

中國醫藥大學中國醫學研究所博士論文

指 導 教 授：高尚德 教授



論文題目

銀翹散對急性肺部發炎老鼠模式的保護作用及免疫調節之研究
**Protective and Immunomodulatory effect of Gin-Gyo-San
in a murine model of acute lung inflammation**

研究生：葉家舟

中國醫藥大學中國醫學研究所
中華民國九十六年四月

中國醫藥大學博士班研究生
論文指導教授推薦書

中國醫學研究所，葉家舟君所提之論文
銀翹散對急性肺部發炎老鼠模式的保護作用及免疫
調節之研究(題目)，係由本人指導撰述，同意提
付審查。

指導教授 夏志德 (簽章)

中華民國 96年 3月 29日

中國醫藥大學博士班研究生
論文口試委員審定書

中國醫學研究所，葉家舟君所提之論文
銀翹散對急性肺部發炎老鼠模式的保護作用
及免疫調節之研究(題目)，經本委員會審議，
認為符合博士資格標準。

論文口試委員會

委員

陳金木

(簽章)

莊志立

蔡金川

陳光偉

高志忠

所長

高志忠

中華民國 96 年 3 月 29 日

目錄

第一章	前言	1
第二章	文獻探討	4
	(一) 中醫文獻回顧	4
	第一節 肺炎中醫病名的產生與沿革	4
	第二節 肺炎病因病機	4
	第三節 中醫對肺炎的分證及治療概論	5
	第四節 銀翹散的文獻回顧	6
	(二) 現代醫學文獻回顧	9
	第一節 內毒素及其產生的發炎反應	9
	第二節 肺部發炎反應相關的細胞激素介紹	11
第三章	材料與方法	
	第一節 材料	18
	1、實驗動物	18
	2、感染原	18
	3、試劑藥品	18
	4、抗體	19
	5、耗材	20
	6、儀器	20
	7、銀翹散的製備	21
	第二節 方法	
	1、LPS 誘發肺炎鼠之動物模式建立	23
	2、支氣管肺泡沖洗液之細胞學檢測	24
	3、組織染色之細胞觀察	25
	4、Nitrite 含量測定	25
	5、ELISA 分析	26
	6、核蛋白分析	27
	7、RNA 分析	32
	8、細胞培養及測量細胞生長及藥物毒性	34

9、銀翹散於高效液相層析之成份分析	35
10、THP-1 單核細胞對 A549 上皮細胞的附著力分析	36
11、流式細胞儀測定附著分子	37
12、統計方法	37

第四章 結果

第一部份 銀翹散對 LPS 誘發造成肺發炎老鼠模式保護作用及 免疫調節機制分析

第一節 不同濃度 LPS 造成肺部損傷的影響	38
第二節 銀翹散對 LPS 造成肺部損傷的影響	38
第三節 銀翹散對 LPS 造成肺部損傷產生的氣管內滲 出液之影響	42
第四節 銀翹散對 LPS 造成肺部損傷產生的肺泡沖洗 液中的血球量之影響	43
第五節 銀翹散對 LPS 誘發的趨化因子的影響	47
第六節 銀翹散對 LPS 誘發的發炎及抗發炎的細胞激素 之影響	49
第七節 銀翹散對 LPS 造成肺部損傷的肺泡沖洗液中的 一氧化氮及肺組織中的細胞激素誘發 NO 的合成 酵素之影響	51
第八節 銀翹散對 LPS 造成肺部損傷產生的肺組織中的 NF- κ B 及 AP-1 轉錄因子之影響	51

第二部分 銀翹散對 LPS 誘發鼠巨噬細胞細胞激素的影響

第一節 銀翹散及其組成之中藥對 LPS 誘發發炎鼠的 巨噬細胞生存率之影響	55
第二節 銀翹散及其組成之中藥對 LPS 誘發發炎的細 胞激素 TNF α 之影響	58
第三節 銀翹散及其組成之中藥對 LPS 誘發抗發炎的	58

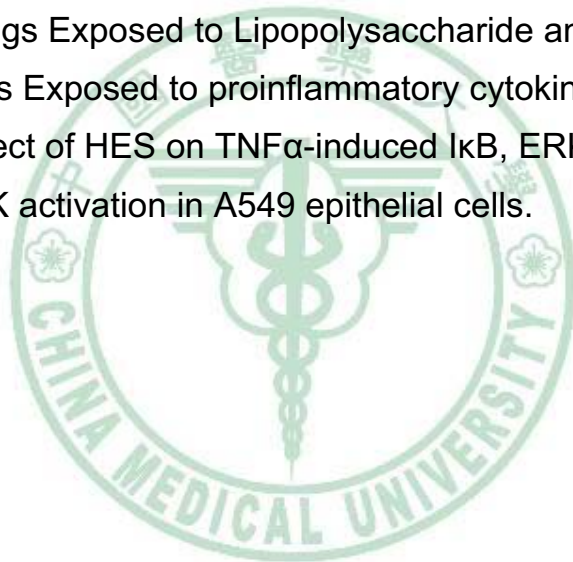
	細胞激素 IL-10 之影響	
第四節	銀翹散之高效液相層析分析	61
第五節	綠原酸對鼠巨噬細胞的 IL-10 分泌之影響	61
第六節	橙皮素對 LPS、TNF α 與 IL-1 β 誘發人類巨噬細胞 THP-1 及人類肺部上皮細胞 A549 之細胞激素分泌之影響	61
第七節	橙皮素對前發炎細胞激素誘發的細胞附著分子之影響	64
第八節	橙皮素對 LPS 活化鼠肺組織及前發炎細胞激素活化 A549 細胞株的 NF- κ B 及 AP-1 之影響	67
第九節	橙皮素對 TNF α 誘發的 I κ B 及 MAPK 路徑之影響	69
第五章	討論	71
第六章	結論	82
	參考文獻	83
	英文摘要	106
	作者簡介	108



圖目錄

Figure 2.1 The cytokine network between the different cells.	13
Figure 4.1 the morphologic damage of lungs exposed to different concentration of LPS.	39
Figure 4.2 The lung morphology changes of GGS treatment.	40
Figure 4.3 The lung morphology changes of GGS, HBX and Hesperidin treatment.	41
Figure 4.4 The weight of lung and concentrations of proteins in BALF(I).	44
Figure 4.5 The weight of lung and concentrations of proteins in BALF(II).	45
Figure 4.6 The cell counts in the BALF.	46
Figure 4.7 The total cell counts and neutrophil number in the BALF.	48
Figure 4.8 Concentrations of the chemokines KC in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and MIP-1 and MIP-2 in the lung tissue.	50
Figure 4.9 Concentrations of tumor necrosis factor-alpha (TNF α), interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-4, IL-10, and IL-12 in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF).	52
Figure 4.10 Concentrations of the nitrite/nitrate and iNOS.	54
Figure 4.11 GGS Reduces NF- κ B and AP-1 activation.	56
Figure 4.12 GGS and its components effect the cell viability of mouse macrophage RAW 264.7 cell line.	57
Figure 4.13 Concentrations of tumor necrosis factor-alpha (TNF α) in mouse macrophage RAW 264.7.	59
Figure 4.14 Concentrations of IL-10 in mouse macrophage RAW 264.7.	60
Figure 4.15 HPLC chromatogram of the GGS.	62

- Figure 4.16 Concentrations of IL-10 in mouse macrophage RAW 63
264.7.
- Figure 4.17 Effect of HES on the expression of cytokine in lung 65
epithelial cells A549 and macrophage-like cells
THP-1.
- Figure 4.18 HES reduces adhesion of THP-1 cells to A549 66
monolayers and Selective inhibition of TNF- α or
IL-1 β -stimulated ICAM-1 or VCAM-1 expression.
- Figure 4.19 Hesperidin Reduces NF- κ B and AP-1 activation in 68
Lungs Exposed to Lipopolysaccharide and in A549
cells Exposed to proinflammatory cytokine.
- Figure 4.20 Effect of HES on TNF α -induced I κ B, ERK1/2, p38, or 70
JNK activation in A549 epithelial cells.



表次

Table 3.1 Oligonucleotide primer designation for RT-PCR analysis	34
Table 3.2 The time and partition of solvent	36
Table 4.1 Effect of GGS on LPS-induced cytokines.	57



銀翹散對急性肺部發炎老鼠模式的保護作用及免疫調節之研究

研究生：葉家舟

指導教授：高尚德 教授

中國醫藥大學中國醫學研究所

急性肺損傷(Acute lung injury; ALI)是造成患者死亡一個重要的成因。如何抗發炎的治療或是改善ALI患者的預後是重要的課題，已有許多文獻指出中醫藥在對抗肺部急性發炎有其成效，而銀翹散便是其中對抗肺部急性發炎重要的方劑，但其抗發炎的機制仍然不清楚。

為了研究銀翹散對抗肺部急性發炎的機制，我們以氣管投與LPS誘發老鼠肺部急性發炎，同時餵食銀翹散，結果發表不論在肺部發炎的病理組織上、中性白血球的浸潤數量、肺部水腫指標及一氧化氮分泌的量上，皆可見到銀翹散有減緩肺部發炎的成效。我們以ELISA 及 RT-PCR 來偵測各種發炎相關的細胞激素及趨化因子，如TNF α 、IL-1 β 、IL-6、KC、MCP-1及MIP-2，銀翹散皆有壓制的作用，同時我們也發現銀翹散可誘發大量的抗發炎細胞激素IL-10的分泌。我們利用鼠巨噬細胞RAW 264.7針對TNF α 及IL-10 進行體外研究。銀翹散、銀花、連翹及牛蒡對LPS誘發產生TNF- α 有明顯壓抑作用，荊芥、薄荷及淡竹葉少許壓制作用。而銀翹散及金銀花可以增加LPS誘發分泌IL-10。

由銀翹散的HPLC成份分析中，找到銀翹散指標成分綠原酸、木犀草素、牛蒡素及橙皮素，其中最大量的成份為綠原酸，我們也證實綠原酸會增加LPS誘發RAW 264.7分泌IL-10；另外我們也發現橙皮素可抑制A549及THP-1的TNF α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8的分泌，同時結果也顯示橙皮素可抑制發炎細胞的附著作用及ICAM-1與VCAM-1的表現。我們進一步發現銀翹散橙皮素可減少NF- κ B與AP-1對其控制序列結合作用，並且橙皮素可阻斷I κ B 及MAPK 路徑。因此，銀翹散有抑制LPS造成的肺部發炎作用及免疫調節作用，有助於急性肺部發炎的治療。

關鍵字：銀翹散,橙皮素,瀉白散,綠原酸,內毒素,細胞激素,轉錄因子,附著因子

第一章 前言

急性肺損傷(Acute lung injury; ALI)是造成患者死亡一個重要的成因。在臨床上和基礎科學上對ALI的病理生成上已有很多的了解。根據這些研究結果，已經將研究的方向轉到了如何抗發炎的治療或是改善ALI患者的預後上，本研究將探討中醫藥在對抗ALI的成效及其抗發炎的機制。

自Ashbaugh¹等人於1967年發表了急性呼吸衰竭的病例，患者因外傷或感染後出現急性呼吸困難，低血氧，肺部應性減低，胸部X光有兩側瀰漫性浸潤，以傳統呼吸治療方法無法矯正其低血氧等現象。病理上出現肺組織明顯的充血，肺泡及間質水腫，肺泡塌陷，炎性細胞浸潤，肺泡內有透明膜(hyaline membrane)之形成及纖維化病變。由於此病近似新生兒之呼吸窘迫症候群，Ashbaugh與Petty²於1971年將之命名為成人呼吸窘迫症候群，(Adult respiratory distress syndrome, ARDS)。經由醫界的努力，對於此病廣泛的研究，發現肺部的直接傷害或肺外的其它疾患，均可導致此一症候群的發生。

而此種急性肺損傷是有輕重之分，ARDS正是此病程最嚴重的表現。臨床上導致ARDS的原因，可分為直接肺傷害和間接肺傷害兩種。間接肺傷害，是由於肺以外的疾病或損傷，經由全身發炎反應的激活，使血中細胞激素或細胞分泌的發炎相關介質濃度增加，而間接造成肺損傷。造成ARDS的臨床疾病有直接肺傷害、吸入胃液、嚴重胸廓外傷、肺挫傷、瀰漫性肺感染、細菌、病毒、肺囊蟲、嚴重敗血症、急性胰臟炎、肺移植術後等。目前雖然對於ARDS的致病機轉較有了解，但ARDS的治療仍屬支持治療為主，而其死亡率雖有下降，但是仍然維持在40%至60%的高點。急性肺炎最常見的是細菌感染，主要是因為主體內在防禦的失效及長時間使用通氣設備造成，有大於三分之一的使用通氣設備造成造成ARDS^{3,4}。ARDS患者可見到在發炎的肺部內見到大量的多核性的中性球^{5,6}及釋放大量的發炎前介質^{7,8}，蛋白質分解酵素，氧分子及一氧化氮分子^{9,10}。最後造成肺泡壁管腔受到損害，而導致大量組織減

少回流而肺泡內產生了肺水腫及改變了肺的通氣機制，結果使得肺的換氣量嚴重的缺乏，而產生了ARDS^{3,4,11}。自從ARDS被發現出來，且將臨床的症狀訂出，但臨床的研究總是不易研究清楚其致病的機制為何，便發展了動物模式，由動物模式可見到當病人發生ARDS時其體內的病理及生理的嚴重的變化一一呈現出來了。

中醫學中並無急性肺部感染病名，但根據本病臨床特點，多屬於中醫學的風溫肺熱証、喘嗽等範疇。中醫學認為肺炎喘嗽的病因包括內因和外因兩個方面。外因是外感風邪(風寒或風熱)，內因是肺臟嬌嫩，形氣未充。西醫學認為是細菌和病毒等病原體感染所致，與身體抵抗力弱也有關。具體闡釋如下:風邪—病原體，包括細菌(如肺炎雙球菌、金黃色葡萄球菌)、病毒(如呼吸道合胞病毒、腺病毒)、支原體(如肺炎支原體)、原蟲(如卡氏肺囊蟲)等。但“病原體”不能完全等同於“風邪”的概念。中醫學從宏觀的整體的角度認識病因，認為疾病的發生是由於人與環境和人自身的穩態被破壞所致，注重對這種失衡狀態的調節，而不深究導致這種狀態的個別因素。中醫學的病因是含有病機意義的綜合概念，像“風邪”這種簡潔的表述，留給以西醫學的方式研究所得去填充的空間是無限的。中醫學對肺炎喘嗽病理機制的論述是:痰阻氣道，肺氣閉鬱，肺失宣肅。關鍵是肺閉，結果是宣肅失常。這一機制可以用現代醫學語言確切地解釋:支氣管粘膜和肺泡壁充血水腫，支氣管和肺泡內分泌物增多，導致通氣和換氣功能障礙(痰阻氣道、肺氣閉鬱)，引起缺氧和二氧化碳的瀦留(宣肅失常)。肺炎喘嗽的常見辨證心陽虛衰的病機也可用心力衰竭的產生解釋¹²。

在許多致病源中的多醣體 (Lipopolysacchride, LPS) 主要來自格蘭氏陰性細菌(gram-negative bacteria)細胞壁外層脂多醣體,會使肺泡內產生了肺水腫及改變了肺的通氣機制，結果使得肺換氣量嚴重的缺乏，而產生了ARDS^{3,4}。在許多致病源中LPS是廣泛被接受造成肺部急性發炎最佳的誘發物，也是最接近臨床上急性發炎的模式^{13,14}。所以今日許多文獻以內毒素來誘發急性肺部炎症反應以作進一步研究。

銀翹散源於清代醫家吳鞠通所著《溫病條辨》之中所記載，是含一定比例的 10 種中藥組成，在台灣，銀翹散是有固定的比例及標準製成

的中藥處方，在臨床上及傳統醫學上，銀翹散經常被使用在呼吸道的疾病，如感冒、氣管感染、及肺炎等。為了研究銀翹散的作用，我們選用以氣管灌入 LPS 的方式，建立老鼠的急性肺部發炎為模式，進行治療，同時利用 HPLC 對銀翹散展開分析，進一步找到主要成份，再以鼠巨噬細胞 RAW 264.7 進行 LPS 攻擊銀翹散並以其主要成份治療。會觀察鼠肺部重量、肺泡沖洗液總細胞數、蛋白質濃度、一氧化氮的表現及各種細胞激素，如 TNF α ， IL-1 β ， IL-6， KC， MIP-2， MCP-1， IL-4， IL-10 and IL-12 等之變化，並對肺組織進行 RT-PCR 分析及核中轉錄因子 (NF-kB and AP-1) 以 EMSA 分析。對鼠的巨噬細胞 RAW 264.7 也會進行細胞激素及核中轉錄因子 (NF-kB and AP-1) EMSA 分析。我們想評估銀翹散對 LPS 造成的肺部發炎、免疫調節作用及機轉，並且分析其中主要成分在銀翹散中的地位及機轉。



第二章 文獻探討

(一) 中醫文獻回顧

第一節 肺炎中醫病名的產生與沿革

中醫學並無急性肺部感染病名，但根據本病臨床特點，多屬於中醫學的風溫肺熱証、喘嗽等範疇。

第二節 肺炎病因病機

急性肺部感染是臨床常見病、多發病。臨床主要表現為發熱、咳嗽、氣促鼻煽，嚴重時甚至可出現張口抬肩、呼吸困難等症狀。漢·張仲景《傷寒論》中對風溫就有論述。對於本病的病因病機，多數醫家認為本病致病因素有內外兩因，內因為肺虛衛外不固，外因為感受風邪，風邪多挾寒挾熱為病，其中以風熱之邪致病多見。肺居上焦，開竅於鼻，外合皮毛，主一身之表。風為百病之長，乃為陽邪，其性輕揚，具有升散的特點。所以風熱之邪侵襲人體，多從口鼻而入，先犯上焦肺衛此之謂“溫邪上受，首先犯肺”。風熱犯肺，外則衛氣郁阻，皮毛開合不利；內則肺氣失宣，肅降失職。以致出現發熱、咳嗽等証候。肺主治節，肺氣郁閉，則血行不暢，出現氣滯血瘀；風熱之邪入裏，逆傳心營，輕者熱灼營陰，擾亂心神；重者熱陷心包，蒙蔽心竅，甚至熱入營血，產生耗血動血的變化。因此本病如治療不得當，後期可出現心陽虛衰或邪陷厥陰。現代研究證實，本病過程中可出現明顯的血瘀證候。

第三節 中醫對肺炎的分證及治療概論

中醫學根據肺炎喘嗽不同階段表現出的症狀、舌象、脈象分為：風熱犯肺、風寒閉肺、痰熱閉肺、心陽虛衰、邪陷厥陰等不同證型。

對於本病的辨證治療，主要分風熱犯肺、風寒閉肺和痰熱壅肺三型。有時也會出現變症，主要有心陽虛衰和內陷厥陰等。風熱犯肺型治以辛涼宣肺、清熱化痰，以麻杏石甘湯合銀翹散加為主，藥用麻黃、杏仁、生石膏、銀花、連翹、薄荷、桔梗、牛蒡子、甘草。喘息痰鳴者，加葶藶子、浙貝母；咽喉紅腫疼痛者，加射干、蟬衣、木蝴蝶；發熱高者，加黃芩、大青葉、柴胡、葛根、水牛角等。

風寒閉肺型治以辛溫開肺、化痰止咳，以三拗湯或華蓋散加減為主，藥用麻黃、杏仁、防風、桔梗、僵蠶、甘草等。由於本證易於化熱或多兼有熱象，故常於上方中加入清熱解毒藥物。本型如挾有寒飲，以小青龍湯治之。

痰熱壅肺型治以清熱宣肺、滌痰定喘，方用五虎湯合葶藶大棗瀉肺湯加減為主，藥用麻黃、杏仁、葶藶子、蘇子、黃芩、虎杖、前胡、細茶、甘草。痰多者，加天竺黃、膽南星；痰稠者，加竹瀝，枳實、梔子、知母、銀花、連翹、大黃、黃柏、魚腥草、石膏等，再配合一些化痰止咳利氣之品，如桔梗、貝母、半夏、紫菀、款冬花、杏仁、枳殼、陳皮、馬兜鈴等。也有以銀翹散、千金葶藶湯、麻杏石甘湯等為主者，再適當配以清肺化痰之品。隨著對本病特異性病原體和肺部炎症的病理變化的深入認識，常選用清熱解毒、抗菌消炎作用較強的中藥，如魚腥草、虎杖、半枝蓮、黃芩、銀花、金蕎麥根、白花蛇舌草等組方治療。在肺炎病理過程中往往出現較嚴重的血瘀証候，因此，在治療過程中見到有血瘀証候時，通常加用一些活血化瘀之品，既提高了療效，又可減少了變症的發生。

第四節 銀翹散的文獻回顧

銀翹散是我國清代醫家吳瑭(字鞠通)創制的著名中藥方劑，處方由10味中藥組成。該方始見於清代1788年刻印出版的吳瑭的代表中醫著作《溫病條辨》，具有辛涼解表、清熱解毒的功效，主治風溫初起，當時以治療風溫、溫熱病以及某些雜病屬於邪在衛分、上焦者而聞名，並一直沿用至今。

藥物組成：連翹，銀花，苦桔梗，薄荷，淡竹葉，生甘草，荊芥穗，淡豆豉，牛蒡子，葦根。

用法用量：鮮葦根湯煎，香氣大出，即取服，勿過煮。病重者約二時一服，日三服，夜一服；輕者三時一服，日二服，夜一服，病不解者作再服。

主治：溫病初起，發熱無汗，或有汗不暢，微惡寒，頭痛口渴，咳嗽咽痛，舌尖紅，苔薄白或薄黃，脈浮數者。

現代臨床上用於治療流行性感冒、急性扁桃腺炎、咽喉炎、肺炎、疱疹、麻疹、流行性腮腺炎等病毒性感染疾病，是中醫臨床上廣泛使用並且療效確切的中藥方劑之一¹⁸。

近年來，有許多人採用現代藥理學研究方法對銀翹散進行深入的研究，結果呈現，銀翹散具有解熱、鎮痛、抗菌、抗病毒、解毒、抗炎、抗過敏等作用。我們針對近年來對銀翹散在上呼吸道感染及肺炎的臨床應用與藥理學實驗研究作整理。

急性上呼吸道感染，為臨床上常見病多發病。本病屬中醫溫病“風溫”的範疇。銀翹散作為治療風溫邪熱在肺衛的主方，該方仍然還是現代治療上呼吸道感染的主要方劑。首先是呂明惠探討提高以中醫藥為主治療急性上呼吸道感染的療效。用自擬加味銀翹散為主方治療急性上呼吸道感染62例，並與使用西藥治療組50例作比較觀察，結果加味銀翹散治療急性上呼吸道感染與單純使用西藥有明顯的差異¹⁹。

劉薇將外感高熱症患兒分為兩組，甲組用雙黃連粉針靜脈點滴合銀翹袋泡劑治療，乙組用青黴素靜脈點滴。治療結果顯示，

甲組總有效率為95.34%，乙組為90.6%。甲組在退熱方面明顯優於乙組($P < 0.05$)²⁰。

1998年王志新將275例感冒病人分成甲乙兩組，甲組給予以銀翹散、板藍根、Ibuprofen等製成的增效銀翹片治療，乙組予強力銀翹片治療。3天內的治癒率、基本治癒率、總有效率分別為，甲組61.45%、23.64%、96.36%；乙組20.69%、10.34%、87.36%²¹。

這些實驗結果表明，銀翹散單獨使用，治療上呼吸道感染有顯著的療效，但是若與化學藥物藥物聯合使用，則治療效果要明顯優於單用銀翹散或者化學藥物，說明某些化學藥物與銀翹散相互間有增效作用。

呼吸道感染主要由病毒引起的，易由上呼吸道感染繼發為氣管炎和肺炎等下呼吸道感染。該病主要發病症狀為發熱、咳嗽、胸悶、口渴、舌紅苔黃、脈數，屬於中醫肺熱病和溫病範疇。

耿小茵及劉光太採用銀翹散煎劑，並以病毒唑加抗病毒口服液作對照，治療102例下呼吸道感染患者，結果表明，治療組的顯效率和總有效率優於對照組($P < 0.05$)²²。

在銀翹散煎劑加減治療小兒肺炎方面，胡居息發現，銀翹散用於臨床治療屢用抗菌素而療效不顯著的肺炎患者有所助益²³。肖淑琴等通以銀翹散或白虎湯加減，症重者加用抗生素，療效優於單用抗生素治療²⁴。韋俊用銀翹散配合青黴素使用。發中西藥治療組療效較單用西藥組快²⁵。

在老人肺炎方面，楊周瑞針對60例老年性肺炎使用銀翹散合併補中益氣湯治療或合併桑菊飲治療比較，兩組有效率皆50%，而合併補中益氣湯組成效較優²⁶。

臨床資料看來，銀翹散對各年齡層的肺炎，不論在單獨加減方使用或配合西藥使用，都能明顯改善肺炎的症狀及縮短病程。

在實驗室裏的藥理研究上也有相當多的成果發表，可惜的是，發表在國際SCI的論文不多，但我們就實驗結果來看，不難看出其結果可與本論文的結果相互佐證。

銀翹散解熱方面，許多動物實驗表明，銀翹散對不同致熱劑所引起的家兔發熱均有明顯的解熱作用；杜力軍等發現銀翹散能夠解除致熱原對Wistar 大鼠溫度敏感神經元的作用，證明該藥為中樞性解熱藥，且其作用原理不全同於解熱鎮痛類藥物³⁰。杜氏等通過以傷寒副傷寒甲乙混合菌苗作為動物觀察銀翹散對體外培養離單核細胞（MNC）合成釋放內生致熱原（endogenous pyrogen, EP），的影響，結果表明其對EP 合成無明顯影響，提示銀翹散的解熱作用可能在於阻斷EP 產生以後的環節³¹。

富杭育等人也對銀翹散在大白鼠之藥物動力學參數進行研究。結果表明銀翹散的最小起效劑量為0.18 g/kg，作用期為6.4 小時，體內生物相當藥量的消除半衰期為1.11小時。另外以發汗的藥效實驗法證明銀翹散能促進大鼠的汗腺分泌，銀翹散的最低起效劑量為0.267 g/kg，相當於臨床等效劑量的效應消退半衰期為3.90小時，效應維持時間為23.71小時，效應達峰時間為2.21小時^{33,34}。

銀翹散同時也被證明具有很強的抗炎與抗過敏作用，能增強巨噬細胞對異物的吞噬能力及抑制組織胺的分泌，但對5-羥色胺(5-HT)無明顯抑制，對前列腺素作用也較弱³⁵。也發現銀翹散有抑菌作用，動物連續給藥四天後再以肺炎球菌感染，則可明顯減少死亡率；銀翹散可提高動物的抗感染力。體外也對肺炎球菌有抑菌作用³⁶。

在國際期刊可見銀翹散的研究中，日本及中國大陸均發表銀翹散具有抗感染及抗病毒的作用^{15,16}。同時找出銀翹散中兩種中藥—甘草及牛蒡子，有抗病毒的作用¹⁵，Kurokawa 也提出銀翹散在抗感染的過程中血清中的serum IL-1 α 會被提昇，來對抗感冒病毒¹⁶。由色層分析來分析銀翹散的成分已找到了19種化學物質¹⁷，如 arctiin, phillyrin, forsythiaside, liquiritigenin, liquiritin, genistein, formononetin, daidzein, glycitrin, 3,3', 4-tri-omethylelagic acid, chlorogenic acid, linarin, acacetin, hesperidin, isoquiritigenin, isoquiritin and hyperoside¹⁷。也

有結合藥效藥理作用對組成複方的單味藥的有效成分進行研究，如發現金銀花中的綠原酸(chlorogenic acid)、異綠原酸(Isochlorogenic acid)具有抗病毒、抗菌的作用；連翹中的連翹酯苷(forsythiaside)具有抗菌作用等³⁶。雖然有許多對銀翹散的研究結果，但是銀翹散對體內的免疫調節的機制，仍尚未找出，本實驗利用LPS肺部感染鼠模式進行銀翹散對肺部內的免疫調控機制，也對上述的研究成結果提出合理的機制。

(二) 現代醫學文獻回顧

第一節 內毒素及其產生的發炎反應

內毒素主要來自格蘭氏陰性細菌的細胞壁外層脂多醣體(LPS)，其結構主要包含兩部分：多醣體(polysaccharide)及脂質(lipid)，而造成生物體毒性反應主要來自脂質的部分，又稱為lipid A。內毒素在生物體內會活化巨噬細胞及其他相關的發炎細胞，當LPS入侵生物體內時必須先與血漿接受體結合後，便會刺激巨噬細胞釋放一些物質，如細胞激素(cytokines)。當巨噬細胞受LPS刺激分泌適量的調節物質時，對身體可以產生保護作用，進而達到殺菌作用。然內皮細胞釋放出自由基、蛋白酵素而破壞組織，形造組織通透性增加。環境中LPS廣泛存在於空氣污染、有機粉塵及煙霧中，可藉由空氣傳播，長期暴露內毒素可造成許多肺部炎症反應，如氣喘、慢性支氣管炎以及呼吸道阻塞等疾病。2002年，Vernooy等人將小黑鼠長期以LPS氣管內投與，發現長期暴露LPS可以誘發肺組織病理性變化，如肺黏液細胞異生(mucus cell metaplasia)、肺泡擴大及呼吸道壁增厚等現象，而造成慢性肺部發炎反應³⁷。LPS除了可以直接造成肺部內皮細胞損傷外³⁸，也可以造成呼吸道及肺循環的功能異常，這些異常包括肺血流動力方面急性改變及肺組織通透性破壞，而造成非心因性肺水腫，進而呼吸衰竭甚至死亡³⁹。

肺中吸入LPS，由LPS刺激的信號傳遞機制會開始啟動發炎的細胞激素及化學趨化因子(chemokines)及附著因子(adhesion moleculars)等造成中性球(neutrophil)移到血管內皮細胞及肺上皮細胞，進而移入肺泡內^{40,41}。發炎前之細胞激素如tumor necrosis factor- α (TNF α)，Interleukin-1 β (IL-1 β)及interleukin-6 (IL-6)，會在肺部發炎發生之前大量的表現^{42,43}。這些發炎前分泌出來的細胞激素，如TNF α 及IL-1 β ，可以刺激核內轉錄因子NF- κ B進入核中開啟一系列發炎開始前一系列的細胞激素產生⁴⁴。在一系列的研究中發現呼吸道的上皮細胞可因NF- κ B的持續作用使得一些化學趨化因子，如IL-8、keratinocyte-derived chemokine (KC)、macrophage inflammatory peptide-2 (MIP-2)、monocyte chemotactic peptide (MCP-1)大量的表現，使得肺部發炎因而加重⁴⁵⁻⁴⁷。這些因子會使得大量有關發炎的白血球，如中性白血球，大量進入肺部的空間中，媒介白血球入侵組織之三步驟當組織受到傷害產生發炎反應時，血流中的白血球會被吸引並遷移至發炎組織，以對抗外來物質或是過敏原，而媒介白血球入侵組織之主要步驟有三⁴⁸：

步驟一、滾動(rolling)

當組織受到傷害時幾分鐘內，中性球會與發炎處血管壁發生交互作用，而在血管壁上進行滾動(rolling)，此步驟由白血球上的 L-selectin 與血管內皮細胞上的 E 及 P-selectin 所媒介。

步驟二、活化(activation):

於血管壁上滾動的中性球受局部炎症反應所釋放之趨化激素(如：IL-1 β 、MCP-1、MIP-2 等)、細胞激素(GM-CSF，IL-8 等)及趨化因子(chemoattractants，如：C5a 等)活化而進行快速改變，包括遮蔽中性球表面 L-selectin，並調節活化另一接受器 integrin(如:beta1、beta2 integrin)表現，受活化的 integrin 會增強中性球與血管內皮細胞結合的力量。

步驟三、遷移(transmigration):

血管內皮細胞上附著因子(adhesion molecule, 如 ICAM-1, VCAM-1)等受到細胞激素(如: TNF α , IL-1 β , IFN- γ , IL-8 等)活化而表現增加, 與活化的中性球上之 integrin 緊密結合, 並造成中性球型態改變。中性球經由型態改變而穿透血管內皮細胞層, 從血管內遷移出血管外至發炎組織。

有此可見, 白血球入侵組織整個過程, 除了受到循環中趨化激素、細胞激素及趨化因子等因素影響外, 與發炎細胞表面接受器(selectin、integrin)及內皮細胞上粘黏分子 selectin, ICAM-1, 等表現有關。

另外值得一提的是, 抗發炎的細胞激素(可能是種限制發炎反應及發炎範圍的細胞激素, 如IL-4、IL-10、IL-12), 這些抗發炎激素卻不會干擾對人體有益的宿主本身的第一線的防禦系統(如Defensin)及免疫作用(補體)⁴⁹。

第二節 肺部發炎反應相關的細胞激素介紹(圖2.1)

(一) 前發炎組織激素(proinflammatory cytokine)

由各種臨床研究顯示發炎反應發生時, 發炎細胞激素(inflammatory cytokines)及趨化因子所形成複雜的 network, 在肺部發炎反應發生時扮演著傳遞、放大及維持的重要角色。這中間還包括了刺激產生抗發炎細胞激素(anti-inflammatory cytokines)與前發炎組織激素之間的相互抗衡, 來調節整個發炎反應的過程。前發炎組織激素如IL-1 β 及TNF α , 可以在肺發炎患者之肺泡沖洗液(bronchoalveolar lavage fluids; BALF)中同時發現, 促使及加強發炎反應的發生, 以下我們針對二者作一些介紹:

1. 第一白細胞激素(IL-1 β)

IL-1 β 可以刺激許多的趨化因子產生, 如第八白細胞激素 (IL-8)⁵², 單核球趨化蛋白-1 (MCP-1)⁵³, 及巨噬

細胞發炎反應蛋白-1 α (MIP-1 α)⁵⁴。所以IL-1 β 是發炎反應中發炎細胞激素連鎖反應 (inflammatory cytokine cascade)的先趨者。許多研究顯示指出在ARDS患者的BALF或浸出液(edema fluid)中可以發現前發炎組織激素的存在⁵³⁻⁵⁶。同時也指出IL-1 β 是維持ARDS患者肺部發炎狀態的主要的細胞激素⁵⁵。同時IL-1 β 也會啟動纖維的增生(fibroproliferative)及上皮的修護過程(epithelial repair processes)^{57,58}。臨床研究也顯示IL-1 β 造成肺部急性發炎及ARDS的早期病理產生(pathogenesis)佔有相當重要的位置⁵⁶。

2. 腫瘤壞死因子(Tumor necrosis factor- α ; TNF α)

相似於IL-1 β ，TNF α 也是一個很重要的前發炎組織激素，它能刺激許多細胞激素的產生⁵⁹⁻⁶¹。在ARDS患者的BALF中也可測到TNF α 的升高，但不能用此預測病況的演變^{62,63}，但是發現在ARDS患者之BALF中的TNF α 會存在超過一週以上，並且影響肺的順應性及嚴重的低氧血症(lung compliance and severity of hypoxemia)的產生機率有關⁵⁶⁴。可見TNF α 對ARDS中有助於預測相關疾病產生的機率。所以TNF α 的測定對肺部急性發炎或ARDS也是相當重要的。

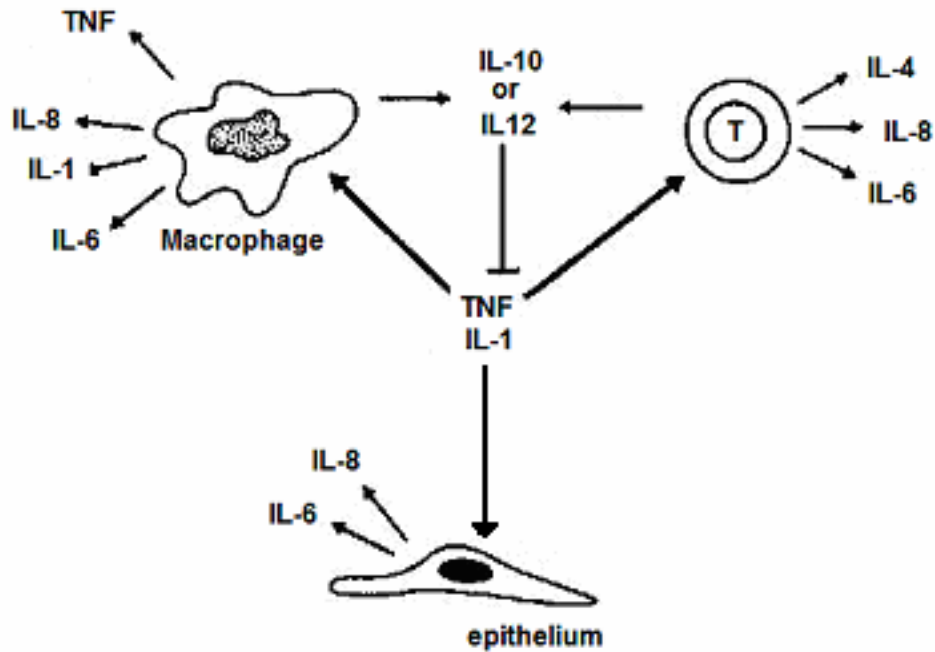


Figure 2.1. The cytokine network between the different cells.

3.趨化因子

當肺部開始產生發炎反應時，Polymorphonuclear Leukocytes (PMN) 就會由血液中向肺泡及氣管浸透。各種的化學趨化因子就會產生來誘導PMN進行浸透及回流作用 (recruitment)。趨化因子可以區分為二種：一種是 α -chemokines (CC) 如MCP-1，其作用可以引誘單核球 (monocytes)、T cells、嗜鹼性白血球(basophils)及嗜伊紅性白血球(eosinophils)⁶⁴；另外一種是 β -chemokines (CXC) 如第八白細胞激素IL-8 (in human), KC及MIP-2 (in mice)，是一種吸引中性球的趨化因子。IL-8可由人類肺泡巨噬細胞及肺部上皮細胞產生^{65,66}，同時也有研究證明在ARDS患者之BALF中含有大量的IL-8^{54,67}。KC、MIP-1及MIP-2也是在肺部發炎時相關的趨化因子^{65,66}，在一些活體的實驗中大量表現KC、MIP-2及MCP-1會提高肺部的發炎的程

⁶⁸⁻⁷¹。它們會使肺泡及氣管內的PMN數量增加，如此便會使患者的肺通氣嚴重的減少,尤其在ARDS的病人⁵⁴。

4. 第六白細胞激素 (Interleukine-6 ; IL-6)

IL-6是一個急性肺部發炎的重要指標，有研究指出可以在肺部急性損傷患者的BALF中測得大量的IL-6，並且指出提高及持續產生IL-6與ARDS、敗血症(sepsis)及創傷(trauma)患者的死亡率有關^{72,73}。另外也有研究指出IL-6的基因的控制因子(promoter region)的多型性(polymorphisms)可以減少IL-6的分泌濃度，並且減少加護病房內肺部急性發炎患者的死亡率⁷⁴。所以減少肺部發炎時的IL-6產生，有助於肺部急性發炎相關病人的預後。

(二) 抗發炎細胞激素

有些細胞激素具有抗發炎的作用，有些動物研究認為其具有療效的潛力^{75,76}，但目前看來尚不具有實行的價值，最有可能利用這抗發炎的細胞激素來治療發炎疾病的方式，就目前來說，就是發展可能的藥物來誘發內生性抗發炎細胞激素(endogenous cytokines)的釋放或活化抗發炎的細胞激素的接受體使抗發炎反應合理的下降⁷⁷。目前最受矚目的抗發炎細胞激素是IL-10及IL-12，以下分別作介紹：

1. 第十白細胞激素(Interleukine 10 ; IL-10)

IL-10 是一種具有anti-inflammatory cytokine，它能抑制各種發炎蛋白的合成，這包含了一些細胞激素 (TNF α 、GM-CSF、IL-5、chemokines) 及一種會在發炎時過度表現的酵素(iNOS)⁷⁸。在去除IL-10 基因的轉殖細胞上看到失去IL-10 可能會造成過敏性疾病(atopic diseases)的狀態⁷⁸⁻⁸¹。

IL-10 不只抑制TNF α 及chemokines，也會對抑制基質金

屬蛋白酶(matrix metalloproteinases)，如MMP-9，其會破壞肺實質(lung parenchyma)中的彈性纖維(elastin)⁸²，而IL-10會增加組織抑制基質金屬蛋白酶(tissue inhibitors of MMPs; TIMPs)的釋放，減少發炎時對肺部造成的傷害。

2. 第十二白細胞激素(Interleukine 12；IL-12)及第四白細胞激素(Interleukine 4；IL-4)

IL-12 是內生性的調節Th1 cell 的發展及調控Th1 / Th2 的平衡⁸³。其中IL-12和IL-4分別為Th1和Th2細胞分化所必須⁸⁴。其能在於連接先天的免疫及後天的免疫反應(innate and adaptive immune responses)，IL-12 可受到Th2細胞所分泌的IL-10的回饋控制⁸⁵。將IL-12投老鼠可阻發炎反應的發生及抑制過敏反應⁸⁶。IL-12 可使IFN- γ 釋放及T細胞分化⁸⁷。人工的IL-12已經有在人體投與的經驗，其結果是產生嚴重的毒性反應⁸⁸，但也看到當患者受過敏原刺激時嗜伊紅性白血球明顯的減少⁸⁹。原始T細胞要分化成為Th2 cell需要IL-4的作用，而且IL-12及IL-4可以阻斷TNF α 的分泌⁹⁰，進而減緩急性發炎反應的延續。故調節IL-4或IL-12的分泌也是降低發炎反應傷害的一種方式。

(三)一氧化氮與肺部發炎反應

一氧化氮在哺乳動物上是由一氧化氮的合成酵素(NO synthases；NOS)所製造的。NOS 有二種不同的異構酵素(isoenzymes)，calcium-dependent (cNOS)(又稱為 endothelial constitutive NOS；ecNOS) 及表現在神經元的nNOS和細胞激素所誘發的NOS (cytokine-inducible NOS；iNOS)。cNOS在對肺的維持穩定是很重要的，如神經控制的血管擴張(neurogenic pulmonary vasodilatation)、氣管擴張(bronchodilation)及免疫的調節⁹²⁻⁹⁴。但是在肺中的cNOS 在

ALI及敗血症反而是被調降的⁹⁵，相反的，iNOS的表現卻是可被發炎刺激因子(如cytokines、bacteria及LPS)⁹⁶。嗜中性白血球及巨噬細胞是在ALI中最主要被誘發高量的iNOS及所產生的NO⁹⁷。

許多報告顯示，ALI或ARDS的患者身上有大量的NO產生，其BALF中的高量nitrites/nitrates對ARDS患者是有危險的⁹⁸⁻¹⁰⁰。故降低ALI或ARDS患者BALF之NO或iNOS是有改善患者預後的效果⁹⁸。

(四)NF- κ B及AP-1與肺部發炎反應的關係

在肺部發炎疾病過程中會產生許多的細胞激素及趨化因子，這發炎相關的激素是受到NF- κ B及AP-1的調控¹⁰¹⁻¹⁰³。當發炎前細胞激素的接受體受到活化，便會將NF- κ B-inducing kinase(NIK)活化，NIK又負責IKK- β 的活化(磷酸化)，而I κ B(Inhibitor of NF- κ B)的磷酸化又受到IKK- β (inhibitors of I κ B kinase- β)的活性調控，一但I κ B受到磷酸化，I κ B ubiquitin ligase可將磷酸化的I κ B接上ubiquitin而分解，同時NF- κ B受到I κ B的磷酸化後，放開NF- κ B而轉移入細胞核內，接上NF- κ B的promotor，便開啟發炎下游的基因表現¹⁰¹。在NF- κ B knock-out mice的實驗中，造成免疫受到抑制及失去主動免疫系統(impair host defenses)，使得NF- κ B knock-out mice得到了敗血病(septicemia)，由此看來控制NF- κ B活化的路徑對於發炎性疾病的控制是很重要的¹⁰⁴。另外一條對發炎反應也十分重要的傳遞路徑是Mitogen-activated protein (MAP) kinases pathway所管控的p38 MAP kinase pathway^{102,103}。在由小分子的p38 MAP kinase抑制劑，如SB203580, SB 239063及 RWJ 67657(已知的cytokine synthesis anti-inflammatory drugs；CSAIDS)，可以廣泛的壓制發炎反應¹⁰⁵。p38的活

化會使AP-1 complex進到細胞核內，活化AP-1的 promotor，而活化許多發炎相關的基因¹⁰⁵。所以抑制NF-κB及AP-1與肺部發炎反應的控制有相當的關係。



第三章 材料與方法

第一節 材料

1、實驗動物

本研究所採用之 BALB/c 小鼠為 6 週大隻雄鼠，購自國科會實驗動物中心。

2、感染原

內毒素 LPS (*Escherichia coli*, 0055:B5)購自 Sigma Chemicals (St. Louis, MO)。

3、試劑藥品

試劑名稱	製造公司	目錄編號
Acetic acid	MERCK	100063
Acrylamide	Bio-Rad	161-0101
Agarose	Seakem	1-800-341-1574
Albumin	Sigma	A-4919
Ammonium persulfate	Bio-Rad	161-0700
Bis-acrylamide	Bio-Rad	161-0201
Chloralhydrat	MERCK	K24127725
Citric acid	Sigma	C-0759
Coomassie Brilliant blue	Bio-Rad	137385A
Eosin	Sigma	E4382
Fetal Bovine serum	Hyclone	SH30071.03
Glycerol	MERCK	K22855994
Glycine	MERCK	K22855994
Griess reagent	Sigma	G441-10G
HCl	Sigma	H-7020
Hematoxylin	Sigma	H3136
H ₂ O ₂	Riedel-de Haen	18312
Ketamine	MERIAL	W099062B

LightShift™	PIERCE	89880
Chemiluminescent EMSA Kit		
Methanol	TEDIA	MS-1922
Micro BCA protein Assay kit	PIERCE	23235
Nuclear Extraction Kit	Panomics	AY2002
One-step RT-PCR kit	GeneMark	RP01
Paraformaldehyde	Sigma	P-6148
PBS	Sigma	D5652
Periodic acid	Sigma	P7875-25G
2-Propanol	Sigma	I9516
Schiff's reagent	Sigma	S5133-500ML
SDS	Sigma	L5750
Sircol soluble collagen assay	Sircol	S1111
Sodium nitrite	Sigma	S2252-500G
Sodium metabisulfite	Sigma	S-1516
Sodium iodate	Sigma	S-4007
TEMED	Bio-Rad	7-759B
Tris	USB	75825
Triton X-100	Sigma	16H1421
Trizol	Invitrogen	15596
Trypan blue	Sigma	T8154
Tween. 20	Sigma	P2287
Xylazine	Chanelle	LA1136
Xylene	TEDIA	XR-2250

4、抗體

抗體名稱

製造公司

Mouse IL-1 β ELISA kit

eBioscience

Mouse TNF α ELISA kit

BD

Mouse IL-6 ELISA kit	eBioscience
Mouse IL-4 ELISA kit	eBioscience
Mouse IL-10 ELISA kit	eBioscience
Mouse IL-12 ELISA kit	eBioscience
Mouse KC ELISA kit	R&D
I κ B 及 I κ B phosphorylation Ab	Cell signal
p38 及 p38 phosphorylation Ab	Cell signal
ERK 及 ERK phosphorylation Ab	Cell signal
JNK 及 JNK phosphorylation Ab	Cell signal
ICAM-1 FITC Ab	eBioscience
VCAM-1 PE Ab	eBioscience
Streptavidin-HRP conjugate	BD
TMB substrate reagent set	BD

5、耗材

耗材名稱	製造公司	目錄編號
1ml 塑膠注射針筒	Top plastic syringe	2K05G
23G Needle	TERUMO	997801D
15 ml 離心管	NUNC	8-0000-560302
50 ml 離心管	CORNING	25330-50
0.22 μ m filter	Millipore	SCGPS05RE
Coating slide	Microslide	5126
Uncoating slide	Microslide	5156
拭鏡紙	Kimble-clark	2F083B86
3mm filter paper	Whatman	3030917
PVDF membrane	Immobilon-p	IPVH00010
Nylon membrane	Hybond-P	S/1282/7307/98/03

6、儀器

儀器名稱	廠牌/公司
------	-------

蛋白質電泳槽	Miniprotein III Cell 165-2940, Bio-Rad
電源供應器	Bio-Rad Power Pac 300 Power Supply
電泳槽	Mini-protein II Bio-Rad, U.S.A.
流式細胞儀	Becton-Dickinson Immunocytometry system, San Jose, CA, USA
可調式震盪器	Vortex mixer, model VM-1000
高壓滅菌鍋	Tomin, Taiwan
高速冷凍離心機	Himac CR 21F, HITACHI, JAPAN
桌上型高速冷凍離心機	Beckman GS-15R, USA
離心機	KUBOTA 5010, JAPAN
顯微鏡	NIKON Type 104, JAPAN
微量天平	A & D company
-20°C 冷凍冰箱	SANYO, JAPAN
-30°C 冷凍冰箱	Medical Freezer, SANYO, JAPAN
-80°C 冷凍冰箱	REVCO, GS Laboratory Equipment ULT2586-9-030 Asheville, N.C., U.S.A.
酵素免疫分析判讀儀	DYNATECH Laboratories, Great Britain
反轉錄酶鏈反應器	Mastercycler personal, Germany .
無菌操作台	Wintvcoon, Chin Tycoon Enlerprises Co.LTD
去離子水製造機	Modulab
血球計數器	MARIENFELD, Japan
冷凍乾燥機	Labconco Corporation, Kansas city, Missouri, U.S.A.
Cytospin	KUBOTA , JAPAN
均質器	KINEMATICA, switzerland
水平式電泳槽	HORIZON 11.14, Life Techologies, U.S.A.
Milli-Q	Wellbond science CO., LTD

7、銀翹散的製備

7-1、銀翹散組成與比例

中文名稱	學 名	比 率
金銀花	Lonicerae japonica thumb.	10
連翹	Forsythiae suspense thumb.	10
薄荷	Menthae Haplocalycis Labiatae	4
荊芥穗	Schizonepetae tenuifolia Benth.	4
淡豆豉	Glycine max L. (Semen Preparatum Sojae),	5
甘草	Glycyrrhizae glabra L.	5
桔梗	Platycodi grandiflorum Jacq.	6
淡竹葉	Lophatheri Gracilis Gramineae	5
牛蒡子	Arctii lappa L.	6
蘆根	Phragmitis communis L.	10

7-2、藥物準備

方劑製備委託柯達製藥廠製備淨膏，簡單流程如下：

金銀花(Flos Lonicera)及桔梗(Radix Platycodi) 粉碎成為細粉，過 120 目細篩；薄荷 (Herva Mentha)及荊芥(Herba Schizonepeta)用揮發油與水溶液分別浸泡，各收集液體層備用，再將各別殘渣收集與其它六種中藥混合，放入水中熬煮二次，每次二小時，各次收集其液體層，過瀘去除殘渣。過瀘液再與薄荷及荊芥浸泡液混合，再與金銀花及桔梗粉末混合均勻，乾燥成為粉末，再過細篩。此時銀翹散的粉末成品送入實驗室，我們將其粉末溶於水中，在取 1 ml 秤重後冷凍乾燥，計算乾重。之後稀釋成 100 mg/ml，儲純於-30°C 冰箱中備用，用於老鼠實驗用。

另外用於細胞實驗中時，我們將已溶於水中的銀翹散，離心 6000 轉，30 分鐘，取出水層，用 0.22 μ Filtor 作無菌過瀘，無菌過瀘液，在取 1 ml 秤重後冷凍乾燥，計算乾重。之後稀釋

成 100 mg/ml，儲純於-30°C 冰箱中備用，用於細胞實驗用。

第二節 方法

1、LPS 誘發肺炎鼠之動物模式建立

1-1、氣管內接種 (intratracheal inoculation)

(1)、試劑製備

麻醉劑 ketamine:xylazine=2:1，用無菌 1X PBS 稀釋 10 倍，每隻小鼠給予約 0.24-0.3 ml，注射到小鼠腹腔。

(2)、步驟

小鼠被麻醉後，將之架在施打氣管內注射的工作台上，左手大拇指和食指輕壓小鼠後腦部，將小鼠下門齒扣到鐵線上，右手用鑷子夾出小鼠的舌頭，以微量注射器在喉嚨處滴進 50 μ l LPS (1 mg/ml)。待小鼠吸入 LPS 溶液，發出嗆鼻聲後鬆開鑷子，放掉舌頭，小鼠保持直立狀態 1 分鐘後，置於檯燈係下保溫，直到恢復清醒。

1-2、血清分離

麻醉小鼠，麻醉劑 0.3 ml/隻，待小鼠倒下，用針頭釘在保麗龍板上，以 75% 酒精噴其胸腹部，從左腋下剪開皮毛及胸大肌，找到腋下動脈放血。以 1 ml 針筒回收血液約 1 ml，注入 eppendorf，待室溫靜置 1 小時後，以 4°C，3000 rpm，20 分鐘，收集上清液均分 3-4 eppendorf，每管 100 μ l，血清長期保存於-80°C。

2、支氣管肺泡沖洗液之細胞學檢測

(1)、試劑製備

0.5% FBS/1xPBS

1xPBS

50 ml

Fetal bovine serum 250 μ l

(2)、步驟

小鼠收集血液樣本後，然後將小鼠腹部朝上固定在解剖板上。用 75%酒精消毒全身皮毛，將下顎至胸腔的皮膚剪開，把唾液腺及頸部肌肉層拉開暴露氣管，剪開氣管上的薄膜，之後在氣管上綁上縫線，在氣管靠近喉頭處切開一開口，插入 0.965 mm 的 polyethylene Tubing 末端接上 25G 的針頭套管，深入約 0.5 cm，綁緊縫線將套管固定在氣管上。將裝有 1 ml 0.5% FBS/1xPBS 的針筒插上針頭，慢慢打進肺部至整個肺部完全膨脹，再回抽，如此反覆三次後，將衝洗液保存於冰中。再換另外一支 1 ml 0.5% FBS/1xPBS 的針筒，重覆前述的步驟。將收集的沖洗液(約 1.8 ml)，以 1200 rpm，4 $^{\circ}$ C，10 分鐘離心，收集上清液於，-20 $^{\circ}$ C 保存。細胞再加入 1 ml 0.5% FBS/1xPBS 的液回溶。

2-1、氣管肺泡沖洗液中細胞總數

(1)、試劑製備

Trypan blue 稀釋 4 倍	各 40 μ l
1xPBS	各 20 μ l

(2)、步驟

取 20 μ l 肺泡沖洗液至 eppendorf，加入 20 μ l 1xPBS 和稀釋 4 倍的 Trypan blue，均勻混合後以 hemocytometer 計算細胞數目。

2-2、氣管肺泡沖洗液中白血球分類計算

(1)、試劑製備

LiuA 及 LiuB

(2)、步驟

取 100 μ l 支氣管肺泡沖洗液，以 cytopsin 將細胞打至玻片做成細胞抹片，風乾後，以 Liu 染液染色。滴 3 滴的 LiuB 染液完全覆蓋抹片，作用 90 sec，不經水洗，再滴 6 滴的 LiuA 染液 40 秒，藉吹風混合兩種染液並呈現金屬光澤，作用 1 分鐘，以自來水沖洗後風乾，利用油鏡（400x）鏡察 100 個白血球細胞種類，計算各佔的百分比，乘上支氣管肺泡沖洗液中細胞總數目，得出各白血球的絕對數目。

3、組織染色之細胞觀察 (Hematoxylin-eosin stain)

(1)、試劑製備

4% paraformaldehyde	
milliQ 水	500 ml
paraformaldehyde	4 g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	6 g
NaOH	2 g

(2)、步驟

組織切片的製作：將小鼠肺部及氣管取下後，於 4% paraformaldehyde 固定液保存。經過漸進式酒精脫水及石臘包埋後，以切片機切成 0.5 mm 厚度的薄片，將之固定於玻片上，以蘇木酸和伊紅來染色。

4、Nitrite 含量測定

(1)、試劑製備

Griess reagent
Sodium nitrite
nitrate reductase

NADPH

(2)、步驟

先加 sample 與 nitrate reductase (610 mU/ml) 及 NADPH (170 mmol/L) 混合，置於室溫三小時，以 sodium nitrite 一系列稀釋後當 standard，再取 100 μ l 肺泡沖洗液，加入等量 Griess reagent 於 96 孔平底微量盤，靜置 15 分鐘，以 ELISA reader 於波長 540 nm 偵測 Nitrite 濃度。

5、ELISA 分析 (Enzyme-linked immunosorbent assay)

(1)、試劑製備

a、washing solution：0.05% PBS-T 的配製方法

1XPBS (PH=7.4) 500 ml

Tween-20 250 μ l

b、coating buffer 的配製方法：

Na₂CO₃ 1.59 g

NaHCO₃ 2.93 g

D.D.H₂O (消毒過) 1000 ml

c、blocking buffer：

3% BSA (3 g BSA/100 ml D.D.W)

d、stopping buffer

1 N H₃PO₄

(2)、步驟

a、Ag (Ab) 以 coating buffer 配成 2 μ g/ml，以 50 μ l/well 加入 96-well assay plate，4°C 下靜置一晚。

b、倒出上清液 (可在紙上用力敲一敲)。

c、加入 3% BSA blocking，100 μ l/well 室溫 1.5-2 小時以上

d、倒掉，拍乾，以 0.05% PBS-T wash 3 次，拍乾。

e、加入待側 Ab (Ag)，100 μ l/well，37°C (RT)，2 小

時

- f、倒掉，拍乾，以 0.05% PBS-T wash 3 次，拍乾
- g、加入二抗（100 μ l/well），37°C，45 分鐘
- h、倒掉，拍乾，以 0.05% PBS-T wash 4 次，拍乾
- i、加 SAV-HRP（streptoavidin- Horse radish peroxidase）100 μ l（2 μ g/well），室溫下靜置 30 分鐘。SAV-HRP（1% BSA dilute 1000x）
- j、倒掉拍乾，以 0.05% PBS-T wash 5 次，拍乾
- k、加入 substrate TMB 100 μ l/well，呈色數分鐘。
- l、加入 50 μ l/well 1 N H₃PO₄ stopping
- m、以 ELISA reader 450 nm 下讀 OD 值。

6、核蛋白分析

6-1、核蛋白萃取

(1)、試劑製備

Buffer A Mix：

1X Buffer A	1.65 ml/管
100mM DTT	16.5 μ l/管
Protease Inhibitor Cocktail	16.5 μ l/管
10% IGEPAL	66 μ l/管

Buffer B Mix：

1X Buffer B	147 μ l/管
Protease Inhibitor Cocktail	1.5 μ l/管
100 mM DTT	1.5 μ l/管

(2)、步驟

小鼠左肺組織加入 1.5 ml 的 Buffer A Mix 後均質化，置於冰上 15 分鐘，之後於 850 xg，4°C 離心 10 分鐘，去掉上清液，再置於冰上，並加入 250 μ l 的 Buffer A Mix 後均質化，置於冰上 15 分鐘後 15000 G，4°C 離

3 分鐘。儲存上清液，另加 150 μ l 的 Buffr B Mix 沖散 pellet，vortexing 10 秒，然後使 eppendorf tube 平躺在冰上，利用 rocking platform 搖晃 200 rpm，2 小時。於 4 $^{\circ}$ C 離心 15000 G，5 分鐘，收集上清液即是我們所要的 nuclear extract，存放於 -80 $^{\circ}$ C。

6-2、蛋白質濃度的定量

(1)、試劑製備

Working reagent (Micro BCA protein Assay kit ; PIERCE)

(2)、步驟

取出 BSA 70 μ l 以 D.D.H₂O 連續稀釋成 200、40、20、10、5、2.5、1、0.5、0 μ g/ml BSA 標準液，取不同濃度的標準液或樣品 150 μ l，加入 96 well plate 中，與 150 μ l Working reagent 混合，搖 30 秒，37 $^{\circ}$ C 2 小時，plate reader OD 570 nm 算出樣品的實際濃度。

6-3、SDS-PAGE 之蛋白質電泳

(1)、試劑製備

解析膠體(separation gel)

30% acrylamide & 0.8% bis-acrylamide	3.3 ml
1.5 M Tris-HCl pH8.8	2.5 ml
10% SDS	1.0 ml
D.D H ₂ O	4.0 ml
10% ammonium persulfate	0.1 ml
TEMED	0.005 ml

疊層膠體(stackig gel)

30% acrylamide & 0.8% bis-acrylamide	0.67 ml
1.0 M Tris-HCl pH 6.8	2.5 ml
10% SDS	0.04 ml

D.D.H ₂ O	2.7 ml
10% ammonium persulfate	0.04 ml
TEMED	0.004 ml

電泳緩衝液(running buffer)

0.025 M Tris-HCl pH 8.3
0.192 M glycine
0.1% SDS

追蹤染劑(4X Sample buffer)

0.25 M Tris-HCl pH 6.8
8% SDS
0.02% BPB
30% Glycerol

染色液(Stain buffer)

0.25% Coomassie blue R-250
10% acetic acid
45% Ethanol

脫色液(Destain buffer)

7% acetic acid
25% Ethanol

(2)、步驟

將解析膠體加入以組合好的電泳裝置，再緩緩加入少許 methanol 於其與空氣接觸之界面。待凝固後，吸掉 methanol，再加入疊層膠體並插好齒狀板 (comb)。將蛋白質溶液與等比例的追蹤溶液混合後，於 100°C 下加熱 5 分鐘，再以每個 well loading 10 μ l 的待測蛋白質溶液。通電 120 V，1.5 小時電泳分析。電泳完成後，將解析膠體取出以染色液染色，於 50°C 下震盪 30 分鐘，再以脫色液去除背景。

6-4、西方墨點法

(1)、試劑製備

轉漬緩衝液 (transfer buffer)

0.192 M glycine

0.0013 M SDS

10-20% methanol

0.025 M Tris (pH 8.3)

染色液

0.1% amido black

45% methanol

10% acetic acid

脫色液

50% methanol

10% acetic acid

PBS

0.8% NaCl

0.02% KCl

0.24% KH_2PO_4 (pH 7.2-7.45)

PBST

PBS 外加 0.05% Tween. 20

(2)、步驟

將完成的 SDS-PAGE 膠體與 methanol 前處理的 PVDF membrane 浸於轉漬緩衝液中 10 分鐘。將膠體 PVDF membrane、濾紙正確地疊放於電泳轉漬槽中，並以 100 mA 通電轉印 1 小時。PVDF membrane 浸於 5% non-fat milk/PBS，4°C 下靜置過夜。取出 PVDF membrane，以 PBST 清洗 3 次 5 小時後，加入溶於 PBST 經適當稀釋的抗血清(一次抗體)，37°C 下反應 2 小時。PBST 清洗 3 次 5 分鐘。加入連結二次抗體，37°C 下反應 2 小時，PBST 清洗 2 次後，PBS

清洗 2 次。最後以 ECL kit 呈色。

6-5、Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

(1)、試劑製備

Oligodeoxynucleotide

NF-KBp (specific probe)

NF-kBc (specific competitor)

6% Nondenaturing polyacrylamide gel

10X TBE 1 ml

30% Acrylamide 4 ml

80% glycerol 625 ml

Water 14.375 ml

10% APS 300 μ l

TEMED 20 μ l

Binding Reagents (Light Shift Chemiluminescent EMSA kit)

Transfer binding reagent

0.5X TBE buffer

Detect Biotin-labeled DNA Reagents

LightShift Blocking Buffer

LightShift Wash Buffer

LightShift Stailized Streptavidin-Horseradish Peroxidase
conjugate

LightShift Substrate Equilibration Buffer

(2)、步驟

先配 6% Nondenaturing polyacrylamide gel，再將配置好的每管 20 μ l binding reagent 加入 5 μ l 的 5X Loading Buffer，loading 後 120 V 跑約 90 分鐘，將 Gel 取出後轉漬到 nylon membrane，membrane 以 120 mJ/cm² 暴露於 254 nm UV 燈下，照射 2 分鐘。將膜浸泡於 20 ml LightShift Blocking Buffer，緩慢地搖晃 15 分鐘。再將 LightShift Blocking Buffer 倒掉，加入

conjugate/blocking buffer solution，緩慢地搖晃 15 分鐘。將膜取出換至乾淨的容器內，以 20 ml 1X wash solution 搖晃清洗 4 次，每次清洗 5 分鐘。之後再暗房中加入 30 ml LightShift Substrate Equilibration Buffer，緩慢地搖晃 5 分鐘。到掉後將 LightShift Substrate Working Solution 直接加在膜上，反應 5 分鐘。去掉 Working Solution，將膜放入塑膠袋內，壓出多餘的 Working Solution 進行壓片。

7、RNA 分析

7-1 RNA 萃取

(1)、試劑製備

Trizol

Chloroform

Isopropyl alcohol

DEPC water

(2)、步驟

將小鼠右肺均質，過 26G 針，靜置 5 分鐘，加入 0.2 ml Chloroform，靜置 15 分鐘，12000 G 15 分鐘 4°C，取上清液，加入 0.5 ml isopropyl alcohol 靜置 10 分鐘 4°C，20000 G. 20 分鐘 4°C 離心，去除上清液，收集沉澱物拍散，以 0.7 ml 100%酒精和 0.3 ml DEPC water 清洗，20000 G. 20 分鐘 4°C 離心，去除上清液，於 Flow 中晾 45 分鐘，以 20 μ l DEPC water 回溶，測 RNA 濃度，調整最終濃度 1 μ g/ml。

7-2、One-Step RT-PCR

(1)、試劑製備

One-Step RT-PCR Kit (GeneMark)

Nuclease free H₂O 15.6 μ l

RNA temple 0.6 μ l

Upstream primer (50-100ng/ μ l) 0.6 μ l

Downstream primer (50-100ng/ μ l)	0.6 μ l
(如表 3.1)	
5X Reaction Mix	6 μ l
5X Enhancer	6 μ l
Enzyme Mix	0.6 μ l
Total	30 μ l

(2)、步驟

First strand cDNA synthesis :

1 cycle Reverse transcription	50°C, 30 分鐘
1 cycle M-MLV RTase inactivation	94°C, 2 分鐘
RNA/cDNA/Primer denaturation	

Second strand cDNA synthesis and PCR reaction :

35 cycle

Denaturation	94°C, 30s-1 分鐘
Annealing	55-65°C, 30s-1 分鐘
Extension	72°C, 30s-3 分鐘

1 cycle Extension 72°C, 7 分鐘

7-3、Agarose gel electrophoresis

(1)、試劑製備

Agarose gel	1.5 g
0.5x TBE	100 ml
10 mg/ml Ethidium bromide	
6x gel loading buffer	

(2)、步驟

取 1.5 g 的 agarose，倒入錐形瓶，保鮮膜封口，刺數個洞，放進微波爐，加熱 1.5 分鐘，倒入電泳槽中凝固，緩緩加入 0.5x TBE 緩衝溶液。取 10 μ l DNA Sample 加入 2 μ l 的 6x gel

loading buffer，加入電泳膠片凹槽中，100 V 1 小時，取出電泳膠片放入 Ethidium bromide 30 分鐘，再放入水中進行脫色 10 分鐘，用 UV 光激發並拍照。

Table 3.1 Oligonucleotide primer designation for RT-PCR analysis

β -actin	5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3' 5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'
TNF α	5'-AGCCCACGTCGTAGCAAACCACCAA-3' 5'-ACACCCATTCCCTTCACAGAGCAAT-3'
IL-1 β	5'-GCGGACTACTATGCTAAAGATG-3' 5'-GTTGTGTTGGTTGTAGAGGGCA-3'
IL-10	5'-GGACTTTAAGGGTACTTGGGTTGCC-3' 5'-CATTTTGATCATCATGTATGCTTCT-3'
iNOS	5'-AATGGCAACATCAGGTCCGCCATCACT-3' 5'-GCTGT-GTGTCACAGAAGTCTCGAACTC-3'
COX-2	5'-GGAGAGACTATC-AAGATAGT-3' 5'-ATGGTCAGTAGACTTTTACA-3'
TGF- β 1	5'-GCGGACTACTATGCTAAAGATGT-3' 5'-GTTGTGTTGGTTGTAGAGGGGCA-3'
MCP-1	5'-ACCAGCCAACCTCACTGAAGC-3' 5'-CAGAATTGCTTGAGGTGGTTGTG-3'
MIP-2	5'-GAACAAAGGCAAGGCTAACTGA-3' 5'-AACATAACAACATCTGGGCAAT-3'

8、細胞培養及測量細胞生長及藥物毒性

小鼠巨噬細胞(RAW 264.7 cell line)、人類肺部上皮細胞株(A549 cell line)及人類巨噬細胞(THP-1 cell line)購自 American Type

Culture Collection(Rockville, MD)。DMEM, penicillin, streptomycin 及 fetal bovine serum 購自 Gibco Life Technologies (Gaithersburg, MD)。RAW264.7 及 A549 細胞培養在 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 而 THP-1 細胞培養在 RPMI 1640 中, 兩者培養液中含有 10% FBS、penicillin (100 unit/ml) 以及 streptomycin (100 µg/ml) 中, 置於 37°C 含有 5% 二氧化碳細胞培養箱中。而亦購自 American Type Culture Collection (Rockville, MD)。

細胞(5×10^4 cells/well)種於 96-Well plates 培養。以 PBS 沖洗。先加入中藥後 1 小時, 再加入 LPS (1 µg/ml) 刺激細胞, 隔夜培養。以 phosphate-buffered saline (PBS) 沖洗後, 藥物作用 24 小時。加入 MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide), 4 小時, 再加入 20% Triton X.100 (final 0.5%) 溶解細胞。將 96-well plates 放入 spectra MAX 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA), 以 570 nm 來測量吸光值變化。

9、銀翹散於高效液相層析之成份分析(High Performance Liquid Chromatography)

針對廠內銀翹散(501 批)中 Chlorogenic acid、Luteolin、acrtiin 及 Hesperidin 作定量分析。以高效液相層析法進行鑑別及含量測定, 高效液相層析儀: Hitachi D-7000 Interface, L-7100 pump, L-7455 DAD, L-7200 Autosampler。高效液相層析條件: 層析管柱: Mightysil RP-18, GP 250×4.6 mm (5 µm), 移動相:

Table 3.2. The time and partition of solvent

Time(min)	Acetonitrile(%)	0.3 %H ₃ PO ₄ (%)
0	10	90
45	25	75
55	70	30
60	10	90
65	10	90

流速：1 ml/分鐘 檢測波長：350 nm 注入量：10 μ l

標準品配製：取以配製之 Chlorogenic acid、Luteolin、acrtiin 及 Hesperidin 標準溶液。檢品溶液之調製：取樣品三次各約 0.5 g 左右，加入 10 ml 的 70 % MeOH。置於迴轉式震盪機，200 rpm，60 分鐘萃取，過濾後再以 70 % MeOH 定容至 10 ml，再分別取 1 ml 定容至 5 ml，取適量通過 0.45 μ m 濾膜供作檢液。

10、THP-1 單核細胞對 A549 上皮細胞的附著力分析

附著實驗主要是用 human monocytic cell line THP-1 對上皮細胞有穩定的附著力產生，THP-1 cells 培養在 RPMI containing 1% FBS 及 5 μ g/ml calcein-AM (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) 在 37°C 下 30 分鐘，螢光標定的 THP-1 (Fluorescence-labeled cells) 調成 1×10^6 cells/ml；另外將單層的 A549 cell (monolayer) 培養在 6-well plates 中加入橙皮素 1 小時，及 TNF α 或 IL-1 β ，4 小時，將 A549 以 PBS 洗二次再加入 100 μ l (1×10^5) labeled THP-1 cells/well (4:1 ratio of monocytes to epithelial cells)，於 37 °C 下反應 30 分鐘。再用 PBS 輕輕洗三次。再將 cells 放在螢光顯微鏡 (Axiovert S100 microscope, Zeiss, Jena, Germany) 下照相及計數被標定的細胞數。

11、流式細胞儀測定附著分子

將 5×10^5 個A549 細胞培養在 6 well plates一天後，用PBS洗二次，再預先給予藥物一小時，再投與 40 ng/ml TNF α 或 10 ng/ml IL-1 β 培養四小時後，用PBS洗二次，再用trypsin solution (Life Technologies)切下細胞，用不同螢光標定的VCAM-1, ICAM-1 抗體 (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany)與A549 細胞作用一小時，再用用PBS洗二次，最後以 300 μ l 的PBS打散細胞，再以FACSscan cytometer (Becton Dickinson)分析。每次收入 10,000 顆細胞，做三重複。

12、統計方法

利用Student's t-test作統計分析，比較各組間之差異。實驗結果以means \pm SEM表示，p值小於0.05視為具統計上的顯著性。



第四章 結 果

第一部份 銀翹散對LPS誘發造成肺發炎老鼠模式保護作用及免疫調節機制分析

第一節 不同濃度LPS造成肺部損傷的影響 (the morphologic damage of lungs exposed to LPS)

在圖一顯示，不同濃度的LPS嗆入鼠肺後所引起的組織發炎的程​​度，由肺組織切片看來，鼠肺受到LPS攻擊24小時後，可看到隨LPS濃度增加而肺損傷的狀態也增加，當鼠肺受到LPS攻擊產生肺部發炎反應，我們可以觀察發炎的肺部組織會產生的變化有(1)肺泡壁的變厚、(2)在肺部的肺泡內有出血、(3)在肺泡內見到大量的單核性白血球及多核性白血球浸潤(如圖4.1)。在LPS 100~200 µg/kg 對誘發肺炎鼠可見到較嚴重的肺部發炎，但在LPS 200 µg/kg 的誘發肺炎鼠會造成鼠隻死亡而收不到資料，故我們選用了LPS 100 µg/kg為實驗使用的濃度。

第二節 銀翹散對LPS造成肺部損傷的影響 (The effect of GGS on the morphologic damage of lungs exposed to LPS)

正常的肺部組織切片應可見到完整的肺泡壁及乾淨的肺泡空間(如圖4.2A)，當鼠肺受到LPS攻擊產生了肺部發炎反應，我們可以觀察發炎的肺部組織見到(1)肺泡壁的變厚、(2)在肺部的肺泡內有出血、(3)在肺泡的內我們可見到大量的單核性白血球及多核性白血球浸潤(如圖4.2B)。我們使用了不同濃度的銀翹散(0.25 mg/kg (C), 0.5 mg/kg (D), 1 mg/kg (E), and 2 mg/kg (F))餵食老鼠及同時氣管內投與LPS 的24小時後，我們可以看到肺部組織受到LPS攻擊後，隨著銀翹散使用濃度的增加而有明顯的改善，如肺泡壁的變薄、在肺泡內出血減少及在肺泡內浸潤單核性白血球及多核性白血球也

明顯減少，可見使用銀翹散對LPS造成肺部損傷有治療的成效。

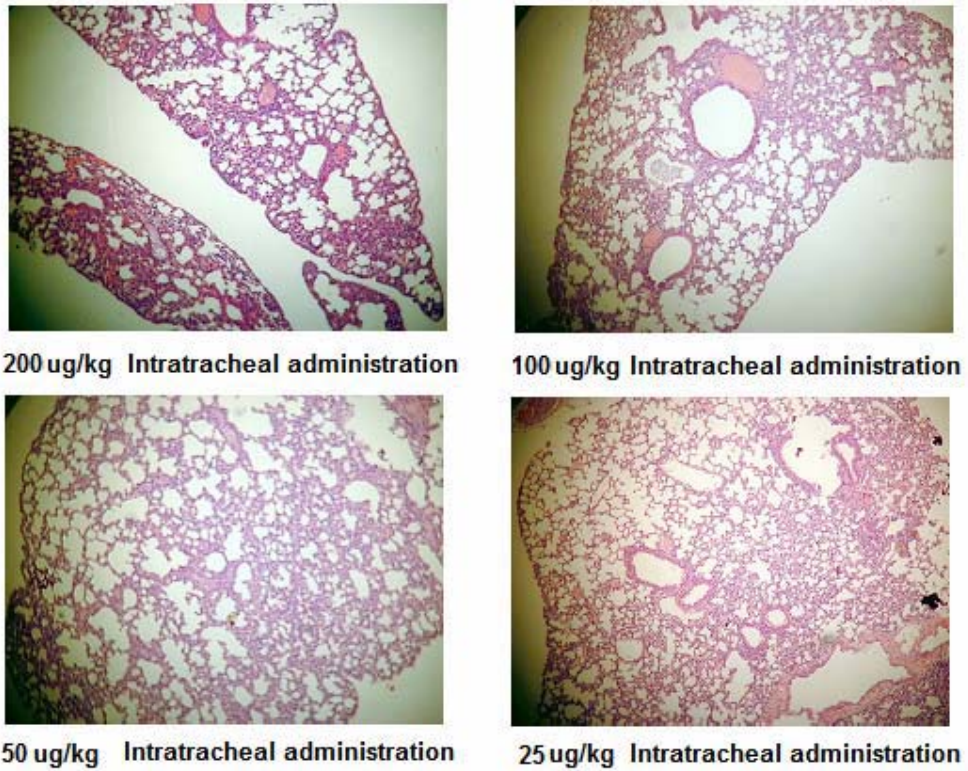


Figure 4.1. the morphologic damage of lungs exposed to different concentration of LPS. Representative histologic sections of lungs harvested 24 hours after the intratracheal instillation of LPS. Magnification $\times 100$.

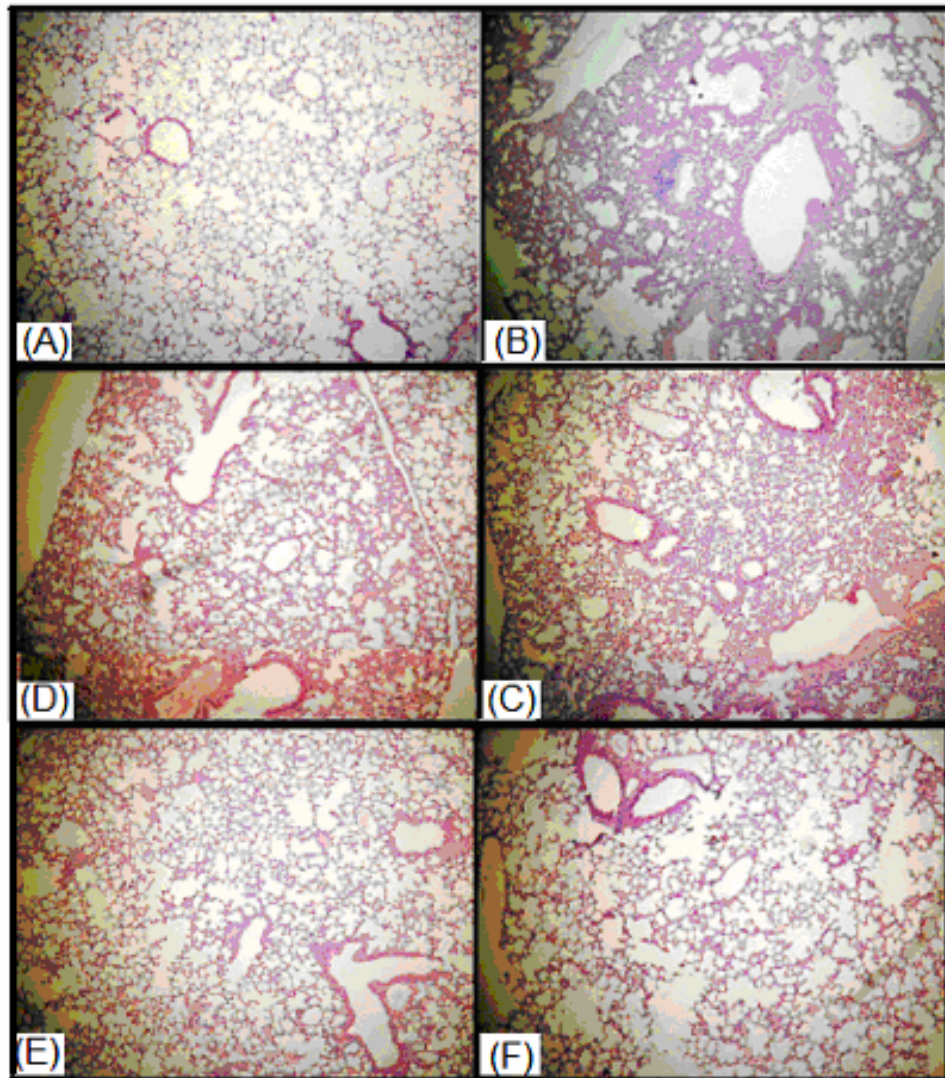


Figure. 4.2. The lung morphology changes of GGS treatment. Representative histologic sections of lungs harvested 24 hours after the intratracheal instillation of LPS (B), or none (A) in mice, and oral administration of 0.25 mg/kg of GGS (C), 0.5 mg/kg of GGS (D), 1 mg/kg of GGS (E), and 2 mg/kg of GGS (F) in LPS-induced lung inflammatory mice. Pictures are representative of n =6 mice/treatment group. Magnification \times . 200.

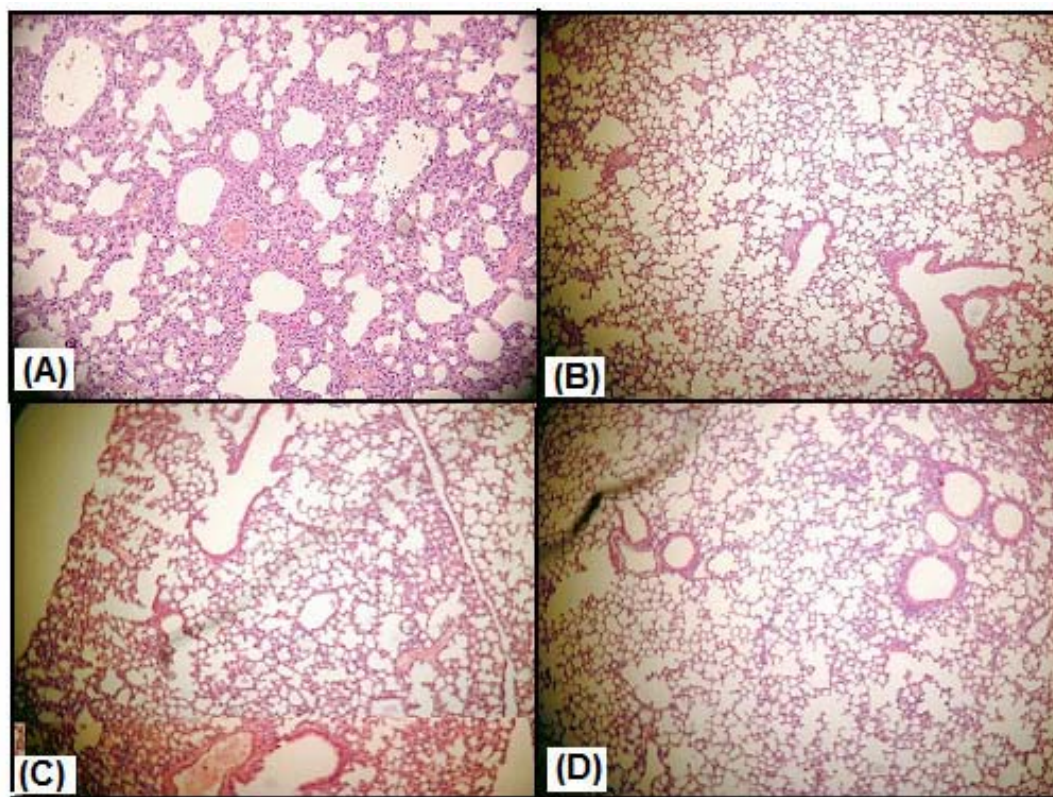


Figure 4.3. The lung morphology changes of GGS, HBX and Hesperidin treatment. Representative histologic sections of lungs harvested 24 hours after the intratracheal instillation of LPS (A), in mice, and oral administration of 1 mg/kg of GGS (B), 1 mg/kg of HBX (C), and. 200 mg/kg of Hesperidin (D) in LPS-induced lung inflammatory mice. Magnification \times 200.

我們也將銀翹散與另一種抗發炎能力比較弱的中藥方-瀉白散(Xia-Bai-san; XBS)，以及在銀翹散中含有抗發炎能力黃酮類-橙皮素(Hesperidin; HES)進行組織切片上的比較，明顯的銀翹散治療組與橙皮素治療組在治療24小時後效果比較好，而瀉白散組也有改善發炎狀態，但效果尚不及上兩種藥（如圖4.3）。

第三節 銀翹散對LPS造成肺部損傷產生的氣管內滲出液之影響 (The effect of GGS on the formation of high-permeability edema after intratracheal instillation of LPS)

ARDS的患者肺部會產生大量的滲出液造成肺部水腫，阻礙了肺部的換氣作用而導致病患死亡，所以改善肺部滲出液的量及滲出液內蛋白濃度是一個很重要的指標。我們測量了肺的重量及肺泡沖洗液內的蛋白質的濃度來表現肺部滲出液的多寡。如圖4.4A顯示，正常老鼠的肺重約 0.15 ± 0.027 g，而LPS誘發鼠肺發炎24小時後，重約 0.24 ± 0.054 g，肺部重量增加大於60%，可見肺部內有許的滲出液的產生。但在同時餵食不同濃度的銀翹散24小時後，其肺部的重量減為 0.22 ± 0.035 g (0.5 mg/kg 銀翹散)、 0.18 ± 0.022 g (1 mg/kg 銀翹散)、 0.17 ± 0.012 g (2 mg/kg 銀翹散)，肺部重量有明顯隨著投與的銀翹散濃度增加有所下降。在肺泡沖洗液內蛋白質濃度上，如圖4.40B顯示，正常老鼠的肺泡沖洗液內蛋白質濃度為 0.21 ± 0.071 $\mu\text{g/ml}$ ，而受到LPS攻擊24小時後肺泡沖洗液內蛋白質濃度增加為 0.54 ± 0.16 $\mu\text{g/ml}$ ，但在同時餵食不同濃度的銀翹散24小時後，可見到肺泡沖洗液內蛋白質濃度有明顯的不同程度的下降， 0.50 ± 0.04 $\mu\text{g/ml}$ (0.5 mg/kg 銀翹散)、 0.46 ± 0.034 $\mu\text{g/ml}$ (1 mg/kg 銀翹散)及 0.43 ± 0.026 $\mu\text{g/ml}$ (2 mg/kg 銀翹散)。

在肺部重量及肺泡沖洗液內蛋白質濃度的治療結果來看，銀翹散可以減少LPS攻擊肺部造成大量的滲出液的狀態，而增加ARDS或肺部急性發炎患者存活的機會。

我們也同時比較銀翹散、瀉白散及橙皮素對LPS誘發鼠肺發炎的肺組織重量及肺泡沖洗液內蛋白質濃度（如圖4.5），效果最好的是橙皮素，其次為銀翹散，而瀉白散雖然比前兩者差但也有療效。

第四節 銀翹散對LPS造成肺部損傷產生的肺泡沖洗液中的血球量之影響 (The effect of GGS on the lung leukocyte accumulation after intratracheal instillation of LPS)

當肺部正在進行發炎反應時，肺泡的內部見到大量的單核性白血球及多核性白血球浸潤，所以當由氣管中取得肺泡沖洗液時，在肺泡沖洗液中便會有許多血球存在，而且數量會急速的升高，肺泡沖洗液中的血球含有巨噬細胞、白血球及淋巴球，在急性發炎反應中最重要的白血球是中性白血球，這此血球會分泌許多促進發炎反應持續進行的發炎因子，所以減少肺泡沖洗液中血球數量也是降低發炎反應重要的工作之一。在圖4.6中顯示著，正常的鼠肺中的肺泡沖洗液中只有少量的血球存在(total cells: $10.0 \pm 2.82 \times 10^4$ cells/BALF)，及極少數的中性白血球的存在($0.9 \pm 0.61 \times 10^4$ cells/BALF)，在氣管內投與LPS來誘發肺部發炎反應24小時後，可見到大量的血球被吸引到肺中，存在肺泡沖洗液中的血球數便向上攀升 (total cells : $89.3 \pm 7.4 \times 10^4$ cells/BALF)，尤其是中性白血球更是佔肺部的細胞中部分值 ($71.5 \pm 1.34 \times 10^4$ cells/BALF at 24 hours)，暗示著肺部發炎反應正在洶湧的進行中，但是當我們同時餵食不同濃度的銀翹散後，肺泡沖洗液中的血球數便有顯著的減少，

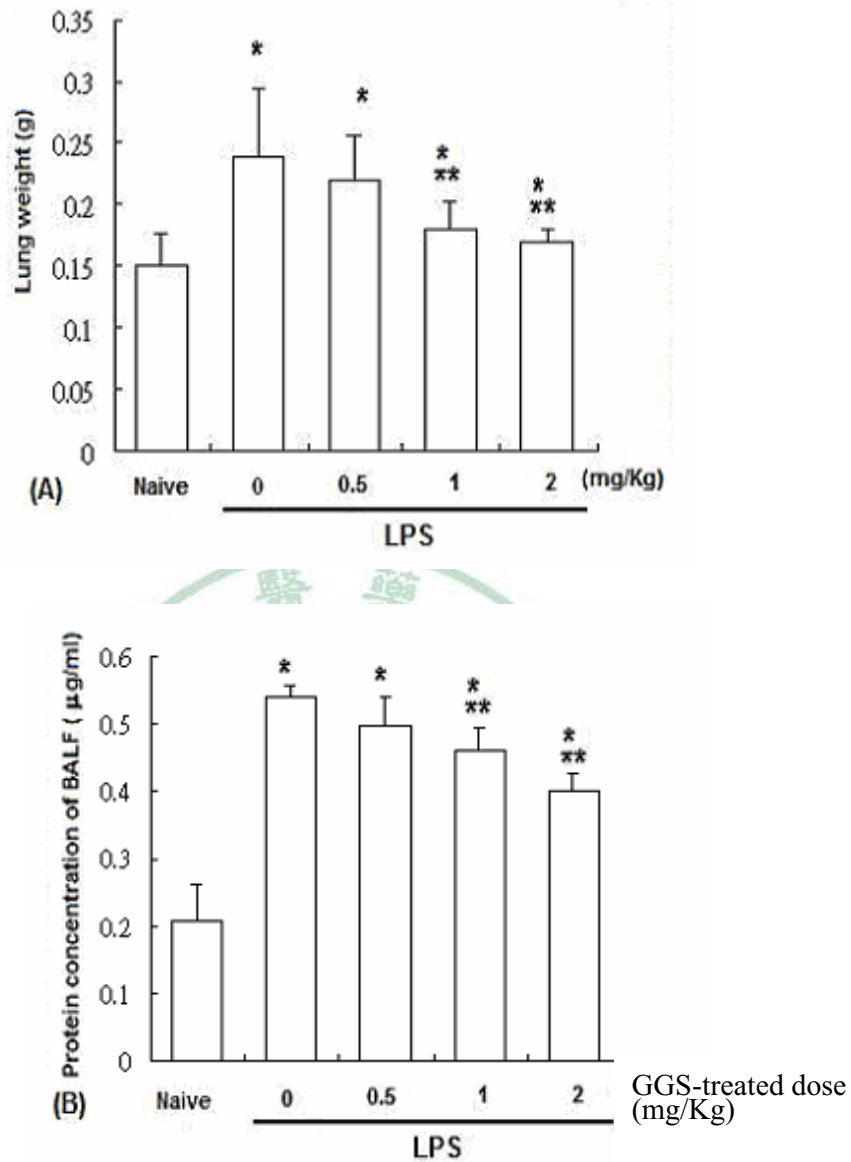


Figure 4.4. The weight of lung and concentrations of proteins in BALF(I). BALB/c mice received an intratracheal instillation of lipopolysaccharide and were treated with different doses of GGS (n = 6) or naïve mice received PBS instead of LPS intratracheally (n = 6), and oral administration of different concentration of GGS in LPS-induced lung inflammatory mice. After 24 hours, mice sacrifice and measure the weight of lung (A) and proteins of BALF (B) as an index of high-permeability pulmonary edema. Means \pm SEM. *P < 0.05 LPS-treated vs. Naïve. **P < 0.05 GGS vs. LPS-treated mice.

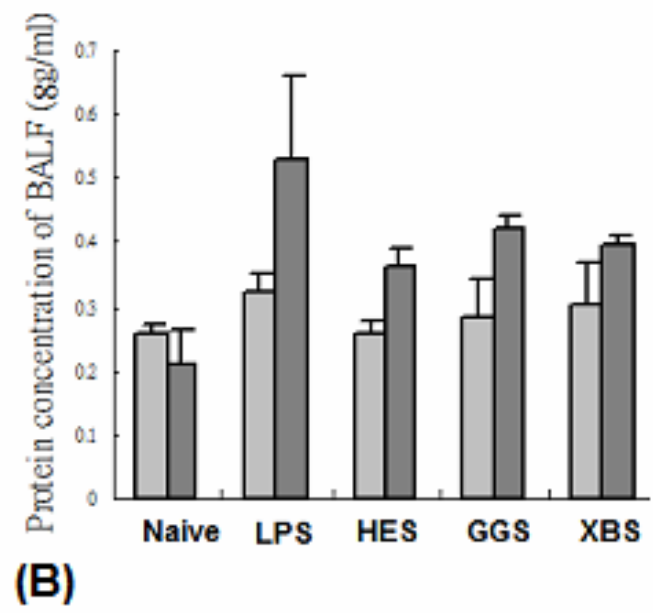
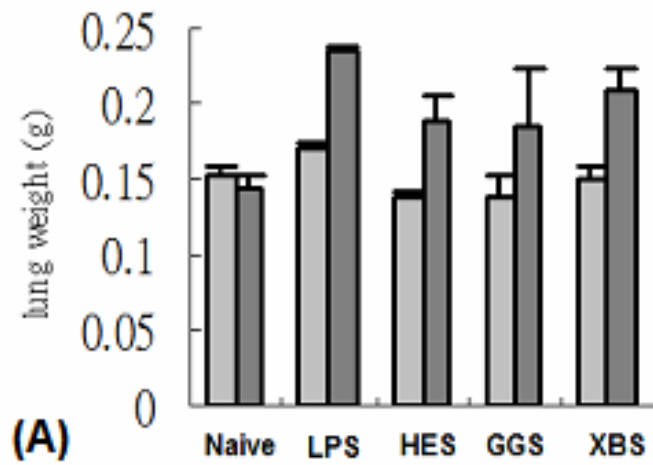


Figure 4.5. The weight of lung and concentrations of proteins in BALF(II). BALB/c mice received an intratracheal instillation of lipopolysaccharide and were treated with GGS, XBS, and HES or naïve mice received PBS instead of LPS intratracheally. After 4 hours and 24 hours, mice sacrifice and measure the weight of lung (A) and proteins of BALF (B) as an index of high-permeability pulmonary edema.

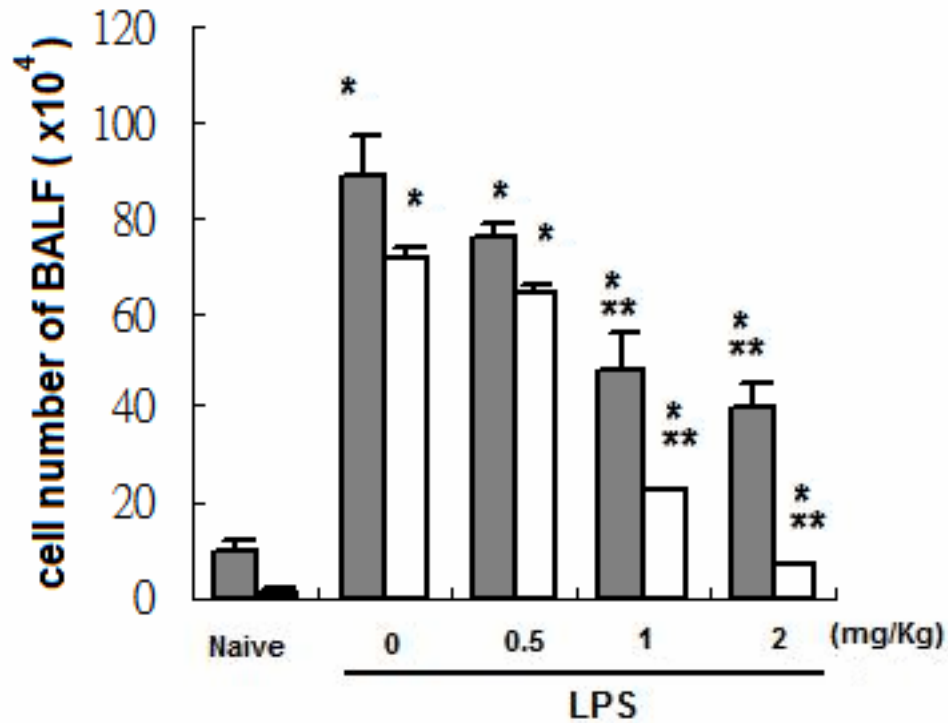


Figure 4.6. The cell counts in the BALF. BALB/c mice received an intratracheal instillation of lipopolysaccharide or not (naïve) and were treated with different doses of GGS. Total cell counts ■ and Neutrophil cell counts □ of BALF were determined at 24 hours after LPS. Means \pm SEM. **P < 0.05 LPS vs. Naïve, *P < 0.05 GGS vs. LPS treated mice.

在總血球數上減為 $76.2 \pm 2.16 \times 10^4$ cells/BALF (0.5 mg/kg 銀翹散)、 $47.3 \pm 8.91 \times 10^4$ cells/BALF (1 mg/kg 銀翹散) 及 $40.5 \pm 4.72 \times 10^4$ cells/BALF (2 mg/kg 銀翹散)；而中性白血球的數量更是明顯的降低，如 $64.5 \pm 1.23 \times 10^4$ cells/BALF (0.5 mg/kg 銀翹散)、 $40.5 \pm 0.67 \times 10^4$ cells/BALF (1 mg/kg 銀翹散) 及 $22.6 \pm 0.51 \times 10^4$ cells/BALF (2 mg/kg 銀翹散)。

銀翹散、瀉白散及橙皮素對LPS誘發鼠肺發炎的總細胞數的比較上，三者皆有效，而橙皮素組優於銀翹散組、瀉白散組(圖4.7A)，但在中性白血球的數量上，卻是銀翹散組、瀉白散組優於橙皮素組(圖4.7B)。

上述結果提示我們給與銀翹散、瀉白散及橙皮素可以減少肺部發炎中的血球浸潤，這與許多誘使血球進入肺部的細胞激素有關，所以以下的實驗便探討與肺部發炎相關的發炎因子。

第五節 銀翹散對LPS誘發的趨化因子的影響(The effect of GGS on the expression of chemokines in lungs exposed to LPS)

在肺部發炎反應中可以誘使大量血球進入肺泡空間內的趨化因子有：IL-8(人類)、KC(老鼠)、MCP-1及MIP-2。我們可以在圖4.8看到老鼠中有關的趨化因子與銀翹散的關係，在圖4.8A中，正常老鼠肺泡沖洗液中的KC是相當低的量(35.78 ± 5.23 pg/ml)，當在氣管內投與LPS來誘發肺部的發炎反應24小時後，KC的量急劇增加(379.78 ± 47.65 pg/ml)，當我們同時以口投與1 mg/kg的銀翹散後，肺泡沖洗液中的KC有意義的下降到 295.81 ± 4.41 pg/ml。

我們也同時取下肺部組織，抽取其mRNA，以RT-PCR的方式，對另外二種趨化因子(MCP-1 及MIP-2)進行追蹤，在圖4.8B，見到MCP-1及MIP-2在正常老鼠是不表現的，但

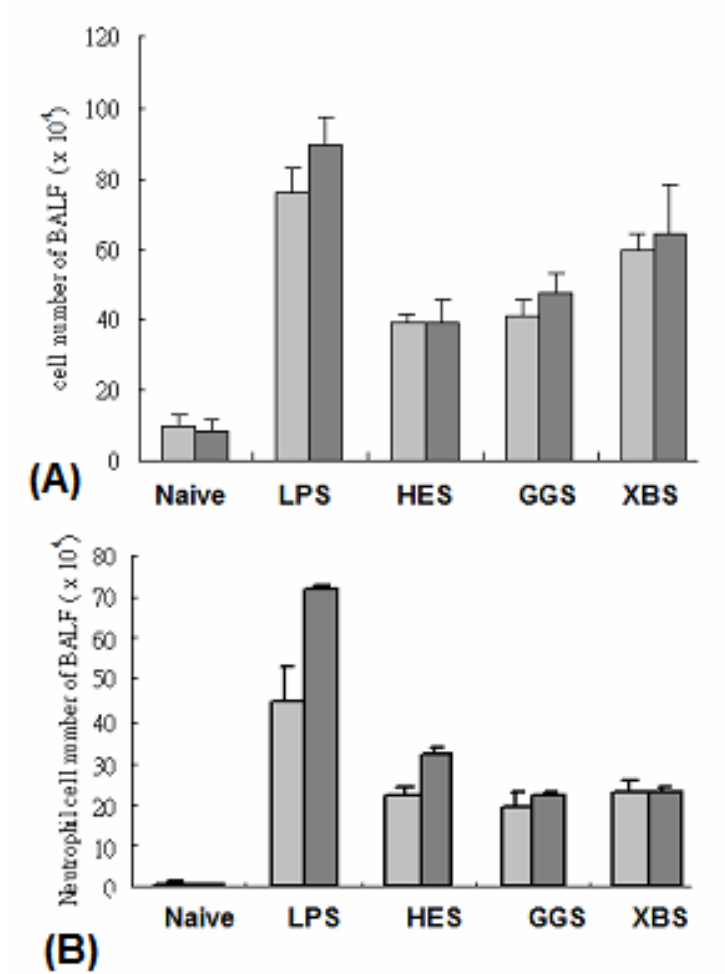


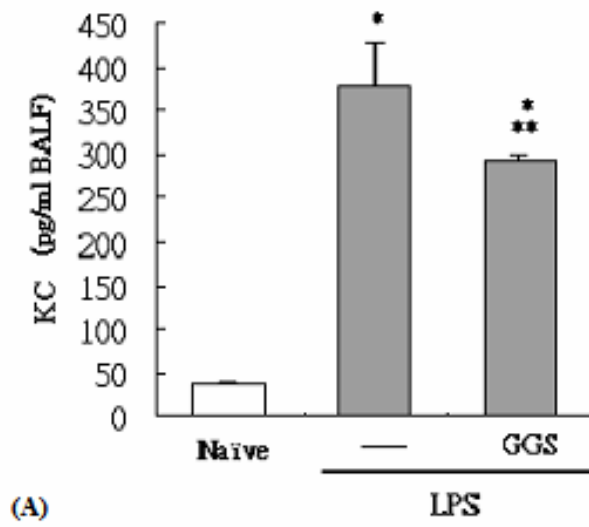
Figure 4.7. The total cell counts and neutrophil number in the BALF. BALB/c mice received an intratracheal instillation of lipopolysaccharide or not (naïve) and were treated with GGS, XBS, and HES. ■ 4 hours and ■ 24 hours after LPS.

被LPS誘發時，卻有大量的表現出來，當餵食銀翹散治療後，MCP-1及MIP-2的表現量有被壓抑的現象，尤其是MIP-2最為明顯。

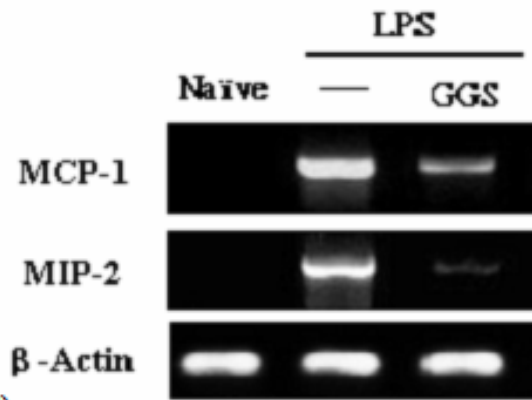
第六節 銀翹散對LPS誘發的發炎及抗發炎的細胞激素之影響(The effect of GGS on the expression of TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-4 and IL-12 and increases the production of IL-10 in lungs exposed to LPS)

在圖4.9是呈現肺部發炎時在肺泡沖洗液中的細胞激素及抗發炎細胞激素的分泌狀態；首先呈現的是TNF α 、IL-1 β 及IL-6，在正常鼠的肺泡沖洗液中只有微量的表現，但在LPS誘發24小時的肺炎鼠肺泡沖洗液中有大量的分泌，表示肺部正在進行炎症的反應，但我們同時給與1 mg/kg銀翹散後，這三種發炎的細胞激素有明顯的下降(數據請參考table 4.1)，說明口服銀翹散有抗肺部發炎的功效。

同時我們檢驗肺泡沖洗液中抗發炎細胞激素IL-10、IL-4及IL-12的表現，在正常鼠的肺泡沖洗液中只有微量的表現，但在LPS誘發24小時的肺炎鼠肺泡沖洗液中有大量的分泌，表示發炎24小時後，鼠體對發炎的現象正在進行調節炎症的強度，我們同時給與1 mg/kg 銀翹散後，IL-4及IL-12的表現有明顯的下降(table 4.1)，但值得注意的是抗發炎細胞激素IL-10被明顯的提高了五倍之多，由以上結果推測銀翹散除了壓制發炎的細胞激素之外，也會針對抗發炎細胞激素IL-10的分泌量進行正向的調節，加強壓抑鼠肺的發炎反應。



(A)



(B)

Figure. 4.8. Concentrations of the chemokines KC in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and MCP-1 and MIP-2 in the lung tissue. Mice were challenged at baseline with lipopolysaccharide (LPS; 100 μ g intratracheally) or none (naïve group, n = 6). Mice receiving LPS were treated with GGS (n = 6). After 24 hours, BALF was obtained and assayed for the concentrations of KC (A) by ELISA and the mRNA of lung was collected and evaluated MIP-1 and MIP-2 (B) by RT-PCR. Means \pm SEM. *P<0.05 LPS-treated vs. naïve. **P<0.05 GGS vs. LPS-treated mice.

第七節 銀翹散對LPS造成肺部損傷的肺泡沖洗液中的一氧化氮及肺組織中的細胞激素誘發NO的合成酵素之影響(The effect of GGS on the production of iNOS and nitric oxide in lungs exposed to LPS)

當鼠肺受到LPS的攻擊24小時後，我們可以明顯看到在肺泡沖洗液內的NO大量的被誘發出來(如圖4.10A)，其NO的量由正常鼠的 2.15 ± 2.15 nmol (4 小時) 及 2.67 ± 0.38 nmol (24小時)，在LPS誘發4小時(25.39 ± 3.76 nmol)及24小時 (40.11 ± 1.34 nmol)的肺炎鼠肺泡沖洗液中有大量的分泌，我們同時給與1 mg/kg 銀翹散後，看到肺泡沖洗液中NO在4小時(19.97 ± 0.66 nmol)及24小時 (14.08 ± 1.99 nmol)有明顯的降低；NO的生成與iNOS生成量有關，所以我們也同時收集發炎的鼠肺組織，抽取其mRNA進行RT-PCR的分析，想了解銀翹散對iNOS的mRNA的影響，在圖4.10B中可看出，在正常鼠的肺部組織中只有少量的表現，在LPS誘發24小時的肺炎鼠肺組織中有大量iNOS mRNA的表現，在同時給與1 mg/kg的銀翹散後，肺炎鼠肺組織中的iNOS mRNA在4小時及24小時後表現有明顯壓制，所以銀翹散會影響iNOS轉錄作用，使得NO的生成減少，而減少發炎反應的程度。

第八節 銀翹散對LPS造成肺部損傷產生的肺組織中的NF- κ B及AP-1轉錄因子之影響 (The effect of GGS on NF- κ B and AP-1 activation in lungs exposed to LPS)

許多與相關發炎的基因如TNF α , IL-1 β , IL-12, iNOS等的控制轉錄序列(promotor)都是含有NF- κ B及AP-1轉錄序列，所以我們選此兩控制轉錄序列以電泳遷移率實驗

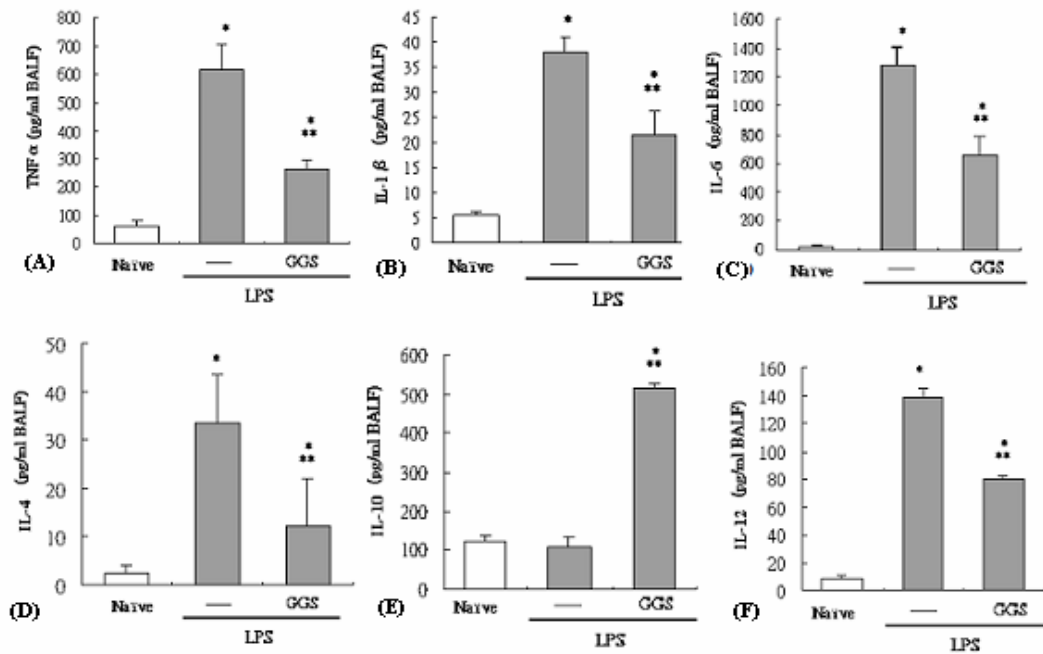


Figure 4.9. Concentrations of tumor necrosis factor-alpha (TNF α), interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-4, IL-10, and IL-12 in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) by ELISA. Cytokines were measured in the BALF obtained 24 hours after an intratracheal instillation of LPS or none (naïve group, n =6). Mice receiving LPS were treated with GGS (n = 6). LPS induced a massive increase of TNF α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), IL-4 (D), IL-10 (E), and IL-12 (F) were determined by ELISA. TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-4 and IL-12 were significantly suppressed by GGS. In contrast, the levels of IL-10 showed significantly increased in the BALF of LPS mice treated with GGS. Means \pm SEM. *P<0.05 vs. naïve. **P<0.05 GGS vs. LPS-treated mice.

表 4.1 Effect of GGS on LPS-induced cytokine

Cytokine	Naïve	LPS-induced	LPS + 1 mg/Kg GGS
TNF α	8.0 \pm 10.76	615.1 \pm 89.91	265.1 \pm 32.87*
IL-1 β	5.5 \pm 0.52	38.1 \pm 2.76	21.7 \pm 4.41*
IL-6	134.9 \pm 17.74	2330.6 \pm 432.71	1413.4 \pm 48.86*
KC	85.7 \pm 5.22	379.7 \pm 46.65	295.8 \pm 4.41*
IL-4	2.3 \pm 1.08	33.5 \pm 10.09	12.1 \pm 9.98*
IL-10	122.5 \pm 13.56	145.0 \pm 17.42	646.0 \pm 131.12*
IL-12	8.9 \pm 1.85	138.2 \pm 7.12	79.7 \pm 2.57*

All data are means of triplicates, and numbers in parentheses indicate the standard deviation of triplicates (N=6). *Data for GGS-treated group compared with LPS-induced group (p<0.05).



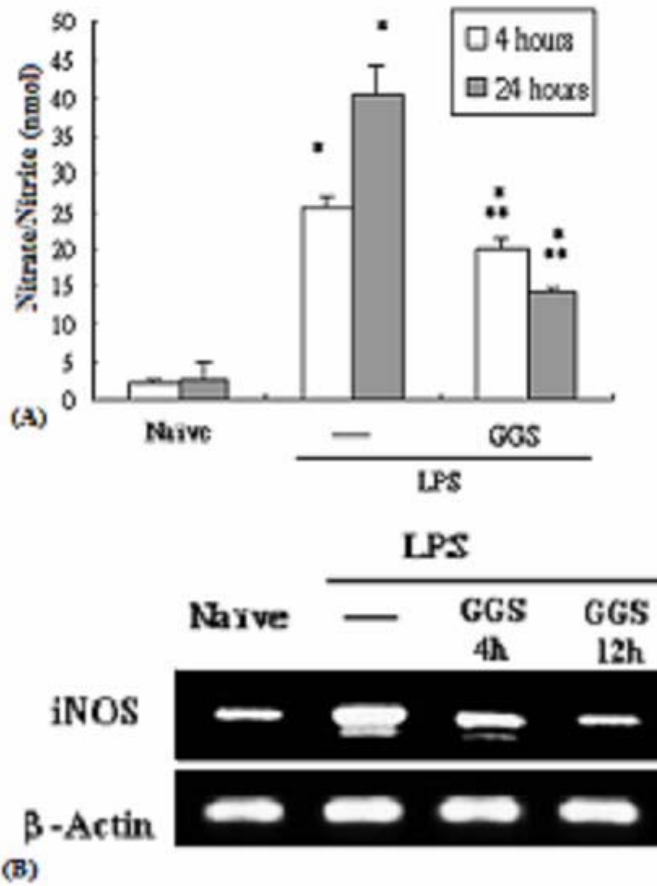


Figure 4.10. Concentrations of the nitrite/nitrate and iNOS. Mice were challenged at baseline with LPS intratracheally or none (naïve group, n = 6). Mice receiving LPS were treated with GGS (n = 6). After 24 hours, BALF was obtained to measure proteins as a nitrite/nitrate (NO_x, A), to evaluate the pulmonary production of nitric oxide and the mRNA of lung was collected and evaluated iNOS (B) by RT-PCR. Means \pm SEM. *P < 0.05 vs. naïve. **P < 0.05 GGS vs. LPS-treated mice.

(electrophoretic mobility shift assay ; EMSA) , 來檢測銀翹散是否可對NF- κ B及AP-1結合開啟其控制轉錄序列有影響。在正常鼠的肺部組織中NF- κ B及AP-1只有少量的結合，在LPS誘發4小時及24小時的肺炎鼠肺組織中有大量NF- κ B及AP-1結合蛋白的表現，在同時給與1 mg/kg的銀翹散，在4小時及24小時後，肺炎鼠肺組織中的AP-1結合現象有明顯壓制。而銀翹散對NF- κ B在4小時在部份的壓制，在24小時後有明顯的壓制。可知銀翹散抑制肺部發炎的過程中，改變NF- κ B及AP-1轉錄序列結合能力可能是一個有重要的關鍵(如圖4.11)。

第二部分 銀翹散對LPS誘發鼠巨噬細胞細胞激素的影響 (in vitro)

第一節 銀翹散及其組成之中藥對LPS誘發發炎鼠的巨噬細胞生存率之影響(The effect of GGS and its components on the viability of mouse macrophage RAW 264.7 exposed to LPS)

我們想要探討銀翹散對LPS造成壓制肺部發炎反應中其組成中藥佔在何種地位，我們使用鼠巨噬細胞RAW 264.7來進行體外實驗，首先我們觀察銀翹散及其組成之中藥對LPS誘發發炎的細胞生存率之影響，由圖4.12我們觀察到RAW 264.7受到LPS刺激後其細胞生長增加，銀翹散對RAW 264.7受到LPS刺激後的生長率沒有影響，但金銀花與桔梗對RAW 264.7受到LPS刺激後生長率有促進的作用，而其它成分反而有壓抑RAW 264.7受到LPS刺激後的成長率。

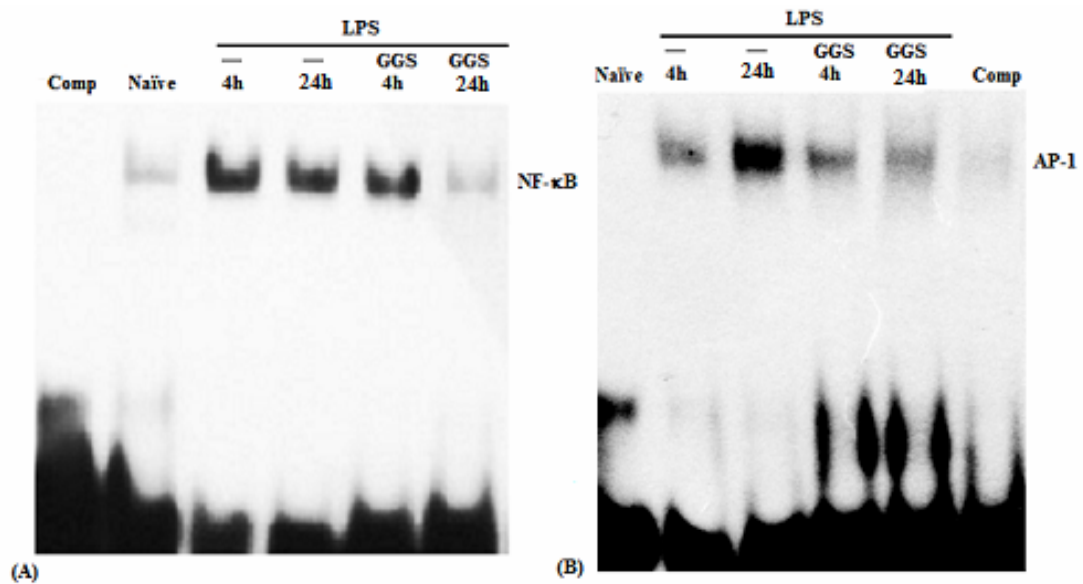


Figure. 4.11. GGS Reduces NF-κB and AP-1 activation by EMSA. BALB/c mice received an intratracheal instillation of LPS and were treated with GGS (n=6) or Naive (n=6). After 4 hours and 24 hours, EMSAs of nuclear extracts of the lung tissue. LPS-induced and GGS inhibit NF-κB (A) and AP-1 (B).

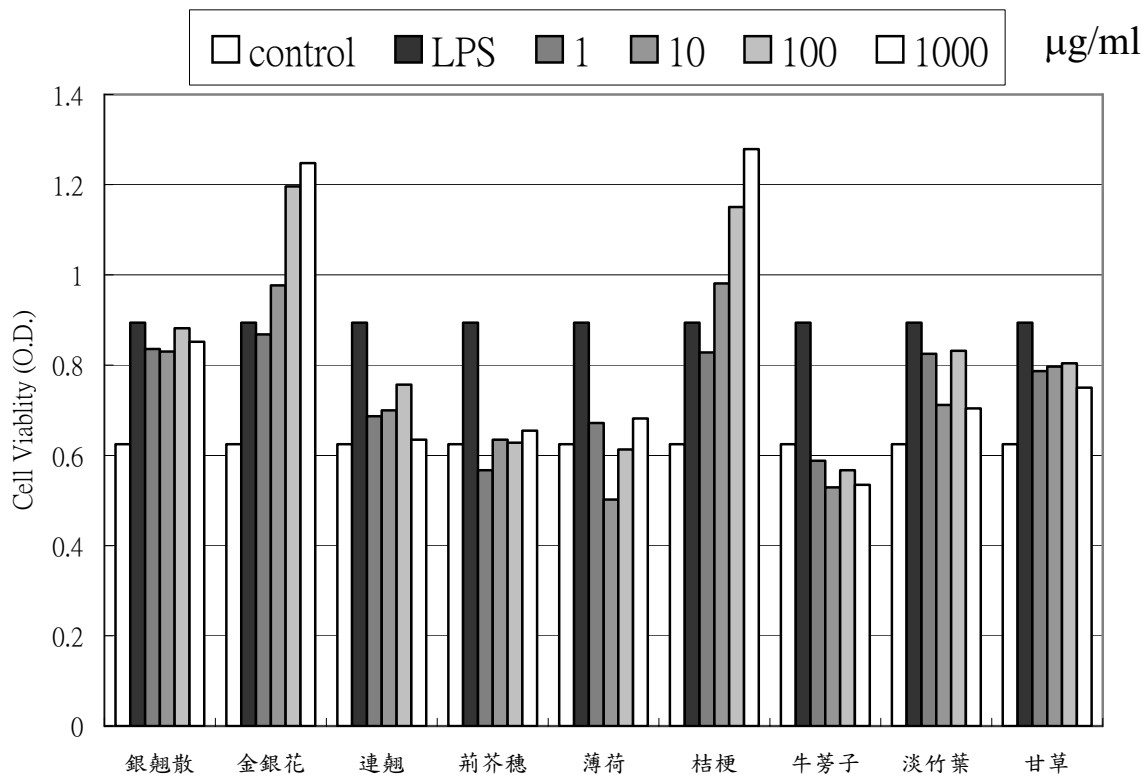


Figure 4.12. GGS and its components effect the cell viability of mouse macrophage RAW 264.7 cell line by ELISA. GGS and its components treated RAW 264.7 cell line 1 hour before LPS-treated. We treated MTT after 24 hours and detected O.D. by ELISA reader.

第二節 銀翹散及其組成之中藥對LPS 誘發發炎的細胞激素TNF α 之影響(The effect of GGS on the LPS-induced TNF α secretion in mouse macrophage RAW 264.7 exposed to LPS)

我們在銀翹散對 LPS 造成肺部損傷產生的活體實驗中發現銀翹散壓制許多發炎因子，其中前發炎細胞激素 TNF α 是對抗發炎的重要指標，我們利用 LPS 誘發 RAW 264.7 產生 TNF α ，並且一小時前投與不同濃度的銀翹散及其組成中藥，觀察它們對 LPS 誘發 RAW 264.7 產生 TNF α 的影響。實驗結果在圖 4.13，我們發現銀翹散、銀花、連翹及牛蒡對 LPS 誘發 RAW 264.7 產生 TNF α 有隨濃度增加有較明顯壓抑作用，荊芥、薄荷及淡竹葉少許壓制 TNF α 的產生，而甘草不能壓制 TNF α 產生，令人注意的，桔梗有增加 LPS 誘發 RAW 264.7 產生 TNF α 的趨勢。

第三節 銀翹散及其組成之中藥對LPS誘發抗發炎的細胞激素IL-10 之影響(The effect of GGS on the LPS-induced IL-10 secretion in mouse macrophage RAW 264.7 exposed to LPS)

我們在活體實驗中觀察到銀翹散治療 LPS 誘發鼠肺發炎 24 小時後，在肺泡沖洗液中有大量的 IL-10 分泌，因此我們測試銀翹散及其組成之中藥是否會對 LPS 誘發 RAW 264.7 分泌 IL-10 有所影響。結果顯示(圖 4.14)，首先 LPS 可誘發 RAW 264.7 分泌 IL-10，而在一系列的銀翹散及其組成中，銀翹散及金銀花可以增加 LPS 誘發 RAW 264.7 分泌 IL-10，其它的中藥皆對 LPS 誘發 RAW 264.7 分泌 IL-10 沒有影響；這結果很明顯的指出，銀翹散所誘發的 IL-10 可能是金銀花的作用。

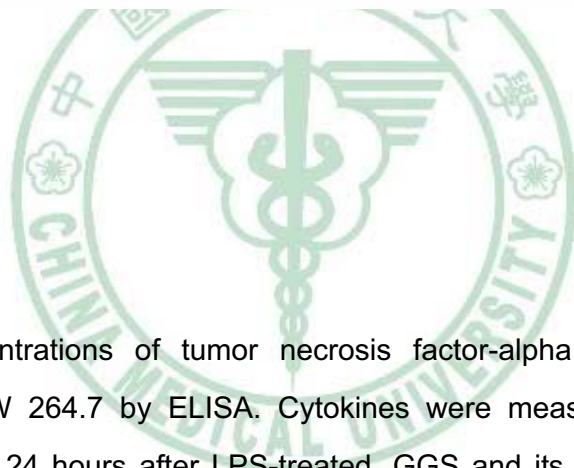
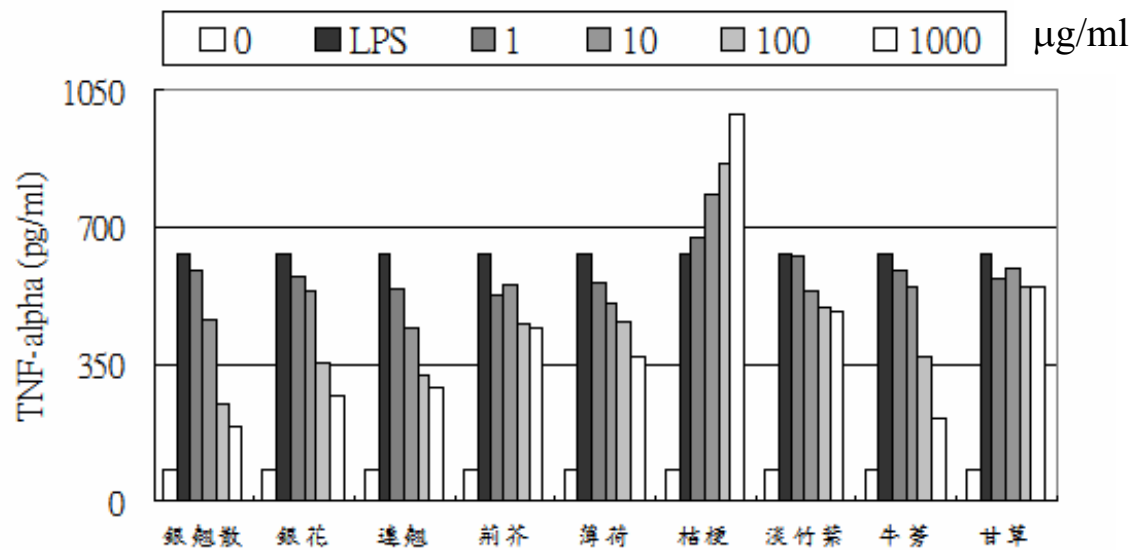


Fig 4.13. Concentrations of tumor necrosis factor-alpha (TNF α) in mouse macrophage RAW 264.7 by ELISA. Cytokines were measured in the culture medium obtained 24 hours after LPS-treated. GGS and its components treated the cell before 1 hours LPS-treated.

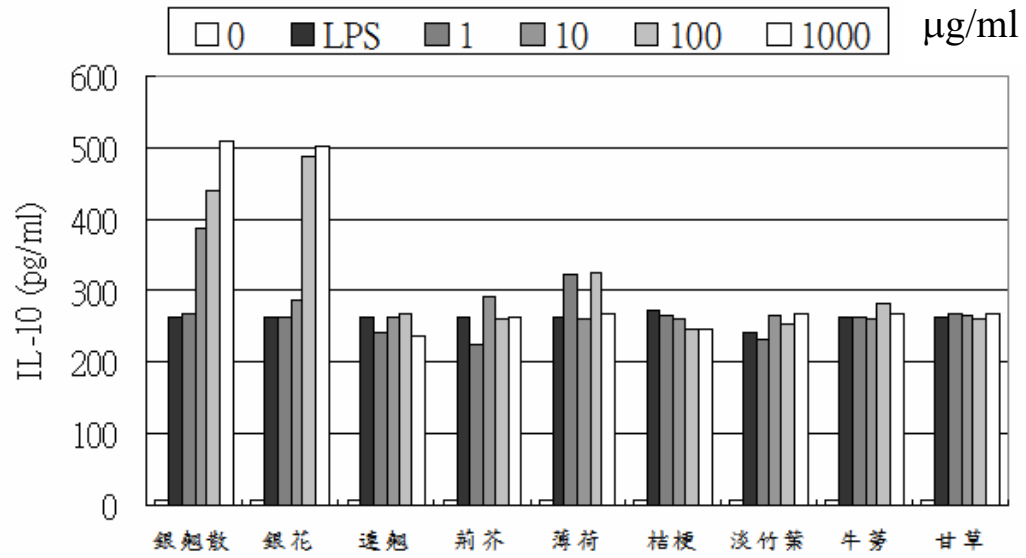


Fig 4.14. Concentrations of IL-10 in mouse macrophage RAW 264.7 by ELISA. Cytokines were measured in the culture medium obtained 24 hours after LPS-treated. GGS and its components treated the cell before 1 hours LPS-treated.

第四節 銀翹散之高效液相層析分析(High Performance Liquid Chromatography of GGS)

為進一步了解銀翹散中的成份，我們委託了科達GMP製藥公司針對其所製造的銀翹散浸膏進行高效液相層析技術分析，並針對了其指標成分綠原酸 (Chlorogenic acid)、木犀草素(Luteolin)、牛蒡素(Acrtiin)及橙皮素(Hesperidin)進行比對 (如圖4.15)，結果顯示在銀翹散中最大量的成份為綠原酸，在銀翹散中含綠原酸含量為5.29 mg/g。

第五節 綠原酸對鼠巨噬細胞的IL-10分泌之影響 (The effect of Chlorogenic acid on the LPS-induced IL-10 secretion in RAW 264.7 cell line)

在銀翹散的HPLC資料中有一最高含量的波峰，經比對發現為綠原酸，根據金銀花的相關文獻中指出，綠原酸是水萃取金銀花中主要化學物質，因此，我們就以綠原酸作用在LPS刺激的鼠巨噬細胞是否有助IL-10的產生進行ELISA及RT-PCR的研究 (圖4.16)，結果顯示綠原酸在LPS刺激下，會隨綠原酸濃度升高而增加分泌及轉錄，但在沒有LPS刺激下，只有160 $\mu\text{g/ml}$ 才能微微誘發IL-10的表現。由此可知綠原酸可能是銀翹散及金銀花能在LPS刺激下，誘發大量的IL-10的主要化學物質。

第六節 橙皮素對LPS、TNF α 與IL-1 β 誘發人類巨噬細胞THP-1及人類肺部上皮細胞A549之細胞激素分泌之影響 (The effect of Hesperidin on the release of LPS-induced cytokines in THP-1 and A549 cells)

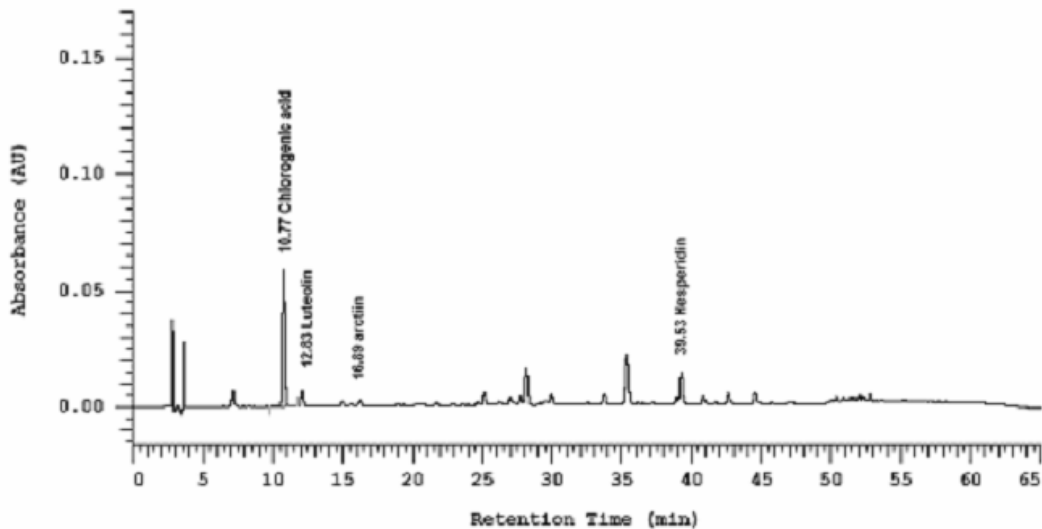


Figure 4.15. HPLC chromatogram of the GGS. The solution of GGS was prepared by dissolving in pyrogen-free isotonic saline (10 mg/100 ml). Detection of the Supreme peak at 10.77 is 0.054 mg/ml chlorogenic acid. The injection volume was 10 μ l and flow rate was 1.0 ml/min.

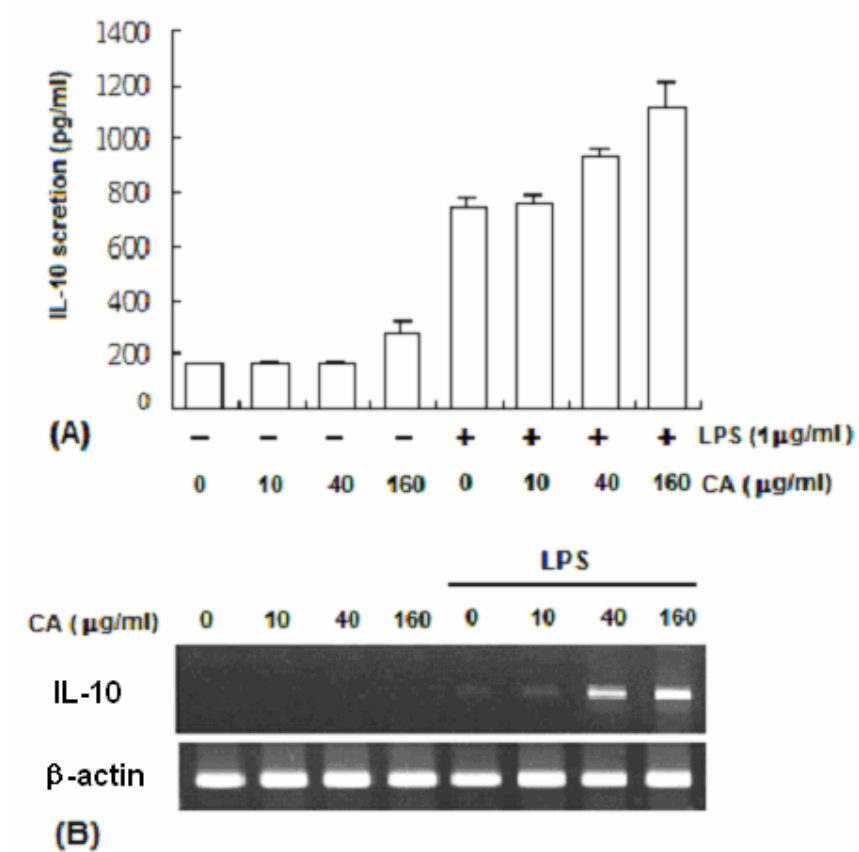


Figure 4.16. Concentrations of IL-10 in mouse macrophage RAW 264.7. Cytokines were measured in the culture medium obtained 24 hours after LPS-treated ELISA and RT-PCR. Chlorogenic acid (CA) treated the cell before 1 hours LPS-treated.

我們在銀翹散的HPLC的資料中找到二種黃酮類：一是橙皮素、二是木犀草素，因為木犀草素對抗LPS誘發發炎反應已有許多的證明，而橙皮素尚未有完整的研究，所以以下我們使用了橙皮素進行體外對抗發炎的一系列研究。

首先，我們觀察了橙皮素對LPS誘發人類巨噬細胞THP-1及人類肺部上皮細胞A549之各種細胞激素分泌之影響，結果如圖4.15。我們首先觀察TNF α 與IL-1 β 混合誘發劑對人類肺部上皮細胞A549誘發IL-8表現（圖4.17A），並用不同濃度的橙皮素來壓制IL-8的表現，當橙皮素在50 μ M 以上時有效抑制IL-8的分泌，故我們決定用50 μ M 來進行下列體外的實驗；我們也用LPS誘發人類巨噬細胞THP-1觀察各種細胞激素分泌（圖4.17B），可以看到LPS誘發THP-1分泌TNF α 、IL-1 β 、IL-6及IL-8，也可被50 μ M橙皮素明顯壓制下來，證明橙皮素在巨噬細胞及肺部上皮細胞有抗發炎的作用。

第七節 橙皮素對前發炎細胞激素誘發的細胞附著分子之影響 (The effect of HES on the expression of proinflammatory cytokine-induced adhesion molecules)

本實驗欲探討橙皮素對前發炎細胞激素誘發的細胞附著分子（cell adhesion molecules, CAM）是否有影響。我們使用了TNF α 與IL-1 β 混合誘發劑對人類肺部上皮細胞A549誘發ICAM-1表現，如圖4.18A,B，我們先用TNF α (40 ng/ml) 及 IL-1 β (10 ng/ml)刺激肺上皮細胞A549，再用含有螢光物質的THP-1細胞與之混合一小時，再用PBS洗去未附著的THP-1細胞後，用螢光顯微鏡觀察及照相；我們發現A549在尚未刺激前只有少部分對的THP-1細胞會附著上去，當A549受到TNF α 與IL-1 β 混合誘發劑刺激後，附著細胞

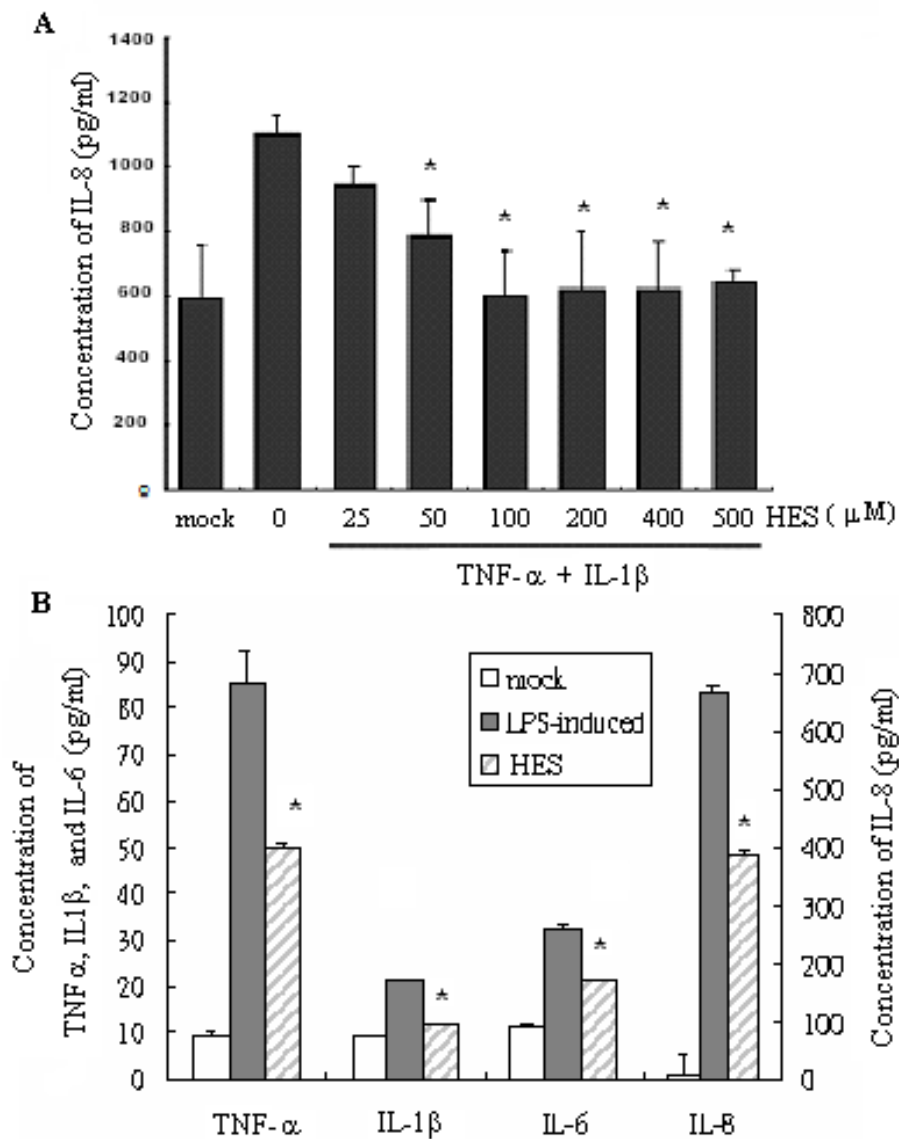


Figure 4.17 Effect of HES on the expression of cytokine. (A) Confluent human alveolar epithelial cells (A549) were stimulated with a mixture of TNF α (40 ng/ml) and IL-1 β (10 ng/ml). ELISA assessed the concentration of IL-8 after 24 hours. (B) TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-8 protein levels in supernatants of macrophage-like cells THP-1 after 24 h incubation with medium alone (open bars), medium containing LPS (filled bars) or medium containing LPS and HES (hatched bars). Values are means \pm SE of 6 experiments. *P < 0.05 compared with medium containing LPS or cytokine.

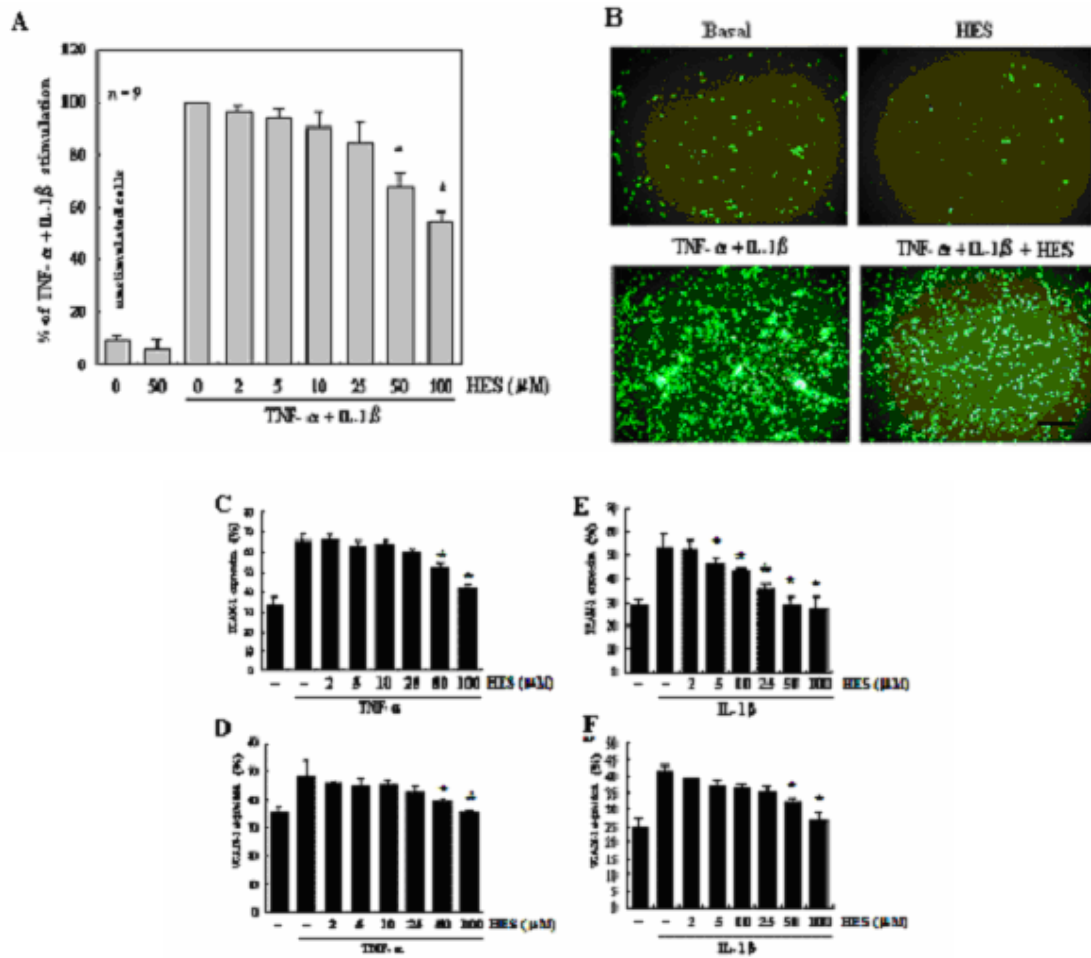


Figure. 4.18. HES reduces adhesion of THP-1 cells to A549 monolayers and Selective inhibition of TNF α or IL-1 β -stimulated ICAM-1 or VCAM-1 expression. (A) A549s were pre-incubated with the indicated doses of Hesperidin and stimulated with a mixture of TNF α (40 ng/ml) and IL-1 β (10 ng/ml) for 4 h. Fluorescence-labeled monocytic THP-1 cells were added to the A549 monolayer. (B) Representative images of the reduction of TNF α + IL-1 β -stimulated adhesion of THP-1 cells to A549 monolayers after pre-incubation with the indicated doses of HES for one hour. A549s were pre-incubated with the indicated doses of HES, followed by stimulation with TNF α (C, D) or IL-1 β (E, F) for 4 h. Expression of ICAM-1 (C, E) and VCAM-1 (D, F) in A549s was measured by FACScan cytometer. *P < 0.05 compared with TNF α and IL-1 β or stimuli alone (mean \pm SEM). Bar represents 50 μ m.

明顯的大量的增加，而預先給予50 μM 的橙皮素後再刺激，可見附著的THP-1細胞明顯的減少。

我們用ICAM-1及VCAM-1的螢光抗體及流式細胞儀 (Flowcytometry; FSCAN) 來測定A549表面的ICAM-1及VCAM-1的表現 (圖4.18 C~F)，我們用TNF α (40 ng/ml) 或IL-1 β (10 ng/ml)各別刺激肺上皮細胞A549，並用不同濃度的橙皮素預先加給A549，得知橙皮素在50 到100 μM 對TNF α 或IL-1 β 誘發的ICAM-1及VCAM-1有意義的壓制，特別是在IL-1 β 誘發的ICAM-1在低濃度的橙皮素就有壓抑的作用。

第八節 橙皮素對LPS活化鼠肺組織及前發炎細胞激素活化A549細胞株的NF- κB 及AP-1之影響 (The effect of Hesperidin on the NF- κB and AP-1 activation in Lungs of mice Exposed to LPS and in Lung epithelial A549 cell lines Induced by TNF α and IL-1 β)

我們欲了解橙皮素對NF- κB 及AP-1活化之影響，我們收集了LPS攻擊及橙皮素治療的鼠肺組織，及用TNF α 與IL-1 β 混合誘發劑刺激A549細胞的核萃取物，與NF- κB 及AP-1的DNA序列結合進行EMSA的實驗，明顯的看出不論在LPS或TNF α 與IL-1 β 混合誘發劑刺激下的鼠肺組織或A549細胞，其NF- κB 及AP-1結合都受到壓制 (如圖4.19)。此結果暗示我們，橙皮素對NF- κB 及AP-1的傳導路徑應會有所影響，所以我們對兩條路徑進行研究。

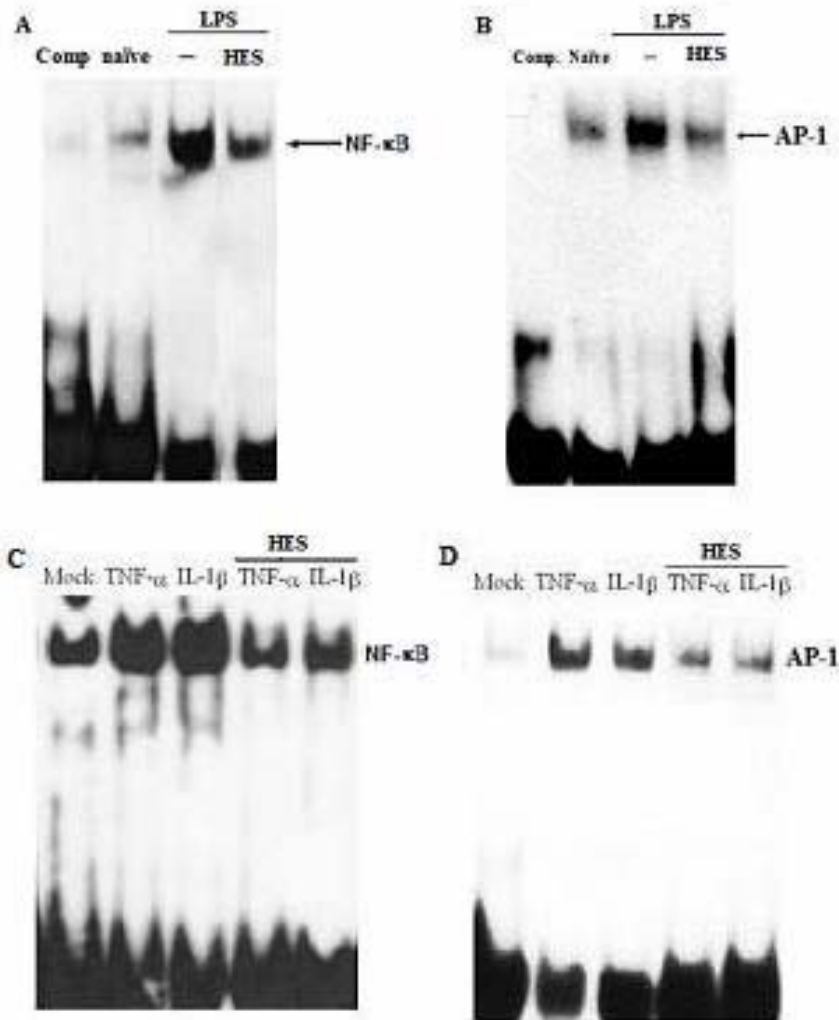


Figure. 4.19. Hesperidin Reduces NF- κ B and AP-1 activation in Lungs Exposed to Lipopolysaccharide and in A549 cells Exposed to proinflammatory cytokine. After 24 hours, EMSAs of nuclear extracts of the lung tissue. LPS-induced and hesperidin inhibit NF- κ B (A) and AP-1 (B). A549s were pre-incubated for one hour with the indicated doses of HES, followed by stimulation with TNF α (40 ng/ml) or IL-1 β (10 ng/ml) for 1 h. EMSAs of nuclear extracts of the lung tissue. LPS-induced and hesperidin inhibit NF- κ B (C) and AP-1 (D).

第九節 橙皮素對TNF α 誘發的I κ B及MAPK路徑之影響 (Effect of HES on TNF α -Induced I κ B and Mitogen-Activated Protein Kinases)

我們以TNF α 誘發A549細胞，收集其細胞質液，用Westren blot分析其蛋白質，並用I κ B、ERK1/2、p38及JNK的磷酸化及非磷酸化抗體，表現各別細胞中的含量。發現橙皮素可以隨濃度的增加，增加阻斷I κ B、p38及JNK的磷酸化，但對ERK1/2的磷酸化卻略有增加的趨勢（如圖4.20）。



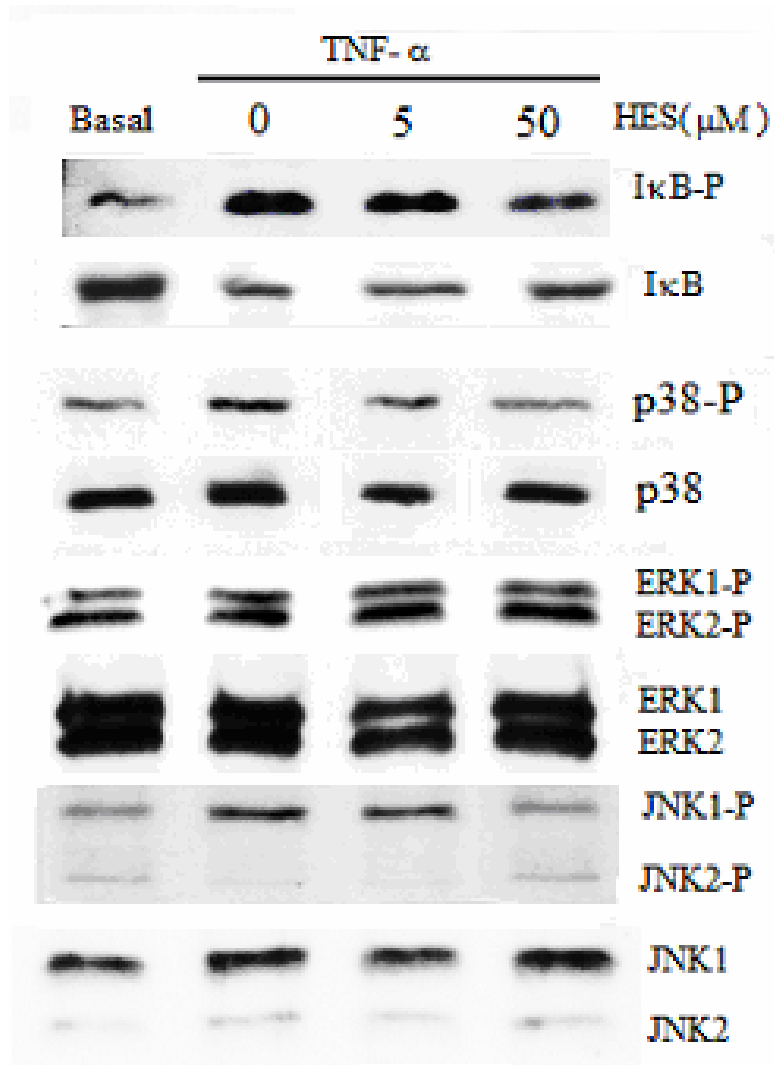


Figure. 4.20. Effect of HES on TNF α -induced I κ B, ERK1/2, p38, or JNK activation in A549 epithelial cells by Western blot. In A, cells were pretreated with 5 or 50 μ M HES for 30 min before incubation with 40 ng/ml TNF α for 30 min, then whole cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using antibodies specific for the phosphorylated form of I κ B, ERK1/2, p38, JNK, or for I κ B, ERK2, p38, or JNK as described under Materials and Methods.

第五章 討 論

ARDS 目前在臨床上大多使用支持性療法 (supportive care)，進而用呼吸器支持病人的呼吸，但病人的死亡率依然很高¹⁰⁶，很多的藥物都針對此疾病進行研究，可惜的是尚未見到對ARDS患者的死亡率有所改善。目前臨床研究使用的藥物有很多，如 corticosteroids、prostaglandins、nitric oxide、prostacyclin、surfactant、lisofylline、ketoconazole、N-acetylcysteine及 fish oil，但卻無法改善病人的死亡率。所以產生了更多針對ARDS病理發展 (pathophysiology of ARDS) 的治療策略，如增加肺泡中積水的清除、增加促進肺泡上皮修護的生長因子、抑制fibrin的堆積、阻斷前發炎相關的轉錄因子 (proinflammatory transcription factors) 活化、防止血管收縮劑 (vasoconstrictors) 的影響，甚至開發一些針對發炎的細胞激素抗體。自古以來，中醫藥對肺炎的治療記載眾多，只因現代醫學發展快速，使我們遺忘了中醫藥對肺部炎症疾病的助益，在現代醫學對疾病治療的成效及發展受限時，由中醫藥中找尋有幫助的藥物或治療法，便是刻不容緩的事。

急性肺損傷中有一大部份的病因由細菌感染及代謝產生的毒素引發。有學者認為“熱由毒生，變由毒起”²⁰¹，中醫的熱毒證與嚴重感染所致的肺部發炎相似，中醫的毒和內毒素在致病上也一致。銀翹散出自清代醫家吳鞠通著《溫病條辨》，是治療風溫、溫熱以及某些屬於邪在衛分、上焦雜病的辛涼清解劑的代表方劑。現代中醫將其廣泛用於治療流行性感、急性扁桃體炎、咽峽泡疹、麻疹、流行性腮腺炎、流行性乙型腦炎等病毒感染性疾病。銀翹散為“辛涼平劑”，該方特點有二：一是芳香辟穢，清熱解毒；二是辛涼中配以小量辛溫之品，且又溫而不燥，既利於透邪，又不背辛涼之旨。綜合文獻¹⁰⁷⁻¹¹¹，銀翹散在治療發熱及感染性疾病時，抗菌種類廣泛，療效顯著。

不論中醫藥的看法及治療的方向如何，其有效的治療成效依然

要用現代的病理變化來探討，首先針對急性肺損傷其病理變化說明，也是我們治療成效的目標；當肺泡壁處於嚴重發的炎反應，使肺泡微血管受到傷害，導致大量血漿鹽份湧入肺泡內，造成肺臟的氣體交換功能受損。同時伴隨發炎反應之外，肺臟組織也出現修補重塑的現象：如肺泡壁微血管、或纖維細胞等結締組織，以及第二型肺泡細胞的增生。急性肺損傷如同其它組織受到傷害一樣，要能夠恢復肺臟的功能，必須在組織修復的程序上，遵循一有次序受控制的步驟而達成。因此，要達成恢復正常的肺功能，(1)要將肺泡內過多的水份和蛋白質移除。(2)第二型肺泡細胞要增生以填補裸露的肺泡壁。(3)水腫和纖維化的肺泡壁間質，要能消散以回復原來的狀態。(4)所有在修補重塑過程中，增生的細胞，必須被清除。任何以上的程序出現失誤，都將導致肺損傷和呼吸衰竭的持續存在。在本實驗使用銀翹散針對LPS攻擊產生肺部發炎的病理現象進行治療，用現代病理的角度進行檢驗，銀翹散對肺臟的功能的組織修復及控制是有成效的，不論是肺部的病理組織改善、肺泡沖洗液的水份和蛋白質移除或發炎細胞的減少，都有明顯的治療效果。

針對ARDS患者的肺泡沖洗液長期的研究，肺泡沖洗液中的TNF α 、IL-1 β 及IL-6之濃度比較，在死亡的病患的肺泡沖洗液中的三種細胞激素的量都明顯偏高¹¹²；另外在單側肺炎而其細菌生長在增加者的患者其肺泡沖洗液中的TNF α 、IL-1 β 及IL-6的濃度也會顯著的增加¹¹³；在因用呼吸系器而造成肺炎的患者，其肺泡沖洗液中三種細胞激素的含量也比感染前增加¹¹³，最近的一項研究顯示因感染gram-negative細菌的肺炎患者，當肺中的細菌清除狀況不佳，肺泡沖洗液中的這三種細胞激素都會持續性升高，不論在肺中腔室內是否已經有大量的多形核白血球的存在¹¹⁴，也有一篇報告指出ARDS患者如遇細菌感染，其TNF α 、IL-1 β 及IL-6的濃度是低的(10–250 pg)，其生存機會大增¹¹⁵；由上述的資料可知，減少肺泡沖洗液中的TNF α 、IL-1 β 及IL-6的濃度，在細菌感染時，不論是肺急性損傷的患者、肺炎的患者或ARDS患者，生存的機會都會增加，所以開發肺部發炎的治療藥物對於減少肺泡沖洗液中的TNF α 、IL-1 β 及IL-6的濃度，成為一個重要的指標；在本研究中所使用的銀翹散

對於LPS感染所形肺炎的肺泡沖洗液中的TNF α 、IL-1 β 及IL-6的濃度有明顯的下降，證明銀翹散有助細菌性肺炎的患者發病時的生存率；在最近一篇針對銀翹散治療流感病毒H1N1感染誘發肺炎之研究，證明銀翹散體外對H1N1流感病毒的增殖沒有明顯抑制作用，但體內實驗表明其可顯著改善流感病毒引起的小鼠肺炎症狀，提高生命率，顯示銀翹散對病毒性感冒也有療效¹¹⁶。在1999年Kobayashi發表文章中指出銀翹散在體外對H2N2流感病毒也不具有抑制病毒的增殖的能力，但在病毒感染鼠的實驗中也證實了，銀翹散可抗病毒感染，而且可以降低死亡率，並指出銀翹散不直接對病毒作用，而是透過生物體本身的抗病毒的能力而產生作用¹¹⁷。另一位學者Kurokawa¹¹⁸用銀翹散對抗病毒感染實驗中提出，銀翹散可以抑制IL-1 α 的產生，而有解熱的作用（Antipyretic activity）。2003年也有一份報告指出銀翹散對細菌及病毒感染皆有其效果¹¹⁹。此處一再指出銀翹散對任何種型的感染都有療效。而我們也提出了銀翹散抑制感染原所引發的發炎細胞激素TNF α 、IL-1 β 及IL-6，它可能是銀翹散如何透過生物體本身的抗感染的能力，降低感染後死亡率的機制之一。

在肺部發炎相關疾病的病理過程中有一個重要現象是白血球的浸潤（infiltrating leukocytes），白血球募集回流（recruitment）的機制需要靠著滲透的白血球與內皮細胞（endothelium）、基質細胞（resident stromal cells）或是間質細胞之間的相互通絡才能完成¹²⁰。這些過程要透過早期反應的趨化激素的刺激，使得這些細胞表現細胞表面附著因子（cell-surface adhesion molecules）及趨化分子（chemotactic molecules）。臨床上ARDS患者肺中的IL-8含量與死亡率是有強烈的關連¹²¹⁻¹²⁴。最值得注意的是Donnelly¹²⁵所做的肺泡沖洗液中IL-8的增加與ARDS患者危險預後評估，其中指出IL-8主要是由肺泡巨噬細胞所分泌，引發了中性白血球的募集回流（neutrophil influx）。在肺部創傷病人的肺泡沖洗液中含高量的IL-8，在一個小時內便可使大量中性白血球募集回流；而惡化中的ARDS病人其肺泡沖洗液中的IL-8是明顯高於沒惡化的病人，有趣的是他們在血漿中的IL-8的含量是沒有差異的。在

缺氧或低氧 (anoxia/hyperoxia) 的實驗中發現在肺部上皮細胞及內皮細胞皆會產生大量的IL-8^{126,128}。在老鼠的身上沒有IL-8，而是具有一群分子如KC (mouse Gro-alpha, CXCL1)、MIP-2 (murine homologue of human GRO-β/γ) 負責吸引中性白血球，MCP-1 (CCL2)負責吸引單核球¹²⁸；若以neutralizing KC (homologous to human GRO-α) antibodies投與老鼠可阻止71%因LPS誘入的中性白血球^{129,130}；而以neutralizing IL-8 antibodies投與內毒素誘發腹膜炎兔，可阻斷77%的中性白血球聚集^{131,132}；而中和MIP-2也可減少細菌造成肺部中性白血球的聚集¹³³；總合上述，減少肺泡沖洗液中趨化因子的含量，可以減少中性白血球在肺中募集回流，減少肺部發炎風暴加大，而改善肺部發炎反應的傷害，我們發現了銀翹散可抑制老鼠肺泡沖洗液中因LPS誘發大量的KC、MIP-2及MCP-1，還有在體外實驗中，銀翹散的成分—橙皮素，可以抑制肺部上皮細胞A549所分泌的IL-8，並且壓制上皮細胞的表面產生附著因子ICAM-1及VCAM-1的表現，進而減少單核球細胞THP-1的貼附，此結果證明銀翹散及其成分—橙皮素可以減少趨化因子的分泌，可以減少中性白血球在肺中募集回流，減少肺部發炎反應傷害。

不論在急性肺部損傷(ALI)或(ARDS)在加護病房中死亡的最重要的原因有：低血氧 (hypoxaemia)、肺浸潤 (pulmonary infiltrates)、微循環通透性增加 (Increased microvascular permeability) 及血管內皮屏障功能瓦解 (endothelial barrier disruption)¹³⁴。造成這些病理狀態可能的因子有一氧化氮、活性氧物質 (reactive oxygen species; ROS) 及前發炎細胞激素；前發炎細胞激素對肺部傷害前面已經討論過了，本段的重心放在LPS造成氧化的傷害上，最近有證據顯示在內毒素所造成的休克 (endotoxin shock) 傷害的早期會有大量的一氧化氮，它是由誘發性的一氧化氮合成酵素 (iNOS) 產生，會快速由過亞硝酸根 (peroxynitrite; ONOO⁻) 形成超氧基 (Superoxide radical; O₂⁻)，造成肺部損傷，是肺炎及ARDS重要的病理生成的原因^{135,136}，而且有些可以清除過亞硝酸根及自由基的藥也已經證明可以減少內毒素造成的發炎細胞激素的產生，更重要的是可以減少因內毒素感染後的死亡率

^{137,138}。我們證明銀翹散及其成分-橙皮素有壓制iNOS的轉錄作用，而且使肺泡沖洗液中的過亞硝酸根的量減少，所以銀翹散也有清除自由基的能力，增加在內毒素攻擊的肺炎風暴中存活的機會。在銀翹散對抗NO的發現我們可能是第一個提出來的。

哺乳動物體內除了有一群誘發發炎的細胞激素之外，還有另一群抗發炎的細胞激素來防止過度的發炎反應，IL-10 就是由巨噬細胞產生來抑制發炎細胞激素的重要抗發炎細胞激素^{139,140}。IL-10 的表現可以抑制TNF α 的表現^{141,142}；對ARDS患者而言，在肺泡沖洗液中有比較高IL-10 含量者，其生存的機率比較高¹⁴³；由敗血性休克（septic shock）的病人身上取得的單核球上的HLA-DR 的表現，會受到IL-10 所抑制，此舉可能在調節一些病重的感染病人體內過度的宿主反應（host response）¹⁴⁴；在ARDS的患者，發病第一天的IL-10 最高，之後隨著時間增加，而IL-10 漸漸減少，到三週後測不到，所以TNF α /IL-10 的比率在ARDS開始時會比較低，當ARDS病情進步時，TNF α /IL-10 的比率會回復到近似於正常的比率，這研究指出ARDS發病後可以生存超過三週以上的患者，其身上一直利用TNF α /IL-10 的比率來長期調控發炎與抗發炎的狀態¹⁴⁵。由上述資料可知，IL-10 是在發炎初期會大量表現的抗發炎細胞激素，來調節TNF α 的量，並控制肺部發炎的程度，所以在肺部發炎的初期，IL-10 所產生的量十分重要，在本研究指出銀翹散在治療LPS誘發的肺炎 24 小時後，肺泡沖洗液及肺組織中都出現了大量的IL-10，比LPS所能誘發的還要多，並且也看到TNF α 的下降，推測銀翹散可能可以誘發IL-10 大量表現，這是首次提出銀翹散具有免疫調節的作用；進一步我們在體外實驗中，看到銀翹散及金銀花都能誘發IL-10 的表現，然而在之後的HPLC的成分比對中，發現綠原酸的含量高達銀翹散總量的十分之一，又是金銀花水萃取時最主要成分，我們用綠原酸再對RAW264.7 刺激可增加IL-10 產生，所以我們推測銀翹散中能誘發IL-10 的成分可能是綠原酸，至於是如何誘發有待進一步研究。

在體內，NF- κ B的活化過程受到精細調控，其中反饋調節是主要的調節方

式。正反饋調節可通過細胞外機制進行，其作用是增強炎症信號。如研究證實，NF- κ B可促進前炎症因子（IL-1、TNF α 、IL-6）等炎性基因的轉錄，而IL-1、TNF α 作為細胞外刺激信號又可激活NF- κ B，進一步擴大炎症反應¹⁴⁶。負反饋調節在NF-(B活化的調節過程中也非常重要，其作用是限制NF- κ B活化，降低生物體對某種刺激的反應。負反饋也可由於細胞外刺激（內毒素、TNF α 、IL-1 β 等）導致反向細胞因子如IL-10等的產生，後者可抑制前炎症細胞因子的產生。Wang ¹⁴⁷研究發現，IL-10可阻斷NF- κ B活化並抑制單核細胞產生細胞因子。在NF- κ B激活過程中，正、負反饋兩種調節方式往往是同時存在的，至於NF- κ B活化狀態及程度則取決於何種調節佔優勢。已有研究證明，在氣管內投與E. coli LPS 可以造成肺部的NF- κ B活化¹⁴⁸；而與中性白血球的募集回流有關的基因如ICAM-1、VCAM-1、KC、MIP-2、iNOS等的轉錄皆與NF-(B有關^{149,150}。而在ICAM-1¹⁵¹及iNOS¹⁵²也需要活化AP-1才能表現。而我們發現銀翹散可以壓抑LPS誘發的IL-1、TNF α 、IL-6、ICAM-1、VCAM-1、KC、MIP-2、iNOS等基因，是透過壓制NF-(B及AP-1的作用，而減少發炎的持續，這也是我們首次提出來的。我們同時也證明銀翹散的成分—橙皮素會透過抑制NF- κ B及MAPK pathway之I κ B、p38及JNK的磷酸化，壓制NF- κ B及AP-1的活性，而使IL-1、TNF α 、IL-6、ICAM-1、VCAM-1、KC、MIP-2、iNOS等基因表現下降，減輕肺炎的傷害。

在銀翹散組成的中藥中有部分已有對抗發炎相關的研究，以下我們做一系列探討：

金銀花 (*Lonicera japonica* Thunb.): 性甘寒。在臨床功效為清熱解毒，涼散風熱。用於癰腫疔瘡，喉痺丹毒，熱毒，血痢，風熱感冒，瘟病發熱。研究上，酒精萃取的金銀花無法致死老鼠，並且在二週連續服用後，對其肝腎功能並無產生影響¹⁵³；水萃取的金銀花隨著濃度增加，抑制LPS誘發鼠產生NO及TNF α 的產生，不論在體內¹⁵⁴或體外¹⁵⁵；也會對trypsin誘發TNF α 分泌有抑制的效果，不論在體外¹⁵⁶或體內¹⁵⁷；並且可干擾I κ B的分解及NF- κ B的活化。我們也證實水萃取金銀花可隨濃度增加而增加抑制LPS誘發鼠巨噬細胞產生TNF α 。金銀花含黃酮類，為木犀草素及木犀草素-7-葡萄糖苷。並含肌醇 (Inositol)，綠原酸、異綠

原酸和皂苷¹⁵⁸。綠原酸和異綠原酸為主要抗菌成分¹⁵⁹，其中水萃取的部分以綠原酸佔最大量¹⁶⁰，綠原酸具有抗發炎的作用¹⁶¹，並且抑制由TPA誘發的NF- κ B及AP-1的活化，經由抑制JNK及p38的磷酸化¹⁶²。我們提出新的作用，就是綠原酸促進IL-10的分泌，但其作用機制，尚要進一步的研究。而木犀草素因是黃酮類，在水萃中的含量比較少，但其對LPS對老鼠誘發的TNF α 及ICAM-1有明顯抑制作用，並防止LPS對老鼠的致死¹⁶³；木犀草素也可抑制IL-8¹⁶⁴、TNF α 及IL-12¹⁶⁵，也透過抑制I κ B磷酸化來減少NF- κ B活性¹⁶⁵；在近期的研究中，木犀草素可以抑制IL-4，透過抑制c-Jun的磷酸化而影響了AP-1的活性¹⁶⁶。在我們的研究中也發現銀翹散在活體內會抑制IL-4及IL-12分泌，銀翹散的HPLC的圖紋中也確認少量的木犀草素，有可能是木犀草素參與了抑制IL-4及IL-12分泌的調控中。

連翹 (*Forsythia suspense* Thunb.): 性微寒，味苦。臨床功效清熱解毒，消腫散結。用於外感風熱、咽喉腫痛、癰腫瘡癤、瘰癧。其有效成分為含樺木酸(betulinic acid)、連翹苷(phillyrin)、牛蒡子苷(arctiin)、羅漢松脂苷(matairesinoside)、松脂素(pinoresinol)、連翹醇苷C、D (forsythoside C, D)等。連翹酒精萃取物對金黃色葡萄球菌、肺炎鏈球菌具有抗菌能力，對大腸桿菌及白色念珠菌不敏感。並且由連翹中萃取出能抗RSV的物質¹⁶⁷。對鼠的巨噬細胞，連翹水萃取液在體外隨著濃度增加，抑制LPS誘發鼠產生NO及TNF α 的產生¹⁵⁵。我們也得到相似的結果，連翹水萃取液可隨濃度增加而增加抑制LPS誘發鼠巨噬細胞產生TNF α 。而連翹水萃取液也會抑制趨化因子對單核球的趨化作用¹⁶⁸及具有抗發炎的能力¹⁶⁹。

荊芥穗 (*Schizonepeta tenuifolia* Briq.): 性微溫，味辛，入肝肺經，用於感冒、頭痛、麻疹、瘡瘍初起等症狀。荊芥穗的化學成分是利用色譜技術進行分離純化，波譜技術進行結構鑒定，結果從荊芥穗中分離得到10個化合物，分別鑒定為：木犀草素(I)、芹菜素(II)、反式桂皮酸(III)、 β -谷甾醇(IV)、熊果酸(V)、橙皮素(VI)、3-羥基-4(8)-烯-P-薄荷烷

-3(9)-內酯(VII)、tilianin(VIII)；橙皮素-7-O-葡萄糖苷(IX)和 schizonepetosides B(X)¹⁷⁰。其中與我們在銀翹散中確認的是木犀草素及橙皮素；荊芥醇提物對H1N1流感病毒感染小鼠死亡率具有顯著的保護作用¹⁷¹，水葦的荊芥穗可抑制DNP IgE誘發的TNF α 分泌¹⁷²，這與我們的結果相近，我們水葦荊芥穗只造成部分壓制TNF α 分泌。我們針對橙皮素進行一系列的研究，在文獻中顯示，橙皮素可壓制LPS刺激的老鼠TNF α 的產生¹⁹³及iNOS的生成¹⁹⁴。我們更加證明橙皮素對前發炎細胞激素、趨化激素、附著因子皆有壓制作用，且可透過減少I κ B、p38及JNK的磷酸化，而減低NF- κ B及AP-1的活性。

薄荷 (*Mentha haplocalyx* Briq.): 其味辛，性涼，用於風熱感冒，風溫初起，頭痛，目赤，喉痺，咽喉腫痛，口舌生瘡，牙痛，蕁麻疹，風疹等。體外試驗表明，薄荷水煎劑對表皮葡萄球菌、金黃色葡萄球菌、變形桿菌、支氣管包特菌、黃細球菌、綠膿桿菌、蠟樣芽桿菌、藤黃八疊球菌、大腸桿菌、枯草桿菌、肺炎鏈球菌等均有較強抗菌作用¹⁷³。薄荷煎劑10 mg/ml在兔腎上皮細胞培養上能抑制10~100 TC ID50 (半數組織培養感染量) 的單純皰疹病毒(HSV) 感染，增大感染量則無抑制作用¹⁷⁴。薄荷提取物250 mg/kg腹腔注射，對大鼠足腫脹的抑制率為60%~100%，主要有效成分為薄荷醇¹⁷⁵。而在國外對薄荷與發炎的研究不多，唯有一篇提及水葦薄荷與抗氧化有關¹⁷⁶。而薄荷醇可以壓抑對LPS誘發LTB $_4$ 、PGE $_2$ 及IL-1 β 的分泌¹⁷⁷，但在我們的HPLC圖譜中無法定出薄荷醇的存在，可能是萃取的方式或其複方中含量太少所致，這與石鉞在2003年對銀翹散的成份分析中也沒有定義出薄荷醇¹⁷，是同樣的結果。

牛蒡子 (*Arctium lappa* L): 辛散苦泄、寒能清熱,故有疏散風熱，宣肺利咽之效。用治風熱感冒、咽喉腫痛等證。牛蒡子中含量最大的是木脂素 (lignan) 成分¹⁷⁸，如拉帕酚A、B、C、D、E、F、H (LappaolA、B、C、D、E、F、H)、牛蒡苷 (arctiin)、牛蒡苷元 (arctigenin)、羅漢松酯素 (matairesinol) 以及數十種2,3-二苄基丁內酯木脂素等,以及新牛蒡素乙 (neoarctin B)。在對抗發炎的研究中，牛蒡苷元強烈抑制

LPS激發鼠巨噬細胞產生TNF α ，且無細胞毒性；在INF γ 誘發的細胞中NO有干擾的作用，但對LPS引起的NO的產生有顯著增加¹⁷⁹。並且有對抗流感病毒作用¹⁸⁰，以及在銀翹散中牛蒡子具有抗病毒的作用¹⁵。更有文獻證明，牛蒡苷元有抑壓LPS誘發的iNOS及TNF α ，並且證實其可經由抑制AP-1及NF- κ B而完成抗發炎的作用¹⁷⁹。而我們呈現水葶牛蒡子有壓抑鼠巨噬細胞產生TNF α ，由於成份不易取得，遺憾無法進行成份的研究。

桔梗 (*Platycodon grandiflorum* Jacq.)：《神農本草經》記載，桔梗性平，味苦，辛，具有化痰止咳、利咽開音、宣暢肺氣、排膿消癰的功效。近年來，作為藥食同源的傳統中藥，桔梗在免疫調節、抗炎、祛痰、保肝、降血脂等方面的藥理作用引起了廣泛關注。目前，研究較多的單體化合物為桔梗皂苷 (Platycodin) A、B、C、D、D2、D3 和遠志皂苷 (Polygalacin) D、D2¹⁸²。在桔梗水提物可顯著刺激小鼠腹腔巨噬細胞增生、抑制細胞增殖，劑量依賴性的促進一氧化氮(NO)、TNF α 的產生，同時對IL-1 β 和IL-6也有升高作用。在RT-PCR中也證明桔梗水提物可增加iNOS mRNA¹⁸³。其作用機制可能是通過活化NF- κ B啟動，上調iNOS和TNF α 的表達¹⁸⁴。但桔梗皂苷D (PD)和D3 (PD3) (桔梗多糖)可抑制RAW 264.7 細胞株釋放NO，升高該TNF α ¹⁸⁵。與之相反，桔梗多糖卻能誘導鼠巨噬細胞株RAW264.7中NO的產生和iNOS mRNA表達，通過TLR4/ NF- κ B信號通路產生作用¹⁸⁶，其具體的分子機制與其活化MAPK和AP-1有關。桔梗多糖也可誘導TNF α 的釋放¹⁸⁷前後不同的是，前者的桔梗皂苷是由齊墩果酸 (oleanolic acid) 合成出來，而後者是直接由桔梗中萃取出來。而我們實驗中見到水葶桔梗是增加了RAW264.7的細胞數及TNF α 的釋放。

淡竹葉 (*Lophatherum gracile* Brongn.)：性寒味甘，無毒。具有清熱除煩，利尿的功效，多用於熱病煩渴，口舌生瘡，小便赤澀淋痛等症。水葶淡竹葉在體外，可抑制金黃葡萄球菌及溶血性鏈球菌¹⁸⁸。目前研究不多，而我們發現淡竹葉對細胞生長、TNF α 的釋放及IL-10的釋

放，均無影響。

淡豆豉 (*Glycine max* (L.) Merr.): 為豆科植物大豆的成熟種子，經蒸罨加工發酵而成。性味辛甘、微苦。《別錄》：“主傷寒頭痛，寒熱，瘴氣惡毒，煩躁滿悶。《本草從新》：“發汗解肌，調中下氣，治傷寒寒熱頭痛，煩燥滿悶，懊農不眠。” 淡豆豉含有大量的黃酮 (Flavonoid)。在黃豆內的兩大黃酮，genistein 和 daidzein，都附有一些糖，令身體無法直接吸收，須靠一些在大腸中寄居的細菌，先把那些糖除掉，身體才能取得這些天然的抗氧化劑。而淡豆豉因為已經過細菌發酵，其中的黃酮可以立即被胃吸收¹⁸⁹。所以其產生的效果應與genistein 和 daidzein 相近，在文獻中，genistein可透過抑制MAPK及NF- κ B pathway 來減少LPS誘發的TNF α 及NO的釋放，並且改善死亡率¹⁹⁰。並且會抑制protein tyrosine kinase (PTK)磷酸化來減少內皮細胞表現VCAM-1 及 E-selectin¹⁹¹。而daidzein對TNF α 、iNOS及I κ B磷酸化都沒有影響¹⁹²。

甘草 (*Glycyrrhizae glabra* L.): 甘草為我國傳統中藥，自古甘草入藥種類較多，素有“十藥九草”之稱，在傳統中醫藥中被稱為“國老”。甘草具有補脾益氣、清熱解毒、止咳祛痰、調和諸藥的功效。主要用於脾胃虛弱、倦怠無力、心悸氣短、咳嗽痰多、腕腹攣急疼痛、癰疽瘡毒，並能夠緩解藥物毒性。甘草具有類固醇荷爾蒙抗過敏反應作用，其主要有效成分是甘草甜素 (Glycyrrhizin) 和甘草次酸 (Glycyrrhizic acid)，其能夠抑制磷酯酶A2 活性，阻止組織胺等活性物質的釋放，降低活化免疫的反應，抑制抗體生成。臨床上多用於各種原因引起的上呼吸道感染，癰疽瘡毒及腎上腺皮質功能低下症¹⁹⁵。甘草甜素在LPS引發的ARDS鼠中，具有減少肺中血小板的累積及減少死亡之作用¹⁹⁶；甘草甜素可抑制eotaxin 1的產生，但對IL-8的分泌沒有影響¹⁹⁷；但甘草甜素可以抑制LPS誘發的IL-12的生成¹⁹⁸；尚沒有文獻指出甘草甜素可以抑制TNF α 或IL-10。我們的結果顯示水萃取甘草對TNF α 或IL-10都沒有影響。

總而言之，銀翹散中的多種黃酮類都具有對抗發炎的能力，可能

是在銀翹散治療LPS誘發的急性肺炎鼠中，抑制發炎的種種細胞激素，如TNF α 、IL-1 β 、IL-6，或對中性白血球的募集回流所需的細胞激素（IL-8、KC、MCP-1及MIP-2）或是附著因子（ICAM-1及VCAM-1）有抑制作用，而對抗發炎細胞激素IL-10，可能是由銀翹散中的金銀花所誘發，而金銀花中的綠原酸更是主要作用成分。中藥方中的各種單味藥也好，或其中含有的主要成分也好，都是在投與中藥方劑治療時，不但可以直接抑制發炎反應的發展，更可透過生物體本身的調節能力來對抗發炎，這種多層次的協同作用，減少了對單一化學物質累積生物毒性的危險，同時也可以達到治療疾病的目的。



第六章 結 論

在本研究中，我們發現銀翹散具很好的抗LPS誘發肺部發炎的能力，銀翹散減少許多因LPS誘發出來的前發炎細胞激素及趨化因子(如 TNF α , IL-1 β , IL-6, KC, MCP-1, MIP-2)，也減少因發炎使得中性白血球浸潤於呼吸道，減少肺部水腫，減輕硝化壓力 (nitrosative stress)，並且誘發大量的抗發炎細胞激素IL-10，而且證明此舉與金銀花中的綠原酸有關，提出銀翹散除了壓制LPS誘發的肺部發炎反應之外，更會誘發生物體內自然控制發炎的機制，進而改善了肺部的形態學。

我們進一步發現銀翹散對LPS誘發轉錄調控因子 (NF- κ B 及 AP-1) 有明顯的抑制效果，在眾多的銀翹散含有的成份中，有許多已被證明有抗發炎的能力，我們提出橙皮素除了有阻斷發炎的細胞激素分泌，及對LPS誘發轉錄調控因子 (NF- κ B 及 AP-1) 抑制效果是透過阻斷I κ B、p38及JNK的磷酸化外；並且也提出橙皮素對血球附著因子 (ICAM-1及VCAM-1) 有抑制的效果，可以減少肺部白血球浸潤，加強了抗肺部發炎的成效。

本研究結果提供臨床上使用銀翹散對上呼吸道發炎及肺炎有效的藥理機制及生物體對中藥方劑的相對的反應，也證明歷史上中醫藥對急性病症有其效用的最佳佐證。

在本次研究，發現中藥對IL-10的產生有調節的作用，也找出了綠原酸在LPS誘發下對IL-10生成有促進的作用，但對於綠原酸如何調節IL-10的生成，是經過基因的調控子 (promotor)，或是經過其他的分子來調節IL-10生成量，這是在未來值得探討的方向。

參考文獻

1. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet*. 1967;2(7511):319-23.
2. Petty TL, Ashbaugh DG. The adult respiratory distress syndrome. Clinical features, factors influencing prognosis and principles of management. *Chest*. 1971;60(3):233-9.
3. Dreyfuss D, Ricard JD. Acute lung injury and bacterial infection. *Clin Chest Med*. 2005;26(1):105-12.
4. Kollef MH, Schuster DP. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 1995;332(1):27-37.
5. Chignard M, Balloy V. Neutrophil recruitment and increased permeability during acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;79(6):L1083-90.
6. Goodman RB, Pugin J, Lee JS, Matthay MA. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003;14(6):523-35.
7. Shinbori T, Walczak H, Krammer PH. Activated T killer cells induce apoptosis in lung epithelial cells and the release of pro-inflammatory cytokine TNF-alpha. *Eur J Immunol*. 2004;34(6):1762-70.
8. Wright RM, Ginger LA, Kosila N, Elkins ND, Essary B, McManaman JL, Repine JE. Mononuclear phagocyte xanthine oxidoreductase contributes to cytokine-induced acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;30(4):479-90.
9. Haddad IY, Pataki G, Hu P, Galliani C, Beckman JS, Matalon S. Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J Clin Invest*. 1994;94(6): 2407-13.
10. Matthay MA, Geiser T, Matalon S, Ischiropoulos H. Oxidant

- mediated lung injury in the acute respiratory distress syndrome. Crit Care Med. 1999;27(9):2028–30.
11. Schuster T, Kuhn H, Indenbom MV. Discontinuity lines in rectangular superconductors with intrinsic and extrinsic anisotropies. Phys Rev B Condens Matter. 1995;52(21):15621-26.
 12. 張月萍、杜永平、王宗仁：從肺炎喘嗽看現代醫學對中醫的闡釋。醫學與哲學. 1998;19(11):584-6.
 13. Sato K, Kadiiska MB, Ghio AJ, Corbett J, Fann YC, Holland SM, Thurman RG, Mason. RP. In vivo lipid-derived free radical formation by NADPH oxidase in acute lung injury induced by lipopolysaccharide: a model for ARDS. FASEB J. 2002;16(13):1713-20.
 14. Harrod KS, Mounday AD, Whitsett JA. Adenoviral E3–14.7K protein in LPS-induced lung inflammation. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2000;278(4):L631–9.
 15. Kobayashi M, Davis SM, Utsunomiya T, Pollard RB, Suzuki F. Antiviral effect of gingyo-san, a traditional Chinese herbal medicine, on influenza A2 virus infection in mice. Am J Chin Med. 1999;27(1):53-62.
 16. Kurokawa M, Yamamura J, Li Z, Sato H, Hitomi N, Tatsumi Y, Shiraki K. Antipyretic activity of gingyo-san, a traditional medicine, in influenza virus-infected mice. Chem Pharm Bull. 1998;46(9):1444-7.
 17. 石鉞、石任兵、劉斌、陸蘊如、杜力軍：銀翹散抗流感病毒有效部位群化學成分的分離與鑒定。中國中藥雜誌. 2003;28(1):43-7.
 18. 陳巧謀、黃禮傑、王煒：銀翹散的臨床應用與藥理實驗研究。湖南中醫藥導報. 2003;9(9):37-9.
 19. 呂明惠：加味銀翹散治療急性上呼吸道感染 62 例觀察。蚌埠醫學院學報 2001,26(5):435-6.
 20. 劉薇：雙黃連粉針合銀翹袋泡劑治療小兒外感高熱症 86 例臨床觀

- 察。貴陽中醫學院學報. 1997;19(3):15-7.
21. 王志新: 增效銀翹片治療感冒 275 例。陝西中醫. 1998;. 19(11): 481-2.
 22. 耿小茵、劉光太: 銀翹散治療病毒性下呼吸道感染療效觀察。海南大學學報. 2000;18(3):302-3.
 23. 胡居息: 銀翹散加減治療小兒肺炎 25 例。湖北中醫雜誌. 1982; 4(1): 55.
 24. 肖淑琴、溫振英、孫中林: 中醫藥治療 26 例小兒支原體肺炎臨床分析。貴陽中醫學院學報 1984;2(1):40-1.
 25. 韋俊: 中西醫結合治療小兒大葉性肺炎 116 例。陝西中醫. 1988; 9(8):341-2.
 26. 楊周瑞.: 銀翹散合補中益氣湯加減治療老年性肺炎的臨床研究。中醫研究. 2001;14(1):25-6.
 27. 肖錦仁: 銀翹散煎劑與顆粒劑藥效學作用的比較研究。中藥材. 2002,25(2):114-7.
 28. 邢富強、何建國、曹永才: 銀翹解毒口服液藥理實驗研究。中國中藥雜誌. 1990;15(10):46-8.
 29. 魏雲、劉禮意、唐映紅: 銀翹解毒顆粒與丸劑的藥理作用比較。中成藥. 1992;14(8):32-3.
 30. 杜力軍、劉文琴、凌一揆: 銀翹散解熱機理的研究 I: 銀翹散等藥對內生致熱原致熱家兔體溫的影響。中藥藥理與臨床. 1991;7(3):4-5.
 31. 杜力軍、沈映君: 銀翹散解熱機理研究 II: 銀翹散對大鼠視前區-下丘腦前部神經元放電頻率的影響。中藥藥理與臨床. 1992;8(5):6-9.
 32. 杜力軍、沈映君、國月英: 銀翹散解熱機理的研究 III、銀翹散對體外培養單核細胞產生內生致熱原的影響。中藥藥理與臨床. 1992;8(1):8-10.
 33. 富杭育、賀玉琢、周愛香: 以解熱的效法初探麻黃湯、桂枝湯、銀翹散、桑菊飲的藥物動力學。中藥藥理與臨床. 1992;8(1):1-4.
 34. 賀玉琢、富杭育、周愛香: 以抗炎的藥效法再探麻黃湯、桂枝湯、銀翹散、桑菊飲的藥物動力學。中藥藥理與臨床. 1993;9(1):1-4.

35. 鄧文龍、王文烈、尚鈞：銀翹散的藥理作用研究。中醫雜誌。1986;27(3):59-62.
36. 邢富強、何建國、曹永才：銀翹解毒口服液藥理實驗研究。中國中藥雜誌 1990;15(10):46-8.
37. Vernooij JH, Dentener MA, van Suylen RJ, Buurman WA, Wouters EF. Long-term intratracheal lipopolysaccharide exposure in mice results in chronic lung inflammation and persistent pathology *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;26(1):152-9.
38. Harlan JM, Harker LA, Reidy MA, Gajdusek CM, Schwartz SM, Striker GE. Lipopolysaccharide-mediated bovine endothelial cell injury in vitro. *Lab Invest*. 1983;48(3):269-74.
39. Esbenshade AM, Newman JH, Lams PM, Jolles H, Brigham KL. Respiratory failure after endotoxin infusion in sheep: lung mechanics and lung fluid balance. *J Appl Physiol*. 1982; 53(4): 967-76.
40. Martin TR. Recognition of bacterial endotoxin in the lungs. *Am J Resp Cell Mol Bio.l*. 2000; 23(2):128–32.
41. Martin TR, Mathison JC, Tobias P, Leturcq DJ, Moriarty AM, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide binding protein enhances the responsiveness of alveolar macrophages to bacterial lipopolysaccharide. Implications for cytokine production in normal and injured lungs. *J Clin Invest*. 1992;90(6):2209–19.
42. Pittet JF, Griffiths MJD, Geiser T, Kaminski N, Dalton SL, Huang XZ. TGF- β 1 is a critical mediator of acute lung injury. *J Clin Invest*. . 2001;107(12):1537-44.
43. Giri SN, Hyde DM, Hollinger MA. Effect of antibody to transforming growth factor beta on bleomycin induced accumulation of lung collagen in mice. *Thorax*. 1993;48(10):959-66.
44. Li Q, Verma IM. NF- κ B regulation in the immune system. *Nature Rev Immunol*. 2002;2(12):725–34.

45. Tsai WC, Strieter RM, Wilkowski JM, Bucknell KA, Burdick MD, Lira SA, Standiford TJ. Lung-specific transgenic expression of KC enhances resistance to *Klebsiella pneumoniae* in mice. *J Immunol*. 1988;161(5):2435–40.
46. Sadikot RT, Han W, Everhart MB, Zoia O, Peebles RS, Jansen ED, Yull FE, Christman JW, Blackwell TS. Selective I κ B kinase expression in airway epithelium generates neutrophilic lung inflammation. *J Immunol*. 2003;170(2):1091–8.
47. Jansson AH, Eriksson C, Wang X. Lung inflammatory responses and hyperinflation induced by an intratracheal exposure to lipopolysaccharide in rats. *Lung*. 2004;182(3):163-71.
48. Ley K. Pathways and bottlenecks in the web of inflammatory adhesion molecules and chemoattractants. *Immunol Res*. 2001;24(1):87-95.
49. Varley AW, Coulthard MG, Meidell RS, Gerard RD, Munford RS. Inflammation-induced recombinant protein expression in vivo using promoters from acute-phase protein genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(12):5346-50.
50. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8: a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest*. 1989; 84(4):1045–9.
51. Standiford TJ, Kunkel SL, Phan SH, Rollins BJ, Strieter RM. Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human type II like epithelial cells. *J Biol Chem*. 1991;266(15):9912–8.
52. Standiford TJ, Rolfe MW, Kunkel SL, Lynch JP 3rd, Burdick MD, Gilbert AR, Orringer MB, Whyte RI, Strieter RM. Macrophage inflammatory protein-1: expression in interstitial lung disease. *J Immunol*. 1993;151(5):2852–63.
53. Suter PM, Suter S, Girardin E, Roux-Lombard P, Grau GE, Dayer

- JM. High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon, and elastase, in patients with respiratory distress syndrome after trauma, shock, or sepsis. *Am Rev Respir Dis.* 1992;145(5):1016–22.
54. Siler TM, Swierkosz JE, Hyers TM, Fowler AA, Webster RO. Immunoreactive interleukin-1 in bronchoalveolar lavage fluid of high-risk patients and patients with the adult respiratory distress syndrome. *Exp Lung Res.* 1989;15(6):881–94.
55. Goodman RB, Strieter RM, Martin DP, Steinberg KP, Milberg JA, Maunder RJ, Kunkel SL, Walz A, Hudson LD, Martin TR. Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154(3-1):602–11.
56. Park WY, Goodman RB, Steinberg KP, Ruzinski JT, Radella F 2nd, Park DR, Pugin J, Skerrett SJ, Hudson LD, Martin TR. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(10-1):1896–903.
57. Geiser T, Jarreau PH, Atabai K, Matthay MA. Interleukin-1beta augments in vitro alveolar epithelial repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279(6):L1184–90.
58. Geiser T, Atabai K, Jarreau PH, Ware LB, Pugin J, Matthay MA. Pulmonary edema fluid from patients with acute lung injury augments in vitro alveolar epithelial repair by an IL-1beta-dependent mechanism. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163(6):1384–8.
59. Tracey KJ, Lowry SF, Cerami A. Cachectin/TNF-alpha in septic shock and septic adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1988;138(3):1377–9.
60. Li XY, Donaldson K, Brown D, MacNee W. The role of tumor necrosis factor in increased airspace epithelial permeability. *Am J*

- Respir Cell Mol Biol. 1995;13(8):185–95.
61. Marks JD, Marks CB, Luce JM, Montgomery AB, Turner J, Metz CA, Murray JF. Plasma tumor necrosis factor in patients with septic shock: mortality rate, incidence of adult respiratory distress syndrome, and effects of methylprednisolone administration. *Am Rev Respir Dis.* 1990;141(1):94–7.
 62. Hyers TM, Tricomi SM, Dettenmeier PA, Fowler AA. Tumor necrosis factor levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1991;144(2):268–71.
 63. Millar AB, Singer M, Meager A, Foley NM, Johnson NM, Rook GAW. Tumor necrosis factor in bronchopulmonary secretions of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet.* 1989; 2(8665):712–4.
 64. Gerard C, Frossard JL, Bhatia M, Saluja A, Gerard NP, Lu B, Steer M. Targeted disruption of the beta-chemokine receptor CCR1 protects against pancreatitis-associated lung injury. *J Clin Invest.* 1997;100(8):2022–7.
 65. Goodman RB, Strieter RM, Frevert CW, Cummings CJ, Tekamp-Olson P, Kunkel SL, Walz A, Martin TR. Quantitative comparison of CXC chemokines produced by endotoxin-stimulated human alveolar macrophages. *Am J Physiol.* 1998;275(1-1): L87–95.
 66. Proost P, De Wolf-Peeters C, Conings R, Opdenakker G, Billiau A, Van Damme J. Identification of a novel granulocyte chemotactic protein (GCP-2) from human tumor cells: in vitro and in vivo comparison with natural forms of GRO, IP-10, and IL-8. *J Immunol.* 1993;150(3):1000–10.
 67. Puneet P, Moochhala S, Bhatia M. Chemokines in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*

- 2005; 288(1):L3-15.
68. Tsai WC, Strieter RM, Wilkowski JM, Bucknell KA, Burdick MD, Lira SA, Standiford TJ. Lung-specific transgenic expression of KC enhances resistance to *Klebsiella pneumoniae* in mice. *J Immunol.* 1998;161(5):2435–40.
69. Sadikot RT, Han W, Everhart MB, Zoia O, Peebles RS, Jansen ED, Yull FE, Christman JW, Blackwell TS. Selective I κ B kinase expression in airway epithelium generates neutrophilic lung inflammation. *J Immunol.* 2003;170(2):1091–8.
70. Wang X, Ebong SJ, Call DR, Newcomb DE, Bolgos GR, Remick DG. Calcitonin gene-related peptide partially reverses decreased production of chemokines KC and MIP-2 following murine sepsis. *Inflammation.* 2002; 26(4):167-74.
71. Jansson AH, Eriksson C, Wang X. Lung inflammatory responses and hyperinflation induced by an intratracheal exposure to lipopolysaccharide in rats. *Lung.* 2004; 182(3):163-71.
72. Park WY, Goodman RB, Steinberg KP, Ruzinski JT, Radella F II, Park DR, Pugin J, Skerrett SJ, Hudson LD, Martin TR. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(10-1): 1896–903.
73. Takala A, Jousela I, Takkunen O, Kautiainen H, Jansson SE, Orpana A, Karonen SL, Repo H. A prospective study of inflammation markers in patients at risk of indirect acute lung injury. *Shock.* 2002;17(4):252–7.
74. Marshall RP, Webb S, Hill MR, Humphries SE, Laurent GJ. Genetic polymorphisms associated with susceptibility and outcome in ARDS. *Chest.* 2002;121(3-1):68S–9S.
75. Barnes PJ, Lim S. Inhibitory cytokines in asthma. *Mol Med Today.* 1998;4(10):452–8.
76. Barnes PJ. Endogenous inhibitory mechanisms in asthma. *Am J*

- Respir Crit Care Med. 2000;161(4):S176–81.
77. Barnes PJ. Cytokine-directed therapies for the treatment of chronic airway diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(6):511-22.
78. Pretolani M, Goldman M. IL-10: a potential therapy for allergic inflammation? *Immunol Today.* 1997;18(6):277-80.
79. Borish L, Aarons A, Rumblyrt J, Cvietusa P, Negri J, Wenzel S. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;97(6):1288-96.
80. John M, Lim S, Seybold J, Robichaud A, O'Connor B, Barnes PJ. Inhaled corticosteroids increase IL-10 but reduce MIP-1, GM-CSF and IFN- γ release from alveolar macrophages in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(1):256-62.
81. Barnes PJ. IL-10: a key regulator of allergic disease. *Clin Exp Allergy.* 2001;31(5):667-9.
82. Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest.* 1995; 96(5):2304-10.
83. Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998; 16:495-521.
84. Robinson DS. The Th1 and Th2 concept in atopic allergic disease *Chem Immunol.* 2000;78(1):50.
85. Yilmaz V, Yentur SP, Saruhan-Direskeneli G. IL-12 and IL-10 polymorphisms and their effects on cytokine production. *Cytokine.* 2005; 30(4):188-94.
86. Gavett SH, O'Hearn DJ, Li X, Huang SK, Finkelman FD, Wills-Karp M. Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway

- hyperresponsiveness, inflammation and Th2 cytokine expression in mice. *J Exp Med.* 1995;182(2):1527-36.
87. Van der Pouw Kraan TC, Boeijs LC, de Groot ER, Stapel SO, Snijders A, Kapsenberg ML. Reduced production of IL-12 and IL-12-dependent IFN-gamma release in patients with allergic asthma. *J Immunol.* 1997;158(11):5560-5.
88. Leonard JP, Sherman ML, Fisher GL, Buchanan LJ, Larsen G, Atkins MB, Sosman JA, Dutcher JP, Vogelzang NJ, Ryan JL. Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood.* 1997;90(7):2541-8.
89. Bryan SA, O'Connor BJ, Matti S, Leckie MJ, Kanabar V, Khan J, Warrington SJ, Renzetti L, Rames A, Bock JA, Boyce MJ, Hansel TT, Holgate ST, Barnes PJ. Effects of recombinant human interleukin-12 on eosinophils, airway hyperreactivity and the late asthmatic response. *Lancet.* 2000;356(9248):2149-53.
90. Riffo-Vasquez Y, Spina D. Role of cytokines and chemokines in bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation. *Pharmacol Ther.* 2002;94(3):185-211.
91. Palleroni AV, Hajos S, Wright RB, Palleroni NJ. Nitric oxide synthase induction in lines of macrophages from different anatomical sites. *Cell Mol Biol.* 1998;44(3):527-35.
92. Scott JA, McCormack DG. Nonadrenergic noncholinergic vasodilation of guinea pig pulmonary arteries is mediated by nitric oxide. *Can J Physiol Pharmacol.* 1999;77(2):89-95.
93. Mehta S, Drazen JM. Bronchodilator actions of nitric oxide and related compounds. In: Belvisi MG, Mitchell JA. (Eds.), *Nitric Oxide in Pulmonary Processes: Role in Physiology and Pathophysiology of Lung Disease.* Birkhauser Verlag AG, London, 2000; pp.127-49.
94. Scott JA, Craig I, McCormack DG. Nonadrenergic noncholinergic

- relaxation of human pulmonary arteries is partially mediated by nitric oxide. *Am J Resp Crit Care Med.* 1996;154(3-1):629–32.
95. Scott JA, Mehta S, Duggan M, Bihari A, McCormack DG. Functional inhibition of constitutive nitric oxide synthase in a rat model of sepsis. *Am J Resp Crit Care Med.* 2002;165(10):1426–32.
96. Ermert M, Ruppert C, Gunther A, Duncker HR, Seeger W, Ermert L. Cell-specific nitric oxide synthase-isoenzyme expression and regulation in response to endotoxin in intact rat lungs. *Lab Invest.* 2002;82(4):425–41.
97. Boyle WA, Parvathaneni LS, Bourlier V, Sauter C, Laubach VE, Cobb JP. iNOS gene expression modulates microvascular responsiveness in endotoxin-challenged mice. *Circul Res.* 2000;87(7): E18–E24.
98. Mehta S. The effects of nitric oxide in acute lung injury. *Vascul Pharmacol.* 2005;43(6):390-403.
99. Sittipunt C, Steinberg KP, Ruzinski JT, Myles C, Zhu S, Goodman RB, Hudson LD, Matalon S, Martin TR. Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Resp Crit Care Med.* 2001;163(2):503–10.
100. Zhu S, Ware LB, Geiser T, Matthay MA, Matalon S. Increased levels of nitrate and surfactant protein A nitration in the pulmonary edema fluid of patients with acute lung injury. *Am J Resp Crit Care Med.* 2001;163(1):166–72.
101. Delhase M, Li N, Karin M. Kinase regulation in inflammatory response. *Nature.* 2000;406(6794):367–8.
102. Meja KK, Seldon PM, Nasuhara Y, Ito K, Barnes PJ, Lindsay MA. p38 MAP kinase and MKK-1 co-operate in the generation of GM-CSF from LPS-stimulated human monocytes by an NF-kappaB-independent mechanism. *Br J Pharmacol.*

- 2000;131(6):1143–53.
103. Underwood DC, Osborn RR, Bochnowicz S, Webb EF, Rieman DJ, Lee JC. SB 239063, a p38 MAPK inhibitor, reduces neutrophilia, inflammatory cytokines, MMP-9, and fibrosis in lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279(5):L895–902
104. Nasuhara Y, Adcock IM, Catley M, Barnes PJ, Newton R. Differential IKK activation and I κ B α degradation by interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in human U937 monocytic cells: evidence for additional regulatory steps in kB-dependent transcription. *J Biol Chem*. 1999;274(28):19965–72.
105. Lee JC, Kumar S, Griswold DE, Underwood DC, Votta BJ, Adams JL. Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. *Immunopharmacology*. 2000;47(2-3):185–201.
106. Jain R, DalNogare A. Pharmacological therapy for acute respiratory distress syndrome. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(2):205-12. Review.
107. 呂明惠:加味銀翹散治療急性上呼吸道感染 62 例觀察。蚌埠醫學院學報 2001;26(5):435-6.
108. 郭蘭:加減銀翹散治療風疹的體會。江西中醫藥 1995;增刊:62.
109. 商讓成、王寶民、張世偉:辨證治療流行性乙型腦炎 60 例。陝西中醫 2002;23(9):771- 2.
110. 賀玉琢、富杭有、周愛香:以抗炎的藥效法再探討麻黃湯、桂枝湯、銀翹散、桑菊飲的藥物動力學。中藥藥理與臨床 1993;1:1-4.
111. 潘竟鏘、劉惠純、韓超:銀翹散濃縮袋泡劑抗炎、解熱、鎮痛、抗菌和抗病毒作用。廣東醫藥 2003;13(1):43-7.
112. Meduri GU, Kohler G, Headley S, Tolley E, Stentz F, Postlethwaite A. Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome. *Chest*. 1995;108(5):1303-14.
113. Headley AS, Tolley E, Meduri GU. Infections and the

- inflammatory response in acute respiratory distress syndrome. *Chest*. 1997;111(5):1306-21.
114. Fox-Dewhurst R, Alberts MK, Kajikawa O, Caldwell E, Johnson MC, Skerrett SJ, Goodman RB, Ruzinski JT, Wong VA, Chi EY, Martin TR. Pulmonary and systemic inflammatory responses in rabbits with gram-negative pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(6):2030-40.
115. Meduri GU, Headley S, Kohler G, Stentz F, Tolley E, Umberger R, Leeper K. Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. *Chest*. 1995;107(4):1062-73.
116. 楊子峰、黃碧松、劉妮、王豔芳、朱宇同：銀翹散抗甲 1 型流感病毒作用的實驗研究。 *中國熱帶醫學* 2005;5(7):1123-5.
117. Kobayashi M, Davis SM, Utsunomiya T, Pollard RB, Suzuki F. Antiviral effect of gingyo-san, a traditional Chinese herbal medicine, on influenza A2 virus infection in mice. *Am J Chin Med*. 1999;27(1):53-62.
118. Kurokawa M, Yamamura J, Li Z, Sato H, Hitomi N, Tatsumi Y, Shiraki K. Antipyretic activity of gingyo-san, a traditional medicine, in influenza virus-infected mice. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1998;46(6):1444-7.
119. 肖錦仁、吳紅娟、郭昱、黃雪梅、邱賽紅、郭國華：不同劑型銀翹散抗菌、抗病毒作用的研究。 *湖南中醫學院學報*. 2003; 23(1):15-8.
120. Strieter RM, Kunkel SL, Keane MP, Standiford TJ. Chemokines in lung injury: Thomas A. Neff Lecture. *Chest*. 1999;116(1 Suppl): 103S-10S.
121. Jorens PG, VanDame J, DeBecker W. Interleukin-8 in the bronchoalveolar lavage fluid from patients with the adult respiratory distress syndrome (ARDS) and patients at risk for

- ARDS. Cytokine. 1992;4(6);592-97.
122. Hack CE, Hart M, Strack-vanSchijndel RJM. Interleukin-8 in sepsis: relation to shock and inflammatory mediators. *Infect Immun*. 1992;60(7):2835-42.
 123. Chollet-Martin S, Montravers P, Gilbert C. High levels of interleukin-8 in the blood and alveolar spaces of patients with pneumonia and adult respiratory distress syndrome. *Infect Immun* . 1993;61(11):4553-9.
 124. Donnelly TJ, Meade P, Jagels M. Cytokine, complement, and endotoxin profiles associated with the development of the adult respiratory distress syndrome after severe injury. *Crit Care Med*. 1994;22(5):768-76.
 125. Donnelly SC, Strieter RM, Kunkel SL. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *Lancet*. 1993;341(8846):643-7.
 126. Metinko AP, Kunkel SL, Standiford TJ. Anoxia-hyperoxia induces monocyte derived interleukin-8. *J Clin Invest*. 1992;90(3):791 -8.
 127. Karakurum M, Shreeniwas R, Chen J. Hypoxia induction of interleukin-8 gene expression in human endothelial cells. *J Clin Invest*. 1994;93(4):1564-70.
 128. Ley K. Arrest chemokines. *Microcirculation*. 2003;10(3-4):289-95. Review.
 129. Frevert CW, Farone A, Danaee H, Paulauskis JD, Kobzik L. Functional characterization of rat chemokine macrophage inflammatory protein-2. *Inflammation*. 1995;19(1):133-42.
 130. Frevert CW, Huang S, Danaee H, Paulauskis JD, Kobzik L. Functional characterization of the rat chemokine KC and its importance in neutrophil recruitment in a rat model of pulmonary inflammation. *J Immunol*. 1995;154(1):335-44.
 131. Boylan AM, Hebert CA, Sadick M, Wong WL, Chuntharapai A,

- Hoeffel JM, Hartiala KT, Broaddus VC. Interleukin-8 is a major component of pleural liquid chemotactic activity in a rabbit model of endotoxin pleurisy. *Am J Physiol.* 1994;267(2 Pt 1):L137-44.
132. Broaddus VC, Boylan AM, Hoeffel JM, Kim KJ, Sadick M, Chuntharapai A, Hebert CA. Neutralization of IL-8 inhibits neutrophil influx in a rabbit model of endotoxin-induced pleurisy. *J Immunol.* 1994;152(6):2960-7.
133. Greenberger MJ, Strieter RM, Kunkel SL, Danforth JM, Laichalk LL, McGillicuddy DC, Standiford TJ. Neutralization of macrophage inflammatory protein-2 attenuates neutrophil recruitment and bacterial clearance in murine *Klebsiella pneumoniae*. *J Infect Dis.* 1996;173(1):159-65.
134. Fulkerson WJ, MacIntyre N, Stamler J, Crapo JD. Pathogenesis and treatment of the adult respiratory distress syndrome. *Arch Intern Med.* 1996;156(1):29-38. Review.
135. Sittipunt C, Steinberg KP, Ruzinski JT, Myles C, Zhu S, Goodman RB, Hudson LD, Matalon S, Martin TR. Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(2):503-10.
136. Gu Z, Ling Y, Cong B. Peroxynitrite mediated acute lung injury induced by lipopolysaccharides in rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2000;80(1):58-61.
137. Kaman S, Demiryurek AT. Propofol is a peroxynitrite scavenger. *Anesth Analg.* 1997; 84(5):1127-9.
138. Taniguchi T, Kanakura H, Yamamoto K. Effects of post-treatment with propofol on mortality and cytokine responses to endotoxin-induced shock in rats. *Crit Care Med.* 2002; 10(5):940-3.
139. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine

- production by Th1 clones. *J Exp Med*. 1989;170(6):2081–95.
140. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*. 1991;147:38(11)15–22.
141. Dickensheets HL, Freeman SL, Smith MF, Donnelly RP. Interleukin-10 upregulates tumor necrosis factor receptor type-II (p75) gene expression in endotoxin-stimulated human monocytes. *Blood*. 1997;90(10):4162–71.
142. Armstrong L, Millar AB. Relative production of tumour necrosis factor alpha and interleukin-10 in adult respiratory distress syndrome. *Thorax*. 1997;52:442–6.
143. Donnelly SC, Strieter RM, Reid PT, Kunkel SL, Burdick MD, Armstrong I, Mackenzie A, Haslett C. The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist in the lung fluids of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med*. 1996;125(3):191–6.
144. Fumeaux T, Pugin J. Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(11):1475–82.
145. Park WY, Goodman RB, Steinberg KP, Ruzinski JT, Radella F 2nd, Park DR, Pugin J, Skerrett SJ, Hudson LD, Martin TR. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(10-1):1896–903.
146. Epstein FH. Nuclear factor-kB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New Eng J Med*. 1993;14(15):436-41.
147. Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukin (IL)-10

- inhibits nuclear factor kappa B (NF-kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem.* 1995;270(16):9558-63.
148. Blackwell TS, Lancaster LH, Blackwell TR, Venkatakrisnan A, Christman JW. Differential NF- κ B activation after intratracheal endotoxin. *Am J Physiol.* 1999;277(4-1):L823–30.
149. Joseph PM. Molecular mechanisms of neutrophil recruitment elicited by bacteria in the lungs. *Semin Immunol.* 2002;14(2): 123–32.
150. Shen J, Julia R, David M, Christopher P, Sreekumar R, Christopher K, Asaf AQ, Stefanie NV, Nilofer Q. Key inflammatory signaling pathways are regulated by the proteasome shock. 2005;25(5):472~84.
151. Chen CC, Chow MP, Huang WC, Lin YC, Chang YJ. Flavonoids inhibit tumor necrosis factor-alpha-induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in respiratory epithelial cells through activator protein-1 and nuclear factor-kappaB: structure-activity relationships. *Mol Pharmacol.* 2004;66(3):683-93.
152. Hoyt JC, Ballering J, Numanami H, Hayden JM, Robbins RA. Doxycycline modulates nitric oxide production in murine lung epithelial cells. *J Immunol.* 2006;176(1):567-72.
153. Thanabhorn S, Jaijoy K, Thamaree S, Ingkaninan K, Panthong A. Acute and subacute toxicity study of the ethanol extract from *Lonicera japonica* Thunb. *J Ethnopharmacol.* 2006;107(3):370-3.
154. Lee JH, Ko WS, Kim YH, Kang HS, Kim HD, Choi BT. Anti-inflammatory effect of the aqueous extract from *Lonicera japonica* flower is related to inhibition of NF-kappaB activation through reducing I-kappaB α degradation in rat liver. *Int J Mol Med.* 2001;7(1):79-83.

155. Park E, Kum S, Wang C, Park SY, Kim BS, Schuller-Levis G. Anti-inflammatory activity of herbal medicines: inhibition of nitric oxide production and tumor necrosis factor-alpha secretion in an activated macrophage-like cell line. *Am J Chin Med.* 2005;33(3):415-24.
156. Kang OH, Choi YA, Park HJ, Lee JY, Kim DK, Choi SC, Kim TH, Nah YH, Yun KJ, Choi SJ, Kim YH, Bae KH, Lee YM. Inhibition of trypsin-induced mast cell activation by water fraction of *Lonicera japonica*. *Arch Pharm Res.* 2004 Nov;27(11):1141-6.
157. Tae J, Han SW, Yoo JY, Kim JA, Kang OH, Baek OS, Lim JP, Kim DK, Kim YH, Bae KH, Lee YM. Anti-inflammatory effect of *Lonicera japonica* in proteinase-activated receptor 2-mediated paw edema. *Clin Chim Acta.* 2003;330(1-2):165-71.
158. 柴興雲、李萍、唐力英：山銀花化學成分研究。中國中藥雜誌 2004;29(9):864-7.
159. 鄧良、袁華、喻宗沅：綠原酸的研究進展。化學與生物工程 2005; 7:4-6.
160. 涂志強、姚書文、楊沂明：金銀花不同萃取液中的綠原酸含量。基層中藥雜誌 1997;11(2):36-7.
161. dos Santos MD, Almeida MC, Lopes NP, de Souza GE. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biol Pharm Bull.* 2006;29(11):2236-40.
162. Feng R, Lu Y, Bowman LL, Qian Y, Castranova V, Ding M. Inhibition of activator protein-1, NF-kappaB, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. *J Biol Chem.* 2005 Jul 29;280(30):27888-95.
163. Kotanidou A, Xagorari A, Bagli E, Kitsanta P, Fotsis T, Papapetropoulos A, Roussos C. Luteolin reduces lipopolysaccharide-induced lethal toxicity and expression of

- proinflammatory molecules in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(6):818-23.
164. Kim JA, Kim DK, Kang OH, Choi YA, Park HJ, Choi SC, Kim TH, Yun KJ, Nah YH, Lee YM. Inhibitory effect of luteolin on TNF-alpha-induced IL-8 production in human colon epithelial cells. *Int Immunopharmacol*. 2005;5(1):209-17.
165. Kim JS, Jobin C. The flavonoid luteolin prevents lipopolysaccharide-induced NF-kappaB signalling and gene expression by blocking IkappaB kinase activity in intestinal epithelial cells and bone-marrow derived dendritic cells. *Immunology*. 2005;115(3):375-87.
166. Hirano T, Higa S, Arimitsu J, Naka T, Ogata A, Shima Y, Fujimoto M, Yamadori T, Ohkawara T, Kuwabara Y, Kawai M, Matsuda H, Yoshikawa M, Maezaki N, Tanaka T, Kawase I, Tanaka T. Luteolin, a flavonoid, inhibits AP-1 activation by basophils. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;340(1):1-7.
167. Zhang GG, Song SJ, Ren J, Xu SX. A new compound from *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl with antiviral effect on RSV. *J Herb Pharmacother*. 2002;2(3):35-40.
168. Chen X, Howard OM, Yang X, Wang L, Oppenheim JJ, Krakauer T. Effects of Shuanghuanglian and Qingkailing, two multi-components of traditional Chinese medicinal preparations, on human leukocyte function. *Life Sci*. 2002;70(24):2897-913.
169. Ozaki Y, Rui J, Tang YT. Antiinflammatory effect of *Forsythia suspensa* V(AHL) and its active principle. *Biol Pharm Bull*. 2000;23(3):365-7.
170. 胡峻、石任兵、張援虎、劉斌、董玉：荊芥穗化學成分研究。北京中醫藥大學學報 2006;29(1):38-40.
171. 倪文澎、朱萱萱、張宗華：荊芥穗提取物對甲型流感病毒感染小鼠的保護作用。中醫藥學刊 2004;22(6):1151-2.

172. Shin TY, Jeong HJ, Jun SM, Chae HJ, Kim HR, Baek SH, Kim HM. Effect of *Schizonepeta tenuifolia* extract on mast cell-mediated immediate-type hypersensitivity in rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1999;21(4):705-15.
173. 梁呈元、李維林、張涵慶、任冰如: 薄荷化學成分及其藥理作用研究進展。 *中國野生植物資源* 2003;22(3):9-12
174. 陰健、郭力弓: 中藥現代研究與臨床應用。北京:學苑出版社 1993; 68.
175. 橫田正實: 從中藥學的角度來研究中藥。 *國外醫學·中醫中藥分冊* 1990;12(2):83-8.
176. Dorman HJ, Kosar M, Kahlos K, Holm Y, Hiltunen R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *J Agric Food Chem.* 2003;51(16):4563-9.
177. Juergens UR, Stober M, Vetter H. The anti-inflammatory activity of L-menthol compared to mint oil in human monocytes in vitro: a novel perspective for its therapeutic use in inflammatory diseases. *Eur J Med Res.* 1998;3(12):539-45.
178. 王海燕、楊峻山: 牛蒡子化學成分的研究。 *藥學學報* 1993; 28(2): 911.
179. Cho JY, Kim AR, Yoo ES, Baik KU, Park MH. Immunomodulatory effect of arctigenin, a lignan compound, on tumour necrosis factor-alpha and nitric oxide production, and lymphocyte proliferation. *J Pharm Pharmacol.* 1999;51(11):1267-73.
180. Yang Z, Liu N, Huang B, Wang Y, Hu Y, Zhu Y. Effect of anti-influenza virus of Arctigenin in vivo. *Zhong Yao Cai.* 2005;28(11):1012-4.
181. Cho MK, Jang YP, Kim YC, Kim SG. Arctigenin, a phenylpropanoid dibenzylbutyrolactone lignan, inhibits MAP kinases and AP-1 activation via potent MKK inhibition: the role in

- TNF-alpha inhibition. *Int Immunopharmacol.* 2004;4(10-11): 1419-29.
182. 宋楊、齊雲: 桔梗的藥理研究進展。 *中國藥房* 2006;17(2):140-1.
183. Choi CY, Kim JY, Kim YS, Chung YC, Hahm KS, Jeong HG. Augmentation of macrophage functions by an aqueous extract isolated from *Platycodon grandiflorum*. *Cancer Lett.* 2001;166(1): 17-25.
184. Choi CY, Kim JY, Kim YS, Chung YC, Seo JK, Jeong HG. Aqueous extract isolated from *Platycodon grandiflorum* elicits the release of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha from murine macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2001;1(6):1141-51.
185. Wang C, Schuller Levis GB, Lee EB, Levis WR, Lee DW, Kim BS, Park SY, Park E. Platycodin D and D3 isolated from the root of *Platycodon grandiflorum* modulate the production of nitric oxide and secretion of TNF-alpha in activated RAW 264.7 cells. *Int Immunopharmacol.* 2004;4(8):1039-49.
186. Yoon YD, Han SB, Kang JS, Lee CW, Park SK, Lee HS, Kang JS, Kim HM. Toll-like receptor 4-dependent activation of macrophages by polysaccharide isolated from the radix of *Platycodon grandiflorum*. *Int Immunopharmacol.* 2003;3(13-14): 1873-82.
187. Yoon YD, Kang JS, Han SB, Park SK, Lee HS, Kang JS, Kim HM. Activation of mitogen-activated protein kinases and AP-1 by polysaccharide isolated from the radix of *Platycodon grandiflorum* in RAW 264.7 cells. *Int Immunopharmacol.* 2004;4(12):1477-87.
188. 黃碧松、楊子峰、楊書蘭、郭興伯: 銀翹散現代藥理研究近況。 *中醫兒科醫學雜誌* 2005;7(1):63-70.
189. 高學敏. *中藥學* 北京:中國中醫藥出版社. 2004;p88.
190. Kumazawa Y, Kawaguchi K, Takimoto H. Immunomodulating effects of flavonoids on acute and chronic inflammatory

- responses caused by tumor necrosis factor alpha. *Curr Pharm Des.* 2006;12(32):4271-9.
191. Weber C. Involvement of tyrosine phosphorylation in endothelial adhesion molecule induction. *Immunol Res.* 1996;15(1):30-7.
192. Comalada M, Ballester I, Bailon E, Sierra S, Xaus J, Galvez J, de Medina FS, Zarzuelo A. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship. *Biochem Pharmacol.* 2006;72(8):1010-21.
193. Kawaguchi K, Kikuchi S, Hasunuma R, Maruyama H, Yoshikawa T, Kumazawa Y. A citrus flavonoid hesperidin suppresses infection-induced endotoxin shock in mice. *Biol Pharm Bull.* 2004;27(5):679-83.
194. Sakata K, Hirose Y, Qiao Z, Tanaka T, Mori H. Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line. *Cancer Lett.* 2003;199(2):139-45.
195. 李儀奎, 姜名瑛。中藥藥理學。北京:中國中醫藥出版社 1992, p189.
196. Yu Z, Ohtaki Y, Kai K, Sasano T, Shimauchi H, Yokochi T, Takada H, Sugawara S, Kumagai K, Endo Y. Critical roles of platelets in lipopolysaccharide-induced lethality: effects of glycyrrhizin and possible strategy for acute respiratory distress syndrome. *Int Immunopharmacol.* 2005;5(3):571-80.
197. Matsui S, Matsumoto H, Sonoda Y, Ando K, Aizu-Yokota E, Sato T, Kasahara T. Glycyrrhizin and related compounds down-regulate production of inflammatory chemokines IL-8 and eotaxin 1 in a human lung fibroblast cell line. *Int Immunopharmacol.* 2004;4(13):1633-44.
198. Utsunomiya T, Kobayashi M, Ito M, Herndon DN, Pollard RB,

Suzuki F. Glycyrrhizin restores the impaired IL-12 production in thermally injured mice. *Cytokine*. 2001;14(1):49-55.

199. 黃星垣: 高熱證治研究的討論紀要。中醫雜誌 1981; 22(7):8-13.



Protective and Immunomodulatory effect of Gingyo-San in a murine
model of acute lung inflammation

Chia-Chou Yeh

Major professor: Shung-Te Kao

Graduate Institute of Chinese Medical Science, College of Chinese
Medicine, Chia Medical University

To investigate the effects of Gingyo-san (GGS), traditional Chinese medicinal formula, on the acute lung inflammation induced by LPS in vivo. Mice were challenged with intratracheal LPS before with treatment GGS or vehicle. In Lung morphology, GGS is better than Xia-Bai-San (XBS) and Hesperidin that reducing the infiltration of activated polymorphonuclear neutrophils in the airways, decreasing pulmonary edema, reduced nitrosative stress, and improved lung morphology. ELISA or RT-PCR detected the expression of cytokines in BALF and lung tissue. The mechanism of these benefits by treatment GGS including attenuating expression TNF α , IL-1 β , IL-6, KC, MCP-1, MIP-2, iNOS, and activation of nuclear factor (NF- κ B and AP-1) in BALF and lung tissue. Particularly, GGS also enhanced the anti-inflammatory cytokine (IL-10) and limited the acute lung inflammation. In vitro, HES suppressed the expression of IL-8 on A549 cells and THP-1 cells, the expression of TNF α , IL-1 β , and IL-6 on THP-1 cells, the expression of ICAM-1 and VCAM-1 on A549 cells which effect cell adhesion function. The suppression of those molecules is controlled by NF- κ B and AP-1, which are activated by I κ B and MAPK pathways. We also demonstract that GGS, Flos Lonicera, and chlorogenic acid induce the IL-10 secretion in LPS-induced RAW 264.7 cell lines.

Therefore, GGS protection activity against LPS-induced lung

inflammatory mediators release and might be beneficial in the treatment of endotoxin-associated inflammation.

Keyword: Gingyo-san, hesperidin, Xia-Bai-San, chlorogenic acid, lipopolysaccharide, inflammatory cytokine, NF- κ B, AP-1, ICAM-1, VCAM-1,



作者簡介

葉家舟

學歷

中國醫藥大學中國醫學研究所 博士

台灣大學病理研究所 碩士

中國醫藥學院中醫學系 學士

經歷

大林慈濟醫院 中醫科 中西醫整合醫學組及斗六門診部 主任

前任區域教學醫院為恭念紀醫院 中醫部主任

前苗栗縣中醫師公會 理事

前中央健保局 北區分會醫管組組長及病歷審察醫師

佛教大林慈濟綜合醫院 醫師

佛教大林慈濟綜合醫院 內兒科醫師訓練

中西醫整合醫學會 會員

苗栗縣人醫會會員

元培技術學院 護理系兼任講師

目前發表論文

1. Yeh CC, Kao SJ, Lin CC, Wang SD, Liu CJ, Kao ST. The immunomodulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin in vivo and in vitro. *Life Sci.* 2007; 80(20):1821-31.
2. Yeh CC, Lin CC, Wang SD, Hung CM, Yeh MH, Liu CJ, Kao ST. Protective and immunomodulatory effect of Gingyo-san in a murine model of acute lung inflammation. *J Ethnopharmacol.* 2007;111(2):418-26.
3. Yeh CC, Lin CC, Wang SD, Chen YS, Su BH, Kao ST. Protective and anti-inflammatory effect of a traditional Chinese medicine, Xia-Bai-San, by modulating lung local cytokine in a murine model of acute lung injury. *Int Immunopharmacol.* 2006;6(9):1506-14.

4. Kao ST, Yeh CC, Hsieh CC, Yang MD, Lee MR, Liu HS, Lin JG. The Chinese medicine Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang inhibited proliferation of hepatoma cell lines by inducing apoptosis via G0/G1 arrest. Life Sci. 2001 Aug 17;69(13):1485-96.

近五年內曾參與相關研究計畫

93. 7~94. 6 陳皮素對肝細胞發炎之探討
94. 7~95. 6 以基因晶片分析中醫藥對治療寒熱性哮喘證型之療效與安全性之研究
95. 7~96. 6 中藥對塵滿及細菌脂多醣體複合誘發實驗性氣喘小鼠之影響及有效成份之探討

