行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

探討抑制人類白血球誘發基質金屬蛋白酵素活化之藥物機轉及其對活體再甦醒性傷害的保護作用之評估 (2/2)

The study of inhibitory mechanisms of anti-leukocyte agents on matrix metalloproteinase activation and evaluate the protective effects on resuscitation injury in vivo (2/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC 92－2320－B038 －016

執行期間： 92 年 08 月 01 日至 93 年 07 月 31 日

計畫主持人：蕭哲志

共同主持人：許準榕

計畫參與人員： 崔巧琪、黃麗曲

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

□赴國外出差或研習心得報告一份

□赴大陸地區出差或研習心得報告一份

□出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

□國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

□涉及專利或其他智慧財產權，□一年□二年後可公開查詢

執行單位：臺北醫學大學藥理學科

中 華 民 國 93 年 10 月 28 日

探討抑制人類白血球誘發基質金屬蛋白酵素活化之藥物機轉及其對活體再甦醒性傷害的保護作用之評估 (2/2)

The study of inhibitory mechanisms of anti-leukocyte agents on matrix metalloproteinase activation and evaluate the protective effects on resuscitation injury in vivo (2/2)

計畫編號：NSC 92－2320－B038 －016

執行期限：92 年 08 月 01 日至 93 年 07 月 31 日

主持人：蕭哲志

共同主持人：許準榕

一、中文摘要

Matrix metalloproteinases 簡稱MMPs，為一群結構類似且含鋅(zinc)金屬離子之蛋白酵素。因MMPs的催化作用需金屬離子加以活化，並且能夠催化分解維持組織結構之細胞外基質蛋白，包括基質與結締纖維組織，故稱之為基質金屬蛋白酵素，而其對於組織之結構重組、修補與破壞都扮演相當重要之角色。在大規模中藥材萃取物及化學合成等藥物之成分篩選實驗中，我們發現在histone deacetylase inhibitor II (HDI II) 及 cinnamophilin，皆具有明顯抑制MMPs活化之作用。在電泳酵素分析法中觀察到HDI II (0.01-5 μM)及cinnamophilin (1-50 μM)確實有意義地依濃度效應抑制對於LPS或MCP-1 誘發人類單核球細胞之MMP-9 活性，此外以細胞存活率測定(MTT assay)發現HDI II及cinnamophilin的抑制作用並非源自細胞之損害。西方點墨法(Western blot)實驗發現在不同刺激下(如LPS或MCP-1) 細胞MMP-9 protein的表現量會隨著HDI II及cinnamophilin濃度的增加而降低，故可證實此兩種藥物作用在MMP-9 蛋白質表現層面。並進一步以RT-PCR的實驗加以分析，發現HDI II及cinnamophilin會抑制MMP-9 mRNA的表現，更深入瞭解細胞轉錄(transcription)之影響程度。同時我們也更進一步探討HDI II及cinnamophilin在訊息傳遞中作用機轉的方式，從實驗結果得知cinnamophilin會明顯抑制由LPS刺激所導致Inhibitor-κB-α (IκB-α)的降解作用，使Nuclear factor-κB (NF-κB)無法進入細胞核中與特定MMP-9 相關的DNA序列接合。在Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)方面，從目前實驗結果得知HDI II 及 cinnamophilin 對於 LPS 誘發 c-Jun-NH_2-terminal kinase (JNK)活化具抑制作用，但對於 extracellular signal-regulated kinases (ERKs)並無直接的影響。HDI II及cinnamophilin對於MCP-1誘發細胞趨化作用具抑制效果。另外，從流式細胞儀的結果發現HDI II及cinnamophilin並不會抑制THP-1 活化後細胞表面CD11b的表現。活體再甦醒性傷害實驗中，的確發現實驗動物依時間關係其肝臟與腎臟功能受損。在目前活體藥物處理下HDI II類似作用藥valproic acid效果不佳，而以抗白血球作用藥YC-1 具部分改善效果。

綜合目前實驗的結果，發現 HDI II 及 cinnamophilin 的確具有抑制 MMP-9 表現之活性，而在 LPS 或 MCP-1 刺激方面其作用機轉可能主要藉由影響 NF-κB 或 JNK 的訊號傳遞過程。未來也將會進行更多相關之實驗及其他活體實驗以瞭解其是否具有抗發炎療效之功能。

關鍵詞: 基質金屬酵素、細胞訊息、再甦醒性傷害

Abstract

Matrix Metalloproteinases (MMPs) are a family of over 20 zinc-containing enzymes that cleave the various components of extracellular matrix. Because the catalytic

ability of MMPs needs to be activated by metal ions, and because they could catalyze and degrade tissue structure maintaining extracellular matrix protein (ECM), including ground substances and connecting fibers, they are named matrix metalloproteinase. Thus, it plays an important role in tissue structure remodeling, repairing and destroys. According to previous experiments, we found that histone deacetylase inhibitor II (HDI II) and cinnamophilin showed obviously inhibitory effect on MMPs activation. We observed that HDI II and cinnamophilin significantly and concentration-dependently inhibit MMP-9 activation induced by LPS and MCP-1 by zymographic method. Also, we found that the inhibitory effect of HDI II and cinnamophilin was not due to impairment of cellular viability by MTT tests.

According to Western blot method, we found that various stimulator-induced expression of MMP-9 protein is concentration-dependent inhibition by HDI II and cinnamophilin. This indicated that these two compounds have effect on the protein expression of MMP-9. By using RT-PCR method, we found that HDI II and cinnamophilin can inhibit the expression of MMP-9 mRNA, thus have deeper influence on the level of MMP-9 transcription. At the same time, we investigated the mechanism of action of HDI II and cinnamophilin in various signaling pathways. We found that cinnamophilin could significantly inhibit the degradation of inhibitor-κB-α (IκB-α) induced by LPS. Therefore, nuclear factor-κB (NF-κB) may not translocate for transcription. Furthermore, in mitogen-activate protein kinases (MAPKs) aspect, HDI II and cinnamophilin showed direct influence on phosphorylated activation of c-Jun-NH_2-terminal kinases (JNK) activation. However, both reagents did not show direct influence on phosphorylated activation of extracellualr signal-regulated kinases (ERKs) activation. Besides, the results of flow cytometry showed that HDI II and cinnamophilin did not inhibit the expression of surface protein, CD11b, on THP-1 cells. In summary, we found that HDI II and cinnamophilin have inhibitory effect on MMP-9 expression, and its main mechanism of action might through NF-κB or MAPK signal pathway on LPS and MCP-1 stimulation. According to the resuscitation injury *in vivo* studies, we found the functions of liver and kidney are graduately decay by the time. Valproic acid as function as HDI II exerted slightly effect, though, anti-leukocyte agent, YC-1 exerted some protective effects. It will be interesting to further investigate its anti-inflammatory therapeutic profile via other related experiments and animal model *in vivo*.

Keywords: Matrix Metalloproteinases, signal transduction, the resuscitation injury

二、緣由與目的

2-1 Matrix metalloproteinases 簡介

2-1-1. Structure and Function

Matrix metalloproteinases 簡稱 MMPs，為一群結構類似且含鋅(zinc ion)金屬離子之蛋白酵素(Kotra et al., 2001)。MMP 的催化作用需金屬離子加以活化，並有催化水解細胞外基質蛋白(extracellular matrix proteins)的能力。且其特有的基因序列可加以區別相近的 MMPs，因而稱之為基質金屬蛋白酵素(Stöcker et al., 1995)。目前已有 28 種 MMPs 被識別出來，並依其只要催化之結締性受質成分被分成五類：gelatinases、stromelysins、membrance-bound enzymes、collagenases 與其它 MMPs，且持續的在增加中(Sternlicht and Werb, 2001)。(A)~(H) 依其功能與結構區分成八類，以茲瞭解 MMPs 序列的相互關係：

(A) Minimal Domain MMPs: MMP-7, 26

(B) Simple Hemopexin Domain-Containing MMPs: MMP-1, 3, 8, 10, 12, 13, 18, 19, 20, 22, 27

(C) Gelatin-binding MMPs: MMP-2 and MMP-9 (which are focused studying in our lab)

(D) Furin-activated Secreted MMPs: MMP-11, MMP28

(E) Transmembrane MMPs: MMP-14, 15, 16, 27

(F) GPI-linked MMPs: MMP-17, MMP-25

(G) Vitronectin-like Insert Linker-less MMPs: MMP-21

(H) Cystein/Proline-Rich IL-1 Receptor-like Domain MMPs: MMP-23

所有的MMPs 都有N-terminal signal sequence (或叫做 “pro” domain)，會在它合成進入ER後被移除掉。大部分的MMPs也因此而被分泌出來。N-terminal sequence可說是target 了MMPs的分泌。然而，MMPs有六個transmembrane domains 並且以細胞表面的酵素被表現。在MMPs的主要結構骨架至少可分為三部分， MMPs的pro domain在pre domain之後，有維持酵素latency的功能，通常被酵素抑制呈不活化狀態。以MMP-7 為例(Gaire et al., 1994)，第一段為signal sequence，第二段為游離的thiol (SH) group peptide，及一段含鋅離子之催化區。Pro domain含有保守的 “systeine switch” sequence和中央的cysteine residue在活化的區域與zinc 結合(Nagase &Woessner, 1999)。在proteolytic cleavage之後，被抑制的區域就會被釋放，而酵素因此而活化。Latent形式的MMPs會在許多不同媒介的作用下被活化(Springman & Harold, 1990; Min, 2002)。例如protease的作用; 形式結構上的破壞與擾亂物(conformational perturbants)如加熱處理; sodium dodecyl sulfate與NaSCN; 重金屬如Au、Hg(II)和organomercurcials; 氧化物如NaOCl; disulfide化合物如氧化的glutathione; sulfhydryl 烷化劑如N-ethylmaleimide (NEM)等等。 有許多的報告表示MMPs的latent form也有自發性的活化功能。 “Cysteine-switch” 的model表現了在活化的區域，Cys-Zn^{2+} 之間的相互作用會短暫的分離 (transient dissociation)。藉由此模式而讓Cys與SH reagents作用。Cys的變形模式接下來便會防止Cys與Zn^{2+}再相互作用，因此，SH基便永久與Zn^{2+}分開，而proMMPs就會autolytically表現propeptide。ProMMPs會藉由上述的物理或化學作用而產生 “cystein-switch”形式。然而，經由APMA或其它SH的作用，化學性的改變在propeptide中的Cys75 而破壞Cys與Zn^{2+}之間的協調，卻不足以活化proMMP-3。proMMPs 經由APMA與SH作用而被活化的精確機轉，目前並不是十分清楚。僅管如此，cysteine-switch的前提闡釋了Cys與Zn^{2+}之間的破壞，對於proMMPs的活化是必須的條件(Woessner, 1999)。

除了 MMP-7 (matrilysin) 、MMP-26(endometase/matrilysin-2) 與MMP-23，所有的 MMPs 都有hemopexin/vitronectin-like domain 並以hinge 或 link region 與催化 domain 連接。Hemopexin domain 會影響 TIMP 與一些特定基質的 binding、也會影響 membrane 的活化與一些 proteolytic 的活性。(Sternlicht, 2001) 。舉例來說，hemopexin-like domain對 MMP-9 在細胞表面的活化與collagenase 的活性表現都是必要的(Mengshol, 2002)。

因為 Gelatinases A 與 B (MMP-2 與MMP-9) 的催化區域中含有三個head-to-tail cystein-rich repeats，而特別被區別出來。這些 inserts 類似 fibronection 的 collagen-binding type II repeats，而需要與 collagen 和 elastin 結合與切除(cleavage) (Murphy.1994; Shipley 1996)。除此之外，MMP-9 為 MMPs sequence 中最常且複雜者 (92 kDa gelatinase B)，在 hinge region 的底部含有獨特的 type V collagen-like inserts，而此 insert 的重要性與功能仍然未知。 Membrane-type 的 MT-MMPs 有single-pass transmembrane domain 與短的cytoplasmic C-terminal tail (如 MMPs 14、15、16 與 24) 或是 C-terminal hydrophobic 的區域 (Itoh. 1999; Kojima, 2000)，以glycophosphatidyl inositol (GPI) membrane-anchoring signal 表現 (如MMP-17 和 MMP-25)。這些 MMPs 的regions 在一些重要的 proteolytic events，到專一性的細胞表面區域的 localizations 上都扮演了不可缺的角色。

MMPs 的其他特徵包括：furin-susceptible site transmembrane

domain 、 cytoplasmic tail 、 glycophosphatidyl inositol-anchoring domain、 cysteine/proline 及 interleukin-1 receptor etc。

MMPs 最初被定義為一群酵素可被金屬螯合劑與內生性抑制劑所抑制，而為活化型可受有機汞所活化；其所能催化水解的細胞外基質蛋白至少一種以上，例如 collagen、elastin、laminin 等。因此其對於組織 modeling、repairing 與 destroying，皆扮演了重要的角色(Woessner et al., 1991)。

MMPs 在生理情況下之內生性抑制劑為 TIMPs (tissue inhibitors of metalloprotinases)，TIMPs 屬於低分子量(20~29kDa) 的蛋白質，主要分泌在細胞表面而與 membrane-bound 的蛋白質相關。它能夠專一性的抑制活化型態的 MMPs (Baker, 2002)。目前已有四種 TIMPs 被發現(如 TIMP-2、TIMP-3 與 TIMP-4 能與 membrane 形式的 MMP-14 結合)，不同的 TIMPs 對於不同的 MMPs 抑制的能力也有差別。每種 TIMP 對於 MMP 的親和力也有所不同(Brew, 2000)，如 TIMP-1 為 MMP-9 的主要抑制劑。TIMPs 對於 MMPs 活性的抑制是為一種相當重要的嚴密調控機制(Curran, 1999)。

在許多病理與生理情況下，MMPs 亦扮演了重要的角色。包括了 embryonic tissue morphogenesis 、 tissue repair 、 angiogenesis atherosclerosis 、 arthritis 、 gastric ulcer、tumor invasion 與 metastasis 等。MMPs 亦與細胞外基質 ECM 分解破壞(extracellular matrix)的 components 息息相關。

一般而言，不同類型之細胞有其特殊分泌之 MMPs。如 HUVEC (人類臍帶代靜脈內皮細胞) ，主要是以 constitutive 分泌的 MMP-2 為主(De Lorenzo et al., 2000)。而活化的人類單核球細胞或巨噬細胞，其分泌主要是以 inducible 的 MMP-9 為主，藉由破壞 base membrane 使單核球滲出至組織 (extravasation) (Lepidi et al., 2001)。

2-1-2. MMPs and Disease

結締組織的完整性依賴於 extracellular matrix 在分解(degradation)與修復(repair)之間的平衡性。而蛋白質水解酵素在 extracellular matrix 的 degradation 上扮演了 rate-limiting 的一員。目前 MMPs 無疑已被認為在 degrade collagen 與其他 extracellar matrix 大分子上扮演了相當重要的角色(Loftus, 2002)。通常 MMPs 會以低濃度的表現量在正常成人體內，而當正常或病理方面的 remodeling process 產生時，MMPs 的量會則會提升。MMPs 與傷口癒合的過程息息相關 (Wysocki, 1993)，但在與 extracellular matrix 的破壞所造成的其它相關疾病上，則有更多的文獻與研究討論。第一個與 MMPs 相關的疾病就是 rheumatoid arthritis (RA)。環繞於關節周圍，由 collagen 所組成的軟骨、骨頭和腱被 MMPs- 特別是 collagenase 所 destructed (Elliott, 2001; Brinckerhoff, 2002)。因此，在 arthritic diseases 方面，MMPs 的抑制劑被認為是一種重要的治療目標 (Mengshol, 2002)。另外 MMPs 還參與了 cell growth、invasion、angiogenesis、atheroma 與 cancer metastasis (Visse, 2003; Chang, 2001; Egeblad, 2002)。MMPs 還可以選擇性的 cleave matrix 的 protein，因此，tumor-expressed-MMPs 便在 ECM 中提供了空間讓 tumor 細胞能通過 basement membrane 進行轉移。MMPs 在 metastasis 的 development 上因而扮演了重要的功能 (McCawley, 2000)。然而，一般而言，在早期 tumor 形成期間，MMPs 的表現量會增高。而在 invasive 與 metastatic 的 tumors 上，又有更高程度與更多的 MMPs 表現。由此可知，幾乎在所有 tumorgenesis 的階段 MMPs 都是需要的。在臨床方面，MMPs 的表現程度可作為許多 tumor type 的 prognostic indicator (Stetler-Stevenson, 1996; Massova, , 1998)。因為 MMPs 參與了多方面性的 tumor 形成 (tumor establishment 、 growth 、 angiogenesis 、 intravasation/extravasion 與 mastasis)，抑制 MMPs 表現的研究在 anti-cancer 上也因而被認為是重要的臨床 implications (Bergers, 1999; Pupa, 2002)。

MMPs 在一些 lung diseases 方面 (Lim, 2003; Kelly, 2003)，也有觀察到 MMP-9 的

量有增高的表現。研究發現，在 asthma 的病人中，inflammatory lung cells 因被刺激而釋放出 MMP-9，經由 cytokines 與 matrix bound growth factors 的調控，MMP-9 進而 modify 細胞的功能。瞭解 MMP-9 在健康與疾病上的角色因而變的相當重要，由於 broad spectrum 與專一性的抑制劑在不久之後，將會從 bench knowledge 轉變成臨床的試驗 (Atkinson, 2003)。

MMPs 被認為與早期粥狀動脈硬化板塊(plaque)的發展有關。Plaque 的形成會引起細胞的 migration 與 proliferation 並逐漸在 extracellular matrix 增加。與 MMP-9 相關的 basement membrane 因此而 degrade，而促使 vascular smooth muscle cell 的 migration 與 proliferation。由 macrophages 所釋放出的 MMPs 所造成的 matrix degradation 被認為是構成在粥狀動脈硬化板塊的不穩定或剝離 (atherosclerotic plaque instability or rupture) 或是動派瘤 (aneurysm) 形成的關鍵。在 atherosclerotic plaque 的過程中，纖維帽的剝離 (fibrous cap rupture) 是觸發 coronary thrombosis 和種種急性 coronary syndromes 的重要因素 (Dzau, 2002; Libby, 2002; Loftus, 2002)。而這兩種源自於 plaque rupture 的病理特徵會造成著 macrophages 密度的增加、collagen 的 loss 並伴隨著 tensile strength 的減少 (Mann, 1996; Chase, 2002)。有學者在人類 atherosclerotic plaque 與一些動物模式的研究中都發現有 MMP-1、MMP-3 與 MMP-9 的大量表現(Loftus, 2002; Henney, 1991; Gails, 1994)。由於 MMPs 活性的大量表現會造成支持性的結締組織 matrix 形成 local destruction，而與 plaque 的剝離息息相關(Zhang, 1999)。因此，藉由抑制 MMPs 由 macrophages 中釋放，便能增進 plaque 的穩定性。

在各種發炎疾病中，MMPs 於疾病過程中扮演了相當重要的角色。而 chemokine MCP-1 與細胞激素如細菌性內毒素 (LPS) 均會刺激或誘導 MMPs 的產生，進而造成結締組織分解，並促使各種不同生理與病理的傷害。

2-1-3 MCP-1 對單核球之作用

MCP-1 是一種單核球細胞的 chemotactic 與活化因子(activating factor，簡稱 MACF)。MCP-1 有 chemoattract 單核球細胞的能力。除此之外，在 in vitro 下，MCP-1 還可以活化單核球細胞 (Mantovani, 1999)，在癌症細胞株使其呈 cytostatic 狀態，使其細胞質的 free calcium 增加，進而造成並釋放出單核球細胞超氧化的陰離子並且釋放單核球細胞 lysosomal 酵素。目前的文獻植指出，在人類單核球細胞中，MCP-1 有調控黏附因子(adhesion molecules)和細胞激素產生表現的能力。並且，MCP-1 還有 chemoattracting、活化並誘導 histamine 從嗜鹼性白血球 (basophils) 中釋放出來。MCP-1 在生物上所扮演的角色，則和發炎與非發炎疾病的狀態有關。其特徵包括了白血球在受傷區域的遷移與積聚 (McQuibban, 2002)、在 artherogenesis 的傷害形成上扮演著重要的角色(Terkeltaub, 1998)、delayed hypersensitivity 與活化單核球細胞中細胞激素的分泌(Reape, 1999) 等等反應。MCP-1 還可與 MIP1-α、RANTES 與 MIP-1β結合。CCL2 (MCP-1) 與 CCL3 (MIP-1α)、CCL5 (RANTES) 屬 CC Chemokines，會激發單核球細胞 MMP-9 的釋放 (Robinson, 2002)。

而 MMP 對於單核球的製造誘發在 cancer、asthma 與 rheumatoid arthritis (RA) 的病理角色都極為重要。先前的研究指出，chemokines 會調控在 peripheral blood lymopocytes 的 MMP-9，而與發炎反應有關的細胞激素如 TNF-α 則會在其他的細胞誘發出 MMP-9；而 chemokine 要激發出 MMP-9 則需有 autocrine TNF-α 的存在。Chemokine 會造成單核球細胞和 THP-1 細胞中 TNF-α mRNA 和蛋白質釋放的量增加。然而，對於 chemokines 在單核球細胞的 MMP 調控機制的瞭解則比較少。在本實驗中，我們對觀察了 MCP-1 對 THP-1 細胞的刺激與作用。

2-1-4 LPS

脂多醣體 Lipopolysaccharide (LPS) 或稱為細菌性內毒素(endotoxin)會誘發人類單核球細胞去表現許多 pro-inflammatory mediators (Guha, 2001;

Netea, 2002)，其中包括了 pro-coagulant 分子 tissue factor (TF) 與細胞激素腫瘤壞死因子 TNF-α。LPS 是最早被發現的內毒素，位於格蘭氏陰性菌 (gram-negative) 的細胞壁上，當細菌溶解時，LPS 會被裂解釋出 (Raetz, 1986)。對於格蘭氏陰性菌 (gram-negative bacteria) 的感染，LPS 可當作是一種發炎反應的主要源頭，而 toll-like receptor 4 (簡稱 TLR4) 則在此現象中有其不可缺少地位(Kiechl, 2002)。人類的單核球細胞對於 LPS 的刺激尤其特別敏感，並反應產生許多發炎性細胞激素。LPS 會與 LPS-binding protein（簡稱 LBP）在 plasma 中結合，並傳送到細胞表面的 CD14 receptor。接下來 LPS 便會被轉換至 transmembrane 的 signaling toll-like receptor 4 與 LTR4 的附加蛋白 MD2 上 (Guha & Mackman, 2001)。LPS 對於單核球與巨噬細胞是一種強有力的激活劑 (O'Connell, 1998)，對於 host 細胞有保護性與傷害性的反應。藉由研究在單核球細胞中 LPS 的分子機制與發炎性基因的調控，也許能夠在許多系統性的發炎反應症狀的治療上，找到新的方法(Guha & Mackman, 2001)。因 LPS 可刺激單核球並釋放 TNF-α，間接誘發 MMP-9 之表現，在本實驗中，我們對觀察了 LPS 對 THP-1 細胞的刺激與作用。

在東方的國家中，藥用性的植物已被廣泛的使用在傳統醫療方面。在大規模藥材萃物及化學合成等成分藥物成分篩選實驗後，我們發現，*Cinnamomum philippinense* 所萃取的天然物 cinnamophilin 和 HDI II (Histone Deacetylase Inhibitor II) 對 MMP-9 有明顯的抑制作用。

2-1-5 Cinnamophilin 的藥理活性

Cinnamophilin ((8R,8')-4,4'-dihydeoxy-3,3'-dimethoxy-7-oxo-8,8'-neo-lignan)，簡稱 MA-1 (Figure 1)，是一種由 *Cinnamomum philippinense* 中所萃取出來的天然物，已被確定有 free radical scavenging capacity (Hsiao, 2001)，並且表現出其特有的抗氧化與保護細胞免於氧化的傷害，而在其他的 in vitro model，其另有抗脂質過氧化反應的能力。

過去的研究發現 (Cheng, 1995; Yu, 1994)，在研究*in vitro* 人類platelet 、隔離的大鼠主動脈、隔離的天竺鼠氣管與*in vivo* 小鼠與天竺鼠的實驗中，cinnamophilin 的藥理性作用除了有抑制 Thromboxane (TX) 合成、阻斷 voltage-dependent鈣離子通道的能力，還有 TXA_2 antagonizing 的作用；cinnamophilin 是為一種選擇性的 TXA_2 的拮抗劑，並且能清楚的表現出抑制TX合成的特徵。因此cinnamophilin被認為是一種novel 的 TX 與TXA_2雙重抑制劑 (dual inhibitor)。TXA_2是一種由血液platelet 的 arachidonic acid (AA) 所產生的主要 cyclo-oxygenase產物。TXA_2 是一種非常有效的platelet aggregator，vasoconstrictor 與bronchoconstrictor。 因此cinnamophilin 被認為在研究與治療與TXA_2 相關的疾病上可視為一項有用的工具。在骨骼肌肉 ischemic 的 model 中 (Cheng, 1995)，cinnamophilin 更能預防進一步的 reperfusion 所造成的傷害。而在另外的一項研究中，(Su, 1999) cinnamophilin 在大鼠心臟中的 ischemia-reperfusion arrhythmia model表現出antiarrhythmic 的能力經由抑制向外流的鉀current和向內流的鈉與鈣current。

2-1-6 Histone Deacetylase Inhibitor HDI II 的藥理活性

Histone deacetylase inhibitor II (m-Carboxycinnamic acid bis-hydroxamide)，簡稱 HDI II (Figure 2)，則被認為是一種有效力的誘導劑，形成 transformed 細胞生長遏止並且造成末端的分化。在人類的 neuroblastoma 細胞中，則會誘發 CD95/CD95 ligand 的表現與 apoptosis。Histone 的 acetylation 在調控 transcription 上扮演著重要的角色。Histone acetylation 的程度是依照 histoneacetyl transferases (HATs) 和 histone deacetylases (HDACs) 這兩種酵素 families 的活性而作調控 (Archer & Kurdistani, 2003)。它是經由控制 chromatin 的結構改變而進而調控 transcription 與 gene 表現。 Histone 是組成 nucleosome 的主要蛋白質成分，histone 與 DNA 相互作用而形成 nucleosomes。

Nucleosomes 包含了緊緊依附在 DNA phosphate backbone 的高 charged hypoacetylated histones，transcription 也因而被抑制。當 histone acetylation 時，這種高 charged 的狀態會被中和，transcription factors、調控因子與 RNA polymerases 才依此途徑去產生開放的 DNA 結構，使 transcription 進行，相關的 gene 也才能產生 (Marks, 2001)。

一般而言，histone 的 actylation 是與 transcription 的 activation 有關; 而 histone deactylation 則與 transcription 的 repression 相關。是否 histone 會 hyperacetylation 或 deacertylation 則被認為是與其專一性的 target gene 有關。如 hydeoxamic acid-based histone deacetylase inhibitos 會限制 tumor 細胞的生長，並會選擇性的作用在 gene 上，去調控大約 2 % tumor 細胞的 gene 表現 (Kramer, 2001)。最近有文獻指出，有許多 malignancies ，特別是 leukemias，與不正常的 histone deacetylases (HDACs) 或是 histone aceyl transferases 如 EP300 的突變有關。最近有新的活體研究發現指出 HDAC 的抑制劑在的治療 cancer 上，與一般抗癌藥物相較，是為更有效的治療目標去對抗難治療的癌症(Batova, 2002)。Histone deacetylase inhibitors 在不同種類的 transformed 細胞中，或是在 tumor-bearing 的動物中，皆能有效的引起生長停滯、分化或是 apoptotic 細胞死亡。目前已有一些 histone deacetylase inhibitors 如 FR901228、oxamflatin，hydroxamic acid-based histone deacetylase inhibitors MS-275 、SAHA pyroxamide 、與 m-carboxy-cinnamic acid bishydroxamate (CBHA-HDI II 的 synonym) 等與 tumor 相關的動物實驗在進行當中(Marks, 2001)。研究指出，CBHA 在有人類 neuroblastoma 異種皮移植的 nude 老鼠中，是為一種非常有效的抗 tumor 生長的抑制劑 (Coffey, 2001)。CBHA、SAHA 與 pyroxamide 皆能有效抑制 tumor 生長，當它們的有效劑量隨著動物體重上升、或是各方面動物屍體的組織研究而增加時，Histone deactylase inhibitors 只會造成微量，或甚至沒有藥毒性的產生。Ailenberg 的研究發現，histone deacetylase inhibitor trichostatin A (TSA) 可以選則性的抑制 3T3 細胞中 gelatinase A 的表現與活化。Gelatinase A mRNA 和 gelatinolytic 的活性都呈現了 dose-related 減少變化。而其他 gelatinase A activating 的複合物如 MT1-MMP 和 TIMP-2 則沒有變化 (Ailenberg, 2001) 。

2-1-7 基因表現之訊息傳遞路徑

Nuclear factor-κB (NF-κB)

Nuclear factor-κB (簡稱 NF-κB)，屬於 transcription factors 家族中的一員。文獻指出，NF-κB 與 Activator protein-1 (AP-1) 的 binding 在人類和兔子的 smooth muscle cells 與 dermal fibroblasts 中能構成 MMP-1、MMP-3 與 MMP-9 的 upregulation (Bond, 2001; Bond, 1999)。而在人類的 macrophages 和兔子的 foam cells 中(Chase, 2002)，同樣觀察到了 NF-κB 與 MMP-1 和 MMP-3 的分泌有關。NF-κB 與許多和發炎反應相關的 genes 表現有關 (Feldmann, 2002)，舉例來說，在 arteriosclerosis lesion 形成的初期(initial phase)，許多在內皮細胞中表現的 proinflammatory genes (如 LPS (O'Connell, 1998)、TNF-α、IL-1 等)與它們 proinflammatory receptors 之間的作用都是 NF-κB dependent。同樣在接下來的 lesion progressing phase 中，有白血球 monocyte 的 infiltrating 作用，將導致這些與發炎反應相關的 genes 表現。而這些 genes 皆是 NF-κB dependent 的(Martin, 2000)。NF-κB 是由 Rel A (p65)、RelB、c-Rel、NF-κ B(p50) 與 NF-κB2 (p52) 所組成。後兩者分別是由 inactive precursor molecule p105 與 p100 所合成。NF-κB 的家族成員還包括了 inhibitory subunits: ĪκBα、IκBβ與IκBε。NF-κB subunits 形成了 homo- 與 heterodimers，而 p65/p50 heterodimer 是最 predominant 的。NF-κB 經由外界的一些 stimuli 與 inflammaroty factors (如 TNF-α、IL-1、LPS、advanced glycation end products (AGEs) 、hyperglycemia、plate-activating factor、sheer stress 等) 刺激之後(Pahl, 1999)，IKKs 會 phosphrylate ĪκB α，並在 polyubiquitinated

與 proteosme 的 complex system 作用下被 degrade 掉。ĪκB α的 degradation 進而使 NF-κ B translocate 到 nucleus 中使一些特定的基因進行 active transcription。

在進來幾年，許多的研究對 NF-κB pathway 在治療上的調節作用(modulation)有有逐漸增加的興趣。由實驗得知，NF-κ B 在治療方面的調控機制包括了基因上的操作(如 Decoy oligodeoxynucleotides (ODN)、ĪκB ˙ mutation、Īκ B gene transfer)到藥理上 NF- κB pathway 中特定步驟的抑制劑如 NSAIDs、proteosine inhibitors、glucocorticoids 等(Zingarelli,2003)。

2-1-8 Mitogen-activated protein kinase (MAPKs)

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 構成了由細胞表面到核內的主要訊息傳遞路徑。這些訊息的傳遞控制了相當複雜的訊息作用程序，並在許多方面調控了 mammalian 細胞的生理作用。其中包括了胚胎發育、細胞的分化、增生與死亡 (Ip, 1998; Chuang, 2000)。另外在短期的變化方面，MAPKs 則與體內平衡與急性賀爾蒙的反應有關 (English, 2002)。MAPKs 屬於 serine-threonine kinase 酵素，主要的 mammalian MAPKs 為 extracelullar signal-regulated kinase (ERK) 、 c-JUN N-terminal kinase (JNK) 與 p38 kinase。MAPKs 會經由 Thr 與 Tyr 的區域磷酸化而產生活性。一種含 MAPK kinase kinase 的 protein kinase 能夠磷酸化和活化一種或多種的 MAPK kinase (MKK)，也因此磷酸化與活化了下游的每一個 MAPK ，進而 translocate 進入細胞核，促使轉錄因子 AP-1 的活化與基因的表現。

一般而言，一些 growth factors 會活化 ERK 的訊息傳遞路徑，在細胞的增生則扮演了決定性的角色 (Hills, 1995)。相反的，基因毒性物與細胞激素會刺激 JNK 與 p38 的訊息傳遞路徑，並傳遞 stress 的反應、生長停頓與 apoptosis。MAPK 在生理上的所表現的複雜性在於對於不同種類的細胞，它能部分性的依其活性的持續期間作用去調控細胞的基因表現。如 ERK 短暫性的活化會導致細胞增生，而持續性的作用則傳達了生長停止或分化的訊息 (Alblas &Yen, 1998)。相對而言，JNK 與 p38 短暫性的誘發則提供了細胞生存的訊息。然而，持續性的活化卻與 apoptosis 的誘發有關 (Guo & Roulston, 1998)。有研究指出，LPS 誘發單核球細胞 MMP-1 的產生是經由 ERK1/2 與 p38 的調控，而對於單核球細胞與初級星細胞 (primary astrocytes) MMP-9 的產生則主要經由 ERK1/2 的訊息傳遞路徑 (Lai & Lee, 2003)。

2-2 實驗目的

在我們的實驗中，以人類單核球細胞 THP-1 為實驗細胞，藉以了解 cinnamophilin 與 HDI-II 等藥物對 MCP-1 與 LPS 所引出或誘發之 MMP-9 蛋白質活性的表現與影響。我們以 Zymography 、Western Blot 與 RT-PCR 等實驗試著了解與觀察 MMP-9 蛋白質與 mRNA 的表現，並以 MTT Assay 觀察細胞存活率的情形。而之後我們探討了之中的藥理作用和機轉等問題，試著進一步的瞭解 cinnamophilin 與 HDI II 在細胞訊息傳遞路徑如 MAPK 或 NF-κB 等機制的影響程度。另外藉由細胞的 migration assay，我們觀察了 MCP-1 所 induce 的細胞 migration 情形。期許能夠藉由 YC-1、cinnamophilin 與 HDI II 類似作用藥 valproic acid 等藥物之研究，對與 MMP 有關的病理反應如出血後再甦醒性傷害，能進一步的評估與瞭解其治療的可能性。

三、結果與討論

3-1 結果

3-1-1. 探討 Cinnamophilin 與 Histone deactylase inhibitor II (HDI II)對人類單核球細胞 (THP-1)以 LPS 或 MCP-1 所誘發的 MMP-9 酵素活性

由之前已建立之刺激物質誘發 MMP-9 活性的表現條件的 gelatine zymography之方法，投與不同濃度之藥物以觀察藥物對 LPS 與 MCP-1 所誘發的 MMP-9 在THP-1 細胞中的影響。我們之前在THP-1 細胞中分別給予不同濃度的 MCP-1 與LPS處理 24 小時後，以gelatine zymography的方法觀察發現以細胞濃度為 1×10^6/ml 時，240 ng/ml 的MCP-1 與 10

ng/ml的LPS能誘發MMP-9 (非MMP-2) 在THP-1 細胞中明顯的表現，之後，依此條件再加以cinnamophilin 或HDI II等藥物。由gelatine zymography的方法發現，隨著cinnamophilin濃度(1 μM、5 μM、10 μM、20 μM、50μM)，或是HDI II (0.05 μM、0.1 μM、0.5 μM、1 μM、2 μM) 濃度的增高，MMP-9 活性的表現呈現逐漸減少而被抑制的現象 (concentration-dependent inhibition)。Cinnamophilin對MCP-1 刺激作用的抑制百分比(In %)分別為 33.8 ±16.1 % (5 μM)，47.3 ±17.7 % (10 μM)，68.5 ± 29.9 % (20 μM)，189.9±16.8 % (50 μM)，其抑制 50 % 反應濃度(IC_{50})為 11.6 ±3.0 μM (n = 3，Figure 3)。另外，cinnamophilin對LPS刺激作用的抑制百分比(In %) 分別為 27.6 ±4.45 % (1 μM)，42.2 ±11.5 % (5 μM)，60.5 ±14.7 % (10 μM)，92.9 ±9.7 % (20 μM)，其抑制 50 % 反應濃度(IC_{50})為 8.1 ±1.5 μM (n=3-4，Figure 5)。而HDI II對MCP-1 刺激作用的抑制百分比(In %)分別為 15.4 ±3.9 % (0.05 μM)，32.5 ±2.4 % (0.1 μM)，61.2 ±9.4 % (0.5 μM)，87.5 ± 12.7 % (1 μM)，其抑制 50 % 反應濃度(IC_{50})為 0.37 ±0.04 μM (n = 3-5，Figure 4)。另一方面，HDI II對LPS刺激作用的抑制百分比(In %) 分別為 23.4 ±7.9 % (0.05 M)，38.0±8.7 % (0.1 M)，63.1 ±15.9 % (0.5 μM)，92.8 ±14.1 % (1 μM)，其抑制 50 % 反應濃度(IC_{50})為 0.43 ±0.16 μM (n = 3-4，Figure 6)。無論是LPS或是MCP-1在THP-1 細胞中所誘發之MMP-9 皆能被cinnamophilin 或HDI II等藥物隨濃度上升而呈現活性減少之反應，此為一種concentration-dependent inhibition。

3-1-2.探討藥物對細胞存活率的影響

為了證明cinnamophilin與HDI II等藥物對於THP-1 細胞中MMP-9 活性的抑制並非引起細胞減少或死亡，而導致MMP-9的活性減少，我們使用了MTT assay的方式。將 1×10^6/ml的細胞種在 24 well中，以cinnamophilin (10 μM、20 μM、50 μM)或HDI II (1 μM、5 μM)處理 22 小時候，再加入MTT試劑處理細胞 2 小時。存活細胞的粒腺體內的酵素會將MTT試劑還原成formazan紫色結晶。之後再加入DMSO溶解結晶以 550 nm測其吸光值，細胞之存活率與resting組比較之後以百分比表示(Figure 7)。我們發現cinnamophilin 在 20 μM (69.3 ±12.7 %) 及 50 μM (81.5 ±8.0 %) 時對細胞的存活率有些許的影響，但在統計上並不具又意義。HDI II在 1 μM (89 ± 11.2 %) 時對細胞的存活率沒有影響，但在濃度增至 5 M (85 ±5.9 %) 時，約影響了 15 % 的細胞存活。

3-1-3.探討 Cinnamophilin 與 HDI II 對 MMP-9 酵素本生活性之影響

在直接將 cinnamophilin 與 HDI II 加入 reacting buffer 中培養，再依照 gelatin zymography 步驟染色所得知結果 (Figure 8)，我們觀察到藥物的投與並不會對 LPS 刺激下的 lytic bands 產生抑制的作用，表示出藥物對於 MMP-9 本生的酵素活性不是直接的抑制作用，而是經由抑制 MMP-9 蛋白質的表現而與細胞內的轉錄作用相關，或藉由影響訊息傳遞路徑如 NF-κB 或 MAPK 等訊息傳遞而對 MMP-9 產生影響與抑制作用。

3-1-4. 探討 Cinnamophilin 或 Histone deactylase inhibitor II (HDI II)對 THP-1 細胞以 LPS 所誘發的 MMP-9 蛋白質表現之作用

由之前的實驗結果得知，cinnamophilin 或 Histone deactylase inhibitor II (HDI II) 能抑制在人類單核球細胞 (THP-1) 中，LPS 或是 MCP-1 所誘發的 MMP-9 酵素活性，並由 MTT assay 證明了 MMP-9 的活性抑制並非源由藥物所影起之細胞毒性作用。 欲瞭解 Cinnamophilin 與 HDI II 對 MMP-9 的抑制是否藉由減少其蛋白質的表現，我們使用了 Western Blot 來分析 cinnamophilin 與 HDI II 對 MMP-9 蛋白質的表現的影響。我們將 THP-1 細胞處理並培養 24 後，取得其萃取物(cell lysate)。由 Figure 9 與 Figure 10 可觀察到，在有外在 LPS 的刺激之下，細胞萃取物有大量被 LPS 誘發出來的 MMP-9 蛋白質表現(lane 1，resting)。反之，在沒有外在刺激劑時(lane 2)，細胞萃取物只有非常微量 MMP-9 蛋白質的表現。在投與不同濃度的

cinnamophilin (1 μM、5 μM、10 μM、20 μM)，或是 HDI II (0.1 μM、0.5 μM、1 μM、2 μM) 時，由 lane 3 至 lane 6 可以觀察到 MMP-9 蛋白質的表現隨藥物濃度逐漸增高，而呈現逐漸減少的情況。Figure 9-cinnamophilin 在 LPS 刺激作用下，relative MMP-9 的表現為: 1 (Resting)，2.28 ±0.18 (Vehicle)，1.93 ±0.06 (1 μM)，1.76 ±0.1 (5 μM)，0.73 ±0.08 (10 μM)，0.65 ±0.06 (20 μM)。Cinnamophilin 對 LPS 刺激作用的抑制百分比(In %) 分別為 26.3 ±6.1 % (1 μM)，40.3 ±5.6 % (5 μM)，96.6 ±25.1 % (10 μM)，104.9 ±23.1 % (20 μM)。Figure 10 顯示 HDI II 在 LPS 刺激作用下，relative MMP-9 的表現為: 1 (Resting)，2.46 ±0.32 (Vehicle)，1.61 ±0.13 (0.1 μM)，0.71 ±0.08 (0.5 μM)，0.56 ±0.04 (1 μM)，0.5 ±0.06 (2 μM)。對 LPS 刺激作用的抑制百分比(In %) 分別為 39 ±10.2 % (0.1 μM)，70.2 ±5.4 % (0.5 μM)，75.6 ±7.2 % (1 μM)，92 ±21.3 % (2 μM)。Cinnamophilin 與 HDI II 這兩種藥物接皆能對在 THP-1 細胞中，LPS 所誘發之 MMP-9 的蛋白質產生 concentration-dependent 的抑制作用。

3-1-5. 探討 Cinnamophilin 與 Histone deactylase inhibitor II (HDI II) 對 THP-1 細胞以 LPS 所誘發釋放 TIMP-1 蛋白質之作用

在組織中，TIMP-1 對於MMPs是最主要的內生性調控者與活性抑制劑 (Nagase, 1998)，目前已知的TIMPs (TIMP-1 至 4) 有四種。每種TIMPs對於MMPs的親和力與抑制力都不盡相同，TIMP-1 便為MMP-9 的主要內生性抑制劑 (Brew, 2000)。為了觀察與瞭解MMP-9 表現量的減少是否與其內生性的抑制因子TIMP-1 有關，我們取實驗所得之上清液 (supernatant) 並使用了Human TIMP-1 ELISA system 來測其 TIMP-1 的變化。由Figure 11 與 12 中可以觀察到，在沒有外界的刺激之下 (Resting)，以每 10^6的細胞為單位，便可偵測到些許程度TIMP-1 的蛋白質表現(分別為 84.4 ±14.8 與 77.8 ±12.9 pg/10^6 cells)。在經LPS刺激後，TIMP-1 的量由Figure 11 可觀察到有一些上升的情形(109.5 ±21.7 pg/10^6 cells)，但在統計上並無明顯的差異。而在經MCP-1 刺激的組別中(Figure 12)，TIMP-1 雖有些微的下降(72.2±8.3 pg/10^6 cells)，但與Resting幾乎沒有明顯的差異。在分別加以藥物處理後 (cinnamophilin 1 μM、20 μM; HDI II 0.5 μM、2 μM)，藥物對於LPS刺激下TIMP-1 蛋白質的表現皆無明顯的影響：cinnamophilin 1 μM (105.1 ±9.2 pg/10^6 cells)、20 μM (102.5 ±12.6 pg/10^6 cells) ; HDI II 0.5 μM (105.7 ±2.4 pg/10^6 cells)、2 μM (97.5 ±7.6 pg/10^6 cells)。而在MCP-1 的刺激之下，同樣投與相同條件的藥物濃度(cinnamophilin 1 μM、20 μM; HDI II 0.5 μM、2 μM)，我們可以觀察到較低濃度(1 μM) 的 cinnamophilin 似乎會減少些許 TIMP-1 蛋白的表現 (59.9 ±6.4 pg/10^6 cells)，但在統計上並無意義。而在有 20 μM cinnamophilin (76.7 ±15.9 pg/10^6 cells) 與 HDI II 0.5 μM (78.5 ±11.3 pg/10^6 cells)、2 M (73.4 ±17.9 pg/10^6 cells) 存在時，對於MCP-1 刺激下TIMP-1 蛋白質的表現在統計上仍無明顯的影響。本實驗所有的數值皆為三次獨立實驗後的平均值。

3-1-6. 探討 Cinnamophilin 與 Histone deactylase inhibitor II (HDI II)在單核球細胞 (THP-1)以 LPS 所誘發的 MMP-9 mRNA 之影響

細胞內 mRNA 的表現是經由 RNA 萃取之後，以 reverse transcriptase reaction (RT-PCR) 的方法完成。使用 MMP-9 與 GAPDH 的專一性 primers 進行 MMP-9 與 GAPDH 之 cDNA 產物，再以 1 % 的 agarose gel 的電泳分析。House-keeping gene，GAPDH 在此為 internal control。由 Figure 13 與 14 中，我們可觀察到 MMP-9 mRNA 程度經由 LPS 的誘發而上升(lane 2)。而在給予藥物之後(lane 3 與 lane 4)，mRNA 量的表現就會被藥物所抑制，並表現出 concentration-dependent inhibition 的現象。 Figure 13 顯示 cinnamophilin 在 LPS 刺激作用下，relative MMP-9 mRNA 的表現為: 1 (Resting)，1.55 ±0.11 (Vehicle)，1.36 ±0.17 (5 μM)，1.07 ±0.06 (20 μM)，而 cinnamophilin 對 LPS 刺激作用的抑制百

分比(In %) 分別為 31.8 ±6.1 % (5 μM)，63.8 ±4.2 % (20 μM)。Figure 14: HDI II 在 LPS 刺激作用下，relative MMP-9 mRNA 的表現為: 1 (Resting)，1.50 ± 0.15 (Vehicle)，1.21 ±0.07 (0.5 μM)，0.89 ±0.1 (2 μM); HDI II 對 LPS 刺激作用的抑制百分比(In %)為 34.7 ±10.8 % (0.5 μM)，當藥物濃度在與 2 μM (lane 3)時，到達了近乎 100 % (97.6 ±24.1 %) 的 mRNA 抑制作用。

3-1-7. 探討 Cinnamophilin 與 Histone deactylase inhibitor II (HDI II)對 THP-1 細胞以 LPS 誘發 IκB-α之降解作用

單核球細胞(monocyte)的吞噬細胞(phagocytes)在免疫與發炎相關的反應作用上扮演了不可缺的重要角色。基於細菌的脂多醣體 lipopolysaccharide (LPS)會誘導單核球細胞經由活化轉錄因子 NF-κB/Rel，而進而表現許多與發炎反應有關的基因 (O'Connell, 1998; Martin, 2000)，我們利用了觀察 NF-κB 的抑制因子(inhibitory subunit)，IκB-α，在 Western blot 中蛋白質量的表現情形，來瞭解藥物對於 IκB-ά磷酸化的分解作用與在 NF-κB 的訊息路徑上所扮演的任務。我們首先觀察 LPS 在不同之時間點對 IκB-ά蛋白質表現所造成之引響。由 Figure 15 中，我們觀察到當由 LPS 刺激 90 分鐘時所取得之細胞 lysate (lane 4)，IκB-ά的表現呈現明顯的降解作用，隨後又回到了 basal level 基準值(lane 5，120 min ; lane 6，180 min)。而在其他時間點的 IκB-ά表現(lane 2，30 min ; lane 3，60 min)，則與 Resting 組無異。我們接下來便以 90 分鐘為 LPS 刺激的基準，分別投與不同濃度之藥物 (Cinnamophilin 10 μM、20 μM 與 HDI II 2 μM、5 μM)。若將 Resting 設為 100 % 的 basal level (Figure 16)，在 LPS 刺激之後，relative IκB-ά的蛋白質含量降低為 80.3 ± 7.8 %，我們觀察到隨著 cinnamophilin 濃度的上升，IκB-ά也逐漸回升到與 Resting 相當的含量: 98.3 ±4 .1 % (10 μM)，118.2 ±9.2 % (20 μM)。而此現象在 Figure 17 中，在 LPS 刺激之後，relative IκB-α的蛋白質含量降低為 67.4 ±1.2 %，但在給予 HDI II 之後，relative IκB-ά 的含量反因藥物濃度的增加而呈現減少的狀況: lane 3, 68.4 ±4.3 % (2 μM); lane 4, 53.1 ±2.3 % (20 μM)。根據由 Figure 16 所關察到的情形，我們可以推斷 cinnamophilin 可能會經由抑制 IκB-ά蛋白質的 degradation 而進一步的減少 NF-κB translocate 至細胞核內的作用。也因此，一些與發炎反應相關的基因也無法經由 NF-κB 的活化而進行運作。LPS 誘導出來的 MMP-9 也因此被抑制而無法表現。而 HDI II 對抑制 IκB-ά蛋白質的 degradation 作用並不明顯，則需進一步的加以探討。

3-1-8. 探討 Cinnamophilin 與 Histone deactylase inhibitor II (HDI II)對 THP-1 細胞以 LPS 誘發 p65 之影響

在使用TransAM™ NF-κB p65 NF- κB p50 Transcription Factor Assay kits之前，我們先使用Western blot的方式來觀察採用 NE-PER™ nuclear and cytoplasmic extraction reagents kit抽出之THP-1 核內物質中，p65 的蛋白質是否會受到藥物的抑制。由 Figure 18 中可以觀察到 cinnamophilin (lane 3: 20 μM) 能抑制在人類單核球細胞 (THP-1) 核內，LPS所誘發的p65 蛋白質表現 (lane 2, Vehicle)，但 Histone deactylase inhibitor II (HDI II) 則無此抑制作用(lane 4: 2 μM)，反而呈現出加強 p65 蛋白質的表現。2,2,5,7,8-Pentamethyl-6-hydroxychromane (PMC) 在 10 μM 時，對於NF-κB 是一種非常強效的抑制劑 (Suzuki, 1993)，因此我們使用PMC (lane 5: 10 μM) 來當作 control。可發現PMC對 LPS所誘發的p65 蛋白質表現有明顯的抑制作用。而HDI II 會加強p65 蛋白質的表現可能是由於正向回饋的的作用。

3-1-9. 探討 Cinnamophilin 與 Histone deactylase inhibitor II (HDI II)對 THP-1 以 LPS 誘發釋放 ERK、JNK 等 MAPKs 之活化作用

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 構成了由細胞表面到核內的主要訊息傳遞路徑。由於主要的 mammalian MAPKs 為 extracelullar signal-regulated

kinase (ERK)、c-JUN N-terminal kinase (JNK)，而 ERK 與 JNK 易受細胞激素的影響而被活化。我們利用了觀察 JNK 與 ERK 在 Western blot 中蛋白質量的表現情形，來瞭解 LPS 是否經由 JNK 或 ERK 等訊息路徑而誘發 MMP-9 的表現，並觀察藥物在其中所扮演的角色。我們首先觀察 LPS 在不同之時間點對 JNK 或 ERK 蛋白質表現所造成之引響，發現在 15 分鐘時，JNK 蛋白質的表現最為明顯，而 ERK 則無顯著的變化 (data not shown)。之後我們便以 15 分鐘為 LPS 刺激之基準，由 Figure 19 中，我們觀察到在分別投與不同濃度之藥物 cinnamophilin 20 M (lane 3) 與 HDI II 2 M (lane 4) 之後，relative JNK 的表現為: 1 (Resting)，1.63 ±0.12 (Vehicle)，1.22 ± 0.02 (cinnamophilin 20 μM)，0.89 ±0.02 (HDI II 2 μM)。Cinnamophilin 對於 LPS 刺激作用的抑制百分比(In %)為 58.7 ±13.6 %，而 HDI II 對 LPS 刺激作用的抑制百分比(In %)則為 100.6 ±9.4 % 。由於在投與藥物之後，ERK 蛋白質的表現作用沒有明顯的改變(Figure 20)，因此，LPS 誘導出來的 MMP-9 可能經由 JNK 的訊息傳遞路徑。我們可以推斷 HDI II 可能會經由抑制 JNK蛋白質的表現再進一步的抑制轉錄因子 AP-1 的活化與 MMP-9 的表現，而 cinnamophilin 對於 JNK 蛋白質的抑制作用則不如 HDI II 顯著。

3-1-10.探討藥物對 MCP-1 誘導人類單核球細胞 (THP-1) 進行 migration 之影響

當有病理性發炎反應產生時，單核球細胞 (monocyte) 會遷移到 vascular subendothelium 中，而這種 migration 作用在 atherosclerosis 與 rheumatoid arthritis 中皆扮演了非常重要的角色(Falcone, 2001; Kintscher, 2000; Zhu, 1999)。穿越內皮細胞的的單核球 migration 作用是一種多階段性的機轉，最先會經由內皮細胞上細胞激素所調控的黏附因子(adhesion molecules)與循環中的單核球(circulating monocyte)的黏附作用。而後，黏附的單核球便會朝向特定的 chemokines (chemotaxis) 移動穿越毗連的內皮細胞，再經過 basement membrane 到受傷發炎的組織中，此時便需要 MMPs 的作用去分解細胞外的基質(如 basal laminae 與 interstitial stroma)而使單核球移入組織中(Ebnet & Jordan, 1999)。而 C-C chemokine MCP-1，對於單核球細胞的 migration，便是一種強效的趨化作用劑 (chemoattractant)。由於 MCP-1 能夠調控單核球細胞的活化與遷移作用(Zhu, 1999)，我們的實驗便在觀察藥物對 MCP-1 所誘發之 THP-1 細胞 migration 的情形，是否有所影響。經過六個小時之後，由 Figure 21 與 Figure 22 (100X)中可觀察到，在沒有 MCP-1 作用下，幾乎沒有 THP-1 細胞 migrate 到 lower chamber 中(lane 1: 2.4 ± 0.4 cells，n = 4)，MCP-1(100 ng/ml) 激發了約 34.84 倍的誘發反應(lane 2: 82.8 ± 24.4 cells，n = 4，$p < 0.05$)。若給予 50 ng/ml 的 MCP-1，則觀察到對 THP-1 細胞的 migration 約有 21.89 倍的誘發反應(52 ± 17.8 cells，n =2，data not shown)。MCP-1 所誘發的 THP-1 細胞的 migration 反應，會隨著 cinnamophilin 濃度的增加而被減弱。可觀察到 Figure 21 中，lane 3: 35 ±12.9 cells，n = 4 (5 μM) 與 lane 4: 9.8 ±6.3 cells，n = 4 (20 μM)。而隨著 HDI II 濃度 (Figure 22: lane 3)的增加雖呈現上升的現象，但仍對 MCP-1 所誘發的 THP-1 細胞的 migration 反應有抑制的作用：18.7 ±4.5 cells，n = 4 (0.5 μM) 與 lane 4: 52.2 ±17.7 cells，n = 4 (2 μM)。若延長作用時間為九小時，在 100X 下觀察到為 24.5 ±11.5 cells (Resting)，166.8±21.8 cells (MCP-1: 100 ng/ml)，158 ±3 cells (cinnamophilin 5 μM)，61 ±6 cells (cinnamophilin 20 μM)，129.5 ±14.5 cells (HDI II 0.5 μM)，97.3 ± 8.3 cells (cinnamophilin 20 μM) 。MCP-1 所誘發的 THP-1 細胞的 migration 反應，皆會隨著藥物濃度的增加有被減弱的表現 (n=2，data not shown)。

3-1-11. 探討藥物對 THP-1 細胞表面 CD11b 表現之影響

為了測定 LPS 調控單核球 THP-1 細胞表面 integrin CD11b 的功能， 與觀察藥物在此所扮演的角色，我們先將 THP-1 細胞處理過 LPS 與藥物後，以流式細胞儀計算細胞表面 integrin CD11b 的變化情形。由

Figure 23 中可以觀察到在 LPS 存在下，細胞表面 CD11b 的表現呈現有意義的增加 (lane 2: 1.31 ±0.1 folds，$p<0.05$，n = 4)。Cinnamophilin (20 μM)與 HDI II (2 μM)會些許提升 CD11b 的表現 (lane 3: 1.48 ± 0.06 folds，n = 4; lane 4: 1.34 ±0.07 folds，n = 4)，而 5 μM的 HDI II 則能抑制 LPS 誘發的 CD11b 表現(lane 5: 1.1 ±0.04 folds，n = 2)。但與 lane 2 相比，藥物的給予對 CD11b 蛋白質的表現在統計上並無意義。

3-1-12.探討在 THP-1 細胞中 MCP-1 與 LPS 對於 MMP-9 的產生和內生性的 TNF-α之關係

過去的文獻曾指出，在單核球細胞中，tumor necrosis factor-α (TNF-α) 與tumor 所促進產生MMP-9 有關。給予TNF-α的抗體會抑制MMP-9 的生成、TNF-α mRNA 的合成與proMMP-9 蛋白質的釋放(Leber, 1998)。過去的研究曾指出，在單核球與巨噬細胞中，LPS對於TNF-α的生成是一種強效的誘發劑。在THP-1 與PBMCs中，LPS 皆會誘導非常顯著的TNF-α生成 Mangalam & Haversen, 2001)。而Stephen 的研究指出， chemokine如MCP-1 要激發出 MMP-9 的表現是需有 autocrine 或 endogenous 的 TNF-α 存在 (Stephen, 2002)。由於上述的種種研究顯示了TNF-α對於MMP-9 在表現上重要性，我們取實驗所得之上清液 (supernatant) 並使用了 Human TNF- ELISA system測其TNF-α的變化。由Figure 24 與 25 中可以觀察到，在沒有LPS的刺激之下(Resting)，以每 10^6的細胞為單位，便可偵測到些許程度 TNF-α的蛋白質表現 (17.3 ±10.3 pg/10^6 cells)。在經LPS (10 ng/ml) 刺激後，可觀察TNF-α的量有一些上升的情形(26.2 ± 3.1 pg/10^6 cells，n = 3)，但在統計上並無明顯的差異。相對的，在高濃度 100 ng/ml 的LPS刺激之下，TNF-α的量則有明顯上升的情形(57.1±10 pg/10^6 cells，$p<0.05$，n = 2) 。而在經MCP-1 刺激的組別中(Figure 26、27)，TNF-α的量與Resting (29.6 ±5.3 pg/10^6 cells，n = 3) 相比雖有些許上升 (42.8 ±8.3 pg/10^6 cells，n = 3)，但在統計上沒有明顯的差異。在分別加以藥物處理後(cinnamophilin 1、5、20 μM)，藥物對於LPS刺激下細胞之TNF-α蛋白質皆呈現顯著的上升：Cinnamophilin 1 μM (62.7±5.5 pg/10^6 cells，n =3，$p<0.05$)、5 μM (83.2± 9.7 pg/10^6 cells， n =3，$p <0.005$) 、20 μM (71.2 ±2.5 pg/10^6 cells，n =3，$p<0.001$) 。在Figure 25 中，HDI II對於在LPS刺激下TNF-α蛋白質的表現皆無明顯的影響：HDI II 0.5 μM (42 ±6.1 pg/10^6 cells，n =3)、1 μM (44.4 ±6.9 pg/10^6 cells，n =3)、2 μM (32.3 ±12.8 pg/10^6 cells，n =3)。而在MCP-1 的刺激之下(Figure 26、27)，同樣投與相同條件的物濃度(cinnamophilin 1、20 μM; HDI II 0.5、2 μM)，我們可以觀察到在MCP-1 刺激下TNF-α蛋白質的表現在cinnamophilin為 20 μM時97.9 ±29.7 pg/10^6 cells，n =3)，比cinnamophilin為 1 μM時49.6 ±2.6 pg/10^6 cells，n =3) 多，但與Vehicle 相比在統計上皆無明顯的差異。較高濃度 2 μM的HDI II (52.4 ±15.5 pg/10^6 cells, n =3) 與 0.5 μM的HDI II (69.3 ±12.5 pg/10^6 cells，n =3) 相比似乎能減少些許TNF-α蛋白的表現，在統計上卻無明顯的差異。藥物與MCP-1 同時存在時，當與Resting相較，可以觀察到對TNF-α蛋白質的表現似乎有加強的效果。我們的結果表示了LPS與MCP-1 雖能些略使TNF-α蛋白質表現量上升，但與Resting相比在統計上卻無有意義的差別。而藥物的作用並不是藉由影響內生性TNF-α而對MMP-9 產生抑制作用。

3-1-13.探討在出血後再甦醒性傷害中 MMP 抑制藥物之研究

由血壓之變化(Figure 28)、腎臟功能 (Figure 29-30)與肝臟功能(Figur 31-32)評估顯示大鼠出血後再甦醒性傷害為多重器官損傷。Anti-leukocyte agents 如 YC-1 (10 mg/kg)與 HDI II 類似作用藥 valproic acid (150 mg/kg)等藥物，雖對 MMP 有所部分影響，但對出血後再甦醒性傷害作用僅部分之作用(劑量或 PK 問題)，仍須進一步探討。

3-2 討論

白血球(leukocyte)滲入(extravasation)與浸潤(infiltration)作用到受傷或是有發炎反應的區域是一種複雜且多步驟的連鎖過

程。白血球對於內皮細胞產生的附著作用(adhesion)導致了一連串滾動(rolling)、loose 與 firm adhesion 再經由vessel wall 與basement membrane 遷移(migration) 滲入到extracellular matrix 中。白血球的extravasation 與 migration 等作用必須要有分解基質的酵素，特別是matrix metalloptoinases (MMP)存在，才能讓白血球穿越 basement membrane，到達組織的基質中(Lindhout, 1999; Ebnet, 1999; Baggiolini, 1998)。這種白血球的 migration 作用在 atherslerotic lesion、thrombosis 的產生與 rheumatoid arthritis 中皆扮演了非常重要的角色(Chase, 2002; Falcone, 2001; kintscher, 2000; Zhu, 1999)。而因為Gelatinases MMP-2 與MMP-9 屬於第四型的collagenases (Type IV collagenases)，能degrade basement membrane 的蛋白質，在這個作用機制中便有其專一性的重要性 (Overall, 2001)。C-C chemokine MCP-1對於單核球細胞的migration是一種強效化學趨化作用劑(chemoattractant)，chemokines可以調控MMP-9 在peripheral blood lymphocytes中的表現 (Johnatty, 1997) 與發炎性細胞激素如TNF-α的生成(Leber, 1998)，然而在 monocyte 中chemokines 如何調控MMP的表現，目前目前所知的卻不多(Robinson, 2002); 而LPS則和許多發炎等疾病息息相關，我們的實驗中，使用了白血球中的單核球細胞THP-1 來觀察在有外在LPS、MCP-1 與TNF-α (data snot shown)的刺激之下，THP-1 所產生MMP-9 反應與在有給予cinnamophilin 與 HDI II 等藥物之下，藥物對MMP-9 所產生的抑制作用。Cinnamophilin 是一種由 *Cinnamomum philippinense* 中所粹取出來的天然物，具有free radical scavenging capacity (Hsiao, 2001)，並且表現出其特有的抗氧化與保護細胞免於氧化的傷害，在研究與治療與TXA_2 相關的疾病上被視為有用的工具。在骨骼肌肉ischaemic 的model中(Cheng, 1995)，cinnamophilin 更能預防進一步的reperfusion 所造成的傷害。而histone deacetylase inhibitor trichostatin A (TSA)可擇選則性的抑制 3T3 細胞中gelatinase A 的表現與活化。另外，histone deacetylase (HDAC) inhibitors 在不同種類的transformed 細胞中，或是在tumor-bearing的動物中，皆能有效的引起生長停滯、分化或是apoptotic 細胞死亡。HDAC的抑制劑在治療cancer上，與一般抗癌藥物相較，是為更有效的治療目標去對抗難治療的癌症(Batova, 2002)。在參考許多學者對於 cinnamophilin 與 histone deacetylase inhibitor 文獻之後，使我們對於這兩種藥物在發炎性反應和MMP-9 的作用上產生了興趣。由zymography的分析可以發現，cinnamophilin或HDI II 能抑制在人類單核球細胞 (THP-1)中，LPS或是MCP-1 所誘發的MMP-9 酵素活性。在LPS (10 ng/ml)的刺激之下，cinnamophilin與HDI II對於MMP-9 的抑制 50 % 反應濃度(IC_{50})為 8.11 ±1.52 μM (n=3-4) 與 0.43 ±0.16 μM (n = 3-4)。而在MCP-1 (240 ng/ml)的刺激之下，cinnamophilin 與HDI II對於MMP-9 的抑制 50 % 反應濃度(IC_{50})為 11.63 ± 3.04 μM (n = 3) 與 0.37 ±0.04 μM (n = 3-5)。無論是LPS或是MCP-1 在THP-1 細胞中所誘發之 MMP-9 皆能被cinnamophilin 或HDI II等藥物隨濃度上升而呈現活性減少之反應，而呈現出concentration-dependent 的抑制作用。

為了證明cinnamophilin與HDI II等藥物對於 THP-1 細胞中 MMP-9 活性的抑制並非引起細胞減少或死亡，我們使用了MTT assay 來觀察。高濃度的cinnamophilin (50 μM)並不會影響細胞的存活率，但 HDI II 到達 2 μM 時，則對細胞的存活率有些許影響。我們可觀察到藥物對於 MMP-9 本生的酵素活性不是直接的抑制作用。

經由 Western blot 分析，cinnamophilin或 Histone deacetylase inhibitor II (HDI II)能抑制在人類單核球細胞 (THP-1)中，LPS 所誘發的 MMP-9 蛋白質表現。Cinnamophilin 與HDI II對MMP-9的抑制是藉由減少其蛋白質的表現，而這兩種藥物皆能對在 THP-1 細胞中，LPS 所誘發之MMP-9 的蛋白質產生concentration-dependent 的抑制作用。經由

TIMP-1 ELISA 的分析，我們可以發現藥物對於 MMP-9 表現量的減少與其內生性的抑制因子 TIMP-1 並不相關。而 RT-PCR 的實驗結果表示出 cinnamophilin 與 HDI II 能夠 concentration-dependent 的抑制由 LPS 所誘發的 MMP-9 mRNA 的產生。由以上的實驗結果，我們可以推論 cinnamophilin 與 HDI II 的抑制作用在發生在 MMP-9 transcription 的 upstream。

許多常見的 inducible MMPs (MMPs 1、3、9 與 13) 含有 activator protein 1 (AP-1) 轉錄因子結合區域(binding site) 在它們近側的 promoters 上，並需要經由細胞激素的作用(如 TNF-α、IL-1)而被誘發。AP-1 因子是由 Fos 與 Jun 蛋白所組成的 heterodimers，這些蛋白質會經由 mitogen-actived protinse kinase (MAPKs)的訊息傳遞路徑而被合成與活化(Firestein, 1999)。在許多組織細胞實驗，藉由阻隔 MAPKs 的路徑便能有效的抑制 MMPs 基因的表現，而在動物模式中抑制 arthritis 的形成(Mengshol, 2002)。Nuclear factor κB (NF-κB) 的訊息傳遞路徑在對於 MMPs 的抑制上提供了另一個有效的目標。這條訊息傳遞路徑控制了許多誘發性的發炎基因與 MMPs 的表現。在接下來的實驗中，我們便對 NF-κB 與 MAPKs kinase 等訊息傳遞路徑加以討論。藉由針對這些訊息傳遞路徑的研究，進接便能鑑別出藥物對於調控 MMPs 合成的可能目標。我們利用了觀察 NF-κB 的抑制因子(inhibitory subunit)，IκB-α，在 Western blot 中蛋白質量的表現情形，來瞭解藥物對於 IκB-α磷酸化的分解作用與在 NF-κB 的訊息路徑上所扮演的角色。發現 LPS 刺激 90 分鐘時所取得之細胞 lysate，IκB-α 的表現呈現明顯的降解作用。以 90 分鐘為 LPS 刺激的基準，分別投與不同濃度之藥物後，可觀查到 cinnamophilin 能抑制在 THP-1 中，LPS 所引發的 IκB-α degradation，而 HDI II 對此作用則較不明顯。目前在癌症的治療上，histone acetylation 調控機制的研究被認為是可行的治療對策。過去的研究曾指出，在 *in vitro* 模式中，給予細胞 histone deacetylse inhibitors 如 butyric acid 或 trichostatin (TSA)，細胞會呈現 apoptosis、生長停頓、分化與基因表現改變的情形，指示出 hyperacetylation 與 carcinogenesis 之間的關連性(Archer, 1999)。而 HDAC inhibitors 是如何調控這整個機轉目前並不是非常瞭解 (Kramer, 2001; Mayo, 2003)。若排除藥物毒性的影響，hydroxamic acid-based HDAC inhibitors 如 TSA 與 suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)，會選則性的作用在基因上，在細胞中進而去改變只有約 2 % 的基因表現 (Ailenberg, 2001; Marks & Kramer, 2001; Archer, 1999)。SAHA 會增加調控 tumor 的基因而進一步的表現其 antitumor 的作用。並且在 *in vitro* 與 *in vivo* model 中，SHAH 能減少 proinflammatory cytokines 的產生(Leoni, 2002)，給予小鼠單一口服計量的 SAHA (10-50 mg/kg, *per os*) 能夠 dose-independently 的減少由 LPS 所誘發的 TNF-α、IL-1β、L-6 與 IFN-γ 等細胞激素。而 TSA 能夠 dose-related 的減少與抑制 fibroblast 3T3 細胞中，gelatinase A mRNA 與 gelatinolytic 的活性 (Ailenberg, 2001)。而在 STO 細胞(mice embryonic fibroblasts)中，亦可觀察到相似的結果。因此，有學者認為可藉由監控與研究 gelatinase A 的表現程度，而當作早期階段的生物參數來監測 TSA 在臨床試驗上的功效。若從結晶學上的研究發現去解釋，HDAC 屬於一種包含了 zinc 在其催化區域的金屬蛋白(Finnin, 1999)。一旦 hydroxate 如 TSA 與 zinc 結合，便能抑制住催化區域的活性而抑制 MMPs 的活性。然而 TSA 與 HDI II 的作用都是經由抑制 MMPs (gelatinse A 與 gelatinase B)的 mRNA。因此，對於疾病或癌症的早期治療可能有其功效。Histone deacetylase inhibitor II 與 TSA 同屬於 hydroxamic acid-based HDAC inhibitors (Marks, 2001) ，是否可能藉由基因的改變，而對 gelatinase B，MMP-9 mRNA 與 gelatinolytic 的活性產生抑制，則需進一步的研究。我們結果發現，cinnamophilin 可能會經由抑制 IκB-α蛋白質的 degradation 而進一步的減少 NF- B translocate 至細胞核內的作用。雖曾有文獻指出 LPS 所誘發單核球細胞中 MMP-9

的生成，主要是經由 ERK 1/2 這條訊息傳遞路徑(Lai, 2003)，但在 THP-1 細胞中，以我們的實驗結果觀察，LPS 所誘發 MMP-9 蛋白質的表現作用，可能經由 JNK 的訊息傳遞路徑。我們可以推斷 cinnamophilin 與 HDI II 可能會經由抑制 JNK 蛋白質的表現而進一步的抑制轉錄因子 AP-1 的活化與 MMP-9 基因的表現，而並非經由訊息傳遞路徑 ERK 與 p38 (data not shown)等 MAPKs pathways。

當組織受傷或是有發炎反應產生時，白血球(leukocyte)會滲入(extravasation)與浸潤(infiltration)到受傷或是有發炎反應的區域，其中需要 MMPs 的作用去分解細胞外的基質(如 basal laminae 與 interstitial stroma)而使單核球移入組織中(Ebnet & Jordan, 1999)。由於 MCP-1 對於單核球細胞的 migration，便是一種強效的趨向作用劑(chemoattractant)，能夠調控單核球細胞的活化與遷移作用(Zhu, 1999)，而與這種複雜且多步驟的連鎖過程息息相關。我們觀察藥物對 MCP-1 所誘發之 THP-1 細胞 migration 的情形。在 migration 實驗中可觀察到，MCP-1 (100 ng/ml) 加強了約 34.84 倍的趨化反應，比 50 ng/ml 的 MCP-1 21.89 倍高。而在藥物存在下，MCP-1 所誘發的 THP-1 細胞的 migration 反應，會隨著 cinnamophilin 濃度的增加而被減弱，而隨著 HDI II 濃度的增加呈現上升的現象，但仍對 MCP-1 所誘發的 THP-1 細胞的 migration 反應有抑制的作用。由以上的實驗我們可以推斷，cinnamophilin 與 HDI II 皆能對在 THP-1 細胞中，MCP-1 所誘發的細胞 migration 作用，產生一些程度上的抑制作用，但與 Vehicle 相比並無統計上的意義。

白血球(leukocyte)遷移到受傷或是有發炎反應的區域，是一連串複雜的過程。除了有之前提到的 MMPs 與 chemokines 的參與之外，還包括了 seletin 和 integrin adhesion molecules 如 ICAM-1、VCAM-1 的作用。單核球細胞能表現 β1 integrin CD49d/CD29 與 2 integrin CD11a/CD18、CD11b/CD18、CD11c/CD18 等 (Han, 2003)。Integrins 不但能調控朝發炎區域移動的白血球與專一性的 ligand 結合，還能將訊息傳入細胞並且控制一些 effectors 的功能。基於在白血球上，CD11b/CD18 是最多的 β 2 integrin，作為許多種類 ligands 如 iC3b、ICAM-1、coagulation factor X 與 fibrinogen 的接受體，並在 locomotion、chemotaxis 與 phagocytosis 上有其重要性(Monneret & Rubel, 2003; Schwarz, 2002)，我們測定了 LPS 調控單核球 THP-1 細胞表面 integrin CD11b 的功能與觀察藥物在此所扮演的角色，並以流式細胞儀計算細胞表面 integrin CD11b 的變化情形。由 Figure 23 中可以觀察到在 LPS 能誘發細胞表面 CD11b 的表現 (lane 2: 1.31 ±0.1 folds，$p<0.05$，n = 4)，而 5 M 的 HDI II 則能抑制 LPS 誘發的 CD11b 表現 (lane 5: 1.1 ±0.04 folds，n = 2)。MA-1(20 μM)與 HDI II (2 μM)會些許提升 CD11b 的表現 (lane 3: 1.48 ±0.06 folds，n = 4; lane 4: 1.34 ±0.07 folds，n = 4)，但與 lane 2 相比，藥物的給予對 CD11b 蛋白質的表現在統計上並無意義。由初步實驗的結果我們可推斷，藥物可選擇性的抑制 MMP-9 蛋白質的表現。

過去的研究曾指出，在單核球與巨噬細胞中，LPS對於TNF-α的生成是一種強效的誘發劑。在THP-1 與PBMCs中，LPS皆會誘導非常顯著的TNF-α生成Mangalam & Haversen, 2001)。而Robinson的研究指出， chemokine如MCP-1 要激發出MMP-9 的表現是需有 autocrine 或 endogenous 的 TNF-α 存在(Robinson, 2002)。基於上述的種種研究顯示了TNF-α對於MMP-9 在表現上重要性，我們觀察了內生性的TNF-α的表現情形。細胞在經LPS (10 ng/ml) 與 MCP-1(240 ng/ml)刺激後，可觀察TNF-α的量有一些上升的情形(26.2 ±3.1 pg/10^6 cells，n = 3 與 29.6 ±5.3 pg/10^6 cells，n = 3)，但在與Resting相比在統計上並無明顯的差異(Vehicles: Figure 24-27)。相對的，在高濃度 100 ng/ml 的LPS的刺激之下(Figure 31 & 32)，TNF-α的量則有明顯上升的情形(57.1 ±10 pg/10^6 cells，$p < 0.05$，n = 2)。在分別加以藥物處理後(cinnamophilin 1、5、20 μM)，藥物對於

LPS刺激下TNF-α蛋白質皆呈現顯著的上升，但HDI II對於在LPS刺激下TNF-α蛋白質的表現皆無明顯的影響。而在MCP-1 的刺激之下，與Vehicle相比，藥物皆能提高TNF-α的表現，但並不具有統計上的意義。因此，我們的結果顯示出LPS與MCP-1雖能些略使TNF-α蛋白質表現量上升，但與Resting相比在統計上卻沒有意義的差別。Cinnamophilin與HDI II的作用並不是藉由影響內生性TNF-α蛋白質表現而對MMP-9 產生抑制作用。

根據以上的種種實驗與討論，我們發現 cinnamophilin 與 HDI II 能夠抑制人類單核球細胞 THP-1 受到 LPS 或 MCP-1 所誘發的 MMP-9 表現。Cinnamophilin 與 HDI II 對於 LPS 與 MCP-1 所誘發的 MMP-9 酵素活性、LPS 所誘發的 MMP-9 蛋白質量的表現與 mRNA 的表現程度，皆能呈現 concentration-dependent 的有效抑制，並與其內生性組織抑制劑 TIMP-1 的產生、THP-1 細胞表面 integrin CD11b 的變化或抑制 MMP-9 本生的酵素活性無關。Cinnamophilin 能抑制在 THP-1 中，LPS 所引發的 IκB-α degradation 與 JNK 蛋白質的表現。而 HDI II 可能會經由抑制 JNK 蛋白質的表現而進一步的抑制轉錄因子 AP-1 的活化與 MMP-9 基因的表現，但對 IκB-α degradation 的抑制作用作用則較不明顯。由此可以推斷 cinnamophilin 主要是經由對 IκB-α的抑制作用，而進階減少 MMP-9 的基因表現。另外在 MCP-1 所誘發 THP-1 細胞的 migration 實驗中，cinnamophilin 與 HDI II 皆能對 MCP-1 所誘發的細胞 migration 作用，產生一些程度上的抑制作用。雖然過去的研究指出了 TNF-α與 MCP-1 與 MMP-9 的表現相關，但在我們的結果中，cinnamophilin 與 HDI II 的作用並不是藉由影響內生性 TNF-α蛋白質表現而對 MMP-9 產生抑制作用。

3-3 結論

綜合我們實驗的結果，證實了 cinnamophilin 與 Histone deacetylase inhibitor II 皆能夠抑制人類單核球細胞 THP-1 受到 LPS 或 MCP-1 所誘發的 MMP-9 表現，並與其內生性組織抑制劑 TIMP-1 的表現和細胞毒性無關。Cinnamophilin 能抑制在 THP-1 中 LPS 所引發的 MMP-9 表現，並主要經由抑制 NF-κB pathway 與 JNK 等訊息傳遞路徑。而 HDI II 可能是經由抑制 JNK 蛋白質的表現而進一步的抑制轉錄因子 AP-1 的活化與 MMP-9 基因的表現。另外，HDI II 是否可能藉由改變細胞基因的表現，而對 MMP-9 mRNA 與 gelatinolytic 的活性產生抑制，則需進一步的研究。在未來的展望上，我們期許能藉由進一步的活體實驗，將藥物視為治療目標，瞭解藥物如何調控 *in vivo* 中 MMP-9 的表現與重要性。

四、參考文獻

Ailenberg, M., Silverman, M. Trichostatin A-histone deacetylase inhibitor with clinical therapeutic potential-is also a selective and potent inhibitor of gelatinase A expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 298: 110-115

Alblas, J., Slager-Davidoa, R., Steenbergh. P.H. Sussenbach, J.S., van der Burg, B. The role of MAP kinase in TPA-mediated cell cycle arrest of human breast cancer cells. *Oncogene* 1998, 16: 131-139.

Archer, S.Y., Hodin, R.A. Histone acetylation and cancer. *Curr. Opin. Gene. Dev.* 1999, 9: 171-174.

Atkinson, J.J., Senior, M.M. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2003, 28: 12-24.

Bond, M., Backer, A.H., Newby, A.C., Nuclear factor κB activity is essential of matrix metalloproteinase-1 and –3 upregulation in rabbit dermal fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 264: 561-567.

Brew, K., Dinakarpandian, D., Nagase, H. Tissue inhibitors of metalloproteinase: evolution, structure and function. *Biochem. Biophys. Acta* 2000, 7: 1-2.

Brinckerhoff, C.E., Matrisian, L.M. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2002, 3: 207-214.

Chase, A.J., Bond, M., Crook, M.F., Newby, A.C. Role of factor-κB activation in

metalloproteinase-1, 3 and –9 secretion by human macrophages in vitro and rabbit foam cells produced in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002, 22: 765-771.
Chang, C, Werb, Z. The many faces of metalloproteinases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *TiCB*. 2001, 11: S37-S43.
Chung, S.M., Wang, I.C., Yang, J.L. Roles of JNK, p38 and ERK mitogen-activated protein kinases in the growth inhibition and apoptosis induced by cadmium. *Carcinogenesis* 2000, 21: 1423-1432.
Coffey, D.C., Kutko, M.C., Glick, R.D., Butler, L.M., Heller, G., Rifkind, R.A., Marks, P.A., Richon, V.M., La Quaglia, M.P. The histone deacetylase inhibitor, CBHA, inhibits growth of human neuroblastoma xenografts *in vivo*, alone and synergistically with all-trans retinoic acid. *Cancer Res.* 2001, 61: 3591-3594.
Collins, T., Cybulsky, M.I. NF-κB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J. Clin. Invest.* 2001, 107: 255-264.
Doniglan III, Finnin J.R., M.S., Cohen, A., Richon, R.A., Rifkind, P.A., Marks, R.B., Pavletich, N.P. Structures of histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* 1999, 40: 188-193.
Dzau, V.J., Braun-Dullaeus, R.C., Sedding, D.G. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspective and therapeutic strategies. *Nature Med.* 2002, 8: 1249-1256.
Guo, Y.L., Baysal, K., Kang, B., Yang, L.J., Williamson, J.R. Colleration between sustained c-Jun N-terminal protein kinase activation and apoptosis4 induced by tumor necrosis factor-α in rat mesangial cells. *J. Biol. Chem.* 1998, 273: 027-4034.
Harold, E., Wart, V., Birkedal-Hansen, H. The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990, 87: 5578-5582.
Hill, C.S., Treisman, R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* 1995, 80: 199-211.
Johnatty, R.N., Taub, D.D., Reeder, S.P., Turcovski-Corrales, S.M., Cottam, D.W., Stephenson, T.J., Rees, R.C. Cytokine and chemokine regulation of proMMP-9 and TIMP-1 production by human peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.* 1997, 158: 2327-2333.
Kelly, E.A., Jarjour, N.N. Role of matrix metalloproteinases in asthma. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2003, 9: 28-33.
Kintscher, U., Goetze, S., Wakino, S., Kim, S., Nagpal, S., Chandraratna, R.A.S., Graf, K., Fleck, E., Hsueh, W.A., Law, R.E. Peroxisome proliferators-activated receptor and retinoid X receptor ligands inhibit monocyte chemotactic protein-1-directed migration of monocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 2000, 401: 259-270.
Kotra, L.P., Cross, J. B., Shimura, Y., Fridman, R., Schlegel, H. B., Mobashery, S. Insight into the complex and dynamic process of activation of matrix metalloproteinase. *J. Am. Chem. Soc*. 2001, 123: 3108-3113.
Lai, W.C., Zhou, M., Shankavaram, U., Peng, G., Wahl, L.M. Differential regulation of lipopolysaccharide-induced monocyte matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-9 by p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases. *J. Immunol.* 2003, 170: 6244-6249.
Marks, P.A., Richon, V.M., Breslow, R., Rifkind, R. A. Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. *Curr. Opin. Oncol.* 2001, 13: 477-483.

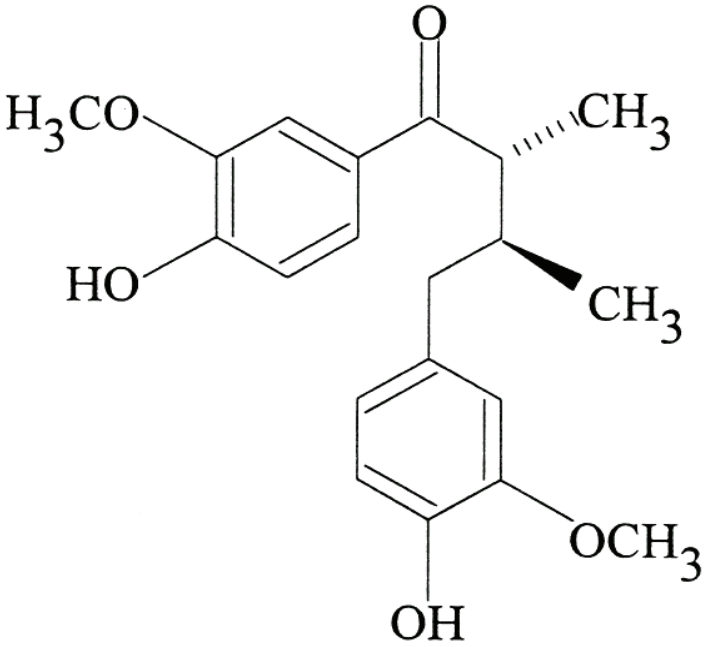

Figure 1 Chemical structure of cinnamophilin (MA-1)

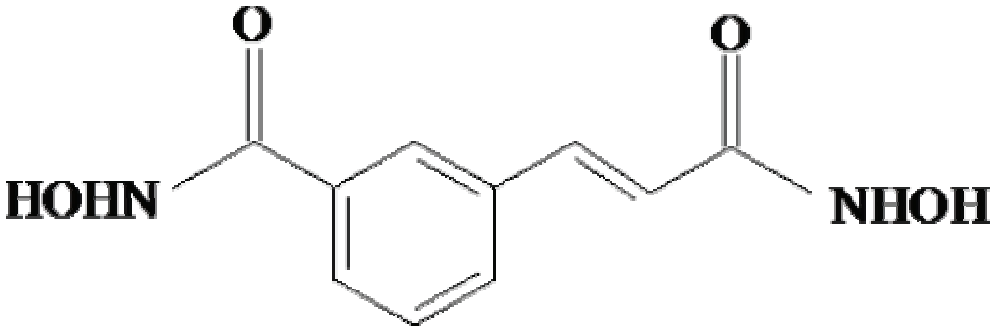

Figure 2 Chemical structure of histone deacetylase inhibitor II (HDI II)

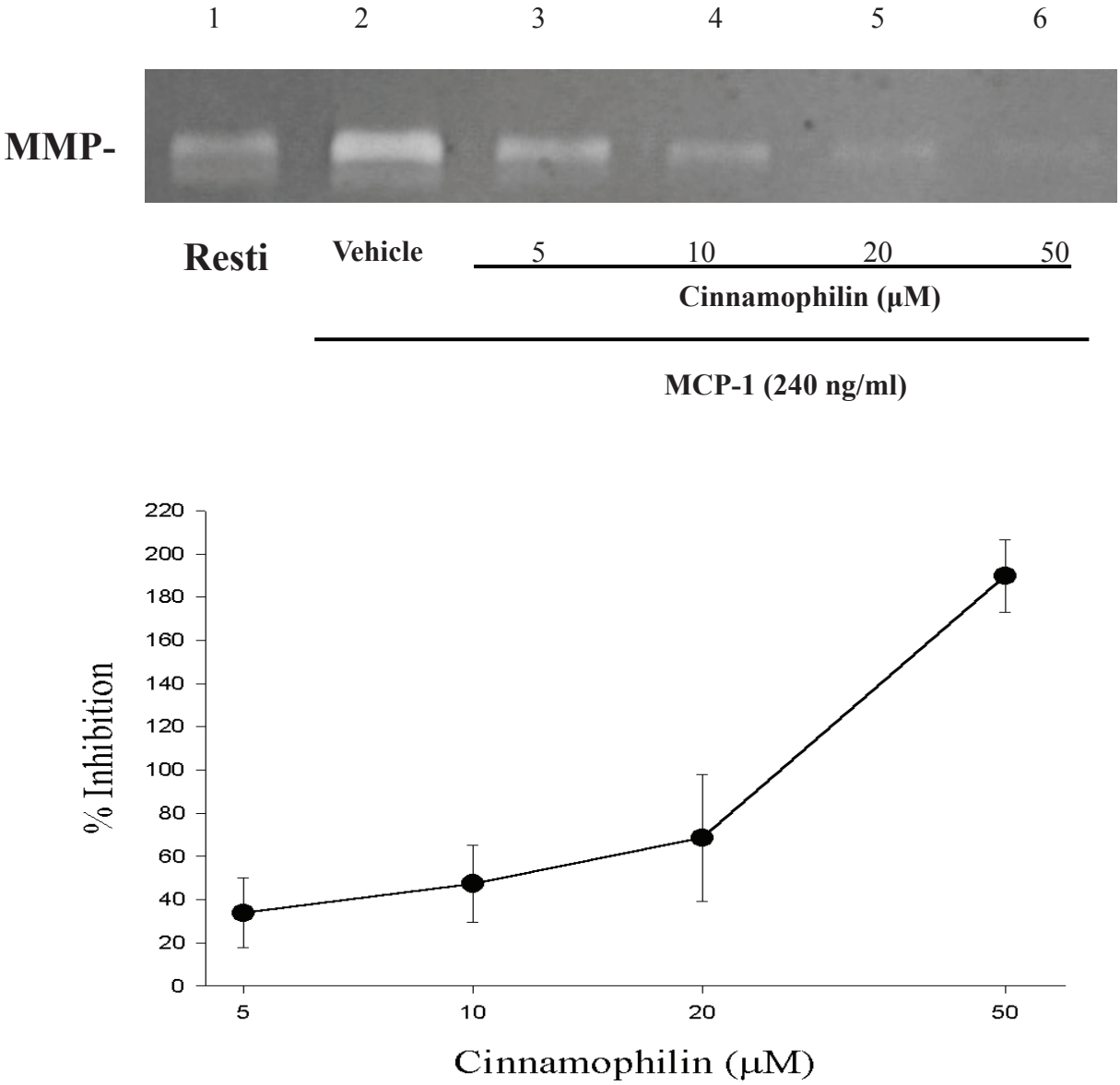

Figure 3 Effects of cinnamophilin on MCP-1 induced enzymatic activity of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in THP-1 cells. THP-1 cells (1×10^6 cell/ml) were dispensed on 24-well plates till 70-80% confluent condition and treated with MCP-1 (240 ng/ml) for 24 hours as indicated. Cells were treated with the indicated concentrations of cinnamophilin (lane 3, 5 μM; lane 4, 10 μM; lane 5, 20 μM; lane 6, 50 μM) or vehicle (lane 2) for 15 minutes before treatment with MCP-1. Cell-free supernatants were then assayed for MMP-9 activity by gelatin zymography, as detailed in "Method" (lane 1, control). Percent inhibition is presented as mean ± S. E.M. of three to four independent experiments.

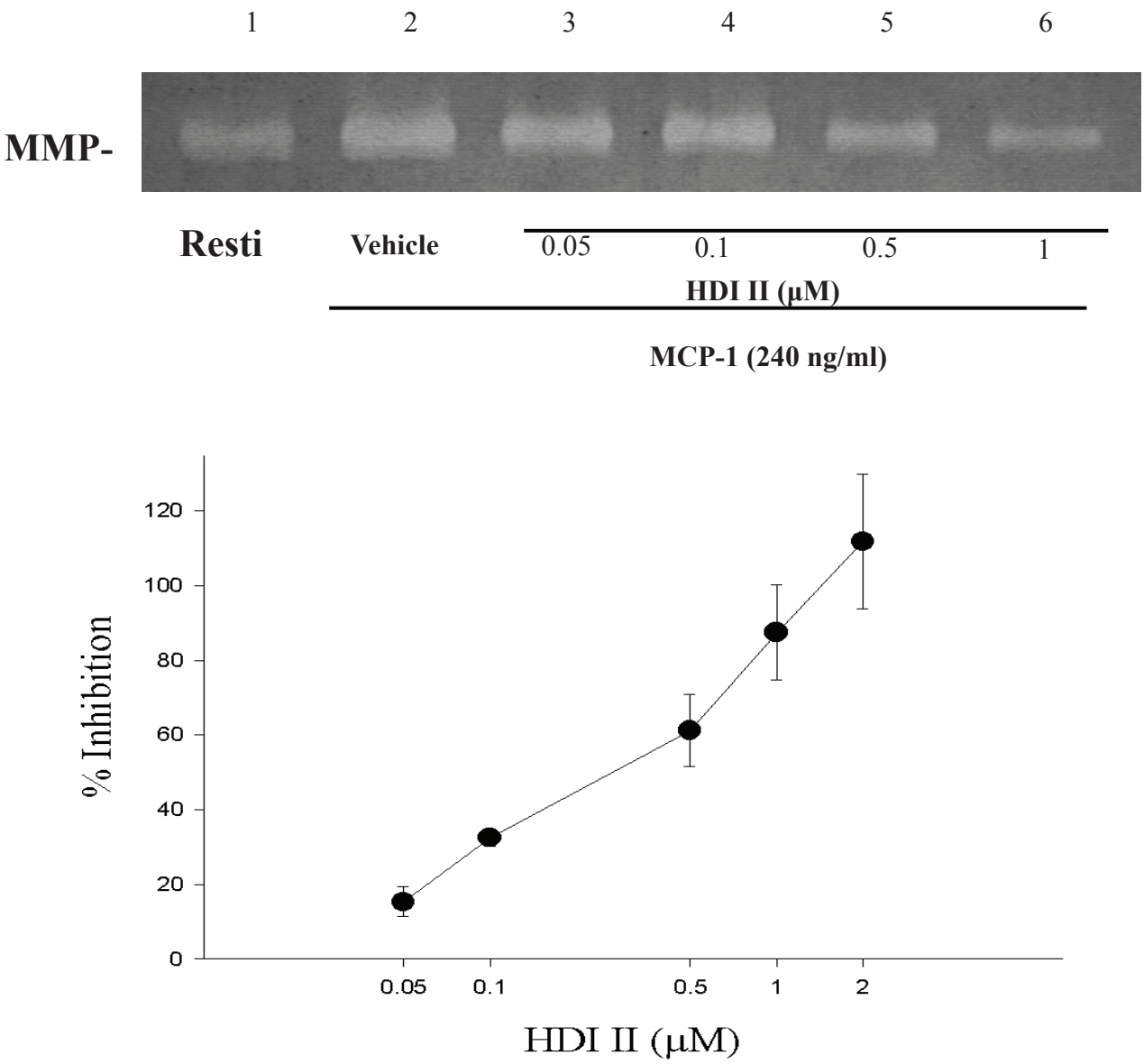

Figure 4 Effects of HDI II on MCP-1 induced enzymatic activity of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in THP-1 cells. THP-1 cells (1×10^6 cell/ml) were dispensed on 24-well plates till 70-80 % confluent condition and treated with MCP-1 (240 ng/ml) for 24 hours as indicated. Cells were treated with the indicated concentrations of HDI II (lane 3, 0.05 μM; lane 4, 0.1 μM; lane 5, 0.5 μM; lane 6, 1 μM) or vehicle (lane 2) for 15 minutes before treatment with MCP-1. Cell-free supernatants were then assayed for MMP-9 activity by gelatin zymography, as detailed in "Method" (lane 1, control). Percent inhibition is presented as mean ± S. E.M. of three to four independent experiments.

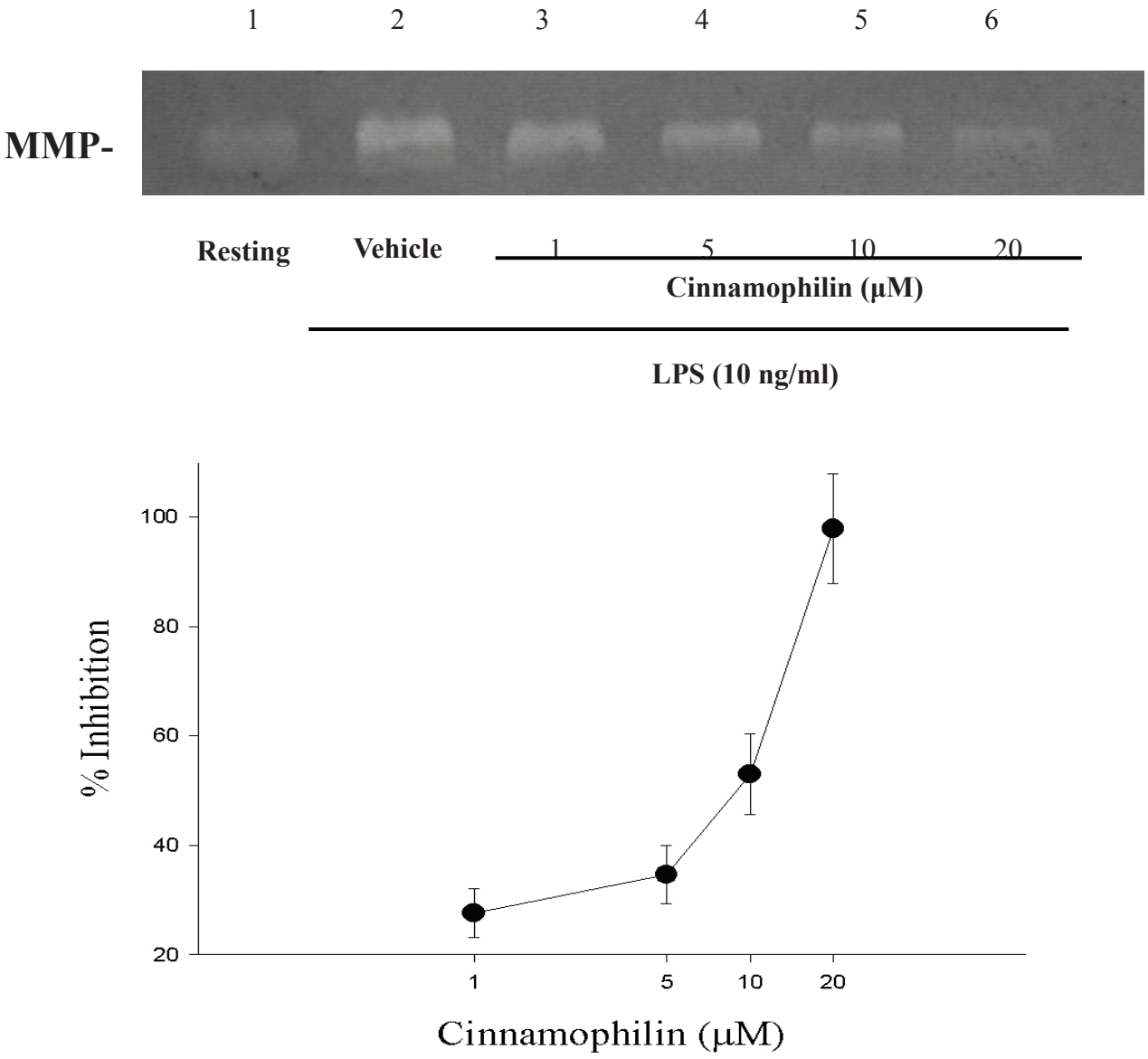

Figure 5 Effects of cinnamophilin on LPS-induced enzymatic activity of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in THP-1 cells. THP-1 cells (1×10^6 cell/ml) were dispensed on 24-well plates till 70-80% confluent condition and treated with LPS (10 ng/ml) for 24 hours as indicated. Cells were treated with the indicated concentrations of cinnamophilin (lane 3, 1 μM; lane 4, 5 μM; lane 5, 10 μM; lane 6, 20 μM) or vehicle (lane 2) for 15 minutes before treatment with MCP-1. Cell-free supernatants were then assayed for MMP-9 activity by gelatin zymography, as detailed in "Method" (lane 1, control). Percent inhibition is presented as mean ± S. E.M. of three to four independent experiments.

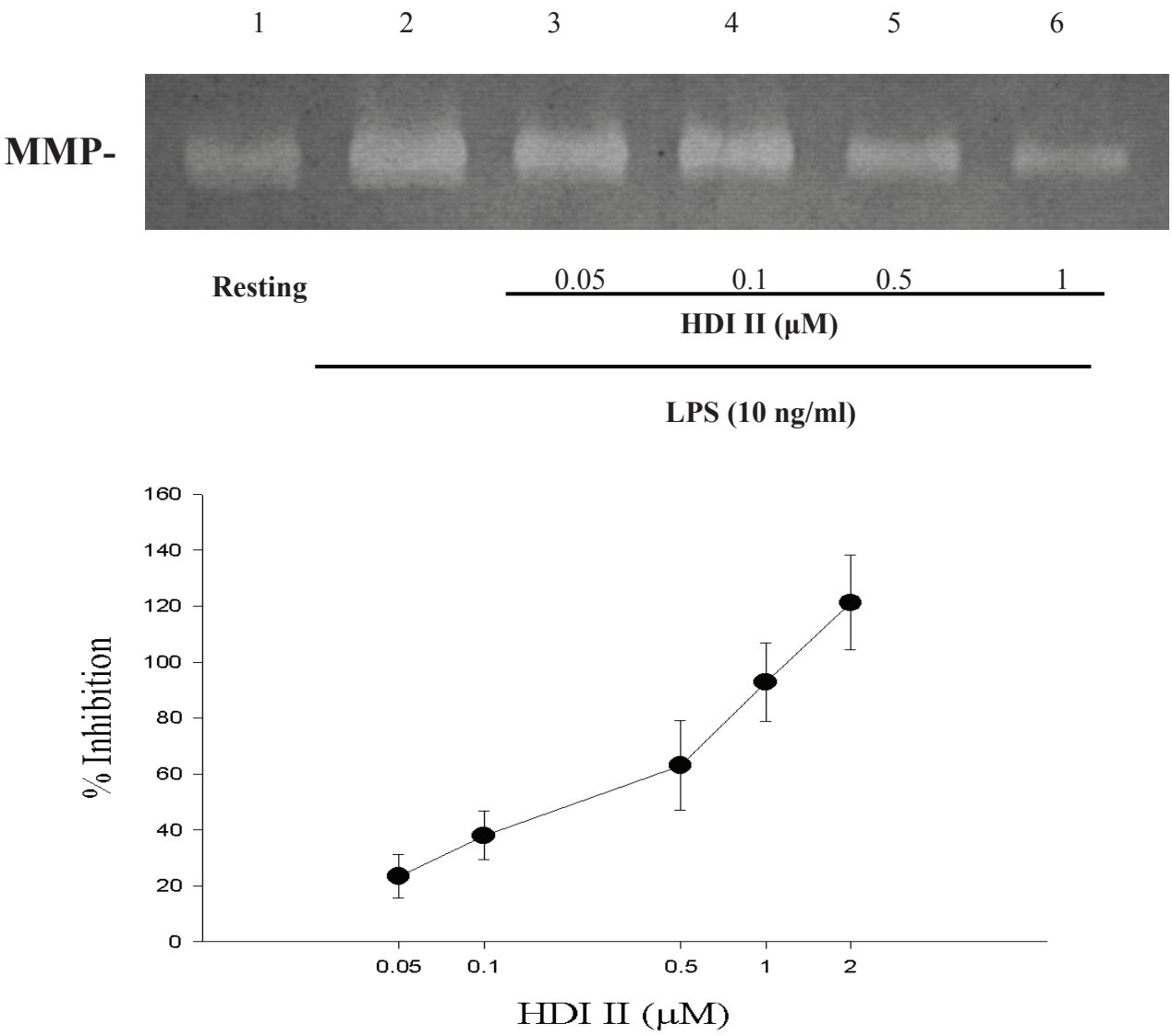

Figure 6 Effects of HDI II on LPS-induced enzymatic activity of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in THP-1 cells. THP-1 cells (1×10^6 cell/ml) were dispensed on 24-well plates till 70-80% confluent condition and treated with LPS (10 ng/ml) for 24 hours as indicated. Cells were treated with the indicated concentrations of HDI II (lane 3, 0.05 μM; lane 4, 0.1 μM; lane 5, 0.5 μM; lane 6, 1 μM) or vehicle (lane 2) for 15 minutes before treatment with MCP-1. Cell-free supernatants were then assayed for MMP-9 activity by gelatin zymography, as detailed in "Method" (lane 1, control). Percent inhibition is presented as mean ± S. E.M. of three to four independent experiments.

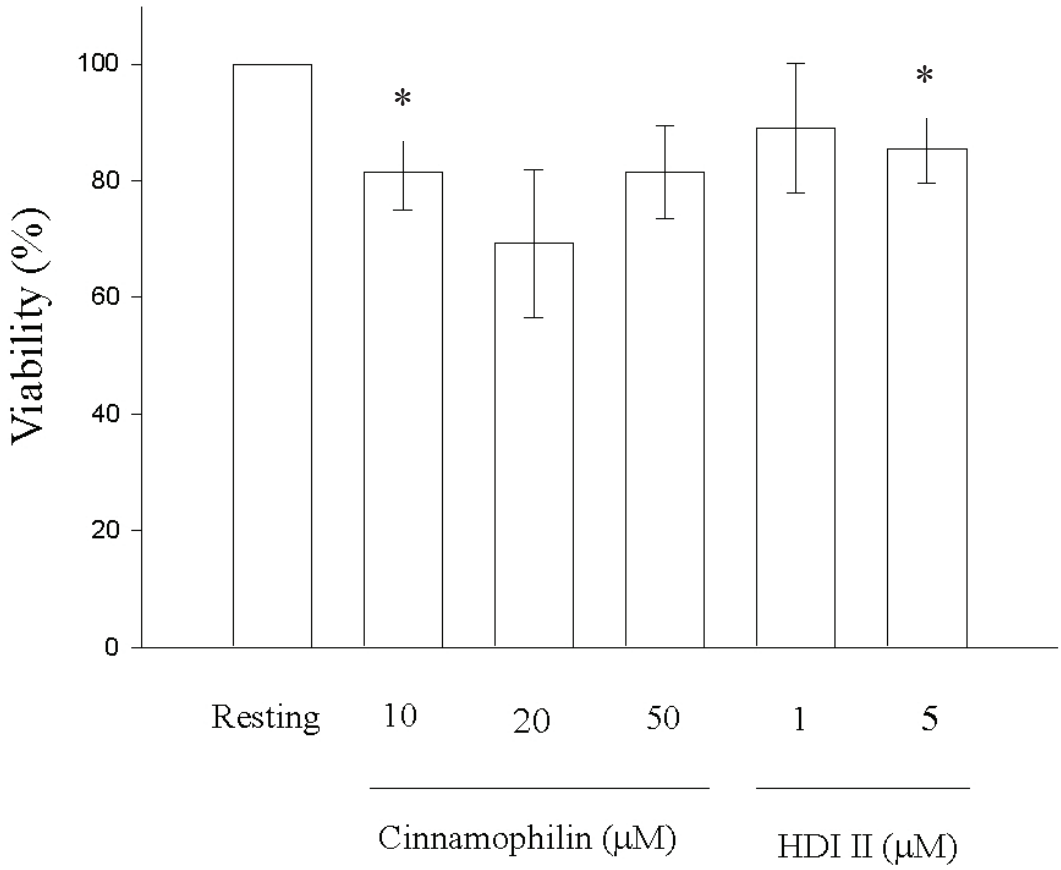

Figure 7 Cytotoxicity of cinnamophilin and HDI II on THP-1 cells. THP-1 cells were treated with different concentration of cinnamophilin (10, 20, 50 μM) and HDI II (1 μM, 5 μM) and incubated for 24 hrs. Cell viability was measured by a colorimetric assay at 550 nm based on the ability of mitochondria to reduce the tetrazolium dye 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphwnyl tetrazolium bromide (MTT) in viable cells. Percentage of viability is presented as mean ± S.E.M. of four independent experiments. ∗: $P < 0.05$ as compared with the resting.

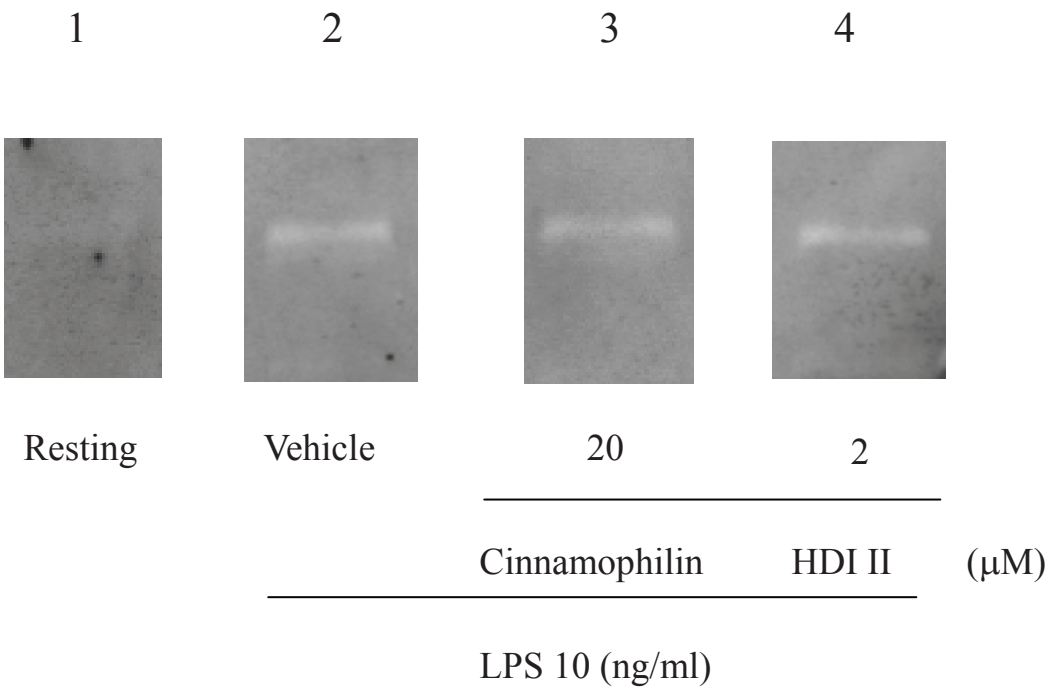

Figure 8 Lack of effect of cinnamophilin and HDI II on gelationlytic activity of conditioned medium from LPS-treated THP-1 cells. Lane 1: Resting and Lane 2: Vehicle: incubation with reacting buffer alone. Lane 3: incubation reacting buffer with cinnamophilin 20 μM; Lane 4: incubation buffer with 2 μM HDI II. There is no effect of cinnamophilin and HDI II on gelatinolytic activity at any concentration tested, for duration of treatment, consult method 4.

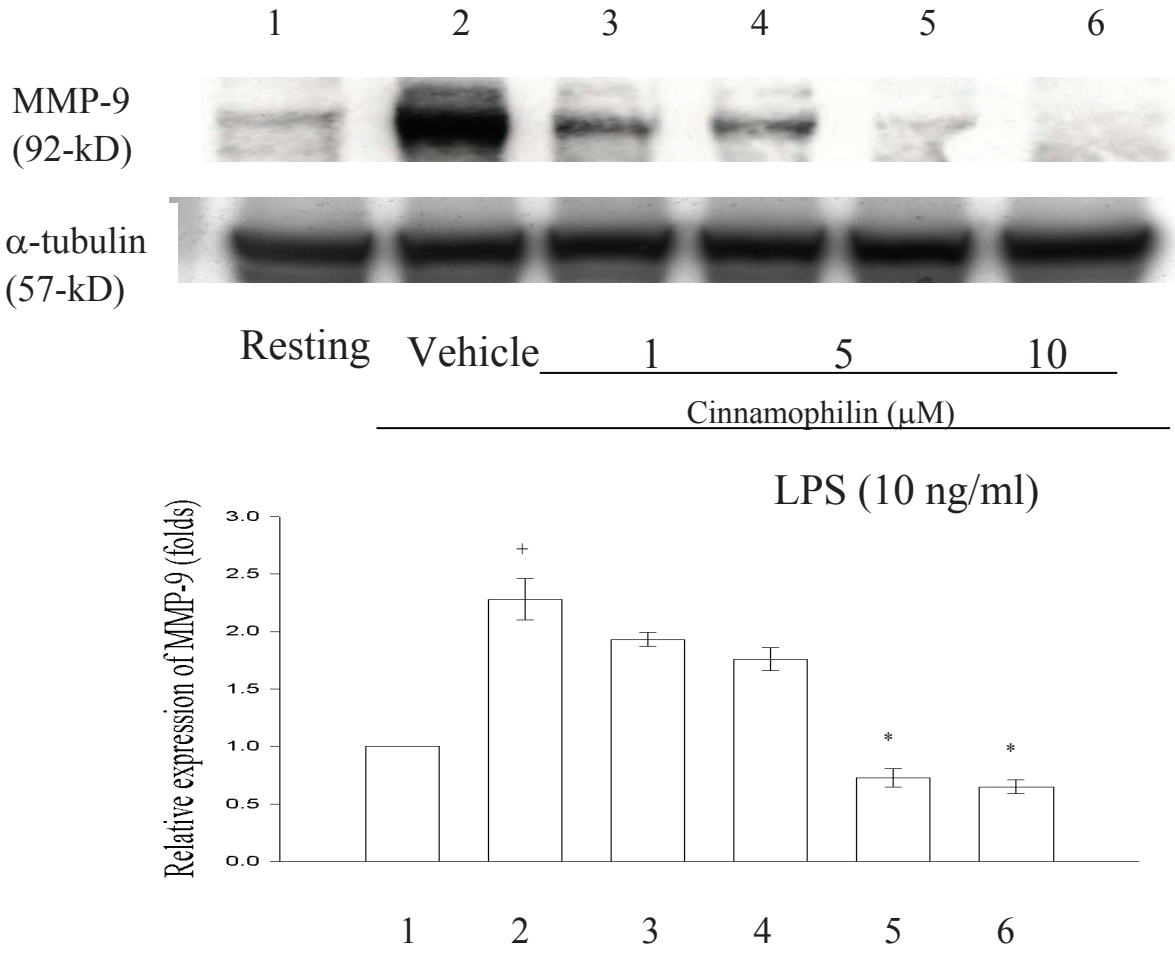

Figure 9 Effect of cinnamophilin on LPS-induced production of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) from THP-1 cells. THP-1 cells (1×10^6 cells/ml) were dispensed on 24-well plates till 70-80% confluent condition and treated with cinnamophilin (lane 3, 1μm; lane 4, 5 μM; land 5, 10 μM; lane 6, 20 μM) or vehicle (lane 2) for 1 hr before treatment with LPS (10 ng/ml) for 24 hrs. Then cell lysates were obtained and analysed for MMP-9 protein expression by Western blot (lane 1, control). The data are representative example of three experiments. ∗: $P<0.01$ as compared with Vehicle. ＋: $P<0.01$ as compared with resting.

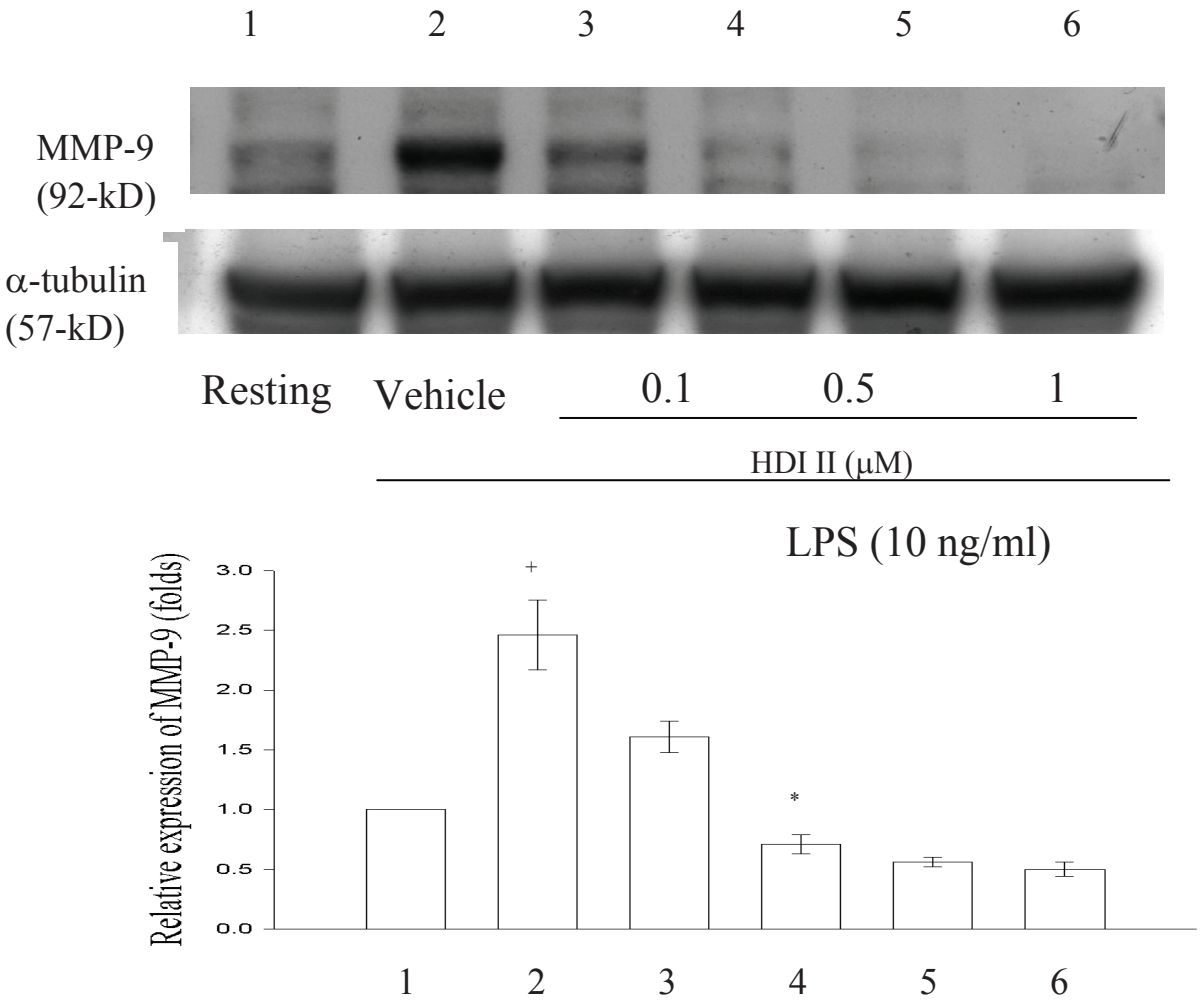

Figure 10 Effect of HDI II on LPS-induced production of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) from THP-1 cells. THP-1 cells (1×10^6 cells/ml) were dispensed on 24-well plates till 70-80% confluent condition and treated with HDI II (lane 3, 0.1μm; lane 4, 0.5 μM; land 5, 1 μM; lane 6, 2 μM) or vehicle (lane 2) for 1 hr before treatment with LPS (10 ng/ml) for 24 hrs. Then cell lysates were obtained and analysed for MMP-9 protein expression by Western blot (lane 1, control). The data are representative example of three experiments. ∗: $P<0.01$ as compared with Vehicle. ＋: $P<0.05$ as compared with resting.

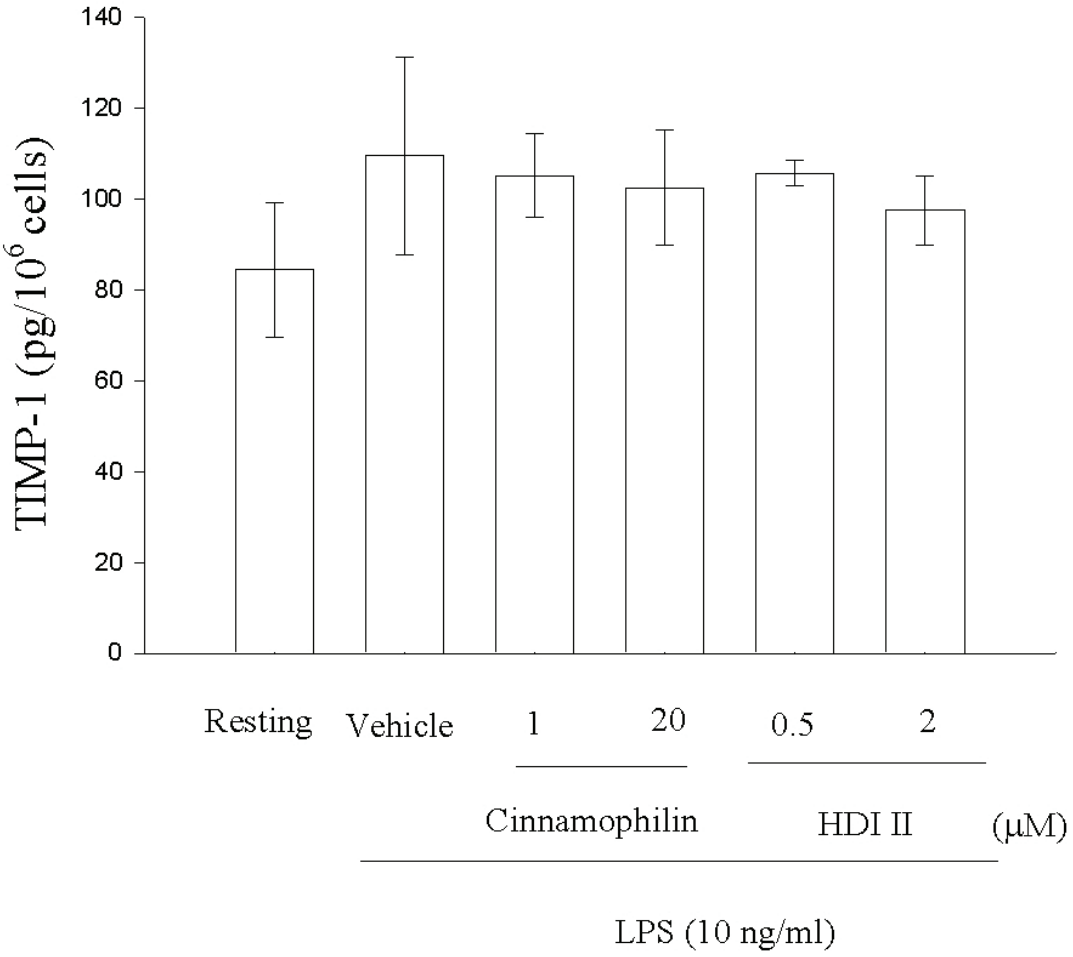

Figure 11 Effect of cinnamophilin and HDI II on LPS-induced production of tissue inhibitor of metalloprotinase-1 (TIMP-1) from conditioned medium of THP-1 cells. THP-1 cells (1×10^6 cell/ml) were dispensed on 24-well plates till 70-80 % confluent condition and treated with different concentration of cinnamophilin (1, 20 μM) and HDI II (0.5, 2 μM) respectively for 15 min before treatment with LPS (10 ng/ml) for 24 hrs. Then supernatants were obtained and analysed for TIMP-1 protein expression by ELISA. TIMP-1 protein is presented as mean ± S.E.M. pg/10^6 cells of three to four independent experiments.

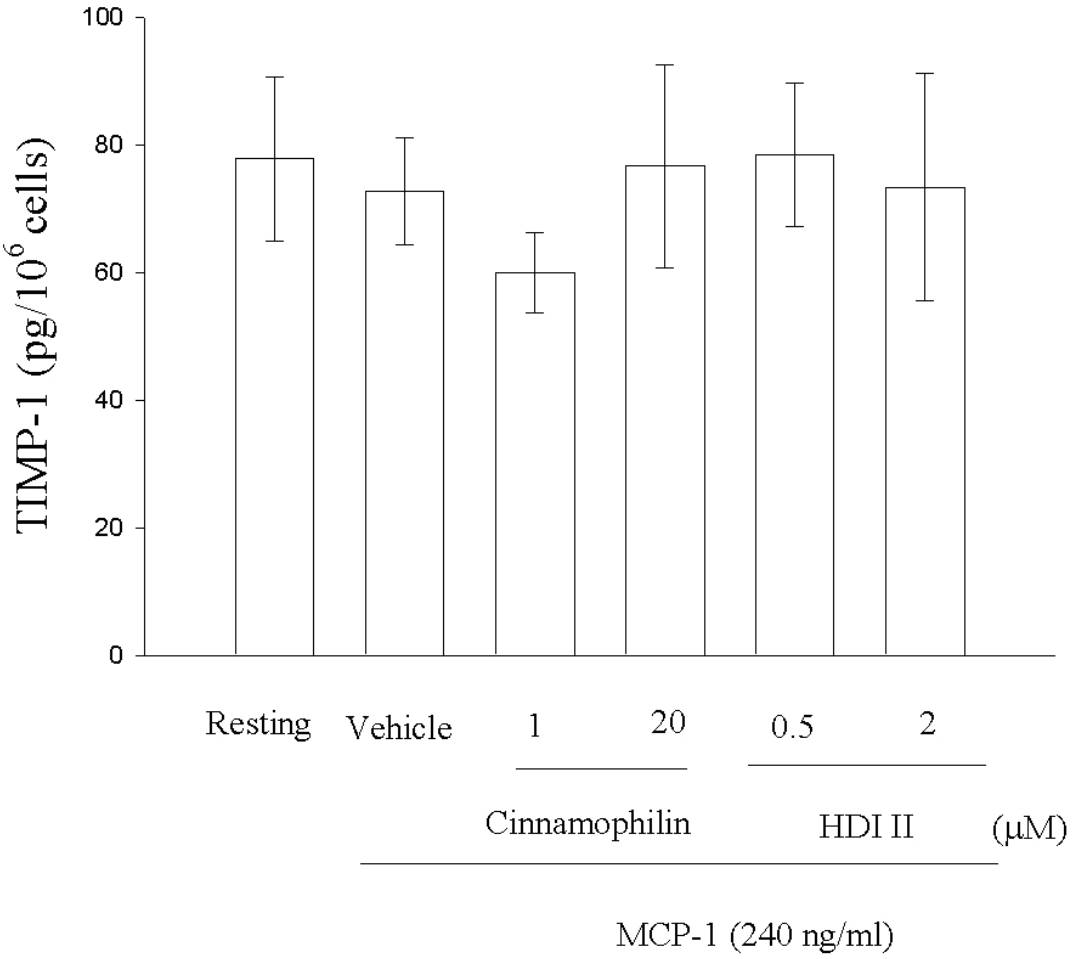

Figure 12 Effect of cinnamophilin and HDI II on MCP-1-induced production of tissue inhibitor of metalloprotinase-1 (TIMP-1) from conditioned medium of THP-1 cells. THP-1 cells (1×10^6 cell/ml) were dispensed on 24-well plates till 70-80 % confluent condition and treated with different concentration of Cinnamophilin (1, 20 μM) and HDI II (0.5, 2 μM) respectively for 15 min before treatment with MCP-1 (240 ng/ml) for 24 hrs. Then supernatants were obtained and analysed for TIMP-1 protein expression by ELISA. TIMP-1 protein is presented as mean ± S.E.M. pg/10^6 cells of three to four independent experiments.

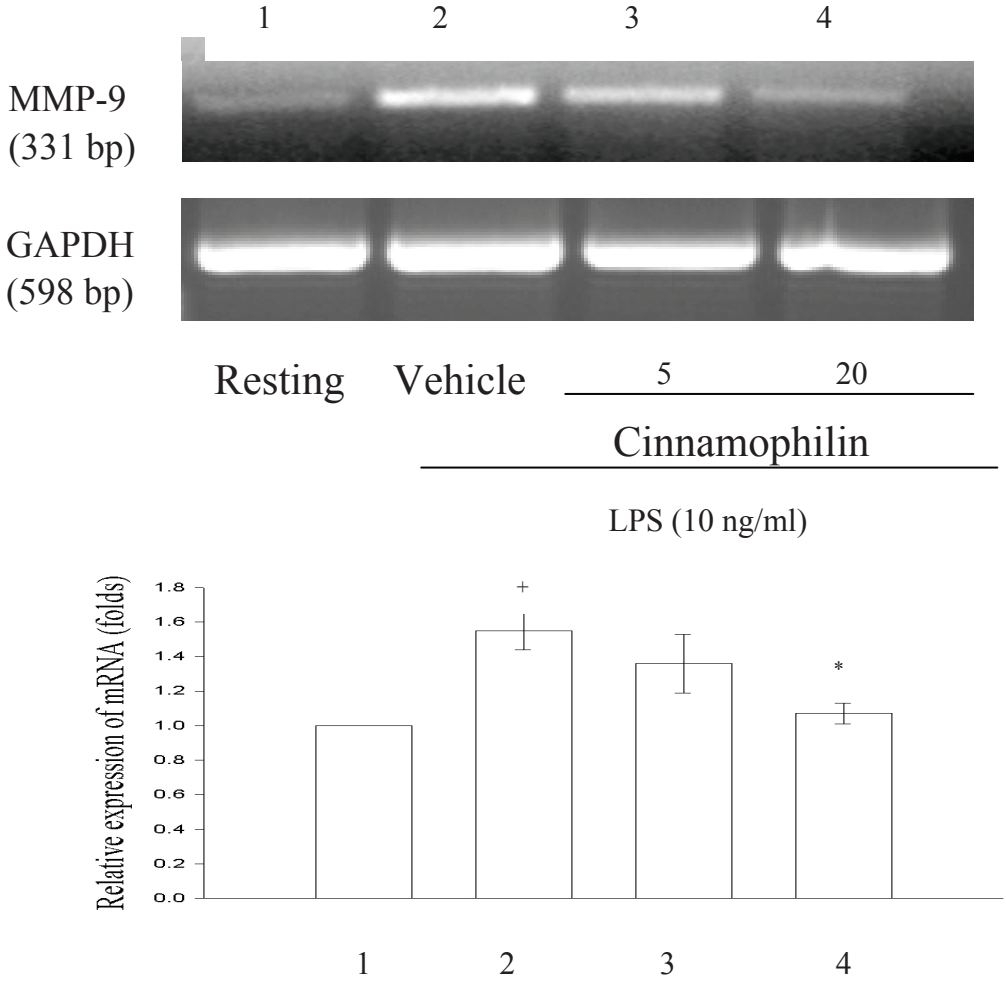

Figure 13 RT-PCR analysis demonstrating the inhibitory effect of cinnamophilin on LPS-induced MMP-9 mRNA expression in THP-1 cells. Cells were treated with Cinnamophilin (lane 3, 5 μM; lane 4, 20 μM) or vehicle (lane 2) for 15 min treatment with LPS (10 ng/ml) for 6 hrs. Following by extraction of total RNA and analysis of mRNA levels of MMP-9 and GAPDH. RT-PCR technique was performed as described in "Methods" (lane 1, control). GAPDH levels normalized the amount of cDNA temple used in each PCR reaction. The data are representative example of three experiments. ∗: $P<0.05$ as compared with vehicle. ＋: $P<0.01$ as compared with resting.

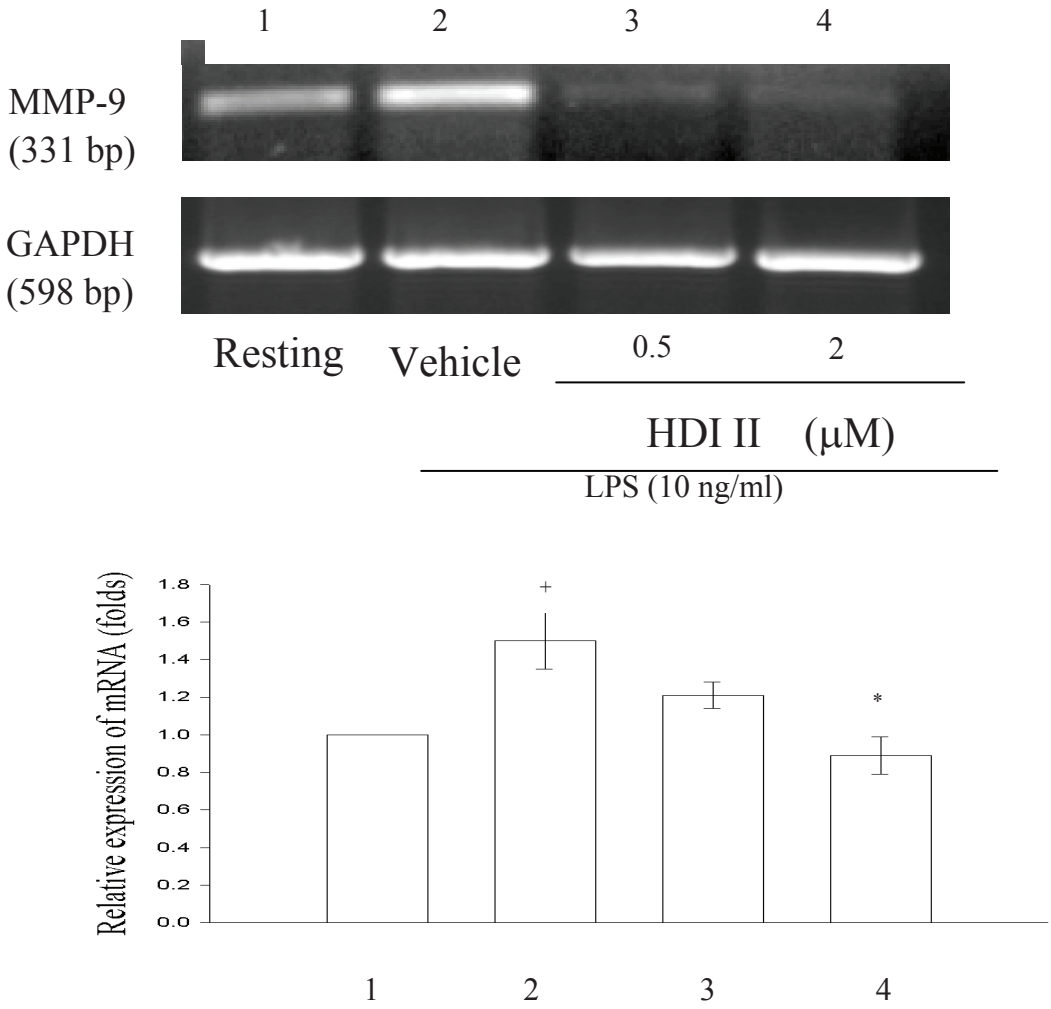

Figure 14 RT-PCR analysis demonstrating the inhibitory effect of HDI-II on LPS-induced MMP-9 mRNA expression in THP-1 cells. Cells were treated with HDI-II (lane 3, 0.5 μM; lane 4, 2 μM) or vehicle (lane 2) for 15 min treatment with LPS (10 ng/ml) for 6 hrs. Following by extraction of total RNA and analysis of mRNA levels of MMP-9 and GAPDH. RT-PCR technique was performed as described in "Methods" (lane 1, control). GAPDH levels normalized the amount of cDNA temple used in each PCR reaction. The data are representative example of three experiments. ∗: $P<0.05$ as compared with vehicle. ＋: $P<0.01$ as compared with resting.

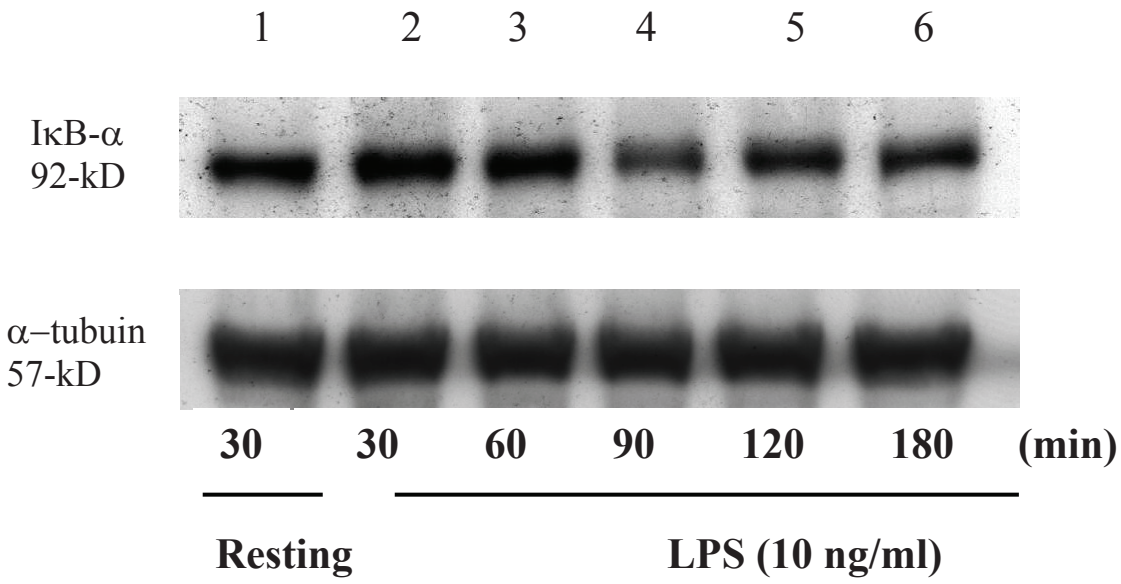

Figure 15 Western blot analysis demonstrating the time course on degradation on immunoreactive IκB-α in THP-1 cells (1×10^6 cells/ml). THP-1 cell were dispensed on 6-well plate till 70-80% confluent condition and treated with LPS 10 ng/ml (lane 2, 30 min; lane 3, 60 min; lane 4, 90 min; lane 5, 120 min; lane 6, 180 min) or vehicle (lane 1, control 30 min) as indicated. The data are representative example of three experiments.

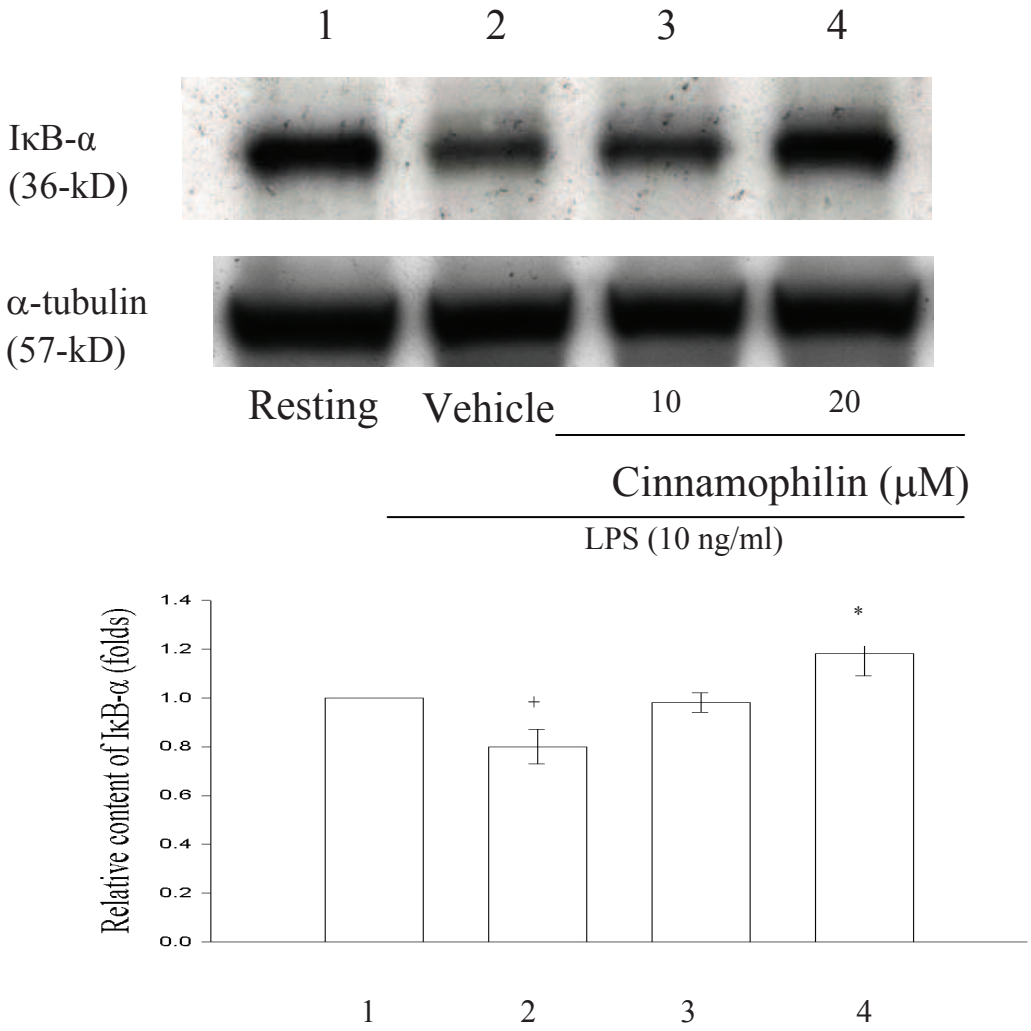

Figure 16 Effect of cinnamophilin on degradation of immunoreactive IκB-α in THP-1 cells. THP-1 cells (1×10^6 cells/ml) were dispensed on 6-well plate till 70-80% confluent condition and treated with LPS (10 ng/ml) for 90 min as indicated. Cells were treated with cinnamophilin (lane 3, 10 μM; lane 4, 20 μM) or vehicle (lane 2) for 15 min before treatment with LPS 10 ng/ml. Then cell lysates were obtained and analysed for IκB-α protein expression by Western blot (lane 1, control). The data are representative example of three experiments. ∗: $P<0.05$ as compared with vehicle. ＋: $P<0.01$ as compared with resting.

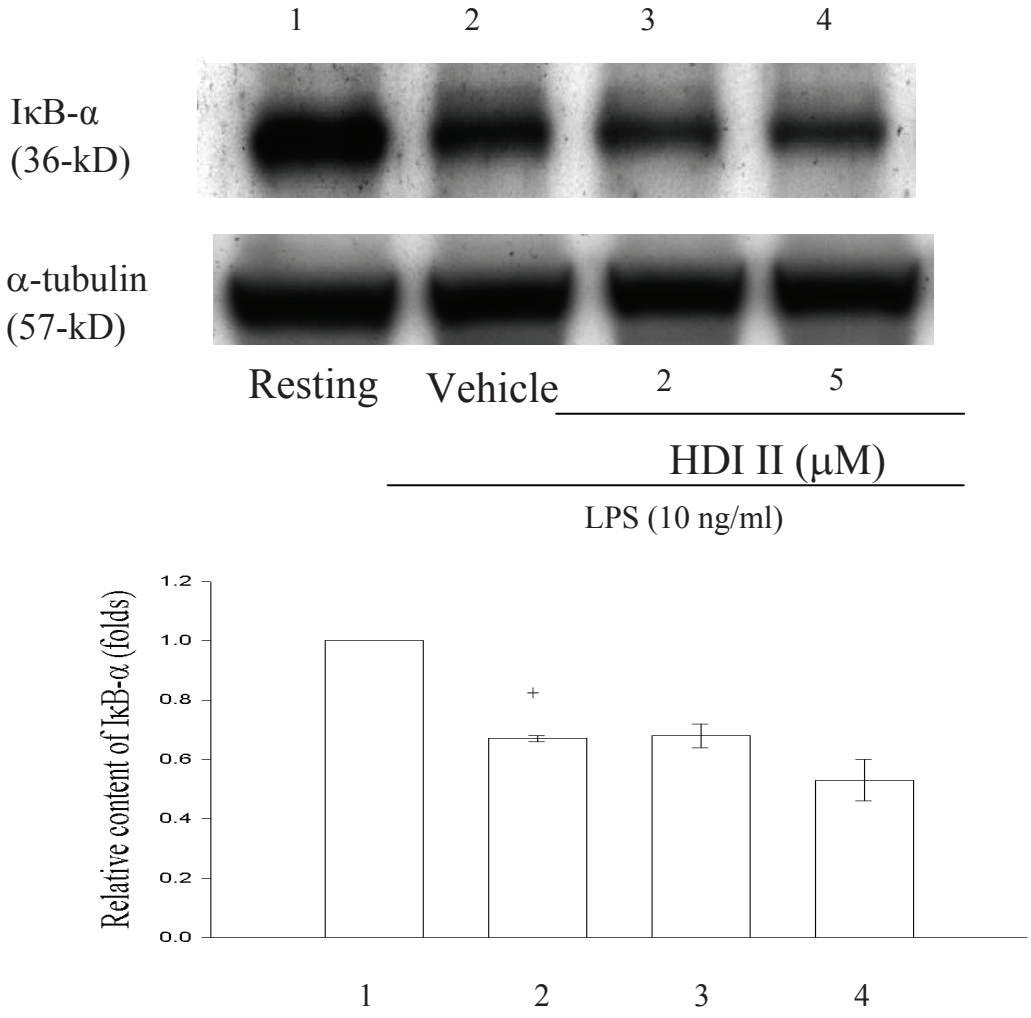

Figure 17 Effect of HDI II on degradation of immunoreactive IκB-α in THP-1 cells. THP-1 cells (1×10^6 cells/ml) were dispensed on 6-well plate till 70-80% confluent condition and treated with LPS (10 ng/ml) for 90 min as indicated. Cells were treated with HDI II (lane 3, 2 μM; lane 4, 5 μM) or vehicle (lane 2) for 15 min before treatment with LPS 10 ng/ml. Then cell lysates were obtained and analysed for IκB-α protein expression by Western blot (lane 1, control). The data are representative example of three experiments. ＋: $P<0.001$ as compared with resting.

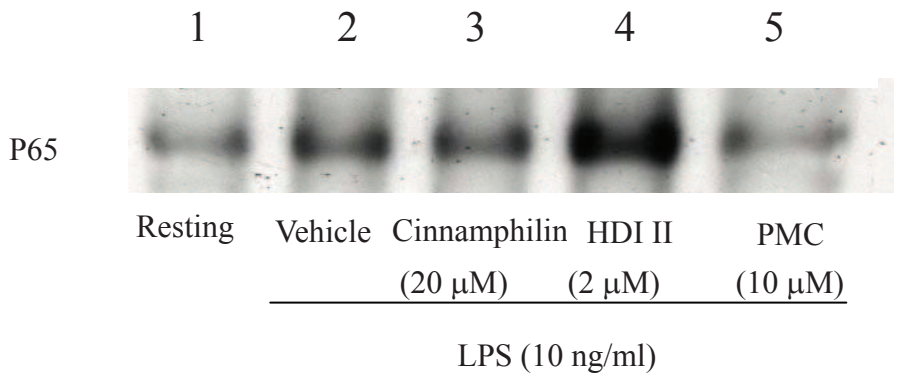

Figure 18 Effects of cinnamophilin, HDI II and PMC on p65 expression in THP-1 cells. THP-1 cells (1×10^7 cells/well) were dispensed on 6-well plate and treated with LPS (10 ng/ml) for 120 min as indicated. Cells were treated with cinnamophilin (lane 3, 20 μM), HDI II (lane 4, 2 μM), PMC (lane 5, 10 μM) or vehicle (lane 2) for 15 min before treatment with LPS 10 ng/ml. The cell nuclear extraction were obtained and analysed for p65 protein expression by Western blot (lane 1, control). The data are representative example of four experiments.

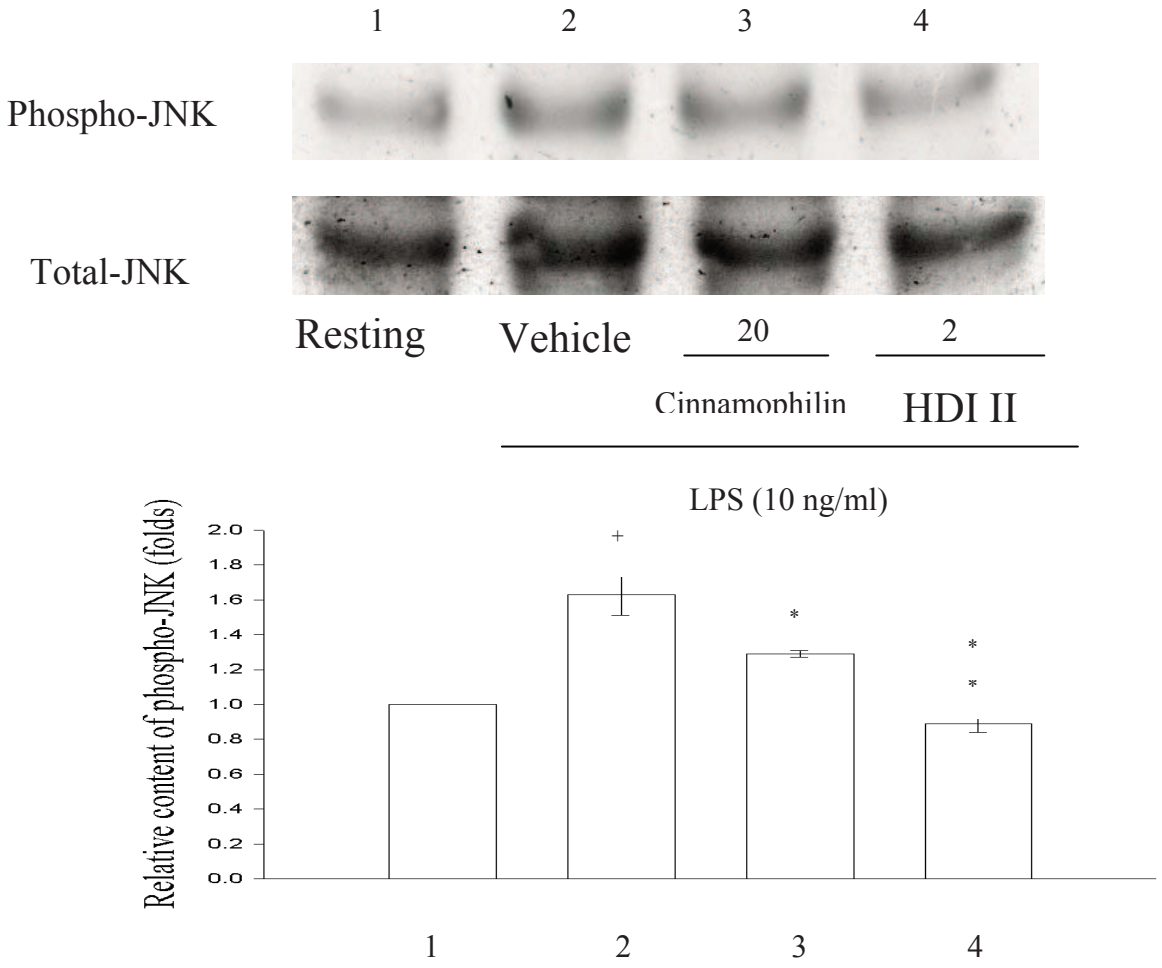

Figure 19 Effect of cinnamophilin and HDI II on expression of JNK in THP-1 cells. THP-1 cells (1×10^6) were dispensed on 6-well plate till 70-80 % confluent condition and treated with LPS (10 ng/ml) for 15 min as indicated. Cells were then treated with cinnamophilin (lane 3, 20 μM) and HDI II (lane 4, 2 μM) or vehicle (lane 2) for 15 min before treatment with LPS. Then cell lysates were obtained and analysed for JNK protein expression by Western blot (Lane 1, control) The data are representative example of three experiments. ∗: $P<0.05$, ∗∗: $P<0.01$ as compared with vehicle. ＋: $P<0.01$ as compared with resting.

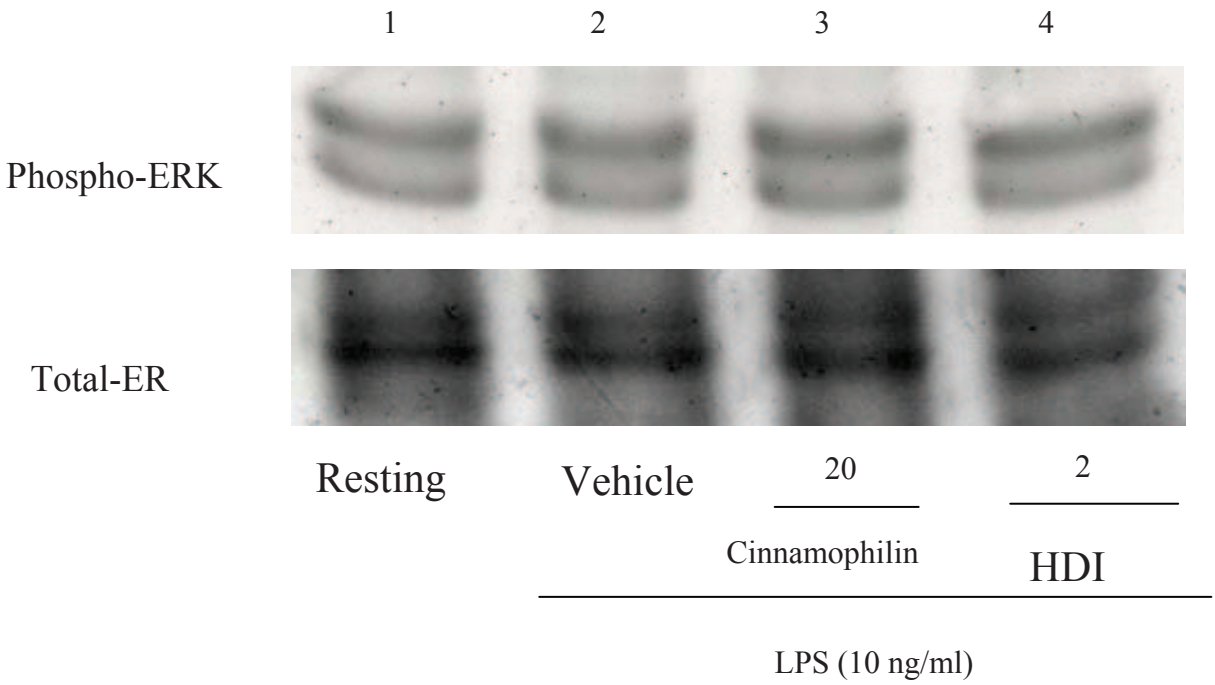

Figure 20 Effect of cinnamophilin and HDI II on expression of ERK in THP-1 cells. THP-1 cells (1×10^6) were dispensed on 6-well plate till 70-80 % confluent condition and treated with LPS (10 ng/ml) for 15 min as indicated. Cells were then treated with cinnamophilin (lane 3, 20 μM) and HDI II (lane 4, 2 μM) or vehicle (lane 2) for 15 min before treatment with LPS. Then cell lysates were obtained and analysed for ERK protein expression by Western blot (Lane 1, control) The data are representative example of three experiments.

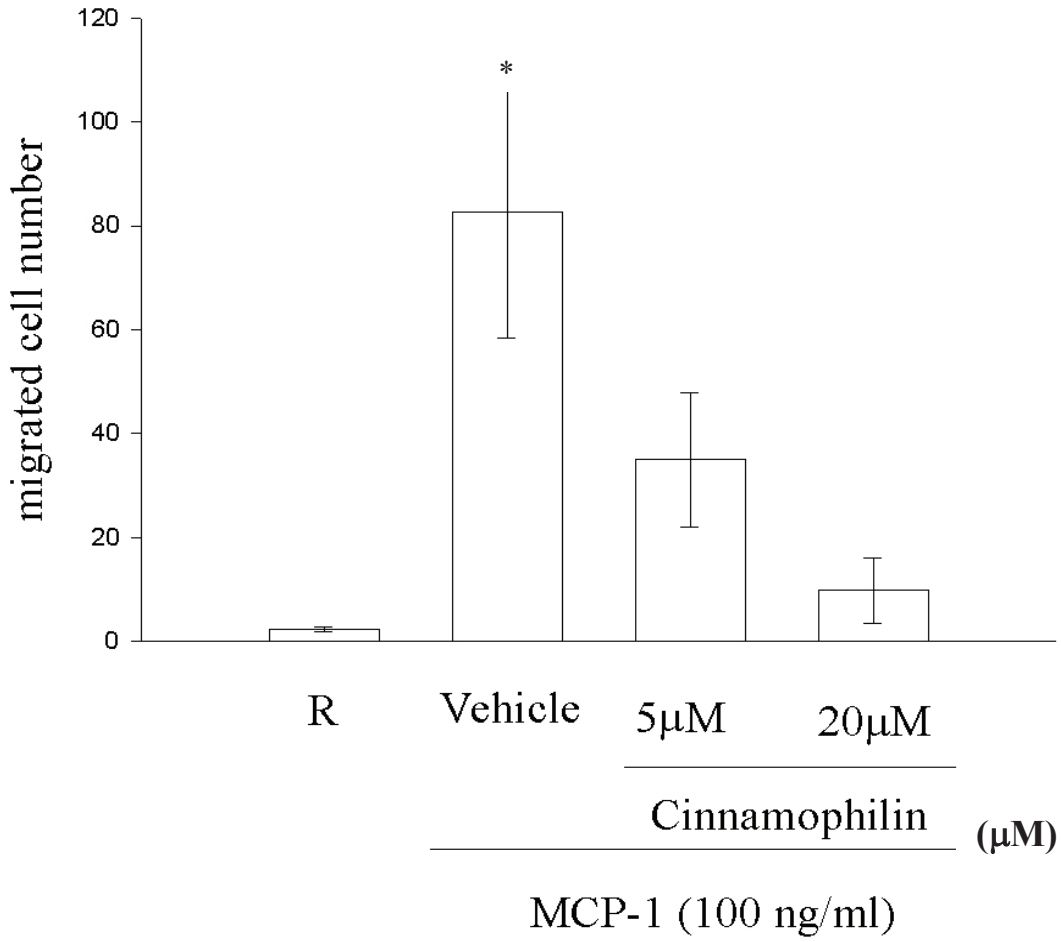

Figure 21 Effect of cinnamophilin on MCP-1-induced THP-1 cell migration. Cells (5×10^4) cultured for 6 hours in presence of different concentration of cinnamophilin (5, 20 μM) or vehicle were used for cell migration assay as described in Methods. Migrated cell numbers are presented as mean ± S.E.M. of three to four independent experiments. ∗: $P<0.05$, as compared with resting

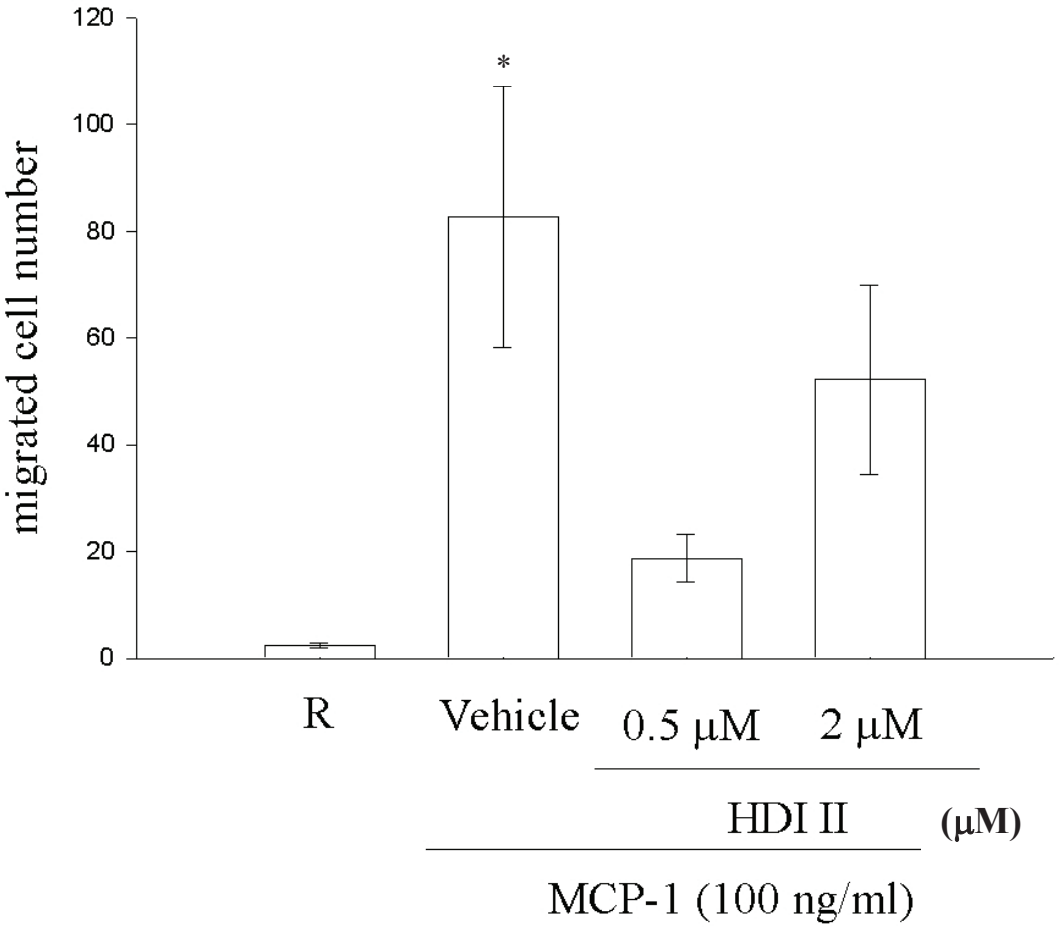

Figure 22 Effect of HDI II on MCP-1-induced THP-1 cell migration. Cells (5×10^4) cultured for 6 hours in presence of different concentration of HDI II (0.5, 2 μM) or vehicle were used for cell migration assay as described in Methods. Migrated cell numbers are presented as mean ± S.E.M. of three to four independent experiments. ∗: $P<0.05$, as compared with resting

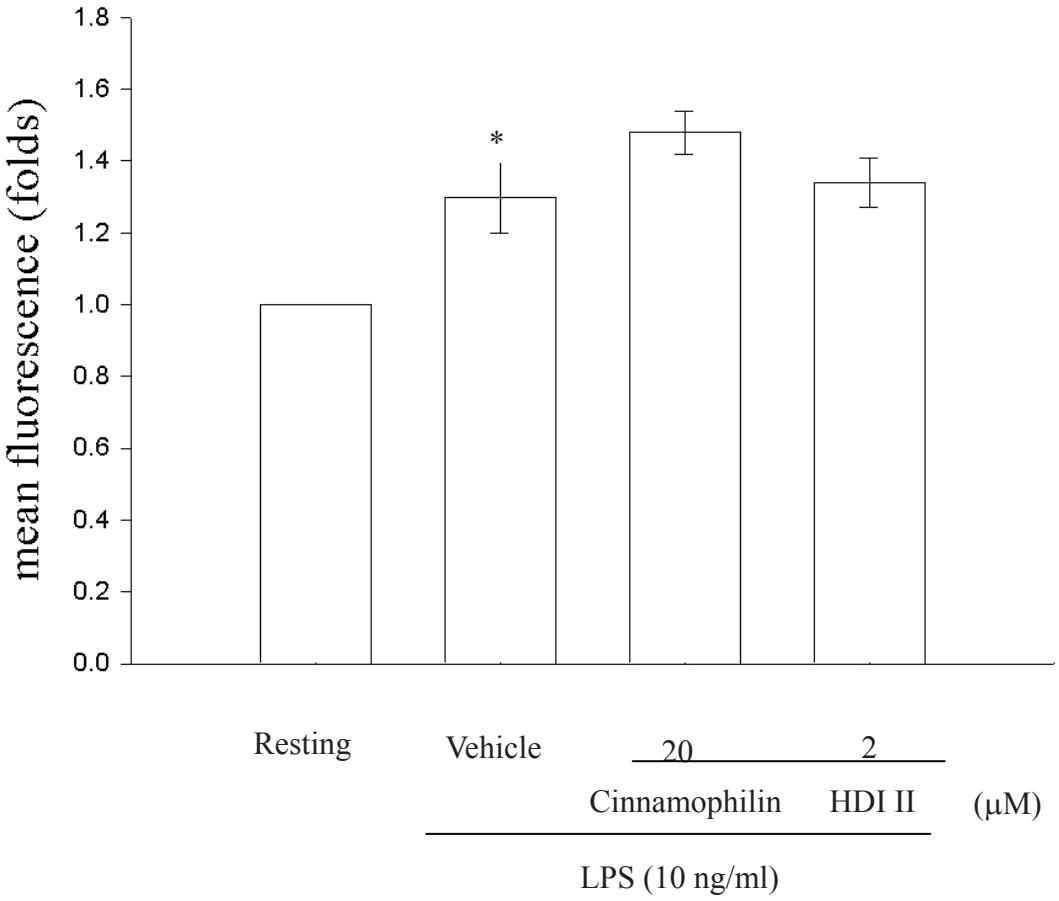

Figure 23 Effect of cinnamophilin and HDI II on LPS-induced production of CD11b from conditioned medium of THP-1 cells. THP-1 cells (0.5×10^6 cells/well) were dispensed on 24-well plates and treated with cinnamophilin (lane 3, 20 μM) or HDI II (lane 4, 2 μM) or vehicle (lane 2) for 15 min before treatment with LPS (10 ng/ml) for 18.5 hrs. Then surpernatant were obtained and detected in flow cytometry using FITC-labeled mouse monoclonal antibody to human CD11b. Depicted are mean fluorescence (folds) and standard error of two to four independent experiments. ∗: $P<0.05$, as compared with resting

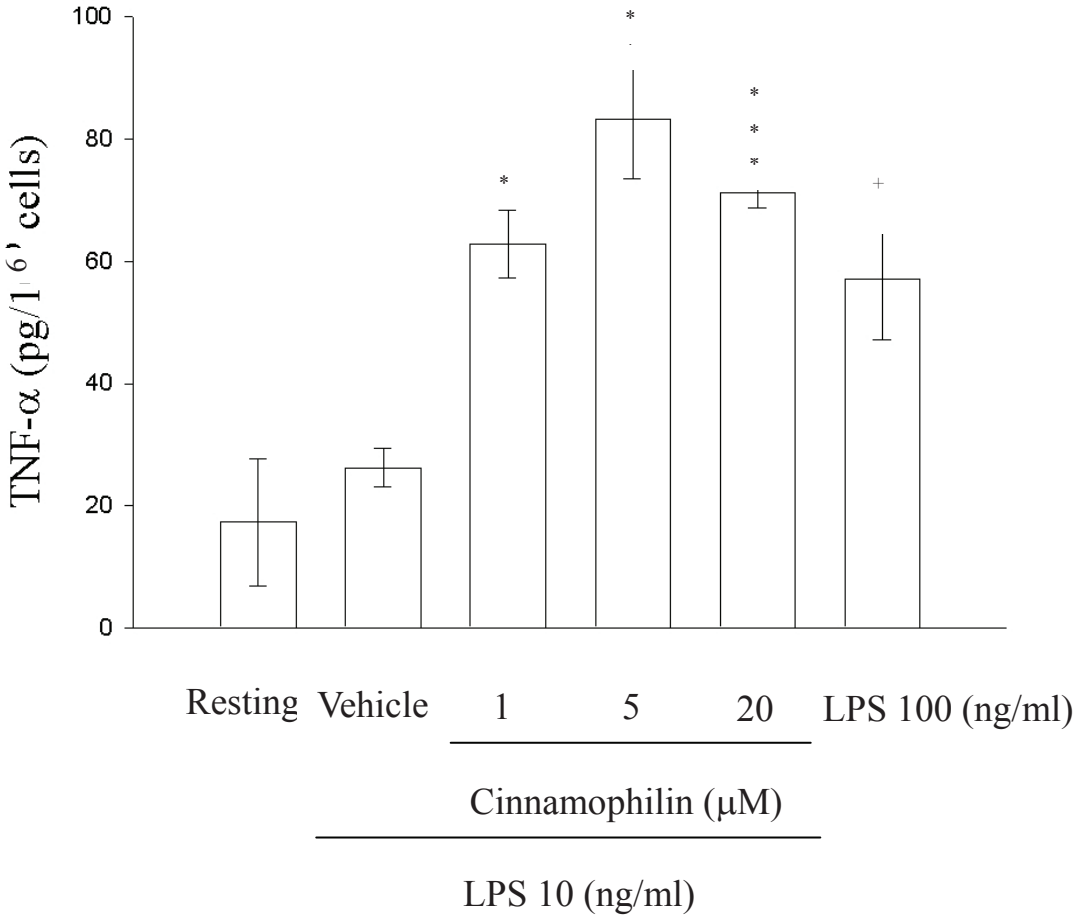

Figure 24 Effect of cinnamophilin on LPS-induced production of tumor necrosis factor-α (TNF-α) from conditioned medium of THP-1 cells. THP-1 cells (1×10^6 cell/ml) were dispensed on 24-well plates till 70-80 % confluence and treated with various concentrations of cinnamophilin (1, 5, 20 μM) for 15 min before treatment with LPS (10 ng/ml) for 24 hrs. Then supernatants were obtained and analysed for TNF-α protein expression by ELISA. TNF-α protein level is presented as mean ± S.E.M. pg/10^6 cells of three independent experiments. ∗: $P<0.05$, ∗∗: $P<0.01$, ∗∗∗: $P<0.001$ as compared with vehicle. ＋: $P<0.05$ as compared with resting.

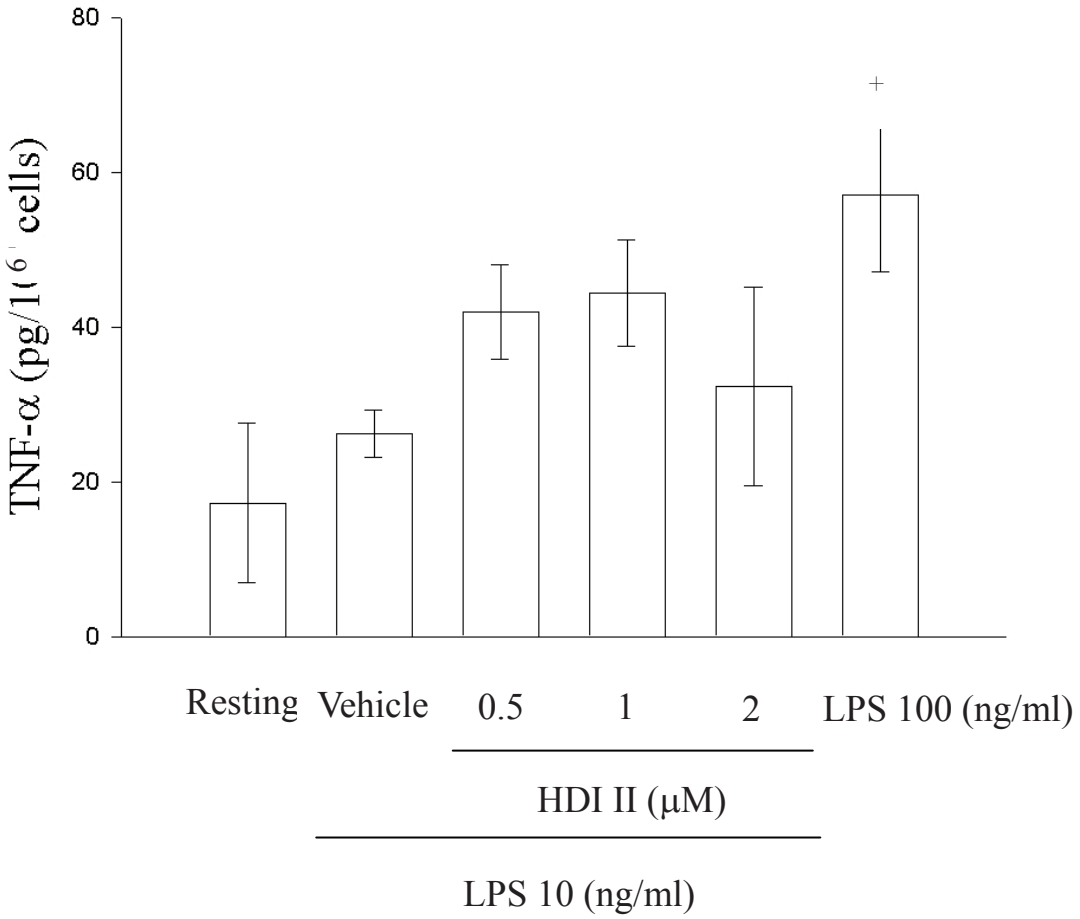

Figure 25 Effect of HDI II on LPS-induced production of tumor necrosis factor-α (TNF-α) from conditioned medium of THP-1 cells. THP-1 cells (1×10^6 cell/ml) were dispensed on 24-well plates till 70-80 % confluence and treated with various concentrations of HDI II (0.5, 1, 2 μM) for 15 min before treatment with LPS (10 ng/ml) for 24 hrs. Then supernatants were obtained and analysed for TNF-α protein expression by ELISA. TNF-α protein level is presented as mean ± S.E.M. pg/10^6 cells of three independent experiments. ＋: $P<0.05$ as compared with resting.

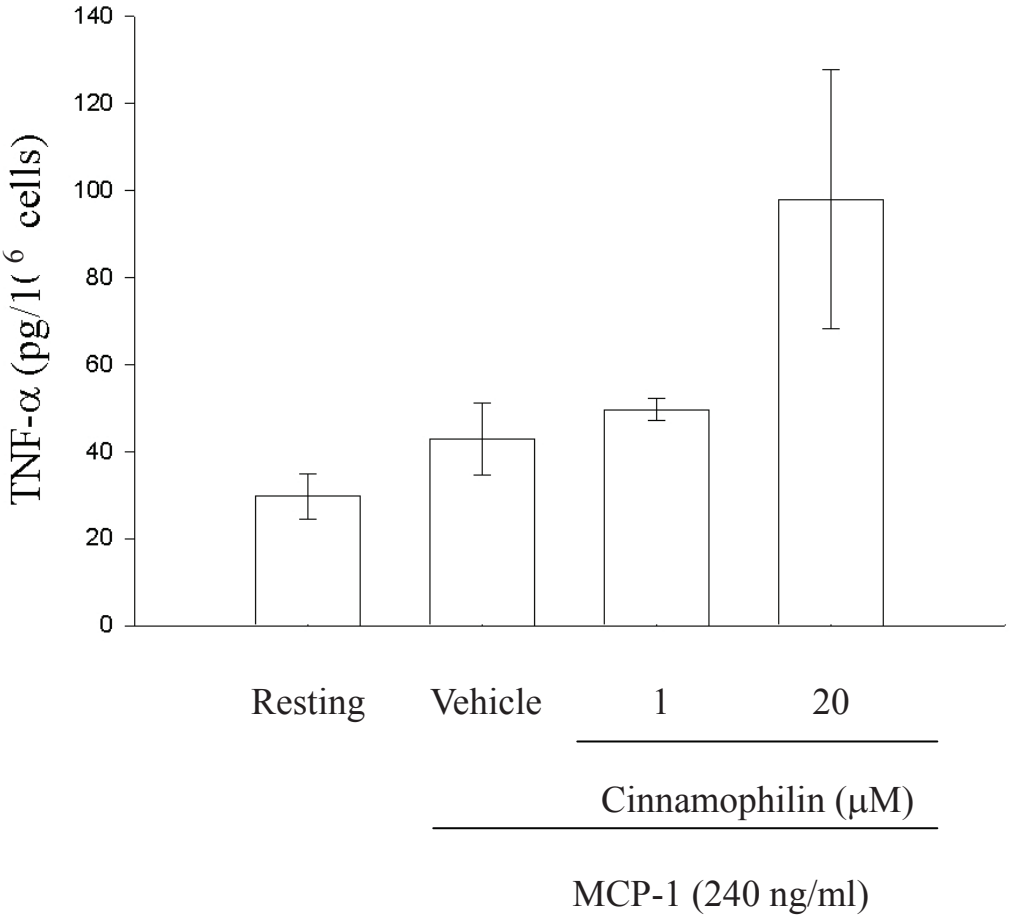

Figure 26 Effect of cinnamophilin on MCP-1-induced production of tumor necrosis factor-α (TNF-α) from conditioned medium of THP-1 cells. THP-1 cells (1×10^6 cell/ml) were dispensed on 24-well plates till 70-80 % confluence and treated with various concentrations of cinnamophilin (1, 20 μM) for 15 min before treatment with MCP-1 (240 ng/ml) for 24 hrs. Then supernatants were obtained and analysed for TNF-α protein expression by ELISA. TNF-α protein level is presented as mean ± S.E.M. pg/10^6 cells of three independent experiments.

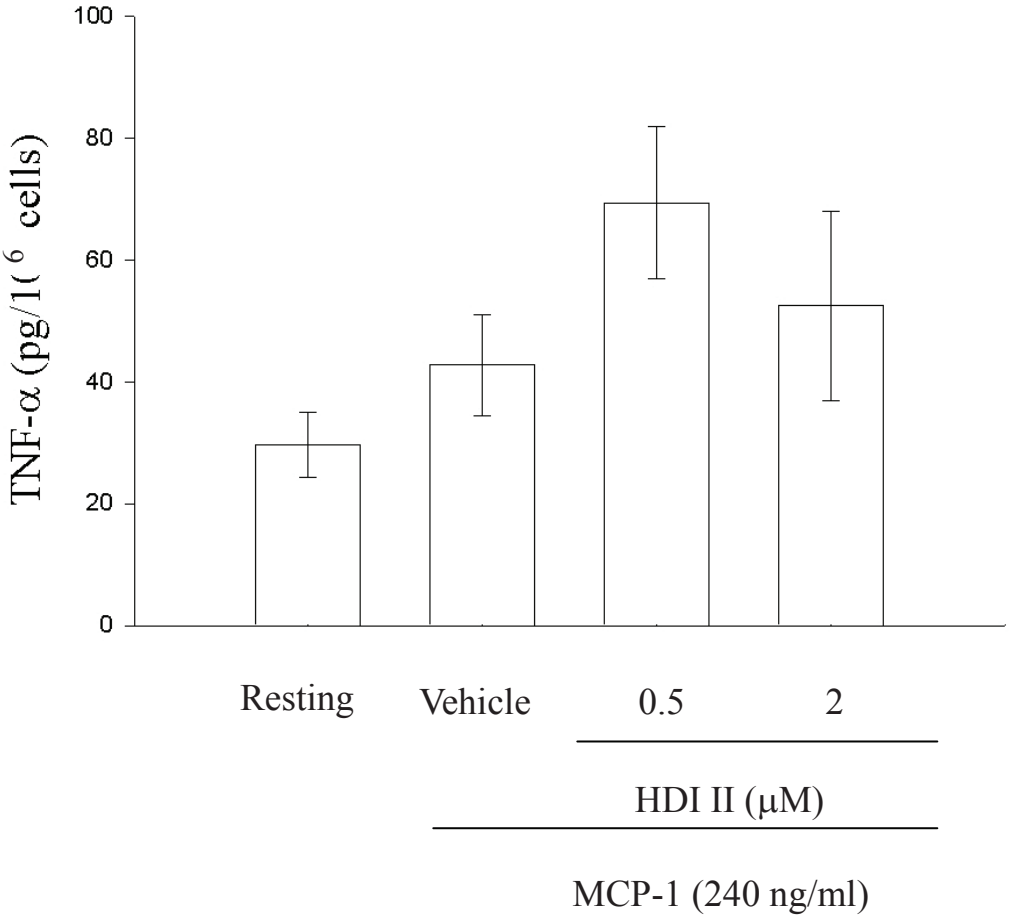

Figure 27 Effect of HDI II on MCP-1-induced production of tumor necrosis factor-α (TNF-α) from conditioned medium of THP-1 cells. THP-1 cells (1×10^6 cell/ml) were dispensed on 24-well plates till 70-80 % confluence and treated with various concentrations of HDI II (0.5, 2 μM) for 15 min before treatment with MCP-1 (240 ng/ml) for 24 hrs. Then supernatants were obtained and analysed for TNF-α protein expression by ELISA. TNF-α protein level is presented as mean ± S.E.M. pg/10^6 cells of three independent experiments.

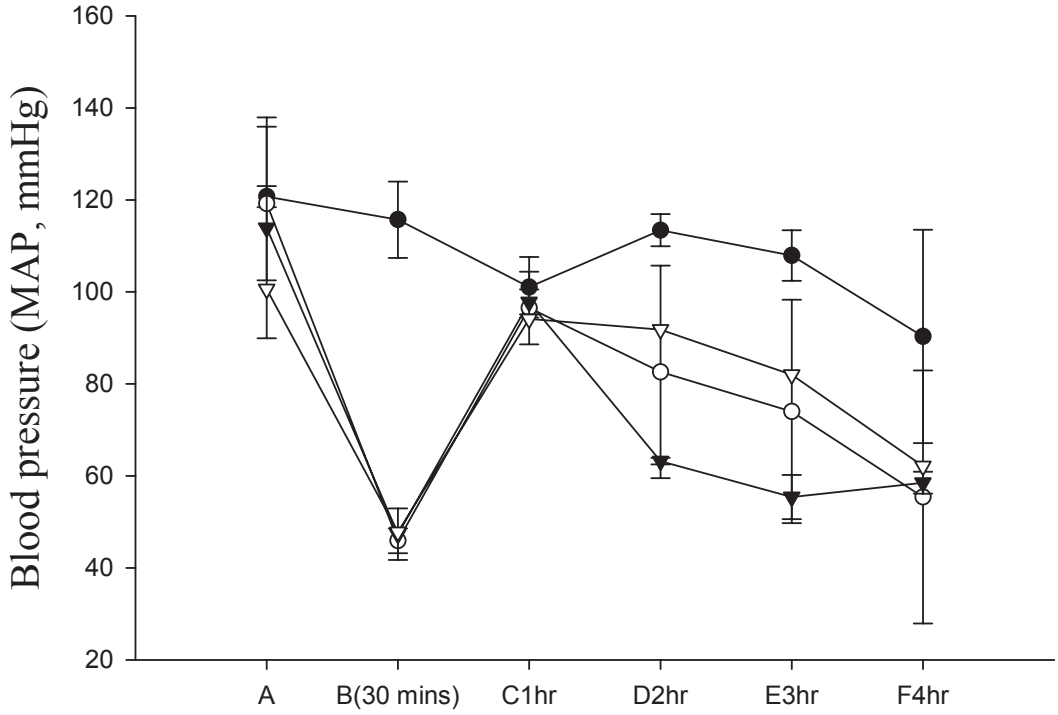

Figure 28 Hemodynamic effects in rats subjected to hemorrhagic shock were treated with either vehicle (○), YC-1 (10 mg/kg, ▼), or valproic acid (150 mg/kg, ▽). The surgical procedure without causing a hemorrage and treated with vehicle as sham-operated condition (●). The results are presented as mean ± S.E.M. (n = 2-8).

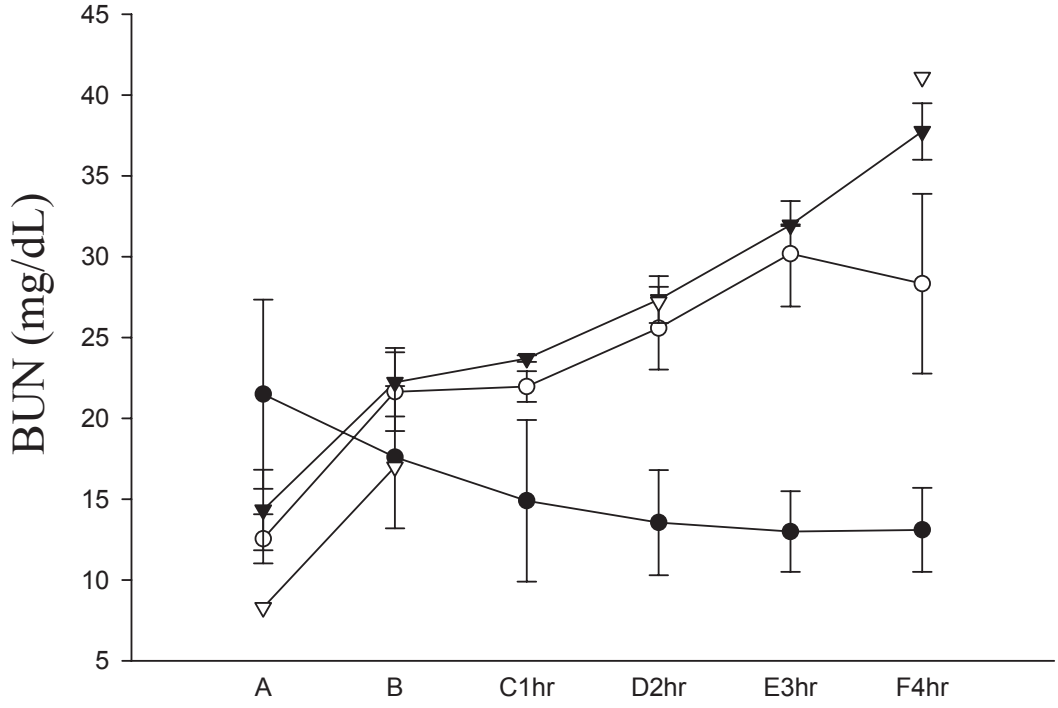

Figure 29 Serum levels of BUN in rats subjected to hemorrhagic shock were treated with either vehicle (○), YC-1 (10 mg/kg, ▼), or valproic acid (150 mg/kg, ▽). The surgical procedure without causing a hemorrage and treated with vehicle as sham-operated condition (●). The results are presented as mean ± S.E.M. (n = 2-8).

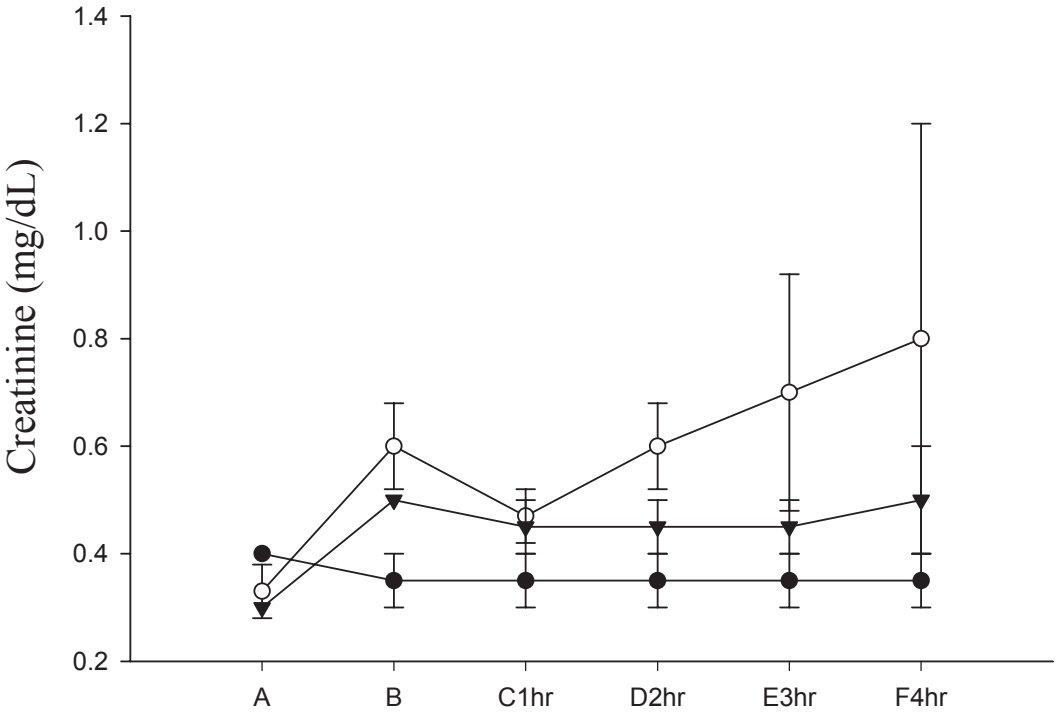

Figure 30 Serum levels of creatinine in rats subjected to hemorrhagic shock were treated with either vehicle (○), YC-1 (10 mg/kg, ▼), or valproic acid (150 mg/kg, ▽). The surgical procedure without causing a hemorrage and treated with vehicle as sham-operated condition (●). The results are presented as mean ± S.E.M. (n = 2-8).

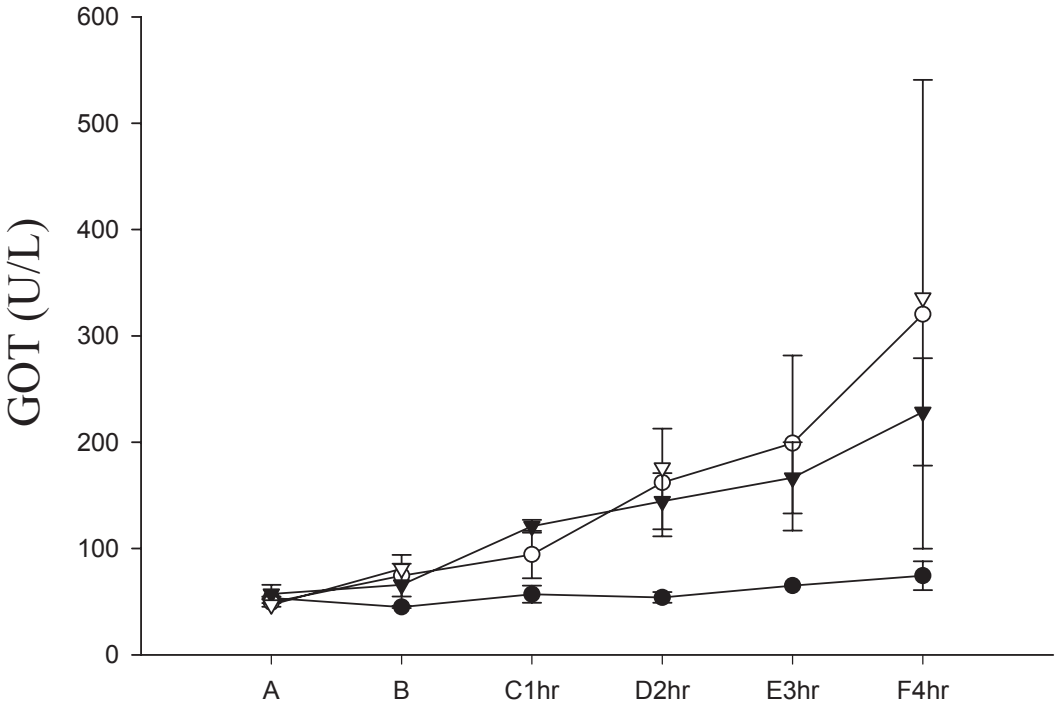

Figure 31 Serum levels of GOT in rats subjected to hemorrhagic shock were treated with either vehicle (○), YC-1 (10 mg/kg, ▼), or valproic acid (150 mg/kg, ▽). The surgical procedure without causing a hemorrage and treated with vehicle as sham-operated condition (●). The results are presented as mean ± S.E.M. (n = 2-8).

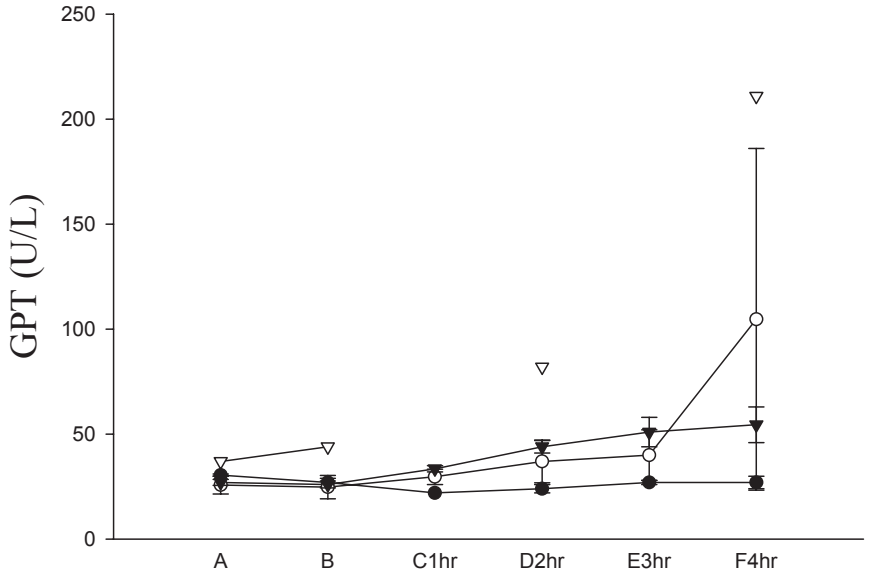

Figure 32 Serum levels of GPT in rats subjected to hemorrhagic shock were treated with either vehicle (○), YC-1 (10 mg/kg, ▼), or valproic acid (150 mg/kg, ▽). The surgical procedure without causing a hemorrage and treated with vehicle as sham-operated condition (●). The results are presented as mean ± S.E.M. (n = 2-8).