

# 調控 SARS 病毒感染引起免疫反應的中草藥開發

主持人：鍾景光

## 本計劃分為五個部分

- 一. 檢測三黃瀉心湯及 Aloe-emodin、Berberine 對老鼠血球細胞的增生
- 二. 檢測三黃瀉心湯及 Aloe-emodin、Berberine 對吞噬細胞吞食作用的影響
- 三. 測 Natural killer cell 的毒殺作用是否能受三黃瀉心湯及 Aloe-emodin、Berberine 所影響
- 四. 檢測 Macrophage 和 Lymphocyte 所分泌的 cytokines 和 chemokines 能否被三黃瀉心湯及 Aloe-emodin、Berberine 所影響
- 五. 檢測 myeloid cells (monocyte 和 neutrophils) 的 receptor (CD13) 表現是否受到三黃瀉心湯及 Aloe-emodin、Berberine 的影響

## 第一期結果摘錄(九月份/92 年)

### 初步結果

目前已進行的實驗有第一、二、三部分，第四和第五部分在進行中。

1. 首先發現三黃的成份 Aloe-emodin、Emodin、Rhein 和 Berberine 在 In Vitro 的實驗會抑制老鼠的白血球細胞的增生，而且此抑制有劑量依成性的影響 (Dose-dependent effect)。另外 Baicalin、Baicalein 和 Wogonin 的實驗則在進行中。  
另外有關在 In Vivo 則白血球細胞影響目前尚未進行，等向國科會訂的老鼠到達之後就會立刻開始。這三個部分實驗應該可以按預定的時間內完成。
2. 依目前先進行 In Vitro 對 Macrophage 吞噬作用，也就是把老鼠白血球細胞分離收集 Macrophage，然後有無加入不同濃度的 Aloe-emodin、Emodin，經過不同時間培養後，分別加入已用螢光標定好的 E. coli 作為 Macrophage 吞噬的抗原 (antigen)，然後利用流氏細胞計數儀來檢測吞噬細胞吞噬的百分比，結果發現在 In Vitro Aloe-emodin、Emodin、Rhein 和 Berberine 的實驗影響到 Macrophage 的吞噬作用。目前實驗正在進行有關 Baicalin、Baicalein 和 Wogonin 的實驗分別在 In Vitro 中的影響也在等向國科會訂的老鼠到達再進行。
3. 有關 Natural killer cells 的毒殺作用，在 In Vitro 實驗的結果，Aloe-emodin、Emodin 和 Rhein 確實能影響到細胞的作用。另外 Berberine、Baicalin、Baicalein 和 Wogonin 的實驗目前正在進行中。In Vivo 的實驗

正在等待國科會老鼠，待老鼠來時，實驗就會進行。這部分的研究應該可以在預定時間內完成。

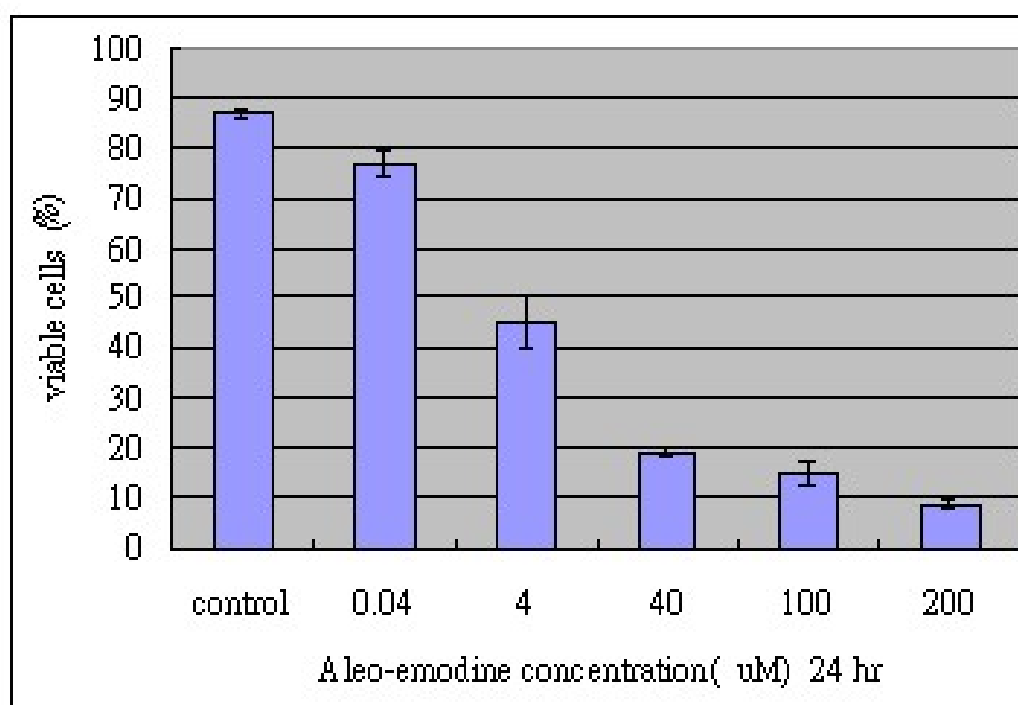
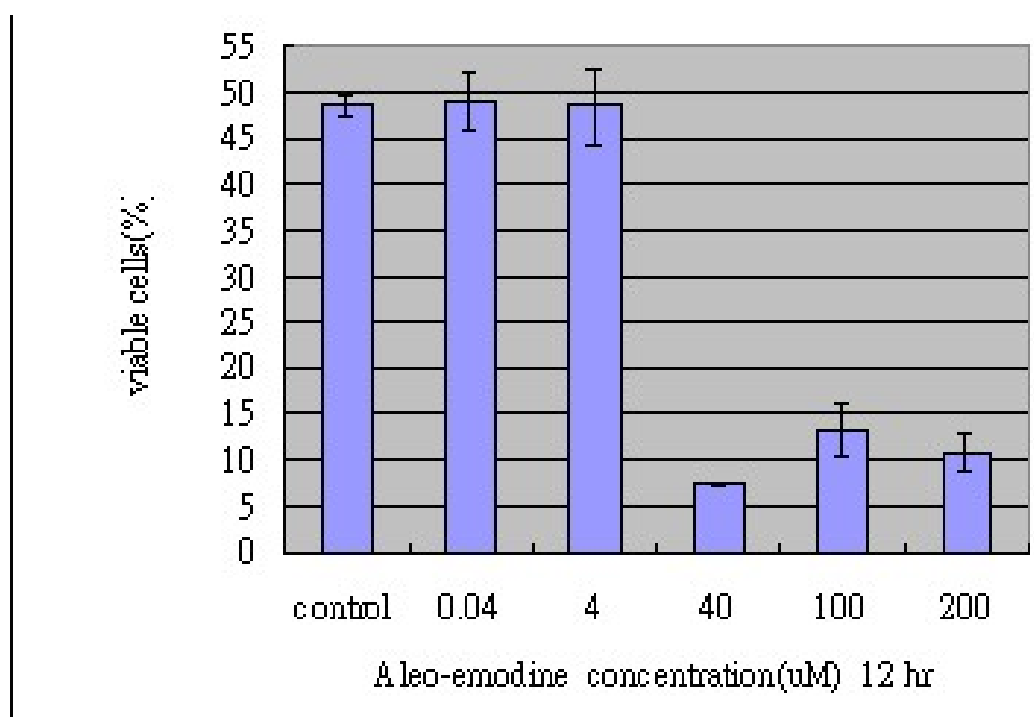
4. 第四和第五部分，In Vitro 實驗現在進行中，將老鼠白血球細胞中的 Macrophage 取出，然後再分別有無加入不同濃度 Aloe-emodin 和 Emodin，然後再定量 RNA 作 cDNA 和 PCR，再檢測  $\beta$ -actin 然後再作 CD13 mRNA 量的變化。目前研究正在進行中，而且 PCR 也會同時檢測 IL-1、IL-6、IL-8 和  $\beta$ -TLF，因為這些 Lytokines 和發燒有關。  
另外 Berberine、Baicalin、Baicalein 和 Wogonin 也正在製備中。同時 In Vivo 實驗也在等國科會的老鼠到達後再進行。

## 第二期結果摘錄 (十月份/92 年)

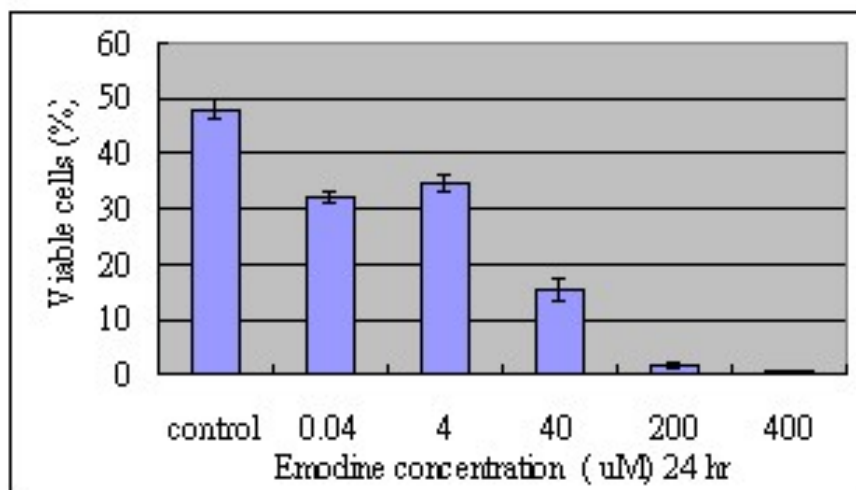
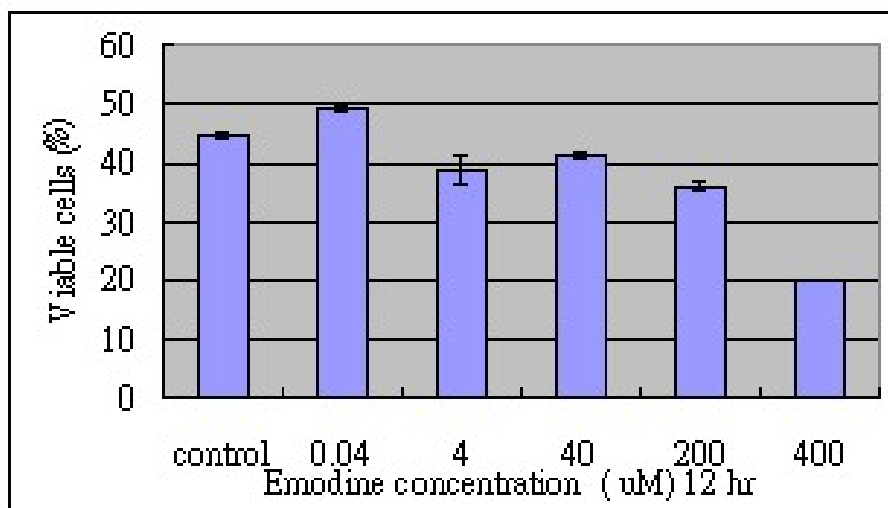
### 檢測一 . 三黃瀉心湯及 Aloe-emodin, Berberine 對老鼠血球

#### 細胞的增生

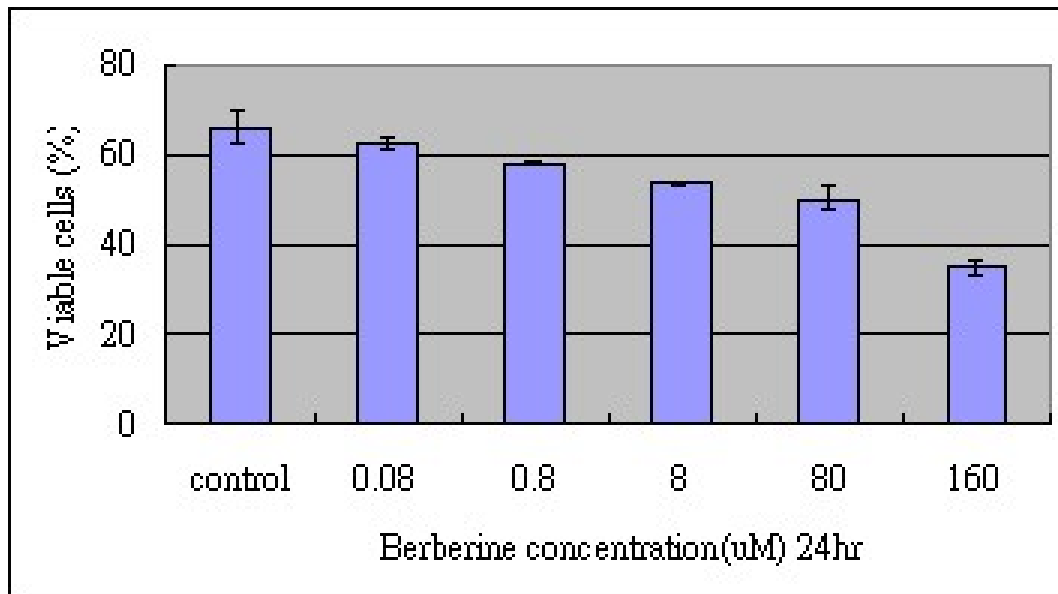
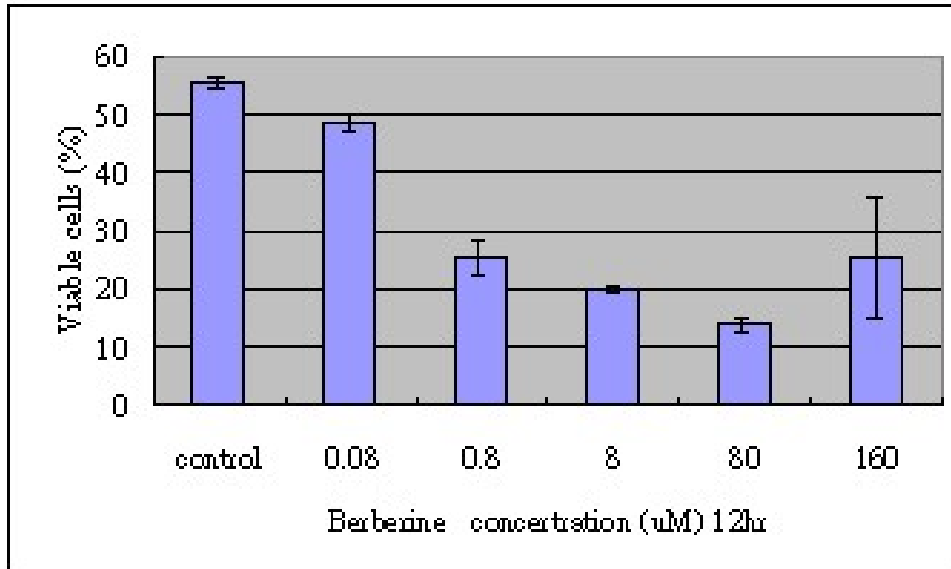
##### Aloe-emodin



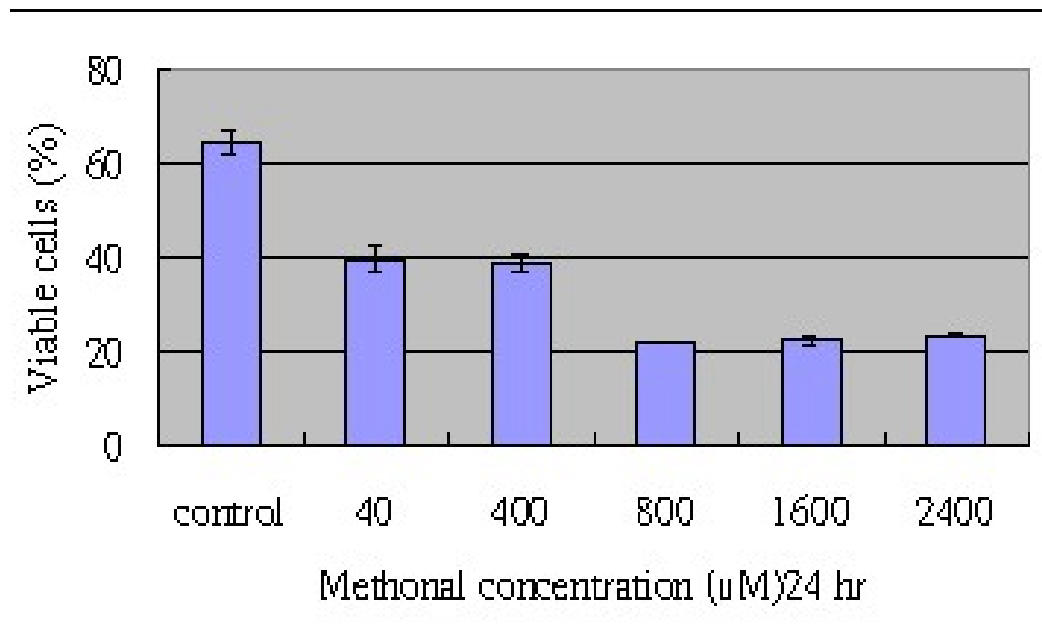
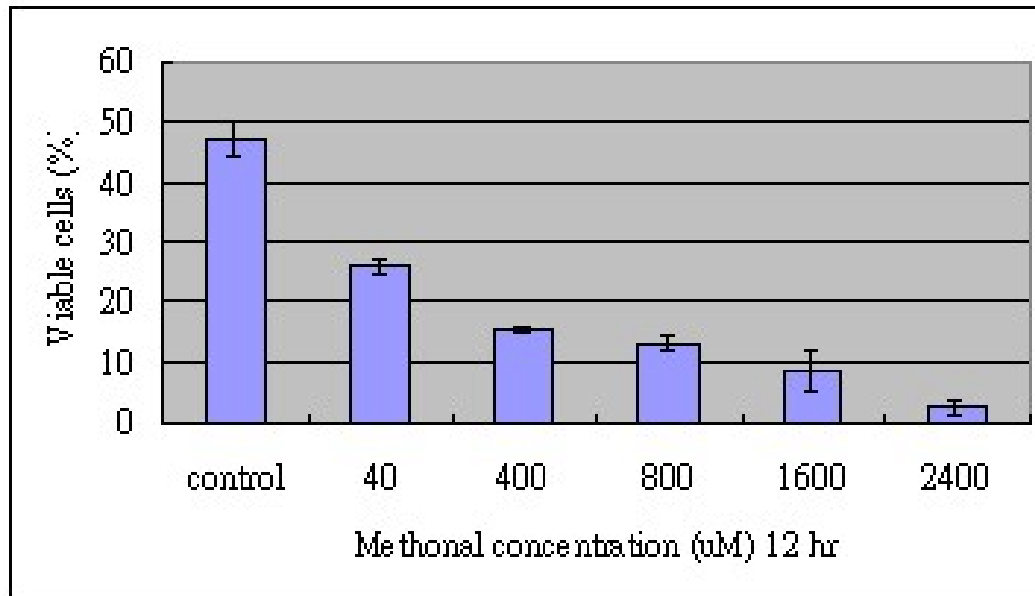
## Emodin



## Berberine

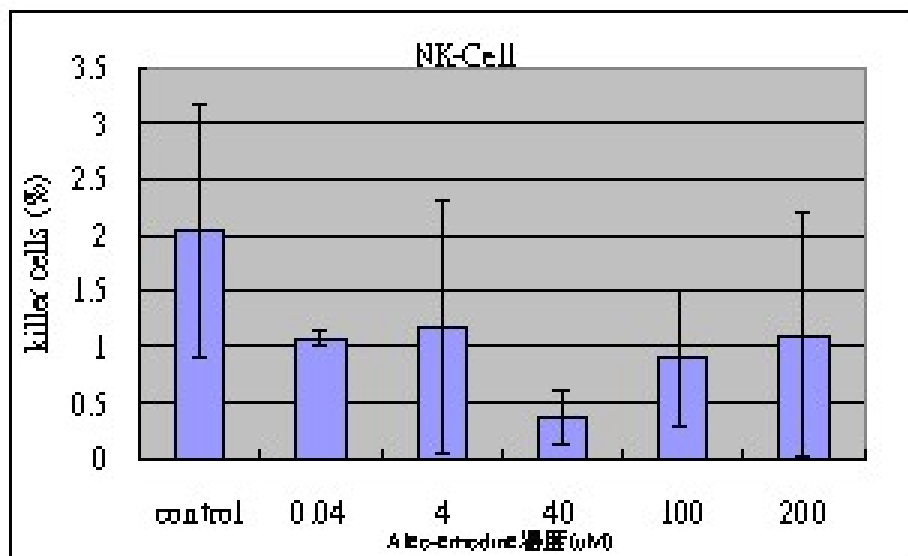


## Menthol

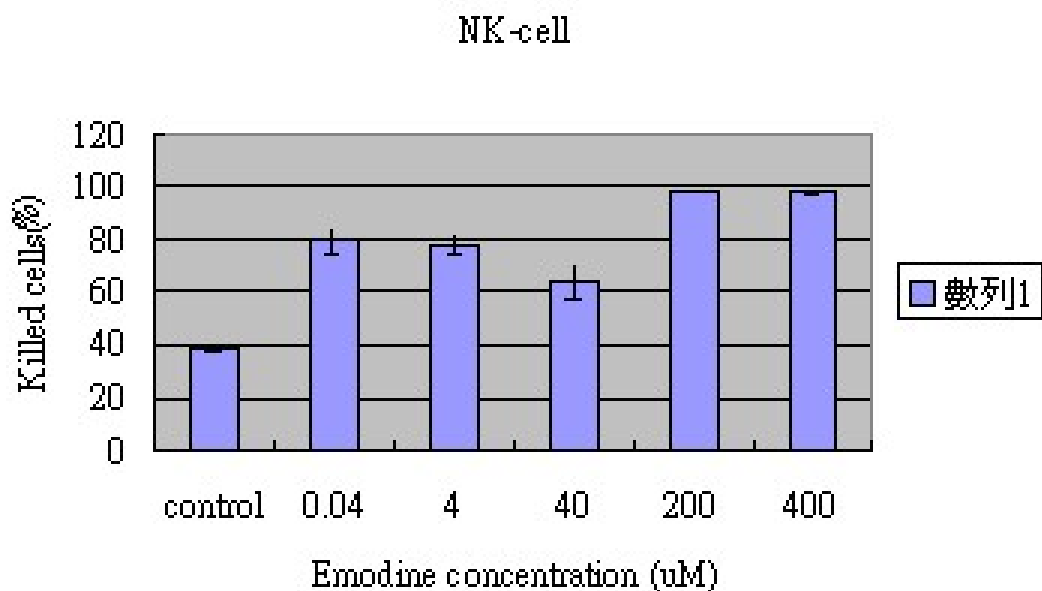


## 檢測二 Natural killer cell 的毒殺作用是否能受三黃瀉心湯及 Aloe-emodin、Berberine 所影響

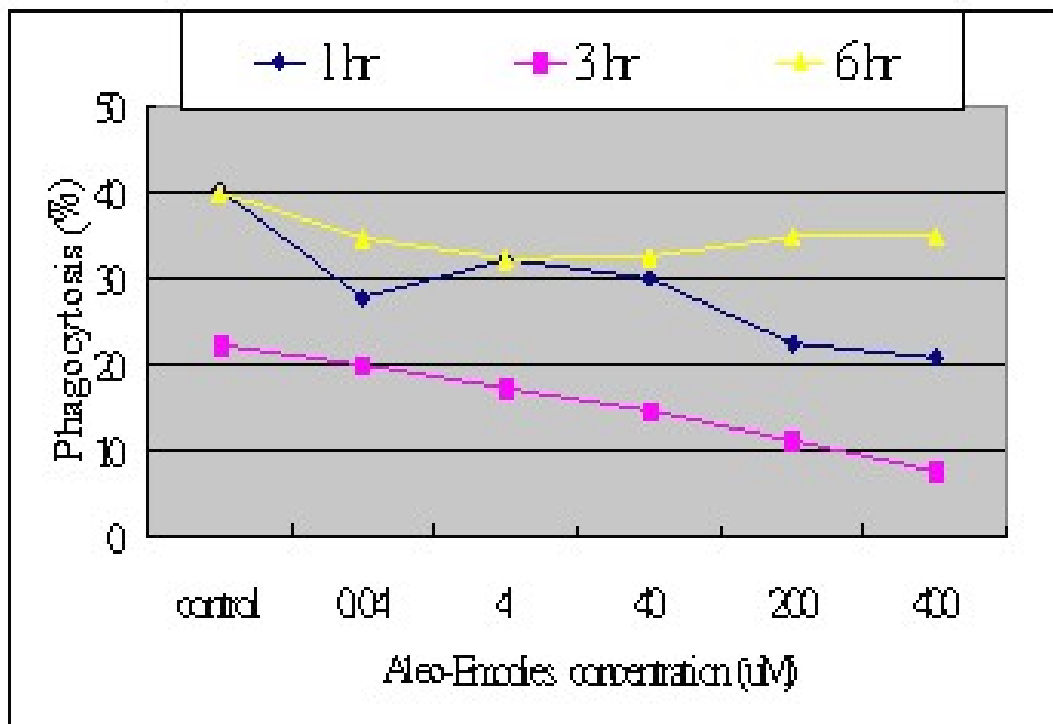
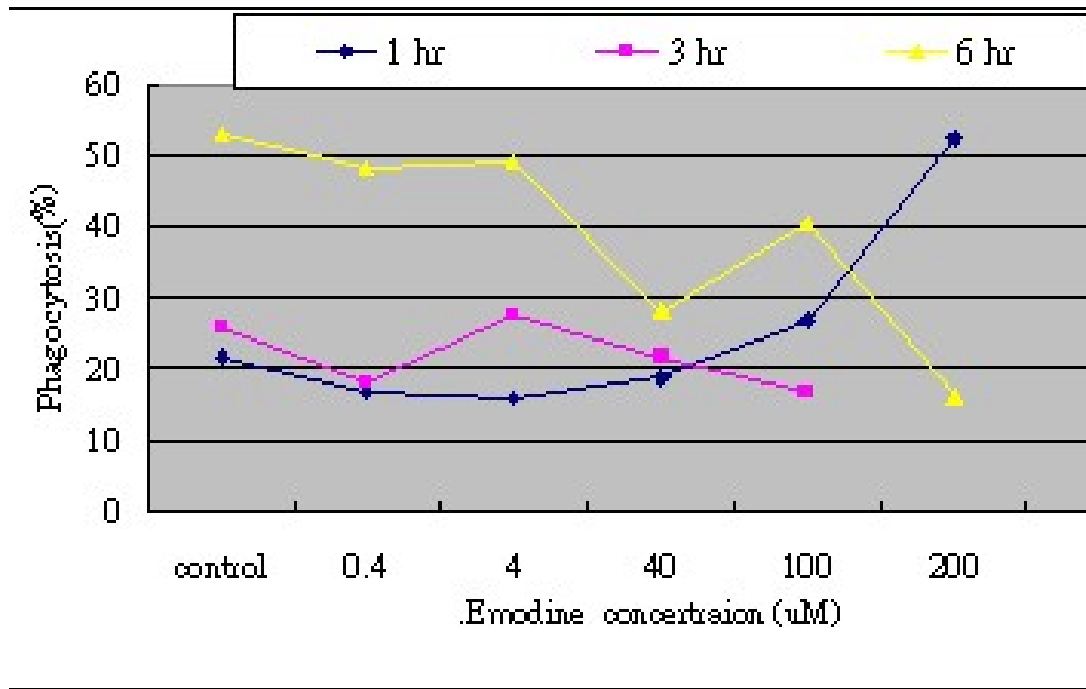
### Aloe-emodin



### Emodin



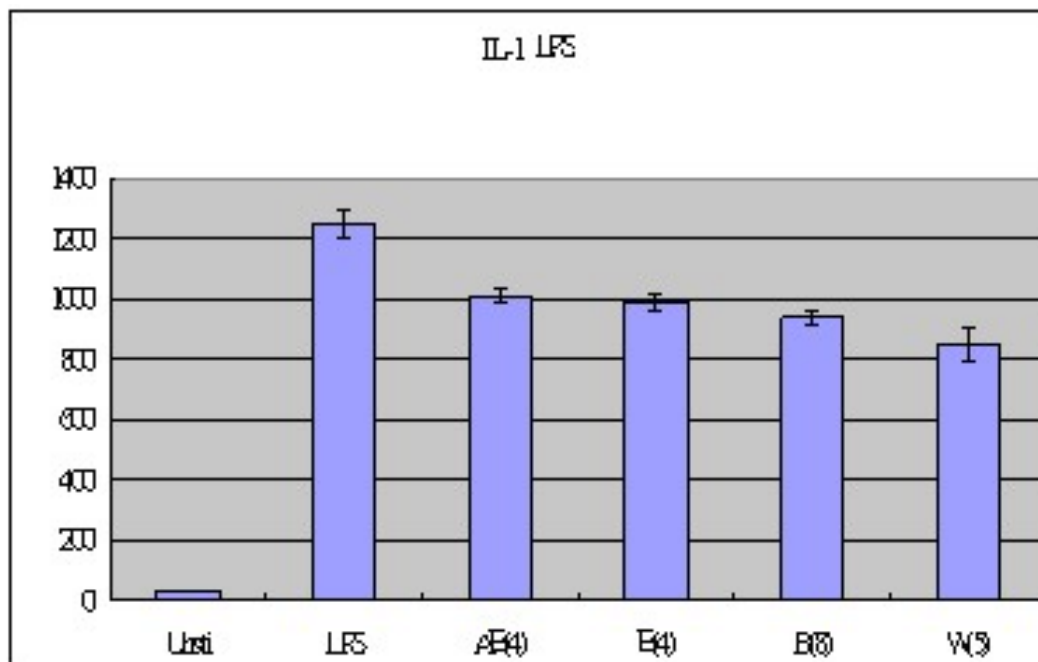
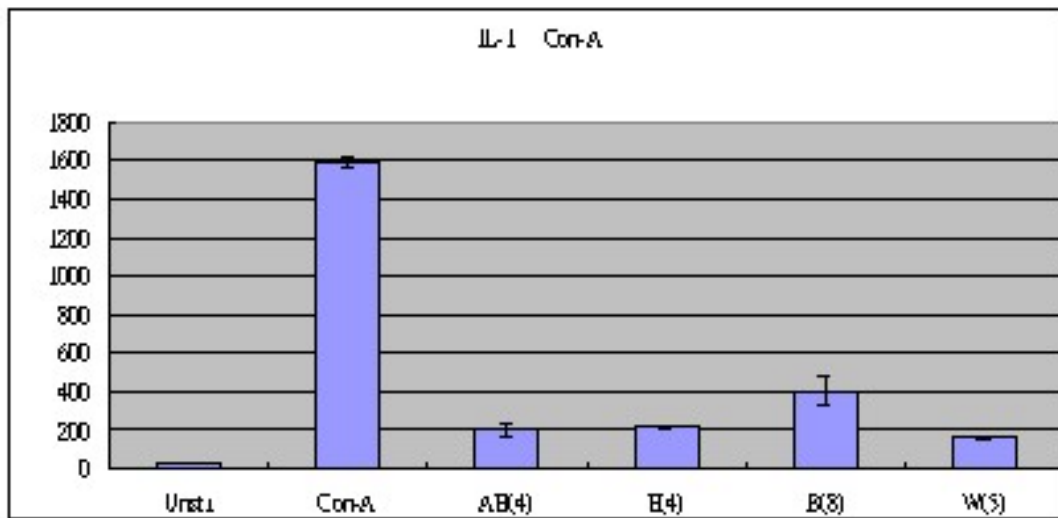
檢測三. 三黃瀉心湯及 Aloe-emodin、Berberine 對吞噬細胞吞食作用的影響

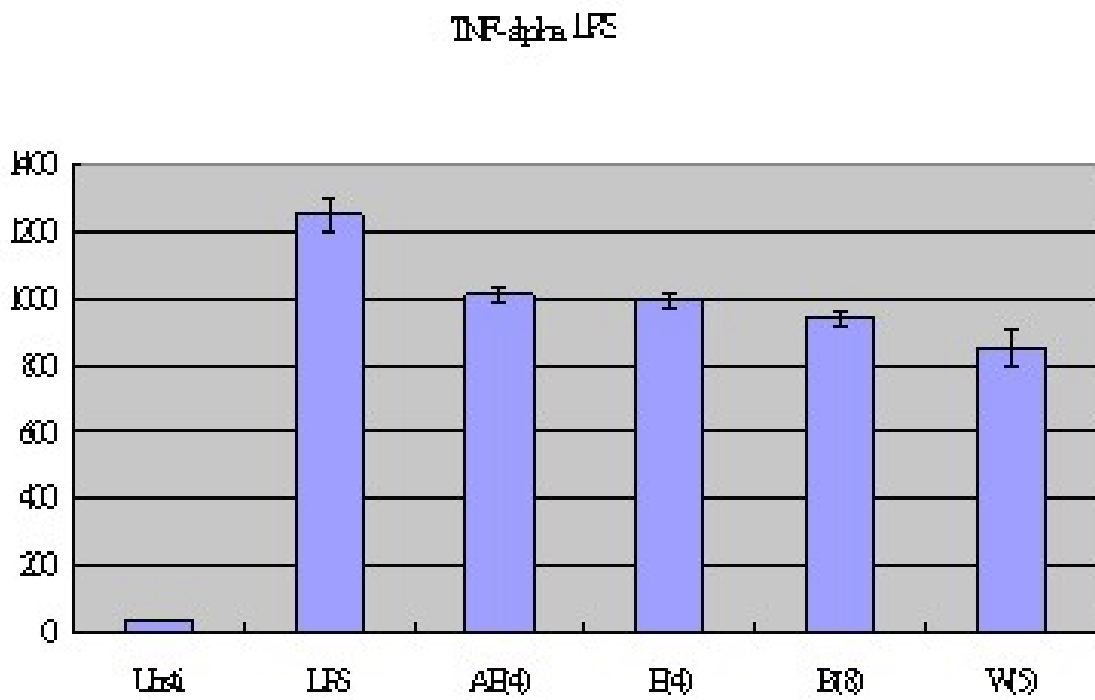
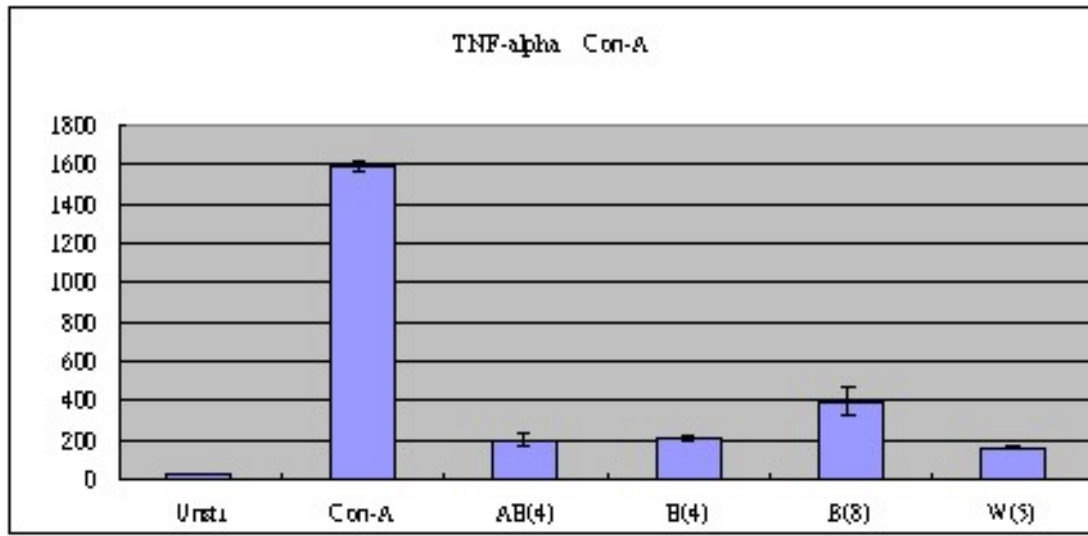




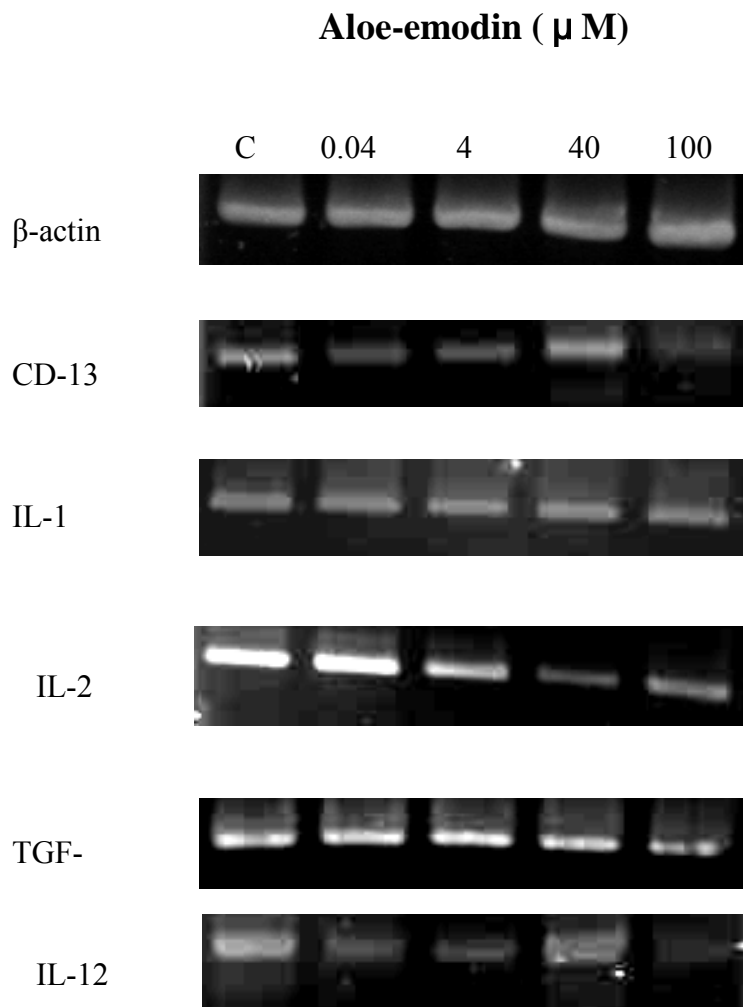
檢測四. Macrophage 和 Lymphocyte 所分泌的 cytokines 和 chemokines 能否被三黃瀉心湯及 Aloe-emodin、Berberine 所影

響

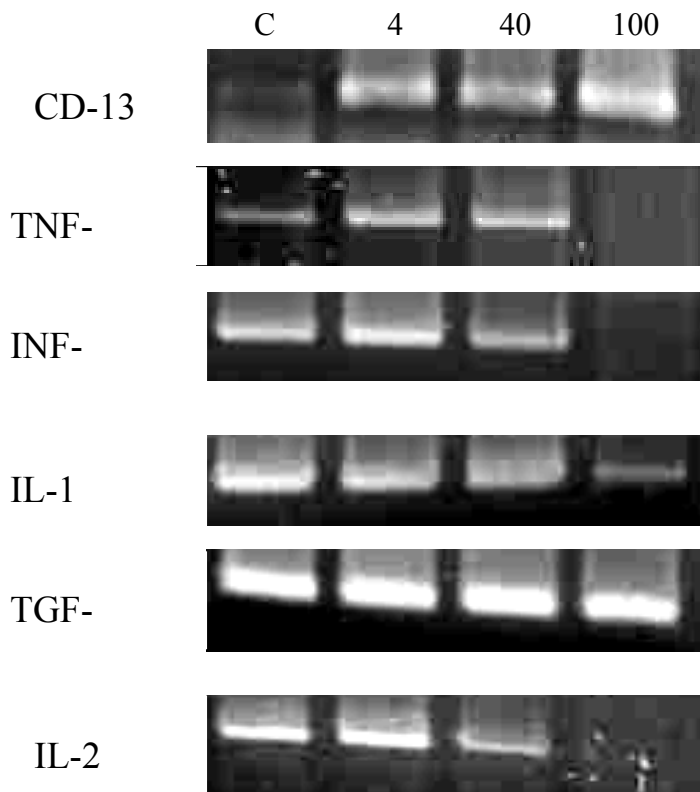




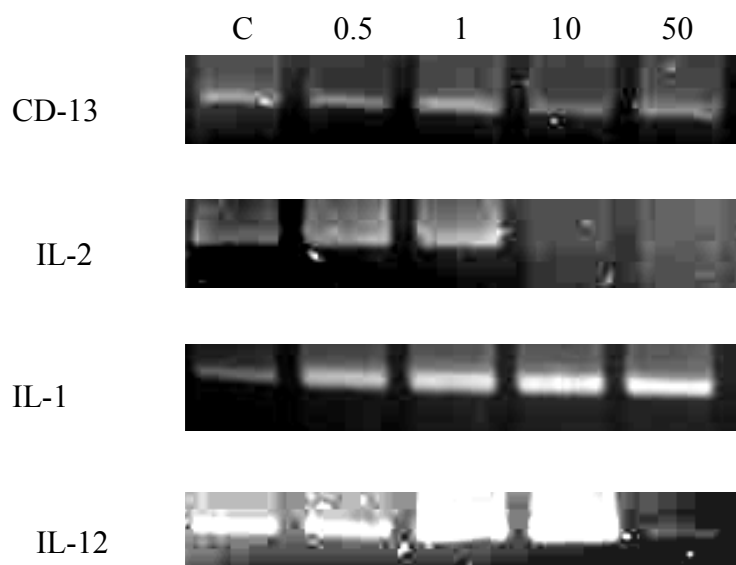
檢測五. myeloid cells (monocyte 和 neutrophils)的 receptor  
(CD13)表現是否受到三黃瀉心湯及 Aloe-emodin、 Berberine 的  
影響



### Emodin( $\mu$ M)



### Wogonin( $\mu$ M)

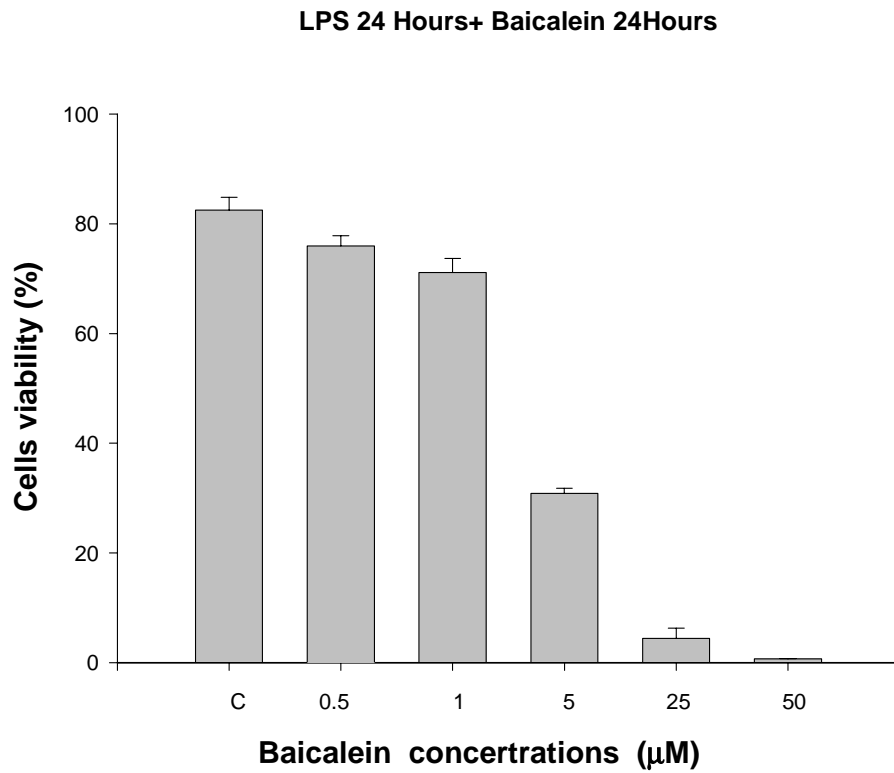
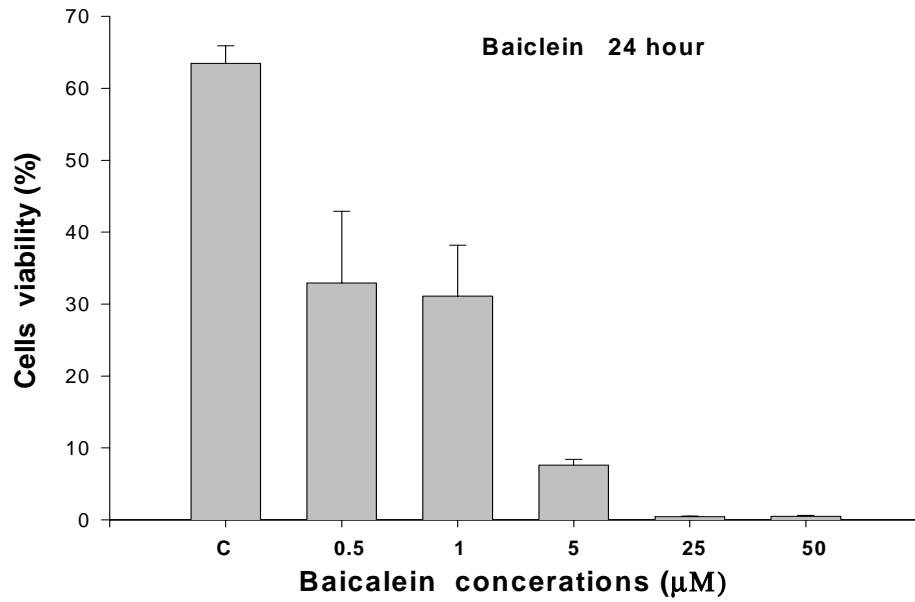


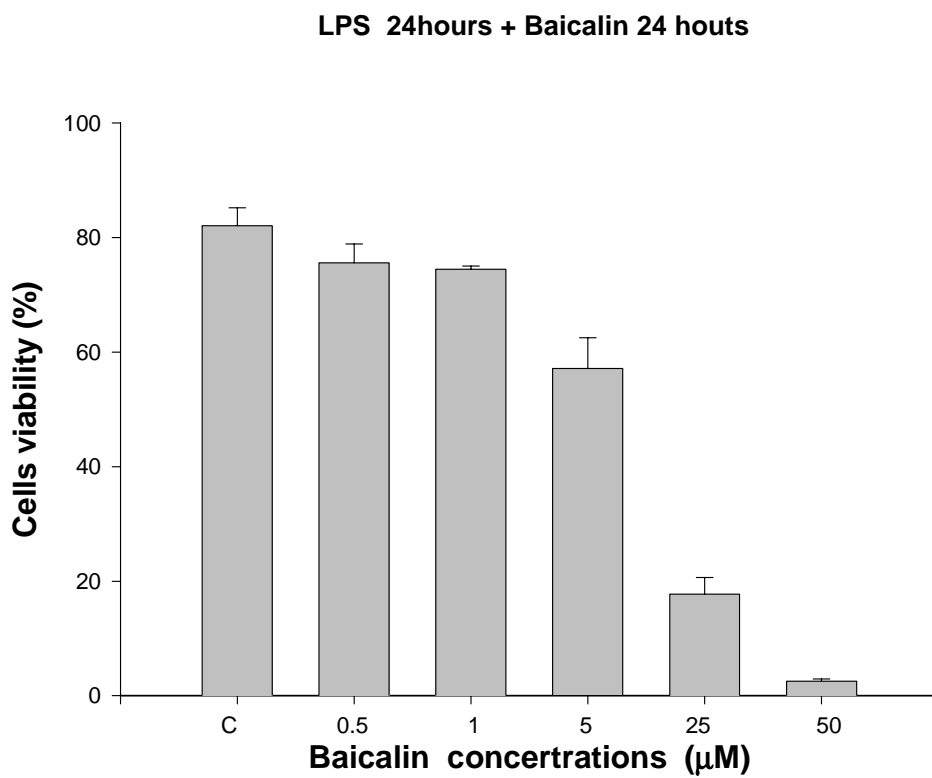
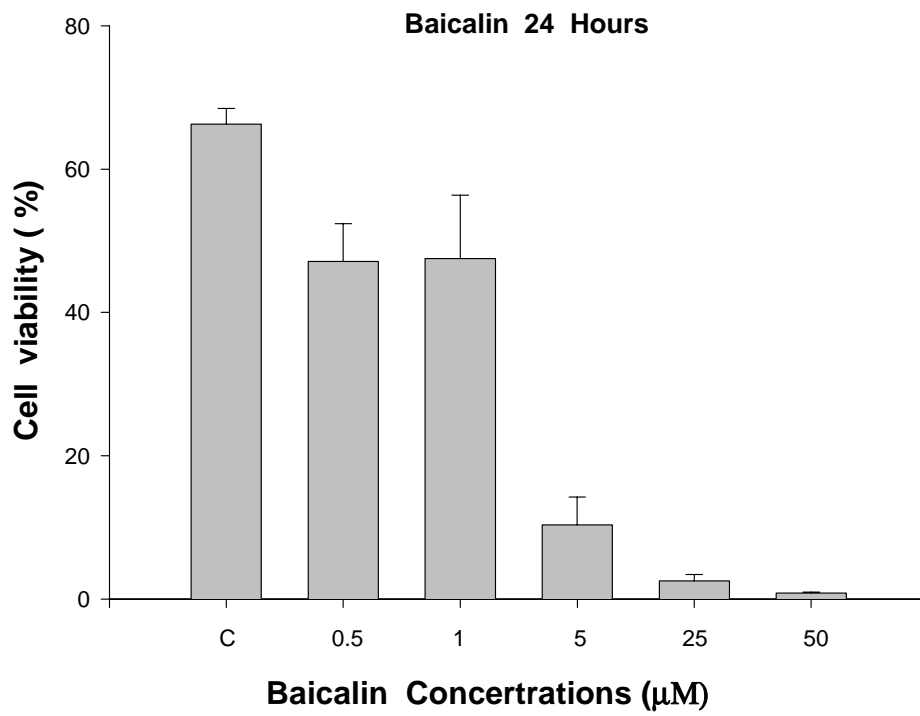
目前正在進行中的實驗仍利用二黃瀉心湯對老鼠細胞  
和體內餵食的影響

1.繼續完成細胞毒性和增生的檢測

2.PCR 的實驗繼續進行有關這些成分對 cytokines 和  
CD-13 的影響

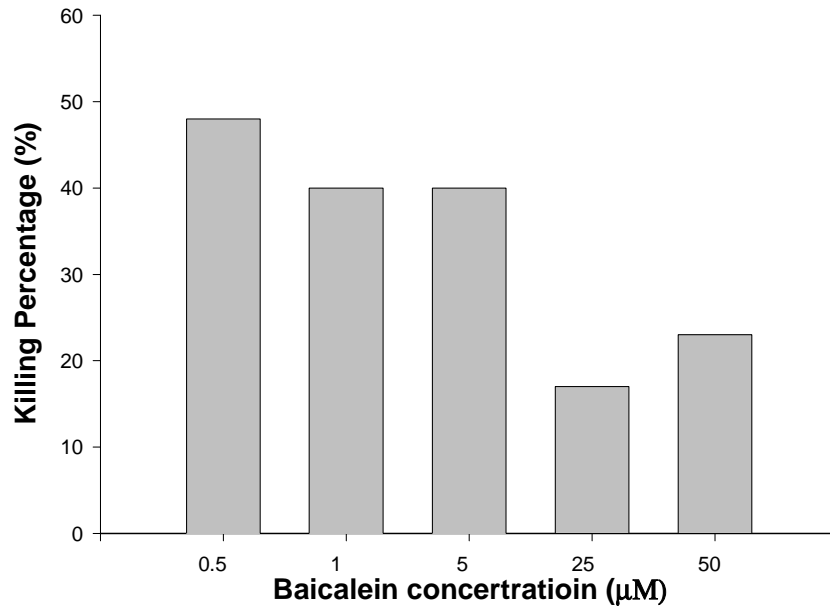
### 第三期結果摘錄 (十月份/92 年) (10/24/2003)



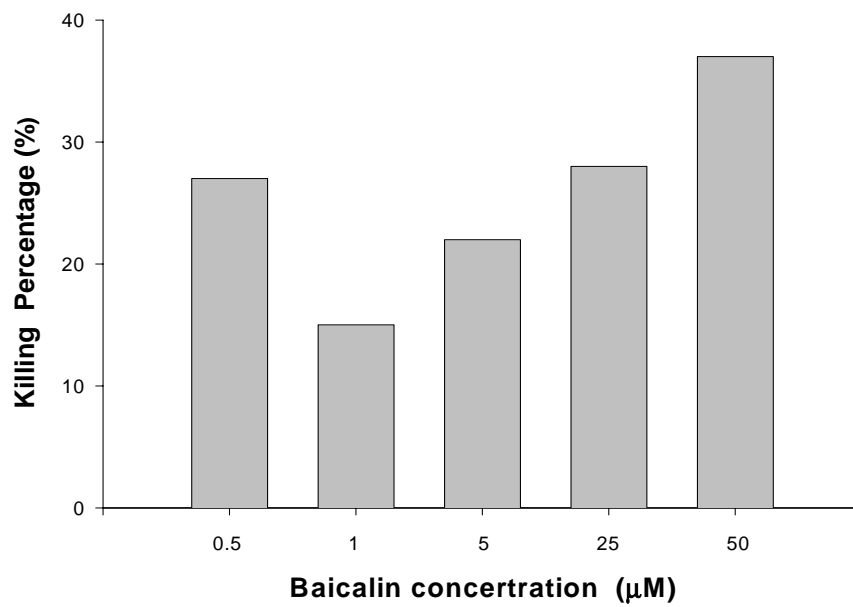


# Natural killer cell 的毒殺作用是否能受三黃瀉心湯及 Baicalein、Baicalin 所影響

Baicalein 24Hours



Baicalin 24Hours





## 第四期結果摘錄 (十一月二月份/92年) (12/10/2003)

本研究十二月份的實驗首先利用三黃瀉心湯和二黃瀉心湯來檢測動物體內和體外對免疫功能和細胞反應相關的細胞因子 (cytokines) 的量和相關基因的表現。實驗過程簡述如下：首先由國科會取得的 SD 老鼠將 24 隻老鼠經由分成三組，每組 8 隻，分為第一組控制組 (未餵食檢測的藥物)、第二組餵食三黃瀉心湯、第三組餵食二黃瀉心湯 (缺少其中一黃)。每天經由口腔灌食 5g/1Kg，連續 4 個星期之後，再經由心臟抽血後，檢測：一、吞噬細胞對酵母菌毒性作用經由流式細胞計數儀分析；二、NK 細胞對細胞毒殺作用(利用 K562 血球細胞接螢光作為 Target 細胞) 經由流式細胞計數儀分析；三、對 T 和 B 細胞的增生作用的檢測經由 Trypan blue stain 來計數；四、再把淋巴球細胞分別抽取 total RNA 作相關基因表現的影響利用 PCR 反應來檢測；五、檢測細胞分泌細胞因子(Cytokines) 的影響利用 ELISA Reader 來檢測。

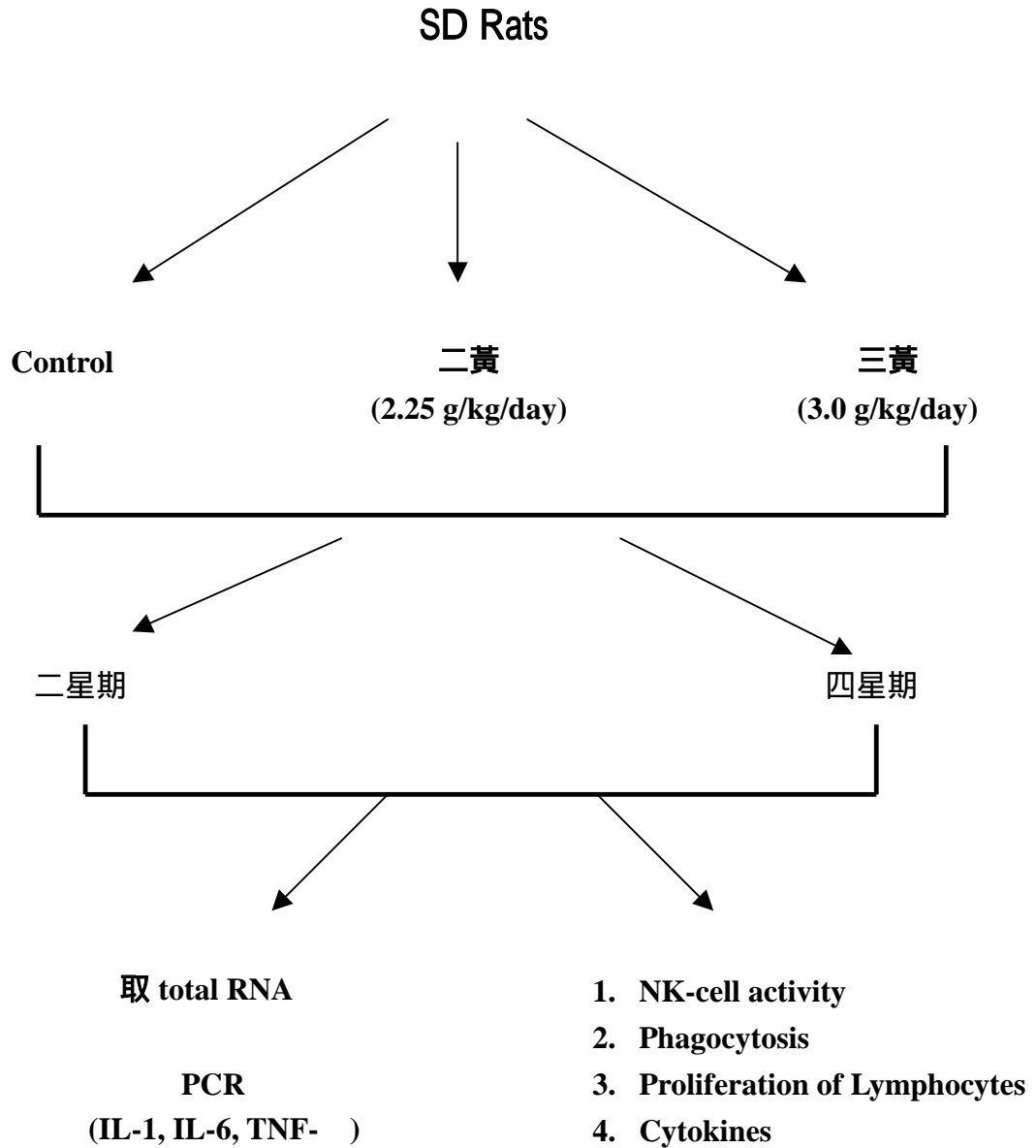
經由統計分析所得的實驗數據初步結果顯示，1.三黃和二黃瀉心湯經由餵食 SD 老鼠四個星期後，對 Macrophages 的吞噬作用的影響與控制組比較顯示沒有統計上有差別的意義。但對 NK 細胞(毒殺 K562 血球細胞)的毒殺作用與控制組比較確實提昇該細胞的功能且具有統計上差別的意義。目前正在進行相關 Cytokines 例如 IL-1、IL-6、 $\gamma$ -TNF 在血清中表現有否受影響及抽取 RNA 相關基因表現受影響。

三黃瀉心湯成分之一 Baicaein 和 Baicalin，經由 PCR 檢測基因表現發現 Baicalin 對 IL-1 的有影響，IL-6、 $\gamma$ -TNF、 $\alpha$ -TNF 的結果也發現沒有影響，但是對 IK- $\beta$  基因表現有影響。對於 IL-12 則有促進該基因表現的作用。此 IL-12 會促進 TC 和 NK 細胞的毒殺作用，此在 In vivo 餵食三黃瀉心湯和二黃瀉心湯，經過四個星期連續餵食後檢測，淋巴球的毒殺作用確實有統計上意義的增強作用，在 In vitro 證明提昇 IL-12，則此為在 In vivo 會增強其毒殺結果的佐證。

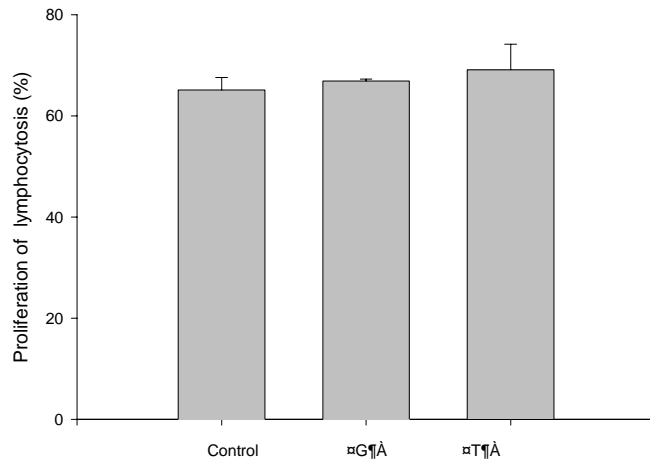
同樣的實驗結果發現 Baicalin 對 IL-1 則有抑制其表現，但對 IL-6 則有促進基因的表現。但對  $\gamma$ -TNF、 $\alpha$ -TNF 兩者則沒有影響，IK- $\beta$ 、Nk- 則沒有影響。

目前實驗正在進行三黃瀉心湯和二黃瀉心湯對免疫細胞相關基因的影響。

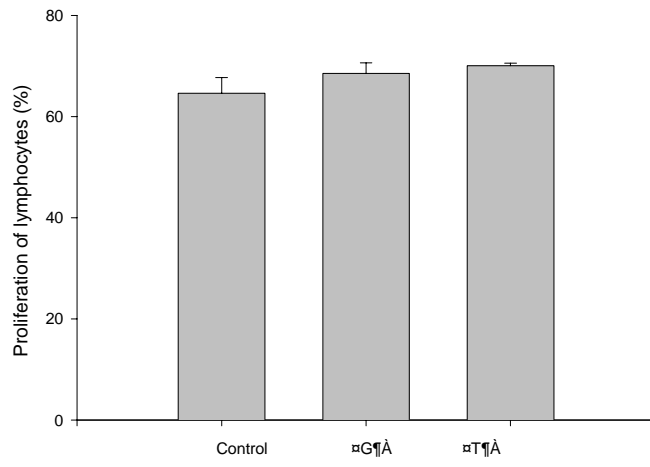
# 第五期結果摘錄 (一月份 /93 年) (1/10/2004)



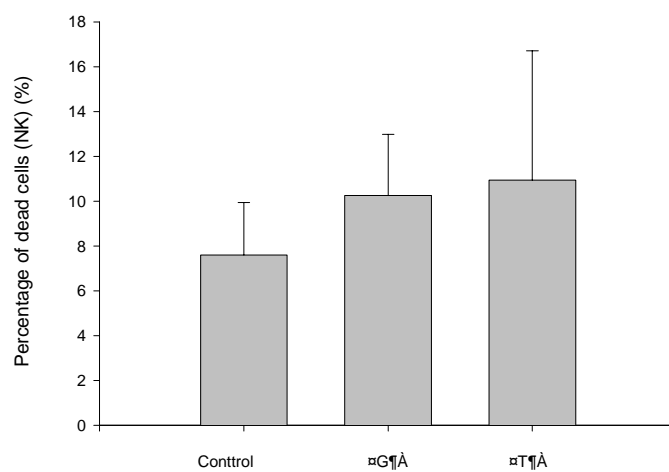
### Con-A 4weeks



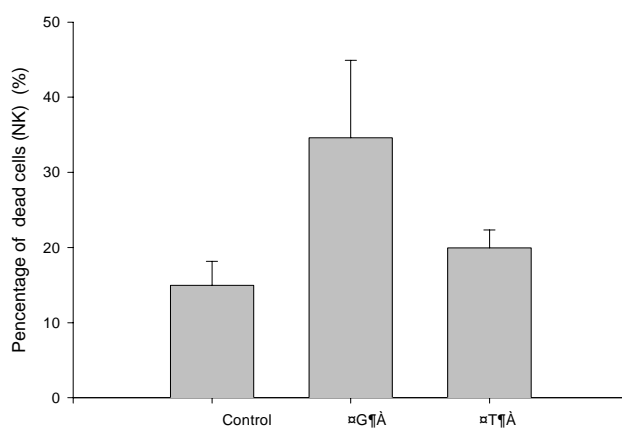
### LPS



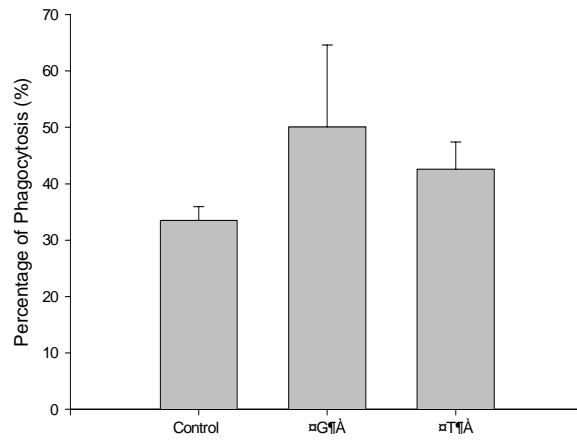
NK-cell 2 weeks



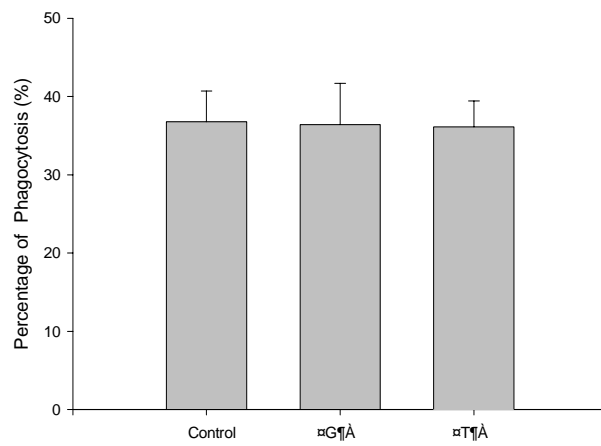
Activity of NK-cell 4 weeks



Phagocytosis 2 weeks



Phagocytosis 4 weeks

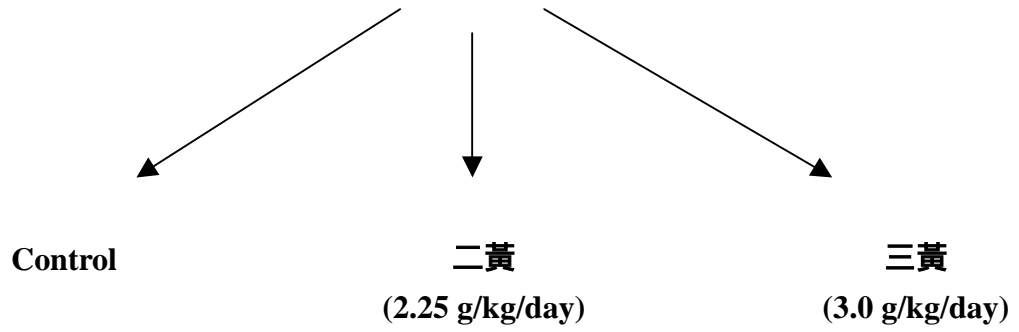


## 第六期結果摘錄 (二、三月份 /93 年) (1/10/2004)

### SD Rats

- 一、本研究計劃已按預定的實驗內容，過程及預定的步驟按部就班進行。上回已報告在老鼠體內經由分別餵食三黃瀉心湯和二黃瀉心湯對該老鼠確有促進吞噬細胞( macrophage )的吞食作用，及加強天然殺手細胞( natural killer cell )的毒殺作用及對淋巴球增生的實驗已完成。
- 二、結果發現二黃瀉心湯的效果優於三黃瀉心湯
- 三、經由 PCR 檢測相關的細胞介子 ( cytokines ) 受三黃瀉心湯和二黃瀉心湯的影響
- 四、目前實驗沒有遭遇瓶頸，一切按照進度進行。

**SD Rats**



**Control**

**二黄**  
**(2.25 g/kg/day)**

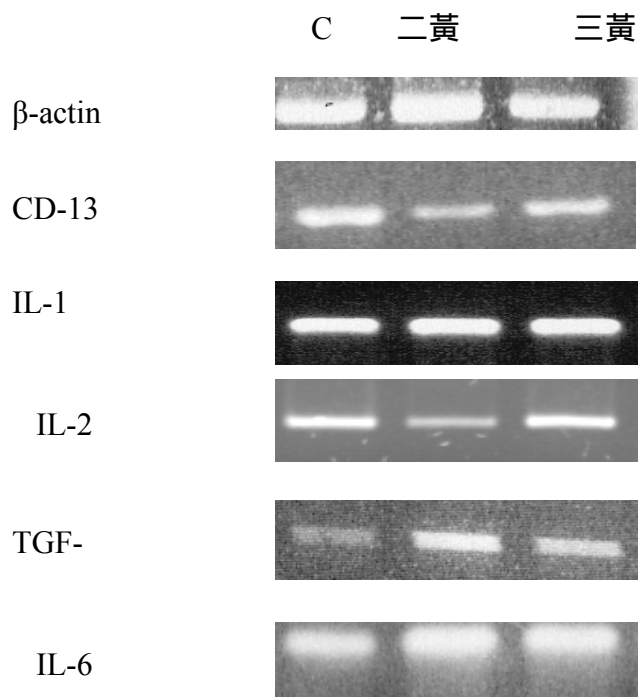
**三黄**  
**(3.0 g/kg/day)**

**二星期**

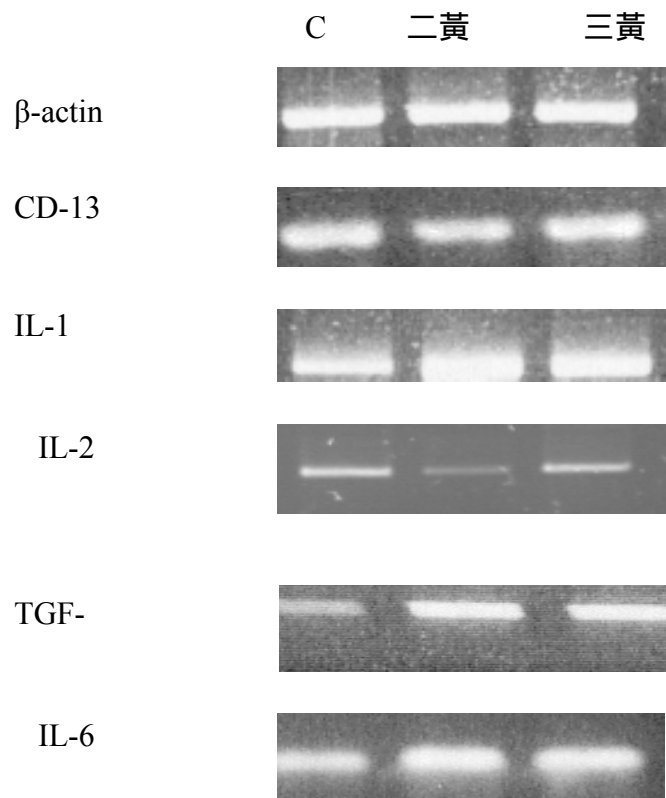
**四星期**

**取 total RNA**  
  
**PCR**  
**(IL-1, IL-6, TNF- )**

- 5. NK-cell activity**
- 6. Phagocytosis**
- 7. Proliferation of Lymphocytes**
- 8. Cytokines**



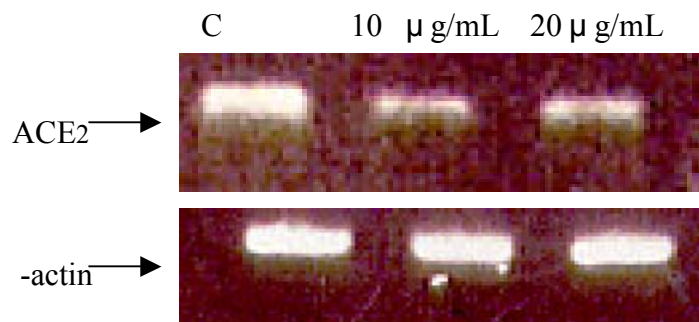




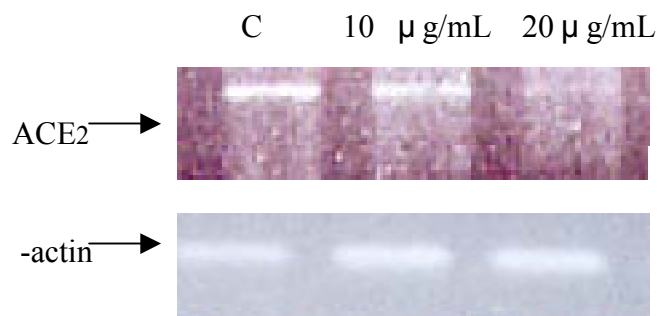
## 第七期結果摘錄 (四月份 /93 年)

The effects of PNR on ACE2 mRNA expression of HL-60 cells and  
rat ' s leukocytes

### HL-60 cells



### Rats Leukocytes



## 第八期結果摘錄 (六月份 /93 年)

1. 二黃瀉心湯比三黃瀉心湯經由老鼠利用 LPS 誘發發炎反應的體內試驗發現比較有效，降低 cytokines 的表現。
2. 二黃瀉心湯比三黃瀉心湯對 SARS 病毒感染細胞的接受器 ACE2 的表現有明顯基因抑制的作用。