)。將細胞週期停在G₁ 期和引起細胞凋亡是需要多種調控訊息交錯傳遞而來，而另一方面，有證據顯示Bcl-2可以防止DNA斷片的產生和細胞形態的改變，saikosaponin-d引起的細胞凋亡作用可能部份經由調控*c-myc*, *p53*, 和 *bcl-2*基因而來。

有報告指出ginsenoside Rh2 (一種人蔘皂素)可經由活化caspase-3而引起 I 人類SK-HEP-1 細胞凋亡 (Park *et al.*, 1997)。近來研究發現，至少存在有十種以上的caspase(cysteine proteases)且在大部分的情況下，它們形成階梯般的訊息傳遞控制細胞的死亡(Xue *et al.*, 1996; Alnemri, 1997)。由我們的實驗結果，saikosaponin-d 抑制細胞 DNA 合成的作用並不會被 Z-VAD-FMK(一種可通透細胞的 fluoromethylketone caspase抑制劑)所影響，這些發現說明saikosaponin-d不會經由活化caspase活性而引起細胞凋亡。

既然這些化合物都具有固醇類(steroid-like)基本結構，依此推測它們可能具有一些和類固醇相關(steroid-related)的藥理活性，糖質固醇的重要功能之一便是防止免疫系統的過度活化(Munck *et al.*, 1984)。糖質固醇引起的細胞凋亡對於T細胞數目和功能來說，是個為人熟知的生理調控者(Brunetti *et al.*, 1995)。在本篇實驗中，saikosaponin-d的細胞凋亡作用被拿來和合成的糖質類固醇-dexamethasone相比較。Dexamethasone所引起的細胞凋亡也以流式細胞儀, TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 和 DNA laddering等方法分析。有報告指出以dexamethasone處理M1 myeloid leukemia 細胞會減少(down-regulated)抑制凋亡基因-*bcl-2* 和促進凋亡基因-*bax*的表現，但是會增加*bcl-XL* 的表現(Lotem & Sachs, 1995)。Proto-oncogene *c-fos* 也被報導和dexamethasone 引起murine T-lymphocytes 的細胞凋亡有關 (Pruschy *et al.*, 1997)。本實驗結果也看到dexamethasone會增加*p53* mRNA 和減少*c-myc* 與 *bcl-2* mRNA 的表現量。但這些改變都未達到有意義的程度，顯示dexamethasone 可能具有不同的作用機轉。

總而言之，我們證明saikosaponin-d 會抑制人類CEM淋巴球DNA合成並引起細胞凋亡，因此saikosaponin-d 將有助於應用在研究或治療動脈硬化和再增生的病理狀態，並可當作發展較佳的免疫抑制劑(immunosuppressive)或抗發炎藥物(anti-inflammatory agents)的模板。我們實驗結果顯示saikosaponin-d引起的細胞凋亡作用可能部份經由增加*c-myc*與*p53* mRNA 和減少*bcl-2* mRNA表現量而來。利用annexin-V染色，我們發現saikosaponin-d在 10^{-5} to 10^{-4} M的濃度下不僅會引起細胞凋亡也會有細胞壞死的現象。在治療動脈硬化、穩定動脈硬化斑塊和血管成型術後再增生時，可以減慢細胞分化但不至於有負面作用的抗增生或細胞凋亡促進劑的劑量範圍應被考慮。

龍膽瀉肝湯是常用的傳統中藥方劑之一，用來治療慢性肝炎病人，可改善

病人的肝功能及不適的症狀。然而，它的作用原理直到目前為止，仍尚未被建立。本篇論文的目的即是來評估龍膽瀉肝湯的藥理作用，以保護肝細胞免於死亡的角色，來說明其在臨床應用上的可能潛在功能。

首先，Yoo et al.發現在感染 B 型肝炎病毒 (HBx) 的早期，會增加 TGF- β 1 的表現，而認為 TGF- β 1 在 B 型肝炎病毒所引起的病理現象中伴演重要的角色 (Yoo et al., 1996)。且慢性 B 型肝炎病人 (Liu et al., 1999)、慢性 C 型肝炎病人 (Roulot et al., 1999; Nelson et al., 1997)、慢性病毒性肝炎病人 (Zhang et al., 1999)、肝硬化 (Liu et al., 1999; Tsai et al., 1997)、猛爆性肝炎中 (Nakamura et al., 2000; Miwa et al., 1997)，皆可觀察到 TGF- β 1 的 protein 或 mRNA 大量表現，且隨著病情惡化而增加，因此認為 TGF- β 1 可能反應了肝臟發炎的嚴重度，及導致之後的肝臟纖維化及肝硬化。當干擾素 (interferon- α) 治療過後，則 TGF- β 1 的量即明顯下降 (Grungreiff et al., 1999; Tsushima et al., 1999)。

TGF- β 1 是一個發炎反應有關的細胞激素 (cytokine)，可刺激細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 的合成與調控肝細胞的生長 (Milani et al., 1991)。在組織細胞的修護過程中，扮演重要的角色 (Singer and Clark, 1999)。但是，若過度活化，則會造成肝臟纖維化，甚至肝硬化 (Border and Noble, 1994) 以及引起肝細胞的死亡 (Patel et al., 1998)。而肝細胞的死亡，與許多肝臟病理情況及肝功能惡化有密切相關 (Patel and Gores, 1995; Alison, 1994)。

因此，我們使用 TGF- β 1 於人類肝臟的細胞株 Hep3B 引起細胞凋亡，當作一個指標，來評估龍膽瀉肝湯的保肝作用。結果顯示，其混合物可有效抑制 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡。為了決定其中有效成分，我們選出 5 個主要成分來分析。其中，gentiopicroside 與 baicalein 可抑制 TGF- β 1 的作用，如此可說明龍膽瀉肝湯的抑制細胞凋亡作用，而 geniposide 則沒有作用。且 baicalein 的作用強度遠大於 gentiopicroside，因此推測在龍膽瀉肝湯中，baicalein 應為主要有效成分。在中國藥材學中 (謝明村等著, 1988) 也記載了『黃芩對各類型肝炎所出現之黃疸有良效。在肝炎早期，尤其黃芩尤需重用，利膽消黃效果迅速』更證實了黃芩或 baicalein 的重要性。關於這個結果，與前人的動物實驗結果一致。

1. 口服 gentiopicroside 30-60mg/kg/day 於小鼠(mice)，可部分抑制 CCl₄、lipopolysaccharide (LPS) /bacillus Calmette-Guerin (BCG) (Kondo et al., 1994) 與 D-galactosamine/LPS (Hase et al., 1997) 所引起的肝發炎情形，

降低肝功能指數(GOT、GPT)。

2. 小柴胡湯方劑藉由升高 hepatocyte growth factor (HGF) 與降低 TGF- β 1 的產生而增加肝臟再生能力。其中於大鼠肝臟中可發現大量 baicalein、baicalin 存在 (Ono et al., 2000)。且同時有實驗證實，小柴胡湯方劑的抗肝纖維化作用可能主要是因為 baicalein 的作用 (Inoue and Jackson, 1999)。
3. 雖然 geniposide 並沒有抑制 TGF- β 1 的作用，但值得注意的是 Yamamoto et al. 發現 in vivo 實驗中，geniposide 只有在口服時，才可抑制由 Fas 引起的肝細胞凋亡作用，i.p. 注射則無效；而 geniposide 被腸內細菌水解而成的 genipin，則無論是口服或注射皆可抑制肝細胞凋亡作用，推測 genipin 才是真正有效產物 (Yamamoto et al., 2000)。且 Wang et al. (1991) 發現大鼠口服 geniposide 連續三天有保肝作用，可明顯減少 aflatoxin B1 的肝毒性。因此，未來還需要更進一步的研究 geniposide 的水解產物 genipin，是否可有效抑制 TGF- β 1 引起的細胞凋亡。

已知細胞凋亡需要許多細胞內訊息傳遞物質的參與。其中，最重要的是 cysteine proteases (caspases) 的活化。許多不同作用機制的細胞凋亡刺激劑，最後都會殊途同歸地活化 caspases (Wyllie, 1997)。直到目前為止，已經找出十幾種不同的人類 caspases (Thomberry and Lazebnik, 1998)。其中 caspases-3 的活化，扮演非常重要的角色，為細胞凋亡的執行者 (Stennicke and Salvesen, 1998)。而且，有參與在 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡中 (Inayat-Hussain et al., 1997; Hung et al., 1998)。本篇論文亦證實，無論在 TGF- β 1 引起的細胞凋亡或 gentiopicoside、baicalein 的抑制細胞凋亡作用中，皆可看到 caspases-3 平行的活性增加或減少，其相關係數為 0.94，顯示 caspase-3 在 TGF- β 1 所引起的 apoptosis 與這些中草藥成份的 anti-apoptosis 的訊息傳遞中扮演十分重要的角色。即 caspases-3 的活化，在本實驗模式下，可能扮演執行細胞凋亡的角色。當然，我們仍無法排除其他 caspases 亦有參與其中。

Alisol B monoacetate 與 saikosaponin-d 本身皆會造成 Hep3B 細胞的死亡，但兩者的作用機制是不同的。alisol B monoacetate 的細胞毒性較溫和，需要反應時間較長，且細胞變圓，染上 Annethin-V，推測為細胞凋亡 (apoptosis) 的死亡。而 saikosaponin-d 處理一小時，即會引起細胞毒性，且細胞整片整片的漂浮在培

養液中，染上 propidium iodide，推測為細胞壞死（necrosis）的死亡。同樣地，saikosaponin-d 在其他人類肝癌細胞株中，亦有細胞毒性，如在 HuH-7 細胞株中會造成細胞壞死（Qian et al., 1995）；在 PLC/PRF/5 及 HepG2 細胞株中，會抑制細胞生長（Motoo and Sawabu, 1994）。

臨床實驗與動物實驗中，柴胡與 saikosaponins 可有效改善慢性肝炎及 CCl₄ 或 D-galactosamine 引起的肝毒性。實驗發現無論給予 saikosaponins 或小柴胡湯 3 個月以上，症狀與肝功能 GOT、GPT、 γ -globulin 均有改善（生藥柴胡與柴胡方劑，林俊清，1990）。在這裡我們推測 saikosaponins 在 in vivo 及 in vitro 的作用不同，可能為：

- (1) Human hepatoma cell line 與 Primary human liver cell 的不同。雖然我們使用的是分化良好接近正常肝細胞的肝癌細胞細胞株，但也許 saikosaponin-d 非常敏感，甚至可以說它可能為一有選擇性的抗癌藥物。在 human hepatoma cell line 中，saikosaponin 需要較高濃度來抑制細胞生長（Motoo and Sawabu, 1994）
- (2) saikosaponins 需要被代謝成有效代謝物之後才有保肝作用。因此，造成 in vivo 及 in vitro 的作用不同。目前也發現 saikosaponin a 在腸胃道會被代謝成幾種分別有不同藥理作用的代謝物（Fujiwara and Ogihara, 1986）

另外，在龍膽瀉肝湯之混合物中，即使高達 300 μ g/ml 的濃度，仍未造成細胞死亡的情形。在中國醫學的方劑中，所選擇的藥物有君、臣、佐、使之分，『君』是主藥，『臣』是輔藥，『佐』是治療兼症或監制之藥，消除某些藥物毒性及調和某些藥物偏性的藥物，『使』是引經的或起調和作用之藥物。因此，或許在龍膽瀉肝湯的混合方劑中，含有可消除 saikosaponin-d 毒性之『佐』藥，而未來我們可以更進一步的研究。

除此之外，alisol B monoacetate 可藉由抑制由 LPS 刺激的巨噬細胞 nitric oxide(NO) 的合成（Matsuda H., 1999; Kim NY., 1999）及抑制補體的活化（Matsuda et al., 1998）來達到抗發炎的作用。Saikosaponins 亦可經由抑制 cyclooxygenase 與 lipooxygenase 活性，及抑制嗜中性細胞分泌出 platelet-activating factor (PAF)，而觀察到 in vivo 或 in vitro 皆有消炎作用（Bermejo Benito et al., 1998; Recio et al., 1995; Nakamura et al., 1993），且有部分抑制病毒活性的能力（Ushio and Abe,

1992)。或許 alisol B monoacetate 與 saikosaponins 在龍膽瀉肝湯治療肝發炎的效果中，並不是因為直接抑制肝細胞的死亡，而是因為他們間接的抗發炎作用而來。

TGF- β 1 在 in vivo 或 in vitro 都是一個很強的肝細胞生長抑制劑，可調控正常生理狀況與參與終止肝細胞再生的過程。因為可刺激 ECM 的增加而幫助傷口的癒合。然而，在許多肝臟疾病中，如慢性肝炎等，TGF- β 1 的作用反而是不受歡迎的，它會使得肝臟組織纖維化及抑制肝細胞生長，而惡化了肝臟功能。所以在肝細胞中，抑制 TGF- β 1 引起的肝細胞死亡，對於肝臟發炎的情況，應該會有保護作用。基於這點，我們觀察龍膽瀉肝湯及其組成成分的作用，發現混合物與 gentiopicoside 與 baicalein 皆可有效抑制 TGF- β 1 引起的細胞凋亡。這個抑制作用應該為龍膽瀉肝湯可治療肝病的作用機制之一。

由於在第一部份中，我們使用 TGF- β 1 在 Hep3B 細胞引起細胞凋亡的實驗模式，來觀察龍膽瀉肝湯及其主要組成成份是否有抑制細胞凋亡的作用。因為這個作用應該為龍膽瀉肝湯治療肝炎病人的作用機轉之一(請參閱第一部份)。我們由 MTTdata 發現 baicalein 可以完全抑制 TGF- β 1 引起的細胞凋亡，甚至在高濃度 (100 μ M) 時，baicalein 會增加細胞存活數。由於這個特別的作用，我們很有興趣地來仔細探討 baicalein 的作用機轉。

已知 baicalein 為專一的 LOX 抑制劑。它抑制血小板 LOX 的 IC₅₀ 為 0.12 μ M，而抑制 COX 的 IC₅₀ 為 830 μ M (6917 倍) (Sekiya and Okuza, 1982)。對 LOX 之抑制主要是 12-LOX 與 15-LOX (Ghosh and Myers, 1998; Nishio and Watanabe, 1997)。人類有三種 LOX，5-、12-與 15-LOX，而 LOX 的反應，可以啟動訊息傳遞分子的合成，影響細胞的結構與代謝，因單一脂肪酸氧化的形成，對於訊息的傳遞是很重要的 (Brash, 1999)。LOX 的代謝產物為 HETEs (Cho et al., 1991)，而 HETE 的功能很多，關於細胞生長的調節方面，絕大部份的實驗顯示 12-HETE 與 15-HETE 有細胞增生的作用，在血管平滑肌細胞 (Nishio and Watanabe, 1997)，動脈內皮細胞 (Setty et al., 1987)，肌纖維母細胞 (Kiran Kumar et al., 1993)，淋巴球母細胞 (Maddox et al., 1991)，晶狀體上皮細胞 (Lysz et al., 1994) 及 in vivo 中的天竺鼠表皮細胞 (Chan et al., 1985) 中皆可觀察到。但是 Smith et al. 發現 12-HETE 在兔子主動脈平滑肌細胞與小鼠黑色素瘤細胞中，有很強的抗增生作用，而 5-HETE 則無效 (Smith et al., 1984)。另外，在人類臍動脈平滑肌細胞中，5-、12-、15-HETE 皆可抑制細胞增生，且血清含量越低，抑制能力愈強

(Brinkman et al., 1991)。但是我們加入 LOX 代謝物，12-HETE 與 15-HETE 並沒有看到與 baicalein 相反的作用，即不會造成細胞凋亡。在這裡看不到作用應該不是因為濃度不夠的關係，因為我們從 30 nM(數據未列)逐漸增加到濃度 300 nM，已高於細胞內訊息傳遞中可能產生的量，皆不會引起細胞凋亡。也許我們應該再將 12-HETE 加入 baicalein 與 TGF- β 1 實驗組，以排除 LOX 與其他訊息傳遞分子間的協同作用，但是，baicalein 這兩個作用所需濃度差異很大，在血小板中抑制 LOX 作用的 IC₅₀ 為 0.12 μ M，在人類胎盤絨毛膜 (Kisch et al., 1997) 及大鼠腎皮質切片與近腎絲球細胞 (juxtaglomerular-like cells) 中，baicalein 1 μ M 皆可完全抑制 angiotensin II 所引起的 12-HETE 增加 (Antonipillai et al., 1989)。這些濃度對於 TGF- β 1 的作用完全沒有任何影響。因此，初步排除 TGF- β 1 引起的細胞凋亡，與 baicalein 的抑制作用是經由 LOX 而來的。

Cytokines (如 TNF- α) 及 growth factors 在 in vivo 或培養的肝細胞中，都可以調控細胞增生與細胞凋亡 (Michalopoulos and defrances, 1997; Fausto et al., 1995; Thorgeirsson et al., 1998)。Growth factors (如 IGF 與 EGF) 不但是有絲分裂因子 (mitogenic factors)，在 in vivo 或 in vitro 亦可保護細胞免於死亡 (Baserga, 1994; Michalopoulos and Defrances, 1997; Fabregat et al., 1996)。Hung et al. (1993) 發現 insulin (10^{-7} M) 可以完全抑制 TGF- β 1 (6 ng/ml) 刺激 48 小時，在 Hep3B 細胞所引起的細胞凋亡。IRS-1 (insulin receptor substrate 1) 為 insulin/IGF receptor tyrosine kinase activity 的受質，亦可調控正常細胞生長 (Sasaki et al., 1993) 及抑制 TGF- β 1 於 Hep3B 細胞引起的細胞凋亡，且同時看到 MAPK 與 PI3K 的活化 (Tanaka and Wands, 1996)。Epidermal growth factor (EGF) 與 IGF 類似，同樣藉由 PI3K 與 ERK 來達到抑制 TGF- β 1 於大鼠肝細胞的細胞凋亡作用 (Robert et al., 2000)。而 TNF- α 抑制 TGF- β 1 所引起大鼠肝細胞的凋亡，不須 PI3K 參與而是活化了 ERK 及 P38 SAPK (Robert et al., 2000)。但是在本篇實驗中，我們發現 baicalein 的抑制細胞凋亡作用與 growth factors 類及 cytokine 類的作用機制不同，並不是經由 MAPK cascade, PI3K 或 p38 而來的。

由於 PKC 在細胞的生理功能中扮演很重要的角色，可調控細胞增生 (Rind and Whittemore, 1999; Lee and Yea, 2000; Piacentini et al., 2000; Yano et al., 1999; Yoshiji et al., 1999; Lijnen and Petrov, 1999)、抗增生 (Takahashi et al., 2000; Kruger et al., 1998; Shizukuda et al., 1999; Sun and Rotenberg, 1999)、細胞分化 (Wang et

al., 1997; Macfarlane and Manzel, 1994; Myklebust et al., 2000)、抑制細胞分化 (Dlugosz et al., 1994; Taoka et al., 1990; Rind and Whittemore, 1999)、細胞凋亡 (Pongracz et al., 1999; Li et al., 1999; Basu and Akkaraju, 1999; Yahata et al., 1999)、抑制細胞凋亡 (Amin et al., 2000; Gomez-Angelats et al., 2000; Balci et al., 1999; Leirdal and Sioud, 1999)。所以，想來看看 TGF- β 1 引起的細胞凋亡中是否有 PKC 的參與。結果發現 PKC 抑制劑可以完全抑制 TGF- β 1 的作用，但是 PKC 活化劑從低濃度到高濃度皆無法模擬 TGF- β 1 的作用。因此，我們認為在 TGF- β 1 引起的細胞凋亡中，PKC 扮演重要的調控 (modulation) 之角色，而非必要 (essential) 角色，可能還同時需要其他的因子 (factors) 參與來調控 TGF- β 1 的作用。

由於文獻報告指出 TGF- β 1 所產生的細胞凋亡與 ROS 有關 (Sanchez et al., 1996; Ribeiro et al., 1999)。在本篇實驗中，我們無法看到 TGF- β 1 在 Hep3B 細胞中所引起的 H_2O_2 產生，卻發現 baicalein 這個抗氧化劑會產生大量的 H_2O_2 。同時也有使用 dihydroethidium (DHE) 觀察 superoxide，結果顯示不論是 TGF- β 1 或 baicalein 皆不會產生 superoxide (數據未列)。關於 TGF- β 1 與 ROS 的關係，也許是 TGF- β 1 在 Hep3B 細胞中產生 ROS 的量太少，而低於 DCFH-DA 的敏感性。且由於 Trolox (水溶性維他命) 非常高濃度 3 mM 仍只能些微抑制 TGF- β 1 的作用，我們認為 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡與 ROS 並沒有很大的關係。

目前已經有很多文獻報告說， H_2O_2 會促進 NF- κ B 的活化 (Schreck et al., 1991; Meyer et al., 1993)。在這裡我們也發現 baicalein 本身在細胞中會產生 H_2O_2 而且導致 NF- κ B 的活化；TGF- β 1 則會抑制 NF- κ B 活化，再加入 baicalein 之後即恢復 NF- κ B 活性。因為 NF- κ B 有抑制細胞凋亡的作用 (Cahir-McFarland et al., 2000; Kim et al., 2000; Kawai et al., 1999)，且在肝細胞中是負責細胞存活的基因 (Arsura et al., 1997)。因此，推測 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡作用主要是經由抑制 NF- κ B 的活性而來，而非經由 ROS 的產生，同時 Arsura et al. (1997) 也發現 TGF- β 1 在老鼠的正常肝細胞株當中，因為抑制 NF- κ B 的活化，而導致肝細胞凋亡。且 baicalein 之所以能抑制 TGF- β 1 的作用是因為活化了 NF- κ B，而阻止了 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡。我們也發現 catalase 可減弱昇高的 NF- κ B 活性，雖然並未完全抑制，但是 baicalein 產生大量的 H_2O_2 可能與它的保護作用有關，不過也許還有與其它的物質共同來調控 NF- κ B，未來還需要更進一步研究。

粒腺體膜電位 ($\Delta\Psi_m$) 的喪失是細胞凋亡的現象之一 (Marzo et al., 1998), 在許多細胞皆可觀察到, 如胸腺細胞 (Castedo et al., 1995; Macho et al., 1996)、T 細胞、B 細胞 (Zamzami et al., 1995)、肝細胞 (Zamzami et al., 1996)、及已變性的腫瘤細胞株 (Decaudin et al., 1997; Metivier et al., 1998)。在處理 TGF- β 1 的細胞中, 可觀察到濃度相依性的 $\Delta\Psi_m$ 之喪失, 而且加入粒腺體電子傳遞鏈 complex I 的抑制劑 (rotenone), 會明顯抑制 TGF- β 1 所引起的細胞凋亡 (數據未列), 表示粒腺體膜電位與 TGF- β 1 引起的細胞凋亡有關。但是很有趣的是, 雖然 baicalein 低濃度可恢復 TGF- β 1 使 $\Delta\Psi_m$ 喪失的作用, 在高濃度時 baicalein 本身即會引起很強的 $\Delta\Psi_m$ 喪失作用, 這個現象與高濃度 baicalein 能完全抑制細胞凋亡的結果並不符合。我們推測 baicalein 抑制細胞凋亡的作用點主要是在粒腺體的下游, 也就是活化了 NF- κ B, 因此雖然會造成 $\Delta\Psi_m$ 的喪失, 但是活化的 NF- κ B 卻可以抑制 $\Delta\Psi_m$ 喪失所造成的毒性。不過, 真正的原因我們並不清楚。目前有些文獻報導, peroxisome proliferators 會活化 NF- κ B, 而有促進肝細胞增生、及抑制細胞凋亡的作用 (Goll et al., 1999; Roberts et al., 2000; Hasmall et al., 2000; Rusyn et al., 2000; Yeldandi et al., 2000), 而且同時也觀察到 $\Delta\Psi_m$ 的喪失 (Zhou and Wallace, 1999), 也許在 peroxisome proliferators 的訊息傳遞中, $\Delta\Psi_m$ 的喪失並不代表著細胞凋亡, 而是扮演其他的功能。而 baicalein 與 peroxisome proliferators 之間的關係未來還需要更進一步的實驗來確定。

關於 baicalein 的功能在細胞生長的調節方面, 直到目前為止, 文獻中只發現 baicalein 有促進癌細胞凋亡 (Ding et al., 1999; Ikemoto et al., 2000) 與抑制細胞增生的作用 (Kuntz et al., 1999; Ikemoto et al., 2000; Huang et al., 1994)。主要都是減少細胞數目。但是我們發現 baicalein 除了有保護肝細胞免於死亡的作用之外, 還有促進肝細胞增生的作用, 無論是使用 MTT 偵測法、流式細胞儀分析細胞週期、或 [3 H]-thymidine 攝入法, 都可發現細胞數增加或 DNA 合成的作用。由參考文獻中發現, baicalein 在其他的人類肝癌細胞株中, 血清存在下有造成細胞死亡的作用 (Matsuzaki et al., 1996; Motoo and Sawabu, 1994), 但是所使用的濃度為 185 ~ 370 μ M, 非常的高, 在 in vivo 情況下幾乎不可能達到。不過, 在 Hep3B 細胞中, 即使使用 300 μ M 的濃度, 仍可觀察到更強的細胞增生作用。在這裡的矛盾之處, 也許是細胞特異性, 也許是血清濃度不同的影響。未來我們還需要再使用 primary 肝細胞或 in vivo 實驗, 與不同的血清的濃度來進一步證實。但是在動物實驗上可見慢性肝炎的病理組織呈現血液流動減緩, 可知血瘀為慢性肝炎之

重要病機之一。且依據中醫的觀點，瘀血亦與黃疸有關。因此，慢性肝炎的病理狀況下，血清的含量應該較平時不足。故中國藥材學（謝明村等著，1988）中表示『黃芩利膽消黃效果迅速』。

結 論 與 建 議

由這本篇研究証明龍膽瀉肝湯對於 $\text{TGF-}\beta_1$ 所引發的肝細胞凋亡有保護作用；且挑選出的五種主要組成成分中，gentiopicroside 與 baicalein 可有效抑制 $\text{TGF-}\beta_1$ 所引起的細胞凋亡，geniposide 沒有作用，而 alisol B monoacetate 與 saikosaponin-d 則有細胞毒性。但是，兩者的細胞毒性作用不同，alisol B monoacetate 主要是引起細胞凋亡，saikosaponin-d 則是引起細胞壞死。其中，baicalein 則是抗凋亡作用中最強的主要成分，其抗凋亡作用主要是來自其活化 NF- κ B 的 nuclear translocation。因此，龍膽瀉肝湯的保肝作用應該是因 baicalein 而來的。

圖、表(見附件一)

參 考 文 獻

- Alison, MR. and Sarraf, CE. Liver cell death: patterns and mechanisms. *Gut*. 1994;35:577-81.
- Alnemri ES. Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem*, 1997;64:33-42.
- Amin, HM., Ergin, M., Denning, MF., Quevedo, ME. and Alkan, S. Characterization of apoptosis induced by protein kinase C inhibitors and its modulation by the caspase pathway in acute promyelocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2000;110:552-62.
- Antonipillai, I., Horton, R., Natarajan, R. and Nadler, J. A 12-lipoxygenase product of arachidonate metabolism is involved in angiotensin action on renin release. *Endocrinology*. 1989;125:2028-34.
- Arsura, M., FitzGerald, MJ., Fausto, N. and Sonenshein, GE. Nuclear factor-kappaB/Rel blocks transforming growth factor beta1-induced apoptosis of murine hepatocyte cell lines. *Cell Growth & Differentiation*. 1997; 8:1049-59.
- Babior, BM. and Woodman, RC. Chronic granulomatous disease. *Seminars in Hematology*. 1990;27:247-59.
- Baeuerle, PA. and Henkel, T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annual Review of Immunology*. 1994;12:141-79.
- Balci, A., Sahin, FI. and Ekmekci, A. I induced apoptosis in the human promyelocytic leukemia cell line HL 60. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 1999;189:51-7.
- Baserga, R. Oncogenes and the strategy of growth factors. *Cell*. 1994;79:927-30.
- Basu, A. and Akkaraju, GR. Regulation of caspase activation and cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cell death by protein kinase C. *Biochemistry*. 1999;38:4245-51.
- Bedossa, P. and Paradis, V. Transforming growth factor-beta (TGF-beta): a key-role in liver fibrogenesis. *Journal of Hepatology*. 1995;22 Suppl 2:37-42.
- Beg, AA. and Baldwin, AS Jr. The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes & Development*. 1993;7:2064-70.
- Benedetti, A., Di Sario, A., Svegliati Baroni, G. and Jezequel, AM. Transforming

- growth factor beta 1 increases the number of apoptotic bodies and decreases intracellular pH in isolated periportal and perivenular rat hepatocytes. *Hepatology*. 1995;22:1488-98.
- Bermejo Benito, P., Abad Martinez, MJ., Silvan Sen, AM., Sanz Gomez, A., Fernandez Matellano, L., Sanchez Contreras, S. and Diaz Lanza, AM. In vivo and in vitro antiinflammatory activity of saikosaponins. *Life Sciences*. 1998;63:1147-56.
- Bissell, DM., Wang, SS., Jarnagin, WR. and Roll, FJ. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *Journal of Clinical Investigation*. 1995;96:447-55.
- Blobe, GC., Schiemann, WP. and Lodish, HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *New England Journal of Medicine*. 2000; 342:1350-8.
- Boersma AWM, Nooter K, Oostrum RG, and Stoter G. Quantification of apoptotic cells with fluorescein isothiocyanate- labeled Annexin V in Chinese hamster ovary cell cultures treated with cisplatin. *Cytometry* 1996;24:123-130.
- Border, WA. and Noble, NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *New England Journal of Medicine*. 1994;331:1286-92.
- Brash, AR. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:23679-82.
- Breuer, W., Epsztejn, S. and Cabantchik, ZI. Dynamics of the cytosolic chelatable iron pool of K562 cells. *FEBS Letters*. 1996;382:304-8.
- Brinkman, HJ., van Buul-Wortelboer, MF. and van Mourik, JA. Selective conversion and esterification of monohydroxyeicosa-tetraenoic acids by human vascular smooth muscle cells: relevance to smooth muscle cell proliferation. *Experimental Cell Research*. 1991;192:87-92.
- Brunetti M, Martelli N, Colasante A, Piantelli M, Musiani P, and Aiello FB. Spontaneous and glucocorticoid-induced apoptosis in human mature T lymphocytes. *Blood* 1995;86:4199-4205.
- Burdon, RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radical Biology & Medicine*. 1995;18:775-94.
- Burdon, RH. Control of cell proliferation by reactive oxygen species. *Biochemical Society Transactions*. 1996;24:1028-32.

- Burdon, RH. and Rice-Evans, C. Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation. *Free Radical Research Communications*.1989; 6:345-58.
- Butenko, IG, Gladtschenko, SV. and Galushko, SV. Anti-inflammatory properties and inhibition of leukotriene C4 biosynthesis in vitro by flavonoid baicalein from *Scutellaria baicalensis* georgy roots. *Agents & Actions*.1993; 39 Spec No:C49-51.
- Cahir-McFarland, ED., Davidson, DM., Schauer, SL., Duong, J. and Kieff, E. NF-kappa B inhibition causes spontaneous apoptosis in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97:6055-60.
- Cain, K., Inayat-Hussain, SH., Couet, C. and Cohen, GM. A cleavage-site-directed inhibitor of interleukin-1 beta-converting enzyme-like proteases inhibits apoptosis in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochemical Journal*.1996; 314:27-32.
- Castedo, M., Macho, A., Zamzami, N., Hirsch, T., Marchetti, P., Uriel, J. and Kroemer, G. Mitochondrial perturbations define lymphocytes undergoing apoptotic depletion in vivo. *European Journal of Immunology*.1995; 25:3277-84.
- Chan, CC., Duhamel, L. and Ford-Hutchison, A. Leukotriene B4 and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid stimulate epidermal proliferation in vivo in the guinea pig. *Journal of Investigative Dermatology*.1985; 85:333-4.
- Chen HW and Huang HC. Effects of curcumin on cell cycle progression and apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Brit J Pharmacol*. 1998;124:1029-1040.
- Chen, RH., Su, YH., Chuang, RL. and Chang, TY. Suppression of transforming growth factor-beta-induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Oncogene*. 1998;17:1959-68.
- Chen, ZJ., Parent, L. and Maniatis, T. Site-specific phosphorylation of IkappaBalpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell*. 1996;84:853-62.
- Cho, H., Ueda, M., Tamaoka, M., Hamaguchi, M., Aisaka, K., Kiso, Y., Inoue, T., Ogino, R., Tatsuoka, T. and Ishihara, T. et al. Novel caffeic acid derivatives: extremely potent inhibitors of 12-lipoxygenase. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1991;34:1503-5.
- Chomczynski P and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol chloroform extraction. *Anal Biochem* 1997;162:156-159.

- Chuang, LY., Hung, WC., Chang, CC. and Tsai, JH. Characterization of apoptosis induced by transforming growth factor beta 1 in human hepatoma cells. *Anticancer Research*. 1994;14:147-52.
- Chung, CP., Park, JB. and Bae, KH. Pharmacological effects of methanolic extract from the root of *Scutellaria baicalensis* and its flavonoids on human gingival fibroblast. *Planta Medica*. 1995; 61:150-3.
- Date, M., Matsuzaki, K., Matsushita, M., Sakitani, K., Shibano, K., Okajima, A., Yamamoto, C., Ogata, N., Okumura, T., Seki, T., Kubota, Y., Kan, M., McKeehan, WL. and Inoue, K. Differential expression of transforming growth factor-beta and its receptors in hepatocytes and nonparenchymal cells of rat liver after CCl₄ administration. *Journal of Hepatology*. 1998;28:572-81.
- Decaudin, D., Geley, S., Hirsch, T., Castedo, M., Marchetti, P., Macho, A., Kofler, R. and Kroemer, G. Bcl-2 and Bcl-XL antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Research*. 1997;57:62-7.
- Desbarats L, Schneider A, Muller D, Burgin A, and Eilers M. Myc: a single gene controls both proliferation and apoptosis in mammalian cells. *Experientia* 1996;52: 1123-9, 1996.
- Dethlefsen, SM., Shepro, D. and D'Amore, PA. Arachidonic acid metabolites in bFGF-, PDGF-, and serum-stimulated vascular cell growth. *Experimental Cell Research*. 1994;212:262-73.
- Ding, XZ., Kuszynski, CA., El-Metwally, TH. and Adrian, TE. Lipooxygenase inhibition induced apoptosis, morphological changes, and carbonic anhydrase expression in human pancreatic cancer cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1999; 266:392-9.
- Dlugosz, AA., Cheng, C., Williams, EK., Dharia, AG., Denning, MF. and Yuspa, SH. Alterations in murine keratinocyte differentiation induced by activated rasHa genes are mediated by protein kinase C-alpha. *Cancer Research*. 1994;54:6413-20.
- Fabregat, I., Sanchez, A., Alvarez, AM., Nakamura, T. and Benito, M. Epidermal growth factor, but not hepatocyte growth factor, suppresses the apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocytes in primary culture. *FEBS Letters*. 1996;384:14-8.
- Fan, G., Ma, X., Kren, BT. and Steer, CJ. The retinoblastoma gene product inhibits TGF-beta1 induced apoptosis in primary rat hepatocytes and human HuH-7

- hepatoma cells. *Oncogene*. 1996;12:1909-19.
- Fausto, N., Laird, AD. and Webber, EM. Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB Journal*.1995; 9:1527-36.
- Feldmann, G. Liver apoptosis. *Journal of Hepatology*.1997; 26 Suppl 2:1-11.
- Fridovich, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*. 1995;64:97-112.
- Fujiwara, K. and Ogihara, Y. Pharmacological effects of oral saikosaponin a may differ depending on conditions of the gastrointestinal tract. *Life Sciences*. 1986;39:297-301.
- Gavrieli Y, Sherman Y, and Ben-sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.
- Ghosh, J. and Myers, CE. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.1998; 95:13182-7.
- Gill, JH., James, NH., Roberts, RA. and Dive, C. The non-genotoxic hepatocarcinogen nafenopin suppresses rodent hepatocyte apoptosis induced by TGFbeta1, DNA damage and Fas. *Carcinogenesis*.1998; 19:299-304.
- Goll, V., Alexandre, E., Viollon-Abadie, C., Nicod, L., Jaeck, D. and Richert, L. Comparison of the effects of various peroxisome proliferators on peroxisomal enzyme activities, DNA synthesis, and apoptosis in rat and human hepatocyte cultures. *Toxicology & Applied Pharmacology*. 1999;160:21-32.
- Gomez-Angelats, M., Bortner, CD. and Cidlowski, JA. Protein kinase C (PKC) inhibits fas receptor-induced apoptosis through modulation of the loss of K⁺ and cell shrinkage. A role for PKC upstream of caspases. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275:19609-19.
- Grande, JP. Role of transforming growth factor-beta in tissue injury and repair. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine*. 1997;214:27-40.
- Gressner, AM., Lahme, B., Mannherz, HG. and Polzar, B. TGF-beta-mediated hepatocellular apoptosis by rat and human hepatoma cells and primary rat hepatocytes. *Journal of Hepatology*. 1997;26:1079-92.

- Grilli, M., Chiu, JJ. and Lenardo, MJ. NF-kappa B and Rel: participants in a multifunctional transcriptional regulatory system. *International Review of Cytology*. 1993;143:1-62.
- Grungreiff, K., Reinhold, D. and Ansorge, S. Serum concentrations of sIL-2R, IL-6, TGF-beta1, neopterin, and zinc in chronic hepatitis C patients treated with interferon-alpha. *Cytokine*. 1999;11:1076-80.
- Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VE, Longthorne V L, Culhane AC, and Williams GT. Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem*1996; 236; 1-26.
- Halestrap, AP., Doran, E., Gillespie, JP. and O'Toole, A. Mitochondria and cell death. *Biochemical Society Transactions*2000; 28:170-7.
- Halliwell, B. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochemical Society Transactions*.1996; 24:1023-7.
- Hase, K., Li, J., Basnet, P., Xiong, Q., Takamura, S., Namba, T., and Kadota, S. Hepatoprotective principles of *Swertia japonica* Makino on D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced liver injury in mice. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1997;45:1823-7.
- Hasmall, SC., James, NH., Macdonald, N., Gonzalez, FJ., Peters, JM. and Roberts, RA. Suppression of mouse hepatocyte apoptosis by peroxisome proliferators: role of PPARalpha and TNFalpha. *Mutation Research*. 2000;448:193-200.
- Heldin, CH., Miyazono, K. and ten Dijke, P. (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 390:465-71.
- Huang HC, Jan TR, and Yeh SF. Inhibitory effect of curcumin, an anti-inflammatory agent, on vascular smooth muscle cell proliferation. *Eur J Pharmacol* 1992; 221:381-384.
- Huang, HC., Hsieh, LM., Chen, HW., Lin, YS. and Chen, JS. Effects of baicalein and esculetin on transduction signals and growth factors expression in T-lymphoid leukemia cells. *European Journal of Pharmacology*. 1994;268:73-8.
- Huang, HC., Wang, HR. and Hsieh, LM. Antiproliferative effect of baicalein, a flavonoid from a Chinese herb, on vascular smooth muscle cell. *European Journal of Pharmacology*.1994;251:91-3.
- Hung, WC., Chang, HC. and Chuang, LY. Transforming growth factor beta 1 potently activates CPP32-like proteases in human hepatoma cells. *Cellular Signalling*.

1998;10:511-5.

- Hung, WC., Chuang, LY., Tsai, JH. and Chang, CC. Effects of insulin on TGF-beta 1-induced cell growth inhibition in the human hepatoma cell lines. *Biochemistry & Molecular Biology International*. 1993;30:655-63.
- Ikemoto, S., Sugimura, K., Yoshida, N., Yasumoto, R., Wada, S., Yamamoto, K. and Kishimoto, T. Antitumor effects of *Scutellariae radix* and its components baicalein, baicalin, and wogonin on bladder cancer cell lines. *Urology*. 2000;55:951-5.
- Inayat-Hussain, SH., Couet, C., Cohen, GM. and Cain, K. Processing/activation of CPP32-like proteases is involved in transforming growth factor beta1-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology*. 1997;25:1516-26.
- Inoue, T. and Jackson, EK. Strong antiproliferative effects of baicalein in cultured rat hepatic stellate cells. *European Journal of Pharmacology*. 1999; 378:129-35.
- Iqbal, J., Clerch, LB., Hass, MA., Frank, L. and Massaro, D. Endotoxin increases lung Cu,Zn superoxide dismutase mRNA: O₂ raises enzyme synthesis. *American Journal of Physiology*. 1989; 257:L61-4.
- Jacobson MD, Weil M, and Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997;88:347-354.
- Janssen, YM., Van Houten, B., Borm, PJ. and Mossman, BT. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Laboratory Investigation*. 1993;69:261-74.
- Kato M, Pu MY, Isobe K, Hattori T, Yanagita N, and Nakashima I. Cell type-oriented differential modulatory actions of saikosaponin-d on growth responses and DNA fragmentation of lymphocytes triggered by receptor-mediated and receptor-bypassed pathways. *Immunopharmacology* 1995;29:207-213.
- Kato M, Pu MY, Isobe K, Iwamoto T, Nagase F, Lwin T, Zhang YH, Hattori T, Yanagita, N, and Nakashima I. Characterization of the immunoregulatory action of saikosaponin-d. *Cell Immunol* 1994;159:15-25.
- Kawai, H., Yamada, Y., Tatsuka, M., Niwa, O., Yamamoto, K. and Suzuki, F. Down-regulation of nuclear factor kappaB is required for p53-dependent apoptosis in X-ray-irradiated mouse lymphoma cells and thymocytes. *Cancer Research*. 1999;59:6038-41.
- Kerr, JF. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *Journal of Pathology*. 1971;105:13-20.

- Kim, JY., Lee, S., Hwangbo, B., Lee, CT., Kim, YW., Han, SK., Shim, YS. and Yoo, CG. NF-kappaB activation is related to the resistance of lung cancer cells to TNF-alpha-induced apoptosis. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 2000;273:140-6.
- Kim, NY., Kang, TH., Pae, HO., Choi, BM., Chung, HT., Myung, SW., Song, YS., Sohn, DH. and Kim, YC. In vitro inducible nitric oxide synthesis inhibitors from *Alismatis Rhizoma*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 1999; 22:1147-9.
- Kiran Kumar, YV., Raghunathan, A., Sailesh, S., Prasad, M., Vemuri, MC. and Reddanna, P. Differential effects of 15-HPETE and 15-HETE on BHK-21 cell proliferation and macromolecular composition. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1993; 1167:102-8.
- Kirillova, I., Chaisson, M. and Fausto, N. Tumor necrosis factor induces DNA replication in hepatic cells through nuclear factor kappaB activation. *Cell Growth & Differentiation*. 1999;10:819-28.
- Kisch, ES., Jaffe, A., Knoll, E. and Stern, N. Role of the lipoxygenase pathway in angiotensin II-induced vasoconstriction in the human placenta. *Hypertension*. 1997;29:796-801.
- Kondo, Y., Takano, F. and Hojo, H. Suppression of chemically and immunologically induced hepatic injuries by gentiopicoside in mice. *Planta Medica*. 1994;60:414-6.
- Kren, BT., Trembley, JH., Krajewski, S., Behrens, TW., Reed, JC. and Steer, CJ. Modulation of apoptosis-associated genes bcl-2, bcl-x, and bax during rat liver regeneration. *Cell Growth & Differentiation*. 1996; 7:1633-42.
- Kruger, EA., Blagosklonny, MV., Dixon, SC. and Figg, WD. UCN-01, a protein kinase C inhibitor, inhibits endothelial cell proliferation and angiogenic hypoxic response. *Invasion & Metastasis*. 1998;18:209-18.
- Kuntz, S., Wenzel, U. and Daniel, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European Journal of Nutrition*. 1999;38:133-42.
- Leirdal, M. and Sioud, M. Ribozyme inhibition of the protein kinase C alpha triggers apoptosis in glioma cells. *British Journal of Cancer*. 1999;80:1558-64.
- Li, PF., Maasch, C., Haller, H., Dietz, R. and von Harsdorf, R. Requirement for protein kinase C in reactive oxygen species-induced apoptosis of vascular smooth

- muscle cells. *Circulation*. 1999;100:967-73.
- Lijnen, P. and Petrov, V. Proliferation of human peripheral blood mononuclear cells during calcium entry blockade. Role of protein kinase C. *Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology*. 1999;21:253-9.
- Lin, JK. and Chou, CK. In vitro apoptosis in the human hepatoma cell line induced by transforming growth factor beta 1. *Cancer Research*. 1992;52:385-8.
- Liu, F., Li, B. and Nan, Y. The effect of serum TGFb1 of patients with chronic hepatitis B in liver fibrosis formation. *Chung Hua Kan Tsang Ping Tsa Chih*. 1999;7:196-8.
- Lotem J and Sachs L. Regulation of bcl-2, bcl-XL and bax in the control of apoptosis by hematopoietic cytokines and dexamethasone. *Cell growth & Differ* 1995;6:647-653.
- Lotz, G., Nagy, P., Patonai, A., Kiss, A., Nemes, B., Szalay, F., and Schaff (1998) TGF- β 1 and apoptosis in human hepatocellular carcinoma and focal nodular hyperplasia. *Journal of Hepatology*. 28:175A
- Lundberg, AS. and Weinberg, RA. Control of the cell cycle and apoptosis. *European Journal of Cancer*. 1999; 35:531-9.
- Lundergan CF, Foegh ML, and Ramwell PW. Peptide inhibition of myointimal proliferation by angiopeptin, a somatostatin analogue. *J Am Coll Cardiol* 1991;17:132B-136B.
- Macfarlane, DE. and Manzel, L. Activation of beta-isozyme of protein kinase C (PKC beta) is necessary and sufficient for phorbol ester-induced differentiation of HL-60 promyelocytes. Studies with PKC beta-defective PET mutant. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269:4327-31.
- Macho, A., Decaudin, D., Castedo, M., Hirsch, T., Susin, SA., Zamzami, N. and Kroemer, G. Chloromethyl-X-Rosamine is an aldehyde-fixable potential-sensitive fluorochrome for the detection of early apoptosis. *Cytometry*. 1996;25:333-40.
- Maddox, JF., Cao, YZ., Mastro, AM., Scholz, RW., Hildenbrandt, G. and Reddy, CC. Increased 12-HETE production in bovine lymphocytes during selenium deficiency. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1991;181:389-95.
- Maly, FE. The B lymphocyte: a newly recognized source of reactive oxygen species with immunoregulatory potential. *Free Radical Research Communications*. 1990;8:143-8.

- Marzo, I., Brenner, C. and Kroemer, G. The central role of the mitochondrial megachannel in apoptosis: evidence obtained with intact cells, isolated mitochondria, and purified protein complexes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 1998;52:248-51.
- Massague, J., Hata, A. and Lui, F. TGF- β signalling through the Smad pathway. *Trends Cell Biol* 1997;7:187-192
- Matsuda, H., Kageura, T., Toguchida, I., Murakami, T., Kishi, A. and Yoshikawa, M. Effects of sesquiterpenes and triterpenes from the rhizome of *Alisma orientale* on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages: absolute stereostructures of alismaketones-B 23-acetate and -C 23-acetate. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 1999;9:3081-6.
- Matsuda, H., Tomohiro, N., Yoshikawa, M. and Kubo, M. Studies on *Alismatis Rhizoma*. II. Anti-complementary activities of methanol extract and terpene components from *Alismatis Rhizoma* (dried rhizome of *Alisma orientale*). *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 1998;21:1317-21.
- Matsuzaki, Y., Kurokawa, N., Terai, S., Matsumura, Y., Kobayashi, N. and Okita, K. Cell death induced by baicalein in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Japanese Journal of Cancer Research*. 1996;87:170-7.
- Metivier, D., Dallaporta, B., Zamzami, N., Larochette, N., Susin, S.A., Marzo, I. and Kroemer, G. Cytofluorometric detection of mitochondrial alterations in early CD95/Fas/APO-1-triggered apoptosis of Jurkat T lymphoma cells. Comparison of seven mitochondrion-specific fluorochromes. *Immunology Letters*. 1998;61:157-63.
- Meyer, M., Schreck, R. and Baeuerle, P.A. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO Journal*. 1993;12:2005-15.
- Michalopoulos, G.K. and DeFrances, M.C. Liver regeneration. *Science*. 1997;276:60-6.
- Miller, S.A., Selzman, C.H., Shames, B.D., Barton, H.A., Johnson, S.M. and Harken, A.H. *Chlamydia pneumoniae* activates nuclear factor kappaB and activator protein 1 in human vascular smooth muscle and induces cellular proliferation. *Journal of Surgical Research*. 2000;90:76-81.
- Miwa, Y., Harrison, P.M., Farzaneh, F., Langley, P.G., Williams, R. and Hughes, R.D. Plasma levels and hepatic mRNA expression of transforming growth factor-beta1 in patients with fulminant hepatic failure. *Journal of Hepatology*. 1997;27:780-8.

- Motoo, Y. and Sawabu, N. Antitumor effects of saikosaponins, baicalin and baicalein on human hepatoma cell lines. *Cancer Letters*. 1994;86:91-5.
- Munck A, Guyre PM, and Holbrook NJ. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrinol Rev*1984; 5:25-44.
- Murawaki, Y., Ikuta, Y., Nishimura, Y., Koda, M. and Kawasaki, H. Serum markers for fibrosis and plasma transforming growth factor-beta 1 in patients with hepatocellular carcinoma in comparison with patients with liver cirrhosis. *Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 1996;11:443-50.
- Musci MA, Latinis KM, and Koretzky GA. Signaling events in T lymphocytes leading to cellular activation or programmed cell death. *Clin Immunol Immunop* 1984;83:205-222.
- Myklebust, JH., Smeland, EB., Josefsen, D. and Sioud, M. Protein kinase C-alpha isoform is involved in erythropoietin-induced erythroid differentiation of CD34(+) progenitor cells from human bone marrow. *Blood*. 2000;95:510-8.
- Nagata S Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355-365.
- Nakamura, T., Kuriyama, M., Kosuge, E., Ishihara, K. and Ito, K. Effects of saiboku-to (TJ-96) on the production of platelet-activating factor in human neutrophils. *Annals of the New York Academy of Sciences*.1993; 685:572-9.
- Nakamura, T., Tomita, Y., Hirai, R., Yamaoka, K., Kaji, K. and Ichihara, A. Inhibitory effect of transforming growth factor-beta on DNA synthesis of adult rat hepatocytes in primary culture. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1985;133:1042-50.
- Nakamura, T., Ushiyama, C., Suzuki, S., Shimada, N., Ebihara, I., Suzaki, M., Takahashi, T. and Koide, H. Effect of plasma exchange on serum tissue inhibitor of metalloproteinase 1 and cytokine concentrations in patients with fulminant hepatitis. *Blood Purification*. 2000;18:50-4.
- Nelson, DR., Gonzalez-Peralta, RP., Qian, K. Xu, Y., Marousis, CG., Davis, GL. and Lau, JY. Transforming growth factor-beta 1 in chronic hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis*. 1997;4:29-35.
- Nishio, E. and Watanabe, Y. Role of the lipoxygenase pathway in phenylephrine-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *European Journal of Pharmacology*. 1997;336:267-73.

- Oberhammer, F., Bursch, W., Parzefall, W., Breit, P., Erber, E., Stadler, M. and Schulte-Hermann, R. Effect of transforming growth factor beta on cell death of cultured rat hepatocytes. *Cancer Research*. 1991;51:2478-85,.
- Oberhammer, F., Bursch, W., Tiefenbacher, R., Froschl, G., Pavelka, M., Purchio, T. and Schulte-Hermann, R. Apoptosis is induced by transforming growth factor-beta 1 within 5 hours in regressing liver without significant fragmentation of the DNA. *Hepatology*. 1993;18:1238-46.
- Oberhammer, FA., Pavelka, M., Sharma, S., Tiefenbacher, R., Purchio, AF., Bursch, W. and Schulte-Hermann, R. Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor beta 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992; 89:5408-12.
- Ohno, K., Ammann, P., Fasciati, R. and Maier, P. Transforming growth factor beta 1 preferentially induces apoptotic cell death in rat hepatocytes cultured under pericentral-equivalent conditions. *Toxicology & Applied Pharmacology*. 1995;132:227-36.
- Ohuchi K, Watanabe M, Ozeki T, and Tsurufuji S. Pharmacological influence of saikosaponins on prostaglandin E₂ production by peritoneal macrophages. *Planta Med* 1985;51:208-212.
- Ono, M., Miyamura, M., Kyotani, S., Saibara, T., Ohnishi, S. and Nishioka, Y. Effect of Sho-saiko-to extract on HGF and TGF-beta levels of intraorgans in liver-injured rats after partial hepatectomy. *Journal of Pharmacy & Pharmacology*. 2000;52:111-8.
- Orrenius, S., McConkey, DJ., Bellomo, G. and Nicotera, P. Role of Ca²⁺ in toxic cell killing. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1989;10:281-5.
- Park JA, Lee KY, Oh YJ, Kim KW, and Lee SK. Activation of caspase-3 protease via a Bcl-2-insensitive pathway during the process of ginsenoside Rh2-induced apoptosis. *Cancer Lett* 1997;121:73-81.
- Patel, T. and Gores, GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology*. 1995;21:1725-41.
- Patel, T., Roberts, LR., Jones, BA. and Gores, GJ. Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: an overview. *Seminars in Liver Disease*. 1998;18:105-14.
- Piacentini, L., Gray, M., Honbo, NY., Chentoufi, J., Bergman, M. and Karliner, JS.

- Endothelin-1 stimulates cardiac fibroblast proliferation through activation of protein kinase C. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 2000;32:565-76.
- Plumpe, J., Malek, NP., Bock, CT., Rakemann, T., Manns, MP. and Trautwein, C. NF-kappaB determines between apoptosis and proliferation in hepatocytes during liver regeneration. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal & Liver Physiology*.2000;278:G173-83.
- Ponchel, F., Puisieux, A., Tabone, E., Michot, JP., Froschl, G., Morel, AP., Frebourg, T., Fontaniere, B., Oberhammer, F. and Ozturk, M. Hepatocarcinoma-specific mutant p53-249ser induces mitotic activity but has no effect on transforming growth factor beta 1-mediated apoptosis. *Cancer Research*.1994; 54:2064-8.
- Pongracz, J., Webb, P., Wang, K., Deacon, E., Lunn, OJ. and Lord, JM. Spontaneous neutrophil apoptosis involves caspase 3-mediated activation of protein kinase C-delta. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:37329-34.
- Pruschy M, Shi YQ, Crompton NE, Steinbach J, Aguzzi A, Glanzmann C, and Bodis S. The proto-oncogene c-fos mediates apoptosis in murine T- lymphocytes induced by ionizing radiation and dexamethasone. *Biochem Bioph Res Co*1997; 241:519-524.
- Qian, L., Murakami, T., Kimura, Y., Takahashi, M. and Okita, K. (1995) Saikosaponin A-induced cell death of a human hepatoma cell line (HuH-7): the significance of the 'sub-G1 peak' in a DNA histogram. *Pathology International*. 45:207-14.
- Recio, MC., Just, MJ., Giner, RM., Manez, S., Rios, JL. and Hostettmann, K. Anti-inflammatory activity of saikosaponins from *Heteromorpha trifoliata*. *Journal of Natural Products*. 1995;58:140-4.
- Rind, HB. and Whittemore, SR. Protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase regulate the neuronal differentiation of immortalized raphe neurons. *Journal of Neuroscience Research*. 1999;56:177-88.
- Roberts, RA., James, NH. and Cosulich, SC. The role of protein kinase B and mitogen-activated protein kinase in epidermal growth factor and tumor necrosis factor alpha-mediated rat hepatocyte survival and apoptosis. *Hepatology*. 2000;31:420-7.
- Roberts, RA., James, NH., Hasmall, SC., Holden, PR., Lambe, K., Macdonald, N., West, D., Woodyatt, NJ. and Whitcome, D. Apoptosis and proliferation in nongenotoxic carcinogenesis: species differences and role of PPARalpha. *Toxicology Letters*. 2000;112-113:49-57.

- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-809.
- Roulot, D., Sevcsik, AM., Coste, T., Strosberg, AD. and Marullo, S. Role of transforming growth factor beta type II receptor in hepatic fibrosis: studies of human chronic hepatitis C and experimental fibrosis in rats. *Hepatology*. 1999;29:1730-8.
- Russell, WE., Coffey, RJ Jr., Ouellette, AJ. and Moses, HL. Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988; 85:5126-30.
- Rusyn, I., Yamashina, S., Segal, BH., Schoonhoven, R., Holland, SM., Cattley, RC., Swenberg, JA. and Thurman, RG. Oxidants from nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase are involved in triggering cell proliferation in the liver due to peroxisome proliferators. *Cancer Research*. 2000;60:4798-803.
- Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T.(1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York,
- Sanchez, A., Alvarez, AM., Benito, M. and Fabregat, I. Apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocyte primary cultures: involvement of reactive oxygen intermediates. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271:7416-22.
- Sanchez, A., Alvarez, AM., Benito, M. and Fabregat, I. Cycloheximide prevents apoptosis, reactive oxygen species production, and glutathione depletion induced by transforming growth factor beta in fetal rat hepatocytes in primary culture. *Hepatology*. 1997;26:935-43.
- Sanderson, N., Factor, V., Nagy, P., Kopp, J., Kondaiah, P., Wakefield, L., Roberts, AB., Sporn, MB. and Thorgeirsson, SS. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92:2572-6.
- Sarafian, TA. and Bredesen, DE. Is apoptosis mediated by reactive oxygen species?. *Free Radical Research*. 1994;21:1-8.
- Sasaki, Y., Zhang, XF., Nishiyama, M., Avruch, J. and Wands, JR. Expression and phosphorylation of insulin receptor substrate 1 during rat liver regeneration. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268:3805-8.

- Schmidt, KN., Amstad, P., Cerutti, P. and Baeuerle, PA. The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B. *Chemistry & Biology*.1995; 2:13-22.
- Schreck, R., Rieber, P. and Baeuerle, PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO Journal*.1991; 10:2247-58.
- Schulze-Osthoff, K., Bauer, MK., Vogt, M. and Wesselborg, S. Oxidative stress and signal transduction. *International Journal for Vitamin & Nutrition Research*. 1997;67:336-42.
- Sekiya, K. and Okuda, H. Selective inhibition of platelet lipxygenase by baicalein. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1982;105:1090-5.
- Setty, BN., Graeber, JE. and Stuart, MJ. The mitogenic effect of 15- and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid on endothelial cells may be mediated via diacylglycerol kinase inhibition. *Journal of Biological Chemistry*. 1987;262:17613-22.
- Shao, ZH., Li, CQ., Vanden Hoek, TL., Becker, LB., Schumacker, PT., Wu, JA., Attele, AS. and Yuan, CS. Extract from *Scutellaria baicalensis* Georgi attenuates oxidant stress in cardiomyocytes. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1999;31:1885-95.
- Sherwood SW and Schimke RT. Cell cycle analysis of apoptosis using flow cytometry. *Met Cell Biol* 1995;46:77-97.
- Shimizu, I. Sho-saiko-to: Japanese herbal medicine for protection against hepatic fibrosis and carcinoma. *Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2000;15 Suppl:D84-90.
- Shimizu, I., Ma, YR., Mizobuchi, Y., Liu, F., Miura, T., Nakai, Y., Yasuda, M., Shiba, M., Horie, T., Amagaya, S., Kawada, N., Hori, H. and Ito, S. Effects of Sho-saiko-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats. *Hepatology*. 1999;29:149-60
- Shirai, Y., Kawata, S., Tamura, S., Ito, N., Tsushima, H., Takaishi, K., Kiso, S. and Matsuzawa, Y. Plasma transforming growth factor-beta 1 in patients with hepatocellular carcinoma. Comparison with chronic liver diseases. *Cancer*. 1994;73:2275-9.
- Shizukuda, Y., Tang, S., Yokota, R. and Ware, JA. Vascular endothelial growth

- factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase Cdelta activity. *Circulation Research*. 1999;85:247-56.
- Singer, AJ. and Clark, RA. Cutaneous wound healing. *New England Journal of Medicine*. 341:738-46.
- Smith, DL., Willis, AL. and Mahmud, I. Eicosanoid effects on cell proliferation in vitro: relevance to atherosclerosis. *Prostaglandins Leukotrienes & Medicine*. 1984;16:1-10.
- So, FV., Guthrie, N., Chambers, AF. and Carroll, KK. Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen. *Cancer Letters*. 1997;112:127-33.
- Spector, MS., Auer, KL., Jarvis, WD., Ishac, EJ., Gao, B., Kunos, G. and Dent, P. Differential regulation of the mitogen-activated protein and stress-activated protein kinase cascades by adrenergic agonists in quiescent and regenerating adult rat hepatocytes. *Molecular & Cellular Biology*. 1997;17:3556-65.
- Stennicke, HR. and Salvesen, GS. Properties of the caspases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998;1387:17-31.
- Sun, XG. and Rotenberg, SA. Overexpression of protein kinase Calpha in MCF-10A human breast cells engenders dramatic alterations in morphology, proliferation, and motility. *Cell Growth & Differentiation*. 1999;10:343-52.
- Takahashi, T., Kamimura, A., Shirai, A. and Yokoo, Y. Several selective protein kinase C inhibitors including procyanidins promote hair growth. *Skin Pharmacology & Applied Skin Physiology*. 2000;13:133-42.
- Tanaka, S. and Wands, JR. Insulin receptor substrate 1 over-expression in human hepatocellular carcinoma cells prevents transforming growth factor beta1-induced apoptosis. *Cancer Research*. 1996;56:3391-4.
- Taoka, T., Tokuda, M., Tasaka, T., Hatase, O., Irino, S. and Norman, AW. Induction of differentiation of HL-60 cells by protein kinase C inhibitor, K252a. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1990;170:1151-6.
- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995;267:1456-1462.
- Thorgeirsson, SS., Teramoto, T. and Factor, VM. Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Seminars in Liver Disease*. 1998;18:115-22.

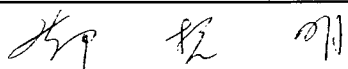
- Thornberry, NA. and Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998;281:1312-6.
- Traenckner, EB., Pahl, HL., Henkel, T., Schmidt, KN., Wilk, S. and Baeuerle, PA. Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *EMBO Journal*. 1995;14:2876-83.
- Tsai, JF., Jeng, JE., Chuang, LY., Chang, WY. and Tsai, JH. Urinary transforming growth factor beta1 levels in hepatitis C virus-related chronic liver disease: correlation between high levels and severity of disease. *Hepatology*. 1997;25:1141-6.
- Tsushima, H., Kawata, S., Tamura, S., Ito, N., Shirai, Y., Kiso, S., Doi, Y., Yamada, A., Oshikawa, O. and Matsuzawa, Y. Reduced plasma transforming growth factor-beta1 levels in patients with chronic hepatitis C after interferon-alpha therapy: association with regression of hepatic fibrosis. *Journal of Hepatology*. 1999;30:1-7.
- Ushio Y and Abe H The effects of saikosaponin on macrophage functions and lymphocyte proliferation. *Planta Med* 1991;57:511-514.
- Ushio Y, Oda Y, and Abe H. Effect of saikosaponin on the immune responses in mice. *Int J Immunopharmac* 1991;13:501-508.
- Ushio, Y. and Abe, H. Inactivation of measles virus and herpes simplex virus by saikosaponin d. *Planta Medica*. 1992;58:171-3.
- Velculescu VE and El-deiry WS Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clin Chem* 1996;42:858-868.
- Wakabayashi, I. Inhibitory effects of baicalein and wogonin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in macrophages. *Pharmacology & Toxicology*. 1999; 84:288-91.
- Wang AM, Doyle MV, and Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:9717-9721.
- Wang, CJ., Wang, SW. and Lin, JK. Suppressive effect of geniposide on the hepatotoxicity and hepatic DNA binding of aflatoxin B1 in rats. *Cancer Letters*. 1991;60:95-102
- Wang, S., Desai, D., Wright, G., Niles, RM. and Wright, GL. Effects of protein kinase C alpha overexpression on A7r5 smooth muscle cell proliferation and

- differentiation. *Experimental Cell Research*. 1997;236:117-26.
- Watabe S, Sendo F, Kimura S, and Arai S. Activation of cytotoxic polymorphonuclear leukocytes by in vivo administration of a streptococcal preparation, OK432. *J Natl Cancer Inst* 1984;72:1365-1370.
- Wyllie, AH. Apoptosis: an overview. *British Medical Bulletin*. 1997;53:451-65.
- Wyllie, AH., Kerr, JF. and Currie, AR. Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology*. 1980; 68:251-306.
- Xue D, Shaham S, and Horvitz HR. The *Caenorhabditis elegans* cell-death protein CED-3 is a cysteine protease with substrate specificities similar to those of the human CPP32 protease. *Genes Dev* 1996;10:1073-1083.
- Yahata, T., Abe, N., Yahata, C., Ohmi, Y., Ohta, A., Iwakabe, K., Habu, S., Yagita, H., Kitamura, H., Matsuki, N., Nakui, M., Sato, M. and Nishimura, T. The essential role of phorbol ester-sensitive protein kinase C isoforms in activation-induced cell death of Th1 cells. *European Journal of Immunology*. 1999;29:727-32.
- Yamamoto M, Kumagai A, and Yamamura Y. Structure and action of saikosaponins isolated from *Bupleurum falcatum* L. II. Metabolic actions of saikosaponins, especially a plasma cholesterol-lowering action. *Arzneimittel- Forschung* 1975;25:1240-1243.
- Yamamoto, M., Fukuda, K., Miura, N., Suzuki, R., Kido, T. and Komatsu, Y. Inhibition by dexamethasone of transforming growth factor beta1-induced apoptosis in rat hepatoma cells: a possible association with Bcl-xL induction. *Hepatology*. 1998;27:959-66.
- Yamamoto, M., Miura, N., Ohtake, N., Amagaya, S., Ishige, A., Sasaki, H., Komatsu, Y., Fukuda, K., Ito, T. and Terasawa, K. Genipin, a metabolite derived from the herbal medicine Inchin-ko-to, and suppression of Fas-induced lethal liver apoptosis in mice. *Gastroenterology*. 2000; 118:380-9.
- Yano, K., Bauchat, JR., Liimatta, MB., Clemmons, DR. and Duan, C. Down-regulation of protein kinase C inhibits insulin-like growth factor I-induced vascular smooth muscle cell proliferation, migration, and gene expression. *Endocrinology*. 1999;140:4622-32.
- Yeldandi, AV., Rao, MS. and Reddy, JK. Hydrogen peroxide generation in peroxisome proliferator-induced oncogenesis. *Mutation Research*. 2000;448:159-77.

- Yen, MH, Lin CC, Chuang CH, and Liu SY. Evaluation of root quality of Bupleurum species by TLC scanner and the liver protective effects of “xiao-chai-hu-tang” prepared using three different Bupleurum species. *J Ethnopharmacol* 1991;34:155-165.
- Yonish-rouach E. The p53 tumor suppressor gene: a mediator of a G₁ growth arrest and of apoptosis. *Experientia* 1996;52:1001-1007.
- Yoo, YD., Ueda, H., Park, K., Flanders, KC., Lee, YI., Jay, G. and Kim, SJ. Regulation of transforming growth factor-beta 1 expression by the hepatitis B virus (HBV) X transactivator. Role in HBV pathogenesis. *Journal of Clinical Investigation*. 1996;97:388-95.
- Yotsumoto, H., Yanagita, T., Yamamoto, K., Ogawa, Y., Cha, JY. and Mori, Y. Inhibitory effects of oren-gedoku-to and its components on cholesteryl ester synthesis in cultured human hepatocyte HepG2 cells: evidence from the cultured HepG2 cells and in vitro assay of ACAT. *Planta Medica*. 1997; 63:141-5.
- Zamai L, Falcieri E, Marhejka G and Vitale M. Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptotic cells in the absence of nucleosomal DNA fragmentation. *Cytometry* 1996;23:303-311.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, JL., Petit, PX. and Kroemer, G. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 1995;181:1661-72.
- Zamzami, N., Susin, SA., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M. and Kroemer, G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*. 1996;183:1533-44.
- Zhang, M., Zhang, L. and Long, J. Expression of TGFb1 and its mRNA in liver tissues of patients with chronic viral hepatitis. *Chung Hua Kan Tsang Ping Tsa Chih*. 1999; 7:193-5.
- Zhou, S. and Wallace, KB. The effect of peroxisome proliferators on mitochondrial bioenergetics. *Toxicological Sciences*. 1999; 48:82-9

行政院
衛生署

中醫藥委員會八十九年度委辦研究計畫成果報告自我
評估表

計畫名稱	龍膽瀉肝湯免疫機轉研究	計畫編號	CCMP88-RD-026 CCMP89-RD-020
執行機構	台大醫學院藥理學科	主持人	鄧哲明
自我評估項目： 一、研究方法是否與原計畫之設計相同 ☐ 完全相同 ☒ 少部分不同 ☐ 大部分不同 ☐ 完全不同 <u>未"完全相同"者請說明不同之項目與原因：</u> 因主持人黃慧貞教授病逝，本人接手此計畫，認為研究工作應集中在肝臟細胞作更廣汎且深入之研究，而有關淋巴細胞之研究方面在第一年之成果看來，繼續進行之可行性不高，因此在第二年之設計完全以 TGF-β1 對 Hep3B 細胞凋亡為架構，來探討五種主要成分之作用機轉。 二、研究成果內容與原計畫書目的之相符程度 ☐ 完全相符 ☒ 少部分不符 ☐ 大部分不符 ☐ 完全不符 <u>未"完全相符"者請說明不符之項目與原因：</u> 大部份相符，尤其五種主要活性成分對肝臟細胞凋亡之影響作得更詳細，並且對具有抑制凋亡作用之 baicalein 的作用機轉非常深入研究。 三、研究成果是否達成預期目標 ☐ 已達成且超過預期目標 ☒ 已達成預期目標 ☐ 部分未達成 ☐ 均未達成 <u>均請說明，未達成目標請務必說明原因：</u> 四、對該研究成果應用價值之自我評估：(可複選) ☐ 可列為中醫師或中藥師在職繼續教育專題演講之內容 ☐ 具出版專籍參考之價值 ☒ 具發表於學術期刊之價值 ☐ 具備申請專利或技術移轉之潛力 ☐ 其他 _____ 五、其他 將分成兩篇論文投稿國際中上級藥理學相關期刊；又因承接黃慧貞教授計畫，無法取得圖一至八之圖表，故無法附上。			
計畫主持人簽章		日期	90.3.12

註：本表電腦檔案可於 "<http://www.ccmp.gov.tw>" 上取得

圖、表

圖一 saikosaponin-d 的結構

圖二 saikosaponin-d 對CEM細胞DNA合成的影響，DNA synthesis were measured by uptake of tritiated thymidine. The control value for serum-induced [3H]thymidine incorporation in the absence of test compound was $9,205 \pm 945$ c.p.m./well. The inhibitory activities of the test compounds are expressed as a percentage of the control values (% of control). Each point with vertical line represents the mean and s.e. mean (n=5).

圖三 saikosaponin-d 對細胞存活力的影響，Quiescent CEM cells (basal level, 2×10^5 cells) were stimulated with serum. After addition of serum for 48 h in the absence (control level) or presence of test compound, the cells were harvested and their viability examined by trypan blue dye exclusion test. The number of viable cells was estimated using a haemocytometer. Each column represents the mean $\pm$ s.e. mean (n=5). *: $P < 0.05$, compared to the cell number in basal condition (basal level).

圖四 saikosaponin-d 對CEM細胞凋亡作用百分比，Quiescent CEM cells were stimulated by serum in the absence and presence of test compound for the indicated time periods. The percentage of apoptotic cells untreated (control) and treated with saikosaponin-d for 12 (□), 24 (□), 48 h (■) was analyzed by flow cytometric analysis of propidium iodide-stained cells as described in Methods. The effect of test compound was compared to that of 3×10^{-7} M dexamethasone. Each column represents the mean $\pm$ s.e. mean (n=3 or 6). #: $P < 0.05$, when compared to the control value (without test compound) for 12 h treatment. +: $P < 0.05$, when compared to the control value (without test compound) for 24h treatment. *: $P < 0.05$, when compared to the control value (without test compound) for 48h treatment.

圖五 CEM細胞的annexin-V/PI雙染色，CEM cells untreated, and treated with saikosaponin-d were performed PI and Annexin V labeling as described in Materials and Methods. The lower left quadrants of each panels (Annexin V⁻PI⁻) show the viable cells, which exclude PI and are negative for Annexin V binding. The lower right quadrants (Annexin V⁺PI⁻) represent the early apoptotic cells, Annexin V positive

and PI negative, demonstrating cytoplasmic membrane integrity. The upper right quadrants (Annexin V⁺PI⁺) contain advanced apoptotic cells and necrotic cells, positive for Annexin V binding and for PI uptake.

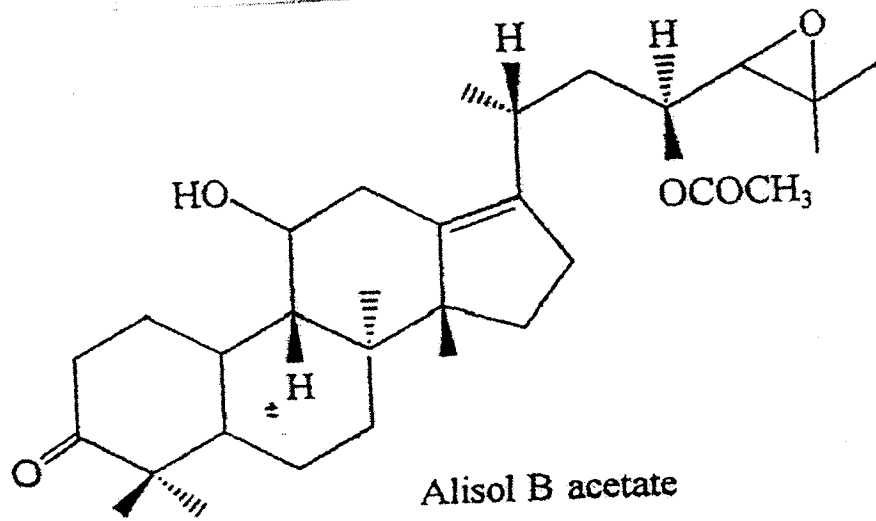
圖六 CEM細胞的TUNEL 分析，CEM cells treated with (a) 10^{-6} M saikosaponin-d and (b) 10^{-5} M saikosaponin-d, (c) 10^{-4} M saikosaponin-d, and (d) control, untreated with test compound, (e) treated with 3×10^{-7} M dexamethasone were taken through the TUNEL procedure. TUNEL-positive cells were visualized using a peroxidase-substrate system as having brown nuclei and counter-staining with methyl-green revealed green-blue nuclei. None of the nuclei in untreated cells were positively labeled for DNA fragmentation, while a large proportion of the nuclei in 10^{-5} and 10^{-4} M saikosaponin-d-treated cells or 3×10^{-7} M dexamethasone-treated cells were TUNEL-positive. Bar=12 μ m. Similar results were obtained in three independent experiments.

圖七 Electrophoresis of fragmented DNA in CEM cells. Genomic DNA was isolated from untreated (control) cells and cells treated with saikosaponin-d or dexamethasone for 48 h. DNA fragmentation was evaluated by electrophoresis on agarose gel containing ethidium bromide and photographed under u.v. light. The DNA ladder was detected in cells treated with 10^{-5} and 10^{-4} M saikosaponin-d. The effect of test compound was compared to that of 3×10^{-7} M dexamethasone. Lane M, ϕ X174/*Hae*III DNA size marker; lane 1, untreated control.; lane 2, treated with 10^{-6} M saikosaponin-d; lane 3, treated with 10^{-5} M saikosaponin-d; ; lane 4, treated with 10^{-4} M saikosaponin-d; lane 5, treated with 3×10^{-7} M dexamethasone. Similar results were obtained in three independent experiments.

圖八 saikosaponin-d 對CEM 細胞 *c-myc*, *p53*, 和 *bcl-2* mRNA 表現量的影響，Quiescent CEM cells were stimulated by serum in the absence and presence of test compound for 12 h. The serum-stimulated test gene mRNA levels in untreated (□) and treated with 10^{-5} M saikosaponin-d (■) or 3×10^{-7} M dexamethasone (□) were analyzed by RT-PCR amplification as described in the Methods. Amplification products were separated by agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining. The signal intensities of test genes and GAPDH were quantified

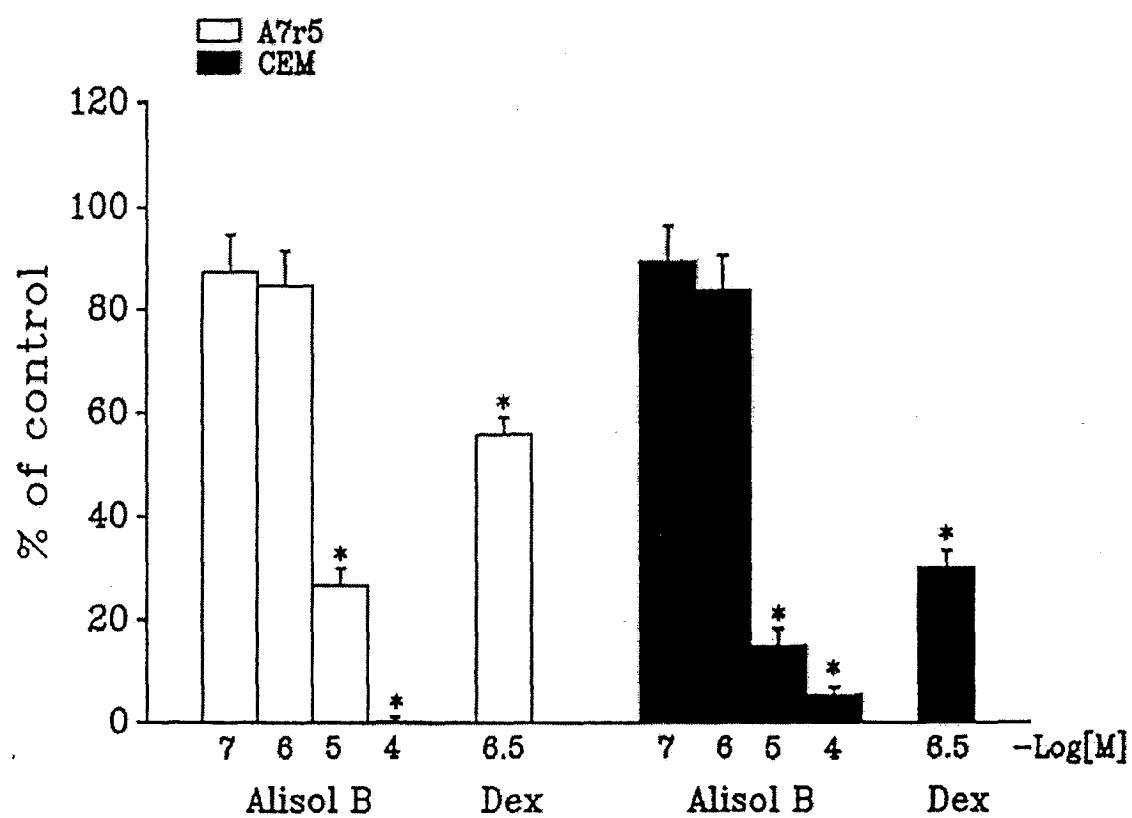
using image analyzer, and the changes in the signal intensities of the test genes relative to GAPDH were calculated. Results are expressed as percentage of the control level without test compound (% of control) (bottom of figure) (n=3); the corresponding electrophoretic patterns of PCR products are shown at the top of each panel. Lane M, ϕ X174/*Hae*III DNA size marker; lane 1, 4, 7, control without test compound; lane 2, 5, 8, 10^{-5} M saikosaponin-d-treated; lane 3, 6, 9, 3×10^{-7} M dexamethasone-treated. *c-myc* mRNA level: lane 1, 2, 3; *p53* mRNA level: lane 4, 5, 6; *bcl-2* mRNA level: lane 7, 8, 9; lane N, negative control, no RT. Each column represents the mean $\pm$ s.e.mean (n=3). *: $P < 0.05$, when compared to the control value without test compound.

圖一



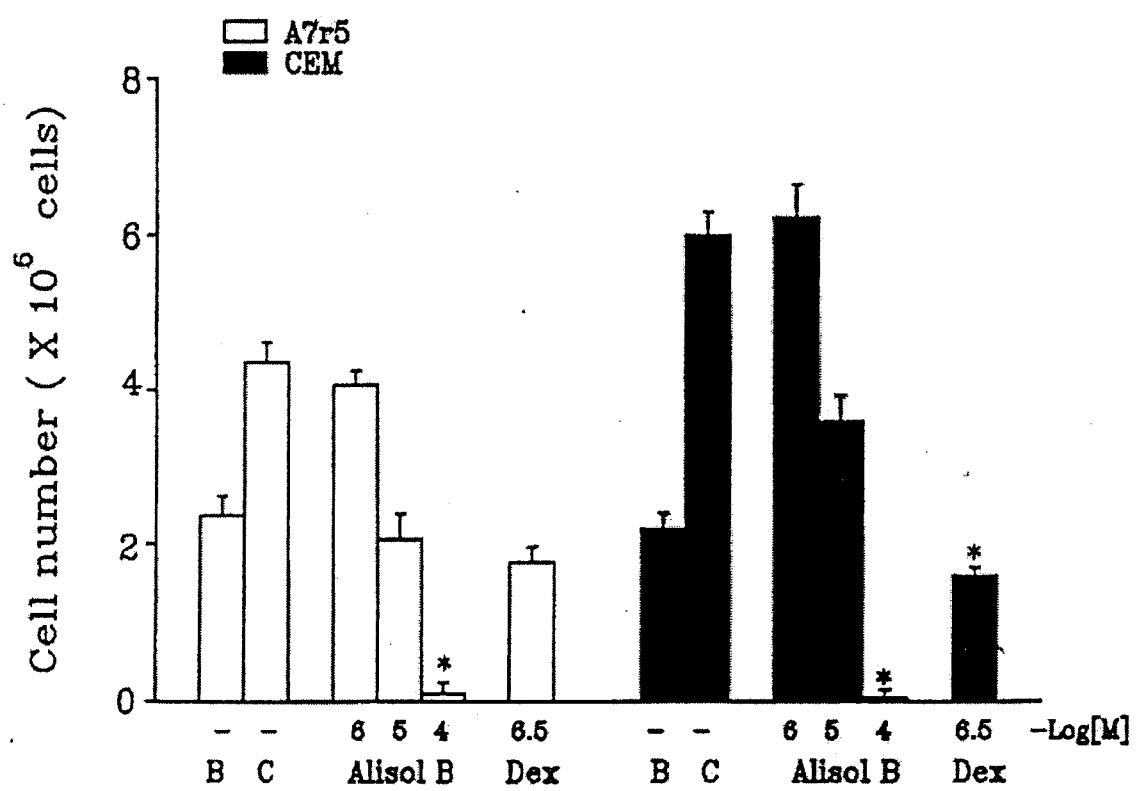
Alisol B 結構式

圖二



Alisol B對細胞增生的影響

圖三



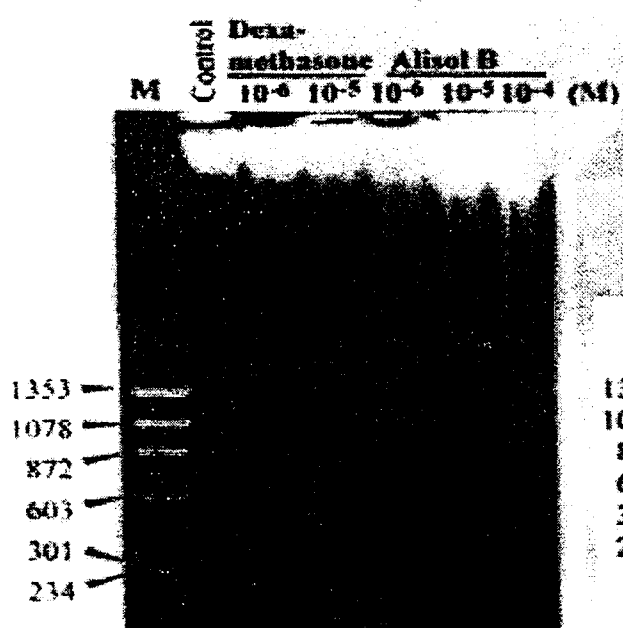
Alisol B對細胞存活力的影響

表一

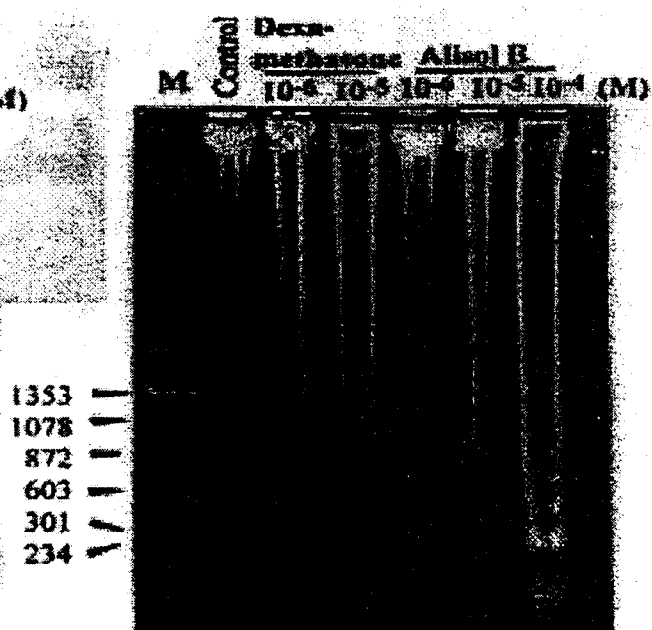
		A7r5 cells					CEM cells			
		Conc.	Apoptosis	G0/G1	S	G2/M	Apoptosis	G0/G1	S	G2/M
		(M)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Control	—		5.9±3.2	59.8±4.7	21.4±3.7	12.9±2.5	6.8±1.4	47.9±4.3	31.4±2.6	13.9±1.8
				(63.5)	(22.7)	(13.7)		(51.4)	(33.7)	(14.9)
Alisol B	10 ⁻⁸		7.7±2.4	56.9±3.6	22.9±2.8	12.5±1.3	7.7±1.9	46.8±3.9	30.2±2.3	14.3±1.8
				(61.6)	(24.3)	(13.5)		(50.7)	(33.8)	(15.4)
	10 ⁻⁵		22.3±4.7*	52.2±2.7	15.3±2.0	10.2±1.8	18.3±3.7*	46.3±2.8	24.3±2.3	11.1±2.1
				(67.2)	(19.7)	(13.1)		(56.7)	(29.7)	(13.6)
Dex	10 ⁻⁴		23.3±3.7*	45.2±3.4	6.5±1.4	1.3±0.7	69.7±6.8*	16.3±2.2	9.3±1.0	4.2±1.2
				(59.1)	(25.0)	(5.9)		(55.4)	(30.5)	(13.8)
	3×10 ⁻⁷		17.3±5.1*	58.2±3.9	14.2±3.1	10.3±1.1	25.3±2.2*	45.7±5.2	20.8±3.1	8.2±1.2
				(70.4)	(17.2)	(12.5)		(61.2)	(27.8)	(11.0)

圖四. 細胞DNA ladder現象

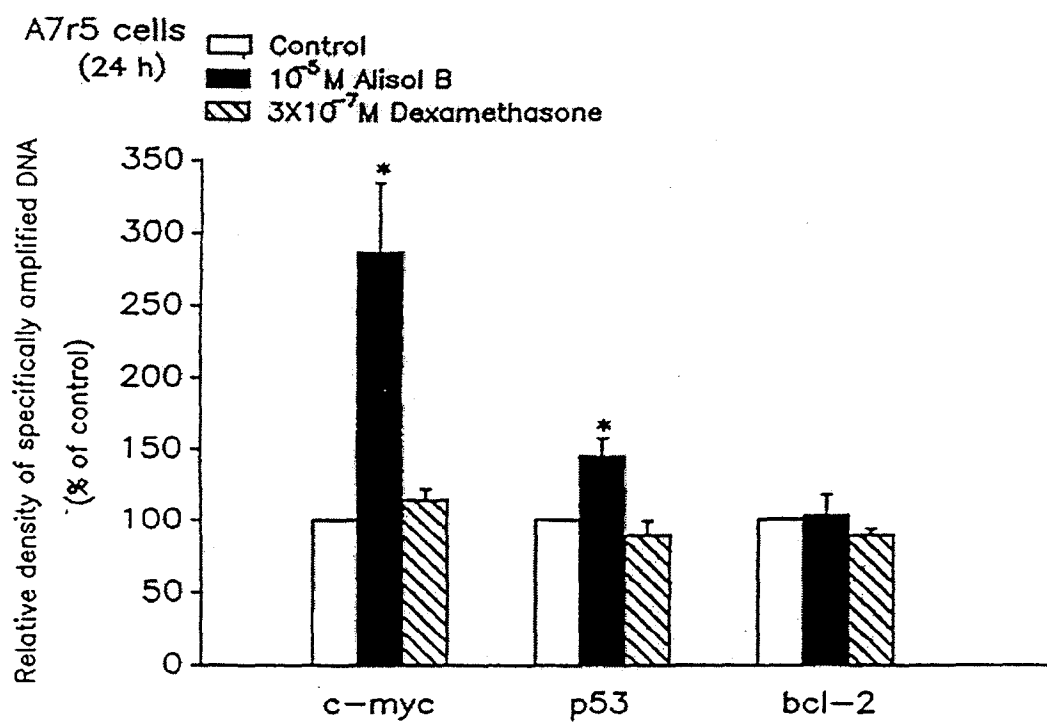
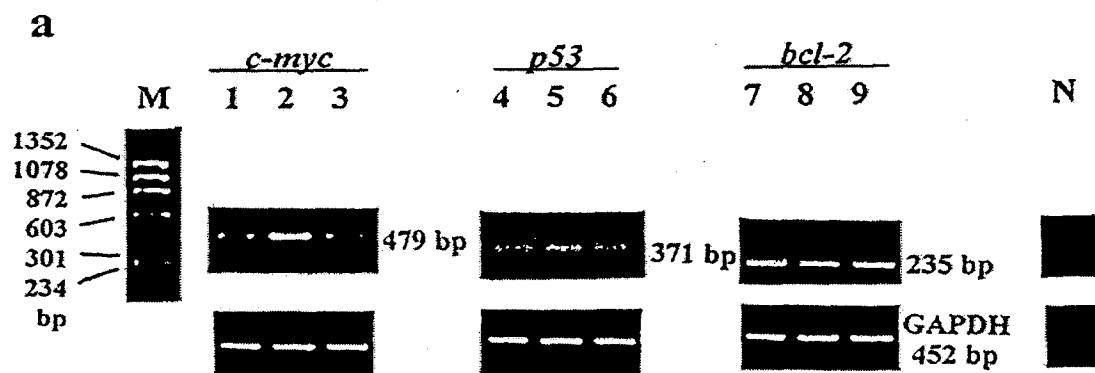
(a) A7r5 細胞



(b) CEM細胞



圖五. Alisol B對c-myc, p53, bcl-2表現的影響



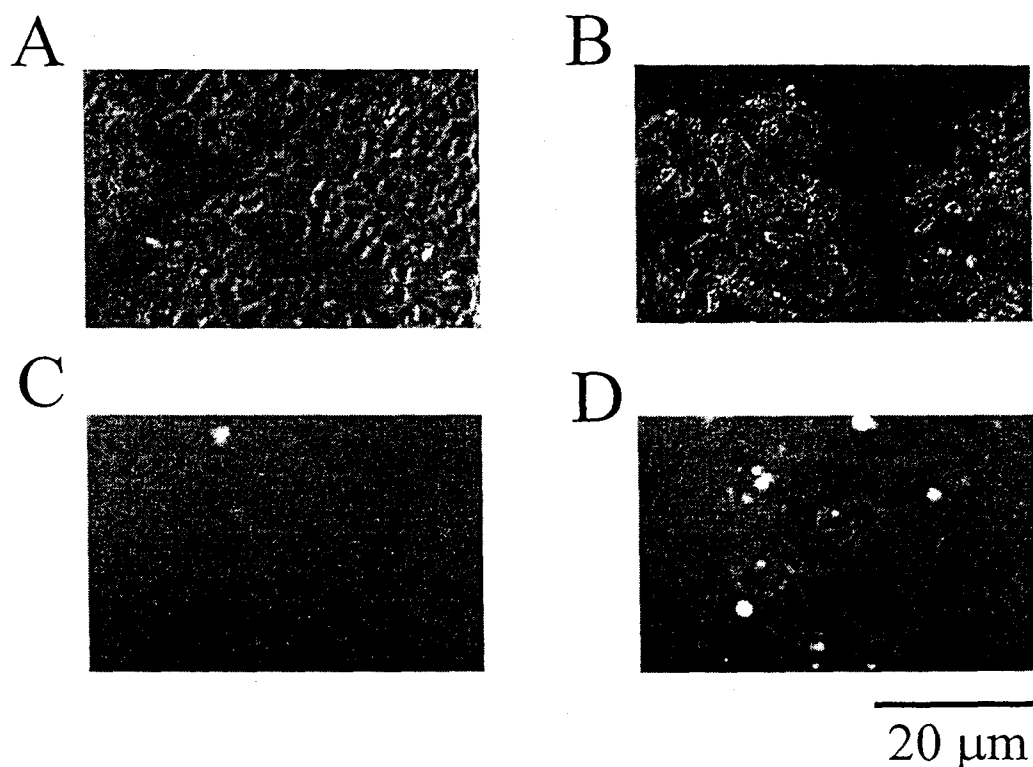


Fig. 1-1. TGF- β_1 在 Hep 3B 細胞中引起的細胞凋亡情形. Cells were incubated in the absence (A and C) or presence (B and D) of medium. Then, cell morphology was observed using a regular microscopic stain (A and B) or immunostained with annexin V (C and D) for the detection of apoptosis as described in Experimental Procedures.

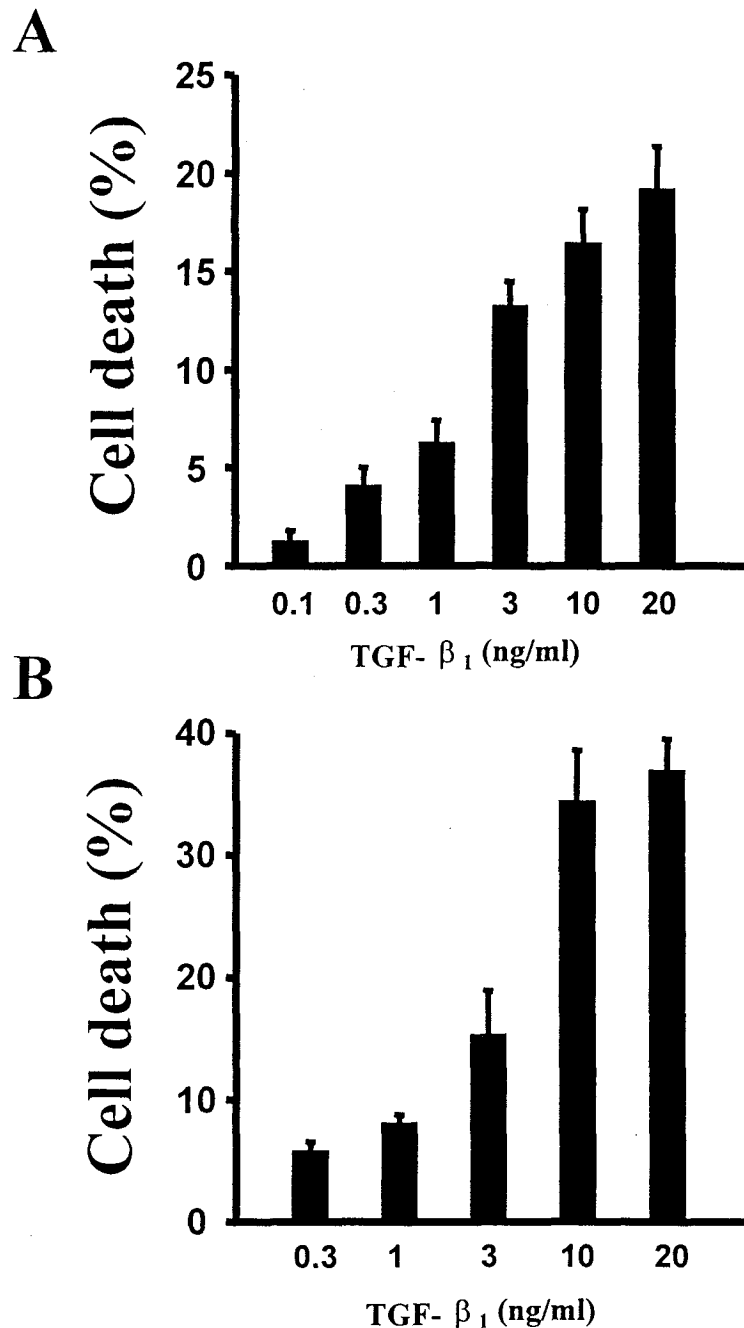


Fig. 1-2. TGF- β_1 在Hep 3B 細胞中引起的細胞凋亡作用 . Cells were treated with TGF- β_1 in several concentrations, and then the apoptotic response was assessed using MTT assay (A) or flow cytometric method (B) as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means $\pm$ SEM of three to five determinations.

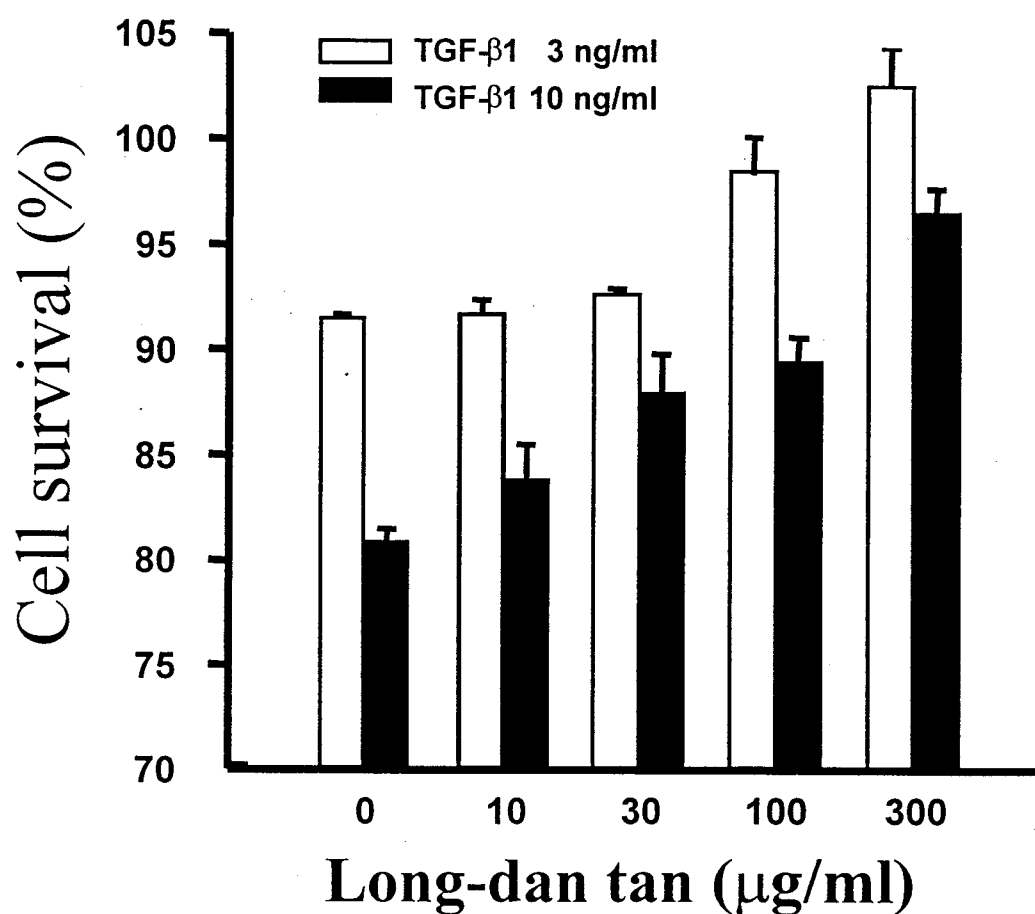


Fig. 1-3. 龍膽瀉肝湯對於 TGF- β_1 引起細胞凋亡作用之影響. Cells were preincubated in the absence or presence of various concentrations of Long-dan-tan, and then cell apoptosis was detected using MTT assay method as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means $\pm$ SEM of three determinations.

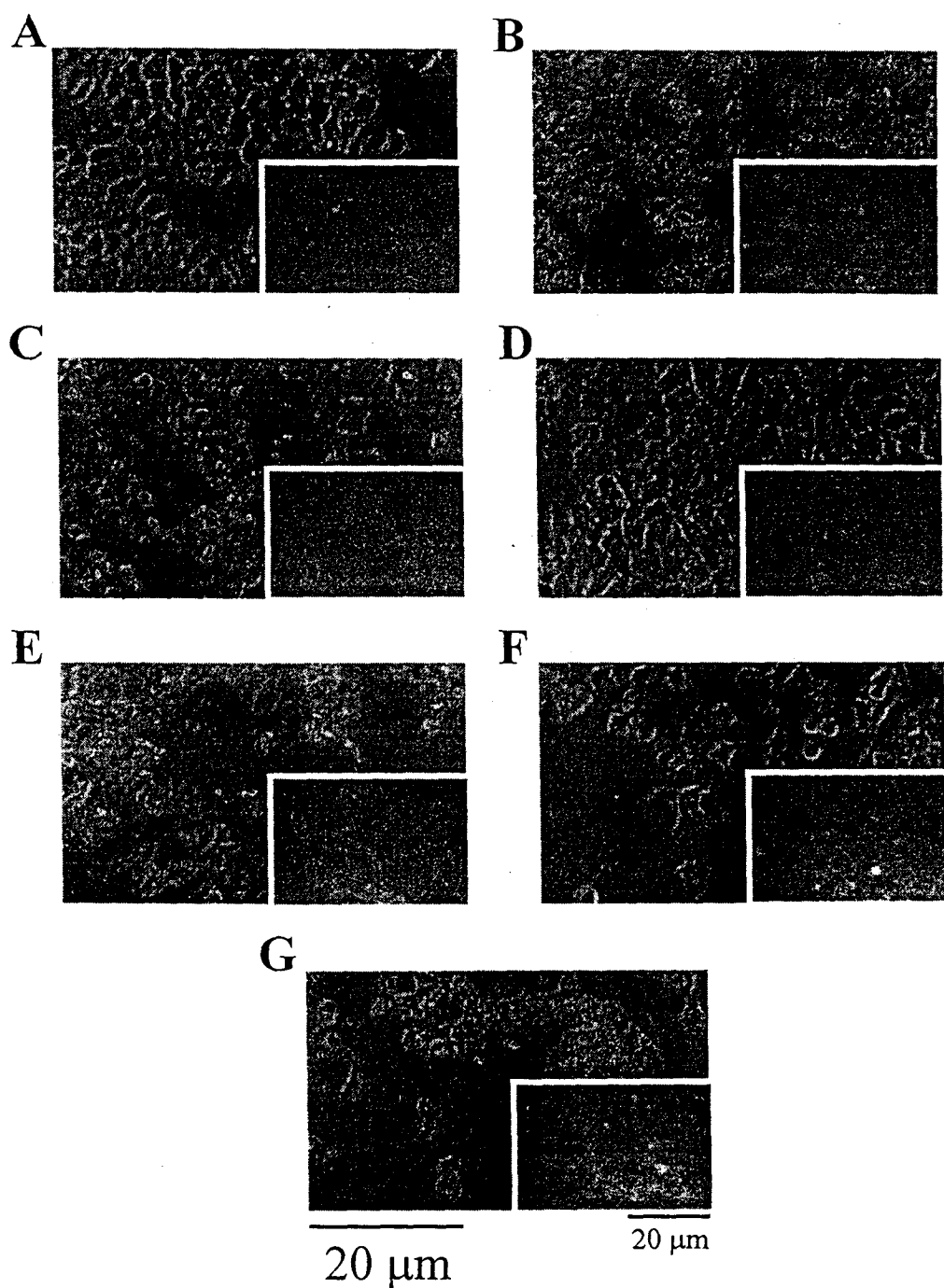


Fig. 1-4. 龍膽瀉肝湯的主要組成成分調控細胞死亡的作用. Cells were preincubated in the absence or presence of gentiopicroside (300 μ M, C), baicalein (100 μ M, D) or geniposide (300 μ M, E) for 30 min, and then TGF- β_1 (10 ng/ml, B, C, D and E), alisol B (50 μ M, F) or saikosaponin-d (5 μ M, G) was added to induce cell death. The cell morphology or immunostaining (Inset) with annexin V (green fluorescence) or propidium iodide (orange fluorescence) was detected as described in Experimental Procedures.

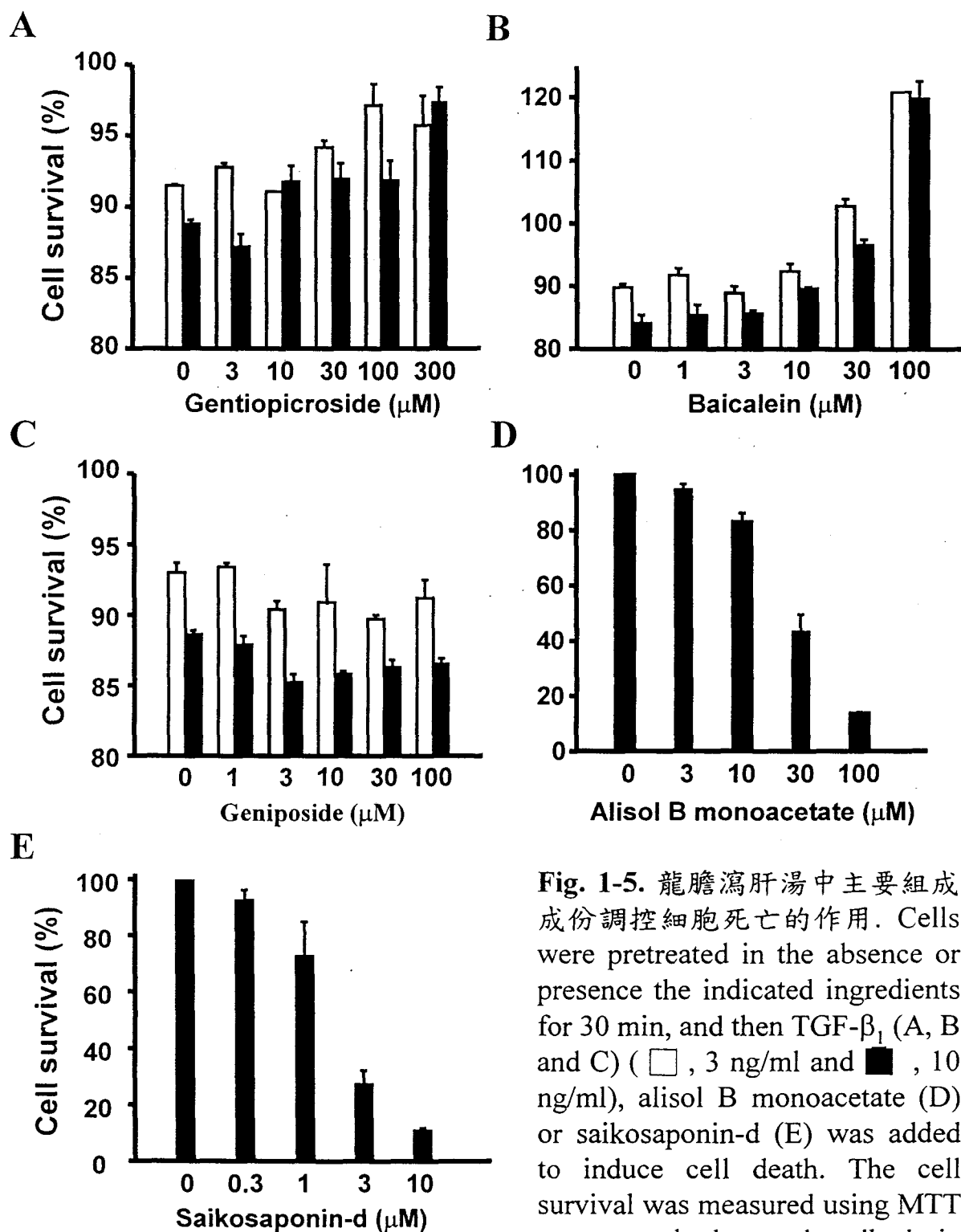


Fig. 1-5. 龍膽瀉肝湯中主要組成成份調控細胞死亡的作用. Cells were pretreated in the absence or presence the indicated ingredients for 30 min, and then TGF-β₁ (A, B and C) (□, 3 ng/ml and ■, 10 ng/ml), alisol B monoacetate (D) or saikosaponin-d (E) was added to induce cell death. The cell survival was measured using MTT assay method as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means ± SEM of three determinations (each in triplicate).

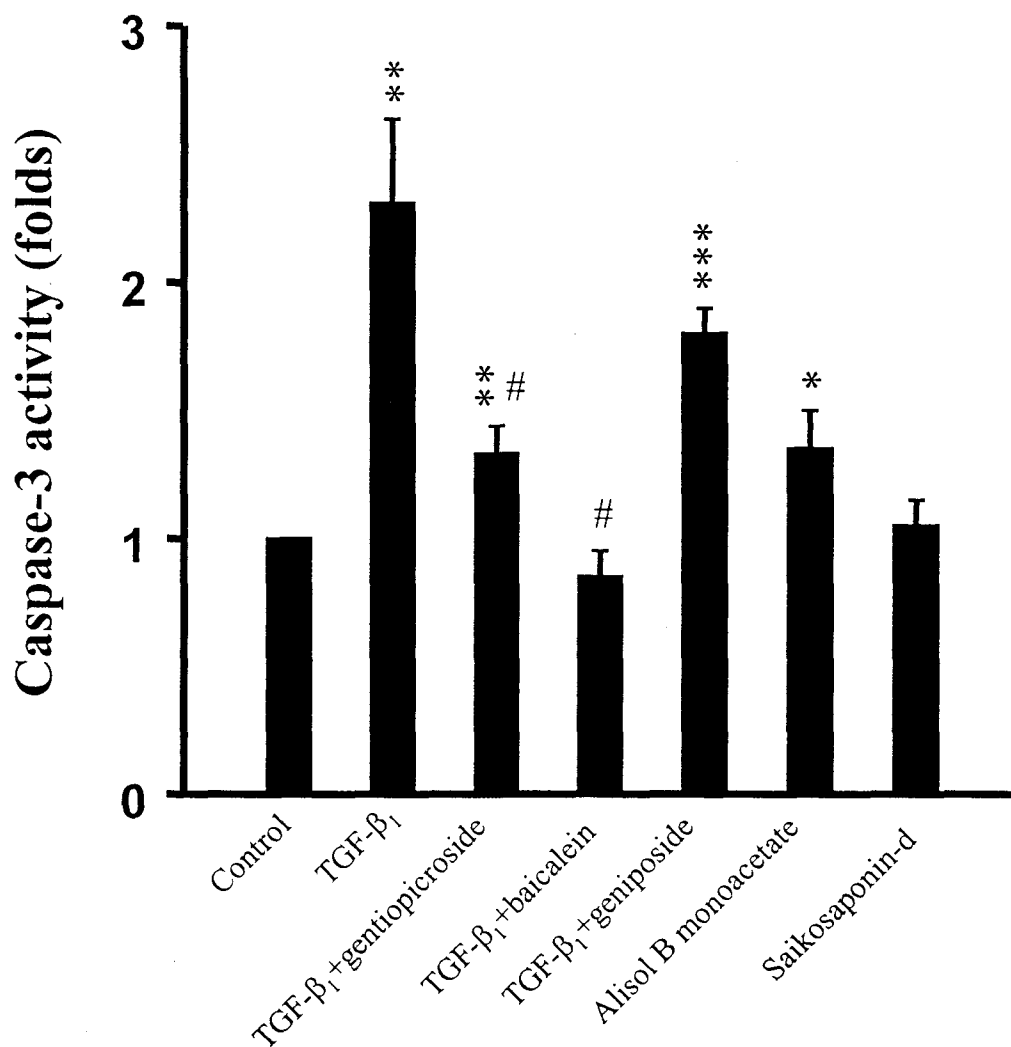


Fig. 1-6. 龍膽瀉肝湯中的主要組成成份對於 caspase-3 活性之影響. Cells were preincubated in the absence or presence of the indicated ingredient for 30 min, and then TGF- β_1 , alisol B monoacetate or saikosaponin-d was added for 16 hr and cells were lysed for the detection of caspase-3 activity as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means $\pm$ SEM of three determinations. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 and # P < 0.05 as compared with control and TGF- β_1 alone, respectively.

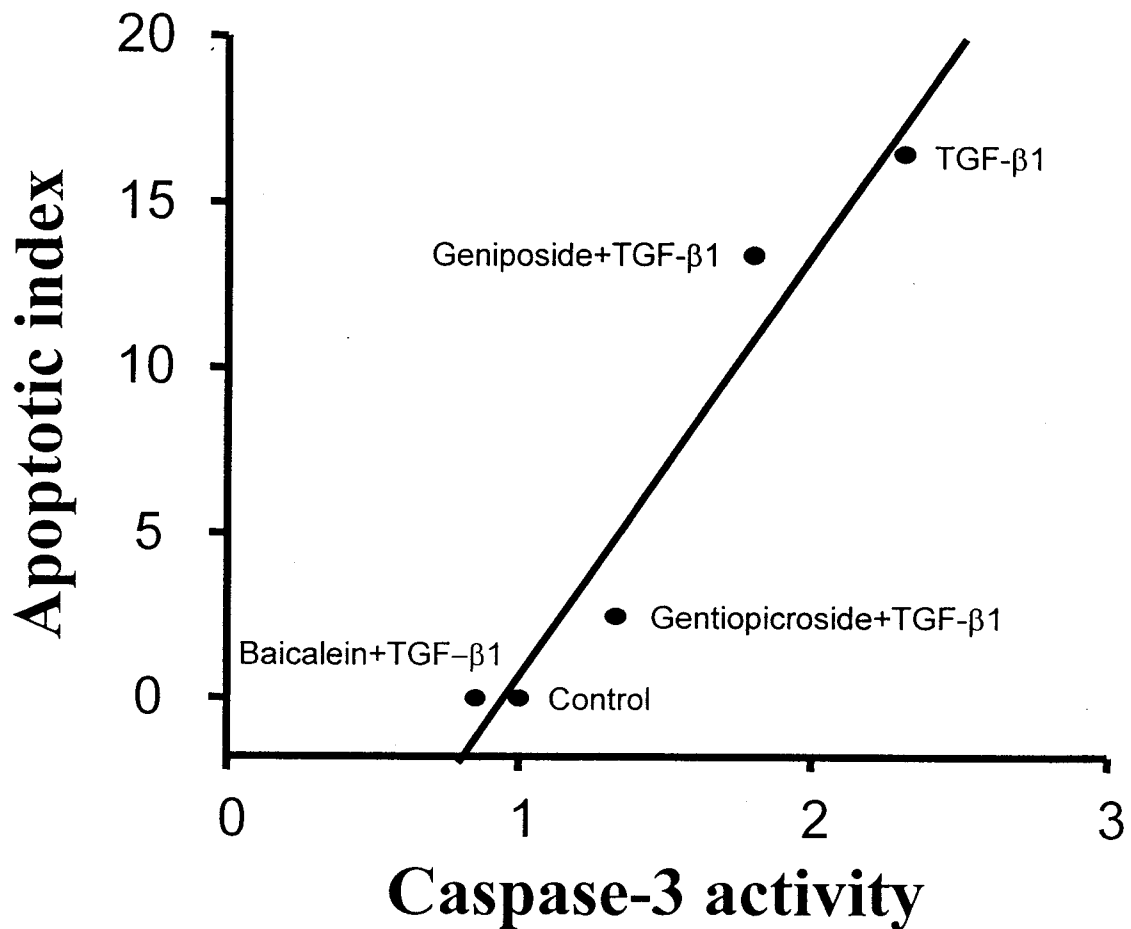


Fig. 1-7. 細胞凋亡作用與 caspase-3 活性的相關性. The apoptotic effect of gentiopicroside, baicalein and geniposide were examined using MTT assay method. Then, the apoptotic index were correlated with the caspase-3 activity as shown in Fig. 6. A good correlation coefficient of 0.94 was obtained.

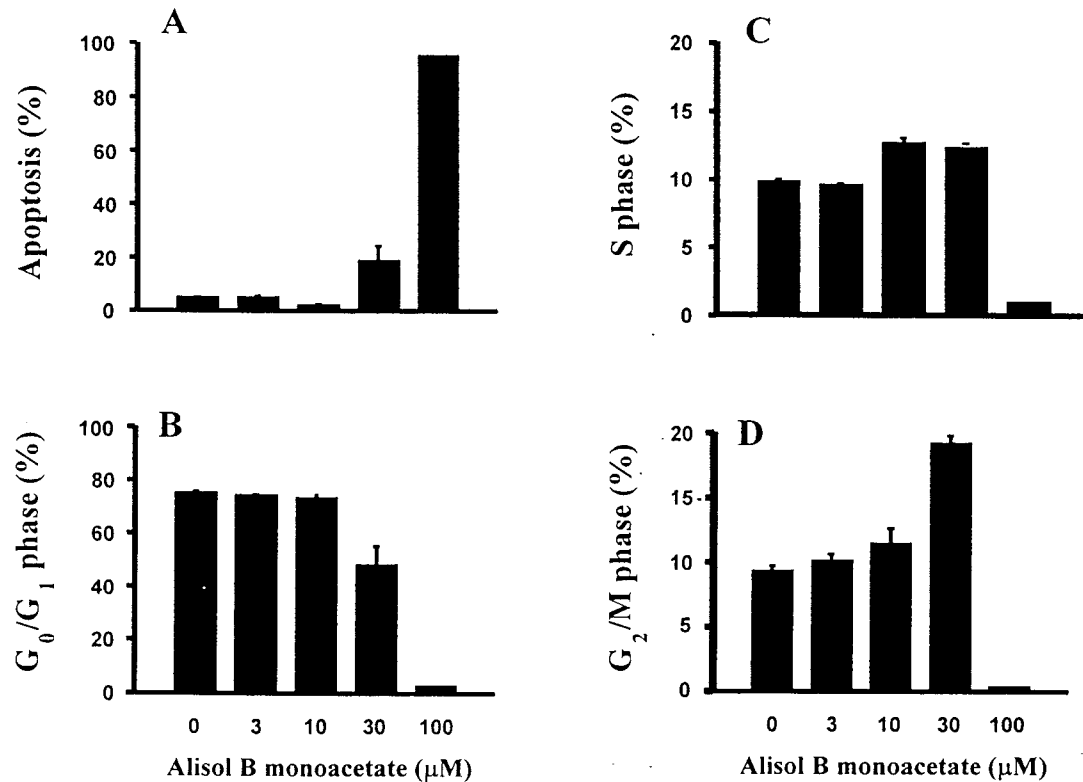


Fig. 1-8. Alisol B monoacetate 促進細胞週期的進行. Cells were preincubated in the absence or presence of alisol B monoacetate for 24hr, and then cells were washed and harvested for the detection of cell cycle progression using flow cytometric method as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means $\pm$ SEM of three determinations.

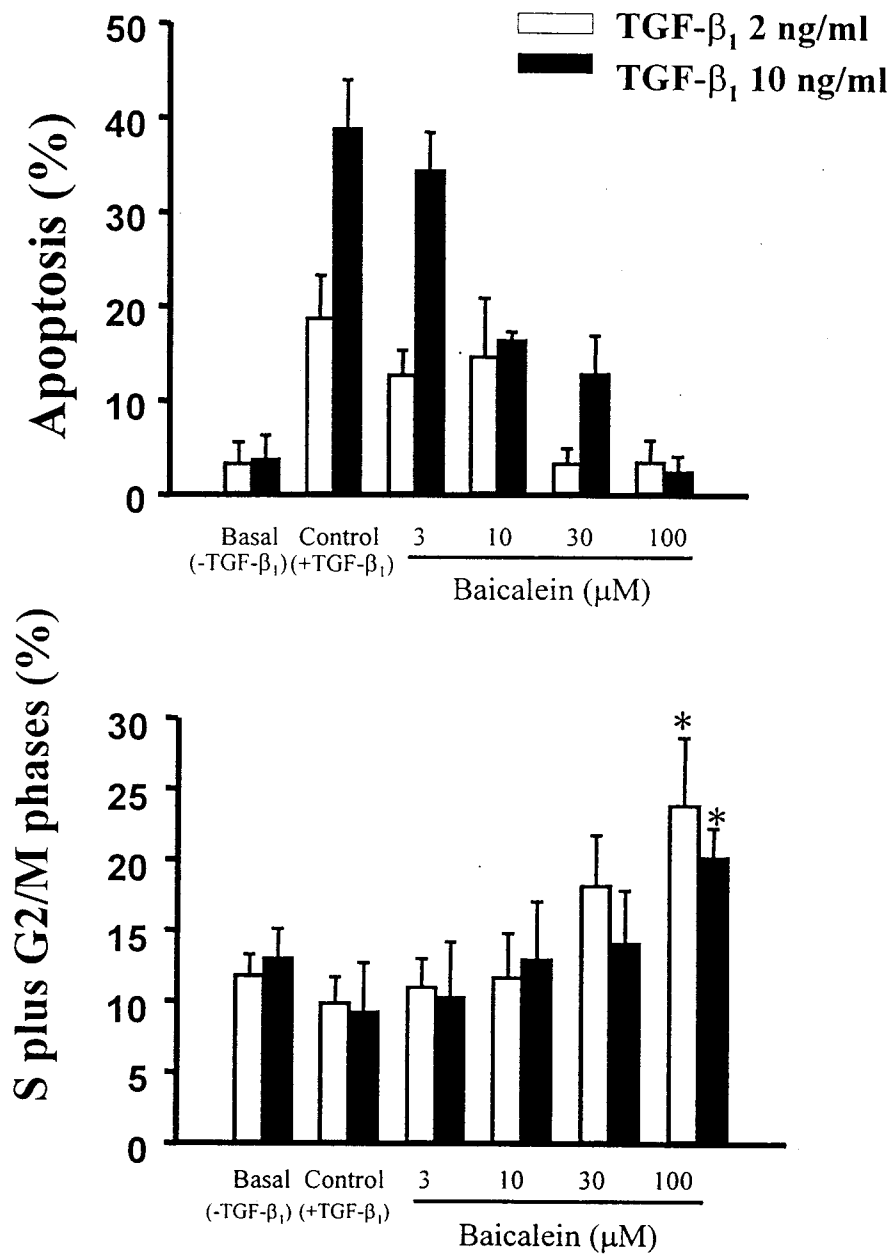


Fig. 2-1. Baicalein 對 TGF-β₁ 引起的細胞凋亡作用之影響. Cells were preincubated in the absence or presence of several concentrations of baicalein for 30 min, and then TGF-β₁ was added to induce cell apoptosis. The apoptosis was measured using flow cytometric method. Data are expressed as means ± SEM of five determinations.

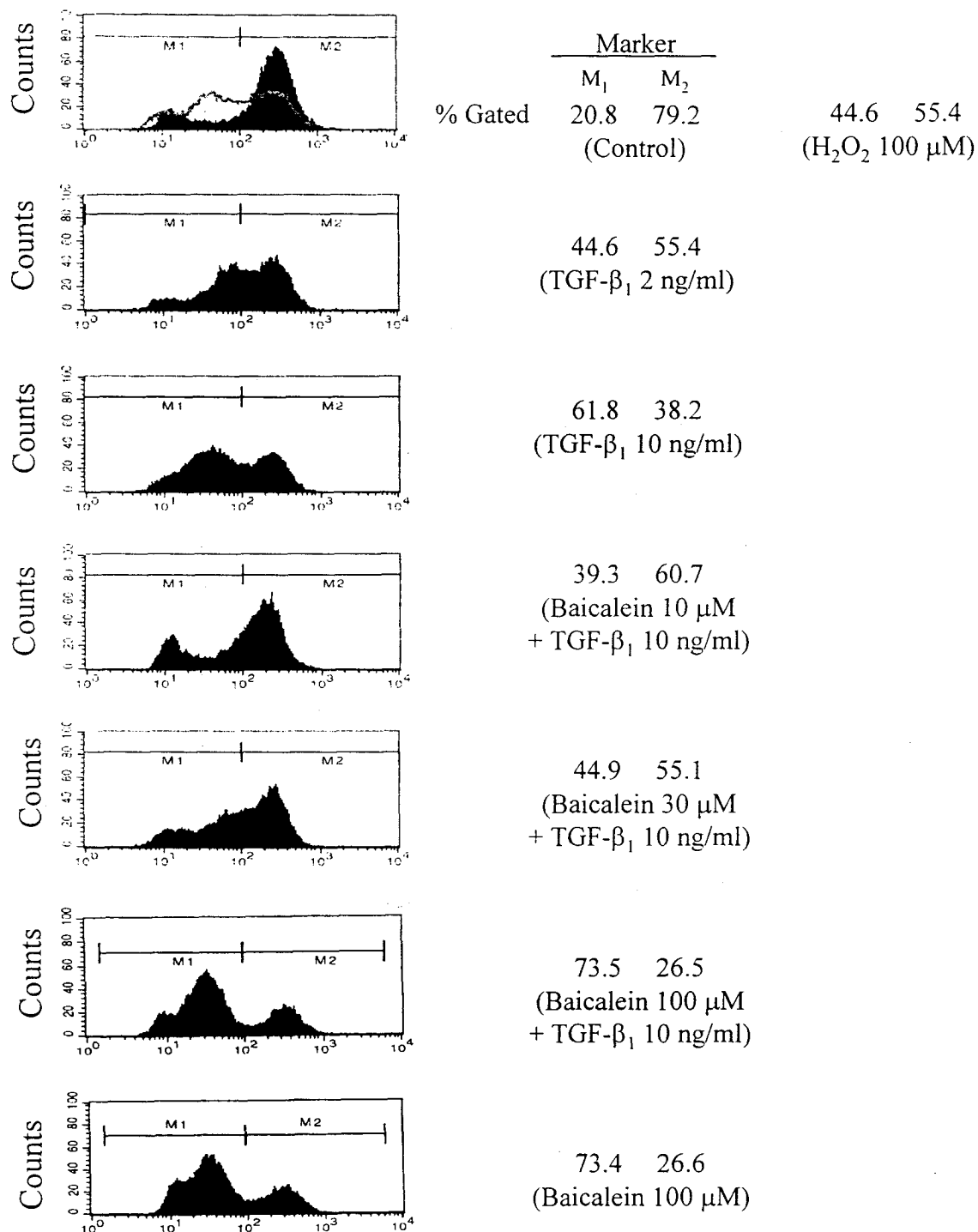


Fig. 2-2. Baicalein對TGF-β₁引起的粒腺體膜電位 ($\Delta\psi_m$)改變之影響. Cells were pretreated with or without baicalein, and then vehicle or TGF-β₁ was added to induce the changes of $\Delta\psi_m$ as described in Experimental Procedures.

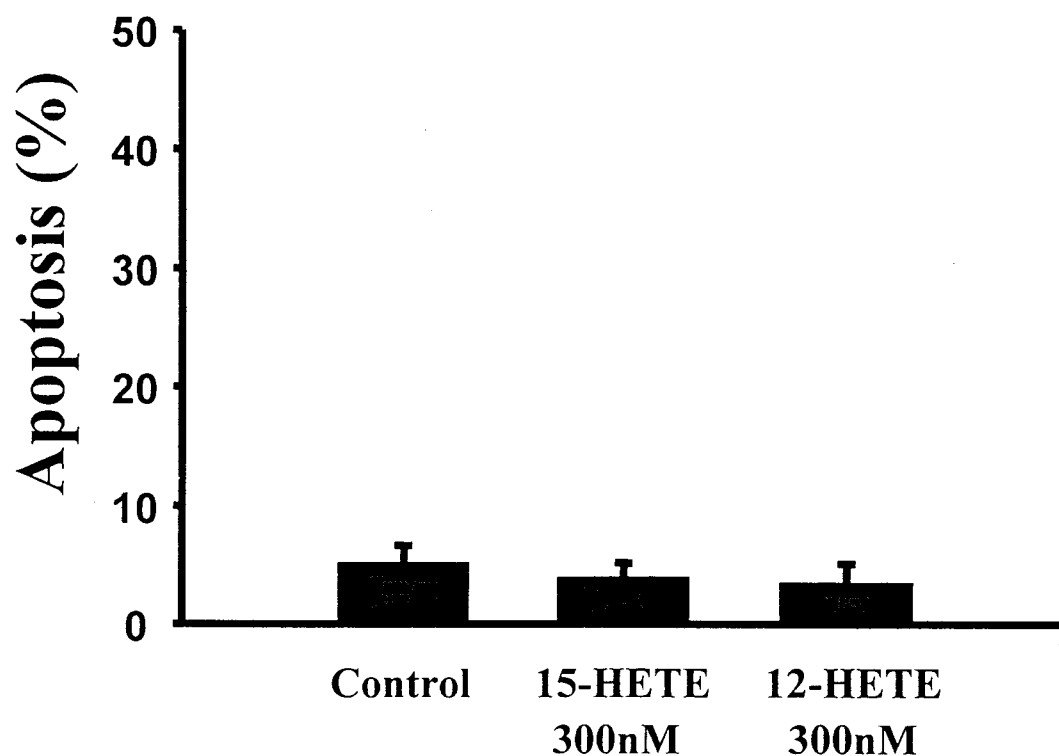
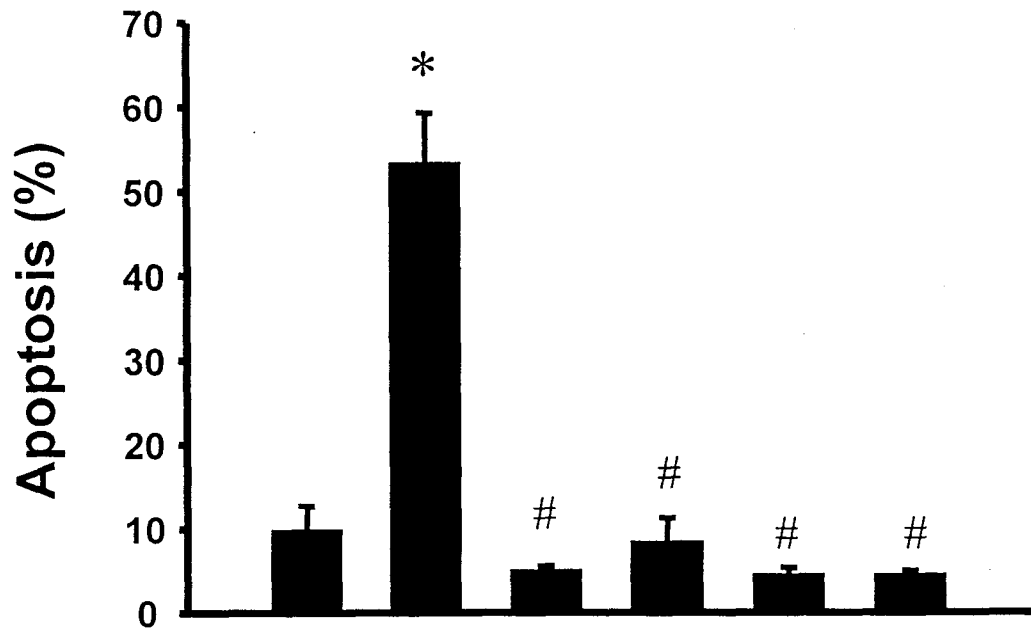


Fig. 2-3. 15-HETE 與 12-HETE 對於細胞凋亡之作用. Cells were preincubated in the absence or presence of 12-HETE or 15-HETE to induce apoptotic response. The apoptosis was assayed using flow cytometric method as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means $\pm$ SEM of three determinations.



TGF- β_1 (10 ng/ml)	-	+	+	+	+	+
Baicalein (100 μ M)	-	-	+	+	+	+
α -Hydroxyfarnesyl-phosphonic acid (10 μ M)	-	-	-	+	-	-
PD098059 (30 μ M)	-	-	-	-	+	-
Wortmannin (1 μ M)	-	-	-	-	-	+

Fig. 2-4. 各種抑制劑對 baicalein 抑制細胞凋亡作用之影響
Cells were pretreated with or without α -hydroxyfarnesyl-phosphonic acid or PD098059 or wortmannin, and then TGF- β_1 alone or TGF- β_1 plus baicalein was added to induce apoptotic/antiapoptotic effect. The apoptosis was determined using flow cytometric method as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means $\pm$ SEM of four determinations. * P < 0.05 and # P < 0.05 as compared with control and TGF- β_1 control, respectively.

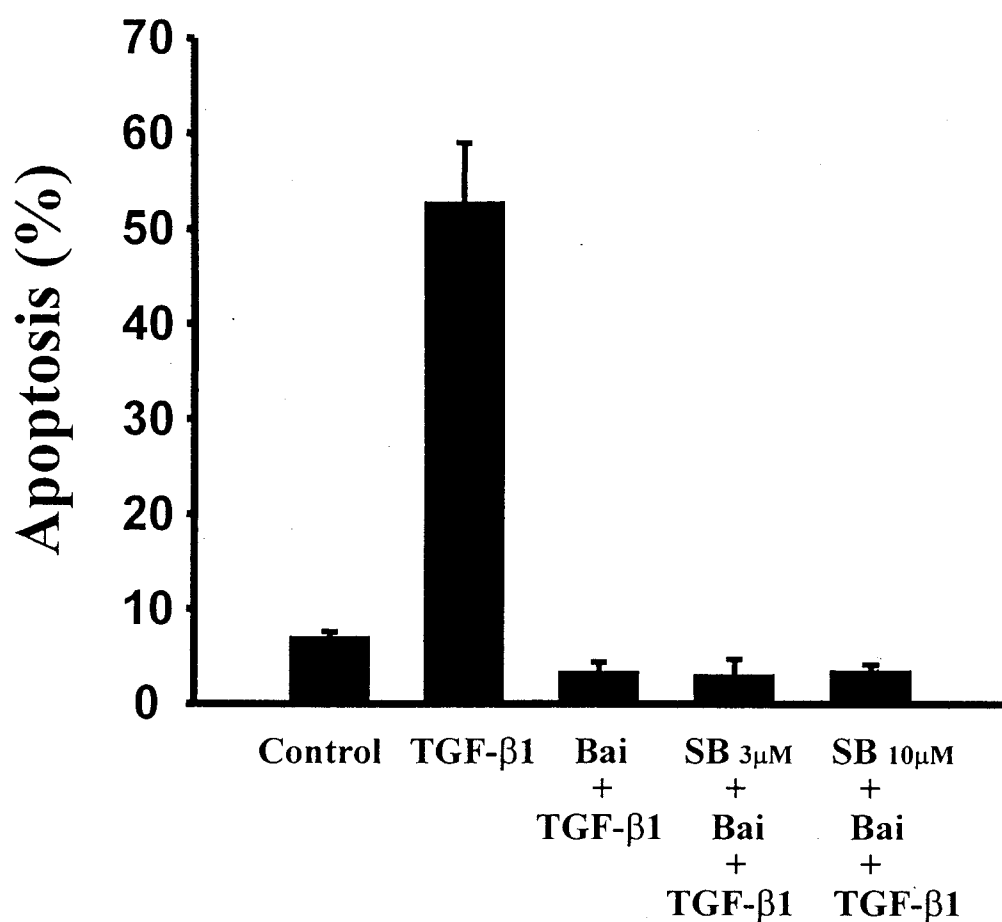


Fig. 2-5. SB203580 (SB) 對於baicalein抑制細胞凋亡作用之影響. Cells were pretreated with or without SB203580, and then TGF- β_1 alone or TGF- β_1 plus baicalein was added to induce apoptotic/antiapoptotic effect. The apoptosis was determined using flow cytometric method as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means $\pm$ SEM of four determinations.

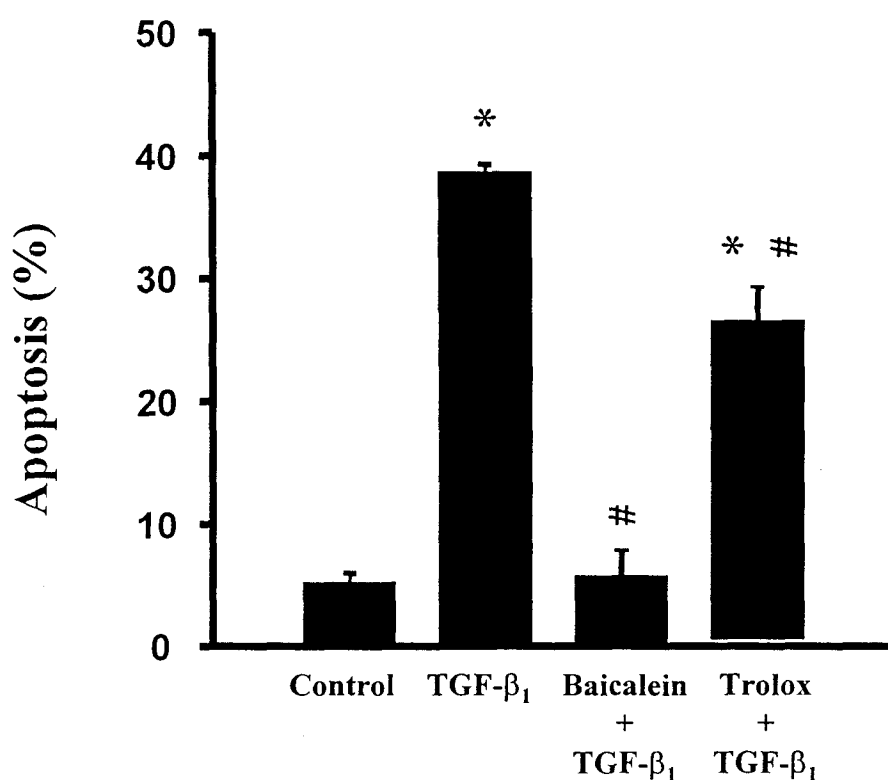


Fig. 2-6. Baicalein 與 trolox 對於 TGF- β_1 引起細胞凋亡之作用. Cells were pretreated with or without baicalein or trolox (3mM), and then TGF- β_1 was added to induce the cell apoptosis. The cell apoptosis was determined using flow cytometric method as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means $\pm$ SEM of three determinations. * $P < 0.05$ and # $P < 0.05$ as compared with control and TGF- β_1 control, respectively.

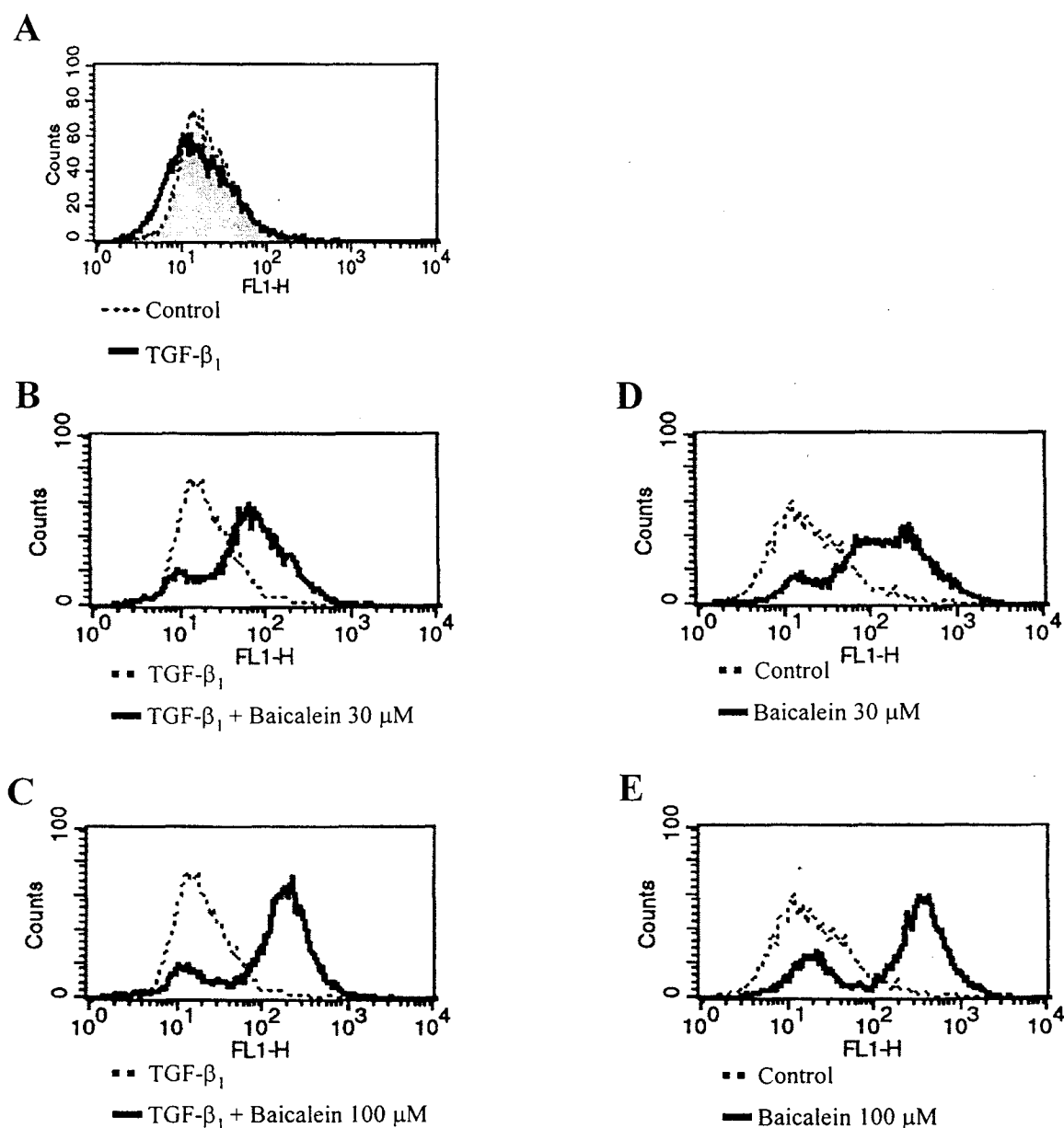
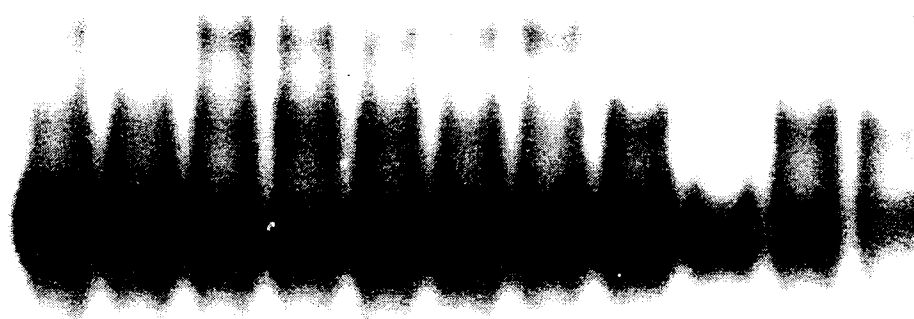


Fig. 2-7. TGF- β_1 與 baicalein 促進細胞凋亡作用之影響。 Cells were incubated in the absence or presence of TGF- β_1 or baicalein or both for 4hr, and then the H_2O_2 formation was detected using DCFH-DA fluorescent probe as described in Experimental Procedures.

NF- κ B ➔



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Lane 1: Control	Lane 5 : PDTC+Bai+TGF	Lane 9 : NF-κB competitor
Lane 2: TGF	Lane 6 : Cat	Lane 10: P65 Ab
Lane 3: Bai	Lane 7 : Cat+Bai	Lane 11: P50 Ab
Lane 4: Bai+TGF	Lane 8 : Cat+Bai+TGF	

Fig. 2-8. 測量轉錄因子 NF- κ B 的活性. Cells were incubated in the absence or presence of the indicated agents, and then cells were prepared and nuclei were extracted for the detection of NF- κ B nuclear translocation by EMSA technique as described in Experimental Procedures. (Bai, baicalein; Cat, catalase; TGF, TGF- β_1)

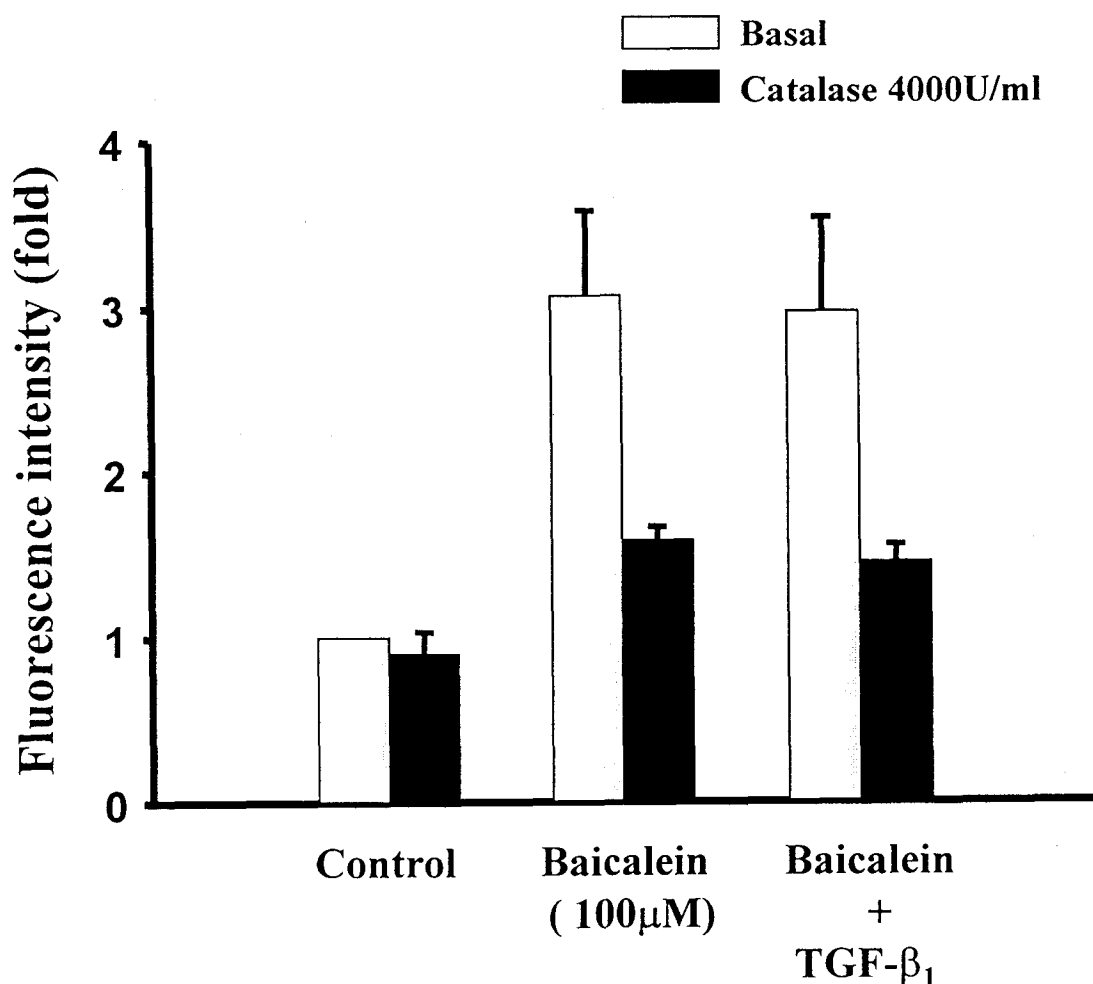


Fig. 2-9. Catalase 對於細胞內過氧化氫形成之作用. Cells were incubated with or without catalase for 1 hr, and then vehicle, baicalein alone or TGF- β_1 plus baicalein was added. The H_2O_2 formation was detected using DCFH-DA fluorescent probe as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means $\pm$ SEM of three determinations.

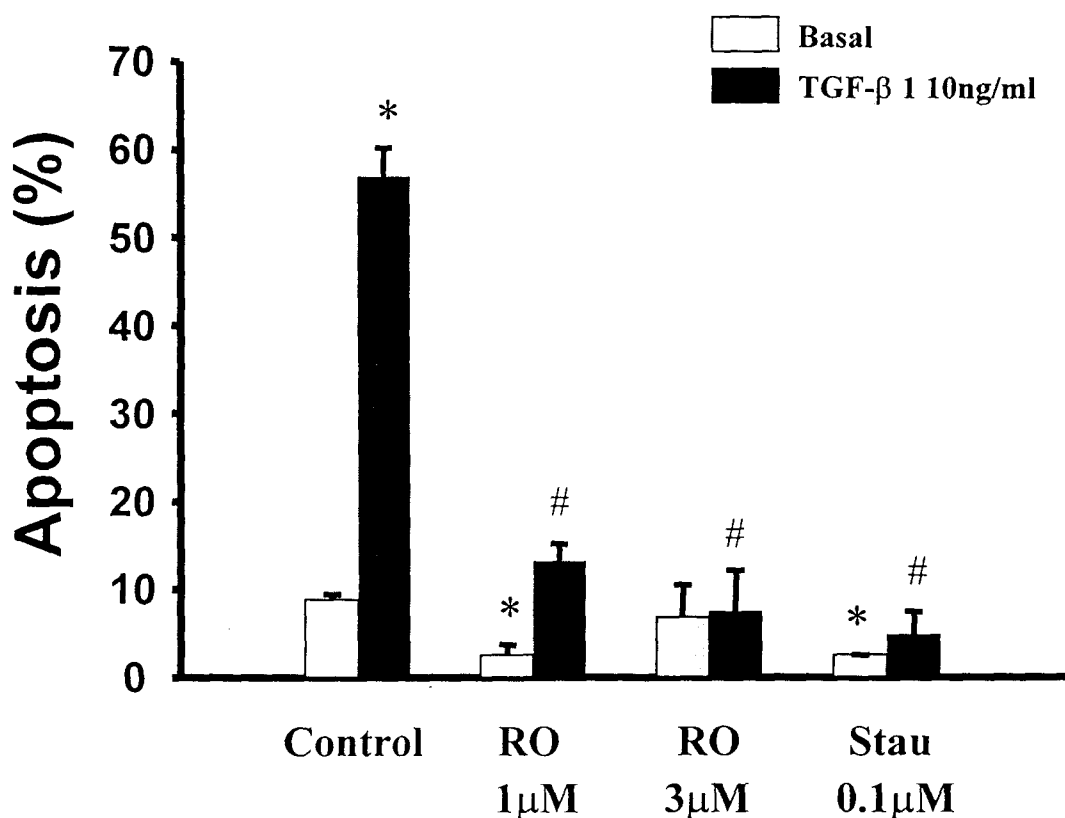


Fig. 2-10. PKC 抑制劑對於TGF- β_1 所引起的細胞凋亡作用之影響. Cells were preincubated in the absence or presence of the indicated agent (RO, Ro 318220; Stau, staurosporine), and then TGF- β_1 was added to induce the apoptotic response. The cell apoptosis was detected using flow cytometric method as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means $\pm$ SEM of three determinations. * $P < 0.05$ and # $P < 0.05$ as compared with control and TGF- β_1 control, respectively.

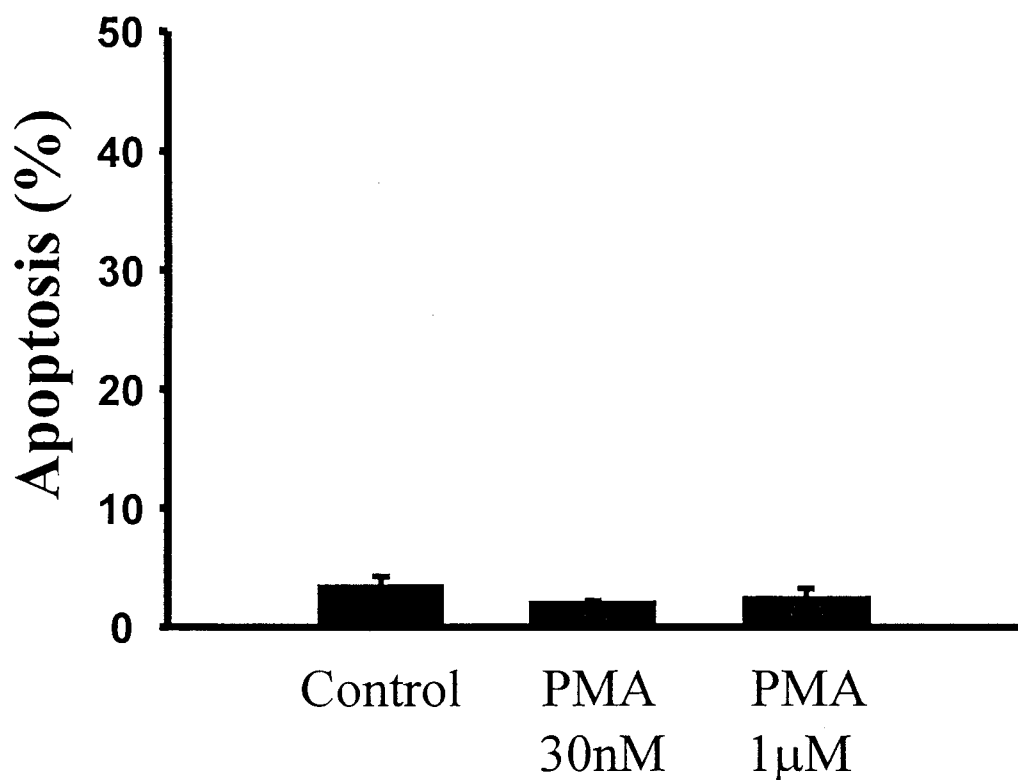


Fig. 2-11. PMA 在 Hep3B 中關於細胞凋亡之作用. Cells were treated with or without PMA for 24hr and then harvested for the detection of apoptosis using flow cytometric method as described as means $\pm$ SEM of three determinations.

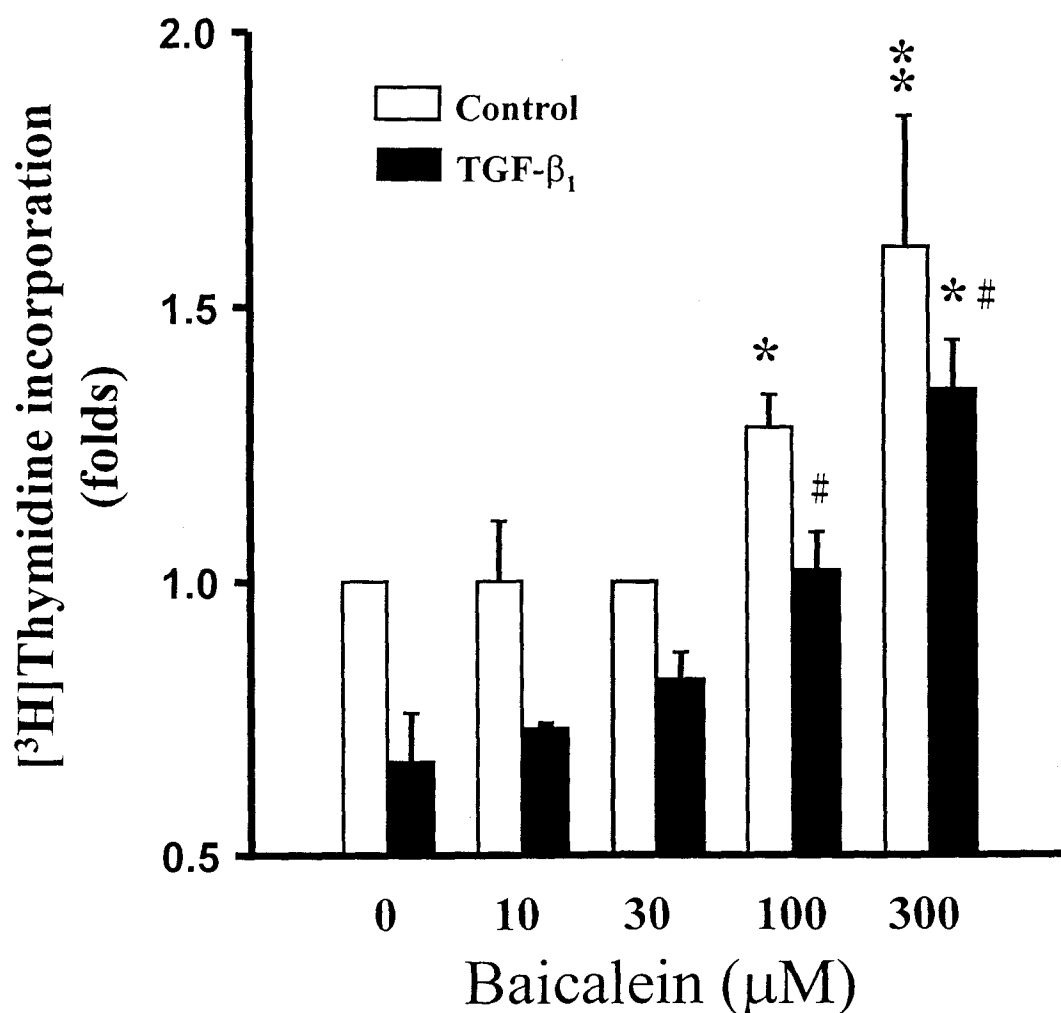


Fig. 2-12. Baicalein 促進DNA合成的作用. After the pretreatment of cells with or without baicalein for 30 min, vehicle or TGF- β_1 was added for 18 hr, and then [^3H]-thymidine was added to the cells for another 6 hr for the measurement of DNA synthesis as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means $\pm$ SEM of three determinations. * $P < 0.05$ and # $P < 0.05$ as compared with control and TGF- β_1 control, respectively.

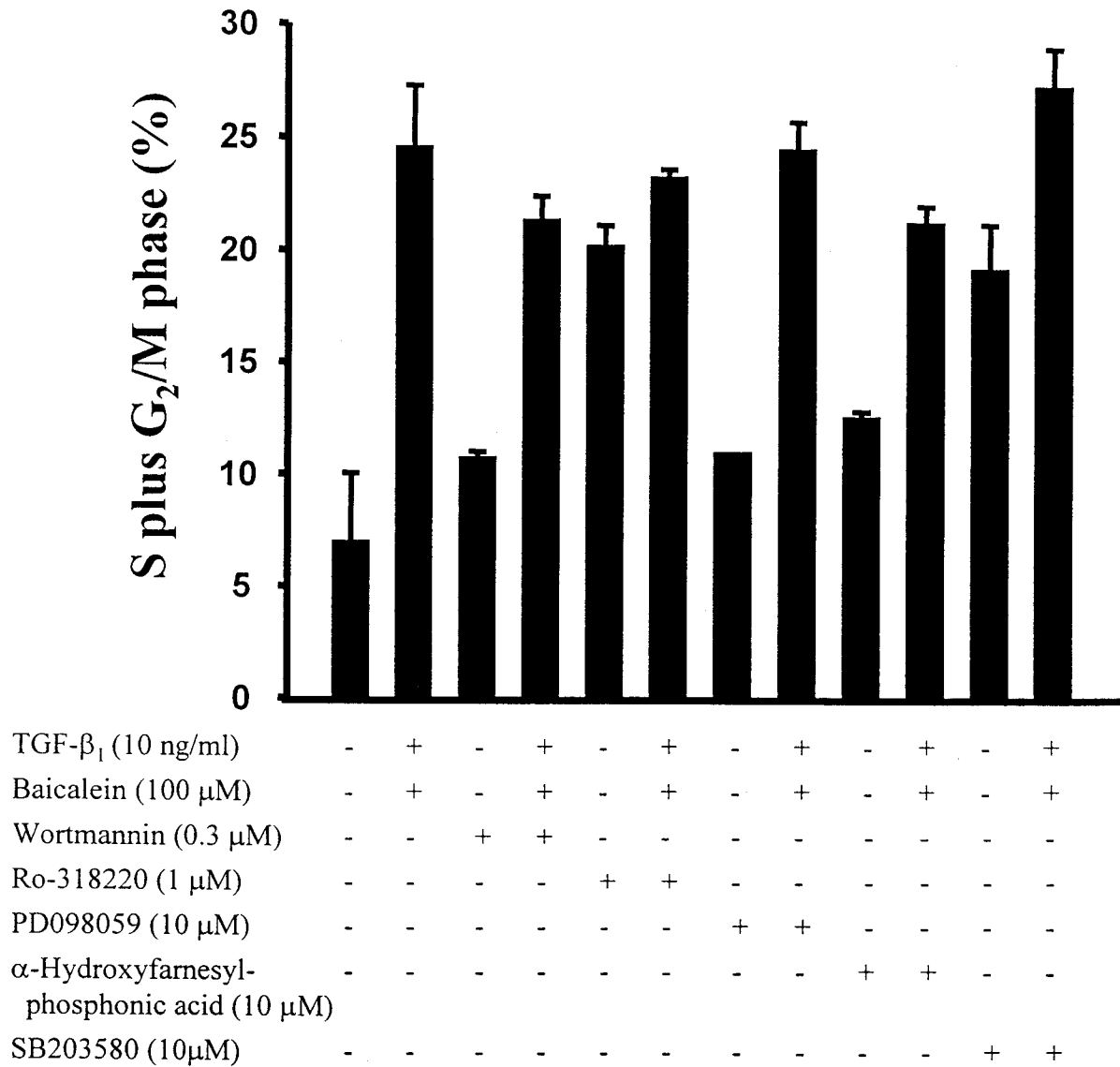


Fig. 2-13 各種訊息傳遞抑制劑對於baicalein在TGF- β_1 細胞週期的調控作用. After the pretreatment of cells with or without the indicated agents for 30min, TGF- β_1 plus baicalein were added for 24hr and the cell cycle progression was measured using flow cytometric method as described in Experimental Procedures. Data are expressed as means $\pm$ SEM of three determinations.

國立台灣大學醫學院
藥理學研究所

TEL: 886-2-23123456 EXT.8310
FAX: 886-2-23221742

PHARMACOLOGICAL INSTITUTE
COLLEGE OF MEDICINE
NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY

台北市仁愛路一段一號
NO.1, JEN-AI RD., SEC. 1,
TAIPEI, TAIWAN

謝謝審查委員之意見，已將研究計畫成果報告依提供意見修改，並回覆如下：

一、資料分析

1. Fig. 1-2, Fig. 1-3 及 Fig.1-5 主要是看作用之劑量-反應關係，不一定要統計比較。
2. Fig. 1-6 之 Alisol B 與 saikosaponin-d 二組均無加 TGF- β_1 ，因此非漏寫，統計亦無錯誤。
3. Fig. 2-2 之 H₂O₂ 圖譜為第一圖之虛線部份。
4. Fig. 2-4 之第 4、5、6 組與第 3 組比較無差異，怕圖太複雜，只寫在 text 中。
5. Fig. 2-6 之統計說明已補填上。
6. 已修改。
7. 本論文統計意義均只選一項($p < 0.05$)為基準。

二、其它

1. 研究重點著重在 baicalein，有關 gentiopicoside 之作用機轉是否相同，有待再進一步探討。
2. 已將二年成果及摘要合併。