國立台東大學生命科學研究所

碩士論文

指導教授：邱文慧　博士

NTTU Library

Miyabenol A 抑制 LPS 誘導巨噬細胞釋放一氧化氮之機轉探討

研究生：古揆廷　　撰

中華民國九十七年七月

國立台東大學生命科學研究所

碩士論文

Miyabenol A 抑制 LPS 誘導巨噬細胞釋放一氧化氮之機轉探討

研究生：古揆廷　　撰

指導教授：邱文慧　博士

中華民國九十七年七月

NTTU Library

國立台東大學
學位論文考試委員審定書

系所別：生命科學研究所

本班 古揆廷 君

所提之論文 Miyabenol A抑制LPS誘導巨噬細胞釋放一氧化氮之機轉探討

業經本委員會通過合於 ☑ 碩士學位論文 ☐ 博士學位論文 條件

論文學位考試委員會：

（學位考試委員會主席）

（指導教授）

論文學位考試日期：97年7月9日

國立台東大學

附註：1. 本表一式二份經學位考試委員會簽後，送交系所辦公室及註冊組或進修部存查。

2. 本表為日夜學制通用，請依個人學制分送教務處或進修部辦理。

博碩士論文授權書

本授權書所授權之論文為本人在 國立臺東大學 生命科學研究所 系(所) ＿＿組 九十六 學年度第 二 學期取得 碩 士學位之論文。

論文名稱：Miyabenol A 抑制 LPS 誘導劇是細胞釋放一氧化氮之機轉探討

本人具有著作財產權之論文全文資料，授權予下列單位：

同意	不同意	單 位
■	□	國家圖書館
■	□	本人畢業學校圖書館
■	□	與本人畢業學校圖書館簽訂合作協議之資料庫業者

得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或其他各種數位化方式重製後散布發行或上載網站，藉由網路傳輸，提供讀者基於個人非營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印。

□同意 □不同意 本人畢業學校圖書館基於學術傳播之目的，在上述範圍內得再授權第三人進行資料重製。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利(未申請者本條款請不予理會)的附件之一，申請文號為：＿＿＿＿＿＿，請將全文資料延後半年再公開。

公開時程

立即公開	一年後公開	二年後公開	三年後公開
			V

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：邱文慧 (親筆簽名)

研究生簽名：古琛廷 (親筆正楷)

學 號：9500808 (務必填寫)

日 期：中華民國 九十七 年 七 月 三十 日

1.本授權書 (得自 http: //www.lib.nttu.edu.tw/theses/ 下載) 請以黑筆撰寫並影印裝訂於書名頁之次頁。

2.依據 91 學年度第一學期一次教務會議決議:研究生畢業論文「至少需授權學校圖書館數位化，並至遲於三年後上載網路供各界使用及校內瀏覽。」

授權書版本:2008/05/29

謝誌

終於到了這一感人的時刻，整本論文裡面我想只有現在，我才能用屬於我的語調來寫寫這感謝人的話。一本論文從無到有，其中間的過程真的是經歷過的才了解，除了自己不放棄之外，更慶幸受到許多人的協助，才能使我在兩年的時間造就這本論文的出現，既使前一年對這本書並沒有什麼多大的付出。

首先感謝我的恩師邱文慧老師，在台北中醫所這段時間裡細心的指導與教誨，曾經您問過我，您算是怎樣的老師？現在我可以很肯定的告訴您，您真的是位好老師，這年頭像您這麼爲學生著想的老師，已經不多了。在此再說聲謝謝，謝謝您對這本論文的指教。感謝國立陽明大學廖志飛教授及中國醫藥研究所黃鈺玲老師，謝謝您們在百忙之中對於論文的批評與指教，學生受益良多。謝謝實驗室的各位，宇柔、淑慧、慧珠、慶芸、銘宏，感謝妳們在實驗上、生活上的幫忙，讓實驗室充滿歡笑與八卦，豐富了枯燥的實驗生活。台東求學一年，對於曾經教導我課業的老師，我充滿感謝；對於曾經幫助過我的兄弟朋友，信哥、黑哥、佩珊、育清、小將，謝謝你們半夜陪我挑燈夜談，學業及生活上彼此之間相互照應與鼓勵，感謝的話就不多說了。另外，要特別感謝姑姑、姑丈一家人的幫助，使我剛到台北的那段時間能夠安心在實驗上。最後謝謝我的父母，感謝你們對我的包容與砥礪，是你們無私的奉獻與付出，才造就現在的我。

兩年的碩士班生活是我難以忘記的回憶，完成的不只是學業，也是人生的一個里程碑。再一次感謝所有幫助我的人，謝謝你們。

目 錄

目錄……I
中文摘要……II
英文摘要……III
縮寫表……V

第一章 緒論……1
第一節、前言……2
第二節、文獻回顧
一、巨噬細胞與免疫……3
二、一氧化氮及一氧化氮合成……4
三、IκB kinase（IKK）/NF-κB 途徑……5
四、Mitogen Activated Protein Kinases（MAPK）……7
五、AP-1（activating protein-1）途徑……8
六、Phosphatidylinositol 3-kinase（PI3K）途徑……8
七、環氧酵素（cyclooxygenase）……9
第三節、實驗目的……10
第二章 實驗方法……11
第三章 實驗結果……22
第四章 討論……30
第五章 結論……35
第六章 參考文獻……37

中文摘要

本論文研究 miyabenol A 對於受到細菌內毒素（lipopolysaccharide, LPS）刺激的 RAW 264 巨噬細胞產生一氧化氮（nitric oxide, NO）的影響，並探討其可能的作用機制。結果顯示 miyabenol A（0.1-10 μM）能夠抑制 LPS 所引起的 NO 生成與 inducible nitrite oxide synthase（iNOS）蛋白質之表現並且呈現劑量反應。在 LPS 所誘導的 iNOS mRNA 生成層次上，miyabenol A 同樣具有抑制的作用。已知 nuclear factor-κB（NF-κB）及 mitogen-activated protein kinase（MAPK）途徑參與調控 iNOS 生成的重要角色，本論文進一步探討 miyabenol A 抑制 iNOS 表現的可能分子作用機轉。實驗結果顯示 LPS 刺激 RAW 264 巨噬細胞可顯著誘導 IKK 磷酸化、IκB 裂解、以及活化 NF-κB 進入細胞核內，前述現象均可以明顯、且呈現濃度相關性地被 miyabenol A 所抑制。LPS 刺激的結果同樣增加三個 MAPK（ERK、p38、及 JNK）的磷酸化。然而，miyabenol A 只選擇性的干擾 p38 MAPK 磷酸化。另外，miyabenol A 也可以抑制 LPS 在 RAW 264 細胞中所造成的 Akt 活化。進一步的分別以 p38 MAPK 抑制劑 SB203580 及 PI3K 抑制劑 wortamanin 前處理細胞，發現 p38 MAPK 抑制劑 SB203580 可以抑制 IKK 的活化 IkB 及 Akt 的磷酸化，然而 PI3K 抑制劑 wortamanin 只能抑制 IKK 的活化及 IkB 磷酸化，對 p38 MAPK 並無影響。這暗示著 p38 MAPK 及 Akt 皆參與調控 IKK/NF-κB 訊息途徑，只不過 Akt 的活性又受到的 p38 MAPK 調控。綜合以上實驗結果，本論文發現 miyabenol A 可有效抑制發炎前趨物 NO 的生成，暗示 miyabenol A 是小本山葡萄表現抗發炎的活性成分之一，且可能透過抑制 p38 MAPK 活化，進而抑制 Akt、NF-kB 的訊號傳遞路徑。

Abstract

In this study, we evaluated inhibitory mechanisms of miyabenol A on lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production in RAW264.7 macrophages. Results showed that miyabenol A (0.1-10 μM) significantly inhibited LPS-induced NO production and inducible nitrite oxide synthase (iNOS) protein expression through suppressing iNOS expression at mRNA levels. Nuclear factor-κB (NF-κB) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) play important roles in LPS stimulated iNOS expression. We further investigated the detail molecular action mechanisms of miyabenol A. Result showed that LPS significantly induced IKK phosphorylation、IκB degradation and NF-κB nuclear translocation in RAW 264 macrophage, and these phenomenon were abrogated in the presence of miyabenol A. LSP stimulation also markedly increased MAPKs phosphorylation. However miyabenol A selectively interfered with p38 MAPK phosphorylation. Furthermore, miyabenol A also suppressed LPS- induced Akt activation. We pre-treated cell wih Akt inhibitor wortamanin and p38 MAPK inhibtor SB203580, and finded that SB203580 suppress IKK phosphorylation, IkB, and Akt phosphorylation, however wortamanin only suppressed the IKK phosphorylation and the IkB degradation without any effection p38 MAPK. This suggested that p38 MAPK may act as upstream signal to regulate IKK/NF- kappa B signal and Akt activation. In summary, we found that miyabenol A can suppress pre-inflammation nitric oxide production effectively, through interfering with p38 MAPK activation and subsequently downregulate Akt releated signal

pathway and NF-κB actication.

縮 寫 表

AP-1：Activation protein-1

ATF-2：Activating transcription factor-2

BSA：Bovine serum albumin

COX：Cyclooxygenase

CREB：cAMP response element binding protein

DMEM：Dulbecco's modified eagle medium

DMSO：Dimethy sulphoxide

ECL：Enhanced chemiluminescence

ERK：Extracellular-regulated protein kinase

eNOS：Endothelial nitric oxide synthase

EtBr：Ethidium bromide

FBS：Fetal bovine serum

IKK：IκB kinase

IκB：Inhibitor κ B protein

iNOS：Inducible nitric oxide synthase

JNK：C-Jun N-terminal kinase

LPS：Lipopolysaccharide

MAPK：Mitogen-activated protein kinase

MTT：3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NF-κB：Nuclear factor-kappa B

nNOS：Neuronal nitric oxide synthase

NO：Nitric oxide

NP-40：Nonidet P-40

OD：Optical density

PBS：Phosphate buffer saline

PGE2：Prostaglandin E_2

PI3 kinase：phosphoinositide 3 kinase

PKC：Protein kinase C

PMSF：Phenylmethanesulfonyl fluoride

PVDF：Polyvinylidene difluoride

RT-PCR：Reverse transcription polymerase chain reaction

SDS-PAG：Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

SNP：Sodium nitroprusside

SRF：Serum response factor

TBST：Tris buffer saline with Tween 20

TEMED：N,N,N,N-tetramethylene diamine

NTU Library

第一章、緒論

第一節、前言

發炎是身體抵抗外來微生物侵略時所誘發的防禦反應之一（Aderem and Ulevitch, 2000; Hoffmann et al., 1999）。當體內巨噬細胞被細菌活化時，會誘發巨噬細胞產生免疫反應以及發炎作用，進而使細胞內的一氧化氮合成酶（iNOS）釋出一氧化氮（NO）。人體裡適量的一氧化氮具有消滅外來細菌的作用，但是當 NO 被過度產生時，則會造成體內組織慢性的發炎反應或者是急性發炎反應，例如：敗血性休克（Nussler and Billiar, 1993）。目前已知經由細菌內毒素（lipopolysaccharides, LPS）刺激的 iNOS（inducible nitric oxide synthase）表現受到許多轉錄因子的調控（Sweet et al., 1996），研究指出 iNOS gene promoter region 上有多類轉錄因子（例如 NF-κB、AP-1、ATF）的結合部位（Jeon et al., 2000; Xie et al., 1994），而這些轉錄因子的活化，又受到如 protein kinase C、tyrosine kinase pathways （Paul et al., 1995）、以及 mitogen-activated protein kinases（MAPKs）(Sweet et al., 1996）的調控。而藉由干擾上述 iNOS 的訊息途徑，可以抑制 iNOS 的表現及 NO 的生成，因此這些藥物可能有潛力用來治療因 NO 過多所產生的細胞傷害及相關疾病（Hyun et al., 2007）。

第二節、文獻回顧

一、巨噬細胞與免疫

血液中的單核球細胞（monocytes）可藉著 cytoplasmic extensions 的方式，穿越長距離而到達器官組織而成巨大的巨噬細胞。巨噬細胞在免疫及發炎反應上扮演了一個很重要的角色，調控宿主的防禦機制，包括辨識及消滅病原微生物（Qureshi et al., 1999）或製造分泌一些促發炎物質（pro-inflammotory），如 TNF-α、IL-1、IL-6、PGE_2 和 NO_2 等。事實上在正常生理情況下，巨噬細胞受到特定物質如 LPS 或 cytokines 刺激下，才會被活化（Schwacha et al., 2003）。細菌內毒素是革蘭氏陰性菌 (Gram-negative bacteria) 細胞壁的脂多醣結構，當細胞被分解與複製的時候，就會被釋放出來。內毒素可存於自然環境中。其主要結構可分為兩部分，分別為 Lipid A 與polysaccharides。Lipid A 則是使其具有毒性的結構。研究發現 Lipid A 都可誘導宿主發炎反應（Glauser et al., 1994）。Lipopolysaccharide-binding protein（LBP）為巨噬細胞表面的 receptor 其成分為一種膜醣蛋白。當 LPS 與 LBP 結合後如再與另一膜蛋白 CD14 結合，將可活化免疫細胞（Hailman et al., 1996），而後活化酪胺酸激酶（tyrosine kinase）、蛋白質激酶（protein kinase C）以及轉錄因子 NF-κB 與 MAPKs（Sweet et al., 1996）的活化。當巨噬細胞被活化時會產生吞噬作用，伴隨吞噬作用的進行而製造出含氮或含氧的毒性物質，如 NO、超氧自由基（superoxideradical）、peroxylnitrite、過氧化氫（H_2O_2）、氫氧自由基（hydorxyl radical）及 HOCl 等，來幫助消滅病原菌。受到 LPS 刺激的巨噬細胞亦

能分泌許多發炎相關物質，包括 TNF-α、IL-1、IL-6、NO 和 PGE_2，導致人體發生敗血症（sepsis）、敗血性休克（sepsis shock）及全身性發炎等症狀（systemic inflammatory response syndrome）（Guha and Mackman, 2001）。不少研究已證實，在慢性發炎及感染之細胞組織，會有一系列 cytokines（IL-1、TNF-α、IFN-γ）（Hanada et al., 2002）、酵素及訊息蛋白（signal protein）生成。iNOS 及 COX-2 分別可催化 NO 及 PGs 大量產生，不但造成組織發炎及併發敗血性休克，也使得慢性傳染病（例如：肺結核）及自體免疫性疾病（例如：風濕性關節炎）等疾病症狀更加惡化（Nussler and Billiar, 1993; reviewed in Sautebin, 2000）。

二、一氧化氮及一氧化氮合成酶

一氧化氮是一種作用短暫、傳遞快速、半衰期很短的含氮自由基，於哺乳動物體內藉由一氧化氮合成酶所製造。一氧化氮和其代謝物在生物的生理、病理狀況下皆扮演重要的角色。低濃度的一氧化氮具有訊息傳遞，引發血管擴張的作用（Liaudet et al., 2000）以及有關宿主防禦功能如急、慢性發炎的發生等（Hibbs et al., 1987; Moncada et al., 1991; Salerno et al., 2002）。但是當一氧化氮濃度過高，則會產生過氧化的自由基，而造成細胞毒性、發炎反應等負面影響（MacMicking et al., 1997; Liaudet et al., 2000）。另外，一氧化氮的過量產生，和敗血性休克及糖尿病有關（Christopherson and Bredt, 1997; Harrison, 1997）。一氧化氮與超氧自由基作用，生成強氧化劑 peroxynitrite 而對組織細胞產生傷害（Higgs et al., 1991; Ohshima and Bartsch, 1994）。空氣中的一氧化氮與氧氣作用而產生二

氧化氮（NO_2），在水溶液中則可轉變成 nitrite 與 nitrate。nitrate 可經由 nitrate reductase 作用轉變成 nitrite，因此一般使用 Griess reagent 測量 NO 穩定的產物 nitrite（Privat et al., 1997）。NO 是體內 L-arginine 在 NADPH 與 O_2 輔助下，經由一氧化氮合成酶作用產生 L-citrullin 和 NO（Konwles and Moncada., 1994）。而這些 NOS 依其功能性的不同分為三種 isoform 表現: 第一種存在於 endothelial cells、epithelial cells 及 cardiac myocytes 的 endothelial NOS(eNOS)。第二種主要存在於 neuronal cells 及 skeletal muscle cells 的 neuronal NOS （nNOS）。第三種存在於巨噬細胞 macrophages、hepatocytes、smooth muscle cells，經由誘導才能產生的 iNOS。它們是從不同的基因被表現出來，有不同的功能，不同的作用。前兩種 nNOS 和 eNOS 藉由細胞內鈣離子濃度的變化達到調節 NOS 的酵素活性，且具有持續催化產生 NO 生成的能力（Bredt et al., 1991）。而這個目的是爲了維持細胞正常生理功能，調控有關血管張力及神經訊息傳遞方面。iNOS 為持續活化的酵素，其活性並不受細胞內鈣離子濃度的調控，在正常狀態下是不存在於大多數種類的細胞中。當細胞受到葛蘭氏陰性細菌的 LPS 或 cytokines 刺激，會促使細胞產生 iNOS（Fang, 1997）。當細胞持續增加 iNOS 的生成，一氧化氮被大量產生時，如無適當的藥物將其抑制，則會引起細胞毒性及低血壓休克等現象(Beutler et al., 1989; Nathan et al., 1997）。許多的研究認為，會造成低血壓休克或是敗血症的一氧化氮合成酶與發炎症狀的產生具有極大的關係（Laskin and Pendino, 1995; MacMicking and Nathan, 1997）。究竟 LPS 是經由何種訊息傳遞路徑，將訊號由細胞膜傳至細胞核來誘導 iNOS 的表現，本論文將使用 RAW 264 巨噬細胞，來探究 LPS 引起的 iNOS 表現的訊號傳遞路徑。

三、IκB kinase （IKK）/NF-κB 途徑

NF-κB 是調節 pro-inflammatory gene expression（TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8、iNOS 及 COX-2）的重要轉錄因子（Jeon et al., 2000; Xie et al., 1994; Zhou et al., 2002）。當巨噬細胞上的 receptor 受到適當的刺激後，會活化細胞內的訊息傳遞，以增加 cytokines 的基因表現（Ghosh et al., 1990; Zhang and Ghosh, 2001）。此過程會誘導轉錄因子 NF-κB 的活化（Rothwarf and Karin, 1999; Xie et al.,1994）。NF-κB 廣泛的參與發炎反應、免疫反應、細胞分化和細胞凋亡（Kaltschmidt etal., 1997; MacMicking et al., 1997; Tong and Perez-Polo, 1995）。在未受刺激的細胞中大多數的 NF-κB 會存在細胞質中與抑制性蛋白 IκB 結合而不具有活性。NF-κB 由 P50、p65 兩個 subunit 與 IκB 所構成，形成不活化的 NF-κB/IκB 複合物（Malek et al., 2001; Tam and Sen, 2001）。一旦細胞接受到刺激後（例如：LPS 造成的敗血性休克及發炎反應），使得 IKK 活化進而磷酸化 IκB-α，IκB-α 與 p50 和 p65 分離而活化 NF-κB （Xie et al., 1994）。分離的 IκB-α 受到 26 S proteasome 的 ubiquination 作用而分解；NF-κB 則進入細胞核中與特定基因上 promoter 之 NF-κB binding site 結合，影響下游基因的轉錄作用以調控發炎或免疫反應 （Brown et al., 1995; Siebenlist et al., 1994）。IκB kinase （IKK）是一個大的複合物，由 IKK-α、IKK-β 及 IKK-γ dimer 形成以調控 NF-κB 的活化狀態。（Miller and Zandi, 2001; Xie et al., 1994）。其中 IKK-α 和 IKK-β 為 catalytic subunit，能催化 ATP 上的磷酸根轉位到 IκB-α 上，而 IKK-γ 為 regulatory subunit（Israel et al., 2000; Miller and Zandi, 2001）。當細胞受到 cytokines 或是過度表現的 kinases 刺激時，IKK

便會被活化（Israel et al., 2000）。因此，本論文中將探討 IκB kinase （IKK）/NF-κB 在 LPS 誘導 RAW 264 巨噬細胞引發 NO 產生及 iNOS 表現的訊號傳遞路徑中是否也扮演重要的調節角色。

四、Mitogen Activated Protein Kinases（MAPK）途徑

當巨噬細胞受到 LPS 刺激時，細胞內訊息傳導路徑誘發 iNOS 表現的過程中，有許多訊息傳遞因子的參與。整個訊息的傳導，從細胞膜經過細胞質，一直傳到細胞核中，其中最主要的就是 MAPK 路徑 （Shapira et al, 1994）。MAPK 是 serine-threonine 的 protein kinases，可以調節許多生理反應，並具有受外界刺激而活化的功能。經由 LPS 活化的 MAPK 路徑主要以 p38、extracellular signal-regulated kinase（ERK）及 c-jun N-terminal kinase（JNK）（Schumann et al., 1996; Sweet et al., 1996）三種 MAPK 都能磷酸化並活化下游的轉錄因子。研究報告指出，ERK1/2 其可受MAPKK（MEK）、MAPKKK（Raf, MEKK1）磷酸化（Gonzalez et al., 1992）；p46/54 JNK 會被 MAPK kinase 4 （MKK4/SEK-1）和 MKK7 活化；而 p38 則經由 MKK3 及 MKK6 來活化（Gonzalez et al., 1992; Roger et al., 1993）。受到磷酸化的 MAPK 則會分別活化其下游的 protein kinases 及 transcription factor。磷酸化的 ERK 會作用到 Elk-1 與 SRF（serum response factor），結合於 SRE （serum response element）binding site 加速基因的轉錄（Watson et al., 1997）；JNK MAPK 會磷酸化 c-Jun、Elk-1、activating transcription factor（ATF-2）等轉錄因子調控發炎基因（Su and Karin, 1996）；而 p38 MAPK 除了會活化 ATF-2 （Chen et al., 1998）、

Elk-1（Raingeaud et al., 1996）之外，也會經由活化下游的 MSK1（mitogen and stress activated protein kinase-1）來磷酸化 CREB（cyclic AMP responsive element-binding protein）轉錄因子，促使基因的表達。

五、AP-1（activating protein-1）途徑

AP-1（activating protein-1）是 iNOS promoter 上的轉錄因子，其組成主要是由 homodimers（c-Jun 和 c-Jun）及 hetrodimers（c-Jun 和 c-Fos）等形式組成。目前至少有三種 Jun 蛋白質（c-Jun、Jun B 和 Jun D），四種 Fos 蛋白質（c-Fos、Fra-1、Fra-2、Fos B）（Karin, 1997）。當巨噬細胞受到 LPS 或 cytokines 刺激而活化，MAPKs 中 JNK 磷酸化而活化下游的 c-Jun 轉錄因子進而調控 iNOS mRNA 表現。

六、Phosphatidylinositol 3-kinase（PI3K）途徑

PI3K 屬於 lipid kinase 的一種，其為一 heterodimer 分為 p85及 p110 兩個 subunit，p85 subunit 稱為 regulatory subunit，p110 subunit 稱為 catalytic subunit，當 p85 磷酸化時會與 p110 相結合使得 PI3K 具有活性（Okkenhaug and Vanhaesebroeck, 2001）。活化的 PI3K 可以調控許多細胞內的反應。有報告證實 PI3K 的活化可引發 p44/42 MAPK 路徑的活化（Eder et al., 1998; Xie et al., 2000）以及 PI3K 下游的 Akt 磷酸化（Jiang and Zhang, 2002）進而影響 NF-κB 轉錄因子的活化達到調控 iNOS protein 的生成（Lee et al., 2008）。

七、環氧酵素（cyclooxygenase）

Cyclooxygenase（COX）擁有三種異構物，分別為環氧酵素-1（Cyclooxygenase-1, COX-1）、環氧酵素-2 （Cyclooxygenase-2, COX-2）和環氧酵素-3（Cyclooxygenase-3, COX-3）。COX-1 主要功能在於調節一般正常的生理作用。細胞給予一些生長因子、內毒素（Lee et al., 1992）或細胞激素（Maier et al., 1990）的刺激後，COX-2 會大量的被誘導表現。COX-2 基因包含了 SP-1、CRE、AP-2 和 NF-κB 等轉錄因子 binding site（Kosaka et al., 1994; Sirois et al., 1993），而 LPS 刺激巨噬細胞表現 COX-2 的訊息傳遞途徑，透過 MAPKs 活化 transcription factor，進而促使 COX-2 基因表現。在 2002 年 Chandrasekharan 於心臟以及主動脈發現一種新的環氧酵素稱作 COX-3 （Chandrasekharan et al., 2002）。

NTU Library

第三節、實驗目的

小本山葡萄 （*Vitis thunbergii* Sieb.& Zucc.），別名細本山葡萄、 山葡萄，屬於葡萄科葡萄屬的植物，分佈於臺灣、中國大陸中南部、日本及朝鮮。其根部傳統上被用於消腫、止血、肝炎、黃疸、跌打損傷、風濕關節痛及腹瀉，為臺灣傳統的民間藥用植物 （甘偉松., 1991）。化合物 miyabenol A （附圖一）是分離自小本山葡萄的根部抽取物的成分，屬於 resveratrol 衍生物。Resveratrol 由先前的文獻中得知，其具有預防冠狀動脈疾病、抗發炎、抗腫瘤及抗氧化等作用 （Juan et al., 2005; Liu et al., 2003; Manna et al., 2000），但 miyabenol A 的抗發炎活性及作用機轉，則尚未被詳細探討。

由於發炎反應所造成的傷害與許多疾病及病程有關，所以本實驗利用細胞外實驗的方式模擬生理感染及發炎反應模式，觀察 miyabenol A 對於受到細菌內毒素 LPS 刺激的 RAW 264 巨噬細胞產生 NO 的影響，以及發炎反應相關的訊號傳遞路徑，並探討可能的調控機制（附圖二）。

第二章、實驗方法

NTTU Library

Buffer 配製

10X PBS

NaCl	80g
Na_2HPO_4	11.6g
KH_2PO_4	2g
KCl	2g
H2O	1000ml

5X TBS

NaCl	40g
KCl	1g
Tris-base	15g
H_2O	To 500ml

50X TAE

Tris-base	121g
Glacial acetic acid	28.55ml
0.05M EDTA	50ml
H_2O	To 500ml

Tris-Glycine SDS Running Buffer (10X)

Component	Quantity required to make a 10X solution
Tris Base	29.0g
Glycine	144.0g
SDS	10.0g
DI Water	To 1.0L

NTU Library

Tris-Glycine Transfer Buffer (25X)

Component	Quantity required to make a 25X solution
Tris Base	18.2g
Glycine	90.0g
DI Water	To 500mL

Tris-Glycine Transfer Buffer (1X)

DI Water	760 mL
25X Transfer Buffer	40mL
MeOH	200mL

NTTU Library

一、RAW 264 巨噬細胞株之培養

RAW 264 巨噬細胞，使用 75 T 培養瓶培養於含 10 % 胎牛血清（fetal bovine serum，FBS），100 unit/ml penicillin 及 100 unit /ml streptomycin 之 DMEM 培養液中，將 75 T 培養瓶置於 37 ℃ 恆溫且含有 5 % CO_2 之培養箱中，培養至八、九分滿時，進行細胞的次培養。細胞的次培養首先將原來培養液抽乾，以冰的 PBS 沖洗兩次，第三次靜置回溫後，將細胞拍下裝入 50 ml 的離心管，另外於需要次培養的 75 T 培養瓶中，加入 14 ml 含有胎牛血清的培養液，加入細胞液 1 ml 於培養瓶中。剩餘的細胞液於 4 ℃ 溫度下，以 27000 rpm 轉速離心 10 分鐘。之後加入適量不含胎牛血清的 DMEM 培養液，利用細胞計數法分別培養於 3.5 cm 培養皿中或 96 well 培養盤中。

二、實驗設計及測量一氧化氮的生成

RAW 264 巨噬細胞，於 96 well 培養盤中培養於含 100 unit/ml penicillin 及 100 unit /ml streptomycin，不含 10 % 胎牛血清（fetal bovin serum, FBS）之 DMEM 培養液。細胞數為 $2x10^6$ cell/well，並將其置於 37 ℃ 恆溫且含有 5 % CO_2 之培養箱中。兩小時後取出 96 well 培養盤，將培養液抽出，更換成含 10 % 胎牛血清（fetal bovine serum，FBS），100 unit/ml penicillin 及 100 unit /ml streptomycin 之 DMEM 培養液，同時以 LPS (1 μg/m l) 和不同濃度之 miyabenol A 處理 18 小時後，測量培養液中的一氧化氮含量。

為了評估 miyabenol A 是否影響 iNOS 酵素活性，細胞先以 LPS 刺激 18 小時誘導 iNOS 蛋白表現，之後再加入 miyabenol A（3 μM 、5 μM、10 μM）及 aminoguanidine hemisulfate（1 μM、 3 μM 、10 μM 、30 μM）共同培養 22 小時，之後測量培養液中的一氧化氮含量。

於一氧化氮自由基清除實驗，先利用 sodium nitroprusside（SNP）本身是一種 NO donor，在正常生理條件下可以產生 NO。本實驗評估 miyabenol A 經由化學方式對 NO 生長速率的抑制作用。

將 100 μM SNP 溶於 10 mM Tris（PH 7.5）中，於室溫狀態下靜置 3 小時後，加入不同濃度的 miyabenol A（0.1 μM、0.5 μM、1 μM、5 μM、10 μM）及 AMG（1 μM、 3 μM 、10 μM 、30 μM），於 12 小時後取 100 μl SNP 溶液與同等體積的 Griess reagent 反應，測量 miyabenol A 在不同的時間點捕捉 NO 的能力。

一氧化氮含量的分析，是從 96 well 培養盤中的每一孔抽 100μl 培養液到新的 96 well 培養盤裡，分別加入 50 μl Griess I 及 50 μl Griess II 試劑，以波長 550 nm 測量吸光值，利用已知的 $NaNO_2$ 畫出標準曲線，並用此標準曲線求出 nitrite 的含量。

三、細胞存活率分析

爲了確認抑制 NO 之產生並非因細胞死亡所造成，故以 MTT assay 來測量 RAW 264 巨噬細胞在各種條件處理下的存活率。MTT（3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide）為一種黃色水溶性的 tetrazolium salt，在活細胞中可藉由粒線體中的

succinated-tetrazolium reductase system（Slater et al., 1963） 將 MTT 的 tetrazolium ring 轉變為非水溶性呈藍紫色的 formazan。藉由測量細胞培養液中 formazan 產量所產生之顏色變化，即可快速判斷細胞存活及增生情形。

將進行過測量一氧化氮生成的 RAW 264 巨噬細胞，在 96 well 中將剩餘的培養液抽乾，換上新的含 10 % 胎牛血清，100 unit/ml penicillin 及 100 U/ml streptomycin 之 DMEM 培養液 100 µl，並加入 10 µl MTT（1 mg/ml），置於 37 ℃ 恆溫且含有 5 % CO_2 之培養箱中處理 4 小時，之後抽去培養液，加入 200 µl 的 100 % DMSO。以波長 570 nm 測量吸光值。

四、細胞蛋白質萃取

細胞質中蛋白質含量乃是使用 Bio-Rad protein 分析試劑組，主要目的在於定量 RAW 264 細胞質、細胞核及細胞中蛋白質含量，進一步計算出進行十二基硫酸鈉電泳法（SDS-PAGE）所需之蛋白質樣本量。

（一）萃取細胞蛋白質進行 iNOS、COX-2 分析

將 RAW 264 細胞置於 3.5 cm dish 中，培養 24 小時後，同時以 LPS (1 µg/m l) 和 miyabenol A 不同濃度處裡 18 小時。18 小時之後抽去培養液，以冰 PBS 清洗兩次，加入適量的 lysis buffer (Triton X-100 2 %、aprotinin 1 µg/ml、leupeptin 1 µg/ml、peptastatin 1 µg/ml、PMSF 1 M)並使其均勻分布於 dish 表面。刮下細胞後，連同 lysis buffer 吸至離心管，反應四十分鐘，再以超音波打碎機（0.5 cycle，amplitude 60 %）作用 1 分

鐘。之後將含有蛋白質的離心管，置於 4 ℃ 下以 14000 rpm 離心 10 分鐘，取其上清液即為蛋白質的萃取液。使用 Bio-Rad protein assay 方法，以波長 595 nm 測量。已知濃度的 Bovine serum albumin 作一標準曲線，並利用此標準曲線求出蛋白質濃度。

（二）細胞核及細胞質蛋白質的萃取

RAW 264 細胞置於 3.5 cm dish 中，培養 24 小時後，同時以 LPS (1 μg/ml) 和不同濃度的 miyabenol A 處裡 1 小時。之後抽去培養液，以冰 PBS 清洗兩次，加入適量的 cytosol protein lysis buffer (10 mM NaH_2PO_4, pH7.5; 10 mM NaF; 5 mM $MgCl_2$; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 10 μg/ml leupeptin; 1 μg/ml aprotinin ; 1 % NP40)並使其均勻分布於 dish 表面。利用橡膠刮刀刮下細胞後，連同 lysis buffer 吸至離心管，反應四十分鐘，再以超音波打碎機（0.5 cycle，amplitude 60％）作用 1 分鐘。之後將含有蛋白質的離心管，置於 4 ℃ 下以 9500 rpm 離心 10 分鐘，上清液即為細胞質蛋白質的萃取液。收集上清液並儲存在 -80 ℃。離心管裡剩餘的 pellet 再加入適量的 nuclear protein lysis buffer (10 mM NaH_2PO_4, pH7.5; 10 mM NaF; 5 mM $MgCl_2$; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 10 μg/ml leupeptin; 1 μg/ml aprotinin ; 1 % NP40 and 0.5 M NaCl)反應四十分鐘，以超音波打碎機（0.5 cycle，amplitude 60 ％）作用 1 分鐘。之後將含有蛋白質的離心管，置於 4 ℃ 下以 13000 rpm 離心 10 分鐘，其上清液即為細胞核蛋白質的萃取液，收集上清液儲存在 -80 ℃。

（三）萃取細胞蛋白質進行各類蛋白激酶的分析

RAW 264 細胞置於 3.5 cm dish 中，培養 24 小時後，先以不同濃度的 miyabenol A 處裡 1 小時之後，分別加入 LPS (1 μg/m l) 作用 10 分鐘及 30 分鐘。之後抽去培養液，以冰 PBS 清洗兩次，加入適量的 total lysis buffer (Tris-HCl 50 mM、NP-40 1 %、Na-deoxycholate 0.25 %、NaCl 150 mM、EDTA 1 mM、NaF 1 mM、Na_3VO_4 1 mM、aprotinin 1 μg/ml、leupeptin 1 μg/ml、peptastatin 1 μg/ml、phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) 1 mM) 反應 40 分鐘，以超音波打碎機（0.5 cycle，amplitude 60 %）作用 1 分鐘。之後將含有蛋白質的離心管，置於 4 ℃ 下以 13000 rpm 離心 5 分鐘，收集上清液儲存在 -80 ℃。

五、Western Blot 分析

將收集的蛋白質萃取液定量再分別取 40 μg 的蛋白質樣本，加入等體積的 Laemmli sample Buffer，於 95 ℃ 下煮沸 5 min 後，置於冰上冷卻，再將蛋白質樣本加入每個 well 中，跑 8 % 的 SDS-PAGE gel，使用 100 V 電壓，待適當時間後停止電泳，並進行蛋白質樣本的轉印。將 NC membrane 先以 methanol 浸潤去極化，連同兩張 3M paper 放入 transfer buffer 中浸濕。操作時，重疊的順序由下往上依序為 3M paper，NC membrane，SDS-PAGE gel，3M paper，並使用玻棒趕走其中的氣泡，再放入轉印槽中。將轉印槽置於 4 ℃ 冰櫃中，以 200 mA 轉印兩小時，NC membrane 以 5 % non-fat milk/TBST blocking buffer 作用 1 小時，去除 blocking buffer，加入 iNOS、COX-2、actin、NF-κB、I-κB、phospho-MAPKS、IKK 等 specific antibodies 作用 1.5 小時，以 TBST wash 三次，加入

anti-mouse IgG conjugated alkaline phosphatase 或 anti-rabbite IgG conjugated alkaline phosphatase 作用 1.5 小時，以 TBST wash 三次後，用 ECL 呈色。於暗房以 X-ray film 感光顯影，再以自動洗片機洗片。

六、iNOS mRNA 萃取及 RT-PCR 分析

（一）、iNOS mRNA 萃取

將 RAW 264 巨噬細胞培養於 25 T 培養瓶中，待細胞長至八分滿時，以 LPS（1 μg/ml）和不同濃度 miyabenol A（3 μM、10 μM）處裡 4 小時後取下細胞，於 4 ℃ 下以 2700 rpm 離心 10 分鐘，使用 GE Healthcare mRNA spin min Kit 萃取 RNA。之後將萃取出的 iNOS mRNA sample，以分光光度計於 260 nm 下測定吸光值來計算產物濃度。RNA 濃度計算公式如下：

RNA（μg/ml）=OD 值×40（μg/ml）×稀釋倍數

（二）RT-PCR 分析

引子（primer）iNOS、NADPH 是向 Invitrogen 訂購，序列如下：

iNOS primer（25-mer）

sense: 5’CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC and

antisense: 5’GGCTGTCAGAGAGCCTCGTGGCTTTGG

GAPDH primer（26-mer）

sense: 5’TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC and

antisense: 5’CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC

首先取 PCR 專用的試管（200 µl eppendoft）加入 2× Reaction Mix（25 µl）、Template RNA（1 µl）、10 µM Sense Primer（1 µl）、10 µM Anti- Sense Primer（1 µl）、RT/Platinum ***Tag*** Mix（1 µl）並加入 0.1 % DEPC 水使其總體積為 50 µl，將試管置於自動溫度梯度調控機進行聚合反應，反應條件為：

95 ℃ for 15 s (denaturation)

55 ℃ for 30 s (annealing)

72 ℃ for 1 min (extension) for 30 cycles

反應結束後將 PCR 產物，利用 1 % Agarose gel（1×TAE）於 100 V 電壓條件下，跑 25 分鐘後，再以 Ethdium bromide（0.5 mg/ml）染液染 20 分鐘取出膠片，使用去離子水退染，於紫外光燈箱觀察 mRNA 與 marker 之相對位置，最後將此膠片以影像分析儀比較每一電泳條帶之亮度並將其數值化。

七、測量 mRNA 的穩定性

RAW 264 細胞培養在 25 T 培養瓶中，待細胞長至八分滿時，加入 LPS（1 µg/ml）刺激細胞 5 小時，同時加入 actinomycin-D（0.1 µg/ml）以及 miyabenol A（10 µM），作用 0、2、4、8 小時後取下細胞，於 4 ℃ 下以 2700 rpm 離心 10 分鐘，使用 GE Healthcare mRNA spin min Kit 萃取 RNA，再進行 RT-PCR 分析。

八、統計分析

實驗數據以測量之平均值±平均值標準誤差（meam ± SE）表示。實驗數據利用 Sigmaplot 10.0 統計軟體，進行無母數分析獨立樣本 Mann-Whitney test 進行之差異檢定。$P < 0.05$ 視為有統計意義之差異。

NTTU Library

第三章、實驗結果

NTTU Library

一、 在 RAW 264 巨噬細胞株探討 miyabenol A 對於細菌內毒素 LPS 刺激引起 NO 生成的影響

爲了釐清 miyabenol A 是否具有抑制一氧化氮生成的能力，細胞以 LPS（1 μg/ml）刺激 18 小時之後，利用 Griess method 分析 NO 下游代謝產物 nitrite（NO_2^-）的變化。圖一為 miyabenol A（0.1 μM、0.3 μM、1 μM、3 μM、5 μM、10 μM、30 μM）、resveratrol（10 μM、15 μM、20 μM、30 μM）與 aminoguanidine hemisulfate（1 μM、3 μM、10 μM、30 μM）抑制一氧化氮產生的比較。LPS（1 μg/ml）刺激 18 小時之後，培養基中的 NO 濃度明顯由 2.4±0.3 增加至 22.4±0.8 μM，結果顯示 miyabenol A 呈現濃度相關性的抑制作用，在 3 μM、5 μM 及 10 μM 即顯著抑制一氧化氮生成分別達 48.5、73.1 及 94.8 % 的程度。相較於 miyabenol A，30 μM resveratrol 及 30 μM aminoguanidine hemisulfate 對於一氧化氮生成的抑制作用，則分別只有 51.1 % 及 64.8 %。

排除 miyabenol A 抑制 LPS 誘發 RAW 264 巨噬細胞產生的一氧化氮，因細胞毒殺所造成，利用 MTT 偵測方法測量 miyabenol A 對細胞存活率的影響。圖二顯示 miyabenol A 在所使用的濃度範圍內並不會造成顯著的細胞毒性。

二、 評估 miyabenol A 對於 iNOS 酵素活性的影響及捕捉一氧化氮自由基的能力

實驗設計先以 LPS 刺激細胞 18 小時誘導 iNOS 蛋白質生成，之後

再加入不同濃度的 miyabenol A（3 μM、5 μM 及 10 μM）持續培養 22 小時，觀察 miyabenol A 在此條件下是否會藉由調控 iNOS 蛋白質的酵素活性而抑制 NO 的生成，並與已知 iNOS 酵素抑制劑 aminoguanidine hemisulfate（1 μM、3 μM、10 μM、30 μM）作比較。圖三(a) 顯示 LPS 刺激長達 40 小時的結果明顯提高 NO 的生成量至 87±3 μM，miyabenol A 在 3 μM、5 μM 及 10 μM 的抑制作用分別為 8、12 及 49.4 %，相較於細胞同時處理 miyabenol A 與 LPS 的情況下 miyabenol A 具有較強的 NO 抑制作用(見圖一) ，暗示藉由調控 iNOS 蛋白質酵素活性並非 miyabenol A 抑制 NO 生成的主要作用機轉，而 aminoguanidine hemisulfate 在此實驗設計下仍保有與 LPS 同時處理時的相同抑制活性，10 μM 的濃度抑制程度達到 54.2 %。圖三(b) 為細胞毒性試驗結果，再次顯示 miyabenol A 與 aminoguanidine hemisulfate 於使用濃度範圍內並不會顯著細胞存活率。

SNP 是一個 NO 供給劑（NO donor），於水溶液環境下會釋放出 NO 並快速轉變成 nitrite。圖四結果顯示，miyabenol A 對於 SNP 溶液中的一氧化氮含量有些影響，但並未呈現濃度相關性的抑制作用。

三、Miyabenol A 對於 LPS 刺激產生誘導型一氧化氮合成酶表現之影響

結果如圖五所示，與控制組比較之下，1 μg/ml LPS 顯著誘發 RAW 264 巨噬細胞表現 iNOS protein，而 LPS 誘發 iNOS protein 會隨著 miyabenol A 濃度增加而遞減，且呈濃度相關性的抑制作用。當 miyabenol A 濃度為 5 μM 抑制效果為 70 %，當劑量濃度達到 10 μM，iNOS protein

表現即被 miyabenol A 完全抑制。

在 iNOS mRNA 表現方面，RAW 264 巨噬細胞以 LPS(1 μg/ml) 及不同濃度 miyabenol A（3 μM、10 μM）處理 4 小時。 結果顯示，與控制組比較下 LPS 顯著增加 iNOS mRNA 表現量，細胞若同時處理 miyabenol A 則明顯抑制 LPS 誘發之 iNOS mRNA 表現，且呈現濃度相關性的減弱作用。如圖六所示，10 μM miyabenol A 選擇性的抑制 iNOS mRNA 表現達 70 %，但並不會影響 GAPDH mRNA 的表現。

本論文進一步探討 miyabenol A 抑制 iNOS mRNA 之表現，是否經由加速 iNOS mRNA 的裂解（即降低 mRNA 穩定性）所致。RAW 264 巨噬細胞先以 LPS（1 μg/ml）處理 5 小時以誘導 iNOS mRNA 表現，之後 actinomycin D（0.1μg/ml）抑制進一步的 RNA 轉錄合成，並在此時加入 10 μM miyabenol A 及並測量往後 0、2、4 及 8 小時的 iNOS mRNA 含量變化。由圖七結果顯示 miyabenol A 存在下並不會影響 iNOS mRNA 的穩定度。

四、 Miyabenol A 對 LPS 誘發 RAW 264 巨噬細胞 NF-κB/IκB/IKK 訊息途徑之影響

已知 NF-κB 訊息途徑參與調控 iNOS 的表現，因此本論文進一步分析 miyabenol A 對 NF-κB、IκB、IKK 蛋白質表現的影響。圖八顯示未經 LPS 刺激的控制組其細胞核內僅有少量的 NF-κB 存在，LPS（1 μg/ml）刺激 30 分鐘之後，NF-κB 在細胞核內的表現量明顯高於控制組，隨著 miyabenol A 預處理的濃度增加，NF-κB 在細胞核內的表現逐漸降低，濃

度於 10 μM 時，NF-κB 蛋白質表現完全被抑制。IκB 蛋白質表現方面，未經 LPS 刺激的控制組，細胞質中存在大量的 IκB，經 LPS（1 μg/ml）刺激 30 分鐘之後，可發現細胞質中的 IκB 表現量因為裂解而顯著減少，若存在 10 μM miyabenol A 則可逆轉 IκB 蛋白質裂解的現象。已知 IκB 必須受到磷酸化活化之後才會被裂解，其中 IKK 在調節 IκB 蛋白質的磷酸化上扮演極重要的角色，本研究發現 LPS 刺激後的細胞不僅促使 IκB 的裂解及增加 NF-κB 轉移入細胞核內，同時也看到 IKK 被顯著的磷酸化(圖八)，而此磷酸化同樣受到 miyabenol A 的抑制。

五、 Miyabenol A 對 LPS 誘發 RAW 264 巨噬細胞 AP-1 表現的影響

本節利用 c-Jun 及 ATF-2 的磷酸化抗體來觀察 LPS 刺激之後對這二個轉錄因子的活化情形，另外利用 c-Fos 抗體來分析 LPS 刺激之後 c-Fos 因為被活化而轉移入細胞核內的情形，實驗以 Western blot 進行分析，並觀察 miyabenol A 存在之下是否影響上述 AP-1 轉錄因子的活化。由圖九觀察出 LPS 刺激後，c-Jun、c-Fos 及 ATF-2 的表現量與控制組相較明顯增多，但是經由 miyabenol A（5 μM、10 μM）預處理後，結果卻沒有明顯的抑制。

六、 Miyabenol A 對 LPS 誘發 RAW 264 巨噬細胞 MAPKs 活化的影響

利用 anti-phospho-ERK、anti-phospho-JNK 及 anti-phospho-p38 抗體來

進行 Western blot，測定 MAPKs 磷酸化而活化的程度。如圖十，當以 LPS（1 μg/ml）刺激 RAW 264 巨噬細胞 10 分鐘後，三個 MAPKs 皆明顯被磷酸化。預處理不同濃度之 miyabenol A（5 μM、10 μM）之後，ERK 及 JNK 的磷酸化並未明顯受影響，然而 miyabenol A 卻選擇性地抑制 LPS 所誘導之 p38 磷酸化。

七、 Miyabenol A 對 LPS 誘發 RAW 264 巨噬細胞 Akt 活化的影響

利用 phospho-Akt 之抗體來進行 Western blot，以測定 Akt 被活化的程度。如圖十一，當以 LPS（1 μg/ml）刺激 RAW 264 巨噬細胞 10 分鍾後 Akt 明顯的被磷酸化。不同濃度之 miyabenol A（5 μM、10 μM）處理後的結果與刺激組相較下，隨著添加 miyabenol A 的濃度增加 phospho-Akt 蛋白質的表現明顯降低。

八、 P38 抑制劑 SB203580 對 LPS 刺激 RAW 264 造成 IKK、IκB、Akt 磷酸化的影響

爲了釐清 p38 MAPK 在 miyabenol A 對 LPS 誘發 RAW 264 巨噬細胞產生 iNOS protein 的訊號傳遞路徑中所扮演的角色，因此分析 SB203580 (一個 p38 MAPK 抑制劑) 對 IKK、IκB、Akt 磷酸化的影響。由圖十二知 LPS（1 μg/ml）刺激組之 IKK 及 Akt 蛋白質磷酸化表現，明顯高於控制組，隨著預處理 SB203580 的濃度增加，IKK 及 Akt 磷酸化表現明顯降低，SB203580 的濃度於 30 μM 時，IKK 及 Akt 蛋白質磷酸

化表現則完全被抑制；另一方面，LPS 刺激所誘導的 κB 蛋白質裂解現象也會因為預處理 SB203580 而顯著減緩。

九、PI3K 抑制劑 wortamanin 對 LPS 刺激 RAW 264 造成 IKK、IκB、p38 磷酸化的影響

爲了釐清 PI3K/Akt 在 miyabenol A 對 LPS 誘發 RAW 264 巨噬細胞產生 iNOS protein 的訊號傳遞路徑中所扮演的角色，因此分析 wortamanin 對 IKK、IκB 及 p38 磷酸化的影響。由圖十三知 LPS（1 μg/ml）刺激組的 IKK 蛋白質磷酸化表現明顯高於控制組，隨著預處理的 wortamanin 濃度增高，IKK 磷酸化表現明顯降低，wortamanin 的濃度於 30 μM 時，IKK 蛋白質磷酸化表現則完全被抑制。IκB 蛋白質表現方面，控制組表現量明顯高於 LPS 處理組，加入 30 μM wortamanin，其 IκB 蛋白質磷酸化程度反而比 LPS 處理組來的高。最後 wortamanin 對 p38 蛋白質磷酸化的表現量的影響，刺激組與控制組相較明顯增多，但是受到 wortamanin（10 μM、30 μM）處理後卻沒有明顯的減少。

十、Miyabenol A 對於 LPS 刺激產生 COX-2 表現之影響

進一步研究 miyabenol A 對於 COX-2 蛋白質表現的影響，我們以西方墨點法分析 COX-2 表現量。由圖十四可見 RAW 264 細胞未受 LPS 刺激時並不會表現 COX-2，經由 LPS 的活化後 COX-2 有顯著的表現。隨著 miyabenol A 劑量的增加，COX-2 的表現量也隨之增加。當

miyabenol A 濃度為 5 μM 有顯著抑制效果，劑量濃度達到 10 μM 時，COX-2 表現幾乎完全被 miyabenol A 抑制。

第四章、討論

首先本實驗利用 miyabenol A 、resveratrol 與 aminoguanidine 比較對於 RAW 264 巨噬細胞因 LPS 刺激而產生 NO 的抑制作用。結果顯示 miyabenol A 在 RAW 264 細胞中抑制了由 LPS 所引發的一氧化氮生成，與 resveratrol 及 aminoguanidine 相比較下，10 μM 的 miyabenol A 能完全抑制 NO 的生成，此效果明顯比 resveratrol 與 aminoguanidine 抑制 NO 的產生來的好。藉由測定 miyabenol A 的細胞毒性結果顯示，抑制一氧化氮的生成並非藥物本身的毒性，在本實驗中發現，同時給予 1 μg/ml 的 LPS 及 0.1-30 μM 的 miyabenol A 對 RAW 264 巨噬細胞的細胞存活率並無顯著之影響，此結果證實 miyabenol A 的確能夠抑制 LPS 刺激 RAW 264 巨噬細胞產生的 NO 。

減少 NO 生成的方法很多，可以經由抑制 iNOS 酵素活性、NO scavenging 分析或是抑制 iNOS 蛋白合成等不同分子機轉達到抑制的作用。本實驗根據這幾個部份作了相關的探討。在酵素活性層面，先以 LPS 刺激細胞達 22 小時使 iNOS 達到穩定的表現量，之後再加入藥物反應評估其對 NO 的抑制效果，藥物若會影響 iNOS 酵素活性則會顯著抑制 NO 的進一步生成。如預期的，已知的 iNOS 酵素抑制劑 aminoguanidine 可有效抑制 NO 的進一步生成，其抑制能力相似於同時與 LPS 一起處理的情況；然而 miyabenol A 卻只能輕微影響 NO 的進一步生成。根據此結果我們不排除 miyabenol A 具有調節 iNOS 酵素活性的能力，但是此輕微的抑制效果並無法解釋其顯著抑制 NO 的活性。另一方面，NO scavenger assay 結果顯示，miyabenol A 對於 SNP 溶液中的一氧化氮含量有些影響，但並未呈現濃度相關性的抑制作用。綜合上述結果推測 miyabenol A 抑制一氧化氮生成必定另有一主要的分子機轉，使得抑制NO 的生成具有如

此明顯的效果。

過去文獻指出 LPS 會促進 iNOS 表現及 NO 大量生成，而這些物質生成在免疫及發炎反應上則扮演著重要的調控角色（Perkins et al., 1999）。本研究探討 miyabenol A 對於 iNOS protein 生成的影響，結果證實 miyabenol A 亦可顯著抑制 iNOS 蛋白質的表現且呈濃度劑量關係，其中以添加 10 μM 的 miyabenol A，抑制 LPS 誘發之 iNOS 蛋白質表現最為顯著。本論文亦對 miyabenol A 抑制發炎蛋白 COX-2 的生成，做了相關的研究。結果顯示 10 μM 的 miyabenol A 能完全抑制 COX-2 生成。此結果暗示，miyabenol A 對於 COX-2 生成的機轉作用具有相關的影響。

本論文更深入的探討 iNOS mRNA 層次，以確認 iNOS 蛋白質被抑制的效果，是否來自於 miyabenol A 對於 iNOS mRNA 的作用？本研究證實在 LPS（1 μg/ml）刺激 RAW 264 巨噬細胞誘發 iNOS mRNA 生成模式下，添加 miyabenol A（10 μM）可顯著抑制 iNOS mRNA 表現。進一步的探討 miyabenol A 抑制 iNOS mRNA 之表現，是否經由加速 iNOS mRNA 的裂解？結果顯示 miyabenol A 存在下，並不會影響 iNOS mRNA 的穩定度。本文中 miyabenol A 結構上雖與 resveratrol 相似，但對於影響 LPS 活化 RAW 264 巨噬細胞所產生的 iNOS mRNA 及 iNOS、COX-2 protein 的表現有明顯的不同。先前的文獻指出 resveratrol 只能隨著濃度增加而降低 NO 及 PGE_2 的生成，無法抑制 LPS 活化 RAW 264 巨噬細胞所產生的 COX-2 及 iNOS 基因及蛋白質之表現。上述對於 miyabenol A 抑制 LPS 誘發 RAW 264 巨噬細胞引起的發炎反應，至目前為止尚未有相關文獻發表，因此本論文進一步深入了解相關訊號傳遞，以釐清 miyabenol A 抑制 NO 生成的機轉為何？

LPS 誘導 NO 生成的訊號傳遞路徑很多，其中主要是透過活化NF-κB 及 MAPK 途徑參與調控 iNOS 生成，進而造成發炎反應產生。因此，本論文首先對於 NF-κB/IκB/IKK 訊息途徑之影響做了試驗，觀察 LPS 所誘導的發炎反應中，miyabenol A 是否能夠抑制此傳遞路徑的表現。結果顯示，miyabenol A 能夠抑制 IKK 磷酸化、IκB 降解、NF-κB 轉位到細胞核。另一方面對於 MAPKs 的影響，結果顯示 miyabenol A 只能選擇性的抑制 p38 MAPK 磷酸化，並不能對 JNK 及 ERK 磷酸化造成影響。LPS 同樣能活化 c-Jun、c-Fos 及 ATF-2，但 miyabenol A 無法對這些轉錄因子造成影響。此結果顯示，miyabenol A 抑制 iNOS mRNA 的表現是經由抑制 NF-κB 轉位到細胞核。另外，miyabenol A 也具有抑制 LPS 在 RAW 264 細胞中所造成的 Akt 活化。綜合上述結果，miyabenol A 除了對 NF-κB/ IκB/ IKK 訊息途徑造成影響外，亦能影響 p38 MAPK、Akt 磷酸化。但三者之間訊息傳遞的相互關係並不清楚。

爲了釐清 p38 MAPK 在 miyabenol A 對 LPS 誘發 RAW 264 巨噬細胞產生 iNOS protein 的訊號傳遞路徑中所扮演的角色，因此分析 p38 MAPK 的專一性抑制劑 SB203580 對 IKK、IκB、Akt 磷酸化的影響。結果顯示，三者皆能受到 SB203580 的影響且明顯呈現濃度劑量相關抑制作用。接著釐清 PI3K 抑制劑 wortamanin 對 IKK、IκB、p38 MAPK 磷酸化的影響，wortamanin 對 IKK 磷酸化及 IκB 降解造成影響，但是並不影響 p38 MAPK。綜合上述推測 miyabenol A 對 LPS 誘發 RAW 264 巨噬細胞產生 iNOS protein 的訊號傳遞路徑為：miyabenol A 先抑制 p38 MAPK 活化後，接著抑制 Akt 的活化，此推論是因為 SB203580 會抑制 Akt 的活性，之後再抑制 IKK 以及其下游的 NF-κB 訊息傳遞路徑，最後

導致在 RAW 264 巨噬細胞中，LPS 無法誘導 iNOS 及 NO 的生成。

本論文証明 miyabenol A 能夠抑制受到 LPS 刺激的 RAW 264 巨噬細胞產生 NO ，是經由影響 p38 MAPK 磷酸化開始，但是 miyabenol A 作用在訊號傳遞的確切位置並不清楚。由目前文獻知道 LPS 會與血液中的 LBP 形成複合體，再與巨噬細胞膜上的 LPS receptor (CD14) 作結合 (Lee et al., 1996)，導致 macrophage 細胞膜上的 protein tyrosine kinase 進行磷酸化 (Weinstein et al., 1991 and 1992)，進而活化 MAPK pathway。而 PTK 到 p38 MAPK 路徑之間又必須經由 Ras、MKK3 及 MKK6 等 protein kinases（Gonzalez et al., 1992; Roger et al., 1993），因此於未來的實驗方向可經由此路徑作進一步深入的探討。

NTTU Library

第五章、結論

綜合上述結果顯示，小本山葡萄的萃取物 miyabenol A，能夠抑制由 LPS 引起的一氧化氮生成。此種抑制作用並非經由藥物對細胞產生毒性或抑制 iNOS 酵素活性，亦不是 miyabenol A 對 NO 的捕捉能力。miyabenol A 抑制一氧化氮生成的機轉，是經由抑制轉錄因子 NF-κB 的活化，進而抑制 iNOS mRNA 表現。抑制 NF-κB 的活性，主要是經由抑制 p38 MAPK 開始，經過 Akt、 IKK 、IκB，最後影響 NF-κB 的活化（圖十五）。

NTTU Library

第六章、參考文獻

甘偉松. 1991. 藥用植物學.國立中國醫藥研究所

陳泓云. 2001. 小本山葡萄萃取之 Resveratrol 聚合物在兔子血小板的作用機轉. 國立陽明大學生命科學院與理學研究所碩士論文

Aderem, A., and Ulevitch, R.J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 406: 782-787.

Beutler, B., and Cerami, A. (1989). The biology of cachectin/TNF-α primary mediator of the host response. *Immunol*. 7: 625-655.

Bredt, D. S., Hwang, P. M., Glatt, C. E., Lowenstein, C., Reed, R. R., and Snyder, S. H. (1991). Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome-P450 reductase. *Nature*. 351: 714-718.

Brown, K., Gerstberger, S., Carlson, L., Franzoso, G., and Siebenlist, U. (1995). Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science*. 267: 1485-1488.

Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, K.L., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S., and Simmons, D.L. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 13926-13931.

Christopherson, K.S., and Bredt, D.S. (1997). Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *J Clin Invest*. 100: 2424-2429.

Eder, A.M., Dominguez, L. Franke, T.F., and Ashwell, J.D. (1998). Phosphoinositide 3-kinase regulation of T cell receptor-mediated

interleukin-2 gene expression in normal T cells. *J Biol Chem.* 273: 28025-28031.

Fang, F.C. (1997). Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide related antimicrobial activity. *J Clin Invest*. 99: 2818-2825.

Ghosh, S., and Baltimore, D. (1990). Activation in vitro of NF-κB by phosphorylation of its inhibitor IκB. *Nature*. 344: 678-682.

Glauser, M.P., Heumann, D., Baumgartner, J.D., and Cohen, J. (1994). Pathogenesis and potential strategies for prevention and treatment of septic shock: an update. *Clin Infect Dis.* 18: S205-16

Gonzalez, F.A., Raden, D.L., Rigby, M.R., and Davis, R.J. (1992). Hetergeneous expression of four MAPK kinase isoforms in human. *FEBS Lett.* 304: 170-178.

Guha, M., and Mackman, N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* 13: 85-94.

Hailman, E., Vasselon, T., Kelley, M., Busse, L.A., Hu, M.C., Lichenstein, H.S., Detmers, P.A., and Wright, S.D. (1996). Stimulation of macrophage and neutrophils by complexes of lipopolysccharide and soluble CD14. *J Immunol.* 156: 4384-4390.

Hambleton, J., Weinstein, S.L., Lem, L., DeFranco, A.L. (1996). Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc Natl Acad Sci*. 93(7): 2774-2778.

Harrison, D.G. (1997). Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest*. 100: 2153-2157.

Hanada, T., and Yoshimura, A. (2002). Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13: 413-421.

Hibbs, J.B., Jr, Taintor, R.R., Vavrin, Z. (1987). Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science.* 235: 473-476.

Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., and Ezekowitz, R.A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*. 284: 1313-1318.

Hyun, J.Y., Myoung, E.M., Haeng, S.P., Suhn, Y.I., and Young, H.K. (2007). Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 358: 954-959.

Israel, A. (2000). The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-κB? *Trends Cell Biol*. 10: 129-133.

Jeon, Y.J., Kim, Y.K., Lee, M., Park, S.M., Han, S.B., and Kim, H.M. (2000). Radicicol suppresses expression of inducible nitric-oxide synthase by blocking p38 kinase and nuclear factor-κB/Rel in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Pharmacol Exp Ther*. 294: 548-54.

Jiang, G., and Zhagh, B.B. (2002). Pi 3-kinase and its up- and down-stream modulators aspotential target for the treatment of type Π diabetes. *Front Biosci*. 7: d903-d907.

Juan, S.H., Cheng, T.H., Lin, H.C., Chu, Y.L., and Lee, W.S. (2005). Mechanism of concentration-dependent induction of heme oxygenase-1 by

resveratrol in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol*. 69: 41-48.

Kaltschmidt, B., Uherek, M., Volk, B., Baeurerle P.A., and Kaltschmidt, C. (1997). Transcription factor NF-κB is activated in primary neurons by amyloid β peptides and in neurons surrounding early plaques feom patients with Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci*. 94: 2642-2647.

Karin, M., Liu, Z., and Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 9(2): 240-246.

Knowles, R. G., and Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem J*. 298: 249-258.

Kosaka, T., Miyata, A., Ihara, H., Hara, S., Sugimoto, T., Takeda, O., Takahashi, E. and Tanabe, T. (1994). Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *Eur J Biochem.* 221: 889-897.

Laskin, D.L., and Pendino, K.J. (1995). Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 35: 655-677.

Lee, J.K., and Burckart, G.J. (1998). Nuclear kappa B: Important transcription factor and therapeutic target. *J Clin Pharmcol.* 38: 981-993.

Lee, S.H., Soyoola, E., Chanmugam, P., Hart, S., Sun, W., Zhong, H.,Liou, S., Simmons, D., and Hwang, D. (1992). Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem*. 267: 25934-25938.

Lee, W. J., Lee, J. D., Kravchenko, V. V., Ulevitch, R. J., and Brey, P. T.

(1996). Purification and molecular cloning of an inducible gram-negative Bacteria-binding protein from the silkworm, Bombyx mori. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 7888-7893.

Liaudet, L., Soriano, F.G., and SzabÓ, C. (2000). Biology of nitric oxide signaling. *Critical Care Medicine*. 28: N37-52.

Liu, J.C., Chen, J.J., Chan, P., Cheng, C.F., and Cheng, T.H. (2003). Inhibition of Cyclic Strain-Induced Endothelin-1 Gene Expression by Resveratrol. *Hypertension*. 42:1198-1205.

MacMicking, J., Xie, Q.W., and Nathan, C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Ann Rev Immunol.* 15: 323-350.

Maier, J.A., Hla, T., and Maciag, T. (1990). Cyclooxygenase is an immediate-early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells. *J Biol Chem*. 265: 10805-10808.

Malek, S., Chen, Y., Huxford, T., and Ghosh, G. (2001). IκBβ, but not IκBα, funcion as a classical cytoplasmic inhibitor of NF-κB dimmers by masking both NF-κB nuclear localization sequences in resting cells. *J Biol Chem*. 276: 45225-45235.

Manna, S.K., Mukhopadhyay, A., and Aggarwal, B.B. (2000). Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol.* 164(12): 6509-6519.

Miller, B.S., and Zandi, E. (2001). Complete reconstitution of human IκB

kinase (IKK) complex in yeast. *J Biol Chem*. 276: 36320-36326.

Moncada, S. Palmer, R.M.J., and Higgs, E.A. (1991). Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Rev Pharmacol.* 43: 109-142.

Nathan, C. (1997). Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest*. 100: 2417-2423.

Nussler, A.K., and Billiar, T.R. (1993).Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leuk Biol.* 54: 171-178.

Ohshima, H., and Bartsch, H. (1994). Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors : possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mut Res.* 305: 253-264.

Okkenhaung, K., and Vanhaesebroeck, B. (2001). New responsibilities for the PI3K regulatory subunit p85 alpha. *Sci STKE.* 2001: PE1.

Paul, A., Pendreigh, R.H., and Plevin, R. (1995). Protein kinase C and tyrosine kinase pathways regulate lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase activity in RAW 264.7 murine macrophages. *Br J Pharmacol.* 114(2): 482-488.

Privat, C., Lantoine, F., Bedioui, F., Brussel, E.M., Devynck, J., and Devynck. (1997). Nitric oxide production by endothelial cells comparison of three methods of quantification. *Life Science*. 61: 1193-1292.

Qureshi, S.T., Gros, P., and Malo, D. (1999). The LPS locus: Genetic regulation of host respones to bacterial lipopolysaccharide. *Inflamm Res.* 48: 613-620.

Roger, J.D. (1993). The mitogen-activated protein kinase signal transduction. *J Biol Chem.* 268: 14553-14556.

Salerno, L., Sorrenti, V., Giacomo, C., Romeo, G., and Siracusa, M.A. (2002).Progress in the development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors. *Curr Pharm Des*. 8: 177-200.

Sautebin, L. (2000). Prostaglandins and nitric oxide as molecular target for anti-inflammatory therapy. *Fitoterapia.* 71: S48-S57.

Schumann, R.R., Pfeil, D., Lamping, N., Kirschning, C., scherzinger, G., Schlag, P., Karawajew, L., and Herrmann, F. (1996). Lipopolysaccharide induces the rapid tyrosine phosphorylation of the mitogen-activated protein kinases erk-1 and p38 in cultured human vascular endothelial cells requiring the presence of soluble CD14. *Blood*. 87: 2805-2814.

Schwacha, M.G. (2003). Macrophages and post-burn immune dysfunction. *Burn.* 29: 1-14

Shapira, L., Takashiba, S., Champagne, C., Amar, S., and Van, D.T. (1994). Involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinase in lipopolysaccharide-induced TNF-alpha and IL-1 beta production by human monocytes. *J Immunol*. 153(4): 1818-1824

Siebenlist, U., nFranzoso, G., and Brown, K. (1994). Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10: 405-455.

Sirois, J., Levy, L. O., Simmons, D. L., and Richards, J. S. (1993). Characterization and hormonal regulation of the promoter of the rat prostaglandin endorperoxide synthase 2 gene in granulose cell. *J Biol Chem*. 268: 12199-12206.

Su, B., and Karin, M. (1996). Mitogen-activated protein kinase cascades and

regulation of gene expression. *Curr Opin Immunol*. 8: 402-411.

Sweet, M.J., and Hume, D.A. (1996). Endotoxin signal transduction in macrophages. *J Leuk Biol.* 60(1): 8-26.

Tam, W.F., and Sen, R. (2001). IkappaB family members function by different mechanisms. *J Biol Chem*. 276: 7701-7704.

Tong, L., and Perez-Polo, J. R. (1995). Transcription factor DNA binding activity in PC12 cells undergoing apoptosis after glucose deprivation. *Neurosci Lett.* 191: 137-140.

Watson, D.K., Robinson, L., Hodge, D.R., Kola, I., Papas, T.S., and Seth, A. (1997). FLI1 and EWS-FLI1 function as ternary complex factors and ELK1 and SAP1a function as ternary and quaternary complex factors on the Egr1 promoter serum response elements. *Oncogene*. 14(2):213-221.

Weinstein, S. L., Gold, M. R., and DeFranco, A. L. (1991). Bacterial lipopolysaccharide stimulates protein tyrosine phosphorylation in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 4148-4152.

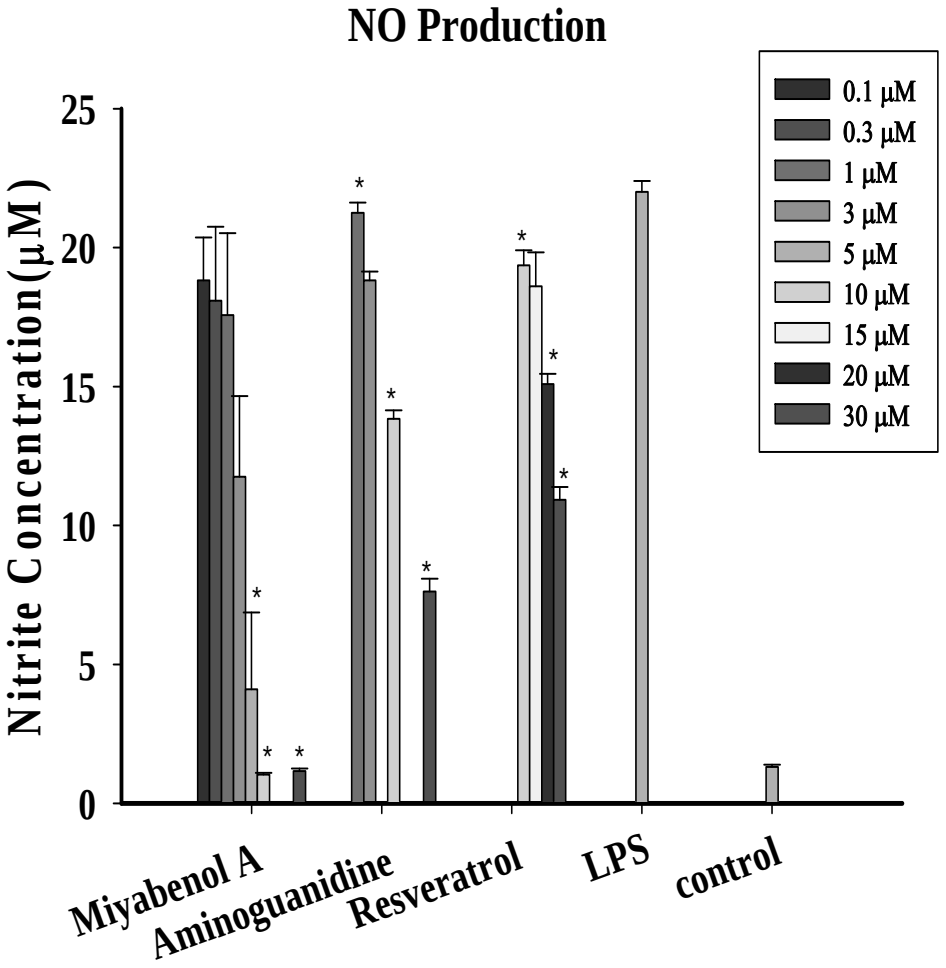
Weinstein, S.L. Sanghera. J.S., Lemke, K., DeFranco, A.L., and Pelech, S.L. (1992). Bacterial lipopolysaccharide induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase in macrophages. *J Biol Chem*. 267: 14955-14962.

Xie, Q.W., Kashiwabara, Y., and Nathan, C. (1994). Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 269: 4705-4708.

Zhang, G., and Ghosh, S. (2001). Toll-like receptor-mediated NF-κB activation:

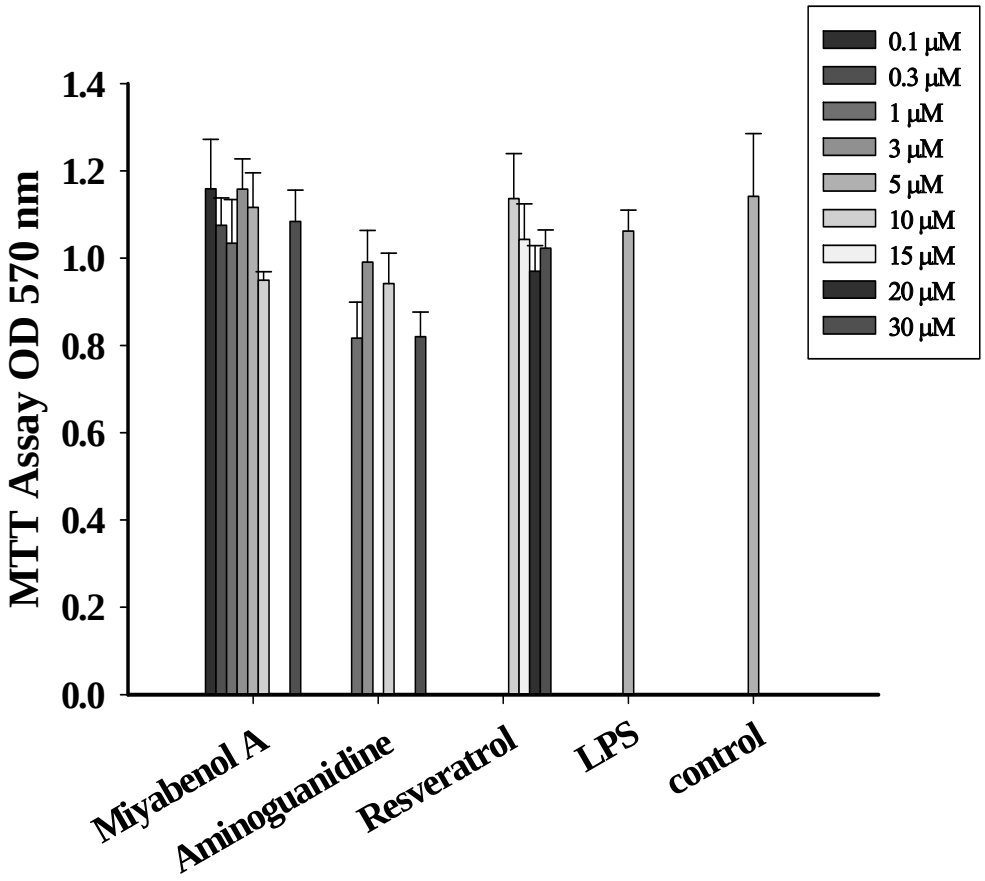
a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest*. 107: 13-19.

Zhou, Y.Q., Chen, Y.Q., Fisher, J.H., and Wang, M.H. (2002). Activation of the RON receptor tyrosine kinase by macrophage-stimulating protein inhibits inducible cyclooxygenase-2 expression in murine macrophages. *J Biol Chem.* 277: 38104-38110.



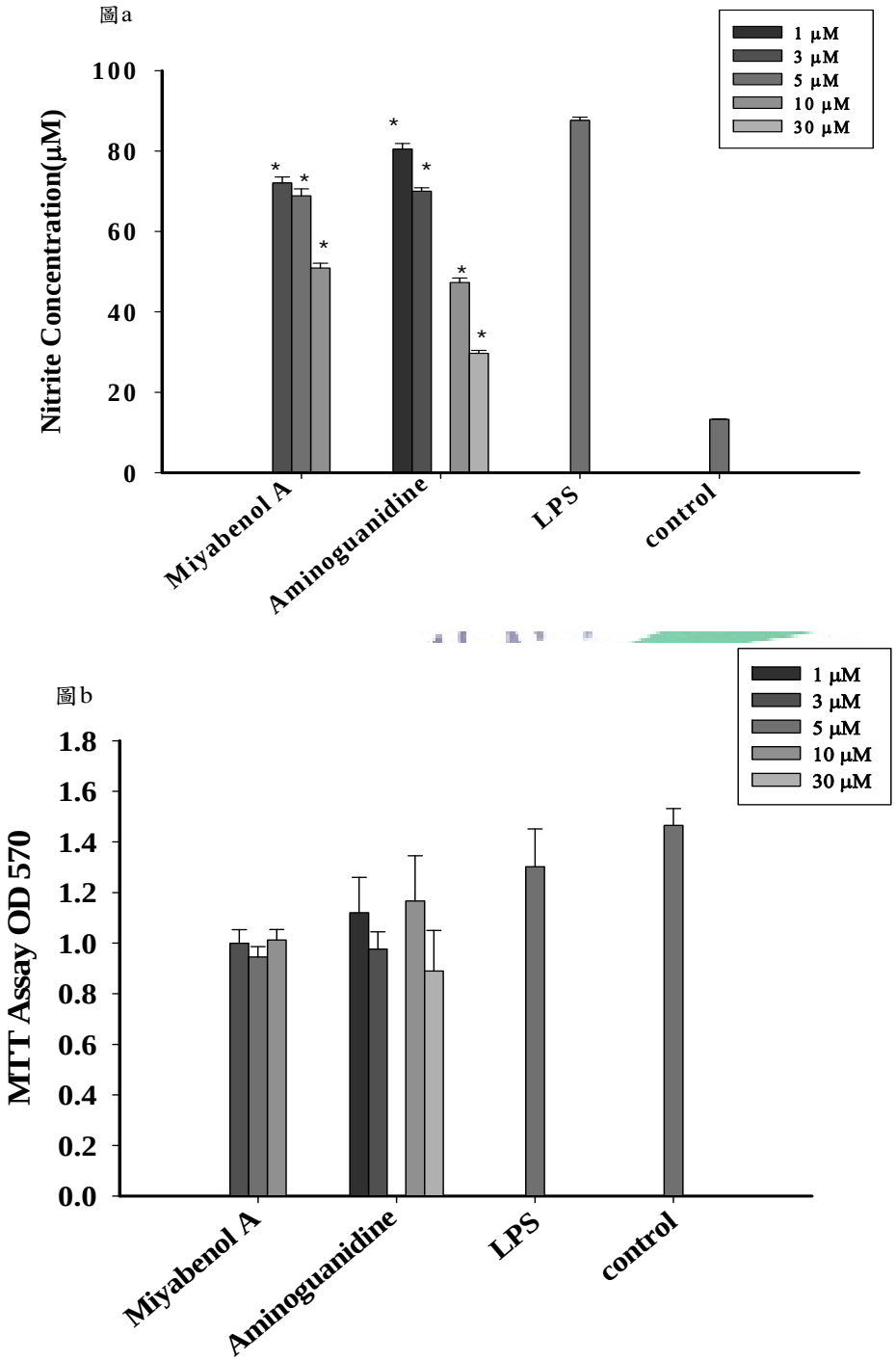
（圖一） Miyabenol A 、 resveratrol 與 aminoguanidine 對 LPS 誘發 RAW 264 巨噬細胞釋放 NO 之影響

RAW 264 巨噬細胞在 LPS（1 μg/ml）刺激下同時給予的 miyabenol A (0.1 μM、0.3 μM、1 μM、3 μM、5 M、10 μM、30 μM) resveratrol （ 10 μM、15 μM、20 μM、 30 μM ）與 aminoguanidine （ 1 M、3 μM、10 μM、30 μM ）作用 18 小時，測量 nitrite 濃度。*P < 0.05，與 LPS 組作比較（n=3）。



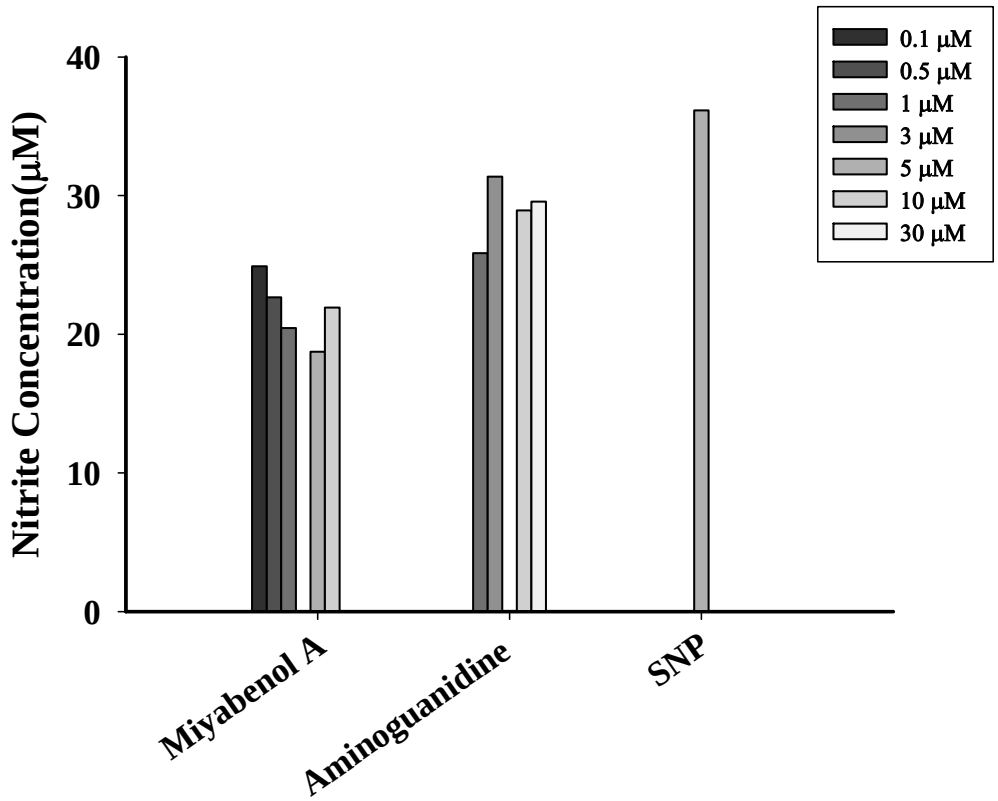
（圖二） Miyabenol A、resveratrol 與 aminoguanidine 對 RAW 264 巨噬細胞存活率之影響

利用 MTT 偵測方法測量 miyabenol A (0.1 μM、0.3 μM、1 μM、3 μM、5 μM、10 μM、30 μM) 、resveratrol （ 10 μM、15 μM、20 μM、 30 μM ）與 aminoguanidine （ 1 μM、3 μM、10 μM、30 μM ）對細胞存活率的影響。(n=3)



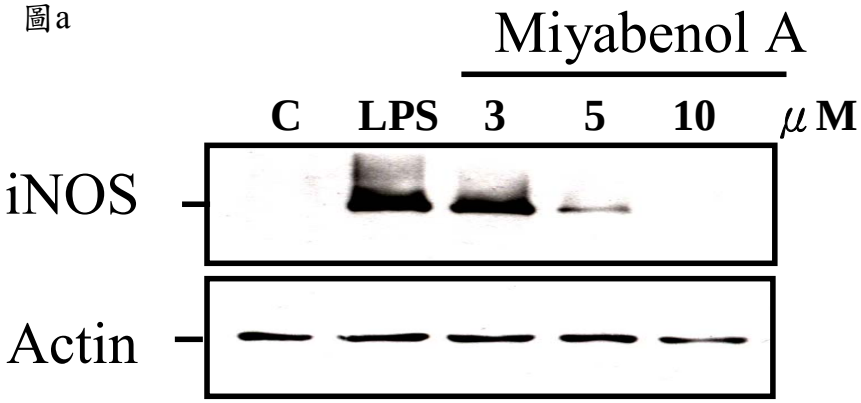
（圖三）a、 Miyabenol A、aminoguanidine 在 RAW 264 巨噬細胞對於 LPS 誘導生成之 iNOS 酵素活性影響及細胞毒性分析

a、LPS (1μg/ml)刺激細胞 18 小時後，加入不同濃度的 miyabenol A（3 μM、5 μM、 10 μM）、aminoguanidine（ 1 μM、3 μM、10 μM、30 μM ）反應 22 小時，利用分析 NO_2^-含量變化間接反應 iNOS 酵素活性。b、利用 MTT 偵測方法測量 miyabenol A (0.1 μM、0.3 μM、1 μM、3 μM、5 μM、10 μM、30 μM) 、與 aminoguanidine （ 1 μM、3 μM、10 μM、30 μM ）對細胞存活率的影響。 *P < 0.05，與 LPS 組作比較（n=3）。

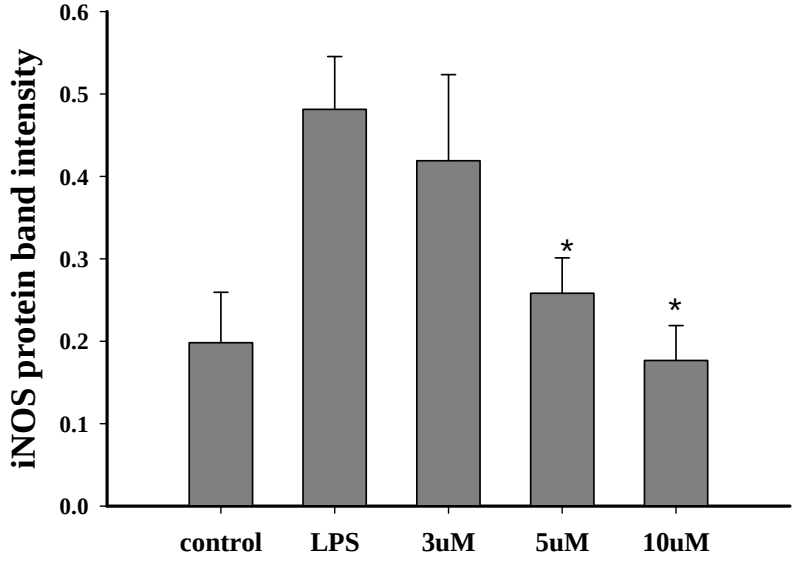


（圖四）Miyabenol A、aminoguanidine 對於 SNP 產生一氧化氮的捕捉能力
100 μM SNP 溶於 10 mM Tris（PH 7.5）中，於室溫狀態下靜置 3 小時後，加入不同濃度的 miyabenol A（0.1 μM、0.5 μM、1 μM、5 μM、10 μM、50 μM、100 μM）及 aminoguanidine（1 μM、 3 μM 、10 μM、30 μM），於 12 小時後測量 nitrite 濃度。

圖a

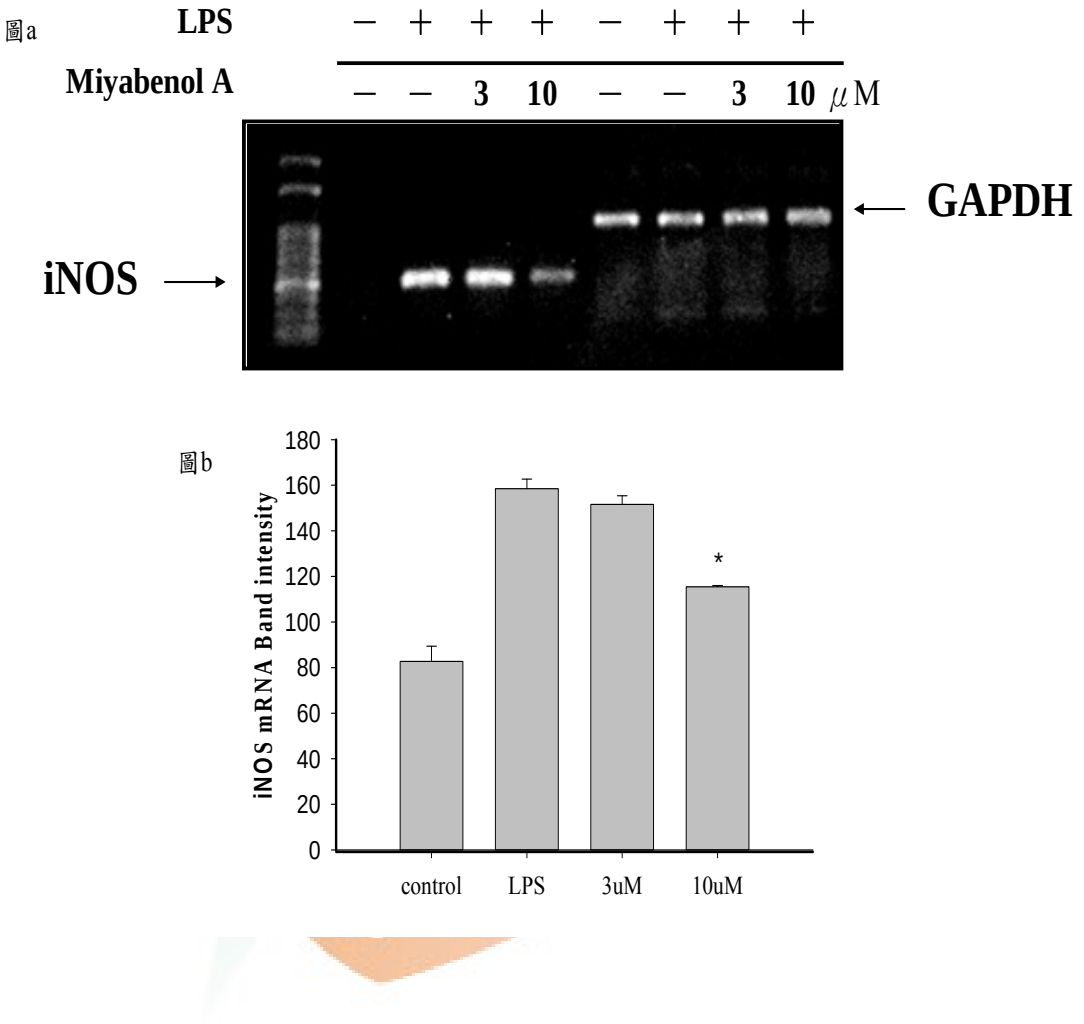


圖b



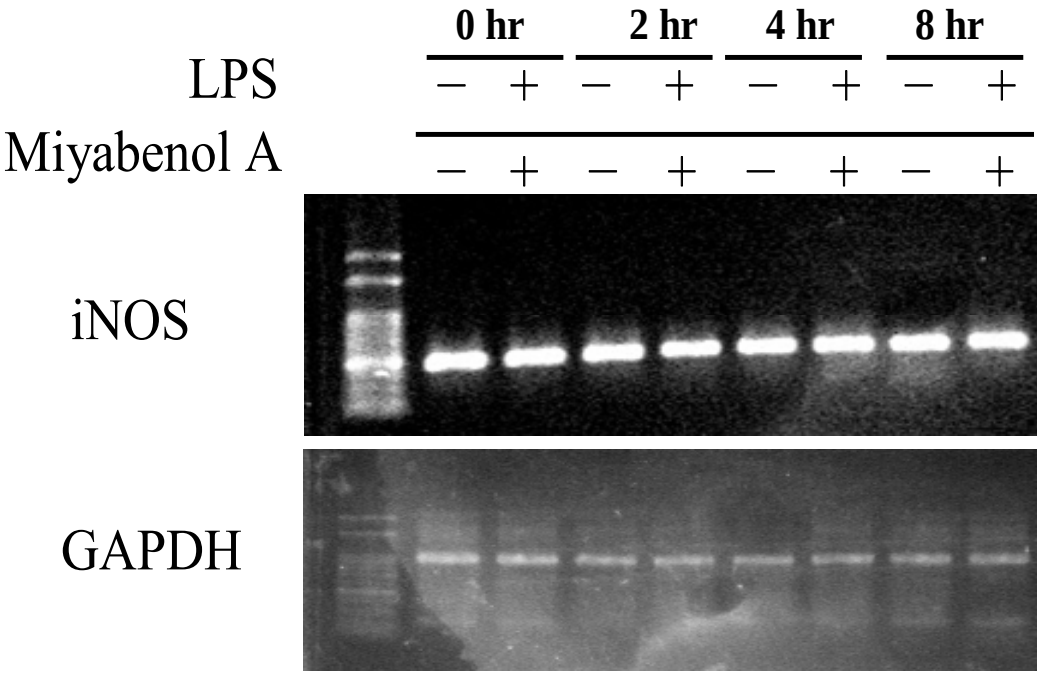
（圖五） Miyabenol A 對 LPS 誘發 RAW 264 巨噬細胞 iNOS protein 表現之影響

a、RAW 264 細胞以 LPS (1 μg/ml) 處理同時加入 miyabenol A (3 μM、5 μM、10 μM)作用 18 小時，利用 Western Blot 方法偵測 iNOS protein 表現，並以 Actin 表現量當做比較基準。b、iNOS protein 量化圖。 *P < 0.05，與 LPS 組作比較（n=3）。



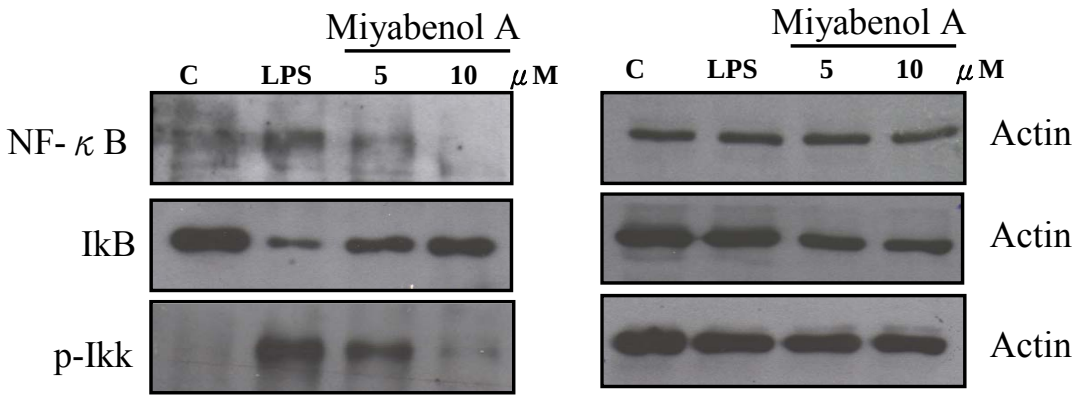
（圖六） Miyabenol A 對 LPS 誘發 RAW 264 巨噬細胞 iNOS mRNA 表現之影響

a、RAW 264 細胞以 LPS (1 μg/ml) 處理同時加入 miyabenol A (3 μM、10 μM) 作用 4 小時後，萃取 RNA 進行 RT-PCR 分析，並以 GAPDH 表現量當做比較基準。 b、iNOS mRNA 表現量化圖。 *P < 0.05，與 LPS 組作比較（n=2）。



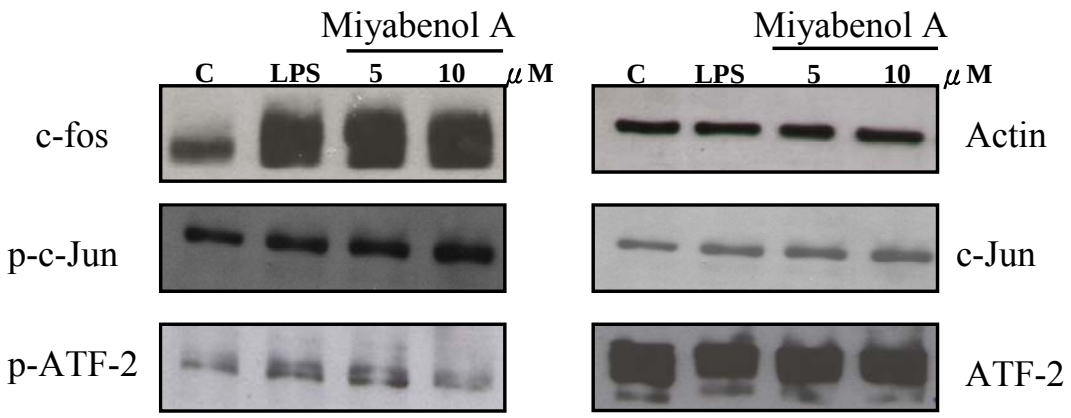
（圖七） Miyabenol A 對 LPS 誘發 RAW 264 巨噬細胞 iNOS mRNA 穩定之影響

RAW 264 細胞以 LPS（1 μg/ml）刺激細胞 5 小時，同時加入 actinomycin-D（0.1 μg/ml）以及 miyabenol A（10 μM），作用 0、2、4、8 小時後，取下細胞萃取 RNA，進行 RT-PCR 分析。以 GAPDH 的表現量作為比較基準。（n=2）

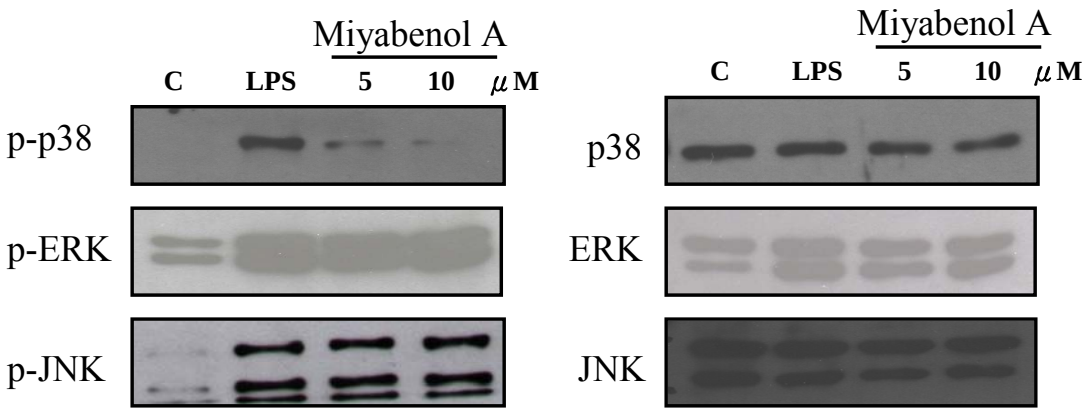


（圖八） Miyabenol A 對 LPS 誘發 RAW 264 巨噬細胞 NF-κB、IκB、IKK 表現的影響

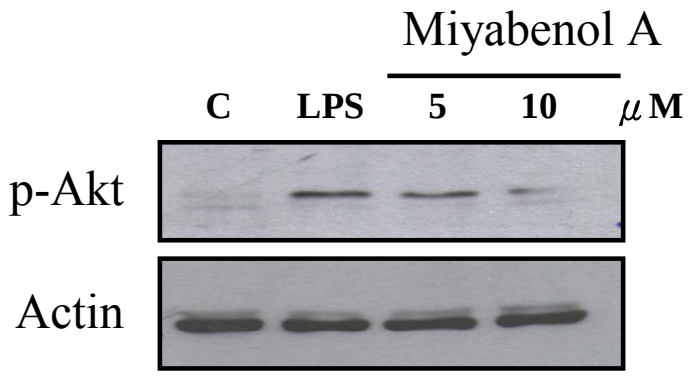
RAW 264 細胞以 miyabenol A (5μM、10μM) 預處理 1 小時，加入 LPS (1 μg/ml)分別作用 10 分鐘（ IkB ）、30 分鐘（ Ikk ）及 1 小時（ NF-κB ），利用 Western Blot 方法來分析。



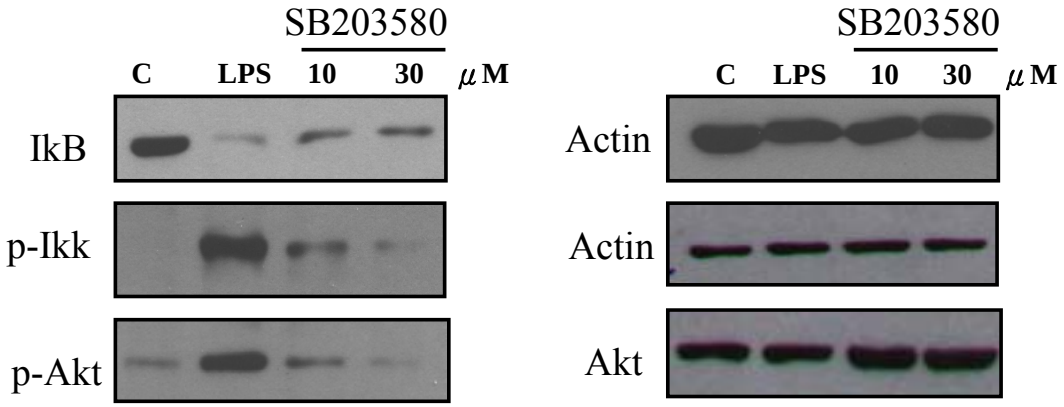
（圖九）Miyabenol A 對 LPS 誘發 RAW 264 巨噬細胞 AP-1 活化的影響
RAW 264 細胞以 miyabenol A (5μM、10μM) 預處理 1 小時後，加入 LPS (1 μg/ml) 分別作用 10 分鐘（p-c-Jun）及 30 分鐘（c-fos、p-ATF-2），利用 Western Blot 方法來分析。



（圖十）Miyabenol A 對 LPS 誘發 RAW 264 巨噬細胞 MAPKs 活化的影響 RAW 264 細胞以 miyabenol A (5 μM、10 μM)預處理 1 小時，同時加入 LPS (1 μg/ml)作用 10 分鐘，利用 Western Blot 方法來分析。

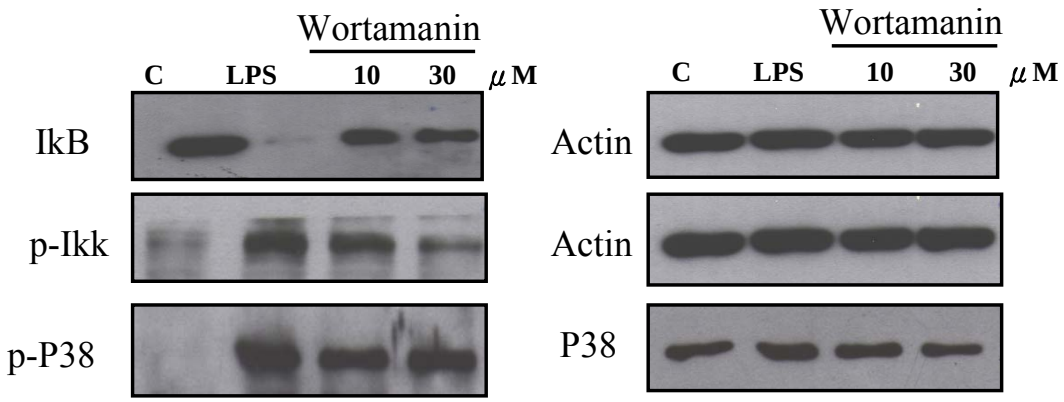


（圖十一）Miyabenol A 對 LPS 誘發 RAW 264 巨噬細胞 Akt 活化的影響
RAW 264 細胞 以 miyabenol A (5μM、10μM) 預處理 1 小時，同時加入 LPS (1 μg/ml)作用 30 分鐘，利用 Western Blot 方法分析之。



（圖十二） P38 抑制劑 SB203580 對 LPS 刺激 RAW 264 造 成 IKK、IκB、Akt 磷酸化的影響

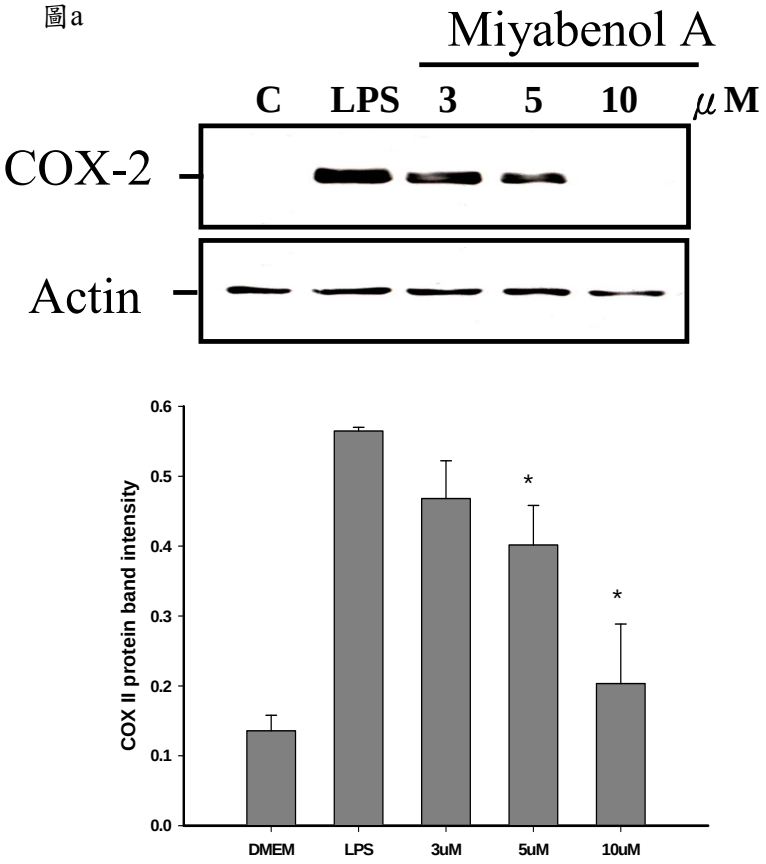
RAW 264 細胞加入 SB203580 (10 μM、30 μM)預處理 1 小時，分別以 LPS (1 μg/ml)作用 10 分鐘（ IkB ）、30 分鐘（ Ikk、p-Akt ）利用 Western Blot 方法來分析。



（圖十三）Akt 抑制劑 wortamanin 對 LPS 刺激 RAW 264 造成 IKK、IκB、p-P38 磷酸化的影響

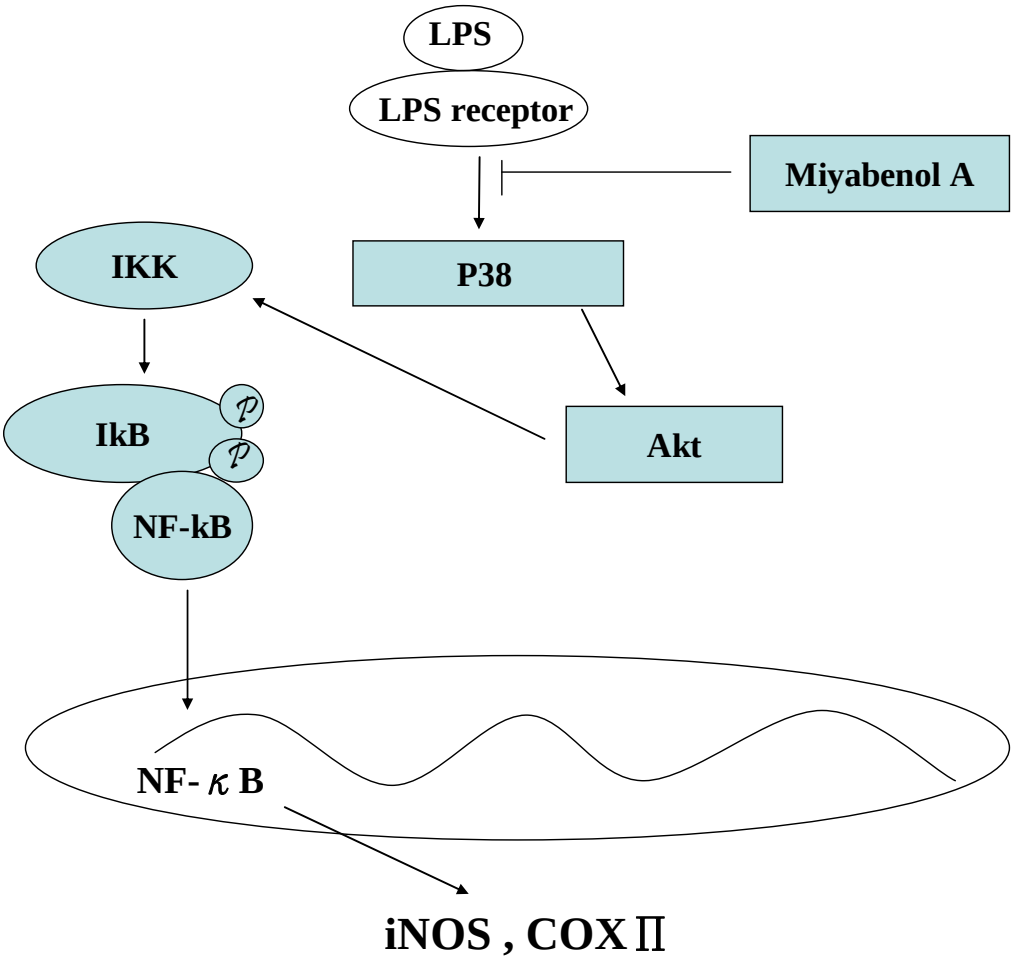
RAW 264 細胞加入 wortamanin (10 μM、30 μM) 預處理 1 小時後，以 LPS (1 μg/ml)作用 10 分鐘利用 Western Blot 方法來分析。

圖a

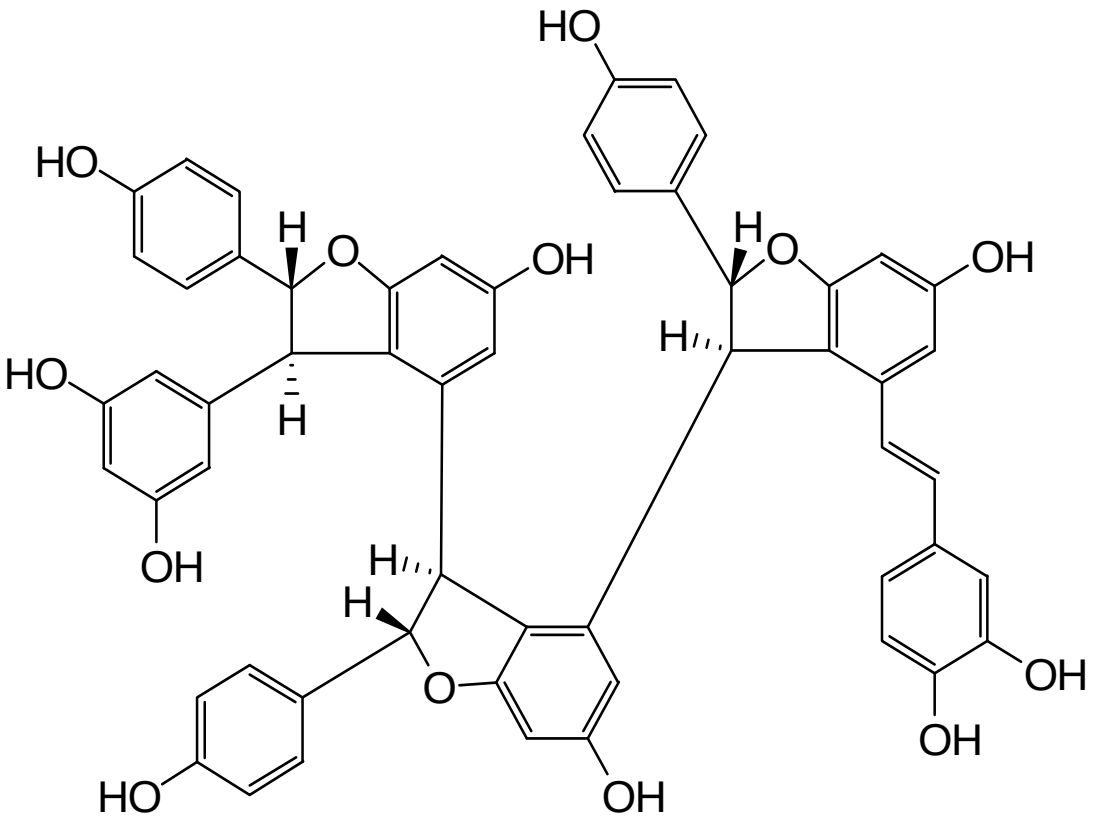


（圖十四）Miyabenol A 對 LPS 誘發 RAW 264 巨噬細胞 COX-2 protein 表現之影響

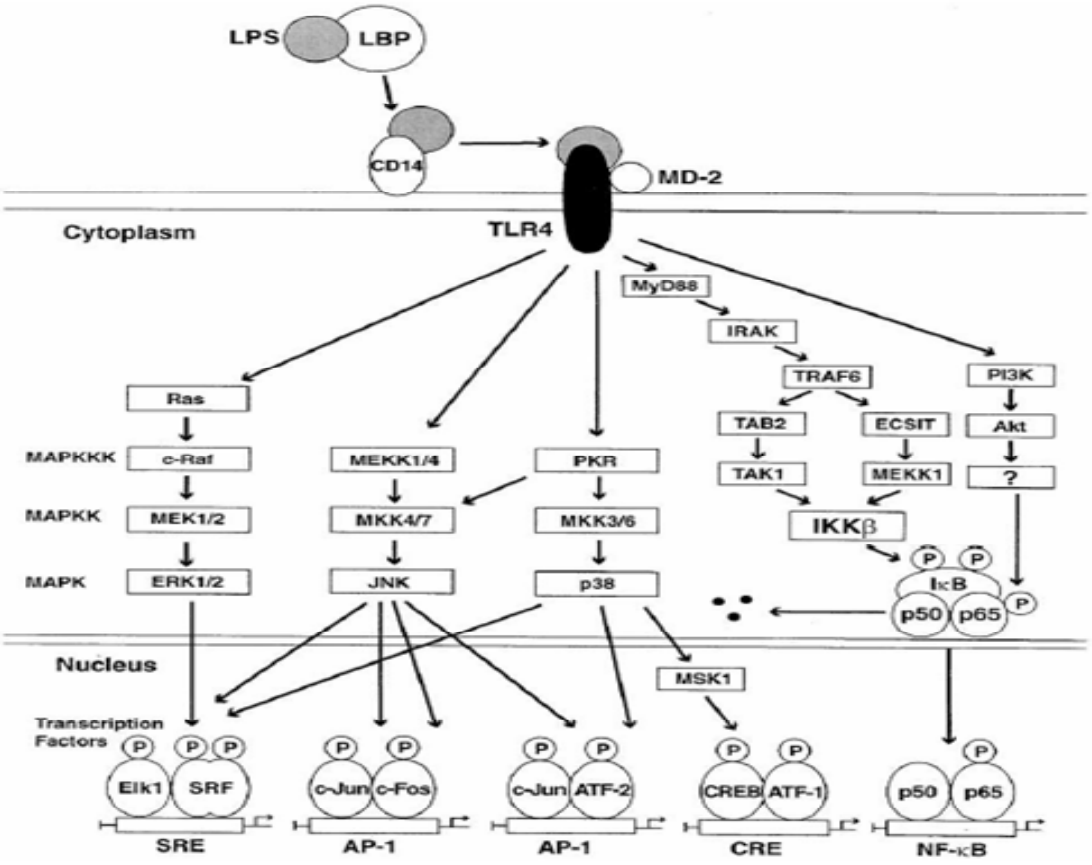
a、RAW 264 細胞以 LPS (1 μg/ml) 處理同時加入 miyabenol A (3 μM、5 μM、10 μM)作用 18 小時後，利用 Western Blot 方法偵測 COX-2 protein 表現，並以 Actin 表現量當做比較基準。b、COX-2 protein 量化圖。*P < 0.05，與 LPS 組作比較（n=3）。



(圖十五)Miyabenol A 抑制 RAW 264 巨噬細胞受到 LPS 誘導活化之訊號傳遞路徑



附圖一：Miyabenol A（國立中國醫藥研究所黃鈺玲老師提供）



附圖二：LPS 活化 MAPKs、PI3K、IKK/Iκ-B/NF-κB 調控 transcription factors 路徑圖(摘錄自 Guha and Mackman, 2001)