

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計 畫 *
* : 馬兜鈴酸抑制細胞內發炎反應的作用機轉 *
* 名 稱 *
* ***** *

執行計畫學生： 林宛儒
學生計畫編號： NSC 98-2815-C-040-048-B
研究期間： 98年07月01日至99年02月28日止，計8個月
指導教授： 劉秉慧

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 99年03月30日

摘要 (Abstract)

馬兜鈴酸 (aristolochic acid, 簡稱 AA) 是由馬兜鈴科植物中萃取出來的天然成份之一, 主要成分為 aristolochic acid I (AAI) 及 aristolochic acid II (AAII), 目前馬兜鈴酸已被證實對人類和鼠類具有嚴重的腎毒性與制癌性。在先前的研究指出許多毒素會影響體內正常的免疫反應, 而當體內正常的巨噬細胞遇到外來刺激時會活化, 進而產生NO引起免疫反應, 所以在本實驗中, 我們以脂多醣 (lipopolysaccharide, 簡稱 LPS) 刺激老鼠白血球的單核球巨噬細胞 (RAW 264.7 cells) 作為引發免疫反應的模式, 來探討馬兜鈴酸在細胞株中對免疫反應的影響, 並進一步探討其作用機轉。研究結果顯示, 當LPS刺激RAW264.7細胞時, 細胞內的nitric oxide (NO) 生成量、inducible nitric oxide synthase (iNOS) 的蛋白質及mRNA的表現量皆有大量增加的現象, 若以馬兜鈴酸予LPS共同處理RAW264.7細胞時, 細胞內的NO生成量、iNOS的蛋白質及mRNA的表現量會隨著馬兜鈴酸的劑量上升而有逐漸下降的趨勢。為了進一步探討馬兜鈴酸對於iNOS基因轉錄作用之機轉, 我們建構iNOS promoter序列的luciferase螢光報導者基因的質體進行實驗, 結果顯示馬兜鈴酸確實能夠抑制iNOS promoter對於下游基因的驅動活性。因此本實驗室推論馬兜鈴酸的抑制機轉主要作用於iNOS promoter的某段未知DNA序列上, 進而調節下游基因的表達。

序論 (Introduction)

馬兜鈴酸 (aristolochic acid, AA)

馬兜鈴科植物大部份為多年生的雙子葉植物，主要可分為馬兜鈴屬 (*Aristolochia* Linn.) 及細辛屬 (*Asarum* Linn.)，在《中國本草圖錄》中有28種常見的馬兜鈴科植物。

馬兜鈴酸是一種由馬兜鈴科植物中萃取出天然混合物的天然混合物，主要以 aristolochic acid I, AAI 和 aristolochic acid II, AAI 組成(附圖一)(Shi et al., 2007; Stiborova et al., 2008)，結構上有三個苯環，並具有一個硝基 (NO₂)。本實驗所使用之馬兜鈴酸為AAI，溶液顏色呈金黃色。

早期含有馬兜鈴酸成份的中草藥，常用來治療風濕及止咳止痛，在比利時馬兜鈴酸這個成份也曾被用於減肥藥中，因此陸續有許多人開始探討馬兜鈴酸的特性、功效及作用機制，並且研究出馬兜鈴酸不論在人體或鼠類體內，都會造成腎毒性及致癌性，在細胞實驗中馬兜鈴酸也會造成細胞毒性 (Wang and Zhang, 2008)，由於這些研究結果指出馬兜鈴酸對人體的種種傷害，美國食品藥物管理局 (FDA) 下令禁止含有馬兜鈴酸的藥材販售及使用 (Gold and Slone, 2003)。

脂多醣 (lipopolysaccharide, 簡稱 LPS) 與發炎反應

Lipopolysaccharide (LPS) 為革蘭氏陰性菌 (Gram-negative bacteria) 外膜上的主要成份，屬於一種細菌內毒素 (endotoxin) (Ulevitch and Tobias, 1995)。LPS 主要分為 lipid A、core polysaccharide 及 O-polysaccharide side chains 三個部份 (如附圖二)，其中影響內毒素活性最主要的部位為 lipid A，其次是 core polysaccharide，而 O-polysaccharide side chains 又稱作 O-antigen，O-antigen 的組成在不同的菌種中會有所差異，並且也是宿主抗體最容易辨識的區域 (Erridge et al., 2002; Raetz and Whitfield, 2002)。

在早先的研究中已知 LPS 能被巨噬細胞和單核球細胞所辨識，並且刺激細胞釋放出許多發炎前驅物質，如 nitric oxide (NO)、prostaglandin E2 (PGE2)、tumor

necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-1 (IL-1) 和 interleukin-6 (IL-6)...等 (Kim *et al.*, 2006 ; Pan *et al.*, 2006) , 因此當宿主受到外來細菌感染時, 免疫系統可藉由巨噬細胞對 LPS 的辨識能力引發一連串反應來對抗並清除外來細菌; 不過一旦 LPS 造成過度發炎反應的話, 則會引起敗血症 (sepsis)、敗血性休克 (septic shock) 或是全身性的免疫發炎疾病 (Schroder *et al.*, 2004) , 故 LPS 所刺激細胞免疫反應的相關機制因而被大量研究。

一氧化氮 (Nitric oxide, NO)

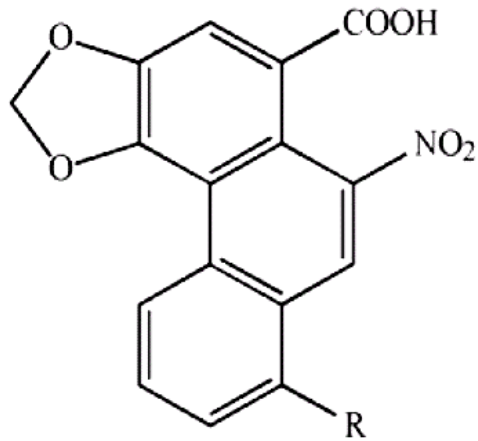
NO 屬於發炎前驅物質之一, 為一種小分子量 (30 Da) 的活性自由基氣體, 能輕易地穿過細胞膜, 但由於 NO 的半衰期很短, 故常以較穩定的亞硝酸鹽 (nitrite) 型式存在。在一些哺乳動物細胞 (如巨噬細胞、平滑肌細胞、與心血管系統相關之細胞及腎臟細胞) 內, 精氨酸 (L-arginine) 經由一氧化氮合成酶 (nitric oxide synthase, NOS) 催化氧化成瓜氨酸 (L-citrulline) 的過程中會生成出 NO (附圖三) (Chi *et al.*, 2003) 。NO 在哺乳動物體內是一個很重要的訊息傳遞分子, 調控許多生理及病理的反應, 如宿主免疫防禦、神經訊息傳遞及與脈管系統相關的功能 (Korhonen *et al.*, 2005 ; Swindle and Metcalfe, 2007) 。針對宿主免疫防禦的功能方面, 由於巨噬細胞受到細菌刺激時會釋放大量 NO 來擴張血管, 引來更多的巨噬細胞跟發炎物質, 因此 NO 可作為免疫反應的指標。

誘發性一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)

一氧化氮合成酶 (NOS) 為 NO 生成的重要酵素蛋白, 可分為 neuronal NOS (nNOS)、inducible NOS (iNOS) 和 endothelial NOS (eNOS) 三種 isoform (詳細比較如表一)。持續性表現的 nNOS 及 eNOS 受到 Ca 離子的調控, 能產生低量的 NO 來維持細胞內基本的表現量, 作為訊息傳遞分子並調控許多生理機制, 因此低量的 NO 並不會造成細胞毒性。誘發性的 iNOS 則需要受到某些細胞激素 (例如: IFN- γ 、TNF- α)、LPS 及微生物產物的刺激作用, 才能產生出大量的 NO 來抑制外來細菌、寄生蟲和病毒的生長, 由於 iNOS 不會受到 NO 的負調控, 因此當 iNOS 受到誘發後, 就會持續地活化且不斷地產生 NO 直到 iNOS 被降解掉為止, 這樣的狀況若發生在不對的時間或地點時, 反而會造成細

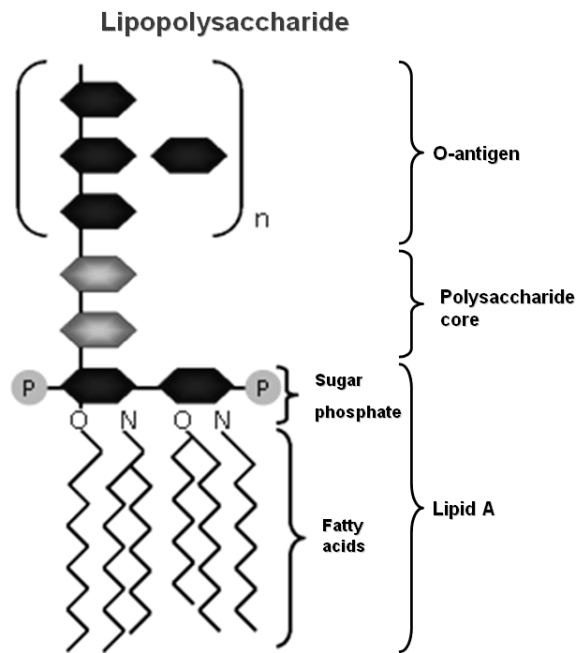
胞毒性 (Kleinert *et al.*, 2004 ; Swindle and Metcalfe, 2007)。

iNOS 的調控機制對細胞而言是很重要的，調控 iNOS 表現的機制主要有三個部份：轉錄機制 (transcriptional mechanism)、轉錄後與轉譯機制 (post-transcriptional/translational mechanism) 及轉譯後機制 (post-translational mechanism) (Geller and Billiar, 1998)。本實驗室專注於探討其轉錄機制。轉錄機制為細胞內 DNA 轉成 mRNA 的一個過程，這個過程需要轉錄因子結合至基因前端啟動子 (promoter) 進而驅動基因做出許多 mRNA，目前已知有許多轉錄因子可結合的序列但在 iNOS 基因前端的啟動子上，這些正向調節的轉錄因子都跟 LPS 或細胞激素刺激並誘發的轉錄機制有關 (Kleinert *et al.*, 2003 ; Kleinert *et al.*, 2004)。



aristolochic acid I (AAI): $R=OCH_3$
 aristolochic acid II (AAII): $R=H$

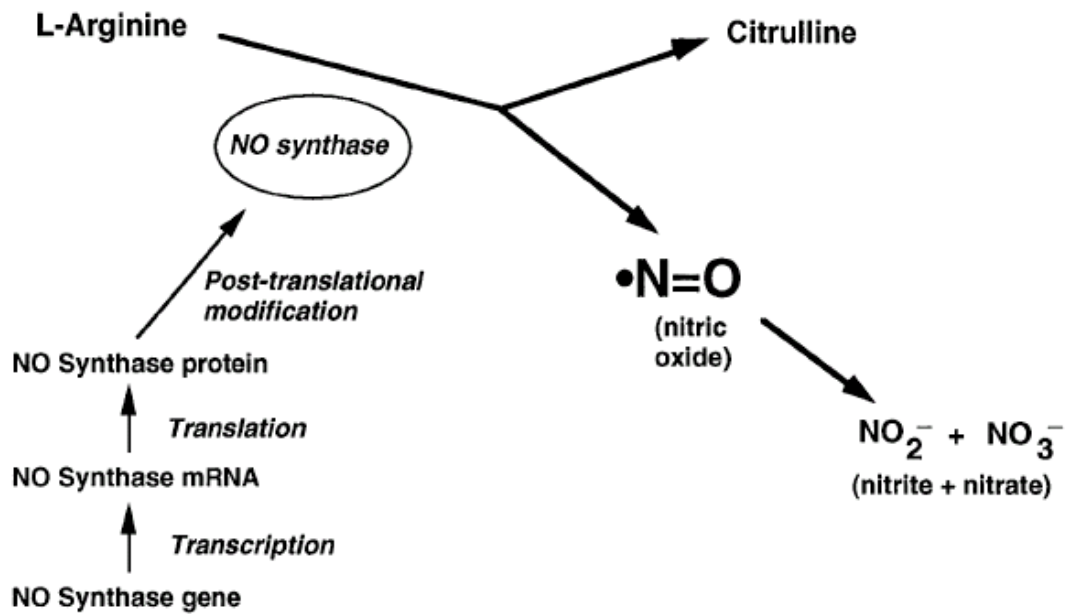
附圖一、Aristolochic acid I 與 II 的化學結構



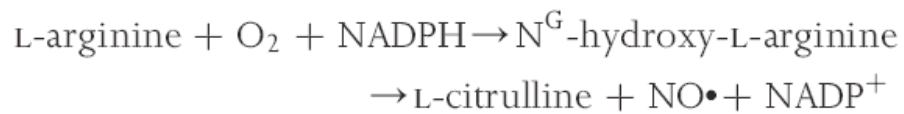
(<http://www.spectraldx.com/images/LPS.gif>)

附圖二、LPS 的基本結構

(A)



(B)



附圖三、NO 生物合成機制 (A) (Geller and Billiar, 1998) 及化學反應式 (B) (Swindle and Metcalfe, 2007)

表一、三種 NOS 的比較 (Swindle and Metcalfe, 2007)

Name	Neuronal NOS (nNOS, NOS1)	Endothelial NOS (eNOS, NOS3)	Inducible NOS (iNOS, NOS2)
Cell types	Neuronal cells Skeletal cells Cardiac muscle	Endothelial cells	Many cell types
Expression type	Constitutive	Constitutive	Inducible
Protein size	161 kDa	133 kDa	130 kDa
Cellular location	Cytosol	Membrane > Cytosol	Cytosol > Membrane
Ca²⁺- dependent	Yes	Yes	No
NO production	Low	Low	High
Function	Neurotransmitter	Vascular regulation	Cell immune system

研究目的 (Motive)

【目標一】 馬兜鈴酸是否會抑制LPS所誘發之iNOS基因的表現量

【目標二】 馬兜鈴酸是否抑制iNOS基因的promoter活性

材料與方法 (Materials and Methods)

細胞株 (Cell lines)

老鼠白血球的單核球巨噬細胞 (Mouse leukaemic monocyte macrophage cell line, 簡稱RAW 264.7 cells), 購自食品工業發展研究所菌種中心。

細胞培養與處理 (Cell culture and treatment)

RAW 264.7細胞所使用的DMEM培養基含10%去活性胎牛血清、1% penicillin/streptomycin及1% L-Glutamate, 置於含5%二氧化碳之37°C培養箱進行培養, 最後根據實驗之需求加入不同濃度之LPS與AA處理。培養基、血清、抗生素及L-Glutamate均購自GIBCO (Grand Island, NY)。

細胞存活率測試 (MTS assay)

MTS為一種淡黃色的tetrazolium compound。MTS assay普遍應用於毒理中測試某些毒性化學物質對於細胞毒性強弱的方法, 其原理為在活細胞內之粒線體中所含之NAPDH去氫酶 (NAPDH dehydrogenase) 能使化學藥劑MTS轉化成可溶性且可經由吸收光定量的formazan染劑, 因為死掉的細胞無此酵素活性, 所以可作為細胞存活率的指標。將RAW264.7細胞培養於96微孔盤中, 每一微孔中分別約有 4×10^4 顆細胞, 置於含5%二氧化碳之37°C培養箱培養24小時後, 以不同濃度之LPS與AA處理24個小時。待藥物處理時間終了, 於每個微孔中 (含100 μ l培養基) 加入20 μ l的MTS reagent (Promega, USA), 置於培養箱培養約30分鐘至1小時後以490nm之吸收光波長進行偵測 (Analyze by ELISA Reader), 藉此得知細胞存活率。

一氧化氮釋放分析測試 (Griess assay)

一氧化氮 (Nitric oxide, NO) 的半衰期很短, 約 6 - 10 秒, 所以當 NO 生成後會立即轉變成 nitrate, 之後 nitrate 會再經由 nitrate reductase 分解, 形成較穩定的 nitrite 型式存在, 故本實驗主要藉由分析 nitrite 濃度來表示 NO 生

成的量。將 RAW 264.7 細胞培養在 35 mm 盤中，每一盤中約有 1×10^6 個細胞，放入含 5% 二氧化碳的 37 °C 培養箱中至少培養 24 個小時後，移除培養液並將培養液更換成不含酚紅 (phenol red) 之 1:1 DMEM/Ham's F-12 培養液，在處理 50 ng/ml LPS 的 RAW 264.7 細胞中，加入溶劑或不同濃度之馬兜鈴酸處理 18 個小時後，將培養液移至乾淨的 1.5 ml 微量離心管後離心 (13000 rpm, 4 °C, 10 分鐘)，之後取 100 μ l 放入 96 微孔盤中，以 NaNO_2 為濃度標準品，在 540 nm 的波長下以 ELISA reader 先測得第一個吸光值並紀錄之，接著加入 100 μ l 緩衝液 A+B (緩衝液 A+B 為緩衝液 A 與緩衝液 B 以 1:1 的比例混合；緩衝液 A: 0.1% N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride, 緩衝液 B: 1% Sulfanilamide、5% Phosphoric acid (H_3PO_4)) 在室溫下避光作用 10 分鐘，再測得第二個吸光值並紀錄計算之。

全蛋白質萃取 (Whole protein extraction)

將 RAW264.7 細胞株培養於 35mm 盤中，每盤分別含有 8×10^5 顆細胞，置於含 5% 二氧化碳之 37 °C 培養箱培養至少 24 小時後，以不同濃度之 LPS 與 AA 處理 18 個小時，隨後將含毒素之培養基移除，以 0.01M 之 PBS 清洗兩次後，加入 93 μ l 冰的細胞萃取緩衝液 (0.01 M PBS、5% glycerol、1 mM EDTA、1 mM DTT、1% protein inhibitor、1 mM PMSF、0.5% Triton X-100)，置於冰上作用 10 分鐘後，將細胞連同萃取液移至微量離心管中，vortex 2 次 (5 sec/次) 後離心 (13000 rpm, 4 °C, 20 分鐘)，接著取上清液 90 μ l 加入 30 μ l 的 4 \times SDS 染劑，置於 95 °C 加熱 5 分鐘以變性蛋白，而後放置於 -20 °C 冰箱保存。另外取上清液 3 μ l 稀釋 10 倍，利用 Bio-Rad Protein Assay，以 BSA 作為標準品進行樣品的蛋白質定量。

西方點墨法 (Western blot)

取 40 μ g 蛋白質樣品進行 10% SDS-聚丙烯醯氨凝膠 (stacking gel: 3.4 ml ddH₂O、830 μ l 30% poly-acrylamide (Acrylamide/Bis 29:1)、630 μ l 1 M Tris pH 6.8、50 μ l 10% SDS、50 μ l 10% APS、10 μ l TEMED; separating gel: 4 ml

ddH₂O、3.3ml 30% poly-acrylamide (Acrylamide/Bis 29:1)、2.5 ml 1.5 M Tris, pH 8.8、100 μl 10% SDS、100 μl 10% APS、8 μl TEMED;) 電泳以分離蛋白質樣品，置於Bio-Rad轉漬裝置中，加入轉印緩衝液 (transfer buffer: 25 mM Tris, pH 8.3、192 mM Glycine、20 % Methanol)，以100伏特電流轉漬1.5小時。將轉漬後的硝化纖維紙 (Nitrocellulose membrane; Bio-Rad)以含5 %脫脂牛奶的TPBS (10 mM PBS, pH 7.5、0.05 % Tween 20)作為阻隔緩衝液 (blocking buffer)中於室溫下進行阻隔作用1小時。倒出阻隔緩衝液後，接著重覆以TPBS緩衝液洗5分鐘三次後，加入含有一級抗體的TPBS緩衝液 (含5 %脫脂牛奶或5 % BSA，視抗體需要做選擇)於4 □作用隔夜。接著重覆以TPBS 緩衝液洗5分鐘三次後，最後加入含有二級抗體的TPBS緩衝液 (含5 %脫脂牛奶)，於室溫下搖晃1小時後，再以TPBS緩衝液洗5分鐘三次，最後加入1:1的SuperSignal[®] West Pico detection kit溶液 (Luminol Enhancer solution: Stable peroxide buffer, PIERCE)，用冷光螢光測定儀 (FUJIFILM, LAS-1000)進行冷光偵測，並且以Fuji軟體進行蛋白質的量化分析。

核糖核酸萃取 (RNA extraction)

將RAW264.7細胞株培養於35mm盤中，每盤分別含有 8×10^5 顆細胞，置於含5%二氧化碳之37□培養箱培養至少24小時後，以不同濃度之LPS與AA處理9個小時，隨後將含毒素之培養基移除，再利用RNeasy[®] mini kits (Qiagen) 萃取整體RNA並測O.D.值260進行定量。

反轉錄作用 (Reverse transcription (RT) reaction)

取4 μg的RNA，加入oligo-d T與 dNTP於70□下作用10分鐘，使雙股的RNA分開，再加入以SuperScript[®] III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen) 進行反轉錄作用，反轉錄後的cDNA即可繼續進行其他實驗。

半定量聚合連鎖反應 (Semi-quantitative PCR)

取反轉錄後的cDNA 1μl當作模板，分別加入2.5μl的10X PCR

buffer/MgCl₂、0.5μl的10μM正股引子、0.5μl的10μM反股引子、0.5μl的10 mM dNTP混合物及0.2 μl的2u/μl Taq polymerase□，最後補d₂H₂O至反應總體積為25μl，以PCR system 2700 機器設定反應條件：以94 □作用5分鐘後，接著以94 □進行變性作用（denaturation）60秒、視引子不同之黏合（annealing）溫度作用30秒，再以72 □進行延長作用（elaongation）90秒，再依不同基因表現量差異將此循環重複30-38次不等，結束後再以72 □反應10分鐘。待作用完成後，取10 μl產物跑含有溴化乙錠（ethidium bromide, EtBr）的1% agarose gel，經UV照射後以數位影像系統分析。

質體建構 (plasmid construct)

pGL4-iNOS promoter vector (如附圖四，由實驗室陳怡孜學姊所建構)

將 MD Bio Inc. 合成之 iNOS promoter-CAT 正股寡核鹵酸序列 iNOS promoter-CAT-F : 5' - GACTCGAGGACTTTGATATGCTGAAAT C - 3' (畫底線處為 Xho□ cutting site) 及反股核鹵酸序列 iNOS promoter-CAT-R : 5' - GAAAGCTTGACTAGGCTACTCCGTGGA - 3' (畫底線處為 Hind □ cutting site)，與 piNOS-CAT 質體(由台中榮總醫院教學研究部兼中國醫藥大學藥物化學所 王繼平老師提供) 進行 PCR，接著將大量合成出的雙股 DNA 序列及 pGL4.21[luc2p/Puro] vector (由中山醫學大學免疫所 劉光耀老師提供) 質體分別以 Xho I 及 Hind III 限制鹵酵素於 37 □ 作用 2 個小時後，以 1 % 含 EtBr 的洋菜膠分離樣品，在長波 UV 光照射下將膠體上片段長度正確的位置挖下，以 QIAguick® Nucleotide Removal Kit (QIAGEN) 回收產物，接著將經過酵素切割與純化過的質體與粘合完成的雙股 DNA 序列以 1:3 的莫耳數比混合後，再由 T4 DNA ligase 在 16 □ 中反應 16 至 18 個小時後即建構完成，接著進行大腸菌質體轉型作用。

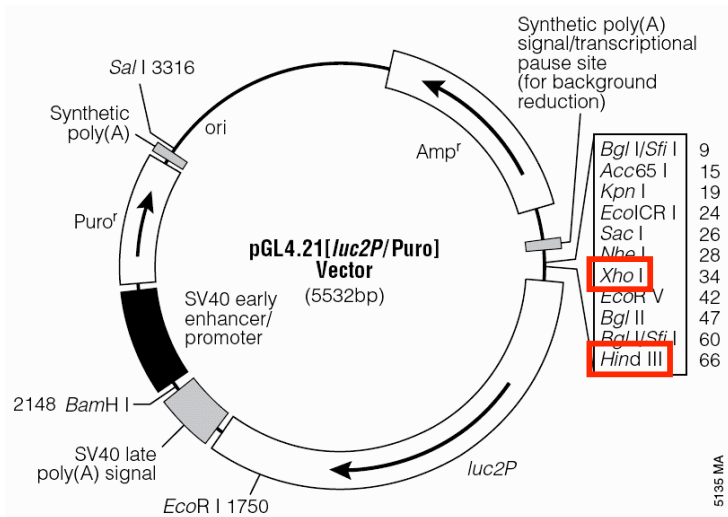
微脂粒法之基因轉殖感染 (Transfection)

將 RAW 264.7 細胞培養在 35 mm 盤中，每盤中約有 3×10⁵ 顆細胞，放入含 5 % 二氧化碳的 37 □ 培養箱至少培養 24 個小時。利用 lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) 將質體送入 RAW 264.7 細胞中，首先將微脂粒與質體(包括

4 μg 自己建構的質體與 4 μg 的 β -galactosidase 質體 (由中山醫學大學毒理所柯俊良老師提供)) 分別與 DMEM 培養液在室溫中混合均勻並靜置 5 分鐘, 之後再將微脂粒及質體混合均勻 (pipetting 40 下) 並在室溫中靜置 20 分鐘讓微脂粒將質體包裹起來, 接著以含有微脂粒及質體的 DMEM 混合液取代一般培養用的培養基, 將細胞放入含 5% 二氧化碳的 37 $^{\circ}\text{C}$ 培養箱在沒有血清及抗生素的環境下轉殖感染 4 小時後, 接著以含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培養基 (內含 1% L-Glutamine、100 U/ml penicillin、0.1 mg/ml streptomycin) 置換掉含有微脂粒及質體的培養基後, 再進行 LPS 及馬兜鈴酸的處理。

螢光酵素報告者試驗之探測螢光酵素活性 (Luciferase reporter gene assay)

將已經由基因轉殖的細胞加藥處理, 待藥物作用中止後移除培養基, 以 0.01 M PBS 清洗 2 次後加入 luciferase assay kit (Promega) 的細胞萃取液 100 μl 後在室溫作用 15 分鐘, 接著將細胞刮下連同萃取液一起移至微量離心管, 以混合器震盪 2 次 (5 sec/次) 後離心 (12000 rcf, 5 分鐘, 4 $^{\circ}\text{C}$), 將 100 μl 的上清液全部移至新的微量離心管中。一方面取 10 μl 的上清液加至 96 微孔盤中, 加入 luciferase assay kit 的酵素受質 60 μl 避光反應 10 秒後, 以冷光測定儀進行冷光偵測; 另一方面取 50 μl 的上清液至 1.5 ml 微量離心管, 並加入 50 μl 的 $2 \times \beta$ -galactosidase 檢驗緩衝液於 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 分鐘, 混合均勻後在 420 nm 的波長下以 Molecular Devices Emax precision microplate reader 測得吸光值。

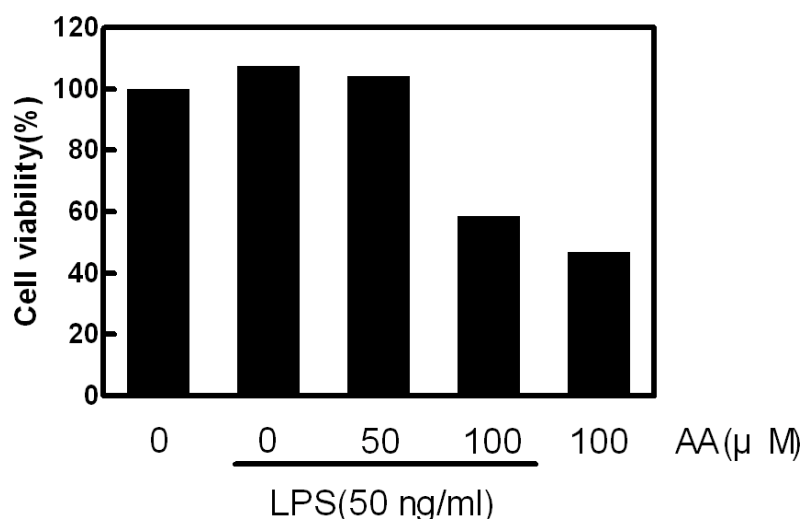


附圖四、iNOS promoter sequence 送入 pGL4.21[luc2p/Puro] vector 之質體建構圖

實驗結果 (Results)

脂多醣與馬兜鈴酸對於RAW264.7巨噬細胞存活率的影響

前人研究結果顯示馬兜鈴酸在動物實驗中會造成腎毒性 (Arlt *et al.*, 2002)，所以首先要確認馬兜鈴酸是否會造成細胞毒性。我們以老鼠 RAW 264.7 巨噬細胞株作為研究對象，以不同濃度的馬兜鈴酸處理細胞 24小時之後，然後利用 MTS assay 測試細胞的存活率。與對照組 (以0.01M PBS及 DMSO 處理) 相比較，觀察到使用50 ng/ml LPS與50 μ M馬兜鈴酸濃度對 RAW 264.7 細胞的存活率並無明顯改變 (如圖一)，當馬兜鈴酸的處理濃度達100 μ M 時，其細胞存活率與對照組相比仍有 50 % 以上。由以上實驗結果證實在 RAW 264.7 細胞中，馬兜鈴酸的處理濃度在100 μ M以下並不會造成 RAW 264.7 細胞的細胞毒性。

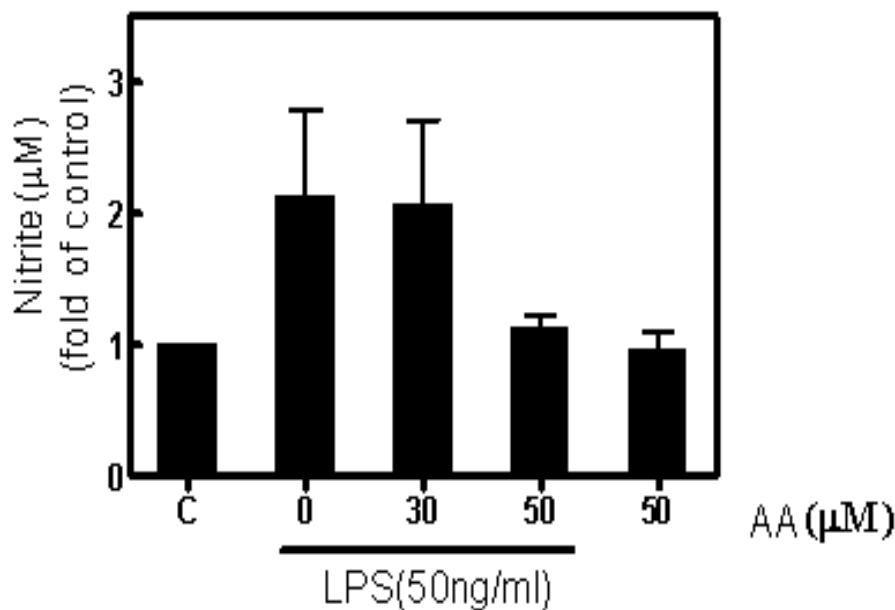


圖一 不同濃度之馬兜鈴酸對巨噬細胞 RAW 264.7 存活率的影響

將 RAW 264.7 細胞種在 96 孔盤中 24 小時，約長至8成滿後在處理 50 ng/ml LPS 的RAW 264.7細胞中，加入溶劑或不同濃度之馬兜鈴酸一起處理 24 小時，接著使用 MTS assay 偵測細胞存活率。以加入溶劑者作為控制組，並將其細胞存活率設為 100 % 來和實驗組進行比較。

馬兜鈴酸抑制LPS所誘發的NO生成量

已知當 LPS 處理 RAW 264.7 細胞時，會刺激細胞產生發炎前驅物質 NO (Tsao *et al.*, 2005 ; Kim *et al.*, 2006 ; Lin *et al.*, 2007) ; 由前一個實驗得知馬兜鈴酸處理之下並不會造成細胞存活率下降，所以進而想要探討馬兜鈴酸是否能使 LPS 所誘發的 NO 生成量受到抑制。在處理 50 ng/ml LPS 的 RAW 264.7 細胞中，再加入溶劑或不同濃度之馬兜鈴酸一起處理 18 個小時後，利用 Griess assay 檢測細胞中 NO 生成的變化。我們發現 LPS 所誘發的 NO 生成量隨著馬兜鈴酸的處理劑量增加而有逐漸降低的趨勢 (如圖二)。由此結果得知在 RAW 264.7 細胞中，當馬兜鈴酸處理的濃度越高，LPS 所誘發之 NO 生成量被抑制的現象越顯著。

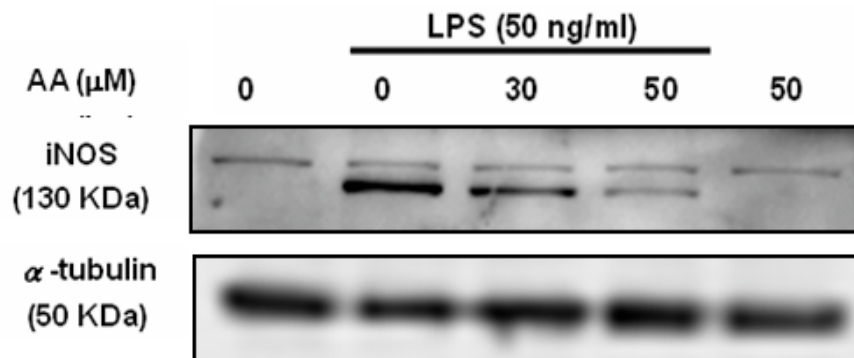


圖二 馬兜鈴酸抑制 LPS 所誘發的 NO 生成量

將RAW 264.7 細胞種在35mm盤中24小時，約達八成滿時在處理 50 ng/ml LPS 的RAW 264.7細胞中，加入溶劑或不同濃度之馬兜鈴酸一起處理18個小時，接著收集不含酚紅 (phenol red) 之培養液，以 Griess reagent 分析培養液中的 NO 濃度，本圖以控制組為1，並且和實驗組進行相對比較。

馬兜鈴酸抑制LPS所誘發的iNOS蛋白質表現量

前人研究得知當 LPS 刺激 RAW 264.7 細胞時，會誘導大量的 iNOS 蛋白質產生，接著 iNOS 蛋白質分解催化精氨酸 (L-arginine) 變成瓜氨酸 (L-citrulline) 繼而產生大量 NO (Laroux *et al.*, 2001 ; Chi *et al.*, 2003) ; 由於在前一個實驗中得知馬兜鈴酸會抑制 LPS 所誘發的 NO 生成量，所以我們進一步探討馬兜鈴酸是否能抑制 LPS 所誘發的 iNOS 蛋白質表現量，在處理 50 ng/ml LPS 的 RAW 264.7 細胞中，再加入溶劑或不同濃度之馬兜鈴酸一起處理 18 個小時後，接著萃取細胞全蛋白質並且使用辨識 iNOS 或是 α -tubulin 蛋白質的專一性抗體進行西方墨點法。我們發現到 LPS 所誘發的 iNOS 蛋白質表現量隨著馬兜鈴酸的處理劑量增加而有逐漸降低的趨勢 (如圖三)。由此結果可知在 RAW 264.7 細胞中，當馬兜鈴酸處理的濃度越高，LPS 所誘發之 iNOS 蛋白質表現量被抑制的現象越顯著。

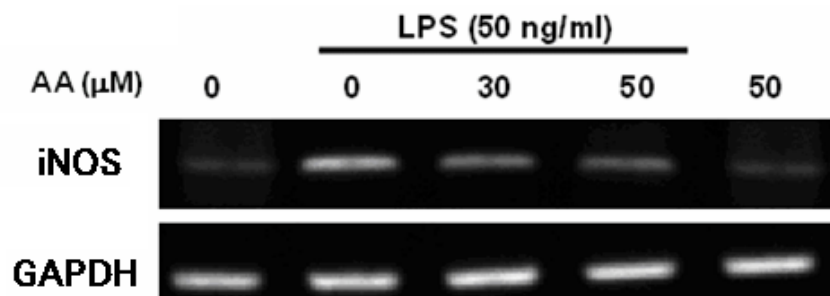


圖三 馬兜鈴酸抑制 LPS 所誘發的 iNOS 蛋白質表現量

將RAW 264.7 細胞種在35mm盤中24小時，約達8成滿時在處理 50 ng/ml LPS 的 RAW 264.7 細胞中，加入溶劑或不同濃度之馬兜鈴酸一起處理18個小時，接著萃取細胞全蛋白質並且使用辨識 iNOS 或是 α -tubulin 蛋白質的專一性抗體進行西方墨點法， α -tubulin 的蛋白量在此做為內部控制組。

馬兜鈴酸抑制LPS所誘發的iNOS mRNA表現量

由前一個實驗得知 LPS 所誘發的 iNOS 蛋白質表現量能被馬兜鈴酸所抑制，因此進一步探討馬兜鈴酸對於 LPS 所誘發的 iNOS mRNA 表現量是否也有同樣的抑制效果。在處理 50 ng/ml LPS 的 RAW 264.7 細胞中，再加入溶劑或不同濃度之馬兜鈴酸一起處理 18 個小時後，接著萃取細胞中 total RNA，將 mRNA 反轉錄成 cDNA 並進行 Quantitative RT-PCR 分析。我們發現 LPS 所誘發的 iNOS mRNA 表現量也隨著馬兜鈴酸的處理劑量增加而有逐漸降低的趨勢 (如圖四)。以上結果顯示在 RAW 264.7 細胞中，當馬兜鈴酸處理的濃度越



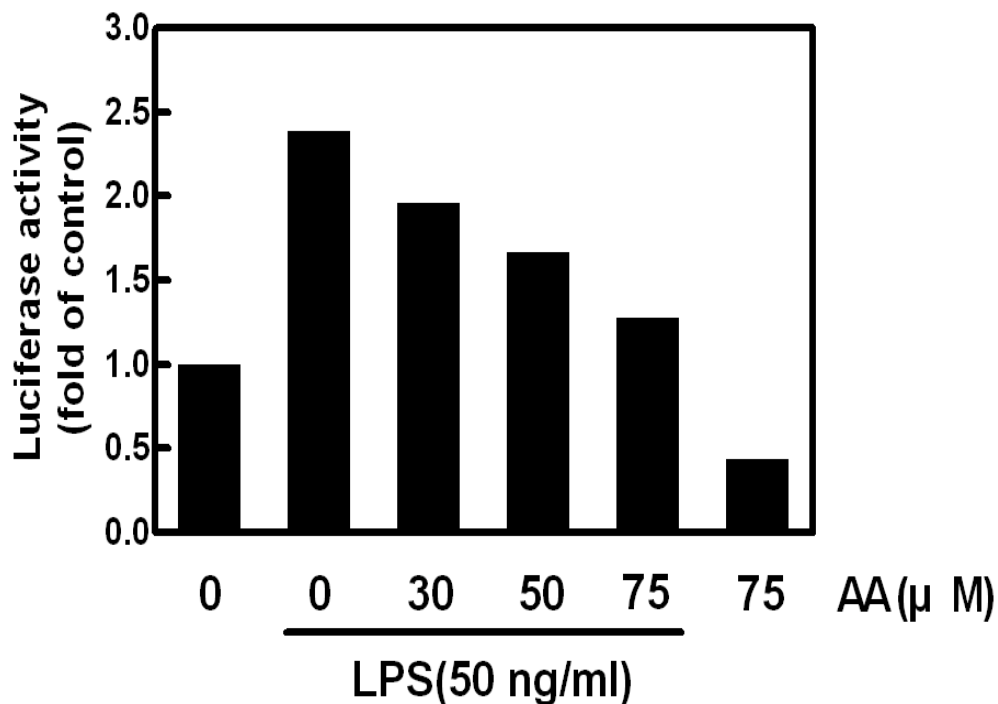
高，LPS 所誘發之 iNOS mRNA 表現量被抑制的現象越為顯著。

圖四、馬兜鈴酸抑制 LPS 所誘發的 iNOS mRNA 表現量

將 RAW 264.7 細胞種在 35mm 盤中 24 小時，約達 8 成滿時在處理 50 ng/ml LPS 的 RAW 264.7 細胞中，加入溶劑或不同濃度之馬兜鈴酸一起處理 18 個小時，以 RT-PCR 觀察其 RNA 表現量，以 GAPDH 作為 internal control。

馬兜鈴酸抑制LPS所誘發的iNOS promoter活性

先前的實驗中得知馬兜鈴酸能抑制 iNOS mRNA 表現量，但是在 iNOS promoter 的轉錄因子 NF- κ B、AP-1 及 STAT 並沒有明顯地受到馬兜鈴酸的抑制，因此我們最後來探討馬兜鈴酸對於 iNOS 啟動子所驅動的下游基因表達是否會有顯著的抑制效果。首先建構iNOS promoter 序列及 luciferase 螢光報導者基因 (luciferase reporter gene) 的質體 (如附圖四)，並且將建構好的質體轉殖送入細胞中，在處理 50 ng/ml LPS 的 RAW 264.7 細胞中，再加入溶劑或不同濃度之馬兜鈴酸一起處理 24 個小時後，萃取細胞內所有蛋白質進行轉錄活性的冷光強度分析，並且以轉殖細胞所散發出的冷光強度作為轉錄活性高低的參考值 (如圖五)。由以上結果顯示馬兜鈴酸能夠顯著地抑制 LPS 所誘發 iNOS promoter 的驅動活性，並且可以知馬兜鈴酸降低 iNOS 基因表達的作用機轉是藉由抑制 iNOS promoter 上的某些 DNA 序列。



圖五、馬兜鈴酸抑制 LPS 所誘發的iNOS promoter活性

將RAW 264.7 細胞種在35mm盤中24小時，約達5成滿時將建構好的iNOS promoter的報導者基因質體轉殖感染細胞，接著在處理 50 ng/ml LPS 的 RAW 264.7 細胞中，加入溶劑或不同濃度之馬兜鈴酸一起處理 24 個小時後，抽取細

胞中的蛋白質分別進行 luciferase 報導者基因試驗及 β -galactosidase 試驗。將 luciferase 活性的數值以 β -galactosidase 的酵素活性值進行正規化，其中只以溶劑處理的控制組設為 1，實驗組與之比較後予以倍數化。

討論 (Discussion)

先前的研究大部份都從致毒性及致癌性的角度，來探討馬兜鈴酸的作用機制，卻很少有研究針對馬兜鈴酸能提高吞噬細胞活性及治療免疫相關疾病 (例如：風濕)，來進一步探討馬兜鈴酸的作用機轉。研究馬兜鈴酸如何影響免疫反應，並瞭解馬兜鈴酸抑制發炎的機制，不僅可以發揮馬兜鈴酸的有利之處，也可以提供一個降低過度免疫反應的方法，因此研究馬兜鈴酸抑制免疫反應首先必須要有一個發炎的模式。

在發炎反應中，巨噬細胞一直扮演著重要的角色，當受到外來物 (例如 LPS) 刺激時可以分泌出許多發炎前驅物質，例如本實驗中的研究對象 NO，一般正常狀況下，NO 為體內重要的訊息傳遞分子，而且可以幫助調控宿主的免疫防禦機制、神經訊息傳遞及脈管相關的功能 (Korhonen *et al.*, 2005; Swindle and Metcalfe, 2007)，不過一旦 NO 過量表現時，反而就會造成人體的傷害並且導致許多免疫發炎疾病。NO 為許多探討發炎機制研究中最常使用的指標之一，所以我們以 LPS 刺激老鼠的巨噬細胞 RAW 264.7，使細胞產生許多發炎前驅物質 NO，作為一個發炎的模式，並且以此模式來研究馬兜鈴酸抑制發炎反應的機制。

已知馬兜鈴酸會造成細胞毒性，因此首先必須瞭解馬兜鈴酸對 RAW 264.7 細胞是否會有傷害，經由細胞存活率的實驗結果得知，當馬兜鈴酸的劑量高達 100 μM 時，細胞的存活率仍然有 50% (如圖一)，由此實驗可證實馬兜鈴酸對 RAW 264.7 細胞造成的影響較小。

在不會造成 RAW 264.7 細胞毒性的馬兜鈴酸劑量範圍內，以 0, 10, 30, 50 μM 的馬兜鈴酸來研究馬兜鈴酸對發炎前驅物質 NO 生成的影響，結果發現以 50 μM 馬兜鈴酸處理被 LPS 刺激過的細胞 18 個小時後，NO 的生成量與 LPS 誘發組相比被抑制了 50% (如圖二)。因此以上結果可得知馬兜鈴酸的確能夠在不傷害細胞的前提下，達到抑制發炎前驅物質 NO 的生成。

LPS 誘發的 NO 生成主要是由於細胞內精氨酸被 iNOS 催化氧化成瓜氨酸的過程中產生的。我們以 18 個小時作為時間點，並且發現 50 μM 馬兜鈴酸

能夠將 LPS 所誘發的 iNOS 蛋白量抑制 (如圖三); 在 iNOS mRNA 的表現量上面, 我們採用與 iNOS 蛋白質表現的時間點相同來觀察馬兜鈴酸抑制 iNOS mRNA 的表現量, 發現到 50 μ M 馬兜鈴酸處理之下, LPS 所誘發的 iNOS mRNA 表現量被抑制了 (如圖四)。

我們首先建構 iNOS 基因前端啟動子 (promoter) 序列的 luciferase 報導者基因質體, 以 Luciferase 的活性作為基因進行轉錄機制的指標, 來探討馬兜鈴酸是否藉由抑制 iNOS promoter 來造成 iNOS 基因無法轉錄成 iNOS mRNA。此實驗結果顯示馬兜鈴酸的確會藉由抑制 iNOS 啟動子來抑制 iNOS 基因的轉錄作用 (如圖五)。

總結而言本實驗的結果可以了解馬兜鈴酸抗發炎機轉, 馬兜鈴酸能透過抑制 iNOS 基因轉錄的機制, 來抑制 iNOS mRNA 量及蛋白質量, 進而減少發炎前驅物質 NO 的生成, 並且目前已證實馬兜鈴酸的抑制區域在 iNOS 基因前端的啟動子上。

未來研究方向 (Future work)

由於目前對於馬兜鈴酸的抑制 iNOS 基因機轉之研究尚未整合出其抑制途徑與作用機轉，但已有研究指出若把 NF- κ B 結合區進行定點突變 (site-directed mutagenesis) 就能明顯地降低 iNOS 的表現 (Xie *et al.*, 1994; Eberhardt *et al.*, 1998)，也有許多抑制發炎的物質透過抑制 NF- κ B 結合至 iNOS 啟動子上的作用，來進行抑制 iNOS 表現及 NO 的生成 (Cheng *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2007)，故可得知 NF- κ B 在 iNOS 基因表現的調控機制中扮演舉足輕重的角色。

常見的發炎基因除了 iNOS 基因外，還有 COX-2，COX-2 為 COX 家族中的成員之一，COX-2 能分解 arachidonic acid 轉成 prostanoids，包含 prostaglandin、prostacyclin 及 thromboxane，而 prostaglandin 則為發炎前驅物質之一，主要能夠調節發炎及過敏反應 (Hwang *et al.*, 1997; Hinz *et al.*, 2000)。COX-2 與 iNOS 相似之處在於 COX-2 也可經由 LPS 誘發而產生，且加入相同抑制劑後會產生與 iNOS 相同的抑制效果 (Niranjan *et al.*, 2008)。針對此結果我們進一步比對前人研究 iNOS 發炎機制與 COX-2 的發炎機制的結果，且先前的研究中大部份抗發炎物質主要以 NF- κ B 作為抑制發炎的途徑 (Cheng *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2007)；而 COX-2 的發炎機制中，常見且可調控 COX-2 基因的轉錄因子，主要有 NF- κ B、AP-1、C/EBP β 及 CREB (Eliopoulos *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Weng *et al.*, 2004)。iNOS 及 COX-2 兩種發炎基因共同的轉錄機制，是由轉錄因子 NF- κ B 或 C/EBP β 來調控下游發炎基因，產生大量發炎前驅物質 (Kim *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2007)，因此馬兜鈴酸很有可能透過抑制轉錄因子 NF- κ B 的活化來抑制 iNOS 及 COX-2 基因的作用，因此本計畫希望能夠更完整的了解馬兜鈴酸對於發炎基因 iNOS 及 COX-2 的抑制機轉，以得知其更明確的作用機轉。

參考文獻 (Reference)

- Cheng, W. L., Lii, C. K., Chen, H. W., Lin, T. H., and Liu, K. L. (2004). Contribution of conjugated linoleic acid to the suppression of inflammatory responses through the regulation of the NF-kappaB pathway. *J Agric Food Chem* 52, 71-8.
- Eliopoulos, A. G., Dumitru, C. D., Wang, C. C., Cho, J., and Tsiichlis, P. N. (2002). Induction of COX-2 by LPS in macrophages is regulated by Tpl2-dependent CREB activation signals. *Embo J* 21, 4831-40.
- Gold, L. S., and Slone, T. H. (2003). Aristolochic acid, an herbal carcinogen, sold on the Web after FDA alert. *N Engl J Med* 349, 1576-7.
- Kim, H. G., Shrestha, B., Lim, S. Y., Yoon, D. H., Chang, W. C., Shin, D. J., Han, S. K., Park, S. M., Park, J. H., Park, H. I., Sung, J. M., Jang, Y., Chung, N., Hwang, K. C., and Kim, T. W. (2006). Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF-kappaB through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. *Eur J Pharmacol* 545, 192-9.
- Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H., and Moilanen, E. (2005). Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4, 471-9.
- Liu, K. L., Chen, H. W., Wang, R. Y., Lei, Y. P., Sheen, L. Y., and Lii, C. K. (2006). DATS reduces LPS-induced iNOS expression, NO production, oxidative stress, and NF-kappaB activation in RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem* 54, 3472-8.
- Lee, A. K., Sung, S. H., Kim, Y. C., and Kim, S. G. (2003). Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF-alpha and COX-2 expression by sauchinone effects on I-kappaBalpha phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *Br J Pharmacol* 139, 11-20.
- Oh, P. S., Lee, S. J., and Lim, K. T. (2007). Glycoprotein isolated from *Rhus verniciflua* Stokes inhibits inflammation-related protein and nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Biol Pharm Bull* 30, 111-6.

- Swindle, E. J., and Metcalfe, D. D. (2007). The role of reactive oxygen species and nitric oxide in mast cell-dependent inflammatory processes. *Immunol Rev* 217, 186-205.
- Wang, W., and Zhang, J. (2008). Protective effect of erythropoietin against aristolochic acid-induced apoptosis in renal tubular epithelial cells. *Eur J Pharmacol* 588, 135-40.
- Weng, M. W., Hsiao, Y. M., Chen, C. J., Wang, J. P., Chen, W. C., and Ko, J. L. (2004). Benzo[a]pyrene diol epoxide up-regulates COX-2 expression through NF-kappaB in rat astrocytes. *Toxicol Lett* 151, 345-55.