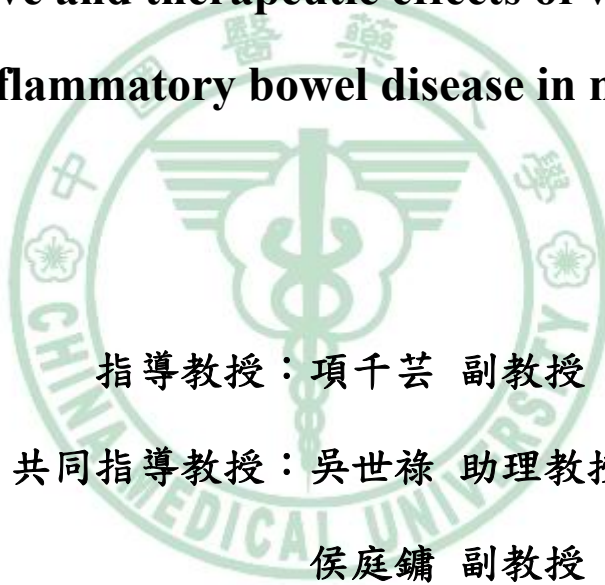


中國醫藥大學醫學研究所

碩士論文

香草醛預防及治療發炎性大腸症之研究

**Preventive and therapeutic effects of vanillin for
inflammatory bowel disease in mice**



指導教授：項千芸 副教授

共同指導教授：吳世祿 助理教授

侯庭鏞 副教授

研究生：傅書琴

中華民國九十五年七月

誌謝

這兩年的碩士班生活裡，由衷感謝指導教授項千芸老師、共同指導教授侯庭鏞老師及吳世祿老師，給我諸多的教誨及指導，讓我了解在研究裡所需秉持的態度。另外，也非常感謝黃蘭如老師及林永昌老師對本論文的細心指導，使我受益良多，得以順利完成此碩士論文。

此外，同時感謝趙德澂學長、李昌誠學長、陳兆群學長、陳君萍學姊、羅欣宜學姊，在實驗上的細心指點，以及同學藝馨、思瑤、佳橙在課業及實驗上相互扶持及幫忙。還有感謝碩士班一年級的學弟妹奕瑾、文議，與大學部的學弟妹們佩妘、雲詳、嘉敏、瑋琦、韻如、澧儀、紀樺、義凱，在實驗上的協助。最後，我要感謝我的家人，在這兩年來給我無限的支持及體諒，讓我可以心無旁騖地將學業完成。



書琴 謹誌

2006年7月

目錄

誌謝	I
目錄	II
圖目錄	III
中文摘要	1
英文摘要	3
第一章 文獻探討	4
第二章 材料與方法	12
第三章 結果	18
第四章 討論	22
參考文獻	43
作者簡歷	53



圖目錄

表 1 直腸巨觀病變的評分標準。	26
表 2 直腸顯微病變的評分標準。	27
圖 1 香草醛(vanillin)之化學結構。	28
圖 2 不同濃度的 TNBS 所誘發發炎性大腸症之形態學分析。	29
圖 3 Vanillin 治療 TNBS 所誘發發炎性大腸症之療效。	31
圖 4 Vanillin 預防 TNBS 所誘發發炎性大腸症之療效。	33
圖 5 Vanillin 治療 TNBS 所誘發發炎性大腸症之效果。	34
圖 6 Vanillin 治療 TNBS 所誘發發炎性大腸症中之老鼠體重的變化	35
圖 7 Vanillin 治療發炎性大腸症對 cytokine 基因表現之影響。	36
圖 8 Vanillin 治療發炎性大腸症的 NF- κ B 活化路徑。	37
圖 9 基因轉殖鼠的構築及確認。	38

圖 10 基因轉殖鼠子代 (F1) 的確認。-----39

圖 11 NF- κ B 報導質體基因轉殖鼠活體影像分-----40

圖 12 利用活體影像分析在 TNBS 所誘發發炎性大腸症中
vanillin 治療之效果。-----41

圖 13 Vanillin 治療發炎性大腸症之 NF- κ B 報導質體基因轉
殖鼠器官影像分析及均質後冷光值變化。-----42



中文摘要

發炎性大腸症 (inflammatory bowel disease, IBD) 為人類相當重要的腸胃道疾病。目前對於發炎性大腸症的致病機轉仍是不清楚，但有些報告指出 proinflammatory cytokine 基因的表現，包括 Interleukin -1 β 、Interleukin -6、Interleukin -4、tumor necrosis factor - α 和 interferon- γ ，可能與發炎性大腸症的發炎有關，而這些 proinflammatory cytokine 基因的表現主要是由 Nuclear factor-kappa B (NF- κ B)調控的。所以抑制 NF- κ B 的活性對於發炎性大腸症病患的治療上，也許是一個相當不錯的標的。香草醛(vanillin)為天然香草的化合物，主要作為香料而廣泛地運用在食品及化妝產品上。有文獻指出 vanillin 具有抗微生物及抗發炎的功能，並且可大量使用在食品的防腐及藥物運用上。因此，本研究利用 trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 誘發老鼠的發炎性大腸症，探討香草醛預防及治療發炎性大腸症的效果。將不同濃度的 TNBS 直接灌入老鼠直腸內，於一天後剖檢進行肉眼及顯微病兆的檢查，結果發現隨著 TNBS 濃度的上升病兆指數也隨之上升，顯示 TNBS 確實可以誘發發炎性大腸症的發生。進一步將 vanillin 於 TNBS 誘發前、誘發中或誘發後再灌入老鼠直腸內，於不同時間剖檢分析，發現 vanillin 可以明顯地降低病兆指數，而且大腸重量也隨之下降，但老鼠體重不受影響。因此，這些結果顯示 vanillin 具有預防及治療發炎性大腸症的潛能。藉由 reverse transcription polymerase chain reaction 分析 vanillin 的作用機轉，發現 vanillin 可以改變 Interleukin -1 β 、Interleukin -6、Interleukin -4、tumor necrosis factor - α 和 interferon- γ 的表現，因為這些 cytokine 的表現主要受到 NF- κ B 的調控。因此，我們藉由 electrophoretic mobility shift assay 及西方轉漬法分析 vanillin 是否會干擾 NF- κ B 活性。結果顯示 vanillin 可以藉由抑制 p65 移動至細胞核內，而抑制 TNBS 所誘發的 NF- κ B 的活性。我們進一步利用活體影像分子系統分析 vanillin 治療發炎性大腸症的效果。將 vanillin 於 TNBS 誘發後注入帶有 NF- κ B/luciferase 的基因轉殖鼠的直腸內，再將 luciferin 以腹腔注射的方

式注入老鼠腹腔內，利用活體冷光儀分析，發現 vanillin 抑制 NF- κ B 活性導致降低 luciferase 的活性。綜合以上結果，vanillin 可以藉由 NF- κ B 訊息傳導路徑抑制 cytokine 的表現，而達到預防及治療發炎性大腸症的效果。



英文摘要

The inflammatory bowel diseases (IBD) is recognized as an important gastrointestinal diseases in children and adults. Pathogenesis of IBD is ambiguous. The expressions of proinflammatory cytokine genes, including interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-4 and interferon (IFN)- γ , might be involved in the pathogenesis of IBD. Since the expression of cytokine gene is mainly regulated by the transcription factor nuclear factor- κ B (NF- κ B), the NF- κ B might be the target for the development of anti-IBD drugs. Vanillin is a widely used flavor compound in food and cosmetics, with an estimated annual worldwide consumption of over 2000 tons. Moreover, vanillin displays antimicrobial and anti-inflammatory properties, and is used as a food preservative and for medicinal purposes. This study therefore investigated the preventive and therapeutic effects of vanillin on trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) -induced colitis in mice. TNBS induced colitis in mice in a dose-dependant manner. However, the administration of vanillin before, during, or after TNBS induction decreased the macroscopic and microscopic scores of IBD. The TNBS-induced colon weight was also decreased by vanillin treatment. Vanillin down-regulated the TNBS-induced expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-4 and IFN- γ by reverse transcription polymerase chain reaction. Moreover, vanillin inhibited NF- κ B activity via suppressing p65 translocation to nuclear. Furthermore, the *in vivo* imaging also showed that vanillin inhibited NF- κ B activity, resulted in the decrease of luciferase activity in transgenic mice. Taken together, vanillin might be the potential compound for the treatment and preventive of IBD.

第一章 文獻探討 (Introduction)

發炎性大腸炎的重要性

腸黏膜具有分泌、吸收、免疫力及屏障的功能，而黏膜屏障功能是由腸道上皮細胞組成的，其中包含有外層細胞和免疫系統，它們可以破壞有害的物質進入體內。若是腸道發生炎症反應，黏膜屏障的功能會出現異常。發炎性大腸症為人類相當重要的腸胃道疾病，包含 Crohn's disease (CD)和 ulcerative colitis 兩種疾病，但是目前對於發炎性大腸症的致病機轉仍是不清楚。然而目前在西方國家罹患發炎性大腸症的病患大約有 80%以上的盛行率，東方國家則是逐年增加的情形。罹患發炎性大腸症的病患常出現有食慾不振、腹痛、腹瀉或是便秘，甚至會有血便和腹膜炎較嚴重的症狀。在 trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)誘發的發炎性大腸症動物模式中，可以發現 proinflammatory cytokines 包括 Interleukin-1 β 、Interleukin-6、Interleukin-12、tumor necrosis factor- α 和 interferon- γ 增加，代表 cytokine 在發炎性大腸症中扮演相當重要的角色 (Strober et al., 1998; Boismenu et al., 2000)。而這些 proinflammatory cytokine gene 的表現主要是由 Nuclear factor-kappa B (NF- κ B)調控的 (Baldwin et al., 1996)，有兩個觀點可以加以說明，第一點是先前的文獻顯示在慢性發炎性大腸症中發現 NF- κ B 活性顯著增加；第二點是在以 p65 NF- κ B antisens 寡核苷酸為主的動物模式中，可藉由在臨床上及組織學上黏膜炎症反應的病理訊號，有效地降低 NF- κ B 活化及 cytokine 大量產生 (Neurath et al., 1996; Hamamoto et al., 1999)。所以抑制 NF- κ B 的活性對於發炎性大腸症病患的治療上，也許是一個相當不錯的標的。而且現今在臨床上治療發炎性大腸炎的藥物，包括 sulfasalazine、mesalazine 和 corticosteroids 都會引起副作用，例如葡萄糖不耐症、腎功能失常及肝炎等 (Auphan et al., 1995; Scheinman et al., 1995; Hanauer et al., 1996; Wahl et al., 1998; Bantel et al., 2000; Weber et al., 2000)，所以必須搜尋高效力、低毒性的自然抗炎症反應的用藥來進行治療。

Nuclear factor- κ B (NF- κ B) 的簡介

經由細菌或病毒感染及壓力引起的細胞內反應是一種快速精確的訊息傳導路徑，從細胞表面受器移動至細胞核中 (Karin and Hunter, 1995)。這些訊息傳導路徑是依靠蛋白質的磷酸化作用，並且最後使誘發標的基因表現的特殊轉錄因子活化。在大多數的細胞中，NF- κ B為炎症反應、免疫反應、細胞增殖及apoptosis相當重要的蛋白質。NF- κ B 存在於細胞質中，與NF- κ B 抑制因子(I κ B)結合處於不活化狀態。當細胞受到刺激時，會誘使 I κ B 進行磷酸化作用並 proteasome-mediated裂解 (Karin and Ben-neriah, 2000)，讓NF- κ B活化進入細胞核內，刺激下游基因的表現。而有許多誘發物包括炎症反應前驅的一些 cytokines、T和B細胞、細菌、LPS、病毒及其蛋白質和生理性及化學性壓力，均會刺激NF- κ B活化。在未受任何刺激的細胞中，NF- κ B- I κ B 複合物也會在細胞質和細胞核中來回穿梭，但是在核的萃取物中更有效力。因此在休眠細胞中，NF- κ B- I κ B 複合物則是會存在細胞質中。先前的文獻已證明蛋白質磷酸化作用是 NF- κ B 活化作用中相當重要的過程。目前這個領域的學者們將自己所了解的部份整理後作總論，那就是已知所有的激酶都可以磷酸化NF- κ B 和 I κ B protein，包含近年來的發表關於B-cell lymphoma 3 (BCL-3) 磷酸化作用的文獻。另外，也說明在炎症反應及癌症中，NF- κ B裂解和I κ B磷酸化作用是很重要的，所以NF- κ B為開發新穎治療藥物可能的標的。

NF- κ B活化的訊息傳導路徑

NF- κ B訊息傳導路徑分為三種不同的活化路徑，它們全部都是藉由酵素刺激磷酸化作用促使NF- κ B活化。第一種路徑為傳統的路徑是由pro-inflammatory cytokines，例如tumour necrosis factor (TNF)- α 來刺激而使不同的adaptor連續性 recruitment至細胞質膜上，包含有TNF-receptor-associated death domain protein

(TRADD)、receptor-interacting protein (RIP)和 TNF-receptor-associated factor 2 (TRAF2)(Hsu et al., 1995)，主要是由recruitment及活化I κ B-kinase (IKK) complex (Devin et al., 2000)，包含有scaffold protein NF- κ B essential modulator (NEMO；也稱作IKK γ) (Yamaoka et al., 1998)、IKK α 及IKK β kinases (Zandi et al., 1997)而產生的。一旦IKK complex活化會使I κ B α 磷酸化，接著經由proteasome路徑進行ubiquitinated和裂解，使heterodimer NF- κ B釋放出來進入細胞核，刺激下游基因的表現；第二種路徑為替代路徑是屬於NEMO-independent，而且是由cytokines例如lymphotoxin β (Dejardin et al., 2002)、B-cell activating factor(BAFF)(Claudio et al., 2002)或CD40 ligand (Coope et al., 2002)以及病毒例如human T-cell leukaemia virus (Xiao et al., 2001)和Epstein-Barr virus (Eliopoulos et al., 2003)來誘發的，此訊息傳導路徑是藉由細胞膜上recruitment TRAF蛋白質及ankyrin-containing和inhibitory molecule p100 (Senftleben et al., 2001)組成homodimer IKK α 的NF- κ B誘發激酶 (NF- κ B-inducing kinase；NIK) (Xiao et al., 2001)來執行的。一旦具有特異性的IKK α 磷酸化，會使p100 ubiquitinated並且使RelB黏附NF- κ B protein p52形成heterodimer進入細胞核中。有研究指出可藉由無法磷酸化使NF- κ B活化作用無效之I κ B突變的無活性細胞 (Brown et al., 1995)，發現當受到次刺激時，因為I κ B無法進行磷酸化使無法活化NF- κ B，所以此路徑是以IKK所調控的 I κ B α 磷酸化來刺激活化NF- κ B。然而在這兩種路徑中I κ B α 磷酸化是NF- κ B活化所必須的。

第三種路徑為非典型路徑，屬於IKK非依賴型的，仍然需要 proteasomes而且可由例如UV (Kato et al., 2003)或doxorubicin (Tergaonkar et al., 2003)造成DNA受損來誘發的。經由UV放射線刺激使proteasome誘發I κ B裂解，是以p38-activated casein kinase 2 (CK2) (Kato et al., 2003)作為標的，並且氧化壓力也會經由I κ B α 磷酸化使NF- κ B活化 (Imbert et al., 1996)，所以I κ B α 磷酸化在此路徑佔有一定的重要性 (Schoonbroodt et al., 2000)，而Syk protein tyrosine kinase需要H₂O₂調節 NF- κ B 活化 (Takada et al., 2003)。然而CK2也會使以

C-terminal Pro-Glu-Ser-Thr 序列為主的 I κ B 磷酸化，因此這項作用是需要快速水解 I κ B α 蛋白質 (Lin et al., 1996; McElhinny et al., 1996; Schwarz et al., 1996) 來執行的。

在炎症反應和癌症中 NF- κ B 的重要性

大多數人類的疾病，包括癌症、神經退化性疾病、類風濕性關節炎、氣喘、發炎性疾病和動脈粥樣化，都與NF- κ B過度活化有關。然而一些proinflammatory cytokine活化NF- κ B誘發細胞增殖及抗細胞凋亡基因表現，也因血管內皮生長因子表現而增加angiogenesis，所以過度活化的NF- κ B 是癌症和慢性發炎性疾病的一種指標。I κ B裂解會引起 NF- κ B 過度活化，所以基本上 NF- κ B 和 I κ B 磷酸化作用是這些疾病主要的原因。甚至，在一些發炎性疾病 (Marok et al., 1996) 及固態腫瘤 (Romieu-Mourez et al., 2001; Gasparian et al., 2002; Biswas et al., 2004; Robe et al., 2004) 中，constitutive IKK活化會增加細胞核內p65量。不過關於在人類癌症細胞中是否可以觀察到constitutive p65磷酸化仍是不清楚的。近來許多不同的動物模式包括腸炎相關的癌症，說明NF- κ B活化作用在腫瘤生長佔有一定重要的角色。而在腸上皮細胞中IKK發生刪除突變會明顯地降低腫瘤的發展；在老鼠的骨髓細胞扮演腫瘤生長因子的一些proinflammatory cytokines表現降低促使腫瘤變小 (Greten et al., 2004)，這些結果顯示IKK活性與炎症反應和癌症有很大的相關性。因此更加證明NF- κ B不活化是減少炎症相關腫瘤形成很有用的工具，而在肝炎相關腫瘤的老鼠模式中也得到相似的結論 (Pikarsky et al., 2004)。有研究指出在具有自發性肝炎進而發展成肝細胞癌的*Mdr2*^{-/-} 老鼠中，當利用I κ B α super-repressor transgene促使NF- κ B不活化時，仍然會發展成肝炎，但是很難發展成癌症 (Pikarsky et al., 2004)。因此，IKK依賴型constitutive NF- κ B活化作用是腫瘤生長所需的，然而磷酸化作用也可以調節I κ B蛋白質的致癌基因活性。此外，在GSK3調節BCL-3磷酸化作用的研究上，藉由proteasome路徑來誘

發裂解作用來減少其致癌基因發生的可能性 (Viatour et al., 2004)，而且這些具有致癌蛋白質的GSK3磷酸化會影響BCL-3誘發其癌症相關標的基因分佈的能力，例如分泌性白血球蛋白酶抑制子 (Viatour et al., 2004)。因此，這些異常constitutive NF- κ B和I κ B磷酸化作用可作為在治療慢性發炎性疾病和癌症上很有用的標的。而在疾病治療藥物上，類風濕性關節炎可能有效的藥物需要會產生選擇性IKK抑制子，例如BMS-345541，並在體內顯示具有抗炎症反應的活性 (McIntyre et al., 2003)。就治療癌症而言，急性白血病有效藥物，例如pyrimidine analogue cytosine arabinoside，會誘發細胞的apoptosis，並且發展出蛋白質磷酸酶2A及2B-A的活化進而使p65去磷酸化 (Yang et al., 2001; Sreenivasa et al., 2003)。防止NF- κ B和I κ B磷酸化可能也可由中斷kinase與其scaffold protein之間的相互作用使穿透細胞peptide失去kinase功能 (May et al., 2000)。在兩個急性炎症反應中，那就是phorbol-12-myristate-13-acetate所誘發的ear edaema和zymosan所誘發的腹膜炎，發現IKK β 和scaffold protein NEMO相互作用的peptide會抑制NF- κ B活化cytokine表現。在蝕骨細胞發生變異中NF- κ B是很重要的角色，所以破壞這個轉錄因子的活性也是對於防止發炎性骨髓再吸收上一個很好的策略。因此，在骨髓再吸收的慢性發炎性疾病中，也可以測穿透細胞的peptide。固然這麼做可以抑制RANKL (為NF- κ B ligand的receptor activator) 刺激NF- κ B活化作用以及在體內蝕骨細胞基因表現 (Jimi et al., 2004)。然而在相同實驗中，這些peptide可消除關節腫以及低含量的TNF和IL-1，進而降低骨髓和軟骨破壞。雖然發展其他的策略，例如proteasome抑制作用，去破壞NF- κ B活化作用，但是臨床應用上已經證明它的效力，所以NF- κ B活化kinase的抑制作用可能會更有特異性並且副作用也減少了。然而是在更適當的環境中分析新穎的藥物來解釋每個kinase正確的生物學及病理毒物學上的角色，因此可以減少應用失敗的危險性。

活體影像分析的重要性

在體內的特殊分子若是要進行影像分析，必須符合以下幾個重要的關鍵：(a) 具有合理藥物動力學之高度親和性的可利用性；(b) 這些有克服生物傳遞屏障的能力（血管、間質、細胞膜）；(c) 利用放大策略（化學性或是生物性）；(d) 靈敏迅速高解析技術的可利用性。符合這四項必要條件，就可成功地在體內進行影像分析了解分子程度。儘管在影像分析技術近來的發展中，有促使改善現今影像分析程式，但是在新的程式研究中仍然是以分子影像系統研究為主軸，例如光學造影技術（包含有散射光局部 χ 射線照相裝置、位相差偵測器、photon 計數器、near-infrared 螢光影像分析）、高度空間性解析核磁共振影像分析技術（例如 micro-MR；micro-PET）都在這領域中扮演很重要的角色。而目前改良空間性解析影像分析，可應用於以人類疾病為主的老鼠動物模式。因此由影像分析出來的發現物及觀點可以用來加以說明臨床上的文章。

近來一些光學影像分析方法大部分都用來分析在體內基因的表現。當影像分析系統以散射光局部 χ 射線照相裝置（Siegel et al., 1999；Ntziachristos et al., 2000）、surface weighted 影像分析（反射性散射光局部 χ 射線照相裝置）（Folli et al., 1994；Mahmood et al., 1999）、位相差偵測器（Boas et al., 1994；Chance et al., 1998）、共軛焦螢光顯微鏡影像分析（Rajadhyaksha et al., 1995；Korlach et al., 1999；Gonzalez et al., 1999）、multiphoton 影像分析（Masters et al., 1997；So et al., 1998；Buehler et al., 1999）或是有內生性 microscopy 之 microscopic 影像分析（Monsky et al., 1999；Dellian et al., 2000）為主時，這些技術依賴螢光、吸收光、反射係數或是生物性冷光作為對照的來源。自然地，near-infrared 螢光影像分析（Weissleder et al., 1999）及 superficial confocal 和 two-photon 影像分析（Rajadhyaksha et al., 1995；Masters et al., 1997；Gonzalez et al., 1999）則是例外，這些一般技術主要是局限於小型動物實驗性的影像分析。然而更重要的是 near-infrared 螢光影像分析方法能有效影像分析一些有關在人類癌症、感染、炎症反應（含有發炎性關節炎）、心血管疾病及退化性疾病的內生性蛋白酶。

生物性冷光與化學性冷光活體影像分析系統的應用性

低光源影像分析儀器是以極微靈敏的CCD攝影相機為主，可用來偵測在檢體表面上發生的生物特異性反應產生光的輸出。這些儀器不只有能夠在單一光束中定量發出的光，也可標的檢體表面上訊息坐落的位置 (Roda et al., 1998)，它們可以用來分析 macrosample 包括大約 100-200 μm 空間性解析生物性冷光與化學性冷光活體影像分析系統，例如膠體、轉印膜、microtiter plates、petri dishes、全身的器官或活體。而相關的光學顯微技術中，它們能夠分析 microsample 包含 0.4 μm 以下的空間性解析，例如組織切片，單一細胞或是晶片裝置，雖然保持高度穩定性，然而選擇適當光學儀器可使光的流失能夠減到最低。

香草醛(Vanillin；4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde)

Vanillin 為天然香草主要的化合物 (圖 1)，廣泛運用在食品及人類產品中的香料化合物，估計每年全世界的消耗量大約 2000 噸 (Rao et al., 2000; Dignum et al., 2001)。而 vanillin 主要來源是從 *vanilla* 蘭科植物的根或莖所萃取出來的。此外，vanillin 顯示出具有抗微生物及抗毒性的功能，並且可大量使用在食品的防腐及藥物運用上 (Burri et al., 1989; Kamat et al., 1997; Aruoma et al., 1999; Cerrutti et al., 2000; Fitzgerald et al., 2003; Walton et al., 2003) 有文獻說明，它具有預防革蘭氏陽性菌和陰性菌在食物中生長的活性，並且也會預防酵母菌和真菌類在水果及實驗室培養液或是培養基中生長 (Cerrutti et al., 1997; Lopez-Malo et al., 1998; Fitzgerald et al., 2003)。

發炎性大腸症為人類相當重要的腸胃道疾病，但是目前對於發炎性大腸症的致病機轉仍是不清楚。而炎症反應和先天免疫反應與會產生炎症反應調控因子的訊息傳導路徑有關，並且這些炎症反應調控因子以 nuclear factor- κB (NF- κB) 活化作用為主。之前治療這類的疾病有效性的研究，大多是以在體外抑制 NF- κB 活性為主的試驗，但沒有利用適當的動物試驗加以證實。而之前在活體 reporter 基

因活性的影像分析的研究上，是使用光學顯微鏡技術、原子能影像技術、或是核磁共振影像分析系統，但是常受到穿透力、解析度及靈敏度的限制。然而現今在臨床上治療發炎性大腸炎的藥物都會引起一些副作用，所以必須搜尋高效力、低毒性的自然抗炎症反應的用藥來進行治療。因此，本研究是探討 vanillin 預防及治療發炎性大腸症的效果及其分子機制。更進一步，用 NF- κ B 報導質體基因轉殖鼠，利用全身性、即時性、非侵入性活體影像分子系統，加以分析說明。



第二章 材料與方法

實驗動物及材料

本研究使用年齡 6 到 8 週體重 19-23 克 BALB/c 母鼠及實驗室自行交配繁殖的基因轉殖鼠(FVB)。依照實驗動物管理與使用指導方針，將所有的老鼠養在特殊無致病原、恆溫（22-25°C）及飲水飼料充足的飼養環境中。Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) (Sigma) 將 5% (w/v) TNBS 溶於 50% 乙醇。使用藥物有 0.5 M 香草醛是溶於 100% 乙醇，而 130 mM 5-Aminosalicylic acid (5-ASA, mesalamine) (Sigma) 是溶於無菌水。

建立 TNBS 誘發發炎性大腸症之模式

前一天老鼠必須禁食後以ketamine和xylazine (2:1) 混合麻醉後，將溶於50%乙醇中不同濃度0.1毫升的TNBS溶液，利用胃管從肛門插入大約3公分，再緩慢注入直腸內，並將老鼠倒立30秒。而對照組的則是注入0.1毫升的50%乙醇後，一樣倒立30秒。利用這樣的方式，大於95%的老鼠會成功地建立TNBS誘發發炎性大腸症。然而，若是溶液很快大約10分鐘被老鼠排出來，則必需刪除掉（Ken et al., 2002）。

形態學的分析

先將老鼠解剖取出直腸放入10%福馬林固定，再用石蠟包埋後切片脫蠟，利用H&E染色法染色封片。形態學的分析是以巨觀及微觀兩種評分方式。巨觀評分是以肉眼直接觀察大腸的充血、炎症反應及潰瘍程度來評分，有0至5分的標準如下：0為沒有任何炎症反應和潰瘍；1為局部充血沒有潰瘍；2為無充血的潰瘍；3只有單一部位有潰瘍和炎症反應發生；4為兩個部位以上有潰瘍和炎症反應發生；5為潰瘍範圍大於2公分（Wallace and Keenan, 1990）（表1）。而微觀評分是以病理切片顯微鏡下觀察腸道組織的白血球浸潤、血管密度及腸壁增厚程度來

評分，有0至4分的標準如下：0為無任何炎症反應訊息發生；1為極少量的白血球浸潤；2為少量的白血球浸潤；3為高量的白血球浸潤、血管密度高和腸壁增厚；4為瀰漫型浸潤並且杯狀細胞消失、血管密度高和腸壁增厚(Fuss et al., 1996)(表2)。

香草醛治療急性發炎性大腸症

前一天先將老鼠禁食後以ketamine和xylazine (2：1) 混合麻醉後，以每0.1毫升100%的乙醇中含有12.5 mM、25 mM或是50 mM不同濃度的香草醛，在TNBS利用胃管從肛門直接直腸攻毒時同位給藥，與先前技術一樣倒立30秒。待24小時後，犧牲取出直腸，放入福馬林固定，並送動物科學研究所進行切片，以及進行之後的分生實驗。

香草醛預防及治療發炎性大腸症

由以上實驗，選擇香草醛適當的濃度及體積，進行香草醛預防及治療發炎性大腸症的實驗。在預防組的實驗上，是在TNBS誘發發炎性大腸症之前，先將溶於100%乙醇的50 mM香草醛和5-ASA治療陽性控制組連續餵食3天，然後七天後犧牲；在治療組的實驗上，是在TNBS誘發發炎性大腸症之後，將溶於100%乙醇的50 mM香草醛和5-ASA治療陽性控制組連續餵食7天後犧牲。皆取出直腸放入福馬林固定，送動物科學研究所切片，以及進行之後的分生實驗。

組織萃取

將老鼠犧牲後取出直腸放入離心管秤重，先以 ice-cold PBS 清洗一次，盲目剪碎後，再加入等量的 ice-cold lysis buffer (100 mM HEPES, pH 7.9、100 mM KCl、100 mM dithiothreitol、1% NP-40、50 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、0.1 M benzamidine、50 µg/ml Leupeptin、100 µg/ml Pepstatin)進行均質，以離心的方式在4°C下 15000 rpm 離 10 分鐘，收集上清液，為細胞質的萃取蛋白質可進

行 western blot 分析。取下層沉澱物秤重，再加入同重量的 low salt buffer (100 mM HEPES-KOH, pH 7.9、250 mM KCl、5 mM Spermidine、20% glycerol、1 mM dithiothreitol、50 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、0.1 M benzamidine、50 µg/ml Leupeptin、100 µg/ml Pepstatin、200 nM Okadaic acid、20 mM sodium orthovanadate、8 nM cypermethrin)，再加入總重量 0.72 倍的 high salt buffer (100 mM HEPES-KOH, pH 7.9、250 mM KCl、5 mM Spermidine、20% glycerol、1 mM dithiothreitol、50 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、0.1 M benzamidine、50 µg/ml Leupeptin、100 µg/ml Pepstatin、200 nM Okadaic acid、20 mM sodium orthovanadate、8 nM cypermethrin、1 M KCl) 混合，在 4% shake 1 小時。之後以離心的方式在 4°C 下 12000 rpm 離 20 分鐘，收集上清液，為細胞核的萃取蛋白質可進行 EMSA 分析。用 (Bio-Rad) 試驗套組來計算蛋白質濃度，並暫存於 -30°C，待之後分析使用 (Yang et al., 1998)。

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

將 10 µg 上述所收集的核內萃取蛋白質與 1 µg/µl poly dIdC 加入反應緩衝液 (10% glycerol、2% polyvinyl alcohol、20 mmol/L HEPES, pH 7.9、40 mmol/L KCl、7 mmol/L MgCl₂ 和 1 mmol/L dithiothreitol)，再加入 5 ng/µl ³²P end-labeled NF-κB oligonucleotide 為探針，其總反應體積為 20 µl，於 25°C 反應 30 分鐘，以 6% native polyacrylamide gel 在 0.25 倍 Tris/borate/ethylenediaminetetraacetic acid (TBE) 緩衝液進行電泳，在 4°C 以 30 V 跑 3 小時。之後再轉印至硝化纖維素膜 (nitrocellulose membrane, Amersham Pharmacia Biotech)，利用 DIG Luminescent Detection Kit 呈色，並以 X 光片呈現結果 (Yang et al., 1998)。

西方轉漬法 (Western blot) 分析

將 10 µg 組織萃取質內和核內不同的蛋白質以 10% 的 SDS-PAGE 分離之後，將分離的 band 以電泳的方式轉印至硝化纖維素膜 (nitrocellulose membrane, Amersham Pharmacia Biotech) 上。再以 blocking buffer (5% 脫脂奶粉，pH 7.6 的

20 mM Tris/HCl, 140 mM NaCl 及 0.1% Tween 20) 固定, 加入抗 p65、IKK α 、IKK β 及 IKK α β 磷酸化單株抗體為一級抗體, 於 4°C overnight。之後, 再以兔子抗 IgG 單株抗體為二級抗體, 於室溫反應一小時。結合的抗體以 peroxidase conjugated secondary antibody (Sigma) 藉由化學螢光 (chemiluminescence, ECL system, amersham) 的方式偵測, 並以 X 光片呈現結果 (Yang et al., 1998)。

Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

將老鼠犧牲後取出直腸放入離心管秤重, 先盲目剪碎後, 以 acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform 方法收集腸組織的 total RNA。利用任意的 hexonucleotides, 在 reverse-transcription reaction solution 中將 RNA 轉換為 complementary DNA, 接下來再跑 PCR。這裡使用的 primer 包括有: β -actin sense, 5'-GGAGAAGATCTGGCACCACACC-3'; β -actin antisense, 5'-CCTGCTTGC-TGATCCACATCTGCTGG-3'; IFN- γ sense, 5'-GCTCTGAGACAATGAAC-GCT-3'; IFN- γ antisense, 5'-AAAGAGATAATCTGGCTCTGC-3'; IL-4 sense, 5'-TCGGCATTGTAACGAGGTC-3'; IL-4 antisense, 5'-GAAAAGCCCGAA-AGAGTCTC-3'; IL-6 sense, 5'-TATGAAGTTCCTCTCTGCAA-3'; IL-6 antisense, 5'-CTTTGTATCTCTGGAAGTTTCAG-3'; IL-1 β sense, 5'-CATCCTCTGTGA-CTCATGGG-3'; IL-1 β antisense, 5'-CTTCTTCTTGGGTATTGCTTG-3'; TNF- α sense, 5'-TAGCCCACGTCGTAGCAAAC-3'; TNF- α antisense, 5'-CACCCATTC-CCTTCACAGAG-3'。反應的條件包括有: Cycle I 為 94°C 需 12 分鐘共 1 個 cycle; Cycle II 為 94°C 需 45 秒, 55°C 需 45 秒, 72°C 需 2 分鐘共 36 個 cycle; Cycle 3 為 72°C 需 7 分鐘, 接下來保持 4°C (Yoshida et al., 1995)。

基因轉殖鼠的構築及確認

我們藉由基因轉殖鼠的構築, 了解 NF- κ B 在體內表現量的分布, 並建立發

炎反應的動物模式。我們請進階生物技術股份有限公司，先利用 pNF- κ B/reporter 模式，將 pNF- κ B/Luciferase (Stratagene) 利用胚原核顯微技術注射的方式，送到老鼠胚胎細胞中，再將胚胎植入母鼠體內。待小鼠出生後，於 3 週剪尾，收集 DNA，利用聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction; PCR) 檢測轉殖基因的機率。PCR 確認所用的引子為 primer 1 (5'-AACTGCATAAGG-CTATGAAGAGATACGCC-3') 及 primer 2 (5'-TTAAAACCGGGAGGTAGA-TGAGATGTGACG-3')。進一步再利用南方雜合法分析轉殖基因在小鼠染色體中的數量。

NF- κ B 基因轉殖鼠的繁殖及 Polymerase chain reaction (PCR) 確認

我們將構築好的 NF- κ B 基因轉殖鼠，分別與同品系野生株小鼠，以一公多母或是一公一母的交配方式，進行子代繁殖。待小鼠出生三週後剪尾，收集 DNA，再利用上述的兩種 primer 藉由 PCR 進行確認，並且計算每次交配組別轉殖基因的陽性率。如此，可以篩選有效的交配組別，提高子代的繁殖及轉殖基因的機率。

NF- κ B 基因轉殖鼠活體影像系統之分析

將 NF- κ B 基因轉殖鼠利用上述香草醛治療 TNBS 誘發發炎性大腸症之相同實驗模式，進行基因轉殖鼠發炎性大腸症實驗。在進行影像分析之前必須先將老鼠麻醉，並且把腹部的毛刮除。然後將取同重量體積的溶於 PBS 中的 D-Luciferin (150 mg/kg, Xenogen)，以腹腔注射方式注入老鼠體內，之後待 15 分鐘後，直接把老鼠放進密封不透光裝有 25mm 鏡頭的 CCD 相機和影像增強器相連構成的極敏感相機儀器 (核能研究所同位素應用組提供) (IVIS Imaging System, Xenogen Corporation) 中，進行全身性活體影像分析。接下來迅速解剖取出直腸放在培養皿上，直接放進儀器中進行分析，再計數 ROI 值 (相對光點數值)，而 ROI 是將老鼠放射出來的 luminescence 利用程式進行定量，單位是 photon/sec/cm² 並作

成圖表。之後取出來的直腸，先用 phosphate buffered saline (PBS) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄ 及 1.4 mM KH₂PO₄)小心沖洗避免血液干擾，再放入 2 毫升的離心管秤重。接下來將器官剪碎加入等比例的 triton lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH7.8; 1% TritonX-100; 1 mM DTT; 1 mM PMSF)均質，再將均質液冷凍解凍兩次之後 4°C 離心 12000rpm 15 分鐘，收集上清液測冷光及蛋白質濃度並且分裝至 1.5 毫升離心管保存-70°C 冰箱。



第三章 結果

建立 TNBS 誘發發炎性大腸症之模式

本研究顯示隨著 TNBS 濃度的增加 (圖 2 A)，從巨觀肉眼來看，可以發現腸道組織受損明顯地愈來愈嚴重，潰瘍程度也是逐漸擴大。而從微觀病理切片來看，因為 TNBS 造成黏膜的炎症反應，可以發現腸道黏膜上皮細胞逐漸失去原本的功能，白血球浸潤增加，促使腸壁增厚造成直腸重量增加。因此，在形態學分析上評分分數與腸道病兆成正比 (圖 2 B)，所以我們成功建立由 TNBS 誘發發炎性大腸症之動物模式。

Vanillin 治療急性發炎性大腸症的結果

從巨觀肉眼來看，顯示有 vanillin 治療的直腸比只有 TNBS 誘發的直腸病灶減緩許多。而從微觀病理切片來看，與只有 TNBS 誘發的比較，發現有 vanillin 治療的明顯降低黏膜組織受損情形，隨著 vanillin 濃度增加病兆指數的發展也隨之降低(圖 3 A)，並且腸重也逐漸下降。(圖 3 B)

Vanillin 預防發炎性大腸症的結果

在 vanillin 預防組試驗中從肉眼觀察，將 TNBS 誘發發炎性大腸症未受 vanillin 預防治療的老鼠直腸和陰性控制組的比較，發現明顯地直腸變寬增厚。而在 TNBS 誘發發炎性大腸症 vanillin 預防治療的老鼠直腸和 5-ASA 治療陽性控制組的老鼠直腸上，可觀察到降低發炎性大腸症病徵的發展 (圖 4 A)。在病理切片觀察，發現未受 vanillin 治療的直腸組織有大量的白血球浸潤，腸道上皮細胞幾乎失去功能 (黑色箭頭)。而在 vanillin 治療的老鼠直腸和 5-ASA 治療陽性控制組的直腸組織中，可降低白血球浸潤，也保有一部分腸道上皮細胞完整性 (圖 4 B)。就型態學分析而言，vanillin 無論在微觀評分或是腸重的評估，都有明顯降低的情形，並有顯著的差異 ($P \text{ value} < 0.05$; $P \text{ value} < 0.01$) (圖 4 C)。

Vanillin 治療發炎性大腸症的結果

在 vanillin 治療組試驗中從肉眼觀察，將 TNBS 誘發發炎性大腸症未受 vanillin 治療的老鼠直腸和陰性控制組的比較，發現明顯地直腸變寬增厚。而在 TNBS 誘發發炎性大腸症 vanillin 治療的老鼠直腸和 5-ASA 治療陽性控制組的老鼠直腸上，可觀察到降低發炎性大腸症病徵的發展（圖 5 A）。在病理切片觀察，發現未受 vanillin 治療的直腸組織有大量的白血球浸潤（黑色箭頭），腸道上皮細胞形態已完全消失（黑色箭頭）。而在 vanillin 治療的老鼠直腸和 5-ASA 治療陽性控制組的直腸組織發現白血球浸潤降低，也回復一部分完整的腸道上皮細胞（圖 5 B）。就型態學分析而言，vanillin 無論在微觀評分或是腸重的評估，都有明顯降低的情形，並有顯著的差異(P value<0.05；P value<0.01)（圖 5 C）。

Vanillin 治療發炎性大腸症老鼠體重的影響

我們觀察 vanillin 預防及治療 TNBS 誘發發炎性大腸症的老鼠體重是否有造成影響。由結果顯示，無論是預防治療或是治療對於發炎性大腸症之老鼠體重，都沒有明顯的差異，相較只有 TNBS 誘發發炎性大腸症和陰性控制組之老鼠體重之下。所以 vanillin 的治療對於體重，沒有太大的影響（圖 6）。

Vanillin 對 Cytokine 基因表現的影響

由 RT-PCR 分析顯示在未受 vanillin 治療只有 TNBS 誘發發炎性大腸症組別中，proinflammatory 和 inflammatory cytokine mRNA 的量顯著地增加，包括：IFN- γ 、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 。而 vanillin 治療組別中，這些 cytokine 的表現明顯受到抑制，幾乎降低到接近陰性控制組 cytokine 的表現，但是 IL-4 則是出現相反的結果。所以由以上結果表示，vanillin 治療在 TNBS 誘發發炎性大腸症的老鼠中，可以抑制 proinflammatory 和 inflammatory cytokine 基因的表現。（圖 7）

Vanillin 對 NF- κ B 活性的影響

利用直腸組織收集核內萃取蛋白質，進行 EMSA 偵測 NF- κ B 活性。結果顯示，未受 vanillin 治療的直腸核內萃取蛋白質，NF- κ B 活性明顯地增加；而 vanillin 治療的直腸核內萃取蛋白質，則是 NF- κ B 活性明顯地降低（圖 8 A）。再藉由

西方轉漬法分析 p65、IKK α 和 IKK β 蛋白質活性的改變。結果顯示，未受 vanillin 治療的直腸無論是核內或是細胞質的 p65，其活性都有明顯地增加。而 IKK α 、IKK β 及 IKK α β 磷酸化的活性，也是明顯地增加。在 vanillin 治療的直腸 p65、IKK α 和 IKK β 蛋白質活性，則是明顯地降低(圖 8 B)。因此，本研究暗示 vanillin 治療在 TNBS 誘發發炎性大腸症的老鼠中，可由抑制 NF- κ B 活性，進而抑制這條訊息傳導路徑，達到降低發炎性大腸症的發展。

基因轉殖鼠的構築及子代的確認

結果顯示出生的 25 隻小鼠中，利用 PCR 檢測，只有 6 隻為基因轉殖鼠，轉殖機率為 24% (圖 9 A)。進一步利用南方雜合法分析轉殖基因在小鼠染色體中的數量，發現其中有三隻 (標號 2、19、21) 轉殖基因的數量為 1~3，其餘的轉殖基因數量為 3~15 (圖 9 B)。因為轉殖基因的數量為 1~3 的小鼠較適合進行交配繁殖第一代 (F1)，因此我們挑選適當的基因轉殖鼠親代，與野生株同品系老鼠進行交配繁殖。從 PCR 陽性率來看，無論是一公多母或是一公一母的交配方式，都有 30 至 50% 左右的成功帶有 NF- κ B 報導質體的子代產生 (圖 10)。

全身性、即時性、非侵入性活體影像的分析

由結果顯示，可明顯觀察到基因轉殖鼠體內放射出來的 luminescence 量，15 分鐘後達到最高峰，之後隨著時間增加而衰退。也可觀察到在一些部位有明顯較強的 luminescenc 表現而在各種器官放射出來的 luminescence 表現情形，也可藉由這極敏感攝相機進行分析，所以這樣的技術平台確實是可行的 (圖 11)。

利用活體影像分析 vanillin 治療發炎性大腸症的效果

在 TNBS 誘發發炎性大腸症未受 vanillin 治療的老鼠活體影像中，可觀察到有放射出很強的 luminescence。而在 TNBS 誘發發炎性大腸症 vanillin 治療的老鼠，放射出來的 luminescence 則是比未治療的降低許多 (圖 12)。老鼠直腸影

像分析也是得到相同的結果（圖 13 A 和 B）。而在直腸組織均質液 luciferase 活性，未受 vanillin 治療的 luciferase 活性表現增加，但是受 vanillin 治療的 luciferase 活性明顯地被抑制下來（圖 13 C）。所以由結果得知，vanillin 治療可以有效抑制 luciferase 活性，也就是能抑制 NF- κ B 活性，進而達到降低 TNBS 所誘發發炎性大腸症疾病的發展。(P value < 0.05 ; P value < 0.01)



第四章 討論

本研究由以上結果，分成五點結論來說明：（1）香草醛可能是預防及治療TNBS所誘發發炎性大腸症的天然性化合物；（2）香草醛可明顯降低炎症反應造成的腸道損傷；（3）在腸道黏膜中經由香草醛治療可減少NF- κ B活化作用；（4）在腸道黏膜中經香草醛治療後，可抑制TNBS誘發proinflammatory和inflammatory cytokine基因的表現；（5）利用我們構築的NF- κ B基因轉殖鼠基於NF- κ B活性已成功建立抗發炎中藥研發技術平台。

本研究是要觀察在發炎性大腸症上香草醛是否有治療疾病的療效，所以我們利用香草醛治療由TNBS誘發小鼠的發炎性大腸症。TNBS所誘發發炎性大腸症的老鼠體重大約2-3天流失，甚至有一些老鼠腸炎更嚴重造成死亡。而在本研究中，我們發現香草醛治療對於老鼠體重變化沒有太大的影響。藉由NF- κ B基因轉殖鼠利用活體影像分析系統觀察在TNBS所誘發發炎性大腸症中香草醛治療後之變化，我們從活體影像分析量化的結果和組織均質後偵測luciferase活性，發現香草醛確實可以有效地NF- κ B活性。再從分生實驗來看，利用電泳移轉試驗和西方轉漬法分析NF- κ B活性變化及其訊息傳導路徑之作用機轉，也得到相同的結果。而我們發現香草醛會改變proinflammatory cytokine基因的表現，包括IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和IL-4，這些proinflammatory cytokine基因在發炎性大腸症中扮演相當重要的角色(Strober et al., 1998; Boismenu et al., 2000)。所以當NF- κ B活化作用受到抑制，使得NF- κ B無法進入細胞核與promotor結合刺激下游cytokine基因的表現。在香草醛預防及治療TNBS誘發老鼠發炎性大腸症實驗中，從肉眼觀察，將TNBS誘發發炎性大腸症未受香草醛治療的老鼠直腸和陰性控制組的比較，發現明顯地直腸變寬增厚。而在TNBS誘發發炎性大腸症香草醛治療的老鼠直腸和5-ASA治療陽性控制組的老鼠直腸上，可觀察到降低發炎性大腸症病徵的發展。在病理切片觀察，發現未受香草醛治療的直腸組織有大量的白血球浸潤，腸道上皮細胞幾乎已失去功能，並出現類似肉芽腫的組織結構。而在香草醛治療

的老鼠直腸和5-ASA治療陽性控制組的直腸組織發現白血球浸潤降低，也回復一部分完整的腸道上皮細胞，所以香草醛可用來預防及治療實驗動物發炎性大腸症的發展。有文獻說明，TNBS所誘發發炎性大腸症與Th1細胞反應有相關性，並且免疫反應類似Crohn's disease，所以TNBS所誘發發炎性大腸症的炎症反應是走Th1細胞調控的路徑（Miyazawa et al., 1998；Asahara et al., 1995）。

現今在臨床上治療發炎性大腸炎的藥物，包括sulfasalazine、mesalazine和corticosteroids。然而corticosteroids治療可能會引起副作用，例如葡萄糖不耐症、腎功能失常及肝炎及增加感染的危險。然而sulfasalazine和mesalazine治療也會引起很嚴重的副作用，例如：肝炎、胰臟炎及抑制骨髓造血功能（Auphan et al., 1995；Scheinman et al., 1995；Hanauer et al., 1996；Wahl et al., 1998；Bantel et al., 2000；Weber et al., 2000）。香草醛在老鼠體內的吸收，對其他器官沒有明顯的刺激或是毒性反應，甚至沒有任何副作用。香草醛為天然香草主要的化合物，廣泛運用在食品及人類產品中的香料化合物，估計每年全世界的消耗量大約2000噸（Dignum et al., 2001）。雖然全球每年香草醛的消耗量相當大，但是只有1%是從vanilla蘭科植物萃取出純天然的香草醛，其他大部分都是利用化學合成製造出來的（Lomascolo et al., 1999；Muheim and Lerch, 1999），而且價位也比純天然的低廉。要注意的是目前對於香草醛其他作用機制尚未明確，所以這樣的問題值得我們在更進一步探討。

Ken et al.在2002年，觀察curcumin是否會預防及改善由TNBS誘發老鼠發炎性大腸症的發展。他們發現會隨著curcumindose-dependent方式，降低TNBS誘發老鼠發炎性大腸症的發展，並且老鼠的存活率高。此外，也會抑制NF- κ B活化作用及proinflammatory cytokine基因的表現，所以結果顯示curcumin可有效地治療發炎性大腸症的病患。curcumin廣泛地作為香料及咖哩色素，是一種從*curcuma longa*萃取出植物性天然化合物（Govindarajan VS, 1980）。有先前研究指出，curcumin具有抗腫瘤、抗炎症反應及抗感染活性的藥理效應（Huang et al., 1991；Ruby et al., 1995；Jiang et al., 1996；Singh et al., 1996；Joe et al., 1997；Xu et al.,

1997)。近年來，有研究報導curcumin在不同細胞株中，都有抑制NF- κ B活性的功能 (Singh et al., 1995; Bierhaus et al., 1997; Kumar et al., 1998; Jobin et al., 1999)。而在1999年，Jobin et al.發現curcumin在腸上皮細胞中，會阻礙NF- κ B-inducing kinase和I κ B kinase上游的訊息傳導。由結果顯示，curcumin可能用來治療發炎性大腸症的病人相當重要的天然化合物。接著Haiyan et al.在2005年，利用Berberin觀察在TNBS誘發大鼠的發炎性大腸炎in vivo和in vitro中Berberin的效果。Berberin是從Goldenseal (*Hydrastis canadensis*) 所分離出來主要的生物鹼。在中草藥中，berberine也是用來治療胃腸炎、腹痛或是腹瀉病人之*Coptidis rhizome*和*Phellodendri cortex*主要的植物性化合物。Berberine具有抗細菌的活性、抗霍亂毒素及抗炎症反應的效力 (Jang CS, 1941)。這篇研究結果顯示，從肉眼觀察或病理切片都發現berberine可有效改善實驗動物發炎性大腸炎的發展，而且也發現可以抑制經LPS處理過細胞所產生的IL-8量。因此，從中草藥所萃取的植物性天然化合物作為新藥開發，是相當不錯的標的。不但毒性低並對人體沒有太大的副作用，也常被運用在食品或是生活用品中。

目前的研究常用來作為發炎性大腸症的動物模式，包括有BALB/c、C57BL/6小白鼠 (mouse) 及Sprague-Dawley大白鼠 (rat)。不同的動物模式，得到結果也不同。比方說先前的研究利用curcumin預防及治療老鼠發炎性大腸症，作者使用兩種品系的老鼠BALB/c和C57BL/6，他們發現在同一濃度的curcumin這兩種動物模式體重的變化情形不相同。在BALB/c，有治療的與未治療的體重變化有顯著的差異；而C57BL/6雖然有差異，但是沒有顯著的差異 (Ken et al., 2002)。大部份的研究都是利用TNBS誘發實驗動物的發炎性大腸症，而且其病徵類似人類的Crohn's disease；有些研究則是利用dextran sulfate sodium (DSS) 誘發實驗動物出血性的發炎性大腸症，而且其病徵類似人類的ulcerative colitis。

未來這樣的活體影像分析可能可以利用在一些癌症藥物的開發，例如將處理過肝癌細胞打入老鼠的肌肉，一段時間後，觀察注入癌症細胞的位置呈現出來luminescence 量來判讀癌症細胞生長情形或是轉移的位置等，之後用藥物治療觀

察是否有抑制的療效；或是某種病毒新藥開發之研究，先前有學者用來觀察皰疹病毒第一型感染老鼠後，造成各種器官的影響及藥物治療後改善的情形 (Gary et al., 2002)；或是特定基因在體內表現的情形等等。所以活體影像分析確實是一個相當方便迅速的分子影像分析系統，對於大量搜尋有效性的藥物或是中草藥化合物也是相當不錯的工具。本研究顯示香草醛可用來預防及治療實驗動物發炎性大腸症的發展，所以香草醛可能是治療發炎性大腸症病患上一個相當不錯的天然化合物。因此，藉由這樣的模式平台，可以加速其他疾病的新藥開發。



表 1 直腸巨觀病變的評分標準







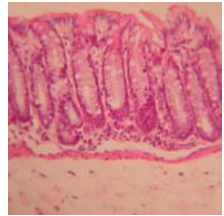
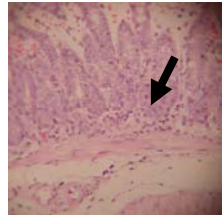
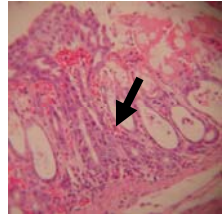
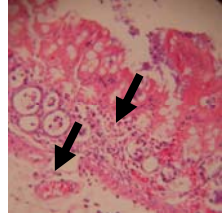
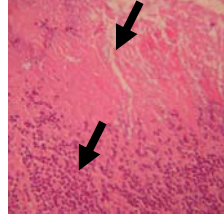
Macroscopic score	Hyperemia	Inflammation	Ulcer	範例
0	-	-	-	
1	+	-	-	
2	-	-	+	
3	-	+	+	
4	-	++	++	
5	-	-	++ > 2 cm	

表 2 直腸顯微病變的評分標準

Microscopic score	Leukocyte infiltration	Vascular density	Colon wall thickening	範例
0	No	No	No	
1	Very low	No	No	
2	Low	No	No	
3	High	High	Yes	
4	Transmural infiltration, loss of goblet cells	High	Yes	

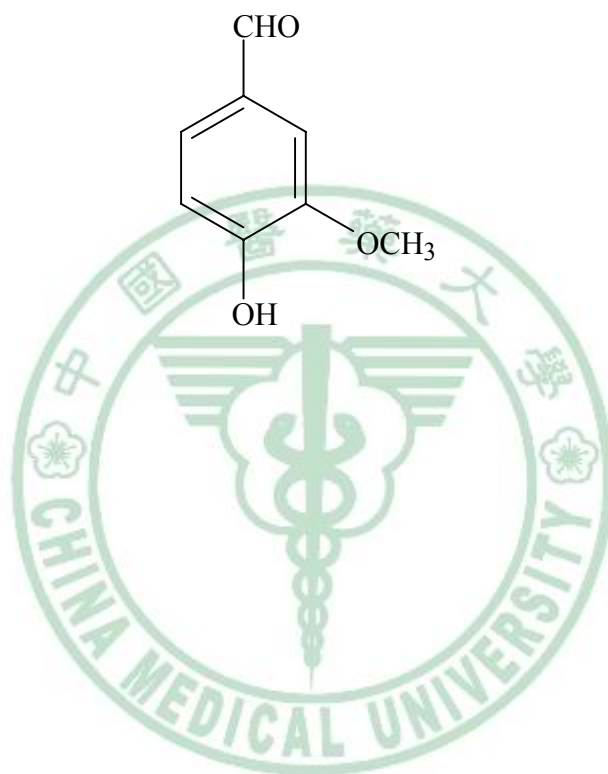
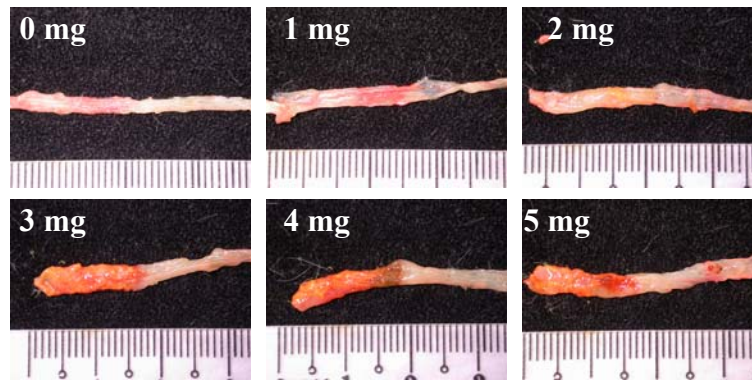
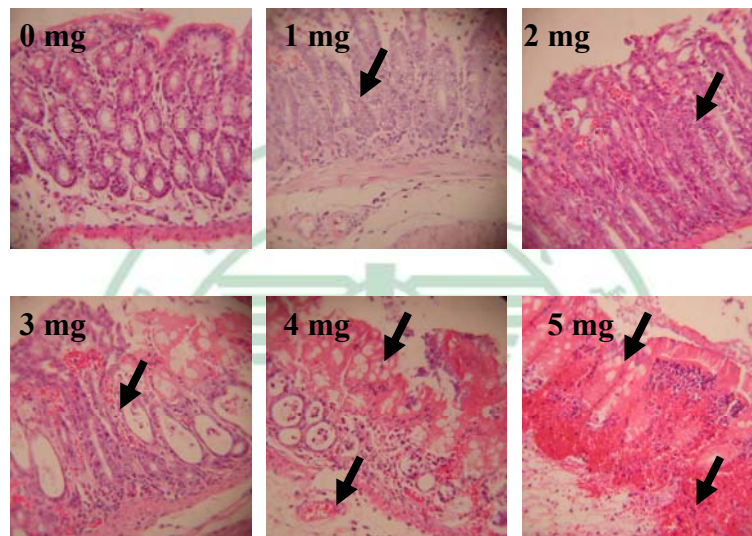


圖 1 香草醛(vanillin)之化學結構。

(A)



(B)



(C)

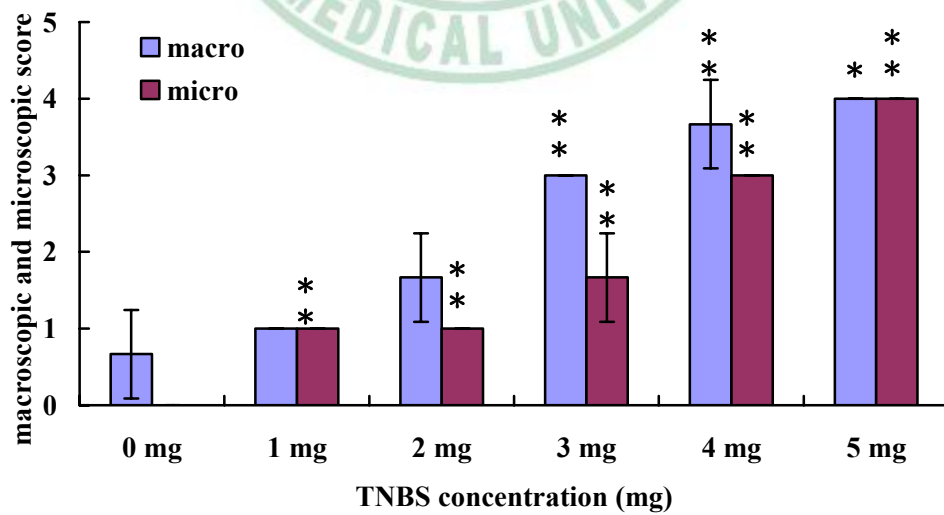
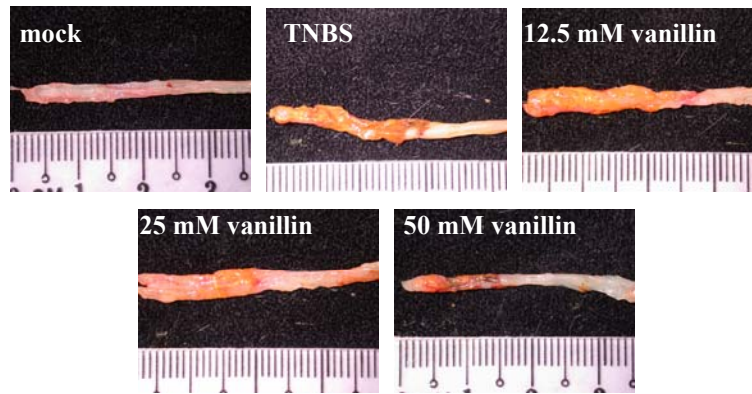


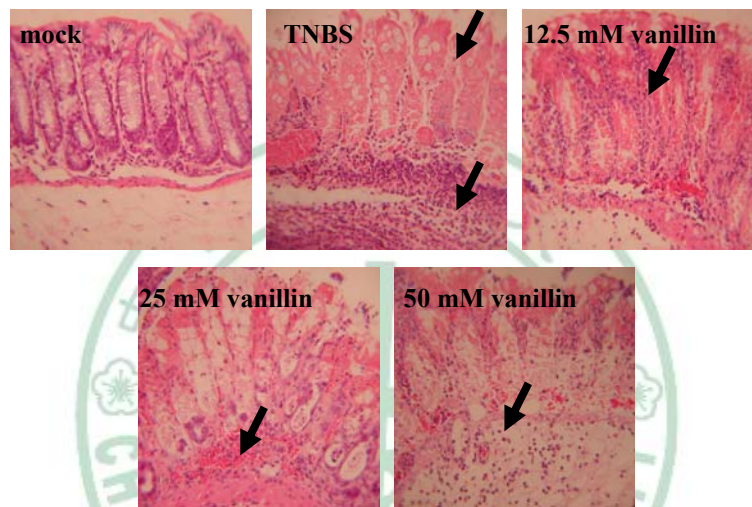
圖 2 不同濃度的 TNBS 所誘發發炎性大腸症之形態學分析。將禁食一天的小鼠利用胃管將不同劑量的 TNBS 緩慢的灌入直腸內，於一天後將小鼠犧牲，觀察直腸肉眼及顯微切片的變化。(A) 直腸肉眼的觀察。(B) 直腸顯微切片的觀察。(C) 直腸肉眼及顯微切片的病變指數。* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ 。箭頭指出腸組織的上皮細胞形態已變形，有白血球浸潤。



(A)



(B)



(C)

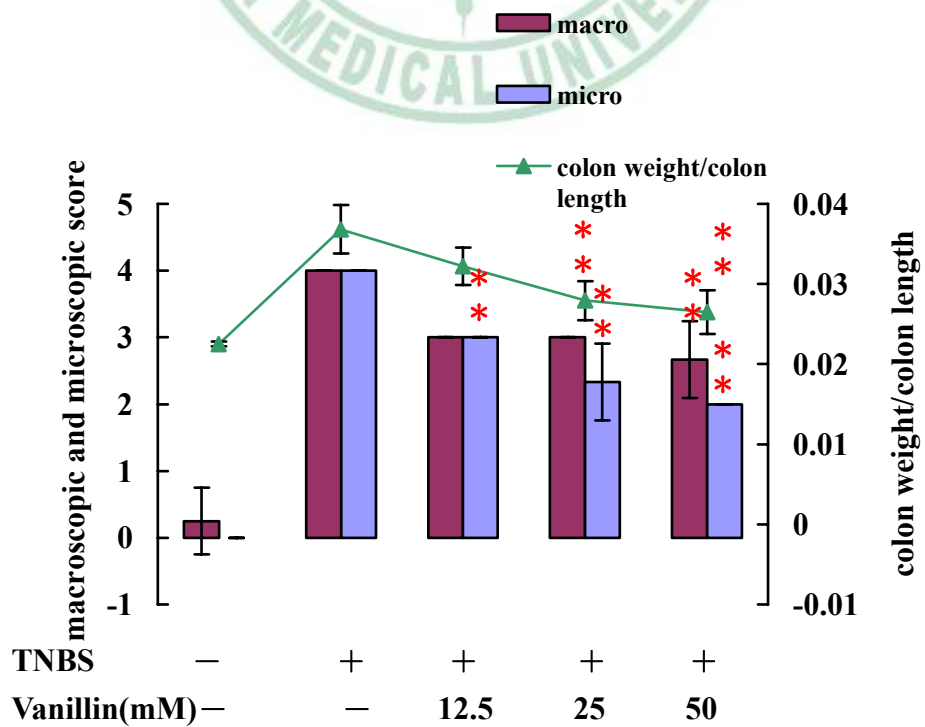
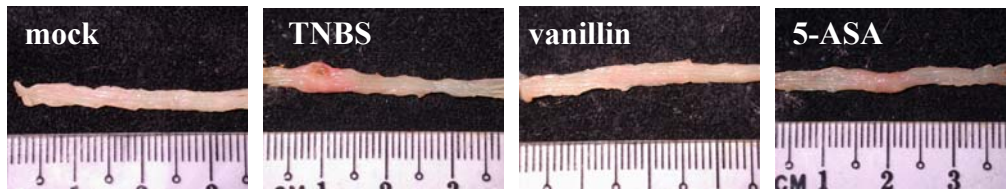


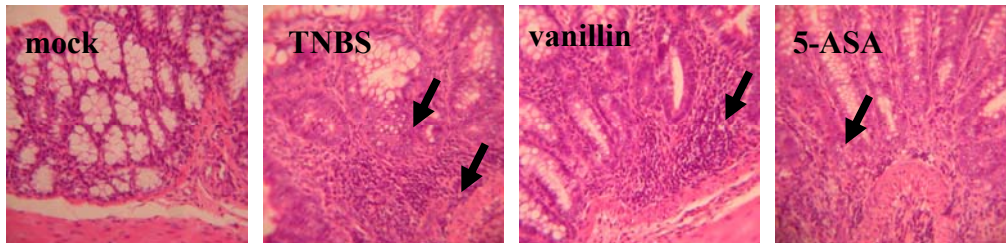
圖 3 Vanillin 治療 TNBS 所誘發發炎性大腸症之療效。將不同劑量的 vanillin 與 5 mg TNBS 共同灌入直腸內，於一天後將小鼠犧牲，觀察直腸肉眼及顯微切片的變化。(A) 為 vanillin 治療 TNBS 所誘發發炎性大腸症中不同濃度之肉眼觀察結果。(B) 為圖 A 之病理組織切片結果。(C) 為將圖 A、B 結果做巨觀及微觀的評估，並觀察腸重/腸長度的比例。黑色箭頭是腸道上皮細胞及白血球浸潤。* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ 。



(A)



(B)



(C)

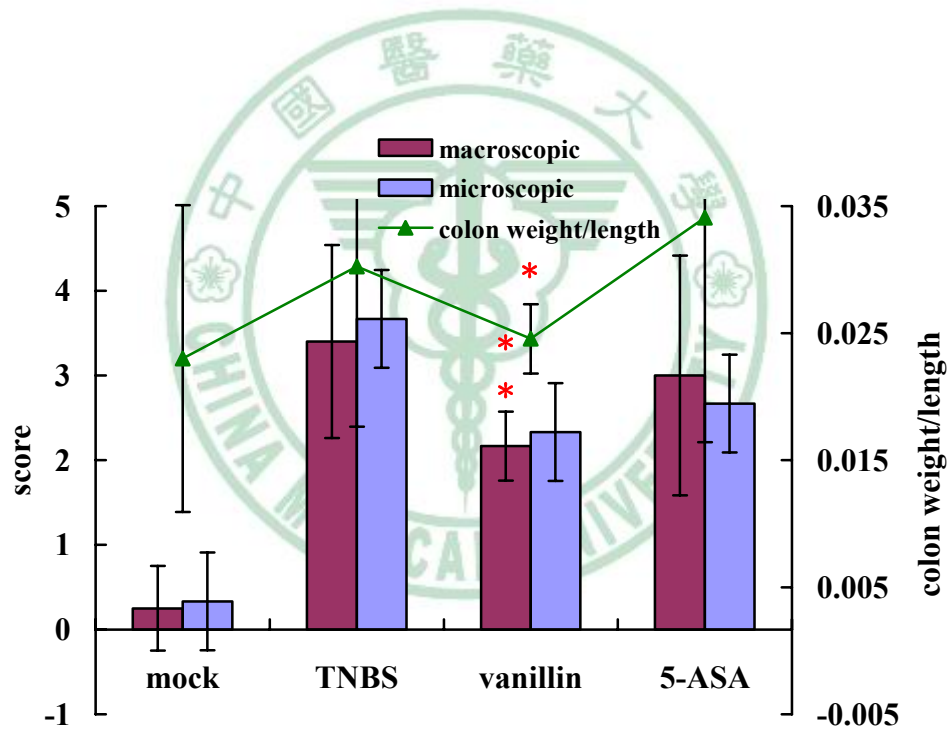


圖 4 Vanillin 預防治療 TNBS 所誘發發炎性大腸症之療效。在 2 mg TNBS 灌入直腸內前給予 50 mM vanillin 和 130 mM 5-ASA 三天，於七天後將小鼠犧牲，觀察直腸肉眼、顯微切片及腸重的變化。(A) 為 vanillin 預防治療 TNBS 所誘發發炎性大腸症之肉眼觀察結果。(B) 為圖 A 之病理組織切片結果。(C) 為將圖 A、B 結果做巨觀及微觀的評估，並觀察腸重/腸長度的比例。黑色箭頭是腸道上皮細胞及白血球浸潤。* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ 。

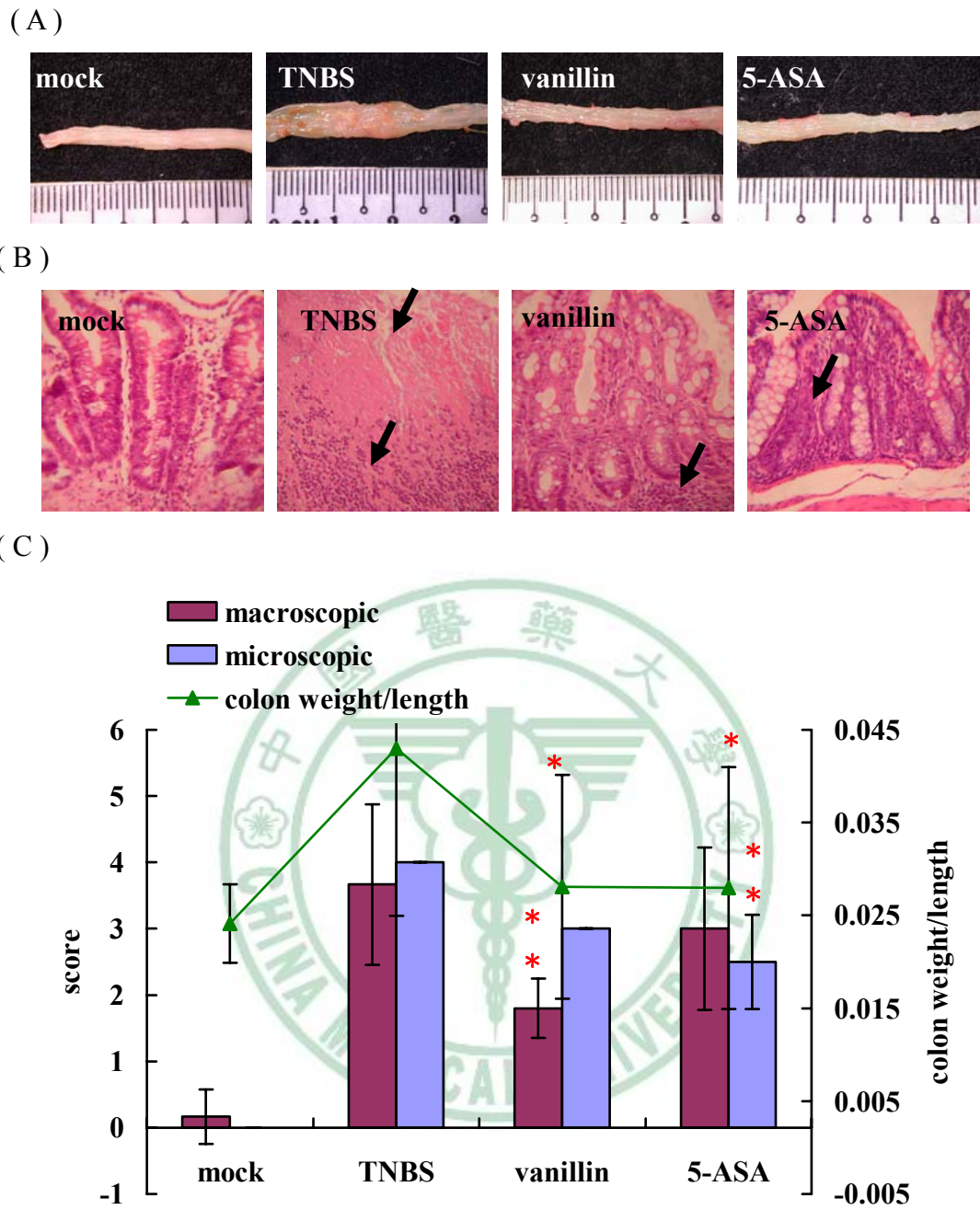


圖 5 Vanillin 治療 TNBS 所誘發發炎性大腸症之效果。將 2 mg TNBS 灌入直腸內，於一天後給予 50 mM 的 vanillin，七天後將小鼠犧牲，觀察直腸肉眼、顯微切片及腸重的變化。(A) 為 TNBS 所誘發發炎性大腸症中 vanillin 治療之肉眼觀察結果。(B) 為圖 A 之病理組織切片結果。(C) 為將圖 A、B 結果做巨觀及微觀的評估，並觀察腸重/腸長度的比例。黑色箭頭是腸道上皮細胞及白血球浸潤。
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

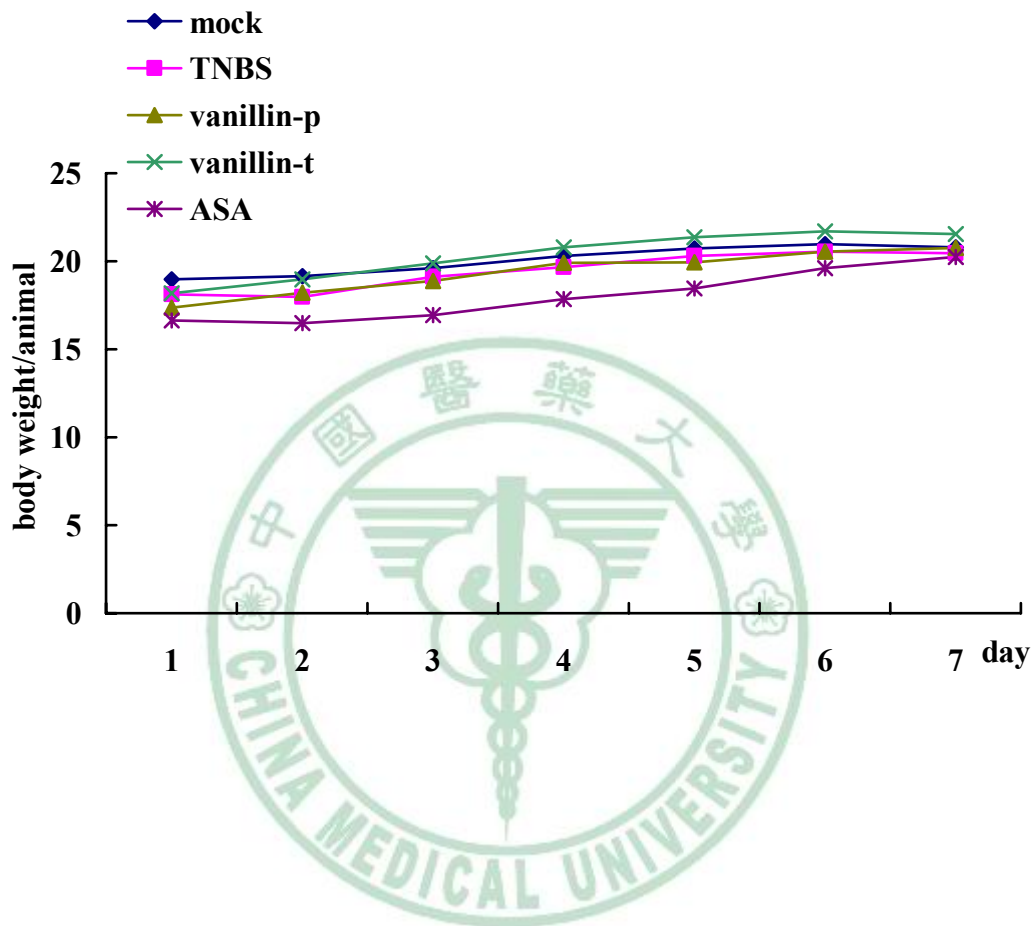


圖 6 Vanillin 治療 TNBS 所誘發發炎性大腸症中之體重的變化。Mock 是只用 50% 乙醇灌腸之老鼠體重；TNBS 是經由 TNBS 所誘發發炎性大腸症之老鼠體重；vanillin-p 是 vanillin 預防治療後 TNBS 所誘發發炎性大腸症之老鼠體重；vanillin-t 是香草醛治療 TNBS 所誘發發炎性大腸症之老鼠體重。5-ASA 是藥物陽性控制組，5-ASA 治療 TNBS 所誘發發炎性大腸症之老鼠體重。

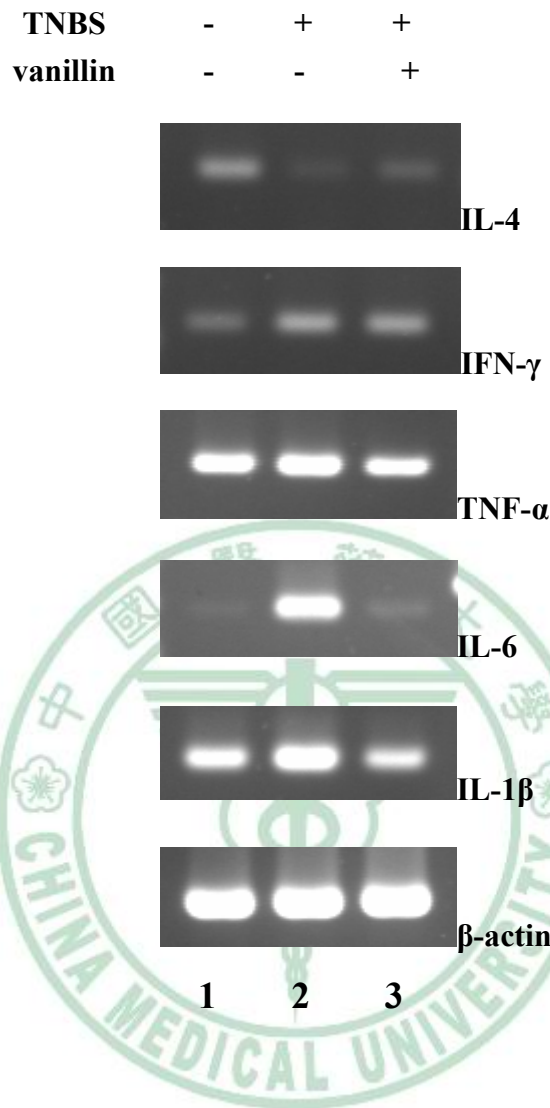
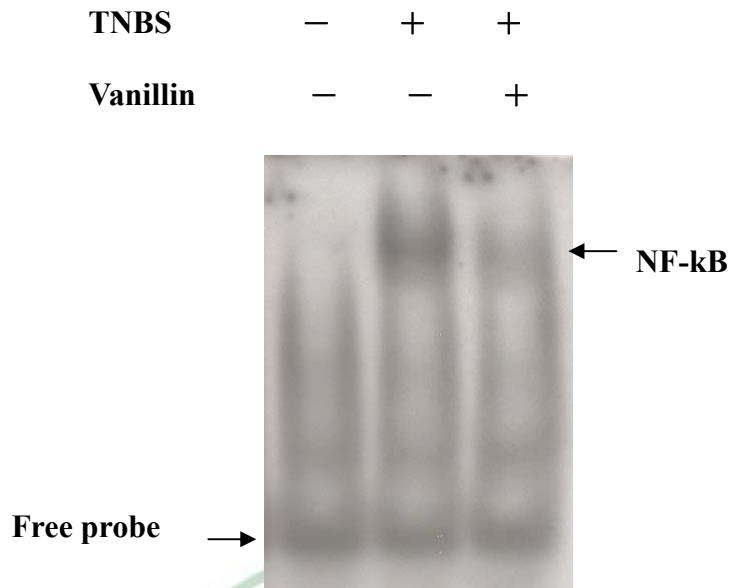


圖 7 Vanillin 治療發炎性大腸症對 cytokine 基因表現之影響。將 vanillin 及 TNBS 處理後的小鼠直腸研磨後，收集 cytokine mRNA 進行 RT-PCR。Lane 1 是只用 50 %乙醇灌腸之老鼠直腸；Lane 2 是經由 TNBS 所誘發發炎性大腸症之老鼠直腸；Lane 3 是先由 TNBS 所誘發發炎性大腸症後給予 vanillin 治療之老鼠直腸。

(A)



(B)

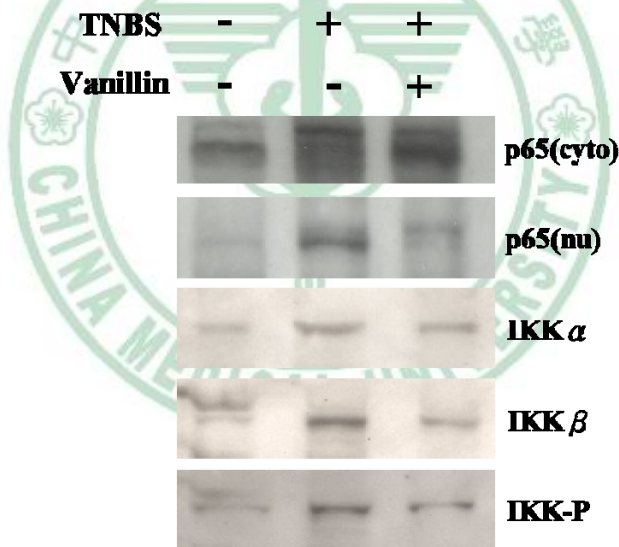
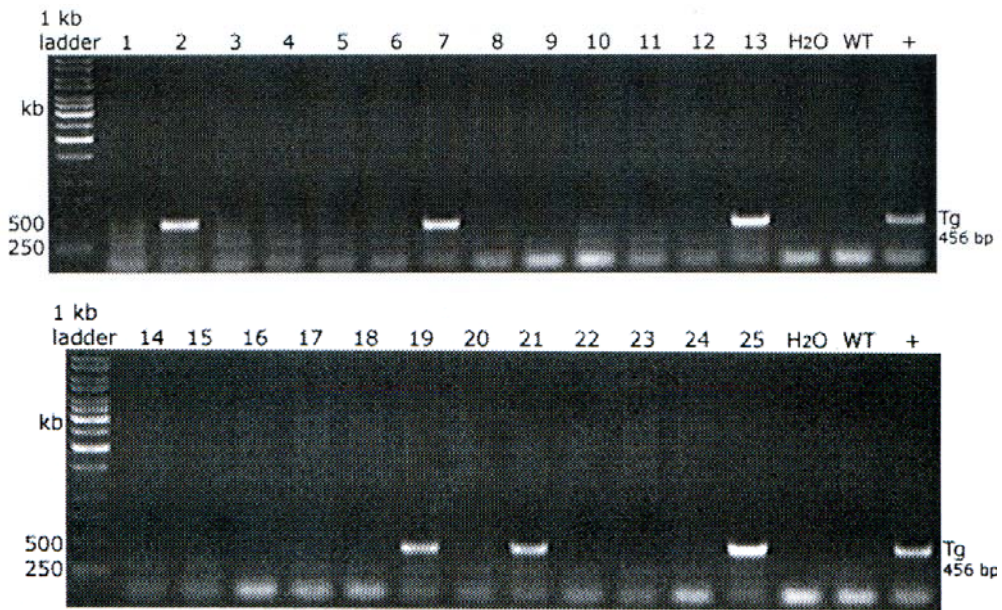


圖 8 Vanillin 治療發炎性大腸症的 NF- κ B 活化路徑。(A) 為 EMSA 偵測 NF- κ B 的活性。將 vanillin 及 TNBS 處理後的小鼠直腸研磨後，收集細胞核內蛋白質，再將蛋白質與 NF- κ B responsive sequence 結合，進行 EMSA。NF- κ B/NF- κ B responsive sequence 複合體以箭頭表示。;(B) 為西方轉漬法。將 vanillin 及 TNBS 處理後的小鼠直腸研磨後，收集細胞核內及細胞質內蛋白質，再利用 p65 和 IKK 抗體進行西方轉漬法。

(A)



(B)

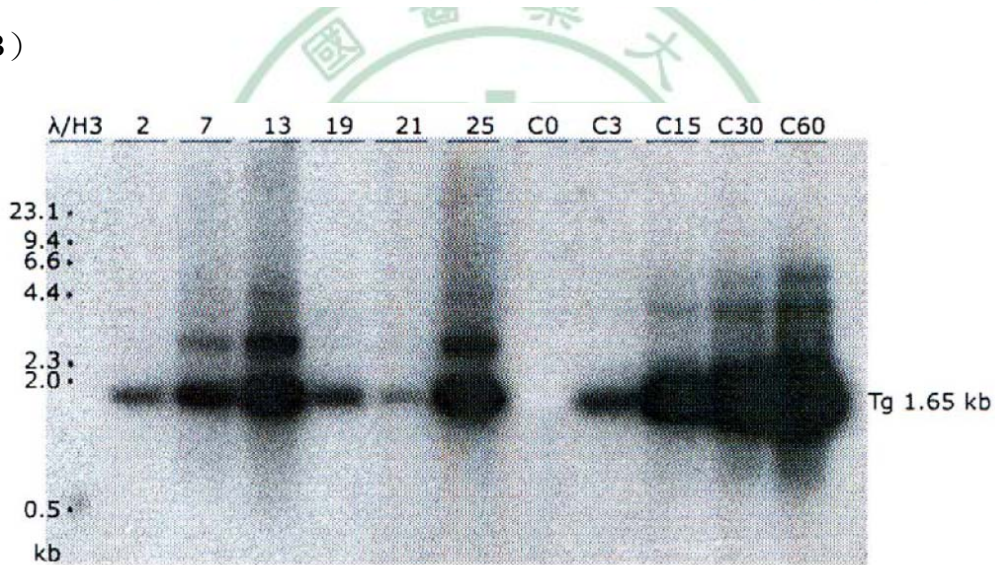
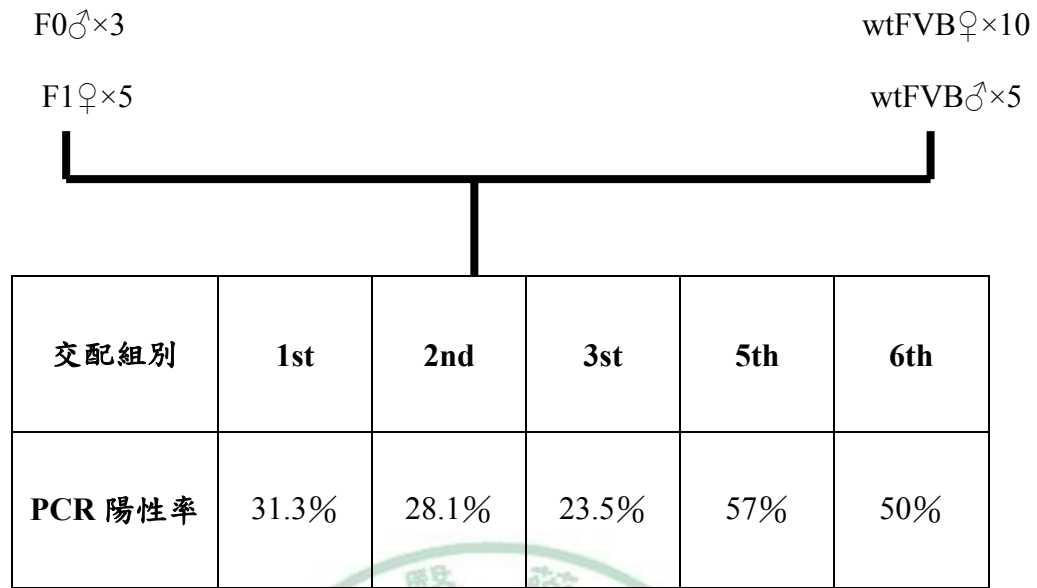


圖 9 基因轉殖鼠的構築及確認。(A) 為 PCR 的結果。數字代表小鼠編號，H₂O 代表反應液中不含 DNA、WT 代表野生株小鼠。轉殖基因片段的位置及長度標示於右邊。(B) 為南方雜合法的結果。數字代表小鼠編號，C0、C3、C15、C30 或 C60 代表轉殖基因的數量。偵測到的轉殖基因片段的位置及長度標示於右邊。

(A)



(B)

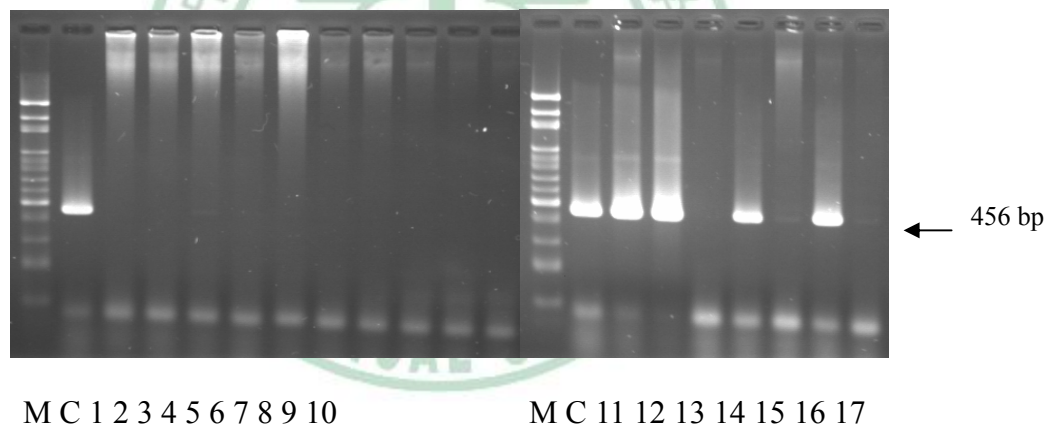
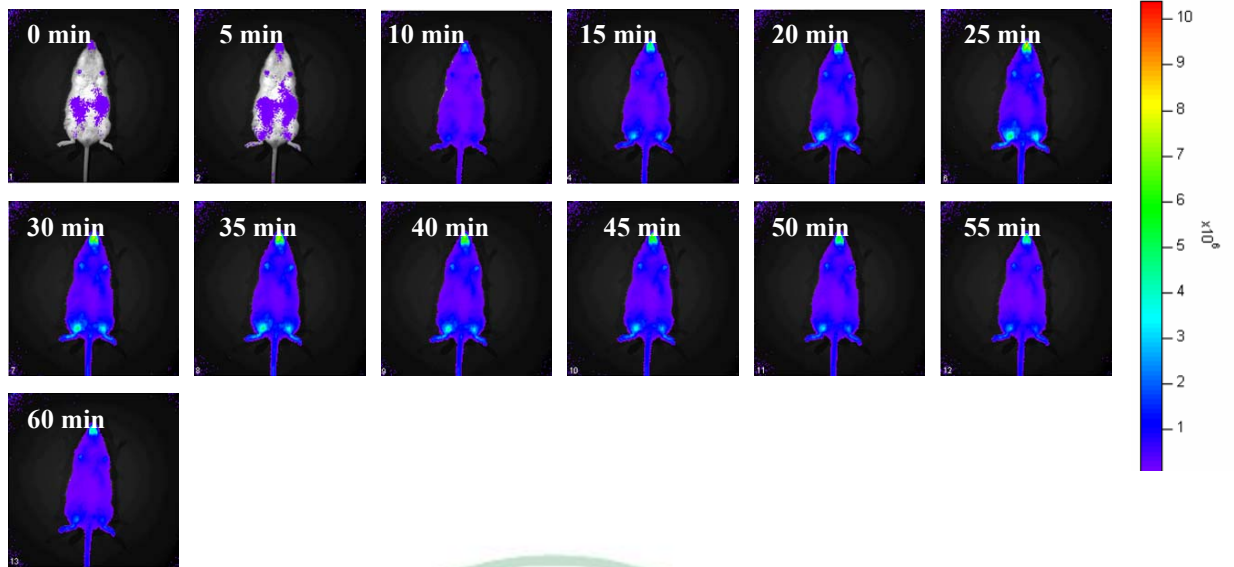


圖 10 基因轉殖鼠子代 (F1) 的確認。將基因轉殖公鼠或是母鼠 (F0) 與野生株公鼠或母鼠交配後，產下的子代於 3 週時剪下一小段尾巴，萃取 DNA，再利用 PCR 的方式，確認小鼠是否含有轉殖基因。(A) 為交配組別及陽性率評估。(B) 為 PCR 的結果。數字代表小鼠編號，M 代表 DNA marker，C 代表陽性控制組。轉殖基因片段的位置及長度標示於右邊。

(A)



(B)

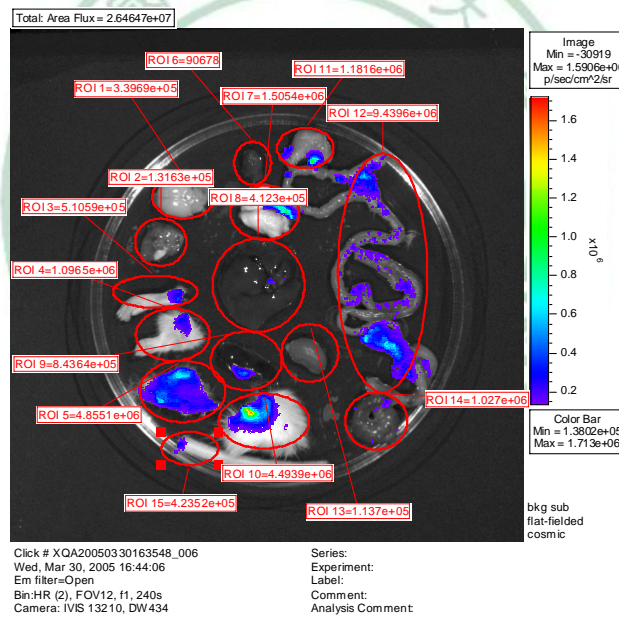
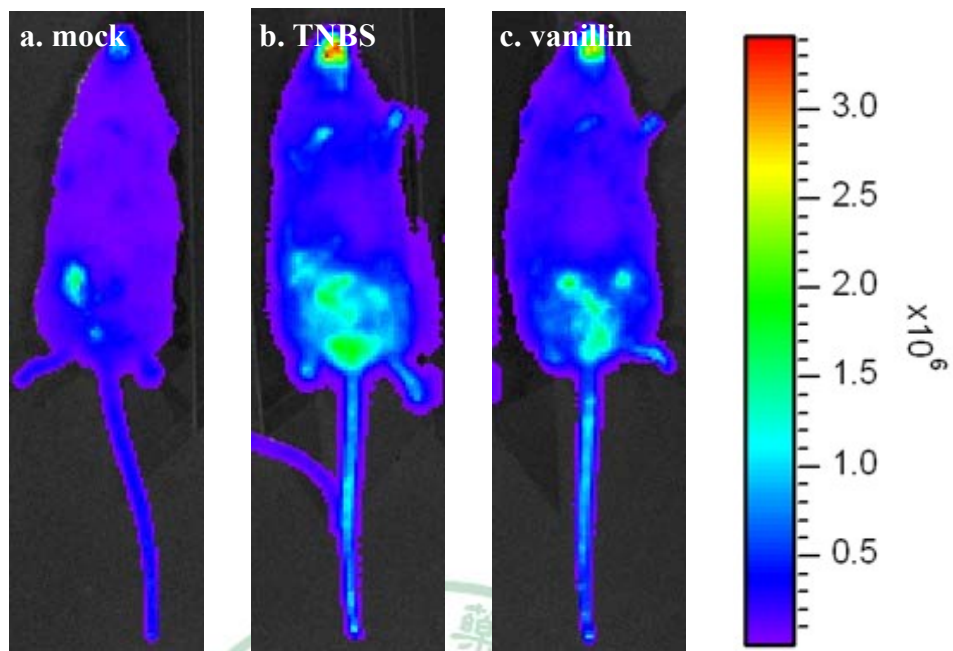


圖 11 NF- κ B 報導質體基因轉殖鼠活體影像分析。(A) 為完整的 NF- κ B 基因轉殖鼠全身活體影像分析。自腹腔注入 D-luciferin 開始計時，由左至右分別是 0 ~ 60 分鐘，分析 luminescence 表現的情形。(B) 為 NF- κ B 基因轉殖鼠各種器官的 luminescence 影像分析。將 luciferin 以腹腔注射的方式注入基因轉殖鼠腹腔，再將老鼠犧牲採取直腸，利用 IVIS 進行偵測。每個 ROI 的單位是 p/sec/cm²/sr。

(A)



(B)

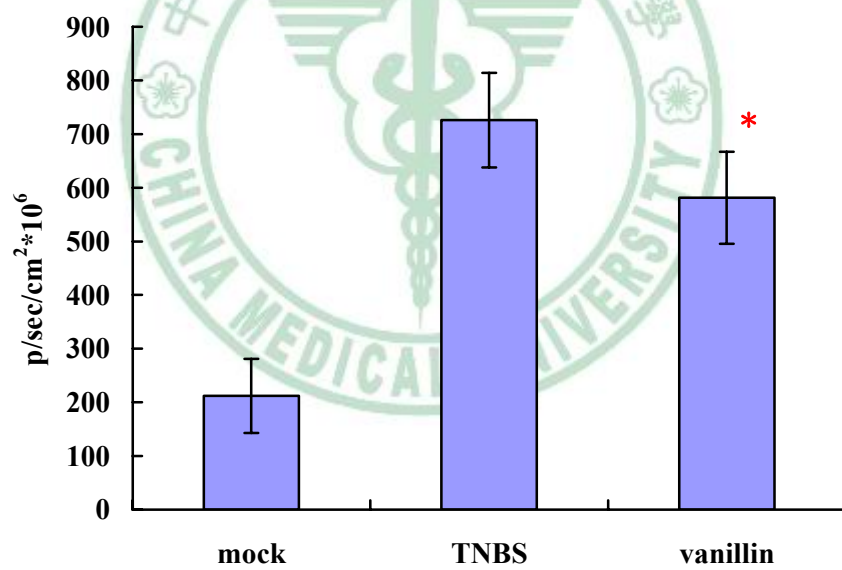
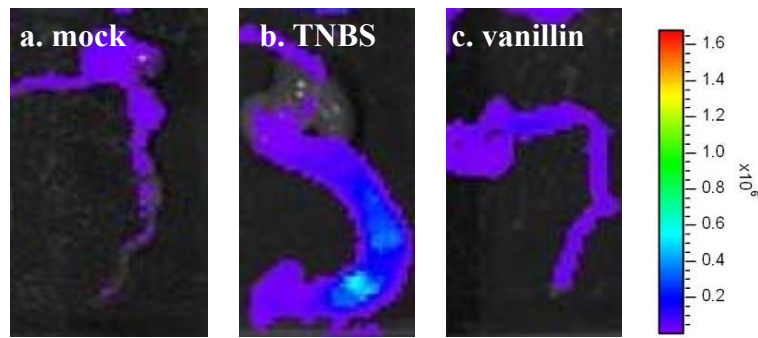


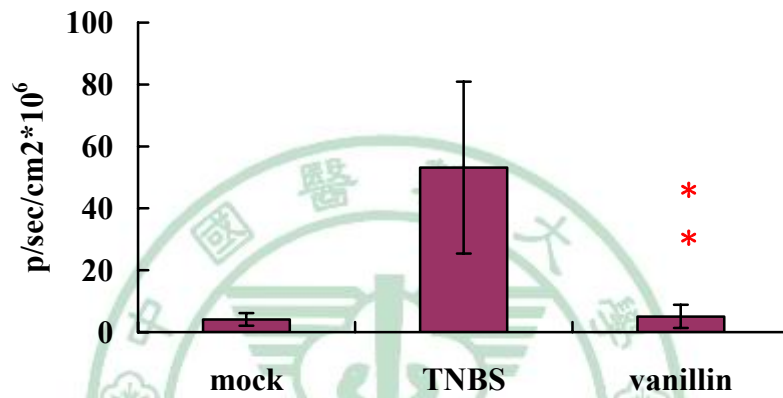
圖 12 利用活體影像分析在 TNBS 所誘發發炎性大腸症中 vanillin 治療之效果。

(A) 為 vanillin 治療發炎性大腸症之基因轉殖鼠全身影像分析；(B) 為 vanillin 治療發炎性大腸症之基因轉殖鼠量化分析。

(A)



(B)



(C)

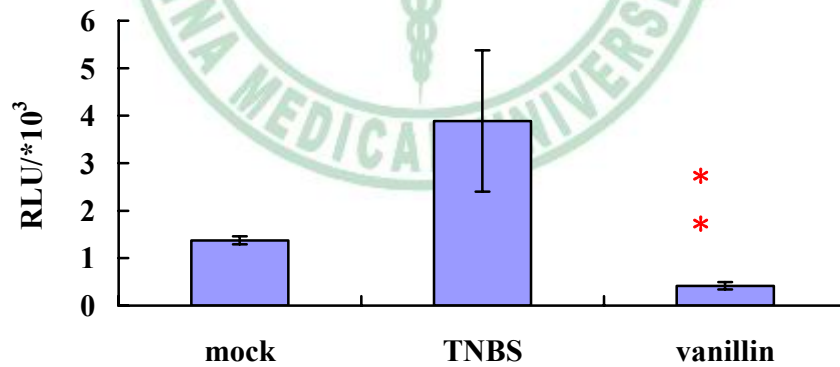


圖 13 Vanillin 治療發炎性大腸症之 NF- κ B 報導質體基因轉殖鼠器官影像分析及均質後冷光值變化。將 luciferin 以腹腔注射的方式注入基因轉殖鼠腹腔，再將老鼠犧牲採取直腸，利用 IVIS 進行偵測。(A) 為 vanillin 治療發炎性大腸症之直腸影像分析。(B) 為 vanillin 治療發炎性大腸症直腸影像之量化分析。(C) 為 vanillin 治療發炎性大腸症之直腸均質後測冷光值。

參考文獻

- Aruoma, O. I., 1999 Antioxidant actions of plant foods: use of oxidative DNA damage as a tool for studying antioxidant efficacy. *Free Radic. Res.* 30, 419–427
- Auphan, N., DiDonato, J.A., Rosette, C., Helmberg, A., Karin, M., 1995 Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science* 270, 286-290
- Baldwin AS., 1996 The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev. Immunol.* 14, 649-683
- Bantel, H., Berg, C., Vieth, M., Stolte, M., Kruis, W., Schulze-Osthoff, K., 2000 Mesalazine inhibits activation of transcription factor NF- κ B in inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* 95, 3452-3457
- Bierhaus, A., Zhang, Y., Quehenberger, P., Luther, T., Haase, M., Muller, Mackman, N., Ziegler, R., Nawroth, PP., 1997 The dietary pigment urcumin reduces endothelial tissue factor gene expression by inhibiting binding of AP-1 to the DNA and activation of NF-kappa B. *Thromb Haemost* 77, 772-782
- Biswas, D.K., Shi, Q., Baily, S., Strickland, I., Ghosh, S., Pardee, A.B., Iglehart, J.D., 2004 NF- κ B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10137–10142
- Boas, D.A., O’Leary, M.A., Chance, B., Yodh, A.G., 1994 Scattering of diffuse photon density waves by spherical inhomogeneities within turbid media: analytic solution and applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 9, 4887-4891
- Boismenu, R., Chen, Y. Insights from mouse models of colitis., 2000 *J. Leukoc. Biol.* 67, 267-278
- Buehler, C., Kim, K.H., Dong, C.Y., Masters, B.R., So, P.T., 1999 Innovations in two-photon deep tissue microscopy. *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.* 18, 23-30

- Burri, J., Graf, M., Lambelet, P., and Lo'linger, J., 1989 *J. Sci. Food Agric.* 48, 49–56
- Cerrutti, P., Alzamora, S. M., and Vidales, S. L., 1997 Vanillin as antimicrobial for producing shelf-stable strawberry purée. *J. Food Sci.* 62, 608–610
- Chance, B., 1998 Near-infrared images using continuous, phase-modulated, and pulsed light with quantitation of blood and blood oxygenation. *Ann. NY. Acad. Sci.* 838, 29-45
- Claudio, E., Brown, K., Park, S., Wang, H., Siebenlist, U., 2002 BAFF-induced NEMO-independent processing of NF- κ B in maturing B cells. *Nat. Immunol.* 3, 958–965
- Coope, H.J., Atkinson, P.G., Huhse, B., Belich, M., Janzen, J., Holman, M.J., Klaus, G.G., Johnston, L.H., Ley, S.C., 2002 CD40 regulates the processing of NF- κ B p100 to p52. *EMBO J.* 21, 5375–5385
- Dejardin, E., Droin, N.M., Delhase, M., Haas, E., Cao, Y., Makris, C., Li, Z.W., Karin, M., Ware, C.F., Green, D.R., 2002 The lymphotoxin- β receptor induces different patterns of gene expression via two NF- κ B pathways. *Immunity* 17, 525–535
- Dellian, M., Yuan, F., Trubetskoy, V.S., Torchilin, V.P., Jain, R.K., 2000 Vascular permeability in a human tumour xenograft: molecular charge dependence. *Br. J. Cancer* 82, 1513-1518
- Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M., Liu, Z., 2000 The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity* 12, 419–429
- Dignum, M. J. W., Kerler, J., and Verpoorte, R., 2001 Vanilla Production: Technological, Chemical and Biosynthetic Aspects. *Food Rev. Int.* 17, 199–219
- Eliopoulos, A.G., Caamano, J.H., Flavell, J., Reynolds, G.M., Murray, P.G., Poyet, J.L., Young, L.S., 2003 Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1 regulates the processing of p100 NF- κ B2 to p52 via an IKK γ /NEMO-independent

- signalling pathway. *Oncogene* 22, 7557–7569
- Fitzgerald, D. J., Stratford, M., and Narbad, A., 2003 Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 113–122
- Folli, S., Westermann, P., Braichotte, D., Westermann, P., Braichotte, D., Pelegrin, A., Wagnieres, G., van den Bergh, H., Mach, J.P., 1994 Antibody-indocyanin conjugates for immunophotodetection of human squamous cell carcinoma in nude mice. *Cancer Res.* 54, 2643-2649
- Fuss, I.J., Neurath, M., Boirivant, M., Klein, J.S., Motte, C., Strong, S.A., Fiocchi, C., Strober, W., 1996 Disparate CD4⁺ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN γ , whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J. Immunol.* 157, 1261-1270
- Gary, D., Luker, J., Patrick Bardill, Julie, L., Prior, Christina, M., Pica, David Piwnica-Worms, and David, A., 2002 Leib Noninvasive bioluminescence imaging of herpes simplex virus type 1 infection and therapy in living mice. *J. of Virology* Vol. 76, No. 23, 12149-12161
- Gasparian, A.V., Yao, Y.J., Kowalczyk, D., Lyakh, L.A., Karseladze, A., Slaga, T.J., Budunova, I.V., 2002 The role of IKK in constitutive activation of NF- κ B transcription factor in prostate carcinoma cells. *J. Cell Sci.* 115, 141–151
- Greten, F.R., Eckmann, L., Greten, T.F., Park, J.M., Li, Z.W., Egan, L.J., Kagnoff, M.F., Karin, M., 2004 IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 118, 285–296
- Gonzalez, S., Rajadhyaksha, M., Rubinstein, G., Anderson, R.R., 1999 Characterization of psoriasis in vivo by reflectance confocal microscopy. *J. Med.* 30, 337-356
- Govindarajan, V.S. Turmeric-chemistry, technology, and quality., 1980 *Crit. Rev.*

Food Sci. Nutr. 12, 199-301

Hamamoto, N., Maemura, K., Hirata, I., Murano, M., Sasaki, S., Katsu, K., 1999 Inhibition of dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice by intracolonicly administered antibodies against adhesion molecules (endothelial leucocyte adhesion molecule-1 [ELAM-1] or intercellular adhesion molecule-1 [ICAM-1]). *Clin. Exp. Immunol.* 117, 462-468

Hanauer, S.B., 1996 Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 334, 841-848

Huang, T.S., Lee, S.C., Lin, J.K., 1991 Suppression of c-Jun/AP-1 activation by an inhibitor of tumor promotion in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 88, 5292-5296

Hsu, H., Xiong, J., Goeddel, D.V., 1995 The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell* 81, 495-504

Imbert, V., Rupec, R.A., Livolsi, A., Pahl, H.L., Traenckner, E.B., Mueller-Dieckmann, C., Farahifar, D., Rossi, B., Auberger, P., Baeuerle, P.A., Peyron, J.F., 1996 Tyrosine phosphorylation of I κ B- α activates NF- κ B without proteolytic degradation of I κ B- α . *Cell* 86, 787-798

Jang, C.S., 1941 The action of berberine on mammalian hearts. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1, 178-186

Jiang, M.C., Yang-Yen, H.F., Yen, J.J., Lin, J.K., 1996 Curcumin induces apoptosis in immortalized NIH 3T3 and malignant cancer cell lines. *Nutr. Cancer* 26, 111-120

Jimi, E., Saito, H., D'Acquisto, F., May, M.J., Nakamura, I., Sudo, T., Kojima, T., Okamoto, F., Fukushima, H., Okabe, K., Ohya, K., Ghosh, S., 2004 Selective inhibition of NF- κ B blocks osteoclastogenesis and prevents inflammatory destruction in vivo. *Nat. Med.* 10, 617-624

Jobin, C., Bradham, C.A., Russo, M.P., Juma, B., Narula, A.S., Brenner, D.A., Sartor, R.B., 1999 Curcumin blocks cytokine-mediated NF- κ B activation and

- proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I κ B kinase activity. *J. Immunol.* 163, 3474-3483
- Joe, B., Rao, U.J., Lokesh, B.R., 1997 Presence of an acidic glycoprotein in these rum of arthritic rats: modulation by capsaicin and curcumin. *Mol. Cell Biochem.* 169, 125-134
- Kamat, J. P., Ghosh, A., and Devasagayam, T. P., 2000 Vanillin as an antioxidant in rat liver mitochondria: Inhibition of protein oxidation and lipid peroxidation induced by photosensitization. *Mol. Cell. Biochem.* 209, 47–53
- Karin, M. and Hunter, T., 1995 Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr. Biol.* 5, 747–757
- Karin, M. and Ben-neriah, Y., 2000 Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 621–663
- Kato, T., Delhase, M., Hoffmann, A., Karin, M., 2003 CK2 is a C-terminal I κ B kinase responsible for NF- κ B activation during the UV response. *Mol. Cell* 12, 829–839
- Ken, Sugimoto, Hiroyuki Hanal, Kotaro Tozawa, Taiki Aoshi, Masato Uchijima, Toshi Nagata, and Yukio Koide, 2002 Curcumin prevents and ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *Gastroenterology* 123, 1912-1922
- Korlach, J., Schwille, P., Webb, W.W., Feigenson, G.W., 1999 Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8461-8466
- Kumar, A., Dhawan, S., Hardegen, N.J., Aggarwal, B.B., 1998 Curcumin (diferuloylmethane) inhibition of tumor necrosis factor (TNF)-mediated adhesion of monocytes to endothelial cells by suppression of cell surface expression of adhesion molecules and of nuclear factor- κ B activation. *Biochem. Pharmacol.* 55, 775-783
- Lin, R., Beauparlant, P., Makris, C., Meloche, S., Hiscott, J., 1996 Phosphorylation of

- I κ B- α in the C-terminal PEST domain by casein kinase II affects intrinsic protein stability. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1401–1409
- Lomascolo, A., Stentelaire, C., Asther, M., Lesage-Meessen, L., 1999 Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. *Trends. Biotechnol.* 17, 282–289.
- Lo'pez-Malo, A., Alzamora, S.M., Argaiz, A., 1998 Vanillin and pH synergistic effects on mould growth. *J. Food Sci.* 63, 143–146
- Mahmood, U., Tung, C.H., Bogdanov, A. Jr, Weissleder, R., 1999 Near-infrared optical imaging of protease activity for tumor detection. *Radiology* 213, 866-870
- Marok, R., Winyard, P.G., Coumbe, A., Kus, M.L., Gaffney, K., Blades, S., Mapp, P.I., Morris, C.J., Blake, D.R., Kaltschmidt, C., Baeuerle, P.A., 1996 Activation of the transcription factor nuclear factor- κ B in human inflamed synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 39, 583–591
- Masters, B.R., So, P.T., Gratton, E., 1997 Multiphoton excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of in vivo human skin. *Biophys. J.* 72, 2405-2412
- May, M.J., D'Acquisto, F., Madge, L.A., Glockner, J., Pober, J.S., Ghosh, S., 2000 Selective inhibition of NF- κ B activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the I κ B kinase complex. *Science* 289, 1550–1553
- McElhinny, J.A., Trushin, S.A., Bren, G.D., Chester, N., Paya, C.V., 1996 Casein kinase II phosphorylates I κ B- α at S-283, S-289, S-293, and T-291 and is required for its degradation. *Mol. Cell. Biol.* 16, 899–906
- McIntyre, K.W., Shuster, D.J., Gillooly, K.M., Dambach, D.M., Pattoli, M.A., Lu, P., Zhou, X.D., Qiu, Y., Zusi, F.C., Burke, J.R., 2003 A highly selective inhibitor of I κ B kinase, BMS-345541, blocks both joint inflammation and destruction in collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 48, 2652–2659
- Monsky, W.L., Fukumura, D., Gohongi, T., 1999 Augmentation of transvascular

- transport of macromolecules and nanoparticles in tumors using vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* 59, 4129-4135
- Muheim, A., Lerch, K., 1999 Towards a high-yield conversion of ferulic acid to vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 456–461.
- Neurath, M.F., Pettersson, S., Meyerzum Buschenfelde, K.H., Strober, W., 1996 Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF- κ B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat. Med.* 2, 998-1004
- Ntziachristos, V., Yodanis, C.L., Schnall, M., Chance, B., 2000 Concurrent MRI and diffuse optical tomography of breast after indocyanine green enhancement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 97, 2767-2772
- Parronchi, P., Romagnani, P., Annunziato, F., Sampognaro, S., Becchio, A., Giannarini, L., Maggi, E., Pupilli, C., Tonelli, F., Romagnani, S., 1997 Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am. J. Pathol.* 150, 823-832
- Pikarsky, E., Porat, R.M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Gukhovskiy, E., Urieli-Shoval, S., Galun, E., Ben-Neriah, Y., 2004 NF- κ B functions as a tumor promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431, 461–466
- Rajadhyaksha, M., Grossman, M., Esterowitz, D., Webb, R.H., Anderson, R.R., 1995 In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast. *J. Invest. Dermatol.* 104, 946-952
- Rao, S. R., and Ravishankar, G. A., 2000 Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes. *J. Sci. Food Agric.* 80, 289–304
- Robe, P.A., Bentires-Alj, M., Bonif, M., Rogister, B., Deprez, M., Haddada, H., Khac, M.T., Jolles, O., Erkmen, K., Merville, M.P., Black, P.M., Bours, V., 2004 In vitro and in vivo activity of the nuclear factor- κ B inhibitor sulfasalazine in human

- glioblastomas. *Clin. Cancer Res.* 10, 5595–5603
- Roda, A., Pasini, P., Baraldini, M., Musiani, M., Gentilomi, G., Robert, C., 1998 Chemiluminescent imaging of enzyme-labeled probes using an optical microscope-videocamera luminograph. *Anal. Biochem.* 257, 53–62
- Romieu-Mourez, R., Landesman-Bollag, E., Seldin, D.C., Traish, A.M., Mercurio, F., Sonenshein, G.E., 2001 Roles of IKK kinases and protein kinase CK2 in activation of nuclear factor- κ B in breast cancer. *Cancer Res.* 61, 3810–3818
- Ruby, A.J., Kuttan, G., Babu, K.D., Rajasekharan, K.N., Kuttan, R., 1995 Antitumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Lett.* 94, 79-83
- Scheinman, R.I., Gualberto, A., Jewell, C.M., Cidlowski, J.A., Baldwin, A.S., 1995 Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF- κ B by activated glucocorticoid receptors. *Mol. Cell Biol.* 15, 943-953
- Schoonbroodt, S., Ferreira, V., Best-Belpomme, M., Boelaert, J.R., Legrand-Poels, S., Korner, M., Piette, J., 2000 Crucial role of the amino-terminal tyrosine residue 42 and the carboxyl-terminal PEST domain of I κ B- α in NF- κ B activation by an oxidative stress. *J. Immunol.* 164, 4292–4300
- Schwarz, E.M., Van Antwerp, D., Verma, I.M., 1996 Constitutive phosphorylation of I κ B- α by casein kinase II occurs preferentially at serine 293: requirement for degradation of free I κ B- α . *Mol. Cell. Biol.* 16, 3554–3559
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C., Karin, M., 2001 Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science* 293, 1495–1499
- Siegel, A.M., Marota, J.J., Boas, D.A., 1999 Design and evaluation of a continuous-wave diffuse optical tomography system. *Optics Express* 4, 287-298
- Singh, A.K., Sidhu, G.S., Deepa, T., Maheshwari, R.K., 1996 Curcumin inhibits the proliferation and cell cycle progression of human umbilical vein endothelial cell.

Cancer Lett. 107, 109-115

Singh, S., Aggarwal, B.B., 1995 Activation of transcription factor NF- κ B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane). *J. Biol. Chem.* 270, 24995-25000

So, P.T., Konig, K., Berland, K., Konig, K., Berland, K., Dong, C.Y., French, T., Buhler, C., Ragan, T., Gratton, E., 1998 New time-resolved techniques in two-photon microscopy. *Cell Mol. Biol. (Noisy-legrand)* 44, 771-793

Sreenivasan, Y., Sarkar, A., Manna, S.K., 2003 Mechanism of cytosine arabinosidemediated apoptosis: role of Rel A (p65) dephosphorylation. *Oncogene* 22, 4356-4369

Strober, W., Fuss, IJ., Ehrhardt, R.O., Neurath, M., Boirivant, M., Ludviksson, B.R., 1998 Mucosal immunoregulation and inflammatory bowel disease: new insights from murine models of inflammation. *Scand. J. Immunol.* 48, 453-458

Takada, Y., Mukhopadhyay, A., Kundu, G.C., Mahabeleshwar, G.H., Singh, S., Aggarwal, B.B., 2003 Hydrogen peroxide activates NF- κ B through tyrosine phosphorylation of I κ B- α and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I κ B- α kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 278, 24233-24241

Viatour, P., Dejardin, E., Warnier, M., Lair, F., Claudio, E., Bureau, F., Marine, J.C., Merville, M.P., Maurer, U., Green, D., Piette, J., Siebenlist, U., Bours, V., Chariot, A., 2004 GSK3-mediated BCL-3 phosphorylation modulates its degradation and its oncogenicity. *Mol. Cell* 16, 35-45

Wahl, C., Liptay, S., Adler, G., Schmid, R.M., 1998 Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J. Clin. Invest.* 101, 1163-1174

Walton, N. J., Mayer, M. J., and Narbad, A., 2003 Vanillin. *Phytochemistry* 63, 505-515

Weber, C.K., Liptay, S., Wirth, T., Adler, G., Schmid, R.M., 2000 Suppression of

- NF- κ B activity by sulfasalazine is mediated by direct inhibition of I κ B kinases α and β . *Gastroenterology* 119, 1209-120-18
- Weissleder, R., Tung, C.H., Mahmood, U., Bogdanov, A Jr., 1999 In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes. *Nat. Biotechnol.* 17, 375-378
- Xiao, G., Cvijic, M.E., Fong, A., Harhaj, E.W., Uhlik, M.T., Waterfield, M., Sun, S.C., 2001 Retroviral oncoprotein Tax induces processing of NF- κ B2/p100 in T cells: evidence for the involvement of IKK α . *EMBO J.* 20, 6805–6815
- Xiao, G., Fong, A., Sun, S.C., 2004 Induction of p100 processing by NF- κ B-inducing kinase involves docking I κ B kinase α (IKK α) to p100 and IKK mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 279, 30099–30105
- Xiao, G., Harhaj, E.W., Sun, S.C., 2001 NF- κ B-inducing kinase regulates the processing of NF- κ B2/p100. *Mol. Cell* 7, 401–409
- Xu, Y.X., Pindolia, K.R., Janakiraman, N., Noth, C.J., Chapman, R.A., Gautam, S.C., 1997 Curcumin, a compound with anti-inflammatory and anti-oxidant properties, down-regulates chemokine expression in bone marrow stromal cells. *Exp. Hematol.* 25, 413-422
- Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S.T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H.E., Kay, R.J., Israel, A., 1998 Complementation cloning of NEMO, a component of the I κ B kinase complex essential for NF- κ B activation. *Cell* 93, 1231–1240
- Yang, J., Fan, G.H., Wadzinski, B.E., Sakurai, H., Richmond, A., 2001 Protein phosphatase 2A interacts with and directly dephosphorylates RelA. *J. Biol. Chem.* 276, 47828–47833
- Zandi, E., Rothwarf, D.M., Delhase, M., Hayakawa, M., Karin, M., 1997 The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell* 91, 243–252

作者簡歷

姓名：傅書琴

民國 69 年 5 月 26 日生

出生地：台中縣

學歷：台中縣立潭子國小

台中縣立潭子國中

私立輔英科技大學五專部

私立元培技術學院二技部

中國醫藥大學基礎醫學研究所

