



中國醫藥大學
基礎醫學研究所
碩士學位論文

散血草降低四氯化碳誘導小鼠肝臟纖維化

Ajuga bracteosa Reduces Liver Fibrosis Induced by Carbon
Tetrachloride in Mice

指導教授：林文川 教授

研究生：劉鈺亭

中華民國九十八年七月

致謝辭

這兩年的研究所生涯，感謝恩師林文川教授的細心照顧及指導，當學生遇到實驗困難時，給予諸多幫助及指引，並給予正向鼓勵，培養學生閱讀文獻及邏輯思考能力，以利學生實驗及論文的進行，在您細心指導下學生受益良多，在此致上由衷的謝意。此外，也特別感謝台灣大學食品科技所沈立言教授以及藥理學科譚思濉副教授，對本篇論文的審閱及指正，使本論文更加完善。

感謝實驗室焄蓮學姊、麗嬋學姊、佳慈學姊、岳文學長、宏柏學長、柏齡、思穎、惠詒、瑞琪，對實驗上的協助及關心。感謝藥理學科譚思濉副教授、湯智昕助理教授、陳玉芳副教授、楊家欣助理教授及謝文聰副教授在實驗上的協助及指導，技佐柯毅文先生的實驗課堂上的諸多協助。

感謝基礎醫學所導師馬明琪教授及謝佳宏助理教授的指導及關心，所辦陳麗如小姐的幫助及鼓勵。感謝基醫所同學們：欣珊、慕恩、娟秀、松源、承騫，及癌生所聖傑同學在課業及實驗上的幫忙，還要特別感謝張文鑫同學於求學期間的互相扶持及真情相待，感激不盡。

最後感謝我的父母，給我很多的支持及鼓勵，還有在我求學時，一直陪伴我的嘉豪，謝謝你的關心及鼓勵，使我順利完成學業。

目錄

圖表目錄.....	III
中文摘要.....	VI
英文摘要.....	VIII
第一章 緒論.....	1
第一節 研究背景及目的.....	1
第二節 散血草相關文獻考察	
一、散血草植物型態.....	4
二、筋骨草屬化學成分研究.....	4
三、藥理作用.....	7
第三節 肝臟纖維化形成之機制	
一、肝臟構造.....	9
二、肝細胞.....	9
三、庫氏細胞.....	11
四、星狀細胞.....	15
五、四氯化碳氧化傷害.....	17
第四節 肝臟損傷與發炎相關因子	
一、腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis α ; TNF- α).....	20

二、介白素-6 (interleukin-6; IL-6).....	20
三、介白素-10 (interleukin-10; IL-10).....	21
四、干擾素- γ (Interferon- γ ; INF- γ).....	21
五、一氧化氮 (NO).....	21

第二章 散血草對四氯化碳誘導小鼠肝臟纖維化之影響

前言.....	23
材料方法.....	23
結果.....	35
討論.....	38

第三章 散血草抑制脂多醣誘發小鼠巨噬細胞株活化

前言.....	58
材料方法.....	58
結果.....	67
討論.....	70

第四章 結論.....87

第五章 參考文獻.....88

圖表目錄

Table 1. Oligonucleotide sequences used in RT-PCR.....	42
Table 2. Effect of ABEE on LPS-induced cytotoxicity and production of NO in mouse RAW 264.7 cells.....	76
Table 3. Effect of ABBE and ABB-AQE on LPS-induced cytotoxicity and production of NO in mouse RAW 264.7 cells.....	77
Table 4. Effect of ABCE and ABC-AQE on LPS-induced cytotoxicity and production of NO in mouse RAW 264.7 cells.....	78
Fig.1. Effect of ABEE on the activity of plasma ALT in CCl ₄ -treated mice.....	43
Fig.2. Effect of ABEE on hepatic hydroxyproline in CCl ₄ -treated mice.....	44
Fig.3. Effect of ABEE on hepatic lipid peroxidation in CCl ₄ -treated mice.....	45
Fig.4. Effect of ABEE on hepatic content of IL-10 in CCl ₄ -treated mice.....	46
Fig.5. Effect of ABEE on hepatic content of INF γ in CCl ₄ -treated mice.....	47
Fig.6. Histologic analysis of liver fibrosis (Sirius red staining).....	48
Fig.7. Histologic analysis of liver setion (hematoxylin-eosin statin).....	49
Fig.8. Immunostaining of CD14 in the liver section.	50
Fig.9. Immunostaining of CD68 in the liver section.....	51
Fig.10. Immunostaining of α -SMA in the liver section.....	52
Fig.11. Effect of ABEE on hepatic mRNA expression of LBP, CD14, TNF- α and CD68 in CCl ₄ -treatd mice.....	53

Fig.12. Effect of ABEE on hepatic mRNA expression of collagen (α 1)(I),and α -SMA in CCl ₄ -treatd mice.....	54
Fig.13. Effect of ABEE-induced cytotoxicity in rat Kupffer cells treated with LPS.....	55
Fig.14. Effect of ABEE on LPS-induced production of NO in rat Kupffer cells.	56
Fig.15. Effect of ABEE on LPS-induced production of TNF- α in rat Kupffer cells.....	57
Fig.16. Effect of LPS-induced cytotoxicity in mouse RAW 264.7 macrophages.....	74
Fig.17. The production of nitric oxide (NO) induced by LPS in mouse RAW 264.7 macrophages.....	75
Fig.18. Effect of ABCE on LPS-induced production of NO in rat Kupffer cells.....	79
Fig.19. Effect of ABCE on LPS-induced production of IL-6 in mouse RAW 264.7 macrophages.....	80
Fig.20. Effect of ABCE on LPS-induced production of TNF- α in mouse RAW 264.7 macrophages.....	81
Fig.21. Effect of ABCE on LPS-induced production of TNF- α in rat Kupffer cell.....	82
Fig.22. Effect of ABCE on LPS-induced iNOS protein expressions in RAW264.7 macrophages.....	83
Fig.23. Effect of ABCE on LPS-induced I κ B α and I κ B α phosphorylation protein expressions in RAW264.7 macrophages.....	84
Fig.24. Effect of ABCE on LPS-induced NF- κ B nuclear translocation in RAW264.7 macrophages.....	85

Fig.25. Effect of ABCE on LPS-induced MAPK and MAPK phosphorylation protein expressions in RAW264.7 macrophages.....86



散血草降低四氯化碳誘導小鼠肝臟纖維化

摘要

散血草為民間用藥應用於護肝。本研究主要探討散血草50%酒精萃取物對四氯化碳誘導小鼠肝臟纖維化的抑制效果。肝臟纖維化之誘導，小鼠每週以管灌餵食兩次四氯化碳 (10% 0.1ml/10g BW) 連續八週。實驗分為正常對照組及四氯化碳三組。四氯化碳三組每日一次經口投予散血草酒精萃出物(300 mg/kg、1000 mg/kg)或去離子水。四氯化碳誘導肝纖維化組顯著增加血液中丙氨酸轉移酶活性 (Alanine aminotransferase, ALT)，肝臟脂質過氧化程度及羥基脯胺酸含量，和四氯化碳組比較，高劑量散血草酒精萃物能降低血液中丙氨酸轉移酶活性，肝臟脂質過氧化程度及羥基脯胺酸含量。散血草可顯著降低四氯化碳誘導之肝臟之IL-10、INF- γ 的增高。組織染色之分析發現散血草酒精萃取物能顯著緩解四氯化碳誘導肝臟纖維化、壞死，及減少CD14及CD68的表現。RT-PCR的分析也顯示散血草酒精萃取物能明顯降低肝臟 *lipopolysaccharide-binding protein(LBP)*, *CD14* , *CD68*, *α -smooth muscle actin (α -SMA)*, *collagen (α 1)(I)*, *tumor necrosis factor- α (TNF- α)* mRNA的表現。另外，在大鼠肝臟庫氏細胞以LPS誘導NO模

式中，發現散血草酒精萃取物可顯著降低LPS所誘導NO的產生量。

在 RAW264.7 巨噬細胞株研究發現，散血草不同分層萃取物皆有抑制 LPS 所誘導之 NO 的產生，其中以 CHCl_3 萃取物(ABCE)最為顯著。LPS 可誘導 iNOS、p-I κ B α 、NF- κ B p65、p50 及 MAPK (p-ERK、p-JNK、pp38)的表現，而 ABCE 能顯著抑制 LPS 所誘導之 NF- κ B 及 MAPK 的磷酸化，在 LPS 誘發 24 小時急性發炎後，其細胞上清液中也發現其 TNF- α 、IL-6 的表現量顯著增加，ABCE 可顯著降低此發炎反應。

ABCE能抑制NF- κ B及MAPK的活化，進而影響其下游相關發炎因子如NO、TNF- α 等。因此推測口服散血草酒精萃取物能明顯緩解四氯化碳誘導的肝臟纖維化，可能是經由抗發炎作用。

***Ajuga bracteosa* Reduces Liver Fibrosis Induced by Carbon Tetrachloride in Mice**

Abstract

Ajuga bracteosa (Labiateae) has been used in traditional folk medicine for its hepatoprotective agent. The purpose of this study was to investigate the effect of 50% ethanol *A. bracteosa* extract (ABEE) on liver fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in mice. Hepatic fibrosis was produced by CCl₄ (10%; 0.1 ml/10 g body weight, p.o.) twice a week for 8 weeks in mice. Mice in the three CCl₄ group were treated daily with distilled water and ABEE (300 or 1000 mg/kg) via gastrogavage throughout the experimental period. CCl₄ caused liver fibrosis, featuring increase in plasma transaminase, hepatic malondialdehyde (MDA) and hydroxyproline (HP) contents. Compared with CCl₄ group, ABEE (1000 mg/kg) treatment significantly decreased the activities of transaminase, hepatic MDA and HP contents. CCl₄ treated mice significantly increased the hepatic contents of interferon- γ , interleukin-10, while ABEE suppressed these mediators of inflammation in liver damage. Histological evaluations showed that ABEE could attenuate the liver fibrosis, necrosis, and expressions of CD14 and CD68 that were induced by CCl₄. In addition, RT-PCR analysis also showed that ABEE treatment decreased hepatic mRNA expressions of *lipopolysaccharide-binding protein*, *α -smooth muscle actin*, *collagen (α 1)(I)*, *CD14*, *CD68* and *tumor necrosis factor- α* . In addition, ABEE was found to inhibit LPS-induced NO production in rat Kupffer cell.

Various fractions of *A. bracteosa*, especially chloroform fraction, were found to inhibit LPS-induced NO production in RAW 264.7 macrophage. *A. bracteosa* chloroform fraction (ABCE) inhibited the protein expression of iNOS. ABCE reduced phosphorylation of I κ B α , NF- κ B p65 and p50 protein expressions. In addition, ABCE inhibited phosphorylation mitogen activated protein kinase (MAPKs) protein expressions, including ERK1/2, JNK, and p38.

ABCE suppressed the activation of NF- κ B and MAPKs, then regulated downstream inflammatory factors such as NO and TNF- α . It is reasonable to suggest that oral administration of ABEE significantly reduced CCl₄-induced hepatic fibrosis in mice probably through the anti-inflammatory action.

第一章 緒論

第一節 研究背景及目的

肝病在台灣是相當普遍的疾病，號稱「國病」。所有慢性肝炎皆會轉變成肝臟纖維化，甚至變為肝硬化。根據 97 年行政院衛生署統計，在十大死因中，慢性肝炎及肝硬化居第八位，台灣每年約有五千人因慢性肝病及肝硬化死亡。另外，在十大死因中，癌症居第一位，肝癌在癌症死亡率中佔第 2 位，慢性肝炎如 B 及 C 型肝炎是引起肝癌的主要危險因子。因此，慢性肝炎的預防與治療在台灣是很重要的課題。目前肝硬化被認為是不可逆的，現代的藥物對於肝硬化尚沒有很好的治療效果，僅能針對肝硬化產生的併發症處理，因此研發保肝的產品，來預防肝炎變為肝硬化是極為重要。

造成肝臟纖維化原因很複雜包括化學性傷害如毒物、藥物濫用，病毒性肝炎，非酒精性肝炎或酒精性肝炎引起的脂肪肝，這些原因都可能造成肝臟纖維化的發生，甚至惡化為肝硬化 (Gines et al., 2004)。

庫氏細胞是存在於肝臟的巨噬細胞，長久以來被認為是主要的清除細胞，負責清除門脈循環來的特殊物質。然而很多的動物實驗結果顯示庫氏細胞參與很多肝臟疾病如病毒性肝炎、脂肪肝、酒精性肝疾病、膽汁鬱滯、肝臟移殖的排斥及肝纖維化等。很多證據指出，庫氏細胞是一個影響細胞(effect cell)能放出有害性的媒介物質來對肝細

胞造成損傷，在病毒感染的肝臟也扮演著抗原呈現細胞的角色(Kolios et al., 2006)。

肝臟纖維化主要是細胞外基質如膠原蛋白等的沉積，這些細胞外基質主要由星狀細胞(stellate cell)所產生。在肝臟纖維化的過程首先要使星狀細胞活化成纖維母細胞來產生膠原蛋白等。其次要抑制分解細胞外基質的蛋白質分解酵素(matrix metalloproteinases ; MMPs) 及增加 MMP 的抑制劑(tissue inhibitors of matrix metalloproteinase , TIMP)的產生。TGF- β 1 (transforming growth factor β 1) 是促使星狀細胞活化最主要的細胞激素，已知庫氏細胞是 TGF- β 1 的主要來源。在細胞實驗也發現庫氏細胞可以誘發星狀細胞 platelet-derived growth factor (PDGF) 接受體的表現，PDGF 可以促使星狀細胞增生。TGF- β 1 也可以影響到 MMP 及 TIMP 的 mRNA 表現 (Kolios et al., 2006)。

四氯化碳誘發小鼠產生肝臟纖維化是常用的動物模式，四氯化碳受到肝臟的代謝產生自由基造成肝細胞的損傷會活化庫氏細胞 (Luckey and Petersen, 2001)。另外，動物口服投與四氯化碳腸道也會產生脂多糖(lipopolysaccharide ; LPS)，LPS 經門脈進入肝臟活化庫氏細胞 (Lorenzo-Zuniga, 2006)。已有不少文獻指出抑制庫氏細胞可以改善肝臟的纖維化(Muriel et al., 2003; Rivera et al., 2001)。

散血草(*Ajuga bracteosa*)在民間被用於治療咽喉炎、肝炎、跌打

損傷、止血、解毒等功效 (邱與張, 1992), 也有文獻報導同屬植物在四氯化碳誘導肝損傷模式中, 可抑制其血清 ALT 表現, 具有保肝作用 (馬與黃, 2002)。

推測散血草具有抗發炎的效果, 也可能經由抑制肝臟發炎而產生有保肝作用。因此, 本研究分成兩個部分, 第一部分探討散血草對四氯化碳誘發小鼠肝纖維的保護功效, 並分析肝組織中庫氏細胞活化相關的基因表現。第二部分以小鼠性巨噬細胞株RAW 264.7來闡明散血草抑制巨噬細胞活化所經由的訊息傳遞途徑。這些結果可用為以後開發保肝健康食品或藥品之依據。



第二節 散血草相關文獻考察

一、散血草植物型態

散血草為唇形花科(Lamiaceae)，筋骨草屬(*Ajuga*)植物，其學名為 *Ajuga bracteosa* Wall.，別名：有苞筋骨草、筋骨草、石灰菜、八正草、百症草、白尾蜈蚣(台灣)、九味一枝蒿，分布：中國大陸、喜馬拉雅、馬來西亞、非洲，產地：台灣全島平野至中低海拔山區之林緣、路旁。常有零星藥用栽培。

型態一莖：多年生草本，株高 5~20 公分。葉：葉叢生狀，葉片匙形至倒披針形，長 5~15 公分，寬 2~5 公分，基部漸狹尖，先端鈍形或微突尖，波狀緣或略呈疏鋸齒緣，兩面被短毛。花：輪繖花序，腋生，排列成總狀花序，小花梗長 0.2~0.5 公分，萼筒 2 唇裂，上唇 3 齒裂，下唇 2 齒裂。花冠管狀，長 0.6~0.8 公分，花冠淡紫色或白色，上部 2 唇裂，下部較上唇長。雄蕊 4 枚，2 強，花藥 2 室，柱頭 2 歧。果實：小堅果橢圓形，長 0.12~0.15 公分，表面被網紋，具臍痕。(邱與張，1992)。

二、筋骨草屬化學成分研究

筋骨草屬有 40 多種植物，其中 20 多種植物的化學成分已被報導，此屬含有 80 多種二萜類化合物、30 多種固醇類化合物、20 多

種皂苷類化合物、少量黃酮類化合物及其他成分 (李等, 2009)。以下介紹重要的筋骨草屬植物的化學成分, 不限於 *A. bracteosa* Wall。

已有文獻報導散血草(*A. bracteos*)含有抑制 lipoxygenase 及 cholinesterase enzymes 的化學成分。抑制 cholinesterase enzyme 的成分如下 (Riaz et al., 2004) :

(一) bracteosin A:

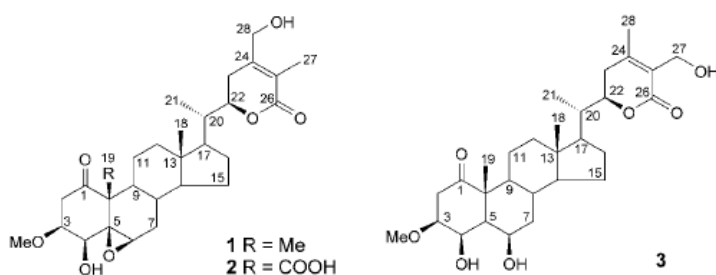
(22R)-5 β ,6 β :22,26-diepoxy-4 β ,28-dihydroxy-3 β -methoxyergost-24-ene-1,26-dione

(二) bracteosin B:

(22R)-5 β ,6 β :22,26-diepoxy-4 β ,28-dihydroxy-3 β -methoxy-1,26-dioxoergost-24-en-19-oic acid

(三) bracteosin C:

(22R)-22,26-epoxy-4 β ,6 β ,27-trihydroxy-3 β -methoxyergost-24-ene-1,26-dione



抑制 lipoxygenase enzyme 的成分如下(Riaz et al., 2007) :

(一) bractin A:

(2S,3S,4R,5E)-2- {[(2R)-2-hydroxydodecanoyl] amino} triacont-5-ene-1,3,4-triol

(二) bractin B:

(2S,3S,4R,5E,8E)-2- {[(2R)-2-hydroxyhexacosanoyl] amino} pentadeca-5,8-diene-3,4,15-triol 1-O-β-D-glucopyranoside

(三) bractic acid:

(5Z,10Z,15Z)-2-decyl-4,7,8,12,13,17,18-heptahydroxy-20,23-dioxopentacos-5,10,15-trienoic acid

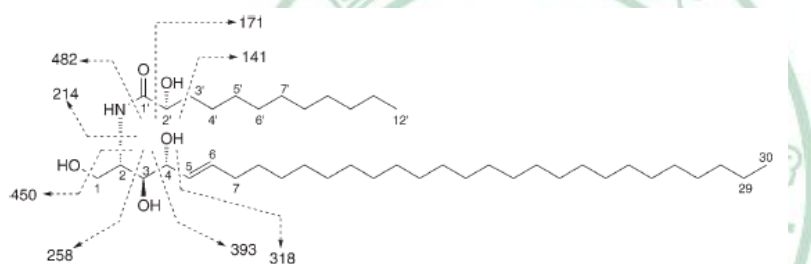


Fig. 1. Structure and mass-fragmentation pattern of 1

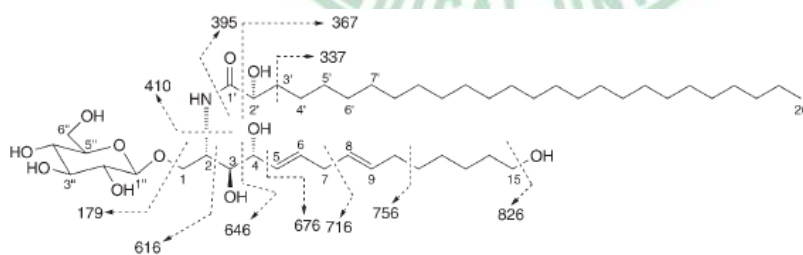


Fig. 4. Structure and mass-fragmentation pattern of 2

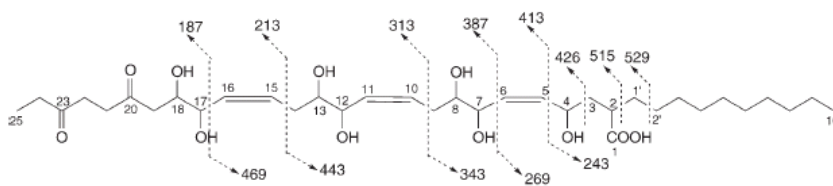


Fig. 6. Structure and mass-fragmentation pattern of 3

白毛夏枯草(*A. decumbens* Thumb), 又稱為筋骨草。全草含新克羅烷雙萜類 (neoclerodane diterpenes) 化合物：金瘡小草素 (ajugacumbin) A、B、C、D、E、F, 筋骨草素 (ajugamarin) 及筋骨草素 A2、B2、G1、H1、F4。亦含環烯醚萜類 (iridoid) 化合物：白毛夏枯草甙 (decumbeside) A、B、C、D, 雷補妥甙 (reptoside), 8-乙酰基哈帕甙 (8-acetyl harpa-gide)。另含固醇類 (sterols) 化合物：杯菟固醇酮 (cyasterone)、蛻皮固醇酮 (ecdysterone)、筋骨草固醇酮 (ajugasterone) B、C, 筋骨草內酯 (ajugalactone)。黃酮類化合物：木犀草 (luteo-lin)。根含筋骨草多糖 (kiransin) (江蘇新醫學院, 1992)。

三、藥理作用

白毛夏枯草(*A. decumbens* Thumb.)具有如下作用：

- (一) 降血壓效果：白毛夏枯草二萜類化合物，在大鼠動物實驗中發現可降低高血壓大鼠的血壓 (王等, 1996)。
- (二) 護肝效果：白毛夏枯草黃酮類化合物，可降低四氯化碳誘導小鼠肝損傷，其血清 ALT 值可顯著降低 (馬與黃, 2002)。
- (三) 抑制腫瘤：白毛夏枯草水提液對小鼠腫瘤移植模式，有明顯的抑制作用 (曾等, 2003)，萃取成分中的 iridoid glycoside 及 8-acetylharpagide 對 Epstein-Barr virus 早期抗原有顯著抑制效

果，具有抗腫瘤之作用。

- (四) 抗骨質疏鬆、抗關節炎：白毛夏枯草能夠降低 NO 合成，達到抗發炎效果，因而減緩骨質疏鬆和關節炎的情況 (Ono et al., 2008)。
- (五) 降血糖：A. iva 水草物能夠降低糖尿病大鼠的血糖表現 (Hilaly and Lyoussi, 2002)。
- (六) 抗菌(黴菌、分枝桿菌)：A. remota 分離之 petroleum ether fraction 有抗黴菌效果 (Kariba, 2001)、ergosterol-5,8-endoperoxide 成份具有抗分枝桿菌的效果 (Cantrell et al., 1999)。對高血壓大鼠也有降血壓之功效 (Odek-Ogunde et al., 1993)。
- (七) 利膽作用：該屬(Ajuga)植物中的甾皮固醇酮化合物，具有促進膽汁分泌作用，且可增加膽汁中膽酸及膽紅素含量，可降低膽固醇 (劉等，2001；楊，1989)。

第三節 肝臟纖維化形成之機制

一、肝臟構造

肝臟是人體最大的器官。其位於右側橫隔膜下腔，成人肝臟重約1,200 至 1,500 公克，肝臟呈楔形，表現平滑呈暗紅色，由鐮狀韌帶分左右葉，其結構分為四葉。肝臟從肝動脈和肝門靜脈的雙重供應血流，肝動脈為細胞供應氧氣及營養，由肝門靜脈的血液獲取大量的營養物質。肝臟也可透過膽道系統與腸道相連，將肝內代謝產物、毒素、廢物等可隨膽汁的分泌，經由腸道排出體外。

肝臟細胞分為實質細胞 (parenchymal cells) 及非實質細胞 (non-parenchymal cells)。實質細胞主要為肝細胞，佔總數目約 80%，外觀為不規則多面體，有數個細胞核，非實質細胞主要有兩種，分別為星狀細胞 (hepatic stellate cell) 及庫氏細胞 (kupffer cell)，另外還包括膽管細胞 (cholangiocyte)、內皮細胞 (endothelial cell) 等。

二、肝細胞

人體有許多重要的生理反應皆在肝細胞進行，包括醣類(葡萄糖)、脂質(脂蛋白、膽固醇、膽汁)、蛋白質(胺基酸、氨)、鐵等營養的代謝、分泌、儲存及合成等，另外，還有藥物毒物的代謝等 (Ramadori. and Saile., 2005)。

肝細胞功能如下：(1)分泌膽汁：膽汁還包括膽汁酸、磷脂質、膽

固醇和膽紅素，可促進脂類消化吸收；(2)促進蛋白質的代謝：身體合成蛋白質的能力，以肝細胞為最強，並且會合成大部分血漿蛋白，包括白蛋白、球蛋白、纖維蛋白原、凝血酶原等，促進氨基酸分解及合成，合成尿素促進毒素代謝等；(3)醣類代謝：調節血中葡萄糖濃度；(4)脂肪的代謝：促進脂類的消化吸收，合成膽固醇的重要場所之一，磷脂、脂蛋白的合成；協助脂溶性維生素的吸收：肝臟有儲存維生素 A、D、E、K 及 B12 的功能；(5)解毒功能：內源性或外源性有毒物質，大部分經肝細胞的脫氨作用、羥基化、氧化還原等作用後失去活性，部分物質經由結合作用後，轉化為可溶物質，以利尿液或糞便排出等等 (詹，2003；陳，2003)。

肝臟細胞進行許多重要的代謝合成反應，需要多酶來輔助進行，如丙氨酸轉換酶(Alanine aminotransferase, ALT)、天門冬胺酸轉換酶(Aspartate aminotransferase, AST)，進行胺基酸代謝產生氨。ALT 即是 GPT (Glutamyl pyruvic transaminase)，主要存在肝臟中，較具肝臟專一性；AST 即是 GOT (Glutamyl oxaloacetic transaminase)，存在於肝臟、心臟、骨骼肌中。當肝細胞受損時，AST 和 ALT 會被釋放到血液中，因此測定其酵素活性，可推測肝臟損傷程度，而此兩項生化檢驗值被認為是偵測肝損傷之功能重要指標 (Sturgill and Lambert, 1997)。

三、庫氏細胞

(一) 庫氏細胞

巨噬細胞依其所在部位的不同，而得到不同的特定名稱，如在結締組織稱為組織細胞 (histiocytes)，在骨骼稱為破骨細胞 (osteoclast)，在肺部稱為肺巨噬細胞 (alveolar macrophage)，在神經組織稱為神經膠質細胞 (microglia)，在肝臟稱為庫氏細胞 (kupffer cell)，在脾臟稱為竇內襯細胞 (Sinusoidal lining cells)，在腎臟稱為系膜細胞 (mesangial cells)。

庫氏細胞，屬於肝臟的巨噬細胞，於 1876 年由 Kupffer 先生首度在肝臟的竇狀隙發現這些特化的內皮細胞，當時命名為 sternalzellen (star cells)，但其他學者為區別庫氏細胞和星狀細胞，改稱呼為庫氏細胞 (kupffer cell) (Haubrich, 2004)。

庫氏細胞大小約 15-20 μm 的不規則型態，細胞上有 70 nm 厚的茸毛外殼，有 15 nm 的莢膜，貼附於肝臟竇狀隙的內皮細胞上，約佔肝臟非實質細胞總數的 35%，以門脈區數量最多 (Gregory and Wing, 2002)。庫氏細胞能吞噬廢棄血球細胞，如紅血球和白血球，或細菌碎片、細菌內毒素等 (Muriel et al., 2001；Muriel and Escobar, 2003；Luckey and Petersen, 2001)。庫氏細胞與慢性肝臟疾病的發炎過程息息相關，包括外來毒素、酒精等引起之免疫反應、由 B、C 型肝炎病毒

引起的免疫反應、肝臟的自體免疫反應等 (Gregory et al., 2002)。

巨噬細胞能清除血液中的一些氧化或醣化蛋白與脂蛋白，其不規則細胞表面大部分與與竇狀隙的血液相接觸(Koo, Chaudry and Wang, 1999)。巨噬細胞為身體內具吞噬功能之單核細胞，由骨髓中的前單核血球 (promonocytes) 分化而成，當單核球由血液移行進入組織後，再分化為成熟的巨噬細胞。巨噬細胞只存在於組織並不出現於血液中，其體積比單核球大，約 25-50 μm ，外觀卵圓形。巨噬細胞在免疫及發炎反應上扮演了一個很重要的角色，會分泌製造前發炎 (pro-inflammatory) 物質，而在正常生理條件下，巨噬細胞若受到特定刺激如 LPS 或細胞激素 (如 interferon- γ) 刺激下，才會被活化 (Schwacha, 2003)。

(二) 庫氏細胞活化

庫氏細胞面對外來毒物如四氯化碳、酒精或內毒素等傷害，會釋出細胞激素或發炎因子如： Tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-6 (IL-6)、interleukin-10 (IL-10) 等，促使細胞損傷 (Su, 2002)。當巨噬細胞被刺激活化後，會增加其吞噬能力及大量增殖，其型態會有改變，實驗上，CD68 經常被用來標定巨噬細胞活化的表徵 (Roberts et al., 2007；Mandrekar and Dolganiuc, 2007)。

LPS 是格蘭氏陰性菌莢膜產生的毒素，化學結構包含三個部分

(1) O-antigen (2) core (3) lipid A ，其中 lipid A 是 LPS 主要的活性部位。大鼠給予四氯化碳誘導肝纖維化模式中，發現其血清中有大量 LPS 存在，且會透過 LPS 途徑活化庫氏細胞(Qiu et al. 2005)。LPS 會透過腸道進入肝臟血流中，引起肝臟損傷，LPS 會與 LPS-binding protein (LBP)在血漿中結合，其中 LBP 由肝臟細胞所生成，與 LPS 形成 LPS/LBP 複合體，可催化 LPS 與庫氏細胞膜上的 CD14 結合，進而轉移並結合到 Toll-like receptor-4 (TLR-4)，最後才將訊息傳入細胞內，刺激發炎因子如 superoxide radicals、TNF- α 的產生，導致肝臟的傷害 (Wheeler, 2003)。許多研究已證實 LPS 可活化許多訊息的傳遞途徑，主要有 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B)及 Mitogen-activated protein (MAP) kinases(MAPK) 兩種途徑 (Mi Jeong et al., 2009 ; Kim et al., 2007b ; Kim et al., 2007a)。

NF- κ B 在發炎反應中扮演的角色：目前在哺乳動物中，NF- κ B 可分為五種不同型態：Rel (c-Rel)、Rel A (p65 & NF- κ B3)、Rel B、NF- κ B1 (p50)、NF- κ B2 (p52)。NF- κ B 由不同次單元體組成同二聚體 (homodimers)或是異二聚體 (heterodimers)，以 p65/p50 異二聚體形式存在最為常見，並具有強力的轉錄活性(Teng et al., 2006)。細胞在未受刺激下，細胞質中的 p65/p50 會和抑制其活性的 Inhibitor of kappa B (I κ B)結合。而 I κ B 會阻擋 NF- κ B 的 nuclear localization signal (NLS)，

使其無法進入核內，而停留在細胞質中。I κ B 家族分為 I κ B α 、 I κ B β 、 I κ B γ 、I κ B ϵ 及 Bcl-3，其中主要的蛋白為 I κ B α 。NF- κ B 在非活化狀態時是和 inhibitor of kappa B (I κ B)結合為複合體，並存在細胞質中，若受到刺激活化後，I κ B α 會被 I κ B kinase (IKK)磷酸化，接著 I κ B α 被 26S proteasome 進行 Ubiquitination 作用而分解，使 NF- κ B 與 I κ B 結合分開，進而活化 NF- κ B 異二聚體進入核內，影響下游基因的發炎或免疫反應(Makarov, 2000；Moynagh, 2005)。目前已知可活化 NF- κ B 因子包括：細胞激素或生長因子如 IL-1、TNF- α 及 TNF- β 等；細菌產物如：LPS；病毒產物如：EBV；壞死性刺激如：H₂O₂ 等(Teng et al., 2006)。

Mitogen-activated protein kinase (MAPK)是 serine/threonine 的 protein kinases，可調控細胞增殖、分化、凋亡或細胞間質堆積等，MAPK pathway 包括 MAP kinase kinase kinase (MKKK or MAP3K)、MAPK kinase kinase (MKK, MEKK, or MAP2K)、MAP kinase (MAPK) 等三類主要傳遞細胞內訊息之蛋白質。MAPK 活化之路徑主要先經由 MKKK 磷酸化 MKK，而 MKK 再磷酸化 MAPK，MAPK 再繼續活化細胞質或細胞核的下游蛋白使其磷酸化，最後再與 DNA 結合進行傳訊。在 MAPKs 家族中大致可分為三大類，extracellular responsive kinase (ERK1 and ERK2；p44/42)、C-Jun N-terminal kinase (p46/54；

JNK 1/2 and 3 ; JNKs)、 p38 Kinases。MAPKs 會參與不同的細胞反應：ERK 主要是參與細胞的增殖、分化及調控細胞週期進行等；JNKs 主要是參與細胞凋亡、壓力及發炎反應等，而 p38 MAPK 其主要調控免疫、發炎反應及對細胞激素的影響等作用(Johnson and Lapadat, 2002)。此三條路徑，皆可調控發炎相關因子(Herlaar and Brown, 1999)。研究顯示 MAPK 可調控發炎相關蛋白免疫反應或是刺激細胞激素的分泌如：TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等(Hommes, Peppelenbosch and van, 2003)，LPS 誘導 MAPK 活化的模式中，MAPK 被活化後，可調控下游 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 表現(Kim et al., 2007b)。

四、星狀細胞

肝臟星狀細胞 (Hepatic Stellate Cell)，1951 年 Ito 學者在人類肝臟細胞切片中發現有儲存脂肪滴的細胞(Willcox, 1952)，Suzuki 氏在迪氏腔發現外型似星狀的細胞，故而得名(Wake, 1980)。星狀細胞約佔肝細胞總數之 5-8%，與肝細胞比例約 13：100，可儲存維生素 A，故又稱作 fat-storing cell、vitamine A rich cell 等(Geerts, 2001)。

在正常情況下，星狀細胞處於靜止期，負責細胞外間質的維持，當肝臟受到傷害，則星狀細胞會受到生長因子或發炎激素的刺激，開始增生和製造膠原蛋白，會導致發炎細胞和活化態的星狀細胞聚集，而促使星狀細胞成為活化狀態，其主要分泌的細胞外間質為膠原蛋白

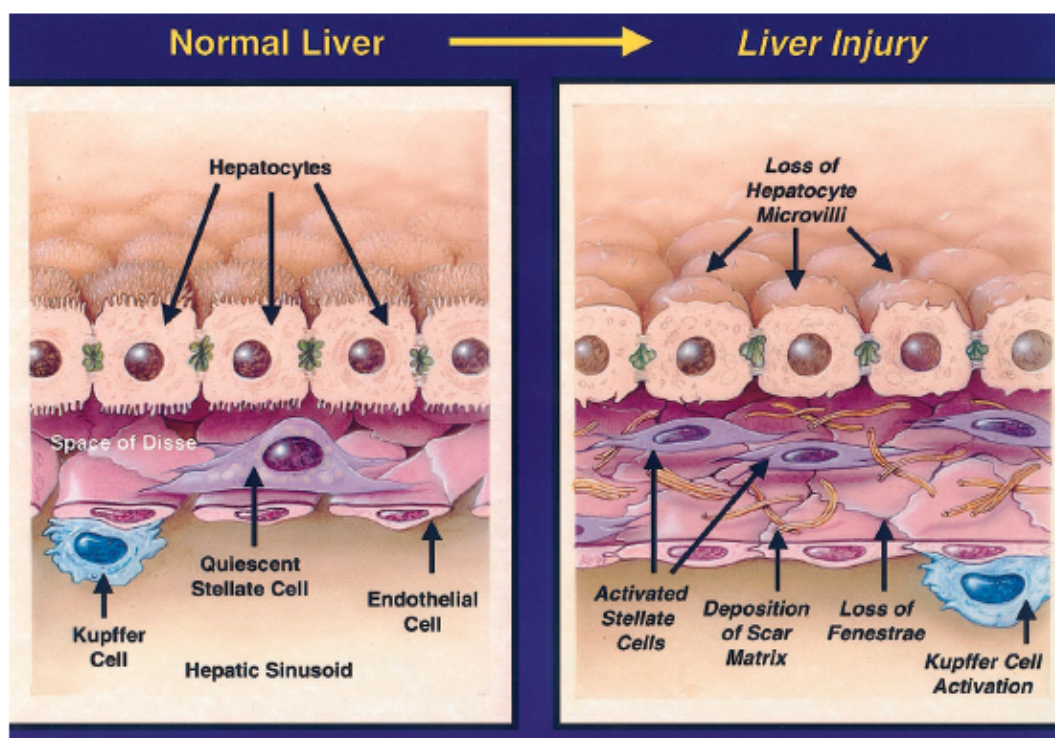
第一及第三型，並以第一型的量為最多(Geerts et al., 1991)，而組成膠原蛋白的主要特殊成分為羥基脯胺酸(hydroxyproline)，可反應纖維化的程度(Dang et al., 2007；Fang, Lai and Lin, 2008)，當肝臟受到損傷，星狀細胞會被活化來進行修復，是造成肝臟纖維化形成的重要細胞(Friedman, 2000)。

活化態的星狀細胞骨架蛋白，主要是 desmin、 α -smooth muscle actin(α -SMA)，其中 α -SMA 是所有活化態星狀細胞都會表現，視為星狀細胞活化程度的重要指標(Geerts et al., 1991)，其為肝臟纖維化的主要原因之一。

肝臟纖維化主要是肝臟的慢性損傷合併細胞外間質的過度堆積。造成肝臟纖維化原因包括化學性傷害如毒物、藥物濫用，病毒性肝炎，非酒精性肝炎或酒精性肝炎引起的脂肪肝，這些原因都可能造成肝臟纖維化的發生。而肝臟纖維化後，細胞外間質的堆積會破壞肝細胞的架構，且傷害一直持續，會進一步轉為肝硬化。肝硬化嚴重時會造成門脈高壓和肝功能衰竭甚至死亡(Gines et al., 2004)。

當肝臟受損時，這些竇狀隙週遭的細胞會產生變化(圖一.)，內皮細胞受損，肝細胞表面的微絨毛減少，而庫氏細胞活化後分泌促發炎細胞激素，促使發炎細胞聚集，且肝臟星狀細胞被活化產生疤痕組織，內皮細胞間的孔隙消失，造成細胞外基質堆積這些改變造成肝臟

損傷及纖維化 (Friedman, 2000)。



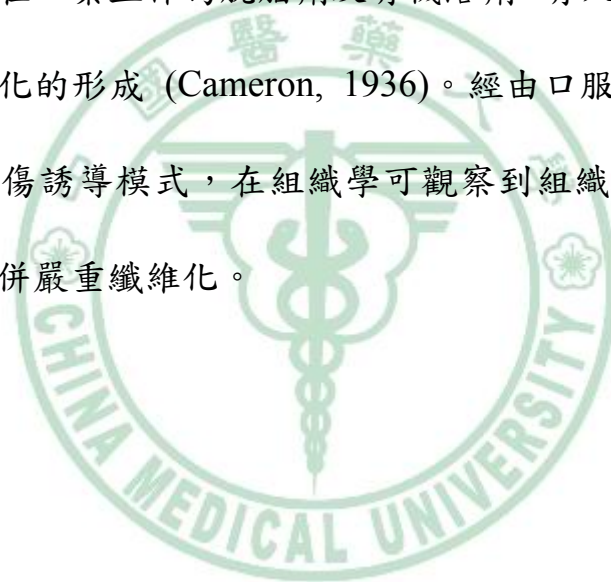
圖一. Sinusoidal events during fibrosing liver injury (Friedman, 2000).

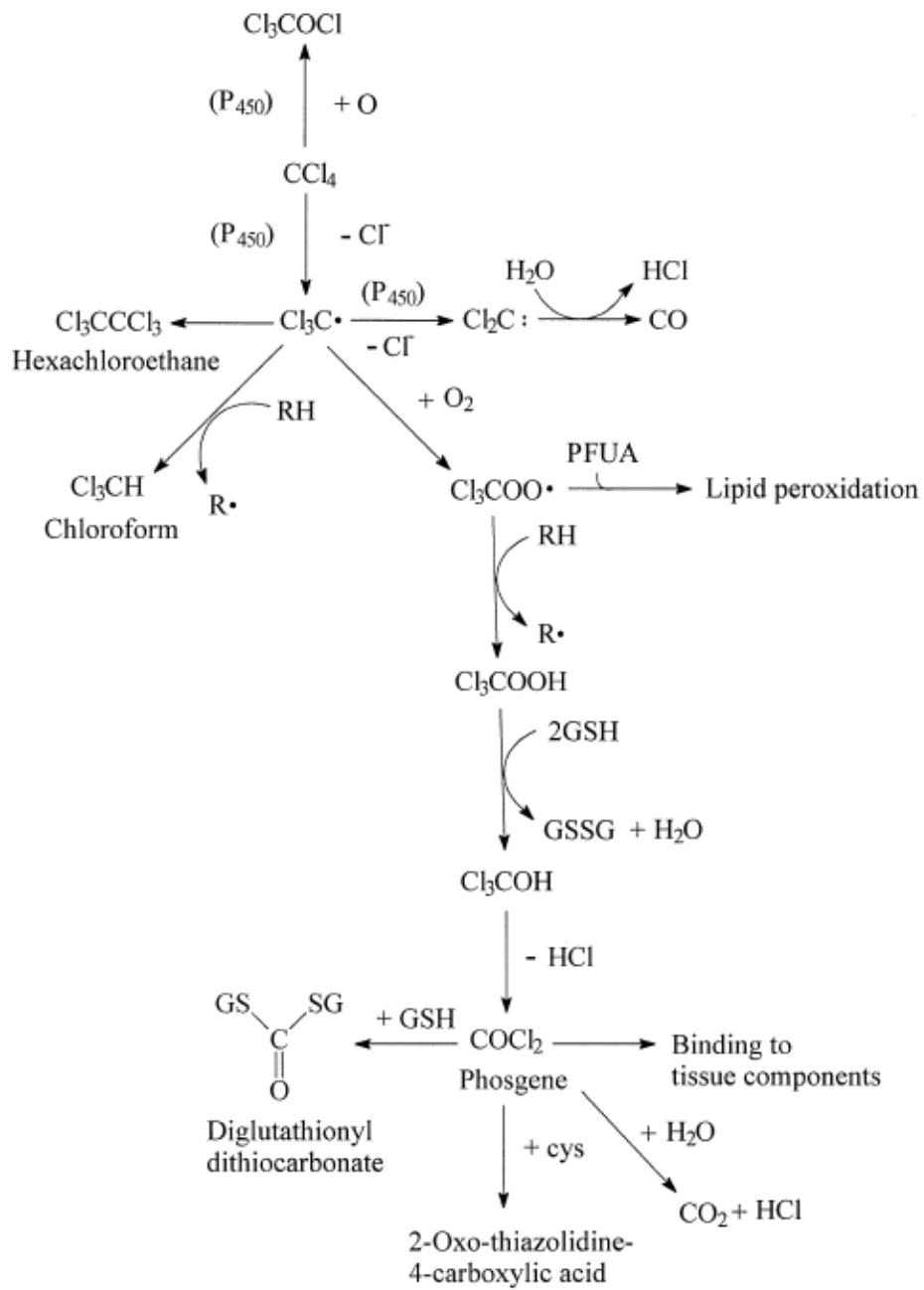
五、四氯化碳氧化傷害

四氯化碳誘導肝臟損傷的方法，被廣泛使用在動物模式中。四氯化碳導致肝損傷的機轉主要是藉由肝臟內質網上的 cytochrome P450 系統中的代謝酵素，主要為 CYP2E1，其次為 CYP2B1 及 CYP2B2 將四氯化碳代謝為三氯甲烷自由基 (trichloromethyl) $\text{CCl}_3\cdot$ 及更具活性之 $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$ (trichloromethylperoxy)，進而造成脂質過氧化或導致蛋白質合成受阻，並引起肝損傷 (McGregor and Lang, 1996) (圖二.)。其中三氯甲烷自由基還會經由鹵烷化作用，使得核酸突變、蛋白質減少甲基化、脂質堆積，進而造成肝臟損傷，除了使粒線體膜

的脂質氧化，影響粒線體的結構及功能外，也會造成肝細胞中鈣離子的失衡、生物膜的破壞等等，最後導致肝細胞纖維化、壞死(Weber, Boll and Stampfl, 2003)。四氯化碳會促使組織損傷，造成庫氏細胞活化，釋出細胞激素或氧化物等，因此，庫氏細胞活化被認為是四氯化碳誘導肝損傷過程中的主要因素(Luckey and Petersen, 2001；Muriel et al., 2001；Muriel and Escobar, 2003；Fang et al., 2008)。

四氯化碳在工業上作為脫脂劑及有機溶劑。有人提出四氯化碳會誘導大鼠肝硬化的形成 (Cameron, 1936)。經由口服的給藥方式，應用於慢性肝損傷誘導模式，在組織學可觀察到組織會出現肝細胞壞死、變性，合併嚴重纖維化。





圖二、四氯化碳代謝途徑 (McGregor and Lang, 1996)

第四節 肝臟損傷與發炎相關因子

一、腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis α ; TNF- α)

TNF- α 主要由單核球細胞和巨噬細胞所分泌出來，TNF- α 是一種具有多種功效的細胞激素，包括抗腫瘤和病毒、調節免疫和發炎等反應。TNF- α 在低濃度的情況下，扮演細胞保護的角色，但是分泌過多反而會導致細胞的損傷，而 TNF- α 在肝損傷過程中扮演一重要的角色，TNF- α 與肝臟的壞死有直接的關聯性且也會使血清轉胺酶升高 (Bruccoleri et al., 1997)。之前研究指出四氯化碳誘導肝臟損傷會代謝為三氯甲烷自由基，造成活化庫氏細胞並釋出 TNF- α ，在肝臟或血清中都可發現 TNF- α 升高 (DeCicco et al., 1998)。TNF- α 也會藉由活化庫氏細胞，因而刺激細胞激素及 iNOS 的生成 (Morio et al., 2001)。

二、介白素-6 (interleukin-6; IL-6)

IL-6 是一種多效能的細胞激素，由巨噬細胞、T 細胞或內皮細胞等所分泌 (Gregory et al., 1998)。其功能包括參與急性期反應、細胞分化、免疫反應、肝細胞再生等。肝臟中主要是由星狀細胞及巨噬細胞分泌，當 IL-6 過度表現可能導致肝纖維化的發生 (Heinrich, Castell and Andus, 1990)。研究發現在肝損傷情況下，TNF- α 及 IL-6 會顯著增加，並促使 NF- κ B 基因的轉錄作用 (Kovalovich et al., 2000; Elsharkawy and Mann, 2007)。

三、介白素-10 (interleukin-10; IL-10)

IL-10 主要由巨噬細胞、第二型輔助型 T 細胞 (T helper 2)、巨細胞(mast cells)、肝細胞及肝臟星狀細胞產生 (Moore et al., 1990)。

IL-10 可抑制發炎反應 NF- κ B 的活化，降低吞噬細胞產生促發炎激素如 TNF- α 、IL-6、IL-12；具有抑制第一型輔助型 T 細胞之活化作用(Williams et al. 2004)。IL-10 抗發炎機轉主要藉由抑制 Th1 細胞產生干擾素- γ ，達到抗發炎作用 (Wang et al., 1998)。研究指出以四氯化碳誘發肝損傷模式中，在 IL-10 基因剔除小鼠中，其肝臟損傷、發炎及纖維化情況比正常小鼠更為嚴重，因此可推斷 IL-10 存在下，可調控肝纖維化程度(Louis et al., 1998)。

四、 干擾素- γ (Interferon- γ ; INF- γ)

INF- γ 主要由 CD4⁺ Th1 細胞、CD8⁺細胞、NK 細胞產生，扮演活化淋巴球的角色，有抗微生物和抗腫瘤的作用。在肝臟纖維化中，INF- γ 是很重要的細胞激素，在動物實驗模式中，許多研究顯示 INF- γ 可抑制星狀細胞活化及細胞外基質的產生(Rockey et al., 1992; Rockey and Chung, 1994 ; Baroni et al., 1996)。

五、 一氧化氮 (NO)

NO 具有多種活性的自由基，由 NO 合成性酵素合成，依 NO 合

成性酵素之不同，可分為三種亞型，分別為 eNOS (endothelial NOS)、nNOS (neuronal NOS)、 iNOS (inducible NOS)。而 iNOS 只有在發炎刺激情況下才會被誘發，其負責產生大量 NO，毒殺標地細胞，因此 iNOS 的表現與免疫保護與防衛功能密切關連。許多血管細胞，例如巨噬細胞、平滑肌細胞、纖維母細胞等，皆會受到發炎激素刺激誘導 iNOS 產生 (Luoma and Yla-Herttuala, 1999)。NO 在低濃度情況下，具有保護功效，但大量產生會造成傷害。在 LPS 誘導巨噬細胞活化的模式中，LPS 可促使多種的發炎媒介物如 TNF- α 、interleukins 及 NO (Harris et al., 2006) 分泌。



第二章 散血草對四氯化碳誘導小鼠肝臟纖維化之影響

前言

四氯化碳誘導肝臟脂質過氧化，與慢性肝損傷、肝臟纖維化有很密切的關係 (Poli, 2000)，當損傷持續存在，肝臟纖維化可能惡化為肝硬化，甚至成為肝癌，因此，要抑制肝臟纖維化的程度，必須阻斷肝臟發炎的反應。

在之前研究已知同屬植物(*Ajuga decumbens* Thumb.)有護肝效果，可降低四氯化碳誘導小鼠急性肝損傷 (馬與黃，2002)，但其作用機轉並不清楚。本研究目的在於釐清散血草是否可減緩四氯化碳誘導之慢性肝炎，產生肝纖維化，並瞭解其相關作用機轉。

材料與方法

一、散血草的製備

散血草購自台中市漢強青草藥行，經本校中藥資源學系郭昭麟副教授鑑定。散血草乾品 1.6 公斤以 50%酒精溫浸(80°C) 24 小時，兩次，濾液經減壓濃縮至乾後，以去離子水複溶適當濃度(570 mg/ml, 800 ml)，萃出物重 456 公克，萃取率為 28.5%。投予小鼠時，以去離子

水稀釋成濃度 100 mg/ml、30 mg/ml，小鼠每 10 公克體重投予 0.1ml，即投予劑量為 1000 mg/kg 和 300 mg/kg，以下簡稱為 ABEE。

二、藥品試劑

編號	名稱	廠牌
1.	Carbon Tetrachloride	OSAKA
2.	Olive oil	Wako
3.	ALT kit (GPT 分析套組)	Roche
4.	HCl	Sigma-Aldrich
5.	NaOH	Sigma-Aldrich
6.	CuSO ₄	Sigma-Aldrich
7.	H ₂ O ₂	Roche
8.	p-dimethylaminobenzaldehyde	Sigma-Aldrich
9.	Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma-Aldrich
10.	Acetic acid	Sigma-Aldrich
11.	Thiobarbituric acid	Sigma-Aldrich
12.	n-butanol	Sigma-Aldrich
13.	Pyridine	Sigma-Aldrich
14.	Coomassie Blue	Sigma-Aldrich
15.	H ₂ SO ₄	Fluka
16.	Enzyme-link immunosorbent assay kit (IL-10)	BioScience
17.	Enzyme-link immunosorbent assay kit	BioScience

	(INF- γ)	
18.	KCl	Wako
19.	CD14 antibody	Santa cruz
20.	CD68 antibody	Abbiotec
21.	Alcohol	Panreac
22.	Diamiobenzidine (DAB)	Sigma-Aldrich
23.	Xylene	Scharlau chemie
24.	Trizol	Invitrogen
25.	Chloroform	Showa
26.	Isopropanol	Scharlau Chemie S.A.
27.	DEPC water	Biotecx
28.	dNTP Mix	GeneMark
29.	MMLV RT	GeneMark
30.	Oligo dT primer	GeneMark
31.	PCR master Mix Kit	GeneMark
32.	6 \times DNA Loading Dye	GeneMark
33.	Gen-50 DNA Ladder	GeneMark
34.	Agarose I	Amresco
35.	TBE buffer	Amresco
36.	Ethidium Bromide (EtBr)	Fermentas
37.	Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)	HyClone
38.	MTS	Promega
39.	Lipopolysaccharides	Sigma-Aldrich
40.	Griess Reagent	Sigma-Aldrich

41.	Pentobarbital	Sigma-Aldrich
42.	Collagenase type IV	Sigma-Aldrich
43.	Percoll 50% : Dissolve 0.35 g NaHCO ₃ (4 mM final) in 400 ml water and add 500 ml of 100% Percoll and 100 ml of 10× HBSS pH to 7.4	GE Healthcare
44.	Heparin	Sigma-Aldrich
45.	HBSS (Hanks' balanced salt solution): 8 g NaCl (138 mM final) 0.4 g KCl (5.4 mM final) 0.091 g Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O (0.3 mM final) 0.06 g KH ₂ PO ₄ (0.4 mM final) 1 g dextrose (5.6 mM final) 0.2 g MgSO ₄ ·7H ₂ O (0.8 mM final) 0.185 g CaCl ₂ ·7H ₂ O (1.26 mM final) 0.35 g NaHCO ₃ (4 mM final) Add H ₂ O to 1 liter Adjust pH to 7.4	Amresco
		Merck
		J.T. Baker
		Wako
		Katayama chemical
		Wako
		Merck
		Merck
46.	CMF-HBSS (Ca ²⁺ and Mg ²⁺ free Hanks' balanced salt solution)	

三、設備器材

編號	名稱	廠牌
1.	Spectrophotometer	Hitachi
2.	PCR system 9700	A & B (Applied

		Biosystems)
3.	AlphaDigDocTM (影像擷取與分析系統)	Alpha Innotech Coporation
4.	CoBAS MIRA PLUS (生化儀)	Roche
5.	KUBOTA 3500 (離心機)	KUBOTA
6.	TOA pH meter HM-5S	TOA Electronics
7.	Microplate Reader Model 550	Bio-RAD
8.	Electronic balance AB104	Mettler toledo

四、動物

實驗動物選用 ICR 小鼠，體重 25-30g，購買自樂斯科生物科技公司。飼養環境維持 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，相對溼度 $55 \pm 5\%$ ，半日照環境，採自由飲水及攝食。

五、四氯化碳誘導之慢性肝毒性

小鼠每週兩次經口服給予四氯化碳 10%(溶於橄欖油)，為期八週，投予體積為每 10 克體重給予 0.1 ml。將小鼠分成控制組(n = 6)及四氯化碳組。四氯化碳組又分成三組，每組 8 隻，三組以四氯化碳誘導肝臟纖維化，每天分別經口給予一次水或 ABEE (300、1000 mg/kg body weight)，每週秤體重一次。四氯化碳與實驗藥物的投予時間，

需相隔 5 小時以上。投藥滿八週後犧牲動物時，快速取下肝臟，浸泡在冰冷生理食鹽水中，洗淨擦乾水分後，將肝臟分成五個部分，第一部份浸泡在 10% 中性福馬林中，以供病理切片用；第二部份測定羥基脯胺酸；第三部份存於液態氮，供蛋白質或 RNA 之分析；第四及第五部分冰凍於 -80°C ，以供後續實驗使用。

六、 肝功能測試

動物投藥滿八週後，小鼠以乙醚麻醉，用 1 ml 針筒由下腔靜脈採血，將全血收集至含有 heparin 潤滑的微量離心管中，在室溫下，4700 rpm 離心 10 分鐘分離出血漿。使用 ALT 試劑，以自動分析儀器檢測 ALT 活性。

七、 肝臟羥基脯胺酸含量測定

參考 Neuman 和 Logan (1950) 的方法，測定肝臟羥基脯胺酸含量。秤取肝臟約 0.3 克，於 100°C 隔夜烘乾，將乾燥的肝臟組織秤重後，放入玻璃試管中，加入 3 ml 的 6N HCl 置於 100°C 烘箱中，加以完全水解。待冷卻後，取樣品 1ml 至微量離心管，10000 rpm 離心 30 分鐘。取 0.1 ml 的上清液，以 1N NaOH 中和水解產物，每管分別加入 1 ml CuSO_4 (0.01M)、NaOH (2.5N)、 H_2O_2 (6%) 震盪後靜置反應 5 分鐘，促進氧化還原反應。之後以 80°C 加熱 5 分鐘，去除多餘過氧化

物。冷卻至室溫，再加入 2 ml 5% P-dimethylaminobenzaldehyde 及 4 ml 3 N H₂SO₄，劇烈震盪均勻後，再放入 70°C 水浴 16 分鐘反應呈色，以分光光度計於 540 nm 測量吸光值。表示單位為 $\mu\text{g hydroxypoline/g}$ 肝臟重。

八、肝臟脂質過氧化(Lipid peroxidation)產物檢測

肝臟脂質過氧化測定參考(Ohkawa, et al., 1979)等人的方法。秤取肝臟組織約 0.3 克，加入 3 ml 的 1.15% KCl 溶液，以均質機均質化後，取 0.2 ml 之上清液，分別加入 0.2 ml sodium dodecyl sulfate (8.1%)、1.5 ml acetic acid (20%)、1.5 ml 2-Thiobarbituric acid (0.8%)，並加入一次水使最終體積為 4ml，以 99°C 水浴 1 小時，待冷卻後，加入 4 ml N-butanol/pyridine 混合液(15:1, v/v)，劇烈震盪數十秒後，以 4°C 4000g 離心 10 分鐘，取有機層以分光光度計 532nm 測量吸光值。組織同時依照 Congdon 等人(1993)之 Coomassie Blue 蛋白質定量法，測定肝臟組織蛋白質含量，以胎牛血清(Bovine derum akbumin)蛋白為標準品。脂質過氧化單位以 nmol malondialdehyde (MDA)/mg protein 表示。

九、肝臟組織之細胞激素 IL-10、INF- γ 之測定

細胞激素測定採用 Enzyme-link immunosorbent assay kit (BioScience) 分析。將肝臟組織秤取約 0.3 克，加入 3 ml 1.15% KCl，

以均質機均質後，取 1 ml 於微量離心管，以 3000 rpm 4°C 離心 5 分鐘，之後取上清液及細胞激素標準液，加入預先 coating 及 blocking 的 96 孔盤中，置於室溫 2 小時，再以 Phosphate Buffered Saline Tween 20 (PBS-T) 清洗 3-5 次，再加入 detection antibody，置於室溫 1 小時，接著以 PBS-T 清洗 3-5 次，加入 Horse Radish peroxidase，室溫作用 30 分鐘，再以 PBS-T 清洗後，加入 Substrate，置於室溫 15 分鐘，使其呈色，最後加入 H₂SO₄，終止反應，呈現黃色，再以 ELISA reader 偵測 OD 450 nm 吸光值。濃度以標準曲線求得之。

十、肝臟病理檢驗

取肝臟最大葉 1/3 浸泡 10% 福馬林固定後，脫水後，進行石臘包埋及切片，再以蘇木青與伊紅染色法(Hematoxylin and Eosin stain) 和天狼猩紅(Sirius red)染色，供評估肝臟組織病變及纖維化程度分析，纖維化程度之百分比以影像分析軟體(Image-pro plus)分析。

將肝臟切片進行 CD14、CD68 及 α -SMA 之免疫組織化學染色。其方法是將切片烘乾後，進行復水步驟，以 5% 脫脂奶粉阻斷非特異性反應 30 分鐘，之後加入一級抗體(1:200)在 4°C 反應 16 小時，以 PBS-T 清洗後，加入 3% H₂O₂ 去除內源性過氧化酶，反應 10 分鐘後，以 PBS-T 清洗，而後加入二級抗體室溫反應 30 分鐘，再利用免疫偵測套組及 diaminobenzidine 呈色，再以蘇木紫染色，脫水、封片後，

以光學顯微鏡觀察即可。

十一、RT-PCR 分析

(一) 肝臟組織 RNA 的萃取

取 0.1 g 的肝組織加入 1 ml trizol 試劑，使組織粉碎均質化，於 4°C、6400 rpm 條件下離心 10 分鐘。取上清液加入 0.2 ml chloroform 萃取 RNA，劇烈震盪 15 秒後，靜置冰上 3 分鐘，於 4°C、12700 rpm 離心 15 分鐘，取上清液加入 0.5 ml isopropanol 使 RNA 沉澱，上下搖晃後，靜置冰上 10 分鐘，於 4°C、12700 rpm 離心 10 分鐘。移除上清液，留下沉澱物，再加入 75% 酒精後，靜置於 -30°C 冰箱 30 分鐘。於 4°C、10000 rpm 離心 5 分鐘，再倒掉上清液，加入適量 Diethyl pyrocarbonate (DEPC) 溶解。於波長 260 nm / 280 nm 測定吸光值，換算其濃度。

(二) 合成 cDNA

cDNA 的製備主要採用 MMLV Reverse Transcriptase (first-strand cDNA synthesis)。取 1 µg mRNA 加入 2.5 µl 10×MMLV RT buffer、0.6 µl MMLV RT、5 µl dNTP、2.5 µl 0.1M DTT、1 µl oligo dT primer，混合後於 37°C 反應 60 分鐘，之後立即置於冰上。

(三) 聚合酵素反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)

利用 PCR Master Mix 套組，將特定 cDNA 量化。取去離子水 9.5

μl 、PCR Master Mix 12.5 μl 、10mM primer 各 1 μl 、cDNA 1 μl 。

(四) DNA 電泳分析

取 PCR 產物 5 μl ，加入 1 μl 6X DNA loading dye，以 2% 洋菜膠及混合 Ethidium Bromide，以 100 伏特電泳進行分離，在暗箱以紫外光照射，再用影像分析軟體(AlphaDigi Doc 1201)分析。採用的 primer 序列如 Table 1。

十二、分離大鼠肝臟庫氏細胞測定 NO 及細胞存活率

依據 Froh, Konno and Thurman (2002) 的方法分離，步驟如下：

實驗步驟：

(一) 分離庫氏細胞

1. 取老鼠，將老鼠稱重。
2. 將老鼠用 pentobarbital (50 mg/kg) 進行麻醉，利用腹腔注射的方式。
3. 待老鼠麻醉完全，從尾巴靜脈的位置進行注射 heparin，適量即可。
4. 將老鼠全身以 95% 酒精進行消毒，用剪刀進行剖腹並將導管插入肝門靜脈，用止血夾子固定。
5. 用 Ca^{2+} and Mg^{2+} free Hanks' balanced salt solution (CMF-HBSS；詳細配方見藥品試劑) 進行灌流 (溫度保持在 37 度，並適時的攪拌)，流速保持在 20 ml/min，將下腔靜脈遠端的位置剪斷，使血液能夠流出。

6. 將下腔靜脈固定，使灌流液能夠充分灌流，並反覆按摩，接著開胸腔剪破心臟，等待肝臟充分灌流。
7. 更換灌流液體 HBSS 進行灌流，並加入 0.02% 的 collagenase type IV。
8. 待肝臟消化完全後，將肝臟剪下放到培養盤上面，用 HBSS 進行沖洗，並用剪刀輕柔剪碎。
9. 利用 nylon gauze 來過濾沒有消化完全的部份和結締組織。
10. 將過濾之後的細胞液，加入 Hanks' balanced salt solution (HBSS 詳細配方見藥品試劑) 至 50 ml 進行離心。
11. 70 g, 4°C 離心 3 分鐘 (離心完的細胞液，須至於冰上)。
12. 將上清液取出至另一個新的離心管，加 HBSS 至 50 ml，並與另一管的 pellets 也加 HBSS 至 50 ml，進行 70×g, 4°C 離心 3 分鐘。
13. 將離心後的細胞液，取出上清液至新的離心管，補 HBSS 至 50 ml 再於 650×g, 4°C 離心 7 分鐘。
14. 去除不要的上清液，再將 pellets 重新 suspension 加入 HBSS 10 ml。
15. 加 10 ml 的 pellets 加到 50% 25% 的 percoll 離心管 (最下層為 50% percoll 20 ml，接著緩慢的加入 25% percoll 20 ml 避免 50% 25% percoll 混合，之後再加入 10 ml 的細胞液) 最後要有分層的出現。
16. 在 1800×g, 4°C 離心 15 分鐘 (不可減速，避免梯度混淆)。

- 17.小心吸除出最上層的上清液(此層為碎片、死細胞)，將第二層和第三層的上清液(多屬非實質細胞)，分別的集中至新的離心管，加入 HBSS 至 50 ml，在 $650\times g$, 4°C 離心 7 分鐘。
- 18.移除上清液，留下 pellets，加入 HBSS 至 5-10 ml 進行沖洗，將多餘的 percoll 清洗乾淨， $300\times g$, 4°C 離心 5 分鐘 (最大減速)，移除上清液，再重新加入 5 ml-10 ml 的 HBSS 之後進行細胞計數。
- 19.接著將取出的庫氏細胞計數，細胞種於 96 孔盤中，每 well 種度 3×10^5 細胞，20~30 分鐘後，讓庫氏細胞貼附後，再洗掉其他細胞。
- 20.庫氏細胞貼附 24 小時後才可進行實驗。
(過程當中須完全無菌的狀態下，所有器具須先經過滅菌)

(二) 細胞實驗步驟

將細胞種於 96 孔盤中，每孔 $100\ \mu\text{l}$ 培養液控制細胞數目 3×10^5 ，加入不同濃度的 ABEE ($600\text{-}1000\ \mu\text{g/ml}$) 培養 1 小時後，加入刺激物 LPS ($0.1\ \mu\text{g/ml}$)，於 37°C ，5% CO_2 培養箱中培養 48 小時後，取出上清液 $50\ \mu\text{l}$ 加入 Griess reagent 等體積溶液呈色後，以 $540\ \text{nm}$ 測吸光值，定量亞硝酸根離子(Nitrite)濃度。

將每孔上清液吸乾後，加入 $100\ \mu\text{l}$ 培養液，再加入 $20\ \mu\text{l/well}$ [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-Tetrazolium] (MTS) 試劑，靜置 1-2 小時。以波長 $490\ \text{nm}$ 測

定吸光值，計算細胞的存活率(Cell viability)。存活率 (%)= (試驗組吸光值/對照組吸光值) x 100%。

另外，將細胞上清液保存，測定 TNF- α 含量，採用 ELISA kit 分析。將細胞上清液 5 倍稀釋，均勻震盪後取出 100 μ l 加入預先 coating 及 blocking 的 96 孔盤中，置於室溫 2 小時，再以 PBS-T 清洗 3-5 次，再加入 detection antibody，置於室溫 1 小時，接著以 PBS-T 清洗 3-5 次，加入 HRP，室溫作用 30 分鐘，再以 PBS-T 清洗後，加入 Substrate，置於室溫 15 分鐘，使其呈色，最後加入 H₂SO₄ 終止反應，呈現黃色，再以 ELISA reader 偵測 OD 450 nm 吸光值。濃度以標準曲線求得之。

十三、統計方法

數據結果以平均值(mean) \pm 標準差(Standard deviation, SD)表示，各組與對照組間的數據，以單因子變異數分析(One-way ANOVA)方法分析，並進行 Dunnett 測試，以 P 值小於 0.05 表示在統計學上具有顯著差異。

結果

一、對血清 ALT 影響

投藥滿八週後，犧牲小鼠採血，血漿部份測定 ALT 活性。四氯化碳組的 ALT 值與控制組比較有顯著增加，ABEE 低劑量 300 mg/kg

和高劑量 1000 mg/kg 組別，皆能顯著降低四氯化碳誘導的 ALT 上升 (Fig.1)。

二、羥基脯氨酸含量

四氯化碳誘導八週後，肝臟羥基脯氨酸含量與控制組比較有顯著增加，而投予 ABEE 低劑量 300mg/kg 和高劑量 1000 mg/kg 組別，其肝臟羥基脯氨酸含量與四氯化碳組比較有顯著的降低 (Fig. 2)。

三、脂質過氧化產物分析

四氯化碳誘導小鼠肝臟纖維化，結果顯示四氯化碳組脂質過氧化產物含量比控制組高。ABEE 低劑量 300 mg/kg 和高劑量 1000 mg/kg 組別能夠顯著降低四氯化碳誘導的脂質過氧化 (Fig. 3)。

四、細胞激素含量

四氯化碳誘導八週後，犧牲取肝臟均漿測試 IL-10 及 INF- γ 濃度。四氯化碳組肝臟的 IL-10 及 INF- γ 表現和控制組比較是明顯升高。ABEE 組別皆能降低四氯化碳所誘導的 IL-10 及 INF- γ 濃度 (Fig. 4、5)。

五、肝臟組織切片染色及免疫化學染色分析

肝臟病理切片的觀察顯示，經由天狼星紅染色分析肝臟纖維化分佈佔肝組織的百分比，發現四氯化碳組引發的肝臟纖維化程度較為嚴重，而投予 ABEE 高劑量的纖維化程度和四氯化碳組比較有顯著的降

低 (Fig. 6)。

肝臟的損傷程度及型態觀察，經由蘇木精和伊紅染色得以判讀，投與四氯化碳八週之小鼠，其組織細胞有廣泛浸潤、壞死的現象，投予高劑量的 ABEE 則可明顯改善肝臟受損情況(Fig. 7)。

經由 CD14 及 CD68 免疫組織化學染色分析肝臟庫氏細胞活化的情況，結果顯示四氯化碳組會誘導 CD14 及 CD68 之表現，而 ABEE 高劑量組的 CD14 及 CD68 表現顯著低於四氯化碳組(Fig. 8、9)。另外，由 α -SMA 免疫組織化學染色分析肝臟星狀細胞活化情況，結果顯示四氯化碳會誘導 α -SMA 之表現，而 ABEE 組的 α -SMA 表現顯著低於四氯化碳組(Fig. 10)

六、RT-PCR 結果

結果如 Fig. 11-12 所示，肝臟 LBP、CD14、CD68、TNF- α 、collagen(α 1)(I)及 α -SMA 的量化結果，顯示四氯化碳組肝臟之 LBP、CD14、CD68、TNF- α 、collagen(α 1)(I)、 α -SMA 的表現較控制組皆顯著提高。ABEE 高劑量的 mRNA 表現，與四氯化碳組比較皆有顯著的降低。

七、大鼠肝臟庫氏細胞之 NO、細胞存活率及 TNF- α 細胞激素含量之測定

將大鼠庫氏細胞，96 孔盤分別加入 LPS 0.1 μ g/ml 或前處理 1 小

時 ABEE，待 48 小時後，結果顯示 LPS 可誘發 NO 的增加，ABEE 具濃度(200-1000 $\mu\text{g/ml}$)依存性抑制 NO 的釋出，且對於細胞存活率並無影響(Fig. 13、14)。另外，在 TNF- α 細胞激素含量測定，結果顯示 ABEE 具濃度 (200-1000 $\mu\text{g/ml}$) 依存性抑制 TNF- α 的釋出 (Fig. 15)。

討論

在本實驗中，主要是探討 ABEE 對四氯化碳慢性肝炎誘導小鼠肝纖維化的保護效果。結果顯示 ABEE 能降低四氯化碳所誘導的小鼠肝纖維化，其作用機轉之一是藉由抑制發炎作用，而達到抑制纖維化的效果。

ALT 主要存在肝臟中，當肝細胞受損時，會被釋放到血液中，因此測定其酵素活性，可推測肝臟損傷程度，為是偵測肝損傷之功能重要指標 (Sturgill and Lambert, 1997)。在小鼠給予四氯化碳八週的實驗中，結果顯示四氯化碳組 ALT 顯著增高，而 ABEE 低劑量或是高劑量的組別皆有顯著降低 ALT 的表現，另外，在蘇木精和伊紅組織染色分析可發現四氯化碳組別肝臟有廣泛壞死、發炎、浸潤的情況，反之，給予 ABEE 高劑量的組別，可發現肝臟發炎、壞死的區域有顯著降低(Fig.7)，這些結果可證實 ABEE 可降低肝臟的損傷程度。

肝臟纖維化是細胞外間質不正常的堆積，尤其是膠原蛋白增生，

膠原蛋白主要的特別成分為羥基脯胺酸，常被用來表示纖維化程度的分析 (Dang et al., 2007 ; Fang et al., 2008)。本實驗，ABEE 能夠降低四氯化碳誘導羥基脯胺酸的增加，在組織 Sirius red 染色，也可發現 ABEE 能夠降低肝臟纖維化程度(Fig. 6)，因此，可推斷 ABEE 能夠降低肝臟纖維化的程度。

四氯化碳會產生自由基攻擊細胞膜，使肝臟產生脂質過氧化，脂質過氧化有多種產物，其中以 malondialdehyde (MDA)最容易定量 (McGregor and Lang, 1996)，在實驗中發現，ABEE 能夠降低四氯化碳所誘導的脂質過氧化程度 (Fig. 3)，顯示 ABEE 能降低自由基的傷害。

過去研究發現，大鼠給予四氯化碳誘導肝纖維化模式中，其血清中有大量 LPS 存在，能經由 LPS 途徑活化庫氏細胞(Qiu et al., 2005)。LPS 會透過腸道進入肝臟血流中，與 LBP 在血漿中結合，形成 LPS/LBP 複合體，進一步與庫氏細胞膜上的 CD14 結合，進而轉移並結合到 Toll-like receptor-4 (TLR-4)，最後才將訊息傳入細胞內，刺激發炎因子如 superoxide radicals、TNF- α ，導致肝臟的傷害 (Wheeler, 2003)。之前研究指出四氯化碳會活化庫氏細胞並釋出 TNF- α ，在肝臟或血清中都可發現 TNF- α 升高 (DeCicco et al., 1998)。庫氏細胞被外來物刺激活化後，其型態會有改變，實驗上，CD68 經常被用來標

定巨噬細胞活化的表徵 (Roberts et al., 2007 ; Szabo et al., 2007)。本實驗發現 ABEE 能降低 LBP、CD14、CD68、TNF- α 的 mRNA 的表現量(Fig. 11)，免疫組織染色也證實 ABEE 能夠降低四氯化碳所誘導 CD14 及 CD68 的表現(Fig. 8、9)，這些結果證實 ABEE 能夠降低四氯化碳誘導巨噬細胞的活化，降低發炎的反應。

庫氏細胞面對外來毒物會釋出 TNF- α 、IL-10 等細胞激素，造成細胞損傷 (Su, 2002)。而 TNF- α 也會藉由活化庫氏細胞，因而刺激細胞激素及 iNOS 的生成 (Morio et al., 2001)。在四氯化碳誘導肝臟損傷模式中，INF- γ 會上升。在 INF- γ 基因剔除小鼠也發現，對由四氯化碳誘導的肝損傷情況有減緩的效果 (Horn et al., 2000 ; Neubauer et al., 2008)。IL-10 為抗發炎因子，抗發炎機轉主要藉由抑制 Th1 細胞產生 INF- γ ，達到抗發炎作用 (Wang et al., 1998)，有文獻指出，在四氯化碳誘導下，大鼠肝臟的 IL-10 表現顯著增加 (Yu et al., 2004)。本實驗結果顯示四氯化碳誘導八週模式中，四氯化碳會誘導 IL-10、INF- γ 的增加，ABEE 能夠降低四氯化碳誘導肝臟的 IL-10、INF- γ 含量的增加(Fig. 4、5)，在大鼠分離的巨噬細胞實驗中，也發現 ABEE 能夠降低 LPS 所誘發 NO 及 TNF- α 的釋出(Fig. 14、15)。根據這些結果可推論，四氯化碳誘導小鼠肝炎模式中，ABEE 能夠降低發炎反應，

四氯化碳誘發肝臟發炎，進而活化星狀細胞，促使細胞外基質堆

積，造成膠原纖維的增生，以第一型的量為最多，而活化態的星狀細胞骨架蛋白，主要是 α -SMA， α -SMA 是所有活化態星狀細胞都會表現，視為星狀細胞活化程度的重要指標 (Geerts et al., 1991; Geesin et al., 1991)。在本實驗，ABEE 能夠降低 α -SMA 及第一型膠原蛋白的 mRNA 表現(Fig. 12)，且在免疫組織染色的結果也顯示 ABEE 能夠降低四氯化碳誘導 α -SMA 之表現 (Fig. 10)，證實 ABEE 能夠抑制星狀細胞活化因而減緩纖維化的堆積。

由大鼠肝臟分離出初代庫氏細胞，ABEE 明顯抑制 LPS 誘發初代庫氏細胞 NO 的產生。另外，在小鼠的實驗，ABEE 能降低肝臟 LBP 的 mRNA 表現。這些結果說明了 ABEE 能抑制四氯化碳誘發小鼠肝炎的機轉，部分是直接抑制庫氏細胞活化。除此之外，也能經由降低腸道 LPS 進入肝臟，減輕肝臟發炎。

Table 1. Oligonucleotide sequences used in RT-PCR

mRNA	Sequence	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)	Cycle
LBP	F:ACCCTTGACCTGGACTTGAC R:ACAGTGCCCGCTCTTAAAGT	127 bp	56	35
CD14	F:CCTAGTCGGATTCTATTCGGAGCC R:AACTTGGAGGGTTCGGGAAGTTG	375 bp	58	38
CD68	F:ATGGACAGCTTACCTTTGGATTCA R: TGCCTGTGGGAAGGACACAT	98 bp	54	40
TNF- α	F:CTCAGCGAGGACAGCAAGG R:AGGGACAGAACCTGCCTGG	108 bp	57	40
Collagen I(α 1)	F:GGTCCCAAAGGTGCTGATGG R:GACCAGCCTCACCACGGTCT	174 bp	64	35
α -SMA	F:CTGCTCTGCCTCTAGCACAC R:TTAAGGGTAGCACATGTCTG	138 bp	56	40
GAPDH	F: TGTGTCCGTCGTGGATCTGA R: CCTGCTTCACCACCTTCTTGA	76 bp		

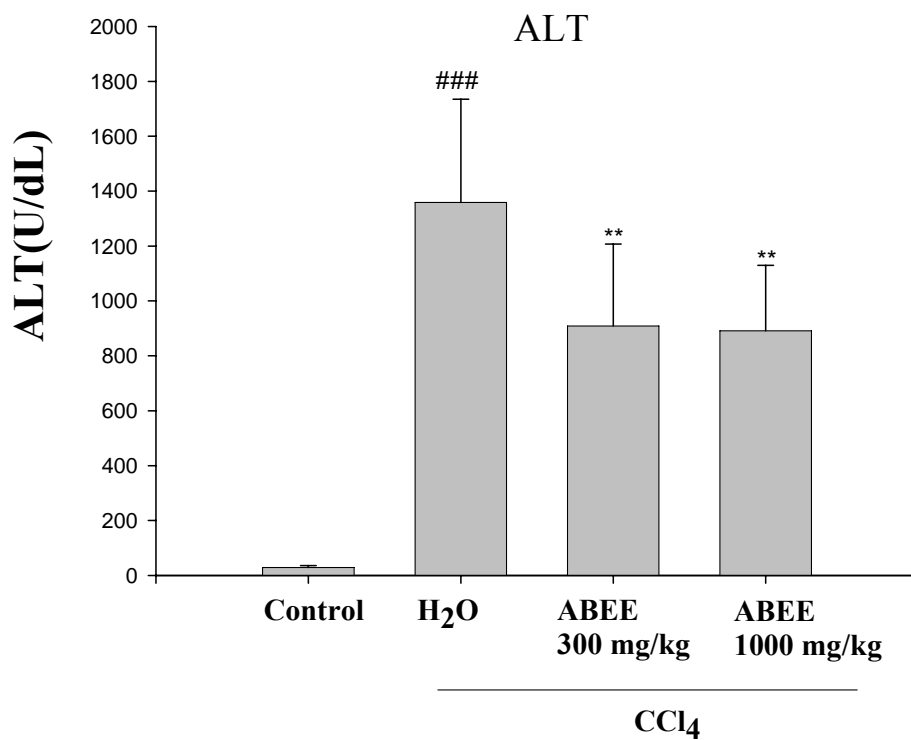


Fig. 1. Effect of ABEE on the activity of plasma ALT in CCl₄-treated mice.

All values are means \pm S.D. (n=6-8). ### P < 0.001 compared with control group. **P < 0.01 compared with CCl₄ + H₂O group.

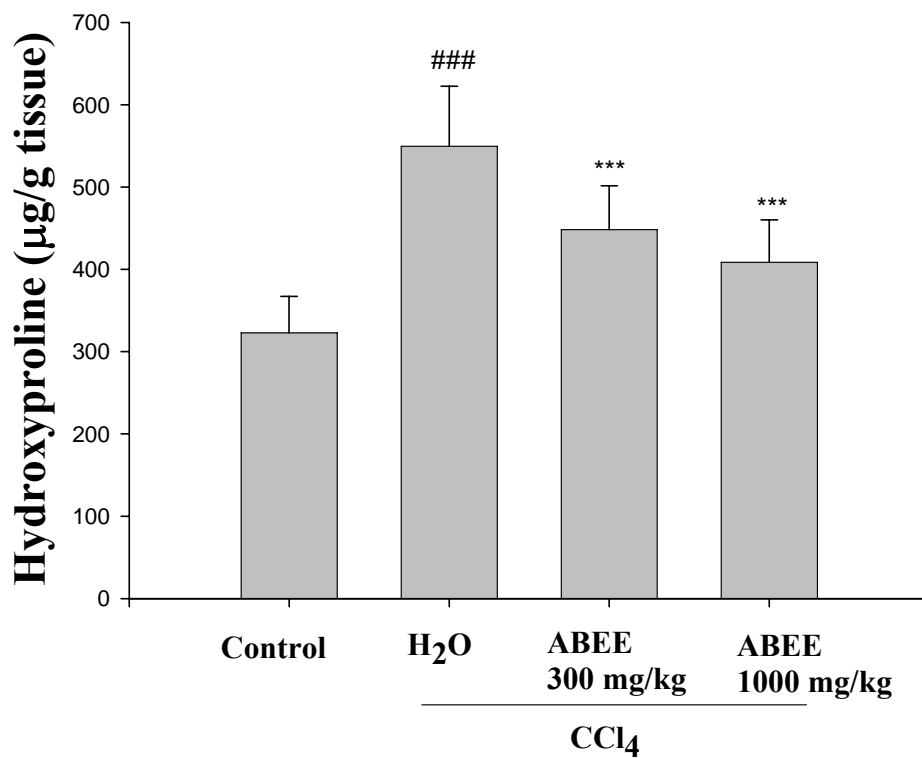


Fig. 2. Effect of ABEE on hepatic hydroxyproline in CCl₄-treated mice.

All values are means \pm S.D. (n= 6-8). ### P < 0.001 compared with control group. ***P < 0.001 compared with CCl₄ + H₂O group

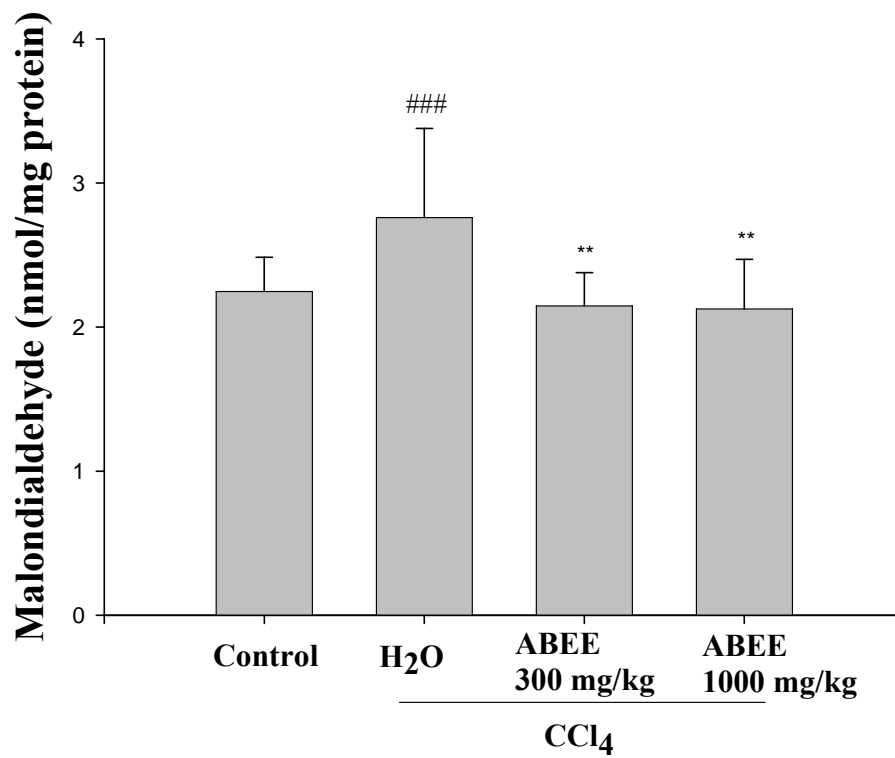


Fig. 3. Effect of ABEE on hepatic lipid peroxidation in CCl₄-treated mice.

All values are means \pm S.D. (n= 6-8). ^{###} P < 0.001 compared with control group. ^{**}P < 0.01 compared with CCl₄ + H₂O group

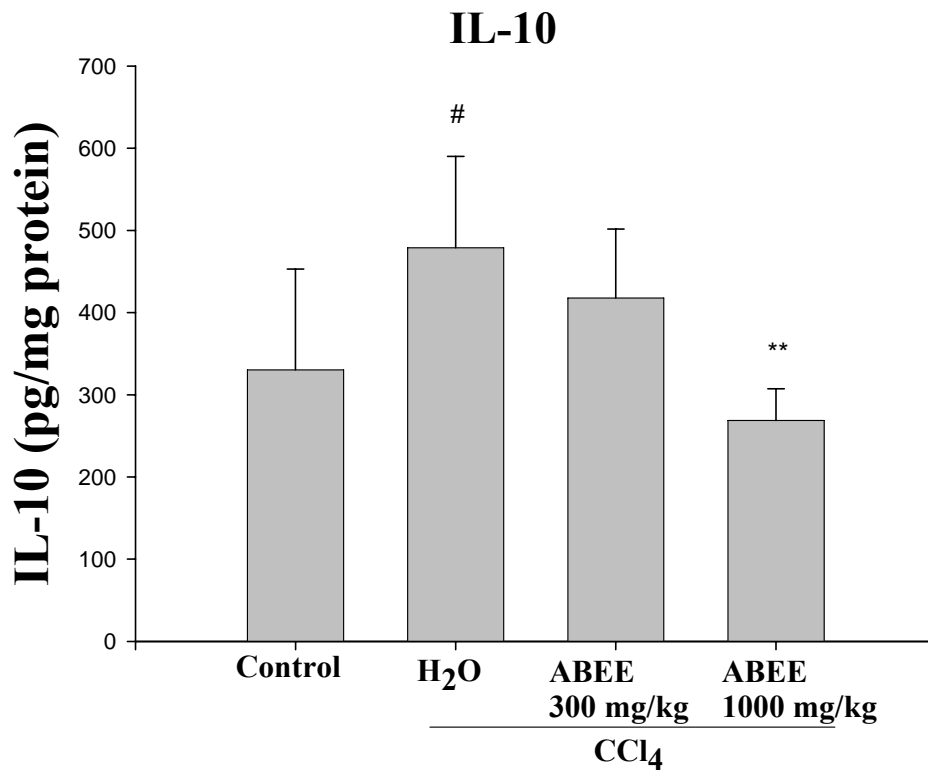


Fig. 4. Effect of ABEE on hepatic content of IL-10 in CCl₄-treated mice. All values are means \pm S.D. (n= 6-8). # P < 0.05 compared with control group. **P < 0.01 compared with CCl₄ + H₂O group.

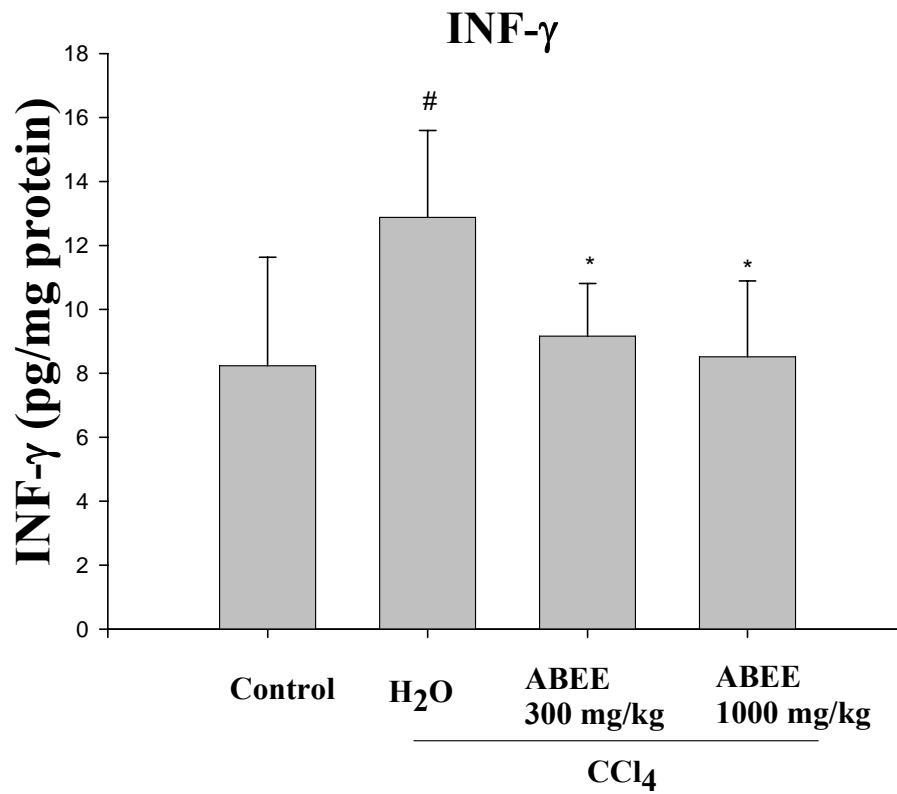


Fig. 5. Effect of ABEE on hepatic content of INF γ in CCl₄-treated mice.

All values are means \pm S.D. (n= 6-8). # P < 0.05 compared with control group. *P < 0.05 compared with CCl₄+ H₂O group.

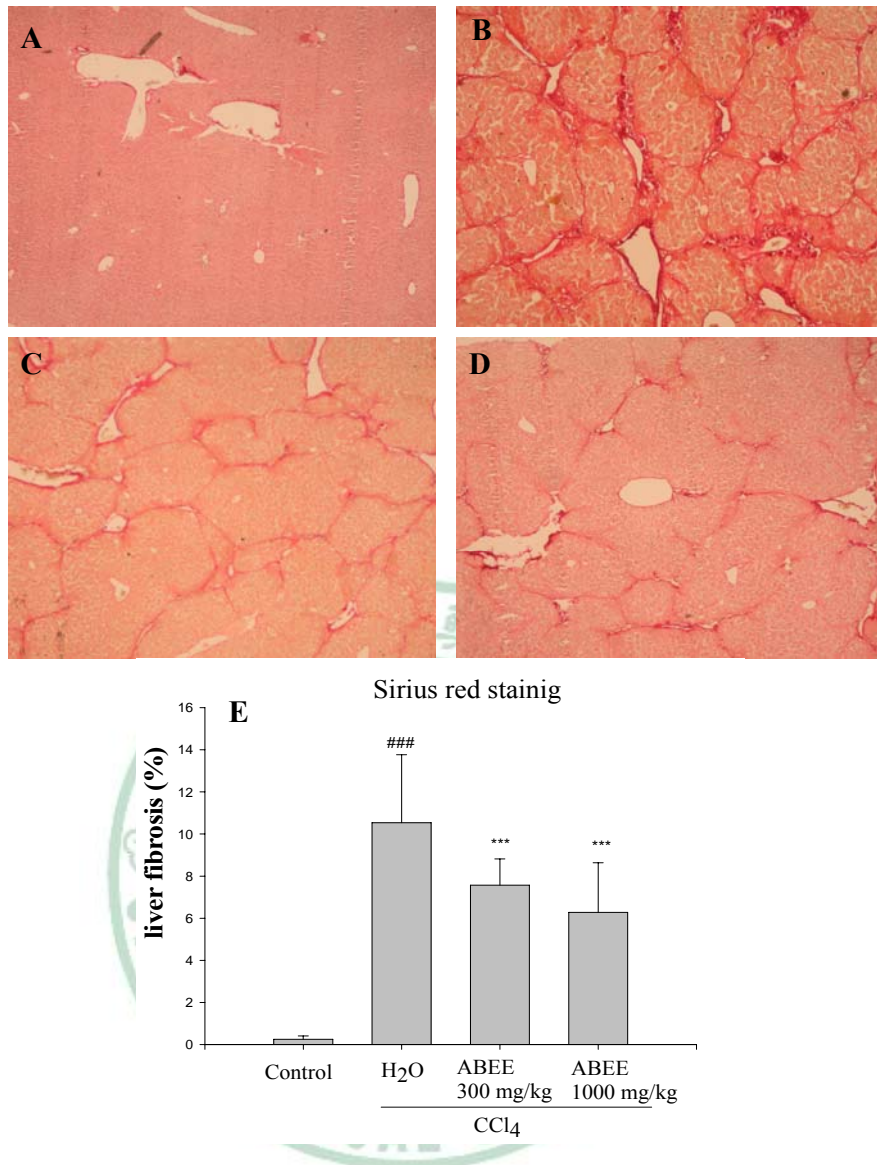


Fig. 6. Histologic analysis of liver fibrosis (Sirius red staining). (A) control group; (B) CCl₄+ H₂O group, showing micronodular formation and complete interconnection of septa with each other; (C) CCl₄+ABEE 300 mg/kg group; (D) CCl₄+ABEE 1000 mg/kg group.(100X); (E) Histogram representing image-quantitation of the mean percentage collagen fibers/total slide area. All values are means ± S.D. (n= 6-8). ###P < 0.001 compared with control group. ***P < 0.001 compared with CCl₄ + H₂O group.

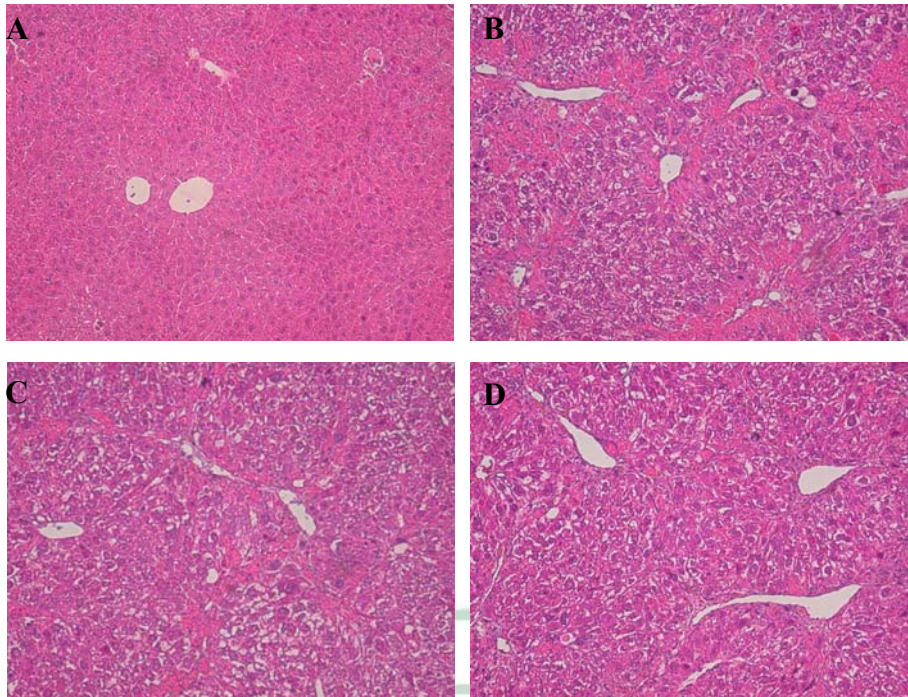


Fig. 7. Histologic analysis of liver section (hematoxylin-eosin stain).
(A) control group; (B) CCl₄ + H₂O group, showing inflammatory cell infiltration and necrosis; (C) CCl₄+ABEE 300 mg/kg group; (D) CCl₄+ABEE 1000 mg/kg group. (100X)

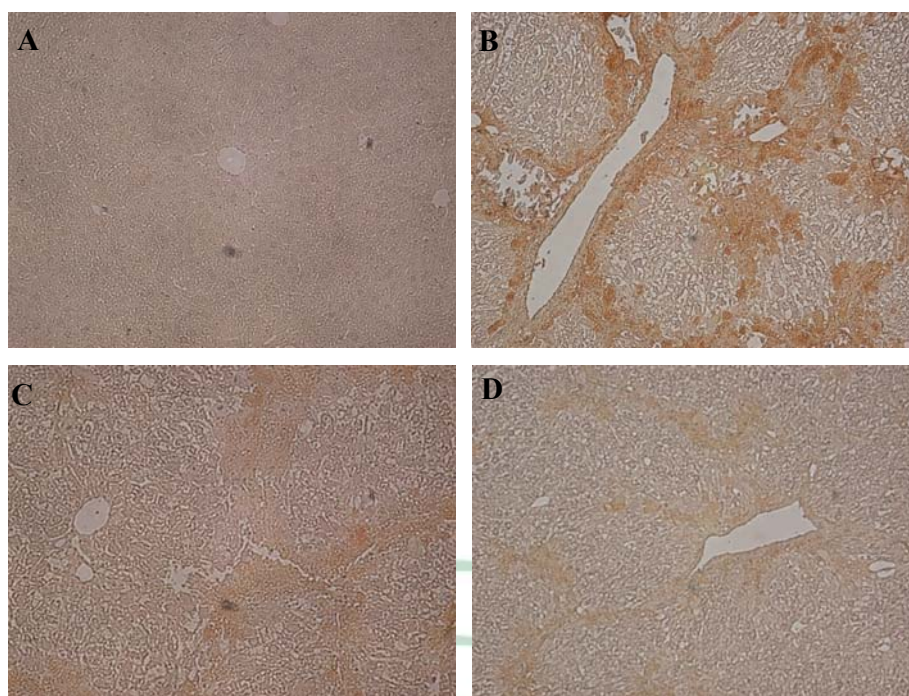


Fig. 8. Immunostaining of CD14 in the liver section.

(A) control group; (B) CCl₄ + H₂O group, CD14 positive cells expressing;
(C) CCl₄+ABEE 300 mg/kg group; (D) CCl₄+ABEE 1000 mg/kg
group.(100X)

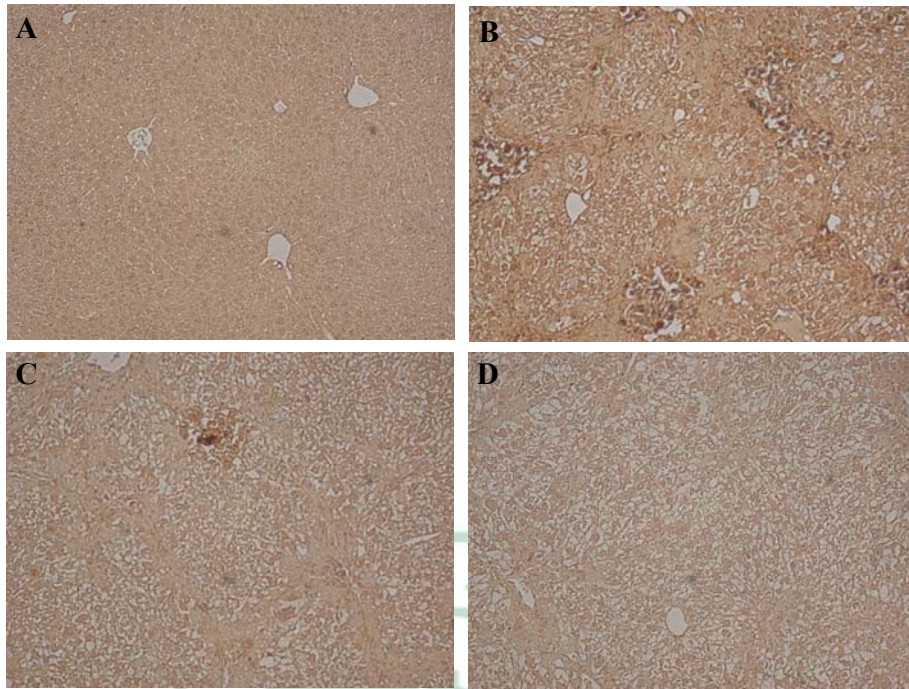


Fig. 9. Immunostaining of CD68 in the liver section.

(A) control group; (B) CCl₄ + H₂O group, CD68 positive cells expressing;
(C) CCl₄+ABEE 300 mg/kg group; (D) CCl₄+ABEE 1000 mg/kg
group.(100X)

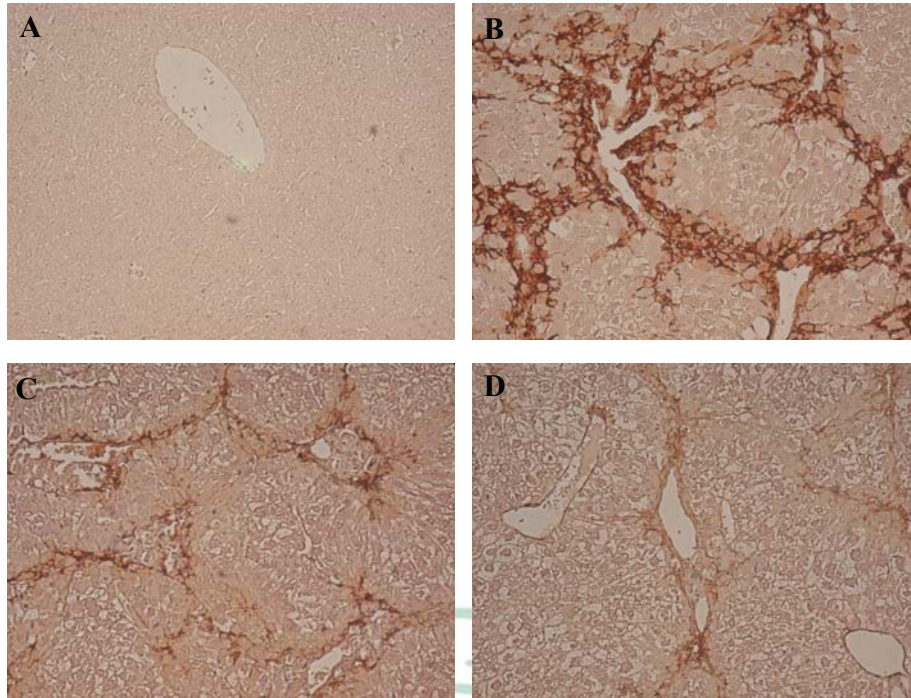


Fig. 10. Immunostaining of α -SMA in the liver section.

(A) control group; (B) $\text{CCl}_4 + \text{H}_2\text{O}$ group, α -SMA positive cells expressing; (C) $\text{CCl}_4 + \text{ABEE}$ 300 mg/kg group; (D) $\text{CCl}_4 + \text{ABEE}$ 1000 mg/kg group.(100X)

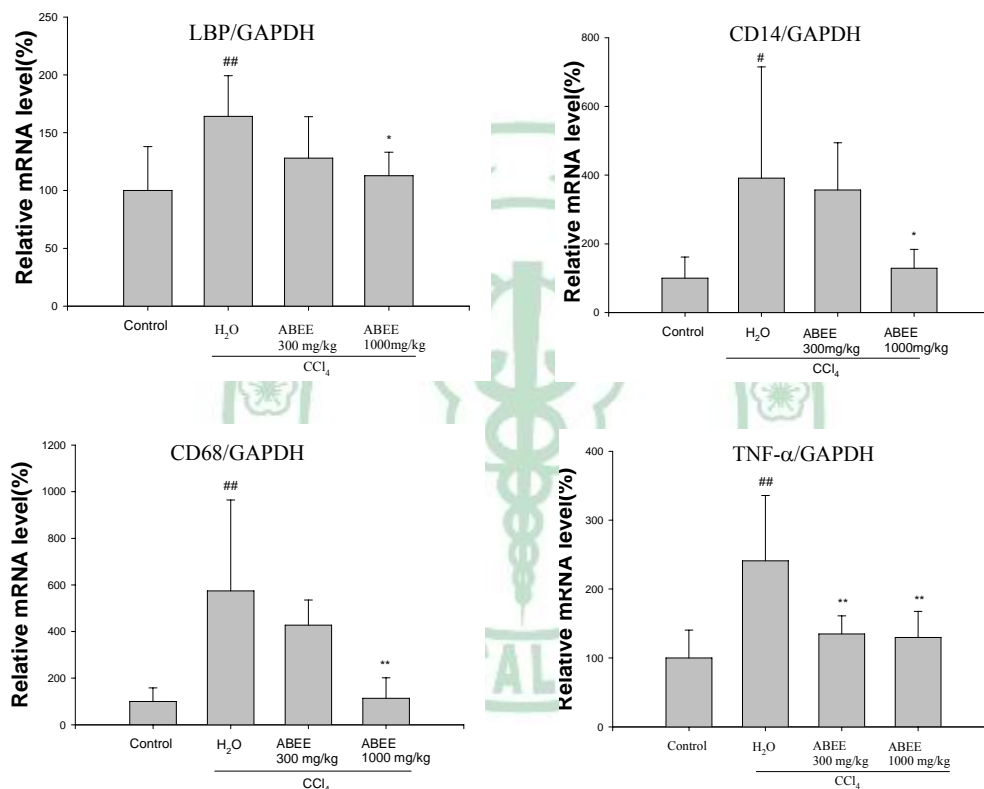
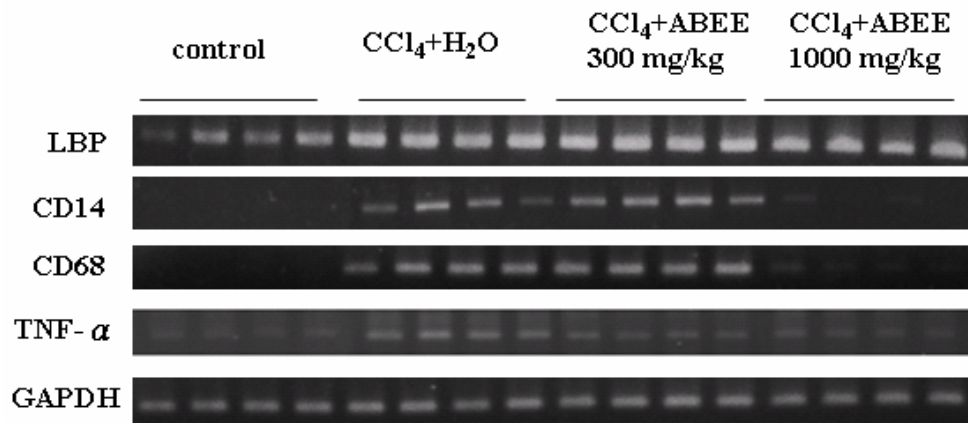


Fig. 11. Effect of ABEE on hepatic mRNA expression of LBP, CD14, TNF- α and CD68 in CCl₄-treated mice.

All values are means \pm S.D. (n = 6-8). ^{###} P < 0.001, [#] P < 0.05 compared with control group. ^{**} P < 0.01, ^{*} P < 0.05 compared with CCl₄+H₂O group.

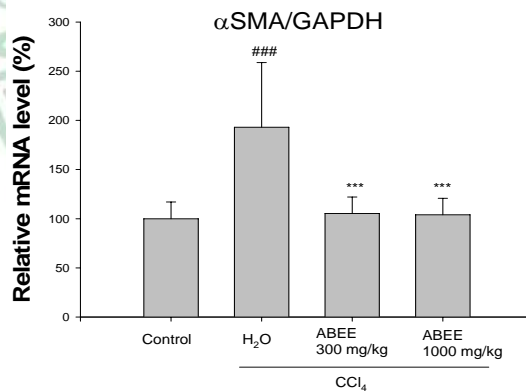
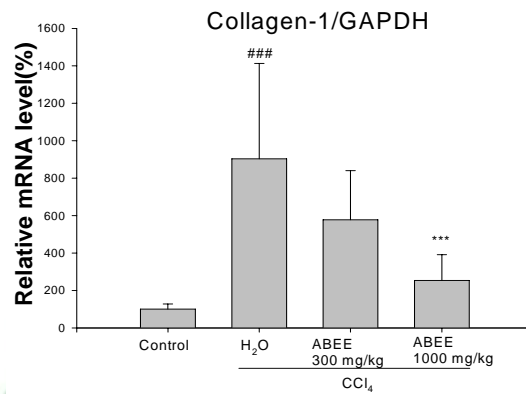
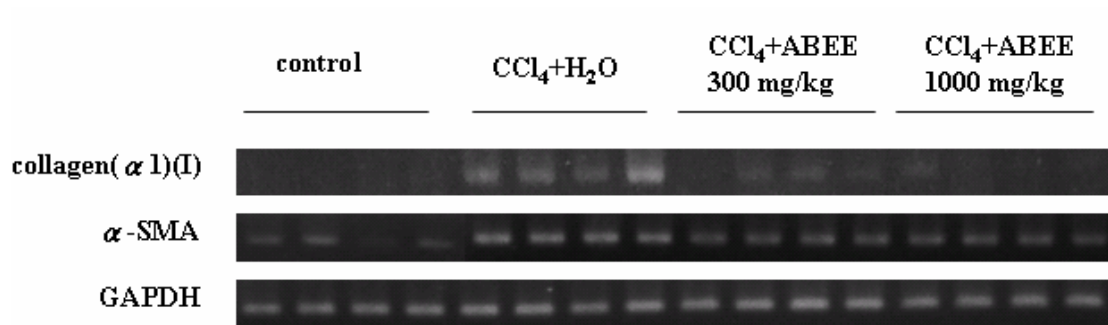


Fig. 12. Effect of ABEE on hepatic mRNA expression of collagen (α1)(I), and α-SMA in CCl₄-treated mice.

All values are means ± S.D. (n = 6-8). ^{###} P < 0.001 compared with control group. ^{***} P < 0.001 compared with CCl₄+H₂O group.

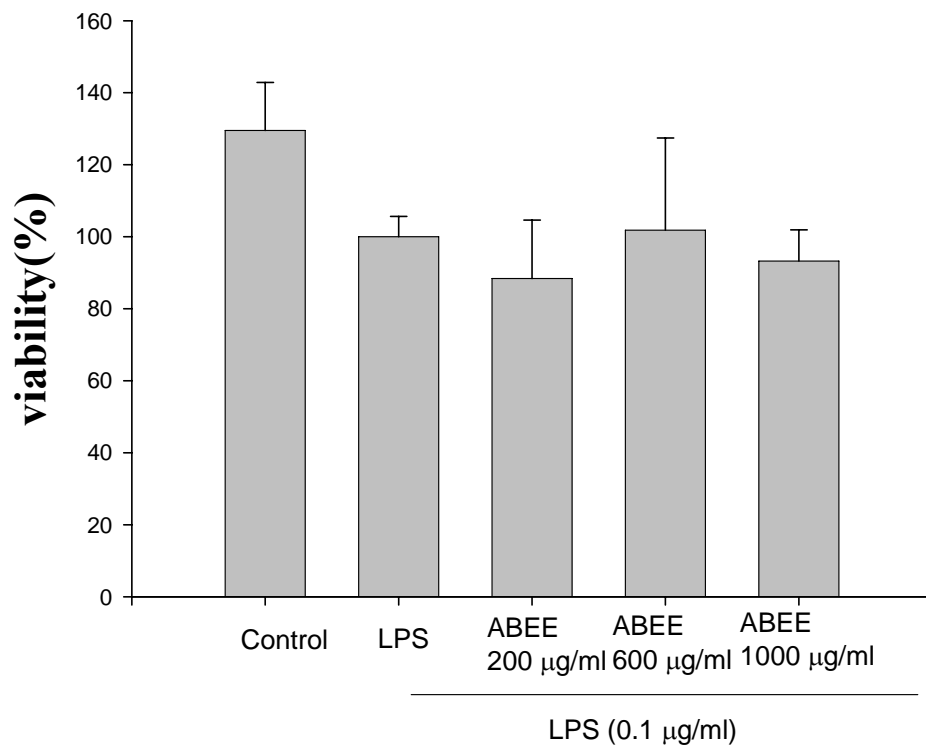
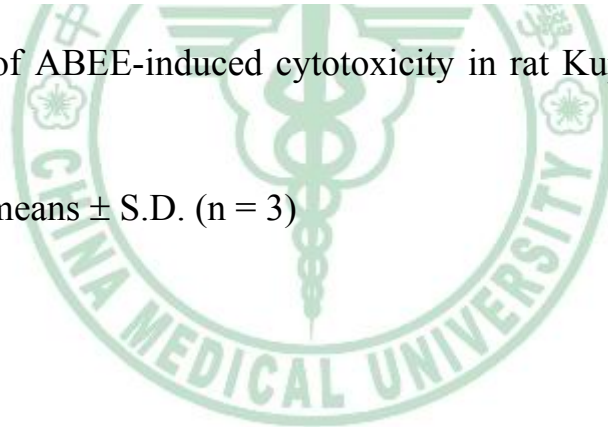


Fig.13. Effect of ABEE-induced cytotoxicity in rat Kupffer cells treated with LPS.

All values are means \pm S.D. (n = 3)



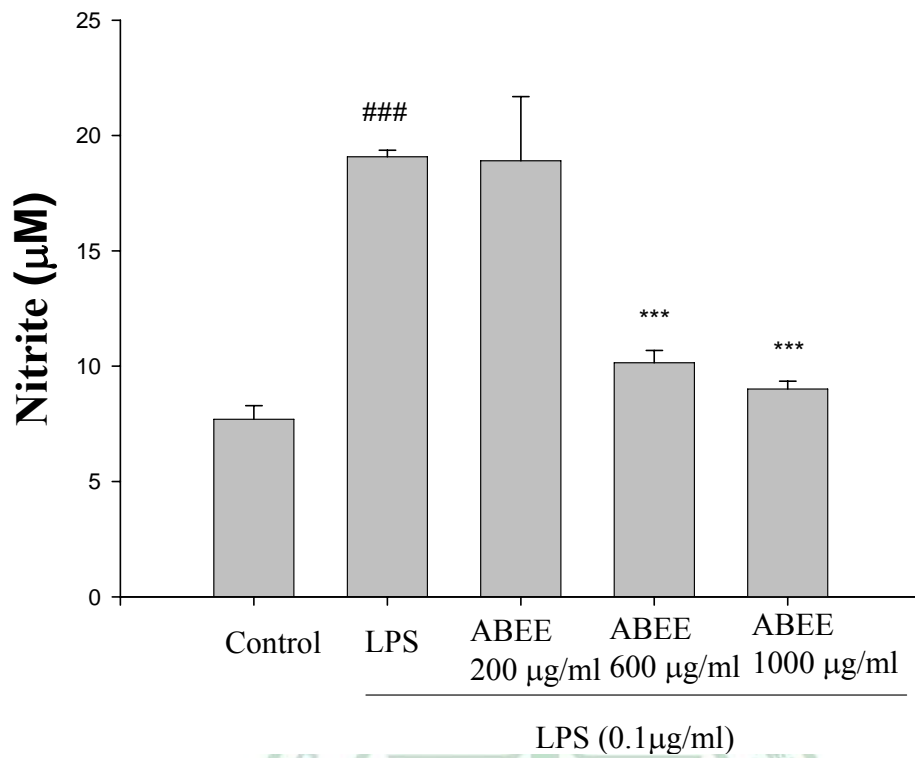


Fig.14. Effect of ABEE on LPS-induced production of NO in rat Kupffer cells.

All values are means \pm S.D. (n = 3). ### P < 0.001 compared with control group. ***P < 0.001 compared with LPS group.

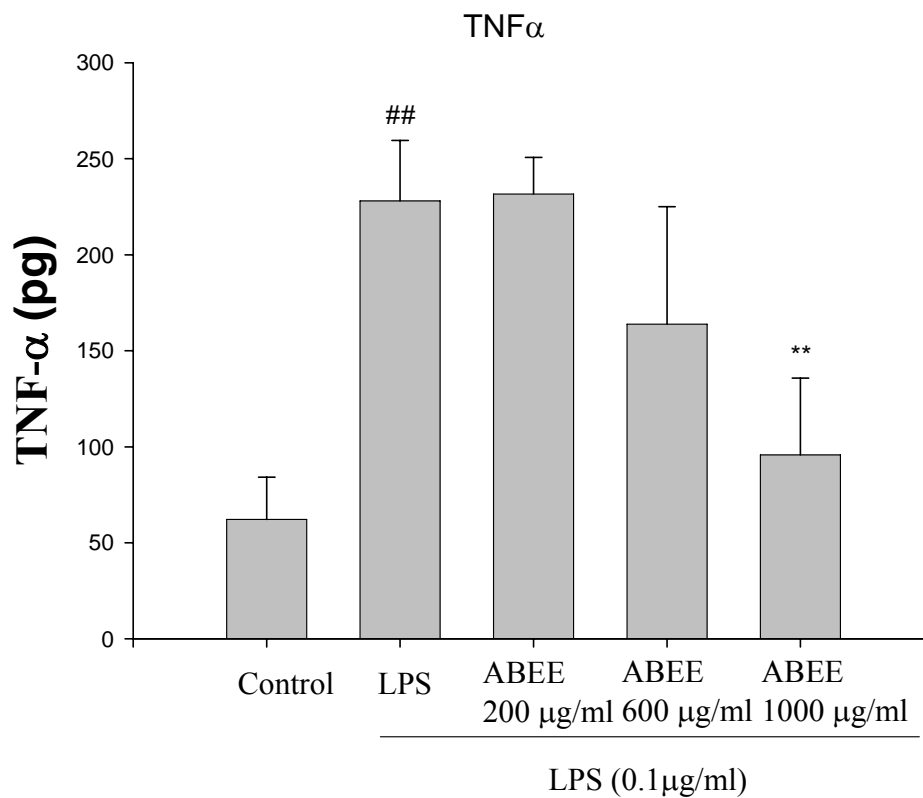


Fig.15. Effect of ABEE on LPS-induced production of TNF- α in rat Kupffer cells.

All values are means \pm S.D. (n=3). ### P < 0.01 compared with control group. **P < 0.01 compared with LPS group.

第三章 散血草抑制脂多糖誘發小鼠巨噬細胞株活化

前言

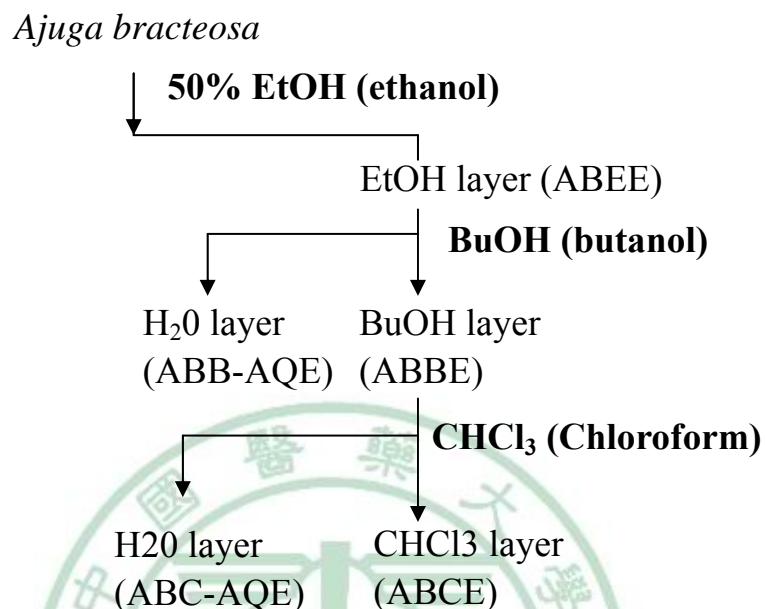
在第二章實驗中，顯示散血草能夠經由抑制庫氏細胞活化，降低發炎反應，進而減緩星狀細胞所導致的肝臟纖維化。因此，進一步使用小鼠巨噬細胞株 RAW264.7，探討散血草抑制 LPS 誘發發炎反應所經由的途徑。許多研究已證實 LPS 可活化許多訊息的傳遞主要有 NF- κ B pathway 及 MAPK pathway (Mi Jeong et al. 2009, Kim et al. 2007b, Kim et al. 2007a)，因此，本章研究目的主要探討此兩條路徑之作用機轉。

材料與方法

一、散血草分層萃出物的製備

萃出物之順序如圖三所示，將前章製備的散血草水萃液 700 ml (400 公克) 以下簡稱為 ABEE，以適量正丁醇(butanol)分層兩次，正丁醇層及水層分別減壓濃縮，得正丁醇層 87 公克，水層 305 公克，以下簡稱為 ABBE 及 ABB-AQE。取正丁醇萃出物 50 公克複溶於水，以氯仿(chloroform) 進行分層兩次，氯仿層及水層分別減壓濃縮，得氯仿層 13.5 公克(ABCE)，水層 35 公克，以下簡稱為 ABCE 及

ABC-AQE。於實驗時，不同分層的萃出物溶於適量的 dimethyl sulfoxide (DMSO)



圖三、散血草分層製備流程

二、藥品試劑

編號	名稱	廠牌
1.	Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)	HyClone
2.	MTS	Promega
3.	Lipopolysaccharides (Escherichia coli serotype 0128-B12)	Sigma-Aldrich
4.	Griess Reagent	Sigma-Aldrich
5.	Coomassie blue dye	Sigma-Aldrich

6.	SDS	Amresco
7.	40% Acrylamide	Amresco
8.	Tris base	Sigma-Aldrich
9.	APS(ammonium persulfate)	Amresco
10.	TEMED	Amresco
11.	Tween 20	Sigma-Aldrich
12.	ECL reagent	Invitrogen
13.	Sodium chloride	Amresco
14.	iNOS	Abcam
15.	p-I κ B	Cell signaling
16.	I κ B	Cell signaling
17.	NF- κ B p65	Cell signaling
18.	NF- κ B p50	Santa cruz
19.	PCNA	Santa cruz
20.	pp38	Abcam
21.	p38	Abcam
22.	p-ERK	Santa cruz
23.	ERK	Abcam
24.	p-JNK	Abcam
25.	JNK	Abcam
26.	α -tubulin	Abcam
27.	Anti-rabbit	Santa cruz
28.	Anti-goat	Santa cruz
29.	Anti-mouse	Santa cruz

30.	PD98059 (ERK)、SB203580(JNK)、 SP600125 (P38) (MAPK inhibitor)	Sigma-Aldrich
-----	--	---------------

三、儀器設備

編號	名稱	廠牌
1.	Spectrophotometer	Hitachi
2	AlphaDigDocTM (影像擷取與分析系統)	Alpha Innotech Coporation
3.	CoBAS MIRA PLUS (生化儀)	Roche
4.	KUBOTA 3500 (離心機)	KUBOTA
5.	TOA pH meter HM-5S	TOA Electronics
6.	Microplate Reader Model 550	Bio-RAD
7.	Electronic balance AB104	Mettler toledo

四、細胞培養與繼代培養

將 RAW 264.7 培養於 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培養液中，內含 10% 胎牛血清、100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin 和 0.25 µg/ml amphotericin。培養環境以 37°C，5% CO₂ 培養。細胞約 2-3 天繼代一次，將培養皿中舊的培養液吸掉，以

PBS 清洗一次，再用培養液將細胞沖洗下來，置於 15 ml 離心管中，於室溫下 300g 離心 5 分鐘，留下沉澱物，加入適量培養液將細胞均勻打散，細胞計數後，將 1×10^6 細胞加入新鮮的培養液於 10 公分培養皿中，置於 37°C ，5% CO_2 培養。

五、一氧化氮測定(Nitric Oxide Assay)

(一) 原理

一氧化氮(NO)是一種滲透性的氣體，由精胺酸 (L-arginine) 受到 NOs 作用所產生。當不穩定的 NO 產生時，迅速的在組織中會氧化成穩定的產物亞硝酸 (nitrite) 或硝酸 (nitrate)，可利用 Griess reagent 進行呈色反應反應，其原理是 Nitrite 會和 Aromatic Amine Sufanilamide 在 Acid form 下形成 Diazonium Salt，再與 3-Hydroxy-1.2.3.4-Tetrahydro-7.8-Benzoquinoline 形成紅色的 AZO Dye。

(二) 實驗步驟

將 RAW 264.7 細胞種於 96 孔盤中，每孔 100 μl 控制細胞濃度 1×10^4 ，加入散血草不同分層萃取物 30 分鐘後，再加入刺激劑 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)，於 37°C ，5% CO_2 培養箱中培養 24 小時後，取出上清液 50 μl 加入 Griess reagent 等體積溶液呈色後，以 540 nm 測吸光值，定量亞硝酸根離子(Nitrite)，並計算濃度。

另外，將庫氏細胞種於 96 孔盤中，每孔 100 μl 培養液控制細胞數目 3×10^5 ，加入不同濃度的 ABCE (25-100 $\mu\text{g/ml}$) 培養 1 小時後，加入刺激物 LPS (0.1 $\mu\text{g/ml}$)，於 37°C，5% CO_2 培養箱中培養 48 小時後，取出上清液 50 μl 加入 Griess reagent 等體積溶液呈色後，以 540 nm 測吸光值，定量亞硝酸根離子，並計算濃度。

六、MTS 分析 (Cell viability assay)：

(一) 原理

MTS 分析是一種檢測細胞存活和生長的方法，化學名為 [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulphophenyl)-2H-Tetrazolium]。是依據活細胞粒線體內的琥珀酸脫氫酶 (succinate dehydrogenase) 會與 MTS 反應，將 MTS 中的 tetrazolium salt 還原為暗紫色 formazan，顏色會由淡黃色變成暗紫；而死細胞的粒線體不具此功能。利用此特性，以酵素免疫自動分析儀 (ELISA reader) 於波長 492 nm 讀取吸光值，細胞的存活率與吸光值成正比。

(二) 實驗步驟

將每孔上清液吸乾後，加入 100 μl 培養液，再加入 20 $\mu\text{l/well}$ [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulphophenyl)-2H-Tetrazolium] (MTS) 試劑，靜置 1-2 小時。以波長 490 nm 測定吸光值，計算細胞的存活率 (Cell viability)。存活率 (%) = (試驗組吸光值 / 對照組吸光值) \times 100%。

七、細胞激素測定

(一) RAW 264.7 細胞激素測定

將 RAW 264.7 細胞種於 96 孔盤中，每孔 100 μl 控制細胞濃度 1×10^4 ，加入 ABCE 30 分鐘後，再加入刺激劑 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)，於 37°C ，5% CO_2 培養箱中培養 24 小時後，取出細胞上清液，將其 10 倍稀釋，均勻震盪後取出 100 μl 加入預先 coating 及 blocking 的 96 孔盤中，置於室溫 2 小時，再以 PBS-T 清洗 3-5 次，再加入 detection antibody，置於室溫 1 小時，接著以 PBS-T 清洗 3-5 次，加入 HRP，室溫作用 30 分鐘，再以 PBS-T 清洗後，加入 Substrate，置於室溫 15 分鐘，使其呈色，最後加入 H_2SO_4 終止反應，呈現黃色，再以 ELISA reader 偵測 OD 450 nm 吸光值。濃度以標準曲線求得之。

(二) 大鼠庫氏細胞胞激素測定

將 Kupffer 細胞種於 96 孔盤中，每孔 100 μl 培養液控制細胞數目 3×10^5 ，加入不同濃度的 ABCE (25-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 培養 1 小時後，加入刺激物 LPS (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)，於 37°C ，5% CO_2 培養箱中培養 48 小時後，將細胞上清液保存，將其稀釋 5 倍測定 TNF- α 含量，採用 ELISA kit 分析，步驟如前所述。

八、西方墨點法(Western blotting)

(一) 蛋白質萃取

將RAW 264.7 巨噬細胞株以 1×10^6 細胞種於6公分培養皿培養，放置隔夜後，加入不同濃度的氣仿層散血草萃取液或已知的抑制劑 (curcumin,PD98059,SB203580,SP600125)，處理30分鐘後，加入LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)，依據蛋白表現的時間不同，予以不同時間的培養。培養時間終止時，吸除培養液，並用PBS洗滌，接著加入適量的冰PBS在dish，將細胞刮下，置於微量離心管中，在 $300 \times g$ 4°C 離心10分鐘，移除上清液，沉澱物加入200 μl 低張緩衝液(Hypotonic Buffer，配方如表二所示)，均勻打散後，置於冰上15分鐘，期間反覆搖晃數次，接著在加入10 μl 10% NP-40均勻混合，以 $6000 \times g$ 4°C 離心10分鐘，上清液留於微量離心試管保存，此部分為細胞質萃取液，而沉澱物即為細胞核，沉澱物加入適量萃取緩衝液(Extraction Buffer，配方如表二所示)，使其均勻分散，並劇烈震盪15秒，置於冰上15分鐘，此步驟反覆四次，再於 $12000 \times g$ 4°C 離心10分鐘，其上清液即為核內萃取液。

表二、蛋白萃取緩衝液配方

Hypotonic buffer	Extraction buffer
10 mM HEPES pH 7.9	20 mM HEPES pH 7.9
10 mM KCl	400mM NaCl
0.1 mM EDTA	1 mM EDTA
0.1 mM EGTA	1 mM EGTA
1 mM dithiothreitol	1 mM dithiothreitol
1 mM PMSF	1 mM PMSF
1 mM NaF	1 mM NaF
1 mM Na ₃ VO ₄	1 mM Na ₃ VO ₄

(二) 蛋白質定量

以 albumin 作為蛋白質標準品，依序稀釋，將 Bradford 試劑加入 100 μ l，以波長 595nm 測定吸光值，求出標準曲線，而蛋白質樣本即以此曲線進行濃度定量。

(三) 蛋白質電泳 (SDS-PAGE)

下膠採用 10% separating gel，上膠採用 3% stacking gel，蛋白質樣本以 100°C 加熱 5-10 分鐘後，置於冰上，隨後將樣本和 maker 分別注入以樣本槽中，以 125 伏特進行電泳約 1 小時。

(四) 轉印(transfer)

以 50 伏特電壓轉印 1 小時後，將凝膠片蛋白質以濕式法 transfer 至 PVDF 膜，將轉印完成之 PVDF 膜浸泡於 5% 脫脂奶，於室溫下 1 小時或放置隔夜，以阻斷非特異性反應，之後以 Tris-buffered

saline-Tween 20 (TBS-T)清洗數次，之後以一級抗體於室溫下反應 2 小時或 4°C 放置隔夜，以 TBS-T 清洗數次，再加入相對應之二級抗體，於室溫下反應 1 小時，以 TBS-T 清洗後，進行壓片。將 PVDF 膜浸泡於冷光試劑中，以底片進行感光，感光時間依蛋白樣本而定，之後放於顯影劑中顯影約 1-2 分鐘，清水沖洗後，再放入定影劑中 3 分鐘，清水洗淨後即可。底片待乾後，以影像分析軟體分析，評估組間的差距。

九、統計方法

數據結果以平均值(mean)±標準差(Standard deviation, SD)表示，各組與對照組間的數據，以單因子變異數分析(One-way ANOVA)方法分析，並進行 Dunnett 測試，以 P 值小於 0.05 表示在統計學上具有顯著差異。

結果

一、LPS 對細胞的毒性測試

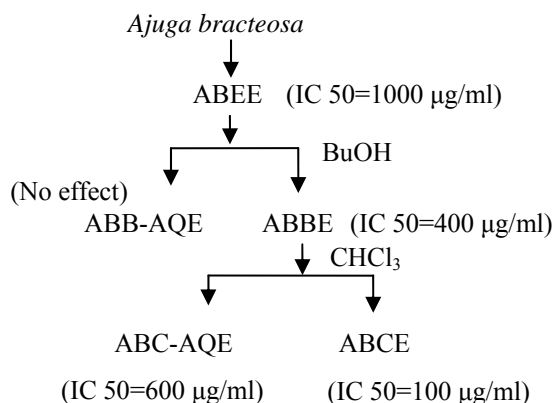
RAW 264.7 巨噬細胞珠，加入不同濃度的 LPS (0.1-1μg/ml)，分別培養不同的時間(12、24、48、72 小時)，結果顯示 LPS 不會影響細胞的存活(Fig. 16)。

二、LPS 誘導 NO 生成之影響

RAW 264.7 巨噬細胞株，加入不同濃度的 LPS (0.1-1 $\mu\text{g/ml}$)，分別培養不同的時間(12、24、48、72 小時)，結果顯示 NO 產生量以 24 小時達到高峰，並以 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS 的濃度最為顯著，故後續之實驗就以此條件下進行 (Fig.17)。

三、散血草萃取物對 LPS 誘導 NO 生成之影響

RAW 264.7 巨噬細胞加入 ABEE (200-1000 $\mu\text{g/ml}$)前處理 30 分鐘後，之後再加入 LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 培養 24 小時後，收集細胞上清液測定 NO 值及細胞存活率，顯示 IC₅₀ (抑制 50% NO 的產生)濃度約為 1000 $\mu\text{g/ml}$ ，且不會造成細胞的死亡 (Table 2)。ABBE 的 IC₅₀ 為 400 $\mu\text{g/ml}$ ，對細胞也沒有傷害，ABB-AQE 在濃度 200-1000 $\mu\text{g/ml}$ 都沒有抑制 NO 效果(Table 3)。ABCE 的 IC₅₀ 約為 100 $\mu\text{g/ml}$ ，ABC-AQE 的 IC₅₀ 為 600 $\mu\text{g/ml}$ (Table 4)。MTS 的試驗顯示這些不同的萃出物在實驗條件下對細胞沒有毒性作用(Table 3、4)。



將大鼠庫氏細胞，96 孔盤分別加入 LPS 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或前處理 1 小時 ABCE，待 48 小時後，結果顯示 LPS 可誘發 NO 的增加，ABCE 具濃度(25-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)依存性抑制 NO 的釋出(Fig. 18)。

四、細胞激素含量

RAW 264.7 巨噬細胞加入 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 經 24 小時後，取細胞上清液測試 IL-6 及 TNF- α 濃度。LPS 組別 IL-6 及 TNF- α 表現和控制組比較是顯著升高。給予 ABCE 之組別，能降低 LPS 所誘導 IL-6 及 TNF- α 的釋出量 (Fig. 19、20)。另外，在庫氏細胞培養的 TNF- α 含量測定，結果顯示 ABCE 具濃度 (25-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 依存性抑制 TNF- α 的釋出 (Fig. 21)。

五、ABCE 對 LPS 誘導 iNOS 蛋白表現之影響

RAW 264.7 巨噬細胞株，加入 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 培養 24 小時後，iNOS 蛋白表現量顯著增加，而加入不同濃度之 ABCE (25-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 前處理 30 分鐘後，可顯著抑制 iNOS 蛋白的表現量(Fig. 22)。

六、ABCE 對 LPS 誘導 I κ B α 蛋白表現之影響

RAW 264.7 巨噬細胞株，加入 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 培養 15 分鐘後，磷酸化 I κ B α 蛋白表現量顯著增加，而加入 ABCE (25-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 前處理 30 分鐘後，可顯著抑制 LPS 誘導磷酸化 I κ B α 蛋白的表現量，而非磷酸化 I κ B α 蛋白的表現量組別間無顯著差異，表示其磷酸化的降低，

並非 I κ B α 降解所導致(Fig. 23)。

七、ABCE 散血草對 LPS 誘導 NF- κ B 蛋白表現之影響

RAW 264.7 巨噬細胞株，加入 LPS 1 μ g/ml 培養 1 小時後，核內 NF- κ B p65/p50 蛋白表現量顯著增加，而加入不同濃度之 ABCE 具有抑制 I κ B α 降解的功能，進而抑制 NF- κ B 轉移到核內。ABCE (25-100 μ g/ml) 前處理後，可顯著抑制 LPS 誘導磷酸化 NF- κ B p65/p50 蛋白的表現量 (Fig. 24)。

八、散血草對 LPS 誘導 MAPK 蛋白表現之影響

RAW 264.7 巨噬細胞株，加入 LPS 1 μ g/ml 培養 15 分鐘後，磷酸化 ERK 1/2、JNK、P38 的蛋白表現量顯著增加，而加入不同濃度之 ABCE (25-100 μ g/ml)前處理 30 分鐘後，可顯著抑制 LPS 誘導磷酸化 I κ B α 蛋白的表現量，而非磷酸化 ERK、JNK、p38 蛋白的表現量組別間無顯著差異，表示其磷酸化的降低，並非非磷酸化 ERK、JNK、p38 蛋白降解所導致(Fig. 25)。總結來說，ABCE 具有抑制 MAPK 蛋白磷酸化的功能。

討論

本實驗主要是探討 ABCE 抑制 LPS 誘導 RAW264.7 巨噬細胞株產生 NO 的作用機轉。ABEE、ABBE、ABCE 及 ABC-AQE 抑制 LPS

誘發 RAW264.7 細胞產生 NO 的 IC₅₀ 分別約為 1000、400、50 及 600 μg/ml。以 ABCE 抑制效果顯著，因此後續實驗，作用機轉的探討使用 ABCE。

LPS 誘發 RAW 264.7 細胞株發炎反應中，細胞上清液中發炎有關的細胞激素 IL-6 及 TNF-α 的濃度有顯著增加情形，ABCE 的前處理可顯著降低 LPS 所誘發之細胞激素發炎反應(Fig.19、20)，且在 LPS 誘發大鼠庫氏細胞發炎反應，其上清液結果亦顯示 ABCE 具濃度 (25-100 μg/ml) 依存性抑制 NO 及 TNF-α 的釋出 (Fig.18、21)。證實 ABCE 能夠減緩 LPS 誘發之發炎反應。

許多研究指出 LPS 可活化 NF-κB pathway 及 MAPK pathway 的訊息傳遞促使下游發炎細胞激素如 IL-6 及 TNF-α 及 NOS 的釋出(Mi Jeong et al., 2009 ; Kim et al., 2007a ; Kim et al., 2007b)。

NF-κB 由不同次單元體組成，以 p65/p50 異二聚體形式最為常見，並具有強力的轉錄活性(Teng et al., 2006)。細胞在未受刺激下，細胞質中的 p65/p50 會和抑制其活性的 IκB 結合存在細胞質中。而 IκB 會阻擋 NF-κB 使其無法進入核內。若受到刺激活化後，IκBα 會被 IKK 磷酸化，接著 IκBα 被 26S proteasome 進行 Ubiquitination 作用而分解，使 NF-κB 與 IκB 結合分開，進而活化 NF-κB 異二聚體進入核內，影響下游基因的發炎或免疫反應(Makarov, 2000 ; Moynagh, 2005)。在本

實驗，ABCE 降低 LPS 所誘發的核內 p65/p50 表現，且 ABCE 能抑制細胞質 I κ B α 磷酸化 (Fig.23、24)，說明了 ABCE 能阻止 I κ B α 和 p65/p50 分開，因此抑制 LPS 誘發的發炎反應。

MAPK 是一種 serine-threonine 的 protein kinase，它具有接受外界刺激並調整生理反應的功能。MAPK 訊息傳遞途徑可分成三種，(a) ERK (extracellular signal-regulated kinase) 有 ERK 1/2、ERK 3/4、ERK 5、ERK 7/8，其中以 ERK 1/2 的途徑較清楚。(b) JNK (c-Jun NH₂ terminal kinases) 包含三種 isoforms，或稱 SAPK (stress-activated protein kinases)。(c) p38 有 α 、 β 、 γ 三種 (Jeffrey et al., 2007)。

ERK 主要是參與細胞的增殖、分化及調控細胞週期進行等；JNKs 主要是參與細胞凋亡、壓力及發炎反應等，而 p38 MAPK 其主要調控免疫、發炎反應及對細胞激素的影響等作用 (Johnson and Lapadat, 2002)。研究顯示 LPS 誘導 MAPK 活化的模式中，MAPK 被活化後，可調控下游 iNOS 表現 (Kim et al., 2007b)。在本實驗 ABCE 能降低 LPS 誘發磷酸化 MAPK 蛋白的表現 (Fig. 25)，說明了 ABCE 能經由 MAPK 途徑抑制發炎的反應。

本研究結果指出，ABCE 顯著抑制 LPS 誘發巨噬細胞的活化，主要抑制 NF- κ B 及 MAPK 途徑的磷酸化，進而影響其下游基因的調控，使得 NO 及 TNF- α 表現降低，降低發炎的反應。證實散血草是

經由抑制巨噬細胞活化，因而降低其發炎的程度。



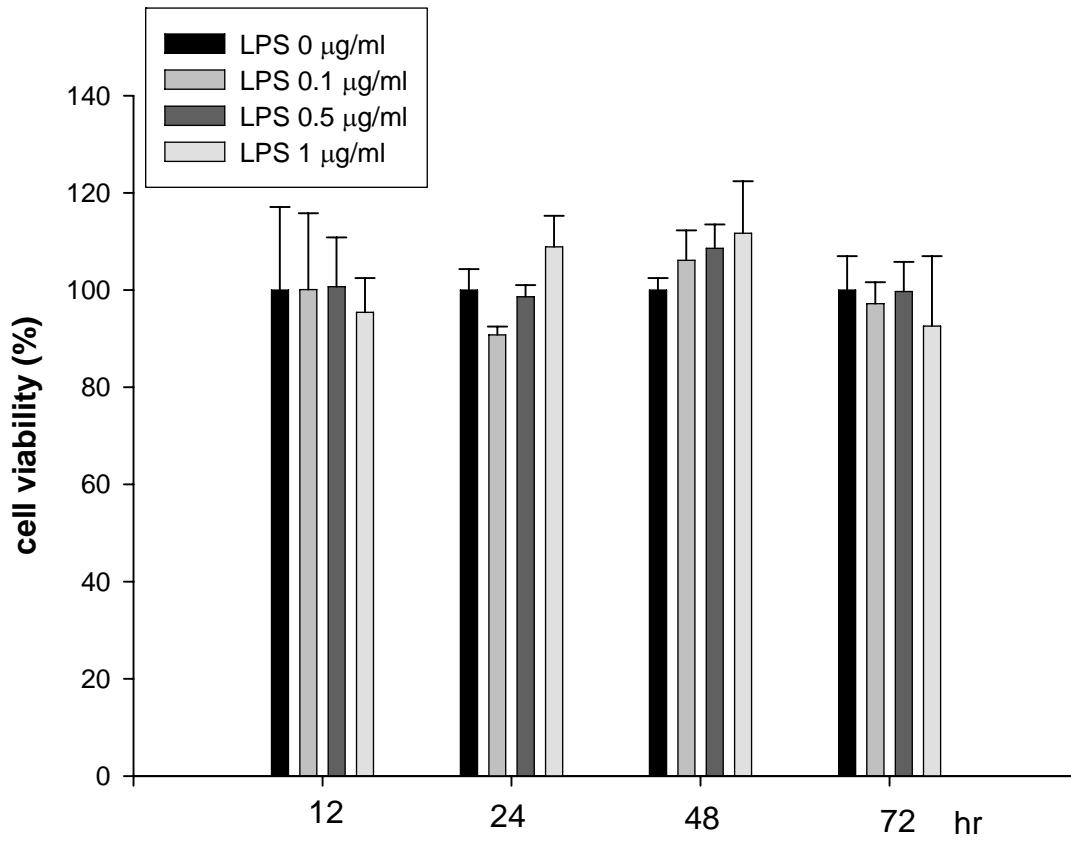


Fig.16. Effect of LPS-induced cytotoxicity in mouse RAW264.7 macrophages.

All values are means \pm SD (n=3).

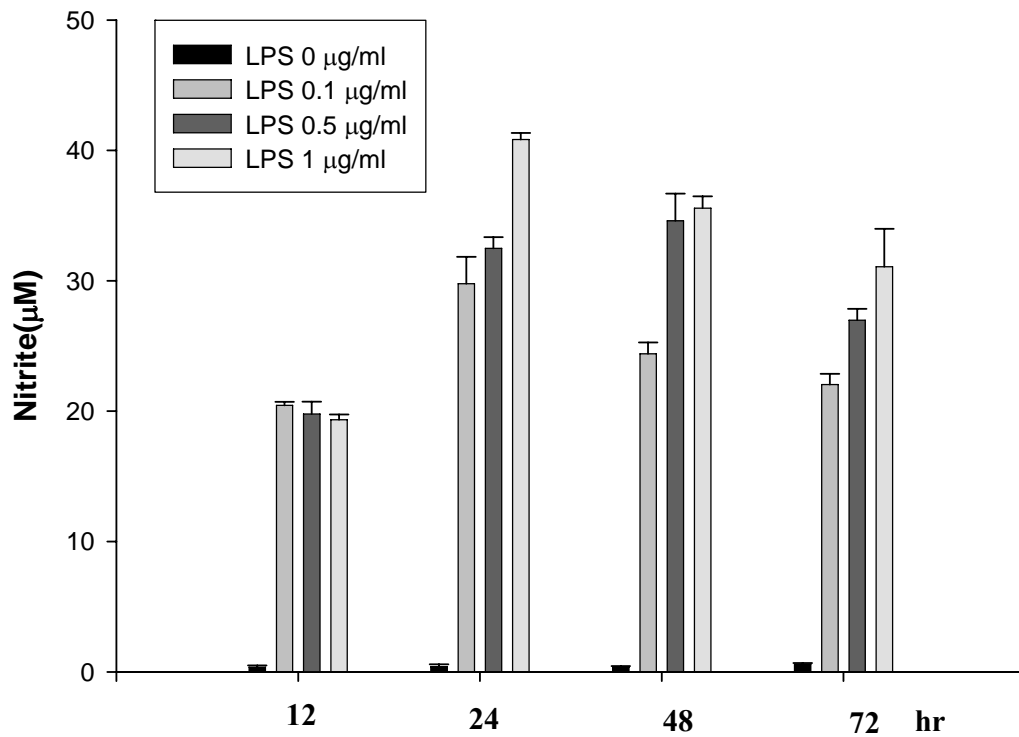


Fig.17. The production of nitric oxide (NO) induced by LPS in mouse RAW 264.7 macrophages.

All values are means \pm SD (n=3).

Table 2. Effect of ABEE on LPS-induced cytotoxicity and production of NO in mouse RAW 264.7 cells.

Drugs	Con. ($\mu\text{g/ml}$)	MTS		NO	
		OD	Viability (%)	$\mu\text{mol/ml}$	Inhibitory (%)
Control		0.7 ± 0.1	100 ± 8.4	4.0 ± 0.4	85.9 ± 1.4
LPS	1	0.7 ± 0.1	102.4 ± 7.8	$28.4 \pm 1.3^{###}$	$0.0 \pm 4.7^{###}$
LPS +ABEE	200	0.6 ± 0.0	92.3 ± 5.2	26.1 ± 3.1	8.1 ± 10.9
	400	0.6 ± 0.0	91.3 ± 2.1	$23.3 \pm 2.1^{***}$	$17.8 \pm 7.4^{***}$
	600	0.7 ± 0.0	101.2 ± 4.7	$16.7 \pm 2.1^{***}$	$41.2 \pm 7.6^{***}$
	800	0.7 ± 0.1	105.0 ± 10.7	$15.9 \pm 2.4^{***}$	$44.1 \pm 8.4^{***}$
	1000	0.7 ± 0.0	105.5 ± 4.5	$8.5 \pm 0.8^{***}$	$70.1 \pm 2.8^{***}$

All values are means \pm SD (n=3). ^{###}P < 0.001 compared with control group. ^{***}P < 0.001 compared with LPS group.

Table 3. Effect of ABBE and ABB-AQE on LPS-induced cytotoxicity and production of NO in mouse RAW 264.7 cells.

Drugs	Con. ($\mu\text{g/ml}$)	MTS		NO	
		OD	Viability (%)	$\mu\text{mol/ml}$	Inhibitory (%)
Control		1.0 \pm 0.1	100 \pm 6.7	4.1 \pm 0.3	80.3 \pm 1.3
LPS	1	1.1 \pm 0.1	110.1 \pm 6.7	20.7 \pm 0.4 ^{###}	0.0 \pm 2.0 ^{###}
LPS + ABBE	200	1.1 \pm 0.2	106.0 \pm 17.8	10.8 \pm 1.1 ^{***}	47.7 \pm 5.4 ^{***}
		400	1.1 \pm 0.1	106.5 \pm 11.1	7.2 \pm 0.1 ^{***}
	600	1.0 \pm 0.0	104.1 \pm 1.9	6.8 \pm 0.2 ^{***}	67.3 \pm 0.8 ^{***}
		800	1.0 \pm 0.1	98.3 \pm 6.8	6.4 \pm 0.3 ^{***}
LPS	1000	1.0 \pm 0.0	98.7 \pm 2.0	7.1 \pm 0.2 ^{***}	65.8 \pm 1.0 ^{***}
		1000	1.0 \pm 0.1	89.5 \pm 6.5	38.0 \pm 0.8
LPS + ABB- AQE	200	1.0 \pm 0.1	95.0 \pm 12.4	35.8 \pm 0.5	5.7 \pm 1.4
		400	1.0 \pm 0.2	96.2 \pm 15.6	34.8 \pm 4.6
	600	1.1 \pm 0.1	107.1 \pm 11.2	36.1 \pm 1.6	5.0 \pm 4.2
		800	1.1 \pm 0.1	106.2 \pm 7.2	36.4 \pm 0.4
	1000	1.0 \pm 0.1	90.0 \pm 5.6	38.1 \pm 0.6	-0.4 \pm 1.5

All values are means \pm SD (n=3). ^{###}P < 0.001 compared with control

group. ^{***}P < 0.001 compared with LPS group.

Table 4. Effect of ABCE and ABC-AQE on LPS-induced cytotoxicity and production of NO in mouse RAW 264.7 cells.

Drugs	Con. ($\mu\text{g/ml}$)	MTS		NO	
		OD	Viability (%)	$\mu\text{mol/ml}$	Inhibitory (%)
Control		$0.8 \pm$	$100.0 \pm$	$1.0 \pm$	$97.1 \pm$
		0.0	4.8	$0.5^{###}$	$1.4^{###}$
LPS	1	$0.8 \pm$	$96.2 \pm$	$35.4 \pm$	$0.0 \pm$
		0.1	7.5	2.5^{***}	7.1^{***}
LPS + ABCE	25	$0.9 \pm$	$103.1 \pm$	$26.0 \pm$	$26.5 \pm$
		0.1	10.4	4.9^{***}	13.7^{***}
	50	$0.8 \pm$	$93.4 \pm$	$17.9 \pm$	$49.4 \pm$
		0.1	9.1	4.0^{***}	11.4^{***}
	100	$0.8 \pm$	$99.8 \pm$	$6.5 \pm$	$81.7 \pm$
		0.1	11.0	2.6^{***}	7.4^{***}
Control		$1.0 \pm$	$100.0 \pm$	$2.0 \pm$	$96.0 \pm$
		0.1	11.4	0.4	2.3
LPS		$1.0 \pm$	$102.5 \pm$	$34.9 \pm$	$0.0 \pm$
		0.0	5.1	$1.7^{###}$	4.9
LPS + ABC- AQE	200	$0.8 \pm$	$87.0 \pm$	$26.4 \pm$	$24.3 \pm$
		0.1	5.8	3.6^{***}	10.4^{***}
	400	$0.8 \pm$	$88.0 \pm$	$18.1 \pm$	$48.1 \pm$
		0.1	10.7	4.0^{***}	11.3^{***}
	600	$0.9 \pm$	$93.0 \pm$	$15.9 \pm$	$54.3 \pm$
		0.1	12.9	3.0^{***}	8.7^{***}
	800	$0.8 \pm$	$87.1 \pm$	$4.4 \pm$	$87.5 \pm$
		0.1	9.3	0.2^{***}	0.6^{***}
	1000	$0.9 \pm$	$88.5 \pm$	$5.6 \pm$	$83.8 \pm$
		0.1	9.5	2.6^{***}	7.5^{***}

All values are means \pm SD (n=3). ^{###}P < 0.001 compared with control group. ^{***}P < 0.001 compared with LPS group.

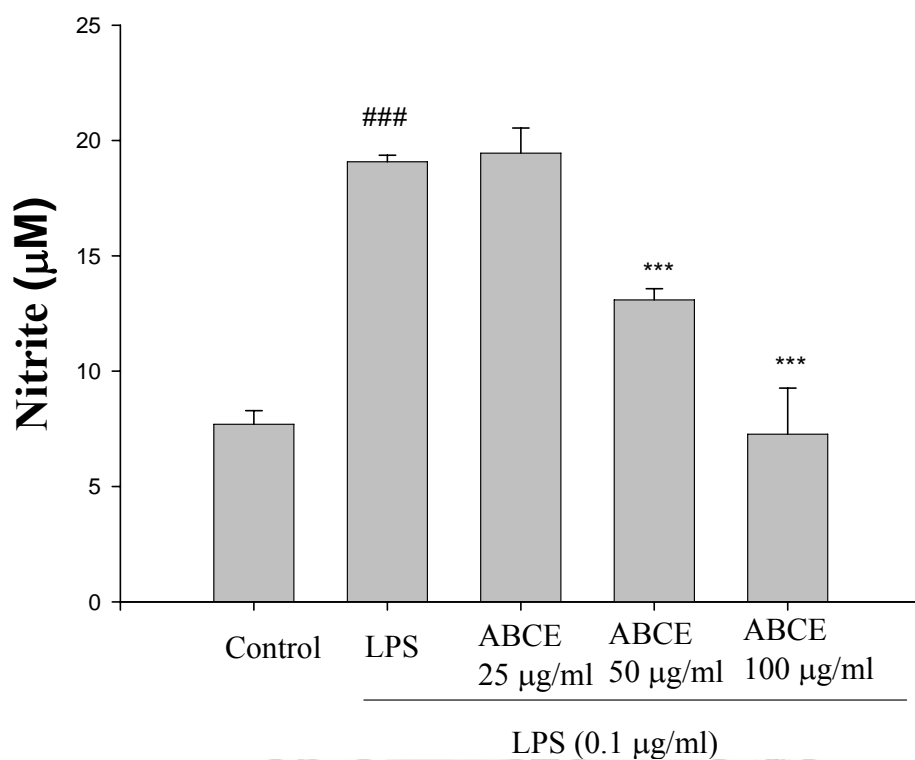


Fig.18. Effect of ABCE on LPS-induced production of NO in rat Kupffer cells.

All values are means \pm S.D. (n=3). ### P < 0.001 compared with control group. ***P < 0.001 compared with LPS group.

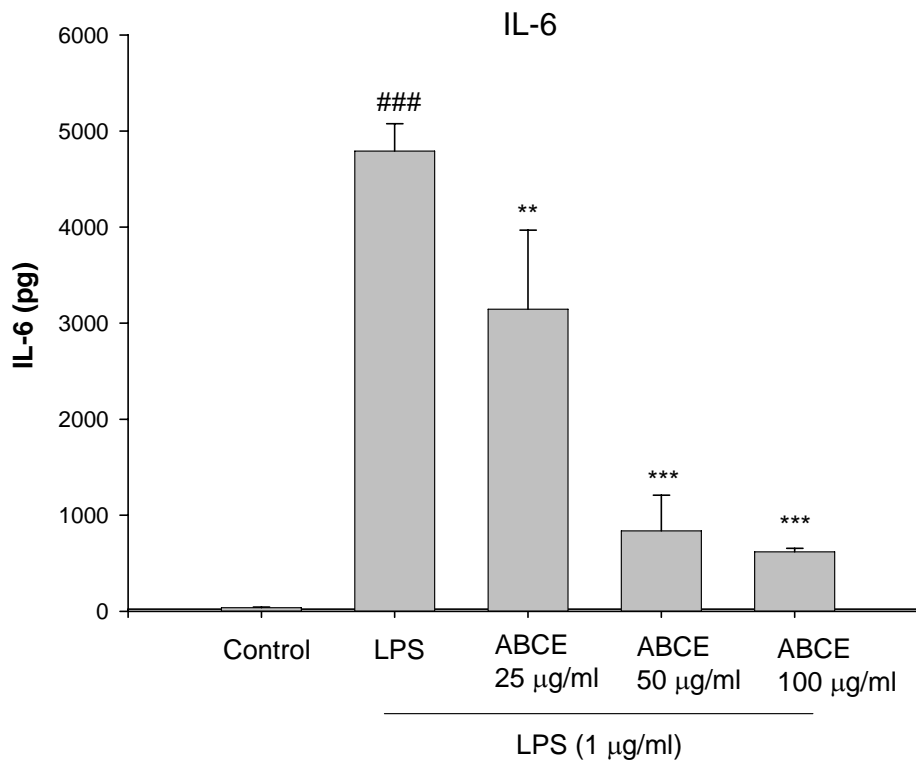


Fig.19. Effect of ABCE on LPS-induced production of IL-6 in mouse RAW 264.7 macrophages.

All values are means \pm S.D. (n=3). ### P < 0.001 compared with control group. ***P < 0.001, **P < 0.01 compared with LPS group.

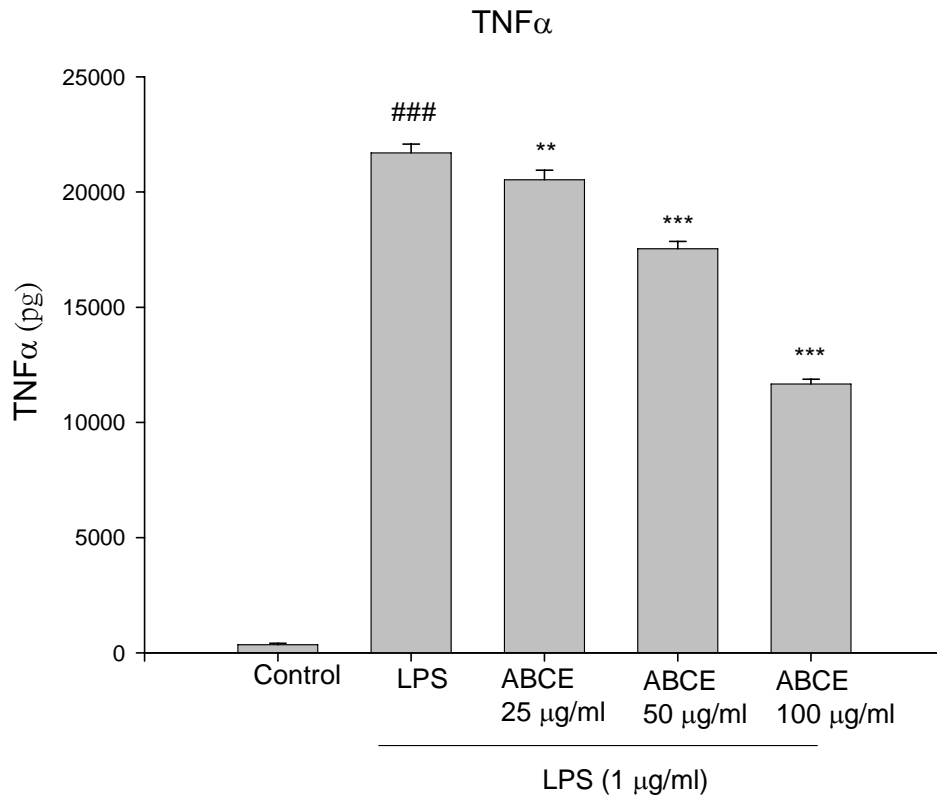


Fig. 20. Effect of ABCE on LPS-induced production of TNF- α in mouse RAW 264.7 macrophages.

All values are means \pm S.D. (n=3). ### P < 0.001 compared with control group. ***P < 0.001, **P < 0.01 compared with LPS group.

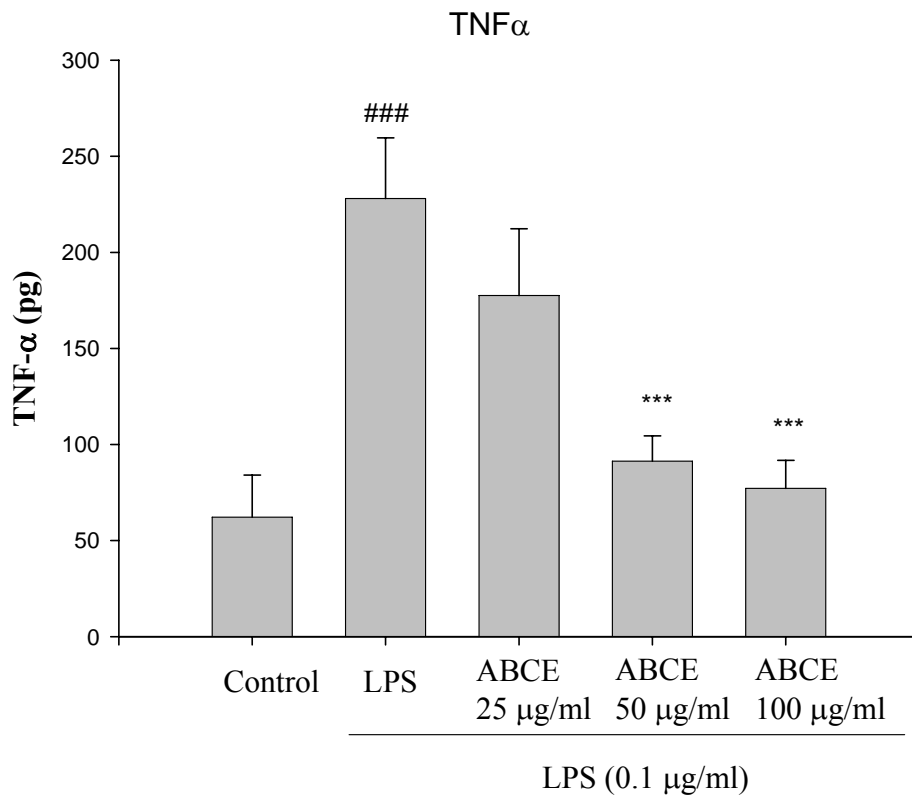


Fig. 21. Effect of ABCE on LPS-induced production of TNF- α in rat Kupffer cell.

All values are means \pm S.D. (n=3). ### P < 0.001 compared with control group. ***P < 0.001 compared with LPS group.

LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)	-	+	+	+	+
ABCE ($\mu\text{g/ml}$)	-	-	25	50	100

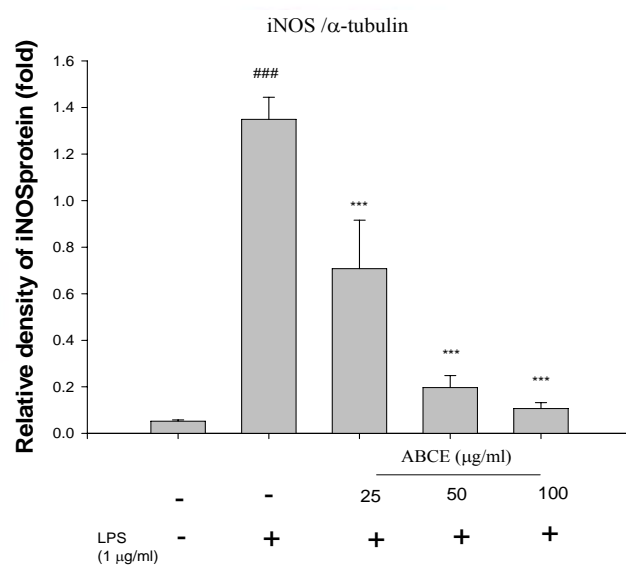
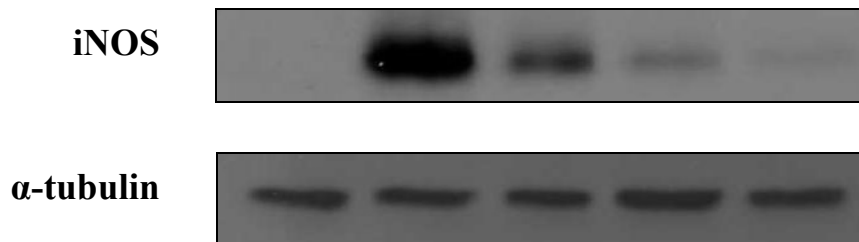


Fig.22. Effect of ABCE on LPS-induced iNOS protein expressions in RAW264.7 macrophages.

All values are means \pm S.D. (n=3). ### P < 0.001 compared with control group. ***P < 0.001 compared with LPS group.

LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)	-	+	+	+	+	+
ABCE ($\mu\text{g/ml}$)	-	-	25	50	100	Curcumin 20 μM

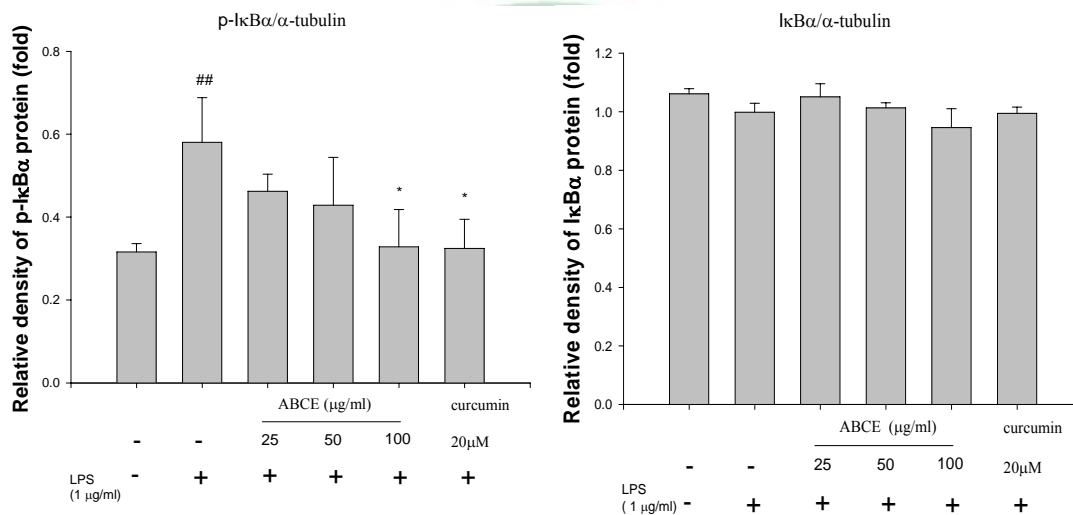
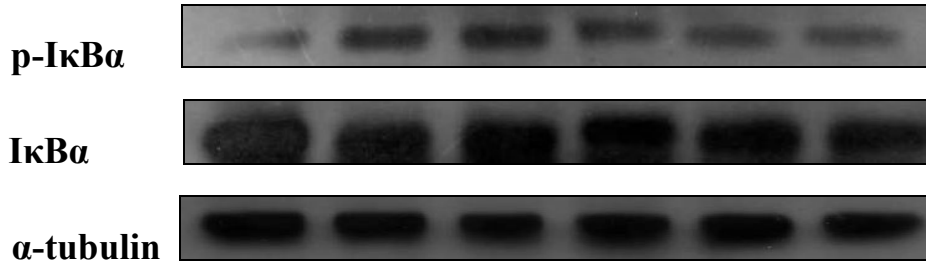


Fig.23. Effect of ABCE on LPS-induced I κ B α and I κ B α phosphorylation protein expressions in RAW264.7 macrophages.

All values are means \pm S.D. (n=3). ^{##} P < 0.01 compared with control group. *P < 0.05 compared with LPS group

LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)	-	+	+	+	+	+
ABCE ($\mu\text{g/ml}$)	-	-	25	50	100	Curcumin 20 μM

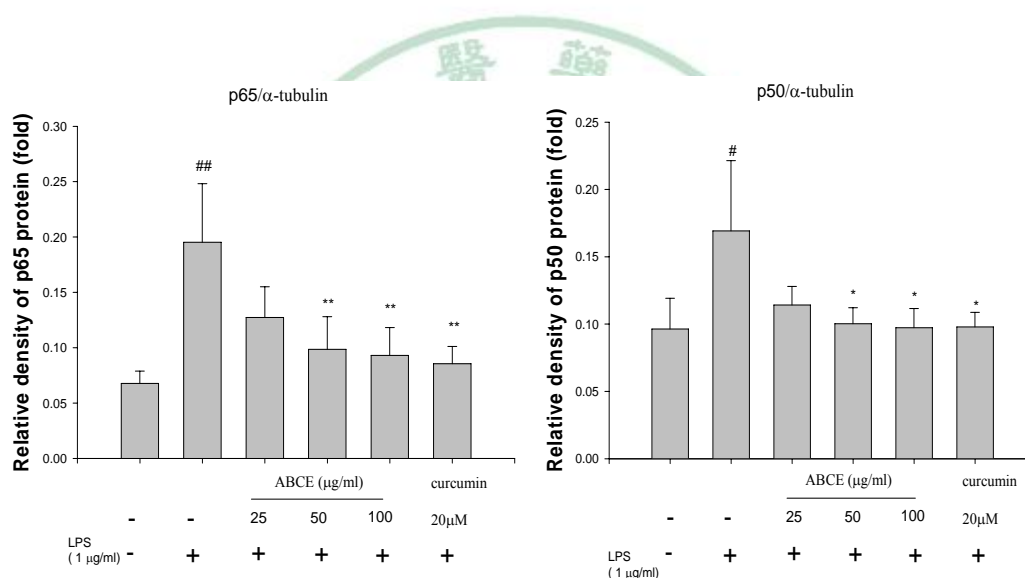
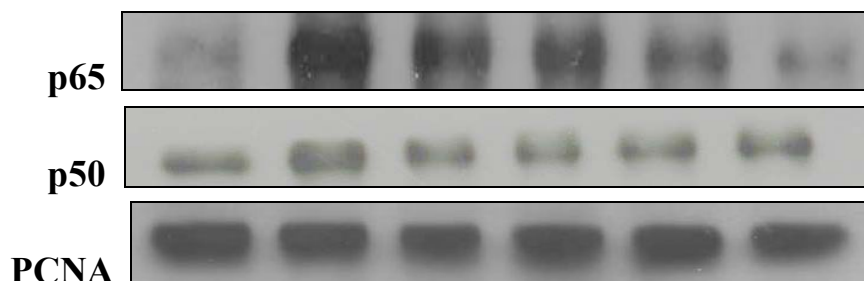


Fig.24. Effect of ABCE on LPS-induced NF- κ B nuclear translocation in RAW264.7 macrophages.

All values are means \pm S.D. (n=3). ^{##} P < 0.01, [#] P < 0.05 compared with control group. ^{**}P < 0.01, ^{*}P < 0.05 compared with LPS group

LPS (1 µg/ml)	-	+	+	+	+	+
ABCE (µg/ml)	-	-	25	50	100	MAPK inhibitors

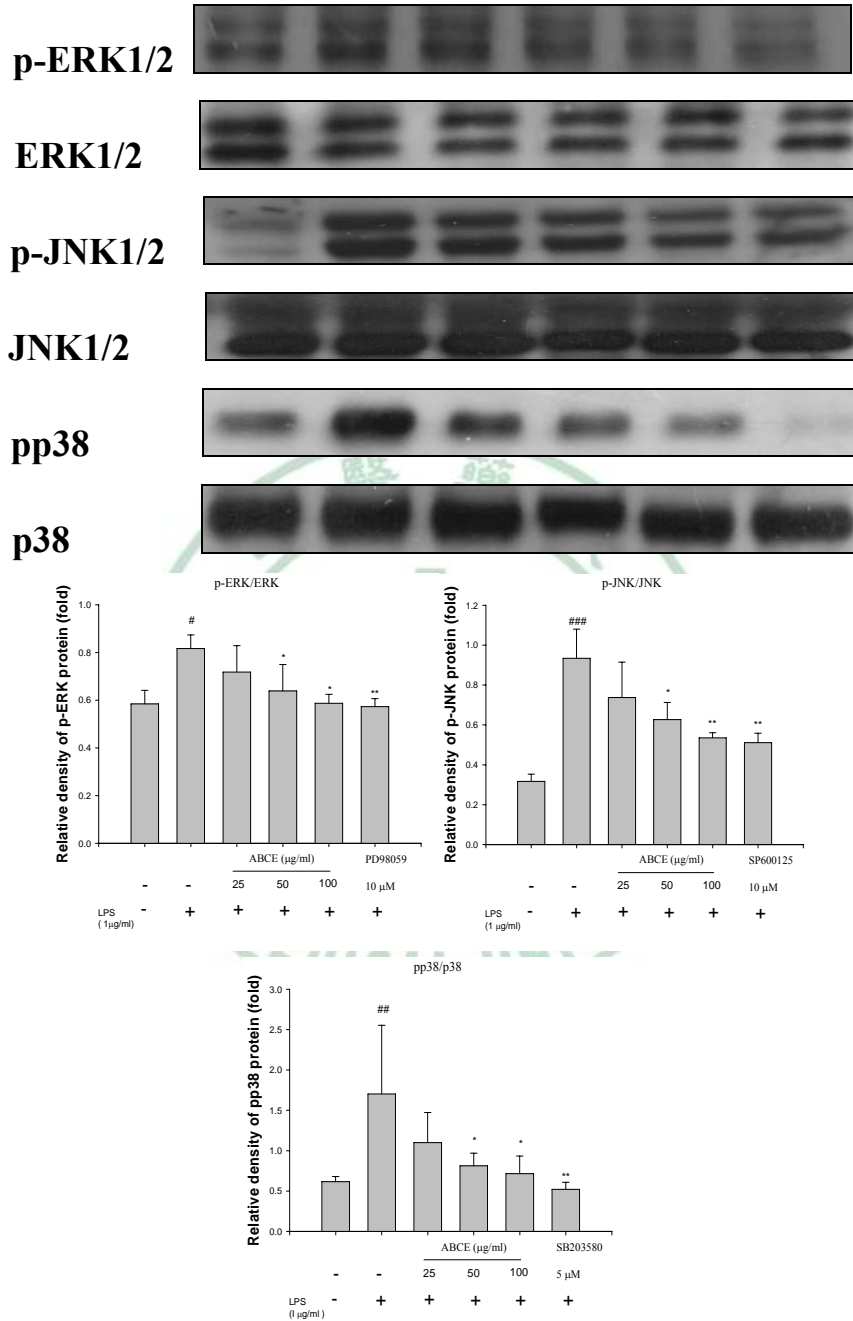


Fig.25. Effect of ABCE on LPS-induced MAPK and MAPK phosphorylation protein expressions in RAW264.7 macrophages.

All values are means \pm S.D. (n=3). ^{###}P < 0.001, ^{##}P < 0.01, [#]P < 0.05

compared with control group. ^{**}P < 0.01, ^{*}P < 0.05 compared with LPS group

第四章、結論

散血草在民間用於治療發炎、解毒等功效，並有文獻報導同屬植物具有抗腫瘤、抗發炎、保肝等作用。本研究目的主要探討散血草對四氯化碳誘導小鼠肝纖維的保護功效，並解明其氣仿萃取物抑制 LPS 誘發 RAW264.7 放出發炎細胞激素的機轉。

結果顯示散血草減輕四氯化碳引起的肝損傷與其抑制庫氏細胞的活化有密切的關係。庫氏細胞是存在於肝臟中的巨噬細胞。先在大鼠初代庫氏細胞證實散血草能抑制 LPS 誘發的發炎反應後，進一步以巨噬細胞 RAW264.7 來解明散血草的作用機轉。散血草氣仿分層的作用最明顯，實驗結果也顯示散血草氣仿分層能經由抑制 NF κ B 途徑及 MAPK 途徑抑 LPS 誘發的發炎反應。

五、參考文獻

- Baroni, G. S., D'Ambrosio, L., Curto, P., Casini, A., Mancini, R., Jezequel, A. M. & Benedetti, A. 1996: Interferon gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis. *Hepatology*, 23, 1189-1199.
- Brucoleri, A., Gallucci, R., Germolec, D. R., Blackshear, P., Simeonova, P., Thurman, R. G. & Luster, M. I. 1997: Induction of early-immediate genes by tumor necrosis factor alpha contribute to liver repair following chemical-induced hepatotoxicity. *Hepatology*, 25, 133-141.
- Cameron GR, K. W. 1936: Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. *J.Pathol.Bacterol.*, 42, 1-21.
- Cantrell, C. L., Rajab, M. S., Franzblau, S. G., Fronczek, F. R. & Fischer, N. H. 1999: Antimycobacterial ergosterol-5,8-endoperoxide from *Ajuga remota*. *Planta Med*, 65, 732-734.
- Dang, S. S., Wang, B. F., Cheng, Y. A., Song, P., Liu, Z. G. & Li, Z. F. 2007: Inhibitory effects of saikosaponin-d on CCl₄-induced hepatic fibrogenesis in rats. *World J Gastroenterol*, 13, 557-563.
- DeCicco, L. A., Rikans, L. E., Tutor, C. G. & Hornbrook, K. R. 1998: Serum and liver concentrations of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta following administration of carbon tetrachloride to male rats. *Toxicol Lett*, 98, 115-121.
- Elsharkawy, A. M. & Mann, D. A. 2007: Nuclear factor-kappaB and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis. *Hepatology*, 46, 590-597.
- Fang, H. L., Lai, J. T. & Lin, W. C. 2008: Inhibitory effect of olive oil on fibrosis induced by carbon tetrachloride in rat liver. *Clin Nutr*, 27, 900-907.
- Friedman, S. L. 2000: Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*, 275, 2247-2250.
- Froh, M., Konno, A. & Thurman, R. G. 2002: Isolation of Liver Kupffer Cells. *Current Protocols in Toxicology*. John Wiley & Sons.
- Geerts, A. 2001: History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis*, 21, 311-335.
- Geerts, A., Lazou, J. M., De Bleser, P. & Wisse, E. 1991: Tissue

- distribution, quantitation and proliferation kinetics of fat-storing cells in carbon tetrachloride-injured rat liver. *Hepatology*, 13, 1193-1202.
- Geesin, J. C., Hendricks, L. J., Falkenstein, P. A., Gordon, J. S. & Berg, R. A. 1991: Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid: characterization of the role of ascorbate-stimulated lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 290, 127-132.
- Gines, P., Cardenas, A., Arroyo, V. & Rodes, J. 2004: Management of cirrhosis and ascites. *N Engl J Med*, 350, 1646-1654.
- Gregory, S. H., Cousens, L. P., van Rooijen, N., Dopp, E. A., Carlos, T. M. & Wing, E. J. 2002: Complementary adhesion molecules promote neutrophil-Kupffer cell interaction and the elimination of bacteria taken up by the liver. *J Immunol*, 168, 308-315.
- Gregory, S. H. & Wing, E. J. 2002: Neutrophil-Kupffer cell interaction: a critical component of host defenses to systemic bacterial infections. *J Leukoc Biol*, 72, 239-248.
- Gregory, S. H., Wing, E. J., Danowski, K. L., van Rooijen, N., Dyer, K. F. & Tweardy, D. J. 1998: IL-6 produced by Kupffer cells induces STAT protein activation in hepatocytes early during the course of systemic listerial infections. *J Immunol*, 160, 6056-6061.
- Harris, G. K., Qian, Y., Leonard, S. S., Sbarra, D. C. & Shi, X. 2006: Luteolin and chrysin differentially inhibit cyclooxygenase-2 expression and scavenge reactive oxygen species but similarly inhibit prostaglandin-E2 formation in RAW 264.7 cells. *J Nutr*, 136, 1517-1521.
- Haubrich, W. S. 2004: Kupffer of Kupffer cells. *Gastroenterology*, 127, 16.
- Heinrich, P. C., Castell, J. V. & Andus, T. 1990: Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*, 265, 621-636.
- Herlaar, E. & Brown, Z. 1999: p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today*, 5, 439-447.
- Hilaly, J. E. & Lyoussi, B. 2002: Hypoglycaemic effect of the lyophilised aqueous extract of *Ajuga iva* in normal and streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 80, 109-113.
- Hommel, D. W., Peppelenbosch, M. P. & van Deventer, S. J. 2003: Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut*, 52, 144-151.
- Horn, T. L., O'Brien, T. D., Schook, L. B. & Rutherford, M. S. 2000:

- Acute hepatotoxicant exposure induces TNFR-mediated hepatic injury and cytokine/apoptotic gene expression. *Toxicol Sci*, 54, 262-273.
- Jeffrey, K. L., Camps, M., Rommel, C. & Mackay, C. R. 2007: Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nat Rev Drug Discov*, 6, 391-403.
- Johnson, G. L. & Lapadat, R. 2002: Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, 298, 1911-1912.
- Kariba, R. M. 2001: Antifungal activity of *Ajuga remota*. *Fitoterapia*, 72, 177-178.
- Kim, H. G., Yoon, D. H., Kim, C. H., Shrestha, B., Chang, W. C., Lim, S. Y., Lee, W. H., Han, S. G., Lee, J. O., Lim, M. H., Kim, G. Y., Choi, S., Song, W. O., Sung, J. M., Hwang, K. C. & Kim, T. W. 2007a: Ethanol extract of *Inonotus obliquus* inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. *J Med Food*, 10, 80-89.
- Kim, H. G., Yoon, D. H., Lee, W. H., Han, S. K., Shrestha, B., Kim, C. H., Lim, M. H., Chang, W., Lim, S., Choi, S., Song, W. O., Sung, J. M., Hwang, K. C. & Kim, T. W. 2007b: *Phellinus linteus* inhibits inflammatory mediators by suppressing redox-based NF- κ B and MAPKs activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophage. *J Ethnopharmacol*, 114, 307-315.
- Kolios, G., Valatas, V. & Kouroumalis, E. 2006: Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol*, 12, 7413-7420.
- Konoshima, T., Takasaki, M., Tokuda, H. & Nishino, H. 2000: Cancer chemopreventive activity of an iridoid glycoside, 8-acetylharpagide, from *Ajuga decumbens*. *Cancer Lett*, 157, 87-92.
- Koo, D. J., Chaudry, I. H. & Wang, P. 1999: Kupffer cells are responsible for producing inflammatory cytokines and hepatocellular dysfunction during early sepsis. *J Surg Res*, 83, 151-157.
- Kovalovich, K., DeAngelis, R. A., Li, W., Furth, E. E., Ciliberto, G. & Taub, R. 2000: Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice. *Hepatology*, 31, 149-159.
- Lorenzo-Zuniga, V., Rodriguez-Ortigosa, C. M., Bartoli, R., Martinez-Chantar, M. L., Martinez-Peralta, L., Pardo, A., Ojanguren, I., Quiroga, J., Planas, R. & Prieto, J. 2006: Insulin-like

- growth factor I improves intestinal barrier function in cirrhotic rats. *Gut*, 55, 1306-1312.
- Louis, H., Van Laethem, J. L., Wu, W., Quertinmont, E., Degraef, C., Van den Berg, K., Demols, A., Goldman, M., Le Moine, O., Geerts, A. & Deviere, J. 1998: Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology*, 28, 1607-1615.
- Luckey, S. W. & Petersen, D. R. 2001: Activation of Kupffer cells during the course of carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in rats. *Exp Mol Pathol*, 71, 226-240.
- Luoma, J. S. & Yla-Herttuala, S. 1999: Expression of inducible nitric oxide synthase in macrophages and smooth muscle cells in various types of human atherosclerotic lesions. *Virchows Arch*, 434, 561-568.
- Makarov, S. S. 2000: NF- κ B as a therapeutic target in chronic inflammation: recent advances *Molecular Medicine Today*, 6, 441-448.
- McGregor, D. & Lang, M. 1996: Carbon tetrachloride: genetic effects and other modes of action. *Mutat Res*, 366, 181-195.
- Mi Jeong, S., Davaatseren, M., Kim, W., Sung Kwang, P., Kim, S. H., Haeng Jeon, H., Myung Sunny, K., Kim, Y. S. & Dae Young, K. 2009: Vitisin A suppresses LPS-induced NO production by inhibiting ERK, p38, and NF- κ B activation in RAW 264.7 cells. *Int Immunopharmacol*, 9, 319-323.
- Moore, K. W., Vieira, P., Fiorentino, D. F., Trounstein, M. L., Khan, T. A. & Mosmann, T. R. 1990: Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science*, 248, 1230-1234.
- Morio, L. A., Chiu, H., Sprowles, K. A., Zhou, P., Heck, D. E., Gordon, M. K. & Laskin, D. L. 2001: Distinct roles of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 172, 44-51.
- Moynagh, P. N. 2005: The NF- κ B pathway. *J Cell Sci*, 118, 4589-4592.
- Muriel, P., Alba, N., Perez-Alvarez, V. M., Shibayama, M. & Tsutsumi, V. K. 2001: Kupffer cells inhibition prevents hepatic lipid peroxidation and damage induced by carbon tetrachloride. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 130, 219-226.
- Muriel, P. & Escobar, Y. 2003: Kupffer cells are responsible for liver

- cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *J Appl Toxicol*, 23, 103-108.
- Neubauer, K., Lindhorst, A., Tron, K., Ramadori, G. & Saile, B. 2008: Decrease of PECAM-1-gene-expression induced by proinflammatory cytokines IFN- γ and IFN- α is reversed by TGF- β in sinusoidal endothelial cells and hepatic mononuclear phagocytes. *BMC Physiol*, 8, 1-14.
- Neuman, R. E. & Logan, M. A. 1950: The determination of hydroxyproline. *J Biol Chem*, 184, 299-306.
- Odek-Ogunde, M., Rajab, M. S., Migwi, G. J. & Ndegwa, J. M. 1993: Blood pressure responses to an extract of *Ajuga remota* in experimentally hypertensive rats. *Planta Med*, 59, 573-574.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. & Yagi, K. 1979: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95, 351-358.
- Ono, Y., Fukaya, Y., Imai, S. & Yamakuni, T. 2008: Beneficial effects of *Ajuga decumbens* on osteoporosis and arthritis. *Biol Pharm Bull*, 31, 1199-1204.
- Poli, G. 2000: Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med*, 21, 49-98.
- Qiu, D. K., Hua, J., Li, J. Q. & Li, E. L. 2005: CD14 expression on Kupffer cells during the course of carbon tetrachloride-mediated liver injury. *Chin J Dig Dis*, 6, 137-141.
- Ramadori, G. & Saile, B. 2005: Signaling Pathways in Liver Diseases. In J.F.Dufour & P.-A.Clavien (eds.) *hepatocyte*. Springer Berlin Heidelberg, 1-13.
- Riaz, N., Malik, A., Nawaz, S. A., Muhammad, P. & Choudhary, M. I. 2004: Cholinesterase-inhibiting withanolides from *Ajuga bracteosa*. *Chem Biodivers*, 1, 1289-1295.
- Riaz, N., Nawaz, S. A., Mukhtar, N., Malik, A., Afza, N., Ali, S., Ullah, S., Muhammad, P. & Choudhary, M. I. 2007: Isolation and enzyme-inhibition studies of the chemical constituents from *Ajuga bracteosa*. *Chem Biodivers*, 4, 72-83.
- Rivera, C. A., Bradford, B. U., Hunt, K. J., Adachi, Y., Schrum, L. W., Koop, D. R., Burchardt, E. R., Rippe, R. A. & Thurman, R. G. 2001: Attenuation of CCl₄-induced hepatic fibrosis by GdCl₃ treatment or dietary glycine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281, G200-207.

- Roberts, R. A., Ganey, P. E., Ju, C., Kamendulis, L. M., Rusyn, I. & Klaunig, J. E. 2007: Role of the Kupffer cell in mediating hepatic toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Sci*, 96, 2-15.
- Rockey, D. C. & Chung, J. J. 1994: Interferon gamma inhibits lipocyte activation and extracellular matrix mRNA expression during experimental liver injury: implications for treatment of hepatic fibrosis. *J Investig Med*, 42, 660-670.
- Rockey, D. C., Maher, J. J., Jarnagin, W. R., Gabbiani, G. & Friedman, S. L. 1992: Inhibition of rat hepatic lipocyte activation in culture by interferon-gamma. *Hepatology*, 16, 776-784.
- Schwacha, M. G. 2003: Macrophages and post-burn immune dysfunction. *Burns*, 29, 1-14.
- Sturgill, M. G. & Lambert, G. H. 1997: Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function. *Clin Chem*, 43, 1512-1526.
- Su, G. L. 2002: Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 283, G256-265.
- Szabo, G., Mandrekar, P. & Dolganiuc, A. 2007: Innate immune response and hepatic inflammation. *Semin Liver Dis*, 27, 339-350.
- Teng, F. Y., Wu, S. K., Hsia, Y. Y., Kao, W. B. & Hsieh, Y. D. 2006: Modulation of Inflammation, Apoptosis, and Oncogenesis by the Nuclear Transcription Factor, NF- κ B. *Chin Dent J.*, 25, 12-24.
- Wake, K. 1980: Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. *Int Rev Cytol*, 66, 303-353.
- Wang, S. C., Ohata, M., Schrum, L., Rippe, R. A. & Tsukamoto, H. 1998: Expression of interleukin-10 by in vitro and in vivo activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem*, 273, 302-308.
- Weber, L. W., Boll, M. & Stampfl, A. 2003: Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol*, 33, 105-136.
- Wheeler, M. D. 2003: Endotoxin and Kupffer cell activation in alcoholic liver disease. *Alcohol Res Health*, 27, 300-306.
- Willcox, R. R. 1952: The Ito skin test for chancroid in the adult and juvenile African. *Am J Syph Gonorrhoea Vener Dis*, 36, 284-288.
- Williams, L. M., Ricchetti, G., Sarma, U., Smallie, T. & Foxwell, B. M.

- 2004: Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation--a continuing puzzle. *Immunology*, 113, 281-292.
- Yu, X. H., Zhu, J. S., Yu, H. F. & Zhu, L. 2004: Immunomodulatory effect of oxymatrine on induced CCl₄-hepatic fibrosis in rats. *Chin Med J (Engl)*, 117, 1856-1858.
- 王實強、王曉洪、許敏 (1996)。筋骨草總二萜的降壓實驗研究。 *湖南中醫藥導報*, 2 (3), 28。
- 行政院衛生署統計室 (2007)。台灣地區死因統計結果摘要(民國九十六年)。
- 江蘇新醫學院 (1992)。 *中藥大辭典(上)*。白毛夏枯草 (頁 751)。上海：上海科學技術出版社。
- 李衛文、吳文玲、劉守金、方成武、梁益敏 (2009)。筋骨草屬植物的化學成分。 *安徽醫藥*, 13 (3), 325-339。
- 邱年永、張光雄 (1992)。 *原色台灣藥用植物圖鑑(3)*。有苞筋骨草 (頁 187)。台北：南天書局。
- 馬志平、黃榕 (2002)。筋骨草有效部位黃酮類粗品的保肝試驗。 *海峽藥學*, 14 (5), 40-41。
- 陳嫻如 (2003)。 *仙草對 tert-butyl hydroperoxide 誘發大鼠急性肝損傷與人類肝癌細胞(hepg2) 氧化傷害之保護效果*。國立中興大學食品科學系研究所碩士論文。
- 曾茂貴、賈鈞、吳符火 (2003)。筋骨草對小鼠 s₁(180)肉瘤的抑瘤試驗。 *福建中醫學院學報*, 13 (2), 30。

楊丁林 (1989)。筋骨草治膽汁痛驗案。新中醫，21 (5)，22。

詹明哲 (2003)。牛磺酸對四氯化碳誘發大鼠肝臟纖維化的改善效果。

中國醫藥學院醫學研究所碩士學位論文。

劉斌、石任兵、葛小俠、周瑩、周靜 (2001)。筋骨草屬植物化學成

分與藥理活性。國外醫藥.植物藥分冊，16 (3)，96-101。

