

計畫編號：DOH89-TD-1065

行政院衛生署八十八年下半年及八十九年度

科技研究發展計畫

以巨噬細胞為模式篩選可能促進或抑制
前列腺素 E_2 生合成之食物或食物成份

研 究 報 告

執行機構：國立臺灣大學農業化學系

計畫主持人：黃青真

研究人員：吳美嬌、李敏雄

執行期間：88 年 7 月 1 日至 89 年 6 月 30 日

＊＊本研究報告僅供參考，不代表本署意見＊＊

目	錄	
中文摘要		2
英文摘要		5
本文		
前言		7
材料與方法		14
結果		21
討論		31
結論與建議		35
參考文獻		36
圖		43

中文摘要

巨噬細胞中可誘發之前列腺素合成酶-2(PGHS-2 or COX-2)受內因性因子，如：cytokine，或外因性因子，如：LPS，之活化而誘發，催化生成前列腺素 E_2 為發炎反應之主要介質。以專一性抑制前列腺素合成酶-2 為目標之非固醇類消炎劑之研發為目前熱門之研究主題。有些由天然食物單離之成份，尤其是多酚類抗氧化劑類，可抑制 COX-2 之表現或酵素活性。本計畫之主要目的乃在初步篩選具有促進或抑制 COX-2 生成 P G 活性之食物或食物成份，以供疾病預防及保健之需。

由於受活化之巨噬細胞為發炎反應中之主要 PG 生成者，本計畫選用巨噬細胞株 RAW264.7 為模式，用以篩選植物性食物材料或成份。選擇傳統認為『上火』或『降火』之食材，包括：龍眼、荔枝、桂圓（龍眼乾）、菊花、苦瓜、蓮子心、芹菜，或已知含較高量類黃酮者，包括：甘藷葉、洋蔥等食物材料。以水萃取並經冷凍乾燥，得水萃物（WE）。冷凍乾燥的渣以乙酸乙酯萃取，經減壓濃縮得有機萃物（EAE）。另購入市售之各種常見於食物之類黃酮與其他具抗氧化力之化合物。將供試化合物或食物萃取物溶於 DMSO、絕對酒精，或直接配入培養液 DMEM，再以培養液稀釋成系列濃度。以含 10%FBS 之 DMEM 養至將近長滿（confluence）之 RAW264.7 細胞，刮下並植於 96 孔培養盤，每孔 $5 \times$

10^6 個細胞。於 37°C 含 $5\% \text{ CO}_2$ 培養箱培養 24 小時後，將培養液換成含系列濃度上述待測樣品之培養液，其中同時含或不含 LPS(1ng/mL)。培養 18 小時後，取上清液以酵素免疫分析法定量前列腺素 E_2 生成量。

結果顯示，荔枝、龍眼與桂圓水草物本身皆可促進巨噬細胞 PGE_2 合成，其 EC_{50} 各為 8.4、16、11 mg/mL 。相反地，針對 LPS 誘發巨噬細胞生成 PGE_2 ，菊花、苦瓜及洋蔥之水草物均有抑制效果，其 IC_{50} 分別為 0.6、0.13 與 0.5 mg/mL 。而苦瓜與洋蔥之有機萃物亦呈現抑制效應， IC_{50} 分別為 21 與 3.5 $\mu\text{g/mL}$ 。在純化之食物成份方面，類黃酮化合物均顯示抑制 LPS 誘發巨噬細胞生成 PGE_2 之效應，其 $\text{IC}_{50}(\mu\text{M})$ 分別為：apigenin, 1.90; curcumin, 9.7; resveratrol, 13.9; quercetin, 23.3; 以及 narigenin, 36.7。綠茶多酚類化合物中有些亦具抑制效應，其 $\text{IC}_{50}(\mu\text{M})$ 分別為：EGCG, 11.3; ECG, 39.2; (-)EC, 151; catechin, 321; 但 EGC 與 (+)EC 則無顯著效應。抗壞血酸需相當高的濃度方具抑制效應，其 IC_{50} 為 833 μM 。 β -胡蘿蔔素則無效應。

以各萃取物或化何物之最高有效抑制或促進濃度處理細胞後，經西方點墨法分析，發現此等處理並未顯著改變還氧化酶-2 蛋白質量。顯示此等促進或抑制效應可能作用在酵素催化活性之層次。

本計畫之結果，可供高危險群（如慢性發炎者）作為選擇食物之參

考，避免促進 PGE_2 生成之食物，如：荔枝、龍眼、桂圓。選擇抑制 PGE_2 生成之食物，如苦瓜洋蔥菊花以及富含類黃酮之化合物。以降低發炎反應造成之生理不適與組織傷害。

中文關鍵詞：巨噬細胞、前列腺素 E_2 、發炎反應、上火、降火、類黃酮、前列腺素合成酶、蔬菜水果

Abstract

Prostaglandin E₂ (PGE₂) produced by macrophage in response to intrinsic factors, such as cytokine, or extrinsic factors, such as lipopolysaccharide (LPS), is known as proinflammatory mediators. Inducible cyclooxygenase-2 is responsible for the production of the proinflammatory PGE₂, which is also the target for the development of specific non-steroidal anti-inflammatory drugs. Macrophage cell line 264.7 was employed in this study to screen for the enhancing or inhibiting activity on PGE₂ production in various plant food or food components.

Food samples, including Lei-Chi, Longan, dried Longan, chryxanthemum, bitter gourd, core of lotus seed, onion and celery, were extracted with water and the Water Extract (WE) fractions were obtained. Residues were dried and extracted with ethyl acetate to obtain ethyl acetate extract (EAE) fractions. These fractions were dissolved in DMEM, DMSO or ethanol and diluted with DMEM to various concentrations and used for cell culture. Confluent cells of the macrophage cell line RAW264.7 were seeded in 96 well plate, 5×10^6 cell/well and cultured for 24 hr in DMEM containing 10%FBS. Medium was then replaced by DMEM containing various concentrations of WE or EAE of various food samples or commercially available compounds known to exist in foods in the presence or absence of LPS (1ng/mL). After culturing for 18 hr, medium was collected and analyzed for PGE₂ by an enzyme-immuno assay kit.

The WE of Lei-Chi, Longan and dried Longan showed a dose-dependent enhancing effect on the PGE₂ production by RAW264.7 cells, with an EC₅₀ of 8.4, 16 and 11 mg/mL, respectively. The PGE₂ production in RAW264.7 cells stimulated by LPS was dose-dependently inhibited by WE of chryxanthemum, bitter gourd and onion, with an IC₅₀ of 0.6, 0.5 and 0.5 mg/mL respectively. The inhibiting effect of the EAE of bitter gourd and onion is less potent than that of the WE. Most of the flavonoid compounds tested showed dose-dependent

inhibition effect on the PGE₂ production stimulated by LPS in RAW264.7 cells. The IC₅₀ (μM) were: apigenin, 1.90; curcumin, 9.7; resveratrol, 13.9; quercetin, 23.3 and narigenin, 36.7. Green tea polyphenols also had similar inhibiting effect, with an IC₅₀(μM) of: EGCG, 11.3; ECG, 39.2; (-)EC, 151; catechin, 321. No inhibition was observed with EGC and (+)EC. The inhibition by ascorbic was less potent with an IC₅₀ of 833 μM. There was no effect observed for β-carotene.

Results of the Western blot analysis indicated that there was no significant difference in the cyclooxygenase-2 protein level between cells treated with various extracted food fractions and control cells, suggesting the inhibition or enhancing effect was probably regulated at the catalytic level.

In conclusion, results of the present study provide an useful information for those who suffered from chronic inflammatory conditions, such as arthritis. Avoiding foods with an enhancing effect and choosing foods with an inhibiting effect on the PGE₂ production may help to ameliorate their inflammatory conditions.

Keywords: macrophage, inflammatory, PGE₂ , flavonoids, cyclooxygenase-2, vegetables and fruits

前 言

Prostanoids, 包括 prostaglandin, prostacyclin 及 thromboxane, 均為由 20 碳多元不飽和脂肪酸經環化衍生之脂性調節物質。其於組織細胞間的互動關係間扮演了樞紐性角色, 例如免疫反應的活化與抑制, 發炎反應, 傷口癒合, 卵巢之排卵與子宮內膜週期性變化, 腦與神經功能, 骨骼發育, 腎絲球過濾率及水分平衡以及凝血反應等(Dubois, 1998)。Prostanoids 之生成及代謝異常與許多疾病狀況密切相關, 如關節炎 (arthritis)、氣喘 (Asthma)、骨吸收 (bone resorption)、心血管疾病、腎毒性、動脈粥狀硬化、低血壓及休克、發炎、疼痛、阿茲海默症 (Alzheimer's Disease)、免疫抑制、胃潰瘍、及癌症等(Dubois, 1998)。

Prostanoid 生合成之共同步驟, 係由前列腺素合成酶 (PGHS) 將 AA 環化成 PGG 並行過氧化酶反應生成 PGH。過去數年來, 分子生物學的研究發展, 對前列腺素合成酶 (PGHS) 基因表現之瞭解有了突破性發展 (Herschman, 1994; Herschman, 1996; Smith et al., 1994; Smith et al., 1996; Smith et al., 1997)。不但發現了一種新的 PGHS-2 酵素, 有別於傳統已知之 PGHS-1, 對於此二種同功酶基因表現之調控也有相當多了解, 包括二者基因之 5'-flanking promoter 區序列均已被定出。

由於傳統的 PGHS-1 在正常基礎狀況即有表現（所謂 constitutive form），被認為是維持正常生理功能所需；而 PGHS-2 則因應刺激因子而被誘發（所謂 inducible form），其被認為是生成發炎介質 PG 之主導者。PGHS-2(又名 COX-2)於發炎與疼痛之角色已被證實(Seibert et al., 1994)。因此，發展選擇性抑制 PGHS-2，但不影響 PGHS-1 之非固醇類消炎藥（NSAID），被認為可以避免傳統不具選擇性 NSAID 之副作用，這是目前極為熱門的研究課題(DeWitt, et. al., 1993; Smith et. al., 1994)。

飲食營養狀況對 PG 生成與代謝之影響，大約 20 年前即已引起學界的注意。但在 PGHS-2 被發現以前，PGHS 不被認為是 PG 合成步驟的關鍵。故早期研究與 Prostanoid 新陳代謝相關飲食因子，均著重於 PG 合成的前驅物，多元不飽和脂肪酸(Mascioli, 1989)。如：來自植物油之 n-6 系列脂肪酸代謝產物 Arachidonic Acid(AA) 為 Prostanoid 之主要生理前驅物。而來自魚油的 n-3 系列脂肪酸可降低血小板凝血及預防心血管疾病，被認為是因魚油富含之 EPA 與 DHA 等 n-3 系列長鏈脂肪酸，本身被 PGHS 轉化之效率極低但卻與 AA 競爭酵素降低 AA 生成發炎性 PG 之故。由於 PGHS 之反應機制研究結果顯示，須有少量過氧化物存在反應方能進行。維生素 E 被認為可以降低 PGE₂ 的生成，可

能是因為其抗氧化劑活性可以減少 PGHS 催化反應所必須之氫過氧化物。而短缺抗氧化能力的狀況，如：Se 缺乏，則可促進 PG 生合成。

在可被誘發的 PGHS-2 被發現後，近年的研究有了新的方向，轉而探討飲食營養因子對此酵素所主導的 P G 生成所造成的影響。此方面的研究才剛開始，研究報告的數量還沒有很多。例如，探討天然抗氧化劑對 PGHS 之影響。

日常生活中，各種發炎狀況所造成的生理不適十分擾人，且會造成組織受傷害。需大力仰賴『消炎藥物』之使用，來消除不適症狀。對慢性發炎者而言，更是痛苦不堪。天然食物中可能含有某些成份，可抑制或促進 PGHS-2 主導的發炎反應。若能針對日常食物進行篩選、鑑定，則吾人於產生發炎的狀況下，選擇食物即可有所依據，避免可能『促進』PGHS-2 反應之食物，在符合營養的原則下盡量選擇具有『抑制』PGHS-2 反應傾向之食物。對某些『高危險』族群（例如慢性發炎性疾病、癌症之『促進』期[promotion]等）來說，此等資訊對病況之控制應該具有相當高的價值，可供為疾病預防之重要參考。

為探討 n-6 PUFA 促進鼠乳癌但 n-3PUFA 抑制鼠乳癌之機制，Badawi et al (1998) 分別餵鼠以 21% 或 7% 紅花油或魚油飼料 3 週，結果紅花油組之乳腺 COX-1 表現比魚油組高 30%。COX-2 在魚

油組沒有，但在紅花油組有相當的表現。紅花油組之 COX 活性與 PGE₂ 產量亦均較高。顯示飲食中 n-6 PUFA 對 COX-2 基因表現有正向調控。

Saito et al(1997) 以 DHA(C22:5, n-3)、EPA(C20:4, n-3)、亞麻油酸及油酸處理鼠血管平滑肌細胞，發現只有 EPA 會促進 PGI₂ 生成，但不改變 phospholipaseA₂ 與 Prostacyclin synthase 活性。EPA 使 COX 活性增加，但 COX-1 與 COX-2 蛋白質量均未改變。由於抗氧化劑會消除 EPA 之促進效果，EPA 之作用機制可能在生成少量過氧化物使 COX 酵素活化而促進 PGI₂ 生成。

Schmitz et al (1995)探討 n-3 脂肪酸對 subtotal 腎切除大白鼠腎絲球體微血管靜壓(hydraulic pressure)之影響，發現餵食魚油飲食者可減少腎絲球體 TXA₂ 合成及 angiotensinII 誘發之 phospholipid turnover，降低入球小動脈壓及出球小動脈阻抗(resistance)，從而使腎絲球體微血管靜壓(hydraulic pressure)降低，顯著減緩腎功能惡化之程度。

Seeger et al (1988) 探討羊 seminal vesicle 微粒體 PGHS 活性受抗氧化劑作用之影響。發現維生素 E isomer 中只有 Trolox 可以促進 PGHS 活性。但是，由發酵黃豆所分離及處理的兩種

isoflavone，具抗氧化性也具有抑制 P G H S 活性之功能。Feng et al (1995) 以鼠 mesangial cell 為模式，發現 hydroxy radical 清除劑可抑制 IL-1、TNF α 及 LPS 引發之 COX-2 表現增加。Tetsuka et al (1996) 亦發現抗氧化劑 PDTC 於鼠 mesangial cell 可抑制 IL-1 β 引發之 COX-2 蛋白質與 PGE₂ 生成增加。Sakamoto et al (1996) 發現維生素 E 補充對鼠腹腔巨噬細胞受 LPS 活化後，PGE₂ 生成及 COX-2 表現增加的現象沒有影響。但 genistein，透過抑制 tyrosine kinase，則可完全抑制 LPS 引發之 PGE₂ 生成。Chen et al (1998) 發現 catalase 可促進鼠血管平滑肌細胞 COX-2 mRNA 與蛋白質的表現。此現象可能透過活化 cAMP responsive element 及 NF-IL6 轉錄因子而達成。Catalase 於低濃度會促進 P G 合成但高濃度則會抑制。Chinery et al (1998) 以各種抗氧化劑(PDTC、Trolox、N-AcetylCystein 及 U74006)處理大腸結腸癌細胞株，發現可降低 PG 合成及細胞生長，同時促進 apoptosis。其 PG 合成降低乃是因為這些抗氧化劑降低了 COX-2 的基因轉錄。這些各式各樣系統模式之研究結果，除 catalase 外，抗氧化劑大致可以降低 PG 之生成。

前述幾個研究中提到的 isoflavones 與 genistein 均屬黃豆或其加工產品中所含之成份概具酚類抗氧化劑之活性。除前述外尚

有其他屬此類化合物曾被報告。例如：薑黃素(Curcumine)(Ammon et al 1993)與 daphnodorin(Sakuma et al., 1998)會抑制人類血小板的 COX 活性。Carex humilis Leyss 根部及 Caragana chamlagu Lamarck 兩種植物所含的成份 α -viniferin 對羊 seminal vesicle 部份純化之 PGHS-2 酵素活性有很高的抑制作用(Lee et al. 1998)。存在於葡萄及其他食物中之 resveratrol, 亦具酚類抗氧化劑活性；當人類乳腺及口腔上皮細胞以 phorbol ester TPA 處理可使 COX-2 大量表現，PGE₂ 大量生成，resveratrol 可以抑制 TPA 誘發之 COX-2 基因表現及 PGE₂ 生成。其機制係透過抑制 protein kinase C 及 AP-1 主導的基因表現 (Subbaramaial et al, 1998)，此研究結果解釋了 resveratrol 之抗癌及抗炎性質。

由於 LPS 誘發巨噬細胞之 COX-2 表現係透過活化 protein-tyrosine kinase 之磷酸化反應產生訊息傳遞而達成。一些具 protein-tyrosine kinase 抑制劑活性之天然物，也可以抑制 COX-2 之表現及 PGE₂ 之生成。如：sesquiterpene lactones(Hwang, et al., 1996)。植物性食物含有的多酚類 quercetin (Graziani, et al., 1981) 以及前述之 Genistein(Sakamoto et al, 1996) 除以抗氧化活性知名外，也會抑制 protein-tyrosine kinase 活性。

Genistein 更以其雌激素活性而出名。

綜之，這些報告似乎指向極性較大的抗氧化劑，如天然物中之酚類化合物，可能抑制 COX-2 主導的 PG 合成。

本計畫之主要目的在初步篩選具有促進或抑制 COX-2 生成 P G 活性之食物或食物成份。以供疾病預防及保健之需。為了可以篩選較多種類之食物材料或成份，擬以可以表現 COX-2 之培養細胞株供為篩選模式。由於受活化之巨噬細胞為發炎反應中之主要 PG 生成者。本計畫乃選用巨噬細胞株 RAW264.7。以 lps 處理引起 PGE₂ 之生成。同時加入食物材料萃取物或食物成份，觀察其對培養巨噬細胞 PGE₂ 生成之抑制作用。另外又以食物材料萃取物或食物成份單獨加入培養液用以培養巨噬細胞，觀察試驗食物材料萃取物與食物成份對巨噬細胞之 PGE₂ 生成是否具促進作用？供試食物樣品係選擇傳統觀念中認為有『清涼降火』者（苦瓜、蓮子心、菊花）或『上火』者（龍眼、荔枝、桂圓），或類黃酮含量較高者（洋蔥）。供試食物成份則大致選擇具抗氧化能力者。

材料與方法

一 材料:

食物材料: 洋蔥、苦瓜、龍眼、荔枝、芹菜等生鮮蔬果購自臺北市水源市場。乾燥之菊花與蓮子心購自中藥店。桂圓(龍眼乾)購自雜貨店。

食物成份材料: Curcumin (Sigma), EGCG(epigallocatechin gallate, Sigma), (-) Epicatechin (Sigma), (+) Epicatechin (Sigma), (-) Epicatechin gallate (Sigma), Catechin (Sigma), β -carotene, Naringenin (Sigma), Ascorbic acid, Resveratrol (Sigma), Apigenin (Sigma), Quercetin (Sigma)。

細胞株: RAW264.7 巨噬細胞株購自食品工業研究所細胞庫(新竹, 臺灣)

培養基: DMEM, FBS 購自 Gibco. 公司

二 食物材料之萃取與樣品製備:

本研究先以水萃出水溶性部份, 再以乙酸乙酯萃取有機溶劑可溶性部份。前者為水萃物(Water Extract, WE), 後者為有機萃物(Ethyl Acetate Extract, EAE)。

洋蔥、苦瓜、龍眼、荔枝等水分含量 80% 以上的蔬菜水果, 直接以組織均質機(Waring Blender)均質, 紗布過濾。芹菜由於纖維較多, 所以加

入 0.2 倍(w/v)的水一起均質。桂圓水分較少，且其汁液黏稠，故加入 1.5 倍(w/v)水量一起均質。菊花第一次是以 10 倍(w/v)100°C 的開水煮 5 分鐘後過濾。過濾後的渣再以 5 倍 100°C 的水煮 5 分鐘，再過濾一次。將兩次的過濾液混合。蓮子心則加入 10 倍(w/v)的二次水均質，再以紗布過濾。

所得的水萃均質濾液於 10500 X g、4°C 離心 30 分鐘。將所得的澄清水萃液與濾渣均予冷凍，分別進行冷凍乾燥，即得水萃物(WE)及乾燥的渣。乾燥後的渣再以 30 倍的乙酸乙酯(ethylacetate)萃取，減壓濃縮後得有機萃取物(EAE)。

將水萃物及有機萃物溶於適當的溶劑(酒精、DMSO 或 DMEM)中，以 DMEM 稀釋後，進行細胞培養實驗。

三、細胞培養：

1. 細胞培養條件的建立：

1) LPS 刺激 PGE₂ 生成的時程與劑量反應

以 100 ng/mL 的 LPS 培養 RAW264.7，分別於 0、12、18、24 小時收集培養液，進行 PGE₂ 測定。結果顯示 RAW264.7 於 LPS(100ng/mL)刺激 12 小時後，PGE₂ 已大量生成，並於 18 小時達最高峰，而且於 24 小時後，PGE₂ 生成則有下降的趨勢。再以不同劑量的 LPS 培養 RAW264.7，發現於 0.8 ng/mL 的 LPS 濃度下，PGE₂ 的生成量隨著 LPS 濃度增加而增加，但是當 LPS 濃度

高於 0.8 ng/mL 下，PGE₂ 生成量則呈飽和狀態。因此所有實驗皆以 1ng/mL 的濃度進行。

2) LPS 誘發 RAW264.7 細胞 COX-2 蛋白質表現的時程效應

將 RAW264.7 培養於培養皿中，並以 1ng/mL 的 LPS 處理，分別於 0、2、4、8、12、24 小時收集細胞，利用西方墨漬法分析其 COX-2 蛋白質量。結果顯示，LPS 處理 2 小時後，COX-2 已有微量表現，之後隨著時間增加，表現量增加，並於 12 小時表現量為最高，而 24 小時的 COX-2 則有降低的現象。因此，實驗的培養時間以 12 小時為佳。另外 COX-1 蛋白質於 RAW264.7 細胞的表現量甚低，無法偵測。

2. 樣品對巨噬細胞 PGE₂ 分泌之影響：

RAW 264.7 巨噬細胞株以含 10%FBS 之 DMEM 培養基，於 25cm² 的培養瓶，置 37°C 5%CO₂ 培養箱中，培養至將近 confluent。將細胞自 25cm² 的培養瓶中刮下，以含 10% FBS 的 DMEM 配成細胞濃度為 6×10^5 cells/mL 之細胞懸浮液。分別於 96 孔微量培養盤中，注入 100uL 調整好細胞濃度的細胞液，於 37°C、5% CO₂ 培養箱中培養 24 小時。吸除培養液，以 200uL 的 PBS 洗一次，更換成含供試樣品之新鮮培養基。其中分為兩部分，一部份為含 1ng/mL LPS(lipopolysaccharide,)並添加各種不同濃度的樣品，另一部份為只單獨添加各濃度樣品。再置於 37°C、5% CO₂ 培養箱中培養 18

小時。之後，收集上清培養基，供進行 PGE_2 的測定。留於培養盤中的細胞則進行 MTT 染色，測定其細胞存活狀況。

2. 樣品對巨噬細胞 cyclooxygenase-2 蛋白質含量之影響：

將培養至 confluent 之 RAW264.7 細胞株由 Flask 中刮下，以 10%DMEM 配成細胞濃度為 $4 \times 10^6 \text{ cell/mL}$ 之細胞懸浮液。在將此細胞液 5mL 種入 6 cm^2 的培養皿中，置於 37°C 、5%二氧化碳培養箱，培養 24 小時。取出以 PBS 洗兩次，更換為含或不含 LPS(1 ng/mL)及各測試樣品的最高效應濃度之培養基(DMEM)5mL，培養 12 小時。收集培養液 1mL，其餘吸除。底部的細胞則以 PBS 洗 2 次，加入 1mL 的 PBS，以 scraper 輕輕將細胞刮離培養盤，置入微量離心管中，離心去除上清液。將沉澱於微量離心管內的細胞置於 -70°C 保存。測試樣品分為兩部分一部份為水草物(桂圓 5 mg/mL 、洋蔥 1 mg/mL 、龍眼 20 mg/mL 、蓮子心 0.2 mg/mL 、菊花 1 mg/mL 、荔枝 5 mg/mL 、苦瓜 0.2 mg/mL 、芹菜 1 mg/mL)及有機萃物(桂圓 10 ug/mL 、洋蔥 10 ug/mL 、龍眼 20 ug/mL 、龍眼 100 ug/mL 、蓮子心 200 ug/mL 、荔枝 20 ug/mL 、苦瓜 100 ug/mL 、芹菜 50 ug/mL 、蕃薯葉 10 ug/mL)與 LPS 同時添加處理細胞。另一部份為水草物(龍眼 20 mg/mL 、桂圓 5 mg/mL 、荔枝 20 mg/mL 、芹菜 1 mg/mL 、蓮子心 0.2 mg/mL 、苦瓜 0.2 mg/mL)單獨處理細胞。

四. 分析：

1. 細胞存活率：

以 MTT 染色法分析之。此法一種活細胞染色法。活細胞粒腺體中之 dehydrogenase，可將 MTT 之 tetrazolium ring 打斷，形成 formazan。此時由黃色轉變成深藍色，再以 acidic isopropanol 將 formazan 溶出，以 ELISA reader 測定 540nm 吸光值，並對照標準曲線，計算活細胞數目。

2. 前列腺素 E₂ 的測定

以市售之 PGE₂ 酵素免疫分析試劑組(PGE₂ Enzyme-Immuno Assay kit, Cayman Co.)進行分析。該法係一種競爭性之免疫分析方法。將樣品(及前述收集之細胞培養液)稀釋程式當濃度後，依試劑組之說明進行分析。

3. Cyclooxygenase-2 蛋白質量的測定

將冷凍保存於微量離心管內的細胞加入 100μl 的 lysis buffer，以 vortex 震盪，將細胞塊打散混勻後，以 1200xg、4°C 離心 20 分鐘，取上清液，以 Lowry 法測定蛋白質量。根據測定結果適當稀釋細胞蛋白質萃取液。取相當於 25μg 蛋白質量之細胞蛋白質萃取液，於微量離心管中，加入等體積的 sample buffer 及少量的 tracking dye(約為樣品的 2/5 倍體積)，混合均勻，於 100°C 水浴加熱 10 分鐘，取出放冷，即可進行電泳。

將預先鑄好 10% 的 SDS 膠片組合於電泳槽內，並注入適當量的電泳緩

衝液。分別將標準品和樣品依序注入膠片之樣品槽，以 150 伏特電壓進行電泳。直到色帶湧出膠片(約需 1.5 小時)，將膠片取出浸入轉印緩衝液中，平衡 30 分鐘。轉印膜(PVDF)先以甲醇浸潤後，泡於轉印緩衝液中平衡 30 分鐘。

將平衡好的膠片與轉印膜取出，組合於轉印卡夾內，以 380 毫安培之電流進行轉印 1 小時。取出轉印膜，以 PBST 洗三次，每次 10 分鐘。之後以 NET 進行 Blocking 隔夜。隔天以 PBST 洗 3 次，每次 10 分鐘，加入以 NET 稀釋 1000 倍的一級抗體溶液(rabbit anti-PGHS-2 antiserum, Cayman Co.)，於室溫下反應 1 小時。再以 PBST 洗 3 次，每次 10 分鐘，接著加入以 NET 稀釋 5000 倍的二級抗體(alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit antibody, Tropix)。於室溫下反應 1 小時，取出轉印膜，以 NET 洗 3 次，每次 10 分鐘，再以 alkaline phosphatase-assay buffer 平衡。取出轉印膜，將以 assay buffer 稀釋 1000 倍的 CDP-star 均勻滴於轉印膜上，反應五分鐘。以紙吸去多餘溶液，將轉印膜置入透明膠膜上(不可有氣泡)，靜置五分鐘。帶呈色穩定，再以感光底片進行壓片。底片沖洗後，以影像分析儀將色帶訊號之大小及深淺加以量化。

五. 統計分析：

每一樣品均至少均重複三批次不同實驗。每批次實驗均進行三重複。

取代表性一批實驗三重複結果進行統計分析，以變方分析法(ANOVA)及鄧肯式多變域測驗(Duncan's multiple range test)比較不同濃度樣品是否顯著影響前列腺素 E_2 之合成。

結 果

一、食物成分對巨噬細胞生成前列腺素 E_2 的影響

1. 薑黃素(curcumin): 是由 *Curcuma longa* L. 植物的根部純化出來，具有苦味的橘黃色粉末，咖哩中含量豐富。如圖一所示，薑黃素會抑制 LPS 誘發巨噬細胞株生成 PGE_2 的作用，並且隨著 curcumin 的濃度增加而 PGE_2 的生成量減少，於 $1\mu M$ 即有抑制效應產生，且在 curcumin 濃度 $20\mu M$ 時達最高的抑制效應 (80%)，其 IC_{50} 為 $9.673\mu M$ 。
2. Resveratro: Resveratrol 為葡萄中的成份，於紅酒中含量甚豐富。屬分類抗氧化劑。如圖 2 所示，其具有抑制 LPS 誘發巨噬細胞生成前列腺素 E_2 的效力。其於濃度 $0.5\mu M$ 時即有抑制效應產生，並於濃度 $30\mu M$ 達 85.96% 的抑制效應。其 IC_{50} 為 $13.91\mu M$ 。另外，Resveratrol 濃度於 $30\mu M$ 以下時，各組的細胞數目與控制組並無顯著差異，但當 Resveratrol 濃度高達 $40\mu M$ 時，其細胞數目顯著低於控制組。
3. 綠茶中多酚類：綠茶中多酚類中 EGCG 對 LPS 刺激的巨噬細胞株 RAW264.7 cells 生成 PGE_2 具最大抑制作用。 $1\sim 20\mu M$ 的 EGCG 與 $1ng/mL$ 的 LPS 一起培養細胞 18 小時後，隨著 EGCG 濃度的增加， PGE_2 的生成量逐漸降低，並於濃度 $100\mu M$ 時完全抑制 PGE_2 的生成(圖 3)。其 IC_{50} 為 $11.3\mu M$ 。綠茶中其他的多酚類，包括：(-)ECG、(-)EC 及 catechin 對 LPS 誘發巨噬

細胞株生成 PGE_2 的作用皆有抑制效應，但其效力皆小於 EGCG。 $(-)\text{ECG}$ 其 IC_{50} 的濃度為 $39.147\ \mu\text{M}$ ， $(-)\text{EC}$ 為 $151.35\ \mu\text{M}$ ，catechin 為 $321.35\ \mu\text{M}$ 。而 $(-)\text{EGC}$ 的抑制效應並不明顯(圖 3)前述各濃度的樣品培養下，對細胞存活率並無顯著影響。

4. 蔬果中的 Flavonoids：蔬果中的 Flavonoids 有四大類，包括黃酮(flavones)、黃酮醇(flavonols)、黃烷酮(flavanones)和異黃酮(isoflavones)等四類，本實驗分別對 flavone 中的 Apigenin、Flavonol 中的 Quercetin 及 Flavanone 中的 Naringenin 進行細胞培養實驗及前列腺素 E_2 分析。

Apigenin 於芹菜及香菜(parsley)中含量豐富。由細胞培養的結果發現(圖 4)，Apigenin 於濃度 $0.67\ \mu\text{M}$ 時，即顯著的抑制了 LPS 誘發巨噬細胞株生成前列腺素 E_2 的效應 (31%)，並於濃度 $0.5\ \mu\text{M}$ 時，抑制效應高達 97%，所以其 IC_{50} 的濃度為 $1.9\ \mu\text{M}$ (圖 4)。另外當 Apigenin 的濃度高於 $13.4\ \mu\text{M}$ 時，細胞數目顯著低於控制組，而於濃度 $0.5\ \mu\text{M}$ 以下，其細胞數目與控制組無差異，因此 Apigenin 具有抑制 LPS 誘發巨噬細胞株生成前列腺素 E_2 。

Quercetin 存在於大部分的蔬菜水果中，其中以洋蔥含量最豐富。Quercetin 對 LPS 誘發巨噬細胞生成前列腺素 E_2 有抑制作用，且 IC_{50} 濃

度為 23.28 μ M，於濃度 40 μ M 時，具有 84.5% 的抑制效應（圖 4）。另外，當濃度於 40 μ M 以下時，各組的細胞數目與控制組無異，但濃度高於 40 μ M 時，細胞數目則顯著低於控制組。

Naringenin 大部分存在於果皮中，例如葡萄柚皮中 Naringenin 的含量非常豐富。本實驗結果，其亦有抑制巨噬細胞株活化生成前列腺素 E_2 的效應，且其 IC_{50} 濃度為 36.74 μ M，並於濃度 100 μ M 時達最高抑制效應 98.96%（圖 4）。另外在濃度 100 μ M 以下各組細胞數目與控制組無顯著差異，當濃度高於 100 μ M 時，則細胞數目顯著低於控制組。

5. β -carotene 及維生素 C: 維生素 C 為水溶性抗氧化維生素。本實驗結果，維生素 C 具有抑制 LPS 誘發巨噬細胞株生成前列腺素 E_2 的效應，但須較高的濃度才有抑制作用。當維生素 C 濃度高達 100 μ M 時，可達 55.7% 的抑制效果（圖 5）。 β -胡蘿蔔素對 LPS 活化巨噬細胞生成前列腺素 E_2 的效應並無影響，與控制組並無顯著差異（圖 5）。

二、西方墨漬法分析各食物成分對 cyclooxygenase-2 蛋白質量的影響

以各種食物成分的最高抑制濃度(curcumin 20 μ M、EGCG 100 μ M、Vit C 1000 μ M、(-)EC 400 μ M、resveratrol 30 μ M、naringenin 100 μ M、(±)catechin 500 μ M、quercetin 50 μ M)及 LPS (1ng/mL)共同培養 RAW264.7 細胞 12 小時，並以西方墨漬法分析其 COX-2 蛋白質的含量(curcumin 20 μ M、EGCG 100 μ M、

Vit C 1000uM、(-)EC 400uM、resveratrol 30uM、naringenin 100uM、(±)catechin 500uM、quercetin 50uM)。發現各樣品處理組細胞中 COX-2 蛋白質表現量與控制組並無顯著差異(圖 6)。所以上述各種食物成分對 COX-2 蛋白質表現量無影響，因此其抑制前列腺素 E_2 生成的原因，可能是抑制了 COX-2 的酵素活性，而導致巨噬細胞株前列腺素 E_2 的生成量減少。

三、食物萃取物對巨噬細胞生成前列腺素 E_2 的影響

1. 菊花水萃取物對 RAW264.7 細胞生成 PGE_2 及 COX-2 蛋白質表現的影響：

菊花水萃取物濃度大於 0.2mg/mL，隨著菊花水萃取物濃度增加，而 PGE_2 生成量降低，在濃度 2mg/mL 時， PGE_2 生成量與 F0 控制組相當，達 100% 抑制(圖 7)。於低濃度(<0.2mg/mL)時，反具有促進活化的 RAW264.7 細胞生成 PGE_2 之效應(圖 7)，並於濃度 0.1mg/mL 時，促進生效應最大，且 PGE_2 生成量比控制組顯著高出約 30%。但是當僅以水萃取物單獨處理細胞時，雖具有抑制效應，但由於細胞不活化，所以 PGE_2 生成量都非常低。對 LPS 誘發的 COX-2 蛋白質表現量而言，水萃取物處理組與控制組並沒有顯著差異(圖 18)。因此菊花水萃取物具有抑制 RAW264.7 生成 PGE_2 的效應，但對 LPS 誘發表現的 COX-2 蛋白質量，並沒有影響。

2. 苦瓜萃取物對 RAW264.7 細胞生成 PGE_2 及 COX-2 蛋白質表現的影響

苦瓜萃取物分為水草物(WE)及乙酸乙酯萃取部分(有機萃物)。LPS 引發 RAW264.7 細胞大量生成 PGE_2 及大量表現 COX-2 蛋白質。而以 LPS 及苦瓜水草物同時處理細胞時，具有抑制 PGE_2 生成的作用，且 IC_{50} 為 0.13mg/mL (圖 8)。以 0.2mg/mL 濃度的水草物具有降低 LPS 誘發 COX-2 蛋白質的表現的趨勢，但是與 FOL1 控制組並無顯著差異(圖 18)。但是僅以苦瓜水草物單獨處理細胞時，對其生成 PGE_2 的效應並無影響，也不會改變 COX-2 蛋白質的表現量。

苦瓜有機萃物與 LPS(1ng/mL)同時處理細胞時，亦具有抑制細胞生成 PGE_2 的效應，且隨著濃度增加，而抑制效果增強。在濃度 $100\mu\text{g/mL}$ 時，具有大於 100% 的抑制效應，其 IC_{50} 為 $21\mu\text{g/mL}$ (圖 9)。另外，濃度 $100\mu\text{g/mL}$ 的有機萃物可降低 LPS 誘發 COX-2 蛋白質的表現(圖 19)，但是與 FOL1 控制組並無顯著差異。但是僅以有機萃物培養細胞時，其對 PGE_2 的生成量並沒有影響。

因此，苦瓜萃取物具有抑制 LPS 引發 RAW264.7 細胞生成 PGE_2 的效應，但是對誘發型 COX-2 蛋白質的表現之影響不顯著。

3. 洋蔥萃取物對 RAW264.7 細胞生成 PGE_2 及 COX-2 蛋白質表現的影響

以洋蔥水草物及 LPS 共同培養細胞，發現水草物具有抑制 LPS 誘發 PGE_2 生成的效應，而且是 dose-dependent 的作用(圖 10)。當水草物濃度

1mg/mL 時，對細胞的抑制效應可達 90%，其 IC_{50} 為 0.5mg/mL(圖 10)。1mg/mL 的水萃物對誘發型 COX-2 蛋白質的表現沒有影響(圖 19)。當水萃物單獨存在時，並不會影響 PGE_2 的生成。

對有機萃物而言，同樣的具有抑制 LPS 誘發 RAW264.7 細胞生成 PGE_2 的效應，亦是隨著有機萃物濃度增加而抑制效應增加，且於濃度 10 μ g/mL 時具有 100%的抑制效應(圖 10)， IC_{50} 為 3.5 μ g/mL。但是 10 μ g/mL 的濃度並不具有抑制 LPS 誘發 COX-2 蛋白質的表現的效應(圖 19)。同樣的，不添加 LPS 處理細胞時，有機萃物並不會影響 PGE_2 的生成效應。另外各組之間的細胞數目並沒有有顯著不同。

因此，洋蔥萃取物具有抑制 LPS 誘發巨噬細胞生成 PGE_2 的效應但對 LPS 誘發 COX-2 蛋白質的表現則沒有影響。

4. 蓮子心萃取物對 RAW264.7 細胞生成 PGE_2 及 COX-2 蛋白質表現的影響

蓮子心水萃物具有抑制 LPS 誘發 PGE_2 生成的效應，於濃度 0.05mg/mL 時即有抑制現象，當濃度 0.2mg/mL 時，抑制 63%的生成量(圖 11)。若是提高水萃物濃度，則會引起細胞毒性，造成細胞死亡。另外其對 LPS 誘發 COX-2 蛋白質表現效應並無影響。當僅以水萃物處理細胞時，RAW264.7 的 PGE_2 生成量有增加的趨勢，但沒有顯著差異。而濃度 0.2mg/mL 的水萃物則具有增加 COX-2 蛋白質表現量，其誘發效應約為 LPS 誘發效應的

0.5 倍。

對有機萃物而言，濃度在 10 μ g/mL 以上時，則有抑制 LPS 又發 PGE₂ 生的效應(圖 12)。同樣的於濃度 200 μ g/mL 時，抑制了 90%的 COX-2 蛋白質表現量。但是不添加 LPS 時，有機萃物則不會影 PGE₂ 的生成。

所以蓮子心水草物及有機萃物皆可抑制 LPS 誘發 PGE₂ 生成的效應，但是水草物會增加 COX-2 蛋白質表現量，而有機萃物則會抑制 LPS 誘發 COX-2 蛋白質生成。

5. 龍眼萃取物對 RAW264.7 細胞生成 PGE₂ 及 COX-2 蛋白質表現的影響

龍眼水草物單獨處理細胞時(0~50mg/mL)，具有促進 PGE₂ 生成的效應，且隨著濃度增加，PGE₂ 生成量大幅提高，濃度 50mg/mL 時的促進效應與 LPS 的誘發效應相當，PGE₂ 的生成量約為 F0 的 10 倍，其 EC₅₀ 為 16mg/mL(圖 13)。但當濃度大於 50mg/mL 時，則會對細胞造成毒性。水草對 COX-2 蛋白質亦有促進效應，表現量約為 LPS 誘發效應的 50%(圖 20)。另外，LPS 與水草物同時添加時，除了濃度 50mg/mL 具有促進效應外，其餘濃度對細胞 PGE₂ 生成量並沒有影響，對 COX-2 蛋白質表現亦無作用。

對有機萃物(0-100 μ g/mL)而言，單獨處理細胞，並不會影響細胞 PGE₂ 的生成；但是 LPS 同時添加時，則有促進 PGE₂ 生成的效應，並於濃度 20 μ g/mL 時，促進效應最大(圖 14)。但是 COX-2 表現量與 LPS 刺激組(F0L1)

表現量相同。另外，在濃度 50ug/mL 時，PGE₂ 生成量開始下降，到了 100ug/mL 時，PGE₂ 生成量與 LPS 刺激組相同，但是 COX-2 蛋白質量則顯著較 LPS 刺激組低。

因此水草物具有促進 RAW264.7 細胞生成 PGE₂ 及 COX-2 蛋白質表現的效應，而有機萃物同樣具有促進 PGE₂ 生成的作用。只是效果不如水草物，而且在高濃度(100ug/mL)時，有抑制 COX-2 蛋白質表現的情形。

6. 桂圓萃取物 RAW264.7 細胞生成 PGE₂ 及 COX-2 蛋白質表現的影響

桂圓水草物(0-20mg/mL)單獨促理細胞時，同樣具有促進 PGE₂ 生成的效應，且於濃度 20mg/mL 具有最大促進效應，生成量約為 F0 的 5 倍(圖 15)。但當濃度大於 20mg/mL 時，則會對細胞造成毒性，水草物亦會萃進 COX-2 蛋白質表現，且誘發效應與 LPS 刺激組相當。若同時添加 LPS 刺激，亦具有增加 PGE₂ 生成的效應，於濃度 5mg/mL 時達飽和，並且於濃度 20mg/mL 時，PGE₂ 生成量有下降之趨勢。

另外，無論是否有添加 LPS，有機萃物並不影響 PGE₂ 的生成(圖 16)，亦不影響 COX-2 蛋白質的表現。

因此，桂圓水草物會促進巨噬細胞生成 PGE₂，且誘發 COX-2 蛋白質表現，但有機萃物則無此效應。

7. 荔枝萃取物 RAW264.7 細胞生成 PGE₂ 及 COX-2 蛋白質表現的影響

同樣的，僅以荔枝水草物(0-2mg/mL)培養 RAW264.7 細胞時，具有促進生成 PGE_2 的效應，且隨著濃度增加生成量增加，濃度 20mg/mL 時增加量約為 F0 的 7.5 倍，同時也具有促進 COX-2 蛋白質表現的效應。若同時添加 LPS 培養細胞， PGE_2 生成量及蛋白質表現量並不受影響。(圖 17A)

對有機萃物而言，不論是否添加 LPS 刺激，對 PGE_2 的生成及 COX-2 蛋白質表現，皆不影響。(圖 17B)

因此，荔枝水草物可促進 PGE_2 的生成及 COX-2 蛋白質的表現，而有機萃物則不具此效應。

8. 芹菜萃取物 RAW264.7 細胞生成 PGE_2 及 COX-2 蛋白質表現的影響

芹菜水草物(0-2mg/mL)具有促進 RAW264.7 細胞生成 PGE_2 的效應，且於濃度 0.8mg/mL 時，有最強的促進效應，當濃度高於 0.8mg/mL 時，促進 PGE_2 生成效應降低(圖 18)。另外水草物也具有促進 COX-2 蛋白質表現的效應，約為 LPS 刺激組的 50%(圖 19)。若同時添加 LPS 與各濃度水草物培養細胞，則水草物對 PGE_2 生成量及 COX-2 蛋白質表現量並無影響(圖 20)。

有機萃物(0-50ug/mL)亦具有促進 LPS 誘發 PGE_2 生成的效應，同樣的於高濃度(50ug/mL)時，不具促進效應反有降低的趨勢，而且濃度 50ug/mL 的有機萃物具有抑制 LPS 誘發 COX-2 蛋白質的表現(圖 21)。當

有機萃物單獨培養細胞時，對 PGE₂ 生成量並無影響。

因此芹菜水萃物會促進 PGE₂ 生成，且增加 COX-2 蛋白質表現，但有機萃物於低濃度(0.1-0.8ug/mL)有促進 PGE₂ 生成效應，但高濃度(50ug/mL)時，則不具促進效應且會抑制 COX-2 蛋白質的表現。

討論

各食物材料之水萃物，有機萃物於 LPS 誘發（+LPS）或無誘發狀況下

對巨噬細胞 PGE₂ 合成之影響如下表所示。

	水萃物（WE）		乙酸乙酯萃取物（EAE）	
	-LPS	+LPS	-LPS	+LPS
芹菜	Slightly enhance	No effect	No effect	Slightly enhance
龍眼	Enhance EC ₅₀ =16mg/mL	Enhance	No effect	Enhance
荔枝	Enhance EC ₅₀ =8.4mg/mL	Enhance (5mg/mL)	No effect	No effect
桂圓	Enhance EC ₅₀ =11mg/mL	Enhance	No effect	No effect
洋蔥	No effect	Inhibit IC ₅₀ =0.5mg/mL	No effect	Inhibit IC ₅₀ =3.5 μ g/mL
苦瓜	Slightly Inhibit (0.1mg/mL)	Inhibit IC ₅₀ =0.13mg/mL	No effect	Inhibit IC ₅₀ =21 μ g/mL
蓮子心	No effect	Inhibit IC ₅₀ =0.08mg/mL	No effect	Inhibit (> 20 μ g/mL)
大豆萃 取物	Inhibit	Inhibit IC ₅₀ =0.17mg/mL		
菊花	Inhibit >(1mg/mL)	Inhibit IC ₅₀ =0.6mg/mL		

芹菜，龍眼，荔枝及桂圓屬促進者，而洋蔥，苦瓜，蓮子心，菊花及

大豆異黃酮萃取物屬抑制者。在沒有 LPS 誘發狀況下，所有的有機萃物均沒有顯著影響。而龍眼，荔枝，桂圓等「上火」食物之水草則是呈現非常明顯的抑制現象。且抑制作用隨劑量增加而顯著增加。顯示其促進 PGE₂ 生合成之成份屬水溶性成份。此等水果均屬高糖份之水果。吾人曾以蔗糖加入培養巨噬細胞，並未能影響其 PGE₂ 生合成。因此懷疑此荔枝、龍眼、桂圓的水草物中是否含有結構類似 LPS 之 lectin 類化合物，透過類似之訊息傳遞過程導致 PGE₂ 生合成。本研究所之結果，桂圓、荔枝水草物在沒有 LPS 誘發時亦導致巨噬細胞中 COX-2 蛋白質表現增加之結果，部份支持此想法。

傳統觀念中，認為涼性可降火的食物如苦瓜、蓮子心、菊花等之水草物則對 LPS 誘導巨噬細胞生成 PGE₂ 具有明顯之抑制效應。富含類黃酮之洋蔥以及大豆類黃酮區分物也有相同之情況。洋蔥、苦瓜及蓮子心之有機萃物亦有類似之效應，LPS 誘發巨噬細胞生成 PGE₂ 之傳訊過程，包括與細胞表面之 LPS 結合蛋白及 LPS 受器 (CD14) 結合後，啟動 protein tyrosine kinase，及 MAP kinase 等系列蛋白質磷酸化反應。將信息傳入細胞核，啟動基因的表現，包括 COX-2 蛋白質的表現，最後導致 PGE₂ 之合成增加。促進或抑制巨噬細胞 PGE₂ 合成，可能透過對上述傳訊機質中各環節之影響。

例如，大豆異黃酮類係透過抑制 tyrosine kinase 活性。而抑制 PGE₂ 之合成。本實驗之結果，大豆異黃酮區分物抑制 COX-2 蛋白質表現及 PGE₂ 合成，支持了文獻中之說法。相反地，本實驗中苦瓜，菊花及蓮子心之水草物雖然顯著的抑制了 LPS 誘發巨噬細胞之 PGE₂ 合成，對 COX-2 蛋白質的表現量並無影響。似乎其影響機制與大豆異黃酮區分物並不相同。其影響的層次可能在(1)酵素活性抑制：已知少量之 peroxide 為 PG 合成 酶 啟動反應之所需。大量的抗氧化劑可能完全清除 peroxide 使反應無法進行；(2) 受質供應：可能影響 phospholipase A₂ 酵素活性，而減少 COX-2 受質 Arachidonic Acid 之供應；(3) 其他尚未明瞭之因子。類黃酮含量高之洋蔥無論是水草物及有機萃物，均呈現出顯著抑制 LPS 誘發巨噬細胞 PGE₂ 之合成，此與本實驗中類黃酮如 quercetin 具有抑制作用相符合。由於類黃酮化合物具極性，甲醇為最佳萃取溶劑，在水溶液及有機溶劑萃取時均有部份可被萃出。本實驗洋蔥之 WE 與 EAE 均呈現抑制效果，支持了洋蔥之效應，可能與其所含之高量類黃酮化合物有關。

本研究所測式的具抗氧化活性之食物成份，大多具有抑制 LPS 誘發巨噬胞生成 PGE₂ 之效應。但是屬營養素中之β-carotene 則無，維他命 C 之抑制效果亦比其他 phytochemicals 差，顯示植物性食物中非屬傳統營養素之成份確有值得研究開發之價值。

結論與建議

本研究結果顯示：荔枝、龍眼及桂圓等傳統觀念中認為會上火的食物，其水萃物可促進培養之巨噬細胞生成 PGE_2 。而菊花、苦瓜、蓮子心等傳統觀念中認為會上火的食物，其萃取物會抑制 LPS 誘發培養之巨噬細胞生成 PGE_2 。洋蔥這種含類黃酮之食物亦同樣有抑制效果。綠茶多酚類、類黃酮化合物，如：apigenin, narigenin, curcumin, quercetin resveratrol 等這些具有抗氧化活性之食物成份，均對 LPS 誘發培養之巨噬細胞生成 PGE_2 具抑制作用。Ascorbic acid 之抑制效果甚低，而 β -蘿蔔素則完全沒有效果。

鑑於此計畫獲致良好成果，值得進一步以動物實驗來驗證此等食物促進或抑制發炎反應之效應。以供實際應用。

参 考 文 献

- Ammon, H.P., Safayhi, H., Mack, T. and Sabieraj, J. 1993 Mechanism of antiinflammatory actions of curcumine and boswellic acids. *J. Ethnopharmacology* 38: 113-119
- Badawi, A.F., El-Sohemy, A., Stephen, L.L. Ghoshal, A.K. and Archer, M.C. 1998 The effect of dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on the expression of cyclooxygenase 1 and 2 and levels of p21ras in rat mammary glands. *Carcinogenesis* 19: 905-910
- Chen, G., Kamal, M., Hannon, R. and Warner, T.D. 1998 Regulation of cyclo-oxygenase gene expression in rat smooth muscle cells by catalase. *Biochem. Pharmacol.* 55: 1651-1631
- Chinery, R., Beauchamp, R.D., Shyr, Y., Kirkland, S.C., Coffey, R.J. and Morrow, J.D. 1998 antioxidants reduce cyclooxygenase-2 expression, prostaglandin production, and proliferation in colorectal cancer cells. *Cancer Re.* 58: 2323-2327
- Cook, H.W. & Lands, W.E.M. (1976) :Mechanism for suppression of cellular biosynthesis of prostaglandins. *Nature* 260 : 630-632.
- Deby, C. (1988) :Metabolism of polyunsaturated fatty acids, precursors of eicosanoids. in :Prostaglandins : Biologi and chemistry of prostaglandins and related eicosanoids. (Curtis-Prior, P.B. ed.) pp11-36, Churchill Livingstone, Edinburgh.
- DeWitt, D. L. & Smith, W. L. 1988: Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:1412-1416
- DeWitt, D. L., El-Harith, E. A., Kraemer, S. A., Andrews, M. J., Yao, E. F., Armstrong, R. L. & Smith W L. 1990: The aspirin and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthases. *J. Biol. Chem.* 265: 5192-5198
- DeWitt, D.L., Kraemer, S.A. & Meade, E.A. (1991) A model for the transcriptional regulation of a mouse PGH synthase gene. in :Prostaglandins, leukotrienes, lipoxins and PAF. (Bailey, J.M. ed.) pp23-29, Plenum Press, New York.
- Dewitt, D.L., Meade, E.A. and Smith, W.L. 1993: PGH synthase isozyme selectivity: The potential for safer nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Am. J. Med* 95(Suppl.2) : 2A-40S-2A44S

- Dinchuk, J. E., Car, B. D., Focht, R. J., Johnston, J. J., Jafee, B. D., Covington, M. B., Contel, N. R., Eng, V. M., Collins, R. J., Czerniak, P. M., Gorry, S. A. & Trzaskos, J. M. 1995: Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* 378(23): 406-409
- Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Van De Putte, L.B.A. and Lipsky, P.E. 1998: Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 12: 1063-1073
- Eling, T. E., Thompson, D. C., Foureman, G. L., Curtis, J. F. & Hughes, M. F. 1990: Prostaglandin H synthase and xenobiotic oxidation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 1-45
- Feng, L., Sun W., Xia Y., Tang W. W., Chanmugam, P., Soyoola, E., Wilson, C. B. & Hwang, D. 1993: Clonig two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. *Arch. Biochem. Biophys.* 307(2): 361-368
- Feng, L., Xia, Y., Garcia, G.E., Hwang, D. and Wilson, C.B. 1995 Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.* 95: 1669-1675
- Fletcher, B. S., Kujubu, D. A., Perrin, D. M. & Herschman, H. R. 1992: Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10 encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. *J. Biol. Chem.* 267:4338-4344
- Funk, C. D., Funk, L. B., Kennedy, M E., Pong, A. S. & Fitzgerald, G. A. 1991: Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J.* 5:2304-2312
- Graziani, Y., Chayoth, R., Karny, N., Feldman, B. and Levy, J. 1981 *Biochim. Biophys. Acta.* 714: 415-421
- Guan, Y., Chahg, M., Cho W., Zhang, Y., Redha, R., Davis, L., Chang, S., Dubois, R. N., Hao, C-M. & Breyer, M. 1997 : Cloning, expression, and regulation of rabbit cyclooxygenase-2 in renal medullary interstitial cells. *Am. J. Physiol.* 273: F18-F26
- Han, J. W., Sadowski, H., Young, D. A. & Macara, I. G. 1990: Persistent induction of cyclooxygenase in p60v-src-transformed 3T3 fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:3373-3377

- Hemler, M. Lands, W. E. M. & Smith, W. L. 1976: Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. *J. Biol. Chem.* 251: 5575-5579
- Herschman, H. R. 1994: Regulation of prostaglandin synthase-1 and prostaglandin synthase-2. *Cancer Meta. Rev.* 13: 241-256
- Herschman, H. R. 1996: Prostaglandin synthase 2. *BBA* 1299: 125-140
- Hla, T. & Neilson, K. 1992: Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:7384-7385
- Hwang, D., Fischer, N.H., Jang, B.C., Tak, H., Kim, J.K. and Lee, W. 1996: Inhibition of the expression of inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines by sesquiterpine lactones in macrophages correlates with the inhibition of MAP kinases. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 226: 810-818
- Inoue, H., Yokoyama, C., Hara, S., Tone, Y. & Tanabe, T. 1995: Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element. *J. Biol. Chem.* 270(42):24965-24971
- Jones, D. A., Carton, D. P., McIntyre, T M., Zimmerman, G. A. & Prescott, S. M. 1993: Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J. Biol. Chem.* 268: 9049-9054
- Komhoff, M., Grone, H. J., Klein, T., Seyberth, H. W. & Nusing, R. M. 1997: Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. *Am. J. Physiol.* 272: F460-F468
- Kraemer, S.A., Meade, E. A. & DeWitt, D. L. 1992 :Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure : identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences. *Arch. Biochem. Biophys.* 293(2): 391-400
- Kujubu, D. A., Fletcher, B. S., Varnum, B. C., Lim, R. W. & Herschman, H. R. 1991: TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J. Biol. Chem.* 266:12866-12872
- Lands, W.E.M. 1979: The biosynthesis and metabolism of prostaglandins. *Ann. Rev. Physiol.* 41 : 633-652.

- Lee, S.H., Shin, N.H., Kang, S.H., Parks, J.S., Chung, S.R., Min, K.R. and Kim, Y. 1998
Alpha-viniferin: a prostaglandin H2 synthase inhibitor from root of *Carex humilis*. *Planta Med.* 64: 204-207
- Mascioli, E.A. 1989: Chapter 10 Nutrition. In: *Prostaglandins in clinical Practice*. (Watkins, W.D. et al., Ed.) Raven Press, New York.
- Masferrer, J. L., Zweifel, B. S., Seibert, K. & Needleman P. 1990: Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice. *J. Clin. Invest.* 86: 1375-1379
- Merlie, J. P., Fagan, D., Mudd, J. & Needleman, P. 1988: Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J. Biol. Chem.* 263: 3550-3553
- Meydani, S.N., Yogeewaran, G., Liu, S., Baskar, S., Meydani, M. 1988 Fish oil and tocopherol-induced changes in natural killer cell-mediated cytotoxicity and PGE₂ synthesis in young and old mice. *J. Nutr.* 118:1245-1252.
- Miwa, M., Kong, Z.L., Shinohara, K., and Watanabe, M. 1990: Macrophage stimulating activity of foods. *Agric. Biol. Chem.* 54: 1863-1866
- Miyamoto, T., Ogino, N., Yamamoto, S. & Hayaishi. 1976: Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J. Biol. Chem.* 251: 2629-2636
- Morris, JK. & Richards, JS. 1996: An E-box region within the prostaglandin endoperoxide synthase-2 (PGS-2) promoter is required for transcription in rat ovarian granulosa cells. *J. Biol. Chem.* 271(28):16633-16643
- Murray, M. D. & Brater, D.C. 1993: Renal toxicity of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:435-465
- O'Banion, M. K., Winn, V. D. & Young, D. A. 1992: cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:4888-4892
- Pace-Asciak, C.R. (1988) :Catabolism of the postanoids and leukotrienes. In :*Prostaglandins : Biologi and chemistry of prostaglandins and related eicosanoids*. (Curtis-Prior, P.B. ed.) pp46-51, Churchill Livingstone, Edinburgh.

- Ping, X. W., Warden, C., Fletcher, B. S., Kujubu, D. A., Herschman, H. R. & Lusi, A. L. 1993: Chromosomal organization of the inducible and constitutive prostaglandin synthase/cyclooxygenase genes in mouse. *Genomics* 15: 458-460
- Rao, Ch. V. (1988) :Receptors for various prostaglandins in :Prostaglandins : Biologi and chemistry of prostaglandins and related eicosanoids. (Curtis-Prior, P.B. ed.) pp171-178, Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Saito, J., Terano, T., Hirai, A., Shiina, T., Tamura, Y. and Saito, Y. 1997 Mechanisms of enhanced production of PGI₂ in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 131: 219-228
- Sakuma, S., Fujimoto, Y., Tsunomori, M., Tagano, S., Nishida, H., Baba, K. and Fujita, T. 1998 Effect of daphnodorin A, B and C, new flavans isolated from traditional Chinese medicine, on the 12-lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism of arachidonic acid in rabbit platelets. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 58: 143-146
- Sakamoto, W., Fujie, K., Nishihira, J., Handa, H., Ueda, N. and Yamamoto, S. 1996 Effect of vitamin E on expression of cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharides-stimulated rat macrophage. *Biochim. Biophys. Acta* 1304: 139-144
- Schmitz, P. G., Lane, P. L., Dalal, R., Zhang, K. & Majidi, B. J. 1995: Omega-3 fatty acids attenuate glomerular capillary hydraulic pressure in rats with ablation. *Kidney Int.* 48(6): 1792-1800
- Sciorra, V. A. & Daniel, L. W. 1996: Phospholipase D-derived products in the regulation of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated prostaglandin synthesis in madin-darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 271(24): 14226-14232
- Seeger, W., Moser, U., and Roka, L. 1988 Effects of alpha-tocopherol, its carboxylic acid chromane compound and two novel antioxidant isoflavanones on prostaglandin H synthase activity and autodeactivation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 338: 74-81
- Sirois, J. & Richards, J. S. 1992: Purification and characterization of a novel, distinct isoform of prostaglandin endoperoxide synthase induced by human chronic gonadotropin in granulosa cells of rat preovulatory follicles. *J. Biol. Chem.* 267: 6383-6388

- Sirois, J., Levy, L. O., Simmons, D. L. & Richards J. S. 1993: Characterization and hormonal regulation of the promoter of the rat prostaglandin endoperoxide synthase 2 gene in granulosa cells. *J. Biol. Chem.* 268: 12199-12206
- Smith, W. L., Mease, E. A. & DeWitt, D. L. 1994 : Interactions of PGH synthase isozymes-1 and -2 with NSAIDs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 744: 50-7
- Smith, W. L., DeWitt & D. L. 1995 : Biochemistry of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and synthase-2 and their differential susceptibility to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Semin. Nephrol.* 15(3): 179-194
- Smith, W. L., Garavito, R. M. & DeWitt, D. L. 1996: Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenase)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 271: 33157-33160
- Smith, W. L., DeWitt, D.L., Arakawa, T., Spencer, A.G., Thuresson, E.D. and Song, I. 1997: Independent prostanoid biosynthetic system associated with prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2. *Thrombosis and Haemostasis.* 78: 627-630
- Subbaramaial, K., Quing, W., Michaluart, P., Telang, N., Tanabe, t., Inoue, H.,Jang, M., Pezzuto, J.M. and Dannenberg, A.J. 1998 Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 273: 21875-21882
- Tetsuka, T., Baier, L.D. and Morrison, A.R. 1996 Antioxidants inhibit interleukin-1-induced cyclooxygenase and nitric-oxide synthase expression in rat mesangial cells. Evidences for post-transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 271: 11689-11693
- Ushikubi, F., Hirata, M. & Narumiya, S. 1995: Molecular biology of prostanoid receptors; an overview. *J. Lipid Mediators Cell Signalling* 12: 343-359
- VanDerouderaa, F. J., Buytenhek, M., Nugteren, D. H. & VanDrop, D. A. 1977: Purification and characterization of prostaglandin synthetase from sheep vesicular glands. *Biochim. Biophys. Acta.* 487:315-331
- Wong, W. Y. L., DeWitt, D. L., Smith, W. L. & Richards, J. S. 1989:Rapid induction of prostaglandin endoperoxide synthase in rat preovulatory follicles by luteinizing hormone and cAMP is blocked by inhibitors of transcription and translation. *Molecular Endocrinology.* 3: 1714-1723

- Xie, W. & Herschman, H. R. 1995: v-src induces prostaglandin synthase 2 gene expression by activation of the c-Jun N-terminal kinase and the c-Jun transcription factor. *J. Biol. Chem.* 270(46):27622-27628
- Xie, W., Chipman, J. G., Robertson, D. L., Erikson, R. L. & Simmons, D. L. 1991: Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:2692-2696
- Yamamoto, K., Arakawa, T., Ueda, N. & Yamamoto, S. 1995: Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. *J. Biol. Chem.* 270(52):31315-31320
- Yamamoto, S. 1988 :Characterization of enzymes in prostanoid synthesis. In :Prostaglandins : Biologi and chemistry of prostaglandins and related eicosanoids. (Curtis-Prior, P.B. ed.) pp37-51, Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Yokayama, C., Takai, T.& Tanabe, T. 1988: Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequence. *FEBS Lett.* 231: 347-351
- Zor, U. & Reiss, N. 1991 :Regulation of plasma membrane phospholipase A₂ activity by phosphorylation / dephosphorylation : is glucocorticoid action mediated by inclusion of protein phosphatase in : Prostaglandins, Leukotrienes. Lipoxins and PAF (Bailey, J.M. ed.) pp135-139, Plenum Press, New York.

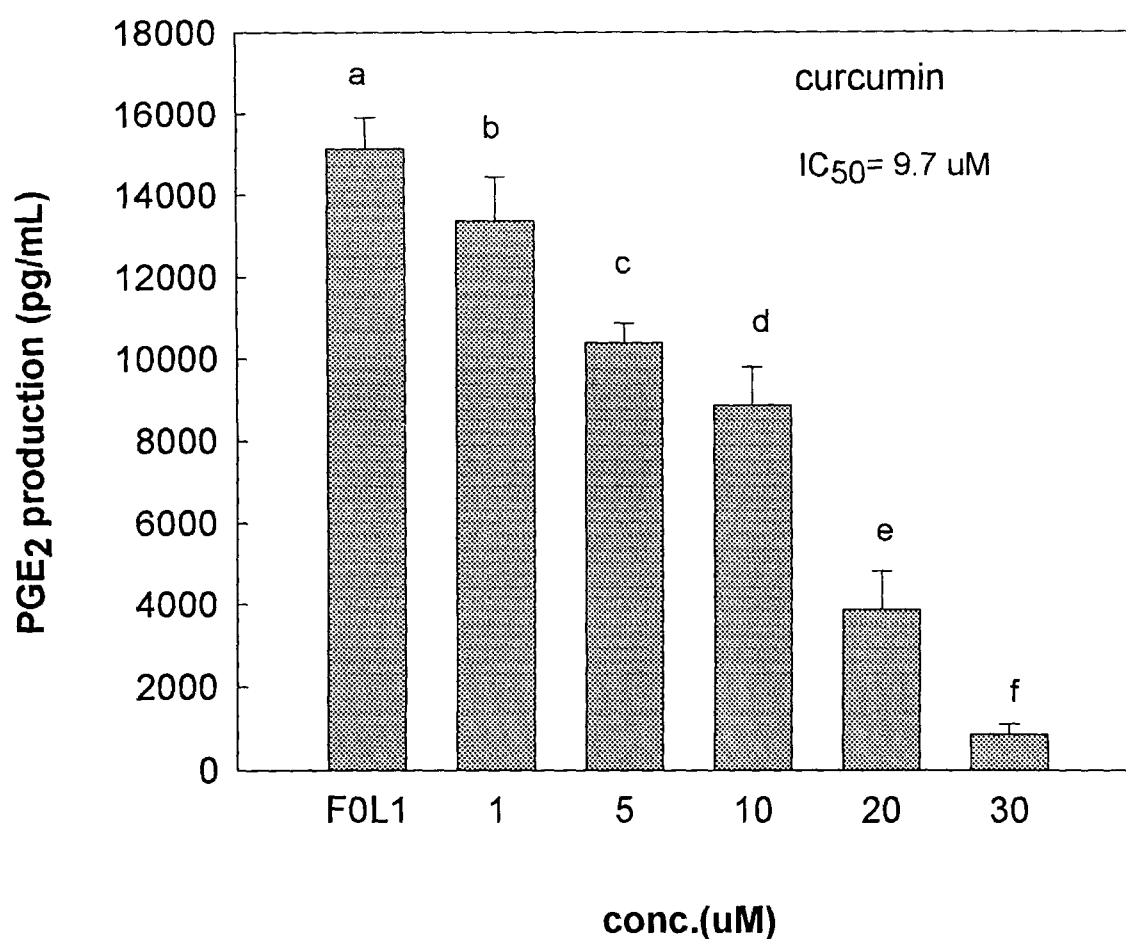


圖 1 薑黃素對 LPS 誘發 RAW264.7 生成 PGE₂ 的影響

Fig 1 Effects of curcumin on LPS-induced PGE₂ production in RAW264.7 cells. The cells were treated with various concentration of curcumin and LPS (1ng/mL) for 18h. F0 is the PGE₂ production without any treatment. PGE₂ in medium was determined by an EIA Kit. The value is means $\pm$ SD of triplicate wells in a representative experiment. Different letters a、b、c、d、e、f indicate significantly different among each other ($P < 0.05$) by ANOVA and Duncan's Multiple Range Test. Data shown are representative of at least triplicate separate experiments with similar result.

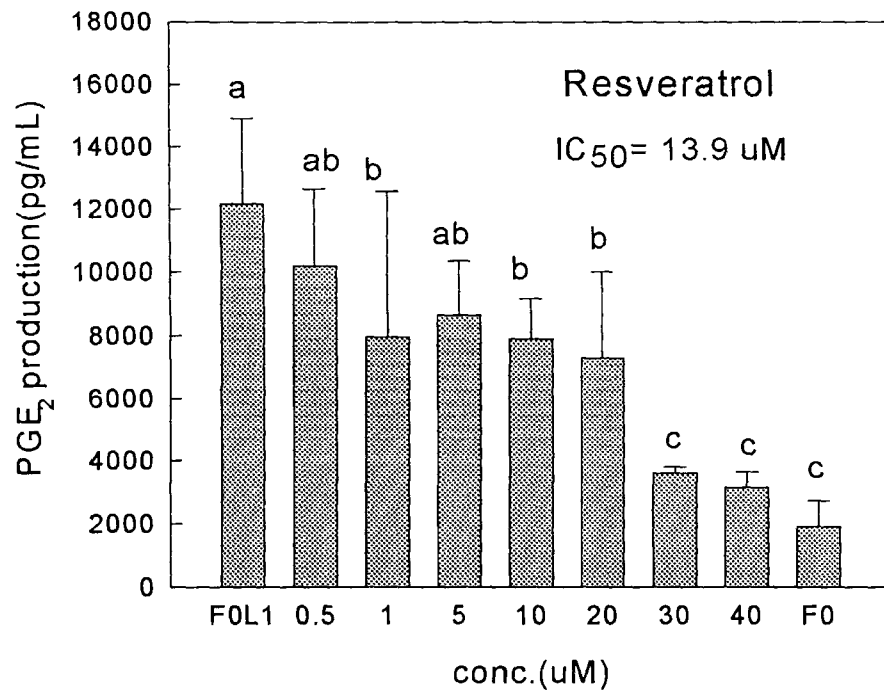


圖 2 Resveratrol 對 LPS 誘發 RAW264.7 生成 PGE₂ 的影響

Fig2 Effects of Resveratrol on ILPS-induced PGE₂ production in RAW264.7 cells. The cells were treated with various concentration of isofoavonoid and LPS (1ng/mL) for 18h. F0 is the PGE₂ production without any treatment. PGE₂ in medium was determined by an EIA Kit. The value is means $\pm$ SD of triplicate wells in a representative experiment. Different letters a, b, c, d, e, f indicate significantly different among each other ($P < 0.05$) by ANOVA and Duncan's Multiple Range Test. Data shown are representative of at least triplicate separate experiments with similar result.

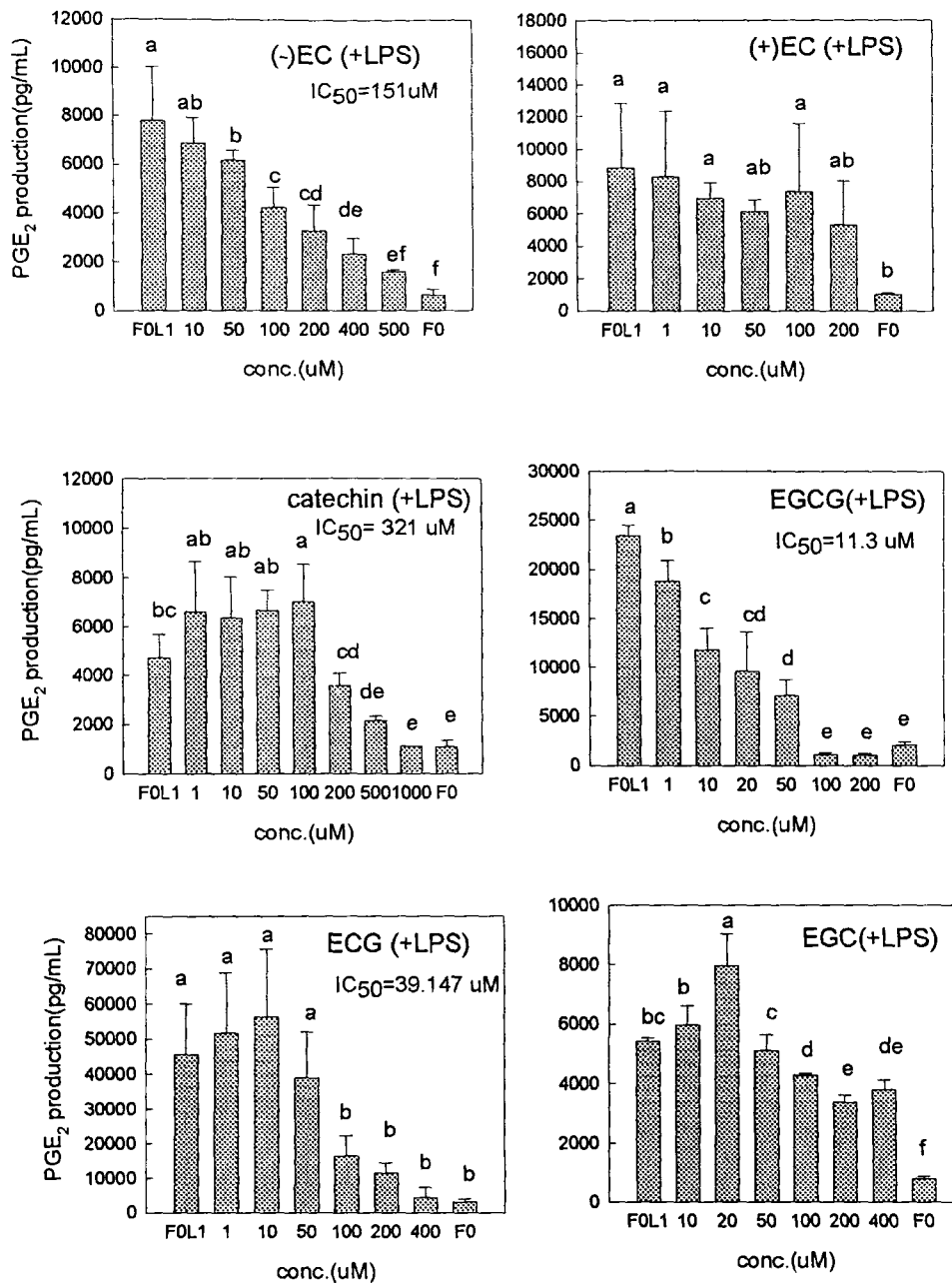


圖 3 綠茶中多酚類化合物對 LPS 引發 RAW264.7 生成 PGE₂ 的影響

Fig 3 Effects of polyphenols from green tea on LPS (1ng/mL)-induced PGE₂ production in RAW264.7 cells. The cells were treated with various concentration of isofoavonoid and LPS (1ng/mL) for 18h. F0 is the PGE₂ production without any treatment. PGE₂ in medium was determined by an EIA Kit. The value is means $\pm$ SD of triplicate wells in a representative experiment. Different letters a · b · c · d · e · f indicate significantly different among each other (P<0.05) by ANONA and Duncan's Multiple Range Test. Data shown are representative of at least triplicate separate eaperiments with similar result.

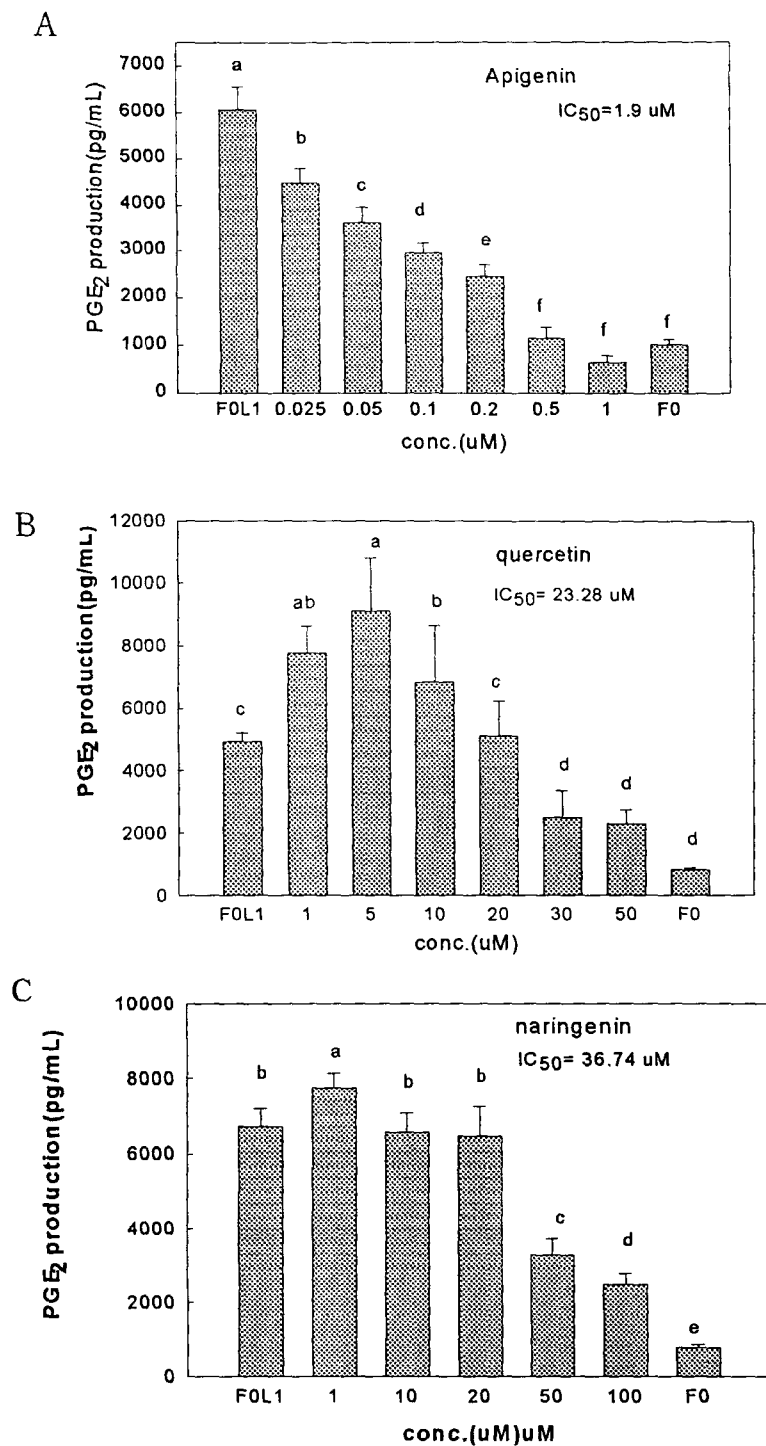


圖 4 類黃酮對 LPS 誘發 RAW264.7 生成 PGE₂ 的影響

Fig 4 Effects of flavonoids on LPS(1ng/mL)-induced PGE₂ production in RAW264.7 cells. The cells were treated with various concentration of flavonoids and LPS (1ng/mL) for 18h. F0 is the PGE₂ production without any treatment. PGE₂ in medium was determined by an EIA Kit. The value is means $\pm$ SD of triplicate wells in a representative experiment. Different letters a、b、c、d、e、f indicate significantly different among each other(P<0.05) by ANOVA and Duncan's Multiple Range Test. Data shown are representative of at least triplicate separate experiments with similar result.

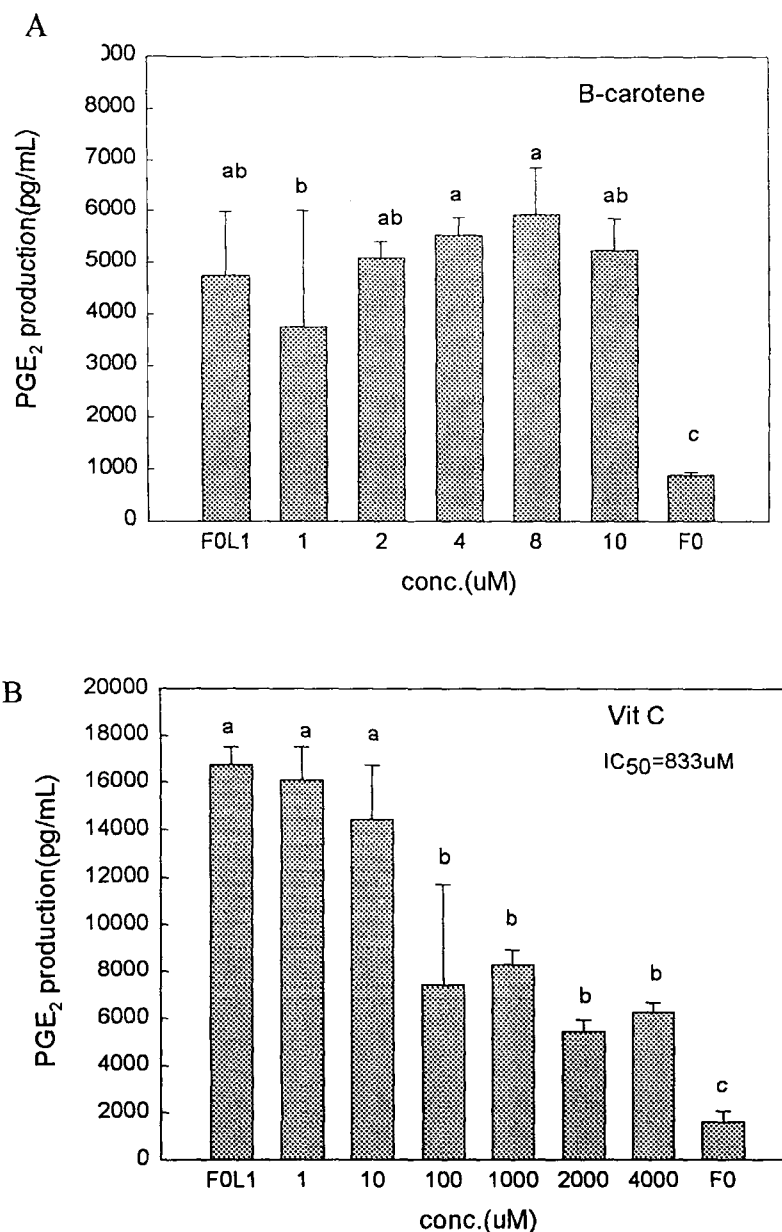


圖 5 類胡蘿蔔素(A)與維生素 C(B)對 LPS 誘發 RAW264.7 生成 PGE₂ 的影響

Fig 5 Effects of Vitamin C and β -carotene on LPS -induced PGE₂ production in RAW264.7 cells. The cells were treated with various concentration of Vitamin C and β -carotene and LPS (1ng/mL) for 18h. F0 is the PGE₂ production without any treatment. PGE₂ in medium was determined by an EIA Kit. The value is means $\pm$ SD of triplicate wells in a representative experiment. Different letters a、b、c indicate significantly different among each other ($P < 0.05$) by ANOVA and Duncan's Multiple Range Test. Data shown are representative of at least triplicate separate experiments with similar result.

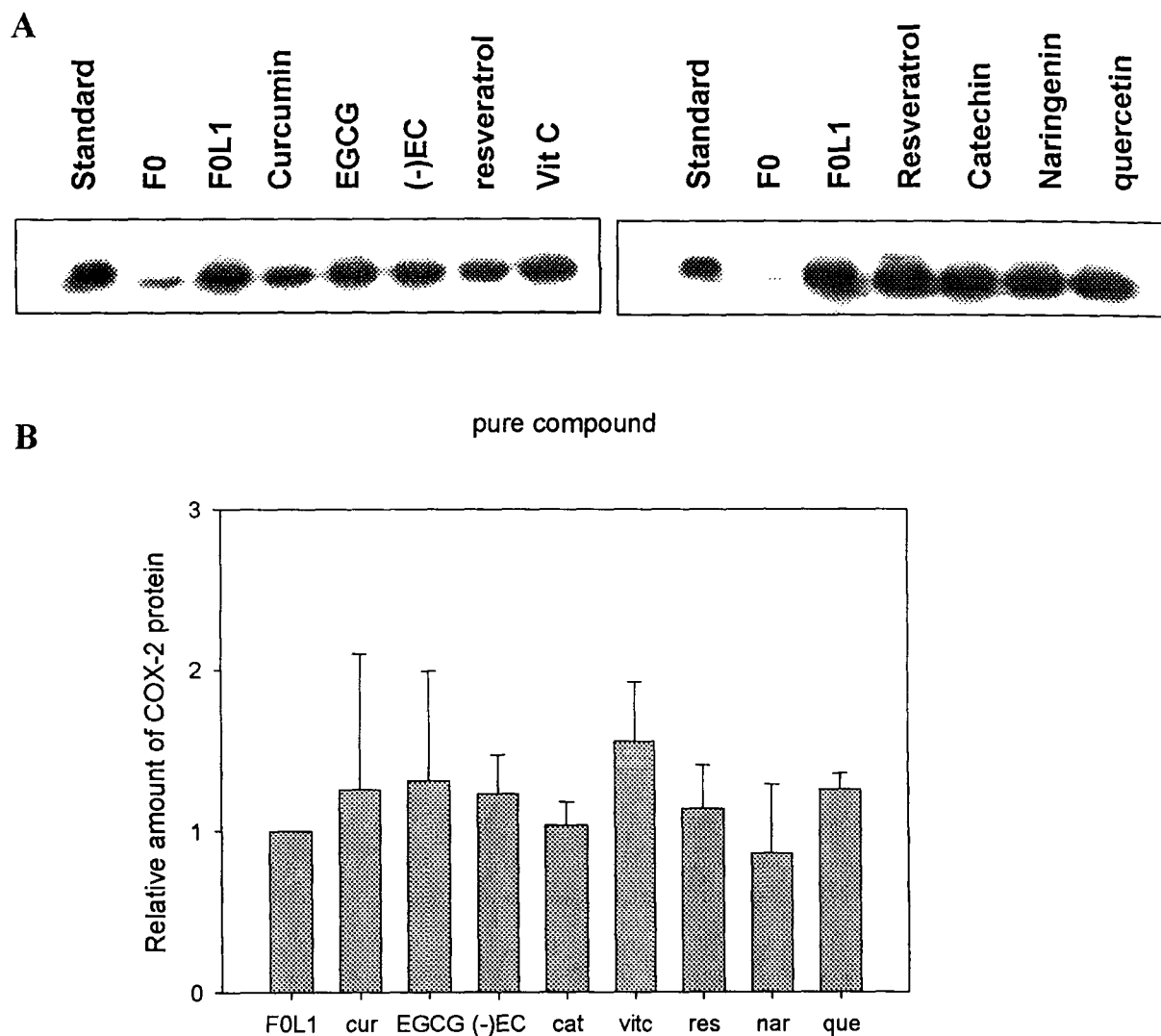


圖 6 食物成份對 LPS 引發巨噬細胞株 COX-2 蛋白質表現之影響。A 圖為 wetern blot 的結果，B 圖為量化的結果。

Fig.6 Effects of various compounds on LPS-induced COX-2 protein level in RAW264.7 cells. The cells were treated with various compound and LPS (1ng/mL) for 12 h. Total cellular protein (25ug/lane) was separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel , transferred to a nitrocellulose membrane and stained with antibodies specific for COX-2. F0 is the COX-2 protein expression without any treatment and F0L1 is treated with LPS Panel A: COX-2 protein analyzed by western blot. Panel B: Image analysis of A, values are means $\pm$ SD of triplicate experiments. Cur.: curcumin, EGCG: Epigallocatechin gallate, (-)EC: (-)epicatechin, Cat: catechin, Res: resveratrol, nar: naringenin, que: quercetin,

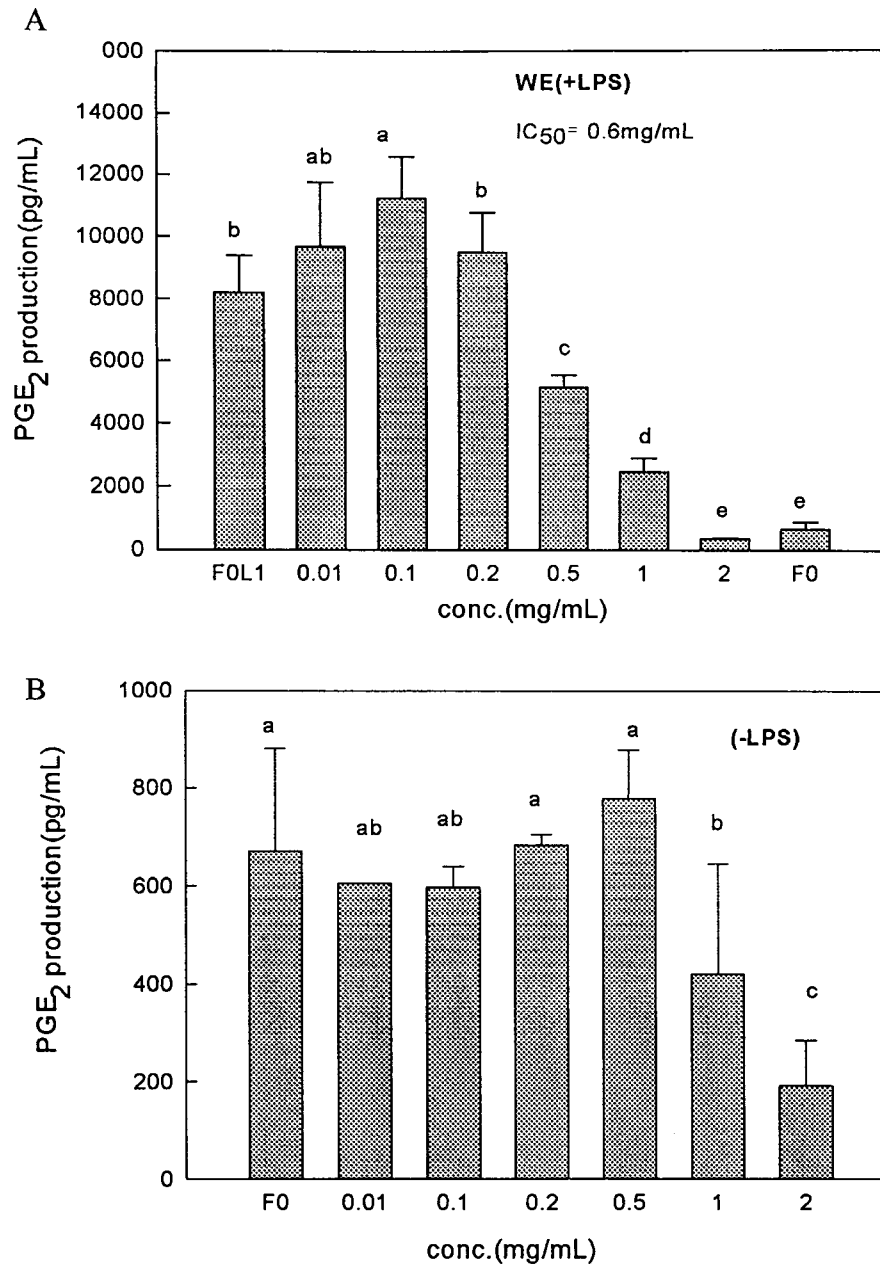


圖 7 菊花水萃物對 RAW264.7 細胞生成 PGE₂ 的影響

Fig. 7 Effects of water soluble fraction from Chrysanthemum on PGE₂ production in RAW264.7 cells. The cells were treated with various concentrations of the Fraction in the prence (+LPS) or absenu (-LPS) of LPS (1ng/mL) for 18h. PGE₂ in medium was determined by an EIA Kit. The value is means $\pm$ SD of triplicate wells in a representitive experiment. Different letters a、b、c indicate significantly different among one another ($P < 0.05$) by ANOVA and Duncan's Multiple Range Test. Data shown are representative of at least triplicate separate experiments with similar results.. Panel A: with LPS 1ng/mL (+LPS) Panel B: no LPS (-LPS)

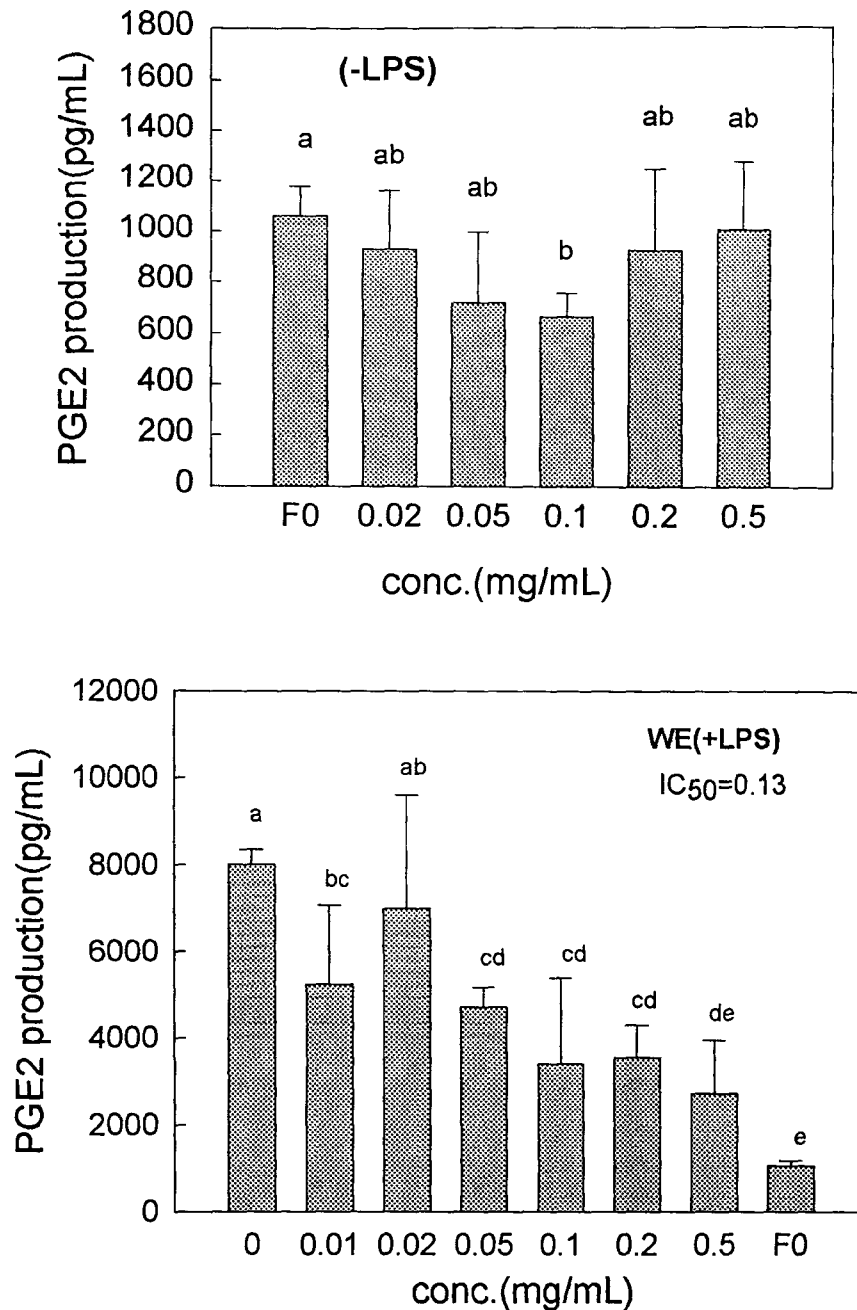


圖 8 苦瓜水萃物對 RAW264.7 細胞生成 PGE₂ 的影響

Fig. 8 Effects of water soluble fraction from bitter melon on PGE₂ production in RAW264.7 cells. The cells were treated with various concentrations of the fraction in the presence (+LPS) or absence (-LPS) of LPS (1ng/mL) for 18h. PGE₂ in medium was determined by an EIA Kit. The value is means $\pm$ SD of triplicate wells in a representative experiment. Different letters a、b、c、d、e indicate significantly different among one another ($P < 0.05$) by ANOVA and Duncan's Multiple Range Test. Data shown are representative of at least triplicate separate experiments with similar results.

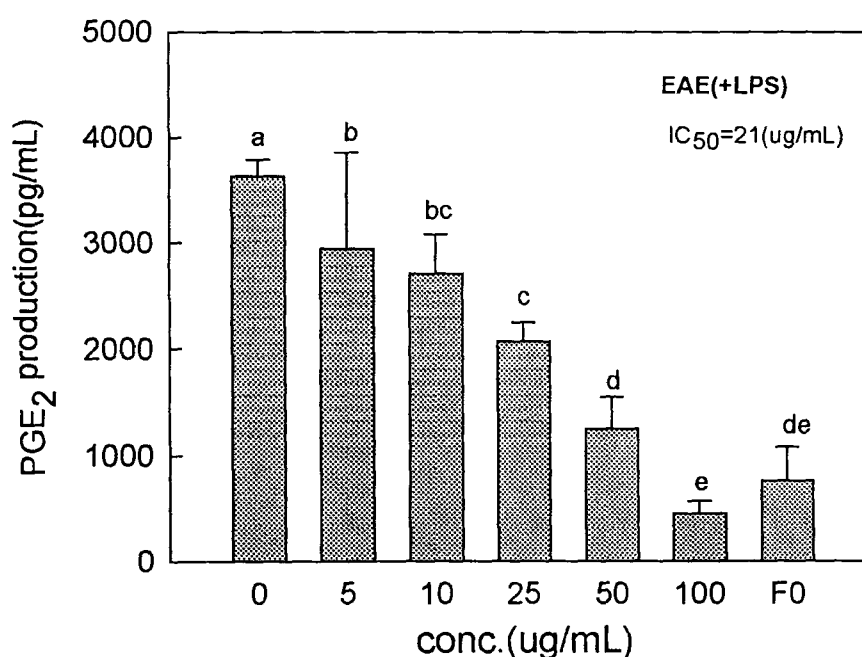
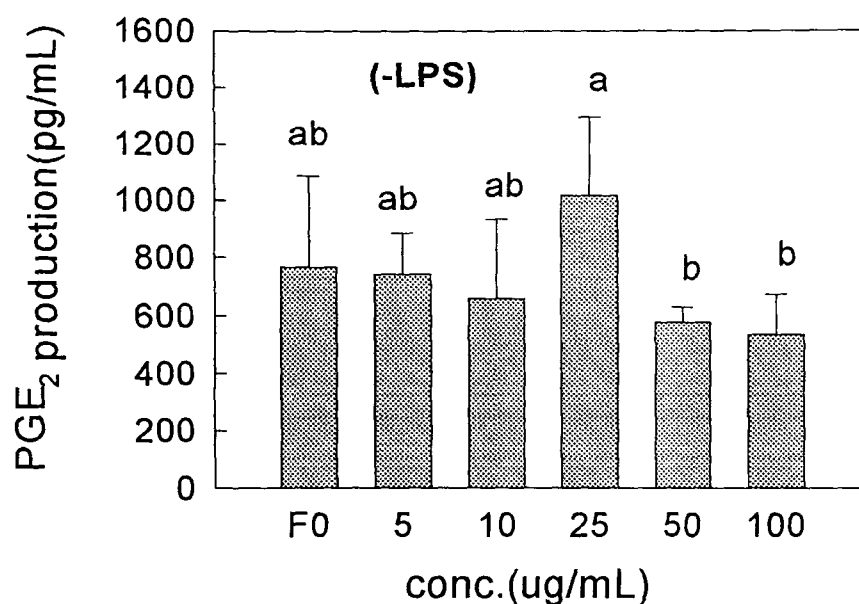


圖 9 苦瓜有機萃物對 RAW264.7 細胞生成 PGE₂ 的影響

Fig. 9 Effects of ethylacetate extract from bitter gourd on PGE₂ production in RAW264.7 cells. The cells were treated with various concentrations of extract in the presence (+LPS) or absence (-LPS) of LPS (1ng/mL) for 18h. PGE₂ in medium was determined by an EIA Kit. The value is means $\pm$ SD of triplicate wells in a representative experiment. Different letters a、b、c、d、e indicate significantly different among one another ($P < 0.05$) by ANOVA and Duncan's Multiple Range Test. Data shown are representative of at least triplicate separate experiments with similar results.

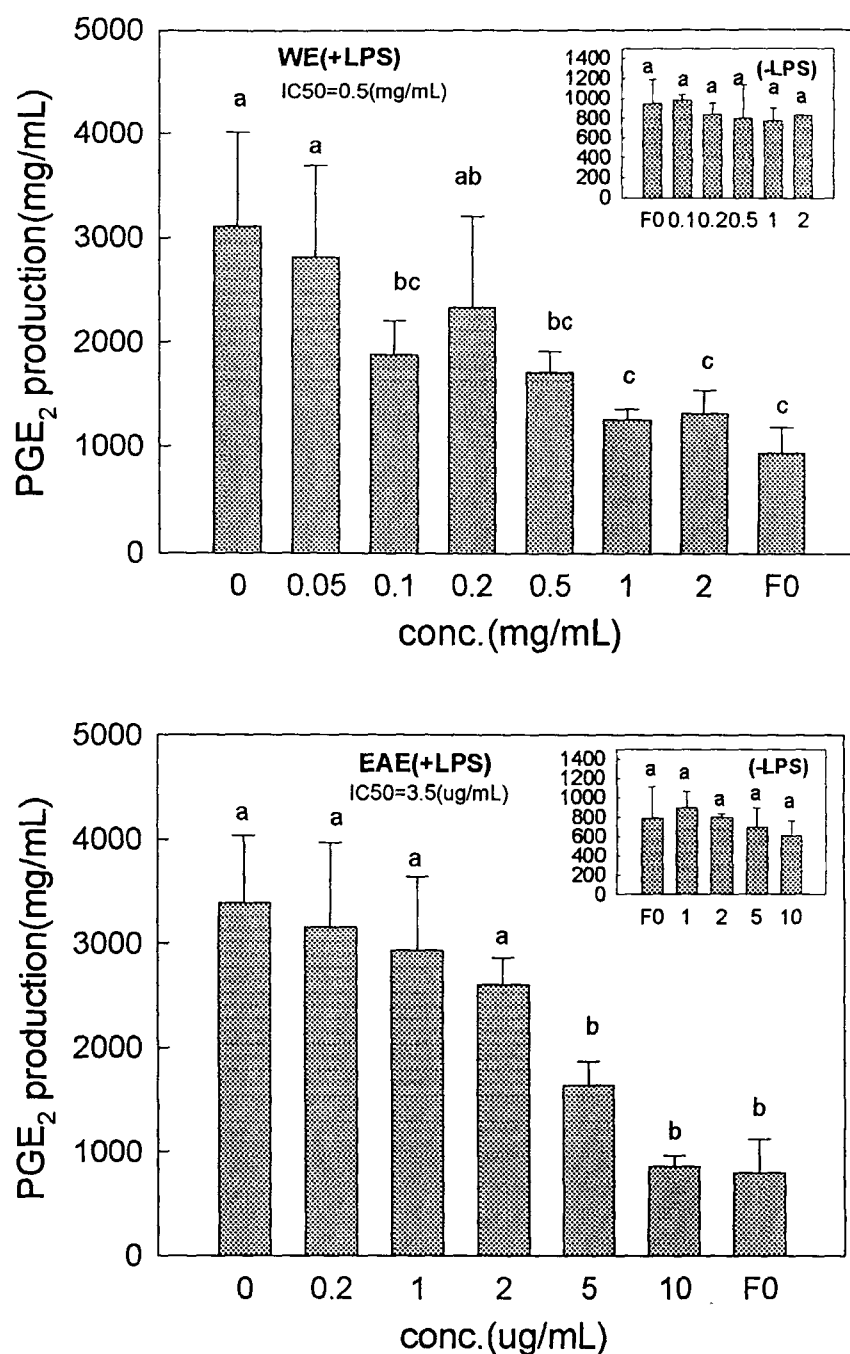


圖 10 洋蔥萃取物對 RAW264.7 細胞生成 PGE₂ 的影響

Fig. 10 Effects of water extract (WE) or ethylacetate extract (EAE) from onion on PGE₂ production in RAW264.7 cells. The cells were treated with various concentrations of the extracts in the presence (+LPS) absence (-LPS) or LPS (1ng/mL) for 18h. PGE₂ in medium was determined by an EIA Kit. The value is means $\pm$ SD of triplicate wells in a representative experiment. Different letters a, b, c indicate significantly different among one another ($P < 0.05$) by ANOVA and Duncan's Multiple Range Test. Data shown are representative of at least triplicate separate experiments with similar results.

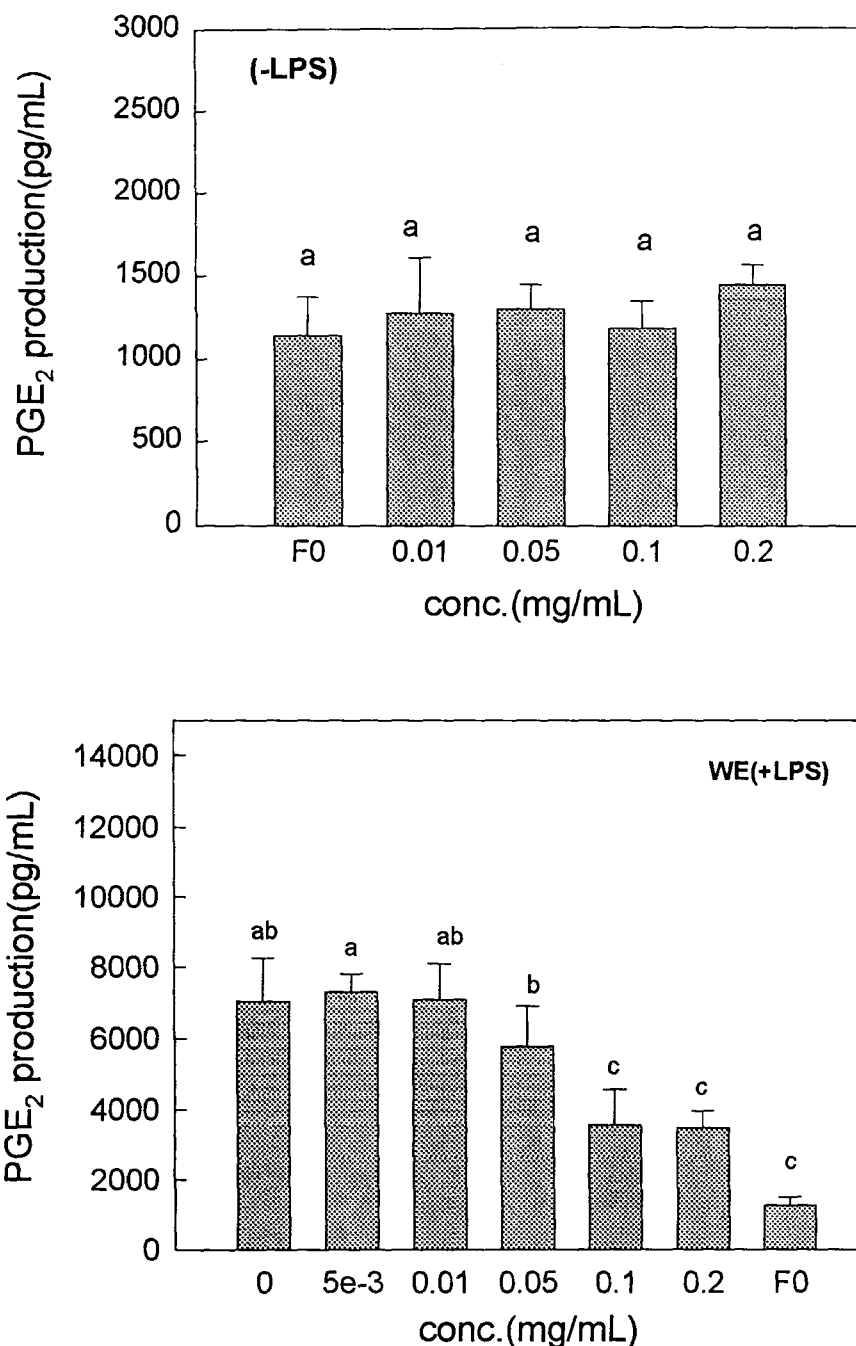


圖 11 蓮子心水萃物對 RAW264.7 細胞生成 PGE₂ 的影響

Fig. 11 Effects of water soluble tration from lotus seed core on PGE₂ production in RAW264.7 cells. The cells were treated with various concentrations of the fraction in the presence (+LPS) or absence of (-LPS) of LPS (1ng/mL) for 18h. PGE₂ in medium was determined by an EIA Kit. The value is means $\pm$ SD of triplicate wells in a representative experiment. Different letters a · b · c indicate significantly different among one another ($P < 0.05$) by ANOVA and Duncan's Multiple Range Test. Data shown are representative of at least triplicate separate experiments with similar results.

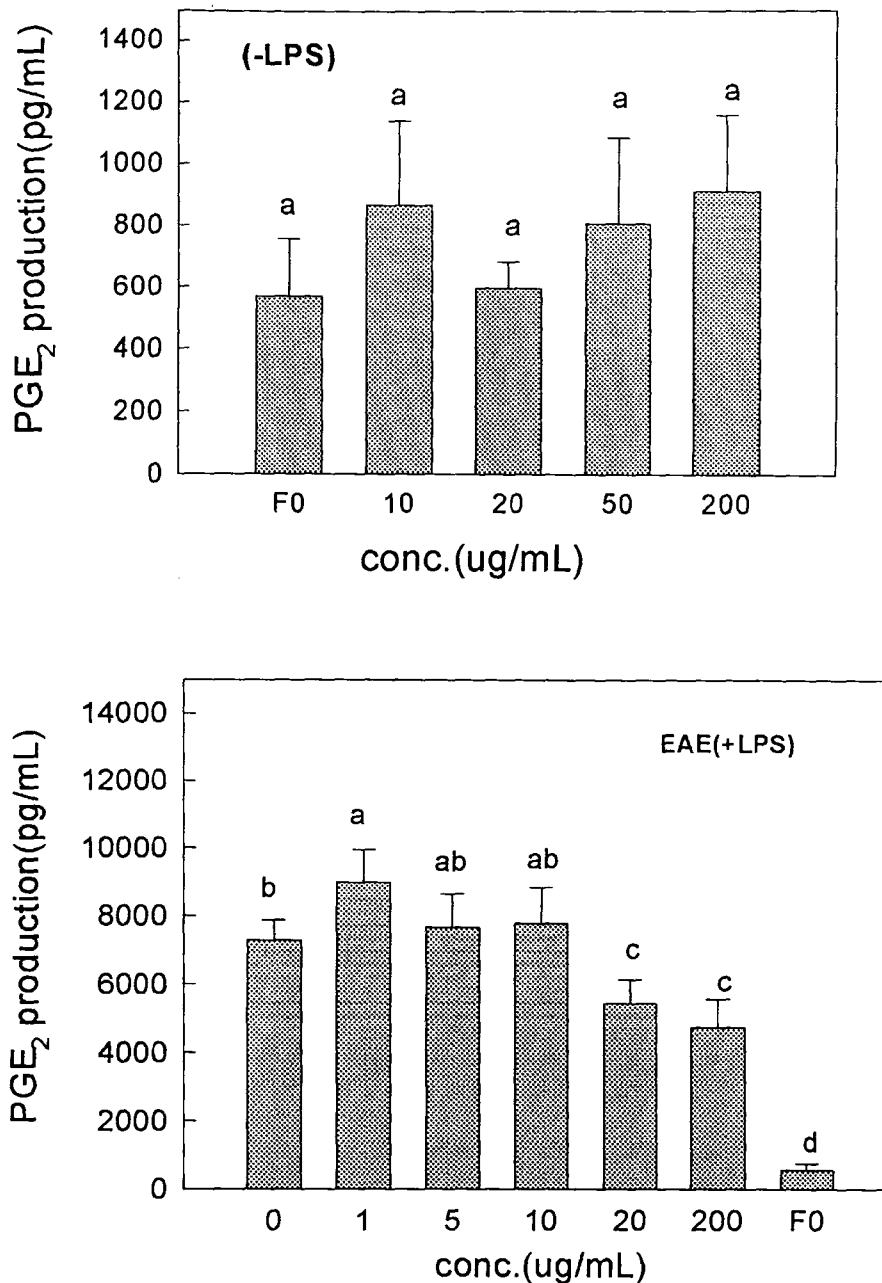


圖 12 蓮子心有機萃物對 RAW264.7 細胞生成 PGE₂ 的影響

Fig 12 Effects of ethylacetate extract from louts seed core on PGE₂ production in RAW264.7 cells. The cells were treated with various concentration of extract in the presence (+LPS) or absence (-LPS) of LPS (1ng/mL) for 18h. PGE₂ in medium was determined by an EIA Kit. The value is means $\pm$ SD of triplicate wells in a representative experiment. Different letters a、b、c、d indicate significantly different among one another ($P < 0.05$) by ANOVA and Duncan's Multiple Range Test. Data shown are representative of at least triplicate separate experiments with similar results.

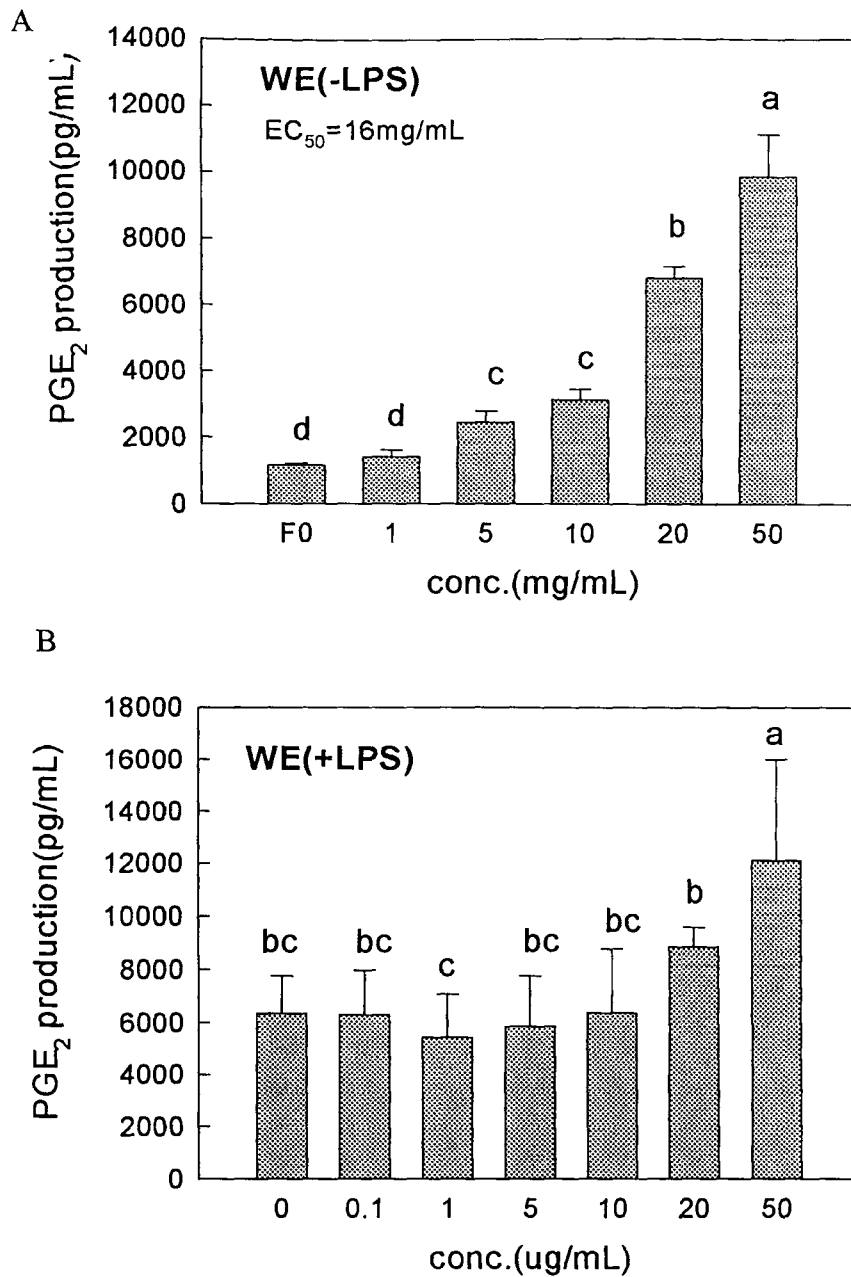


圖 13 龍眼水萃物對 RAW264.7 細胞生成 PGE₂ 的影響

Fig 13 Effects of water soluble fraction from longan on PGE₂ production in RAW264.7 cells. The cells were treated with various concentration of the fraction in the presence (+LPS) or absence (-LPS) of LPS (1ng/mL) for 18h. PGE₂ in medium was determined by an EIA Kit. The value is means $\pm$ SD of triplicate wells in a representative experiment. Different letters a、b、c、d、e、f indicate significantly different among one another ($P < 0.05$) by ANOVA and Duncan's Multiple Range Test. Data shown are representative of at least triplicate separate experiments with similar results.

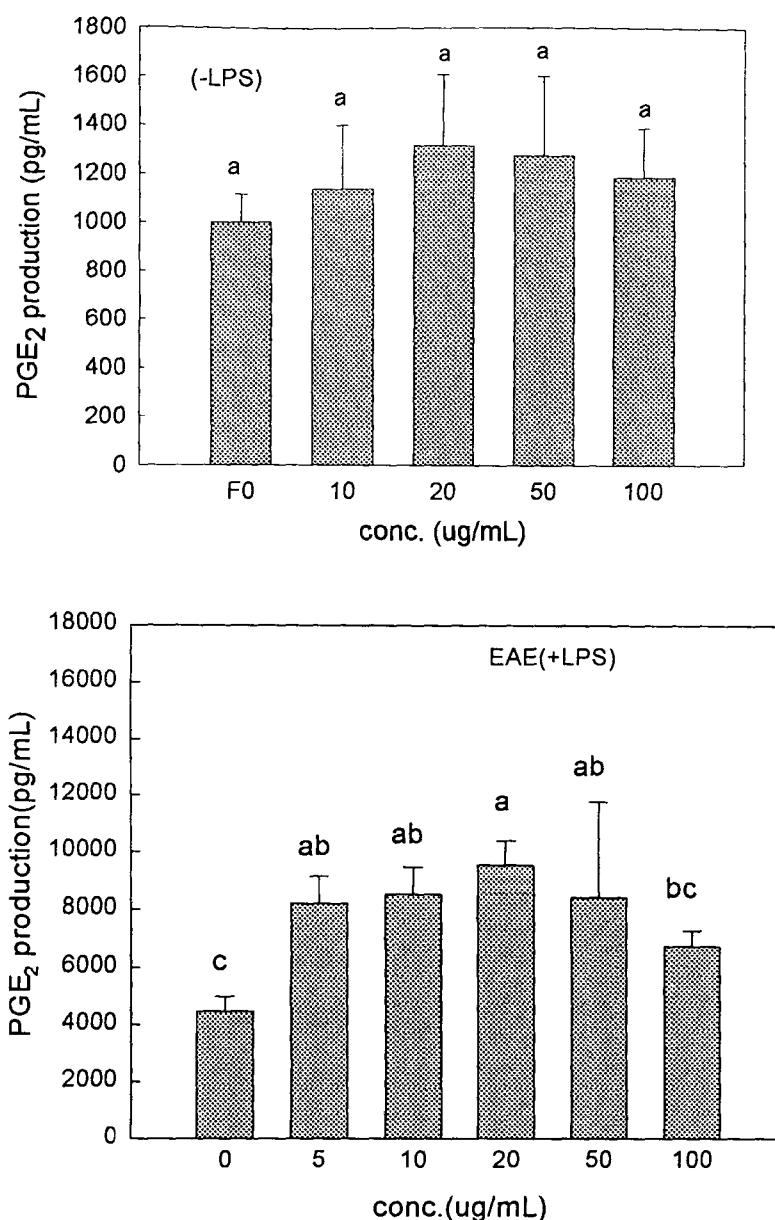


圖 14 龍眼有機萃物對 RAW264.7 細胞生成 PGE₂ 的影響

Fig. 14 Effects of ethylacetate extract from longan on PGE₂ production in RAW264.7 cells. The cells were treated with various concentration of extract in the presence (+LPS) or absence (-LPS) of LPS (1ng/mL) or not for 18h. PGE₂ in medium was determined by an EIA Kit. The value is means $\pm$ SD of triplicate wells in a representative experiment. Different letters a, b, c indicate significantly different among one another ($P < 0.05$) by ANOVA and Duncan's Multiple Range Test. Data shown are representative of at least triplicate separate experiments with similar results.

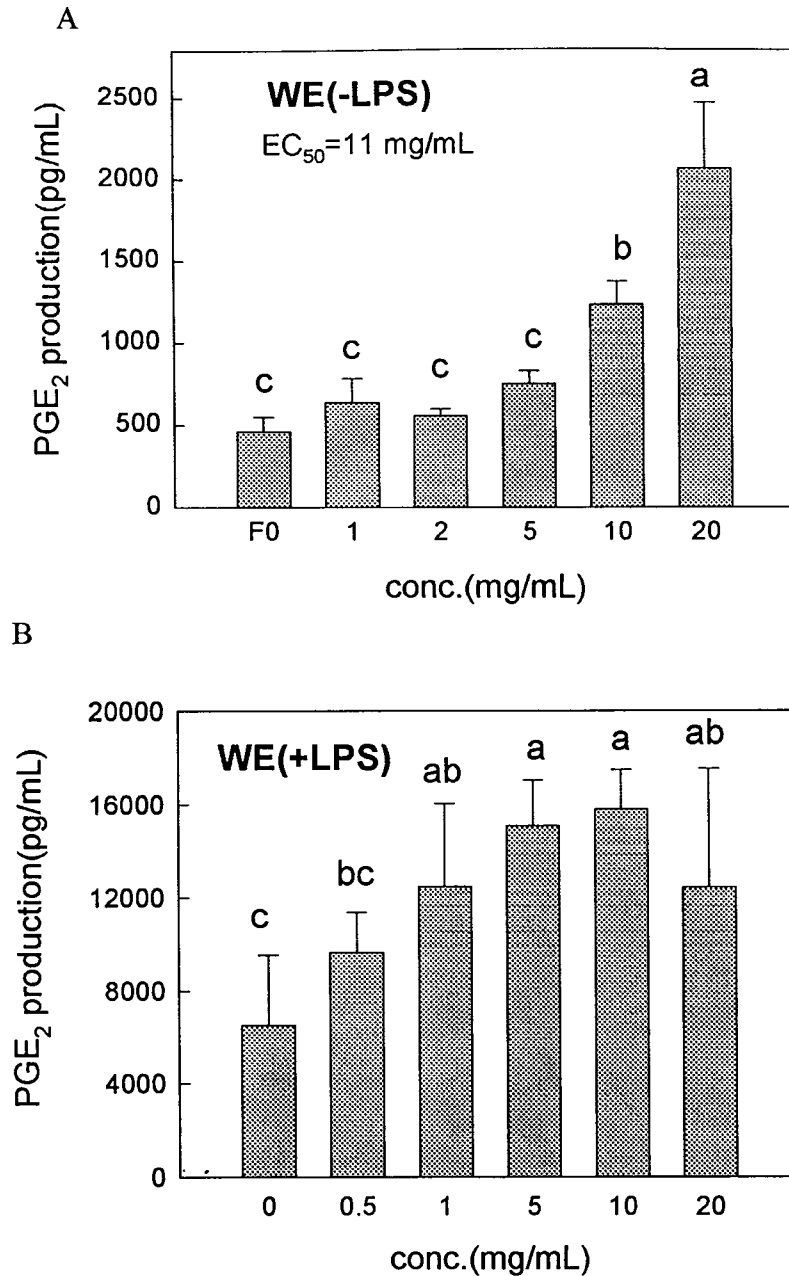
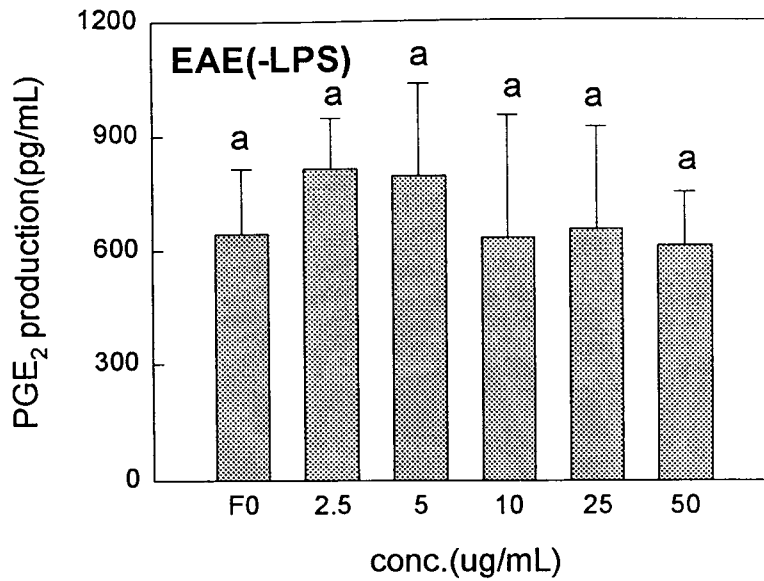


圖 15 桂圓水萃物對 RAW264.7 細胞生成 PGE₂ 的影響

Fig. 15 Effects of water soluble fraction from dried longan on PGE₂ production in RAW264.7 cells. The cells were treated with various concentrations of the fraction in the presence (+LPS) or absence (-LPS) of LPS (1ng/mL) for 18h. PGE₂ in medium was determined by an EIA Kit. The value is means $\pm$ SD of triplicate wells in a representative experiment. Different letters a · b · c indicate significantly different among one another ($P < 0.05$) by ANOVA and Duncan's Multiple Range Test. Data shown are representative of at least triplicate separate experiments with similar results.

A



B

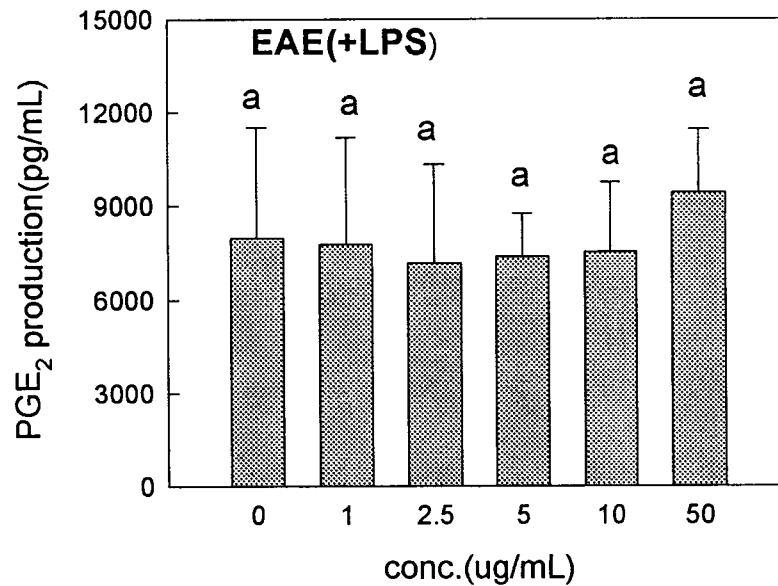
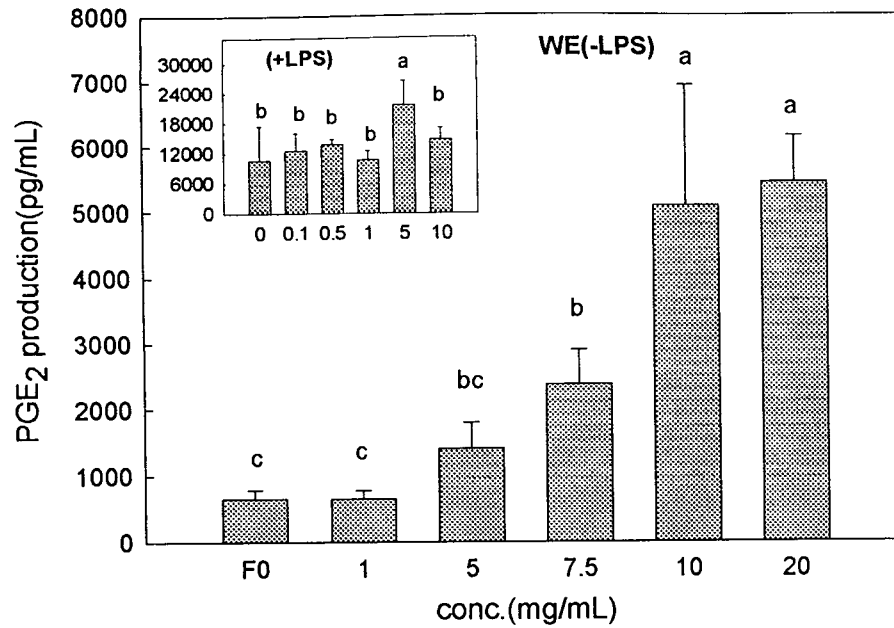


圖 16 桂圓有機萃物對 RAW264.7 細胞生成 PGE₂ 的影響

Fig. 16 Effects of ethylacetate extract from dried longan on PGE₂ production in RAW264.7 cells. The cells were treated with various concentrations of the extract the fraction in the presence (+LPS) or absence (-LPS) of LPS (1ng/mL) for 18h. PGE₂ in medium was determined by an EIA Kit. The value is means $\pm$ SD of triplicate wells in a representative experiment. Different letters a、b、c、d、e、f indicate significantly different among one another ($P < 0.05$) by ANOVA and Duncan's Multiple Range Test. Data shown are representative of at least triplicate separate experiments with similar results..

A



B

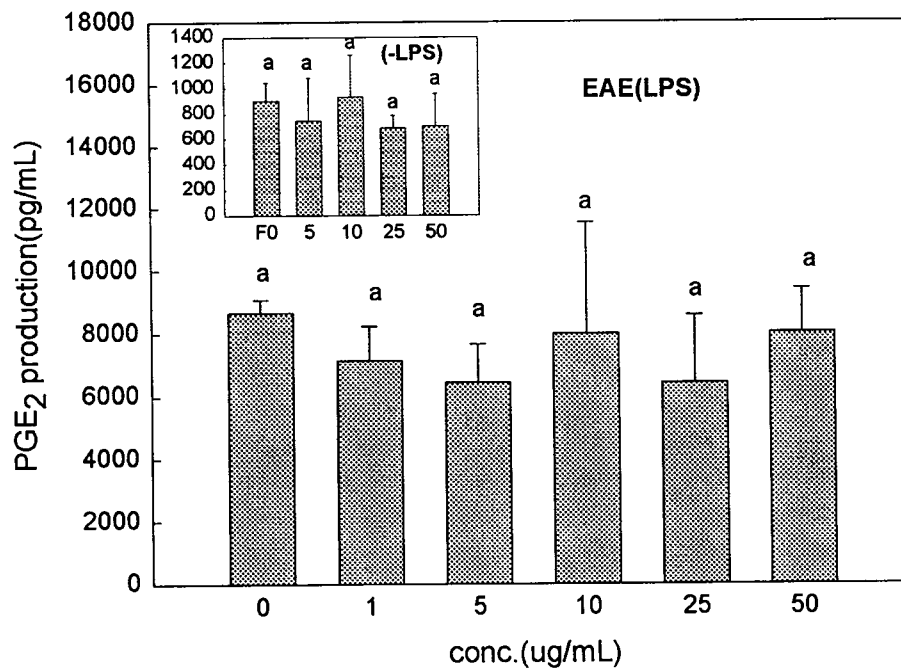


圖 17 荔枝萃取物對 RAW264.7 細胞生成 PGE₂ 的影響

Fig.17 Effects of water extract (WE) or ethylacetate extract (EAE) from Litchi on PGE₂ production in RAW264.7 cells. The cells were treated with various concentrations of extracts in the presence (+LPS) or absence (-LPS) of LPS (1ng/mL) for 18h. PGE₂ in medium was determined by an EIA Kit. The value is means $\pm$ SD of triplicate wells in a representative experiment. Different letters a、b、c indicate significantly different among one another ($P < 0.05$) by ANOVA and Duncan's Multiple Range Test. Data shown are representative of at least triplicate separate experiments with similar results. Panel A: aqueous extract B: ethylacetate extract.

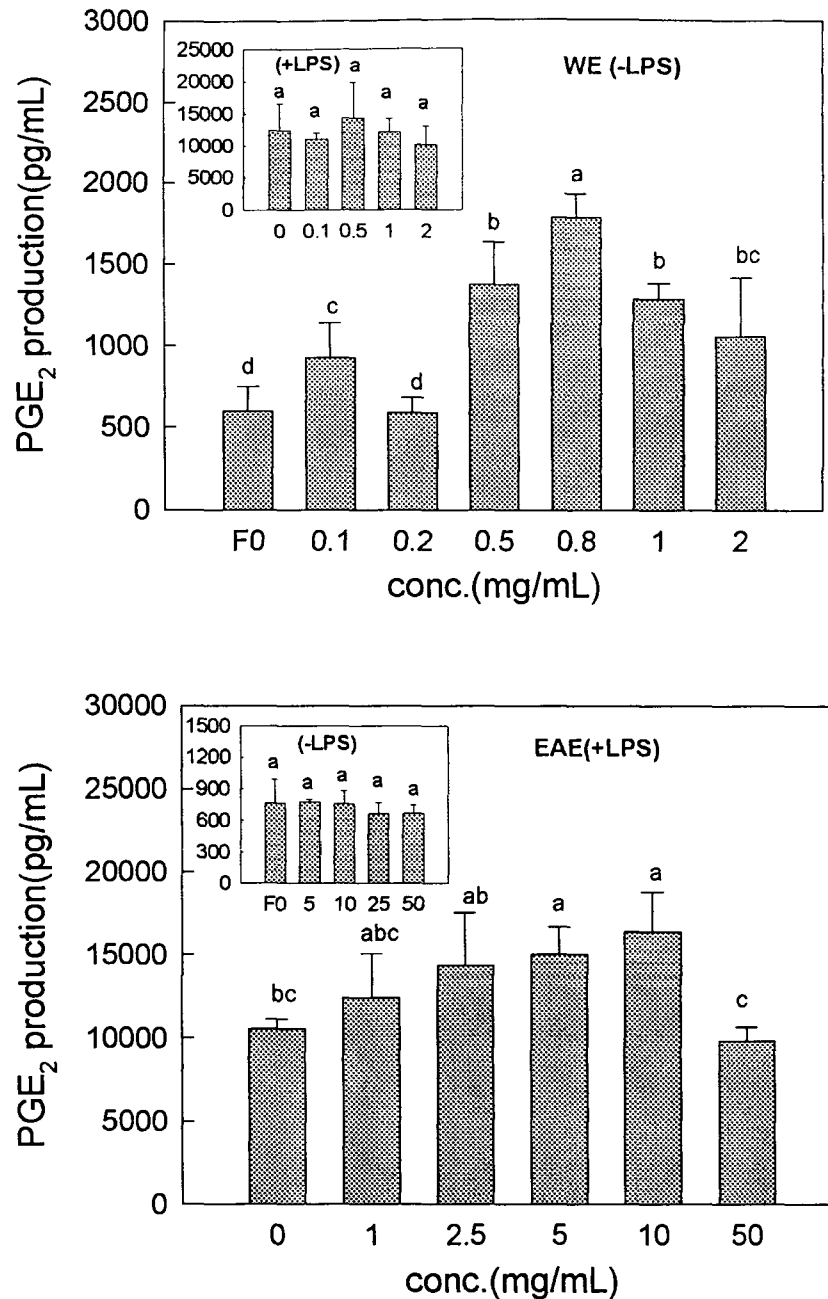


圖 18 芹菜萃物對 RAW264.7 細胞生成 PGE₂ 的影響

Fig. 18 Effects of water extract (WE) or ethylacetati extract (EAE) from celery on PGE₂ production in RAW264.7 cells. The cells were treated with various concentrations of extracts in the presence (+LPS) or absence (-LPS) of LPS (1ng/mL) for 18h. PGE₂ in medium was determined by an EIA Kit. The value is means $\pm$ SD of triplicate wells in a representative experiment. Different letters a、b、c、d indicate significantly different among one another(P<0.05) by ANOVA and Duncan's Multiple Range Test. Data shown are representative of at least triplicate separate experiments with similar results.

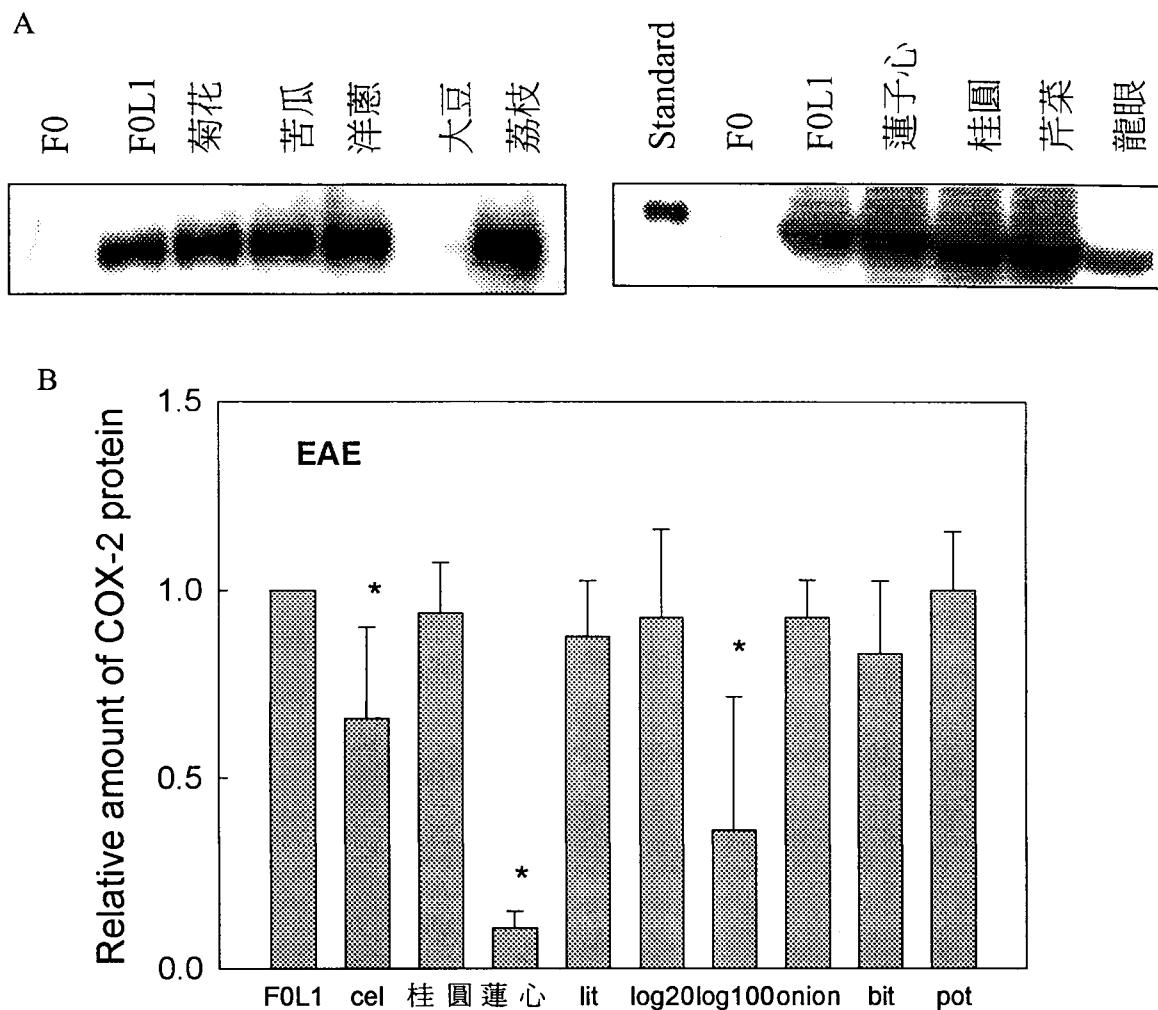


圖 19 水萃物對 LPS 誘發巨噬細胞 COX-2 蛋白質表現之影響。A 圖為 western blot 的結果，B 圖為量化的結果 Fig. 2-17 Effects of aqueous fraction from various foods on LPS-induced COX-2 protein level in RAW264.7 cells. The cells were treated with various sample and LPS (1ng/mL) for 12h. Total cellular protein (5ug/lane) was separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel, transferred to a nitrocellulose membrane and stained with antibodies specific for COX-2. F0 is the COX-2 protein expression without any treatment and F0L1 is treated with LPS Panel A: COX-2 protein analyzed by western blot.. Panel B: Image analysis of A, values are means $\pm$ SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$

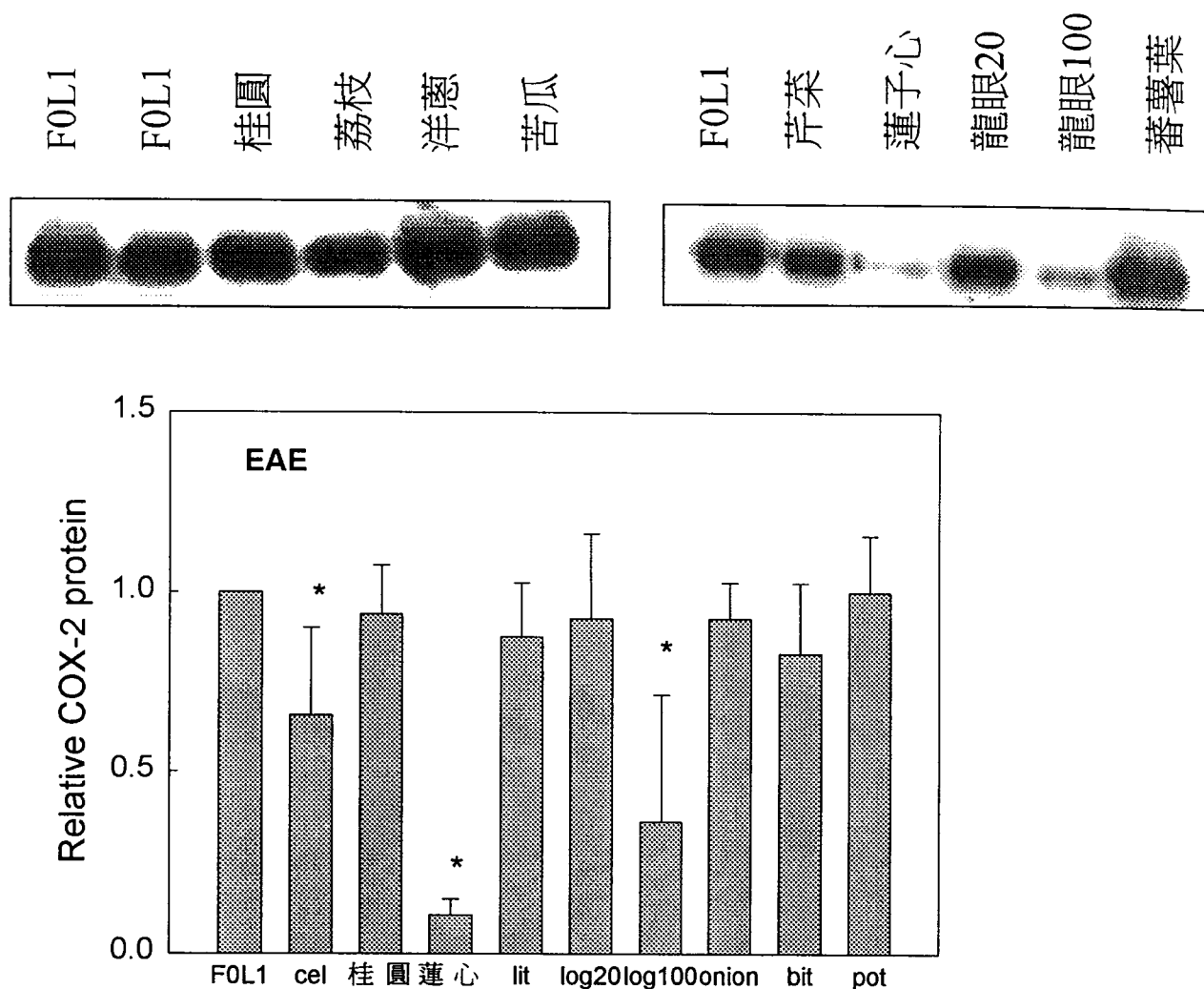


圖 20 有機萃物對 LPS 誘發巨噬細胞 COX-2 蛋白質表現之影響。A 圖為 western blot 的結果，B 圖為量化的結果

Fig. 2-18 Effects of ethylacetate extract from various foods on LPS-induced COX-2 protein level in RAW264.7 cells. The cells were treated with various sample and LPS (1ng/mL) for 12h. Total cellular protein (5ug/lane) was separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel, transferred to a nitrocellulose membrane and stained with antibodies specific for COX-2. F0 is the COX-2 protein expression without any treatment and F0L1 is treated with LPS Panel A: COX-2 protein analyzed by western blot. Panel B: Image analysis of A, values are means $\pm$ SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$. cel: celery, lit: litchi, log20: longan 20ug/mL, log100: longan 100ug/mL, bit: bitter gourd pear

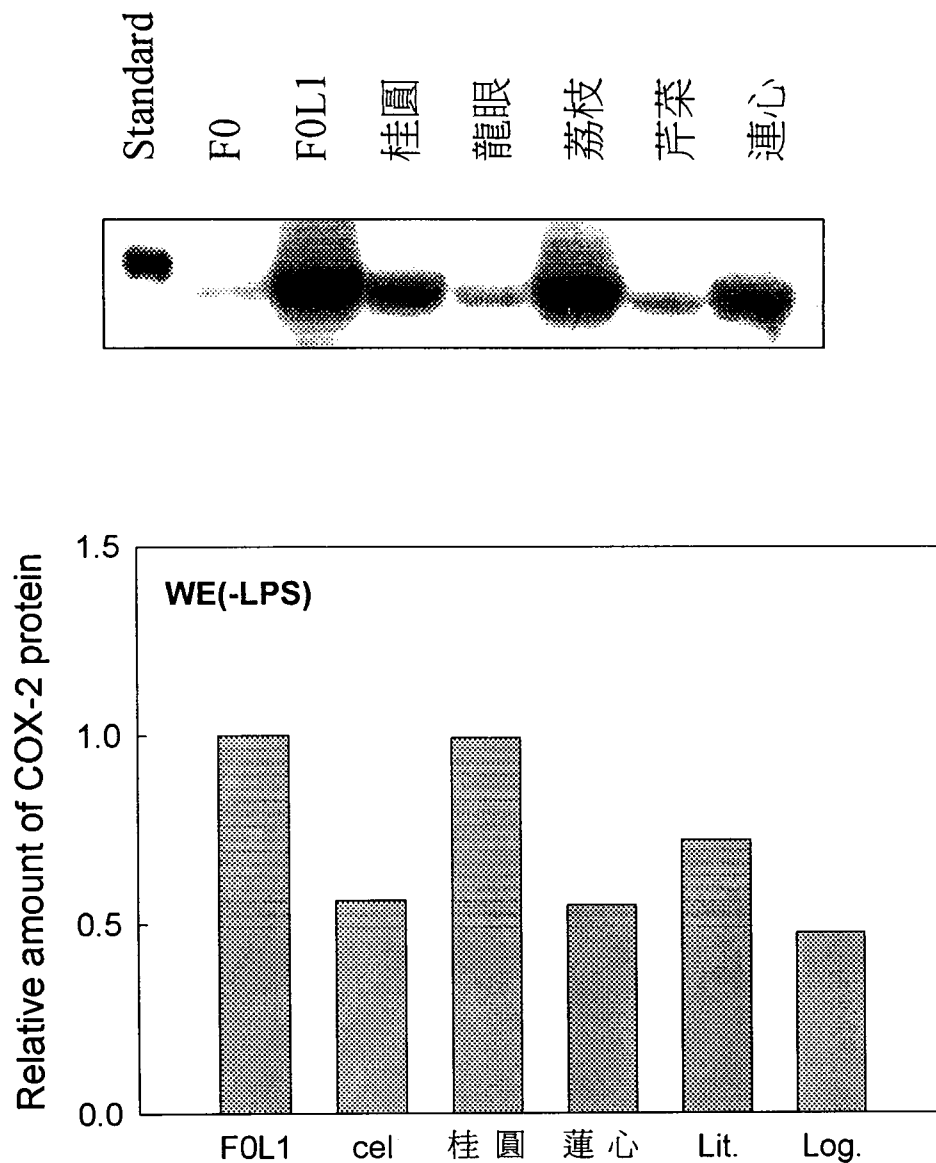


圖 21 水萃物對巨噬細胞 COX-2 蛋白質表現之影響。A 圖為 western blot 的結果，B 圖為量化的結果

Fig. 21 Effects of aqueous fraction from various foods on COX-2 protein level in RAW264.7 cells. The cells were treated with various sample and LPS (1ng/mL) for 12h. Total cellular protein (5ug/lane) was separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel, transferred to a nitrocellulose membrane and stained with antibodies specific for COX-2. F0 is the COX-2 protein expression without any treatment and FOL1 is treated with LPS Panel A: COX-2 protein analyzed by western blot.. Panel B: Image analysis of A, values are means of triplicate experiments. *P<0.05. standard: ovine COX-2, Cel: celery, Lit: litchi, Log:longan