200817027

發明專利說明書

（本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號：96122231　　A61K 36/605 (2006.01)

※ 申請日期：96.6.20　　※IPC 分類：A61K 31/047 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

一、發明名稱：（中文/英文）

異阿伐酸(ISOALPHA ACID)為基質之蛋白質激酶調節癌症治療

ISOALPHA ACID BASED PROTEIN KINASE MODULATION CANCER TREATMENT

二、申請人：（共 1 人）

姓名或名稱：（中文/英文）

邁它蛋白質體有限責任公司

METAPROTEOMICS, LLC

代表人：（中文/英文）

艾馬/EMMA, DENNIS

住居所或營業所地址：（中文/英文）

美國加州聖克萊門特市帕達大道 100 號

100 Avenida La Pata, San Clemente, CA 92673, U.S.A.

國　籍：（中文/英文）

美國/U.S.A.

三、發明人：（共 7 人）

姓　名：（中文/英文）

1.翠瑪修/TRIPP, MATTHEW L.

2.巴約翰/BABISH, JOHN G.

3.柏蘭德/BLAND, JEFFREY S.

4.何愛咪/HALL, AMY

5.卡恩達/KONDA, VEERA

6.帕林達/PACIORETTY, LINDA M.

7.迪莎伊/DESAI, ANU

國　籍：(中文/英文)

1.-7.均為美國/U.S.A.

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為：　年　月　日。

☑申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號　順序註記】

☑ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

美國；西元 2006 年 06 月 20 日；60/815,064

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號　順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼　順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼　順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

國　籍：(中文/英文)

1.-7.均為美國/U.S.A.

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為：　年　月　日。

☑申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號　順序註記】

☑ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

美國；西元 2006 年 06 月 20 日；60/815,064

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號　順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼　順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼　順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

相關申請案之交互參照

本申請書係主張2006年6月20日申請之美國臨時申請案序號60/815,064之優先權。

【發明所屬之技術領域】

本發明一般係關於可用於治療或抑制易受蛋白質激酶調節影響之癌症之方法及組合物。更特而言之，本發明係關於利用通常由蛇麻草(hop)或由相思樹(*Acacia*)屬植物成員中分離出之化合物或衍生物，或其組合物之方法及組合物。

【先前技術】

訊號傳導提供了一個對維持正常體內平衡重要的拱形調節機制，或若經擾動，係作為引起或造成與許多疾病病理及症狀有關之機制。在細胞層級上，訊號傳導係指訊號或傳遞訊號基團由細胞外部移動至細胞內部。訊號，一旦到達其受體目標，可引發許多細胞事件所必需之配體-受體交互作用，其中某些可進一步作為後續訊號。這些交互作用不僅作為串集，同時亦為能提供微調控制體內平衡過程之錯綜複雜的訊號情事之交互作用網路或網絡。然而這些網路可變成失調，因而導致細胞活性改變以及在反應細胞間表現之基因作用方式改變。參見，例如圖1係顯示調節胰島素敏感性及阻抗性之交互作用的激酶網之簡圖。

訊號傳導受體一般係分為三類。第一類受體為穿透細胞膜並具有一些內生酵素活性之受體。具有內生酵素活性之代

表性受體包括酪胺酸激酶(例如PDGF、胰島素、EGF及FGF受體)、酪胺酸磷酸酶(例如T細胞及巨噬細胞之CD45[群集決定因子(*cluster determinant)-45*]蛋白)、鳥苷酸環化酶(例如鈉尿(natriuretic)肽受體)及絲胺酸/蘇胺酸激酶(例如激活素及TGF-β受體)。具有內升性酪胺酸激酶活性之受體能自動磷酸化以及將其他基質磷酸化。

第二類受體為在細胞內與GTP-結合及水解蛋白(稱為G-蛋白)偶合之受體。這類與G-蛋白作用之受體具有特徵為7個跨膜區域之結構。這些受體稱為蛇型(serpentine)受體。此類之實例有腎上腺素受體、氣味受體及某些荷爾蒙受體(例如，升糖素、血管收縮素(angiotensin)、血管升壓素(vasopressin)及緩激肽(bradykinin))。

第三類受體可描述為在細胞內發現及經與配體結合後，遷移至細胞核，在此處配體-受體複合物係直接影響基因轉錄。

編碼受體酪胺酸激酶(RTK)之蛋白質含有四個主要區域，其為：a)一跨膜區、b)一胞外配體結合區、c)一胞內調節區及d)一胞內酪胺酸激酶區。RTK之胺基酸序列係高度地以cAMP-依賴蛋白質激酶(在ATP及受質結合區內)之胺基酸保留。RTK蛋白質係分類為以其胞外蛋白結構特性為基礎之家族，其包括富含半胱胺酸區、類免疫球蛋白區、鈣黏附素(cadherin)區、富含白胺酸區、環餅區(Kringle domain)、酸性區、纖連蛋白(fibronectin)第III型重複區、類盤狀I(discoidin I-like)區及類EGF區。依照這些不同胞外區之

存在，RTK已再細分為至少14個不同的家族。

許多具有內生性酪胺酸激酶活性之受體因磷酸化而與其他訊號傳遞聯集之蛋白相互作用。這些其他蛋白包含一胺激酸序列區，其係與首先在c-Src原致癌基因中辨識出之區域同源。這些區域稱為SH2區。

含有SH2區之蛋白質與RTK或酪胺酸激酶相關受體之相互作用導致含SH2蛋白質之酪胺酸磷酸化。所生成的磷酸化產生活性上之改變(正向或負向)。數個具有內生性酵素活性之含SH2蛋白質包括磷脂酶C-γ(PLC-γ)、與GTP酶活化蛋白(rasGAP)連結之原致癌基因c-Ras、磷酯醯肌醇-3-激酶(PI-3K)、蛋白質酪胺酸磷酸酶-1C(PTP1C)，以及蛋白質酪胺酸激酶(PTK)Src家族之成員。

非受體蛋白質酪胺酸激酶(PTK)係藉由或大量與本身缺乏酵素活性之細胞受體偶合。經由蛋白相互作用之受體訊號傳遞實例包括胰島素受體(IR)。此受體具有內生性酪胺酸激酶活性，但不直接在自體磷酸化後與含SH2區之酵素活性蛋白質(例如PI-3K或PLC-γ)作用。取而代之的，此主要的IR受質為一種稱為IRS-1之蛋白。

TGF-β超家族之受體代表原型化受體絲胺酸/蘇胺酸激酶(RSTK)。多功能之TGF-β超家族蛋白質包括激活素(activin)、抑制素(inhibin)及骨形成蛋白質(BMPs)。這些蛋白質可引發及/或抑制細胞增生或分化並調節各種細胞類型之遷移和黏附。TGF-β之一主要效用為經由細胞週期調節進化。此外，涉及細胞對TGF-β反應之核蛋白為 c-Myc，其

直接影響帶Myc-結合元素之基因的表現。PKA、PKC及MAP激酶代表三種主要非受體絲胺酸/蘇胺酸激酶之種類。

目前有許多實驗室已在進行激酶活性及疾病狀態關係之研究。此等關係可為疾病本身之原因或密切與疾病相連的症狀學之表現和惡化有關。類風濕性關節炎，一種自體免疫疾病為一目前研究中之激酶與疾病關係之實例。

自體免疫疾病係因免疫系統功能失調所導致，其中身體產生自我抗體，攻擊其本身器官、組織及細胞--一種經由蛋白質磷酸化介導之過程。

超過80種臨床上不同的自體免疫疾病已辨識出，且在美國總計約有2仟4百萬人為其所苦。自體免疫疾病可影響身體的組織或器官。因為此多變性，依照自體免疫攻擊的位置，其可造成大範圍的症狀及器官損傷。雖然目前存有許多自體免疫疾病之治療，但對其仍無任何決定性的治療。降低嚴重度之治療常常具有不利的副作用。

類風濕性關節炎(RA)為最普遍及最佳自體免疫疾病之研究，且全世界約有1%的人口為其所苦，而如同其他自體免疫疾病，原因仍未知，且患病人口仍在增加。RA的特徵為慢性滑囊發炎造成漸進式關節之骨骼及軟骨破壞。細胞激素、趨化激素及前列腺素為主要的發炎傳遞因子，並可在活性疾病病患之關節和血液中大量發現。例如，PGE2係大量地存在RA病患的滑囊液中。PGE2量增加係由導入環氧化酶-2(COX-2)所引起並在發炎位置能引發一氧化氮合成酶(iNOS)。[參見，例如van der Kraan PM及van den Berg WB. Anabolic and

destructive mediators in osteoarthritis. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 3:205-211, 2000；Choy EHS及Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. N Eng J Med. 344:907-916, 2001; 及Wong BR, 等人，Targeting Syk as a treatment for allergic and autoimmune disorders. Expert Opin Investig Drugs 13:743-762, 2004.]

對人類RA之病源學及致病病理了解仍貧乏，但其進程可分三階段來看。開始期，在此期樹突細胞出現對抗自體反應T細胞之自身抗原。T細胞經由細胞激素活化了自體反應B細胞，導致自身抗體產生，其依次於關節上形成免疫複合物。在效應物時期，免疫複合物於巨噬細胞及肥大細胞上與Fcf受體結合，導致細胞激素及趨化激素、發炎和疼痛釋放出。在最終期，細胞激素及趨化激素活化及招募滑囊纖維母細胞、破骨細胞及釋放蛋白酶、酸及ROS例如O2-之多形核嗜中性細胞，導致不可逆之軟骨和骨質破壞。

在膠原蛋白引發RA的動物模型中，T及B細胞的參與對引發疾病是必須的。在抗原受體觸發後，B細胞活化經由脾臟酪胺酸激酶(Syk)及磷酯醯肌醇3-激酶(PI3K)傳遞訊號[Ward SG, Finan P. Isoform-specific phosphoinositide 3-kinase inhibitors as therapeutic agents. Curr Opin Pharmacol. Aug;3(4):426-34, (2003)]。待抗原受體在B細胞上接合後，Sky於三個酪胺酸上磷酸化。Syk為一種72-kDa蛋白質-酪胺酸激酶，其在將免疫識別受體偶合至多

下游訊號傳遞路徑上扮演著一個中樞性的角色。這個功能為其催化活性及其參與含SH2區作用蛋白相互作用能力之性質。Tyr-317、-342及-346之磷酸化創造了含多個SH2區蛋白質之停泊位點[Hutchcroft, J. E., Harrison, M. L. & Geahlen, R. L. (1992). Association of the 72-kDa protein-tyrosine kinase Ptk72 with the B-cell antigen receptor. J. Biol. Chem. 267: 8613—8619, (1992)及Yamada, T., Taniguchi, T., Yang, C., Yasue, S., Saito, H. & Yamamura, H. Association with B-cell antigen cell antigen receptor with protein-tyrosine kinase-P72(Syk) and activation by engagement of membrane IgM. Eur. J. Biochem. 213: 455—459,(1993)]。

Syk已顯示為活化PI3K，回應包括B細胞抗原受體(BCR)及巨噬細胞或嗜中性細胞Fc受體接合之各種訊號所必須。[參見Crowley, M. T., 等人,. J. Exp. Med. *186:* 1027—1039, (1997)；Raeder, E. M., 等人, J. Immunol. 163, 6785—6793, (1999);及Jiang, K., 等人, Blood 101, 236-244, (2003)]。在B細胞中，BCR-刺激PI3K之活化作用可經由銜接蛋白質例如BCAP、CD19或Gabl之磷酸化來進行，其創造了PI3K之p85調節亞單位之結合位置。藉由許多IgG受體傳輸訊號需要活化Syk及PI3K二者，及並將其招募至群集受體之位置。在嗜中性細胞及單核細胞中，以FcgRIIA上之活化模體序列為基準之PI3K與磷酸化免疫受體酪胺酸之直接結合被認為是招募PI3K至受體之機制。且最近已有報告

指出Syk及PI3K間之直接分子交互作用[Moon KD, 等人, Molecular Basis for a Direct Interaction between the Syk Protein-tyrosine kinase and Phosphoinositide 3-kimase. J. Biol. Chem. 280, No. 2, Issue of January 14, pp. 1543-1551, (2005)]。

許多的研究已顯示COX-2活性之抑制劑會導致PGE2產生減少並有效的舒緩患有慢性關節炎症狀(例如RA)病患之疼痛。然而，因為COX-1及COX-2涉及重要的組織例如胃腸道及心血管系統之功能維護，所以對抑制COX酵素活性藥劑之不利的作用之關注逐漸升高。因此，設計一種供這些病患舒緩疼痛之安全、長期治療方法是必須的。因為COX-2及iNOS合成之引發劑係經由Syk、PI3K、p38, ERK1/2及NF-kB依賴路徑傳送訊號，這些路徑之抑制劑可為自體免疫症狀之治療劑，特別是用於RA病患之發炎及退化中的關節。

在RAW 264.7小鼠發炎之巨噬細胞模型中對PGE2抑制作用之篩選，發現了蛇麻草衍生物Rho異阿伐酸（isoalpha acid)(RIAA)。在本研究中，吾等評估了RIAA是否為一直接的COX酵素抑制劑及/或其是否抑制了COX-2及iNOS之引入。吾等發現RIAA無法直接抑制COX酵素活性，但取而代之的，抑制了NF-kB驅動酵素引入，而使吾等研究RIAA是否為一激酶抑制劑。吾等發現，RIAA抑制了Syk及PI3K二者，而使吾等以先驅研究試驗其在患有各種自體免疫疾病之病患中之效力。

目前正在研究其與疾病症狀關聯性之其他激酶，包括

Aurora、FGFB、MSK、RSE及SYK。

Aurora-重要的細胞分裂調節劑，絲胺酸/蘇胺酸激酶之Aurora家族包括Aurora A、B及C。Aurora A及B激酶已辨識出在有絲分裂中具有直接但不同的作用。這三種同質物(isoform)之過度表現與各種範圍的人類腫瘤類型，包括白血病、大腸直腸癌、乳癌、前列腺癌、胰臟癌、黑色素瘤及子宮頸癌相關聯。

纖維母細胞生長因子受體(FGFR)為一種受體酪胺酸激酶。此受體之突變可導致經由受體二聚化作用之持續活化、激酶活化及增加對FGF之親和力。FGFR已與軟骨發育不全、血管新生及先天性疾病相關聯。

MSK(促分裂原-及壓力-活化蛋白質激酶)1及MSK2為在活體中活化ERK(胞外-訊號-調節激酶)1/2或p38 MAPK(促分裂原活化蛋白質激酶)路徑下游之激酶，且為CREB(cAMP反應元件結合蛋白)及組蛋白H3之磷酸化所必須。

Rse主要係高度地表現於腦中。Rse亦稱為Brt、BYK、Dtk、Etk3、Sky、Tif或海-相關受體酪胺酸激酶，係為一種受體酪胺酸激酶，其主要的作用為保護神經元免於凋亡。Rse、Axl及Mer屬於新辨識出之細胞黏附分子相關受體酪胺酸激酶之家族。GAS6為一酪胺酸激酶受體Rse、Axl及Mer之配體。GAS6係作為生理抗發炎劑，係由靜止的EC所產生且當前發炎刺激啟動EC之前黏附機制時耗盡。

肝醣合成酶激酶-3(GSK-3)存在有二種同質物，經辨識為一涉及控制肝醣代謝之酵素，且可作為細胞增生及細胞死

亡之調節劑。不同於許多的絲胺酸/蘇胺酸激酶，GSK-3具結構上之活性且在回應胰島素或生長因子時受到抑制。其在肌肉肝醣合成之胰島素刺激中的作用使其成為糖尿病及代謝症狀治療介入之引人注意的目標。

GSK-3失調已顯示為胰島素阻抗發展之焦點。抑制GSK3，不僅藉由增加葡萄糖處理率同時亦藉由抑制肝細胞中的醣質新生基因例如磷酸烯醇丙酮酸羧激酶及葡萄糖-6-磷酸酶來改善胰島素阻抗。再者，選擇性的GSK3抑制劑，在活體外或活體中賦予肌肉葡萄糖運輸及利用之胰島素依賴活化作用。GSK3亦直接磷酸化胰島素受體基質-1之絲胺酸/蘇胺酸殘基，其導致了胰島素訊號傳遞減損。GSK3在胰島素訊號傳遞路徑中扮演一個重要的角色，且其在缺乏胰島素下磷酸化及抑制肝醣合成[Parker, P. J., Caudwell, F. B.及Cohen, P. (1983) *Eur. J. Biochem.* 130:227-234]。有越來越多的證據支持GSK-3在調節骨骼肌葡萄糖運輸活性中之負面的角色。例如，以選擇性GSK-3抑制急性治療胰島素阻抗嚙齒動物改善了整體胰島素敏感性及胰島素在肌肉葡萄糖運輸之作用。以專一性GSK-3抑制劑慢性治療胰島素阻抗糖尿病前期肥胖的Zucker大鼠增進了口服葡萄糖耐受性及整體胰島素敏感性，並與改善血脂異常及改善骨骼肌之IRS-1-依賴胰島素訊號傳遞。這些結果提供了肌肉中GSK-3之選擇性訂定目標可作為治療肥胖症有關的胰島素阻抗之有效干預之證據。

Syk為一涉及由B細胞受體及IgE受體傳遞訊號之與

ZAP-70有關的非受體酪胺酸激酶。Syk在這些受體間與ITAM模體結合，及引發經由Ras、PI 3-激酶及PLCg訊號傳遞路徑之訊號傳遞。Syk在胞內訊號傳遞扮演一個重要的角色，且因此為發炎疾病和呼吸疾病之重要的目標。

因此，找出能調節單一或多種選擇的激酶之表現或活性之方法及組合物係為有用的。了解各種蛋白質激酶及激酶路徑間之關係和相互作用的複雜性，增強了發展能作為對多種激酶或多種激酶路徑具有有利活性之蛋白質激酶調節劑、調整劑或抑制劑之藥劑的迫切需求。特定以一種激酶或一種激酶路徑為路徑為目標之單一藥劑方式，可能不適合治療非常複雜的疾病、症狀及病症，例如糖尿病及代謝症候群。調節多種激酶之活性可另外產生協乘治療效用，其經由單一激酶調節是無法得到的。

此調節及使用可能需要持續的用於慢性症狀或間歇的使用，例如發炎時(為症狀本身或為許多疾病和症狀之整體性成份)需要。此外，作為激酶調節劑之組合物可廣泛的作用於各種哺乳動物之病症。本發明係描述由蛇麻草或相思樹(*Acacia*)衍生出之化合物及萃取物，其可用於調節激酶活性，因而提供了治療許多疾病相關症狀伴隨增加生活品質之方法。

【發明內容】

本發明一般係關於可用於治療或抑制易受蛋白質激酶調節影響之癌症之方法及組合物。更特而言之，本發明係關於利用通常由蛇麻草(hop)或由相思樹(*Acacia*)屬植物成員

中分離出之化合物或衍生物，或其組合物之方法及組合物。

在本發明第一實施例中係描述治療有此需要之哺乳動物其反應蛋白質激酶調節之癌症之方法。該方法包括投予此哺乳動一治療上有效量之異阿伐酸。

在本發明第二實施例中係描述治療有此需要之哺乳動物其反應蛋白質激酶調節之癌症之組合物，其中該組合物係包含一治療上有效量之異阿伐酸，而該治療上有效量調節了癌症有關的蛋白質激酶。

【實施方式】

本發明一般係關於可用於治療或抑制易受蛋白質激酶調節影響之癌症之方法及組合物。更特而言之，本發明係關於利用通常由蛇麻草(hop)或由相思樹(*Acacia*)屬植物成員中分離出之化合物或衍生物，或其組合物之方法及組合物。

本文所指之專利、公開申請案及科學文獻係為熟習本項技術者所知且其全文係以引用的方式併入本文中，就如同其特定及各別地提出併入作為參考。任何本文所引述的參考文獻與此說明書中特定的教導間之任何衝突，應以利於後者來決定。同樣地，任何字詞或片語之技術所了解的定義與本說明書中特定教導之字詞或片語之定義間的衝突，應以利於後者來決定。

本文所用之技術及科學術語具有熟習本項技術者一般所了解之意義，除非另有定義否則亦適用於本發明。本文係言及熟習本項技術者已知之各種方法學及物質。敘述重組DNA技術一般原理之標準參考文獻包括Sambrook 等人,

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)；Kaufman 等人, Eds., Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology in Medicine, CRC Press, Boca Raton (1995)；McPherson, Ed., Directed Mutagenesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford (1991)。敘述藥學一般原理之標準參考文獻包括Goodman及Gilman的The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th Ed., McGraw Hill Companies Inc., New York (2006)。

在說明書及所附的申請專利範圍中，除非文中清楚的指出，否則單數形式包括複數的指示物。除非文中清楚的指出，否則如本說明書中所用，單數形式「一(a、an及the)」亦特定涵蓋其所指術語之複數形式。此外，除非有特別指出否則如本文中所用之「或」一詞係用在「及/或」所「包括(inclusive)」的意義且不「排除(exclusive)」在「或(either/or)」意義之外。術語「約」用於本文係指大約、在範圍內、大致或在附近。當術語「約」與數字範圍聯合使用時，其係藉由將所述的數值界線向上或向下延伸修改範圍。一般而言，術語「約」於本文係用於以20%變化向上及向下修改所述之值。

如本文所用，詳述變數之數字範圍係希望傳達本發明能以可變的相當於範圍內之任何值來施行。因此，就本質上為不連續的變數而言，該變數可等於數字範圍內之任何整數值，包括範圍的末端值。同樣的，就本質上為連續的變數而

言，該變數可等於數字範圍之任何實數，包括範圍的末端值。例如，描述具有介於0及2間之值之變數，可為1或2，就本質上為不連續的變數，並可為0.0、0.1、0.01、0.001或任何其他本質上為連續的變數之實數。

下文係詳細地論及本發明之特定實施例。當本發明與這些特定實施例合併描述時，應了解，並不希望將本發明限制於該等特定的實施例中。相反的，如所附的申請專利範圍之定義，在可包含於本發明的精神及範圍中，係希望涵蓋選擇方案、修改及同等物。在下列說明中，許多特定之詳述係用來說明以提供全面了解本發明。在無某些或所有這些詳述下，亦可施行本發明。在其他實例中，熟知之過程操作並無詳述，以便於不會非必要的使本發明變艱澀。

熟習本項技術者已知之任何適合的物質及/或方法皆可用於進行本發明。然而，係描述較佳的物質及方法。除非另有說明，否則下列說明及實例所言及之物質、試劑及其類似物品可從市面上購得。

本發明之第一實施例係揭示治療有此需要之哺乳動物其易受蛋白質激酶調節影響之癌症之方法，其中該方法係包括投予哺乳動物一治療上有效量之異阿伐酸。在此實施例之某些方面，異阿伐酸係由異葎草酮(isohumulone)、異近葎草酮(isoadhumulone)及異類葎草酮(isocohumulone)組成之群中選出。

又在此實施例之其他方面，調節之蛋白質激酶係由下列組成之群中選出：AMPK、Aurora-A、Bmx、BTK、CHK1、CHK2、

CK1γ1、CK1γ2、CK1γ3、DAPK1、DAPK2、EphB1、ErbB4、Fer、FGFR2、Flt4、GSK3β、GSK3α、Hck、IGF-1R、MAPKAP-K2、MSK2. PAK3、PI3K、Pim-1、PKA(b)、PKCα、PRAK、Ron、Rsk1、Rsk2、Syk、Tie2及TrkA。

又其他方面，易反應激酶調節之癌症係由下列組成之群中選出：膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、肺癌、白血病、黑色素瘤、前列腺癌、甲狀腺癌及子宮癌。

用於此實施例方法之組合物進一步係包含一或多種由下列組成之群中選出之成員：抗氧化物、維生素、礦物質、蛋白質、油脂及碳水化合物或醫藥上可接受之由下列組成之群中選出之賦形劑：包膜、等張及吸收延遲劑、結著劑、黏著劑、潤滑劑、崩解劑、著色劑、調味劑、甜味劑、吸收劑、洗滌劑及乳化劑。

如文中所用，「疾病相關激酶」係指該等各別蛋白質激酶或激酶之群族或家族為直接疾病之原因或其活性係與作為加劇所論及之疾病症狀之路徑有關者。

片語「蛋白質激酶調節有利於受試者之健康」係指其中蛋白質激酶調節(上調或下調)導致減少、預防及/或逆轉疾病之症狀或增加第二種治療形式之活性之該等例子。

片語「易反應蛋白質激酶調節之癌症」係指其中給予本發明化合物a)直接調節癌細胞之激酶，其中該調節產生有利於受試者健康之效用(例如目標癌細胞之凋亡或生長抑制)；b)調節第二種激酶，其中該調節聯集或給予之激酶調節產生有利於受試者健康之效用；或c)所調節的目標激酶致使癌細

胞更易感受第二種治療形式(例如化療或放射線治療)之該等例子。

如本說明書中所用，無論是在轉折片語或申請專利範圍本體中，術語「包含(comprise及comprising)」係應解釋為具有開放式意義。亦即，該術語應解釋為與片語「具有至少」或「包括至少」同義。當用於製程之內容中時，術語「包括」係指該製程包括至少所提及之步驟，但可包括另外的步驟。當用於化合物或組合物之內容中時，術語「包含」係指該化合物包含至少此所提的特性或化合物，但亦可包括另外的特性或化合物。

如文中所用，術語「衍生物」或「衍生」一事係指一化學物質在結構上與另一物質相關，且理論上可由其得之，亦即可從另一物質製造之物質。衍生物可包括經由化學反應得來之化合物。

如文中所用，術語「蛇麻草萃取物」係指(1)將蛇麻草植物產品暴露於溶劑中，(2)將溶劑由蛇麻草植物產品中分離出，及(3)去除溶劑所產生之固體物質。「酒花粕(spent hop)」係指蛇麻草萃取製程後，蛇麻草植物產品之殘渣。蛇麻草化學之詳細論述請參見Verzele, M.及De Keukeleire, D., Developments in Food Science 27: Chemistry and Analysis of Hop and Beer Bitter Acids, Elsevier Science Pub. Co., 1991, New York, USA，其全文係以引用的方式併入本文中。如文中所用，當有關RIAA，「Rho」係指該等還原的異阿伐酸，其中該還原係將4-甲基-3-戊烯醯基側鏈

之羰基基團還原。

如文中所用，術語「溶劑」係指具有必須特性以從蛇麻草植物產品中萃取固體物質之水性或有機性質之液體。溶劑之實例包括(但不限於)水、蒸氣、過熱水、甲醇、乙醇、己烷、氯仿、液態CO_2、液態N_2或任何此等物質之組合物。

如文中所用，術語「CO_2萃取物」係指將蛇麻草植物產品暴露於液態或超臨界CO_2製備物中，接著隨後移除CO_2所產生之固體物質。

術語「醫藥上可接受」係在與組合物之其他成份相容及對其賦形劑無害的觀念下使用。

如文中所用，「化合物」可由其化學結構、化學名稱或俗名來辨識。當化學結構及化學名稱或俗名相衝突時，化學結構為辨識化合物之決定要件。本文所述的化合物可含有一或多個對掌中心及/或雙鍵，因此可以立體異構物存在，例如雙鍵異構物(亦即幾何異構物)、鏡像異構物或非對映異構物。因此，本文所描繪的化學結構係涵蓋所說明或辨識化合物之所有可能的鏡像異構物及立體異構物，包括純立體異構形式(例如純幾何異構形、純鏡像異構形或純非對映異構形)及鏡像異構形和立體異構形混合物。鏡像異構形和立體異構形混合物可使用熟習本項技術者已知之分離技術或對掌合成技術解析成其成份鏡像異構物或立體異構物。化合物亦可以數種互變異構物形式存在，包括烯醇形式、酮形式及其混合物。因此，本文所描繪的化學結構係涵蓋所說明或辨識化合物之所有可能的互變異構物形式。所述之化合物亦涵蓋其

中一或多個原子具有之分子量與天然界發現習知之分子量不同之同位素標定化合物。可併入化合物中之同位素之實例包括(但不限於)^{2}H、^{3}H、^{13}C、^{14}C、^{15}N、^{18}O、^{17}O等。化合物可以非溶劑化物形式以及溶劑化物形式存在，包括水合物形式及為N-氧化物形式。一般而言，化合物可為水合、溶劑化合或N-氧化物。某些化合物可以多晶體或非晶形式存在。化合物之同類物、類似物、水解產物、代謝物及前驅物或前藥亦涵蓋在本發明之範圍內。一般而言，除非另有指出，否則就本文所涵蓋之用途，所有物理形式皆相等並希望在本發明之範圍中。

本發明之化合物可以鹽類存在。特別是涵蓋化合物之醫藥上可接受鹽類。本發明之「醫藥上可接受鹽」為本發明化合物與酸或鹼化合，與該化合物形成鹽(例如，鎂鹽，本文係指"Mg"或"Mag")，且在治療狀況下可為受試者耐受。一般而言，本發明化合物之醫藥上可接受鹽類具有1或更大之治療指數(最低毒性劑量與最低治療上有效劑量之比率)。熟習本項技術者應了解，最低治療上有效劑量將依受試者及適應症而不同，並因而據此作調整。

如文中所用，「蛇麻草(hop或hops)」係指葎草(Humulus)屬之植物果實，其含有苦芳香油，係用於釀酒工業防止細菌作用及於啤酒中添加特殊苦味。更佳地，所用的蛇麻草係由蛇麻(*Humulus lupulus*)衍生。

如文中所用，術語「相思樹(acacia)」係指任何豆科樹成員及相思樹屬之灌木。較佳地，從相思樹衍生之植物化合

物係由兒茶樹(*Acacia catechu*)或阿拉伯金合歡(*Acacia nilotica*)所衍生。

本發明化合物係視需要與熟知之醫藥上可接受載劑，包括稀釋劑及賦形劑調配於醫藥上可接受媒劑中(參見Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA 1990及Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams & Wilkins, 1995)。用於產生本發明組合物之醫藥上可接受載劑/媒劑將依組合物投予哺乳動物之模式而不同，一般醫藥上可接受載劑為生理上惰性及無毒的。本發明組合物之調配物可含有一種以上的本發明化合物以及任何其他可用於治療所欲治療之癥狀/症狀之藥理活性成份。

如文中所用之術語「調節(modulate或modulation)」係指以所指之化合物、成份等上調或下調酵素之表現或活性。

如文中所用，術語「蛋白質激酶」係代表轉移酶類酵素，其能將磷酸基團由捐贈分子轉移至蛋白質之胺基酸殘基上。就蛋白質激酶及家族/群族命名之詳細論述請參見Kostich, M., 等人, Human Members of the Eukaryotic Protein kinases Family, *Genome Biology* 3(9)：research 0043.1-0043.12, 2002，其全文係以引用的方式併入本文中。

激酶之代表性、非限制實例包括Abl、Abl(T3151)、ALK、ALK4、AMPK、Arg、Arg、ARKS、ASK1、Aurora-A、Axl、Blk、

Bmx、BRK、BrSKI、BrSK2、BTK、CaMKI、CaMKII、CaMKIV、CDK1/週期素B、CDK2/週期素A、CDK2/週期素E、CDK3/週期素E、CDK5/p25、CDK5/p35、CDK6/週期素D3、CDK7/週期素H/MAT1、CDK9/週期素 T1、CHK1、CHK2、CK1(y)、CK1δ、CK2、CK2α2、cKit(D816V)、cKit、c-RAF、CSK、cSRC、DAPKI、DAPK2、DDR2、DMPK、DRAK1、DYRK2、EGFR、EGFR(L858R)、EGFR(L861Q)、EphA1、EphA2、EphA3、EphA4、EphA5、EphA7、EphA8、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、ErbB4、Fer、Fes、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、Fgr、F1t1、F1t3(D835Y)、F1t3、F1t4、Fms、Fyn、GSK3β、GSK3α、Hck、HIPK1、HIPK2、HIPK3、IGF-1R、IKKB、IKKα、IR、IRAK1、IRAK4、IRR、ITK 、JAK2、JAK3、JNK1α1、JNK2α2、JNK3、KDR、Lck、LIMK1、LKB1、LOK、Lyn、Lyn、MAPK1、MAPK2、MAPK2、MAPKAP-K2、MAPKAP-K3、MARK1、MEK1、MELK、Met、MINK、MKK4、MKK6、MKK7β、MLCK、MLK1、Mnk2、MRCKβ、MRCKα、MSK1、MSK2、MSSK1、MST1、MST2、MST3、MuSK、NEK2、NEK3、NEK6、NEK7、NLK、p70S6K、PAK2、PAK3、PAK4、PAK6、PAR-1Bα、PDGFRβ、PDGFRβ、PDK1、PI3Kβ、PI3Kδ、PI3Kγ、Pim-1、Pim-2、PKA(b)、PKA、PKBβ、PKBα、PKBγ、PKCμ、PKCβI、PKCβII、PKCα、PKCγ、PKCδ、PKCε、PKCζ、PKCη、PKCθ、PKCι、PKD2、PKG1β、PKG1α、P13、PRAK、PRK2、PrKX、PTK5、Pyk2、Ret、RIPK2、ROCK-I、ROCK-II、ROCK-II、Ron、Ros、Rse、Rsk1、Rsk1、Rsk2、Rsk3、SAPK2a、SAPK2a(T106M)、SAPK2b、SAPK3、SAPK4、SGK、SGK2、SGK3、

SIK、Snk、SRPK1、SRPK2、STK33、Syk、TAK1、TBK1、Tie2、TrkA、TrkB、TSSK1、TSSK2、WNK2、WNK3、Yes、ZAP-70、ZIPK。在某些實施例中，該激酶可為ALK、Aurora-A、Axl、CDK9/週期素 T1、DAPK1、DAPK2、Fer、FGFR4、GSK3β、GSK3α、Hck、JNK2a2、MSK2、p70S6K、PAK3、PI3Kδ、PI3Kγ、PKA、PKBβ、PKBα、Rse、Rsk2、Syk、TrkA及TSSK1。又在其他實施例中，該激酶係由下列組成之群中選出：ABL、AKT、AURORA、CDK、DBF2/20、EGFR、EPH/ELK/ECK、ERK/MAPKFGFR、GSK3、IKKB、INSR、JAK DOM 1/2、MARK/PRKAA、MEK/STE7、MEKK/STE11、MLK、mTOR、PAK/STE20、PDGFR、PI3K、PKC、POLO、SRC、TEC/ATK及ZAP/SYK。

本發明之方法及組合物係可望用於任何哺乳動物，其可經驗本發明方法之利益。此等哺乳動物中最重要的為人類，雖然並不希望就此限制本發明，但亦能應用於獸醫用途。因此，依據本發明，「哺乳動物」或「有需要之哺乳動物」包括人類以及非人類之哺乳動物，特別是飼養的動物，其包括(但不限於)貓、狗及馬。

如文中所用，「自體免疫病症」係指該等當宿主之系統被宿主自身之免疫系統攻擊時，所引起之疾病、病症及症狀。自體免疫疾病之代表性、非限定實例包括斑禿、僵直性脊椎炎、關節炎、抗磷脂質症候群、自體免疫性艾迪生疾病(Addison's disease)、自體免疫性溶血性貧血、自體免疫性內耳疾病(亦稱為梅尼爾氏症)、自體免疫性淋巴增生症候群(ALPS)、自體免疫性血小板缺乏紫斑症、自體免疫性溶血

性貧血、自體免疫性肝炎、白塞氏病(Bechet's disease)、克隆氏症(Crohn's disease)、第 I 型糖尿病、腎絲球腎炎、葛瑞夫茲氏病(Graves' disease)、吉藍-古巴症候群(Guillain-Bane syndrome)、發炎性腸疾病、狼瘡性腎炎、多發性硬化症、重症肌無力、天皰瘡、惡性貧血、結節性多動脈炎、多發性肌炎、原發性膽汁性肝硬化、乾癬、風濕熱、類風濕性關節炎、硬皮症、修格連氏症(Sjogren's syndrome)、全身性紅斑性狼瘡、潰瘍性結腸炎、白化症及韋格納肉芽腫(Wegener's granulamatosis)。與自體免疫疾病有關的激酶之代表性、非限制實例包括 AMPK、BTK、ERK、FGFR、FMS、GSK、IGFR、IKK、JAK、PDGFR、PI3K、PKC、PLK、ROCK 及 VEGFR。

如文中所用，「過敏疾病」係指對物質、情況環境或身體狀態之異常或病理反應(例如打噴嚏、呼吸窘迫、癢或皮膚起疹子)，其在一般個體並無可相比之效應。如文中所用，「發炎疾病」係指對細胞傷害之反應(通常為局部的)，其表徵為毛細孔擴張、白血球浸潤、發紅、發熱、疼痛、腫脹及經常功能喪失，且其係作為引發消除毒性劑及受損組織之機制。過敏或發炎病症之實例包括(但不限於)氣喘、關節炎、潰瘍性結腸炎、克隆氏症、胰臟炎、胃炎、良性腫瘤、息肉、遺傳性息肉症候群、大腸癌、直腸癌、乳癌、前列腺癌、胃癌、消化器官之潰瘍性疾病、心絞痛、動脈硬化、心肌梗塞、心絞痛及心肌梗塞之後遺症、老年失智症及腦血管疾病。與過敏病症有關的激酶之代表性、非限制實例包括AKT、AMPK、

BTK、CHK、EGFR、FYN、IGF-1R、IKKB、ITK、JAK、KIT、LCK、LYN、MAPK、MEK、mTOR、PDGFR、PI3K、PKC、PPAR、ROCK、SRC、SYK及ZAP。

如文中所用，「代謝症候群」及「糖尿病相關病症」係指胰島素相關病症，亦即對胰島素之反應為疾病之原因或與疾病或症狀之惡化或抑制有關聯之疾病或症狀。胰島素相關病症之代表性實例包括(但不限於)糖尿素、糖尿病併發症、胰島素敏感性、多囊性卵巢疾病、高血糖、血脂異常、胰島素阻抗、代謝症候群、肥胖症、體重增加、發炎疾病、消化器官疾病、心絞痛、心肌梗塞、心絞痛及心肌梗塞後遺症、老年失智症及腦血管性失智。參見，Harrison's Principles of Internal Medicine, 16h Ed., McGraw Hill Companies Inc., New York (2005)。發炎症狀之非限定實例包括消化器官之疾病(例如潰瘍性結腸炎、克隆氏症、胰臟炎、胃炎、消化器官之良性腫瘤、消化道息肉、遺傳性息肉症候群、大腸炎、直腸癌、胃癌及消化器官之潰瘍性疾病)、心絞痛、心肌梗塞、心絞痛及心肌梗塞後遺症、老年失智症、腦血管性失智、免疫疾病及一般的癌症。與代謝症候群有關的激酶之非限制實例可包括AKT、AMPK、CDK、CSK、ERK、GSK、IGFR、JNK、MAPK、MEK、PI3K及PKC。

「胰島素阻抗」係指，因身體之胰島素依賴過程對胰島素敏感性降低，導致這些過程活性降低或胰島素產生增加或二者。胰島素阻抗為第2型糖尿病之典型，但在無糖尿病時亦可能發生。

如文中所用，「糖尿病併發症」包括(但不限於)視網膜病變、心肌梗塞、瀰漫性特異性過度骨化及骨流失、足潰瘍、神經病變、動脈硬化、呼吸自主神經病變及胸腔和肺薄壁組織結構性紊亂、左心室肥大、心血管疾病、腎功能逐漸喪失及貧血。

如文中所用，「癌症」係指任何各種良性或惡性腫瘤其特徵為退行性發育細胞之增生，若為惡性則傾向侵入組織周圍及轉移至新的身體部位。被視為在本發明範圍內之癌症之代表性、非限制實例包括腦癌、乳癌、大腸癌、腎癌、血癌、肝癌、肺癌及前列腺癌。被視為在本發明範圍內與癌症有關的蛋白質激酶之非限制實例包括ABL、AKT、AMPK、Aurora、BRK、CDK、CHK、EGFR、ERB、FGFR、IGFR、KIT、MAPK、mTOR、PDGFR、PI3K、PKC及SRC。

「眼部疾病」係指因發育異常、疾病、損傷或毒素所引起之眼部結構或功能之任何干擾。被視為在本發明範圍內之眼部病症之非限制實例包括視網膜病變、黃斑部退化或糖尿病視網膜病變。與眼部病症有關的激酶包括(但不限於)AMPK、Aurora、EPH、ERB、ERK、FMS、IGFR、MEK、PDGFR、PI3K、PKC、SRC及VEGFR。

如文中所用，「神經病症」係指因發育異常、疾病、損傷或毒素所引起之中樞神經系統結構或功能之任何干擾。神經病症之代表性、非限制實例包括阿茲海默症、帕金森氏症、多發性硬化症、肌萎縮性脊髓側索硬化症(ALS或路・蓋里格氏病(Lou Gehrig's Disease))、亨丁頓氏症、神經性

認知功能障礙、老年失智症及情緒障礙疾病。與神經病症有關的蛋白質激酶包括(但不限於)AMPK、CDK、FYN、JNK、MAPK、PKC、ROCK、RTK、SRC及VEGFR。

如文中所用，「心血管疾病」或「CVD」係指心臟組織或血管之功能損壞或破壞。與心血管疾病有關的激酶包括(但不限於)AKT、AMPK、GRK、GSK、IGF-1R、IKKB、JAK、JUN、MAPK、PKC、RHO、ROCK及TOR。

如文中所用，「骨質疏鬆症」係指其中骨質已變得極度多孔，因而使得骨骼更容易碎裂且復原更緩慢之疾病。與骨質疏鬆症有關的蛋白質激酶包括(但不限於)AKT、AMPK、CAMK、IRAK-M、MAPK、mTOR、PPAR、RHO、ROS、SRC、SYR及VEGFR。

本發明一實施例係描述於有此需要之哺乳動物中治療易感應蛋白質激酶調節之癌症之組合物。該組合物係包括一治療上有效量之異阿伐酸；其中該治療上有效量調節了與癌症有關的蛋白質激酶。在此實施例之某些方面，該異阿伐酸係由異葎草酮、異近葎草酮及異類葎草酮組成之群中選出。

在此實施例其他方面，組合物進一步係包含由下列組成之群中選出之醫藥上可接受賦形劑：包膜、等張及吸收延遲劑、結著劑、黏著劑、潤滑劑、崩解劑、著色劑、調味劑、甜味劑、吸收劑、洗滌劑及乳化劑。

又在其他方面，組合物進一步係包含一或多種由下列組成之群中選出之成員：抗氧化物、維生素、礦物質、蛋白質、油脂及碳水化合物。

如文中所用，「治療」係指與非經本發明治療之個體的症狀相比較，能減少、預防及/或逆轉已給予本發明化合物個體者之症狀。施行者應了解，文中所述之化合物、組合物及方法可與熟習技術施行者(醫師或獸醫師)之持續臨床評估共同使用，用以決定後續治療。因此，根據標準方法，治療後施行者將可評估任何肺部發炎治療之改善。此評估將幫助及告知評估是否增加、減少或持續特定的治療劑量、給藥模式等。

應了解，投予本發明化合物之對象不需忍受特定的創傷狀態。事實上，本發明化合物可在任何症狀發生前預防性地給藥。術語「治療」、「治療上」及這些術語之交換係用來包含治療、減緩以及預防用途。因此，如文中所用，「治療或減緩症狀」係指與未接受此給藥之個體的症狀相比較，能減少、預防及/或逆轉已給予本發明化合物個體者之症狀。

術語「治療上有效量」係用來表示能有效達到所尋求的治療結果之治療劑量。再者，熟習技術者應了解，可藉由細微調整及/或給予一種以上本發明化合物，或將本發明化合物與另一種化合物共同投予來降低或增加本發明化合物之治療上有效量。參見，例如 Meiner, C.L., "Clinical Trials: Design, Conduct, and Analysis," Monographs in Epidemiology and Biostatistics, Vol. 8 Oxford University Press, USA (1986)。因此，本發明係提供一種對特定所指哺乳動物之特別緊急事件量身訂做的給藥/治療之方法。如下列實例所說明，治療上有效量可容易地決定，

例如以經驗為主，由較低量開始並同時評估有利的效用逐步增量。

熟習本項技術者應了解，本發明化合物之給藥數量，以在任何給予的時間內特定病患的醫療狀況，包括其他臨床因素例如年齡、體重及哺乳動物的狀況及所選之給藥路徑為基準，將隨病患而不同。

如文中所用，「徵狀」係指病患所經歷之感覺或身體功能改變且與特定疾病有關，亦即伴隨「X」之任何事且被認為是「X」的存在之象徵。請明瞭及了解，徵狀將隨疾病或症狀之不同而變。與自體免疫病症有關的徵狀之非限定實例包括疲勞、眩暈、不適、器官或組織變大(例如葛瑞夫茲氏病之甲狀腺種大)或器官或組織破壞導致器官或組織功能降低(例如，糖尿病中胰臟之胰島細胞被破壞)。

與過敏有關的疾病或症狀之代表性徵狀包括失神、過敏性休克、氣喘、眼燒灼、便秘、咳嗽、眼睛周圍及下黑眼圈、皮膚炎、抑鬱、腹瀉、吞嚥困難、分心或注意力集中困難、暈眩、濕疹、窘迫、疲勞、潮紅、心悸、蕁麻疹、嗅覺減損、易怒/行為問題、鼻子、皮膚或喉嚨癢、關節痛肌肉疼痛、鼻塞、鼻息肉、噁心、鼻涕倒流(鼻涕後滴)、脈膊跳動快速、鼻漏(流鼻涕)、耳部乒砰響或耳悶脹、呼吸短促、皮膚疹子、睡眠困難、打噴嚏、腫脹(血管性水腫)、喉嚨聲嘶、鼻刺痛、疲倦、眩暈、嘔吐、流淚或癢或僵硬、或紅眼及喘息。

如文中所用，「發炎」或「發炎症狀」係指對細胞傷害之局部反應(通常為局部的)，其表徵為毛細孔擴張、白血球

浸潤、發紅、發熱、疼痛、腫脹及經常性功能喪失，且其係作為引發消除毒性劑及受損組織之機制。發炎或發炎症狀之代表徵狀，若範圍在關節上，則包括發紅、關節腫脹其觸摸時為熱的、關節疼痛及關節功能喪失。全身性的發炎反應可產生「類流行性感冒」之徵狀，例如發燒、發冷、疲勞/無力、頭痛、沒胃口及肌肉僵硬。

糖尿病及代謝症候群通常無法診斷，因為其許多徵狀似乎是無害的。例如，某些糖尿病徵狀包括(但不限於)：頻尿、過度口渴、極度飢餓、不正常的體重減輕、疲勞增加、煩躁及視力模糊。

神經病症之徵狀為多變的且可包括(但不限於)發麻、刺痛、感覺過敏(敏感性增加)、麻痺、局部化虛弱、構音障礙(說話困難)、複視(雙重影像)、認知問題(例如，無法集中注意)、記憶喪失、暫時性黑視(單眼暫時性喪失視力)、走路困難、顫抖、痙攣、困惑、昏睡、失智、譫妄及昏迷。

下列實例係意欲進一步說明本發明某些較佳的實施例且本質上不受限。僅使用本文所述之例行的實驗、許多特定物質之同等物及製程，熟習本項技術者應能了解，或應能確定。

實例

實例 1

經改質的蛇麻草成份對蛋白質激酶之效用

如上所述，激酶係代表轉移酶類酵素，其能將磷酸基團由供體分子(通常為 ATP)轉移至蛋白(通常為蘇胺酸、絲胺

酸或酪胺酸)之胺基酸殘基上。激酶係用於酵素調節之訊號傳導，亦即其可抑制或活化酵素活性，例如在膽固醇生物合成、胺基酸轉化或肝醣週轉中。大多數的激酶係特定在單一種類的胺基酸殘基中，某些激酶具有雙重活性，其中其可磷酸化二種不同的胺基酸。如圖 1 所示，激酶的功能為訊號傳導及轉譯。

方法-10 μg RIAA/ml 的本發明化合物對人類激酶活性之抑制效用係於超過 200 種激酶的面板上以激酶 ProfilerTM 分析(Upstate Cell Signaling Solutions, Upstate USA, Inc., Charlottesville, VA., USA)來進行試驗。特定激酶之分析方法係摘述於 http://www.upstate.com/img/pdf/kp protocols full.pdf 中(最後一次參訪網站係於 2006 年 6 月 12 日)。

結果-在無細胞系統中分析超過205種激酶。令人驚訝的，吾等發現所試驗的蛇麻草化合物以10%或更大抑制了205種中的25種激酶。205種中的八(8)種抑制>20%；205種中的5種抑制>30%；2種抑制約50%。

特別是在 PI3 激酶路徑中，蛇麻草抑制了 PI3Kγ、PI3Kδ、PI3Kβ、Akt1、Akt2、GSK3α、GSK3β、P70S6K。應注意，試驗中並無 mTOR。

蛇麻草化合物 RIAA 對所試驗的激酶之抑制效用係如下表 1 所示。

表 1

於激酶 Profiler™ 分析試驗 10 μg/ml 之 RIAA 對激酶抑制

作用

激酶	對照組%		激酶	對照組%
Abl	93		MAPKAP-K2	98
Abl	102		MAPKAP-K3	97
Abl(T3151)	121		MARK1	101
ALK	84		MEK1	113
ALK4	109		MELK	98
AMPK對	103		Met	109
Arg	96		MINK	109
Arg	95		MKK4	94
ARK5	103		MKK6	114
ASK1	116		MKK7β	113
Aurora-A	77		MLCK	114
Axl	89		MLK1	109
Blk	115		Mnk2	116
Bmx	108		MRCKβ	114
BRK	112		MRCKα	119
BrSK1	108		MSK1	97
BrSK2	100		MSK2	89
BTK	97		MSSK1	92
CaMKI	96		MST1	105
CaMKII	119		MST2	103
CaMKIV	115		MST3	104

CDK1/週期素B	109		MuSK	100
CDK2/週期素A	94		NEK2	99
CDK2/週期素E	122		NEK3	109
CDK3/週期素E	104		NEK6	98
CDK5/p25	100		NEK7	98
CDK5/p35	103		NLK	109
CDK6/週期素D3	110		p70S6K	87
CDK7/週期素H/MAT1	108		PAK2	92
CDK9/週期素T1	84		PAK3	54
CHK1	102		PAK4	99
CHK2	98		PAK6	109
CK1(y)	109		PAR-1Bα	109
CK1δ	104		PDGFRβ	109
CK2	122		PDGFRα	101
CK2α2	126		PDK1	118
cKit(D816V)	135		PI3Kβ	95
cKit	103		PI3Kδ	88
c-RAF	101		PI3Kγ	80
CSK	108		Pim-1	133
cSRC	103		Pim-2	112
DAPK1	78		PKA(b)	99
DAPK2	67		PKA	66
DDR2	108		PKBβ	87
DMPK	121		PKBα	49

DRAK1	111		PKB γ	100
DYRK2	112		PKC μ	100
EGFR	120		PKC β I	112
EGFR(L858R)	113		PKC β II	99
EGFR(L861Q)	122		PKC α	109
phA1	105		PKC γ	109
EphA2	115		PKC δ	101
EphA3	93		PKC ε	99
EphA4	108		PKC ζ	107
EphA5	120		PKC η	119
phA7	127		PKC θ	117
EphA8	112		PKC ι	96
EphB1	134		PKD2	115
EphB2	110		PKGI β	99
EphB3	101		PKG1 α	110
phB4	113		Plk3	98
ErbB4	123		PRAK	100
Fer	80		PRK2	102
Fes	121		PrKX	94
FGFR1	96		PTK5	104
FGFR2	103		Pyk2	112
FGFR3	109		Ret	96
FGFR4	83		RIPK2	98
Fgr	102		ROCK-I	105

Flt1	102		ROCK-II	90
Flt3(D835Y)	103		ROCK-II	105
Flt3	108		Ron	102
Flt4	110		Ros	94
Fms	105		Rse	84
Fyn	100		Rsk1	93
GSK3β	82		Rsk1	95
GSK3α	89		Rsk2	89
Hck	83		Rsk3	95
HIPK1	98		SAPK2a	111
HIPK2	113		SAPK2a(T106M)	108
HIPK3	119		SAPK2b	100
IGF-1R	97		SAPK3	98
IKKβ	117		SAPK4	98
IKKα	117		SGK	94
IR	95		SGK2	96
IRAK1	109		SGK3	107
IRAK4	110		SIK	90
IRR	102		Snk	98
ITK	117		SRPK1	117
JAK2	112		SRPK2	110
JAK3	111		STK33	94
JNK1α1	104		Syk	82
JNK2α2	84		TAK1	109

JNK3	98		TBK1	121
KDR	101		Tie2	95
Lck	94		TrkA	85
LIMKI	102		TrkB	91
LKB1	106		TSSK1	51
LOK	127		TSSK2	97
Lyn	100		WNK2	102
Lyn	109		WNK3	104
MAPK1	95		Yes	92
MAPK2	101		ZAP-70	113
MAPK2	113		ZIPK	91

應注意，PI3K路徑中的數種激酶較佳地係以RIAA抑制，例如Akt1有51%抑制。有利的注意到，有三種Akt同質物存在。Akt1裸小鼠可存活，但生長遲緩[Cho等人, Science 292:1728-1731 (2001)]。Akt1缺陷之果蠅眼細胞之大小減小[Verdu等人, Nat cell Biol 1:500-505 (1999)]；過度表現導致大小比正常的還大。Akt2裸小鼠可存活但具有葡萄糖控制之障礙[Cho 等人, J Biol Chem 276:38345-38352 (2001)]。因此，其顯示Akt1參與了大小之決定，且Akt2係涉及胰島素之訊號傳遞。

已知PI3K路徑在mRNA穩定性及mRNA轉譯選擇上扮演一個關鍵的角色，係導致各種致癌基因蛋白及發炎路徑蛋白之差異的蛋白表現。表示5'-TOP之一特定的5'mRNA結構已顯示為調節mRNA轉譯選擇上之關鍵結構。

cPLA文獻及DNA序列之觀點指出人類cPLA2之5'mRNA含有相同的(與類似調節的已知致癌基因具82%同源性)序列，顯示其亦具有一5'TOP結構。sPLAs亦已知與發炎有關，同時具有此相同的5'-TOP。再者，其指出係藉由PI3K路徑，經由增加cPLA2 mRNA之轉譯選擇導致cPLA2蛋白增加，而上調cPLA2及可能其他PLAs。相反地，PI3K抑制劑可降低cPLA2之量及減少經由COX2路徑所產生之PGE_2形成。

將激酶數據及吾等之結果整合，其中吾等發現，蛇麻草化合物抑制了cPLA2蛋白表現(西方墨點，數據並無顯示)而不是mRNA，顯示蛇麻草化合物之抗發炎作用模式可經由減少COX2之可取得物質，藉由降低cPLA2蛋白之量，且或許更特別是，藉由抑制PI3K路徑產生抑制TOP mRNA轉譯之活化。

活化之確切的路徑尚未明瞭。某些報告堅持，活化係經由六個核糖體蛋白S6(RPS6)同質物中的一或多個之磷酸化所發生之模式。報告指出RPS6分解了5'TOP mRNA使有效的轉譯進入蛋白中。然而，Stolovich等人, Mol Cell Biol Dec, 8101-8113 (2002)對此模式有爭論，且認為Aktl磷酸化一未知的轉譯因子X，其使得TOP mRNA轉譯發生。

實例 2

蛇麻草或相思樹組成份對選擇的激酶之劑量反應效用

mgRho之劑量反應係以約10、50及100 μg/ml於超過六十個選擇的激酶中，根據實例1之方法來試驗，係如下表2A & 2B所示。最受到抑制之五種激酶係如圖2中之圖形所示。

THIAA 製備物之激酶抑制作用(以對照組之百分比表示)

之劑量反應係以約 1、10、25 及 50 ug/ml 於 86 種選擇的激酶中試驗，係如下表 3 所示。同樣地，相思樹製備物係以約 1、5 及 25 ug/ml 於超過 230 種選擇的蛋白質激酶中，根據實例 1 之方法來試驗，並如下表 4 所示。異阿伐酸(IAA)、六氫異阿伐酸(HHIAA)、貝他酸及黃腐酚之製備物亦以約 1、10、25 及 50 ug/ml 於 86 種選擇的激酶中試驗，而劑量反應結果係分別如下表 5-8 所示。

表 2A

mgRho 對選擇的激酶之劑量反應效用(對照組之%)

激酶	10 ug/ml	50 ug/ml	100 ug/ml		激酶	10 ug/ml	50 ug/ml	100 ug/ml
Abl	103	82	65		MSSK1	120	31	26
ALK	79	93	109		p70S6K	105	86	69
AMPK	107	105	110		PAK2	99	84	89
Arg	94	76	64		PAK5	99	94	78
Aurora-A	96	59	33		PASK	105	111	102
Axl	101	87	85		PDK1	98	90	78
CaMKI	95	85	77		PI3Kβ(est)	74	49	39
CDK2/週期素A	106	81	59		PI3Kδ(est)	64	22	13
CDK9/週期素T1	100	88	101		PI3Kγ(est)	85	69	55
c-RAF	105	109	103		PKA	103	95	92
DAPK1	82	56	51		PKCε	96	93	91
DAPK2	64	51	45		PKCι	100	94	96

EphA3	103	64	55		PrKX	100	105	90
Fer	87	74	83		ROCK-II	102	101	99
FGFR1	98	99	93		Ros	105	86	90
FGFR4	111	68	35		Rse	71	39	22
GSK3β	65	17	26		Rsk2	108	79	56
GSK3α	65	64	13		Rsk3	108	102	86
Hck	86	72	59		SAPK2a	96	105	109
IKK13	104	91	92		SAPK2a(T106M)	100	107	107
IKKa	104	101	96		SAPK2b	101	102	106
IR	87	85	78		SAPK3	110	109	110
JNK1α1	105	115	106		SAPK4	97	107	109
JNK2α2	119	136	124		SGK	111	105	94
JNK3	98	98	86		SIK	130	125	117
Lck	105	83	81		STK33	99	96	103
MAPK1	77	53	44		Syk	79	46	28
MAPK2	101	104	106		Tie2	113	74	56
MAPKAP-K2	111	99	49		TrkA	127	115	93
MAPKAP-K3	109	106	73		TrkB	106	105	81
MEK1	106	104	91		TSSK1	105	100	95
MKK4	110	110	98		Yes	100	105	100
MSK2	92	54	43		ZIPK	92	62	83

表 2B

mgRho 對選擇的激酶之劑量反應效用(對照組之%)

激酶	1 ug/ml	5 ug/ml	25 ug/ml	50 ug/ml
AMPK(r)	102	98	99	91
CaMKI(h)	100	106	106	87
CaMKIIB(h)	101	87	114	97
CaMKIIγ(h)	85	97	97	90
CaMKIS(h)	117	110	105	90
CaMKIIS(h)	100	97	102	96
CaMKIV(h)	109	101	73	95
FGFR 1(h)	103	108	106	103
FGFRI(V561M)(h)	104	108	110	102
FGFR2(h)	96	90	94	55
FGFR3(h)	100	113	91	40
FGFR4(h)	115	110	100	71
GSK3α(h)	51	77	63	38
GSK3β(h)	95	86	71	51
Hck(h)	89	96	87	95
IGF-IR(h)	76	65	65	102
IKKα(h)	126	125	145	144
IKKβ(h)	130	118	105	89
IRAKI(h)	101	104	107	99
JAK3(h)	89	93	89	76
JNK1α1(h)	103	78	72	70

JNK2α2(h)	95	97	97	92
JNK3(h)	88	92	91	98
KDR(h)	108	103	102	109
Lck(h)	99	102	90	92
LKBI(h)	135	135	140	140
MAPK1(h)	98	90	90	80
MAPK2(h)	112	110	111	1 07
MAPKAP-K2(h)	103	100	92	68
MAPKAP-K3(h)	108	99	94	87
MSK1(h)	134	110	111	101
MSK2(h)	117	97	102	86
MSSK1(h)	103	103	81	69
p70S6K(h)	100	103	100	89
PKCβII(h)	98	100	77	58
PKCγ(h)	106	99	105	92
PKCδ(h)	103	102	91	85
PKCε(h)	107	104	93	85
PKCη(h)	108	106	99	89
PKCι(h)	84	94	94	101
PKCμ(h)	88	97	95	89
PKCθ(h)	110	105	102	100
PKCζ(h)	96	100	100	103
Syk(h)	101	109	90	84
TrkA(h)	97	98	51	41

TrkB(h)	91	87	91	97

表 3

THIAA 對選擇的激酶之劑量反應效用(對照組之%)

激酶	1 ug/ml	5 ug/ml	25 ug/ml	50 ug/ml
Abl(T315I)	104	95	68	10
ALK4	127	112	108	
AMPK	135	136	139	62
Aurora-A	102	86	50	5
Bmx	110	105	57	30
BTK	104	86	58	48
CaMKI	163	132	65	16
CaMKII β	106	102	90	71
CaMKII γ	99	101	87	81
CaMKII δ	99	103	80	76
CaMKIV	99	117	120	126
CaMKI δ	91	95	61	43
CDKI/週期素B	82	101	77	66
CDK2/週期素A	118	113	87	50
CDK2/週期素E	87	79	73	57
CDK3/週期素E	113	111	105	32
CDK5/p25	102	100	85	54
CDK5/p35	109	106	89	80
CDK6/週期素D3	114	113	112	70

CDK9/週期素T1	106	93	66	36
CHK1	116	118	149	148
CHK2	111	116	98	68
CK1(y)	101	101	55	
CK1γ1	101	100	42	43
CK1γ2	94	85	33	48
CK1γ3	99	91	23	18
CK1δ	109	97	65	42
cKit(D816H)	113	113	69	75
CSK	110	113	92	137
cSRC	105	103	91	17
DAPK1	62	34	21	14
DAPK2	60	54	41	17
DRAK1	113	116	75	18
EphA2	110	112	85	31
EphA8	110	110	83	43
EphB1	153	177	196	53
ErbB4	124	125	75	56
Fer	85	41	24	12
Fes	112	134	116	57
FGFR1	109	110	110	111
FGFRI(V561M)	97	106	91	92
FGFR2	126	115	58	7
FGFR3	112	94	39	16

FGFR4	122	93	83	58
Fgr	121	120	110	47
Flt4	126	119	85	31
IKK α	139	140	140	102
JNK1 α 1	71	118	118	107
JNK2 α 2	94	97	98	101
JNK3	121	78	58	44
KDR	106	107	104	126
Lck	97	105	125	88
LKB1	145	144	140	140
MAPK2	99	109	112	102
Pim-1	103	100	44	44
Pim-2	103	109	83	22
PKA(b)	104	77	32	0
PKA	104	101	90	25
PKB β	117	102	27	33
PKB α	103	101	49	50
PKB γ	107	109	99	33
PKC μ	90	90	93	87
PKC β II	99	107	103	64
PKC α	110	111	112	102
PKC γ	86	95	77	62
PKC δ	97	93	84	87
PKC ε	76	88	88	90

PKC ζ	93	100	107	103
PKC η	82	99	103	90
PKC θ	93	95	86	90
PKC ι	77	90	93	134
PRAK	99	81	21	33
PrKX	92	76	32	38
Ron	120	110	97	42
Ros	105	105	94	93
Rsk1	101	87	48	31
Rsk2	100	85	40	14
SGK	98	103	79	77
SGK2	117	110	45	18
Syk	99	93	55	17
TBKI	101	100	82	56
Tie2	109	115	100	32
TrkA	107	65	30	15
TrkB	97	96	72	21
TSSK2	112	111	87	66
ZIPK	106	101	74	59

表 4

相思樹對選擇的蛋白質激酶之劑量反應效用(對照組之%)

激酶	1 ug/ml	5 ug/ml	25 ug/ml	激酶	1 ug/ml	5 ug/ml	25 ug/ml
Abl	53	27	2	LOK	103	72	27

Abl(T315I)	57	26	11	Lyn	4	1	2
ALK	102	52	10	MAPK1	115	38	15
ALK4	84	96	98	MAPK2	108	90	48
AMPK	108	101	77	MAPK2	99	78	45
Arg	86	53	23	MAPKAP-K2	67	12	1
Arg	106	55	18	MAPKAP-K3	82	28	1
ARKS	36	13	6	MARK1	52	20	4
ASK1	100	70	23	MEK1	117	94	41
Aurora-A	8	-1	3	MELK	61	27	2
Axl	64	17	4	Mer	95	74	5
Blk	31	-2	-3	Met	168	21	7
Bmx	101	51	0	MINK	79	57	18
BRK	47	19	7	MKK4	103	135	13
BrSK1	58	6	2	MKK6	113	105	50
BrSK2	82	16	4	MKK7 β	91	44	9
BTK	15	-1	-3	MLCK	83	38	52
CaMKI	97	90	49	MLK1	92	75	42
CaMKII	83	50	6	Mnk2	103	71	29
CaMKII β	87	45	10	MRCK β	95	52	18
CaMKII γ	90	51	12	MRCK α	96	76	32
CaMKII δ	25	13	6	MSK1	105	97	33
CaMKIV	89	44	44	MSK2	56	22	12
CaMKI δ	69	19	10	MSSK1	12	4	4
CDK1/週期素B	62	48	9	MST1	58	36	17

CDK2/週期素A	69	15	5	MST2	106	104	38
CDK2/週期素E	51	14	8	MST3	50	10	2
CDK3/週期素E	41	13	4	MuSK	97	83	63
CDK5/p25	82	41	7	NEK11	89	58	19
CDK5/p35	77	46	13	NEK2	99	100	37
CDK6/週期素D3	100	54	5	NEK3	79	41	18
CDK7/週期素H/MAT1	124	90	42	NEK6	78	43	4
CDK9/週期素T1	79	21	4	NEK7	110	94	27
CHK1	87	52	17	NLK	103	90	44
CHK2	52	16	5	p70S6K	43	17	10
CK1(γ)	77	32	3	PAK2	103	79	16
CK1γ1	51	7	-4	PAK3	43	5	3
CK1γ2	31	5	1	PAK4	99	91	58
CK1γ3	49	16	0	PAK5	69	6	2
CK1δ	60	15	6	PAK6	77	22	1
CK2	157	162	128	PAR-1Bα	70	20	8
CK2α2	95	83	51	PASK	136	114	26
cKit(D816H)	27	7	2	PDGFRβ	59	19	9
cKit(D816V)	111	91	41	PDGFRa(D842V)	60	11	5
cKit	94	68	24	PDGFRα	100	106	51
cKit(V560G)	49	5	0	PDGFRa(V561D)	59	11	7
cKit(V654A)	30	8	3	PDK1	97	57	16
CLK3	33	16	6	PhKγ2	67	62	16

c-RAF	105	100	87	Pim-1	44	9	2
CSK	74	19	1	Pim-2	82	17	10
cSRC	99	12	0	PKA(b)	104	52	7
DAPK1	90	72	12	PKA	99	85	16
DAPK2	75	31	4	PKB β	61	9	-1
DCAMKL2	107	106	77	PKB α	98	67	8
DDR2	84	91	45	PKB γ	86	50	5
DMPK	105	106	116	PKC μ	90	81	44
DRAK1	92	40	11	PKC β I	108	112	100
DYRK2	83	55	25	PKC β II	71	47	30
eEF-2K	103	97	59	PKC α	75	34	32
EGFR	76	26	6	PKC γ	72	47	27
EGFR(L858R)	99	40	1	PKC δ	105	94	63
EGFR(L861Q)	90	49	1	PKC ε	108	90	59
EGFR(T790M)	93	29	7	PKC ζ	34	10	2
EGFR(T790M, L858R)	74	30	4	PKC η	107	99	84
EphA1	106	43	9	PKC θ	88	31	21
EphA2	94	82	6	PKC ι	66	69	63
EphA3	94	83	50	PKD2	106	108	81
EphA4	55	12	6	PKG1 β	31	16	5
EphA5	100	28	10	PKG1 α	41	18	7
EphA7	103	80	6	PIk3	114	106	115
EphA8	113	84	19	PRAK	18	18	35

EphB 1	116	63	8	PRK2	92	35	8
EphB2	30	5	2	PrKX	49	14	16
EphB3	109	35	1	PTK5	99	95	88
EphB4	30	11	3	Pyk2	90	45	9
ErbB4	61	8	0	Ret	23	-1	-2
FAK	106	78	2	RIPK2	103	95	64
Fer	106	134	28	ROCK-I	95	90	54
Fes	143	74	43	ROCK-II	100	66	39
FGFR1	125	26	3	ROCK-II	91	59	39
FGFR1(V561M)	92	50	2	Ron	32	2	4
FGFR2	73	-2	-5	Ros	95	40	35
FGFR3	21	3	1	Rse	35	14	0
FGFR4	30	7	5	Rsk1	45	9	4
Fgr	78	18	7	Rsk1	75	8	5
Flt1	41	12	1	Rsk2	60	4	3
Flt3(D835Y)	65	15	-1	Rsk3	78	31	7
Flt3	76	16	3	Rsk4	71	25	12
Flt4	12	3	2	SAPK2a	99	106	106
Fms	94	73	19	SAPK2a(T106M)	110	106	80
Fyn	23	5	1	SAPK2b	99	100	77
GRK5	96	91	81	SAPK3	108	79	40
GRK6	117	117	94	SAPK4	103	86	57
GSK3β	13	5	4	SGK	89	34	2
GSK3α	5	2	1	SGK2	102	36	5

Hck	87	29	-2	SGK3	103	96	34
HIPK1	110	112	62	SIK	115	28	5
HIPK2	92	71	24	Snk	93	96	61
HIPK3	106	92	56	SRPK1	56	14	6
IGF-1R	148	122	41	SRPK2	37	15	4
IKKβ	30	6	3	STK33	100	94	64
IKKα	120	86	11	Syk	2	2	3
IR	121	123	129	TAK1	105	101	86
IRAK1	98	85	49	TAO2	97	64	25
IRAK4	117	95	47	TBK1	37	5	12
IRR	91	70	28	Tie2	97	67	7
Itk	121	114	48	TrkA	20	4	2
JAK2	83	69	23	TrkB	22	0	0
JAK3	24	7	1	TSSK1	89	10	5
JNK1α1	118	110	75	TSSK2	97	29	2
JNK2α2	99	106	102	VRK2	98	88	67
JNK3	52	23	3	WNK2	96	75	21
KDR	90	60	18	WNK3	110	98	38
Lck	92	93	25	Yes	63	33	3
LIMK1	108	104	53	ZAP-70	57	19	10
LKB 1	126	122	98	ZIPK	104	81	28

表 5

IAA 對選擇的蛋白質激酶之劑量反應效用(對照組之%)

激酶	1	5	25	50

	ug/ml	ug/ml	ug/ml	ug/ml
Abl(T315I)	104	119	84	56
ALK4	92	110	113	
AMPK	122	121	86	49
Aurora-A	103	106	61	20
Bmx	90	125	108	43
BTK	96	102	62	48
CaMKI	126	139	146	54
CDK1/週期素B	96	102	86	69
CDK2/週期素A	102	111	98	59
CDK2/週期素E	81	89	72	55
CDK3/週期素E	99	121	107	62
CDK5/p25	88	108	95	69
CDK5/p35	92	117	100	73
CDK6/週期素D3	111	119	108	64
CDK9/週期素T1	87	109	77	51
CHK1	105	117	140	159
CHK2	102	106	75	46
CK1(y)	94	105	103	
CK1γ1	98	102	69	21
CK1γ2	89	88	39	42
CK1γ3	91	87	26	17
CK1δ	95	111	90	56
cKit(D816H)	98	117	100	59

CSK	95	111	72	86
cSRC	99	111	100	53
DAPK1	73	52	36	21
DAPK2	59	54	50	47
DRAK1	102	123	129	75
EphA2	104	118	108	88
EphA8	113	120	117	98
EphB1	112	151	220	208
ErbB4	93	107	110	20
Fer	95	76	49	38
Fes	101	110	120	59
FGFR2	85	122	97	5
Fgr	99	120	119	70
Flt4	85	37	74	33
Fyn	90	88	92	90
GSK3β	86	77	47	14
GSK3α	85	83	56	17
Hck	88	81	76	4
HIPK2	101	107	107	84
HIPK3	97	101	127	84
IGF-1R	132	229	278	301
IKKB	103	116	93	56
IR	110	107	121	131
IRAK1	115	143	156	122

JAK3	88	98	83	74
Lyn	82	114	41	73
MAPK1	81	87	55	55
MAPKAP-K2	100	98	82	36
MAPKAP-K3	108	113	106	80
MINK	102	122	118	127
MSK1	99	103	66	61
MSK2	95	90	44	45
MSSK1	90	78	52	52
p70S6K	94	98	84	58
PAK3	91	66	21	11
PAK5	101	108	106	59
PAK6	98	109	106	102
PhKγ2	103	109	102	66
Pim-1	104	106	77	46
Pim-2	101	108	88	60
PKA(b)	104	115	86	12
PKA	110	102	99	106
PKBβ	104	110	57	76
PKBα	98	103	91	72
PKBγ	103	108	104	76
PKCβII	103	103	102	59
PKCα	106	104	89	46
PRAK	99	91	38	18

PrKX	94	92	91	58
Ron	117	113	113	40
Ros	101	108	84	75
Rsk1	96	101	72	48
Rsk2	95	101	76	36
SGK	102	110	100	96
SGK2	99	128	105	60
Syk	85	92	53	7
TBK1	100	105	82	86
Tie2	101	124	113	40
TrkA	112	139	24	20
TrkB	97	111	90	59
TSSK2	99	112	109	75
ZIPK	102	102	95	73

表 6

HHIAA 對選擇的蛋白質激酶之劑量反應效用(對照組之%)

激酶	**1 ug/ml**	**5 ug/ml**	**25 ug/ml**	**50 ug/ml**
Abl(T315I)	113	109	84	38
ALK4	123	121	108	
AMPK	133	130	137	87
Aurora-A	111	107	64	27
Bmx	103	102	106	44
BTK	110	105	67	61

CaMKI	148	151	140	56
CDK1/週期素B	118	115	98	85
CDK2/週期素A	109	112	82	60
CDK2/週期素E	83	84	70	88
CDK3/週期素E	115	119	108	85
CDK5/p25	101	94	69	51
CDK5/p35	110	103	73	68
CDK6/週期素D3	119	124	117	83
CDK9/週期素T1	106	96	66	40
CHK1	127	124	140	144
CHK2	119	117	110	82
CK1(γ)	102	102	100	
CK1γ1	105	103	68	30
CK1γ2	99	99	45	49
CK1γ3	104	98	28	22
CK1δ	110	115	89	56
cKit(D 816H)	116	109	91	68
CSK	100	108	109	112
cSRC	105	114	103	37
DAPK 1	94	67	37	27
DAPK2	72	58	46	47
DRAK1	110	119	103	69
EphA2	106	127	115	68
EphA8	133	109	89	74

EphB1	154	162	200	164
ErbB4	141	122	85	14
Fer	90	62	13	20
Fes	137	126	111	81
FGFR2	116	120	71	7
Fgr	122	127	118	91
Flt4	135	116	88	58
Fyn	104	119	82	81
GSK3β	138	84	51	10
GSK3α	89	82	58	18
Hck	93	99	73	77
HIPK2	103	105	100	98
HIPK3	117	121	118	29
IGF-1R	138	173	207	159
IKKβ	123	116	98	79
IR	129	95	105	81
IRAK1	142	140	152	120
JAK3	104	103	61	90
Lyn	115	113	56	80
MAPK1	100	88	55	67
MAPKAP-K2	104	99	71	29
MAPKAP-K3	111	109	99	77
MINK	107	102	114	123
MSK1	105	101	58	69

MSK2	101	86	39	48
MSSK1	98	78	41	60
p70S6K	108	99	78	56
PAK3	113	24	14	10
PAK5	109	105	89	36
PAK6	106	106	88	71
PhK γ 2	105	109	85	54
Pim-1	107	110	81	50
Pim-2	111	106	98	58
PKA(b)	105	119	67	12
PKA	98	107	102	91
PKB β	121	142	50	42
PKB α	105	108	81	57
PKB γ	115	116	107	42
PKC β II	113	115	109	95
PKC α	110	90	105	103
PRAK	109	89	41	33
PrKX	86	88	77	59
Ron	114	106	129	74
Ros	113	107	109	98
Rsk1	101	102	53	60
Rsk2	105	103	58	25
SGK	108	114	112	64
SGK2	120	121	96	63

Syk	100	95	68	17
TBK1	115	103	99	114
Tie2	109	120	95	43
TrkA	87	73	41	24
TrkB	100	107	97	13
TSSK2	115	112	109	71
ZIPK	109	109	96	8

表 7

貝他酸對選擇的激酶之劑量反應效用(對照組之%)

激酶	**1 ug/ml**	**5 ug/ml**	**25 ug/ml**	**50 ug/ml**
Abl(T315I)	101	101	70	29
ALK4	108	114	90	
AMPK	136	131	135	77
Aurora-A	110	85	43	2
Bmx	111	100	93	54
BTK	96	90	14	37
CaMIU	142	142	131	57
CDKI/週期素B	116	120	95	65
CDK2/週期素A	106	104	94	64
CDK2/週期素E	93	86	81	65
CDK3/週期素E	119	115	96	53
CDK5/p25	97	97	95	96
CDK5/p35	109	106	90	50

CDK6/週期素D3	107	117	101	76
CDK9/週期素T1	101	104	88	35
CHK1	111	125	144	164
CHK2	103	100	94	69
CK1(γ)	102	104	83	
CK1γ1	100	95	82	33
CK1γ2	97	83	55	44
CK1γ3	99	75	40	21
CK1δ	103	98	81	54
cKit(D816H)	103	112	100	18
CSK	107	111	108	145
cSRC	104	99	90	19
DAPK1	109	106	88	59
DAPK2	97	76	57	45
DRAK1	124	134	107	51
EphA2	116	122	115	80
EphA8	107	105	86	36
EphB1	130	164	204	207
ErbB4	111	118	116	28
Fer	78	69	30	18
Fes	120	106	114	79
FGFR2	130	118	99	7
Fgr	119	119	127	62
Flt4	104	96	65	22

Fyn	99	94	86	78
GSK3β	83	67	27	4
GSK3α	70	71	31	1
Hck	102	88	61	22
HIPK2	101	104	99	94
HIPK3	109	119	118	83
IGF-1R	101	163	262	260
IKKβ	110	113	85	59
IR	106	106	108	95
IRAK1	143	155	165	158
JAK3	100	98	64	38
Lyn	114	120	68	59
MAPK1	88	75	51	37
MAPKAP-K2	111	104	65	22
MAPKAP-K3	108	106	102	69
MINK	102	103	123	140
MSK1	106	97	54	36
MSK2	96	86	28	25
MSSK1	95	82	61	67
p70S6K	89	95	69	44
PAK3	103	40	16	11
PAK5	103	99	81	44
PAK6	103	98	82	83
PhKγ2	108	103	79	40

Pim-1	104	97	57	21
Pim-2	103	101	68	73
PKA(b)	120	104	51	3
PKA	103	105	102	28
PKBβ	114	108	56	52
PKBα	98	95	80	58
PKBγ	105	104	101	52
PKCβII	107	105	100	49
PKCα	108	104	98	54
PRAK	105	81	24	11
PrKX	93	86	68	29
Ron	108	119	98	44
Ros	107	103	80	98
Rsk1	103	99	69	17
Rsk2	98	96	56	8
SGK	109	111	98	100
SGK2	123	113	84	0
Syk	92	81	62	16
TBK1	110	103	80	78
Tie2	110	100	106	79
TrkA	97	66	53	18
TrkB	105	100	86	11
TSSK2	112	109	103	62
ZIPK	105	110	85	37

表 8

黃腐酚對選擇的蛋白質激酶之劑量反應效用(對照組之%)

激酶	1 ug/ml	5 ug/ml	25 ug/ml	50 ug/ml
Abl(T315I)	126	115	16	4
ALK4	116	100	71	49
AMPK	122	113	90	81
Aurora-A	83	27	3	8
Bmx	108	97	22	0
BTK	109	57	2	20
CaMKI	142	83	3	4
CDK1/週期素B	118	103	46	18
CDK2/週期素A	107	96	57	6
CDK2/週期素E	82	86	18	9
CDK3/週期素E	101	100	37	8
CDK5/p25	97	97	24	87
CDK5/p35	103	102	41	44
CDK6/週期素D3	110	79	23	7
CDK9/週期素T1	110	107	45	31
CHK1	121	126	142	149
CHK2	25	5	3	2
CK1(y)	91	63	37	9
CK1γ1	101	79	50	26
CK1γ2	92	48	30	12

CK1γ3	98	51	22	15
CK1δ	75	32	16	12
cKit(D816H)	94	45	14	
CSK	113	113	93	100
cSRC	92	50	27	21
DAPK1	113	85	49	20
DAPK2	105	88	45	26
DRAK1	133	40	19	-5
EphA2	124	113	121	52
EphA8	103	92	29	19
EphB1	92	122	175	161
ErbB4	132	85	52	27
Fer	55	20	10	1
Fes	131	106	102	26
FGFR2	116	89	36	4
Fgr	101	36	10	0
Flt4	74	10	11	4
Fyn	104	66	42	18
GSK3β	120	99	25	3
GSK3α	102	81	11	-4
Hck	85	35	17	0
HIPK2	110	98	75	37
HIPK3	106	102	90	59
IGF-1R	107	113	129	139

IKK13	145	118	61	44
IR	120	108	97	103
IRAK1	129	104	81	36
JAK3	104	84	17	5
Lyn	97	40	4	2
MAPK1	91	64	19	17
MAPKAP-K2	99	95	6	8
MAPKAP-K3	100	99	17	7
MINK	42	10	5	7
MSK1	114	92	31	9
MSK2	126	61	8	19
MSSK1	47	11	7	5
p70S6K	94	48	19	7
PAK3	21	18	8	4
PAK5	106	99	42	5
PAK6	105	94	14	2
PhKy2	106	60	11	5
Pim-1	88	35	4	3
Pim-2	104	48	14	6
PKA(b)	137	113	33	2
PKA	105	109	98	21
PKBβ	146	102	1	8
PKBα	102	81	18	5
PKBγ	104	104	12	4

PKCβII	108	108	71	79
PKCα	100	100	75	83
PRAK	101	53	2	2
PrKX	92	75	2	3
Ron	135	127	60	69
Ros	101	99	85	94
Rsk1	34	49	4	0
Rsk2	96	43	3	4
SGK	111	84	0	3
SGK2	130	110	2	-4
Syk	95	60	32	17
TBK1	104	71	45	42
Tie2	94	96	100	35
TrkA	36	19	8	3
TrkB	95	89	58	3
TSSK2	102	95	61	48
ZIPK	115	74	20	70

結果－各種試驗化合物之激酶活性調節效用，依照特定激酶及所試驗的化合物(表 2-8)顯示廣範圍之調節效應，並如下列列舉之代表性實例所示。

PI3Kδ，一種與自體免疫疾病(例如類風濕性關節炎及紅斑性狼瘡)密切相關之激酶，MgRho 在 10、50 及 100 ug/ml 分別具有抑制 36%、78%及 87%激酶活性之反應。MgRho 以劑量依賴的方式抑制了 Syk，其在 10、50 及 100 pg/ml 分別具

有 21%、54%之 72%抑制作用。此外，在 mgRho 暴露後，GSK 或肝糖合成酶(GSKα及β兩者)出現抑制作用(在 10、50、100 μg/ml 時，α分別為 35、36、87%抑制；β分別為 35、83、74 %抑制)。參見表 2。

對所檢驗的許多激酶，THIAA 展現一劑量依賴之激酶活性抑制，其在 1、5、25 及 50 μg/ml 時分別具有 7%、16%、77%及 91%之 FGFR2 抑制作用。分別在 1、5、25 及 50 μg/ml 時，於 FGFR3(0%、6%、61%及 84%)及 TrkA (24%、45%、93%及 94%)觀察到類似的結果。參見表 3。

所試驗的相思樹萃取物(阿拉伯金合歡)似乎為對所檢驗的激酶活性之最強力抑制劑(表 4)，對該等激酶例如 Syk(98%)、Lyn(96%)、GSK3α(95%)、Aurora-A(92%)、Flt4(88%)、MSSK1(88%)、GSK3β(87%)、BTK(85%)、PRAK(82%)及 TrkA(80%)(所有皆暴露於 1 μg/ml)，係展現 80%或更大活性抑制作用。

實例 3

蛇麻草組成份對 PI3K 活性之效用

蛇麻草組成份黃腐酚及貝他酸之鎂鹽酸、異阿伐酸之鎂鹽酸(Mg-IAA)、四氫異阿伐酸之鎂鹽(Mg-THIAA)及六氫異阿伐酸之鎂鹽(Mg-HHIAA)對人類PI3K-β、PI3K-γ及PI3K-δ之抑制效應係根據實例1之程序及方法來檢驗。另外檢驗阿拉伯金合歡心材之萃取物。所有的化合物皆以50μg/ml來試驗。結果係如圖3之圖示所示。

應注意，所有試驗的蛇麻草化合物顯示>50%之PI3K活性

抑制作用，而Mg-THIAA產生了最大的整體抑制作作用(對所有試驗的PI3K同質物皆>80%抑制)。進一步請注意，黃腐酚及Mg-貝他酸對PI3K-γ比對PI3K-β或PI3K-δ更具有抑制性。Mg-IAA對PI3K-β之抑制大約為PI3K-γ或PI3K-δ之三倍。阿拉伯金合歡心材萃取物顯現刺激PI3K-β或PI3K-δ活性。得到Syk及GSK激酶之比較結果(數據未顯示)。

實例 4

於經刺激及未經刺激的鼠科巨噬細胞中以蛇麻草化合物及衍生物抑制PGE_2之合成

此實例之目標係於鼠科RAW 264.7模型中評估蛇麻草衍生物抑制PGE_2之COX-2合成優於PGE_2之COX-1合成之程度。RAW 264.7細胞株為一用於評估試驗劑之抗發炎活性之完全建立模型。以細菌脂多糖刺激RAW 264.7細胞，以引發COX-2表現並產生PGE_2。PGE_2合成之抑制係用來作為試驗劑之抗發炎活性之度量。設備、化合物及試劑、PGE_2分析及計算係如下所述。

設備-用於此實例之設備包括一 OHAS Model#E01140 分析平衡、Forma Model #F1214 生物安全櫃(Marietta, Ohio)、遞送 0.1 至 100 μl 之各種吸液管(VWR, Rochester, NY)、細胞手壓式計數器(VWR Catalog #23609-102、Rochester、NY)、Forma Model #F3210 CO_2培養箱(Marietta, Ohio)、血球計數器(Hausser Model #1492, Horsham, PA)、a Leica Model #DM IL 倒立顯微鏡(Wetzlar, Germany)、PURELAB Plus 純水系統(U.S. Filter, Lowell, MA)、4°C

冷藏櫃(Forma Model #F3775, Marietta, Ohio)、旋渦混合器(VWR Catalog #33994-306, Rochester, NY)及37°C水浴(Shel Lab Model #1203, Cornelius, OR)。

化合物及試劑-細菌脂多糖(LPS；B E. coli 055:B5)係購自Sigma (St. Louis, MO)。經熱失活化之胎牛血清(FBS-HI Cat. #35-011CV)及Dulbecco's修改之Eagle's培養基(DMEM Cat #10-013CV)係購自Mediatech(Herndon, VA)。蛇麻草餾分物(1)阿伐蛇麻草(1%阿伐酸；AA)、(2)aromahop OE(10%貝他酸及2%異構化阿伐酸、(3)isohop(異構化阿伐酸；IAA)、(4)貝他酸溶液(貝他酸BA)、(5)hexahop gold(六氫異構化阿伐酸；HHIAA)、(6)redihop(還原的異構物化阿伐酸；RIAA)、(7) tetrahop (四氫-異-阿伐酸THIAA)及(8)酒花粕係得自Betatech Hops Products公司(Washington, D.C., U.S.A.)。將酒花粕以相同體積之無水乙醇萃取二次。於40°C加熱移除乙醇，直到僅剩下濃稠的棕色殘餘物。將此殘餘物溶於DMSO以供RAW 264.7細胞試驗用。

試驗物質—係使用如表12所述之蛇麻草衍生物。使用COX-1選擇性抑制劑阿斯匹靈(aspirin)及COX-2選擇性抑制劑西樂保(celecoxib)作為陰性對照組。阿斯匹靈係得自Sigma公司(St. Louis, MO)並使用西樂保之市售調配物(Celebrex™, Searle & Co., Chicago, IL)。

細胞培養及以試驗物質處理—將得自American Type Culture Collection公司之RAW 264.7細胞(Catalog #TIB-71, Manassas, VA)培養於Dulbecco's改質之Eagle's

培養基中(DMEM, Mediatech, Herndon, VA)並維持在對數期。藉由將50 ml於熱失活化之FBS及5 ml的青黴素(penicillin)/鏈黴素(streptomycin)加至500 ml的DMEM瓶中製成DMEM生長培養基並儲存於4°C。使用前以水浴將生長培養基加溫至37°C。

就COX-2有關的PGE_2合成，係從第一天培養的細胞盤的每個孔槽中移出100 μl的培養基，並以100 μl平衡的2X最終濃度之試驗化合物替代。然後將細胞培養90分鐘。於所欲刺激的細胞各孔槽中加入20μl的LPS，以達到1μg LPS/ml之最終濃度並將細胞培養4小時。將細胞以5 μM的花生四烯酸再培養15分鐘。將各孔槽中25μl的上清液轉置於透明的微量離心管中以測定釋出到培養基中的PGE_2。

就COX-1有關的PGE_2合成，係從第一天培養的細胞盤的每個孔槽中移除100 μl的培養基，並以100 μl平衡的2X最終濃度之試驗化合物替代。然後將細胞培養90分鐘。然後，不進行LPS刺激，而是將細胞以100 μM的花生四烯酸培養15分鐘。將各孔槽中25μl的上清液轉置於透明的微量離心管中以測定釋出到培養基中的PGE_2。

觀察細胞的外觀，並以目視評估生長力。任何的化合物在最高試驗濃度時並無觀察到明顯的毒性。將各孔槽中25μl的上清液轉置於透明的微量離心管中以測定釋出到培養基中的PGE_2。PGE_2之測定及報告係如前面所提，描述於下。

PGE_2分析-使用市售、無放射活性之PGE_2定量程序(Caymen Chemical, Ann Arbor, MI)及使用製造商建議之程

序並無修改。簡言之，將25μl的培養基與連續稀釋的PGE_2標準樣本以適量的經乙醯膽酯酶標定的追蹤劑及PGE_2抗血清混合，並於室溫下培養18小時。在清空孔槽及以沖洗緩衝液清洗後，加入200μl含有用於乙醯膽酯酶物質之伊爾曼試劑(Ellman's reagent)。將反應置於緩慢的震盪器中於室溫下震盪1小時，並於Bio-Tek Instruments (Model #Elx800, Winooski, VT)ELISA盤式判讀機中測定415 nm之吸收度。PGE_2濃度係以每毫升(ml)之皮克(picogram)數來表示。此分析之製造商規格包括變化<10%之內分析係數，與PGD_2和PGF_2之交互作用低於1%且線性係在10-1000 pg ml^{-1}之範圍。COX-2及COX-1二者對PGE_2合成之半數抑制濃度(IC_{50})係如下所述來計算。

計算-PGE_2合成之半數抑制濃度(IC_{50})係使用CalcuSyn (BIOSOFT, Ferguson, MO)來計算。各試驗物質至少使用四種濃度或使用陽性對照組來計算。此統計套裝係使用如T.C Chou及P. Talalay [Chou, T.C.及P. Talalay. Quantitative analysis of dose-effect relationships；the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv Enzyme Regul 22: 27-55, (1984)]所述之半數效用方法來進行多藥劑劑量效用計算，該文獻係以引用的方式併入本文中。於三個不同的日期重複實驗三次。各劑量之百分比抑制作用為此三次獨立實驗之平均並用於計算所提出的半數抑制濃度。

半數抑制濃度係排列成四種任意的類別：(1)最高抗發

炎反應之該等藥劑，具有 IC_{50} 值在 0.1 至 0.3μg/ml；(2)高抗發炎反應之該等藥劑，具有 IC_{50} 值在 0.7 至 1μg/ml；(3)中等抗發炎反應之該等藥劑，具有 IC_{50} 值在 2 至 7 μg/ml 間；及(4)低抗發炎反應之該等藥劑，具有大於 12 μg/ml(最高試驗濃度)之 IC_{50} 值。

結果 - 在此模型系統中，阿斯匹靈及西樂保陽性對照組驗證其各別的環氧化酶選擇性(表 9)。當阿斯匹靈對 COX-1 之選擇約為 1000-倍，西樂保對 COX-2 之選擇約為 114-倍。所有蛇麻草物質皆為 COX-2 選擇性，以 Rho 異阿伐酸及異阿伐酸展現最高的 COX-2 選擇性，分別為 363-和 138-倍。此高 COX-2 選擇性與低半數抑制濃度組合，就其他來源的天然產品中而言，之前並未提出過。在其餘的蛇麻草衍生物中，僅 aromahop 油具有 3 倍臨界的 COX-2 選擇性。以活體外之數據推斷臨床效用，一般係假設 5 倍或 5 倍以上的 COX-2 選擇性顯示有臨床上明顯的胃黏液保護之潛力。在此準則下，貝他酸、CO_2 蛇麻草萃取物、酒花粕、四氫異阿伐酸及六氫異阿伐酸顯示潛在臨床上相應的 COX-2 選擇性。

表 9

RAW 264.7 細胞中蛇麻草餾分物及衍生物對 COX-2 及 COX-1 抑制作用

試驗物質	IC_{50} COX-2 [ug/ml]	IC_{50} COX-1 [μg/ml]	COX-1/COX-2
Rho異阿伐酸	0.08	29	363
異阿伐酸	0.13	18	138

貝他酸	0.54	29	54
CO_2蛇麻草萃取物	0.22	6.3	29
阿伐酸	0.26	6.2	24
酒花粕CO_2/乙醇	0.88	21	24
四氫異阿伐酸	0.20	4.0	20
六氫異阿伐酸	0.29	3.0	10
Aromahop油	1.6	4.1	3.0
陽性對照組			
阿斯匹靈	1.16	0.0009	0.0008
西樂保	0.005	0.57	114

實例 5

在經LPS刺激之Raw 264.7細胞中還原之異構化異阿伐酸或異構化阿伐酸缺乏直接的PGE_2抑制作用

此研究之目的係於RAW 264.7細胞之發炎模型評估蛇麻草衍生物還原之異阿伐酸及異構化阿伐酸，獨立作為介導PGE_2生物合成之COX-2直接抑制劑之能力。此實例中係使用如實例4中所述之RAW 264.7細胞。設備、化學品和試劑、PGE_2分析及計算係如實例4所述。

試驗物質 - 係使用如表12中所述之蛇麻草衍生物還原之異阿伐酸及異構化阿伐酸。阿斯匹靈，一種COX-1選擇性陽性對照組，係得自Sigma公司(St. Louis, MO)。

細胞培養及以試驗物質處理—RAW 264.7細胞(TIB-71)係得自American Type Culture Collection公司(Manassas, VA)並如實例4所述進行繼代培養。於37°C以5% CO_2培養至隔

夜後，將生長培養基吸出並以200 μl無FBS或青黴素/鏈黴素之DMEM替代。將RAW 264.7細胞以LPS刺激並培養至隔夜以引發COX-2表現。LPS-刺激後十八小時，加入試驗化合物，60分鐘後加入鈣離子載體(ionophore)A23187。將試驗物質溶於DMSO中成為250-倍之儲存溶液。將4 μl之此250-倍之儲存試驗物質製備物加到1 ml的DMEM中，及後續將200 μl之此溶液加到八個孔槽之各劑量的試驗物質中。30分鐘後，取樣上清液培養基供PGE_2測定。如實例4所述由最少四種濃度之二個獨立的實驗中計算出半數抑制濃度。

PGE_2之測定-如實例4所述，使用市售、無放射活性之PGE_2定量程序(Caymen Chemical, Ann Arbor, MI)及使用製造商建議之程序並無修改。

細胞存活能力－細胞之存活能力係在PGE_2分析之培養基採樣後立即以顯微鏡檢驗細胞來評估。在所試驗的任何濃度並無觀察到明顯的細胞死亡。

計算－使用四種濃度0.10、1.0、10及100 μg/ml產生劑量反應曲線，並以95%信賴區間使用CalcuSyn(BIOSOFT, Ferguson, MO)計算半數抑制濃度(IC_{50s})。

結果-於RAW 264.7細胞中，相對於未經刺激之細胞，經LPS-刺激之PGE_2產生範圍從1.4-倍至2.1-倍。所計算之阿斯匹靈陽性對照組之IC_{50}值為8.7 μg/ml (95% CL = 3.9-19)與已發表範圍從1.4至50 μg/ml之直接COX-2抑制作用相符[Warner, T.D. 等人, Nonsteroidal drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2

are associated with human gastrointestinal toxicity: A full *in vitro* analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:7563-7568, (1999)]且此實驗室A549細胞株之歷史資料為3.2 μg/ml (95% CL = 0.55-19)。

當在RAW 264.7細胞以PLS引發COX-2後，加入RIAA及IAA僅產生適度的、劑量相關的PGE_2抑制。在增加超過1000-倍試驗物質之濃度，對RIAA及IAA僅觀察到分別增加14及10百分比之抑制。劑量反應斜率之淺度產生mg/ml範圍之RIAA (36 mg/ml)及IAA(>1000 mg/ml)之IC_{50}值(表10)。於三對數單位劑量之反應觀察到之最小改變顯示，在此細胞基礎分析中所觀察到的蛇麻草衍生物對PGE_2抑制效用，可能為細胞之二級效用，而非直接抑制COX-2酵素活性。

圖 4A 及 4B 以白色長條分別描繪 RIAA 及 IAA 之劑量反應數據，而此實例之劑量反應數據為灰色長條。添加順序之效用可明顯看出，且支持 RIAA 及 IAA 不為直接 COX-2 酵素抑制劑之推論。

其顯示，(1)以其在活體外抑制 PGE_2 生物合成之能力作評估，蛇麻草物質為其中最具活性抗發炎的天然產品；*(2)* 依照其有關 COX-2 引發之抑制模式，RIAA 及 IAA 似乎不為直接的 COX-2 酵素抑制劑；及(3)RIAA 及 IAA 具有 COX-2 選擇性，其似乎係以抑制 COX-2 表現為基礎，而非抑制 COX-2 酵素。此選擇性與以差異的酵素抑制作用為基礎之西樂保選擇性不同。

表 10

於 LPS 刺激隔夜後加入試驗物質，RAW264.7 細胞中 RIAA、IAA 之半數抑制濃度

試驗物質	IC_{50} [μg/ml]	95%信賴區間 [μg/ml]
RIAA	36,000	17,000-9,000
IAA	>1,000,000	-
陽性對照組	IC_{50} [μg/ml]	95%信賴區間 [μg/ml]
Aspirin	8.7 pg/ml	3.9 - 19

將 RAW 264.7 細胞以 LPS 刺激並培養至隔夜以引發 COX-2 表現。LPS-刺激十八小時後，加入試驗物質，60 分鐘後加入 A23187。30 分鐘後，取樣上清液培養基供 PGE_2 測定。以最少八重複之四種濃度的二個獨立實驗計算出半數抑制濃度。

實例 6

於 A549 肺表皮細胞中蛇麻草化合物及衍生物不為直接的環氧化酶酵素抑制劑

化合物-用於此實例之蛇麻草及蛇麻草衍生物係如前面實例4所述。所有其他化合物係如實例4所述來自供應商。

*設備、PGE_2 分析及計算係如*實例 4 所述。

細胞-A549細胞(人類肺表皮細胞)係得自American Type Culture Collection公司(Manassas, VA)及根據供應

商之指示進行繼代培養。將細胞例行地以5% CO_2於37°C於含有10% FBS、50單位青黴素/ml、50 μg鏈黴素/ml、5 mM丙酮酸鈉及5 mM L-麩胺酸之RPMI 1640中培養。在實驗當天，收集指數性生長之細胞並以無血清RPMI 1640清洗。

將對數期A549細胞以每孔8 x 10^4個細胞置於每孔含0.2 ml生長培養基之96-孔的組織培養盤中。就以試驗化合物測定PGE_2抑制作用，係依照Warner等人[Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full *in vitro* analysis. Proc Nall Acad Sci U S A 96, 7563-7568, (1999)]之過程，又稱為WHMA-COX-2法，並無修改。簡言之，植入A549細胞24小時後，加入介白素-1β(10 ng/ml)以引發COX-2之表現。24小時後，將細胞以無血清之RPMI 1640清洗。隨後，將溶於DMSO及無血清RPMI之試驗物質加到孔槽中使最終濃度達到25、5.0、0.5及0.05 μg/ml。重複進行各濃度。將DMSO以與試驗孔槽等體積之量加到對照組孔槽中。六十分鐘後，將A23187(50 μM)加到孔槽中以釋放花生四烯酸。30分鐘後由孔槽中取出25μl培養基之樣本，進行PGE_2測定。

細胞生存力係以目視評估，任何的化合物在最高試驗濃度時並無觀察到明顯的毒性。上清培養基中之 PGE_2係如前面實例 4 所述來測定及報告。PGE_2合成之半數抑制濃度係如前面實例 4 所述來計算。

結果-於所試驗的劑量，此實驗方法無法得到任何蛇麻

草萃取物或衍生物之半數有效濃度。因為此方法需要在加入試驗物質前先刺激COX-2表現，所以咸信，試驗物質無法抑制PGE_2合成係因為其作用機制為抑制COX-2酵素表現而非直接抑制活性。雖然使用WHMA-COX-2方法可觀察到一些直接抑制作用，此過程顯然不適用於評估蛇麻草化合物或蛇麻草化合物之衍生物之抗發炎特性。

實例 7

蛇麻草衍生物於A549肺表皮細胞中抑制塵蟎過敏原活化之PGE_2生物合成

化合物 - 用於此實例之蛇麻草及蛇麻草衍生物(1)阿伐蛇麻草(1%阿伐酸;AA)、(2)aromahop OE(10%貝他酸及2%異構化)(3)isohop(異構化阿伐酸；IAA)、(4)貝他酸溶液(貝他酸BA)、(5)hexahop gold(六氫異構化阿伐酸;HHIAA)、(6)redihop(還原的異構化-阿伐酸；RIAA)及(7)tetrahop(四氫-異-阿伐酸THIAA)係於描述於前面實例1中。所有其他合物係如實例4所述，得自供應商。加入塵蟎過敏原前60分鐘，先加入最終濃度10 μg/ml之試驗物質。

*設備、PGE_2分析及計算*係如實例 4 所述。

塵蟎過敏原之分離-*美洲塵蟎(Dermatophagoides farinae)*為美國居家之塵蟎。將*美洲塵蟎*置於1:1比率之Purina Laboratory飼料(Ralston Purina, Co, St. Louis, MO)及Fleischmann's顆粒乾酵母(Standard Brands, Inc. New York, NY)於室溫及75%溼度下培養。將活的塵蟎由培養容器中吸出，當將其從培養基中移出時，以冷凍殺死，脫水

並儲存於0%溼度下。將塵蟎的過敏成份在周圍溫度下以水萃取出。於15 ml圓錐離心試管中(VWR, Rochester, NY)，將五百毫克的塵蟎粉末加到5 ml的水中(1:10重量/體積)，震盪一分鐘並於周圍溫度下放置隔夜。隔天，將水層使用0.2 μm丟棄式注射過濾器(Nalgene, Rochester, NY)過濾。該濾液即為塵蟎過敏原，並用於A549肺表皮細胞中試驗PGE_2生物合成之引發。

細胞培養及處理-將人類氣管表皮細胞株A549 (American Type Culture Collection, Bethesda, MD)如前面實例6所述培養及處理。將塵蟎過敏原加到培養基中使最終濃度達到1000 ng/ml。十八小時後，由培養基中取樣供PGE_2測定。

結果-表11係描述於經塵蟎過敏原刺激的A549肺細胞中，蛇麻草衍生物對PGE_2生物合成之抑制程度。所有試驗的蛇麻草衍生物皆能顯著地抑制塵蟎過敏原之刺激作用。

表 11

於經塵蟎過敏原刺激的 A549 肺表皮細胞中，蛇麻草衍生物之 PGE_2 抑制作用

試驗物質	**PGE_2抑制百分比**
阿伐蛇麻草(AA)	81
Aromahop OE	84
Isohop(IAA)	78
貝他酸(BA)	83
Hexahop(HHIAA)	82

Redihop(RIAA)	81
Tetrahop(THIAA)	76

此實例係說明蛇麻草衍生物能抑制A549肺細胞之塵蟎過敏原之PGE_2刺激作用。

實例8

還原的異阿伐酸缺乏直接的COX-2抑制

此實例之目的係測定還原的異阿伐酸鎂是否可作為COX-2酵素活性之直接抑制劑。

物質 - 於二甲亞碸(DMSO)中製備試驗化合物，並儲存於-20°C。LPS係購自Sigma-Aldrich公司(St. Louis, MO)。MgRIAA係由Metagenics公司(San Clemente, CA)提供，並使用西樂保之市面調配物(Celebrex™, Searle & Co., Chicago, IL)。

細胞培養 - 鼠科巨噬細胞RAW 264.7細胞係購自ATCC (Manassas, VA)並根據其指示養護。將細胞以每孔8x 10^4個細胞之密度於96孔盤中進行繼代培養，並使其達到90%的滿度，大約2天。將LPS(1μg /ml)或PBS單獨加到細胞培養基中並培養12小時。從孔槽中移除培養基及將LPS (1μg/ml)與溶於DMSO及無血清RPMI之試驗化合物加到孔槽中使MgRIAA之最終濃度為20、5.0、1.0及0.1μg/ml，而西樂保為100、10、1及0.1 ng/ml。各濃度進行8重複。以試驗化合物培養1小時後，移除細胞培養基，以帶有試驗化合物及LPS(1μg/ml)之培養基置換並培養。由孔槽中移除培養基並分析PGE_2合成。

PGE_2合成-使用市售、無放射活性程序(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)進行PGE_2定量分析。於EIA緩衝液中將樣本稀釋10倍並使用製造商所建議之程序並無修改。PGE_2濃度係以每毫升之皮克數來表示。此分析之製造商規格包括變化<10%之內分析係數，與PGD_2和PGF_2之交互作用低於1%且線性在10-1000 pg ml^{-1}之範圍。

雖然並無觀察到明顯的MgRIAA之PGE_2抑制，COX-2專一抑制劑西樂保係以劑量依賴抑制COX-2介導PGE_2合成(100、10、1及0.1 ng/ml)。該數據顯示，如同西樂保，MgRIAA不為直接的COX-2酵素抑制劑(圖5)。

實例 9

以 MgRIAA 抑制 iNOS 及 COX-2 蛋白質表現

將以MgRIAA處理及經LPS刺激之RAW 264.7細胞之細胞萃取物以西方墨點分析iNOS及COX-2蛋白。

物質-於二甲亞碸(DMSO)中製備試驗化合物，並儲存於-20°C。MgRIAA係由Metagenics公司(San Clemente, CA)所供應。小白菊內酯(Parthenolide)係購自Sigma-Aldrich公司(St. Louis, MO)。PI3K抑制劑渥曼青黴素(wortmannin)及LY294002係購自EMD Biosciences公司(San Diego, CA)。所產生的抗COX-2及iNOS抗體係購自Cayman Chemical公司(Ann Arbor, MI)。所產生抗GAPDH之抗體係購自Novus Biological公司(Littleton, CO)。與山葵過氧化酶偶合之二級抗體係購自Amersham Biosciences公司(Piscataway, NJ)。

細胞培養 - 鼠科巨噬細胞RAW 264.7細胞株係購自ATCC (Manassas, VA)並根據其指示養護。將細胞以每孔$3x10^5$個細胞之密度於24孔盤中進行細胞培養及繼代培養，並使其達到90%的滿度，大約2天。將試驗化合物加到溶於無血清細胞培養基最終濃度為0.4% DMSO之細胞中。以試驗物質培養1小時後，將LPS (1μg/ml)或磷酸緩衝鹽水單獨加到細胞孔槽中並持續培養至指定的時間。

西方墨點 - 於緩衝液 E 中(50 mM HEPES, pH 7.0；150 mM NaCl、1% triton X-100、1 mM 釩酸鈉、胰酶抑肽素(aprotinin)5 μg/ml、胃酶抑肽素 A(pepstatin A)1 μg/ml、亮抑酶肽(leupeptin)5μg/ml、苯基甲磺醯氟 1 mM)製備細胞萃取液。簡言之，將細胞以冷的 PBS 清洗二次並加入緩衝液 E。將細胞刮至乾淨的試管中，於 4°C 以 14,000 rpm 離心 10 分鐘後，取出上清液係為總細胞萃取液。將細胞萃取液(50μg)經由預注入 4%-20% Tris-HCl Criterion 凝膠(Bio-Rad, Hercules, CA)進行電泳分析，直到前面遷移的染色達到距底部凝膠 5 mm。使用 Bio-Rad (Hercules, CA)之半乾燥系統，將蛋白移轉至硝基纖維素膜。於室溫下清洗該膜並以 5%乾奶粉阻斷 1 小時。先以初級抗體，之後以二級抗體於室溫下各培養一小時。使用 Pierce Biotechnology 公司(Rockford, IL)之 SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate 藉由以等體積的魯米諾(luminol)/增強劑溶液及穩定的過氧化物溶液於室溫下培養 5 分鐘，來進行化學發光。使用冷式 CCD Kodak®(Rochester, NY) IS1000

影像系統補捉西方墨點之影像。使用 Kodak®軟體進行密度分析。

COX-2及iNOS蛋白表現之百分比係使用西方墨點偵測來評估。以LPS刺激20小時後，觀察COX-2之表現。當與DMSO之溶劑對照組相比較，可看到MgRIAA之COX-2蛋白表現降低了55%(圖6)。專一的NF-kB抑制劑小白菊內酯，抑制了蛋白表現22.5%，而PI3-激酶抑制劑降低的COX-2表現約47%(圖6)。此外，以LPS刺激20小時後，觀察到MgRIAA之iNOS蛋白表現降低了73%(圖7)。

實例 10

NF-κB 核轉位及 DNA 結合

將經 MgRIAA 處理及經 LPS 刺激 4 小時之 RAW 264.7 細胞之核萃取物進行 NF-κB 與 DNA 結合之分析。

物質 - 於二甲亞碸(DMSO)中製備試驗化合物，並儲存於-20°C。MgRIAA係由Metagenics公司(San Clemente, CA)所供應。小白菊內酯(Parthenolide)係購自Sigma-Aldrich公司(St. Louis, MO)。PI3K抑制劑LY294002係購自EMD Biosciences公司(San Diego, CA)。

細胞培養 - 鼠科巨噬細胞RAW 264.7細胞株係購自ATCC (Manassas, VA)並根據其指示養護。將細胞以每孔$1.5x10^6$個細胞之密度於6孔盤中進行細胞培養及繼代培養，並使其達到90%的滿度，大約2天。將試驗化合物MgRIAA(55及14 μg/ml)、小白菊內酯(80 μM)及LY294002(25 μM)加到溶於無血清細胞培養基最終濃度為0.4% DMSO之細胞中。以試驗物

質培養1小時後，將LPS (1μg/ml)或PBS單獨加到細胞培養基中並再持續培養四小時。

NF-κB-*DNA*結合—核萃取物基本上係如Dignam等人所述[Nucl Acids Res 11:1475-1489, (1983)]來製備。簡言之，將細胞以冷的PBS清洗二次，然後加入緩衝液A(10 mM HEPES, pH 7.0；1.5 mM $MgCl_2$；10 mM KCl；0.1% NP-40；胰酶抑肽素(aprotinin)5 μg/ml；胃酶抑肽素A(pepstatin A) 1 μg/ml；亮抑酶肽(leupeptin)5 μg/ml；苯基甲磺醯氟1 mM)並置於冰上15分鐘。然後將細胞刮至乾淨的試管中，及經由三個循環之冷凍-融解處理。於4°C以10,000 x g離心5分鐘後，上清液層即為細胞質之餾份物。將剩餘的團塊再懸浮於緩衝液C中(20 mM HEPES, pH 7.0；1.5 mM KCl；420 mM KCl；25%甘油；0.2 M EDTA；胰酶抑肽素(aprotinin) 5 μg/ml；胃酶抑肽素A(pepstatin A) 1 μg/ml；亮抑酶肽(leupeptin) 5 μg/ml；苯基甲磺醯氟1 mM)並於冰上放置15分鐘。於4°C以10,000 x g離心5分鐘後，收集核萃取液之上清液層。使用Active Motif公司(Carlsbad, CA)之TransAM NF-κB套組，如各製造商之指示，評估核萃取液之NF-κB DNA結合。如圖8中所見，在於96孔之模式中，TransAM套組偵測到p50亞單位之NF-κB結合至相同序列。測量蛋白質濃度(Bio-Rad分析)並以雙重試驗分析10 μg之核蛋白萃取液。

核萃取物之分析(10 μg蛋白質)係以雙重複來進行，結果係如圖9之圖示所示。以LPS (1 μg/ml)刺激導致NF-κB DNA結合增加二倍。以LY294002(一種PI3激酶抑制劑)處理，

如前面文獻報告所預期，產生NF-κB結合適度增加。小白菊內酯亦如預期對NF-κB結合產生明顯的下降。就MgRIAA，觀察到NF-κB結合大量降低。觀察到的效用為劑量反應方式。NF-κB結合降低可導致目標基因，包括COX-2、iNOS及TNFα之轉錄活化降低。

就MgDHIAA，結果顯示所觀察到的NF-κB結合降低可導致COX-2蛋白表現降低，最後導致PGE_2產生降低。

實例 11

由相思樹幹水性萃取物中可溶於二甲基亞碸之餾分物引起3T3-L1 脂肪細胞脂質生成增加

模型-使用3T3-L1鼠科纖維母細胞模型研究化合物對脂肪細胞分化及脂質生成之潛在效用。此細胞株係研究調節前脂肪細胞複製與調節脂肪細胞分化之刺激和機制之分別[Fasshauer, M., Klein, J., Neumann, S., Eszlinger, M., and Paschke, R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L 1 adipocytes. Biochem Biophys Res Commun, 290: 1084-1089, (2002)；Li, Y.及Lazar, M. A. Differential gene regulation by PPARgamma agonist and constitutively active PPARgamma2. Mol Endocrinol, 16: 1040-1048, (2002)]以及試驗藥劑之胰導素敏化及減低三酸甘油酯能力[Raz, I., Eldor, R., Cernea, S.及Shafrir, E. Diabetes: insulin resistance and derangements in lipid metabolism. Cure through intervention in fat transport and storage. Diabetes

Metab Res Rev, 21: 3-14, (2005)]。

作為脂肪細胞，3T3-L1細胞具有纖維母細胞之表徵。其在培養中複製直到形成聚滿單層，之後細胞-細胞接觸觸發G_0/G_1生長阻滯。3T3-L1細胞終端分化為脂肪細胞係依照聚滿前-及後-的前脂肪細胞之增生而定。隨後以3-異丁基-1-甲基黃原膠、甲基黃原膠(methylxanthane)、地塞米松(dexamethasone)及高劑量胰島素(MDI)刺激二天，促進這些細胞進行聚滿後有絲分裂複製擴張，退出細胞週期並開始表現脂肪細胞專一性基因。大約在引發分化五天後，有多於90%的細胞展現具特色的脂質填補脂肪細胞表現型。評估3T3-L1細胞之三酸甘油酯合成提供了試驗藥劑之胰島素-敏化能力之確實模型。

在脂肪細胞中促進脂質吸收之藥劑應能改善胰島素敏感性顯得很弔詭。已有數種假設提出試圖要解釋此種矛盾。一種已持續得到研究支持之提論為「脂肪酸偷竊」之觀念或脂肪酸由血漿中併入脂肪細胞造成肌肉中相當的脂肪酸消耗，伴隨葡萄糖吸收增加[Martin, G., K. Schoonjans等人, PPARgamma activators improve glucose homeostasis by stimulating fatty acid uptake in the adipocytes. Atherosclerosis 137 Suppl: S75-80, (1998)]。噻唑啶二酮，例如曲格列酮(troglitazone)及吡格列酮(pioglitazone)已顯示可選擇性刺激脂肪細胞之脂肪生成活性，產生較大的胰島素抑制脂質分解，或釋放脂肪酸至血漿中[Yamauchi, T., J. Kamon 等人, The mechanisms by

which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance. J Biol Chem 276(44): 41245-54, (2001)；Oakes, N. D., P. G. Thalen, 等人, Thiazolidinediones increase plasma-adipose tissue FFA exchange capacity and enhance insulin-mediated control of systemic FFA availability. Diabetes 50(5): 1158-65, (2001)]。此作用會使其他組織可用的脂肪酸變少[Yang, W. S., W. J. Lee, 等人, Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. J Clin Endocrinol Metab 86(8): 3815-9, (2001)]。因此，以噻唑啶二酮治療的結果，會使在肌肉及肝臟中游離的脂肪酸之胰島素去敏化效用降低。這些活體外結果已經臨床確認[Boden, G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. Diabetes 46(1): 3-10, (1997)；Stumvoll, M. and H. U. Haring Glitazones: clinical effects and molecular mechanisms. Ann Med 34(3): 217-24, (2002)]。

試驗物質－曲格列酮係得自Cayman Chemicals公司(Ann Arbor, MI)，而甲基異丁基黃嘌呤、地塞米松、吲哚美辛(indomethacin)、油紅O及胰島素係得自Sigma公司(St. Louis, MO)。試驗化合物為深棕色粉末，係由相思樹樹膠(AcE)樣本#4909之50:50(v/v)水/酒精萃取物所製造的，並得自

Bayir Chemicals公司(No. 68, South Cross Road, Basavanagudi, India)。此萃取物經標準化，含有20%以上之apecatechin。用於此實例批號A Cat/2304，經UV分析測量含有20.8%的apecatechin。青黴素、鏈黴素、Dulbecco's修改Eagle's培養基(DMEM)係購自Mediatech公司(Herndon, VA)，而10% FBS-HI(胎牛血清-熱滅式)係來自Mediatech and Hyclone公司(Logan, UT)。除非另有說明，否則所有其他的標準試劑係購自Sigma公司。

細胞培養及處理-鼠科纖維母細胞株3T3-L1係購自美國菌種保存中心(Manassas, VA)及根據供應商之指示進行繼代培養。實驗前，將細胞置於含有10% FBS-HI及添加50單位青黴素/ml及50 μg鏈黴素/ml之DMEM中培養，並在實驗前保持在對數期。將細胞置於5% CO_2潮濕的培養箱中於37°C下培養。聚滿前培養基之成份包括(1) 含有4.5 g葡萄糖/L之10% FBS/DMEM；(2)50 U/ml青黴素及(3)50 μg/ml鏈黴素。生長培養基係藉由將50 ml的於熱失活化之FBS及5 ml的青黴素/鏈黴素加到500 ml DMEM所製成。將此培養基儲存於4°C。使用前，將培養基以水浴加熱至37°C。

將3T3-T1細胞以起初$6x10^4$細胞/cm^2之密度植入24-孔盤中。二天，讓細胞生長達到全滿。全滿後，藉由添加分化培養基促使細胞分化成脂肪細胞；此培養基含有(1)10% FBS/DMEM(高葡萄糖)；(2)0.5 mM甲基異丁基黃嘌呤；(3)0.5 μM地塞米松及(4)10 μg/ml胰島素(MDI培養基)。三天後，將培養基換成含有10 μg/ml胰島素之10% FBS/DMEM溶液之

後-分化培養基。

將AcE部分溶解於二甲基亞碸(DMSO)並加入培養基以在分化的第0天及整個成熟期(第6或7天(D6/7))達到50 μg/ml之濃度。無論新鮮的培養基是在何時加入，同時亦加入新鮮的試驗物質。DMSO係因其極性及其可與水性細胞培養基混合之事實所選擇。分別加入吲哚美辛及曲格列酮，以達到5.0及4.4μg/ml之最終濃度，作為陽性對照組。以0.36%油紅O或0.001% BODIPY將分化的、D6/D7 3T3-L1細胞染色。完整的分化及以試驗物質處理細胞之過程係以圖表概述於圖10中。

油紅O染色 - D6/D7-分化的3T3-L1細胞之三酸甘油酯含量係以油紅O根據Kasturi及Joshi之方法來估算[Kasturi, R.及Joshi, V. C. Hormonal regulation of stearoyl coenzyme A desaturase activity and lipogenesis during adipose conversion of 3T3-L1 cells. J Biol Chem, 257: 12224-12230, 1982]。以PBS(磷酸緩衝食鹽水)清洗單層細胞並以10%的甲醛固定十分鐘。將固定的細胞以三部分0.6%油紅溶液/異丙醇儲存溶液及二部分水之油紅O作用溶液染色一小時，並將多餘的染劑以水清洗一次。將生成的染色油滴以丙醇從細胞中萃取出並於540 nm以分光光度分析定量(MEL312e BIO-KINETICS READER, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT)。試驗物質及陽性對照組吲哚美辛和曲格列酮之結果係以相對於溶劑對照組之540 nm吸收度來表示。

BODIPY染色 —使用4,4-二氟-1,3,5,7,8-五-甲基-4-硼

-3a,4a-二氮雜-s-茚申(BODIPY 493/503；Molecular Probes, Eugene, OR)進行細胞中性及非極性脂質之定量。簡言之，移除培養基並將細胞以未滅菌的PBS清洗一次。將1 mg BODIPY溶於1 ml DMSO (1,000 μg BODIPY/ml)來製造1000X BODIPY/DMSO儲存溶液。然後將10μl的儲存溶液加到990μl的PBS製造BODIPY作用溶液，使作用溶液中最終的BODIPY濃度為0.01μg/μl。將100μl的此操作溶液(1μg BODIPY)加到96孔的微量滴定盤各孔中。於周圍溫度下，在水平迴轉式振盪器(DS-500, VWR Scientific Products, South Plainfield, NJ)上15分鐘後，以100μl PBS清洗細胞，接著加入100μl PBS供螢光光譜法測定BODIPY併入細胞之判讀。使用設定在485 nm激發光及530 nm發射光之Packard螢光光譜儀(Model#BFI0000, Meridan, CT)定量BODIPY螢光。試驗物質、吲哚美辛及曲格列酮之結果係以相對於溶劑對照組之螢光來表示。

所有中性及非極性脂質之BODIPY定量及於3T3-L1細胞中在D7以油紅O測定三酸甘油酯含量間之卡方(chi-square)分析關係，以$p<0.001$及4.64之勝算比(Odds Ratio)，顯示二種分法間有顯著的關係。

統計計算及解釋-AcE及吲哚美辛以雙重複最少分析三次。溶劑及曲格列酮對照組亦以雙重複，重複八次。非極性脂質併入係以相對於溶劑對照組中完全分化細胞之非極性脂質累積來表示。陽性反應係定義為以油紅O或BODIY染色評估脂質堆積增加大於溶劑對照組之各別的上方95%信賴區間

(單尾, Excel；Microsoft, Redmond, WA)。AcE另外的特徵為相對於溶劑反應，脂質生成增加大於或等於曲格列酮陽性對照組；使用Excel之學生t試驗功能作為此次之評估。

結果－陽性對照組吲哚美辛及曲格列酮在3T3-L1細胞中引發脂質生成之量相類似(圖11)。令人意外地，AcE產生的脂肪生成反應大於陽性對照組吲哚美辛及曲格列酮任一項。

3T3-L1細胞中水性相思樹樣本#4909萃取物之可溶於二甲基亞碸成份所展現的脂質生成潛力，證實了其在具有對胰島素不敏感現象或徵狀之人類或其他哺乳動物中增加胰島素敏感性之潛力。

實例 12

以水性相思樹萃取物之可溶於二甲基亞碸餾份引發胰島素阻抗的3T3-L1脂肪細胞之脂聯素(adiponectin)分泌增加

模型-這些實驗係使用如實例 11 所述之 3T3-L1 鼠科纖維母細胞模型。

試驗物質—曲格列酮係購自Cayman Chemical (Ann Arbor, MI)，而甲基異丁基黃嘌呤、地塞米松及胰島素係得自Sigma公司(St. Louis, MO)。試驗化合物為深棕色粉末，係由相思樹樹膠(AcE)樣本#4909之50:50(體積/體積)水/酒精萃取物所製造的，並得自Bayir Chemicals公司(No. 68, South Cross Road, Basavanagudi, India)。此萃取物經標準化，含有不低於20%之apecatechin。用於此實例之批號ACat/2304，經UV分析測量含有20.8%的apecatechin。青黴

素、鏈黴素、Dulbecco's 修改Eagle's培養基(DMEM)係購自Mediatech公司(Herndon, VA)，而10% FBS-HI (胎牛血清-熱滅式)係來自Mediatech and Hyclone公司(Logan, UT)。除非另有說明，否則所有其他的標準試劑係購自Sigma公司。

細胞培養及處理 - 如實例10所述，進行鼠科纖維母細胞株3T3-L1培養以產生第6天分化脂肪細胞。將3T3-T1細胞以起初$1x10^4$細胞/cm^2之密度植入96-孔盤中。二天，讓細胞生長達到全滿。全滿後，藉由添加分化培養基促使細胞分化成脂肪細胞；此培養基含有(1)10% FBS/DMEM(高葡萄糖)；(2)0.5 mM甲基異丁基黃嘌呤；(3)0.5 μM地塞米松及(4)10 μg/ml胰島素(MDI培養基)。從第3天至第5天，將培養基換成含有10 μg/ml胰島素之10% FBS/DMEM溶液之後-分化培養基。

評估相思樹對胰島素阻抗之效用，係將成熟的3T3-L1細胞使用如Fasshauer等人所述改變之過程來進行[Fasshauer, *et al.* 等人 Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. BBRC 290:1084-1089, (2002)]。簡言之，在第6天將細胞保持在含有0.5%牛血清白蛋白之無血清培養基中三小時，然後以1 μg胰島素/ml加上溶劑或胰島素加上試驗物質處理。將曲格列酮溶於二甲基亞碸並加入以達到5、2.5、1.25及0.625 μg/ml之濃度。相思樹萃取物係以50、25、12.5及6.25 μg/ml進行試驗。二十四小時後，將上清培養基取樣供脂聯素測定。完整的分化過程及以試驗物質處理細胞係以圖表概述於

圖12中。

脂聯素分析－分泌至培養基之脂聯素係使用小鼠脂聯素Quantikine®免疫分析套組(R&D Systems, Minneapolis, MN)來定量，並無修改。製造商所提供的資料指出，在小鼠細胞培養基中脂聯素阻礙之恢復平均為103%及最低可偵測的脂聯素濃度範圍從0.001至0.007 ng/ml。

統計計算及解釋－所有的分析係以雙重複進行。就統計分析，相思樹對脂聯素分泌之效用係以相對於溶劑對照組所計算。劑量間的差異性係使用學生t-試驗來測定並無對多重比較進行校正；選擇些微五個百分比之型I誤差機率。

試驗化合物之效力係使用修改的Hofstee之方法[Hofstee, B.H. Non-inverted versus inverted plots in enzyme kinetics. Nature 184:1296-1298, (1959)]測定表觀米氏常數(apparent Michaelis constant)及最大速度來估算。以{相對脂聯素分泌/[濃度]}取代獨立變數v/[S]及以{相對脂聯素分泌}取代獨立變數{v}，產生y=mx+b形式之關係。相對於溶劑對照組之最大脂聯素分泌係由y軸截距來估算，而半數最大脂聯素分泌所需之試驗化合物之濃度係由斜率的負數值來計算。

結果—在胰島素阻抗3T3-L1細胞中，陽性對照組曲格列酮之所有試驗濃度，相對於溶劑對照組，在2.5μg/ml時係以2.44-倍之最大刺激，增進脂聯素分泌(圖13)。相對於溶劑對照組，在50及25 μg相思樹/ml濃度增加脂聯素分泌分別為1.76-及1.70-倍。雖然這些相思樹濃度皆不等於以曲格

列酮所觀察到的最大脂聯素分泌，但可與1.25及0.625μg/ml濃度之曲格列酮相比。

估算衍生自修改的Hofstee圖之最大脂聯素分泌中顯示因半數最大刺激所需的濃度之大差異，脂聯素分泌相對具相當之增加。由y截距估算曲格列酮及兒茶樹之最大脂聯素分泌，相對於溶劑對照組，分別為2.29-及1.88-倍。然而，在胰島素阻抗3T3-L1細胞中，刺激半數最大脂聯素分泌所需之曲格列酮濃度為0.085μg/ml，而相思樹濃度為5.38μg/ml。依照20%之最低apecatechin含量所計算，後者相思樹之值變為大約1.0μg/ml。

在胰島素阻抗3T3-L1細胞中，依其增進脂聯素分泌之能力，可預期相思樹及/或apecatechin在抑制血漿脂聯素濃度之臨床病理上，具有正面效用。

實例 13

以水性相思樹萃取物之可溶於二甲基亞碸餾份物引發經TNFα處理之3T3-L1脂肪細胞之脂聯素分泌增加

模型-這些實驗係使用如實例 11 所述之 3T3-L1 鼠科纖維母細胞模型。

試驗化合物 - 吲哚美辛、甲基異丁基黃嘌呤、地塞米松及胰島素係得自Sigma公司(St. Louis, MO)。試驗化合物為深棕色粉末，係由相思樹樹膠樣本#4909之50:50(體積/體積)水/酒精萃取物所製造的，並得自Bayir Chemicals公司(No. 68, South Cross Road, Basavanagudi, India)。此萃取物經標準化，含有不低於20%之apecatechin。用於此實例之批

號A Cat/2304，經UV分析測量含有20.8%的apecatechin。青黴素、鏈黴素、Dulbecco's修改Eagle's培養基(DMEM)係購自Mediatech公司(Herndon, VA)，而10% FBS-HI(胎牛血清-熱滅式)係來自Mediatech and Hyclone公司(Logan, UT)。除非另有說明，否則所有其他的標準試劑係購自Sigma公司。

細胞培養及處理 - 如實例10所述，進行鼠科纖維母細胞株3T3-L1培養以產生第3天分化的脂肪細胞。將3T3-T1細胞以起初$1x10^4$細胞/cm^2之密度植入96-孔盤中。二天，讓細胞生長達到全滿。全滿後，藉由添加分化培養基促使細胞分化成脂肪細胞；此培養基含有(1)10% FBS/DMEM(高葡萄糖)；(2)0.5 mM甲基異丁基黃嘌呤；(3)0.5 μM地塞米松及(4)10 μg/ml胰島素(MDI培養基)。從第3天至第5天，將培養基換成含有10% FBS/DMEM溶液之後-分化培養基。在第5天，將培養基換成含有10、2或0.5 ng TNFα/ml之10% FBS/DMEM溶液，有或無吲哚美辛或相思樹萃取物之試驗培養基。將吲哚美辛溶於二甲基亞碸並加入使濃度達到5、2.5、1.25及0.625 μg/ml。將相思樹萃取物以50、25、12.5及6.25 μg/ml試驗。在第6天，取樣上清培養基供脂聯素測定。完整的分化及以試驗物質處理細胞之過程係以圖表概述於圖14中。

脂聯素分析 - 分泌至培養基之脂聯素係使用小鼠脂聯素Quantikine®免疫分析套組(R&D Systems, Minneapolis, MN)來定量，並無修改。製造商所提供的資料指出，在小鼠細胞培養基中脂聯素阻礙之恢復平均為103%及最低可偵測的脂聯素濃度範圍從0.001至0.007 ng/ml。

統計計算及解釋－所有的分析係以雙重複進行。就統計分析，吲哚美辛、兒茶樹對脂聯素分泌之效用係以相對於溶劑對照組所計算。劑量及試驗藥劑間的差異性係使用學生t-試驗來測定並無對多重比較進行校正；選擇名義五個百分比之型I誤差機率。

結果—在成熟的3T3-L1細胞中，10及2 ng/ml濃度之TNFα分別以65及29%顯著地($p<0.05$)抑制脂聯素分泌，而在0.5 ng/ml時對脂聯素分泌無明顯效用(圖15)。相對於試驗的TNFα之單獨所有劑量，於10及2 ng TNFα/ml時，吲哚美辛促進了($p<0.05$)脂聯素分泌，但無法將脂聯素分泌恢復至溶劑對照組之量。相思樹治療在10 ng TNFα/ml之存在下，相對於吲哚美辛，儘管是遞減，產生類似之脂聯素增加。在四個增加的劑量，兒茶樹及吲哚美辛間脂聯素刺激之差異分別為14，20，32及41%。因為劑量間之多重性對吲哚美辛及相思樹為相同的，所以這些結果顯示，就恢復3T3-L1之脂聯素分泌，在超生理濃度之TNFα存在下，吲哚美辛之效力大於相思樹中之活性物質。

以2 ng TNFα及相思樹處理3T3-L1細胞，相對於以TNFα單獨處理產生脂聯素分泌增加，其在6.25、25及50 μg/ml時為顯著的($p<0.05$)。然而，不像10 ng TNFα/ml處理，相思樹及吲哚美辛間之差異較小且明顯與劑量較不相關，四種試驗濃度之總平均為5.5%。如吲哚美辛中所觀察到，相思樹並沒有將脂聯素分泌恢復至溶劑對照組中所觀察到之量。

在0.5 ng TNFα/ml時，吲哚美辛產生劑量依賴之脂聯

素分泌降低，其在2.5及5.0 μg/ml濃度時為顯著的($p<0.05$)。有利地，不像吲哚美辛，相對於經TNFα及溶劑處理之3T3-L1脂肪細胞，兒茶樹在50 μg/ml增加了脂聯素分泌。因此，當TNFα濃度接近生理量時，兒茶樹促進脂聯素分泌，相較於TNFα及溶劑對照組，令人驚訝地優於吲哚美辛。

在經TNFα-處理之3T3-L1細胞中，依其增進脂聯素分泌之能力，可預期相思樹及/或apecatechin在其中TNFα量升高且血漿脂聯素濃度受到抑制之所有臨床病理上，具有正面效用。

實例 14

3T3-L1 脂肪細胞模型中各種市售相思樹樣本增加脂質生成

模型-這些實驗係使用如實例11所述之3T3-L1鼠科纖維母細胞模型。所用的所有化合物及程序係如實例11中所述，但是僅進行油紅O分析來評估兒茶樹引發的細胞之三酸甘油酯量。兒茶樹樣本#5669係得自Natural Remedies公司(364, 2nd Floor, 16th Main, 4th T Block Bangalore, Karnataka 560041 India)；而樣本#4909、#5667及#5668係得自Bayir Chemicals公司(No. 10, Doddanna Industrial Estate, Penya II Stage, Bangalore, 560091 Karnataka, India)。阿拉伯金合歡樣本#5639、#5640及#5659係購自KDN-Vita International, Inc. (121 Stryker Lane, Units 4 & 6 Hillsborough, NJ 08844)。樣本#5640說明為樹幹，樣本#5667為樹膠而樣本#5669為心材粉末。除非另有指出，否則

所有的其他樣本係為兒茶樹幹之專屬甲醇萃取物。

結果－所有檢測的相思樹樣本皆產生陽性脂質生成反應(圖16)。最高的脂質生成反應係由樣本#5669心材粉末(1.27)、#5659－甲醇萃取物(1.31)、#5640－DMSO萃取物(1.29)及#4909－甲醇萃取物(1.31)所達成。

此實例另外驗證兒茶樹中有多重化合物存在，其能正向修改脂肪細胞生理支持增加胰島素作用。

實例 15

在TNFα-3T3-L1脂肪細胞模型中各種市售相思樹樣本增加脂聯素分泌

模型-這些實驗係使用如實例 11 所述之 3T3-L1 鼠科纖維母細胞模型。所用的標準化合物及細胞處理係如實例 11 及 13 中所記載來進行。然而，以 TNFα 處理之 3T3-L1 脂肪細胞與實例 12 中的不同，其中細胞僅暴露於 2 或 10 ng TNFα/ml 中。在第 6 天將培養的上清培養基如實例 12 所詳述進行脂聯素分析。相思樹樣本#4909、#5639、#5659、#5667、#5668、#5640 及#5669 係如實例 13 所述。

結果－相對溶劑對照組，2 ng/ml TNFα 降低了 3T3-L1 脂肪細胞之脂聯素分泌 27%，而相對 TNFα 溶劑對照組，1.25 μg 吲哚美辛/ml 之脂聯素分泌最大上升 11%(表 12)。僅相思樹調配物#5559 在任何四個所試驗的劑量無法增加脂聯素分泌。所有其他的相思樹調配物皆產生範圍從 10 至 15%之可相匹敵的脂聯素分泌最大增加。然而，有關由各種相思樹調配物引發最大脂聯素分泌之濃度，觀察到差異性。最強效的

調配物為#5640，在 12.5 μg/ml 時達到最大脂聯素刺激，接著是#5639、#5667 及#5669 係在 50 μg/ml 時。

表 12

在 2 ng TNFα/ml 的存在下由各種相思樹調配物引發 3T3-L1 脂肪細胞之相對最大脂聯素分泌

試驗化合物	濃度[μg/ml]	脂聯素指數†
2ngTNFα/ml±95%CI	-	1.00±0.05
溶劑對照組	-	1.27*
吲哚美辛	1.25	1.11*
兒茶樹#4909樹幹(甲醇萃取物)	25.0	1,15*
阿拉伯金合歡#5639心材(DMSO萃取物)	50.0	1.14*
阿拉伯金合歡#5659樹幹(甲醇萃取物)	25	1.02
兒茶樹#5667樹幹(甲醇萃取物)	50.0	1.10*
兒茶樹#5668(樹膠)	25.0	1.15*
阿拉伯金合歡#5640樹幹(DMSO萃取物)	12.5	1.14*
兒茶樹#5669心材粉末(DMSO萃取物)	50.0	1.14*

†脂聯素指數=[脂聯素]$_{試驗}$/[脂聯素]$_{TNFα對照}$

*相對 TNFα溶劑反應為顯著增加($p<0.05$)

相對溶劑對照組，10 ng/ml TNFα降低了 3T3-L1 脂肪細胞之脂聯素分泌 54%，而相對 TNFα溶劑對照組，5.0 μg 吲哚美辛/ml 之最大脂聯素分泌上升 67%(表 13)。曲格列酮在最低試驗劑量 0.625 μg/ml 時，最大增加脂聯素分泌 51%。所有其他的相思樹調配物皆產生範圍從 10 至 15%之可相匹敵的最大脂聯素分泌增加。相思樹調配物#5559 在 25μg/ml

時產生 12%之最低顯著的增加($p<0.05$)。所有其他的相思樹調配物在 50 μg/ml 時皆產生範圍從 17 至 41%之最大脂聯素分泌增加。最強效的調配物為#4909 及#5669，相對 TNFα溶劑對照組，分別具有 41 及 40%之脂聯素分泌增加。

表 13

在 10 ng TNFα/ml 的存在下由各種相思樹調配物引發 3T3-L1 脂肪細胞之相對最大脂聯素分泌

試驗物質	濃度[μg/ml]	脂聯素指數†
10 ng TNFα/ml±95%CI	-	1.00±0.10
溶劑對照組	-	1.54*
吲哚美辛	5.0	1.67*
曲格列酮	0.625	1.51 *
兒茶樹#4909樹幹(甲醇萃取物)	50	1.41 *
阿拉伯金合歡#5639 心材(DMSO 萃取物)	50	1.26*
阿拉伯金合歡#5659樹幹(甲醇萃取物)	25	1.12*
兒茶樹#5667樹幹(甲醇萃取物)	50	1.26*
兒茶樹#5668(樹膠)	50	1.30*
阿拉伯金合歡#5640樹幹(DMSO萃取物)	50	1.17*
兒茶樹#5669心材粉末(DMSO萃取物)	50	1.40*

†脂聯素指數=[脂聯素]$_{試驗}$/[脂聯素]$_{TNFα對照}$

*相對 TNFα 溶劑反應為顯著增加($p<0.05$)

在代謝症候群之第二模型中，觀察到不同的相思樹樣本或調配物引起類似反應，另外驗證了相思樹中多重化合物之存在，能正向修改脂肪細胞生理支持胰島素作用增加。

實例 16

兒茶樹之極性及非極性溶劑萃取化合物能增加TNFα/3T3-L1脂肪細胞模型之脂聯素分泌

模型-這些實驗係使用如實例11所述之3T3-L1鼠科纖維母細胞模型。所用的標準化合物係如實例11及13中所記載。如實例13中所述以10 ng TNFα/ml處理3T3-L1脂肪細胞。在第6天將培養物上清培養基如實例13所詳述進行脂聯素分析。

試驗物質-將大塊的*兒茶樹*樣本#5669心材(每片重量5-10克)以5/8"金屬鑽頭使用標準動力鑽於低速鑽動。將木刨片收集至研缽中，並磨成細粉，並於液態N_2下冷凍。然後將此粉末以250微米的篩子過篩，得到約10 g自由流動性之細粉末。

表 14

供 3T3-L1 脂聯素分析之*兒茶樹*萃取樣本之說明

萃取溶劑	萃取物之重量[mg]	萃取之百分比
胃液[1]	16	11
二甲基亞碸	40	27
氯仿	0.2	0.13
甲醇/水pH=2 95:5	20	13
水	10	6.7
乙酸乙酯	4	2.7

[1]胃液含有 2.90 g NaCl、7.0 ml 濃 HCl 水溶液、3.2 g 胃蛋白酶(800-2500 活性單位/mg)，以水稀釋成 1000 ml。最終的 pH 為 1.2。就此萃取，係將胃液-心材懸浮液保持在 40°C 一小時，接著真空移除胃液。然後將剩餘的殘餘物溶於 MeOH，以 0.45 微米的 PTFEF 注射過濾器過濾並真空濃縮。

將此粉末分散於六支玻璃褐色的樣品瓶中(150 mg/瓶)並以 2 ml 之下表 14 中所列的溶劑於 40°C 下萃取約 10 小時。萃取後，將心材/溶劑懸浮液離心(5800 x g, 10 分鐘)。將離心後的上清液部分以 0.45 微米 PTFE 注射過濾器過濾至分開的褐色玻璃樣品瓶中。將這些樣本各自真空濃縮。如表 7 中所見，以 DMSO 由兒茶樹心材萃取大部分的物質及最後以氯仿萃取。所有的萃取樣本係以 50、25、12.5 及 6.25 μg/ml 來試驗。

吡格列酮係由市售來源Actos®(Takeda Pharmaceuticals, Lincolnshire, IL)得來之45 mg的吡格列酮錠劑。將錠劑磨成細粉並以5.0、2.5、1.25及0.625 μg吡格列酮/ml進行試驗。同時亦包括吲哚美辛，作為額外陽性對照組。

結果 - 陽性對照組吡格列酮及吲哚美辛二者，在TNFα的存在下增加脂肪細胞之脂聯素分泌分別為115及94%(圖17)。吡格列酮及吲哚美辛之最適濃度分別為1.25及2.5 μg/ml。兒茶樹樣本#5669之所有萃取物，相對於TNFα處理，皆增加了脂聯素分泌。在萃取物中，DMSO萃取物為最有效力的脂聯素分泌引發劑，觀察到最大的活性係在6.25 μg萃取

物/ml。此結果可能係因為DMOS萃取廣泛各種極性物質之能力。檢視圖17指出，水萃取物(極性化合物)及氯仿萃取物(非極性化合物)二者在TNFα/3T3-L1脂肪細胞模型中，其增加脂聯素分泌之能力相似。這些萃取物含有相似的化合物是不可能的。此實例說明，具有不同極性之溶劑由*兒茶樹*心材中萃取化合物之能力，其在前發炎刺激物之存在下，能增加脂肪細胞之脂聯素分泌。

實例 17

在TNFα/3T3-L1脂肪細胞模型中*兒茶樹*酸性及鹼性餾份物能增加脂聯素分泌

模型-這些實驗係使用如實例11所述之3T3-L1鼠科纖維母細胞模型。所用的標準化合物係如實例11及13中所記載。3T3-L1脂肪細胞係如實例13中所述以10 ng TNFα/ml處理。在第6天將培養的上清培養基如實例13所詳述進行脂聯素分析。

試驗物質－兒茶樹樣本#5669係根據下列程序來萃取：將鹼性異丙醇溶液(1%(體積/體積)1.5N NaOH之異丙醇溶液)加到含約50 mg乾燥兒茶樹心材粉末#5669之50 ml試管中。然後將樣本短暫混合，以超音波處理30分鐘及離心一小時讓剩餘的固體物質形成團塊。然後將上清液以0.45微米的濾紙過濾。所用的鹼性異丙醇之pH為pH 8.0，而所收集的液體pH為pH 7.0。取一部分澄清過濾過的液體進行真空乾燥，並出現白色固體。此樣本即為乾燥鹼性萃取物。

將剩餘的團塊物質置於酸性異丙醇溶液(1%(體積/體

積)10% HCl之異丙醇溶液)，為紅色溶液。將此樣本混合直到團塊物質完全分散於液體中，然後離心30分鐘得到剩餘之團塊。將淡黃色的上清液通過0.45微米濾紙濾。所收集的液體pH為pH 3.0且發現當樣本的pH升至pH 8-9時，有紅棕色沉澱（乾沉澱）形成。收集沉澱並乾燥，得到紅棕色固體。再次將上清液通過0.45微米過濾器以移除任何殘餘的沉澱；此液體為深黃色。將剩餘的液體乾燥產生固體棕色樣本，稱為乾燥酸性萃取物。三種回收之餾份係如表15所列。所有的試驗化合物係於50、25、12.5及6.25 μg/ml分析，而吡格列酮陽性對照組係於5.0、2.5、1.25及0.625 μg/ml進行試驗。

表 15

兒茶樹心材粉末之試驗物質回收

試驗物質	**所收集mg(%兒茶樹樣本#5669)**
乾燥鹼性萃取物	0.9 (1.8)
乾燥沉澱	1.2 (2.4)
乾燥酸性萃取物	1.5 (3.0)

結果：相對於溶劑對照組，TNFα降低脂聯素分泌46%。吡格列酮之脂聯素分泌之最大恢復為在1.25 μg/ml之TNFα處理中所觀察到的1.47倍(表16)。在試驗物質中，僅乾燥沉澱無法顯著地將脂聯素分泌增加至僅有TNFα之對照組之上。酸性萃取物及心材粉末(起始物質)在TNFα存在下，其增加脂聯素分泌之能力相似，而鹼性萃取物僅在最高劑量50 μg/ml時增加脂聯素分泌。

表 16

在 TNFα/3T3-L1 模型中四種劑量所引發之最大脂聯素分泌

試驗物質	濃度[μg /ml]	脂聯素指數†
DMSO對照組	-	1.86
TNFα±95%CI	-	1.00±0.11††
皃茶樹樣本#5669 心材粉末	6.25	1.14
乾燥鹼性萃取物	50	1.19
乾燥沉澱	6.25	1.09
乾燥酸性萃取物	6.25	1.16
吡格列酮	1.25	1.47

†脂聯素指數=[脂聯素]試驗/[脂聯素]TNFα對照

*值>1.11 為顯著與 TNFα對照組不同($p<0.05$)

實例 18

於經TNFα-處理之3T3-L1脂肪細胞中以相思樹水性萃取物之可溶於二甲基亞碸餾份物降低介白素-6分泌

介白素-6(IL-6)為多功能細胞激素，其在宿主防禦、急性期反應、免疫反應、神經細胞功能、造血作用及代謝症候群中扮演一個重要角色。其係藉由各種正常及轉化的淋巴或非淋巴細胞(例如脂肪細胞)來表現。IL-6之產生係藉由許多訊號例如有絲分裂原或抗原刺激、脂多糖、鈣離子載體、細胞 激素及病毒向上調整[Hibi, M., Nakajima, K., Hirano T. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. J Mol Med. 74(1):1-12, (Jan 1996)]。在許多病理症狀包括細菌及病毒感染、創傷、

自體免疫疾病、惡性腫瘤及代謝症候群已觀察到血清含量上升[Amer, P. Insulin resistance in type 2 diabetes -- role of the adipokines. Curr Mol Med.;5(3):333-9, (May 2005)]。

模型-這些實驗係使用如實例11所述之3T3-L1鼠科纖維母細胞模型。所用的標準化合物係如實例11及13中所記載。3T3-L1脂肪細胞係如實例13中所述以10 ng TNFα/ml處理。在第6天將培養物上清培養基如實例13所詳述進行脂聯素分析。

試驗物質—吲哚美辛、甲基異丁基黃嘌呤、地塞米松及胰島素係得自Sigma公司(St. Louis, MO)。試驗化合物為深棕色粉末，係由兒茶樹膠樣本#4909之50:50(體積/體積)水/酒精萃取物所製造的，並得自Bayir Chemicals公司(No. 68, South Cross Road, Basavanagudi, India)。此萃取物經標準化，含有不低於20%之apecatechin。用於此實例之批號ACat/2304，經UV分析測量含有20.8%的apecatechin。青黴素、鏈黴素、Dulbecco's修改Eagle's培養基(DMEM)係購自Mediatech公司(Herndon, VA)，而10% FBS(胎牛血清)係來自Mediatech and Hyclone公司(Logan, UT)。除非另有指出，否則所有其他的標準試劑係購自Sigma公司。

介白素-6分析 - 分泌至培養基之IL-6係使用未作修改之小鼠脂聯素Quantikine®小鼠IL-6免疫分析套組(R&D Systems, Minneapolis, MN)來定量。製造商所提供的資料指出，在小鼠細胞培養基中，以1:2稀釋，IL-6阻礙之恢復

平均為99%，及最低可偵測的IL-6濃度範圍從1.3至1.8 pg/ml。所有上清培養基樣本分析時皆未稀釋。

統計計算及解釋－所有的分析係以雙重複進行。供統計分析用，相思樹對脂聯素或IL-6分泌之效用係以相對於溶劑對照組計算。劑量間的差異性係使用學生t-試驗來測定並無對多重比較進行校正；選擇名義五個百分比之型I誤差機率(單尾)。

結果—如前面實例中所見，TNFα大幅地降低脂聯素分泌，而在TNFα的存在下，吲哚美辛及兒茶樹萃取物增加了脂聯素分泌。雖然吲哚美辛陽性對照組及兒茶樹萃取物二者展現劑量相關之脂聯素分泌增加，但是沒有物質將脂聯素濃度恢復至無 TNFα之二甲基亞碸對照組中所見到之濃度(表17)。在 TNFα的存在下，兒茶樹萃取物展現強力之劑量相關之 IL-6 分泌之抑制作用，而吲哚美辛卻驗證無抗發炎效用。

檢驗抗發炎脂聯素對前發炎 IL-6 之比率，吲哚美辛及兒茶樹萃取物在相對的抗發炎活性上產生良好的劑量相關之增加。

表 17

在 TNFα/3T3-L1 模型中以兒茶樹樣本#4909 引起 IL-6 分泌降低及脂聯素分泌增加

試驗物質	濃度 [μg/ml]	脂聯素指數†	IL-6 指數††	脂聯素/IL-6
DMSO對照組	-	2.87*	0.46*	6.24*
TNFα對照組	-	1.00±0.079	1.00 ±	1.00±0.08

±95% CI			0.08	
吲哚美辛	5.00	2.69*	1.10*	2.45*
	2.50	2.08*	1.04	2.00*
	1.25	1.71*	1.01	1.69*
	0.625	1.54*	1.37*	1.12*
兒茶樹樣本#4909	50.0	1.51 *	0.27*	5.55*
	25.0	1.19*_	0.71*	1.68*
	12.5	1.13*	0.78*	1.45*
	6.25	1.15*	0.93	1.23*

將兒茶樹試驗物質或吲哚美辛一致以 10 ng TNFα/ml 加到 D5 3T3-L1 脂肪細胞中。在隔天，自上清培養基取樣進行脂聯素及 IL-6 測定。所有的值係以 TNFα對照組為指數。

†脂聯素指數=[脂聯素]試驗/[脂聯素]TNFα對照

††IL-6 指數=[IL-6 試驗-IL-6 對照]/[IL-6TNFα - IL-6 對照]

*顯著地與TNFα對照組不同($p<0.05$)。

*兒茶樹*樣本#4909在TNFα/3T3-L1脂肪細胞中，證實有雙重抗發炎作用。兒茶樹萃取物之成份增加脂聯素分泌同時增加IL-6分泌。相對於TNFα對照組，兒茶樹整體之效用係具強力的抗發炎性。這些結果支持兒茶樹於改變脂肪細胞以生理降低胰島素阻抗、體重增加、肥胖、心血管疾病及癌症之用途。

實例 19

在胰島素阻抗3T3-L1脂肪細胞中水溶性相思樹萃取物之可溶於二甲基亞碸餾分物對脂聯素、IL-6及抵抗素(resistin)分泌之效用

模型-這些實驗係使用如實例11所述之3T3-L1鼠科纖維母細胞模型。所用的標準化合物係如實例11及12中所記載。I1-6係如實例18所述進行分析。

抵抗素分析-分泌至培養基之抵抗素之量係使用未作修改之小鼠脂聯素Quantikine®小鼠抵抗素免疫分析套組(R&D Systems, Minneapolis, MN)來定量。製造商所提供的資料指出，在小鼠細胞培養基中，以1:2稀釋，抵抗素阻礙之恢復平均為99%，及最低可偵測的抵抗素濃度範圍從1.3至1.8 pg/ml。分析前，所有上清培養基樣本皆以製造商提供之稀釋培養基稀釋成1:20。

統計計算及解釋-所有的分析係以雙重複進行。供統計分析用，相思樹對脂聯素或IL-6分泌之效用係以相對於溶劑對照組所計算。劑量間的差異性係使用學生t-試驗來測定並無對多重比較進行校正；選擇名義五個百分比之型I誤差機率(單尾)。

結果—在高濃度胰島素的存在下，曲格列酮及相思樹樣本#4909以劑量相關的方式增加脂聯素分泌(表18)。兒茶樹在僅6.25 μg/ml濃度時，經由降低IL-6展現抗發炎效用，而曲格列酮在5.00及1.25 μg/ml時具前發炎性，在其他二種濃度時並無觀察到效用。對曲格列酮，抵抗素分泌係以劑量依

賴之方式增加，然而，兒茶樹降低抵抗素表現同樣係以劑量依賴之方式。

如實例18所見，在高胰島素血症/3T3-L1脂肪細胞模型中，兒茶樹樣本#4909再次驗證雙重抗發炎作用。兒茶樹萃取物之成份增加脂聯素分泌同時降低IL-6分泌。因此，相對於高胰島素對照組，兒茶樹之整體效用係具抗發炎性。再高胰島素濃度下兒茶樹對抵抗素分泌之效用係與曲格列酮相反：曲格列酮增加抵抗素表現，而兒茶樹則進一步降低抵抗素表現。這些數據顯示複雜的兒茶樹萃取物並非經由PPARγ受體來作用。這些結果提供了兒茶樹於修改脂肪細胞生理降低胰島素阻抗、體重增加、肥胖、心血管疾病及癌症之用途之另外的支持。

表18

在胰島素阻抗3T3-L1模型中兒茶樹萃取物對脂聯素、IL-6及抵抗素分泌之效用

試驗物質	濃度 [μg/ml]	脂聯素指數†	IL-6指數††	抵抗素指數 †††
胰島素對照組	-	1.00±0.30*	1.00±0.23	1.00±0.13
曲格列酮	5.00	1.47	1.31	1.43
	2.50	2.44	1.06	1.22
	1.25	1.87	1.46	1.28
	0.625	2.07	1.00	0.89

兒茶樹樣本 #4909	50.0	1.76	1.23	0.50
	25.0	1.70	0.96	0.61
	12.5	1.08	0.92	0.86
	6.25	1.05	0.64	0.93

將兒茶樹試驗物質或吲哚美辛以與 166 nM 胰島素同樣加到 D5 3T3-L1 脂肪細胞中。在隔天，自上清培養基取樣進行脂聯素、IL-6 及抵抗素測定。所有的值係以僅有胰島素對照組為指數。

†脂聯素指數=[脂聯素]試驗/[脂聯素]胰島素對照

††IL-6 指數=[IL-6 試驗]/[IL-6 胰島素對照]

†††抵抗素指數=[抵抗素試驗]/[抵抗素胰島素對照]

*指數值係代表平均值±95%信賴區間，係由變異數分析之餘差平均平方來計算。值大於或低於胰島素對照組±95%CI 為具 $p<0.05$ 之顯著性差異。

實例 20

以蛇麻草衍生之植物性化合物(phytochemical)增加脂肪細胞之脂質生成

模型-這些實驗係使用如實例 11 所述之 3T3-L1 鼠科纖維母細胞模型。所用的標準化合物及統計程序係如實例 11 中所記載。

試驗物質-此試驗中所用之蛇麻草植物性化合物係如表 19 中所述且係得自 Betatech Hops Products 公司 (Washington, D.C., U.S.A.)。

表 19

蛇麻草試驗物質之說明

蛇麻草試驗物質	說明
阿伐酸溶液	以體積計82%異阿伐酸/2.7%貝他酸/2.95%異阿伐酸。阿伐酸包括異葎草酮、異近葎草酮及異類葎草酮
Rho 異阿伐酸(RIAA)	Rho-異葎草酮、rho-異近葎草酮及rho-異類葎草酮
異阿伐酸(IAA)	以體積計25.3%異阿伐酸。包括順式及反式異葎草酮、順式及反式異近葎草酮及順式及反式異類葎草酮
四氫異阿伐酸(THIAA)	複合蛇麻草 - 以體積計8.9% THIAA。包括順式及反式四氫-異葎草酮、順式及反式四氫-異近葎草酮及順式及反式四氫-異類葎草酮
六氫異阿伐酸(HHIAA)	以體積計3.9% THIAA；4.4% HHIAA。HHIAA 異構物包括包括六氫-異葎草酮、六氫-異近葎草酮及六氫-異類葎草酮。
貝他酸溶液	以體積計10%貝他酸；<2%阿伐酸。貝他酸包括蛇麻酮(lupulone)、輔蛇麻酮(colupulone、聚蛇麻酮(adlupulone)及前蛇麻酮(prelupulone)。
黃腐酚(XN)	以重量計>80%黃腐酚。包括黃腐酚、黃腐酚A、黃腐酚B、黃腐酚C、黃腐酚D、黃腐酚E、黃腐酚F、黃腐酚G、黃腐酚H、去甲基黃腐酚、黃

	黃自乳鯨脂醇(xanthogalenol)、4'-O-甲基黃腐酚、3'-香葉基查爾酮柚皮素、3',5'二異戊烯基查爾酮柚皮素、5'-異戊烯黃腐酚、flavokawin、ab-二氫黃腐酚及異-二氫環黃腐酚水合物
酒花粕	黃腐酚、黃腐酚A、黃腐酚B、黃腐酚C、黃腐酚D、黃腐酚E、黃腐酚F、黃腐酚G、反式-羥基黃腐酚、1",2"-二氫黃腐酚C、去甲基黃腐酚B、去甲基黃腐酚J、黃腐酚I、去甲基黃腐酚、異黃腐酚、ab—二氫黃腐酚、二異戊烯基黃腐酚、5"-羥基黃腐酚、5'-異戊烯基黃腐酚、6,8-二異戊烯基柚皮素、8-異戊烯基柚皮素、6-異戊烯基柚皮素、異黃腐酚、葎草靈酮(humulinone)、副律草靈酮(cohumulinone)、4-羥基苯甲醛及谷甾醇-3-O-b-吡喃葡萄糖苷
六氫輔蛇麻酮	以體積計1%六氫輔蛇麻酮之KOH溶液

細胞培養及處理-將蛇麻草化合物溶解於二甲基亞碸(DMSO)並加入以便在分化的第0天達到10、5、4或2 μg/ml之濃度並維持至整個成熟期(第6或7天)。酒花粕係以50 μg/ml進行試驗。無論新鮮的培養基是在何時增加，同時亦加入新鮮的試驗物質。DMSO係因其極性及其可與水性細胞培養基混合之事實所選擇。作為陽性對照組，分別加入吲哚美辛

及曲格列酮，以達到5.0及4.4μg/ml之最終濃度。以0.36%由紅O或0.001% BODIPY將分化的、D6/D7 3T3-L1細胞染色。

結果 - 陽性對照組吲哚美辛及曲格列酮在3T3-L1細胞中誘發脂質生成之程度相類似(圖18)。令人意外地，四類的蛇麻草在3T3-L1脂肪細胞產生促脂肪生成反應大於陽性對照組吲哚美辛及曲格列酮任一項。這四類包括異阿伐酸、Rho-異阿伐酸、四氫異阿伐酸及六氫異阿伐酸。由已發表的報告來看，此發現令人驚訝，個別的異葎草酮與PPARγ之結合大約為PPARγ促進劑吡格列酮之三分之一至四分之一[Yajima, H., Ikeshima, E., Shiraki, M., Kanaya, T., Fujiwara, D., Odai, H., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Oikawa, S., and Kondo, K. Isohumulones, bitter acids derived from hops, activate both peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma and reduce insulin resistance. J Biol Chem, 279: 33456-33462, (2004)]。

黃腐酚、阿伐酸及貝他酸之脂肪生成反應可與吲哚美辛及曲格列酮相匹敵，而酒花粕及六氫輔蛇麻酮無法引起大於溶劑對照組之脂質生成反應。

依照其在3T3-L1細胞中之脂質生成潛力，在此研究中陽性的蛇麻草植物性化合物種類包括異構化阿伐酸、阿伐酸及貝他酸以及黃腐酚可預期於具有胰島素不敏感現象或徵狀之人類或其他哺乳動物中增加胰島素敏感性並降低血清三酸甘油酯。

實例 21

在胰島素阻抗的 3T3-L1 脂肪細胞中蛇麻草植物性化合物增加脂聯素分泌

模型-這實例中係使用如實例11所述之3T3-L1鼠科纖維母細胞模型。標準化合物，蛇麻草化合物RIAA、IAA、THIAA、HHIAA、黃腐酚、六氫輔蛇麻酮、酒花粕係分別如實例12及20中所述。

細胞培養及處理－細胞係如實例12中所述培養並如前述以蛇麻草植物性化合物處理。脂聯素分析及統計闡釋係如實例12中所述。試驗化合物之效力係使用修改的Hofstee之方法，測定表觀米氏常數及最大速度來估算。以{相對脂聯素分泌/[濃度]}取代獨立變數v/[S]及以{相對脂聯素分泌}取代獨立變數{v}，產生y=mx+b形式之關係。相對於溶劑對照組之最大脂聯素分泌係由y軸截距來估算，而半數最大脂聯素分泌所需之試驗化合物之濃度係由斜率的負數值來計算。

結果-在胰島素阻抗3T3-L1細胞中，陽性對照組曲格列酮，相對於溶劑對照組，在2.5μg/ml時係以最大刺激增進脂聯素分泌2.44-倍(圖19)。相對於溶劑對照組，所有試驗的蛇麻草植物性化合物驗證促進脂聯素分泌，而異阿伐酸產生比曲格列酮(相對於對照組為2.97-倍)更顯著的脂聯素。在四種所試驗的劑量中，最大的脂聯素分泌係在5 μg/ml(最高劑量)之異阿伐酸、Rho異阿伐酸、六氫異阿伐酸及四氫異阿伐酸中觀察到。就黃腐酚、酒花粕及六氫輔蛇麻

酮分別係在 1.25、25及12.5 μg/ml時觀察到最大脂聯素分泌增加。觀察到的最大相對脂聯素表現，黃腐酚、Rho異阿伐酸及酒花粕可與曲格列酮相匹敵，而六氫異阿伐酸、六氫輔蛇麻酮及四氫異阿伐酸則低於曲格列酮但高於對照組。

表 20

以 y 軸截距及 Hofstee 圖斜率分別估算之最大脂聯素分泌及半數最大脂聯素分泌所需之試驗化合物濃度

試驗化合物	最大脂聯素分泌[1] [相對於對照組之倍數]	半數最大分泌時之試驗物質[μg/mL]
異阿伐酸	3.17	0.49
黃腐酚	2.47	0.037
Rho異阿伐酸	2.38	0.10
曲格列酮[2]	2.29	0.085
酒花粕	2.21	2.8
六氫異阿伐酸[2]	1.89	0.092
六氫輔蛇麻酮[2]	1.83	3.2
四氫異阿伐酸	1.60	0.11

[1]使用所試驗四種所有的濃度由 Hofstee 圖之直線回歸來估算

[2]去除一種極端值使用三種濃度用於劑量-反應估算

如表 20 中所見，衍生自 Hofstee 圖(圖 20)之最大脂聯素分泌之估算支持上列所記載之觀察。Y 截距估算最大脂聯素分泌粗略分成三組：(1)異阿伐酸、(2)黃腐酚、Rho 異阿伐酸、曲格列酮及酒花粕及(3)六氫異阿伐酸、六氫輔蛇麻酮及四氫異阿伐酸。在胰島素阻抗 3T3-L1 細胞中，刺激半

數最大脂聯素分泌所需之試驗化合物之濃度大約 0.1μg/ml，與曲格列酮以體積計、Rho 異阿伐酸、四氫異阿伐酸及六氫異阿伐酸相似。在半數最大脂聯素分泌 0.49 μg/ml 時異阿伐酸濃度近乎為 5-倍多。黃腐酚在半數最大脂聯素分泌時具有之最低劑量預估在 0.037 μg/ml。估算半數最大脂聯素分泌變數之最高濃度係在酒花粕及六氫輔蛇麻酮中見到，分別為 2.8 及 3.2 μg/ml。

依照其在3T3-L1細胞中之促進脂聯素分泌之能力，在此研究中可見到的陽性的蛇麻草植物性化合物種類異阿伐酸、Rho異阿伐酸、四氫異阿伐酸、六氫異阿伐酸、黃腐酚、酒花粕及六氫輔蛇麻酮，可預期在血漿脂聯素濃度受到抑制之所有臨床病理上，具有正面效用。

實例 22

在胰島素阻抗3T3-L1脂肪細胞中，經由促進脂聯素分泌及抑制介白素-6分泌，蛇麻草植物性化合物展現抗發炎活性

模型-這些實驗係使用如實例11所述之3T3-L1鼠科纖維母細胞模型。脂聯素及IL-6分析係分別如實例12及18中所述。標準化合物，蛇麻草化合物RIAA、IAA、THIAA、HHIAA、黃腐酚、六氫輔蛇麻酮、酒花粕係如實例12及20中所述。

統計計算及解釋－所有的分析係以雙重複進行。就統計分析，蛇麻草衍生物對脂聯素或IL-6分泌之效用係以相對於溶劑對照組所計算。劑量間的差異性係使用學生t-試驗來測定並無對多重比較進行校正；選擇名義五個百分比之型I誤差機率。

結果—在高濃度胰島素的存在下，曲格列酮及所有試驗的蛇麻草衍生物皆增加脂聯素分泌(表21)。曲格列酮在此模型中並無降低IL-6分泌。事實上，曲格列酮及HHCL在二種濃度時IL-6分泌增加，而THIAA及酒花粕在最高濃度時增加IL-6，但在其他濃度時無效用。在最高試驗濃度時，RIAA、HIAA及XN增加IL-6分泌，僅IAA無增加IL-6分泌。RIAA、IAA、THIAA及XN顯著降低IL-6分泌。

表 21

在胰島素阻抗 3T3-L1 脂肪細胞中，蛇麻草化合物對脂聯素及介白素-6 分泌之效用

試驗物質	濃度 [μg/ml]	脂聯素指數†	IL-6指數††	脂聯素/IL-6指數
胰島素對照組±95%CI	-	1.00±0.30*	1.00±0.23	1.00±0.30
曲格列酮	5.00	1.47#	1.31#	1.12
	2.50	2.44#	1.06	2.30#
	1.25	1.87#	1.46#	1.28
	0.625	2.07#	1.00	2.07#
Rho異阿伐酸	5.0	2.42#	1.28#	1.89#
(RIAA)	2.5	2.27#	0.83	2.73#
	1.25	2.07#	0.67#	3.09#
	0.625	2.09#	0.49#	4.27#

異阿伐酸	5.0	2.97#	0.78	3.81#
(IAA)	2.5	2.49#	0.63#	3.95#
	1.25	2.44#	0.60#	4.07#
	0.625	1.73#	0.46#	3.76#
四氫異阿伐酸	5.0	1.64#	1.58#	1.04
(THIAA)	2.5	1.42#	0.89	1.60#
	1.25	1.55#	0.94	1.65#
	0.625	1.35#	0.80	1.69#
六氫異阿伐酸	5.0	1.94#	1.49#	1.30#
(HHIAA)	2.5	1.53#	0.74#	2.07#
	1.25	1.64#	0.67#	2.45#
	0.625	1.69#	0.73#	2.32#
黃腐酚	5.0	2.41#	1.23#	1.96#
(XN)	2.5	2.11#	0.96	2.20#
	1.25	2.50#	0.92	2.72#
	0.625	2.29#	0.64#	3.58#
六氫輔蛇麻酮	50.0	1.65#	2.77#	0.60#
(HHCL)	25.0	1.62#	1.19	1.36#
	12.5	1.71#	0.94	1.82#

	6.25	1.05	1.00	1.05
酒花粕	50.0	1.92#	1.58#	1.22#
	25.0	2.17#	0.86	2.52#
	12.5	1.84#	1.03	1.79#
	6.25	1.46#	1.03	1.42#

將兒茶樹試驗物質或吲哚美辛與 166 nM 胰島素同樣加到 D5 3T3-L1 脂肪細胞中。在隔天，自上清培養基取樣進行脂聯素、IL-6 及抵抗素測定。所有的值係以僅有胰島素之對照組為指數。

†脂聯素指數=[脂聯素]$_{試驗}$/[脂聯素]$_{胰島素對照}$

††IL-6 指數=[IL-6 $_{試驗}$]/[IL-6 $_{胰島素對照}$]

*指數值為平均值±95%信賴區間，係由變異數分析之餘差平均平方來計算。就脂聯素或脂聯素/IL-6，值<0.7 或>1.3 為顯著與胰島素對照組不同，就 IL-6，值<0.77 或>1.23 為顯著與胰島素對照組不同。

#為顯著與胰島素對照組不同 $p<0.05$

脂聯素/IL-6比例，整體抗發炎效力之度量，RIAA、IAA、HHIA及XN為強烈陽性(>2.00)。THIAA、HHCL及酒花粕為陽性，儘管脂聯素/IL-6比例較低。對曲格列酮，脂聯素/IL-6比例為混合性的，在2.5及0.625μg/ml時具強烈性反應而在5.0或1.25μg/ml時無效用。

數據指出，在脂肪細胞中蛇麻草衍生物RIAA、IAA、HHIA、XN、HHCL及酒花粕對高胰島素血症之前發炎效用可

為遞減的。一般而言，蛇麻草衍生物對未併發TNFα高胰島素血症之高胰島素血症症狀之抗發炎效用比曲格列酮更具一致性。

實例 23

在經 TNFα處理之 3T3-L1 脂肪細胞中，蛇麻草植物性化合物增加脂聯素分泌

模型-這些實驗係使用如實例11所述之3T3-L1鼠科纖維母細胞模型。標準化合物及蛇麻草化合物IAA、RIAA、HHIAA及THIAA係分別如實例13及20中所述。蛇麻草衍生物係於0.625、1.25、2.5及5.0μg/ml之濃度進行試驗。脂聯素係如實例12所述來分析。

結果-以 10 ng TNFα/ml 過夜處理第 5 天(D5)的 3T3-L1 脂肪細胞，明顯的抑制脂聯素分泌(圖 21)。所有的蛇麻草衍生物 IAA、RIAA、HHIAA 及 THIAA，相對於 TNFα/溶劑對照組，皆增加脂聯素分泌。觀察線性劑量-反應曲線，RIAA 及 HHIAA 在最高試驗濃度 5.0 μg/ml 產生最大抑制。 IAA 在 1.25 μg/ml 時引發最大脂聯素分泌，而 THIAA 在 5.0 μg/ml 時具有最大脂聯素分泌之曲線反應。

在超生理濃度之TNFα存在下，蛇麻草衍生物IAA、RIAA、HHIAA及THIAA增加脂肪細胞脂聯素分泌之能力支持這些化合物於預防或治療涉及次優化脂肪細胞作用之發炎症狀之用途。

實例 24

在3T3-L1脂肪細胞中*兒茶樹*調配物與蛇麻草衍生物之協乘

交互作用改變脂質生成及脂聯素分泌

模型-這些實驗係使用如實例11及13所述之3T3-L1鼠科纖維母細胞模型。

試驗化合物及處理-標準化合物係如實例11及13中所記載。將3T3-L1脂肪細胞中在分化前如實例11處理以計算脂質生成指數或如實例12以TNFα評估脂聯素指數。使用如實例14所述之*兒茶樹*樣本#5669與前述之蛇麻草衍生物Rho-異阿伐酸及異阿伐酸。*兒茶樹*及5:1和10:1的相思樹:RIAA及相思樹:IAA之組合物係以50、10、5.0 及1.0 μg/ml進行試驗。RIAA及IAA獨立地以5.0、2.5、1.25及0.625 μg/ml進行試驗。

計算－如前述估算相思樹/蛇麻草組合物之預期的脂質生成反應及脂聯素分泌並測定協乘作用。

結果－所有試驗的組合物在一或多種試驗濃度時皆具有脂質生成協乘性(表22)。一般而言相思樹:RIAA組合物比相思樹:IAA組合物更具活性，相思樹:RIAA[5:1]在所有的劑量下具協乘性，及相思樹:RIAA[10:1]在10及5.0μg/ml下驗證具協乘性，而在任何試驗濃度皆不具拮抗性。相思樹:IAA[10:1]組合物在二種中等劑量時亦具協乘性且並無顯現拮抗性。雖然相思樹:IAA[5:1]在50μg/ml濃度時具協乘性，但在5.0 μg/ml劑量具拮抗性。

同樣的，所有的組合物在一或多種試驗濃度下對增進脂聯素分泌驗證具協乘性(表 23)。相思樹:IAA[10:1]在所有的劑量皆展現協乘性，而相思樹:RIAA[5:1]及相思樹:RIAA[10:1]在三種劑量具協乘性，在一種濃度時具拮抗

性。相思樹:IAA[5:1]組合物在 10 μg/ml 時具協乘性而在高於 1.0 μg/ml 時具拮抗性。

表 22

在胰島素阻抗之 3T3-L1 模型中由*兒茶樹*及蛇麻草衍生物所引發之實際和預期的脂質生成反應

		脂質生成指數†		
試驗物質	濃度[μg/ml]	實際值	預計值	結果
相思樹/RIAA [5:1][1]	50	1.05	0.98	協乘
	10	0.96	0.89	協乘
	5.0	0.93	0.90	協乘
	1.0	0.92	0.89	協乘
相思樹/IAA [5:1][2]	50	1.06	0.98	協乘
	10	0.93	0.95	無影響
	5.0	0.90	0.98	拮抗
	1.0	0.96	0.98	無效用
相思樹/RIAA [10:1][3]	50	0.99	1.03	無效用
	10	1.00	0.90	協乘
	5.0	1.00	0.90	協乘
	1.0	0.94	0.89	無效用
相思樹/IAA	50	1.37	1.29	協乘

[10:1][4]				
	10	1.16	1.15	無效用
	5.0	1.08	1.09	無效用
無影響	1.0	1.00	0.99	無效用

†脂質生成指數=[OD]試驗/[OD]DMSO對照

1)高於95%信賴界限為1.03具有最小顯著差異=0.03。

2)高於95%信賴界限為1.03具有最小顯著差異=0.03。

3)高於95%信賴界限為1.07具有最小顯著差異=0.07。

4)高於95%信賴界限為1.02具有最小顯著差異=0.02。

表 23

在TNFα/3T3-1模型中由*兒茶樹*及蛇麻草衍生物所引發之實際和預期的脂質聯素分泌

		脂質生成指數†		
試驗物質	**濃度[μg/ml]**	**實際值**	**預計值**	**結果**
相思樹/RIAA [5:1][1]	50	1.27	1.08	協乘
	10	0.99	1.25	拮抗
	5.0	1.02	0.92	協乘
	1.0	1.19	1.07	協乘
相思樹/IAA [5:1][1]	50	1.13	1.16	無效用
	10	0.92	1.13	拮抗
	5.0	1.04	1.09	無效用

	1.0	1.25	1.13	協乘
相思樹/RIAA [10:1]^2	50	1.29	1.11	協乘
	10	1.07	0.95	協乘
	5.0	0.94	1.06	拮抗
	1.0	1.03	0.94	協乘
相思樹/IAA [10:1]^2	50	1.28	0.82	協乘
	10	1.12	1.07	協乘
	5.0	1.11	0.99	協乘
	1.0	1.30	1.05	協乘

†脂聯素指數=[脂聯素]$_{試驗}$/[脂聯素]$_{TNF\alpha}$

1)高於95%信賴界限為1.07具有最小顯著差異=0.07。

2)高於 95%信賴界限為 1.03 具有最小顯著差異=0.03。

*兒茶樹*及蛇麻草衍生物 Rho 異阿伐酸或異阿伐酸之組合物對增加脂肪細胞之脂質併入及增加脂肪細胞之脂聯素分泌具有協乘組合及僅有些許拮抗組合。

實例 25

在脂多糖/3T3-L1 脂肪細胞模型中蛇麻草衍生物之抗發炎活性

模型-這些實驗係使用如實例 11 及 13 所述之 3T3-L1 鼠科纖維母細胞模型。

試驗化合物及處理-標準化合物，係如實例11及13中所

記載，然而在D5使用100 ng/ml之細菌脂多糖(LPS, Sigma, St. Louis, MO)取代TNFα。所用的蛇麻草衍生物Rho-異阿伐酸及異阿伐酸係如實例20所述。非類固醇抗發炎藥(NSAID)阿斯匹靈，水楊酸及布洛芬(ibuprofen)係得自Sigma。使用西樂保之市售的膠囊調配物(Celebrex™, G.D. Searle & Co. Chicago, IL)並依照活性成份之含量給予細胞劑量。蛇麻草衍生物、布洛芬及西樂保係以5.00、2.50、1.25及0.625 μg/ml投藥。吲哚美辛、曲格列酮及吡格列酮係以10、5.0、1.0及0.50 μg/ml進行試驗。阿斯匹靈之濃度為100、50.0、25.0及12.5 μg/ml，而水楊酸之濃度為200、100、50.0及25.0 μg/ml。如前面實例18之IL-6及實例13之脂聯素中所述，進行IL-6及脂聯素評估和分析數據並列成表。

結果 - 於D5的脂肪細胞中以LPS提供一IL-6之12-倍刺激。所有的試驗藥劑皆以不同程度降低了經LPS-刺激之脂肪細胞之IL-6分泌。在所觀察到的最大抑制中之最大IL-6抑制及濃度係如表24中所述。因為處理變異相當大，最大IL-6抑制之程度在這些試驗物質中並無差異。然而最大抑制發生時之劑量相當不同。對IL-6抑制之效力排序為布洛芬>RIAA=IAA>西樂保>吡格列酮=吲哚美辛>曲格列酮>阿斯匹靈>水楊酸。以定性為基準，吲哚美辛、曲格列酮、吡格列酮、布洛芬及西樂保在所有的試驗濃度皆抑制IL-6分泌，而RIAA、IAA及阿斯匹靈在最低濃度時並無顯著地抑制IL-6(數據並無顯現)。

相對於DMSO對照組，LPS處理之D5 3T3-L1脂肪細胞降低

脂聯素分泌(表25)。與IL-6抑制不同(其中所有的試驗化合物抑制某程度之分泌)，阿斯匹靈、水楊酸及西樂保在任何試驗濃度皆無法引起經LPS-處理之3T3-L1脂肪細胞其脂聯素分泌。曲格列酮、RIAA、IAA及布洛芬在0.625 μg/ml時所觀察到之最大脂聯素刺激分別為15、17、20及22%。效力順序其次為吡格列酮在1.25 μg/ml時具有12%之脂聯素刺激。吲哚美辛在2.50 μg/ml時具有9%之脂聯素分泌刺激，為活性試驗物質中效力最小者。

在 LPS/3T3-L1 模型中，蛇麻草衍生物 RIAA 和 IAA 以及布洛芬在與活體中所得到相類似之濃度下降低 IL-6 分泌及增加脂聯素分泌。噻唑啶二酮之曲格列酮及吡格列酮為較低效力之 IL-6 抑制劑，比蛇麻草衍生物需要較高劑量，但對脂聯素刺激與蛇麻草衍生物類似。在巨噬細胞模型及脂肪細胞模型中觀察到 NSAID 吲哚美辛、阿斯匹靈、布洛芬及西樂保之抗發炎活性間無一致關係。

表 24

在 LPS/3T3-L1 脂肪細胞中蛇麻草衍生物及選擇的 NSAID 之最大 IL-6 分泌抑制

試驗物質	濃度[μg/ml]	IL-6指數†	抑制%
DMSO對照組	-	0.09*	91 *
LPS對照組±95% CI	-	1.00 ±0.30	0
吲哚美辛	5.00	0.47*	53*

曲格列酮	10.0	0.31*	69*
吡格列酮	5.00	0.37*	63*
Rho-異阿伐酸	1.25	0.63*	37*
異阿伐酸	1.25	0.61*	39*
阿斯匹靈	25.0	0.61*	39*
水楊酸	50.0	0.52*	48*
布洛芬	0.625	0.46*	54*
西樂保	2.50	0.39*	61*

將試驗化合物以 100 ng LPS/ml 加到 D5 3T3-L1 脂肪細胞中。在隔天，自上清培養基取樣測定 IL-6。所有的值皆以下列所記載之 LPS 對照組為指標。所顯示的濃度代表提供最大 IL-6 分泌抑制之劑量且該等低於 0.70 之值顯著低於 LPS 對照組($p<0.05$)。

†IL-6 指數=[IL-6 試驗-IL-6 對照]/[IL-6LPS - IL-6 對照]

*與 LPS 對照組顯著不同($p<0.05$)。

表 25

在 LPS/3T3-L1 脂肪細胞中蛇麻草衍生物及選擇的 NSAID 之最大脂聯素分泌刺激

試驗物質	**濃度[μg/ml]**	**脂聯素指數†**	**刺激%**
DMSO對照組	-	1.24	
LPS對照組±95% CI	-	1.00	
吲哚美辛	2.50	1.09*	9
曲格列酮	0.625	1.15*	15

吡格列酮	1.25	1.12*	12
Rho-異阿伐酸	0.625	1.17*	17
異阿伐酸	0.625	1.20*	20
阿斯匹靈	113	1.02	NS
水楊酸	173	0.96	NS
布洛芬	0.625	1.22*	22
西樂保	5.00	1.05	NS

†脂聯素指數=[脂聯素]試驗/[脂聯素]Lps 對照

*大於 1.07 之值與 LPS 對照組顯著不同 $p<0.05$).

NS=與 LPS 對照組無顯著不同

實例 26

在 TNFα/3T3-模型中兒茶樹或蛇麻草衍生物與薑黃素或黃腐酚組合之協乘作用

模型-這些實驗係使用如實例 11 及 13 所述之 3T3-L1 鼠科纖維母細胞模型。

試驗化合物及處理-所用之標準化合物，係如實例 11 及 13 中所記載。如實例 13 中所述以 TNFα 刺激 3T3-L1 脂肪細胞以評估脂聯素指數。這些實驗係使用如實例 14 所述之兒茶樹樣本#5669、如實例 20 所述之蛇麻草衍生物 Rho-異阿伐酸和黃腐酚以及由 Metagenics 公司(Gig Harbor, WA)所提供之薑黃素。兒茶樹及 5:1 的相思樹:薑黃素組合物以及相思樹:黃腐酚組合物係以 50、10、5.0 及 1.0 μg/ml 進行試驗。RIAA 與薑黃素和 XN 之 1:1 組合物係以 10、5、1.0 及 0.50 μg/ml 進行試驗。

計算-如前述估算組合物之預計的脂聯素指數及測定協乘作用。

結果-TNFα降低脂聯素分泌約為溶劑對照組之50%。陽性對照組吡格列酮增加脂聯素分泌80%(表26)。相思樹與薑黃素或XN之組合物證明在較高濃度時具拮抗性而在較低濃度時具協乘性。同樣地，RIAA及薑黃素在三個較高的劑量下具協乘性，但在最低劑量1.0 μg/ml時具高度協乘性。二種蛇麻草衍生物RIAA及XN在經TNFα-刺激之3T3-L1細胞中對脂聯素分泌不具協乘性。

在經TNFα-刺激之3T3-L1脂肪細胞中，相思樹及RIAA二者協乘性地增加脂聯素分泌，而僅相思樹與XN具協乘性。

表26

在TNFα/3T3-模型中兒茶樹及蛇麻草衍生物與薑黃素或黃腐酚組合之協乘作用

		脂聯素指數†		
試驗物質	**濃度[μg/ml]**	**實際**	**預計**	**說明**
DMSO對照組	-	2.07	-	-
TNFα ± 95% CI	-	1.0 ± 0.049	-	-
吡格列酮	1.0	1.80	-	-
相思樹/薑黃素[5:1][1]	50	0.56	0.94	拮抗
	10	1.01	1.07	拮抗
	5.0	1.19	1.02	協乘

	1.0	1.22	1.16	協乘
			-	
相思樹/XN[5:1][1]	50	0.54	0.85	拮抗
	10	0.95	1.06	拮抗
	5.0	0.97	1.01	拮抗
	1.0	1.26	1.15	協乘
RIAA/薑黃素 [1:1][1]	5	0.46	0.79	拮抗
	1	1.03	1.11	拮抗
	5.0	1.12	1.28	拮抗
	1.0	1.30	1.08	協乘
RIAA/XN [1:1][1]	50	0.31	0.63	拮抗
	10	0.81	1.06	拮抗
	5.0	1.09	1.25	拮抗
	1.0	1.09	1.06	無效用

†脂聯素指數=[脂聯素]試驗/[脂聯素]TNFα對照

1)95%信賴界限為0.961至1.049具有最小顯著差異=0.049。

實例27

在胰島素阻抗之3T3-L1脂肪細胞模型中共軛亞麻油酸與蛇麻草衍生物Rho-異阿伐酸組合於活體外之脂質生成協乘作用

模型-這些實驗係使用如實例11及13所述之3T3-L1鼠科纖維母細胞模型。

試驗化合物及處理-所用之標準化合物，係如實例 11 中所記載。在分化前如實例 11 中所述處理 3T3-L1 脂肪細胞以計算脂質生成指數。CLA 粉末係得自 Lipid Nutrition 公司(Channahon, IL)且為 c9t11 及 t10c12 異構物之 1:1 混合物。CLA 及 5:1 之 CLA:RIAA 組合物係以 50、10、5.0 及 1.0 μg/ml 進行試驗。RIAA 係以 10、1.0 及 0.1μg/ml 進行試驗供計算如前述之預期的脂質生成指數。

結果－RIAA 與 CLA 組合協乘性地增加三酸甘油酯量。所有的劑量皆有協乘性(表 27)。

CLA 及 RIAA 間之協乘作用在廣泛的劑量範圍中皆有觀察到且潛在上能用於增加 CLA 之胰島素敏化效力。

表 27

在胰島素阻抗之 3T3-L1 脂肪細胞模型中共軛亞麻油酸與蛇麻草衍生物 Rho-異阿伐酸之脂質生成之協乘作用

脂質生成指數†				
試驗物質	**濃度 [μg/ml]**	**實際**	**預計**	**說明**
CLA:RIAA[5:1]	50	1.26	1.15	協乘
	10	1.16	1.06	協乘
	5.0	1.16	1.10	協乘
	1.0	1.17	1.06	協乘

†脂質生成指數=$[OD]_{試驗}/[OD]_{DMSO\ 對照}$

1)高於 95%信賴界限為 1.05 具有最小顯著差異=0.05。

實例 28

在經 TNFα 處理之 3T3-L1 脂肪細胞中蛇麻草植物性化合物抑制 NF-κB 活化

模型-這些實驗係使用如實例 11 所述之 3T3-L1 鼠科纖維母細胞模型。

細胞培養及處理-分化後將 3T3-L1 脂肪細胞保持在分化後培養基 40 天。標準化合物、培養基及蛇麻草化合物 RIAA 及黃腐酚如實例 13 及 20 所述。蛇麻草衍生物及陽性對照組吡格列酮係以 2.5 及 5.0 μg/ml 之濃度進行試驗。試驗化合物係在 1 小時前加入而核萃取物係在以 TNFα 處理後三及 24 小時所製備。

ELISA-分化後，將 3T3-L1 脂肪細胞保持在生長培養基中 40 天。使用 Active Motif 公司 (Carlsbad, CA)之 TransAM™ NF-kB 套組測定核 NF-kBp65，並無修改。套組中所提供之 Jurkat 合萃取物係衍生自於添加 50 ng/ml TPA(佛波醇(phorbol), 12-苣蔂酸, 13 乙酯)及 0.5 μM 鈣離子載體 A23187 之培養基中在 37°C 培養二小時後立即收取之細胞。

蛋白質分析—使用活化模體螢光蛋白定量套組(Active Motif Fluorescent Protein Quantification Kit)進行核蛋白定量。

統計分析—使用單尾學生 t-試驗進行比對。型 I 誤差之機率係定在微不足道五個百分比量。

結果—經 TPA-處理之 Jurkat 核萃取物展現預期的

NF-kBp65 增加，顯示套組試劑之性能足夠(圖 22)。以 10 ng TNFα/ml 分別處理三(圖 22A)或 24 小時(圖 22B)之 D40 3T3-L1 脂肪細胞增加核 NF-kBp65 2.1-及 2.2-倍。如預期的，在 TNFα 處理後，PPARγ 促進劑吡格列酮在三或 24 小時並無出現一定量之核 NF-kBp65。NF-kBp65 之核轉位受到抑制，於 5.0 及 2.5μg RIAA/ml 在 TNFα 後三小時分別為 9.4 及 25%。在 24 小時，僅 5.0 RIAA/ml 處理展現顯著的 ($p<0.05$) NF-kBp65 核轉位抑制作用。黃腐酚抑制 NF-kBp65 之核轉位，於 5.0 及 2.5 μg/ml 時在 TNFα 處理後三小時分別為 15.6 及 6.9%，而在 24 小時後為 13.4 及 8.0%。

在經TNFα處理之成熟的胰島素阻抗脂肪細胞中，RIAA及黃腐酚對NF-kBp65之核轉位，儘管小，驗證了一致性之抑制。此結果與PPARγ促進劑中所述不同，其在3T3-L1脂肪細胞中並無顯現抑制NF-kBp65之核轉位。

實例 29

在胰島素阻抗之3T3-L1脂肪細胞中*兒茶樹萃取物*及美弗明(metformin)協乘地增加三酸甘油酯摻入

模型-這些實驗係使用如實例 11 所述之 3T3-L1 鼠科纖維母細胞模型。所使用之所有化合物及程序係如實例 11 所述。

試驗化合物及處理-美弗明係得自Sigma (St. Louis, MO)。在分化的第0天及整個成熟期(第6/7天)每二天將試驗化合物加到二甲基亞碸中。加入曲格列酮使最終濃度達到 4.4 μg/ml，作為陽性對照組。美弗明、兒茶樹樣本#5669

及1:1(重量/重量)之美弗明/相思樹組合物係以50 μg試驗物質/ml進行試驗。以0.2%的油紅O將分化的3T3-L1細胞染色。將生成的染色油滴溶於異丙醇並以分光光度分析於530 nm定量。結果係以溶劑對照組中完全分化細胞之相對的三酸甘油酯含量來表示。

計算-使用下列關係式估算美弗明/兒茶樹萃取物之預期的脂肪生成效用：1/LI=X/LIx+Y/LIy，其中LI=脂質生成指數，X及Y為試驗混合物中各組份之相對，且X+Y=1。若估算的LI之平均落在估算的對應觀察部分之95%信賴區間外，則推論具協乘性。此協乘作用之定義，涉及與其各組份組合之效用比較，係由Berenbaum [Berenbaum, M. C. What is synergy? Pharmacol Rev 41(2), 93-141, (1989)]所述。

結果－兒茶樹萃取物具高度脂質生成性，增加3T3-L1細胞之三酸甘油酯含量32百分比(圖23)產生1.32之脂質生成指數。具有0.79之脂質升成指數，單獨的美弗明不具脂質生成性。美弗明/兒茶樹萃取物組合具有1.35之觀察的脂質生成指數。具有預期的98之脂質生成指數，美弗明/兒茶樹萃取物證實具協乘作用，如觀察到的脂質生成指數係落在預期值之二個百分比95%以上信賴界限之外。

依照3T3-L1細胞中驗證的脂質生成潛力，1:1的美弗明及兒茶樹萃取物之組合物在臨床用途上可預期具協乘性表現。此等組合可用於增加美弗明治療之正面利益範圍，例如增加血漿三酸甘油酯或延長美弗明效用時期。

實例 30

在胰島素阻抗之3T3-L1脂肪細胞模型中蛇麻草衍生物及噻唑啶二酮於活體外之脂質生成協乘作用

模型-這些實驗係使用如實例11及13所述之3T3-L1鼠科纖維母細胞模型。

試驗化合物及處理-所用之標準化合物，係如實例11中所記載。在分化前如實例11中所述處理3T3-L1脂肪細胞以計算脂質生成指數。曲格列酮係得自Cayman Chemicals公司(Chicago, IL)。吡格列酮為市售之錠劑調配物(ACTOSE®, Takeda Pharmaceuticals, Lincolnshire, IL)。將錠劑磨碎並將全部粉末用於此分析。所有的結果係以活性成份含量為基準來計算。所用的蛇麻草衍生物Rho-異阿伐酸及異阿伐酸係如實例20所述。曲格列酮與RIAA和IAA之組合係以4.0 μg/ml進行試驗，而更強力的吡格列酮係以與RIAA和IAA之1:1組合物及2.5 μg/ml來進行試驗。所有的物質亦獨立地以4.0及2.5 μg/ml進行試驗，如實例34所述，用於計算預期的脂質生成指數。

結果—當曲格列酮或吡格列酮分別以 4.0 及 2.5 μg/ml 進行試驗時，在胰島素阻抗之 3T3-L1 脂肪細胞模型中，Rho-異阿伐酸及異阿伐酸二者與噻唑啶二酮協乘性地增加三酸甘油酯合成(表 28)。

蛇麻草衍生物 Rho-異阿伐酸及異阿伐酸能協乘性地增加噻唑啶二酮之胰島素敏化效用，產生降低劑量之潛在的臨床利益或增加反應良好病患之數目。

表 28

在胰島素阻抗之 3T3-L1 脂肪細胞模型中蛇麻草衍生物及噻唑啶二酮於活體外之協乘作用

		脂質生成指數†		
試驗化合物	濃度 [μg/ml]	實際	預計	說明
曲格列酮/RIAA[1:1][1]	4.0	1.23	1.06	協乘
曲格列酮/IAA[1:1][1]	4.0	1.14	1.02	協乘
吡格列酮/RIAA[1:1][2]	2.5	1.19	1.00	協乘
吡格列酮/IAA[1:1][2]	2.5	1.16	0.95	協乘

†脂質生成指數=$[OD]_{試驗}/[OD]_{DMSO\ 對照}$

1)高於95%信賴界限為1.02具有最小顯著差異=0.02。

2)高於95%信賴界限為1.05具有最小顯著差異=0.05。

實例 31

在 TNFα/3T3-L1 脂肪細胞模型中 Rho-異阿伐酸及美弗明於活體外之協乘作用

模型-這些實驗係使用如實例 11 所述之 3T3-L1 鼠科纖維母細胞模型。所用之標準化合物及以 10 ng TNFα/ml 處理之脂肪細胞分別如實例 11 及 13 中記載。

試驗化合物及細胞處理-美弗明係得自 Sigma(St. Louis, MO)而 Rho-異阿伐酸係如實例 20 所述。將無或有 1 μg RIAA/ml 之美弗明以 50、10、5.0 或 1.0 μg/ml 與 10 ng TNFα/ml 同樣加到 D5 3T3-L1 脂肪細胞中。如實例 11 所詳述，在第 6 天就培養物上清培養基進行 IL-6 分析。如前述估算美弗明:RIAA 混合物對 IL-6 抑制之預期效用。

結果 - 在 D5 脂肪細胞中 TNFα 提供六-倍之 IL-6 分泌增加。曲格列酮在 1 μg/ml 時，相對於對照組，抑制 IL-6 分泌 34%，而 1 μg RIAA，相對於對照組，抑制 IL-6 分泌 24%（表 29）。美弗明與 1 μg RIAA/ml 之組合在 50 μg/ml 濃度時具有協乘作用，而在 1μg/ml 濃度時具影強烈的協乘作用。在混合物中，50μg 美弗明/ml、1 μg RIAA 提供額外的 10%抑制作用；而 1μg 美弗明、1μg RIAA 增加 IL-6 抑制作用 35%。美弗明:RIAA 組合物在二個中等劑量時，可見到分別為拮抗及無效用。

美弗明及 Rho-異阿伐酸之組合在高及低濃度時協乘性作用，降低了經 TNFα 處理之 3T3-L1 脂肪細胞 IL-6 之分泌。

表 29

在 TNFα /3T3-L1 脂肪細胞中蛇麻草 Rho-異阿伐酸及美弗明協乘抑制 IL-6 分泌

試驗物質	濃度 [μg/ml]	IL-6指數†	抑制%	說明
DMSO對照組	-	0.16	-	-
TNFα 對照組+ 95% CI	-	1.00 ± 0.07*	0	-
曲格列酮	1.0	0.66	34	-
RIAA	1.0	0.76	24	-
美弗明	50	0.78	22	-
美弗明/1μg RIAA	50	0.68	32	協乘
美弗明	10	0.78	22	-

美弗明/1μg RIAA	10	0.86	14	拮抗
美弗明	5.0	0.96	4	-
美弗明/1μg RIAA	5.0	0.91	9	無效果
美弗明	1.0	0.91	9	-
美弗明/1μg RIAA	1.0	0.56	44	協乘

試驗化合物係以所述的濃度與 10 ng TNFα/ml 同樣加到 D5 3T3-L1 脂肪細胞中。隔天，自上清培養基取樣進行 IL-6 測定。所有的值係以 TNFα 對照組為指數。

†IL-6 指數=[IL-6 試驗-IL-6 對照]/[IL-6TNFα - IL-6 對照]

*值低於 0.93 為顯著地($p<0.05$)低於 TNFα 對照組。

實例 32

在活體外試驗化合物對癌細胞增生之效用

此實驗係驗證本發明之許多試驗化合物在活體外對癌細胞增生之直接的抑制效用。

方法-本發明之試驗化合物對癌細胞增生之抑制效用係於 RL 95-2 內皮癌細胞模型(AKT 激酶之過度表現因子)和於 HT-29(固定表現 COX-2)及 SW480(固定表現活化的 AKT 激酶)大腸癌細胞模型中檢驗。簡言之，將目標細胞置入 96 孔組織培養盤中並使其生長至聚滿前期。然後如實例 4 所述將細胞以各種量之試驗化合物處理 72 小時，並以 CyQuant (Invitrogen, Carlsbad, CA)商業螢光分析測定相對的細胞增生。

結果-將 RL 95-2 細胞以 10 μg/ml 的 MgDHIAA (mgRho)、IAA、THIAA、TH-HHIAA(1:1 之 THIAA& HHIAA 混合物)、Xn (黃

腐酚)、LY(LY 249002，一種 PI3K 抑制劑)、EtOH（乙醇)、阿伐(阿伐酸混合物)及貝他(貝他酸混合物)處理 72 小時。對細胞增生之相對抑制作用係如圖 24 所示，相對於 DMS 溶劑對照組，黃腐酚顯示大於 50% 之抑制作用。圖 25 & 26 分別顯示各種濃度之 RIAA 或 THIAA 對 HT-29 及 SW480 癌細胞之劑量反應結果。RIAA 及 THIAA 對 HT-29 細胞之半數抑制濃度為 31 及 10 μM，對 SW480 細胞株為 38 及 3.2 μM。

實例 33

在KK-A^y小鼠糖尿病模型中阿拉伯金合歡及蛇麻草衍生物於活體內之降血糖作用

模型-使用雄性、九星期大、平均40±5克之KK-A^y/Ta小鼠來評估試驗物質對降低禁食的血清葡萄糖或胰島素濃度之能力。小鼠品系為1940年代發展出作為糖尿病模型之KK品系與A^y/a之基因型品系間混血之結果。觀察到的表型為多基因突變之結果，其尚未完全定性出，但至少四種數量性狀基因座已辨識出。其中一項係與瘦體素(leptin)受體中之錯義突變有關連。儘管突變，此受體仍有功能，雖然可能不具完全功效。KK品系發展出與胰島素不敏感有關之糖尿病及葡萄糖耐受不良而非明顯的高血糖症。導入A^y突變引發肥胖症及高血糖症。A^y突變為一種*Raly基因*之170kb缺失，其係位於5'至agouti位點及將agouti之控制置於Raly啟動子之下。純合子動物在植入前死亡。

試驗物質—使用如實例14所述之阿拉伯金合歡樣本#5659及如實例20所述之蛇麻草衍生物Rho-異阿伐酸、異阿

伐酸及黃腐酚。阿拉伯金合歡、RIAA及IAA係以100毫克/公斤/天給藥，同時XN係以20 mg/kg投藥。此外，調配阿拉伯金合歡與RIAA、IAA及XN之5:1及10:1的組合物並以100毫克/公斤/天投藥。

試驗過程-試驗物質係溶於0.2% Tween-80每天以管灌給藥每組五隻動物。在開始投藥前及在第三和最終投藥後九十分鐘，收集眼窩後竇之血清。藉由變旋酶/葡萄糖氧化酶法以酵素測定無禁食之血清葡萄糖，並以小鼠特定ELISA(酵素連結免疫吸附分析)測定血清之胰島素。

數據分析—將投藥後葡萄糖及胰島素值先相對於投藥前濃度正常化，作為各小鼠預治療百分比，以評估相對於對照組，試驗物質是否降低血清葡萄糖或胰島素。就葡萄糖及胰島素二變數，計算預治療百分比之關鍵值(單尾，低於對照組小鼠之95%信賴區間)。將各試驗物質之預治療百分比與對照組之關鍵值相比較。這些試驗物質之預治療百分比低於對照組的關鍵值者係視為顯著地與對照組不同($p<0.05$)。

結果- 在三天的治療期間，於對照組小鼠中，無禁食的血清葡萄糖提升 2.6%，而血清胰島素降低 6.7%。相對於對照組對血清胰島素無效用，所有的羅格列酮、阿拉伯金合歡、XN: 相思樹[1:5]、XN: 相思樹[1:10]、相思樹:RIAA[5:1]、黃腐酚、相思樹:IAA[5:1]、異構化阿伐酸及 Rho-異阿伐酸皆降低無禁食血清葡萄糖。相思樹:RIAA[10:1]及相思樹:IAA[10:1]對血清葡萄糖或胰島素無效用(表 30)。

在第 2 型糖尿病之 KK-Ay 小鼠模型中，阿拉伯金合歡樣本#5659、黃腐酚、異構化阿伐酸和 Rho-異阿伐酸以及其各種組合之快速降血糖效用支持其在治療與高血糖有關的人類疾病上之臨床功效潛力。

表 30

在 KK-Ay 糖尿病小鼠中阿拉伯金合歡及蛇麻草衍生物對無禁食血清葡萄糖及胰島素之效用

試驗物質	投藥† [mg/kg-天]	葡萄糖 [預治療%]	胰島素 [預治療%]
對照組(關鍵值)	-	102.6(98.7)	93.3(85.4)
羅格列酮	1.0	80.3#	88.7
阿拉伯金合歡樣本#5659	100	89.1#	95.3
XN:相思樹[1:5]	100	91.5#	106.5
XN:相思樹[1:10]	100	91.7#	104.4
相思樹:RIAA [5:1]	100	92.6#	104.8
黃腐酚	20	93.8#	106.4
相思樹:IAA [5:1]	100	98.0#	93.2
異構化阿伐酸	100	98.1#	99.1
Rho-異阿伐酸	100	98.3#	100
相思樹:RIAA[10:1]	100	101.6	109.3
相思樹:IAA[10:1]	100	104.3	106.4

†對每組五隻動物每天進行一次投藥，連續三天。

#顯著低於對照組($p<0.05$)。

實例 34

在糖尿病 db/db 小鼠模型中阿拉伯金合歡及蛇麻草衍生物於活體中之協乘作用

模型-使用雄性、C57BLKS/Jm/mLepr^{db}(db/db)小鼠評估試驗物質降低禁食血清葡萄糖或胰島素濃度之潛力。此品系之小鼠係藉由缺乏瘦體素功能之效力而對瘦體素具抗性。血漿胰島素之升高係於第10至14天開始，血糖係於第4至8星期開始升高。在試驗時間(第9週)動物為明顯的肥胖50±5 g及展現島細胞肥大之實證。

試驗物質—各連續三天分別給予陽性對照組美弗明及羅格列酮300 mg/kg-天及1.0 mg/kg-天之劑量。如前述給予阿拉伯金合歡樣本#5659、蛇麻草衍生物及其組合物。

試驗過程-試驗物質係溶於0.2% Tween-80每天以管灌給藥。在開始投藥前及在第三和最終投藥後九十分鐘，收集眼窩後竇之血清。藉由變旋酶/葡萄糖氧化酶法以酵素測定無禁食之血清葡萄糖，並以小鼠特定ELISA測定血清之胰島素。

結果-相對於對照組，陽性對照組美弗明及羅格列酮降低血清葡萄糖或胰島素濃度(表31)。僅RIAA及XN驗證為可接受結果之單一的試驗物質。RIAA降低血清胰島素，而XN產生血清葡萄糖降低但對胰島素無效用。相思樹:RIAA[5:1]為最有效的降低血清胰島素濃度之試驗藥劑，提供21%降低血清胰島素量加上雙胍美弗明之17%降低胰島素濃度及噻唑啶二酮羅格列酮之15%降低。此相思樹:RIAA[5:1]組合物之反應大於各別的組份之反應，因此具有協乘作用之潛力。阿拉伯

金合歡單獨無法降低血清葡萄糖或胰島素，而RIAA如同美弗明降低血清胰島素至類似程度。其餘的試驗物質中，相思樹:IAA[10:1]組合物亦有效的降低血清胰島素濃度。

在第 2 型糖尿病之 db/db 小鼠模型中，受 Rho-異阿伐酸作用之快速血清胰島素下降及黃腐酚之血清葡萄糖下降支持其在治療與胰島素不敏感及高血糖有關的人類疾病上之臨床功效潛力。再者，Rho-異阿伐酸及兒茶樹之 5:1 組合物在 db/db 鼠科糖尿病模型中出現協乘作用。Rho-異阿伐酸、黃腐酚及相思樹:RIAA [5:1]調配物在二個獨立的糖尿病動物模型中及三個活體外模型中展現陽性反應，支持其於需要降低血清葡萄糖或促進胰島素敏感性之臨床狀況上之潛在用途。

表 31

在糖尿病 db/db 小鼠中阿拉伯金合歡及蛇麻草衍生物對無禁食血清葡萄糖或胰島素之效用

試驗物質	投藥† [mg/kg-天]	葡萄糖 [預治療%]	胰島素 [預治療%]
對照組(關鍵值)	-	103.6 (98.4)	94.3 (84.9)
相思樹:RIAA [5:1]	100	99.6	79.3#
美弗明	300	67.6#	83.3#
Rho-異阿伐酸	100	102.3	83.8#
相思樹:IAA [10:1]	100	104.3	84.4#
羅格列酮	1.0	83.0#	84.7#

XN:相思樹[1:10]	100	101.5	91.1
阿拉伯金合歡樣本#5659	100	100.4	91.9
相思樹:RIAA [10:1]	100	101.6	93.5
異構化阿伐酸	100	100.8	95.8
黃腐酚	20	97.8#	101.6
XN:相思樹[1:5]	100	104.1	105.6
相思樹:IAA[5:1]	100	102.7	109.1

†對每組五隻動物每天進行一次投藥，連續三天。

#顯著低於各別的對照組($p<0.05$)。

實例 35

在糖尿病 db/db 小鼠模型中阿拉伯金合歡及蛇麻草衍生物於活體中之最適化作用

模型-使用雄性、C57BLKS/Jm/mLepr*db*(db/db)小鼠評估試驗物質降低禁食血清葡萄糖或胰島素濃度之潛力。此品系之小鼠係藉由缺乏瘦體素功能之效力而對瘦體素具抗性。血漿胰島素之評估係於第10至14天開始升高，血糖係於第4至8星期開始升高。在試驗時間(第9週)動物為明顯的肥胖50±5 g及展現島細胞肥大之實證。

試驗物質-各連續五天分別給予陽性對照組美弗明及羅格列酮300 mg/kg-天及1.0 mg/kg-天之劑量。蛇麻草衍生物RIAA與阿拉伯金合歡樣本#5659比例為1:99、1:5、1:2、1:1、2:1及5:1係以100 mg/kg投藥。

試驗過程-試驗物質係溶於0.2% Tween-80每天以管灌給藥。在開始投藥前及在第五和最終投藥後九十分鐘，收集眼窩後竇之血清。藉由變旋酶/葡萄糖氧化酶法以酵素測定無禁食之血清葡萄糖，並以小鼠特定ELISA測定血清之胰島素。

結果-相對於對照組，陽性對照組美弗明及羅格列酮降低血清葡萄糖及胰島素濃度($p<0.05$,結果無顯示)。個別地，相對於對照組，RIAA及相思樹於100 mg/kg時五天皆降低了血清葡萄糖，分別為7.4及7.6%($p<0.05$)。RIAA及相思樹之1:99、1:5或1:1之組合物出現拮抗性，而2:1及5:1比率之RIAA:相思樹，相對於對照組，降低了血清葡萄糖或胰島素分別為11及22%。此反應大於RIAA或相思樹單獨之反應，並意味著二種組份間之協乘效用。可見到類似的降低血清胰島素濃度之效用(圖27)。

另外於此模型中試驗Rho-異阿伐酸及相思樹之5:1組合物對抗美弗明及羅格列酮(二種目前用於治療糖尿病之醫藥劑)。結果(圖28)指出，5:1之Rho-異阿伐酸及相思樹組合物在降低血清葡萄糖(A圖)或血清胰島素(B圖)上產生與醫藥劑可比擬之結果。

2:1及5:1之Rho-異阿伐酸及相思樹組合物在db/db鼠科糖尿病模型中出現協乘作用，支持其於需要降低血清葡萄糖或促進胰島素敏感性之臨床狀況上之潛在用途。

實例 36

<u>於膠原蛋白引發類風濕關節炎之鼠科模型中蛇麻草試驗化</u>

合物之效用

此實例係於類風濕關節炎模型中驗證二種蛇麻草化合物Mg Rho及THIAA於降低發炎及關節炎症狀之效力，而此發炎及症狀已知，部分係由許多蛋白質激酶所介導。

模型－將雌性DBA/J小鼠(10/組)豢養於標準的亮光及黑暗的條件下並隨其任意飲食。於第0天以皮下注射含100 μg第II型膠原蛋白及100 μg結核分枝桿菌之鮫鯊烯溶液之混合物。在第21天重複推入注射。於第22-27天檢驗小鼠之關節炎現象，將無反應之小鼠從研究中剔除。於第28天開始將小鼠每天灌食試驗化合物達14天，並於第42天結束。如此實例中所用，試驗化合物RIAA(MgRho)為10 mg/kg(低)、50 mg/kg(中)或250 mg/kg(高)；THIAA為10 mg/kg(低)、50 mg/kg(中)或250 mg/kg(高)；西樂保為20 mg/kg；及潑尼松龍(prednisolone)為10 mg/kg。

使用如下述之關節炎指數評估各掌之關節炎症狀(記分0－4)。在此關節炎指數下0=無可見的現象；1=水腫及/或紅斑:單一；2=水腫及/或紅斑:二處關節；3=水腫或紅斑:多於二處關節；及4=整個掌及指頭與關節僵直及畸形有關之嚴重關節炎。

組織檢驗-在實驗終了時，將小鼠殺死，切下一肢並將其保存於緩衝的福馬林(formalin)中。以關節炎指數分析得到支持後，由個治療組中隨機選擇二隻動物以 H&E 染色進行組織學分析。以 4 種顯示嚴重傷害之評分於四點標度上檢視軟組織、關節及骨改變。

細胞激素分析-在實驗終了時，由小鼠中收集血清進行細胞激素分析。樣本體積低(~0.2- 0.3 ml/小鼠)，將十隻小鼠之樣本隨機放在二個各五隻動物之儲庫中。進行此操作以便能重複分析；各分析最少進行二次。使用小鼠專一性試劑(R&D Systems, Minneapolis, MN)，根據製造商之指示進行TNF-α及IL-6分析。二十六個儲庫中僅五個產生可偵測之TNF-α量；以媒劑處理之對照組動物組係在其中。

結果-RIAA對關節炎指數之效用係如圖29以圖形表示。潑尼松龍在10 mg/kg(第30-42天)，西樂保在20 mg/kg (第32-2天)，RIAA在250 mg/kg(第34-2天)及RIAA在50 mg/kg (第38-2天)觀察到顯著下降($p<0.05$,雙尾t-試驗)，其驗證RIAA在50或250 mg/kg時之抗關節炎功效。圖30顯示THIAA對關節炎指數之效用。此處西樂保(第32-42天)，RIAA在250 mg/kg(第34-42天)及THIAA在50 mg/kg(第34-42天)觀察到顯著下降，亦驗證THIAA作為抗關節炎藥劑之效用。

關節組織傷害之組織檢驗結果係如圖31所示，在經THIAA治療之個體中缺乏或顯示最小的關節破壞證據。在250 mg/kg及50 mg/kg時有清楚的劑量反應現象及組織評分下降，分別為40%及28%。此有利地與其中關節破壞評分為中等之經西樂保治療之群組相匹敵。請注意在西樂保之情況下，組織學評分實際增加了33%。個體動物間有明顯的不同，例如其中一個經媒劑治療的動物顯現緩和關節破壞之證據而另一個顯然地無損傷。除了經潑尼松龍治療群組中的一隻動物外，在所有的治療群族中皆出現滑膜炎。

IL-6之細胞激素分析結果係概括於圖32中。雖然僅潑尼松龍達到統計上的顯著性，但除了西樂保外，高劑量之Rho對所有的治療皆降低了IL-6量。

實例 37

RIAA:相思樹(1:5)對人類代謝症候群之效用

此實驗係於患有代謝症候群之自願病患中檢驗RIAA:相思樹(1:5)調配物治療對許多臨床上相關標記之效用。

方法及試驗設計-此試驗為在單一研究位置(功能性醫學研究中心(the Functional Medicine Research Center), Gig Harbor, WA)進行之隨機、安慰劑對照組、雙盲試驗。研究所需的受試者之包括標準(介於18至70歲)需滿足下列：(i) BMI介於25至42.5 kg/m^2；(ii)TG/HDL-C比率≥3.5；(iii)禁食胰島素>10 mcIU/mL。此外，受試者必須符合下列5項標準中的其中3項：(i)腰圍>35"(女性)及>40"(男性)；(ii)TG≥ 150 mg/dL；(iii)HDL<50 mg/dL(女性)，及<40 mg/dL(男性)；(iv)血壓≥130/85或醫學上診斷出高血壓；及(v)禁食葡萄糖≥100 mg/dL。

滿足包括標準之受試者隨機分配至四組中的其中一組：(i)以每次1錠每天三次服用RIAA/相思樹組合物之受試者(每錠含有100 mg RIAA及500 mg兒茶樹心材萃取物)；(ii)以每次2錠每天三次服用RIAA/相思樹組合物之受試者；(iii)安慰劑，每次1錠每天三次；及(iv)安慰劑，每次2錠每天三次。整個試驗期間為12星期。在第1天、在第8星期及12星期從受試者抽血以評估對各種代謝症候群之參數之增補效用。

結果-試驗中所登記的受試者之起初的人口統計及生化特性(聯合安慰劑組及每天服用3錠之RIAA/相思樹)係如表32所示。起初的禁食血液葡萄糖及進食後2小時(2 h pp)葡萄糖值，RIAA/相思樹及安慰劑組間為相似的(分別為99.0 vs. 96.5 mg/dl，及128.4 vs. 109.2 mg/dL)。此外，二種葡萄糖值一般係在實驗室參考範圍內(禁食血液葡萄糖為40-110 mg/dL，而2 h pp葡萄糖為70-150 mg/dL)。此結果係在預料中，因為2 h pp胰島素反應之變化優先於葡萄糖及禁食胰島素之提升，其在後期的代謝症候群及真正的糖尿病中可發現。

表 32

人口統計及基線生化特性

	安慰劑		**RIAA/相思樹(3錠/天)**	
N	35		35	
性別				
男性	11 (31%)		12 (34%)	
女性	24 (69%)		23 (66%)	
	平均	**SD**	**平均**	**SD**
年齡(歲)	46.0	13.2	47.9	13.4
重量(磅)	220.6	35.2	219.5	31.6
BMI(kg/m^2)	35.0	4.0	35.4	4.0
收縮BP(mm)	131.0	15.1	129.7	13.9
舒張BP(mm)	83.7	8.5	82.6	7.8
腰圍(吋)	42.9	4.9	42.9	4.5

臀圍(吋)	47.1	4.0	47.6	3.2
禁食胰島素(mcIU/mL)	13.2	5.2	17.5	12.1
2h pp胰島素(mcIU/mL)	80.2	52.1	99.3*	59.2*
禁食葡萄糖(mg/dL)	96.5	9.0	99.0	10.3
2h pp葡萄糖(mg/dL)	109.2	30.5	128.4	36.9
禁食TG(mg/dL)	231.2	132.2	255.5	122.5

*一位受試者被排除至分析外，因為不正常的2 h pp胰島素值；BMI，基本代謝指數；BP，血壓；TG，三酸甘油酯；HDL，高密度脂蛋白

禁食血液胰島素測量值相類似且一般亦在參考範圍內，RIAA/相思樹組之起始值為17.5 mcIU/mL，安慰劑組為13.2 mcIU/mLI(參考範圍3-30 mcIU/mL)。2h pp胰島素量升高超過參考範圍(99.3 vs. 80.2 mcIU/mL)，並顯示比禁食胰島素或葡萄糖測量值變化更大。雖然，起始值相似，但在此試驗中8星期後RIAA/相思樹在禁食胰島素及2h pp胰島素以及2h pp血液葡萄糖顯示下降更多(圖33及34)。

恆定模式評估(HOMA)評分係一種公開的胰島素阻抗之測量。所有受試者HOMA評分之變化係如圖35所示。因為在代謝症候群受試者之胰島素及葡萄糖值中見到之多變性，所以亦對該等僅禁食胰島素>15 mcIU/mL之受試者亞群族進行評估。此亞群族之HOMA評分係如表33所示，並顯示與安慰劑組相比，在RIAA/相思樹組中觀察到顯著的下降。

表33

在起初禁食胰島素≧15 mcIU/mL之受試者中RIAA/相思樹補

充(3錠/天)對HOMA評分之效用

		HOMA評分	
治療	N	起初	8星期後
安慰劑	9	4.39	4.67
RIAA/相思樹	13	5.84	4.04

群組間之差異在8星期時為顯著的($p<0.05$)。HOMA評分係由禁食胰島素及葡萄糖利用公開的方法[(胰島素(mcIU/mL)*葡萄糖(mg/dL))/405]來計算。

三酸甘油酯(TG)之升高亦為代謝症候群重要的建議指標。表34及圖36指出，與安慰劑相比，RIAA/相思樹補充在8星期後使TG明顯的降低($p < 0.05$)。RIAA/相思樹組之TG/HDL-C比率亦顯示實質下降(由6.40降至5.28)，而安慰劑組則無觀察到降低(由5.81至5.92)。

表 34

RIAA/相思樹補充(3錠/天)對TG量及TG/HDL-膽固醇比例之效用

	禁食TG(mg/dL)			TG/HDL		
補充	起始	8星期後	改變	起初	8星期後	改變
安慰劑	231.2	229.8	-1.4	5.81	5.92	+0.11
RIAA/相思樹(每天3錠劑)	258.6	209.6	-49.0	6.40	5.28	-1.12

在8星期期間以100 mg rho-異阿伐酸及500 mg兒茶樹心材萃取物每天3錠補充之代謝症候群受試者，與安慰劑相比，產生較大的2 h pp胰島素下降。再者，禁食胰島素、

禁食及 2 h pp 葡萄糖、禁食三酸甘油酯及 HOMA 評分之較大的下降在服用 RIAA/相思樹補充劑(每天 3 錠)之受試者及服用安慰劑之受試者中觀察到。這些結果指出 RIAA/相思樹補充可有效的維持代謝症候群之受試者其胰島素體內平衡。

實例 38

試驗化合物在活體外對癌細胞增生之效用

此實驗係驗證本發明之許多試驗化合物在活體外對癌細胞增生之直接抑制效用。

方法-將大腸直腸癌細胞株 HT-29、Caco-2 及 SW480 以 $3x10^3$ 細胞/孔植入 96 孔盤中，並培養至隔夜使細胞黏附在盤上。各濃度之試驗物質係複製 8 次。七十二小時後，使用 CyQUANT®細胞增生分析套組對所有存活的細胞進行分析。計算相對 DMSO 溶劑對照組之存活細胞下降百分比。作圖之值為八個觀察值之平均±95%信賴區間。

結果 - 圖37 - 41係以圖示表示RIAA(圖37)、IAA(圖38)、THIAA(圖39)、HHIAA(圖40)及黃腐酚(XN；圖41)之抑制效用。

實例 39

西樂保及試驗化合物在活體外對癌細胞增生之效用

此實驗係比較RIAA或THIAA與西樂保組合在活體外對癌細胞增生之實際及預期的抑制效用。

方法-將大腸直腸癌細胞株以 $3x10^3$ 細胞/孔植入 96 孔盤中，並培養至隔夜使細胞黏附在盤上。各濃度之試驗物質係複製 8 次。七十二小時後，使用 CyQUANT®細胞增生分析套組

對所有存活的細胞進行分析。計算相對 DMSO 溶劑對照組之存活細胞之觀察的下降百分比。使用關係式：1/[T]x= X/[T]x+Y/[T]y 來估算預計的西樂保及 RIAA 或 THIAA 組合物之細胞毒性效用，其中 T=毒性代表生長受抑制及被殺死的細胞之部分，X 及 Y 為試驗混合物中各組份之相對部分，X+Y=1。作圖之值為八個觀察值之平均±95%信賴區間。當下降的估算百分比落在對應的觀察部份之 95%信賴區間以下時，則視為具協乘作用。

圖 42 及 43 係以圖示表示 RIAA(圖 42)或 THIAA(圖 43)對癌細胞增生之實際及預計的抑制作用間之比較。這些結果顯示試驗的化合物與西樂保組合抑制癌細胞增生之程度大於大多數實例中數學上預計之程度。

實例 40

在口服投藥後偵測血清中 THIAA

此實驗之目的係測定THIAA在口服投藥後是否會代謝及是否可偵測。

方法 - 在投藥前抽血後，服用五個軟膠囊(188mg THIAA/ softgel)給予940 mg游離酸THIAA(PR Tetra Standalone Softgel. OG# 2210 KP-247. Lot C42331111)並立即給予一瓶水果優格。除了無咖啡因之咖啡外，在服用THIAA後四小時內不再食用額外的食物。以45分鐘的間隔將樣本抽至無促凝固劑之Corvac血清分離管中。讓樣本於室溫下凝結45分鐘並於4°C以1800 x g離心10分鐘使血清分離。於0.3 ml的血清中加入含有0.5% HOAc之0.9 ml的MeCN並保

持在-20°C達45-90分鐘。將混合物於4°C以15000 x g離心10分鐘。離心後明顯的分成二層；於上層取樣0.6 ml進行HPLC分析。使用添加樣本測定復原率，且復原率大於95%。

結果 - 結果係如圖44 - 46之圖示所示。圖44之圖示顯示在服用940 mg的THIAA後一段時間，於血清中所偵測的THIAA。圖45顯示服用後225分鐘，血清中偵測之THIAA量與活體外試驗之THIAA量之比較。圖46係描繪CYP2C9*1之THIAA代謝。

本發明已完全描述，熟習本項技術之一般技術者應了解，在不悖離所附的申請專利範圍之精神及範圍下，其可做許多改變及修改。

【圖式簡單說明】

圖1係以圖示描繪一部分調節胰島素敏感性及阻抗之激酶網路。

圖2係以圖示描繪MgRIAA(mgRho)對五種選擇激酶之抑制作用。

圖3係以圖示描繪五種蛇麻草成份及阿拉伯金合歡(*Acacia nilotica*)萃取物對PI3K同質物之抑制作用。

圖4係描繪在COX-2表現(白色條帶)之LPS刺激前加入或LPS-刺激隔夜後加入試驗物質(灰色條帶)前，PGE_2生物合成之RIAA[A圖]及IAA[B圖]劑量相關抑制作用。

圖5係提供於RAW 264.7細胞中分析西樂保(celecoxib)[A圖]及MgRIAA[B圖]對LPS引發COX-2介導PGE_2產生之直接酵素抑制作用之圖示。測量PGE_2並以pg/ml表示。

誤差長條係代表標準偏差(n=8)。

圖6係提供西方墨點偵測COX-2蛋白之表現。在指定的時間以LPS刺激RAW 264.7細胞，之後將總細胞之萃取物以西方墨點為COX-2及GAPDH表現[A圖]顯像。進行COX-2及GAPDH條帶之密度測量。圖[B圖]係代表COX-2與GAPDH之比率。

圖7係提供西方墨點偵測iNOS蛋白之表現。在指定的時間以LPS刺激RAW 264.7細胞，之後將總細胞之萃取物以西方墨點為iNOS及GAPDH表現[A圖]顯像。進行iNOS及GAPDH條帶之密度測量。圖[B圖]係代表COX-2與GAPDH之比率。

圖 8 係提供利用 96 孔模式之 TransAM NF-κB 套組之代表性概圖。與盤結合之寡核苷酸含有 NF-κB 相同的結合位置。原生抗體偵測 NF-κB 之 p50 亞單位。

圖9係以TransAM NF-κB套組測量，提供NF-κB之代表結合活性。DNA結合百分比係以相對LPS對照組(100%)所計算。誤差長條係代表標準偏差(n = 2)。如實例部分所述，將RAW 264.7細胞以試驗化合物及LPS處理4小時。

圖10為評估相思樹樣本#4909萃取物對脂肪細胞發育及成熟之脂質生成效用之代表性試驗過程之概述。使用3T3-L1鼠科纖維母細胞模型，研究試驗化合物對脂肪細胞脂肪新生之潛在效用。

圖11為描繪經相思樹樣本#4909萃取物或陽性對照組吲哚美辛(indomethacin)及相對溶劑對照組之曲格列酮(troglitazone)處理之3T3-L1脂肪細胞之非極性脂質量之圖示。誤差長條係代表95%信賴界線(單尾)。

圖12為評估相思樹樣本#4909水溶性萃取物之可溶於二甲基亞碸餾分物對胰島素阻抗3T3-L1脂肪細胞分泌脂聯素(adiponectin)之效用之代表性試驗過程之概述。

圖13為一代表性長條圖，係描繪於24小時內，由三劑量之曲格列酮及四劑量之相思樹樣本#4909水溶性萃取物之可溶於二甲基亞碸餾分物所引起的胰島素阻抗3T3-L1脂肪細胞之最大脂聯素分泌。顯示的值為相對溶劑對照組之百分比；誤差長條係代表95%信賴區間。

圖14為一代表性試驗方法之概述，係用於評估相思樹樣本#4909水溶性萃取物之可溶於二甲基亞碸餾分物對經試驗物質及10、2或0.5 ng TNFα/ml處理過之3T3-L1脂肪細胞分泌脂聯素之效用。

圖15描繪代表性的長條圖，係代表由吲哚美辛或相思樹樣本#4909萃取物引起經TNFα處理的成熟3T3-L1細胞分泌之脂聯素。顯示的值為相對溶劑對照組之百分比；誤差長條係代表95%信賴區間。*明顯地不同於TNFα單獨處理者($p<0.05$)。

圖16係以圖示說明各種不同的市售兒茶樹(*Acacia catechu*)及阿拉伯金合歡之組合物所引起之胰島素阻抗3T3-L1脂肪細胞之相對的三酸甘油酯增加量。顯示的值為相對溶劑對照組之百分比；誤差長條係代表95%信賴區間。

圖17係以圖示描繪由各種兒茶樹萃取物所引起之最大相對脂聯素分泌之代表。顯示的值為相對溶劑對照組之百分比；誤差長條係代表95%信賴區間。

圖18係以圖示描繪經蛇麻草化合物或陽性對照組吲哚美辛及曲格列酮處理之3T3-L1脂肪細胞其脂質含量(相對於溶劑對照組)。使用3T3-L1鼠科之纖維母細胞模型，研究試驗化合物對脂肪細胞脂肪新生之潛在效用。結果係以對照組細胞之相對非極性脂質含量表示；誤差長條係代表95%信賴區間。

圖19為一24小時內由試驗物質四種劑量引起胰島素阻抗3T3-L1脂肪細胞之最大脂聯素分泌之代表長條圖。顯示的值為相對溶劑對照組之百分比；誤差長條係代表95%信賴區間。IAA=異阿伐酸，RIAA=Rho異阿伐酸，HHIA=六氫異阿伐酸及THIAA=四氫異阿伐酸。

圖20係描述Rho異阿伐酸、異阿伐酸、四氫異阿伐酸、六氫異阿伐酸、黃腐酚(xanthohumol)、酒花粕、六氫輔蛇麻酮(hexahydrocolupulone)及陽性對照組曲格列酮之Hofstee圖。由y-截距估算相對溶劑對照組之最大脂聯素分泌，同時由斜率之負數值計算出半數最大脂聯素分泌所需的試驗化合物濃度。

圖21係顯示二個長條圖，代表由異阿伐酸和Rho異阿伐酸[A圖]及六氫異阿伐酸和四氫異阿伐酸[B圖]引起經TNFα處理的成熟3T3-L1細胞之相對脂聯素分泌。顯示的值為相對溶劑對照組之百分比；誤差長條係代表95%信賴區間。*明顯地不同於TNFα單獨處理者($p<0.05$)。

圖22係描繪加入10 ng TNFα/ml三小時後[A圖]及24小時後[B圖]，胰島素阻抗3T3-L1脂肪細胞中之NF-kB核轉位。

吡格列酮(Pioglitazone)、RIAA及黃腐酚係以5.0(黑色長條)及2.5(帶狀長條)μg/ml加入。由細胞得來之Jurkat核萃取物係置於添加50 ng/ml TPA (佛波醇(phorbol)、12-肉豆蔻酯(myristate)、13乙酯)及0.5 μM鈣離子載體(calcium ionophore)A23187(CI)之培養基中於37°C培養二小時，之後立即收集。

圖23係以圖示描述經溶劑、美弗明(metformin)、相思樹樣本#5659水性萃取物或1:1的美弗明/兒茶樹萃取物組合處理之胰島素阻抗3T3-L1細胞之相對三酸甘油酯含量。結果係以溶劑對照組中完全分化細胞之相對的三酸甘油酯含量表示。

圖24係以圖示描述10 μg/ml之溶劑對照組(DMSO)、RIAA、異阿伐酸(IAA)、四氫異阿伐酸(THIAA)、1:1之THIAA及六氫異阿伐酸(HHIAA)混合物、黃腐酚(XN)、LY 249002 (LY)、乙醇(ETON)、阿伐酸(ALPHA)及貝他酸(BETA)對RL 95-2子宮內膜細胞株之細胞增生之效用。

圖25係以圖示描繪各種濃度之THIAA或還原的異阿伐酸(RIAA)對HT-29細胞株之細胞增生之效用。

圖26係以圖示描繪各種濃度之THIAA或還原的異阿伐酸(RIAA)對SW480細胞株之細胞增生之效用。

圖 27 係以圖示描繪各種還原的異阿伐酸(RIAA)及相思樹之組合於 db/db 小鼠模型中對降低血清葡萄糖[A圖]及血清胰島素[B圖]之劑量反應。

圖28係以圖示描繪於db/db小鼠模型中，相較於醫藥抗

糖尿病化合物羅格列酮(roziglitazone)及美弗明，由5:1的RIAA:相思樹組合所產生之血清葡萄糖[A圖]及血清胰島素[B圖]之降低。

圖29係以圖示描繪還原的異阿伐酸(RIAA)在類風濕關節炎之鼠科模型中對關節炎指數之影響。

圖30係以圖示描繪THIAA在類風濕關節炎之鼠科模型中對關節炎指數之影響。

圖31係以圖示概述RIAA及THIAA對膠原蛋白引發關節損傷之影響。

圖32係以圖示概述在膠原蛋白引發關節炎的動物模型中RIAA及THIAA對IL-6量之影響。

圖33係以圖示描繪RIAA/相思樹(1:5)補充(每天3錠)對禁食及進食後2小時胰島素量之影響。就2小時pp之胰島素量評估，係在受試者禁食10-12小時後，食用含75 g葡萄糖(Trutol 100, CASCO NERL® Diagnostics)溶液；給予葡萄糖2小時後，抽血並進行胰島素量分析(Laboratories Northwest, Tacoma, WA)。

圖34係以圖示描繪RIAA/相思樹(1:5)補充(每天3錠)對禁食及進食後2小時葡萄糖量之影響。就2小時pp之葡萄糖量評估，係在受試者禁食10-12小時後，食用含75 g葡萄糖(Trutol 100, CASCO NERL® Diagnostics)溶液；給予葡萄糖2小時後，抽血並進行葡萄糖量分析(Laboratories Northwest, Tacoma, WA)。

圖35係以圖示描繪RIAA/相思樹(1:5)補充(每天3錠)對HOMA

評分之影響。HOMA評分係由禁食之胰島素及葡萄糖以已公開之方法[(胰島素(mclU/mL)*葡萄糖(mg/dL))/405]所計算出。

圖 36 係以圖示描繪 RIAA/相思樹(1:5)補充(每天 3 錠)對血清 TG 量之影響。

圖37.RIAA或西樂保：薑黃素(Curcumin)(1:3)對(A) HT-29、(B) Caco-2或(C) SW480大腸癌細胞之抑制百分比。

圖38.IAA或西樂保：薑黃素(1:3)或LY294002對(A) HT-29、(B) Caco-2或(C) SW480大腸癌細胞之抑制百分比。

圖39.THIAA或西樂保：薑黃素(1:3)對(A)HT-29、(B) Caco-2或(C)SW480大腸癌細胞之抑制百分比。

圖40.HHIAA或西樂保：薑黃素(1:3)對(A)HT-29、(B) Caco-2或(C) SW480大腸癌細胞之抑制百分比。

圖41.NX或西樂保：薑黃素(1:3)對(A) HT-29、(B) Caco-2或(C) SW480大腸癌細胞之抑制百分比。

圖42.西樂保及RIAA之組合物對(A) HT-29、(B)Caco-2或(C)SW480大腸癌細胞之實際及預期的抑制作用。

圖43.西樂保及THIAA之組合物對(A) HT-29、(B)Caco-2或(C)SW480大腸癌細胞之實際及預期的抑制作用。

圖44係以圖示顯示在攝取940 mg的THIAA後於一段時間偵測血清中之THIAA。

圖 45 係顯示血清及對照組中可偵測到之 THIAA 態樣。

圖 46 係描繪 CYP2C9*1 對 THIAA 之代謝。

【主要元件符號說明】

無

五、中文發明摘要：

本發明係揭示用於調節蛋白質激酶供癌症治療之化合物及方法。所揭示之化合物及方法係以常發現於蛇麻草(hop)中之異阿伐酸(isoalpha acid)為基質。

六、英文發明摘要：

Compounds and methods for protein kinase modulation for cancer treatment are disclosed. The compounds and methods disclosed are based on isoalpha acids, commonly found in hops.

十、申請專利範圍：

1. 一種於有需要之哺乳動物中治療對蛋白質激酶調節有反應之癌症之方法，該方法包括投予此哺乳動物一治療上有效量之異阿伐酸。
2. 如申請專利範圍第1項之方法，其中被該異阿伐酸係由異葎草酮(isohumulone)、異近葎草酮(isoadhumulone)及異類葎草酮(isocohumulone)組成之群中選出。
3. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該調節之蛋白質激酶係由下列組成之群中選出：AMPK、Aurora-A、Bmx、BTK、CHK1、CHK2、CK1γ1、CK1γ2、CK1γ3、DAPK1、DAPK2、EphB1、ErbB4、Fer、FGFR2、Flt4、GSK3β、GSK3α、Hck、IGF-1R、MAPKAP-K2、MSK2. PAK3、PI3K、Pim-1、PKA(b)、PKCα、PRAK、Ron、Rsk1、Rsk2、Syk、Tie2及TrkA。
4. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該對蛋白質激酶調節有反應之癌症係由下列組成之群中選出：膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、肺癌、白血病、黑色素瘤、前列腺癌、甲狀腺癌及子宮癌。
5. 一種於有需要之哺乳動物中治療對蛋白質激酶調節有反應之癌症之組合物，該組合物包括一治療上有效量之異阿伐酸；其中該治療上有效量係調節與蛋白質激酶有關之癌症。
6. 如申請專利範圍第5項之組合物，其中該異阿伐酸係由異葎草酮、異近葎草酮及異類葎草酮組成之群中選出。
7. 如申請專利範圍第5項之組合物，其中該組合物進一步係包括由下列組成之群中選出之醫藥上可接受賦形劑：包膜、

等張及吸收延遲劑、黏合劑、黏著劑、潤滑劑、崩解劑、著色劑、調味劑、甜味劑、吸收劑、洗滌劑及乳化劑。

8. 如申請專利範圍第 5 項之組合物，其中該組合物進一步係包含一或多種由下列組成之群中選出之成員：抗氧化物、維生素、礦物質、蛋白質、油脂及碳水化合物。

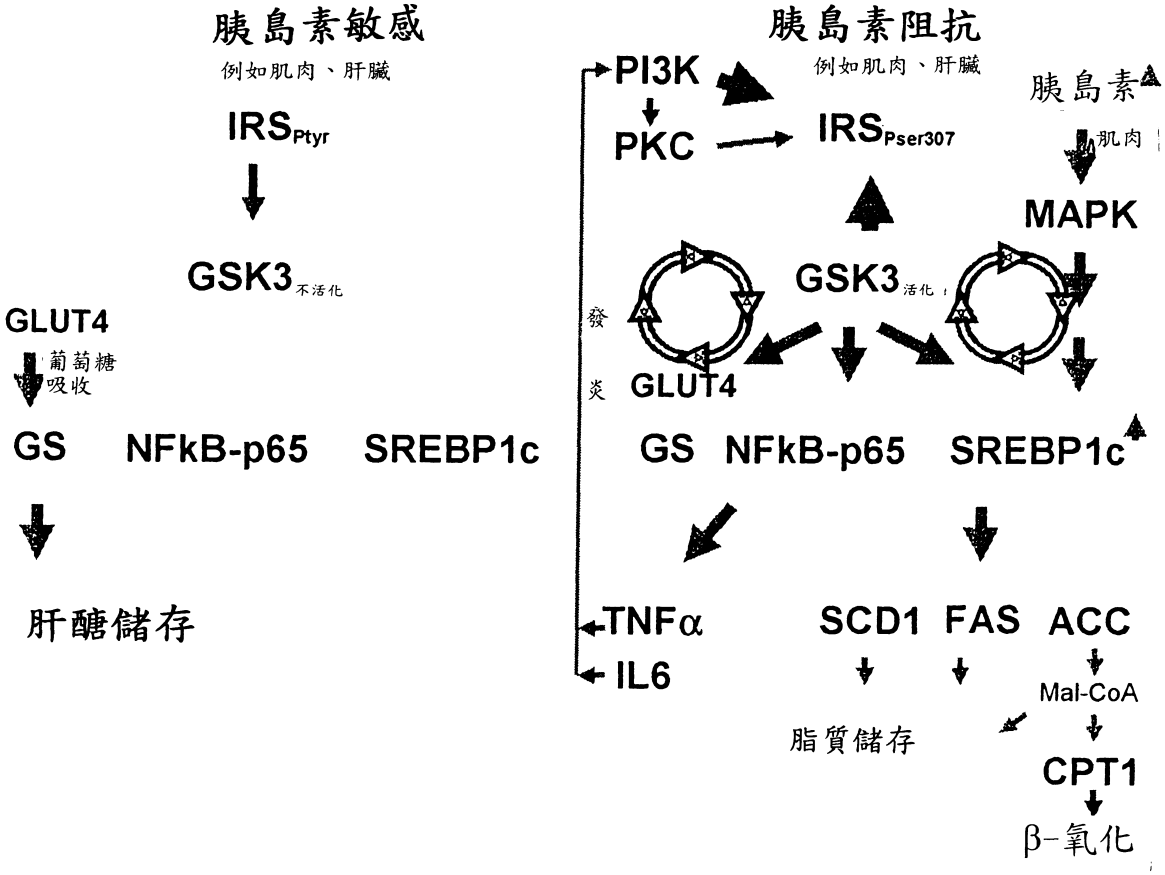

胰島素敏感
例如肌肉、肝臟
IRSPtyr
GSK3不活化
GLUT4
葡萄糖吸收
GS
NFkB-p65
SREBP1c
肝醣儲存
胰島素阻抗
例如肌肉、肝臟
PI3K
PKC
IRSPser307
胰島素
肌肉
MAPK
GSK3活化
發炎
GLUT4
GS
NFkB-p65
SREBP1c
TNFα
IL6
SCD1
FAS
ACC
Mal-CoA
脂質儲存
CPT1
β-氧化

圖 1

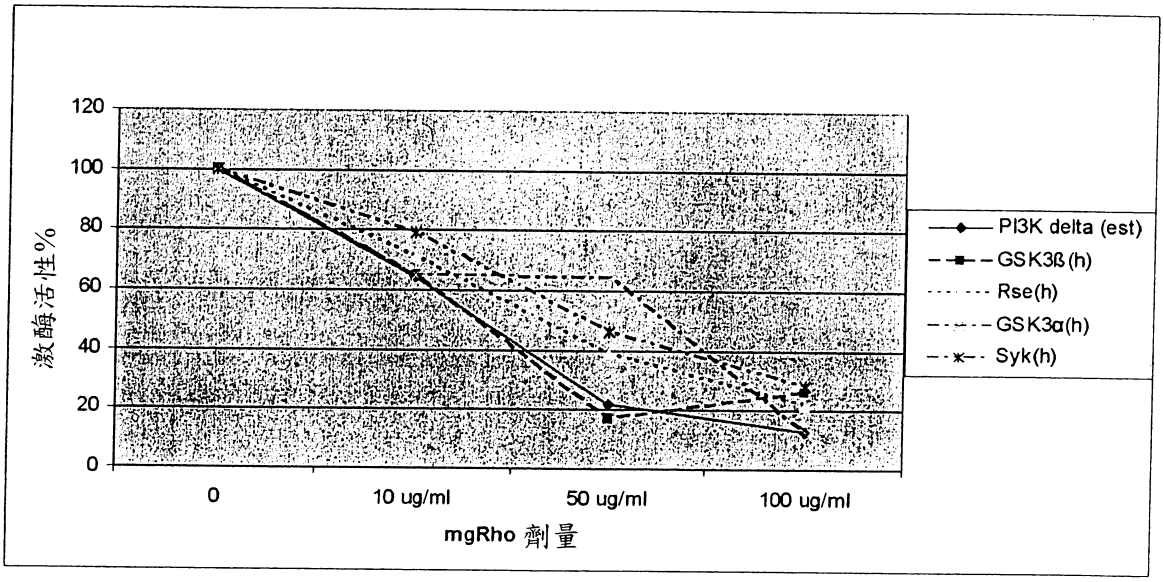

120
100
80
60
40
20
0
激酶活性%
0
10 ug/ml
50 ug/ml
100 ug/ml
mgRho 劑量
PI3K delta (est)
GSK3ß(h)
Rse(h)
GSK3α(h)
Syk(h)

圖 2

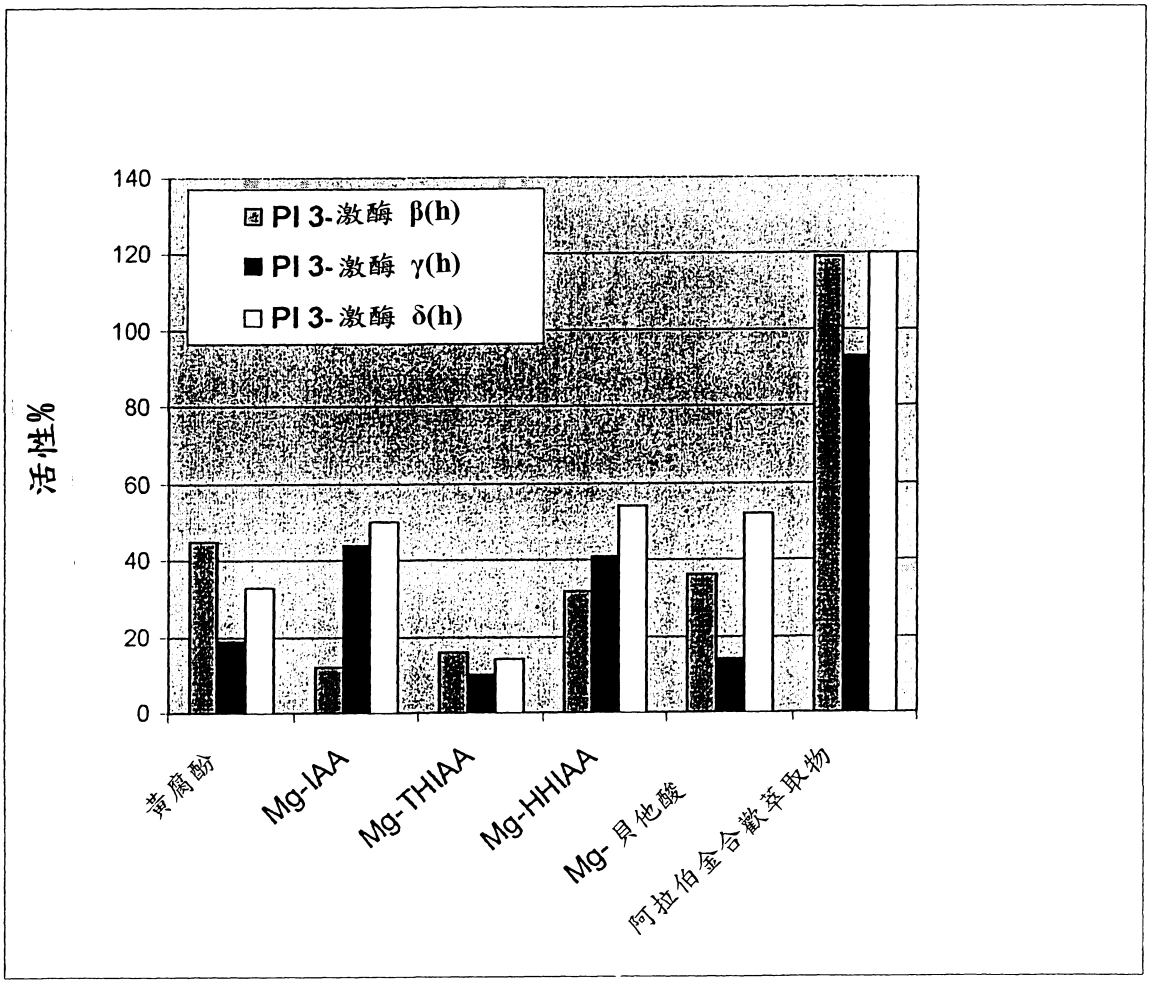
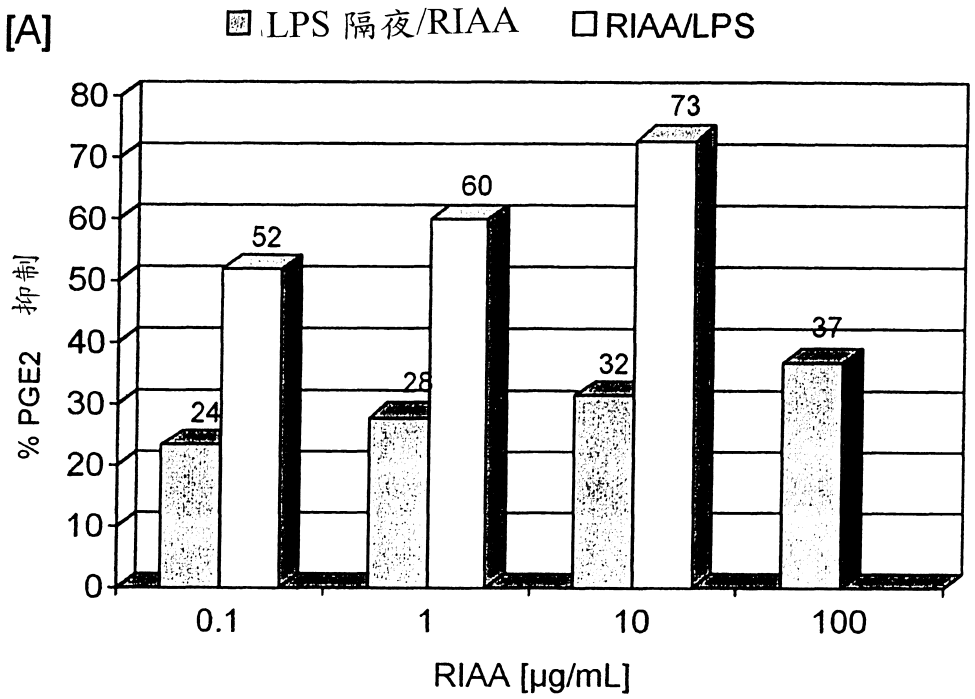

140
120
100
80
60
40
20
0
%抑制
PI 3-激酶 β(h)
PI 3-激酶 γ(h)
PI 3-激酶 δ(h)
黃腐酚
Mg-IAA
Mg-THIAA
Mg-HHIAA
Mg-貝他酸
阿拉伯金合歡萃取物

圖 3


[A]
LPS 隔夜/RIAA
RIAA/LPS
% PGE2 抑制
80
70
60
50
40
30
20
10
0
24
52
28
60
32
73
37
0.1
1
10
100
RIAA [μg/mL]

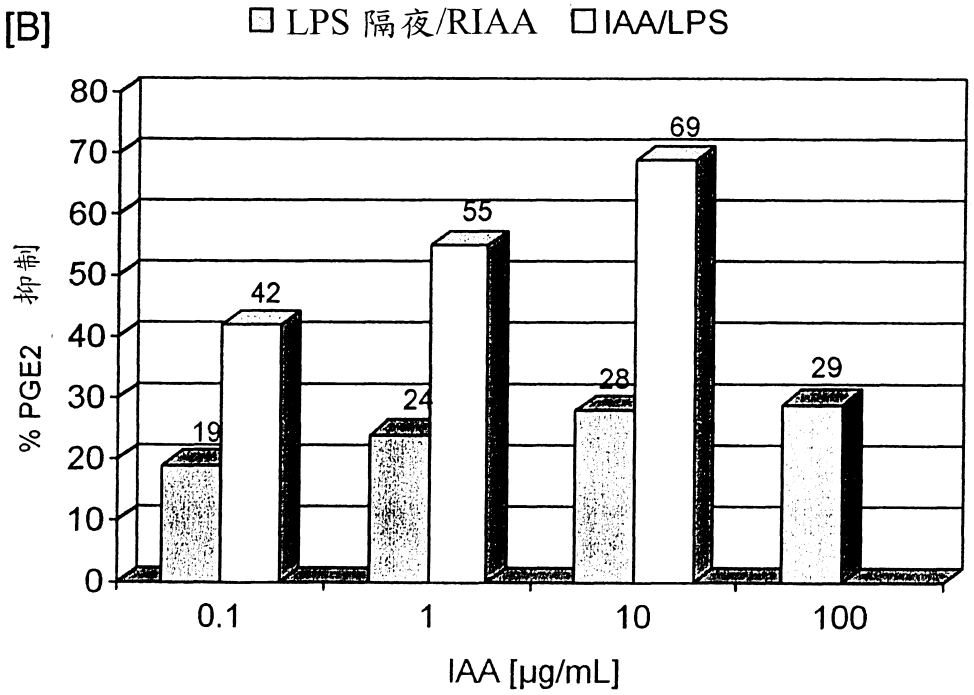
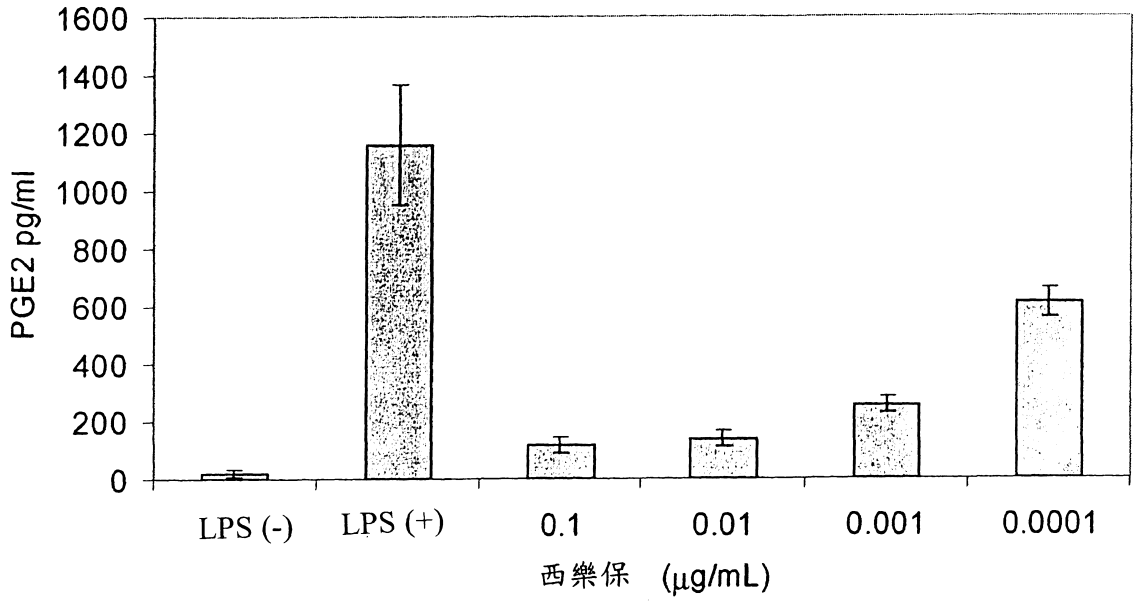

[B]
LPS 隔夜/RIAA
IAA/LPS
% PGE2 抑制
80
70
60
50
40
30
20
10
0
19
42
24
55
28
69
29
0.1
1
10
100
IAA [μg/mL]

圖 4

A.


1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
PGE2 pg/ml
LPS (-)
LPS (+)
0.1
0.01
0.001
0.0001
西樂保 (μg/mL)

B.

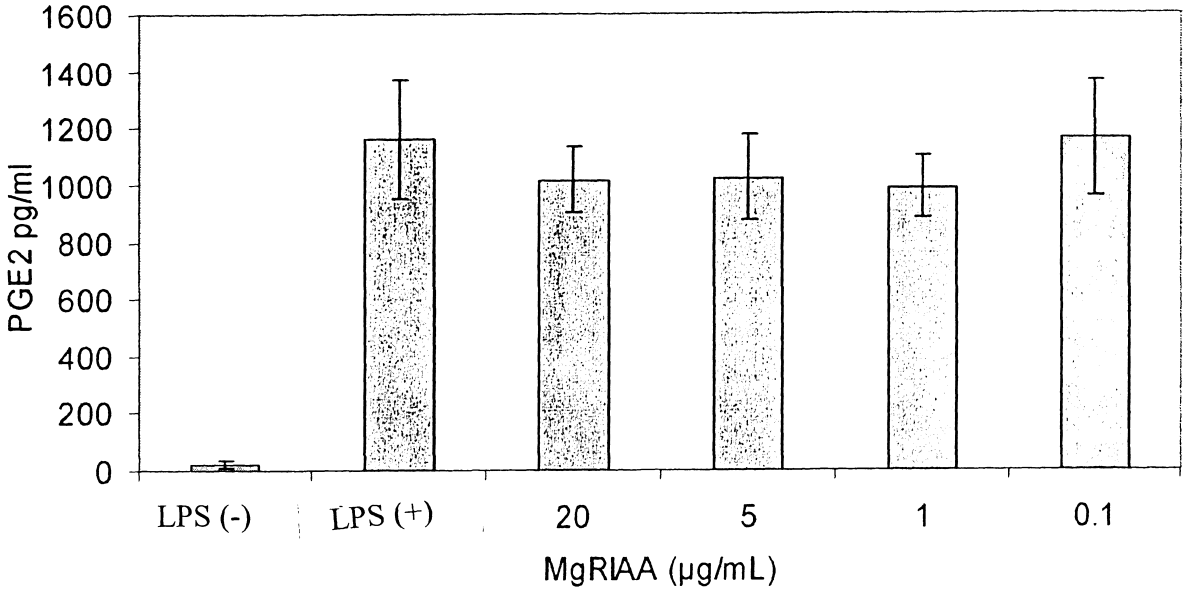

1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
PGE2 pg/ml
LPS (-)
LPS (+)
20
5
1
0.1
MgRIAA (μg/mL)

圖 5

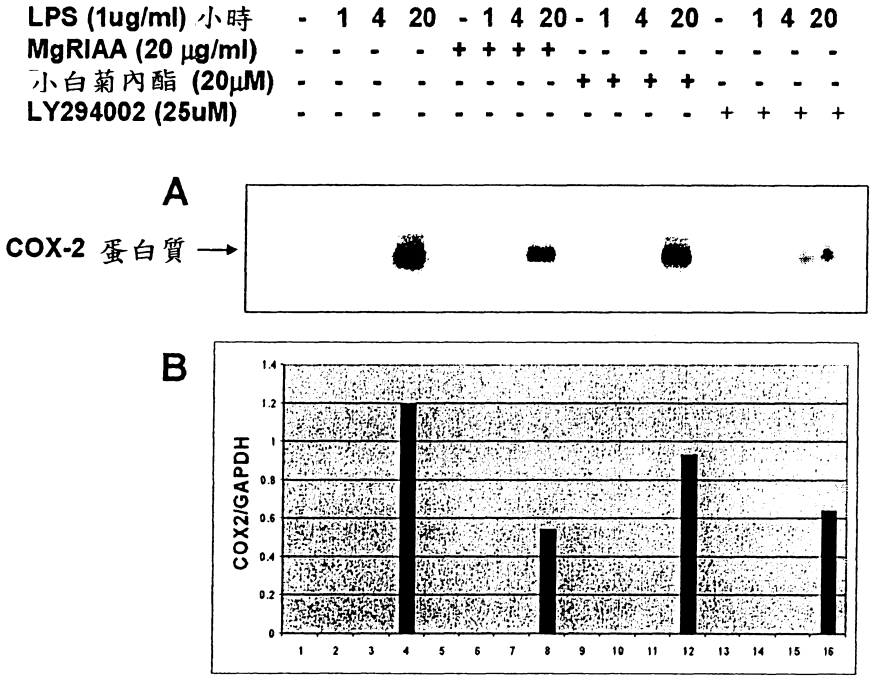

LPS (1ug/ml) 小時 - 1 4 20 - 1 4 20 - 1 4 20 - 1 4 20
MgRIAA (20 μg/ml) - - - - + + + + - - - - - - - -
小白菊內酯 (20μM) - - - - - - - - + + + + - - - -
LY294002 (25uM) - - - - - - - - - - - - + + + +
A
COX-2 蛋白質
B
COX2/GAPDH
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

圖 6

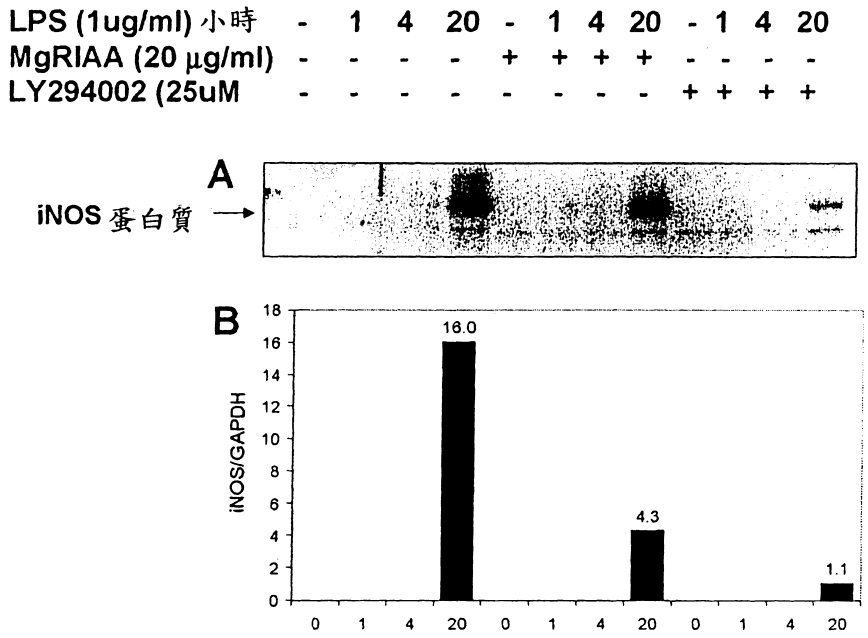

LPS (1ug/ml) 小時 - 1 4 20 - 1 4 20 - 1 4 20
MgRIAA (20 μg/ml) - - - - + + + + - - - -
LY294002 (25uM - - - - - - - - + + + +
A
iNOS 蛋白質
B
iNOS/GAPDH
16.0
4.3
1.1
0 1 4 20 0 1 4 20 0 1 4 20

圖 7

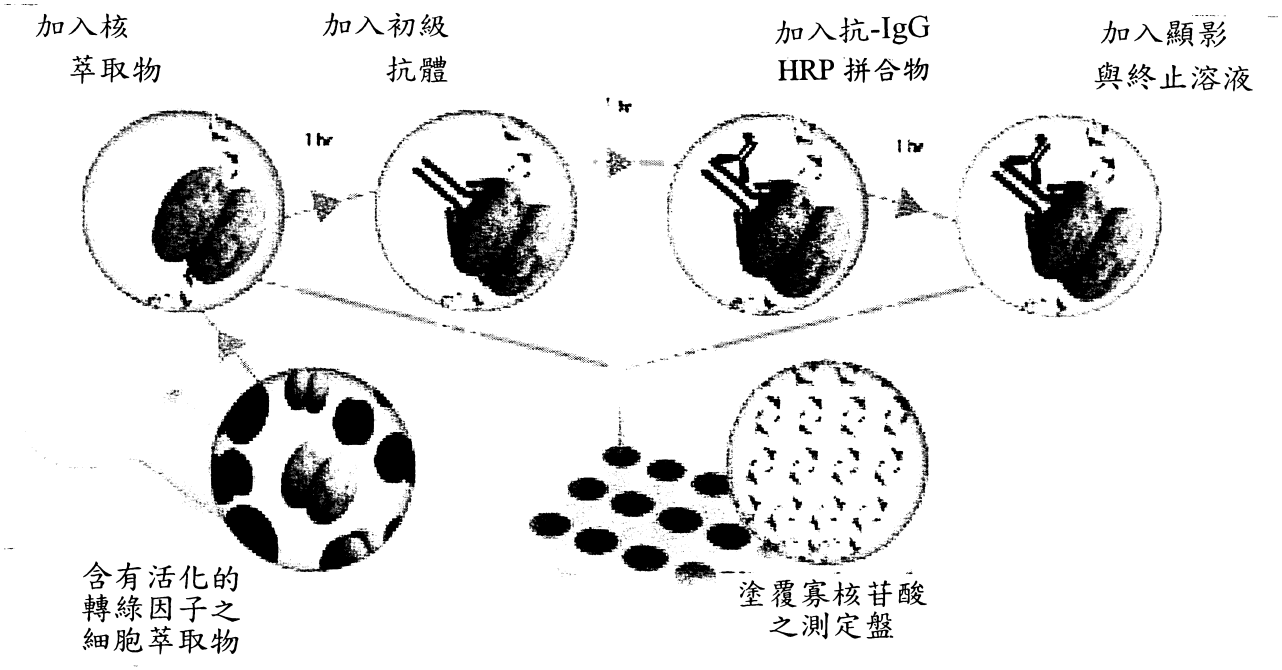


圖 8

200817027

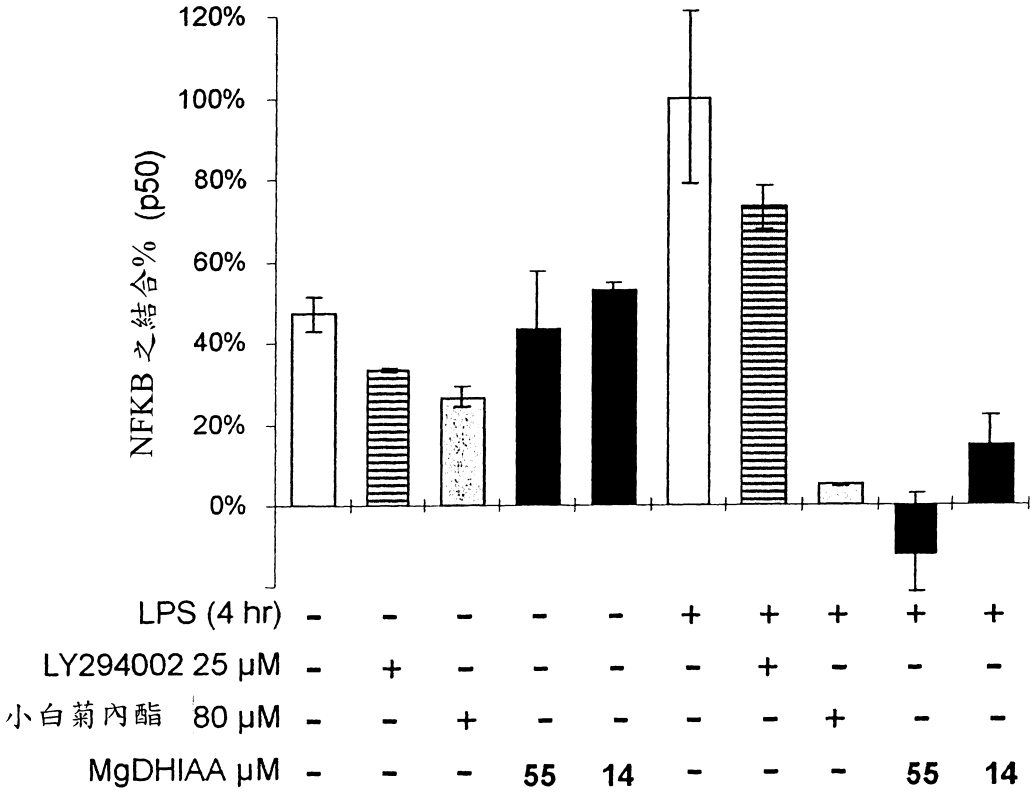

120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
NFKB 之結合% (p50)
LPS (4 hr) - - - - - + + + + +
LY294002 25 μM - + - - - - + - - -
小白菊內酯 80 μM - - + - - - - + - -
MgDHIAA μM - - - 55 14 - - - 55 14

圖 9

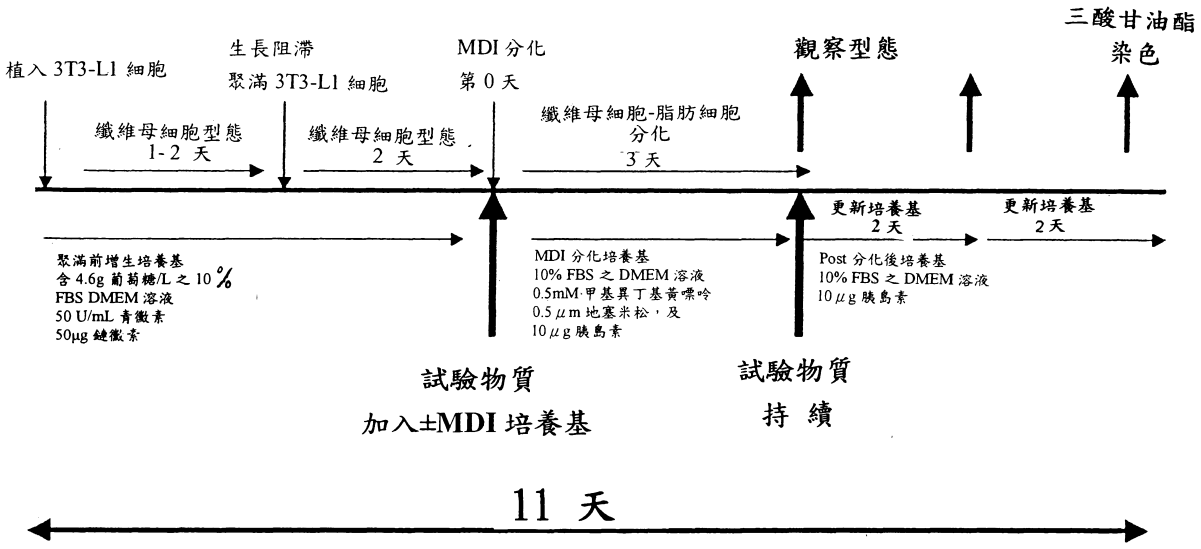

植入 3T3-L1 細胞
生長阻滯
聚滿 3T3-L1 細胞
MDI 分化
第 0 天
觀察型態
三酸甘油酯
染色
纖維母細胞型態
1-2 天
纖維母細胞型態
2 天
纖維母細胞-脂肪細胞
分化
3 天
更新培養基
2 天
更新培養基
2 天
聚滿前增生培養基
含 4.6g 葡萄糖/L 之 10 %
FBS DMEM 溶液
50 U/mL 青黴素
50μg 鏈黴素
MDI 分化培養基
10% FBS 之 DMEM 溶液
0.5mM 甲基異丁基黃嘌呤
0.5 μm 地塞米松，及
10 μg 胰島素
Post 分化後培養基
10% FBS 之 DMEM 溶液
10 μg 胰島素
試驗物質
加入±MDI 培養基
試驗物質
持 續
11 天

圖 10

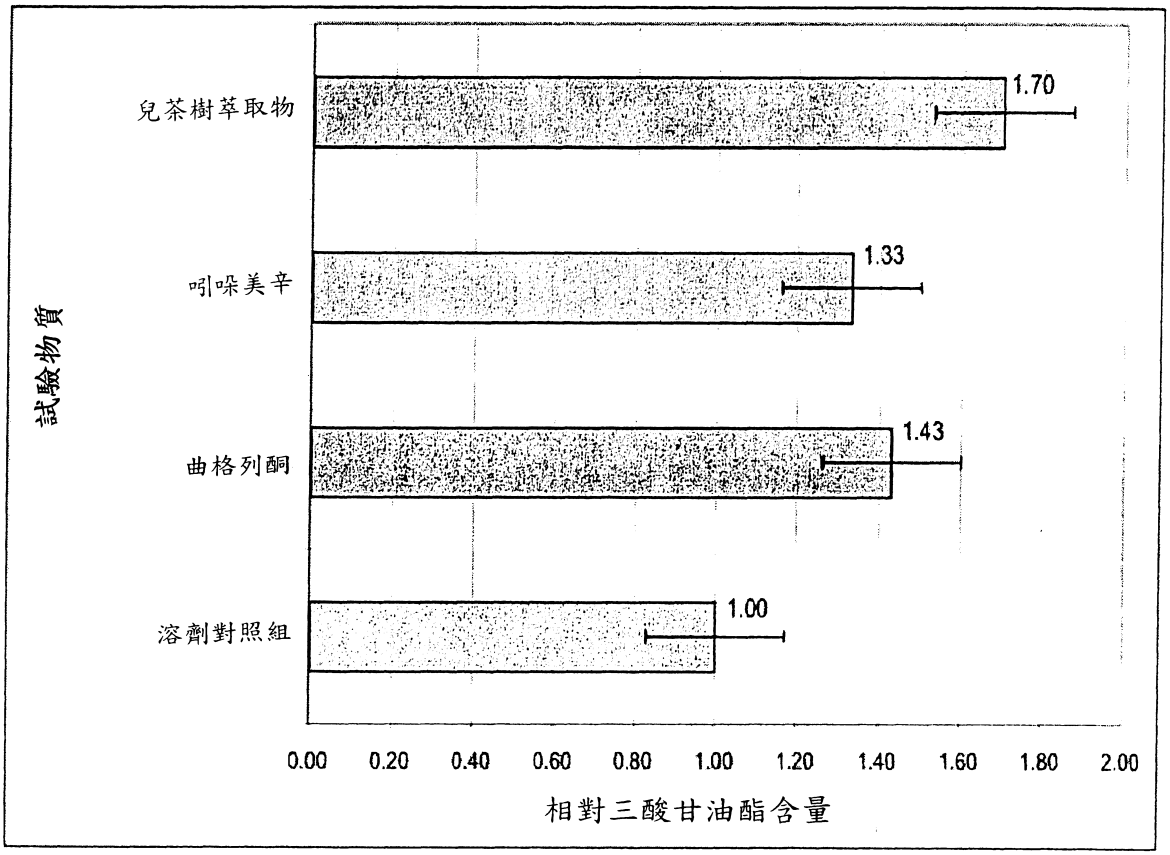

兒茶樹萃取物
吲哚美辛
曲格列酮
溶劑對照組
1.70
1.33
1.43
1.00
試驗物質
0.00
0.20
0.40
0.60
0.80
1.00
1.20
1.40
1.60
1.80
2.00
相對三酸甘油酯含量

圖 11

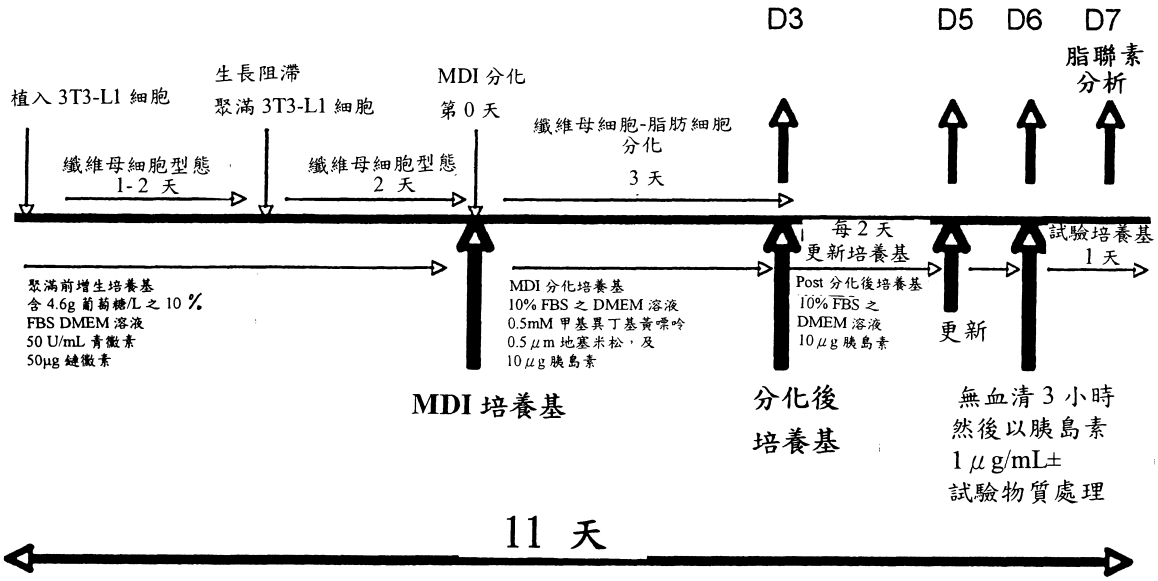

D3
D5
D6
D7
脂聯素
分析
植入 3T3-L1 細胞
生長阻滯
聚滿 3T3-L1 細胞
MDI 分化
第 0 天
纖維母細胞型態
1-2 天
纖維母細胞型態
2 天
纖維母細胞-脂肪細胞
分化
3 天
每 2 天
更新培養基
試驗培養基
1 天
聚滿前增生培養基
含 4.6g 葡萄糖/L 之 10 %
FBS DMEM 溶液
50 U/mL 青黴素
50μg 鏈黴素
MDI 分化培養基
10% FBS 之 DMEM 溶液
0.5mM 甲基異丁基黃嘌呤
0.5 μm 地塞米松，及
10 μg 胰島素
Post 分化後培養基
10% FBS 之
DMEM 溶液
10 μg 胰島素
更新
MDI 培養基
分化後
培養基
無血清 3 小時
然後以胰島素
1 μg/mL±
試驗物質處理
11 天

圖 12

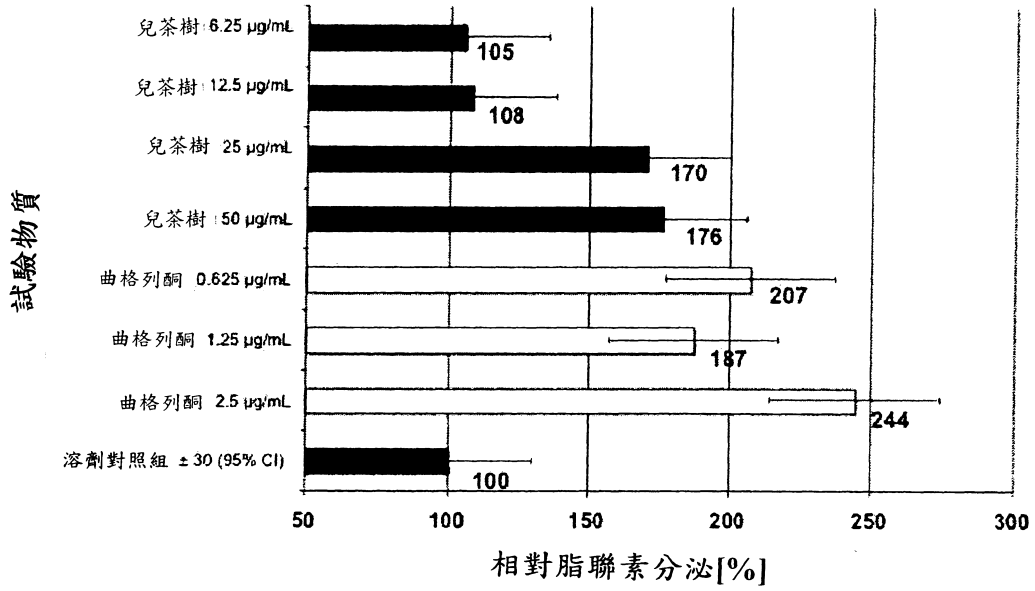

兒茶樹 6.25 μg/mL
105
兒茶樹 12.5 μg/mL
108
兒茶樹 25 μg/mL
170
兒茶樹 50 μg/mL
176
曲格列酮 0.625 μg/mL
207
曲格列酮 1.25 μg/mL
187
曲格列酮 2.5 μg/mL
244
溶劑對照組 ± 30 (95% CI)
100
試驗物質
50
100
150
200
250
300
相對脂聯素分泌[%]

圖 13

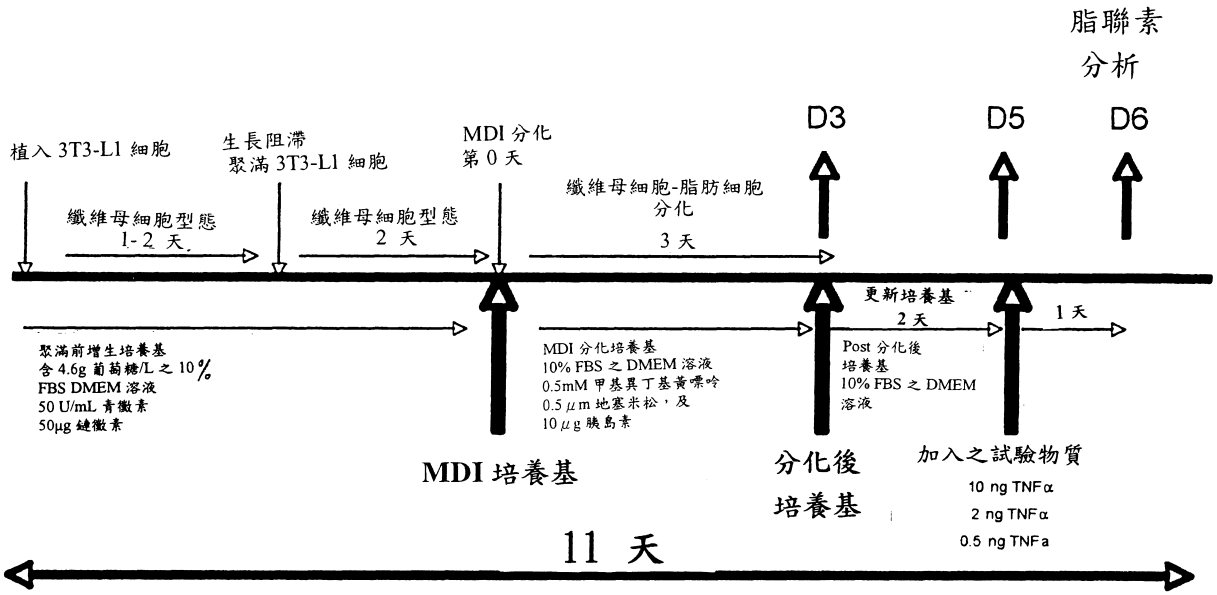

脂聯素
分析
D3
D5
D6
植入 3T3-L1 細胞
生長阻滯
聚滿 3T3-L1 細胞
MDI 分化
第 0 天
纖維母細胞型態
1-2 天
纖維母細胞型態
2 天
纖維母細胞-脂肪細胞
分化
3 天
更新培養基
2 天
1 天
聚滿前增生培養基
含 4.6g 葡萄糖/L 之 10%
FBS DMEM 溶液
50 U/mL 青黴素
50μg 鏈黴素
MDI 分化培養基
10% FBS 之 DMEM 溶液
0.5mM 甲基異丁基黃嘌呤
0.5μm 地塞米松，及
10μg 胰島素
Post 分化後
培養基
10% FBS 之 DMEM
溶液
MDI 培養基
分化後
培養基
加入之試驗物質
10 ng TNFα
2 ng TNFα
0.5 ng TNFa
11 天

圖 14

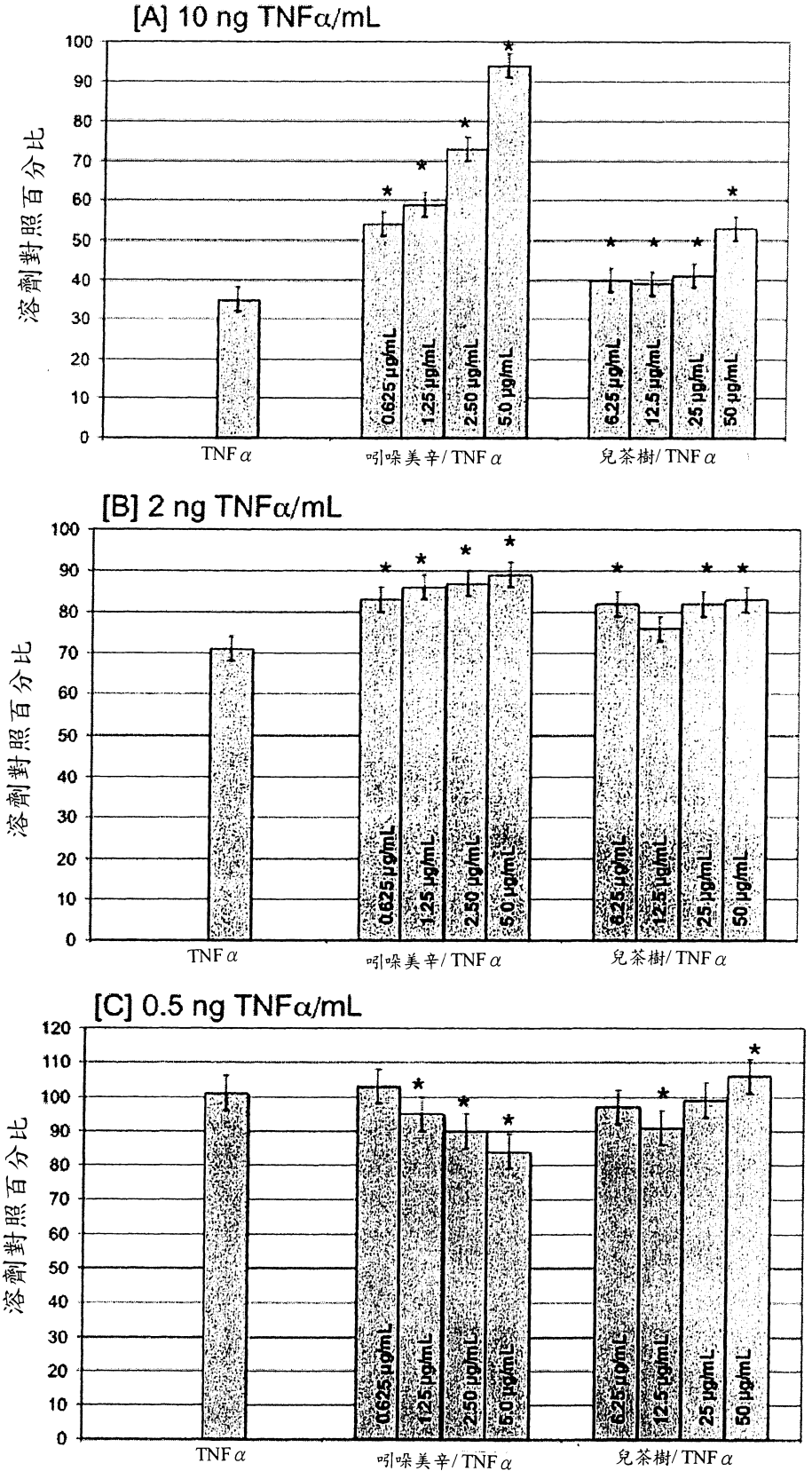

[A] 10 ng TNFα/mL
溶劑對照百分比
TNF α
吲哚美辛/ TNF α
兒茶樹/ TNF α
0.625 μg/mL
1.25 μg/mL
2.50 μg/mL
5.0 μg/mL
6.25 μg/mL
12.5 μg/mL
25 μg/mL
50 μg/mL
[B] 2 ng TNFα/mL
溶劑對照百分比
TNF α
吲哚美辛/ TNF α
兒茶樹/ TNF α
[C] 0.5 ng TNFα/mL
溶劑對照百分比
TNF α
吲哚美辛/ TNF α
兒茶樹/ TNF α

圖 15

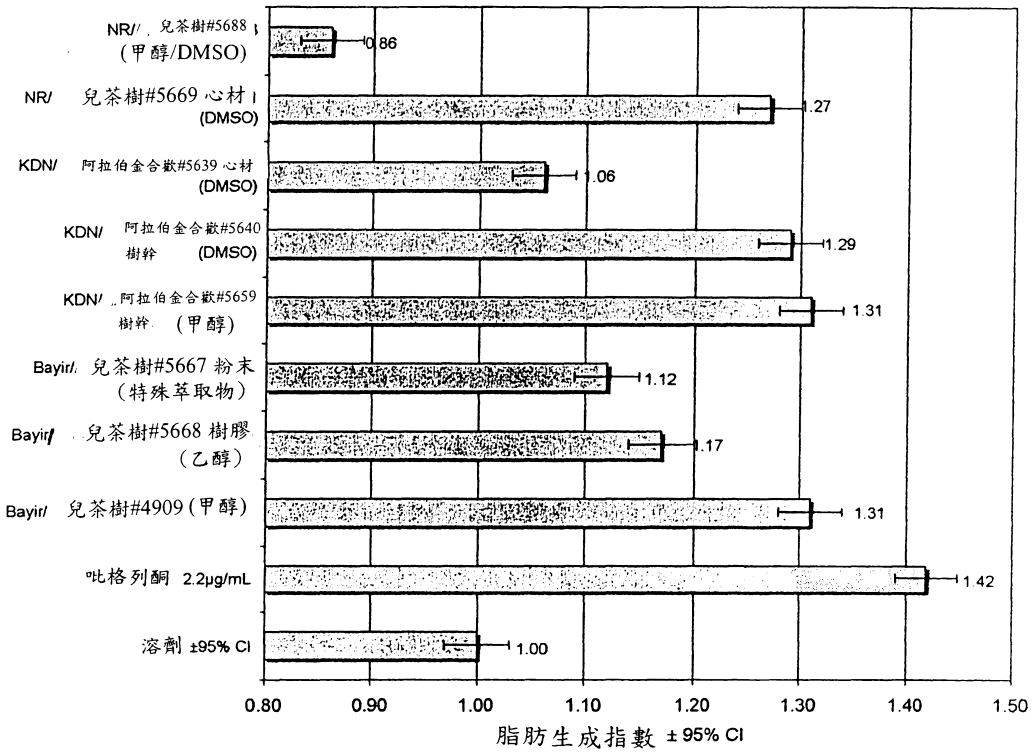

NR/ 兒茶樹#5688
(甲醇/DMSO)
0.86
NR/ 兒茶樹#5669 心材
(DMSO)
1.27
KDN/ 阿拉伯金合歡#5639 心材
(DMSO)
1.06
KDN/ 阿拉伯金合歡#5640
樹幹 (DMSO)
1.29
KDN/ 阿拉伯金合歡#5659
樹幹 (甲醇)
1.31
Bayir/ 兒茶樹#5667 粉末
(特殊萃取物)
1.12
Bayir/ 兒茶樹#5668 樹膠
(乙醇)
1.17
Bayir/ 兒茶樹#4909 (甲醇)
1.31
吡格列酮 2.2μg/mL
1.42
溶劑 ±95% CI
1.00
0.80
0.90
1.00
1.10
1.20
1.30
1.40
1.50
脂肪生成指數 ± 95% CI

圖 16

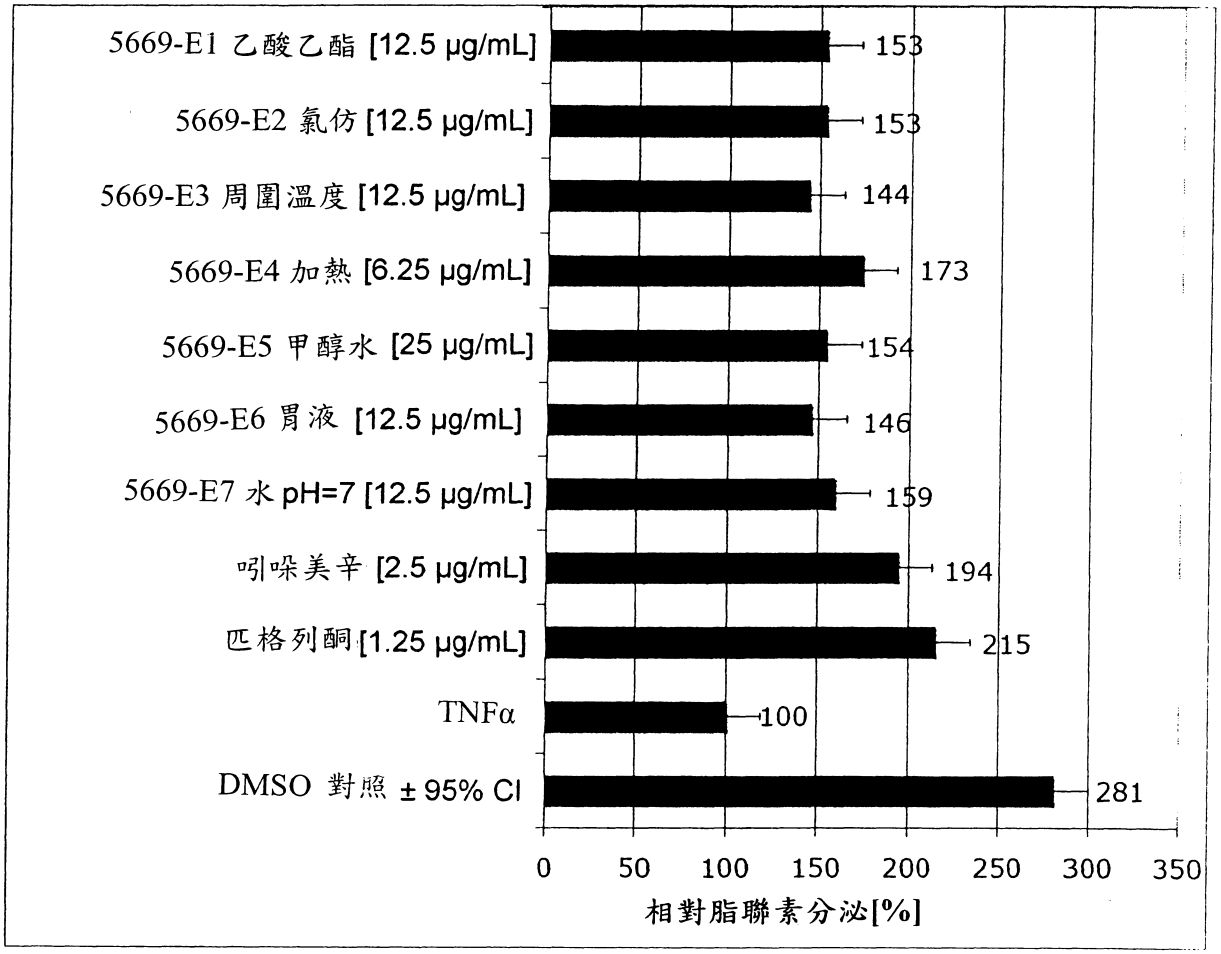

5669-E1 乙酸乙酯 [12.5 µg/mL]
153
5669-E2 氯仿 [12.5 µg/mL]
153
5669-E3 周圍溫度 [12.5 µg/mL]
144
5669-E4 加熱 [6.25 µg/mL]
173
5669-E5 甲醇水 [25 µg/mL]
154
5669-E6 胃液 [12.5 µg/mL]
146
5669-E7 水 pH=7 [12.5 µg/mL]
159
吲哚美辛 [2.5 µg/mL]
194
匹格列酮 [1.25 µg/mL]
215
TNFα
100
DMSO 對照 ± 95% CI
281
0
50
100
150
200
250
300
350
相對脂聯素分泌[%]

圖 17

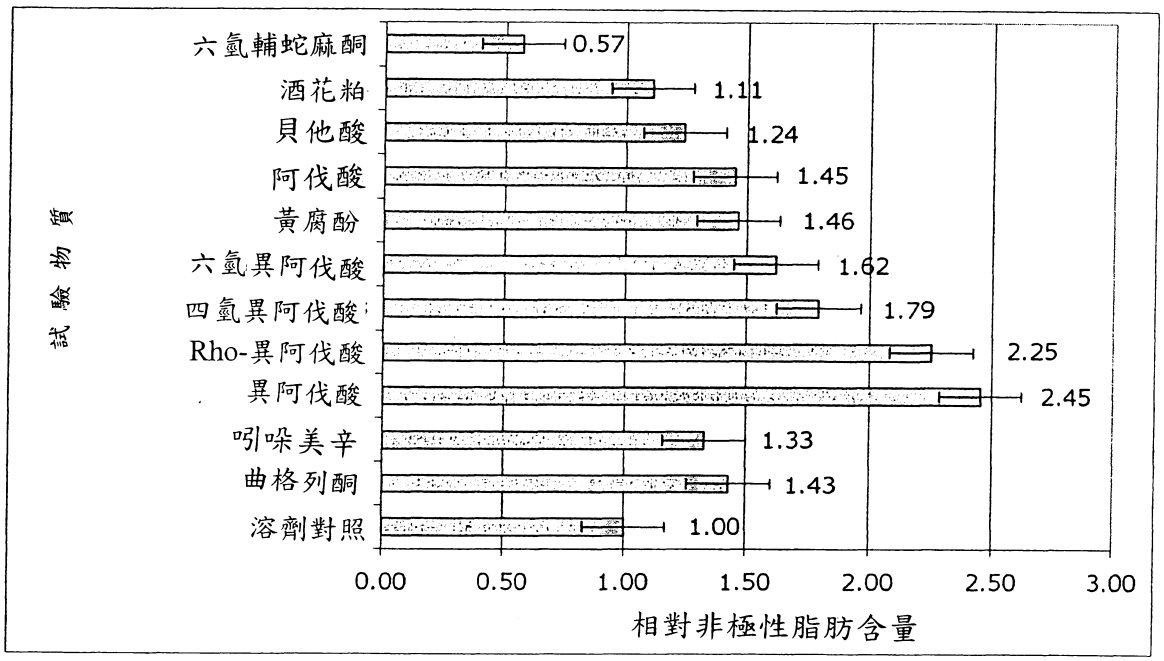

試驗物質
六氫輔蛇麻酮
酒花粕
貝他酸
阿伐酸
黃腐酚
六氫異阿伐酸
四氫異阿伐酸
Rho-異阿伐酸
異阿伐酸
吲哚美辛
曲格列酮
溶劑對照
0.57
1.11
1.24
1.45
1.46
1.62
1.79
2.25
2.45
1.33
1.43
1.00
0.00
0.50
1.00
1.50
2.00
2.50
3.00
相對非極性脂肪含量

圖 18

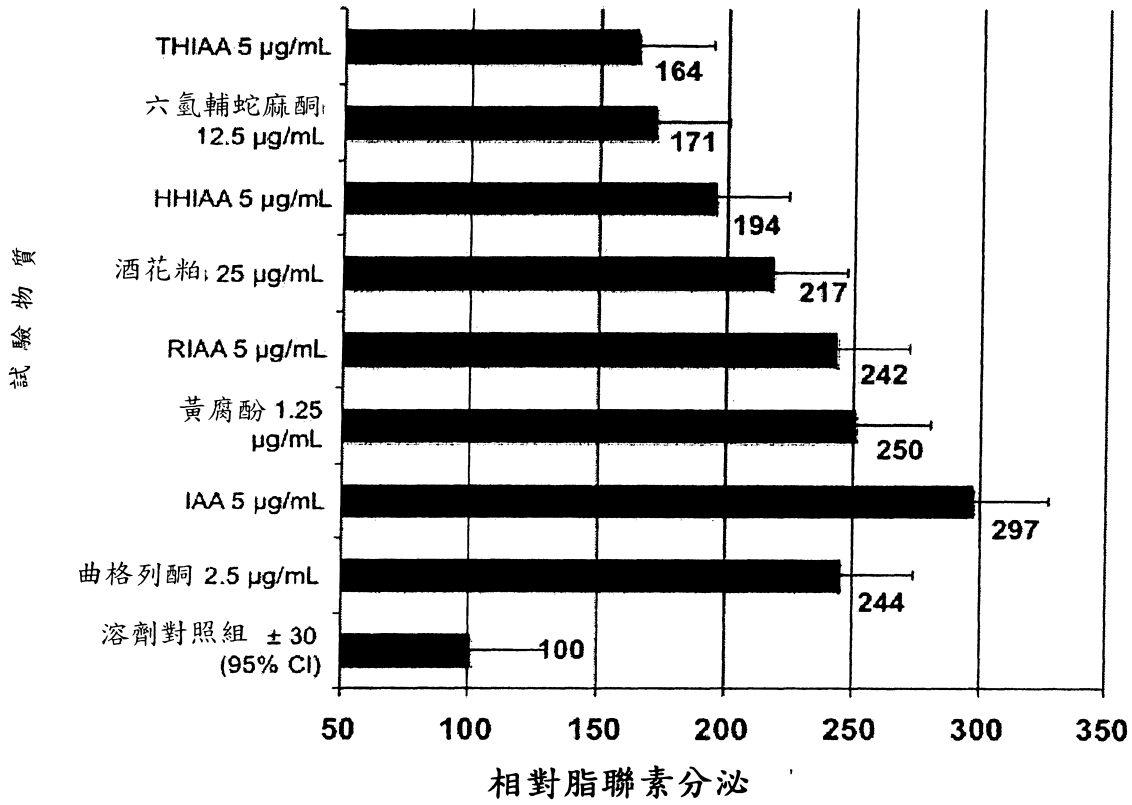

試驗物質
THIAA 5 µg/mL
六氫輔蛇麻酮 12.5 µg/mL
HHIAA 5 µg/mL
酒花粕 25 µg/mL
RIAA 5 µg/mL
黃腐酚 1.25 µg/mL
IAA 5 µg/mL
曲格列酮 2.5 µg/mL
溶劑對照組 ± 30 (95% CI)
164
171
194
217
242
250
297
244
100
50
100
150
200
250
300
350
相對脂聯素分泌

圖 19

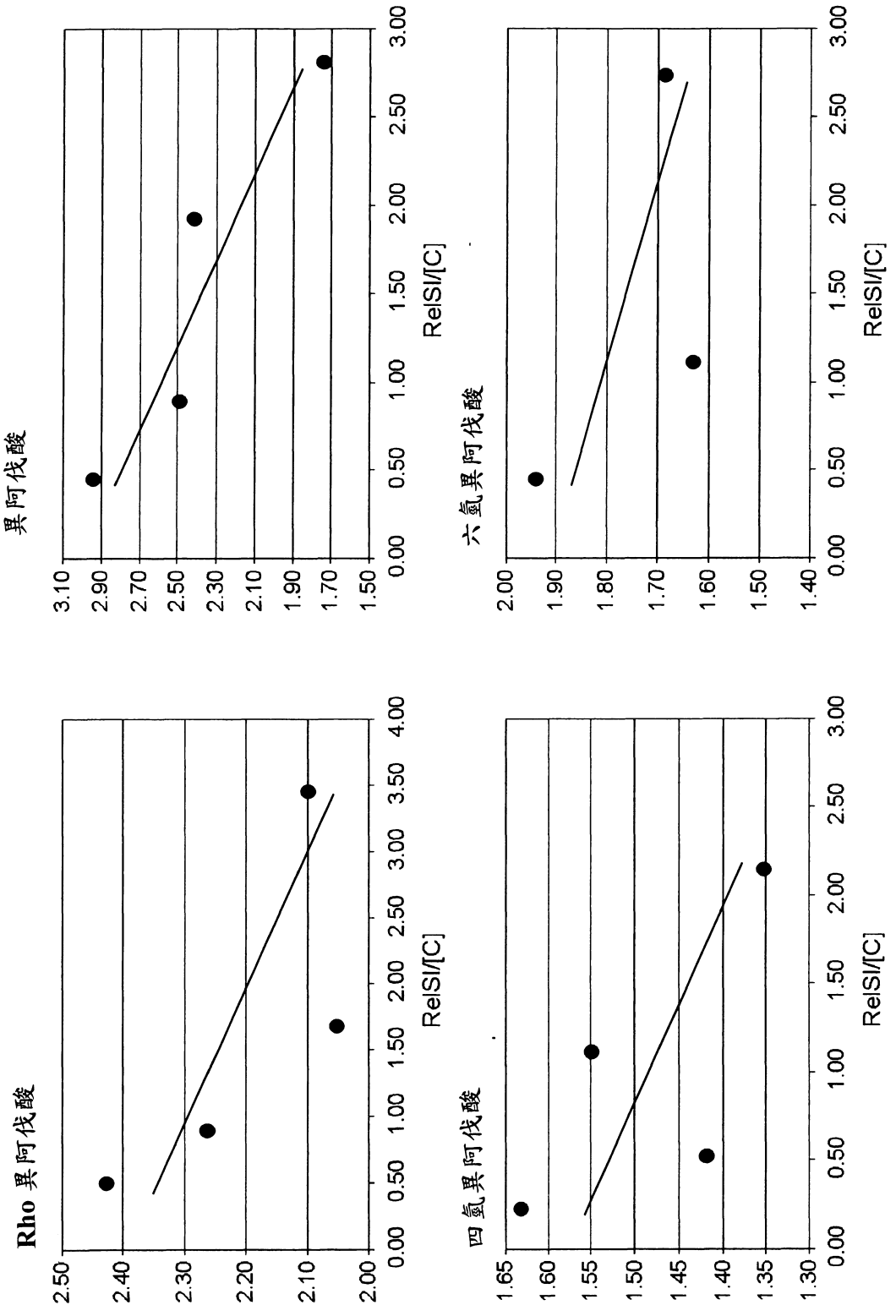


圖 20

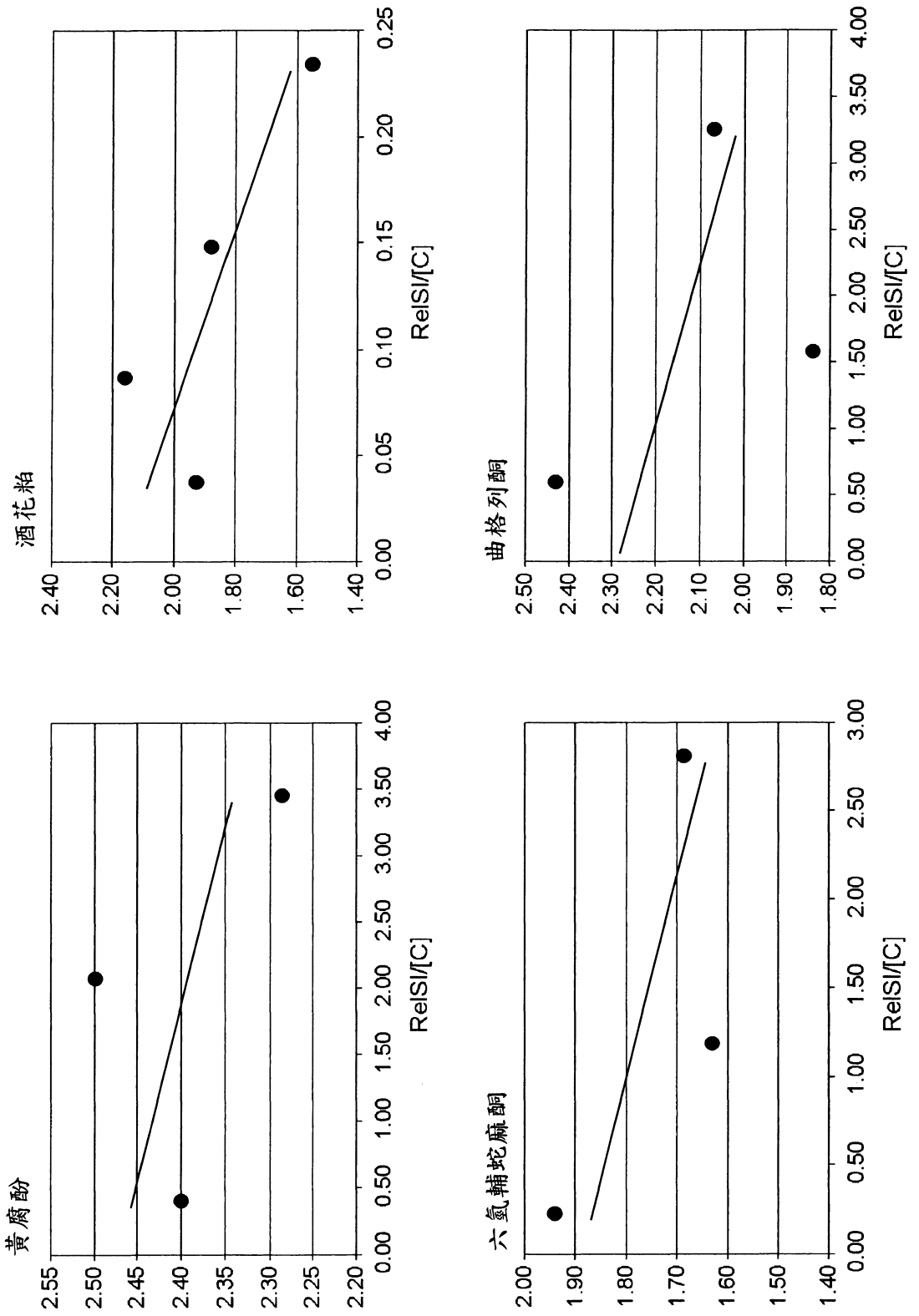
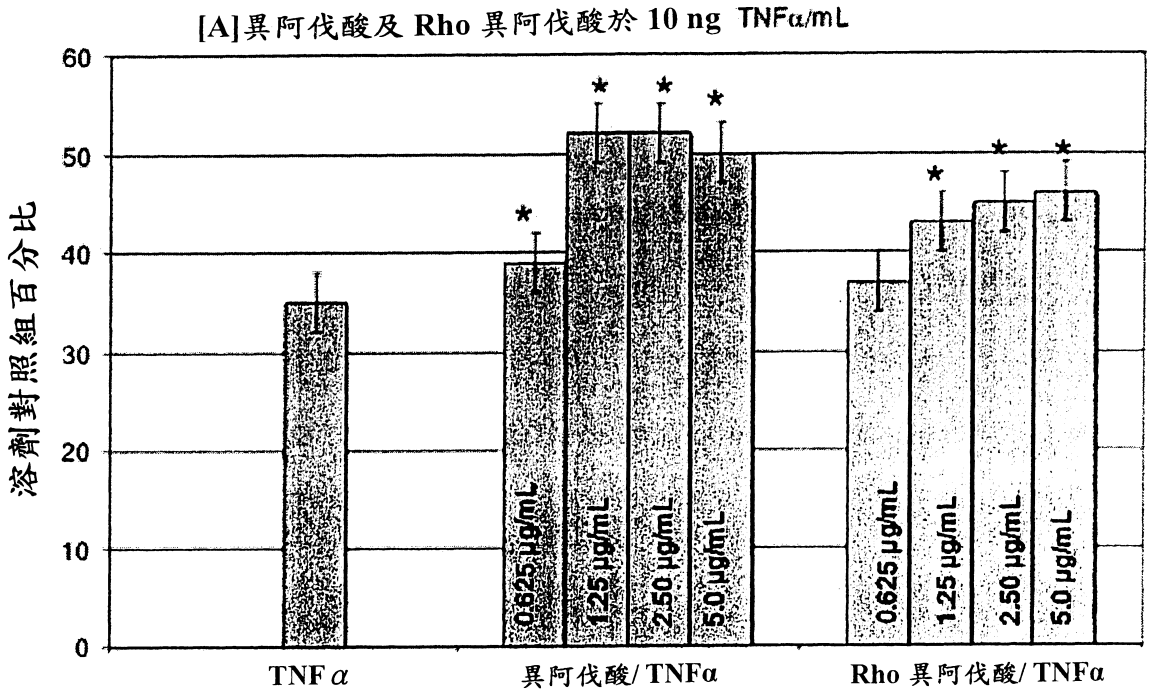


圖 20 (續)


[A]異阿伐酸及 Rho 異阿伐酸於 10 ng TNFα/mL
溶劑對照組百分比
60
50
40
30
20
10
0
0.625 µg/mL
1.25 µg/mL
2.50 µg/mL
5.0 µg/mL
TNF α
異阿伐酸/ TNFα
Rho 異阿伐酸/ TNFα

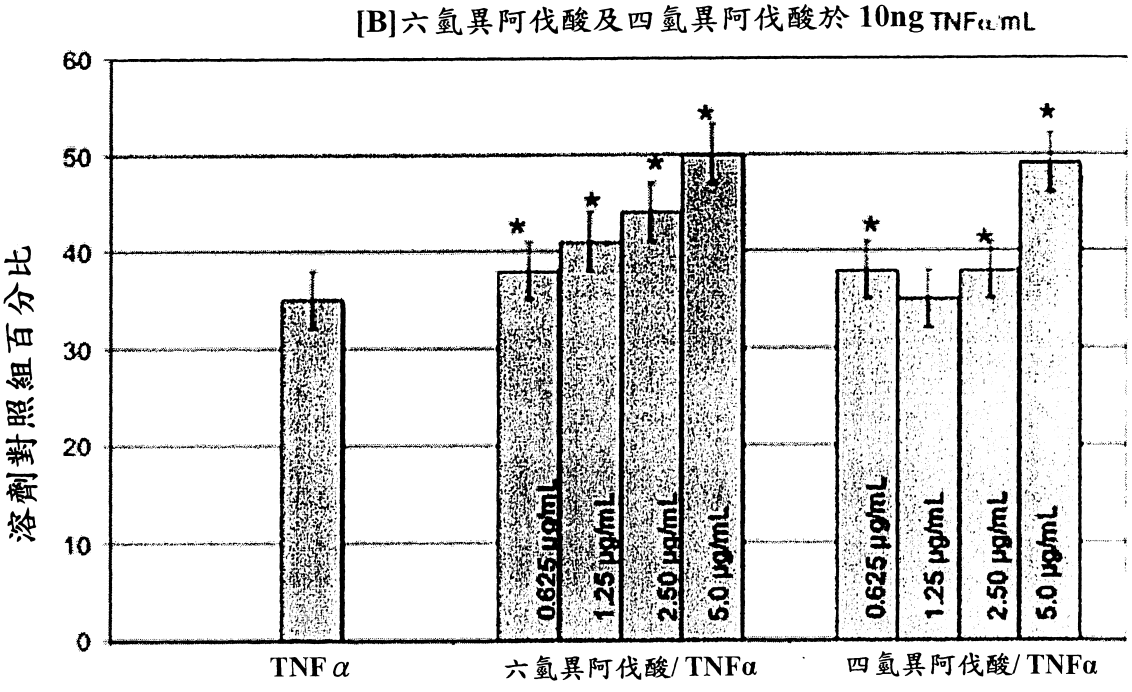

[B]六氫異阿伐酸及四氫異阿伐酸於 10ng TNFα/mL
溶劑對照組百分比
60
50
40
30
20
10
0
0.625 µg/mL
1.25 µg/mL
2.50 µg/mL
5.0 µg/mL
TNF α
六氫異阿伐酸/ TNFα
四氫異阿伐酸/ TNFα

圖 21

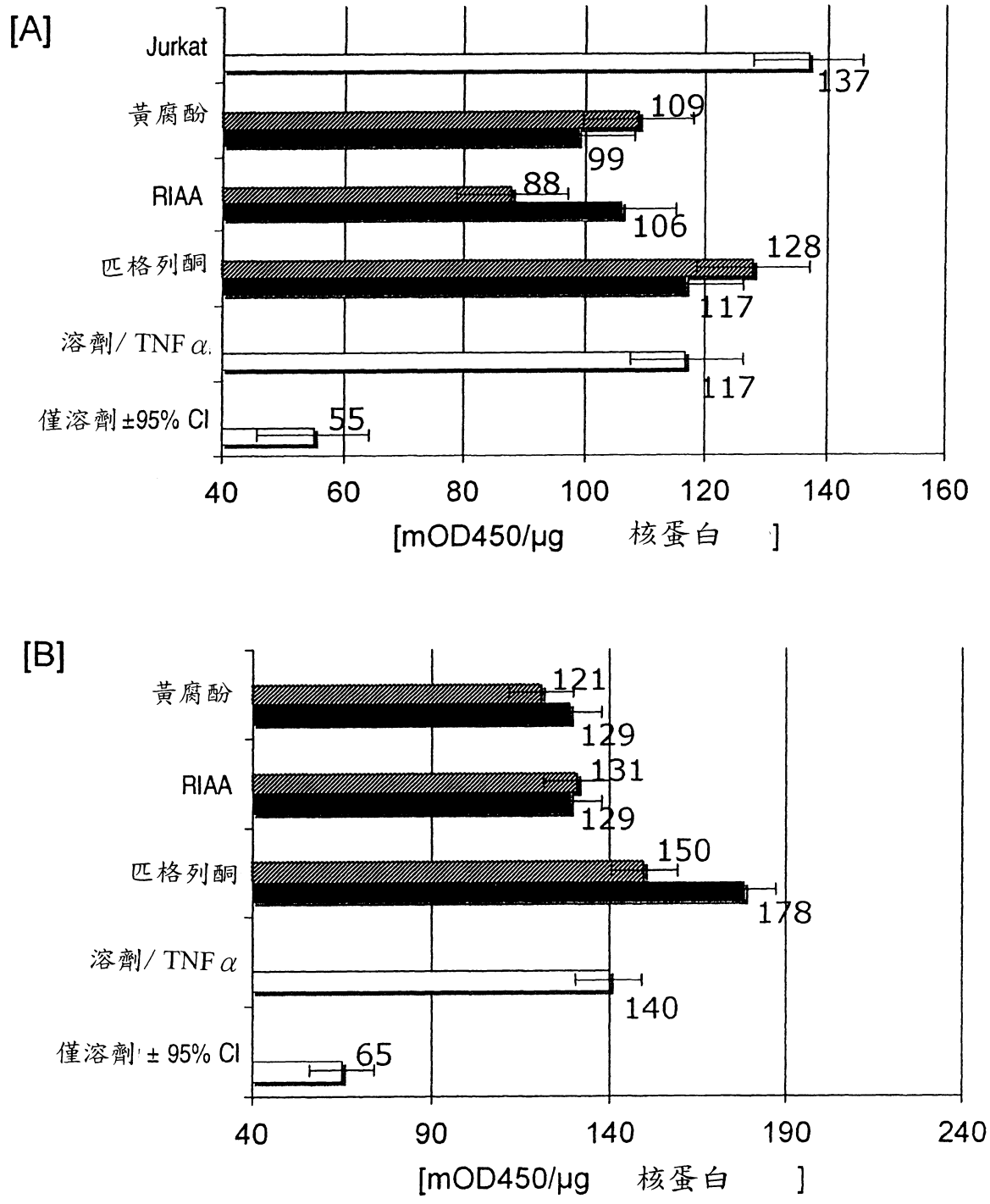

[A]
Jurkat
黃腐酚
RIAA
匹格列酮
溶劑/ TNF α
僅溶劑 ±95% CI
137
109
99
88
106
128
117
117
55
40
60
80
100
120
140
160
[mOD450/μg 核蛋白]
[B]
黃腐酚
RIAA
匹格列酮
溶劑/ TNF α
僅溶劑 ± 95% CI
121
129
131
129
150
178
140
65
40
90
140
190
240
[mOD450/μg 核蛋白]

圖 22

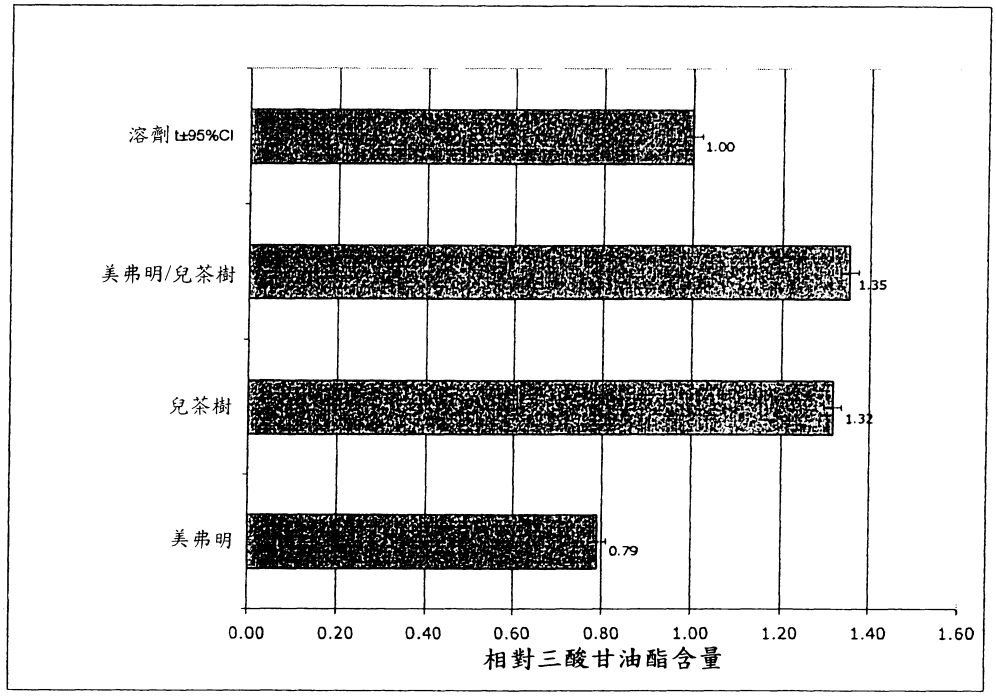
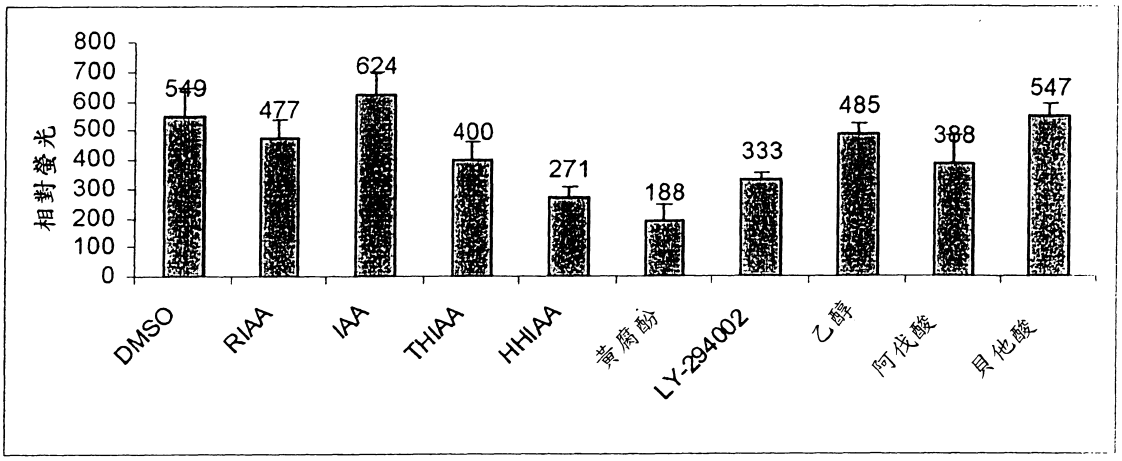

溶劑 ±95%CI
美弗明/兒茶樹
兒茶樹
美弗明
1.00
1.35
1.32
0.79
0.00
0.20
0.40
0.60
0.80
1.00
1.20
1.40
1.60
相對三酸甘油酯含量

圖 23


800
700
600
500
400
300
200
100
0
相對螢光
549
477
624
400
271
188
333
485
388
547
DMSO
RIAA
IAA
THIAA
HHIAA
黃酮酚
LY-294002
乙醇
阿伐酸
貝他酸

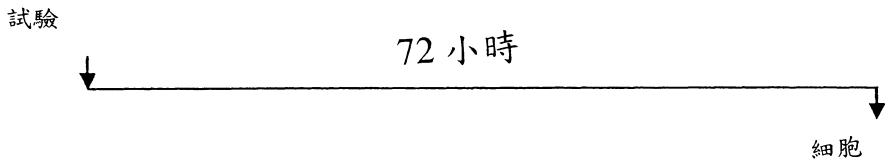

試驗
72 小時
細胞

圖 24

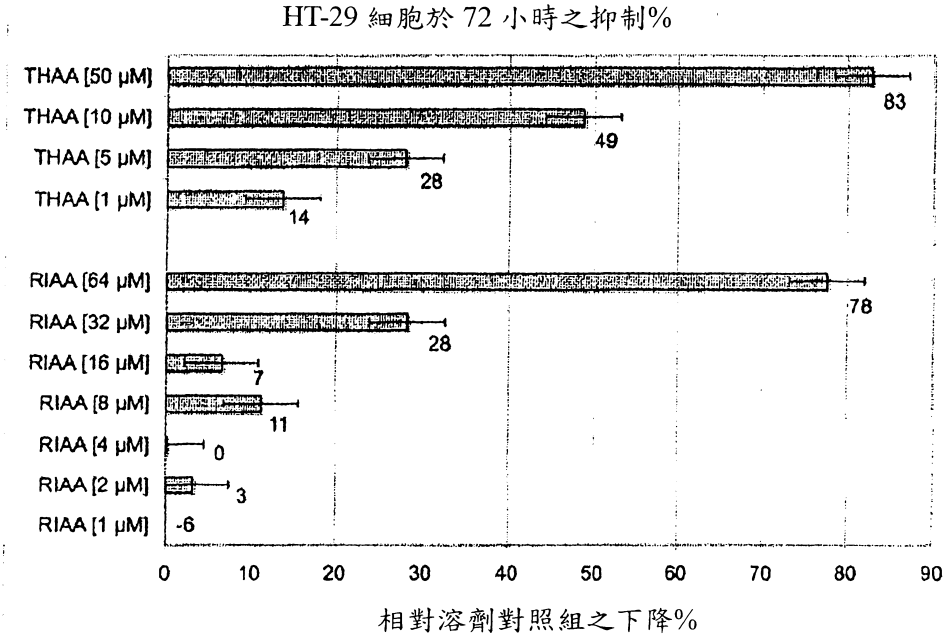

HT-29 細胞於 72 小時之抑制%
THAA [50 μM]
THAA [10 μM]
THAA [5 μM]
THAA [1 μM]
RIAA [64 μM]
RIAA [32 μM]
RIAA [16 μM]
RIAA [8 μM]
RIAA [4 μM]
RIAA [2 μM]
RIAA [1 μM]
83
49
28
14
78
28
7
11
0
3
-6
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
相對溶劑對照組之下降%

圖 25

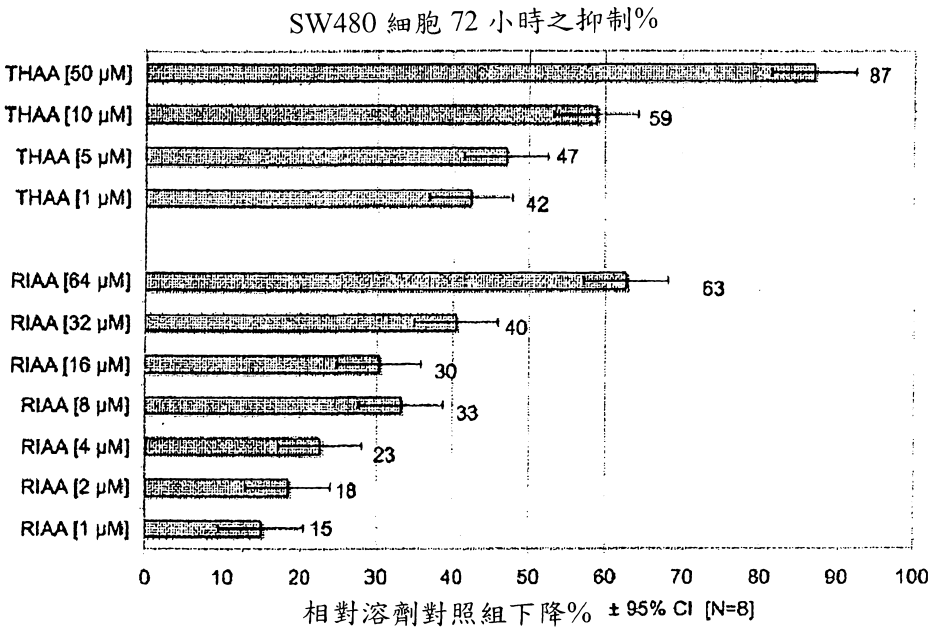

SW480 細胞 72 小時之抑制%
THAA [50 μM]
THAA [10 μM]
THAA [5 μM]
THAA [1 μM]
RIAA [64 μM]
RIAA [32 μM]
RIAA [16 μM]
RIAA [8 μM]
RIAA [4 μM]
RIAA [2 μM]
RIAA [1 μM]
87
59
47
42
63
40
30
33
23
18
15
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
相對溶劑對照組下降% ± 95% CI [N=8]

圖 26

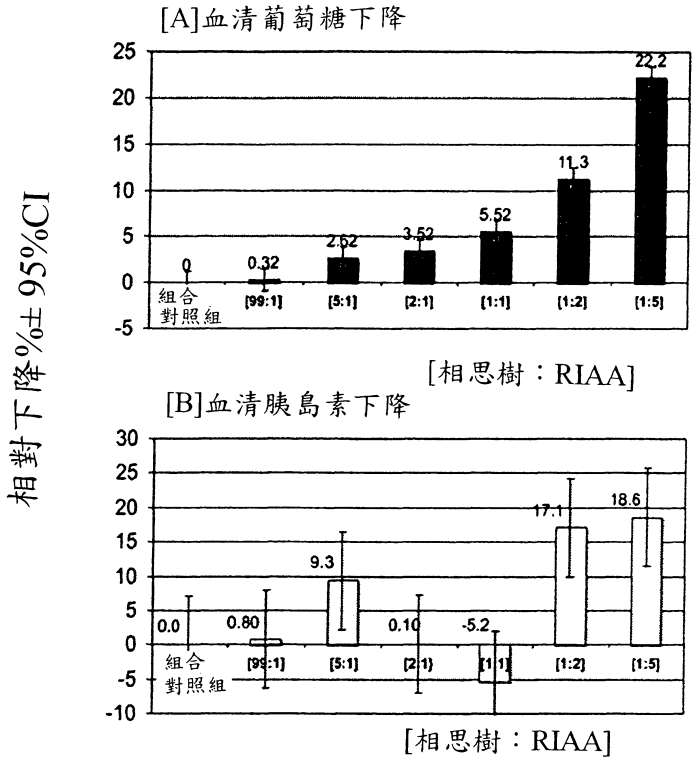

[A]血清葡萄糖下降
相對下降%± 95%CI
25
20
15
10
5
0
-5
0
0.32
2.62
3.52
5.52
11.3
22.2
組合
對照組
[99:1]
[5:1]
[2:1]
[1:1]
[1:2]
[1:5]
[相思樹：RIAA]
[B]血清胰島素下降
30
25
20
15
10
5
0
-5
-10
0.0
0.80
9.3
0.10
-5.2
17.1
18.6
組合
對照組
[99:1]
[5:1]
[2:1]
[1:1]
[1:2]
[1:5]
[相思樹：RIAA]

圖 27

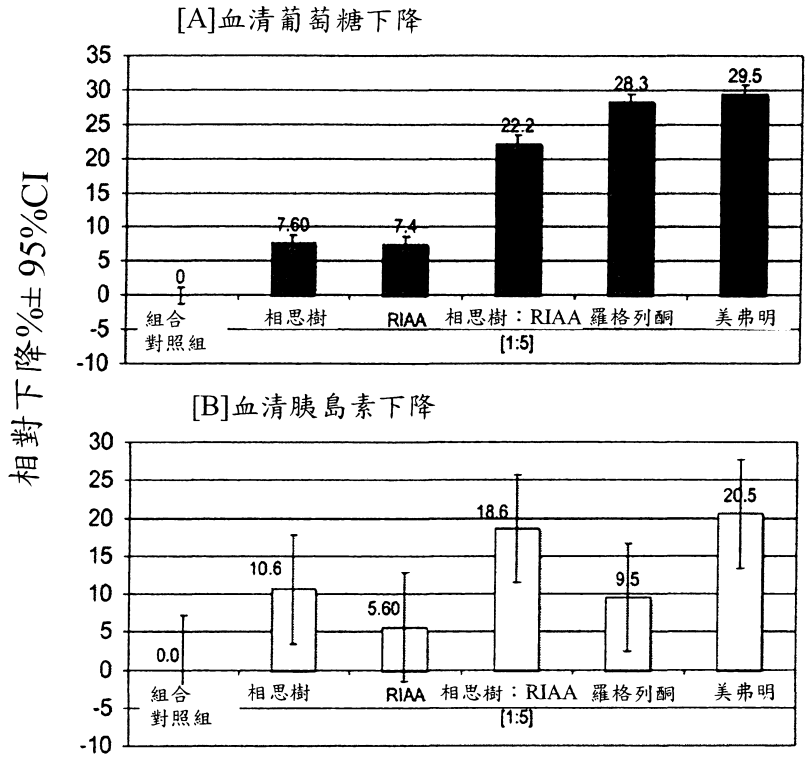

[A]血清葡萄糖下降
相對下降%± 95%CI
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
-10
0
7.60
7.4
22.2
28.3
29.5
組合對照組
相思樹
RIAA
相思樹：RIAA [1:5]
羅格列酮
美弗明
[B]血清胰島素下降
30
25
20
15
10
5
0
-5
-10
0.0
10.6
5.60
18.6
9.5
20.5
組合對照組
相思樹
RIAA
相思樹：RIAA [1:5]
羅格列酮
美弗明

圖 28

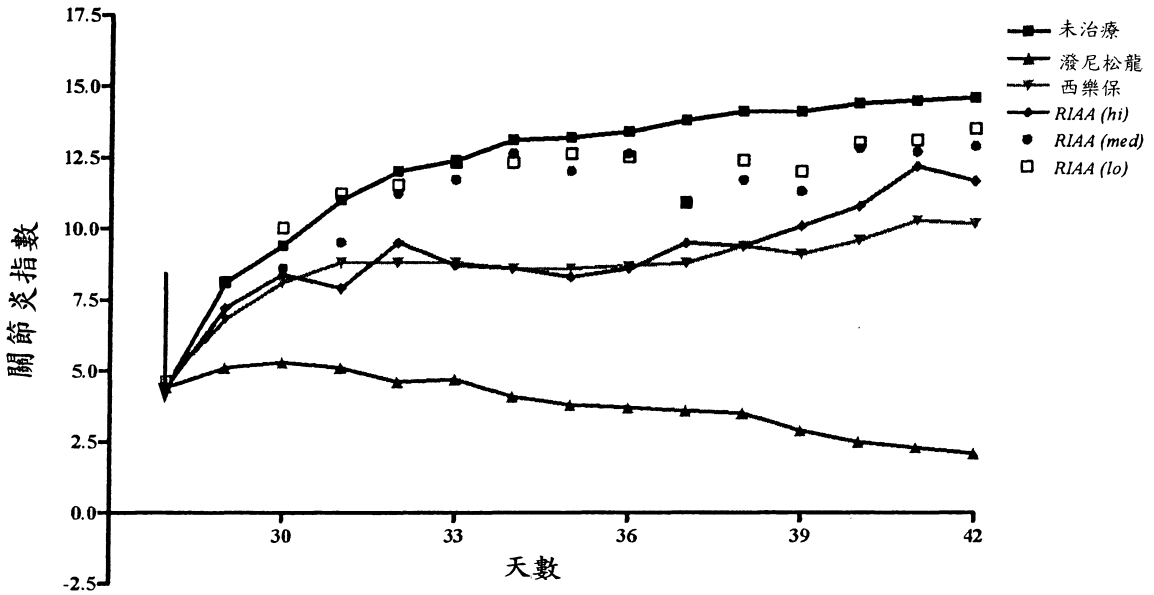

17.5
15.0
12.5
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
-2.5
關節炎指數
30
33
36
39
42
天數
未治療
潑尼松龍
西樂保
RIAA (hi)
RIAA (med)
RIAA (lo)

圖 29

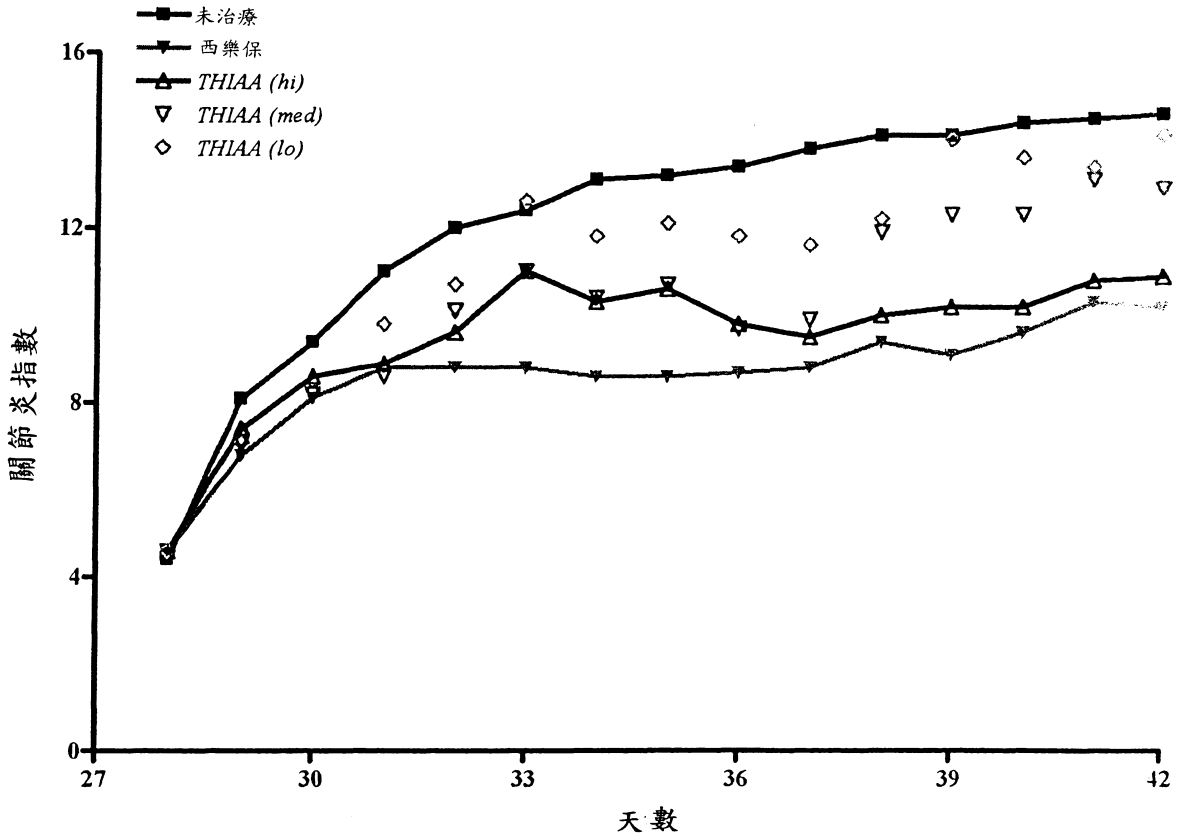

未治療
西樂保
THIAA (hi)
THIAA (med)
THIAA (lo)
關節炎指數
16
12
8
4
0
27
30
33
36
39
42
天數

圖 30

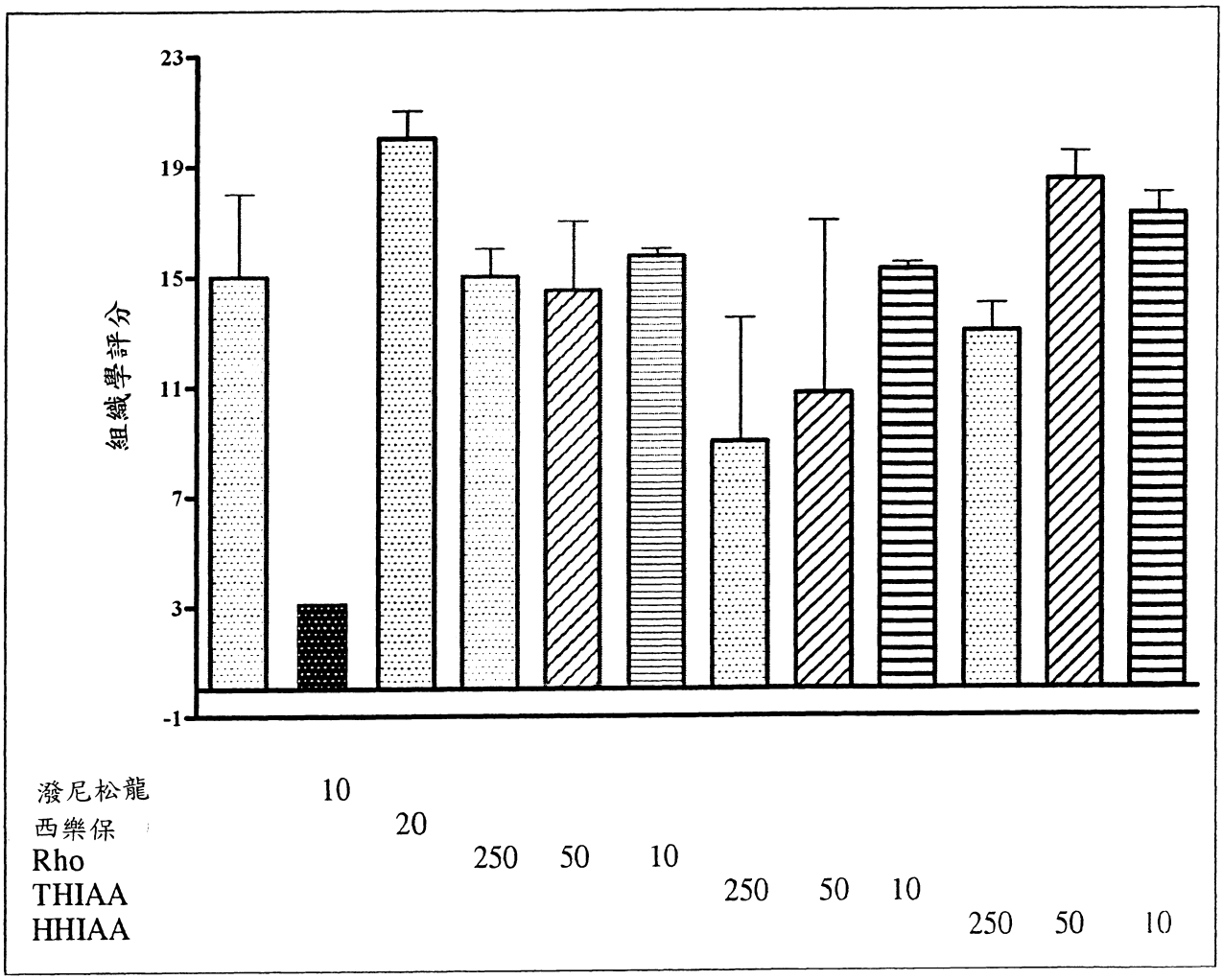

組織學評分
23
19
15
11
7
3
-1
潑尼松龍 10
西樂保 20
Rho 250 50 10
THIAA 250 50 10
HHIAA 250 50 10

圖 31

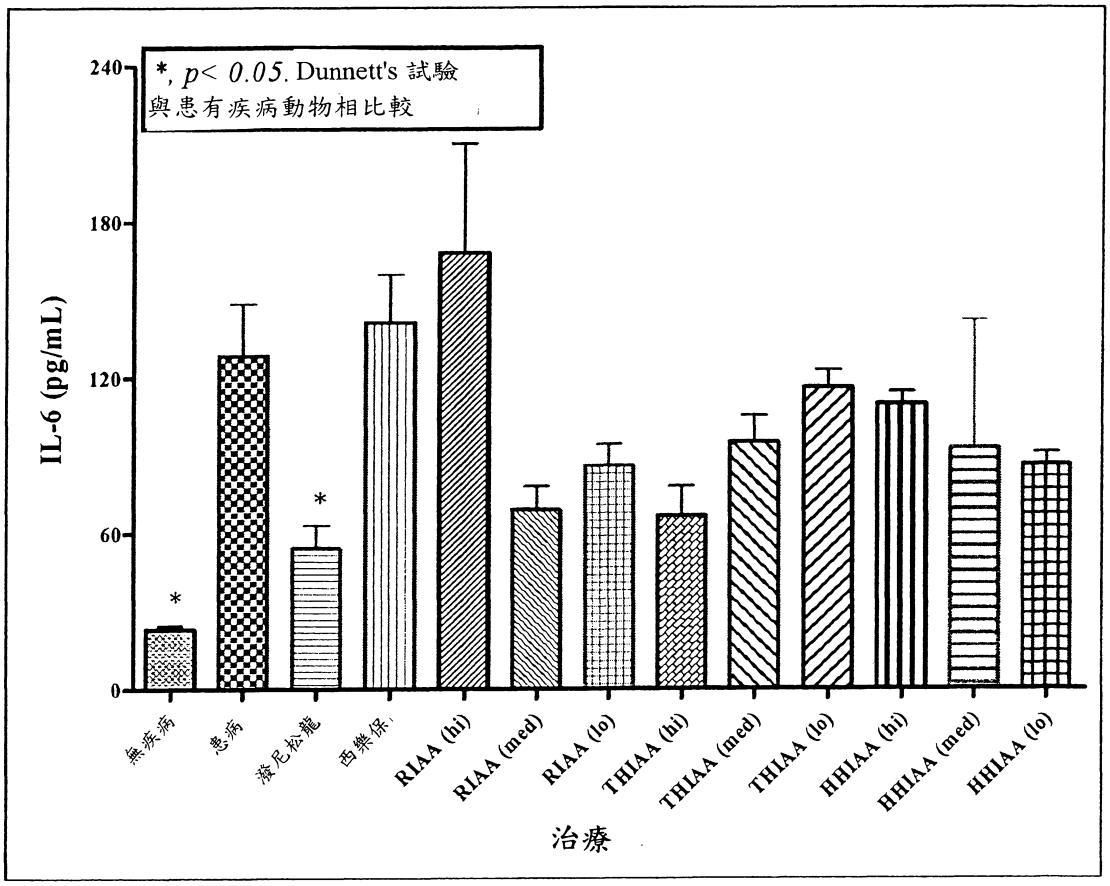
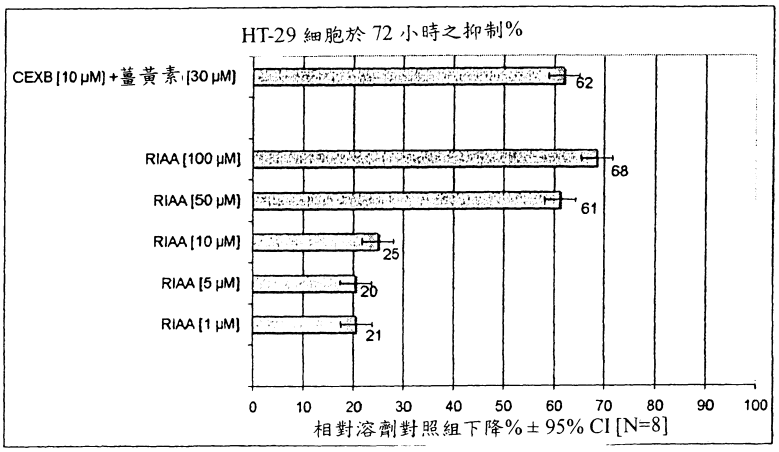
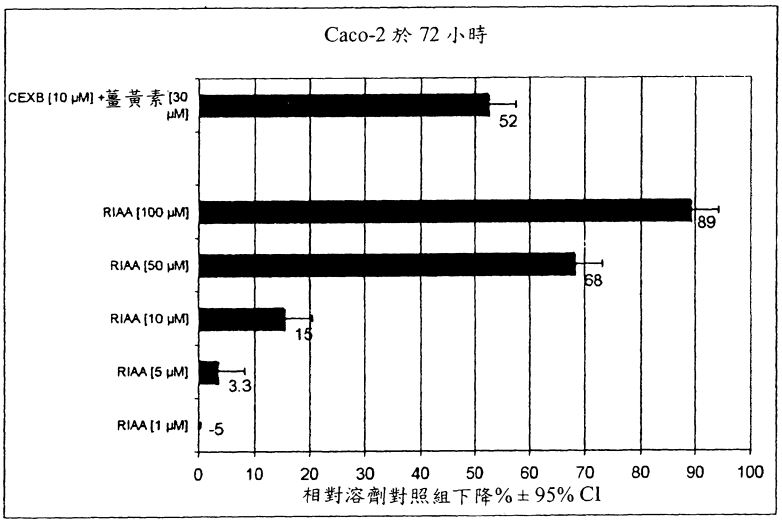

*, p< 0.05. Dunnett's 試驗
與患有疾病動物相比較
IL-6 (pg/mL)
240
180
120
60
0
*
*
無疾病
患病
波尼松龍
西樂保
RIAA (hi)
RIAA (med)
RIAA (lo)
THIAA (hi)
THIAA (med)
THIAA (lo)
HHIAA (hi)
HHIAA (med)
HHIAA (lo)
治療

圖 32

(A)


HT-29 細胞於 72 小時之抑制%
CEXB [10 μM] +薑黃素 [30 μM]
62
RIAA [100 μM]
68
RIAA [50 μM]
61
RIAA [10 μM]
25
RIAA [5 μM]
20
RIAA [1 μM]
21
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
相對溶劑對照組下降% ± 95% CI [N=8]

(B)


Caco-2 於 72 小時
CEXB [10 μM] +薑黃素 [30 μM]
52
RIAA [100 μM]
89
RIAA [50 μM]
68
RIAA [10 μM]
15
RIAA [5 μM]
3.3
RIAA [1 μM]
-5
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
相對溶劑對照組下降% ± 95% CI

(C)

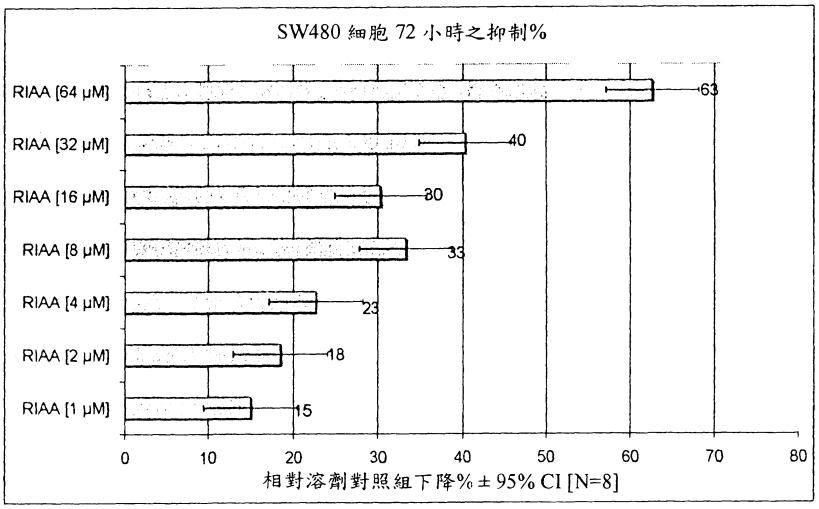
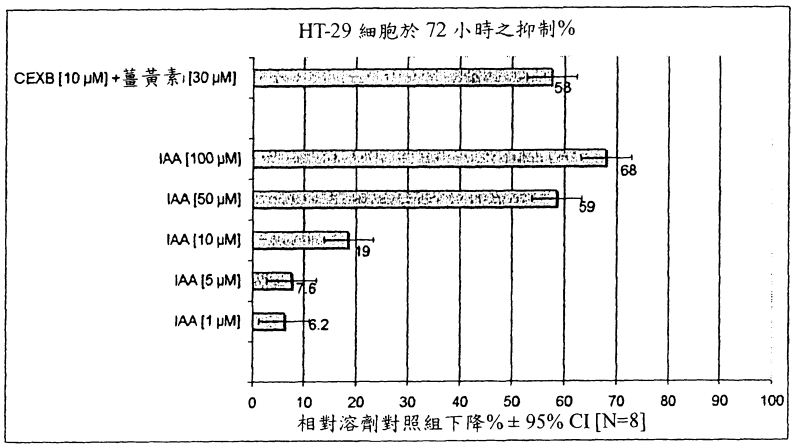
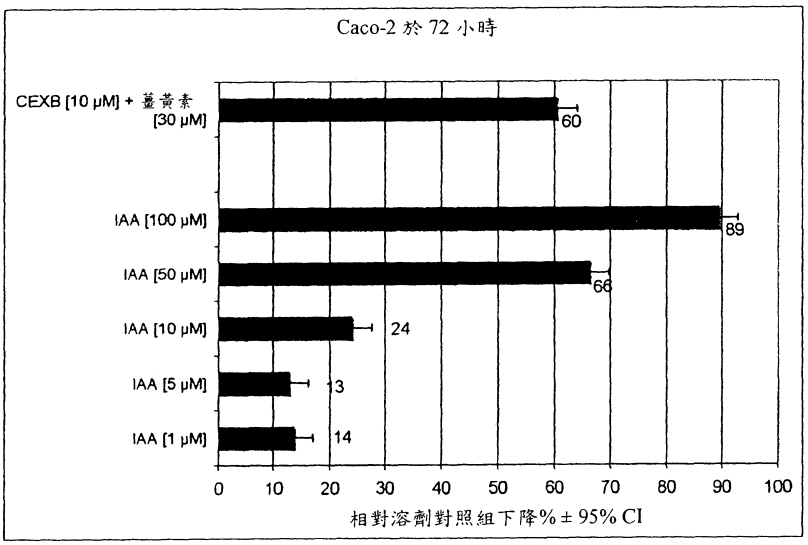

SW480 細胞 72 小時之抑制%
RIAA [64 μM]
63
RIAA [32 μM]
40
RIAA [16 μM]
30
RIAA [8 μM]
33
RIAA [4 μM]
23
RIAA [2 μM]
18
RIAA [1 μM]
15
0 10 20 30 40 50 60 70 80
相對溶劑對照組下降% ± 95% CI [N=8]

圖 37

(A)


HT-29 細胞於 72 小時之抑制%
CEXB [10 μM] + 薑黃素 [30 μM]
58
IAA [100 μM]
68
IAA [50 μM]
59
IAA [10 μM]
19
IAA [5 μM]
7.6
IAA [1 μM]
6.2
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
相對溶劑對照組下降% ± 95% CI [N=8]

(B)


Caco-2 於 72 小時
CEXB [10 μM] + 薑黃素 [30 μM]
60
IAA [100 μM]
89
IAA [50 μM]
66
IAA [10 μM]
24
IAA [5 μM]
13
IAA [1 μM]
14
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
相對溶劑對照組下降% ± 95% CI

(C)

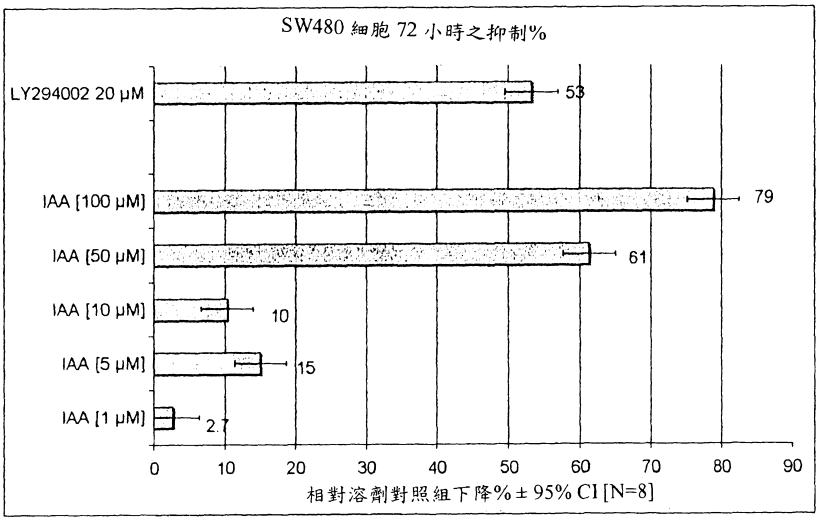
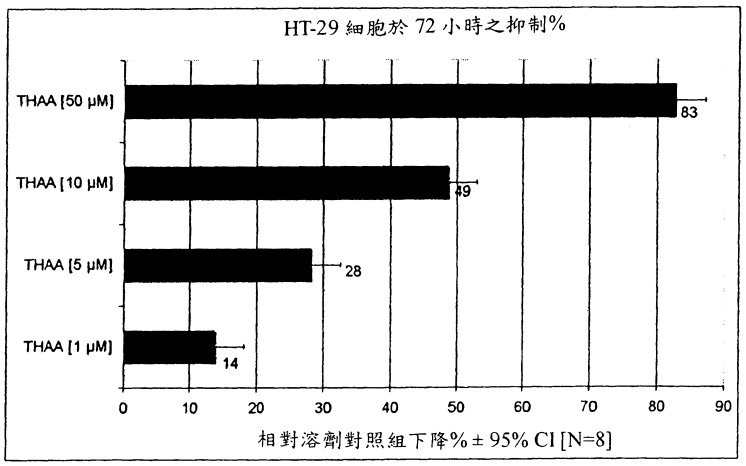
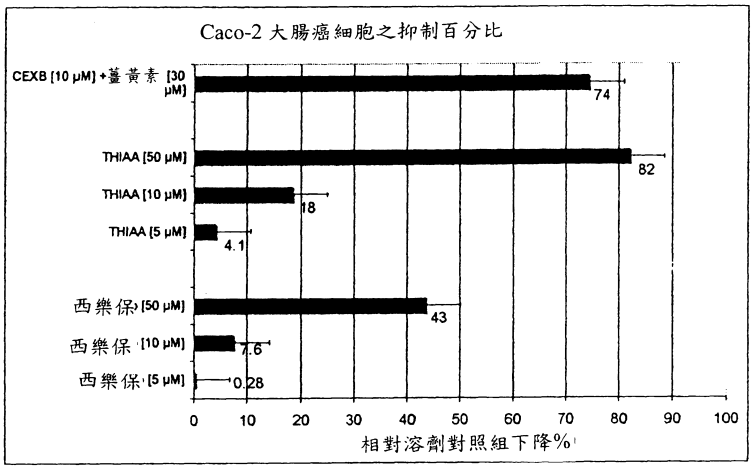

SW480 細胞 72 小時之抑制%
LY294002 20 μM
53
IAA [100 μM]
79
IAA [50 μM]
61
IAA [10 μM]
10
IAA [5 μM]
15
IAA [1 μM]
2.7
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90
相對溶劑對照組下降% ± 95% CI [N=8]

圖 38

(A)


HT-29 細胞於 72 小時之抑制%
THAA [50 μM]
THAA [10 μM]
THAA [5 μM]
THAA [1 μM]
83
49
28
14
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
相對溶劑對照組下降% ± 95% CI [N=8]

(B)


Caco-2 大腸癌細胞之抑制百分比
CEXB [10 μM] + 薑黃素 [30 μM]
THIAA [50 μM]
THIAA [10 μM]
THIAA [5 μM]
西樂保 [50 μM]
西樂保 [10 μM]
西樂保 [5 μM]
74
82
18
4.1
43
7.6
0.28
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
相對溶劑對照組下降%

(C)

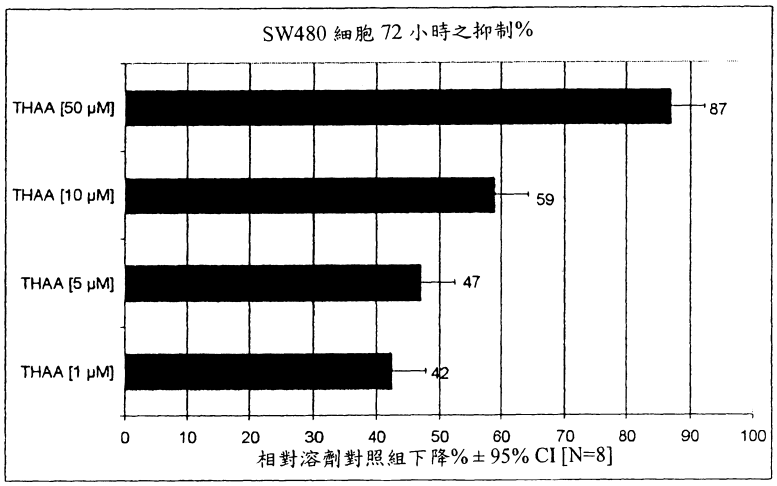
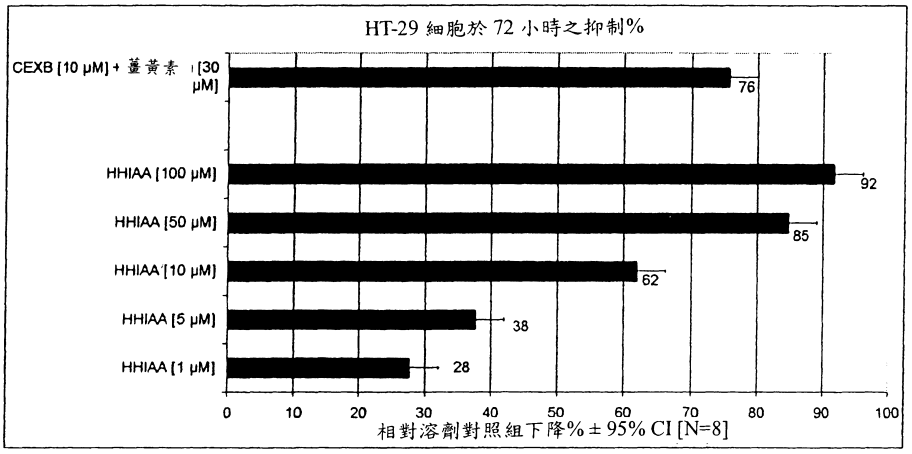
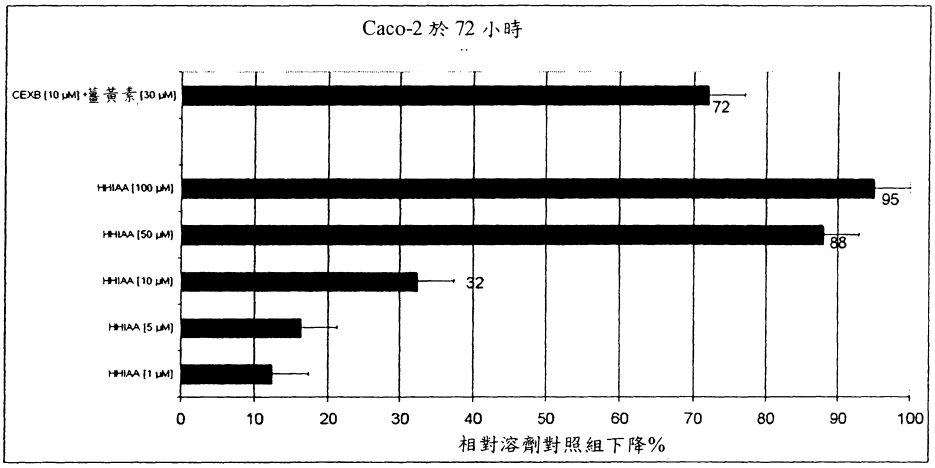

SW480 細胞 72 小時之抑制%
THAA [50 μM]
THAA [10 μM]
THAA [5 μM]
THAA [1 μM]
87
59
47
42
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
相對溶劑對照組下降% ± 95% CI [N=8]

圖 39

(A)


HT-29 細胞於 72 小時之抑制%
CEXB [10 μM] + 薑黃素 [30 μM]
HHIAA [100 μM]
HHIAA [50 μM]
HHIAA [10 μM]
HHIAA [5 μM]
HHIAA [1 μM]
76
92
85
62
38
28
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
相對溶劑對照組下降% ± 95% CI [N=8]

(B)


Caco-2 於 72 小時
CEXB [10 μM] + 薑黃素 [30 μM]
HHIAA [100 μM]
HHIAA [50 μM]
HHIAA [10 μM]
HHIAA [5 μM]
HHIAA [1 μM]
72
95
88
32
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
相對溶劑對照組下降%

(C)

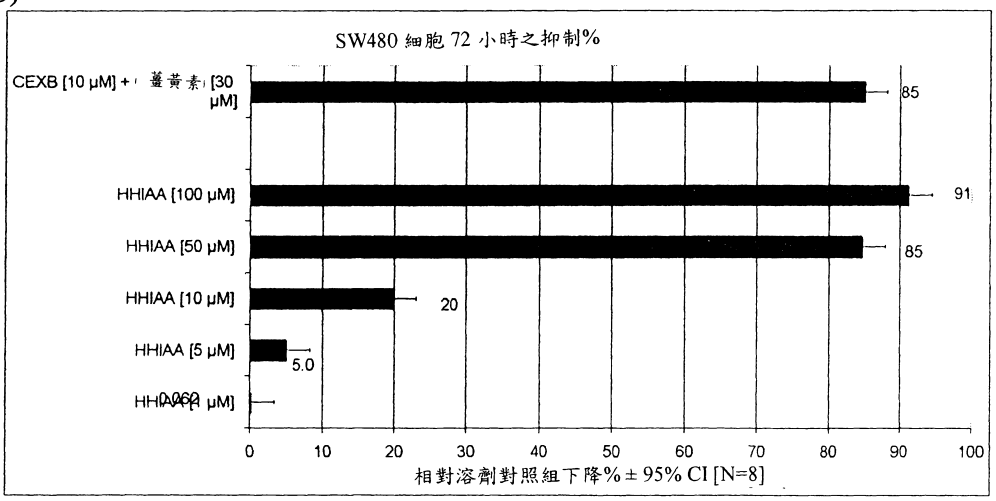
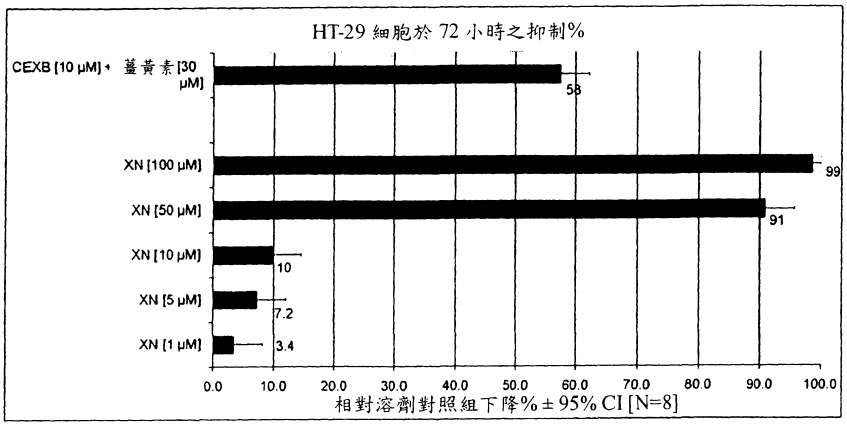
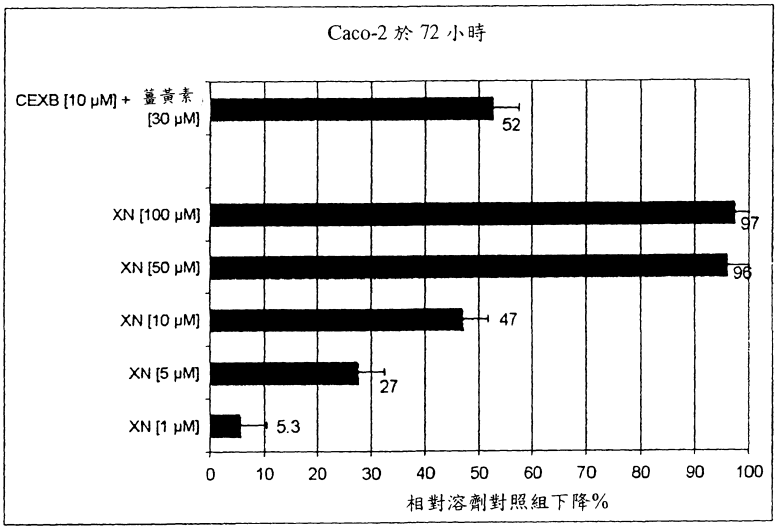

SW480 細胞 72 小時之抑制%
CEXB [10 μM] + 薑黃素 [30 μM]
HHIAA [100 μM]
HHIAA [50 μM]
HHIAA [10 μM]
HHIAA [5 μM]
HHIAA [1 μM]
85
91
85
20
5.0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
相對溶劑對照組下降% ± 95% CI [N=8]

圖 40

(A)


HT-29 細胞於 72 小時之抑制%
CEXB [10 μM] + 薑黃素 [30 μM]
58
XN [100 μM]
99
XN [50 μM]
91
XN [10 μM]
10
XN [5 μM]
7.2
XN [1 μM]
3.4
0.0 10.0 20.0 30.0 40.0 50.0 60.0 70.0 80.0 90.0 100.0
相對溶劑對照組下降% ± 95% CI [N=8]

(B)


Caco-2 於 72 小時
CEXB [10 μM] + 薑黃素 [30 μM]
52
XN [100 μM]
97
XN [50 μM]
96
XN [10 μM]
47
XN [5 μM]
27
XN [1 μM]
5.3
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
相對溶劑對照組下降%

(C)

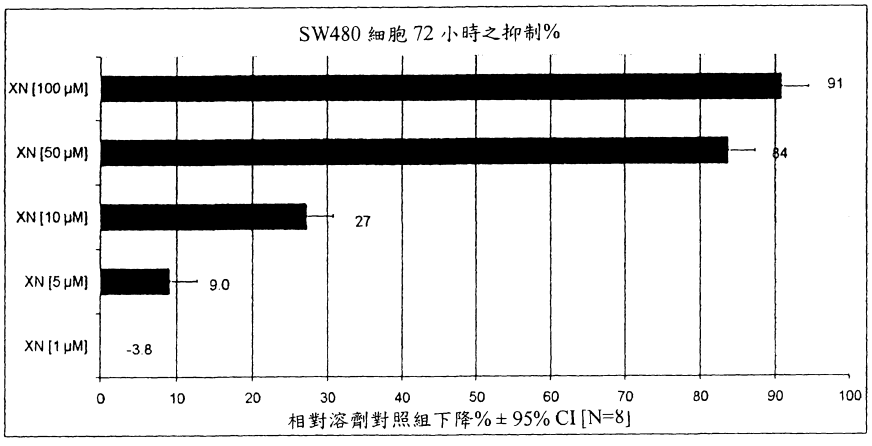
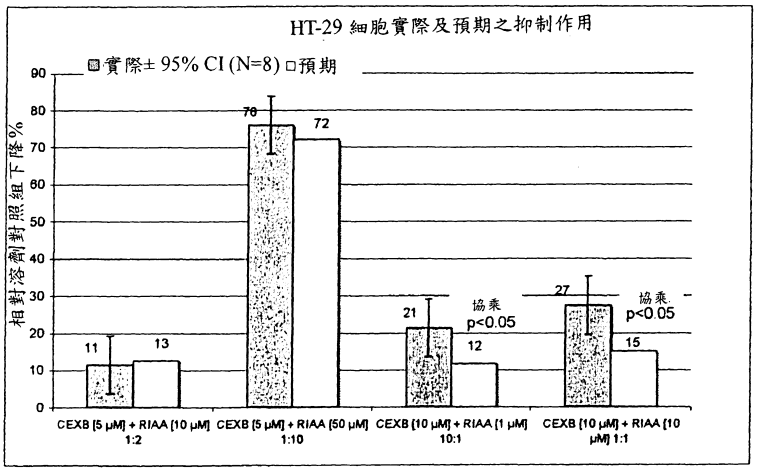
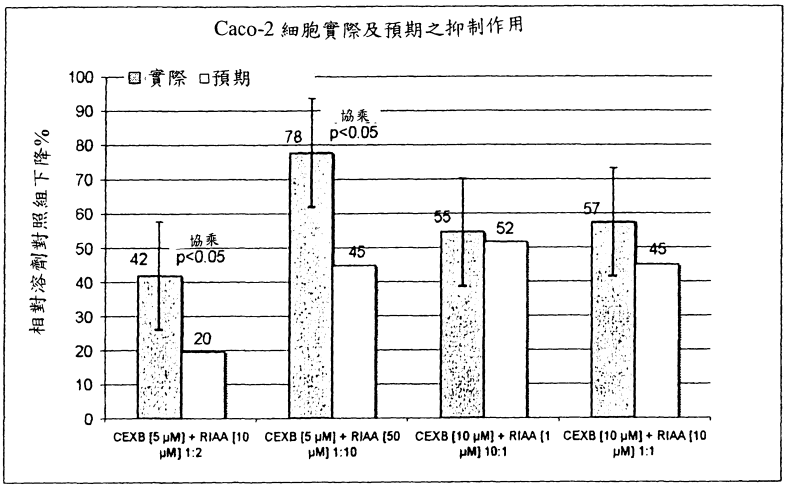

SW480 細胞 72 小時之抑制%
XN [100 μM]
91
XN [50 μM]
84
XN [10 μM]
27
XN [5 μM]
9.0
XN [1 μM]
-3.8
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
相對溶劑對照組下降% ± 95% CI [N=8]

圖 41

(A)


HT-29 細胞實際及預期之抑制作用
實際± 95% CI (N=8) 預期
相對溶劑對照組下降%
11
13
78
72
21
12
27
15
協乘 p<0.05
協乘 p<0.05
CEXB [5 μM] + RIAA [10 μM] 1:2
CEXB [5 μM] + RIAA [50 μM] 1:10
CEXB [10 μM] + RIAA [1 μM] 10:1
CEXB [10 μM] + RIAA [10 μM] 1:1

(B)


Caco-2 細胞實際及預期之抑制作用
實際 預期
相對溶劑對照組下降%
42
20
78
45
55
52
57
45
協乘 p<0.05
協乘 p<0.05
CEXB [5 μM] + RIAA [10 μM] 1:2
CEXB [5 μM] + RIAA [50 μM] 1:10
CEXB [10 μM] + RIAA [1 μM] 10:1
CEXB [10 μM] + RIAA [10 μM] 1:1

(C)

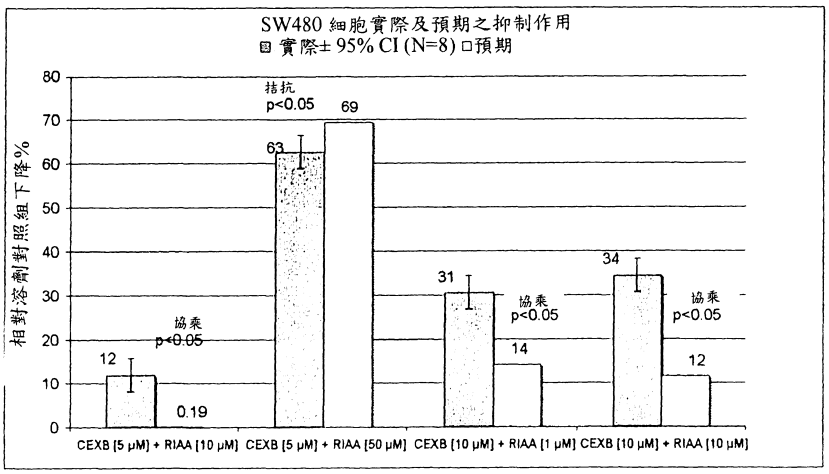
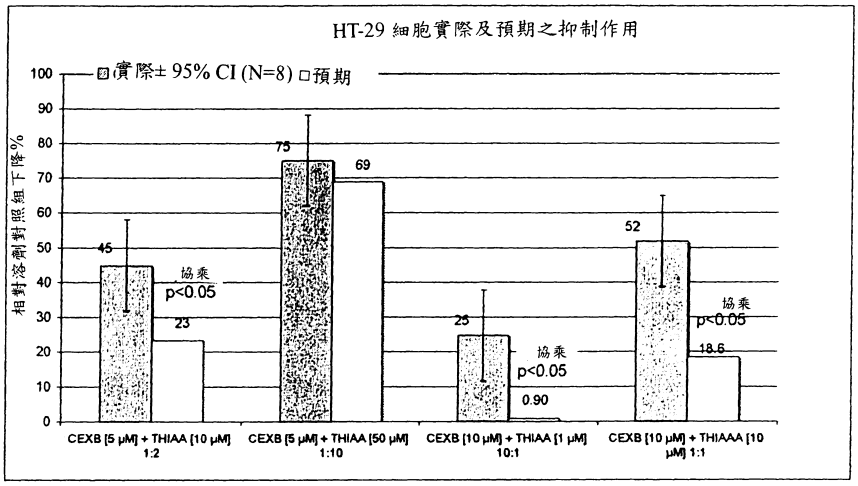
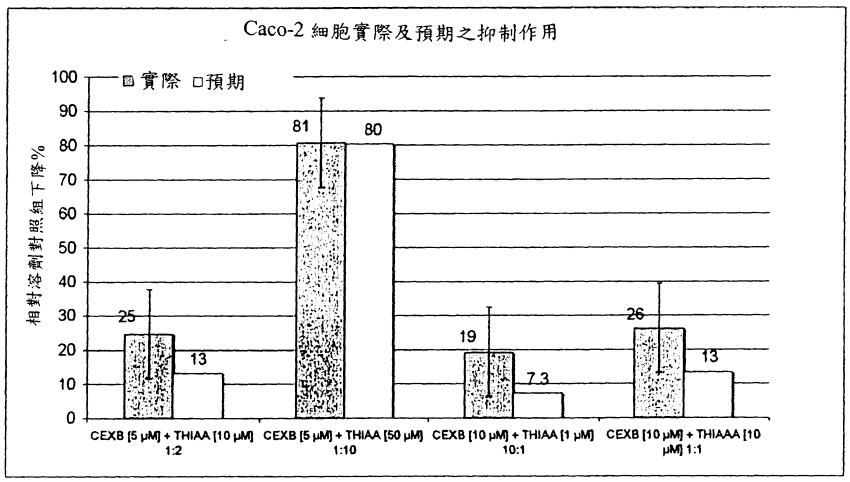

SW480 細胞實際及預期之抑制作用
實際± 95% CI (N=8) 預期
相對溶劑對照組下降%
12
0.19
63
69
31
14
34
12
協乘 p<0.05
拮抗 p<0.05
協乘 p<0.05
協乘 p<0.05
CEXB [5 μM] + RIAA [10 μM]
CEXB [5 μM] + RIAA [50 μM]
CEXB [10 μM] + RIAA [1 μM]
CEXB [10 μM] + RIAA [10 μM]

圖 42

(A)


HT-29 細胞實際及預期之抑制作用
實際± 95% CI (N=8) 預期
相對溶劑對照組下降%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
45
協乘
p<0.05
23
75
69
25
協乘
p<0.05
0.90
52
協乘
p<0.05
18.6
CEXB [5 μM] + THIAA [10 μM] 1:2
CEXB [5 μM] + THIAA [50 μM] 1:10
CEXB [10 μM] + THIAA [1 μM] 10:1
CEXB [10 μM] + THIAAA [10 μM] 1:1

(B)


Caco-2 細胞實際及預期之抑制作用
實際 預期
相對溶劑對照組下降%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
25
13
81
80
19
7.3
26
13
CEXB [5 μM] + THIAA [10 μM] 1:2
CEXB [5 μM] + THIAA [50 μM] 1:10
CEXB [10 μM] + THIAA [1 μM] 10:1
CEXB [10 μM] + THIAAA [10 μM] 1:1

(C)

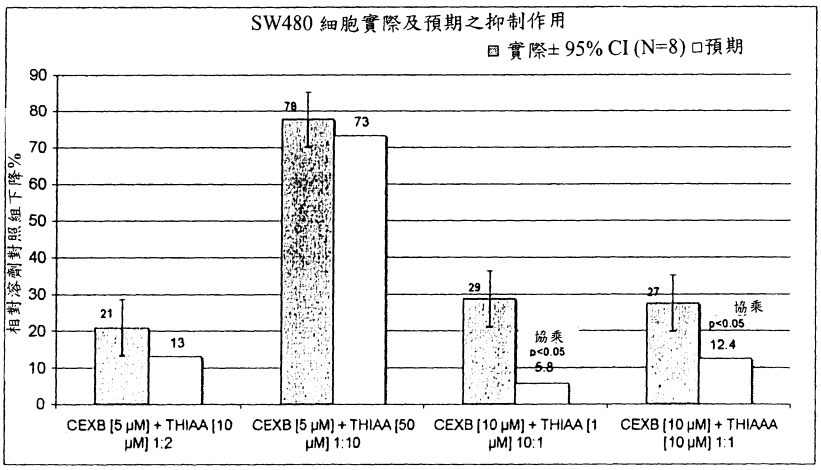

SW480 細胞實際及預期之抑制作用
實際± 95% CI (N=8) 預期
相對溶劑對照組下降%
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
21
13
78
73
29
協乘
p<0.05
5.8
27
協乘
p<0.05
12.4
CEXB [5 μM] + THIAA [10 μM] 1:2
CEXB [5 μM] + THIAA [50 μM] 1:10
CEXB [10 μM] + THIAA [1 μM] 10:1
CEXB [10 μM] + THIAAA [10 μM] 1:1

圖 43

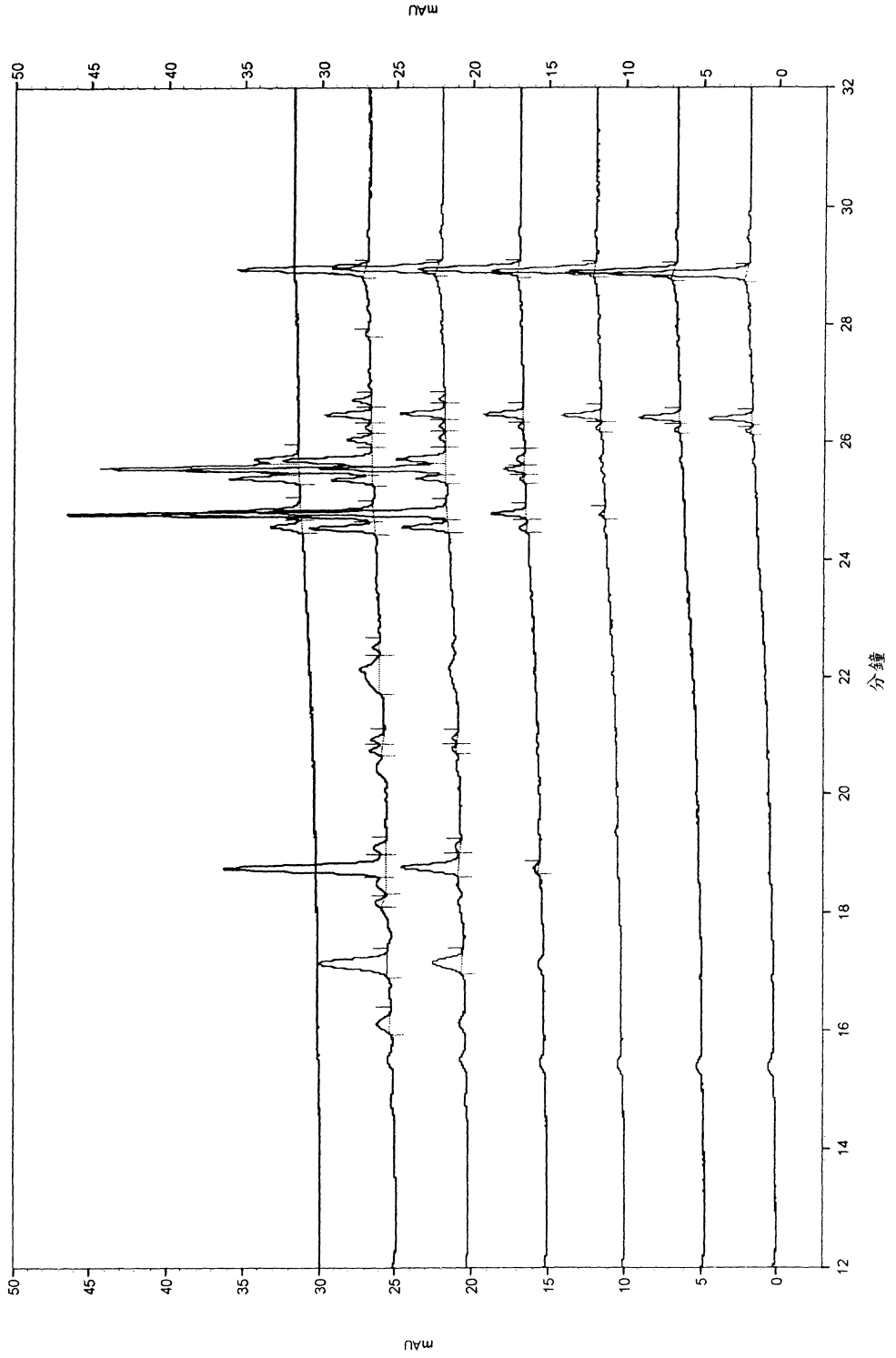


圖 44

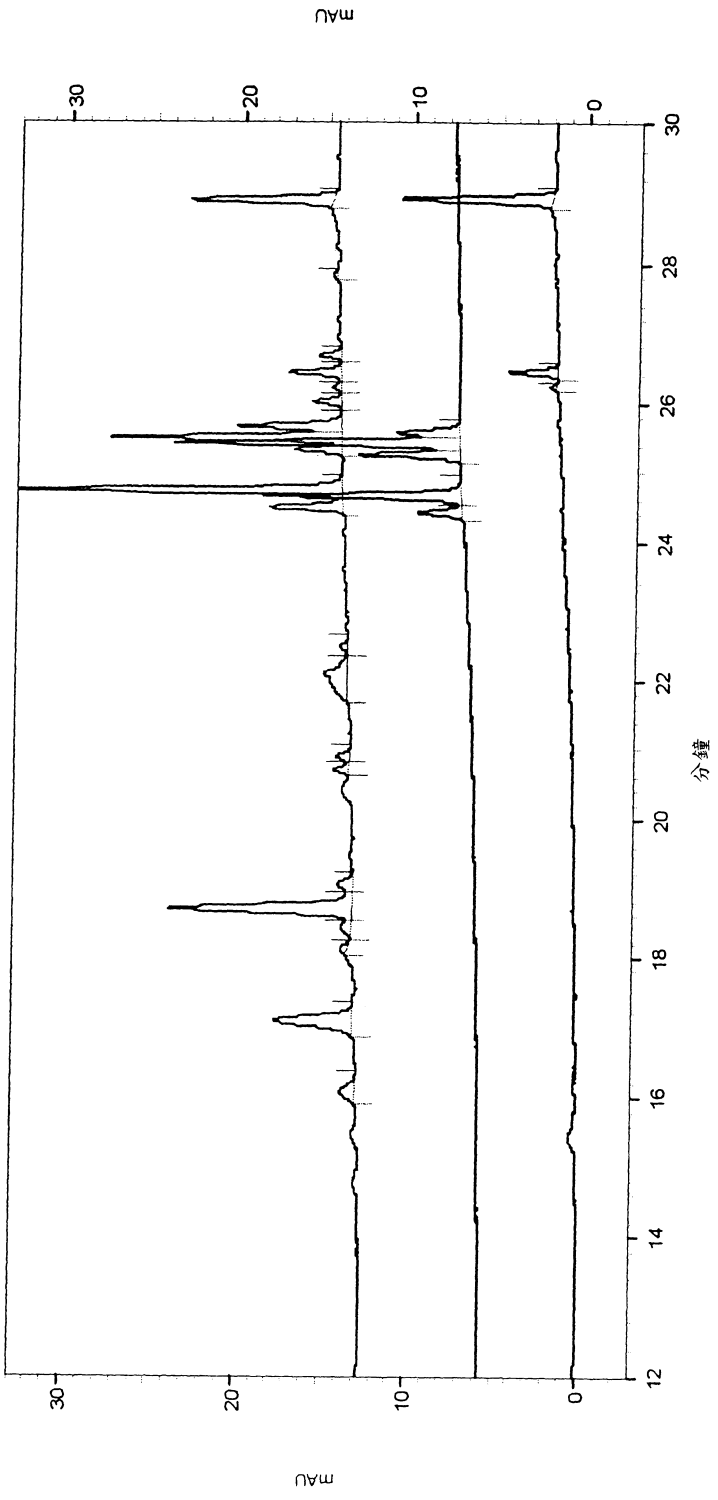


圖 45

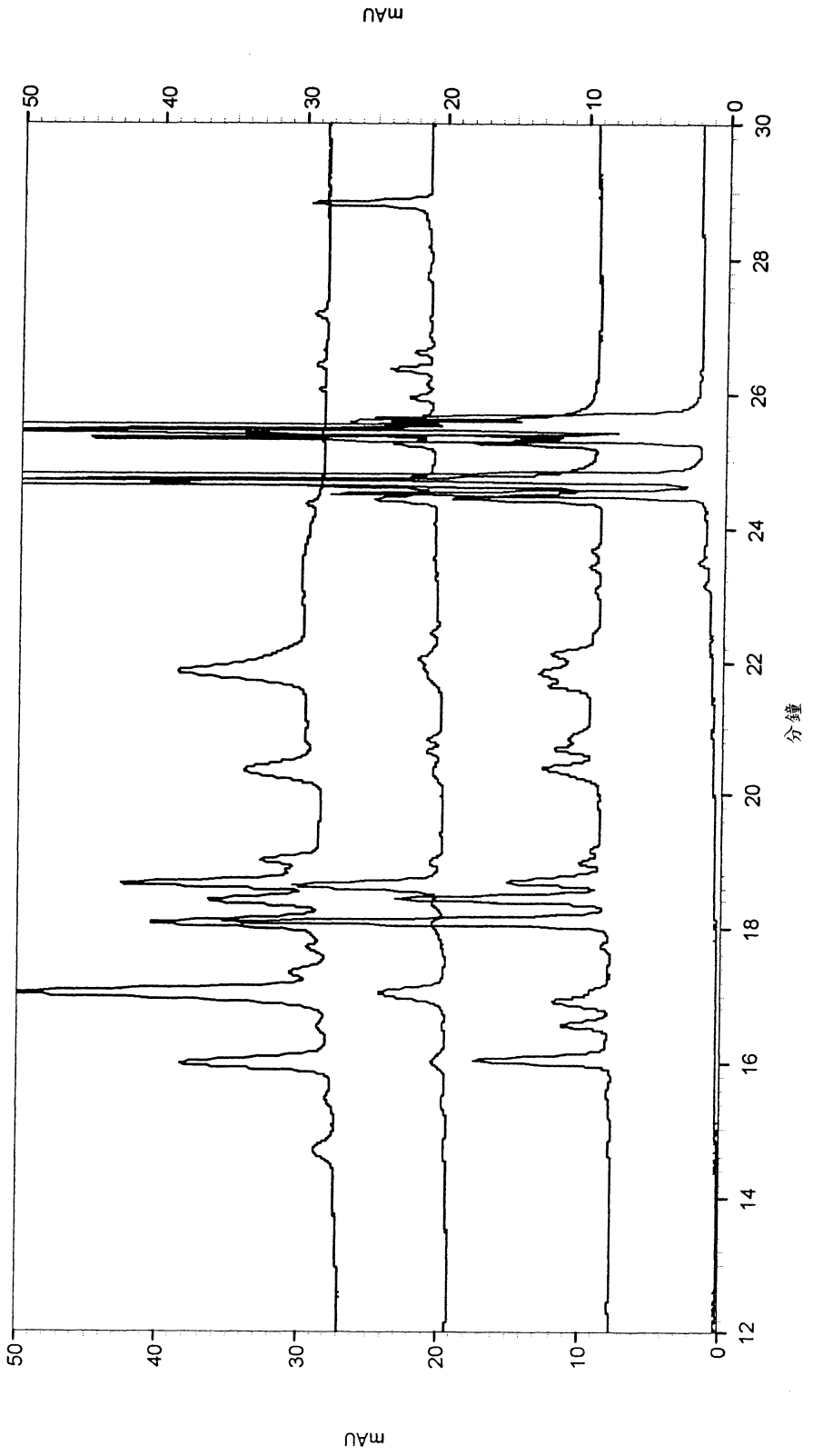

mAU
50
40
30
20
10
0
30
28
26
24
22
20
18
16
14
12
分鐘
mAU
50
40
30
20
10
0

圖 46

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（2）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明:

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

圖12為評估相思樹樣本#4909水溶性萃取物之可溶於二甲基亞碸餾分物對胰島素阻抗3T3-L1脂肪細胞分泌脂聯素(adiponectin)之效用之代表性試驗過程之概述。

圖13為一代表性長條圖，係描繪於24小時內，由三劑量之曲格列酮及四劑量之相思樹樣本#4909水溶性萃取物之可溶於二甲基亞碸餾分物所引起的胰島素阻抗3T3-L1脂肪細胞之最大脂聯素分泌。顯示的值為相對溶劑對照組之百分比；誤差長條係代表95%信賴區間。

圖14為一代表性試驗方法之概述，係用於評估相思樹樣本#4909水溶性萃取物之可溶於二甲基亞碸餾分物對經試驗物質及10、2或0.5 ng TNFα/ml處理過之3T3-L1脂肪細胞分泌脂聯素之效用。

圖15描繪代表性的長條圖，係代表由吲哚美辛或相思樹樣本#4909萃取物引起經10 ng/ml (A)、2 ng/ml (B)或0.5 ng/ml (C) TNFα處理的成熟3T3-L1細胞分泌之脂聯素。顯示的值為相對溶劑對照組之百分比；誤差長條係代表95%信賴區間。*明顯地不同於TNFα單獨處理者($p<0.05$)。

圖16係以圖示說明各種不同的市售兒茶樹(*Acacia catechu*)及阿拉伯金合歡之組合物所引起之胰島素阻抗3T3-L1脂肪細胞之相對的三酸甘油酯增加量。顯示的值為相對溶劑對照組之百分比；誤差長條係代表95%信賴區間。

圖17係以圖示描繪由各種兒茶樹萃取物所引起之最大相對脂聯素分泌之代表。顯示的值為相對溶劑對照組之百分比；誤差長條係代表95%信賴區間。