

# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

探討丁香醇和異丁香醇衍生物之體外對抗內毒素引起發炎反應及氧化壓力路徑之作用

計畫類別：個別型計畫      整合型計畫

計畫編號：CN9832

執行期間：98年1月1日至98年12月31日

計畫主持人：劉淑芬

計畫參與人員：劉淑芬；楊凱婷（藥學二丁）

執行單位：藥學系

中華民國 99 年 2 月 24 日

## 前言

敗血症(sepsis)是一種系統性發炎反應症候群，常在一些嚴重感染的病人上出現(Martin et al., 2003)。病人身體中的局部發炎會促進發炎前介質像是腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor, TNF)和介白素(interleukins)的釋放，接著這些發炎前介質會導致白血球、淋巴球移行到感染的區域。一些全身的反应像是微血管通透性增加、血小板聚集、局部血流減少以及缺血再灌流的的損害都會發生。在臨床上表現出系統性的低血壓、對血管收縮劑的反應性不良，接著影響到器官的血液灌流及功能改變，最後導致多重性的器官衰竭(Bone et al., 1997; Brix-Christensen et al., 2004; Marik and Zaloga, 2002)。敗血性休克(septic shock)則是敗血症常見的併發症並且可能會致命。而敗血症通常是由革蘭氏陰性菌的內毒素(endotoxin)或脂多醣體(lipopolysaccharide, LPS)所引起。

丁香油酚(eugenol；4-allyl-2-methoxyphenol)和異丁香油酚(isoeugenol；4-propenyl-2-methoxyphenol)是丁香油中的主要成分，常用來當作矯味劑或是牙齒外科中的抗菌劑。另外，eugenol 和 isoeugenol 也已經被發現具有抗氧化作用，可抑制脂質過氧化(Yokota et al., 1988)。在之前的抗發炎研究中發現 eugenol 和 isoeugenol 可抑制經脂多醣體刺激的巨噬細胞發炎時的 NO 和 COX-2 釋放，主要是經由抑制 NF- $\kappa$ B 路徑和 ERK1/2、p38 的活化，因此顯示兩者具有顯著的抗發炎作用(Choi et al., 2007; Li et al., 2006)。

而本實驗所探討的藥物除了原料藥 eugenol 和 isoeugenol 外，還包括了利用 eugenol、isoeugenol 為骨架的衍生物，像是 isoeugenodilol (N-{4-[2-hydroxy-3-(2-methoxy-1-oxyethylaminobenzene)propoxy]-3-methoxy}-1-propenylbenzene)、isoeugenolol (1-(isopropylamino)-3-[(4-propenyl-2-methoxy)propoxy]-2-propanol) 以及 glyceryl- isoeugenol (4-o-glycerol-3-methoxy-1-propenylbenzene)皆是由 isoeugenol 衍生而來。在之前的研究中顯示，isoeugenolol 是一種選擇性的 $\beta$ 1-blocker，同時能使血管及氣管平滑肌放鬆(Lin et al., 1999)；而 isoeugenodilol 則是 $\alpha/\beta$  blocker，並且發現具有抗氧化功效 (Yeh et al., 2000)。另外，eugenolol(1-(isopropylamino)-3-[(4-allyl-2-methoxy-)phenoxy]-2-propanol) 則是 eugenol 的衍生物，Chen 等人(1997)發現 eugenolol 是一種非選擇性的 $\beta$ -blocker 同時具有血管的放鬆功能。

在過去的研究中，eugenol 被發現具有抗發炎(Kim et al., 2003; Lee et al., 2007; Li et al., 2006)、抗氧化及抑制脂質過氧化的功能(Nagababu and Lakshmaiah, 1992)；而 isoeugenol 同樣也被發現有抗發炎作用(Murakami et al., 2005)。合成的衍生物在過去的研究中被證實具有心血管作用，但是其抗發炎效果及機轉還未被探討。因此在本實驗中，利用 LPS 刺激的老鼠巨噬細胞株 RAW264.7 當作實驗模式來評估 eugenol 和 isoeugenol 衍生物的抗發炎效果，並進而探討其相關的機轉。

## 實驗方法

一、一氧化氮測定 (nitric oxide analysis): 將  $10^6$  個細胞種於 6 孔培養盤中，24 小時後細胞投與不同的藥物及其不同濃度一小時後，再加入 LPS (100 ng/ml) 培養 24 小時後，吸取 150  $\mu$ l 上清液至 96 孔盤中，加入 150  $\mu$ l 的 Griess Reagent 均勻混合後，測量 540 nm 吸光值。與檢量線比較後即可計算出上清液所含 nitrite 量。

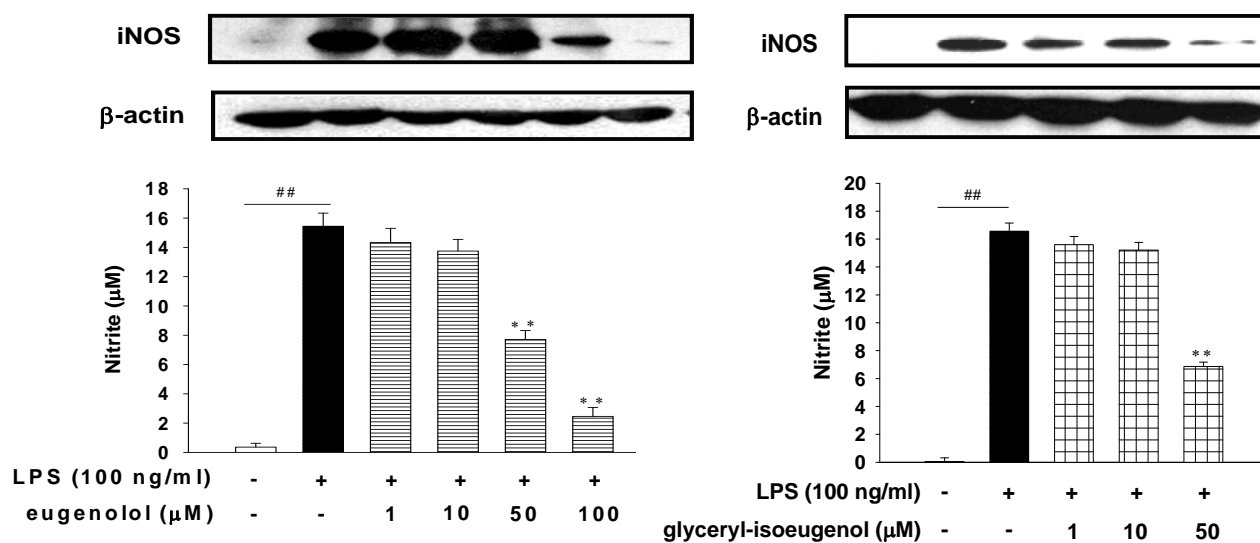
二、測定 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  含量 (ELISA): 將  $10^5$  個細胞種於 24 孔培養盤中，24 小時後細胞投與不同的藥物及其不同濃度一小時後，再加入 LPS (1  $\mu$ g/ml) 培養

24 小時後，吸取上清液並用 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的 ELISA kit 測定其含量。

**三、西方點墨法 (Western blotting):** 蛋白質濃度以 Bio-Rad DC Protein Assay 測量。得知濃度後，以二次蒸餾水稀釋至特定濃度，取稀釋蛋白液約四分之一體積的 sample buffer 加入後，放置於沸水中 5 分鐘，再置於冰上 5 分鐘，短暫離心後即可注入至孔洞中。先以電壓 100 伏特跑 10 分鐘，待蛋白質跑至上下膠交界處後，再將電壓轉至 200 伏特，待 40 分鐘後即關閉電源。將 PVDF membrane 先以甲醇浸泡 2 分鐘，再用二次蒸餾水潤洗後，再浸泡於 transfer buffer 中 15 分鐘備用。將 SDS-PAGE 置於 membrane 上，上下以潤濕的紙墊包夾後，置於 semi-dry transfer 機器上扣好電極和上蓋後，以 20 伏特轉漬 30 分鐘。修剪 membrane 得到特定分子量的 band 後，加入適量 blocking buffer (5 % 脫脂奶粉於 washing buffer) 室溫下搖晃 1 小時以去除非特异性結合，再以稀釋過的一級抗體均勻覆蓋於 band 上 4 $^{\circ}$ C 作用隔夜。之後吸起一級抗體後，以 washing buffer 洗 5 分鐘六次。在將稀釋後的二級抗體均勻覆蓋於 band 上室溫作用 1 小時，之後再以 washing buffer 洗 5 分鐘六次，即可用 ECL 壓片。

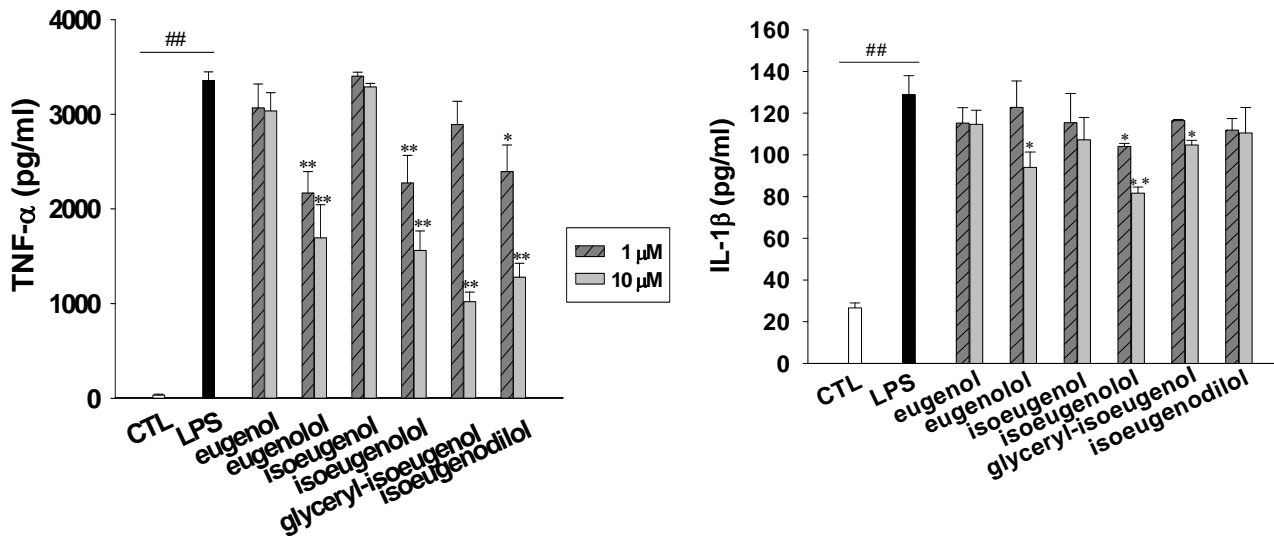
### 結果與討論

為了探討化學結構與抗發炎能力之間的關係，我們評估了 eugenol 與 isoeugenol 衍生物的抗發炎作用。從我們的結果可以知道，eugenol 的 iNOS、TNF- $\alpha$  以及 IL-1 $\beta$  的抑制作用比 eugenol 顯著；在 isoeugenol 衍生物方面，glyceryl-isoeugenol 的抗發炎作用是衍生物中最好的，它比 isoeugenol 有更顯著的抑制 TNF- $\alpha$  以及 IL-1 $\beta$  作用；isoeugenol 的抗發炎作用較偏向抑制 TNF- $\alpha$  以及 IL-1 $\beta$ ；isoeugenodilol 則是在 TNF- $\alpha$  抑制有較強的作用。總結來說，從我們的結果可知，eugenol 及 glyceryl-isoeugenol 的抗 iNOS、TNF- $\alpha$  以及 IL-1 $\beta$  表現作用可能是經由阻斷 MAPKs 及 Akt/I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化表現來抑制下游 NF- $\kappa$ B 等轉錄因子的表現與活化而來。

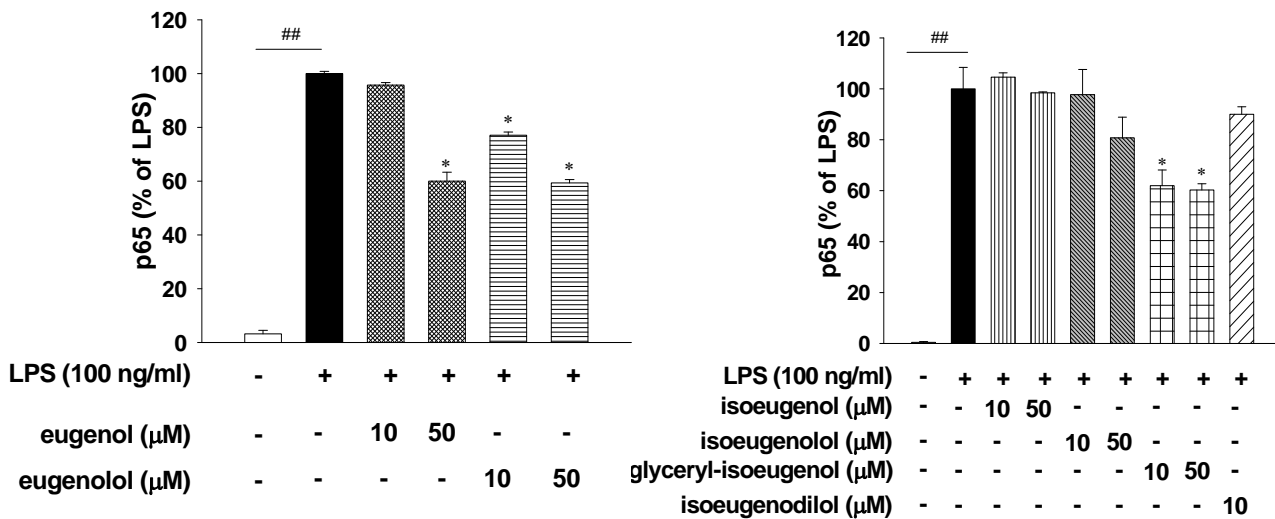
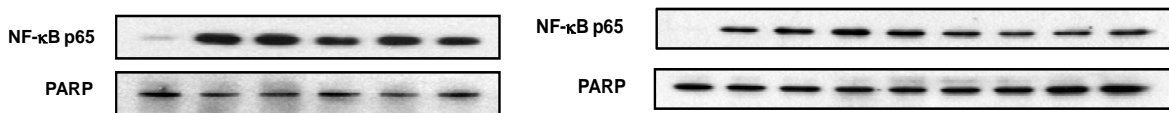


如上圖所示，先給予藥物 30 分鐘後再給予 LPS(100 ng/ml) 刺激 24 小時，發現 NO 及 iNOS 可在 LPS 組被刺激出來。給藥組發現結構修飾的 eugenol 在 50  $\mu$ M 時就能夠有效抑制 NO 釋放 50 %；而在 isoeugenol 衍生物方面，

glyceryl-isoegenol 要在 50  $\mu\text{M}$  才有顯著的抑制 NO 的作用 ( $p < 0.01$ )。而 eugenolol 也能更有效的抑制 LPS 引起的 iNOS 表現；而在 isoegenol 衍生物方面，相似於 NO 釋放的實驗結果也在 iNOS 表現中被觀察到。



如上圖所示，先給予藥物 30 分鐘後再給予 LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) 刺激 24 小時，發現 LPS 可明顯增加 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  釋放量。在 TNF- $\alpha$  方面，發現給藥組中的 eugenol 和 isoegenol 對 TNF- $\alpha$  的產生沒有任何影響；然而其他的衍生物都能夠濃度相關性的有效抑制 TNF- $\alpha$  的產生。在低濃度時 (1  $\mu\text{M}$ )，eugenolol、isoegenolol 以及 isoegenodilol 都能夠抑制 TNF- $\alpha$  的產生約 40 %；高濃度時 (10  $\mu\text{M}$ )，則以 glyceryl-isoegenol 效果最為顯著，可減少約 70 %。在 IL-1 $\beta$  方面，在低濃度時 (1  $\mu\text{M}$ )，只有 isoegenolol 有些微抑制效果 (約 20%)；而高濃度時 (10  $\mu\text{M}$ )，eugenolol、isoegenolol 和 glyceryl-isoegenol 能夠抑制 IL-1 $\beta$  的產生，其中以 isoegenolol 效果最明顯 (約 40%)。



如上圖所示，先給予藥物 30 分鐘後再給予 LPS (100 ng/ml) 刺激 30 分鐘，萃取核

蛋白分析後發現 NF- $\kappa$ B p65 次單元在 LPS 組被刺激出來，代表以 LPS 刺激的巨噬細胞會有大量的 p65 蛋白轉入核中。加藥組發現低濃度時(10  $\mu$ M)，有明顯的抑制 p65 入核能力。在 isoeugenol 衍生物部分，glyceryl-isoeugenol 在 10  $\mu$ M 時，就能夠抑制 p65 入核表現 40 %。

### 參考文獻

- Bone, R. C., et al., 1997. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*. 112, 235-43.
- Brix-Christensen, V., et al., 2004. Acute hyperinsulinemia restrains endotoxin-induced systemic inflammatory response: an experimental study in a porcine model. *Anesthesiology*. 100, 861-70.
- Choi, C. Y., et al., 2007. Isoeugenol suppression of inducible nitric oxide synthase expression is mediated by down-regulation of NF-kappaB, ERK1/2, and p38 kinase. *Eur J Pharmacol*. 576, 151-9.
- Kim, S. S., et al., 2003. Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells. *Life Sci*. 73, 337-48.
- Lee, Y. Y., et al., 2007. Eugenol suppressed the expression of lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators in human macrophages. *J Endod*. 33, 698-702.
- Li, W., et al., 2006. Inhibitory action of eugenol compounds on the production of nitric oxide in RAW264.7 macrophages. *Biomed Res*. 27, 69-74.
- Lin, Y. T., et al., 1999. Isoeugenolol: a selective beta1-adrenergic antagonist with tracheal and vascular smooth muscle relaxant properties. *Jpn J Pharmacol*. 80, 127-36.
- Marik, P. E., Zaloga, G. P., 2002. Therapeutic sedation: has its time come? *Crit Care Med*. 30, 949-52.
- Martin, G. S., et al., 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 348, 1546-54.
- Murakami, Y., et al., 2005. Dehydrodiisoeugenol, an isoeugenol dimer, inhibits lipopolysaccharide-stimulated nuclear factor kappa B activation and cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Arch Biochem Biophys*. 434, 326-32.
- Nagababu, E., Lakshmaiah, N., 1992. Inhibitory effect of eugenol on non-enzymatic lipid peroxidation in rat liver mitochondria. *Biochem Pharmacol*. 43, 2393-400.
- Yokota, H., et al., 1988. Enhancement of UDP-glucuronyltransferase, UDP-glucose dehydrogenase, and glutathione S-transferase activities in rat liver by dietary administration of eugenol. *Biochem Pharmacol*. 37, 799-802.