

修正本

計畫編號：DOH91-TD-1003

行政院衛生署九十一年度科技研究發展計畫

七層塔萃取物抑制肝臟發炎功效
之評估

研究報告

執行機構：中山醫學大學生物化學研究所

計畫主持人：劉哲育

研究人員：徐志誠

執行期間：91年8月1日至92年7月31日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見

目錄

中文摘要.....	
英文摘要.....	
前言.....	
材料與方法.....	
結果.....	
討論.....	
結論與建議.....	
參考文獻.....	
圖表.....	

中文摘要

七層塔是台灣的常用民間保健草藥之一，根據中草藥的文獻指出七層塔有治療咽喉腫痛、咳血及肝炎等療效 (1-4)。另外，在保肝方面的研究指出利用四氯化碳處理的小鼠加入不同品種的七層塔萃取液均被證實有抑制發炎的現象 (7)。

研究報導指出肝星狀細胞 (hepatic stellate cells, HSC) 活化是造成肝纖維化及肝硬化形成的主要因素 (23)。當正常肝細胞受到病毒或酒精等因素傷害時，肝星狀細胞開始轉型活化 (例如纖維化、增加生長速率及分泌發炎激素等現象)，最後導致肝功能失常、纖維化和肝硬化。然而七層塔是否具有抑制肝星狀細胞活化的能力，仍然未知。因此本實驗計畫將深入探討七層塔萃取液抑制肝星狀細胞活化的作用機制，也同時偵測台灣不同區域內不同七層塔品種的藥效。

本實驗為一年期計畫。首先將台灣北、中、南及東部四區內的七層塔全草進行傳統水萃取。然後收集 Wistar 雄鼠內的肝星狀細胞進行初代培養，並處理不同地區 (北、中、南及東部) 及不同劑量的七層塔萃取液，觀察細胞型態及細胞增殖速率的現象。同時採用 RT-PCR 來偵測肝星狀細胞內細胞激素 (IL-6) 及原膠元蛋白 α 2 mRNA 表現，和利用細胞免疫螢光染色測定 α -SMA 表現 (肝纖維化指標) 的抑制情形。

結果顯示 HSCs 在細胞分離後 168h 時即表現活化和增殖現象。七層塔萃取液明顯抑制 HSCs 細胞的增殖。給予不同劑量七層塔萃取液 31.2 μ g/ml、62.4 μ g/ml、156 μ g/ml、312 μ g/ml 和 624 μ g/ml，細胞增殖速率在處

理七層塔萃取液後 120h，從 123.6% 分別降至 60.8%、39.1%、27.4%、24.2% 和 10.1%。而細胞活化伸張的外型也受到抑制。另外 HSCs 活化指標 α -SMA、IL-6 和 pro-collagen，在 HSCs 活化時分別上升至 190%、171% 和 117%。而 31.2 μ g/ml 七層塔萃取液抑制分別下降至 57%、106% 和 49%，62.4 μ g/ml 七層塔萃取液抑制則更分別下降至 57%、67% 和 0%。利用免疫螢光染色法，更確定 α -SMA 表現受到限制。

此項結果不僅證明七層塔具有抑制肝發炎的功效，同時也建立天然藥物抑制肝臟發炎反應的細胞模式。

關鍵字：七層塔、肝星狀細胞、肝纖維化

英文摘要

Salvia pleveia R. Brown is one of common health protective herb in Taiwan. According to the traditional herb studies, it has been provided with the therapeutic ability for sore-throat、hemoptysis and hepatitis (1-4). In the hepatoprotective studies, the extracts of the different kinds of *Salvia pleveia* R. Brown have also been evidenced to have the anti-inflammatory effect in the CCl₄-treated mice (7) .

Many reports have indicated that liver fibrogenesis and cirrhogenesis are mainly due to the activation of hepatic stellate cells (HSCs) (23). When normal liver cells are injured by virus or alcohol, HSCs will be transformed to activation (such as increase of fibrogenesis and the growth rate and the secretion of cytokine), and finally cause liver dysfunction, fibrosis and cirrhosis. So, to inhibit HSCs activation will be the best choice to prevent liver fibrosis and cirrhosis. However, whether the activation of HSCs is really inhibited by *Salvia pleveia* R. Brown is still unconfirmed. Thus, this experimental design will further investigate the mechanism of the inhibitory effect of *Salvia pleveia* R. Brown on the serum-induced HSCs activation, and also will screen the medical effect of the different types of *Salvia pleveia* R. Brown collected from different areas in Taiwan.

This experiment will be performed in one year. First, *Salvia pleveia* R. Brown will be collected from the north、midst、south and eastern part of Taiwan and will be extracted by water-boiling-water extraction. HSCs separated from Wistar male rats will be treated with different concentrations of the extracts of *Salvia pleveia* R. Brown from different area (north、midst、south and eastern part), and then observed cell morphology and measure cell growth rates. In the same time, to confirm the inhibitory effect the expressions of cytokine (IL-6) and pro-collagen α 2 mRNAs will be detected by using RT-PCR analysis, and the marker of the fibrosis (α -SMA) by immunofluorescence staining will be also screened.

The result showed that the activation and proliferation of HSCs was observed on 168h after cell isolation. The extract of *Salvia pleveia* R. Brown significantly inhibited the proliferation of HSCs. After treatment with different dose of the extract of *Salvia pleveia* R. Brown by 31.2 μ g/ml、62.4 μ g/ml、156 μ g/ml、312 μ g/ml and 624 μ g/ml, the cells revealed the decrease in cell proliferation on 120 h, from 123.6% to 60.8%、39.1%、27.4%、24.2% and 10.1%, respectively. The extent of morphology was also inhibited. Besides, the markers of the HSCs activation α -SMA、IL-6 and pro-collagen were increased in the mRNA expressions by 190%、171% and 117%. The expressions of mRNA were inhibited by the 31.2 μ g/ml extract

of *Salvia pleveia* R. Brown to 57%、106% and 49%, respectively; by the 62.4 $\mu\text{g/ml}$ extract to 57%、67% and 0%, respectively. By using immunofluorescence staining analysis, the protein expression of α -SMA also confirmed the inhibition.

These results not only provide the evidence of the anti-inflammatory effect of *Salvia pleveia* R. Brown in liver, but also set up a novel cellular model of the anti-inflammatory effect in liver for screening nature medicines.

Key word : *Salvia pleveia* R. Brown, hepatic stellate cells, liver fibrosis

前 言

七層塔係本省特有之民間草藥，又名賴斷頭草、節毛鼠尾草、荔枝草等，常生長於河堤邊、田間等陰濕處。據中草藥文獻指出其能解毒、利尿、清熱、消炎，民間常用於治療咽喉腫痛、咳血、肝硬化及肝炎等(1-4)。之前的研究發現，七層塔水煮萃取物對於小鼠有鎮咳、平喘作用，同時對於大鼠的支氣管炎亦能夠有效治療(5)。在抑菌試驗上，發現其對於金黃色葡萄球菌、肺炎雙球菌等球菌以及痢疾桿菌、綠膿桿菌等桿菌均有明顯的抑制作用(6)。在保肝方面，根據林榮貴、張建雄的研究發現，不同品種的七層塔萃取液均有不同程度的保肝作用，亦即有抑制四氯化碳(CCl_4)誘發小鼠肝細胞損傷及降低肝功能指數的功用，同時也減少小鼠的肝纖維化作用(7)。而林俊清、蔣連財等人研究亦發現，台灣產地的唇型科生藥中，七層塔對於B型肝炎病毒有顯著的抑制作用(8)，同時亦有抑制脂質過氧化的作用活性(9)。而七層塔精油則能加強肝細胞中 Glutathione (GSH)之抗氧化系統，同時降低由黃麴毒素 B1 所誘發肝細胞非程序性 DNA 合成(10)。七層塔經由甲醇或水煮萃取後可得到黃酮類化合物，其中包含：高車前苷(homoplantagenin, 即 4',5-二羥基-6-甲氧基黃酮-7-葡萄糖苷)、粗毛豚草素(hispidulin, 即 4',5,7-三羥基-6-甲氧基黃酮)、尼辟黃酮苷(nepitrin, 即 3',4',5',7-四羥基-6-甲氧基黃酮)、4-羥基苯基乳酸(4-hydroxyphenyllactic acid)、咖啡酸(caffeic acid)等，所以這些成份可能是抑制 CCl_4 誘發肝細胞傷害的主要成份(11)。惟民間另一株常用生藥九層塔之前曾檢測出含有黃樟素(Safrole)，但含量甚低，而七層塔(*Salvia pleveia* R. Br.)與九層塔(*Ocimum basilicum* L.)是完全不同品種的生藥，故七層塔是否同樣含有黃樟素有待商榷。然而，由行政院農委會所公佈的「藥用保健植物目錄」中已將七層塔納入其中，是故七層塔的安全性應毋庸置疑。

研究發現肝纖維化/肝硬化與高量 cytokines 持續誘發發炎作用有密切的關係(12)。B 型肝炎的病人其肝組織內經常含有高量的 IL-6 與 IL-8 (13,14)。慢性肝疾病的病人血液中亦含有高量的 cytokines (如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 與 IL-8) (15)。酒精性肝硬化 (alcoholic liver cirrhosis) 的病人血液中 IL-6、TNF- α 和 IL-8 的含量也增加(16)。在實驗動物處理 CCl₄ 或膽管結紮後也發現肝細胞會發生發炎現象，其肝組織內 IL-6 與 IL-8 的含量增加，隨後產生肝壞死和肝硬化(17)。大白鼠長期處理 IL-6 也會造成肝細胞纖維化(18)。其中研究顯示 IL-6 可能經由細胞內訊息傳遞活化 gp130 和 STAT 轉譯活化因子，再誘發標地基因 (JunB；原始致癌基因) 表現。雖然當細胞受到 CCl₄ 毒物傷害時 IL-6 可能有減少肝細胞凋亡的功能(19)，卻依然會產生肝硬化。而缺乏 IL-6 的基因改良大鼠經處理 CCl₄ 後，肝硬化有減緩的現象(20)。因此長時間高量的 IL-6 表現，可能是導致肝細胞病變的原因。

在正常的肝組織中，hepatic stellate cells (HSCs)，亦稱 fat-storing cells、perisinusoidal cells、Ito cells 及 lipocytes 等，是以未活化的狀態穩定的環繞附著於肝內皮細胞(endothelial cell) 層上，HSCs 的功能在於調節血流量 (Blood Flow Regulation) (21,22) 與調控肝細胞中脂質的代謝 (23)，其中包括視網醇(retinoid metabolism) (24-28)、輔脂蛋白 E (apolipoprotein E) 的代謝 (29,30) 等。惟現今研究 HSCs 皆在於其為肝纖維化與肝硬化病狀初期活化的細胞(31)。當肝組織受到肝炎病毒、CCl₄、酒精等外在因素傷害時，HSCs 即開始轉型分化 (transdifferentiation) 和活化 (activation) (32)，被活化的 HSCs 產生發炎現象，其過程包括纖維化(fibrogenesis)、失去脂滴和 retinoid、增加生長速率(proliferation)、增加細胞外間質成分、增加分泌 MMPs 和 TIMPs、增加 cytokines 分泌和增加細胞收縮力(contractility) 等。最後導致肝細胞轉化、失去肝功能而形成肝纖維化和肝硬化(33)。所以活化的 HSCs

是導致肝纖維化/肝硬化的主要細胞之一，而如何防止 HSCs 的活化，甚至是使已活化的 HSCs 回復到未活化的狀態，將是抑制肝臟發炎和肝纖維化最好的方式。

另外 You. H. 曾經測試一種名為 *compound 861* 的中草藥萃取物，發現 *compound 861* 能夠有效抑制 HSCs 活化，同時亦能抑制慢性 B 型肝炎患者肝組織內 HSCs 活化的數量(34)。而 Liu. C. 等人則發現丹參中的 *salvianolic acid* 具有抑制 HSC 活化的作用(35)，同時也發現能夠抑制 CCl_4 誘發肝纖維化的能力(36)。故利用抑制 HSCs 活化的實驗模式來測試中草藥的抗肝發炎作用將可得到真正有效的保健草藥。

然而七層塔是否抑制 HSC 活化，還需觀察其相關生化指標方能確定。根據林榮貴、張建雄對於七層塔的生藥學研究確認台灣市售七層塔之基源為節毛鼠尾草(*Salvia pleveia* R. Br.)和印度羅勒(*Ocimum gratissimum* L.)兩種品種之全草(37)。根據孔憲鐸等人以為中草藥有效成份含量的高低，隨其不同的品種、產地和產期而異(38)。所以本實驗計畫為了確定七層塔抑制肝發炎的能力和了解不同產地七層塔的功效，預計分別選用由台灣北、中、南、東四地區夏秋生產的不同品種七層塔全草，進行傳統的水萃取法，採用傳統式水萃取法的目的在於符合一般民間用藥煮食方式。而實驗細胞的採用預計選用 Wistar 雄鼠 50 隻 (350-450g)，收集其肝星狀細胞 (HSCs) 來進行初代培養 (primary culture)，以 serum (Fetal Bovine Serum, FBS) 為發炎激素誘導其活化後，同時處理不同地區及不同劑量七層塔萃取液，觀察發炎作用之相關生化指標。其結果不僅證實七層塔是否確為抑制肝發炎作用的草藥，同時亦建立研究天然物質抑制肝發炎作用之細胞模式。

材 料 與 方 法

(一)七層塔傳統水萃取

將七層塔略為清洗後秤取 20 克置入電動煎藥壺，以 1000 毫升的蒸餾水煎煮一小時，之後將煎煮萃取液移至燒杯內加熱濃縮至 100 毫升，待冷卻後離心(12000rpm, 1hr, 4°C)去除雜質，再將上清液進行真空冷凍乾燥，使其成為粉末狀，保存於-20°C，待需要取用時再依所需濃度以培養液回溶配製。

實驗中濃度的選用是依據民間以七層塔治療肝炎之用藥量(4)經一正常體重 50kg 的人攝食代謝後，估算所到達細胞之作用量而得。

(二)大白鼠 hepatic stellate cells (HSCs)之分離與初級培養

HSCs 之分離是根據 Friedman 及 Bernard 等人(1987)(39)所利用之膠原蛋白酶(collagenase)灌流法與梯度離心法(density gradient centrifugation)分離。方法如下：350-450g Wistar 雄鼠以腹腔注射 (i.p.) sodium pentobarbital (80mg/kg body weight)進行麻醉，麻醉後剪開腹腔，利用頭皮針經肝門靜脈進行灌流，以 10ml/min 流速注入 125ml Libovitz L-15 medium (Sigma)，其中 L-15 medium 內含 10mmol/L HEPES，1U/ml penicillin G，與 1 μ g/ml streptomycin，隨後用含有 200mg non-specific protease (Calbiochem-Novabiochem Corporation, La-Jolla, CA, USA.) 的 Eagle's minimum essential medium (MEM)灌流沖洗，以上目的在將肝臟中的血液沖洗出。之後以含有 80mg collagease (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Germany) 225ml MEM 進行流速為 20ml/min 的灌流，灌流時間約 10 分鐘。

待灌流後以剪刀將肝臟取出，置於含有 20mg protease 和 1 mg DNase I (DTI; GIBCO)的 100ml MEM 中進行 digestion，digestion 環境為置於 37°C 搖

晃式水浴槽中以 275rpm 離心 20 分鐘，digestion 後將肝細胞懸浮液以孔徑 60 μ m 尼龍網收集過濾，再以低速離心(1200rpm, 5min)將細胞洗淨，利用 28.7% Nycodenz (Sigma)製造分子量梯度，經由離心(25 $^{\circ}$ C, 3000rpm, 20min)即可發現 hepatic stellate cells 介於 medium 與 Nycodenz 層之間，將 HSCs 取出後以 10ml HBSS 將之略為清洗(1200rpm, 5min)，之後培養於含有 10% FBS 的 DMEM 6-well plate (Corning, Cambridge, MA, USA)中，調整其細胞濃度為 1×10^6 /ml。DMEM 培養液每 24hr 更換一次。由於 HSCs 的初級細胞培養中其細胞貼附與延展力十分的緩慢，所以在培養 3 天後，細胞才得以完全延展貼附，而在第七天後，才會出現較密集的 HSCs 細胞群。Desmin 常被用來當做確認 HSCs 純度的指標(40)，所以最後以 desmin immunofluorescence 來做 HSCs 的純度分析。

(三)細胞形態觀察

先將細胞以 Giemsa stain 染色固定，再佐以顯微鏡觀察 HSC 細胞型態 (morphology)，最後依不同倍數照相觀察。

(四)細胞增殖試驗

以 MTT Assay (Microculture Tetrazolium colorimetric assay)與細胞計數 (Cell Number Count assay)來測定。

MTT Assay：將 5×10^4 cells/well HSCs 培養於 6-well plate (Corning, Cambridge, MA, USA)中並加入 2ml DMEM，培養 24 小時後，加入不同濃度的七層塔，使之最終濃度為 5、2、1、0.1、0.01 mg/ml，並以 0.02% DMSO 當控制組。持續培養 18 小時後移去原有的培養基，以 PBS 清洗一遍後加入新的 DMEM 以及 MTT (25mg/ml) 20 μ l，持續培養 5 小時後移去 DMEM，加入異丙醇 (Isopropanol) 2ml 析出細胞所吸附進的 MTT，置於離心管中離心

(1500rpm, 5min)。最後取上清液以分光光度計在波長563nm下測其吸光值。

細胞增值測定之計算方式以DMSO組為100%，加藥組所測得的吸光值除以控制組(DMSO)後的百分比即為此加藥濃度下的細胞增值率。

(五)RT-PCR (Reverse-Transcription PCR)

RT (reverse transcriptase)：取 4 ug 的 RNA 加入 DEPC-H₂O，以 70°C 處理 5 分鐘。加入 40 U RNase inhibitor (Promega)，5X RT buffer (Promega) 以及 2.5 mM dNTP (Promega)，和 5 uM Oligo dT 後，於溫度循環機處理 42°C，5 分鐘後加入 1U RT 酵素 (Promega)，繼續在 42°C 反應，1 小時之後再以 99°C 作用 5 分鐘後以 4°C 保存。

PCR (Polymerase chain Reaction)：取 10 ul cDNA 加入 DEPC-H₂O，加入 5 uM sense primer 和 anti-sense primer，再加入 10 mM dNTP 以及 10X PCR buffer (DyNa；10 mM Tris-HCl，1.5 mM MgCl₂，50 mM KCl 和 0.1% Triton X-100)，於溫度循環機處理 94°C，5 分鐘後加入 2U DNA polymerase (DyNa)，處理 94°C 1 分鐘，annealing 溫度 60°C 1 分鐘，並於 72°C 反應 2 分鐘，共 30 個循環，最後再處理 72°C 反應 20 分鐘，4°C 保存。配置 1.2% 的 DNA 電泳膠片。加入 DNA marker 和取 PCR 產物及 DNA loading dye，加到電泳膠片。電壓 100 V，跑電泳膠片 30 分鐘，利用 EtBr 染色，於 UV 光下對照 DNA marker 位置，檢查所要的位置是否有所表現。

(三) 免疫螢光染色 (Immunofluorescence staining)

處理不同濃度花青素的 HSCs，培養 48 小時後，移除 DMEM，PBS 清洗兩遍後，以 3.7% 福馬林及 2% TritonX-100 固定 8 分鐘，接著加入 1% 的 BSA 阻止一些非特異性抗體的結合，經過 30 分鐘後，在室溫下加入單株抗體 α -SMA (1:400)，作用 1 小時後以 PBS 清洗 2 次，每次 3 分鐘，接著加入 2 級抗體 FITC conjugated anti-goat IgG (1:50)，作用 30 分鐘後以 PBS 清

洗 2 次，每次 3 分鐘，最後在標本上滴入 mounting media，再以共軛焦顯微鏡(LSM 410 from Zeiss)波長 488nm 及 543nm 分別觀察細胞型態及 α -SMA 表現。

結 果

結果顯示七層塔葉萃取物造成未活化態的 HSC 細胞凋亡 (apoptosis) 的 LD₅₀ 是 0.312 mg/ml，而 0.125 mg/ml 即有抑制 HSC 細胞活化。若與先前結果比較，肝細胞 (Hepatocyte) 的 LD₅₀ 是 1.248 mg/ml 七層塔葉萃取物，活化態的 HSC 細胞 LD₅₀ 是 0.312 mg/ml，當肝細胞和未活化態的 HSC 細胞同時培養時 LD₅₀ 是 1.248 mg/ml，七層塔在不傷害肝細胞的劑量下即具有抑制 HSC 活化的作用。另外以九層塔或北柴胡處理細胞時，則即使在高劑量下也不影響 HSC 細胞活化和凋亡。可見七層塔具有獨特抑制 HSC 活化的功效。

本次實驗分別選用由台灣北、中、南、東四各地區購入的七層塔全草，進行傳統水萃取法，實驗細胞則取 Wistar 雄鼠之肝星狀細胞 (HSCs) 進行初代培養，以 serum 為發炎激素誘導其活化後，同時處理不同地區 (北、中、南、東四地區) 和不同劑量 (31.2 μ g/ml、62.4 μ g/ml、156 μ g/ml、312 μ g/ml、624 μ g/ml) 七層塔萃取液，利用 MTT assay 觀察不同地區之七層塔對 HSCs 細胞存活率之影響，結果發現不同的地區對 HSCs 之存活率影響並無差異性，接下來選用東部七層塔萃取液進行以下的實驗，以東部七層塔萃取液處理 HSCs 結果顯示處理 24 小時 (圖一)，從 31.2 μ g/ml 到 62.4 μ g/ml 的劑量對於 HSC 細胞的存活率約從 88% 降到 44%。隨後隨時間增加持續下降，31.2 μ g/ml 在處理七層塔萃取液後 120 小時降到約 60%，62.4 μ g/ml 降到 40%，156 μ g/ml 降到 27%，312 μ g/ml 降到 25%，62.4 μ g/ml 降到 10%，而 control 組則細胞快速增殖，由 100% 增殖至 120%。

在觀察其 24 小時和 48 小時細胞型態的變化，發現 31.2 μ g/ml 七層塔

處理後的細胞都較對照組小，隨劑量增加有更明顯的抑制細胞生長，而且有較少伸張的觸手（圖二和圖三），而以 RT-PCR 偵測經不同劑量七層塔萃取液處理後之 HSCs 中與發炎及纖維化相關基因之 mRNA 表現，發現發炎指標 IL-6 之表現有下降，當加入血清 (serum) 誘發發炎，IL-6 明顯上升 171.3%，加入 31.2 $\mu\text{g/ml}$ 和 62.4 $\mu\text{g/ml}$ 七層塔萃取液分別明顯下降至 106% 和 67.0%。另外 α -SMA 也被血清誘發上升 190%，加入 31.2 $\mu\text{g/ml}$ 和 62.4 $\mu\text{g/ml}$ 七層塔萃取液分別明顯下降至 57.3% 和 56.9%。Pro-collagen 被血清誘發上升 117.5%，加入 31.2 $\mu\text{g/ml}$ 和 62.4 $\mu\text{g/ml}$ 七層塔萃取液則分別明顯下降至 48.5% 和 0% (圖四和圖五)。利用共軛焦顯微鏡偵測其 α -SMA 的含量也發現隨七層塔劑量的增加 HSC 細胞也較單獨處理 serum 的細胞顯著下降 (圖六和圖七)。

討 論

在實驗中首先分析台灣北部、中部、南部及東部不同地區之七層塔對 HSCs 之影響，發現不同地區所萃取的七層塔萃取液對 HSCs 之存活率並無差異，這可能是因為台灣本島面積不大，陽光、土壤以及氣候對不同地區之七層塔品質並無明顯差異。

先前的文獻中以指出 HSCs 是肝臟中引發肝炎及肝纖維化主要的細胞之一，而在本次實驗中發現七層塔萃取液在低劑量時以有明顯的抑制 HSCs 生長及存活率之效果，然而在七層塔萃取出造成未活化態的 HSC 細胞凋亡 (apoptosis) 的 LD50 是 $31.2 \mu\text{g/ml}$ ， $12.5 \mu\text{g/ml}$ 即有抑制 HSC 細胞活化。若與先前結果比較，肝細胞 (Hepatocyte) 的 LD50 是 1.248 mg/ml 七層塔葉萃取物，活化態的 HSC 細胞 LD50 是 0.312 mg/ml ，當肝細胞和未活化態的 HSC 細胞同時培養時 LD50 是 1.248 mg/ml ，七層塔在不傷害肝細胞的劑量下即具有抑制 HSC 活化的作用。另外以九層塔或北柴胡處理細胞時，則即使在高劑量下也不影響 HSC 細胞活化和凋亡。可見七層塔具有獨特抑制 HSC 活化的功效。

另外在分析七層塔萃取液對 HSCs 中與發炎及纖維化相關因子之表現，於 RT-PCR 中發現當加入 serum 刺激後發炎因子 IL-6 mRNA 表現隨之增加，然而加入七層塔萃取液後 IL-6 mRNA 即有明顯的降低，而纖維化上分析 α -SMA 及 pro-collagen mRNA 之表現，亦有相同抑制的情形，然而再進一步利用螢光免疫染色觀察 α -SMA 也有相同的發現，因此可以確定七層塔在抑制肝炎及肝纖維化上確實是有明顯的效果。

接下來的實驗中，我們欲針對七層塔萃取液進一步純化分析，找出

七層塔中可以抑制肝炎及肝纖維化的單一化合物；另外在文獻中也指出在肝損傷後肝臟中固有細胞和浸潤的炎症細胞會經由 paracrine 或 autocrine 的途徑產生許多細胞激素，其中以 PDGF 和 TGF- β 1 最重要，前者是目前已知的最強的促 HSC 增殖因數，後者是最強的促 HSC 纖維生成因數，因此接下來的實驗亦可探討七層塔對於抑制 HSCs 中 PDGF 和 TGF- β 1 的相關機制之研究。

結論與建議

七層塔萃取物確實有抑制肝臟發炎作用，尤其防止肝纖維化的作用。而且從本實驗得知七層塔萃取物防止肝纖維化可能與抑制肝星狀細胞 (HSC) 活化有關。

台灣七層塔的來源，不論北、中、南、東區，它的效果都一樣；而七層塔本身的效果，以種子最有效，其次葉、小莖，大莖效果最差。

因為七層塔在高劑量下，仍然有部分細胞毒性，故不適宜長期服用，比較建議間歇性的服用。另外七層塔有抑制細胞內許多基因的轉錄作用 (transcription)，可能可以考慮應用在 HBV 和 HCV 感染的病人，減少病毒增殖擴散。

參考文獻

1. 許鴻源：台灣地區出產中藥材圖鑑，行政院衛生署中醫藥委員會，第 294 頁，台北，(1972)。
2. 甘偉松：藥用植物學，國立中醫藥研究所，第 485 頁，台北，(1981)。
3. 李岡榮：即將失傳的台灣青草藥(下)，第 260 頁，台灣，(2000)。
4. 呂通信：台灣民間常用青草藥總整理(下)，第 200 頁，台灣，(1996)。
5. Wei ZM: Effects of injection *Salviae miltiorrhizae* on senile chronic asthmatic bronchitis patients. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 1996;16:402-4.
6. Miski M, Ulubelen A, Johansson C, Mabry TJ: Antibacterial activity studies of flavonoids from *Salvia palaestina*. *J Nat Prod* 1983;46:874-5.
7. 林榮貴、張建雄、林俊清：嘉南學報，第十九期，第 21-32 頁，台南，(1993)。
8. 林俊清、蔣連財：中華民國生藥學會學術研討會，台北，(2000)。
9. 方博正：台灣產生藥之抗氧化及抗皰疹病毒活性資源開發研究.高雄醫學大學天然藥物研究所，碩士論文，(2001)。
10. 黃曉元：九層塔與七層塔精油對大白鼠初代肝細胞中 GSH 相關之抗氧化與解毒代謝系統之影響.中興大學食品科學所，碩士論文，(1997)。
11. Ferrandiz ML, Bustos G, Paya M, Gunasegaran R, Alcaraz MJ: Hispidulin protection against hepatotoxicity induced by bromobenzene in mice. *Life Sci* 1994;55:PL145-50.
12. Tsukamoto H: Cytokine regulation of hepatic stellate cells in liver fibrosis. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:911-6.
13. Geneva-Popova M, Murdjeva M: Study on proinflammatory cytokines (IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha) and IL-2 in patients with acute hepatitis B. *Folia Med (Plovdiv)* 1999;41:78-81.
14. Masumoto T, Ohkubo K, Yamamoto K, Ninomiya T, Abe M, Akbar SM, Michitaka K, Horiike N, Onji M: Serum IL-8 levels and localization of IL-8 in liver from patients with chronic viral hepatitis. *Hepatogastroenterology*

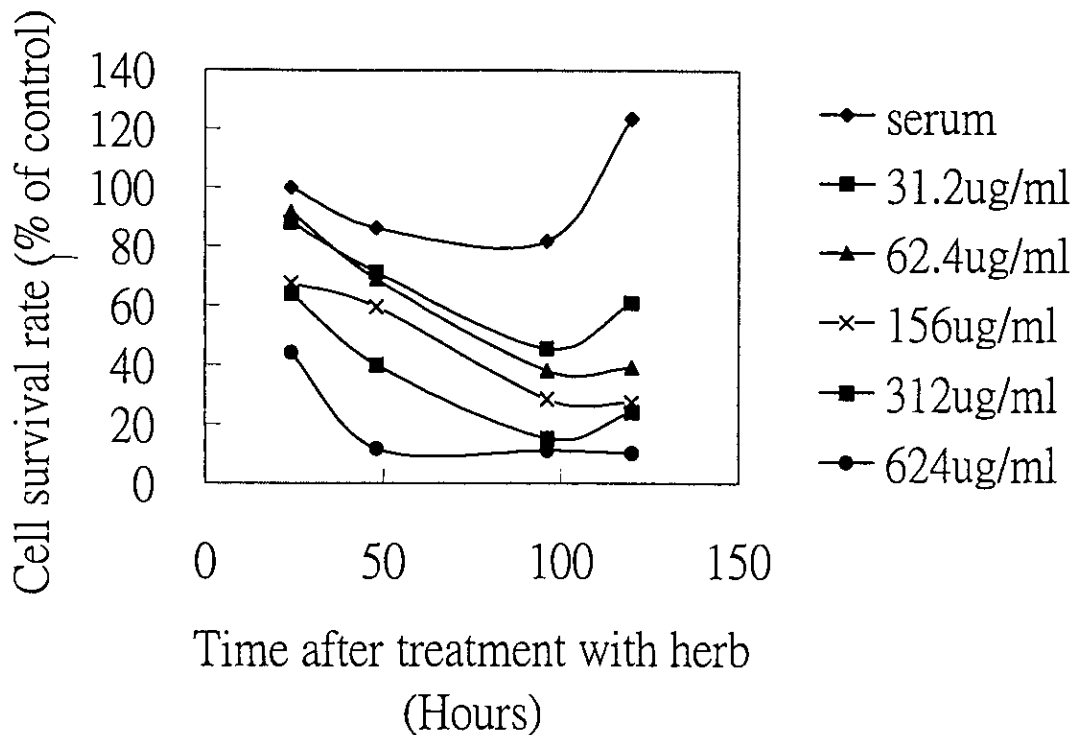
- 1998;45:1630-4.
15. Garcia Buey L, Garcia Monzon C, Moreno Otero R: The mediators of inflammation and chronic hepatitis. *Gastroenterol Hepatol* 1995;18:42-54.
 16. Daniluk J, Szuster-Ciesielska A, Drabko J, Kandefer-Szerszen M: Serum cytokine levels in alcohol-related liver cirrhosis. *Alcohol* 2001;23:29-34.
 17. Natsume M, Tsuji H, Harada A, Akiyama M, Yano T, Ishikura H, Nakanishi I, Matsushima K, Kaneko S, Mukaida N: Attenuated liver fibrosis and depressed serum albumin levels in carbon tetrachloride-treated IL-6-deficient mice. *J Leukoc Biol* 1999;66:601-8.
 18. Choi I, Kang HS, Yang Y, Pyun KH: IL-6 induces hepatic inflammation and collagen synthesis in vivo. *Clin Exp Immunol* 1994;95:530-5.
 19. Kovalovich K, Li W, DeAngelis R, Greenbaum LE, Ciliberto G, Taub R: Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2, and Bcl-xL. *J Biol Chem* 2001;276:26605-13.
 20. Natsume M, Tsuji H, Harada A, Akiyama M, Yano T, Ishikura H, Nakanishi I, Matsushima K, Kaneko S, Mukaida N: Attenuated liver fibrosis and depressed serum albumin levels in carbon tetrachloride-treated IL-6-deficient mice. *J Leukoc Biol* 1999;66:601-8.
 21. Thimigan MS, Yee HF, Jr: Quantitation of rat hepatic stellate cell contraction: stellate cells' contribution to sinusoidal resistance. *Am J Physiol* 1999;277:G137-G143.
 22. Kolodney MS, Thimigan MS, Honda HM, Tsai G, Yee HF Jr: Ca²⁺-independent myosin II phosphorylation and contraction in chicken embryo fibroblasts. *J Physiol* 1999;515(part 1):87-92.
 23. Friedman SL: Hepatic stellate cells. *Prog Liver Dis* 1996;14:101-130.
 24. Blomhoff R, Wake K: Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. *FASEB J* 1991;5:271-277.
 25. Blaner WS, Hendriks HF, Brouwer A, de Leeuw AM, Knook DL, Goodman DS: Retinoids, retinoid-binding proteins, and retinyl palmitate hydrolase distributions in different types of rat liver cells. *J Lipid Res*

- 1985;26:1241-1251.
26. Blomhoff R, Norum KR, Berg T: Hepatic uptake of [3H]retinol bound to the serum retinol binding protein involves both parenchymal and perisinusoidal stellate cells. *J Biol Chem* 1985;260:13571-13575.
 27. Blomhoff R, Rasmussen M, Nilsson A, Norum KR, Berg T, Blaner WS, Kato M, Mertz JR, Goodman DS, Eriksson U: Hepatic retinol metabolism. Distribution of retinoids, enzymes, and binding proteins in isolated rat liver cells. *J Biol Chem* 1985;260:13560-13565.
 28. Hendriks HF, Verhoofstad WA, Brouwer A, de Leeuw AM, Knook DL: Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver. *Exp Cell Res* 1985;160:138-149.
 29. Ramadori G, Knittel T, Schwogler S, Bieber F, Rieder H, Meyer zum Buschenfelde KH: Dexamethasone modulates alpha 2-macroglobulin and apolipoprotein E gene expression in cultured rat liver fat-storing (Ito) cells. *Hepatology* 1991;14:875-882.
 30. Friedman G, Liu LM, Friedman SL, Boyles JK: Apolipoprotein E is secreted by cultured lipocytes of the rat liver. *J Lipid Res* 1991;32:107-114.
 31. Friedman SL: Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury. *J Biol Chem* 2000;275:2247-2250.
 32. Toda K, Kumagai N, Tsuchimoto K, Inagaki H, Suzuki T, Oishi T, Atsukawa K, Saito H, Morizane T, Hibi T, Ishii H: Induction of hepatic stellate cell proliferation by LPS-stimulated peripheral blood mononuclear cells from patients with liver cirrhosis. *J Gastroenterol* 2000;35:214-20.
 33. Tsukamoto H: Cytokine regulation of hepatic stellate cells in liver fibrosis. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:911-6.
 34. You H, Wang B, Wang T: Proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells and effects of compound 861 on liver fibrosis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2000;8:78-80.
 35. Liu CH, Liu P, Hu YY, Xu LM, Tan Y, Wang ZN, Liu C: Effects of salvianolic acid-A on rat hepatic stellate cell proliferation and collagen production in culture. *Acta Pharmacol Sin* 2000;21:721-6.
 36. Liu P, Hu Y, Liu C, Liu C, Zhu D: Effects of salvianolic acid-A (SA-A) on liver injury: SA-A action on hepatic peroxidation. *Liver* 2001;21:384-390.

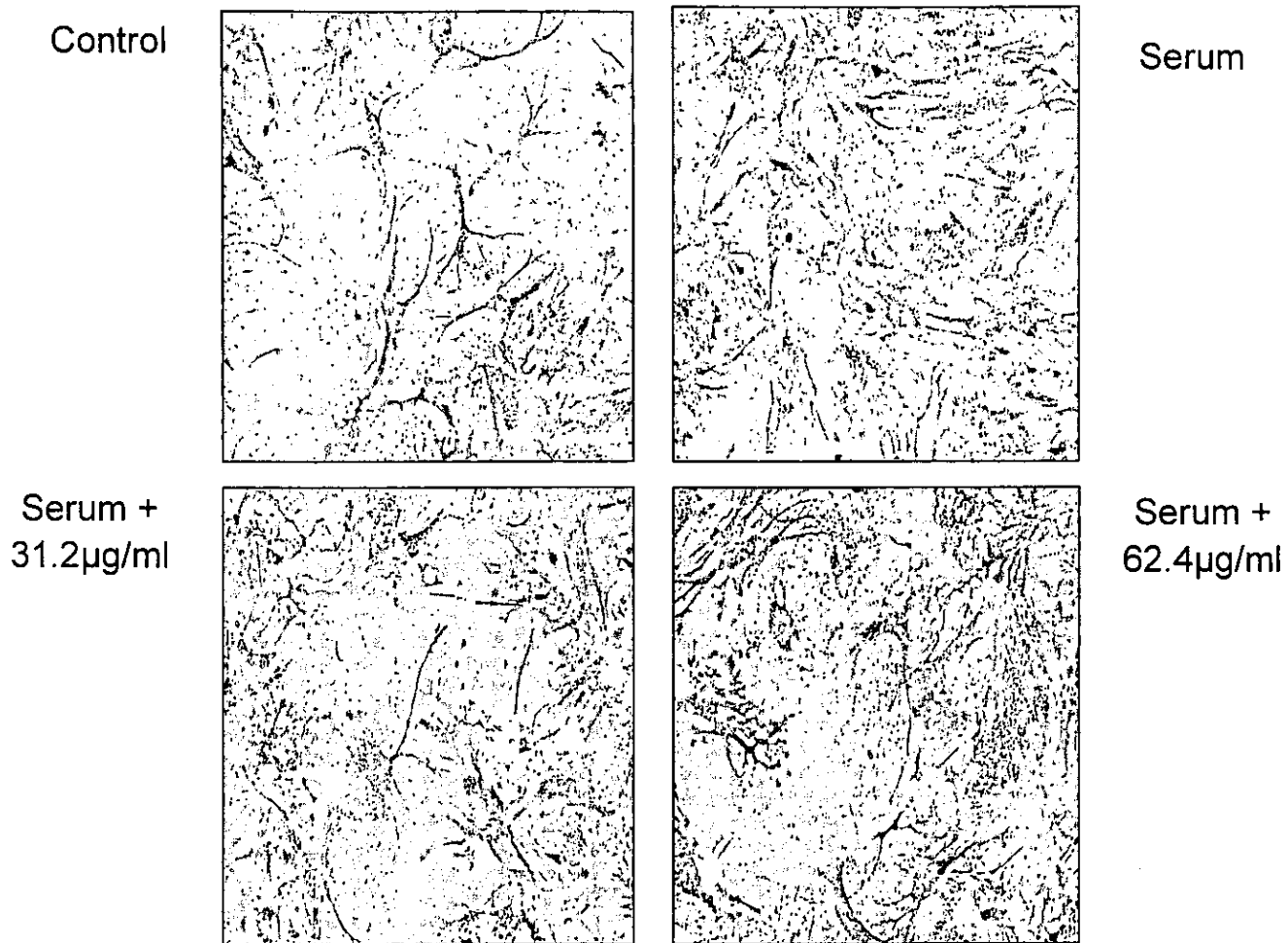
- 37.林榮貴、張建雄、林俊清：嘉南學報，第十八期，第 28-43 頁，台南，(1992)。
- 38.孔憲鐸：生命科學簡訊，第十四卷，第一期，台中，(2001)。
- 39.Alpini G, Phillips JO, Vroman B, Larusso NF: Recent advances in the isolation of liver cells. *Hepatology* 1994;20: 494-514.
- 40.Yokoi Y, Nahimisa T, Kuroda H, Komatsu I, Miyazaki A, Watanabe S, Usui, K: Immunocytochemical detection of desmin in fat-storing cells (Ito cells). *Hepatology* 1984;4:709-714.

表一 不同來源七層塔導致 HSCs 死亡半劑量之比較

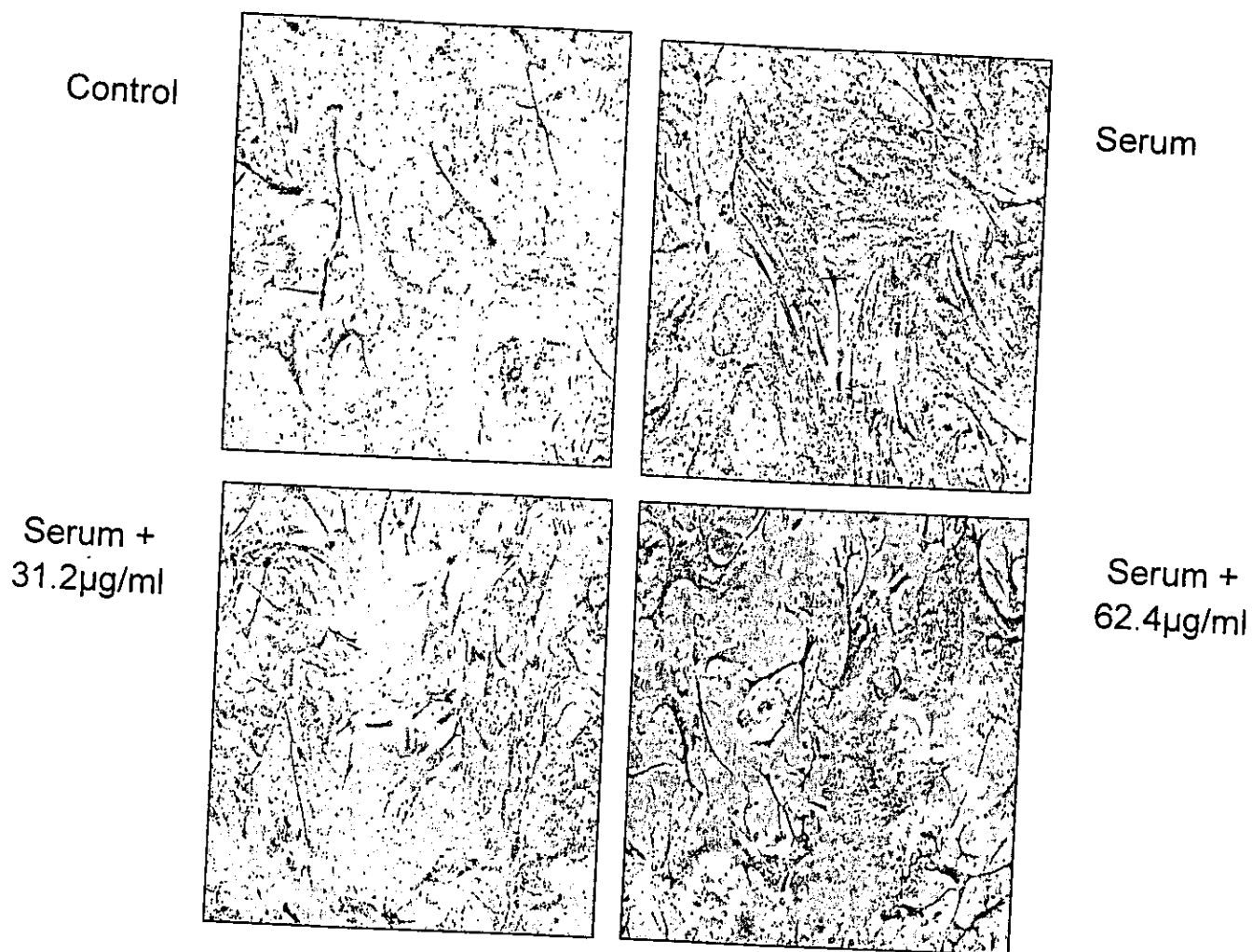
細胞	處理	死亡半劑量 LD50 ($\mu\text{g/ml}$)
HSCs	七層塔種子(東)	156
	七層塔葉(東)	312
	七層塔莖(東)	642
	七層塔葉(北)	312
	七層塔葉(中)	312
	七層塔葉(南)	312
	節毛鼠尾草葉(中)	312
Hepatocytes	七層塔葉(東)	1248



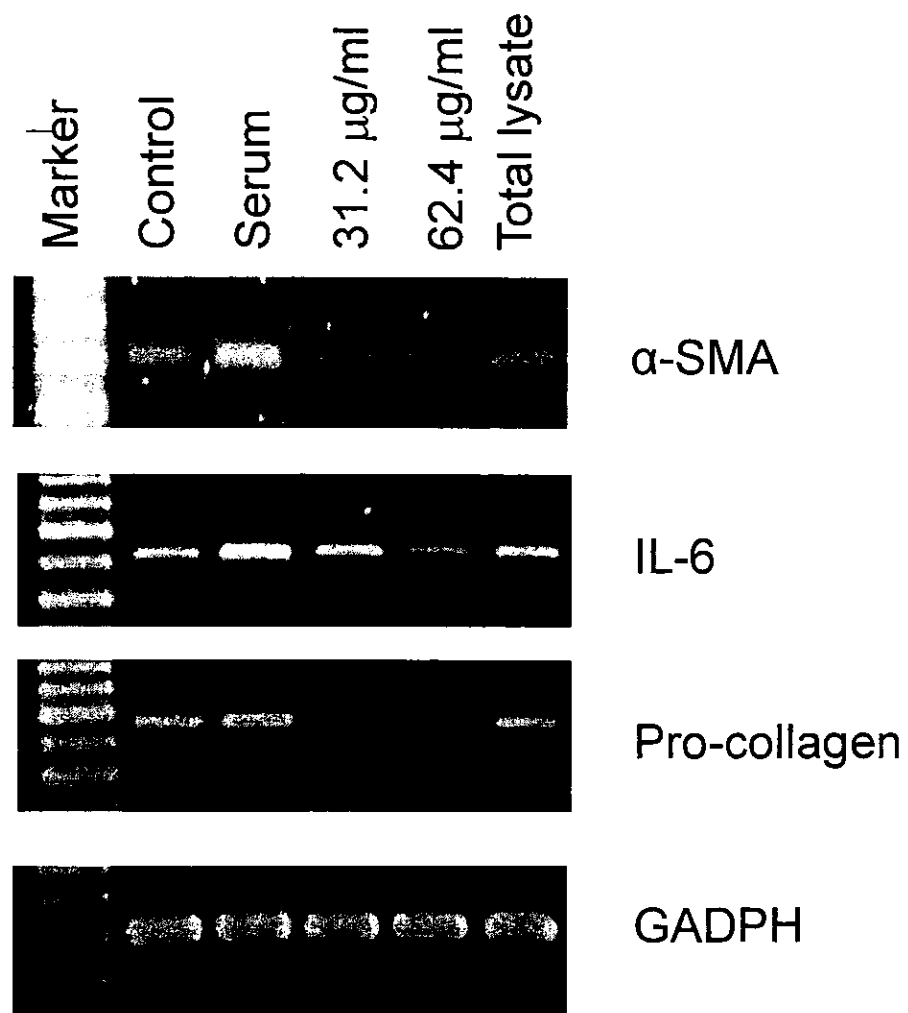
圖一：MTT assay，細胞培養24小時後，加入不同濃度七層塔，分別在培養24、48、96及120小時後，PBS清洗一遍加入含MTT (0.5mg/ml) 的DMEM 1ml，持續培養4小時後移去DMEM，加入1ml異丙醇於37°C下培養10分鐘析出細胞所吸附進的MTT，最後以分光光度計在波長570nm下測其吸光值。



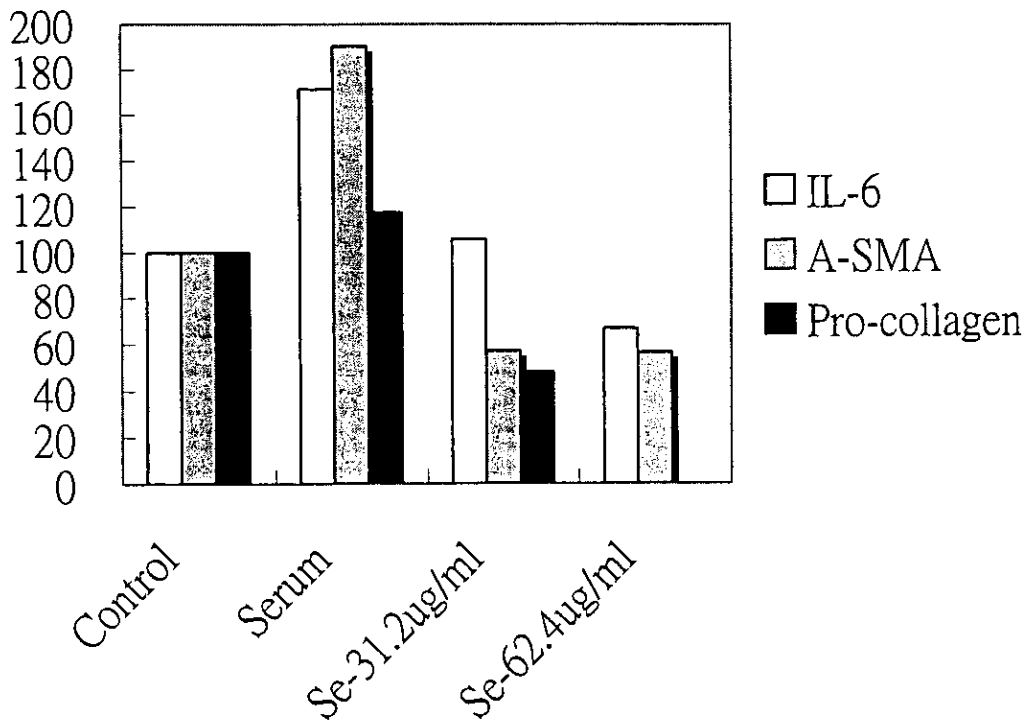
圖二：處理不同濃度七層塔後HSCs型態圖（100X），初級培養HSCs，於第5天加藥後，利用光學顯微鏡觀察加藥後24小時細胞型態。



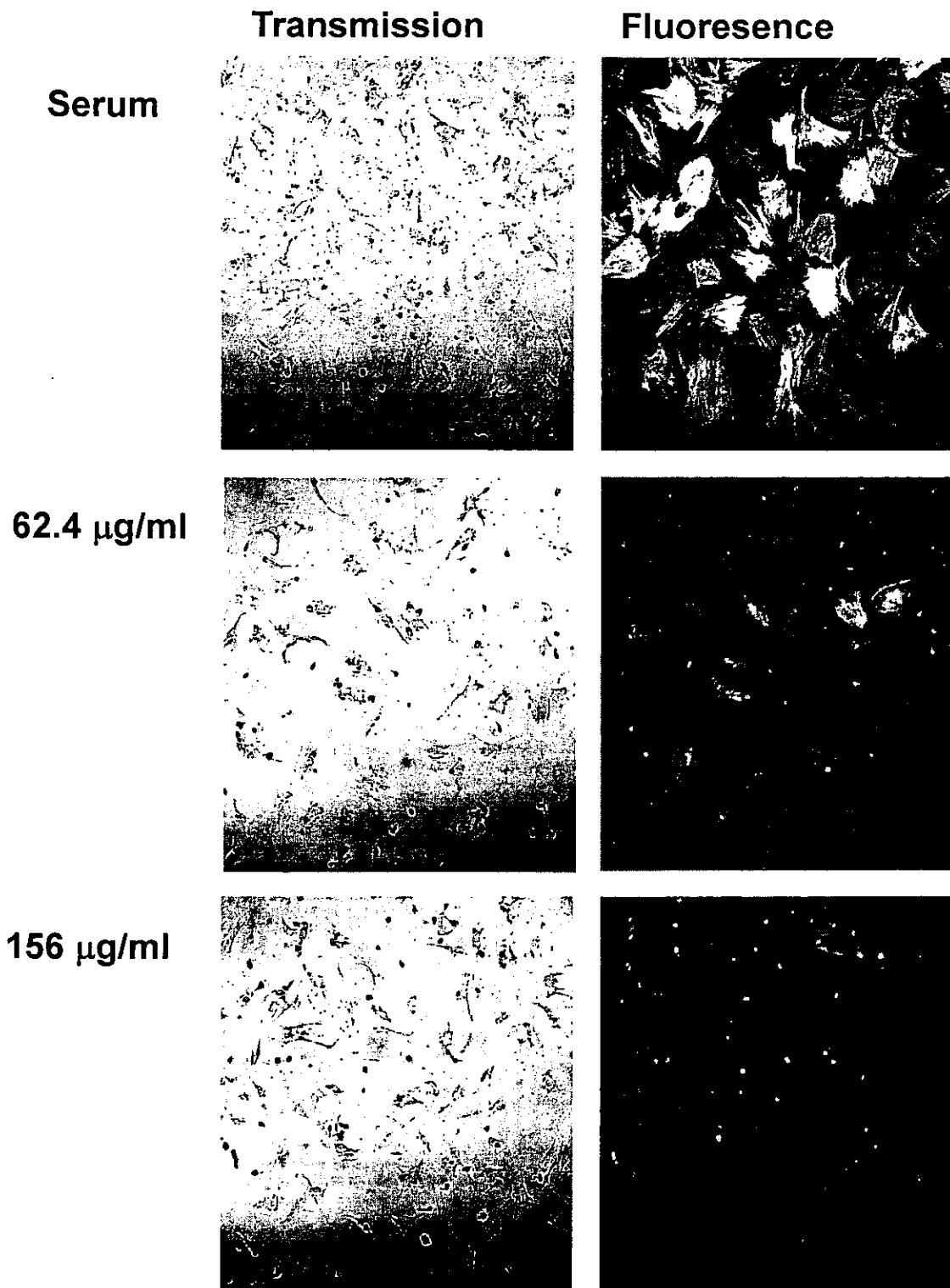
圖三：處理不同濃度七層塔後HSCs型態圖（100X），初級培養HSCs，於第5天加藥後，利用光學顯微鏡觀察加藥後48小時細胞型態。



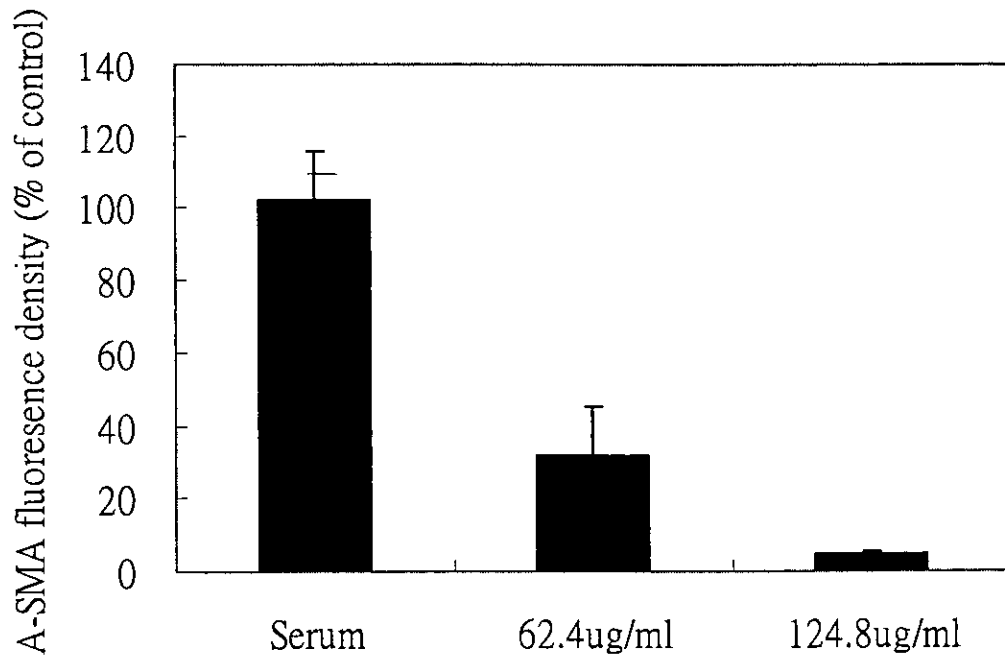
圖四：RT-PCR分析初代培養HSCs經不同七層塔劑量處理後 α -SMA、IL-6及pro-collagen mRNA的表現。



圖五：定量RT-PCR分析初代培養HSCs經不同七層塔劑量處理後 α -SMA、IL-6及pro-collagen mRNA的表現。



圖六：共軛焦顯微鏡觀察HSCs型態及 α -SMA之表現(100X)，初級培養的HSCs培養兩天後，加入不同濃度七層塔48小時後以共軛焦顯微鏡觀察，Transmission為細胞結構，Fluorescence為 α -SMA之表現。



圖七： α -SMA含量分析圖。