

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

台灣大戟 (*Euphorbia formosana*) 之三萜類及黃酮類活性  
化合物對內毒素在體外及體內引起發炎之作用及分子機制  
研究

研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 96-2320-B-041-002-  
執行期間：96年08月01日至97年07月31日  
執行單位：嘉南藥理科技大學藥學系

計畫主持人：劉淑芬  
共同主持人：葉竹來  
計畫參與人員：大專生-兼任助理人員：劉鈺文

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 97年10月27日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

台灣大戟 (*Euphorbia formosana*) 之三萜類及黃酮類活性化合物對  
內毒素在體外及體內引起發炎之作用及分子機制研究

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：96-2320-B-041-002-

執行期間：96年08月01日至97年07月31日

計畫主持人：劉淑芬

嘉南藥理科技大學藥學系

共同主持人：葉竹來

高雄醫學大學藥理學研究所

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、  
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年  二年後可公開查詢

執行單位：嘉南藥理科技大學藥學系

中華民國 97 年 10 月 27 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

台灣大戟 (*Euphorbia formosana*) 之三萜類及黃酮類活性化合物對  
內毒素在體外及體內引起發炎之作用及分子機制研究

Effects and molecular mechanisms of triterpenoids and flavonoids  
isolated from *Euphorbia formosana* on lipopolysaccharide-induced  
inflammation in vitro and in vivo.

計畫編號：96-2320-B-041-002-

執行期限：96年08月01日至97年07月31日

計畫主持人：劉淑芬

嘉南藥理科技大學藥學系

共同主持人：葉竹來

高雄醫學大學藥理學研究所

## 中文摘要

內毒素 (lipopolysaccharide, LPS) 所引發的巨噬細胞活化會誘發誘導型一氧化氮合成酶 (iNOS) 及第二環氧化酶 (COX-2) 的表現，產生過量的NO及PGE<sub>2</sub>，在發炎的過程中扮演著重要的角色。台灣大戟廣泛分布在台灣原野沙草地，尤以台東縣境常見，於民間用法為著名的蛇傷藥，也常用在疔瘡等皮膚病及無名腫毒等抗發炎作用上。最近我們從台灣大戟中主要分離出4種成分，並分別命名為EF-1、EF-3、EF-5及EF-7。然而，尚未有文獻針對台灣大戟中抗發炎成份的分離及性質的描述。因此在我們的研究中，將以細胞及動物模式來探討從台灣大戟中分離出的三萜類及黃酮類成分的抗發炎活性及分子作用機制。研究結果指出在小鼠的巨噬細胞株RAW264.7中，這4個化合物具有不同程度的抑制由革蘭氏陰性菌的脂多糖體 (Lipopolysaccharide; LPS) 所引發的發炎反應。Nitric Oxide (NO) 的測定證明這4個化合物在10 μM濃度下皆能顯著的抑制LPS所引發的NO釋放；西方墨點法顯示這4個化合物對以LPS處理過後的iNOS及COX-2表現具有不同程度的抑制作用，且也能抑制IkBα在LPS處理後之磷酸化現象，並且在以LPS處理後，抑制ERK1/2與JNK1/2的磷酸化現象。另以ELISA測量發炎相關的

細胞激素 (cytokines)，發現EF-3、EF-5與EF-7皆能有效的抑制以LPS分別處理後TNF-α、IL-1β的釋放，且也能夠使抗發炎的細胞激素IL-10釋放增加。總結來說這4個化合物能夠抑制因LPS引發的發炎反應，其作用機轉包括抑制LPS引起的：NO/iNOS、COX-2、TNF-α、IL-1β的釋放，IkBα與ERK的磷酸化作用。

## Abstract

The plant *Euphorbia formosana* widely distributed in original sand meadow, especially in Taitung County, Taiwan. It has long been used as a traditional crude drug for the treatment of snake bite and inflammation. We have recently isolated four constituents from *Euphorbia formosana*. However, no report on the isolation and characterization of anti-inflammatory constituents from this plant has been made. Therefore, in our present study, the anti-inflammatory activities and molecular mechanisms of triterpenoid and flavonoid constituents isolated from *Euphorbia formosana* will be examined in cell model. In this study, the effects of four constituents on protein expressions related to inflammation were investigated in murine macrophage RAW264.7. Pretreatment of cells with four constituents diminished lipopolysaccharide

(LPS)-induced nitric oxide (NO) production in a concentration-dependent manner. Four constituents inhibition of LPS-induced NO production accompanied by suppression of inducible NO synthase (iNOS) expression. ERK1/2 and I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation were also inhibited by four constituents in RAW264.7. Although COX-2 was slightly inhibited by four constituents, LPS-induced PGE<sub>2</sub> level was lowered by four constituents in concentration-dependent manners. Four constituents also decrease pro-inflammatory cytokines-TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  release and increases anti-inflammatory cytokine-IL-10 production. Taken together, four constituents exert its anti-inflammatory effect by inhibiting LPS-induced pro-inflammatory mediators, and thus could be used as a potential agent for anti-inflammation.

**Keywords:** *Euphorbia formosana*, macrophage, lipopolysaccharide, nitric oxide, cytokine, mitogen-activated protein kinase

## 序論

台灣大戟 (*Euphorbia formosana*) 屬於大戟科 (Euphorbiaceae) 的大戟屬 (*Euphorbia*) 植物。依文獻 (Huang, 1993; Rivera and Obon, 1995) 顯示, 大戟屬於全世界約有8000種, 有14種分佈於台灣, 而台灣大戟 (*E. formosana*) 是具有本土特色的台灣固有種植物。其別名為八卦草、大甲草、藥虎草, 由於本植物藥性猛烈, 有五虎下山之勢, 所以又稱五虎下山。本植物廣泛分布台灣原野沙草地, 尤以台東縣境常見。於民間用法為著名的蛇傷藥, 將全草搗碎, 或煎服或直接敷蓋傷口, 均有奇效 (特別雨傘節、白步蛇及龜殼花), 也常用在疔瘡等皮膚病及無名腫毒等抗發炎作用上。於背景文獻顯示尚未有成分方面的研究報告, 但同屬植物於文獻 (Jassbi et al., 2002; Lee et al., 2002; Hohmann et al., 2003; Krebs et al., 2004) 報告上發現了許多新奇化合物及具有活性的成份。將台灣大戟粗萃取物分別以丙酮與乙醇萃取物進行抗發炎的初步篩選, 發現在抗發炎部份呈現強烈的抑制效果, 二種溶媒對以 compound 48/80 為引發劑, 在

$\beta$ -Glucuronidase抑制上有顯著的效果, 其 IC<sub>50</sub>分別為38.8  $\pm$  12.4  $\mu$ g/ml (乙醇)、31.5  $\pm$  6.3  $\mu$ g/ml (丙酮)。因此在本計劃中, 擬繼續對從台灣大戟 (*Euphorbia formosana*) 純化出來的三萜類及黃酮類活性化合物評估其抗發炎作用及作用機制等, 希望由此計畫之進行能找出有用之抗發炎藥物。利用色層分析將丙酮的萃取液進行成分分析, 分離得11種化合物, 其中4種化合物經各種光譜鑑定, 證明分別為 isoscopoletin (EF-1)、6-hydroxy-stigmast-4en-3one、3-hydroxy glut-5-ene 及 N-benzoylphenylalanylphenylpropanol acetate (EF-3)、glutanol (EF-5)、glutinine (EF-7), 研究抗發炎相關之藥物開發是我們主要的目標。

內毒素 (endotoxin; LPS) 為一個複雜的 glycolipid, 分為親水性的多醣體和疏水性的 lipid A 兩部分。LPS 是構成革蘭氏陰性菌外膜的主要成份, LPS 能夠引發微生物性的發炎反應 (Raetz, 1990), 且引發單核球和巨噬細胞分泌一些發炎性的細胞激素: TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-8、IL-12 (Raetz, 1990), LPS 也能夠使巨噬細胞分泌血小板活化因子 (platelet-activated factor)、前列腺素、酵素和自由基, 如: 一氧化氮 (Raetz, 1990), 這些細胞激素的釋放能夠控制入侵微生物的生長並進一步的將之殺死; 但是當過量的釋放時, 會導致全身性的症狀: 微循環的功能異常、組織的傷害、高致死率的敗血性休克 (Morrison and Ryan, 1987)。

LPS 所引發的巨噬細胞活化而產生許多發炎的細胞激素和其他的中間媒介物 (Fujihara et al., 1993; Muroi and Suzuki, 1993), 皆是經由以下途徑, 包括: protein kinase A (Muroi and Suzuki, 1993)、protein kinase C (Fujihara et al., 1994)、Src-related kinases (Herrera-Velitz and Reiner, 1996)、三個系列的 mitogen-activated protein kinase (extracellular-related kinase; extracellular signal-regulated protein kinase (ERK1/2) (Weinstein et al., 1992)、p38 (Han et al., 1994)、c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) (Hambleton et al., 1996) 的活化。內毒素的主要接受體為 CD14, 活化後即傳遞訊息

給 Toll-like receptor 第四型 (TLR4)，再經由 MyD88-dependent 路徑訊息傳遞，來到 Mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAP3KK)，而分別活化 IKK 和 MAP3K；IKK 為二個 IKK $\alpha$ 、一個 IKK $\beta$  和一個 IKK $\gamma$  共同組合而成，會將 I $\kappa$ B 磷酸化；當 I $\kappa$ B 磷酸化後即會與 NF- $\kappa$ B 分離而迅速被 26S proteasome 加上數個 ubiquitin，而進行 ubiquitin 相關的蛋白質水解，而 NF- $\kappa$ B 是由 p65 (RelA) 及 p50 共同組成，或僅兩個 p65 或 p50 組成，但最常見的即為 p65/p50，就此活化進入核內，扮演其轉錄因子的角色。

中國傳統醫學目前正漸漸取得醫界的重視，其可輔助或加強西方醫學的不足，地位有日漸上升之趨勢，且現在於許多先進國家，正在使用已被科學化或標準化的中草藥，然而，直到目前為止，有些中草藥的作用、組成成分與劑量尚未科學地評估。台灣大戟於民間用法為著名的蛇傷藥，將全草搗碎，或煎服或直接敷蓋傷口，均有奇效（特別兩傘節、白步蛇及龜殼花），也常用在疔瘡等皮膚病及無名腫毒等抗發炎作用上。於背景文獻顯示尚未有成分及藥理作用方面的研究報告，因此本計畫擬以細胞模式作研究，來評估由台灣大戟分離取得的多種化合物之抗發炎作用，以找出其中主要藥效之成分，並深入研究其作用機制，甚至可根據主要藥效之成分的結構與作用機轉，而發展出類似西藥模式的藥品，可更廣泛的用於社會大眾。

## 研究方法

### 細胞培養

Macrophage cell line RAW264.7 (購自食品工業發展研究所菌種保存及研究中心，編號為BCRC 6001)。將10% (v/v) 胎牛血清 (FBS)；L-glutamine 2 mM；penicillin (100 U/mL)；streptomycin (0.1 mg/mL)；amphotericin B (0.25 mg/mL)；0.15% (w/v) NaHCO<sub>3</sub> 混合DMEM粉末而成為溶液。調整pH值至7.1~7.2。將細胞株依解凍方法解凍後，加至含有10 mL的DMEM之10cm細胞培養盤中，培養於37°C、5% CO<sub>2</sub>/air 環境中等待時間使細胞貼附於底面。繼代培養將舊的medium吸除，以PBS洗細胞一

次後，加入 0.05% trypsin 和 0.02% EDTA 將附著細胞脫落分離。置於37°C 等待十分鐘後，加入適當的FBS中和Trypsin的作用，離心1,000 r.p.m. 十分鐘，以Trypan Blue計算適當的細胞數，分盤至所需的細胞培養盤中。

### 藥物毒性試驗 (MTT assay)

將10<sup>5</sup>個細胞種於二十四孔細胞培養盤中，待至九分滿後，細胞分別投予不同的活性成分濃度，加入MTT使濃度為0.5 mg/mL作用四小時後，將medium抽出，加入300  $\mu$ L之酸化isopropanol溶解盤底紫色結晶formazan，十分鐘後，將上清液抽取100  $\mu$ L至96孔盤中，測量540nm(OD<sub>540</sub>)和630nm(OD<sub>630</sub>)的吸光值，將每一組之(OD<sub>540</sub> - OD<sub>630</sub>)值和控制組之值比較後即可計算其給藥後的細胞存活率，而代表藥物對此細胞的毒性。

### 亞硝酸鹽的測定 (Nitrite Analysis)

當細胞受到內毒素的刺激時，會釋放iNOS以合成一氧化氮(NO)，而一氧化氮又會很快的形成亞硝酸鹽(Nitrite)，Griess Reagent可偵測細胞培養液中的亞硝酸鹽濃度，而可得知細胞所釋放出的NO量。將10<sup>5</sup>個細胞種於二十四孔細胞培養盤中，待至九分滿後，細胞分別投予不同的活性成分濃度前處理三十分鐘，之後加入LPS (100 ng/ml)。培養24小時後，分別抽取medium 150  $\mu$ L至96孔盤(二重複)，加入150  $\mu$ L Griess Reagent均勻混合後，避光作用十分鐘，以ELISA Reader測定其540 nm吸收值。在和檢量線比較後，即可計算出medium的nitrite含量。

### 測定 IL-1 $\beta$ 、IL-10、TNF- $\alpha$ 的含量 (ELISA)

將10<sup>5</sup>個細胞種於二十四孔細胞培養盤中，待至九分滿後，細胞分別投予不同的活性成分濃度前處理三十分鐘，之後加入LPS (100 ng/ml)。培養24小時後，分別使用IL-1 $\beta$ 、IL-10、TNF- $\alpha$ 等ELISA kit，測定細胞的培養基中上述細胞激素的濃度變化。

### 西方點漬法 (Western blotting)

(1) 將鼠科動物巨噬細胞 RAW 264.7 ( $5 \times 10^5$  cells/1mL/dish) 置於六孔細胞培養盤中培養，待細胞長至九分滿後，加入不同濃度的待測活性成分前處理 30 分鐘後，再加入脂多醣體 (Lipopolysaccharides, LPS, 100 ng/mL)，依不同時間培養。

(2) 將細胞，以 PBS 洗二次後，加入 60  $\mu$ L Lysis buffer 作用十分鐘後，再以刮杓刮下細胞，以 13,000 rpm，4 $^{\circ}$ C 離心取上清液，蛋白質的濃度測定則採用 "Bio-Rad DC Protein Assay"。此法是以 BSA 當標準品，利用紫外光/可見光光譜分析儀 (Hitachi U-200, Japan) 於波長 595 nm 測定其吸光值，並依此吸光值做出標準曲線，然後測檢體之蛋白質濃度。得到的蛋白質，稀釋到特定濃度後，取 Sample buffer 加入四分之一檢體量的體積，加熱 100  $^{\circ}$ C，5 分鐘，再依序加到各 well 中。先將電壓設定在 100 伏特進行電泳，待蛋白質已跑至下膠後即將電壓調整至 200 伏特，待 SDS-PAGE 中的染劑跑出 SDS-PAGE 後，則關掉電泳。

(3) 將 SDS-PAGE 上之蛋白質轉移到 PVDF membrane。PVDF membrane 需浸潤在 Transfer buffer 內備用。將 SDS-PAGE 層覆蓋於 PVDF 上，並在其上下各加上三張 3 mm Filter paper，使成似 "三明治" (sandwich)，將之置於蛋白質轉印槽中，滿浸於 Transfer buffer 中，電流設定在 100 伏特 90 分鐘完成，然後取出。

(4) 修剪 PVDF 得到適當分子量的 band 後，加入適量 Blocking buffer (5 % 脫脂奶於 t-TBS 內) 於室溫下進行 Blocking 一小時以去除非特異性結合，之後以 washing buffer (t-TBS) 連續洗 30 分鐘 (5 分鐘，6 次)，然後稀釋好的 Primary antibody 分別為 iNOS (1:1,000)、COX-2 (1:5,000)、I $\kappa$ B $\alpha$  (1:500)、p-ERK(1:1,000)、ERK(1:1,000)、 $\beta$ -actin (1:10,000) 均勻覆蓋在 PVDF membrane 上 4  $^{\circ}$ C 作用隔夜，之後再以 washing buffer 洗一小時去除多餘的抗體。再將 Secondary antibody 稀釋到合適濃度，均勻倒在 PVDF membrane 上室溫反應 1 小時。最後再以 washing buffer 洗 60 分鐘，則加入 ECL 1 分鐘，待略乾後壓片、洗片即可完成。

**細胞內自由基 (intracellular ROS) 之測**

**量**

在給予細胞 LPS (100 ng/mL) 處理後，細胞會產生活性氧屬 (reactive oxygen species, ROS)，給予 10  $\mu$ M H<sub>2</sub>DCF-DA 並於 37 $^{\circ}$ C 中染色 30 分鐘後，以 PBS 清洗 2 次，螢光染劑 H<sub>2</sub>DCF-DA 可自由通透細胞膜而與 ROS 結合，之後 ROS 會將 H<sub>2</sub>DCF-DA 氧化而產生待有綠色螢光的 2,7-dichlorofluorencin (DCF)，在激發光 485 nm 散射光 535 nm 的條件下，可分別利用螢光顯微鏡與流體細胞儀偵測細胞內的螢光即可代表細胞內 ROS 的含量。

**研究結果**

**EF-1、EF-3、EF-5、EF-7 對於鼠科巨噬細胞株的毒性試驗**

如 Figure 1 所示，以 MTT 試驗發現 4 種化合物即使濃度使用到 100  $\mu$ M，也不會造成細胞死亡，意即以下的實驗劑量不會造成細胞毒性而掩飾其抗發炎作用。

**投予 EF-1、EF-3、EF-5、EF-7 後的鼠科巨噬細胞株 RAW264.7 對於內毒素所引起 iNOS 蛋白質和一氧化氮的反應**

如 Figure 2~3 所示，我們發現在給予內毒素 24 小時後，iNOS 和一氧化氮的表現最為明顯，先以不同的活性成分投予至細胞培養液中，24 小時發現 iNOS 可在 LPS 組中被刺激出來，而給藥組依濃度相關性，使得 iNOS 的表現減弱，此種關係亦在一氧化氮分析中得到。

**投予 EF-1、EF-3、EF-5、EF-7 後的鼠科巨噬細胞株 RAW264.7 對於內毒素所引起 COX-2 蛋白質的反應**

如 Figure 4 所示我們發現在給予內毒素 24 小時後，內毒素所引起的 COX-2 有最明顯的表現，先以不同濃度的活性成分投予至細胞培養液中，30 分鐘後再給予 LPS (100 ng/mL) 刺激 24 小時後發現 COX-2 可在 LPS 組中明顯被刺激出來，在 RAW264.7 中 EF-1 與 EF-3 可明顯發現能夠抑制 COX-2 表現。

**投予 EF-1、EF-3、EF-5、EF-7 後的鼠科巨噬細胞株 RAW264.7 對於內毒素所引起**

## **IκBα蛋白質**

如Figure 5所示，我們發現在給予內毒素24小時後，內毒素使IκBα磷酸化有最明顯的作用。先以不同濃度的活性成分投予至細胞培養液中，30分鐘後給予LPS (100 ng/mL) 刺激後24小時發現 IκBα 磷酸化的現象可在LPS組中明顯被增強，而投予EF-3與EF-7可使得 IκBα磷酸化的表現明顯被抑制。

## **投予EF-1、EF-3、EF-5、EF-7後的鼠科巨噬細胞株 RAW264.7對於內毒素所引起MAPKs 蛋白質磷酸化現象**

如Figure 6所示，我們發現在給予內毒素30分鐘後，內毒素將 MAPKs 磷酸化有最明顯的作用，所以選取此時間觀察。先以不同濃度的活性成分投予至細胞培養液中，30分鐘後給予 LPS (100 ng/mL)刺激後30分鐘發現 ERK1/2 的磷酸化現象可在LPS組中明顯被活化，而投予EF-3與EF-7可使得 ERK1/2 磷酸化現象被抑制。投予4種活性成分對於p38 磷酸化現象則沒有明顯的抑制作用，而投予EF-1、EF-3與EF-5可使得 JNK1/2 磷酸化現象被抑制。

## **投予 EF-1、EF-3、EF-5、EF-7 後的鼠科巨噬細胞株 RAW264.7對於內毒素所引起的 TNF-α、IL1β、IL-10 表現**

如Figure 7~9所示，以ELISA kit和文獻參考測得時間點，發現內毒素所引起 TNF-α、IL1β、IL-10 的表現最明顯的時間為24小時，先以不同濃度的 活性成分投予至細胞培養液中，30分鐘後給予 LPS (100 ng/mL) 刺激。發現TNF-α、IL-1β在LPS組中有明顯的表現，因細胞有自我保護之機制而使得IL-10有些微的上升，而給藥組依濃度相關性減少TNF-α、IL1β及增加IL-10的表現。

## **投予 EF-1、EF-3、EF-5、EF-7 後的鼠科巨噬細胞株 RAW264.7對於內毒素所引起細胞內自由基的反應**

如Figure 10所示，我們發現在給予LPS反應24小時後，所引起之細胞內自由基有明顯增加的作用。先分別投予EF-1、EF-3、EF-5、EF-7 (10 μM) 至細胞培養液中，30分鐘後再給予LPS (100 ng/mL) 刺激24小時後發現4種活性成分有不同程度抑制細

胞內自由基的生成。

## **討論**

本實驗主要探討在LPS誘發下4種活性成分對於巨噬細胞 cytokines、iNOS/NO、COX-2、IκBα和MAPKs的表現之作用。LPS是革蘭氏陰性菌外膜主要的部份，屬於內毒素 (endotoxin) 的一種，會造成局部發炎反應和全身性的細菌感染，因此LPS是常被作為誘發發炎反應的誘發劑。

我們研究發現，4種活性成分能夠以濃度相關性的抑制內毒素所引發在巨噬細胞的iNOS、COX-2 蛋白質表現，還能夠減少一氧化氮的釋放；我們也探討了內毒素所引起巨噬細胞的發炎或抗發炎的細胞激素的釋放，結果發現TNF-α、IL-1β能夠被濃度相關性的抑制，而抗發炎的細胞激素IL-10能夠被活化增加釋放，而可能可以保護細胞免於發炎反應的侵犯。

在機轉方面我們先討論4種活性成分對於在巨噬細胞株RAW264.7中IκBα的路徑的影響，研究發現4種活性能夠有效抑制IκBα和ERK1/2的磷酸化。

總結來說，4種活性成分在週邊血液的巨噬細胞株-RAW264.7中，具有不同程度的抑制由內毒素所引起的發炎媒介物，如iNOS/NO、COX-2/PGE<sub>2</sub>的製造和釋放，能抑制發炎性的細胞激素：TNF-α、IL-1β的釋放，增加抗發炎細胞激素：IL-10的產生，且4種活性成分的抗發炎機制，可能部份和抑制ERK1/2活化和IκBα的磷酸化，而使NF-κB與其目標基因的啟動子結合之能力減弱，而達到其抗發炎之效果。未來還能回溯上游的LPS相關路徑，近一步發現4種活性成分抗發炎的完整面貌，而且也期許4種活性成分也或許能夠作為發炎性疾病的治療藥物之一。

## **References**

1. Fujihara M, Connolly N, Ito N and Suzuki T (1994) Properties of protein kinase C isoforms (beta II, epsilon, and zeta) in a macrophage cell line (J774) and their roles in LPS-induced nitric oxide production. *J Immunol* 152:1898-1906.
2. Hambleton J, Weinstein SL, Lem L and

DeFranco AL (1996) Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2774-2778.

3. Han J, Lee JD, Bibbs L and Ulevitch RJ (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265:808-811.

4. Herrera-Velazquez P and Reiner NE (1996) Bacterial lipopolysaccharide induces the association and coordinate activation of p53/56lyn and phosphatidylinositol 3-kinase in human monocytes. *J Immunol* 156:1157-1165.

5. Hohmann, J.; Forgo, P.; Csupor, D.; Schlosser, G., *Helv. Chim. Acta* 2003, 86, 3386 – 3393.

6. Huang, TC (eds) (1993). *Flora of Taiwan* 2nd, 1, p460.

7. Jassbi, A. R.; Fukushi, Y.; Tahara, S., *Helv. Chim. Acta* 2002, 85, 1706 – 1713.

8. Krebs HC, Duddeck H, Malik S, Beil W, Rasoanaivo P, Andrianarijaona MZ, *Naturforsch., B: Chem. Sci.* 2004, 59, 58 – 62.

9. Lee, S.S.; Kishore, P. H.; Chen, C.H., *Helv. Chim. Acta*, 2002, 85, 2403 – 2408.

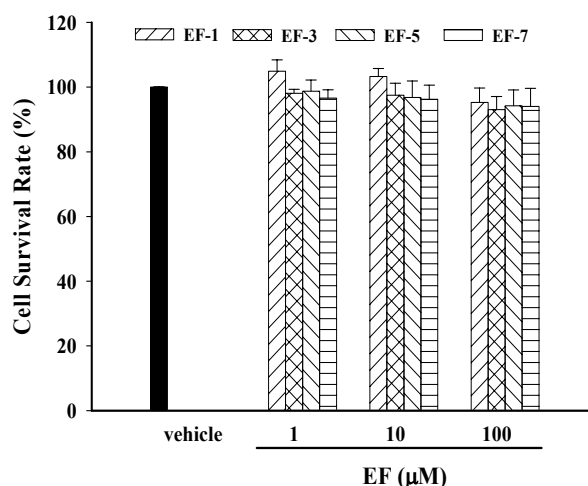
10. Morrison DC and Ryan JL (1987) Endotoxins and disease mechanisms. *Annu Rev Med* 38:417-432.

11. Muroi M and Suzuki T (1993) Role of protein kinase A in LPS-induced activation of NF-kappa B proteins of a mouse macrophage-like cell line, J774. *Cell Signal* 5:289-298.

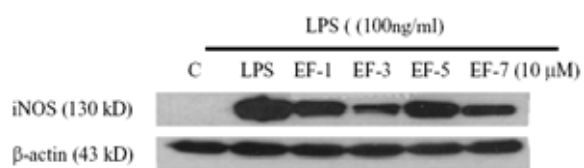
12. Raetz CR (1990) Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem* 59:129-170.

13. Rivera D and Obon C (1995) The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo Islands, a review. *J Ethnopharmacol.* 46:73-93.

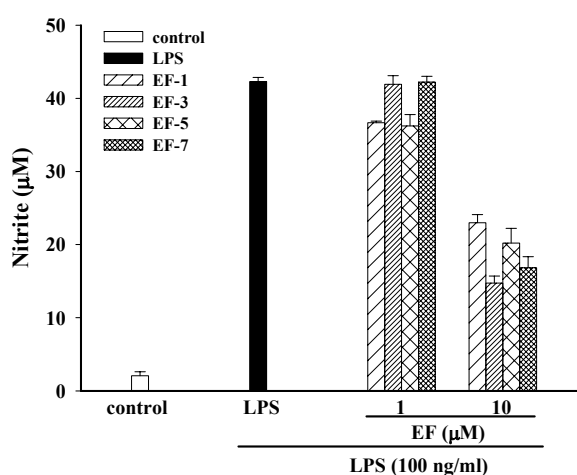
14. Weinstein SL, Sanghera JS, Lemke K, DeFranco AL and Pelech SL (1992) Bacterial lipopolysaccharide induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in macrophages. *J Biol Chem* 267:14955-14962.



**Figure 1.** Effects of four constituents isolated from EF on cellular viability. Macrophage cell line-RAW264.7 were treated four constituents (1-100 μM) for 24hours, respectively. Cell survival rate was performed by MTT assay. Bar represent the mean ± S.E.M. from three independent experiments.

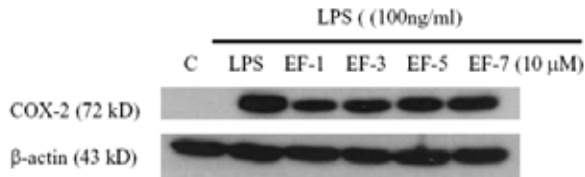


**Figure 2.** Effects of EF-1, EF-3, EF-5 and EF-7 on LPS-induced iNOS expression in LPS (100 ng/ml)-treated RAW264.7 for 24 hours.

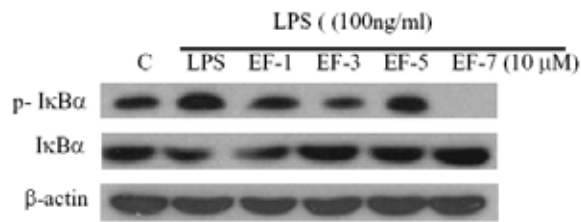


**Figure 3.** Inhibitory effects of EF-1, EF-3, EF-5 and EF-7 on nitrite production in LPS (100 ng/ml)-treated RAW264.7 for 24 hours. Bar represent the mean ± S.E.M. from three independent experiments.

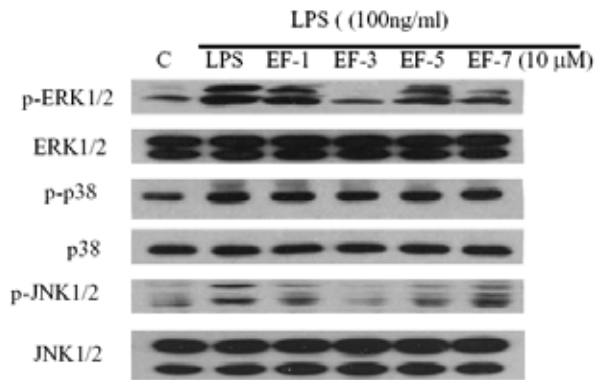




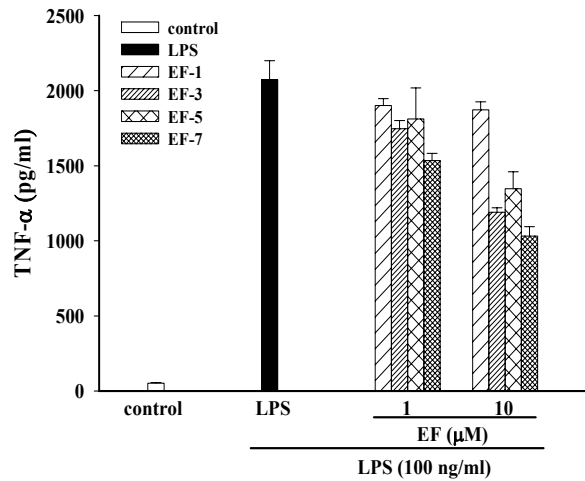
**Figure 4.** Effects of EF-1, EF-3, EF-5 and EF-7 on LPS-induced COX-2 expression in LPS (100 ng/ml)-treated RAW264.7 for 24 hours.



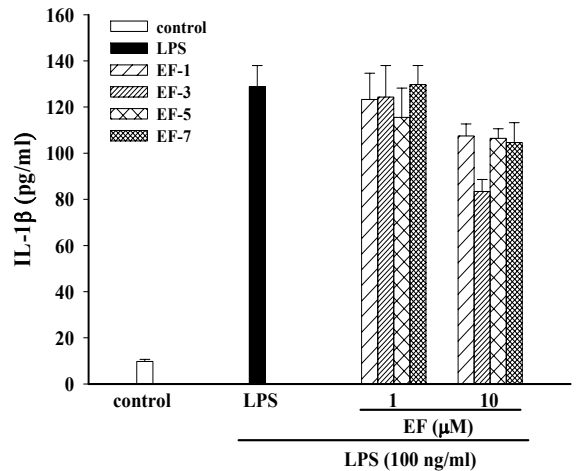
**Figure 5.** Effects of EF-1, EF-3, EF-5 and EF-7 on LPS-induced IκBα phosphorylation in LPS (100 ng/mL)-treated RAW264.7 for 24 h.



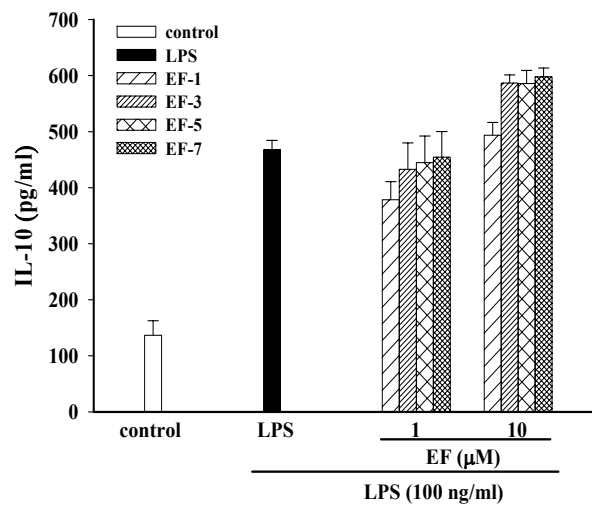
**Figure 6.** Effects of EF-1, EF-3, EF-5 and EF-7 on LPS-induced MAPKs phosphorylation in LPS (100 ng/mL)-treated RAW264.7 for 30 mins, respectively.



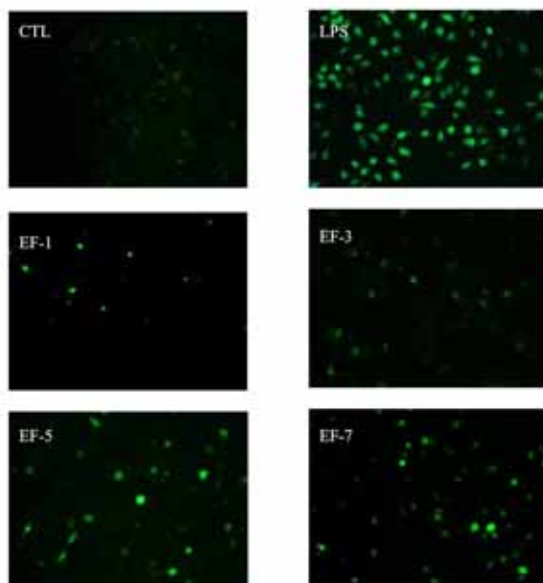
**Figure 7.** Effects of LPS and four constituents on TNF-α production. Macrophage cell line RAW 264.7 was grown in vitro and exposed to LPS (100 ng/mL) plus four constituents (1, 10 μM), respectively. Supernatants were collected at 24 hours for measurement of TNF-α by ELISA. Each bar represents the mean ± SEM of three experiments.



**Figure 8.** Effects of LPS and four constituents on IL1β production. Macrophage cell line RAW 264.7 was grown in vitro and exposed to LPS (100 ng/mL) plus four constituents (10, 50 μM), respectively. Supernatants were collected at 24 hours for measurement of IL1β by ELISA. Each bar represents the mean ± SEM of three experiments.



**Figure 9.** Effects of LPS and four constituents on IL-10 production. Macrophage cell line RAW 264.7 was grown in vitro and exposed to LPS (100 ng/mL) plus four constituents (10, 50 μM), respectively. Supernatants were collected at 24 hours for measurement of IL-10 by ELISA. Each bar represents the mean ± SEM of three experiments.



**Figure 10.** Macrophage cell line RAW 264.7 was exposed to LPS (100 ng/mL) for 24 h in the absence or presence of EF-1, EF-3, EF-5 and EF-7 (10 μM). The fluorescence in cells was detected by fluorescent microscopic observation.