

計畫編號：DOH92-TD-1007

修正本

行政院衛生署九十二年度科技研究發展計畫

利用疾病相關轉錄因子活性建立保健食品多複方評估體系及有效成分快速搜尋系統

研究報告

執行機構：中國醫藥學院

計畫主持人：項千芸

研究人員：侯庭鏞、吳世祿

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

	頁碼
封面	
目錄	
一、摘要	(1)
二、本文	
(一) 前言	(3)
(二) 材料與方法	(6)
(三) 結果	(10)
(四) 討論	(15)
(五) 結論與建議	(19)
(六) 參考文獻	(20)
(七) 圖表	(26)

摘要

轉錄因子控制細胞的增殖、分裂及分化，也調控疾病致病機轉相關基因圖譜之變化。細胞中有為數眾多的轉錄因子，其中 activator protein 1 (AP-1) 在癌化過程中扮演重要的角色，nuclear factor- κ B (NF- κ B) 則與免疫反應息息相關。因此本研究主要以 AP-1 為細胞轉形之標的，以 NF- κ B 為炎症反應的標的，藉由分析 AP-1 及 NF- κ B 轉錄因子活性為起步，建立抗細胞轉形及抗發炎反應等保健食品生物療效的評估體系。我們先構築含有轉錄因子結合序列 (AP-1 或 NF- κ B) / 報導基因 (luciferase) 的重組細胞株，利用 phorbol ester (TPA) 誘發 AP-1 作為細胞轉形的模式，利用細菌細胞壁的成分 lipopolysaccharide (LPS) 誘發 NF- κ B 作為發炎反應的模式，再加入靈芝、薏仁、山藥及複方食材的甲醇萃取液及水萃取液進行分析。結果發現，靈芝、薏仁、山藥的甲醇萃取液及靈芝的水萃取液可以抑制 TPA 所誘發的 AP-1 活性，表示可能具有抗細胞轉形的潛能。至於靈芝及薏仁的水萃取液也具有抑制 LPS 誘發 NF- κ B 的活性，表示可能具有抗發炎反應的潛能。而含有這三種保健食品的複方食材對於抑制 AP-1 或 NF- κ B 的活性並無加成作用。因此本研究所設定的細胞模式除了可以作為抗細胞轉形及抗發炎等保健功效的搜尋平台，未來也可利用此模式，探討重要的臨床用藥，在適當疾病療程時，相關保健食品最佳食用時機及可能的實用禁忌，以增進國人健康。

關鍵詞：轉錄因子、細胞轉形、發炎反應、保健食品

Abstract

Several studies indicate that transcription factors play important roles in diseases. For examples, nuclear factor- κ B (NF- κ B) activity is associated with inflammation, and activator protein 1 (AP-1) plays an important role in cell proliferation, differentiation, apoptosis and transformation. It is therefore reasonable by using the transcription factor as the target to evaluate the functional activities of health food. In this study, we established the transcription factor-based screening system to evaluate the anti-transformation and anti-inflammation activities of health food. The effects of health food on phorbol ester (TPA)-induced AP-1 activity and lipopolysaccharide (LPS)-induced NF- κ B activity were analyzed. The methanolic extracts of *Ganoderma* spp., *Coix* spp. and Yam, and the aqueous extract of *Ganoderma* spp. inhibited the TPA-induced AP-1 activity, suggested that these extracts exhibited the anti-transformation potentials. Moreover, aqueous extracts of *Ganoderma* spp. and *Coix* spp. inhibited the LPS-induced NF- κ B, suggested that these extracts exhibited the anti-inflammation effects. Taken together, our data provided the cellular models for evaluating the anti-transformation and anti-inflammation potential of health food. The better understanding of functional activities of health food could further provide the information about the therapeutic effects and safety of health food, and therefore promote the public health.

Keywords: transcription factor, cellular transformation, inflammation, health food

前言

近年來，國人對所謂的「健康食品」、「機能性食品」需求增加。傳統上，健康食品的保健功效（例如抗癌症、增進免疫反應等），多是利用動物試驗加以評估，但這種方式需要長達數週的時間才能得到結果，而且需要有足夠數量的動物才能達到客觀的標準。因此，本研究主要藉由實驗室已設定之細胞模式，建立保健食品多複方評估體系，以快速地評估食材的保健功效，進一步也可提供生物性療效之分生證據。

目前有越來越多的報告指出，轉錄因子除了控制細胞的增殖、分裂及分化，也調控疾病致病機轉相關基因圖譜之變化。細胞中有為數眾多的轉錄因子，其中 activator protein 1 (AP-1) 在細胞的癌化過程中扮演重要的角色 (Dong et al., 1994; Young et al., 1996; Dong et al., 1997)，而 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 則與免疫反應息息相關 (Baeurele and Baichwal, 1997)。因此本研究主要以 AP-1 為細胞轉形之標的，而以 NF- κ B 為炎症反應的標的，藉由分析 AP-1 及 NF- κ B 轉錄因子活性為起步，建立抗細胞轉形及抗發炎反應的複方產品保健功效篩選系統，並探討薏仁、山藥、靈芝單獨或併用其他食材之效果，或這些保健食品中多種組成成分間之相互作用。

AP-1 是由 Jun 和 Fos 蛋白質所組成的 heterodimeric complex，其中 Jun family 的成員包含 c-Jun、JunB 及 JunD，而 Fos family 則包含 c-Fos、FosB、Fra-1、Fra-2、FosB2 和 ATF2 (Angel and Karin, 1991)。這些組成 AP-1 的蛋白質皆為含有 "leucine zipper" 結構的 DNA-binding protein，此種蛋白質的 C 端具有 heptad repeat leucine，可協助蛋白質形成 dimer (Harbury et al., 1993)，而 N 端則具有 α -helix，可結合到 DNA 上 (Shuman et al., 1990)。AP-1 為掌控細胞增殖及分化之即發性早期蛋白，可參與多種基因轉錄調節的過程 (Herschman, 1991)，而受 AP-1 所調控的基因，其啟動子具有 AP-1

結合序列。AP-1 所辨認的序列為 5'-TGAGTCA-3'，屬於迴文序列，由於這個位置也可以被 tumor promoter—phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA) 所活化，因此也稱為 TPA responsive element (TRE) (Angel et al., 1987)。近十年來的研究發現，AP-1 的活性可以被許多因子活化，如細胞緊迫、紫外光刺激、DNA 傷害、氧化傷害及細胞素（例如 tumor necrosis factor- α 和 interferon- γ ）等 (Wisdom, 1999)。

AP-1 是一種很重要的 *trans*-activator，根據 Iyer 等 (1999) 指出，在生長停滯的纖維芽母細胞中添加血清，有 300 種基因可進行新生合成，而這些被血清所誘發表現的基因，其啟動子上均含有 AP-1 結合序列，因此推論 AP-1 的活性與細胞增殖有關。另外由其他的研究指出，AP-1 的活化對細胞轉形是必須的，此外阻斷 TPA 誘發 AP-1 的活性，可以抑制細胞的轉形 (Dong et al., 1994; Young et al., 1996; Dong et al., 1997)，因此藉由 TPA 誘發細胞轉形模式，利用對 TPA 誘發 AP-1 活性的影響，可以初步篩選出具有抗細胞轉形潛力的化合物。

NF- κ B 在發炎反應上扮演重要的角色。發炎反應 (inflammation) 為宿主面臨內在及外來刺激時所產生的防禦機制，這些刺激包括輻射、脂多糖 (lipopolysaccharide; LPS)、革蘭氏陰性菌的產物、細胞素 (例如 tumor necrosis factor、interleukin-1)、ceramide、雙氧水、phorbol ester、hyperoxia/hypoxia、化學治療劑、及 okadaic acid 等 (Manna and Aggarwal, 2000)。當細胞與發炎物質接觸後，許多基因的表現會被誘發，這些基因產物包括細胞表面吸附蛋白質、cyclooxygenases、lipooxygenases、inflammatory cytokines 和其接受器、major histocompatibility complex 的組成份、及 metalloproteases。這些基因的啟動子區域中，幾乎都含有轉錄因子 NF- κ B 的結合位置，NF- κ B 的活化會誘發與發炎有關基因的表現，而大部分發炎

物質都會活化 NF- κ B (Baeurele and Baichwal, 1997)。

NF- κ B 最早是由 Baltimore 於 1986 年發現。在正常情況下，NF- κ B 存在於所有真核細胞的細胞質內，以 p50、p65 及 NF- κ B 抑制蛋白質 (I κ B α) 等三種蛋白質所形成 heterotrimer 的形式存在。當細胞與發炎物質接觸後，在數分鐘內，I κ B α 就會發生磷酸化、ubiquitination、進而被分解，這時 p50 及 p65 蛋白質 nuclear localization signals 暴露出來，而使得 p50/p65 heterodimer 送到細胞核內。活化狀態的 heterodimer 會進一步與發炎有關基因啟動子上的特定序列結合，而導致基因的表現 (Manna and Aggarwal, 2000)。

在許多免疫性疾病 (包括風濕性關節炎、氣喘、動脈粥狀硬化) 中，NF- κ B 的表現會被活化，顯示 NF- κ B 在免疫性疾病的致病機轉中扮演關鍵的角色 (Tak and Firestein, 2001)，因此也使得 NF- κ B 成為抗發炎藥物開發的標的。在細胞模式下，許多研究證實 LPS 可誘發細胞的發炎反應，且在此路徑中，NF- κ B 的活性也同步被誘發 (Pan et al., 2000; Wang et al., 2000)，因此，藉由 LPS 誘發細胞發炎模式，利用對 LPS 誘發 NF- κ B 活性的影響，可以初步篩選出具有抗發炎潛力的化合物。

薏仁、山藥、靈芝等食材是國人常用之健康食品。為了評估保健食品複方食材之相互作用及其可能之生物療效，本研究先構築含有 AP-1 結合序列或 NF- κ B 結合序列/報導基因的重組細胞株，藉由 TPA 或 LPS 等誘導劑，建立細胞轉形或發炎等模式。這些細胞模式先利用已知的西藥，例如抗癌用藥，印證本系統的可行性，進一步作為搜尋平台，應用於探討薏仁、山藥、靈芝單獨或併用其他食材之效果，並提供這些食材生物性療效之分生證據。

材料與方法

一、細胞轉形及細胞發炎模式的建立及確認

(一) 轉錄因子結合序列/報導基因 (luciferase) 重組細胞株的建立

為了快速分析保健食品對轉錄因子 AP-1 及 NF- κ B 活性的效應，我們先建立可穩定含有轉錄因子結合序列/報導基因 (luciferase) 的重組細胞株。實驗方法是，將肝細胞 Chang liver 及 HepG2 繼代至 25T flask，使細胞於 24 小時內長至約 8 分滿之後，將 AP-1/Luciferase、NF- κ B/Luciferase 報導基因質體和具有 neomycin 抗藥性的 pSV3-neo 質體分別利用限制酶 *AlwNI* 和 *EcoRI* 切成直線形，再利用 SuperFect 進行 co-transfection。Transfection 後 48 小時，以 1:15 的比例繼代至新的 flask 中，24 小時之後更換含有 400 ng/ml Geneticin (G418) 的新鮮培養液進行篩選。4~7 天後，將細胞繼代至 24 well plate 中，持續給予 400 ng/ml G418 的培養液進行選殖。最後自 24 well plate 中挑選出單一具有抗藥性的 clone，利用 luciferase assay 篩選出 luciferase 活性最強的為重組肝細胞株，成為後續實驗所用之重組細胞株。

(二) 細胞轉形模式的建立

TPA 是為人所熟知的腫瘤促進劑，可活化 AP-1 的活性，並且可以使細胞發生轉形，因此我們擬建立 TPA 誘發的細胞轉形模式。首先將不同濃度的 TPA 加到 AP-1/Luciferase 重組細胞中，藉由上述之 reporter assay，測定 TPA 誘發 AP-1 活性的最佳濃度。因為細胞發生轉形最明顯的特徵就是在沒有基質的環境下也能增殖，因此我們利用 anchorage-independent transformation assay，驗證細胞轉形的表現型。實驗方法為，以 4 ml 的 0.6% agar 將 25T flask 覆蓋，使細胞缺乏細胞外基質，agar 中含有細胞生長培養基及不同濃度的 TPA，再將肝細胞培

養於 2 ml 的 0.4% agar 中，其中含有細胞生長培養基及不同濃度的 TPA。將細胞持續培養於 37°C、5% CO₂ 培養箱中，若細胞發生轉形，則會形成群落 (colony)。

(三) 以 AP-1 抑制劑及抗癌用藥 daunorubicin 證實 AP-1 活性與細胞轉形的相關性

在利用上述一連串的實驗證實 TPA 可藉由活化 AP-1 的活性，造成肝細胞的轉形後，我們擬利用反向的實驗方式，藉由抑制 AP-1 的活性後對 TPA 誘導肝細胞轉形的影響，確認 AP-1 活性與肝細胞轉形的相關性。實驗方法為，細胞先以 retinoic acid 或抗癌用藥 daunorubicin 處理，再以 TPA 刺激細胞的轉形，細胞轉形的評估為 anchorage-independent transformation assay。Retinoic acid 為已知的 AP-1 活性抑制劑，在抑制 AP-1 活性後，若造成 TPA 無法誘發肝細胞轉形的發生，就可證明 AP-1 的活性為肝細胞轉形所必須。

(四) 細胞發炎模式的建立

細菌內毒素 lipopolysaccharide (LPS) 可以誘發發炎反應，也會造成 NF- κ B 活性的增加，因此我們擬利用 LPS 建立細胞的發炎模式。首先將不同濃度的 LPS 加到 NF- κ B/Luciferase 重組細胞中，在不同作用時間下收集樣品，再藉由上述 reporter assay，測定 LPS 誘發 NF- κ B 活性的最佳濃度及最佳時間，以作為細胞發炎模式的標準化。

二、薏仁、山藥、靈芝單獨或併用其他食材在抗細胞轉形及抗發炎反應的作用

(一) 保健食品的種類

我們收集下列二類的保健食材進行分析：

第一類、薏仁、山藥、靈芝三種食材分別經水及甲醇萃取，探討保健食

品在抗細胞轉形及抗發炎可能之生物性療效。

第二類、含薏仁、山藥、靈芝三種主食材之常見複合保健食品，包括四神湯（重量比為薏仁：茯苓：芡實：蓮子=2：1：1：2）、六味地黃丸（重量比為山藥：地黃：山茱萸：澤瀉：茯苓：牡丹皮=1：2：1：1：1：1）及靈芝北耆片（重量比為靈芝：黃耆=1：3）等，總共 11 種食材，利用上述模式探討其在抗細胞轉形及抗發炎之相互作用。

（二）保健食品的萃取及分組

保健食品的食用方式多為熱水浸泡或烹煮後才加以食用。經由熱水浸泡後，可以分離出糖苷、有機酸、皂苷、酚苷、鞣質、水溶性生物鹼等物質，但是黃酮類、香豆精、揮發油類、甾體等物質，無法經由熱水浸泡的方式萃取出來，因此我們利用熱水及甲醇浸泡的方式，將極性及非極性物質分別萃取出來。實驗方法為熱水浸液萃取出物：將 4 g 的食材粉浸入 40 ml 水中，浸泡過夜，去除殘渣後，置於 60°C 加熱 10 分鐘；甲醇萃取出物：將 5 g 的食材粉浸入 60 ml 的 100% 甲醇，於水浸中加熱回流 20 分鐘。這些食材的萃取出物經冷凍乾燥後，保存於 -20°C。

為了了解食材本身及與其他食材的併用效果，我們擬利用不同排列組合的方式，組合成不同成分的組別，再利用上述熱水及甲醇兩種方式加以萃取。以四神湯為例，我們可以區分成 8 種組合，但為了單純化變因，組別內的重量比與上述比例相同。其他兩類複方食材（六味地黃丸、靈芝北耆片）也以相同方式分組。食材的分組見表一。

（三）保健食品對細胞活性的測定

我們藉由 MTT assay 測定上述各組保健食品萃取出物在使用濃度下對細胞活性的影響。實驗方法為，保健食品萃取出物經連續稀釋後加入細胞中，於 37°C 培養 48 小時，之後再加入 MTT，於 37°C 作用 24 小時，

若是細胞仍存活，則細胞粒線體內的 dehydrogenase 會將 MTT 形成藍色不可溶的 formazan，最後以 SDS/HCl 溶解 formazan，於 570 nm 波長下測定吸光值。由 MTT 的結果，可了解保健食品萃取物在不同使用濃度下對細胞活性的影響。

(四) 利用上述細胞模式篩選保健食品抗細胞轉形及抗發炎反應的潛能

我們利用 reporter assay 快速篩選可以抑制 TPA 所刺激 AP-1 活性的保健食品，及可以抑制 LPS 所刺激 NF- κ B 活性的保健食品。實驗方法為，將培養於 96 well 中達八至九成滿的重組細胞更換新鮮的培養液之後，加入食材萃取物及誘發劑，於 37°C 培養適當時間。之後將培養液移除，再加入 lysis buffer，使細胞完全破裂後，以冷光儀進行 reporter assay，以了解食材對轉錄因子 AP-1 及 NF- κ B 活性的效應，藉此判斷這些食材是否有抗細胞轉形及抗發炎反應的潛能，並判斷這些複方食材間相互作用影響的方式。

結果

一、細胞轉形及細胞發炎模式的建立及確認

(一) 建立重組細胞

我們利用 stable transfection 的方式，將上游含有 AP-1 或 NF- κ B 結合位，下游含有 luciferase 報導基因的質體，與具有抗藥性基因的 pSV3neo 質體，同時送入 Chang liver 細胞和 HepG2 細胞，再藉由 Geneticin(G418) 及 luciferase assay 挑選出具有抗藥性及 luciferase 強度最強的重組細胞，重新命名為 Chang/AP-1、HepG2/AP-1 或 HepG2/NF- κ B 重組細胞。如此一來便可利用此重組細胞作為快速搜尋系統，探討保健食品抗細胞轉形及發炎反應的功效。

本計畫採用兩種不同的肝細胞株，主要是因為不同實驗必須採取適當合理的肝細胞株。例如，在轉形的細胞模式中，最好以不同癌化時期的細胞為之，因此在轉形模式中我們使用兩種肝細胞—Chang liver (正常的肝細胞) 及 HepG2 (含有 B 型肝炎病毒表面抗原基因)。至於發炎反應的細胞模式方面，發炎反應與 NF- κ B 的活性有關，而目前國際性報告進行肝炎研究較常使用的細胞株為 HepG2，因此本計畫發炎反應細胞模式中我們主要以 HepG2 細胞為主。

(二) 細胞轉形模式的建立及確認

細胞在繼代到 96 孔盤，待其生長到全滿後，把生長環境中的血清去除，加入含 0.1 %胎牛血清的培養液進行 starvation，以使細胞週期停止在 G₁ phase。之後加入以一倍 DMEM 稀釋不同濃度的 TPA 溶液，反應 16 小時後，觀察 TPA 對細胞中 AP-1 的反應。在 Chang liver/AP-1 細胞中，當 TPA 濃度為 1 ng/ml 時約可活化 2 倍的 AP-1 活性，而高於此濃度後，仍然有繼續上升的趨勢，到了濃度為 100 ng/ml 時約可活化 6.5 倍

(圖一 A)。而 HepG2/AP-1 細胞則不易受到 TPA 的活化，TPA 的濃度大於 50 ng/ml 之後，才有較明顯的活化的反應，到了濃度為 100 ng/ml 時，約可活化 2 倍 (圖一 B)。因此由結果顯示，TPA 可以活化重組細胞中 AP-1 的活性。

因為細胞發生轉形最明顯的特徵就是在沒有基質的環境下也能增殖，因此我們利用 anchorage-independent transformation assay，驗證細胞轉形的表現型。將 Chang/AP-1 或 HepG2/AP-1 重組細胞培養於 0.4% soft agar 中，soft agar 中一組為含 10% 胎牛血清之 DMEM 生長培養基；另一組為此生長培養基中含有 100 ng/ml TPA。持續培養 21 天後，進行 INT 染色 24 小時，最後以倒立位相差顯微鏡 40x 來觀察細胞生長的情形，並予以拍照。由圖二顯示，Chang/AP-1 及 HepG2/AP-1 重組細胞在單獨只有生長培養基存在時，因細胞缺乏細胞外基質，所以轉形情形不明顯，但在外加 100 ng/ml TPA 處理下，細胞會在缺乏細胞外基質的情況下形成 colony，而有轉形現象。結果顯示 TPA 的確可以誘發 Chang/AP-1 及 HepG2/AP-1 重組細胞轉形。

進一步探討由 TPA 所誘發 AP-1 的活性是否與細胞轉形的現象成正相關，我們利用能與 AP-1 進行交互作用而抑制 AP-1 活性的 retinoic acid (Fanjul et al., 1994)，及臨床上治療肝癌的藥物 daunorubicin，探究 AP-1 與細胞轉形的相關性。在對 TPA 所誘發 AP-1 活性的影響方面，圖三顯示不管在有無 TPA 存在下，daunorubicin 皆可抑制 AP-1 的活性，且呈劑量反應。而在細胞轉形方面，我們同樣藉由 anchorage-independent transformation assay 的方式，將重組細胞培養於 2 ml 的 0.4% soft agar 中，其中一組為生長培養基中含有 100 ng/ml TPA，而另一組為生長培養基中含 100 ng/ml TPA 外，再加入 10 μ M retinoic acid 或不同濃度的

daunorubicin，21 天後進行比較。圖四顯示 retinoic acid 及 daunorubicin 可以將由 TPA 所誘發的細胞轉形抑制下來。因此以上結果顯示，AP-1 的活性是細胞轉形所必須的。

(三) 細胞發炎模式的建立

將細胞繼代到 96 孔盤生長到全滿後，活化 LPS 以進行反應。LPS 活化的方法為：將 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ LPS 以 1:4 的比例稀釋到胎牛血清中，並以 37°C 反應 1 小時 30 分使 LPS 活化，之後以 1 倍 DMEM 進行連續稀釋，再加入細胞中，於 37°C 培養箱中培養 16 小時後，測量冷光的活性。LPS 在濃度大於 1 ng/ml 後，開始活化 HepG2 細胞的 NF- κ B 轉錄活性，到了濃度為 10 ng/ml 時，約可活化細胞中的 NF- κ B 活性達 2 倍，在更高的濃度仍然可以持續活化細胞中的 NF- κ B 活性，而當 LPS 濃度為 100 ng/ml 時，NF- κ B 約可活化 2.5 倍（圖五）。因此由以上結果，我們決定以濃度 20 ng/ml 的 LPS，作為後續保健食品抗發炎反應的使用濃度。

二、薏仁、山藥、靈芝單獨或併用其他食材在抗細胞轉形及抗發炎反應的作用

在保健食品的萃取方面，我們利用兩種溶劑進行萃取。水萃取主要是模擬保健食品的食用方式，因此主要是作為保健食品調控細胞增殖、抗細胞轉形及抗發炎反應等保健功效的研究用。而甲醇萃取因為甲醇極性範圍含跨水及乙醇，因此主要作為新藥開發導引的研究用。

(一) 保健食品抗細胞轉形的能力

在將薏仁、山藥、靈芝甲醇萃取物加入 TPA 所處理的 Chang/AP-1 重組細胞，於反應 16 小時後測量冷光，發現這三種保健食品都可以抑制 TPA 所誘發的 AP-1 活性，且呈劑量反應（圖六）。薏仁及靈芝在濃度高達 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 時，可抑制一半以上的 AP-1 活性，而且細胞活性不僅不

受影響，在靈芝反而有活性上升的現象。反觀山藥，在濃度為 200 $\mu\text{g/ml}$ 時，也可抑制一半以上的 AP-1 活性，但在這種濃度下，細胞活性也受到影響，因此山藥可能是藉由細胞毒殺作用而造成 AP-1 活性的降低。由以上結果發現薏仁、靈芝及山藥的甲醇萃取物在不傷及細胞的狀況下，可以抑制 TPA 所誘發的 AP-1 活性，因此薏仁、靈芝及山藥的甲醇萃取物可能具有抗細胞轉形的效果。

在水萃取物方面，將薏仁、山藥、靈芝水萃取物加入 TPA 所處理的 HepG2/AP-1 重組細胞，於反應 16 小時後測量冷光。圖七顯示，靈芝的水萃取物隨著劑量的增加，會逐漸抑制 TPA 所誘發的 AP-1 活性，而山藥及薏仁則沒有影響，而且這三種保健食品的水萃取物也都不會影響細胞活性。由以上結果發現靈芝的水萃取物在不傷及細胞的狀況下，可以抑制 TPA 所誘發的 AP-1 活性，因此靈芝的水萃取物可能也具有抗細胞轉形的效果。

進一步以含薏仁、山藥、靈芝三種主食材之常見複合保健食品進行分析，研究這些複方食品是否可以增強薏仁、山藥、靈芝抗細胞轉形的效果。在甲醇萃取物方面，靈芝（標號 1）、薏仁（標號 3）及山藥（標號 11）如預期一般，可以抑制 TPA 所誘發的 AP-1 活性，而含薏仁、山藥、靈芝之常見複合保健食品所呈現的圖譜就非常多樣化（圖八）。在靈芝加上北耆的組別方面（標號 2），北耆無法增加靈芝抑制 AP-1 活性的能力，但卻可以加強細胞的活性。在四神湯的組合方面（編號 3~10），只含有四神湯內的兩種或三種食材，並無法抑制 TPA 所誘發的 AP-1 活性，但是含有四神湯內四種食材的組別（標號 10），卻可造成 AP-1 活性的下降，同時呈現細胞毒殺效應。在六味地黃的組別方面（編號 11~41），只有同時含有山藥、熟地黃、山茱萸、茯苓的組別（編號 28）呈現與山

藥一般的抑制效果，其他組別皆無加成作用。

在水萃取物方面，靈芝（標號 1 及 42）如預期一般，可以抑制 TPA 所誘發的 AP-1 活性（圖九）。在靈芝北耆組（標號 2）及四神湯組（編號 3~10）皆無抑制 AP-1 活性的作用。在六味地黃的組別方面（編號 11~41），只有同時含有山藥及牡丹皮（編號 16）、山藥、熟地黃及山茱萸（編號 17）、山藥、山茱萸、澤瀉及茯苓（編號 33）及同時具有六種成分的組別（編號 41），呈現抑制 AP-1 的效果，其他組別皆無影響。

（二）保健食品抗發炎反應的能力

在保健食品抗發炎反應的部份，我們以保健食品是否會抑制 LPS 所誘發的 NF- κ B 活性，作為保健食品是否具有抗發炎反應的指標。在將靈芝、薏仁、山藥的水萃取物加入 LPS 所處理的 HepG2/NF- κ B 重組細胞，於反應 16 小時後測量冷光，我們發現靈芝及薏仁隨著劑量的上升，會逐漸抑制 LPS 所誘發的 NF- κ B 活性，而山藥則對 NF- κ B 的活性沒有影響（圖十）。因為這三種保健食品對於細胞皆無毒殺現象，因此結果顯示靈芝極易人可能具有抗發炎反應的效果。

至於以含薏仁、山藥、靈芝三種主食材之常見複合保健食品進行分析，發現靈芝（標號 1 及 42）及薏仁（標號 3 及 43）如預期一般，可以抑制 LPS 所誘發的 NF- κ B 活性（圖十一）。而靈芝北耆組（標號 1~2）及四神湯組（編號 3~10）都呈現具有抑制 NF- κ B 的效果，但與靈芝或薏仁比較，皆沒有呈現加成作用，顯示靈芝北耆湯及四神湯可能都具有抗發炎的作用，而且主要是靈芝及薏仁的作用。至於六味地黃組（編號 11~41）不管所含的成分為何，皆不會影響 LPS 所誘發 NF- κ B 的活性。

討論

本研究主要是藉由構築含有轉錄因子結合序列 (AP-1 或 NF- κ B) / 報導基因 (luciferase) 的重組細胞株，先證實 AP-1 及 NF- κ B 與細胞轉形及發炎反應的相關性，再以 TPA 所誘發 AP-1 的活性及 LPS 所誘發 NF- κ B 的活性為指標，建立快速搜尋系統，探討靈芝、山藥、薏仁及複方食材抗細胞轉形及抗發炎反應的潛能。

TPA 是為人熟知的腫瘤促進劑，可與 protein kinase C (PKC) 結合而調控細胞生長、分化及基因的表達 (Blumberg, 1991; Arnold and Newton, 1996)。PKC 為 TPA 的 receptor (Ghosh et al., 1993; Su et al., 1995)，TPA 可藉由結合 PKC 後，經由 Ras-Raf-1/MAPK cascade 而活化 AP-1 (Su et al., 1995; Ben-Ari et al., 1992)。許多細胞在加入 TPA 之後，可以發現組成 AP-1 的成分，不管在 mRNA 的合成或蛋白質的總量上都有明顯的增加 (Vogt and Bos, 1990)。而在我們的研究中也發現，TPA 除了會造成細胞轉形外，也可以活化細胞中 AP-1 的活性。

為了確認 TPA 所造成細胞轉形的現象與 AP-1 的活化有關，我們以 AP-1 抑制劑—retinoic acid 及抗癌用藥—daunorubicin，藉由 anchorage-independent transformation assay 及 reporter assay 進行分析。目前已知 retinoic acid 可以抑制腫瘤細胞生長，並且能使惡性腫瘤細胞分化回正常細胞 (Li et al., 1996; Gudas, 1992)。在 JB6 (P+) 細胞中加入 retinoic acid，可抑制乳突瘤之形成，並且抑制由 TPA 所誘發之 AP-1 活性和細胞轉形 (Dong et al., 1994; Li et al., 1996; Verma et al., 1983; Verma et al., 1979; Athar et al., 1991)。Daunorubicin 是一種具細胞毒性的 anthracycline 類抗生素，現已被廣泛應用於癌症治療，特別是應用於急性白血病、淋巴瘤、胃腫瘤、乳癌、卵巢癌、卡波西氏肉瘤及骨癌 (Hortohagyi, 1997)。在肝癌的經肝動脈化學栓塞療法

上，臨床研究顯示合併化學治療藥物（如 daunorubicin）之療效較單純的栓塞療法更佳（Lovet et al, 2003），因此 daunorubicin 為肝癌化學栓塞療法的主要藥物之一（Befelter et al., 2002）。在本研究中，我們發現 daunorubicin 及 retinoic acid 可以抑制 TPA 所誘發的 AP-1 活性，也可以抑制細胞的轉形，證明 AP-1 與細胞轉形的相關性，也證實以 AP-1 活性為指標代表細胞轉形潛能的可行性。

NF- κ B 為一個控制免疫相關因子表現的轉錄因子，許多細胞素的啟動子區域，都有 NF- κ B 的結合位置（Baeurele and Baichwal, 1997）。另外在腫瘤生長或發生炎症反應的組織中，也有 NF- κ B 大量表現的情形。肝臟在長期受酒精刺激或是革蘭氏陰性菌細胞壁的 LPS 存在的情況下，會經由結合特定的接受器並經由 PKC/Rac/NIK/IKK 的訊息傳導路線，促進 I- κ B 的磷酸化和解離，並促使 NF- κ B 由細胞質進入到細胞核中，使得肝細胞內的 NF- κ B 高度活化，並造成細胞素，如 tumor necrosis factor- α 、CD14、interleukin-1 及 interleukin-6 等大量表現而促進炎症反應的產生（Gutierrez-Ruiz et al., 1999；Wheeler and Ronald, 2002；Yin et al., 2001；Bode et al., 1993；Luster et al., 1994）。因此在本研究中，我們利用 LPS 誘導 NF- κ B 活性上升的現象，作為發炎模式，以作為研究保健食品抗發炎效果的指標。

保健食品的實用方式多為保健食品的食用方式多為熱水浸泡或烹煮後才加以食用。經由熱水浸泡後，可以分離出糖苷、有機酸、皂苷、酚苷、鞣質、水溶性生物鹼等物質，但是黃酮類、香豆精、揮發油類、甾體等物質，無法經由熱水浸泡的方式萃取出來，因此我們利用熱水及甲醇浸泡的方式，將極性及非極性物質分別萃取出來，並分別進行測試。

本研究主要針對靈芝、薏仁、山藥及其相關複方食材進行抗細胞轉形及抗發炎反應功效的探討。薏仁為禾穀類食物中含蛋白質（13~16%）及脂

肪(9%)豐富之穀類(Moreau et al., 2001),自古以來不僅被用作滋養強壯劑,亦為漢藥方的重要材料。本草綱目謂「薏苡仁,益胃健脾、治水腫濕痺、腳氣疝氣、泄痢熱淋、補肺清熱、治風熱筋急拘攣」。在中國和日本的民間療法中,薏仁被認為具有健脾、益胃、利尿、消炎和抗腫瘤等功效,而在近代醫學報告上,也證實薏仁具有抗氧化(Kuo et al., 2001)、抗癌細胞增殖(Kuo et al., 2001)、消炎(Otsuka et al., 1988; Seo et al., 2000)、增加毒殺性淋巴球數量(Hidaka et al., 1992)、降血脂(Park et al., 1988)、促進排卵(Kondo et al., 1988)、抗糖尿病(Roman Ramos et al., 1992)等能力。山藥為上品藥材,自古以來即被用作滋補養生之食品。本草綱目謂「山藥可健脾胃,補虛羸,益腎氣,止瀉痢,強筋骨,化痰涎,潤皮毛,除寒熱邪氣久服耳聰目明,輕身不饑延年」。山藥中含有具抗腫瘤增殖的固醇類皂素 diosgenin(Hu et al., 1996)、具抗氧化能力的皂素 dioscorea(Araghiniknam et al., 1996)及蛋白質 dioscorin(Hou et al., 2001),此外,山藥的粗萃取物也具有增進大鼠學習記憶(Hsieh et al., 2000)、抗微生物生長(Aderiyee et al., 1996; Kelmanson et al., 2000)等功效。靈芝,在中國又稱「仙草」、「瑞草」,在日本則又稱之為「吉祥茸」。兩千多年來,靈芝在中國醫學一直佔有崇高地位,而且是最吉祥珍貴的調理滋補藥材,其價值甚至比人蔘的地位還高。靈芝被列為上品,是一種滋補強壯、扶正固本、延年益壽及鬆弛身心的珍貴藥材。經由科學化的驗證,發現靈芝的多醣體能促進人體免疫功能,並激發巨噬細胞及 T 淋巴細胞產生大量和抗腫瘤有關的細胞激素(γ -interferon、TNF- α),以消滅腫瘤細胞(Lu et al., 2001; Wang et al., 2002)。靈芝中的三帖類(triterpenoids)是靈芝保肝功能的主要因素,可減輕肝炎和肝纖維化(Kim et al., 1999),除了護肝功能外,三帖類還有抑制癌細胞生長、抑制組織胺釋放、防止過敏、抗氧化等作用(Zhu et al., 1999;

Giner-Larza et al., 2000 ; Min et al., 2000)。由我們的結果顯示，靈芝、薏仁、山藥的甲醇萃取液及靈芝的水萃取液可以抑制 TPA 所誘發的 AP-1 活性，表示可能具有抗細胞轉形的潛能。至於靈芝及薏仁的水萃取液也具有抑制 LPS 誘發 NF- κ B 的活性，表示可能具有抗發炎反應的潛能。而含有這三種保健食品的複方食材對於抑制 AP-1 或 NF- κ B 的活性並無加成作用。至於這些食材的主藥效成分，則仍待進一步分析。

結論與建議

本計畫主要以 AP-1 為細胞轉形之標的，以 NF- κ B 為炎症反應的標的，藉由分析 AP-1 及 NF- κ B 轉錄因子活性為起步，建立抗細胞轉形及抗發炎反應等保健食品生物療效的篩選系統及保健食品相互作用之多複方評估體系。由本計畫的執行，得到以下結論與建議：

一、細胞轉形及細胞發炎模式的建立及確認

利用構築含有轉錄因子結合序列（AP-1 或 NF- κ B）/報導基因（luciferase）的重組細胞株，我們已證實 TPA 誘發 AP-1 的活性及 LPS 所誘發 NF- κ B 的活性分別與細胞轉形及發炎反應具有相關性，因此可以利用 AP-1 及 NF- κ B 的活性作為快速搜尋系統的指標，以加速保健食品抗細胞轉形及抗發炎功效的評估。

二、薏仁、山藥、靈芝單獨或併用其他食材在抗細胞轉形及抗發炎反應的作用

利用上述快速搜尋平台，我們發現，靈芝、薏仁、山藥的甲醇萃取液及靈芝的水萃取液可以抑制 TPA 所誘發的 AP-1 活性，表示可能具有抗細胞轉形的潛能。至於靈芝及薏仁的水萃取液也具有抑制 LPS 誘發 NF- κ B 的活性，表示可能具有抗發炎反應的潛能。而含有這三種保健食品的複方食材對於抑制 AP-1 或 NF- κ B 的活性並無加成作用。至於這些食材的主藥效成分，則仍待進一步分析。

傳統上，健康食品的保健功效（例如抗癌症、增進免疫反應等），多是利用動物試驗加以評估，但這種方式需要長達數週的時間才能得到結果，而且需要有足夠數量的動物才能達到客觀的標準。因此，本研究所設定之細胞模式，主要可應用於快速地評估食材的保健功效，進一步也可提供生物性療效之分生證據。

參考文獻

- Aderiye BI, Ogundana SK, Adesanya SA, Roberts MF: Antifungal properties of yam (*Dioscorea alata*) peel extract. *Folia Microbiol* 1996;41:407-12.
- Angel P, Imagawa M, Chiu R, Stein B, Imbra RJ, Rahmsdorf HJ, Jonat C, Herrlich P, Karin M: Phorbol ester-inducible genes contain a common *cis* element recognized by a TPA-modulated *trans*-acting factor. *Cell* 1987;49:729-39.
- Angel P, Karin M: The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1991;1072:129-57.
- Araghiniknam M, Chung S, Nelson-White T, Eskelson C, Watson RR: Antioxidant activity of dioscorea and dehydroepiandrosterone (DHEA) in older humans. *Life Sci* 1996;59:PL147-57.
- Arnold RS, Newton AC: Diacylglycerol directly stimulates the insulin receptor tyrosine kinase. *FEBS Lett* 1996;380:58-62.
- Athar M, Agarwal R, Wang ZY, Lloyd JR, Bickers DR, Mukhtar H: All-*trans* retinoic acid protects against conversion of chemically induced and ultraviolet B radiation-induced skin papillomas to carcinomas. *Carcinogenesis* 1991;12:2325-9.
- Baeuerle PA, Baichwal VR: NF-kappa B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv Immunol* 1997;65:111-37.
- Ben-Ari ET, Bernstein LR, Colburn NH: Differential c-jun expression in response to tumor promoters in JB6 cells sensitive or resistant to neoplastic transformation. *Mol Carcinog* 1992;5:62-74.
- Blumberg PM: Complexities of the protein kinase C pathway. *Mol Carcinog* 1991;4:339-44.

- Bode C, Fukin H, Bode JC: Hidden endotoxin in plasma of patients with alcoholic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1993;5:257-62.
- Dong Z, Birrer MJ, Watts RG, Matrisian LM, Colburn NH: Blocking of tumor promoter-induced AP-1 activity inhibits induced transformation in JB6 mouse epidermal cells. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:609-13.
- Dong Z, Crawford HC, Lavrovsky V, Taub D, Watts R, Matrisian LM, Colburn NH: A dominant negative mutant of *jun* blocking 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced invasion in mouse keratinocytes. *Mol Carcinog* 1997a;19:204-12.
- Dong Z, Huang C, Brown RE, Ma WY: Inhibition of activator protein 1 activity and neoplastic transformation by aspirin. *J Biol Chem* 1997b; 272:9962-70.
- Dong Z, Ma W, Huang C, Yang CS: Inhibition of tumor promoter-induced activator protein 1 activation and cell transformation by tea polyphenols, (-)-epigallocatechin gallate, and tea flavones. *Cancer Res* 1997c;57:4414-9.
- Fanjul A, Dawson MI, Hobbs PD, Jong L, Cameron JF, Harlev E, Graupner G, Lu XP, Pfahl M: A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation. *Nature* 1994;372:107-11.
- Ghosh R, Amstad P, Cerutti P: UVB-induced DNA breaks interfere with transcriptional induction of *c-fos*. *Mol Cell Biol* 1993;13:6992-9.
- Giner-Larza EM, Manez S, Giner-Pons RM, Carmen Recio M, Rios JL: On the anti-inflammatory and anti-phospholipase A(2) activity of extracts from lanostane-rich species. *J Ethnopharmacol* 2000;73:61-9.
- Gudas LJ: Retinoids, retinoid-responsive genes, cell differentiation, and cancer. *Cell Growth Differ* 1992;3:655-62.
- Gutierrez-Ruiz MC, Quiroz SC, Souza V, Bucio L, Hernandez E, Olivares IP, Llorente L, Vargas-Vorackova F, Kershenobich D: Cytokines, growth factors, and oxidative stress in HepG2 cells treated with ethanol, acetaldehyde, and LPS. *Toxicology* 1999;134:197-207.

- Harbury PB, Zhang T, Kim PS, Alber T: A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. *Science* 1993;262:1401-7.
- Herschman HR: Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Ann Rev Biochem* 1991;60:281-319.
- Hidaka Y, Kaneda T, Amino N, Miyai K: Chinese medicine, Coix seeds increase peripheral cytotoxic T and NK cells. *Biotherapy* 1992;5:201-3.
- Hou WC, Lee MH, Chen HJ, Liang WL, Han CH, Liu YW, Lin YH: Antioxidant activities of dioscorin, the storage protein of yam (*Dioscorea batatas* Decne) tuber. *J Agric Food Chem* 2001;49:4956-60.
- Hsieh MT, Peng WH, Wu CR, Wang WH: The ameliorating effects of the cognitive-enhancing Chinese herbs on scopolamine-induced amnesia in rats. *Phytother Res* 2000;14:375-7.
- Hu K, Dong A, Yao X, Kobayashi H, Iwasaki S: Antineoplastic agents; I. Three spirostanol glycosides from rhizomes of *Dioscorea collettii* var. *hypoglauca*. *Planta Med* 1996;62:573-5.
- Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JCF, Trent JM, Staudt LM, Hudson J, Boguski MS, Lashkari D, Shalon D, Botstein D, Brown PO: The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* 1999;283:83-7.
- Kelmanson JE, Jager AK, van Staden J: Zulu medicinal plants with antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 2000;69:241-6.
- Kim DH, Shim SB, Kim NJ, Jang IS: Beta-glucuronidase-inhibitory activity and hepatoprotective effect of *Ganoderma lucidum*. *Biol Pharm Bull* 1999;22:162-4.
- Kondo Y, Nakajima K, Nozoe S, Suzuki S: Isolation of ovulatory-active substances from crops of Job's tears (*Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* STAPF.). *Chem Pharm Bull* 1988;36:3147-52.

- Kuo CC, Shih MC, Kuo YH, Chiang W: Antagonism of free-radical-induced damage of adlay seed and its antiproliferative effect in human histolytic lymphoma U937 monocytic cells. *J Agric Food Chem* 2001;49:1564-70.
- Li JJ, Dong Z, Dawson MI, Colburn NH: Inhibition of tumor promoter-induced transformation by retinoids that trans-repress AP-1 without transactivating retinoic acid response element. *Cancer Res* 1996;56:483-9.
- Lu H, Uesaka T, Katoh O, Kyo E, Watanabe H: Prevention of the development of preneoplastic lesions, aberrant crypt foci, by a water-soluble extract from cultured medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) mycelia in male F344 rats. *Oncol Rep* 2001;8:1341-5.
- Luster MI, Germolec DR, Yoshida I, Kayama F, Thompson M: Endotoxin-induced cytokine gene expression and excretion in the liver. *Hepatology* 1994;19:480-8.
- Manna SK, Aggarwal BB: Wortmannin inhibits activation of nuclear transcription factors NF- κ B and activated protein-1 induced by lipopolysaccharide and phorbol ester. *FEBS Lett* 2000;473:113-8.
- Min BS, Gao JJ, Nakamura N, Hattori M: Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against meth-A and LLC tumor cells. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2000;48:1026-33.
- Moreau RA, Singh V, Hicks KB: Comparison of oil and phytosterol levels in germplasm accessions of corn, teosinte, and Job's tears. *J Agric Food Chem* 2001;49:3793-5.
- Otsuka H, Hirai Y, Nagao T, Yamasaki K: Anti-inflammatory activity of benzoxazinoids from roots of *Coix lachryma-jobi var. ma-yuen*. *J Nat Prod* 1988;51:74-9.
- Pan MH, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JH, Lin JK: Suppression of lipopolysaccharide-induced nuclear factor-kappaB activity by theaflavin-3,3'-digallate from black tea and other polyphenols through

- down-regulation of IkappaB kinase activity in macrophages. *Biochem Pharmacol* 2000;59:357-67.
- Park Y, Suzuki H, Lee YS, Hayakawa S, Wada S: Effect of coix on plasma, liver, and fecal lipid components in the rat fed on lard- or soybean oil-cholesterol diet. *Biochem Med Metab Biol* 1988;39:11-7.
- Roman Ramos R, Alarcon-Aguilar F, Lara-Lemus A, Flores-Saenz JL: Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics. *Arch Med Res* 1992;23:59-64.
- Seo WG, Pae HO, Chai KY, Yun YG, Kwon TH, Chung HT: Inhibitory effects of methanol extract of seeds of Job's Tears (*Coix lachryma-jobi L. var. ma-yuen*) on nitric oxide and superoxide production in RAW 264.7 macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2000;22:545-54.
- Shuman JD, Vinson CR, McKnight SL: Evidence of changes in protease sensitivity and subunit exchange rate on DNA binding by C/EBP. *Science* 1990;249:771-4.
- Su LC, Mukherjee AB, Mukherjee BB: Expression of antisense osteopontin RNA inhibits tumor promoter-induced neoplastic transformation of mouse JB6 epidermal cells. *Oncogene* 1995;10:2163-9.
- Tak PP, Firestein GS: NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001;107:7-11.
- Verma AK, Garcia CT, Ashendel CL, Boutwell RK: Inhibition of 7-bromomethylbenz[a]anthracene-promoted mouse skin tumor formation by retinoic acid and dexamethasone. *Cancer Res* 1983;43:3045-9.
- Verma AK, Shapas BG, Rice HM, Boutwell RK: Correlation of the inhibition by retinoids of tumor promoter-induced mouse epidermal ornithine decarboxylase activity and of skin tumor promotion. *Cancer Res* 1979;39:419-25.
- Vogt PK, Bos TJ: Jun: oncogene and transcription factor. *Adv Cancer Res*

1990;55:1-35.

Wang XC, Saban R, Kaysen JH, Saban MR, Allen PL, Benes EN, Hammond TG: Nuclear factor kappa B mediates lipopolysaccharide-induced inflammation in the urinary bladder. *J Urol* 2000;163:993-8.

Wang YY, Khoo KH, Chen ST, Lin CC, Wong CH, Lin CH: Studies on the immuno-modulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides: functional and proteomic analyses of a fucose-containing glycoprotein fraction responsible for the activities. *Bioorg Med Chem* 2002;104:1057-62.

Wheeler MD, Ronald G: Thurman up-regulation of cd14 in liver due to acute ethanol involves oxidant-dependent ap-1 pathway. *J Bio Chem* 2002;76:664-70.

Wisdom R: AP-1: one switch for many signals. *Exp Cell Res* 1999;253:180-5.

Yin M, Bradford BU, Wheeler MD, Uesugi T, Froh M, Goyert SM, Thurman RG: Reduced early alcohol-induced liver injury in CD14-deficient mice. *J Immunol* 2001;166:4737-42.

Young MR, Li JJ, Rincon M, Flavell RA, Sathyanarayana BK, Hunziker R: Transgenic mice demonstrate AP-1 (activator protein-1) transactivation is required for tumor promotion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9827-32.

Zhu M, Chang Q, Wong LK, Chong FS, Li RC: Triterpene antioxidants from *Ganoderma lucidum*. *Phytother Res* 1999;13:529-31.

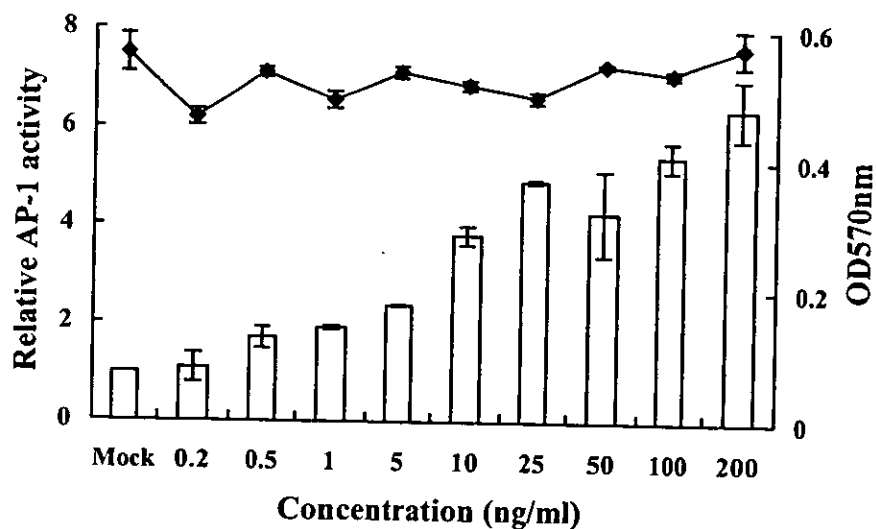
表一 保健食品的分組

編號	靈芝	北耆	薏仁	茯苓	芡實	蓮子	山藥	熟地黃	山茱萸	澤瀉	牡丹皮
1	+										
2	+	+									
3			+								
4			+	+							
5			+		+						
6			+			+					
7			+	+	+						
8			+	+		+					
9			+		+	+					
10			+	+	+	+					
11							+				
12							+	+			
13							+		+		
14							+			+	
15				+			+				
16							+				+
17							+	+	+		
18							+	+		+	
19				+			+	+			
20							+	+			+
21							+		+	+	

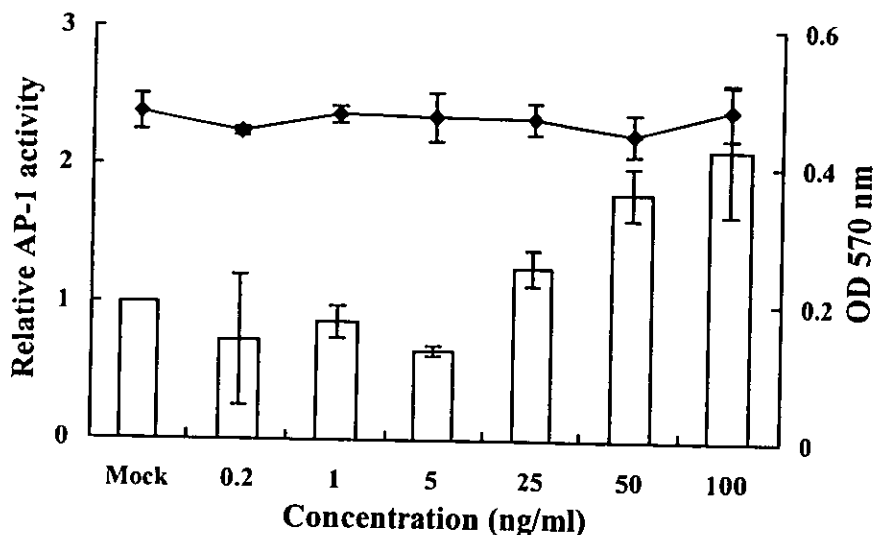
表一 保健食品的分組 (續)

編號	靈芝	北耆	薏仁	茯苓	芡實	蓮子	山藥	熟地黃	山茱萸	澤瀉	牡丹皮
22				+			+		+		
23							+		+		+
24				+			+			+	
25							+			+	+
26				+			+				+
27							+	+	+	+	
28				+			+	+	+		
29							+	+	+		+
30				+			+	+		+	
31							+	+		+	+
32				+			+	+			+
33				+			+		+	+	
34							+		+	+	+
35				+			+		+		+
36				+			+			+	+
37				+			+	+	+	+	
38				+			+	+	+		+
39							+	+	+	+	+
40				+			+		+	+	+
41				+			+	+	+	+	+

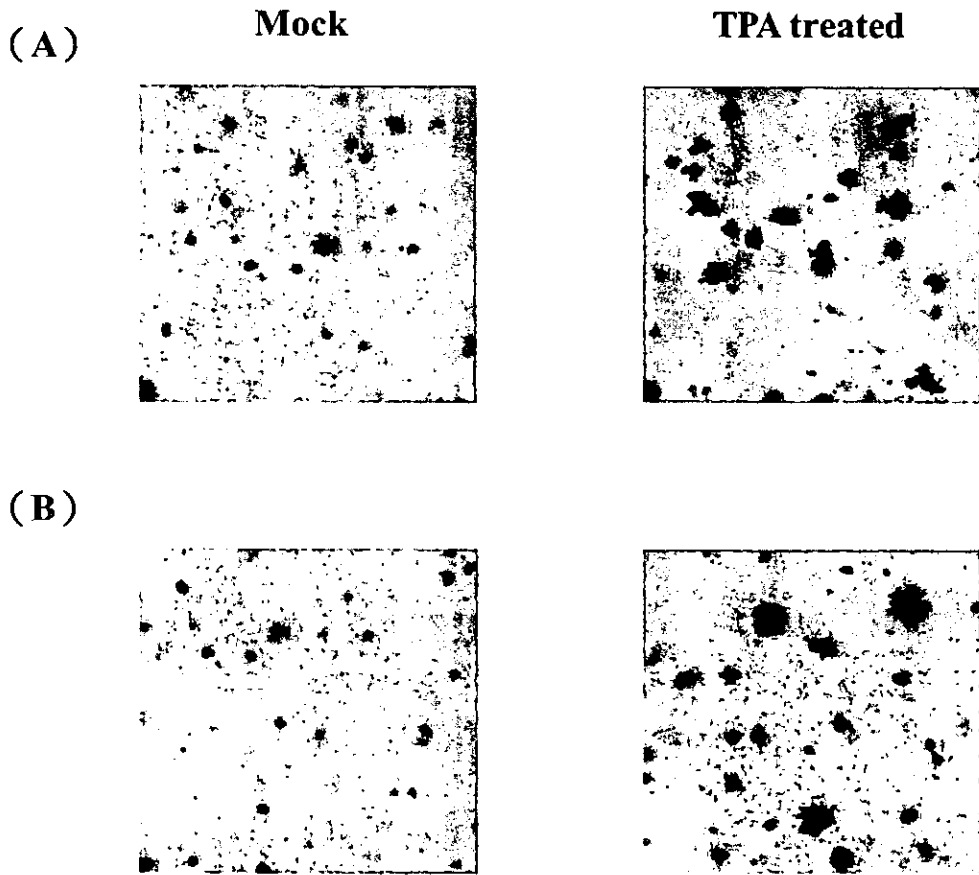
(A)



(B)

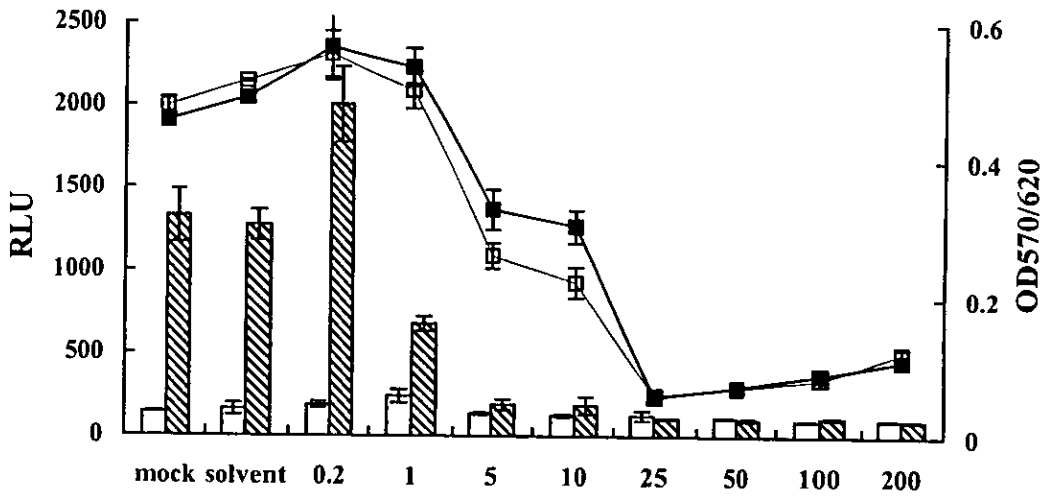


圖一 TPA 對 Chang Liver/AP-1 細胞和 HepG2/AP-1 細胞中 AP-1 活性的影響。將 Chang Liver/AP-1 細胞 (A) 及 HepG2/AP-1 細胞 (B) 在去除血清的培養基培養 24 小時後，以不同濃度的 TPA 刺激細胞，經過 16 小時後利用 reporter assay 測定 AP-1 的活化程度，並利用 MTT assay 測定細胞活性。直條圖為 AP-1 的相對活性，折線圖為細胞的活性。以上實驗為六次實驗的平均值±標準差。

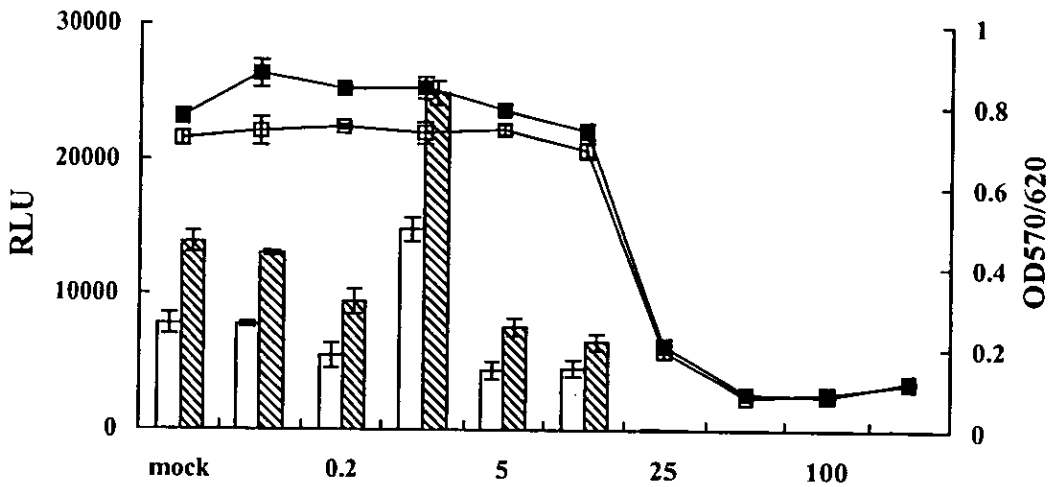


圖二 TPA 誘發細胞的轉形。利用 anchorage-independent transformation assay，將 Chang/AP-1 (A) 及 HepG2/AP-1 (B) 重組細胞分別培養於 0.4 % soft agar 中，其一組為不加 TPA 之對照組，而另一組含有 100 ng/ml TPA，持續培養 21 天後，進行 INT 染色 24 小時，最後以倒立位相差顯微鏡 40x 觀察並拍照。

(A)

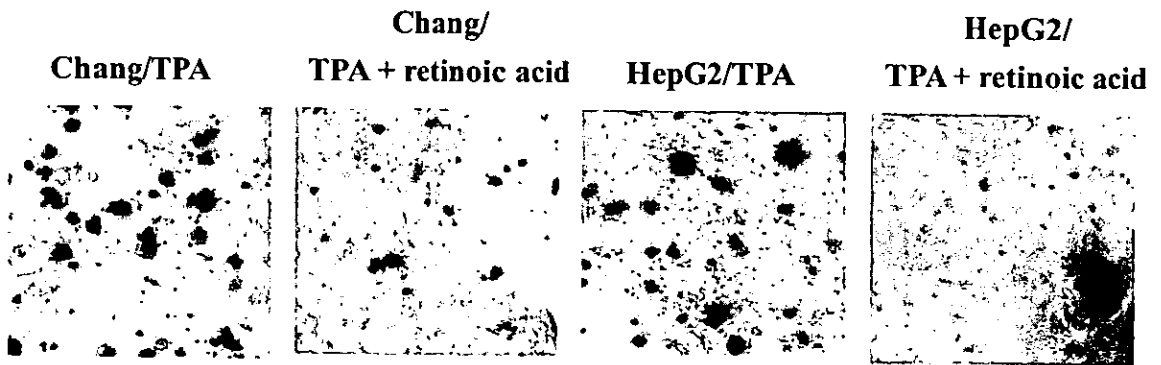


(B)

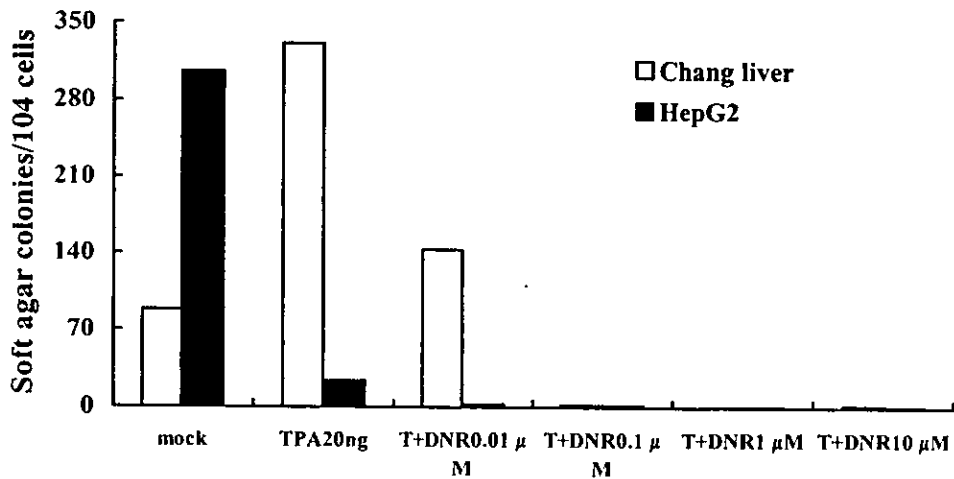


圖三 Daunorubicin 對細胞中 AP-1 活性的影響。將 Chang Liver/AP-1 細胞 (A) 及 HepG2/AP-1 細胞 (B) 於去除血清的培養基培養 24 小時後，在 TPA 存在 (斜線直條圖) 及不存在 (空心直條圖) 的情況下，以不同濃度的 daunorubicin 刺激細胞，經過 16 小時後利用 reporter assay 測定 AP-1 的活化程度，並利用 MTT assay 測定細胞活性。直條圖為 luciferase 的強度，折線圖為細胞的活性。以上實驗為六次實驗的平均值±標準差。

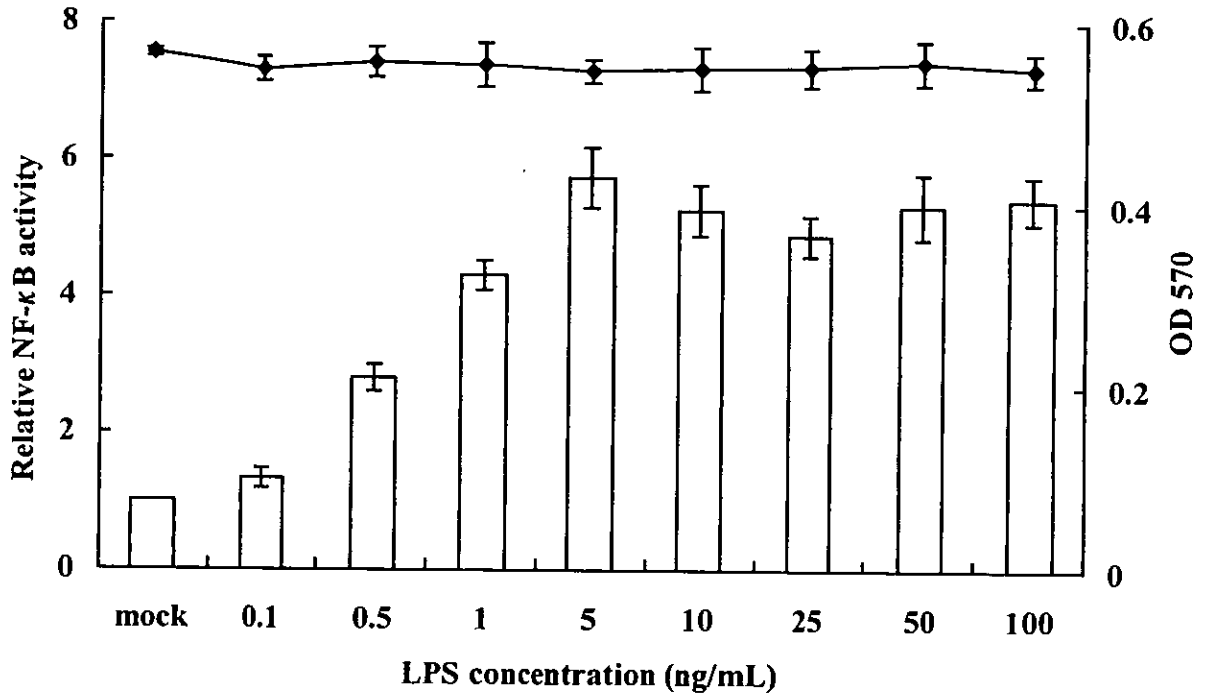
(A)



(B)

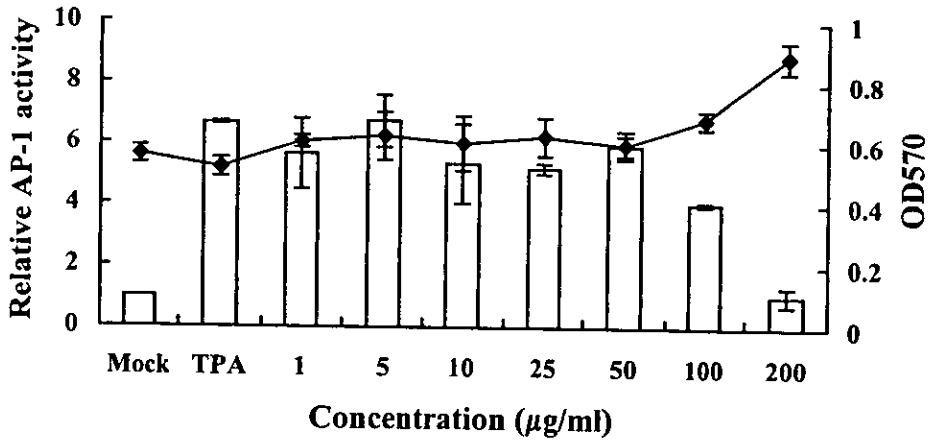


圖四 Retinoic acid 及 daunorubicin 對 TPA 誘發細胞轉形的影響。利用 anchorage-independent transformation assay 的方式，將 Chang/AP-1 及 HepG2/AP-1 重組細胞培養於 2 ml 0.4% soft agar 中，一組為 agar 中含有細胞生長培養基及 100 ng/ml TPA，另一組為細胞生長培養基及 100 ng/ml TPA 之外，再加入 50 μ M retinoic acid (A) 或不同濃度的 daunorubicin (B)，持續培養 21 天後，利用 INT 染色 24 小時，最後以倒立位相差顯微鏡 40x 觀察並拍照。

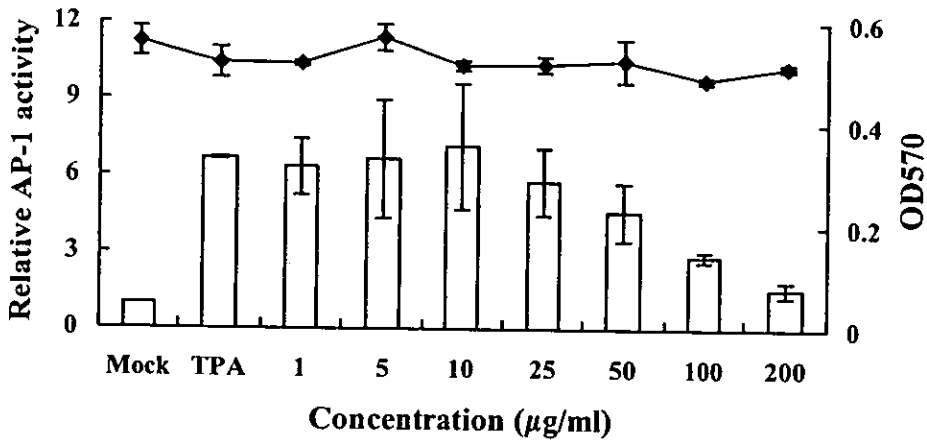


圖五 LPS 對細胞中 NF- κ B 活性的影響。細胞培養 24 小時後，加入不同濃度的 LPS 反應 16 小時，再以 reporter assay 測量 NF- κ B 的活性，並利用 MTT assay 測定細胞活性。直條圖為 NF- κ B 的相對活性，折線圖為細胞的活性。以上實驗為三次實驗的平均值 \pm 標準差。

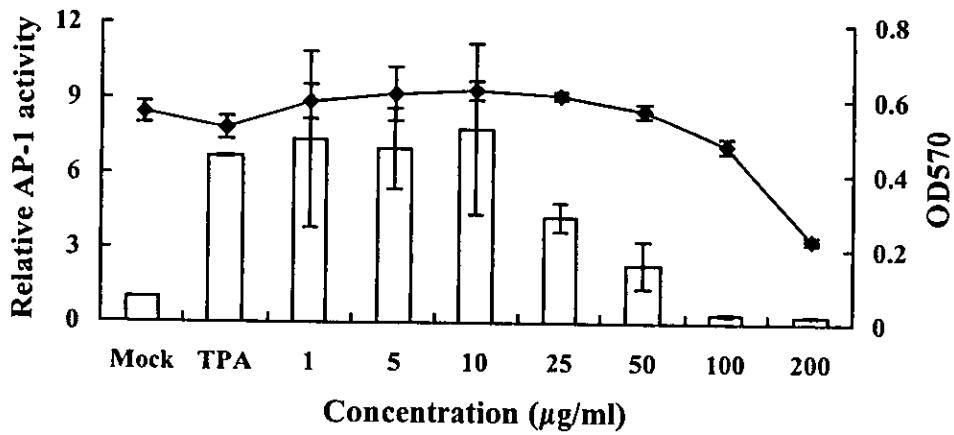
(A)



(B)

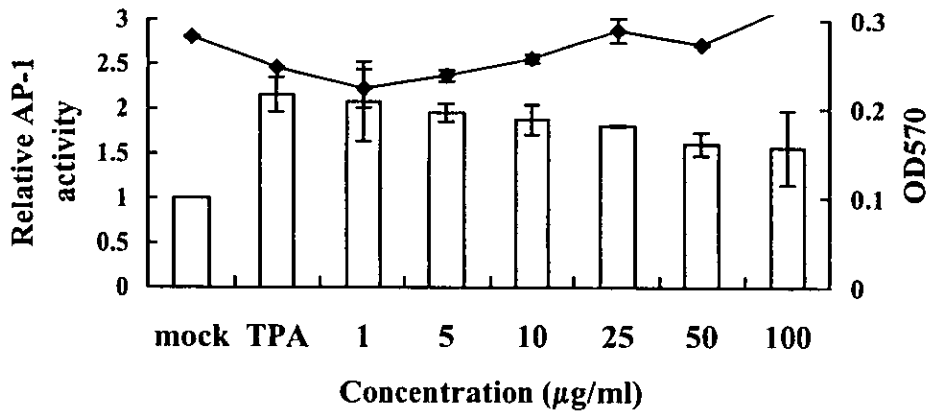


(C)

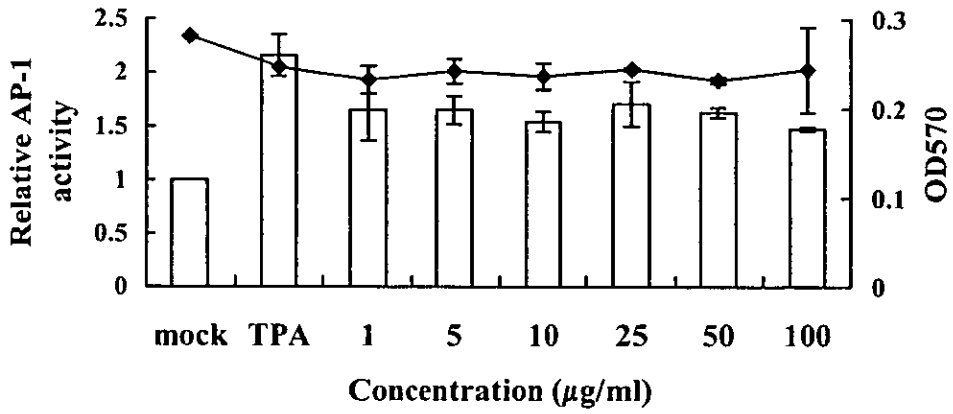


圖六 靈芝、薏仁、山藥甲醇萃取物對於 TPA 誘發 AP-1 活性的影響。將 Chang Liver/AP-1 細胞在去除血清的培養基培養 24 小時後，以 20 ng/ml 的 TPA 刺激細胞，並加入不同濃度的靈芝 (A)、薏仁 (B)、山藥甲醇萃取物 (C)，經過 16 小時後利用 reporter assay 測定 AP-1 的活化程度，並利用 MTT assay 測定細胞活性。直條圖為 AP-1 的相對活性，折線圖為細胞的活性。以上實驗為六次實驗的平均值±標準差。

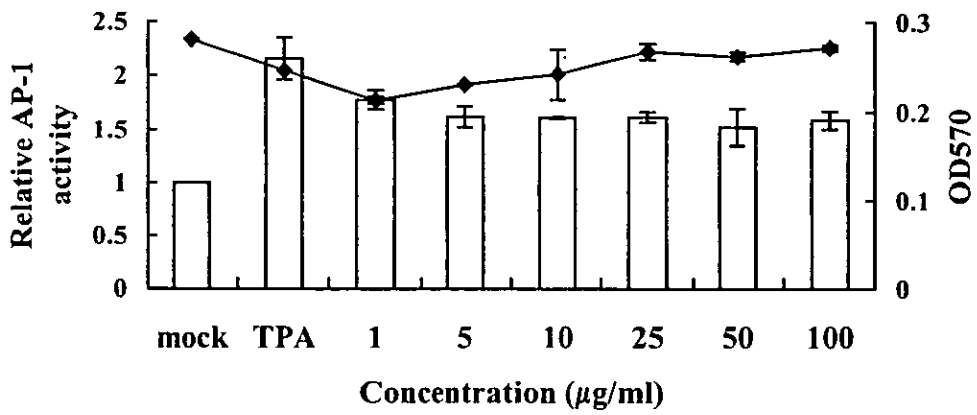
(A)



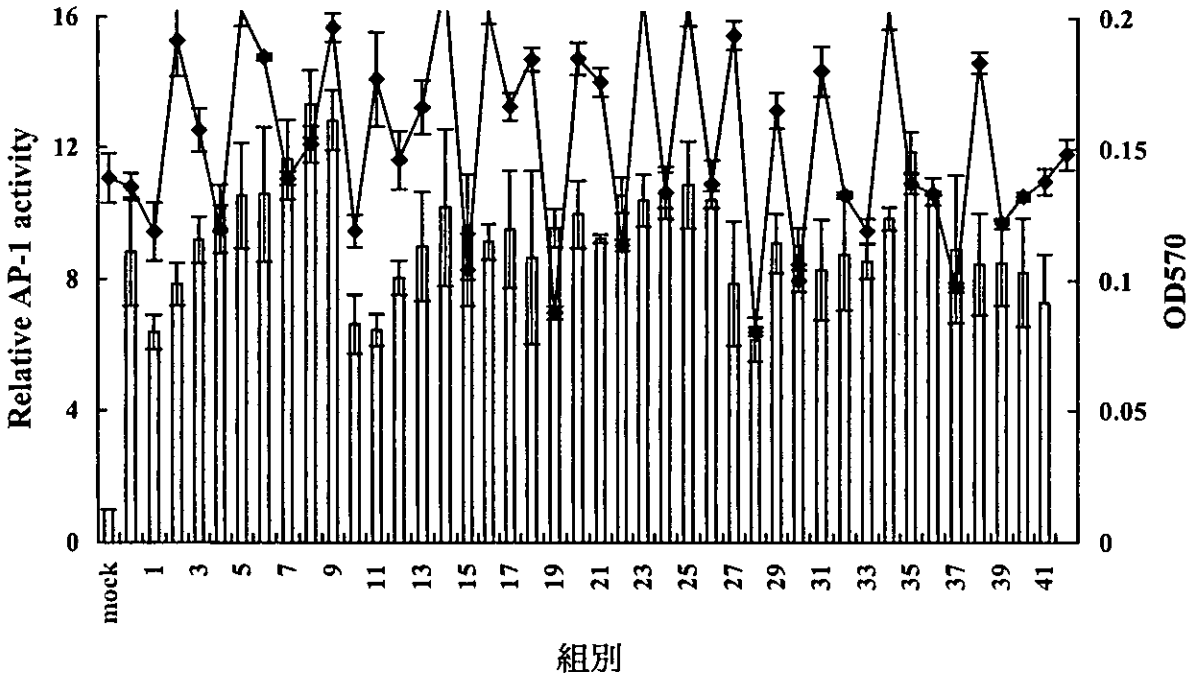
(B)



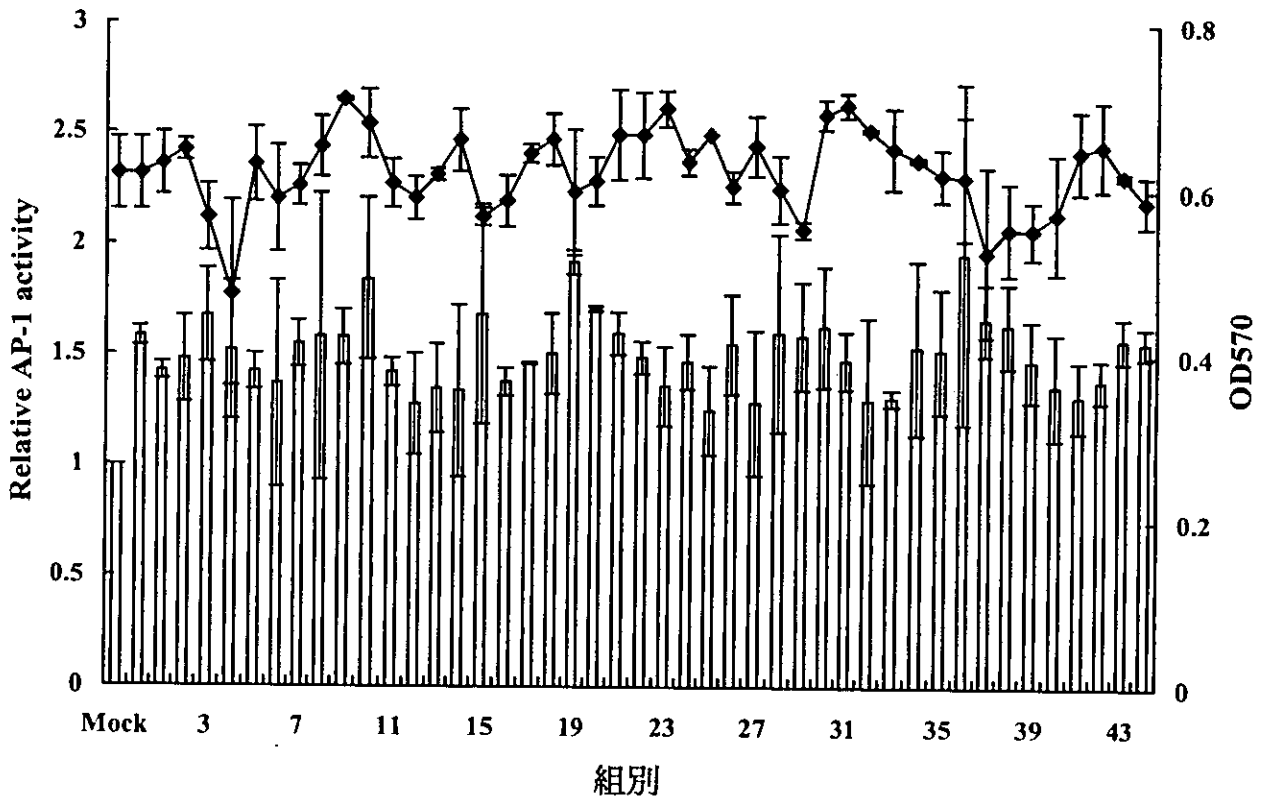
(C)



圖七 靈芝、薏仁、山藥水萃取物對於 TPA 誘發 AP-1 活性的影響。將 HepG2/AP-1 細胞在去除血清的培養基培養 24 小時後，以 20 ng/ml 的 TPA 刺激細胞，並加入不同濃度的靈芝 (A)、薏仁 (B)、山藥甲醇萃取物 (C)，經過 16 小時後利用 reporter assay 測定 AP-1 的活化程度，並利用 MTT assay 測定細胞活性。直條圖為 AP-1 的相對活性，折線圖為細胞的活性。以上實驗為六次實驗的平均值±標準差。

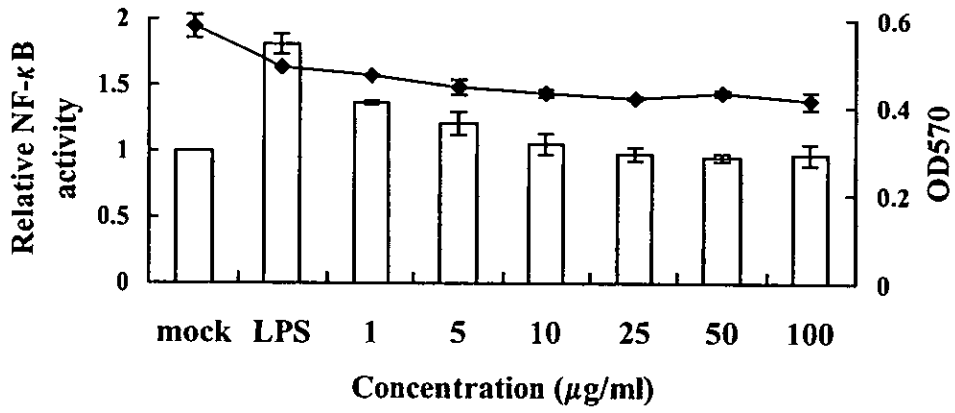


圖八 靈芝、薏仁、山藥及複方食材甲醇萃取物對於 TPA 誘發 AP-1 活性的影響。將 Chang Liver/AP-1 細胞在去除血清的培養基培養 24 小時後，以 20 ng/ml 的 TPA 刺激細胞，並加入不同濃度的甲醇萃取物，經過 16 小時後利用 reporter assay 測定 AP-1 的活化程度，並利用 MTT assay 測定細胞活性。組別成分參見表一，直條圖為 AP-1 的相對活性，折線圖為細胞的活性。以上實驗為六次實驗的平均值±標準差。

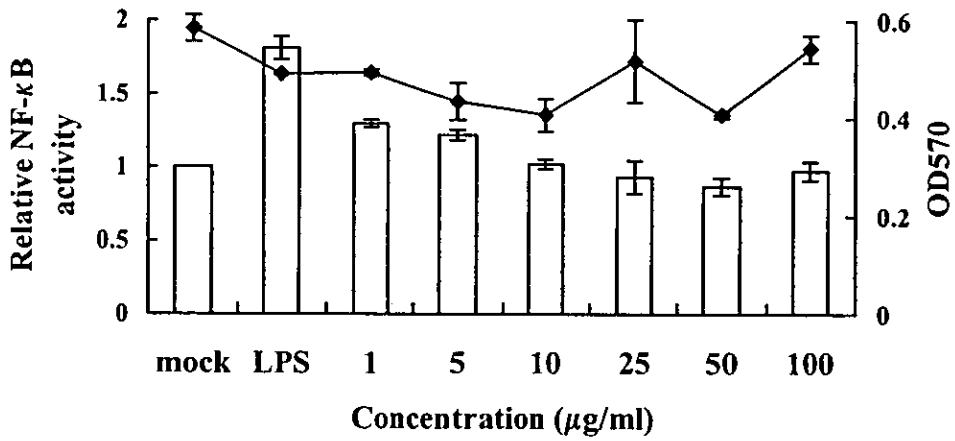


圖九 靈芝、薏仁、山藥及複方食材水萃取物對於 TPA 誘發 AP-1 活性的影響。將 HepG2/AP-1 細胞在去除血清的培養基培養 24 小時後，以 20 ng/ml 的 TPA 刺激細胞，並加入不同濃度的水萃取物，經過 16 小時後利用 reporter assay 測定 AP-1 的活化程度，並利用 MTT assay 測定細胞活性。組別成分參見表一，直條圖為 AP-1 的相對活性，折線圖為細胞的活性。以上實驗為六次實驗的平均值±標準差。

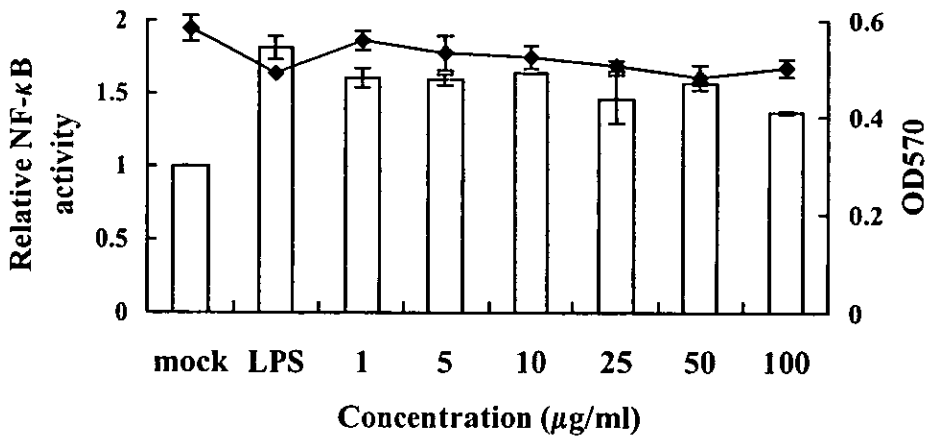
(A)



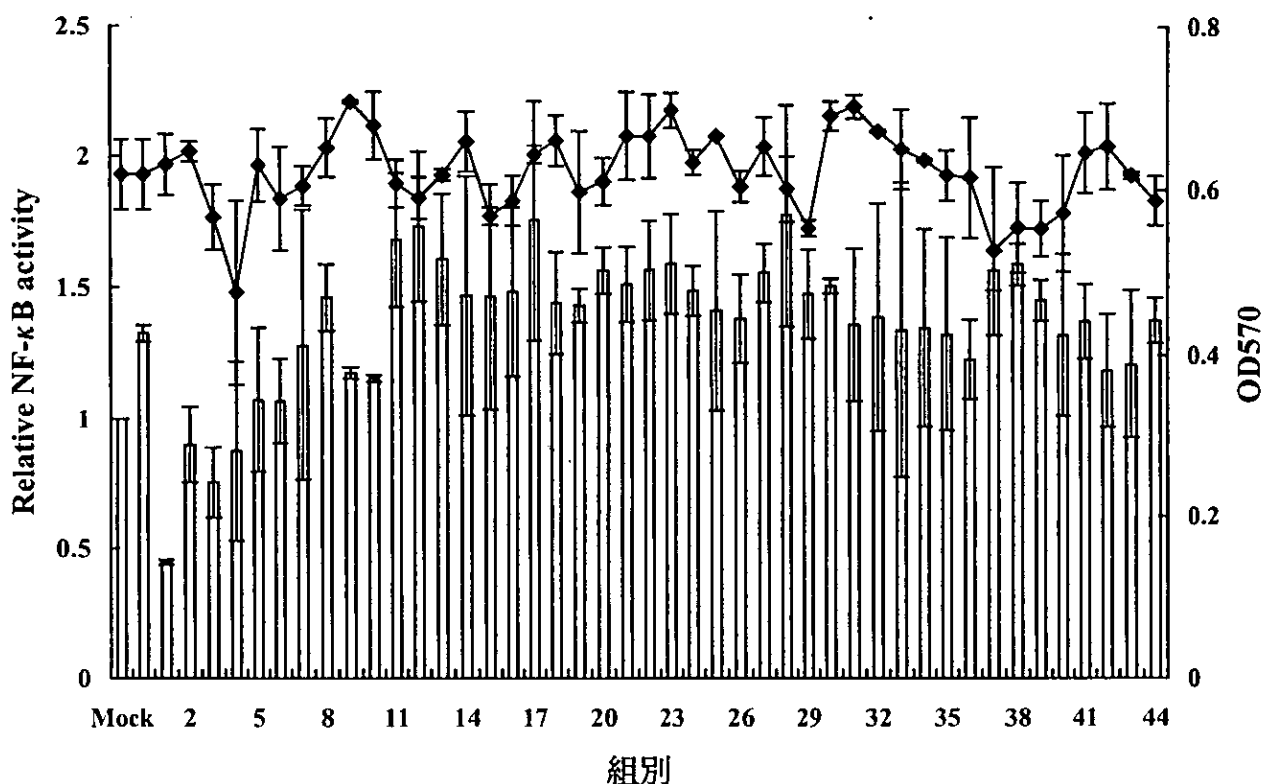
(B)



(C)



圖十 靈芝、薏仁、山藥水萃取物對於 LPS 誘發 NF- κ B 活性的影響。將 HepG2/NF- κ B 細胞以 20 ng/ml 的 LPS 刺激細胞，並加入不同濃度的靈芝 (A)、薏仁 (B)、山藥甲醇萃取物 (C)，經過 16 小時後利用 reporter assay 測定 NF- κ B 的活化程度，並利用 MTT assay 測定細胞活性。直條圖為 NF- κ B 的相對活性，折線圖為細胞的活性。以上實驗為六次實驗的平均值 \pm 標準差。



圖十一 靈芝、薏仁、山藥及複方食材水萃取物對於 LPS 誘發 NF- κ B 活性的影響。將 HepG2/NF- κ B 細胞以 20 ng/ml 的 LPS 刺激細胞，並加入不同濃度的水萃取物，經過 16 小時後利用 reporter assay 測定 NF- κ B 的活化程度，並利用 MTT assay 測定細胞活性。組別成分參見表一，直條圖為 NF- κ B 的相對活性，折線圖為細胞的活性。以上實驗為六次實驗的平均值±標準差。