

東海大學畜產與生物科技學系

Department of Animal Science and Biotechnology

Tunghai University

碩士論文

Master Thesis

指導教授：謝長奇 博士

Advisor: Chang-Chi Hsieh, Ph. D.

鹿茸萃取物對卵白蛋白誘導之呼吸道過度反應

的調節作用

Velvet antler extracts modulate OVA-induced airway

hyperresponsiveness

研究生：趙文瑜

Graduate student: Wen-Yu Chao

中華民國一百年六月

June, 2011

東海大學碩士班研究生

論文口試委員審定書

畜產與生物科技學系 趙文瑜(學號 G96610014) 君
所提之論文：

鹿茸萃取物對卵白蛋白誘導之呼吸道過度反應的
調節作用，經本委員會審議，認為符合碩士資格標準。

論文指導教授 謝長奇 (簽章)

畜產與生物科技學系主任 歐柏榮 (簽章)

考試委員 謝長奇 (簽章)

詹明修

林文川

中華民國 100 年 6 月 10 日

致謝

承蒙指導教授謝長奇博士細心指導與教誨，使研究順利完成，於此謹呈最虔摯之謝忱。並於論文口試時，承蒙中國醫學大學林文川博士、中山醫學大學詹明修博士對本論文之撥冗審查，惠與寶貴意見與修正，促使本論文的撰寫更加完善，僅此敬致最誠摯之謝意。

受業期間亦蒙中興大學廖俊旺博士與竹南動物科技研究所給予組織病理切片評估方面之指導與協助，以及系所內諸位師長之關懷指導，睿與新知，受益恩情永銘於心。感謝中國醫藥大學林文川博士實驗室成員、中國醫藥大學李妙蓉博士實驗室成員、中國醫藥大學宏柏學長、中興大學晉東學長於實驗上之協助。

此外，感謝實驗室的夥伴們，宜綸學姐、漢儀、助理依陵與如玉、佑軒學弟、彥文學弟、品欣學妹、軒妙學妹、怡姬學妹、晉文學妹、治暄學弟、瑋仁學弟、炯呈學弟、景聰學弟、秀芳學妹、新雅學妹、柏翰學弟、嘉瑋學弟、怡婷學妹、世雋學弟在這些日子來的相處中，給予實驗和生活上的協助、關心與歡樂。

最後，感謝最親愛的家人在這些年中的支持和鼓勵，使學業能順利完成，並感謝士平一路上的陪伴，僅以這微小成果獻予諸位，並獻上感恩之意。

目次

| | |
|--------------------------|----|
| 壹、 摘要 | 1 |
| 貳、 前言 | 5 |
| 參、 文獻探討 | 7 |
| 一、 鹿茸 | 7 |
| (一) 鹿茸來源與型態 | 7 |
| (二) 鹿茸分類 | 8 |
| (三) 鹿茸品質鑑別 | 8 |
| (四) 鹿茸之組成份 | 9 |
| (五) 鹿茸之藥理作用 | 10 |
| (六) 鹿茸之毒性與副作用 | 11 |
| 二、 氣喘 | 12 |
| (一) 氣喘定義 | 12 |
| (二) 氣喘盛行率及死亡率 | 12 |
| (三) 氣喘病理特徵 | 13 |
| (四) 免疫系統 | 13 |
| (五) 氣喘相關分子 | 14 |
| (六) 氣喘相關細胞表面抗原分子介紹 | 16 |
| (七) 氣喘致病機轉 | 17 |
| (八) 氣喘治療 | 19 |
| 肆、 研究目的 | 21 |
| 伍、 材料方法 | 22 |
| 一、 實驗材料 | 22 |
| 二、 實驗方法 | 24 |
| (一) 動物飼養與分組 | 24 |
| (二) 鹿茸萃取物製備流程 | 24 |

| | |
|--|-----------|
| (三) 動物致敏模式..... | 25 |
| (四) 樣品收集..... | 25 |
| (五) 樣品分析..... | 26 |
| (六) 以 EL4 細胞株和 Raw264.7 細胞株模擬體內細胞 | 29 |
| 陸、 統計分析 | 31 |
| 柒、 結果 | 32 |
| 一、 小鼠呼吸道過度反應之免疫調節..... | 32 |
| (一) 小鼠體重、脾臟、胸線與肺臟重量之變化..... | 32 |
| (二) 呼吸道過度反應中肺部沖洗液細胞總數之變化..... | 32 |
| (三) 呼吸道過度反應中呼吸道週邊淋巴細胞次族群之變化..... | 32 |
| (四) 呼吸道過度反應中肺部沖洗液淋巴細胞次族群之變化..... | 33 |
| (五) 呼吸道過度反應中脾臟淋巴細胞次族群之變化..... | 34 |
| (六) 呼吸道過度反應中肺部沖洗液細胞激素之變化..... | 35 |
| (七) 呼吸道過度反應中血清與肺部沖洗液特異性抗體之變化..... | 35 |
| (八) 呼吸道過度反應中肺部沖洗液細胞浸潤種類之變化..... | 36 |
| (九) 肺部組織病理切片之變化..... | 36 |
| (十) 小鼠呼吸道過度反應之變化..... | 37 |
| 二、 以細胞模式模擬體內細胞反應..... | 37 |
| (一) EL4 細胞株生長週期..... | 37 |
| (二) EL4 細胞經鹿茸萃取物刺激後細胞增生之效果..... | 37 |
| (三) EL4 細胞經鹿茸萃取物刺激後分泌細胞激素之變化..... | 38 |
| (四) EL4 細胞經鹿茸不同極性萃取層刺激後細胞激素之變化..... | 38 |
| (五) Raw 264.7 細胞經鹿茸不同極性萃取層刺激後細胞激素之變化 | 38 |
| 捌、 討論 | 39 |
| 一、 呼吸道過度反應中 T 細胞之分化 | 39 |
| 二、 呼吸道過度反應中 IgE 之生成..... | 40 |
| 三、 呼吸道過度反應中經過免疫調節支氣管病理狀況..... | 41 |
| 四、 以細胞模式模擬體內細胞..... | 42 |

| | |
|----------------|----|
| 玖、 結論 | 43 |
| 壹拾、 參考文獻 | 44 |
| 壹拾壹、 附錄 | 51 |
| 壹拾貳、 附表 | 84 |
| 壹拾參、 附圖 | 88 |
| 壹拾肆、 附件 | 94 |

表次

| | |
|---|----|
| 表一、 鹿茸萃取物對小鼠脾臟、胸腺及肺部濕重之影響 | 51 |
| 表二、 鹿茸萃取物對小鼠肺部沖洗液中卵白蛋白誘導之細胞激素之影響 | 52 |
| 表三、 鹿茸萃取物對小鼠血清中特異性 OVA 抗體 (IgE、IgG ₁ 、IgG _{2a}) 之影響 | 53 |
| 表四、 鹿茸萃取物對小鼠肺部沖洗液中特異性 OVA 抗體 (IgE、IgG ₁ 、IgG _{2a}) 之影響 | 54 |
| 表五、 小鼠肺部組織病理切片中肺泡壁發炎情形之評估 | 55 |
| 表六、 小鼠肺部組織病理切片中靜脈週邊區域浸潤情形之評估 | 56 |
| 表七、 小鼠肺部組織病理切片中動脈週邊與支氣管週邊區域浸潤情形之評估 | 57 |
| 表八、 小鼠肺部組織病理切片之總評估 | 58 |
| 表九、 小鼠肺部組織中肺泡壁與支氣管區域黏液分佈情形之評估 | 59 |
| 表十、 EL4 細胞經鹿茸萃取物刺激後分泌細胞激素 (IL-4 與 IFN- γ) 之變化 | 60 |
| 表十一、 EL4 細胞經鹿茸不同極性萃取層刺激後分泌細胞激素 (IL-4) 之變化 | 61 |
| 表十二、 Raw 264.7 細胞經鹿茸不同極性萃取層刺激後分泌細胞激素 (IL-12) 之變化 | 62 |

圖次

| | | |
|-------|-------------------------------------|----|
| 圖一、 | 鹿茸萃取物對 OVA 致敏小鼠每周體重之影響 | 63 |
| 圖二、 | 鹿茸萃取物對 OVA 致敏小鼠肺部沖洗液中總細胞數之影響 | 64 |
| 圖三、 | 小鼠呼吸道週邊淋巴結中淋巴細胞亞族群 | 65 |
| 圖四、 | 小鼠呼吸道週邊淋巴結中 T 淋巴細胞亞族群 | 66 |
| 圖五、 | 小鼠呼吸道週邊淋巴結中 T 輔助細胞第一型與第二型亞族群 | 67 |
| 圖六、 | 小鼠呼吸道週邊淋巴結中活化 T 淋巴細胞亞族群 | 68 |
| 圖七、 | 小鼠呼吸道週邊淋巴結中 T 調節細胞第一型與第二型亞族群 | 69 |
| 圖八、 | 小鼠肺部沖洗液中 T 淋巴細胞亞族群 | 70 |
| 圖九、 | 小鼠肺部沖洗液中 T 輔助細胞第一型與第二型亞族群 | 71 |
| 圖十、 | 小鼠肺部沖洗液中活化 T 淋巴細胞亞族群 | 72 |
| 圖十一、 | 小鼠脾臟中淋巴細胞亞族群 | 73 |
| 圖十二、 | 小鼠脾臟中 T 淋巴細胞亞族群 | 74 |
| 圖十三、 | 小鼠脾臟中 T 輔助細胞第一型與第二型亞族群 | 75 |
| 圖十四、 | 小鼠脾臟中活化 T 淋巴細胞亞族群 | 76 |
| 圖十五、 | 小鼠脾臟中 T 調節細胞第一型與第二型亞族群 | 77 |
| 圖十六、 | 鹿茸萃取物對 OVA 致敏小鼠肺部沖洗液中白血球組態之影響 | 78 |
| 圖十七、 | OVA 致敏小鼠肺部組織病理切片圖 | 79 |
| 圖十八、 | OVA 致敏小鼠肺部組織黏液分佈圖 | 80 |
| 圖十九、 | OVA 致敏小鼠呼吸道阻力測定 | 81 |
| 圖二十、 | EL4 細胞株生長曲線 | 82 |
| 圖二十一、 | EL4 細胞株經鹿茸萃取液刺激後細胞增生之效果 | 83 |

壹、摘要

過敏性氣喘為一種慢性呼吸道過度反應，常伴隨著肺部發炎、嗜酸性白血球浸潤與血清中 IgE 含量增加。已有研究指出鹿茸在體外試驗中可抑制大鼠腹股溝淋巴結生成 IL-2，亦可抑制發炎物質前驅物的細胞激素例如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 。而臨床試驗發現，氣喘孩童在不停用西藥下，同時服用鹿茸後，血清中組織胺、白三烯素 C4 有下降的趨勢，且 IFN- γ 增加，但其相關機制不明。因此本研究希望能藉由動物模式來進一步探討鹿茸對於呼吸道過度反應之調節作用。試驗中以卵白蛋白致敏八週齡 BALB/c 雌鼠誘發其呼吸道過度反應，以口服方式餵食小鼠不同劑量之鹿茸酒精萃取物 (50、100、300 mg/kg)，並以皮質類固醇 (10 mg/kg) 作為正對照組。七週後測量其呼吸道阻力，並犧牲小鼠收集頸部氣管週邊淋巴結、肺部沖洗液、脾、胸腺、肺等，進行淋巴細胞表面標記分析 (CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD69, CD278, Tim-3)、抗卵白蛋白抗體 (Anti-OVA-IgE, Anti-OVA-IgG₁, Anti-OVA-IgG_{2a}) 及細胞激素 (IL-4, IL-5, IFN- γ) 測定、肺部沖洗液中血球形態區分、蘇木素與嗜伊紅染色法 (Hematoxylin-eosin stain) 和過碘酸希夫染色 (Periodic acid-Schiff stain) 評估肺部組織病理切片中細胞浸潤、氣管受損及黏液分泌情形。結果顯示經過卵白蛋白致敏後，鹿茸萃取物可增加肺部沖洗液中 Th1 細胞 (Tim-3, CD4⁺) 比例，減少脾臟淋巴細胞中 Th2 (CD278⁺, CD4⁺) 細胞比例；且降低肺部沖洗液中 IL-4 與 IL-5 分泌量、降低血清及肺部沖洗液中抗卵白蛋白 IgE 與 IgG₁ 生成，提高其抗卵白蛋白 IgG_{2a} 生成量；並減少肺部支氣管週邊細胞浸潤情形及嗜酸性白血球數量；減少肺泡壁發炎反應、靜脈週邊區域中、動脈週邊與支氣管週邊區域中發炎細胞浸潤；進而顯著性減緩呼吸道過度反應。進一步利用細胞試驗來解明分子調控之機轉。以鹿茸萃取物或鹿茸不同極性萃取層刺激 EL4 細胞株及 RAW 264.7 細胞株觀察其細胞激素的分泌調控。鹿茸萃取物 (10.0 μ g/ml) 可顯著性提高 EL4 細胞的 IFN- γ 分泌量，而鹿茸氣仿萃取物可提升 Raw 264.7 細胞的 IL-12 分泌量。綜上所述，鹿茸可透過活化全身性之 T 調節細胞、調節 naïve T 細胞分化趨向 Th1 cells、進而降低過敏性 IgE 抗體生成與發炎細胞於肺部浸潤來降低呼吸道過度反應。

關鍵詞：呼吸道過度反應、過敏體質、免疫調節、鹿茸

ABSTRACT

Allergic asthma is a chronic disease associated with airway hyperresponsiveness such as bronchial inflammation, eosinophils infiltration and increase of serum IgE. Previous *in vitro* studies were reported that velvet antler can decrease the production of IL-2, and suppress pro-inflammatory cytokines including IL-1 β , IL-6 and TNF- α . Otherwise, in the clinical study, it was discovered that the concentration of histamine and leucotriene were decreased and IFN- γ was increased in serum of asthmatic children after velvet antler treatment. But the relative mechanism is still unclear. In this study, we established the animal model to realize the effect of velvet antler (VA) in airway hyperresponsiveness. Female BALB/c mice were sensitized and challenged with ovalbumin (OVA) to induce airway hyperresponsiveness and administered with various doses of velvet antler (50, 100, and 300 mg/kg) or prednisolone (10 mg/kg) for seven weeks. After seven weeks treatments, mice were determined the enhanced pause (Penh) using whole body plethysmography, pulmonary cell infiltration and T cell differentiation, anti-OVA antibodies (including Anti-OVA-IgE, Anti-OVA-IgG₁, Anti-OVA-IgG_{2a}) and cytokines (such as IL-4, IL-5, IFN- γ) analysis, the paraffin section of lung for hematoxylin-eosin stain and periodic acid-Schiff stain. The results indicated that Velvet antler extracts (VAE) could increase the Th1 cells (Tim-3, CD4⁺) and reduce the Th2 cells (CD278⁺, CD4⁺) and to modulate T helper cell differentiation. VAE significantly decreased the secretion of IL-4 and IL-5 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of asthmatic mice. Anti-OVA IgE and IgG₁ were significantly decreased and anti-OVA IgG_{2a} were significantly increased in serum and BALF of asthmatic mice. It also decreased the leukocytes infiltration and eosinophils counts in BALF. Moreover, VAE reduced the infiltration in perivenous regions and periarterial and peribronchial regions and inflammation in alveolar wall. VAE significantly decrease Penh after OVA challenged in allergic BALB/c mice. Furthermore, we used *in vitro* cell culture system to determinate the molecular regulation mechanism. Various doses of VAE or VAE fractions were treated EL4 cells and RAW 264.7 cells to observe their cytokines modulation. It was showed that VAE significantly raised the production of IFN- γ in EL4 cells. The chloroform fraction of VA stimulated the IL-12 expression in RAW 264.7 cells. It suggested that velvet antler might effectively modulate Treg cells, regulate T cells tend to th1 cells differentiation, down-regulated allergic IgE and inflammatory cells infiltration to regulated airway hyperresponsiveness.

Keywords: Airway hyperresponsiveness, Allergic constitutions, Immunomodulation, Velvet antler.

略字表

| | |
|-------------------|---|
| AHG | Aluminum hydroxide gel |
| AHR | Airway hyperresponsiveness |
| ALN | Airway draining lymphocytes |
| APC | Antigen presenting cell |
| AP-1 | Activator protein-1 |
| BALF | Bronchoalveolar lavage fluid |
| DMEM | Dulbecco's Modification of Eagle's Medium |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide |
| DPBS | Dulbecco's phosphate buffered saline |
| ELISA | Enzyme-linked immunoabsorbent assay |
| ECP | Eosinophil cationic protein |
| EDN | Eosinophil-derived neurotoxin |
| EPO | Eosinophil peroxidase |
| FACS | Fluorescence-Activated Cell Sorter |
| FBS | Fetal bovine serum |
| FcεRI | High-affinity IgE receptor I |
| GATA-3 | GATA binding protein 3 |
| HBSS | Hank's balanced salt solution |
| HRP | Horseadish peroxidase |
| H&E stain | Hematoxylin & eosin stain |
| IGF | Insulin-like growth factor |
| IgE | Immunoglobulin E |
| IgG ₁ | Immunoglobulin G ₁ |
| IgG _{2a} | Immunoglobulin G _{2a} |
| IFN-γ | Interferon-gamma |
| IL | Interleukin |
| LTC ₄ | Leukotriene C ₄ |
| MBP | Major basic protein |

| | |
|----------------|--|
| MHC | major histocomparibility complex class |
| NFATs | Nuclear factor of activated T cells |
| NF- κ B | Nuclear factor- κ B |
| OVA | Ovalbumin |
| PAF | Platelet activating factor |
| PAS stain | Periodic Acid-Schiff stain |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PEF | Peak expiratory flow |
| PGD2 | Prostaglandin D2 |
| PIF | Peak inspiratory flow |
| PMA | Phorbol 12-myristate 13-acetate |
| SATA | Signal transducer and activator of transcription |
| Te | Expiratory time |
| TMB | Tetramethyl-benzidine Substrate Solution |
| T-bet | T-box expressed in T cells |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| RT | Relaxation time |
| VAE | Velvet antler extracts |

貳、前言

中醫歷代醫書常記載，認為鹿茸可壯元陽、補氣血、益精髓，服用後可身強體壯，改變骨本。文獻發現，鹿茸水萃物可藉由減少細胞激素生成以抑制誘發膠原蛋白佐劑型關節炎的發生。每日腹腔注射 (intraperitoneal, i.p.) 50 µg/kg 以上鹿茸水萃物，可抑制大鼠腹股溝周圍淋巴細胞因佐劑型關節炎而生成之 T 細胞激素如 IL-2；亦可抑制巨噬細胞生成細胞激素如 IL-1β、IL-6 及 TNF-α；鹿茸萃取物可藉由抑制蝕骨細胞分化以抑制蝕骨作用 (Kim *et al.*, 2003)。唐巍然等 (1998) 以鹿茸精餵食環磷醯胺所導致的免疫抑制狀態模式小鼠，可提高血清中 IgG 含量。唐巍然等 (2000) 亦發現免疫功能不全模式小鼠口服鹿茸多糖 (Pilose antler polysaccharide, PAPS) 6 日後，可增強其 T 細胞功能，並有免疫調節功用，使免疫功能不全模式小鼠的抗體生成數恢復正常。中國藥物學者多認為鹿茸為無毒性藥物，服用後一般無嚴重副作用，偶爾有胃腸道障礙、皮膚潮紅、搔癢感、噁心等症狀。Zhang H *et al.* (2000) 在鹿茸毒性測試試驗中發現，以鹿茸 2 g/kg 進行 subacute toxicity test (1 g/kg, 90 days)，均未出現中毒症狀或死亡，病理檢查也未發現組織病理發生異常。但鹿茸在中醫上屬於補陽藥材，若服用不善，易發生吐血、血尿、頭暈、中風等症狀。

氣喘是一種世界性且常見的疾病，發作時可能相當嚴重甚至會導致死亡。據兒童氣喘與過敏症國際研究 (International Study of Asthma and Allergies in Childhood, ISAAC) 估計，依照此趨勢，西元 2025 年將有 45% 到 59% 的世界人口有氣喘病。過敏性氣喘為一種慢性呼吸道疾病，其主要特徵包括：呼吸道過度反應 (airway hyperresponsiveness, AHR)，呼吸道黏液分泌增加，以及呼吸道重塑 (remodeling)。患者呼吸道中常有大量的嗜酸性白血球 (eosinophils) 及 CD4⁺ T 細胞浸潤。活化後的 CD4⁺ T 細胞可分化成第一型輔助細胞 (type I helper T cells, Th1 cells) 或第二型輔助細胞 (type II helper T cells, Th2 cells)，若 Th1/Th2 之間不平衡則易發生免疫疾病，如過敏性氣喘。當過敏原與 IgE 結合後，形成複合體結合至肥大細胞的 IgE receptors (FcεRI)，使肥大細胞活化，產生去顆粒化，釋放出許多過敏性介質，導致支氣管平滑肌收縮、黏液分泌增加、血管通透性增加及呼吸困難。此種反應發生的時間相當迅速，僅需 15 至 30 分鐘達高峰，維持 1 至 2 小時，稱為早期反應 (early phase reaction)。而 naïve T 細胞在 IL-4 的幫助下會趨向發展為 Th2 cells，IL-4 也抑制巨噬細胞 (macrophage) 活性，阻斷 IFN-γ 活化巨噬細胞，並刺激肥大細胞生長及發育。此外嗜酸性白血球在受到由 Th2 cells 及肥大細胞所分泌的 IL-5 活化後，成熟，釋放出發炎性蛋白質，可直接破壞呼吸道上皮細胞使細胞剝落，加強呼吸道過度反應，及造成嗜鹼性白血球 (basophils) 和肥大細胞的去顆粒化，使呼吸道過度反應加劇。嗜酸性白血球亦會釋放出大量過敏性介質使呼吸道平滑肌收縮、增加血管通透性，而可能吸引更多嗜酸性白血球聚集至呼吸道，導致呼吸道過度收縮及發炎反應持續進行，此反應約在激發後 6 至 12 小時發生，可延續 2 至 3 天之久，稱為後期反應 (late phase reaction)。

目前尚無根治氣喘的方式。西醫對氣喘疾病的治療以長期抑制呼吸道發炎反應與緩解反應症狀的藥物治療為主，包括類固醇（corticosteroids）、支氣管擴張劑（bronchodilators）等，但長期使用可能反而產生呼吸道過度反應或藥效減退，且有副作用。而根據行政院衛生署 2002 年調查中，發現約 30 至 40% 氣喘患者會同時尋求相關的中醫藥或民俗療法來治療或控制其病情。近年研究陸續發現許多常使用的中醫藥方劑，在動物試驗及人體臨床試驗中，對氣喘程度有程度上的減緩。

參、 文獻探討

一、 鹿茸

鹿在中國古代又稱「斑龍」，為我國傳統珍貴的藥用動物。中醫學古書多認為鹿可助腎補陽。而鹿茸為雄鹿初生幼角，又稱斑龍頂上珠，自古至今，常被當作滋補益氣、強身健骨及治療虛弱疾病之良藥。最早收錄於神農本草經中，列為中品，為中國傳統名貴藥材之一。

神農本草經記載：味甘，溫，主漏下惡血，寒熱，驚癇，益氣強志，生齒不老。

名醫別錄曰：療虛勞，洒洒如瘧，羸瘦，四肢痠疼，腰脊痛，小便利，洩精，溺血，破留血在腹，散石淋腫，骨中熱癢。

本草綱目：生精補髓、養血益陽、強筋健骨，治一切虛損，耳聾目暗，眩運虛癩。

(一)、 鹿茸來源與型態

1. 鹿科動物

鹿科動物為哺乳綱偶蹄目鹿科，主要可分為梅花鹿 (*Cervus Nippon Temminck*)、馬鹿 (*Cervus elaphus*) 及水鹿 (*Cervus unicolor Kerr*)。而台灣水鹿 (*Cervus unicolor swinhoei*) 為台灣特有亞種。分布於海拔 1500 公尺以上之原始森林中，為台灣最大型的草食性哺乳動物，頭軀幹長約 210 公分至 240 公分，尾長約 15 至 30 公分。一歲時不分支，二歲時始分支；每年約二月至四月間解角 (casting)。

2. 鹿茸來源

鹿茸為雄鹿未骨化密生茸毛之幼角，其骨質尚未硬化，內部有血液神經，質地柔軟，表面佈滿茸毛。鹿角的生長具有週期性，每年再生和脫落一次，主要分為新茸角萌發到茸毛脫落 (脫茸) 與蛻茸到硬角脫落兩階段。鹿角的組織學型態隨著不同生長階段之不同而有所差異。鹿角初自角座 (pedicle) 生長時，組織柔軟，外表被覆一層細密之茸毛，此時稱為茸角 (velvet antler)。茸角生長到後期茸毛會逐漸脫落，內不完全骨化而形成硬角，此時稱為硬角 (hard antler)。而後，鹿角在鹿隻性線萎縮時脫落，此過程稱為解角 (casting)。解角後角座開始長出新的茸角 (Bank, 1974)。

鹿角主要可分成角冠 (coronet)、主幹 (beam) 及分支 (tine) 等。鹿角的大小、分支數目、側枝位置及主幹彎曲度等外部型態具有種別與個體上的差異。鹿角之第一分枝為眉叉 (brow-tine)，第二分枝為第二叉 (bez-tine)，第三分枝為第三叉 (trez-tine)，第四分枝為第四叉 (dorsal-tine)。即使同一個體，在鹿茸不同生長階段的形態表現亦不同，或在同一生長期左右兩側表現也可能不一樣。茸毛的長短、粗細、疏密與顏色，皆可反映出鹿種或類型環境上的差異。

(二)、鹿茸分類

1. 依照採集方式

鹿茸的採集方式通常分為鋸茸與砍茸。雄鹿出生後第二年鹿茸開始生長，於第三年可開始鋸茸，每年可採收 1 至 2 次。每年採兩次者，第一次在清明後 45 至 75 天採收，第二次約在立秋前後。而砍茸是將鹿頭砍下，再將鹿茸連同頭蓋骨一併鋸下，由於此種方法會犧牲鹿隻生命，無法再採收，現今已較少使用。

2. 依照品種分類

(1). 花鹿茸

花鹿茸又稱黃毛茸，為梅花鹿未骨化之幼角，多為鋸茸和砍茸。鋸茸為圓柱狀，大多一至二分枝。一分枝者，主枝稱為大挺，長 16 至 20 公分，鋸口徑為 2 至 5 公分，側枝長 9 至 16 公分，較主枝細，頂端圓鈍，外皮多為紅棕或棕色，表面密生紅黃色或棕黃色茸毛，上密下疏，鋸面有蜂窩狀小孔，外無骨質，氣微腥，味微鹹。二分枝者，較一分枝者細，成弓型，皮為紅黃色，毛較稀疏。砍茸為帶腦骨茸，形狀與鋸茸相似，茸間約 6.6 公分，前端平齊，後端有一對分居兩旁的弧形骨俗稱虎牙，腦骨潔白無殘肉，外附腦皮，皮上密生茸毛，氣味與鋸茸相同（宋等，2000）。

(2). 馬鹿茸

馬鹿茸又稱青毛茸，為馬鹿未骨化之幼角，大多為砍茸，形狀與花鹿茸相似，但體型略大，分枝較多，表面有稜，分枝較長偏彎，茸毛粗長，為灰色或灰黑色，鋸口常見骨質，氣腥臭，味鹹。

3. 依照炮製方法分類

(1). 鹿茸片

外觀為圓形薄片，質地堅脆，氣微腥，味微鹹。不同部會切片有不同的名稱，角尖部位為血片，中上部位為粉片，下部俗稱老角片、砂片或骨片。花鹿茸血片表面為淺棕色或黃白色，外皮為紅棕或棕色，無骨質，質地堅韌；粉片及骨片較厚，表面為粉白或淺棕色，中間有蜂窩狀細孔，外皮無骨質或略帶些許骨質，週邊粗糙，為紅棕或棕色。而馬鹿茸片的表面及週邊呈灰黑色，中間為米黃色，馬鹿茸血片無骨質，質地堅韌；粉片及骨片有細蜂窩狀小孔，外皮較厚，無骨質或略具骨質。

(2). 鹿茸粉

將鹿茸燎去茸毛刮乾淨後，劈成碎塊磨研成細粉，多為灰白色或米黃色粉末。

(三)、鹿茸之品質鑑別

1. 外觀鑑別

古人認為：茸之頂尖，最首層之白如臘，油潤如脂，明之約臘片；次層白中兼黃，

純系血液貫注其中，故名之血片；最次層片有蜂窩，色紫黑透孔，俗云木通片，如木通知空通也；最次者為骨片，效力最差。

一般鹿茸外觀呈不規則圓形或橢圓，外皮為紅棕色或黑灰色，鋸口面為棕黃色，組織質地緻密為蜂窩狀細孔，外層皮成交叉重疊狀，內層骨質與外層皮接合處時而分離呈現一字型空隙者較佳。若外觀成規則圓形，顏色黃白相間，邊緣有些許光滑半透明角質，上無茸毛或其茸毛可撕斷，斷面蜂窩狀小而細而密，則可能是偽鹿茸（馬志平，1992）。

2. 水分

鹿茸中水分含量的多寡為其質量優劣之關鍵，若茸毛潮濕表示水分含量大，易生微生物，尤其是黴菌，造成鹿茸腐敗變質。可以手觸摸鹿茸皮，若不潮濕，茸毛直立，且將兩支茸輕輕地互相撞擊，若有骨質輕脆聲則為品質較佳的鹿茸。

3. 氣味及色澤

鹿茸在腐敗過程中，經過微生物及化學作用，會將蛋白質和非蛋白質含氮物分解產生氨（ NH_3 ）、硫化氫（ H_2S ）、硫醇化合物（ $\text{CH}_3\text{OH} \cdot \text{C}_2\text{H}_6\text{-SH}$ ）及 $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{H}_2\text{O}_2$ 等氣體，含有強烈的惡臭味。而菌類繁殖產生的菌絲和毒素使茸片成紫黑色或黃色。此種鹿茸易變質，為劣質品。

(四)、鹿茸之組成分

鹿茸含有許多有機物質與無機物質。包括水溶性成份的胺基酸、多肽、葡萄糖、多醣類與蛋白質等；脂溶性的磷脂類、脂肪酸、中性脂、前列腺素（prostaglandin, PG）；以及雌二醇（estradiol）、睪固酮（testosterone）與助孕固酮（progesterone）等荷爾蒙激素；其他物質尚有尿嘧啶（uracil）、尿苷（uridine）、次黃嘌呤（hypoxanthine）、肌酐（creatinine）等核苷酸、生物胺類、膽固醇、維生素 B1、B2、維生素 A 與維生素 K 等各種有機物質，以及磷、鈣、鎂、鉀與各種微量元素 Co、Cr、Mo、Cd、Ni、Se、Cu、Fe、Sr、Zn、Ba 等無機物質（鍾英傑，2005）；鹿茸含有高濃度的生長因子，包括第一型類胰島素生長因子（insulin-like growth factor 1, IGF-1）、第二型類胰島素生長因子（insulin-like growth factor 2, IGF-2）以及可促進表皮、神經細胞、細胞轉型、上皮細胞等活化的生長因子。

鹿茸中胺基酸成份占鹿茸乾重的 35%~50%，含有非常豐富的游離胺基酸與結構胺基酸。已知含有人體無法合成的必需胺基酸，如離胺酸、苯丙胺酸、白胺酸、胺酸等。凌等（1999）以放射線免疫法測定馬鹿茸中雌二醇含量為 $15.3 \pm 1.8 \text{ ng/g}$ ，梅花鹿茸中含量為 $11.4 \pm 1.3 \text{ ng/g}$ 。鹿茸各成分含量多寡因品質及提取方法不同而有所差異。如產自東北的上、中、下三等鹿茸，依序水分含量為 12.91%、11.01%、10.82%，有機物 60.44%、51.8%、49.07%，水溶性浸出物 12%、8.77%、7.02%，酒精溶性浸出物 2.31%、1.08%、0.89%，醚溶性浸出物 1.16%、0.64%、0.61%，灰分 26.65%、37.79%、40.11%。其中灰分又含鈣、磷、鎂等，水浸出物中多含膠質（柴中元，2003）。

(五)、鹿茸之藥理作用

1. 強身健骨

鹿茸有強健筋骨作用，常用於老年人精神衰弱、腰脊痠楚、肢體關節疼痛、筋骨萎軟等，可單味服用，亦可與熟地、杜仲、巴戟天等藥材形成複方使用。Kim *et al.*, (2003) 研究發現，鹿茸水萃物可藉由減少細胞激素生成以抑制第二型膠原蛋白誘發關節炎 (collagen induced arthritis, CIA) 的發生。每日腹腔注射 (intraperitoneal, ip) 50 µg/kg 以上鹿茸水萃物，可抑制大鼠腹股溝周圍淋巴細胞因佐劑型關節炎而生成之 T 細胞激素如 IL-2；亦可抑制巨噬細胞生成細胞激素如 IL-1β、IL-6 及 TNF-α。鹿茸萃物可藉由抑制蝕骨細胞分化以抑制蝕骨作用 (Kim *et al.*, 2003)。此外以鹿茸萃物餵予佐劑型關節炎大鼠二十天，可預防第二期骨關節炎中，腰椎骨骨密度及長度的減少以及調節骨更換作用 (Kim *et al.*, 2005)。利用不同極性萃取鹿茸再以萃取層刺激骨片，發現氫仿層萃物可抑制蝕骨作用，推測其氫仿層中可能含有可抑制發炎之活性物質 (Kim *et al.*, 2007)。研究發現，鹿茸的活性多肽對於軟骨細胞、表皮細胞的分裂增殖、骨折修復有明顯作用。鹿茸多肽可促進體外培養的兔骨隨間質幹細胞分化 (羅等, 2007)。此外在飼料中添加鹿茸可顯著地促進幼鼠生長速率並改善飼料轉換率。

2. 增強免疫

早期鹿茸藥性研究中，發現具有藥性之有效因子時多稱之為鹿茸精 (pantocrin)。雄性小鼠在腹腔注射鹿茸精七日後，可顯著地增強巨噬細胞的吞噬作用，且其作用可隨劑量之增加而增強。鹿茸精可增加小鼠血清中溶血素 (hemolysin) 含量，增加胸腺重量。此外，以鹿茸精餵食環磷醯胺所導致的免疫抑制狀態模式小鼠，可提高血清中 IgG 含量，其中對正常小鼠而言，低劑量鹿茸精效果最佳；而對免疫抑制狀態模式小鼠則以中劑量鹿茸精效果較好。鹿茸醇提物能提高免疫功能低下模式小鼠吞噬細胞的吞噬活性 (陳與聶等, 2000)。鹿茸成分中，鹿茸多糖 (Pilose antler polysaccharide, PAPS) 具有稱強免疫及調節的作用。免疫功能不全模式小鼠口服 PAPS 六日後，可增強免疫功能低下模式小鼠的 T 細胞功能，並有免疫調節功用，使免疫功能不全模式小鼠的抗體生成數量恢復正常 (唐等, 2000)。此外，PAPS 亦可顯著地增值淋巴細胞。PAPS 可活化免疫機制殺害腫瘤細胞，有利於腫瘤治療 (趙與陳等, 2005)。臨床上發現，患有氣喘的孩童在服用鹿茸後，組織胺有下降趨勢且 IFN-γ 值增加 (高一瑛, 1994)。

3. 增強性腺功能

中國醫藥學認為腎臟為人體生長、發育及生殖之本源。腎陽虛弱可能導致精神疲倦、四肢寒冷、腰脊酸痛等現象。研究發現，鹿茸精可刺激去勢鼠的貯精囊發育及提早小鼠性成熟 (Yudin and Dobryakov, 1974)。以高劑量離體培養鹿茸細胞餵予未成年雄性小鼠，可顯著增加未成年雄性小鼠之睪丸、前列腺素、儲精囊等重量，且增加血漿中睪固酮含量 (陳等, 1990)。SAM 品系小鼠餵予鹿茸萃液 8 天後，血漿中睪固酮濃度明顯增加，且發現雄性及雌性小鼠血漿中排卵素 (luteinizing hormone, LH) 濃度皆提高 (Wang *et al.*, 1988)。

4. 延緩衰老

服用鹿茸後透過調節神經的興奮、抑制過程和內分泌功能，促進核酸及蛋白質合成。SAM 品系小鼠以口服餵食鹿茸萃取液 8 天後，可減少肝臟及腦中 malondialdehyde 含量及單胺氧化酶 B (monoamine oxidase B, MAO-B) 活性，增加肝臟超氧化歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性 (Wang *et al.*, 1988)。鹿茸水萃物能增強老年小鼠 (24 月齡) 及幼鼠 (1 月齡) 腦、肝中 SOD 活性，降低腦、肝中丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量。而鹿茸正丁醇萃取液、鹿茸乙醚萃取液對於 MAO-B 之活性有明顯抑制作用 (Wang *et al.*, 1988)。而王與陳 (1989) 於鹿茸正丁醇萃取液中分離出尿素 (urea)、尿嘧啶 (uracil)、肌酸酐 (creatinine)、次黃嘌呤 (hypoxanthine) 等，發現尿嘧啶及次黃嘌呤可明顯抑制 MAO-B 活性。

5. 強心作用

鹿茸可使心血管系統及心肌功能異常者恢復常態，達到強心的效應。鹿茸具有降低小鼠血壓之藥效。而體外試驗中發現，鹿茸水萃液可顯著地增加體外培養之心肌細胞於低鈣培養基 (0.5 M Ca^{2+}) 中跳動振幅。Clifford *et al.* (1979) 發現鹿茸醇提物靜脈注射於狗可增加其心搏量 (stroke volume)。高劑量鹿茸萃取物，可使心臟的振幅變小，心率減慢，外周遭血管擴張，血壓降低。中劑量的鹿茸劑能增加冠狀動脈的血流量，增強心收縮力，加速心率，增大心縮幅度，提高心臟收縮量及每分鐘的輸出量，消除心肌疲勞。此外，可使心臟心律不整的個體，恢復其心跳節律，同時使心臟收縮加速。臨床上常用鹿茸制劑治療各種原因導致的心力衰竭，尤其是風濕性心臟病伴有心悸，或低血壓及其他慢性循環障礙者。

(六)、鹿茸之毒性與副作用

中國藥物學者多認為鹿茸為無毒性藥物，服用後一般無嚴重副作用，偶爾有胃腸道障礙、皮膚潮紅、搔癢感、噁心等症狀。動物實驗中發現，在小鼠過敏後再次使用靜脈注射鹿茸，不會引起過敏性休克。但鹿茸在中醫上屬於溫熱性藥材，若服用不善，易發生吐血、血尿、頭暈、中風等症狀。如外感風寒風熱，發生寒冷發熱頭痛與肢體疼痛等症狀時，忌服用鹿茸。而乾咳少痰、咯血、煩躁、舌面光剝或乾裂、口渴與兩眼乾澀昏花等症狀出現時，屬於虛熱症，倘若誤用鹿茸此類溫性補藥，輕者身體不適病情加劇，重者可能出現併發症。而近年來也有些許鹿茸副作用的報導，如刺激胃黏膜、孕婦大劑量食用鹿茸時，其雄激素引起胎兒性早熟；高血壓患者服用過度劑量鹿茸，可能引發急性心功能不全等。而 Zhang H *et al.* (2000) 在鹿茸毒性測試試驗中發現，以鹿茸 2 g/kg 進行 subacute toxicity test (1 g/kg, 90 days)，均未出現中毒症狀或死亡，病理檢查也未發現組織病理發生異常。

二、 氣喘

(一)、 氣喘定義

美國衛生研究院 (National Institutes of Health, NIH) 的國家心肺及血液研究院 (National Heart Lung and Blood Institute, NHLBI) 在 1997 年頒訂氣喘診療指引 (Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma)，將氣喘定義為一種呼吸道慢性發炎的疾病。主要特徵為不可逆的氣流阻斷、呼吸道發炎反應 (airway inflammation)、持續性的呼吸道過度反應 (airway hyperresponsiveness) 和呼吸道重塑 (airway remodeling)。許多如肥大細胞 (mast cells)、巨噬細胞 (macrophages)、嗜酸性白血球 (eosinophils)、嗜中性白血球 (neutrophils)、T 細胞、上皮細胞等細胞，以及細胞激素 (cytokines)、趨化激素 (chemokines)、分泌蛋白、黏液等細胞分泌介質浸潤於呼吸道中。好發於夜間或清晨，患者會呼吸困難，產生喘鳴聲，胸悶及咳嗽等症狀。而誘導引發出氣喘的因素很多，如吸入過敏原 (常見為花粉、塵蹣、黴菌、蟑螂糞便、寵物毛屑、灰塵)、吸入刺激物、環境中溫度及濕度變化或激烈的運動等。

氣喘大致可分為三型，免疫性外因型氣喘、非免疫性內因型氣喘和混合型氣喘。免疫性外因型氣喘大多是對於周遭環境的過敏原產生過敏反應，而這些過敏原常是空氣中的浮游物，如室內灰塵、花粉、黴菌、動物皮屑等等。當患者吸入這些浮游物後，在氣管產生一系列過敏反應，引起氣喘發作。這些導致過敏的過敏原可用皮膚試驗來測知。實驗發現此類患者血清中 IgE 值偏高，有時血中、痰中的嗜酸性白血球也偏高。而非免疫性內因型氣喘目前無法找出引起氣喘反應的過敏原，皮膚試驗呈陰性反應，或產生無法與病史配合的陽性反應，血中 IgE 值正常，嗜酸性白血球少有偏高的現象。混合性氣喘無法歸類到外因型或內因型，介於二者之間，對於外界過敏原可能有過敏，但不顯著。

(二)、 氣喘盛行率及死亡率

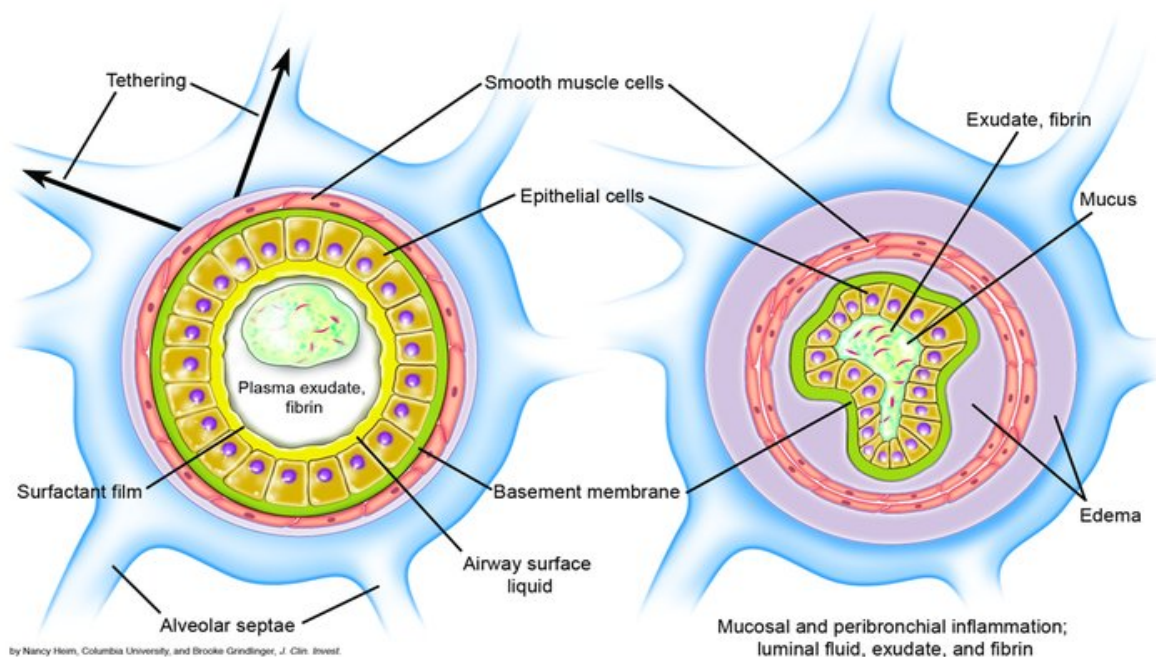
氣喘為一種世界性且常見的疾病，發作時可能相當嚴重甚至會導致死亡。據兒童氣喘與過敏症國際研究 (International Study of Asthma and Allergies in Childhood, ISAAC) 估計，目前全世界約有三億人口罹患氣喘病，日益增加的氣喘病人除了影響個人健康與造成家庭困擾外，每年耗費在治療氣喘上的醫療資源及其他的相關社會成本也相當值得重視。一些英語系國家如英國、紐西蘭、澳大利亞、美國和加拿大與其他國家相比氣喘盛行率較高，近年來非洲、拉丁美洲以及部分的亞洲國家氣喘盛行率也漸漸劇增，尤其是越趨向工業化的社會，氣喘的盛行率也越高。2006 年至 2007 年間，全球 13 至 14 歲孩童的疑似氣喘盛行率從 13.2% 增加至 13.7%，6 至 7 歲孩童則由 11.1% 增加為 11.6%。依照這種增加的趨勢，到西元 2025 年將有 45% 到 59% 的世界人口有氣喘病，也就是說在未來十多年全世界氣喘人口將急速增加。估計在西元 2025 年氣喘人口將額外增加 10 億人。根據行政院衛生署統計，1998 年呼吸道疾病 (氣喘和肺部阻塞性疾病) 的死亡率居全國第 11 位，但 2001 年已進入台灣十大死亡原因之一。自 1974 年至 1994 年，台北市向 7 至 15 所國小學童做過四次調查，發現台北市學童氣喘發生率在 1974 年為 1.30%，1985 年為 5.08%，1991 年為 5.80%，1994 年高達 10.79%，20 年間增加了八倍以上。而台北市政府衛生局於 2007 年底，委託台北市立聯合醫院針對台北市國小一年級學童共 24458 位學童進行 ISAAC 氣喘暨過敏

性疾病的問卷調查，發現台北市國小一年級學童氣喘盛行率為 20.3%。據健保局統計，近年氣喘醫療成本占總年健保醫療成本的 1.6%；氣喘用藥占總健保用藥支出的 2.4%。

(三)、 氣喘病理特徵

過敏性氣喘為一種慢性呼吸道疾病，其主要特徵包括：1. 呼吸道過度反應 (airway hyperresponsiveness, AHR)；2. 呼吸道黏膜腫脹，黏液分泌增加，當呼吸道暴露於過敏原時會使呼吸道平滑肌產生收縮，加上發炎反應造成呼吸道變形，發生呼吸道重塑 (remodeling)。

氣喘造成咳嗽及呼吸困難主因是由於氣管阻塞。正常人的氣管上皮細胞排列整齊且無痰液。而氣喘病患的氣管上皮細胞大多不完整且充滿黏液，由於上皮細胞排列不完整，神經末稍易暴露出來，使得氣管非常敏感，易受刺激而引起平滑肌收縮。當氣管受到過敏原刺激而引起發炎反應，會分泌許多黏液，藉由咳嗽把氣管內之異物排出。但咳嗽情形較嚴重者會導致氣管內平滑肌收縮更厲害，使氣管變得更狹窄而呼吸更為困難。患者呼吸道常有大量的嗜酸性白血球與 $CD4^+$ T 細胞浸潤，且在肺泡沖洗液 (bronchoalveolar-lavage fluid, BALF) 中含有可調控發炎反應的細胞激素和趨化激素。



(Michael *et al.*, 2004)

(四)、 免疫系統

身體的免疫系統是由一系列免疫細胞、免疫球蛋白、細胞激素與補體所組成之複雜系統。免疫反應的多樣性與複雜性、各種免疫細胞之間的相互協調，為抵抗外界病

原體侵入並維持體內免疫狀況穩定的基礎。主要機制可分為兩大類，包括先天性免疫反應 (innate immunity)，又稱非專一性免疫反應；以及後天性免疫反應 (acquired immunity)。先天性免疫反應為高抗原非專一性免疫反應，辨識致病菌相關分子模組 (pathogen associated molecular pattern, PAMP)。若先天性免疫反應無法有效清除外來病原菌時，便經由抗原呈獻細胞 (antigen presenting cells, APCs) 為始產生一連串的免疫反應，則為後天性免疫反應。

免疫系統由許多組織、器官、免疫細胞及分子所組成。骨髓 (bone marrow) 的骨幹細胞 (stem cells) 會分化為淋巴系統 (lymphoid lineage) 及骨髓系統 (myeloid lineage)。而淋巴系統包括 T 細胞、B 細胞和自然殺手細胞 (nature killer cells, NK cells)。B 細胞在骨髓中發育成熟後，會離開骨髓，而當細胞受到抗原刺激或病原菌感染後，B 細胞會生成抗體並對此特定抗原產生記憶性，第一次接觸到的病原所產生的抗體以免疫球蛋白 M (immunoglobulin M, IgM) 為主，若曾經有相同或類似的抗原經驗時，則以生成免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 為主。T 細胞在胸腺 (thymus) 中分化及成熟，可分為 T 輔助細胞 (T helper cells, Th cells)、T 毒殺細胞 (T cytotoxic cells, Tc cells) 及 T 調節細胞 (T regulatory cells, Treg cells)。骨髓為淋巴細胞及血液細胞之發源處，骨髓與胸腺稱為中樞淋巴器官，又稱初級淋巴器官。淋巴細胞可由初級淋巴器官轉至淋巴結 (lymph node)、脾臟 (spleen) 及各組織黏膜表層淋巴組織，這些淋巴組織稱為週邊淋巴器官或次級淋巴器官 (Kuby *et al.*, 2003)。

(五)、 氣喘相關分子

1. 白血球

(1). 免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE)

免疫球蛋白 E (IgE) 是一種分泌型免疫球蛋白，分子量約 200KD，為雙硫鍵所連接的對稱性雙分子結構，重鏈為 ϵ 。當 IgE 結合至肥大細胞高度親和 IgE receptors (Fc ϵ RI)，可活化肥大細胞，產生去顆粒化，釋放介質，而產生一系列過敏反應。過敏原經過 APCs 呈現給 Th2 cells 後，B 細胞上的 B7 會與 Th2 cells 上的 CD28 結合，進而活化 T 細胞，活化的 Th2 cells 生成 IL-4，表現 CD40 ligand 與 B 細胞上的 CD40 結合，使 B 細胞被活化，而開始合成 IgE (Gould and Sutton, 2008)。半衰期約為 2 天，正常人血清中 IgE 含量極少，約為 0.1 至 0.9 $\mu\text{g/ml}$ ，通常男性略高於女性。過敏體質或過敏疾病患者，血清中 IgE 明顯高於正常人。

(2). 免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)

重鏈為 γ ，免疫球蛋白 G (IgG) 主要由脾臟、淋巴結中的漿細胞合成分泌，屬於體液免疫反應 (humoral mediated immunity)，為血清中濃度最高之免疫球蛋白，約占總免疫球蛋白的 70 至 75%。IgG 可通過胎盤，提供新生兒免疫力。人體中具有四種亞型 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄；而小鼠的四種亞型為 IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃。其中 IgG₁ 與 Th2 cells 有關；而 IgG_{2a} 與 Th1 cells 有關。

2. 細胞激素

(1). 介白素 4 (Interleukin-4, IL-4)

IL-4 分子量約 18KD，可促使 T 細胞在接觸抗原後分化為 Th2 cells，再分泌大量的 IL-4。IL-4 會抑制巨噬細胞活性，阻斷 IFN- γ 活化巨噬細胞並藉由增加第二型主要組織相容複合物 (major histocompatibility complex class II, MHC II) 的表現而活化的 B 細胞分泌 IgE 進而引起過敏反應。環境中存有 IL-4 時，會刺激 Th0 cells 分化為 Th2 cells，並抑制巨噬細胞與樹突細胞 (Dendritic cells, DC cells) 分泌 IL-12，進而抑制 Th1 cells 的分化。

(2). 介白素 5 (Interleukin-5, IL-5)

IL-5 分子量約 45 至 50KD，由 Th2 cells 及肥大細胞分泌，可刺激 B 細胞生長，促進嗜酸性白血球生長與分化，而誘使氣喘患者產生發炎反應及肺部浸潤情形。

(3). 介白素 12 (Interleukin-12, IL-12)

IL-12 分子量約 70KD，由 p35 與 p40 兩個次單元經雙硫鍵連接而成，其中 p35 在多數細胞皆有表現，但 p40 僅在活化後的 APCs 大量表現。由巨噬細胞與樹突細胞分泌，可活化自然殺手細胞，亦可促使 naïve T 細胞在接觸抗原後分化為 Th1 cells。

(4). γ 型干擾素 (Interferon-gamma, IFN- γ)

IFN 為醣蛋白的一種，目前可分成 α 、 β 、 γ 三種類型。IFN- γ 由 Th1 cells、樹突細胞、自然殺手細胞所分泌。IFN- γ 可增加 APCs 上 MHC I 及 MHC II 的表現，促使 T 細胞更進一步活化。IFN- γ 亦可促進 naïve CD4⁺ T 細胞分化成 Th1 cells 而抑制 Th2 cells 的分化。

3. 細胞介質

(1). 組織胺 (histamine)

分子量約 111，化學式為 C₅H₉N₃，為一種活性胺化合物。存在於肥大細胞、嗜鹼性白血球內，以及肺、肝和胃的黏膜組織中，與 H1 和 H2 組織胺受體結合可使各種平滑肌發生痙攣、血管擴張、通透性增加。

(2). 白三烯素 C4 (leukotriene C4, LTC4)

為脂類介質。由肥大細胞、嗜酸性白血球、嗜鹼性白血球受到刺激活化後所分泌，可使支氣管收縮、血管通透性增加，而 LTD₄ 可使血管水腫、黏液分泌增加及排除減慢、使神經纖維裸露、支氣管收縮與增生。

(3). 前列腺素 D2 (prostaglandin D2, PGD₂)

化學式為 C₂₀H₃₂O₅，為一種脂類介質。主要由肥大細胞釋放，而嗜酸性白血球、嗜鹼性白血球及 Th2 cells 亦可分泌，並存在於哺乳類腦中，可促使支氣管收縮、引起睡眠。

- (4). 血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF)
化學式為 $C_{26}H_{54}NO_7P$ ，為一種磷脂類介質。由嗜中性白血球、嗜鹼性白血球、血小板及內皮細胞分泌，可促使支氣管收縮、血小板聚集、血管擴張、使嗜酸性白血球釋放發炎性蛋白質。
- (5). 主要鹼性蛋白 (major basic protein, MBP)
為 117 個胺基酸所組成之蛋白質，由嗜酸性白血球活化成熟後釋放。MBP 可破壞黏膜上皮細胞造成損傷。
- (6). 嗜酸性白血球陽離子蛋白 (eosinophil cationic protein, ECP)
由 160 個胺基酸組成，為一種核糖核苷酸水解酶 (ribonuclease)，由嗜酸性白血球活化後釋放，可抗菌及抗寄生蟲。ECP 對支氣管上皮細胞造成極強的細胞毒性，與肝素 (heparin) 結合則能抑制 ECP 的細胞毒性。
- (7). 嗜酸性白血球神經毒素 (eosinophil-derived neurotoxin, EDN)
為嗜酸性白血球活化成熟後釋放之分泌性蛋白質，具有高等電點值。與 ECP 類似，但細胞毒性為 ECP 的 20 至 30 倍。
- (8). 嗜酸性白血球過氧化酶 (eosinophil peroxidase, EPO)
由嗜酸性白血球活化成熟後釋放。

4. 轉錄調控因子

- (1). GATA binding protein 3 (GATA-3)
GATA-3 是一個含有 zinc finger 的轉錄因子，僅在 T cell 上表現，會使 T 細胞分化時趨向 Th2 cells。GATA-3 活化後會進入細胞核內與一些 Th2 細胞激素有關的 promoter 結合，使 IL-4、IL-5、IL-13 被表現。
- (2). T-box expressed in T cells (T-bet)
T-bet 為 T-box 家族的轉錄因子之一，含有約 200 個胺基酸，藉著調控 IFN- γ 基因轉錄以促進細胞趨向 Th1 cells 的極化。

(六)、 氣喘相關細胞表面抗原分子介紹

1. CD3
分子量約 20KD，為 T 細胞表面抗原之一。
2. CD4
分子量約 55KD，多分佈於胸腺細胞、樹突細胞，為 T 細胞抗原受體次單元，可表示為 T 輔助細胞。
3. CD8
分子量約 30-34KD，為 MHC I 第一型受體。可表示為 T 毒殺細胞。

4. CD19
分子量約 95KD，為 B 細胞表面抗原之一。
5. CD25
分子量約 55KD，為 IL-2 receptor alpha chain，活化中 T 細胞、活化中 B 細胞、已活化 T 細胞、已活化 B 細胞、樹突細胞、蝕骨細胞、胸腺細胞等細胞表面皆有分佈。
6. CD69
分子量約 35-39KD。分佈於已活化 T 細胞、已活化 B 細胞、已活化 NK 細胞等。
7. CD278
分子量 55-60KD，亦稱 ICOS，為 Th2 cells 及活化 T 細胞所特有。
8. Tim-3
為 Th1 cells 特有細胞表面抗原。

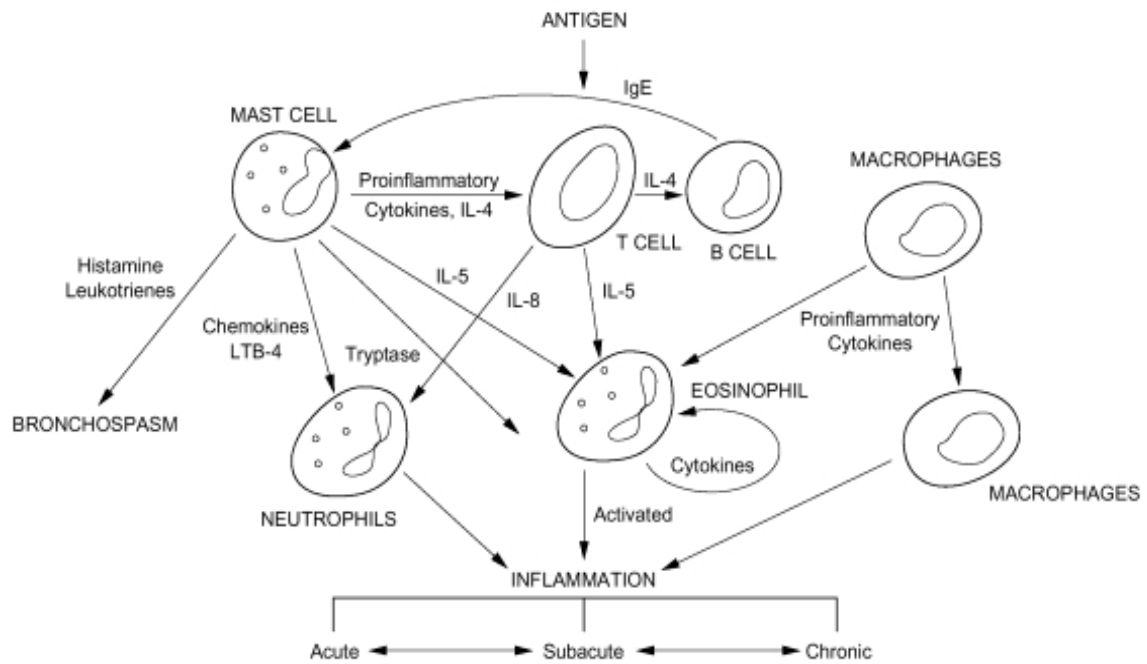
(七)、 氣喘致病機轉

許多研究已指出，CD4⁺ T 細胞在氣喘機轉中扮演著相當重要的角色。當個體接觸到過敏原時，過敏原於呼吸道中遇到 APCs 時，會被 APCs 以吞噬作用吞入，再藉由 MHC II 來把抗原片段呈現給 CD4⁺ T 細胞，活化後的 CD4⁺ T 細胞可分化成第一型輔助細胞 (type I helper T cells, Th1 cells) 或第二型輔助細胞 (type II helper T cells, Th2 cells)，進而產生一連串不同的免疫反應。目前已知 IL-12 有助於 CD4⁺ T 細胞分化為 Th1 cells；IL-4 可促使 Th2 cells 分化。而 Th1 cells 可生成的細胞激素為 interferon- γ (IFN- γ)、IL-2 及 tumor necrosis factor- α (TNF- α)，主要作用為防禦功能；Th2 cells 可生成 IL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-13，與過敏性發炎的調控有關。Th1 與 Th2 所生成的細胞激素具有拮抗作用，在體內保持著微妙的陰陽動態平衡關係，有如翹翹板。臨床研究發現，類風濕性關節炎 (Rheumatoid arthritis, RA)、紅斑性狼瘡 (Systemic lupus erythematosus, SLE) 等自體免疫疾病患者體內 Th1 cells 比例較高；而過敏反應、全身性硬皮症、異位性皮膚炎等疾病患者體內 Th2 cells 比例較高。過敏性氣喘的發炎反應和 Th1/Th2 之間不平衡有關。有過敏傾向的個體，其 T 輔助細胞會趨向發展為 Th2，為體液免疫 (humoral mediated immunity)；而較健康的個體，其 T 輔助細胞會趨向發展為 Th1，為細胞性免疫 (cell mediated immunity)。

Th2 cells 能辨識經 B 細胞內化分解所衍生的胜肽片段與 MHC II 分子結合的複合物，Th2 cells 表面之 T cell receptor (TCR) 上的 CD40 ligand 與 B 細胞的 CD40 結合；以及 IL-4 和 IL-13 因有約百分之三十的相似性可共用 IL-4 γ chain，結合至 B 細胞上的 IL-4R 及 IL-13R，活化訊息傳送路徑 (signal transducer and activator of transcription 6, STAT-6)；再加上其他成對受器配體可活化 B 細胞，促使 B 細胞分化、分裂、轉形成漿細胞而具有分泌能結合外來抗原之抗體的能力，生成分泌型免疫球蛋白 IgE。(Zavorotinskaya *et al.*, 2003)。肥大細胞具有和 IgE 高度親和的受體，當過

敏原與 IgE 結合後，形成複合體結合至肥大細胞的 IgE receptors (FcεRI)，再加上 IL-4 IL-9 IL-10，可使肥大細胞活化，產生去顆粒化 (degranulation)，釋放出組織胺 (histamine)、白三烯素 C4 (leukotriene C4, LTC4)、前列腺素 D2 (prostaglandin D2, PGD2)、血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF) 等發炎性介質 (Beck *et al.*, 1989)，導致支氣管平滑肌收縮、黏液分泌增加、血管通透性增加及呼吸困難而引起支氣管痙攣、哮喘及氣流阻塞 (Kuby *et al.*, 2003)。此種反應發生的時間相當迅速，僅需 15 至 30 分鐘達高峰，維持 1 至 2 小時，稱為早期反應 (early phase reaction)。而在早期反應中 T 毒殺細胞可抑制氣喘的發作 (Stock *et al.*, 2004)。

而 IFN-γ 會抑制 Th2 cells 的分化及促進生成 IgE。naïve T 細胞在 IL-4 的幫助下會趨向發展為 Th2 cells，IL-4 也抑制巨噬細胞活性，阻斷 IFN-γ 活化巨噬細胞，並刺激肥大細胞生長及發育 (Tykocinski *et al.*, 2005)。Th2 cells 會分泌細胞激素如 IL-4、IL-13 等使肺中上皮細胞及平滑肌細胞纖維化，釋放出 eotaxin。嗜酸性白血球在受到由 Th2 cells 及肥大細胞所分泌之 IL-5，及由肺中上皮細胞及平滑肌細胞纖維化後所釋放出的 eotaxin 活化後，成熟，釋放出主要鹼性蛋白 (major basic protein, MBP)、嗜酸性白血球陽離子蛋白 (eosinophil cationic protein, ECP)、嗜酸性白血球神經毒素 (eosinophil-derived neurotoxin, EDN) 和嗜酸性白血球過氧化酶 (eosinophil peroxidase, EPO) 等發炎性蛋白質，MBP、ECP、EDN 可直接破壞呼吸道上皮細胞使細胞剝落，加強呼吸道過度反應，及造成嗜鹼性白血球 (basophils) 和肥大細胞的去顆粒化，都會使得呼吸道過度反應更為嚴重。嗜酸性白血球亦會釋放出大量 LTC4 和 PAF，使呼吸道平滑肌收縮、增加血管通透性，更可能吸引更多嗜酸性白血球聚集至呼吸道，導致呼吸道過度收縮及發炎反應持續進行，引起呼吸道發炎現象、氣流阻塞、呼吸道過度反應。此類反應約在激發後 6 至 12 小時發生，可延續 2 至 3 天之久，稱為後期反應 (late phase reaction)。



(NHLBI, 1997)

氣喘的發炎反應藉由活化的轉錄因子 (transcription factors) 結合 promoters 上，而引起一連串呼吸道反應。與氣喘發炎反應有關的轉錄因子包括 nuclear factor- κ B (NF- κ B)、nuclear factor of activated T cells (NFATs)、activator protein-1 (AP-1)、cyclic AMP response element binding protein (CREB protein) 及許多 signal transduction-activated transcription factors (STATs factors) 等。NF- κ B 最早發現於 B 細胞，具有序列特異性，可結合至免疫球蛋白 κ -light chain 基因增強子 (enhancer) 上 GGGZCTTTGG 序列，使 B 細胞及漿細胞 (plasma cells) Ig κ 之基因表現，T 細胞、單核球、巨噬細胞、內皮細胞及上皮細胞等皆含有 NF- κ B (Barnes and Karin, 1997)。研究發現，氣喘病人的呼吸道上皮細胞的 NF- κ B 明顯的被活化，抑制 NF- κ B 的活化可降低呼吸道發炎反應。NF- κ B 和 STAT6 可調控與 Th2 cells 分化增生有關的轉錄因子 GATA binding protein 3 (GATA-3)。GATA-3 是一個含有 zinc finger 的轉錄因子，僅在 T cell 上表現，會使 T 細胞分化時趨向 Th2 cells。GATA-3 活化後會進入細胞核內與一些 Th2 細胞激素有關的 promoter 結合，使 IL-4、IL-5、IL-13 被表現 (Yamashita *et al.*, 2006)。以豚草為過敏原刺激 C57BL/6J 小鼠之動物模式中發現，透過肺部原位雜交試驗發現 GATA-3 mRNA 表現於細支氣管週邊浸潤細胞，IL-4 及 IL-5 分泌量會透過嗜酸性白血球生成增加而有顯著性提高 (Justice *et al.*, 2002)。而與 GATA-3 一同特異性調控 naïve T 細胞的另一個轉錄因子為 T-box expressed in T cells (T-bet)。T-bet 由哈佛大學研究小組於 2000 年分離出，為 T-box 基因家族中新型轉錄因子，約含 200 個胺基酸，專一性表現於 Th1 cells。T-bet 為 IFN- γ 接受器 (IFN- γ R) 及 STAT-1 所調控。研究發現 T-bet 的表現會使趨向分化為 Th2 cells 的 T 細胞又趨向 Th1 cells，增加 IFN- γ 分泌量，並降低 IL-4、IL-5 分泌量 (Mullen *et al.*, 2003)。利用反轉錄病毒將 T-bet 在 EL4 淋巴瘤細胞株中大量表現，可使細胞生成內生性 IFN- γ 。T-bet 除了促進 Th1 細胞激素的生成外，也會抑止 Th2 細胞激素的分泌；同樣地 GATA-3 不僅可促進 Th2 細胞激素的生成，亦可抑止 Th1 細胞激素的生成 (Kiwamoto *et al.*, 2006)。

(八)、 氣喘治療

目前尚無根治氣喘的方式。西醫對氣喘疾病的治療，在臨床上進行診斷時，通常會觀察哮喘聲、間斷地出現氣流阻塞的狀況、氣流阻塞的現象是否部分可逆等現象，將氣喘嚴重度分為四級，分別為輕度間歇性、輕度持續性、中度持續性及重度持續性。氣喘的治療會依據嚴重程度做階梯式的處理治療。使用的藥物以長期抑制呼吸道發炎反應與緩解反應症狀的藥物治療為主。包括類固醇 (corticosteroids)、白三烯素調節劑 (leukotriene modifiers)、支氣管擴張劑 (bronchodilators)、 β 型交感神經興奮劑 (β -agonist)、抗膽鹼劑 (anticholinergics)、茶鹼製劑 (Methylxanthines) 等。支氣管擴張劑在急性氣喘發作時是個很好的緩解藥劑，但易產生耐藥性，長期使用可能產生呼吸道過度反應或藥效減退，為死亡的危險因子。而類固醇是臨床上治療氣喘的主要藥物，可以有效抑制呼吸道發炎反應，但隨著病情加重及劑量的加重，很可能產生庫辛氏症候群、腎上腺功能抑制及失調、體液及電解質失衡等副作用 (呂春美, 2001)。且這些藥物除了具有潛在的副作用外，也常常無法根治疾病。

根據行政院衛生署 2002 年調查中，發現約 30 至 40% 氣喘患者會同時尋求相關中醫藥或民俗療法來治療或控制其病情。而研究陸續發現許多常使用的中醫藥方劑，在動物試驗及人體臨床試驗中，對氣喘程度有程度上的減緩。大鼠在餵食過定喘湯

後，可降低其呼吸道過度反應及肺泡沖洗液中嗜酸性白血球的聚集數目（孫茂峰，2010）。而以卵白蛋白誘發天竺鼠過敏性氣喘模式的動物試驗中，發現小青龍湯對於天竺鼠的氣管平滑肌有放鬆效果，且在接觸過敏原 24 小時後，可減緩呼吸道中嗜酸性白血球數目的聚集速度，並在肺泡沖洗液及肺組織切片中發現可抑制嗜中性白血球的數目增加。

貳、 研究目的

鹿茸 (velvet antler, VA) 為鹿隻未骨化完全且密生茸毛之幼角。自古至今，鹿茸常被中國醫者用為滋補益氣、強身健骨及治療虛弱疾病之良藥，其中民間常用鹿茸泡白酒來服用。Kim *et al.* (2003) 研究發現，鹿茸水萃物在體外試驗中可抑制大鼠腹股溝淋巴結生成發炎物質前驅物的細胞激素例如IL-1 β 、IL-6、TNF- α 。Wang *et al.* (1985) 發現鹿茸可萃出一種酸性粘多醣，此醣類物質為動物結締組織之主要構成成分，且具有抗潰瘍、加速創傷癒合、促進鈣化與修復骨質等作用。而臨床試驗發現，氣喘孩童在不停用西藥治療下，服用鹿茸後，血清中組織胺 (histamine) 濃度有下降的趨勢，且IFN- γ 值增加，而白三烯素C4 (Leukotriene C4, LTC4) 含量下降 (高一瑛，1994)。但其相關調節機制尚不明瞭。因此本研究希望能藉由與鹿茸藥酒類似之炮製過程，更進一步探討鹿茸對於呼吸道過度反應之免疫調節作用。

伍、 材料與方法

一、 實驗材料

(一)、 藥品、試劑

1. 牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA, A-5503)、卵白蛋白 (ovalbumin, OVA, Chicken egg albumin, Grade V)、氫氧化鋁膠 (aluminum hydroxide gel, AHG, 13 mg/ml, Sigma A8222)、氯化鈉 (NaCl, S-6191)、Dimethyl sulfoxide (DMSO)、Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)、Con A (concanavalin A, C-2631)、LPS (lipopolysaccharide, L-9143 ; L-8274) 以上購自 Sigma 藥廠 (友和公司代理)。
2. RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, ALM51319A)、DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium, ANE18791A)、FBS (Fetal bovine serum, 092k83011)、L-glutamine 以上購自 HyClone (岑祥公司代理)。
3. Bovine serum albumin (BSA, 10857) 以上購自 USB (季勗公司代理)。
4. Gentamicine (15710-064) 以上購自 GIBICO™ (量子公司代理)。
5. Liu's stain 溶液組 (Liu' A Solution, BA-4001、Liu' B Solution, BA-4002)。
6. IL-4 cytokine ELISA kit (88-7044)、IL-5 cytokine ELISA kit、IFN- γ cytokine ELISA kit (88-7314)、IL-12 cytokine ELISA kit 以上購自 eBioscience (鉅生公司代理)。
7. Mouse IgE ELISA kit、Mouse IgG₁ ELISA kit、Mouse IgG_{2a} ELISA kit 以上購自 Bethyl (賀浚公司代理)。
8. Tween-20。
9. Sodium azide (21610) 購自 USB
10. BCA™ protein assay kit (23225、23227) 購自 PIERCE。
11. Periodic Acid-Schiff stain kit 購自 ScyTek。
12. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS, G3582) 購自 Promega。
13. 甲醇 (methanol)、正己烷 (n-Hexane)、氯仿 (chloroform)、正丁醇 (n-Butanol) 以上購自 景明化工。
14. 乙醚 (Ethyl ether, 9112302)、二甲苯 (xylene)、10% Formaldehyde 以上購自 聯工化學廠。
15. 生理食鹽水 (Saline Solution, 4AK1677) 以上購自信東。
16. 95%酒精購自華欣。

(二)、設備、器材

1. Ventilated Micro Isolator System (VMIS) 相當於 Individually Ventilated Cage System (IVC System), 由樂斯科生物科技股份有限公司製造之小鼠專用機型。
2. 24 組小鼠飼育盒 (含隔離網蓋, MC7115 w/w MCFCP)。
3. Buxco 小動物無拘束式全體呼吸量測系統 (unrestrained whole body plethysmography) MAX II 1320 Modular Unit。
4. iworx 多頻道數據記錄系統。
5. Laminar flow。
6. FACSCalibur (BD 82294R) 購自 Becton Dickinson (騰達行代理)。
7. 桌上型離心機 (HERMLE、HSIANGTAI) (保富公司代理)。
8. 落地式離心機 (KUBOTA 6200) (東興儀器公司代理)。
9. Microplate reader (Enzyme-linked immunosorbent assay) 購自 Thermo Labsystem (岑祥公司代理)。
10. ELISA washer 購自 BioTek (岑祥公司代理)。
11. 減壓濃縮機系統 (R-210) 購自 BUCHI (上泰公司代理)。
12. 5% CO₂ Incubator。
13. Water bath。
14. 顯微鏡 (Nikon E200, Nikon TS100-F) 購自 Nikon (國祥公司代理)。
15. 顯微鏡傳輸器 (Nikon DS-U2) 購自 Nikon (國祥公司代理)。
16. 1ml、5ml、10ml 針筒購自 Top。
17. 小鼠餵食管、手術器械、200 目鋼篩購自捷陞。
18. 氣管插管 (PE50 tube) 購自 Becton Dickinson。
19. 包埋盒。
20. Sealing Tape Applicator 購自 NUNC。
21. 濾紙 (Filter paper, Advantec NO.1 125mm)。
22. 6、24、96 孔洞培養盤孔洞培養盤購自 TPP、NUNC。
23. 6、10 公分培養皿購自 TPP。
24. 15 毫升、50 毫升離心管購自 NUNC。
25. 1.5ml eppendorf 購自 Axygen。
26. 無菌塑膠吸管購自 3P
27. polypropylene round-bottom tube with cap 12 × 75 mm、FACScan Flow cytometry 購自 Becton Dickinson。

二、 實驗方法

(一)、 動物飼養與分組

實驗動物選用 8 週齡，無特定病原雌性 BALB/c 小白鼠（購自國家動物研究中心，台北）。將實驗鼠隨機分為六組：Naïve 組（未給予任何處理）、Control 組（以過敏原致敏及餵食管口服給予滅菌蒸餾水 10 ml/kg/day）、及試驗組 VAEL、VAEM、VAEH（以過敏原致敏及餵食管口服給予 VAE 50 mg/kg/day、100 mg/kg/day、300 mg/kg/day）、以及正對照組 Pred.（以過敏原致敏及餵食管口服給予 Prednisolone 10 mg/kg/day）；每組老鼠有 8 隻，共六組，在 IVC system 環境下以無菌飼養籠飼養，採取任飼及飲水，環境溫度為 18 至 22°C，日夜週期為 12/12 小時。飼養方式遵循東海大學實驗動物管理小組之相關規範。

(二)、 鹿茸萃取物製備流程

實驗中所使用鹿茸於 2007 年 10 月 9 日自欣隆蔘藥行（台中）購入，共 4 兩，為 150 克，為台灣水鹿新鮮鹿茸。

1. 鹿茸酒精萃取物

先將鹿茸片研磨成粉，取粉末 30 克裝於含有 38%酒精 300 ml 的血清瓶中，於 37°C 環境中震盪萃取 14 天，再減壓濃縮將鹿茸酒精萃取液濃縮為 166.67 ml，濃縮溫度為 50°C，再將酒精萃取液裝於 2 ml 離心管中，20000 xg，離心 10 分鐘後，無菌下吸取其上清液，過濾至 1.5 ml 離心管中，取 100 µl 以冷凍乾燥方式計算出實際濃度為 10.8 mg/ml，萃取率為 0.054%。以滅菌蒸餾水將酒精萃取液稀釋成實驗所需濃度。

實驗中小鼠餵食劑量是經由美國藥物食品檢驗局（U.S Food and Drug Administration, FDA）所公告之體表面積劑量換算公式（Formula for Dose Translation Based on Body Surface Area）計算得之（附表 2 與附圖 6）。依照公式及 Suttie and Haines（1998）建議之每日成人攝食量 1050 mg/60 kg，換算成小鼠餵食量分別為 VAEL: 50 mg/kg/day、VAEM: 100 mg/kg/day、VAEH: 300 mg/kg/day，相當於人體攝食量 VAE-L: 243 mg/60 kg/day、VAE-M: 486 mg/60 kg/day、VAE-H: 1458 mg/60 kg/day。

2. 鹿茸極性分層萃取物

(1). 粗萃取

將鹿茸乾燥粉末 20 克以 200 ml 甲醇（methanol）浸泡，並分別以超音波震盪 20 分鐘，重複萃取 3 次後，將萃取液合併過濾（125 mm），並濃縮萃取液。

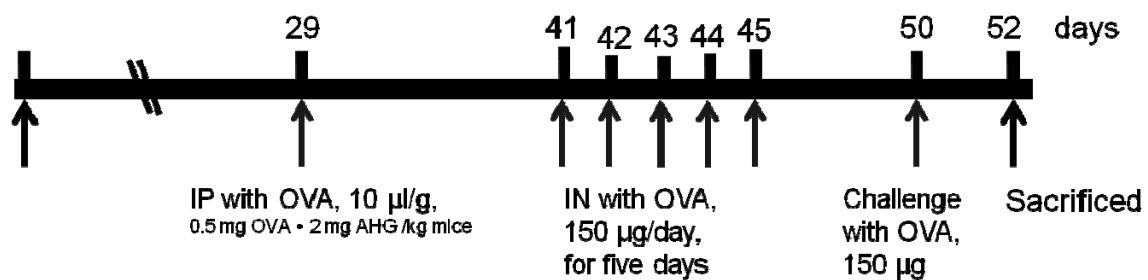
(2). 液-液萃取

先將粗萃取物以甲醇溶解後，倒入裝有 150 ml 純水之分液漏斗中。以 150 ml 正己烷（n-Hexane）進行 3 次液-液分離萃取並濃縮，濃縮溫度為 40°C，由上層獲得萃取物（VAE-H）。剩下溶液以 150 ml 氯仿（chloroform）萃取 3 次並濃縮，濃縮溫

度為 40°C，由下層獲得萃取物 (VAE-C)。剩餘溶液再以 150 ml 正丁醇 (n-Butanol) 萃取 3 次並濃縮，濃縮溫度為 60°C，由上層獲得萃取物 (VAE-B)。最後將水層之部分收集並濃縮，濃縮溫度為 60°C，獲得萃取物 (VAE-M)。萃取物重量分別為 VAE-H: 102 mg、VAE-C: 121 mg、VAE-B: 163 mg 及 VAE-M: 106 mg。以二甲基亞砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 將萃取物配製成 100 mg/ml，再以 RPMI 稀釋成實驗所需濃度。

(三)、動物致敏模式

小鼠在試驗前先採眼窩血，餵食 28 天後，再採血一次，隔天致敏，每一隻小鼠以腹腔注射 (intraperitoneal, I.P.) 方式將卵白蛋白 (ovalbumin Grade V, OVA) 10 µl/g 以氫氧化鋁膠 (aluminum hydroxide gel, AHG) 當佐劑注射至小鼠體內。第 40 天採血，隔天每隻小鼠以鼻腔滴注 (intranasal, I.N.) 方式給予 OVA 150 µg，滴注完立刻使用尖嘴鑷子張開小鼠嘴巴 5 秒鐘，使 OVA 溶液流入呼吸道，連續 5 天。於第 49 天再採血，隔天再以鼻腔滴注 OVA 150 µg，滴注完後 1 小時、3 小時、7 小時、16 小時、24 小時、48 小時測定小鼠呼吸道阻力 (Airway hyperresponsiveness, AHR)，並於 52 天犧牲採樣。



(四)、樣本收集

1. 血清 (serum)

小鼠麻醉失去痛覺反射昏厥過去後，固定小鼠四肢，頭部以內含乙醚棉球的 15 ml 離心管蓋住，用 95% 酒精噴灑全身，從左側上肢腋下剪開皮膚及血管，以 1 ml 針筒收集血液樣本 (至少 200 µl)，靜置凝固後，以 10000 ×g，4°C，離心 10 分鐘，吸取上清液保存於 -20°C 冰箱。

2. 脾臟細胞 (splenocytes)

固定小鼠四肢，剪開小鼠腹部，小心取出完整的脾臟並剔除相連的結締組織，秤重，置於含有 10% FBS/RPMI 的 6 公分培養皿中，在無菌操作台中以無菌之鋼篩 (200 目) 壓碎脾臟，倒入 15 ml 離心管，以 300 ×g，4°C，離心 10 分鐘，倒去上清液，將此脾臟細胞以 0.1 倍 HBSS (Hank's balanced salt solution) 及 2 倍 HBSS 將紅血球裂解後沉降，吸取細胞液至 15 ml 離心管，以 300 ×g，4°C，離心 10 分鐘，去除上清液，加入含有 10% FBS/RPMI。從中取 5 µl 細胞液加 290 µl analysis buffer (0.05% NaN₃，

5% FBS/RPMI/PBS) 和 5 μ l PI stock solution 以 FACS Calibur 計算細胞數。

3. 頸部週邊淋巴結 (airway draining lymphocytes, ALN)

固定小鼠四肢，剪開小鼠頸部，(勿破壞氣管及肺部)，取出頸部週邊淋巴結，置於含有 10% FBS/RPMI 的 6 公分培養皿中，以無菌之鋼篩 (200 目) 壓碎，倒入 15 ml 離心管，以 300 \times g, 4 $^{\circ}$ C，離心 10 分鐘，去除上清液，加入 10% FBS/RPMI。從中取 5 μ l 細胞液加 290 μ l analysis buffer (0.05% NaN₃, 5% FBS/RPMI/PBS) 和 5 μ l PI stock solution 以 FACS Calibur 計算細胞數。

4. 支氣管肺部沖洗液 (Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)

將小鼠腹部朝上固定小鼠四肢，用 95% 酒精消毒全身皮毛，由下顎致胸腔剪開小鼠頸部 (勿剪破肺部)，於氣管軟骨節間小心插入管子 (PE 50 tube) 約 0.5 至 1.0 公分，再以縫線綁緊氣管與管子避免因滑動而使管子脫落，管子末端接上針頭 (25 G)，將裝於 1 ml 針筒中的滅菌 PBS 緩緩推入小鼠肺臟來回沖洗內部三次，置於離心管中，收取約 3 ml 後，以 300 \times g, 4 $^{\circ}$ C，離心 10 分鐘，收集上清液，置於冰上備用。從中取 5 μ l 細胞液加 290 μ l analysis buffer (0.05% NaN₃, 5% FBS/RPMI/PBS) 和 5 μ l PI stock solution 以 FACS Calibur 計算細胞數。

5. 肺部組織

待肺部沖洗液沖洗取樣完成後，完整將肺部組織取下，秤重，分組置於 10% 中性福馬林 (formaldehyde) 中浸泡 30 天以上。

(五)、 樣品分析

1. 呼吸道阻力 (Enhanced pause)

Penh 值是一種呼吸道收縮的指標。在第 50 天以卵白蛋白鼻腔滴注致敏後，分別於 1 小時、3 小時、7 小時、16 小時、24 小時、48 小時進行小鼠呼吸道阻力測定，來觀察小鼠呼吸道收縮狀況。利用 Buxco 無拘束式全體呼吸量測系統 (unrestrained whole body plethysmography) MAX II 1320 Modular Unit 及 iworx 多頻道數據記錄系統，將小鼠放置於密閉之 Buxco 壓克力室中，蓋上黑布待小鼠穩定，當小鼠呼吸時，小量的空氣通過 pneumotachograph 並流入流出小鼠體腔時，偵測小鼠呼吸速率及氣流量變化，再經由 LabScribe 2.0 測定小鼠尖端呼氣流量 (peak expiratory flow, PEF, ml/s)、尖端吸氣流量 (peak inspiratory flow, PIF, ml/s)、呼氣時間 (expiratory time, Te, 秒)、鬆弛時間 (relaxation time, RT, 秒)，再利用公式 $Penh = (Te/RT - 1) \times (PEF/PIF)$ 算出 Penh 值。

2. 頸部週邊淋巴細胞、脾臟細胞及肺泡沖洗液中細胞表面分子抗體標記分析

使用 Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS) 分析法，以流式細胞儀 (FACS Calibur) 做分析，利用 Fluorescein isothiocyanate (FITC) 及 Phycoerythrin (PE)

染色的單株抗體計算不同表面抗體標記的比例。待測樣品在壓力下壓入流動室，不含細胞的平衡緩衝液在高壓下從鞘液管噴出，鞘液管入口方向和待測樣品成一定角度，使鞘液能包繞樣品高速流動組成一個圓形流束。待測細胞在鞘液的包圍下成單行排列，依次通過雷射照射區。被螢光染色的細胞受強烈的雷射照射後發出各種螢光，同時產生光散射。在雷射光束垂直的 90 度方向收集螢光信號，以 CELLQuest 軟體紀錄分析。

將定量過的細胞懸浮液以適當比例與 10 μ l 螢光抗體混合液均勻混合，於 4°C 避光反應 30 分鐘，培養後再加 3 ml 清洗液 (0.05% NaN_3/PBS) 清除未鍵結之抗體，離心 300 \times g，4°C，10 分鐘，倒掉上清液打散細胞後，再加入 analysis buffer (0.05% NaN_3 ，5% FBS/RPMI/PBS) 250 μ l，重新懸浮細胞，以 FACSCalibur 分析頸部週邊淋巴細胞 (ALN)、脾臟細胞 (SP) 及肺泡沖洗液 (BALF) 淋巴細胞之表面抗原分子 (CD marker) 包括 CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD69, CD278, Tim-3。

3. 血液中 OVA 特異性 IgE、IgG₁、IgG_{2a} 抗體含量測定

利用被覆溶液 (0.05 M sodium carbonate, pH 9.6) 將 OVA 過敏原稀釋至 5 μ g/ml，覆蓋在 96 孔微量離心盤上，隔夜培養於 4°C。隔日以清洗溶液 (0.05% Tween 20/PBS) 清洗三次，每次 350 μ l/well，將多餘或未固定在盤子底部的 OVA 過敏原清除，之後進行 Blocking，各 well 中加入 300 μ l 的阻斷溶液 (50 mM Tris, 0.14 NaCl, 1% BSA, pH 8.0) 靜置 30 分鐘，再以清洗溶液清洗三次，每次 350 μ l/well，加入 20 倍稀釋血清樣本，放置室溫培養一小時，再以清洗溶液清洗五次。每 well 中加入 100 μ l (稀釋 1:10) 的 Goat anti-Mouse IgE-HRP conjugate 或 Goat anti-Mouse IgG₁-HRP conjugate 或 Goat anti-Mouse IgG_{2a}-HRP conjugate 於室溫下反應一小時，倒掉後再以清洗溶液洗五次。最後加入呈色劑 tetramethyl-benzidine Substrate Solution (TMB) 觀察呈色反應，發色劑原本為無色的物質，但經過 horseradish peroxidase (HRP) 此酵素的催化後，樣品的顏色會由透明逐漸轉為水藍色，再加入 50 μ l 硫酸 (H_2SO_4 , 2M) 終止反應，此時樣品顏色會由水藍轉為黃色，以微孔盤讀值機測量波長 450 nm 下的吸光值。每實驗樣本皆三重覆，計算出 EU 值

4. IL-4、IL-5、IFN- γ 細胞激素含量測定

利用 coating solution 將 anti-mouse IL-4 capture antibody、anti-mouse IL-5 capture antibody、anti-mouse IFN- γ capture antibody 覆蓋在 96 孔微量離心盤上，包上封片膜以隔離外界的異物侵入，隔夜培養於 4°C。隔日以清洗溶液 (0.05% Tween 20/PBS) 清洗三次，每次 350 μ l/well，將多餘或未固定在盤子底部的 capture antibody 清除，之後各 well 中加入 200 μ l 的 assay diluent 室溫靜置 1 小時，再以清洗溶液清洗三次，每次 350 μ l/well，再加入標準品及樣本，放置室溫培養兩小時，再以清洗溶液清洗五次。每 well 中加入 100 μ l detection antibody 於室溫下培養一小時，倒掉後再以清洗溶液洗五次。再加入 IL-4 Avidin-HRP 或 IL-5 Avidin-HRP 或 IFN- γ Avidin-HRP 於室溫下反應 30 分鐘，倒掉後再以清洗溶液洗七次。最後加入呈色劑 TMB 觀察呈色反應，發色劑原本為無色的物質，但經過 HRP 催化後，樣品的顏色會由透明逐漸轉為水藍色，呈色後每 well 中加入 50 μ l 硫酸 (H_2SO_4 , 2M) 終止反應，此時樣品顏色會由水藍轉為黃色，以微孔盤讀值機測量波長 450 nm 下的吸光值。每實驗樣本皆三重覆及與標準

減量線來比較，以計算得樣品濃度。

Recombinant mouse IL-4 標準品依照不同濃度序列稀釋為 500 pg/ml、250 pg/ml、125 pg/ml、62.5 pg/ml、31.25 pg/ml、15.625 pg/ml、7.813 pg/ml、3.906 pg/ml。Recombinant mouse IL-5 標準品依照不同濃度序列稀釋為 500 pg/ml、250 pg/ml、125 pg/ml、62.5 pg/ml、31.25 pg/ml、15.625 pg/ml、7.813、3.906 pg/ml。Recombinant mouse IFN- γ 標準品依照不同濃度序列稀釋為 2000 pg/ml、1000 pg/ml、500 pg/ml、250 pg/ml、125 pg/ml、62.5 pg/ml、31.25 pg/ml、15.625 pg/ml。

5. 嗜酸性白血球、嗜中性白血球、淋巴球、單核球計數

Liu's stain 所用的染液包含 Liu A 和 Liu B 兩種。Liu A 含有 Eosin Y 可將鹼性物質染成橘紅色，methylene blue 可將細胞內酸性物質如細胞核及細胞質和血紅素等染成紅色；Liu B 則含有 Azure I 和 methylene blue，可將細胞核以及白血球的嗜鹼性顆粒染成藍紫色。將處理過的 BALF 細胞，利用 Shandon Cytospin 4 將細胞離心至載玻片上，離心 300 \times g，4 $^{\circ}$ C，5 分鐘，再用 Liu's stain 進行染色。以 Liu A 染 45 秒，Liu B 染 90 秒後用水沖洗多餘染劑，放置於通風處自然風乾，滴些許 xylene 將樣本封片。以顯微鏡 Nikon E200 依照型態學區分嗜酸性白血球 (eosinophils)、嗜中性白血球 (neutrophils)、淋巴球 (lymphocytes)、巨噬細胞 (macrophages)。

6. 組織病理切片

取浸泡於中性福馬林中肺部之最大葉放置於包埋盒 (cassette) 中進行石臘包埋，切片後進行蘇木素與嗜伊紅染色法 (Hematoxylin-eosin stain, H&E stain) 和過碘酸希夫染色 (Periodic acid-Schiff stain, PAS stain)。以顯微鏡 Nikon E200，Image pro 5.0 觀察拍照組織形態、細胞浸潤及黏液分泌情形，並以病理評分表做分析統計 (附表3) (Jeffrey *et al.*, 1991)。

(1). H&E stain

將含有組織之玻片置於 60 $^{\circ}$ C 中 10 至 15 分鐘，以便於進行脫臘。將玻片依序放入 xylene 3 分鐘、xylene 3 分鐘、100%酒精 3 分鐘、100%酒精 3 分鐘、95%酒精 3 分鐘、75%酒精 3 分鐘，再以蒸餾水沖洗，將蘇木素 (hematoxylin) 滴於玻片上覆蓋過組織樣本，浸潤 5 分鐘後，以自來水流沖去染劑，於蒸餾水中潤洗數秒，浸泡於 PBS 中使組織切片呈藍色 (約 5 分鐘)，至於 95%酒精 30 秒，再將伊紅試劑 (eosin) 滴於組織樣本上覆蓋 30 秒，依序置於 95%酒精、100%酒精、100%酒精數秒、xylene 5 分鐘，置於風乾處待乾，再以封片膠封片，於顯微鏡 Nikon E200，Image pro 5.0 觀察拍照。hematoxyline 為藍紫色鹼性染劑，可與細胞核內核酸結合，染上嗜鹼性細胞；而 eosin 為紅色酸性染劑，容易染上細胞質、細胞間質和嗜酸性細胞。

(2). PAS stain

以 Periodic Acid-Schiff (PAS) stain kit 染色。先將含有組織之玻片置於 60 $^{\circ}$ C 中 10 至 15 分鐘，以便於進行脫臘。將玻片依序放入 xylene 3 分鐘、xylene 3 分鐘、100%酒精 3 分鐘、100%酒精 3 分鐘、95%酒精 3 分鐘、75%酒精 3 分鐘，再以蒸餾水沖洗，將 Periodic acid solution (PAQ250) 滴於玻片上覆

蓋過組織樣本，浸潤 5 分鐘後，以蒸餾水洗淨染劑，再將 Schiff's solution (SRF250) 滴於玻片上覆蓋過組織樣本，浸潤 15 分鐘，以自來水流將染劑沖去，置於蒸餾水中潤洗數秒，滴上 Hematoxylin, Mayer's (HMM125) 覆蓋 2 至 3 分鐘，以自來水流沖去染劑，再滴上 Bluing reagent (BRT125) 浸潤 30 秒，用蒸餾水將玻片洗淨，置於 95% 酒精中脫水，置於風乾處待乾，再以封片膠封片，於顯微鏡 Nikon E200, Image pro 5.0 觀察拍照。PAS 能染多醣類、黏質醣 (mucopolysaccharide)、黏質蛋白 (mucoprotein) 及醣蛋白等。鏡檢下鮮紅色顆粒球即為 PAS 染色染上之黏液部分。

(六)、以 EL4 細胞株和 Raw 264.7 細胞株模擬體內細胞

1. 細胞株介紹

(1). EL4 細胞株

EL4 細胞為鼠科 T 淋巴瘤 (T lymphoma) 細胞株其中一種，是 C57BL/6N 小鼠經過 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene 刺激後，誘導產生的腫瘤細胞，再進行分離培養成穩定細胞株。為懸浮性細胞，外觀呈不規則圓形。

(2). Raw 264.7 細胞株

Raw 264.7 細胞為 Balb/c 小鼠巨噬細胞株，是艾伯森病毒所誘發的白血病腫瘤細胞 (Abelson murine leukemia virus-induced tumor) 之巨噬細胞、單核球細胞。為附著性細胞，外觀呈圓形。

2. 細胞計數方式

將 EL4 細胞、PBS、trypan blue 以 1:2:1 比例混合均勻，自血球計數器 (hemocytometer) 上 chamber 凹槽處加入，蓋上蓋玻片，以顯微鏡 Nikon TS100-F, 100 倍觀察。由於 trypan blue 會滲入死細胞染上藍色，而活細胞因細胞膜完整，呈透明狀。計算 1-9 個大方格之細胞總數 (數目為 25 至 200 個，方格數可視細胞總數多寡而定)，若細胞位於線上，只計上線與右線之細胞。方格之細胞總數乘以稀釋倍數，除以計算之方格數量，再乘以 10^4 ，即為每 ml 中細胞懸浮液之細胞總數。

3. EL4 細胞株生長週期分裂時間測定

將 EL4 細胞以濃度為 10^5 個/ml 於 37°C ，5% CO_2 培養 24 小時、48 小時、72 小時、96 小時後，以細胞計數方式計算細胞總數。再以趨勢線推測出細胞分裂時間。實驗樣本皆三重覆並重覆三次。

4. 鹿茸萃取物刺激 EL4 細胞增殖情形

將 EL4 細胞以細胞密度 10^5 個/ml 種於 96 孔培養盤中，以無 FBS 的 RPMI 培養於 37°C ，5% CO_2 中，待 3 小時穩定後，將培養液換成 10% FBS/RPMI，分別加入鹿茸酒精萃取物 (VAE) 0.064 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.032 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、8.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、40.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、200.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 1 ng/ml ，刺激培養 24、36、48、

64 小時，並以 RPMI 為對照組。利用 CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) 測定 EL4 細胞存活率。CellTiter 96[®] AQueous One solution reagent 含有 tetrazolium 化合物 [3-(4,5-dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS]，為金黃色化合物，可經由活細胞作用後將其還原產生紅紫色之 formazan，而死細胞則無此反應。再將 96 孔培養盤置於 37 °C 避光培養 2 小時，以微孔盤讀值機測量波長 490 nm 下的吸光值，吸光值越高表示活細胞數量越多。VAE 各組和 PMA 組皆與 RPMI 組相比，以反映出細胞增殖情形。每實驗樣本皆三重覆並重覆三次。

5. 鹿茸萃取物刺激 EL4 細胞分泌細胞激素

(1). 鹿茸酒精萃取物 (Velvet antler extracts, VAE)

將 EL4 細胞以細胞密度 10^6 個/ml 種於 24 孔培養盤中，以無 FBS 的 RPMI 培養於 37°C，5% CO₂ 中，待 3 小時穩定後，將培養液換成 10% FBS/RPMI，分別加入 VAE 0.625 µg/ml、2.5 µg/ml、10.0 µg/ml、40.0 µg/ml 及 PMA 1 ng/ml，並以 RPMI 為對照組，刺激培養 72 小時後，離心 300 ×g，4°C，10 分鐘，收取其上清液，以 ELISA 測定代表為 Th1 cells 的 IFN-γ 及代表為 Th2 cells 的 IL-4 兩種細胞激素。ELISA 測定方法同於測量小鼠體內血清及 BALF 中 IL-4、IFN-γ 細胞激素含量。每實驗樣本皆四重覆。

(2). 鹿茸不同極性萃取層 (VAE-H、VAE-C、VAE-B、VAE-M)

將 EL4 細胞以細胞密度 10^6 個/ml 種於 24 孔培養盤中，以無 FBS 的 RPMI 培養於 37°C，5% CO₂ 中，待 3 小時穩定後，將培養液換成 10% FBS/RPMI，分別加入 VAE-H、VAE-C、VAE-B、VAE-M 各 0.4 µg/ml、2.0 µg/ml、10.0 µg/ml、50.0 µg/ml 及 PMA 1 ng/ml，並以 RPMI 為對照組，刺激培養 72 小時後，離心 300 ×g，4°C，10 分鐘，收取其上清液，以 ELISA 測定 IFN-γ 及 IL-4。ELISA 測定方法同於測量小鼠體內血清及 BALF 中 IL-4、IFN-γ 細胞激素含量。每實驗樣本皆三重覆。

6. 鹿茸萃取物刺激 Raw 264.7 細胞分泌細胞激素

將 Raw 264.7 細胞以細胞密度 10^6 個/ml 種於 24 孔培養盤中，以無 FBS 的 DMEM 培養於 37°C，5% CO₂ 中，待 3 小時穩定後，將培養液換成 10% FBS/DMEM，分別加入 VAE-H、VAE-C、VAE-B、VAE-M 各 0.08 µg/ml、0.4 µg/ml、2.0 µg/ml、10.0 µg/ml、50.0 µg/ml，並以 DMEM 為對照組，刺激培養 72 小時後，離心 300 ×g，4°C，10 分鐘，收取其上清液，以 ELISA 測定 IL-12。ELISA 測定方法同於測量 EL4 細胞分泌細胞激素含量。

陸、 統計分析

一、 單因子變異數分析 (one-way analysis of variance, One-Way ANOVA)

試驗數據(病理組織切片評分除外)皆以單因子變異數分析方法進行分析,並以鄧肯多變域檢定(Duncan's multiple-range test)進行事後檢定($P < 0.05$)。(Duncan, 1955)。對照組(control)與正常組(naïve)相比以[#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ 標示差異顯著性;試驗組與對照組相比以* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 標示差異顯著性。而相同字母表示各試驗中,同處理組間,無顯著差異($P > 0.05$)。

二、 無母數分析 (Non-parametric statistics)

病理切片評分數據以無母數分析方式評估,並以Mann-Whitney U-test進行檢定。對照組(control)與正常組(naïve)相比以[#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ 標示差異顯著性;試驗組與對照組相比以* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 標示差異顯著性。

柒、 結果

一、 小鼠呼吸道過度反應之免疫調節

(一)、 小鼠體重、脾臟、胸腺與肺臟重量之變化

如表 1 與圖 1 中顯示,在 52 天試驗中不同處理之間其體重增重並無顯著性差異。而在 52 天卵白蛋白(OVA)致敏模式試驗後,經過 OVA 誘發後小鼠其對照組(control)與正常組(naïve)相比,體內脾臟重量、胸腺重量及肺臟濕重皆有顯著性地增加($P < 0.001$),表示此 OVA 誘發之氣喘模式小鼠造型成功,試驗動物對抗原(OVA)具有免疫反應。而其餘試驗組(VAEL、VAEM、VAEH、Pred.)與對照組相比下,VAEL 組、VAEM 組、VAEH 組小鼠體內胸腺重量及肺臟濕重皆無顯著性變化,VAEH 組小鼠體內脾臟重量與對照組相比有顯著性減少($P < 0.05$),而 Pred.組其小鼠體內脾臟重量及肺臟濕重皆有顯著性減少($P < 0.001$),其胸腺重量亦有顯著性降低($P < 0.01$)。顯示 Pred.組小鼠對於過敏反應有免疫調節或免疫抑制反應。

(二)、 呼吸道過度反應中肺部沖洗液細胞總數之變化

如圖 2 中顯示,在 52 天 OVA 致敏模式試驗後,經過 OVA 誘發後小鼠其 Control 組與 Naïve 組相比,肺部沖洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)細胞數有顯著性地增加($P < 0.001$)。而其餘試驗組與 Control 組相比下,VAEM 組及 VAEH 組肺部沖洗液細胞數顯著地減少($P < 0.01$),VAEL 組及 Pred.組肺部沖洗液細胞數皆明顯較 Control 組減少($P < 0.001$),顯示試驗組對於過敏反應有免疫調節或免疫抑制反應。

(三)、 呼吸道過度反應中呼吸道週邊淋巴細胞次族群之變化

呼吸道週邊淋巴結(airway draining lymphocytes, ALN)中淋巴細胞族群表現,可表示局部型的免疫反應。如圖 3、4、5、6、7 所示,結果如下:

1. T 細胞與 B 細胞組態

T 細胞($CD3^+$, $CD45^+$)和 B 細胞($CD19^+$, $CD45^+$)皆屬淋巴系統成員。與 Control 組相比,VAEM 組的 ALN 細胞中 B 細胞($CD19^+$, $CD45^+$)比例顯著地高於 Control 組($P < 0.01$),VAEL 組及 VAEH 組並無顯著性差異, Pred.組的 B 細胞比例明顯低於 Control 組($P < 0.05$)。而試驗組 T 細胞($CD3^+$, $CD45^+$)的百分比皆無顯著性差異。

2. T 細胞組態

T 細胞包括 T 輔助細胞($CD4^+$, $CD3^+$)及 T 毒殺細胞($CD8^+$, $CD3^+$)。Pred.組 T 輔助型細胞($CD4^+$, $CD3^+$)細胞百分比顯著地低於 Control 組($P < 0.01$), T 毒殺細胞($CD8^+$, $CD3^+$)顯著地高於 Control 組($P < 0.001$)。而 VAEL 組、VAEM 組、VAEH

組 ALN 細胞中 T 輔助細胞 (CD4⁺, CD3⁺) 及 T 毒殺細胞 (CD8⁺, CD3⁺) 與 Control 組相比皆無顯著性差異。

3. Th1 cells 與 Th2 cells 平衡關係

Th1 cells/Th2 cells 失衡為導致過敏之重要因子。Control 組 ALN 細胞中活化的 Th2 cells (CD278⁺, CD4⁺) 顯著地高於 Naïve 組 ($P < 0.05$)。Pred. 組中活化的 Th1 cells (Tim-3, CD4⁺) 及活化的 Th2 cells (CD278⁺, CD4⁺) 顯著地高於 Control 組 ($P < 0.001$)。而 VAEL 組、VAEM 組、VAEH 組其 ALN 細胞中活化的 Th1 cells (Tim-3, CD4⁺) 及活化的 Th2 cells (CD278⁺, CD4⁺) 與 Control 組相比皆無顯著性差異。

4. T 輔助細胞組態

與 control 相比下，Pred. 組活化中的 T 輔助細胞 (CD4⁺, CD69⁺) 細胞百分比顯著高於 Control 組 ($P < 0.01$)，已活化的 T 輔助細胞 (CD4⁺, CD25⁺) 亦明顯較高 ($P < 0.05$)。而 VAEL 組、VAEM 組、VAEH 組其 ALN 細胞中已活化的 T 輔助細胞 (CD4⁺, CD25⁺) 及活化中的 T 輔助細胞 (CD4⁺, CD69⁺) 與 Control 組相比皆無顯著性差異。

5. T 調節細胞組態

T 調節細胞可分成 Treg-1 細胞 (Tim-3, CD25⁺) 與 Treg-2 細胞 (CD278⁺, CD25⁺)。Pred. 組 ALN 中 Treg-1 細胞 (Tim-3, CD25⁺) 及 Treg-2 細胞 (CD278⁺, CD25⁺) 皆顯著地高於 Control 組 ($P < 0.001$)。而 VAEL 組、VAEM 組、VAEH 組與 Control 組相比則皆無顯著性差異。

(四)、 呼吸道過度反應中肺部沖洗液淋巴細胞次族群之變化

肺部沖洗液 (BALF) 中細胞表現可顯示肺部中過敏反應之情形。如圖 8、9、10 所示，結果如下：

1. T 細胞組態

T 細胞分為 T 輔助細胞 (CD4⁺, CD3⁺) 及 T 毒殺細胞 (CD8⁺, CD3⁺)。VAEM 組的 T 輔助型細胞 (CD4⁺, CD3⁺) 比例明顯高於 Control 組 ($P < 0.05$)，Pred. 組 T 輔助型細胞 (CD4⁺, CD3⁺) 比例明顯低於 Control 組 ($P < 0.001$)，VAEL 組及 VAEH 組的 T 輔助型細胞 (CD4⁺, CD3⁺) 與 Control 組相比並無顯著性差異；而試驗組的 T 毒殺細胞分佈百分比皆無顯著性差異。

2. Th1 cells 與 Th2 cells 平衡關係

Th1 cells/Th2 cells 失衡為導致過敏之重要因子。Control 組呼吸道周遭淋巴細胞中活化的 Th2 cells (CD278⁺, CD4⁺) 顯著地高於 Naïve 組 ($P < 0.01$)；而與 Control 組相比，VAEL 組、VAEM 組、VAEH 組活化的 Th2 cells (CD278⁺, CD4⁺) 並無顯著性差異，Pred. 組中活化的 Th2 cells (CD278⁺, CD4⁺) 明顯高於 Control 組 ($P < 0.01$)。

VAEL 組和 VAEM 組活化的 Th1 cells (Tim-3, CD4⁺) 顯著高於 Control 組 ($P < 0.05$)，VAEH 組活化的 Th1 cells (Tim-3, CD4⁺) 顯著高於 Control 組 ($P < 0.01$)，Pred. 組則無顯著性差異。

3. T 輔助細胞組態

試驗組活化中的 T 輔助細胞 (CD4⁺, CD69⁺) 及已活化的 T 輔助細胞 (CD4⁺, CD25⁺) 比例與 Control 組相比皆無顯著性差異。

(五)、呼吸道過度反應中脾臟淋巴細胞次族群之變化

脾臟為全身性免疫器官，因此脾臟中淋巴細胞次族群表現可顯示出全身性免疫情形。如圖 11、12、13、14、15 所示，結果如下：

1. T 細胞與 B 細胞組態

T 細胞 (CD3⁺, CD45⁺) 和 B 細胞 (CD19⁺, CD45⁺) 皆屬淋巴系統成員。與 Control 組相比下，Pred. 組的 T 細胞 (CD3⁺, CD45⁺) 比例顯著地高於 Control 組 ($P < 0.001$)，B 細胞 (CD19⁺, CD45⁺) 比例明顯低於 Control 組 ($P < 0.05$)；而 VAEL 組、VAEM 組、VAEH 組的 T 細胞與 B 細胞百分比皆無顯著性差異。

2. T 細胞組態

T 細胞包括 T 輔助細胞 (CD4⁺, CD3⁺) 及 T 毒殺細胞 (CD8⁺, CD3⁺)。與 Control 組相比，VAEH 組脾臟淋巴細胞中的 T 輔助型細胞 (CD4⁺, CD3⁺) 比例顯著高於 Control 組 ($P < 0.05$)，VAEL 組的 T 毒殺細胞 (CD8⁺, CD3⁺) 分布比例明顯較低 ($P < 0.05$)；而 Pred. 組 T 輔助型細胞 (CD4⁺, CD3⁺) 及 T 毒殺細胞 (CD8⁺, CD3⁺) 比例皆顯著高於 Control 組 ($P < 0.001$)。VAEM 組的 T 輔助型細胞 (CD4⁺, CD3⁺) 及 T 毒殺細胞 (CD8⁺, CD3⁺) 與 Control 組相比並無顯著性差異。

3. Th1 cells 與 Th2 cells 平衡關係

Th1 cells/Th2 cells 失衡為導致過敏之重要因子。Control 組脾臟淋巴細胞中活化的 Th2 cells (CD278⁺, CD4⁺) 顯著地高於 Naïve 組 ($P < 0.01$)；而與 Control 組相比，VAEL 組活化的 Th2 cells (CD278⁺, CD4⁺) 顯著性較低 ($P < 0.01$)，VAEH 組活化的 Th2 cells (CD278⁺, CD4⁺) 顯著性較低 ($P < 0.05$)、VAEM 組則無顯著性差異，Pred. 組中活化的 Th2 cells (CD278⁺, CD4⁺) 明顯高於 Control 組 ($P < 0.05$)。而 VAEH 組活化的 Th1 cells (Tim-3, CD4⁺) 顯著高於 Control 組 ($P < 0.05$)，VAEL 組和 VAEM 組並無顯著性差異，Pred. 組活化的 Th1 cells (Tim-3, CD4⁺) 顯著高於 Control 組 ($P < 0.01$)。

4. T 輔助細胞組態

與 Control 組相比，VAEH 組活化中的 T 輔助細胞 (CD4⁺, CD69⁺) 顯著性較高

($P < 0.05$)，VAEL 組及 VAEM 組則無顯著性差異，Pred.組中活化中的 T 輔助細胞 ($CD4^+$, $CD69^+$) 明顯高於 Control 組 ($P < 0.01$)。而 VAEM 組及 VAEH 組脾臟淋巴細胞中已活化的 T 輔助細胞 ($CD4^+$, $CD25^+$) 皆顯著高於 Control 組 ($P < 0.001$)，VAEL 組與 control 組相比無顯著性差異，Pred.組已活化的 T 輔助細胞 ($CD4^+$, $CD25^+$) 顯著高於 Control 組 ($P < 0.001$)。

5. T調節細胞組態

T調節細胞可分成Treg-1細胞 ($Tim-3$, $CD25^+$) 與Treg-2細胞 ($CD278^+$, $CD25^+$)。與Control組相比，VAEM組及VAEH組脾臟淋巴細胞中Treg-1細胞 ($Tim-3$, $CD25^+$) 顯著地高於Control組 ($P < 0.05$)，VAEL組則無顯著性差異，Pred.組中Treg-1細胞 ($Tim-3$, $CD25^+$) 明顯較高 ($P < 0.001$)。而VAEL組、VAEM組、VAEH組脾臟淋巴細胞中Treg-2細胞 ($CD278^+$, $CD25^+$) 比例與Control組相比皆無顯著性差異。Pred.組的Treg-2細胞 ($CD278^+$, $CD25^+$) 顯著高於Control組 ($P < 0.05$)。

(六)、 呼吸道過度反應中肺部沖洗液細胞激素之變化

如表 2 中顯示，在 52 天 OVA 致敏模式試驗後，經過 OVA 誘發後小鼠，其 Control 組與 Naïve 組相比，肺部沖洗液 (BALF) 中代表為 Th1 cells 的 $IFN-\gamma$ 其含量有顯著性地增加 ($P < 0.001$)；而試驗組與 Control 組相比，VAEH 組的 $IFN-\gamma$ 分泌量有顯著性地增加 ($P < 0.05$)，VAEL 組、VAEM 組及 Pred.組並無顯著性差異。而代表為 Th2 cells 的 IL-4 及 IL-5 在 Control 組小鼠 BALF 的含量顯著性地較 Naïve 組高 ($P < 0.001$)；而試驗組與 Control 組相比，VAEL 組及 VAEM 組的 IL-5 分泌量顯著地下降 ($P < 0.001$)，IL-4 分泌量並無差異。VAEH 組及 Pred.組的 IL-4 分泌量顯著地低於 Control 組 ($P < 0.05$)，IL-5 分泌量顯著地降低 ($P < 0.001$)。

(七)、 呼吸道過度反應中血清與肺部沖洗液特異性抗體變化

如表 3、4 中顯示，在 52 天 OVA 致敏模式試驗後，經過 OVA 誘發後小鼠，其 Control 組與 Naïve 組相比，全血血清中 Anti-OVA-IgE 生成量明顯高於 Naïve 組 ($P < 0.001$)；而試驗組與 Control 組相比，VAEL 組及 VAEM 組血清中 Anti-OVA-IgE 生成量顯著地降低 ($P < 0.01$)，VAEH 組血清中 Anti-OVA-IgE 生成量顯著地減少 ($P < 0.001$)，Pred.組血清中 Anti-OVA-IgE 生成量顯著地較 Control 組減低 ($P < 0.001$)。而可代表 Th2 cells 的 Anti-OVA-IgG₁ 在 Control 組的生成量顯著地高於 Naïve 組 ($P < 0.001$)；而試驗組與 Control 組相比，VAEM 組及 VAEH 組的 Anti-OVA-IgG₁ 生成量有顯著性的降低 ($P < 0.05$)，VAEL 組並無顯著性差異，Pred.組血清中 Anti-OVA-IgG₁ 生成量明顯低於 Control 組 ($P < 0.001$)。而可代表 Th1 cells 的 Anti-OVA-IgG_{2a} 在 Control 組的生成量顯著地高於 Naïve 組；而試驗組與 Control 組相比，VAEL 組、VAEM 組、VAEH 組並無顯著性地差異，Pred.組血清中 Anti-OVA-IgG_{2a} 生成量明顯低於 Control 組 ($P < 0.05$)。

而肺泡沖洗液(BALF)方面，其 Control 組與 Naïve 組相比，BALF 中 Anti-OVA-IgE

含量明顯高於 Naïve 組 ($P < 0.001$)；而試驗組與 Control 組相比，VAEL 組及 VAEM 組血清中 Anti-OVA-IgE 含量顯著地降低 ($P < 0.05$)，VAEH 組 BALF 中 Anti-OVA-IgE 生成量顯著地減少 ($P < 0.01$)，Pred.組血清中 Anti-OVA-IgE 含量顯著地較 Control 組減低 ($P < 0.001$)。而可代表 Th2 cells 的 Anti-OVA-IgG₁ 在 Control 組的含量顯著地高於 Naïve 組 ($P < 0.001$)；而試驗組與 Control 組相比，VAEL 組、VAEM 組、VAEH 組並無顯著性地差異，Pred.組 BALF 中 Anti-OVA-IgG₁ 含量明顯低於 Control 組 ($P < 0.001$)。而可代表 Th1 cells 的 Anti-OVA-IgG_{2a} 在 Control 組的含量顯著地高於 Naïve 組；而試驗組與 Control 組相比，VAEL 組、VAEM 組、VAEH 組並無顯著性地差異，Pred.組 BALF 中 Anti-OVA-IgG_{2a} 含量明顯低於 Control 組 ($P < 0.01$)。

(八)、 呼吸道過度反應中肺部沖洗液細胞浸潤種類之變化

肺部沖洗液 (BALF) 經過 Liu's stain 染色後，於顯微鏡 Nikon E200 下依照血球形態區分 BALF 中嗜酸性白血球 (eosinophils)、嗜中性白血球 (neutrophils)、淋巴球 (lymphocytes)、巨噬細胞 (macrophages)，並計算數量，再乘以 BALF 細胞總數。如圖 16 顯示，Control 組與 Naïve 組相比，BALF 中巨噬細胞、嗜酸性白血球、嗜中性白血球及淋巴球皆顯著性增加 ($P < 0.001$)。而試驗組與 Control 組相比，VAEL 組的巨噬細胞及淋巴球顯著性減少 ($P < 0.001$)，嗜酸性白血球顯著性減少 ($P < 0.01$)；VAEM 組的巨噬細胞顯著性降低 ($P < 0.001$)，嗜酸性白血球顯著性降低 ($P < 0.01$)，嗜中性白血球及淋巴球皆顯著性減少 ($P < 0.05$)；VAEH 組巨噬細胞及嗜酸性白血球明顯少於 Control 組 ($P < 0.001$)、淋巴球明顯少於 Control 組 ($P < 0.05$)；Pred.組 BALF 中巨噬細胞、嗜酸性白血球、嗜中性白血球及淋巴球數量皆有顯著性降低 ($P < 0.001$)。顯示試驗組對於過敏反應所產生之呼吸道細胞浸潤有免疫調節反應。

(九)、 肺部組織病理切片之變化

H&E 染色及 PAS 染色結果經由病理評分表進行肺泡壁發炎反應 (Alveolar wall inflammation)、靜脈週邊區域中 (Perivenous regions)、動脈週邊與支氣管週邊區域 (Periarterial & Peribronchial regions) 浸潤情形及總分數 (total score) 評分並統計分析，如表 5、6、7、8、9 所示。

1. H&E 染色

如表 5，在肺泡壁發炎反應中 Control 組與 Naïve 組相比下，肺泡壁之發炎情形顯著性地增加 ($P < 0.05$)。VAEL 組、VAEM 組、VAEH 組、Pred.組與 Control 組相比皆顯著性地減少 ($P < 0.05$)。如表 6，靜脈週邊區域中 Control 組與 Naïve 組相比，靜脈週邊之發炎細胞浸潤顯著性地增加 ($P < 0.05$)，VAEL 組、VAEH 組、Pred.組與 Control 組相比皆顯著性地減少 ($P < 0.05$)。而如表 7，動脈週邊與支氣管週邊區域中 Control 組與 Naïve 組相比肺支氣管之發炎細胞浸潤顯著性地增加，VAEL 組、VAEM 組、VAEH 組、Pred.組與 Control 組相比顯著性地減少。在總評分分數方面如表 8，Control 組與 Naïve 組相比，Control 組明顯地高於 Naïve 組 ($P < 0.05$)，VAEL 組、VAEM 組、VAEH 組與 Control 組相比皆顯著性地減少 ($P < 0.05$)。顯示 OVA 誘發之氣喘模式小鼠在接觸抗原 (OVA) 後，可引發其支氣管受損、呼吸道細胞浸潤、肺泡壁發炎。而試驗

組對於過敏反應所引發之肺泡壁發炎反應、靜脈週邊區域中及動脈週邊與支氣管週邊區域浸潤情形有減緩效果。

2. PAS 染色

在肺泡壁及支氣管週邊區域中，觀察黏液分泌情形。結果如表 9 所示，Control 組與 Naïve 組相比下，黏液分泌情形顯著性地增加 ($P < 0.05$)；VAEL 組、VAEM 組、VAEH 組、Pred. 組與 Control 組相比，黏液分泌情形皆顯著性地減少 ($P < 0.05$)。顯示抗原 (OVA) 可促使 OVA 誘發之氣喘模式小鼠分泌大量黏液於呼吸道中。而試驗組對於過敏反應所生成之黏液有減緩效果。

(十)、小鼠呼吸道過度反應之變化

如圖 19 中顯示，OVA 致敏模式小鼠在第 50 天經過 OVA 挑釁後，其 Control 組於致敏後 7 小時、16 小時、48 小時的 Penh 值皆顯著性高於 Naïve 組 ($P < 0.001$)，致敏後 1 小時、24 小時的 Penh 值皆顯著性高於 Naïve 組 ($P < 0.01$)，表示此 OVA 誘發之氣喘模式小鼠造型成功。而其餘試驗組與 Control 組相比下，VAEL 組、VAEM 組、VAEH 組於致敏後 7 小時、16 小時的 Penh 值皆顯著高於 Control 組 ($P < 0.001$)，致敏後 1 小時、24 小時的 Penh 值皆顯著高於 Control 組 ($P < 0.01$)，VAEH 組於致敏後 48 小時的 Penh 值顯著地高於 Control 組 ($P < 0.05$)。顯示鹿茸萃取物對於小鼠之呼吸道過度反應有減緩之效果。

二、以細胞模式模擬體內細胞反應

(一)、EL4 細胞生長週期

由圖 20 顯示，EL4 細胞以濃度為 10^5 個/ml 培養 24 小時後，細胞數平均為 $3.95 \pm 1.43 \times 10^5$ 個/ml；培養 48 小時後平均為 $13.90 \pm 2.99 \times 10^5$ 個/ml；培養 72 小時後平均為 $14.09 \pm 2.36 \times 10^5$ 個/ml；培養 96 小時後平均為 $11.39 \pm 0.68 \times 10^5$ 個/ml。藉由趨勢線可發現，EL4 細胞細胞數量快速增加的濃度為 6.0×10^5 個/ml 至 12.0×10^5 個/ml，因此判斷 EL4 細胞分裂時間約為 12 小時。

(二)、EL4 細胞經過鹿茸萃取物刺激後細胞增生之效果

由圖 21 顯示，EL4 細胞以初始濃度 10^5 個/ml，經過鹿茸萃取物 (VAE) 或 Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 刺激培養 24、36、48、64 小時後，加入 MTS 以測定 EL4 細胞存活率。與對照組 (RPMI 組) 相比，加入 VAE $8.0 \mu\text{g/ml}$ 、 $40.0 \mu\text{g/ml}$ 、 $200.0 \mu\text{g/ml}$ 可顯著提高 EL4 細胞刺激培養 48 小時後的增生數目 ($P < 0.05$)，代表 VAE 可促進 EL4 細胞之生長速率。

(三)、 EL4 細胞經鹿茸萃取物刺激後分泌細胞激素之變化

如表 10 顯示，EL4 細胞在經過鹿茸萃取物 (VAE) 或 PMA 刺激培養 72 小時後，收取其上清液，以 ELISA 測定代表為 Th1 cells 的 IFN- γ 及代表為 Th2 cells 的 IL-4 兩種細胞激素。結果顯示加入 VAE 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 可顯著性提高 EL4 細胞的 IFN- γ 分泌量 ($P < 0.05$)，VAE 0.625 $\mu\text{g/ml}$ 、2.5 $\mu\text{g/ml}$ 、40.0 $\mu\text{g/ml}$ 及 PMA 1 ng/ml 的添加對於 IFN- γ 分泌量並無顯著性差異。而加入 PMA 1 ng/ml 可使 IL-4 的分泌量顯著地上升 ($P < 0.01$)，加入 VAE 0.625 $\mu\text{g/ml}$ 、2.5 $\mu\text{g/ml}$ 、10.0 $\mu\text{g/ml}$ 、40.0 $\mu\text{g/ml}$ 對於 EL4 細胞株的 IL-4 分泌量皆無顯著性影響。

(四)、 EL4 細胞經鹿茸極性萃取層刺激後分泌細胞激素之變化

如表 11 顯示，EL4 細胞在經過鹿茸極性分層萃取物 (VAE-H、VAE-C、VAE-B、VAE-M) 刺激培養 72 小時後，收取其上清液，以 ELISA 測定代表為 Th1 cells 的 IFN- γ 及代表為 Th2 cells 的 IL-4 兩種細胞激素。結果顯示加入 VAE-B 20 $\mu\text{g/ml}$ 可顯著性提升 EL4 細胞的 IL-4 分泌量，VAE-H、VAE-B、VAE-M 10 $\mu\text{g/ml}$ 、20 $\mu\text{g/ml}$ 、30 $\mu\text{g/ml}$ 、40 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 及 VAE-B 10 $\mu\text{g/ml}$ 、30 $\mu\text{g/ml}$ 、40 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 的添加對於 EL4 細胞的 IL-4 分泌量皆無顯著性影響。而 IFN- γ 無法測得。

(五)、 Raw 264.7 細胞經鹿茸極性萃取層刺激後分泌 IL-12 之變化

如表 12 顯示，Raw 264.7 細胞在經過鹿茸極性分層萃取物 (VAE-H、VAE-C、VAE-B、VAE-M) 刺激培養 72 小時後，收取其上清液，以 ELISA 測定可使 naive T 細胞趨向分化為 Th1 cells 的細胞激素 IL-12。結果顯示加入 VAE-C 0.08 $\mu\text{g/ml}$ 、0.40 $\mu\text{g/ml}$ 、2.0 $\mu\text{g/ml}$ 時可顯著提升 Raw 264.7 細胞的 IL-12 分泌量，並有劑量依賴性 (dose dependent)。

捌、 討論

鹿茸 (velvet antler, VA) 為鹿隻未骨化完全且密生茸毛之幼角。自古至今，鹿茸常被中國醫者用為滋補益氣、強身健骨及治療虛弱疾病之良藥，其中民間常用鹿茸泡白酒來服用。Kim *et al.* (2003) 研究發現，鹿茸水萃物在體外試驗中可抑制大鼠腹股溝淋巴結生成 IL-2，亦可抑制發炎物質前驅物的細胞激素例如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 。而臨床試驗發現，氣喘孩童在不停用西藥治療下，服用鹿茸後，血清中組織胺 (histamine) 濃度有下降的趨勢，且 IFN- γ 值增加，而白三烯素 C4 (Leukotriene C4, LTC4) 含量下降 (高一瑛, 1994)。但其相關調節機制尚未明瞭。就中醫觀點而言，氣喘屬於古時哮喘病，病理因素以痰為主，而痰的產生乃因臟腑陰陽失調，復加外感而影響津液之運行，停積凝聚而成。現今中醫對於哮喘治療多以複方為主，根據臨床表現不同，將哮喘急性期分為寒哮及熱哮，分別以溫肺化痰及清熱化痰兩個方向治療，所用方藥也截然不同 (呂春美, 2001)。主張急則治標、緩則治本，未發以扶正氣為主、既發以攻邪氣為輔，改變病患內在體質以增強免疫力 (陳朝宗, 1998)。故本研究欲利用鹿茸萃物以評估鹿茸對於小鼠呼吸道過度反應中之調節反應。

一、 呼吸道過度反應中 T 細胞之分化

氣喘的發生主要可分為早期反應 (early phase reaction) 及晚期反應 (late phase reaction)，早期反應發生的時間相當迅速，僅需 15 至 30 分鐘達高峰，維持 1 至 2 小時，而激發後 6 至 12 小時則為後期反應，可延續 2 至 3 天之久。當個體第一次接觸到過敏原時，抗原呈獻細胞 (antigen-presenting cell, APCs) 會以吞噬作用吞入，再藉由第二型主要組織相容複合物 (major histocompatibility complex class II, MHC II) 來把抗原片段呈現給 CD4⁺ T 細胞。活化後的 CD4⁺ T 細胞可分化成第一型輔助細胞 (type I helper T cells, Th1 cells) 或第二型輔助細胞 (type II helper T cells, Th2 cells)，而有過敏傾向的個體，其 CD4⁺ T 細胞會趨向發展為 Th2 cells。由呼吸道週邊淋巴細胞 (ALN) 族群表現，可顯示肺部局部型的免疫反應。如圖 3、4、5、6、7 顯示，每日餵食 VAEL、VAEM、VAEH 之小鼠以 OVA 致敏後，其 ALN 細胞組態中，無論是 T 細胞比例、T 毒殺細胞與 T 輔助細胞、Th1/Th2、T 調節細胞或 Treg-1/Treg-2 皆無顯著性差異。可推測鹿茸萃物可能不是從呼吸道週邊 APCs 接觸到過敏原時之路徑來調節呼吸道過度反應。其中餵食 VAEM 組的小鼠 ALN 細胞中 B 細胞比例明顯高於 Control 組 ($P < 0.01$)。而餵食 prednisolone, 10 mg/kg/day 小鼠呼吸道週邊淋巴細胞 T 毒殺細胞 ($P < 0.001$) 及 T 輔助細胞 ($P < 0.01$) 皆明顯低於 Control 組；活化中的 T 輔助細胞 ($P < 0.01$) 及已活化的 T 輔助細胞 ($P < 0.05$) 明顯較高；Th1 cells、Th2 cells 及 Treg-1 cells、Treg-2 cells 明顯高於 Control 組 ($P < 0.001$)。因 CD4⁺、CD25⁺ 細胞活化後可抑制 Th1 cells 及 Th2 cells 增生，進而抑制 Th1 及 Th2 細胞分泌細胞激素，而更進一步抑制 IL-4 的分泌 (Xu *et al.*, 2003)。而在早期反應中 T 毒殺細胞可抑制氣喘的發作 (Stock *et al.*, 2004)。但此試驗犧牲時間點為再次以 OVA 挑釁後 48 小時，此時呼吸道反應應已進入晚期反應。表示 Pred. 組並非因 T 調節細胞的免疫抑制作用而抑制局部性免疫反應，亦非因 T 毒殺細胞所以引起之抑制反應。

而肺部沖洗液 (BALF) 中細胞組態可表示肺部中局部性的免疫反應。如圖 8、9 所示，餵食 VAEM 之小鼠 BALF 中 T 輔助型細胞 ($CD4^+$, $CD3^+$) 明顯較 Control 組高 ($P < 0.05$)，餵予 VAEL、VAEM ($P < 0.05$) 及 VAEH ($P < 0.01$) 之小鼠其 BALF 中活化的 Th1 cells ($Tim-3$, $CD4^+$) 明顯高於 Control 組，而活化的 Th2 cells ($CD278^+$, $CD4^+$) 細胞比例並無明顯變化，顯示 VAE 可促使局部性的 naïve T 細胞趨向分化成 Th1 cells。表 2 顯示，餵予 VAEH 之小鼠其 BALF 中 IL-4 含量明顯較低，而 IFN- γ 含量則顯著地較高。可能因 naïve T 細胞趨向分化成 Th1 cells，且因 BALF 環境中 IFN- γ 含量較多而使 Th2 cells 被抑制。而圖 10 中，小鼠經過 VAE 餵食後，BALF 中 T 調節細胞 ($CD4^+$, $CD25^+$) 及活化中 T 輔助細胞 ($CD4^+$, $CD69^+$) 比例皆無顯著性差異。表示 VAE 在局部型免疫反應中不會透過 T 調節細胞抑制 Th1 cells 及 Th2 cells 增生，而抑制 IL-4 及 IFN- γ 分泌量。而 Pred. 組其 BALF 中 T 輔助細胞的細胞比例明顯少於 Control 組 ($P < 0.001$)、Th2 cells 明顯低於 Control 組 ($P < 0.01$)。

位於脾臟中的淋巴細胞則負責平衡全身性免疫反應。如圖 11、12、13、14、15 所示，小鼠餵予 VAEL、VAEM、VAEH 後，脾臟細胞中 T 細胞與 B 細胞組成比例並無顯著性差異；而 VAEH 組的 T 輔助細胞比例明顯提高 ($P < 0.05$)，Th1 cells 及 Th2 cells 的比例也顯著地較高 ($P < 0.05$)，代表在全身性免疫方面，VAEH 組小鼠體內大量 T 細胞被活化，且分化為 Th1 cells 或 Th2 cells。而 VAEM 組及 VAEH 組脾臟淋巴細胞中已活化的 T 輔助細胞 ($CD4^+$, $CD25^+$) 皆顯著高於 Control 組 ($P < 0.001$)，Treg-1 細胞 ($Tim-3$, $CD25^+$) 顯著地高於 Control 組 ($P < 0.05$)，表示餵食 VAEM 及 VAEH 可能使得 T 調節細胞大量被活化，而引起全身性的免疫抑制反應，進而調節呼吸道反應，抑制發炎情形。此外 Pred 組其 T 細胞百分比 ($P < 0.001$)、T 輔助細胞 ($P < 0.001$)、T 毒殺細胞、Th1 cells ($P < 0.01$)、Th2 cells ($P < 0.05$)、T 調節細胞 ($P < 0.001$)、Treg-1 ($P < 0.001$)、Treg-2 ($P < 0.05$) 皆顯著地高於 Control 組，表示 Pred. 的免疫反應明顯被活化。

二、 呼吸道過度反應中 IgE 之生成

IgE 為一種分泌型免疫球蛋白。過敏原經過抗原呈獻細胞 (APCs) 呈現給 Th2 cells 後，B 細胞上的 B7 會與 Th2 cells 上的 CD28 結合，進而活化 T 細胞，活化的 Th2 cells 則分泌 IL-4，表現 CD40 ligand 與 B 細胞上的 CD40 結合，促使 B 細胞活化，而開始合成 IgE (Gould and Sutton, 2008; Zavorotinskaya *et al.*, 2003)。若過敏原再度接觸到個體，過敏原會與 IgE 結合至肥大細胞或嗜酸性白血球的高度親和 IgE receptors ($Fc\epsilon RI$)，使肥大細胞活化，產生去顆粒化，釋放出組織胺 (histamine)、白三烯素 C4 (LTC_4)、前列腺素 D2 (PGD_2)、血小板活化因子 (PAF) 等發炎性介質 (Beck *et al.*, 1989)，使上皮細胞剝落，發炎細胞浸潤，包括淋巴球、嗜酸性白血球、嗜中性白血球、單核球及巨噬細胞。而嗜酸性白血球在受到由 IL-4 和 IL-13 引發肺中上皮細胞及平滑肌細胞纖維化釋放出之 eotaxin 與 IL-5 活化後，成熟，釋放出主要鹼性蛋白 (MBP)、嗜酸性白血球陽離子蛋白 (ECP)、嗜酸性白血球神經毒素 (EDN) 和嗜酸性白血球過氧化酶 (EPO) 等發炎性蛋白質，MBP、ECP 與 EDN 可直接破壞呼吸道上皮細胞使細胞剝落，加劇呼吸道過度反應，及造成嗜鹼性白血球和肥大細胞的去顆粒化，都會使得呼吸道過度反應更為嚴重。嗜酸性白血球亦會釋放出大量 LTC_4

和 PAF，使呼吸道平滑肌收縮、增加血管通透性，吸引更多嗜酸性白血球聚集至呼吸道。而 IFN- γ 會抑制 Th2 cells 的分化及促進生成 IgE。naïve T 細胞在 IL-4 的幫助下會趨向發展為 Th2 cells，IL-4 也抑制巨噬細胞 (macrophase) 活性，阻斷 IFN- γ 活化巨噬細胞，並刺激肥大細胞生長及發育 (Tykocinski *et al.*, 2005)。如表 3、4 中顯示，餵食 VAEL ($P < 0.01$)、VAEM ($P < 0.01$)、VAEH ($P < 0.001$) 小鼠全血血清中 Anti-OVA-IgE 生成量顯著地降低。而餵食 VAEL ($P < 0.05$)、VAEM ($P < 0.05$)、VAEH ($P < 0.01$) BALF 中 Anti-OVA-IgE 生成量亦顯著地降低。代表無論是流通全身性的全血血清或代表局部性 BALF 中，較少 OVA 特異性 IgE 生成；而表 2 中顯示，餵予 VAEH 之小鼠其 BALF 中 IL-4 含量明顯較低；圖 9 中顯示 VAEH 組 BALF 中 Th2 cells 卻無顯著性低於 Control 組。推測 VAEH 可能是透過促使 naïve T 細胞趨向活化 Th1 cells，而分泌 IFN- γ ，抑制 Th2 cells 分泌 IL-4。而嗜酸性白血球活化因子 IL-5 方面，VAEL 組及 VAEM 組 VAEH 組及 Pred. 組小鼠 BALF 中 IL-5 分泌量顯著地下降 ($P < 0.001$)。如圖 16 所示，VAEL 組小鼠的巨噬細胞及淋巴球顯著性減少 ($P < 0.001$)，嗜酸性白血球顯著性減少 ($P < 0.01$)；VAEM 組小鼠的巨噬細胞顯著性降低 ($P < 0.001$)，嗜酸性白血球顯著性降低 ($P < 0.01$)，嗜中性白血球及淋巴球皆顯著性減少 ($P < 0.05$)；VAEH 組小鼠巨噬細胞及嗜酸性白血球明顯少於 Control 組 ($P < 0.001$)、淋巴球明顯少於 Control 組 ($P < 0.05$)。顯示 OVA 過敏模式小鼠經由攝取鹿茸萃取物後，小鼠 BALF 中巨噬細胞、淋巴球、嗜酸性白血球、嗜中性白血球等與發炎相關之細胞皆明顯減少，表示鹿茸萃取物可減緩肺部中細胞浸潤情形。

三、 呼吸道過度反應中經過免疫調節支氣管病理狀況

肥大細胞活化後，去顆粒化，釋放出組織胺 (histamine)、白三烯素 C4 (LTC4)、前列腺素 D2 (PGD2)、血小板活化因子 (PAF) 等發炎性介質；而嗜酸性白血球在受到 IL-5 活化後，成熟，釋放出主要鹼性蛋白 (MBP)、嗜酸性白血球陽離子蛋白 (ECP)、嗜酸性白血球神經毒素 (EDN) 和嗜酸性白血球過氧化酶 (EPO) 等發炎性蛋白質。此類發炎性介質及發炎性蛋白質會直接破壞呼吸道上皮細胞，使上皮細胞剝落，由於上皮細胞排列不完整，神經末稍易暴露出來，使得氣管非常敏感，易受刺激而引起平滑肌收縮，血管通透性增加，而發炎反應使黏液分泌增加，想藉由咳嗽將氣管內異物咳出，咳嗽情形較嚴重者會導致氣管內平滑肌收縮更為厲害，使呼吸更加困難 (Kuby *et al.*, 2003)。OVA 免疫小鼠其肺部組織病理切片評估如表 5、6、7、8、9 所示，小鼠在餵食 VAEL、VAEM、VAEH 後，皆可顯著性減緩肺泡壁發炎反應及動脈週邊與支氣管週邊區域中發炎細胞浸潤情形 ($P < 0.05$)，且顯著地減少肺泡壁及支氣管週邊區域中黏液分泌情形 ($P < 0.05$)；而餵食 VAEL 與 VAEH 可顯著減少靜脈週邊區域中發炎細胞浸潤情形 ($P < 0.05$)。顯示 VAE 可減緩 OVA 誘發之氣喘模式小鼠在接觸抗原 (OVA) 後所引發之肺泡壁發炎反應、靜脈週邊區域中及動脈週邊與支氣管週邊區域浸潤情形，亦可減少肺泡壁及支氣管週邊區域中黏液分泌。而如圖 19 所示，OVA 致敏模式小鼠致敏後 7 小時、16 小時、48 小時的 Penh 值皆顯著性高於 Naïve 組 ($P < 0.001$)，致敏後 1 小時、24 小時的 Penh 值皆顯著性高於 Naïve 組 ($P < 0.01$)，表示此 OVA 誘發之氣喘模式小鼠造型成功。而其餘試驗組與 Control 組相比下，VAEL 組、VAEM 組、VAEH 組於致敏後 7 小時、16 小時的 Penh 值皆顯著高於 Control 組 ($P < 0.001$)，致敏後 1 小時、24 小時的 Penh 值皆顯著高於 Control 組 ($P < 0.01$)，VAEH 組於致敏後 48 小時的 Penh 值顯著地高於 Control 組 ($P < 0.05$)。

顯示 OVA 過敏模式小鼠經由攝取 VAE 後對於 OVA 引起之呼吸道過度反應有減緩之效果，並趨近於正常小鼠。

四、以細胞模式模擬體內細胞

先前研究發現添加 1%、5%、10% 鹿茸萃取液於鹿茸細胞中皆會抑制其增殖情形，但可促進 HEL 細胞株之細胞增殖（陳瑞楠，2001）。而如圖 21 顯示，鹿茸酒精萃取物（VAE） 8.0 $\mu\text{g/ml}$ 、40.0 $\mu\text{g/ml}$ 、200.0 $\mu\text{g/ml}$ 可顯著提高 EL4 細胞刺激培養 48 小時後的增生數目（ $P < 0.05$ ）。顯示鹿茸酒精萃取物可促進 EL4 細胞株生長。而陳瑞楠（2001）指出，鹿茸萃取液中可抑制鹿茸細胞增殖之主要抑制因子，可能為分子量 33KD 之熱不安定分子。由於研究中採用之鹿茸萃取物萃取過程中經 50°C 環境中減壓濃縮，可抑制鹿茸細胞增殖之抑制因子可能已被破壞。

由於 Th1 cells 可分泌 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 。IFN- γ 可促使 naïve CD4⁺ T 細胞分化成 Th1 cells 而抑制 Th2 cells 的分化。IL-12 可促使 naïve T 細胞在接觸抗原後分化為 Th1 cells。而 Th2 cells 可分泌 IL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-13。IL-4 可促使 naïve T 細胞在接觸抗原後分化為 Th2 cells，再分泌大量的 IL-4；並阻斷 IFN- γ 活化巨噬細胞而抑制巨噬細胞與樹突細胞分泌 IL-12，進而抑制 Th1 cells 的分化。進而以 EL4 細胞株模擬小鼠體內 T 淋巴細胞。EL4 細胞經 VAE 刺激培養 72 小時後，收取其上清液，以 ELISA 測定 IFN- γ 及 IL-4 以探討 Th1 cells 與 Th2 cells 之分化。結果如表 10 所示，VAE 10 $\mu\text{g/ml}$ 可顯著性提高 EL4 細胞之 IFN- γ 分泌量（ $P < 0.05$ ），表示 VAE 10 $\mu\text{g/ml}$ 可促使 EL4 細胞趨向分化為 Th1 cells。

Kim *et al.*, (2007) 發現，利用不同極性萃取鹿茸，再以不同極性萃取層刺激骨片，發現氯仿層萃取物可抑制蝕骨作用，推測其氯仿層中可能含有可抑制發炎之活性物質。而王與陳（1989）發現，鹿茸正丁醇萃取液中分離出之次黃嘌呤及尿嘧啶可抑制 MAO-B 活性。因此參照（Kim *et al.*, 2007）試驗中鹿茸萃取流程得到四種不同極性之萃取層：n-Hexane 萃取層、chloroform 萃取層、n-Butanol 萃取層、methanol 萃取層。EL4 細胞經鹿茸不同極性萃取層（VAE-H、VAE-C、VAE-B、VAE-M）刺激培養 72 小時後，收取其上清液，以 ELISA 測定 IFN- γ 及 IL-4 以探討 Th1 cells 與 Th2 cells 之分化。結果如表 11 所示，VAE-B 20 $\mu\text{g/ml}$ 顯著性提升 EL4 細胞的 IL-4 分泌量，VAE-H、VAE-C、VAE-M 及 VAE-B 10 $\mu\text{g/ml}$ 、30 $\mu\text{g/ml}$ 、40 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 對於 EL4 細胞之 IL-4 分泌量皆無顯著性影響。可能因萃取方式或來源不同，鹿茸活性因子有所差異。

進而以 Raw 264.7 細胞株模擬小鼠體內巨噬細胞，Raw 264.7 細胞經 VAE-H、VAE-C、VAE-B、VAE-M 刺激培養 72 小時後，收取其上清液，以 ELISA 測定 IL-12。如表 12 所示，VAE-C 0.08 $\mu\text{g/ml}$ 、0.40 $\mu\text{g/ml}$ 、2.0 $\mu\text{g/ml}$ 可顯著提升 Raw 264.7 細胞之 IL-12 分泌量，並有劑量依賴性（dose dependent）。表示鹿茸氯仿萃取層可促使 Raw 264.7 細胞增加 IL-12 分泌量，進而促使 Th0 cells 趨向分化為 Th1 cells。

玖、 結論

口服餵予鹿茸萃取物之小鼠在外來抗原藉由 APCs 細胞呈獻給 Naïve T 細胞時，活化全身性 T 調節細胞 ($CD4^+$, $CD25^+$)，並促使 naïve T 細胞趨向分化成 Th1 cells，肺部沖洗液 (BALF) 環境中因 IFN- γ 含量較多而使 Th2 cells 被抑制，明顯降低 IL-4 與 IL-5 分泌量，進而降低過敏性 IgE 抗體生成，減緩發炎細胞於肺部浸潤情形。並可顯著地減少白血球的浸潤、減少支氣管破損及氣管黏液分泌，以舒緩呼吸道過度反應。且鹿茸酒精萃取物可顯著促進 EL4 細胞株生長，增加 EL4 細胞的 IFN- γ 分泌量；鹿茸氣仿萃取層可促使 Raw 264.7 小鼠巨噬細胞分泌 IL-12。因此鹿茸具有潛力可開發為具有保健功效之健康食品。

壹拾、參考文獻

- 王志華、趙文忠、李二秋。2000。人參、鹿茸對體液免疫功能改善的研究。今日科技 11：32-33。
- 王本祥與陳曉光。1989。次黃嘌呤對單胺氧化酶的抑制作用。藥學學報 8：573-577。
- 王琮仁。2004。分析進口鹿茸之氨基酸及銅鐵之含量。國立東華大學生物技術研究所碩士論文。
- 那琦與謝文全。1977。重輯名醫別錄。中國醫藥學院中國藥學研究所，台中。
- 李時珍。1982。本草綱目。人民衛生出版社，中國。
- 呂春美、黃曉薇、賴銘淙、李明憲、許清祥。2001。過敏性氣喘寒熱證型動物模型之建立。中國醫藥期刊 12：155-164。
- 宋玉萍、李建勳、潘錫明。2000。中藥鹿茸的品種分類和外觀鑑定。中草藥 31(8)：634-635。
- 凌雲、羅方成、李秋俠。1999。中藥鹿茸性激素的含量測定。中草藥 30(7)：499。
- 高一瑛。1994。鹿茸、西洋參、黃芩、甘草及麻杏甘石湯。台北醫學大學生藥所研究所碩士論文。
- 孫茂峰。2010。中醫臨床標準作業程序及療效評估：以氣喘、腦中風、腦性麻痺為例（全程總報告）。中醫藥年報 28(3)：69-110
- 馬志平。1992。人蔘、鹿茸、燕窩真偽品的簡易鑑別方法。福建中醫藥 23(5)：17。
- 唐巍然、聞傑、于曉紅、張德山。1998。鹿茸多醣對小鼠免疫功能的影響。中醫藥信息 15(006)：43-44。
- 唐巍然、于曉紅、聞傑、楊寶準、王桂山、張德山。2000。鹿茸多醣對免疫功能低下模型小鼠細胞免疫功能的影響。中國中醫藥科技 7(004)：234-234。
- 陳曉光、楊明、王木祥、曲文、崔勇與王岩。1990b。人工培養鹿茸細胞的藥理作用。中藥藥理與臨床 1：30-32。
- 陳俊吉。2004。老化與鹿茸給予對早老化小鼠骨骼動態及其相關內泌素變化之影響。東海大學畜產系研究所博士論文。
- 陳書明與聶向庭。2000。鹿茸醇提物對用環磷酰胺處理的小白鼠紅細胞免疫功能的影響。經濟動物學報 4(001)：23-25。

- 陳書明與聶向庭。2000。鹿茸醇提物對白細胞減少小鼠模型腹腔吞噬細胞吞噬功能的影響。山西中醫學院學報 1(001)：4-5。
- 陳朝宗。1998。腎氣丸對塵蹣激發氣喘天竺鼠呼吸道發炎與免疫之影響。中國醫藥學院中國醫學研究所碩士論文。
- 陳瑞楠。2001。鹿茸萃取液對鹿茸細胞增殖之影響。東海大學畜產系研究所碩士論文。
- 柴中元與施仁潮。2003。鹿茸，第 198 頁。浙江科學技術出版社，中國。
- 許清祥、徐昫耀、李明憲。2000。中醫平喘方劑對於過敏原特異性呼吸道發炎反應的作用機轉評估。中華醫誌 11：111-121。
- 張賢哲與蔡貴花。1984。中藥炮製及藥材。中國醫藥學院出版組：855-859。
- 黃玉儒。2003。靈芝免疫調節蛋白的作用機制及其減緩塵致敏之應用。中山醫藥大學毒理學研究所碩士論文。
- 趙詠梅與陳曉光。2005。鹿茸口服液抗炎、鎮痛、免疫增強作用的實驗研究。中國中醫藥科技 12：128-128。
- 鍾英傑。2005。梅花鹿茸的化學成分及藥理作用研究進展。長春中醫學院學報 21(003)：61-63。
- 羅翔丹，孫威，周玉，張鐵華，潘風光。2007。鹿茸活性多肽軟膠囊對大鼠免疫功效的初步研究。食品科學 28(11)：554-557。
- Banks, W. J. 1974. The ossification process of the developing antler in the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Calcif. Tissue Int.* 14:257-274.
- Barnes, P. J. and M. Karin. 1997. Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory disease. *New Eng. J. Med.* 336:1066-1071.
- Beck, L. and H. L. Spiegelberg. 1989. The polyclonal and antigen-specific IgE and IgG subclass response of mice injected with ovalbumin in alum or complete Freund's adjuvant* 1. *Cell. Immunol.* 123:1-8.
- Bousquet, J., P. Chanez, J. Y. Lacoste, G. Barneon, N. Ghavanian, I. Enander, P. Venge, S. Ahlstedt, J. Simony-Lafontaine and P. Godard. 1990. Eosinophilic inflammation in asthma. *N. Engl. J. Med.* 323:1033-1039.
- Braithwaite, M., S. Harikrishnan, R. A. Robins, C. Nichols, A. J. Fahey, L. Showe and C. S. Constantinescu. 2009. Glucocorticoids increase CD4⁺CD25⁺ cell percentage and Foxp3 expression in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* 119:239-245.

- Chen, J. Y. 1973. Chinese health foods and herb tonics. *Am. J. Chin. Med.* (Gard City. N. Y). 1:225-247.
- Clifford, D. H., M.O. Lee, C.Y. Kim and D.C. Lee. 1979. Can an extract of deer antlers alter cardiovascular dynamics. *Am. J. Chin. Med.* 7:345-350.
- Doganci, A., M. F. Neurath and S. Finotto. 2005. Mucosal immunoregulation: Transcription factors as possible therapeutic targets. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* 4:565-575.
- Feili-Hariri, M., D. H. Falkner and P. A. Morel. 2005. Polarization of naive T cells into Th1 or Th2 by distinct cytokine-driven murine dendritic cell populations: Implications for immunotherapy. *J. Leukoc. Biol.* 78:656-664.
- Gould, H. J. and B. J. Sutton. 2008. IgE in allergy and asthma today. *Nat. Rev. Immunol.* 8:205-217.
- Guidance, C. 1996. Guidance for industry. Center for Biologics Evaluation and Research (CBER).
- Hamada, K., Y. Suzaki, A. Leme, T. Ito, K. Miyamoto, L. Kobzik and H. Kimura. 2007. Exposure of pregnant mice to an air pollutant aerosol increases asthma susceptibility in offspring. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A.* 70:688-695.
- Huang, S. L., N. Kakiuchi, M. Hattori and T. Namba. 1991. A new monitoring system of cultured myocardial cell motion: Effect of pilose antler extract and cardioactive agents on spontaneous beating of myocardial cell sheets. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 39:384-387.
- JinYuarn, L. and L. BiFong. 2000. Effects of weekly vs bi-weekly ovalbumin sensitization protocols in ICR mice. *Food Science and Agricultural Chemistry.* 2:28-34.
- Kaminuma, O., A. Mori, N. Kitamura, T. Hashimoto, F. Kitamura, S. Inokuma and S. Miyatake. 2005. Role of GATA-3 in IL-5 gene transcription by CD4⁺ T cells of asthmatic patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 137 Suppl 1:55-59.
- Kao, S., S. Wang, C. Yu, H. Lei and J. Wang. 2000. The effect of chinese herbal medicine, xiao-qing-long tang (XQLT), on allergen-induced bronchial inflammation in mite-sensitized mice. *Allergy.* 55:1127-1133.
- Kenyon, N. J., K. Gohil and J. A. Last. 2003. Susceptibility to ovalbumin-induced airway inflammation and fibrosis in inducible nitric oxide synthetase-deficient mice: Mechanisms and consequences. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 191:2-11.
- Kim, K. H., K. S. Kim, B. J. Choi, K. H. Chung, Y. C. Chang, S. D. Lee, K. K. Park, H. M. Kim and C. H. Kim. 2005. Anti-bone resorption activity of deer antler aqua-acupuncture, the pilose antler of cervus korean TEMMINCK var. mantchuricus swinhoe (nokyong) in adjuvant-induced arthritic rats. *J. Ethnopharmacol.* 96:497-506.

- Kim, K. S., Y. H. Choi, K. H. Kim, Y. C. Lee, C. H. Kim, S. H. Moon, S. G. Kang and Y. G. Park. 2004. Protective and anti-arthritic effects of deer antler aqua-acupuncture (DAA), inhibiting dihydroorotate dehydrogenase, on phosphate ions-mediated chondrocyte apoptosis and rat collagen-induced arthritis. *Int. Immunopharmacol.* 4:963-973.
- Kim, Y. K., K. S. Kim, K. H. Chung, J. G. Kim, K. S. Kim, Y. C. Lee, Y. C. Chang and C. H. Kim. 2003. Inhibitory effects of deer antler aqua-acupuncture, the pilose antler of cervus korean TEMMINCK var mantchuricus swinhoe, on type II collagen-induced arthritis in rats. *Int. Immunopharmacol.* 3:1001-1010.
- Kiwamoto, T., Y. Ishii, Y. Morishima, K. Yoh, A. Maeda, K. Ishizaki, T. Iizuka, A. E. Hegab, Y. Matsuno, S. Homma, A. Nomura, T. Sakamoto, S. Takahashi and K. Sekizawa. 2006. Transcription factors T-bet and GATA-3 regulate development of airway remodeling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 174:142-151.
- Kohguchi, M., T. Kunikata, H. Watanabe, N. Kudo, T. Shibuya, T. Ishihara, K. Iwaki, M. Ikeda, S. Fukuda and M. Kurimoto. 2004. Immuno-potentiating effects of the antler-shaped fruiting body of ganoderma lucidum (rokkaku-reishi). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68:881-887.
- Kuo, Y. C., W. J. Tsai, J. Y. Wang, S. C. Chang, C. Y. Lin and M. S. Shiao. 2001. Regulation of bronchoalveolar lavage fluids cell function by the immunomodulatory agents from cordyceps sinensis. *Life Sci.* 68:1067-1082.
- Larche, M. 2007. Regulatory T cells in allergy and asthma. *Chest.* 132:1007-1014.
- Lee, M. H., J. Park, S. W. Chung, B. Y. Kang, S. H. Kim and T. S. Kim. 2004. Enhancement of interleukin-4 production in activated CD4⁺ T cells by diphtalate plasticizers via increased NF-AT binding activity. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 134:213-222.
- Lefrancois, L. and N. Lycke. 2001. Isolation of mouse small intestinal intraepithelial lymphocytes, peyer's patch, and lamina propria cells. *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 3: Unit 3.19.
- Li, Y. J., T. H. Kim, H. B. Kwak, Z. H. Lee, S. Y. Lee and G. J. Jhon. 2007. Chloroform extract of deer antler inhibits osteoclast differentiation and bone resorption. *J. Ethnopharmacol.* 113:191-198.
- Lin, J. Y., M. L. Chen, B. L. Chiang and B. F. Lin. 2006. Ganoderma tsugae supplementation alleviates bronchoalveolar inflammation in an airway sensitization and challenge mouse model. *Int. Immunopharmacol.* 6:241-251.
- Lin, J. Y., M. L. Chen and B. F. Lin. 2006. Ganoderma tsugae in vivo modulates Th1/Th2 and macrophage responses in an allergic murine model. *Food Chem. Toxicol.* 44:2025-2032.

- Liu, Y. H., C. F. Tsai, M. C. Kao, Y. L. Lai and J. J. Tsai. 2003. Effectiveness of Dp2 nasal therapy for Dp2- induced airway inflammation in mice: Using oral ganoderma lucidum as an immunomodulator. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 36:236-242.
- Mauri, C., M. Feldmann and R. O. Williams. 2003. Down-regulation of Th1-mediated pathology in experimental arthritis by stimulation of the Th2 arm of the immune response. *Arthritis Rheum.* 48:839-845.
- Michael, A. M. and A. C. John. 2004. Coagulation-dependent mechanisms and asthma. *J. Clin. Invest.* 114: 20-3.
- Motta, A. C., J. L. Vissers, R. Gras, B. C. Van Esch, A. J. Van Oosterhout and M. C. Nawijn. 2009. GITR signaling potentiates airway hyperresponsiveness by enhancing Th2 cell activity in a mouse model of asthma. *Respir. Res.* 10:93.
- National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute. 1997. Expert Panel Report II. Guidelines for the diagnosis and management of asthma. NIH publication No. 97-4053.
- Pan, H. J., H. X. Sun and Y. J. Pan. 2005. Adjuvant effect of ethanol extract of semen cuscatae on the immune responses to ovalbumin in mice. *J. Ethnopharmacol.* 99:99-103.
- Park, J., S. W. Chung, S. H. Kim and T. S. Kim. 2006. Up-regulation of interleukin-4 production via NF-AT/AP-1 activation in T cells by biochanin A, a phytoestrogen and its metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 212:188-199.
- Park, J., S. H. Kim, D. Cho and T. S. Kim. 2005. Formononetin, a phyto-oestrogen, and its metabolites up-regulate interleukin-4 production in activated T cells via increased AP-1 DNA binding activity. *Immunology.* 116:71-81.
- Park, K. R., J. H. Lee, C. Choi, K. H. Liu, D. H. Seog, Y. H. Kim, D. E. Kim, C. H. Yun and S. S. Yea. 2007. Suppression of interleukin-2 gene expression by isoeugenol is mediated through down-regulation of NF-AT and NF-kappaB. *Int. Immunopharmacol.* 7:1251-1258.
- Patel, M., D. Xu, P. Kewin, B. Choo-Kang, C. McSharry, N. C. Thomson and F. Y. Liew. 2005. Glucocorticoid-induced TNFR family-related protein (GITR) activation exacerbates murine asthma and collagen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.* 35:3581-3590.
- Reagan-Shaw, S., M. Nihal and N. Ahmad. 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 22:659-661.
- Romagnani, S. 2004. Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113:395-400.
- Seminario, M. C. and G. J. Gleich. 1994. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Curr. Opin. Immunol.* 6:860-864.

- Shin, T. Y., S. H. Kim, K. Suk, J. H. Ha, I. Kim, M. G. Lee, C. D. Jun, S. Y. Kim, J. P. Lim, J. S. Eun, H. Y. Shin and H. M. Kim. 2005. Anti-allergic effects of *lycopodium lucidum* on mast cell-mediated allergy model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 209:255-262.
- Suttie, J. M. and S. R. Haines. 1998 Evaluation of New Zealand velvet antler efficacy and diagnostic testing. *AgResearch*.
- Suh, S. J., K. S. Kim and A. Lee. 2007. Prevention of collagen-induced arthritis in mice by *cervus koreanus* TEMMINCK var. *mantchuricus* swinhoe. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23:147-153.
- Stock, P., T. Kallinich, O. Akbari, D. Quarcoo K. Gerhold U. Wahn, D. T. Umetsu and E. Hamelmann. 2004. CD8(+) T cells regulate immune responses in a murine model of allergen-induced sensitization and airway inflammation. *Eur. J. Immunol.* 34(7): 1817-27.
- Sy, L. B., Y. L. Wu, B. L. Chiang, Y. H. Wang and W. M. Wu. 2006. Propolis extracts exhibit an immunoregulatory activity in an OVA-sensitized airway inflammatory animal model. *Int. Immunopharmacol.* 6:1053-1060.
- Szabo, S. J., S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman and L. H. Glimcher. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 100:655-669.
- Takaki, H., K. Ichiyama, K. Koga, T. Chinen, G. Takaesu, Y. Sugiyama, S. Kato, A. Yoshimura and T. Kobayashi. 2008. STAT6 inhibits TGF-beta1-mediated Foxp3 induction through direct binding to the Foxp3 promoter, which is reverted by retinoic acid receptor. *J. Biol. Chem.* 283:14955-14962.
- Takaki, H., K. Ichiyama, K. Koga, T. Chinen, G. Takaesu, Y. Sugiyama, S. Kato, A. Yoshimura and T. Kobayashi. 2008. STAT6 inhibits TGF-beta1-mediated Foxp3 induction through direct binding to the Foxp3 promoter, which is reverted by retinoic acid receptor. *J. Biol. Chem.* 283:14955-14962.
- Tamachi, T., N. Watanabe, Y. Oya, S. Kagami, K. Hirose, Y. Saito, I. Iwamoto and H. Nakajima. 2007. B and T lymphocyte attenuator inhibits antigen-induced eosinophil recruitment into the airways. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 143 Suppl 1:50-55.
- Tykocinski, L. O., P. Hajkova, H. D. Chang, T. Stamm, O. Sozeri, M. Lohning, J. Hu-Li, U. Niesner, S. Kreher, B. Friedrich, C. Pannetier, G. Grutz, J. Walter, W. E. Paul and A. Radbruch. 2005. A critical control element for interleukin-4 memory expression in T helper lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 280:28177-28185.
- Umetsu, D. T. and R. H. DeKruyff. 2006. Immune dysregulation in asthma. *Curr. Opin. Immunol.* 18:727-732.
- University of South Carolina.
USA. <http://pathmicro.med.sc.edu/bowers/cell-mediated-ver2.htm>

- Voetberg, B. J., B. A. Garvy, H. K. Mayer, L. E. King and P. J. Fraker. 1994. Apoptosis accompanies a change in the phenotypic distribution and functional capacity of murine bone marrow B-cells chronically exposed to prednisolone. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 71:190-198.
- Wang, B., X. Zhao, X. Yang, S. Kaneko, M. Hattori, T. Namba and Y. Nomura. 1988. Identification of the inhibitor for monoamine oxidase B in the extract from deer antler (rokujo). *Journal of Medical and Pharmaceutical Society for WAKAN-YAKU.* 5:116-122.
- Wu, Y., H. Sun, F. Qin, Y. Pan and C. Sun. 2006. Effect of various extracts and a polysaccharide from the edible mycelia of cordyceps sinensis on cellular and humoral immune response against ovalbumin in mice. *Phytother. Res.* 20:646-652.
- Xu, D., H. Liu, M. Komai-koma, C. McSharry, J. Alexander and F. Y. Liew. 2003. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, Leishmania major infection, and colitis in mice. *J. Immunol.* 170(1): 394-9.
- Xu, G., L. Cheng, L. Lu, Y. Zhu, R. Xu, X. Yao and H. Li. 2008. Expression of T-cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-1 (TIM-1) is increased in a mouse model of asthma and relationship to GATA-3. *Life Sci.* 82:663-669.
- Yamaguchi, S., M. Kagoshima, S. Kohge and M. Terasawa. 1997. Suppressive effects of Y-24180, a long-acting antagonist for platelet-activating factor, on allergic pulmonary eosinophilia in mice. *Jpn. J. Pharmacol.* 75:129.
- Yamashita, N., H. Tashimo, H. Ishida, Y. Matsuo, H. Tamauchi, M. Terashima, I. Yoshiwara, S. Habu and K. Ohta. 2006. Involvement of GATA-3-dependent Th2 lymphocyte activation in airway hyperresponsiveness. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 290:L1045-51.
- Yudin, A. and Y. Dubryakov. 1974. A guide for the preparation and storage of uncalcified male antlers as a medicinal raw material. Reindeer antlers, Academy of Sciences of the USSR. Far East Science Centre.
- Zavorotinskaya, T., A. Tomkinson and J. E. Murphy. 2003. Treatment of experimental asthma by long-term gene therapy directed against IL-4 and IL-13. *Mol. Ther.* 7:155-162.

壹拾壹、 附錄

表 1 鹿茸萃取物對小鼠脾臟、胸腺及肺部濕重之影響

Table 1 Spleen weights, thymus weights and lung wet weights of mice treated with various concentration of velvet antler extracts (VAE) after 52-days treatment

| Groups | Spleen weight, g | Thymus weight, g | Lung wet weight, g |
|------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Naïve | 0.104±0.0070 ^a | 0.030±0.0052 ^a | 0.200±0.0296 ^a |
| OVA immunization | | | |
| Control | 0.147±0.0260 ^b | 0.036±0.0065 ^a | 0.292±0.0622 ^b |
| VAEL, 50 mg/kg | 0.131±0.0139 ^{bc} | 0.030±0.0038 ^a | 0.227±0.0753 ^{ab} |
| VAEM, 100 mg/kg | 0.141±0.0136 ^{bc} | 0.030±0.0054 ^a | 0.289±0.0594 ^b |
| VAEH, 300 mg/kg | 0.126±0.0177 ^c | 0.031±0.0065 ^a | 0.257±0.0822 ^{ab} |
| Pred., 10 mg/kg | 0.033±0.0039 ^d | 0.018±0.0089 ^b | 0.189±0.0605 ^a |

數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。

a、b、c、d：相同字母表示各試驗中，同處理組間，無顯著差異 ($P > 0.05$)。

Results are expressed as mean±SD at least 8 mice. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test.

a, b, c, d: mean with same superscripts are not significantly different among groups at the 5% level.

表 2 鹿茸萃取物對小鼠肺部沖洗液中卵白蛋白誘導之細胞激素之影響

Figure 2 Concentration of ova-induced cytokines secretion (IL-4, IL-5, IFN- γ) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of velvet antler extracts (VAE) after 52-days treatment

| Groups | IL-4, pg/ml | IL-5, pg/ml | IFN- γ , pg/ml |
|------------------|------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| Naïve | 13.870 \pm 9.169 ^a | 2.123 \pm 2.679 ^{ac} | 125.157 \pm 91.037 ^a |
| OVA immunization | | | |
| Control | 63.927 \pm 33.549 ^b | 23.712 \pm 9.010 ^b | 250.869 \pm 117.213 ^{abc} |
| VAEL, 50 mg/kg | 42.055 \pm 27.396 ^{bc} | 7.090 \pm 6.938 ^a | 377.922 \pm 196.020 ^{bc} |
| VAEM, 100 mg/kg | 42.193 \pm 13.428 ^{abc} | 4.163 \pm 5.126 ^{ac} | 414.426 \pm 148.279 ^c |
| VAEH, 300 mg/kg | 32.226 \pm 23.113 ^{ac} | 2.448 \pm 2.623 ^{ac} | 425.978 \pm 184.547 ^c |
| Pred., 10 mg/kg | 19.541 \pm 7.791 ^c | 0.645 \pm 1.059 ^c | 229.351 \pm 88.171 ^{ab} |

數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。

a、b、c、d：相同字母表示各試驗中，同處理組間，無顯著差異 ($P > 0.05$)。

Results are expressed as mean \pm SD at least 8 mice. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test.

a, b, c, d: mean with same superscripts are not significantly different among groups at the 5% level.

表 3 鹿茸萃取物對小鼠血清中特異性 OVA 抗體 (IgE、IgG₁、IgG_{2a}) 之影響

Figure 3 Effect of anti-OVA IgE, anti-OVA IgG₁, anti-OVA IgG_{2a} in serum of mice treated with various concentration of velvet antler extracts (VAE) after 52-days treatment

| Groups | IgE-EU | IgG1-EU | IgG2a-EU |
|------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Naïve | 0.016±0.003 ^a | 0.002±0.001 ^a | 0.004±0.001 ^a |
| OVA immunization | | | |
| Control | 0.342±0.053 ^b | 0.807±0.066 ^b | 0.055±0.057 ^{ab} |
| VAEL, 50 mg/kg | 0.292±0.027 ^c | 0.759±0.061 ^{bc} | 0.0220±0.317 ^{ab} |
| VAEM, 100 mg/kg | 0.294±0.029 ^c | 0.753±0.047 ^c | 0.127±0.108 ^{ab} |
| VAEH, 300 mg/kg | 0.272±0.027 ^c | 0.744±0.059 ^c | 0.234±0.334 ^b |
| Pred., 10 mg/kg | 0.021±0.012 ^a | 0.014±0.013 ^a | 0.002±0.001 ^a |

數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。

a、b、c：相同字母表示各試驗中，同處理組間，無顯著差異 ($P > 0.05$)。

Results are expressed as mean±SD at least 8 mice. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test.

a, b, c: mean with same superscripts are not significantly different among groups at the 5% level.

表 4 鹿茸萃取物對小鼠肺部沖洗液中特異性 OVA 抗體 (IgE、IgG₁、IgG_{2a}) 之影響

Figure 4 Effect of anti-OVA IgE, anti-OVA IgG₁, anti-OVA IgG_{2a} in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cells of mice treated with various concentration of velvet antler extracts (VAE) after 52-days treatment

| Groups | IgE-EU | IgG1-EU | IgG2a-EU |
|------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Naïve | 0.227±0.023 ^a | 0.167±0.175 ^a | 0.062±0.021 ^a |
| OVA immunization | | | |
| Control | 0.565±0.164 ^b | 2.014±0.333 ^b | 0.120±0.056 ^{ab} |
| VAEL, 50 mg/kg | 0.439±0.059 ^c | 1.907±0.169 ^b | 0.239±0.111 ^b |
| VAEM, 100 mg/kg | 0.435±0.086 ^c | 1.853±0.158 ^b | 0.205±0.040 ^b |
| VAEH, 300 mg/kg | 0.423±0.108 ^c | 1.842±0.125 ^b | 0.244±0.213 ^b |
| Pred., 10 mg/kg | 0.264±0.062 ^a | 0.160±0.138 ^a | 0.029±0.021 ^a |

數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。

a、b、c：相同字母表示各試驗中，同處理組間，無顯著差異 ($P > 0.05$)。

Results are expressed as mean±SD at least 8 mice. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test.

a, b, c: mean with same superscripts are not significantly different among groups at the 5% level.

表 5 鹿茸萃取物影響小鼠肺部組織病理切片中肺泡壁發炎情形之評估

Figure 5 Scales of alveolar wall inflammation of lungs from sensitized mice treated with various concentration of velvet antler extracts (VAE) by histopathological examination

| Groups | Alveolar wall inflammation | | | | Mean ^A |
|------------------|----------------------------|---|---|---|-------------------|
| | - | 1 | 2 | 3 | |
| Naïve | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| OVA immunization | | | | | |
| Control | 0 | 0 | 3 | 3 | 2.50 |
| VAEL, 50 mg/kg | 0 | 2 | 4 | 0 | 1.67* |
| VAEM, 100 mg/kg | 0 | 2 | 4 | 0 | 1.67* |
| VAEH, 300 mg/kg | 1 | 5 | 0 | 0 | 0.83* |
| Pred., 10 mg/kg | 5 | 1 | 0 | 0 | 0.17* |

數據以等級表示，結果以無母數分析方法分析後以 Mann-Whitney U-test 進行檢定。

：試驗組與對照組相比以 $P < 0.05$ 標示差異顯著性。

^A：Mean = (0×等級數 + 1×等級數 + 2×等級數 + 3×等級數) ÷ 6

Results are expressed as rank at least 6 mice. Mean data was analyzed with Non-parametric statistics and tested with Mann-Whitney U-test.

*: mean with symbol are significantly different compared to control group at the 5% level.

^A: Mean = (0×rank number + 1×rank number + 2×rank number + 3×rank number) ÷ 6

表 6 鹿茸萃取物影響小鼠肺部組織病理切片中靜脈週邊區域浸潤情形之評估

Figure 6 Scales of infiltration in peravenous regions of lungs from sensitized mice treated with various concentration of velvet antler extracts (VAE) by histopathological examination

| Groups | Infiltration in peravenous regions | | | | Mean ^A |
|------------------|------------------------------------|---|---|---|-------------------|
| | - | 1 | 2 | 3 | |
| Naïve | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| OVA immunization | | | | | |
| Control | 0 | 0 | 3 | 3 | 2.50 |
| VAEL, 50 mg/kg | 0 | 4 | 2 | 0 | 1.33* |
| VAEM, 100 mg/kg | 0 | 3 | 3 | 0 | 1.50* |
| VAEH, 300 mg/kg | 1 | 4 | 1 | 0 | 1.00* |
| Pred., 10 mg/kg | 4 | 2 | 0 | 0 | 0.33* |

數據以等級表示，結果以無母數分析方法分析後以 Mann-Whitney U-test 進行檢定。

：試驗組與對照組相比以 $P < 0.05$ 標示差異顯著性。

^A：Mean = (0×等級數 + 1×等級數 + 2×等級數 + 3×等級數) ÷ 6

Results are expressed as rank at least 6 mice. Mean data was analyzed with Non-parametric statistics and tested with Mann-Whitney U-test.

*: mean with symbol are significantly different compared to control group at the 5% level.

^A: Mean = (0×rank number + 1×rank number + 2×rank number + 3×rank number) ÷ 6

表 7 鹿茸萃取物影響小鼠肺部組織病理切片中動脈週邊與支氣管週邊區域浸潤情形之評估

Figure 7 Scales of infiltration in periarterial and peribronchial regions of lungs from sensitized mice treated with various concentration of velvet antler extracts (VAE) by histopathological examination

| Groups | Infiltration in periarterial and peribronchial regions | | | | Mean ^A |
|------------------|--|---|---|---|-------------------|
| | - | 1 | 2 | 3 | |
| Naïve | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| OVA immunization | | | | | |
| Control | 0 | 0 | 3 | 3 | 2.50 |
| VAEL, 50 mg/kg | 0 | 2 | 4 | 0 | 1.67* |
| VAEM, 100 mg/kg | 0 | 4 | 2 | 0 | 1.33* |
| VAEH, 300 mg/kg | 1 | 4 | 1 | 0 | 1.00* |
| Pred., 10 mg/kg | 5 | 1 | 0 | 0 | 0.33* |

數據以等級表示，結果以無母數分析方法分析後以 Mann-Whitney U-test 進行檢定。

：試驗組與對照組相比以 $P < 0.05$ 標示差異顯著性。

^A：Mean = (0×等級數 + 1×等級數 + 2×等級數 + 3×等級數) ÷ 6

Results are expressed as rank at least 6 mice. Mean data was analyzed with Non-parametric statistics and tested with Mann-Whitney U-test.

*: mean with symbol are significantly different compared to control group at the 5% level.

^A: Mean = (0×rank number + 1×rank number + 2×rank number + 3×rank number) ÷ 6

表 8 鹿茸萃取物影響小鼠肺部組織病理切片之總評估

Figure 8 Total scores of lungs from sensitized mice treated with various concentration of velvet antler extracts (VAE) by histopathological examination

| Groups | Total scores | | | | Mean ^A |
|------------------|--------------|---|---|---|-------------------|
| | - | 1 | 2 | 3 | |
| Naïve | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| OVA immunization | | | | | |
| Control | 0 | 0 | 4 | 2 | 2.33 |
| VAEL, 50 mg/kg | 0 | 2 | 4 | 0 | 1.67* |
| VAEM, 100 mg/kg | 0 | 4 | 2 | 0 | 1.33* |
| VAEH, 300 mg/kg | 2 | 4 | 0 | 0 | 0.67* |
| Pred., 10 mg/kg | 5 | 1 | 0 | 0 | 0.33* |

數據以等級表示，結果以無母數分析方法分析後以 Mann-Whitney U-test 進行檢定。

：試驗組與對照組相比以 $P < 0.05$ 標示差異顯著性。

^A：Mean = (0×等級數 + 1×等級數 + 2×等級數 + 3×等級數) ÷ 6

Results are expressed as rank at least 6 mice. Mean data was analyzed with Non-parametric statistics and tested with Mann-Whitney U-test.

*: mean with symbol are significantly different compared to control group at the 5% level.

^A: Mean = (0×rank number + 1×rank number + 2×rank number + 3×rank number) ÷ 6

表 9 鹿茸萃取物影響小鼠肺部組織中肺泡壁與支氣管區域黏液分佈情形之評估

Figure 9 Scales of mucus secretion in alveolar wall and peribronchial regions of lungs from sensitized mice treated with various concentration of velvet antler extracts (VAE)

| Groups | Alveolar wall and peribronchial regions | | | | Mean ^A |
|------------------|---|---|---|---|-------------------|
| | - | 1 | 2 | 3 | |
| Naïve | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| OVA immunization | | | | | |
| Control | 0 | 0 | 2 | 4 | 2.67 |
| VAEL, 50 mg/kg | 0 | 2 | 3 | 1 | 1.83* |
| VAEM, 100 mg/kg | 0 | 2 | 4 | 0 | 1.67* |
| VAEH, 300 mg/kg | 3 | 3 | 0 | 0 | 0.50* |
| Pred., 10 mg/kg | 6 | 0 | 0 | 0 | 0.00* |

數據以等級表示，結果以無母數分析方法分析後以 Mann-Whitney U-test 進行檢定。

：試驗組與對照組相比以 $P < 0.05$ 標示差異顯著性。

^A：Mean = (0×等級數 + 1×等級數 + 2×等級數 + 3×等級數) ÷ 6

Results are expressed as rank at least 6 mice. Mean data was analyzed with Non-parametric statistics and tested with Mann-Whitney U-test.

*: mean with symbol are significantly different compared to control group at the 5% level.

^A: Mean = (0×rank number + 1×rank number + 2×rank number + 3×rank number) ÷ 6

表 10 EL4 細胞經鹿茸萃取物刺激後分泌細胞激素 (IL-4 與 IFN- γ) 之變化

Figure 10 Concentration of cytokines secretion (IL-4 and IFN- γ) in EL4 stimulated with various concentration of velvet antler extracts (VAE) after 72 hours

| Groups | IL-4, pg/ml | IFN- γ , pg/ml |
|----------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Control | 13.082 \pm 1.429 ^a | 52.358 \pm 14.148 ^a |
| VAE 0.625 μ g/ml | 14.976 \pm 4.729 ^a | 89.768 \pm 35.936 ^a |
| VAE 2.5 μ g/ml | 17.523 \pm 6.246 ^a | 52.297 \pm 23.442 ^a |
| VAE 10 μ g/ml | 13.860 \pm 5.797 ^a | 141.479 \pm 58.510 ^b |
| VAE 40 μ g/ml | 23.330 \pm 7.268 ^a | 109.901 \pm 81.804 ^a |
| PMA, 1 ng/ml | 29.156 \pm 10.020 ^b | 92.044 \pm 32.160 ^a |

數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。

a、b：相同字母表示各試驗中，同處理組間，無顯著差異 ($P > 0.05$)。

Results are expressed as mean \pm SD. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test.

a, b: mean with same superscripts are not significantly different among groups at the 5% level.

表 11 EL4 細胞經鹿茸不同極性萃取層刺激後分泌細胞激素 (IL-4) 之變化

Figure 11 Concentration of Type II cytokines secretion (IL-4) in EL4 stimulated with various concentration of velvet antler extracts (VAE-H, VAE-C, VAE-B, VAE-M) after 72 hours

| Groups | IL-4, pg/ml | | | |
|------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | VAE-H | VAE-C | VAE-B | VAE-M |
| Control | 64.981±10.932 ^a | 69.776±4.732 ^a | 70.499±7.345 ^a | 78.823±0.953 ^a |
| 0.08 µg/ml | 63.986±10.421 ^a | 90.131±40.436 ^a | 95.559±30.575 ^b | 75.837±12.780 ^a |
| 0.4 µg/ml | 63.171±8.627 ^a | 69.233±4.953 ^a | 68.690±3.549 ^a | 73.666±4.888 ^a |
| 2.0 µg/ml | 68.147±10.202 ^a | 67.242±2.108 ^a | 61.543±2.825 ^a | 70.590±1.957 ^a |
| 10.0 µg/ml | 67.242±9.325 ^a | 64.257±9.458 ^a | 67.695±1.495 ^a | 70.409±2.902 ^a |
| 50.0 µg/ml | 70.499±7.924 ^a | 73.485±7.952 ^a | 69.685±2.719 ^a | 72.761±6.207 ^a |

數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。

a：相同字母表示各試驗中，同處理組間，無顯著差異 ($P > 0.05$)。

Results are expressed as mean±SD. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test.

a: mean with same superscripts are not significantly different among groups at the 5% level.

表 12 Raw 264.7 細胞經鹿茸不同極性萃取層刺激後分泌細胞激素 (IL-12) 之變化

Figure 12 Concentration of cytokines secretion (IL-12) in Raw 264.7 stimulated with various concentration of velvet antler extracts (VAE-C, VAE-B, VAE-M) after 72 hours

| Groups | IL-12, EU | | |
|------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | VAE-C | VAE-B | VAE-M |
| Control | 0.196 ^a | 0.169 ^a | 0.156 ^a |
| 0.08 µg/ml | 0.254 ^b | 0.356 ^b | 0.180 ^a |
| 0.4 µg/ml | 0.351 ^c | 0.250 ^b | 0.173 ^a |
| 2.0 µg/ml | 0.502 ^d | 0.318 ^b | 0.200 ^a |
| 10.0 µg/ml | 0.127 ^e | 0.209 ^a | 0.195 ^a |
| 50.0 µg/ml | 0.094 ^e | 0.441 ^c | 0.186 ^a |

數據以平均值表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。

a、b、c、d、e：相同字母表示各試驗中，同處理組間，無顯著差異 ($P > 0.05$)。

Results are expressed as mean. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test.

a, b, c, d, e: mean with same superscripts are not significantly different among groups at the 5% level.

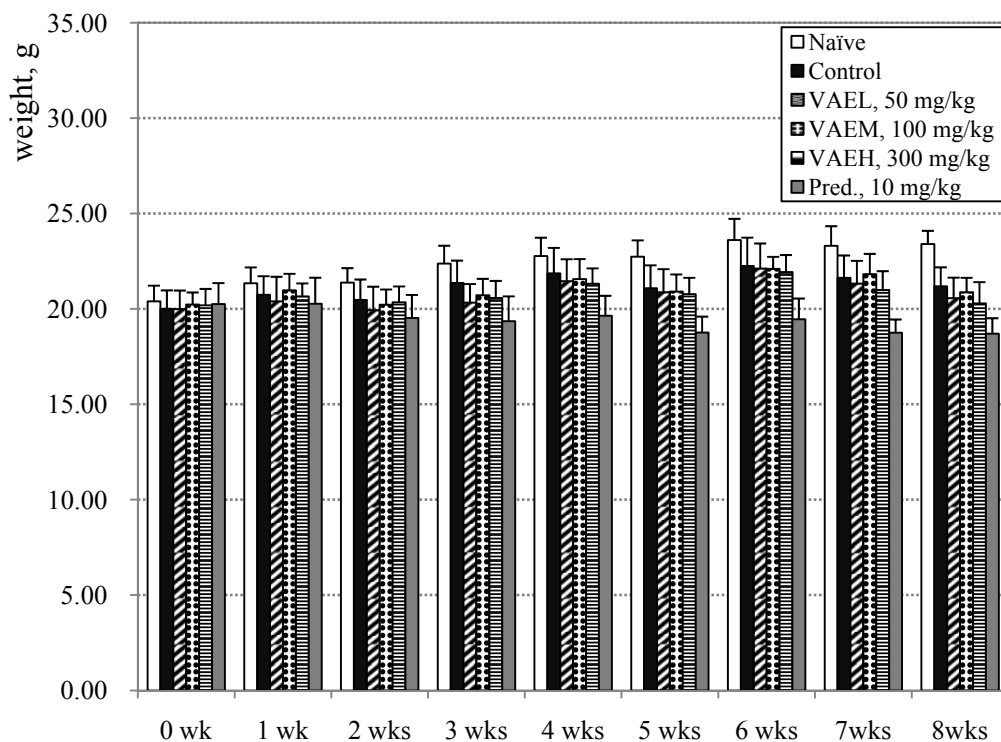


圖 1 鹿茸萃取物對小鼠每周體重之影響

Figure 1 The body weights of mice treated with various concentration of velvet antler extracts (VAE) each week

數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。結果顯示各試驗組間體重無顯著性差異 ($P < 0.05$)。

Results are expressed as mean \pm SD at least 8 mice. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Means among groups are not significantly different at the 5% level.

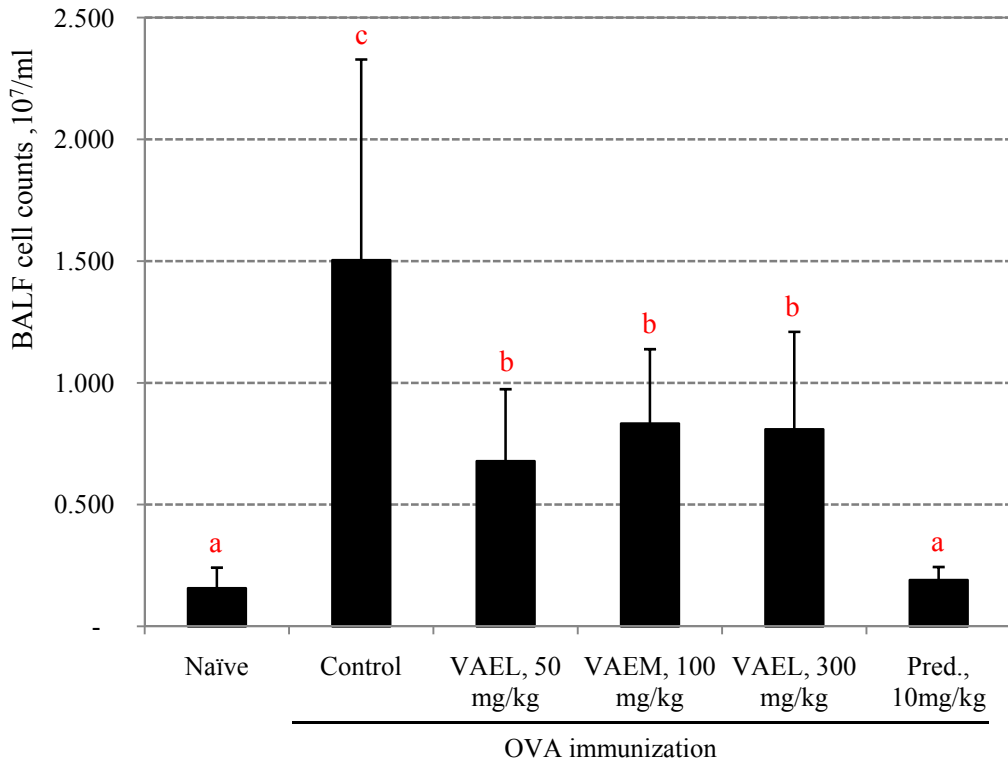


圖 2 鹿茸萃取物對 OVA 致敏小鼠肺部沖洗液中總細胞數之影響

Figure 2 Total cell counts in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of sensitized mice treated with various concentration of velvet antler extracts (VAE) after 52 days different treatments

數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。

a、b、c：相同字母表示各試驗中，同處理組間，無顯著差異 ($P > 0.05$)。Results are expressed as mean \pm SD at least 8 mice. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test.

a, b, c: mean with same superscripts are not significantly different among groups at the 5% level.

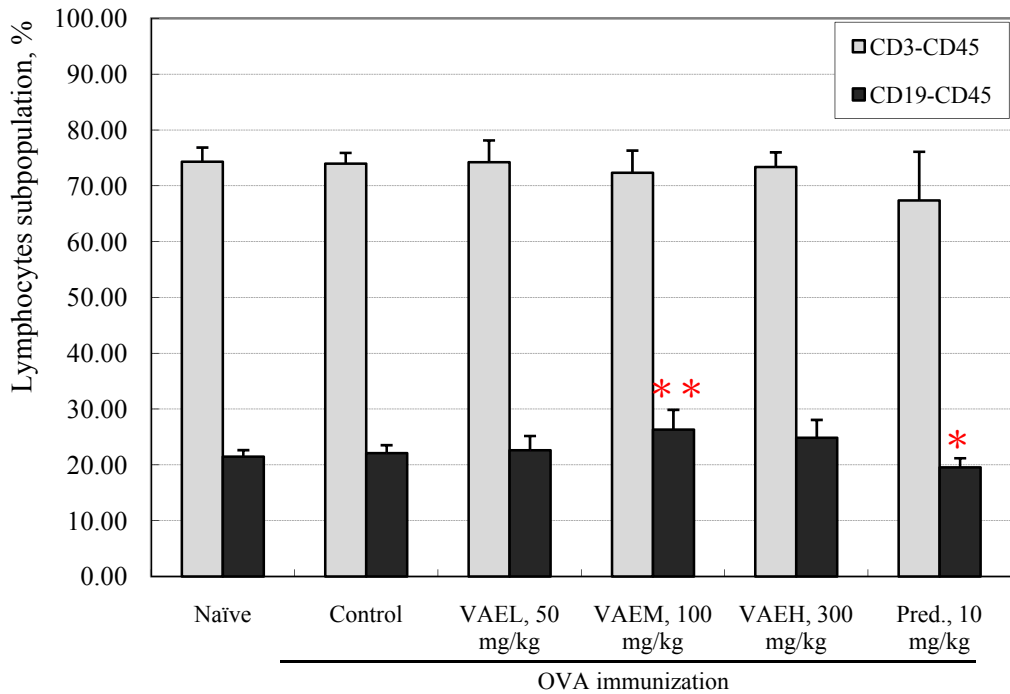


圖 3 小鼠呼吸道週邊淋巴結中淋巴細胞亞族群

Figure 3 The percentage of lymphocyte subpopulation in airway draining lymph nodes (ALN)

數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。對照組與正常組相比無顯著性差異 ($P < 0.05$)；試驗組與對照組相比以* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 標示差異顯著性。

Results are expressed as mean±SD at least 6 mice. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Means between control group and naïve group are not significantly different at the 5% level. Treatment groups were compared to control group (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

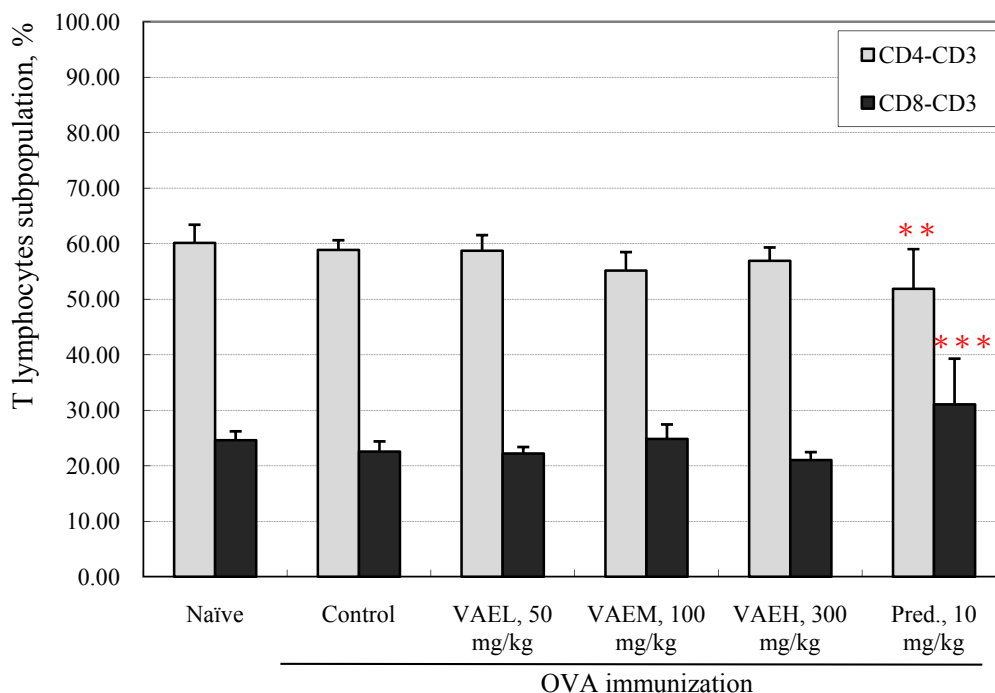


圖 4 小鼠呼吸道週邊淋巴結中 T 淋巴細胞亞族群

Figure 4 The percentage of T lymphocyte subpopulation in airway draining lymph nodes (ALN)

數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。對照組與正常組相比無顯著性差異 ($P < 0.05$)；試驗組與對照組相比以** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 標示差異顯著性。

Results are expressed as mean \pm SD at least 6 mice. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Means between control group and naïve group are not significantly different at the 5% level. Treatment groups were compared to control group (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

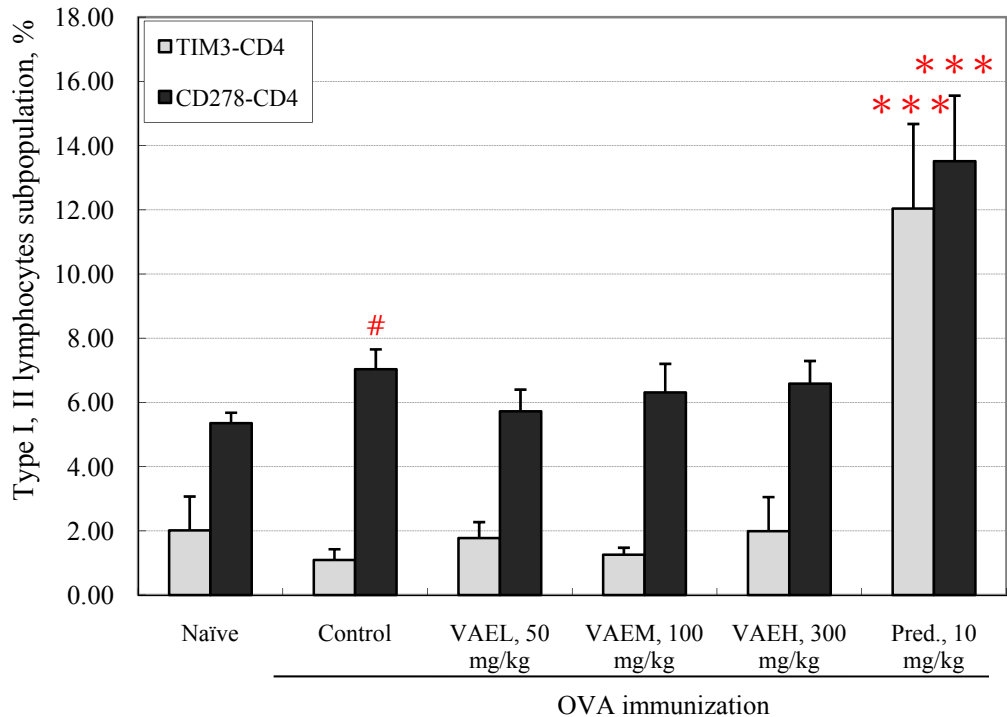


圖 5 小鼠呼吸道週邊淋巴結中 T 輔助細胞第一型與第二型亞族群
 Figure 5 The percentage of type I, II T helper cell subpopulation in airway draining lymph nodes (ALN)

數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。對照組與正常組相比以[#] $P < 0.05$ 標示差異顯著性；試驗組與對照組相比以*** $P < 0.001$ 標示差異顯著性。

Results are expressed as mean±SD at least 6 mice. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Control group was compared to naïve group ([#] $P < 0.05$). Treatment groups were compared to control group (*** $P < 0.001$).

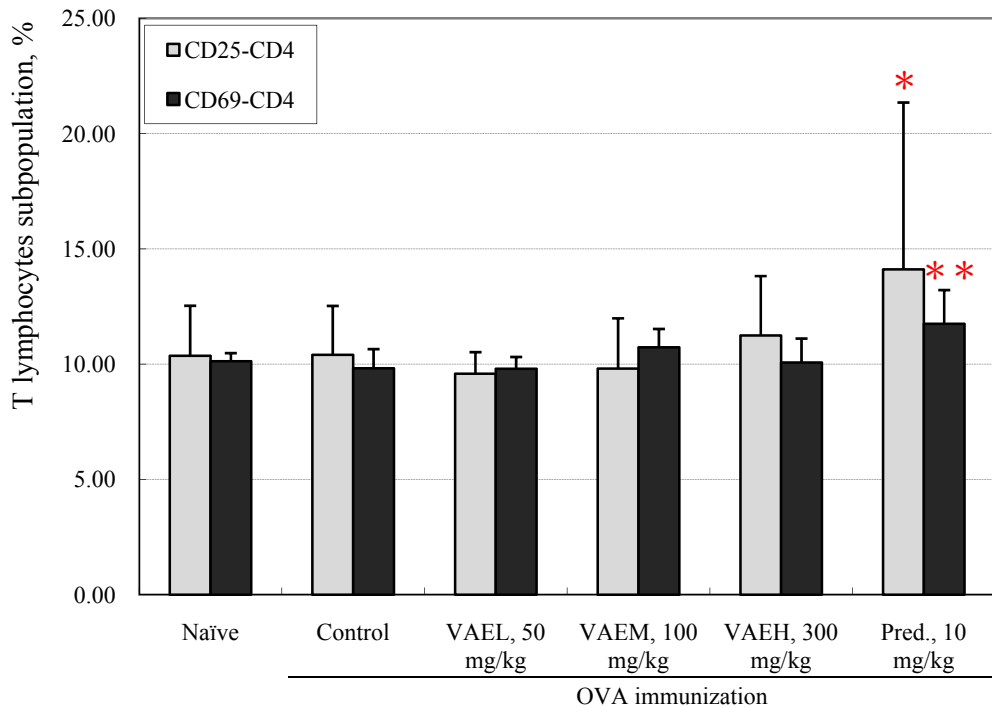


圖 6 小鼠呼吸道週邊淋巴結中活化 T 淋巴細胞亞族群

Figure 6 The percentage of activated T lymphocyte subpopulation in airway draining lymph nodes (ALN)

數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。對照組與正常組相比無顯著性差異 ($P < 0.05$)；試驗組與對照組相比以* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 標示差異顯著性。

Results are expressed as mean \pm SD at least 6 mice. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Means between control group and naïve group are not significantly different at the 5% level. Treatment groups were compared to control group (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

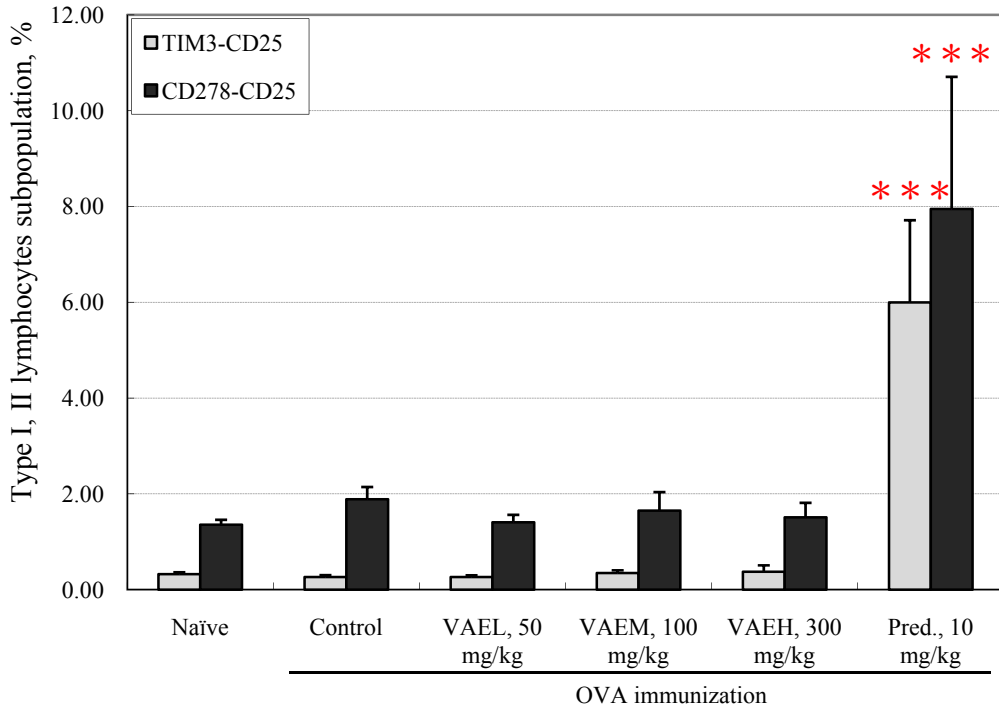


圖 7 小鼠呼吸道週邊淋巴結中 T 調節細胞第一型與第二型亞族群

Figure 7 The percentage of type I, II T regulatory subpopulation in airway draining lymph nodes (ALN)

數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。對照組與正常組相比無顯著性差異 ($P < 0.05$)；試驗組與對照組相比以*** $P < 0.001$ 標示差異顯著性。

Results are expressed as mean \pm SD at least 6 mice. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Means between control group and naïve group are not significantly different at the 5% level. Treatment groups were compared to control group (***) $P < 0.001$).

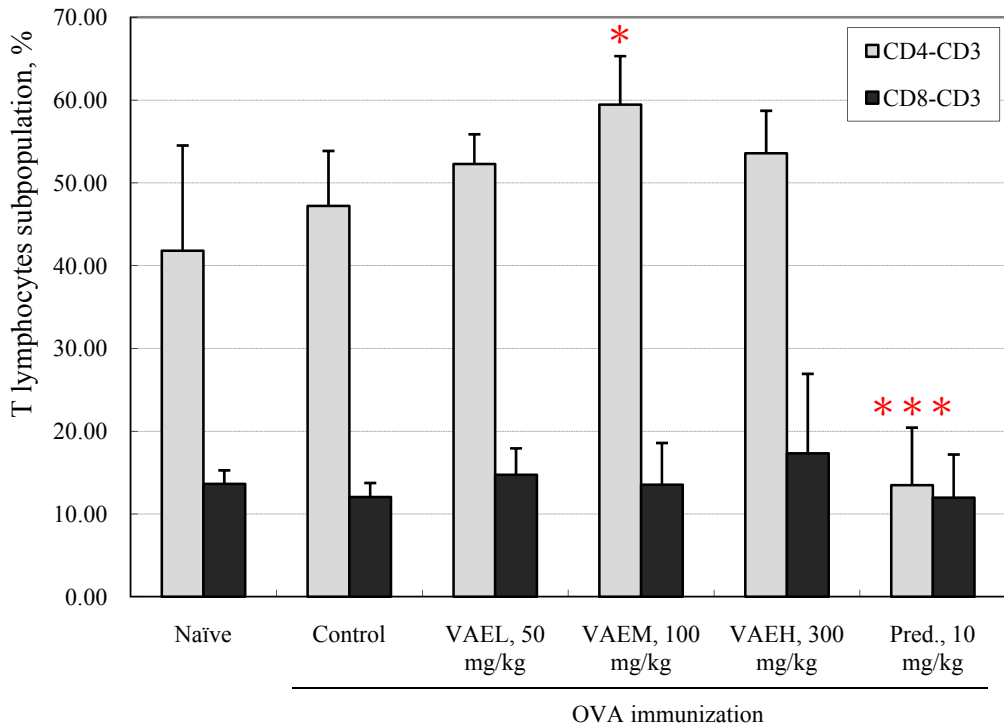


圖 8 小鼠肺部沖洗液中 T 淋巴細胞亞族群

Figure 8 The percentage of T lymphocyte subpopulation in bronchoalveolar lavage fluid (BALF)

數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。對照組與正常組相比無顯著性差異 ($P < 0.05$)；試驗組與對照組相比以* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 標示差異顯著性。

Results are expressed as mean±SD at least 6 mice. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Means between control group and naïve group are not significantly different at the 5% level. Treatment groups were compared to control group (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

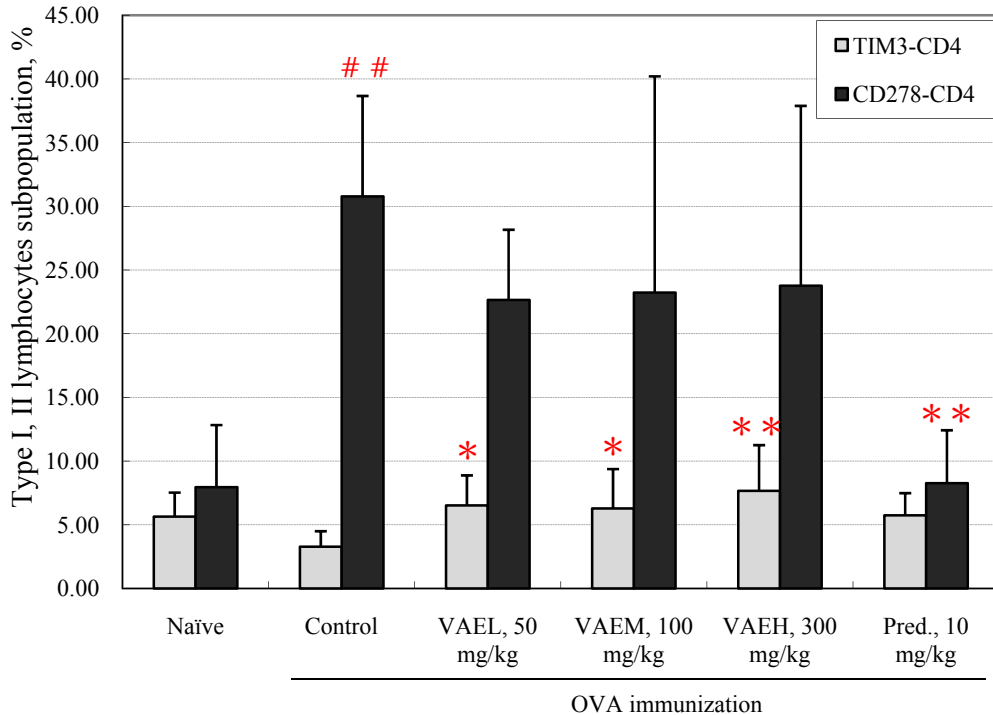


圖 9 小鼠肺部沖洗液中 T 輔助細胞第一型與第二型亞族群
 Figure 9 The percentage of type I, II T helper cell subpopulation in bronchoalveolar lavage fluid (BALF)

數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。對照組與正常組相比以^{# #} $P < 0.01$ 標示差異顯著性；試驗組與對照組相比以^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 標示差異顯著性。

Results are expressed as mean±SD at least 6 mice. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Control group was compared to naïve group (^{# #} $P < 0.01$). Treatment groups were compared to control group (^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$).

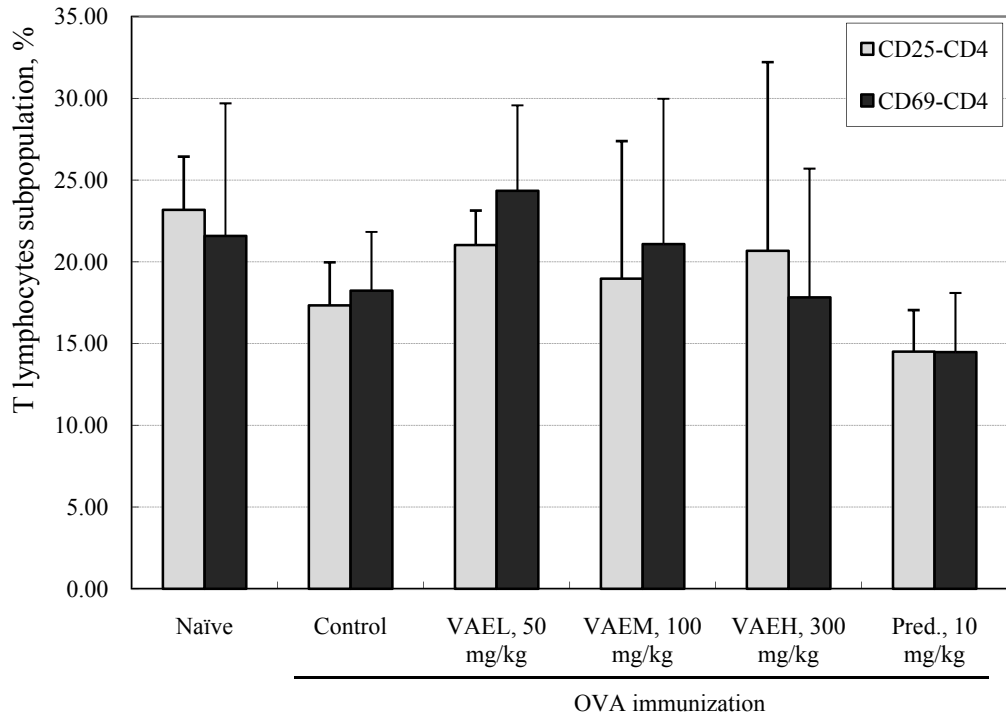


圖 10 小鼠肺部沖洗液中活化 T 淋巴細胞亞族群

Figure 10 The percentage of activated T lymphocyte subpopulation in bronchoalveolar lavage fluid (BALF)

數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。各試驗組間皆無顯著性差異 ($P < 0.05$)。

Results are expressed as mean±SD at least 6 mice. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Means among groups are not significantly different at the 5% level.

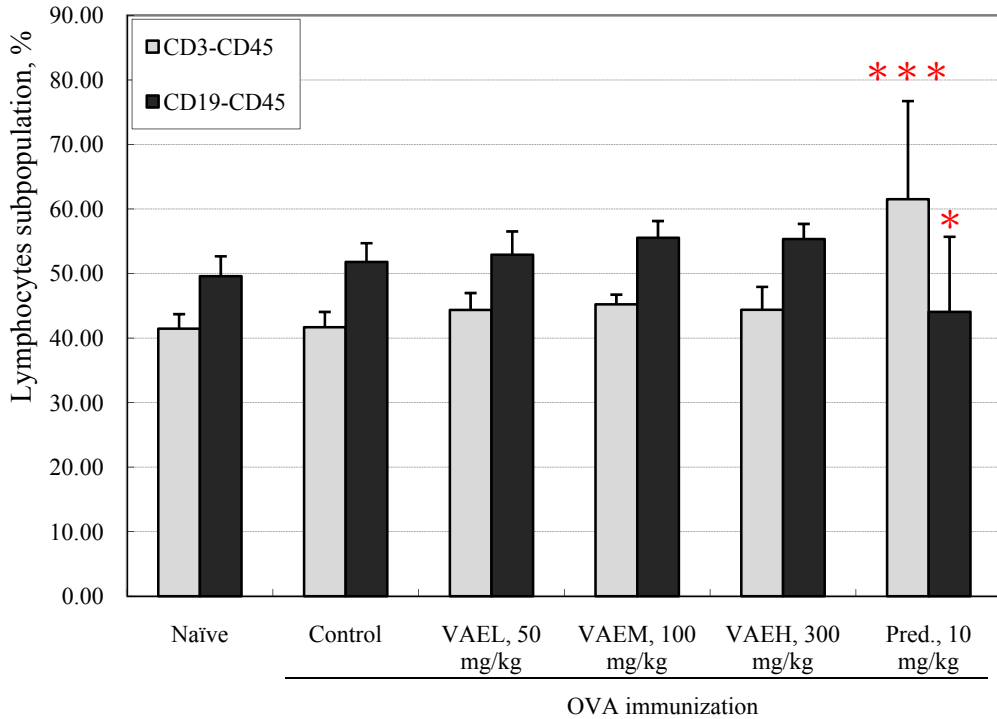


圖 11 小鼠脾臟中淋巴細胞亞族群

Figure 11 The percentage of lymphocyte subpopulation in splenocytes.

數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。對照組與正常組相比無顯著性差異 ($P < 0.05$)；試驗組與對照組相比以* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 標示差異顯著性。

Results are expressed as mean±SD at least 6 mice. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Means between control group and naïve group are not significantly different at the 5% level. Treatment groups were compared to control group (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

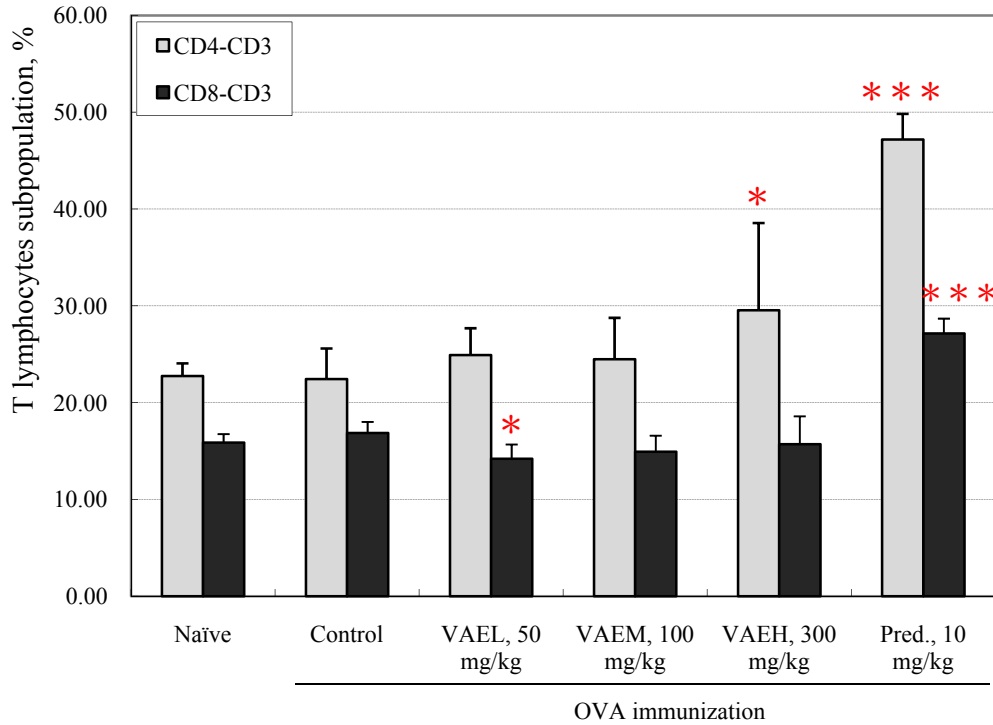


圖 12 小鼠脾臟中 T 淋巴細胞亞族群

Figure 12 The percentage of T lymphocyte subpopulation in splenocytes.

數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。對照組與正常組相比無顯著性差異 ($P < 0.05$)；試驗組與對照組相比以* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 標示差異顯著性。

Results are expressed as mean±SD at least 6 mice. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Means between control group and naïve group are not significantly different at the 5% level. Treatment groups were compared to control group (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

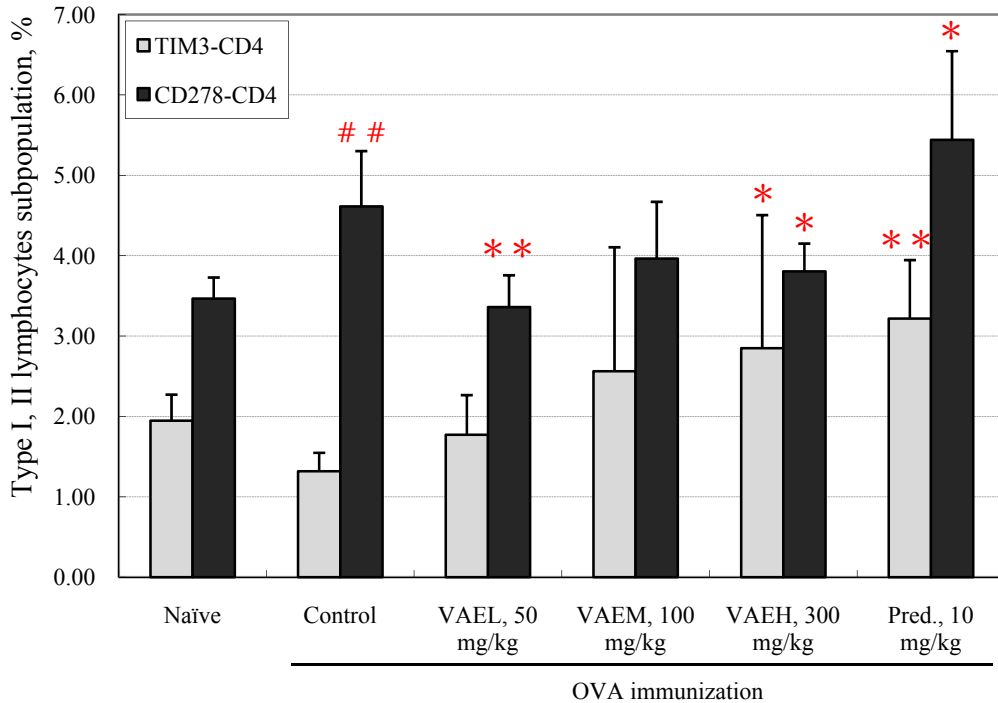


圖 13 小鼠脾臟中 T 輔助細胞第一型與第二型亞族群

Figure 13 The percentage of type I, II T helper cell subpopulation in splenocytes

數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。對照組與正常組相比以^{# #} $P < 0.01$ 標示差異顯著性；試驗組與對照組相比以^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 標示差異顯著性。

Results are expressed as mean±SD at least 6 mice. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Control group was compared to naïve group (^{# #} $P < 0.01$). Treatment groups were compared to control group (^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$).

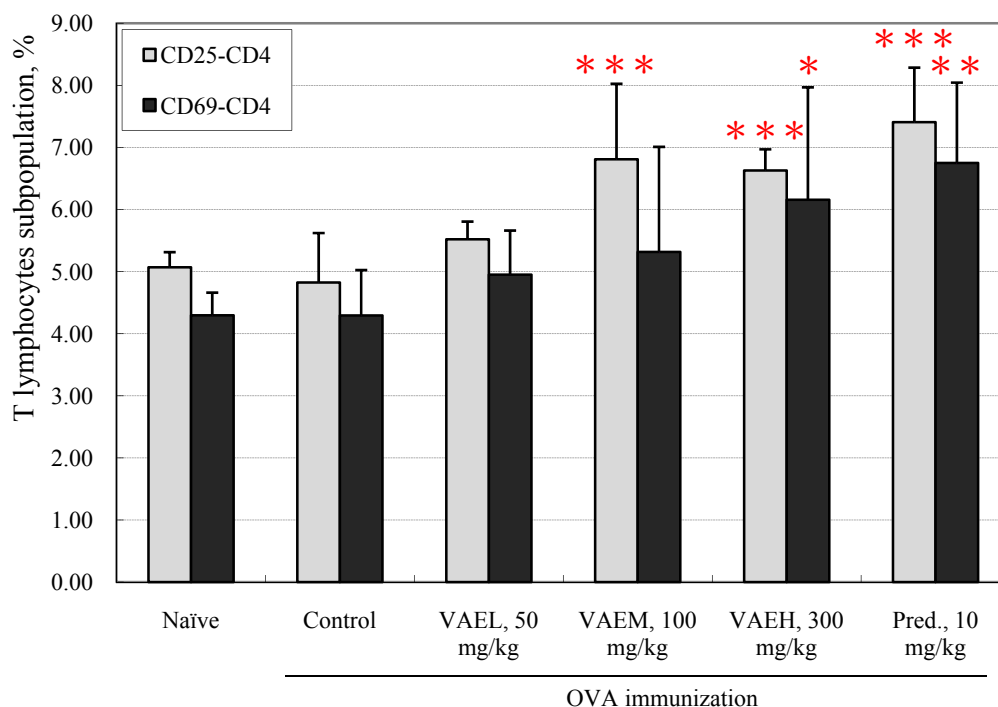


圖 14 小鼠脾臟中活化 T 淋巴細胞亞族群

Figure 14 The percentage of activated T lymphocyte subpopulation in splenocytes

數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。對照組與正常組相比無顯著性差異 ($P < 0.05$)；試驗組與對照組相比以* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 標示差異顯著性。Results are expressed as mean±SD at least 6 mice. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Means between control group and naïve group are not significantly different at the 5% level. Treatment groups were compared to control group (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

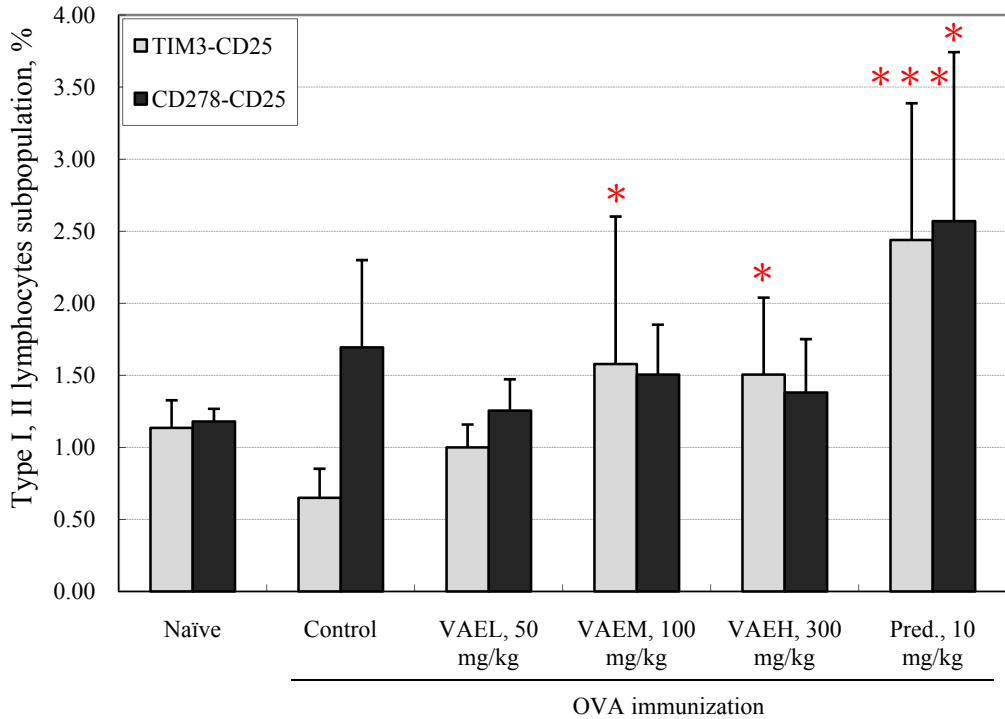


圖 15 小鼠脾臟中 T 調節細胞第一型與第二型亞族群

Figure 15 The percentage of type I, II T regulatory subpopulation in splenocytes

數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。對照組與正常組相比無顯著性差異 ($P < 0.05$)；試驗組與對照組相比以* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 標示差異顯著性。

Results are expressed as mean±SD at least 6 mice. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Means between control group and naïve group are not significantly different at the 5% level. Treatment groups were compared to control group (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

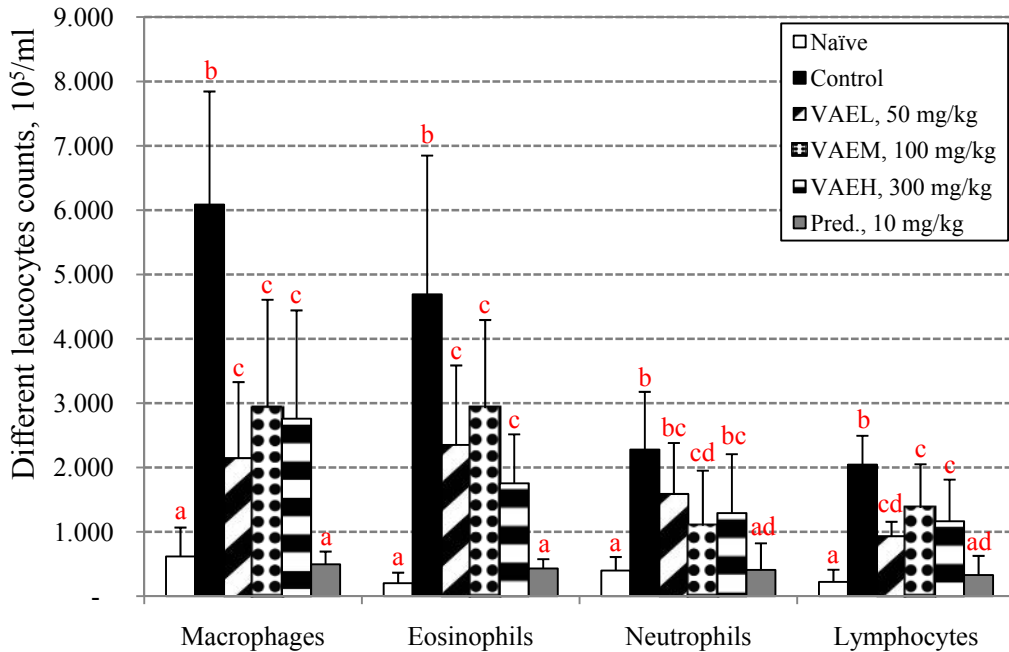
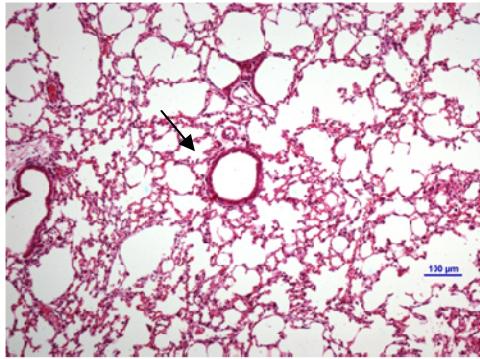


圖 16 鹿茸萃取物對 OVA 致敏小鼠肺部沖洗液中白血球組態之影響
 Figure 16 Several leucocytes counts in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of sensitized mice treated with various concentration of velvet antler extracts (VAE) after 52 days different treatments

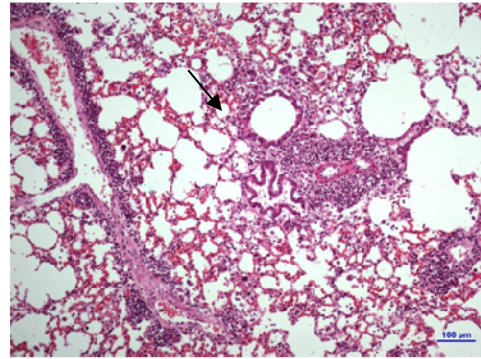
數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。

a、b、c、d：相同字母表示各試驗中，同處理組間，無顯著差異 ($P > 0.05$)。Results are expressed as mean \pm SD at least 8 mice. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test.

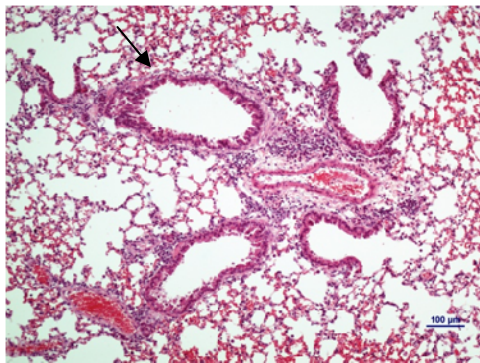
a, b, c, d: mean with same superscripts are not significantly different among groups at the 5% level.



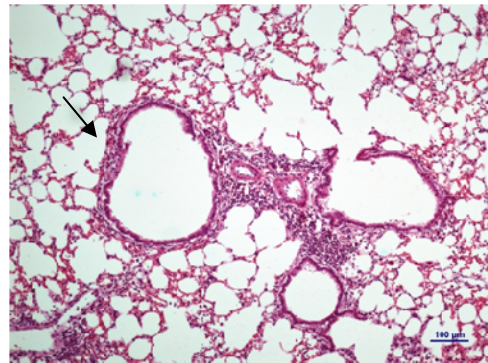
Naive



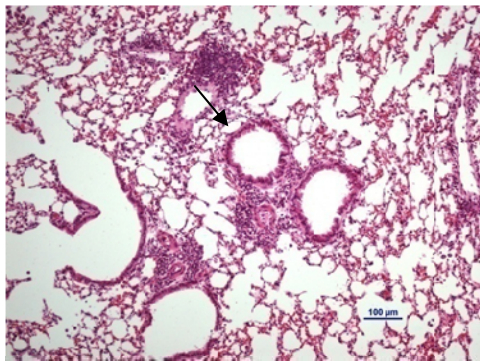
Control



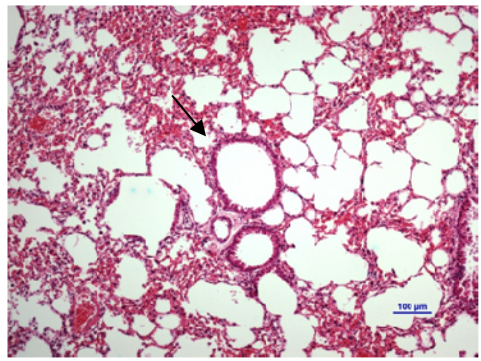
VAEM



VAEL



VAEH



Prednisolone

圖 17 OVA 致敏小鼠肺部組織病理切片圖

Figure 17 Histopathological examination of lungs from sensitized mice treated with various concentration of velvet antler extracts (VAE)

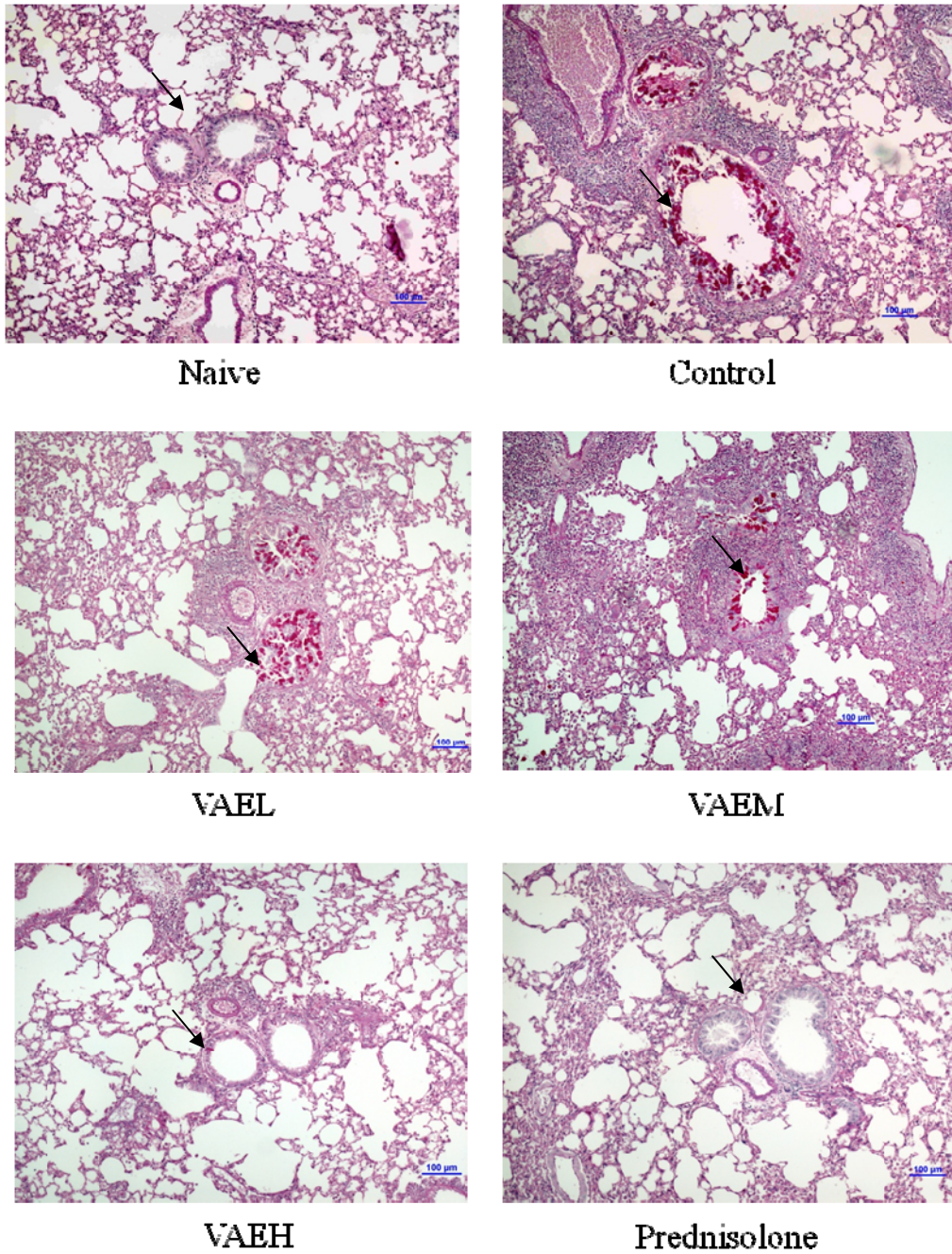


圖 18 OVA 致敏小鼠肺部組織黏液分佈圖
 Figure 18 Mucus secretion of lungs from sensitized mice treated with various concentration of velvet antler extracts (VAE)

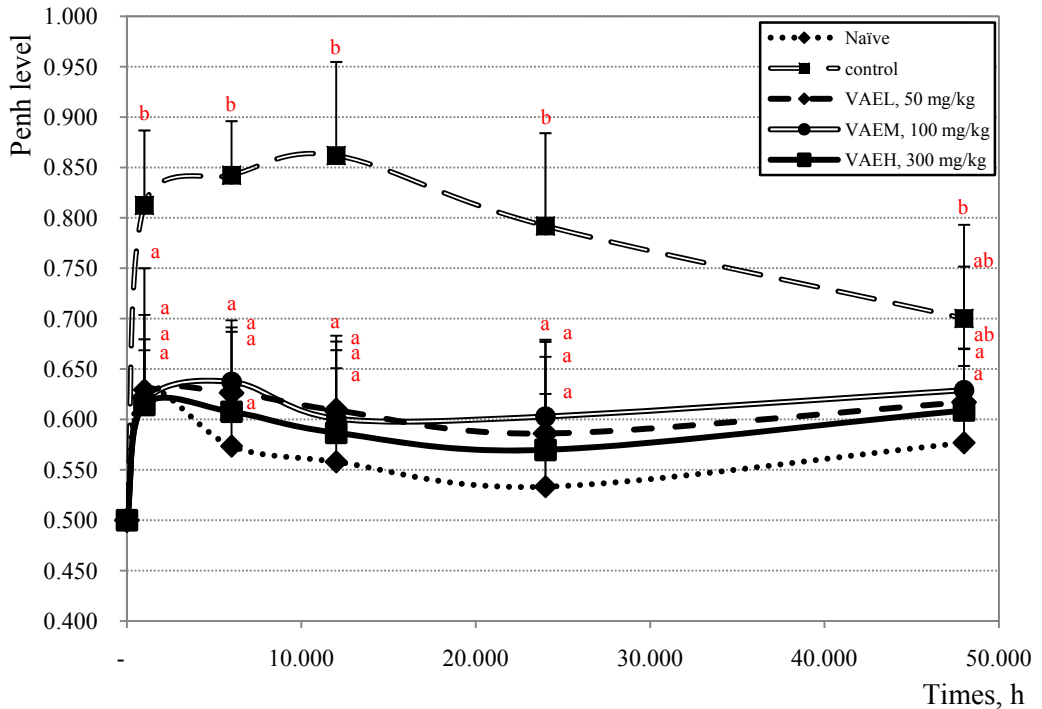


圖 19 OVA 致敏小鼠呼吸道阻力測定
Figure 19 The levels of enhanced pause (Penh)

數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。

a、b：相同字母表示各試驗中，同處理組間，無顯著差異 ($P > 0.05$)。

Results are expressed as mean \pm SD at least 8 mice. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test.

a, b: mean with same superscripts are not significantly different among naïve group and control group at the 5% level.

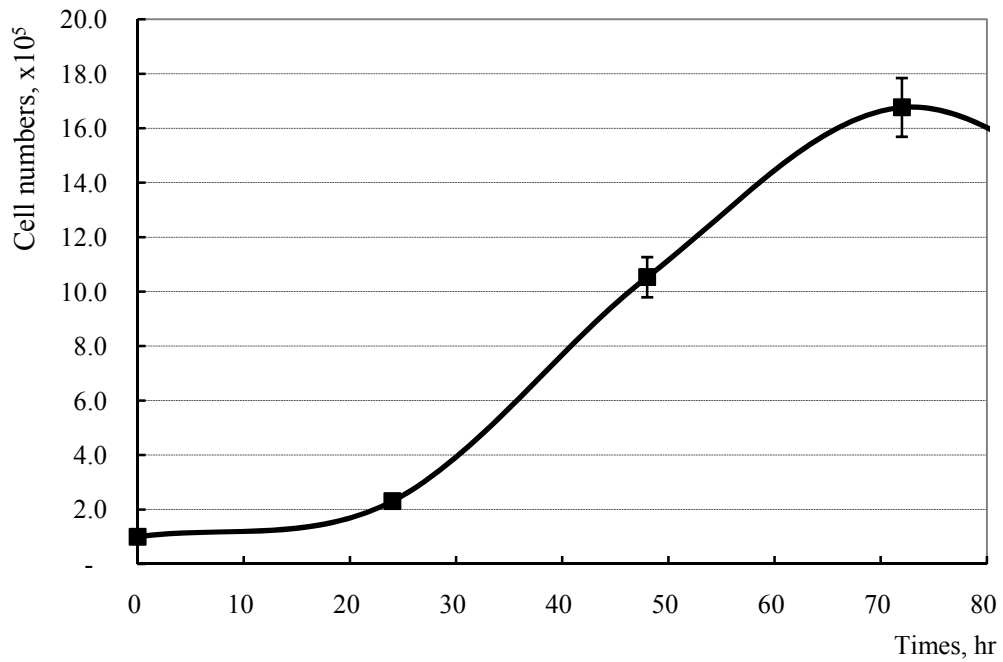


圖 20 EL4 細胞株生長曲線

Figuer 20 EL4 cell growth curve

數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。結果顯示同一時間點細胞數量無顯著性差異 ($P < 0.05$)。Results are expressed as mean±SD. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Means with the same time are not significantly different at the 5% level.

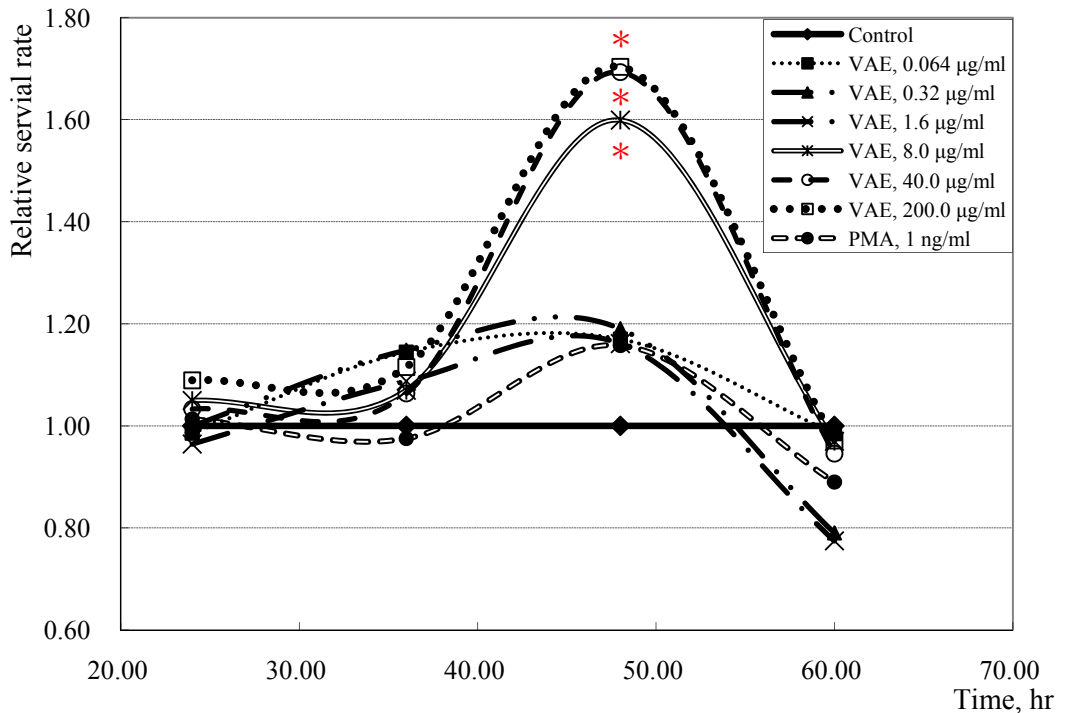


圖 21 EL4 細胞經鹿茸萃取物刺激後細胞增生之效果

Figure 21 EL4 cell proliferation treated with various concentration of velvet antler extracts (VAE)

數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析方法分析後進行鄧肯氏多變域檢定。以對造組為基準，試驗組與對照組相比以* $P < 0.05$ 標示差異顯著性。

Results are expressed as mean±SD. Mean data was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Treatment groups were compared to control group based on control group (* $P < 0.05$).

壹拾貳、 附表

附表 1 體外試驗中鹿茸萃取物添加於淋巴細胞經過第二型膠原蛋白刺激後分泌細胞激素之影響

Appendix table 1 Effect of velvet antler extracts (VAE) on cytokine production from lymph node cells in response to Collagen II (CII) stimulation *in vitro*

| | IL-1 β , pg/ml | | IL-2, pg/ml | | IL-6, pg/ml | |
|---------------------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|---------------------|----------------|------------------|
| | Medium alone | CII | Medium alone | CII | Medium alone | CII |
| Dose of VAE (μ g/kg) | | | | | | |
| 0 | 5.9 \pm 1.5 | 166.5 \pm 19.5 | 1.2 \pm 0.4 | 576.3 \pm 76 | 126.4 \pm 11 | 503.4 \pm 45 |
| 20 | 9.2 \pm 0.9 | 183.8 \pm 29.4 | 4.3 \pm 0.3 | 545.4 \pm 45 | 142.3 \pm 11 | 475.4 \pm 44 |
| 50 | 8.9 \pm 1.1 | 194.4 \pm 29.8 | 3.3 \pm 0.2 | 454.3 \pm 65 | 140.3 \pm 12 | 354.3 \pm 45 |
| 100 | 9.6 \pm 1.2 | 87.4 \pm 12.4* | 4.1 \pm 1.3 | 123.4 \pm 15* | 129.3 \pm 13 | 122.3 \pm 12* |
| 150 | 6.5 \pm 0.5 | 54.8 \pm 12.2** | 2.8 \pm 0.9 | 38.4 \pm 4.3** | 102.5 \pm 12 | 78.3 \pm 2.2** |
| | TNF- α , pg/ml | | IFN- γ , pg/ml | | | |
| | Medium alone | CII | Medium alone | CII | | |
| Dose of VAE (μ g/kg) | | | | | | |
| 0 | 165.1 \pm 15 | 876.4 \pm 87 | 2.4 \pm 0.4 | 965.2 \pm 87 | | |
| 20 | 176.5 \pm 29 | 934.4 \pm 67 | 3.3 \pm 0.3 | 1123.4 \pm 131 | | |
| 50 | 168.5 \pm 21 | 809.4 \pm 76 | 2.2 \pm 0.2 | 1086.4 \pm 133 | | |
| 100 | 159.7 \pm 22 | 134.3 \pm 14* | 2.4 \pm 0.2 | 879.5 \pm 98 | | |
| 150 | 123.3 \pm 18 | 77.5 \pm 8.4** | 1.4 \pm 0.2 | 665.3 \pm 67 | | |

(Kim *et al.*, 2003)

附表 2 生物種類、體重、體表面積與體表面積劑量換算公式中 K_m 值之關係。

Appendix table 2 Conversion of animal doses to human equivalent dose (HED) based on body surface area (BSA)

| Species | Weight (kg) | BSA (m ²) | K_m factor |
|------------|-------------|-----------------------|--------------|
| Human | | | |
| Adult | 60 | 1.6 | 37 |
| Child | 20 | 0.8 | 25 |
| Baboon | 12 | 0.6 | 20 |
| Dog | 10 | 0.5 | 20 |
| Monkey | 3 | 0.24 | 12 |
| Rabbit | 1.8 | 0.15 | 12 |
| Guinea pig | 0.4 | 0.05 | 8 |
| Rat | 0.15 | 0.025 | 6 |
| Hamster | 0.08 | 0.02 | 5 |
| Mouse | 0.02 | 0.007 | 3 |

Values based on data from FDA Draft Guidelines (7). To convert dose in mg/kg to dose in mg/m², multiply by K_m value.

(Reagan-Shaw *et al.*, 2007)

附表 3 病理組織切片評估準則表

Appendix table 3 Histologic Grading Criteria

Alveolar wall inflammation

- 1+ Increased numbers of inflammatory cells in alveolar walls.
- 2+ As above, plus 1–3 foci per section showing cellular alveolar exudate and atelectasis.
- 3+ As above, plus more than 3 foci per section showing cellular alveolar exudate and atelectasis.

Perivenous regions

- 1+ Occasional veins cuffed by inflammatory cells.
- 2+ Most veins surrounded by a thin layer (1–5 cells thick) of inflammatory cells.
- 3+ Most veins surrounded by a thick layer (> 5 cells thick) of inflammatory cells.

Periarterial and peribronchial regions

Same scoring criteria as perivenous regions.

Venous endothelial changes

- 1+ Scattered inflammatory cells adherent to the endothelium; flat endothelial cells.
- 2+ Endothelial cells show hypertrophy; 1–3 veins per section show focal piling up of inflammatory cells along the endothelium.
- 3+ Endothelial cells show hypertrophy; > 3 veins per section show piling up of inflammatory cells, usually marked.

Arterial endothelial changes

Same scoring criteria as venous endothelial changes.

(Jeffrey *et al.*, 1991)

附表 4 不同細胞激素對於抗體生成之影響

Appendix table 4 The effects of different cytokines on the class of antibody produced

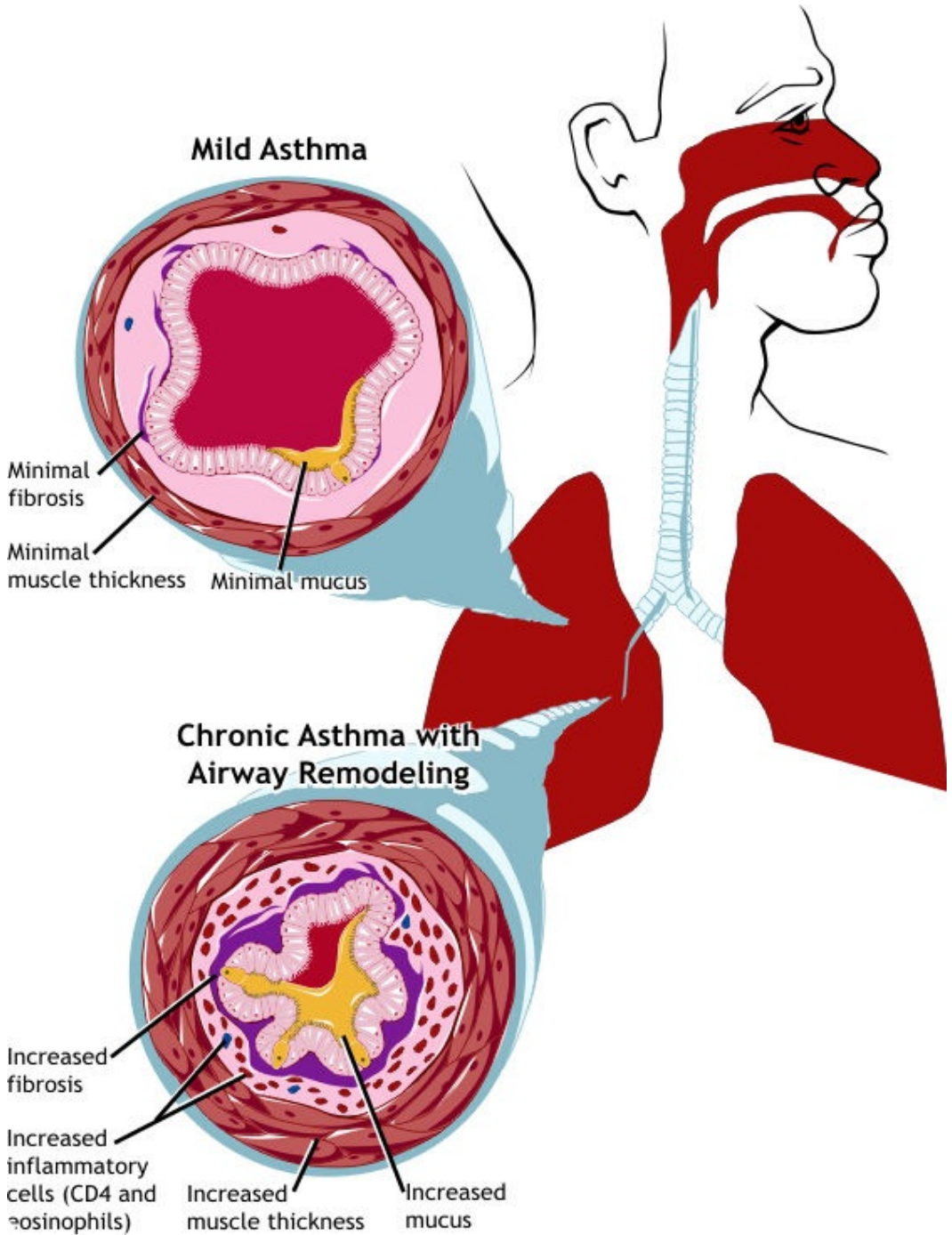
| Cytokine | IgG1 | IgG2a | IgG2b | IgG3 | IgA | IgE | IgM |
|-----------|---------|---------|--------|---------|--------------------|---------|---------|
| IL-4 | Induce | Inhibit | | Inhibit | | Induce | Inhibit |
| IL-5 | | | | | Augment production | | |
| IFN-gamma | Inhibit | Induce | | Induce | | Inhibit | Inhibit |
| TGF-beta | | | Induce | Inhibit | Induce | | Inhibit |

Isotype regulation by murine T cell cytokines.

Certain cytokines either induce (green) or inhibit (pink) the production of certain antibody isotypes. Inhibition mostly results from switch to the different isotype

(<http://pathmicro.med.sc.edu/bowers/cell-mediated-ver2.htm>)

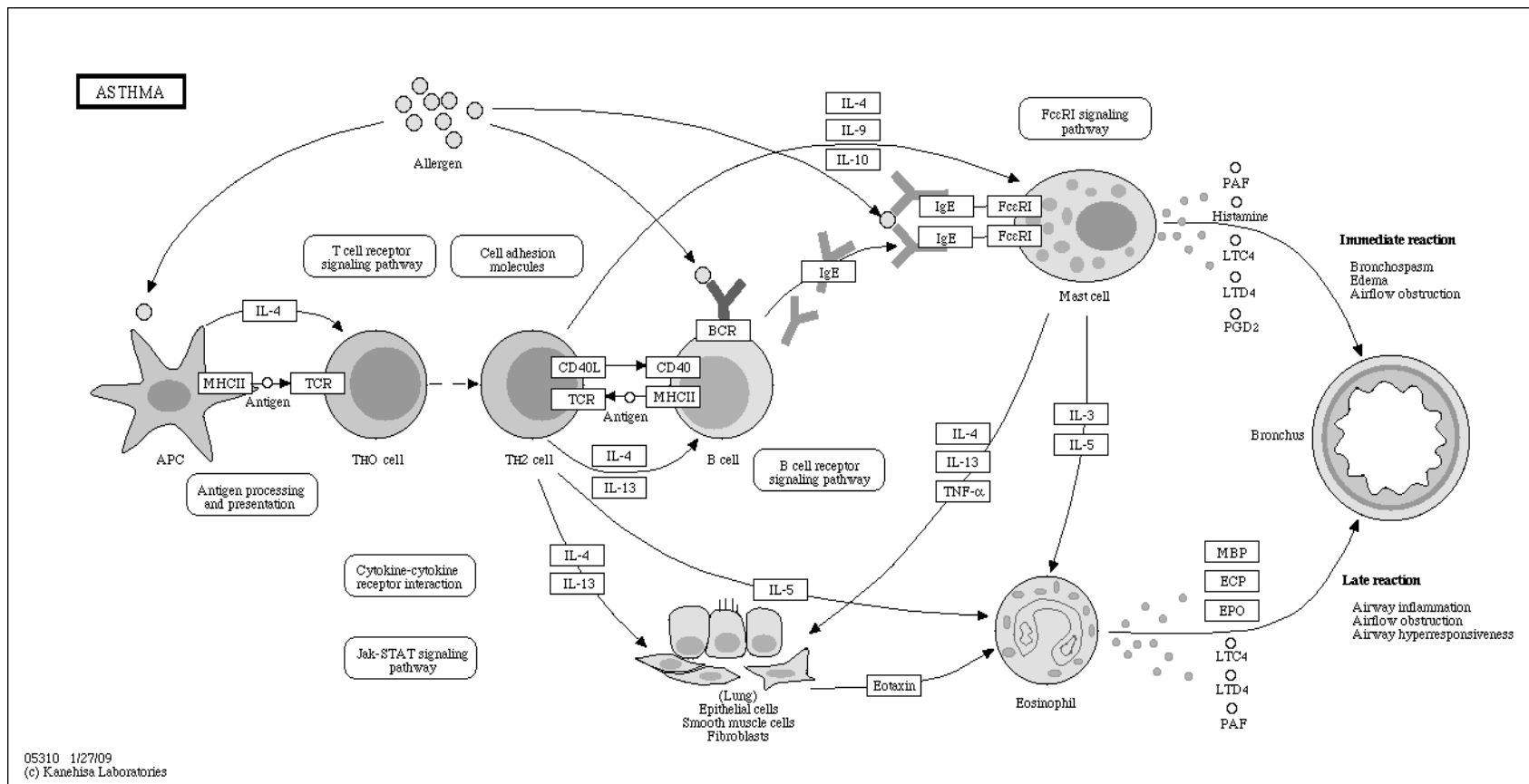
壹拾參、 附圖



附圖 1 正常氣管與呼吸道過度反應下氣管

Appendix figure 1 The narrowing of the airways from their bronchioles

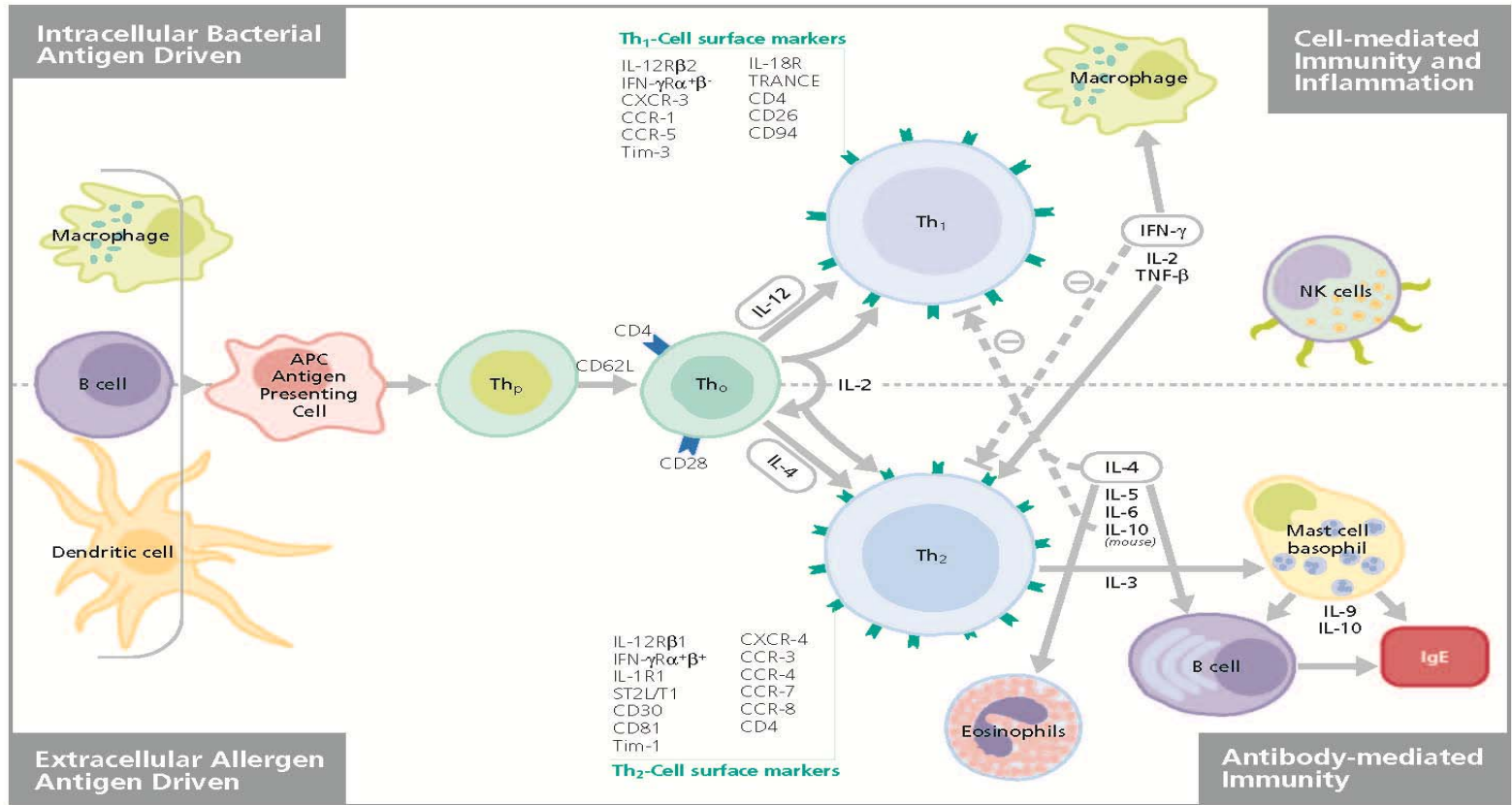
(<http://www.news-medical.net/health/Asthma.aspx>)



附圖 2 氣喘之分子路徑

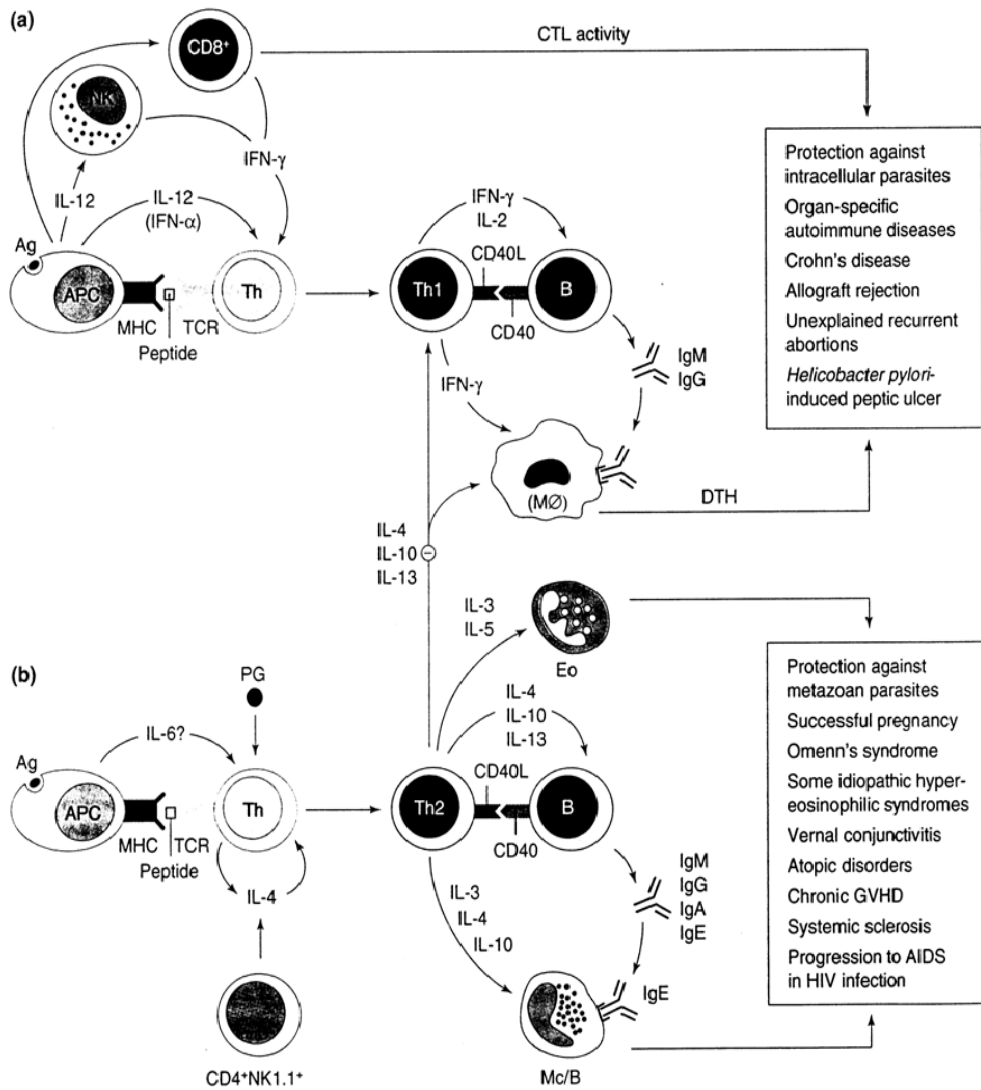
Appendix figure 2 Cellular pathway of asthma

(<http://www.genome.jp/kegg/pathway>)



附圖 3 第一型輔助細胞及第二型輔助細胞調節分化
Appendix figure 3 Th1 and Th2 differentiation

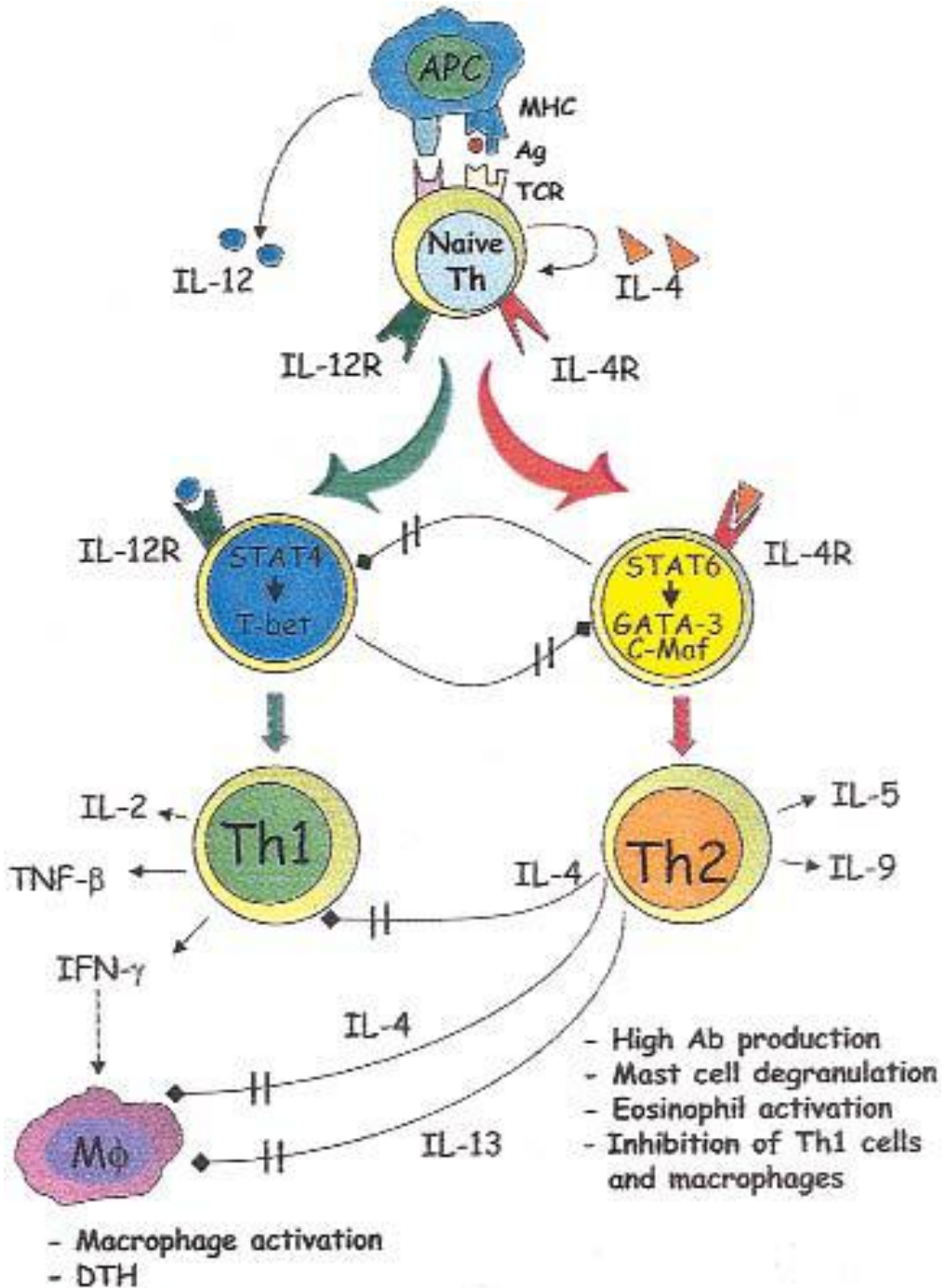
(BD Bioscience, 2006)



附圖 4 影響呼吸道過度反應中前期反應及後期反應之細胞調節關係

Appendix figure 4 The Th1/Th2 paradigm

(Sergio, 1997)



附圖 5 第一型輔助細胞與第二型輔助細胞分子調節
 Appendix figure 5 Th1/Th2 cells and mechanisms

(Sergio, 2004)

| Formula for Dose Translation Based on BSA | |
|---|---|
| HED (mg/kg) = Animal dose (mg/kg) | <i>multiplied by</i> $\frac{\text{Animal } Km}{\text{Human } Km}$ |

附圖 6 根據體表面積將動物劑量換算人體劑量公式

Appendix figure 6 Formula for dose translation based on body surface area (BSA)

(Reagan-Shaw *et al.*, 2007)

壹拾肆、 附件

附件一、 東海大學動物實驗管理小組審查同意書

東海大學動物實驗管理小組審查同意書
Affidavit of Approval of Animal Use Protocol
Tunghai University

動物實驗申請表暨同意書編號： 97-03

計畫申請人： 謝長奇 職稱： 助理教授
單位： 畜產與生物科技學系 飼養/應用地點： 畜產系 / 實驗動物房
計畫名稱： 鹿茸有效分劃調節小鼠呼吸道過敏模式中之分子調控機轉

本計畫之「動物實驗申請表」業經動物實驗管理小組 實質形式審查通過。
本計畫預定飼養應用之動物如下：

| 動物種類 | 動物數量 | 計畫執行期間 |
|-------------|-------|-------------------|
| Mice-BALB/c | 720 隻 | 97年8月1日至100年7月31日 |

The animal use protocol listed below has been reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

Protocol Title: The molecular regulated mechanism of velvet antler extracted fraction in airway allergic murine model

IACUC Approval No: 97-03

Period of Protocol: Valid From: 08/01/2008 To: 07/31/2011 (mm/dd/yyyy)

Principle Investigator (PI): Hsieh, Chang-Chi

動物實驗管理小組召集人

IACUC Chairman



日期

Date 12/24

附件二、 台灣保健食品學會 2009 年會摘要

PA 027

Velvet antler extracts modulate airway hyperresponsiveness in asthmatic mice

Wen-Yu Chao (趙文瑜)、Chang-Chi Hsieh (謝長奇)*

Department of Animal Science and Biotechnology, Tunghai University, Taichung, Taiwan.

Allergic asthma is a chronic disease associated with airway hyperresponsiveness such as bronchial inflammation, eosinophils infiltration, mucus protein overproduction in airway, and increase of serum IgE. Velvet antler is a traditional Chinese medicine and healthy food. Velvet antler is extensively used to treat various diseases including modulate immune response. It was reported that velvet antler can suppress the production of IL-1 β , IL-6 and TNF- α *in vitro* which are pro-inflammatory cytokines. In this study, female BALB/c mice were sensitized and challenged with ovalbumin (OVA) to induce asthma and administered with various doses of velvet antler (50, 100, and 300 mg/kg) or prednisolone (10 mg/kg) for seven weeks. After seven weeks treatments, mice were determine the *enhanced* pause (*Penh*) using whole body plethysmography, pulmonary cell infiltration and T cell differentiation, anti-OVA antibodies and modulated cytokines analysis. It was showed that velvet antler extract can significantly decreased airway hyper-reactivity after OVA challenged. Anti-OVA IgE and anti-OVA IgG1 were significantly decreased and anti-OVA IgG2a were significantly increased in asthmatic mice. It suggested that velvet antler might effectively regulate T cells differentiation and modulated immunoglobulin to regulated hyperresponsiveness in asthma. Velvet antler might be an idea immunomodulator for functional food in allergic constitutions.

Keywords: Airway hyperresponsiveness, Allergic constitutions, Immunomodulation, Velvet antler.

PA 028

培養基組成與培養條件對蛹蟲草菌生質量及胞外多醣體生成之影響

李柏儀、陳姿蓉、唐添筑、施雅芳、徐泰浩

大葉大學生物產業科技學系

蛹蟲草 (*Cordyceps militaris*) 又叫北蟲草及北冬蟲夏草，具有許多生物活性，包含抗癌、抗發炎、抗氧化及降低血脂作用。本研究主要探討培養基組成與培養條件對藥用真菌蛹蟲草菌絲體及胞外多醣體生成之影響。以麥芽糖為碳源與酵母萃取物為氮源時可測得最高菌絲體生質量，胞外多醣含量以葡萄糖及蛋白脲最高。轉速 125 rpm 培養時可測得最高菌絲體生質量，胞外多醣含量以轉速 150 rpm 培養時最高。22 $^{\circ}$ C 培養時可測得最高菌絲體生質量與胞外多醣體。以蔗糖為碳源時菌絲體生質量及胞外多醣體含量皆有相當的水準，因此蔗糖較有利於產量之增加。生產菌絲體生質量及胞外多醣可依需要選擇較適當之氮源，轉速 125 rpm ~ 150 rpm 與 22 $^{\circ}$ C 培養蛹蟲草時可獲到最大量菌絲體生質量及胞外多醣產量。因此適當培養基組成與培養條件對蛹蟲草生長扮演重要角色。

關鍵字：蛹蟲草、生物活性、藥用真菌、生質量、胞外多醣體

附件三、 2009 年全球華人保健食品大會摘要

O-27: Velvet antler extracts modulate airway hyperresponsiveness

Wen-yu Chao, Shyi-kuen, Yang, Chang-chi Hsieh

Department of Animal Science and Biotechnology, Tunghai University, Taiwan

Allergic asthma is a chronic disease associated with airway hyperresponsiveness such as bronchial inflammation, eosinophils infiltration, and increase of serum IgE. In this study, we established the animal model to realize the effect of velvet antler in airway hyperresponsiveness. Female BALB/c mice were sensitized and challenged with ovalbumin (OVA) to induce airway hyperresponsiveness, and then administered with various doses of velvet antler (50, 100, and 300 mg/kg) or prednisolone (10 mg/kg) for seven weeks. After treatments, the enhanced pause (Penh) of mice was determined using whole body plethysmography. Then mice were sacrificed and collected airway draining lymphocytes (LN), bronchoalveolar lavage fluid (BALF), spleen for infiltrated differentiation of T lymphocytes, lung inflammatory cell infiltration, anti-OVA antibodies and cytokines analysis. Velvet antler extracts significantly decreased Penh after OVA challenge. Velvet antler extract also decreased IL-4 and IL-5 secretion in BALF at 48 hour after the OVA inhalation. Furthermore, anti-OVA IgE and IgG1 were significantly decreased and anti-OVA IgG2a were increased in serum and BALF in asthmatic mice. Velvet antler extract also decreased the leukocytes infiltration in BALF. It is suggested that velvet antler effectively regulates differentiation of T cells, modulates immunoglobulin production and down-regulates inflammatory cells infiltration, and hence regulates airway hyperresponsiveness.

O-28: Effect of oxidized cholesterol and phytosterol on blood cholesterol

Zhen-yu Chen, Lei guan, Gui-hua Xu, Rui Jiao, Chi-ho Ng

Food & Nutritional Sciences Programme, Department of Biochemistry, The Chinese University of Hong Kong, P.R. China

Human diets contain both cholesterol and phytosterols with the former being present in foods of animal origin while the latter being mainly found in foods of plant origin. Both cholesterol and phytosterol are susceptible to oxidation to form a series of oxidation products under various food processing conditions. It is well known that high cholesterol consumption elevates plasma total cholesterol (TC) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels and increases the risk of coronary heart diseases (CHD). However, the effect of cholesterol oxidation products (COPs) and phytosterol oxidation products (POPs) in diet on blood cholesterol is unknown. Therefore, we have investigated the effect of COPs on blood cholesterol level, atherosclerotic plaque formation and endothelium function, finding that COPs is much more hypercholesterolemic and atherogenic than non-oxidized cholesterol. We have also studied the effect of phytosterol and POPs on blood cholesterol, finding that phytosterol possesses potent hypocholesterolemic property while POPs have no such activity. While the current recommendation for daily cholesterol intake is less than 300mg, and the food label must present the amount of cholesterol in foods, adverse effect of COPs and POPs in diet on blood cholesterol and artery function should not be ignored.