

山防風水萃物對小鼠體內免疫調節之研究¹

郭肇凱²、顏國欽³、許輔⁴、張隆仁²

摘 要

試驗以BALB/c小鼠體內模式探討山防風水萃冷凍乾燥樣本所產生之免疫反應，結果體內非特異性免疫調節活性試驗發現，餵食山防風水萃冷凍乾燥樣本之小鼠單核球百分吞噬率可以顯著($P<0.05$)高於餵食對照組；體內Ovalbumin (OVA)特異性免疫調節活性試驗發現，餵食山防風水萃冷凍乾燥樣本之小鼠脾細胞，相較於餵食對照組會顯著($P<0.05$)增加OVA特異性之脾細胞增生率，而且其血清相較於餵食對照組會產生顯著($P<0.05$) OVA特異性之IgG生成，有助於體液防禦對抗侵害性之特異抗原。

關鍵字：山防風、免疫調節、吞噬作用、細胞增生、免疫球蛋白。

前 言

山防風(*Echinops grijsii*)為菊科漏盧屬多年生草本植物之乾燥根，其根狀似牛蒡。在體外免疫調節試驗結果發現，山防風水萃冷凍乾燥粉末在濃度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，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⁽²⁾。由於在體外試驗之結果對於免疫調節已有初步的成效反應，所以欲探討在體內試驗中是否也具有活化免疫機能的效果存在。

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。將乾燥的山防風100 kg，加水(1:10, w/v)於70°C浸泡14 hr後，再煮沸2 hr以獲得初萃液。過濾後收集濾液，並將殘留未溶物加水(1:8, w/v)煮沸2 hr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，以真空冷凍乾燥法製備得到山防風水萃物之冷凍乾燥粉末⁽²⁾，水萃物產率約為9.33%。

¹臺中區農業改良場研究報告第 0639 號。

²臺中區農業改良場國防訓儲研究助理、副研究員。

³國立中興大學食品暨應用生物科技學系教授。

⁴國立台灣大學園藝學系副教授。

二、餵食試驗設計

自台大動物中心購入約五週齡之BALB/c品系雌鼠，飼養於鋪有墊料的PC飼育盒中，並置於室溫維持在 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 之乾淨動物房，光週期為12 hr循環，飼料與飲用水的供應採自由取食飼育法。待馴養數週後，選取八週齡以上之BALB/c雌鼠採逢機分組(每組5隻)進行實驗，以餵食軟管(feeding tube)隔日餵食小鼠⁽¹⁾，體內試驗之餵食濃度參考體外試驗之結果⁽²⁾，設計餵食濃度為 $200\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ，若以一隻BALB/c雌鼠體重約為20 g來估算，則需 $200\times 20 = 4,000\ \mu\text{g}$ ，且每次以管餵法餵食量為 $200\ \mu\text{L}$ ，則配製之stock濃度為 $4,000/0.2 = 20,000\ \mu\text{g}/\text{mL} = 20\ \text{mg}/\text{mL}$ 。所以將山防風水萃物樣本以phosphate-buffered saline (PBS)調配成濃度 $20\ \text{mg}/\text{mL}$ ，並以PBS作為對照組。

餵食設計流程如圖一所示，非特異性試驗每週進行餵食 $200\ \mu\text{L}$ ($4\ \text{mg}/\text{mouse}$)共4次，隔週休息後再重複上述動作至犧牲前，其中至少進行餵食三週，便可再進行後續試驗；OVA特異性試驗與非特異性試驗操作相同，其中並於第1、3、5週之第一天以腹腔注射法(intraperitoneal)進行卵白蛋白OVA免疫，注入輔以佐劑($20\% \text{KAl}(\text{SO}_4)_2\cdot 12\text{H}_2\text{O}$)混合濃度為 $500\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 之OVA $100\ \mu\text{L}$ ($50\ \mu\text{g}/\text{mouse}$)作為特異性抗原⁽¹⁾，而後再進行後續之試驗。

三、血液中單核球之吞噬試驗

吞噬作用(phagocytosis)是一種高等真核生物寄主對病原菌結合與攝入的過程，藉由觀察與定量噬入螢光染劑fluorescein isothiocyanate (FITC)標定細菌粒子的細胞，偵測被噬入細胞之粒子所發散出之螢光強度而了解整個細胞吞噬作用的程度。

將完成非特異性試驗餵食之BALB/c小鼠以 $20\% \text{acepromazine maleate}$ 麻醉後進行尾部採血，於流式細胞儀(FACScan Flow Cytometry System)特殊試管中裝盛血液 $100\ \mu\text{L}$ 與FITC標定之*E. coli*粒子之溶液 $20\ \mu\text{L}$ 混合均勻反應，控制組迅速冰浴而不進行吞噬反應，試驗組則是 37°C 水浴15 min以進行吞噬反應，待反應結束後皆插冰以終止吞噬作用，而後排除黏附於胞外具有螢光標定之菌體，再以 $250\ \text{xg}$ 進行離心5 min後倒去上層液。接著加入erythrocyte lysis buffer均勻混合後於室溫下反應15 min以將紅血球完全溶解，再以 $250\ \text{xg}$ 進行離心5 min後倒去上層液，加入螢光染劑propidium iodode (PI)進行染色，均勻混合後於冰浴下閉光反應20 min，而後通過300目之篩網排除細胞團塊，於1 hr內以流式細胞儀進行分析。

四、OVA特異性細胞增生試驗(BrdU)

將完成OVA特異性試驗餵食之BALB/c小鼠分離脾細胞(splenocytes)培養於DMEM培養基中^(2,7)，將細胞數目調整至 $5\times 10^6/\text{mL}$ ，取 $50\ \mu\text{L}$ 混合均勻之細胞懸浮液接種於96 well ELISA盤中，並添加原先刺激之抗原OVA ($100\ \mu\text{g}/\text{mL}$) $50\ \mu\text{L}$ ，而對照組則加入DMEM培養基 $50\ \mu\text{L}$ ，於96 well ELISA盤中與脾細胞共同培養於 37°C ， $5\% \text{CO}_2$ ，經OVA活化48 hr後以Roche公司的BrdU細胞增生試驗套組進行分析，加入 $10\ \mu\text{L}$ 的BrdU solution，在同條件下繼續培養24 hr，離心以移除culture medium，清洗之後加入anti-BrdU-POD $100\ \mu\text{L}$ 於室溫下靜置90 min，最後以TMB呈色系統呈色，室溫下靜置約5 min後，加入 $1\text{M H}_2\text{SO}_4$ 終止反應並測其 $450\ \text{nm}$ 之吸光值，每次實驗皆有三重複並以相對吸光值來計算細胞增生活性。

五、OVA特異性細胞激素interferon-gamma (IFN- γ)測定

將完成OVA特異性試驗餵食之BALB/c小鼠分離脾細胞(splenocytes)培養於DMEM培養基中^(2,8)，實驗操作與OVA特異性細胞增生試驗相同，最後培養於37°C，5% CO₂，經OVA活化72 hr後收取細胞培養液，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 μ L後，存放4°C靜置12 hr。而後清洗多餘或未固定於底盤之capture antibody，進行blocking 1 hr降低非特異性的干擾，清洗後加入細胞培養液與標準品反應2 hr，清洗後，再加入detection antibody及enzyme reagent (avidin-HRP)作用1 hr，清洗後以ABTS呈色系統呈色，反應約20 min後測量405 nm之吸光值。每次實驗皆有九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。

六、OVA特異性免疫球蛋白(IgG)測定

預先於96 well ELISA軟盤上coating 1 mg/mL OVA 50 μ L以及序列稀釋之mouse IgG 50 μ L作為標準品，於4°C靜置一晚。隔天清洗後加入blocking buffer 150 μ L於室溫下靜置2 hr，而後加入完成OVA特異性試驗餵食之BALB/c小鼠血清50 μ L，至於預先coating mouse IgG者則是繼續加入blocking buffer反應共2 hr，清洗後每well加入二級抗體goat anti-mouse IgG-AP 50 μ L靜置2 hr，清洗後於每well再加入酚氨磷酸反應液(p-NPP) 50 μ L，黑暗中反應呈色完全後，測其在405 nm之吸光值，每次實驗皆有九重複並與標準曲線比對，以測得樣品各吸光值後求得各IgG濃度⁽¹⁾。

結果與討論

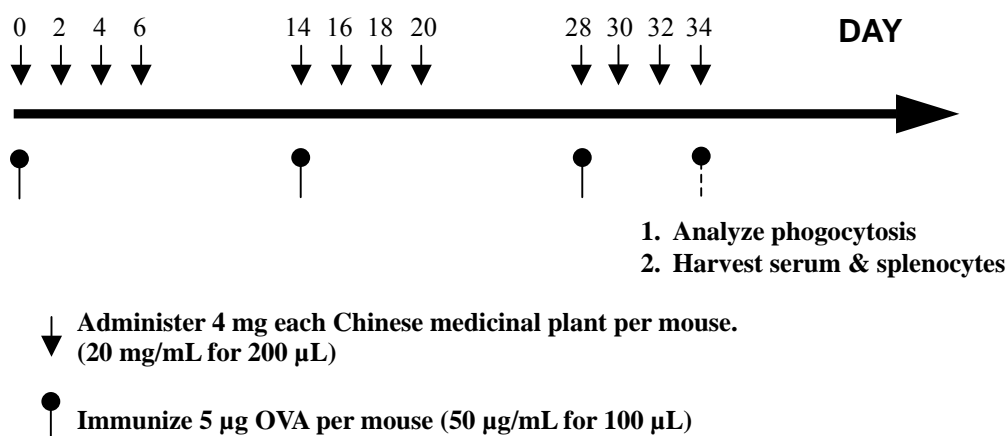
一、餵食試驗設計與劑量討論

餵食設計流程如圖一所示，總共重複進行三次非特異性及OVA特異性免疫調節餵食試驗，每次試驗約40天完成，試驗期中皆沒有小鼠因餵食而產生急毒性死亡或是體重下降之現象發生。體內試驗研究之餵食劑量由體外細胞試驗結果估算而來，體外細胞試驗山防風樣本濃度為200 μ g/mL時可以有效活化巨噬細胞株RAW 264.7與小鼠脾細胞，而若以進行體內試驗之BALB/c小鼠體重約為20 g計算，則需餵食之有效劑量為4 mg/mouse。日後若有機會運用在人體臨床試驗時，以一成年人體重60 kg計算，則需考慮換算動物與人體體重劑量之折算係數因子(表一)，所以需服用之有效劑量為 $4 \times 9.01 = 36.04$ mg/kg (即2.16 g / 60 kg)，若需再考慮山防風水萃物之萃取率(9.33%)，則每次需服用約23.15 g之山防風生藥，結果尚為合理。

二、血液中單核球之吞噬試驗

試驗操作以流式細胞儀藉由488 nm之氬離子雷射(argon-ion laser)與CellQuest軟體進行分析。首先以控制組(不進行吞噬反應)操作，於FSC/SSC (前方散射/側方散射)之二維散光圖譜上圈選出單核球細胞群之範圍，而後以FL-2之直方圖偵測染上PI所釋出之紅色螢光以確定細胞活性後，再以FL-1/SSC之二維散光圖偵測FITC標定*E. coli*所釋出之綠色螢光，藉以確定不進行吞噬反應之基本螢光量，而後分別換上有進行吞噬反應之各實驗組，收集圈選之單核球細胞並計算FL-1之螢光強度大於基本螢光量之細胞佔全部圈選之單核球細胞之比率⁽³⁾。以

流式細胞儀操作圈選收集5,000顆有效之螢光標定單核球細胞，結果如圖二所示，發現餵食PBS之對照組在不經吞噬反應(0°C)之處理下，其百分吞噬率為7.18%，而餵食山防風樣本之試驗組經進行吞噬反應(37°C)後，單核球百分吞噬比率為42.12%，顯著($P < 0.05$)大於餵食PBS試驗組之38.76%，所以食用山防風樣本可以提升血液中單核球之吞噬能力，有助於調控免疫能力以抵抗外來病原菌。



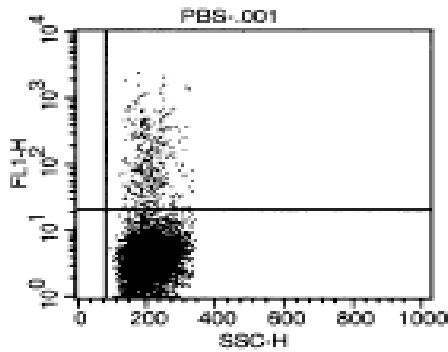
圖一、非特異性與 OVA 特異性免疫調節試驗餵食設計流程圖。

Fig. 1. Administration schedule for non-specific and OVA-specific immunomodulatory experiment. The detail procedures of administration were described in the materials and methods section. The schedule of administration and experiments are shown.

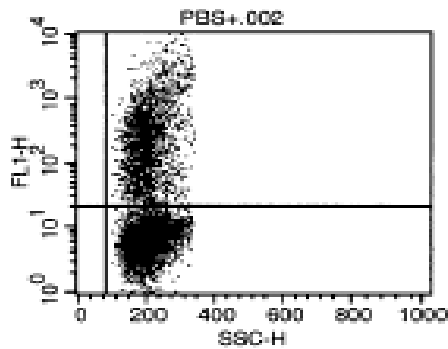
表一、動物與人體的每公斤體重劑量折算係數表

Table 1. Conversion factors for the dosage per kilogram of body weight among animals and human

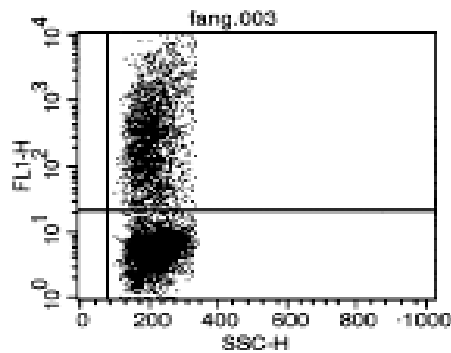
Convert coefficient W	Mouse 0.02 kg	Rat 0.2 kg	Guinea pig 0.4 kg	Rabbit 1.5 kg	Cat 2 kg	Dog 12 kg	Human 60 kg
Mouse 0.02 kg	1.00	1.40	1.60	2.70	3.20	4.80	9.01
Rat 0.2 kg	0.70	1.00	1.14	1.88	2.30	3.60	6.25
Guinea pig 0.4 kg	0.61	0.87	1.00	1.65	2.05	3.00	5.55
Rabbit 1.5 kg	0.37	0.52	0.60	1.00	1.23	1.76	2.30
Cat 2 kg	0.30	0.42	0.48	0.81	1.00	1.44	2.70
Dog 12 kg	0.21	0.28	0.34	0.56	0.68	1.00	1.88
Human 60 kg	0.11	0.16	0.18	0.30	0.37	0.53	1.00



File: CK.001		Total Events: 5000	
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	359	7.18	7.18
LL	0	0.00	0.00
LR	4641	92.82	92.82



File: PBS.002		Total Events: 5000	
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	1938	38.76	38.76
LL	0	0.00	0.00
LR	3062	61.24	61.24



File: <i>Echinops grijsii</i> .003		Total Events: 5000	
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	2106	42.12	42.12
LL	0	0.00	0.00
LR	2894	57.88	57.88

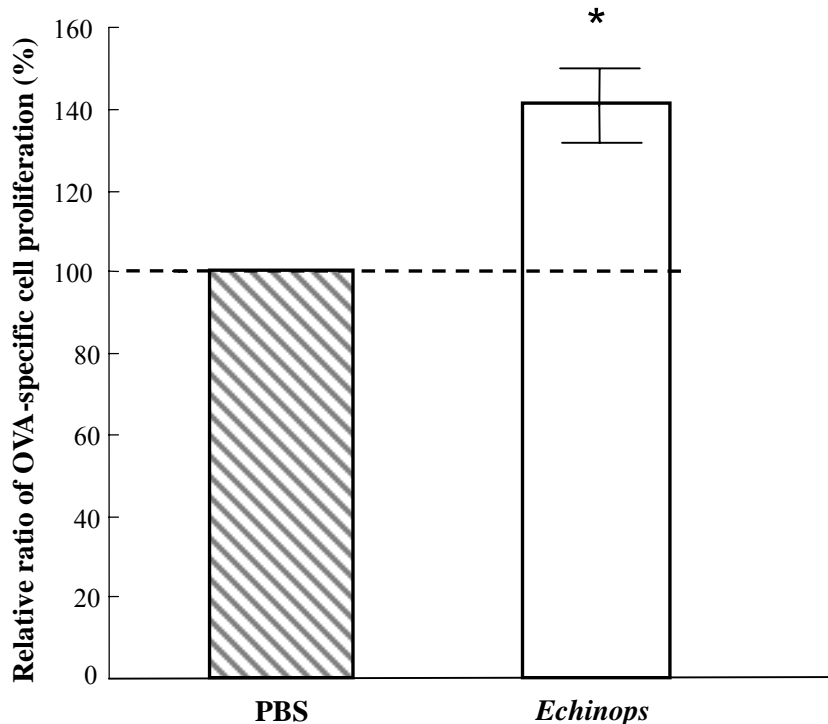
圖二、餵食山防風水萃樣本對小鼠血液中單核球吞噬作用之影響。

Fig. 2. Effects of the administration freeze-dried waterextract of *Echinops grijsii* on phagocytosis of mouse monocytes. The assays were operated by FACScan Flow Cytometry System.

三、OVA特異性之細胞增生

BrdU分析之原理是利用溴尿苷Br-Uridine (BrdU)取代胸腺嘧啶(thymidine)作為細胞合成DNA之材料，讓分裂中的細胞自由攝取BrdU，之後再以BrdU之特異性抗體辨識被細胞攝取而利用之BrdU分子含量，因此藉由偵測定量來推斷細胞之增生活性。而ELISA BrdU分析結果發現完成餵食山防風樣本並經由OVA三次免疫後之小鼠，取其脾細胞於體外加入原先之刺激抗原OVA予以活化，其細胞增生的能力相較於餵食控制組PBS並無顯著($P>0.05$)之提升，但是，若將OVA活化之餵食試驗組減去未以OVA活化之控制組(naive)，所得結果相對於餵食控制組

PBS換算為百分增生率，則發現山防風具有顯著($P < 0.05$)之百分增生率(圖三)，其脾細胞增生率會提高41%。結果表示餵食山防風樣本可提高小鼠之OVA特異性脾細胞增生，表示體內脾細胞經體外特異性之抗原刺激後具有增生之效應，使體內T細胞對於特異性抗原具有專一性之辨識^(4,7)，有助於提高特異性免疫反應。



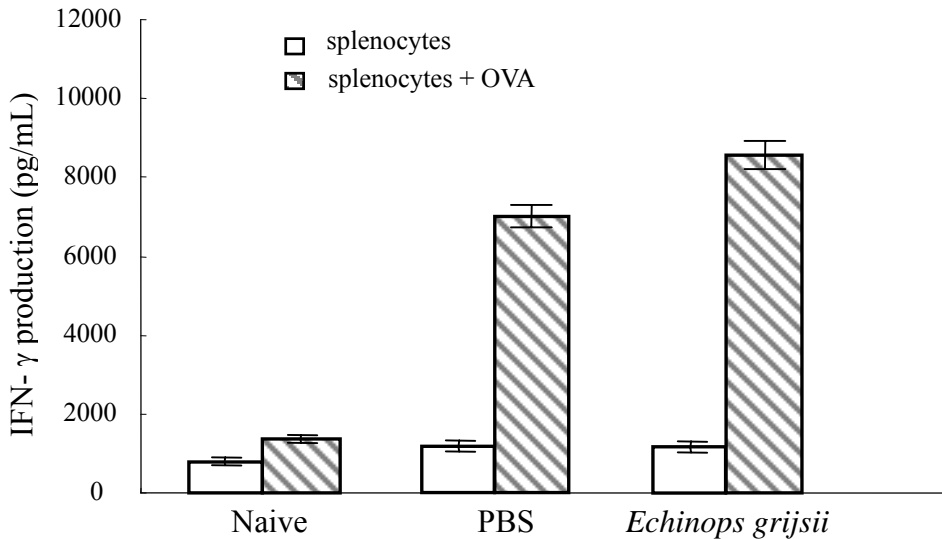
圖三、餵食山防風水萃樣本對經過 OVA 免疫之小鼠脾臟細胞產生 OVA 特異性細胞增生(BrdU)百分比。

Fig. 3. Relative OVA-specific cell proliferation by OVA-immuned BALB/c mouse splenocytes after administration of freeze-dried waterextract of *Echinops grijsii*, comparing to the PBS control. Cell proliferation was determined using BrdU assay. Data are shown as mean \pm SD (n = 3).

* : Data are significantly different from the control ($P < 0.05$)

四、OVA特異性細胞激素IFN- γ 分泌

由圖四可以發現，餵食山防風樣本並經由OVA三次免疫後之小鼠，取其脾細胞於體外加入原先之刺激抗原OVA予以活化，相較於naive小鼠脾細胞則會顯著($P < 0.05$)提高OVA特異性之細胞激素IFN- γ 分泌，而若是相較於餵食控制組PBS，可以顯著($P < 0.05$)提高OVA特異性之IFN- γ 分泌。由於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^(1,5)，因此IFN- γ 可說是一種正向的回饋訊號，有助於提高特異性免疫反應。

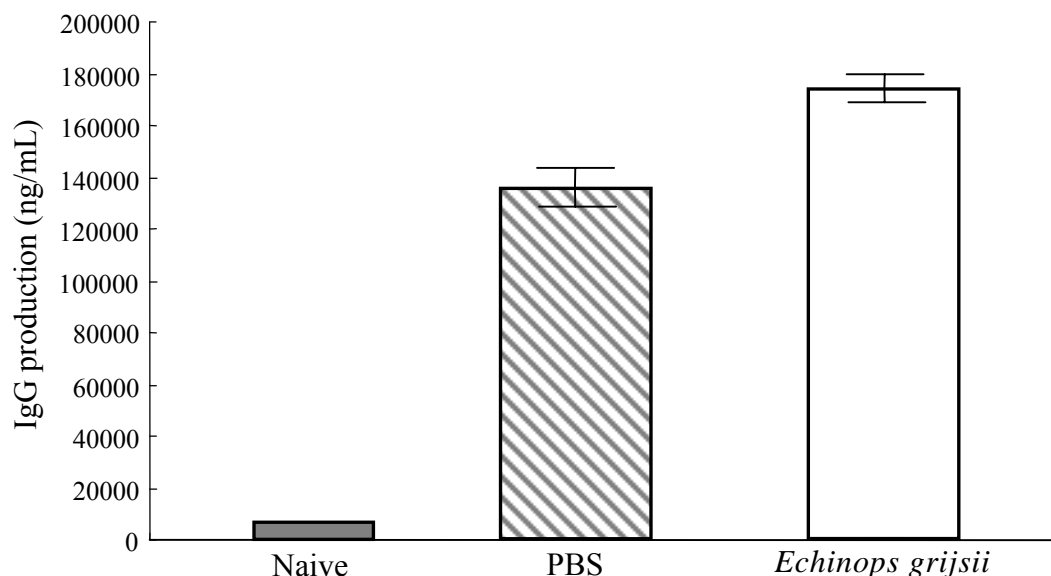


圖四、餵食山防風水萃樣本對經過 OVA 免疫之小鼠脾臟細胞產生 OVA 特異性 IFN- γ 之影響。
 Fig. 4. Effects of the administration of freeze-dried waterextract of *Echinops grijsii* on the OVA-specific IFN- γ secretion by OVA-immuned BALB/c mouse splenocytes. OVA-specific IFN- γ levels of the cell soup were measured using sandwich ELISA assay. Data are shown as mean \pm SD (n = 3).
 * : Data are significantly different from the control ($P < 0.05$).

五、OVA 特異性免疫球蛋白(IgG)生成

免疫球蛋白(immunoglobulins, Igs)又被稱為抗體(antibodies)，存在於脊椎動物的體液之中，於體液中防禦並對抗侵害性抗原，而已知的五個免疫球蛋白(IgG、IgA、IgM、IgD及IgE)，又可依其結構與免疫功能有所區別而各有特色，特定的免疫球蛋白則可製造特殊之抗原鍵結中和抗原作用。其中IgG約佔血清中所有免疫球蛋白的80%，而且是續發性免疫反應的主要抗體，因此藉由酵素免疫連結分析測定IgG之抗血清效價，藉以瞭解免疫程度之高低。

將小鼠的血清稀釋後以酵素免疫連結分析方法分析⁽⁶⁾，測定餵食山防風樣本之小鼠中含 OVA 特異性抗體 IgG 之含量，結果發現腹腔注射 OVA 進行免疫之小鼠，其血清中 OVA 特異性之 IgG 濃度較 naive 小鼠明顯提升，而未經腹腔注射 OVA 進行免疫之小鼠，其血清中則幾乎偵測不到 IgG 之含量，結果顯示經注射特異性抗原後而餵食山防風樣本之小鼠，可以刺激 B 細胞大量產生對外來抗原具專一性之抗體，若相較於對照組(餵食 PBS)則有顯著的差異($P < 0.05$)，結果如圖五所示，表示食用山防風樣本時，可以提升血清中 OVA 特異性 IgG 之濃度(175 $\mu\text{g/mL}$)，表示血清中具有可辨識 OVA 之抗體，有助於體液防禦對抗侵害性之特異抗原，並增強體內免疫細胞辨識標的細胞之能力而提高特異性免疫反應⁽⁹⁾。



圖五、餵食山防風水萃樣本對小鼠血清中 OVA 特異性 IgG 含量之影響。

Fig. 5. Effects of the administration of freeze-dried water-extract of *Echinops grijsii* on the OVA-specific IgG production by OVA-immuned BALB/c mouse. OVA-specific IgG were measured using sandwich ELISA assays. Data are shown as mean \pm SD (n = 3).

六、結論

本試驗研究發現餵飼山防風水萃物能夠直接活化小鼠某些非特異性與特異性免疫反應，然而其有效成分之活性物質仍待進一步研究確認，未來若在安全性評估試驗中沒有急性反應或是其他致危害因子發生的潛在可能，則可以嘗試開發利於粉末沖泡回溶之茶包型式用以保健養生。

參考文獻

1. 杜元平 2003 金針菇免疫調節蛋白FIP-*fve*抗腫瘤活性之探討 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文。
2. 郭肇凱、許輔 2005 保健植物山防風免疫調節之研究 臺中區農業改良場研究彙報 88:61-69。
3. Abel, G., J. Szollosi, G. Chihara and J. Facht. 1989. Effect of lentinan and mannan on phagocytosis of fluorescent latex microbeads by mouse peritoneal macrophages: a flow cytometric study. Int. J. Immunopharm. 11: 615-621.
4. Dwyer, J. and C. Johnson. 1981. The use of concanavalin A to study the immunoregulation of human T cells. Clin Exp. Immunol. 46: 237-249.

5. Hikino, Y., Y. Konishi, J. Koike, T. Tabata, Y. Ohashi and N. Sugano. 1994. Productions of interferon-gamma and nitrite are induced in mouse splenic cells by a heteroglycan-protein fraction from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Immunopharm.* 28(1): 77-85.
6. Jacquelyn, G. B. 1993. *Microbiology principles and applications* (2th). Prentice hall, Inc.
7. Janeway, Jr. C. A. and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 197-216.
8. Ko, J. L., C. I. Hsu, R. H. Lin, C. L. Kao and J. Y. Lin. 1995. A new fungal immunomodulatory protein, FIP-*five* isolated from edible mushroom, *Flammulina velutipes* and its complete amino acid sequence. *Eur. J. Biochem.* 228: 244-249.
9. Parker, D. C. 1993. The functions of antigen recognition in T cell depend B cell activation. *Semin. Immunol.* 5(6): 413-420.

Studies on the *In Vivo* Immunomodulatory Properties of *Echinops grijsii* Extract¹

Xhao-Kai Kuo², Gow-Chin Yen³, Fuu Sheu⁴ and Long-Zen Chang²

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the immunomodulatory effects of *Echinops grijsii* extract in an *in vivo* experiments using BALB/c mice. The non-specific immunomodulatory experiments showed that administration of *E. grijsii* extract significantly ($P<0.05$) increased the phagocytosis percentage of monocytes. Besides, the OVA-specific immunomodulatory experiments showed that administration of *E. grijsii* extract not only significantly ($P<0.05$) enhanced the OVA-specific cell proliferation of mouse splenocytes but also stimulated OVA-specific IgG production significantly ($P<0.05$). It is speculated that the consumption of *E. grijsii* is useful for defending the invading specific antigens.

Key words: *Echinops grijsii*, immunomodulatory function, phagocytosis, cell proliferation, immunoglobulin.

¹Contribution No. 0639 of Taichung DARES, COA.

²DIRDS Research Assistant and Associate Agronomist of Taichung DARES, COA.

³Professor, Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University.

⁴Associate Professor, Department of Horticulture, National Taiwan University.