

東海大學食品科學研究所
Graduate Institute of Food Science
TUNGHAI UNIVERSITY

食品科技組
Food Technology Section

碩士論文
Master thesis

指導教授：盧錫祺 博士
Advisor: Lu, Hsi-Chi, Ph. D.

探討木犀草素在 BV-2 細胞中的抗發炎機制
Mechanism of Anti-inflammatory Activities of Luteolin
in BV-2 Cells

研究生：宋佩娟 撰
Graduate Student: Song, Pei-Jyuan

中華民國九十七年十二月
December, 2008

謝 誌

論文的完成仰賴許多人的幫忙，謹以此向大家獻上我由衷的感謝。感謝恩師 盧錫祺老師在實驗態度和思考模式的訓練，及生活上的照顧與關懷。當我面對許多壓力時，總會適時的提醒我以另一面去思考，將沮喪、消沉轉換成正面的力量。感謝中山醫學大學 關宇翔老師對於論文給予多面向的思維，提供許多精闢的建議，使得論文更加完善。

感謝台中榮總教研部 陳春榮老師在我研究生涯中，教導我研究的方法及實驗的思考方向，更在論文的完成上花費許多心力。感謝教研部 R401 中的廖素蘭學姊、阮淑玲學姊在實驗上的協助與生活上的關懷叮嚀，及任昀學長、重強學長、慶憶學長、玉涵學姊、小眼、玉汝、小董、阿曉、鈺婷、雅妮給予扶持及勉勵，且提供一個愉快、溫暖的工作氣氛。感謝實驗室裡滑頭學姊、大魚學姊、修碧學姊、西瓜學長沒有架子的親切感讓我剛當上研究生就喜歡上實驗室的生活，還有一起從大學走到研究所具有深厚革命情感的鈺玲、老張，學弟妹茹婕、惠蘭、宇男、心語、附偉、汝翔、山熊的陪伴和支援，豐富了我的研究所生活。

最後，感謝默默支持我的爸媽、姊姊和弟弟，有你們強力的後盾和提供我疲累時的避風港，讓我可以心無旁騖的不斷往前，謝謝你們的包容和鼓勵！謝謝你們！

宋佩娟 謹致於

台中榮總教研部 R401

中華民國九十七年十二月

目錄

摘要.....	1
Abstract.....	3
縮寫表.....	5
一、前言.....	7
1-1、發炎反應.....	7
1-2、中樞神經系統與發炎反應.....	7
1-3、類黃酮與發炎反應.....	10
1-4、調控發炎相關途徑:(一)MAPK 傳訊路徑.....	11
1-5、調控發炎相關途徑:(二) JAK/STAT 傳訊路徑.....	13
1-6、研究目的.....	16
二、材料與方法.....	17
2-1、實驗材料.....	17
2-2、BV-2 cell line 微神經膠細胞株培養.....	17
2-3、細胞存活率分析(MTS assay).....	18
2-4、測量一氧化氮的生成.....	18
2-5、酵素連結免疫分析(ELISA).....	18
2-6、RT-PCR.....	19
2-7、蛋白質定量.....	22
2-8、製備細胞核萃取液.....	22
2-9、西方轉漬法.....	22
2-10、統計分析.....	23
三、結果.....	24
3-1、木犀草素對脂多醣/干擾素- γ 所誘發一氧化氮及誘導型一氧化氮合成酶的 影響.....	24
3-2、木犀草素對脂多醣/干擾素- γ 所誘導發炎相關基因表現之分析.....	24
3-3、木犀草素對脂多醣/干擾素- γ 誘發 MAPK 訊息傳遞路徑活化之影響..	25
3-4、木犀草素對脂多醣/干擾素- γ 誘發 Akt 活化之影響.....	26
3-5、木犀草素對脂多醣/干擾素- γ 誘發 JAK/STAT 路徑活化之影響.....	27
3-6、木犀草素對脂多醣/干擾素- γ 誘發NF- κ B的活性分析.....	28
3-7、木犀草素對脂多醣/干擾素- γ 誘發IRF-1生合成分析.....	29
四、討論.....	30
五、圖表.....	36
表一.....	21
圖 3-1、脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對一氧化氮及誘導 型一氧化氮合成酶生合成的影響。.....	36
圖 3-2、探討木犀草素及脂多醣/干擾素- γ 是否會對微神經膠細胞產生毒 性。.....	37

圖 3-3、脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對發炎相關基因的影響。	38
圖 3-4、脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對 COX-2 生合成的影響。	39
圖 3-5、脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對促發炎細胞激素生合成的影響。	40
圖 3-6、脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對 MEK 及 ERK 活性的影響。	41
圖 3-7、脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對 p38 活性的影響。	42
圖 3-8、脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對 JNK 活性的影響。	43
圖 3-9、脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對 Akt 活性的影響。	44
圖 3-10、觀察脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對 STAT 轉錄因子活化的影響。	45
圖 3-11、脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，探討 AG490 對一氧化氮、IL-6 和 TNF- α 表現的影響。	46
圖 3-12、觀察脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對 JAK 活性的影響。	47
圖 3-13、觀察脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對 Src 活性及 SOCS-3 生合成的影響。	48
圖 3-14、脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對 NF- κ B 活化的影響。	49
圖 3-15、脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對 IRF-1 生合成的影響。	50
六、參考文獻	51
附圖一	60

摘要

微神經膠細胞為中樞神經系統主要的常駐型免疫細胞，當有刺激活化壓力時可因應變化大量表現一氧化氮、腫瘤壞死因子- α 、介白素 1 β 和介白素 6 等促發炎相關物質，啟動先天性免疫進而擴展發炎反應。文獻指出，過度活化的微神經膠細胞及所產生的促發炎相關物質會造成神經細胞死亡，導致阿茲海默症等神經退化性疾病。木犀草素為類黃酮成份的一種，具有抗氧化、抗腫瘤、抗過敏及抗發炎等生物活性。研究顯示木犀草素具有神經保護功效而潛在的作用機制可能與抗發炎生物活性有關。木犀草素週邊抗發炎作用及機制已被廣泛討論，然而在中樞神經系統中的抗發炎功效及作用機制仍不明瞭。因此本研究探討木犀草素潛在的中樞抗發炎活性及作用機轉。脂多醣/干擾素- γ 刺激可活化 BV-2 微神經膠細胞株表現促發炎相關物質，例如腫瘤壞死因子- α 、誘導型一氧化氮合成酶、介白素 1 β 、環氧酶等基因表現及產物釋出。不具細胞毒性的木犀草素可抑制這些基因 mRNA 及蛋白質表現，意謂著木犀草素的抑制作用是發生在促發炎相關基因的轉錄層次。通常細胞內訊息傳遞分子例如 MAPKs、Akt、酪胺酸激酶(如 Jak 家族、Src)等可因應變化而改變生物活性，這些訊息傳遞路徑的下游作用對象之一為轉錄因子。常見 NF- κ B、IRF、STAT 等轉錄因子負責調控細胞基因的表現，包括促發炎相關基因。藥理活性分析發現，ERK、JNK、p38、Akt、Jak 等訊息傳遞分子活性抑制劑都可降低脂多醣/干擾素- γ 刺激所造成的促發炎物質生合成釋出。藉由蛋白質磷酸化西方轉漬法分析發現，脂多醣/干擾素- γ 刺激會促進 ERK、JNK、p38、Akt、Jak1、Jak2、Tyk2、Src 等訊息傳遞分子活性，木犀草素可抑制 ERK、JNK、p38、Akt、Src 等訊息傳遞分子的活化，但是對於 Jak1、Jak2、Tyk2 等訊息傳遞分子活性則沒有顯著變化。透過 I κ B- α 磷酸化及 NF- κ B 次單元 p50、p65、RelB 核轉移幅度證實脂多醣/干擾素- γ 刺激會活化 NF- κ B 轉錄因子，而木犀草素可藉由抑制 I κ B- α 磷酸化及 NF- κ B 次單元 p65 及 RelB 核轉移幅度來降低 NF- κ B 轉錄因子活性。脂多醣/干擾素- γ 刺激增加轉錄因子 IRF-1 蛋白質表現，木犀草素顯著抑制 IRF-1 的誘導表現。脂多醣/干擾素- γ 刺激可增加

STAT-1 及 STAT-3 蛋白質磷酸化導致轉錄活性上升。木犀草素抑制 STAT-1 及 STAT-3 蛋白質磷酸化及轉錄活性。進一步分析發現，雖然木犀草素不影響 STAT 上游活化激酶 Jak1、Jak2、Tyk2 活性，卻會抑制另一個 STAT 上游活化激酶 Src 活性，此外，木犀草素可誘發 STAT 活性抑制蛋白質 SOCS3 的表現。本研究結果發現，木犀草素可透過干擾 ERK、JNK、p38、Akt、Src 等訊息傳遞分子及 NF- κ B、IRF-1、STAT-1、STAT-3 等轉錄因子活性進而顯現中樞抗發炎功效。

Abstract

Microglia, resident immune cells in the central nervous system (CNS), respond to extracellular insults by releasing diversity of pro-inflammatory mediators such as nitric oxide (NO), tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin 1 (IL-1 β), and IL-6, leading to the initiation and promotion of inflammation. Evidence indicates that over-activated microglia and the associated pro-inflammatory mediators cause neural cell damage and contribute to several neurological disorders such as Alzheimer's disease. Luteolin, a flavonoid compound, exhibits anti-oxidative, anti-neoplastic, anti-allergic, and anti-inflammatory effects. Study suggests the neuroprotective effect of luteolin and proposes an anti-inflammatory mechanism. While the anti-inflammatory action is well demonstrated in the peripheral system, the role and potential action mechanisms of luteolin against inflammation in the CNS are largely unclear. The study was aimed to elicit the potential anti-inflammatory effect and mechanisms of luteolin against inflammatory responses in BV2 microglia cell lines after lipopolysaccharide (LPS)/interferon (IFN- γ) stimulation. LPS/IFN- γ stimulation caused BV2 cells elevating several pro-inflammatory mediators biosynthesis and releasing such as TNF- α , iNOS, IL-6, and cyclooxygenase-2. Non-toxic level of luteolin reduced LPS/IFN- γ -induced pro-inflammatory mediator production at the level of mRNA and protein. That is, the anti-inflammatory effect of luteolin is mediated by transcriptional regulation. Generally, intracellular signaling molecules such as ERK, JNK, p38, Akt, Jak family members, and Src could transduce extracellular signals to induce gene expression particularly pro-inflammatory genes through the modulation of transcription factors. Transcription factors such as NF- κ B, IRF, and STAT are commonly downstream effectors of these signaling pathways. The inhibition of ERK, JNK, p38, Akt, and Jak activity by pharmacological inhibitors attenuated LPS/IFN- γ -induced pro-inflammatory mediator production. LPS/IFN- γ stimulation increased ERK, JNK, p38, Akt, Jak1, Jak2, Tyk2, and Src activity in BV2 cells, as evidenced by the elevated protein phosphorylation. Luteolin decreased ERK, JNK, p38, Akt, and Src but not Jak1, Jak2, and Tyk2 activity in LPS/IFN- γ -treated cells. LPS/IFN- γ stimulation caused I κ B- α phosphorylation and triggered p50, p65, and RelB NF- κ B subunit nuclear accumulation, indicating an activation of NF- κ B. Luteolin attenuated LPS/IFN- γ -induced I κ B- α phosphorylation and p50 and RelB nuclear accumulation leading to a resolution of NF- κ B activation. LPS/IFN- γ

increased IRF-1 protein expression resulting in activation and the increased IRF-1 expression was attenuated by luteolin. LPS/IFN- γ stimulated STAT-1 and STAT-3 activity through the increased protein phosphorylation. Luteolin reduced LPS/IFN- γ -induced STAT-1 and STAT-3 phosphorylation. Although luteolin had little effect on Jak family protein activity, another STAT upstream activator Src was inactivated in LPS/IFN- γ stimulated cells by luteolin. Besides, luteolin increased SOCS3 protein expression, a negative regulator of STAT activation. Taken together, our experimental findings indicate that the anti-inflammatory effects of luteolin in microglia cells could be mediated by the down-regulation of ERK, JNK, p38, Akt, Src signaling molecules and NF- κ B, IRF-1, STAT-1, and STAT-3 transcription factors.

縮寫表

CNS	central nervous system
COX	cyclooxygenase
DMEM	Dulbeccos' modified Eagles' medium
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ELISA	enzyme-linked immuno-sorbent assay
FBS	fetal bovine serum
IFN- γ	interferon- γ
IL-1 β	interleukin-1 beta
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IRF-1	interferon regulatory factor-1
JAK	Janus kinase
JNK/SAPK	c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase
LPS	lipopolysaccharide
MAPK	mitogen-activated protein kinase
NF- κ B	nuclear factor- κ B
NO	nitric oxide
PBS	phosphate-buffered saline
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
ROS	reactive oxygen species
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SOCS	suppressors of cytokine signaling
STAT	signal transducer and activator of transcription

STK	Src-family tyrosine kinase
TNF- α	tumor necrosis factor- α
Tyk2	tyrosine kinase 2

一、前言

1-1、發炎反應

發炎(inflammation)是身體對感染原或抗原入侵或身體受傷時所做的反應，有紅、腫、熱、痛等症狀，可觀察到感染部位血液供應量增加、微血管通透性增加及白血球浸潤到組織中。一般來說，發炎反應可分成急性發炎反應(acute inflammatory response)及慢性發炎反應(chronic inflammatory response)。急性發炎反應產生相當快速，通常伴隨全身性反應，而慢性發炎反應為抗原長期存在而發展出來。發炎反應會釋出發炎媒介物，吸引免疫細胞聚集到感染處，像嗜中性白血球(neutrophils)、單核球(monocytes)、淋巴球(lymphocytes)及巨噬細胞(macrophages)等(Douglas *et al.*, 2002)。一開始被活化的是嗜中性球，隨後巨噬細胞也參與反應，晚期才有負責專一性免疫反應的淋巴球出現在發炎部位。巨噬細胞為宿主防禦系統的第一道防線，當受到病原菌入侵或受傷刺激後，會釋放細胞激素、一氧化氮、二十碳烯酸(eicosanoid)等。適度的發炎反應有助於清除入侵的病原菌，但過度的發炎則會對正常的細胞造成傷害甚至有致死的可能，常見與過度發炎相關的疾病有類風濕性關節炎(rheumatoid arthritis)、發炎性腸道疾病(inflammatory bowel disease)、敗血性休克(septic shock)及異位性皮膚炎(atopic dermatitis)等。

1-2、中樞神經系統與發炎反應

中樞神經系統主要由神經元細胞(neurons)及神經膠細胞(glial cells)兩種細胞型態所組成，神經膠細胞包含星狀神經膠細胞(astrocytes)、寡樹突細胞(oligodendrocytes)及微神經膠細胞(microglia)。微神經膠細胞在神經膠細胞中約佔5-12% (Kim and de Vellis, 2005; Dheen *et al.*, 2007)。中樞神經系統(central nervous system, CNS)有特殊的免疫系統，主要分子為微神經膠細胞，利用吞噬作用(phagocytosis)移除受損的細胞(Streit *et al.*, 2005; Dheen *et al.*, 2007)。在體外分

析中，微神經膠細胞會被多種發炎物質如脂多醣(lipopolysaccharide, LPS)、乙型-澱粉樣蛋白(β -Amyloid, A β)、凝血酶(thrombin)、促發炎細胞激素及干擾素(interferon- γ , IFN- γ)刺激而活化(Dheen *et al.*, 2007)，活化後的微神經膠細胞會快速增生，且分泌大量的促發炎細胞激素，像腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、介白素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、介白素-6 (interleukin-6, IL-6)及細胞毒性分子，例如一氧化氮(nitric oxide, NO)和活性氧物質(reactive oxygen species, ROS)，造成腦部的神經退化，而這些發炎物質也與許多神經退化性疾病有關(Jeohn *et al.*, 1998; Dheen *et al.*, 2005)。中樞神經系統的發炎過程會使神經細胞死亡，造成神經退化性疾病(neurodegenerative disease)，例如帕金森氏症(Parkinson's Disease, PD)、阿茲海默症(Alzheimer's Disease, AD)及多發性硬化症(Multiple Sclerosis, MS)等(Dheen *et al.*, 2007)。

當組織中的巨噬細胞被免疫刺激原活化後，會釋出一氧化氮等媒介物具有抗微生物及抗腫瘤的效果，相對的微神經膠細胞若所產生過量的一氧化氮也會對神經細胞產生毒性(Chao *et al.*, 1992)。一氧化氮是由一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)催化 arginine 所產生，到目前為止一氧化氮合成酶分成持續性表現及誘導型表現兩種。神經性一氧化氮合成酶(nNOS)與內皮性一氧化氮合成酶(eNOS)屬於持續性表現，主要由細胞中鈣離子濃度來調控；誘導型一氧化氮合成酶(iNOS)不受鈣離子濃度影響，一般情況下不會表現，而會被細胞激素及脂多醣刺激誘發表現(Heneka *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002)。內皮性一氧化氮合成酶所產生的一氧化氮，與調節血管擴張有關；神經性一氧化氮合成酶產生的一氧化氮與神經傳導相關；在巨噬細胞及其他細胞中，誘導型一氧化氮合成酶所產生的一氧化氮則參與了發炎反應(Guzik *et al.*, 2003)。經由脂多醣或多種細胞激素刺激後，巨噬細胞、微神經膠細胞、星狀神經膠細胞及神經元皆會快速表現誘導型一氧化氮合成酶(Stuehr and Marletta, 1985; Galea *et al.*, 1992; Minc-Golomb *et al.*, 1994)。一氧化氮的功能為一體兩面，適量的一氧化氮有助於抵抗外來微生物的侵入，但過多的一氧化氮會對細胞造成毒性(Heneka *et al.*, 2000)。在大腦中的誘

導型一氧化氮合成酶所產生的一氧化氮，會對神經元細胞及寡樹突細胞造成傷害且死亡，而一氧化氮與帕金森氏症、阿茲海默症及多發性硬化症有關(Kim and de Vellis, 2005)。

COX(cyclooxygenase)有兩種催化活性，第一個是bis-oxygenase activity，催化花生四烯酸(arachidonic acid)轉變成前列腺素G₂(PGG₂)，第二個是peroxidase activity，進一步使PGG₂還原成PGH₂，再利用專一性合成酶產生與發炎反應相關的前列腺素(prostaglandins)(Minghetti, 2004)。COX有兩種異構型，分別為COX-1及COX-2，其同源性高達 65%。COX-1 在大部分的組織中穩定持續的表現調控生理的現象，如胃部的保護機制及血小板的凝集作用；而COX-2 屬於誘導型酵素，當受到生長因子、細胞激素及脂多醣刺激後會被誘導表現，在急性及慢性發炎反應中，催化前列腺素的產生。文獻指出，在微神經膠細胞中IL-1 β 、TNF- α 及IL-6 會誘發COX-2 的表現。COX-2 大量表現及催化前列腺素的產生，與神經退化性疾病中的肌萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis)、多發性硬化症、帕金森氏症有關(Consilvio et al., 2004; Minghetti, 2004)。在大腦中抑制前列腺素的生合成，可快速且有效的緩和疼痛感(Pallapies *et al.*, 1995)。

微神經膠細胞活化後，會產生大量的促發炎細胞激素，包括 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 及具有細胞毒性的物質，像一氧化氮及活性氧物質等。細胞激素是胜肽荷爾蒙和神經傳導物質，會活化一連串與發炎反應相關的訊息傳遞路徑(Safieh-Garabedian *et al.*, 2004)。這些物質作用在神經元細胞、星狀神經膠細胞、寡樹突細胞或微神經膠細胞本身，會直接或間接的造成神經元細胞的死亡(Hanisch, 2002; Nakamura, 2002)。大量的 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 會直接破壞神經元細胞及髓鞘的結構，造成神經元細胞的死亡及去髓鞘化(demyelination)(Zielasek and Hartung, 1996)。有文獻指出，TNF- α 會誘導星狀神經膠細胞釋出過量的麩胺酸(glutamate)，造成神經細胞的死亡(Bezzi *et al.*, 2001)，而 TNF- α 和 IL-1 β 合併使用會誘發大腦皮層神經細胞的死亡(Chao *et al.*, 1995)。

1-3、類黃酮與發炎反應

類黃酮(flavonoids)在自然界中的種類非常多，目前已知有 4000 種以上的衍生物存在。類黃酮是一種天然的多酚類化合物(polyphenols)，為植物的二級代謝物(secondary metabolites)，廣泛存在於植物、蔬菜及水果中，賦予蔬果顏色及風味(Ross and Kasum, 2002)。類黃酮基本的結構由兩個六碳的苯環(A 及 B 環)中間接著一個三碳環(C 環)所組成，每個環上碳的位置皆可接上甲基、氫氧基等官能基，所以類黃酮種類繁多。類黃酮依結構可分為六類：黃酮(flavones)、黃酮醇(flavonols)、黃烷醇(flavanols)、黃烷酮(flavanones)、異黃酮(isoflavones)及花青素(anthocyanidins)(Middleton *et al.*, 2000)。過去許多研究指出類黃酮具有抑制血管新生(anti-angiogenesis)、抗氧化(antioxidation)、抗腫瘤(anti-tumor)、抗過敏(antiallergic)、抗病毒(antiviral)及抗發炎(anti-inflammatory)等生物活性(Formica and Regelson, 1995; Fotsis *et al.*, 1997)。

研究證實類黃酮化合物具有抗發炎的作用。在體外實驗中，從 *Amorpha fruticosa* 中分離出來的類黃酮化合物 amoradin，可抑制脂多醣誘發巨噬細胞 RAW264.7 所產生之 TNF- α (Cho *et al.*, 2000)。EGCG(epigallocatechin gallate)、Carnosol 和 Curcumin 皆抑制脂多醣及干擾素- γ 誘發腹腔巨噬細胞所釋出一氧化氮(Chan *et al.*, 1995)。從 *Waltheria indica* 分離出的類黃酮可抑制脂多醣/干擾素- γ 誘發小鼠腹腔巨噬細胞所產生的一氧化氮及 TNF- α (Rao *et al.*, 2005)、中草藥黃芩中分離出的 Wogonin 可抑制脂多醣誘發巨噬細胞產生一氧化氮、誘導型一氧化氮合成酶、PGE₂ 及 COX-2 的表現(Chen *et al.*, 2001)。Quercetin 可抑制脂多醣刺激巨噬細胞 RAW264.7 後，所產生的一氧化氮和 TNF- α (Manjeet and Ghosh, 1999)。

木犀草素(luteolin)即為類黃酮的一種，在芹菜、青椒、紫蘇及洋甘菊中大量存在，從紫蘇(*Perilla frutescens*)中分離出的木犀草素(luteolin)為抗發炎及抗過敏的活性成份(Ueda *et al.*, 2002)。Quercetin 及木犀草素亦可抑制 IL-1 β 活化星狀神經膠細胞後活性氧物質的分泌(Sharma *et al.*, 2007)。在骨髓巨噬細胞(bone marrow-derived macrophages)中經由脂多醣刺激後，Quercetin、Genistein、木犀草

素抑制了 TNF- α 的產生，而 Quercetin、木犀草素、apigenin 和 diosmetin 則可抑制誘導型一氧化氮合成酶和一氧化氮的表現，亦能抑制 I κ B α 磷酸化，但 Genistein 沒任何作用，所以 Quercetin、木犀草素、apigenin 和 diosmetin 的抗發炎機制可能是與轉錄因子 NF- κ B 有關(Comalada *et al.*, 2006)。有研究指出，在脂多糖刺激巨噬細胞 RAW264.7 後，木犀草素有效的抑制 TNF- α 和 IL-6 的釋出，也能抑制酪胺酸、Akt 及 I κ B α 的磷酸化，進而抑制 NF- κ B 啟動子的活性，達到抗發炎的作用(Xagorari *et al.*, 2001)。進一步實驗證明，木犀草素亦能抑制 ERK、p38 及酪蛋白激酶-2 (casein kinase 2, CK2)的磷酸化(Xagorari *et al.*, 2002)。由以上結果得知，類黃酮可透過抑制轉錄因子的活化及訊息傳遞路徑中蛋白質激酶的磷酸化而達到抗發炎的效果。

1-4、調控發炎相關途徑：(一)MAPK 傳訊路徑

蛋白質激酶(protein kinase)可把磷酸根專一性的共價鍵結到特定蛋白質上的酪胺酸(tyrosine)、絲胺酸(serine)及蘇胺酸(threonine)，磷酸化後可以調控酵素活性、與其他蛋白質作用、改變在細胞中的位置及被蛋白質水解酶分解等。真核生物發展出多種可把細胞外訊息傳送到細胞內的蛋白質分子，MAPKs(mitogen-activated protein kinase)即是其中一種。MAPKs 是由一群蛋白質激酶家族所組成，只對蛋白質上的絲胺酸及蘇胺酸磷酸化，磷酸化調控多種細胞活性包括基因表現、有絲分裂(mitosis)、移動、代謝及細胞凋亡(apoptosis)等，其範圍從單細胞生物如酵母菌到有複雜機制的人類都存在(Johnson and Lapadat, 2002)。MAPK 將受質磷酸化可使受質的活性上升或抑制，這些受質包括蛋白質激酶、磷脂酶(phospholipases)、轉錄因子及骨架蛋白(cytoskeletal proteins)等。當細胞被活化後 MAP3K(MAPK kinase kinases, MKKK)會對 MAP2K(MAPK kinases, MKK)磷酸化，MAP2K 接著對 MAPK 磷酸化，所以 MAPK 訊息傳遞路徑是一連串激酶的磷酸化反應。MAPK 屬於絲胺酸/蘇胺酸家族，在哺乳類動物中有三個個別的 MAPK 途徑被確認，分別為 ERK(extracellular signal-regulated kinase, ERK1

及 ERK2)、JNK/SAPK(c-jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase)及 p38 kinase，對外在不同刺激反應不同。ERK 會受到生長因子、細胞激素及病毒感染的刺激，JNK 及 p38 kinase 則會被壓力刺激所活化，如 UV 輻射、熱休克、滲透壓、致突變劑、脂多醣及促發炎細胞激素如 TNF- α 和 IL-1 β 等，所以又屬於 stress-activated protein kinases (SAPK) (Cobb, 1999; Ji, 2004; Kim and de Vellis, 2005)。ERK 和調控細胞生長與分化有關，而 JNK 控制細胞的凋亡，p38 MAPK 被促發炎細胞激素活化後，會調控許多細胞激素的表現所以與人類疾病有關，像氣喘和自體免疫疾病(Johnson and Lapadat, 2002)。研究證明，活化 ERK 和 p38 MAPK 會增加許多發炎媒介物的合成，如誘導型一氧化氮合成酶和 COX-2 (Ji, 2004)。分別用 IL-1 β 刺激星狀神經膠細胞和脂多醣活化微神經膠細胞，皆可大量增加 TNF- α mRNA 及蛋白質釋出，給予 p38 MAPK 專一性抑制劑 SB203580 後，可有效抑制星狀神經膠細胞及微神經膠細胞 TNF- α 的分泌，所以 p38 MAPK 在 IL-1 β 刺激星狀神經膠細胞和脂多醣活化微神經膠細胞中，扮演增加 TNF- α 表現的角色(Lee *et al.*, 2000)。

PI3K(phosphoinositide 3-kinases)調控一系列的細胞功能，包括細胞增殖(proliferation)、分化(differentiation)、細胞凋亡、細胞骨架(cytoskeleton)及細胞膜物質流動(membrane traffic)等(Gamet-Payrastra *et al.*, 1999)。Akt 是一個位於 PI3K 下游的磷酸化激酶(serine/threonine kinase)，其序列上相似於 PKC(protein kinase C)及 PKA(protein kinase A)，所以也稱為 PKB (protein kinase B)。目前在哺乳動物中有三種 Akt 被確認，分別為 Akt1(PKB α)、Akt2(PKB β)和 Akt3(PKB γ)。Akt 基本結構是由 PH 功能部位(pleckstrin homology domain)、催化功能部位(catalytic domain)及一個位於 C-terminal 的絲胺酸調節功能部位所組成。PI3K 調控 Akt 活性的方式是召集 Akt 到細胞膜，讓 PDK1(3-phosphoinositide-dependent kinase 1)對 Akt Thr308 磷酸化，PDK2 再對 Akt Ser473 磷酸化使 Akt 活化。Akt 會被生長因子活化，如胰島素及胰島素生長因子(insulin growth factor-1)等，Akt 的活化會促進細胞週期的進行、細胞存活及代謝等功能(Vanhaesebroeck *et al.*, 1997;

Blanco-Aparicio *et al.*, 2007)。有文獻指出，經由抑制 PI3K/Akt 的途徑而抑制 NF- κ B 的活化，則可抑制許多促發炎細胞激素的產生，而有抗發炎的效果(Giri *et al.*, 2004)。

NF- κ B(nuclear factor- κ B)在發炎反應調控上為重要的轉錄因子，可被許多刺激原活化，像細胞激素、氧自由基、UV 輻射、細菌或病毒產物，活化後誘導許多細胞激素、趨化激素、生長因子及細胞黏著分子的基因表現。不適當的活化與許多發炎疾病有關，像關節炎、氣喘、敗血性休克、肺部纖維化、動脈硬化、發炎性腸道疾病及 AIDS 等。在哺乳類動物中，NF- κ B 有五個家族成員被確認，分別為 NF- κ B1(p50/p105)、NF- κ B2(p52/p100)、RelA(p65)、RelB 及 c-Rel。所有的 NF- κ B 家族成員在 N-terminal 的 300 個胺基酸序列都有高度的相似性，稱為 Rel 同質性區域(Rel homology domain)。這個區域與調控 DNA 結合、形成雙聚體及與抑制性蛋白 I κ B 結合有關。在不活化狀態下，NF- κ B 與 I κ B 互相結合位在細胞質中，一旦接受外來刺激如脂多醣、干擾素- γ 或 TNF- α 活化後，I κ B 會被 I κ B 激酶磷酸化，磷酸化後的 I κ B 會被 proteasome 分解，一旦 I κ B 從 NF- κ B 的複合物中解離出來後，NF- κ B 就會從細胞質中轉位到核內，結合到啟動子上特定的 DNA 序列，活化下游基因的轉錄活性(Xagorari *et al.*, 2001)。活化狀態的 NF- κ B 通常以同質二聚體(homodimer)或異質二聚體(heterodimer)存在，最常見的型態是 p50/p65、p52/p65，其他還有以 p50/p50、p52/p52、RelA/RelA、RelA/c-Rel 等形式存在(Chen *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2007; Wu and Miyamoto, 2007)。在免疫及發炎相關反應中，轉錄因子 NF- κ B 可以調控誘導型一氧化氮合成酶、COX-2、血管細胞間黏著分子(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)和細胞間黏著分子(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)基因的表現(Aktan, 2004)。

1-5、調控發炎相關途徑：(二)JAK/STAT 傳訊路徑

細胞激素和生長因子經由活化 JAK(Janus kinase)/STAT (signal transducer and activator of transcription)途徑調控許多免疫及發炎反應。JAK 家族成員包括

JAK1、JAK2、JAK3 及 Tyk2(tyrosine kinase 2)，位於細胞膜內側且附著於受器上，屬於非受器酪胺酸激酶(non-receptor tyrosine kinases)，其長度超過 1000 個胺基酸，分子量在 120-130 kDa 之間。JAK1、JAK2 和 Tyk2 在大部分細胞中皆存在，而 JAK3 只有在骨髓及淋巴系統中表現。在哺乳類動物中，有七種 STATs 蛋白質被確認出來，包括 Stat1、Stat2、Stat3、Stat4、Stat5a、Stat5b 及 Stat6。干擾素家族(IFN- $\alpha/\beta/\gamma$)、介白素家族(IL-10, IL-19, IL-20, IL-22)、gp130 家族(IL-6, IL-11, IL-12, IL-23)皆可活化 STATs。有文獻指出，干擾素- γ 的訊息傳遞主要是透過 JAK/STAT 途徑，當干擾素- γ 與其受器結合時，接受器會形成二聚體使 JAK 彼此靠近，JAK-1 和 JAK-2 會自行磷酸化接著對受器的酪胺酸磷酸化，磷酸化後的受器會吸引 STAT1 靠近，JAK-1 和 JAK-2 對 STAT1 磷酸化後，STAT1 會形成二聚體，接著轉位至細胞核中與 GAS(IFN- γ -activated site)結合，活化特定基因的轉錄活性。研究證明，干擾素- γ 會誘導混合神經膠細胞中 STAT1 的活化及 IRF-1(interferon regulatory factor-1)的表現(Choi *et al.*, 2005)。IRF-1 即是 STAT1 誘發活化的基因之一，對於干擾素- γ 誘導的基因表現中佔有重要角色(Kisseleva *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2004)。有文獻進一步指出在小鼠微神經膠細胞中，脂多醣/干擾素- γ 會透過 IRF-1 誘導一氧化氮的產生，且在巨噬細胞中 IRF-1 對於誘導型一氧化氮合成酶的活化是必要的(Kamijo *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2001)，因此，JAK/STAT 和 IRF-1 參與了干擾素- γ 的訊息傳遞。

JAK/STAT 途徑參與許多重要反應，像細胞分化、增殖、內分泌調控、致癌機轉(oncogenesis)及宿主防禦反應等，文獻指出，微生物病原菌、細胞激素、趨化激素會藉由活化 JAK/STAT 路徑而強烈誘發中樞神經系統的免疫反應，對神經細胞造成傷害(Safieh-Garabedian *et al.*, 2004)，因此如何調控 JAK/STAT 更顯重要。STAT 是透過磷酸化而活化，於是可由磷酸水解酶(phosphatases)及負調控因子(negative modulators)如 SOCS(suppressors of cytokine signaling)和 PIAS(protein inhibitor of activated STAT)來調控其活性。SHP(SH2-containing phosphatase)為持續性表現的蛋白質，會結合到受器上對已被磷酸化的受器或 JAK 去磷酸化，而

抑制 STAT 的活化。PIAS 家族亦是持續性表現的蛋白質，包括 PIAS1、PIAS3、PIASx 和 PIASy，PIAS1 和 PIAS3 分別與 STAT1 及 STAT3 結合，抑制 STAT 結合到 DNA 序列上阻斷基因轉錄活性。到目前為止只有八種 SOCS 家族成員被確認出來，包括 SOCS1-7 和 CIS(cytokine-inducible SH2-domain-containing protein)。SOCS 會直接和已磷酸化的受器結合，如 SOCS2、SOCS3 和 CIS，或鍵結到 JAK 像 SOCS1，進而抑制 JAK 的活性(Wormald and Hilton, 2004)。有文獻指出，SOCS1/SOCS3 基因突變的小鼠其 STAT3 活化程度更高，結腸炎亦更加嚴重，而 SOCS3 有效抑制 STAT3 活性減緩腸道的發炎反應(Suzuki *et al.*, 2001)。凝血酶不只可以刺激微神經膠細胞產生促發炎細胞激素，也會誘導 SOCS3 表現避免微神經膠細胞長時間活化(Yang *et al.*, 2004)，因此 SOCS3 與抑制發炎反應上有極大的相關性。

Src 屬於非受器酪胺酸激酶，目前有九個家族成員，包括 Src、Fyn、Yes、Yrk、Blk、Fgr、Hck、Lck 及 Lyn，前面四個普遍存在於各種細胞，而 Lck 在 T 細胞中表現。Src 家族介導許多胞內的訊息傳遞路徑，在急性發炎反應中，Src 會吸引及活化單核球、巨噬細胞、嗜中性球及其他的免疫細胞，調控血管的通透性。研究證實，抑制 Src 可以保護局部缺血及灌流對大腦及心臟的損傷，亦可降低敗血症的發生(Okutani *et al.*, 2006)。有研究指出，Lyn、Fgr 及 Hck 這三個酪胺酸激酶參與脂多醣活化巨噬細胞，但在剔除 Lyn、Fgr 及 Hck 這三個基因後 (*lyn^{-/-}fgr^{-/-}hck^{-/-}*)，巨噬細胞對脂多醣的反應跟正常老鼠沒有差異，推測可能有其他的酪胺酸激酶參與脂多醣對巨噬細胞的活化(Meng and Lowell, 1998)。之後有研究證實，脂多醣刺激巨噬細胞產生的一氧化氮與 TNF- α ，和 c-Src 的活化有關(Leu *et al.*, 2006)。Src 在致癌機轉中被廣泛討論，文獻指出 Src 會活化 STAT3，而在許多癌症中都有 STAT3 持續活化的現象(Yu *et al.*, 2007)。

1-6、研究目的

本研究為釐清木犀草素在中樞神經系統抗發炎的作用機轉，鎖定胞內幾個

訊息傳遞分子包括 MAPKs(ERK, p38, JNK)、Akt 及 JAK/STAT，測量其蛋白質活性變化，探討木犀草素是否藉由調控這些分子活性而調節中樞神經系統的發炎反應。

二、材料與方法

2-1、實驗材料

Antibodies: p-ERK1/2 antibody、ERK1/2 antibody、p38 antibody、JNK antibody、p-Akt antibody、Akt antibody、p-JAK-1, -2 antibody、JAK-1, -2 antibody、p-Tyk2 antibody、Tyk2 antibody、p-STAT1(Y701) antibody、STAT1 antibody、p-STAT3(Y705) antibody、STAT3 antibody、p-Src antibody、Src antibody、IRF1 antibody、SOCS3 antibody、NF- κ B p65、NF- κ B p50、NF- κ B RelB、PCNA(Santa Cruz Biotechnology)、p-p38 antibody、p-JNK antibody、p-STAT3(S727) antibody(BD Biosciences)

DMEM(HyClone)

FBS、HBSS(Gibco)

Fungizone(臺灣必治妥)

HRP-conjugated secondary antibody(Jackson ImmunoResearch Laboratories)

iNOS、COX-2 antibody(Cayman)

M-MLV reverse transcriptase、MTS assay kit(Promega)

Mouse IL-6、Mouse TNF- α ELISA kit(R & D Systems, Inc)

Penicillin(永豐化工)

PVDF membrane、ECL Western blotting reagents(PerkinElmer Life Science, Inc.)

Streptomycin、Glutamine、Trypsin-EDTA、Lipopolysaccharide Interferon- γ (Sigma)

Taq DNA polymerase(Super Therm)

U0126、SB203580、SP600125、LY294002、AG490(TOCRIS)

2-2、BV-2 cell line 微神經膠細胞株培養

BV-2 細胞株是小鼠的微神經膠細胞，由臺中榮總教研部陳春榮博士實驗室所提供，保有初代微神經膠細胞的型態及功能。BV-2 細胞株以含 10%FBS之培養液(DMEM、2.2g/L Sodium bicarbonate、1% Penicillin/Streptomycin)於 37°C、5%CO₂培養箱中培養，依實驗需求分別接種於 24、96 孔盤及 60 mm培養盤。

2-3、細胞存活率分析(MTS assay)

使用CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega)商業套組進行細胞存活分析，其原理是利用活細胞中粒線體的去氫酶(dehydrogenase) 將 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt, MTS]代謝還原成可溶性產物formazan，顏色由金黃色轉成深紫色，死細胞則無法進行此反應。因此，可藉由490 nm波長來測定formazan的生成量。分別接種 1×10^4 cells/well之細胞於96孔培養盤中，每孔加入100 μ L培養液，24小時後移除培養液，加入LPS/IFN- γ 及不同濃度的Luteolin，培養24小時，再加入20 μ L MTS試劑，置於37°C、5% CO₂培養箱中1-3小時，以波長490 nm讀取吸光值。

2-4、測量一氧化氮的生成

分別接種 5×10^4 cells/well之細胞於24孔培養盤中，每孔加入500 μ L培養液，24小時後移除培養液，加入不同濃度的Luteolin前處理1小時，再添加LPS/IFN- γ 24小時後，取出50 μ L培養液於96孔盤中，先加入50 μ L Griess reagent A(0.1% naphthylethylenediamine)置避光處反應10分鐘，再加入50 μ L Griess reagent B (0.1% sulfanilamide、5% H₃PO₄) 同樣置避光處10分鐘。以ELISA reader (PowerWaveX 340, Bio-Tek, Instruments, Inc.)讀取吸光值，波長設定為550 nm。將不同濃度的標準品作出標準曲線，再以內差法估算樣品濃度。

2-5、酵素連結免疫分析(ELISA)

分別接種 5×10^4 cells/well之細胞於24孔培養盤中，反應後收集上清液，並根據DuoSet ELISA Development kit (R&D Systems, Inc)所提供之操作步驟進行測定。加入100 μ L/well Capture antibody(IL-6、TNF- α)於96孔盤中，室溫避光放置24小時，以400 μ L/well Wash buffer (0.05% Tween 20 in PBS)清洗3次，隨後加入300 μ L/well Blocking buffer (1% BSA in PBS)室溫放置1小時以上。接著以400 μ L/well Wash buffer清洗3次後，加入100 μ L/well細胞上清液及標準品，室溫放置2小時，以400 μ L/well Wash buffer清洗3次，其後加入100 μ L/well Detection antibody，室溫放置2小時。再以400 μ L/well Wash buffer清洗3次，加入100 μ L/well

Streptavidin-HRP，室溫避光放置20分鐘，並再以400 $\mu\text{L}/\text{well}$ Wash buffer清洗3次。之後加入100 $\mu\text{L}/\text{well}$ Substrate solution進行呈色反應，在室溫避光20分鐘，再加入50 $\mu\text{L}/\text{well}$ Stop solution(2N H_2SO_4)，輕拍盤身使其混合均勻，於450 nm下測其吸光值，將序列稀釋的標準品作成標準曲線，再以內插法推算細胞上清液中細胞激素的濃度。

2-6、RT-PCR

接種 1×10^6 cells/dish之細胞於6 cm培養盤中，反應後移除上清液，以冰的PBS清洗細胞2次，加入1 mL RareRNA reagent放置冰上5分鐘，再將細胞吸至微量離心管中。加入300 μL 氯仿，混合均勻後放置冰上10分鐘，以12000 rpm的轉速離心10分鐘。離心後取出上清液，加入等體積之異丙醇，放置於 -20°C 下沉澱2小時，以12000 rpm轉速離心15分鐘。離心後移除上清液，再以75%的酒精清洗沈澱物，以12000 rpm轉速離心5分鐘，移除上清液使沉澱物在室溫風乾，風乾後加入20 μL 二次水溶解。為了提高RNA純度，加入1 μL DNase於 37°C 作用30分鐘，補二次水至體積為200 μL ，再加入200 μL 酚/氯仿進行萃取，以12000 rpm轉速離心10分鐘。取出上清液加入等體積之異丙醇，放置 -20°C 下沉澱2小時後，以12000 rpm轉速離心15分鐘，離心後移除上清液，再以75%的酒精清洗沈澱物，隨後以12000 rpm轉速離心5分鐘，移除上清液後使沉澱物在室溫風乾，風乾後加入20 μL 二次水溶解，再以分光光度計定量。取5 μg 的RNA進行反轉錄(reverse transcription, RT)反應，加入1 μL 0.5 mg/mL oligo-dT及1 μL 0.5 mg/mL hexamer，於 70°C 加熱分離10分鐘後，放置冰上10分鐘。再加入4 μL 5X reverse transcription buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3、250 mM KCl、20 mM MgCl_2 、50 mM DTT)、2 μL 10 mM dNTP、1 μL 1 U RNase inhibitor及1 μL 200 U M-MLV reverse transcriptase，總反應體積為20 μL ，於 42°C 反應60分鐘，即得到終產物互補的DNA (cDNA)，再進行聚合酶鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)。加入1 μL cDNA、2.5 μL 10X reaction buffer (400 mM Tris-HCl, pH 8.0、60 mM MgCl_2 、100 mM DTT、20 mM spermidine、100 mM NaCl)、2.5 μL 2.5 mM dNTP、各1 μL 20 pmole正反股引子、0.2 U/ μL Taq DNA polymerase及二次水，總體積為25 μL 。混合均勻後，以PCR機器(Perkin- Elmer-Cetus 9700)進行擴增。所用的條件為：One cycle of

94°C, 2 min; 28 cycles of 94°C, 30 sec, 56~60°C, 30 sec, 72°C, 50 sec; then 72°C, 10min。擴增後的產物以1.5% agarose gel進行分析。

表一、聚合酶鏈鎖反應中所用到的引子序列

基因	序列	產物大小	黏合溫度(°C)
β-actin	(F) 5' TCCTGTGGCATCCACGAAACT 3' (R) 5' GGAGCAATGATCCTGATCTTC 3'	185 bp	58
IL-6	(F) 5' ATGAAGTTTCTCTCCGCAAGAGACTTCCAGCCAG 3' (R) 5' CTAGGTTTGCCGAGTAGACCTCATAGTGACC 3'	636 bp	58
IL-1β	(F) 5' ATGGCAACTGTCCCTGAACTC 3' (R) 5' GTCGTTGCTTGTCTCTCCTTG 3'	500 bp	56
TNF-α	(F) 5' CCCTCACACTCAGATCATCTTCTCAA 3' (R) 5' TCTAAGTACTTGGGCAGGTTGACCTC 3'	423 bp	58
iNOS	(F) 5' CATGGCTTGCCCCTGGAAGTTTCTCTTCAAAG 3' (R) 5' GCAGCATCCCCTCTGATGGTGCCATCG 3'	828 bp	58
COX-2	(F) 5' AACTCTATCACTGGCATCC 3' (R) 5' GAAGGGACACCCTTTCACAT 3'	584 bp	60

2-7、蛋白質定量

由細胞中萃取出總蛋白質，利用Bio-Rad Protein Assay的方法測量蛋白質濃度。接種 2×10^6 cells/dish之細胞於10 cm培養盤中，反應後移除上清液，以冰的PBS清洗細胞2次，加入500 μ L Cell lysis buffer (100 mM NaCl、20 mM Tris-HCl, pH 8.0、1 mM EDTA、0.05% SDS、1% NP 40、0.5% sodium deoxycholate)，將細胞刮下放入微量離心管，放置冰上作用30分鐘，再以12000 rpm轉速離心10分鐘。取出1 μ L上清液，加入799 μ L二次水與200 μ L試劑，在室溫下反應10分鐘，於595 nm下測量其吸光值。以BSA為標準品做出標準曲線，再以內差法估算總蛋白質濃度。

2-8、製備細胞核萃取液

以NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents(PIERCE)抽取細胞核蛋白質，其步驟參照套組內廠商的建議進行。接種 2×10^6 cells/dish之細胞於10 cm培養盤中，反應後移除上清液，以冰的PBS清洗細胞1次，加入1mL PBS將細胞刮下放入微量離心管，以500 \times g 轉速離心2-3分鐘，移除上清液盡量讓沈澱物乾燥。加入200 μ L cell lysis buffer(10mM HEPES, pH 8.0、10mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM EDTA、1mM DTT、10% glycerol、0.5mM PMSF)，劇烈震盪15秒讓沈澱物完全懸浮，放置冰上作用10分鐘，再加入11 μ L 10% NP-40劇烈震盪5秒，在冰上作用1分鐘。劇烈震盪5秒後，以16000 \times g轉速離心5分鐘，將上清液取到預冷的微量離心管中，此即為細胞質萃取物的部份。再加入100 μ L nuclear extraction buffer(20mM HEPES, pH 8.0、420mM NaCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM EDTA、1mM DTT、10% glycerol、0.5mM PMSF)到沈澱物中，劇烈震盪15秒後放置冰上作用10分鐘，再劇烈震盪15秒，如此循環4次共40分鐘，以16000 \times g轉速離心10分鐘，將上清液取到預冷的微量離心管中，此即為細胞核萃取液，貯存在-80°C中備用。

2-9、西方轉漬法

每個樣品取50 μ g蛋白質，加入4X sample buffer (250 mM Tris-HCl, pH 6.8、10% SDS、50% Glycerol、2.5% β -mercaptoethanol、0.5% Bromophenol blue)在95°C加熱5分鐘，之後放置冰上。將處理過的樣品用7.5%或10% SDS-PAGE於緩衝液

(192 mM glycine、250 mM Tris-HCl、10% SDS)中進行電泳，隨後以10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 將蛋白質轉漬到PVDF膜上。把膜置於2% skim milk-PBST(1.4M NaCl、7.4 mM Na_2HPO_4 、92 mM NaH_2PO_4 、0.1% Tween-20，pH 7.4)中室溫下作用1小時，加入適當稀釋倍數的一級抗體，於室溫下作用2小時，再以0.1% PBST清洗3次，每次10分鐘。隨後加入有Horseradish peroxidase(HRP)鍵結的二級抗體，在室溫下作用1小時，再以0.1% PBST清洗3次，每次10分鐘。清洗後加入反應基質(Enhanced chemiluminescent substrate, ECL)，以X光底片曝光，底片經掃描後以軟體AlphaDigDoc imaging system(Alpha Innotech Corporation)定量。

2-10、統計分析

實驗數據以means±SEM表示。所有的實驗數據利用ANOVA及Student's t-test分析，當P值小於0.05($P < 0.05$)表示統計上有顯著差異。再使用SigmaPlot 9.0 (Systat software, Inc., USA)作圖。

三、結果

3-1、木犀草素對脂多醣/干擾素- γ 所誘發一氧化氮及誘導型一氧化氮合成酶的影響

微神經膠細胞為中樞神經系統的免疫細胞，當受到活化刺激時會產生釋出大量具生物活性的分子，如一氧化氮、促發炎細胞激素及活性氧物質等(Dheen *et al.*, 2005)。為探討木犀草素是否具中樞抗發炎活性，實驗將藉由脂多醣及干擾素- γ 刺激活化微神經膠細胞，分析木犀草素對一氧化氮產量及誘導型一氧化氮合成酶生合成的影響。微神經膠細胞先預處理木犀草素 1 小時後，再加入脂多醣及干擾素- γ 刺激，24 小時後收取上清液進行一氧化氮產量分析。結果顯示，脂多醣及干擾素- γ 刺激會產生大量一氧化氮而木犀草素(>15 μM)可顯著抑制一氧化氮的產生(圖 3-1A)。為進一步確認木犀草素對一氧化氮產生的抑制作用是否與調控誘導型一氧化氮合成酶的生合成有關，後續實驗將探討誘導型一氧化氮合成酶 mRNA 及蛋白質的變化。微神經膠細胞先預處理木犀草素 1 小時，再給予脂多醣/干擾素- γ 刺激，收集細胞 RNA 及蛋白質進行 RT-PCR 和西方轉漬分析。結果發現，脂多醣/干擾素- γ 會誘發誘導型一氧化氮合成酶 mRNA 和蛋白質表現，木犀草素可顯著降低誘導型一氧化氮合成酶 mRNA(圖 3-1B)及蛋白質的表現(圖 3-1C)。這些初步結果顯示，木犀草素可抑制活化態微神經膠細胞產生一氧化氮。木犀草素的抑制作用可能透過專一性干擾一氧化氮的生合成過程，也可能是因為過度的細胞毒性所造成。透過 MTS 的細胞存活分析發現以 25 μM 以下木犀草素合併脂多醣/干擾素- γ 處理並不會對微神經膠細胞造成顯著細胞毒性(圖 3-2)。因此後續的實驗將著重於探討木犀草素抑制炎症因子表現的分子調控機制。

3-2、木犀草素對脂多醣/干擾素- γ 所誘導發炎相關基因表現之分析

文獻指出，當微神經膠細胞被脂多醣活化後會釋出許多與發炎反應相關的細胞激素和媒介因子，如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 COX-2 等(Ghoshal *et al.*, 2007; Kim

et al., 2008)。因此實驗將分析木犀草素是否也對這些炎症因子的生合成有影響。木犀草素處理 1 小時後，再經過脂多醣/干擾素- γ 刺激，收取細胞 RNA 分析 TNF- α (3 小時)、IL-1 β (8 小時)、IL-6(8 小時)及 COX-2(6 小時)基因的表現量。由結果發現，經由脂多醣/干擾素- γ 處理後，這些細胞激素的 mRNA 表現量顯著增加，而木犀草素(>15 μ M)可有效抑制 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 及 COX-2 mRNA 的表現(圖 3-3)。除了 mRNA 表現的影響，西方轉漬法(圖 3-4)及 ELISA(圖 3-5)分析結果亦顯示木犀草素也抑制這些發炎相關激素蛋白質的生合成及釋出。由以上結果得知，木犀草素對發炎相關細胞激素的影響主要是作用在轉錄層次上。

3-3、木犀草素對脂多醣/干擾素- γ 誘發 MAPK 訊息傳遞路徑活化之影響

許多神經退化性疾病是因為慢性發炎所造成，且可看到 MAPK 路徑被活化的情形。文獻證實微神經膠細胞被脂多醣刺激活化後，MAPK 訊息傳遞中相關分子的活化對於促發炎基因的表現是重要的(Nikodemova *et al.*, 2006)。因此我們有興趣探討木犀草素抑制發炎相關激素生合成的過程中，MAPK 路徑是否為作用的標的分子。木犀草素處理 30 分鐘，再加入脂多醣/干擾素- γ 刺激 1 小時，收取細胞蛋白質進行西方轉漬法，分析 ERK、p38 和 JNK 的磷酸化程度。結果發現，經過脂多醣/干擾素- γ 刺激，ERK 的磷酸化程度顯著增加，木犀草素(>20 μ M)能抑制誘發性及內源性 ERK 的活化(圖 3-6)。為瞭解木犀草素抑制 ERK 的磷酸化是否是因為抑制了其上游分子，乃進一步分析 MEK 的變化。由圖 3-6 得知，木犀草素既可以抑制因為脂多醣/干擾素- γ 活化的 MEK，對於內源性的 MEK 也有相同的抑制效果。前面結果顯示木犀草素可以抑制一氧化氮、TNF- α 和 IL-6 的釋出，為進一步確認木犀草素的抗發炎效果是否與 MEK/ERK 路徑抑制有關，選擇 MEK 的抑制劑 U0126 來釐清。先加入不同濃度 U0126 (10、15、20 μ M) 1 小時後，給予脂多醣/干擾素- γ 刺激 24 小時，收集細胞上清液以 Griess reagent 和 ELISA 分別測量一氧化氮及 TNF- α 和 IL-6 的產量。結果發現 U0126 (>10 μ M)顯著降低一氧化氮、TNF- α 和 IL-6 的產生(圖 3-6)。所以木犀草素的抗發炎作用

其中一個可能的途徑是因為抑制了 MEK 和 ERK 的活化。木犀草素既然可以抑制 MEK/ERK 的活性，那對 MAPK 其他相關分子是否有相同的效果？我們繼續分析木犀草素對 p38 和 JNK 活化的影響。由結果得知，經過脂多醣/干擾素- γ 刺激後，p38 及 JNK 的磷酸化顯著增加，而木犀草素有效降低 p38(圖 3-7)及 JNK 的活化(圖 3-8)。相同的，我們亦使用 p38 的抑制劑 SB203580 和 JNK 的抑制劑 SP600125 來探討木犀草素的抗發炎途徑。預處理不同濃度 SB203580(5、10、15 μ M)和 SP600125(5、10、20 μ M)1 小時後，給予脂多醣/干擾素- γ 刺激 24 小時，收集細胞上清液以 Griess reagent 和 ELISA 分別測量一氧化氮及 TNF- α 和 IL-6 的產量。結果顯示，SB203580 和 SP600125 均能顯著降低一氧化氮、TNF- α 和 IL-6 的產量(圖 3-7, 3-8)。因此木犀草素的抗發炎效果不僅可以透過抑制 MEK/ERK 的活化，亦可經由抑制 p38 和 JNK 的活化，結果顯示木犀草素可藉由 MAPK 途徑的抑制而達到抗發炎的效果。

3-4、木犀草素對脂多醣/干擾素- γ 誘發 Akt 活化之影響

文獻指出，抑制 PI3K(phosphatidylinositol kinase)的活性就可以抑制 IL-1 β 及 TNF- α 的產生，而 Akt 是一個位於 PI3K 下游的磷酸化激酶(serine/threonine kinase) (Ojaniemi *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2006)。文獻證實，Akt 活化後會造成 NF- κ B 的活化導致發炎細胞激素的釋出(Gutierrez-Venegas *et al.*, 2006)。為探討木犀草素抑制發炎細胞激素的產生是否與 Akt 活性調控有關，先處理木犀草素 30 分鐘，再加入脂多醣/干擾素- γ 刺激 1 小時，收取細胞蛋白質進行西方轉漬法，分析 Akt 磷酸化的情形。結果顯示，經由脂多醣/干擾素- γ 誘發會顯著增加 Akt 的活化，木犀草素 (>10 μ M)有效抑制 Akt 的磷酸化(圖 3-9)。木犀草素的抗發炎效果是否與 PI3K/Akt 路徑有關乃由 PI3K 的抑制劑 LY294002 來釐清。先加入不同濃度 LY294002(5、10、15 μ M)處理 1 小時後，給予脂多醣/干擾素- γ 刺激 24 小時，收集細胞上清液以 Griess reagent 和 ELISA 分別測量一氧化氮及 TNF- α 和 IL-6 的產量。結果顯示，LY294002 (>15 μ M)明顯降低一氧化氮、TNF- α 和 IL-6 的產量(圖 3-9)。所以木犀草素的抗發

炎作用，另一個可能的途徑是經由抑制PI3K/Akt的活化。

3-5、木犀草素對脂多醣/干擾素- γ 誘發 JAK/STAT 路徑活化之影響

文獻指出，干擾素- γ 傳訊透過活化JAK(Janus kinase)/STAT(signal transducer and activator of transcription)途徑，而JAK/STAT路徑與許多發炎反應有關，如誘導型一氧化氮合成酶的表現等(Lv *et al.*, 2008)，亦即JAK/STAT路徑也可能是木犀草素的抗發炎作用標的之一。因此分析木犀草素對轉錄因子STAT活性的影響。先處理木犀草素30分鐘，再加入脂多醣/干擾素- γ 刺激，1小時後收取細胞蛋白質進行西方轉漬法，分析STAT-1(Tyr701)及STAT-3(Tyr705, Ser727)磷酸化情形。結果顯示，脂多醣/干擾素- γ 顯著增加STAT-1(Tyr701)、STAT-3(Tyr705, Ser727)的磷酸化，而木犀草素有效抑制其活化(圖3-10)。為釐清JAK/STAT路徑的參與程度，實驗將透過JAK/STAT路徑抑制劑AG490來測試。使用AG490(25、30、40 μ M)處理1小時後，加入脂多醣/干擾素- γ 刺激24小時，收集細胞上清液以Griess reagent和ELISA分別測量一氧化氮及TNF- α 和IL-6的產量。由圖3-11得知，AG490(>25 μ M)顯著降低一氧化氮及TNF- α 和IL-6的釋出。為明瞭STAT活性下降的作用機制，實驗繼續探討木犀草素對STAT活性調控分子的影響。JAK家族為主要的STAT上游活化分子(Planas *et al.*, 2006)。給予木犀草素30分鐘後，再加入脂多醣/干擾素- γ 刺激1小時，收取細胞蛋白質進行西方轉漬法分析。由結果得知，脂多醣/干擾素- γ 明顯誘發JAK-1、JAK-2、Tyk2的活化，但木犀草素對JAK家族分子沒有任何抑制的效果(圖3-12)。結果顯示木犀草素抑制STAT-1, -3活化的作用並非透過抑制JAK活性造成，可能是作用在其他相關分子上。

Src為酪胺酸激酶(protein tyrosine kinase)，可與許多蛋白質交互作用啟動訊息傳遞路徑，調控細胞增生、分化、存活及代謝作用，其中一個角色是調控發炎反應(Okutani *et al.*, 2006)。由以上結果得知，木犀草素抑制STAT的活化可能是經由別條途徑達成，研究證實，Src也是STAT活化的上游分子之一，於是推測木犀草素有無可能是透過抑制Src磷酸化而抑制STAT活化。經木犀草素前處理30分鐘，

再加入脂多醣/干擾素- γ 刺激1小時，收取細胞蛋白質進行西方轉漬法，分析Src磷酸化的情形。結果發現，給予脂多醣/干擾素- γ 會誘發Src磷酸化，木犀草素(>20 μ M)有效抑制Src的活化(圖3-13)，故STAT活化的抑制可能原因之一是因為抑制Src的活性。

SOCS(suppressor of cytokine signaling)是由轉錄因子STAT所調控表現的蛋白質，會直接抵銷STAT的活化，即為典型的回饋循環(feedback loop)(Kisseleva et al., 2002)。到目前為止有八種SOCS被命名，包括CIS與SOCS1-7，其中SOCS1和SOCS3與抗發炎相關(Yang et al., 2007)。SOCS家族應該也是木犀草素抑制STAT活性的可能標的之一。木犀草素處理30分鐘後，再加入脂多醣/干擾素- γ 刺激6小時，收取細胞蛋白質進行西方轉漬法分析。由圖3-13顯示，木犀草素顯著增加SOCS3蛋白質的生合成，但脂多醣/干擾素- γ 刺激並不會對SOCS3有任何影響，當木犀草素與脂多醣/干擾素- γ 同時存在時，有效提高SOCS-3的產量(圖3-13)。

3-6、木犀草素對脂多醣/干擾素- γ 誘發NF- κ B的活性分析

轉錄因子 NF- κ B 是細胞內基因表現的重要媒介分子，調控許多生理功能包括細胞的存活、凋亡及免疫發炎反應等，亦是 MAPK、PI3K 和 JAK/STAT 等路徑下游的作用分子之一(Marcus et al., 2003)。當細胞未活化時，NF- κ B 會與抑制蛋白 I κ B 家族形成穩定的聚合物，一旦受到刺激活化後，I κ B 就會磷酸化與 NF- κ B 次單元解離而被 proteasome 分解，NF- κ B 則轉位至細胞核與啟動子上特定的 DNA 序列結合，活化基因的轉錄活性(Xagorari et al., 2001)。因此實驗將探討轉錄因子 NF- κ B 的角色。先處理木犀草素 30 分鐘，再加入脂多醣/干擾素- γ 刺激 1 小時，收取細胞蛋白質進行西方轉漬法，分析 I κ B α 的磷酸化程度。由結果得知，脂多醣/干擾素- γ 顯著增加 I κ B α 磷酸化的現象，木犀草素(>20 μ M)有效抑制其活化(圖3-14)。進一步瞭解木犀草素對 NF- κ B 次單元活化的影響，於是以脂多醣/干擾素- γ 刺激 3 小時，收取細胞核蛋白質進行西方轉漬法檢視 NF- κ B 次單元核移轉幅度。結果發現微神經膠細胞被誘發活化後，NF- κ B-p50、NF- κ B-p65 和 NF- κ B-RelB

轉位至核中明顯增加，木犀草素則有效抑制 NF- κ B-p65 和 NF- κ B-RelB 的轉位現象(圖 3-14)。

3-7、木犀草素對脂多醣/干擾素- γ 誘發IRF-1生合成分析

研究顯示，轉錄因子IRF-1(interferon response factor-1)調控一氧化氮和誘導型一氧化氮合成酶的表現(Kamijo *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2001)。為探討木犀草素的抗發炎活性是否與IRF-1有關，以脂多醣/干擾素- γ 刺激活化微神經膠細胞，分析木犀草素對IRF-1生合成的影響。先給予木犀草素30分鐘，再加入脂多醣/干擾素- γ 刺激1小時後，收取細胞蛋白質進行西方轉漬分析。由結果得知，經由脂多醣/干擾素- γ 誘發後，IRF-1蛋白質表現顯著增加，木犀草素(>20 μ M)有效抑制其合成作用(圖3-15)，推論木犀草素的抗發炎效果其中一個可能路徑是藉由抑制IRF-1的表現。

四、討論

類黃酮為植物二級代謝物，賦與蔬果顏色及風味，具有包括抗氧化、抗癌症、抗腫瘤、抗病毒及抗過敏等生物活性(Formica and Regelson, 1995; Fotsis *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2004)。許多天然的類黃酮可以抑制促發炎細胞激素及發炎相關媒介物的產生達到抗發炎的效果(Yuan *et al.*, 2006)。研究指出，產生過量的細胞激素會造成許多發炎疾病像敗血性休克、類風濕性關節炎和動脈硬化等。若能抑制促發炎細胞激素和媒介物的釋出就能有效控制發炎反應，因此在發炎相關疾病的治療上，天然的類黃酮引起廣泛的注意。木犀草素即為類黃酮的一種，在芹菜、青椒及洋甘菊中大量存在，不論是在*in vitro*或*in vivo*都具有良好的抗發炎活性。微神經膠細胞為中樞神經系統中常駐型巨噬細胞，當大腦受到物理、化學、缺氧性損傷或者感染這種急性傷害時，微神經膠細胞會被活化啟動許多先天性免疫反應(*innate immunity*)像誘發發炎反應、細胞毒性及呈現抗原讓T細胞辨認等。活化的微神經膠細胞會殺死侵入的微生物移除有害的細胞碎片，分泌生長因子促進組織修復及維持大腦中細胞的恆定，對中樞神經系統有保護的效果，為中樞神經系統的第一道防線(Kreutzberg, 1996; Orr *et al.*, 2002; Streit, 2005)。許多神經退化性疾病的原因即是微神經細胞過度活化所造成，故調控微神經膠細胞免於過度活化將有助於發展有效治療策略。當微神經膠細胞被脂多醣、細胞激素或病毒活化後會產生一氧化氮及許多促發炎細胞激素，適量的一氧化氮有助於殺死侵入的微生物，過度產生則會對神經元細胞造成死亡(Kim and de Vellis, 2005)。所以分析木犀草素在脂多醣/干擾素- γ 刺激活化微神經膠細胞後一氧化氮產量的影響，結果顯示木犀草素有效抑制一氧化氮的產生，此結果在週邊巨噬細胞、骨髓巨噬細胞、人類牙齦纖維母細胞、肺部巨噬細胞中可看到(Kim *et al.*, 1999; Xagorari *et al.*, 2001; Comalada *et al.*, 2006; Gutierrez-Venegas *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007)。這些研究進一步指出木犀草素比hesperetin、eriodictyol、genistein和chrysin等其他類黃酮更有效抑制TNF- α 和IL-6的產生。由我們結果顯示，木犀

草素除了可抑制一氧化氮的產生，亦可抑制誘導型一氧化氮合成酶、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 和COX-2的表現，且主要作用在轉錄層次上。在其他週邊巨噬細胞中也可看到類似的結果(Xagorari *et al.*, 2001; Comalada *et al.*, 2006; Harris *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007)。因此，深入研究木犀草素在脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞的作用機制。

MAPK家族由MAPKKK、MAPKK和MAPK所組成，MAPK路徑調控許多細胞生理的功能，從基因的表現到細胞凋亡等(Chang and Karin, 2001)。哺乳類細胞在脂多醣存在下會活化ERK、JNK和p38 (Feng *et al.*, 1999)，於是本研究分析木犀草素對於脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞誘發ERK、JNK和p38磷酸化的影響。結果顯示，脂多醣/干擾素- γ 顯著增加ERK、JNK和p38磷酸化，而木犀草素可抑制ERK、JNK和p38的活化，此結果與先前研究一致(Xagorari *et al.*, 2002; Gutierrez-Venegas *et al.*, 2006)。研究指出，MAPK途徑與許多促發炎細胞激素的表現有關(Carter *et al.*, 1999; Schroeter *et al.*, 2002)，進一步確認木犀草素抑制ERK、JNK和p38的磷酸化是否與抑制一氧化氮、IL-6和TNF- α 產生有關。分別使用其專一性抑制劑U0126、SP600125和SB203580，發現皆能抑制這些發炎物質的釋出，推測木犀草素的抗發炎作用同時抑制ERK、JNK和p38活化。在我們的結果中，木犀草素不只對MAPK中的ERK有抑制作用，對ERK上游MAPKK的MEK1/2亦有相同效果。在Xagorari *et al.*(2002)研究中，木犀草素除了可抑制MEK1/2活化亦能抑制p38上游MAPKKs中MEK3/6的活化，綜合以上結果，推測木犀草素抑制MAPK的活化是作用在上游分子。作用在MAPK上游的分子包括許多酪胺酸激酶(protein tyrosine kinases, PTK)，處理酪胺酸激酶抑制劑則可抑制脂多醣誘發MAPK的活化(Novogrodsky *et al.*, 1994)。研究指出，脂多醣刺激巨噬細胞後會導致許多蛋白質分子的酪胺酸磷酸化，而木犀草素可抑制其活化(Xagorari *et al.*, 2001)。當脂多醣與其受器CD14結合後會活化酪胺酸激酶中Src家族(Src-family tyrosine kinases, STK)的Lyn、Hck和Fgr，誘發促發炎細胞激素的產生(Stefanova *et al.*, 1993)，因而研究中繼續分析木犀草素在脂多醣/干擾素- γ 刺激微

神經膠細胞誘發Src活性影響，並由實驗結果證實木犀草素有效抑制Src的磷酸化。文獻指出，Src家族可透過活化ERK和p38活性增加IL-8的產生(Ovrevik *et al.*, 2004; Trevino *et al.*, 2005)，過氧化氫介導JNK的活化是透過Src調控(Yoshizumi *et al.*, 2000)，推測木犀草素藉由抑制Src活化而抑制ERK、p38和JNK活性。

當細胞被脂多醣刺激後，會磷酸化一系列的蛋白質分子，導致轉錄因子的活化和細胞激素的表現。類黃酮除了可抑制酪胺酸激酶的磷酸化，也可抑制絲胺酸/蘇胺酸激酶磷酸化像PI3K/Akt和PKC(protein kinase C)(Gamet-Payrastre *et al.*, 1999)。酪胺酸激酶會與絲胺酸/蘇胺酸激酶互相作用活化基因的表現，例如Akt會活化MAPK活性來刺激轉錄因子NF- κ B活化(Madrid *et al.*, 2001)。已知PI3K/Akt途徑和細胞的分化、增生、存活和發炎反應有關(Wong, 2005)，所以分析木犀草素抑制發炎媒介物的產生除了與抑制MAPK活性有關是否與PI3K/Akt途徑相關，處理PI3K專一性抑制劑LY294002有效抑制一氧化氮、IL-6和TNF- α 釋出，與先前研究一致(Xagorari *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2004)。研究指出，木犀草素不只抑制PKC的活性，也有效抑制PI3K活化(Gamet-Payrastre *et al.*, 1999)。所以木犀草素的抗發炎作用其中一個可能的機制是藉由抑制PI3K活性。已知Akt是PI3K的下游分子，研究指出，在肥胖細胞中Akt的活化會刺激TNF- α 啟動子的轉錄活性，進而促進TNF- α 產生(Kitaura *et al.*, 2000)。研究顯示，木犀草素可抑制週邊巨噬細胞、小鼠肺部巨噬細胞、人類牙齦纖維母細胞和腸道上皮細胞被刺激後Akt的磷酸化(Xagorari *et al.*, 2001; Gutierrez-Venegas *et al.*, 2006; Ruiz and Haller, 2006; Chen *et al.*, 2007)。進一步分析木犀草素對中樞神經系統是否也有相同效果，結果發現木犀草素有效抑制脂多醣/干擾素- γ 刺激微神經膠細胞誘發Akt的磷酸化。文獻指出，Akt活化會對IKK α 的Thr23位點磷酸化，磷酸化後的IKK α 再對I κ B α Ser32和Ser36位點磷酸化，使I κ B α 被proteasome分解，釋出NF- κ B啟動NF- κ B的活化(Ozes *et al.*, 1999; Israel, 2000)。研究顯示，在微神經膠細胞中抑制Akt和NF- κ B的活化即可達到抗發炎作用(Lee *et al.*, 2006; Nam *et al.*, 2008)。於是分析木犀草素在脂多醣/干擾素- γ 刺激微神經膠細胞活化I κ B α 的作用。結果發現木犀草

素可抑制I κ B α 磷酸化，在其他研究中也可看到類似的結果(Xagorari *et al.*, 2001; Comalada *et al.*, 2006)，且對脂多醣誘發I κ B α 被proteasome分解亦有抑制作用(Xagorari *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2007)。但在TNF- α 刺激腸道上皮細胞中，木犀草素對I κ B α 磷酸化及I κ B α 分解沒有抑制效果(Ruiz and Haller, 2006)。I κ B α 磷酸化會釋出NF- κ B，使NF- κ B從細胞質中轉位到細胞核中，於是分析細胞核中NF- κ B次單元表現量。在哺乳類中，NF- κ B有五種次單元分別為NF- κ B1(p50/p105)、NF- κ B2(p52/p100)、c-Rel、RelA(p65)和RelB，NF- κ B通常以同質二聚體或異質二聚體存在(Chen *et al.*, 1999)。由我們的結果得知，木犀草素可抑制脂多醣/干擾素- γ 刺激微神經膠細胞活化NF- κ B次單元p65和RelB轉位到細胞核中，對p50沒有影響。在肺部巨噬細胞中，木犀草素可抑制p65轉位到細胞核中(Chen *et al.*, 2007)，而在人類牙齦纖維母細胞中可抑制p50的移動(Gutierrez-Venegas *et al.*, 2006)。文獻指出，RelB只能形成異質二聚體，當受到lymphotoxin β (LT β)、B-cell activating factor(BAFF)和CD40 ligand(CD40L)刺激時，會活化RelB/p52異質二聚體，此為NF- κ B活化路徑中的替代路徑(alternative, noncanonical pathway)(Wu and Miyamoto, 2007)。當刺激原為生長因子、脂多醣、病毒蛋白或促發炎細胞激素時，通常活化p65/p50、p50/c-Rel異質二聚體，此為NF- κ B活化的典型途徑(classical, canonical pathway)(Lee *et al.*, 2007)。文獻指出，當微神經膠細胞被脂多醣刺激後，會活化p65/p50異質二聚體，若胞外ATP與其受體P2Z結合後，會活化p65同質二聚體(Ferrari *et al.*, 1997)。因此不同的刺激原會活化不同的NF- κ B次單元，而p65同質二聚體通常與慢性發炎反應有關(Sandersen *et al.*, 2001; Fitzgerald *et al.*, 2007)，若要確認在脂多醣/干擾素- γ 刺激微神經膠細胞中，活化哪種NF- κ B二聚體則要使用EMSA進一步分析。

JAK/STAT途徑介導許多發炎媒介物的表現導致發炎反應。干擾素- γ 的訊息傳遞主要是透過JAK/STAT路徑，當干擾素- γ 與其受體結合後會使JAK1及JAK2磷酸化，吸引STAT1靠近使其磷酸化，磷酸化後的STAT1雙聚體會移動到細胞核中活化基因的轉錄活性(Kisseleva *et al.*, 2002)。由我們的結果得知，木犀草素可抑

制脂多醣/干擾素- γ 刺激微神經膠細胞誘發STAT1(Tyr701)及STAT3(Tyr705, Ser727)磷酸化。而初代微神經細胞在干擾素- γ 刺激後，木犀草素對STAT1位點Ser727磷酸化亦有抑制效果(Rezai-Zadeh *et al.*, 2008)。研究指出，綠茶成份中的EGCG可抑制STAT1(Tyr701)磷酸化進而抑制誘導型一氧化氮合成酶的表現，達到抗發炎的效果(Tedeschi *et al.*, 2004)。Sporgen、S14-95和S-curvularin從*Penicillium*中分離出來，可抑制STAT1(Tyr701)磷酸化而抑制誘導型一氧化氮合成酶的表現(Yao *et al.*, 2003)。研究顯示，酪胺酸磷酸化對STAT1和STAT3的活化是必須的，若有一個或多個位點的絲胺酸磷酸化，則其活性達到最大(Wen *et al.*, 1995)，而木犀草素對STAT3的酪胺酸及絲胺酸皆有抑制效果，推測木犀草素對抗發炎的作用有加成的效果。進一步確認STATs活性的下降與其上游活化分子的關聯，由結果得知木犀草素對JAK1、JAK2和Tyk2的活性沒有影響。研究指出，在微神經膠細胞中curcumin會活化SHP2，而SHP2會抑制JAK1/JAK2磷酸化進而抑制STAT1/STAT3磷酸化，降低MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1)和ICAM-1表現，但對SOCS1及SOCS3沒有影響(Kim *et al.*, 2003)。在神經膠細胞中，15d-PGJ₂(15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J₂)和rosiglitazone誘導SOCS1和SOCS3的表現進而抑制STAT1和STAT3的活化，降低腦部的發炎反應(Park *et al.*, 2003)。木犀草素對STATs上游活性分子沒有影響，推測是直接作用在STATs分子上，於是分析木犀草素對SOCS3表現的影響。由實驗結果得知，木犀草素可誘發SOCS3表現且隨著濃度增加有逐漸上升的趨勢。文獻指出，SOCS會和已磷酸化的受器結合或直接與JAK鍵結而抑制JAK的活性(Wormald and Hilton, 2004)，而在*in vitro*實驗中發現，SOCS3會與JAK2鍵結但不會抑制JAK2的催化活性(Chen *et al.*, 2000)，與本實驗結果相符，推測SOCS3與JAK2結合後抑制受器上酪胺酸的磷酸化，於是無法吸引STATs單體分子靠近和磷酸化，阻斷STATs活化。IRF-1也是轉錄因子的一種，可被干擾素- γ 、TNF- α 和IL-6活化，且在干擾素刺激下IRF-1的活化對於誘導型一氧化氮合成酶的表現是必須的(Kamijo *et al.*, 1994)。由實驗結果發現，木犀草素有效抑制IRF-1的生合成，在腸道上皮細胞中也可看到類似的結

果(Ruiz and Haller, 2006)。

細胞一旦接受細胞激素或生長因子的刺激，受器形成雙體後JAK及Src家族即會被活化再對STATs進行磷酸化，活化基因的轉錄活性(Rane and Reddy, 2002)。研究指出，脂多醣誘發巨噬細胞產生一氧化氮和TNF- α 與Src的磷酸化有關(Leu *et al.*, 2006)。Davallialactone有效抑制Src磷酸化，使用專一性抑制劑PP2也有相同效果且幾乎完全抑制一氧化氮的產生(Lee *et al.*, 2008)，研究顯示PP1抑制脂多醣誘發STAT1磷酸化進而抑制誘導型一氧化氮合成酶的表現(Lee *et al.*, 2005)，所以Src在脂多醣誘發發炎反應中扮演重要的角色。因此木犀草素抑制STATs活性可能是藉由抑制Src的活化。文獻指出，巨噬細胞經脂多醣處理後PP1可抑制I κ B α 絲胺酸磷酸化、I κ B α 被proteasom分解及p65的移動，且Src可與I κ B α 直接結合對Tyr42位點磷酸化進而活化NF- κ B(Abu-Amer *et al.*, 1998; Fan *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2005)。且Src活化會誘發ERK和NF- κ B活性而促進IL-8釋出(Liu *et al.*, 2001)，推測木犀草素抑制發炎分子的表現可能是抑制Src活性而同時抑制轉錄因子STATs和NF- κ B的活化。

五、圖表

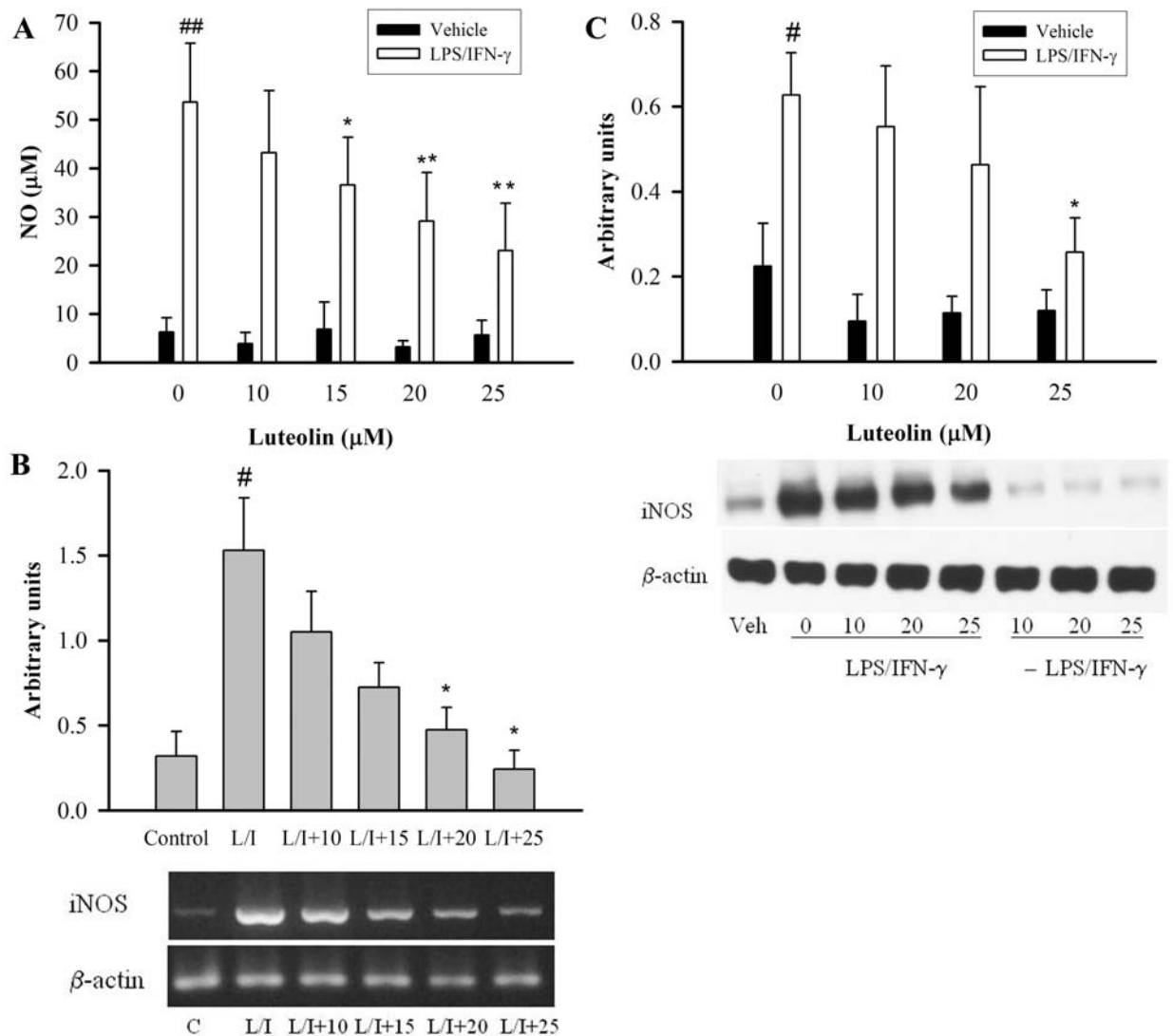


圖 3-1、脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對一氧化氮及誘導型一氧化氮合成酶生合成的影響。

給予不同濃度木犀草素 1 小時後，加入脂多醣(100 ng/ml)/干擾素- γ (10 ng/ml)刺激 24 小時，收取細胞上清液再以 Griess reagent 分析一氧化氮生成量(A)。脂多醣(100 ng/ml)/干擾素- γ (10 ng/ml)分別刺激 6 及 8 小時，收集細胞的 RNA 及蛋白質以 RT-PCR(B)及西方轉漬法(C)分析誘導型一氧化氮合成酶的表現情形。 β -actin 為內部對照。數據以 Mean \pm S.E.值表示。##表示 $P < 0.01$ ，#表示 $P < 0.05$ ，控制組與脂多醣/干擾素- γ 比較；**表示 $P < 0.01$ ，*表示 $P < 0.05$ ，脂多醣/干擾素- γ 與脂多醣/干擾素- γ /木犀草素比較。L/I，LPS/IFN- γ 、L/I+10，LPS/IFN- γ +10 μ M Luteolin、L/I+15，LPS/IFN- γ +15 μ M Luteolin、L/I+20，LPS/IFN- γ +20 μ M Luteolin、L/I+25，LPS/IFN- γ +25 μ M Luteolin(n=3)。

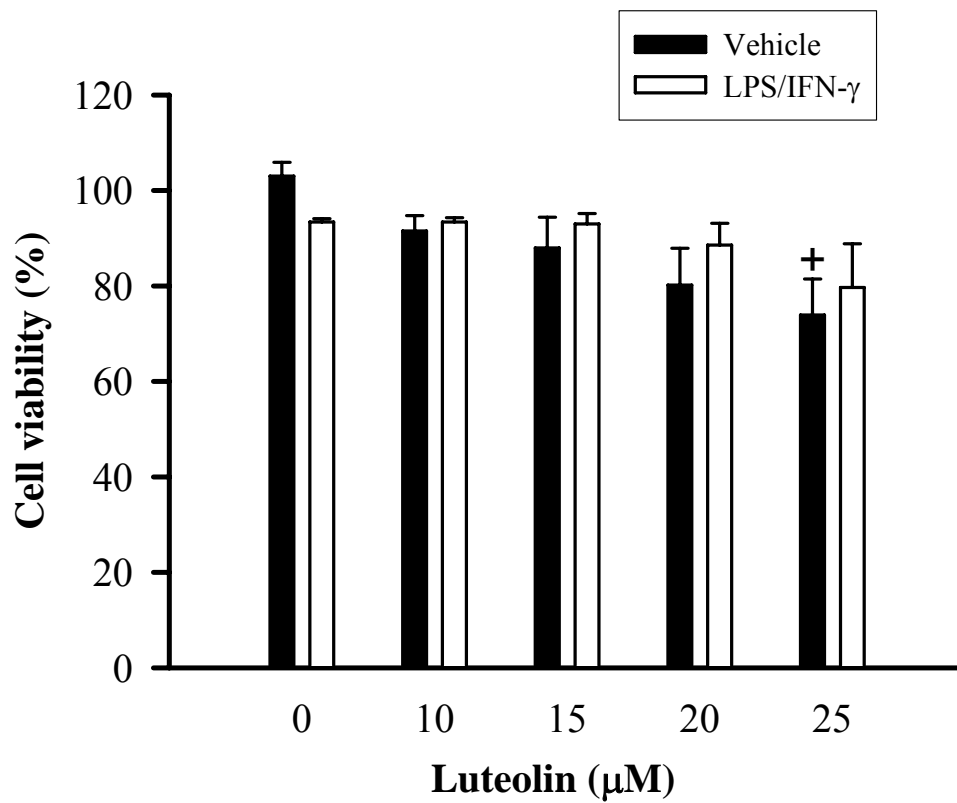


圖 3-2、探討木犀草素及脂多醣/干擾素- γ 是否會對微神經膠細胞產生毒性。給予不同濃度木犀草素 1 小時後，加入脂多醣(100 ng/ml)/干擾素- γ (10 ng/ml)刺激 24 小時，進行細胞存活分析。數據以 Mean \pm S.E.值表示。+表示 P<0.05，控制組與單獨加入木犀草素比較(n=3)。

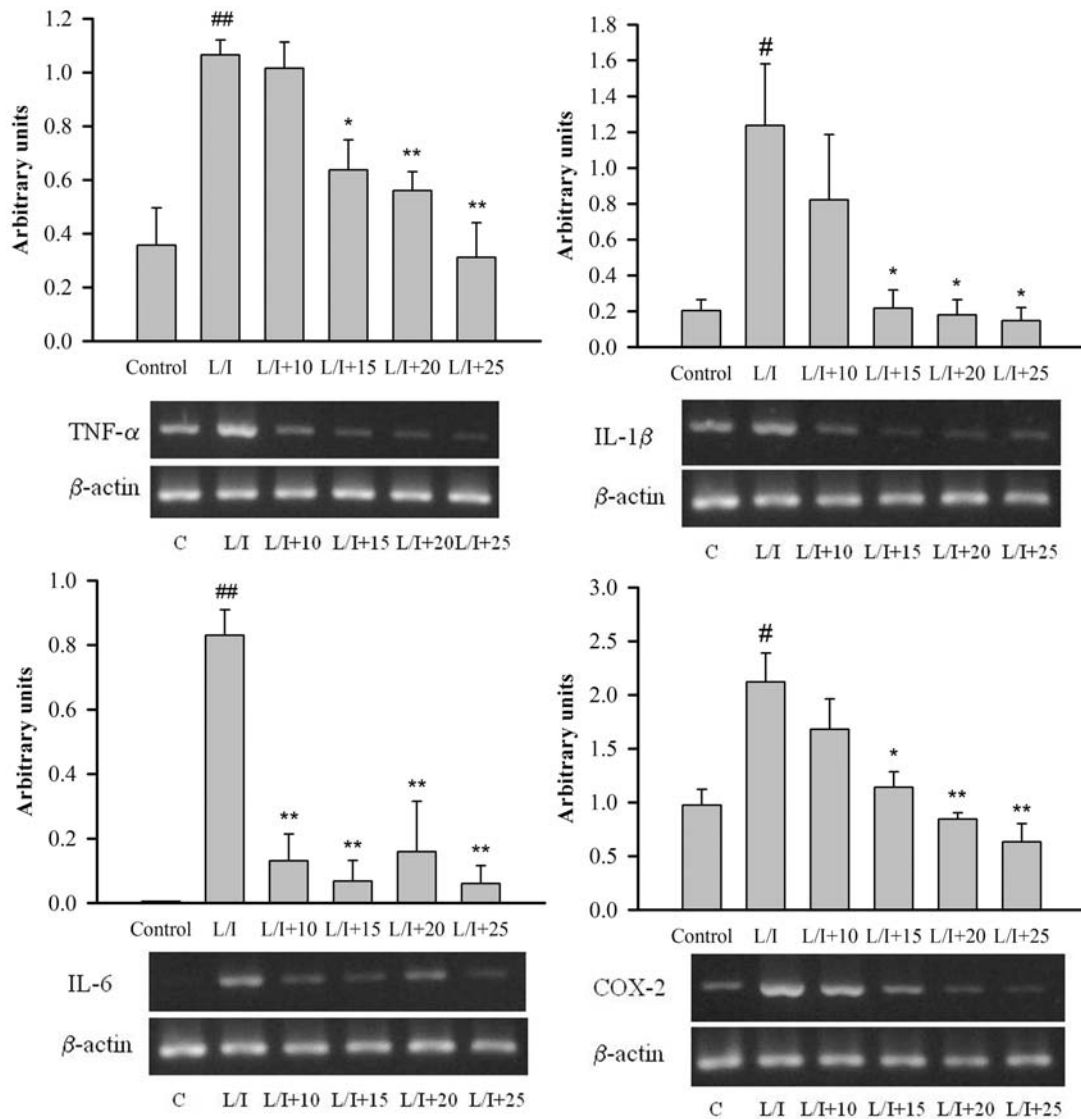


圖 3-3、脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對發炎相關基因的影響。給予不同濃度木犀草素 1 小時後，加入脂多醣(100 ng/ml)/干擾素- γ (10 ng/ml)刺激，經過特定時間點收集細胞的 RNA 以 RT-PCR 分析 TNF- α (3hr)、IL-6 (6hr)、IL-1 β (6hr)、COX-2(6hr)及 β -actin 的表現情形， β -actin 為內部對照。數據以 Mean \pm S.E.值表示。##表示 $P < 0.01$ ，#表示 $P < 0.05$ ，控制組與脂多醣/干擾素- γ 比較；**表示 $P < 0.01$ ，*表示 $P < 0.05$ ，脂多醣/干擾素- γ 與脂多醣/干擾素- γ /木犀草素比較。L/I，LPS/IFN- γ 、L/I+10，LPS/IFN- γ +10 μ M Luteolin、L/I+15，LPS/IFN- γ +15 μ M Luteolin、L/I+20，LPS/IFN- γ +20 μ M Luteolin、L/I+25，LPS/IFN- γ +25 μ M Luteolin(n=3)。

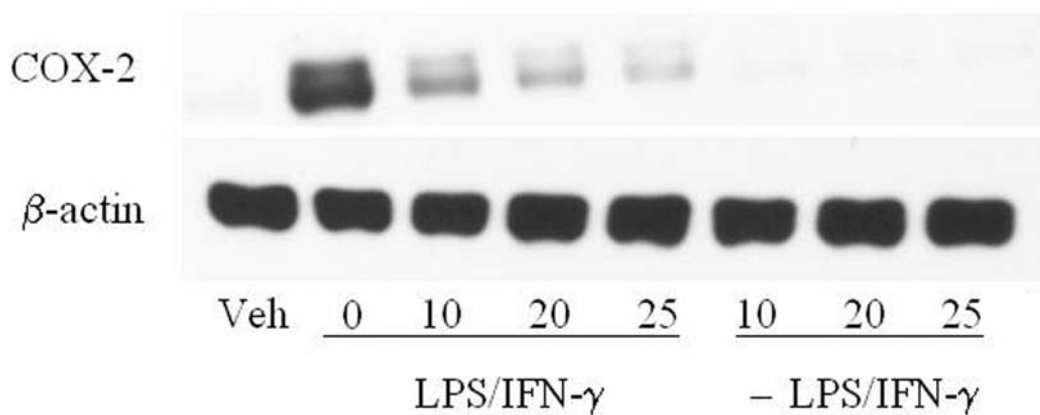
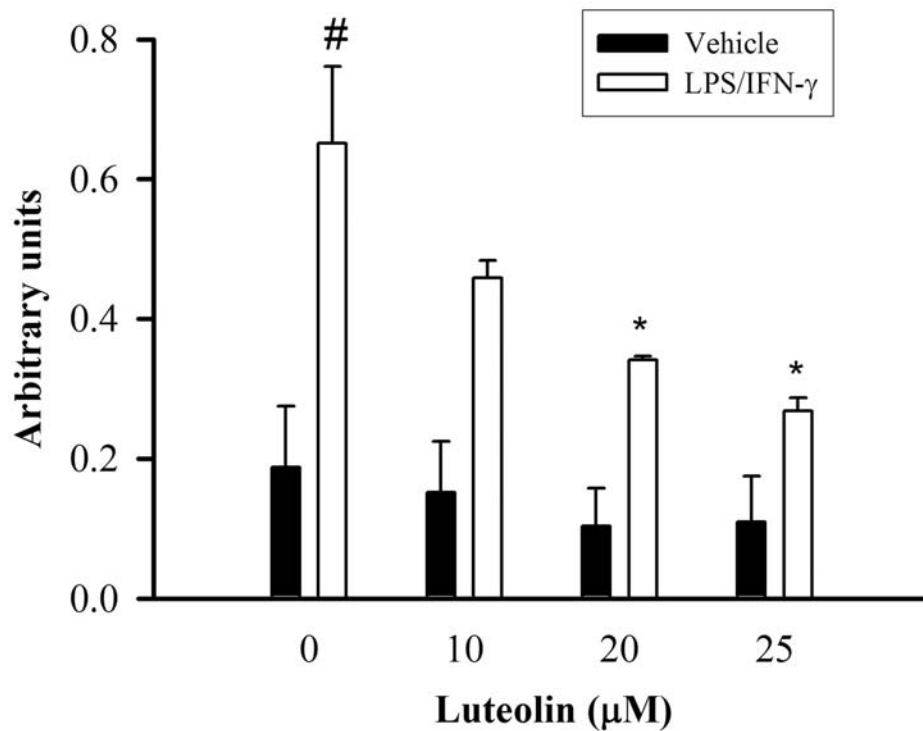


圖 3-4、脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對 COX-2 生合成的影響。

給予不同濃度木犀草素 1 小時後，加入脂多醣(100 ng/ml)/干擾素- γ (10 ng/ml)刺激 8 小時，收集細胞的蛋白質以西方轉漬法分析 COX-2 的表現情形。 β -actin 為內部對照。數據以 Mean \pm S.E.值表示。#表示 P<0.05，控制組與脂多醣/干擾素- γ 比較；*表示 P<0.05，脂多醣/干擾素- γ 與脂多醣/干擾素- γ /木犀草素比較。Veh, control(n=3)。

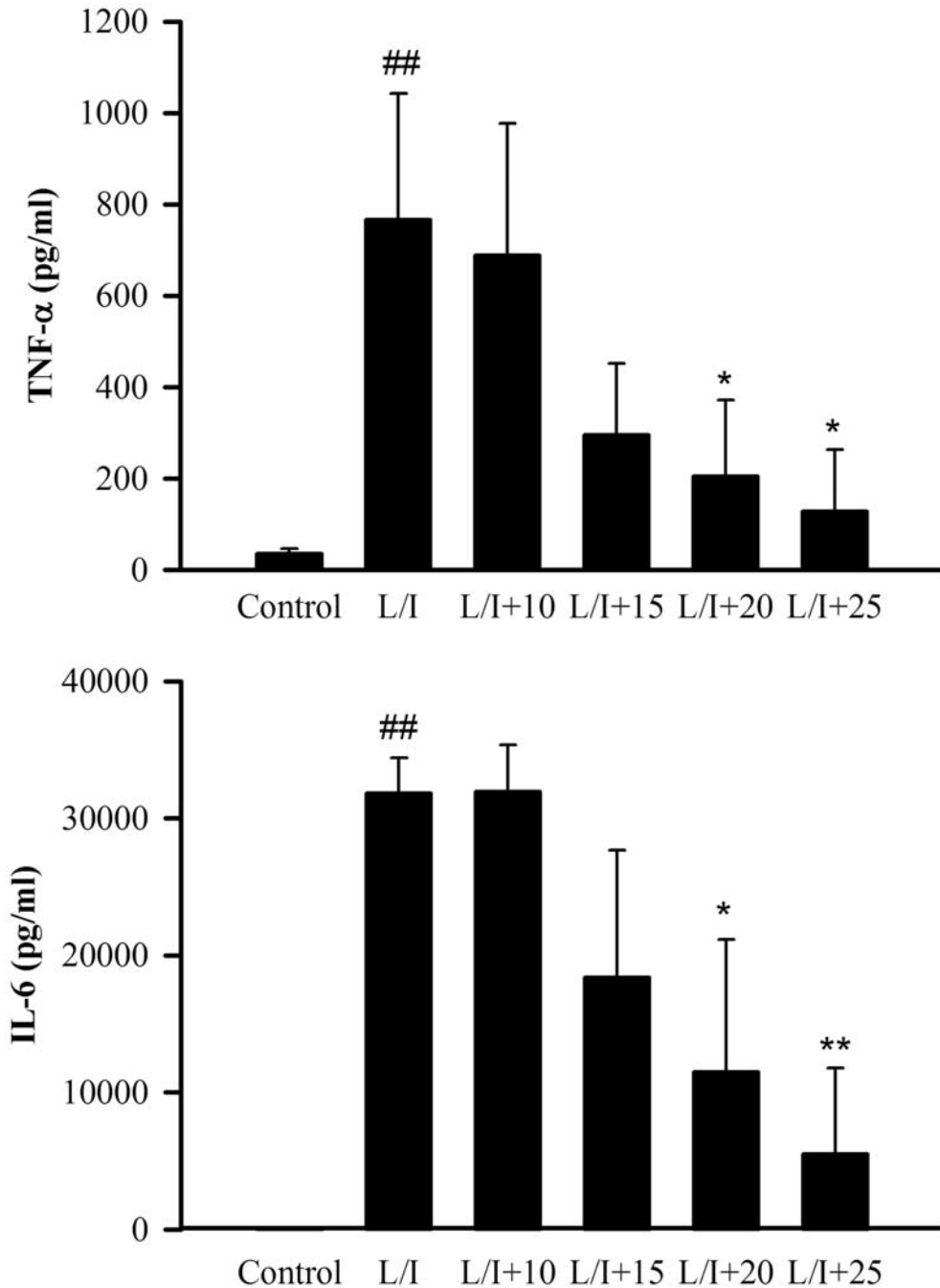


圖 3-5、脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對促發炎細胞激素生合成的影響。

給予不同濃度木犀草素 1 小時後，加入脂多醣(100 ng/ml)/干擾素- γ (10 ng/ml)刺激 24 小時，使用酵素連結免疫分析法分析 IL-6 及 TNF- α 釋出情形。數據以 Mean \pm S.E.值表示。##表示 $P < 0.01$ ，控制組與脂多醣/干擾素- γ 比較；**表示 $P < 0.01$ ，*表示 $P < 0.05$ ，脂多醣/干擾素- γ 與脂多醣/干擾素- γ /木犀草素比較。L/I，LPS/IFN- γ 、L/I+10，LPS/IFN- γ +10 μ M Luteolin、L/I+15，LPS/IFN- γ +15 μ M Luteolin、L/I+20，LPS/IFN- γ +20 μ M Luteolin、L/I+25，LPS/IFN- γ +25 μ M Luteolin(n=3)。

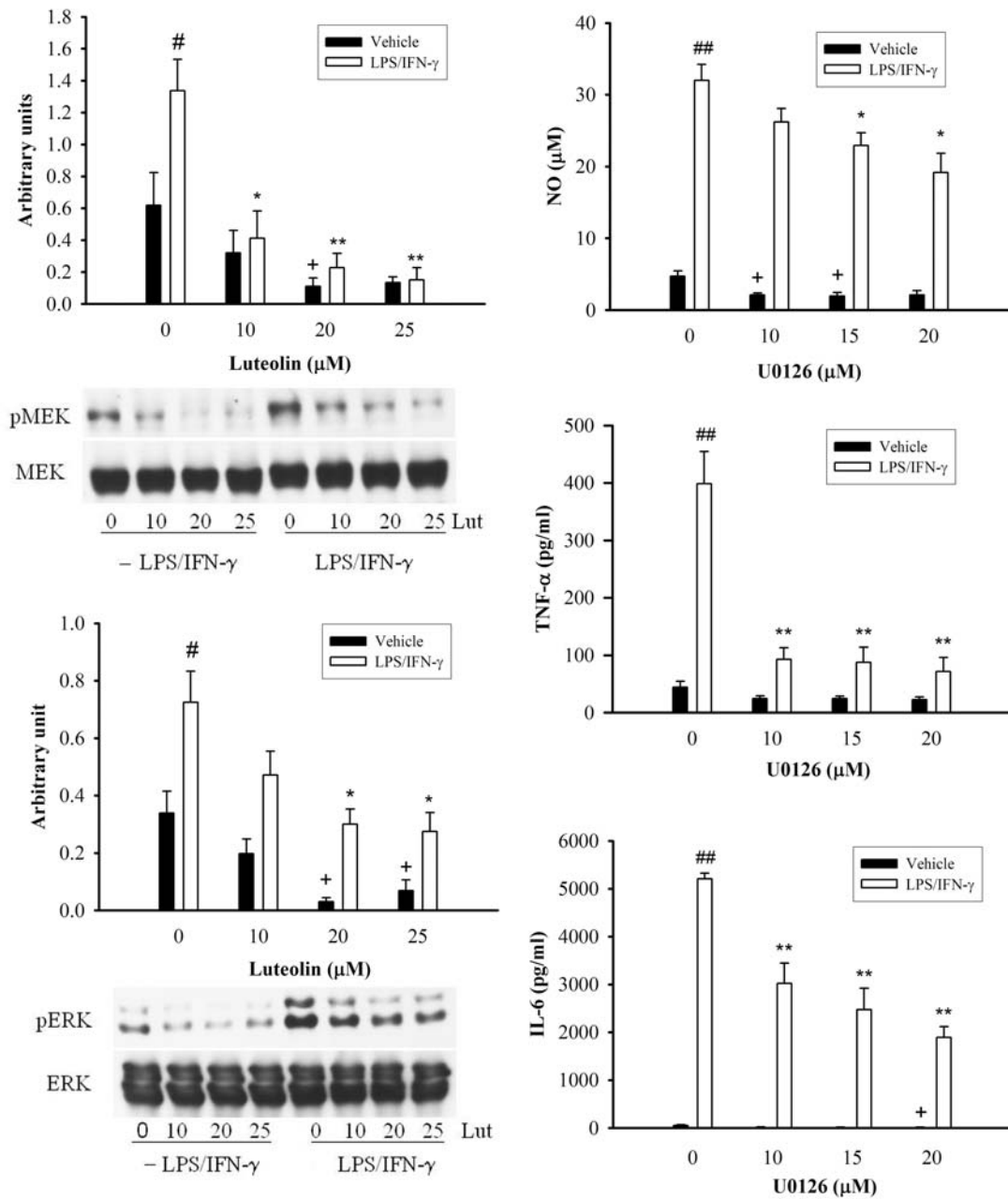


圖 3-6、脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對 MEK 及 ERK 活性的影響。

以 0、10、20、25 μM 木犀草素前處理 30 分鐘，加入脂多醣(100 ng/ml)/干擾素- γ (10 ng/ml)刺激活化 1 小時後，收取細胞蛋白質進行西方轉漬法，偵測 MEK 及 ERK 磷酸化情形。以 0、10、15、20 μM U0126(MEK 抑制劑)前處理 1 小時，加入脂多醣(100 ng/ml)/干擾素- γ (10 ng/ml)培養 24 小時後，收取上清液以酵素連結免疫分析法分析。數據以 Mean \pm S.E.值表示。##表示 $P < 0.01$ ，#表示 $P < 0.05$ ，控制組與脂多醣/干擾素- γ 比較；**表示 $P < 0.01$ ，*表示 $P < 0.05$ ，脂多醣/干擾素- γ 與脂多醣/干擾素- γ /木犀草素比較；+表示 $P < 0.05$ ，控制組與單獨處理木犀草素組比較(n=3)。

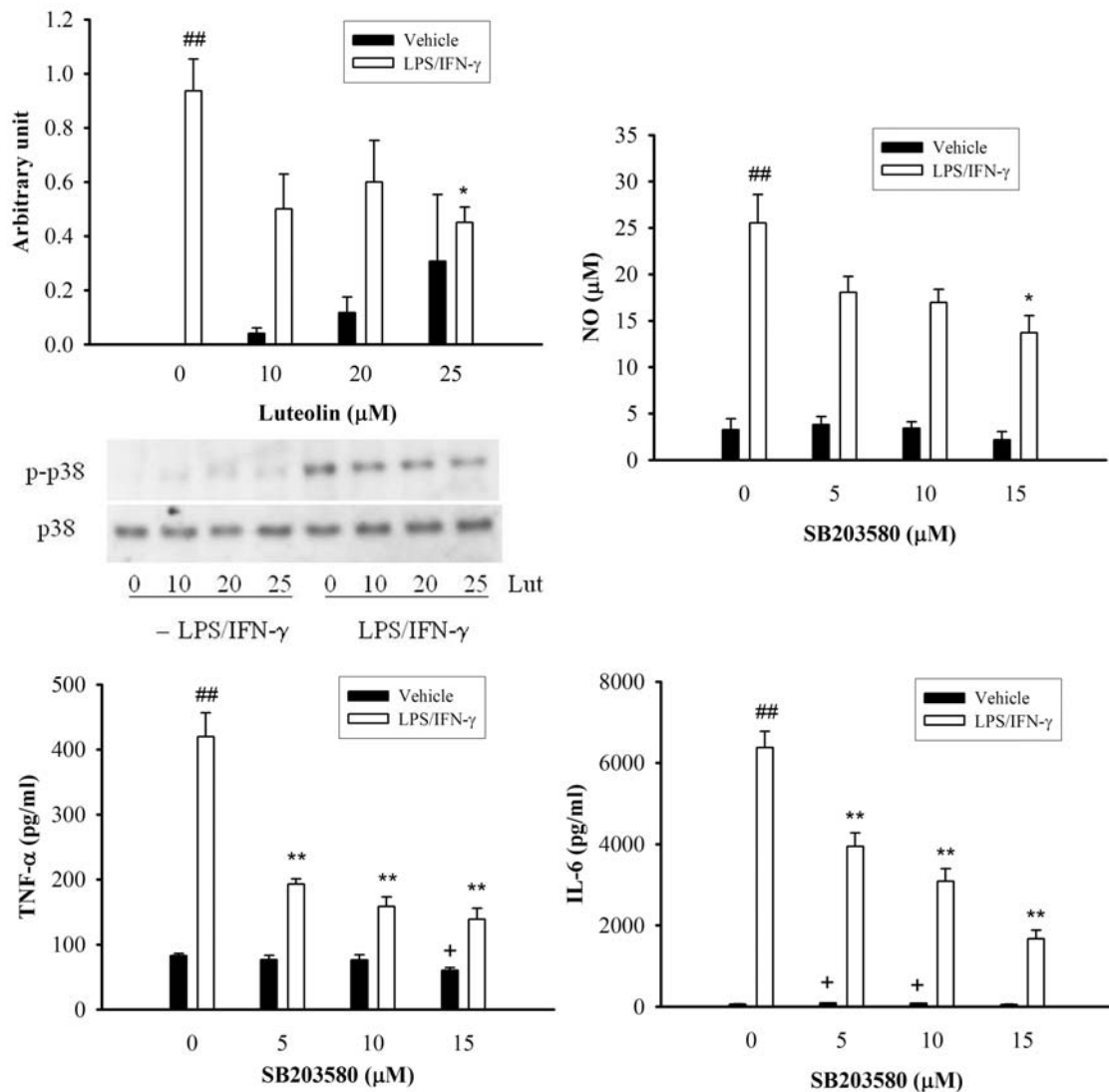


圖 3-7、脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對 p38 活性的影響。以 0、10、20、25 μM 木犀草素前處理 30 分鐘，加入脂多醣(100 ng/ml)/干擾素- γ (10 ng/ml)刺激活化 1 小時後，收取細胞蛋白質進行西方轉漬法，偵測 p38 磷酸化情形。以 0、5、10、15 μM SB203580(p38 抑制劑)前處理 1 小時，加入脂多醣(100 ng/ml)/干擾素- γ (10 ng/ml)培養 24 小時後，收取上清液以酵素連結免疫分析法分析。數據以 Mean \pm S.E.值表示。##表示 $P < 0.01$ ，控制組與脂多醣/干擾素- γ 比較；**表示 $P < 0.01$ ，*表示 $P < 0.05$ ，脂多醣/干擾素- γ 與脂多醣/干擾素- γ /木犀草素比較；+表示 $P < 0.05$ ，控制組與單獨處理木犀草素組比較(n=3)。

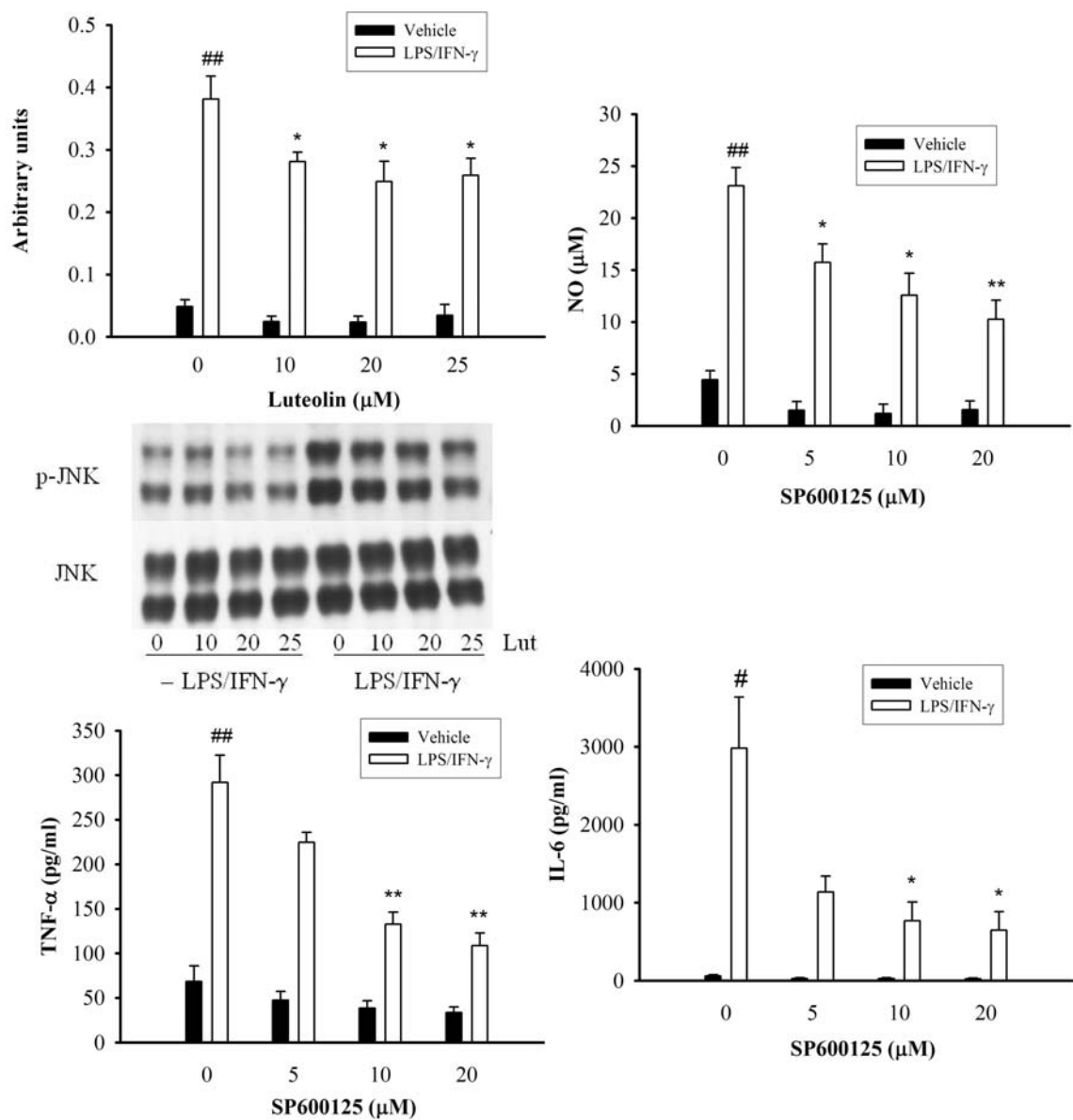


圖 3-8、脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對 JNK 活性的影響。以 0、10、20、25 μM 木犀草素前處理 30 分鐘，加入脂多醣(100 ng/ml)/干擾素- γ (10 ng/ml)刺激活化 1 小時後，收取細胞蛋白質進行西方轉漬法，偵測 JNK 磷酸化情形。以 0、5、10、20 μM SP600125(JNK 抑制劑)前處理 1 小時，加入脂多醣(100 ng/ml)/干擾素- γ (10 ng/ml)培養 24 小時後，收取上清液以酵素連結免疫分析法分析。數據以 Mean \pm S.E.值表示。##表示 $P < 0.01$ ，#表示 $P < 0.05$ ，控制組與脂多醣/干擾素- γ 比較；**表示 $P < 0.01$ ，*表示 $P < 0.05$ ，脂多醣/干擾素- γ 與脂多醣/干擾素- γ /木犀草素比較(n=3)。

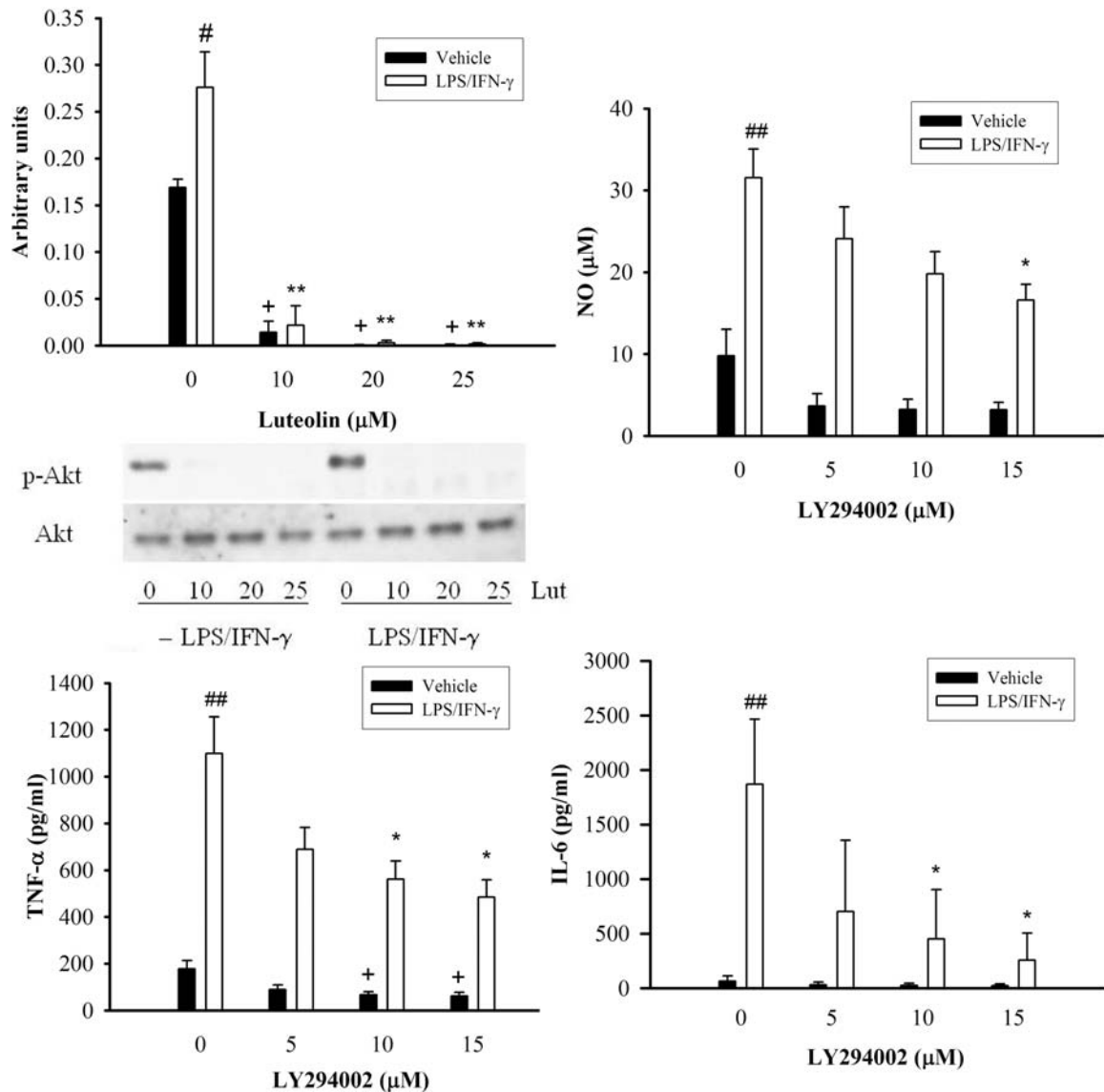


圖 3-9、脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對 Akt 活性的影響。以 0、10、20、25 μM 木犀草素前處理 30 分鐘，加入脂多醣(100 ng/ml)/干擾素- γ (10 ng/ml)刺激活化 1 小時後，收取細胞蛋白質進行西方轉漬法，偵測 Akt 磷酸化情形。以 0、5、10、15 μM LY294002(PI3K 抑制劑)前處理 1 小時，加入脂多醣/干擾素- γ 培養 24 小時後，收取上清液以酵素連結免疫分析法分析。數據以 Mean \pm S.E.值表示。##表示 $P < 0.01$ ，#表示 $P < 0.05$ ，控制組與脂多醣/干擾素- γ 比較；**表示 $P < 0.01$ ，*表示 $P < 0.05$ ，脂多醣/干擾素- γ 與脂多醣/干擾素- γ /木犀草素比較；+表示 $P < 0.05$ ，控制組與單獨處理木犀草素組比較(n=3)。

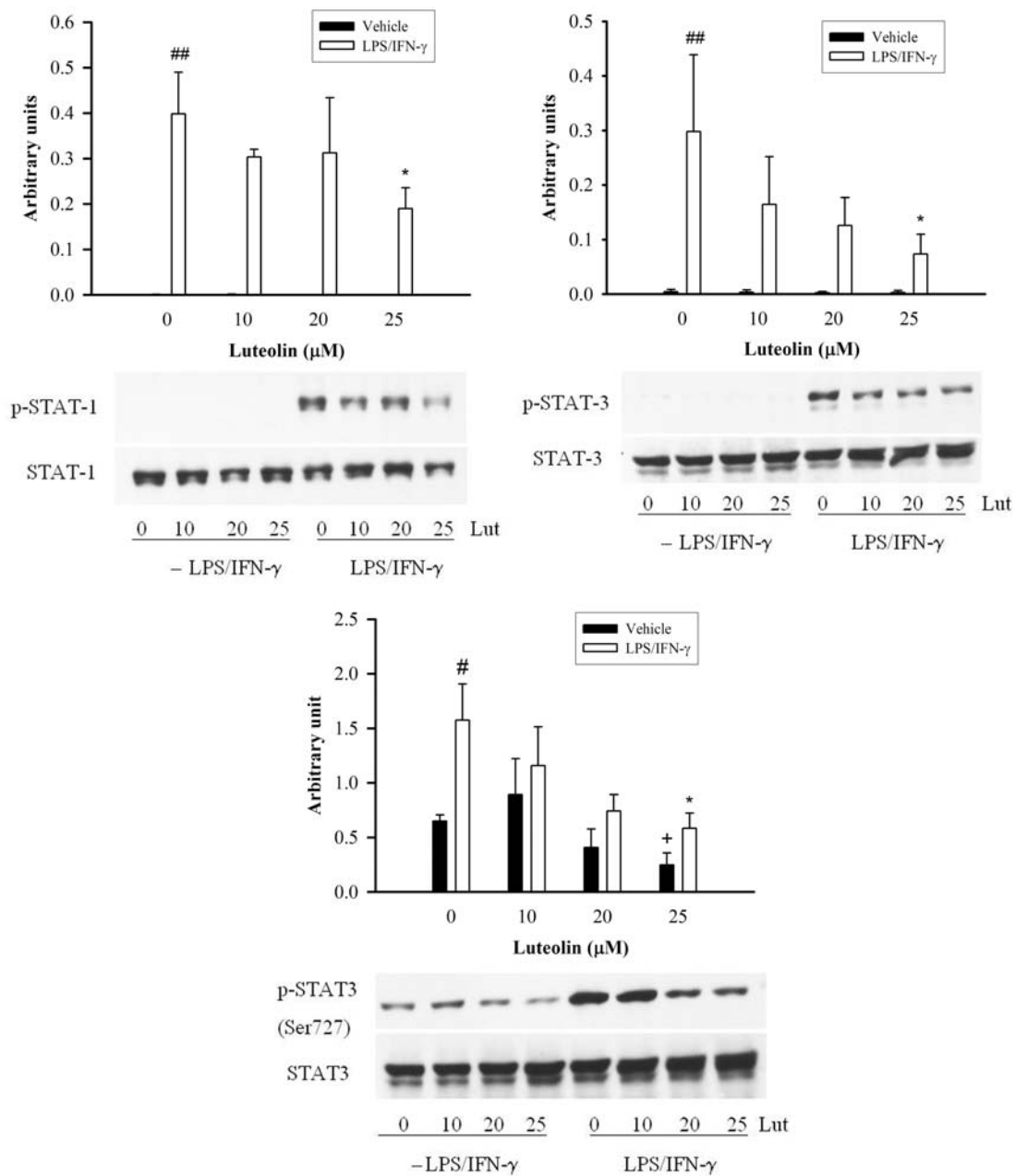


圖 3-10、觀察脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對 STAT 轉錄因子活化的影響。

以 0、10、20、25 μM 木犀草素前處理 30 分鐘，加入脂多醣(100 ng/ml)/干擾素- γ (10 ng/ml) 刺激活化 1 小時後，收取細胞蛋白質進行西方轉漬法，偵測 STAT-1(Tyr701)、STAT-3(Tyr705)及 STAT-3(Ser727)磷酸化情形。數據以 Mean \pm S.E. 值表示。##表示 $P < 0.01$ ，#表示 $P < 0.05$ ，控制組與脂多醣/干擾素- γ 比較；*表示 $P < 0.05$ ，脂多醣/干擾素- γ 與脂多醣/干擾素- γ /木犀草素比較；+表示 $P < 0.05$ ，控制組與單獨處理木犀草素組比較(n=3)。

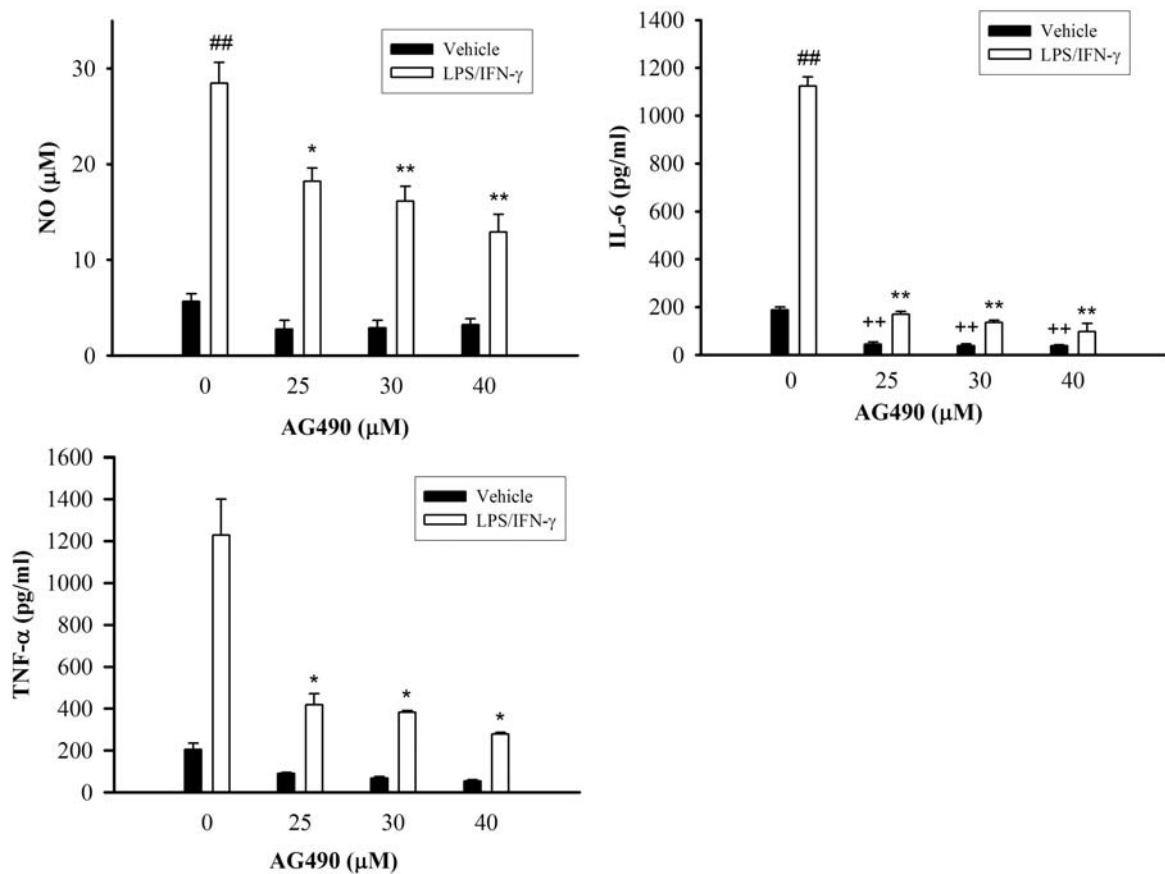


圖 3-11、脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，探討 AG490 對一氧化氮、IL-6 和 TNF- α 表現的影響。

加入 AG490(25、30、40 μ M)前處理 1 小時後，給予脂多醣(100 ng/ml)/干擾素- γ (10 ng/ml)刺激活化 24 小時，收集細胞上清液以 Griess reagent 及酵素連結免疫法分析一氧化氮、IL-6 和 TNF- α 的產量。數據以 Mean \pm S.E.值表示。##表示 P<0.01，控制組與脂多醣/干擾素- γ 比較；**表示 P<0.01，*表示 P<0.05，脂多醣/干擾素- γ 與脂多醣/干擾素- γ /AG490 比較；++表示 P<0.01，控制組與單獨處理 AG490 組比較(n=3)。

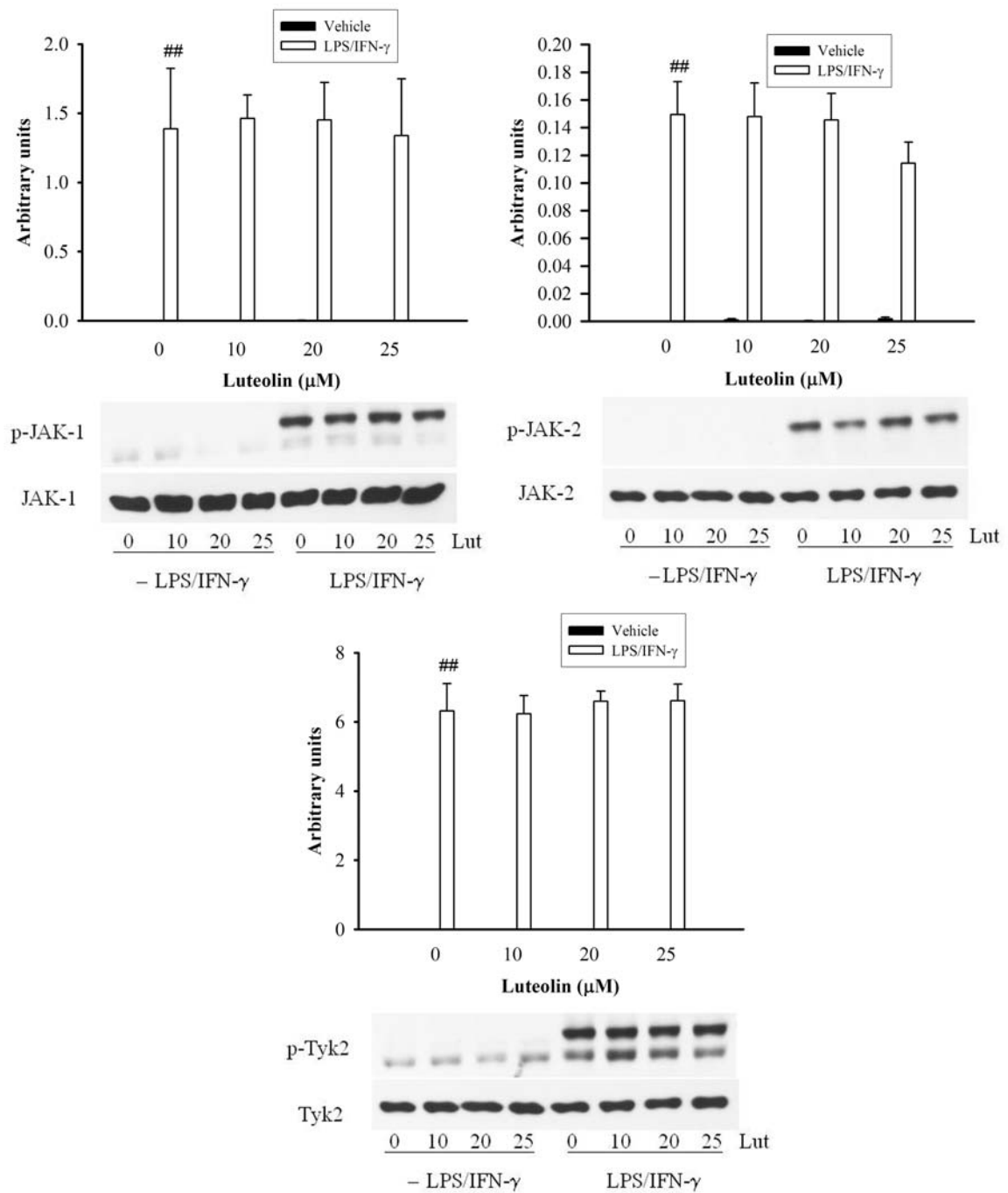


圖 3-12、觀察脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對 JAK 活性的影響。

以 0、10、20、25 μM 木犀草素前處理 30 分鐘，加入脂多醣(100 ng/ml)/干擾素- γ (10 ng/ml)刺激活化 1 小時後，收取細胞蛋白質進行西方轉漬法，偵測 JAK-1、JAK-2 和 Tyk2 磷酸化情形。數據以 Mean \pm S.E.值表示。##表示 $P < 0.01$ ，控制組與脂多醣/干擾素- γ 比較(n=3)。

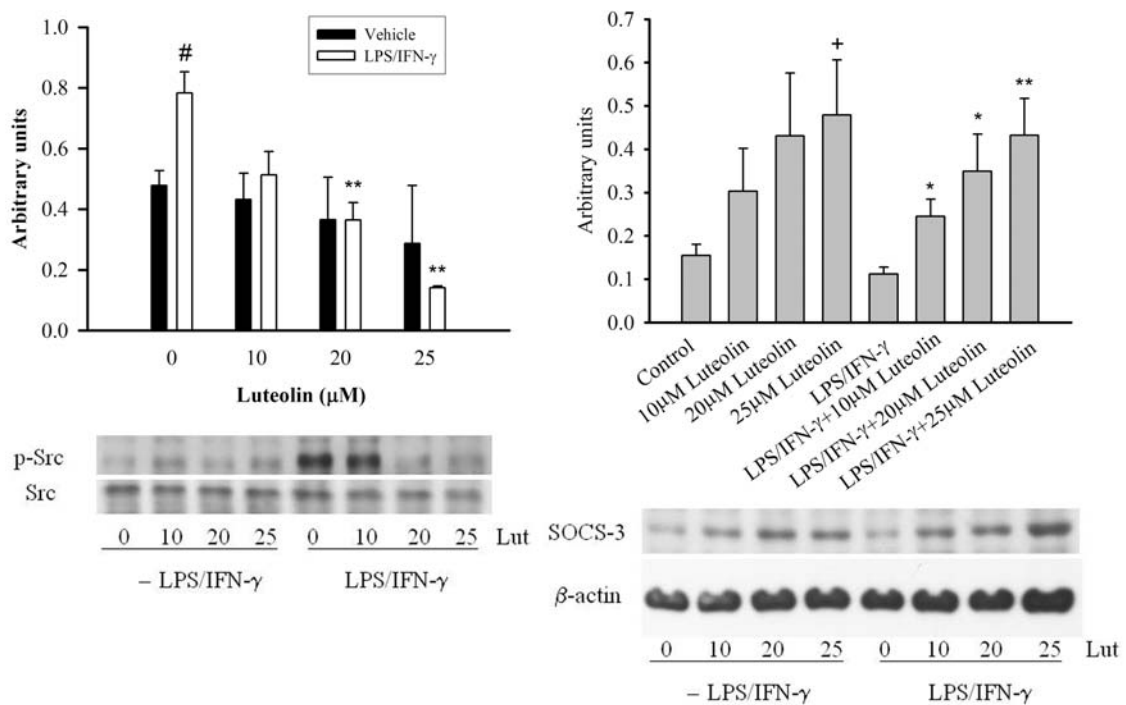


圖 3-13、觀察脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對 Src 活性及 SOCS-3 生合成的影響。

以 0、10、20、25 μM 木犀草素前處理 30 分鐘，加入脂多醣(100 ng/ml)/干擾素- γ (10 ng/ml)刺激活化後，收取細胞蛋白質進行西方轉漬法，分析 Src(1 hr)磷酸化情形和 SOCS-3(6 hr)的蛋白質表現量。數據以 Mean \pm S.E.值表示。#表示 $P < 0.05$ ，控制組與脂多醣/干擾素- γ 比較；**表示 $P < 0.01$ ，*表示 $P < 0.05$ ，脂多醣/干擾素- γ 與脂多醣/干擾素- γ /木犀草素比較；+表示 $P < 0.05$ ，控制組與單獨處理木犀草素組比較(n=3)。

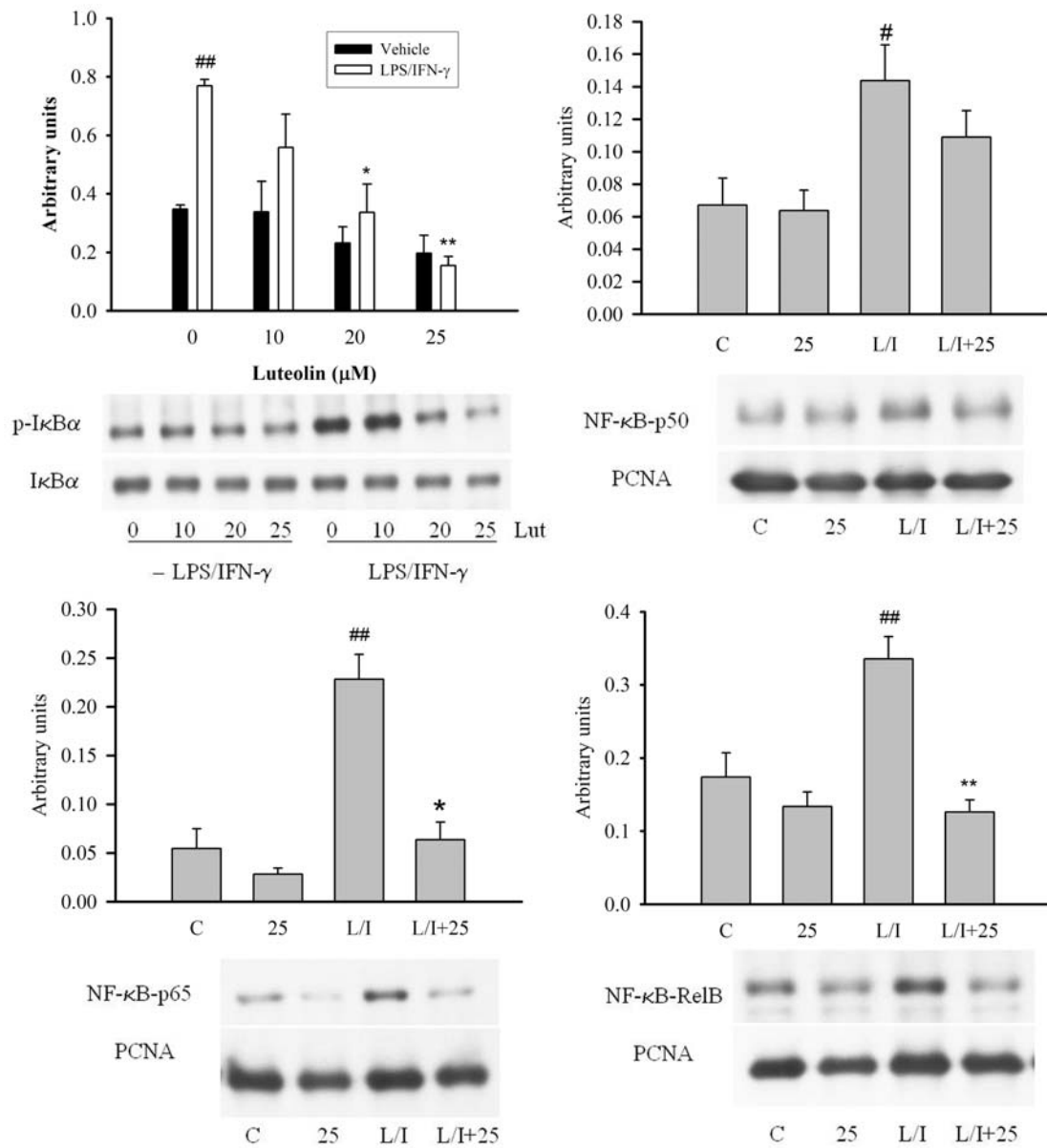


圖 3-14、脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對 NF- κ B 活化的影響。以 0、10、20、25 μ M 木犀草素前處理 30 分鐘，加入脂多醣(100 ng/ml)/干擾素- γ (10 ng/ml)刺激活化後，收取細胞總蛋白質及核蛋白進行西方轉漬法，觀察 I κ B α (1 hr)磷酸化情形及 NF- κ B/p50、NF- κ B/p65 和 NF- κ B/RelB(3 hr)轉位至細胞核情形。數據以 Mean \pm S.E.值表示。##表示 P<0.01，#表示 P<0.05，控制組與脂多醣/干擾素- γ 比較；**表示 P<0.01，*表示 P<0.05，脂多醣/干擾素- γ 與脂多醣/干擾素- γ /木犀草素比較(n=3)。

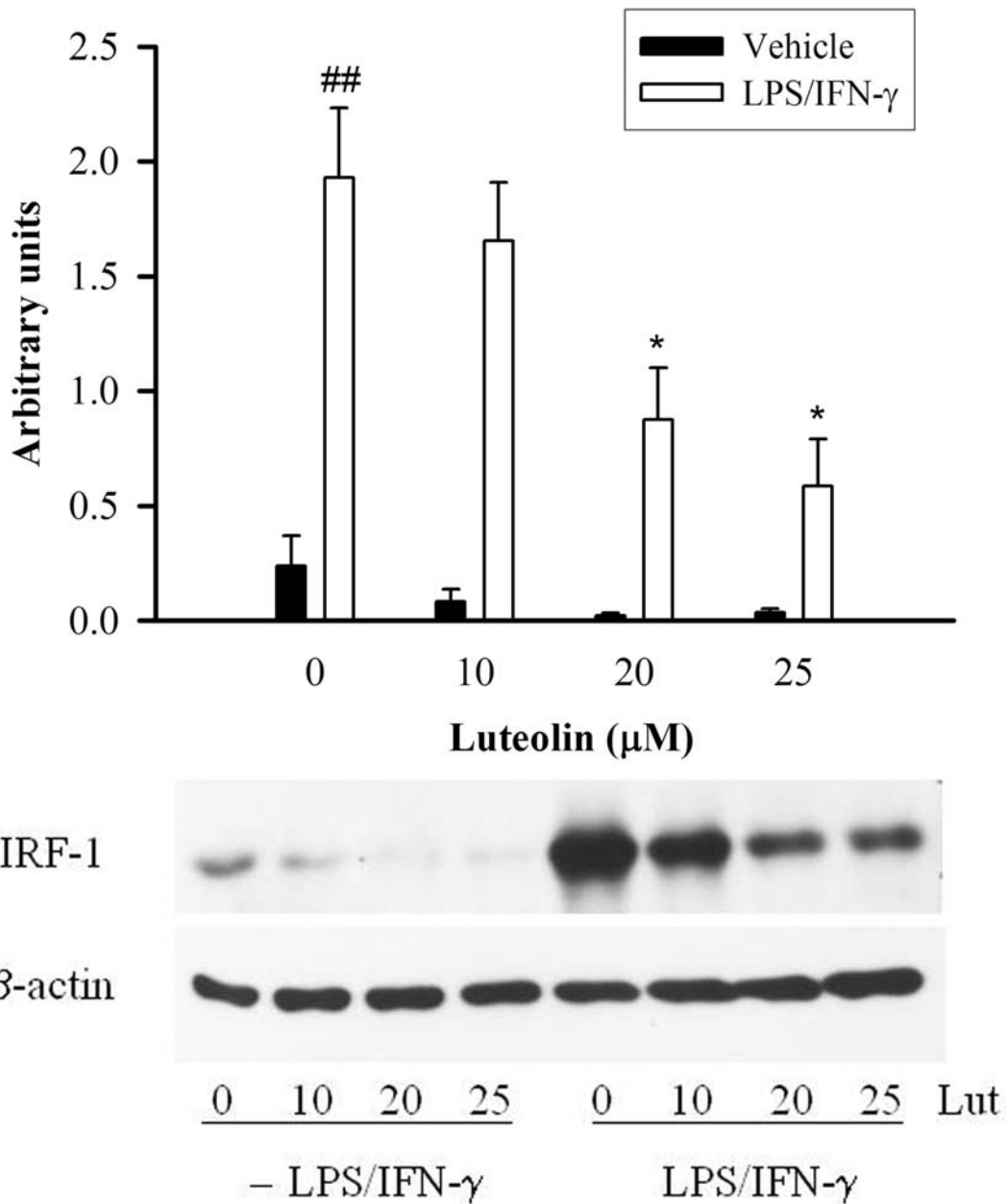


圖 3-15、脂多醣/干擾素- γ 活化微神經膠細胞後，木犀草素對 IRF-1 生合成的影響。

以 0、10、20、25 μM 木犀草素前處理 30 分鐘，加入脂多醣(100 ng/ml)/干擾素- γ (10 ng/ml)刺激活化 1 小時後，收取細胞蛋白質進行西方轉漬法，分析 IRF-1 蛋白質表現量。數據以 Mean \pm S.E.值表示。##表示 $P < 0.01$ ，控制組與脂多醣/干擾素- γ 比較；*表示 $P < 0.05$ ，脂多醣/干擾素- γ 與脂多醣/干擾素- γ /木犀草素比較(n=3)。

六、參考文獻

- Abu-Amer Y, Ross FP, McHugh KP, Livolsi A, Peyron JF and Teitelbaum SL (1998) Tumor necrosis factor- α activation of nuclear transcription factor- κ B in marrow macrophages is mediated by c-Src tyrosine phosphorylation of I κ B. *J Biol Chem* **273**:29417-29423.
- Aktan F (2004) iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* **75**:639-653.
- Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clercq E, Vescovi A, Bagetta G, Kollias G, Meldolesi J and Volterra A (2001) CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci* **4**:702-710.
- Blanco-Aparicio C, Renner O, Leal JF and Carnero A (2007) PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis* **28**:1379-1386.
- Carter AB, Monick MM and Hunninghake GW (1999) Both Erk and p38 kinases are necessary for cytokine gene transcription. *Am J Respir Cell Mol Biol* **20**:751-758.
- Chan MM, Ho CT and Huang HI (1995) Effects of three dietary phytochemicals from tea, rosemary and turmeric on inflammation-induced nitrite production. *Cancer Lett* **96**:23-29.
- Chang L and Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**:37-40.
- Chao CC, Hu S, Ehrlich L and Peterson PK (1995) Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Behav Immun* **9**:355-365.
- Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG and Peterson PK (1992) Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol* **149**:2736-2741.
- Chen CY, Peng WH, Tsai KD and Hsu SL (2007) Luteolin suppresses inflammation-associated gene expression by blocking NF- κ B and AP-1 activation pathway in mouse alveolar macrophages. *Life Sci* **81**:1602-1614.
- Chen F, Castranova V, Shi X and Demers LM (1999) New insights into the role of nuclear factor- κ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* **45**:7-17.
- Chen XP, Losman JA and Rothman P (2000) SOCS proteins, regulators of intracellular signaling. *Immunity* **13**:287-290.
- Chen YC, Shen SC, Chen LG, Lee TJ and Yang LL (2001) Wogonin, baicalin, and

- baicalein inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions induced by nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide. *Biochem Pharmacol* **61**:1417-1427.
- Cho JY, Kim PS, Park J, Yoo ES, Baik KU, Kim YK and Park MH (2000) Inhibitor of tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells from *Amorpha fruticosa*. *J Ethnopharmacol* **70**:127-133.
- Choi DK, Lee H, Jeong J, Lim B and Suk K (2005) Differential effects of ethanol on glial signal transduction initiated by lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J Neurosci Res* **82**:225-231.
- Cobb MH (1999) MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* **71**:479-500.
- Comalada M, Ballester I, Bailon E, Sierra S, Xaus J, Galvez J, de Medina FS and Zarzuelo A (2006) Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship. *Biochem Pharmacol* **72**:1010-1021.
- Consilvio C, Vincent AM and Feldman EL (2004) Neuroinflammation, COX-2, and ALS--a dual role? *Exp Neurol* **187**:1-10.
- Dheen ST, Jun Y, Yan Z, Tay SS and Ling EA (2005) Retinoic acid inhibits expression of TNF-alpha and iNOS in activated rat microglia. *Glia* **50**:21-31.
- Dheen ST, Kaur C and Ling EA (2007) Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem* **14**:1189-1197.
- Douglas MR, Morrison KE, Salmon M and Buckley CD (2002) Why does inflammation persist: a dominant role for the stromal microenvironment? *Expert Rev Mol Med* **4**:1-18.
- Fan C, Li Q, Ross D and Engelhardt JF (2003) Tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha activates NF kappa B through a redox-regulated and c-Src-dependent mechanism following hypoxia/reoxygenation. *J Biol Chem* **278**:2072-2080.
- Feng GJ, Goodridge HS, Harnett MM, Wei XQ, Nikolaev AV, Higson AP and Liew FY (1999) Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: *Leishmania* phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *J Immunol* **163**:6403-6412.
- Ferrari D, Wesselborg S, Bauer MK and Schulze-Osthoff K (1997) Extracellular ATP activates transcription factor NF-kappaB through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-kappaB p65. *J Cell Biol* **139**:1635-1643.
- Fitzgerald DC, Meade KG, McEvoy AN, Lillis L, Murphy EP, Machugh DE and Baird AW (2007) Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases nuclear factor

- kappaB (NFkappaB) activity in and interleukin-8 (IL-8) release from bovine mammary epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol* **116**:59-68.
- Formica JV and Regelson W (1995) Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* **33**:1061-1080.
- Fotsis T, Pepper MS, Aktas E, Breit S, Rasku S, Adlercreutz H, Wahala K, Montesano R and Schweigerer L (1997) Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res* **57**:2916-2921.
- Galea E, Feinstein DL and Reis DJ (1992) Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:10945-10949.
- Gamet-Payrastre L, Manenti S, Gratacap MP, Tulliez J, Chap H and Payrastre B (1999) Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *Gen Pharmacol* **32**:279-286.
- Ghoshal A, Das S, Ghosh S, Mishra MK, Sharma V, Koli P, Sen E and Basu A (2007) Proinflammatory mediators released by activated microglia induces neuronal death in Japanese encephalitis. *Glia* **55**:483-496.
- Giri S, Rattan R, Singh AK and Singh I (2004) The 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 inhibits the inflammatory response in primary rat astrocytes via down-regulating multiple steps in phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-NF-kappaB-p300 pathway independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Immunol* **173**:5196-5208.
- Gutierrez-Venegas G, Kawasaki-Cardenas P, Arroyo-Cruz SR and Maldonado-Frias S (2006) Luteolin inhibits lipopolysaccharide actions on human gingival fibroblasts. *Eur J Pharmacol* **541**:95-105.
- Guzik TJ, Korb R and Adamek-Guzik T (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* **54**:469-487.
- Hanisch UK (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* **40**:140-155.
- Harris GK, Qian Y, Leonard SS, Sbarra DC and Shi X (2006) Luteolin and chrysin differentially inhibit cyclooxygenase-2 expression and scavenge reactive oxygen species but similarly inhibit prostaglandin-E2 formation in RAW 264.7 cells. *J Nutr* **136**:1517-1521.
- Heneka MT, Dumitrescu L, Loschmann PA, Wullner U and Klockgether T (2000) Temporal, regional, and cell-specific changes of iNOS expression after intrastriatal microinjection of interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Chem Neuroanat* **18**:167-179.
- Hwang SY, Jung JS, Lim SJ, Kim JY, Kim TH, Cho KH and Han IO (2004) LY294002 inhibits interferon-gamma-stimulated inducible nitric oxide synthase expression in BV2 microglial cells. *Biochem Biophys Res Commun*

318:691-697.

- Israel A (2000) The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB? *Trends Cell Biol* **10**:129-133.
- Jeohn GH, Kong LY, Wilson B, Hudson P and Hong JS (1998) Synergistic neurotoxic effects of combined treatments with cytokines in murine primary mixed neuron/glia cultures. *J Neuroimmunol* **85**:1-10.
- Ji RR (2004) Peripheral and central mechanisms of inflammatory pain, with emphasis on MAP kinases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **3**:299-303.
- Johnson GL and Lapadat R (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**:1911-1912.
- Kamijo R, Harada H, Matsuyama T, Bosland M, Gerecitano J, Shapiro D, Le J, Koh SI, Kimura T, Green SJ and et al. (1994) Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* **263**:1612-1615.
- Kang JL, Lee HW, Kim HJ, Lee HS, Castranova V, Lim CM and Koh Y (2005) Inhibition of SRC tyrosine kinases suppresses activation of nuclear factor-kappaB, and serine and tyrosine phosphorylation of IkappaB-alpha in lipopolysaccharide-stimulated raw 264.7 macrophages. *J Toxicol Environ Health A* **68**:1643-1662.
- Kim HK, Cheon BS, Kim YH, Kim SY and Kim HP (1999) Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* **58**:759-765.
- Kim HP, Son KH, Chang HW and Kang SS (2004) Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci* **96**:229-245.
- Kim HY, Park EJ, Joe EH and Jou I (2003) Curcumin suppresses Janus kinase-STAT inflammatory signaling through activation of Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 2 in brain microglia. *J Immunol* **171**:6072-6079.
- Kim JS, Lee HJ, Lee MH, Kim J, Jin C and Ryu JH (2006) Luteolin inhibits LPS-stimulated inducible nitric oxide synthase expression in BV-2 microglial cells. *Planta Med* **72**:65-68.
- Kim JY, Kim TH and Kim SS (2008) Anti-inflammatory effect of a human prothrombin fragment-2-derived peptide, NSA9, in EOC2 microglia. *Biochem Biophys Res Commun* **368**:779-785.
- Kim SU and de Vellis J (2005) Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* **81**:302-313.
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J and Schindler CW (2002) Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*

285:1-24.

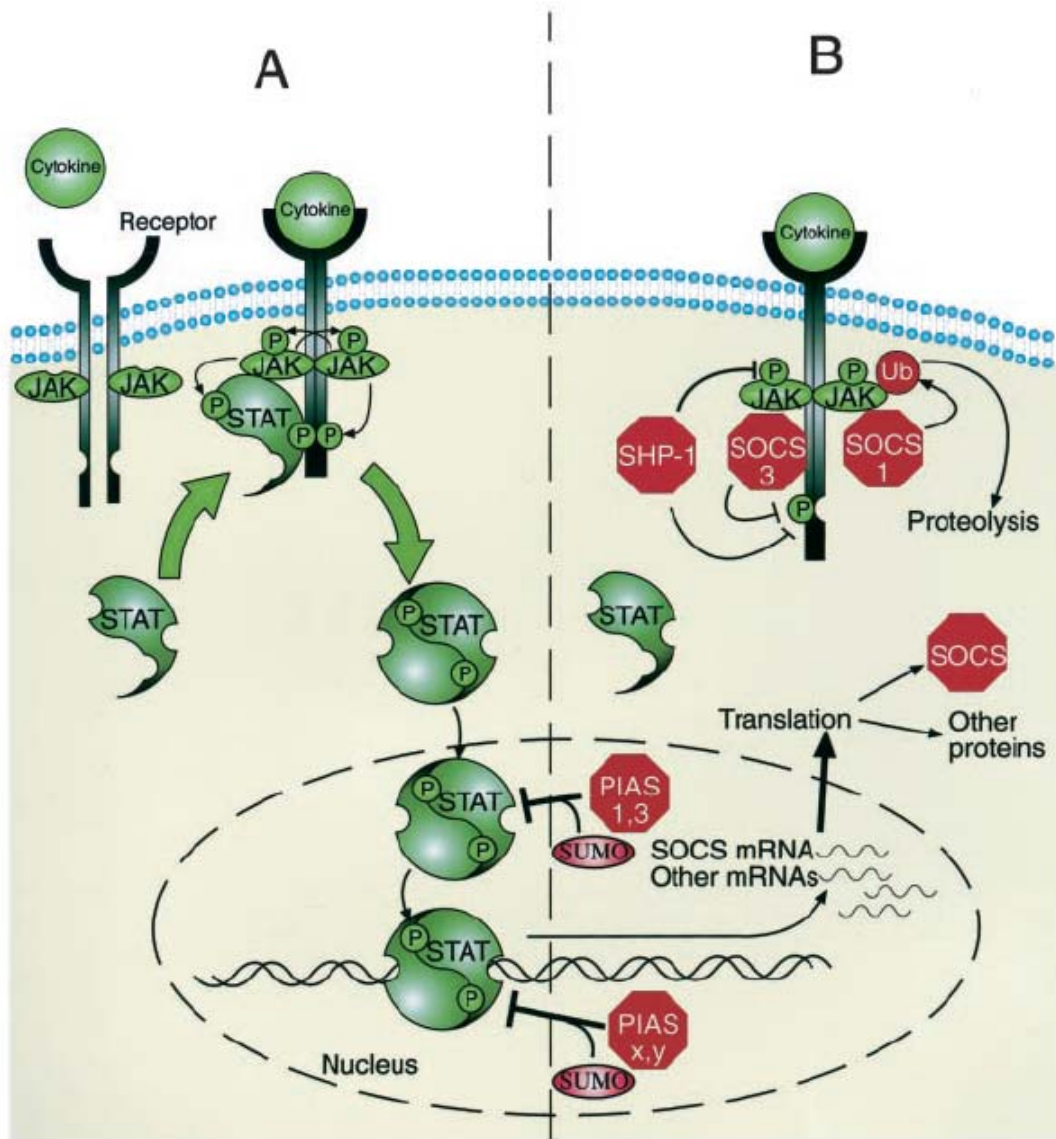
- Kitaura J, Asai K, Maeda-Yamamoto M, Kawakami Y, Kikkawa U and Kawakami T (2000) Akt-dependent cytokine production in mast cells. *J Exp Med* **192**:729-740.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* **19**:312-318.
- Lee CH, Jeon YT, Kim SH and Song YS (2007) NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors* **29**:19-35.
- Lee J, Hur J, Lee P, Kim JY, Cho N, Kim SY, Kim H, Lee MS and Suk K (2001) Dual role of inflammatory stimuli in activation-induced cell death of mouse microglial cells. Initiation of two separate apoptotic pathways via induction of interferon regulatory factor-1 and caspase-11. *J Biol Chem* **276**:32956-32965.
- Lee JY, Jhun BS, Oh YT, Lee JH, Choe W, Baik HH, Ha J, Yoon KS, Kim SS and Kang I (2006) Activation of adenosine A3 receptor suppresses lipopolysaccharide-induced TNF-alpha production through inhibition of PI 3-kinase/Akt and NF-kappaB activation in murine BV2 microglial cells. *Neurosci Lett* **396**:1-6.
- Lee JY, Lowell CA, Lemay DG, Youn HS, Rhee SH, Sohn KH, Jang B, Ye J, Chung JH and Hwang DH (2005) The regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase by Src-family tyrosine kinases mediated through MyD88-independent signaling pathways of Toll-like receptor 4. *Biochem Pharmacol* **70**:1231-1240.
- Lee YB, Schrader JW and Kim SU (2000) p38 map kinase regulates TNF-alpha production in human astrocytes and microglia by multiple mechanisms. *Cytokine* **12**:874-880.
- Lee YG, Lee WM, Kim JY, Lee JY, Lee IK, Yun BS, Rhee MH and Cho JY (2008) Src kinase-targeted anti-inflammatory activity of davallialactone from *Inonotus xeranticus* in lipopolysaccharide-activated RAW264.7 cells. *Br J Pharmacol* **154**:852-863.
- Leu TH, Charoenfuprasert S, Yen CK, Fan CW and Maa MC (2006) Lipopolysaccharide-induced c-Src expression plays a role in nitric oxide and TNFalpha secretion in macrophages. *Mol Immunol* **43**:308-316.
- Liu B, Gao HM, Wang JY, Jeohn GH, Cooper CL and Hong JS (2002) Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* **962**:318-331.
- Liu R, Aupperle K and Terkeltaub R (2001) Src family protein tyrosine kinase signaling mediates monosodium urate crystal-induced IL-8 expression by monocytic THP-1 cells. *J Leukoc Biol* **70**:961-968.

- Lv N, Song MY, Kim EK, Park JW, Kwon KB and Park BH (2008) Guggulsterone, a plant sterol, inhibits NF-kappaB activation and protects pancreatic beta cells from cytokine toxicity. *Mol Cell Endocrinol* **289**:49-59.
- Madrid LV, Mayo MW, Reuther JY and Baldwin AS, Jr. (2001) Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *J Biol Chem* **276**:18934-18940.
- Manjeet KR and Ghosh B (1999) Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophages. *Int J Immunopharmacol* **21**:435-443.
- Marcus JS, Karackattu SL, Fleegal MA and Sumners C (2003) Cytokine-stimulated inducible nitric oxide synthase expression in astroglia: role of Erk mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB. *Glia* **41**:152-160.
- Meng F and Lowell CA (1998) A beta 1 integrin signaling pathway involving Src-family kinases, Cbl and PI-3 kinase is required for macrophage spreading and migration. *EMBO J* **17**:4391-4403.
- Middleton E, Jr., Kandaswami C and Theoharides TC (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* **52**:673-751.
- Minc-Golomb D, Tsarfaty I and Schwartz JP (1994) Expression of inducible nitric oxide synthase by neurones following exposure to endotoxin and cytokine. *Br J Pharmacol* **112**:720-722.
- Minghetti L (2004) Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* **63**:901-910.
- Nakamura Y (2002) Regulating factors for microglial activation. *Biol Pharm Bull* **25**:945-953.
- Nam KN, Son MS, Park JH and Lee EH (2008) Shikonins attenuate microglial inflammatory responses by inhibition of ERK, Akt, and NF-kappaB: neuroprotective implications. *Neuropharmacology* **55**:819-825.
- Nikodemova M, Duncan ID and Watters JJ (2006) Minocycline exerts inhibitory effects on multiple mitogen-activated protein kinases and IkappaBalpha degradation in a stimulus-specific manner in microglia. *J Neurochem* **96**:314-323.
- Novogrodsky A, Vanichkin A, Patya M, Gazit A, Osherov N and Levitzki A (1994) Prevention of lipopolysaccharide-induced lethal toxicity by tyrosine kinase inhibitors. *Science* **264**:1319-1322.
- Ojaniemi M, Glumoff V, Harju K, Liljeroos M, Vuori K and Hallman M (2003) Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in Toll-like receptor 4-mediated

- cytokine expression in mouse macrophages. *Eur J Immunol* **33**:597-605.
- Okutani D, Lodyga M, Han B and Liu M (2006) Src protein tyrosine kinase family and acute inflammatory responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**:L129-141.
- Orr CF, Rowe DB and Halliday GM (2002) An inflammatory review of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* **68**:325-340.
- Ovrevik J, Lag M, Schwarze P and Refsnes M (2004) p38 and Src-ERK1/2 pathways regulate crystalline silica-induced chemokine release in pulmonary epithelial cells. *Toxicol Sci* **81**:480-490.
- Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM and Donner DB (1999) NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* **401**:82-85.
- Pallapies D, Salinger A, Meyer zum Gottesberge A, Atkins DJ, Rohleder G, Nagyvanyi P and Peskar BA (1995) Effects of lysine clonixinate and ketorolac tromethamine on prostanoid release from various rat organs incubated ex vivo. *Life Sci* **57**:83-89.
- Park EJ, Park SY, Joe EH and Jou I (2003) 15d-PGJ2 and rosiglitazone suppress Janus kinase-STAT inflammatory signaling through induction of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) and SOCS3 in glia. *J Biol Chem* **278**:14747-14752.
- Planas AM, Gorina R and Chamorro A (2006) Signalling pathways mediating inflammatory responses in brain ischaemia. *Biochem Soc Trans* **34**:1267-1270.
- Rane SG and Reddy EP (2002) JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene* **21**:3334-3358.
- Rao YK, Fang SH and Tzeng YM (2005) Inhibitory effects of the flavonoids isolated from *Waltheria indica* on the production of NO, TNF-alpha and IL-12 in activated macrophages. *Biol Pharm Bull* **28**:912-915.
- Rezai-Zadeh K, Ehrhart J, Bai Y, Sanberg PR, Bickford P, Tan J and Shytle RD (2008) Apigenin and luteolin modulate microglial activation via inhibition of STAT1-induced CD40 expression. *J Neuroinflammation* **5**:41.
- Ross JA and Kasum CM (2002) Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* **22**:19-34.
- Ruiz PA and Haller D (2006) Functional diversity of flavonoids in the inhibition of the proinflammatory NF-kappaB, IRF, and Akt signaling pathways in murine intestinal epithelial cells. *J Nutr* **136**:664-671.
- Safieh-Garabedian B, Haddad JJ and Saade NE (2004) Cytokines in the central nervous system: targets for therapeutic intervention. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **3**:271-280.

- Sandersen C, Bureau F, Turlej R, Fievez L, Dogne S, Kirschvink N and Lekeux P (2001) p65 Homodimer activity in distal airway cells determines lung dysfunction in equine heaves. *Vet Immunol Immunopathol* **80**:315-326.
- Schroeter H, Boyd C, Spencer JP, Williams RJ, Cadenas E and Rice-Evans C (2002) MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol Aging* **23**:861-880.
- Sharma V, Mishra M, Ghosh S, Tewari R, Basu A, Seth P and Sen E (2007) Modulation of interleukin-1beta mediated inflammatory response in human astrocytes by flavonoids: implications in neuroprotection. *Brain Res Bull* **73**:55-63.
- Stefanova I, Corcoran ML, Horak EM, Wahl LM, Bolen JB and Horak ID (1993) Lipopolysaccharide induces activation of CD14-associated protein tyrosine kinase p53/56lyn. *J Biol Chem* **268**:20725-20728.
- Streit WJ (2005) Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev* **48**:234-239.
- Streit WJ, Conde JR, Fendrick SE, Flanary BE and Mariani CL (2005) Role of microglia in the central nervous system's immune response. *Neurol Res* **27**:685-691.
- Stuehr DJ and Marletta MA (1985) Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**:7738-7742.
- Suzuki A, Hanada T, Mitsuyama K, Yoshida T, Kamizono S, Hoshino T, Kubo M, Yamashita A, Okabe M, Takeda K, Akira S, Matsumoto S, Toyonaga A, Sata M and Yoshimura A (2001) CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation. *J Exp Med* **193**:471-481.
- Tedeschi E, Menegazzi M, Yao Y, Suzuki H, Forstermann U and Kleinert H (2004) Green tea inhibits human inducible nitric-oxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1alpha activation. *Mol Pharmacol* **65**:111-120.
- Trevino JG, Summy JM, Gray MJ, Nilsson MB, Lesslie DP, Baker CH and Gallick GE (2005) Expression and activity of SRC regulate interleukin-8 expression in pancreatic adenocarcinoma cells: implications for angiogenesis. *Cancer Res* **65**:7214-7222.
- Ueda H, Yamazaki C and Yamazaki M (2002) Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens*. *Biol Pharm Bull* **25**:1197-1202.
- Vanhaesebroeck B, Leervers SJ, Panayotou G and Waterfield MD (1997) Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* **22**:267-272.

- Wen Z, Zhong Z and Darnell JE, Jr. (1995) Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* **82**:241-250.
- Wong WS (2005) Inhibitors of the tyrosine kinase signaling cascade for asthma. *Curr Opin Pharmacol* **5**:264-271.
- Wormald S and Hilton DJ (2004) Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem* **279**:821-824.
- Wu ZH and Miyamoto S (2007) Many faces of NF-kappaB signaling induced by genotoxic stress. *J Mol Med* **85**:1187-1202.
- Xagorari A, Papapetropoulos A, Mauromatis A, Economou M, Fotsis T and Roussos C (2001) Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. *J Pharmacol Exp Ther* **296**:181-187.
- Xagorari A, Roussos C and Papapetropoulos A (2002) Inhibition of LPS-stimulated pathways in macrophages by the flavonoid luteolin. *Br J Pharmacol* **136**:1058-1064.
- Yang MS, Lee J, Ji KA, Min KJ, Lee MA, Jou I and Joe E (2004) Thrombin induces suppressor of cytokine signaling 3 expression in brain microglia via protein kinase Cdelta activation. *Biochem Biophys Res Commun* **317**:811-816.
- Yang MS, Min KJ and Joe E (2007) Multiple mechanisms that prevent excessive brain inflammation. *J Neurosci Res* **85**:2298-2305.
- Yao Y, Hausding M, Erkel G, Anke T, Forstermann U and Kleinert H (2003) Sporogen, S14-95, and S-curvularin, three inhibitors of human inducible nitric-oxide synthase expression isolated from fungi. *Mol Pharmacol* **63**:383-391.
- Yoshizumi M, Abe J, Haendeler J, Huang Q and Berk BC (2000) Src and Cas mediate JNK activation but not ERK1/2 and p38 kinases by reactive oxygen species. *J Biol Chem* **275**:11706-11712.
- Yu H, Kortylewski M and Pardoll D (2007) Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* **7**:41-51.
- Yuan G, Wahlqvist ML, He G, Yang M and Li D (2006) Natural products and anti-inflammatory activity. *Asia Pac J Clin Nutr* **15**:143-152.
- Zielasek J and Hartung HP (1996) Molecular mechanisms of microglial activation. *Adv Neuroimmunol* **6**:191-122.



附圖一、JAK/STAT 訊息傳遞路徑。(Wormald and Hilton, 2004)