

中華民國第四十八屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生活與應用科學科

佳作

最佳(鄉土)教材獎

040812

食飲“涼”方#--研究傳統降火氣食品是否具有抗發炎效果

學校名稱：臺北市立第一女子高級中學

作者： 高二 邱薰頡 高二 邱薰儀	指導老師： 薛如娟
-------------------------	--------------

關鍵詞：降火氣、抗發炎、巨噬細胞

食飲”涼”方？ ----

研究傳統降火氣食品是否具有抗發炎效果

摘要

在炎炎夏日總希望來點可以「降火氣」的食品，依據古籍記載某些中藥材具有降火氣的效應，而中醫所謂的降火氣與西醫的抗發炎反應密切相關。本實驗利用巨噬細胞株受到 LPS (*Lipopolysaccharide*，革蘭氏陰性菌細胞壁表面所含有的脂多醣體)刺激後，會分泌發炎介質的現象，再分別加入各項傳統認為可降火氣(以菊花、薏仁、仙草作為樣品)或上火氣(選用龍眼作為樣品)的中藥食材，來評估中藥材對巨噬細胞分泌發炎介質能力的影響。經由實驗，我們發現市售的『降火氣』中藥食材，在適當的濃度下，確實具有降低 IL-6、TNF- α 分泌量的能力，但濃度過高時卻會造成細胞凋亡。另外，我們將樣品萃取方式分為「水萃」及「冷凍乾燥」兩個部分，發現傳統以水熬煮的方式比冷凍乾燥取得的樣品有更好的降低 IL-6、TNF- α 分泌量的能力。我們期望以此一系列的實驗，來建立篩選『降火氣』食材的抗發炎效用的研究模式，並在後續實驗中可用以篩選出更多具抗發炎效應的中藥材。

壹、 研究動機

在酷熱的暑假裡，品嚐著媽媽所謂可以「降火氣」的仙草冰時，突然很好奇，何謂「降火氣」？食用這些食品是否真能產生『降火氣』的效果？而降火氣在西醫上又與什麼生理機制有關？經過搜尋與查閱相關資料後，我們發現中醫的「火氣」理論由來已久，老祖宗早就發現：上火會使人有嘴巴破、睡不好、心神不寧等症狀。而相對於中醫有關『火氣』的說法，似乎又與西醫的『發炎反應』有密切相關性。因我們很喜歡「東方」與「西方」之間的關係、中西醫之間的連結，再加上高中生物下冊，及高三選修生物下冊也提及了人體非專一性的免疫反應，因此我們想到利用傳統中藥材、或一般食材中所謂可以清涼降火的食品，來進行相關實驗以評估『降火氣』與『發炎反應』間的關係。

貳、 研究目的及研究問題

本實驗是利用巨噬細胞株受到 LPS 後會分泌發炎介質的現象，再分別加入各項降火氣(我們選用菊花、薏仁、仙草作為樣品)或上火氣食品(選用龍眼作為樣品)，來評估它們對巨噬細胞分泌發炎介質能力的影響。期望以此一系列的實驗，來建立篩選『降火氣』食材的抗發炎效用的研究模式。

一、 樣本介紹

(一)清涼降火食品----薏仁

- 學名 *Coix lacryma-jobi*，別名薏苡仁、苡仁、白薏仁、薏米、菩提子、米仁、六谷、

川穀、鴨母珠

- 禾本科多年生草本植物，莖桿直立而不分枝，高約 1~2 公尺。
- 分布地區：中國大陸，熱帶地區。台灣中部彰化縣二林鎮、台中縣大甲鎮、南投縣草屯鎮.....有專業栽培。
- 用途：根、葉、仁均可食用；可配合其他中藥材開發為健康食品。
- 功能與機轉：近期臨床實驗發現薏仁可以抗腫瘤、降血脂、降血糖、促進新陳代謝和美白肌膚。

(二) 清涼降火食品----菊花

- 菊科植物，別名有菊華、秋菊、九華、黃花、帝女花、笑靨金、節花。
- 菊花除可觀賞外也有很高的藥用價值。最為常見的是沖泡「菊花茶」。菊花茶分類主要有：黃山的貢菊，杭州的杭白菊 (*Dendranthema morifolium*) 以及山東的野菊花。
- 用途：有的作為藥用或作消暑清涼飲料，如滁菊、杭白菊等，有清涼鎮靜的功效，治頭痛、眩暈、血壓抗進，神經性頭痛及眼結膜炎等症。

(三) 清涼降火食品----仙草

- 仙草名稱首見於中國藥植圖鑑，又稱為田草、洗草、仙草凍、仙草乾、仙草舅。
- 一年生草本，高 15-100cm。
- 枝幹葉：莖上部直立，下部伏地，四稜形，被脫落的長柔毛或細剛毛。
- 果：果期 8~11 月，小堅果長圓形，黑色。
- 用途：仙草除食用外，在各種本草中亦有保健功效之記載：本草求原「清暑熱，解臟腑結熱毒。治酒風。」中國藥植圖鑑：「為清涼解渴除暑劑，全草煎服治糖尿病。」廣東中藥：「治濕火骨痛」；廣州常用中藥手冊：「清熱解毒、治中暑、感冒、高血壓、肌肉、關節疼痛。」中藥大辭典：「仙草具有清熱、解暑、除熱毒之功，治中暑、消渴、高血壓、肌肉及關節疼痛」；甘松偉之藥用植物學：「仙人凍，一名涼粉草，全草治花柳入骨。」；又在福建藥用志：「仙草及敗醬草各 30 公克，水煎服，治痢疾」。

(四) 上火氣食品之一----龍眼

- 龍眼，又稱桂圓、亞荔枝、燕卵，為中國南方水果，多產於兩廣地區。
- 其樹為大喬木，高 5—10 米。葉互生，為偶數羽狀複葉，長橢圓形，長 6—10 厘米，寬 2-4 厘米，基部傾斜。開白花，成實於初秋。
- 用途：和荔枝性屬濕熱不同，龍眼能夠入藥。其肉甘溫，滋補強壯；其核澀平，收斂止血；其葉淡平，解表。有壯陽益氣、補益心脾、養血安神、潤膚美容等多種功效，可治療貧血、心悸、失眠、健忘、神經衰弱及病後、產後身體虛弱等症。

二、偵測指標：生成的介質物

免疫細胞會分泌出許多小分子 (cytokines) —— 一群低分子量，可分泌性的調節蛋白，各有不同的功能，可以決定免疫反應的性質，參與發炎和免疫反應。

(一) IL-6：IL-6 主要由巨噬細胞和 T 細胞所分泌，可刺激 T 細胞和 B 細胞的增生分化，和急性

蛋白質增加，為感染時早期發炎反應 (acute phase reaction)的重要細胞激素。

(二)TNF- α ： TNF- α 主要由巨噬細胞和自然殺手細胞所分泌，可活化上皮細胞，以分泌黏附分子吸引淋巴球至感染部位，並增加上皮細胞通透性，是引起局部發炎感染時的早期發炎反應 (acute phase reaction)的重要細胞激素。

三、對照組----Naltrexone (NTX)：

Naltrexone 是一種鴉片樣受體的對抗劑 (opiate receptor antagonist)，可降低病患對酒精與鴉片的依賴性。近期研究指出其具有抗發炎的效用。

四、LPS 的介紹

為 Lipopolysaccharide 之簡稱，乃是格蘭氏陰性菌外膜的脂多醣類，為內毒素，可活化巨噬細胞。當細胞受到細菌的侵犯時，細胞會被內毒素刺激，內毒素可活化巨噬細胞，使其分泌細胞激素，包括 TNF、IL-1、IL-6、IL-8 等。LPS 導致白血球 (Macrophages、Neutrophils) 活化之過程，可說是細胞對格蘭氏陰性菌產生非特異性免疫反應之基石。

參、 研究設計

一、研究設備及器材

待測樣品(薏仁、龍眼、菊花、仙草)、RAW264.7 巨噬細胞株、培養液(DMEM+ 10% FBS)、Trypsin、Incubator、計時器、離心管、pipette-aid、pipette、pipettement、eppendorf、Trypan Blue、counter、顯微鏡、離心機、震盪器、Dish、酒精燈、MTT、DMSO

二、事前準備：

(一)細胞培養 RAW264.7

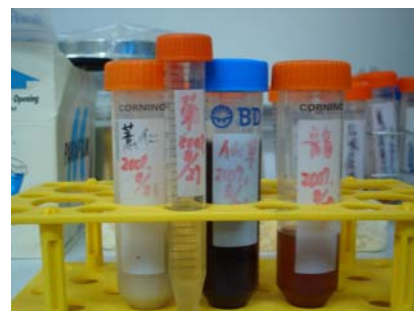
RAW264.7 巨噬細胞株 (購自 ATCC)，以 DMEM+ 10% FBS complete medium 培養。

(二) 研究Sample

將萃取樣品上清液的方式分為「水萃」及「冷凍乾燥。」

1.水萃

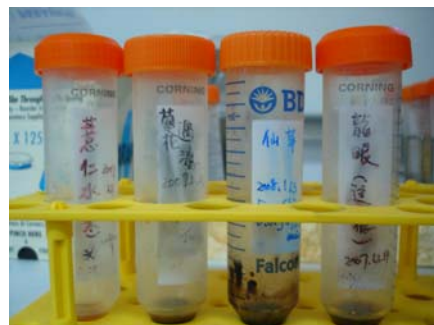
- (1) 薏仁：市售薏仁34.13g+水215mL 煮沸騰後小火煮 20 分鐘後，取上清液保存於 -20 °C。
- (2) 菊花：市售菊花乾10.04g+水200mL 煮沸騰後小火煮 20 分鐘後，取上清液保存於 -20°C。
- (3) 仙草：仙草乾10.04g洗淨後，加水250mL 煮沸騰再小火煮 20 分鐘後，取上清液保存於 -20 °C。
- (4) 龍眼：市售龍眼乾30.50g先洗去糖分後，加水60mL煮沸騰，再小火煮 20 分鐘後， 取上清液保存於 -20 °C。



2. 冷凍乾燥

取薏仁、仙草、龍眼各20g+水400ml，因菊花較輕，取10g+水200ml後，將樣品裝入錐形瓶中經高溫高壓鍋萃取，取上清液冷凍於-80 °C。冷凍過後的樣品經冷凍乾燥系統(溫度≒-54°C，壓力≒0.4 torr)，收取樣品，並加入可完全溶解樣品之最小量medium：

- (1) 薏仁：0.24g +1ml medium
 - (2) 菊花：1.05g +1ml medium
 - (3) 仙草：0.11g +1ml medium
 - (4) 龍眼：1.21g +1.2ml medium
- (其中將以上濃度的 1/40 當成最高濃度 1)



二、實驗方法：

(一) 評估 RAW264.7 細胞受到 LPS 刺激後分泌發炎物質的能力與 LPS 刺激的最適當濃度

1. 取 RAW264.7 細胞調成 5×10^4 個/well，seeding 於 Flat 96 well plate 100 μ L/well
2. LPS stock 1mg/ml，分別稀釋成 4 μ g/ml, 1 μ g/ml, 400 ng/ml, 200 ng/ml，50 μ L/well → final conc. 分別為 1 μ g/ml, 250 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml
3. 每個 well 補 50 μ L medium
4. 另外加入已知具有抗發炎效用的Naltrexone 100 μ g/ml作為對照組，50 μ L/well
5. Incubation 37 °C，over night。
6. 收 supernatant，凍 -20 °C，之後以 ELISA 測 IL-6, TNF- α 。

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	LPS 1 μ g/ml					LPS 1 μ g/ml+NTX					
	LPS 250 ng/ml					LPS 250ng/ml +NTX					
	LPS 100 ng/ml					LPS 100 ng/ml +NTX					
	LPS 50 ng/ml					LPS 50 ng/ml +NTX					
	Cell only										

(二) 分析樣品對於受LPS刺激後之RAW264.7分泌發炎物質能力的影響

分為水萃樣品實驗與冷凍乾燥樣品實驗：

1. 取 RAW264.7 細胞調成 5×10^4 個/well，seeding 於 Flat 96 well plate 100 μ L/well
2. LPS stock 1mg/ml，稀釋成 1 μ g/ml，50 μ L/well → final conc. 為 250 ng/ml
3. 加入樣品：
 - (1) 將水萃樣品分別稀釋成 1/2, 1/8, 1/32, 1/128，50 μ L/well → final conc. 為 1/8, 1/32, 1/128, 1/512
 - (2) 將冷凍乾燥樣品分別稀釋成 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16，50 μ L/well → final conc. 為 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64

- 另外加入已知具有抗發炎效用的Naltrexone 100 μ g/ml作為對照組，50 μ L/well
- Incubation 37 °C，over night。
- 收 supernatant，凍 -20 °C，之後以 ELISA 測 IL-6, TNF- α 。

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
薏仁 1/4			菊花 1/4			仙草 1/4			龍眼 1/4			
薏仁 1/8			菊花 1/8			仙草 1/8			龍眼 1/8			
薏仁 1/16			菊花 1/16			仙草 1/16			龍眼 1/16			
薏仁 1/32			菊花 1/32			仙草 1/32			龍眼 1/32			
薏仁 1/64			菊花 1/64			仙草 1/64			龍眼 1/64			
										冷	凍	
Cell only			LPS only			LPS+Naltrexone					乾	燥

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
薏仁 1/8			菊花 1/8			仙草 1/8			龍眼 1/8			
薏仁 1/32			菊花 1/32			仙草 1/32			龍眼 1/32			
薏仁 1/128			菊花 1/128			仙草 1/128			龍眼 1/128			
薏仁 1/512			菊花 1/512			仙草 1/512			龍眼 1/512			
Cell only			LPS only			LPS+Naltrexone						
											水	萃

(三) 測試經樣品處理後細胞的存活率

- 上述實驗，將 supernatant 收集完成後，將每 well 殘餘液體吸乾。
- 加入 MTT，以 medium 稀釋五倍。
- Incubation 37 °C，3 小時。
- 吸出MTT，加入 100 μ L/well DMSO。
- Read OD570。
- 算出 unknown/cell only 和 unknown/LPS only 的比例。

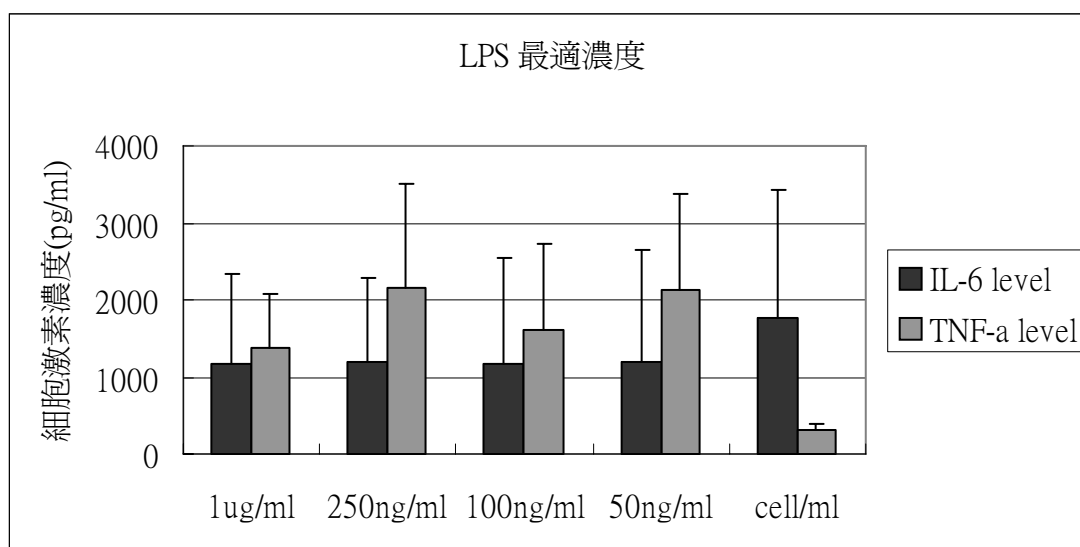
(四). 促發炎細胞激素量的測定 (Sandwich ELISA)

- 先在 96well ELISA 微量盤上 coating 100 μ L/well 溶於 PBS 的 capture antibody (IL-6 和 TNF- α)，置於室溫下 overnight
- 以 washing buffer 清洗三次後，加入 300 μ L/well blocking buffer，於室溫下反應至少一小時。
- 以 washing buffer 清洗四次後，於各槽 loading 上清液 sample 或 standard 100 μ L/well，於室溫下反應 2 小時。
- 以 washing buffer 清洗五次後，加入以 biotin 連接的 detection antibody (IL-6 和 TNF- α) 100 μ L/well，室溫下反應 2 個小時。

5. 以 washing buffer 清洗六次後，加入連接 avidin 的過氧化酶 100 μ L/well (要稀釋 200 倍)(要避光)，於室溫下反應 30 分鐘。
6. 以 washing buffer 清洗八次後，加入 100 μ L/well TMB 基質溶液，進行呈色反應。
7. 以 ELISA reader 偵測 450nm 吸光值，進而得到細胞激素量。

肆、 研究結果

一、 評估 RAW264.7 細胞受到 LPS 刺激後分泌發炎物質的能力與 LPS 刺激的最適當濃度

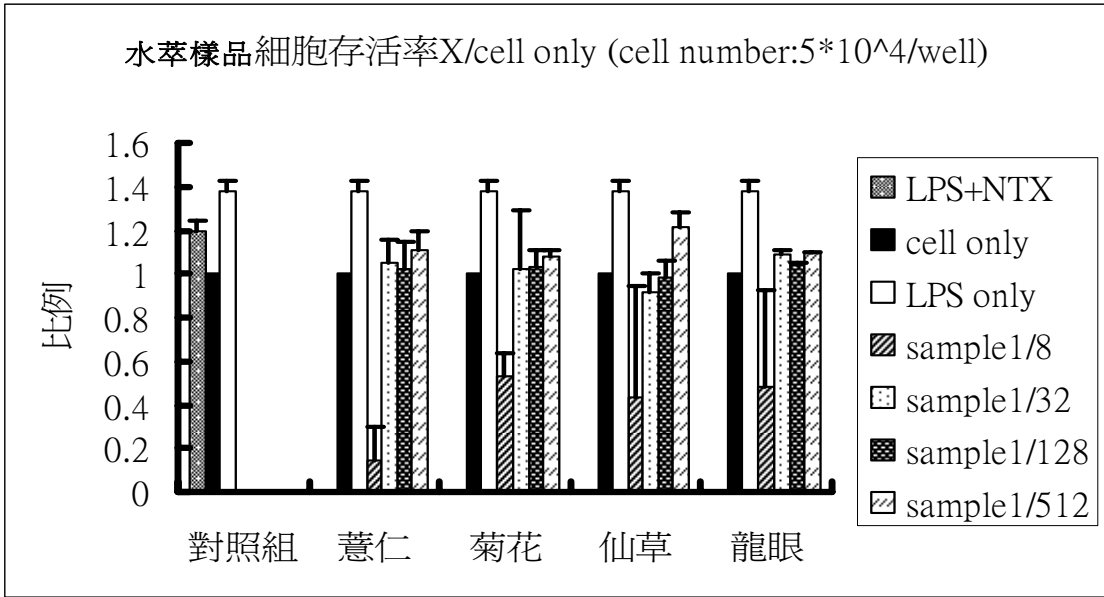


圖表一

- (一) 觀察上表可以看出 250ng/ml 和 50ng/ml 的 LPS 可使細胞產生最大濃度的發炎反應，但 250ng/ml 的 LPS 造成細胞發炎產生 IL-6 的標準差卻是比 50ng/ml 的標準差小，而造成細胞發炎分泌 TNF- α 的標準差是相差較小的，故接下來的實驗皆是以加入 250ng/ml 的 LPS 來探討樣品對巨噬細胞 RAW264.7 發炎的抑制效果。
- (二) LPS 濃度的變化對於刺激巨噬細胞分泌 IL-6 的影響不大，故由 TNF- α 之量的變化來選取 LPS 最適當濃度是合理的。
- (三) 上表 cell only 分泌的 IL-6 量之高是令人訝異的，但相對的，它的標準差卻也比其他受到 LPS 刺激的細胞所呈現的細胞激素量還高，故認為實驗誤差是存在的。

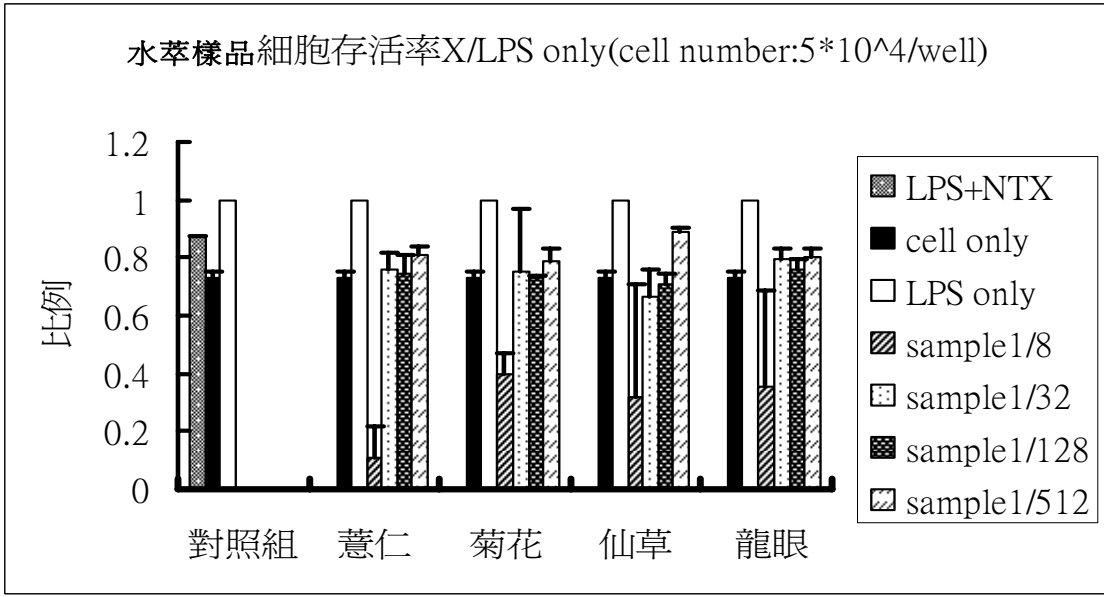
二、 測試經樣品處理後的細胞存活率

(一) 水萃樣品



圖表二-1

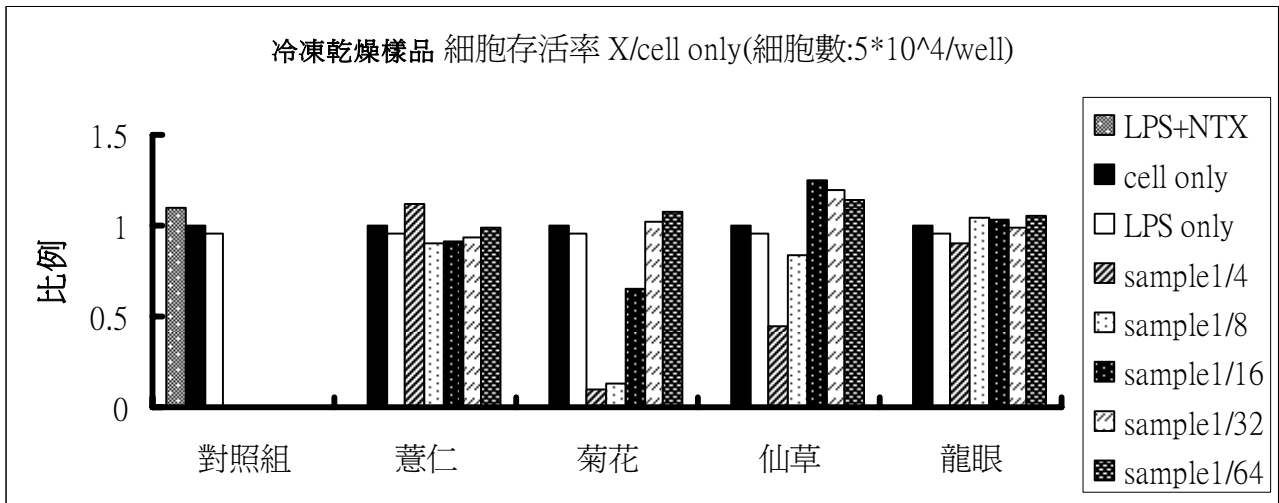
濃度太高的樣品會造成細胞的死亡，故探討樣品對於受 LPS 刺激後所產生的抑制效果時，sample 1/8 不予探討。



圖表二-2

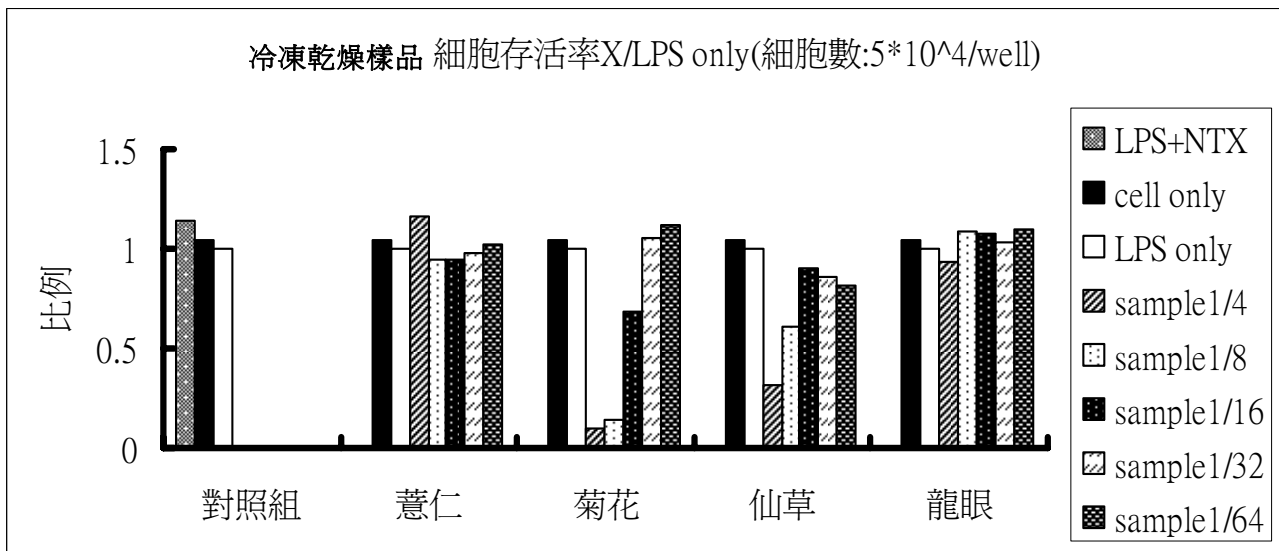
濃度太高的樣品會造成細胞的死亡，故探討樣品對於受 LPS 刺激後所產生的抑制效果時，sample 1/8 不予探討。

(二) 冷凍乾燥樣品



↑圖表三之一

濃度太高的樣品會造成細胞的死亡，故探討樣品對於受 LPS 刺激後所產生的抑制效果時，菊花 sample 1/4、1/8 不予探討。

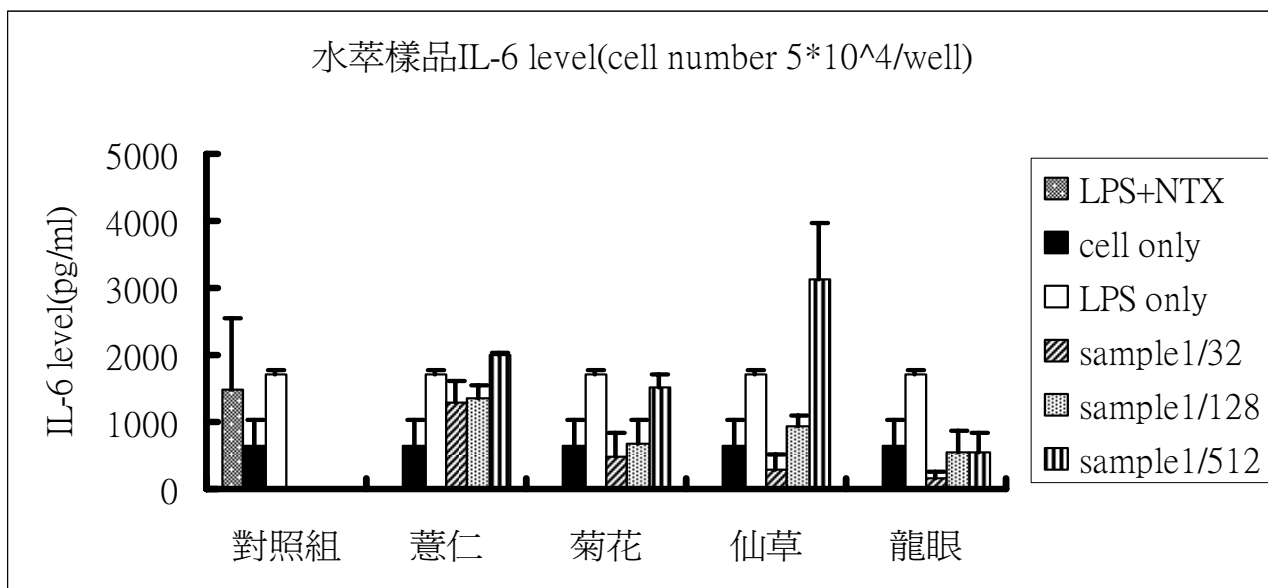


↑圖表三之二

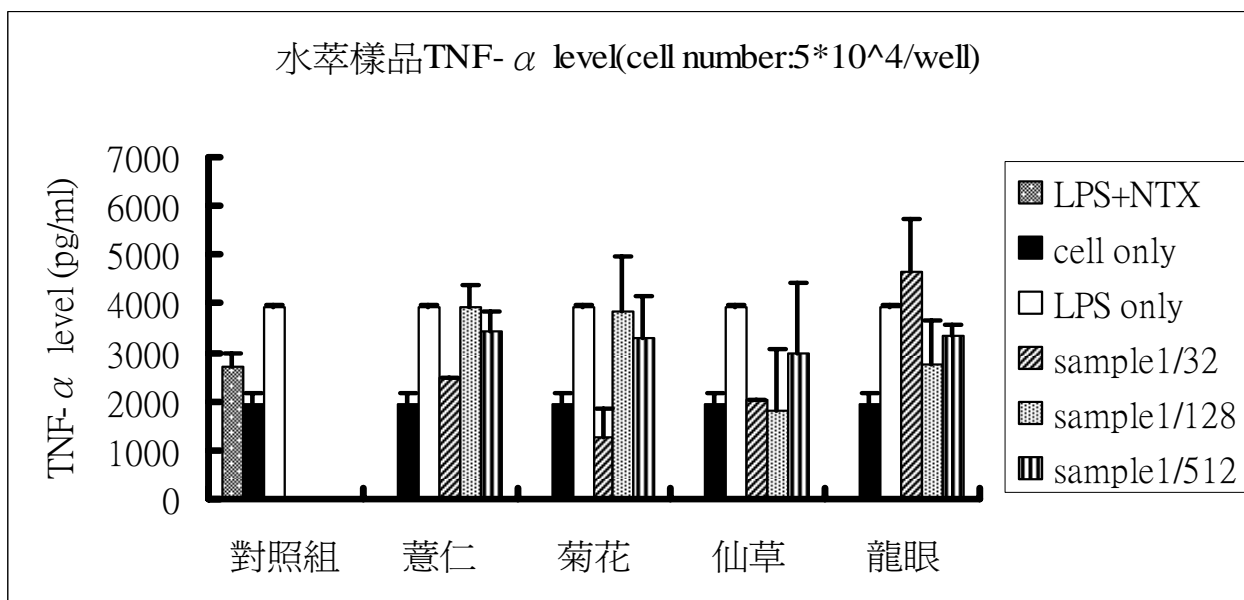
濃度太高的樣品會造成細胞的死亡，故探討樣品對於受 LPS 刺激後所產生的抑制效果時，菊花 sample 1/4、1/8 不予探討。

三、分析樣品對於受 LPS 刺激後之 RAW264.7 分泌發炎物質能力的影響

(一) 水萃樣品

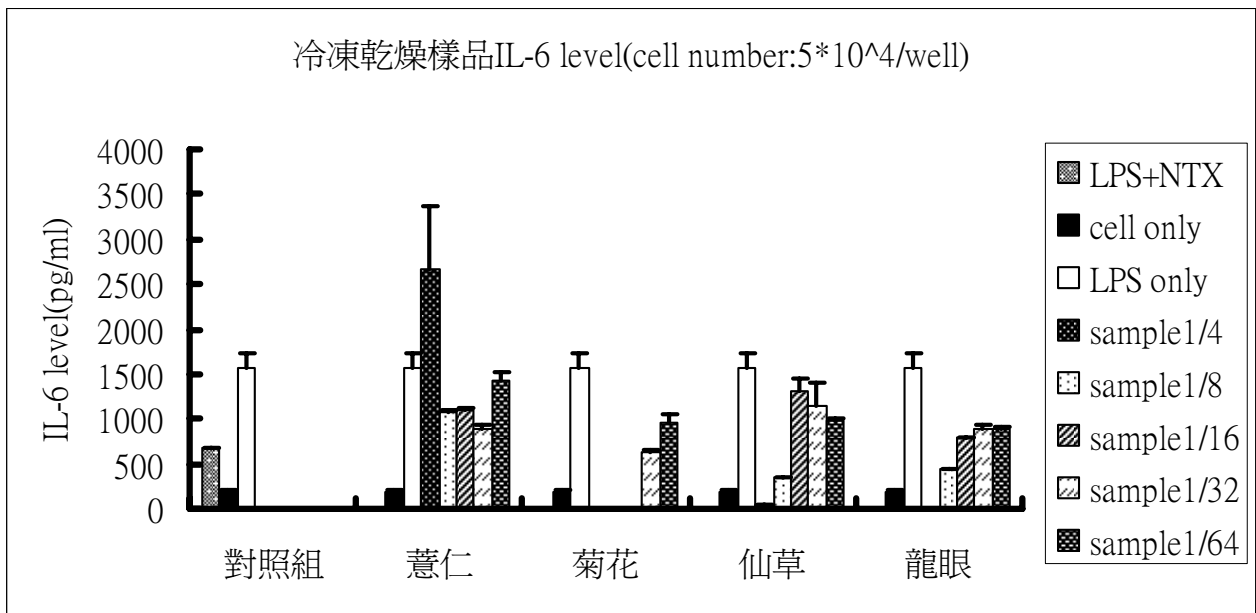


↑ 圖表四

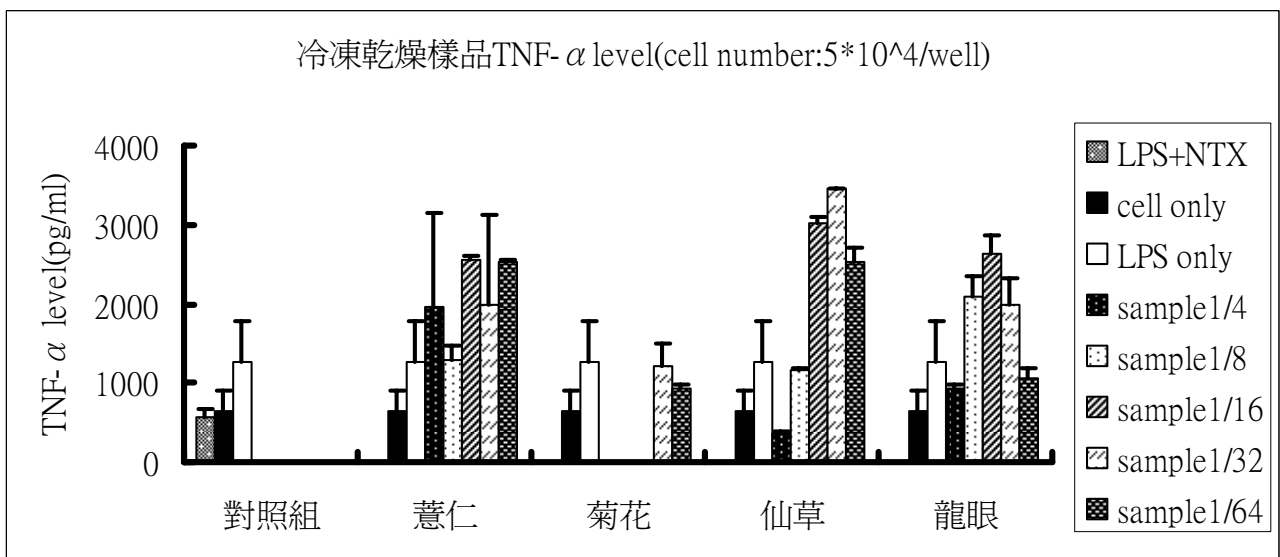


↑ 圖表五

(二) 冷凍乾燥樣品



↑圖表六



↑圖表七

陸、 討論

一、水萃

(一)

(圖表四)對於 IL-6 分泌量而言：

1. 薏仁在高低濃度下，均無顯著差異。
2. 菊花在高濃度下可降低 IL-6 之分泌，低濃度下則不顯著。
3. 高濃度的仙草有良好的抗發炎效果，但在低濃度下，卻有促進 IL-6 的分泌、促進發炎之虞。我們可以深思仙草的降火氣效果：為什麼人們在寒冷的天氣要吃”燒仙草”呢？中醫常說仙草

清涼降火，具有消暑的功用，但顯然與吃燒仙草的含意相牴觸了。由我們的實驗可知，仙草的抗發炎(降火氣)效果是有待商榷。

4. 龍眼在我們測試的三種濃度下都有不同於以往傳統認知，皆有效抑制 IL-6 之分泌。

(二)

(圖表五) 對於 TNF- α 分泌量而言：

1. 薏仁、菊花以高濃度下抑制 TNF- α 分泌效果最好，其餘濃度下無顯著差異。
2. 仙草在三種樣品濃度下，都呈現抑制 TNF- α 的分泌。
3. 龍眼在測試濃度下對於 TNF- α 分泌量都無顯著差異。

二、冷凍乾燥

(一)

(圖表六) 對於 IL-6 分泌量而言：

1. 冷凍乾燥處理的薏仁在濃度 1/4 下呈現促進發炎的反應，但其標準差之大，或許存在著些實驗上的誤差。其餘濃度呈現了一致性，均具有抗發炎的效用。
2. 冷凍乾燥處理的菊花在濃度 1/4、1/8 下會使細胞死亡，故不予探討。其餘濃度顯示菊花具有降低 IL-6 分泌之效用。
3. 仙草及龍眼在 IL-6 分泌量的實驗上呈現著抑制發炎的效果，特別是以高濃度下為佳。

(二)

(圖表七) 對於 TNF- α 分泌量而言：

1. 冷凍乾燥處理的薏仁樣品普遍具有高低不等的促進發炎效果，呈現一致性，但此種結果是異於 IL-6 的。
2. 菊花對 TNF- α 的結果異於 IL-6，並無顯著差異，唯低濃度下微具抗發炎效用。
3. 仙草在高濃度下具有抗發炎效用，但在低濃度下卻呈現促進發炎的效果，此種結果異於 IL-6，可藉由進一步偵測 IL-1 再確認結果。但是比較水萃和冷凍乾燥樣品的 TNF- α 分泌量，兩者是呈現迥異的結果，推測是由於仙草當中關於免疫的成分，需溶於水中，老祖宗以最普通簡便的方式，卻也得到其功效。
4. 龍眼在濃度 1/4 和 1/64 都有些微抗發炎效用，在 1/8 至 1/32 下呈現一致的促進發炎反應。

三、應用與展望

(一)目前是測定 IL-6 和 TNF- α ，未來也會加入 IL-1 和 IL-1ra 的測定，進一步分析樣品對不同細胞激素的反應，建立較為完整的樣品之抗發炎效果。

(二)裂殖素濃度添加足以高度活化細胞，若待測樣品的添加亦是活化作用，也極易造成細胞凋亡而使測定值降低，而呈現抑制作用。所以關於樣品龍眼(傳統上火食品)的探討，檢測上存在著盲點。另外，我們所採用的龍眼樣品是由龍眼乾熬煮而成，未來可試用新鮮龍眼汁樣品做比較，確立龍眼是否為上火氣食品。

(三)此階段是以 RAW264.7(BALB/c 小鼠單核細胞經病毒誘發之巨噬細胞株) 做實驗，但對於人體之巨噬細胞的效用仍不確定。因此可進一步討論對於人類之巨噬細胞的效果，探討樣品對於小鼠和人類細胞發炎介質物的異同，來評估抗發炎食材的潛力。

(四) 水萃薏仁漿十分濃稠，目前我們還在努力尋求改善的方法，希望萃取液的濃稠度能改善，以降低對細胞可能造成的影響，以做更進一步的探討。此外，目前萃取樣品是採用水萃及冷凍乾燥的方式，但也有實驗結果顯示水萃與酒萃物，對細胞的發炎反應呈現促進與抑制兩種迥異的結果，而這一點又與傳統中藥材食品調製過程的方法密切相關，因此，這一部分將是我們在後續實驗會更深入探討的主題。

(五) 不同的萃取方式得到的有效物質不盡相同。期望能夠對萃取物做物質分析，了解有效物質的成分。

(六) 在樣品真的具有抗發炎效果的前提下，以其他方式做進一步深入的研究，例如：Western Blot。

柒、 結論

1. 水萃樣品結論：在水萃樣品的部分，綜合以上偵測 IL-6 和 TNF- α 的實驗結果，菊花、薏仁、仙草及龍眼在高濃度下都有抗發炎的效果，低濃度下則不顯著，符合傳統上所稱頌的降火氣(抗發炎)效果，唯龍眼異於傳統說法。薏仁在高濃度下也有抑制發炎的反應，至於仙草在兩種偵測指標下所測出來的結果缺少了一致性，要更確定抑制發炎與否，則須再測定其他激素的分泌量，如 IL-1。

2. 冷凍乾燥樣品結論：在冷凍乾燥樣品的部分，綜合以上偵測 IL-6 和 TNF- α 的實驗結果可發現，兩種偵測指標所呈現的無一致性，只可確定菊花具有些微抗發炎效用，若要進一步確定結果，則需再測定 IL-1 的分泌量來尋求一致性。但有趣的是，老祖宗所使用的水煮中草藥，雖簡便，卻可達其降火氣的目的。

捌、 參考資料

1. Yong-Han Hong and Bi-Fong Lin, 2004, Evaluation of the Anti-inflammation Screening Model of Macrophages Cell Line by the Proinflammatory Mediators Sections, Nutr Sci J. 2004, Vol. 29, No.3, pp.159~167
2. Chang Shan Medical University, Institute of Biochemistry and Biotechnology, Job's tears <http://rcocc.csmu.edu.tw/database/b-50.PDF>
3. LDN for Multiple sclerosis. http://www.lowdosenaltrexone.org/ldn_and_ms.htm
4. Preventing AIDS with LDN in Mali, Africa <http://www.ldnafricaaids.org/>
5. Schmitz J, Stotts A, Rhoades H, Grabowski J. "Naltrexone and relapse prevention treatment for cocaine-dependent patients." *Addict Behav* 26 (2): 167-80.
6. 陳怡如 (2001) IL-15 和 LPS對老鼠巨噬細胞 (RAW) 產生細胞激素之影響，中央研究院高中生命科學資優生培育計畫論文。
7. 何士慶、蘇淑茵 (2005) 中草藥保健功能性食品之應用與開發，科技圖書，台北市。
8. Marion D. Kendall (2001) 免疫兵團，天下文化，台北市。
9. 成川一郎 (1997) 對現代病有療效的中藥，青春出版社，台北市。

