

中草藥對於促發炎細胞激素生成之影響

梁佳玟 賴怡君 朱燕華

食品工業發展研究所

新竹，台灣

(2004年9月27日受理，2004年11月25日接受刊載)

本研究主要以小鼠巨噬細胞株 J774A.1 及初代腹腔細胞為實驗模式，探討九種中草藥萃取物對脂多醣類 lipopolysaccharide (LPS) 所誘發之促發炎細胞激素 TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β 生成的影響。首先以 MTS 分析法進行不同濃度中草藥萃取物在 LPS 存在下對小鼠巨噬細胞株 J774A.1 及初代腹腔細胞存活率之影響，並將收集的細胞培養液進行 TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β 之分析。結果顯示：金銀花與雷公根之水萃取物以及五味子、金銀花與杜仲之乙醇萃取物均可抑制由 LPS 誘導 J774A.1 細胞株生成 IL-6 之作用；甘草及杜仲之乙醇萃取物對初代腹腔細胞有明顯抑制 IL-6 之生成；杜仲、陳皮及五味子之乙醇萃取物則對 LPS 誘導的初代腹腔細胞生成的 IL-1 β 有明顯的抑制作用。另外，陳皮之水及乙醇萃取物在兩種細胞培養模式下均有抑制 TNF- α 生成之作用。

關鍵字：發炎反應，細胞激素，巨噬細胞。

前 言

當細菌或內毒素入侵後會引起體內的免疫反應，促使巨噬細胞活化以對抗外來病原，而降低其對體內之傷害。以內毒素 (endotoxin) 刺激巨噬細胞時，所生成的物質分為三類：(1) 高反應性含氧分子 (reactive oxygen species, ROS)：如一氧化氮 (nitric oxide, NO)。(2) 脂質衍生物：包括血小板活化因子及環氧合酶 (cyclooxygenase) 和脂氧合酶 (lipoxygenase) 代謝花生四烯酸 (arachidonic acid) 所生成之發炎分子包括白三烯素 (leukotrienes)、前列腺素 (prostaglandins) 及血栓凝集素 (thromboxan)。(3) 蛋白質：通常是 interleukin (如 IL-1、IL-6、IL-8)、TNF- α 、IFN- γ ，其中 IL-1、IL-6 及 TNF- α 為促發炎細胞激素 (pro-inflammatory cytokines)，在急性發炎反應中扮演重要角色，這三種細胞激素會增加血管通透性，因而導致紅、腫、熱、痛等發炎反應，為發炎反應之主要調節者，可持續刺激活化巨噬細胞以分泌更多的促發炎的細胞激素¹。

IL-1 由許多不同的細胞，包括單核白血球、巨噬細胞及樹狀突細胞所分泌，包括 IL-1 α 及 IL-1 β 兩種形式存在，IL-1 之主要功能包括誘導急性期蛋白質之生合成、增加體溫、刺激 T 及 B 細胞的活化等；IL-6 屬多功能之細胞激素，是由巨噬細胞、T 細胞、纖維母細胞及內皮細胞所分泌，其功能包括誘導急性期蛋白質之生合成、增加體溫、刺激 T 細胞的活化及刺激 B 細胞產生抗體等；TNF- α (tumor necrosis factor- α) 是從單核球細胞及巨噬細胞中所產生出來，其功能可以誘導單核白血球及巨噬細胞分化、活化巨噬細胞、刺激補體及凝血系統。在脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS) 誘導的發炎反應中，TNF- α 是一個最早期被誘發的調節因子，其次誘發 IL-1、IL-6 及 IL-8 的產生，進而誘導感染區域血管表達黏附分子，促使內皮細胞產生血小板活化因子，以催化血液凝結及局部血管阻塞，防止病原菌擴散²，當其產生量不足或過度時反而會傷害宿主，許多疾病如敗血症、風濕性關節炎、氣喘等皆與 TNF- α 的過量形成有關³，因此產生適量的 TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β 之調控是相當重要。

本研究依據衛生署公佈之可食用性中草藥，並從文獻中蒐集具抗發炎、鎮咳、去痰及解熱功效之中草藥^{4,5} 進行探討，其中金銀花水萃取物 (Lonicerae Flos)⁶ 對 trypsin 誘導的小鼠足部浮腫有明顯抑制作用，且減少 TNF- α 在組織的表現，具抗發炎效果；馬鞭草 (Verbenae Herba)⁷ 的甲醇、乙醚及氯仿萃取物對 carrageenin 所誘導老鼠足部浮腫有明顯的抑制作用；當歸 (Angelicae Radix) 中的 ferulic acid 也具有抑制足部浮腫的抗發炎作用⁸；甘草中的甘草甜素 (glycyrrhizin) 具有抗發炎⁹、抗潰瘍、抗過敏、免疫調節等功能，也可以用於治療慢性肝炎。報告指出¹⁰，杜仲 (Eucommiae Cortex)、甘草 (Glycyrrhizae Radix) 及當歸之 50 % 乙醇萃取物在濃度為 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 對 LPS 誘導的小鼠巨噬細胞株 RAW 264.7 所產生的 Nitric Oxide (NO) 及 prostaglandin E₂ (PGE₂) 有抑制作用；陳皮 (Citri Leiocarpae Exocarpium)¹¹ 中的 nobiletin 會抑制 LPS 及 IFN- γ 誘導 RAW264.7 細胞生成 NO 及 PGE₂；另外五味子 (Schizandrae Fructus) 中的 gomisin A 會抑制老鼠由 TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) 所引起的耳朵發炎¹²。雷公根 (Centellae Herba) 在民間中也是草藥的一種，有解熱、解毒、明目、清暑等功效，研究指出¹³，在老鼠肝纖維化模式下，雷公根具有抑制之效果；山葡萄為民間常用於利尿、消炎、止血、治慢性腎炎及肝炎等，研究指出¹⁴，廣東山葡萄之甲醇粗萃物對 carrageenin 所誘導老鼠足部浮腫有明顯的抑制作用，且對福馬林誘發足趾之疼痛實驗具抑制效果，具鎮痛抗炎作用。

本實驗利用體外的小鼠巨噬細胞株 J774A.1 及 BALB/c 小鼠初代腹腔細胞之兩種細胞培養實驗模式，探討九種中草藥之水及乙醇萃取物對脂多醣 lipopolysaccharide (LPS) 所誘導之促發炎細胞激素，包括腫瘤壞死因子 TNF- α (tumor necrosis factor- α)、IL-6 (interleukin-6) 及 IL-1 β (interleukin-1 β) 生成的影響，並比較兩者結果之相關性，希望能藉由抑制促發炎細胞激素，有效減緩發炎時所造成之生理不適狀況。

材料方法

一、材料

(一) 選取金銀花 (Lonicerae Flos) 之花蕾、雷公根 (Centellae Herba) 之全草、馬鞭草 (Verbenae Herba)

之全草、山葡萄 (Porcelain Ampelopsis)、甘草 (Glycyrrhizae Radix)、當歸 (Angelicae Radix)、陳皮 (Citri Leiocarpae Exocarpium)、五味子 (Schizandrae Fructus) 及杜仲 (Eucommiae Cortex) 共九種樣品，每種樣品分別秤取 50 克分別以 10 倍量水及乙醇加熱迴流萃取 4 小時，共 2 次，萃取液經過濾、濃縮、冷凍乾燥後，保存於-20 °C 冰櫃中備用。

(二)水及乙醇萃取後之樣品分別溶解於 PBS (phosphate buffered saline) 及 DMSO (dimethyl sulfoxide) 溶液中，並於無菌操作箱內以 0.22 μm 孔徑之滅菌過濾膜過濾，濾液保存於 4 °C 冰箱備用。

二、細胞培養

(一)細胞株試驗：本實驗所使用之小鼠巨噬細胞株 J774A.1 購自新竹食品工業發展研究所，細胞生長在內含 10 %胎牛血清和 1 mM sodium pyruvate 的 DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium) 之細胞培養液中。上述細胞置於 37 °C，5 %二氧化碳與 95 %空氣混合的的細胞培養箱內培養。

(二)初代腹腔細胞培養試驗：先在 BALB/c 雌鼠的腹腔中打入 3 % thioglycollate，3~4 天後將小鼠以二氧化碳窒息犧牲，75 %酒精噴灑腹面後利用鈍頭鑷子輕挑起鼠腹部外皮，剪開小洞，以手指撕開腹部皮毛至露出整個腹膜。以 5 mL 體積針筒吸取 HBSS (Hanks' balanced salt solution) 緩衝液，注入腹膜內，再提起鼠體左右或上下抖動，促使腹腔器官間的免疫細胞均勻的懸浮於 HBSS 緩衝液中，並以 5 mL 空針筒抽取腹腔細胞，重複上述步驟兩次，取得 8 mL 腹水液。腹水以桌上型離心機於 1500 rpm 低速離心 10 分鐘，捨棄上清液，輕拍細胞沉澱使之分散，加入細胞培養液後，培養於細胞培養盤中 2 小時，讓巨噬細胞貼附在培養盤上，再以 PBS 沖洗細胞 3 次，並用細胞鏟將細胞刮下，以 trypan blue 染色，在顯微鏡下計數細胞總數。

三、MTS 分析法

為確認九種中草藥萃取物對促發炎細胞激素之影響並非造成細胞毒性所致，故以 Cell Titer96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Kits® (Promega) 進行細胞毒性之試驗。MTS[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]分析法¹⁵ 主要是根據活細胞中粒線體內的 succinate dehydrogenase 會將 tetrazolium salt 還原成 formazan，而藍褐色之 formazan 的生成量則與活細胞數目成正比，可利用酵素免疫自動分析儀 (ELISA reader) 於 490 nm 波長讀取吸光值，各槽之吸光值與對照槽吸光值之比代表細胞存活率。

分別將小鼠巨噬細胞株 J774A.1 (5×10^3 cells/well) 及初代腹腔細胞 (1×10^5 cells/well) 各植入 96 孔細胞培養盤，待細胞附著後，吸除舊細胞培養液，加入含不同濃度之中草藥萃取物及 LPS (lipopolysaccharides, E. coli serotype 026:B6, Sigma) 之新鮮細胞培養液，細胞置於培養箱中 72 小時後，再吸除舊細胞培養液，以 200 μL PBS 清洗細胞，每槽再另加入 100 μL 細胞培養液及 20 μL MTS 溶液，經 1 至 4 小時之培養，讀取吸光值。細胞生長抑制率 = $(1 - \text{試驗組的吸光值} / \text{對照組的吸光值}) \times 100\%$ 。

四、細胞激素 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 之分析

- (一)將小鼠巨噬細胞株 J774A.1 及初代腹腔細胞植入 48 孔細胞培養盤中，於 37 °C 培養箱培養 3 小時使其細胞附著後，移除舊細胞培養液，加入含有中草藥萃取物及 LPS(小鼠巨噬細胞株 J774A.1 及初代腹腔細胞所使用之 LPS 濃度分別為 1 及 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)之細胞培養液，分別培養 16 小時後，收集細胞培養上清液，並儲放於 -80 °C 冰箱待後續細胞激素之分析。
- (二)細胞激素分析測定是採用 mouse TNF- α Enzyme-Linked Immune Substrate Assay (ELISA) kit (R & D system, USA)、mouse IL-6 ELISA kit 及 mouse IL-1 β ELISA kit。以 ELISA reader 偵測 OD 450 nm 吸光值，細胞培養上清液中 IL-6、TNF- α 及 IL-1 β 濃度以內插標準曲線求得。

五、統計方法

採用 Statistical Analysis System (SAS) 軟體進行統計分析，以變方分析 (Analysis of variance, ANOVA) 進行統計處理，並以 Duncan's test 比較各因子間顯著差異程度 ($p < 0.05$)，所得數據以平均值 \pm 標準偏差 (Mean \pm SD) 表示。

結果與討論

一、樣品濃度

為避免使用之中草藥萃取物抑制 LPS 所誘導細胞激素的生成，是來自對細胞產生毒性之故，因此本實驗利用 MTS 分析方法先測定中草藥萃取物在 LPS 添加下對細胞株及初代腹腔細胞之細胞存活率，即以不影響細胞生長之中草藥萃取物濃度進行細胞試驗。

(一)小鼠巨噬細胞株 J774A.1

以不同濃度中草藥 (6.25、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 進行小鼠巨噬細胞株 J774A.1 生長之抑制實驗。在水萃取物方面，由表 1 結果顯示：甘草及陳皮在濃度為 100~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時會抑制細胞生長，金銀花及雷公根在濃度為 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時也會抑制細胞生長，其它五種樣品在濃度 6.25~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 皆不會對細胞產生毒性。另外在乙醇萃取物方面，由表 2 結果顯示：雷公根、山葡萄、甘草及陳皮在濃度為 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 有抑制細胞生長的情形，而當歸及五味子則在濃度大於 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 才会有影響。後續小鼠巨噬細胞株 J774A.1 之中草藥水及乙醇萃取物的培養濃度選擇 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 進行細胞激素生成實驗。

(二)初代腹腔細胞

以不同濃度中草藥萃取物 (25、50、100、200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 進行初代腹腔細胞生長抑制實驗，並選擇適當的萃取物濃度進行後續發炎相關細胞激素之測定。九種中草藥之水萃取物在濃度 25~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下對初代腹腔細胞並沒有抑制生長的作用；在乙醇萃取物方面，由表 3 結果顯示：甘草在濃度為 200~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時會影響初代腹腔細胞的生長，而山葡萄及杜仲在濃度為 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時也會有影響；後續初代腹腔細胞之中草藥水及乙醇萃取物的培養濃度選擇 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 進行細胞激素生成實驗。

表 1 九種中草藥之水萃取物對小鼠巨噬細胞株 J774A.1 存活率之影響

	濃度**	金銀花	雷公根	馬鞭草	山葡萄	甘草
細胞存活率(%)	100	99.2 ± 3.4	99.6 ± 5.2	100.4 ± 5.6	102.2 ± 1.8	70.5 ± 2.7*
	200	93.1 ± 6.8*	91.8 ± 6.6*	99.2 ± 2.2	101.7 ± 4.8	57.3 ± 2.7*
	濃度**	當歸	陳皮	五味子	杜仲	
細胞存活率(%)	100	97.6 ± 4.3	82.4 ± 2.4*	99.4 ± 3.3	101.3 ± 1.3	
	200	101.2 ± 4.2	74.1 ± 2.1*	99.4 ± 3.4	97.9 ± 2.4	

*表示與控制組 (100%) 具有顯著差異 ($p < 0.05$)。

**濃度單位為 $\mu\text{g/mL}$

表 2 九種中草藥之乙醇萃取物對小鼠巨噬細胞株 J774A.1 存活率之影響

	金銀花	雷公根	馬鞭草	山葡萄	甘草
細胞存活率(%)	100.1 ± 1.4	95.1 ± 2.6*	101.1 ± 1.5	91.5 ± 4.3*	85.1 ± 3.4*
	當歸	陳皮	五味子	杜仲	
細胞存活率(%)	99.1 ± 5.7	82.0 ± 7.4*	98.5 ± 6.0	98.7 ± 2.1	

*表示與控制組 (100%) 具有顯著差異 ($p < 0.05$)，樣品之濃度為 $50 \mu\text{g/mL}$ 。

表 3 九種中草藥之乙醇萃取物對 BALB/c 小鼠初代腹腔細胞存活率之影響

	濃度**	金銀花	雷公根	馬鞭草	山葡萄	甘草
細胞存活率(%)	200	105.2 ± 3.2	99.7 ± 4.2	101.4 ± 4.6	104.2 ± 2.8	51.5 ± 2.7*
	400	101.1 ± 4.8	99.8 ± 5.6	99.3 ± 2.5	67.7 ± 2.5*	45.3 ± 2.1*
	濃度**	當歸	陳皮	五味子	杜仲	
細胞存活率(%)	200	99.6 ± 2.3	103.4 ± 3.4	99.4 ± 3.3	103.2 ± 3.1	
	400	101.2 ± 4.1	102.1 ± 2.2	100.4 ± 3.4	85.2 ± 1.2*	

*表示與控制組 (100%) 具有顯著差異 ($p < 0.05$)。

**濃度單位為 $\mu\text{g/mL}$

二、中草藥萃取物對促發炎細胞激素 (TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β) 的影響

本研究將九種中草藥之水及乙醇萃取物分別進行細胞株及初代腹腔細胞試驗，以 LPS 刺激細胞 16 小時後收集各細胞培養液進行測定，探討九種中草藥萃取物對促發炎細胞激素釋放之影響。

(一)中草藥之水萃取物抑制 LPS 誘導小鼠巨噬細胞株 J774A.1 及初代腹腔細胞生成 TNF- α 及 IL-6 之影響

TNF- α 之生成如圖 1A 所示，在細胞株之結果顯示，陳皮、甘草及當歸在濃度 $25 \mu\text{g/mL}$ 時抑制 TNF- α 的產生分別達 30、16 及 8%，以陳皮之抑制效果較好；在初代腹腔細胞結果方面，陳皮、金銀花、馬鞭草及五味子在濃度 $100 \mu\text{g/mL}$ 時其抑制率分別為 22、11、9 及 6%。由上述結果得知：以陳皮之水萃取物對 LPS 誘導兩種細胞模式下抑制 TNF- α 生成之效果較佳，且具一致性。

IL-6 之生成如圖 1B 所示，在細胞株之結果顯示，金銀花、雷公根及馬鞭草在濃度 $25 \mu\text{g/mL}$ 時抑制 IL-6 的產生分別達 45、38 及 20%，其中以金銀花及雷公根之抑制效果最為顯著；初代腹腔細胞之結果顯示，

金銀花、山葡萄、雷公根、馬鞭草及五味子在濃度為 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，抑制率分別為 20、20、14、11 及 8%，金銀花與山葡萄之抑制效果相當。在兩種細胞模式的探討中，金銀花、雷公根及馬鞭草則呈現抑制 IL-6 生成之一致性結果，甘草、當歸、陳皮及杜仲對 LPS 誘導細胞生成 IL-6 作用皆無抑制效果。

(二)中草藥之乙醇萃取物抑制 LPS 誘導小鼠巨噬細胞株 J774A.1 及初代腹腔細胞生成 TNF- α 及 IL-6 之影響

TNF- α 之生成結果如圖 2A 所示，在細胞株之結果顯示，以陳皮之抑制 TNF- α 生成效果最為顯著，約抑制 59%，而甘草、當歸、五味子、山葡萄及馬鞭草在濃度為 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 約抑制 10~17%。初代腹腔細胞之結果顯示，陳皮、馬鞭草及甘草均具有降低 TNF- α 生成的作用，在濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時其抑制率各分別為 60、33 及 24%。在兩種細胞模式下，陳皮、馬鞭草及甘草均具有抑制 TNF- α 之生成，以陳皮抑制效果最佳，而金銀花、雷公根及杜仲皆無抑制 TNF- α 生成之作用；當歸、五味子及山葡萄則只有在 J774A.1 細胞株下具有降低 TNF- α 生成之作用，在初代腹腔細胞則無抑制作用。

IL-6 之生成結果如圖 2B 所示，在細胞株之結果顯示，五味子、金銀花、杜仲、雷公根、當歸、甘草、山葡萄、馬鞭草及陳皮在濃度 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時其抑制率分別為 60、59、43、35、28、19、16、12 及 9%，其中以五味子及金銀花抑制效果最為顯著。初代腹腔細胞之結果顯示，甘草、杜仲、五味子、馬鞭草及山葡萄均具有降低 IL-6 的效果，在濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時抑制 IL-6 的產生分別達 68、66、42、14 及 11%，以甘草及杜仲之抑制效果較顯著。整體而言，在兩種細胞模式下，五味子、杜仲、甘草、山葡萄及馬鞭草對 LPS 誘導細胞生成 IL-6 作用皆具有抑制效果。

(三)中草藥萃取物抑制 LPS 誘導初代腹腔細胞生成 IL-1 β 之影響

IL-1 β 之生成結果如圖 3 所示，除了馬鞭草外，其他八種中草藥水萃取物在濃度為 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 並無明顯抑制 IL-1 β 生成之作用；乙醇萃取物結果顯示：杜仲、陳皮及五味子具有明顯降低 IL-1 β 生成的效果，在濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時抑制 IL-1 β 的產生分別達 62、45 及 41%。

近年來已有許多陳皮萃取物的抗發炎報告¹⁶，Manthey¹⁷指出在 LPS 誘導人類單核球細胞實驗中，citrus flavonoids 會抑制 TNF- α 之生成，但對 IL-1 β 及 IL-6 生成並無影響，此外，Murakami¹¹也指出陳皮中的 nobletin 會抑制由 LPS 及 IFN- γ 所誘導 RAW264.7 細胞生成 NO、PGE₂、TNF- α 及 IL-1 β 。在本研究中，陳皮之水及乙醇萃取物在兩種細胞模式下皆具有降低 TNF- α 產生，但對 IL-6 抑制效果不明顯，而在初代腹腔細胞中乙醇萃取物也有降低 IL-1 β 之情形，此結果與 Murakami 報告相符。

Lee 的研究¹⁸指出金銀花的水萃取物在 LPS 誘發老鼠肝發炎模式下會選擇性調節 NF- κB 的活性，並且會抑制肝細胞中 TNF- α 及 iNOS 之活性。在本研究中金銀花之水萃取物在 LPS 誘發兩種細胞模式下皆有抑制 IL-6 之形成，以細胞株抑制效果較顯著，且在初代腹腔細胞中金銀花之水萃取物也有抑制 TNF- α 之作用，另外，金銀花之水及乙醇萃取物並不影響 IL-1 β 之生成，可能與 NF- κB 的活性被選擇性調節有關。

近來許多學者研究發現¹⁹抗氧化物質具有抑制發炎反應的能力，如會抑制由 LPS 所引發細胞的 NF- κB 活化，對抗活性氧 (reactive oxygen species; ROS) 所引發的急性發炎及氧化傷害等，而且促發炎性細胞激素所引發之 NF- κB 活化過程與細胞內活性氧化物的增加有關。Zhu²⁰研究指出五味子之水萃取物具有有保護四

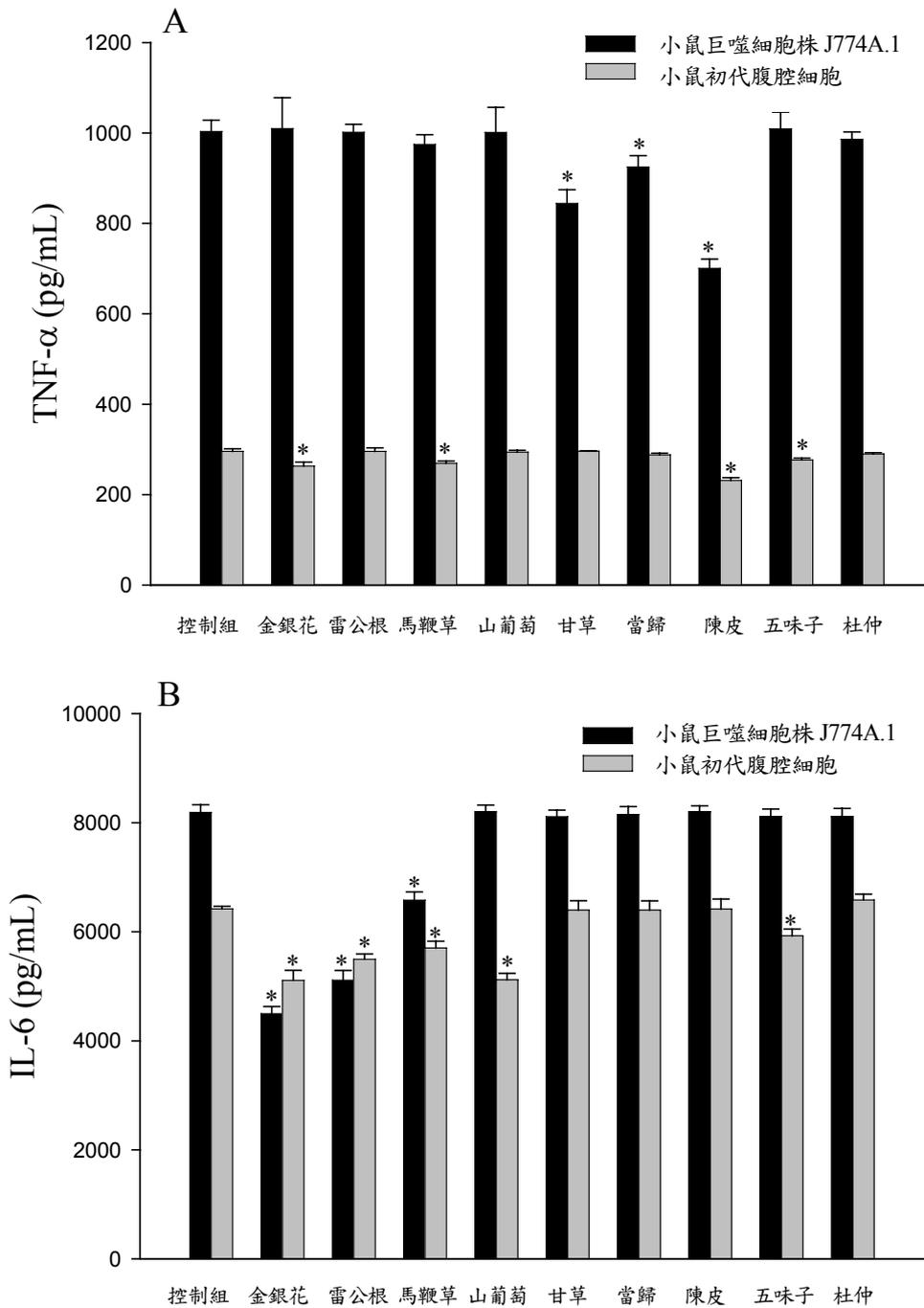


圖 1：九種中草藥水萃取物對小鼠巨噬細胞株 J774A.1 及 BALB/c 小鼠初代腹腔細胞生成 TNF-α(A)及 IL-6(B)的影響

氯化碳所引起之老鼠肝損傷及抗氧化的作用，杜仲的水萃取物亦具抗氧化能力²¹。在本研究中，五味子及杜仲的乙醇萃取物在兩種細胞模式下具有顯著之抑制 IL-6 生成效果，且在初代腹腔細胞中也有降低 IL-1β 生成之情形，但對 TNF-α 並無明顯抑制效果。另外，Lee²²的報告指出以 70 % 甲醇萃取之甘草萃取物具有保護倉鼠肺纖維母細胞免於 H₂O₂ 所造成之損傷，具有對抗氧化傷害之能力，本研究中甘草之水萃取物對在細胞株

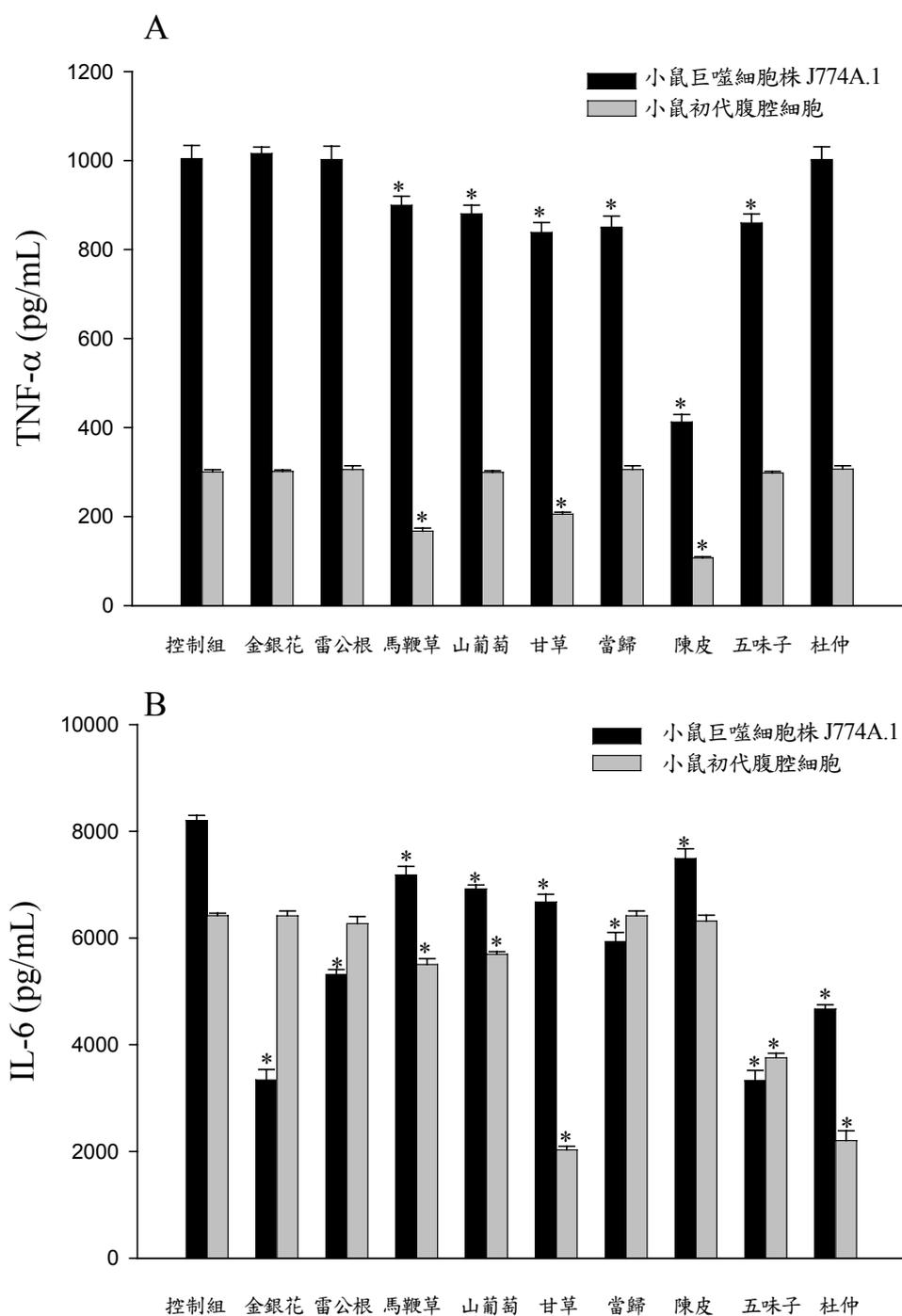


圖 2：九種中草藥乙醇萃取物對小鼠巨噬細胞株 J774A.1 及 BALB/c 小鼠初代腹腔細胞生成 TNF- α (A)及 IL-6(B)的影響

中具有降低 TNF- α 生成，但對 LPS 誘導兩種細胞模式下皆無抑制 IL-6 生成作用；甘草之乙醇萃取物在兩種細胞模式下均具有降低 TNF- α 及 IL-6 生成之一致性結果；Yabe²³ 研究指出山葡萄之乙醇萃取物具有保護四氯化碳所引起之老鼠肝損傷，具有抗氧化活性，Cheong¹³ 研究指出雷公根具有抑制老鼠肝纖維化之效果，本實驗中，山葡萄之乙醇萃取物及雷公根的水萃取物對 LPS 誘發兩種細胞模式下均有抑制 IL-6 生成的作用。

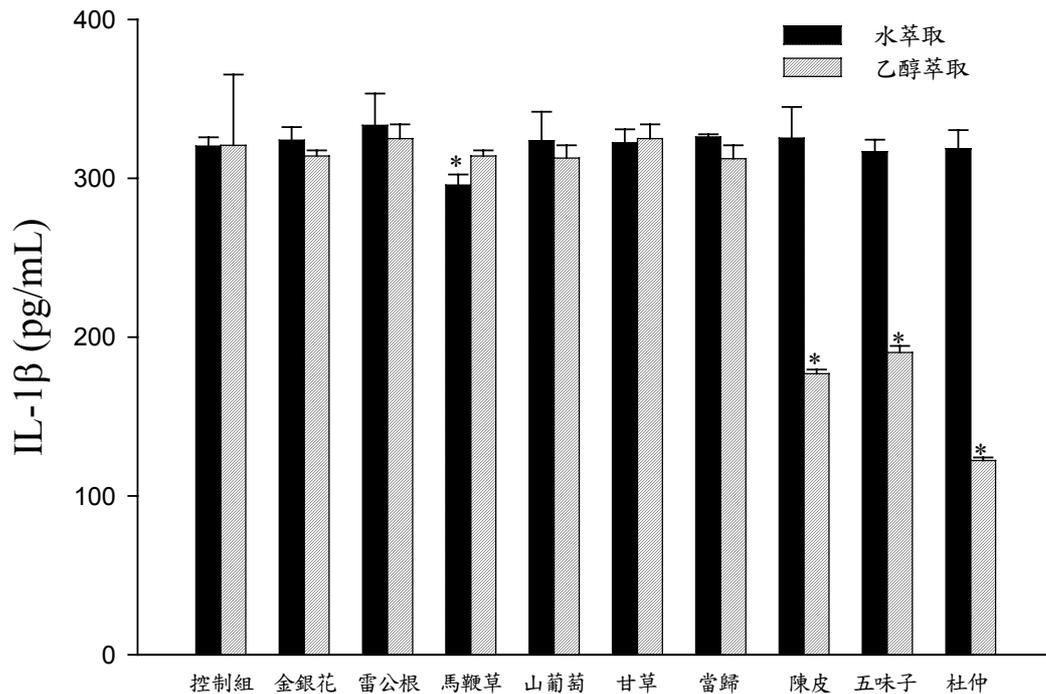


圖 3：九種中草藥之水及乙醇萃取物對 BALB/c 小鼠初代腹腔細胞生成 IL-1 β 的影響

因此這些萃取物亦可能藉由其清除自由基之作用，而降低促發炎細胞激素的生成。

馬鞭草的甲醇萃取物⁷及當歸中的 Ferulic Acid⁸對 carrageenin 所誘導老鼠足部浮腫有明顯抑制作用，具鎮痛及抗炎的作用，Ye²⁴ 研究指出當歸中多醣的成分具有保護四氯化碳所引起之老鼠肝損傷。本實驗中，在二種細胞模式下馬鞭草之乙醇萃取物也有抑制促發炎細胞激素 TNF- α 及 IL-6 生成，當歸的乙醇萃取物則在細胞株有抑制 TNF- α 及 IL-6 作用。

綜合以上結果，九種中草藥之水萃取物在兩種細胞模式下以陳皮具有降低 TNF- α 之一致性結果，金銀花、雷公根及馬鞭草之水萃取物在兩種細胞模式下也呈現抑制 IL-6 生成之一致性結果；中草藥之乙醇萃取物在兩種細胞模式下亦以陳皮具明顯抑制 TNF- α 之效果，五味子、杜仲、甘草、山葡萄及馬鞭草對 LPS 誘導兩種細胞生成 IL-6 作用也具有抑制效果。總之，減少發炎因子的生成，應有助於抑制發炎反應，在預防及治療慢性發炎扮演重要之角色。

致 謝

感謝林福文博士在中草藥方面之協助，本實驗研究經費源自經濟部科專計劃（03T200-03B1），特此感謝。

參考文獻

1. Nathan CF. Secretory products of macrophages. J. Clin. Invest. 79: 319-323, 1987.

2. Peter P. The immune system. Garland Publishing, London, pp.201-219, 2000.
3. Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 9: 317-343, 1993.
4. 蔡永敏、王黎、張國泰、任玉讓，最新中藥藥理與臨床應用，華夏出版社，北京，pp. 77-79，1998。
5. 許鴻源、陳玉盤、許順吉、許照信、陳建志、張憲昌，簡明藥材學，新醫藥出版社，台北，pp. 157-484，1984。
6. Tae J, Han SW, Yoo JY, Kim JA, Kang OH, Baek OS, Lim JP, Kim DK, Kim YH, Bae KH, Lee YM. Anti-inflammatory effect of *Lonicera japonica* in proteinase-activated receptor 2-mediated paw edema. *Clin. Chim. Acta.* 330: 165-171, 2003.
7. Deepak M, Handa SS. Antiinflammatory activity and chemical composition of extracts of *Verbena officinalis*. *Phytother. Res.* 14: 463-465, 2000.
8. Ozaki Y. Antiinflammatory effect of tetramethylpyrazine and ferulic acid. *Chem. Pharm. Bull.* 40: 954-956, 1992.
9. Okimasu E, Moromizato Y, Watanabe S, Sasaki J, Shiraiishi N, Morimoto YM, Miyahara M, Utsumi K. Inhibition of phospholipase A2 and platelet aggregation by glycyrrhizin, an antiinflammation drug. *Acta. Med. Okayama.* 37: 385-391, 1983.
10. 曾頌惠，非類固醇抗炎藥與天然物合併治療對抗發炎反應之協調作用，台北醫學院生藥學研究所，pp. 28-29，2002。
11. Murakami A, Nakamura Y, Torikai K, Tanaka T, Koshihara T, Koshimizu K, Kuwahara S, Takahashi Y, Ogawa K, Yano M, Tokuda H, Nishino H, Mimaki Y, Sashida Y, Kitanaka S, Ohigashi H. Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice. *Cancer Res.* 60: 5059-5066, 2000.
12. Yasukawa K, Ikeya Y, Mitsuhashi H, Iwasaki M, Aburada M, Nakagawa S, Takeuchi M, Takido M. Gomisins A inhibits tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology* 49: 68-71, 1992.
13. Cheong JY, Oh TY, Lee KM, Kim do H, Ahn BO, Kim WB, Kim YB, Yoo BM, Hahm KB, Kim JH, Cho SW. Suppressive effects of antioxidant DA-9601 on hepatic fibrosis in rats. *Taehan Kan Hakhoe Chi* 8: 436-447, 2002.
14. Hsieh WT, Tan TW, Chen CF, Tsai HY. Studies of anti-inflammatory and analgesic effect of *Ampelopsis brevipedunculata*. *Chin. Med. Coll. J.* 7: 81-87, 1998.
15. Riss TL, Moravec RA. Comparison of MTT, XTT, and novel tetrazolium compound for MTS for in vitro proliferation and chemosensitivity assays. *Mol. Biol. Cell.* 3: 184, 1992.
16. Manthey JA, Grohmann K, Guthrie N. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Curr. Med. Chem.* 8: 135-153, 2001.
17. Manthey JA, Grohmann K, Montanari A, Ash K, Manthey CL. Polymethoxylated flavones derived from citrus suppress tumor necrosis factor-alpha expression by human monocytes. *J Nat Prod* 62: 441-444, 1999.
18. Lee JH, Ko WS, Kim YH, Kang HS, Kim HD, Choi BT. Anti-inflammatory effect of the aqueous extract from *Lonicera japonica* flower is related to inhibition of NF-kappaB activation through reducing I-kappaBalpha degradation in rat liver. *Int. J. Mol. Med.* 7: 79-83, 2001.

19. Cadena S, Cadena AM. Fighting the stranger antioxidant protection against endotoxin toxicity. *Toxicology* 180: 45-63, 2002.
20. Zhu M, Lin KF, Yeung RY, Li RC. Evaluation of the protective effects of *Schisandra chinensis* on Phase I drug metabolism using a CCl_4 intoxication model. *J. Ethnopharmacol.* 67: 61-68, 1999.
21. Hsieh CL, Yen GC. Antioxidant actions of Du-zhong (*Eucommia Ulmoides* Oliv.) toward oxidative damage in biomolecules *Life Sci.* 66: 1387-1400, 2000.
22. Lee SE, Hwang HJ, Ha JS, Jeong HS, Kim JH. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sci.* 73: 167-179, 2003.
23. Yabe N, Matsui H. *Ampelopsis brevipedunculata* (Vitaceae) extract inhibits a progression of carbon tetrachloride-induced hepatic injury in the mice. *Phytomedicine.* 7: 493-498, 2000.
24. Ye YN, Liu ES, Li Y, So HL, Cho CC, Sheng HP, Lee SS, Cho CH. Protective effect of polysaccharides-enriched fraction from *Angelica sinensis* on hepatic injury. *Life Sci.* 69: 637-46, 2001.

A STUDY OF THE EFFECTS OF NINE CHINESE HERBS ON PROINFLAMMATORY CYTOKINES PRODUCTION IN TWO CELL CULTURE MODELS

Chia-Wen Liang, Yi-Chung Lai and Yan-Hwa Chu

Food Industry Research and Development Institute

Hsinchu, Taiwan

(Received 27th September 2004, accepted 25th November 2004)

Nine Chinese herbal extracts were used to study the inhibition of the proinflammatory cytokines including TNF- α , IL-6 and IL-1 β in J774A.1 mouse macrophage cell line and primary peritoneal macrophage cells stimulated by LPS, respectively. All the macrophage cells were incubated with different doses of Chinese herbal extracts and LPS for 72 hours, and cell viability was measured by MTS assay. The supernatants were harvested and the production of TNF- α , IL-6, and IL-1 β were measured by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The result showed that water extracts of *Lonicerae Flos* and *Centellae Herba* and the ethanolic extracts of *Schizandrae Fructus*, *Lonicerae Flos* and *Eucommiae Cortex* significantly inhibited the production of IL-6 in J774A.1 cells. Among these herbs, *Glycyrrhizae Radix* and *Eucommiae Cortex* showed a significant inhibition on the production of IL-6 in LPS-induced primary peritoneal macrophage cells. Inhibition of IL-1 β production in LPS-induced primary peritoneal macrophage cells were also observed in the ethanolic extracts of *Eucommiae Cortex*, *Citri Leiocarpae Exocarpium* and *Schizandrae Fructus*. In addition, the water and ethanolic extracts of *Citri Leiocarpae Exocarpium* also inhibited LPS-induced TNF- α secretion in J774A.1 cells and primary peritoneal macrophages.

Key words: Inflammatory response, Cytokine, Macrophage.