

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫名稱

民間用中草藥抗發炎功效研究

計畫類別： 個別型計畫

整合型計畫

計畫編號：CNIB-92-06

執行期間：92 年 1 月 1 日至 92 年 12 月 31 日

計畫主持人：吳明娟

共同主持人：

計畫參與人員：

執行單位：生物科技系

中華民國 93 年 2 月 28 日

摘要：

益母草、使君子、去尖蒼耳子、化石草、雞屎藤、鳳尾草及白花蛇舌草等為民間常見之具抗發炎功效的中草藥。本研究利用巨噬細胞 RAW264.7 的一氧化氮生成抑制效果來篩選這些中草藥乙醇萃取物的抗發炎功效。結果顯示，去尖蒼耳子及鳳尾草之乙醇萃取物，可以明顯的抑制由 LPS 誘發細胞生成的一氧化氮，且無明顯的細胞毒性，由此可見，其抗發炎的機轉可能與抑制一氧化氮合成酵素的活性或一氧化氮合成酵素的基因表達有關。

關鍵字：抗發炎、一氧化氮、巨噬細胞、去尖蒼耳子、鳳尾草。



緒論

在生物體內，一氧化氮 (NO) 的產生主要是經由一氧化氮合成酵素 (NOS) 將 L-arginine 之 guanidino 官能基反應所得。幾乎各類的哺乳動物細胞，包括血管的內部表皮細胞、神經細胞、免疫細胞皆可產生。目前已知有三種 NOS，第一類存在神經細胞，稱為 nNOS；第二類存在表皮細胞，稱為 eNOS；此兩種皆為衡定表現的酵素，可以保持細胞內 NO 的衡定。第三類是誘導表現的酵素，稱為 iNOS，此種酵素在巨噬細胞，肝臟及小腸黏膜中皆存在，但只有在受 LPS 或是細胞激素刺激時，其活性才會表達出來，並產生大量的 NO，引發發炎反應 (Kilbourn and Griffith, 1992)。目前已知大量的 NO 可能導致急性敗血症 (septic shock) (Rees *et al.*, 1990)，大腦受損 (cerebral injury) (Dawson *et al.*, 1993)，局部心肌缺血症 (Matheis *et al.*, 1992)，局部及系統性的發炎，糖尿病，心血管疾病等 (Stefanovic-Racic *et al.*, 1993; Connor *et al.*, 1995; Wu and Thiemermann, 1996)。因此如何選擇性的抑制 iNOS 而不影響 eNOS 及 nNOS 的活性或生成，是許多抗發炎新藥的研究重點 [Southan *et al.*, 1996]。

一般中藥典所稱可能與抗發炎相關的用詞包括清熱、解毒、止咳、清血、消腫等。但並未完全經科學驗證。近幾年來國內也有不少對抗發炎中草藥的研究。利用巨噬細胞為模式發現，在六種傳統抗發炎的中藥中只有青脆枝及大葉桑寄生兩種中藥的甲醇萃取液可明顯抑制由 LPS/IFN- γ 所誘發的 NO 的產生 [Chiou *et al.*, 2000]。另外以單核白血球的分裂抑制及 IL-2 的抑制為指標發現，在三十八種中藥中只有鱧腸、兔仔草、馬蹄金、含殼草、金錢草、家舌草、烏馬面、白龍船、蚊子香頭、山芙蓉、武靴藤、白花蛇舌草、咸豐草、青脆枝及風藤等 15 種有抗發炎的功效 [Kuo *et al.*, 1995; Kuo *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1999]。

本研究我們用巨噬細胞為模式來探討七種中草藥抗發炎之機制。益母草，屬唇形科植物，其功能為活血調經，利尿消腫，清熱解毒。主治月經失調，經閉，胎漏難產，胞衣不

下，產後血暈，瘀血腹痛，跌打損傷，小便不利，水腫，疔瘡，眼疾，高血壓病^[1]。使君子，屬使君子植物科，產於四川、廣東省與廣西省，其功能有除蟲除熱，健脾開胃，消疔化積。主治蟲積腹痛，小兒疳積，乳食停滯，腹大肌瘦，面色萎黃，瀉痢，瘡癬，蟲牙疼痛，婦科陰道滴蟲^[2]。去尖蒼耳子，屬菊科植物，其功能為清熱解毒，祛風燥濕。主治疗瘡，癰疽，丹毒，纏喉風，闌尾炎，宮頸炎，痢疾，腎炎水腫，乳糜尿，風濕痺痛，高血壓，頭暈頭痛，糖尿病^[3]。化石草，屬唇形科植物，其功效為利尿、消炎、化石、降壓，主治高血壓、水腫、腎結石、肝炎等^[4]。雞屎藤，屬茜草科植物，其功能為祛風除濕，消食化積，解毒消腫，活血止痛。主治風溼痺痛，食積腹脹，瀉痢，黃疸，肝炎，中暑，疳積，咳嗽，腸癰，腫毒損傷，蛇蟲咬傷^[5]。鳳尾草(*Gandarussa vulgaris* Nees)，屬鳳尾蕨科植物，多分佈於長江以南及河北、山東、陝西、甘肅，其功能為清熱利濕，消腫解毒，消化食道。主治泄瀉，痢疾，淋濁，帶下，黃疸，瘡癬癰腫，喉痺，乳癰，蛇蟲咬傷，尿血，便血，瘡傷出血，尿路感染，結石^[6]。白花蛇舌草，屬茜草科植物，其功能為清熱解毒，利濕通淋，止瀉抗癌，利膽退黃。主治肺熱喘嗽，咽喉腫痛，腸癰，癰腫瘡傷，毒蛇咬傷，熱淋澀痛，水腫，痢疾，腸炎，濕熱黃疸，癌腫^[7]。

本研究之目的為以一般抗發炎藥理研究的細胞培養模式，以老鼠巨噬細胞 RAW264.7 探討益母草、使君子、去尖蒼耳子、化石草、雞屎藤、鳳尾草及白花蛇舌草等的抗發炎功效，以期進一步了解傳統中草藥的分子藥理。

材料與方法

一、材料

本實驗所使用之中草藥：皆由高雄市中藥店購得，益母草產於嘉義縣，其餘產地皆為中國大陸。MTT reagent、LPS(E coli 055:B5)及 Griess reagent 購自 Sigma (USA)。Sodium nitrite 購 J.T.Baker (USA)。細胞培養基及血清皆購自 Hyclone (USA)。RAW264.7 老鼠巨噬細胞株購自食品工業研究所之菌種中心 (Taiwan)。

二、方法

1、樣品製備與萃取

稱取 100~180 克不等的七種中草藥(益母草、使君子、去尖蒼耳子、化石草、雞屎藤、鳳尾草、白花蛇舌草。)加 500 ml~1000 ml 不等的乙醇，用攪拌機攪碎，倒入容器中浸漬 24 小時後，將上清液以 2 號濾紙過濾，濾液另外保存，其餘殘渣繼續加入 500 ml 的乙醇浸漬 24 小時。再將樣品(包括上清液及沉澱物)以 2 號濾紙過濾後，所得濾液與第一次濾液混合，進行減壓濃縮乾燥。乾燥所得到之乙醇萃取物以 35 ml~50 ml 不等量的乙醇回溶，儲存以-20°C 冷凍備用。

2、細胞培養

RAW 264.7 在 96-well 中以含有 10% fetal calf serum (Hyclone)、2mM glutamine、1mM pyruvate、1% non-essential amino acid、100U/ml penicillin 及 100 μ g/ml streptomycin 的 Dubach' Modified Eagle 培養液(DMEM)培養。其培養條件為在 37°C 下含有 5% CO₂；細胞每 48 小時換一次新鮮的培養液。當細胞長滿時，即可進行篩選七種中草藥抑制 RAW264.7 細胞產生硝酸鹽的測定。

3、 中草藥乙醇萃取物對 RAW264.7 細胞發炎機制探討

七種中草藥之乙醇萃取物對 RAW264.7 細胞產生的硝酸鹽測定是參考 chiu ^[8] 的方法。RAW264.7 細胞在 96-well 中長滿後，換上新鮮的培養液，在 well 中加入七種中草藥乙醇萃取物分別以原濃度、30mg/ml、10mg/ml 等三種濃度及 LPS(1 μ g/ml)，培養反應 20 小時後，取 100 μ l 細胞上層液加入等量的 Griess reagent (含 1% sulfanilamide 及 0.1% naphthylendiamine 的 5% phosphoric acid)，即刻測其 550nm 吸光值，並以 Sodium nitrite 為標準品計算硝酸鹽產生的量。

4、 七種中草藥乙醇萃取物對 RAW264.7 細胞之細胞毒性

RAW264.7 細胞在 96-well 中長滿後，換上新鮮的培養液，在 well 中加入七種中草藥乙醇萃取物分別稀釋相同濃度及 LPS(1 μ g/ml)，培養 RAW264.7 細胞反應 20 小時後，除去上層液，加入 100 μ l MTT(0.5%)，於 37°C 培養 4 小時，除去上層液之 MTT，加入 tetrazolium bromide 與活細胞才有的 mitochondrial dehydrogenase 作用形成不溶性的紫色 formazan，再以 DMSO 將細胞膜打破，將紫色結晶溶出，使用 ELISA reader 檢測 A550 之吸光值。

結果與討論

乙醇為一般常見之中草藥萃取溶劑，本研究利用乙醇萃取七種中草藥，其萃取溶液重量及中草藥萃取回收量，詳細記錄如表一。由表一可知回收率為 1.4 % - 4.6 % 不等，其中白花蛇舌草回收率最高，使君子最低。

在未對巨噬細胞以 LPS 誘發前，我們首先探討七種中草藥萃取液是否會引發正常 RAW264.7 細胞產生 NO 或造成細胞毒性。圖一(A)顯示 RAW264.7 細胞在無 LPS 誘發時其

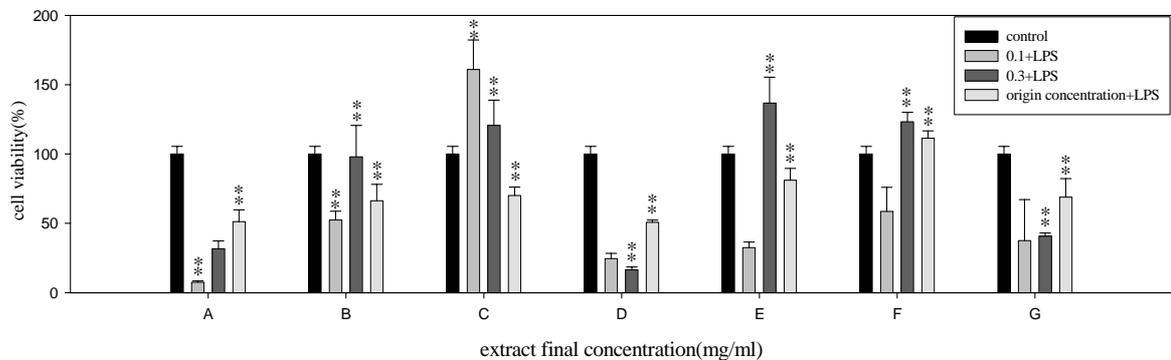
NO 產生量很低，約為 $0.07 \pm 0.24 \mu\text{M}$ 。當加入七種中草藥時，RAW264.7 細胞釋放之 NO，增加量雖少，但統計上皆顯著。且其誘導效應隨中草藥濃度增加而遞增。在中草藥濃度為 0.1 mg/ml 時，RAW264.7 細胞釋放之 NO 量為 $0.35 - 1.83 \mu\text{M}$ ，0.3 mg/ml 時 NO 量為 $1.3 - 6.0 \mu\text{M}$ 。其中以去尖蒼耳子、雞屎藤及蛇舌草對未活化的 RAW264.7 細胞的 NO 產生誘導效果最低。接著利用 MTT 方法，測試七種中草藥對未活化的 RAW264.7 細胞的存活率的影響，結果如圖一(B)所示。很訝異的我們發現，許多中草藥(益母草、化石草、雞屎藤、鳳尾草、蛇舌草)對未活化的 RAW264.7 細胞的毒性，隨濃度增加而遞減。其中益母草、化石草在低濃度時，對於巨噬細胞毒性最強：在 0.1 mg/ml 時，RAW264.7 細胞的存活率由未添加中草藥時的 100% 分別降至 $5.4 \pm 0.6\%$ 及 $13.6 \pm 1.9\%$ 。在 0.3 mg/ml 時，RAW264.7 細胞的存活率分別增為 $41.2 \pm 4.7\%$ ， $66.6 \pm 1.9\%$ 。反之雞屎藤、鳳尾草、蛇舌草只在 0.1 mg/ml 時有少許毒性(存活率為 54.6 - 77%)，但 0.3 mg/ml 以上時則無明顯毒性。其中雞屎藤在 0.3 mg/ml 以上反而有促進細胞增生的效果。其餘的使君子僅在最高濃度時 (0.53 mg/ml) 對細胞才有顯著的毒性 (存活率為 $81.2 \pm 2.7\%$)。去尖蒼耳子在 0.3 mg/ml 以下時毒性較弱(存活率為 78 - 88%)，但在最高濃度 (0.63 mg/ml) 對細胞毒性增加(存活率為 $65.7 \pm 6.5\%$)。

接著我們繼續探討七種中草藥對受 LPS 活化後的 RAW264.7 巨噬細胞的 NO 產生量及存活率的影響。當 RAW264.7 巨噬細胞受 LPS 作用 20 hr 後，NO 產生量可由原來未活化時的 $0.07 \pm 0.24 \mu\text{M}$ 劇增至 $40.5 \pm 1.3 \mu\text{M}$ (圖二 A)。當同時加入中草藥及 LPS 作用 20 hr 後，這七種中草藥皆可有效抑制 NO 的誘導。而且隨著濃度的增加，抑制效果遞增。在 0.1

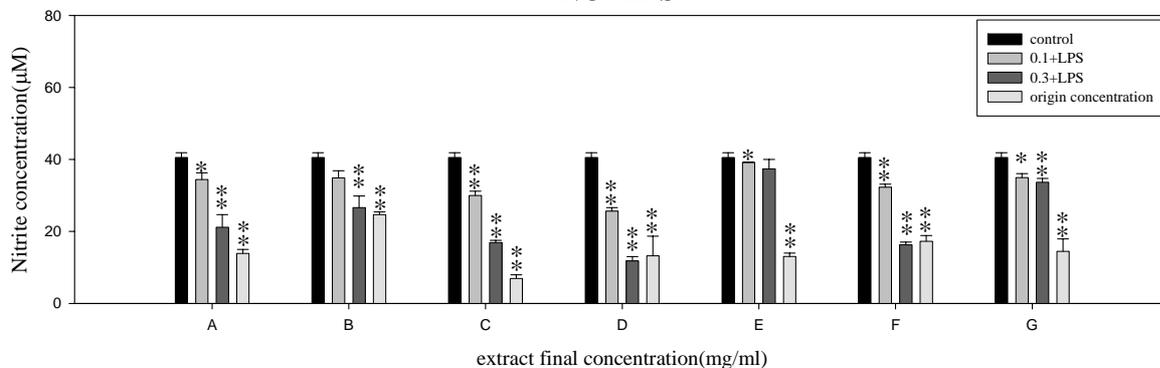
mg/ml 時, NO 產生降至 25.6- 35 μM , 在 0.3 mg/ml 時, NO 產生進一步降為 11.8 –33.7 μM 。

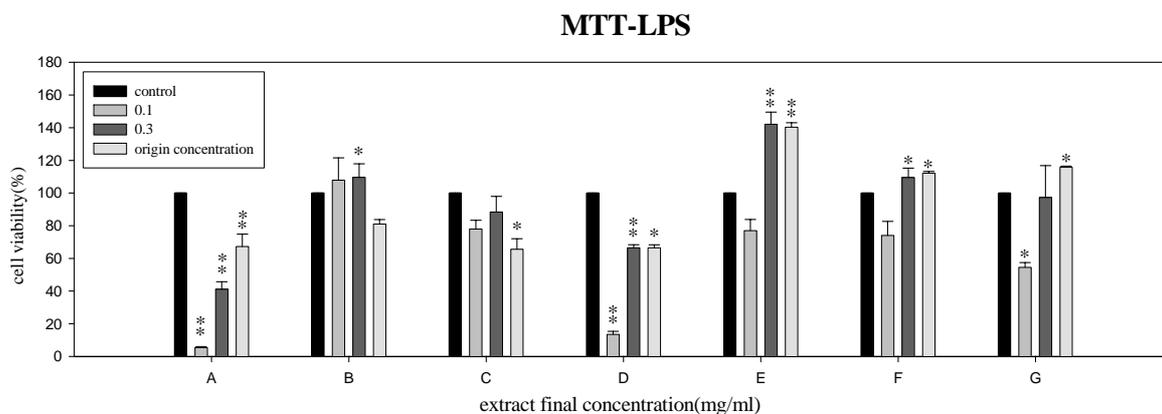
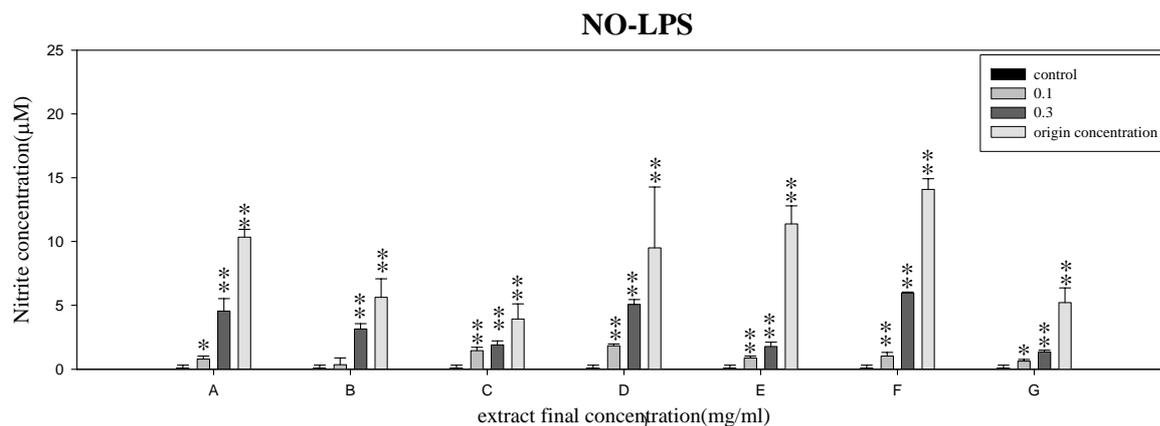
接著利用 MTT 探討七種中草藥對受 LPS 活化的 RAW264.7 細胞的存活率的影響, 結果如圖二(B)所示。益母草、化石草、雞屎藤、鳳尾草、蛇舌草對活化後的 RAW264.7 細胞的毒性與對未活化的細胞的毒性的影響類似, 皆隨濃度增加而遞減。其中益母草、化石草及蛇舌草對於巨噬細胞毒性最強。反之, 去尖蒼耳子在低濃度時不僅無細胞毒性, 且有促進細胞增生的功效, 僅在最高濃度 (0.63 mg/ml)時才對細胞產生毒性(存活率約為 70.2 ± 6.2 %)。對照 NO 產生量與細胞毒性, 我們發現益母草及蛇舌草的濃度越低時, 毒性越強, 對 NO 抑制效果越差。使君子在低濃度和高濃度時皆有毒性僅在 0.3mg/ml 時無毒, 但是抑制 NO 產生效果雖顯著但並不強。

MTT+LPS



NO+LPS





(B)

圖一：七種中草藥分別對沒有受 LPS 誘導及有受 LPS 誘導之 RAW264.7 巨噬細胞的 NO 產生量

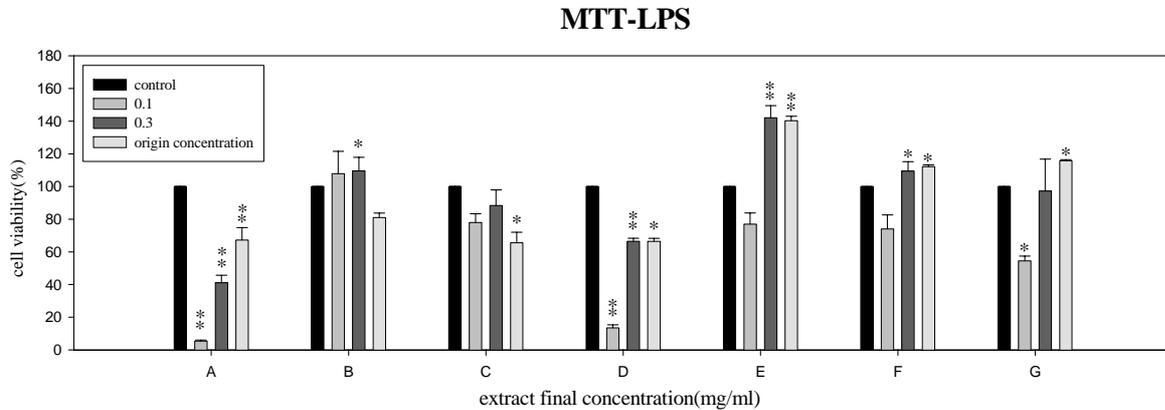
(A) 沒有以 LPS 誘導 (B) 受 LPS 誘導

圖一(A)control 組是未受 LPS 誘導者，七種中草藥萃取物分別為：A 益母草、B 使君子、C 去尖蒼耳子、D 化石草、E 雞屎藤、F 鳳尾草、G 蛇舌草。origin concentration 分別為益母草原濃度 0.44mg/ml(A)。使君子原濃度 0.53mg/ml(B)。去尖蒼耳子原濃度 0.62mg/ml(C)。化石草原濃度 0.69mg/ml(D)。雞屎藤原濃度 1.27mg/ml(E)。鳳尾草原濃度 0.52mg/ml(F)。白花蛇舌草原濃度 1.16mg/ml(G)。

圖二是藉由 MTT 的方法來檢測細胞之存活率，圖二(A)是要觀察七種中草藥本身對細胞是否有毒性，由結果看出，七種中草藥中與控制組比較起來，發現益母草與化石草對於巨噬細胞有顯著的毒性，使細胞之存活率下降，其餘的使君子、去尖蒼耳子、雞屎藤、鳳尾草、蛇舌草皆對細胞沒有顯著的毒性。圖二(B)是檢測七種中草藥對受

LPS 活化 RAW264.7 細胞的毒性。由圖二(B)中可明顯的看出，加入 LPS 誘導 RAW264.7 細胞產生發炎反應，七種中草藥細胞存活率與 normal 100% 存活率來比較，可以發現有些中草藥具有毒性，又以益母草與化石草毒性最強，去尖蒼耳子與鳳尾草的毒性最弱。

(A)



(B)

圖二：七種中草藥分別對沒有受 LPS 誘導及有受 LPS 誘導之 RAW264.7 巨噬細胞藉由 MTT assay 來檢測細胞的存活率。(A) 沒有以 LPS 誘導 (B) 受 LPS 誘導

圖一(A)control 組是未受 LPS 誘導者，七種中草藥萃取物分別為：A 益母草、B 使君子、C 去尖蒼耳子、D 化石草、E 雞屎藤、F 鳳尾草、G 蛇舌草。origin concentration 分別為益母草原濃度 0.44mg/ml(A)、使君子原濃度 0.53mg/ml(B)、去尖蒼耳子原濃度 0.62mg/ml(C)、化石草原濃度 0.69mg/ml(D)、雞屎藤原濃度 1.27mg/ml(E)、鳳尾草原濃度 0.52mg/ml(F)、白花蛇舌草原濃度 1.16mg/ml(G)。

以圖一、圖二的結果顯示，七種中草藥中，去尖蒼耳子及鳳尾草兩種中草藥，可以明顯的抑制受 LPS 活化的 RAW264.7 細胞生成 NO，且無明顯的細胞毒性產生。

討論:

一氧化氮是個存在時間極短的生物活性分子，它參與許多生理及病理的反應，^[9]。在生物體內，NO 是經由 NOS 將 L-arginine 之 guanidino 官能機反應得。目前已知有三種 NOS，第三類則是誘導表現的酵素，稱為 iNOS，此種巨噬細胞，只有在受 lipopolysaccharide (LPS)、interferon- γ (IFN- γ) 或是 interleukin-1 細胞激素刺激時，其活性才會表達出來，並產生大量的 NO，引發發炎反應，因此藉由 lipopolysaccharide (LPS)、interferon- γ (IFN- γ) 或是 interleukin-1，來刺激細胞產生發炎反應或是刺激其免疫力，細胞發炎時會釋放出 nitric oxide synthase (iNOS) 在培養液中，固越能抑制活

化後的 RAW264.7 細胞硝酸鹽的產生且無毒性的中草藥，表示含抗發炎效果越高。在實驗結果可明顯的看出，去尖蒼耳子與鳳尾草這兩種藥草的抗發炎效果最好且對細胞沒有毒性，因此建議，我們可以針對這兩種中草藥更進一步的以 RT-PCR 來看 iNOS 基因的表達，另外以 Western blot 來看 protein 的表達等，可以更清楚了解兩種中草藥抗發炎的機轉。

參考文獻:

- 【1】常用中草藥手冊，國立中國醫藥研究所出版，李沐勳、李威著 聯著，91 月出版，p93。
- 【2】常用中草藥手冊，國立中國醫藥研究所出版，李沐勳、李威著 聯著，91 月出版，p66。
- 【3】常用中草藥手冊，國立中國醫藥研究所出版，李沐勳、李威著 聯著，91 月出版，p124。
- 【4】常用中草藥手冊，國立中國醫藥研究所出版，李沐勳、李威著 聯著，91 月出版，p36。
- 【5】常用中草藥手冊，國立中國醫藥研究所出版，李沐勳、李威著 聯著，91 月出版，p136。
- 【6】常用中草藥手冊，國立中國醫藥研究所出版，李沐勳、李威著 聯著，91 月出版，p126。
- 【7】常用中草藥手冊，國立中國醫藥研究所出版，李沐勳、李威著 聯著，91 月出版，p50。



表一. 利用乙醇萃取七種中草藥之回收率

樣品名稱	益母 草	使君 子	去尖蒼耳 子	化石 草	雞屎 藤	鳳尾 草	白花蛇舌 草
樣品重量(g)	150	150	150	100	180	100	100
萃取用乙醇量 (ml)	1500	1000	1000	1000	1000	1500	1500
回收樣品重量 (g)	2.2	2.12	2.48	3.45	4.445	2.6	4.64
回溶乙醇量 (ml)	50	40	40	50	35	50	40
回溶後樣品濃 度 (mg/ml)	44	53	62	69	127	52	116
回收率 (%)	1.47	1.41	1.65	3.45	2.47	2.6	4.64