

第四章 實驗結果

一、PN 抑制 LPS 誘發之細胞素釋出---

本實驗希望觀察到中藥對於被 LPS 激活的肺巨噬細胞是否有調控作用，或者有功能上的變化，因此從巨噬細胞的活性 (MTT Assay) 及 cytokines 的變化二項來評估，由肺沖洗液得到的肺泡巨噬細胞以 2×10^6 /ml 培養於 24-well 培養盤中， 37°C 培養 2 小時後以 HBSS 清洗 2 次，吸去未貼壁細胞，餘之即為肺巨噬細胞。

實驗依對照組及 LPS 刺激組 ($1 \mu\text{g/ml}$)，不同劑量之三七 PN (Panax Notogenseng) 等分組，每組各以三重複進行，細胞加藥處理後於培養箱中培養 24 小時，收集上清液並保存於 -70°C 備用。

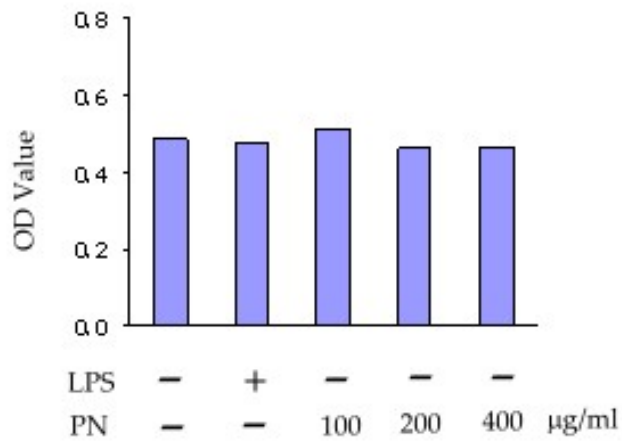
以 MTT assay 比較各組之細胞活性有無差異，ELISA reader 波長 550 nm 下測定吸光值，結果觀察到在加入 LPS 及不同濃度的 PN (100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$) 後，各組間之 MTT 分析的吸光值並無顯著差異，平均值分別為 0.49, 0.48, 0.51, 0.46, 0.47，這代表每孔培養皿裡的細胞活性並不會因加入 LPS 或 PN 而有所不同，亦即無論是否加入 LPS 或 PN 均不會影響肺巨噬細胞的存活，細胞數目維持一定數量(圖一)。

Cytokines 方面的測量是以 ELISA reader 450 nm 下測吸光值 (OD

value)再以標準曲線換算 cytokine 之濃度。結果觀察到在 LPS 刺激小鼠肺巨噬細胞 (macrophage)後，IL-6 明顯的增加，IL-6 產生的濃度平均為 380.09 pg/ml，經投予不同濃度的 PN (100, 200, 400 ug/ml)後，IL-6 表現的濃度平均為 333.68, 331.88, 197.40 pg/ml，顯示在 400 ug/ml 濃度下，PN 明顯抑制 IL-6 的產生 ($P < 0.05$) (圖二)。

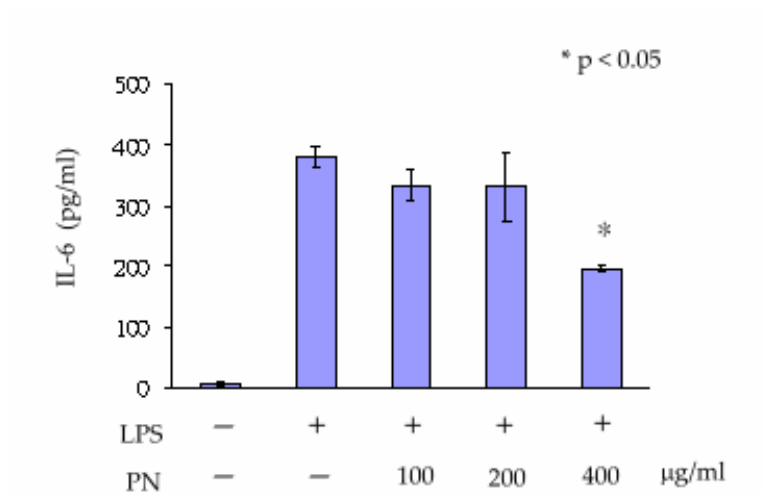
我們同樣的以 ELISA kit 測量 TNF- α ，同樣可以看到 LPS 刺激小鼠肺巨噬細胞 (macrophage)產生大量的 TNF- α ，產生的濃度平均為 198.39 pg/ml。但經投予不同濃度的 PN (100, 200, 400 ug/ml)後，TNF- α 的濃度分別平均為 171.73, 111.14, 77.22 pg/ml，因此隨著處理 PN 的增加可明顯降低 TNF- α 的產生 ($p < 0.05$) (圖三)。

由以上結果，我們得知在不影響 cell viability 狀態下，400ug/ml 濃度的 PN 有效的抑制 LPS 所誘發小鼠 lung macrophage 產生之 Pro-inflammatory 細胞激素 IL-6 及 TNF- α 。此體外試驗之結果，證實三七 (PN) 能有效抑制 LPS 刺激而產生的過多細胞激素 IL-6 及 TNF- α 。



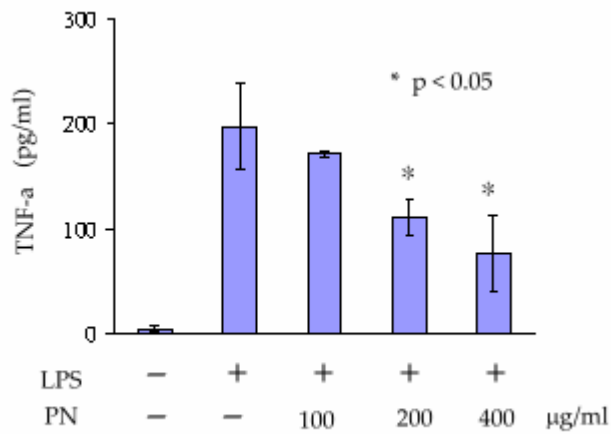
圖一 LPS 及 PN 不會改變小鼠肺之巨噬細胞的活性

肺沖洗液中純化的肺泡巨噬細胞 (macrophage) 以 2×10^6 /ml 培養於 24-well 培養盤中，分別加入 LPS 及不同濃度的 PN (100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$) 後，MTT 分析的吸光值結果發現各處理之間並無顯著差異。代表每孔培養皿裡的細胞數目 (cell viability) 並不會因加入 LPS 或 PN 而有所不同。



圖二 PN 抑制 LPS 刺激誘導的小鼠肺巨噬細胞產生 IL-6

我們以 ELISA 的方法來測巨噬細胞 (macrophage) 產生 cytokine 的濃度，在 LPS 刺激巨噬細胞後，IL-6 表現量明顯的增加。但經投予不同濃度的 PN (100, 200, 400 µg/ml) 後，發現在 400 ug/ml 濃度下，LPS 誘發的 IL-6 的產生明顯的受到抑制 ($P < 0.05$)。



圖三 PN 抑制 LPS 刺激誘導的小鼠肺巨噬細胞產生 TNF- α

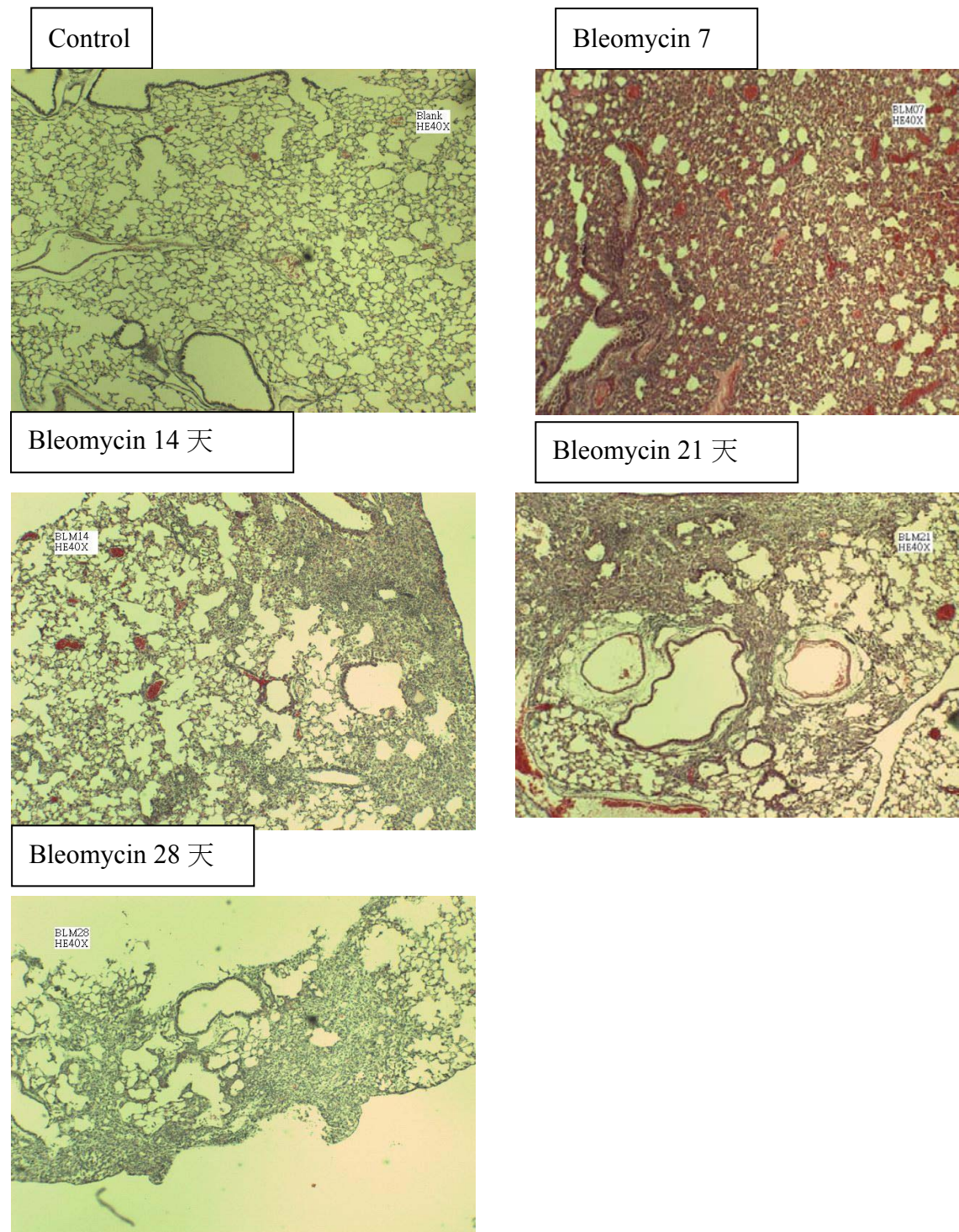
以 ELISA 的方法測定巨噬細胞 (macrophage) 產生 TNF- α 的濃度，結果觀察到 LPS 刺激肺巨噬細胞產生大量的 TNF- α ，經投予不同濃度的 PN (100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$) 後，觀察到 PN 只要在濃度 200 $\mu\text{g/ml}$ 時，即有意義的降低 TNF- α 的產生 ($p < 0.05$)。

二、C57BL/6 小鼠肺纖維化動物模式之建立

(1) Bleomycin (BL)以無菌注射用生理食鹽水配成 1 mg/ml 溶液備用。小鼠分成 NS 7, NS 14, NS 21, NS 28, BL 7, BL 14, BL 21 及 BL 28 共 8 組，每組 3 隻，以乙醚麻醉後稱重，每隻小鼠以 0.3 u/100g 單一劑量 (約為 75 μ l)經由氣管投藥，並於給藥後第 7, 14, 21, 28 天處死，看肺纖維化情形。

(2) 三七餵食 Bleomycin 誘發肺纖維化小鼠預試驗:

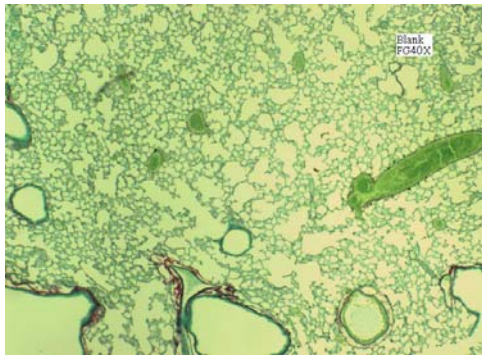
8 週齡實驗小鼠分成 4 組，每組 6 隻，氣管投以 3 mg/kg 的 Bleomycin。中藥組第二天起餵食不同量的三七粉末，第 7, 14, 21 天處死取肺臟，注入 10% formaldehyde 固定，埋蠟，切片，染色。我們發現 Bleomycin 處理組在第 7 天時，在顯微鏡下，整個肺有明顯的發炎反應，而第 14 天肺纖維化已形成，且隨著時間逐漸惡化，第 21、28 天時更明顯 (圖四、五)。如此，我們確定了這個肺纖維化的動物的模式。然而，接下來要評估給予 PN 的治療療效。bleomycin 給藥後給予不同劑量的 PN，經過 0.5 mg/kg/day, 1 mg/kg/day, 2 mg/kg/day。結果發現在給予 2 mg/kg/day 時，66%的 C57BL/6 鼠會死亡，而 0.5mg/kg/day 的都存活，因此我們取用 0.5 mg/kg/day 的劑量餵食。至於死亡的老鼠經過 autopsy，發現肺部有明顯發炎浸潤及肺泡壁覆蓋一層 hyaline membrane。



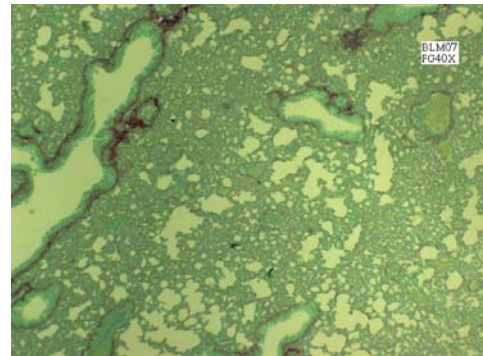
圖四 Bleomycin 誘發肺纖維化小鼠肺組織切片 (HE stain)

我們發現在第 7 天時，在顯微鏡下，整個肺有明顯的發炎反應，而第 14 天肺纖維化已成型，且隨著時間逐漸惡化，第 21、28 天時更明顯。

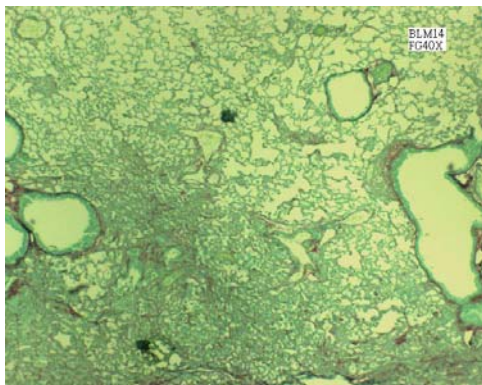
Control



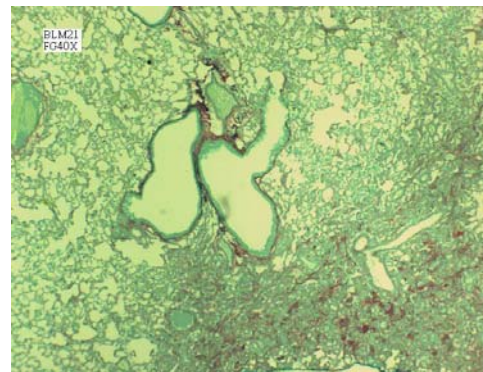
Bleomycin 7 天



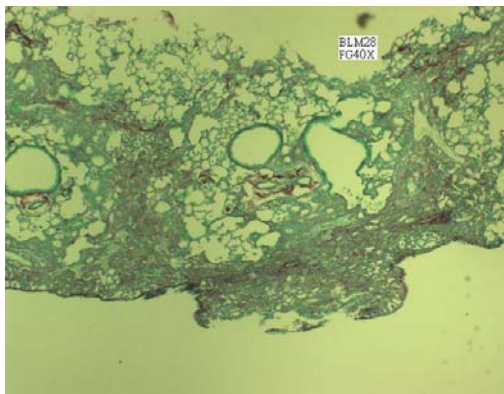
Bleomycin 14 天



Bleomycin 21 天



Bleomycin 28 天



圖五 Bleomycin 誘發肺纖維化小鼠肺組織切片以 Fast Green

(collagen red) 染色

在第 7 天時，於顯微鏡下觀察發現，整個肺有明顯的發炎反應，而第 14 天肺纖維化已成型，且隨著時間逐漸惡化，第 21、28 天時更明顯。

三、動物模式下三七 (PN)能有效抑制小鼠肺纖維化過程中產生的過多細胞激素 (IL-1 β , TNF- α , TGF- β)---

根據上述肺纖維化動物實驗，取 C57BL/6 小鼠分成 NS 7, NS 14, NS 21, BL 7, BL 14, BL 21, BA 7, BA 14, BA 21, BD 14 及 BD 21 共 11 組，每組 6 隻，於給藥 (三七粉末 0.5 mg/kg)後第 7, 14, 21 天，CO₂ 處死，固定於解剖盤上，分別從頸部剪開胸骨，露出氣管及胸腔，在氣管上端(會厭下方)剪一小洞插入導管並用線固定，導管另一端接 1 ml 針筒，每次以 1 ml HBSS 緩慢灌入肺臟，並輕輕按摩肺葉，吸出沖洗液，重覆以上沖洗動作 3 次，收集每隻小鼠的肺沖洗液，以 200 μ l capture antibody coating overnight (4 °C)，用 wash buffer (0.05% Tween in PBS , PH 7.0)洗三次，加入 100 μ l blocking solution (assay diluent)，置於室溫下一小時，wash buffer 洗三次，加入 100 μ l 之檢體，置於室溫下二小時，wash buffer 洗五次，加入二次抗體，置於室溫下一小時，wash buffer 洗七次 (最後一次沖洗需浸泡 30 秒)，加入 100 μ l TMB (tetramethylbenzidine)呈色劑，置於室溫下(避光)30 分鐘，樣品漸呈藍色，加入 50 μ l stop solution (2N H₃PO₄)顏色變成黃色，以 ELISA READER 450 nm 下測吸光值 (OD value)再以標準曲線換算 cytokine 之濃度。

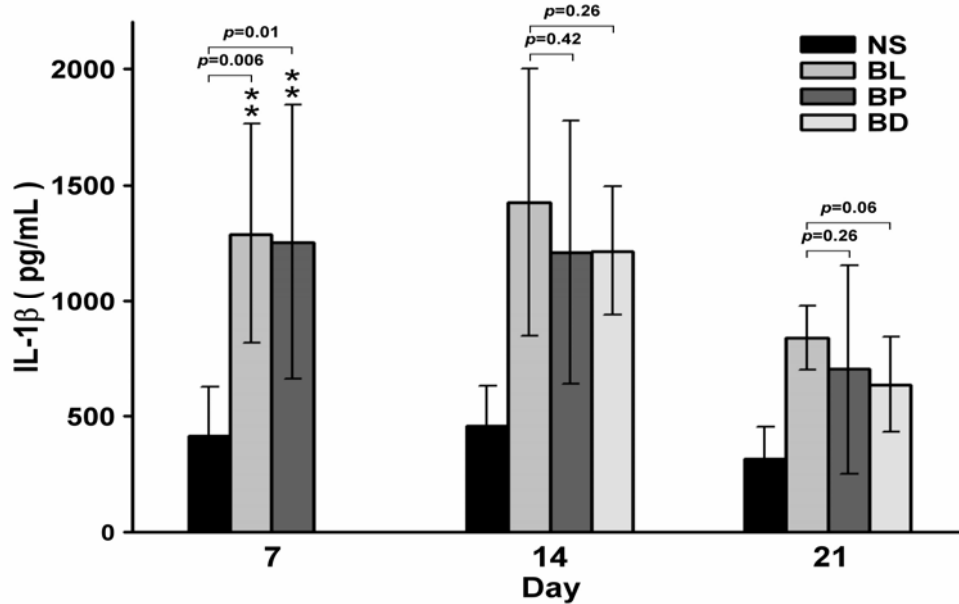
進行 Bleomycin 誘發肺纖維化後，經 PN 處理後肺內 cytokine 變化之評估。首先，我們觀察 IL-1 β 的變化，在第 7 天時，Bleomycin (BL) 與對照組相比較，明顯大量刺激 IL-1 β 的產生($P<0.01$)，而分別於第 2 天 (BA) 及第 7 天 (BD) 開始給予 PN 治療，雖然在第 7、14、21 天都可看到有抑制 IL-1 β 的現象，但僅有第 7 天開始給藥組 (BD) 於第 21 天時，IL-1 β 有較明顯的降低 ($P<0.06$)。至於第 2 天給藥與第 7 天開始給藥間 (BA vs BD)，雖第 7 天開始給藥組 (BD) IL-1 β 減少較多，但兩者間，並無統計學上之差異(圖六)。

在 IL-6 方面，同樣 LPS 明顯的刺激 IL-6 的產生，雖然在第 7 天開始給藥組 (BD)，IL-6 之表現差異性並無統計學上的意義。值得一提的是，IL-6 在第 2 天給藥組(BA)，卻是比單獨 Bleomycin 組 (BL) 誘發更多 IL-6 的產生($P<0.05$)，而第 7 天開始給藥組與第 2 天開始給藥組相較下(BD vs BA)，有意義的抑制 IL-6 的產生($P<0.01$) (圖七)。

在 TNF- α 方面的變化，我們仍可以看到 TNF- α 被 Bleomycin 刺激大量產生($P<0.01$)，第 2 天 (BA) 及第 7 天開始給藥組 (BD) 兩者都可減少 TNF- α 的產生，但僅 7 天開始給藥組於第 14 天時，TNF- α 較有意義的減少($P<0.07$) (圖八)。

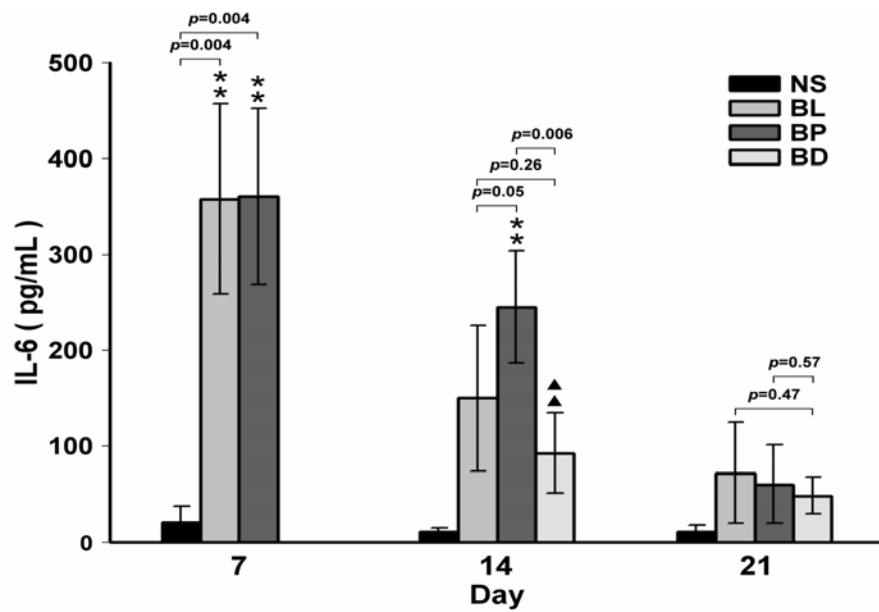
在 TGF- β 方面，我們可以看到跟對照組比較，Bleomycin 刺激後有大量增加的現象，且隨著時間逐漸上升，巔峰值約在 7-21 天間，

不像前面三種 pro-inflammatory cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α)於 7 天後都往下降，兩種不同時間點 (BA, BD) 給予 PN 的治療，皆可看到 TGF- β 較 Bleomycin 組有較大的減少，尤其是第 7 天開始給藥組，更能明顯降低 TGF- β 的產生 (14th day P<0.01, 21st day P<0.05)且與第 2 天開始給藥組比，也都有相當意義的下降 (P<0.05, P<0.07) (圖九)。



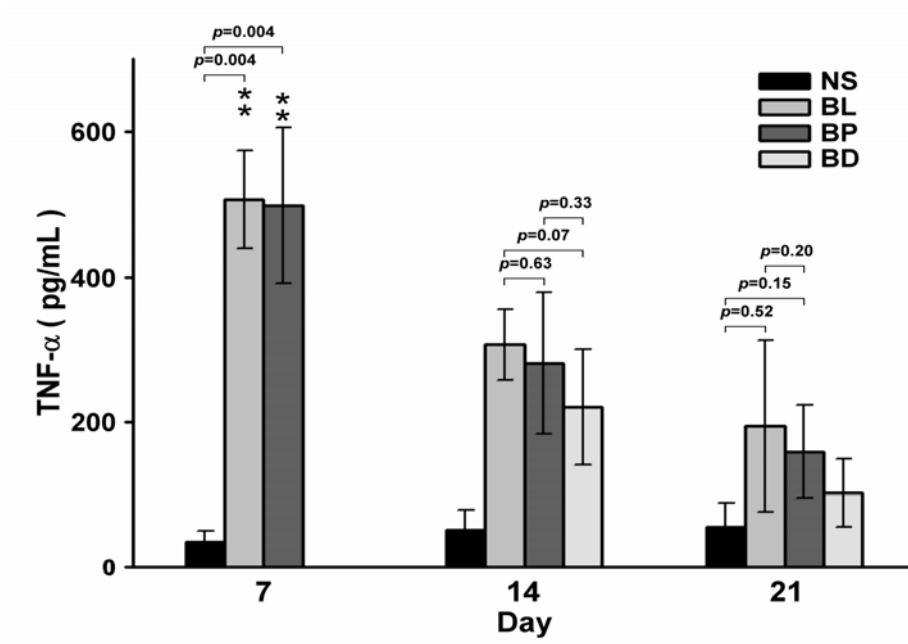
圖六 PN 抑制小鼠肺纖維化過程中 IL-1 beta 的產生

我們觀察 IL-1-Beta 的變化，在第 7 天時，Bleomycin (BL) 與 NS 組相比較，明顯大量刺激 IL-1beta 的產生 ($P < 0.01$)，而分別於第 2 天 (BA) 及第 7 天 (BD) 開始給予 PN 治療，雖然在第 7、14、21 天都可看到有抑制 IL-1beta 的現象，但僅有第 7 天開始給藥組 (BD) 於第 21 天時，IL-1beta 有較明顯的降低 ($P < 0.06$)。至於第 2 天給藥與第 7 天開始給藥間 (BA vs BD)，雖第 7 天開始給藥組 (BD) IL-1beta 減少較多，但兩者間，並無統計學上意義。



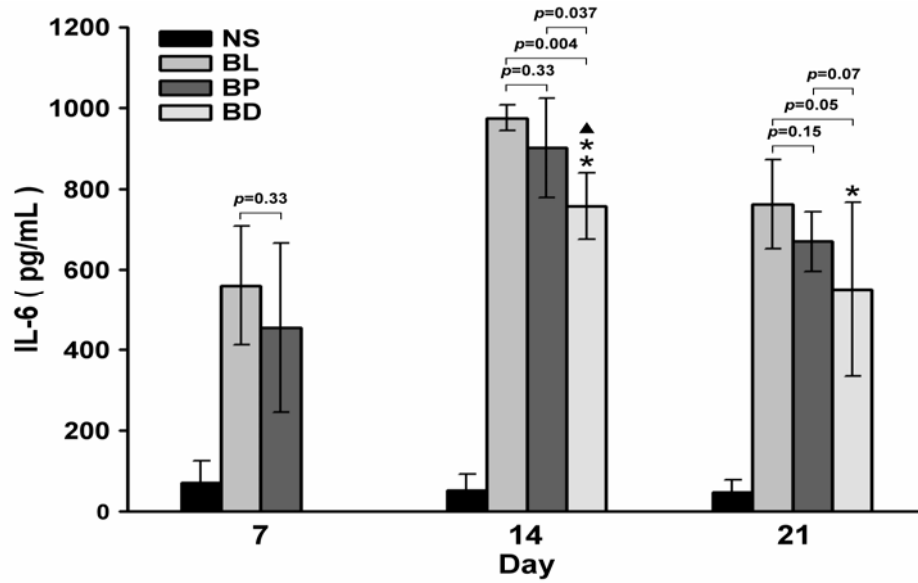
圖七 PN 抑制小鼠肺纖維化過程中 IL-6 的產生較不明顯

在 IL-6 方面，同樣 LPS 明顯的刺激 IL-6 的產生，雖然在第 7 天開始給藥組 (BD)，可看到有較多的 IL-6 減少，但兩者皆無統計學上的意義。不過要注意的是，IL-6 在第 2 天給藥組(BA)，卻是比單獨 Bleomycin 組 (BL)誘發更多 IL-6 的產生($P < 0.05$)，而第 7 天開始給藥組與第 2 天開始給藥組相較下(BD vs BA)，有意義的抑制 IL-6 的產生 ($P < 0.01$)。



圖八 PN 抑制小鼠肺纖維化過程中 TNF alpha 的產生

在 TNF- α 方面的變化，我們仍然可以看到 TNF- α 被 Bleomycin 刺激大量產生($P < 0.01$)，第 2 天 (BA) 及第 7 天開始給藥組 (BD) 兩者都可減少 TNF- α 的產生，但僅 7 天開始給藥組於第 14 天時，TNF- α 較有意義的減少($P < 0.07$)。



圖九 PN 抑制小鼠肺纖維化過程中 TGF beta 的產生

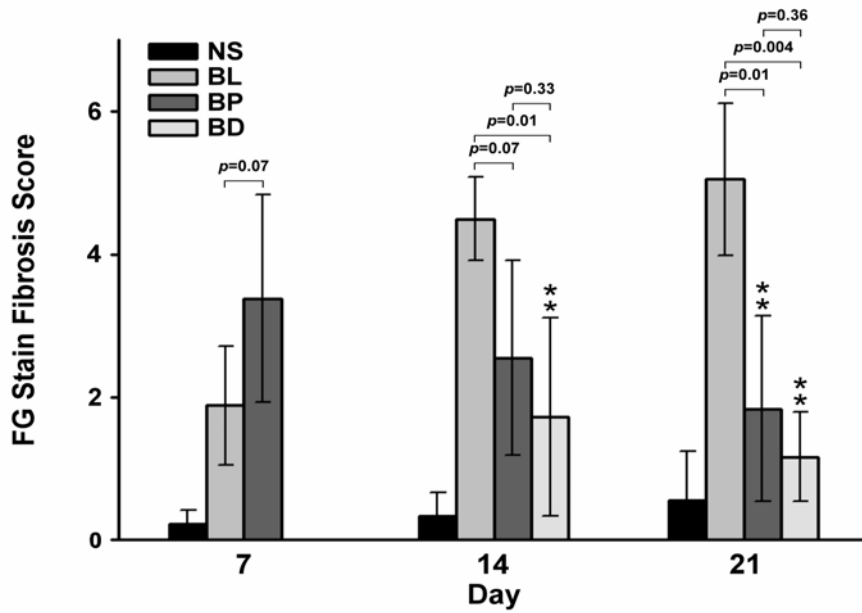
在 TGF- β 方面，我們可以看到跟對照之 NS 組比較，Bleomycin 刺激後有大量增加的現象，且隨著時間逐漸上升，巔峰值約在 7-21 天間，不像前面三種 pro-inflammatory cytokine (IL-1 β ，IL-6，TNF- α) 於 7 天後都往下降，兩種不同時間點 (BA, BD) 給予 PN 的治療，皆可看到 TGF- β 較 Bleomycin 組有較大的減少，尤其是第 7 天開始給藥組，更能明顯降低 TGF- β 的產生 (14th day P<0.01，21st day P<0.05) 且與第 2 天開始給藥組比，也都有相當意義的下降 (P<0.05, P<0.07)。

四、組織切片肺纖維化程度評估顯示 PN 能改善小鼠肺纖維化：

根據上述肺纖維化動物實驗模式，取 C57BL/6 小鼠分成 NS 7, NS 14, NS 21, BL 7, BL 14, BL 21, BA 7, BA 14, BA 21, BD 14 及 BD 21 共 11 組，每組 6 隻，於給藥後第 7, 14, 21 天，CO₂ 處死，1 ml 福馬林由氣管灌入固定內部並泡於福馬林中。隔天取出肺組織修片，前處理，埋蠟，切片(厚度 5 μ m)，脫蠟 Hematoxylin and Sirius Red 染色，顯微鏡下觀察肺纖維化程度。

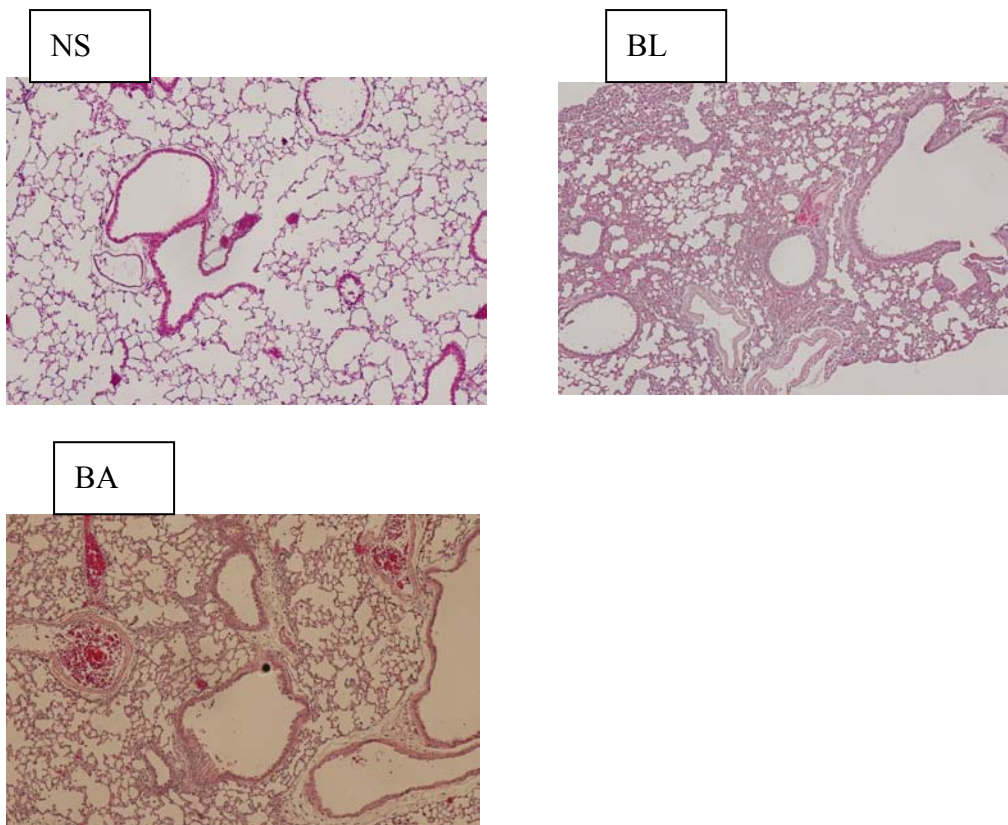
根據 1988 年 Journal Clinical Pathology 的肺纖維化分級，我們把纖維化分級為 0-8 不同程度的 score，藉由 HE stain 及 Ra Sirius red stain 我們發現單獨 Bleomycin 組隨著時間增加，肺纖維化的程度愈嚴重，但是治療組則相反，不管第 2 天開始給藥或第 7 天開始給藥治療，都有意義的在第 14 天、21 天降低肺纖維化，第 14 天(BA vs BL P<0.08；BD vs BL P<0.01)，第 21 天(BA vs BL P<0.01；BD vs BL P<0.01)，尤其是第 7 天開始給予 PN 治療組，改善肺纖維化更明顯(圖十、十一、十二及十三)。

然而，於第 7 天時，我們要注意第 2 天給藥組其 score 反而比未給藥組來的高(圖十)。



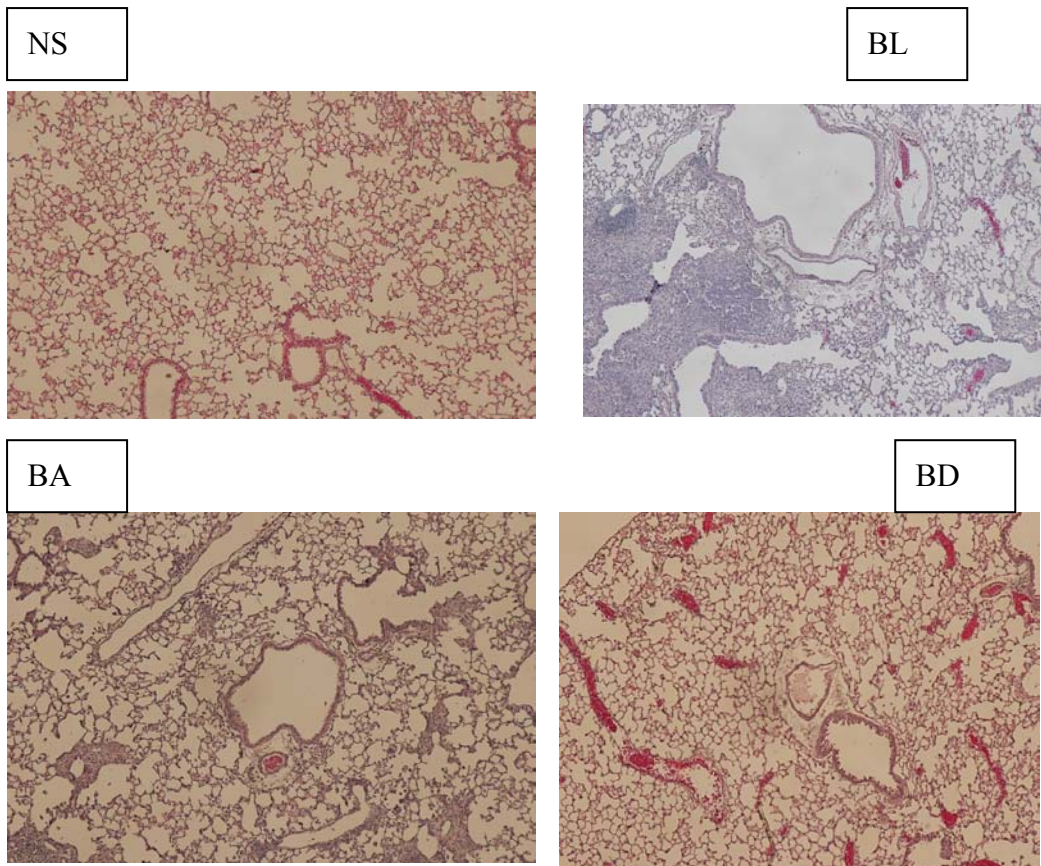
圖十 PN 能改善小鼠肺組織纖維化程度 (FG stain fibrosis score)

根據 1988 年 Journal Clinical Pathology 的分級標準將肺纖維化分級為 0-8 不同程度的 score，藉由 Ra Sirius red stain，我們亦發現處理 PN 在第 14 天、21 天可有效的降低肺纖維化。



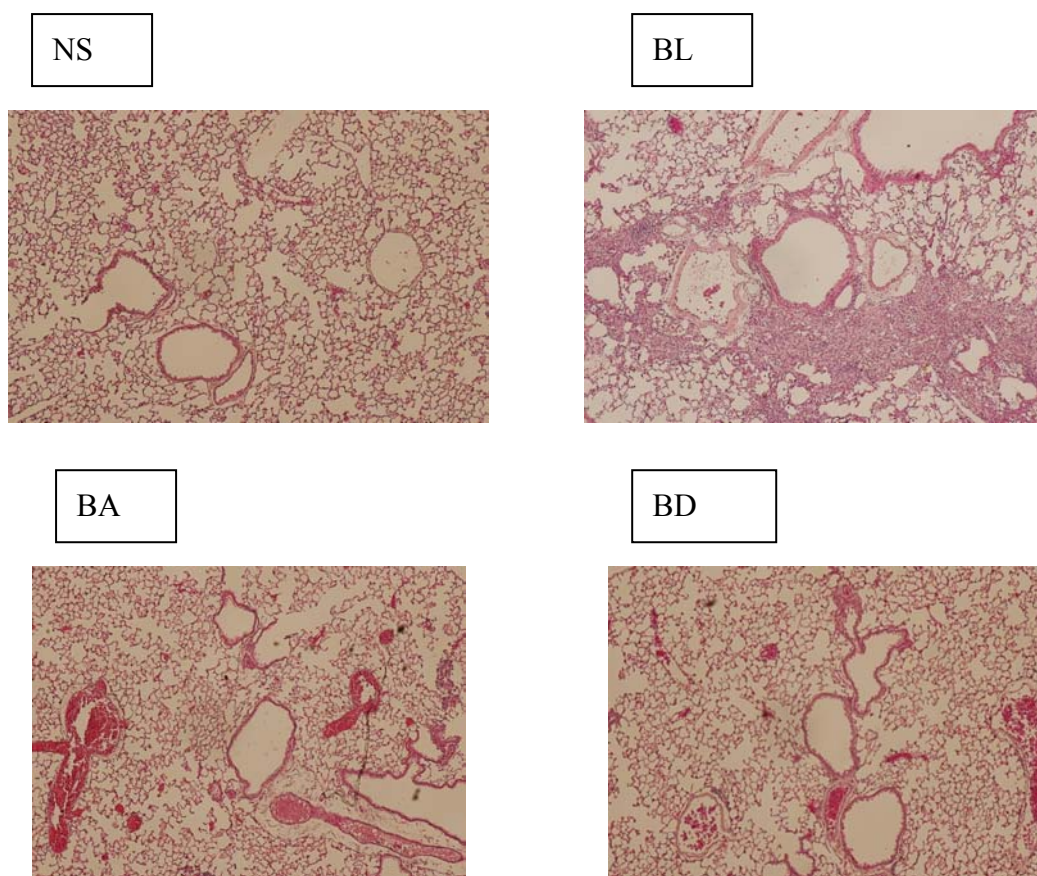
圖十一 第 7 天小鼠肺纖維化組織切片圖

於第 7 天時，第 2 天給藥（BA）其肺纖維化程度從小鼠肺纖維化組織切片圖來看反而比未給藥組（BL）來的高。（HE stain ; 50 X）



圖十二 第 14 天小鼠肺纖維化組織切片圖

於第 14 天時，第 2 天給藥 (BA) 及第 7 天給藥組 (BD) 從小鼠肺纖維化組織切片圖來看，其肺纖維化程度皆比 Bleomycin 處理組 (BL) 來的減輕。(HE stain ; 50 X)



圖十三 第 21 天小鼠肺纖維化組織切片圖

於第 21 天時，第 2 天給藥（BA）及第 7 天給藥組（BD）從小鼠肺纖維化組織切片圖來看，其肺纖維化程度皆比未給藥組（BL）來的減輕許多。（HE stain ; 50 X）