

編號：CCMP97-CT-008

市售小柴胡湯與防風通聖散對於間質性 肺炎之作用及機制之探討

李珍珍

中國醫藥大學

摘要

研究目的：

由於日前電視報導婦人食用防風通聖散減肥導致間質性肺炎，且日本臨床報告也指出中藥如黃連解毒湯、乙字湯、牛車腎氣丸（湯）、紫胡桂枝湯、紫胡桂枝乾薑湯、紫朴湯、紫苓湯、小柴胡湯、大柴胡湯、小青龍湯、辛夷清肺湯、清心蓮子湯、清肺湯、麥門冬湯、半夏瀉心湯、補中益氣湯、防風通聖散、防己黃耆湯會引發間質性肺炎而規定在販賣包裝上加上警語。但目前研究對於中藥引發間質性肺炎仍未有定論且對於作用機制也不清楚。因此為瞭解中藥是否會誘發間質性肺炎及其作用機制，本研究將選擇兩種指標性中藥柴胡湯及防風通聖散，探討對於誘發間質性肺炎的作用及其機制，以提供國人服用中藥提供完善的建議。我們將分兩年探討，第一年：Specific aim 為評估市售小柴胡湯及防風通聖散對於人類肺部纖維細胞，細胞外基質（extracellular matrix, ECM）異常增生相關酵素及細胞增生的表現的影響。第二年：Specific aim 為(A) *in vivo* 評估市售小柴胡湯及防風通聖散對於小鼠是否會產生間質性肺炎及其作用機制。(B) *in vivo* 評估市售小柴胡湯及防風通聖散對於間質性肺炎小鼠動物模式中間質性肺炎的惡化及其作用機制。

研究方法：

第一年：

一、市售小柴胡湯及防風通聖散對於肺部纖維細胞 ECM 異常增生相關酵素的偵測方法為：培養肺部纖維細胞株處理不同濃度(0.0015, 0.015, 0.15, 1.5 mg/ml)小柴胡湯及(0.00175, 0.0175, 0.175, 1.75 mg/ml)防風通聖散，部分實驗組會再加入 TGF- β ，利用 realtime-PCR 方法測定 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-4、MM-9 及 TIMP-1、TIMP-2 的表現。

二、市售小柴胡湯及防風通聖散對於肺部纖維細胞增生的影響並評估是否會加強 TGF- β 刺激肺部纖維細胞增生的能力。我們則利用 BrdU incorporation 方法並同上述的處理藥物的條件方法偵測肺部纖維細胞增生的能力。

第二年：

一、*in vivo* 評估市售小柴胡湯及防風通聖散對於小鼠是否會產生間質性肺炎及其作用機制(1)利用組織切片染色後觀察 epithelium 的增生、lung inflammation 及 collagen 的沈澱的產生。(2)測定肺沖洗液中發炎細胞的種類及數目，觀察肺部發炎的情形。(3)透過測定肺組織中 collagen、NF- κ B、MMPs、TIMP-1 的表現。

二、*in vivo* 評估市售小柴胡湯及防風通聖散對於間質性肺炎小鼠動物模式中間質性肺炎的惡化及其作用機制。

我們將利用 bleomycin 建立間質性肺炎小鼠動物模式，比較給予小柴胡湯及防風通聖散後對於間質性肺炎小鼠動物模式中，間質性肺炎是否有惡化的情形包括：(1)利用組織切片染色後觀察 epithelium 的增生 lung inflammation 及 collagen 的沈澱的產生。(2)測定肺沖洗液中發炎細胞的種類及數目，觀察肺部發炎的情形。(3)透過測定肺組織中 collagen、NF- κ B、MMPs、TIMP-1 的表現。

結果與討論：

我們發現給予不同濃度，順天堂、仙豐與港香蘭公司生產小柴胡湯及防風通腎散 24 小時後，並不會造成 human lung fibroblast cell line WI-38 增生的作用。且處理順天堂、仙豐公司生產 0.15 及 1.5mg/ml 小柴胡湯及 0.0175、0.175 及 1.75mg/ml 防風通腎散 24 小時後，皆可抑制 human lung fibroblast cell 的增生並呈現劑量關係。但會增加 TGF- β 促肺纖維細胞增生的反應，但港香蘭公司生產小柴胡湯及防風通腎散則無明顯作用。順天堂與仙豐公司生產小柴胡湯及防風通聖散並無明顯差異。進一步利用 realtime PCR 方法檢測 collagen 沈澱，結果顯示，單獨處理小柴胡湯與防風通腎散有抑制 human collagen type I mRNA 生成，但是，卻會增加 TGF- β 誘導 human collagen type I mRNA 生成。再進一步分析 MMPs 及 TIMPs 的 mRNA 表現，單獨處理小柴胡湯與防風通腎散有抑制 MMP-9 mRNA 的表現，再共同處理 TGF- β 後則會增加 MMP-9 mRNA 及抑制 TIMP-1 mRNA 的表現。

在動物實驗中，成熟的 C57BL/6 小鼠每日管餵建議劑量之一倍與兩倍的順天堂與仙豐公司生產小柴胡湯及防風通聖散，28 天後犧牲小鼠，收取支氣管及肺泡灌洗液(BALF)的細胞，作白血球鏡檢分群，另外取肺組織切片作 H&E stain 及 Masson's trichrome stain，皆沒有發現肺部發炎的情況。並利用 real time PCR 分析肺組織中 collagen-I、NF-kappa B、MMPs 及 TIMPs 的 mRNA 表現，皆沒有發現間質性肺炎的情況。而小鼠先以 bleomycin 引發間質性肺炎後再以同法管餵藥物，則發現在餵食小柴胡湯及防風通聖散一倍組及兩倍的組別並不會明顯增加 bleomycin 引肺部的發炎及纖維化的現象，在 collagen-I、NF- κ B、MMPs、TIMP-1 mRNA 表現量也沒有明顯增加的現象。

關鍵詞：小柴胡湯、防風通腎散、間質性肺炎、肺纖維細胞

Number: CCMP97-CT-008

Effects of Xiao-Chai-Hu-Tang and Fang Fong Huang Qi Tang on Interstitial Pneumonia *in Vitro* and *in Vivo*

Chen-Chen Lee
China Medical University

ABSTRACT

Aim:

Previous news reported that a woman taken Fang Fong Huang Qi Tang for losing weight but caused the interstitial pneumonitis on television. In Japan, government asked the manufacturer must add the warning label attached to package of Chinese medicine such as Huang Lian Jie Du Tang, Yi Zi Tang, Gosha-jinki-gan, Saiko-Keishi-To, Saiko-Keishi-Kankyo-To, Xiao-Chai-Hu-Tang, Dai-Saiko-To, Sho-Seiryu-To, Ban Xia Xie Xin Tang, Bu Zhong Yi Qi Tang, Fang Fong Huang Qi Tang, Fang Ji Huang Qi Tang and etc. about the side effect of inducing interstitial pneumonitis. However, the effects and mechanisms of Chinese medicine on interstitial pneumonitis are still unclear. In this study, we chosen two important Chinese medicines- Xiao-Chai-Hu-Tang and Fang Fong Huang Qi Tang- to study the effects and mechanisms on interstitial pneumonitis *in vitro* and *in vivo*. We wish the information of this study could provide the suggestion of taking Chinese medicine safety. Therefore, we will have two years project to understanding the effects and mechanisms of Xiao-Chai-Hu-Tang and Fang Fong Huang Qi Tang on interstitial pneumonitis *in vitro* and *in vivo*.

In the first year,

- (A) Detection the effects of Xiao-Chai-Hu-Tang and Fang Fong Huang Qi Tang on extracellular matrix deposition related enzymes (MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-4、MM-9 and TIMP-1、TIMP-2) expression expressions by real-time PCR and cell proliferation by BrdU incorporation in human fibroblast cells.

(B) Besides, we will also demonstrate the effects of Xiao-Chai-Hu-Tang and Fang Fong Huang Qi Tang on TGF- β induced extracellular matrix deposition related enzymes expressions and cell proliferation in human fibroblast cells. The methods were same as described in (A).

In second year, we investigated the effects of Xiao-Chai-Hu-Tang and Fang Fong Huang Qi Tang on interstitial pneumonitis in animal study.

(A) Demonstrated the lung epithelium proliferation, lung inflammation and collagen deposition after treated with Xiao-Chai-Hu-Tang and Fang Fong Huang Qi Tang in C57B/6 mice.

Demonstrated bronchoalveolar lavage cells, lung pathology, collagen, MMPs, TIMP-1 and NF- κ B mRNA expressions after treated with Xiao-Chai-Hu-Tang and Fang Fong Huang Qi Tang in C57B/6 mice.

(B) We will demonstrate the effects of Xiao-Chai-Hu-Tang and Fang Fong Huang Qi Tang on interstitial pneumonitis in a murine model of lung fibrosis.

- a. Compared the lung fibrosis and inflammation between Xiao-Chai-Hu-Tang (Xiao) and Fang Fong Huang Qi Tang (Fang) treated and untreated groups in a murine model of lung fibrosis.
- b. Demonstrated bronchoalveolar lavage cells, lung pathology, collagen, MMPs, TIMP-1 and NF- κ B mRNA expressions after treated with Xiao-Chai-Hu-Tang and Fang Fong Huang Qi Tang in a murine model of lung fibrosis.

Method:

(A) Detection the effects of Xiao-Chai-Hu-Tang and Fang Fong Huang Qi Tang on extracellular matrix deposition related enzymes (collagen α 1, NF- κ B, MMP-2、MM-9 and TIMP-1) expression expressions by real-time PCR and lung inflammation by BALF cells profile and lung pathology.

(B) Lung collagen deposition by lung pathology.

Results & Discussion:

We found that treated different concentrations of Xiao-Chai-Hu-Tang and Fang Fong Huang Qi Tang for 24h, it did not show increase cell proliferation effects on WI-38 cells. Besides, treated 0.15, 1.5 mg/ml Xiao-Chai-Hu-Tang and 0.0175, 0.175, and 1.75 Fang Fong Huang Qi Tang showed inhibitory effect on WI-38 cells proliferation. After treated with TGF- β , the inhibitory of cell proliferation effect enhanced. Next, we detected the human collagen type I mRNA expression in WI-38

cells, we found that treated Xiao-Chai-Hu-Tang and Fang Fong Huang Qi Tang for 24h obviously inhibited human collagen type I mRNA expression but increase the TGF- β induced human collagen type I mRNA expression. The drugs from 順天 and 仙豐 did not show obviously difference. However, the drug from 港香蘭 did not show increase TGF- β induced human collagen type I mRNA expression. Further investigation the related MMPs and TIMPs expression, we found that treated Xiao-Chai-Hu-Tang and Fang Fong Huang Qi Tang for 24h inhibited MMP-9 mRNA expression but after cotreated with TGF- β we found Xiao-Chai-Hu-Tang and Fang Fong Huang Qi Tang increased the MMP-9 mRNA expression and inhibited TIMP-1 mRNA expression.

In animal study, 6 weeks old C57BL/6 mice were daily oraled 1 and 2 times to the recommend dosages of Xiao and Fang for 28 days. The BALF cells were harvested for analysis of lung inflammation. Lung tissue histology was stained with H&E and Masson's trichrome. The levels of the mRNAs of collagen-I, NF- κ B, MMPs and TIMPs in lung tissue were measured by real time PCR and we did not find obvious difference among different groups. In mouse pre-treated with bleomycin to induce interstitial pneumonitis and then treated with 1 and 2 recommend dosages of Xiao and Fang also did not observe the obviously increase in lung inflammation in BALF cells and lung pathology and lung collagen deposition, compared to only treated with bleomycin group. The levels of the mRNAs of collagen-I, NF- κ B, MMPs and TIMPs in lung tissue were measured by real time PCR and we did not find obvious difference among blenomycin treated groups. The drugs from 順天 and 仙豐 did not show obviously difference.

Keywords: Xiao-Chai-Hu-Tang, Fang Fong Huang Qi Tang, interstitial pneumonitis, Chinese medicine, human lung fibroblast cell

壹、前言

背景

一、間質性肺炎症狀、病因及治療現狀

間質性肺炎又稱為擴散性肺實質疾病(diffuse parenchymal lung diseases, DPLD)，主要造成肺間質組織如肺泡上皮細胞、肺部微血管內皮細胞、基底膜、血管周邊組織及淋巴周邊組織病變(King, 2005)。根據美國胸腔協會及歐洲呼吸協會的分析，擴散性肺實質疾病可分為：(1)已知形成原因 DPLD 如藥物引起或血管結締組織疾病造成；(2)未知原因所引起 DPLD；(3)自發性肺部間質性疾病(idiopathic interstitial pneumonias)包括自發性肺部纖維化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)及非自發性肺部纖維化肺部疾病；(4)肉牙腫(granulomatous) DPLD 如類肉瘤(sarcoidosis)(American Thoracic Society and European Respiratory Society, 2002)。在間質性肺炎的病因中肺部纖維化是導致病情惡化的主因及病徵，肺部纖維細胞增生會造成細胞外基質(extracellular matrix, ECM)增生並引起肺泡上皮細胞死亡，使得氣體交換功能失調。在間質性肺炎病患，其肺部纖維細胞會不斷增生不像在正常肺部纖維細胞增生受到嚴密的調控(Xia *et al.*, 2008)；此外，異常 ECM 再造(remodeling)主要與 matrix metalloproteinase (MMP) 家族如 collagenase-1 (MMP-1)、gelatinases A 和 B (MMP-2 和 -9) 及 the tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs) 的調控有關(Hayashi *et al.*, 1996)。肺部纖維細胞對於異常 ECM 再造扮演重要角色因為纖維細胞正是異常分泌 ECM 的主要來源。

目前對於間質性肺炎的成因除了第一類已知原因外，其他類還不清楚，且對於間質性肺炎作用機制也不清楚。根據目前研究指出，間質性肺炎的形成有一連串複雜的環境及基因相關因子所調控，並且經由無數研究者利用基因體微陣列及蛋白質體的分析，對於診斷及治療間質性肺炎提供新的方法及方向。在 Yang 等人的研究中，分析家族性及自發性發現肺部間質性疾病(interstitial pneumonias)的基因並進一步利用肺纖維疾病小鼠動物模式發現 CXCL12 chemokine 與其受體 CXCR4 扮演相當重要的角色(Yang *et al.*, 2007)。Tzouvelekis 等人的研究中(Tzouvelekis *et al.*, 2007)，發現間質性肺炎與 intergrin 及低氧環境所引發訊息傳遞有關。進一步利用微陣列分析低氧環境對於肺部纖維化的作用機制顯示在自發性肺部纖維化疾病(IPF)增生的第二型肺泡上皮細胞中 hypoxia inducible factor (HIF)-1 α 及 HIF 基因會過量表現。而調控 HIF-1 的表現除了低氧環境外，引發發炎作用細胞激素 TNF- α 也會增加其表現。此外，許多研究也指出在肺纖維化的易感小鼠

動物模式中，與發炎有關的細胞激素如 identified dipeptidyl-peptidase I (DPPI or cathepsin C) 及 tissue inhibitor matrix metalloproteinase (TIMP)-3 表現量會增加(Pottier *et al.*, 2007)。與巨噬細胞相關的細胞激素如 macrophage colony stimulating factor (M-CSF) 及 CC chemokine ligand 2 (CCL2) 的表現量會增加 (Baran *et al.*, 2007)。除巨噬細胞外，樹突狀細胞在在自發性肺部纖維化疾病 (IPF) 數目也有增加的現象(Marchal-Somme *et al.*, 2007)。由以上研究顯示，免疫與發炎反應為引發肺部纖維化疾病的病理角色中扮演重要角色。

由於間質性肺炎區分為多種類型非單一疾病，目前對於間質性肺炎的治療需依照不同疾病的不同成因來著手。針對自發性與結締組織相關間質性肺炎目前主要使用類固醇類藥物治療如 prednisolone，有些病人會伴隨免疫抑制藥物的治療，病人如有低氧的情形出現則會補充氧氣。此外，如果是因職業關係曝露有害物質需避免此類環境，如為藥物引起應停止服用藥物。最新研究也發現抑制 T 細胞 nuclear facor- κ B 的表現不但可以避免肺部纖維化對於 bleomycin 所誘發肺纖維疾病小鼠動物模式也有治療的效果 (Fujimoto *et al.*, 2007)。

二、中藥引起間質性肺炎現況及作用機制

自從 1989 年築山邦規等人首次報導第一例因服用小柴胡湯引起間質性肺炎以來，在日本，至 1998 年有關小柴胡湯引起間質性肺炎已達 138 例，其中包括死亡的病例(賀琦 and 張天高, 2000)。因此引起了日本政府高度重視對於中藥引發間質性肺炎進行一系列研究，將在臨床報告中發現會引發間質性肺炎的中藥如黃連解毒湯、乙字湯、牛車腎氣丸(湯)、紫胡桂枝湯、紫胡桂枝乾薑湯、牛車腎氣丸、紫朴湯、紫芩湯、小柴胡湯、大柴胡湯、小青龍湯、辛夷清肺湯、清心蓮子湯、清肺湯、麥門冬湯、半夏瀉心湯、補中益氣湯、防風通聖散、防己黃耆湯在販賣包裝上加上警語。

中藥引起間質性肺炎屬於藥物引起間質性肺炎，其臨床報告顯示其症狀類似包括運動後呼吸困難、咳嗽有痰、發燒，胸部 X 線檢查有間質性肺炎的瀰漫性陰影，大部分的患者在停止服用中藥後搭配藥物治療後都可痊癒(Shiota *et al.*, 1996; Takeshita *et al.*, 2001; Katayama *et al.*, 2004; Hata and Uehara, 2005)。在中藥引起間質性肺炎的研究，以小柴胡湯(成份：柴胡、黃芩、人參、大棗、甘草、生薑、半夏)最為清楚。小柴胡湯在日本使用相當廣泛，主要治療慢性肝炎、肝硬化及肝癌。在臨床上，小柴胡湯所引發間質性肺炎特點有(1)多見於 50-70 歲的中老年者或少年兒童(最小 7 歲)，而青壯年少見；(2)患者多有肝臟疾患，常見於患有丙型肝炎病毒感染的慢性肝炎或肝纖維化、肝癌；(3)一些病例已經連續服用小柴胡湯多年；(4)肺炎發生在連續服藥 2~3 個月之後；(5)初發症狀為發燒，乾咳，呼吸困

難；(6) 胸部X線檢查有間質性肺炎的瀰漫性陰影(微細結節形或毛玻璃狀陰影特點，中下野多見)，肺聽診可聞及細濕囉音；(7) 小柴胡湯或干擾素的DLST(淋巴細胞刺激實驗)多出現陽性反應；(8) 支氣管肺泡灌注液可見肺泡炎，淋巴細胞、中性粒細胞或嗜酸性粒細胞浸潤、CD4/CD8 T細胞比值降低；肺活檢見肺泡炎、肺間隔過度增生；屍體解剖發現瀰漫性肺泡損傷和蜂窩狀改變；(9) 停用小柴胡湯後肺炎好轉，用激素治療有效；再次應用小柴胡湯又復發；(10) 死亡患者多死於呼吸衰竭和肝功能障礙。

在研究中發現，分離自發性肺部纖維化疾病患者肺組織及正常人肺纖維細胞，處理小柴胡湯會增加IL-6及IL-8的表現，並會吸引嗜中性白血球(neutrophil)至肺部(黃欣, 1999)。在實驗小鼠研究中發現，口服小柴胡湯會增加肺組織IL-6的表現但不影響TNF- α 及IL-1 β 的表現，分析其成分發現與甘草素(liquiritigenin)有關；但在本研究中也發現小柴胡湯會抑制lipopolysaccharide(LPS)引起肺沖洗液中嗜中性球增加的現象(Otakea *et al.*, 2000)。此外，在drug lymphocyte stimulation test實驗中顯示小柴胡湯成分黃芩陽性率最高其次為柴胡、半夏、人參(李杰芬, 1997)。由以上研究顯示，服用小柴胡湯引起間質性肺炎出現病情惡化甚至死亡的肺纖維化現象應為在已有疾病的情形下能長期服用小柴胡湯，使得肺部產生長期發炎反應所引起的肺組織纖維化而致死。

目的

由於日前電視報導婦人食用防風通聖散(成份：防風、川芎、當歸、芍藥、大黃、薄荷、麻黃、連翹、石膏、黃芩、桔梗、滑石、甘草、荊芥、白朮、滬子、生薑、芒硝)減肥導致間質性肺炎喚醒國人對於中藥引起副作用的重視。在臺灣及大陸地區相較於日本，較少因服用中藥引起間質性肺炎的病例，主要因為日本中醫是隨證療法，方證相對不拘於體質，歸納症候群來處方，與傳統中醫強調辨證論治不同。隨證療法有其簡便性，只要症候群相對應即可處方，但卻容易導致副作用而失去療效甚至危及性命。雖然臺灣地區，較少發生中藥引起間質性肺炎，但國人仍有自行購買中藥服用的現象，且目前對於日本政府在包裝標示會引發間質性肺炎警語的中藥是否會導致間質性肺炎及其作用機制仍不清楚。故必須進一步研究此類中藥是否會導致間質性肺炎或引起間質性肺炎的惡化及其作用機制，以作為是否未來是否對中藥產生間質性肺炎進行擴大篩選、上市時的篩選項目及列入藥物包裝警語中的依據。

因此，本研究選擇兩種指標性藥物小柴胡湯及防風通聖散分兩年探討其是否會誘發間質性肺炎及其作用機制，且選定之前研究未探討或不清楚的機制進行相關研究。今年度，我們將利用 *in vitro* 方法探討小柴胡湯及防

風通聖散對於人類肺部纖維細胞 extracellular matrix 異常增生相關酵素及細胞增生的表現；明年度，我們將利用 *in vivo* 方法探討小柴胡湯及防風通聖散對於小鼠是否會產生間質性肺炎及其作用機制並探討是否造成間質性肺炎小鼠動物模式中間質性肺炎的惡化及其作用機制。透過本研究，我們將可以瞭解小柴胡湯及防風通聖散是否引發或增強間質性肺炎的作用，並建立評估中藥引發或增強間質性肺炎的實驗平台，以作為未來是否對中藥產生間質性肺炎進行擴大篩選、上市時的篩選項目及在包裝上加上警語的參考。

貳、材料與方法

第一年：Specific aim 為 評估市售小柴胡湯及防風通聖散對於人類肺部纖維細胞，細胞外基質(extracellular matrix, ECM)異常增生相關酵素及細胞增生的表現的影響。

- 一、市售小柴胡湯及防風通聖散對於肺部纖維細胞 ECM 異常增生相關酵素的偵測方法為：培養肺部纖維細胞株處理不同濃度(0.0015, 0.015, 0.15, 1.5 mg/ml)小柴胡湯及(0.00175, 0.0175, 0.175, 1.75 mg/ml)防風通聖散，部分實驗組會再加入 TGF- β ，利用 realtime-PCR 方法測定 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-4、MM-9 及 TIMP-1、TIMP-2 的表現。
- 二、市售小柴胡湯及防風通聖散對於肺部纖維細胞增生的影響並評估是否會加強 TGF- β 刺激肺部纖維細胞增生的能力。我們則利用 BrdU incorporation 方法並同上述的處理藥物的條件方法偵測肺部纖維細胞增生的能力。

1-1 藥品與化學試藥

小柴胡湯及防風通聖散購自順天堂製藥有限公司(Taiwan)、仙豐製藥有限公司(Taiwan)及港香蘭製藥有限公司(Taiwan)。其成分標準化、含量、製程將由順天堂、仙豐及港香蘭提供。

1-2 細胞培養

WI-38 human normal lung fibroblast cells 購自 ATCC (Manassas, VA, USA). WI-38 cells 培養於 DMEM medium 含有 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS) (Invirogen)以 1:3 比率繼代培養於 37°C，5% CO₂ 培養箱。

1-3 以 realtime PCR 定量基因表現

將 RNA 反轉錄成 cDNA 後，使用 ABI PRISM 7900 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)分析 mRNA 基因表現。PCR 的條件為：50°C 2 分鐘，95°C 10 分鐘，60°C 1 分鐘，重複 40 cycles。以 Ct (threshold cycle) 表示每個基因的表現量，並用 endogenous control hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT)基因的表現做為 mRNA 量的校正。

1-4 BrdU incorporation assay

將細胞培養於 96well 後，經過不同濃度的藥物處理，以 BrdU incorporation assay kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 所提供的方法測定細胞增生。

1-5 統計分析

所有實驗數據會以 mean \pm S.E.M. 呈現，並利用 one-way ANOVA 及 Newman-keuls 事後檢定方法分析統計差異， $p < 0.05$ 認定為有統計差異。

第二年：Specific aim 1：*in vivo* 評估市售小柴胡湯及防風通聖散對於小鼠是否會產生間質性肺炎及其作用機制。

根據日本之前對於小柴胡湯產生間質性肺炎的臨床報告，肺炎發生在連續服藥 2~3 個月之後，因此，在動物實驗設計方法為：依據衛生署 2008 年公佈國人平均壽命為 78 歲換算成小鼠 life cycle 為 18 個月，因此小鼠服用小柴胡湯理論上只需 2 天便可產生傷害，但顧及有部分病患會服用一年以上且並非立即吃藥後便有病理反應，我們將評估時間設為 28 天。劑量選擇根據市售建議每日成人所需服用量 9g，以 78kg 為標準以表面積換算成老鼠的每日食用劑量為 1.42g/kg，以一倍及兩倍食用劑量進行小柴胡湯及防風通聖散對於小鼠是否會產生間質性肺炎的評估：包括（1）利用組織切片染色後觀察 epithelium 的增生、lung inflammation 及 collagen 的沈澱的產生。（2）測定肺沖洗液中發炎細胞的種類及數目，觀察肺部發炎的情形。（3）透過測定肺組織中 collagen、NF- κ B、MMPs、TIMP-1 的表現，進一步探討市售小柴胡湯及防風通聖散對於間質性肺炎作用機制。

Specific aim 2: *in vivo* 評估市售小柴胡湯及防風通聖散對於間質性肺炎小鼠動物模式中間質性肺炎的惡化及其作用機制。

我們將利用 bleomycin 建立間質性肺炎小鼠動物模式，比較給予小柴胡湯及防風通聖散後對於間質性肺炎小鼠動物模式中，間質性肺炎是否有惡化的情形包括：包括（1）利用組織切片染色後觀察 epithelium 的增生、lung inflammation 及 collagen 的沈澱的產生。（2）測定肺沖洗液中發炎細胞的種類及數目，觀察肺部發炎的情形。（3）透過測定肺組織中 collagen、NF- κ B、MMPs、TIMP-1 的表現。

2-1 動物實驗設計與建立間質性肺炎小鼠動物模式

實驗設計（1）評估市售小柴胡湯及防風通聖散對於小鼠是否會產生間質性肺炎：7 週大公的 C57BL/6 小鼠，隨意分為五組，每組 6 隻，分別為 PBS 組、市售劑量小柴胡湯組、兩倍市售劑量小柴胡湯組、市售劑量防風通聖散組及兩倍市售劑量防風通聖散組，每天以管餵方式給予小柴胡湯及防風通聖散一次，經 28 天後，觀察對於小鼠是否會產生間質性肺炎。

實驗設計（2）評估市售小柴胡湯及防風通聖散對於間質性肺炎小鼠動物模式中間質性肺炎的惡化及其作用機制：在間質性肺炎小鼠動

物模式實驗中(Ara *et al.*, 2000)，將動物麻醉，以單一劑量氣管滴入的方式給予 0.8mg/kg 體積為 0.05ml 的 bleomycin 誘發肺部纖維化，之後再以管餵方式給予小柴胡湯及防風通聖散經 21 天後，觀察對於小鼠間質性肺炎的影響。實驗設計為將 7 週大公的 C57BL/6 小鼠，隨意分為六組，每組 6 隻，分別為 PBS 組、bleomycin 組、bleomycin+市售劑量小柴胡湯組、bleomycin+兩倍市售劑量小柴胡湯組、bleomycin+市售劑量防風通聖散組及 bleomycin+兩倍市售劑量防風通聖散組。

2-2 藥品與化學試藥

小柴胡湯及防風通聖散購自順天堂(Taiwan)、仙豐(Taiwan)及港香蘭(Taiwan)製藥有限公司(Taiwan)。其成分標準化、含量、製程將由順天堂、仙豐及港香蘭提供。藥物配法如下：

建議劑量 human 6 (g/day) (港香蘭小柴胡)
則 mouse 0.947 (g/kg BW/day)
20g BW mouse 需要 18.93mg/300μL，餵食體積 300μL
餵食體積 (μL)= BW (g) *15

一倍劑量，秤取 0.170g 藥粉，再加入 2.7mL 無菌水回溶，震盪均勻。
二倍劑量，秤取 0.340g 藥粉，再加入 2.7mL 無菌水回溶，震盪均勻。

建議劑量 human 9 (g/day) (順天堂小柴胡、仙豐防風/小柴胡、港香蘭防風)
則 mouse 1.42 (g/kg BW/day)
20g BW mouse 需要 28.4mg/300μL，餵食體積 300μL
餵食體積 (μL)= BW (g) *15

一倍劑量，秤取 0.256g 藥粉，再加入 2.7mL 無菌水回溶，震盪均勻。
二倍劑量，秤取 0.5112g 藥粉，再加入 2.7mL 無菌水回溶，震盪均勻。

建議劑量 human 10.5 (g/day) (順天堂防風)
則 mouse 1.65 (g/kg BW/day)
20g BW mouse 需要 33mg/300μL，餵食體積 300μL
餵食體積 (μL)= BW (g) *15

一倍劑量，秤取 0.297g 藥粉，再加入 2.7mL 無菌水回溶，震盪均勻。
二倍劑量，秤取 0.594g 藥粉，再加入 2.7mL 無菌水回溶，震盪均勻。

2-3 支氣管肺泡沖洗液與組織病理學研究

第 28 天，將所有的老鼠犧牲。然後立即將自支氣管插管以 1 ml 不含鈣鎂離子之 HBSS 灌洗三次至老鼠肺部後收集起來。將所收集的肺泡沖洗液以 400g 的轉速在 4°C 下離心 10 分鐘。離心後所得之細胞懸浮於 1 ml HBSS 中，然後以 hemocytometer 計算細胞總數。接著以 Cytocentrifuged preparations 將細胞固定於玻片上後再進行劉氏染色 (Liu's stain) 以計算各類細胞之數目。各類細胞數目以 300 顆細胞中巨噬細胞、淋巴球、嗜中性球與嗜伊紅性白血球各自所佔之數目來計算，並且根據其標準型態來分類。組織病理分析實驗的部分，取得肺泡沖洗液後就立即將其肺臟取下以中性福馬林固定。組織以石蠟包埋後切成 5 μm 後的切片。此組織切片以 hematoxylin/eosin (H&E) 及以 Masson's Trichrome 染色，在顯微鏡下肺部發炎、膠原蛋白沈澱的產生的情形。

2-4 以 realtime PCR 定量基因表現

將 RNA 反轉錄成 cDNA 後，使用 ABI PRISM 7900 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 分析 mRNA 基因表現。PCR 的條件為：50°C 2 分鐘，95°C 10 分鐘，60°C 1 分鐘，重複 40 cycles。以 Ct (threshold cycle) 表示每個基因的表現量，並用 endogenous control hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) 基因的表現做為 mRNA 量的校正。

2-5 統計分析

所有實驗數據會以 mean \pm S.E.M. 呈現，並利用 one-way ANOVA 及 Newman-keuls 事後檢定方法分析統計差異， $p < 0.05$ 認定為有統計差異。

參、結果

一、小柴胡湯及防風通腎散抑制人類肺部纖維細胞增生卻會增加 TGF- β 促肺纖維細胞增生的反應

我們發現給予不同濃度小柴胡湯及防風通腎散 24 小時後，並不會造成 human lung fibroblast cell line WI-38 增生的作用 (Fig.1)。且處理 0.15 及 1.5mg/ml 小柴胡湯及 0.0175、0.175 及 1.75mg/ml 防風通腎散 24 小時後，皆可抑制 human lung fibroblast cell 的增生並呈現劑量關係。我們也利用 trypan blue exclusion 方法觀察細胞死亡的情形，結果顯示，給予不同濃度小柴胡湯及防風通腎散 24 小時後，高濃度小柴胡湯 1.5mg/ml 及防風通腎散 1.75mg/ml 會明顯引起 WI-38 細胞死亡，小柴胡湯 0.15mg/ml 和防風通聖散 0.175mg/ml 分別會造成 10% 及 13% 細胞死亡的情形。其餘濃度並不會造成 WI-38 細胞有明顯死亡的情形。

因為高濃度 1.5mg/ml 小柴胡湯及 1.75 mg/ml 防風通腎散在加入細胞培養液時有明顯混濁不溶解的情形且會明顯造成細胞死亡，因此在進一步實驗中不採用這個濃度時，在給予 TGF- β 處理後，小柴胡湯 0.015mg/ml 和防風通聖散 0.0175mg/ml 有明顯增加 TGF- β 促肺纖維細胞增生的反應。順天堂與仙豐所生產市售小柴胡湯及防風通聖散者比較並無顯著的差異。但在港香蘭所生產市售小柴胡湯及防風通聖散並無明顯增加 TGF- β 促肺纖維細胞增生的反應。

二、小柴胡湯及防風通腎散抑制 human collagen type I mRNA 生成卻促進 TGF- β 引起 collagen type I mRNA 生成

進一步利用 realtime PCR 方法檢測 collagen mRNA 的表現，結果顯示，單獨處理小柴胡湯與防風通腎散有明顯抑制 human collagen type I mRNA 生成，並在高濃度具有統計意義 (Fig 2)。其抑制現象有劑量關係成負相關。然而，評估對於 TGF- β 所誘發 human collagen type I mRNA 生成作用時，卻發現處理小柴胡湯 0.015mg/ml 與防風通腎散 0.0175mg/ml 會增加 TGF- β 所誘發 human collagen type I mRNA 生成 (Fig 2)。於是我們進一步分析與形成 collagen 沈澱有關酵素 MMPs 及 TIMPs 的表現，初步結果顯示，單獨處理小柴胡湯與防風通腎散有抑制 MMP-9 mRNA 的表現的現象，但同時處理 TGF- β 後，有促進 MMP-9 mRNA 的表現及抑制 TIMP-1mRNA 的表現的現象。其他相關酵素包括 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-4、TIMP-2 mRNA 的表現，則無明顯的作用。

三、餵食小柴胡湯及防風通聖散並不會造成小鼠肺部發炎及纖維化

為了瞭解餵食市售小柴胡湯及防風通腎散對於間質性肺炎的作用，我

們餵食小鼠一倍與兩倍建議劑量由順天堂與仙豐所生產的市售小柴胡湯及防風通聖散 28 天後，觀察肺部發炎的情形。首先在體重方面，餵食小鼠一倍與兩倍建議劑量由順天堂、仙豐及港香蘭所生產的市售小柴胡湯及防風通聖散 28 天後，並不會造成體重下降與餵食二次水組並無明顯差別 (Fig.3)。進一步，利用觀察肺部沖洗液中發炎細胞種類及數目，結果顯示餵食小鼠一倍與兩倍建議劑量市售小柴胡湯及防風通聖散不論由順天堂、仙豐及港香蘭所生產經過 28 天後，皆不會造成肺部沖洗液中發炎細胞增加的現象 (Fig.4)，且觀察不同種類比例，也顯示並沒有造成 neutrophil、eosinophil、lymphocyte 有明顯增加的現象 (Fig.4)。在肺部病理切片也得到類似的結果。在餵食小鼠一倍與兩倍建議劑量由順天堂與仙豐所生產的市售小柴胡湯及防風通聖散 28 天後，並沒有發現肺部有發炎 (Fig.5A) 及纖維化的現象 (Fig.5B)。

四、餵食小柴胡湯及防風通聖散並不會影響肺組織 collagen、NF- κ B、MMPs、TIMP-1 的 mRNA 表現

進一步利用 realtime PCR 方法檢測肺組織與間質性肺炎有關的基因其 mRNA 的表現，結果顯示，餵食一倍與兩倍建議劑量小柴胡湯與防風通聖散 28 天後，不論是順天堂 (Fig.6A) 或仙豐 (Fig.6B)，都不會增加 collagen、NF- β 、MMP-2、MMP-9、TIMP-1 的 mRNA 表現 (Fig.6)。

五、餵食小柴胡湯及防風通聖散並不會增加 blenomycin 所導致小鼠肺部發炎及纖維化

進一步利用我們利用 blenomycin 引發鼠肺部發炎及纖維化來模擬小間質性肺炎的動物模式、探討小柴胡湯及防風通聖散是否會增加間質性肺炎的病徵-肺部發炎及纖維化。我們利用氣管滴入的方式給予 blenomycin 經過 14 天後用觀察肺部沖洗液中發炎細胞種類及數目確定肺部發炎後，餵食小柴胡湯及防風通聖散，經 28 與 21 天後，犧牲小鼠，觀察肺部有發炎及纖維化的現象。首先，在小鼠體重部分，結果顯示，再給予 blenomycin 組別體重較 negative control 都來的低，但再給予小柴胡湯及防風通聖散組別與只給予 blenomycin positive control 組別，並無明顯差別 (Fig.7)。在觀察肺部沖洗液中發炎細胞種類及數目，結果只給予 blenomycin positive control 組別，及細胞數相較於 negative control 組有明顯增加，進一步觀察不同種類比例顯示餵食小鼠一倍與兩倍建議劑量市售小柴胡湯及防風通聖散不論由順天堂與仙豐所生產，皆有 lymphocyte 明顯增加的現象 (Fig.8)，其他細胞 macrophage、neutrophil、eosinophil 顯示並沒有造成明顯增加的現象。在肺部病理切片也得到類似的結果。在餵食小鼠一倍與兩倍建議劑量由順天堂生產的市售小柴胡湯及防風通聖散 21 天後，結果只給予 blenomycin positive

control 組別，發炎細胞數相較於 negative control 組有明顯增加(Fig.9A)，且也有明顯纖維化的現象(Fig.9B)，然而在餵食小鼠一倍與兩倍建議劑量由順天堂及仙豐生產的市售小柴胡湯及防風通聖散後，其肺部發炎與纖維化的情形，並無明顯增加(Fig.9)。因為小鼠在給予 blenomycin 後體重下降健康情形較差因此餵食仙豐中藥的小鼠提早於餵食小柴胡湯及防風通聖散，經 21 天後，犧牲小鼠。之後，在經比較餵食順天堂小柴胡湯及防風通聖散，經 21 天(8B)與 28 天(8A)後的結果並無顯著差異。

六、餵食小柴胡湯及防風通聖散並不會增加 blenomycin 所導致 collagen、NF- β 、MMPs、TIMP-1 的 mRNA 表現

進一步利用 realtime PCR 方法檢測肺組織與間質性肺炎有關的基因其 mRNA 的表現，結果顯示只給予 blenomycin positive control 組別 collagen、NF- κ B、MMP-2、TIMP-1 的 mRNA 表現都較 negative 有增加的現象，但只有在 collagen 及 TIMP-1 mRNA 表現有統計上的差異(Fig.10)。餵食小鼠一倍與兩倍建議劑量由順天堂與仙豐所生產市售小柴胡湯及防風通聖散 28 與 21 天後，並無明顯增加 collagen、NF- κ B、MMP-2、TIMP-1 的 mRNA 表現。

肆、討論

由於在之前日本多起臨床報告中發現服用小柴胡湯及防風通聖散會造成肺部纖維化，而在我們第一年 *in vitro* 結果證實處理小柴胡湯及防風通聖散 24 小時，會抑制人類肺部纖維細胞增生、human collagen I mRNA 及 MMP-9 的表現，卻會增加 TGF- β 誘發肺部纖維細胞增生、human collagen I mRNA 表現，並會增加 MMP-9 的表現及抑制 TIMP-1 的表現。因此，為了進一步釐清小柴胡湯及防風通聖散是否會增加間質性肺炎的風險。

一、我們利用 *in vivo* 小鼠實驗餵食小柴胡湯及防風通聖散經 28 天後，觀察相關因子的變化。得到下列的結果：

- (一) 在體重變化部分，餵食小柴胡湯及防風通聖散與餵食二次水的組別並無差別。
- (二) 在肺部發炎與纖維化的分析，不論是肺沖洗液或肺部切片染色，餵食小柴胡湯及防風通聖散與餵食二次水的組別並無差別。
- (三) 在肺組織中 collagen、NF- κ B、MMP-2、MMP-9、TIMP-1 的 mRNA 表現，餵食小柴胡湯及防風通聖散與餵食二次水的組別並無差別。
- (四) 在比較順天堂與仙豐所生產小柴胡湯及防風通聖散經 28 天餵食後，以上的結果也無差別。

二、為了進一步瞭解已經是間質性肺炎的情況下，小鼠再餵食小柴胡湯及防風通聖散 21 天（仙豐）與 28 天（順天堂）後對於肺部發炎及纖維化的影響。

- (一) 在體重變化部分，給予 blenomycin positive control 組，經 3 天後與沒有給予 blenomycin 組別相比便可發現到體重下降，但再給予小柴胡湯及防風通聖散組別與只給予 blenomycin positive control 組別，並無明顯差別。
- (二) 在肺部發炎與纖維化的分析，給予 blenomycin positive control 組其不論是肺沖洗液或肺部切片染色，皆有明顯增加肺部發炎及纖維化的情形，餵食小柴胡湯及防風通聖散後與只給予 blenomycin positive control 組別，並無統計上明顯差別。
- (三) 在肺組織中 collagen、NF- κ B、MMP-2、MMP-9、TIMP-1 的 mRNA 表現，給予 blenomycin positive control 組表現量除 MMP-9 外皆有明顯增加，在餵食小柴胡湯及防風通聖散後與只給予 blenomycin positive control 組別，並無統計上明顯差別。
- (四) 在比較順天堂、仙豐與港香蘭所生產小柴胡湯及防風通聖散後，其結果並無顯著差別。

本研究目的是要研究是否市售小柴胡湯及防風通聖散會引發間質性肺炎的副作用。就其複方之單一藥材的藥理作用，針對小柴胡湯在藥理的研究發現，在免疫功能的部份，許多研究都發現小柴胡湯有抑制肝炎及肝癌的作用(呂鋒洲, 92.10; 鄭振鴻 and 吳正文, 95.05; 陳明和 *et al.*, 97.06)、在免疫作用上(覃仁安, 1995)，*in vitro* 研究中，有增加 mice nature killer cell 活性、human peripheral mononuclear cells IL-1 IL-2, IL-4, IL-6 的表現。在抗發炎反應中，有發現會抑制刺激劑所誘發關節腫脹的作用，抑制 macrophage phospholipase A2 的活性。但在楊書蘭等人(楊書蘭 *et al.*, 96.02)的研究中卻發現餵食小柴胡湯 14g/kg/d 經 10 天，會明顯增加鴨乙型肝炎病毒所導致的肝組織發炎及肝細胞壞死的現象，作者認為小柴胡湯有增強型肝炎病毒免疫反應的作用。但在我們的實驗中不論是單獨餵食或給予 blenomycin 後餵食小柴胡湯都沒有觀察到引發或增加肺部發炎的情形。所以並無觀察到作者所提 *in vivo* 的增加免疫反應的現象，會造成如此差異的原因可能有：(a)劑量的不同，本研究使用劑量較低；(b)引發發炎的反應的物質不同為病毒我們是 blenomycin 抗生素；(c)觀察的部位不同；(d)動物品系不同。在防風通聖散的研究其藥理作用包括減脂及降血醣並無有增加免疫反應或發炎反應的研究。

伍、結論與建議

處理順天堂與仙豐所生產小柴胡湯及防風通腎散 24 小時，會抑制人類肺部纖維細胞增生、human collagen I mRNA 及 MMP-9 的表現，卻會增加 TGF- β 誘發肺部纖維細胞增生、human collagen I mRNA 表現，並會增加 MMP-9 的表現及抑制 TIMP-1 的表現。但在港香蘭所生產的小柴胡湯及防風通腎散並無增加 TGF- β 誘發肺部纖維細胞增生。

再進一步利用 *in vivo* 小鼠實驗餵食市售劑量一倍與兩倍小柴胡湯及防風通聖散 28 天後，並不會有引發間質性肺炎的現象也無引發毒性的現象。在間質性肺炎小鼠動物模式中餵食市售劑量一倍與兩倍小柴胡湯及防風通腎散 21 天後，也並無明顯增加肺部發炎及纖維化的情形，因此，餵食市售劑量小柴胡湯及防風通聖散導致間質性肺炎在本次實驗並無發現。

本次研究的目的再評估小柴胡湯及防風通聖散對於間質性肺炎的毒性研究，我們所用的劑量雖然比一般再做毒性試驗低一倍但因為我們的實驗為評估一般人在食用小柴胡湯及防風通聖散對於間質性肺炎的作用並非一般藥物上市的毒性測試因此才採用此劑量且給小鼠實驗的時間 28 天平均壽命 2 年，推算人類約 3 年 (2008 年平均壽命 78 年)。因此劑量並不會太少。雖然動物實驗上並無明顯作用但因為在 human fibroblast cells 中，小柴胡湯及防風通聖散會增加 TGF- β 所誘導 collagen type I mRNA 的表現，為了謹慎起見，所以仍然建議宜小心。或許未來可請專家利用設計實驗進行 human 的研究，以進一步釐清。但在已有肺炎的病患宜應小心。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會計畫編號 CCMP97-CT-008 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

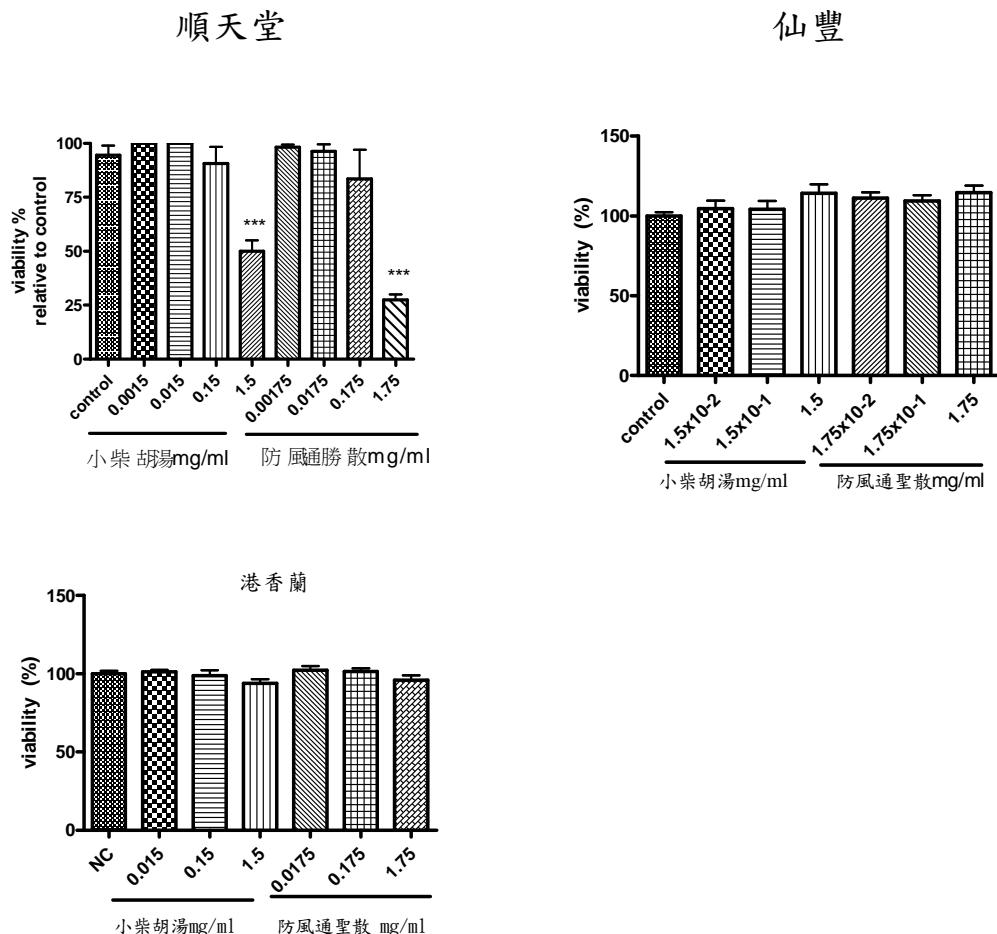
1. American Thoracic Society, and European Respiratory Society (2002). American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS) and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Med* 165, 277-304.
2. Ara, T., Abe, K. Y., Matsuoka, H., Yoshida, M., Mori, M., Goya, S., Kida, H., Nishino, K., Osaki, T., Tachibana, I., Kaneda, Y., and Hayashi, S. (2000). Introduction of the interleukin-10 gene into mice inhibited bleomycin-induced lung injury *in vivo*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278, L914-L922.
3. Baran, C. P., Opalek, J. M., McMaken, S., Newland, C. A., O'Brien, J. M. J., Hunter, M. G., Bringardner, B. D., Monick, M. M., Brigstock, D. R., and Stromberg, P. C. (2007). Important roles for macrophage colony-stimulating factor, CC chemokine ligand 2, and mononuclear phagocytes in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 176, 78-89.
4. Fujimoto, H., D'Alessandro-Gabazza, C. N., Palanki, M. S., Erdman, P. E., Takagi, T., Gabazza, E. C., Bruno, N. E., Yano, Y., Hayashi, T., and Tamaki, S. (2007). Inhibition of nuclear factor-kB in T cells suppresses lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 176, 1251-1260.
5. Hata, Y., and Uehara, H. (2005). A case where herbal medicine sho-seiryu-to induced interstitial pneumonitis. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*. 43, 23-31.
6. Hayashi, T., Stetler-Stevenson, W. G., Fleming, M. V., Fishback, N., Koss, M. N., Liotta, L. A., Ferrans, V. J., and Travis, W. D. (1996). Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lungs of patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 149, 1241-1256.
7. Katayama, H., Hamada, H., Yokoyama, A., Kadokami, T., Ito, R., and Higaki, J. (2004). A case of interstitial pneumonia caused by gosha-jinki-gan. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 41, 675-678.
8. King, T. E. (2005). Clinical advances in the diagnosis and therapy of the interstitial disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 172, 268-279.

9. Marchal-Somme, J., Uzunhan, Y., Marchand-Adam, S., Kambouchner, M., Valeyre, D., Crestani, B., and Soler, P. (2007). Dendritic cells accumulate in human fibrotic interstitial lung disease. . *Am J Respir Crit Care Med* 176, 1007-1014.
10. Otakea, N., Suzukia, R., Daikuharaa, H., Nakaia, Y., Yamamotoa, M., Amagayaa, S., Ishigea, A., Sasakia, H., Komatsua, Y., Fukudab, K., and Hayashi, S. (2000). Modulation of lung local immune responses by oral administration of a herbal medicine Sho-saiko-to. *Int J Immunopharmacol* 22, 419-430.
11. Pottier, N., Chupin, C., Defamie. V., Cardinaud, B., Sutherland, R., Rios, G., Gauthier, F., Wolters, P. J., Berthiaume, Y., and Barbry, P. (2007). Relationships between early inflammatory response to bleomycin and sensitivity to lung fibrosis: a role for dipeptidyl-peptidase I and tissue inhibitor of metalloproteinase-3? . *Am J Respir Crit Care Med* 176, 1098-1107.
12. Shiota, Y., Wilson, J. G., Matsumoto, H., Munemasa, M., Okamura, M., Hiyama, J., Marukawa, M., Ono, T., Taniyama, K., and Mashiba, H. (1996). Adult respiratory distress syndrome induced by a Chinese medicine, kamisyoyo-san. *Internal Med* 35, 494-496.
13. Takeshita, K., Saisho, Y., Kitamura, K., Kaburagi, N., Funabiki, T., Inamura, T., Oyamada, Y., Asano, K., and Yamaguchi, K. (2001). Penumoitis induced by ou-gon (scullcap). *Internal Med* 40, 764-768.
14. Tzouvelekis, A., Harokopos, V., Paparountas, T., Oikonomou, N., Chatzioannou, A., Vilaras, G., Tsiambas, E., Karameris, A., Bouros, D., and Aidinis, V. (2007). Comparative expression profiling in pulmonary fibrosis suggests a role of hypoxia-inducible factor-1a in disease pathogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 176, 1108-1119.
15. Xia, H., Diebold, D., Richard, N., Perlman, D., Kleidon, J., Kahm, J., Avdulov, S., Peterson, M., Nerva, J., Bitterman, P., and Henke, C. (2008). Pathological integrin signaling enhances proliferation of primary lung fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis *J Exp Med* 205, 1659-1672.
16. Yang, I. V., Burch, L. H., Steele, M. P., Savov, J. D., Hollingsworth, J. W., McElvania-Tekippe, E., Berman, K. G., Speer, M. C., Sporn, T. A., and Brown, K. K. (2007). Gene expression profiling of familial and sporadic

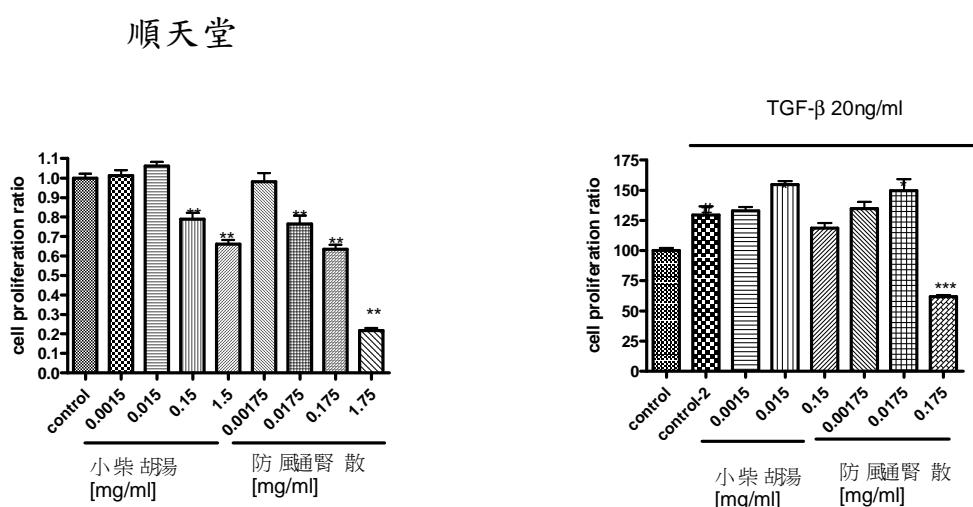
- interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 175, 45-54.
- 18. 呂鋒洲 (92.10). 中藥方劑小柴胡湯之成分誘導人類肝癌細胞計畫性死亡之機制探討. 行政院衛生署中醫藥年報 21:1, 頁 263-315。
 - 19. 李杰芬 (1997). 關於小柴胡湯引起間質性肺炎及其對策. 國外醫學中醫中藥分冊 19, 64-65。
 - 20. 陳明和、陳榮洲、蔡金川、王穩創、謝小燕 (97.06). Xiao-Chai-Hu-Tang Attenuated the Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen and Epidermal Growth Factor in a Rat Model of Hepatic Fibrosis. 中臺灣醫學科學雜誌 13:2, 頁 65-74。
 - 21. 覃仁安 (1995). 90 年代以來小柴胡湯的藥理研究進展. 貴陽中醫學院學報 17, 53-55。
 - 22. 賀琦, and 張天高 (2000). 小柴胡湯引起的間質性肺炎. 中國臨床醫藥雜誌 9, 262-263。
 - 23. 黃欣 (1999). 日本有關小柴胡湯引起間質性肺炎的研究近況. 國外醫學中醫中藥分冊 21, 20-24。
 - 24. 楊書蘭、黃正昌、朱辨絃、張奉學、郭興伯、朱宇同 (96.02). 柴胡和小柴胡湯對鴨乙型肝炎治療作用的研究. 中醫肝病醫學雜誌 3:1, 頁 1-6。
 - 25. 鄭振鴻, and 吳正文 (95.05). 小柴胡湯配方對慢性肝炎之療效評估. 北市醫學雜誌 3:5, 頁 461-469。

柒、圖、表

(A)



(B)



仙 豐

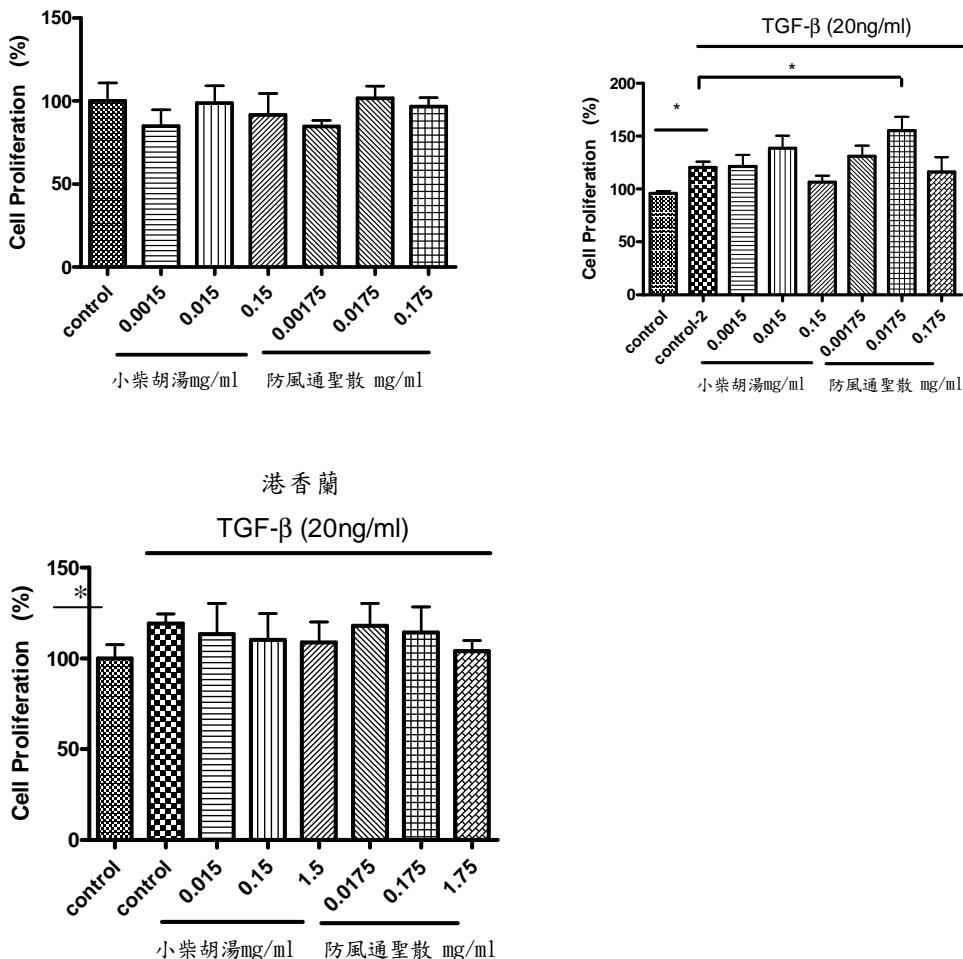


Figure 1. Effects of Xiao-Chai-Hu-Tang and Fang Fong Huang Qi Tang on cell proliferation on human lung fibroblast cells. WI-38 cells treated different concentrations of Xiao-Chai-Hu-Tang and Fang Fong Huang Qi Tang for 24h and detection of cell viability by MTT assay (A) and cell proliferation by BrdU incorporation (B). Data were expressed in mean±S.E.M. Cells culture in 10% FBS basal medium. **p<0.01, compared with control group cells culture in 0.5% FBS basal medium and combined with 20ng/ml TGF- β . #p<0.05, compared with normal control, *p<0.05, ***p<0.01, compared with control group contained TGF- β .

順天堂

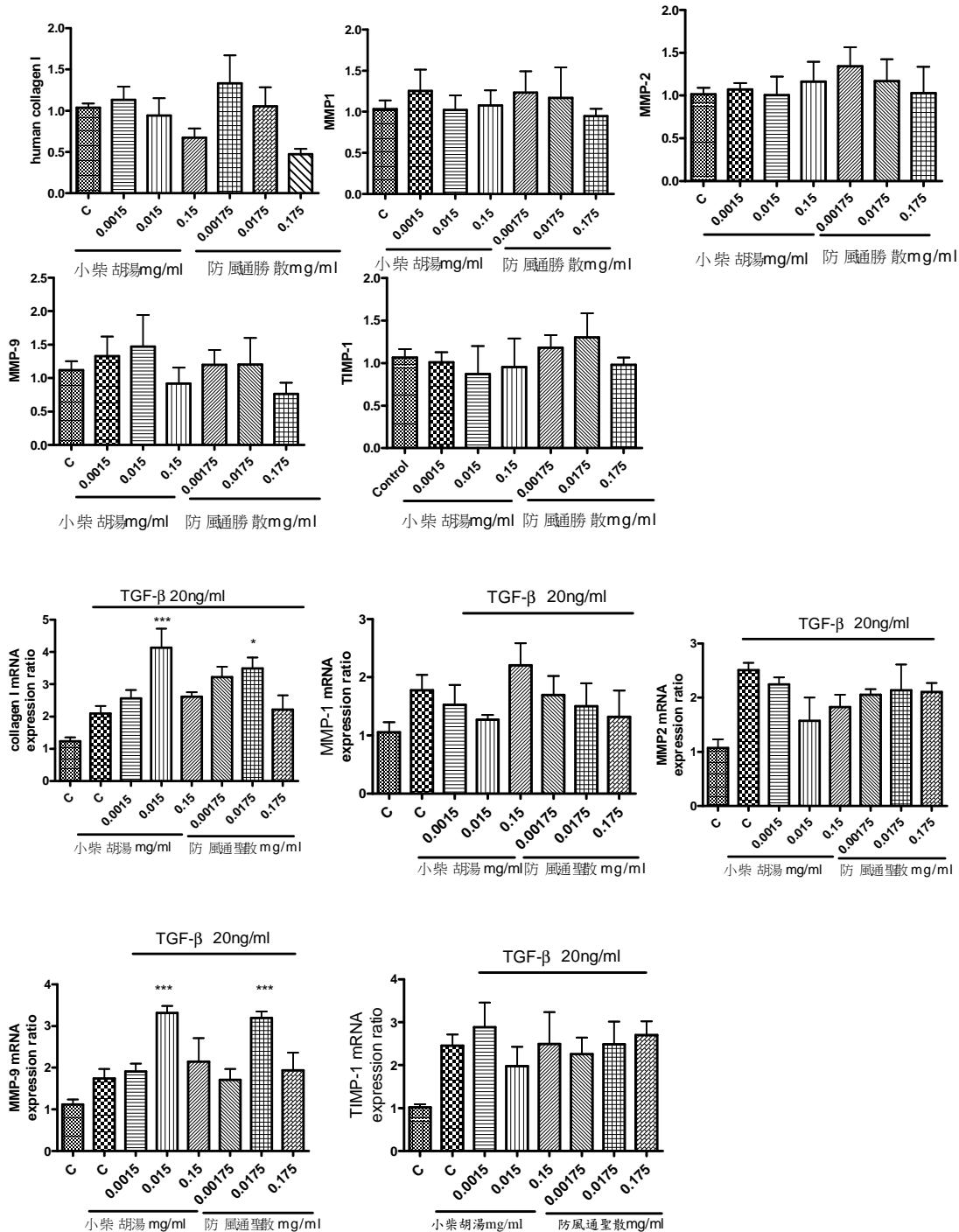


Figure.2 Effects of Xiao-Chai-Hu-Tang and Fang Fong Huang Qi Tang on MMPs and TIMPs mRNA expression in human lung fibroblast cells. WI-38 cells treated different concentrations of Xiao-Chai-Hu-Tang and Fang Fong Huang Qi Tang for 24h and detection of RNA expression by real-time PCR. Data were expressed in mean \pm S.E.M
*p<0.05, ***p<0.001, compared with TGF-β control group.

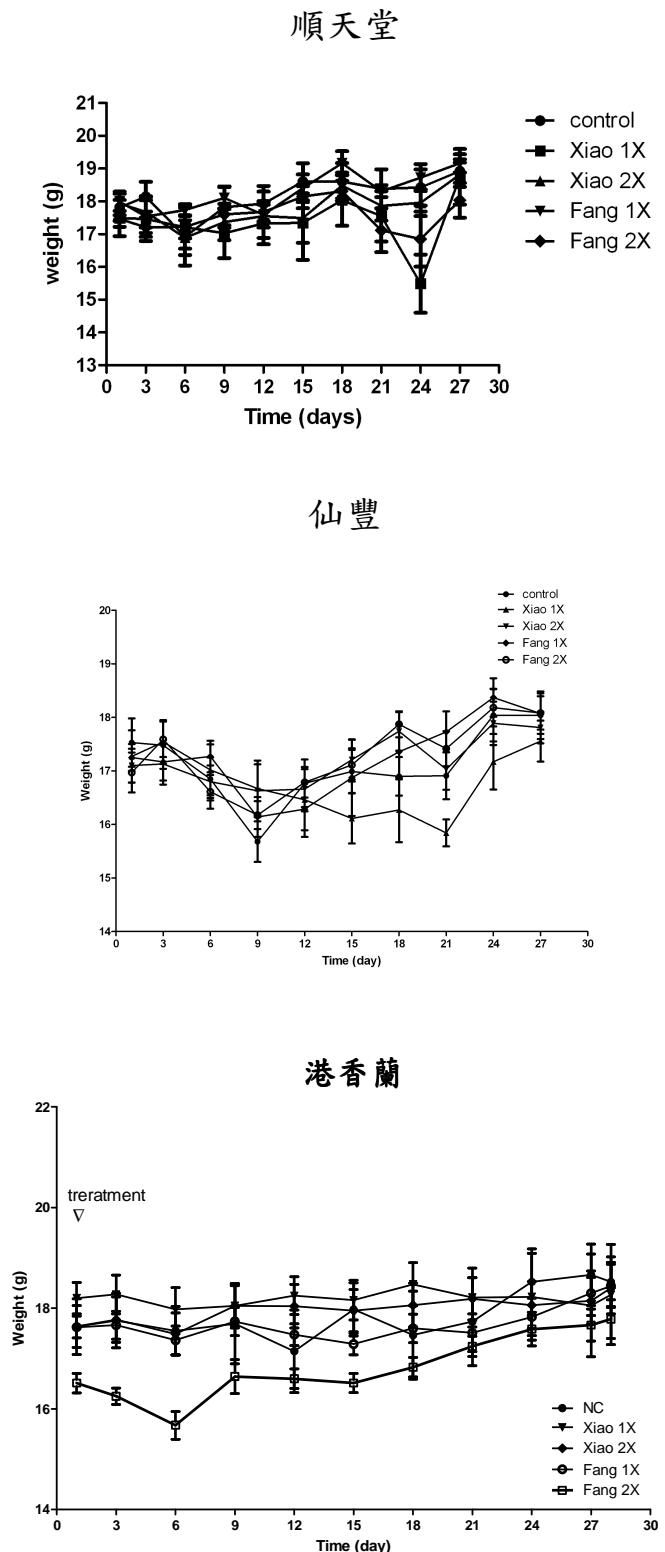
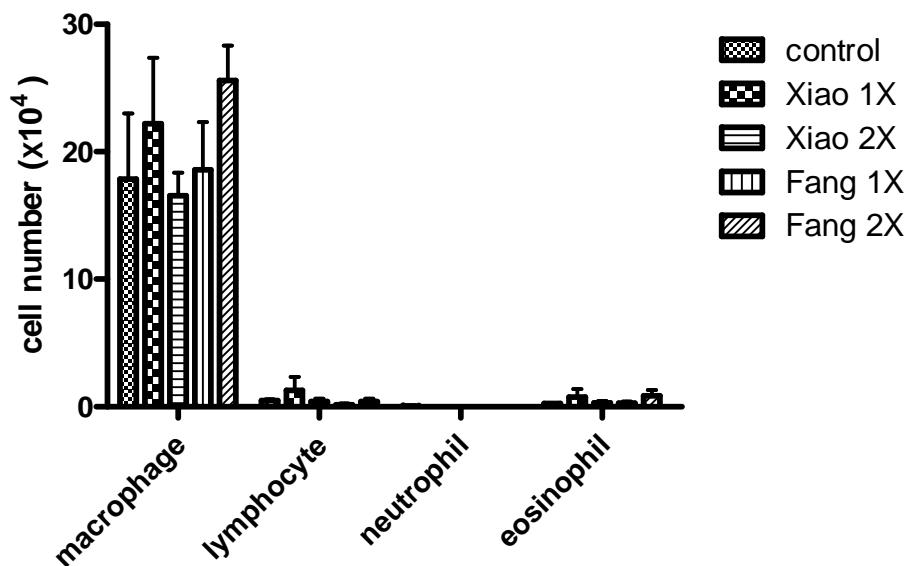
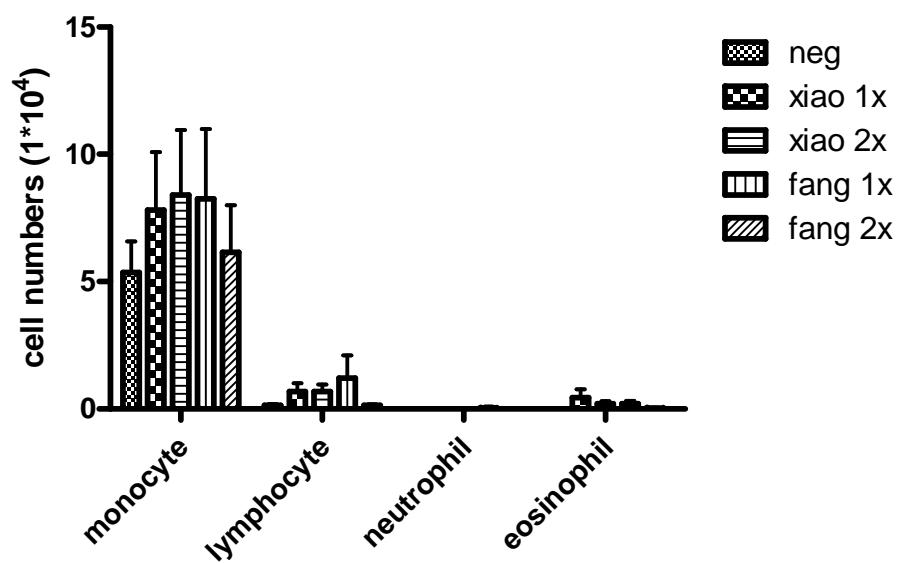


Figure 3. Detection of body weight after oral delivery of Xiao-Chai-Hu-Tang (Xiao) and Fang Fong Huang Qi Tang (Fang) on C57B6 mice. Mice were oral delivery of concentrations 1 and 2 recommend dosages of Xiao and Fang from 順天堂, 仙豐 and 港香蘭 Pharmaceutic Inc. for 28 days as described in Materials and Methods. Data were expressed in mean \pm S.E.M. ($N\geq 8$).

順天堂



仙豐



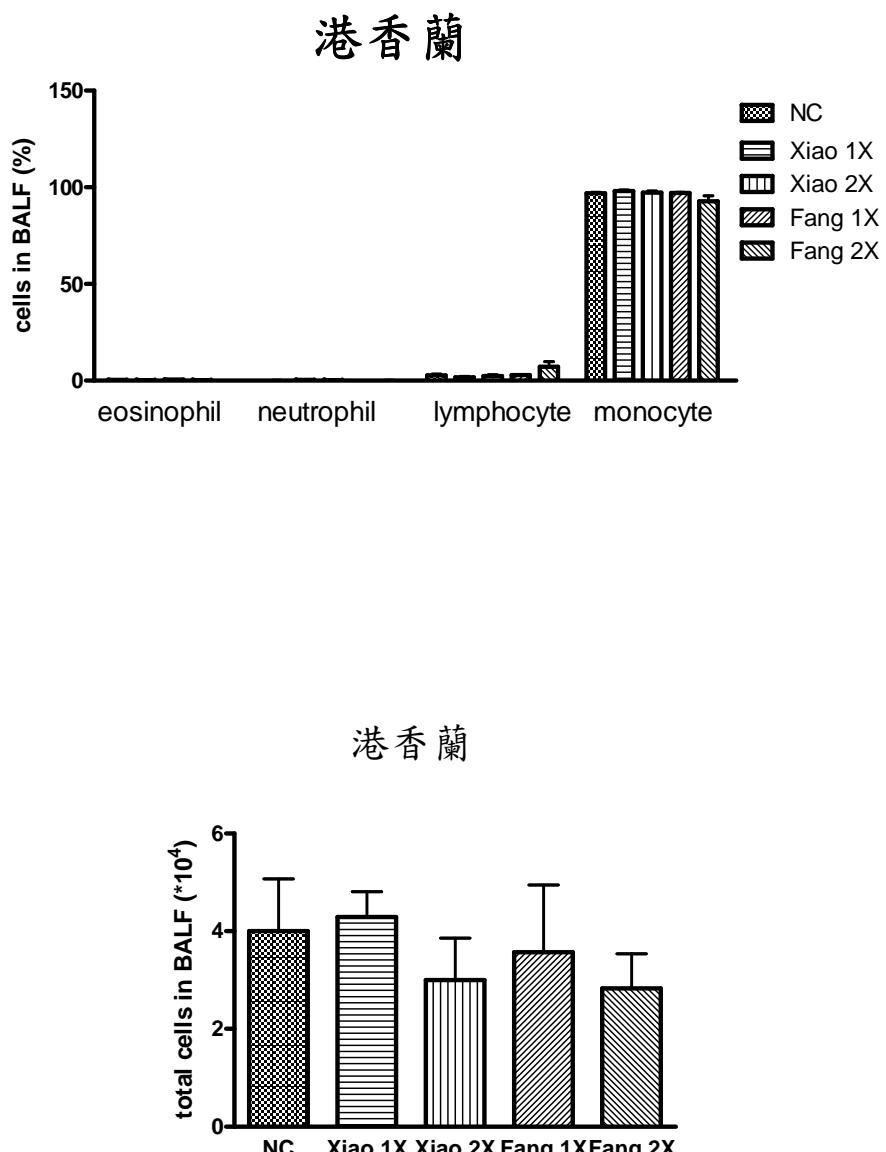
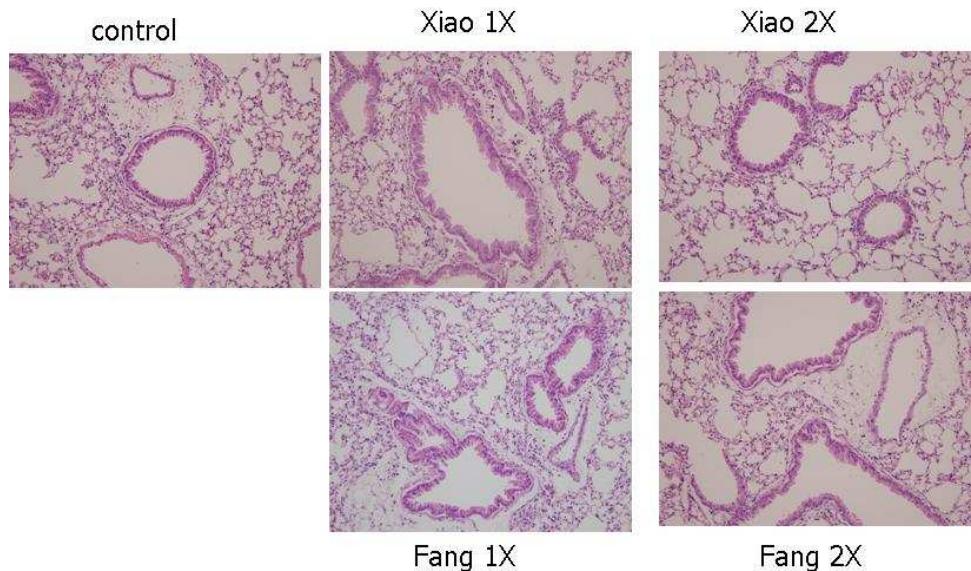


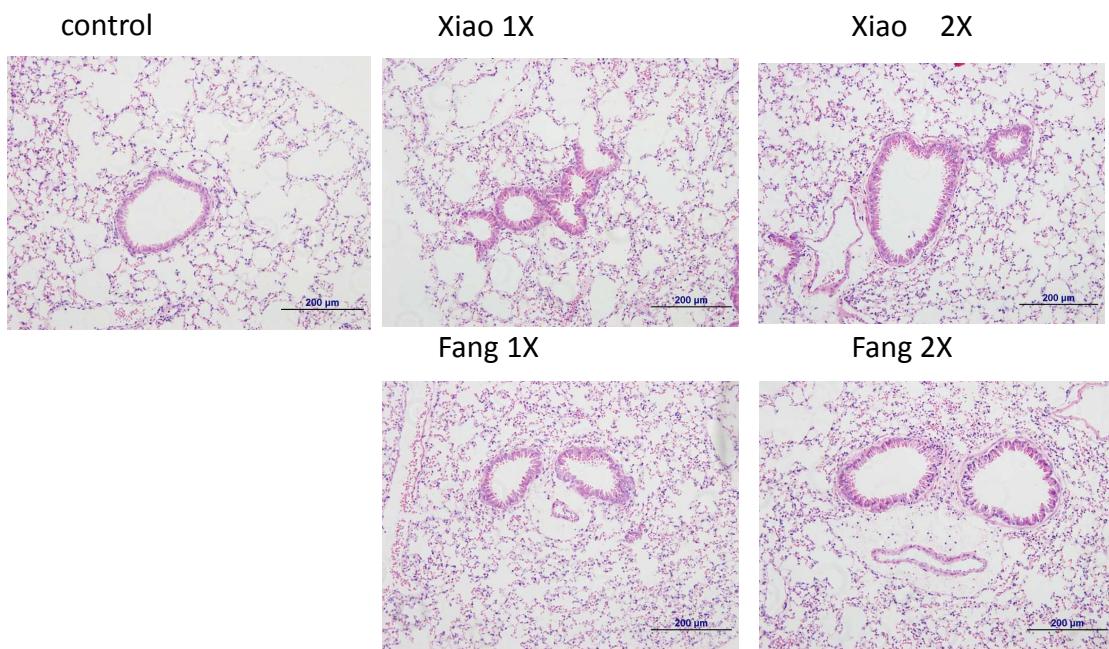
Figure 4. BALF cell profiles after oral delivery of Xiao-Chai-Hu-Tang (Xiao) and Fang Fong Huang Qi Tang (Fang) on C57B6 mice. Mice were oral delivery of concentrations 1 and 2 recommend dosages of Xiao and Fang from 順天堂, 仙豐 and 港香蘭 Pharmaceutic Inc. for 28 days as described in Materials and Methods. Data were expressed in mean \pm S.E.M. ($N\geq 8$).

(A)

順天堂

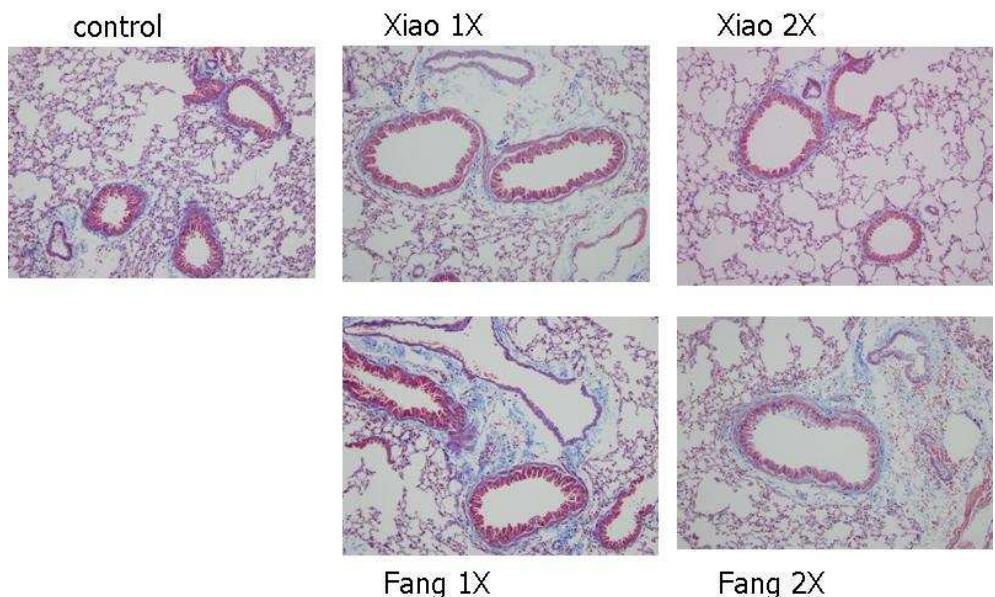


仙豐



(B)

順天堂



仙豐

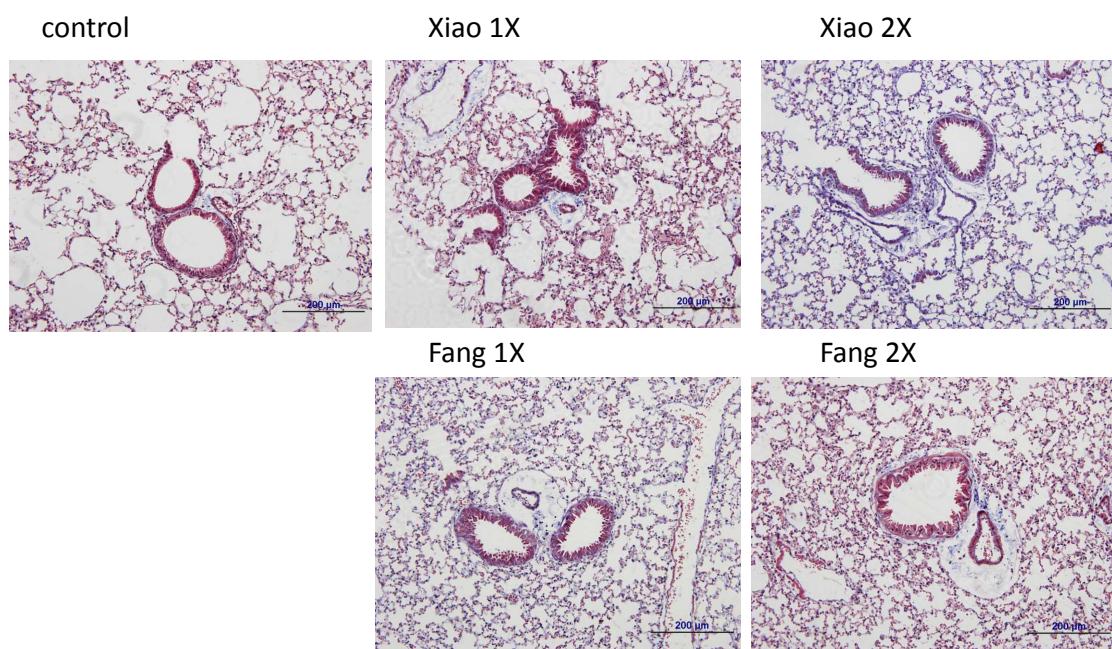
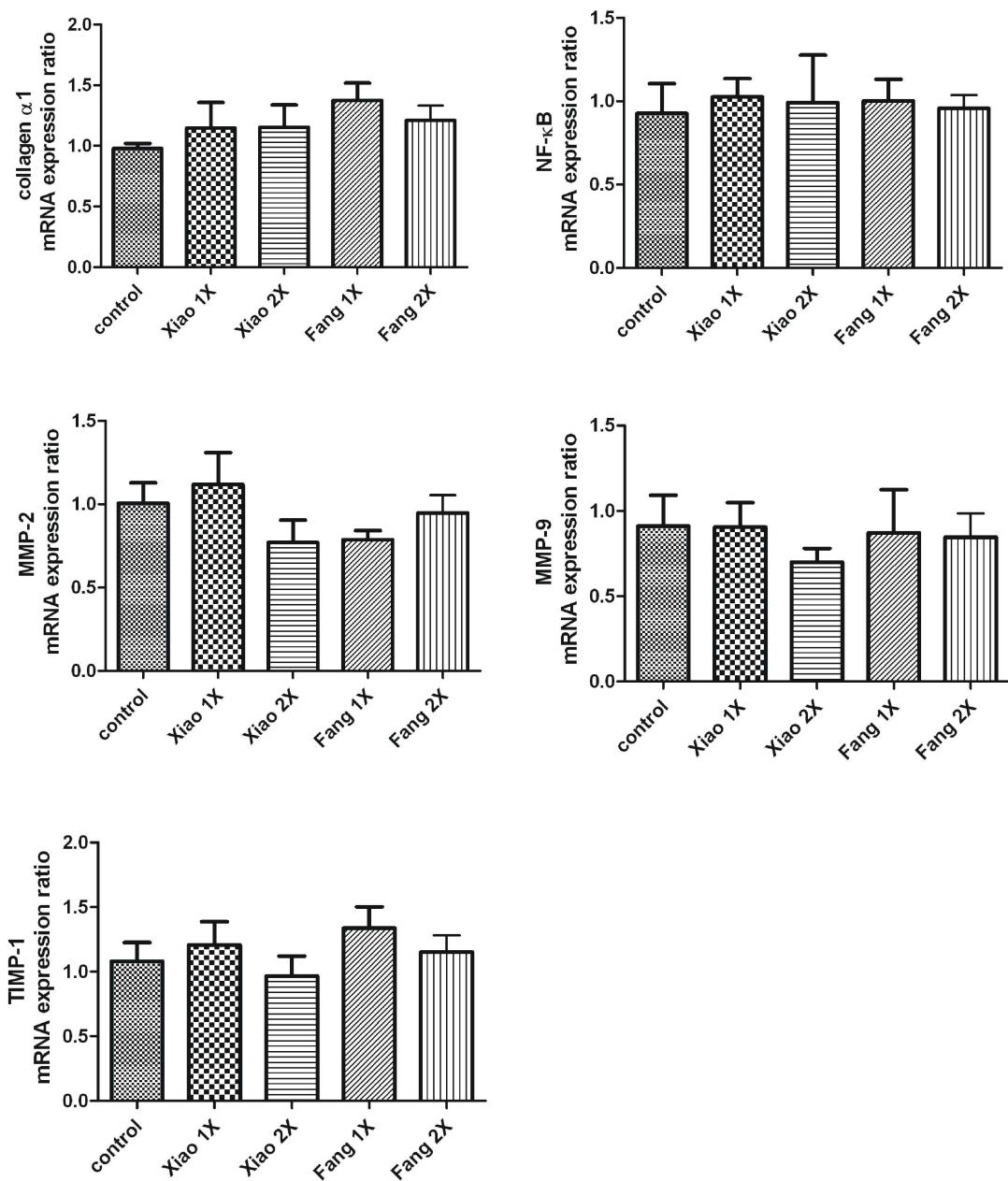


Figure 5. Lung histology after oral delivery of Xiao-Chai-Hu-Tang (Xiao) and Fang Fong Huang Qi Tang (Fang) on C57B6 mice. Mice were oral delivery of concentrations 1 and 2 recommend dosages of Xiao and Fang from 順天堂 and 仙豐 Pharmaceutic Inc. for 28 days as described in Materials and Methods. Lung sections stained with (A) H&E for detection lung inflammation. (B) Massion trichrome for detection lung fibrosis. Origin magnification: $\times 200$.

順天堂



仙 豐

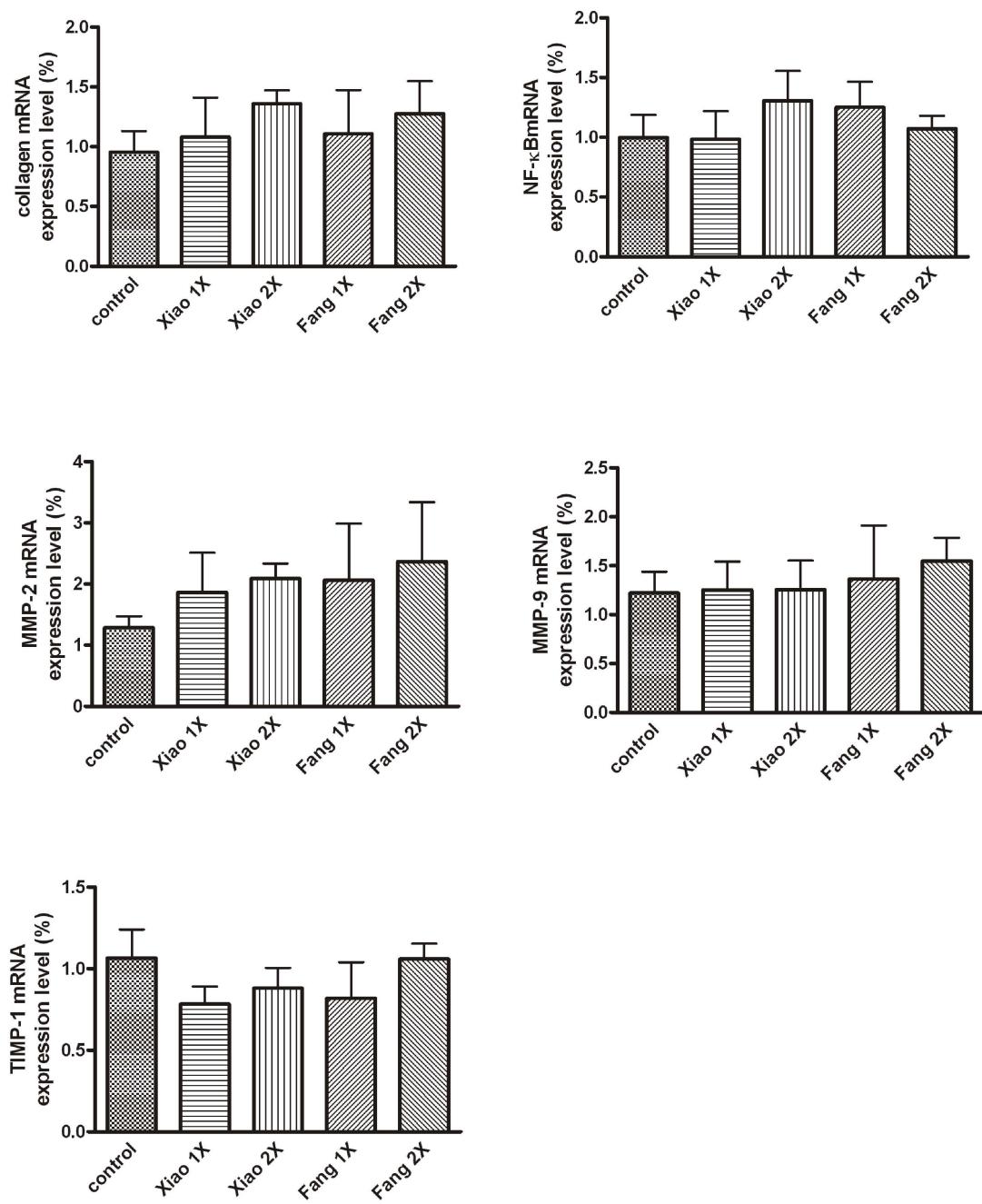
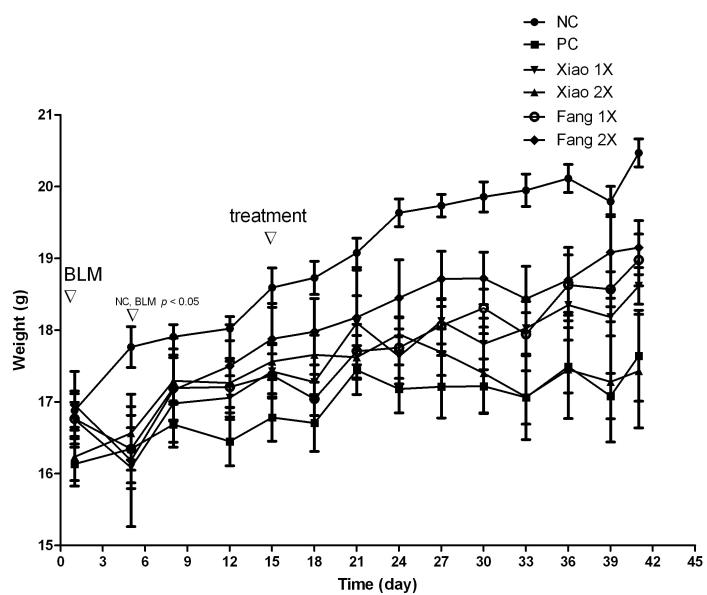
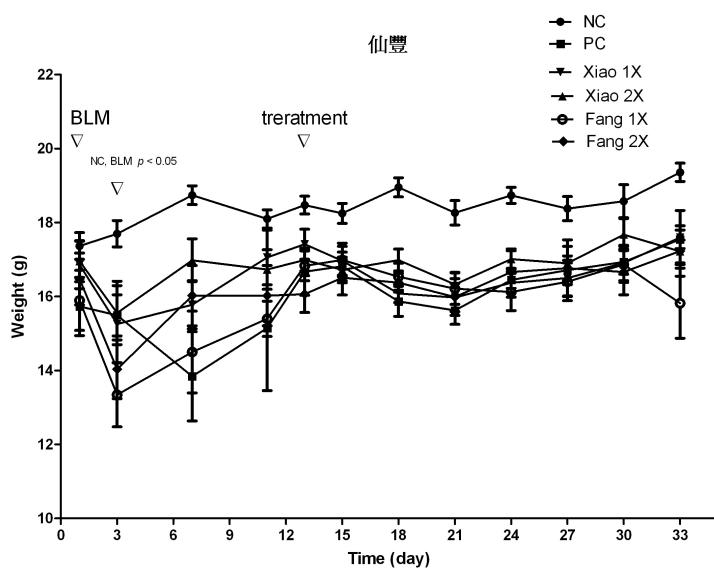


Figure 6. Detection of collagen, MMPs, TIMP-1 and NF-κB mRNA expressions after treated with Xiao-Chai-Hu-Tang and Fang Fong Huang Qi Tang on C57B6 mice. Mice were oral delivery of concentrations 1 and 2 recommend dosages of Xiao and Fang from 順天堂 and 仙豐 Pharmaceutic Inc. for 28 days as described in Materials and Methods. Using realtime PCR to detect specific gene expression as described in Materials and Methods. Data were expressed in mean \pm S.E.M. ($N\geq 8$).

順天堂



仙豐



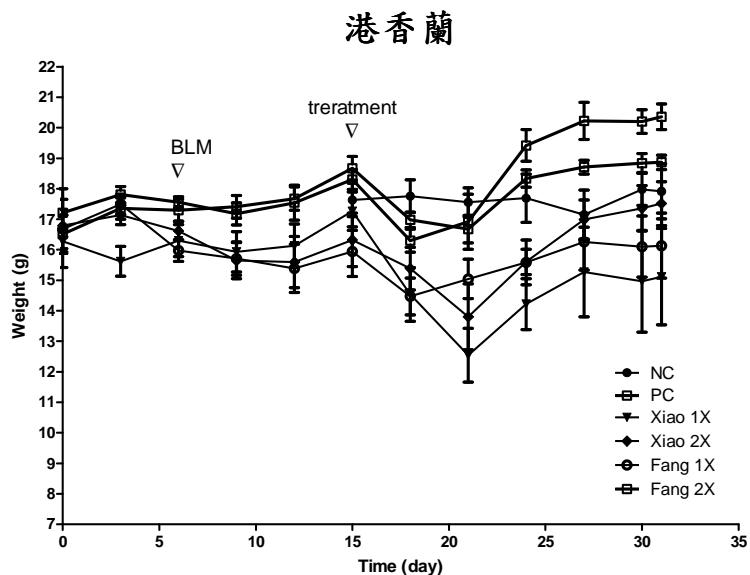
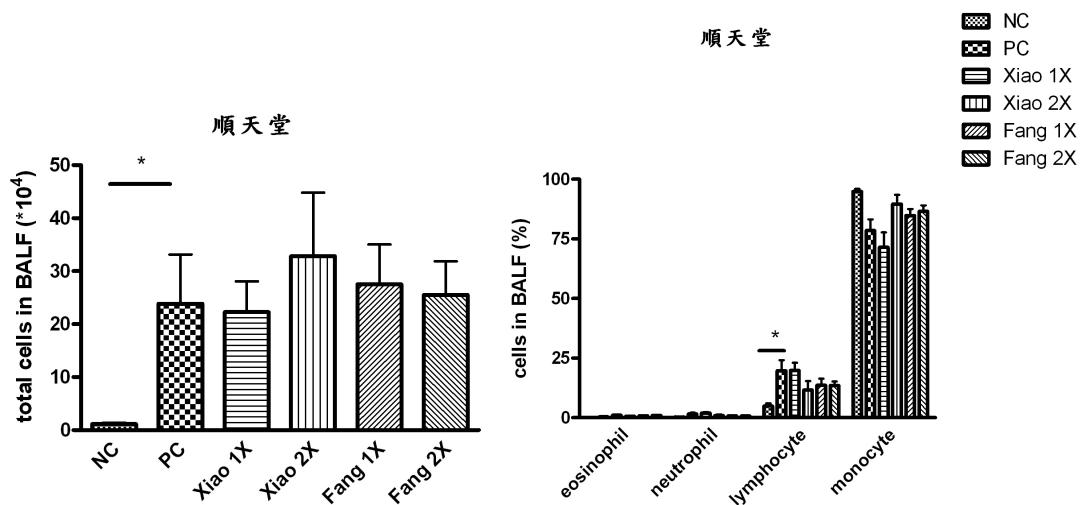
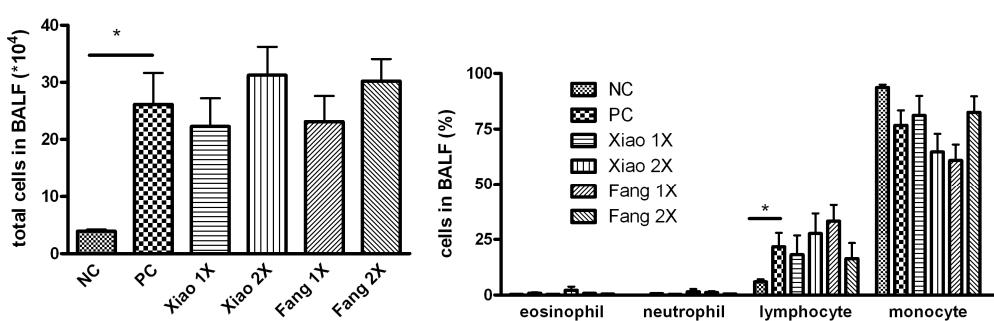


Figure 7. Detection of body weight after oral delivery of Xiao-Chai-Hu-Tang (Xiao) and Fang Fong Huang Qi Tang (Fang) on blenomycin treated C57B6 mice. Mice were intratracheal instillation of blenomycin 0.12U/mouse for 14 days than oral delivery of concentrations 1 and 2 recommend dosages of Xiao and Fang from 順天堂, 仙豐, and 港香蘭 Pharmaceutic Inc. for 28 and 21 days as described in Materials and Methods. Data were expressed in mean±S.E.M. ($N\geq 8$).

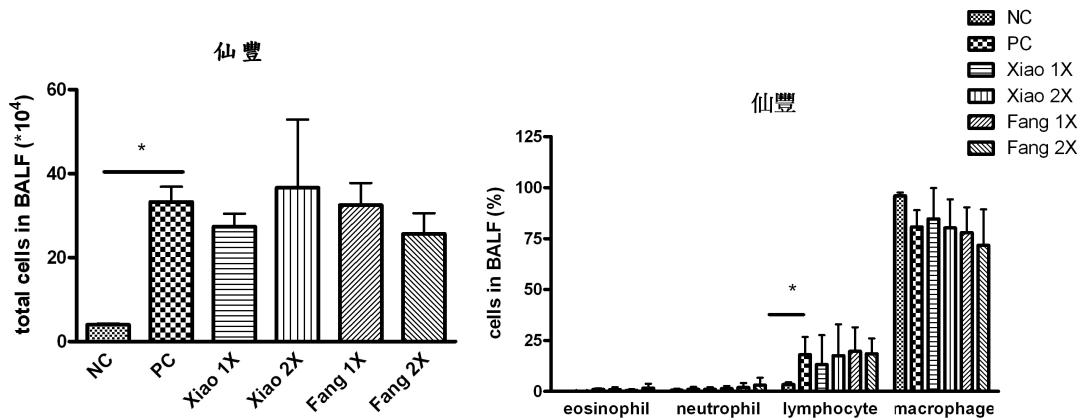
(A)



(B)



(C)



(D)

港香蘭

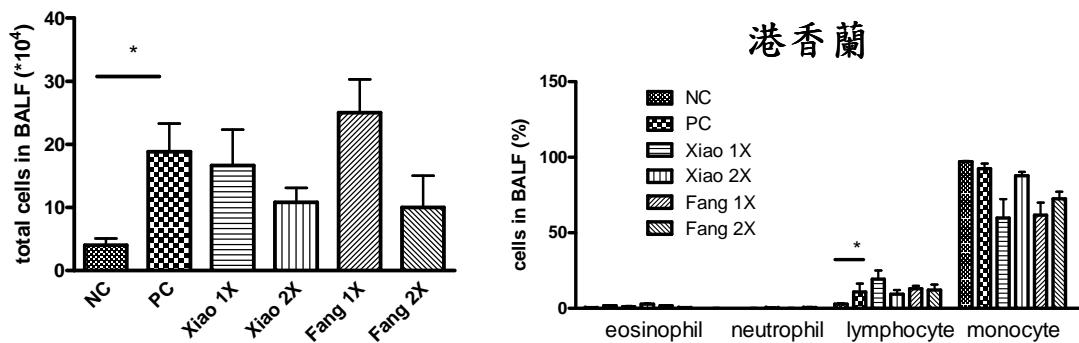
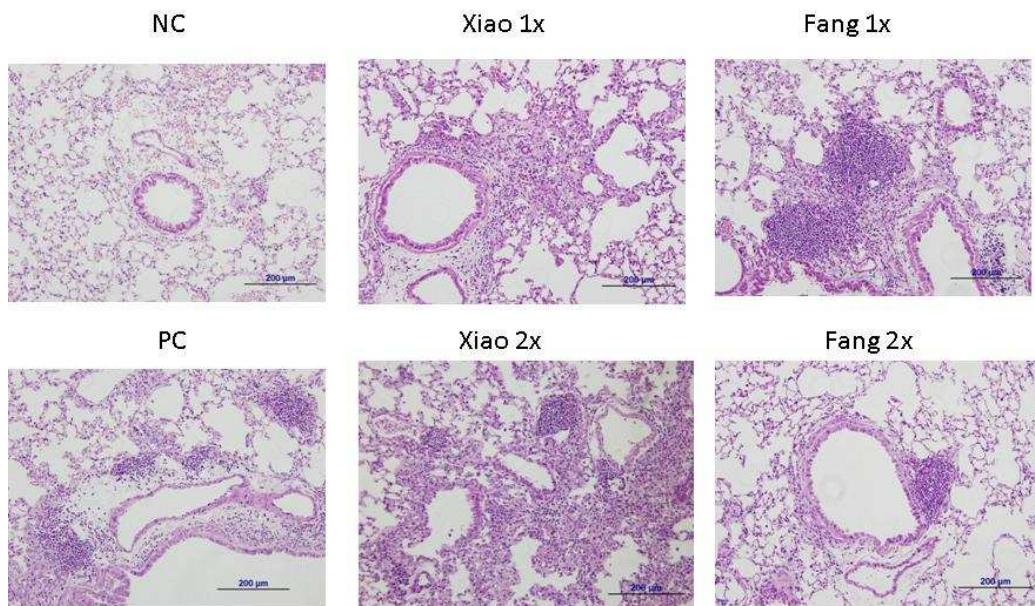


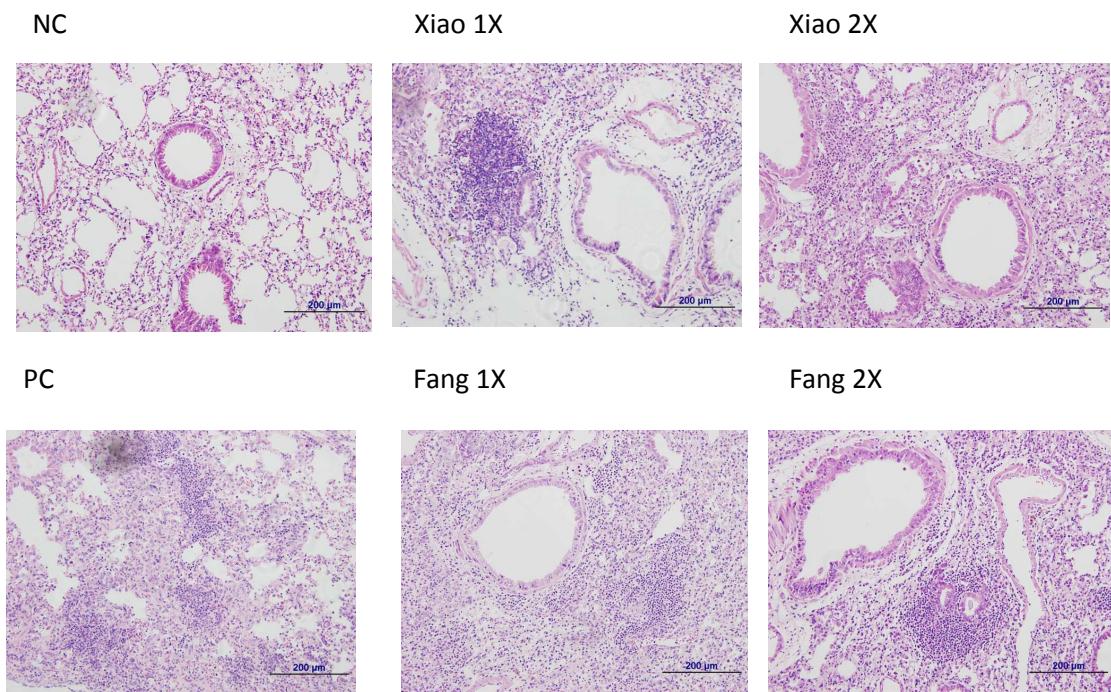
Figure 8. BALF cell profiles after oral delivery of Xiao-Chai-Hu-Tang (Xiao) and Fang Fong Huang Qi Tang (Fang) on blenomycin treated C57B6 mice. Mice were intratracheal instillation of blenomycin 0.12U/mouse for 14 days than oral delivery of concentrations 1 and 2 recommend dosages of Xiao and Fang from 順天堂 and 仙豐 Pharmaceutic Inc. for 28 days (A) and 21 days (B) and 仙豐 Pharmaceutic Inc. (C) and 港香蘭 Pharmaceutic Inc. (D) for 21 days as described in Materials and Methods. BALF cells were collected and analyzed differential inflammatory cells by Liu staining as described in Materials and Methods. Data were expressed in mean±S.E.M. ($N\geq 8$). * $p<0.05$.

(A)

順天堂

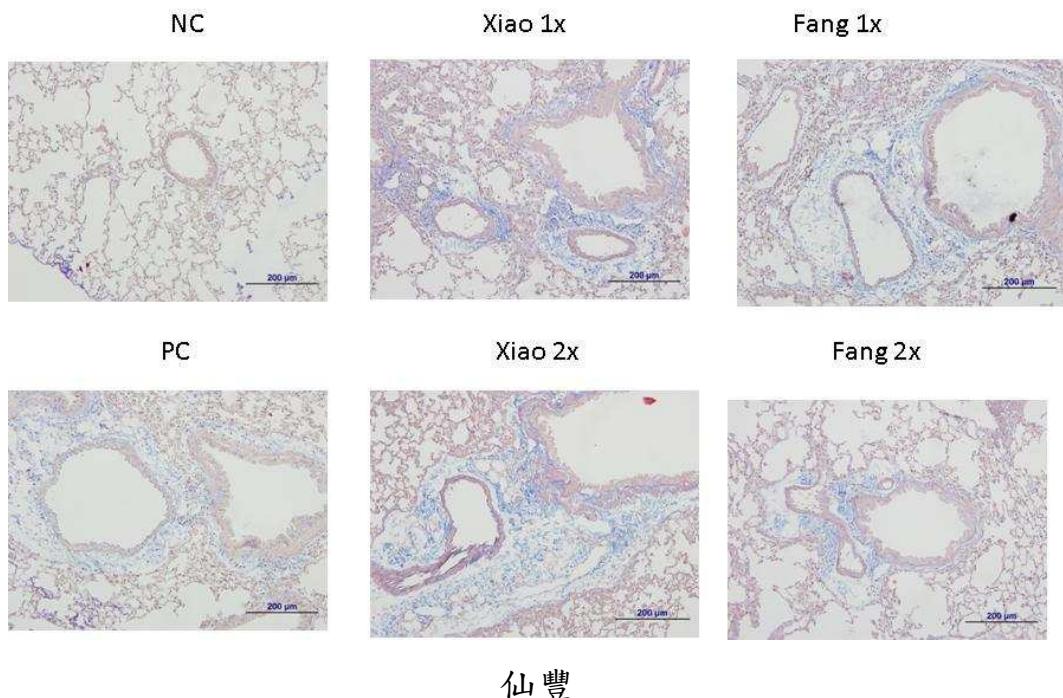


仙豐



(B)

順天堂



仙豐

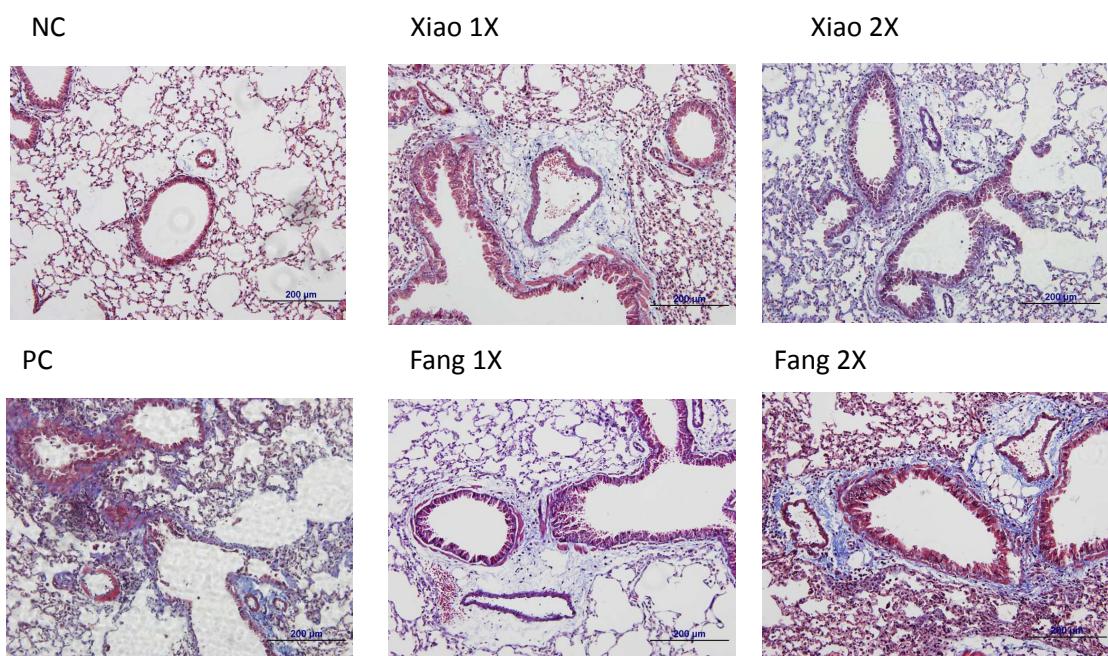
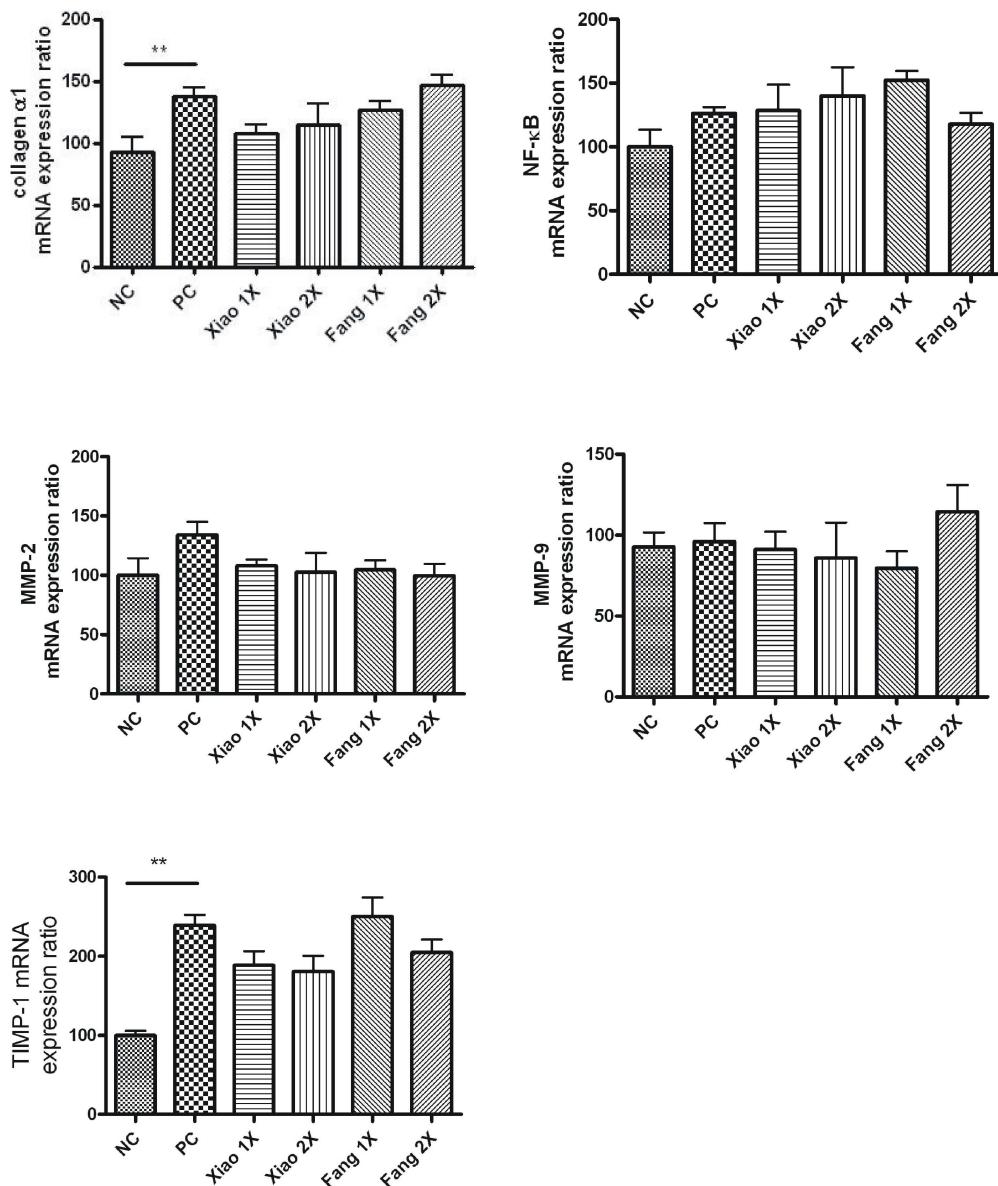


Figure 9. Lung histology after oral delivery of Xiao-Chai-Hu-Tang (Xiao) and Fang Fong Huang Qi Tang (Fang) on on blenomycin treated C57B6 mice. Mice were intratracheal instillation of blenomycin 0.12U/mouse for 14 days than oral delivery of concentrations 1 and 2 recommend dosages of Xiao and Fang from 順天堂 and 仙豐 Pharmaceutic Inc. for 28 and 21 days as described in Materials and Methods. Lung sections stained with (A) H&E for detection lung inflammation. (B) Massion trichrome for detection lung fibrosis. Origin magnification: $\times 200$.

(A)

順天堂



(B)

仙 豐

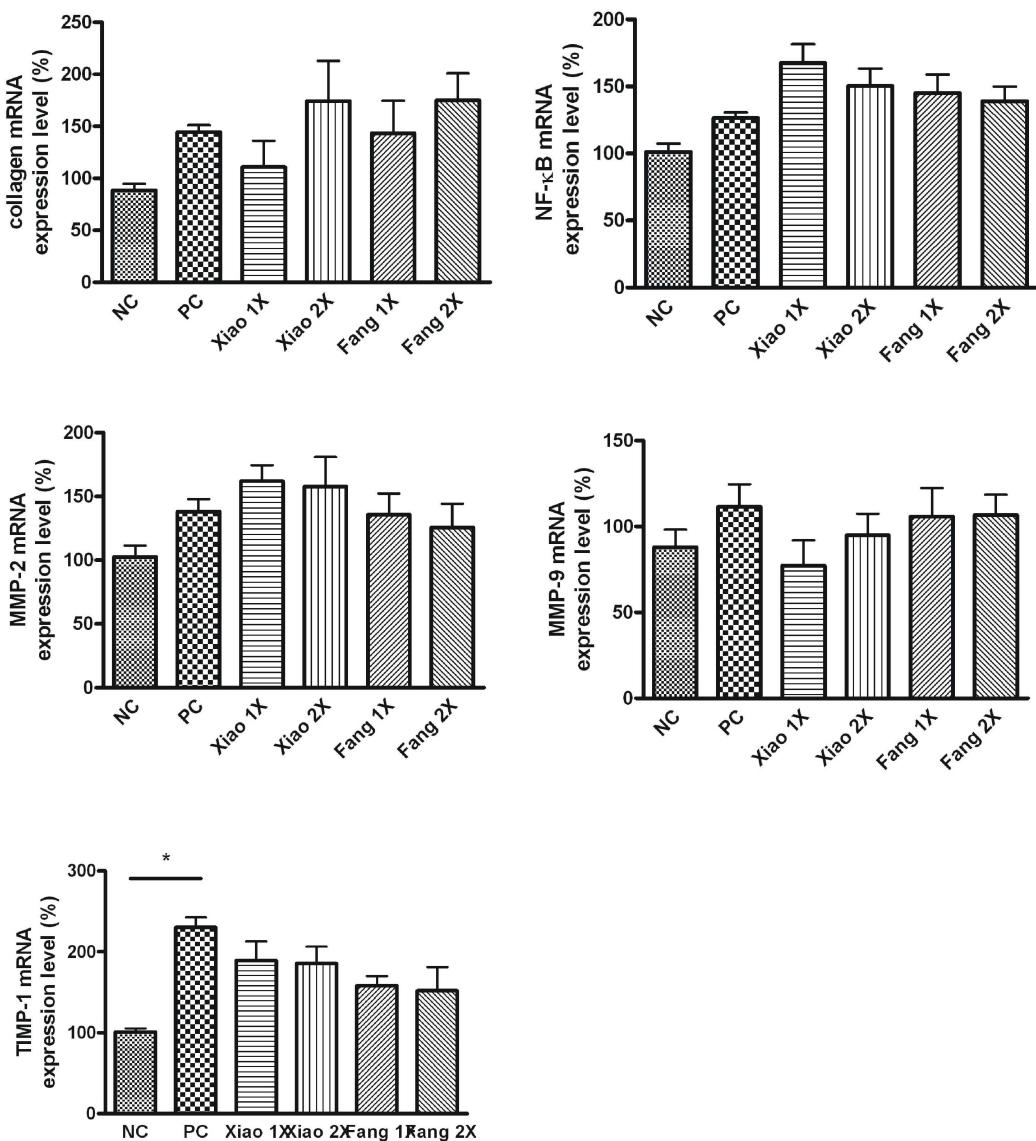


Figure 10. Detection of collagen, MMPs, TIMP-1 and NF-κB mRNA expressions after treated with Xiao-Chai-Hu-Tang and Fang Fong Huang Qi Tang on blenomycin treated Mice. Mice were intratracheal instillation of blenomycin 0.12U/mouse for 14 days than oral delivery of concentrations 1 and 2 recommend dosages of Xiao and Fang from 順天堂 (A) and 仙豐 (B) Pharmaceutic Inc. for 28 and 21 days as described in Materials and Methods. Using realtime PCR to detect specific gene expression as described in Materials and Methods. Data were expressed in mean±S.E.M. ($N \geq 8$). * $p < 0.05$.