

行政院農業委員會林務局委託研究計畫系列 98-06-5-01

台灣產筋骨草活性成分之動物細胞及動物生理活性試驗分析

Biological studies of active components from  
*Ajuga taiwanensis* in cell culture

期末報告



委託機關：行政院農業委員會林務局屏東林區管理處

執行機關：大葉大學

計畫主持人：楊博文

協同計畫主持人：孫芳君、何偉真

中華民國 98 年 12 月 18 日

## 壹、摘要

本研究針對筋骨草中蛻皮甙酮、總酚、總黃酮等成分進行最佳萃取條件及利用動物細胞篩選平台進行各項生物活性之功效評估，以了解台灣產筋骨草品種及萃取條件對化學組成與生物活性之效應影響。本研究發現以 25% 乙醇微波萃取台灣產筋骨草蛻皮甙酮效果較佳，其中台灣筋骨草蛻皮甙酮 0.0483% 產率最高。總黃酮以 75% 乙醇微波萃取效果較好，其中以矮筋骨草 17.98% 產率為最高。總多酚以 25% 乙醇微波萃取效果較佳，其中以日本筋骨草 1.60% 產率為最高。DPPH 自由基清除能力分析顯示，25% 乙醇微波萃取台灣產筋骨草萃取液有較強清除自由基能力，其中以匍匐筋骨草 90.07% 清除自由基能力為最高。利用哺乳類動物細胞平台檢測台灣產筋骨草之生物活性功效，結果發現 75% 乙醇微波萃取液的抗氧化力為最高，並且在不同品系筋骨草之抗氧化力由高到低，分別為：矮筋骨草、台灣筋骨草、日本筋骨草、匍匐筋骨草。台灣產筋骨草萃取液皆具有抗發炎的功效，並且在 50% 乙醇萃取條件下之萃取液抗發炎效果為最佳。台灣產筋骨草萃取液具有抑制肝癌細胞 HepG2 及 Hep3B 2.1-7 增殖能力，其中以 50% 及 25% 乙醇萃取條件下其毒殺率高達 60%。未來會持續以動物試驗來驗證筋骨草生物功效，並且以將其開發為保健食品為目標。

## 貳、計畫緣起及目標

### 2-1、計畫緣起

在台灣，筋骨草屬植物(*Ajuga*)於民俗用藥上，被用來止咳、消腫止血、清熱解毒，另外已知其對肝炎、心血管方面疾病有不錯的治癒效果。

中國大陸在筋骨草保肝功效的初步實驗中，發現筋骨草中的粗黃酮萃取物，可治療 CCl<sub>4</sub> 誘導之大白鼠肝損傷。亦可應用於治療高血壓、降血脂、減緩氣喘症狀及抗痢疾等。

現今台灣產筋骨草於民間有零星栽培，在南投曾有以筋骨草作為原料之化妝保養品，在治療糖尿病及肝病方面亦有應用。

### 2-2、計畫目標

不同萃取溶劑條件對台灣產筋骨草活性成分之動物細胞生理活性試驗分析。

## 叁、筋骨草不同萃取溶劑成份分析

### 一、實驗材料與方法：

#### 3-1、材料

#### 材料一、

矮筋骨草 *Ajuga pygmaea* A. Gray



## 材料二.

日本筋骨草 *Ajuga nipponensis* Makino



## 材料三.

匍匐筋骨草 *Ajuga decumbens* Thunb. ex Murray



## 材料四.

台灣筋骨草 *Ajuga taiwanensis* Nakai ex Murata



### 3-2、樣品前處理

新鮮筋骨草以去離子水反覆洗淨後，以自然乾燥方式陰乾約 5~7 天，以不透氣塑膠袋封閉保存，此為未經粉碎之母樣品，備用。

自母樣品中取適量乾燥筋骨草，以粉碎機碎後，過 60 mesh 樣品則以製備，粉碎後樣品則以市售之不透氣塑膠袋密閉，待水分平衡約 3 天後，分別測定含水量。

### 3-3、標準萃取分析方法

此萃取分析法為參考張等(2002)及陳等(2002)在研究萃取分析蛻皮甾酮所使用之方式(以超音波為萃取方式)。在本研究中略加修改，用來分析比較四種不同台灣產筋骨草，矮筋骨草，日本筋骨草，台灣筋骨草及匍匐筋骨草之抗氧化能力，蛻皮甾酮、總黃酮和總多酚含量。微波萃取條件上，精秤 60 mesh 樣品約 2 g，加入溶劑 40ml，置於圓形錐瓶中密封，溶劑分別為不同乙醇濃度及水、溫度設定 65°C、功率 300 W 下萃取時間為 3 分鐘，靜置冷卻(室溫)，直接以相對應溶劑定量至刻度 100ml，樣品儲存於 4°C 下備用，待成份分析。

### 3-4、蛻皮甾酮 (Ecdysterone;20-Hydroxyecdysone; $\beta$ -ecdysone) 分析步驟

(1)、HPLC 分析條件:

Column : RP-18 column ( 250 mm  $\times$  4.6 mm , 5 $\mu$ m )

Mobile phase : methanol/water = 40 : 60 (v/v)

Detector : UV 248 nm

Flow rate : 1.0 ml/min

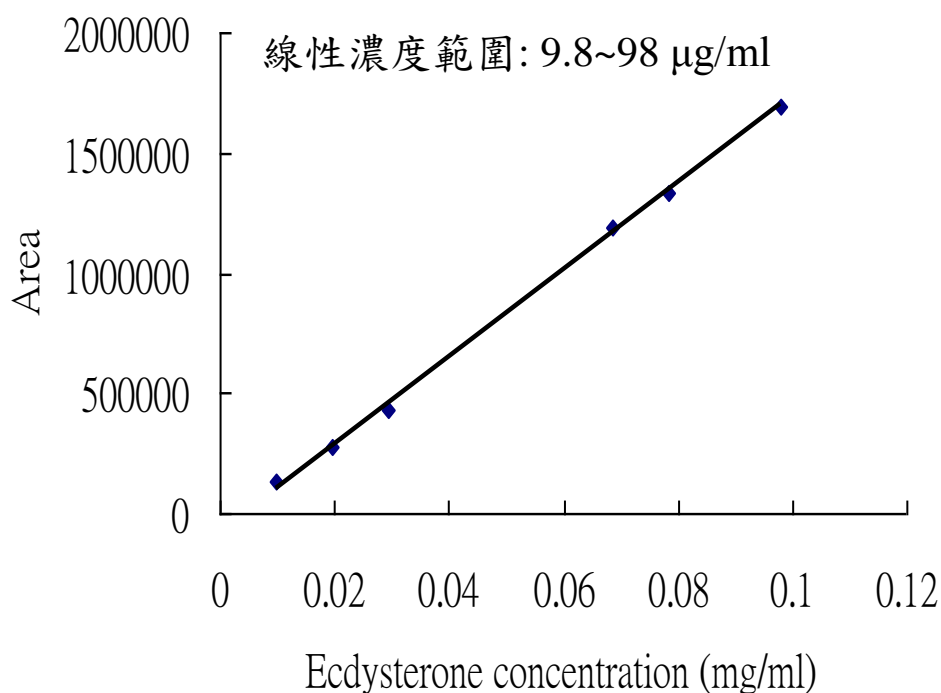
Injection volume : 20 $\mu$ l

Column temperature : 40 $^{\circ}$ C

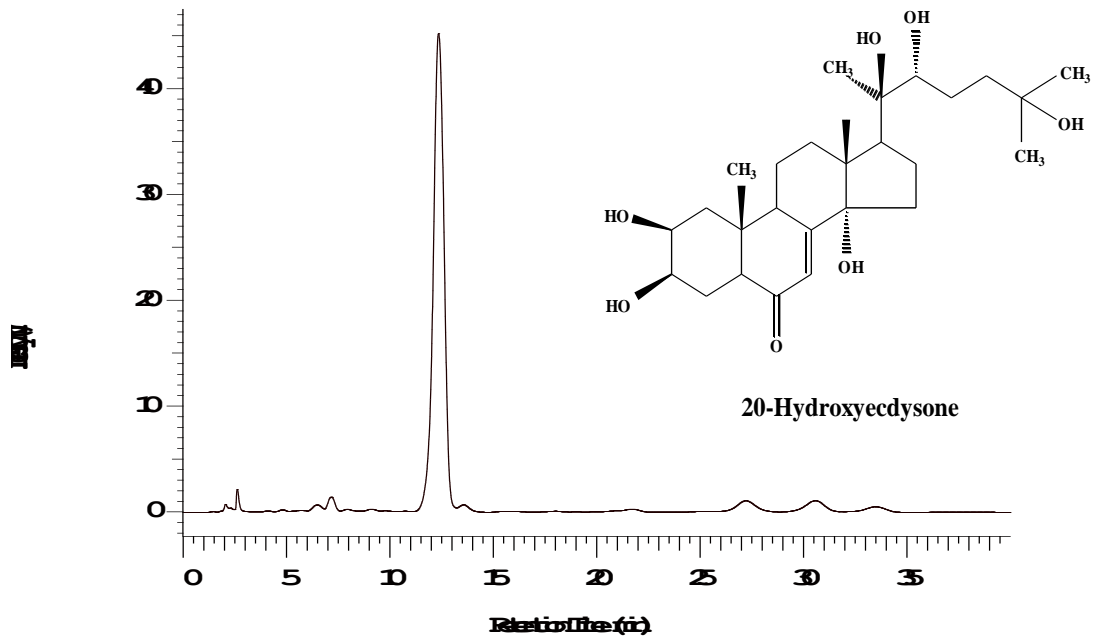
### 3-5、蛻皮甾酮標準曲線建立

精秤 9.8 mg 蛻皮甾酮(Ecdysterone)標準品，以分析級甲醇定容至 100 ml，此為濃度 0.098 mg/ml 蛻皮甾酮標準品母液。自母液中分別精密吸取 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 至 10 ml 定量瓶中，加分析級甲醇稀釋至刻度，即可得到不同濃度的蛻皮甾酮標準品(0.0098~0.098 mg/ml)。以前述 HPLC 分析條件進行分析，以面積 (Y) 對相應濃度 (X) 做蛻皮甾酮標準曲線。

$$Y = 18054249.3257X + 70394.3242, R^2 = 0.9992$$







**Retention Time = 12.35 min**

蛻皮甾酮標準曲線及 HPLC 層析圖

The standard curve and HPLC chromatogram of ecdysterone

### 3-6、總黃酮 (Total flavonoids) 分析步驟

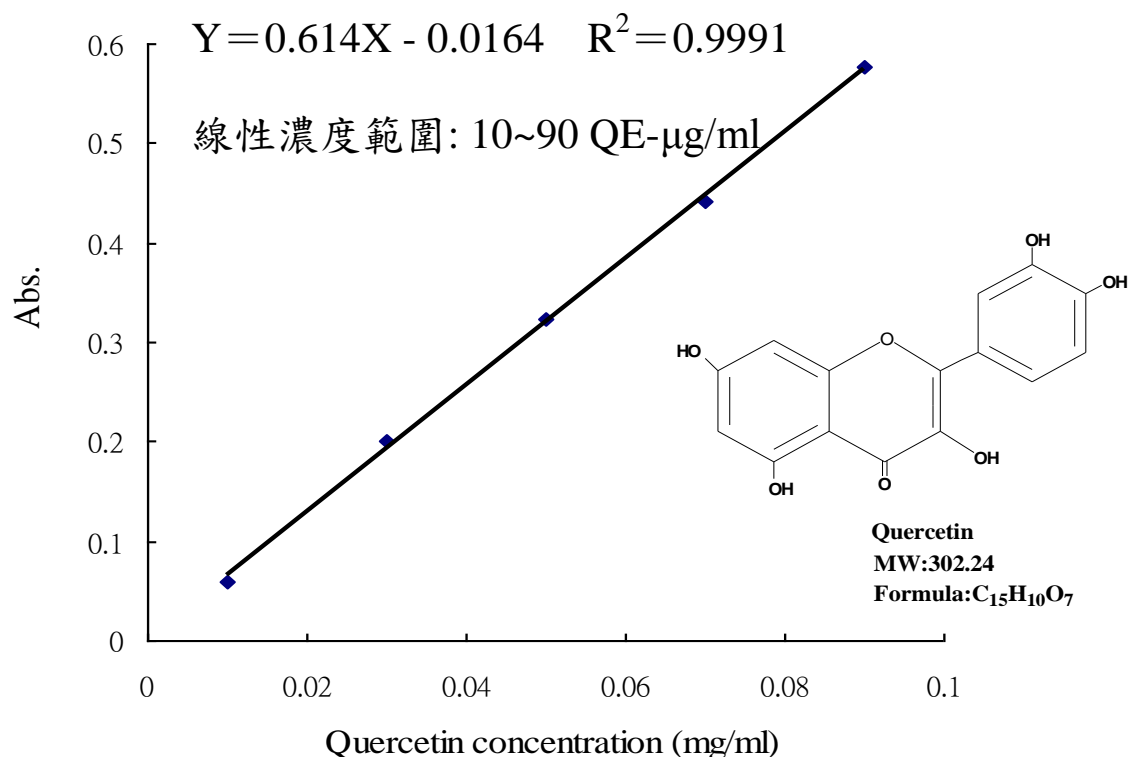
#### (1)、分光比色分析方法

採  $\text{AlCl}_3$  呈色法原理，分析流程則參考 Lin and Tang (2007) 之總黃酮分析步驟：取稀釋 10 倍後之萃取樣品 0.5 ml 加入 1.5 ml 95% 乙醇，再加入 0.1 ml (10%)  $\text{AlCl}_3$ 、0.1 ml (1M)  $\text{CH}_3\text{COOK}$  與 2.8 ml 去離子水，室溫下靜置 40 分鐘，測其 415 nm 吸光值。利用槲皮素(Quercetin)製作之標準曲線計算樣品中之總黃酮含量，並以槲皮素當量(Quercetin

equivalents, QE %,w/w)表示樣品之總黃酮含量。

### 3-7、總黃酮標準曲線建立

不同濃度之槲皮素標準品以上述方式作標準曲線。不同濃度槲皮素標準品配置方式如下：精秤 10.0 mg 槲皮素，以分析級甲醇定量至 10 ml，即得槲皮素母液( 1.0 mg/ml )，再自母液分別精密吸取 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 ml 至 10ml 定量瓶中，加甲醇稀釋至刻度，即得不同濃度槲皮素( 0.01~0.09 mg/ml )。以吸光值 (Y) 對相應濃度 (X) 做標準曲線。



總黃酮標準曲線

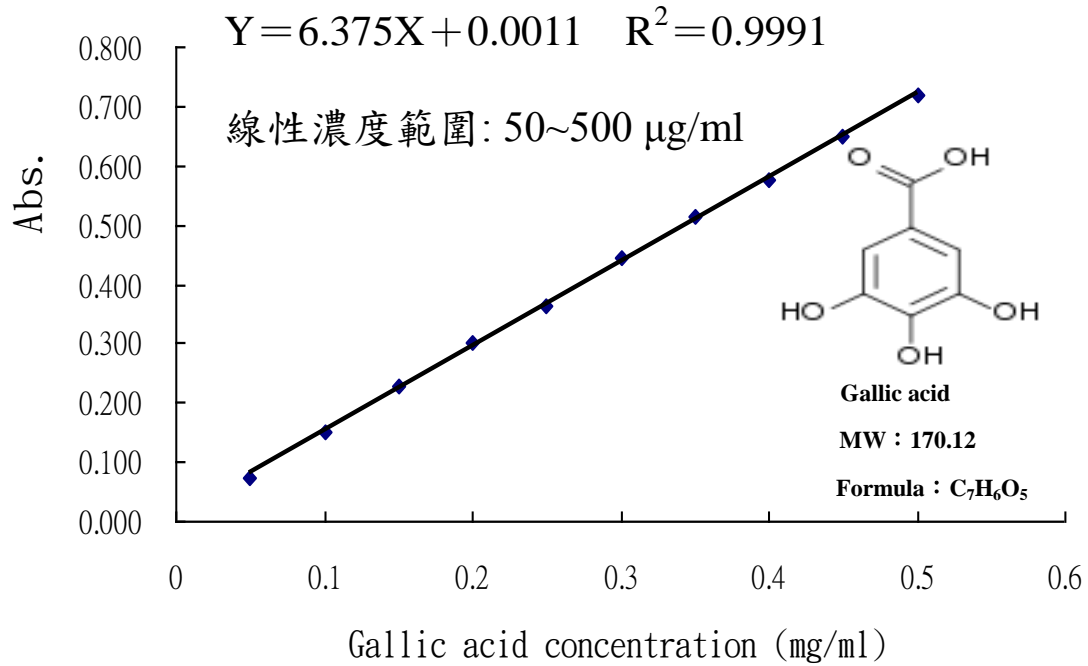
The standard curve of total flavonoids.

### 3-8、總多酚(Total polyphenols)分析步驟

此分析方法則參考吳等(2007)之總多酚分析步驟：將樣品離心 (3500 ×g，20min)後取 0.1mL 上清液，加蒸餾水至 4mL，再加入 1mL 之 Folin-Ciocalteu phenol(1N) reagent 搖勻，最後加入 2.5mL 20% (w/v)碳酸鈉溶液，充分混合後靜置 20 分鐘，以分光光度計測定樣品在 765nm 下之吸光值。

### 3-9、總多酚標準曲線建立

精秤 50 mg 沒食子酸(Gallic acid)標準品，以蒸餾水定容至 100 ml，此為濃度 0.5 mg/ml 沒食子酸標準品母液。自母液中分別精密吸取 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 至 10 ml 定量瓶中，加蒸餾水稀釋至刻度，即可得到不同濃度的沒食子酸標準品(0.05~0.5 mg/ml)。以吸光值 (Y) 對相應濃度 (X) 做標準曲線。

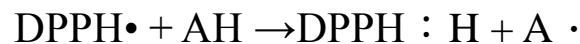


總多酚標準曲線

The standard curve of total polyphenols.

### 3-10、DPPH 自由基清除能力測定(Shimada et al.,1992)

原理： DPPH 自由基為一相當安定的自由基，其甲醇溶液在 517nm 有強吸光值，當自由基被抗氧化物還原或與另一個自由基結合時吸光值會降低或消失，吸光值愈低，表示抗氧化物的供氫能力愈強。



取 5 mL 不同濃度之乙醇溶液，加入新鮮配製 0.2 mM  $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydraz (DPPH) 之甲醇溶液 1 mL，均勻混

合靜置 30 分鐘後，於 517 nm 測其吸光值。吸光值愈低表示清除能力愈強。以【1- (樣品吸光值/未加樣品之控制組吸光值)】 $\times 100$ ，得自由基清除百分率。

## 二、結果

### (一) 微波輔助萃取分析蛻皮甾酮產量之比較

表一 微波輔助萃取 4 種台灣產筋骨草-水及不同乙醇濃度之蛻皮甾酮產量

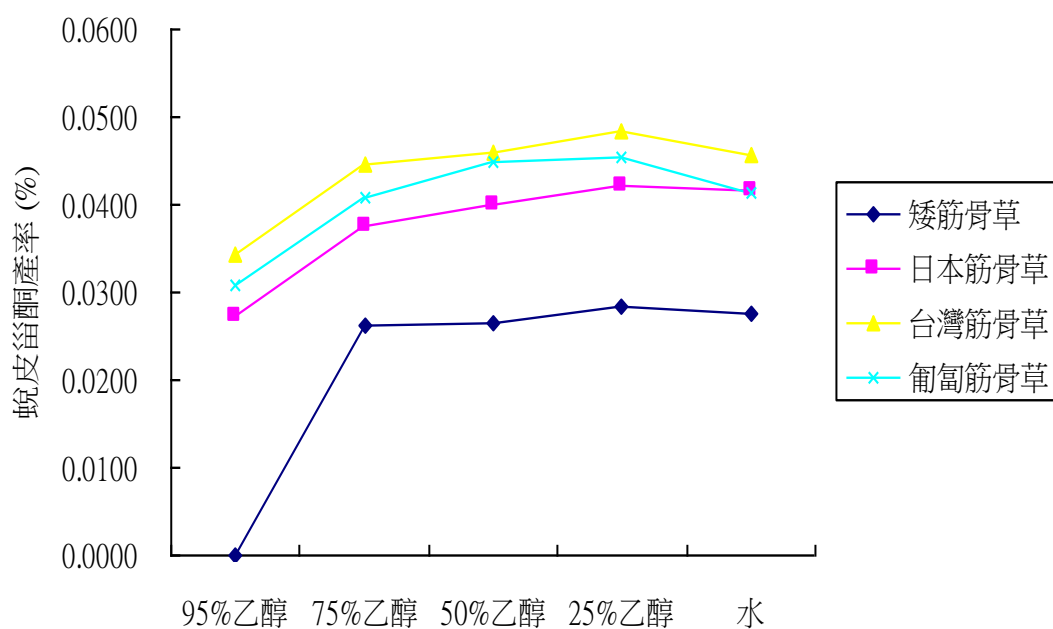
微波輔助萃取	蛻皮甾酮產量 (mg/g)				
	95%乙醇	75%乙醇	50%乙醇	25%乙醇	水
矮筋骨草	-ND-	0.2618	0.2658	0.2850	0.2758
日本筋骨草	0.2724	0.3764	0.4001	0.4205	0.4165
台灣筋骨草	0.3435	0.4475	0.4598	0.4828	0.4555
匍匐筋骨草	0.3082	0.4084	0.4488	0.4532	0.4143

ND= not detectable

表二 微波輔助萃取 4 種台灣產筋骨草-水及不同乙醇濃度  
之蛻皮甾酮產率

微波輔助萃取	蛻皮甾酮產率 (%)				
	95%乙醇	75%乙醇	50%乙醇	25%乙醇	水
矮筋骨草	-ND-	0.0262	0.0266	0.0285	0.0276
日本筋骨草	0.0272	0.0376	0.0400	0.0421	0.0417
台灣筋骨草	0.0343	0.0447	0.0460	0.0483	0.0456
匍匐筋骨草	0.0308	0.0408	0.0449	0.0453	0.0414

ND= not detectable



圖一 微波輔助萃取-水及不同乙醇濃度之蛻皮甾酮產率

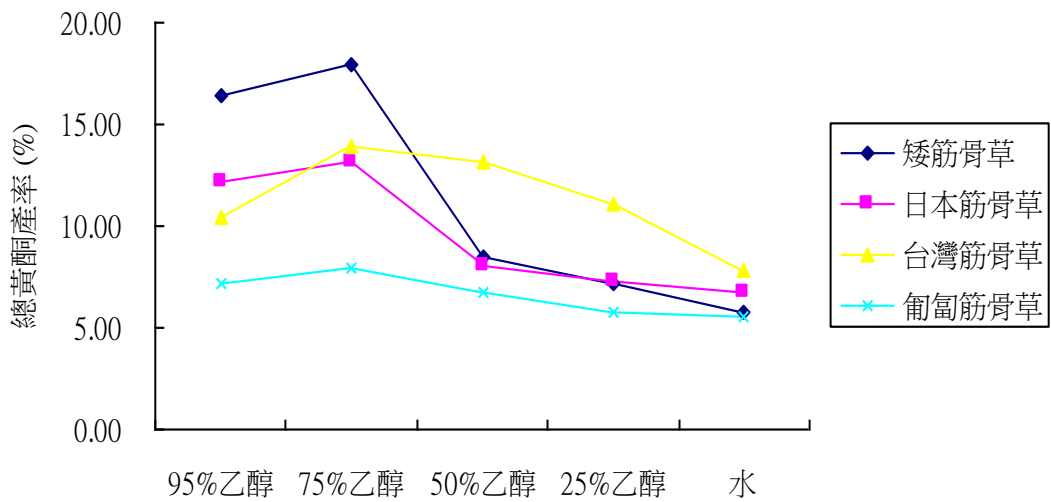
## (二) 微波輔助萃取分析總黃酮產量之比較

表三 微波輔助萃取 4 種台灣產筋骨草-水及不同乙醇濃度  
之總黃酮產量

微波輔助萃取	總黃酮產量 (QE-mg/g)				
	95% 乙醇	75% 乙醇	50% 乙醇	25% 乙醇	水
矮筋骨草	164.41	179.75	84.97	72.01	57.35
日本筋骨草	121.62	131.91	80.10	73.13	67.82
台灣筋骨草	103.85	139.44	131.14	118.03	78.03
匍匐筋骨草	71.85	79.17	67.20	54.90	57.90

表四 微波輔助萃取 4 種台灣產筋骨草-水及不同乙醇濃度  
之總黃酮產率

微波輔助萃取	總黃酮產率 (%)				
	95% 乙醇	75% 乙醇	50% 乙醇	25% 乙醇	水
矮筋骨草	16.44	17.98	8.50	7.20	5.73
日本筋骨草	12.16	13.19	8.01	7.31	6.78
台灣筋骨草	10.39	13.94	13.11	11.80	7.80
匍匐筋骨草	7.19	7.92	6.72	5.79	5.49



圖二 微波輔助萃取-水及不同乙醇濃度之總黃酮產率

### (三) 微波輔助萃取分析總多酚產量之比較

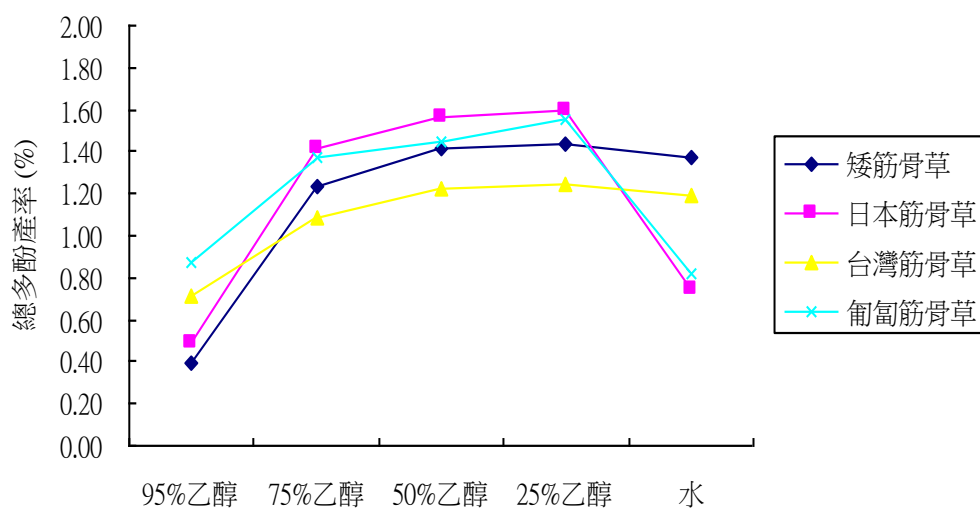
表五 微波輔助萃取 4 種台灣產筋骨草-水及不同乙醇濃度之總多酚產量

微波輔助萃取	總多酚產量 (mg/g)				
	95% 乙醇	75% 乙醇	50% 乙醇	25% 乙醇	水
矮筋骨草	3.91	12.27	14.18	14.45	13.72
日本筋骨草	4.86	14.21	15.60	15.97	7.40
台灣筋骨草	7.14	10.76	12.20	12.41	11.87
匍匐筋骨草	8.69	13.71	14.48	15.50	8.17



表六 微波輔助萃取 4 種台灣產筋骨草-水及不同乙醇濃度  
之總多酚產率

微波輔助萃取	總多酚產率 (%)				
	95% 乙醇	75% 乙醇	50% 乙醇	25% 乙醇	水
矮筋骨草	0.39	1.23	1.42	1.44	1.37
日本筋骨草	0.49	1.42	1.56	1.60	0.74
台灣筋骨草	0.71	1.08	1.22	1.24	1.19
匍匐筋骨草	0.87	1.37	1.45	1.55	0.82



圖三 微波輔助萃取-水及不同乙醇濃度之總多酚產率

#### (四) 微波萃取台灣產筋骨草自由基清除能力

表七 台灣產筋骨草清除自由基能力

微波輔助萃取清除自由基能力	自由基清除百分率(%)				
	95%乙醇	75%乙醇	50%乙醇	25%乙醇	水
矮筋骨草	71.2	71.5	74.5	78.2	74.1
日本筋骨草	77.4	78.1	86.8	89.8	40.3
台灣筋骨草	67.9	80.9	82.8	85.4	70.2
匍匐筋骨草	79.7	79.9	89.4	90.1	84.7

### 三、討論

#### (一) 微波輔助萃取分析蛻皮甾酮產量之比較

微波輔助萃取蛻皮甾酮，實驗結果顯示出，四種筋骨草中微波輔助萃取比較，以 25% 乙醇萃取效果較好(表一)，由於蛻皮甾酮偏向水溶性化合物，另外也顯示蛻皮甾酮可能與 25% 乙醇的極性相近，互溶效果較佳。

在蛻皮甾酮產率上，以台灣筋骨草 25% 乙醇萃取之蛻皮甾 0.0483% 產率最高(表二)。

#### (二) 微波輔助萃取分析總黃酮產量之比較

總黃酮萃取上，本實驗中嘗試以不同乙醇濃度及水來探討，顯示出黃酮類物質也深受乙醇濃度影響，就趨勢上來看(圖二)，隨著乙醇濃度增加總黃酮產量越高，以 75% 乙醇萃取效果較好，但水萃黃酮產率不佳(表三)，此原因在於，75% 乙醇濃度，較接近黃酮苷元的極性性質。

在總黃酮產率上，實驗結果顯示出，四種筋骨草中微波萃取以矮筋骨草 75% 乙醇萃取之總黃酮 17.98% 產率最高(表四)。

### (三) 微波輔助萃取分析總多酚產量之比較

在總多酚萃取上，實驗結果顯示出，四種筋骨草中微波輔助萃取比較，以 25% 乙醇萃取效果較好(表五)，這方面顯示總多酚可能與 25% 乙醇的極性相近，互溶效果較佳。

在總多酚產率上，實驗結果顯示出，四種筋骨草中微波萃取以日本筋骨草 25% 乙醇萃取之總多酚 1.60% 產率最高(表六)，其次為匍匐筋骨草 1.55%，矮筋骨草 1.44%，相較之下台灣筋骨草 1.24% 較不及其他三種。

### (四) 微波萃取台灣產筋骨草自由基清除能力

抗氧化物還原時吸光值會降低，吸光值愈低，表示抗氧化物的供氫能力愈強。以 25% 乙醇微波萃取有較強清除自由基能力。

在不同種台灣產筋骨草抗氧化能力的比較分析下，匍匐筋骨草的自由基清除能力效果最佳，自由基清除率達 90.1% (表七)，其次為日本筋骨草 89.8%，台灣筋骨草 85.4% 相較之下矮筋骨草 78.2% 的抗氧化能力都較不及其它 3 種筋骨草之抗氧化效果。

## 肆、動物細胞抗氧化能力分析

### 一、實驗設計及方法

#### (一) 抗氧化及細胞活性試驗

第一階段實驗設計以不同條件萃取台灣筋骨草之萃取液來處理中國倉鼠細胞株(CHO-K1)，探討其萃取液是否有抗氧化之能力以及是否會對細胞造成毒殺性。

#### 一、細胞培養

將中國倉鼠細胞(CHO-K1 cell)以Ham's F12 medium 培養液培養於5% CO<sub>2</sub> 的37°C的細胞培養箱中。細胞長滿後，將培養液抽乾，先以PBS 溶液清洗細胞，加入2 ml 0.05% trypsin-EDTA，置於37°C，2分鐘後，加入新鮮的培養液將細胞收集，離心1000 rpm，5 分鐘後吸掉培養液，再加入新鮮培養液，將細胞均勻沖散，依實驗目的的不同，將細胞均勻分配到各種大小的培養皿中。

#### 二、藥物處理細胞的方法

每次實驗，細胞都經重新換代養殖，經過24 小時培養

後，先吸除原來的舊培養液，藥物以培養液充分混合，加入細胞培養皿，依各種實驗情況在培養箱中放不同時間。若因藥物作用而懸浮於培養液之細胞仍和固定於培養皿的細胞一起收集分析。

### 三、XTT 反應分析

細胞培養於96-well 的培養皿上，培養液含各種不同濃度之筋骨草萃取成分，經各種時間的培養後，將含藥物的培養液吸除，以一倍濃度的PBS 緩衝液洗滌細胞，加入XTT 試劑，每個50 $\mu$ l，於37 $^{\circ}$ C 培養5 小時，若細胞粒線體的呼吸作用仍在進行，則粒線體內的dehydrogenase 酵素會將XTT 轉化成橙黃色的formazan化合物，細胞越健康，粒線體呼吸作用越旺盛，其dehydrogenase活性越高，則所形成的橙黃色越明顯，再於490 nm的ELISA reader 測定吸光值，互相作比較以決定各種濃度的藥物處理後細胞的活性。

### 四、Flow cytometry 偵測細胞氧自由基、超氧自由基之生成

本實驗欲偵測藥物處理對細胞氧自由基、超氧自由基之生成速率的影響，故於處理時間到達前30 分鐘加入最終濃

度為10mM之DCFH-DA 反應，以模擬細胞自由基生成的動態。細胞以4°C的PBS 洗二次後，加入2 ml 0.1%trypsin-EDTA 置於37°C 5 分鐘後，輕拍培養皿底部，加入5 ml 新鮮的培養液以中和掉trypsin 的作用，以pipet 小心吸放使細胞皆成為單一顆粒，以PBS 清洗並離心1000 rpm一次，再懸浮細胞於1ml PBS 中以FACScan flow cytometer分析氧自由基、超氧自由基之生成。

#### 五、Flow cytometry 偵測細胞穀胱甘(Glutathione)之變化

細胞以4°C的PBS 洗二次後，加入3 ml 0.1% trypsin-EDTA 置於37°C，5分鐘後，輕拍培養皿底部，加入7 ml 新鮮的培養液以中和trypsin的作用，以pipet小心吸放使細胞皆成為單一顆粒，以PBS 清洗並離心1000 rpm二次，使細胞懸浮於1 ml 的PBS，取適量的細胞以hemacytometer計算細胞數目，以PBS 調整細胞濃度為 $10^6$ 個/ml，取出1 ml 的細胞置於離心管，加入最終濃度為50mM之CMF-DA 反應10 分鐘後，以PBS 清洗並離心1000 rpm 一次，再懸浮細胞於1ml PBS中以FACScan flow cytometer分析穀胱甘(Glutathione)之變化。

## (二) 一氧化氮之分析測定

首先將 Raw264.7 細胞培養在 6 well 中( $10^6$  cell/well)，待細胞貼附後加入所需的樣品濃度混合後(0.5 ml/well)，並加入 LPS (2 $\mu$ g/ml)將細胞培養於 5% CO<sub>2</sub>，37°C 培養箱中 24 小時，在吸取 100 $\mu$ l 上清液於 96 well 中，再依序加入 50 $\mu$ l Sulfanilamide (1% Sulfanilamide + 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 及 50 $\mu$ l Ethylenediamine [ 1% N-(1-Naphthyl) Ethylenediamine + 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>]，震盪後避光 10 分鐘，以 ELISA reader( 540nm)偵測其 O.D 值。

## (三) 腫瘤壞死因子之測定

TNF- $\alpha$  主要由巨噬細胞和自然殺手細胞所分泌，可活化上皮細胞，以分泌黏附分子吸引淋巴球至感染部位，並增加上皮細胞通透性，是引起局部發炎感染時的早期發炎反應的重要細胞激素。巨噬細胞株培養液加入筋骨草萃取物及 LPS 分別培養後，收集細胞培養上清液，利用細胞激素 ELISA 套組偵測 TNF- $\alpha$ 。利用 LPS 誘導巨噬細胞 RAW264.7 分泌 TNF- $\alpha$  為陽性對照組；而已知具有抗發炎效用的 NAC 為抑制細胞激素分泌之對照組。



#### **(四) 抑制腫瘤試驗**

第三階段是將腫瘤細胞 HepG2 以及 Hep3B 2.1-7 分別培養於不同營養需求的培養液中，待細胞完全貼附後，加入不同濃度劑量的筋骨草萃取液，經 24 小時培養後，將含藥物的培養液吸除，以一倍濃度的 PBS 緩衝液洗滌細胞，加入 XTT 試劑，每個 50 $\mu$ l，於 37 $^{\circ}$ C 培養 5 小時，利用 ELISA reader 測定吸光值，互相作比較以決定各種濃度的藥物處理後細胞的活性。另外，在不同培養時間(24、48、72 小時)觀察細胞的型態變化並且記錄。

#### **(五) 抗 B 型肝炎檢測試驗**

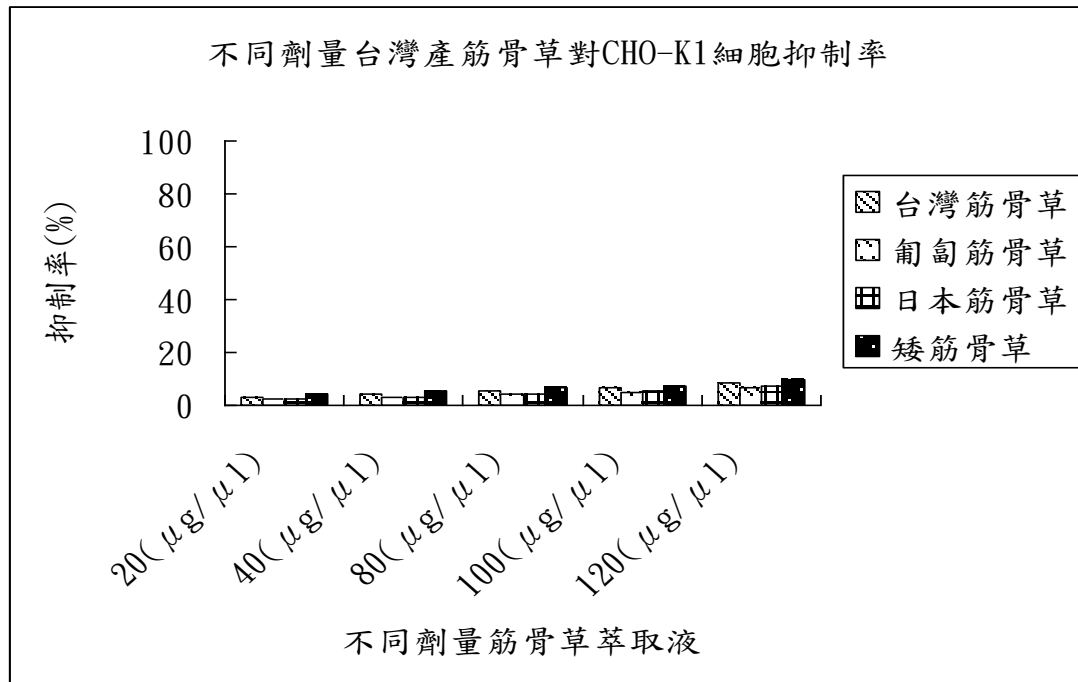
Hep3B 2.1-7 肝癌細胞株會分泌 B 型肝炎病毒的表面抗原。本實驗中利用 URASE B-96(TMB)套組來檢測不同萃取條件下之筋骨草萃取液是否具有抑制 B 型肝炎病毒表面抗原分泌之能力。

## **二、實驗結果**

### **一、台灣產筋骨草萃取液對 CHO-K1 細胞之毒殺能力測試**

首先以不同條件萃取之台灣筋骨草萃取液處理 CHO-K1 細胞，評估其對 CHO-K1 細胞株之影響及效用。利用 XTT 反

應分析得知：當台灣筋骨草萃取液處理CHO-K1細胞後，並不會有明顯抑制細胞生長甚至死亡現象，其細胞存活率大約在90%以上(圖一)。



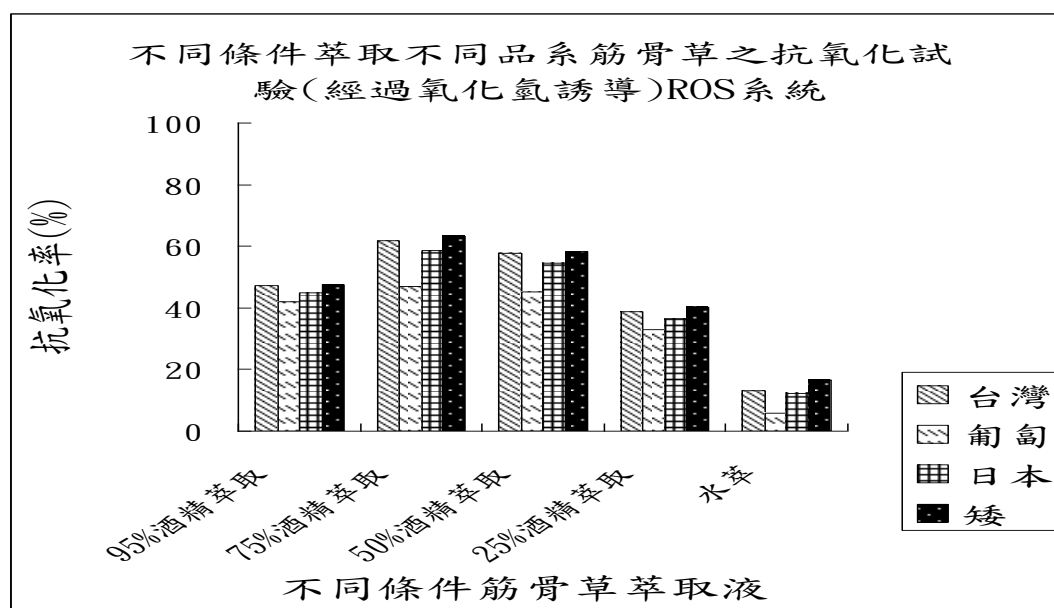
圖一、台灣產筋骨草萃取液對CHO-K1細胞之影響

## 二、台灣產筋骨草萃取液抗氧化能力分析

### (1) 活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)系統

DCFH-DA 為可以穿透細胞之無色染劑，進入細胞後，藉自由基之作用，將結構上雙氫氧基(dihydro group)進行氧化，再由細胞內之脫酯(easterase)將雙醋酸根基(diacetate)去除後，產生具有螢光之染劑 DCF。藉由此原理我們利用流式細胞儀來偵測台灣筋骨草之清除自由基能力。進行藥物處理細

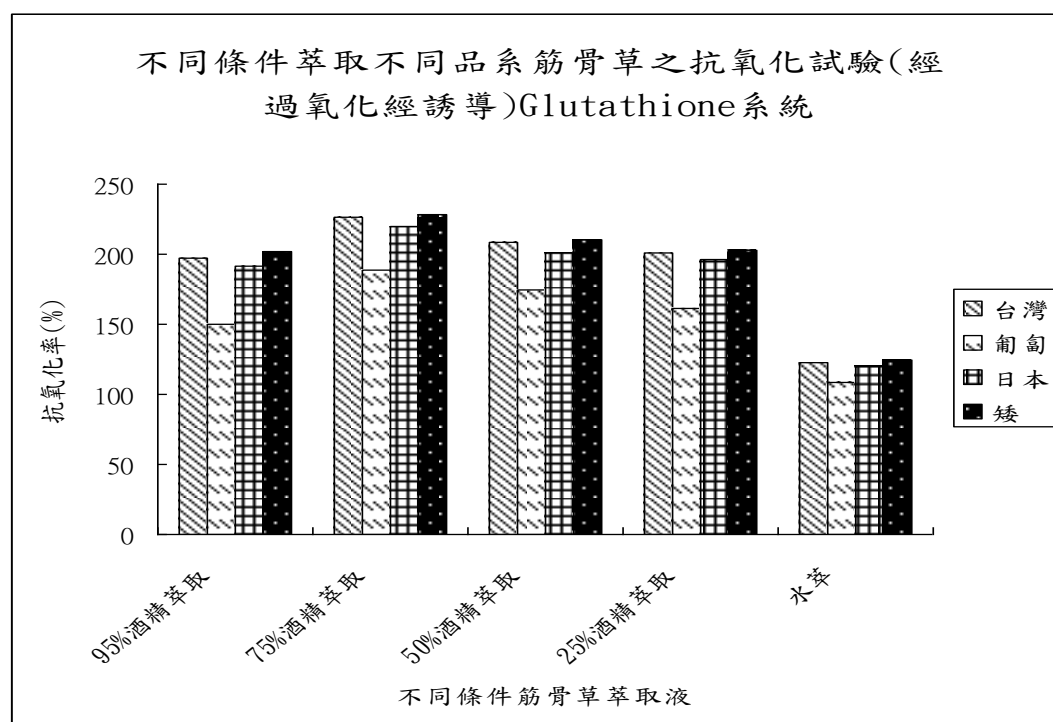
胞之前，必須先將不同濃度  $H_2O_2$  對細胞之影響當作此後誘導濃度的標準。結果發現細胞在高劑量的  $H_2O_2$  誘導時會造成較高的氧化傷害而有死亡現象，因此決定以 0.125M  $H_2O_2$  做為標準誘導濃度。ROS 系統中實驗組分為未經  $H_2O_2$  誘導直接加藥組以及經  $H_2O_2$  誘導再加藥組，結果發現無論是直接加藥或是先經誘導再加入不同萃取條件之不同品系筋骨草，皆以 75% 乙醇萃取液的抗氧化力為最高。而且在不同品系筋骨草之抗氧化力由高到低，分別為：矮筋骨草、台灣筋骨草、日本筋骨草、匍匐筋骨草（圖二）。



圖二、台灣產筋骨草不同萃取條件下之清除ROS能力分析

## (2) 細胞抗氧化物質 glutathione 系統

以 0.125M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 為最佳外源性自由基誘導條件。不同品系台灣產筋骨草萃取液處理細胞後，偵測細胞內 Glutathione 含量。結果發現以 75% 乙醇萃取矮筋骨草萃取液之 Glutathione 含量為最高 (圖三)。



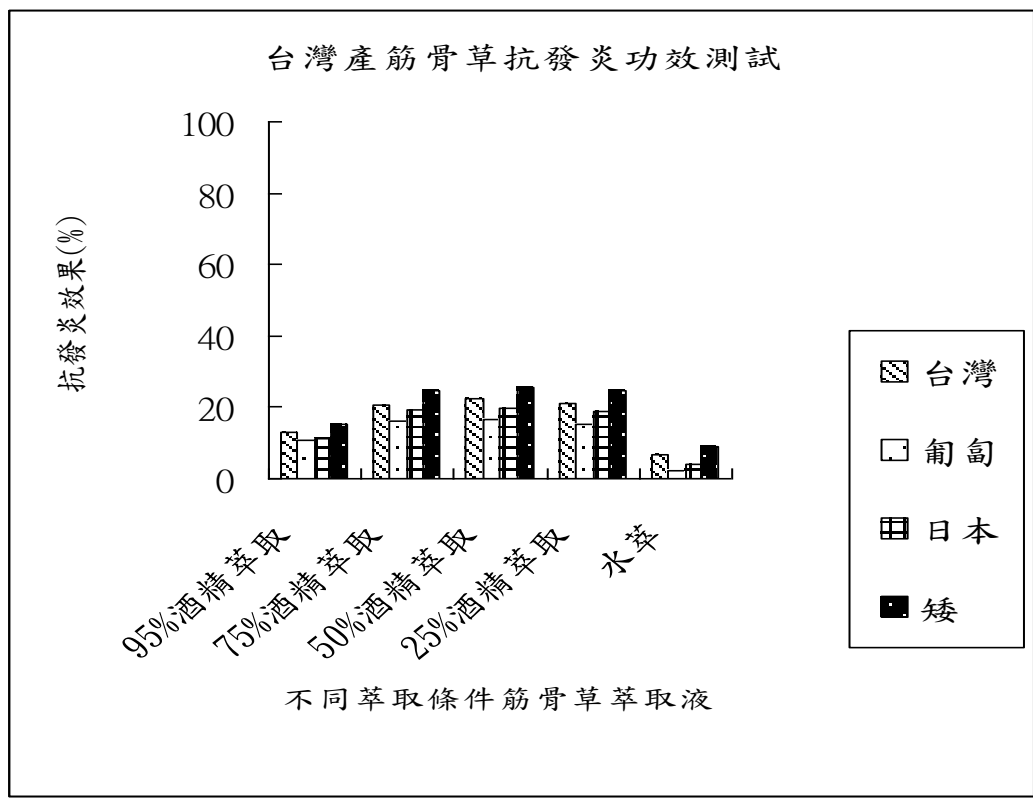
圖三、台灣產筋骨草不同萃取條件下之Glutathione含量。

## 三、台灣產筋骨草萃取液抗發炎能力分析

### (1) 一氧化氮(NO)系統

NO 生成主要是經由一氧化氮合成酵素(NOS)將細胞內之 L-arginine 轉變成為 L-citrulin 及 NO 自由基的釋放。細胞

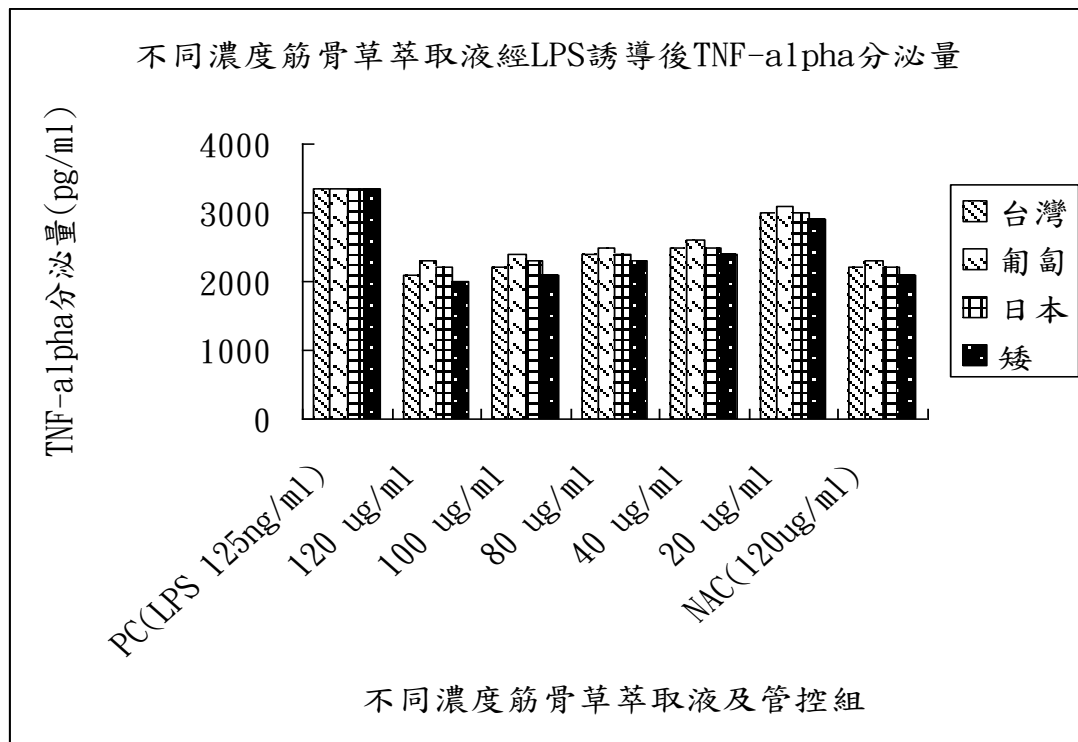
內 NOS 主要分為兩大類；一為結構性 NOS(constitutive NOS; cNOS)，另一種為誘導型 NOS (inducible NOS; iNOS)。cNOS 產生固定量之 NO 為維持體內正常運作之重要訊息傳遞因子，NO 會藉由促使 GDP 轉變為 cGMP，進而誘發一連串之生理反應，包括血管擴張、子宮平滑肌鬆弛及抑制血小板凝集等作用。相反的，iNOS 所誘導出之大量 NO 自由基則會造成細胞的傷害與血管過度的舒張最後造成嚴重的發炎反應以及併發症，如敗血性休克、中風、DNA 受損及突變所造成細胞的癌化。NO 與發炎反應有密切的相關性，為了檢測不同條件萃取之筋骨草萃取液是否具有抗發炎之效果，經由樣品處理及測試結果發現，台灣產筋骨草萃取液皆具有抗發炎的功効，並且在 50% 乙醇萃取條件下之筋骨草萃取液之抗發炎效果為最佳（圖四）。



圖四、台灣產筋骨草不同萃取條件下之抗發炎效果分析

## (2) 腫瘤壞死因子(TNF- $\alpha$ )系統

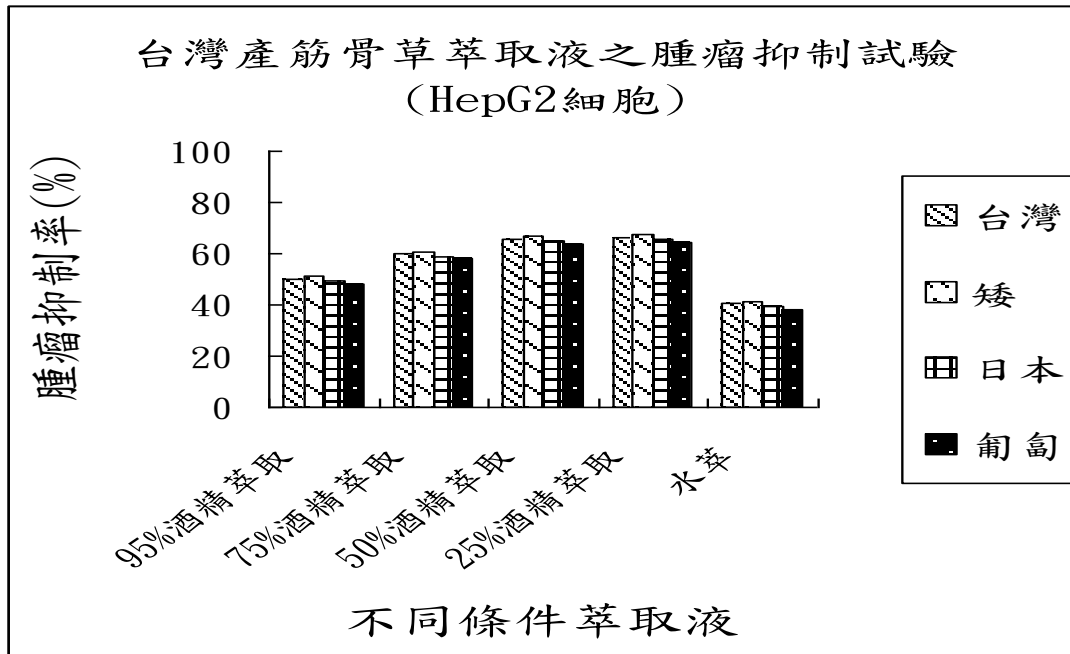
LPS 誘導巨噬細胞RAW264.7 分泌TNF- $\alpha$ 為陽性對照組。分析不同萃取條件之筋骨草萃取液是否會抑制LPS所活化之TNF- $\alpha$ 分泌量，結果發現在120 ug/ml 筋骨草萃取液抑制TNF- $\alpha$ 分泌效果最佳 (圖五)。



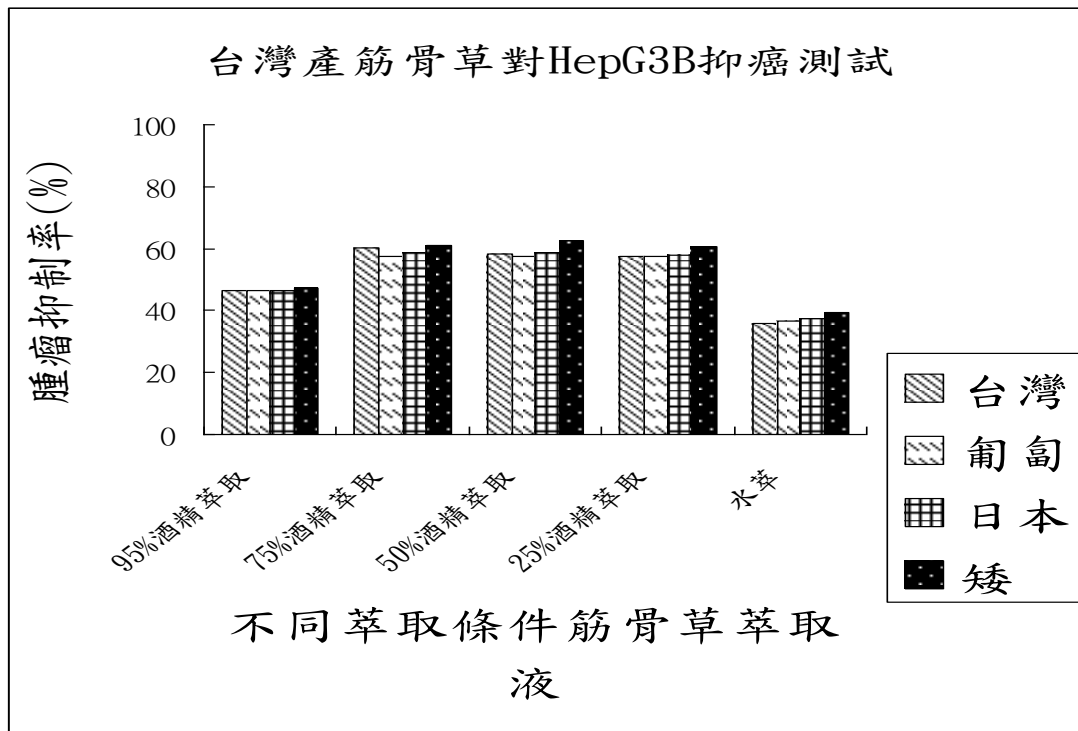
圖五、筋骨草萃取液對巨噬細胞TNF- $\alpha$ 分泌之影響

#### 四、台灣產筋骨草萃取液抑制肝臟腫瘤細胞之功能分析

評估筋骨草萃取液對肝臟腫瘤HepG2及Hep3B 2.1-7細胞之毒殺能力，結果發現筋骨草具有抑制肝癌細胞增生，且毒殺率會依不同的品系筋骨草的作用而有所不同。50%及25%乙醇萃取之筋骨草萃取液作用於肝癌細胞株式具有毒殺效果，毒殺率高達60% (圖六及圖七)。另外，對偏正常的中國倉鼠細胞CHO-K1的影響並不大，其存活率達到90% (圖一)。



圖六、台灣產筋骨草抑制HepG2腫瘤細胞能力

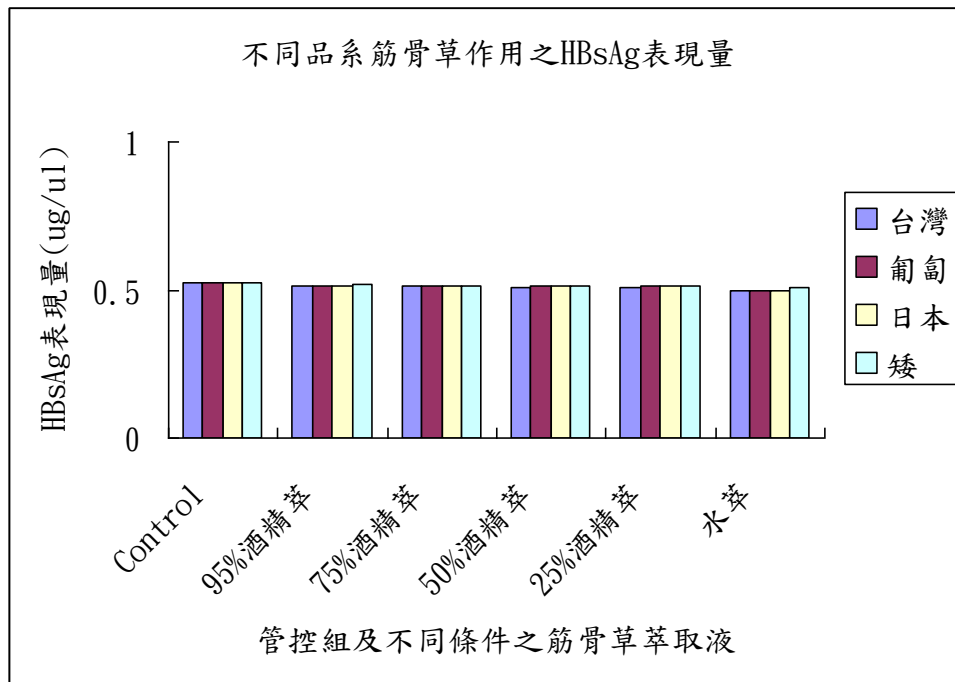


圖七、台灣產筋骨草抑制Hep3B 2.1-7腫瘤細胞能力



## 五、台灣產筋骨草萃取液抑制B型肝炎病毒表面抗原分泌之功能分析

利用 SURASE B-96(TMB) 套組來偵測 B 型肝炎病毒之表面抗原在細胞外的分泌量，藉此分析萃取液抑制 B 型肝炎病毒的效果，結果發現萃取液在微量劑量 $10\mu\text{g/ml}$ 作用下，對於Hep3B 2.1-7細胞不具毒殺效果且對於 B 型肝炎病毒表面抗原的分泌沒有抑制作用。



圖八、台灣產筋骨草抑制B型肝炎病毒表面抗原分泌能力

### 三、討論

一般而言，植物及中草藥成份中具有多酚類(polyphenols)化合物，而且黃酮類(flavonoids)是多酚類常見的具有生物活性成分之一，依據文獻指出在體內試驗及體外試驗的研究不勝枚舉，包含了一些免疫調節、抗發炎、抑癌等生物生理活性試驗。多酚類如(+)-catechin、rutin、gallic acid 等化合物具有抑制linoleic acid 過氧化作用及有效清除自由基DPPH及ROS的能力。依據2008年文獻指出，筋骨草有效成份確實含有黃酮類、多酚類、蛻皮甾酮等，經細胞平台檢測後發現，不同品系筋骨草確實具有抗氧化、抗發炎、抑制腫瘤等功效。然而在抗氧化方面，利用流氏細胞儀檢測後發現，以75%乙醇萃取之筋骨草萃取液的抗氧化功能較為顯著，這有可能是因為以75%乙醇萃取的總黃酮量較高的緣故。另一方面，在抗發炎及抑制腫瘤細胞檢測結果發現，以50%與25%乙醇萃取之筋骨草萃取液效果最明顯，推測這可能與多酚類及蛻皮甾酮的含量較有關係，而且多酚類及蛻皮甾酮屬於水溶性的化合物，有可能在低乙醇溶度及高水溶劑下萃取出來的多酚類及蛻皮甾酮較多而導致其抗發炎及抑制癌細胞作用效果較佳。

## 伍、分析討論

本實驗以不同濃度乙醇及水溶劑進行台灣產筋骨草微波萃取，分析筋骨草中蛻皮甾酮、總酚、總黃酮等成分之含量比較。結果顯示蛻皮甾酮可能與 25% 乙醇的極性相近，互溶效果較佳。黃酮類極性性質與 75% 乙醇濃度相近，因此 75% 乙醇萃取總黃酮效果較好，但水萃黃酮產量不佳。總多酚可能與 25% 乙醇的極性相近，互溶效果較佳。利用化學性自由基清除能力分析，結果顯示以 25% 乙醇微波萃取有較強清除自由基能力。本計劃共同主持人孫芳君老師利用動物細胞分析平台進行台灣產筋骨草萃取液之抗氧化、抗發炎及抗腫瘤等生物活性功能分析。結果發現，75% 乙醇微波萃取之矮筋骨草萃取液其細胞內抗氧化能力最佳，推測因 75% 乙醇微波萃取得到的總黃酮含量較高所致。台灣產筋骨草萃取液皆具有抗發炎的功効，並且在 50% 及 25% 乙醇萃取條件下之筋骨草萃取液之抗發炎效果為最佳，推測與萃取液內總多酚及蛻皮甾酮含量較高有關。50% 及 25% 乙醇萃取之台灣產筋骨草對於肝臟腫瘤細胞具有特異性毒殺效果，推測毒殺肝腫瘤細胞之活性物質為總多酚及蛻皮甾酮。根據以上實驗數據，我們相信台灣產筋骨草極具有潛力開發成為健康食品。未來

將持續利用動物試驗檢測台灣產筋骨草之生物活性，同時研究台灣產筋骨草繁殖方式和種植方法，以提高國內農民收益及促進農業生物科技之發展。

## 陸、參考文獻

- 1.吳立軍。2006。中藥化學。第 1-33 頁。科技圖書館。台北。台灣。李岡榮。
- 2.蕭久富。2007。不同萃取方法對台灣筋骨草及匍匐筋骨草活性成分之比較研究。大葉大學碩士論文。
- 3.張英、韋異和粟暉。2002。超聲提取-反相高效液相色譜法測定牛膝中蛻皮甾酮。光譜實驗室 19(5):668-671。
- 4.陳莉莉、吳紅權、李穎和帥琴。2002。漏蘆中蛻皮甾酮提取方法研究。中藥材 3 (25):195-197。
- 5.蔡旻都和陳皓君。2006。蔬果中類黃酮之抗氧化作用與生物活性。化學 64(3):315-353。
- 6.龍春、高志強、陳鳳鳴和王林。2006。黃酮類化合物的結構-抗氧化活性關係研究進展。重慶文理學院學報(自然科學版)5(2):13-17。
- 7.徐世清、戈志強、戴漩穎、喬洪根、司馬楊虎和鄭必平。2005。20-羥基蛻皮酮的藥理作用和醫學應用研究進展。科技通報 21(1):56-62。

- 8.武繼彪、隋在雲和張玲。2001。β-蛻皮甾酮延緩衰老的初步實驗研究。天然產物研究與開發 13(5):28-29。
- 9.邱明華和邢其毅。1998。具有生理活性的天然有機化合物。化學進展 10 (3):265-272。
- 10.劉斌、石任兵、葛小俠、周瑩和周靜。2001。筋骨草屬植物化學成分與藥理活性。國外醫藥（植物藥分冊） 16 (3):96-101。
- 11.薛聰賢。2003。台灣原生景觀植物圖鑑。第 149 頁。台灣普綠有限公司出版部。彰化。台灣。謝宗欣。1998。台灣筋骨草屬植物介紹。自然保育季刊 21:21-27。
- 12.曾茂貴、賈鈿和吳符火。2003。筋骨草對小鼠 S<sub>180</sub> 肉瘤的抑瘤試驗。福建中醫學院學報 13(2):30-31。
- 13.馬志平和黃榕。2002。筋骨草有效部位黃酮類粗品的保肝試驗。海峽藥學 14(5):40-41。
- 14.褚小蘭和王漢章。1997。筋骨草的本草考証。中藥材 20(11) : 586-587。
- 15.白洁、孫海峰、陳翔飛。2007。4 種中藥體外抗結核分枝杆菌 H<sub>37</sub>RV 的研究。時珍國醫國藥 18 : 1。
- 16.陳小霞、盧偉。2007。福建省三種常用筋骨草屬植物中蛻皮甾酮的含量測定。海峽藥學 19 : 12。
- 17.鄭斌、王存嫦、徐安武。2009。微波輔助提取花生殼黃

- 酮類化合物及其抗氧化性研究。中國油脂 34(3)：54-57。
- 18.王忠合、林泳生。2009。羅勒葉黃酮的提取及其清除自由基的作用。產品加工學刊 3：57-61。
- 19.楊桂福。2009。枇杷葉黃酮對油脂的抗氧化性能研究。黑龍江醫藥 22(2)：150-152。
- 20.顏棟美、姚艾東。2009。金花茶多酚抗氧化性能得研究。河南工業大學學報 30(2)：42-45。
- 21.尹文清、宋鑫明、陳光英、韓長日、紀明慧、李小麗。2009。青梅葉中多酚含量測定及抗氧化活性研究。食品科技 34(5)：282-286。
22. 李晔。2002。蝴蝶蘭(繁殖、生育特性、產期調節及產後品質)。財團法人台灣區花卉發展協會，p205-209。
23. Given, D. R. 1994. Principles and Practice of Plant Conservation. , pp115-143.
24. Blois, M.S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical.
25. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1985. Free Radicals in Biology and Medical. Oxford University Press.
26. Naczki, M. and Shahidi, F. 2004. Extraction and Analysis of phenolics in food (Review). Journal of Chromatography A

1054:95-111.

27. Jacob RA and Burri B. 1996. Oxidative damage and defense. Am J Clin Nutr 63 : 985-90.

28. Bergemdi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M. 1999. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. Life Sci 65 : 1865-74.

29. Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. J. Agric. Food Chem. 40(6): 945-948.

30. Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction : Antioxidative activities of products of browning reaction Prepared from glucosamine. Jpn. J. Nutr. 44: 307-315.

31. Julkunen-Titto, R. 1985. Phenolic constituents in The levels of northern willows : Methods for precursors of clarified apple juice sediment. J. Food Sci. 33 : 254-257.

32 .Chen, Q., Xia, Y.P. and Qiu, Z.Y. 2006. Effect of Ecdysterone on glucose metabolism in vitro. Life Sciences 78(10):1108-1113.

33. Chenni, A., Ait Yahia, D., Boukortt, F.O., Prost , J., Lacaille –Dubois, M.A., Bouchenak, M. 2007. Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high

-cholesterol diet. *Journal of Ethnopharmacology* 109 (2):207-213.

34. Konoshima, T., Takasaki, M., Tokuda, H. and Nishino H. 2000. Cancer chemopreventive activity of an iridoid glycoside, 8-acetylharpagide, from *Ajuga decumbens*. *Cancer Letters* 157(1):87-92.

35. Hilaly El, J., Lyoussi, B., Wibo M. and Morel, N. 2004. Vasorelaxant effect of the aqueous extract of *Ajuga iva* in rat aorta. *Journal of Ethnopharmacology* 93(1):69-74.

36. Kariba, R. M. 2001. Antifungal activity of *Ajuga remota*. *Fitoterapia* 72:77-178.

37. D. Taleb-Senouci, H.Ghomaria, D.Krouf, S.Bouderbala, J.Prost,M.A. Lacaille-Duboisc, M.Bouchenak 2009. Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine* 16 : 623–631.

38. A. Chenni , D. Ait Yahia , F.O. Boukourt , J. Prost ,M.A. Lacaille-Dubois , M. Bouchenak . Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high-cholesterol diet. *Journal of Ethnopharmacology* 109 : 207–213.

39. S. Bouderbalaa, M. Lamri-Senhadjia, J. Prostb, M.A. Lacaille-Duboisc, M. Bouchenaka. Changes in antioxidant



defense status in hypercholesterolemic rats treated with *Ajuga iva*. *Phytomedicine* 15 : 453–461.

40. Yun Shen, Liang Jin, Peng Xiao, Yan Lu, Jinsong Bao. Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight. *Journal of Cereal Science* 49 : 106-111.

41. Mouming Zhao , Bao Yang , Jinshui Wang , Baozhen Li , Yueming Jiang. Identification of the major flavonoids from pericarp tissues of lychee fruit in relation to their antioxidant activities. *Food Chemistry* 98 : 539-544.

42. Pi-Jen Tsai , Shiau-Chi Wu , Yu-Kuei Cheng . Role of polyphenols in antioxidant capacity of napiergrass from different growing seasons. *Food Chemistry* 106 : 27-32.

43. Limaye, P.V., Raghuram, N., Sivakami, S., 2003. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol. Cell. Biochem.* 243, 147–152.

44. Bhor, V.M., Raghuram, N., Sivakami, S., 2004. Oxidative damage and altered antioxidant enzymes activities in the

intestine of streptozotocin-induced diabetic rats. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36, 89–97.

45. Chenni, A., Aityahia, D., Boukortt, F.O., Prost, J., Lacaille-Dubois, M.A., Bouchenak, M., 2007.

Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high-cholesterol diet. *J. Ethnopharmacol.* 109, 207–213.

46. El-Hilaly, J., Lyoussi, B., 2002. Hypoglycemic effect of the lyophilized aqueous extract of *Ajuga iva* in normal and streptozotocin diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 80, 109–113.

47. Lin CC. *Practical pharmacognosy (I) Crude Drug and Free Radical*. Fu-San Publishing Company, Kaohsiung, Taiwan, R.O.C. 1995.

48. Minhajuddin, M., Beg, Z.H., Iqbal, J., 2005. Hypolipidemic and antioxidant properties of tocotrienol rich fraction isolated from rice bran oil in experimentally induced hyperlipidemic rats. *Food Chem. Toxicol.* 43, 747–753

49. Zhu, Y.Z., Huang, S.H., Tan, B.K.H., Sun, J., Whiteman, M., Zhu, Y.C., 2004. Antioxidants in Chinese herbal medicines: a

biochemical perspective. *Nat. Prod. Rep.* 21, 478–489

50. Chenni, A., Ait Yahia, D., Boukortt, F.O., Prost, J., Lacaille-Dubois, M.A., Bouchenak, M. 2007. Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high-cholesterol diet. *Journal of Ethnopharmacology* 109 (2) :207-213.

51 .Adhikari, S., Joshi, R., Patro, B. S., Ghanty, T. K., & Chintalwar, G. J., et al. (2003). Antioxidant activity of bakuchiol: experimental evidences and theoretical treatments on the possible involvement of the terpenoid chain. *Chemical Research in Toxicology*, 16, 1062–1069.

52 .Aviram, M., & Fuhrman, V. (2002). Wine Flavonoids Protect against LDL Oxidation and Atherosclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957, 146–161.

53. Barbieri, S. S, Eligini, S., Brambilla, M., Tremoli, E., & Colli, S. (2003). Reactive oxygen species mediate cyclooxygenase-2 induction during monocyte to macrophage differentiation: critical role of NADPH oxidase. *Cardiovascular Research*, 60, 187–197.

54. Wessner M, Champion B, Girault J-P, Kaouadji M, Saïdi B & Lafont R 1992 Ecdysteroids from *Ajuga iva*. *Phytochemistry* 31 3785–3788.
55. Begum, H.A., M.M. Jan and F. Hussain. 2005. Ethnobotanical studies on some plants of Dehri-julagram Malakand agency, Pakistan. *Int. J. Biol, Biotech.*, 2: 597-602.
55. Mostafa A. Fouad, Sabrin R. M. Ibrahim, Ehab S. Elkhayat, Tatsufumi Okino. Chemical Composition and Hepato-protective activity of *Imperata cylindrica* Beauv, *Pharmacognosy Magazine*, Vol 4, Issue 17, 28-36, Jan-Mar, 2009.
56. Liao SC, Chiu TF, Chen JC, Lin CC (2005) *Ajuga nipponensis* Makino poisoning. *Clin Toxicol (Phila)* 43:583-585.
57. Murakami A, Nakamura Y, Torikai K, Tanaka T, Koshiha T, Koshimizu K, Kuwahara S, Takahashi Y, Ogawa K, Yano M, Tokuda H, Nishino H, Mimaki Y, Sashida Y, Kitanaka S, Ohigashi H. Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor

promotion in mice. *Cancer Res.* 60: 5059-5066, 2000.

58. Riss TL, Moravec RA. Comparison of MTT, XTT, and novel tetrazolium compound for MTS for in vitro proliferation and chemosensitivity assays. *Mol. Biol. Cell.* 3: 184, 1992.

59. Manthey JA, Grohmann K, Guthrie N. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Curr. Med. Chem.* 8: 135-153, 2001.

60. Bauer R 1999. Chemistry, analysis and immunological investigations of Echinacea phytopharmaceuticals. In *Immunomodulatory agents from plants*. H.Wagner, ed. Birkhauser Verlag, Basel, p. 41.

62. Chen HS, Tsai YF, Lin S, Lin CC, Khoo KH, Lin CH and Wong CH, Studies on the immuno-modulating and anti-tumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides. *Bioorg Med Chem* 2004; 12: 5595-5601.

63. Fujimoto, Y., Ohyama, K., Nomura, K., Hyodo, R., Takahashi, K., Yamada, J., Morisaki, M., 2000. Biosynthesis of sterols and ecdysteroids in *Ajuga hairy* roots. *Lipids* 35, 279–288.

64. Ghedira, K., Chemli, R., Richard, B., Zeches, M., Le Men-Olivier, L., 1991. Contribution to the study of the traditional Tunisian pharmacopoeia: study of aerial parts of *Ajuga iva* (L.) Schreb. *Plantes Medicinales et Phytotherapie* 25, 100–111 (in French).
65. Hilaly, J.E., Lyoussi, B., 2002. Hypoglycaemic effect of the lyophilized aqueous extract of *Ajuga iva* in normal and streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 80, 109–113.
66. Ikan, R., Ravid, U., 1971. The isolation and identification of ecdysterone from *Ajuga iva*. *Planta Medica* 20, 33–35.
67. Kariba, R.M., 2001. Antifungal activity of *Ajuga remota*. *Fitoterapia* 72, 177–178.
68. Khafagy, S.M., Sabri, N.N., El-Sebakhy, N., Blessington, B., Asaad, A., 1979. A C-20 ecdysone-like substance from *Ajuga iva*. *Planta Medica* 35, 184–185.
69. Khan, P.M., Ahmad, S., Nawaz, H.R., Ullah, N., Malik, A., 1999. New acetylated quinols from *Ajuga parviflora*. *Fitoterapia* 70, 229–232.

70. Konoshima, T., Takasaki, M., Tokuda, H., Nishino, H., 2000. Cancer Chemo preventive activity of an iridoid glycoside, 8-acetylharpagide, from *Ajuga decumbens*. *Cancer Letters* 157, 87–92.
71. Kubo, I., Klocke, J.A., Asano, S., 1981. Insect ecdysis inhibitors from the East African medicinal plant *Ajuga remota* (Labiatae). *Agricultural and Biological Chemistry* 45, 1925–1927.
72. Kuria, K.A., De Coster, S., Muriuki, G., Masengo, W., Kibwage, I., Hoogmartens, J., Laekeman, G.M., 2001. Antimalarial activity of *Ajuga remota* Benth (Labiatae) and *Caesalpinia volkensii* Harms (Caesalpinaceae): in vitro confirmation of ethnopharmacological use. *Journal of Ethnopharmacology* 74, 141–148.
73. Kuria, K.A., Chepkwony, H., Govaerts, C., Roets, E., Busson, R., De Witte, P., Zupko, I., Hoornaert, G., Quiryne, L., Maes, L., Janssens, L., Hoogmartens, J., Laekeman, G., 2002. The anti plasmodial activity of isolates from *Ajuga remota*. *Journal of Natural Products* 65, 789–793.

74. Kutepova, T.A., Syrov, V.N., Khushbaktova, Z.A., Saatov, Z., 2001. Hypoglycemic activity of the total ecdysteroid extract from *Ajuga turkestanica*. *Khimiko-Farmatsevticheski Zhurnal* 35, 608–609.
75. Litchfield, J.T., Wilcoxon, F., 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 96, 99–113.
76. Malakov, P.Y., Papanov, G.Y., 1998. Areptins A and B, two new neo-clerodane diterpinoids from *Ajuga reptans*. *Phytochemistry* 49, 2443–2447.
77. Nawaz, H.R., Malik, A., Khan, P.M., Ahmed, S., 1999. Ajugin E and F: two withanolides *Ajuga parviflora*. *Phytochemistry* 52, 1357–1369.
78. Odek-Ogunde, M., Rajab, M.S., Migwi, G.J., Ndegwa, J.M., 1993. Blood pressure responses to an extract of *Ajuga remota* in experimentally hypertensive rats. *Planta Medica* 59, 573–574.
79. Sprenger N, Keller F (2000). Allocation of raffinose family oligosaccharides to transport and storage pools in *Ajuga reptans*: the roles of two distinct galactinol synthases. *Plant J.*



21:249-258.

80. Wessner, M., B. Champion, J.P. Girault, N. Kaouaji, B. Saidi, and R. Lafont. 1992. Ecdysteroids from *Ajuga iva*. *Phytochemistry* **31(11)**: 3785-3788.

81. El-Hilaly, J., Hmammouchi, M., Lyoussi, B., 2003. Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (northern Morocco). *Journal of Ethnopharmacology* 86, 149–158.

82. El-Hilaly, J., Israili, Z.H., Lyoussi, B., 2004. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology* 91, 43–50.

83. Yuan R, Lin Y.: Traditional Chinese medicine: an approach to scientific proof and clinical validation. *Pharmacol* 2000; *Therapeutics* 86: 191-198.

84. Beutler B.: TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. *J Invest Medicine* 1998; 43: 227-235.

85. Barnes PJ, Karin M.: Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med.* 1997; 336: 1066-1071.

86. Yang, NS, Wang, JH, and Turner, J.: Molecular strategies for improving cytokine transgene expression in normal and malignant tissues. *Gene Therapy*. 2004; 11:100-108.
87. Nakano A, Watanabe N, Nishizaki Y, Takashimizu S, Matsuzaki S. Immunohistochemical studies on the expression of P-glycoprotein and p53 in relation to histological differentiation and cell proliferation in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2003; 25:158-165.
88. Lee KH, Kim KC, Jung YJ, Ham YH, Jang JJ, Kwon H, Sung YC, Kim SH, Han SK, Kim CM. Induction of apoptosis in p53-deficient human hepatoma cell line by wild-type p53 gene transduction: inhibition by antioxidant. *Mol Cells* 2001; **12**: 17-24.
89. Boussif, F Lezoualc'h, MA Zanta, MD Mergny, D Scherman, B Demeneix, and J Behr A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995 92;7297-7301.