

嘉南藥理大學114年度 研究計畫成果報告

☑校內專題研究整合型計畫

總計畫名稱：合成衍生物與天然植萃之新型抗菌劑開發策略

子計畫名稱：CN11412藥物抗發炎活性之評估

☐個人型產學合作研究計畫

計畫名稱：

執行期間：114年06月09日至114年12月31日

總計畫主持人：施美份教授

本（子）計畫主持人：梁峰賓 助理教授

中華民國115年02月20日

一、 研究背景與研究目的

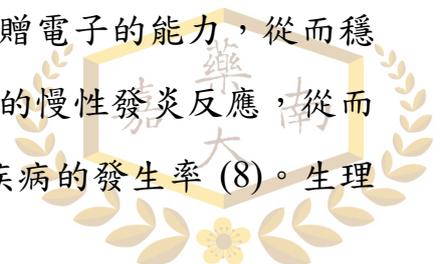
Clotrimazole 在化學上被認為是一種結構特殊的藥物，它含有四個芳香環，與一個四面體碳原子結合，對這個原子造成高度的立體包覆，其中一個芳香基團是咪唑環，已知可在生物體系中介導電子轉移反應。Clotrimazole 廣泛用於腳癬、外陰陰道念珠菌病和口咽念珠菌病的局部治療。它能針對麥角甾醇的生物合成，從而抑制真菌生長，因此具有抗真菌活性。除了抗真菌活性之外，Clotrimazole 也是一種針對其他幾種疾病的藥物，例如鎌狀細胞疾病、瘧疾和某些癌症 (1)。除此之外，Clotrimazole 可以抑制細胞質內 NF- κ B 轉移至細胞核內而抑制其對下游基因的轉錄活性 (2)，NF- κ B 一直被認為觸發生理發炎反應的訊息傳遞分子，主要是藉由白介素 1 (IL-1) 和腫瘤壞死因子 α (TNF α) 等促發炎細胞因子對 NF- κ B 的活化，以及 NF- κ B 在活化其他促發炎基因 (包括細胞因子、化學因子和黏附分子) 表達的作用 (3)。再者，Clotrimazole 亦可以調節抗氧化防禦系統 (CAT、SOD、GSH 和 GST) 和氧化應激生物指標 (脂質過氧化 - LPO；蛋白質羰基化 - PTC) 的能力 (4)，顯示 Clotrimazol 除了原有的抗菌作用之外，亦蘊含了其他的生物活性，具有開發成為其他領域用藥的潛能。

魚腥草，本品為三白草科 Saururaceae 植物蕺菜 *Houttuynia cordata* Thunb. 之開花期乾燥全草，它喜歡在潮濕的土壤和溫暖的環境中生長，在台灣、韓國、日本、印度和其他亞洲地區都有其草本應用的描述，魚腥草含有多種豐富的化學成分，包含了生物鹼、揮發油和黃酮類等，這些都是發揮其藥理活性的主要成分 (5)。許多文獻已證明魚腥草萃取物能有效對抗各種疾病，包括癌症、糖尿病、肥胖症、肺纖維化、皮膚病和嚴重急性呼吸道症候群 (SARS)，其中



氧化壓力和發炎被認為是涉及各種疾病病理的中心機制，魚腥草的不同溶劑萃取物及其活性生物分子已被證實可有效對抗各種發炎因子所引起的發炎，包含抑制發炎細胞因子 TNF- α 、各種白細胞介素 (IL) 的表現與功能，以及降低由誘導性 NOS (iNOS) 合成的活性自由基 NO，魚腥草的乙酸乙酯萃取物也被證實可抑制 NF- κ B p65 的核轉移，並減少 LPS 引發的 RAW 264.7 細胞中 MAPKs (p38 和 JNK) 的活化。此外，萃取物亦可顯著降低 NO、PGE2、TNF- α 和 IL-6 的表現。另外，魚腥草萃取物及其生物活性分子的抗氧化特性，透過使用多種抗氧化測試方法，已證明其在體外和體內模型中均具有強大的抗氧化特性，諸如活化芳基碳氮化合物受體 (AHR) 和紅血球核因子 2 (NFE2) 相關因子 2 (Nrf2)，以及與維生素 E 相似的強效抗脂質過氧化活性。魚腥草萃取物及其生物活性分子被證實具有抗發炎和抗氧化的特性，於體外和體內研究都顯示魚腥草對各種使用的實驗模型中沒有顯示毒性，未來的臨床研究將有望對治療發炎相關疾病的未來方向產生影響 (6)。

在人體大量複雜的分子和細胞生存機制中，發炎反應是最活躍、最重要的生理機制之一，炎症反應旨在保護宿主免受致病性感染或傷害的威脅，消除傷害因子，並啟動移除受損組織和恢復組織平衡的過程 (7)。自由基是氧在人體內經新陳代謝後所產生的活性不穩定因子，其可與任何物質發生強烈的反應，所以，當體內存在過多的自由基時，會攻擊細胞，造成細胞的氧化、損傷，以致體內產生發炎反應，甚至導致疾病與衰老。而抵禦抗自由基攻擊的抗氧化物，它是一類可以中和自由基的化合物，具有捐贈電子的能力，從而穩定自由基並減少其損傷效應，進而降低身體的慢性發炎反應，從而降低了對人體組織無形的慢性傷害，與降低疾病的發生率 (8)。生理



上，有大量的關鍵酵素參與發炎的發生與發展，一旦藥物對相關的酵素具有抑制活性，就具有很高的抗發炎潛力。因此，建構與關連酵素活性的分子與生化模型非常重要，目前常見有已建立之 PLA2、COX、5-LOX、PGE2 合成酶、LTA4H 等的經典分子與生化實驗模式。考慮到氧化壓力和炎症之間的密切關係，抗氧化活性的分子和生化模型（DPPH、ABTS 和總抗氧化能力測試）也可用於評估抗炎與抗氧化作用(9)。

本研究中預計執行 Clotrimazole 結構衍生物和魚腥草萃取物之抗氧化與抗發炎的活性評估。由於依據過去的研究，Clotrimazole 除抗菌活性之外，亦具有調節發炎反應因子與氧化壓力的活性功效，因此，針對 Clotrimazole 結構衍生物同樣的去探討其調節發炎反應因子與氧化壓力的活性功效。而魚腥草含有豐富的生物鹼、揮發油、多酚和黃酮類等活性成分，亦是具有抗氧化與抗發炎的藥理活性，兩者都是具有開發成為抗發炎先導型藥物的潛力，或者開發成為保健產品的候選素材。因此，本計畫將利用 DPPH 檢測法測定苯基三唑合成物和抗菌性天然萃取物之抗氧化效果，與體外5-脂氧合酶分析來偵測這些候選物質其抗發炎的潛力(10)。

二、 研究方法與步驟

(一)、實驗試劑

所有實驗試劑皆購自於 Sigma。

(二)、清除 DPPH 自由基能力試驗(11)

本研究使用 DPPH 檢測法測定不同化合物與天然萃取物的自由基清除活性，將不同濃度的化合物與萃取物用 DMSO 調至 40 μ L 並加入 2.96mL DPPH (0.1mM) 溶液，並混和均勻，接著於室



溫下避光反應混合物30分鐘，之後，將反應物轉移至96孔盤中，在 517nm 波長下以酵素免疫分析儀檢測吸光值，自由基清除活性百分比使用以下公式計算：

清除活性 (%) = [(Abs control - Abs sample) / Abs control] x 100。

體外5-脂氧合酶分析 In-vitro 5-Lipoxygenase Inhibition Assay (12)在50 μ L 含有 LOX (最終濃度為 100 ng 蛋白質/mL) 的50 mM Tris HCl 緩衝液 (pH 7.4)，與 20 μ L 測試樣品 (化合物與萃取物) 於 25°C 下先反應 5 分鐘，接著加入 50 μ L 亞油酸 (最終濃度140 μ M) 再進行反應，LOX 和亞油酸的最終濃度是以反應混合物的總容量 120 μ L 為基礎。加入 100 μ L 新製備的 FOX 試劑：硫酸 (30mM)、二甲酚橙 (100 μ M)、硫酸鐵 (II)(100 μ M)、甲醇/水 (9:1)，以終止實驗。終止後，讓 Fe³⁺-染料複合物在 25°C 下作用 30 分鐘，然後在酵素免疫分析儀上以 560 nm 的波長進行測量。

三、 結果與討論

氧化壓力 (Oxidative Stress) 與發炎反應 (Inflammation) 之間的互動，現已被理解為一個雙向、階層化且受精細調控的分子網路，而非單一路徑的因果關係。過去生物醫學多將活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 與活性氮 (Reactive Nitrogen Species, RNS) 視為細胞代謝中不可避免的有害副產物，並強調其主要危害在於對脂質、蛋白質與核酸造成非特異性的氧化性損傷。然而，隨著氧化還原生物學 (Redox Biology) 的發展，研究逐漸形成新的共識：在生



理範圍內、具訊號功能的氧化活性物質所構成的「氧化性善壓力」(Oxidative Eustress)，其角色更偏向於細胞訊息傳遞、環境適應與免疫恆定的關鍵調節者。

當此一氧化還原平衡被破壞——亦即活性物質的生成速率超過細胞內源性抗氧化防禦與清除系統的負荷——細胞便會進入「氧化性惡壓力」(Oxidative Distress) 狀態。此時所呈現的不僅是物理化學層面的傷害累積，更可視為一種不良適應的氧化還原訊號傳遞 (maladaptive redox signaling)：它會促使特定轉錄因子與促發炎訊息路徑被啟動，進而引發急性或慢性發炎反應。另一方面，發炎一旦被啟動，活化的免疫細胞（例如吞噬細胞）亦會透過多種氧化酶系統進一步產生 ROS 以執行防禦功能，反過來又加劇氧化還原失衡，形成一個可自我強化的正回饋惡性循環，使氧化壓力與發炎反應彼此推動、相互放大。

在現今植物化學 (phytochemistry) 與民族藥理學 (ethnopharmacology) 的研究框架下，魚腥草 (*Houttuynia cordata* Thunb.) 因呈現多層面的生物活性而備受關注。魚腥草為三白草科 (Saururaceae) 蕺菜屬多年生草本植物，長期應用於亞洲傳統醫療經驗之中；同時，其成分組成具高度特色，使其逐漸成為功能性食品與高階化妝品原料開發的重要候選者。

就抗氧化機制而言，魚腥草萃取物的關鍵活性物質以黃酮類化合物為主。其中已鑑定出多種黃酮醇苷 (flavonol glycosides)，以槲

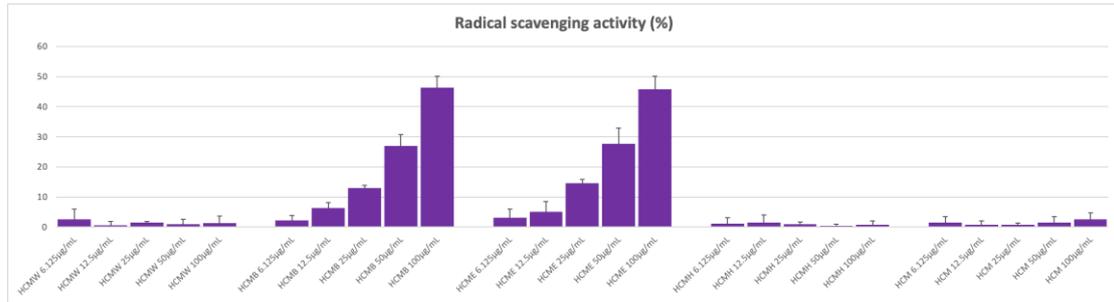


皮苷 (quercitrin) 與金絲桃苷 (hyperoside) 的含量相對突出。這些多酚類成分可透過電子或氫原子供體作用 (electron/hydrogen-donating capacity)，清除或鈍化活性氧 (ROS)，進而降低氧化壓力對脂質、蛋白質與核酸等生物大分子的氧化性傷害，並在細胞層級維持氧化還原平衡。

基於魚腥草具備顯著的抗氧化潛力，本子計畫八承接子計畫六所建立之原料處理與萃取流程，取得以不同溶劑極性進行分段萃取之魚腥草萃取物 (例如非極性之正己烷層、中等極性之乙酸乙酯層，以及高極性之甲醇與水層等)，並以 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 自由基清除試驗作為初步體外抗氧化評估平台，用以比較各分段萃取物之自由基清除能力與效力差異。

由圖一的 DPPH 檢測結果顯示，各分段萃取物的自由基清除能力呈現明顯差異；其中以正丁烷層 (HCMB) 與乙酸乙酯層 (HCME) 之萃取物表現最為突出，且在測試濃度範圍內呈現劑量依存性 (dose-dependent) 提升，顯示其抗氧化活性成分在上述中低極性分段中具有較高的富集程度。相較之下，正己烷層 (偏脂溶性) 與高極性之甲醇/水層雖仍可能具一定清除能力，但整體效力較不顯著，暗示其主要成分可能偏向脂溶性揮發物、色素或高分子極性成分 (如多醣、部分有機酸) 而非對 DPPH 反應性最強之多酚類骨架。



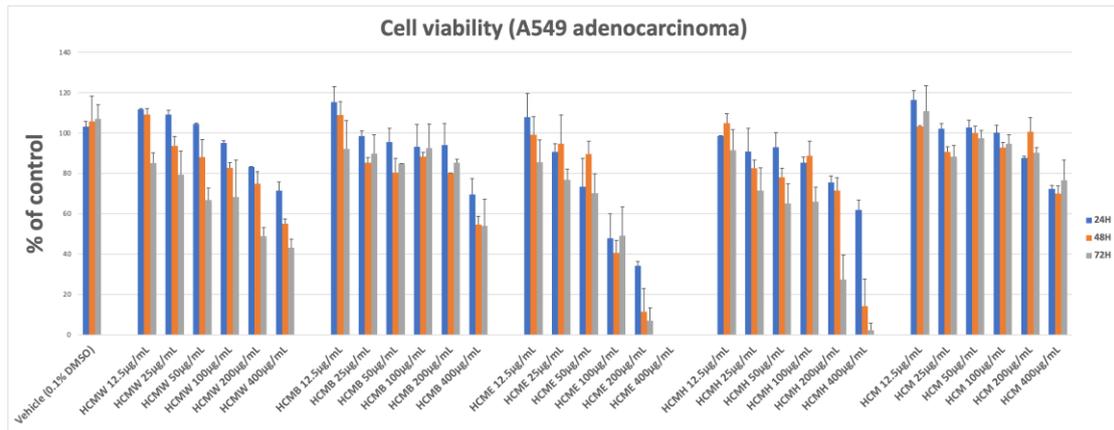


圖一、不同魚腥草萃取物的自由基清除能力

鑑於魚腥草雖長期作為亞洲常見之藥食兩用素材而被廣泛使用，但在經由溶劑分段萃取後，萃取物的化學組成將相對富集特定親脂性或中等極性成分，其濃度與暴露型態已不同於傳統食用或水煎使用情境，因而可能帶來安全性與生物相容性上的不確定性。為初步釐清不同分段萃取物之細胞層級安全性，本研究以人類肺腺癌細胞株 A549 作為體外評估模型，採用 MTT 細胞活性檢測法量測各分段魚腥草萃取物對細胞存活率之影響，並建立其濃度與毒性的反應關係。

由圖二的 MTT 檢測結果顯示，各分段萃取物對 A549 的影響存在顯著差異；其中以乙酸乙酯層萃取物 (HCME) 與正己烷層萃取物 (HCMH) 呈現最明顯的細胞毒殺 (cytotoxic) 效應，且在測試濃度範圍內表現為劑量依存性 (dose-dependent) 下降之細胞存活率。





圖二、不同魚腥草萃取物對於 A549 肺腺癌細胞株之體外毒殺作用

在藥物與保健食品市場中，口服給藥途徑（oral administration）因其操作簡便、使用依從性高及大眾接受度佳，長期以來一直是最主要的投予方式。就藥品而言，約有九成以上之上市製劑係以口服劑型形式存在，顯示口服給藥在臨床治療與健康管理體系中的核心地位。然而，口服途徑亦不可避免地面臨生體可用率（bioavailability, F）受限的問題。不同藥物在腸胃道吸收與體內可用性方面具有高度差異。在保健食品與天然物領域中亦存在類似問題。多種具有高度藥理潛力的天然化學成分，如薑黃素（curcumin）與槲皮素（quercetin），其實際口服吸收率普遍低於5%。這種極低的生體可用率導致其體內暴露量高度依賴個體腸道吸收能力、代謝活性與腸道菌相差異，因而產生顯著的個體間變異（inter-individual variability）。其結果是，該類成分在人體內往往難以呈現可預測、可重現且可劑量控制的生理調節效果。而魚腥草中富含的黃酮類（特別是配糖型黃酮醇苷）即屬於屬於生物藥劑學分類系統（BCS）中的第二類或第四類藥物，即溶解度差或滲透性差。傳統賦形劑無法



改善這些難溶性成分的溶解性或是滲透性，導致藥物在胃腸道的吸收效率低下，療效難以完全發揮。因此，若能引入口服吸收促進劑（oral absorption enhancers）作為功能性賦形劑，可以改善目前口服使用上，成分吸收不足的缺點。

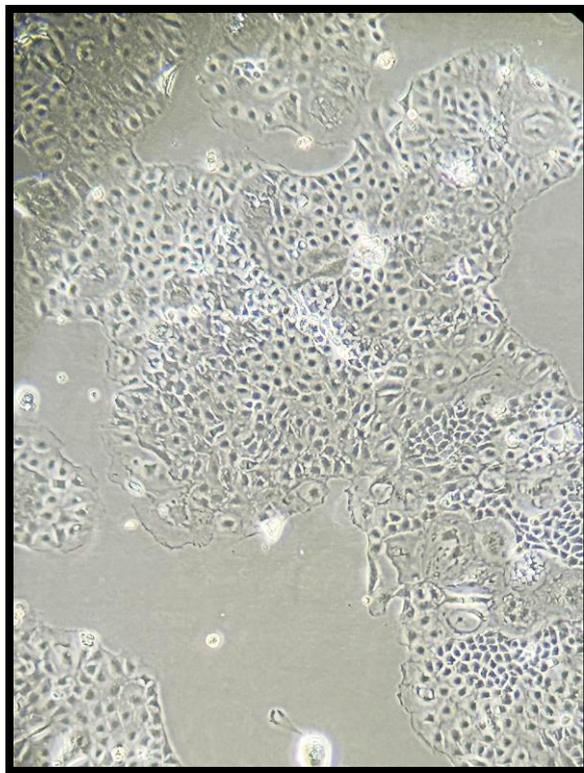
在吸收促進劑的篩選與優化過程中，體外細胞實驗模型（In Vitro Cell Models）扮演著不可替代的角色。目前，體外細胞模型最常使用的是源自人類結腸腺癌的 Caco-2細胞株，已成為評估腸道吸收的「黃金標準」。在特定的培養條件下（通常在具半透膜 transwell insert 上培養21天），Caco-2細胞能夠發生自發分化，形成與人類小腸腸細胞（Enterocytes）高度相似的單層柱狀上皮結構。分化後的 Caco-2細胞表現出顯著的極性（Polarity），其頂端側（Apical side, 代表腸腔）發育出密集的微絨毛（Microvilli），並形成典型的刷狀緣結構；基底側（Basolateral side, 代表血液/間質）則附著於半透膜上。細胞間形成緊密連接（Tight Junctions）、黏附連接（Adherens Junctions）和橋粒（Desmosomes），將單層細胞緊密封閉，形成高電阻的物理屏障。而所形成的跨膜電阻（transepithelial electrical resistance, TEER）是評估上皮／內皮細胞單層緊密連結完整性最常用、也最適合做早期高效率篩選比較的電生理指標之一。

本子計畫八同步建置一套以跨上皮電阻為核心技術指標的篩選平台，用以鑑別具潛力之口服吸收促進劑，以支援後續開發可提升魚腥草黃酮類成分口服吸收率之功能性賦形劑（functional



excipients)。此平台的目的是在於建立一個快速、非破壞性、可連續追蹤的腸道屏障評估系統，並以「可逆且可控地調節緊密連結（tight junction, TJ）通透性」作為候選材料之篩選準則。

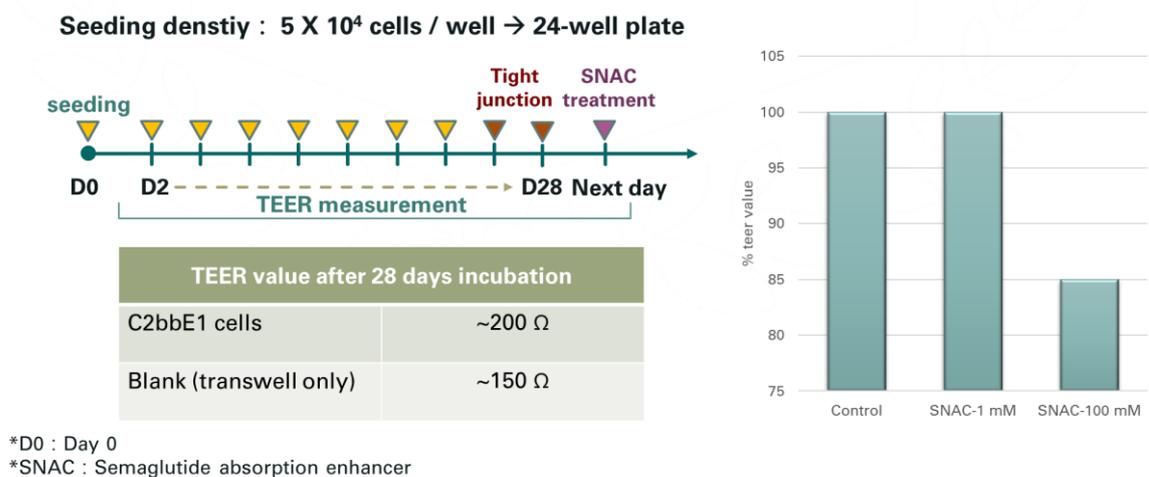
如圖三所示，本研究採用 C2BBe1 細胞株（亦稱 Caco-2BBe；ATCC CRL-2102），其為對表皮生長因子（Epidermal Growth Factor, EGF）具陽性反應的人類結腸腺癌細胞株。C2BBe1 為自 Caco-2（ATCC HTB-37）經稀釋分離（limiting dilution）篩選所獲得之亞株，具備較佳的刷狀緣（brush border）分化特徵與較穩定的單層屏障形成能力，因此常用作為腸道上皮屏障與經上皮運輸研究之體外模型。相較於母株，C2BBe1 在形態分化、單層一致性與 TEER 穩定性上通常更利於建立可重現的篩選流程。



圖三、C2BBe1細胞株培養狀況



如圖四所示，本計畫已以 TEER 連續量測方式確認 C2BBel 在 Transwell 系統中可形成具功能性的上皮屏障，隨培養天數增加，TEER 值逐步上升並達到穩定高原期，顯示細胞間緊密連結逐漸形成，而旁細胞路徑（paracellular pathway）通透性下降。此一 TEER 成熟曲線亦提供本平台的關鍵操作參數，包括可進行促進劑處理的最佳時間區塊、量測頻率與判定標準。為驗證此篩選系統對緊密連結調控的靈敏度與可行性，本研究進一步採用已知可降低 TEER 的吸收促進劑 SNAC (sodium N-(8-[2-hydroxybenzoyl]amino) caprylate) 作為正對照。結果顯示，SNAC 處理後 TEER 值出現可偵測且具顯著性的下降，證實本平台可有效反映細胞通透性功能變化，並具備作為候選促進劑初篩工具的技术可行性。



圖四、跨膜電阻測量技術 (TEER)



四、 參考文獻

1. P D Crowley, H C Gallagher. Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. *J Appl Microbiol.* 2014; 117(3): 611.
2. Dinesh Thapa , Jong Suk Lee, Su-Young Park, Yun-Hee Bae, Soo-Kyung Bae, Jun Bum Kwon, Kyoung-Jin Kim, Mi-Kyoung Kwak, Young-Joon Park, Han Gon Choi, Jung- Ae Kim. Clotrimazole ameliorates intestinal inflammation and abnormal angiogenesis by inhibiting interleukin-8 expression through a nuclear factor-kappaB-dependent manner. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 327(2): 353.
3. Toby Lawrence. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009; 1(6): a001651.
4. Daniel Escorsim Machado, Enrico Mendes Saggiaro, Sidney Fernandes Sales Junior, Jéssica Alessandra-Perini, Luciana de Campos Gomes Diniz, Wagner Santos Coelho, Patrícia Zancan, Jamila Alessandra Perini. Clotrimazole is effective, safe and tolerable for the treatment of endometriosis and functions by downregulating inducible nitric oxide synthase and modulating oxidative stress biomarkers. *Mol Cell Endocrinol.* 2023; 564: 111883.
5. Zhao Wu, Xinyu Deng, Qichao Hu, Xiaolin Xiao, Jing Jiang, Xiao Ma, Mingquan Wu. *Houttuynia cordata* Thunb: An Ethnopharmacological Review. *Front Pharmacol.* 2021; 12: 714694.
6. Khanchuila Shingnaisui, Tapan Dey, Prasenjit Manna, Jatin Kalita. Therapeutic potentials of *Houttuynia cordata* Thunb. against inflammation and oxidative stress: A review. *J Ethnopharmacol.* 2018; 220:35.
7. Pietro Ghezzi, Luciano Floridi, Diana Boraschi, Antonio Cuadrado, Gina Manda, Snezana Levic, Fulvio D'Acquisto, Alice Hamilton, Toby J Athersuch, Liza Selley. Oxidative Stress and Inflammation Induced by Environmental and Psychological Stressors: A Biomarker Perspective. *Pharmacol Ther.* 2021; 227: 107879.
8. Nitish Kumar Bhol, Madhabi Madhusmita Bhanjadeo, Anup Kumar Singh, Umesh Chandra Dash, Rakesh Ranjan Ojha, Sanatan Majhi, Asim K Duttaroy, Atala Bihari Jena: The interplay between cytokines, inflammation, and antioxidants: mechanistic insights and therapeutic potentials of various antioxidants and anti-cytokine compounds. *Biomed Pharmacother.* 2024; 178: 117177.
9. Du Hongzhi, Hou Xiaoying, Guo Yujie, Chen Le, Miao Yuhuan, Liu Dahui, Huang Luqi. Classic mechanisms and experimental models for the anti-inflammatory effect of traditional Chinese medicine. *Animal Model Exp Med.* 2022; 5(2): 108.
10. Astrid S Kahnt, Carlo Angioni, Tamara Göbel, Bettina Hofmann, Jessica Roos, Svenja D Steinbrink, Florian Rörsch, Dominique

Thomas, Gerd Geisslinger, Kai Zacharowski, Sabine Grösch, Dieter Steinhilber, Thorsten J Maier: Inhibitors of Human 5- Lipoxygenase Potently Interfere With Prostaglandin Transport. *Front Pharmacol.* 2022; 12: 782584.

11. Fan Xiao, Tao Xu, Baiyi Lu, Ruihai Liu: Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers.* 2020; 1: 60–69.
12. Waqas Alam, Haroon Khan, Muhammad Saeed Jan, Hany W Darwish, Maria Daglia, Ahmed A Elhenawy: In vitro 5-LOX inhibitory and antioxidant potential of isoxazole derivatives. *PLoS One.* 2024; 19(10): e0297398.

