

中藥黃芩及其活性成分之抗發炎作用 研究

Study on the Anti-inflammatory Effect of Scutellaria Baicalensis Georgi and its Active Constituent

謝明學 ^{*1}Ming-Shueh Shieh 周瑞玲 ²Jui-ling Chou
元培科技大學環境工程衛生系 元培科技大學生物科技系

¹Department of Environmental Engineer and Health, Yuanpei University

²Department of Biotechnology, Yuanpei University

(Received, November,10, 2011; Revised, February 02, 2012; Accepted, February 24, 2012)

摘要：巨噬細胞在生物體內扮演著調控先天免疫及發炎作用反應的重要角色，此種細胞表面有細菌脂多醣 Lipopolysaccharide (LPS)的接受體，可利用 LPS 來誘發老鼠 RAW 264.7 巨噬細胞釋放一氧化氮 (NO)；再以 Griess reation 分析方法，測定 NO 含量變化，可以反映發炎之程度，並得以評估藥物對抗發炎過程的影響。黃芩的主成分為黃芩素及黃芩苷，本研究藉由 NO 釋放的效應，以體外試驗方式，進行化學成分之抗發炎作用探討。結果顯示，黃芩的 50%乙醇粗抽物及其活性成分黃芩素和黃芩苷都具有抗發炎效果，其對抑制 RAW 264.7 巨噬細胞釋放 NO 的 EC₅₀ 值分別為 0.2mg/mL、28μg/mL 及 22μg/mL。同時，黃芩素和黃芩苷對 NO 生成的抑制效果具有加成性。

關鍵詞：黃芩、黃芩素、黃芩苷、一氧化氮、抗發炎、巨噬細胞

*Corresponding author



Abstract: Macrophages play an essential role in innate immunity and inflammatory responses. Its surface has bacterial lipopolysaccharide (LPS) receptors. The nitric oxide (NO) production which has induced in LPS-stimulated RAW 264.7 cells is quantitatively determined by the Griss reaction method. NO may reflect the degree of inflammation and provide a measure to assess the effect of drugs on the inflammatory process. Main components of *Scutellaria Baicalensis Georgi* are baicalein and baicalein-7- β -D-gluopyranosiduronic acid. In this study, we attempt to investigate the effect of these chemical constituents on anti-inflammation in vitro. The results show that they suppressed NO production in LPS induced RAW 264.7 cells and the EC₅₀ values were 0.2mg/mL (50% ethanol crude extract), 28 μ g/mL(baicalein) and 22 μ g/mL(baicalein-7- β -D-gluopyranosiduronic acid), respectively. Simultaneously, baicalein and baicalein-7- β -D-gluopyranosiduronic acid have the additive effect to suppress NO production.

Key words: *Scutellaria Baicalensis Georgi*, Baicalein, Baicalein-7- β -D-gluopyranosiduronic acid, Nitric oxide, Anti-inflammation, Macrophage.

壹、前 言

近年來在醫療上，由於抗生素的大量使用，使許多病菌產生抗藥性，在病人的治癒上產生一些困擾、障礙及醫葯的浪費，所以藥學方面一直希望能開發抗生素以外的臨床治療藥物；然而化學合成藥物的研究、開發，包含毒性的測試及臨床的使用，需耗費相當的時間、人力及經費。反觀，中醫的治療方式，長久以來，以本草綱目及典籍記載的藥方為依據，提供病人服用，此種中藥材在免疫上的維護及醫病治療上亦有相當的成效。然而，中醫運用的這種天然物藥方，種類繁多，且有專屬的治療方向，每種植物被應用的部位有根、莖、葉、果實、種子等，有不同的療效，其間的化學成分也相當複雜。因此，在中藥萃取物中，何者為生物的有效化學成分，此活性成分的化學結構與受體間的關係為何，一直為藥理學研究的目標。人體的發炎反應與許多慢性疾病的病程發展有關，如何藉由保健食品或調整飲食來抑制發炎反應，以減緩疾病機轉的進行，漸為許多研究者深感興趣的課題。

唇形科植物的黃芩(*Scutellaria Baicalensis Georgi*)是一種常用的中藥，具有鎮熱、解痛、止血安胎等功效，臨床上用於上呼吸道感染、急慢性扁桃腺炎、急性咽喉炎、肺炎、痢疾和抗腫瘤等疾病(張喜平等，2001)。黃芩的主要成分為黃芩素(Baicalein)及黃芩苷(Baicalein-7- β -D-gluopyranosiduronic acid)，在化學結構的歸類屬於黃酮類化合物，此類化合物具有多種生物活性，一直以來都得到國內外學者的重視。

一氧化氮 (NO)在發炎反應過程中扮演相當重要的角色，其生成是經由活化細胞內的一氧化氮合成酶，利用酵素作用，將細胞內之 L-arginine 轉變成為 L-citrulline 及 NO 自由基的釋放(Chen et al., 1998)。細胞內生性的一氧化氮是維持體內正常運作之重要訊息傳遞因



子，它促使 GDP 轉變為 cGMP 進而誘發一連串之生理反應，包括血管擴張、子宮平滑肌鬆弛及抑制血小板凝集等作用，但當過量被生成則會造成細胞的傷害與血管過度的舒張，最後造成嚴重的發炎反應以及併發症 (DeGroot et al., 1997)。在葛蘭氏陰性與陽性菌感染的過程中，其細胞壁成份中之 Lipopolysaccharide (LPS)與 Lipoteic acid (LTA)均會誘導大量 NO、PGE2 與細胞激素的產生，而進而引起發炎反應(Salkowski et al., 1997; Mello et al., 1997)。

本研究選用 RAW 264.7 細胞株為實驗對象，主要是利用它在 Lipopolysaccharide(LPS)的刺激下，會大量生成 NO 的特性做研究。以黃芩 50%乙醇萃取液及管柱層析法，單離純化後的黃芩素及黃芩苷化合物為目的物，實驗是否能抑制被刺激過之 RAW 264.7 細胞的一氧化氮生成，來探討中藥黃芩及主成分之抗發炎成效。

貳、儀器與試藥

一、儀器及器材

氣相層析質譜儀(Shimadzu, GCMS-QP2010)

液相層析質譜儀(Finnigan TSQ Ultra EMR, Triple Quadrupole, LC/ESI/APCI/MS)

酵素免疫分析儀(ELISA reader, Stat Fax-2100, Awareness Technology, Inc.)

二、試藥

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazoyl blue) (MTT, Sigma, M-2128, USA)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma, USA)

Dimethylsulfide oxide (DMSO, Sigma, USA)

Ethanol (台灣菸酒公賣局)

Fetal bovine serum (FBS, GIBCO BRL, USA)

Lipopolysaccharide (LPS, Sigma, L-2755 Escherichia coli (E. Coli) Serotype USA)

Phosphate Buffer Saline (D-PBS, GIBCO BRL, USA)

Trypan Blue (Sigma, USA)

參、材料與方法

一、黃芩成分萃取

取中藥科學製劑黃芩濃縮粉末 100 公克(購自順天堂藥廠出產之商品)，用 50%乙醇萃取 3 次，每次 4 小時。合併萃液，以減壓機濃縮後，加入適量的水，依次用乙酸乙酯、正丁醇萃取，獲得乙酸乙酯、正丁醇層。

二、成分分離及化學結構鑑定



乙酸乙酯、正丁醇層分別濃縮去除溶劑後；再以矽膠(silica gel)及 Sephadex LH-20 gel 多次管柱層析，單離出化合物；化合物進一步再結晶，純化出化合物 Y1 及 Y2，經由液相層析質譜分析測定。

三、小鼠巨噬細胞(RAW 264.7 cells)之培養

實驗細胞購自食品工業發展研究所。其為 BALB/c 小鼠以 Abelson murine leukemia virus 引發而來之小鼠巨噬細胞株。細胞的生長是以培養在含 10%胎牛血清(FBS) 的 DMEM 培養液，放置於恆溫細胞培養箱(37°C、5%CO₂)中，當細胞長到八至九分滿即進行繼代培養。

四、細胞生成一氧化氮(NO)之測量

細胞內生成的一氧化氮，會很快氧化成 nitrite (NO₂⁻)和 nitrate (NO₃⁻)，因此透過測定 nitrite 的方式，可間接測定 NO 的生成量。本實驗使用的 Griess 試液可與 nitrite 反應生成紅色溶液，在 546nm 波長下有最大的吸光值，因待測細胞培養液中 nitrite 累積量的不同而造成濃度不同，其呈現深淺的吸光值不同，而做定量分析(Schmidt et al., 1992)。本實驗方法參考 Cho 等人(2000)之操作步驟。

方法步驟如下：

1. 將細胞濃度調整為 1x10⁶cells/mL，種入 96 孔組織培養盤。
2. 置於恆溫細胞培養箱(37°C、5%CO₂) 培養 24 小時。
3. 加入不同濃度的待測藥物反應 30 分鐘後，再加入 LPS (0.1μg/mL)培養 16 小時。
4. 取培養液 80μl/well，加入等量事先已混合的 Griess 試劑[由 Griess A 試劑(0.1% N-(1-Naphthyl) ethylenediamine) 與 Griess B 試劑(1% Sulfanilamide /5%H₃PO₄以 1:1 比例混合)，用酵素免疫分析儀，測量波長 550nm 的吸光值(O.D.)。
5. 以已知濃度的 Sodium nitrite (NaNO₂)溶液為標準，將樣本 OD 值以內插法換算樣品中 nitrite 濃度。

五、細胞存活率分析：MTT assay

MTT assay 是一種常用於測定細胞存活率或增殖作用的方法；MTT 為水溶性化合物，在水溶液中呈黃色，可被活細胞內粒線體中的琥珀酸脫氫酶還原成紫色結晶。因此，當在細胞樣品中添加 MTT 試劑，樣品中活的細胞數越多，相對呈現出來之脫氫酶活性會越強，而使 MTT 被還原成紫色結晶堆積於細胞中量越高；用 DMSO 溶劑溶解出來，即可依其呈現紫色深淺的吸光值，來評估細胞樣品的存活率。本實驗方法參考 Cho 等人(2004)之 MTT assay 的方法。

方法步驟如下：

1. 將實驗處理過的細胞樣品，分別加入 MTT 試劑(1mg/mL，pH7.4)50μl/well。
2. 置恆溫細胞培養箱(37°C、5%CO₂)培養 2 小時。
3. 移除上清液，再加入 100μl/well 的 DMSO，以 150 rpm 震盪將細胞內的紫色結晶溶出。



4. 最後以酵素免疫分析儀，測量波長 540nm 下的吸光值。

六、黃芩素和黃芩苷合併使用實驗

藥物對生物活性的效應，彼此間可能具有協同性(synergism)或拮抗性(antagonism)或加成效應(additive effect)。實驗以黃芩素和黃芩苷化合物的單獨劑量使用及不同劑量相互配對合併使用，測試其對被LPS刺激活化之RAW 264.7細胞的NO生成量與藥物濃度效應間的關係。根據Chou TC等人(1984)及Liang Zhao等(2004)，提出之兩種藥物的聯用指數（combination index, CI）來分析評估兩種藥物間之交互作用。評估的計算公式為： $CI = C_{A,x}/IC_{x,A} + C_{B,x}/IC_{x,B}$ ，其中 $C_{A,x}$ 和 $C_{B,x}$ 是指同時合併使用A、B两种藥物達到x%有效時的各別部分藥物濃度， $IC_{x,A}$ 和 $IC_{x,B}$ 是指單獨用一種藥物達到x%有效時的藥物濃度。

計算出CI 值後，如果 $CI < 1$ 認為兩藥物聯用為協同作用；如果 $CI = 1$ ，認為兩藥聯用為加成作用；如果 $CI > 1$ ，則認為兩藥聯用為拮抗作用。

七、統計分析

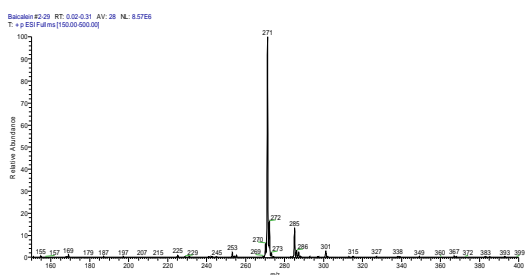
1. 控制組以未添加待測藥物之 LPS 刺激活化之 RAW 264.7 細胞的存活率及 NO 生成量為 100%。
2. 實驗結果及作圖，所表示的數據，均以平均值 ± 標準差 (means ± S. D.)顯示。以 Student's *t*-test 對不同的實驗組與控制組間結果做統計分析，若統計結果所得之 P 值 ≤0.01，則視為統計上具有顯著的差異

肆、結果與討論

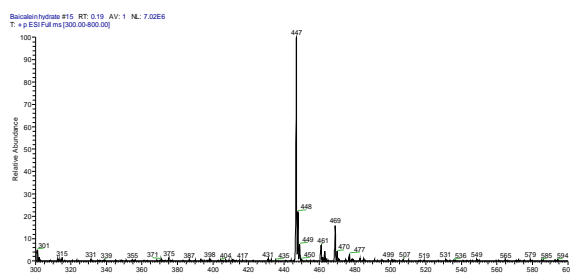
一、黃芩主成分之化學結構

化合物 Y1 及 Y2，質譜圖如下，經由標準品比對 retention time 及質譜分析比較，確認成分如下：

化合物 Y1 質譜：



化合物 Y2 質譜：



Y1 為黃芩素(baicalein and) 圖 1，Y2 為黃芩苷(Baicalein-7-β-D-gluopyranosiduronic acid) 圖 2。

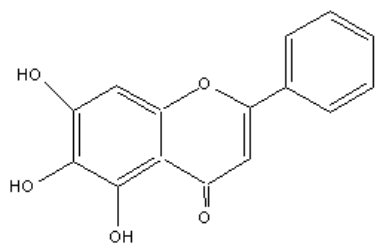


圖 1 黃芩素

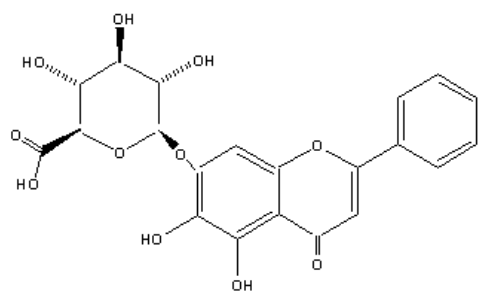


圖 2 黃芩苷

二、黃芩 50%乙醇粗抽物對 RAW 264.7 細胞(LPS 刺激活化)的形態、存活率影響

在光學顯微鏡下，觀察添加的待測藥物對 RAW 264.7 細胞形態變化，結果如圖 3，不論是添加黃芩 50%乙醇粗抽物或成分黃芩素、黃芩苷等，對 RAW 264.7 細胞形態不會產生顯著性變化，細胞生長和存活狀態與控制組做觀察比較，沒有顯著的差別。另根據 MTT 試驗數據之結果如圖 4，得知在黃芩 50 %乙醇粗抽物 0.4mg/mL 的濃度下，細胞存活率在統計上，亦無顯著的差異。

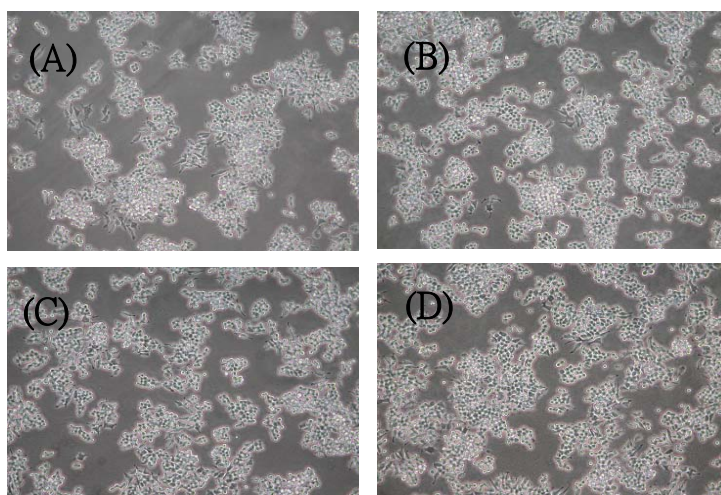


圖 3 黃芩 50%乙醇粗抽物及主成分黃芩素、黃芩苷對 RAW 264.7 細胞形態不會產生顯著性變化

(A)：控制組，不添加藥物 (B)：添加黃芩 50%乙醇粗抽物(0.4mg/mL) (C)：添加黃芩素(50



µg/mL) (D)：添加黃芩苷(25 µg/mL)，置恆溫細胞培養箱(37°C、5%CO₂)，培養 24 小時後，於光學顯微鏡下觀察之照片。

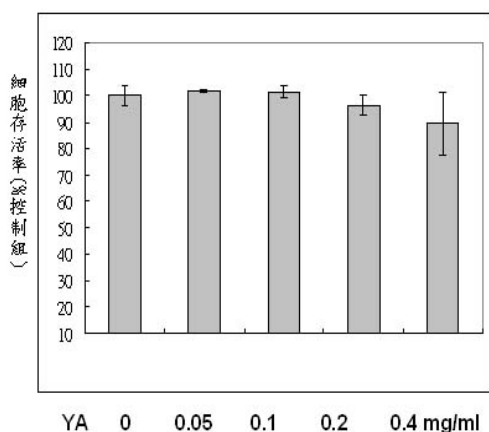


圖 4 黃芩 50%乙醇粗抽物對 RAW 264.7 細胞存活率的影響

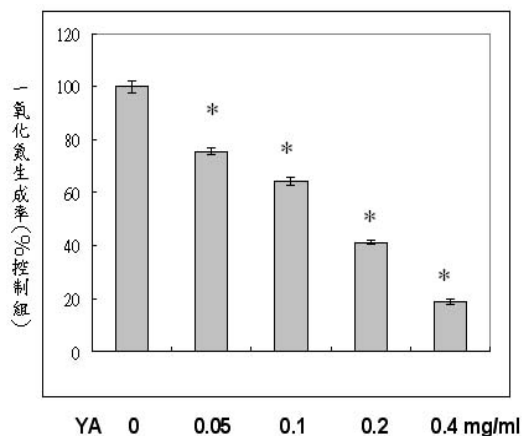


圖 5 黃芩 50%乙醇粗抽物(YA)對 R264.7 細胞 (LPS 刺激活化)NO 生成量之抑制率 (n=8, * 表示 P ≤ 0.01)

三、黃芩 50%乙醇粗抽物，不同濃度下，RAW 264.7 細胞(LPS 刺激活化)生成 NO 量之變化

依據上述肆、二的結果，實驗以未添加待測藥物之 LPS 刺激活化之 RAW 264.7 的 NO 生成量為 100%，平行配合實驗，添加不同濃度之黃芩 50%乙醇粗抽物(0, 0.05, 0.1, 0.2 和 0.4mg/mL)，置於恆溫細胞培養箱(37°C、5%CO₂)培養，培養 16 小時後，測量 RAW 264.7(LPS 刺激活化)產生 NO 之變化量。

結果如圖 5，顯示黃芩 50%乙醇粗抽物，具抑制細胞釋放 NO 的能力，其藥物劑量與 NO 生成量百分率間，具有線性關係(負)。經計算評估，黃芩 50%乙醇粗抽物之 EC₅₀ 值為 0.2mg/mL，表明黃芩 50%乙醇粗抽物具有抗發炎有的效果。

四、黃芩素和黃芩苷對 RAW 264.7 細胞(LPS 刺激活化) NO 生成量之影響

在不影響 RAW 264.7 細胞之形態(圖 3C 和 3D)與存活率的藥物濃度範圍內，以未添加待測藥物之 RAW264.7 細胞 (LPS 刺激活化)NO 生成量為 100%時，實驗分別添加不同濃度之黃芩素(0, 5, 10, 25 和 50 µg/mL)和黃芩苷(0, 5, 10, 15 和 25 µg/mL)，置於恆溫細胞培養箱(37°C、5%CO₂)培養，16 小時後，測量 NO 生成量之變化。結果如圖 6 和 7 顯示，黃芩素和黃芩苷都能有效地降低細胞 NO 生成或釋放量，且藥物劑量與 NO 生成量百分率間，具有線性關係(負)。經計算評估，黃芩素作用之 EC₅₀ 值為 28µg/mL、黃芩苷作用之 EC₅₀ 值為 22µg/mL。



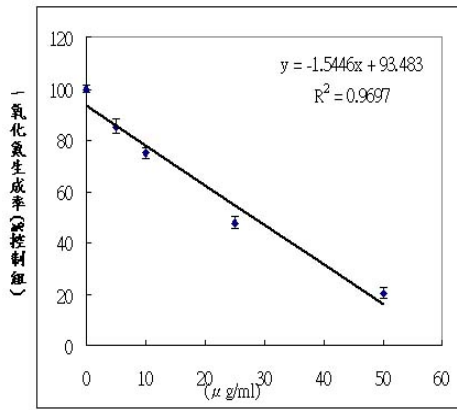


圖 6 不同黃芩素濃度抑制 RAW264.7 細胞生成 NO 量之劑量曲線

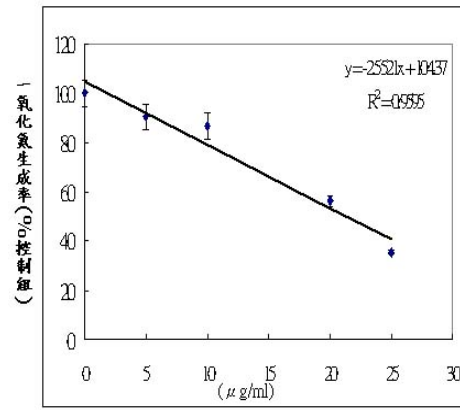


圖 7 不同黃芩苷濃度抑制 RAW264.7 細胞生成 NO 量之劑量曲線

五、黃芩素和黃芩苷合併使用實驗

結果如圖 8 顯示，單獨使用 10 μ g/mL 之黃芩素和黃芩苷藥物，與控制組比較，分別可各降低約 23.1 \pm 4.9 和 20.6 \pm 6.5%的 NO 生成量；而當同時添加 10 μ g/mL 之黃芩素和黃芩苷試劑，則產生加成抑制效果增加，約降低了 41.4 \pm 7.4%之 NO 生成百分率；比較圖 8 合併使用不同劑量兩種藥物(μ g/mL)：1.黃芩素+黃芩苷(10+10) 2.黃芩素+黃芩苷(10+25) 3.黃芩素+黃芩苷(25+10)，結果一氧化氮生成率平均值分別為 58.6%、35.0%、27.4%。以黃芩素+黃芩苷(10 μ g/mL+10 μ g/mL)為例，將 58.6 代入圖 6 與圖 7 之線性方程式 y 值中，得到 IC_{x,A}=22.6 及 IC_{x,B}=17.9，計算兩種藥物聯用指數值(combination index, CI); CI=(10/22.6)+(10/17.9)=1.001，趨近於 1，表示兩者具有加成性效果，亦即對抗發炎有加乘的功效。其他藥物之交叉配對組中都可測量到類似的結果。

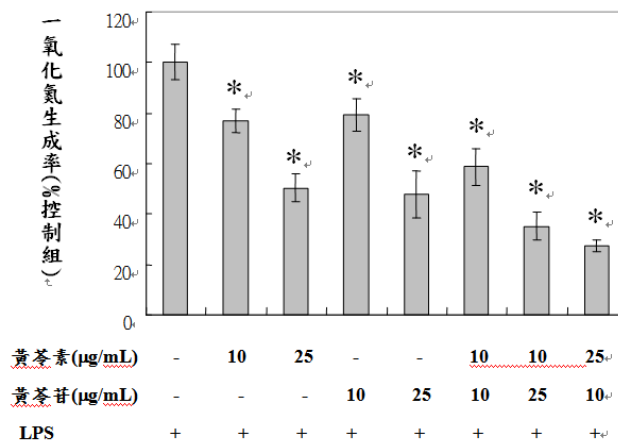


圖 8 黃芩素、黃芩苷單獨劑量與不同劑量混合配對，對 RAW 264.7 細胞 NO 生成量的抑制作用(n=6, * 表示 P \leq 0.01)



伍、結 論

本研究利用萃取、層析及純化的技術，分離並鑑定黃芩萃取物中的主成分為黃芩素、黃芩苷；將此單一成分用於評估抗發炎的成效。研究結果顯示，黃芩 50% EtOH 粗萃取物及純化物黃芩素、黃芩苷等，均具有相當良好的抗發炎活性。因此，中藥黃芩在未來鎮痛及抗發炎藥物的研究發展上，具有相當良好的開發潛力；其成分化學結構亦可為研究生物抗發炎機制之參考。

參考文獻

1. 張喜平，李宗芳，劉效恭，「黃芩素的藥理學研究概況」，中國藥理學通報，第 17 卷第 6 期，民國 90 年，711-713 頁。
2. Chen YC, Lin-Shiau SY and Lin JK., "Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite induce apoptosis," *J Cell Physiol*, Vol. 177, 1998, pp. 324-333.
3. Cho JY, Baik KU, Jung JH, Park MH., "In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin lactone, a sesquiterpene lactone, from *Saussurea lappa*.Eur," *J Pharmacol*, Vol. 398, 2000, pp. 399-407.
4. Cho JY, Park JS, Baik KU, Lee JG, Kim HP, Yoo ES et al., "Differential effect of phosphodiesterase IV inhibitor RP73401 on various inflammatory and immune responses relevant to rheumatoid arthritis," *Pharmacol Res*, Vol. 49, 2004, pp. 423-431.
5. Chou TC, Talalay P., "Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors," *Adv Enzyme Regul*, Vol. 22, 1984, pp.27-55.
6. De Groot CJ, Ruuls SR, Theeuwes JW, Dijkstra CD and Van der Val P., "Immunocytochemical characterization of the expression of inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase in demyelinating multiple sclerosis lesions," *J Neuropathol Exp Neurol*, Vol. 56, 1997, pp. 10-20.
7. Liang Zhao, M. Guillaume Wientjes, and Jessie L-S., "An Evaluation of Combination Chemotherapy: Integration of Nonlinear Regression, Curve Shift, Isobologram, and Combination Index Analyses," *Clinical Cancer Research*, Vol. 10, 2004, pp.7994-8004.
8. Mello SB, Novaes GS, Laurindo IM, Muscara MN, Maciel FM and Cossermelli W., "Nitric oxide synthase inhibitor influences prostaglandin and interleukin-1 production in experimental arthritic joints," *Inflammation Res*, Vol. 46, 1997, pp. 72-77.
9. Salkowski CA, Detore G, McNally R, van Rooijen N and Vogel., "SN1992 Regulation of inducible nitric oxide synthase messenger RNA expression and nitric oxide production by lipopolysaccharide in vivo: the roles of macrophages, endogenous IFN-gamma and TNF receptor-1-mediated signaling," *J Immunol*, Vol. 158, 1997, pp. 905-912.



10. Schmidt HHH, Warner TD and Murad F., "Double-edged role of endogenous nitric oxide ,"
Lancet, 1992, pp. 339-986.

