

黃芩萃取物及其組成分抑制痤瘡 丙酸桿菌誘導之發炎反應

謝鳴綺

摘 要

痤瘡桿菌是痤瘡等發炎疾病的重要因子，會刺激單核球等細胞分泌大量促發炎細胞激素 IL-1 β 、IL-8，造成發炎反應。黃芩是一種傳統中草藥，在中醫合併其他藥物用來治療痤瘡，其主要活性成分有 Baicalin、baicalein、wogonin 和 oroxylin A，具有抗發炎、抑制腫瘤生成等效果。

本研究以痤瘡桿菌刺激人類單核球細胞(THP-1)為發炎模式，先測試黃芩正丁醇、乙酸乙酯(EtOAc)粗萃物的抗發炎效果，發現黃芩 EtOAc 粗萃物及其所含有的七種黃酮類化合物 oroxylin A、wogonin、7-O-methylwogonin、skullcapflavone II、5,7, 4'-trihydroxy-8-methoxyflavone、5,6,2'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone 和 ganhuangenin，均可顯著抑制 IL-1 β 和 IL-8 分泌。其中 wogonin 效果最佳，抑制 IL-1 β 和 IL-8 分泌之 IC₅₀ 分別為 4.9 μ M、8.7 μ M，其次為 5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavone 抑制 IL-1 β 和 IL-8 分泌之 IC₅₀ 為 11.3 μ M 和 10.2 μ M。之後以小鼠耳朵注射痤瘡桿菌模式，檢測耳朵厚度和組織均質液 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 濃度，發現七個化合物皆可抑制耳朵發炎和腫脹現象且抑制三種細胞激素的分泌。

綜合而論，黃芩萃取物和其活性成分能有效抑制痤瘡桿菌引起的發炎反應，具改善痤瘡潛力。

關鍵詞：痤瘡、黃芩、抗發炎、介白素-1 β 、介白素-8

黃芩萃取物及其組成分抑制痤瘡 丙酸桿菌誘導之發炎反應

謝鳴綺

一、緒論

(一)研究動機

超過 80%的人在青春期或成年早期都曾患有痤瘡，大多數會痊癒，少數會留下疤痕或是色素沉澱。痤瘡桿菌的大量增生、角質細胞異常、皮脂大量分泌和發炎反應為其成因。

黃芩是目前被中醫使用治療痤瘡的傳統中草藥。研究發現其有抗菌、抗發炎等功效，目前已發現幾個黃芩中主要的活性成分，baicalein、baicalin 和 wogonin (Lai *et al.*, 2001)。

這些化合物被發現有抗發炎、抗氧化、抗腫瘤等功效，研究發現 baicalein 可抑制 cisplatin 誘導腎損傷的 MAPKs 和 NF- κ B 的作用(Sahu *et al.*, 2015);在一用 LPS 刺激微膠細胞研究中發現，wogonin 可以抑制細胞激素 TNF- α 、IL-1 和促發炎的轉譯因子 NF κ -B(Piao *et al.*, 2004)。

故本研究希望能探討黃芩萃取物和其中分離之黃酮類化合物抗 *P. acnes* 誘導之發炎的效果。

(二)研究目的

本篇研究使用黃芩正丁醇和乙酸乙酯(EtOAc)粗萃物及從 EtOAc 粗萃物中分離的七個黃酮類化合物 oroxylin A、wogonin、7-O-methylwogonin、skullcapflavone II、5,7, 4'-trihydroxy-8-methoxyflavone、5,6,2'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone 和 ganhuangenin，並以抑制 heat-killed *P. acnes* 誘導人類單核球細胞細胞化學趨化激素 IL-1 β 和 IL-8 生成為指標，篩選出能夠減少 IL-1 β 和 IL-8 生成之黃酮類化合物，再以 *P. acnes* 誘導之動物模式探討其抗發炎效果，期盼能找出七個黃酮類化合物中最有效的成分。

二、材料與方法

(一)研究材料

1.黃芩

黃芩，為脣形科黃芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)的乾燥根，性寒味苦，具有清熱瀉火、解毒止血和安胎的功效，產地為中國河北、陝西、內蒙古、日本、韓國和俄羅斯。黃芩中包含超過 30 種的黃酮類化合物。其藥理活性包括抗發炎、抗氧化、抗菌、抗腫瘤、抗病毒等(Bauer & Xiao, 2011)。黃芩被中醫用來治療痤瘡，以口服或外敷方式合併黃連、黃柏等中藥一起使用。

黃芩具有抗菌的能力，研究發現可抑制多種念珠菌屬(*candida species*)的生長(Seneviratne *et al.*, 2008)。國內也有人發現黃芩可以抑制 *P. acnes* 的生長(鄭景峯, 2005)。黃芩萃取物也可抗發炎，Yoon 等人發現黃芩水萃物可抑制以 LPS 誘導 Raw264.7 細胞生成的促發炎 NO、IL-6、IL-10、IL-12(Yoon *et al.*, 2009)。

黃芩主要活性成分為：Baicalin、Baicalein、Wogonin、Oroxylin A、Scutellarin，詳細介紹如表 1-1(備註：Wogonin 和 Oroxylin A 為實驗樣品，在表 1-2 介紹)

本實驗使用黃芩 Butanol 和 EtOAc 粗萃物和從 EtOAc 粗萃物分離的黃酮化合物 oroxylin A、wogonin、7-O-methylwogonin、Skullcapflavone II、5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavone、5,6,2'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone 和 Ganhuangenin (以 FL1-FL7 代稱)，其結構、抗發炎文獻資料如表 1-2。

表 1-1 黃芩主要活性成分介紹

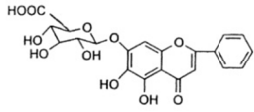
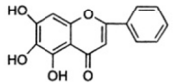
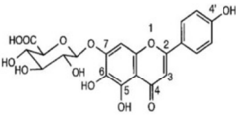
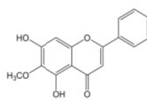
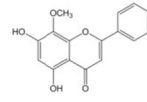
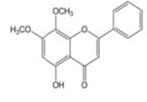
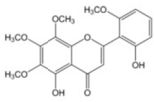
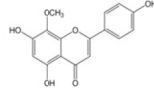
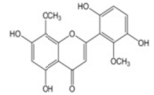
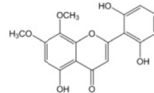
俗名	化學式	化學結構	功能	參考文獻
Baicalin 黃芩苷	Baicalin-7-O-glucuronide		抗腫瘤 抗發炎 抗氧化 抗菌 (Franky L. Chana, 2000) 抗病毒	(Li-Weber, 2009) (Bao Qun Li a, 2000) (Waisundara <i>et al.</i> , 2009) (Cushnie <i>et al.</i> , 2003)
Baicalein 黃芩苷元	5,6,7-trihydroxyflavone		抗腫瘤 抗發炎 抗氧化 (Franky L. Chana, 2000) 抗菌 抗病毒	(Li-Weber, 2009) (Shen <i>et al.</i> , 2003) (Kang <i>et al.</i> , 2012) (Chan <i>et al.</i> , 2011) (Johari <i>et al.</i> , 2012)
Scutellarin	Scutellarein-7-O-glucuronide		抗腫瘤 抗發炎 抗氧化 抗菌 (X. Chen <i>et al.</i> , 2006) 抗病毒	(Li <i>et al.</i> , 2013) (S. Wang <i>et al.</i> , 2011) (Hong & Liu, 2004) (Su <i>et al.</i> , 2014) (Sun <i>et al.</i> , 2015)

表 1-2 黃芩 EtOAc 粗萃物分離之 FL1~FL7 介紹

化合物	化學式	俗名	化學結構	抗發炎機制	參考文獻
FL1	5,7-dihydroxy-6-methoxyflavone	oroxylin A 木蝴蝶素 A		抑制 LPS 誘導巨噬細胞 NFκB 的活化來降低 iNOS 和 COX-2 的表現	(Y.-C. Chen <i>et al.</i> , 2000)
FL2	5,7-Dihydroxy-8-methoxyflavone	wogonin 漢黃芩素		在 TPA 誘導小鼠耳朵發炎模式中，抑制 TNF-α 和 COX-2 的表現	(Chi <i>et al.</i> , 2003)
FL3	5-hydroxy-7,8-dimethoxyflavone	7-O-Methylwogonin		抑制 LPS 誘導巨噬細胞 NFκB 的活化並降低 TNF-α、IL-6、MIP-2	(Chao <i>et al.</i> , 2010)

FL4	5,6'-dihydroxy-6,7,8,2'-tetramethoxyflavone	Skulcapflavone II		在一 OVA 誘導過敏性 氣喘小鼠模式中，藉由 抑制 Th2 細胞激素分 泌等，降低反應	(Jang et al., 2012)
FL5	5,7, 4'-trihydroxy-8-methoxyflavone	(-)		(-)	(-)
FL6	5,6,2'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone	(-)		(-)	(-)
FL7	5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone	Viscidulin III Ganhuangenin		(-)	(-)

備註：(-)為無相關資料，FL5- FL7 研究發現有抗病毒、抗氧化等作用

2. 痤瘡桿菌

痤瘡桿菌(*P. acnes*) 是一種親脂性的兼性厭氧格蘭氏陽性菌，存在於皮膚的毛囊管、口腔、腸胃道和生殖器管道中，對於痤瘡的形成扮演重要角色。除了上述，*P. acnes* 也是攝護腺、人工關節、手術植入物、椎間盤和眼部等處發炎的主要微生物(Yu et al., 2015)。 *P. acnes* 生存在毛囊和皮脂腺中，代謝皮脂產生游離脂肪酸，皮膚上的 *P. acnes* 會生成短鏈脂肪酸進而抑制 *S. aureus* 和 *Streptococcus pyogenes* 等病原菌的入侵(Tomida et al., 2013)，另外其可生成丙酸並分泌細菌素，像是硫肽，這些物質可抑制 *S. aureus* 和其他治病菌的生長(Brown et al., 2009; Shu et al., 2013)。

研究發現在痤瘡病人臉部無感染的皮膚區域給予 *P. acnes*，會造成發炎和膿包的形成，而將 *P. acnes* 注射到角質核細胞中，會造成其破裂和發炎反應的發生，這些證據顯示 *P. acnes* 為痤瘡的關鍵致病因子(Tanghetti, 2013)。 *P. acnes* 會釋放游離脂肪酸，並刺激 IGF-1 和 IL-1 α 等生成，使粉刺生成。

3. 單核球細胞

單核球(monocyte)是巨噬細胞的前驅物，參與在皮膚發炎中，其受到刺激會進入皮膚中並分化為巨噬細胞，是一種抗原呈現細胞。巨噬細胞在發炎初期，會被活化並有消滅病原體的能力，研究發現其會誘導超過 400 種基因，以消滅細菌和分泌相關細胞激素或趨化素來調節相關細胞功能(Valledor et al., 2010)。

大量的 *P. acnes* 聚集生長造成單核球細胞分泌促發炎細胞激素 IL-1 β 、IL-8 和 TNF- α (Vowels *et al.*, 1995)，藉由調控 TLRs(toll-like receptors)來影響這些細胞激素的生成(Jugeau *et al.*, 2005)，TLRs 參與在宿主對抗細菌、寄生蟲、真菌等外來微生物抗原的先天性免疫反應中(Kim *et al.*, 2002; Netea *et al.*, 2004)，可活化巨噬細胞和使其凋亡而引起發炎反應(Into *et al.*, 2004; Lopez *et al.*, 2003)。在人類單核球細胞(THP-1)中，TLR2 藉由 MyD88、Fas 相關蛋白和 caspase-8 誘導 NF- κ B 的活化和自體凋亡(Aliprantis *et al.*, 1999)。

(二)實驗方法

1. 樣品製備

乾燥黃芩 1.7 公斤，在室溫下以乙醇萃取兩次，每次五天，萃取物經減壓濃縮後剩下殘留物為 52.4 公克，再經正丁醇和乙酸乙酯進行分配萃取，得到兩種 Butanol 和 EtOAc 粗萃物。再將 EtOAc 粗萃物以管柱層析法分離，並經 HPLC 更進一步的純化，分離出七個化合物 FL1-FL7。

2. 細胞培養

人類單核球細胞 (Human acute monocytic leukemia, THP-1) 以 RPMI 1640 培養細胞，含 2 μ M L-glutamin、10% fetal bovine serum、0.05 mM 2-mercaptoethanol 以及 1%的抗生素，置於 37°C, 5% CO₂ 的細胞培養箱中培養，約兩到三天更換一次培養液。

3. 痤瘡桿菌

(1)培養方式

本實驗所使用之痤瘡桿菌 (*Propionibacterium acnes*, *P. acnes*) (BCRC10723)，是由人類臉部痤瘡患部所分離出來之菌株。以 Brain heart infusion (BHI) broth，含 1% Glucose，置於 37°C 的厭氧缸培養。

(2)處理方式

live *P. acnes* 以不含抗生素之 RPMI 配製成 40 mg/mL 的 stock solution，而 heat-killed *P. acnes* 則將 *P. acnes* 置於 100°C 水浴加熱 30 分鐘，使其死亡，實驗用不含抗生素之 RPMI 配製成 40 mg/mL 的 stock solution，再用超音波震盪機震盪 30 分鐘。

4. 細胞存活率測定－MTT assay

將 THP-1 cells (2×10^6 cells/mL)種於 96-well plate 中，每 well 含有 100 μ L 的細胞液，實驗組分別加入 100 μ L 不同濃度的實驗樣品溶液，控制組則加入 100

μL 的細胞培養液，置於 37°C，5% CO₂ 的細胞培養箱中培養 24 小時。24 小時後，每 well 加入 50 μL 的 MTT 溶液於細胞培養箱中反應 2 小時。移去上清液後，每 well 加入含 0.04 N HCl 的 Isopropanol 將紫色結晶溶出，利用 ELISA reader 讀取 550nm 之吸光值。實驗組與控制組之吸光值經計算後，可求得細胞存活率，公式如下：細胞存活率(%) = 實驗組之吸光值 / 控制組之吸光值 × 100%

5. *in vitro* 抑制 IL-1β、IL-8 生成之活性評估－ELISA assay

本實驗使用 heat-killed *P. acnes* 刺激 THP-1 cells，使 THP-1 cells 產生促發炎的細胞激素 IL-1β 和 IL-8 主要由單核球、巨噬細胞等免疫細胞分泌，是一種促發炎細胞激素，具有化學趨化作用，能吸引嗜中性球至患部吞噬外來病原，造成患部細胞浸潤及發炎反應，本研究使用 IL-1β 和 IL-8 作為指標，評估黃芩 Butanol、EtOAc 粗萃物及 FL1-FL7 化合物的抗發炎活性，並運用具有抗發炎作用的藥劑：luteolin 作為本實驗的正對照組。

(1) 不同處理方式 *P. acnes* 誘導 THP-1 細胞產生 IL-8 蛋白質的關係

將 THP-1 cells 以 2×10^6 cells/mL 的密度種於 96-well plate 中，每 well 含有 100 μL 的細胞液，之後加入 100 μL 含有 *P. acnes* + 含抗生素培養液、*P. acnes* + 不含抗生素培養液、heat killed *P. acnes* + 不含抗生素培養液，置於 37°C，5% CO₂ 的細胞培養箱中共培養 24 小時後收集上清液，之後使用市售套組分析 IL-8 的含量。

(2) Heat-killed *P. acnes* 誘導 THP-1 細胞產生 IL-1β、IL-8 蛋白質

將 THP-1 cells 以 2×10^6 cells/mL 的密度種於 96-well plate 中，每 well 含有 100 μL 的細胞液，之後加入 100 μL 含有 heat-killed *P. acnes* [200 μg/mL，M.O.I.=75，換算方式如下]的 Butanol、EtOAc 粗萃物、FL1-FL7、luteolin 溶液，控制組加入 100 μL 不含 *P. acnes* 的 PRMI 培養液，置於 37°C，5% CO₂ 的細胞培養箱中共培養 24 小時後收集上清液，之後使用市售套組分析 IL-1β、IL-8 的含量。

M.O.I.(Multiplicity of Infection)病毒感染倍數，指環境中一顆細胞受到多少顆病菌感染(細菌數量/細胞數量)：實驗使用 *P. acnes* 200μg/mL 以培養液稀釋法(Broth Dilution Method)，得到菌液濃度為 7.5×10^7 CFU/mL，而 THP-1 cells 密度為 1×10^6 cells/mL，換算後 M.O.I.為 75

(3) IC₅₀ 的計算

以 *P. acnes* 刺激組(FoL100)的抑制百分率為 0%，求各濃度抑制百分率(%)為多少。

$$\text{抑制百分率(\%)} = [1 - (\text{P}_{\text{sample}} - \text{P}_{\text{blk}}) / (\text{P}_{\text{FoL100}} - \text{P}_{\text{blk}})] \times 100\%$$

P_{FoL100} ：給予 200 $\mu\text{g/mL}$ Heat killed *P. Acnes*(M.O.I.=75)刺激下，THP-1 細胞 cytokines 生成量

P_{blk} ：在無任何刺激下，THP-1 細胞 cytokines 生成量

P_{sample} ：*P. acnes* 與各濃度樣品存在下，THP-1 細胞 cytokines 生成量

將各濃度樣品之抑制百分率與其濃度作圖(用 sigmaplot12.0 軟體的 standard curve 作圖)，並以內插法求抑制百分率為 50%時的樣品濃度，即為 IC_{50} 。

6. *in vivo* 抗發炎活性評估

參考 Nakatsuji 等人(2009)於文獻中建立的動物實驗模式，將 *P. acnes* 活菌注射在 ICR 小鼠耳朵皮下組織中引起發炎反應，實驗組則注射含有 *P. acnes* 與 FL1-FL7，評估 FL1-FL7 的 *in vivo* 抗發炎效果。

(1)實驗動物

本實驗使用的動物為 6 周大的 ICR 公鼠，給予市售 chow diet 及飲水，自由進食適應 3 天後分組進行實驗。

(2)菌液配製

根據預實驗測定 600 nm 吸光值下菌液的相對活菌數，以無菌的 1X PBS 將活化的 *P. acnes* 調整濃度至 6×10^9 CFU/mL。

吸光值與菌液濃度對照：

72 小時活化	OD 600nm	CFU/mL
BCRC10723	1.1	約 6×10^9

(3)樣品配製

FL1-FL7 於細胞實驗中能抑制 IL-1 β 和 IL-8 生成，因此進一步探討 FL1-FL7 之 *in vivo* 抗發炎效果。FL1-FL7 stock solution 以 DMSO 回溶樣品成 40 $\mu\text{g/mL}$ ，再以無菌之 1X PBS 稀釋至實驗濃度：20 μg per 10 μL 。

(4)注射方式

將小鼠以乙醚麻醉之後使用 0.3 mL 的胰島素針抽取實驗樣品與菌液後進行注射，注射時以棉花棒撐起小鼠耳朵，以大約 20~30 度的角度入針，入針後緩緩將 10 μL 菌液與樣品注入耳朵皮下組織，如有水泡隆起即代表注射成功。

先進行刺激時間點測試，每組各 3 隻小鼠，注射菌液後 6、12、24 小時候犧牲採樣。確認刺激時間後，每組各 6 隻小鼠，注射菌液和 7 種樣品。

(5)動物犧牲與組織採樣

樣品及菌液注射後依不同實驗分組時間點以乙醚犧牲小鼠。犧牲後剪下小鼠耳朵並使用微測徑器測量耳朵厚度，並計算抑制率(% inhibition)。

耳朵厚度增加百分比 = 實驗組之耳朵厚度 / 控制組之耳朵厚度 × 100%

$$\% \text{ inhibition} = \left(1 - \frac{\text{wt. of } P. \text{ acnes/FLs-treated ear} - \text{wt. of control ear}}{\text{wt. of } P. \text{ acnes-treated ear} - \text{wt. of control ear}} \right) \times 100$$

(6) *P. acnes* 誘導小鼠耳朵產生 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 蛋白質

將測完厚度的小鼠耳朵冰存 -80℃，隔天取出剪小塊，放入研磨管中，並加入 lysis buffer 700 μ L，以電動研磨器研磨約 30 秒~1 分鐘，接著以 4℃ 10000g 離心 1 分鐘，取出組織均質液到 1.5mL 微量離心管中，再以 4℃ 14000rpm 離心 10 分鐘，得到上清液，再以市售 ELISA kit 分析鼠耳組織所產生的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 蛋白質濃度。

7.統計分析

每次實驗都至少進行三次獨立試驗，各實驗結果數值以 mean $\pm$ SD (n = 3) 表示，並以 SPSS (Statistical Product and Service Solutions) 12 版統計軟體進行實驗數據的統計分析，實驗結果之數據以單因子變異數分析(one way ANOVA)檢定組間差異之顯著性，再以 LSD (Least Significant Difference)法進行事後比較，檢定各實驗組別與 vehicle group (heat-killed *P. acnes* alone)間是否具有顯著差異 ($p < 0.05$ ， $p < 0.01$ ， $p < 0.001$)。檢定各實驗組別彼此之間是否具有顯著差異時，使用 Duncan 檢定法進行事後比較，各組別間標示不同的小寫英文字母，則代表該組別之間具有統計上的顯著差異($p < 0.05$)。

三、結果

(一)*in vitro* 抗發炎作用

1.細胞存活率測定(MTT)

實驗樣品的實驗濃度選定，以不影響細胞存活率為原則，避免影響細胞生長而造成細胞數目不同而成為實驗的干擾因素。

(1) 黃芩 Butanol 和 EtOAc 粗萃物

黃芩 Butanol 粗萃物在 250 μ g/mL 濃度會對 THP-1 cell 產生毒性而排除該濃度。實驗結果以 50、150、200 μ g/mL 作為後續實驗使用的濃度。而 EA 粗萃物在 20 μ g/mL 濃度會對 THP-1 cell 產生毒性而排除該濃度選用 2.5、5、10 μ g/mL 作為後續實驗使用的濃度。

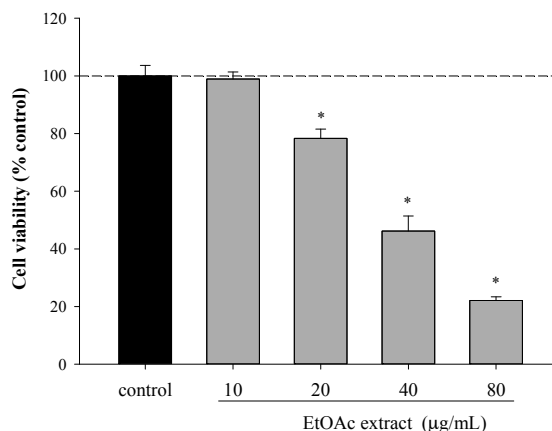


圖 1-1 以 MTT 方法測試不同濃度之黃芩 EtOAc 粗萃物處理 THP-1 cell 之細胞存活率

(2) 黃芩 EtOAc 粗萃物分離之黃酮類化合物 FL1-FL7

實驗結果如表 1-3，FL1、FL2、FL4 和 FL5 以 5, 10, 15 μ M 作為後續實驗使用的濃度。FL3 以 30, 60, 120 μ M 作為後續使用的濃度。FL6 以 15, 30, 60 μ M 作為後續使用的濃度。FL7 以 60, 90, 120 μ M 作為後續使用的濃度。

2. 抑制 IL-1 β 、IL-8 生成之活性評估(ELISA assay)

(1) 不同處理方式 *P. acnes* 誘導 THP-1 細胞產生 IL-8 蛋白質的關係

P. acnes 以活菌或經熱殺皆能達到誘發皮膚發炎狀態(Lyte *et al.*, 2009)，我們以不同方式處理 *P. acnes*，以含抗生素的培養液、活菌和熱殺處理(*P. acnes* =200 μ g/mL)，發現三者皆達到誘導 THP-1 細胞生成 IL-8 的效果(圖 1-3)。從文獻得知，樣品具有抑菌效果，由於我們想探討的是樣品抗發炎效果，因此選用 heat-killed *P. acnes* 作為後續研究的刺激物。

(2) 黃芩 Butanol 和 EtOAc 粗萃物

以不同濃度黃芩 Butanol 和 EtOAc 粗萃物和 heat-killed *P. acnes*(M.O.I. =75) 與 THP-1 cell 共同培養 24 小時，收取上清液，以 ELISA 方法分析促發炎激素 IL-1 β 和 IL-8，發現在 Butanol 粗萃物 50、150 和 200 μ g/mL(圖 1-4)和 EtOAc 粗

萃物 5 和 10 $\mu\text{g/mL}$ (圖 1-5)有顯著抑制效果，Butanol 和 EtOAc 粗萃物的 IL-1 β 和 IL-8 的 IC₅₀ 如圖 1-10、圖 1-11。

(3)黃芩 EtOAc 粗萃物分離之黃酮類化合物 FL1-FL7

將不同濃度黃芩 EtOAc 粗萃物分離之黃酮類化合物 FL1-FL7 和 heat-killed *P. acnes* (M.O.I. =75)與 THP-1 cell 共同培養 24 小時，收取上清液，以 ELISA 方法分析促發炎激素 IL-1 β 和 IL-8，發現每個化合物都有顯著抑制效果(如表 1-3)，而 FL1-FL7 的 IL-1 β 和 IL-8 的 IC₅₀(因未達 50%抑制率，FL1 和 FL6 沒有計算 IL-1 β 的 IC₅₀，FL4 沒有計算 IL-8 的 IC₅₀)。

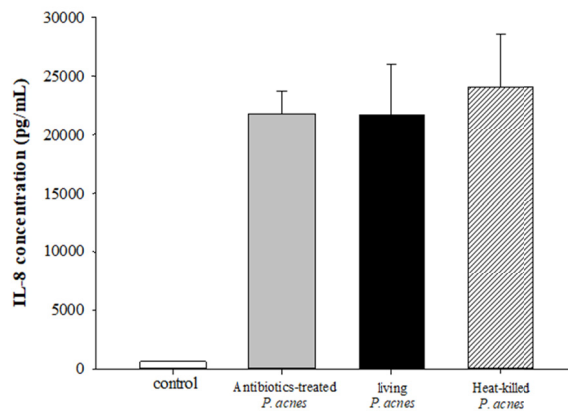


圖 1-3 *P. acnes*(200 $\mu\text{g/mL}$)以不同處理方式誘導 THP-1 細胞生成 IL-8

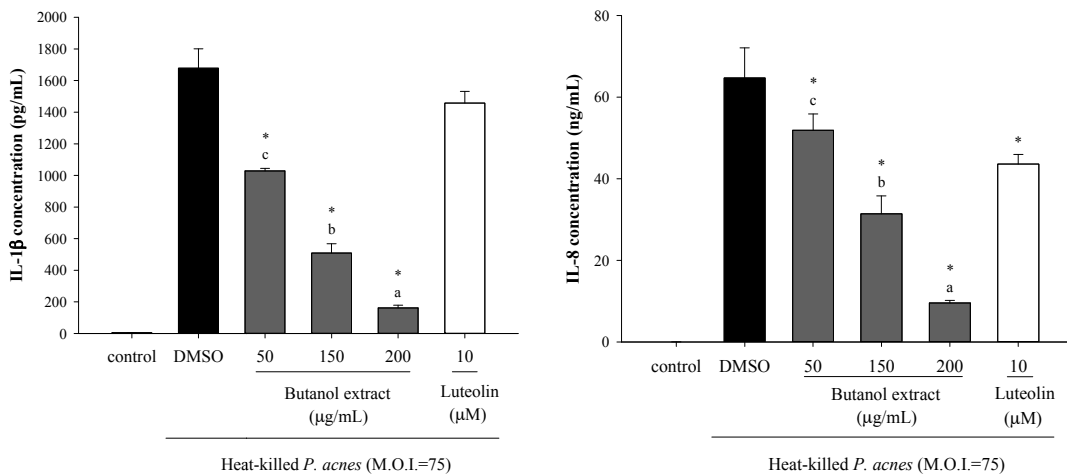


圖 1-4 黃芩 Butanol 粗萃物抑制 heat-killed *P. acnes* 誘導 THP-1 細胞之 IL-1 β 、 IL-8 cytokines 生成

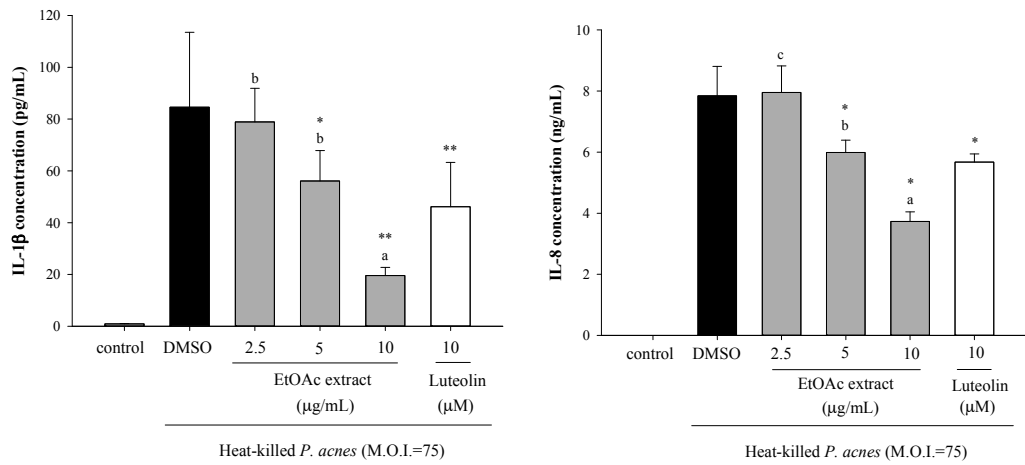


圖 1-6 黃芩 EtOAc 粗萃物抑制 heat-killed *P.acnes* 誘導 THP-1 細胞之 IL-1 β ·IL-8 cytokines 生成

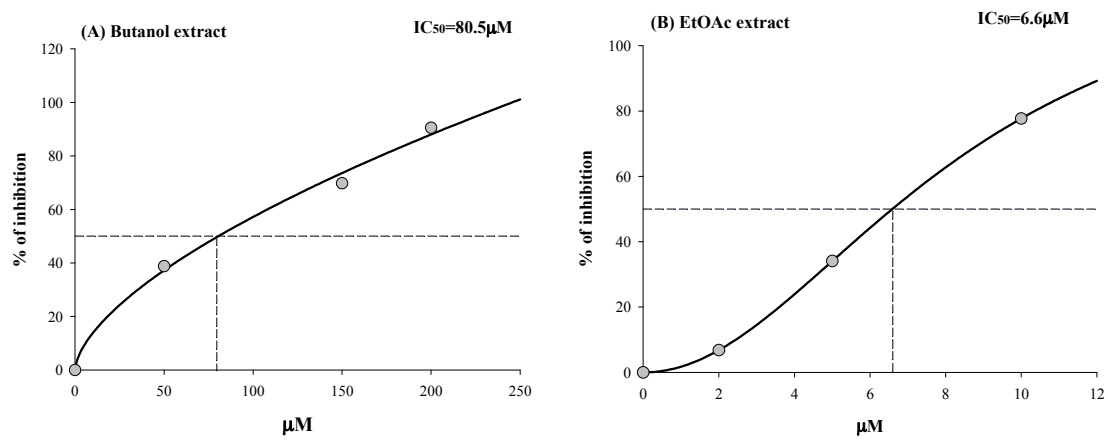


圖 1-7 黃芩 Butanol 和 EtOAc 粗萃物抑制 heat-killed *P.acnes* 誘導 THP-1 細胞之 IL-1 β cytokines 生成效果(% 抑制率和 IC₅₀)

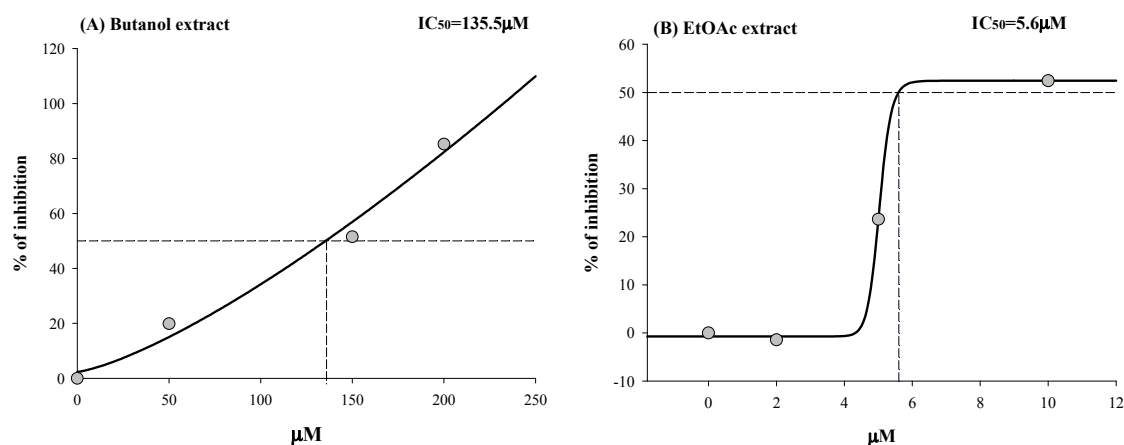


圖 1-8 黃芩 Butanol 和 EtOAc 粗萃物抑制 heat-killed *P.acnes* 誘導 THP-1 細胞之 IL-8 cytokines 生成效果(% 抑制率和 IC₅₀)

表 1-3 FL1-FL7 以 MTT 方法測試細胞存活率和抑制 heat-killed *P.acnes* 誘導 THP-1 細胞之 IL-1β、IL-8 cytokines 生成情形、IC₅₀

樣品	濃度 (μM)	細胞存活率 (% of control)	IL-8 濃度 (ng/mL)	IL-8 的 IC ₅₀ (μM)	IL-1β 濃度 (ng/mL)	IL-1β 的 IC ₅₀ (μM)
Control	(-)	93.2 ± 4.5	0.2 ± 0.2***		0.008 ± 0.007***	
DMSO	(+)	100 ± 2.5	52.4 ± 5.1		2.4 ± 0.2	
FL1	5	101.8 ± 7.8	3.9 ± 3.8*	13.1	1.6 ± 0.2***	NA
	10	93.3 ± 4.0	29.3 ± 5.4***		1.5 ± 0.2***	
	15	97.2 ± 3.0	24.1 ± 2.5***		1.2 ± 0.1***	
	30	64.5 ± 3.0	ND		ND	
FL2	5	98.6 ± 12.1	55.8 ± 8.0	8.7	1.2 ± 0.1***	4.9
	10	112.0 ± 13.0	18.9 ± 3.5***		0.6 ± 0.1***	
	15	94.7 ± 2.1	5.9 ± 1.3***		0.3 ± 0.1***	
	30	88.4 ± 4.0	ND		ND	
FL3	30	99.9 ± 7.1	39.1 ± 12.0*	55.2	1.4 ± 0.1***	72.8
	60	101.0 ± 7.8	24.7 ± 7.4***		1.4 ± 0.1***	
	120	103.6 ± 4.5	15.8 ± 3.0***		1.0 ± 0.1***	
	240	65.6 ± 2.4	ND		ND	
FL4	5	102.8 ± 2.4	56.4 ± 1.9	NA	1.6 ± 0.1***	9.1
	10	98.8 ± 3.9	39.3 ± 1.6*		1.1 ± 0.1***	
	15	99.6 ± 0.5	29.6 ± 2.2***		1.0 ± 0.1***	
	30	87.1 ± 1.8	ND		ND	
FL5	5	103.6 ± 2.0	67.7 ± 10.1***	10.2	2.0 ± 0.1*	11.3
	10	100.1 ± 2.0	32.4 ± 2.5***		1.3 ± 0.2***	

	15	100.8 ± 2.5	13.5 ± 0.6***		0.8 ± 0.1***	
	30	78.2 ± 2.8	ND		ND	
FL6	15	104.3 ± 5.8	41.5 ± 8.2*	26.1	2.0 ± 0.2***	NA
	30	101.3 ± 4.6	23.8 ± 1.5***		1.6 ± 0.1***	
	60	100.9 ± 4.2	20.3 ± 3.4***		1.4 ± 0.1***	
	120	87.5 ± 3.1	ND		ND	
FL7	60	106.7 ± 6.0	33.5 ± 2.3**	124.3	1.7 ± 0.1***	84.3
	90	110.9 ± 1.1	28.6 ± 3.0***		1.0 ± 0.1***	
	120	120.7 ± 1.2	26.3 ± 1.2***		0.8 ± 0.1***	
	240	89.3 ± 3.2	ND		ND	

Abbreviates: IC₅₀ value, concentration that provide 50% inhibition; ND, not-determined; NA, not applicable.

(-), a control experiment without *P. acnes* treatment was conducted in parallel.

(+), cells were co-incubated with DMSO (as vehicle) and *P. acnes* (M.O.I. = 75) for 24 h.

3. *in vivo* 抗發炎活性評估

從細胞實驗中觀察到 FL1-FL7 可以抑制 heat-killed *P. acnes* induced THP-1 cell 生成的 IL-1 β 和 IL-8，以 *P. acnes* 皮下注射鼠耳動物模式來檢視樣品的抗發炎效果。爲了確認樣品的安全性和 *in vivo* 實驗濃度，先以單純注射 FL1-FL7 至小鼠耳朵，根據小鼠外觀目測(外觀無紅腫等現象)選擇不造成刺激的劑量，定 20 μ g/10 μ L/ear 進行實驗。

將 *P. acnes* 活菌注射在 ICR 小鼠耳朵皮下組織中誘發小鼠耳朵紅腫發炎。先進行預實驗，以注射 *P. acnes* 後不同時間點的外觀和促發炎細胞激素變化來決定之後的刺激時間，實驗 A 注射 *P. acnes* 6、12、24 小時後犧牲小鼠，紀錄耳朵組織厚度變化，發現三個時間點都達到誘發小鼠耳朵腫脹的效果(圖 1-9)，接著取下鼠耳組織均質，均質液以 ELISA 方法分析促發炎細胞激素 IL-6 和 IL-1 β ，發現 IL-1 β 在刺激 12 小時後可生成最高的量(圖 1-10)，而 IL-6 則是刺激 6 小時後較高(圖 1-10)。我們選擇以刺激 12 小時作爲後續實驗的模式。

接下來將 *P. acnes* 和樣品一起注射，實驗 B 注射 *P. acnes* 與 FL1-FL7 於 12 小時後犧牲小鼠，在厚度方面，FL1-FL7 皆能顯著降低 ICR 小鼠耳朵的厚度，降低 *P. acnes* 刺激所造成之腫脹現象(圖 1-11、表 1-4)。之後將鼠耳磨碎均質，組織均質液以 ELISA 方法分析促發炎細胞激素 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α ，發現 FL1-FL7 對於 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 皆有抑制的效果 (圖 1-12、圖 1-13 和圖 1-14)，

FL1 -FL7 皆可顯著抑制 IL-6 和 TNF- α 的生成，而 FL3 -FL7 可顯著抑制 IL-1 β 的生成。

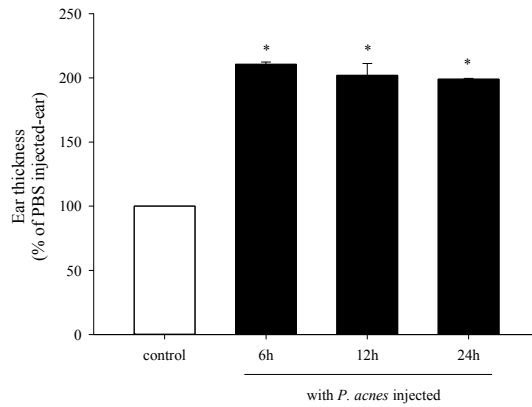


圖 1-9 不同時間點 6、12、24 小時以 *P. acnes* 誘發 ICR 小鼠耳朵腫脹發炎之影響

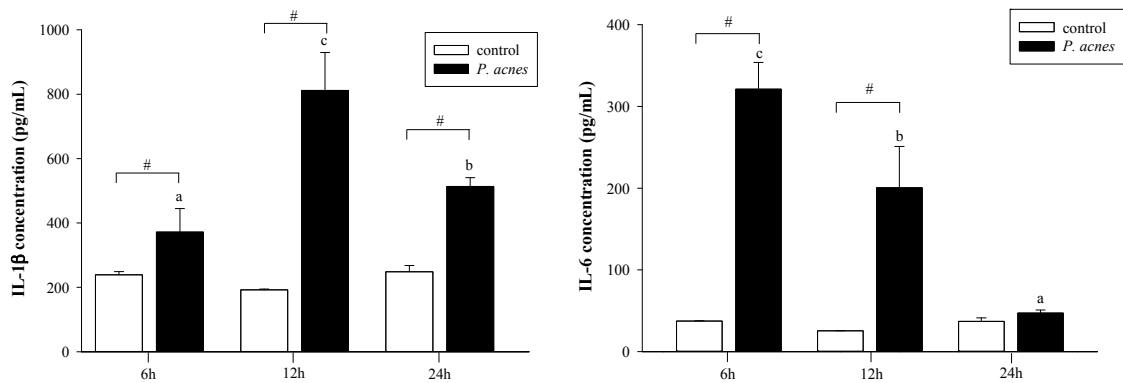


圖 1-10 不同時間點 PBS 和 *P. acnes* 注射小鼠耳朵後組織均質液的 IL-1 β 、IL-6 cytokines 生成情形

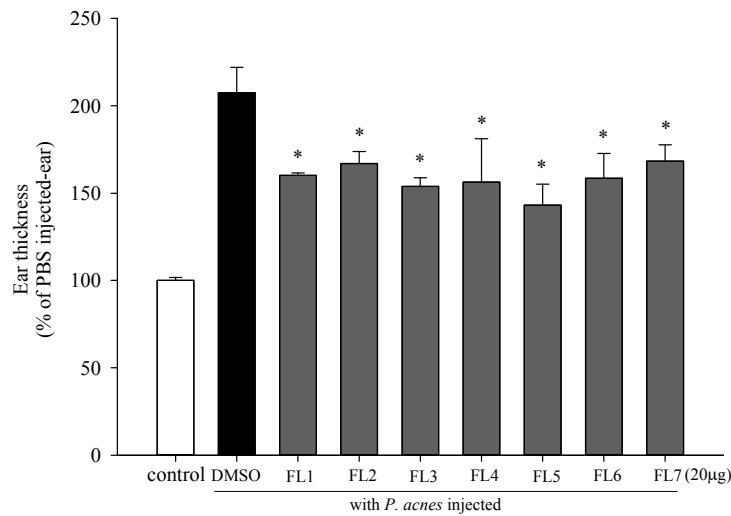


圖 1-11 FL1-FL7 對 *P. acnes* 誘發 ICR 小鼠耳朵腫脹發炎之影響

表 1-4 FL1-FL7 抑制 *P. acnes* 誘發 ICR 小鼠耳朵腫脹發炎之效果(% 抑制率)

<i>P. acnes</i>		with <i>P. acnes</i> injected						
		FL1	FL2	FL3	FL4	FL5	FL6	FL7
抑制率	0 ± 0.0	$33.9 \pm$	$27.8 \pm$	$37.9 \pm$	$36.3 \pm$	$38.3 \pm$	$30.7 \pm$	$27.0 \pm$
(%)		a, b	b	a, b	a, b	a	a, b	b
		6.4	7.7	5.8	17.6	16.9	14.1	8.6

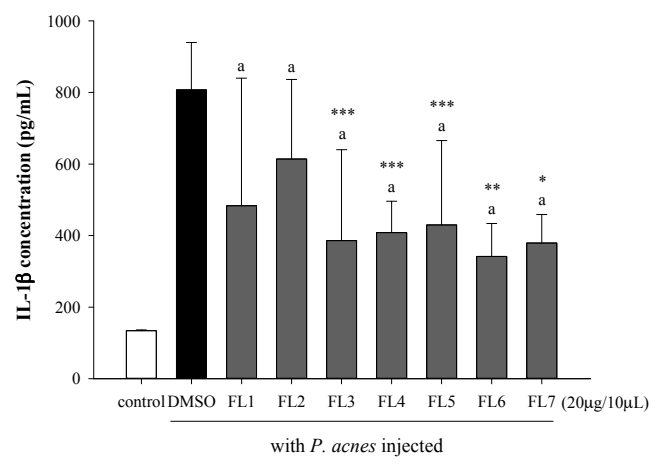


圖 1-12 FL1-FL7 對於 *P. acnes* 注射 12 小時後小鼠耳朵組織均質液的 IL-1β cytokines 生成情形

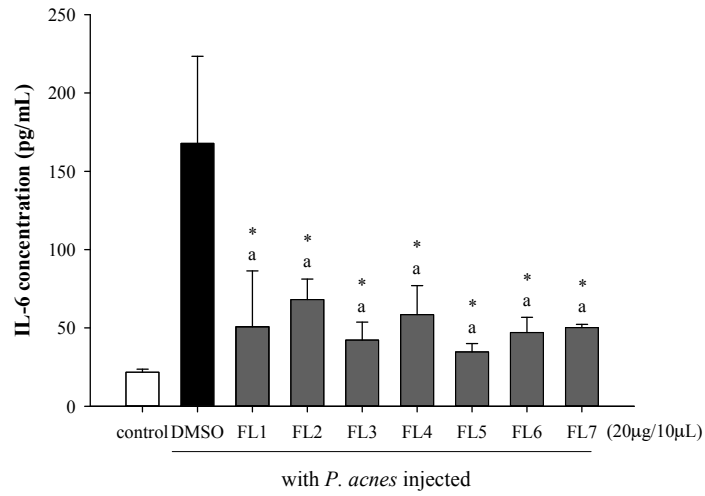


圖 1-13 FL1-FL7 對於 *P. acnes* 注射 12 小時後小鼠耳朵組織均質液的 IL-6 cytokines 生成情形

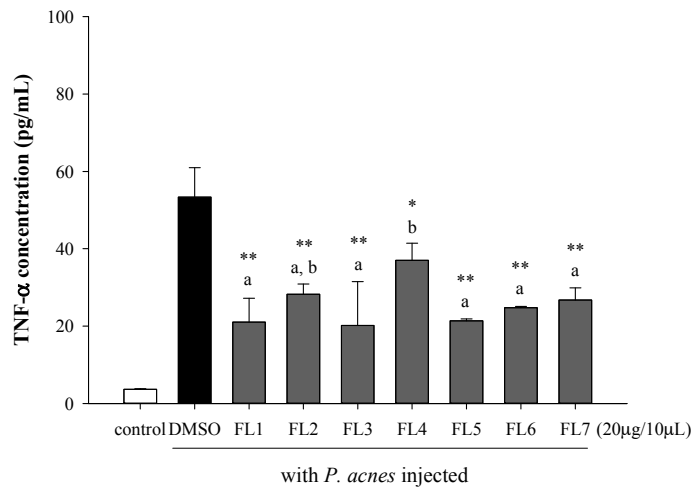


圖 1-14 FL1-FL7 對於 *P. acnes* 注射 12 小時後小鼠耳朵組織均質液的 TNF-α cytokines 生成情形

四、討論

(一) 黃芩粗萃物 *in vitro* 抗發炎活性評估

P. acnes 分泌的 peptidoglycan 可以誘導單核球細胞(THP-1 cell)促發炎 IL-1 β 和 IL-8 等細胞激素或化學趨化物的生成造成痤瘡等皮膚疾病的發炎反應(W. R. Lee *et al.*, 2014)。本實驗使用 heat-killed *P. acnes* 刺激 THP-1 細胞，發現黃芩 Butanol、EtOAc 粗萃物皆能顯著抑制 IL-1 β 和 IL-8 的分泌量。

以 IC₅₀ 比較兩者的抑制效果，黃芩 EtOAc 粗萃物在 IL-1 β 和 IL-8 皆較佳，而根據 Chen 等人研究顯示黃芩 EtOAc 粗萃物含有較多的黃酮類化合物(黃芩 Butanol 粗萃物分離的活性物質為 baicalin 和 scutellarein，而 EtOAc 粗萃物可分離出 baicalin、baicalein、wogonin、oroxylin-A、scutellarein 和 5,7,2'-trihydroxy-6-methoxyflavone)，(H. J. Chen *et al.*, 2013)，顯示可能因其中含較多的活性成分，而抑制發炎效果較佳。

在上述這些活性物質中，baicalin 和 baicalein 已被廣泛研究和應用在抗發炎方面，多篇研究顯示 baicalin 有很好的抗發炎效果(Dong *et al.*, 2015; Lixuan *et al.*, 2010; Min *et al.*, 2015)，其可藉由和化學趨化物 IL-8、MCP 等結合，而抑制發炎作用(Bao Qun Li a, 2000)。Baicalein 則可抑制 NF- κ B 和 MAPK pathway 來抑制發炎作用(He *et al.*, 2015; W. Wang *et al.*, 2015)。本實驗雖未探討黃芩粗萃物抑制 heat-killed *P. acnes* 刺激 THP-1 細胞生成 IL-1 β 和 IL-8 的機制，其可能藉由上述方式來作用。

(二) FL1-FL7 的 *in vitro* 和 *in vivo* 抗發炎活性評估

從 EtOAc 粗萃物分離的七種化合物 FL1-FL7(oroxylin A、wogonin、7-O-methylwogonin、skullcapflavone II、5,7, 4'-trihydroxy-8-methoxyflavone、5,6,2'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone 和 ganhuangenin)，皆能抑制 heat-killed *P. acnes* 刺激 THP-1 細胞生成的 IL-1 β 和 IL-8。

FL2(wogonin)在細胞實驗中有最好的抗發炎效果，其他研究中也觀察到同樣的情形，一篇以 LPS 刺激 RAW264.7 小鼠巨噬細胞研究中，發現 wogonin 可顯著抑制 NO 和 PGE₂ 的生成(Yen-Chou Chen, 2001)；另一研究，以 LPS 誘導 BV-2 老鼠神經細胞，wogonin 可顯著抑制 NO 和 TNF- α 、IL-1 β 的生成(H. Lee *et al.*, 2003)。抑制效果其次為 FL5(5,7, 4'-trihydroxy-8-methoxyflavone)，觀察兩者結構發現，5,7, 4'-trihydroxy-8-methoxyflavone 比 wogonin 在 C4'上多了一個 OH 基，可能是其抗發炎效果低於 wogonin 的原因之一。另外 C5 和 C7 上的 OH 基

被發現為黃酮類化合物抑制 LPS 誘導 NO 生成的重要關鍵，而 C8 上的 OCH₃ 則可增強抑制作用(Huang *et al.*, 2007)；另一研究發現當去除 C8 上的 OCH₃(chrysin)，會顯著降低抗發炎效果，確認了 C8 上的 OCH₃ 對於 wogonin 抗發炎作用的地位(Pham *et al.*, 2012)。這些可能是這兩個化合物能達到最佳抑制效果的原因。FL7(Ganhuangenin)在 C5、C7 和 C8 雖也有同樣結構，但可能因增加了 C2'和 C5'上的 OH 基及 C6'的 OCH₃，降低了抗發炎的效果。

FL1(oroxylin A)對 IL-8 抑制也達到很好的效果，IL-1 β 抑制率則接近 50%，oroxylin A 的 C6 上有 OCH₃，可能為其作用點，研究發現 oroxylin A 可抑制 LPS 刺激 RAW264.7 細胞的 COX2 和 iNOS 的 mRNA 表現量(Pham *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2014)。FL4(skullcapflavone II) 對 IL-1 β 抑制達到有很好的效果，但 IL-8 抑制率則未達 50%，就其結構來說，其 A 環上具有最多的 OCH₃，可能是影響其抗發炎效果的因素。FL3(7-O-methylwogonin)和 FL6(5,6,2'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone)在 A 環的結構一樣，差別於 5,6,2'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone 在 B 環多了兩個 OH 基，單比較兩者抑制 IL-8 的 IC₅₀，後者比前者效果好，可能和其 B 環結構有關。而在一以 LPS 刺激 J774A.1 老鼠巨噬細胞發現，7-O-methylwogonin 可降低 NO、PGE₂、IL-1 β 、IL-6 的生成(Chandrasekaran *et al.*, 2011)，顯示其抗發炎效果。FL7(ganhuangenin)在七個化合物中為抗發炎效果最差的，其 C5'上有一個 OCH₃，可能是影響因素。

從 *in vitro* 實驗結果，顯示七個黃酮類化合物皆具有抗發炎的效用，因此以 *P. acnes* 引起小鼠耳朵腫脹與發炎來評估其 *in vivo* 的抗發炎活性。從實驗 A 發現不同時間點給予注射 *P. acnes*，並沒有造成厚度差異，表示在 6 小時即引起發炎現象且維持至少到 24 小時，而組織均質液中的促發炎細胞激素 IL-6 則在 6 小時表現最高依時間降低，IL-6 是急性發炎的重要指標，由於 IL-1 β 在 12 小時最高，為觀察兩者後以刺激 12 小時為後續實驗模式。

從實驗 B 發現，給予七個化合物在外觀方面皆能改善紅腫現象，而測量耳朵厚度，也皆能顯著抑制 *P. acnes* 引起之發炎反應，七個化合物抑制率沒有差異。接著探討 *P. acnes* 注射小鼠耳朵引起促發炎細胞激素 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的分泌量，發現七個化合物皆有抑制效果，並不能看出哪一個黃酮類化合物最有效，而黃芩粗萃物本身具有抗菌作用，七個化合物中 oroxylin A、wogonin 被發現可抗菌(Franzblau & Cross, 1986; Luitel *et al.*, 2010)，因此其抑制發炎可能和抗菌作用相關，另本實驗使用的劑量可能為一影響因子，若測試數個劑量並計算 IC₅₀，或可看出七個化合物的抗發炎效果區別。

(三) 結論

黃芩 Butanol、EtOAc 粗萃物和化合物 oroxylin A、wogonin、7-O-methylwogonin、skullcapflavone II、5,7, 4'-trihydroxy-8-methoxyflavone、5,6,2'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone 和 ganhuangenin 在 *P. acnes* 誘導 in vitro 和 in vivo 模式中，皆有顯著抑制抗發炎的效果。

以 heat-killed *P. acnes* 誘導 THP-1 細胞生成促發炎激素模式中，wogonin 和 5,6'-dihydroxy-6,7,8,2' -tetramethoxyflavone 具有最佳的抗發炎效果，而以 *P. acnes* 引起小鼠耳朵腫脹與發炎模式中，七個黃酮類化合物區分不出那一個有最佳效果。

結果顯示黃芩粗萃物和其中分離之黃酮類化合物皆具良好抗發炎效果，未來可以進一步了解相關機制，發展成為改善痤瘡的藥物。

五、參考文獻

- 鄭景峯. (2005). 六十種中藥材熱水萃出物對痤瘡病原菌之抑菌性. 大同大學生物工程學系所學位論文
- Aliprantis, A. O., Yang, R.-B., Mark, M. R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J. D., Zychlinsky, A. (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science*, 285(5428), 736-739.
- Bao Qun Li a, T. F., Wang-Hua Gong, Nancy Dunlop, Hsiang-fu Kung, Yaodong Yan, Jian Kang, Ji Ming Wang. (2000). The flavonoid baicalin exhibits anti-inflammatory activity by binding to chemokines. *Immunopharmacology*, 49, 295–306.
- Bao Qun Li a, T. F., Wang-Hua Gong, Nancy Dunlop, Hsiang-fu Kung, Yaodong Yan, Jian Kang, Ji Ming Wang. (2000). The flavonoid baicalin exhibits anti-inflammatory activity by binding to chemokines. *Immunopharmacology*, 49, 295–306.
- Bauer, R., & Xiao, P.-G. (2011). *Radix Scutellariae—Huangqin*: Springer.
- Brown, L. C. W., Acker, M. G., Clardy, J., Walsh, C. T., & Fischbach, M. A. (2009). Thirteen posttranslational modifications convert a 14-residue peptide into the antibiotic thiocillin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(8), 2549-2553.

- Chan, B. C., Ip, M., Lau, C. B., Lui, S. L., Jolival, C., Ganem-Elbaz, C., . . . Leung, P. C. (2011). Synergistic effects of baicalein with ciprofloxacin against NorA over-expressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and inhibition of MRSA pyruvate kinase. *J Ethnopharmacol*, 137(1), 767-773. doi: 10.1016/j.jep.2011.06.039
- Chandrasekaran, C. V., Thiagarajan, P., Deepak, H. B., & Agarwal, A. (2011). In vitro modulation of LPS/calcimycin induced inflammatory and allergic mediators by pure compounds of *Andrographis paniculata* (King of bitters) extract. *Int Immunopharmacol*, 11(1), 79-84. doi: 10.1016/j.intimp.2010.10.009
- Chao, W. W., Kuo, Y. H., & Lin, B. F. (2010). Anti-inflammatory activity of new compounds from *Andrographis paniculata* by NF-kappaB transactivation inhibition. *J Agric Food Chem*, 58(4), 2505-2512. doi: 10.1021/jf903629j
- Chen, H. J., Liang, T. M., Lee, I. J., Huang, Y. T., & Lin, Y. L. (2013). *Scutellariae radix* suppresses LPS-induced liver endothelial cell activation and inhibits hepatic stellate cell migration. *J Ethnopharmacol*, 150(3), 835-842. doi: 10.1016/j.jep.2013.08.049
- Chen, Y.-C., Yang, L.-L., & Lee, T. J. (2000). Oroxylin A inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of nuclear factor-κB activation. *Biochemical Pharmacology*, 59(11), 1445-1457.
- Chi, Y. S., Lim, H., Park, H., & Kim, H. P. (2003). Effects of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on skin inflammation: in vivo regulation of inflammation-associated gene expression. *Biochemical Pharmacology*, 66(7), 1271-1278.
- Cushnie, T. P., Hamilton, V. E., & Lamb, A. J. (2003). Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiol Res*, 158(4), 281-289. doi: 10.1078/0944-5013-00206
- Dong, S.-j., Zhong, Y.-q., Lu, W.-t., Li, G.-h., Jiang, H.-l., & Mao, B. (2015). Baicalin Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammation Through Signaling NF-κB Pathway in HBE16 Airway Epithelial Cells. *Inflammation*, 1-9.

- Franzblau, S. G., & Cross, C. (1986). Comparative in vitro antimicrobial activity of Chinese medicinal herbs. *Journal of ethnopharmacology*, 15(3), 279-288.
- He, X., Wei, Z., Zhou, E., Chen, L., Kou, J., Wang, J., & Yang, Z. (2015). Baicalein attenuates inflammatory responses by suppressing TLR4 mediated NF- κ B and MAPK signaling pathways in LPS-induced mastitis in mice. *International immunopharmacology*, 28(1), 470-476.
- Hong, H., & Liu, G.-Q. (2004). Protection against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells by scutellarin. *Life sciences*, 74(24), 2959-2973.
- Huang, G.-C., Chow, J.-M., Shen, S.-C., Yang, L.-Y., Lin, C.-W., & Chen, Y.-C. (2007). Wogonin but not Nor-wogonin inhibits lipopolysaccharide and lipoteichoic acid-induced iNOS gene expression and NO production in macrophages. *International immunopharmacology*, 7(8), 1054-1063.
- Into, T., Kiura, K., Yasuda, M., Kataoka, H., Inoue, N., Hasebe, A., . . . Shibata, K.-i. (2004). Stimulation of human Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR6 with membrane lipoproteins of *Mycoplasma fermentans* induces apoptotic cell death after NF- κ B activation. *Cellular Microbiology*, 6(2), 187-199. doi: 10.1046/j.1462-5822.2003.00356.x
- Jang, H.-Y., Ahn, K.-S., Park, M.-J., Kwon, O.-K., Lee, H.-K., & Oh, S.-R. (2012). Skullcapflavone II inhibits ovalbumin-induced airway inflammation in a mouse model of asthma. *International immunopharmacology*, 12(4), 666-674.
- Johari, J., Kianmehr, A., Mustafa, M. R., Abubakar, S., & Zandi, K. (2012). Antiviral activity of baicalein and quercetin against the Japanese encephalitis virus. *Int J Mol Sci*, 13(12), 16785-16795. doi: 10.3390/ijms131216785
- Jugeau, S., Tenaud, I., Knol, A. C., Jarrousse, V., Quereux, G., Khammari, A., & Dreno, B. (2005). Induction of toll-like receptors by *Propionibacterium acnes*. *Br J Dermatol*, 153(6), 1105-1113. doi: 10.1111/j.1365-2133.2005.06933.x
- Kang, K. A., Zhang, R., Piao, M. J., Chae, S., Kim, H. S., Park, J. H., . . . Hyun, J. W. (2012). Baicalein inhibits oxidative stress-induced cellular damage via antioxidant effects. *Toxicol Ind Health*, 28(5), 412-421. doi: 10.1177/0748233711413799
- Kim, J., Ochoa, M. T., Krutzik, S. R., Takeuchi, O., Uematsu, S., Legaspi, A. J., . . . Modlin, R. L. (2002). Activation of Toll-Like Receptor 2 in Acne Triggers

- Inflammatory Cytokine Responses. *The Journal of Immunology*, 169(3), 1535-1541. doi: 10.4049/jimmunol.169.3.1535
- Lai, M.-Y., Chen, C.-C., Hsiu, S.-L., & Chao, P.-D. L. (2001). Analysis and comparison of baicalin, baicalein and wogonin contents in traditional decoctions and commercial extracts of *Scutellariae Radix*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 9(3).
- Lee, H., Kim, Y. O., Kim, H., Kim, S. Y., Noh, H. S., Kang, S. S., . . . Suk, K. (2003). Flavonoid wogonin from medicinal herb is neuroprotective by inhibiting inflammatory activation of microglia. *FASEB J*, 17(13), 1943-1944. doi: 10.1096/fj.03-0057fje
- Lee, W. R., Kim, K. H., An, H. J., Kim, J. Y., Han, S. M., Lee, K. G., & Park, K. K. (2014). Protective effect of melittin against inflammation and apoptosis on *Propionibacterium acnes*-induced human THP-1 monocytic cell. *Eur J Pharmacol*, 740, 218-226. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.06.058
- Li, H., Fan, H., Wang, Z., Zheng, J., & Cao, W. (2013). Potentiation of scutellarin on human tongue carcinoma xenograft by low-intensity ultrasound. *PLoS One*, 8(3), e59473.
- Li-Weber, M. (2009). New therapeutic aspects of flavones: the anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. *Cancer Treat Rev*, 35(1), 57-68. doi: 10.1016/j.ctrv.2008.09.005
- Lixuan, Z., Jingcheng, D., Wenqin, Y., Jianhua, H., Baojun, L., & Xiaotao, F. (2010). Baicalin attenuates inflammation by inhibiting NF-kappaB activation in cigarette smoke induced inflammatory models. *Pulm Pharmacol Ther*, 23(5), 411-419. doi: 10.1016/j.pupt.2010.05.004
- Lopez, M., Sly, L. M., Luu, Y., Young, D., Cooper, H., & Reiner, N. E. (2003). The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* Protein Induces Macrophage Apoptosis Through Toll-Like Receptor-2. *The Journal of Immunology*, 170(5), 2409-2416. doi: 10.4049/jimmunol.170.5.2409
- Luitel, H. N., Rajbhandari, M., Kalauni, S. K., Awale, S., Masuda, K., & Gewali, M. B. (2010). Chemical constituents from *Oroxylum indicum* (L.) Kurz of Nepalese origin. *Scientific World*, 8(8), 66-68.
- Min, W., Ahmad, I., Chang, M. E., Burns, E. M., Qian, Q., & Yusuf, N. (2015). Baicalin Protects Keratinocytes From Toll-Like Receptor-4 Mediated DNA

Damage and Inflammation Following Ultraviolet Irradiation. *Photochemistry and*

Photobiology.

Netea, M. G., van der Graaf, C., Van der Meer, J. W., & Kullberg, B. J. (2004). Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(5), 749-755.

Pham, T.-A. N., Che, H., Phan, P.-T. T., Lee, J.-W., Kim, S.-S., & Park, H. (2012). Oroxylin A analogs exhibited strong inhibitory activities against iNOS-mediated nitric oxide (NO) production. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(7), 2534-2535.

Piao, H. Z., Jin, S. A., Chun, H. S., Lee, J.-C., & Kim, W.-K. (2004). Neuroprotective effect of wogonin: potential roles of inflammatory cytokines. *Archives of pharmacal research*, 27(9), 930-936.

Sahu, B. D., Kumar, J. M., & Sistla, R. (2015). Baicalein, a Bioflavonoid, Prevents Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury by Up-Regulating Antioxidant Defenses and Down-Regulating the MAPKs and NF- κ B Pathways. *PLoS One*, 10(7).

Seneviratne, C. J., Wong, R. W., & Samaranayake, L. P. (2008). Potent anti-microbial activity of traditional Chinese medicine herbs against *Candida* species. *Mycoses*, 51(1), 30-34. doi: 10.1111/j.1439-0507.2007.01431.x

Shen, Y.-C., Chiou, W.-F., Chou, Y.-C., & Chen, C.-F. (2003). Mechanisms in mediating the anti-inflammatory effects of baicalin and baicalein in human leukocytes. *European journal of pharmacology*, 465(1-2), 171-181. doi: 10.1016/s0014-2999(03)01378-5

Shu, M., Wang, Y., Yu, J., Kuo, S., Coda, A., Jiang, Y., . . . Huang, C.-M. (2013). Fermentation of *Propionibacterium acnes*, a commensal bacterium in the human skin microbiome, as skin probiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 8(2), e55380.

Su, Y., Ma, L., Wen, Y., Wang, H., & Zhang, S. (2014). Studies of the in vitro antibacterial activities of several polyphenols against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 19(8), 12630-12639.

- Sun, N., Yu, T., Zhao, J.-X., Sun, Y.-G., Jiang, J.-B., Duan, Z.-B., . . . Li, H.-Q. (2015). Antiviral activities of natural compounds derived from traditional chinese medicines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20(1), 180-187.
- Tanghetti, E. A. (2013). The role of inflammation in the pathology of acne. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, 6(9), 27.
- Tomida, S., Nguyen, L., Chiu, B.-H., Liu, J., Sodergren, E., Weinstock, G. M., & Li, H. (2013). Pan-genome and comparative genome analyses of propionibacterium acnes reveal its genomic diversity in the healthy and diseased human skin microbiome. *MBio*, 4(3), e00003-00013.
- Valledor, A. F., Comalada, M., Santamaría-Babi, L., Lloberas, J., & Celada, A. (2010). 1 Macrophage Proinflammatory Activation and Deactivation: A Question of Balance. *Advances in immunology*, 108, 1.
- Vowels, B. R., Yang, S., & Leyden, J. J. (1995). Induction of proinflammatory cytokines by a soluble factor of Propionibacterium acnes: implications for chronic inflammatory acne. *Infection and immunity*, 63(8), 3158-3165.
- Waisundara, V. Y., Hsu, A., Tan, B. K., & Huang, D. (2009). Baicalin improves antioxidant status of streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *J Agric Food Chem*, 57(10), 4096-4102. doi: 10.1021/jf8028539
- Wang, S., Wang, H., Guo, H., Kang, L., Gao, X., & Hu, L. (2011). Neuroprotection of Scutellarin is mediated by inhibition of microglial inflammatory activation. *Neuroscience*, 185, 150-160. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.04.005
- Wang, W., Zhou, P.-h., Xu, C.-g., Zhou, X.-j., Hu, W., & Zhang, J. (2015). Baicalein attenuates renal fibrosis by inhibiting inflammation via down-regulating NF-κB and MAPK signal pathways. *Journal of molecular histology*, 1-8.
- Ye, M., Wang, Q., Zhang, W., Li, Z., Wang, Y., & Hu, R. (2014). Oroxylin A exerts anti-inflammatory activity on lipopolysaccharide-induced mouse macrophage via Nrf2/ARE activation. *Biochemistry and Cell Biology*, 92(5), 337-348.
- Yen-Chou Chen, S.-C. S., Lih-Geeng Chen, Tony J-F Lee, Ling-Ling Yang. (2001). Wogonin, baicalin, and baicalein inhibition of inducible nitric oxide. *Biochemical Pharmacology*, 61, 1417–1427.

- Yoon, S. B., Lee, Y. J., Park, S. K., Kim, H. C., Bae, H., Kim, H. M., .. Park, W. (2009). Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol*, 125(2), 286-290. doi: 10.1016/j.jep.2009.06.027
- Yu, Y., Champer, J., & Kim, J. (2015). Analysis of the Surface, Secreted, and Intracellular Proteome of *Propionibacterium acnes*. *EuPA Open Proteomics*. doi: 10.1016/j.euprot.2015.06.003