

編號：CCMP97-RD-201

利用功能性基因體學平台為基礎進行中藥 免疫調控之研究（3-1）

項千芸

中國醫藥大學

摘 要

研究目的：

在本研究中，我們利用活體冷光影像導引之微陣列分析方法，分析與解釋中草藥調控免疫的活性及機轉。第一年以系統構築及中草藥抗發炎分析為主。

研究方法：

我們先構築帶有會受到 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 調控的冷光酵素基因轉殖鼠，再利用細菌脂多醣 (lipopolysaccharide; LPS) 建立發炎反應的動物模式。接著我們將清熱解毒中草藥或天然化合物餵食發炎小鼠後，利用活體冷光影響圖譜判定中草藥或天然化合物抗發炎的功效及影響的器官。我們進一步選取這些器官進行 DNA 微陣列的分析，以解讀中草藥或天然化合物抗發炎的機轉。

結果與討論：

我們的結果顯示在 NF- κ B 基因轉殖鼠中，淋巴組織的位置與 NF- κ B 冷光訊號的位置呈現高度相關性的現象，證明冷光訊號的強度可以反應活體內 NF- κ B 的活性。此外，LPS 可以誘導小鼠體內 NF- κ B 的活性，具有清熱解毒功效的中草藥，包括山梔子、黃連以及黃柏，在動物體內可以降低 LPS 所誘導之 NF- κ B 活性，而山梔子的主成份—梔子素 (genipin) 可以藉由降低 interleukin- 1β 及 tumor necrosis factor- α 的產生、藉由影響 interferon-induced proteins 及 chemokine ligands 相關基因的表現，而抑制 LPS 所誘導之發炎反應。此外，由表現有差異基因之間的交互作用網路中發現，NF- κ B 為此一交互作用網路的中心分子，而這個結果也顯示利用 NF- κ B 活體冷光影像圖譜於抗發炎中藥研究之合理性。經由上述實驗，我們認為生物冷光影像系統能夠廣為應用於即時性監控炎症反應的產生，並發展成為新穎的抗發炎藥物活體平台。

關鍵詞：中草藥、免疫、NF- κ B、活體冷光影像、DNA 微陣列

Number: CCMP97-RD-201

Study on the Immunomodulation of Chinese Medicinal Herbs by Functional Genomic Platform Approaches (3-1)

Chien-Yun Hsiang
China Medical University

ABSTRACT

Aim:

We applied the bioluminescent imaging-guided microarray techniques to analyze and elucidate the therapeutic efficacies and immunomodulatory mechanisms of Chinese medicinal herbs. The aims of the first-year project are to construct the bioluminescent imaging-guided microarray system and to analyze the anti-inflammatory effects of herbs.

Method:

Nuclear factor- κ B (NF- κ B)-dependent luminescent signal in transgenic mice carrying the luciferase genes was used as the guide to monitor the herbs-affected organs. Lipopolysaccharide (LPS) was used to establish the inflammatory model in transgenic mice. Inflammatory transgenic mice were orally administrated with Chinese medicinal herbs or phytochemicals. The anti-inflammatory effects were evaluated by bioluminescent imaging and the anti-inflammatory mechanisms of herbs were elucidated by DNA microarray.

Results and Discussion:

The correlation between the location of lymphoid tissue and the location of bioluminescent signal demonstrated that the level of bioluminescence was capable of reflecting the NF- κ B activity in the living mice. LPS was able to activate the NF- κ B activity *in vivo*; however, some Chinese medicinal herbs, including *Gardenia jasminoides*, *Coptis chinensis* and *Phellodendron chinense*, were able to suppress LPS-induced NF- κ B activities. Furthermore, genipin, the major component of *Gardenia jasminoides*, was able to inhibit the LPS-induced inflammation by reducing the productions of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α , and altering the gene expression of interferon-induced proteins and chemokine ligands. Moreover, network analysis of the differentially expressed genes showed that NF- κ B was in the central part of the network. In conclusion, the functional genomic platform approach established in this study provided an overall monitoring of the gene expression profiles of herbs *in vivo*. The gene expression profiles further provided a basis for analyzing the immunomodulatory mechanisms of Chinese medicinal herbs.

Keywords: Chinese medicinal herb, immune response, NF- κ B, bioluminescent imaging, DNA microarray

壹、前言

在美國及西歐，替代醫學的使用，包括藥用植物及營養補充品，已有逐漸增加的趨勢（Bray and Greenway, 2007）。使用藥用植物的族群，以慢性病患居多，其中包含了癌症、自體免疫疾病、氣喘以及後天性免疫缺乏症候群等患者（Bodeker ET AL., 2006; Canter et al., 2006; Li, 2007; Pierce, 2007）。此外，隨著紫錐花（*echinacea*）及北美黃蓮（*goldenseal*）被證實可能具有增強免疫力的效果，而在市場上成為高銷售的中草藥產品後，這些現象顯示越來越多的消費者轉而使用藥用植物來增強免疫力，或是抑制特定的免疫反應（Blumenthal, 2005）。

許多中草藥已被證實可以藉由調控不同的免疫分子，而達到調節免疫的功效（Spelman et al., 2006）。舉例來說，靈芝（*Ganoderma lucidum*）在人體細胞或是活體動物的模式中，會活化巨噬細胞、T 淋巴細胞與自然殺手細胞，並且會誘導細胞產生細胞激素，包括 tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukins (IL) 與 interferons 等（Lin et al., 2005）。臨床的證據也顯示，靈芝可藉由刺激淋巴細胞增生及產生細胞激素，而對罹患侵襲性大腸直癌（advanced colorectal cancer）的患者產生免疫調節的作用（Chen et al., 2006）。另外，人蔘（*ginseng*）可以增加來自於後天性免疫缺乏症候群患者與健康個體周邊血液單核球細胞的活性（See et al., 1997）。臨床試驗也顯示，人蔘可以增加健康個體嗜中性白血球、CD4 T 細胞與自然殺手細胞的功能（Scaglione et al., 1990）。此外，人蔘也具有佐劑的功能，在與流行性感疫苗共同使用的情況下，可以增加特異性抗體的力價及抗體的中和能力（Quan et al., 2007）。除了人蔘以外，薑（*Zingiber officinale*）也被發現可以藉由活化巨噬細胞，而刺激 TNF- α 的產生，進而抑制流行性感病毒的繁殖（Imanishi et al., 2006）。雖然中草藥的免疫調控功效已被許多學者研究過，這些研究大多是藉由分析淋巴細胞與細胞激素的反應來判斷中草藥調控免疫的功效，但是否單由淋巴細胞與細胞激素的反應就足夠說明中草藥免疫調控的機制呢？這一點是存疑的。此外，中草藥於體外測試的反應是否與體內的反應具有一致性，這一點也是令人懷疑的。因此，在本計畫中，我們主要是利用活體冷光影像導引之微陣列分析方法，分析與解釋中草藥調控免疫的活性及機轉。

Nuclear factor- κ B (NF- κ B) 轉錄因子與活化 NF- κ B 的訊號傳遞路徑是調節先天性免疫反應與特異性免疫反應的關鍵步驟。NF- κ B 是一種核內的轉錄因子，由 RelA (p65)、c-Rel、RelB、p50、及 p52 等蛋白質組成。NF- κ B 的活性可以被細菌、病毒、壞死細胞的產物和細胞激素所誘導。當受到刺激時，NF- κ B 會結合到位於免疫反應基因啟動子上的 NF- κ B 結合位，而刺

激免疫反應基因的表現。因此 NF- κ B 在免疫調控上是不可或缺的分
子 (Barnes et al., 1997; Karin et al., 2000; Bonizzi et al., 2004)。

傳統上，中草藥引起的免疫反應是藉由抗體、細胞激素、淋巴細胞增
生等免疫學技術來評估的。進行這些實驗時，血液與淋巴組織等樣品通常
是在中藥投與後之特定時間才由動物體內取得的，這種方式無法即時性的
反應出動物體內的免疫狀態。最近，我們已利用非侵入性分子影像技術直
接觀察並評估中草藥接合之生醫材料在 NF- κ B 基因轉殖鼠內所引起免疫反
應，由活體生物冷光影像結果與病理組織變化具有高度的一致性看來，非
侵入性影像技術可以被用來掃描基因轉殖鼠體內即時性的免疫反應 (Ho et
al., 2007)。

全基因體基因表現圖譜已被用來分析中醫方劑或中草藥的作用機制。
例如，PC-SPES 為一種營養補充品，主要由八種不同中草藥所組成，包括
黃芩、甘草、靈芝、板藍根、三七、菊花、茜草、扁行棕櫚 (Kubota et al., 2000;
Small et al., 2000)。PC-SPES 可作為前列腺癌患者的替代療法，而由基因表
現圖譜也顯示，干擾參與細胞週期、細胞結構與男性賀爾蒙反應基因的表
現，可能是造成 PC-SPES 細胞毒性的原因 (Bonham et al., 2002)。六味地
黃丸是由熟地黃、山藥、山茱萸、茯苓、丹皮、澤瀉等六種中草藥組成的，
六味地黃丸已被廣泛地用於抗老，而且在亞洲國家已有上百年的使用經驗
(Hsieh et al., 2003)。由基因表現圖譜也顯示，六味地黃丸可以誘導與保護
神經細胞、增強神經細胞分化以及神經生長相關基因的表現，並且藉由刺
激這些基因的表現，而增強記憶力 (Hsieh et al., 2003; Rho et al., 2005)。薑
黃素 (curcumin) 是薑黃 (*Curcuma longa*) 的主要組成分，可作為香料，
使得咖哩具有特殊的味道與顏色，也可作為化妝品或是藥品製備過程中的
材料 (Govindarajan, 1980)。薑黃素在動物體內具有抑制腫瘤生成的活性
(Huang et al., 1988)。利用 DNA 微陣列技術分析其作用機轉，發現薑黃素
抗癌的機制主要是藉由調控與癌細胞分化相關基因的表現，進而抑制癌細
胞的生長 (Chen et al., 2004)。中草藥或是天然物的萃取物中含有非常多具
有不同生物活性的分子，但是因為萃取物的複雜性以及萃取物中組成份的
交互作用，造成中草藥萃取物的生物活性通常不易分析。而藉助高密度微
陣列技術所獲得的全基因體基因表現圖譜提供了一個簡單的方法，可以測
試中草藥的生物活性，並從中了解這些中草藥的潛在療效及可能的副作用
(Watanabe et al., 2001)。

許多文獻指出，中草藥在體內或體外可以藉由改變免疫功能的活性，
而調節免疫反應。但是這些研究通常只測定少量淋巴細胞的功能或是少數
基因或蛋白質的含量。因此，本研究的目的是利用分子影像導引之微陣列

分析方法，分析與解釋中草藥調控免疫的活性及機轉。本研究所建立的功能性基因體學平台可以綜觀中草藥所影響的器官中之基因表現圖譜，而本研究所建立的全基因體基因表現圖譜可進一步作為探勘中草藥調節免疫活性的基礎。

貳、材料與方法

一、建立具有免疫調控潛力的中草藥庫

(一) 中醫方劑、單味藥及天然化合物的收集

我們依照三種準則來進行中醫方劑、單味藥及天然化合物中草藥的收集：中草藥的研究文獻、中醫師常用方劑、全民健保常用中藥。例如具有清熱解毒功效的中草藥山梔子、黃芩、黃連、黃柏、板藍根以及金銀花等。又如靈芝與人蔘具有免疫調控功效是眾所皆知的，而且已經有許多文獻也證實了這種功效。此外，薑、黨參、黃芩、白朮、夏枯草、當歸、枸杞子則是一般民眾較常用來改善免疫力的補藥。

(二) 中醫方劑及單味藥的萃取

中醫方劑及單味藥是自順天 GMP 工廠取得，天然化合物則自 Sigma、Wako 等公司購入。萃取的方法為：先將中醫方劑及單味藥處理成較小的粉末，再將 100 公克的粉末與 500 毫升的去離子水混合後，在 4°C 下搖晃至隔夜。之後將萃取液以 10,000 xg 離心五分鐘，收集上清液後置於真空烘箱中乾燥，然後再次以去離子水混勻至最終濃度為 1 mg/ml，最後分裝保存於 -20°C 冰箱中。天然化合物主要以酒精或去離子水等溶媒溶解，分裝保存於 -20°C 冰箱中。

二、活體分子影像平台的建立

(一) NF- κ B-luc 基因轉殖鼠的構殖與繁殖

質體 DNA—NF- κ B-luc 是將 5 個 NF- κ B 結合位 (5'-GGGACT TTCC-3') 置於冷光酵素基因 (luciferase, luc) 的上游所構築而成的。先將 NF- κ B-luc 利用 SuperFect 試劑送入 HepG2 細胞中，測試 NF- κ B-luc 是否可以真實地報導 NF- κ B 的活性後，再將 NF- κ B-luc 利用原核顯微注射技術，送到 FVB 小鼠的卵細胞中。小鼠繁殖後的子代利用 PCR 的方式篩選基因轉殖鼠，PCR 所使用的引子為 primer-P (5'-AACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCC-3') 及 primer-M (5'-TTAAAACCGGGAG GTAGATGAGATGTGACG-3')。所有的基因轉殖鼠皆與野生鼠雜交，以生產出具有 FVB 遺傳特性的 NF- κ B-luc heterozygous 基因轉殖鼠。

(二) 活體內與活體外冷光影像的測定

活體內與活體外冷光影像的測定參考自 Ho 等 (Ho et al., 2007)。活體內冷光影像測定的方法為：小鼠先使用吸入性麻醉劑 isoflurane 麻醉，再將每公斤體重 150 mg 的 luciferin 以腹腔注射的

方式，注射到小鼠腹腔中。五分鐘後，將小鼠腹部朝上置於 IVIS Imaging System[®] 100 Series 的照影艙中，再利用 Living Image[®] software 定量自組織散出的光子數。訊號強度的計算是將設定範圍每秒所測到的光子總數減去背景值而求得，訊號強度的結果是以 photons/sec/cm²/steradian (photons/sec/cm²/sr) 呈現。

活體外冷光影像測定的方法為：小鼠先使用吸入性麻醉劑 isoflurane 麻醉，再將每公斤體重 150 mg 的 luciferin 以腹腔注射的方式，注射到小鼠腹腔中。五分鐘後進行解剖，將器官摘出後，再置於 IVIS Imaging System[®] 100 Series 的照影艙中，利用 Living Image[®] software 定量自組織散出的光子數。訊號強度的計算為組織所測到的光子總數，訊號強度的結果是以 photons/sec 呈現。

三、基因表現圖譜分析平台的建立

(一) RNA 樣品之製備

RNA 樣品是以 RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) 先進行細胞 total RNA 的萃取。接著，利用 Beckman DU800 分光光度計 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) 進行 total RNA 的定量，A260/A280 比值大於 1.8 的樣品，進一步利用 Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 評估其 total RNA 的品質。只有當樣品的 RNA integrity number 高於 8.0 時，才會用於下述的微陣列實驗分析。

(二) 微陣列的流程

將 total RNA (5 µg) 先利用 MessageAmp[™] aRNA kit (Ambion)，經由試管內轉錄 (*in vitro* transcription) 的步驟加以放大。放大的 RNA (amplified RNA，簡稱 aRNA) 再和 Cy5 染劑進行化學反應，並將 Cy5 染劑標定到 aRNA 上，使得 aRNA 成為帶有螢光標定的標的物。螢光標定完成後，利用蓋玻片和華聯公司所提供的雜合反應緩衝劑 (hybridization buffer)，將螢光標定的標的物與 Whole Genome OneArray[™] 進行雜合反應。於 50°C 經過一夜的雜合反應之後，藉由三個清洗步驟將非專一性結合的標的物從晶片上清除。接著將晶片以離心的方式使之乾燥，並利用 Axon 4000 掃描器 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 進行螢光強度的掃描。我們使用 genepix 4.1 軟體 (Molecular Devices) 對晶片上每一點的 Cy5 螢光強度進行分析。每一點的訊號經由扣除周圍背景值的方式校正其強度。我們刪除作為內在控制的探針 (probe) 或是訊雜比 (signal-to-noise ratio) 小於零的點。通過這些門檻的點藉由

R 程式的 limma package 進行歸一化(normalization)(Smyth, 2005)。

(三) 程式分析

歸一化的資料使用 limma package 計算並尋找表現有統計差異的基因。接著，將表現有差異的基因利用 Gene Ontology Tree Machine(<http://bioinfo.vanderbilt.edu/gotm/>)進行 Gene Ontology 分析，以找出這些受調控的基因所影響的細胞行為模組。Gene Ontology Tree Machine 是一個在網路上使用、以基因群組 (gene set) 為分析基礎的資料探勘工具 (Zhang et al., 2005)。我們進一步使用 R 程式的 PGSEA package，從擷取自 Molecular Signature Database web site (http://www.broad.mit.edu/gsea/msigdb/msigdb_index.html) 的 522 個基因群組 (gene sets) 中，進行統計並找出表現有差異的基因群組 (Kim and Volsky, 2005)。這些表現有差異的基因群組中的基因再藉由 TIGR Multiexperiment Viewer (<http://www.tm4.org/index.html>; Eisen et al., 1998) 進行階層式叢集分析 (hierarchical clustering analysis)，以展現這些基因彼此之間的相關性。最後，我們利用 BiblioSphere Pathway Edition 軟體 (Genomatix Applications, <http://www.genomatix.de/index.html>) 建構表現有差異基因之間的交互作用網路 (interaction network)。

四、發炎反應的動物模式

革蘭氏陰性菌的脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS) 為一種內毒素，可以造成發炎反應 (Wang et al., 2000)。發炎反應動物模式的建立方法為將每公斤體重 4 mg 的 LPS 以腹腔注射的方式，注射到基因轉殖鼠腹腔中，發炎反應以活體影像圖譜及免疫組織化學染色判定。除了發炎反應的動物模式外，目前也正在進行疫苗免疫的動物模式。

參、結果

一、活體冷光影像系統的建構

(一) NF- κ B-luc 質體的測試—細胞模式

NF- κ B-luc 質體是將 5 個 NF- κ B 結合位(5'-GGGACTTTCC-3')置於冷光酵素基因的上游所構築而成的。為了測試 NF- κ B-luc 是否可以真實地報導 NF- κ B 的活性，同時也要測試 NF- κ B 的活性是否可以被 LPS 所誘導，因此我們先將 NF- κ B-luc 試劑送入 HepG2 細胞中，再加入不同濃度的 LPS，最後測定冷光的強度。圖一可見 NF- κ B 的活性與 LPS 的劑量成正比，NF- κ B 的活性隨著 LPS 劑量的增加而上升，當 LPS 濃度為 100 ng/ml 時，細胞的活性不受影響，但是 NF- κ B 的活性可增加 1.8 倍。這個實驗結果證實了 LPS 確實能夠活化細胞內 NF- κ B 的活性。

(二) NF- κ B-luc 基因轉殖鼠之特性

基因轉殖鼠是將 NF- κ B-luc 利用原核顯微注射技術，送到 FVB 小鼠的卵細胞中所構築的，因為基因轉殖鼠體內帶有會受到 NF- κ B 調控的冷光酵素基因，因此可以藉由注射冷光受質 (luciferin)，再藉助活體等光偵測系統 (IVIS)，判定小鼠體內的 NF- κ B 活性 (圖二)。

為了測定內源性的 NF- κ B 活性，我們先經由腹腔注射 luciferin 後，再觀察基因轉殖鼠的全身性冷光影像。圖三可見基因轉殖鼠的腹部有明顯的冷光訊號，而體外冷光影像的結果顯示冷光訊號主要出現在脾臟、小腸以及腸繫膜。因此這些結果顯示基因轉殖鼠腹腔的冷光主要源自於脾臟、小腸內的 Peyer's patches 及腸繫淋巴結。另外，基因轉殖鼠的鼻子、腿部以及尾巴部位也出現冷光訊號，這些冷光訊號可能是因為與墊料或籠子磨擦刺激後的結果。

我們接著監控 LPS 所誘發的 NF- κ B 活性。將 LPS 經由腹腔注射基因轉殖鼠，經過 4 小時後觀察，發現 LPS 會增強全身，尤其是腹部的冷光訊號，經解剖後發現 LPS 可以增強所有器官的冷光強度，在小腸可以觀察到最高的冷光強度，而腸繫膜淋巴結、脾臟、肝臟則呈現中等的冷光強度 (圖三)。這些結果顯示 LPS 確實可以誘導小鼠體內 NF- κ B 的活性。

二、利用即時性活體冷光影像系統評估清熱解毒中草藥抗發炎的潛能

我們接著應用即時性冷光活體影像系統評估中草藥抗發炎的潛能。目前認為，具有清熱解毒功效的中草藥可能與抗發炎有關，因此，我們從中

決選出山梔子、黃芩、黃連、黃柏、板藍根以及金銀花等清熱解毒中藥進行實驗。將這些中草藥的萃取液換算成人體劑量連續餵食小鼠七天後，再利用腹腔注射 LPS，並於 LPS 注射 4 小時後，進行冷光影像的測定。圖四可見 LPS 誘發發炎反應之基因轉殖鼠，其腹部有明顯的冷光活性，而經過中藥處理的基因轉殖鼠，其腹部的冷光強度有下降的現象，尤其以山梔子、黃連以及黃柏的下降圖譜最具特異性，另外，中藥處理組各臟器的冷光強度也呈現不同程度的下降。這些結果顯示，具有清熱解毒功效的中草藥在動物體內確實可以降低 LPS 所誘導之 NF- κ B 活性。

三、以活體冷光影像導引之微陣列分析方法研究中草藥抗發炎的療效及機轉—以梔子素（genipin）為例

(一) 以活體冷光影像為工具，進行 genipin 抑制 LPS 誘發 NF- κ B 活性的分析

因為山梔子在上述實驗中呈現抗發炎的潛能，因此我們選取山梔子的主成分—梔子素（genipin），進行療效及機轉的研究。將 100 mg/kg genipin 及 4 mg/kg LPS 腹腔注射基因轉殖鼠後，再進行冷光的測定，發現 LPS 可增強全身，尤其是腹部區域的冷光反應（ $\sim 5.37 \times 10^8$ photons/sec/cm²/sr），而 genipin 可以明顯地抑制 LPS 所誘發之 NF- κ B 活性（ $\sim 1.10 \times 10^8$ photons/sec/cm²/sr）（圖五）。經過解剖後，發現 LPS 可以活化全身各臟器的 NF- κ B 活性，誘發強度最高的臟器為小腸、脾臟、肝臟以及胃部，而 genipin 可以降低大部分器官中，LPS 所誘導的 NF- κ B 活性，其中又以腦部、心臟、腎臟下降的比例最為明顯（圖六）。這些結果顯示 genipin 確實可以抑制 LPS 所誘導的 NF- κ B 活性。

(二) Genipin 活體免疫抑制的確認

IL-1 β 及 TNF- α 為發炎反應的重要指標，為了確認 genipin 抑制 LPS 所誘導 NF- κ B 活性的結果是否與抑制發炎反應有關，我們利用免疫組織化學染色的方式進行分析。圖七可見，LPS 可以增加腦、心臟、腎臟切片中的 IL-1 β 及 TNF- α ，而 LPS 所增加之 IL-1 β 及 TNF- α 可明顯地被 genipin 所抑制。這些結果顯示 genipin 可以藉由降低 IL-1 β 及 TNF- α 的產生，而抑制 LPS 所誘導之發炎反應。

(三) 以活體冷光影像導引之微陣列分析方法研究 genipin 抗發炎的機轉

由冷光影像發現 genipin 可以明顯地調降腦部、心臟、腎臟的 NF- κ B 活性，因此，我們選取這三個器官進行微陣列分析。在 30968 個基因中，有 142 個基因的表現會被影響。藉由 TIGR Multiexperiment Viewer 進行階層式叢集分析後，發現所有被 LPS

所活化的基因都可以被 genipin 所抑制，而大部分受影響的基因都是屬於 interferon-induced proteins 及 chemokine ligands（圖八）。進一步利用 Gene Ontology Tree Machine 進行 Gene Ontology 分析，發現受 genipin 調控的基因都是屬於”immune system process”及”physiological response to stimulus”等兩個群組（圖九）。最後，我們利用 BiblioSphere Pathway Edition 軟體建構表現有差異基因之間的交互作用網路，結果發現 NF- κ B 為此一交互作用網路的中心分子（圖十），而這個結果也顯示利用 NF- κ B 活體冷光影像圖譜於抗發炎中藥研究之合理性。

肆、討論

NF- κ B 為調節免疫反應的關鍵分子。許多不同的刺激，包括細菌、病毒、發炎性細胞激素、生理化學緊迫等，都會活化 NF- κ B，而活化的 NF- κ B 又可進一步干擾一大群與免疫和發炎反應有關的基因表現（Barnes and Karin, 1997; Karin and Ben-Neriah, 2000; Bonizzi and Karin, 2004）。在本研究中，我們建構了帶有會受到 NF- κ B 調控的冷光酵素基因轉殖鼠，並且將其應用於監控發炎反應的發生。在缺乏外來刺激的情況下，大部分的淋巴組織，包括頸部淋巴結、脾臟以及小腸的 Peyer's patches，可以偵測到較強的冷光。Carlsen 等（2002）也發現 NF- κ B 基因轉殖鼠的頸部淋巴結、胸腺與小腸的 Peyer's patches 皆可偵測到較強的冷光。淋巴組織的位置與 NF- κ B 冷光訊號的位置呈現高度相關性的現象，證明冷光訊號的強度可以反應活體內 NF- κ B 的活性，而且，淋巴組織中 NF- κ B 的活化也與之前認為 NF- κ B 與免疫反應有關的說法一致。

生物冷光影像系統已被用於偵測活體內中草藥與宿主之交互作用，也已被應用於測定活體內細胞的生長（Blum et al., 2004; Román et al., 2007）。雖然缺乏了核磁共振攝影或微型電腦斷層掃描儀在空間性解析度的優勢，但是生物冷光影像系統具有高敏感性的特色，所以仍被用來偵測活體內的腫瘤生成作用、細胞凋亡與蛋白質交互作用（Vooijs et al., 2002; Laxman et al., 2002; Luker et al., 2004; Paulmurugan et al., 2004）。此外，可以在短時間測定多隻動物的全身性影像，以及冷光酵素半衰期很短（2-3 小時）等特性，都使得生物冷光影像系統可以即時性地偵測基因的動態表現（Southern et al., 2006）。舉例來說，發炎反應可以在動物經過 LPS 誘導就立刻被偵測到，此外，同一隻動物可以進行持續性的掃描。

建立一個可以預測及評估中草藥在活體內作用的平台是一件重要的課題。然而，宿主對中草藥的反應是一個相當複雜的過程，有些中草藥在植入體內後，可能會引發一連串的发炎反應，包括血液的凝集、白血球的浸潤等（Anderson, 2001; Williams, 2008）。傳統上，以細胞為主的細胞毒殺試驗最常被使用，而且高危險的中草藥在細胞平台的階段就可以被察覺而被剔除。轉錄質體學或蛋白質體學也已經被用來研究細胞對中草藥的複雜反應（Klapperich and Bertozzi, 2004; Gallagher et al., 2006; Lü et al., 2009）。雖然這些細胞模式可以用來評估某一種特定的生物功能，但是這些細胞模式仍然無法預測中草藥在體內可能發生的複雜反應（Hunt et al., 1997）。

在本研究中，我們已經證實了以 NF- κ B 活體冷光影像系統評估中草藥抗發炎功效的可行性，但是中草藥會影響哪一些器官呢？抗發炎的機制為何呢？因為 NF- κ B 可以被許多不同的因子所活化，此外也與多種疾病發展

與多種訊息傳導路徑有關聯，因此 NF- κ B 涉及許多訊息傳導路徑的特性，使得活體內 NF- κ B 活性的變化非常適合作為多重生理現象的感應器，反應出中草藥會影響哪一些臟器。至於活體內 NF- κ B 活性變化所造成之生理現象為何，尚須考量 NF- κ B 所誘導之下游基因的種類。以測試 genipin 於活體內是否具有抗發炎反應為例，我們所使用的誘發劑為 LPS，藉助活體內 NF- κ B 活性的變化，可以快速地確認 genipin 發揮抗發炎潛能之器官，而抗發炎效應仍須藉助微陣列分析受到調控的基因及路徑，並進一步利用免疫組織化學染色等試驗，才能確認。在 1995 年發展出 DNA 微陣列之後，近年來，DNA 微陣列技術已有了快速的進展 (Schena et al., 1995)。DNA 微陣列可以快速地分析細胞內所有基因的表現圖譜，而且可以用來預測生物標的、預測藥物的療效、預測疾病的癒後、分析藥物的潛在毒性及發現小分子/基因/疾病的相關性 (Scherf et al., 2000; Gunther et al., 2003; Lamb et al., 2006)。因此，在本研究中，我們應用活體冷光影像導引之微陣列分析方法，分析與解釋中草藥調控免疫的活性及機轉，將傳統中草藥抗發炎的療效以更直接的方式呈現並解讀。

我們首先以 LPS 誘發基因轉殖鼠發生發炎反應，再口服餵食清熱解毒湯藥後進行觀察。由冷光影像圖譜可以清楚地解讀 LPS 在基因轉殖鼠身上所造成的發炎現象，而藉由口服清熱解毒中草藥治療後，冷光影像結果呈現山梔子、黃連以及黃柏的冷光訊號明顯減弱，表示其體內的發炎反應已有緩解的情形，經過解剖後也同時確認動物體內不同臟器的發炎反應有被緩解的現象。所以，我們進一步將梔子的主成分—genipin 作為抗發炎的藥物標的，作為下一階段抗發炎藥物之基因圖譜的確認。

目前已知中藥梔子具有抗發炎的作用，其主要活性成分為 geniposide，而 geniposide 代謝後的產物以 genipin 為主。根據民國 93 年行政院衛生署編印的「中華中藥典」指出，梔子中 geniposide 的含量應在 2% 以上，若以順天堂科學中藥製劑建議量進行換算，人體每日 geniposide 的攝取量約為 6-18 mg，而考量實驗動物小鼠的代謝率進行換算，小鼠每日 geniposide 的攝取量約為 60-180 mg/kg，因此本實驗使用 100 mg/kg genipin 應為合理的臨床應用濃度。此外，由 Hou 等 (2008) 的報告亦指出 100 mg/kg genipin 為動物體內有效抗發炎且不具毒性之劑量，因此本實驗選用該濃度作為抑制 LPS 所誘發炎症反應之劑量。由我們的實驗中發現，genipin 確實可以影響由 LPS 所誘發之免疫反應，並且能夠調節細胞激素、受體以及 interferon-induced protein 等基因的表現，而上述這些基因都會受到 NF- κ B 所調控 (Borgland et al., 2000; Horton et al., 2002; Sánchez-Sánchez et al., 2004; Kanda et al., 2007; Yamauchi et al., 2007)。藉由資料庫搜尋的方式，我們分析這些基因之間的

交互關連性。有趣的是，經由 Network 分析我們發現，NF- κ B 似乎是這些基因之間共同交連到的中心標的分子。這些結果顯示 genipin 能夠藉由 NF- κ B 活體冷光影像圖譜，清楚地觀察到 genipin 抑制 LPS 所誘發的 NF- κ B 活性。另外，我們也證明 genipin 可以藉由誘導 IL-1 β 以及 TNF- α 的產生，進而抑制 LPS 所引起的發炎反應。IL-1 β 與 TNF- α 屬於發炎性細胞激素，在發炎反應的機轉中，扮演重要的角色。IL-1 β 與發炎反應的啟動與持續性有關 (Dinarello, 1996)，舉例來說，若是抑制 IL-1 β 的活性，則實驗動物在暴露於香菸煙霧中產生肺部炎症反應的機率會降低 (Castro et al., 2004)。我們的研究結果顯示，genipin 能夠有效地抑制 LPS 所誘導產生的 IL-1 β 與 TNF- α ，因為 IL-1 β 與 TNF- α 在發炎反應病程中扮演重要的角色，因此我們的結果證實了 genipin 在抗發炎中主要作用之分子機轉。

我們發現 genipin 可以藉由調控免疫系統以及生理反應相關基因的表現，來影響 LPS 所引發之發炎反應，並且與發炎反應中心分子 NF- κ B 的活性息息相關。因為，genipin 治療組中細胞激素相關基因的表現大多是呈現下調的現象，因此，我們推論 genipin 是藉由調節免疫系統以及生理反應來抑制實驗動物小鼠體內之炎症反應。經由上述實驗總論，我們認為非侵入性的生物冷光影像系統，能夠廣為應用於即時性監控炎症反應的產生，並發展成為抗發炎藥物活體平台。

伍、結論與建議

在本研究中，我們利用活體冷光影像導引之微陣列分析方法，分析與解釋中草藥調控免疫的活性及機轉，將傳統中草藥抗發炎的療效以更直接的方式呈現並解讀。我們的結果顯示在基因轉殖鼠中，淋巴組織的位置與 NF- κ B 冷光訊號的位置呈現高度相關性的現象，證明冷光訊號的強度可以反應活體內 NF- κ B 的活性。此外 LPS 可以誘導小鼠體內 NF- κ B 的活性，具有清熱解毒功效的中草藥在動物體內可以降低 LPS 所誘導之 NF- κ B 活性，而 genipin 可以藉由降低 IL-1 β 及 TNF- α 的產生、藉由影響 interferon-induced proteins 及 chemokine ligands 相關基因的表現，而抑制 LPS 所誘導之發炎反應。此外，由表現有差異基因之間的交互作用網路中發現，NF- κ B 為此一交互作用網路的中心分子，而這個結果也顯示利用 NF- κ B 活體冷光影像圖譜於抗發炎中藥研究之合理性。

本研究的結果，有關活體冷光影像導引之微陣列分析方法的應用，已發表於 *Biomaterials* (Hsiang et al., 2009)，枇杷葉及其組成份抑制肺上皮細胞發炎反應的機轉已發表在 *American Journal of Chinese Medicine* (Lee et al., 2008)，天然化合物 vanillin 抑制動物體內發炎反應的療效及機轉已投稿至 *Journal of Pharmacology and Experimental Therapies*，目前正在修正中。利用活體冷光影像導引之微陣列方法分析 genipin 抗發炎的療效及機轉目前正在撰稿中。

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-RD-201 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. Anderson JM: Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res* 2001; 31: 81-110.
2. Barnes PJ and Karin M: Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997;336: 1066-71.
3. Barnes PJ, Karin M: Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066-71.
4. Blum JS, Temenoff JS, Park H, Jansen JA, Mikos AG, Barry MA: Development and characterization of enhanced green fluorescent protein and luciferase expressing cell line for non-destructive evaluation of tissue engineering constructs. *Biomaterials* 2004; 25: 5809-19.
5. Blumenthal M: Herb sales down 7.4 percent in mainstream market. *HerbalGram* 2005; 66: 63.
6. Bodeker G, Carter G, Burford G, and Dvorak-Little M: HIV/AIDS: Traditional systems of health care in the management of a global epidemic. *J Altern Complement Med* 2006; 12: 563-576.
7. Bonham M, Arnold H, Montgomery B, and Nelson PS: Molecular effects of the herbal compound PC-SPEs: identification of activity pathways in prostate carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62: 3920-3924.
8. Bonizzi G and Karin M: The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004; 25: 280-288.
9. Bonizzi G, Karin M: The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004; 25: 280-8.
10. Borgland SL, Bowen GP, Wong NC, Libermann TA, and Muruve DA: Adenovirus vector-induced expression of the C-XC chemokine IP-10 is mediated through capsid-dependent activation of NF- κ B. *J Virol* 2000; 74: 3941-3947.
11. Bray GA and Greenway FL: Pharmacological treatment of the overweight patient. *Pharmacol Rev* 2007; 59: 151-184.
12. Canter PH, Lee HS, and Ernst E: A systematic review of randomised clinical trials of *Tripterygium wilfordii* for rheumatoid arthritis. *Phytomedicine* 2006; 13: 371-377.
13. Carlsen H, Moskaug JØ, Fromm SH, and Blomhoff R: *In vivo* imaging of NF- κ B activity. *J Immunol* 2002; 168: 1441-6.
14. Castro P, Legora-Machado A, Cardilo-Reis L, Valenca S, Porto LC,

- Walker C, Zuany-Amorim C, Koatz VL. Inhibition of interleukin-1 β reduces mouse lung inflammation induced by exposure to cigarette smoke. *Eur J Pharmacol* 2004; 498: 279-286.
15. Chen HW, Yu SL, Chen JJW, Li HN, Lin YC, Yao PL, Chou H, Chein CT, Chen WJ, Lee YT, and Yan PC: Anti-invasive gene expression profile of curcumin in lung adenocarcinoma based on a high throughput microarray analysis. *Mol. Pharmacol* 2004; 65: 9-110.
 16. Chen X, Hu ZP, Yang XX, Huang M, Gao Y, Tang W, Chan SY, Dai X, Ye J, Ho PC, Duan W, Yang HY, Zhu YZ, and Zhou SF: Monitoring of immune responses to a herbal immuno-modulator in patients with advanced colorectal cancer. *Int. Immunopharmacol* 2006; 6: 499-508.
 17. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996; 87: 2095-2147.
 18. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, and Botstein D: Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14863-14868.
 19. Gallagher WM, Lynch I, Allen LT, Miller I, Penney SC, and O'Connor DP: Molecular basis of cell-biomaterial interaction: insights gained from transcriptomic and proteomic studies. *Biomaterials* 2006; 27: 5871-82.
 20. Govindarajan VS: Turmeric: chemistry, technology and quality. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1980; 12: 199-301.
 21. Govindarajan VS: Turmeric: chemistry, technology and quality. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1980; 12: 199-301.
 22. Gunther EC, Stone DJ, Gerwien RW, Bento P, and Heyes MP: Prediction of clinical drug efficacy by classification of drug-induced genomic expression profiles *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 9608-13.
 23. Ho TY, Chen YS, and Hsiang CY: Noninvasive nuclear factor- κ B bioluminescence imaging for the assessment of host-biomaterial interaction in transgenic mice. *Biomaterials* 2007; 28: 4370-4377.
 24. Horton MR, Boodoo S, Powell JD. NF- κ B activation mediates the cross-talk between extracellular matrix and interferon- γ (IFN- γ) leading to enhanced monokine induced by IFN- γ (MIG) expression in macrophages. *J Biol Chem* 2002; 277: 43757-43762.
 25. Hou YC, Tsai SY, Lai PY, Chen YS, Chao PDL. Metabolism and pharmacokinetics of genipin and geniposide in rats. *Food Chem Toxicol*

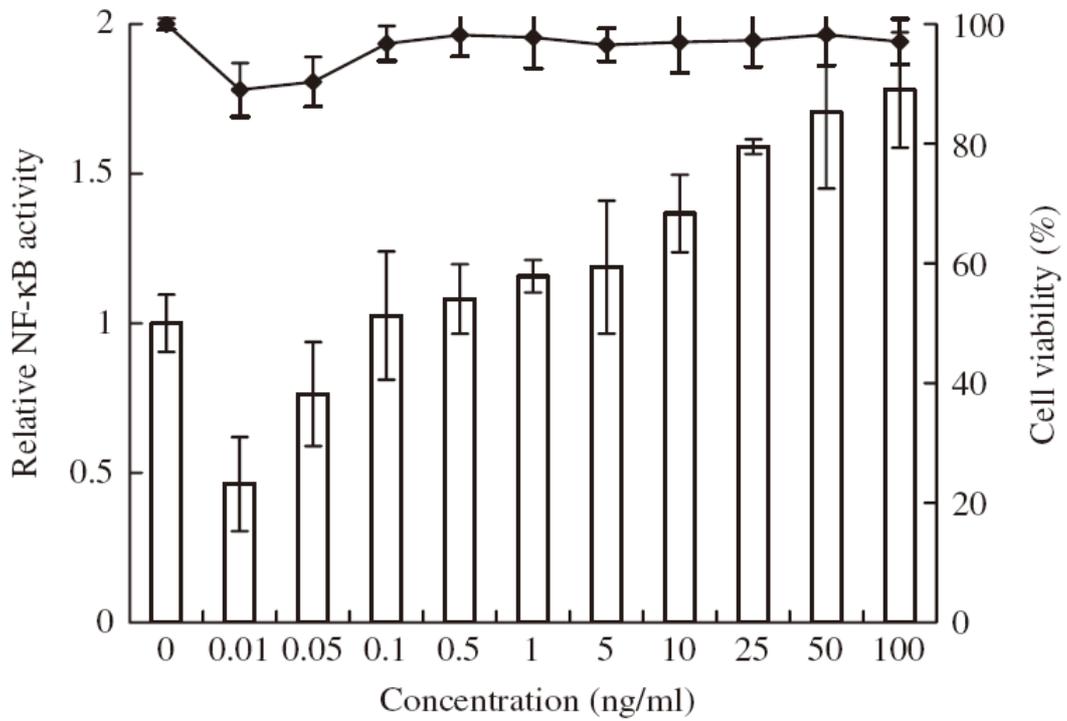
- 2008; 46: 2764-2769.
26. Hsiang CY, Chen YS, and Ho TY: Nuclear factor- κ B bioluminescence imaging-guided transcriptomic analysis for the assessment of host-biomaterial interaction in vivo. *Biomaterials* 2009; in press.
 27. Hsieh MT, Cheng SJ, Lin LW, Wang WH, and Wu CR: The ameliorating effects of acute and chronic administration of LiuWei DiHuang Wang on learning performance in rodents. *Biol. Pharm. Bull* 2003; 26: 156-161.
 28. Huang MT, Smart RC, Wong CQ, and Conney AH: Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res* 1988; 48: 5941-5946.
 29. Hunt JA, McLaughlin PJ, and Flanagan BF: Techniques to investigate cellular and molecular interactions in the host response to implanted biomaterials. *Biomaterials* 1997; 18: 1449-59.
 30. Imanishi N, Andoh T, Mantani N, Sakai S, Terasawa K, Shimada Y, Sato M, Katada Y, Ueda K, and Ochiai H: Macrophage-mediated inhibitory effect of *Zingiber officinale* Rosc, a traditional oriental herbal medicine, on the growth of influenza A/Aichi/2/68 virus. *Am J Chin Med* 2006; 34: 157-169.
 31. Kanda N, Shimizu T, Tada Y, and Watanabe S: IL-18 enhances IFN- γ -induced production of CXCL9, CXCL10, and CXCL11 in human keratinocytes. *Eur J Immunol* 2007; 37: 338-350.
 32. Karin M and Ben-Neriah Y: Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 621-663.
 33. Karin M, Ben-Neriah Y: Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 621-63.
 34. Kim SY and Volsky DJ: PAGE: parametric analysis of gene set enrichment. *BMC Bioinformatics* 2005; 86: 144.
 35. Klapperich CM and Bertozzi CR: Global gene expression of cells attached to a tissue engineering scaffold. *Biomaterials* 2004; 25: 5631-41.
 36. Kubota T, Hisatake J, Hisatake Y, Said JW, Chen SS, Holden S, Taguchi H, and Koeffler HP: PC-SPES: a unique inhibitor of proliferation of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Prostate* 2000; 42: 163-171.
 37. Lamb J, Crawford ED, Peck D, Modell JW, Blat IC, and Wrobel MJ: The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small

- molecules, genes, and disease. *Science* 2006; 313: 1929-35.
38. Laxman B, Hall DE, Bhojani MS, Hamstra DA, Chenevert TL, Ross BD, and Rhemtulla A: Noninvasive real-time imaging of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 16551-5.
 39. Lee CH, Wu SL, Chen JC, Li, CC, Lo HY, Cheng WY, Lin JG, Chang YH, Hsiang CY, and Ho TY: Eriobotrya japonica leaf and its triterpenes inhibited lipopolysaccharide-induced cytokines and inducible enzymes productions via the nuclear factor- κ B signaling pathway in lung epithelial cells. *Am J Chin Med* 2008; 36(6): 1185-1198.
 40. Lin ZB: Cellular and molecular mechanisms of immuno-modulation by *Ganoderma lucidum*. *J Pharmacol Sci* 2005; 99: 144-153.
 41. Lü X, Bao X, Huang Y, Qu Y, Lu H, and Lu Z: Mechanisms of cytotoxicity of nickel ions based on gene expression profiles. *Biomaterials* 2009; 30: 141-8.
 42. Luker KE, Smith MC, Luker GD, Gammon ST, Piwnica-Worms H, and Piwnica-Worms D: Kinetics of regulated protein-protein interactions revealed with firefly luciferase complementation imaging in cells and living animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 12288-93.
 43. Paulmurugan R, Massoud TF, Huang J, and Gambhir SS: Molecular imaging of drug-modulated protein-protein interactions in living subjects. *Cancer Res* 2004; 64: 2113-9.
 44. Pierce B: The use of biofield therapies in cancer care. *Clin J Oncol Nurs* 2007; 11: 253-258.
 45. Quan FS, Compans RW, Cho YK, and Kang SM: Ginseng and Salviae herbs play a role as immune activators and modulate immune responses during influenza virus infection. *Vaccine* 2007; 25: 272-282.
 46. Rho S, Kang M, Choi B, Sim D, Lee J, Lee E, Cho C, Oh JW, Park S, Ko S, Shin M, Hong M, and Bae H: Effects of Yukmijihwang-tang derivatives (YMJd), a memory enhancing herbal extract, on the gene-expression profile in the rat hippocampus. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 87-93.
 47. Román I, Vilalta M, Rodriguez J, Matthies AM, Srouji S, and Livne E: Analysis of progenitor cell-scaffold combinations by *in vivo* non-invasive photonic imaging. *Biomaterials* 2007; 28: 2718-28.
 48. Sánchez-Sánchez N, Riol-Blanco L, de la Rosa G, Puig-Kröger A, García-Bordas J, Martín D, Longo N, Cuadrado A, Cabañas C, Corbí AL,

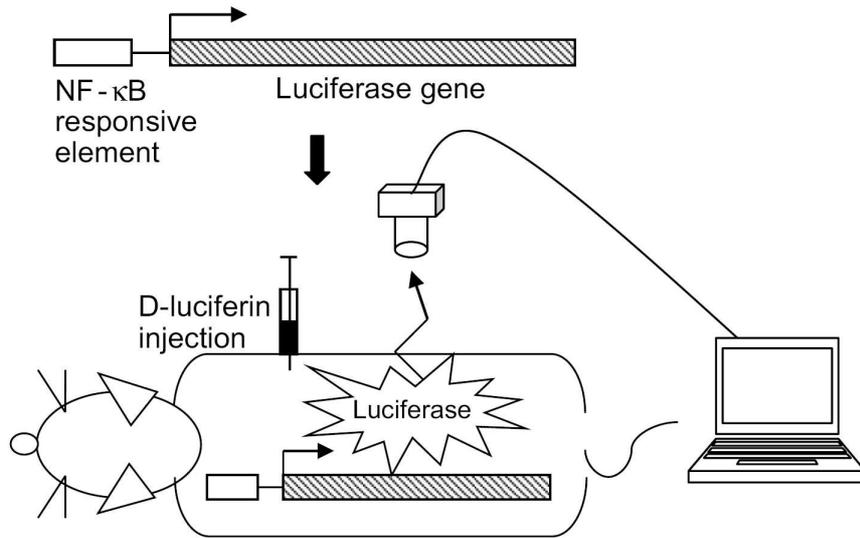
- Sánchez-Mateos P, and Rodríguez-Fernández JL: Chemokine receptor CCR7 induces intracellular signaling that inhibits apoptosis of mature dendritic cells. *Blood* 2004; 104: 619-625.
49. Scaglione F, Ferrara F, Dugnani S, Falchi M, Santoro G, and Frascini F: Immunomodulatory effects of two extracts of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Drugs Exp Clin Res* 1990; 16: 537-542.
50. Schena M, Shalon D, Davis RW, and Brown PO: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270: 467-70.
51. Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, and Tanabe L: A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet* 2000; 24: 236-44.
52. See DM, Broumand N, Sahl L, and Tilles JG: *In vitro* effects of *Echinacea* and ginseng on natural killer and antibody-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients. *Immunopharmacology* 1997; 35: 229-235.
53. Small EJ, Frohlich MW, Bok R, Shinohara K, Grossfeld G, Rozenblat Z, Kelly WK, Corry M, and Reese DM: Prospective trial of the herbal supplement PC-SPES in patients with progressive prostate cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3595-3603.
54. Smyth GK: Limma: linear models for microarray data. In: Gentleman R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R, and Huber W: *Bioinformatics and computational biology solutions using R and bioconductor*. Springer 2005; 397-420.
55. Southern MM, Brown PE, and Hall A: Luciferases as reporter genes. *Methods Mol Biol* 2006; 323: 293-305.
56. Spelman K, Burns JJ, Nichols D, Winters N, Ottersberg S, and Tenborg M: Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators. *Altern Med Rev* 2006; 11: 128-150.
57. Vooijs M, Jonkers J, Lyons S, and Berns A: Noninvasive imaging of spontaneous retinoblastoma pathway-dependent tumors in mice. *Cancer Res* 2002; 62: 1862-7.
58. Wang, J E, Jorgensen P F, Almlof M, Thiemermann C, Foster S J, Aasen A O, and Solberg R: Peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus*

- aureus* induce tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL-6), and IL-10 production in both T cells and monocytes in a human whole blood model. *Infect. Immun* 2000; 68: 3965-3970.
59. Watanabe CM, Wolfram S, Ader P, Rimbach G, Packer L, Maguire JJ, Schultz PG, and Gohil K: The *in vivo* neuromodulatory effects of the herbal medicine ginkgo biloba. *Proc Natl Acad Sci* 2001. USA 98: 6577-6580.
 60. Williams DF: On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008; 29: 2941-53.
 61. Yamauchi M, Hashimoto M, Ichiyama K, Yoshida R, Hanada T, Muta T, Komune S, Kobayashi T, and Yoshimura A: Ifi202, an IFN-inducible candidate gene for lupus susceptibility in NZB/W F1 mice, is a positive regulator for NF-kappaB activation in dendritic cells. *Int Immunol* 2007; 19: 935-942.
 62. Zhang B, Schmoyer D, Kirov S, and Snoddy J: GOTree Machine (GOTM): a web-based platform for interpreting sets of interesting genes using Gene Ontology hierarchies. *BMC Bioinformatics* 2004; 5: 16-23.

柒、圖、表

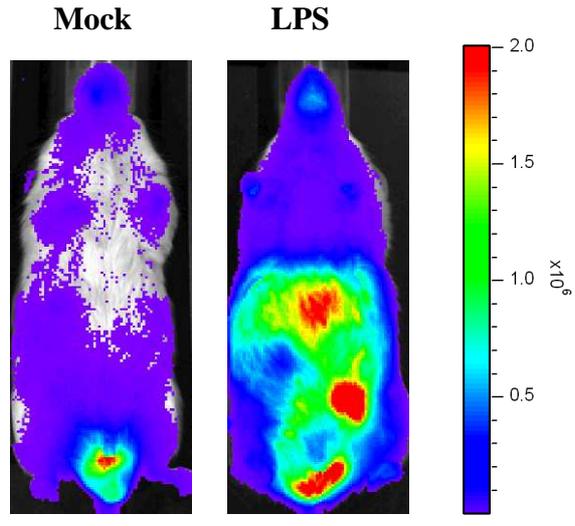


圖一、NF-κB-luc 質體的測試—細胞模式。將 NF-κB-luc DNA 送入 HepG2 細胞，再加入不同濃度的 LPS，作用 24 小時後，測定冷光酵素的活性與細胞存活率。柱狀圖為 NF-κB 的相對活性，線性圖為細胞的活性。數值是經重複三次分析後所得，數值呈現的方式為中間值±標準差。

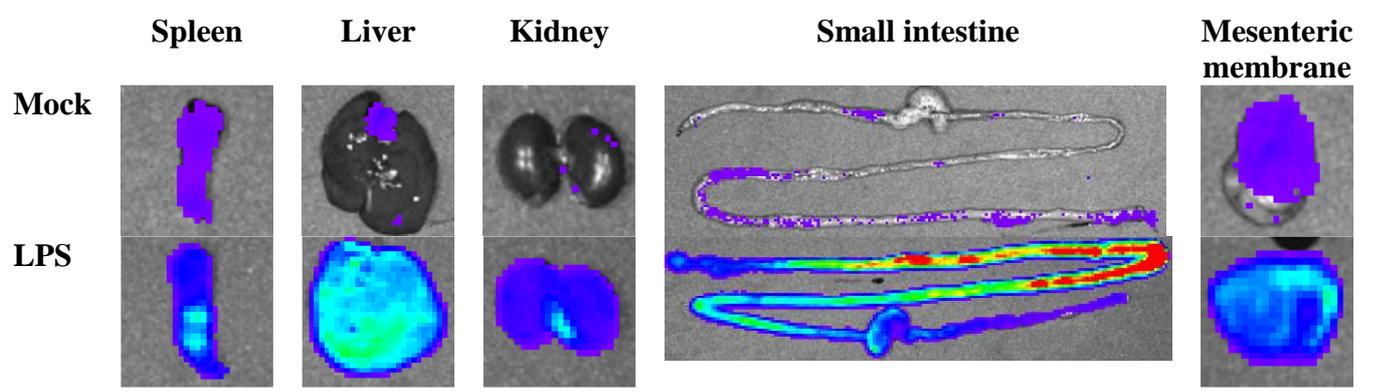


圖二、NF- κ B-luc 基因轉殖鼠的建構與活體照影的模式圖。上方所示為 NF- κ B-luc 質體 DNA 的示意圖。NF- κ B-luc 是將 5 個 NF- κ B 結合位 (5'-GGGACTTTCC-3') 置於冷光酵素基因的上游所構築而成的。下方為活體照影的模式圖。NF- κ B-luc 利用原核顯微注射技術，送到 FVB 小鼠的卵細胞，以構築基因轉殖鼠。活體照影的方法是先將小鼠麻醉後，再將每公斤體重 150 mg 的 luciferin 以腹腔注射的方式，注射到小鼠腹腔中。五分鐘後，將小鼠腹部朝上置於 IVIS Imaging System[®] 100 Series 的照影艙中，再利用 Living Image[®] software 定量自組織散出的光子數。

(A)



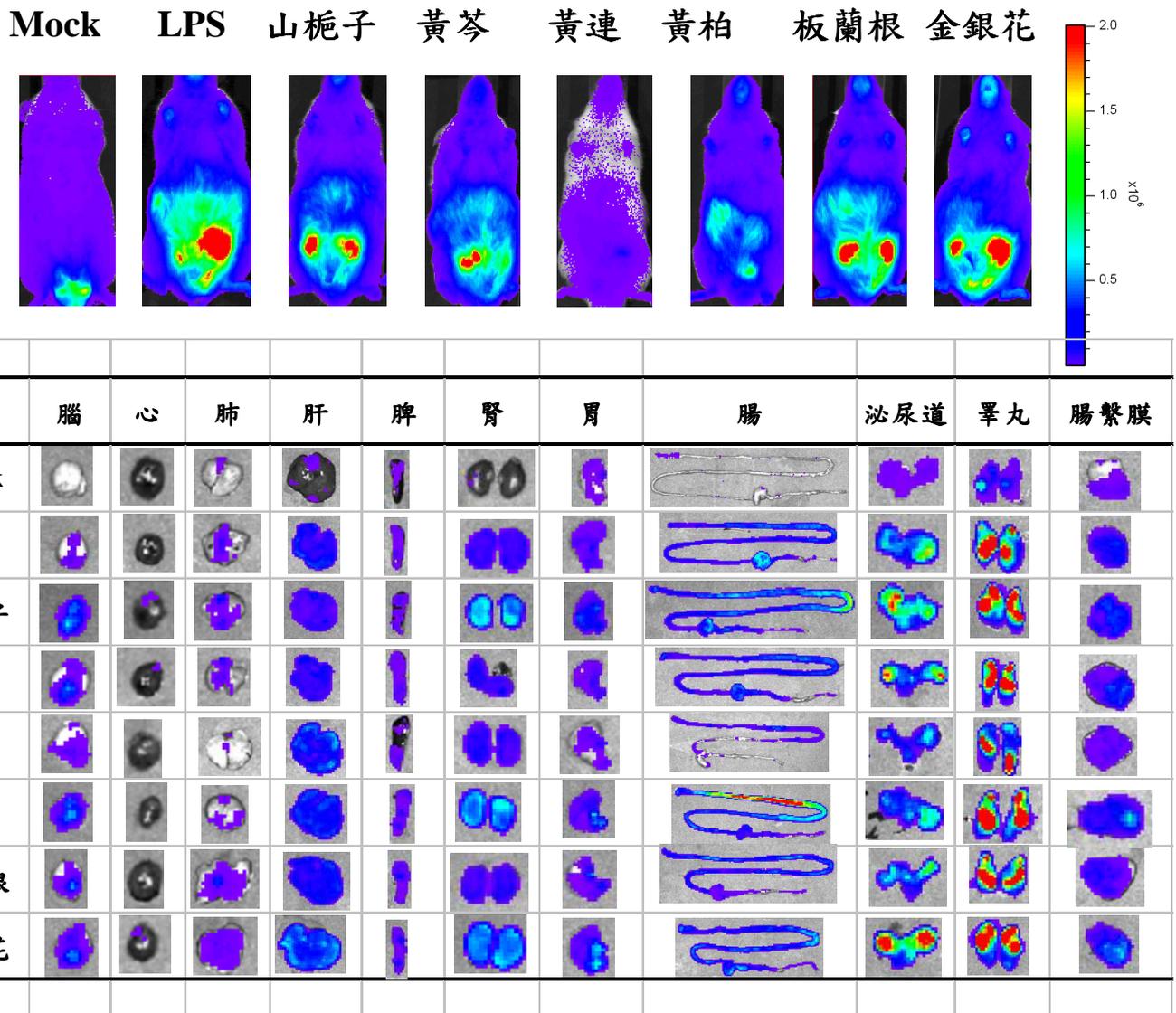
(B)



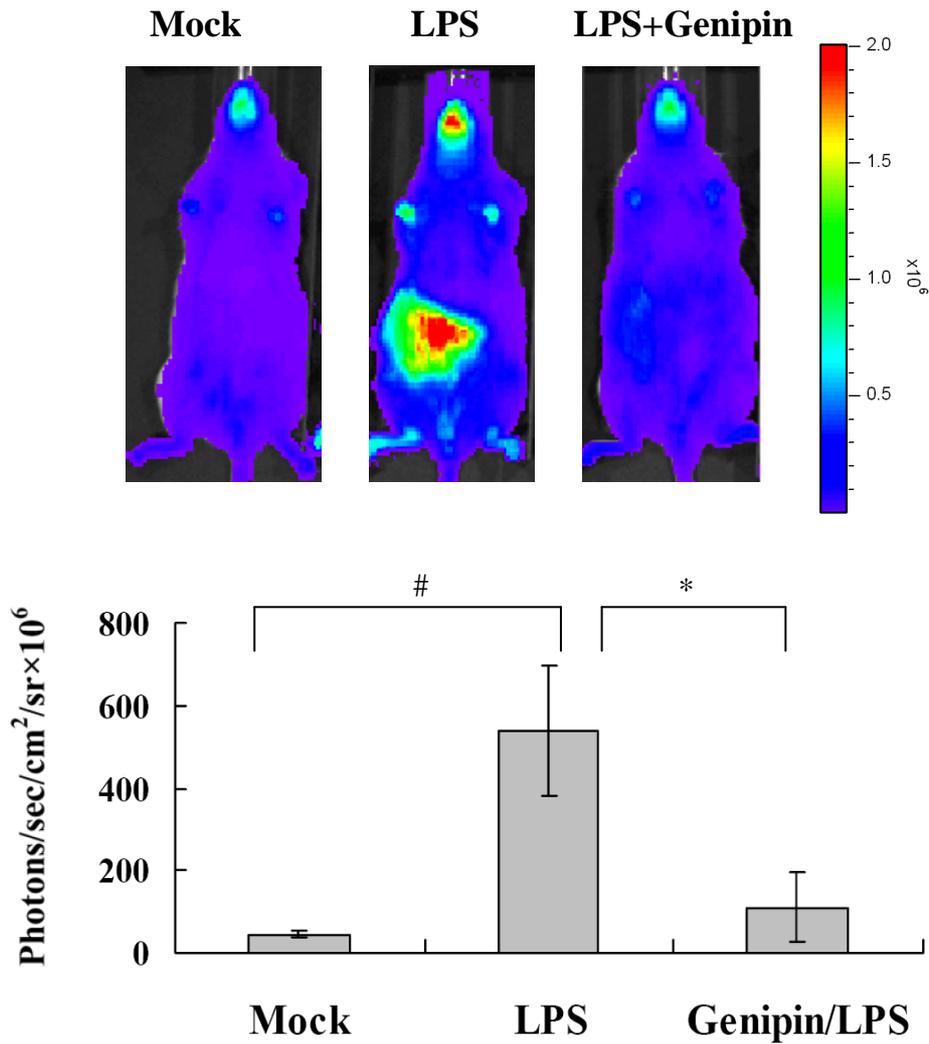
圖三、NF- κ B-luc 基因轉殖鼠生物冷光影像圖譜的分析。

(A)活體冷光影像。基因轉殖鼠經腹腔注射 PBS (mock) 或 4 mg/kg LPS (LPS) 4 小時後，再經腹腔注射 luciferin。5 分鐘後進行活體冷光影像的測定。

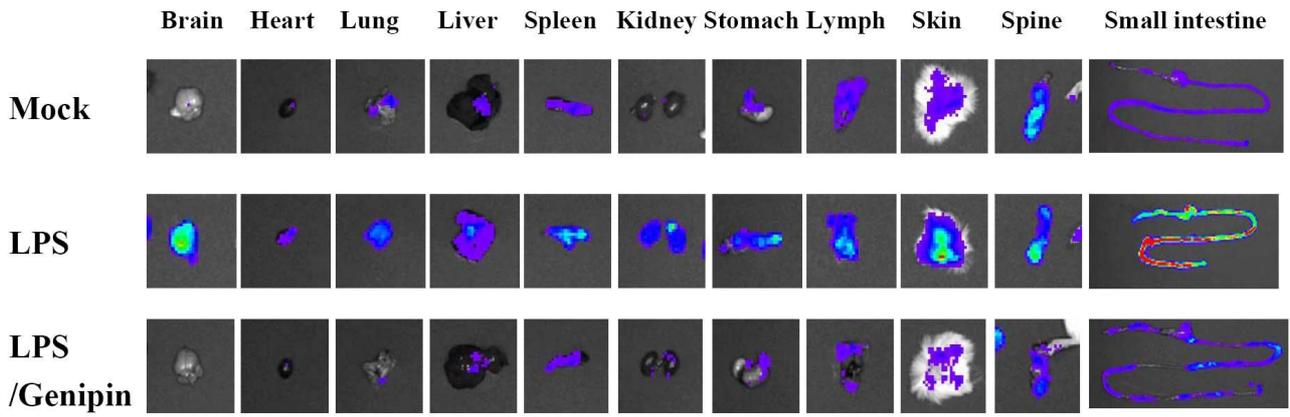
(B)器官冷光影像。基因轉殖鼠經腹腔注射 PBS (mock) 或 4 mg/kg LPS (LPS) 4 小時後，再經腹腔注射 luciferin。5 分鐘後進行解剖，將器官摘出後，進行冷光影像的測定。冷光影像強度可對照 color scale，單位為 photons/sec。



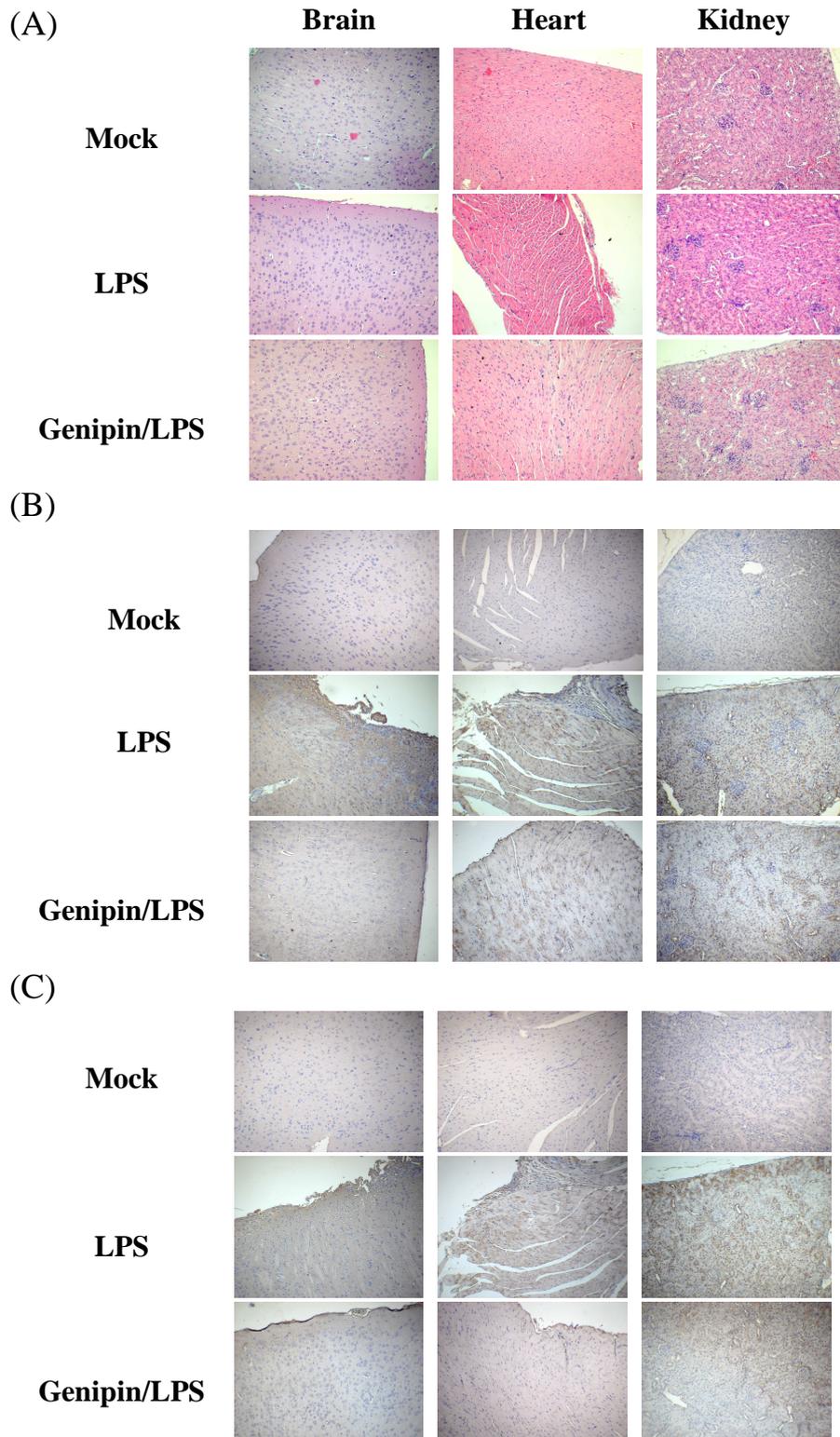
圖四、利用即時性活體冷光影像系統評估清熱解毒中草藥抗發炎之潛能。為例。實驗室以LPS作為炎症誘發之動物模式，並處理上述之中草藥，再利用冷光系統觀察NF- κ B活性表現情形。將山梔子、黃芩、黃連、黃柏、板藍根以及金銀花等清熱解毒中藥以人體劑量口服七天後，再進行LPS (4 mg/kg) 的腹腔注射。四小時後再經腹腔注射 luciferin，5分鐘後進行活體冷光影像（上圖）或是個別器冷光影像（下圖）的測定。冷光影像強度可對照 color scale，單位為 photons/sec。



圖五、利用活體冷光影像評估 genipin 抑制 LPS 所誘導 NF-κB 活性的能力。Genipin (100 mg/kg) 與 LPS (4 mg/kg) 進行腹腔注射，四小時後再經腹腔注射 luciferin，5 分鐘後進行活體冷光影像的測定。上圖為冷光圖譜，下圖為冷光強度的定量圖。數值是經重複三次分析後所得，數值呈現的方式為中間值±標準差。#及*表示 $p < 0.05$ 。冷光影像強度可對照 color scale，單位為 photons/sec。



圖六、利用冷光影像評估 genipin 所影響的器官。Genipin (100 mg/kg) 與 LPS (4 mg/kg) 進行腹腔注射，四小時後再經腹腔注射 luciferin，5 分鐘後進行解剖，將器官摘出後，進行冷光影像的測定。

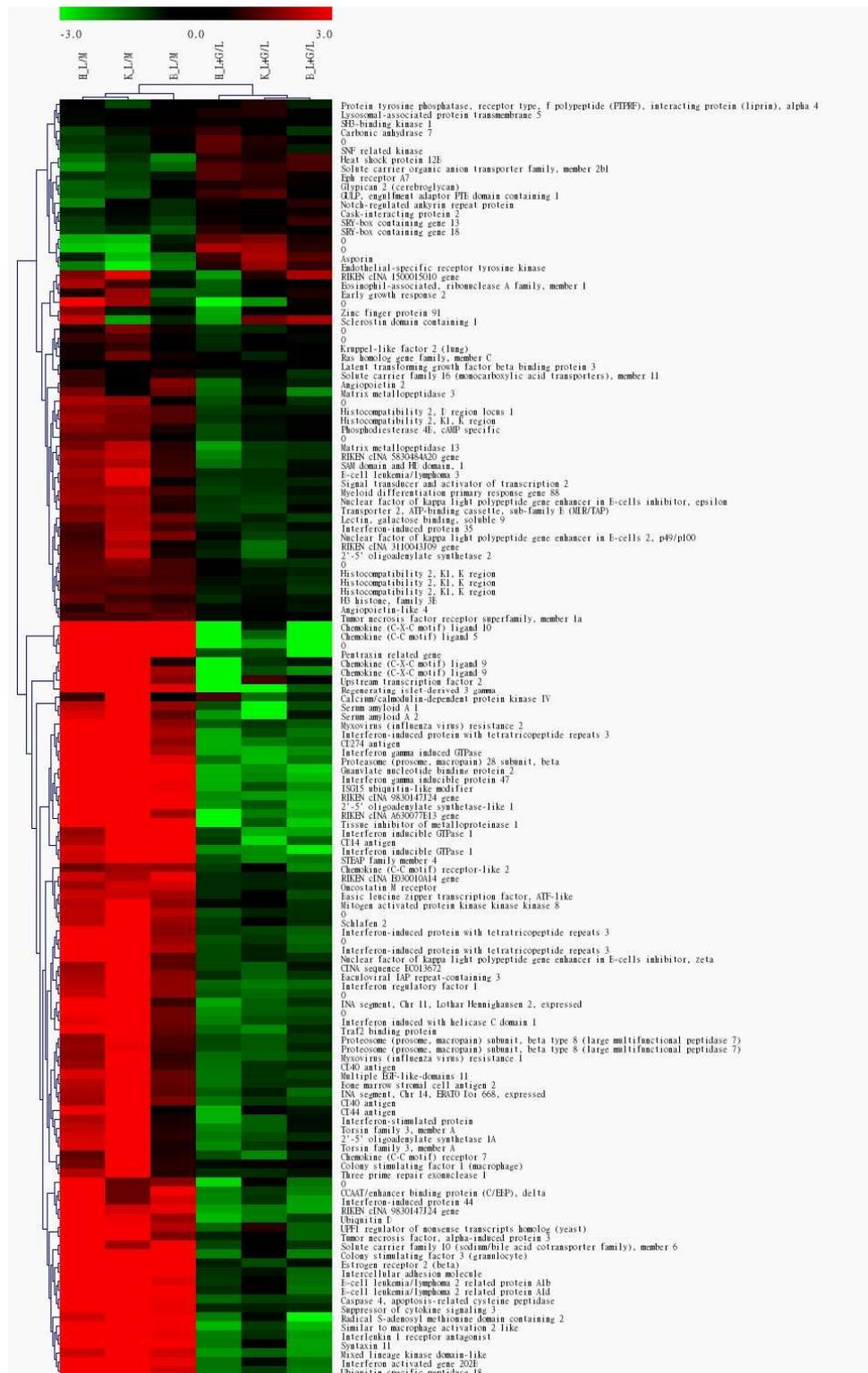


圖七、利用免疫組織化學染色法驗證 genipin 抗發炎的功效。將切片後的心臟、腎臟、腦組織進行 H&E 染色

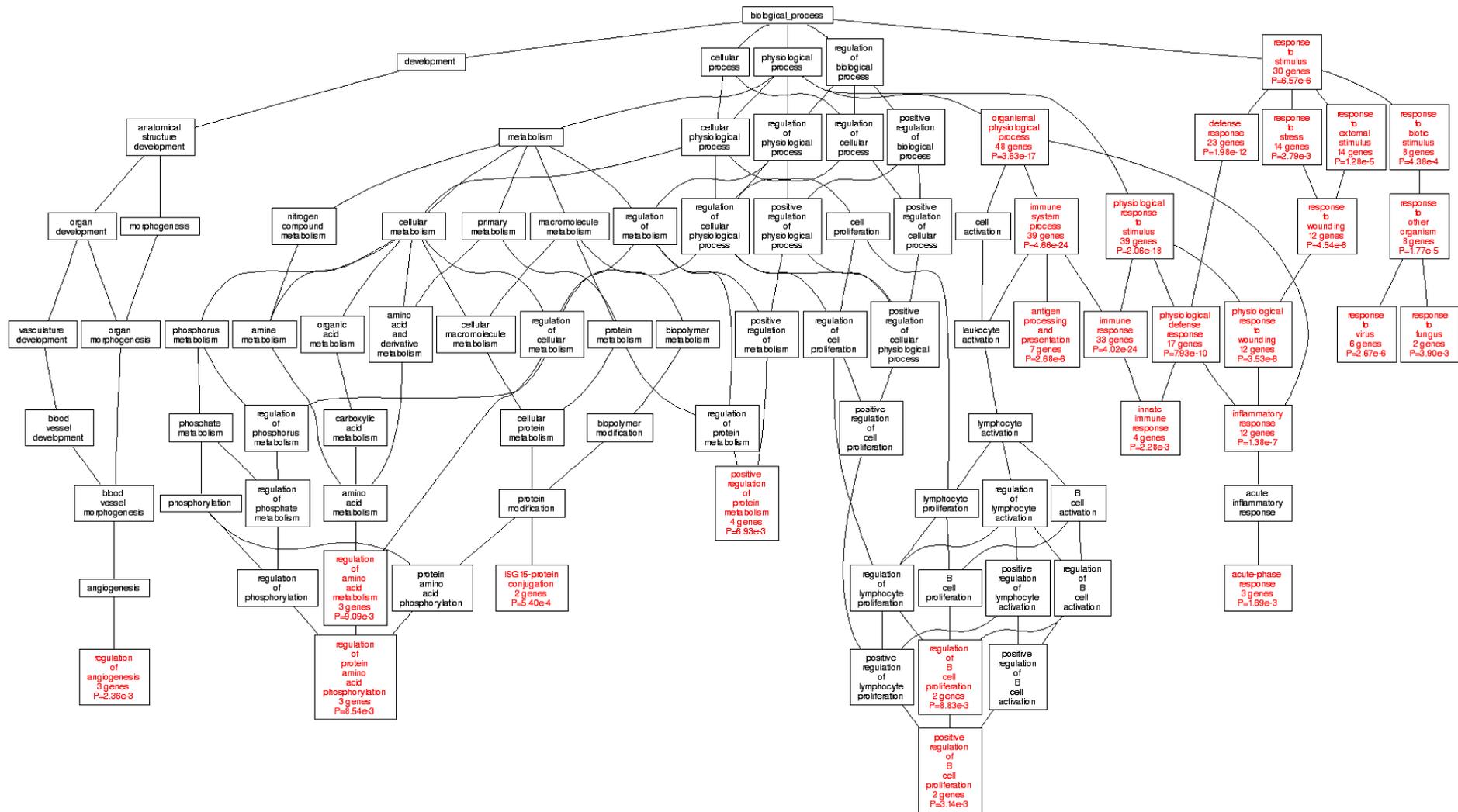
(A)或是使用與抗體進行免疫組織化學染色測定 IL-1 β

(B)或 TNF- α

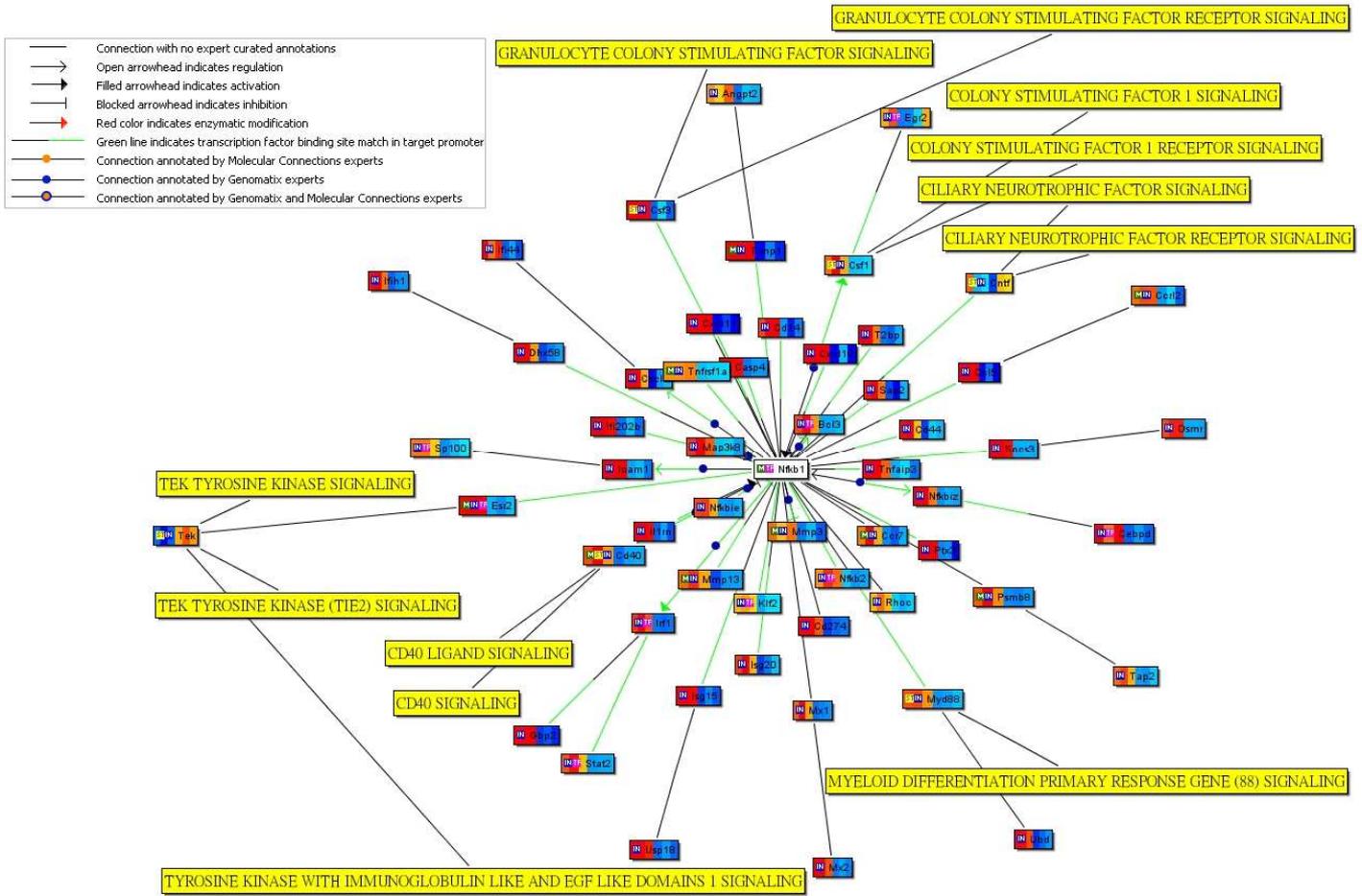
(C)放大倍率為 100 \times



圖八、以階層式叢集分析 genipin 所影響的基因。抽取 LPS 組及 LPS/genipin 組的心臟、腎臟及腦部 RNA 後，進行 DNA 微陣列分析，表現有差異的基因藉由 TIGR Multiexperiment Viewer 進行階層式叢集分析。歸一化的 \log_2 表現數值以顏色表示，紅色代表活化，綠色代表抑制。



圖九、利用 Gene Ontology 分析 genipin 所影響的基因。抽取 LPS 組及 LPS/genipin 組的心臟、腎臟及腦部 RNA 後，進行 DNA 微陣列分析，表現有差異的基因利用 Gene Ontology Tree Machine 進行 Gene Ontology 分析，以找出這些受調控的基因所影響的細胞行為模組。受影響的細胞行為模組 ($p < 0.01$ 而且至少有兩個基因) 以紅色表示。



圖十、利用 Network 分析 genipin 所影響的基因。抽取 LPS 組及 LPS/genipin 組的心臟、腎臟及腦部 RNA 後，進行 DNA 微陣列分析，表現有差異的基因利用 BiblioSphere Pathway Edition 軟體建構表現有差異基因之間的 Network。輸入的基因以 IN 表示，轉錄因子基因以 TF 表示，與訊息傳導途徑有關的基因以 ST 表示。基因表現的程度以顏色呈現，被活化的基因以紅色表示，被抑制的基因以藍色表示，顏色由左到右分別代表該基因在心臟、腎臟及腦部的表現程度。