

散血草可恢復 THP-1 單核球細胞經微波輻射所抑制 NFκB 活化表現現象

Manybracteole Bugle Extract shown to rescue protein expression of transcription factor NFκB in THP-1 monocytes that are inhibited by microwave radiation

黃兆君¹ Chou-Chun Huang

元培科技大學通識教育中心

李晨宇² Chen-Yu Li

元培科技大學醫學檢驗生物技術系

廖美華³ May-Hua Liao

元培科技大學醫學工程學系

蔡文翔² Wein-Shiang Tsai

元培科技大學醫學檢驗生物技術系

唐存愷^{*4} Tswen-Kei Tang

國立金門大學護理學系

¹General Education Center, Yuanpei University

²Institute of Medical Laboratory Science and Biotechnology, Yuanpei University

³Department of Biomedical Engineering, Yuanpei University

⁴Department of Nursing, National Quemoy University

(Received July 25, 2013; Revised November 16, 2013; Accepted November 12, 2013)

摘要：微波，是人們在日常生活中常會接觸到的，當世界衛生組織(World Health Organization – WHO) 提出微波是一種微弱干擾人體生理功能的環境能量後，即引發人類開始思考微波是否會對人體生理功能造成傷害，單核球免疫力之表現與細胞中發炎因子 NFκB 的活性有密切相關。人類單核球細胞株 THP-1 細胞受到 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)

*Corresponding author



作用促使 THP-1 細胞分化成為巨噬細胞，接著再以 lipopolysaccharides (LPS) 作用促進活化使 THP-1 細胞內 NFκB 蛋白質的量增加。在微波照射的頻率為 2450 MHz 900W 影響 THP-1 細胞 NFκB 蛋白質量降低。另外探討在微波照射後加入散血草對 THP-1 單核球細胞 NFκB 蛋白質表現。散血草具有強效調節活化免疫細胞，而中國草藥指出散血草具有抗發炎的效果。我們用西方墨點分析 NFκB 蛋白質表現在 THP-1 單核細胞。在我們的實驗中，100 nM PMA 作用 24 小時刺激 THP-1 單核細胞分化成巨噬細胞，在立即微波照射的頻率為 2450 MHz 900W，隨後分別加入散血草萃取液 15 μg、30 μg、150 μg、三種不同劑量培養 3 小時後，接著再以 1 μg/ml LPS 作用 2 小時，結果發現加了散血草萃取液的作用下 NFκB 蛋白質都會上升，由其在散血草萃取液 15μg 濃度時有顯著的上升在 NFκB 蛋白質的表現。

關鍵詞：人類單核球細胞株(THP-1)、佛波醇 12-十四酸酯 13-乙酸酯(PMA)、脂多醣體(LPS)、細胞核轉錄因子(NF-B)、散血草

Abstract : Microwave radiation can be encountered regularly in daily lives. When World Health Organization (WHO) announced that microwave radiation is a kind of environmental energy which interferes with the physiological functions of human body, great concerns have been raised over the damage frequency can do to human physiology. The immunological performance and the activeness of cellular inflammatory factor NFκB have been closely related in monocytes. Due to the effect of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) to THP-1 monocytes, THP-1 monocytes can divide into macrophages and then react with lipopolysaccharides (LPS), causing an increase in the amount of NFκB protein in THP-1 monocytes. The protein expression of NFκB decreases when cells are exposed to frequency at 2450 MHz at 900W. After addition of Manybracteole Bugle extract to THP-1 monocytes, protein expression of NFκB has shown to be rescued. Manybracteole Bugle is a Taiwanese folk medicine, and possesses anti-inflammatory effects. Analysis of NFκB protein expression in THP-1 monocytes has been done with Western Blotting. It was observed that under stimulation with 100 nM PMA for 24h, THP-1 monocytes were able to differentiate into macrophages. Furthermore, in the immediate frequency of microwave irradiation 2450 MHz at 900W, Manybracteole Bugle extract was added at three kinds different doses including 15μg, 30 μg, 150 μg for 3 hours, followed by 2 hours to effect 1 μg/ml LPS. It was found under the effect of addition of 15μg, 30 μg, 150 μg, Manybracteole Bugle extract rescue protein level of NFκB.

Key words : THP-1 monocyte, Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), Lipopolysaccharides (LPS), Nuclear Factor - Kappa B (NF-B), Manybracteole Bugle extract



壹、前言

微波輻射(microwave radiation)，是人們在日常生活中常會接觸到，現今微波已不在侷限於工業用或醫療^{1,2}，而是應用於商業與家庭對於微波加熱使用，美國聯邦通訊管理委員會(Federal Communications Commission, FCC) 限定加熱用的微波頻率是 2450 MHz³，微波使用上十分便利於是大量使用，但很少研究有關於微波輻射對細胞生理活動之影響。根據 Stankiewicz W.⁴ 等人的研究使用低頻率微波對離體的人類周邊單核球(peripheral bloodmononuclear cell, PBMC)發現會影響其免疫的活性，由於人體含大量血液，因此推論人體靠近微波源時，很可能含大量水分的血液會使血液中細胞受其影響，其中血液中的單核球與組織中的巨噬細胞共同組成單核球細胞吞噬系統，擔任重要的免疫反應。根據文獻探討微波輻射對免疫的相關研究，如微波照射(2450 MHz, 5, 15 mW/cm²)可誘導胸腺細胞凋亡，導致胸腺病理變化，並影響細胞週期，可能抑制動物的免疫功能⁵。此外，微波(2 mW/cm² 照射 90 分鐘功率密度為 2450 MHz)暴露於懷孕期老鼠導致自然殺手(Natural Killer, NK) 細胞活性降低⁶，於是我們將動物模式換成人類單核球細胞株(THP-1)，單核球免疫力之表現與細胞中發炎因子 NFκB 的活性有密切相關⁷。人類的單核球細胞株受到 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 作用促使 THP-1 細胞分化成為巨噬細胞⁸，接著再以 lipopolysaccharides (LPS) 作用促進活化使巨噬細胞內 NFκB 蛋白質的量增加。當細胞受到微波(頻率 2450 MHz, 功率為 900 W) 的照射後會影響細胞內 NFκB 蛋白質的表現⁹。當 THP-1 細胞接受 PMA 及 LPS 刺激而分化為巨噬細胞時，此時細胞內 NFκB 蛋白質的量明顯上升⁹。若又受到微波照射，NFκB 表現量則會受到抑制。於是我們建立微波照射可抑制 THP-1 細胞受 PMA 和 LPS 活化的功能⁹。

散血草(Manybracteole Bugle)，學名 *Ajugataiwanensis* Nakai ex Murata，屬於唇形花科(Lamiaceae)筋骨草屬(*Ajuga*)。散血草又可稱為有苞筋骨草、台灣筋骨草、石灰菜、八正草、百症草、台灣白尾蜈蚣、九味一枝蒿。產地為中國大陸、喜馬拉雅、馬來西亞、非洲，台灣雖非產地，但台灣全島平野至中低海拔山區、路旁常有出現。散血草為民間藥用植物，其療效可治跌打損傷、肝炎、扁桃腺炎、咽喉炎、牙痛、腹痛、金瘡、腫毒等。外敷可治刀傷出血、燙傷和皮膚病等，內服則有清熱涼血、消炎消腫等功效¹⁰。

本研究主要是探討散血草經甲醇萃取物對微波所抑制發炎因子 NFκB 的效果。當世界衛生組織提出微波是一種微弱干擾人體生理功能的環境能量，當長期接觸微波的人們則會直接影響體內血中白血球(leukocytes)的數量。單核球免疫力之表現與細胞中發炎因子 NFκB 的活性有密切相關。單核球分化之誘導，人類的單核球細胞株(monocyte cell) THP-1 細胞受到 100nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 作用 24 小時促使 THP-1 細胞分化成為巨噬細胞，接著再以 1μg/ml lipopolysaccharides (LPS) 作用促進活化使 THP-1 細胞內 NFκB 蛋白質的量增加。當細胞受到微波 6 秒(頻率 2450 MHz, 功率為 900 W) 的照射後會抑制細胞內 NFκB 蛋白質的表現。但經由散血草萃取物作用後，發現散血草甲醇萃取物可顯著提高微波所抑制 NFκB 的產生量，有效地恢復發炎反應的效果。



貳、材料及方法

一、散血草萃取物製備

散血草萃取物是使用散血草的葉子，取 1 公斤的葉子，曬乾，浸泡在 2 公升 100% 甲醇，一個月。將此溶液經冷凍乾燥，再加入 10% 甲醇 / 90% 丙酮溶劑，抽取可溶性的上清液。將此上清液加入 200 mg silica gel (60Å, 200-400 mesh, Sigma)，使得有機溶劑物質附著在膠體上。再以 20% 甲醇 / 80% 丙酮溶劑，加到 silica gel 內溶出有機物質，收集液體。將液體真空冷凍抽乾，所得即是散血草萃取物的粉末狀，配製散血草溶液 3 mg/ml 溶解在 PBS。

二、細胞存活率

THP-1 細胞以 100 nM PMA 前處理 24 小時，隨後暴露在微波照射 2450 MHz 6 秒後，接著分別各加入 0 µg、15 µg、30 µg、150 µg、300 µg、600 µg 散血草溶液於 THP-1 培養於 37°C、5% CO₂ 培養箱中培養 2 小時，且隨後加入 1 µg/mL LPS 作用 2 小時。收集細胞評估藉由 0.4% (最終濃度) trypan blue dye (Gibco) 排除法分析¹¹。將細胞數測定活細胞計數在 Neubauer-improved 血球計數器 (superior marienfeld, Germany) 以倒立式顯微鏡 (Nikon ecipse, TS100) 觀察。活細胞的百分比從每個細胞培養以及與處理後取得運用下列公式： $\% \text{活細胞} = (\text{VC} / \text{TC}) \times 100$ ，VC = 活細胞計數，TC = 總細胞計數(染色加未染色細胞)。

三、THP-1 細胞經微波照射加入散血草萃取物觀察 NFκB 表現量的實驗

2x10⁶ cells THP-1 播種在 100 mm² culture dish 之上，單核細胞以 100 nM PMA 作用 24 小時分化為巨噬細胞培養於 37°C、5% CO₂ 培養箱。隨後暴露在微波照射 2450 MHz 6 秒後，接著分別各加入 0 µg、15 µg、30 µg、150 µg、300 µg、600 µg 散血草溶液於 THP-1 培養於 37°C、5% CO₂ 培養箱中培養 2 小時，且隨後加入 1 µg/mL LPS 作用 2 小時。收集細胞，萃取細胞蛋白質，以 10% SDS-PAGE 電泳進行西方墨點法進行分析，來觀察細胞內發炎因子 NFκB 表現。

四、統計分析

本實驗均採三重實驗結果以平均值±標準偏差 (Mean±SD) 表示。細胞存活率、實驗之數據分析各實驗組與控制組之顯著差異則採用 SigmaPlot 10.0 軟體中具統計分析功能之 t-test 檢定其差異性，若兩組間之相符機率 $p < 0.05$ ，即視為具有顯著差異(*)，若兩組間之相符機率 $p < 0.01$ ，即視為具有非常顯著差異(**)，若兩組間之相符機率 $p < 0.001$ ，即視為具有極顯著差異(***)。



參、結果與討論

THP-1 單核球以 100nM PMA 分化為巨噬細胞 24 小時，然後將細胞暴露在 2450MHz 微波照射 6 秒，加入 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS，隨後分別加入散血草萃取物(3 mg/ml) 15 μg 、30 μg 、150 μg 、300 μg 、600 μg ，刺激 2 小時，觀察細胞之存活率(圖 1)。THP-1 經微波照射 6 秒及加入不同劑量的散血草溶液，細胞的存活率沒有明顯改變。

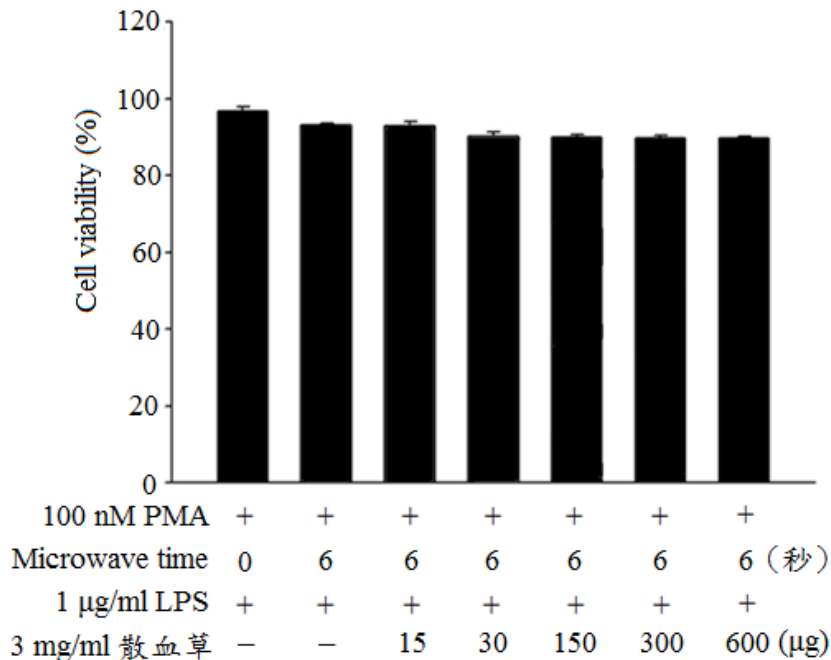


圖 1. THP-1 經微波照射加入散血草萃取物之存活率。Y 軸為微波照射單核細胞後之細胞存活率。X 軸為微波照射單核細胞細胞 6 秒加入不同劑量散血草萃取物。將 THP-1 單核細胞分盤後，加入 100nM PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate)與細胞作用 24 小時，隨後將細胞經微波照射(2450 MHz) 6 秒，接著加入散血草萃取物(3 mg/ml) 分別為 15 μg 、30 μg 、150 μg 、300 μg 及 600 μg ，反應 2 小時，隨後加入 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS，細胞以 Trypan blue exclusion assay 來計算細胞的存活率。實驗統計結果以平均值 \pm 標準偏差(Mean \pm SD)表示(n=3)。

接著收取細胞萃取蛋白質以西方墨點分析。實驗結果顯示 THP-1 單核細胞經微波照射後其 NF κ B 表達量下降，但經由散血草萃取物作用後，當散血草劑量在 30 μg 有明顯恢復發炎反應的效果(圖 2)。我們發現散血草甲醇萃取物可以提高因微波受抑制的 NF κ B 的產生，因此可利用此散血草複合物做為提高發炎反應的一個指標。



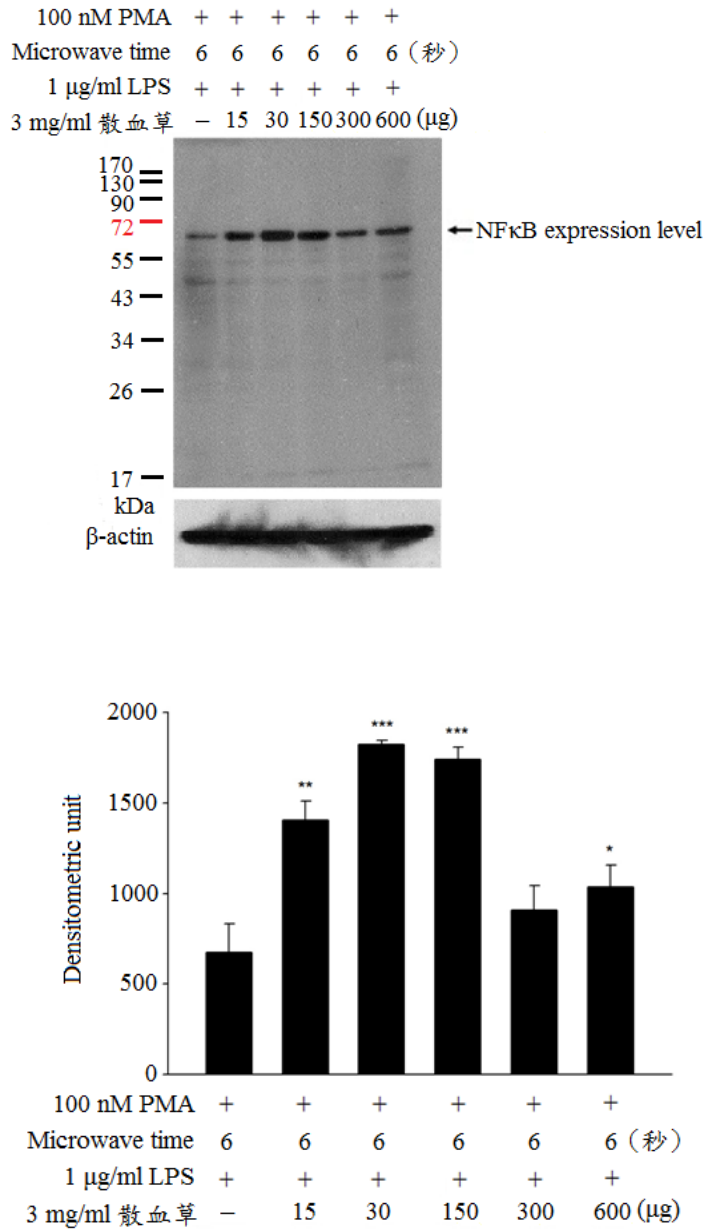


圖 2. THP-1 經微波照射加入散血草萃取物之 NF κ B 表現。THP-1 單核球以 100 nM PMA 分化為巨噬細胞 24 小時，然後將細胞暴露在 2450 MHz 微波照射 6 秒，加入 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS，接著加入散血草萃取物 (3 mg/ml) 分別為 15 μg 、30 μg 、150 μg 、300 μg 及 600 μg ，反應 2 小時，隨後加入 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS，以西方墨點分析。實驗統計結果以平均值 \pm 標準偏差(Mean \pm SD) 表示(n=3)。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 和 *** $p < 0.001$ 皆與控制組(100 nM PMA + 微波 6 秒 + 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS)比較。



散血草用於中藥的治療。全草皆可用藥，全年可採集，鮮用或晒乾用。散血草的化學成分含克羅烷型二萜(clerodaneterpenoids)、植物甾皮甾醇(phytoecdysteroids)、類黃酮(flavonoids)、環烯醚(iridoids)以及三酸甘油脂(triglycerides)¹²。此外，尚有皂苷、有機酸、生物鹼。味苦，性寒。有清熱解毒，祛痰止咳，涼血消腫之效。在台灣民間傳統中常被用來治療上呼吸道感染、扁桃腺炎、急性結膜炎、肝炎及肝方面疾病、胃腸炎、肺炎、支氣管炎、肺膿瘍、乳腺炎¹³。外用可治跌打損傷、毒蛇咬傷、外傷出血、燒燙傷。燒燙傷、腹痛、發燒、喉嚨痛、肺部等疾病¹¹。而本實驗中加入散血草萃取物會使的原本受到微波抑制的 NFκB 恢復發炎反應，散血草用途在中藥的治療，意外發現可以提高 NFκB 的產生，或許可幫助免疫力低下的病人提高免疫反應用途，因此我們實驗利用此複合物做為提高發炎反應的一個指標，如更進一步的研究調控此發炎機制必須純化分離散血草複合物的成分，分析何種物質可調控。

參考文獻

1. Ku, H.S., Siu, F., Siores, E., Ball, J.A.R. and Blicblau, A.S., "Applications of fixed and variable frequency microwave (VFM) facilities in polymeric materials processing and joining," *J. Mater. Process. Tech.*, Vol. 113, 2001, pp. 184-188.
2. Liang, P., Dong, B., Yu, X., Yu, D., Wang, Y., Feng, L. and Xiao, Q., "Prognostic factors for survival in patients with hepatocellular carcinoma after percutaneous microwave ablation," *Radiology*, Vol. 235, 2005, pp. 299-307.
3. Thostenson, E.T. and Chou, T.W., "Microwave processing: fundamentals and applications," *Composites Part A*, Vol. 30, 1999, pp. 1055-1071.
4. Stankiewicz W, Dabrowski MP, Kubacki R, Sobiczewska E. and Szmigielski S., "Immunotropic influence of 900 MHz microwave GSM signal on human blood immune cells activated in vitro," *Electromagn. Biol Med*, Vol. 25, No. 1, 2006, pp. 45-51.
5. Sun, X., Zhang, W.H., Niu, Y.J., Zeng, M., Hou, Y.C. and Wang, X.R., "Effects of microwave radiation on thymocytes in mice at different power densities.," *Zhonghua lao dong wei sheng zhi ye bing za zhi*, Vol. 22, 2004, pp. 108-111.
6. Nakamura, H., Seto, T., Hatta, K., Matsuzaki, I., Nagase, H., Yoshida, M. and Ogino, K., "Natural killer cell activity reduced by microwave exposure during pregnancy is mediated by opioid systems," *Environ. Res*, Vol. 79, 1998, pp. 106-113.
7. Azuma, Y. and Ohura, K., "Endomorphins 1 and 2 inhibit IL-10 and IL-12 production and innate immune functions, and potentiate NF-κB DNA binding in THP-1 differentiated to macrophage-like cells," *Scand. J. Immunology*, Vol. 56, 2002, pp. 260-269.
8. Kohro, T., Tanaka, T., Murakami, T., Wada, Y., Aburatani, H., Hamakubo, T. and Kodama, T.,



- “A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage,” *J. Atheroscler. Thromb.*, Vol. 11, No. 2, 2004, pp. 88-97.
9. Li C.Y., Liao M.H., Lin C.W, Tsai W.S., Huang C.C. and Tang T.K., “Inhibitory effect of microwave radiation on LPS-induced NFκB expression in the THP-1 monocytes,” *Chinese J. Physiol.*, Vol. 55, No. 6, 2012, pp. 421-427.
 10. Hou D., *Flora of Taiwan*, Vol. 4, Editorial Committee of the Flora of Taiwan, Taipei, Taiwan, 1996, pp. 442.
 11. Correa G.T., Veranio G.A., Silva L.E., Hirata J. R., Coil J.M. and Scelza M.F., “Cytotoxicity evaluation of two root canal sealers and a commercial calcium hydroxide paste on THP1 cell line by Trypan Blue assay,” *J. Appl. Oral. Sc.*, Vol. 17, 2009, pp. 457-461.
 12. Chan Y.Y., Wu T.S., Kuoh C.S. and Damu A.G., “A new phytoecdysteroid from *Ajugataiwanensis*,” *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), Vol. 53, No.7, 2005, pp. 836-838.
 13. Chan Y.Y., “Neoclerodane diterpenoids from *Ajuga taiwanensis*,” *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), Vol. 53, No. 2, 2005, pp.164-167.

