

保健植物山防風免疫調節之研究¹

郭肇凱²、許 輔³

摘 要

本研究探討保健植物山防風水萃物冷凍乾燥粉末在體外免疫調節之活性，試驗結果發現山防風樣本濃度在400 $\mu\text{g/mL}$ 以下時，能夠直接活化小鼠巨噬細胞株RAW 264.7產生一氧化氮(NO)與腫瘤壞死因子(TNF- α)，且皆具有劑量效應，此外亦能顯著($P<0.05$)提高處理後的小鼠脾細胞之細胞干擾素(IFN- γ)分泌量。由體外試驗結果發現山防風之水萃物中具有免疫調節功能之物質，深具醫藥治療之研究潛力。

關鍵字：保健植物、山防風、免疫調節。

前 言

山防風(*Echinops grijsii*)別名漏蘆、野蘭與鬼油麻等，為菊科(*Compositae*)漏蘆屬多年生草本植物，其根狀似牛蒡，味苦鹹性寒，具有清熱解毒、消腫排膿、通乳利經脈之用^(1, 3, 7)，於神農本草經中始有記載，並列為上品。近年來我國工業技術研究院生物醫學工程中心與國內外醫學單位合作，在體外試驗發現山防風於對腎癌、乳癌、大腸癌及卵巢癌等多種癌症細胞具有細胞毒性，而動物體內藥理活性檢驗結果亦發現山防風具有殺死癌細胞之高度選擇性。其它的研究團隊從山防風所分離之噻吩(thiophenes)化合物，對於癌細胞株MS-G2具有選擇性之毒殺能力⁽⁸⁾，且某些噻吩化合物及其衍生物在體外細胞試驗對於子宮頸上皮細胞癌、人類肝癌、人類表皮細胞瘤以及大腸線狀瘤等癌細胞，皆具有顯著的毒殺效果^(2, 5)。由於癌症的發生與個體自身免疫力的高低具有高度關聯性，山防風所具有的抗癌能力可能由其調節免疫貢獻部分活性，所以本研究主要目的在探討山防風在體外試驗對於免疫細胞的活化程度，可作為免疫調節之指標，並作為後續動物試驗之參考依據。

材料與方法

一、山防風樣本萃取製備

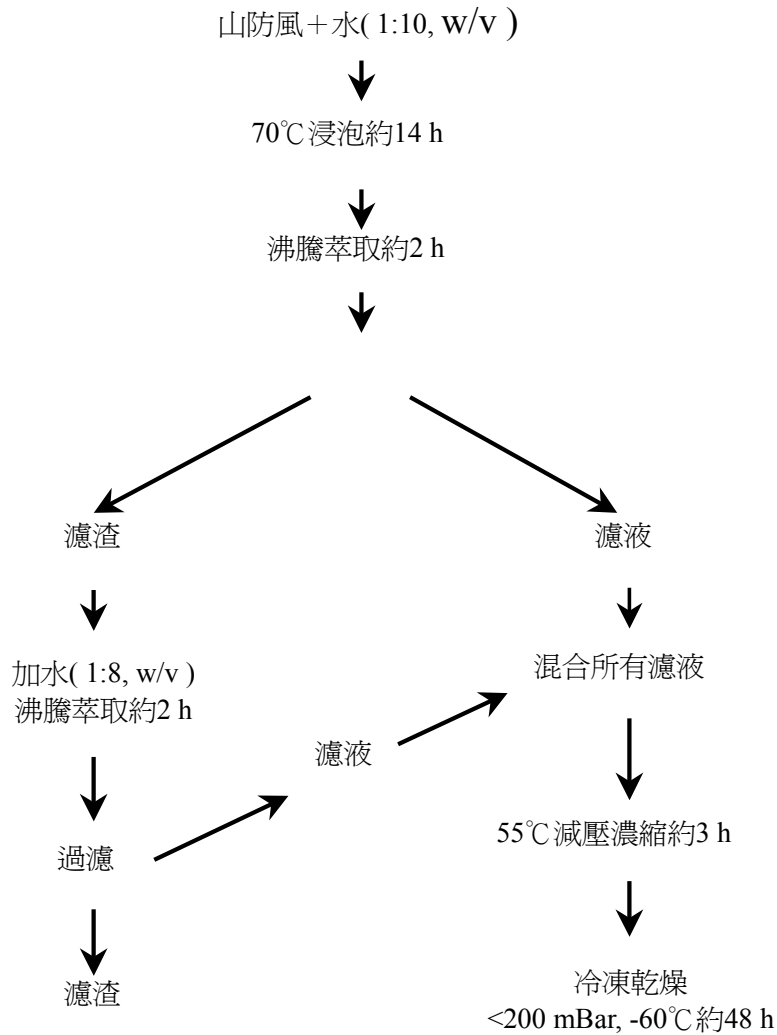
實驗材料山防風購自彰化吉春興業有限公司，製備過程如圖一所示。取乾燥的山防風100 kg，加水(1:10, w/v)於70 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡14 h後，再煮沸2 h以獲得初萃液。過濾後收集濾液，並將殘

¹臺中區農業改良場研究報告第 0630 號。

²臺中區農業改良場國防訓儲研究助理。

³國立臺灣大學園藝學系副教授。

留未溶物加水(1:8, w/v)煮沸2 h後再過濾，收集並混合所有濾液，55 °C減壓濃縮至固形物約15-20 % (w/v)，於零下60 °C冷凍後，以真空冷凍乾燥法取得山防風水萃物之冷凍乾燥粉末。



圖一、山防風樣本之萃取製備流程。

Fig. 1. Flow chart for the preparation of *Echinops grijsii* water extract.

二、一氧化氮(Nitric Oxide, NO)之分析測定

巨噬細胞株RAW 264.7(BCRC 60001)購自新竹食品工業發展研究所，於冷凍保存管活化後，於37 °C，5 % CO₂培養至足夠細胞數，將細胞接種至96 well微量分析盤並調整每well細胞數為5 x 10⁵，加入山防風之PBS回溶液，濃度分別序列稀釋為2000、400、200、40與0 µg/mL，於37 °C，5 % CO₂培養24 h後。分別取培養液以及一氧化氮標準品與Griess reagent試劑反應，反應形成紫紅色產物於540 nm處具有最大吸光值，故以540 nm吸光值計算樣本亞硝酸根濃度。每次實驗皆有三重複以上並與標準曲線比對，測得樣本濃度計算其產生量。

三、腫瘤壞死因子(Tumor Necrosis Factor alpha, TNF- α)之分析測定

將巨噬細胞株RAW 264.7自冷凍保存管活化後，於37°C，5% CO₂培養至足夠細胞數，將細胞接種至96 well ELISA盤並調整每well細胞數為 5×10^5 ，加入山防風之PBS回溶液，濃度分別序列稀釋為2000、400、200、40與0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，於37°C，5% CO₂培養約24 h後取細胞培養液以BD Pharmingen TNF- α OptEIA™ set 套組進行定量分析。預先在96 well ELISA軟盤上coating capture antibody 100 μL 後，存放4°C靜置12 h。遂以wash buffer清洗多餘或未固定於底盤之capture antibody，而後進行blocking步驟以降低非特異性的干擾，1 h後以wash buffer清洗，之後加入經山防風樣本刺激後所取得之細胞培養液與標準品反應，2 h後以wash buffer清洗，再加入detection antibody及enzyme reagent (avidin-HRP)作用，1 h後以wash buffer清洗，並以ABTS呈色系統呈色，測量405 nm之吸光值。每次實驗皆有三重複以上並與標準曲線比對，以測得樣本濃度計算其產生量。

四、細胞干擾素(Interferon-gamma, IFN- γ)之分析測定

由無菌操作檯中從BALB/c小鼠取出脾臟，以潤濕之磨砂載玻片磨碎脾臟取出脾細胞，在室溫下以300 xg離心5 min，而後加入RBC lysis buffer來回沖吸細胞1 min後，靜置約2 min以完全去除紅血球，再以300 xg離心5 min，而後加入液態培養基調整細胞個數至 $5 \times 10^6/\text{mL}$ ，取50 μL 混合均勻之細胞懸浮液接種於96 well微量分析盤中，並加入序列稀釋之不同濃度山防風樣本(2000、1000、500、250、125與0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 50 μL ，於96 well ELISA盤中與脾細胞共同培養於37°C，5% CO₂約72 h後收取細胞液，利用BD Pharmingen IFN- γ OptEIA™ set 套組進行分析。預先在96 well ELISA軟盤上coating capture antibody 100 μL 後，存放4°C靜置12 h。遂以wash buffer清洗多餘或未固定於底盤之capture antibody，而後進行blocking步驟以降低非特異性的干擾，1 h後以wash buffer清洗，之後加入經山防風樣本刺激後所取得之細胞培養液與標準品反應，2 h後以wash buffer清洗，再加入detection antibody及enzyme reagent (avidin-HRP)作用，1 h後以wash buffer清洗，並以ABTS呈色系統呈色，測量405 nm之吸光值。每次實驗皆有三重複以上並與標準曲線比對，以測得樣本濃度計算其產生量。

五、細胞毒性測定

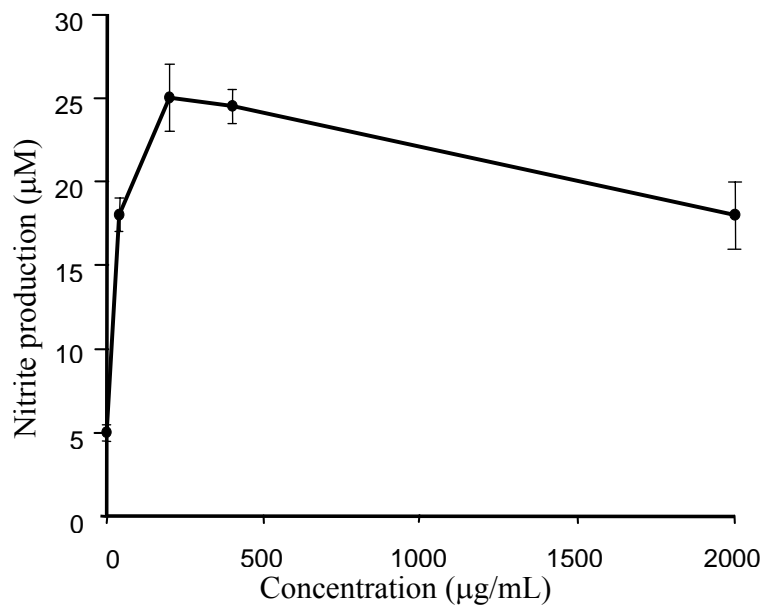
傳統上精確測量細胞毒性必須測定同位素³H]-thymidine或是⁵¹Cr]等釋放，而乳酸脫氫酶(lactate dehydrogenase, LDH)分析是以分光法測定LDH的活性。當細胞死亡後，細胞質中的LDH會被釋放至細胞培養液中，因此可以測定細胞培養液中LDH的相對活性，以估算不同處理間細胞死亡之程度。lactate會被LDH作用轉變為pyruvate，再由NADH⁺與tetrazolium作用生成紅色的formazan化合物，測量時即以測定formazan的產生量，則可推估LDH在培養液中的含量，藉以評估細胞存活之程度。實驗使用Roche之LDH kit分析，於96 well微量分析盤中加入分離好之小鼠脾細胞、細胞培養液與2% Triton X-100，並在實驗組分別加入不同濃度之山防風樣本，於37°C，5% CO₂培養箱中共同培養24 h之後取出，以250 xg離心10 min後，將上清液對應加到另一乾淨之96 well微量分析盤，每一well加入reaction mixture 100 μL (catalyst : dye solution = 1:45)，於室溫下避光反應20 min後測其490 nm之吸光值。每次實驗皆有三重複以

上，並以脾細胞加入Triton X-100 solution作為positive control之吸光值為100 % 表示，而脾細胞僅加入細胞培養液作為negative control之吸光值為0 %，計算並評估處理組之細胞毒性。

結果與討論

一、山防風樣本刺激巨噬細胞株RAW 264.7產生一氧化氮

實驗由山防風樣本與巨噬細胞之共同培養液以及一氧化氮標準品與Griess reagent試劑反應，以540 nm吸光值計算樣本亞硝酸根濃度，結果(圖二)發現山防風樣本於濃度0-400 $\mu\text{g/mL}$ 時能夠直接活化巨噬細胞株RAW 264.7產生NO，所產生最高之NO濃度約在25 μM ，且養液中nitrite的濃度隨著樣本濃度的增加而有所提高並具劑量效應，但若樣本濃度高於400 $\mu\text{g/mL}$ 時，則此活化情況下降，推測高濃度之山防風樣本可能會影響細胞之正常生長，所以生成之NO濃度也會隨之減少。



圖二、山防風樣本對 RAW 264.7 巨噬細胞產生 NO 之影響。

Fig. 2. Effects of *Echinops grijsii* on nitrite production by RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 macrophages were treated with different concentrations (0-2,000 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h at 37°C. The nitrite accumulation in the culture soup was measured using the Griess assay. Results are given as means \pm SD, n = 3.

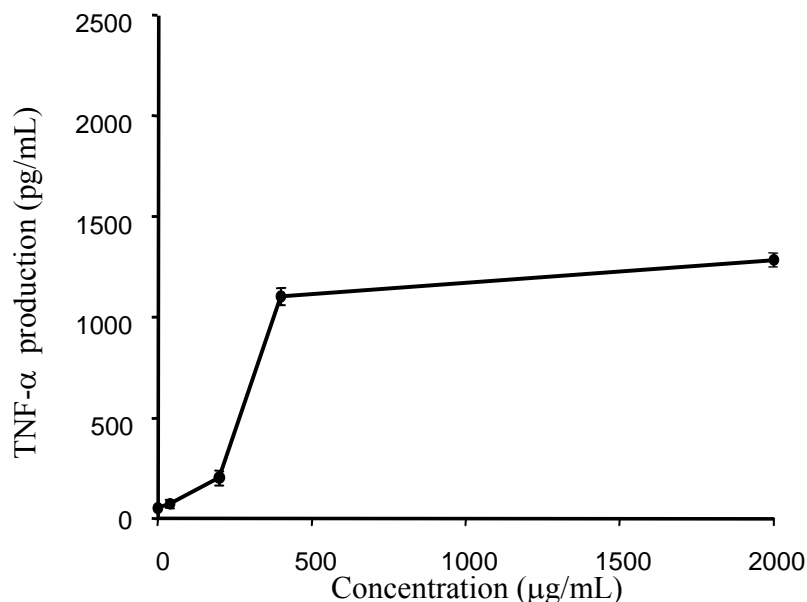
由於細胞內所產生之一氧化氮主要經由一氧化氮合成酶(NO synthase, NOS)所合成，而RAW 264.7巨噬細胞若受大腸桿菌脂多醣(lipopolysaccharide, LPS)刺激後，會將iNOS大量表現，使arginine催化成爲NO與citrulline，所產生的NO與活性氧物質結合後，會形成攻擊性極強的氮氧自由基，是巨噬細胞狙殺病原菌的重要武器。因此可以測定細胞培養液中亞硝酸鹽

濃度以代表所生成之NO濃度，所分析NO的產生量則是評估巨噬細胞受活化程度的重要指標之一⁽⁹⁾。而經山防風樣本處理後之RAW 264.7巨噬細胞，不需LPS之共同活化刺激即可直接產生NO，表示山防風之水萃樣本中可能含有類似LPS之免疫調節物質存在。

二、山防風樣本刺激巨噬細胞株RAW 264.7產生腫瘤壞死因子

實驗由山防風樣本與巨噬細胞之共同培養液以BD Pharmingen TNF- α OptEIA™ set套組進行sandwich ELISA定量分析，結果(圖三)顯示山防風樣本於濃度0-400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時能夠直接活化巨噬細胞株RAW 264.7產生TNF- α ，提高細胞培養液中的TNF- α 濃度且具劑量效應，養液中TNF- α 的濃度隨著樣本濃度的增加而提高，由於TNF- α 的測定是使用酵素連結免疫分析法(ELISA)，所以可以有效避免樣本自身色澤的干擾現象，所得結果應較NO之測定更為準確，但是所得結果與山防風樣本刺激RAW 264.7巨噬細胞產生NO的影響相似，更加提升了山防風之水萃樣本中含有免疫調節物質存在的可能性。

TNF- α 是在LPS所誘發的發炎反應中最早期的調節因子，可以透過介導免疫反應而監視與殺滅腫瘤細胞，不僅可以活化巨噬細胞，增強其吞噬作用，並能誘生多種免疫調節介質，如細胞激素IL-1、IL-6、IL-8等參與各種免疫反應⁽⁶⁾，還能刺激T細胞與NK細胞活性，抑制腫瘤血管形成並引起腫瘤組織微血管內皮細胞凋亡，繼而導致腫瘤組織出血壞死⁽⁴⁾，因此產生適量的TNF- α 調控是相當重要。



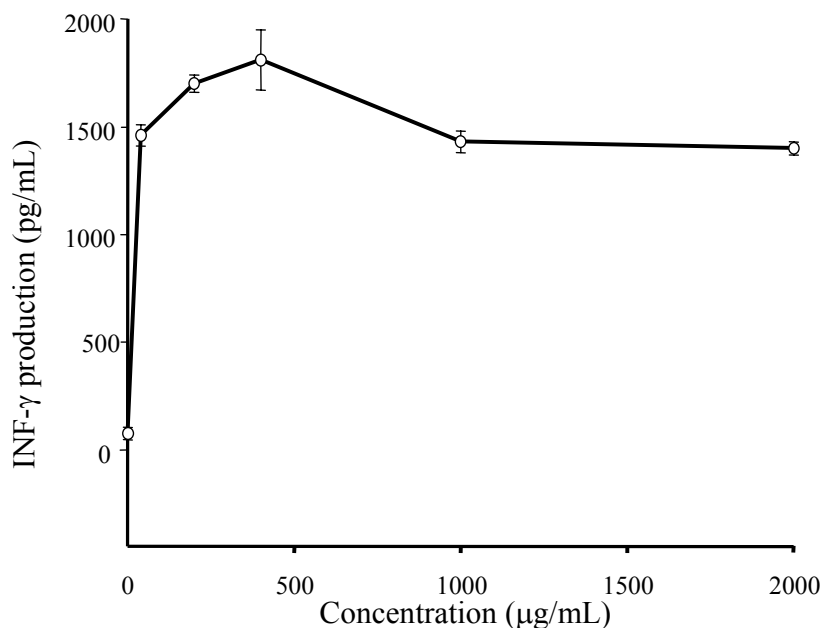
圖三、山防風樣本對 RAW 264.7 巨噬細胞產生 TNF- α 之影響。

Fig. 3. Effects of *Echinops grijsii* on TNF- α production by RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 macrophages were treated with different concentrations (0-2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h at 37°C. TNF- α accumulation in the culture soup was measured using the sandwich ELISA. Results are given as means \pm SD, n = 3.

三、山防風樣本刺激小鼠脾細胞(Splenocytes)產生細胞干擾素

實驗自健康小鼠取得脾細胞，將脾細胞與山防風樣本下共同培養72 h，之後以ELISA assay分析計算處理組中細胞養液之IFN- γ 濃度，結果(圖四)顯示山防風濃度在0-400 $\mu\text{g/mL}$ 時，可以顯著($P<0.05$)提高小鼠脾細胞干擾素IFN- γ 的分泌並具劑量效應，且最適濃度介於40-400 $\mu\text{g/mL}$ ，其中山防風樣本於濃度200 $\mu\text{g/mL}$ 的效果最佳，經其處理後的小鼠脾細胞培養液中，IFN- γ 濃度可達1,805 pg/mL ，為對照組的100倍以上。

當小鼠脾細胞到刺激活化後，受活化的T細胞和NK細胞便會產生IFN- γ ，可以增加抗原呈現細胞的功能，而使T細胞更進一步活化，因此IFN- γ 可說是一種正向的回饋訊號。IFN- γ 通常亦會活化巨噬細胞，可以提高巨噬細胞呈現抗原的能力，以及干擾病毒複製，並可抑制腫瘤細胞的生長，因此IFN- γ 是免疫系統抵禦病原菌入侵、病毒複製、腫瘤生長的最重要細胞激素之一。



圖四、山防風樣本對小鼠脾細胞產生 IFN- γ 之影響。

Fig. 4. Effects of *Echinops grijsii* on the secretion of interferon-gamma (IFN- γ) by mouse splenocytes.

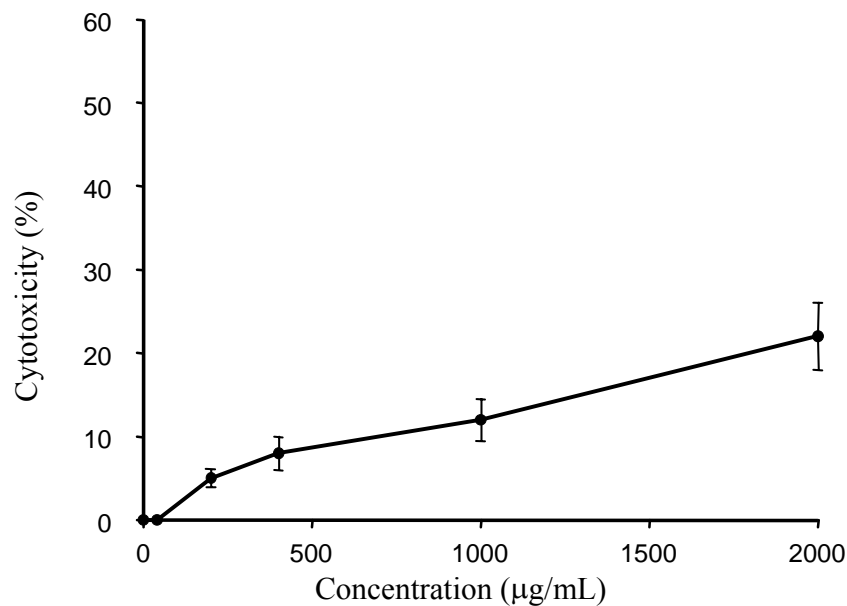
Mouse splenocytes were cultured in the presence of different concentrations for 72 h at 37°C.

IFN- γ levels of the cultured soup were measured using sandwich ELISA assay. Results are given as means \pm SD, n = 3.

四、細胞毒性測定(LDH assay)

將分離好之脾細胞與山防風樣本(0-2000 $\mu\text{g/mL}$)共同培養24 h，以LDH之釋放而測定山防風樣本對脾細胞所產生之細胞毒性，以脾細胞加入 Triton X-100 solution 作為 positive control 之吸光值作為 100 % 表示，而脾細胞僅加入細胞培養液作為 negative control 之吸光值為 0 %，計

算山防風樣本之百分率細胞毒性，以作為安全性考量之評估。結果(圖五)顯示，山防風則可能具有低劑量之細胞毒性，其百分率細胞毒性隨著山防風樣本濃度之增加而有所提高，而山防風樣本在濃度為2000 $\mu\text{g/mL}$ 時之百分率細胞毒性約為20 %。結果與前人研究發現山防風在體外試驗對某些癌細胞具有細胞毒性，並具有選擇性毒殺癌細胞之能力^(2, 8)相類似，然而是否山防風也會對於正常細胞產生傷害，其中之可能關聯性值得再深入評估探究。



圖五、以 LDH assay 測定山防風對小鼠脾細胞之細胞毒性。

Fig. 5. Cytotoxicity of *Echinops grijsii* on mouse splenocytes. Mouse splenocytes were treated with different concentrations (0-2,000 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h at 37°C. Cytotoxicity was determined by measuring the activity of released LDH by treated cells. Results are given as means \pm SD, n = 3.

參考文獻

1. 李幸祥 1999 臺灣藥草事典第四冊 p.34-35 旺文社股份有限公司。
2. 吳明德 2003 臺灣產五味子科植物生物活性成分與山防風噻吩衍生物合成之研究 p.151 國立中山大學化學研究所博士論文。
3. 楊文乾 1998 神奇草藥大圖鑑 p.284-285 林鬱文化有限公司。
4. Ko, J. L., C. I. Hsu, R. H. Lin, C. L. Kao and J. Y. Lin. 1995. A new fungal immunomodulatory protein, FIP-*fve* isolated from edible mushroom, *Flammulina velutipes* and its complete amino acid sequence. *Eur. J. Biochem.* 228:244-249.
5. Lee, H. and J. Y. Lin 1988. Antimutagenic activity of extracts from anticancer drugs in Chinese medicine. *Mutat. Res.* 204(2):229-234.

6. Liang, C. W., Y. C. Lai and Y. H. Chu. 2004. A study of the effects on nine Chinese herbs on proinflammatory cytokines production in two cell culture models. *J. Chin Med.* 15(4):293-304.
7. Lin, C. C., M. H. Yen, H. F. Chiu and C. H. Chang. 1990. The pharmacological and pathological studies on Taiwan folk medicine (IV): The effects of *Echinops grijsii* and *Latifolius*. *Am. J. Chin. Med.* 118(3-4):113-120.
8. Lin, Y. L., R. L. Huang, Y. H. Kuo and C. F. Chen. 1999. Thiophenes from *Echinops grijsii* Hance. *Chin. Pharm. J.* 51 (3):201-211.
9. Sheu, F., H. H. Lai and G. C. Yen. 2001. Suppression effect of soy isoflavones on nitric oxide production in RAW 264.7 Macrophages. *J. Agric. Food Chem.* 49(4):1767-1772.

Studies on the Immunomodulatory Properties of Chinese Medicinal Plant *Echinops grijsii*¹

Xhao-Kai Kuo² and Fuu Sheu³

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the immunomodulatory effects of the freeze-dried powder obtained from the water extract of Chinese medicinal plant *Echinops grijsii*. *In vitro* immunomodulatory experiments showed that *E. grijsii* (0-400 µg/mL) stimulated RAW 264.7 macrophages to produce NO and secrete TNF-α in a dose-dependent manner. Moreover, *E. grijsii* significantly ($P < 0.05$) promoted the IFN-γ secretion of mouse splenocytes. The results showed that the water extract of *E. grijsii* had immunomodulatory functions as well as potentials in related medicinal applications.

Keywords: Chinese medicinal plant, *Echinops grijsii*, immunomodulatory function.

¹ Contribution No. 0630 from Taichung DARES.

² DIRDS Research Assistant of Taichung DARES, COA.

³ Associate Professor, Department of Horticulture, National Taiwan University.