

# 知識天地

## 草藥抗發炎功效之分子及細胞學機制的研究

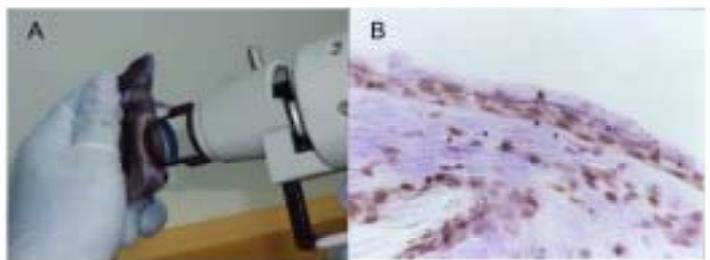
楊寧蓀（生農所籌備處主任）、徐麗芬（生農所籌備處副研究員）

近十年來，在歐、美、亞洲等較發達國家，都可看到一種新的生活文化，即越來越多的所謂營養添加物、功能性食品或草藥的使用文化。它們已用各種商業包裝的形式出現在西方／東方的藥房或百貨商場。這種由草藥（Herbal medicine）所衍生的新潮流之流行可說是現代化社會的一種綜合需求。主要的原因之一是目前不少疾病及醫療之問題，都發現與人們的飲食習慣及身心保健有重要的關係，而有著幾千年人類文化傳承之草藥知識，憑著長久由病人身上之使用經驗與觀察，提供了目前美歐所謂的另類及互補性醫藥（Complementary & Alternative Medicine）之一重要選項。全世界知名的美國前三軍聯席醫院院長（Surgeon General）庫普博士（Dr. E. Koop），在 2002 年於《科學》雜誌（*Science*）發表的一篇“Future of Medicine”社論中提到了「學界、藥廠與食品藥物管理局（FDA）應加強天然藥物（~90%為植物來源）之研發與合作，以應未來醫藥之希望與需要」。融合社會、經濟及歷史等多種因素，草藥研究已經成爲了一種國際上的研發潮流，生農所草藥研究團隊幾年來即以草藥之生物活性及有用植物二次代謝產物（組）及圖譜研究爲重點研究目標。我們研究室在幾年來經營、規劃、合作推動了利用分子生物學、細胞學及生物體學（Biomics）包括：基因體、蛋白質體及代謝產物體學等工具及實驗系統，進行了一系列藥用植物的實驗研究。

以下就我們最近在美國《生物化學雜誌》（*J. Biol. Chem.*, 2004 (279): 5877-5885）及英國《藥學雜誌》（*Br. J. Pharm.*, 2005 (146): 352-363）發表的兩篇文章，做爲一個例子來介紹我們在研究中草藥之抗發炎功能上的研發策略與成果。我們的實驗設計是根據以下幾項認知、觀察、推論而考慮的：（一）若草藥能「消炎」，也就是抗發炎（anti-inflammation），那麼是那些分子或細胞機制／生理在發炎現象中引起重要或主導作用呢？（二）發炎爲組織或器官層次的生理現象，利用何種動物活體（in vivo）生理系統來測試草藥活性？（三）選擇那一類具代表性的分子或細胞型態來研究發炎作用，並應用到醫學或生物技術學開發上；（四）草藥中有主要或特殊的一些成分，它們果真具有抗發炎活性嗎？（五）研發成果是否能提供西／中方的製藥／醫療產業有用且可應用之訊息？

在初步分析以上這些問題後，利用相應的一些假說（hypothesis），我們設計並規範了以下可行之實驗策略：（一）利用幾種特殊白血球細胞生長激素（cytokines）的基因調控機制，重點性的探討「抗」或「促」發炎作用。（二）以老鼠活體的皮膚組織爲實驗系統，這是因爲皮膚發炎具明顯與容易評估之優勢，而多種抗發炎草藥多爲外敷藥，以動物皮膚系統爲研究標的是最直接與可應用的選擇。（三）根據我們實驗室多年的經驗及文獻報導，TNF- $\alpha$ （即腫瘤壞死因子- $\alpha$ ，爲一種 cytokine）通常被認爲是在發炎及其他一些免疫反應中，扮演了關鍵性上游極爲重要角色的一種蛋白質，我們亦同時測試了 IL-12、IL-2、GM-CSF 等其他淋巴細胞之生長激素，以作對比。（四）我們將 cytokine 的轉殖基因啓動子（transgenic promoter），下游再接上一個可產生冷光的螢火蟲報導型基因（reporter gene luciferase）後，此質體（plasmid）DNA 組合可利用基因槍容易地打到老鼠皮膚的上皮細胞層去（見圖一之 A、B），可在皮膚正常或在發炎情況下，偵測 TNF- $\alpha$  或其它轉殖基因啓動子之功能表達。皮膚可同時敷上草藥提取物後，來檢測這些基因啓動子表達水平，相比較之後，可清楚的以高「特異性」的生化與分生學的分析技術獲得重要且有意義的實驗結果。（五）由

圖一



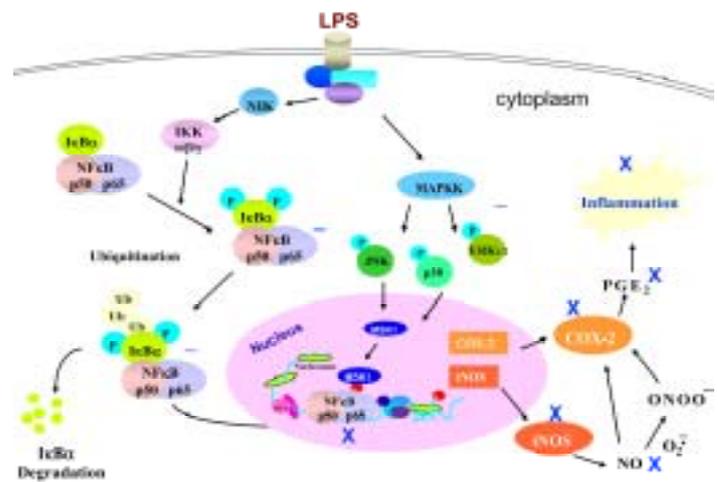
A: 用基因槍在小鼠之皮膚組織上做基因表達的活體實驗，實驗以 ( $\mu$ M) 細小金粒來載著的上萬 DNA 質粒之基因，經粒子轟炸 (particle-bombardment) 作用，被射擊入皮膚之表皮細胞中，達成表達轉殖基因之效果。

B: 細胞皮膚組織的十幾層細胞，此圖可見微小金粒射入表皮 (epidermal) 細胞內。

近年的文獻搜尋整理後，我們了解到不少西方醫藥界、藥廠、生技公司也正努力地在尋找能調節各種不同抗或促發炎作用的新藥，尤其目前常用的重要西藥，如類固醇 (glucocorticoid)，經常帶來一些不好的副作用，而針對研發除去或控制 TNF- $\alpha$  所引起之發炎現象之藥物，更是許多專家投入心力的研發重點。因此，我們研判這幾個命題與研究方向應該是正確的，且為民生及醫療所需的。

中草藥中的紫草為民俗藥物「紫雲膏」之主要成份，主要用於外敷、消炎、療傷等功效。紫草中主要含有一群化合物被通稱為「shikonins」亦即紫草素，這是一類分子量約為 288 的有機小分子，它們就是賦予紫草紫紅顏色的植物代謝產物 (metabolites)，我們分離並利用 shikonins 來測試與證實我們當初的假說或命題。首先利用啓動子／報導基因工具系統化，在五、六種細胞激素基因啓動子的活化 (activation) 或活性 (activity) 作用比較中，我們證明了經轉殖的老鼠或人類 TNF- $\alpha$  啓動子的活化作用，會受到 shikonin 及其類似的四種衍生物極高 (80%–90%) 的抑制作用。在老鼠皮膚的實驗中，並證明 TNF- $\alpha$  之 mRNA 及其蛋白質的表達同樣被 shikonin 強烈抑制。我們進而證明 shikonin 化合物顯然作用在 TNF- $\alpha$  啓動子 (即可「開或關」控制它下游基因表達的一段 DNA 序列) 之一個核心調節區，此區包含一個叫 TATA 的管理盒 (TATA box 為一個短的 DNA 序列，大部分基因都會有與 TATA 這四至六個核酸鹼基對類似或一樣的序列，因此是一個很重要的管控點)，另外，也包括自其周圍的一個有 48 個鹼基對的 DNA 小區，正好座落在基因表達時，開始上路運作的起點。這 48 個鹼基對小區就如火車離站前的月台最後一排椅子，離開此，就像是出站「上路了」，也就像是「基因開始表達了」。接下來，我們又再深入的探討，發現原來是有一個已知且重要的蛋白質，這個蛋白質會去結合 (bind) TATA 盒子，即被稱為 TBP 的蛋白質 (TATA box-binding protein)，它與 TATA 盒結合的功能，是會受到 shikonin 抑制的。因此，shikonin 在老鼠皮膚系統所影響到的，是個很重要的啓動子基本功能控管區 (basal transcription machinery)。shikonin 對 GM-CSF 基因之啓動子也具類似之抑制效果，但對其它 cytokine，如：IL-2，則不具顯著活性，表示 shikonin 之高特異活性。最近我們研究室進一步發現在白血球之單核細胞中，紫草素在低的濃度下 (約 0.5  $\mu$ M)，可以很有效地抑止 TNF- $\alpha$  mRNA 之切接合成 (splicing) 之作用，形成另一有趣之天然物抗發炎作用之機制，此項結果亦將不久發表。

咸豐草為廣泛分布於熱帶及亞熱帶地區之台灣全境常見菊科藥用植物。根據文獻記載民間常用其全草治療各種炎症，近年也陸續有許多研究報告指出咸豐草萃取物具有免疫抑制及降血糖等活性，然而在抗發炎之研究上，並無更詳細明確之研究。在我們實驗室中，我們將咸豐草全草以乙醇萃取後再以不同溶媒進行極性分割，發現乙酸乙酯層能顯著抑制巨噬細胞經由細菌脂多醣內毒素(LPS)刺激所產生之一氧化氮(NO)。根據生物活性為基準之分割策略，由乙酸乙酯層鑑定出咖啡酸衍生物 ethyl caffeate，它能抑制誘發型一氧化氮合成酶(iNOS)和環氧酶-2 (COX-2)蛋白質及其基因啓動子之表現並抑制前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 之合成。此外，我們並以老鼠皮膚模式進行抗發炎活性評估，於免疫組織化學染色法結果中顯示，ethyl caffeate 同樣具有顯著抑制體內 COX-2 與 iNOS 蛋白質表現之活性。在進一步活性成分之作用機轉探討中，我們發現 ethyl caffeate 是經由抑制 NF- $\kappa$ B-DNA complex 之形成而達到抑制 iNOS 及 COX-2 表現之效果。因此，針對 ethyl caffeate 之結構-活性關係(SAR)加以研究，我們推測 ethyl caffeate 結構中之 catechol 及  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketone group 二個特定官能基結構在抑制 NF- $\kappa$ B-DNA complex 形成上扮演關鍵性之角色。根據這些研究結果我們提出了 ethyl caffeate 在抗發炎活性上之可能分子作用機轉 (圖二)，並證明了咸豐草萃取物及其所含活性成分 ethyl caffeate 在相關發炎症狀之預防或抑制上所具有之潛力。



圖二、咖啡酸乙酯(ethyl caffeate)抗發炎之分子作用機轉

我們這些分子生物學、細胞學的科學數據，可有效與直接的來解釋紫草及咸豐草這些為華人、亞洲、或美洲國家人民沿用長久作為重要藥草之抗傷口發炎的真正作用之機轉。從近年來之免疫學及細胞學已獲得了之大量科學新知，認識到各種發炎作用與多種病癥，包括癌症、心臟疾病及各種長期發炎、器官潰爛等多種病情有著重要關係，因而我們在保健及醫療上急需開發各種不同類型之「抗發炎」之藥物，我們認為這尤其可從傳統中藥（TCM）或民俗草藥及其所含活性植物化合物（衍生物）來發掘，我們預期目前建立的一些研究系統與成果，可提供未來研發重要的新型抗發炎藥物的應用參考與價值。