

篩選與探討多種天然植物萃取物對小鼠巨噬細胞之抗發炎作用

許貴媿、蔡明勳

E-mail: 364812@mail.dyu.edu.tw

摘要

發炎是身體的防禦機制，也是痊癒的必經過程，但如果演變成持續性地發炎，不但使健康器官或組織受損，甚至會促進異常細胞增生，導致許多疾病產生。已有許多科學研究指出現代人常見的文明病都跟慢性發炎有關，因此若能預防或治療發炎，就可以免除罹患這些文明病。由於抗發炎藥物通常毒性高、副作用大，所以抗發炎植物萃取物的開發已成為當前醫藥研發的主要選擇之一。本研究以實驗室有的21種中草藥或植物之乙醇萃取物為研究標的，利用脂多醣(LPS)活化RAW264.7小鼠巨噬細胞作為發炎實驗模式，以抑制一氧化氮(NO)生成作為初步篩選具有抗發炎活性的依據。結果顯示21種乙醇萃取物中，在濃度250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時以五味子、艾草、芋頭葉及高良薑抑制NO效果最佳，因此以這4種萃取物做進一步研究，分析萃取物在不同濃度(6.25~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)下對LPS誘導巨噬細胞之抗發炎效果。五味子與芋頭葉萃取物皆可促進抗發炎激素 - Interleukin-10 (IL-10)的生成、抑制LPS誘導的促發炎激素Tumor Necrosis Factor- (TNF-)及NO產量，並可藉由降低LPS誘導的Cyclooxygenase-2 (COX-2)酵素表現來減少誘導發炎反應發生之Prostaglandin E2 (PGE2)的分泌量。艾草萃取物可抑制LPS誘導NO的產量，並可藉由抑制LPS誘導COX-2酵素表現以減少PGE2的產量，但艾草萃取物無法促進IL-10的分泌，亦無抑制LPS誘導之TNF- 分泌。高良薑萃取物可促進抗發炎激素IL-10的生成，並抑制NO與PGE2的分泌，但高良薑萃取物無法抑制LPS誘導之TNF- 分泌，且對COX-2酵素表現不具調節作用。綜合以上結果，可以確定五味子、艾草、芋頭葉與高良薑之乙醇萃取物對LPS誘導巨噬細胞之發炎模式具有抗發炎作用，其中以五味子與芋頭葉萃取物的作用機制較明確。這4種萃取物有潛力開發為抗發炎藥物或保健食品，而其有效的使用濃度與抗發炎的機制需要進一步研究。

關鍵詞：RAW264.7小鼠巨噬細胞、抗發炎、中草藥與植物萃取物

目錄

封面內頁	簽名頁	中文摘要	iii	英文摘要	v	誌謝	vii	目錄	viii	圖目錄	xi	表目錄	xiv	1.緒論	1	2.文獻回顧	3	2.1發炎與巨噬細胞	3	2.2脂多醣(LPS)	4	2.3 NO與NO合成?(NO synthases, NOSs)	7	2.4腫瘤壞死因子- (TNF-)	9	2.5前列腺素E2 (PGE2)與環氧合?(COX)	10	2.6介白素-10 (IL-10)	11	2.7植物萃取液介紹	12	2.7.1五味子	12	2.7.2艾草	14	2.7.3芋頭葉	15	2.7.4高良薑	16	3.材料與方法	18	3.1實驗材料	18	3.1.1植物萃取液	18	3.1.2細胞株	18	3.1.3藥品	19	3.1.4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit	21	3.1.5抗體	21	3.1.6其它耗材及設備	22	3.2細胞培養與保存	22	3.2.1以粉末配製DMEM培養基(以1 L為例)	22	3.2.2 RAW264.7巨噬細胞株之培養	23	3.2.3 RAW264.7巨噬細胞株之保存	23	3.3細胞存活率分析	24	3.3.1 3-(4,5-cimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay	24	3.4發炎反應相關檢測分析	24	3.4.1樣品製備	24	3.4.2亞硝酸鹽測定(Nitrite assay)	25	3.4.3 IL-10與TNF- 測定	26	3.4.4 PGE2測定	27	3.5偵測COX-2蛋白表現量	28	3.5.1細胞全蛋白萃取液製備	28	3.5.2蛋白質濃度測定	29	3.5.3以SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)進行蛋白質電泳分析	30	3.5.4轉印	32	3.5.5蛋白質免疫偵測(西方雜合法)	33	3.6統計分析	33	4.結果與討論	34	4.1 73種乙醇萃取物對LPS刺激巨噬細胞分泌NO之影響	34	4.2不同濃度的五味子萃取物對巨噬細胞發炎反應之影響	36	4.3不同濃度的艾草萃取物對巨噬細胞發炎反應之影響	44	4.4不同濃度的芋頭葉萃取物對巨噬細胞發炎反應之影響	52	4.5不同濃度的高良薑萃取物對巨噬細胞發炎反應之影響	60	5.結論	68	參考文獻	73	附錄	79	圖目錄		圖2.1 LPS在格蘭氏陰性菌的位置和結構圖	5	圖2.2巨噬細胞經由LPS活化調控發炎相關傳遞路徑與基因之途徑	5	圖2.3巨噬細胞分泌的各種細胞激素對其他免疫相關細胞的交互作用影響	6	圖2.4五味子果實照片	13	圖2.5艾草植株照片	14	圖2.6芋頭植株及其葉子照片	15	圖2.7高良薑根莖切片的照片	17	圖3.1三明治轉漬夾示意圖	32	圖4.1不同濃度的五味子萃取物對RAW264.7細胞存活率之影響	38	圖4.2不同濃度的五味子萃取物對LPS誘導RAW264.7細胞分泌NO之影響	39	圖4.3不同濃度的五味子萃取物對LPS誘導RAW264.7細胞分泌IL-10之影響	40	圖4.4不同濃度的五味子萃取物對LPS誘導RAW264.7細胞分泌TNF- 之影響	41	圖4.5不同濃度的五味子萃取物對LPS誘導RAW264.7細胞分泌PGE2之影響	42	圖4.6不同濃度的五味子萃取物對LPS誘導RAW264.7細胞表現COX-2蛋白質之影響	43	圖4.7不同濃度的艾草萃取物對RAW264.7細胞存活率之影響	46	圖4.8不同濃度的艾草萃取物對LPS誘導RAW264.7細胞分泌NO之影響	47	圖4.9不同濃度的艾草萃取物對LPS誘導RAW264.7細胞分泌IL-10之影響	48	圖4.10不同濃度的艾草萃取物對LPS誘導RAW264.7細胞分泌TNF- 之影響	49	圖4.11不同濃度的艾草萃取物對LPS誘導RAW264.7細胞分泌PGE2之影響	50	圖4.12不同濃度的艾草萃取物對LPS誘導RAW264.7細胞表現COX-2蛋白質之影響	51	圖4.13不同濃度的芋頭葉萃取物對RAW264.7細胞存活率之影響	54	圖4.14不同濃度的芋頭葉萃取物對LPS誘導RAW264.7細胞分泌NO之影響	55	圖4.15不同濃度的芋頭葉萃取物對LPS誘導RAW264.7細胞分泌IL-10之影響	56	圖4.16不同濃度的芋頭葉萃取物對LPS誘導RAW264.7細胞分泌TNF- 之影響	57	圖4.17不同濃度的芋頭葉萃取物對LPS誘導RAW264.7細胞分泌PGE2之影響	58	圖4.18不同濃度的	
------	-----	------	-----	------	---	----	-----	----	------	-----	----	-----	-----	------	---	--------	---	------------	---	-------------	---	----------------------------------	---	--------------------	---	----------------------------	----	-------------------	----	------------	----	----------	----	---------	----	----------	----	----------	----	---------	----	---------	----	------------	----	----------	----	---------	----	---	----	---------	----	--------------	----	------------	----	---------------------------	----	------------------------	----	------------------------	----	------------	----	---	----	---------------	----	-----------	----	----------------------------	----	---------------------	----	--------------	----	-----------------	----	-----------------	----	--------------	----	--	----	---------	----	---------------------	----	---------	----	---------	----	-------------------------------	----	----------------------------	----	---------------------------	----	----------------------------	----	----------------------------	----	------	----	------	----	----	----	-----	--	------------------------	---	---------------------------------	---	-----------------------------------	---	-------------	----	------------	----	----------------	----	----------------	----	---------------	----	----------------------------------	----	--	----	---	----	---	----	--	----	--	----	---------------------------------	----	---------------------------------------	----	--	----	---	----	--	----	--	----	-----------------------------------	----	---	----	--	----	--	----	---	----	------------	--

芋頭葉萃取物對LPS誘導RAW264.7細胞表現COX-2蛋白質之影響 59 圖4.19不同濃度的高良薑萃取物對RAW264.7細胞存活率之影響 62 圖4.20不同濃度的高良薑萃取物對LPS誘導RAW264.7細胞分泌NO之影響 63 圖4.21不同濃度的高良薑萃取物對LPS誘導RAW264.7細胞分泌IL-10之影響 64 圖4.22不同濃度的高良薑萃取物對LPS誘導RAW264.7細胞分泌TNF- α 之影響 65 圖4.23不同濃度的高良薑萃取物對LPS誘導RAW264.7細胞分泌PGE2之影響 66 圖4.24不同濃度的高良薑萃取物對LPS誘導RAW264.7細胞表現COX-2蛋白質之影響 67 圖5.1五味子與芋頭葉萃取物之抗發炎可能機制示意圖 70 圖5.2艾草萃取物之抗發炎可能機制示意圖 71 圖5.3高良薑萃取物之抗發炎可能機制示意圖 72 ? 表目錄 表3.1 SDS-PAGE配製比例 31 表4.1初始NO抑制率達90%以上的萃取物之NO抑制率統計 35

參考文獻

- 1.弓德?, 何衍彪、谷會、武?霞、王松標、詹儒林。2010。20種植物提取物對芒果炭疽病菌的抑制作用研究。安徽農業科學 :5149-5151
- 2.王蘭、張麗娟、張芳?、樊錦慧。2010。?柏、苦參、陳皮、高良薑等中藥材的體外防霉活性研究。中國衛生檢驗雜誌 20 (8) :1942-1943.
- 3.江睿玲、謝明村、周泰廷、郭槐秋、張永勳。1997。五味子中schizandrin及gomisin A定量及抗肝損傷之研究。中醫藥雜誌 8 (3) :155-164.
- 4.吳秀慧。2004。Leflunomide類似物之合與生物活性:第25-26頁。國防醫學院碩士論文。台北。
- 5.巫玉琳。2008。香菜萃出物對脂多醣體誘發小鼠RAW264.7巨噬細胞發炎反應之探討:第4-10頁。中山醫學大學碩士論文。台中。
- 6.林旻儒、杜宇晨、謝旻儒、郭宗甫。2011。五味子的藥物療效介紹。中華傳統獸醫學會會刊 15 (2) :51-60.
- 7.林興中。1992。類固醇在基層醫療之使用。臺灣醫界 35 (10) :68-76.
- 8.洪毓珮。2007。中醫治病最愛用的植物--艾草。中國醫訊 53:62-64.
- 9.范少怡、詹國靖、朱燕華。2010。五味子萃取物對倉鼠血脂質及肝臟脂質之影響。臺灣農業化學與食品科學 48 (4) :189-196.
- 10.徐雅芬。2006。全球植物藥產業概況及市場分析。農業生技產業季刊 5:1-5.
- 11.張倩芝、蔡明招、盧志毅。2006。高良薑與大高薑姜精油中活性物質的比較。中草藥 37 (8) :1151-1152.
- 12.陳婉吟。2006。Gamma-次亞麻油酸與亞麻油酸對脂多醣體誘發小鼠RAW264.7巨噬細胞發炎反應之效應及相關機轉:第4-8頁。中山醫學大學碩士論文。台中。
- 13.陳素靜。2007。非類固醇類抗發炎止痛藥 在創傷治療扮演的角色。中國醫訊 49:58-59.
- 14.陳艷芬、江濤、唐春萍、馮毅凡、楊超燕。2009。高良薑總?酮抗發炎?痛作用的實驗研究。廣東藥學院學報 25 (2) :188-191.
- 15.曾堯人、顏兆熊。2010。老人慢性疼痛之藥物治療。家庭醫學與基層醫療 25 (2) :44-52.
- 16.黃智生。2008。發炎反應 - 常見文明病的始作俑者。科學發展 422:6-10.
- 17.蔡佩珊。2003。Ccy1a-c1影響巨噬細胞株RAW264.7生成一氧化氮的研究:第8-10頁。中山醫學大學碩士論文。台中。
- 18.鄭文玲。2003。共軛亞麻油酸在脂多醣體誘發RAW264.7巨噬細胞發炎反應相關事件之影響:第19-22頁。中山醫學大學碩士論文。台中。
- 19.薛守英。2006。硫磺菌固體發酵及其生物活性之研究:第10-11頁。南台科技大學碩士論文。台南。
- 20.謝世川。2007。魚針草(anisomeles indica)抗發炎活性成分之分離純化探討:第12-19頁。朝陽科技大學碩士論文。台中。
- 21.謝廷芳、黃晉興、謝麗娟、胡敏夫、柯文雄。2005。植物萃取液對植物病原真菌之抑菌效果。植物病理學會刊 14 (1)。
- 22.謝強敏、卞如瀛、楊秋火、唐法娣、王硯。1999a。艾葉油的呼吸系統藥理研究-I:支氣管擴張、鎮咳和祛痰作用。中國現代應用藥學 16 (4) :16-19.
- 23.謝強敏、唐法娣、王硯、楊秋火、卞如瀛。1999b。艾葉油的呼吸系統藥理研究-II:抗過敏作用。中國現代應用藥學 16 (5) :3-7.
- 24.醫學全在線 (2012a)。芋葉。檢索自: http://www.med126.com/pharm/2009/20090113051817_91394.shtml
- 25.醫學全在線 (2012b)。高良薑。檢索自: http://www.med126.com/mingzu/2009/20090512114749_152929.shtml
- 26.魏國會、杜梅素、宋寧、岳春景。2010。艾葉油的平喘作用研究——小鼠卵蛋白復制法。時珍國醫國藥 21 (1) :86-87.
- 27.Dong, Z., and I.J. Fidler. 2002. Macrophages. In Encyclopedia of Cancer (Second Edition). R.B. Editor-in-Chief: Joseph, editor. Academic Press, New York. 77-88.
- 28.Duan, W., J. Zhou, S. Zhang, K. Zhao, L. Zhao, K. Ogata, T. Sakaue, A. Mori, and T. Wei. 2011. ESeroS-GS modulates lipopolysaccharide-induced macrophage activation by impairing the assembly of TLR-4 complexes in lipid rafts. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 1813:772-783.
- 29.Gordon, S. 1998. Macrophage Activation. In Encyclopedia of Immunology (Second Edition). J.D. Editor-in-Chief: Peter, editor. Elsevier, Oxford. 1642-1649.
- 30.Hammes, L.S., R.R. Tekmal, P. Naud, M.I. Edelweiss, N. Kirma, P.T. Valente, K.J. Syrjanen, and J.S. Cunha-Filho. 2007. Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression—Clinicopathological correlation. Gynecologic Oncology. 105:157-165.
- 31.Handa, S.S., A. Sharma, and K.K. Chakraborti. 1988. Natural products and plants as liver protecting drugs. Fitoterapia. 21:307-345.
- 32.Hikino, H., Y. Kiso, H. Taguchi, and Y. Ikeya. 1984. Antihepatotoxic actions of lignoids from Schizandra chinensis Fruits. Planta Medica. 50:213-218.
- 33.Huang, Y.H., P.S. Tsai, and C.J. Huang. 2008. Bupivacaine inhibits COX-2 expression, PGE2, and cytokine production in endotoxin-activated macrophages. Acta anaesthesiologica Scandinavica. 52:530-535.
- 34.Kang, S.-M., K.-N. Kim, S.-H. Lee, G. Ahn, S.-H. Cha, A.-D. Kim, X.-D. Yang, M.-C. Kang, and Y.-J. Jeon. 2011. Anti-inflammatory activity of polysaccharide purified from AMG-assistant extract of Ecklonia cava in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Carbohydrate Polymers. 85:80-85.
- 35.Kiso, Y., M. Tohkin, H. Hikino, Y. Ikeya, and H. Taguchi. 1985. Mechanism of antihepatotoxic activity of wuweizisu C and gomisin A1. Planta Medica. 51:331-334.
- 36.Kou, X., S. Qi, W. Dai, L. Luo, and Z. Yin. 2011. Arctigenin inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS expression in RAW264.7 cells through suppressing JAK-STAT signal pathway. International Immunopharmacology. 11:1095-1102.
- 37.Laskin, D.L., C.R. Gardner, and J.D. Laskin. 2010. 5.06 - Phagocytes. In Comprehensive Toxicology (Second Edition). A.M. Editor-in-Chief: Charlene, editor. Elsevier, Oxford. 133-153.
- 38.Oh, B.K., J. Mun, H.W. Seo, S.Y. Ryu, Y.S. Kim, B.H. Lee, and K.-S. Oh. 2011. Euonymus alatus extract attenuates LPS-induced NF- κ B activation via IKK inhibition in RAW 264.7 cells. Journal of Ethnopharmacology. 134:288-293.
- 39.Park, C.M., J.Y. Park, K.H. Noh, J.H. Shin, and Y.S. Song. 2011. Taraxacum officinale Weber extracts inhibit LPS-induced oxidative stress and nitric oxide production via the NF- κ B modulation in RAW 264.7 cells. Journal of Ethnopharmacology. 133:834-842.
- 40.Park-Min, K.H., T.T. Antoniv, and L.B. Ivashkiv. 2005. Regulation of macrophage

phenotype by long-term exposure to IL-10. *Immunobiology*. 210:77-86. 41.Ramaiah, S.K., and R.E. Rose. 2010. 9.08 - Endotoxin-Induced Hepatotoxicity. In *Comprehensive Toxicology (Second Edition)*. A.M. Editor-in-Chief: Charlene, editor. Elsevier, Oxford. 613-625. 42.Sautebin, L. 2000. Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy. *Fitoterapia*. 71, Supplement 1:S48-S57. 43.Squadrito, M.L., and M. De Palma. 2011. Macrophage regulation of tumor angiogenesis: Implications for cancer therapy. *Molecular Aspects of Medicine*. 32:123-145. 44.Stachowska, E., M. Ba?kiewicz-Masiuk, V. Dzieziejko, G. Adler, J. Bober, B. Machali?ski, and D. Chlubek. 2007. LIPIDS. In *Conjugated Linoleic Acids Can Change Phagocytosis of Human Monocytes/Macrophages by Reduction in Cox-2 Expression*. Vol. 42. 707-716. 45.Xiao, C., J. Li, X. Dong, X. He, X. Niu, C. Liu, G. Zhong, R. Bauer, D. Yang, and A. Lu. 2011. Anti-oxidative and TNF-[alpha] suppressive activities of puerarin derivative (4AC) in RAW264.7 cells and collagen-induced arthritic rats. *European Journal of Pharmacology*. 666:242-250. 46.Yu, T., Y.J. Lee, H.-J. Jang, A.R. Kim, S. Hong, T.W. Kim, M.-Y. Kim, J. Lee, Y.G. Lee, and J.Y. Cho. 2011. Anti-inflammatory activity of *Sorbus commixta* water extract and its molecular inhibitory mechanism. *Journal of Ethnopharmacology*. 134:493-500.