

ISSN 2305-087X

Yearbook of Chinese Medicine and Pharmacy  
(DVD version)

# 中醫藥年報

(光碟版)

年刊2016 (105年) 第五期  
Annual 2016 Issue 5

(第一冊) 電子書



中華民國一百零五年十二月 製作  
Published in December, 2016

衛生福利部  
Ministry of Health and Welfare

ISSN : 2305-087X

# 中 醫 藥 年 報

## ( 光 碟 版 )

---

Yearbook of Chinese Medicine and Pharmacy (DVD version)

年刊 2016 ( 105 年 )

第五期

Annual 2016

Issue 5

衛生福利部  
Ministry of Health and Welfare  
中華民國一百零五年十二月 製作  
Published in December, 2016

## 中醫藥年報(光碟版)第五期

## 總目錄(第一冊)

計畫編號	計畫名稱	執行機構	計畫主持人
CCMP93-RD-057	脈壓力波與 APACHE II 對加護病房重症病人預後的比較研究	長庚紀念醫院	陳玉昇
CCMP95-RD-008	網膜缺血或實驗性青光：活血去瘀要川芎內含成分之神經保護探討	臺北榮民總醫院	趙效明
CCMP96-RD-007	新型艾灸排煙通風器對中醫醫療院所室內空氣品質改善之研究	臺北市立聯合醫院	蔡德豐
CCMP96-RD-045	六味地黃散品質精緻化可行性與藥劑相等性評估	中國醫藥大學	余建志
CCMP96-RD-206	人類癌症基因體以驗證探討抗癌中草藥-子計畫六、中草藥調節抑癌基因對抗肝癌機制的探討(2-2)	國立臺灣大學	呂紹俊
CCMP96-RD-207	利用 $\beta$ -Catenin 啟動子之報導基因平台評估具抗血癌活性之中草藥(2-2)	輔仁大學	郭育綺
CCMP96-RD-210	茄科植物中具抗肝炎病毒之天然物及分子演化	中國醫藥大學	周昌弘
CCMP97-RD-012	網膜缺血或實驗性青光眼:黃芩內含成分黃芩素之神經保護探討	臺北榮民總醫院	趙效明
CCMP97-RD-210	茄科植物中具抗肝炎病毒及幽門螺旋桿菌天然物之分子機制探討	中國醫藥大學	周昌弘
CCMP98-RD-031	小型可攜式舌診系統(2-1)	國立中山大學	蔣依吾
CCMP99-RD-105	小型可攜式舌診系統(2-2)	國立中山大學	蔣依吾
CCMP99-RD-208	台灣八角金盤具抗肝炎病毒及幽門螺旋桿菌感染之天然物分子機轉探討	中國醫藥大學	周昌弘
CCMP100-RD-022	樟芝發酵產物微波殺菌及微波凍乾製程研發	國立宜蘭大學	陳淑德
CCMP100-RD-108	台灣產黃花石斛健康食品之開發(2-2)	中國醫藥大學	林文川
CCMP101-RD-020	香砂六君子湯改善逆流性食道炎症狀及預防復發的效果(2-1)	義大醫療財團法人義大醫院	陳明豐
CCMP101-RD-028	滎陽治肝湯對慢性 C 型肝炎病人之療效評估:一隨機雙盲對照及交叉研究(2-1)	臺北榮民總醫院	黃信彰
CCMP101-RD-029	高氏柴胡防治 C 型肝炎病毒感染與應用安全性評估(2-1)	高雄醫學大學	林俊清
CCMP101-RD-030	中西藥或食品間的交互作用參考手冊編纂	國立陽明大學	蔡東湖
CCMP101-RD-031	雷公藤對 Cisplatin 抑制腫瘤生長及血管新生之影響(2-1)	慈濟學校財團法人慈濟大學	王寧
CCMP101-RD-033	少腹逐瘀湯加減對疼痛性糖尿病周圍神經病變療效研究(2-1)	中國醫藥大學	蔡宗璋

計畫編號	計畫名稱	執行機構	計畫主持人
CCMP102-RD-004	台灣金銀花與川芎有機及GAP栽培模式與生物活性研究(2-1)	明道大學	陳柏青
CCMP102-RD-006	中草藥標靶肝型脂肪酸結合蛋白治療肝癌	國立臺灣師範大學	林榮耀
CCMP102-RD-009	中醫藥治療子宮內膜異位症婦女之療效評估及對助孕酮受器表現之影響	國立陽明大學	賈愛華
CCMP102-RD-105	台灣常用中藥方劑與抗凝血劑 warfarin、消炎止痛 ibuprofen 之交互作用分析(2-2)	義守大學	蔡金川
CCMP102-RD-107	少腹逐瘀湯加減對疼痛性糖尿病周圍神經病變療效研究(2-2)	中國醫藥大學	陳榮興
CCMP102-RD-109	榮陽治肝湯對慢性 C 型肝炎病人之療效評估;一隨機雙盲對照及交叉研究(2-2)	臺北榮民總醫院	黃信彰
CCMP102-RD-110	建構中西醫合作治療癌症研究平台(2-2)	臺北榮民總醫院	陳方佩
CCMP102-RD-111	高氏柴胡防治 C 型肝炎病毒感染與應用安全性評估(2-2)	高雄醫學大學藥學系	林俊清
CCMP102-RD-112	雷公藤對 Cisplatin 抑制腫瘤生長及血管新生之交互作用(2-2)	慈濟學校財團法人慈濟大學	王寧
CCMP102-RD-113	中醫症狀術語作業標準化(2-2)	財團法人彰化基督教醫院	羅綸謙

# 脈壓力波與 APACHE II 對加護病房重症病人預後的比較研究

陳玉昇  
長庚紀念醫院

## 摘要

危重病中西醫結合的治療在大陸及長庚醫院已有初步的經驗，如微循環障礙中藥輔助改善，輔助脫離呼吸器依賴，調整機體的免疫功能輔助抗生素的控制感染，協助提高昏迷狀態助意識恢復等，而中醫與西醫協助診療的時機，中西醫合作之診療模式為何，基本取決於有一客觀有效的評估方法。尤其在危重病病人評估，更是中醫能否協助重症醫療的重要前提，或許也是中醫住院能否推廣及開展的因素，脈波儀可能是目前相對發展成熟而且易取於定性、定量資料的媒介。

### 研究目的：

93 年度本計畫進行的重點在於脈波儀的研發及修改及其穩定性的測定及收集中醫典籍（內經、難經、傷寒論、脈經）有關脈診、常脈、死脈之文獻資料以作為發展脈波儀之參考依據。

### 研究方法：

本研究收集長庚紀念醫院林口院區內科第一加護病房(MICUI)危重症病人 100 例，取得其 APACHE II score 及脈波儀資料，選擇觀察期間死亡者 30 名為 B 組，其餘為對照組 C 組。

並徵求健康學生 100 人為 A 組，男女不限，年齡介於 18-25 歲，記錄其脈波，以建立脈波基準值資料庫。以 SPSS 統計軟體進行多變項分析 APACHE II score 及脈波特徵參數之相關性，推出可能預測預後之脈波模式。在所有分析中， $P < 0.05$  作為有顯著差異。

### 研究發現：

診脈的長度及深度有別於現今的二十八脈系統，而是以難經的五層（皮、脈、肉、筋、骨），及脈經的大於七部（寸三分，尺三分，關一），提供了本研究史理想的多位階同步式脈波儀之依據。而脈波儀之穩定性測試 44 位健康人，以所測得之收縮壓、舒張壓、平均壓及脈搏為參考參數，每人測量三次，間隔 3-5 分鐘，

以重複測量 ANOVA 分析，檢定結果顯示均未達到顯著意義，(P 值均大於 0.05)，表示此四項測量在重複三次測量中均未發生受試者內變異，亦即在不同時間測量的測量值並未受到時間不同的影響，一致性良好。

### 研究困難：

本計畫限於時間五個月，經費及人力使得研究成果受限完成進度之阻礙，及影響脈診儀的研發製作。

94 年度繼續進行脈波資料的蒐集，希望達到得到下面之目標：(1) 找出脈波中與死亡危險性相關的脈形及特徵參數，並探討「死脈」之現代涵義。(2) 驗證中醫典籍（內經、難經、傷寒論、脈經）所論「死脈」與本研究之符合度(3) 初步建立脈法在死亡危險性預後上的模式。(4) 提供下一階段預測性研究的參考。

關鍵詞：危重症預後、脈診、脈波儀、中醫現代化、APACHE

# The Sphygmogram in Predicting the Prognosis of Intensive Care unit Patients

Chen Yu-Sheng  
Chang Gung Memorial Hospital

## ABSTRACT

### **Aim:**

In China Mainland and Chang-Gung memorial hospital in Taiwan, there has been some initiative experience in the combination therapy of modern medicine and traditional Chinese medicine in critical patients, for example, microcirculation impairment, ventilator-dependence weaning, immune adjustment for infection control, consciousness improvement in coma patients, Objective and effective evaluation methods are important to the indication and cooperation model of combination of modern medicine and traditional Chinese medicine. The evaluation of critical patients is the presupposition whether traditional Chinese medicine conduces to critical medicine or riot, and the key point to promote the admission care by Chinese medicine. Probably, the pulsimeter is presently relatively mature medium for catching quantitative and qualitative data.

### **Methods:**

This study collects APACHE-II score and pulsimeter data of one hundred critical patients in medical intensive care unit I of Chang-Gung memorial hospital. The thirty dead will be classified to group-B, and the others are group-C as control group. We invite one hundred healthy students as group-A, male or female, aged 18 to 25, and we collect their pulse wave for setting baseline data bank. We will use SPSS software to analyze the relationship of APACHE-II score and parameters of pulse wave, in order to develop the pulse wave model for prognosis anticipation. Significant difference is defined as p value is less than 0.05. In this year, our focus was on the development and stability measurement of pulsimeter, and we reviewed the descriptions about pulse diagnostics, normal pulse and death pulse in the bibles of traditional Chinese medicine, including Nei-jing(內經, Inner Canon)、Nan-jing(難經, Classic of Difficult Issues)、

Shang-Han-lun (傷寒論, On Cold Damage) and Mai-jing (脈經, Pulse Canon).

### **Results:**

In the view of performance, the positioning-length and press-depth in old pulse diagnostics in the bibles above are different from those in current pulse diagnostics. In Nan-jing, the pulse measurement is performed layer by layer in press-depth, including skin, vessel, muscle, tendon and bone. In Mai-jing, it presents a finer performance in positioning-length. These methods provide the background for the development of multilevel synchropulsimeter (MLSP) in our study. We checked the stability of MLSP by measuring forty-four health persons, and used pulse rate, systolic pressure, diastolic pressure and mean pressure as parameters. We measured everyone three times in the interval of 3 to 5 minutes. The ANOVA analysis didn't show significant difference in the measurement data above. The measurement results didn't change significantly in short interval and different time, which meant good stability.

### **Difficulty:**

The study time was changed from one year to 5 months. Because the study appropriation was slashed several times, we couldn't employ full-time assistant for data management and front office work, which led to incomplete work performance, bafflement in progress and delay in development of pulsimeter. We will collect data related to pulsimeter and hope to perform these aims below:

1. To find out the characteristic parameter of pulse wave related to mortality, and the meaning of "death pulse".
2. To assay the accordance of our study and the descriptions in the bibles of traditional Chinese medicine, including Nei-jing, Nan-jing, Shang-Han-lun and Mai-jing.
3. Initiatively, to develop the model of prognosis anticipation by pulse wave.
4. To advise the following researches about the anticipation.

**Keywords:** prognosis of critical patients, pulse diagnostics, pulsimeter, modernization of traditional Chinese medicine, APACHE-II

## 壹、前言

### 一、背景分析

加護病房(Intensive care unit)中，儘早對病人病情危重度及預後做出評估是非常重要的，除了能有明確的客觀依據幫助醫師進行決策，也能快速的評估處置是否為合理，提升花費高昂醫療成本的效益，減少社會及家庭的負擔；並能儘早給予家屬病情的正確理解，避免不當的預期，減少不必要的醫療糾紛，有助於醫病關係之建立；並可作為指導後續操作的依據，充分發揮重症加護的功用，亦可評估新治療法的效果，及各種操作程序的優劣等，APACHE score 是目前公認為準確度高(達 80.2%)及並遍使用的評估方法。

Knaus 於 1985 年推出 APACHE II，將急性生理狀況評分壓縮到 12 項，並將年齡和既往健康狀況直接納入 APACHE II 評分，此法近年應用較多。

脈診也是中醫用以判定疾病預後的重要依據，《內經》中曾提出了真臟脈及關格之脈，作為判定生死之重要依據。《內經·平人氣象論》：『平人之常氣廩於胃，胃者，平人之常氣也，人無胃氣曰逆，逆者死。』提出了有胃氣則生。《內經·玉機真藏論》提出了脈絕猶死：『急虛身中卒至，五藏絕閉，脈道不通，氣不往來，譬于墮溺，不可為期。其脈絕不來，若人一息五六至，其形肉不脫，真藏雖不見，猶死也。』《內經·大奇》提出了怪脈亦死：『脈至如火薪然，是心精之予奪也，草乾而死。脈至如散葉，是肝氣予虛也，木葉落而死。脈至如省客，省客者脈塞而鼓，是腎氣予不足也，懸去棗華而死。脈至如丸泥，是胃精予不足也，榆莢落而死。』皆是以脈決預後的說明。

中西醫結合能否以客觀有效的評估方法為依據，脈診是目前已發展成熟而且資料取得方便，易於定性定量化的研究。中醫與西醫協助診療時機，中西醫合作之診療模式為何等種種問題，基本取決於是否能以客觀有效的評估方法為重要條件。尤其在危重病病人評估，更是中醫能否協助重症醫療的重要前提，或許也是中醫住院能否推廣及開展的因素，而脈波儀可能是目前相對發展成熟而且易取於定性、定量資料的媒介。

### 二、現況

- (一)收集中醫典籍(內經、難經、傷寒論、脈經)有關脈診之文獻資料已收集部份如下列內容
1. 為何選擇脈作為診斷的重要方法
  2. 診脈部位之演變
  3. 診脈的方法操作。

- (二)收集中醫典籍（內經、難經、傷寒論、脈經）有關常脈之文獻資料已收集部份如下列內容 1. 何謂常人與平人 2. 何謂平人之脈 3. 年齡、季節、體質、性別與常脈的關係。
- (三)收集中醫典籍（內經、難經、傷寒論、脈經）有關死脈之文獻資料已收集部份如下列內容 1. 何謂「死」、及其之生理病理狀態為何 2. 在此生理病理狀態下認知之死脈。
- (四)討論出能相容性高的脈波儀的特點及其設計之大綱，並進行資料擷取及測試。

### 三、研究目的

本研究所使用之脈波儀為所發展的「可攜式腕部脈搏訊號監測系統」為一套腕部橈動脈之連續脈壓訊號量測系統，可同時提供不同指壓點之量測脈波訊號，提供醫師在臨床上需長時間監測連續脈壓訊號之用途。系統分為三通道脈搏感應器及電腦系統主機二部份，可即時顯示所測得之脈壓波形訊號與換算後之頻譜值，以提供使用者做為參考。除此，並針對所擷取之脈壓訊號及其頻譜特徵進行後續的分析。綜合以上所述，我們期望能找出脈波中能預測危重症病人預後—死亡危險性的脈波特徵，並與 APACHE II 比較其相關性即為本研究之目的。

九十三年度研究計畫之目的如下：

1. 整理中醫典籍中脈診之相關理論。
2. 參考中醫典籍建立常脈之基本模式。
3. 參考中醫典籍中診脈之理論及操作方法，以作為發展多位階同步式脈波儀之依據。
4. 完成多位階同步式脈波儀之信度、效度及穩定性之測試。
5. 完成多位階同步式脈波儀之操作手冊。

本研究具體完成之總三標（94 年度）如下

1. 完成 100 例健康學生脈波測量，以建立脈波基準值資料庫。
2. 完成 30 例死亡病患脈波測量，並找出相關死亡危險性脈波之特徵參數。
3. 中醫典籍（內經、難經、傷寒論、脈經）所論「死脈」之文獻整理。
4. 以統計軟體進行多變項分析 APACHE II Score 及脈波特徵參數之相關性，完成相關度之統計結果。
5. 探討脈在預測死亡危險性上之意義，及建立預測死亡之模式。
6. 找出以脈波預測死亡模式範圍。

## 貳、材料與方法

### 一、材料

脈波儀之相關器材：PIEZO SENSOR、放大器、BASIC STAMP、A/D CONVTER (MAXI271)、IR Flexipanel；含儀器配備之電腦、主機、USB 轉接線、脈壓袋、血壓球及充氣帶組等。

### 二、方法

- (一)蒐集古籍找出中醫脈診、常脈、操作方法及死脈之文獻，並分析引為脈波儀發展之參考依據。
- (二)本研究收集長庚紀念醫院林口院區內科第一加護病房 (MICUI) 危重症病人 100 例，取得其 APACHE II Score 及脈波儀資料，選擇觀察期間死亡者 30 名為 B 組，其餘為對照組 C 組。並徵求健康學生 100 人為 A 組，男女不限，年齡介於 18-25 歲，記錄其脈波，以建立脈波基準值資料庫。以 SPSS 統計軟體進行多變項分析 APACHE II score 及脈波特徵參數之相關性，推出可能預測預後之脈波模式。在所有分析中， $P < 0.05$  作為有顯著差異。
- (三)穩定性測式：脈波儀之穩定性測試 44 位健康人，以所測得之收縮壓、舒張壓、平均壓及脈搏為參考參數，每人測量三次，間隔 3-5 分鐘，以重複測量 ANOVA 分析，檢定結果顯示均未達到顯著意義，(P 值高於 0.05)，表示此四項測量在重複三次測量中均未發生受試者內變異，亦即在不同時間測量的測量值並未受到時間不同的影響，一致性良好。

## 參、結果

### 一、古籍文獻資料整理分析結果（古籍文獻見附錄三）

#### （一）脈診的操作

##### 1. 定位

- (1) 寸口脈的操作首先必須要界定其診脈之位置，《內經》已有寸口之名並多與人迎脈為對比。
- (2) 有關寸口分三關的診法，《內經》雖有寸、尺之名，但尺指尺膚，並非三關中之尺。
- (3) 《素問·奇病論》：「人有尺脈數甚者，筋急而見，此為何病」，看似有尺脈之名，唯甲乙經「脈數」作「膚」，當是。
- (4) 唯《素問·至真要大論》將尺、寸並舉，而且二者一為上，一為下，當指脈之尺寸，然本篇成篇年代有所爭議，有定為東漢，甚至唐者，且只為孤證，不應作為寸口脈中尺、寸定名之證據。
- (5) 寸口脈之分寸、尺實始於《難經·二難》。
- (6) 《難經》已有寸口脈寸、尺之名，並曰：「三部者，寸關尺也」。
- (7) 《傷寒論·平脈法》已明言「脈有三部，尺寸及關」。
- (8) 脈經明確定出寸、尺及關之相對位置，脈至少分七部多於寸關尺三部，並引仲景脈論（即《傷寒論·平脈法》）（圖一）。  
（於分別三關境界脈候所主第三從魚際至高骨，（其骨自高）卻行一寸，其中名曰寸口，從寸至尺，名曰尺澤，故曰尺寸。寸後尺前名曰關，陽出陰入，以關為界，陽出三分，陰入三分，故曰三陰三陽。）

##### 2. 布指

布指之法，四大經典皆未明言。（相當於寸關尺的定位，於總計畫之報告中有討論之）

##### 3. 時間

- (1) 診脈之時間，其義分為二類，一是診脈之最佳時間，二是診脈應診多久。
- (2) 診脈最佳之時間，應以清晨為最佳。即《內經》中所謂診法常以平曰「常」則並非一成不變，其要乃在氣血未動。

- (3) 診脈應診多久才能得完整之脈的變化，內經雖有五十動之說，但旨在說明五藏之受氣與否，並非用以規範診脈之時間。
- (4) 仲景在其《傷寒雜病論》自序中批評醫診斷之粗糙，曰：「動數發息，不滿五十，短期未知訣診，九候曾無彷彿」，以否定之語法強調診脈至少應有五十動（脈動約大於43秒）。

#### 4. 持脈輕重與藏府分部

- (1) 持脈輕重在現代脈診的觀點上是言運指，但在四大經典中，其更重要之意義乃在分別藏府之部位。
- (2) 《難經》中首先提出持脈輕重之法分為五部，以候五藏。又提出五部可約簡為三部，浮中沉也。
- (3) 《傷寒論·平脈法》就《難經》所論持脈輕重之法則加以說明。
- (4) 中醫學史上，除了以浮中沉三部與五部之法分候藏府之氣外，亦同時存在著寸口脈三關分部以候經脈藏府之法，二者並行存在。
- (5) 《內經》中，《脈要精微論》有「尺內兩傍則季協也，尺外以候腎，尺裡以候腹中……」，看似指關三關分部候藏府經絡之條文，但如前所述，內經之尺指尺膚，原非寸口脈之尺部。
- (6) 三關分部之定位，始自《難經·十八難》。
- (7) 脈經則更明確定出寸關尺分主藏府之法，廣為後世使用。

#### (二) 平人之脈

1. 《素問·平人氣變論》：「平人者，不病也」。
2. 《內經》中判斷平人之法，乃以脈法為準，並且強調脈法之互參。
3. 平人之脈，有四個要件：
  - (1) 在寸口脈與人迎脈之對比
  - (2) 手足六經之脈動正常
  - (3) 十二經脈本末之溫度相協調
  - (4) 外形與內在血氣之相稱
4. 平人之脈，首在有胃氣
  - (1) 以次數言，平人之脈一呼一吸在4~5至之間。
  - (2) 平人之脈並非一成不變，自有其影響因素，故所謂平人之脈

乃在一定之範圍。

- (3) 季節與平人之脈之關係在《素問·平人氣變論》論之最詳，分為四季之常脈，《難經》、《傷寒論》亦承繼之。
- (4) 《內經》另有由脈至而知五運六氣之至的脈法，《難經》解此，名曰王脈，唯條文內容與《內經》略有不同。
- (5) 《難經》首先提出男女之平脈不同，其差別在尺部。
- (6) 不同年齡層之平人之脈不同，《脈經》首先論述此觀點，尤其強調小兒脈之特別性。
- (7) 《內經》強調診脈當視身形大小，而判定其平脈，其要乃在形脈相應。
- (8) 《脈經》發揮體格與脈之關係，有專篇論述。

### (三)死脈

1. 《內經》以為死與脈動有絕對之關係，尤其反映在脈動之頻率上，脈不動故死，一呼一吸脈來八至亦死。
2. 《內經》中以指出見下列之情況則死
  - (1) 脈無胃氣則必死，即見真藏脈者死
  - (2) 三部九候之脈不能相協調者死
  - (3) 強調中部之脈減弱或節率不整者死
  - (4) 脈不應四時者死
  - (5) 脈病不合者死
  - (6) 色脈相反者死
3. 《內經》中對死之預後表述，提出四種說法：
  - (1) …者死（必死）
  - (2) 死不治（無須治之）
  - (3) 法當死（推斷當死，適當治療可以不死）
  - (4) 期 日死（依術數推斷其死期）
4. 《難經》指出脈無根（沈取）者死，即無腎間動氣者死
5. 《傷寒論》以實際臨床觀察，指出了許多脈病不合之死脈  
(以上所彙集資料俱見於附件上)

## 二、脈波儀穩定性測試結果

依典籍之考據及分析診脈的長度及深度有別於現今的二十八脈系統，而是以難經的五層（皮、脈、肉、筋、骨），及脈經的大於七部（寸三分，尺三分，關一）(圖一)，提供了本研究理想的多位階同步式脈波儀之依據。

### 三、可攜式腕部脈搏訊號監測系統操作手冊

#### (一)前言

脈診是中醫四診組成的重要部份。中醫臨床運用切脈，與望、聞、問相互配合，作為診斷疾病的重要方法。本操作系統利用壓力帶記錄手腕動脈之時域脈壓，可以多位階方式測量，比傳統的浮、中、沉三候或難經的皮、脈、肉、筋、骨五候分五層更細。

本研究所使用之脈波儀為所發展的「可攜式腕部脈搏訊號監測系統」是一套腕部橈動脈之連續脈壓訊號量測系統，可同時提供不同壓力之量測脈波訊號，提供醫師在臨床上需長時間監測連續脈壓訊號之用途。系統分為三通道脈搏感應器及電腦系統主機二部份，可即時顯示所測得之脈壓波形訊號與換算後之頻譜值，以提供使用者做為參考。

#### (二)儀器配備

軟體：NEW DPP

(注意當安裝軟體時，電腦使用者名稱不能為中文)

硬體：脈壓袋	1 個
主機	1 台
電腦	1 台
USB 轉接線	1 條

(非必備，如電腦可接 RS232 就不需要)

血壓球及充氣帶組	1 套
----------	-----

#### (三)功能簡介

- |                  |                      |
|------------------|----------------------|
| 1. 施加壓力顯示        | 主要顯示脈波感測器輔助裝置所施加的壓力  |
| 2. 病患資料登入        | 受測者一般資料與基本輸入         |
| 3. 啟動時域訊號擷取裝置與儲存 |                      |
| 4. 測資料存入硬碟       |                      |
| 5. 格線標定          | 顯示格線以利波形定位判讀         |
| 6. 量測位置設定        | 協助使用者標示量測位置          |
| 7. 報表列印          | 提供醫師脈波判讀所需資訊報表       |
| 8. 結束            | 離開系統回到 Windows 視窗主畫面 |

#### (四)操作步驟

1. 開機：本系統為動力為永備式電池，故不用開機
2. 將所有導線連接完畢

3. 校正：一般不用校正，除非測不到訊號則可調整檢試氣閥
4. 新增一個資料夾以存取所量測 data
5. 執行脈診儀主程式
6. 選開始後，找到自己所新增的資料
7. 填寫基本資料表：點選新增測試者，填入姓名、ID、身高、體重、性別、出生年月日等
8. 點選受測者，然後在上列選項點選測量
9. 按下校正鈕（歸零，非必須每次做）
- 10.調整連接阜（RS232 是 com1；如果用 USB 就必須檢視看看是 com3 或是 com4）
- 11.調整所欲測量的上限值還有下限值，還有脈壓袋尺寸（小孩）
- 12.在清單上選找欲受測者，點選 2 下
- 13.點選測量，開始（注意：可能會發生連接阜錯誤或是沒電，此時必須多試幾次，如果還是不行，請在檢查連接阜是否正確，電池是否有電）
- 14.打氣
- 15.量測
- 16.當銀幕出現放氣時，開始緩慢的放氣
- 17.儲存數值，寫註解
- 18.離開程式

#### (五)測量姿勢

1. 以坐姿或臥姿平臂仰掌，病人平臂約略與心臟同高，仰掌心向上五指略屈而不強直腕下置一小枕使橈動脈無阻力，肌肉呈放鬆狀態，肘關節放鬆而不強直，肩部下垂而勿上抬。
2. 定關：找出橈骨莖突，前後定位，界定其範圍，平移至橈內，尋找橈動脈。
3. 標記：貼上薄膜標記。

#### (六)脈波診斷系統列印

進入到量測畫面時，點選受測者名字，進入過去所量測的結果，每次量測時都可以下一個註解，可以由註解找出欲列印之圖，點選進去選擇列印即可。

#### (七)分析

每次量測完後都會有收縮壓、舒張壓、脈搏等數據，並有趨勢

圖可供查閱。擷取欲分析的部分波形後，經由程式作 Fourier 轉換，得到頻域的分析。觀看經過 Fourier 轉換，脈波會有什麼特點。

(八)注意事項

1. 每次測量前至少休息三分鐘。
2. 測量期間不可說話。
3. 呼吸均勻，避免突然深呼吸或閉氣。
4. 量測中不要有太劇烈的動作。

## 肆、討論

- 一、本計畫原規劃為一年調整至五個月，經費數次刪減，且無專任助理處理基礎的行政工作及資料整理，造成工作執行連續性不完整，增加完成進度之阻礙。
- 二、因脈診儀製作所需費用極高如：充氣帶改進模具至少要五十萬；pizeo sensor 的修改為專業技術，光是焊接就要二十萬；均勻的充氣及排氣技術(step)之硬體及軟體技術為一百萬，但因本研究經費有限，故影響脈診儀的研發製作。
- 三、脈波儀操作測量時所遇到問題
  - (一)確立測量時病人的體位 (ICU 的病人每隔固定時間會翻身以減少褥瘡的發生)。
  - (二)確立如何穿戴脈波儀(讓 ICU 的護理人員可以正確地穿戴脈波儀，避免過鬆或過緊)。
  - (三)脈波儀是否要量雙側或單側？(建議：測量雙側再依實際測試決定之) ICU 自動監測項目中有“血壓”一項，會有一個 cuff 連接到病人肢體(上肢或下肢，通常是上肢)，每隔固定時間就測量一次，若要測量雙側要注意脈波儀測量時間與自動血壓監測器測量時間勿衝突。

## 伍、結論與建議

### 一、九十三年度中醫藥研究計劃期中執行報告討論會議意見

(一)本子計劃與前子計劃有部份重覆(資料收集)是否分工?或甚衝突請注意?

回覆:分工已詳列於總計劃書內 P.3。本子計劃著重在四大古籍對於死脈的看法,是其他子計劃所不同的。

(二)在測試部份以學生為基準,與死亡個案或重症比較是否合適宜更加考慮。

回覆:本計劃的目標在於找出死亡危險性的脈波特徵,以收集加護病房危重症病人 100 例,取得其 APACHE II Score 及脈波儀資料,選擇觀察期間死亡者 30 名為 B 組,其餘為對照組 C 組。以此二組皆為重症病人者進行分析,推出可能預測預後之脈波模式。而健康學生 100 人僅做為建立脈波一般基準值資料庫,不以其與死亡組來比較。

(三)符合期中進度。

(四)經費支出額度不詳。

(五)本計劃進度期限為五個月,而期中(3個月)報告要進行 100 位病人的分析,在僅剩 3 個半月是否能夠完成?

回覆:本年度的目標是完成多位階同步式脈波儀之信度、效度、穩定性之測試及其操成手冊,至 10 月底之訊號擷取已完成,而分析軟體仍在努力之中,因為時間太短,或許未必能完成 100 人的測試,但應可完成 30 人的訊號分析,並依此建立脈波儀之信度、效度、穩定性之測試及其操成手冊,其他未完成部份可於 94 年度繼續執行。謝謝委員的體諒及關心。

(六)文獻探討部份,符合預定進度。

(七)到 93 年底應「完成多位階同步脈波儀之信度、效度及穩定性之測試」此部份進度可能要加速。

如第 5 題所回覆。

(八)已收集之文獻最好有文獻告或書目,開九次議的內容為何?for what?

當於期末報告中附上會議內容及文獻報告。主要分成總計劃會議 3 次,長庚大學電子系與長庚中醫醫院之討論會議,內容大綱為脈波儀之

設計，中醫脈診的操作方法及回顧，儀器測試與改進等部份，目的是為了使儀器發展的工程組和醫師的理念能充分溝通。

## 二、脈波儀操作之建議事項

- (一)脈波儀可以事前設定在固定的時間測量，如 09:00、17:00、01:00，如此可以減少護理人員負擔，避免忘記記錄的情況；脈波儀同時可以記錄蒐集起始與終結時間。(目前長庚醫院的護理人力吃緊，本計劃與她們無關，若是造成她們的工作負擔，恐怕會造成反彈或是資料蒐集不完全)
- (二)脈波儀在預設時間測量前約 1 或 2 分鐘，自動發出提醒訊號，告知護理人員預先調整體位，並注意與自動血壓監測器未有衝突；調整體位後，時間一到就啟動測量，或是由護理人員手動啟動測量，若是來不及調整體位，設計可以自動延後測量的功能。
- (三)脈波儀外面要有保護設施(如：包一層醫用固定膠膜或市售的保鮮膜)並且具有防水功能，避免接觸到病人體液，以免損害脈波儀並確脈波可以重覆使用。
- (四)當測量不到品質良好的脈波時(問題：何謂“品質良好的脈波？如何判定？)。脈波儀要有自動警訊的功能，告知護理人員重新檢視病人及脈波儀。
- (五)脈波儀電池用盡前或資料庫滿載前，會發出警示訊號。
- (六)脈波儀本身要能耐受一定程度的撞擊(ICU病人會翻身，或作治療，難免會撞擊)。
- (七)若要測量雙側建議脈波儀要有固定的標示如：顏色(左紅右綠)，或是“L” / “R”，“左” / “右”，讓操作人員有所遵循。

三、臨床收案前需進行研究人員及臨床護理人員的課程教學訓練，包括脈診的基礎教學和脈波儀操作。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部中醫藥司計畫編號 CCMP93-RD-057 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

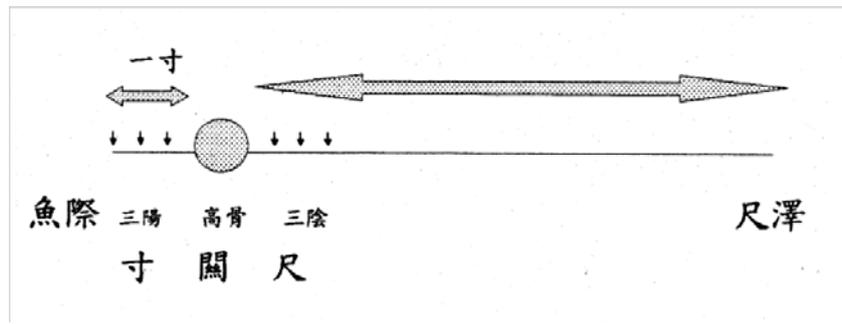
## 陸、參考文獻

1. 趙恩儉，中醫脈診學，天津科學技術出版社，2001，97-99。
2. 汪叔和，中醫脈學圖形診斷要點，中華民國中醫診斷學脈學研討會，1988。
3. 張永賢等，2000 大陸中醫醫療器材交流訪問報告，2000 4/2-4/13。
4. 王唯工、王林玉英，以脈診研究中醫藥之歸經原理，行政院衛生署中醫藥年報，1999，295-332。
5. 王唯工，以脈診研究中醫藥之歸經原理，行政院衛生署中醫藥年報民，1998，149-176。
6. 王唯工，以脈診分析原理研究六味地黃丸之作用，行政院衛生署中醫藥年報，1997，147-169。
7. 楊徑、孟新科等，APACHE III, SAPA II, MPM II0，與 APACHE II 在急診內科危重病人病情評估中的比較，China J Critical Care Med, 2002,22(2):78-80。
8. 王海燕，盛昭瀚等，危重病人生命體徵信號分析及處理方法，國外醫學生物醫學工程分冊，2001,24(3):123。
9. 柴枝楠，中西醫結合危重病評分系統初探，中西醫結合實用臨床急救，1999.4，6-4。
10. 楊力，中醫疾病預測學第一版，北京：北京科學技術出版社 1991：4-7。
11. 劉清泉、王小紅等，急危重病中醫治療的病例分析，北京中醫 1998：6。
12. 何建宇，急危重病中西醫結合治療體會，中國中醫急症，2002.8:11(4)。
13. 孫華，危重病人危重度評分及結果預測，交通醫學，2002；16(1)。
14. 肖平田，高壓氧配合中西醫成功救治毒覃中毒多器官衰竭的危重病人，中南大學湘雅醫院高壓氧科，2002.2。
15. Mamardi LT, Ylitlankala A, Korhonen I, et al. Monitoring the autonomic nervous system in the ICU through cardiovascular variability signals. IEEE Engineering in Medicinf and Biology1997, 16(6):64-75.
16. Winchell RJ, Hoyt DB. Spectral analysis of heart rate variability in the ICU: a measure ic function. J Surg Res 1996, 63(1):11-16.
17. Haberthur C, Lehmann F Ritz R. Assessment of depth of midazdam sedationusing objective parameters. Intensive Care Med,

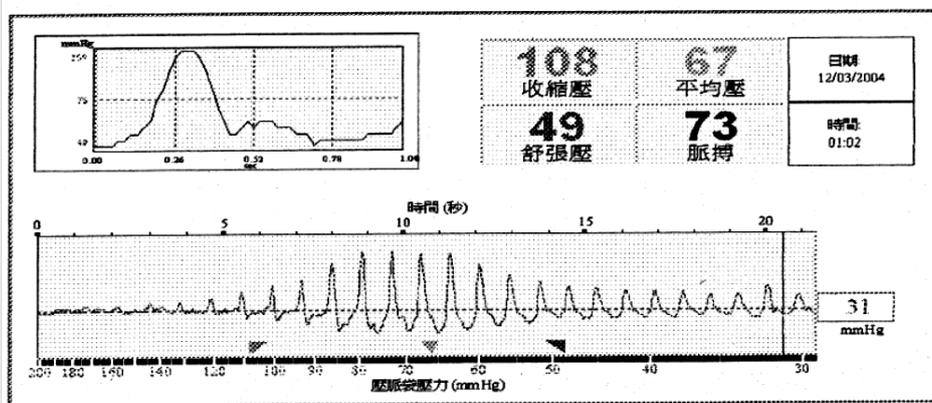
- 1996,22(12):1385-1390.
18. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, et al. An evaluation of outcome from intensive care in major medical centers. *Ann Intern Med*, 1986, 104:410.
  19. Jacobs S, Chang RW, Lee B, et al. Audit of intensive care: A30 months experience using the APACHE II severity of disease classification system. *Intensive Care Med*, 1988, 14:567-574.
  20. Berger MM, Marazzi A, Freeman J, et al. Evaluation of the consistency of Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE II) scoring in a surgical intensive care unit *Crit Care Med*, 1992, 20:1681.
  21. Teik E, Hutchinson R, Short S, et al. Verification of the Acute Physiology and Chronic Health Evaluation scoring system in a Hong Kong intensive care unit. *Crit Care Med*, 1993, 21:698.
  22. Cerra FB, Negro F, Abrams J, et al. APACHE II score does not predict multiple organ failure or mortality in postoperative surgical patients. *Arch Surg*, 1990, 125:519. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP et al. APACHE II: A severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985, 13:881-829.
  23. Bion JF, Edlin SA, Ramsay G, et al. Validation of a prognostic score in critically ill patients undergoing transport. *Br Med J* 1985, 291:432-434.
  24. Chang RW, Jacobs S, Lee B, et al. Predicting deaths among intensive care unit patients, *Crit Care Med* 1998, 16:34-42.
  25. Giangiuliano G Mancini A, Gin D. Validation of a severity of illness score (APACHE II) in a surgical intensive care unit. *Int Care Med* 1989, 15:519-522.
  26. Knaus UA, Wagner D, Draper E. Development of APACHE. *Crit Care Med* 1989, 17(suppl): S181-185.
  27. Teike OH, Robert Hutchinson, Steve Shott, et al. Verification of the acute physiology and chronic health evaluation scoring system in a Hong Kong intensive care unit. *Crit Care Med* 1993, 21(5):698-705.
  28. Knaus WA, Draper EA, Wagner DR et al. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*, 1985, 13:818-829.
  29. Katsaragkis S, Papadimitropoulos K, Antonakis P, et al. Comparison of acute physiology and chronic health evaluation II (APACHE II) and simplified acute physiology score II (APAS II) scoring systems in a single Greek

- intensive care unit. *Crit care Med*, 2000, 28(2):426-432.
30. Livingston BM, Mackirdy FN, howie JC, et al. Assessment of the performance of five intensive care scoring modal within a large Scottish database. *Crit care Med*, 2000,28(6):1820-1827.
  31. Ridley S. Severity of illness scoring systems and performance appraisal [J]. *Anaesthesia*, 1998, 53(12):1185-1194.
  32. Von Bierbrauer A, Ricdel S, Von Wichert P. Validation of the acute physiology and chronic health evaluation (APACHE) III scoring system and comparison with APACHE II in German intensive care units. *Anesthetists*, 1998, 47(1):30-38.
  33. Markgraf R, Deutschinoff G, Pientka L, et al. Intensive care medicine for elderly patients: how applicable are the APACHE III and II score systems. *Z Gerontology Geriatr*, 1999, 32(3):193-199.
  34. Bano B, Presedo J, Castro D, et al. Intelligent tale monitoring of critical care patients. *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, 1999, 18(4):80-88.
  35. Winchell RJ, Hoyt DB, Spectral analysis of heart rate variability in the ICU: a measure ic function. *J Surg Res*, 1996, 63(1):11-16.
  36. Haberthur C, Lehmann F, Ritz R. Assessment of depth of macadam sedation using objective parameters. *Intensive Care Med*, 1996,22(12):1385-1390.
  37. Figliola A, Serrano E. Analysis of physiological time series using wavelet transforms. *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, 1997, 16(3):74-79.
  38. Sahambi JS, Tandon SN, Bhatt RKP. Using wavelet transforms for ECG characterization 1. *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, 1997, 16(1):77-83.
  39. Karrakchou M, Rheymer KV, Vesin JM, et al. Improving cardiovascular monitoring through modern techniques. *IEEE Engineering through modern techniques* [J]. *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, 1996, 15(5):68-78.
  40. Figliola A, Serrano E. Analysis of physiological time series using wavelet transforms. *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, 1997, 16(3):74-79.
  41. Sahambi JS, Tandon SN, Bhatt RKP. Using wavelet transforms for ECG characterization. *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, 1997,16(1):77-83.

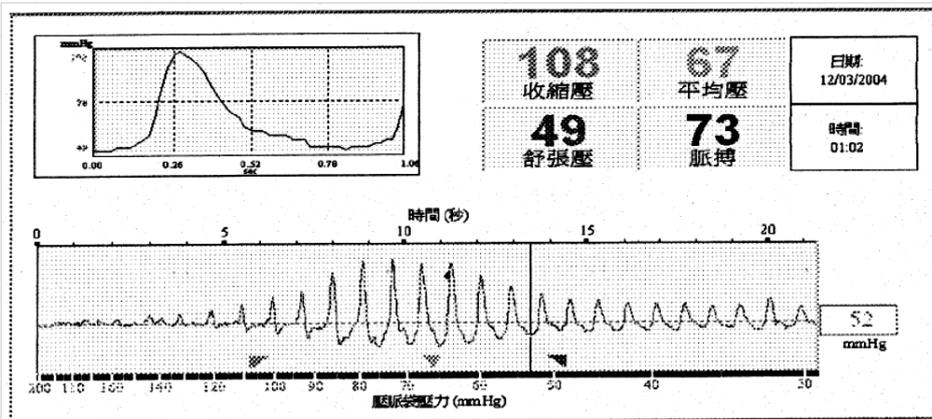
柒、圖、表



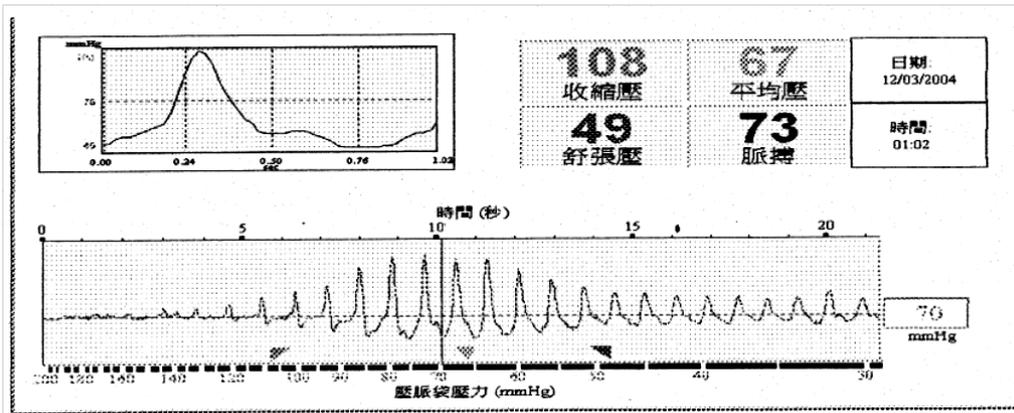
圖一



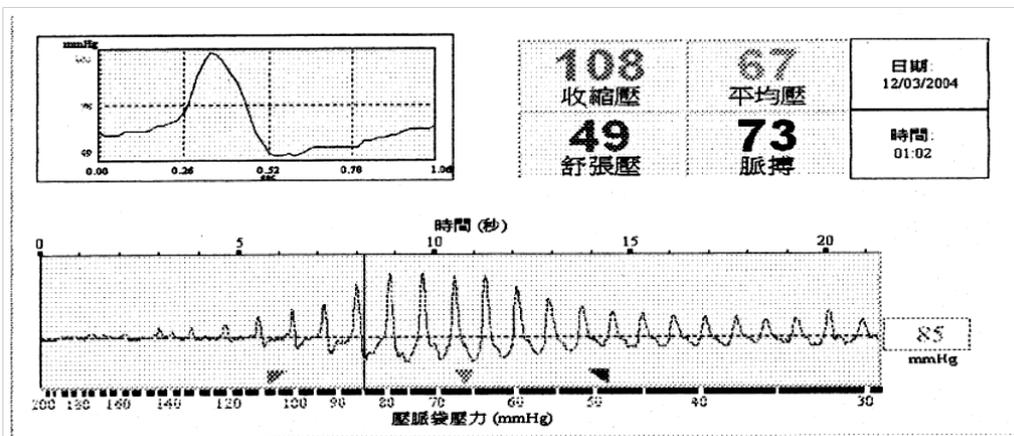
圖二、脈波儀測試 外加壓力 31mmhg



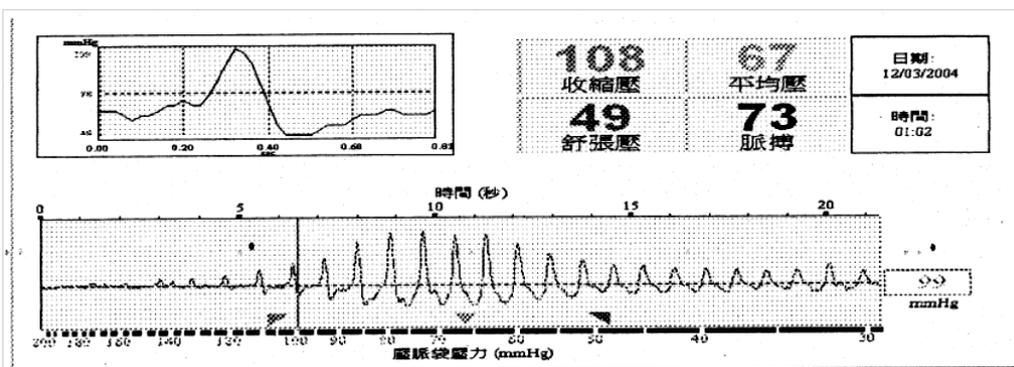
圖三、脈波儀測試 外加壓力 52mmhg



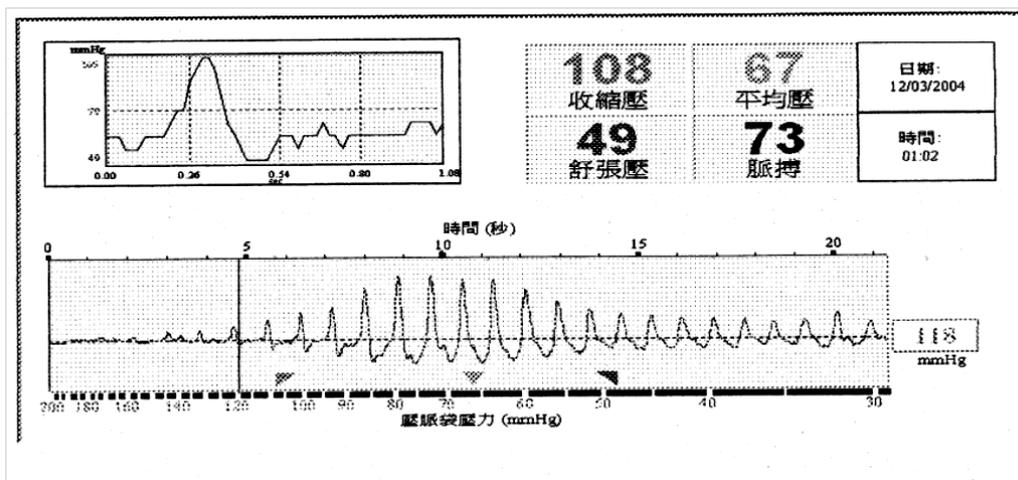
圖四、脈波儀測試 外加壓力 70mmhg



圖五、脈波儀測試 外加壓力 85mmhg



圖六、脈波儀測試 外加壓力 99mmhg



圖七、脈波儀測試 外加壓力 118mmhg

表一、重複測量 ANOVA 分析(Repeated Measures Analysis of Variance)

	F 檢定	P-value
收縮壓	0.679	0.514
舒張壓	0.096	0.909
平均壓	0.639	0.534
脈搏	0.234	0.793

## 捌、附錄

### 附錄一、脈波儀原理綱要

#### CHAP 1. SENSOR

1-1 壓電效應

1-2 PIEZO SENSOR

1-3 Piezo Sensor Advantages

1-4 放大器

#### CHAP 2. BASIC STAMP

2-1 What's Basic Stamp

2-2 Basic Stamp Advantages

2-3 Architecture

2-4 Different Versions and Specification

2-5 Programming

#### CHAP 3. A/D CONVTER (MAX1271)

3-1 類比與數位概論

3-2 類比數位轉換過程

3-3 類比與數位比較

3-4 Why use MAX1270 or MAX1271 12-bit A/D ?

3-5 MAX1270 and MAX1271 Specification

#### CHAP 4.I/RMODULE (FLEXIPANEL)

4-1 IR Flexipanel

4-2 The patented FlexiPanel system features

4-3 VCP Software

4-4 Flexipanel Applications

附錄二、脈波儀會議記錄彙整

會議日期及內容一覽表

日期/時間	地點	會議主題
93/07/15(五) 15:00	長庚大學	脈診計畫專題討論
93/07/22(四) 15:00	長庚大學	中醫脈診的操作方法
93/07/22(四) 16:00	長庚大學	生物光子文獻討論 (陳國鎮老師的理論)
93/07/25(日) 15:00	台中弘德中醫醫院	脈診研究的討論—配合及交流
93/07/29(四) 15:00	長庚大學	紅外線傳輸介面；雙光子顯微術於生物組織的應用；Biophoton Emission from Rat Liver
93/08/05(四) 16:00	長庚大學	脈波儀的製作原理及結構
93/08/12(四) 16:00	長庚大學	中醫脈診的操作方法
93/08/19(四) 16:00	長庚大學	中醫脈診的操作方法
93/09/03(五) 12:00	長庚醫院桃園分院	古典脈學與現代生理的關連性之討論 (一)
93/09/07(二) 10:00	中國醫藥大學附設醫院	新一代自動化診斷脈診儀開發與研究
93/09/22(三) 16:00	長庚大學	中醫脈診操作方法
93/10/15(五) 10:00	中國醫藥大學附設醫院	脈診儀測試
93/11/26(五) 10:00	中國醫藥大學附設醫院	各子計畫進度報告與討論

## 脈波儀會議記錄

脈診操作·脈形介紹

綱要脈

六綱脈：浮沉遲數長短

八綱脈：浮沉遲數長短虛（不足：頻率·脈搏·振幅大小·脈管張力）實  
（有餘）

殘賤之脈：浮沉弦緊滑濇（不規則不完整之脈）

脈位：手指能感應到脈動之處以浮沉形容之

脈形：可看成為二度空間之波形以長短形容之

脈勢：為脈之趨勢需要附加外力測量之以滑濇形容之

脈頻（數）：單位時間內脈搏之次數

辨脈要領

辨浮沉：浮沉散牢伏

辨大小：紅（來盛去衰似波濤）大革；細緊弦

辨虛實：滑濇虛實弱濡

辨長短：長弦實·短動

辨遲數：遲緩·結促

Pc1-1710 series, DFT（離散傅利葉轉換）

PCL—1710 series：

- 16 single-ended or 8 differential analog inputs, or a combination
- 12-bit A/D converter, with up to 100 kS/s sampling rate
- Programmable gain for each input channel
- Two 12-bit analog output channels
- 16 digital inputs and 16 digital outputs
- Programmable pacemaker/counter
- 可使用 PCLD-8710 支援 PCL-1710 降低成本

壓電效應：居里兄弟發現在某一類晶體中施以壓力會有電性產生，經過實驗發現具有壓電性的這些晶體都具有非晶方性（anisotropic）結構，晶方性（isotropic）材料是不會產生壓電性的。

非晶方性晶體中，施一外力使晶體變形，則由於晶格中電荷的移動造成晶體內局部性不均勻電荷分布，而產生一電位移。電荷的位移是由於晶體內部所有離子的移動，或者因為原子軌道上電子分布的變形而引起離子偏極化所造成，這些電荷位移現象在所有材料中都存在，可是要具有壓電效應，

則必須能在材料每單位體積中造成有效的電雙極矩變化。是否有這種變化，端視晶格結構之對稱性而定。居里兄弟做實驗證明了這個理論，且建立了壓電性與晶體結構的關係。其中電壓效應材料以陶瓷為主流多為聚合物優點為（體積小、響應快、消耗功率低）缺點為（有溫度限制、易碎）

逆效應：電能轉為機械能

正效應：機械能轉為電能

（於材料加壓則電偶極兩端隨之壓縮，材料內部因而產生電荷使長度維持一定）

DTF(離散傅利葉轉換):在連續時間下的系統輸入之信號多為類比的方式，但是在許多情形下的某些系統輸入函數卻呈現著離散的型態，例如每隔一段時間間隔才量取的實驗數據，每隔一段距離間隔才量化的影像資料，這時候我們就必須將原來的傅利葉轉換作視當的修正，從連續時間下的傅利葉轉換轉到離散時間傅利葉轉換(Discrete-Time Fourier Transform；DTFT)時，其定義為：

$$X(e^{j\omega}) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} x[n]e^{-j\omega n}$$

其逆轉換之定義則為

$$x[n] = \frac{1}{2\pi} \int_{-\pi}^{\pi} X(e^{j\omega})e^{j\omega n} d\omega$$

Nyquist theorem：這是信號在取樣時常常會引起交疊(aliasing)的現象，而導致信號失真，為避免此一情形，信號在取樣時之取樣頻率必須不小於有效取樣頻率，至於有效取樣頻率則需參照信號取樣定理的規定，信號取樣定理又稱為奈奎斯特取樣定理(Nyquist Sampling Theorem)，其內容為若  $X_c$  是一所謂的帶限信號 (band limited signal)，亦即當  $|\omega| > \Omega_N$  時  $X_c(j\omega) = 0$  的有效取樣頻率 (effective Sampling frequency)  $\Omega_s$ ，必須滿足  $\Omega_s \geq 2\Omega_N$  的規定。在此  $\Omega_N$  稱為奈奎斯特頻率(Nyquist frequency)而， $2\Omega_N$  稱為奈奎斯特率(Nyquist rate)。即找出最小頻率使波形不重疊，其中最小頻率為帶限信號最大頻率之兩倍，另外也可加裝濾波器防止波形重疊。

測量脈波所遇到的問題：

1. 如何作出能分別量出寸·關·尺的脈波儀？

2. 將 sensor 套於三指上量出脈波是否可行？
3. 使用直接加壓法，如何找出脈壓最大點（定位點）？
4. 使用金屬夾固定於手臂兩側是否可測量出脈波？
5. 使用 cuff 測量會量出所有訊號，包刮雜訊，是否可行？

可行的辦法：

1. 量出波形進而分析出脈搏狀態。
2. 用三點式 sensor 加壓量出脈搏（缺點是此 sensor 一個月後才有）。
3. 使用矩陣式 sensor 可量出脈的粗細。
4. 使用加壓器測量出加壓器體積變化量，進而算出能量變化得到波形訊息，同時也可鎖定特定部份量取（ex：寸、關、尺）。

把脈注意事項：

1. 把脈姿勢需放鬆。
2. 患者的手需平行於心臟，手前臂並且手掌朝上。
3. 需墊一軟枕使脈管露出。
4. 先找出關再定出尺·寸。
5. 可用指目（測量面積大）或指尖把脈。

把脈實際操作：

同學們輪流給醫師把脈，醫師依序把每位同學脈象特徵描述出來，之後同學互相把對方的脈，體驗實際的把脈感覺、技巧。

電子儀器實際操作：

1. 測量脈搏時，感應器需對準正確脈搏位置，否則測不出有效訊號。
2. 發現使用感應器測量脈搏時，可使用絕緣體附加於感應器上隔絕雜訊。
3. 開始能測出施加於脈管上的力。
4. 氣壓器漏氣問題獲得改善。
5. 最後使用 origin 軟體測量出符合脈搏的訊號（ex：脈搏每分鐘 120 次，測出訊號為 2Hz）。

### 附錄三

#### 一、平人之脈之參考文獻

##### 【引用之古籍文獻】

##### 內經

##### 終始第九

持其脈口人迎，以知陰陽有餘不足，平與不平，天道畢矣。所謂平人者不病，不病者，脈口人迎應四時也，上下相應而俱往來也，六經之脈不結動也，本末寒溫之相守司也，形肉血氣必相稱也，是謂平人。少氣者，脈口人迎俱少而不稱尺寸也。

##### 邪客第七十一

黃帝曰：持鍼縱舍奈何。歧伯曰：必先明知十二經脈之本末，皮膚之寒熱，脈之盛衰滑濇，其脈滑而盛者，病日進，虛而細者，久以持，大以濇者，為痛痺，陰陽如一者，病難治，其本末尚熱者，病尚在，其熱已衰者，其病亦去矣。持其尺，察其肉之堅脆，大小滑濇，寒溫燥濕，因視目之五色，以知五藏，而決死生，視其血脈，察其色，以知其寒熱痛痺。

##### 調經論篇第六十二

歧伯曰：夫陰與陽，皆有俞會，陽注於陰，陰滿之外，陰陽勻平，以充其形，九候若一，命曰平人。

##### 禁服第四十八

黃帝曰：寸口主中，人迎主外，兩者相應，俱往俱來，若引繩大小齊等，春夏人迎微大，秋冬寸口微大，如是者，名曰平人。

##### 平人氣象論篇第十八

黃帝問曰：平人何如。歧伯對曰：人一呼脈再動，一吸脈亦再動，呼吸定息脈五動，閏以太息，命曰平人。平人者，不病也。常以不病調病人，醫不病，故為病人平息以調之為法。人一呼脈一動，一吸脈一動，曰少氣。人一呼脈三動，一吸脈三動而躁，尺熱曰病溫，尺不熱脈滑曰病風，脈濇曰痺。人一呼脈四動以上曰死，脈絕不至曰死，乍疏乍數曰死。

平人之常氣稟於胃，胃者，平人之常氣也，人無胃氣曰逆，逆者死。春胃微弦曰平，弦多胃少曰肝病，但弦無胃曰死，胃而有毛曰秋病，毛甚曰今

病。藏真散於肝，肝藏筋膜之氣也，夏胃微鉤曰平，鉤多胃少曰心病，但鉤無胃曰死，胃而有石曰冬病，石甚曰今病。藏真通於心，心藏血脈之氣也。長夏胃微稟弱曰平，弱多胃少曰脾病，但代無胃曰死，稟弱有石曰冬病，弱甚曰今病。藏真濡於脾，脾藏肌肉之氣也。秋胃微毛曰平，毛多胃少曰肺病，但毛無胃曰死，毛而有弦曰春病，弦甚曰今病。藏真高於肺，以行榮衛陰陽也。冬胃微石曰平，石多胃少曰腎病，但石無胃曰死，石而有鉤曰夏病，鉤甚曰今病。藏真下於腎，腎藏骨髓之氣也。

### 玉機真藏論篇第十九

黃帝問曰：春脈如弦，何如而弦。岐伯對曰：春脈者肝也，東方木也，萬物之所以始生也，故其氣來，稟弱輕虛而滑，端直以長，故曰弦，反此者病。

帝曰：何如而反。岐伯曰：其氣來實而強，此謂太過，病在外；其氣來不實而微，此謂不及，病在中。帝曰：春脈太過與不及，其病皆何如。岐伯曰：太過則令人善忘，忽忽眩冒而顛疾；其不及，則令人胸痛引背，下則兩胛滿。帝曰：善。

夏脈如鉤，何如而鉤。岐伯曰：夏脈者心也，南方火也，萬物之所以盛長也，故其氣來盛去衰，故曰鉤，反此者病。帝曰：何如而反。岐伯曰：其氣來盛去亦盛，此謂太過，病在外；其氣來不盛去反盛，此謂不及，病在中。帝曰：夏脈太過與不及，其病皆何如。岐伯曰：太過則令人身熱而膚痛，為浸淫；其不及，則令人煩心，上見欬唾，下為氣泄。帝曰：善。秋脈如浮，何如而浮。岐伯曰：秋脈者肺也，西方金也，萬物之所以收成也，故其氣來，輕虛以浮，來急去散，故曰浮，反此者病。帝曰：何如而反。岐伯曰：其氣來，毛而中央堅，兩傍虛，此謂太過，病在外；其氣來，毛而微，此謂不及，病在中。帝曰：秋脈太過與不及，其病皆何如。岐伯曰：太過則令人逆氣而背痛，慍慍然；其不及，則令人喘，呼吸少氣而欬，上氣見血，下聞病音。帝曰：善。冬脈如營，何如而營。岐伯曰：冬脈者腎也，北方水也，萬物之所以合藏也，故其氣來，沈以搏，故曰營，反此者病。帝曰：何如而反。岐伯曰：其氣來如彈石者，此謂太過，病在外；其去如數者，此謂不及，病在中。帝曰：冬脈太過與不及，其病皆何如。岐伯曰：太過，則令人解體，脊脈痛而少氣不欲言；其不及，則令人心懸如病飢，眇中清，脊中痛，少腹滿，小便變。帝曰：善。

帝曰：四時之序，逆從之變異也，然脾脈獨何主。歧伯曰：脾脈者土也，孤藏以灌四傍者也。帝曰：然則脾善惡，可得見之乎。歧伯曰：善者不可得見，惡者可見。帝曰：惡者何如可見。歧伯曰：其來如水之流者，此謂太過，病在外；如鳥之喙者，此謂不及，病在中。帝曰：夫子言脾為孤藏，中央土以灌四傍，其太過與不及，其病皆何如。歧伯曰：太過，則令人四支不舉；其不及，則令人九竅不通，名曰重強。帝瞿然而起，再拜而稽首曰：善。吾得脈之大要，天下至數，五色脈變，揆度奇恆，道在於一，神轉不迴，迴則不轉，乃失其機，至數之要，迫近以微，著之玉版，藏之藏府，每旦讀之，名曰玉機。

### 第十五難

經言春脈弦，夏脈鉤，秋脈毛，冬脈石，是王脈耶？將病脈也？然：弦鉤毛石者，四時之脈也。

春脈弦者，肝東方木也，萬物始生，未有枝葉，故其脈之來，濡弱而長，故曰弦。夏脈鉤者，心南方火也，萬物之所茂，垂枝布葉，皆下曲如鉤，故其脈之來疾去遲，故曰鉤。秋脈毛者，肺西方金也，萬物之所終，草木華葉，皆秋而落，其枝獨在，若毫毛也，故其脈之來，輕虛以浮，故曰毛。冬脈石者，腎北方水也，萬物之所藏也，盛冬之時，水凝如石，故其脈之來，沉濡而滑，故曰石。

此四時之脈也。如有變奈何？然：春脈弦，反者為病。何謂反？然：其氣來實強，是謂太過，病在外；氣來虛微，是謂不及，病在內。氣來厭厭聶聶，如循榆葉曰平，益實而滑，如循長竿曰病，急而勁益強，如新張弓弦曰死。春脈微弦曰平，弦多胃氣少曰病，但弦無胃氣曰死，春以胃氣為本。夏脈鉤，反者為病。何謂反？然：其氣來實強，是謂太過，病在外；氣來虛微，是謂不及，病在內。其脈來累累如環，如循琅玕，曰平，來而益數，如雞舉足者曰病。前曲後居，如操帶鉤曰死。夏脈微鉤曰平，鉤多胃氣少曰病，但鉤無胃氣曰死。夏以胃氣為本。

秋脈毛，反者為病。何謂反？然：其氣來實強，是謂太過，病在外；氣來虛微，是謂不及，病在內。其脈來藹藹如車蓋，按之益大曰平。不上不下，如循雞羽曰病，按之蕭索，如風吹毛曰死。秋脈微毛曰平。毛多胃氣少曰病，但毛無月氣曰死，秋以胃氣為本。

冬脈石，反者為病。何謂反？然：其氣來實強，是謂太過，病在外；氣來虛微，是謂不及，病在內，脈來上大下兌，濡滑如雀之喙曰平，啄啄連屬，

其中微曲曰病。來如解索，去如彈死曰死。冬脈微石曰平，石多胃氣少曰病，但石無胃氣曰死，冬以胃氣為本。胃者，水穀之海，主稟四時，皆以胃氣為本，是謂四時之變病，死生之要會也。脾者，中州也，其平和不可得見，衰乃見耳，來如雀之啄，如水之下漏，是脾衰見也。

### 傷寒論平脈法第二

問曰：脈有三部，陰陽相乘。榮衛血氣，在人體躬。呼吸出入，上下於中，因息游布，津液流通。隨時動作，效象形容，春弦秋浮，冬沉夏洪。察色觀脈，大小不同，一時之間，變無經常，尺寸參差，或短或長。上下乖錯，或存或亡。病輒改易，進退低昂。心迷意惑，動失紀綱。願為具陳，令得分明。師曰：子之所問，道之根源。脈有三部，尺寸及關。榮衛流行，不失銜銓。腎沉心洪，肺浮肝弦，此自經常，不失銖分。

### 至真要大論篇第七十四

帝曰：善。六氣之勝，何以候之。岐伯曰：乘其至也，清氣大來，燥之勝也，風木受邪，肝病生焉。熱氣大來，火之勝也，金燥受邪，肺病生焉。寒氣大來，水之勝之，火熱受邪，心病生焉。濕氣大來，土之勝也，寒水受邪，腎病生焉。風氣大來，木之勝也，土濕受邪，脾病生焉。所謂感邪而生病也。乘年之虛，則邪甚也。失時之和，亦邪甚也。遇月之空，亦邪甚也。重感於邪，則病危矣。有勝之氣，其必來復也。帝曰：其脈至何如。岐伯曰：厥陰之至，其脈弦，少陰之至，其脈鉤，太陰之至，其脈沈，少陽之至，大而浮，陽明之至，短而濇，太陽之至，大而長。至而和則平，至而甚則病，至而反者病，至而不至者病，未至而至者病，陰陽易者危。

### 第七難

經言少陽之至，乍大乍小，乍短乍長。陽明之至，浮大而短。太陽之至，洪大而長。太陰之至，緊大而長。少陰之至，緊細而微。厥陰之至，沉短而敦。此六者，是平脈邪？將病脈耶？然：皆王脈也。其氣以何月，各王幾日？然：冬至之後，得甲子少陽王，復得甲子陽明王，復得甲子太陽王，復得甲子太陰王，復得甲子少陰王，復得甲子厥陰王，王各六十日，六六三百六十日，以成一歲。此三陽三陰之王時日大要也。

### 第十九難

經言脈有逆順，男女有恆，句而反者，何謂也？然：男子生於寅，寅為木，陽也；女子生於申，申為金，陰也。故男脈在關上，女脈在關下。是以男子尺脈恆弱；女子尺脈恆盛，是其常也。

平小兒雜病證第九 小兒脈呼吸八至者平，九至者傷，十至者困

### 玉機真藏論篇第十九

黃帝曰：凡治病，察其形氣色澤，脈之盛衰，病之新故，乃治之無後其時。形氣相得，謂之可治；色澤以浮，謂之易已；脈從四時，謂之可治；脈弱以滑，是有胃氣，命曰易治，取之以時。形氣相失，謂之難治；色夭不澤，謂之難已；脈實以堅，謂之益甚；脈逆四時，為不可治。

### 平脈視人大小長短男女逆順法第五

凡診脈當視其人大小長短、及性氣緩急，脈之遲速大小長短，皆如其人形性者則吉，反之者則為逆也，脈三部大都欲等，只如小人婦人細人脈小軟，小兒四五歲脈，呼吸八至，細數者吉。〔千金翼云，人大而脈細，人細而脈大，人樂而脈實，人苦而脈虛，性急而脈緩，性緩而脈躁，人壯而脈細，人羸而脈大，此皆為逆，逆則難治，反此為順，順則易治，凡婦人脈常欲濡弱於丈夫，小兒四五歲者脈自駛疾，呼吸八至也，男左大為順，女右大為順，肥人脈沈，瘦人脈浮〕

## 二、死脈之參考文獻

### 【引用文獻】

#### (一)死脈

1. 一呼脈一動，一吸脈一動，曰少氣。人一呼脈三動，一吸脈三動而躁，尺熱，曰病溫，尺不熱脈滑曰病風，脈澀曰痺。人一呼脈四動以上曰死，脈絕不至曰死，乍疏乍數曰死。平人之常氣廩於胃，胃者，平人之常氣也，人無胃氣曰逆，逆者死。《素問·平人氣象論》
2. 婦人手少陰脈動甚者，妊子也。脈有逆從四時，未有藏形，春夏而脈瘦，秋冬而脈浮大，命曰逆四時也。風熱而脈靜，泄而脫血，脈實，病在中，脈虛，病在外，脈澀堅者，皆難治，命曰反四時也。人以水穀為本，故人絕水穀則死，脈無胃氣亦死。

所謂無胃氣者，但得真藏脈不得胃氣也。所謂脈不得胃氣者，肝不弦腎不石也。太陽脈至，洪大以長；少陽脈至，乍數乍疏，乍短乍長；陽明脈至，浮大而短。《素問·平人氣象論》

## (二)死

1. 人迎與寸口俱盛四倍以上為關格，關格之脈羸，不能極於天地之精氣，則死矣。《素問·六傑臟象論》
2. 凡相五色之奇脈，面黃目青，面黃目赤，面黃目白，面黃目黑者，皆不死也。面青目赤，面赤目白，面青目黑，面黑目白，面赤目青，皆死也。《素問·五臟生成》
3. 脈短氣絕，死，病溫虛甚，死。《素問·玉版論要》
4. 搏脈痺躄，寒熱之交。脈孤為消氣，虛泄為奪血。孤為逆，虛為從。行奇恆之法，以太陰始行所不勝曰逆，逆則死；行所勝曰從，從則活。《素問·玉版論要》
5. 黃帝問曰：診法何如？岐伯對曰：診法常以平旦，陰氣未動，陽氣未散，飲食未進，經脈未盛，絡脈調勻，氣血未亂，故乃可診有過之脈。切脈動靜而視精明，察五色，觀五藏有餘不足，六府強弱，形之盛衰，以此參伍，決死生之分。夫脈者，血之府也，長則氣治，短則氣病，數則煩心，大則病進，上盛則氣高，下盛則氣脹，代則氣衰，細則氣少，澀則心痛，渾渾革至如涌泉，病進而色弊，綿綿其去如弦絕，死。《素問·脈要精微論》
6. 五藏者，中之守也。中盛藏滿，氣勝傷恐者，聲如從室中言，是中氣之濕也。言而微，終日乃復言者，此奪氣也。衣被不斂，言語善惡，不避親疏者，此神明之亂也。倉廩不藏者，是門戶不要也。水泉不止者，是膀胱不藏也。得守者生，失守者死。《素問·脈要精微論》
7. 夫五藏者，身之強也。頭者精明之府，頭傾視深，精神將奪矣。背者胸中之府，背曲肩隨，府將壞矣。腰者腎之府，轉搖不能，腎將憊矣。膝者筋之府，屈伸不能，行則僂附，筋將憊矣。骨者髓之府，不能久立，行則振掉，骨將憊矣。得強則生，失強則死。《素問·脈要精微論》
8. 人一呼脈一動，一吸脈一動，曰少氣。人一呼脈三動，一吸脈三動而躁，尺熱，曰病溫，尺不熱脈滑曰病風，脈澀曰痺。人

一呼脈四動以上曰死，脈絕不至曰死，乍疏乍數曰死。平人之常氣廩於胃，胃者，平人之常氣也，人無胃氣曰逆，逆者死。《素問·平人氣象論》

9. 急虛身中卒至，五藏絕閉，脈道不通，氣不往來，譬于墮溺，不可為期。其脈絕不來，若人一息五六至，其形肉不脫，真藏雖不見，猶死也。《素問·玉機真臟論》
10. 真肝脈至，中外急，如循刀刃責責然，如按琴瑟弦，色青白不澤，毛折，乃死。真心脈至，堅而搏，如循薏苡子累累然，色赤黑不澤，毛折，乃死。真肺脈至，大而虛，如以毛羽中人膚，色白赤不澤，毛折，乃死。真腎脈至，搏而絕，如指彈石辟辟然，色黑黃不澤，毛折，乃死。真脾脈至，弱而乍數乍疏，色黃青不澤，毛折，乃死。諸真藏脈見者，皆死不治也。《素問·玉機真臟論》
11. 帝曰：決死生奈何？岐伯曰：形盛脈細，少氣不足以息者危。形瘦脈大，胸中多氣者死。形氣相得者生，參伍不調者病。三部九候皆相失者死。上下左右之脈，相應如參舂者，病甚。上下左右相失不可數者死。中部之候雖獨調，與眾藏相失者死。中部之候相減者死。目內陷者死。《素問·三部九候論》
12. 帝曰：何以知病之所在？岐伯曰：察九候，獨小者病，獨大者病，獨疾者病，獨遲者病，獨熱者病，獨寒者病，獨陷下者病。以左手足上，上去踝五寸，按之，庶右手足，當踝而彈之，其應過五寸以上，蠕蠕然者不病；其應疾，中手渾渾然者病；中手徐徐然者病；其應上不能至五寸，彈之不應者死。是以脫肉身不去者死。中部乍疏乍數者死。其脈代而鉤者，病在絡脈。九候之相應也，上下若一，不得相失。一候後則病，二候後則病甚，三候後則病危。所謂後者，應不俱也。察其府藏，以知死生之期，必先知經脈，然後知病脈，真藏脈見者勝死。足太陽氣絕者，其足不可屈伸，死必戴眼。《素問·三部九候論》
13. 帝曰：冬陰夏陽奈何？岐伯曰：九候之脈，皆沉細懸絕者為陰，主冬，故以夜半死。盛躁喘數者為陽，主夏，故以日中死。是故寒熱病者，以平旦死。熱中及熱病者，以日中死。病風者，以日夕死。病水者，以夜半死。其脈乍疏乍數乍遲乍疾者，日乘四季死。形肉已脫，九候雖調，猶死。七診雖見，九候皆從

者不死。所言不死者，風氣之病及經月之病，似七診之病而非也，故言不死。若有七診之病，其脈候亦敗者死矣，必發噦噫。必審問其所始病，與今之所方病，而後各切循其脈，視其經絡浮沉，以上下逆從循之，其脈疾者不病，其脈遲者病，脈不往來者死，皮膚著者死。《素問·三部九候論》

14. 帝曰：經虛絡滿何如？岐伯曰：經虛絡滿者，尺熱滿，脈口寒澀也，此春夏死，秋冬生也。《素問·通評虛實論》
15. 帝曰：何以治之？岐伯曰：所謂氣虛者，言無常也。尺虛者，行步恆然。脈虛者不象陰也。如此者，滑則生，澀則死也。《素問·通評虛實論》
16. 帝曰：寒氣暴上，脈滿而實何如？岐伯曰：實而滑則生，實而逆則死。《素問·通評虛實論》
17. 帝曰：脈實滿，手足寒，頭熱，何如？岐伯曰：春秋則生，冬夏則死。脈浮而澀，澀而身有熱者死。《素問·通評虛實論》
18. 帝曰：其形盡滿何如？岐伯曰：其形盡滿者，脈急大堅，尺澀而不應也，如是者，故從則生，逆則死。《素問·通評虛實論》
19. 帝曰：乳子而病熱，脈懸小者何如？岐伯曰：手足溫則生，寒則死。《素問·通評虛實論》
20. 帝曰：乳子中風熱，喘鳴肩息者，脈何如？岐伯曰：喘鳴肩息者，脈實大也，緩則生，急則死。《素問·通評虛實論》
21. 帝曰：腸澼下白沫何如？岐伯曰：脈沈則生，脈浮則死。《素問·通評虛實論》
22. 帝曰：腸澼下膿血何如。岐伯曰：脈懸絕則死，滑大則生。《素問·通評虛實論》
23. 帝曰：腸澼之屬，身不熱，脈不懸絕何如。岐伯曰：滑大者曰生，懸澇者曰死，以藏期之。《素問·通評虛實論》
24. 帝曰：癲疾何如。岐伯曰：脈搏大滑，久自已；脈小堅急，死不治。《素問·通評虛實論》
25. 帝曰：癲疾之脈，虛實何如。岐伯曰：虛則可治，實則死。《素問·通評虛實論》
26. 帝曰：或喘而死者，或喘而生者，何也。岐伯曰：厥逆連藏則死，連經則生。《素問·陽明脈解》
27. 黃帝問曰：今夫熱病者，皆傷寒之類也，或愈或死，其死皆以

六七日之間，其愈皆以十日以上者，何也。不知其解，願聞其故。岐伯對曰：巨陽者，諸陽之屬也，其脈連於風府，故為諸陽主氣也。人之傷於寒也，則為病熱，熱雖甚不死，其兩感於寒而病者，必不免於死。《素問·熱論》

28. 帝曰：願聞其狀。岐伯曰：傷寒一日，巨陽受之，故頭項痛腰脊強。二日陽明受之，陽明主肉，其脈俠鼻絡於目，故身熱目疼而鼻乾，不得臥也。三日，少陽受之，少陽主膽，其脈循脇絡於耳，故胸脇痛而耳聾。三陽經絡皆受其病，而未入於藏者，故可汗而已。四日，太陰受之，太陰脈布胃中絡於嗌，故腹滿而嗌乾。五日，少陰受之，少陰脈貫腎絡於肺，繫舌本，故口燥舌乾而渴。六日，厥陰受之，厥陰脈循陰器而絡於肝，故煩滿而囊縮。三陰三陽，五藏六府，皆受病，榮衛不行，五藏不通，則死矣。《素問·熱論》

29. 帝曰：其病兩感於寒者，其脈應與其病形何如。岐伯曰：兩感於寒者，病一日，則巨陽與少陰俱病，則頭痛口乾而煩滿；二日，則陽明與太陰俱病，則腹滿身熱，不欲食譫言；三日，則少陽與厥陰俱病，則耳聾囊縮而厥，水漿不入，不知人，六日死。《素問·熱論》

30. 帝曰：五藏已傷，六府不通，榮衛不行，如是之後，三日乃死，何也。岐伯曰：陽明者，十二經脈之長也，其血氣盛，故不知人，三日其氣乃盡，故死矣。《素問·熱論》

31. 熱病先眩冒而熱，胸脇滿，刺足少陰少陽。太陽之脈，色榮顴骨，熱病也，榮未交，曰今且得汗，待時而已。與厥陰脈爭見者，死期不過三日。其熱病內連腎，少陽之脈色也。少陽之脈，色榮頰前，熱病也，榮未交，曰今且得汗，待時而已，與少陰脈爭見者，死期不過三日。《素問·刺熱論》

32. 黃帝問曰：有病溫者，汗出輒復熱，而脈躁疾不為汗衰，狂言不能食，病名為何。岐伯對曰：病名陰陽交，交者死也。《素問·評熱病論》

33. 且夫熱論曰：汗出而脈尚躁盛者死。今脈不與汗相應，此不勝其病也，其死明矣。狂言者是失志，失志者死。今見三死，不見一生，雖愈必死也。《素問·評熱病論》

34. 少陰之厥，則口乾溺赤，腹滿心痛；厥陰之厥，則少腹腫痛，

腹脹涇澁不利，好臥屈膝，陰縮腫筋內熱，盛則瀉之，虛則補之，不盛不虛，以紅取之。太陰厥逆，筋急攣，心痛引腹，治主病者，少陰厥逆，虛滿嘔變，下泄清，治主病者；厥陰厥逆，攣腰痛，虛滿前閉譫言，治主病者；三陰俱逆，不得前後，使人手足寒，三日死。太陽厥逆，僵仆嘔血善衄，治主病者；少陽厥逆，機關不利，機關不利者，腰不可以行，項不可以顧，發腸癰不可治驚者死，陽明厥逆喘欬身熱，善驚衄嘔血。手太陰厥逆，虛滿而欬，善嘔沫治主病者；手心主少陰厥逆，心痛引喉身熱死不可治。《素問·厥論》

- 35.心脈滿大，癰癭筋攣。肝脈小急，癰癭筋攣。肝脈驚暴，有所驚駭，脈不至若瘖，不治自己。腎脈小急，肝脈小急，心脈小急，不鼓皆為瘖。腎肝并沈為石水，并浮為風水，并虛為死，并小絃欲驚。腎脈大急沈，肝脈大急沈，皆為疝，心脈搏滑急為心疝。肺脈沈搏為肺疝。三陽急為瘖，三陰急為疝，二陰急為癰厥，二陽急為驚。脾脈外鼓，沈為腸澼，久自己，肝脈小緩為腸澼易治。腎脈小搏，沈為腸澼，下血血溫身熱者死。心肝澼亦下血，二藏同病者可治。其脈小沈瀦為腸澼，其身熱者死，熱見七日死。胃脈沈鼓瀦胃外鼓大，心脈小堅急，皆鬲偏枯。男子發左，女子發右，不瘖舌轉，可治，三十日起。其從者瘖，三歲起。年不滿二十者，三歲死。《素問·大奇論》
- 36.脈至而搏，血衄身熱者死，脈來懸鉤浮為常脈。脈至如喘名曰暴厥，暴厥者，不知與人言。脈至如數，使人暴驚，三四日自己。脈至浮合，浮合如數，一息十至以上，是經氣予不足也，微見九十日死。《素問·大奇篇》
- 37.脈至如火薪然，是心精之予奪也，草乾而死；脈至如散葉，是肝氣予虛也，木葉落而死；脈至如省客，省客者，脈塞而鼓，是腎氣予不足也，懸去棗華而死；脈至如丸泥是胃精予不足也，榆莢落而死。《素問·大奇篇》
- 38.脈至如橫格，是膽氣予不足也，禾熟而死；脈至如弦縷，是胞精予不足也，病善言，下霜而死，不言可治；脈至如交漆，交漆者，左右傍至也，微見三十日死。《素問·大奇篇》
- 39.脈至如涌泉浮鼓，肌中太陽氣予不足也，少氣味，韭莢而死。脈至如頽土之狀，按之不得，是肌氣予不足也，五色先見黑白

壘發死；脈至如懸雍，懸雍者浮，揣切之益大，是十二俞之予不足也，水凝而死。《素問·大奇篇》

40.脈至如偃刀，偃刀者，浮之小急，按之堅大急，五藏菹熟，寒熱獨并於腎也，如此其人不得坐，立春而死。《素問·大奇篇》

41.脈至如丸滑不直手，不直手者，按之不可得也，是大腸氣予不足也，棗葉生而死；脈至如華者，令人善恐，不欲坐臥，行立常聽，是小腸氣予不足也，季秋而死。《素問·大奇篇》

42.黃帝問曰：願聞禁數。岐伯對曰：藏有要害，不可不察，肝生於左，肺藏於右，心部於表，腎治於裏，脾為之使，胃為之市。鬲育之上，中有父母，七節之傍，中有小心，從之有福，逆之有咎。刺中心，一日死，其動為噫。刺中肝，五日死，其動為語。刺中腎，六日死，其動為嚏。刺中肺，三日死，其動為欬。刺中脾，十日死，其動為吞。刺中膽，一日半死，其動為嘔。刺跗上，中大脈，血出不止，死。刺面，中溜脈，不幸為盲。刺頭中腦戶，入腦立死。刺舌下中脈太過，血出不止為瘡。刺足下布絡中脈，血不出為腫。刺郤中大脈，令人仆脫色。刺氣街中脈，血不出，為腫鼠僕。刺脊間，中髓為偃。刺乳上，中乳房為腫根蝕。刺缺盆中內陷，氣泄令人喘欬逆。刺手魚腹內陷為腫。無刺大醉，令人氣亂。無刺大怒，令人氣逆。無刺大勞人，無刺新飽人，無刺大饑人，無刺大渴人，無刺大驚人。刺陰股中大脈，血出不止，死。刺客主人內陷中脈，為內漏為聾。刺膝臑出液為跛。刺臂太陰脈，出血多立死。刺足少陰脈，重虛出血，為舌難以言。刺膺中陷中肺，為喘逆仰息。刺肘中內陷，氣歸之，為不屈伸。刺陰股下三寸內陷，令人遺溺。刺掖下脇間內陷，令人欬。刺少腹中膀胱溺出，令人少腹滿。刺臑腸內陷為腫。刺匡上陷骨中脈，為漏為盲。刺關節中液出，不得屈伸。《素問·刺禁論》

43.帝曰：人之所有者，血與氣耳。今夫子乃言血并為虛，氣并為虛，是無實乎。岐伯曰：有者為實，無者為虛，故氣并則無血，血并則無氣，今血與氣相失，故為虛焉。絡之與孫脈俱輸於經，血與氣并，則為實焉。血之與氣并走於上，則為大厥，厥則暴死，氣復反則生，不反則死。《素問·調經論》

44.帝曰：逆四時而生亂氣，柰何。岐伯曰：春刺絡脈，血氣外溢，

令人少氣。春刺肌肉，血氣環逆，令人上氣。春刺筋骨，血氣內著，令人腹脹。夏刺經脈，血氣乃竭，令人解。夏刺肌肉，血氣內卻，令人善恐。夏刺筋骨，血氣上逆，令人善怒。秋刺經脈，血氣上逆，令人善忘。秋刺絡脈，氣不外行，令人臥不欲動。秋刺筋骨，血氣內散，令人寒慄。冬刺經脈，血氣皆脫，令人目不明。冬刺絡脈，內氣外泄，留為大痺。冬刺肌肉，陽氣竭絕，令人善忘。凡此四時刺者大逆之病，不可不從也，反之則生亂氣相淫病焉。故刺不知四時之經，病之所生，以從為逆，正氣內亂，與精相薄，必審九候，正氣不亂，精氣不轉。帝曰：善。刺五藏，中心一日死，其動為噫。中肝五日死，其動為語。中肺三日死，其動為欬。中腎六日死，其動為噓欠。中脾十日死，其動為吞。刺傷人五藏必死，其動，則依其藏之所變候知其死也。《素問·四時刺逆從論》

45. 少陽之復，大熱將至，枯燥燔蒸，介蟲乃耗，驚癩欬衄，心熱煩躁，便數憎風，厥氣上行，面如浮埃，目乃瞶癩，火氣內發，上為口糜嘔逆，血溢血泄，發而為瘡，惡寒鼓慄，寒極反熱，啞絡焦槁，渴引水漿，色變黃赤，少氣脈萎，化而為水，傳為胛腫，甚則入肺，欬而血泄。尺澤絕，死不治。《素問·至真要大論》
46. 帝曰：其脈應皆何如。岐伯曰：差同正法，待時而去也。脈要曰：春不沈，夏不弦，冬不濇，秋不數，是謂四塞。沈甚曰病，弦甚曰病，濇甚曰病，數甚曰病，參見曰病，復見曰病，未去而去曰病，去而不去曰病，反者死。故曰：氣之相守司也，如權衡之不得相失也。夫陰陽之氣，清靜則生化治，動則苛疾起，此之謂也。《素問·至真要大論》
47. 起所有餘，知所不足。度事上下，脈事因格。是以形弱氣虛，死。形氣有餘脈氣不足，死。脈氣有餘形氣不足，生。《素問·方盛衰論》
48. 黃帝曰：願卒聞之。岐伯答曰：色青者，其脈弦也，赤者，其脈鉤也，黃者，其脈代也，白者，其脈毛，黑者，其脈石。見其色而不得其脈，反得其相勝之脈，則死矣；得其相生之脈，則病已矣。《靈樞·邪氣臟腑病形》
49. 腎脈急甚為骨癩疾；微急為沉厥奔豚，足不收，不得前後。緩

甚為折脊；微緩為洞，洞者，食不化，下嗝逐出。大甚為陰痿；微大為石水，起臍已下至小腹睡睡然，上至胃脘，死不治。小甚為洞泄；微小為消瘵。滑甚為癰；微滑為骨痿，坐不能起，起則目無所見。澀甚為大癰；微澀為不月，沉痔。《靈樞·邪氣臟腑病形》

50.故曰：刺不知逆順，真邪相搏。滿而補之，則陰陽四溢，腸胃充郭，肝肺內，陰陽相錯。虛而寫之，則經脈空虛，血氣竭枯，腸胃辟，皮膚薄著，毛腠夭焦，予之死期。《靈樞·根結》

51.脈口一盛，病在足厥陰；厥陰一盛而躁，在手心主。脈口二盛，病在足少陰；二盛而躁，在手少陰。脈口三盛，病在足太陰；三盛而躁，在手太陰。脈口四盛，且大且數者，名曰溢陰。溢陰為內關，內關不通，死不治。人迎與太陰脈口俱盛四倍以上，名曰關格。關格者，與之短期。《靈樞·終始》

52.手太陰氣絕，則皮毛焦。太陰者，行氣溫於皮毛者也。故氣不榮，則皮毛焦；皮毛焦，則津液去皮節；津液去皮節者，則爪枯毛折；毛折者，則毛先死。丙篤丁死，火勝金也。《靈樞·經脈》

53.手少陰氣絕，則脈不通；脈不通，則血不流；血不流，則髮色不澤，故其面黑如漆柴者，血先死。壬篤癸死，水勝火也。《靈樞·經脈》

54.足太陰氣絕者，則脈不榮肌肉。唇舌者，肌肉之本也。脈不榮，則肌肉軟；肌肉軟，則舌萎人中滿；人中滿，則唇反；唇反者，肉先死。甲篤乙死，木勝土也。《靈樞·經脈》

55.足少陰氣絕，則骨枯。少陰者，冬脈也，伏行而濡骨髓者也，故骨不濡，則肉不能著也；骨肉不相親，則肉軟卻；肉軟卻，故齒長而垢，髮無澤；髮無澤者，骨先死。戊篤己死，土勝水也。《靈樞·經脈》

56.足厥陰氣絕，則筋絕。厥陰者，肝脈也，肝者，筋之合也，筋者，聚於陰氣，而脈絡於舌本也。故脈弗榮，則筋急；筋急則引舌與卵，故唇青舌卷卵縮，則筋先死。庚篤辛死，金勝木也。《靈樞·經脈》

57.五陰氣俱絕，則目系轉，轉則目運；目運者，為志先死；志先

- 死，則遠一日半死矣。六陽氣絕，則陰與陽相離，離則腠理發泄，絕汗乃出，故旦占夕死，夕占旦死。《靈樞·經脈》
- 58.陰氣太盛則陽氣不能榮也，故曰關。陽氣太盛，則陰氣弗能榮也，故曰格。陰陽俱盛，不得相榮，故曰關格。關格者，不得盡期而死也。《靈樞·脈度》
- 59.春取絡脈，夏取分腠，秋取氣口，冬取經輸。凡此四時，各以時為齊。絡脈治皮膚，分腠治肌肉，氣口治筋脈，經輸治骨髓。五藏，身有五部：伏兔一；腓二，腓者腠也；背三，五藏之輸四；項五。此五部有癰疽者死。《靈樞·寒熱病》
- 60.骨癰疾者，顛、齒諸腠、分肉皆滿而骨居，汗出、煩悒，嘔多沃沫，氣下泄，不治。筋癰疾者，身倦攣急大，刺項大經之大杼脈，嘔多沃沫，氣下泄，不治。脈癰疾者，暴仆，四肢之脈皆脹而縱，脈滿，盡刺之出血，不滿，灸之挾項太陽，灸帶脈於腰相去三寸，諸分肉本輸。嘔吐沃沫，氣下泄，不治。癰疾者，疾發如狂者，死不治。《靈樞·癰狂》
- 61.熱病七日八日，脈微小，病者澁血，口中乾，一日半而死。脈代者，一日死。《靈樞·熱病》
- 62.熱病已得汗出，而脈尚躁，喘且復熱，勿刺膚，喘甚者死。《靈樞·熱病》
- 63.熱病七日八日，脈不躁，躁不散數，後三日中有汗，三日不汗，四日死。未曾汗者，勿腠刺之。《靈樞·熱病》
- 64.熱病已得汗而脈尚躁盛，此陰脈之極也，死；其得汗而脈靜者，生。《靈樞·熱病》
- 65.腸胃之長，凡五丈八尺四寸，受水谷九斗二升一合合之大半，此腸胃所受水谷之數也。平人則不然，胃滿則腸虛，腸滿則胃虛，更虛更滿，故氣得上下，五藏安定，血脈和利，精神乃居，故神者，水谷之精氣也。故腸胃之中，當留谷二斗，水一斗五升；故平人日再後，後二升半，一日中五升，七日五七三斗五升，而留水谷盡矣；故平人不食飲七日而死者，小谷精氣津液皆盡故也。《靈樞·平人絕穀》
- 66.何謂夜暝？歧伯曰：瘖乎其無聲，漠乎其無形，折毛發理，正氣橫傾，淫邪泮衍，血脈傳溜，大氣入藏，腹痛下淫，可以致死，不可以致生。《靈樞·病傳》

- 67.黃帝曰：諸病皆有逆順，可得聞乎？岐伯曰：腹脹、身熱、脈大，是一逆也；腹鳴而滿，四肢清泄，其脈大，是二逆也；衄而不止，脈大，是三逆也；咳而澀血脫形，其脈小勁，是四逆也；咳脫形，身熱，脈小以疾，是謂五逆也。如是者，不過十五日而死矣。其腹大脹，四末清，脫形，泄甚，是一逆也；腹脹便血，其脈大，時絕，是二逆也；咳澀血，形肉脫，脈搏，是三逆也；嘔血，胸滿引背，脈小而疾，是四逆也；咳嘔，腹脹且飧泄，其脈絕，是五逆也。如是者，不及一時而死矣。工不察此者而刺之，是謂逆治。《靈樞·玉版》
- 68.黃帝曰：決其生死奈何？岐伯曰：反其目視之，其中有赤脈，上下貫瞳子，見一脈，一歲死；見一脈半，一歲半死；見二脈，二歲死；見二脈半，二歲半死；見三脈，三歲而死。見赤脈不下貫瞳子，可治也。《靈樞·寒熱》
- 69.黃帝曰：手少陰之脈，獨無俞，何也？岐伯曰：少陰，心脈也。心者，五藏六府之大主也，精神之所舍也，其藏堅固，邪弗能容也。容之則心傷，心傷則神去，神去則死矣。故諸邪之在於心者，皆在於心之包絡。包絡者，心主之脈也，故獨無俞焉。《靈樞·邪客》
- 70.黃帝曰：治人之五態奈何？少師曰：太陰之人，多陰而無陽，其陰血濁，其衛氣澀，陰陽不和，緩筋而厚皮，不之疾寫，不能移之。少陰之人，多陰少陽，小胃而大腸，六府不調，其陽明脈小，而太陽脈大，必審調之，其血易脫，其氣易敗也。太陽之人，多陽而少陰，必謹調之，無脫其陰，而寫其陽。陽重脫者易狂，陰陽皆脫者，暴死，不知人也。少陽之人，多陽少陰，經小而絡大，血在中而氣外，實陰而虛陽。獨寫其絡脈，則強氣脫而疾，中氣不足，病不起也。《靈樞·通天》
- 71.尺炬然熱，人迎大者，當奪血；尺堅大，脈小甚，少氣，免有加，立死。目赤色者病在心，白在肺，青在肝，黃在脾，黑在腎。黃色不可名者，病在胸中。《靈樞·論疾診尺》
- 72.診目痛，赤脈從上下者，太陽病；從下上者，陽明病；從外走內者，少陽病。診寒熱，赤脈上下至瞳子，見一脈一歲死；見一脈半，一歲半死；見二脈，二歲死；見二脈半，二歲半死；見三脈，三歲死。診齟齒痛，按其陽之來，有過者獨熱，在左

左熱，在右右熱，在上上熱，在下下熱。診血脈者，多赤多熱，多青多痛，多黑為久痺，多赤、多黑、多青皆見者，寒熱。《靈樞·論疾診尺》

73.身痛而色微黃，齒垢黃，爪甲上黃，黃疸也。安臥小便黃赤，脈小而澀者不嗜食。人病，其寸口之脈，與人迎之脈小大等，及其浮沉等者，病難已也。女子手少陰脈動甚者妊子。嬰兒病，其頭毛皆逆上者必死。耳間青脈起者掣痛。大便赤瓣飧泄，脈小者，手足寒，難已；飧泄，脈小，手足溫，泄易也。《靈樞·論疾診尺》

74.是故太一入徙立於中宮，乃朝八風，以占吉凶也。風從南方來，名曰大弱風，其傷人也，內舍於心，外在於脈，氣主熱。風從西南方來，名曰謀風，其傷人也，內舍於脾，外在於肌，其氣主為弱。風從西方來，名曰剛風，其傷人也，內舍於肺，外在於皮膚，其氣主為燥。風從西北方來，名曰折風，其傷人也，內舍於小腸，外在於手太陽脈，脈絕則溢，脈閉則結不通，善暴死。風從北方來，名曰大剛風，其傷人也，內舍於腎，外在於骨與肩背之膂筋，其氣主為寒也。風從東北方來，名曰凶風，其傷人也，內舍於大腸，外在於兩脅腋骨下及肢節。風從東方來，名曰嬰兀風，其傷人也，內舍於肝，外在於筋紐，其氣主為身濕。風從東南方來，名曰弱風，其傷人也，內舍於胃，外在於肌肉，其氣主體重。此八風皆從其虛之鄉來，乃能病人。三虛相搏，則為暴病卒死。兩實一虛，病則為淋露寒熱。犯其兩濕之地，則為痿。故聖人避風，如避矢石焉。其有三虛而偏中於邪風，則為仆偏枯矣。《靈樞·九宮八風》

75.岐伯曰：經脈留行不止，與天同度，與地合紀。故天宿失度，日月薄蝕；地經失紀，水道流溢，草莖不成，五穀不殖；徑路不通，民不往來，巷聚邑居，則別離異處。血氣猶然，請言其故。夫血脈營衛，周流不休，上應星宿，下應經數。寒邪客於經絡之中，則血泣，血泣則不通，不通則衛氣歸之，不得復反，故癰腫。寒氣化為熱，熱勝則腐肉，肉腐則為膿。膿不寫則爛筋，筋爛則傷骨，骨傷則髓消，不當骨空，不得泄寫，血枯空虛，則筋骨肌肉不相榮，經脈敗漏，熏於五藏，藏傷故死矣。《靈樞·癰疽》

76.發於頸，名曰天疽。其癰大以赤黑，不急治，則熱氣下入淵腋，前傷任脈，內熏肝肺。熏肝肺，十餘日而死矣。《靈樞·癰疽》  
以下難經、傷寒論、脈經部分

1. 發汗多，若重發汗者，亡其陽，譫語，脈短者死，脈自和者不死。《傷寒論·辨陽明脈證并治》
2. 少陰病，四逆，惡寒而身蜷，脈不至，不煩而躁者死。《傷寒論·辨少陰脈證并治》
3. 傷寒六七日，脈微，手足厥冷，煩燥，灸厥陰，厥不還者，死。《傷寒論·辨厥陰病脈證并治》
4. 傷寒脈遲六七日，而反與黃芩湯徹其熱。脈遲為寒，今與黃芩湯，復除其熱，腹中應冷，當不能食；今反能食，此名除中，必死。《傷寒論·辨厥陰病脈證并治》
5. 下利，脈沉弦者，下重也；脈大者，為未止；脈微弱數者，為欲自止，雖發熱，不死。《傷寒論·辨厥陰病脈證并治》
6. 下利，手足厥冷，無脈者，灸之不溫，若脈不還，反微喘者，死。少陰負趺陽者，為順也。下利後脈絕，手足厥冷，晷時脈還，手足溫者生，脈不還者死。《傷寒論·辨厥陰病脈證并治》
7. 脈浮而大，浮為氣實，大為血虛。血虛為無陰，孤陽獨下陰部者，小便當赤而難，胞中當虛，今反小便利，而大汗出，法應衛家當微，今反更實，津液四射，榮竭血盡，乾煩而不得眠，血薄肉消，而成暴液。醫復以毒藥攻其胃，此為重虛，客陽去有期，必下如污塗而死。《傷寒論·辨不可下病脈證并治》
8. 寸口脈平而死者，何謂也？然：諸十二經脈者，皆係於生氣之原。所謂生氣之原者，謂十二經之根本也，謂腎間動氣也。此五藏六府之本，十二經脈之根，呼吸之門，三焦之原。一名守邪之神。故氣者，人之根本也，根絕則莖葉枯矣。寸口脈平而死者，生氣獨絕於內也。《難經·第八難》
9. 經言五藏脈已絕於內，用鍼者反實其外；五藏脈已絕於外，用鍼者反實其內。內外之絕，何以別之？然：五藏脈已絕於內者，腎肝氣已絕於內也，而醫反補其心肺；五藏脈已絕於外者，其心肺脈已絕於外也，而醫反補其腎肝。陽絕補陰，陰絕補陽，是謂實實虛虛，損不足益有餘。如此死者，醫殺之耳。《難經·第十二難》

- 10.經言見其色而不得其脈，反得相勝之脈者即死，得相生之脈者，病即自己。色之與脈當參相應，為之奈何？然：五藏有五色，皆見於面，亦當與寸口、尺內相應。假令色青，其脈當弦而急；色赤，其脈浮大而散；色黃，其脈中緩而大；色白，其脈浮濇而短；色黑，其脈沉濇而滑。此所謂五色之與脈，當參相應也。脈數，尺之皮膚亦數；脈急，尺之皮膚亦急；脈緩，尺之皮膚亦緩；脈濇，尺之皮膚亦濇；脈滑，尺之皮膚亦滑。藏各有聲、色、臭、味，當與寸口、尺內相應，其不相應者病也。假令色青，其脈浮濇而短，若大而緩為相勝；浮大而散，若小而滑為相生也。經言知一為下工，知二為中工，知三為上工。上工者十全九，中工者十全八，下工者十全六，此之謂也。《難經·第十三難》
- 11.脈有損至，何謂也？然：至之脈，一呼再至曰平，三至曰離經，四至曰奪精，五至曰死，六至曰命絕，此死之脈。何謂損？一呼一至曰離經，二呼一至曰奪精，三呼一至曰死，四呼一至曰命絕。此謂損之脈也。至脈從下上，損脈從上下也。損脈之為病奈何？然：一損損於皮毛，皮聚而毛落；二損損於血脈，血脈虛少，不能榮於五藏六府也；三損損於肌肉，肌肉消瘦，飲食不為肌膚；四損損於筋，筋緩不能自收持；五損損於骨，骨痿不能起於床。反此者，至於收病也。從上下者，骨痿不能起於床者死；從下上者，皮聚而毛落者死。治損之法奈何？然：損其肺者，益其氣；損其心者，調其榮衛；損其脾者，調其飲食，適寒溫；損其肝者，緩其中；損其腎者，益其精，此治損之法也。脈有一呼再至，一吸再至；有一呼三至，一吸三至；有一呼四至，一吸四至；有一呼五至，一吸五至；有一呼六至，一吸六至；有一呼一至，一吸一至；有再呼一至，再吸一至；有呼吸再至。脈來如此，何以別知其病也？然：脈來一呼再至，一吸再至，不大不小曰平。一呼三至，一吸三至，為適得病，前大後小，即頭痛目眩，前小後大，即胸滿短氣。一呼四至，一吸四至，病欲甚，脈洪大者，苦煩滿，沉細者，胸中痛，滑者傷熱，濇者中霧露。一呼五至，一吸五至，其人當困，沉細夜加，浮大晝加，不大不小，雖困可治，其有大小者為難治。一呼六至，一吸六至，為死脈也，沉細夜死，浮大晝死。一呼

一至，一吸一至，名曰損，人雖能行，猶當著床，所以然者，血氣皆不足故也。再呼一至，呼吸再至，名曰無魂，無魂者當死也，人雖能行，名曰行尸。上部有脈，下部無脈，其人當吐，不吐者死。上部無脈，下部有脈，雖困無能為害也。所以然者，譬如人之有尺，樹之有根，枝葉雖枯槁，根本將自生。脈有根本，人有元氣，故知不死。《難經·第十四難》

12. 經言春脈弦，夏脈鉤，秋脈毛，冬脈石，是王脈耶？將病脈也？然：弦鉤毛石者，四時之脈也。春脈弦者，肝東方木也，萬物始生，未有枝葉，故其脈之來，濡弱而長，故曰弦。夏脈鉤者，心南方火也，萬物之所茂，垂枝布葉，皆下曲如鉤，故其脈之來疾去遲，故曰鉤。秋脈毛者，脈西方金也，萬物之所終，草木華葉，皆秋而落，其枝獨在，若毫毛也，故其脈之來，輕虛以浮，故曰毛。冬脈石者，腎北方水也，萬物之所藏也，盛冬之時，水凝如石，故其脈之來，大甚為喉介；微小為心痺，引背善淚出。小甚為善噦；微小為消瘴。滑甚為善渴，微滑為心疝引臍少腹鳴；澀甚為喑；微澀為血溢維厥，耳鳴巔疾。手少陰氣絕則脈不通。少陰者，心脈也。心者，脈之合也。脈不通則血不流，血不流則髮色不澤，故其面黑如漆柴者，血先死。壬篤癸死，水勝火也。心死臟，浮之脈實，如豆麻擊手，按之益躁疾者，死。《脈經·心小腸部第二》

右素問鍼經張景仲

脾象土，與胃合為腑（胃為水穀之腑）。其經足太陰（太陰，脾之脈也），與足陽明為表里（陽明胃脈）。其脈緩（緩，脾脈之大形也），其相夏三月（火王土相），王季夏六月，廢秋三月，囚冬三月，死春三月。其王日戊己，王時食時、日；困日壬癸，困時人定、夜半；其死日甲乙，死時平旦、日出（並木時也）。其神意，其主味，其養肉，其候口，其聲歌，其色黃，其臭香，其液涎，其味甘，其宜辛，其惡酸。脾俞在背第十一椎，募在章門（季肋端是）。胃俞在背第十二椎，募在太倉。

右新撰

脾者土也。敦而福，敦者，濃也，萬物眾色不同（脾主水穀，其氣微弱，水穀不化。脾為土行，王於季夏，土性敦濃，育養萬物，當此之時，草木備具、枝葉茂盛，此為端好之類）。腎為安聲，

其味爲鹹（肺主聲，腎爲其子，助於肺，故言安聲。鹹，腎味也）。倚坐母敗，臭如腥（金爲水母，而歸水中，此爲母往從子，脾氣反虛，五臟由此而相克賊，倚倒致敗宅臭而腥，故雲然也）。土得其子，則成爲山。金得其母，名曰丘矣。

#### 右四時經

黃帝曰：四時之序，逆從之變異也，然脾脈獨何主？岐伯曰：脾者土也，孤臟以灌四旁者也。曰：然則脾善惡可得見乎？曰：善者不可得見，惡者可見。曰：惡者何如？曰：其來如水之流者，此謂太過，病在外；如鳥之喙，此謂不及，病在中。太過則令人四肢沉重不舉；其不及，則令人九竅壅塞不通，名曰重強。

脾脈來而和柔相離，如雞足踐地，曰平。長夏以胃氣爲本。脾脈來實而盈數，如雞舉足，曰脾病。脾脈來堅兌，如鳥之喙，如鳥之距，如屋之漏，如水之溜，曰脾死。真脾脈至，弱而乍疏乍散（一作數），色青黃不澤，毛摺，乃死。長夏胃微濡弱，曰平。弱多胃少，曰脾病；但代無胃，曰死。濡弱有石，曰冬病；石甚，曰今病。

脾藏榮，榮舍意，愁憂不解則傷意，意傷則悶亂，四肢不舉，毛悴色夭，死於春。六月季夏建未，坤未之間土之位，脾王之時。其脈大阿阿而緩，名曰平脈。反得弦細而長者，是肝之乘脾，木之克土，爲賊邪，大逆，十死不治。反得浮（《千金》浮作微），澀而短者，是肺之乘脾，子之扶母，爲實邪，雖病自愈。反得洪大而散者（《千金》作浮大而洪），是心之乘脾，母之歸子，爲虛邪，雖病易治。反得沉濡而滑者，腎之乘脾，水之陵土，爲微邪，雖病即瘥。

脾脈萋萋而弱（《千金》萋萋作長長），來疏去數，再至，曰平；三至，曰離經，病；四至，脫精；五至，死；六至命盡，足太陰脈也。脾脈急甚，爲蠱；微急，爲脾中滿，食飲入而還出，後沃沫。緩甚，爲痿厥；微緩，爲風痿，四肢不用，心慧然若無病。大甚，爲擊僕；微大，爲痞氣，裏大膿血，在腸胃之外；小甚，爲寒熱；微小，爲消痺。滑甚，爲頽癰；微滑，爲蟲毒蛔，腸鳴熱。澀甚，爲腸頽；微澀，爲內潰，多下膿血也。足太陰氣絕，則脈不營其口唇。口唇者，肌肉之本也。脈不營則肌肉濡，肌肉濡則人中滿，人中滿則唇反，唇反者肉先死。甲篤乙死，木

勝土也。脾死麟，浮之脈大緩，按之中如覆杯，狀如搖者，死。  
右素問鍼經張景仲《脈經·脾胃部第三》

13.肺象金，與大腸合為腑（大腸為傳導之腑也）。其經手太陰（手太陰肺脈也），與手陽明為表里（手陽明大腸脈也）。其脈浮（浮，肺脈之大形也）。其相季夏六月（季夏土王金相）。其王秋三月，廢冬三月，囚春三月，死夏三月（夏火王金死）。其王日庚日庚辛，王時晡時、日入；其困日甲乙，困時平旦、日出；其死日丙丁，死時禺中、日中。其神魄，其主聲，其養皮毛，其候鼻，其聲哭，其色白，其臭腥，其液涕，其味辛，其宜咸，其惡苦。肺俞在背第三椎（或云第五椎也），募在中府（直兩乳上下肋間）。大腸俞在背第十六椎，募在天樞（挾臍旁各一寸半）。

右新撰

肺者西方金，萬物之所終（金性剛，故王西方，割斷萬物，萬物是以皆終於秋也）。宿葉落柯，萋萋枝條，其杌然獨在。其脈為微浮毛，衛氣遲（萋萋者，零落之貌也，言草木宿葉得秋隨風而落，但有枝條杌然獨在。此時陽氣則遲，脈為虛微如毛也），榮氣數。數則在上，遲則在下，故名曰毛（諸陽脈數，諸陰脈遲，榮為陰，不應數，反言榮氣數，陰得秋節而升轉在陽位，故一時數而在上也。此時陰始用事，陽即下藏，其氣反遲，是以肺脈數散如毛也）。陽當陷而不陷，陰當升而不升，為邪所中（陰陽交易，則不以時定，二氣感激，故為風寒所中）。陽中邪則卷，陰中邪則緊，卷則惡寒，緊則為栗，寒栗相薄，故名曰瘧。弱則發熱，浮乃來出（卷者，其人拘卷也，緊者，脈緊也。此謂國中風寒之時，脈緊，其人則寒，寒止而脈更微弱，弱則其人發熱，熱止則脈浮，浮者，瘧解王脈出也），旦中旦發，暮中暮發（言瘧發皆隨其國中風邪之時也）。臟有遠近，脈有遲疾，周有度數，行有漏刻（臟，謂人五臟，肝心脾肺腎也，心肺在膈上，呼則其氣出，是為近，呼為陽，其脈疾。腎肝在膈下，吸則其氣入，是為遠也，吸為陰，其脈遲。度數，謂經脈之長短，周身行者，榮衛之行也。行陰、陽各二十五度，為一周也，以應漏下百刻也）。遲在上，傷毛採；數在下，傷下焦。中焦有惡則見，有善則匿（秋則陽氣遲，陰氣數。遲當在下，數當在上，隨節變，故言傷毛採也。人之皮毛，肺氣所行。下焦在臍下，陰之所治也，其脈應遲，今反數，故言

傷下焦。中焦，脾也，其平善之時脈常自不見，衰乃見耳。故云有惡則見也。陽氣下陷，陰氣則溫（言陽氣下陷，溫養諸臟）。陽反在下，陰反在巔，故名曰長而且留。（陰陽交代，各順時節，人血脈和平，言可長留竟一時）

#### 右四時經

黃帝問曰，秋脈如浮，何如而浮？岐伯對曰，秋脈肺也，西方金也，萬物之所以收成也。故其氣來輕虛而浮，其氣來急去散，故曰浮。反此者病。黃帝曰何如而反？岐伯曰，其氣來毛而中央堅，兩旁虛，此謂太過，病在外；其氣來毛而微，此謂不及，病在中。黃帝曰秋脈太過與不及，其病何如？岐伯曰，太過則令人氣逆而背痛溫溫（《內經》溫溫作愠愠）然，不及則令人喘，呼吸少氣而咳，上氣見血，下聞病音。肺脈來厭厭聶聶，如落榆莢，曰肺平。秋以胃氣為本（《難經》云厭厭聶聶，如循榆葉，曰春平脈。藹藹如車蓋。按之益大，曰秋平脈），肺脈來不上不下，如循雞羽，曰肺病（《巢源》無不字）。肺脈來如物之浮，如風吹毛，曰肺死。真肺脈至，大而虛，如以毛羽中人膚，色赤白不澤，毛折，乃死。秋胃微毛，曰平；毛多胃少，曰肺病；但毛無胃，曰死。毛而有弦，曰春病；弦甚，曰今病。肺藏氣，氣舍魄。喜樂無極則傷魄，魄傷則狂，狂者意不存人，皮革焦，毛悴色夭，死於夏。秋金肺王。其脈浮（《千金》浮作微）澀而短，曰平脈。反得洪大而散者（《千金》作浮大而洪），是心之乘肺，火之克金，為賊邪，大逆，十死不治（一本雲，日月年數至四，忌丙丁），反得沉濡而滑者，是腎之乘肺，子之扶母，為實邪，雖病自愈，反得大而緩者，是脾之乘肺，母之歸子，為虛邪，雖病易治。反得弦細而長者，是肝之乘肺，木之陵金，為微邪，雖病即瘥。肺脈來，泛泛輕如微風吹鳥背上毛，再至，曰平；三至，曰離經，病；四至，脫精；五至，死；六至，命盡。手太陰脈也。肺脈急甚，為癰疾；微急，為肺寒熱，息墮，咳唾血，引腰背胸，苦鼻息肉不通。緩甚，為多肝；微緩，為痿偏風（一作漏風），頭以下汗出不可止。太甚，為脛腫；微大，為肺痺，引胸背，起腰內。小甚，為飧洩；微小，為消瘵。滑甚，為息賁，上氣；微滑，為上下出血。澀甚，為嘔血；微澀，為鼠，在頸支掖之間，下不勝其上，其能喜酸。手太陰氣絕則皮毛焦。太陰者，行氣溫皮毛者也，氣

弗營則皮毛焦，皮毛焦則津液去，津液去則皮節傷，皮節傷者則爪（爪字一作皮）枯毛折，毛折者則氣（氣字一作毛）先死。丙篤丁死，火勝金也。肺死臟，浮之虛，按之弱如蔥葉，下無根者，死。《脈經·肺大腸部第四》右素問鍼經張仲景。

14. 腎象水，與膀胱合為腑，（膀胱為津液之腑。）其經足少陰，（足少陰腎脈也。）與足太陽為表裏。其脈沈，（沈，腎脈之大形也。）其相秋三月，（秋金王水相。）其王冬三月，廢春三月，囚夏三月，其死季夏六月。其王日壬癸，王時人定夜半，其困日丙丁，困時禺中日中，其死日戊己，死時食時日昃。其神志，其主液，其養骨，其候耳，其聲呻，其色黑，其臭腐，其液唾，其味鹹，其宜酸，其惡甘。腎俞在背第十四椎，募在京門。膀胱俞在第十九椎，募在中極。（橫骨上一寸，在臍下五寸，前陷者中）

右新撰

腎者北方水，萬物之所藏。（冬則北方用事，王在三時之後，腎在四臟之下，故王北方也。萬物春生，夏長，秋收，冬藏。）百蟲伏蟄，（冬伏蟄，不食之蟲，言有百種也。）陽氣下陷，陰氣上升，陽氣中出，陰氣烈為霜，遂不上升，化為雪霜，猛獸伏蟄，螺蟲匿藏。（陽氣下陷者，謂降於土中也，其氣猶越而升出。陰氣在上，寒盛，陽氣雖升出，而不能自致，因而化作霜雪；或謂陽氣中出，是十月，則霜降。猛獸伏蟄者，蓋謂龍蛇，冬時而潛處。螺蟲無毛甲者，得寒皆伏蟄，逐陽氣所在，如此避冰霜，自溫養也。）其脈為沈，沈為陰，在裏不可發，汗發則螺蟲出，見其霜雪。（陽氣在下，故冬脈沈，溫養於臟腑，此為裏實，而表虛。復從外發其汗，此為逆治，非其法也。猶百蟲伏蟄之時，而反出土，見於冰霜，必死不疑。逆治者死，此之謂也。）陰氣在表，陽氣在臟，慎不可下，下之者傷脾，脾土弱，即水氣妄行，（陽氣在下，溫養諸臟，故不可下也；下之既損於陽氣，而脾胃復傷，土以防水而今反傷之，故令水得盈溢，而妄行也。）下之者，如魚出水，蛾入湯。（言治病逆則殺人，如魚出水，蛾入湯火之中，立死。）重客在裏，慎不可熏，熏之逆客，其息則喘。（重客者，猶陽氣也，重者尊重之貌也。陽位尊處於上，今一時在下，非其當所，故言客也。熏謂燒鍼，及以湯火之輩，熏發其汗，如此則客熱從外入，與陽氣相薄，是為逆也。氣上熏胸中，故令喘息。）無持客熱，

令口爛瘡；（無持者，無以湯火發熏其汗也；熏之則火氣入裏，為客熱，故令其口生瘡。）陰脈且解，血散不通，正陽遂厥，陰不往從，（血行脈中，氣行脈外，五十周而復會，如環之無端也。血為陰，氣為陽，相須而行，發其汗，使陰陽離別，脈為解散，血不得通。厥者逆也，謂陽氣逆，而不復相朝，使治病失所，故陰（陽錯逆，可不慎也？）客熱狂入，內為結胸，（陰陽錯亂，外熱狂入，留結胸中也。）脾氣遂弱，清溲痢通。（脾主水穀，其氣微弱，水穀不化，下痢不息。清者廁也，溲從水道出，而反清。溲者是謂下痢至廁也。）

#### 右四時經

冬脈如營，何如而營。歧伯曰：各脈者腎也，北方水也，萬物之所以合藏也，故其氣來，沈以搏，故曰營，反此者病。帝曰：何如而反。歧伯曰：其氣來如彈石者，此謂太過，病在外；其去如數者，此謂不及，病在中。帝曰：冬脈太過與不及，其病皆何如。歧伯曰：太過，則令人解，脊脈痛而少氣不欲言；其不及，則令人心懸如病飢，中清，脊中痛，少腹滿，小便黃赤。腎脈來…喘喘類類如鉤，按之而堅，曰腎平，冬以胃氣為本，腎脈來，如引葛，按之益堅，曰腎病，腎脈來，發如奪索，辟辟如彈石，曰腎死。真腎脈至，搏而絕，如指彈石辟辟然，色黑黃不澤，毛折，乃死。真脾脈至，弱而乍數乍踈，色黃青不澤，毛折，乃死。冬胃微石曰平，石多胃少曰腎病，但石無胃曰死，石而有鉤曰夏病，鉤甚曰今病（凡人以水穀為本，故人絕水穀則死，脈無胃氣亦死，所謂無胃氣者，但得真臟脈，不得胃氣也，所謂脈不得胃氣者，肝不弦，腎不石也）。腎藏精，精舍志，盛怒而不止則傷志，志傷則喜忘其前言，腰脊不可以俛仰屈伸，毛卒色夭，死於季夏，冬腎水王，其脈沉濡而滑曰平，脈反得大而緩者，是脾之乘腎，土之刻水，為賊邪，大逆，十死不治（一本云日月年數至一，忌戊己），反得絃細而長者，是肝之乘腎，子之扶母，為實邪，雖病自愈。反得浮（《千金》作微）澀而短者，是肺之乘腎，母之歸子，為虛邪，雖病易治。反得洪大而散者（《千金》作浮大而洪），是心之乘腎，火之陵水，為微邪，雖病即瘥。腎脈沉細而緊，再至，曰平；三至，曰離經，病；四至，脫精；五至，死；六至，命盡。足少陰脈也。腎脈急甚，為骨痠、癰疾；微急，為奔豚、沉厥，

足不收，不得前後。緩甚，為折脊；微緩，為洞下，洞下者食不化，入咽還出。大甚，為陰痿；微大，為石水，起臍下以至小腹腫，垂垂然，上至胃脘，死不治；小甚，為洞洩；微小，為消瘵。滑甚，為癰；微滑，為骨痿，坐不能起，目無所見，視見黑花。澀甚，為大癰；微澀，為不月水，沉痔。足少陰氣絕則骨枯。少陰者，冬脈也，伏行而濡骨髓者也。故骨不濡則肉不能著骨也，骨肉不相親則肉濡而卻，肉濡而卻故齒長而垢，（《難經》垢字作枯）發無澤，發無澤者，骨先死。戊篤己死，土勝水也。腎死臟，浮之堅，按之亂如轉丸，益下入尺中者，死。右素問鍼經張仲景《脈經·腎膀胱部第五》

15.經言所謂三部者，寸、關、尺也；九候者，每部中有天、地、人也。上部主候從胸以上至頭，中部主候從膈以下至氣街，下部主候從氣街以下至足。浮、沉、牢、結、遲、疾、滑、澀，各自異名，分理察之，勿怠觀變，所以別三部九候，知病之所起。審而明之，針灸亦然也。故先候脈寸中（寸中一作寸中於九）。浮在皮膚，沉細在裡。昭昭天道，可得長久。上部之候，牢、結、沉、滑，有積氣在膀胱。微細而弱，臥引裡急，頭痛，咳嗽，逆氣上下。心膈上有熱者，口乾渴燥。病從寸口，邪入上者名曰解。脈來至，狀如琴弦，苦少腹痛，女子經月不利，孔竅生瘡；男子病痔，左右脅下有瘡。上部不通者，苦少腹痛，腸鳴。寸口中虛弱者，傷氣，氣不足。大如桃李實，苦痺也。寸口直上者，逆虛也。如浮虛者，洩利也。中部脈結者，腹中積聚。若在膀胱、兩脅下，有熱。脈浮而大，風從胃脘入，水脹，乾嘔，心下澹澹，如有桃李核。胃中有寒，時苦煩、痛、不食，食即心痛，胃脹支滿，膈上積。脅下有熱，時寒熱淋露。脈橫出上者，脅氣在膀胱，病即著。右橫關入寸口中者，膈中不通，喉中咽難。刺關元，入少陰。下部脈者，其脈來至浮大者，脾也。與風集合，時上頭痛，引腰背，小滑者，厥也。足下熱，煩滿，逆上搶心，上至喉中，狀如惡肉，脾傷也。病少腹下，在膝、諸骨節間，寒清不可屈伸；脈急如弦者，筋急，足攣結者，四肢重。從尺邪入陽明者，寒熱也。大風邪入少陰，女子漏白下赤，男子溺血，陰萎不起，引少腹痛。人有三百六十脈，法三百六十日。三部者，寸、關、尺也。尺脈為陰，陰

脈常沉而遲；寸、關為陽，陽脈俱浮而速。氣出為動，入為息。故陽脈六息七息十三投，陰脈八息七息十五投，此其常也。二十八脈相逐上下，一脈不來，知疾所苦。尺勝治下，寸勝治上，尺寸俱平治中央。臍以上陽也，法於天；臍以下陰也，法於地；臍為中關。頭為天，足為地。有表無裡，邪之所止，得鬼病。何謂表裡？寸尺為表，關為裡，兩頭有脈，關中絕不至也。尺脈上不至關為陰絕，寸脈下不至關為陽絕。陰絕而陽微，死不治。三部脈或至或不至，冷氣在胃中，故令脈不通也。上部有脈，下部無脈，其人當吐，不吐者，死。上部無脈，下部有脈，雖困無所苦。所以然者，譬如人之有尺，樹之有根，雖枝葉枯槁，根本將自生，木有根本，即自有氣，故知不死也。寸口脈平而死者，何也？然諸十二經脈者，皆係於生氣之原。所謂生氣之原者，非謂十二經之根本也，謂腎間動氣也。此五臟六腑之本，十二經之根，呼吸之門，三焦之原，一名守邪之神也。故氣者，人根本也，根絕則莖枯矣。寸口脈平而死者，生氣獨絕於內也。（腎間動氣，謂左為腎，右為命門，命門者，精神之所舍，原氣之所繫也，一名守邪之神。以命門之神固守，邪氣不得妄入，入即死矣。此腎氣先絕於內，其人便死。其脈不復，反得動病也）岐伯曰，形盛脈細，少氣不足以息者，死；形瘦脈大，胸中多氣者，死。形氣相得者，生；參伍不調者，病。三部九候皆相失者，死。上下左右之脈相應如參舂者，病甚；上下左右相失不可數者，死。中部之候雖獨調，與眾臟相失者，死；中部之候相減者，死。目內陷者，死。黃帝曰，冬陰夏陽奈何？岐伯曰，九候之脈皆沉細懸絕者，為陰，主冬，故以夜半死；盛躁喘數者，為陽，主夏，故以日中死。是故寒熱者，平旦死；熱中及熱病者，日中死；病風者，以日夕死；病水者，以夜半死；其脈乍數乍疏乍遲乍疾者，以日乘四季死；形肉已脫，九候雖調，猶死。七診雖見，九候皆順者，不死。所言不死者，風氣之病及經月之病，似七診之病而非也，故言不死。若有七診之病，其脈候亦敗者，死矣。必發噦噫，必審問其所始病與今之所方病，而後各切循其脈，視其經絡浮沉，以上下逆順循之。其脈疾者，不病；其脈遲者，病；脈不往來者，死；皮膚著者，死。兩手脈，結上部者，濡；結中部者，緩；結三

里者，豆起，弱反在關，濡反在巔。微在其上，澀反在下。微即陽氣不足，沾熱汗出；澀即無血，厥而且寒。黃帝問曰，餘每欲視色、持脈，獨調其尺，以言其病，從外知內，為之奈何？岐伯對曰，審其尺之緩、急、小、大、滑、澀，肉之堅脆，而病形變定矣。調之何如？對曰，脈急者，尺之皮膚亦急；脈緩者，尺之皮膚亦緩；脈小者，尺之皮膚減而少；脈大者，尺之皮膚亦大；脈滑者，尺之皮膚亦滑；脈澀者，尺之皮膚亦澀。凡此六變，有微有甚。故善調尺者，不待於寸；善調脈者，不待於色。能參合行之，可為上工。尺膚滑以淖澤者，風也；尺內弱，解安臥脫肉者，寒熱也；尺膚澀者，風痺也；尺膚粗如枯魚之鱗者，水淡飲也；尺膚熱甚，脈盛躁者，病溫也，其脈盛而滑者，汗且出；尺膚寒甚，脈小（一作急）者，洩，少氣；尺膚然（然，《甲乙》作熱炙人手），先熱後寒者，寒熱也；尺膚先寒，久持之而熱者，亦寒熱也；尺然熱，人迎大者，嘗奪血；尺緊人迎脈小甚則少氣；色白有加者，立死。肘所獨熱者，腰以上熱；肘前獨熱者，膺前熱；肘後獨熱者，肩背熱。肘後粗以下三四寸，腸中有蟲；手所獨熱者，腰以上熱；臂中獨熱者，腰腹熱；掌中熱者，腹中熱；掌中寒者，腹中寒；魚上白肉有青血脈者，胃中有寒。諸浮、諸沉、諸滑、諸澀、諸弦、諸緊，若在寸口，膈以上病；若在關上，胃以下病；若在尺中，腎以下病。寸口脈滑而遲，不沉不浮，不長不短，為無病。左右同法。寸口太過與不及，寸口之脈，中手短者，曰頭痛；中手長者，曰足脛痛；中手促上擊者，曰肩背痛。寸口脈浮而盛者，病在外。寸口脈沉而堅者，病在中。寸口脈沉而弱者，曰寒熱（一作氣，又作中）及疝瘕、少腹痛。寸口脈沉而弱，發必墮落。寸口脈沉而緊，苦心下有寒，時痛，有積聚。寸口脈沉，胸中短氣。寸口脈沉而喘者，寒熱。寸口脈但實者，心勞。寸口脈緊或浮，膈上有寒，肺下有水氣。脈緊而長過寸口者，注病。脈緊上寸口者，中風。風頭痛亦如之。（《千金翼》雲亦為傷寒頭痛）脈弦上寸口者，宿食；降者，頭痛。脈來過寸入魚際者，遺尿。脈出魚際逆氣喘息。寸口脈，如羹上肥，陽氣微；連連如蜘蛛絲，陰氣衰。寸口脈偏絕，則臂偏不遂；其人兩手俱絕者，不可治。兩手前部陽絕者，苦心下寒毒，喙中熱。

關上脈浮而大，風在胃中，張口肩息，心下澹澹，食慾嘔。關上脈微浮，積熱在胃中，嘔吐蛔蟲，心健忘。關上脈滑而大小不勻（《千金》雲必吐逆），是為病方欲進，不出一二日復欲發動。其人欲多飲，飲即註利。如利止者，生；不止者，死。關上脈緊而滑者，蛔動。關上脈澀而堅，大而實，按之不減有力，為中焦實，有伏結在脾，肺氣塞，實熱在胃中。關上脈大，而尺寸細者，其人必心腹冷積，瘕結聚，欲熱飲食。關上脈時來時去、乍大乍小、乍疏乍數者，胃中寒熱，羸劣不欲飲食，如瘧狀。尺脈浮者，客陽在下焦。尺脈細微，澹洩，下冷利。尺脈弱，寸強，胃絡脈傷。尺脈虛小者，足脛寒，痿痺腳疼。尺脈澀，下血不利，多汗。（《素問》又云尺澀脈滑謂之多汗）尺脈滑而疾，為血虛。尺脈沉而滑者，寸白蟲。尺脈細而急者，筋攣，痺不能行。尺脈粗，常熱者，謂之熱中，腰膝疼，小便赤熱。尺脈偏滑疾，面赤如醉。外熱則病。《脈經·辨三部九候脈證第一》

- 16.滑為實、為下，（又為陽氣衰。）數為虛、為熱。浮為風、為虛。動為痛、為驚。沉為水、為實，（又為鬼疰。）弱為虛、為悸。遲則為寒，澀則少血，緩則為虛，洪則為氣。（一作熱）緊則為寒，弦數為瘧。瘧脈自弦，弦數多熱，弦遲多寒。微則為虛，代散則死。弦為痛痺（一作浮為風疰）。偏弦為飲，雙弦則脅下拘急而痛，其人澀澀惡寒。脈大，寒熱在中。伏者，霍亂。安臥，脈盛，謂之脫血。凡亡汗，肺中寒飲，冷水咳嗽，下利，胃中虛冷，此等其脈並緊。浮而大者，風。浮大者，中風，頭重，鼻塞。浮而緩，皮膚不仁，風寒入肌肉。滑而浮散者，攤緩風。滑者，鬼疰。澀而緊，痺病。浮洪大長者，風眩癲疾。大堅疾者，癲病。弦而鉤，脅下如刀刺，狀如蜚屍，至困不死。緊而急者，遁屍。洪大者，傷寒熱病。浮洪大者，傷寒。秋吉，春成病。浮而滑者，宿食。浮滑而疾者，食不消，脾不磨。短疾而滑，酒病。浮而細滑，傷飲。遲而澀，中寒，有結。快而緊，積聚，有擊痛。弦急，疝瘕，小腹痛，又為痺病。（一作痺病）遲而滑者，脹。盛而緊曰，脹。弦小者，寒痺。沉而弦者，懸飲，內痛。弦數，有寒飲，冬夏難治。緊而滑者，吐逆。小弱而澀，胃反。遲而緩者，有寒。微而緊者，有寒。沉而遲，

腹臟有冷病。微弱者，有寒，少氣。實緊，胃中有寒，苦不能食。時時利者，難治（一作時時嘔稽留難治）。滑數，心下結，熱盛。滑疾，胃中有熱。緩而滑，曰熱中。沉（一作浮）而急，病傷寒，暴發虛熱。浮而絕者，氣。關大而滑，中有短氣。浮短者，其人肺傷。諸氣微少，不過一年死。法當嗽也。沉而數，中水。冬不治自愈。短而數，心痛，心煩。弦而緊，脅痛，臟傷，有瘀血。（一作有寒血）沉而滑，為下重，亦為背脊痛。脈來細而滑，按之能虛，因急持直者，僵僕，從高墮下，病在內。微浮，秋吉，冬成病。微數，雖甚不成病，不可勞。浮滑疾緊者，以合百病，人易愈。陽邪來，見浮洪。陰邪來，見沉細。水穀來，見堅實。脈來乍大乍小、乍長乍短者，為崇。脈來洪大裊裊者，社崇。脈來沉沉澤澤，四肢不仁而重，土崇。脈與肌肉相得，久持之至者，可下之。弦小緊者，可下之。緊而數，寒熱俱發，必下乃愈。弦遲者，宜溫藥。緊數者，可發其汗。《脈經·平雜病脈第二》

- 17.病患肝絕，八日死。何以知之？面青，但欲伏眠，目視而不見人，汗（一作泣）出如水不止。（一曰二日死）病患膽絕，七日死，何以知之？眉為之傾。病患筋絕，九日死。何以知之？手足爪甲青，呼罵不休。（一曰八日死）病患心絕，一日死。何以知之？肩息，回視，立死。（一曰目亭亭，一日死）病患腸（一云小腸）絕，六日死。何以知之？發直如乾麻，不得屈伸，白汗不止。病患脾絕，十二日死。何以知之？口冷，足腫，腹熱，臏脹，洩利不覺，出無時度。（一曰五日死）病患胃絕，五日死。何以知之？脊痛，腰中重，不可反復。（一曰腓腸平，九日死）病患肉絕，六日死。何以知之？耳干，舌皆腫，溺血，大便赤洩。（一曰足腫，九日死）病患肺絕，三日死，何以知之？口張，但氣出而不還。（一曰鼻口虛張短氣）病患大腸絕，不治。何以知之？洩利無度，利絕則死。病患腎絕，四日死。何以知之？齒為暴枯，面為正黑，目中黃色，腰中欲折，白汗出如流水。（一曰人中平，七日死）病患骨絕，齒黃落，十日死。諸浮脈無根者，皆死。以上五臟六腑為根也。《脈經·診五臟六腑氣絕證猴第三》

- 18.春三月木王，肝脈治，當先至，心脈次之，肺脈次之，腎脈次

之。此為四時王相順脈也。到六月土王，脾脈當先至而反不至，反得腎脈，此為腎反脾也，七十日死。何謂腎反脾？夏，火王，心脈當先至，肺脈次之，而反得腎脈，是謂腎反脾。期五月、六月，忌丙丁。脾反肝，三十日死。何謂脾反肝？春，肝脈當先至，而反不至，脾脈先至，是謂脾反肝。期正月、二月，忌甲乙。腎反肝，三歲死。何謂腎反肝？春肝脈當先至而反不至，腎脈先至是謂腎反肝也。期七月、八月、忌庚辛。腎反心，二歲死。何謂腎反心？夏，心脈當先至而反不至，腎脈先至，是謂腎反心也。期六月，忌戊己。(臣億等按《千金》雲此中不論肺金之氣疏略未論指南又推五行亦頗顛倒待求別錄也)《脈經·診四時相反脈證第四》

- 19.脈有損至，何謂也？然至之脈，一呼再至曰平，三至曰離經，四至曰奪精，五至曰死，六至曰命絕，此至之脈也。何謂損？一呼一至曰離經，二呼一至曰奪精，三呼一至曰死，四呼一至曰命絕，此損之脈也。至脈從下上，損脈從上下也。損脈之為病奈何？然一損損於皮毛，皮聚而毛落；二損損於血脈，血脈虛少，不能榮於五臟六腑也；三損損於肌肉，肌肉消瘦，食飲不為肌膚；四損損於筋，筋緩不能自收持；五損損於骨，骨痿不能起於床。反此者，至於收病也。從上下者，骨痿不能起於床者，死；從下上者，皮聚而毛落者，死。治損之法奈何？然；損其肺者，益其氣；損其心者，調其榮衛；損其脾者，調其飲食，適其寒溫；損其肝者，緩其中；損其腎者，益其精氣。此治損之法也。脈有一呼再至，一吸再至；一呼三至，一吸三至；一呼四至，一吸四至；一呼五至，一吸五至；一呼六至，一吸六至；一呼一至，一吸一至；再呼一至，再吸一至；呼吸再至。脈來如此，何以別知其病也？然脈來一呼再至，一吸再至，不大不小，曰平。一呼三至，一吸三至，為適得病。前大後小，即頭痛目眩；前小後大，即胸滿短氣。一呼四至，一吸四至病適欲甚。脈洪大者，苦煩滿；沉細者，腹中痛；滑者，傷熱；澀者，中霧露。一呼五至，一吸五至，其人當困。沉細即夜加，浮大即晝加，不大小雖困可治，其有大小者為難治。一呼六至，一吸六至，為十死脈也。沉細夜死，浮大晝死。一呼一至，一吸一至，名曰損。人雖能行，猶當（一作猶未）著床，所以然

者，血氣皆不足故也。再呼一至，再吸一至，名曰無魂。無魂者，當死也，人雖能行，名曰行屍。扁鵲曰脈一出一入曰平，再出一入少陰，三出一入太陰，四出一入厥陰。再入一出少陽，三八一出陽明，四入一出太陽。脈出者為陽，入者為陰。故人一呼而脈再動，氣行三寸；一吸而脈再動，氣行三寸。呼吸定息，脈五動。一呼一吸為一息，氣行六寸。人十息，脈五十動，氣行六尺。二十息，脈百動，為一備之氣，以應四時。天有三百六十五日，人有三百六十五節。晝夜漏下水百刻。一備之氣，脈行丈二尺。一日一夜行於十二辰，氣行盡則周遍於身，與天道相合，故曰平，平者，無病也，一陰一陽是也。脈再動為一至，再至而緊即奪氣。一刻百三十五息，十刻千三百五十息，百刻萬三千五百息，二刻為一度，一度氣行一周身，晝夜五十度。脈三至者離經。一呼而脈三動，氣行四寸半。人一息脈七動，氣行九寸。十息脈七十動，氣行九尺。一備之氣。脈百四十動，氣行一丈八尺。一周於身，氣過百八十度，故曰離經。離經者病，一陰二陽是也。三至而緊則奪血。脈四至則奪精。一呼而脈四動，氣行六寸。人一息脈九動，氣行尺二寸。人十息脈九十動，氣行一丈二尺。一備之氣，脈百八十動，氣行二丈四尺。一周於身，氣過三百六十度，再遍於身，不及五節，一時之氣而重至。諸脈浮澀者，五臟無精，難治。一陰三陽是也（四至而緊則奪形）。脈五至者，死。一呼而脈五動，氣行六寸半（當行七寸半）。人一息脈十一動，氣行尺三寸（當行尺五寸）。人十息脈百一十動，氣行丈三尺（當行丈五尺）。一備之氣，脈二百二十動，氣行二丈六尺（當行三丈）。一周於身三百六十五節，氣行過五百四十度。再周於身，過百七十度。一節之氣而至此。氣浮澀，經行血氣竭盡，不守於中，五臟痿，精神散亡。脈五至而緊則死，三陰（一作二）三陽是也，雖五猶未，如之何也。脈一損一乘者，人一呼而脈一動，人一息而脈再動，氣行三寸。十息脈二十動，氣行三尺。一備之氣，脈四十動，氣行六尺，不及周身百八十節。氣短不能周遍於身，苦少氣，身體懈墮矣。脈再損者，人一息而脈一動，氣行一寸五分。人十息脈十動，氣行尺五寸。一備之氣，脈二十動，氣行三尺，不及周身二百節。疑氣血盡，經中不能及，故曰離經。

血去不在其處，小大便皆血也。脈三損者，人一息復一呼而脈一動。十息脈七動，氣行尺五寸（當行尺五分）。一備之氣，脈十四動，氣行三尺一寸（當行二尺一寸）。不及周身二百九十七節，故曰爭，氣行血留，不能相與俱微。氣閉實則胸滿臟枯，而爭於中，其氣不朝，血凝於中，死矣。脈四損者，再息而脈一動。人十息脈五動，氣行七寸半。一備之氣，脈十動。氣行尺五寸。不及周身三百一十五節，故曰亡血，亡血者，忘失其度，身羸疲，皮裹骨。故氣血俱盡，五臟失神，其死明矣。脈五損者，人再息復一呼而脈一動。人十息脈四動，氣行六寸。一備之氣，脈八動，氣行尺二寸。不及周身三百二十四節，故曰絕。絕者，氣急，不下床，口氣寒，脈俱絕，死矣。岐伯曰脈失四時者為至啟，至啟者，為損至之脈也。損之為言，少陰主骨為重，此志損也；飲食衰減，肌肉消者，是意損也；身安臥，臥不便利，耳目不明，是魂損也；呼吸不相通，五色不華，是魄損也；四肢皆見脈為亂，是神損也。大損三十歲，中損二十歲，下損十歲。損，各以春、夏、秋、冬。平人，人長脈短者，是大損，三十歲；人短脈長者，是中損，二十歲；手足皆細，是下損，十歲；失精氣者，一歲而損；男子，左脈短，右脈長，是為陽損，半歲；女子，右脈短，左脈長，是為陰損，半歲。春，脈當得肝脈，反得脾、肺之脈，損；夏，脈當得心脈，反得腎、肺之脈，損；秋，脈當得肺脈，反得肝、心之脈，損；冬，脈當得腎脈，反得心、脾之脈，損。當審切寸口之脈，知絕不絕。前後去為絕。掌上相擊，堅如彈石，為上脈虛盡，下脈尚有，是為有胃氣（上脈盡，下脈堅如彈石，為有胃氣）。上下脈皆盡者，死；不絕不消者，皆生，是損脈也。至之為言，言語音深遠，視憤憤，是誌之至也；身體粗大飲食暴多，是意之至也；語言妄見，手足相引，是魂之至也；龍蔥華色，是魄之至也；脈微小不相應，呼吸自大，是神之至也。是至脈之法也。死生相應，病各得其氣者生，十得其半也。黃帝曰，善。《脈經·診損至脈第五》

- 20.脈一動一止，二日死（一經云、一日死）。二動一止，三日死。三動一止，四日死或五日死。四動一止，六日死。五動一止，五日死，或七日死。六動一止，八日死。七動一止，九日死。

八動一止，十日死。九動一止，九日死，又云十一日死（一經云十三日死，若立春死）。十動一止，立夏死（一經云立春死）。十一動一止，夏至死（一經云立夏死；一經云立秋死）。十二、十三動一止，立秋死（一經云立冬死）。十四、十五動一止，立冬死（一經云立夏死），二十動一止，一歲死，若立秋死。二十一動一止，二歲死。二十五動一止，立冬死（一經云一歲死，或二歲死）。三十動一止，二歲若三歲死。三十五動一止，三歲死。四十動一止，四歲死。五十動一止，五歲死。不滿五十動一止，五歲死。脈來五十投而不止者，五臟皆受氣，即無病（《千金方》雲五行氣畢，陰陽數同，榮衛出入，經脈通流，晝夜百刻，五德相生）。脈來四十投而一止者，一臟無氣，卻後四歲，春草生而死。脈來三十投而一止者，二臟無氣，卻後三歲，麥熟而死。脈來二十投而一止者，三臟無氣，卻後二歲，桑椹赤而死。脈來十投而一止者，四臟無氣，歲中死。得節不動，出清明日死，遠不出穀雨死矣。脈來五動而一止者，五臟無氣，卻後五日而死。脈一來而久住者，宿病在心主中治。脈二來而久住者，病在肝枝中治。脈三來而久住者，病在脾下中治。脈四來而久住者，病在腎間中治。脈五來而久住者，病在肺支中治。五脈病，虛羸人得此者，死。所以然者，藥不得而治，針不得而及。盛人可治，氣全故也。《脈經·診脈動止投數數死期年月第六》

21. 診傷寒，熱盛，脈浮大者，生；沉小者，死。傷寒，已得汗，脈沉小者，生；浮大者，死。溫病，三、四日以下，不得汗，脈大疾者，生；脈細小難得者，死，不治。溫病，穰穰大熱，其脈細小者，死。（《千金》 穰穰時行）溫病，下利，腹中痛甚者，死，不治。溫病，汗不出，出不至足者，死；厥逆汗出，脈堅強急者，生；虛緩者，死。溫病，二、三日，身體熱，腹滿，頭痛，食飲如故，脈直而疾者，八日死。四、五日。頭痛，腹痛而吐，脈來細強，十二日死。八、九日頭不疼，身不痛，目不赤，色不變，而反利，脈來牒牒，按之不彈手，時大，心下堅，十七日死。熱病，七、八日，脈不軟（一作喘），不散（一作數）者，當喑。喑後三日，溫汗不出者，死。熱病，七、八日，其脈微細，小便不利，加暴口燥，脈代，舌焦幹黑者，死。

熱病，未得汗，脈盛躁疾，得汗者，生；不得汗者，難瘥。熱病，已得汗，脈靜安者，生；脈躁者，難治。熱病，已得汗，常大熱不去者，亦死。（大，一作專）熱病，已得汗，熱未去，脈微躁者，慎不得刺治。熱病，發熱，熱甚者，其脈陰陽皆竭，慎勿刺。不汗出，必下利。診人被風，不仁痿蹇，其脈虛者，生；堅急疾者，死。診癩病，虛則可治，實則死。癩疾，脈實堅者，生；脈沉細小者，死。癩疾，脈搏大滑者，久久自己。其脈沉小急實，不可治；小堅急，亦不可療。診頭痛、目痛、久視無所見者，死。（久視，一作卒視）診人心腹積聚，其脈堅強急者，生；虛弱者，死。又實強者，生；沉者，死。其脈大，腹大脹，四肢逆冷，其人脈形長者，死。腹脹滿，便血，脈大時絕，極下血；脈小疾者，死。心腹痛，痛不得息，脈細小遲者，生；堅大疾者，死。腸，便血，身熱則死，寒則生。腸下白沫，脈沉則生，浮則死。腸，下膿血，脈懸絕則死，滑大則生。腸之屬，身熱，脈不懸絕，滑大者，生；懸澀者，死。以麟期之。腸，下膿血，脈沉小流連者，生；數疾且大，有熱者，死。腸，筋攣，其脈小細安靜者，生；浮大緊者，死。洞洩，食不化，不得留，下膿血，脈微小連者，生；緊急者，死。洩注，脈緩，時小結者，生；浮大數者，死。蝕陰，其脈虛小者，生；緊急者，死。咳嗽，脈沉緊者，死；浮直者，生；浮軟者，生；小沉伏匿者，死。咳嗽，羸瘦，脈形堅大者，死。咳，脫形，發熱，脈小堅急者，死；肌瘦，下（一本云不）脫形，熱不去者，死。咳而嘔，腹脹且洩，其脈弦急欲絕者，死。吐血、衄血、脈滑小弱者，生；實大者，死。汗出若衄，其脈小滑者，生；大躁者，死。唾血，脈緊強者，死；滑者，生。吐血而咳，上氣，其脈數，有熱，不得臥者，死。上氣，脈數者，死。謂其形損故也。上氣，喘息低昂，其脈滑，手足溫者，生；脈澀，四肢寒者，死。上氣，面浮腫，肩息，其脈大，不可治，加利必死。（一作又甚）上氣，注液，其脈虛寧寧伏匿者，生；堅強者死。寒氣上攻，脈實而順滑者，生；實而逆澀則死。（《太素》雲寒氣暴上，脈滿實何如？曰，實而滑則生，實而逆則死矣。其形盡滿何如？曰；舉形盡滿者，脈急大堅，尺滿而不應，如是者，順則生，逆則死。何謂順則生，逆則死？曰，所謂順者，

手足溫也；謂逆者，手足寒也）瘧，脈實大，病久可治；脈懸小堅急，病久不可治。消渴，脈數大者，生；細小浮短者，死。消渴，脈沉小者，生；實堅大者，死。水病，脈洪大者，可治；微細者，不可治。水病，脹閉，其脈浮大軟者，生；沉細虛小者，死。水病，腹大如鼓，脈實者，生；虛者，死。卒中惡，吐血數升，脈沉數細者，死；浮大疾快者，生。卒中惡，腹大，四肢滿，脈大而緩者，生；緊大而浮者，死；緊細而微者，亦生。病瘡，腰脊強急，蠟者，皆不可治。寒熱，蠟，其脈代、絕者，死。金瘡，血出太多，其脈虛細者，生；數實大者，死。金瘡出血、脈沉小者，生；浮大者，死。斫瘡，出血一、二石，脈來大，二十日死。斫刺俱有，病多，少血，出不自止斷者，其脈止，脈來大者，七日死；滑細者，生。從高頓僕，內有血，腹脹滿，其脈堅強者，生；小弱者，死。人為百藥所中傷，脈浮澀而疾者，生；微細者，死；洪大而遲者，生。（《千金》遲作速）人病甚而脈不調者，難瘥。人病甚而脈洪者，易瘥。人內外俱虛，身體冷而汗出，微嘔而煩擾，手足厥逆，體不得安靜者，死。脈實滿，手足寒，頭熱，春秋生，冬夏死。老人脈微，陽羸陰強者，生；脈焱大加息（一作如急）者，死。陰弱陽強，脈至而代，奇（一作寄）月而死。尺脈澀而堅，為血實氣虛也。其發病腹痛、逆滿、氣上行，此為婦人胞中絕傷，有惡血，久成結瘕。得病以冬時，黍赤而死。尺脈細而微者，血氣俱不足，細而來有力者，是谷氣不充，病得節輒動，棗葉生而死。此病秋時得之。左手寸口脈偏動，乍大乍小，不齊，從寸口至關，關至尺，三部之位，處處動搖，各異不同，其人病，仲夏得之此脈，桃花落而死。（花，一作葉）右手寸口脈偏沉伏，乍小乍大，朝來浮大，暮夜沉伏。浮大即太過，上出魚際。沉伏即下不至關中。往來無常，時時復來者，榆葉枯落而死。（葉，一作英）右手尺部，脈三十動一止，有頃更還，二十動一止，乍動乍疏，連連相因，不與息數相應，其人雖食穀，猶不愈，繁草生而死。左手尺部，脈四十動而一止，止而復來，來逆如循直木，如循張弓弦，然如兩人共引一索，至立冬死。（《千金》作至立春而死）《脈經·診百病死生訣第七》

22.三部脈調而和者，生。三部脈廢者，死。三部脈虛，其人長病

得之，死。虛而澀，長病亦死，虛而滑亦死，虛而緩亦死，虛而弦急，癩病亦死。三部脈實而大，長病得之，死；實而滑，長病得之，生。卒病得之，死；實而緩亦生；實而緊亦生；實而緊急，癩癩可治。三部脈強，非稱其人病，便死。三部脈羸，非其人（一作脈）得之，死。三部脈粗，長病得之，死；卒病得之，生。三部脈細而軟，長病得之，生；細而數亦生；微而緊亦生。三部脈大而數，長病得之，生；卒病得之，死。三部脈微而伏，長病得之，死。三部脈軟（一作濡），長病得之，不治自愈；治之，死。卒病得之，生。三部脈浮而結，長病得之，死；浮而滑，長病亦死；浮而數，長病風得之，生；卒病得之，死。三部脈芤，長病得之，生；卒病得之，死。三部脈弦而數，長病得之，生；卒病得之，死。三部脈革，長病得之，死；卒病得之，生。三部脈堅而數，如銀釵股，蠱毒病，必死；數而軟，蠱毒病得之，生。三部脈如羹上肥，長病得之，死；卒病得之，生。三部脈連連如蜘蛛絲，長病得之，死；卒病得之，生。三部脈如霹靂，長病得之，死；三十日死。三部脈如弓弦，長病得之，死。三部脈累累如貫珠，長病得之，死。三部脈如水淹然流，長病不治自愈，治之反死。（一云如水流者，長病七十日死；如水不流者，長病不治自愈）三部脈如屋漏，長病十日死。（《千金》雲十四日死）三部脈如雀啄，長病七日死。三部脈如釜中湯沸，朝得暮死，夜半得日中死，日中得夜半死。三部脈急，切腹間，病又婉轉腹痛，針上下瘥。《脈經·診三部脈虛實決死生第八》

- 23.脈，平旦曰太陽，日中曰陽明，晡時曰少陽，黃昏曰少陰，夜半曰太陰，雞鳴曰厥陰，是三陰三陽時也。少陽之脈，乍小乍大，乍長乍短，動搖六分。王十一月甲子夜半，正月、二月甲子王。太陽之脈，洪大以長，其來浮於筋上，動搖九分。三月、四月甲子王。陽明之脈，浮大以短，動搖三分。大前小後，狀如科鬥，其至跳。五月、六月甲子王。少陰之脈緊細，動搖六分。王五月甲子日中，七月、八月甲子王。太陰之脈、緊細以長，乘於筋上，動搖九分。九月、十月甲子王。厥陰之脈，沉短以緊，動搖三分。十一月、十二月甲子王。厥陰之脈急弦，動搖至六分以上，病遲脈寒，少腹痛引腰，形喘者死；脈緩者

可治。刺足厥陰入五分。少陽之脈，乍短乍長，乍大乍小，動搖至六分以上。病頭痛，脅下滿，嘔可治；擾即死（一作偃可治，偃即死）。刺兩季肋端足少陽也，入七分。陽明之脈，洪大以浮，其來滑而跳，大前細後，狀如科鬥，動搖至三分以上。病眩頭痛，腹滿痛，嘔可治；擾即死。刺臍上四寸，臍下三寸，各六分。從二月至八月，陽脈在表；從八月至正月，陽脈在裡。附陽脈強，附陰脈弱。至即驚，實則。細而沉，不即洩，洩即煩，煩即渴，渴即腹滿，滿即擾，擾即腸，即脈代，乍至乍不至。大而沉即咳，咳即上氣，上氣甚則肩息，肩息甚則口舌血出，血出甚即鼻血出。變出寸口，陰陽表裡，以互相乘。如風有道，陰脈乘陽也。寸口中，前後溢者，行風。寸口中，外實內不滿者，三風、四溫。寸口者，勞風。勞風者，大病亦發，快行汗出亦發。軟風者，上下微微扶骨，是其診也。表緩腹內急者，軟風也。猥雷實夾者，飄風。從陰趨陽者，風邪。一來調，一來速，鬼邪也。陰緩陽急者，表有風來入臟也。陰急者，風已抱陽入腹。上遂遂，下宛宛，不能至陽，流飲也。上下血微，陰強者，為漏癖；陽強者，酒癖也。偃偷不過，微反陽，澹漿也。陰扶骨絕者，從寸口前頓趣於陰，汗水也。來調四布者，欲病水也。陰脈不偷，陽脈傷，復少津。寸口中後大前兌，至陽而實者，癖食。小過陽一分者，七日癖；二分者，十日癖；三分者，十五日癖；四分者，二十日癖；四分中伏不過者，半歲癖。敦敦不至胃陰一分，飲餌癖也。外勾者，久癖也。內捲者，十日以還。外強內弱者，裏大核也，並浮而弦者，汁核。並浮緊而數，如沉，病暑食粥（一作微）。有內緊而伏，麥飯若餅。寸口脈倚陽，緊細以微，瓜菜皮也；若倚如緊，薺藏菜也。躋躋無數，生肉癖也；附陽者，炙肉癖也。小倚生，浮大如故，生麥豆也。《脈經·扁鵲陰陽脈法第二》

- 24.扁鵲曰，人一息脈二至謂平脈，體形無苦。人一息脈三至謂病脈。一息四至謂痺者，脫脈氣，其眼睛青者，死。人一息脈五至以上，死，不可治也。都（一作聲）息病，脈來動，取極五至，病有六、七至也。扁鵲曰，平和之氣，不緩不急，不滑不澀，不存不亡，不短不長，不俯不仰，不從不橫，此謂平脈，腎（一作緊）受如此（一作剛），身無苦也。扁鵲曰，脈氣弦急，

病在肝。少食多厭，裡急多言，頭眩目痛，腹滿，筋攣，癩疾上氣，少腹積堅，時時唾血，咽喉中乾。相病之法，視色聽聲，觀病之所在，候脈要訣豈不微乎？脈浮如數，無熱者，風也。若浮如數，而有熱者，氣也，脈洪大者，又兩乳房動，脈複數，加有寒熱，此傷寒病也。若羸長病，如脈浮溢寸口，復有微熱，此疰氣病也，如復咳又多熱，乍劇乍瘥，難治也。又療無劇者，易瘥；不咳者，易治也。《脈經·扁鵲陰陽脈法第三》

25.病患五臟已奪。神明不守，聲嘶者，死。病患循衣縫，謔言者，不可治。病患陰陽俱絕，掣衣掇空，妄言者，死。病患妄語錯亂及不能語者，不治；熱病者，可治。病患陰陽俱絕，失音不能言者，三日半死。病患兩目有黃色起者，其病方愈。病患面黃目青者，不死；青如草滋，死。病患面黃目赤者，不死；赤如血，死。病患面黃目白者，不死；白如枯骨，死。病患面黃目黑者，不死；黑如，死。病患面目俱等者，不死。病患面黑目青者，不死。病患面青目白者，死。病患面黑目白者，不死。病患面赤目青者，六日死。病患面黃目青者，九日必死，是謂亂經。飲酒當風邪入胃經，膽氣妄洩，目則為青。雖有天救，不可復生。病患面赤目白者，十日死。憂患思慮，心氣內索，面色反好，急求棺槨。病患面白目黑者，死。此謂榮華已去，血脈空索。病患面黑目白者，八日死。腎氣內傷，病因留積。病患面青目黃者，五日死。病患著床，心痛短氣，脾竭內傷，百日復愈。能起傍徨，因坐於地，其亡倚床，能治此者，可謂神良。病患面無精光，若土色，不受飲食者，四日死。病患目無精光及牙齒黑色者，不治。病患耳目鼻口有黑色起，入於口者，必死。病患耳目及顴頰赤者，死在五日中午。病患黑色出於額，上髮際，下直鼻脊兩顴上者，亦死在五日中午。病患黑氣出天中，下至年上、顴上者，死。病患及健人黑色若白色起，入目及鼻口，死在三日中午。病患及健人面忽如馬肝色，望之如青，近之如黑者，死。病患面黑，目直視，惡風者，死。病患面黑，唇青者，死。病患面青，唇黑者，死。病患面黑，兩脅下滿，不能自轉反者，死。病患目回回直視，肩息者，一日死。病患頭目久痛，卒視無所見者，死。病患陰結陽絕，目精脫，恍惚者，死。病患陰陽絕竭，目眶陷者，死。病患眉系傾者，七日

死。病患口如魚口，不能複閉，而氣出多不反者，死。病患口張者，三日死。病患唇青，人中反，三日死。病患唇反，人中滿者，死。病患唇口忽幹者，不治。病患唇腫齒焦者，死。病患陰陽俱竭，其齒如熟小豆，其脈快者，死。病患齒忽變黑者，十三日死。病患舌卷卵縮者，必死。病患汗出不流，舌卷黑者，死。病患發直者，十五日死。病患發如乾麻，善怒者，死。病患發與眉冲起者，死。病患爪甲青者，死。病患爪甲白者，不活。病患手足爪甲下肉黑者，八日死。病患榮衛竭絕，面浮腫者，死。病患卒腫，其面蒼黑者，死。病患手掌腫，無紋者，死。病患臍腫，反出者，死。病患陰囊莖俱腫者，死。病患脈絕，口張足腫，五日死。病患足趺腫，嘔吐頭重者，死。病患足趺上腫，兩膝大如斗者，十日死。病患臥，遺尿不覺者，死。病患屍臭者，不可治。肝病皮黑，肺之日庚辛死。心病目黑，腎之日壬癸死。脾病唇青，肝之日甲乙死。肺病頰赤目腫，心之日丙丁死。腎病面腫唇黃，脾之日戊己死。青欲如蒼璧之澤，不欲如藍。赤欲如帛裹朱，不欲如赭。白欲如鵝羽，不欲如鹽。黑欲重漆，不欲如炭。黃欲如羅裏雄黃，不欲如黃土。目色，赤者病在心，白在肺，黑在腎，黃在脾，青在肝。黃色不可名者，病胸中。診目病，赤脈從上下者，太陽病也；從下上者，陽明病也；從外入內者，少陽病也。診寒熱瘰，目中有赤脈，從上下至瞳子，見一脈，一歲死見一脈半，一歲半死；見二脈，二歲死；見二脈半，二歲半死；見三脈，三歲死。診齩齒痛，按其陽明之脈，來有過者獨熱，在右右熱，在左左熱，在上上熱，在下下熱。診血者脈，多赤多熱，多青多痛，多黑為久痺，多赤、多黑、多青皆見者，寒熱身痛。面色微黃，齒垢黃，爪甲上黃，黃膽也。安臥，少黃赤，脈小而澀者，不嗜食。《脈經·扁鵲華陀察聲色要訣第四》

- 26.扁鵲曰，夫相死脈之氣，如群鳥之聚，一馬之馭系，水交馳之狀，如懸石之落。出筋之上，藏筋之下，堅關之裡，不在榮衛，伺候交射，不可知也。脈病患不病，脈來如屋漏、雀啄者，死（屋漏者，其來既絕而止，時時復起，而不相連屬也。雀啄者，脈來甚數而疾，絕止復頓來也）。又經言，得病七八日，脈如屋漏、雀啄者，死（脈彈人手如黍米也）脈來如彈石，去如解索

者，死。（彈石者，辟辟急也。解索者，動數而隨散亂，無復次緒也）脈困，病患脈如蝦之遊，如魚之翔者，死。（蝦遊者，苒苒而起，尋復退沒，不知所在，久乃復起，起輒遲而沒去速者是也。魚翔者，似魚不行，而但掉尾動，頭身搖而久住者是也）脈如懸薄卷索者，死。脈如轉豆者，死。脈如偃刀者，死。脈湧湧不去者，死。脈忽去忽來，暫止復來者，死。脈中侈者，死。脈分絕者，死。（上下分散也）脈有表無裡者，死。經名曰結，去即死。何謂結？脈在指下如麻子動搖，屬腎，名曰結，去死近也。脈五來一止，不復增減者，死。經名曰代。何謂代？脈五來一止也。脈七來是人一息，半時不復增減，亦名曰代，正死不疑。經言，病或有死，或有不治自愈，或有連年月而不已。其死生存亡，可切脈而知之耶？然，可具知也。設病者若閉目不欲見人者，脈當得肝脈，弦急而長，反得肺脈浮短而澀者，死也。病若開目而渴，心下牢者，脈當得緊實而數，反得沉滑而微者，死。病若吐血，復黝衄者，脈當得沉細，而反浮大牢者，死。病若譫言妄語，身當有熱，脈當洪大，而反手足四逆，脈反沉細微者，死。病若大腹而洩，脈當微細而澀，反得緊大而滑者，死。此之謂也。經言，形脈與病相反者，死。奈何？然，病若頭痛目痛，脈反短澀者，死。病若腹痛，脈反浮大而長者，死。病若腹滿而喘，脈反滑利而沉者，死。病若四肢厥逆，脈反浮大而短者，死。病若耳聾，脈反浮大而澀者，死（《千金翼》雲，脈大者生，沉遲細者難治）病若目，脈反大而緩者，死。左有病而右痛，右有病而左痛，下有病而上痛，上有病而下痛，此為逆，逆者死，不可治。脈來沉之絕濡，浮之不止，推手者，半月死。（一作半日）脈來微細而絕者，人病當死。人病脈不病者，生；脈病患不病者，死。人病屍厥，呼之不應，脈絕者，死。脈當大反小者，死。肥人脈細小，如絲欲絕者，死。羸人得躁脈者，死。人身澀而脈來往滑者，死。人身滑而脈來往澀者，死。人身小而脈來往大者，死。人身短而脈來往長者，死。人身長而脈來往短者，死。人身大而脈來往小者，死。尺脈不應寸，時如馳，半日死。（《千金》雲，尺脈上應寸口，太遲者，半日死）肝脾俱至，則穀不化。肝多即死。肺肝俱至，則癰疽，四肢重。肺多即死。心肺俱至，則痺，

消渴，懈怠。心多即死。腎心俱至，則難以言，九竅不通，四肢不舉。腎多即死。脾腎俱至，則五臟敗壞。脾多即死。肝心俱至，則熱甚，汗不出，妄見邪。肝腎俱至，則疝瘕，少腹痛，婦人月使不來。肝滿、腎滿、肺滿皆實，則為腫。肺之雍，喘而兩滿。肝雍，兩滿，臥則驚，不得小便。腎雍，腳下至少腹滿，有大小，髀大跛，易偏枯。心脈滿大，癩筋攣。肝脈小急，癩筋攣。肝脈驚暴，有所驚駭，脈不至，若喑，不治自己。腎脈小急，肝脈小急，心脈小急，不鼓皆為瘕。腎肝並沉，為石水；並浮，為風水；並虛，為死；並小弦，欲驚。腎脈大急沉，肝脈大急沉，皆為疝。心脈搏滑急為心疝，肺脈沉搏為肺疝。脾脈外鼓，沉為腸，久自己。肝脈小緩為腸，易治。腎脈小搏沉，為腸下血，溫身熱者死。心肝，亦下血。二臟同病者可治，其脈小沉澀者為腸，其身熱者死，熱見七日死。胃脈沉鼓澀，胃外鼓大，心脈小緊急，皆膈偏枯，男子發左，女子發右，不喑舌轉，可治，三十日起。其順者喑，三歲起。年不滿二十者，三歲死。脈至而搏，血衄身有熱者死。脈來如懸鉤，浮，為熱。脈至如喘，名曰氣厥。氣厥者，不知與人言。（《素問》《甲乙》作暴厥）脈至如數，使人暴驚，三四日自己。脈至浮合，浮合如數，一息十至、十至以上，是為經氣予不足也，微見，九十日死。脈至如火新然，是心精之予奪也，草乾而死。脈至如散葉，是肝氣予虛也，木葉落而死。（木葉落作棗華）脈至如省客，省客者，脈塞而鼓，是腎氣予不足也，懸去棗華而死。脈至如泥丸，是胃精予不足也，榆莢落而死。（《素問》莢作葉）脈至如橫格，是膽氣予不足也，禾熟而死。脈至如弦縷，是胞精予不足也，病善言，下霜而死；不言，可治。脈至如交漆，交漆者，左右旁至也，微見四十日死。（《甲乙》作交棘）。脈至如湧泉，浮鼓肌中，是大腸氣予不足也，少氣，味韭英而死。脈至如委土（《素問》作頽土）之狀，按之不得，是肌氣予不足也，五色先見黑，白壘（一作）發死。脈至如懸雍，懸雍者，浮揣切之益大，是十二俞之予不足也，水凝而死。脈至如偃刀，偃刀者，浮之小急也，按之堅大急，五臟菹熟，寒熱獨並於腎也，如此其人不得坐，立春而死。脈至如丸滑不直手，不直手者，按之不可得也，是大腸氣予不足也，棗葉生而死。脈至如舂者，

令人善恐，不欲坐臥，行立常聽，是小腸氣予不足也，季秋而死。問曰，嘗以春二月中，脈一病患，其脈反沉。師記言到秋當死。其病反愈，到七月復病，因往脈之，其脈續沉。復記言，至冬死。問曰，二月中得沉脈，何以故處之至秋死也？師曰，二月之時，其脈自當濡弱而弦，得沉脈，到秋自沉，脈見浮即死，故知到秋當死也。七月之時，脈復得沉，何以處之至冬當死？師曰，沉脈屬腎，真臟脈也，非時妄見。經言，王相囚死。冬脈本王脈，不再見，故知至冬當死也。然後至冬復病，王以冬至日死，故知為諦。華佗效此。《脈經·扁鵲診諸反逆死脈要訣第五》

27.心氣虛，則悲不已；實，則笑不休。心氣虛，則夢救火，陽物，得其時則夢燔灼。心氣盛，則夢喜笑及恐懼。厥氣客於心，則夢丘山煙火。病在心，日中慧，夜半甚，平旦靜。病先發於心者，心痛；一日之肺，喘咳；三日之肝，脅痛支滿；五日之脾，閉塞不通，身痛體重；三日不已，死，冬夜半，夏日中。心脈搏堅而長，當病舌卷不能言。其軟而散者。當病消渴，自己。心脈沉之小而緊，浮之不喘，苦心下聚氣而痛，食不下，喜咽唾，時手足熱，煩滿，時忘，不樂，喜太息，得之憂思。赤脈之至也，喘而堅。診曰有積氣在中，時害於食，名曰心痺。得之外疾，思慮而心虛，故邪從之。心脈急，名曰心疝，少腹當有形。其以心為牡臟，小腸為之使，故少腹當有形。邪哭使魂魄不安者，血氣少也。血氣少者，屬於心。心氣虛者，其人即畏（一作衰），合目欲眠，夢遠行而精神離散，魂魄妄行。陰氣衰者即為癲。陽氣衰者即為狂。五臟者，魂魄之宅舍，精神之所根據託也。魂魄飛揚者，其五臟空虛也，即邪神居之，神靈所使，鬼而下之，脈短而微，其臟不足，則魂魄不安。魂屬於肝，魄屬於肺。肺主津液，即為涕泣。肺氣衰者，即為泣出。肝氣衰者，魂則不安。肝主善怒，其聲呼。心中風者，翕翕發熱，不能起，心中飢而欲食，食則嘔。心中寒者，其人病心如啖蒜狀。劇者，心痛徹背，背痛徹心，如蟲注。其脈浮者，自吐乃愈。愁憂思慮則傷心，心傷則苦驚，喜忘，善怒。心傷者，其人勞倦即頭面赤而下重，心中痛徹背，自發煩熱，當臍挑手，其脈弦，此為心臟傷所致也。心脹者，煩心，短氣，臥不安。

心水者，其人身體重（一作腫），而少氣，不得臥，煩而躁，其陰大腫。腎乘心，必癢。真心痛，手足清至節，心痛甚，旦發夕死，夕發旦死。心腹痛，懊，發作腫聚，往來上下行，痛有休作，心腹中熱，苦渴，涎出者，是蛔咬也。以手聚而堅，持之毋令得移，以大針刺之，久持之，蟲不動，乃出針。腸中有蟲蛔咬，皆不可取以小針。心之積，名曰伏梁，起於臍上，上至心，大如臂。久久不愈，病煩心，心痛。以秋庚辛日得之，何也？腎病傳心，心當傳肺，肺適以秋王，王者不受邪，心復欲還腎，腎不肯受，因留結為積，故知伏梁以秋得之。心病，其色赤，心痛，短氣手掌煩熱，或啼笑罵詈，悲思愁慮，面赤身熱，其脈實大而數，此為可治。春當刺中衝，夏刺勞宮，季夏刺太陵，皆補之；秋刺間使，冬刺曲澤，皆瀉之（此是手厥陰心包絡經）。又當灸巨闕五十壯，背第五椎百壯。心病者，胸內痛，脅支滿，兩脅下痛，膺背肩甲間痛，兩臂內痛。虛則胸腹大，脅下與腰背相引而痛。取其經，手少陰、太陽，舌下血者，其變病，刺中血者。邪在心，則病心痛，善悲，時眩僕，視有餘不足而調之其輸。黃帝曰，手少陰之脈獨無輸，何也？岐伯曰，少陰者，心脈也，心者，五臟六腑之大主也。心為帝王，精神之所舍，其臟堅固，邪不能客。客之則傷心，心傷則神去，神去則身死矣。故諸邪在於心者，皆在心之包絡，包絡者，心主之脈也，故少陰無輸焉。少陰無輸，心不病乎？對曰，其外經腑病，臟不病，故獨取其經於掌後兌骨之端也。手心主之脈，起於胸中，出屬心包，下膈，歷絡三焦，其支者，循胸，出脅，下腋三寸，上抵腋，下循內，行太陰少陰之間，入肘中，下臂，行兩筋之間，入掌中，循中指出其端。其支者，別掌中，循小指次指出其端。是動則病手心熱，肘臂攣急，腋腫，甚則胸脅支滿，心中澹澹大動，面赤目黃，善笑不休。是主脈所生病者，煩心，心痛，掌中熱。盛者，則寸口大一倍於人迎；虛者則寸口反小於人迎也。手心主之別，名曰內關，去腕二寸，出於兩筋間，循經以上，係於心包，絡心系。氣實則心痛，虛則為煩心，取之兩筋間。心病，煩悶，少氣，大熱，熱上盪心，嘔吐，欬逆，狂語，汗出如珠，身體厥冷，其脈當浮，今反沉濡而滑；其色當赤，而反黑者，此是水之克火，為大逆，十死

不治。《脈經·心手少陰經病證第三》

28.小腸病者，少腹痛，腰脊控臑而痛，時窘之，复耳前熱。若寒甚，獨肩上熱，及手小指次指之間熱。若脈陷者，此其候也。少腹控臑，引腰脊，上冲心，邪在小腸者，連臑系，屬於脊，貫肝肺，絡心系。氣盛則厥逆，上冲腸胃，動肝肺，散於育，結於厥（一作齊）。故取之育原以散之，刺太陰以與之，取厥陰以下之，取巨虛下廉以去之，按其所過之經以調之。小腸有寒，其人下重，便膿血，有熱，必痔。小腸有宿食，常暮發熱，明日復止。小腸脹者，少腹脹，引腹而痛。厥氣客於小腸，則夢聚邑街衢。手太陽之脈，起之於小指之端，循手外側，上腕，出踝中，直上，循臂骨下廉，出肘內側兩骨之間，上循外後廉，出肩解，繞肩甲，交肩上，入缺盆，向腋，絡心，循咽，下膈，抵胃，屬小腸。其支者，從缺盆循頸上頰，至目兌，卻入耳中。其支者，別頰，上，抵鼻，至目內，斜絡於顴。是動則病嗌痛，頰腫，不可以顧，肩似拔，似折。是主液所生病者，耳聾，目黃，頰頰腫，頸、肩、肘、臂外後廉痛。盛者，則人迎大再倍於寸口；虛者，則人迎反小於寸口也。《脈經·小腸手太陽經病證第四》

29.脾氣虛，則四肢不用，五臟不安；實，則腹脹，溼洩不利。脾氣虛，則夢飲食不足，得其時，則夢築垣蓋屋。脾氣盛，則夢歌樂，體重，手足不舉。厥氣客於脾，則夢丘陵大澤，壞屋風雨。病在脾，日慧，平旦甚，日中持，下晡靜。病先發於脾，閉塞不通，身痛體重；一日之胃，而腹脹；二日之腎，少腹腰脊痛，脛；三日之膀胱，背筋痛，小便閉；十日不已，死。冬人定，夏晏食。脾脈搏堅而長，其色黃，當病少氣。其軟而散，色不澤者，當病足腫，若水狀。脾脈沉之而濡，浮之而虛，苦腹脹，煩滿，胃中有熱，不嗜食，食而不化，大便難，四肢苦痺。時不仁，得之房內。月使不來，來而頻並。黃脈之至也，大而虛，有積氣在腹中，有厥氣，名曰厥疝，女子同法。得之疾使四肢，汗出當風。寸口脈弦而滑，弦則為痛，滑則為實。痛即為急，實即為踴，痛踴相搏，即胸脅搶急。跌陽脈浮而澀，浮即胃氣微，澀即脾氣衰，微衰相搏，即呼吸不得，此為脾家失度。寸口脈雙緊，即為入，其氣不出，無表有里，心下痞堅。

跌陽脈微而澀，微即無胃氣，澀即傷脾。寒在於膈，而反下之，寒積不消，胃微脾傷，谷氣不行，食已自噫。寒在胸膈，上虛下實，谷氣不通，為秘塞之病。寸口脈緩而遲，緩則為陽，其氣長；遲則為陰，榮氣促。榮衛俱和，剛柔相得，三焦相承，其氣必強。跌陽脈滑而緊，滑即胃氣實，緊即脾氣傷。得食而不消者，此脾不治也，能食而腹不滿，此為胃氣有餘。腹滿而不能食，心下如飢，此為胃氣不行，心氣虛也。得食而滿者，此為脾家不治。脾中風者，翕翕發熱，形如醉人，腹中煩重，皮肉而短氣也，凡有所擊僕，若醉飽入房，汗出當風，則傷脾。脾傷則中氣，陰陽離別，陽不從陰，故以三分候死生。脾氣弱，病利，下白，腸垢，大便堅，不能更衣，汗出不止，名曰脾氣弱。或五液注下，青、黃、赤、白、黑。病患鼻下平者，胃病也；微赤者，病發癰；微黑者，有熱；青者，有寒；白者，不治。唇黑者，胃先病；微燥而渴者，可治；不渴者，不可治。臍反出者，此為脾先落。（一云先終）脾脹者，善噦，四肢急，體重不能衣。（一作枚）脾水者，其人腹大，四肢苦重，津液不生，但苦少氣，小便難。跌陽脈浮而澀，浮則胃氣強，澀則小便數，浮澀相搏，大便則堅，其脾為約。脾約者，其人大便堅，小便利而反不渴。凡人病脈已解，而反暮微煩者，人見病者瘥安，而強與穀，脾胃氣尚弱，不能消谷，故令微煩。損谷則愈。脾之積，名曰痞氣，在胃脘，覆大如盤。久久不愈，病四肢不收，黃瘠，食飲不為肌膚。以冬壬癸日得之，何也？肝病傳脾，脾當傳腎，腎適以冬王，王者不受邪，脾復欲還肝。肝不肯受，因留結為積，故知痞氣以冬得之。脾病，其色黃，飲食不消，腹苦脹滿，體重節痛，大便不利，其脈微緩而長，此為可治。宜服平胃丸、瀉脾丸、茱萸丸、附子湯。春當刺隱白，冬刺陰陵泉，皆瀉之；夏刺大都，季夏刺公孫，秋刺商丘，皆補之。又當灸章門五十壯，背第十一椎百壯。脾病者，必身重，苦飢，足痿不收（《素問》作善肌，肉痿，足不收）。行善蠲，腳下痛；虛則腹脹，腸鳴，澹洩，食不化。取其經，足太陰、陽明、少陰血者。邪在脾胃，肌肉痛。陽氣有餘，陰氣不足，則熱中，善飢；陽氣不足，陰氣有餘，則寒中，腸鳴腹痛；陰陽俱有餘，若俱不足，則有寒有熱。皆調其三里。足太陰之脈，起於大指

之端，循指內側白肉際，過核骨後，上內踝前廉，上內，循骨後，交出厥陰之前，上循膝股內前廉，入腹，屬脾，絡胃，上膈，挾咽，連舌本，散舌下。其支者，復從胃別上膈，注心中。是動則病舌本強，食則嘔（一作吐），胃脘痛，腹脹，善噫，得後與氣，則快然而衰，身體皆重。是主脾所生病者，舌本痛，體不能動搖，食不下，煩心，心下急痛，寒瘧，澹，痲，洩，水閉，黃膽，好臥，不能食肉，唇青，強立，股膝內痛厥，足大趾不用。盛者，則寸口大三倍於人迎；虛者，則寸口反小於人迎。足太陰之別，名曰公孫，去本節後一寸，別走陽明。其別者，入絡腸胃。厥氣上逆，則霍亂。實則腹中切痛，虛則鼓脹。取之所別。脾病，其色黃，體青，失溲，直視，唇反張，爪甲青，飲食吐逆，體重節痛，四肢不舉。其脈當浮大而緩，今反弦急，其色當黃，今反青，此是木之剋土，為大逆，十死不治。《脈經·脾足太陰經病證第五》

30. 胃病者，腹脹，胃脘當心而痛，上支兩脅，膈咽不通，飲食不下，取三里。飲食不下，隔塞不通，邪在胃脘。在上脘，則抑而刺之；在下脘，則散而去。胃脈搏堅而長，其色赤，當病折脾。其軟而散者，當病食痺，脾痛。胃中有癖，食冷物者，痛，不能食；食熱即能食。胃脹者，腹滿，胃脘痛，鼻聞焦臭，妨於食，大便難。診得胃脈，病形何如？曰，胃實則脹，虛則洩。病先發於胃，脹滿；五日之腎，少腹腰脊痛，脛；三日之膀胱，背筋痛，小便閉；五日上之脾，閉塞不通，身痛體重（《靈樞》雲，上之心）。六日不已，死，冬夜半後，夏日。（六日一作三日）脈浮而芤，浮則為陽，芤則為陰，浮芤相搏，胃氣生熱，其陽則絕。跌陽脈浮者，胃氣虛也。跌陽脈浮大者，此胃家微，虛煩，圍必日再行。芤而有胃氣者，脈浮之大而軟，微按之芤，故知芤而有胃氣也。跌陽脈數者，胃中有熱，即消谷引食。跌陽脈澀者，胃中有寒，水穀不化。跌陽脈粗粗而浮者，其病難治。跌陽脈浮遲者，故久病。跌陽脈虛則遺溺，實則失氣。動作頭痛重，熱氣朝者，屬胃。厥氣客於胃，則夢飲食。足陽明之脈，起於鼻交中，旁約太陽之脈，下循鼻外，入上齒中，還出挾口，環唇，下交承漿。卻循頤後下廉出大迎，循頰車，上耳前，過客主人，循髮際，至額顛。其支者，從大迎前下人迎，

循喉嚨，入缺盆，下膈，屬胃，絡脾。其直者，從缺盆下乳內廉，下挾臍，入氣街中。其支者，起胃下口，循腹裡，下至氣街中而合，以下髀關，抵伏菟，下入膝臑中，下循外廉，下足跗，入中指內間。其支者，下膝三寸而別，以下入中指外間。其支者，別跗上，入大指間，出其端。是動則病淒淒然振寒，善伸，數欠，顏黑。病至人與火，聞木音則惕然而驚，心動，欲獨閉戶牖而處，甚則欲上高而歌，棄衣而走，貴響腹脹，是為厥。是主血（血一作胃）所生病者，狂，瘧（一作蠛），溫，淫汗出，鼽衄，口，唇緊，頸腫，喉痺，大腹水腫，膝臑痛，循膺、乳、街、股、伏菟、外廉、足跗上皆痛，中指不用。氣盛，則身以前皆熱，其有餘於胃，則消谷善飢，溺色黃；氣不足，則身以前皆寒栗，胃中寒則脹滿。盛者，則人迎大三倍於寸口；虛者，則人迎反小於寸口也。《脈經·胃足陽明經病證第六》

31. 肺氣虛，則鼻息利，少氣；實，則喘喝，胸憑仰息。肺氣虛，則夢見白物，見人斬血藉藉，得其時，則夢見兵戰；肺氣盛，則夢恐懼，哭泣。厥氣客於肺，則夢飛揚，見金鐵之器奇物。病在肺，下晡慧，日中甚，夜半靜。病先發於肺，喘咳；三日之肝，脅痛支滿；一日之脾，閉塞不通，身痛體重；五日之胃，腹脹；十日不已，死。冬日入，夏日出。肺脈搏堅而長，當病唾血，其濡而散者，當病漏汗（漏，一作灌）。至今不復散發。肺脈沉之而數，浮之而喘，苦洗洗寒熱，腹滿，腸中熱，小便赤，肩背痛，從腰以上汗出。得之房內，汗出當風。白脈之至也，喘而浮大，上虛下實，驚，有積氣在胸中，喘而虛，名曰肺痺。寒熱，得之因醉而使內也。肺中風者，口燥而喘，身運而重，冒而腫脹。肺中寒者，其人吐濁涕。形寒寒飲則傷肺，以其兩寒相感，中外皆傷，故氣逆而上行。肺傷者，其人勞倦則咳唾血。其脈細緊浮數，皆吐血，此為躁擾嗔怒得之，肺傷氣擁所致。肺脹者，虛而滿，喘欬逆倚息，目如脫狀，其脈浮。肺水者，其人身體重，而小便難，時時大便鴨溏。肝乘肺，必作虛。脈軟而弱，弱反在關，軟反在巔。浮反在上，弱反在下。浮則為陽，弱則血不足，必弱為虛。浮弱自別，浮則自出，弱則為入。浮則為出入，此為有表無裡；弱則為入不出，此為

無表有里。陽出極汗，齊腰而還，此為無表有里，故名曰厥陽。在當汗出不汗出。跌陽脈浮緩，少陽微緊，微為血虛，緊為微寒，此為鼠乳。其病屬肺。肺之積，名曰息賁，在右脅下，覆大如杯。久久不愈，病灑灑寒熱，氣逆喘咳，發肺癰，以春甲乙日得之，何也？心病傳肺，肺當傳肝，肝適以春王，王者不受邪，肺復欲還心，心不肯受，因留結為積，故知息賁以春得之。肺病，其色白，身體但寒無熱，時時咳，其脈微遲，為可治。宜服五味子大補肺湯、瀉肺散。春當刺少商，夏刺魚際，皆瀉之；季夏刺太淵，秋刺經渠，冬刺尺澤，皆補之。又當灸臑中百壯，背第三椎二十五壯。肺病者，必喘咳，逆氣，肩息，背痛，汗出，尻、陰、股、膝攣，髀、足皆痛。虛則少氣，不能報息，耳聾，啞幹。取其經手太陰，足太陽之外、厥陰內少陰血者。邪在肺，則皮膚痛，發寒熱，上氣，氣喘，汗出，咳動肩背。取之膺中、外輸，背第三椎之旁，以手痛按之快然，乃刺之，取之缺盆中以越之。手太陰之脈，起於中焦，下絡大腸，還循胃口，上膈，屬肺，從肺系橫出腋下，下循內，行少陰心主之前，下肘中，後循臂內上骨下廉，入寸口，上魚，循魚際，出大指之端。其支者，從腕後直次指內廉，出其端。是動則病肺脹滿，膨膨而喘咳，缺盆中痛，甚則交兩手而瞀，是為臂厥。是主肺所生病者，咳，上氣、喘喝，煩心，胸滿，臂內前廉痛，掌中熱。氣盛有餘，則肩背痛，風汗出，小便數而欠；氣虛，則肩背痛，寒，少氣不足以息，溺色變，卒遺失無度。盛者，則寸口大三倍於人迎；虛者，則寸口反小於人迎也。手太陰之別，名曰列缺。起於腋下（一云腕上）分間，別走陽明。其別者，並太陰之經，直入掌中，散入於魚際。其實則手兌掌起，虛則欠咳，小便遺數。取之去腕一寸半。肺病，身當有熱，咳嗽，短氣，唾出膿血。其脈當短澀，今反浮大，其色當白，而反赤者，此是火之克金，為大逆，十死不治。《脈經·肺手太陰經病證第七》

- 32.大腸病者，腸中切痛而鳴濯濯，冬日重感於寒則洩，當臍而痛，不能久立。與胃同候。取巨虛上廉。腸中雷鳴，氣上沖胸，喘，不能久立，邪在大腸。刺育之原、巨虛上廉、三里。大腸有寒，溏；有熱，便腸垢。大腸有宿食，寒栗發熱，有時如瘧狀。大

腸脹者，腸鳴而痛，寒則洩，食不化。厥氣客於大腸，則夢田野。手陽明之脈，起於大指次指之端外側，循指上廉，出合谷兩骨之間，上入兩筋之中，循臂上廉，上入肘外廉，循外前廉，上肩，出骨之前廉，上出柱骨之會上，下入缺盆，絡肺，下膈，屬大腸。其支者，從缺盆直入，上頸，貫頰，入下齒縫中，還出挾口，交人中，左之右，右之左，上挾鼻孔。是動則病齒痛，腫。是主津所生病者，目黃，口乾，鼻衄，喉痺，肩前痛，大指次指痛不用。氣盛有餘，則當脈所過者熱腫；虛，則寒栗不復。盛者，則人迎大三倍於寸口；虛者，則人迎反小於寸口也。

《脈經·大腸手陽明經病證第八》

33. 腎氣虛，則厥逆；實，則脹滿，四肢正黑。腎氣虛，則夢見舟船溺人，得其時，夢伏水中，若有畏怖；腎氣盛，則夢腰脊兩解不相屬。厥氣客於腎，則夢臨淵，沒居水中。病在腎，夜半慧，日乘四季其，下晡靜。病先發於腎，少腹腰脊痛，脛。三日之膀胱，背筋痛，小便閉。二日上之心，心痛。三日之小腸，脹；四日不已，死。冬大食，夏晏晡。腎脈搏堅而長，其色黃而赤，當病折腰。其軟而散者，當病少血。腎脈沉之大而堅，浮之大而緊，苦手足骨腫厥而陰不興，腰脊痛，少腹腫。心下有水氣，時脹閉，時洩。得之浴水中，身未乾而合房內，及勞倦發之。黑脈之至也，上堅而大，有積氣在少腹與陰，名曰腎痺。得之沐浴清水而臥。凡有所用力舉重，若入房過度，汗出如浴水，則傷腎。腎脹者，腹滿引背央央然，腰髀痛。腎水者，其人腹大臍腫，腰重痛，不得溺，陰下濕如牛鼻頭汗，其足逆寒，大便反堅。腎著之為病，從腰以下冷，腰重如帶五千錢。腎著之病，其人身體重，腰中冷如冰狀。（一作如水洗狀。一作如坐水中，形如水狀）反不渴，小便自利，食飲如故，是其證也。病屬下焦。從身勞汗出，衣裡冷濕故，久久得之。腎之積，名曰奔豚，發於少腹，上至心下，如豚奔走之狀，上下無時。久久不愈，病喘逆，骨痿，少氣，以夏丙丁日得之，何也？脾病傳腎，腎當傳心，心適以夏王，王者不受邪，腎復欲還脾，脾不肯受，因留結為積。故知奔豚，以夏得之。水流夜疾，何以故？師曰土休，故流疾而有聲，人亦應之，人夜臥則脾不動搖，脈為之數疾也。腎病，其色黑，其氣虛弱，吸吸少氣，兩

耳苦聾，腰痛，時時失精，飲食減少，膝以下清，其脈沉滑而遲，此為可治。宜服內補散、建中湯、腎氣丸、地黃煎。春當刺湧泉，秋刺伏留，冬刺陰谷，皆補之；夏刺然谷，季夏刺太谿，皆瀉之。又當灸京門五十壯，背第十四椎百壯。腎病者，必腹大，脛腫痛，喘咳，身重，寢汗出，憎風。虛即胸中痛，大腹、小腹痛，清厥，意不樂。取其經，足少陰、太陽血者。邪在腎，則骨痛陰痺。陰痺者，按之而不得，腹脹，腰痛，大便難，肩背、頸項強痛，時眩。取之湧泉、崑崙，視有血者，盡取之。足少陰之脈，起於小指之下，斜趣足心，出然骨之下，循內踝之後，別入跟中，以上內，出中內廉，上股內後廉，貫脊，屬腎，絡膀胱。其直者，從腎上貫肝膈，入肺中，循喉嚨，挾舌本。其支者，從肺出絡心，注胸中。是動則病飢而不欲食，面黑如炭色（一作地色），咳唾則有血，喉鳴而喘，坐而欲起，目無所見，心懸若飢狀，氣不足則善恐，心惕惕若人將捕之，是為骨厥（一作痿）。是主腎所生病者，口熱，舌乾，咽腫，上氣，噤乾及痛，煩心，心痛，黃膽，腸，脊、股內後廉痛，痿厥，嗜臥，足下熱而痛。灸則強食而生害（一作肉），緩帶被發，大杖重履而步。盛者，則寸口大再倍於人迎；虛者，則寸口反小於人迎也。足少陰之別，名曰大鐘。當踝後繞跟，別走太陽。其別者，並經上走於心包，下貫腰脊。其病，氣逆則煩悶，實則閉癢，虛則腰痛，取之所別。腎病，手足逆冷，面赤目黃，小便不禁，骨節煩疼，少腹結痛，氣沖於心，其脈當沉細而滑，今反浮大，其色當黑，而反黃。此是土之克水，為大逆，十死不治。《脈經·腎足少陰經病證第九》

- 34.膀胱病者，少腹偏腫而痛，以手按之，則欲小便而不得，肩上熱。若脈陷，足小指外側反脛踝後皆熱。若脈陷者，取委中。膀胱脹者，少腹滿而氣癢。病先發於膀胱者，背筋痛，小便閉。五日之腎，少腹、腰脊痛，脛。一日之小腸脹。一日之脾，閉塞不通，身痛體重。二日不已，死。冬雞鳴，夏下晡（一云日夕）。厥氣客於膀胱，則夢遊行。足太陽之脈，起於目內，上額，交巔上。其支者，從巔至耳上角。其直者，從巔入絡腦，還出別下項，循肩膊內，挾脊，抵腰中，入循膂，絡腎，屬膀胱。其支者，從腰中下會於後陰，下貫臀，入中。其支者，從膊內

左右，別下貫臑（一作肺），過髀樞，循髀外後廉，過（一本下合）中，以下貫內，出外踝之後，循京骨，至小指外側。是動則病沖頭痛，目似脫，項似拔，脊痛，腰似折，髀不可以曲，如結，如列，是為踝厥。是主筋所生病者，痔，瘡，狂，癲疾，頭腦頂痛，目黃，淚出，鼻衄，項、背、腰、尻、腳皆痛，小指不用。盛者，則人迎大再倍於寸口；虛者，則人迎反小於寸口也。《脈經·膀胱足太陽經病證第十》

35.三焦病者，腹脹氣滿，小腹尤堅，不得小便，窘急，溢則為水，留則為脹。候在足太陽之外大絡，在太陽、少陽之間，赤見於脈。取委陽。少腹病腫，不得小便，邪在三焦，約取太陽大絡視其結脈與厥陰小絡結而血者腫，上及胃脘，取三里。三焦脹者，氣滿於皮膚，殼殼然而堅，不疼。熱在上焦，因咳為肺痿。熱在中焦，因堅。熱在下焦，因溺血。手少陽之脈，起於小指次指之端，上出兩指之間，循手錶腕，出臂外兩骨之間，上貫肘，循外，上肩，而交出足少陽之後，入缺盆，交膻中，散絡心包，下膈，遍屬三焦。其支者，從膻中上出缺盆，上項，挾耳後，直上出耳上角，以屈下額，至。其支者，從耳後，入耳中，出走耳前，過客主人前，交頰。至目兌。是動則病耳聾，輝輝，嗑腫，喉痺。是主氣所生病者，汗出，目兌痛，頰腫，耳後、肩、肘、臂外皆痛，小指次指不用。盛者，則人迎大一倍於寸口；虛者，則人迎反小於寸口也。《脈經·三焦手少陽經病證第十一》

36.大法，秋宜下。凡可下者，以湯勝丸散，中病便止，不必盡三服。陽明病，發熱汗多者，急下之，屬大柴胡湯。少陰病，得之二、三日，口燥咽乾者，急下之，屬承氣湯。少陰病六、七日，腹滿不大便者，急下之，屬承氣湯證。少陰病，下利清水，色青者，心下必痛，口乾燥者，可下之，屬大柴胡湯、承氣湯證。下利，三部脈皆平，按其心下堅者，可下之，屬承氣湯證。陽明與少陽合病而利，脈不負者為順，負者失也，互相剋賊為負。滑而數者，有宿食，當下之，屬大柴胡、承氣湯證。傷寒後脈沉，沉為內實（《玉函》雲脈沉實，沉實者，下之），下之解，屬大柴胡湯證。傷寒六、七日，目中不了了，睛不和，無表裡證，大便難，微熱者，此為實。急下之，屬大柴胡湯、承

氣湯證。太陽病未解，其脈陰陽俱停，必先振，汗出解。但陽微者，先汗之而解；但陰微者，先下之而解。屬大柴胡湯證。（陰微一作尺實）脈雙弦遲，心下堅，脈大而緊者，陽中有陰，可下之，屬承氣湯證。結胸者，項亦強，如柔狀，下之即和。病者無表裡證，發熱七、八日，雖脈浮數，可下之，屬大柴胡湯證。太陽病六、七日，表證續在，其脈微沉，反不結胸，其人發狂，此熱在下焦，少腹當堅而滿，小便自利者，下血乃愈。所以然者，以太陽隨經，瘀熱在裡故也。屬抵當湯。太陽病，身黃，其脈沉結，少腹堅，小便不利，為無血；小便自利，其人如狂者，血證諦。屬抵當湯證。傷寒有熱而少腹滿，應小便不利，今反利者，此為血，當下之，屬抵當丸證。陽明病，發熱而汗出，此為熱越，不能發黃，但頭汗出，其身無有，齊頸而還，小便不利，渴引水漿，此為瘀熱在裡，身必發黃，屬茵陳蒿湯。陽明證，其人喜忘，必有畜血。所以然者，本有久瘀血，故令喜忘。雖堅，大便必黑，屬抵當湯證。汗出而譫語者，有燥屎在胃中，此風也，過經乃可下之。下之若早，語言亂，以表虛裡實故也。下之則愈，屬大柴胡湯、承氣湯證。病者煩熱，汗出即解，復如瘧狀，日晡所發者，屬陽明。脈實者，當下之，屬大柴胡湯、承氣湯證。陽明病，譫語，有潮熱，而不能食者，必有燥屎五、六枚；若能食者，但堅耳，屬承氣湯證。太陽中風，下利嘔逆，表解，乃可攻之。其人汗出，發作有時，頭痛，心下痞堅滿，引脅下痛，嘔則短氣，汗出，不惡寒，此為表解裡未和，屬十棗湯。太陽病不解，熱結膀胱，其人如狂，血自下，下之即愈。其外未解，尚未可攻，當先解外。外解，小腹急結者，乃可攻之，屬桃仁承氣湯。傷寒七、八日，身黃如橘，小便不利，少腹微滿，屬茵陳蒿湯證。傷寒十餘日，熱結在裡，復往來寒熱，屬大柴胡湯證。但結胸，無大熱，此為水結在胸脅，頭微汗出，與大陷胸湯。傷寒六、七日，結胸熱實，其脈沉緊，心下痛，按之如石堅，與大陷胸湯。陽明病，其人汗多，津液外出，胃中燥，大便必堅，堅者則譫語，屬承氣湯證。陽明病，不吐下而心煩者，可與承氣湯。陽明病，其脈遲，雖汗出而不惡寒，其體（一本作人）必重，短氣，腹滿而喘，有潮熱，如此者，其外為解，可攻其裡。若手足然汗出

者，此大便已堅，屬承氣湯。其熱不潮，未可與承氣湯。若腹滿大而不大便者，屬小承氣湯，微和胃氣，勿令至大下。陽明病，譫語，發潮熱，其脈滑疾，如此者，屬承氣湯。因與承氣湯一升，腹中轉失氣者，復與一升；如不轉失氣者，勿更與之。明日又不大便，脈反微澀者，此為裡虛，為難治，不可更與承氣湯。二陽並病，太陽證罷，但發潮熱手足汗出，大便難而譫語者，下之愈，屬承氣湯證。病患小便不利，大便乍難乍易，時有微熱，喘冒不能臥者有燥屎也，屬承氣湯證。《脈經·病可下證第七》

- 37.問曰，溫病，汗出輒復熱，而脈躁疾，不為汗衰，狂言，不能食，病名為何？對曰，名曰陰陽交，交者，死。人所以汗出者，生於谷，谷生於精。今邪氣交爭於骨肉而得汗者，是邪卻而精勝。精勝則當能食而不復熱。熱者，邪氣也。汗者，精氣也。今汗出而輒復熱者，邪勝也。不能食者，精無俾也。汗而熱留者，壽可立而傾也。夫汗出而脈尚躁盛者，死。此今脈不與汗相應，此不勝其病也。狂言者，是失志，失志者，死。有三死，不見一生，雖愈必死。熱病，已得汗，而脈尚躁盛，此陽脈之極也，死。其得汗而脈靜者，生也。熱病，脈尚躁盛，而不得汗者，此陽脈之極也。死。脈躁盛得汗者，生也。熱病，已得汗，而脈尚躁，喘且復熱，勿膚刺，喘甚者，死。熱病，陰陽交者，死。熱病，煩已而汗，脈當靜。太陽病，脈反躁盛者，是陰陽交，死。復得汗，脈靜者，生。熱病，陰陽交者，熱煩身躁，太陰寸口脈兩衝尚躁盛，是陰陽交，死。得汗脈靜者，生。熱病，陽進陰退，頭獨汗出，死。陰進陽退，腰以下至足汗出，亦死。陰陽俱進，汗出已，熱如故，亦死。陰陽俱退，汗出已，寒栗不止，鼻口氣冷，亦死。（上熱病，陰陽交部。）熱病，所謂並陰者，熱病已得汗，因得洩，是謂並陰，故治。（治一作活）熱病，所謂並陽者，熱病已得汗，脈尚躁盛，大熱，汗之，雖不汗出，若衄，是謂並陽，故治。上熱病並陰陽部。少陰病，惡寒，蜷而利，手足逆者，不治。少陰病，下利止而眩，時時自冒者，死。少陰病，其人吐利，躁逆者，死。少陰病，四逆，惡寒而蜷，其脈不至，其人不煩而躁者，死。少陰病六、七日，其人息高者，死。少陰病，脈微細沉，但欲臥，

汗出不煩，自欲吐，五、六日自利，復煩躁，不得臥寐者，死。少陰病，下利，若利止、惡寒而蜷，手足溫者，可治。少陰病，惡寒而蜷，時時自煩，欲去其衣被者，可治。少陰病，下利止，厥逆無脈，幹，煩（一本作乾嘔）。服湯藥，其脈暴出者，死。微細者，生。上少陰部。傷寒六、七日，其脈微，手足厥，煩躁，灸其厥陰，厥不還者，死。傷寒，下利，厥逆，躁不能臥者，死。傷寒，發熱，下利至厥不止者，死。傷寒，厥逆，六、七日不利，便發熱而利者，生。其人汗出，利不止者，死。但有陰無陽故也。傷寒五、六日，不結胸，腹濡，脈虛復厥者，不可下，下之，亡血，死。傷寒，發熱而厥，七日，下利者，為難治。上厥逆部。熱病，不知所痛，不能自收，口乾，陽熱甚，陰頗有寒者，熱在髓，死不治。熱病在腎，令人渴，口乾，舌焦黃赤，晝夜欲飲不止，腹大而脹，尚不厭飲，目無精光，死不治。脾傷，即中風，陰陽氣別離，陰不從陽，故以三分，候其死生。傷寒，欬逆上氣，其脈散者，死。謂其人形損故也。傷寒，下利，日十餘行，其人脈反實者，死。病者脅下素有痞，而不在臍旁，痛引少腹，入陰挾陰筋，此為臟結，死。夫實則譫語，虛則鄭聲。鄭聲者，重語是也。直視、譫語、喘滿者，死。若下利者，亦死。結胸證悉具，而躁者，死。吐舌下卷者，死。唾如膠者，難解。舌頭四邊，徐有津液，此為欲解。病者至經，上唇有色，脈自和，為欲解。色急者，未解。上陰陽竭盡部。《脈經·熱病陰陽交並少陰厥逆陰陽竭盡生死證第十八》

38. 問曰，何謂虛實？對曰，邪氣盛則實，精氣奪則虛。重實者，肉大熱，病氣熱，脈滿，是謂重實。問曰，經絡俱實，何如？對曰，經絡皆實，是寸脈急而尺緩也，皆當俱治。故曰滑則順，澀則逆。夫虛實者，皆從其物類始，五臟骨肉滑利，可以長久。寒氣暴上，脈滿實。實而滑，順則生，實而澀，逆則死。形盡滿，脈急大堅，尺滿而不應，順則生，逆則死。所謂順者，手足溫。所謂逆者，手足寒也。問曰，何謂重虛？對曰，脈虛，氣虛、尺虛，是謂重虛也。所謂氣虛者，言無常也；尺虛者，行步匡然也；脈虛者，不像陰也。如此者，滑則生，澀則死。氣虛者，肺虛也；氣逆者，足寒也。非其時則生，當其時則死，餘臟皆如此也。脈實滿，手足寒，頭熱者，春秋則生，冬夏則

死。脈浮而澀，澀而身有熱者，死。絡氣不足，經氣有餘，脈熱而尺寒，秋冬為逆，春夏為順。經虛絡滿者，尺熱滿而寒澀，春夏死，秋冬生。絡滿經虛，灸陰刺陽；經滿絡虛，刺陰灸陽。問曰，秋冬無極陰，春夏無極陽，何謂也？對曰，無極陽者，春夏無數虛陽明，陽明虛則狂。無極陰者，秋冬無數虛太陰，太陰虛則死。上重實重虛部。熱病，所謂陽附陰者，腰以下至足熱，腰以上寒，陰氣下爭，還心腹滿者，死。所謂陰附陽者，腰以上至頭熱，腰以下寒，陽氣上爭，還得汗者生。（上陰陽相附部）《脈經·重實重虛陰陽相附生死證第十九》

39.太陽之脈，色榮顴骨，熱病也。榮未天，曰今且得汗，待時自己。與厥陰脈爭見者，死期不過三日，其熱病氣內連腎。少陽之脈，色榮頰前，熱病也。榮未天，曰今且得汗，待時自己。與少陰脈爭見者，死期不過三日。熱病七、八日，脈微小，病者澀血，口中乾，一日半而死。脈代者，一日死。熱病七、八日，脈不躁喘，不數，後三日中有汗。三日不汗，四日死。未曾汗，勿膚刺（膚，一作庸）。熱病三、四日，脈不喘，其動均者，身雖煩熱，今自得汗，生。傳曰，始腑入臟，終陰復還陽，故得汗。熱病七、八日，脈不喘，其動均者，生。微熱在陽不入陰，今自汗也。熱病七、八日，脈不喘，動數均者，病當啞。期三日不得汗，四日死。熱病，身面盡黃而腫，心熱，口乾，舌卷，焦黃黑，身麻臭，伏毒傷肺。中脾者，死。熱病，蠛，狂言，不得汗，蠛不止，伏毒傷肝，中膽者，死。熱病，汗不出，出不至足，嘔膽，吐血，善驚不得臥，伏毒在肝。腑足少陽者，死。《脈經·熱病生死期日證第二十》

40.熱病，腹滿脹，身熱者，不得大小便，脈澀小疾，一逆見，死。熱病，腸鳴腹滿，四肢清，洩注，脈浮大而洪不已，二逆見，死。熱病，大衄不止，腹中痛，脈浮大絕，喘而短氣，三逆見，死。熱病，嘔且便血，奪形肉，身熱甚，脈絕動疾，四逆見，死。熱病，咳喘，悸眩，身熱，脈小疾，奪形肉，五逆見，死。熱病，腹大而脹，四肢清，奪形肉，短氣，六逆見，一旬內死。熱病，腹脹便血，脈大，時時小絕，汗出而喘，口乾舌焦，視不見人，七逆見，一旬死。熱病，身熱甚，脈轉小，咳而便血，目眶陷，妄言，手循衣縫，口乾，躁擾不得臥，八逆見，一時

死。熱病，蠓，狂走，不能食，腹滿，胸痛，引腰臍背，嘔血，九逆見，一時死。熱病，嘔血，喘咳，煩滿，身黃，其腹鼓脹，洩不止，脈絕，十逆見，一時死。《脈經·熱病十逆死證第二十一》

41.熱病，肺氣絕，喘逆，咳唾血，手足腹腫，面黃，振栗不能言語，死。魄與皮毛俱去，故肺先死，丙日篤，丁日死。熱病，脾氣絕，頭痛，嘔宿汁，不得食，嘔逆吐血，水漿不得入，狂言譫語，腹大滿，四肢不收，意不樂，死。脈與肉氣俱去，故脾先死，甲日篤，乙日死。熱病，心主氣絕，煩滿，骨痛（一作蠓），噎腫，不可咽，欲咳不能咳，歌哭而笑，死。神與榮脈俱去，故心先死。壬日篤，癸日死。熱病，肝氣絕，僵僕，足不安地，嘔血，恐懼，灑淅惡寒，血妄出，遺尿溺，死。魂與筋血俱去，故肝先死。庚日篤，辛日死。熱病，腎氣絕，喘悸，吐逆，腫疽，尻癰，目視不明，骨痛，短氣，喘滿，汗出如珠，死。精與骨髓俱去，故腎先死。戊日篤，巳日死。故外見瞳子青小，爪甲枯，發墮，身澀，齒挺而垢，人皮面濃塵黑，咳而唾血，渴欲數飲，大滿，此五臟絕，表病也。《脈經·熱病五臟氣絕死日證第二十二》

42.熱病，脈四至，三日死，脈四至者，平人一至，病患脈四至也。熱病，脈五至，一日死。時一大至，半日死，忽忽悶亂者，死。熱病，脈六至，半日死。忽急疾大至，有頃死。《脈經·熱病至脈死日證第二十三》

43.熱病脈，四損，三日死。所謂四損者，平人四至，病患脈一至，名曰四損。熱病脈，五損，一日死。所謂五損者，平人五至，病患脈一至，名曰五損。熱病脈，六損，一時死，所謂六損者，平人六至，病患脈一至，名曰六損。若絕不至，或久乃至，立死。治傷寒形證所宜進退晉王叔和集仲景評脈要論。《脈經·熱病脈損日死證第二十四》

44.寸口沉大而滑，沉則為實，滑則為氣，實氣相搏，血氣入於臟即死，入於腑即愈，此為卒厥。不知人，唇青身冷，為入臟，即死；如身溫和，汗自出，為入腑，而復自愈。《脈經·平卒屍厥脈證第一》

45.嘔而脈弱，小便複利，身有微熱，見厥者，難治。跌陽脈浮者，

胃氣虛，寒氣在上，憂氣在下，二氣並爭，但出不入，其人即嘔而不得食，恐怖而死，寬緩即瘥。夫嘔家有癰膿者，不可治嘔，膿儘自愈。先嘔卻渴者，此為欲解。先渴卻嘔者，為水停心下，此屬飲家。嘔家本渴，今反不渴者，以心下有支飲也。問曰，病患脈數，數為熱，當消谷引食，而反吐者，何也？師曰，以發其汗，令陽微，膈氣虛，脈乃數，數為客熱，不能消谷，胃中虛冷，故吐也。陽緊陰數，其人食已即吐，陽浮而數，亦為吐。寸緊尺澀，其人胸滿，不能食而吐，吐止者為下之，故不能食，設言未止者，此為胃反，故尺為之微澀也。寸口脈緊而芤，緊則為寒，芤則為虛，虛寒相搏，脈為陰結而遲，其人則噎。關上脈數，其人則吐。脈弦者，虛也。胃氣無餘，朝食暮吐，變為胃反，寒在於上，醫反下之，今脈反弦，故名曰虛。趺陽脈微而澀，微則下利，澀則吐逆，穀不得入也。寸口脈微而數，微則無氣，無氣則榮虛，榮虛則血不足，血不足則胸中冷。趺陽脈浮而澀，浮則為虛，澀則傷脾，脾傷則不磨，朝食暮吐，暮食朝吐，宿穀不化，名曰胃反。脈緊而澀，其病難治。夫吐家，脈來形狀如新臥起。病患欲吐者，不可下之。嘔吐而病在膈上，後思水者，解，急與之。思水者，豬苓散主之。噦而腹滿，視其前後，知何部不利，利之即愈。夫六腑氣絕於外者，手足寒，上氣，腳縮。五臟氣絕於內者，下利不禁，下甚者，手足不仁。下利，脈沉弦者，下重，其脈大者，為未止。脈微弱數者，為欲自止，雖發熱不死。脈滑，按之虛絕者，其人必下利。下利，有微熱，其人渴。脈弱者，今自愈。下利，脈數，若微發熱，汗自出者，自愈。設脈復緊，為未解。下利，寸脈反浮數，尺中自澀，其人必清膿血。下利，手足厥，無脈，灸之不溫，若脈不還，反微喘者，死。少陰負趺陽者為順也。下利，脈數而浮（一作渴）者，今自愈。設不瘥，其人必清膿血，以有熱故也。下利後，脈絕，手足厥冷，時脈還，手足溫者，生。脈不還者，死。下利，脈反弦，發熱身汗者，自愈。下利氣者，當利其小便。下利清穀，不可攻其表，汗出必脹滿，其臟寒者，當下之。下利，脈沉而遲，其人面少赤，身有微熱。下利清穀，必鬱冒，汗出而解，其人微厥。所以然者，其面戴陽，下虛故也。下利，腹脹滿，身體疼痛，先溫其里，乃攻其

表。下利，脈遲而滑者，實也。利未欲止，當下之。下利，脈反滑者，當有所去。下乃愈。下利瘥，至其年、月、日、時復發，此為病不盡，當複下之。下利而譫語者，為有燥屎也，宜下之。下利而腹痛滿，為寒實，當下之。下利，腹中堅者，當下之。下利後更煩，按其心下濡者，為虛煩也。下利後，脈三部皆平，按其心下堅者，可下之。下利，脈浮大者，虛也，以強下之故也。設脈浮革，因爾腸鳴，當溫之。病者痿黃，躁而不渴，胃中寒實，而下利不止者，死。夫風寒下者，不可下之。下之後，心下堅痛。脈遲者，為寒，但當溫之。脈沉緊，下之亦然。脈大浮弦，下之當已。《脈經·平嘔吐噦下利脈證第十四》

46.問曰，熱在上焦者，因咳為肺痿。肺痿之病，從何得之？師曰，或從汗出，或從嘔吐，或從消渴，小便利數，或從便難，數被快藥下利，重亡津液，故得之。寸口脈不出，而反發汗，陽脈早索，陰脈不澀，三焦踟躕，入而不出，陰脈不澀，身體反冷，其內反煩，多唾，唇燥，小便反難，此為肺痿。傷於津液，便如爛瓜，亦如豚腦，但坐發汗故也。肺痿，其人欲咳不得咳，咳則出乾沫，久久小便不利，甚則脈浮弱。肺痿，吐涎沫而不咳者，其人不渴，必遺溺，小便數。所以然者，以上虛不能製下也，此為肺中冷，必眩，多涎唾，甘草乾薑湯以溫其臟。師曰，肺痿咳唾，咽燥欲飲水者，自愈。自張口者，短氣也。咳而口中自有津液，舌上苔滑，此為浮寒，非肺痿也。問曰，寸口脈數，其人咳，口中反有濁唾、涎沫者，何也？師曰，此為肺痿之病。若口中辟辟燥，咳則胸中隱隱痛，脈反滑數，此為肺癰。咳唾膿血，脈數虛者，為肺痿；脈數實者，為肺癰。問曰，病欬逆，脈之何以知此為肺癰？當有膿血，吐之則死，後竟吐膿死。其脈何類？師曰，寸口脈微而數，微則為風，數則為熱；微則汗出，數則惡寒。風中於衛，呼氣不入；熱過於榮，吸而不出。風傷皮毛，熱傷血脈。風舍於肺，其人則咳，口乾，喘滿，咽燥不渴，多唾濁沫，時時振寒。熱之所過，血為凝滯，畜結癰膿，吐如米粥。始萌可救，膿成則死。咳而胸滿，振寒，脈數，咽乾不渴，時時出濁唾腥臭，久久吐膿如粳米粥者，為肺癰，桔梗湯主之。肺癰，胸滿脹，一身面目浮腫，鼻寒清涕出，不聞香鼻酸辛，欬逆上氣，喘鳴迫塞，葶蘆大棗瀉肺湯主

之。寸口脈數，趺陽脈緊，寒熱相搏，故振寒而咳。趺陽脈浮緩，胃氣如經，此為肺癰。問曰，振寒發熱，寸口脈滑而數，其人飲食起居如故，此為癰腫病。醫反不知，而以傷寒治之，應不愈也。何以知有膿？膿之所在，何以別知其處？師曰，假令膿在胸中者，為肺癰。其人脈數，咳唾有膿血。設膿未成，其脈自緊數。緊去但數，膿為已成也。夫病吐血，喘咳上氣，其脈數，有熱，不得臥者，死。上氣，面浮腫，肩息，其脈浮大，不治。又加利尤甚。上氣燥而喘者，屬肺脹，欲作風水，發汗則愈。（一云，咳而上氣，肺脹，其脈沉，心下有水氣也。《要略》《千金》《外台》沉作浮）夫酒客咳者，必致吐血，此坐極飲過度所致也。咳家，脈弦為有水，可與十棗湯下之。咳而脈浮，其人不咳不食，如是四十日乃已（一云三十日）。咳而時發熱，脈卒弦者，非虛也。此為胸中寒實所致也，當吐之。咳家，其脈弦，欲行吐藥，當相人強弱而無熱，乃可吐之。其脈沉者，不可發汗。久咳數歲，其脈弱者，可治；實大數者，不可治。其脈虛者，必苦冒，其人本有支飲在胸中故也，治屬飲家。問曰，夫飲有四，何謂也？師曰，有淡飲（一云留飲），有懸飲，有溢飲，有支飲。問曰，四飲何以為異？師曰，其人素盛今瘦，水走腸間，瀝瀝有聲謂之淡飲。飲後水流在脅下，咳唾引痛，謂之懸飲。飲水流行，歸於四肢，當汗出而不汗出，身體疼重，謂之溢飲。欬逆倚息，短氣不得臥，其形如腫，謂之支飲。留飲者，脅下痛引缺盆，咳嗽轉盛。（一云輒已）胸中有留飲，其人短氣而渴，四肢歷節痛，其脈沉者，有留飲。夫心下有留飲，其人背寒冷大如手。病者脈伏，其人欲自利，利者反快，雖利，心下續堅滿，此為留飲欲去故也。甘遂半夏湯主之。病淡飲者，當以溫藥和之。心下有淡飲，胸脅支滿，目眩，甘草（草一作遂）湯主之。病溢飲者，當發其汗，小青龍湯主之。支飲，亦喘而不能臥，加短氣，其脈平也。膈間支飲，其人喘滿，心下痞堅，面色黧黑，其脈沉緊，得之數十日，醫吐下之，不愈，木防己湯主之。心下有支飲，其人苦冒眩，澤瀉湯主之。嘔家本渴，渴者為欲解，今反不渴，心下有支飲故也，小半夏湯主之。夫有支飲家，咳煩，胸中痛者，不卒死，至一百日或一歲，可與十棗湯。膈上之病，滿喘咳吐，發則寒

熱，背痛，腰疼，目泣自出（目泣自出，一作目眩），其人振振身劇，必有伏飲。夫病患飲水多，必暴喘滿。凡食少飲多，心下水停，甚者則悸，微者短氣。脈雙弦者，寒也。皆大下後喜虛。脈偏弦者，飲也。肺飲不弦，但喜喘短氣。病患一臂不隨，時復轉移在一臂，其脈沉細，非風也。必有飲在上焦。其脈虛者為微勞，榮衛氣不周故也，久久自瘥。（一云，冬自瘥）腹滿，口苦乾燥，此腸間有水氣也，防己椒目葶藶大黃丸主之。假令瘦人臍下悸，吐涎沫而癩眩者，水也，五苓散主之。先渴卻嘔，為水停心下，此屬飲家，半夏加茯苓湯主之。水在心，心下堅築短氣，惡水不欲飲。水在肺，吐涎沫欲飲水。水在脾，少氣身重。水在肝，脅下支滿，噯而痛。水在腎，心下悸。《脈經·平肺痿肺癰欬逆上氣淡飲脈證第十五》

47. 婦人懷胎，一月之時，足厥陰脈養。二月，足少陽脈養。三月，手心主脈養。四月，手少陽脈養。五月，足太陰脈養。六月，足陽明脈養。七月，手太陰脈養。八月，手陽明脈養。九月，足少陰脈養。十月，足太陽脈養。諸陰陽各養三十日活兒。手太陽、少陰不養者，下主月水，上為乳汁，活兒養母。懷娠者不可灸刺其經，必墮胎。婦人懷娠三月而渴，其脈反遲者，欲為水分。復腹痛者，必墮胎。脈浮汗出者，必閉。其脈數者，必發癰膿。五月、六月脈數者，必向壞。脈緊者，必胞漏。脈遲者，必腹滿而喘。脈浮者，必水壞為腫。問曰，有一婦人，年二十所，其脈浮數，發熱嘔咳，時下利，不欲食。脈復浮，經水絕，何也？師曰，法當有娠，何以故？此虛家法當微弱，而反浮數，此為戴陽。陰陽和合，法當有娠。到立秋，熱當自去。何以知然？數則為熱，熱者是火，火是木之子，死於未。未為六月位，土王，火休廢，陰氣生，秋節氣至，火氣當罷，熱自除去，其病即愈。師曰，乳後三月有所見，後三月來，脈無所見，此便是軀。有兒者護之，恐病利也，何以故？懷妊陽氣內養，乳中虛冷。故令兒利。婦人懷娠，六月、七月，脈弦發熱，其胎逾腹，腹痛惡寒，寒者小腹如扇之狀。所以然者，子臟開故也，當以附子湯溫其臟。婦人妊娠七月，脈實大牢強者生，沉細者死。婦人妊娠八月，脈實大牢強弦緊者生，沉細者死。婦人懷軀六月、七月，暴下鬥餘水，其胎必倚而墮。此

非時，孤漿預下故也。師曰，寸口脈洪而澀，洪則為氣，澀則為血。氣動丹田，其形即澀。澀在於下，胎冷若冰。陽氣胎活，陰氣必終。欲別陰陽，其下必僵。假令陽終，畜然若杯。問曰，婦人妊娠病，師脈之，何以知此婦人雙胎，其一獨死，其一獨生？而為下其死者，其病即愈，然後竟免軀，其脈何類？何以別之？師曰，寸口脈，衛氣平調，榮氣緩舒。陽施陰化，精盛有餘，陰陽俱盛，故成雙軀。今少陰微緊，血即濁凝，經養不周，胎則偏夭。少腹冷滿，膝臏疼痛，腰重起難，此為血理。若不早去，害母失胎。師曰，婦人有胎腹痛，其人不安，若胎病不長，欲知生死，令人摸之，如覆杯者則男，如肘頭參差起者女也。冷在何面？冷者為死，溫者為生。師曰，婦人有漏下者，有中後，因續下血，都不絕者，有妊娠下血者。假令妊娠腹中痛，為胞漏（一云阻），膠艾湯主之。婦人妊娠，經斷三月，而得漏下，下血四十日不止，胎欲動，在於臍上，此為。妊娠六月動者，前三月經水利時胎也。下血者，後斷三月，也，所以下血不止者，其不去故也。當下其，宜桂枝茯苓丸。《脈經·平妊娠胎動血分水分吐下腹痛證第二》

48. 診婦人漏血下赤白，日下血數升，脈急疾者，死；遲者，生。診婦人漏下赤白不止，脈小虛滑者，生；大緊實數者，死。診婦人新生乳子，脈沉小滑者，生；實大堅弦急者，死。診婦人疝、癥、積、聚，脈弦急者，生；虛弱小者，死。診婦人新生乳子。因得熱病，其脈懸小，四肢溫者，生；寒清者，死。診婦人生產，因中風、傷寒、熱病，喘鳴而肩息，脈實大浮緩者，生；小急者，死。診婦人生產之後，寸口脈焱疾不調者，死；沉微附骨不絕者，生。金瘡在陰處，出血不絕，陰脈不能至陽者，死；接陽而復出者，生。《脈經·平婦人病生死證第八》

49. 小兒脈，呼吸八至者平，九至者傷，十至者困。診小兒脈，多雀鬥，要以三部脈為主。若緊為風癩，沉者乳不消，弦急者客忤氣。小兒是其日數應變蒸之時，身熱而脈亂，汗不出，不欲食，食輒吐者，脈亂無苦也。小兒脈沉而數者，骨間有熱，欲以腹按冷清也。小兒大便赤，青瓣，飧洩，脈小，手足寒，難已；脈小，手足溫，易已。小兒病困，汗出如珠，著身不流者，死。小兒病，其頭毛逆上者，必死。又曰，耳間青脈起者，掣

痛。小兒病而囟陷，入其口，脣乾，目皮反，口中出氣冷，與頭相抵，臥不舉身，手足四肢垂，其臥正直如得轉，其掌中冷皆死，十日不可復治之。足脛痛苦寒，時欬，血泄利黃，針入六分卻至三分。後如內者足少陰也動苦少腹痛與心相引，背痛，淋從高墮下傷於內，小便血。後如內者足少陰也，動苦少腹痛與心相引，背痛，淋，從高墮下，傷於尻內，便血裏急，月水來，上搶心，胸滿，拘急，股裏急也，針入六分，卻至三分(以上足三陰脈六條)。前部左右彈者，陽蹻也。動，苦腰背痛，微澀為風癰。取陽蹻。前部左右彈者，陽蹻也。動，苦腰痛，癰癩，惡風，偏枯，僵僕羊鳴，痺，皮膚身體強(一作淫)痺。直取陽蹻，在外踝上三寸，直絕骨是。中部左右彈者，帶脈也。動，苦少腹痛引命門，女子月水不來，絕繼復下止，陰鬪寒，令人無子，男子苦少腹拘急，或失精也。後部左右彈者陰蹻也。動，苦癰癩，寒熱，皮膚強(一作淫)痺。後部左右彈者，陰蹻也。動，苦少腹痛，裡急，腰及臍下相連陰中痛，男子陰疝，女子漏下不止。中央直前者，手少陰也。動，苦心痛微堅，腹脅急。實堅者，為感忤；純虛者，為下利，腸鳴。滑者，為有娠，女子陰中癢痛，痛出玉門上一分前。中央直中者，手心主也。動，苦心痛，面赤，食苦，咽多，喜怒。微浮者，苦悲傷，恍惚不樂也。澀為心下寒。沉為恐怖，如人捕之狀也。時寒熱，有血氣。中央直後者，手太陰也。動，苦欬逆，氣不得息。浮為內風。緊澀者，胸中有積熱，時咳血也，有沉熱。上手三陰脈。從少陰斜至太陽，是陽維也。動，苦肌肉痺癢。從少陰斜至太陽，是陽維也。動，苦顛，僵僕羊鳴，手足相引，甚者失音，不能言，癰疾。直取客主人，兩陽維脈，在外踝絕骨下二寸。從少陽斜至厥陰，是陰維也。動，苦癰癩，僵僕羊鳴。從少陽斜至厥陰，是陰維也。動，苦僵僕，失音，肌肉淫，癢痺。汗出惡風。脈來暫大暫小，是陰絡也(一作結)。動，苦肉痺，應時自發，身洗洗也。脈來暫小暫大者，是陽絡也。(一作結)。動，苦皮膚痛，下部不仁，汗出而寒也。肺脈之來也。如循榆葉，曰平。如風吹毛，曰病。狀如連珠者死，期丙丁日，禺中日中。心脈之來也，如反筍莞大，曰平。如連珠，曰病。前曲後居如帶鉤者，死。期壬癸日，人定夜半。肝脈之來也，搏而

弱，曰平。如張新弓弦，曰病。如雞踐地者，死。期庚辛日，晡時日入。脾脈之來也，阿阿如緩，曰平。來如雞舉足，曰病。如鳥之啄，如水之漏者，死。期甲乙日，平旦日出。腎脈之來也，微細以長，曰平。來如彈石，曰病。去如解索者，死，期戊己日，食時、日、黃昏、雞鳴。寸口中脈躁竟尺，關中無脈應，陽幹陰也。《脈經·平小兒雜病證第九》

50.扁鵲曰，夫相死脈之氣，如群鳥之聚，一馬之馭系，水交馳之狀，如懸石之落。出筋之上，藏筋之下，堅關之裡，不在榮衛，伺候交射，不可知也。脈病患不病，脈來如屋漏、雀啄者，死（屋漏者，其來既絕而止，時時復起，而不相連屬也。雀啄者，脈來甚數而疾，絕止復頓來也）。又經言，得病七八日，脈如屋漏、雀啄者，死（脈彈人手如黍米也）脈來如彈石，去如解索者，死。（彈石者，辟辟急也。解索者，動數而隨散亂，無復次緒也）脈困，病患脈如蝦之遊，如魚之翔者，死。（蝦遊者，蕻蕻而起，尋復退沒，不知所在，久乃復起，起輒遲而沒去速者是也。魚翔者，似魚不行，而但掉尾動，頭身搖而久住者是也）脈如懸薄卷索者，死。脈如轉豆者，死。脈如偃刀者，死。脈湧湧不去者，死。脈忽去忽來，暫止復來者，死。脈中侈者，死。脈分絕者，死。（上下分散也）脈有表無裡者，死。經名曰結，去即死。何謂結？脈在指下如麻子動搖，屬腎，名曰結，去死近也。脈五來一止，不復增減者，死。經名曰代。何謂代？脈五來一止也。《脈經·扁鵲診諸反逆死脈要訣第五》

### 三、平脈、常脈

1. 夫十二經皆有動脈，獨取寸口，以決五臟六腑死生吉凶之候者，何謂也？然，寸口者，脈之大會，手太陰之動脈也。人一呼脈行三寸，一吸脈行三寸，呼吸定息，脈行六寸。人一日一夜凡一萬三千五百息，脈行五十度，周於身。漏水下百刻，榮衛行陽二十五度，行陰亦二十五度，為一周（時也）。故五十度而復會於手太陰。太陰者，寸口也，即五臟六腑之所終始，故法取於寸口。脈有尺寸，何謂也？然，尺寸者，脈之大會要也。從關至尺是尺內，陰之所治也；從關至魚際是寸口內，陽之所治也。故分寸為尺，分尺為寸。故陰得尺內一寸，陽得寸內九分。尺寸終始一寸九分，故曰尺寸也。脈有太過，有不及，有陰陽

相乘，有覆有溢，有關有格，何謂也？然，關之前者，陽之動也，脈當見九分而浮。過者，法曰太過；減者，法曰不及。遂上魚為溢，為外關內格，此陰乘之脈也。關之後者，陰之動也，脈當見一寸而沉。過者，法曰太過；減者，法曰不及。遂入尺為覆，為內關外格，此陽乘之脈，故曰覆溢。是真臟之脈也，人不病自死。《脈經·辨尺寸陰陽榮衛度數第四》

2. 凡診脈，當視其人大小、長短及性氣緩急。脈之遲速、大小、長短皆如其人形性者，則吉。反之者，則為逆也。脈三部大都欲等，只如小人、細人、婦人脈小軟。小兒四、五歲，脈呼吸八至，細數者，吉。（《千金翼》雲，人大而脈細，人細而脈大，人樂而脈實，人苦而脈虛，性急而脈緩，性緩而脈躁，人壯而脈細，人羸而脈大，此皆為逆，逆則難治。反此為順，順則易治。凡婦人脈常欲濡弱於丈夫。小兒四、五歲者，脈自快疾，呼吸八至也。男左大為順，女右大為順。肥人脈沉，瘦人脈浮）  
《脈經·平脈視人大小長短男女逆順法第五》

# 網膜缺血或實驗性青光眼：活血去瘀藥川芎 內含成分阿魏酸及川芎嗪之神經保護探討

趙效明

行政院退除役官兵輔導委員會台北榮民總醫院

## 摘 要

### 研究目的：

缺血傷害在眼科疾病，如青光眼與糖尿病視網膜病變中扮演重要角色；本研究目標在探討川芎內含成分阿魏酸及川芎嗪對於網膜缺血再灌流動物模式的保護效果及機轉。

### 研究方法：

實驗採用電氣網膜生理圖、生化、反轉錄酶-聚合酶連鎖反應、西方墨點法，及組織病理學等方法。

### 結果與討論：

60 或 120 分鐘之網膜缺血再灌流，缺血眼：網膜生理圖乙型波振幅顯著下降；氫氧根游離基產量顯著增加；反轉錄 酶聚合酶連鎖反應測得網膜的基質金屬蛋白酶第九型訊息核糖核酸 (MMP-9 mRNA；損傷指標) 表現增加；Thy-1 mRNA (網膜神經節細胞標記) 表現減少；免疫組織染色的結果顯示：MMP-9 表現位置在網膜神經節細胞與內核層；膽鹼乙醯轉化酶 (ChAT; amacrine 細胞標記) 顯著減少。而這些傷害可透過在缺血前給阿魏酸(0.1 或 0.5 nmol)或白藜蘆醇(0.03 nmol)來緩解。總結，三種成分可能透過上述機轉提供神經保護作用。

關鍵詞：川芎、阿魏酸、川芎嗪、神經保護、網膜缺血、實驗性青光眼

# **Therapeutic effects of Two Chinese Herbal Ingredients (Ferulic Acid and Tetramethylpyrazine) Against Retinal Ischaemia or Experimental Glaucoma**

Hsiao-Ming Chao  
Veterans General Hospital, Taipei

## **ABSTRACT**

### **Aim:**

The aim of this study was to determine whether Chuan Xiong ingredients ferulic acid (FA) and tetramethylpyrazine (TMP) can provide neuroprotection against a retinal ischemic insult. Such an insult is thought to play an important role in glaucomatous optic neuropathy and diabetic retinopathy, and so on.

### **Method:**

The methods included are electroretinogram (ERG), biochemistry, molecular biology, histopathology.

### **Results & Discussion:**

Present results have indicated that 60 or 120 minutes of retinal ischemia plus reperfusion caused retinal damage characterized by a decline in electroretinographic b-wave amplitude, the localization of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9; ischaemic injury marker) immunoreactivity in retinal ganglion cell and inner nuclear layers, and a reduction in choline acetyltransferase (amacrine cell marker) immunoreactivity. The level of Thy-1 (retinal ganglion cell marker) or MMP-9 mRNA was respectively reduced, or upregulated. What is more, these damages were blunted when FA (0.5 or 0.1 nmol), or resveratrol (0.03 nmol) was applied 24 hours before ischemia. Conclusively, this study supports a possible neuroprotective role for the defined component(s), acting through above mentioned mechanisms.

Keywords: Chuan Xiong, ferulic acid, tetramethylpyrazine, neuroprotection, retinal ischaemia, experimental glaucoma

## 壹、前言

### 一、視網膜缺血之背景與現況

#### (一)簡介

視網膜缺血(retinal ischemia)在青光眼(glaucoma)或是糖尿病視網膜病變(diabetic retinopathy)等許多眼科疾病中扮演重要的角色；缺血發生時，會造成氧氣與營養物質無法到達組織，也會使組織產生的廢物無法排除，進而產生一連串的失衡反應，隨著缺血的時間加長，將會造成組織的損傷(Osborne et al., 2004)；簡言之，缺血導致血液無法充分到達組織，進而造成能量供需失衡的一種病理狀況。

#### (二)視網膜缺血再灌流導致的傷害機轉

過去十幾年中有大量探討缺血機轉的研究被發表，但目前由視網膜缺血所導致視網膜損傷的機轉目前尚未完全明瞭。目前的發現顯示在視網膜缺血初期的時候，由於供應視網膜的氧氣與葡萄糖被阻斷，減少了糖解作用與氧化磷酸化的速度，導致細胞內的腺嘌呤核苷三磷酸(ATP, adenosine triphosphate)減少，造成一系列細胞膜破壞與離子平衡失調的損害(Lipton, 1999)。當細胞內的ATP減少的時候會使鈉鉀離子幫浦( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase pump)的活性受損，使細胞內鈉離子濃度梯度(gradient)增加(Lipton, 1999)，最後導致突觸前(pre-synaptic)細胞膜去極化(depolarization)，釋出麸胺酸；麸胺酸可刺激 N-methyl-D-aspartate (NMDA)與 kainate 型的麸胺酸受器，以前者為例，NMDA 受體就會受到周遭增加的麸胺酸所活化，造成了原本阻斷 NMDA 受體的電位依賴性鎂離子(voltage-dependent  $\text{Mg}^{2+}$ )被移除，打開配體閘控的鈣離子通道(ligand-gated calcium channel)，刺激鈣離子內流(Zeevalk and Nicklas, 1992)，造成視網膜的損害(Lipton, 1999; Lipton et al., 1994, Nishizawa et al., 2001)。另外麸胺酸也會作用於 alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA)與 kainate 受體，增加鈣離子、鈉離子、氯離子與水的內流，導致組織的水腫並進而使細胞破裂(Lipton, 1999; Osborne et al., 2004)。

當血液再灌流進入組織中，會產生大量自由基，原因是由於在缺血的過程中 ATP 排空導致 hypoxanthine 產生，並增加神經細

胞內鈣離子去活化鈣離子依賴性蛋白酶calpain, calpain 將 xanthine dehydrogenase 轉化為 xanthine oxidase, 而在再灌流情形下 xanthine oxidase 會將 hypoxanthine 或 xanthine 氧化成尿酸(uric acid), 造成超氧離子(superoxide anion,  $\cdot\text{O}_2^-$ )的釋放, 產生氫氧自由基( $\cdot\text{OH}$ ), 造成近一步的傷害(Osborne et al., 2004; Liu and Rosenberg, 2005)。

### (三)視網膜缺血再灌流對神經細胞的選擇性傷害

視網膜缺血導致組織細胞的傷害已經被報導, 許多模擬青光眼視網膜病變的動物實驗報告指出, 在內側的視網膜神經細胞死亡較為明顯, 但是其他的視網膜細胞也有被報導(Osborne et al., 1999a~c)。在急性的視網膜缺血動物模式中, 以 120 mmHg 的壓力缺血 60 分鐘, 並經過七天的再灌流(reperfusion), 可以觀察到視網膜電氣生理圖(ERG, electroretinogram)的 a-wave 以及 b-wave 有明顯的減少, 而 a-wave 在圖譜中的反應代表感光(photoreceptors)及雙極(bipolar/müller cells)細胞的電生理反應, 證明了缺血會對上述細胞造成損害(Chao et al, 2001; Chidlow et al., 2002)。另外, 在同樣壓力與時間造成缺血後, 以 24 小時再灌流的動物模式中, 也觀察到感光細胞的凋亡(apoptotic)現象(Singh et al., 2001)。

近年來視網膜缺血由於其在許多眼科疾病, 如青光眼、前側缺血視神經病變(AION, anterior ischemia optic neuropathy)、視網膜與脈絡膜血管阻塞(retinal and choroidal vessel occlusions)、糖尿病視網膜病變、新生兒視網膜病變(ROP, retinopathy of prematurity)與創傷性視神經病變(traumatic optic neuropathy), 扮演了一部分的角色, 而以上所列疾病都有報告指出會使神經節細胞層(ganglion cell)損傷與缺失(Osborne et al., 1999c, 2004)。另外, 在實驗研究的結果也顯示出, 目前已知的缺血損傷同樣會造成神經節細胞的損傷與缺失(Lafuente et al., 2002; Li et al., 2002; Chidlow and Osborne, 2003)。其中一種用於測定缺血後造成神經節細胞缺損的方法, 是觀察視網膜訊息核糖核酸(mRNA)的層次改變, 如 Thy-1 的 mRNA 可專一性的代表神經節細胞(Chidlow and Osborne, 2003; Nash and Osborne, 1999)。且 kainate 型與 NMDA 型的穀氨酸受體皆表現於神經節細胞上, 因此當穀氨酸的量增加時, 會直接造成對神經節細胞的傷害(Lin et al., 2002; Brandstatter et al., 1994; Fletcher et al., 2000)。

另外一類對缺血傷害與麸胺酸引起興奮性細胞毒性(glutamate-induced excitotoxicity)也相當敏感的細胞為無軸突細胞(amacrine cells)，當給予麸胺酸受體的致效劑(agonist)後，會造成 GABA (gamma-aminobutyric acid)、血清素(serotonin)或膽鹼乙醯轉化酶(ChAT, choline acetyltransferase)在無軸突細胞中的改變。而缺血所造成細胞死亡的機轉則與神經節細胞相似(Osborne et al., 2004)。

## 二、高眼內壓導致視網膜缺血再灌流之背景與現況

### (一)簡介

目前有許多的動物模式已被建立用於研究視網膜缺血，例如增加眼內壓力(HIOP, high intraocular pressure)造成缺血、使用縫合線結紮視神經束(ligature of optic nerve bundle)或結紮眼部血管(ligature of ophthalmic vessels)以達到完全的視網膜缺血。也有部分的方法，是部分結紮血管以達到不完全的視網膜缺血。或是利用靜脈注射打入玫瑰紅(rose Bengal)或其他光敏感性染劑(photosensitive dye)後，再以強光照射視網膜來產生視網膜血管的阻塞，可模擬分枝視網膜動脈阻塞(BRAO, branch retinal artery occlusion; Osborne et al., 2004)。

### (二)高眼內壓導致視網膜缺血再灌流模式

在這個研究中，使用的是高眼內壓導致視網膜缺血(HIOP-induced retinal ischemia)的模式，目前這個方法已被廣泛使用。它最早在 1952 年由 Smith 與 Baird 所提出，藉直接對眼睛注入無菌的液體，使所有的血液被足夠的壓力所阻斷(Smith and Baird, 1952)。而在 1991 年由 Buchi 等人重新建立，其使用一個水槽連接一隻針，針接在大鼠眼球前房(anterior chamber)的位置，升高水槽使壓力差達到 110 mmHg，讓眼內壓高過眼睛的灌流壓力(ocular perfusion pressure)以阻斷血流(Buchi et al., 1991)。此動物模式可以藉著阻斷視網膜的循環(retinal circulation)造成全眼的缺血，並可以透過缺血過程中觀察到眼底變白(whitening of fundus)與網膜電氣生理圖的振幅(amplitude)變平來確認。在病理特徵上，此動物模式與中央視網膜血管阻塞(CRAO, central retinal artery occlusion)及慢性青光眼相當類似，也可以作為模擬急性青光眼的模式(Osborne et al., 2004)。

在過去的文獻中有提到，在高眼內壓誘導缺血後，暗適應光

誘導電氣網膜生理圖(dark-adapted light-evoked ERG)的 b-wave 會降低，b-wave ratio 可作為缺血損傷指標(Chao and Osborne, 2001; Safa and Osborne, 2000)，但若是給予缺血處理時間不夠長，有可能只會造成 b-wave 短暫的變化，在回復後，b-wave 可能會變回正常的狀況(Foulds and Johnson, 1974; Osborne et al., 2004)。而若要造成組織病理學上的差異，可能需要更長時間的缺血處理來達成。

### 三、基質金屬蛋白酶之背景與現況

#### (一)簡介

組織存在於一個動態的環境中，在組織中細胞會與細胞及其周圍的基質進行交互作用，持續地維持組織的架構是由基質金屬蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的活性所控制。已知 MMP 是一群中性含鋅的蛋白酶，而其受質主要是細胞外基質(extracellular matrix, ECM)的成分，與細胞表面的許多分子。許多的 MMP 參予在損傷的修復(wound healing)、血管新生(angiogenesis)、發炎(inflammation)與腫瘤轉移(tumor metastases)等生理與病理狀況。其功能包括有降解細胞外基質的構造，摧毀細胞表面的蛋白質、細胞激素(cytokines)與蛋白酶抑制劑，活化或釋放潛伏的訊號分子(signaling molecules)或蛋白酶(Yong et al., 2001; Egeblab and Werb, 2002)。

MMP 為含鋅的內切酶(endopeptidases)，一般於分泌出的時候不具活性，在細胞外基質中被活化。這些酵素通常都有某些常見的構造特色，在 N 端會有 propeptide，作用為阻擋酵素的活化區，防止含有鋅的位置外露，將 propeptide 切去會使酵素活化。而在 C 端的 hemopexin 區域，可以決定酵素對受質的專一性。目前已發現二十多種的 MMP(Sivak and Fini., 2002)。

#### (二)基質金屬蛋白酶在缺血中的角色

短暫或長時間缺血的情形下，MMP 會被向上調節，並於再灌流時，對血腦障壁(blood brain barrier, BBB)受到干擾的情形負有重要的角色(Liu and Rosenberg, 2005)。目前有大量的證據證明，在腦部缺血再灌流的傷害中，活化的 MMP 會使血腦障壁蛋白質分解而破壞。再灌流時所產生的自由基與其所產生的氧化壓力，會透過直接或間接的方式去影響 MMP 的活性。直接的方式是自由基去氧化或硝化 MMP 使其活化(Gu et al., 2002)；間接的方式是自由基作

用於 MMP 轉錄過程中，影響對氧化還原敏感的轉錄因子如 NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B)與 AP-1 (activating protein-1)，進一步調節 MMP (Huang et al., 2001a and 2001b)。

### (三)基質金屬蛋白酶在視網膜中的角色

近幾年中，有許多討論基質金屬蛋白酶在視網膜中所扮演的角色的相關報告陸續被提出。目前已知如基質金屬蛋白酶第一、二、三和九型有表現於人類的玻璃體及感光細胞間的基質，而基質金屬蛋白酶第九型則被發現在神經節細胞層有表現(Sivak and Fini, 2002)。而在一些常見的眼科疾病如老年黃斑部病變 (age-related macular degeneration, AMD)、糖尿病視網膜病變與青光眼中，發現會有基質金屬蛋白酶會有短暫地增加現象(Sivak and Fini, 2002)。

而在動物實驗中，使用了缺失基質金屬蛋白酶第九型的基因轉殖小鼠，發現對於結紮視神經的動物模式傷害有保護的效果 (Chintala et al., 2002)。若給予小鼠玻璃體腔注射 kainic acid 或氯化鉀 (potassium chloride, KCl) 產生興奮性細胞毒性，會造成基質金屬蛋白酶第九型的活性增加，使神經節細胞明顯死亡並造成視網膜的損傷 (Mali et al., 2005; Zhang et al., 2004)。也有科學家給予玻璃體腔注射 NMDA 產生興奮性細胞毒性後，發現視網膜神經節細胞會由於一氧化氮 (nitric oxide, NO) 活化基質金屬蛋白酶第九型而受到損傷 (Manabe et al., 2005)，並在給予基質金屬蛋白酶抑制劑後，能減少基質金屬蛋白酶活性與興奮性毒性所產生的傷害 (Mali et al., 2005; Manabe et al., 2005; Zhang et al., 2004)。另外，有研究指出，利用注射高濃度的食鹽水溶液到上鞏膜靜脈 (episcleral vein) 提高眼內壓後，發現基質金屬蛋白酶第九型活性增加、細胞外基質降解與視網膜神經節細胞缺損都有極明顯的相互關係 (Guo et al., 2005)。

## 四、阿魏酸、川芎嗪、白藜蘆醇之背景與現況 (圖一)

### (一)阿魏酸 (*ferulic acid*，縮寫為 *FA*) 川芎成份含有阿魏酸 (*ferulic acid*)。

阿魏酸屬於酚酸的一種，酚酸具有很強之抗氧化活性 (Masuda et al., 2006)、具有清除自由基之能力 (Srinivasan et al., 2006)。酚酸之抗氧化活性關聯到它們與金屬離子螯合及清除超氧自由基 (superoxide radical)、氫氧自由基 (hydroxyl radical) 等能力有關。結構上主要捕捉

自由基作用的部位，第一個位置在苯環上的OH基，其可提供自由基一個氫原子，形成一個aryloxyl radical，aryloxyl radical 的穩定性高，因此可加強抗氧化之活性，單酚結構提供一個氫原子給自由基的作用，比多酚結構弱(Zhang Z et al, 2003; Frank B et al, 2005; Kanski et al, 2002)；苯環上第二個接hydroxy group，取代位置在鄰位或對位，在脂質過氧化之研究上，有增加抗氧化之能力，原因是其形成穩定phenoxyl radical 結構，而增強抗氧化作用(Zhang Z et al, 2003; Frank B et al, 2005; Kanski et al, 2002)。另有研究顯示，於苯環之鄰位取代基為甲氧基或烷基，其形成aryloxyl radical，使得結構更安定，而增加抗氧化能力(Lahti et al., 1996)。例如：阿魏酸其結構苯環上鄰位有甲氧基取代，結構側鏈上有一不飽合雙鍵，形成一個結構共振且穩定的phenoxyl radical，因此它就具有更強的抗氧化活性(Bourne et al, 1997)。

(二)川芎嗪 (*tetramethylpyrazine*；簡稱TMP) 川芎成份除了前面所提到的阿魏酸外，還有川芎嗪(*tetramethylpyrazine*)。即四甲基吡嗪 (*tetramethylpyrazine*；簡稱TMP)。川芎嗪是中國藥草川芎提煉出來的出主要化學成分之一，其結構為2,3,5,6-tetramethylpyrazine，分子式為 $C_8H_{12}N_2$ ，無色針狀結晶，熔點 $80\sim 82^{\circ}C$ ，沸點為 $190^{\circ}C$ 。具有特殊氣味，有吸濕性，易容於熱水、石油醚、稀鹽酸，但不溶於冷水。在心血管方面的實驗顯示，川芎嗪有擴張冠狀動脈的作用，可鬆弛人體肺及支氣管動脈壓的作用(Liu et al., 2005)；並可增加 prostaglandin  $I_2$  ( $PGI_2$ )的產生，抑制thromboxane  $A_2$  ( $TXA_2$ )釋放作用，以增加抗凝血作用(Feng et al., 1997; Liu et al., 2001)；同時具有抑制外鈣內流及具內鈣外釋作用，進而有抗栓塞、抗血小板凝集活性的作用(Tsai et al., 2003; Liu et al., 2001)。有關川芎嗪對於腦神經細胞的作用機轉。最早學者證實，對沙鼠的大腦局部缺血所造成的損傷，若能事先給予腹腔注射川芎嗪，則能提高其存活率(Hsiao et al., 2006)。學者也提出，川芎嗪具有清除自由基的功能(Zhang et al., 2003)。TMP藉由保護粒線體、抑制自由基生成，降低kainate 所誘發的神經細胞興奮毒性(Shih et al., 2002)。所以川芎可以降低缺血的損傷和清除自由基的功能。

(三)白藜蘆醇(*resveratrol*, 3,4',5-trihydroxystilbene)，最早在1976年，由Langcake與Pryce從葡萄藤中測得，白藜蘆醇是一種由某些種子植物

如葡萄藤(*grapevine*)，為了應變損傷如黴菌或是暴露於紫外線下時，所製造的天然植物抗毒素(*phytoalexin*)。在早期的流行病學調查下，發現平時有習慣飲用紅酒的族群，與心血管疾病的發生率為負相關。白藜蘆醇含量在葡萄皮較多，且一般的紅酒中也比白酒含量多許多。在紅酒中，所含白藜蘆醇濃度約為0.1到15 mg/L(即0.0004到0.06 mM； Lucie, 2000)。白藜蘆醇是酚性化合物(*phenolic compound*)，可作抗氧化劑(*antioxidant*)，也可預防人類的心血管疾病(Lucie, 2000)。

### 1. 白藜蘆醇的生物活性

目前白藜蘆醇已被發現的生物活性包括了：抑制脂質過氧化(*inhibition of lipid peroxidation*)、螯合銅離子(*chelation of copper*)、清除自由基(*free-radical scavenging*)、抑制血小板凝集(*inhibition of platelet aggregation*)、抗發炎(*anti-inflammatory activity*)、血管舒張(*vasorelaxing activity*)、調節脂質代謝(*modulation of lipid metabolism*)與抗癌活性(*anticancer activity*; Fremont, 2000)等。

### 2. 白藜蘆醇對於缺血的影响

在之前與缺血相關的研究中提到，使用中央大腦動脈阻塞(*middle cerebral artery occlusion*)的動物模式中，連續 21 天預先給予白藜蘆醇(20 mg/kg 腹腔注射)，可以防止大鼠運動行為的損傷、減少脂質過氧化、增加還原態的 *glutathione*、減少腦部缺血損傷的面積，而認為白藜蘆醇對於缺血性的動物模式具有保護的作用(Sinha et al., 2002)。另外，有其他科學家利用興奮性細胞毒性的動物模式，每天腹腔注射給予 *kainic acid* (8mg/kg)連續五天，與有加入白藜蘆醇(30 mg/kg)的實驗組比較，發現在海馬迴(*hippocampal*)的神經細胞傷害會被抑制，並且減少由 *kainic acid* 引起的 *astrocytes* 與 *microglial cells* 活化現象，由於 *kainic acid* 所引起的神經毒性中，氧化壓力是一個關鍵因子，因此白藜蘆醇有可能是透過其清除自由基的能力達到保護的效果(Wang et al., 2004)。而在流行病學的報告中指出，適度的飲用紅酒或是食用富含抗氧化劑的飲食，可以減少老年黃斑部病變的發生。因此，學者利用一個人類的視網膜色素性上皮細胞株(*human retinal pigment epithelial cell line, ARPE-19*)以過氧化氫(*hydrogen*

peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)處理，模擬老年黃斑部病變的傷害，發現白藜蘆醇濃度在 100 μmole/L 時，透過抑制細胞內的氧化，並保護細胞避免死亡(King et al., 2005)。

### 3. 白藜蘆醇對於基質金屬蛋白酶的影響

由於已知白藜蘆醇具有抗癌的活性，之後有學者開始探討白藜蘆醇與其他多酚性化合物對癌症中負有部份角色的基質金屬蛋白酶的影響，而發現在膠質母細胞瘤細胞株 U-87 給予了這些藥物的處理後，可以減少基質金屬蛋白酶第二型與第九型的活性(Demeule et al., 2000)。

## 五、研究目的

已知阿魏酸、川芎嗪、白藜蘆醇對於腦部缺血、氧化壓力傷害與老年黃斑部病變等損傷，或多或少具有保護效果(Chalas et al., 2001; Huang et al., 1994; Lucie, 2000; Shih et al., 2002; Sinha et al., 2002)；基質金屬蛋白酶第九型在腦部缺血中扮演重要的角色，並且在興奮性細胞毒性的傷害下會有活性增加與向上調節的情形，而抑制基質金屬蛋白酶則可以降低這些傷害(Mali et al., 2005; Manabe et al., 2005; Zhang et al., 2004)。本研究進一步探討，大鼠視網膜缺血再灌流傷害後，網膜生理功能、自由基、基質金屬蛋白酶第九型、神經節細胞與amacrine細胞是否會受到影響。另外，在視網膜缺血前注射藥物至玻璃體腔，評估視網膜的生理功能，並觀察在視網膜缺血再灌流模式中，對自由基、基質金屬蛋白酶、神經節細胞與amacrine細胞的療效及機轉。

## 貳、材料與方法

### 一、藥品

阿魏酸、川芎嗪、白藜蘆醇, sodium chloride 購買自 Sigma, MO, USA ; ketamine (imalgene<sup>®</sup> 10 g/100 mL) 10 mL , 購買自 Merial, Bourgelat, France ; 10% xylazine (chanazine<sup>®</sup>) 購買自 Chanelle, Galway, Ireland ; 0.5% proparacaine (alcaine<sup>®</sup>), 1% tropicamide (mydracayl<sup>®</sup>) 購買自 Alcon, Puurs, Belgium ; balanced salt solution (BSS) 購買自 Alcon, Texas, USA ; phosphate buffer saline (PBS) 購買自 BDH, Poole, England ; paraformaldehyde, sucrose, gelatin 購買自 Merck, Darmstadt, Germany ; chromium potassium sulfate, chloroform, isopropranol 購買自 Baker, NJ, USA ; primary antibody (goat polyclonal anti-matrix metalloproteinase-9) , secondary antibody (anti-goat IgG, HRP conjugate) 來自 Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA ; TSA<sup>™</sup> fluorescence systems kit 來自 PerkinElmer Life Sciences, Inc., Boston, MA, USA ; trizol reagent 購買自 Invitrogen, Carlsbad, California ; RevertAid<sup>™</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit, 100 bp DNA ladder 購買自 Fermentas, Lithuania ; dNTP, Bio Taq DNA polymerase, TBE buffer 購買自 慧眾(BIOMAN scientific CO., LTD., Taiwan); agarose 藥品購買自 Cambrex, ME, USA ; Primers ( $\beta$ -actin, MMP-9, Thy-1) 購買自 明欣生物科技有限公司, 臺灣(MB Mission Biotech CO., LTD., Taiwan)。

### 二、儀器

電腦(computer)購買自 Apexons<sup>®</sup> ; 立體定位儀(stereotaxic frame) ; 示波器(monitor)購買自 Textronic ; 訊號放大器(amplifier P511 ; regulated power supply RPS107/Stimulator PS22)購買自 Grass Telefactor, Astro Med Inc., RI, USA ; 發光二極體(LED, Light-emitted diode) ; 發光二極體電源供應器(LED power supply; Hewlett-Packard E3630A) ; 冷凍切片機(Microtome Freezing, Leica CM1900) ; 高速離心機(centrifugator)購買自 Sigma 2K15, Harz, Germany ; 分光光度計(S2100 Diode Array Spectrophotometer) ; 聚合酶連鎖反應儀(PCR sprint thermal cycler) ; 電泳膠片照膠系統(Image Master VDS, Israel) ; 大型自動正立螢光顯微鏡(Fluoromicroscope, Olympus AX-80)。

### 三、動物

本實驗採用約 6~8 週大, 200~300 g 重之 Wistar rats。飼養於臺北榮民總醫院教學研究部動物室, 飲水與飼料供應充足, 12 小時燈光以及 12 小時

暗室的週期環境之中。環境溫度控制在  $25 \pm 1$  °C，濕度控制在 40~60 %，空調則維持 air changes 12~15/hour。

#### 四、閃光網膜電器生理圖 [ flash electroretinogram(ERG) ]

動物在給予藥物前一天與再灌流第三、五、七天，進行閃光網膜電氣生理圖的測量，用以評估藥物對於視網膜生理功能的影響。

在進行測量之前，先開啟電腦(MS-DOS 系統下的 ERG 軟體)、示波器、訊號放大器(amplifier, Grass, USA)與發光二極體(light-emitted diode, LED)電源供應器(power supply)，動物皆須接受至少 30 分鐘以上之暗適應，其後之流程皆於暗房中完成。完成暗適應之動物先以 ketamine (100 mg/kg, imalgene<sup>®</sup>)及 2% xylazine (5 mg/kg, chanazine<sup>®</sup>)肌肉注射麻醉。以立體定位儀固定後，滴加散瞳劑 1% tropicamide (mydracayl<sup>®</sup>)與局部麻醉劑 0.5% proparacaine (alcaine<sup>®</sup>)各一滴，將待測眼球固定。將參考電極接於舌頭，地極接於頭皮，並將白金環輕觸角膜作為紀錄電極(Block et al., 1992)。將 LED 放置於眼球前 5 公分處，啟動閃光後，視網膜產生的神經電訊號可透過電極紀錄於電腦，將檔案以 Excel 軟體開啟後紀錄 b-wave amplitude，由於不同動物的 b-wave amplitude 可能會有不同，單純比較 b-wave amplitude 可能較不客觀，因此以同一隻動物缺血眼的 b-wave amplitude 除以正常眼的 b-wave amplitude 定義為乙型波比率(b-wave ratio)，評估缺血與給藥的變化(Chao and Osborne, 2001; Safa and Osborne, 2000)。

#### 五、活體內測量活性氧族的方法

捕捉氫氧基，可用微量透析探針，伸入有或沒有高眼內壓導致之實驗性青光眼（網膜缺血）或實驗性鐵沉著症（氧化壓力）的大鼠玻璃體腔，以含有 5 mM 水楊酸的生理食鹽水灌流。在這裡，水楊酸是用附在微透析灌流幫浦之一毫升微量針筒(Exmire)，以每分鐘 1 微升( $\mu$ l)的速度注入；每隔 15 或 20 分鐘，從微量透析探針流出之微量透析透液收集到一個管子(含有 15 或 20  $\mu$ l 的次氯酸，可以穩定收集到的析透液)；氫氧基的產生，可用水楊酸氫氧化產物【二氫氧苯酸 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA)】量的來測量；2,5-二氫氧苯酸(DHBA)可經由酵素 P-450 的途徑產生，因此 2,3-二氫氧苯酸(DHBA)被認為是更具專一性的氫氧基標記；收集到微透析液，直接的將它注入高效能液相層析儀-電化學偵測器(HPLC-EC)去測量，這是首次利用這個方法在大鼠眼睛之活體試驗；氫氧基可以用 8~40 pmoles of 2,3-二氫氧苯酸 (DHBA，可用乙醇溶解)，作內部的標準，然後定量。

## 六、藥物的劑量與投予

將白藜蘆醇溶解於 25 % ethanol 中，給予劑量為 0、0.3 nmol 與 0.03 nmol；阿魏酸溶解於水中，給予劑量為 0、0.5 nmol 與 0.1 nmol；川芎嗪溶解於水中，給予劑量為 0、0.5 nmol；利用 10  $\mu$ L 的 microsyringe 接 30 號針頭作玻璃體內注射。

將各給藥組動物區分為 3 個劑量組（但川芎嗪為 2 個劑量組）與一個溶劑組（25 % ethanol 或水），以右眼作為正常對照組。

在作缺血處理之前一天(24 小時)，將通過閃光網膜電器生理圖評估為正常的動物，以 ketamine (100 mg/kg, imalgene<sup>®</sup>)及 2% xylazine (5 mg/kg, chanazine<sup>®</sup>)肌肉注射麻醉，玻璃體內注射 3~5  $\mu$ L 的上述藥物，在隔天作缺血處理。

## 七、大鼠視網膜缺血一再灌流實驗模式之建立

動物先以 ketamine (100 mg/kg, imalgene<sup>®</sup>)及 2% xylazine (5 mg/kg, chanazine<sup>®</sup>)肌肉注射麻醉。麻醉後以立體定位儀固定，在兩眼滴加散瞳劑 1% tropicamide(mydril<sup>®</sup>)與局部麻醉劑 0.5% proparacaine (alcaine<sup>®</sup>)各一滴，選擇左眼或右眼（本實驗使用左眼），使用 30 號針刺入眼球之前房 (anterior chamber)，針後連接於均衡鹽注射液(balanced salt solution, BSS)。本實驗中瓶內水面比眼球高 185 公分（約 136 mm-Hg），壓力造成網膜缺血可觀察到眼底變白，如此持續 30, 45, 60, 75, 90 分鐘缺血後出針，即可觀察到因缺血變白的視網膜快速充血，即已開始再灌流(Buchi et al., 1991)。在缺血後再灌流的第 3, 5, 7 天，利用測量閃光網膜電氣生理圖觀察 b-wave amplitude 變化，並計算 b-wave ratio 以評估傷害。

## 八、免疫組織染色(Lee et al., 2005)

已完成缺血一再灌流及藥物測試的動物先以 pentobarbital sodium 麻醉，剪開動物胸腔找到心臟位置，以蝴蝶針刺入左心室，剪斷上（下）腔靜脈後以 75 ml 0.9% NaCl 灌流，接著再以 75 ml 4% paraformaldehyde 灌流，待灌流完成後取出眼球，以 4% paraformaldehyde 浸泡一天後，換以 15% sucrose 浸泡一天脫水，再以 30% sucrose 加強脫水保存。

取出組織以 OCT 包埋後進行冷凍切片，切片方向為自視神經到角膜，切片厚度為 10  $\mu$ m。本實驗中，免疫組織染色部份，使用 TSA<sup>TM</sup> fluorescence systems kit (Lee et al., 2005)，切片後先以 TNT buffer 清洗蓋住標本 5 分鐘，再以 TNB buffer 蓋住標本於 25  $^{\circ}$ C 下反應 30 分鐘。取出標本後以 TNT buffer 沖洗 3 次，每次 5 分鐘。再加入(goat polyclonal matrix metalloproteinase-9,

MMP-9)一級抗體(1:200; Santa Cruz, CA, USA), 覆蓋標本在 37 °C 下反應 1 小時, 取出後以 TNT buffer 沖洗 3 次, 每次 5 分鐘。再加上(anti-goat immunoglobulin G, IgG, HRP conjugate)二級抗體(1:250; Santa Cruz, CA, USA), 覆蓋標本在 25 °C 下反應 30 分鐘, 之後以 TNT buffer 沖洗 3 次, 每次 5 分鐘。加入 tetramethylrhodamine-labeled tyramide 在 25°C 下反應 10 分鐘, 取出後以 TNT buffer 沖洗 3 次, 每次 5 分鐘, 風乾後用 mounting gel 封片, 大型自動正立螢光顯微鏡(Fluoromicroscope, Olympus AX-80)觀察。

另加入一級抗體〔小鼠抗乙醯膽鹼轉化酶單株抗體, mouse anti-choline acetyltransferase (ChAT) monoclonal antibody; 1:30 Sigma-Aldrich; 1:30; 會對 cholinergic amacrine cells 進行標記〕, 再加二級抗體(anti-mouse IgG; 1:100), 以前述方法完成封片後, 以螢光顯微鏡觀察照相。

九、反轉錄聚合酶連鎖反應〔reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR); Nash and Osborne, 1999〕

將視網膜取出後, 使用 diethylpyrocarbonate(DEPC)水清洗三次後, 放入 eppendorff tube 中, 再將 tube 放進液態氮容器中 15~30 秒 (使網膜易於磨碎), 加入 trizol reagent (400µl/2 pieces retina), 超音波震碎後置於冰上(3~5 次, 直到均質), 再加入 chloroform (80µl/2 pieces retina)一起搖晃 15~30 秒後, 置於冰上 5 分鐘分層, 在 4°C 下 13000 rpm 離心 15 分鐘後, 吸取上清液至另一個 eppendorff。加入 isopropranol (200 µl/2 pieces)到上清液以沉澱 RNA, 再輕輕搖晃後在冰上放置 5~10 分鐘, 在 4°C 下 13000 rpm 離心 15 分鐘後倒掉上清液。加 1 ml 的 75% ethanol-DEPC 水清洗, 於 4°C 下 7500 rpm 離心 5 分鐘 (若 pellet 仍然漂浮, 改以 13000 rpm 離心), 倒掉上清液, 乾燥後得到核糖核酸(RNA) pellet, 最後再加入 DEPC 水溶解 RNA pellet, 即完成 RNA 萃取。

將已溶解的 RNA 略為稀釋, 使用 S2100 Diode Array Spectrophotometer 測量, 先使用 500 µl 的 DEPC 水作為 blank (reference), 再測量以 DEPC 水稀釋後的 RNA(e.g. 5 µl RNA sample in DEPC water plus 495 µl DEPC water), 先觀察 O.D. 260/280 的值(test), 須介於 1.7~1.8, 再計算 RNA 濃度, [公式:  $A_{260} \times 40 \times \text{稀釋倍數(e.g. 100)} \times 1/1000$ , 單位為 µg/µl]。

本實驗中反轉錄的部份, 使用 RevertAid™ First Strand cDNA synthesis kit (Fermentas, Lithuania)。取 RNA (e.g. 4 µl)加入 DEPC 水(e.g. 8 µl)至 12µl, 輕搖 15~30 秒後 7500 rpm 離心 15~30 秒, 以聚合酶連鎖反應儀(PCR sprint thermal cycler)反應 70 °C 5 分鐘, 4 °C 10 分鐘後, 置於冰上; 加入 8 µl cDNA

synthesis mixture [4  $\mu$ l 5X reaction buffer, 0.5  $\mu$ l RiboLock™ ribonuclease inhibitor (20u/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l 10 mM dNTP, 0.5  $\mu$ l 的 oligo (dT)<sub>18</sub> primer (33 mM), 1  $\mu$ l RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/ $\mu$ l)], 輕搖後離心, 以 42 °C 60 分鐘合成 cDNA, 再以 70 °C 10 分鐘中止反應, 即得到 cDNA 20  $\mu$ l: 保存 15  $\mu$ l 於 -20 °C; 剩 5  $\mu$ l 加入 20  $\mu$ l DEPC 水進行聚合酶連鎖反應。

取 1  $\mu$ l cDNA template (取代以 DEPC 水為 control 組)、5  $\mu$ l 10X reaction buffer、4  $\mu$ l dNTPs (2.5 mM)、primer (各 1  $\mu$ l 的 sense 與 antisense)、0.5  $\mu$ l Taq polymerase, 最後加 37.5  $\mu$ l DEPC 水至 50  $\mu$ l, 上機進行聚合酶連鎖反應 (參最末頁)。完成後取 5  $\mu$ l 加上 1  $\mu$ l 的 sample dye, 取 5  $\mu$ l 放進每個 well (marker 則取 2  $\mu$ l), 以 1 % agar gel 跑膠 [150 ml gel solution: 1.5 g agarose, 30 ml TAE/ TBE buffer (5X), 120 ml DEPC-treated water], 電壓調至 100 伏特, 方向由 (-) 到 (+), 時間 20~30 分鐘 (直到倒數三行)。最後以 0.5 % ethidium bromide (5 gm ethidium bromide in 1 ml TAE/ TBE) 泡 20~30 分鐘進行染色, 再以 dd-H<sub>2</sub>O 脫色後, 以 UV 光源照下結果 (Nash and Osborne, 1999)。本次實驗中所用的 primer 包括  $\beta$ -actin、Thy-1 與 MMP-9。

$\beta$ -actin : 94°C 40 s; 55°C 40 s; 62°C 1 min for 24 cycles, 433 bps  
forward primer 5'-CCCTAAGGCCAACCGTGAAAAGATG-3'

reverse primer 5'-GAACCGCTCATTGCCGATAGTGATG-3'

Thy-1 : 94°C 40 s; 48°C 40s; 72°C 40 s for 34 cycles, 344 bps

forward primer 5'-CGCTTTATCAAGGTCCTTACTC-3'

reverse primer 5'-GAGTAAGGACCTTGATAAAGCG-3'

MMP-9 : 94°C 1 min; 56°C 1 min; 72°C 1 min for 34 cycles, 536 bps

forward primer 5'-CGGTCGGTATTGGAAGTTCTCG-3'

reverse primer 5'-GCTGAAGCAAAAGAGGAGCCTTAG-3'

#### 十、統計方法

每次實驗各組最少三重複, 實驗數據以平均值  $\pm$  標準誤差 (mean  $\pm$  S.E.) 表示, 組別之間採用 unpaired Student's *t* test 比較其有無差異,  $p < 0.05$  時視為具有統計意義。

## 參、結果

### 一、建立高眼內壓導致視網膜缺血一再灌流模式

由於利用高眼內壓導致視網膜缺血一再灌流的實驗模式，發現隨缺血處理時間不同或壓力不同，造成的傷害程度也會跟著改變，缺血損傷：會導致一個平直的電氣網膜生理圖（圖二 A，缺血眼振幅極低；圖二 B，為正常眼之振幅）；大量的氧化游離基增產（氫氧基產量高峰分別落在缺血後 75 分鐘及灌流後 60 分鐘，以缺血前基準線比較，前者有顯著意義，圖二 C）。

本實驗首先，在做缺血處理前先進行閃光網膜電氣生理圖的檢查，只選擇 b-wave ratio（定義見第二章第四節）介於 75.00~125.00% 的動物進行實驗。接著利用相同壓力(136 mmHg)，做不同時間長度（30, 45, 60, 75, 90 分鐘）的缺血處理，觀察再灌流 3 天後閃光網膜電氣生理圖的變化（見圖三）。經測量後發現給予 30 分鐘的缺血，b-wave ratio 大約為  $74.00 \pm 4.88\%$ （平均值 $\pm$ 標準誤差；n=4）。給予 45 分鐘的缺血，b-wave ratio 降至  $51.00 \pm 8.74\%$ （平均值 $\pm$ 標準誤差；n=3）。給予 60 分鐘的缺血，b-wave ratio 降至  $24.50 \pm 13.33\%$ （平均值 $\pm$ 標準誤差；n=4）。給予 75 分鐘的缺血，b-wave ratio 降至  $36.50 \pm 9.40\%$ （平均值 $\pm$ 標準誤差；n=4）。而給予 90 分鐘的缺血，b-wave ratio 會降至  $21.25 \pm 6.98\%$ （平均值 $\pm$ 標準誤差；n=4）。由實驗結果顯示，給予 60, 75 或 90 分鐘的缺血處理，b-wave amplitude 有明顯下降，而此三時間點之間並不會有明顯的差異，因此在之後的實驗，將會以 136 mm-Hg 的壓力缺血處理 60 分鐘作為實驗模式。

由於在缺血處理後，有可能會有短時間內 b-wave ratio 降低，但是經過一段時間回復後，閃光網膜電氣生理圖的結果又回到正常。為了確認實驗動物在缺血一再灌流的實驗中不會自行回復，繼續觀察給予 136 mmHg 的壓力處理 60 分鐘後，再灌流 3, 5, 7 天後的閃光網膜電氣生理圖變化（見圖四）。實驗結果顯示未做缺血處理前 b-wave ratio 為  $104.50 \pm 7.19\%$ （平均值 $\pm$ 標準誤差；n=4），而再灌流第三天時，b-wave ratio 為  $24.50 \pm 13.33\%$ （平均值 $\pm$ 標準誤差；n=4）。第五天時 b-wave ratio 為  $39.00 \pm 12.38\%$ （平均值 $\pm$ 標準誤差；n=4）。第七天 b-wave ratio 為  $34.00 \pm 12.88\%$ （平均值 $\pm$ 標準誤差；n=4）。由此可證明，實驗動物模式並未回復到正常，且缺血組與正常組間有明顯差異，並具有統計上的意義。

### 二、阿魏酸、川芎嗪、白藜蘆醇對於視網膜功能的影響

在建立了實驗動物模式的條件，並確定再現性之後，可以進一步去探

討藥物對於缺血一再灌流模式的影響。在本實驗中，先對未進行任何處理的動物進行閃光網膜電氣生理圖的檢測，如前述，只選擇 b-wave ratio 介於 75.00~125.00%間的動物進行實驗。在缺血處理前 24 小時，先以玻璃體腔內注射不同劑量的藥物（參考五、藥物的劑量與投予），再以 136 mmHg 壓力下進行 60 分鐘的缺血處理。在進行缺血處理後的第 3, 5, 7 天，檢測其閃光網膜電氣生理圖的變化。實驗結果顯示給予水（阿魏酸或川芎嗪的溶劑，vehicle for FA or TMP）處理，並不會顯著影響缺血後下降的 b-wave amplitude（數據未附）；此外（見圖五），只做缺血處理的動物，再灌流第 7 天 b-ratio 為  $26.7 \pm 9.52\%$ （平均值 $\pm$ 標準誤差；n=6）；預處理 0.5 nmol 阿魏酸組，再灌流第 7 天時為  $76.5 \pm 14.20\%$ （平均值 $\pm$ 標準誤差；n=4）；預處理 0.1 nmol 阿魏酸組，再灌流第 7 天時為  $27.97 \pm 13.04\%$ （平均值 $\pm$ 標準誤差；n=3）；預處理 0.5 nmol 川芎嗪組，再灌流第 7 天時為  $20.18 \pm 8.50\%$ （平均值 $\pm$ 標準誤差；n=4）。

其他結果顯示，預處理 25%乙醇（白藜蘆醇的溶劑；vehicle for resveratrol）組，再灌流第 7 天時為  $29.67 \pm 8.97\%$ （平均值 $\pm$ 標準誤差；n=3），與只做缺血再灌流組的數據無顯著差異（數據未附）；預處理 0.3 nmol resveratrol 組，再灌流第 7 天時為  $54.80 \pm 11.03\%$ （平均值 $\pm$ 標準誤差；n=5）；預處理 0.03 nmol resveratrol 組，再灌流第 7 天時為  $83.75 \pm 10.68\%$ （平均值 $\pm$ 標準誤差；n=4）；發現給予 0.03 nmol 白藜蘆醇處理可以明顯緩解缺血造成之 b-wave ratio 的降低。

### 三、藥物對基質金屬蛋白酶第九型（MMP-9，缺血損傷指標）的影響

透過閃光網膜電氣生理圖的檢測，評估白藜蘆醇對於視網膜功能的影響之後；在缺血處理前 24 小時，先以玻璃體腔內注射 0.03 nmol 白藜蘆醇或溶劑（25%乙醇），再以 136 mmHg 壓力下進行 60 分鐘的缺血處理。接著探討在視網膜缺血前給予藥物處理後，對於視網膜中基質金屬蛋白酶第九型的影響；在本實驗中，在動物再灌流第七天時將其犧牲，並進行冷凍切片與免疫螢光組織染色；在基質金屬蛋白酶第九型免疫螢光反應的結果中，相較於正常視網膜（見圖六 B）：在缺血處理前給予 25%乙醇處理，基質金屬蛋白酶第九型會大量的表現於網膜神經節細胞層與內核層中〔見圖六 D：與單純缺血處理相同（圖未附）〕；相較於缺血前給予溶劑組，在缺血處理前給予白藜蘆醇，於視網膜中會減少基質金屬蛋白酶第九型的表現（見圖六 F）；使用 RT-PCR，分析缺血再灌流後，藥物對基質金屬蛋白酶第九型核糖核酸（MMP-9 mRNA）的變化；在實驗結果中發現（見圖七），相較於正

常視網膜：在缺血前給予 25%乙醇增加 MMP-9 mRNA 的表現之傾向〔與單純缺血處理組相同(圖表未附)〕；相較於給予溶劑組，缺血前給予 0.03 nmol 白藜蘆醇則具減少 MMP-9 mRNA 表現之趨勢(見圖七)；阿魏酸、川芎嗪或許和白藜蘆醇亦具相同藥效(實驗仍在進行)。

#### 四、藥物對於乙醯膽鹼轉化酶(ChAT; amacrine 細胞標記)的影響

在缺血處理前 24 小時，先以玻璃體腔內注射 0.5 nmol 阿魏酸或溶劑(水)，再以 136 mmHg 壓力下進行 60 分鐘的缺血處理。接著探討在視網膜缺血前給予藥物處理後，對於視網膜中 ChAT 的影響；在本實驗中，在動物再灌流第七天時將其犧牲，並進行冷凍切片與免疫螢光組織染色；在 ChAT 免疫螢光反應的結果中：正常視網膜(見圖八 A)，特徵為 amacrine 細胞之神經纖維在內網層(inner plexiform layer, IPL)排列成兩個帶狀的圖案(2-band；細箭)；IPL 兩側可見細胞本體(粗箭)；在缺血處理後，amacrine 細胞的兩個前述特徵不復存在，甚而在內核層細胞本體所在處呈現空洞〔見圖八 B；與缺血前給予水處理相同(圖未附)〕；而在缺血處理後給予阿魏酸，呈現類似於正常視網膜之免疫螢光反應(見圖八 C)；川芎嗪、白藜蘆醇或許和阿魏酸亦具相同效應(實驗仍在進行)。

#### 五、藥物對於 Thy-1 mRNA (網膜神經節細胞標記)的影響

接下來的實驗，再使用 RT-PCR，在缺血處理前 24 小時，先以玻璃體腔內注射 0.03 nmol 的白藜蘆醇或溶劑(25%乙醇)，再以 136 mmHg 壓力下進行 60 分鐘的缺血處理；分析再灌流後，藥物對 Thy-1 mRNA 變化；在實驗結果中發現(見圖九)，相較於正常視網膜：Thy-1 mRNA 在給予 25%乙醇處理下有減少的現象〔與單純缺血處理相同(圖表未附)〕；但給予 0.03 nmol 白藜蘆醇處理則具增加之趨勢(見圖九)；阿魏酸、川芎嗪或許和白藜蘆醇亦具相同藥效(實驗仍在進行)。

再用 RT-PCR 反轉錄聚合酶連鎖反應，在缺血處理前 24 小時，先以玻璃體腔內注射 0.03 nmol 的白藜蘆醇或溶劑(25%乙醇)，再以 136 mm-Hg 壓力下進行 60 分鐘的缺血處理；分析再灌流後，藥物對 Thy-1 mRNA 變化；結果發現(見圖九)，相較於正常視網膜：Thy-1 mRNA 在給予 25%乙醇處理下有減少的現象〔與單純缺血處理相同(圖表未附)〕；但給予 0.03 nmol 白藜蘆醇處理則具增加之趨勢(見圖九)；阿魏酸、川芎嗪或許和白藜蘆醇亦具相同藥效(實驗仍在進行)。

#### 六、藥效機轉研究(氧化壓力)

本研究採用所建立之氧化壓力模式：硫酸亞鐵(透過 Fenton 反應，產

生毒性氫氧根游離基)，對網膜進行為時不等之傷害，進而檢測藥物對氧化壓力之療效(圖十)：氧化壓力進行20分鐘後及其他時間點，阿魏酸(0.5 nmol 優於0.1 nmol；即劑量相關)及川芎嗪0.5 nmol；數據未附)明顯抵消硫酸亞鐵誘發之氧化壓力[即減少氫氧根游離基產生；阿魏酸優於川芎嗪(數據未附)]。

## 肆、討論

許多治療視網膜缺血傷害的策略被提出；其中包括有使用 NMDA 與 kainate 型的麸胺酸受器拮抗劑，來保護視網膜缺血傷害(Adachi et al., 1998; Seo et al., 2001)利用抗氧化劑減少自由基產生的視網膜傷害(Block and Schwarz, 1997)；或投予鈣離子通道拮抗劑來減少鈣離子內流(Osborne et al., 2002)。

本實驗高眼內壓導致視網膜缺血的傷害模式中，結果證明在給予玻璃體腔注射 0.5 nmol 阿魏酸或 0.03 nmol 白藜蘆醇，皆可明顯的降低高眼內壓導致視網膜缺血的傷害（見圖五~十）；給予 0.5 或 0.1 nmol 阿魏酸，分別顯著地或具傾向緩解因缺血下降之網膜生理功能，0.5 nmol 效果較 0.1 nmol 好，與一般 dose-response curve 一致（見圖五）；然而，白藜蘆醇 0.03 nmol 效果較 0.3 nmol 好，與 dose-response curve 不一致，推測 0.3 nmol 已超出藥理濃度（pharmacologic concentration；見圖五）

在本實驗中所使用的高眼內壓導致視網膜缺血一再灌流模式中，除了在缺血後再灌流第七天時發現有明顯的視網膜功能損害外（見圖二~四）。也發現在視網膜神經節細胞層與內核層細胞有 MMP-9 表現量的增加（見圖六）。這些實驗結果與之前的文獻所提出缺血會導致網膜功能下降或許相關(Chao and Osborne., 2001)，且視網膜受到興奮性細胞毒性傷害時，MMP-9 會表現在視網膜的位置(Mali et al., 2005; Manabe et al., 2005; Zhang et al., 2004)，和過去報導缺血易損傷內層網膜是一致的(Osborne et al., 1999a; Chao et al., 2000)。比較缺血前給予溶劑乙醇組，實驗結果顯示：缺血前投予 0.03 nmol 白藜蘆醇後，視網膜生理功能所受傷害減輕（見圖五），也觀察到在缺血後再灌流第七天時，視網膜神經節細胞層之 MMP-9 增加的表現量，有緩解的現象（見圖六）。本研究更進一步推測白藜蘆醇降低 MMP-9 表現量的結果，可能在降低視網膜功能受損上，具有某種程度上的重要性。

在評估視網膜神經節細胞的損害上，之前有文獻透過評估 Thy-1 mRNA 來代表視網膜神經節細胞所受的損傷(Chidlow and Osborne, 2003; Nash and Osborne, 1999)。而本實驗中也沿用此方法，將缺血後再灌流的動物犧牲，取出視網膜進行 RT-PCR 來觀察基質金屬蛋白酶第九型與 Thy-1 mRNA 表現量改變。實驗結果顯示，與給予 25%乙醇比較，Thy-1 mRNA 經過缺血減少的現象，會因為白藜蘆醇的處理，有增加 Thy-1 mRNA 的趨勢（見圖九）；而經過缺血處理後 MMP-9 mRNA 增加的趨勢，會因為給予 0.03 nmol

白藜蘆醇而降低(見圖七)。RT-PCR 的結果顯示：在給予白藜蘆醇處理後，可以減少視網膜神經節細胞(Thy-1 mRNA)所受的傷害；並減少 MMP-9 mRNA 表現量的增加(缺血損傷指標；見圖九)。據此推測，透過給予白藜蘆醇的處理造成 MMP-9 與 MMP-9 mRNA 表現量降低的現象，可能是使視網膜神經節細胞存活增加的機轉之一。

本研究顯示，0.5 nmol 阿魏酸顯著地緩解因缺血下降之 ERG b-wave 振幅(見圖五)；而在缺血處理前給予阿魏酸(見圖八 C)，呈現類似於正常視網膜之免疫螢光反應(見圖八 A)；阿魏酸劑量相關且明顯減少氫氧根游離基產生(圖十)，或許至少為阿魏酸對於網膜缺血之生理和病理藥效(前述)，提供佐証：自由基吞噬機轉。

由於 MMP-9 可能受到自由基直接或間接的活化(Gu et al., 2002)，而被活化的 MMP-9 會進一步降解細胞外基質(Mali et al., 2005; Manabe et al., 2005; Zhang et al., 2004)，最後產生視網膜的損傷。在本實驗結果中，推測可能在給予缺血一再灌流損傷時，所產生之自由基直接或間接的向上調節 MMP-9，進而導致視網膜的損傷，並造成視網膜功能的傷害。因 MMP 與自由基之間的關係(Liu and Rosenberg, 2005)，且白藜蘆醇具有抑制 MMP-9 的作用(Demeule et al., 2000)，所以白藜蘆醇有可能是透過減少自由基，而減少了 MMP-9 表現量，最後減輕了視網膜所受到的損傷，此推測需進一步証實；藉著白藜蘆醇建立之基質金屬蛋白酶第九型與 Thy-1 mRNA 的研究平台，繼續探討阿魏酸、川芎嗪的藥效機轉。

## 伍、結論與建議

網膜缺血再灌流導致：生理功能下降；氧化壓力增加；MMP-9 免疫螢光反應表現位在網膜內層及其 mRNA(損傷指標)表現增加；Thy-1 mRNA (網膜神經節細胞標記)表現減少；膽鹼乙醯轉化酶 (ChAT; amacrine 細胞標記) 免疫螢光反應表現消失。網膜缺血再灌流易傷害網膜內層；而這些傷害可透過在缺血前給阿魏酸(0.5 nmol)或白藜蘆醇(0.03 nmol)來緩解。總結，兩種成分可能透過上述機轉提供神經保護作用。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP99-RD-008 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. **Adachi, K., Fujita, Y., Morizane, C., Akaike, A., Ueda, M., Satoh, M., Masai, H., Kashii, S., Honda, Y.** Inhibition of NMDA receptors and nitric oxide synthase reduces ischemia injury of the retina. *Eur. J. Pharmacol.* 1998 250, 53-57.
2. **Block, F., Schwarz, M., Sontag, K.H.** Retinal ischemia induced by occlusion of both common carotid arteries in rats as demonstrated by electroretinography. *Neurosci. Lett.* 1992 144, 124-126.
3. **Block, F., Schwarz, M.** Effects of antioxidants on ischemic retinal dysfunction. *Exp. Eye. Res.* 1997 64, 559-564.
4. **Bourne LC, Rice-Evans CA.** The effect of the phenolic antioxidant ferulic acid on the oxidation of low density lipoprotein depends on the pro-oxidant used. *Free Radic Res.* 1997 Sep;27(3):337-44.
5. **Brandstatter, J.H., Hartveit, E., Sassoe Pognetto, M., Wassle, H.** Expression of NMDA and high-affinity kainite receptor subunit mRNAs in the adult rat retina. *Eur. J. Neurosci.* 1994 6, 1100-1112.
6. **Buchi, E.R., Suivaizdis, I., Fu, J.** Pressure-induced retinal ischemia in rats: an experimental model for quantitative study. *Ophthalmologica* 1991 203, 138-147.
7. **Chao, H.M., Chidlow, G., Melena, J., Wood, J.P.M., Osborne, N.N.** An investigation into the potential mechanisms underlying the neuroprotective effect of clonidine in the retina. *Brain Res.* 2000 877, 47-57.
8. **Chao, H.M., Osborne, N.N.** Topically applied clonidine protects the rat retina from ischaemia/reperfusion by stimulating alpha(2)-adrenoceptors and not by an action on imidazoline receptors. *Brain Res.* 2001 904, 126-136.
9. **Chidlow, G., Osborne, N.N.** Rat retinal ganglion cell loss caused by kainite, NMDA and ischemia correlates with a reduction in mRNA and protein of Thy-1 and neurofilament light. *Brain Res.* 2003 963, 298-306.
10. **Chidlow, G., Schmidt, K.G., Wood, J.P., Melena, J., Osborne, N.N.** Alpha-lipoic acid protects the retina against ischemia-reperfusion. *Neuropharmacology* 2002 43, 1015-1025.
11. **Chintala, S.K., Zhang, X., Austin, J.S., Fini, M.E.** Deficiency in matrix

- metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) protects against retinal ganglion cell death after optic nerve ligation. *J. Biol. Chem.* 2002 277, 47461-47468.
12. **Demeule, M., Brossard, M., Page, M., Gingras, D., Beliveau, R.,** 2000. Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2002 1478, 51-60.
  13. **Egeblad, M., Werb, Z.** New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. 2002 *Nat. Rev. Cancer* 2, 161-172.
  14. **Feng J, Wu G, Tang S.** The effects of tetramethylpyrazine on the incidence of arrhythmias and the release of PGI<sub>2</sub> and TXA<sub>2</sub> in the ischemic rat heart. *Planta Med.* 1999 Apr;65(3):268-70.
  15. **Fleccher, E.L., Hack, I., Brandstatter, J.H., Wassle, H.** Synaptic localization of NMDA receptor subunits in the rat retina. *J. Comp. Neurol.* 2000 420, 98-112.
  16. **Foulds, W.S., Johnson, N.F.** Rabbit electroretinogram during recovery from induced ischemia. *Trans. Ophthalmol. Soc. UK.* 1974 94, 383-393.
  17. **Frank B, Gupta S.** A review of antioxidants and Alzheimer's disease. *Ann Clin Psychiatry.* 2005 Oct-Dec;17(4):269-86. Review.
  18. **Fremont, L.** Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 2000 66, 663-673.
  19. **Gu, Z., Kaul, M., Yan, B., Kridel, S.J., Cui, J., Strongin, A., Smith, J.W., Liddington, R.C., Lipton, S.A.** S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science.* 2002 297, 1186-1190.
  20. **Guo, L., Moss, S.E., Alexander, R.A., Ali, R.R., Fitzke, F.W., Cordeiro, M.F.** Retinal ganglion cell apoptosis in glaucoma is related to intraocular pressure and IOP-induced effects on extracellular matrix. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005 46, 175-182.
  21. **Huang, C.Y., Fujimura, M., Noshita, N., Chang, Y.Y., Chan, P.H.** SOD1 down-regulates NF-kappaB and c-Myc expression in mice after transient focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2001a 21, 163-173.
  22. **Huang, C.Y., Fujimura, M., Chang, Y., Chan, P.H.** Over-expression of copper-zinc superoxide dismutase attenuates acute activation of activator protein-1 after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 2001b 32, 41-747.
  23. **Kanski J, Aksenova M, Stoyanova A, Butterfield DA.** Ferulic acid

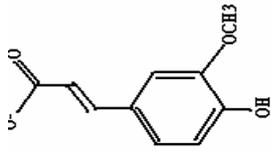
- antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure-activity studies. *J Nutr Biochem*. 2002 May;13(5):273-281.
24. **King, R.E., Kent, K.D., Bomser, J.A.** Resveratrol reduces oxidation and proliferation of human retinal pigment epithelial cells via extracellular signal-regulated kinase inhibition. *Chemico-Biological Interactions* 2005 151, 143-149.
  25. **Lafuente, M.P., Villegas-Perez, M.P., Sells-Navarro, I., Mayor-Torroglosa, S., Miralles de Imperial, J., Vidal-Sanz, M.** Retinal ganglion cell death after acute retinal ischemia is an ongoing process whose severity and duration depends on the duration of the insult. *Neuroscience* 2002 109, 157-168.
  26. **Lahti PM, Modarelli DA, Rossitto FC, Inceli AL, Ichimura AS, Ivatury S.** Aryl Oxalate Derivatives as Convenient Precursors for Generation of Aryloxyl Radicals. *J Org Chem*. 1996 Mar 8;61(5):1730-1738.
  27. **Lee, S.W., Lee, S.E., Ko, S.H., Hong, E.K., Nam, K.I., Nakamura, K.I., Imayama, S., Park, Y.J., Ahn, K.Y., Bae, C.S., Kim, B.Y., Park, S.S.** Introduction of tyramide signal amplification (TSA) to pre-embedding nanogold-silver staining at electron microscopic level. *J. Histochem. Cytochem*. 2005 53, 249-252.
  28. **Li, Y., Schlamp, C.L., Poulsen, G.L., Jackson, M.W., Griep, A.E., Nickells, R.W.** p53 regulates apoptotic retinal ganglion cell death induced by N-methyl-D-aspartate. *Mol. Vis*. 2002 8, 341-350.
  29. **Liu CF, Lin CH, Chen CF, Huang TC, Lin SC.** Antioxidative effects of tetramethylpyrazine on acute ethanol-induced lipid peroxidation. *Am J Chin Med*. 2005;33(6):981-8.
  30. **Lin, B., Martin, P.R., Grunert, U.** Expression and distribution of ionotropic glutamate receptor subunits on parasol ganglion cells in the primate retina. *Vis. Neurosci*. 2002 19, 453-465.
  31. **Lipton, P.** Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev*. 1999 79, 1431-1568.
  32. **Lipton, S.A., Rosenberg, P.A.** Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med*. 1994 330, 613-622.

33. **Liu, K.J., Rosenberg, G.A.** Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radic. Biol. Med.* 2005 39, 71-80.
34. **Mali, R.S., Cheng, M., Chintala, S.K.** Intravitreal injection of a membrane depolarization agent cause retinal degeneration via matrix metalloproteinase-9. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005 46, 2125-2132.
35. **Manabe, S.I., Gu, Z., Lipton, S.A.** Activation of matrix metalloproteinase-9 via neuronal nitric oxide synthase contributes to NMDA-induced retinal ganglion cell death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005 46, 4747-4753.
36. **Masuda T, Yamada K, Maekawa T, Takeda Y, Yamaguchi H.** Antioxidant mechanism studies on ferulic acid: identification of oxidative coupling products from methyl ferulate and linoleate. *J Agric Food Chem.* 2006 Aug 9;54(16):6069-74.
37. **Nash, M.S., Osborne, N.N.** Assessment of Thy-1 mRNA levels as an index of retinal ganglion cell damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999 40, 1293-1298.
38. **Nishzawa, Y.** Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sci.* 2001 69, 369-381.
39. **Osborne, N.N., Casson, R.J., Wood, J.P.M., Chidlow, G., Graham, M., Melena, J.** Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog. Retin. Eye Res.* 2004 23, 91-147.
40. **Osborne, N.N., DeSantis, L., Bae, J.H., Ugarte, M., Wood, J.P.M., Nash, M.S., Chidlow, G.** Topically applied betaxolol attenuates NMDA-induced toxicity to ganglion cells and the effects of ischemia to the retina. *Exp. Eye Res.* 1999a 69, 331-342.
41. **Osborne, N.N., Safa, R., Nash, M.S.** Photoreceptors are preferentially affected in the rat retina following permanent occlusion of the carotid arteries. *Vision Res.* 1999b 39, 3995-4002.
42. **Osborne, N.N., Ugarte, M., Chao, M., Chidlow, G., Bae, J.H., Wood, J.P.M., Nash, M.S.** Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Surv. Ophthalmol.* 1999c 43, (Suppl. 1), 102-128.
43. **Osborne, N.N., Wood, J.P.-M., Cupido, A., Melena, J., Chidlow, G.** Topical flunarizine reduces IOP and protects the retina against

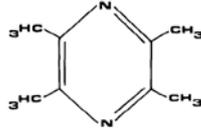
- ischemia-excitotoxicity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002 43, 1456-1464.
44. **Safa, R., Osborne, N.N.** Retinas from albino rats are more susceptible to ischaemic damage than age-matched pigmented animals. *Brain Res.* 2000 862, 36-42.
  45. **Seo, S.Y., Yun, B.S., Ryoo, I.J., Choi, J.S., Joo, C.K., Chang, S.Y., Chung, J.M., Oh, S., Gwag, B.J., et al.** Complestatin is a noncompetitive peptide antagonist of N-methyl-D-aspartate and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid/kainite receptors: secure blockade of ischemic neuronal death. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001 299, 377-384.
  46. **Singh, M., Savitz, S.I., Hoque, R., Gupta, G., Roth, S., Rosengbaum, P.S., Rosenbaum, D.M.** Cell-specific caspase expression by different neuronal phenotypes in transient retinal ischemia. *J. Neurochem.* 2001 77, 466-475.
  47. **Sinha, K., Chaudhary, G., Gupta, Y.K.** Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life Sci.* 2002 71, 655-665.
  48. **Sivak, J.M., Fini, M.E.** MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Prog. Retin. Eye Res.* 2002 21, 1-14.
  49. **Smith, G.G., Baird, C.D.,** 1952. Survival time of retinal cells when deprived of their blood supply by increased intraocular pressure. *Am. J. Ophthalmol.* 35, 133-136.
  50. **Srinivasan M, Sudheer AR, Pilai KR, Kumar PR, Sudhakaran PR, Menon VP.** Influence of ferulic acid on gamma-radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant status in primary culture of isolated rat hepatocytes. *Toxicology.* 2006 Dec 7;228(2-3):249-58. Epub 2006 Sep 19.
  51. **Tsai CC, Lai TY, Huang WC, Yang T, Liu IM, Wong KL, Chan P, Cheng JY.** Tetramethylpyrazine as potassium channel opener to lower calcium influx into cultured aortic smooth muscle cells. *Planta Med.* 2003 Jun;69(6):557-8.
  52. **Wang, Q., Yu, S., Simonyi, A., Rottinghaus, G., Sun, G.Y., Sun, A.Y.** Resveratrol protects against neurotoxicity induced by kainic acid.

- Neurochem. Res. 2004 29, 2105-2112.
53. **Yong, V.W., Power, C., Forsyth, P., Edwards, D.R.** Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 2001 2, 502-511.
  54. **Zeevalk, G.D., Nicklas, W.J.** Evidence that the loss of the voltage-dependent  $Mg^{2+}$  block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism. *J. Neurochem.* 1992 59, 1211-1220.
  55. **Zhang, X., Cheng, M., Chintala, S.K.** Kainic acid-mediated upregulation of matrix metalloproteinase-9 promotes retinal degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004 45, 2374-2383.
  56. **Zhang Z, Wei T, Hou J, Li G, Yu S, Xin W.** Iron-induced oxidative damage and apoptosis in cerebellar granule cells: attenuation by tetramethylpyrazine and ferulic acid. *Eur J Pharmacol.* 2003 Apr 25;467(1-3):41-7.

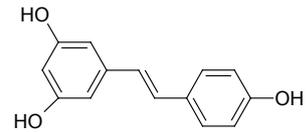
## 柒、圖表



Ferulic acid

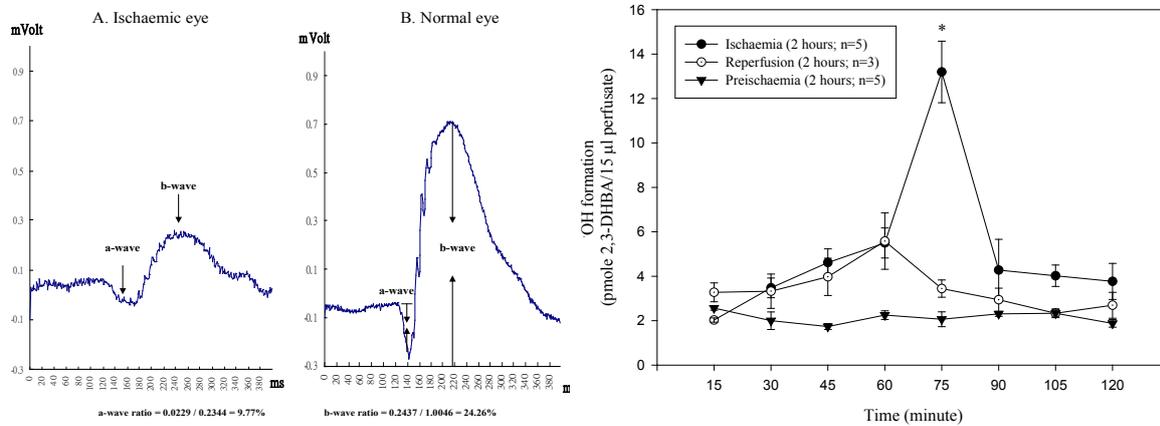


Tetramethylpyrazine

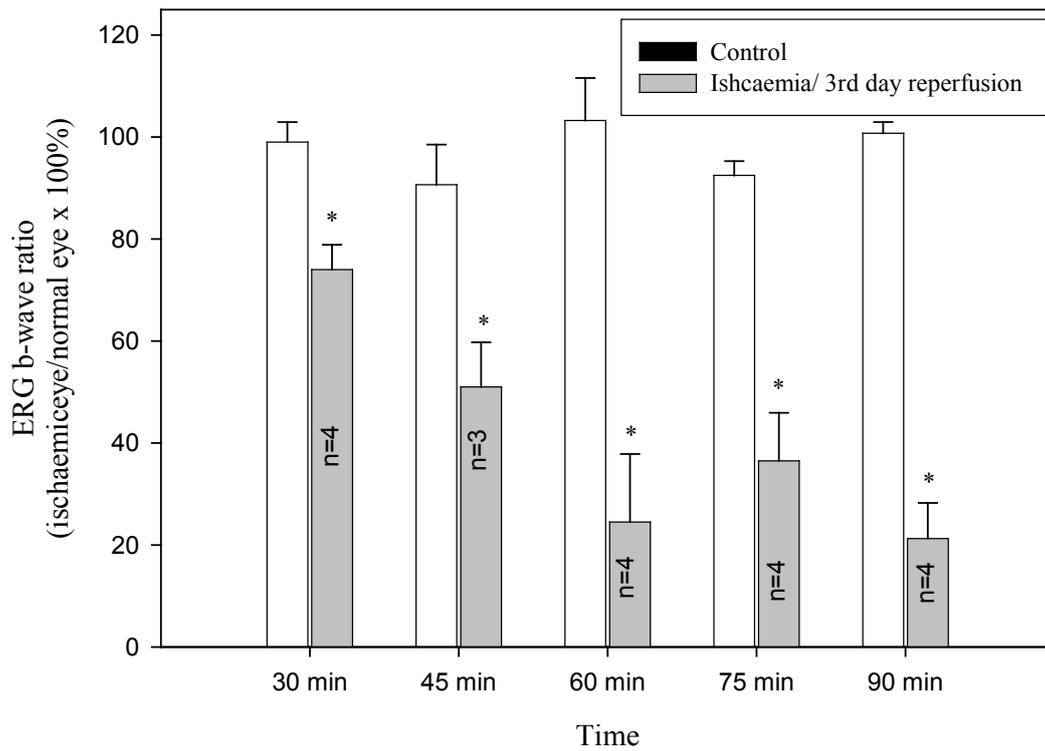


Resveratrol

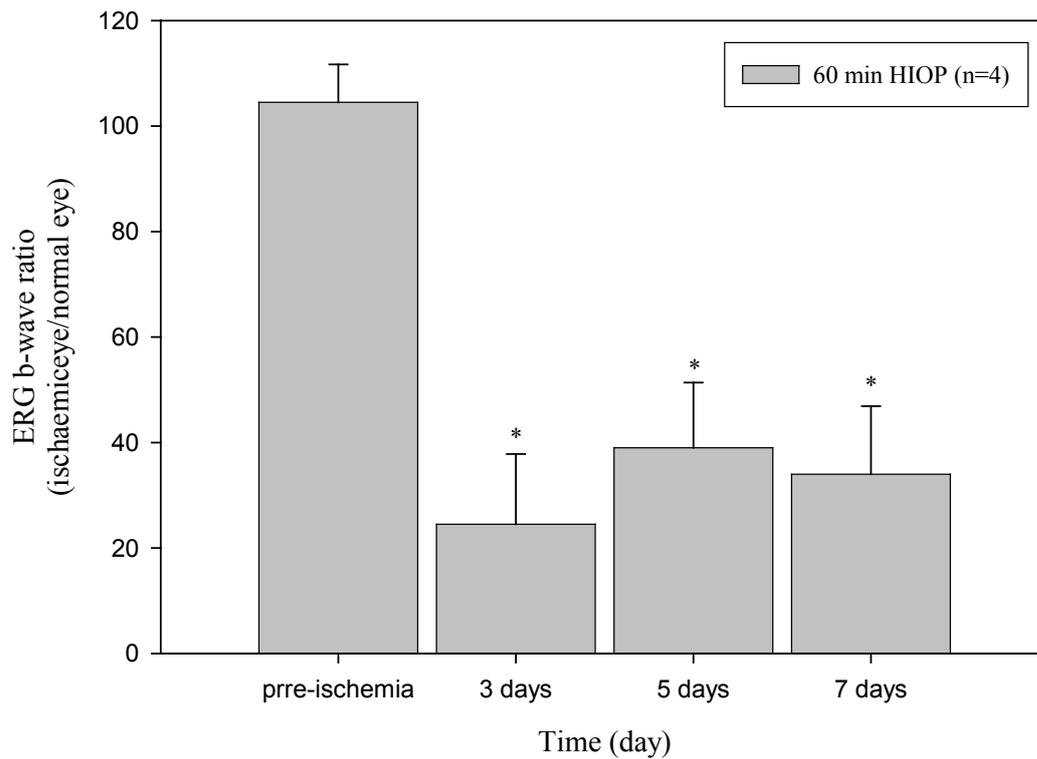
圖一、阿魏酸 (ferulic acid, 分子量為 194.2)、川芎嗪 (tetramethylpyrazine, 分子量為 136.2)、白藜蘆醇 (resveratrol; 3, 4', 5 trihydroxystilbene, 分子量為 228) 的化學結構式。



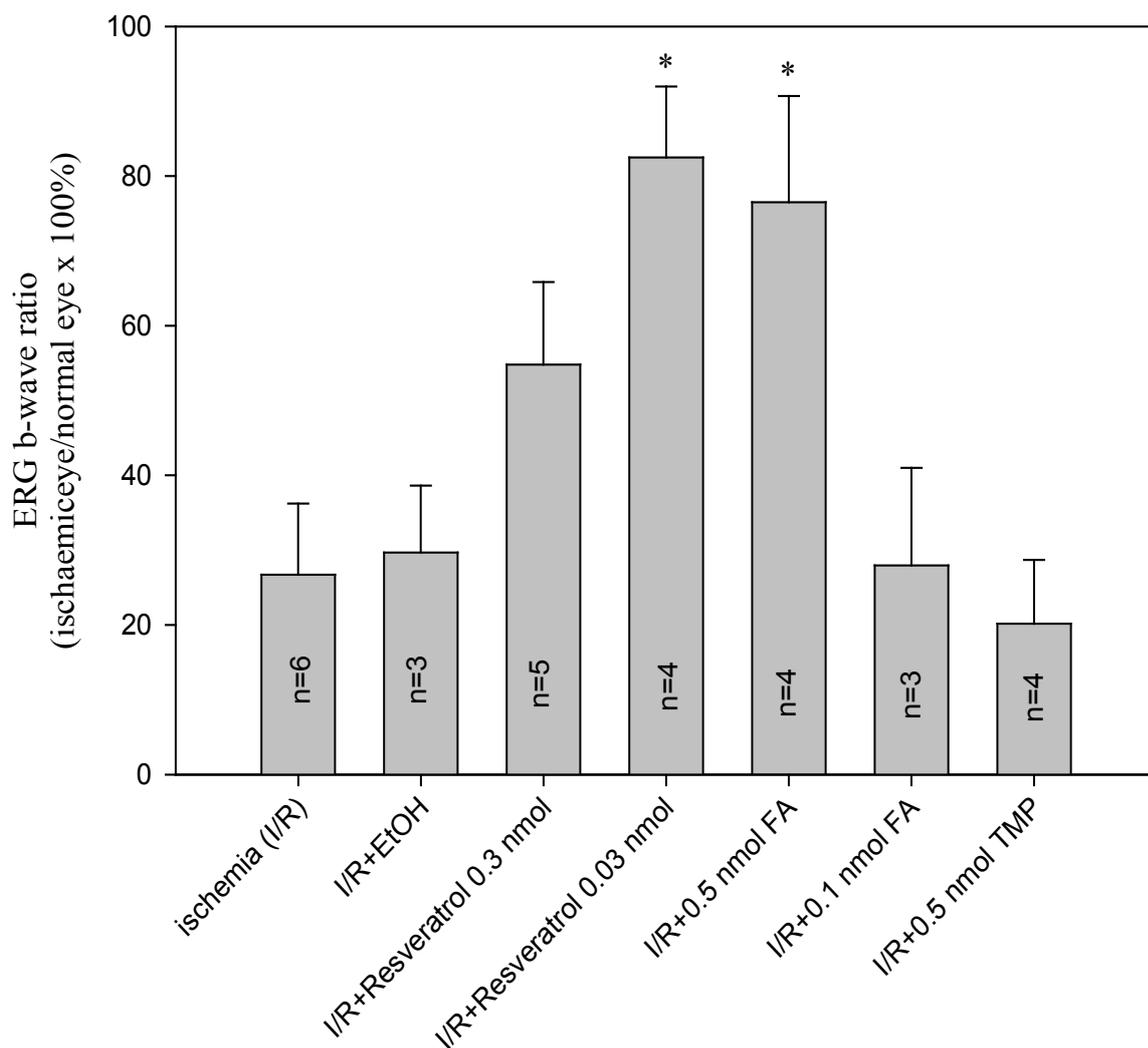
圖二、(A)在 45 分網膜缺血/再灌注三天後，缺血眼之電氣網膜生理圖甲及乙型波(ERG a-wave and b-wave)振幅急遽下降；(B)正常眼之 ERG a-wave and b-wave 振幅；缺血眼比正常眼的比率(a-wave 及 b-wave ratio)分別為 9.77%及 24.26%；(C)毒性氫氧基可以用二氫氧苯酸(2,3-dihydroxybenzoic acid, 2,3-DHBA)來定量，二氫氧苯酸濃度的平均值±標準誤差，動物數目，如插圖所示，用不同濃度的二氫氧苯酸(8-40 pmoles)建構一個標準曲線，用來定量氫氧基的生成，氫氧基取得的方法如前述(見藥物和方法)，每隔 15 分測量毒性氫氧基的產生(缺血前 60 分，2 時缺血，和 2 時灌注)；以缺血前基準線和其他組比較，二氫氧苯酸在缺血或重新灌注後 30 分漸增，分別在缺血 75 分後或灌注 60 分後達最高點；\*代表缺血前與缺血 75 分後之比較，其 *p* 值小於 0.05，統計方式為 unpaired Student's *t*-test。



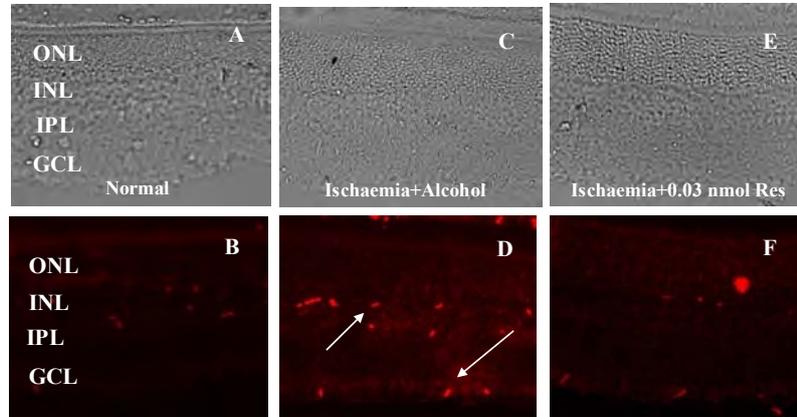
圖三、給予動物不同時間長度的缺血處理再灌流三天時，評估電氣網膜生理圖的變化；各組結果乃為平均值±標準誤差，動物數目如圖示。\*代表缺血前與缺血後再灌流第三天之比較其  $p$  值小於 0.05。統計方式為 unpaired Student's  $t$ -test。



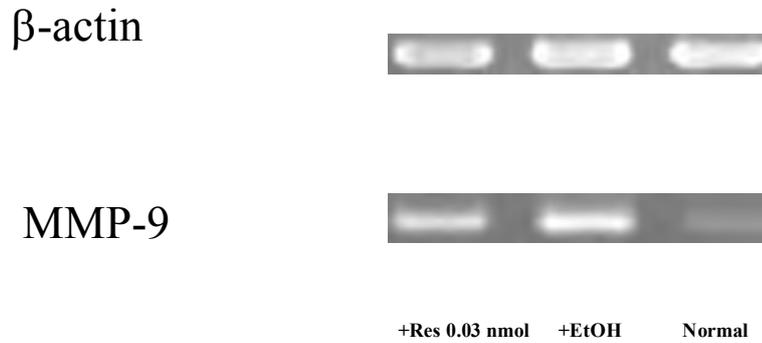
圖四、觀察動物在缺血處理前(pre-ischemia)以及給予 60 分鐘缺血後再灌流第 3, 5, 7 天時電氣網膜生理圖的改變；各組結果乃為平均值±標準誤差，動物數目如圖示。\*代表缺血前與缺血後再灌流第 3, 5 或 7 天之比較，其  $p$  值小於 0.05。統計方式為 unpaired Student's  $t$ -test。



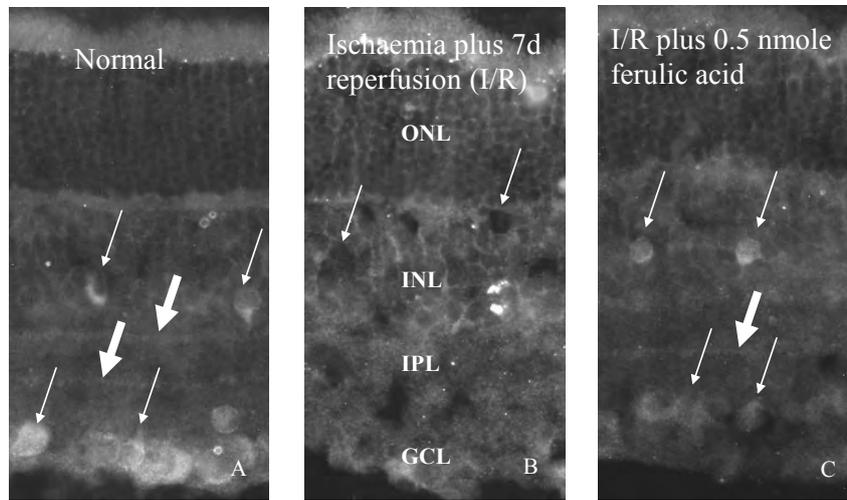
圖五、預處理各種治療組，在給予 60 分鐘缺血處理後再灌流第 7 天時與只作缺血處理動物比較，電氣網膜生理圖乙型波比率(ERG b-wave ratio)的變化；給予水〔(阿魏酸 (ferulic acid, FA) 或川芎素 (tetramethylpyrazine, TMP) 的溶劑, vehicle for FA and TMP)〕處理，並不會顯著影響缺血後下降的乙型波振幅(數據未附)；給予 0.5 nmol 阿魏酸或 0.03 nmol 白藜蘆醇處理，顯著緩解因缺血下降之 b-wave ratio；各組結果乃為平均值±標準誤差，動物數目如圖示。\*代表缺血後給予各種治療處理與不給予治療處理的缺血組之比較，其 *p* 值小於 0.05。統計方式為 unpaired Student's *t*-test；縮寫：乙醇 (EtOH，白藜蘆醇溶劑, vehicle for resveratrol)。



圖六、預處理各種治療組，在給予 60 分鐘缺血處理後再灌流第 7 天時，基質金屬蛋白酶第九型在視網膜中的免疫螢光反應之變化；B 為正常視網膜；D 缺血眼預處理 25%乙醇（溶劑；未給溶劑之缺血組結果類似，圖未附）；F 為缺血眼預處理 0.03 nmol 白藜蘆醇(Res, resveratrol)；A, C, E 分別是對應的相比影像；縮寫：外核層(outer nuclear layer, ONL)；內核層(inner nuclear layer, INL)；內網層(inner plexiform layer, IPL)；神經節細胞層(ganglion cell layer, GCL)。



圖七、預處理各種治療組，在給予 60 分鐘缺血後再灌流，基質金屬蛋白酶第九型(matrix metalloproteinases, MMP-9) mRNA 在視網膜中的變化；給予乙醇組（未給溶劑乙醇之缺血組結果類似，結果未附），增加 MMP-9 mRNA 的表現量；與給予乙醇組比較，給予白藜蘆醇能緩解缺血增加的 MMP-9 mRNA 表現量；而正常組 MMP-9 mRNA 表現太低，無法定量；此代表結果選自各組三隻獨立動物中之一； $\beta$ -actin 為管家基因(house-keeping gene)。

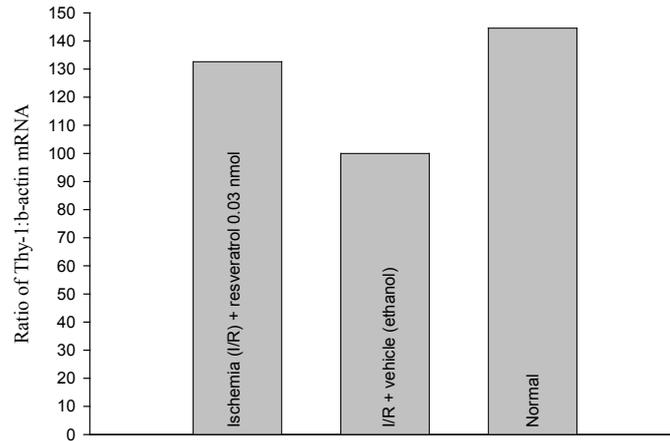


圖八、預處理各種治療組，在給予 60 分鐘缺血處理後再灌流第 7 天時，乙酰膽鹼轉化酶 (ChAT; amacrine 細胞標記) 在視網膜中的免疫螢光反應之變化；A 為正常視網膜：amacrine 細胞之神經纖維在內網層 (inner plexiform layer, IPL) 排列成兩個帶狀 (粗箭)，IPL 兩側可見細胞本體 (細箭)；B 缺血眼預處理水 (溶劑；未給溶劑之缺血組結果類似，圖未附)，前述特徵消失；C 為缺血眼預處理 0.5 nmol 阿魏酸，免疫螢光反應似於正常視網膜；縮寫：外核層 (outer nuclear layer, ONL)；內核層 (inner nuclear layer, INL)；神經節細胞層 (ganglion cell layer, GCL)。

$\beta$ -actin

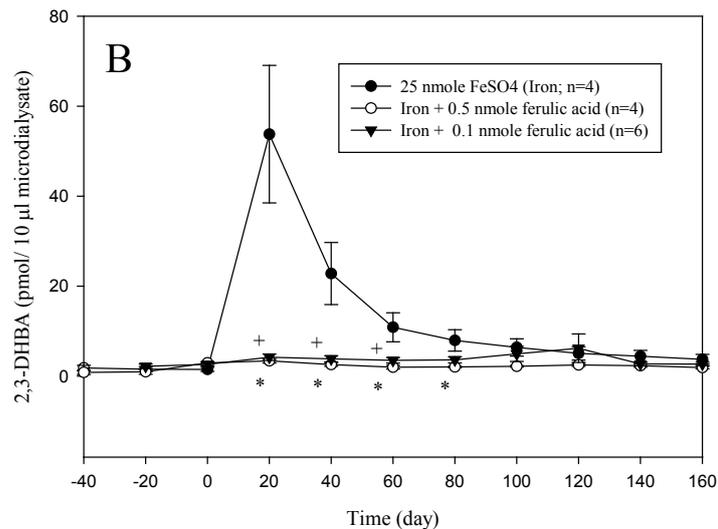
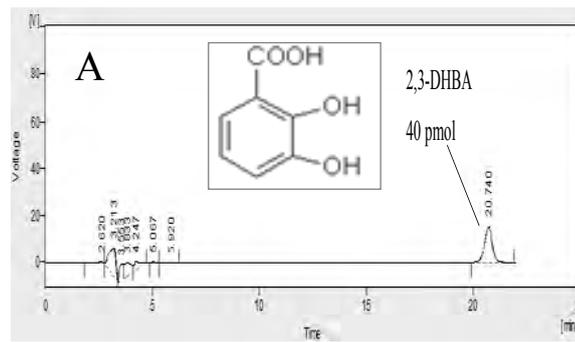


Thy-1



圖九、預處理各種治療組，在給予 60 分鐘缺血後再灌流，在視網膜中 Thy-1 mRNA（網膜神經節細胞標記）的變化；相較於正常視網膜，給予乙醇組（未給溶劑乙醇之缺血組結果類似，圖表未附），減少 Thy-1 mRNA 的表現量；與給予乙醇組比較，給予白藜蘆醇後，能緩解缺血減少 Thy-1 mRNA 的表現量；此代表結果選自各組三隻獨立動物中之一。

各組代表影像強度量化(densometry)而來之數值(Thy-1： $\beta$ -actin 之比率)作圖； $\beta$ -actin 為管家基因(house-keeping gene)。



圖十、毒性氫氧基可以用二氫氧苯酸(2,3-dihydroxybenzoic acid, 2,3-DHBA)來定量(指標所指波峰來自:A、40 pmole 2,3-DHBA); 2,3-DHBA濃度的平均值±標準誤差,動物數目,如插圖所示;每隔20分鐘測量氫氧基的產生(給予表列藥前40分鐘,以及給藥後160分鐘);與給予25 nmole FeSO<sub>4</sub>組比較:加0.5(\*)或0.1 nmole FA(†)明顯地減少25 nmole 硫酸亞鐵(FeSO<sub>4</sub>)誘導增產之氫氧基的總量(0.5 nmole FA效強);\*,†代表然率小於0.05,有顯著差異,統計方式為unpaired Student's *t*-test;縮寫:阿魏酸(ferulic acid, FA)。

# 新型艾灸排煙通風器對 中醫醫療院所室內空氣品質改善之研究

蔡德豐

臺北市立聯合醫院忠孝院區中醫科

## 摘要

### 研究目的：

艾葉中含有揮發油，尤其新製艾絨，所含揮發油較多，灸時常有火力過強，病者灼痛感較大；而陳艾，其油質揮發殆盡，質更柔軟，灸之火力較柔和，痛苦較少。經驗中以新艾來灸氣喘病患，常易使病人聞其氣味而氣喘突然發作，而陳艾較則較少發生，但此時所產生的空氣中細小懸浮顆粒仍是有許多，仍然會對室內空氣品質產生影響

### 研究方法：

1. 室內空氣品質問卷調查
2. 艾絨燃燒後之空氣品質分析
3. 艾絨燃燒後之健康風險評估
4. 新型「艾灸排煙通風器」之效能分析

### 結果與討論：

新艾絨燃燒後之空氣粗微粒(PM<sub>10</sub>)的個別毒物危害指數(HI 值)高達 20.16，其次空氣細微粒(PM<sub>2.5</sub>)之 HI 值亦高達 5.31，均高於正常值 1 表示會對健康會造成一定的風險。然而新型「艾灸排煙通風器」使用後除了可有效降低 PM<sub>2.5</sub> 濃度之外，其 HI 指數也小於 1，而 PM<sub>10</sub> 的 HI 值也降低到 1.5，表示新型排煙器的使用可有效降作操作人員的健康風險。故建議中醫醫療場所視其艾灸的使用量加裝「艾灸排煙通風器」以改善操作人員的健康。

關鍵詞：艾灸、室內空氣品質、懸浮微粒、危害指數

# **The Study of New Type Moxibustion Ventilator to Improve Traditional Chinese Medicine Hospital Indoor Air Quality (IAQ)**

Tsai , Te- Feng  
Taipei City Hospital Zhongxiao Branch

## **ABSTRACT**

### **Aim:**

Moxa includes the volatile oil, especially newly made moxa which contains more volatile oil .When burning , its fire is often excessively strong, which makes patients suffer. Comparatively, old moxa, which contains less volatile oil and softer, and its fire is more gentle, the pain is less. In our experience, using newly made moxa on the patients of asthma can generate the smoke which easily cause the asthma patients to break out. But the old moxa seldom happens. However, it still has many tiny suspended particle in the air, and affects the indoor air quality.

### **Method:**

1. Indoor air quality questionnaire survey.
2. Air quality analysis after burning moxa.
3. After burning the moxa , we carried on the health risk appraisal.
4. Analysis the effects of the “new moxibustion ventilator”.

### **Results & Discussion:**

After burning new moxa, the Hazard index (HI) of the thick air particle (PM10) is up to 20.16, and the HI of the small air particle (PM2.5) is up to 5.31. They are both higher than the normal value 1, which indicate that they will cause risk to health. However after one uses the new type of “moxa ventilated machine”, the density of PM2.5 is effectively reduced, the HI index is smaller than 1, and the HI of the PM10 is low to 1.5, which indicate the machine can effectively decline the risk to operators’ health. We suggest the Chinese medical hospital to use the machine to improve the health of operators.

Keywords: moxibustion, indoor air quality, suspended particle, Hazard index

## 壹、前言

### 一、政策或法令依據：

環保署為有效推動我國室內空氣品質管制工作，於 95/08/31 提出「室內空氣品質管理法草案」，公告之場所以公眾得出入之場所為原則，包括表演廳、禮堂、展覽館及會議廳（室）；室內體育館及游泳池；托兒所、幼稚園；圖書室、教室及實驗室；醫療機構、護理機構、其他醫事機構及殘障福利機構。

### 二、問題狀況或發展需求：

(一)火的熱力透入肌膚，疏通經絡的作用，用以溫通氣血，達到治病和保健的目的：

在針灸學的領域中，以灸療法的方式極為多樣。灸的起源很早，在內經之前已有灸的存在，如：孟子離婁篇：『七年之疾，求三年之艾。』，靈樞官針篇：『針所不為，灸之所宜。』。灸法，主要是以艾絨放置在體表的穴位上燒灼、溫熨。借灸火的熱力透入肌膚，通過經絡的作用，以溫通氣血，達到治病和保健目的的一種外治方法。臨床上，對於虛寒和陽氣衰弱的病症，單純施用針法，效果就不及灸治顯著。因此，灸法的適應範圍一般以陰症及慢性久病為主，也用於一些急性陽氣虛脫的病症。

(二)醫療環境室內空氣品質改善須與各權責機關權責互相配合：

每人每天約 80%至 90%的時間處於室內的環境中，因此室內空氣品質之良窳，會直接影響工作品質及效率，使得室內空氣污染物對人體健康影響受到重視。因此有效改善室內空氣品質，方可促進環境管理及人體健康。然而醫療環境室內空氣品質改善須從室內之通風換氣、室內裝修與使用材料、建築整體規劃設計與使用維護管理等方面著手，因涉及環保署、衛生署、內政部營建署等機關權責，故在「室內空氣品質管理法草案」已針對各相關部會所應負權責加以明訂，並要求權責事業主管機關應輔導所轄公私場所改善室內空氣品質，使推動工作依法有據。

(三)室內二手「灸」味對中醫醫療品質之影響：

郝道猛、鐘傑（83年，中醫藥委員會研究計畫）針對有煙灸與無煙灸來治療實驗性腫瘤的研究，研究結果顯示，有煙灸的療效比無煙灸者為佳。此研究所認定的有煙灸為艾柱灸、香柱灸；

無煙灸為紅外線灸及艾膏紅外線灸，但此實驗的無煙灸只單純為紅外線的熱刺激，而無經過艾條燃燒的過程。本實驗乃是針對艾條燃燒過程並使用艾灸吸煙器，評估其空氣品質改善度。

吸煙危害健康是眾所周知的，各式各樣來自政府、公益團體、社團與醫療研究的禁煙訴求不斷地出現在各種的體場合，甚至現在也有法律來規範煙害防治，二手煙對於人體器官的殘害，在最近幾十年當中可以看出有許多的研究報告，它們顯示非自願地吸入二手煙，對身體健康的危害，並不亞於自己吸煙，而此結果不管是成人或兒童都有類似的情形。

艾葉中含有揮發油，尤其新製艾絨，所含揮發油較多，灸時常有火力過強，病者灼痛感較大；而陳艾，其油質揮發殆盡，質更柔軟，灸之火力較柔和，痛苦較少。經驗中以新艾來灸氣喘病患，常易使病人聞其氣味而氣喘突然發作，而陳艾較則較少發生，但空氣中的細小懸浮顆粒仍是有許多，仍然會對周圍空氣品質產生影響。

長期以來，當我們進入中醫療院所常會聞到一股中藥味，尤其當醫院正在燃燒艾灸的二手「灸」味時，則室內空氣品質更為惡劣，即使此時有加裝一般抽風設備，經驗上仍是效果不彰。

### 三、本計畫與醫療保健之相關性等。

如何提昇醫療品質是目前醫界極為重視之課題，醫院評鑑亦以醫療品質為審查之重點，當 95/08/31「室內空氣品質管理法草案」出現後，中醫醫療場所之醫療品質之問題一定會浮現，且無法避免會被提出來檢討，而不是一句「艾灸對人體是健康」可逃避的，因此目前本醫院中醫科自行研發新型「艾灸排煙通風器」對中醫醫療院所室內空氣品質可達到改善之效果。本試驗證實效果良好且來院民眾之滿意度調查亦均非常良好，甚至不覺得有艾灸之氣味出現。

## 貳、材料與方法

### 一、材料：

#### (一)本試驗選用之艾葉

1. 新艾及陳艾均採用目前市面上使用量較大且同來源供應商的同一種艾葉。
2. 基源：艾葉 *Artemisia vulgaris* L.。
3. 產地：湖北湖南山區。
4. 陳艾：同一來源艾葉放置七年。

#### (二)環境空氣品質測量儀器之選用

1. KD Airboxx：可量測 O<sub>3</sub>、SO<sub>2</sub>、CO、CO<sub>2</sub>、TVOC、溫度及相對濕度。
2. AEROCET 531：可量測 PM<sub>1.0</sub>、PM<sub>2.5</sub>、PM<sub>7.0</sub>、PM<sub>10</sub>、TSP。
3. PPM Formaldemeter htv：可量測甲醛。

### 二、方法：

#### (一)樣品灰化後之成份分析

測試前將附有蓋子之坩鍋洗淨後，置於高溫爐中，以 1200°C 空燒 30 分鐘。空燒後降低爐溫至 300°C 時，將坩鍋移至乾燥器冷卻備用，使用前稱重。

#### (二)樣品水分、灰分及可燃分之測定

##### 1. 樣品水分之測定

(1)稱取適量之經粉碎後艾葉樣品(粒徑 1 mm 以下，精稱至 0.001 g) 約 5 至 10 g (W1)，置於上述已稱重之坩鍋中，以 105±5 °C 之烘箱乾燥 2 小時，取出移入乾燥器，冷卻至室溫，精稱 (W2)。

(2)重複以上步驟，直至前後兩次重量差小於 0.005 g 為止。

##### 2. 樣品灰分之測定

(1)將經步驟(二)- 2.之樣品及坩鍋置於 800±50°C 之高溫爐中加熱燃燒 3 小時。

(2)降低爐溫至 300°C 時，將坩鍋及樣品移入乾燥器中冷卻至室溫，精稱 (W3)。

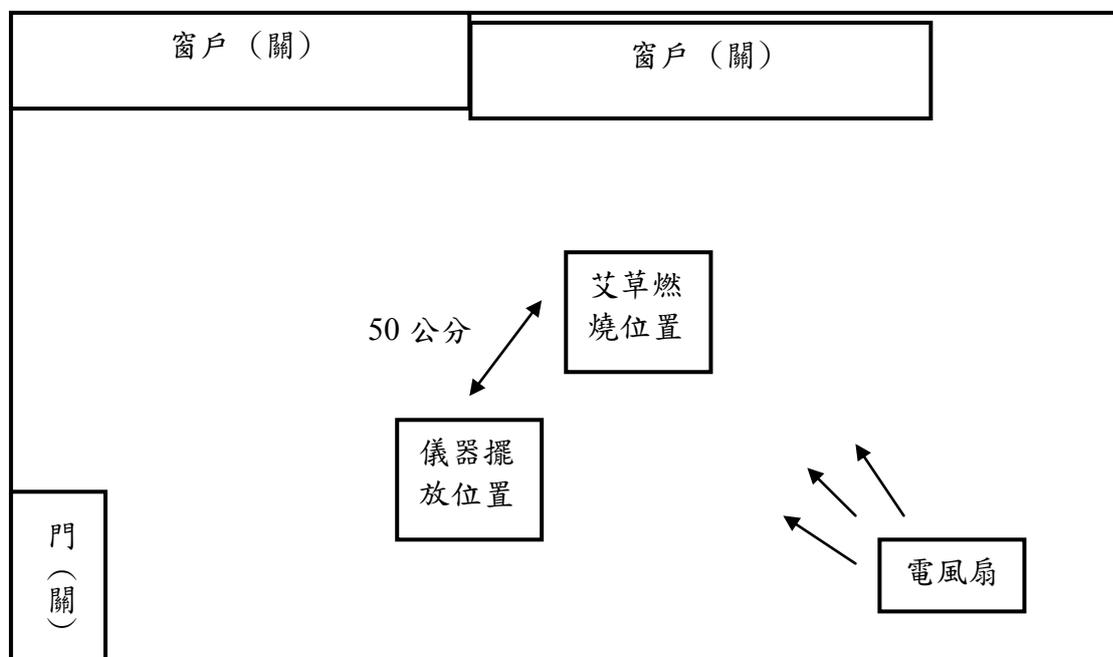
##### 3. 樣品可燃分之測定

樣品之可燃分不直接測定，而由樣品總重量減去水分和灰

分而得之。

### (三)新舊艾草燃燒產生污染物之比較

本實驗將新舊艾草在密閉室內（10.5 公尺×5.25 公尺×3 公尺）燃燒 15 分鐘，比較各自產生的污染物濃度，以下為實驗配置圖。



### (四)新型與一般艾灸排煙器在距離燃艾不同高度下懸浮微粒濃度的比較

本實驗分別使用新型艾灸排煙器與一般抽風機，在未燃艾前及燃艾後排煙器距離燃艾 15cm、25cm、35cm 等位置測量 PM<sub>10</sub> 濃度。

### (五)氣相層析質譜儀(GC-MASS)之測量

#### 1. 檢測目的

瞭解新艾及舊艾燃燒時，廢氣中產生之有機揮發成份，並探討其中揮發性有機成份對人體健康之危害，以提供及改善使用人員暴露於揮發性有害空氣污染物之參考。

#### 2. 檢測方法

分析新艾及舊艾燃燒時產生之廢氣，並分析燃燒廢氣中產生之有機揮發成份。首先，以零污染之試管採集艾燃燒產生之廢氣，再以氣相層析質譜儀 GC/MS 進行廢氣中有機揮發成份之定性分析。新、舊艾燃燒廢氣之有機揮發成份定性流程，如圖

2.1。相關有機揮發成份定性分析儀及操作條件如下:

(1) 分析儀器：

- a. 氣相層析儀 (gas chromatography)：6890N，Agilent Technologies 公司，美國。
- b. 質譜儀 (mass spectrometry detector)：5973N，Agilent Technologies 公司，美國。
- c. 分析管柱(column)：AB-624，管長 60m，內徑 0.25mm，薄膜厚度 1.4 $\mu$ m，可承受溫度範圍：-20~260 $^{\circ}$ C。

(2) 氣相層析儀操作條件:

- a. 攜行氣體為高純氮氣，流速1ml/min。
- b. 注入口溫度280 $^{\circ}$ C。
- c. 升溫程式：初溫35 $^{\circ}$ C以每分鐘上升15 $^{\circ}$ C，至220 $^{\circ}$ C。

(3) Oven Temp Program：

<b>Ramp</b>	<b><math>^{\circ}</math>C/min</b>	<b>Next<math>^{\circ}</math>C</b>	<b>Hold(min)</b>	<b>Runtime(min)</b>
<b>Initial</b>		35	5.00	4
<b>Ramp1</b>	15.00	220	7.00	21.33

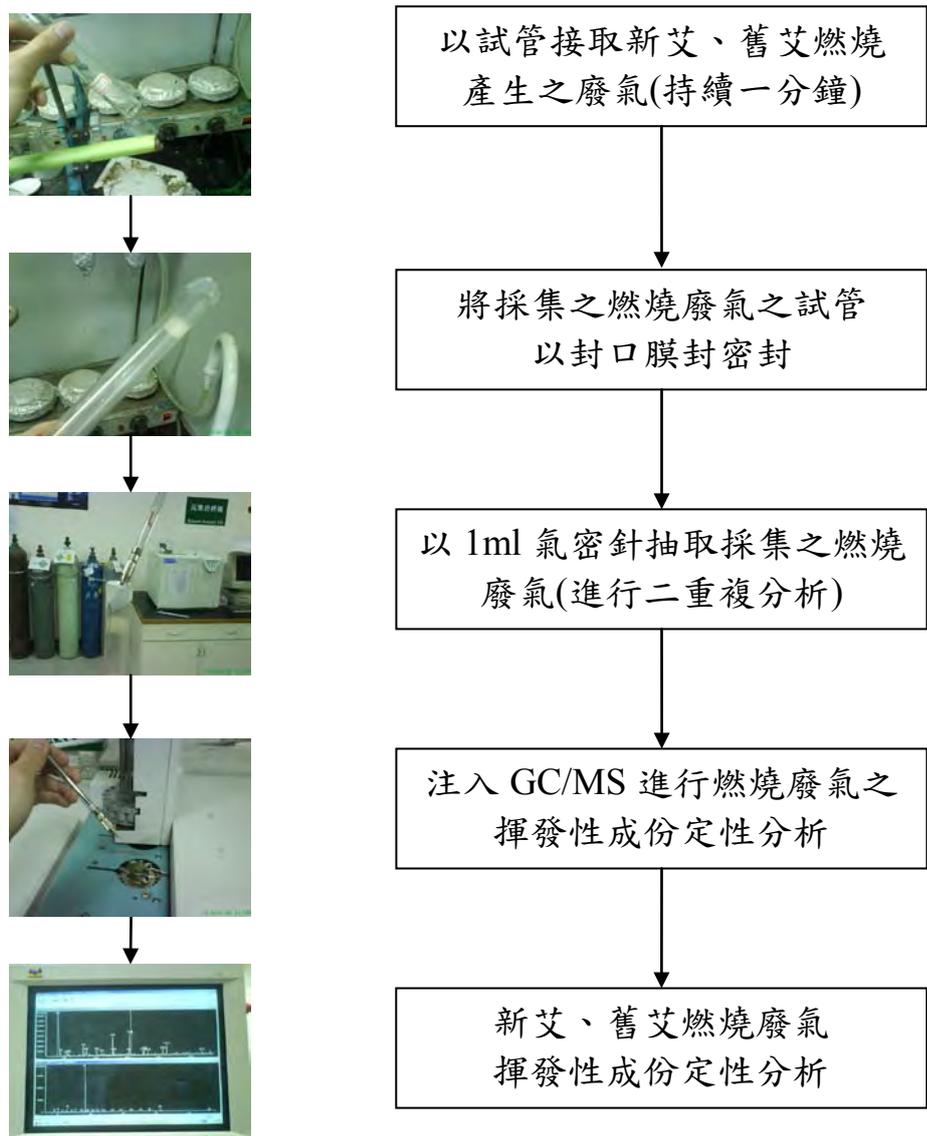


圖 2.1 新、舊艾燃燒廢氣之有機揮發成份定性流程

## 參、結果

### 一、新舊艾草三成份（水分、灰份、可燃份）

	水分%	揮發份%	固定碳%	灰份%	可燃份%
新艾草(1)	5.9	63.47	10.97	19.64	74.45
新艾草(2)	5.83	62.99	11.67	19.49	74.67
新艾草(3)	5.95	65.76	8.81	19.46	74.58
新艾草(4)	10.41	66.6	9.03	13.94	75.64
平均值 (標準差)	5.89(2.25)	64.07(1.74)	10.49(1.42)	19.53(2.80)	74.56(0.54)
舊艾草(1)	9.08	69.99	13.12	7.81	83.1
舊艾草(2)	11.58	80.29	3.49	4.62	83.79
舊艾草(3)	12.43	74.16	9.57	3.82	83.74
舊艾草(4)	9.1	77.35	5.57	7.96	82.93
平均值 (標準差)	10.55(1.72)	75.44(4.41)	7.94(4.27)	6.05(2.14)	83.39(0.44)

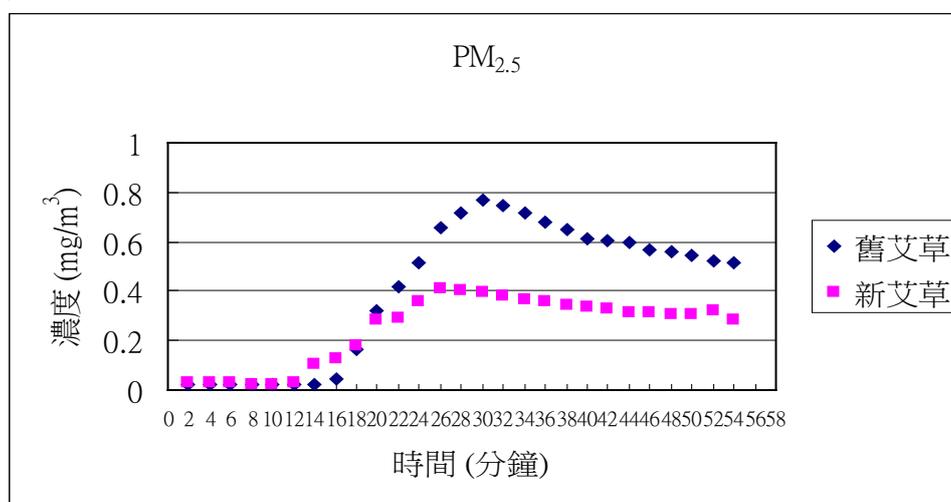
結果：

初步比較的結果新艾草的灰份較多，而舊艾草所含的水分較多。

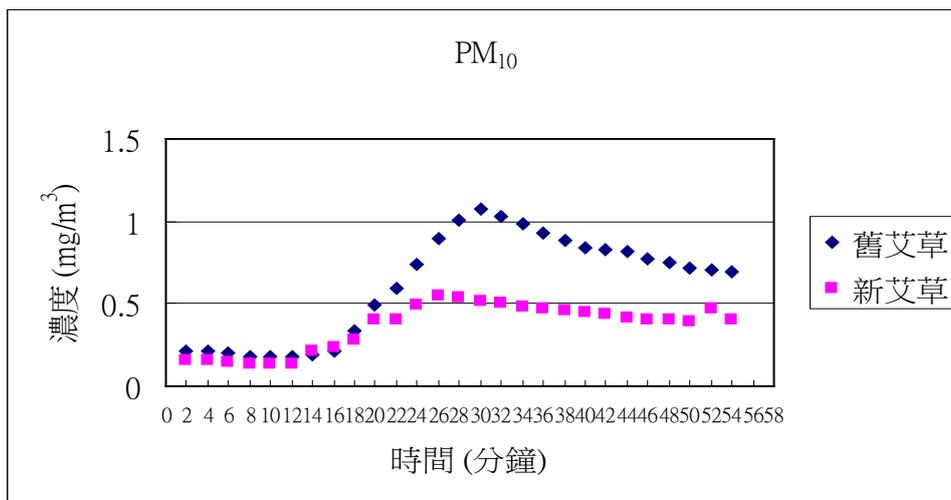
### 二、新舊艾草燃燒濃度比較圖：

雖然空氣中的懸浮微粒濃度是舊艾大於新艾，但是艾草中燒燒後易揮發性有機酸則是新艾遠大於舊艾。

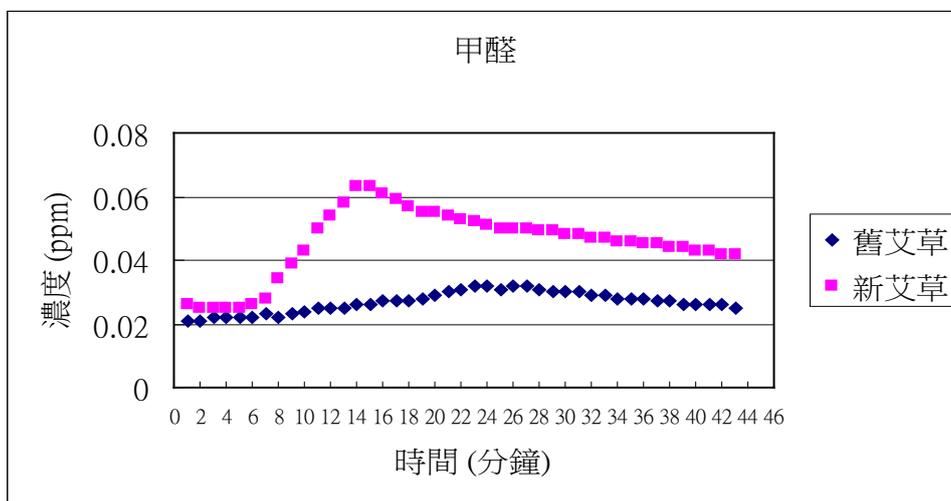
#### (一) PM<sub>2.5</sub> 濃度比較圖：



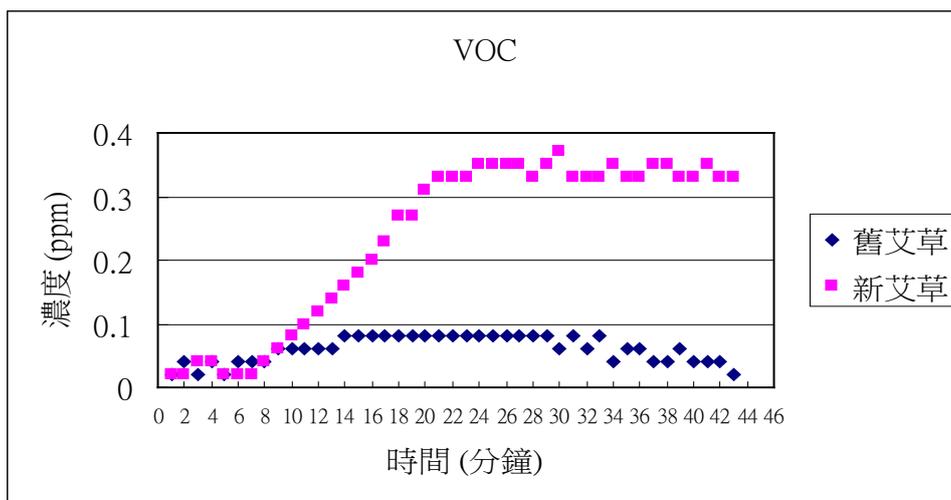
(二) PM10 濃度比較圖：



(三) 甲醛濃度比較圖：

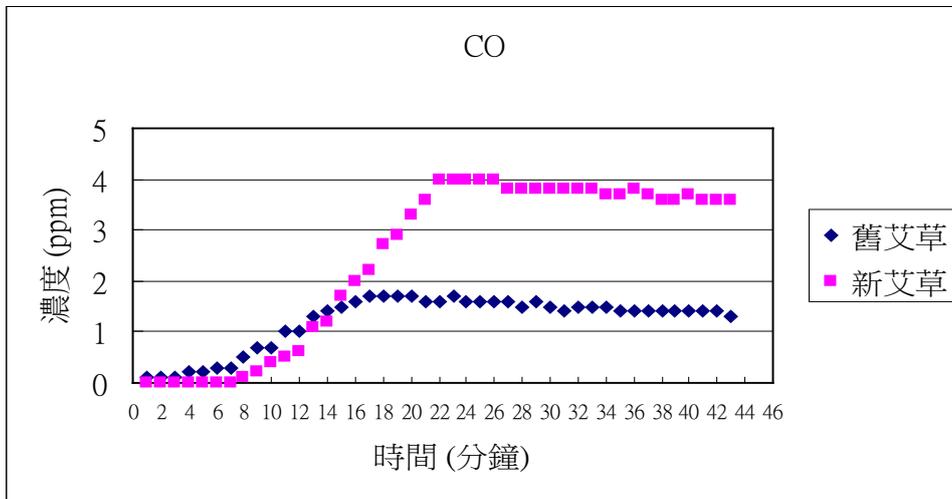


(四) 揮發性有機物濃度比較圖：

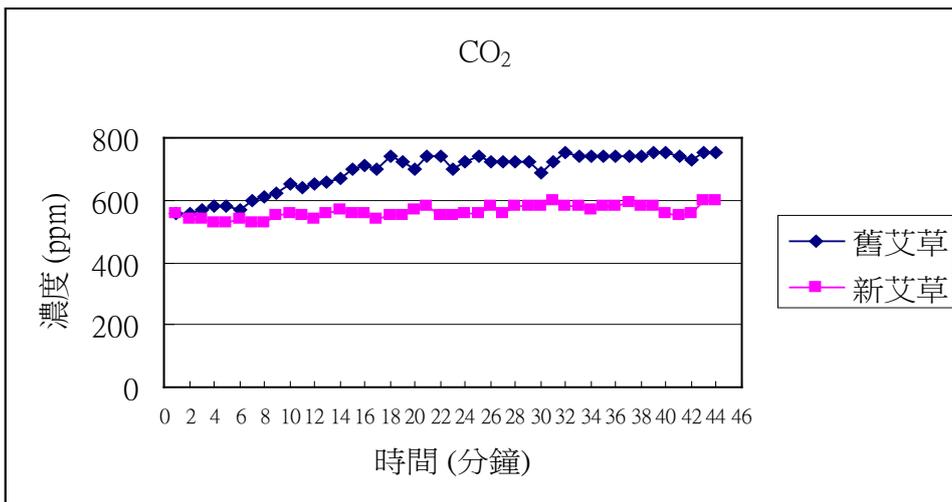


(五) 一氧化碳濃度比較圖：

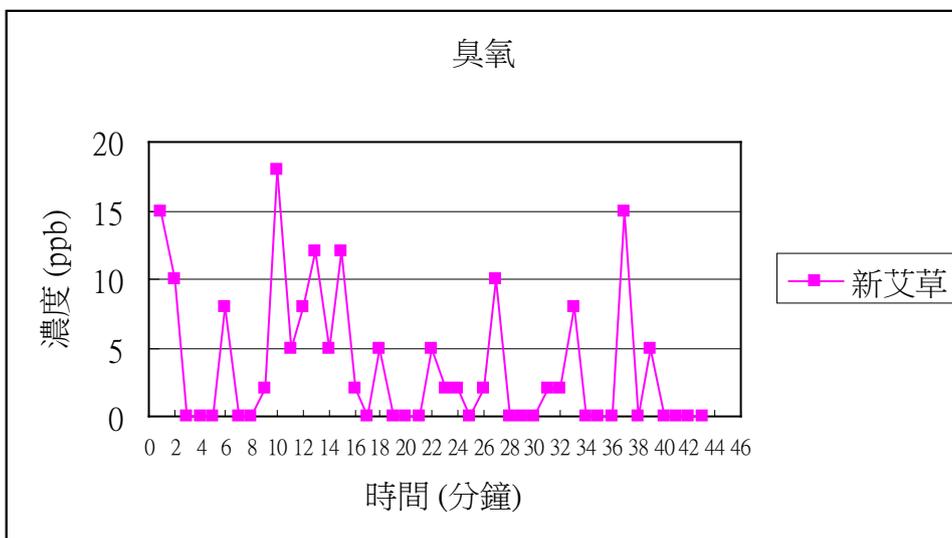
由於舊艾其灰燼少燃燒氧化較完全，故燃艾時在空氣中 CO 量少，CO<sub>2</sub> 量多。



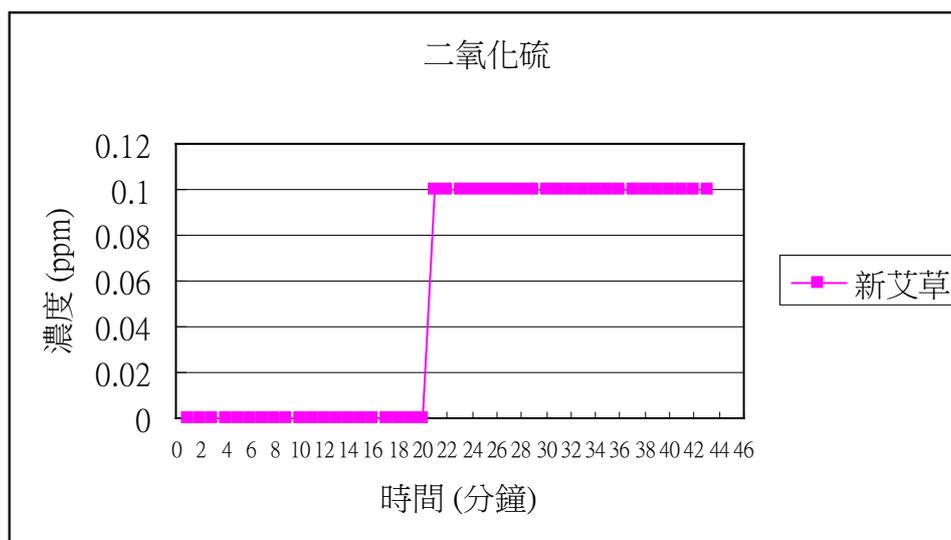
(六) 二氧化碳濃度比較圖：



(七) 新艾草燃燒臭氧濃度圖：



(八) 新艾草燃燒二氧化硫濃度圖：



燃燒舊艾草後，空氣中的臭氧量及 SO<sub>2</sub> 可能因存放過久而無法測得。

三、新舊艾草燃燒濃度比較表

	燃燒 10 分鐘	停止燃燒 5 分鐘	停止燃燒 25 分鐘
舊 (PM2.5)	415 µg/m <sup>3</sup>	749 µg/m <sup>3</sup>	524 µg/m <sup>3</sup>
新 (PM2.5)	288 µg/m <sup>3</sup>	379 µg/m <sup>3</sup>	320 µg/m <sup>3</sup>
舊 (PM 10)	595 µg/m <sup>3</sup>	1032 µg/m <sup>3</sup>	702 µg/m <sup>3</sup>
新 (PM 10)	408 µg/m <sup>3</sup>	499 µg/m <sup>3</sup>	467 µg/m <sup>3</sup>
舊 (甲醛)	0.026 ppm	0.031 ppm	0.025 ppm
新 (甲醛)	0.063 ppm	0.05 ppm	0.042 ppm
舊 (揮發性有機物)	0.08 ppm	0.08 ppm	0.02 ppm
新 (揮發性有機物)	0.18 ppm	0.35 ppm	0.33 ppm
舊 (一氧化碳)	1.5 ppm	1.6 ppm	1.3 ppm
新 (一氧化碳)	1.7 ppm	4 ppm	3.6 ppm
舊 (二氧化碳)	740 ppm	720 ppm	770 ppm
新 (二氧化碳)	540 ppm	560 ppm	580 ppm
舊 (臭氧)	0 ppb	0 ppb	0 ppb
新 (臭氧)	7 ppb	1.6 ppb	2.3 ppb

結論：

新艾草	舊艾草
甲醛濃度較高	PM 濃度較高
揮發性有機物濃度較高	
一氧化碳濃度較高	

#### 四、診間抽風機效率

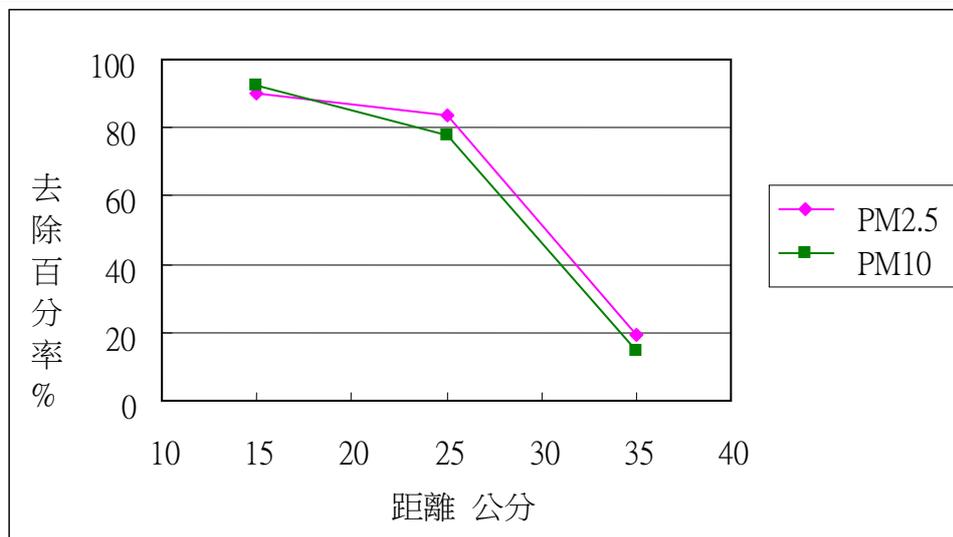
新型艾灸排煙抽風機與艾灸的距離	$\mu\text{g}/\text{m}^3$	
	PM <sub>2.5</sub>	PM <sub>10</sub>
背景值	48	78
15 cm	54	90
25 cm	89	265
35 cm	429	1030
無抽風機	531	1210

根據行政院環保署公告，室內空氣品質建議值 PM<sub>10</sub> 濃度  $60\mu\text{g}/\text{m}^3$ ，PM<sub>2.5</sub> 建議值  $100\mu\text{g}/\text{m}^3$ 。

由上表可知，在抽風機與艾灸相距 15cm 的距離內仍可維持空氣懸浮微粒濃度低於安全值。

新型艾灸排煙抽風機去除 PM 效率：

抽風機與艾灸的距離	百分比	
	PM <sub>2.5</sub>	PM <sub>10</sub>
背景值	78	-
15 cm	89.78 %	98.90 %
25 cm	83.69 %	83.40 %
35 cm	19.20 %	15.90 %
無抽風機	-	-



一般抽風機去除 PM 效率：

$\mu\text{g}/\text{m}^3$	PM <sub>10</sub>	去除率
空白	52.09	-
15 cm	443.57	21.13 %
25 cm	518.85	7.75 %
50 cm	542.14	3.61 %
無抽風機	562.42	-

結論：

醫院屬於第一類場所背景 PM<sub>10</sub> 建議值 60  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ，PM<sub>2.5</sub> 建議值 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ，當抽風機高度小於 25 cm 時 PM<sub>2.5</sub> 的濃度符合建議值。

當抽風機高度小於 15 cm 時 PM<sub>2.5</sub> 濃度：46~54 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ；PM<sub>10</sub> 濃度：90~93 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 。

與一般抽風機比較，新型艾灸排煙抽風機在與燃艾距離 25 cm 時去除率為 83.40 %；而一般抽風機則為 7.75 %。

綜合以上所述，故建議高度距離為 15-25cm 之間。

## 五、氣相層析質譜儀(GC-MASS)之測量

(一)本研究首先採集新艾、舊艾燃燒時產生之廢氣，再以氣相層析質譜儀 GC/MS 進行廢氣中有機揮發成份定性分析。新、舊艾燃燒廢氣中之有機揮發成份定性分析結果如下：

### 1. 舊艾燃燒廢氣之有機揮發成份定性分析結果：

舊艾燃燒廢氣之有機揮發成份重複定性分析結果，包括：p-Xylene (對-二甲苯)、Toluene (甲苯)、Benzene (苯)、Ethyl-benzene (乙苯)、Styrene (苯乙烯)、1-Decene (癸烯)、D-Limonene (右旋-檸檬烯)、Phenol (酚)、及 1-Heptene (庚烯)等之物種。舊艾燃燒廢氣之有機揮發成份重複定性分析結果，如表 1。

表 1、舊艾燃燒廢氣之有機揮發成份定性分析結果

第一次分析		第二次分析		第三次分析	
Compound	Name	Compound	Name	Compound	Name
p-Xylene	對-二甲苯	p-Xylene	對-二甲苯	p-Xylene	對-二甲苯
Toluene	甲苯	Toluene	甲苯	Toluene	甲苯
Benzene	苯	Benzene	苯	Benzene	苯
Ethyl-benzene	乙苯	Ethyl-benzene	乙苯	Ethylbenzene	乙苯
Styrene	苯乙烯	Styrene	苯乙烯	Styrene	苯乙烯
1-Decene	癸烯	1-Decene	癸烯	D-Limonene	右旋-檸檬烯
D-Limonene	右旋-檸檬烯	D-Limonene	右旋-檸檬烯		
Phenol	酚	Phenol	酚		
1-Heptene	庚烯	1-Heptene	庚烯		
1-Propene,2-methyl-	2-甲基丙烯	1,3-Butadiene, 2-methyl-	2-甲基-1,3-二丁烯	Propene	丙烯
1-Hexene,3-methyl-	3-甲基己烯	1-Octene	辛烯	1-Butene	丁烯
Acetone	丙酮	Pyrrole	吡咯	1,4-Pentadiene	1,4-二戊稀
1-Hexene	己烯	Benzene,1-methyl-3-(1-m ethylethyl)-	3-異丙基甲苯	1-Hexene	己烯
1,4-Pentadiene	1,4-二戊烯				
Pyridine	氮苯(吡啶)				
1-Butyl-2-methylcycloprop ane	1-丁基-2 甲基環丙烷				
Benzene,1-methyl-4-(1-me thylethyl)-	4-異丙基甲苯				

2. 新艾燃燒廢氣之有機揮發成份定性分析結果：

新艾燃燒廢氣之有機揮發成份重複定性分析結果，包括：  
1-Hexene (己烯)、Furan, 2-methyl- (2-甲基呋喃)、Benzene (苯)、  
1-Octene (辛烯)、Toluene (甲苯)、Ethylbenzene (乙苯)、Styrene (苯  
乙烯)、及 Acetone (丙酮)等之物種。新艾燃燒廢氣之有機揮發成  
份重複定性分析結果，如表 2。

表 2、新艾燃燒廢氣之有機揮發成份定性分析結果

第一次分析		第二次分析		第三次分析	
Compound	Name	Compound	Name	Compound	Name
1-Hexene	己烯	p-Xylene	對-二甲苯	Benzene	苯
Furan, 2-methyl-	2-甲基呋喃	Toluene	甲苯	Toluene	甲苯
Benzene	苯	Benzene	苯	D-Limonene	右旋-檸檬烯
1-Octene	辛烯	Ethylbenzene	乙苯	Acetone	丙酮
Toluene	甲苯	Styrene	苯乙烯		
Ethylbenzene	乙苯	D-Limonene	右旋-檸檬烯		
Styrene	苯乙烯				
Acetone	丙酮				
Cyclobutane	環丁烷			Propene	丙烯
1,3-Butadiene, 2-methyl-	2-甲基-1,3-二丁烯	Propene	丙烯	1,4-Pentadiene	1,4-二戊稀
1-Heptene	庚烯	1-Butene	丁烯	Phenol	酚
p-Xylene	對-二甲苯	1,4-Pentadiene	1,4-二戊稀	Indole	吲哚
D-Limonene	右旋-檸檬烯	1-Hexene	己烯		
Phenol	酚				
2-Tetradecene, (E)-	2-十四烯				

註：底色部份為兩次分析皆有出現的產物

### 3. 新、舊艾燃燒廢氣之有機揮發成份定性分析結果比較

新、舊艾燃燒廢氣之有機揮發成份定性分析結果，新艾及舊艾燃燒時，皆會產生之有機揮發成份包括：Benzene（苯）、Ethyl-benzene（乙苯）、Toluene（甲苯）、及Styrene（苯乙烯）。另外，於舊艾燃燒時，產生之有機揮發成份，包括 p-Xylene（對-二甲苯）、1-Decene（癸烯）、D-Limonene（右旋-檸檬烯）、Phenol（酚）、及 1-Heptene（庚烯）；新艾燃燒時，產生之有機揮發成份，包括：1-Hexene（己烯）、Furan, 2-methyl-（2-甲基呋喃）、1-Octene（辛烯）、及 Acetone（丙酮）。新、舊艾燃燒廢氣之有機揮發成份定性分析結果比較，如表 3。

#### 空白實驗

GC-MASS 燃燒廢氣之背景值	
Compound	Name
Cyclotrisiloxane	環四矽氧烷
Cyclotetrasiloxane	環四硅氧烷
Limonene	檸檬烯
Eicosane	二十(碳)烷

表 3、新、舊艾燃燒廢氣之有機揮發成份定性分析結果比較

舊艾燃燒廢氣		新艾燃燒廢氣	
Compound	Name	Compound	Name
Benzene	苯	Benzene	苯
Ethyl-benzene	乙苯	Ethylbenzene	乙苯
Toluene	甲苯	Toluene	甲苯
Styrene	苯乙烯	Styrene	苯乙烯
p-Xylene	對-二甲苯	1-Hexene	己烯
1-Decene	癸烯	Furan, 2-methyl-	2-甲基呋喃
D-Limonene	右旋-檸檬烯	1-Octene	辛烯
Phenol	酚	Acetone	丙酮
1-Heptene	庚烯		

註：底色部份為兩次分析皆有出現的產物

#### 4. 新、舊艾燃燒廢氣之有機揮發成份對人體健康之危害

新、舊艾燃燒廢氣產生之有機揮發成份，包括：Benzene (苯)、Ethyl-benzene (乙苯)、Toluene (甲苯)、及 Styrene (苯乙烯)。Benzene，揮發性大，暴露於空氣中很容易擴散。少量苯也能使人產生睡意、頭昏、心率加快、頭痛、顫抖、意識混亂、神志不清等現象。人吸入大量苯進入體內，會引起急性和慢性苯中毒，對中樞神經系統產生麻痺作用，引起急性中毒。重者會出現頭痛、噁心、嘔吐、神志模糊、知覺喪失、昏迷、抽搐等，嚴重者會因為中樞系統麻痺而死亡，目前已經實驗證明為致癌物質會導致白血病、基因突變。Ethyl-benzene，可引起噁心、頭痛、嘔吐、暈眩、中樞神經系統抑制、疲勞、昏睡。Toluene，對人體相較於苯危害較輕，吸入有害，造成中樞神經系統抑制。蒸氣可能造成頭痛、疲勞、暈眩、眼花、麻木、噁心、精神混亂、動作不協調，食入或嘔吐時可能引起倒吸入肺部。乙苯，也會引起類似的症狀。Styrene，已被認定為可能致癌物及致突變物，高濃度蒸氣下會造成頭痛、噁心、嘔吐等症狀。此外，Styrene 的暴露可能引起耳部毒性而導致聽力的受損。新、舊艾燃燒廢氣之人體健康危害，彙整如表 4。

表 4、新、舊艾燃燒廢氣之有機揮發成份對人體健康之危害

舊艾燃燒廢氣	
Compound	人體健康危害
Benzene 苯 (揮發性大)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 對中樞神經系統產生麻痺作用，引起急性中毒。</li> <li>2. 少量使人產生睡意、頭昏、心率加快、頭痛、顫抖、意識混亂、神志不清等現象。</li> <li>3. 重者會出現頭痛、噁心、嘔吐、神志模糊、知覺喪失、昏迷、抽搐等，嚴重者會因為中樞系統麻痺而死亡。</li> </ol>
Ethyl-benzene 乙苯	可引起噁心、頭痛、嘔吐、暈眩、中樞神經系統抑制、疲勞、昏睡。
Toluene 甲苯	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 吸入造成中樞神經系統抑制。</li> <li>2. 蒸氣可能造成頭痛、疲勞、暈眩、眼花、麻木、噁心、精神混亂、動作不協調。</li> </ol>
Styrene 苯乙烯	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 主要刺激呼吸道、抑制中樞神經系統。</li> <li>2. 高濃度蒸氣可能造成頭痛、噁心等。</li> <li>3. 動物實驗為疑似致癌物及致突變物。</li> </ol>
p-Xylene 對-二甲苯	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 會抑制中樞神經系統。</li> <li>2. 高濃度暴露可能導致意識喪失。</li> </ol>
1-Decene 癸烯	高濃度蒸氣對眼、呼吸道有輕度刺激性，有弱麻醉作用。
D-Limonene 右旋-檸檬烯	具有化學預防的作用，可以預防癌症、抑制及復原癌症，包括胰臟癌、肝癌、肺癌及 UV 所導致的皮膚癌。
Phenol 酚	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 其蒸氣及霧滴會刺激鼻及咽。</li> <li>2. 會影響中樞神經系統（噁心、暈眩、頭痛）。</li> <li>3. 大量的暴露可能造成肝及腎傷害。</li> </ol>
1-Heptene 庚烯	吸入可引起麻醉，伴有眼和呼吸道黏膜刺激、眩暈、嘔吐及對皮膚有刺激性。
新艾燃燒廢氣	
Compound	人體健康危害
Benzene 苯	同上
Ethylbenzene 乙苯	同上
Toluene 甲苯	同上
Styrene 苯乙烯	同上
1-Hexene 己烯	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 麻醉和刺激作用。</li> <li>2. 吸入後引起頭痛、咳嗽、呼吸困難；大量吸入出現中樞神經系統抑制、精神錯亂、神智喪失。</li> </ol>

新艾燃燒廢氣	
Compound	人體健康危害
Furan, 2-methyl-2- 甲基呋喃	LC <sub>50</sub> : 500 ppm/4H (大鼠, 吸入)
1-Octene 辛烯	1. 對呼吸道黏膜和眼結膜有輕度刺激作用。 2. 中毒表現有燒灼感、咳嗽、喘息、喉炎、氣喘、頭痛、噁心和嘔吐。
Acetone 丙酮	1. 輕微中樞神經抑制劑。 2. 高濃度蒸氣可能引起頭痛、噁心、頭暈、嗜睡、動作不協調和精神混淆、刺激眼睛。

#### 六、新艾絨燃燒後之空氣品質的危害指數(HI)

非致癌健康風險之推估：

個別毒物危害指數 (HI) = I/RFD

I=暴露劑量

RFD=參考劑量

危害指數若小於 1，則表示無明顯危害健康效應；總危害指數若大於 1，則表示可能產生危害健康效應。

以下是未使用抽風機所作的評估

	二氧 化碳 (ppm)	一氧 化碳 (ppm)	甲醛 (ppm)	揮發性 有機物 (ppm)	懸浮粗微 粒 PM <sub>10</sub> (µg/m <sup>3</sup> )	懸浮細微 粒 PM <sub>2.5</sub> (µg/m <sup>3</sup> )	臭氧
I=暴露量	1010	0.02	0.05	0.36	1210	531	0.02
RFD=建議值	600	2	0.1	3	60	100	0.03
HI 值	1.68	0.01	0.5	0.12	20.16	5.31	0.67

PM<sub>10</sub>：粗微粒<10 µm PM<sub>2.5</sub>：細微粒<2.5µm。

以下是使用抽風機所作的評估

µg/m <sup>3</sup>		
	PM <sub>2.5</sub>	PM <sub>10</sub>
抽風機距艾灸的高度 15 cm	54	90
RFD=建議值	100	60
HI 值	0.54	1.5

結論：

在燃燒新艾草時，PM10 的 HI 值高達 20.16，其次 PM2.5 的 HI 值高達 5.31，表示會對健康造成一定風險，其餘污染物皆低於 1 以內。

當使用抽風機時在 15 cm 時可以有效降低 PM<sub>2.5</sub> 濃度，HI 指數小於 1，而 PM<sub>10</sub> 的 HI 值可以降低到 1.5。

## 七、室內空氣品質問卷調查

### (一)問卷內容

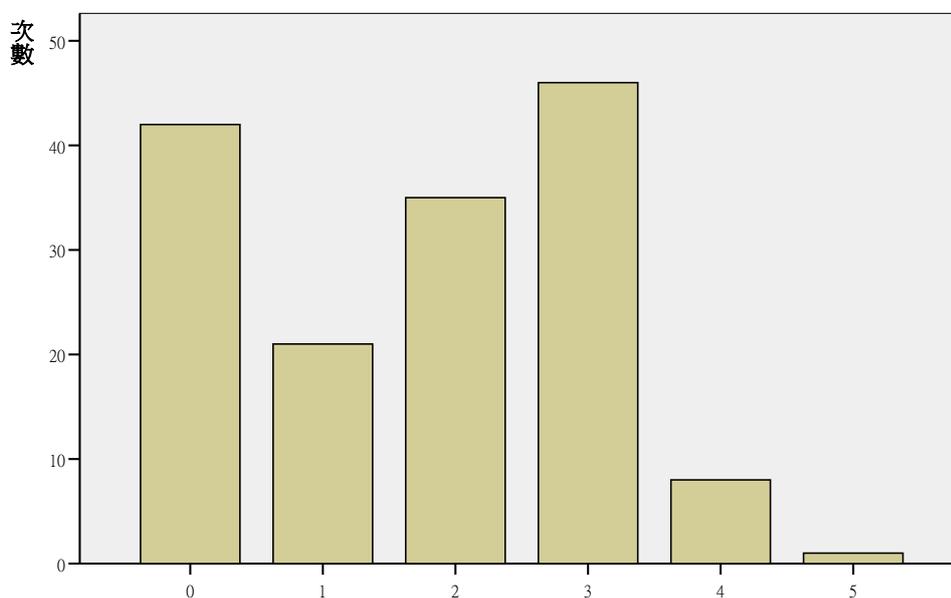
本問卷共分三部份

### (二)問卷內容統計分析

本問卷針對來院看診民眾隨機抽選有意願且有能力回答問卷內容者，根據民眾適合之時間，分別在不同門診時段共進行 6 次調查，合計發出 231 份問卷，回收 160 份，有效問卷為 153 份。

### 平時是否喜歡艾草燃燒的味道

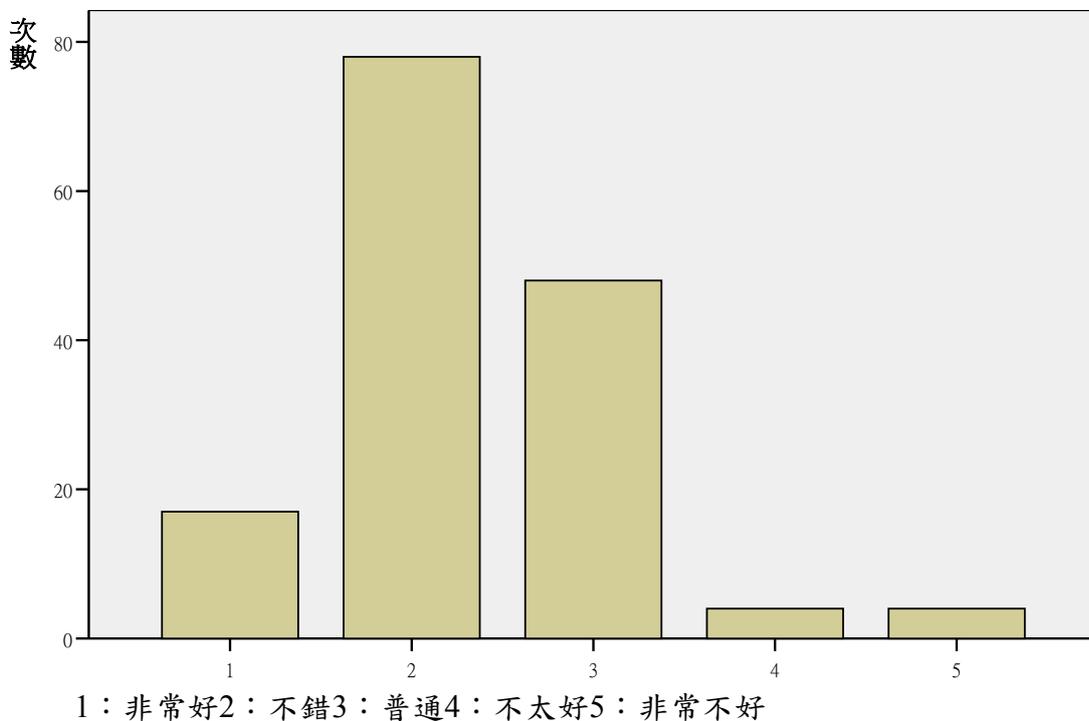
	次數	百分比
0(無接觸)	42	27.5
1(很喜歡)	21	13.7
2(喜歡)	35	22.9
3(可以接受)	46	30.1
4(不喜歡)	8	5.2
5(非常不喜歡)	1	0.7
總和	153	100.0



1：很喜歡 2：喜歡 3：可以接受 4：不喜歡 5：非常不喜歡

### 對於診間空氣品質的評分

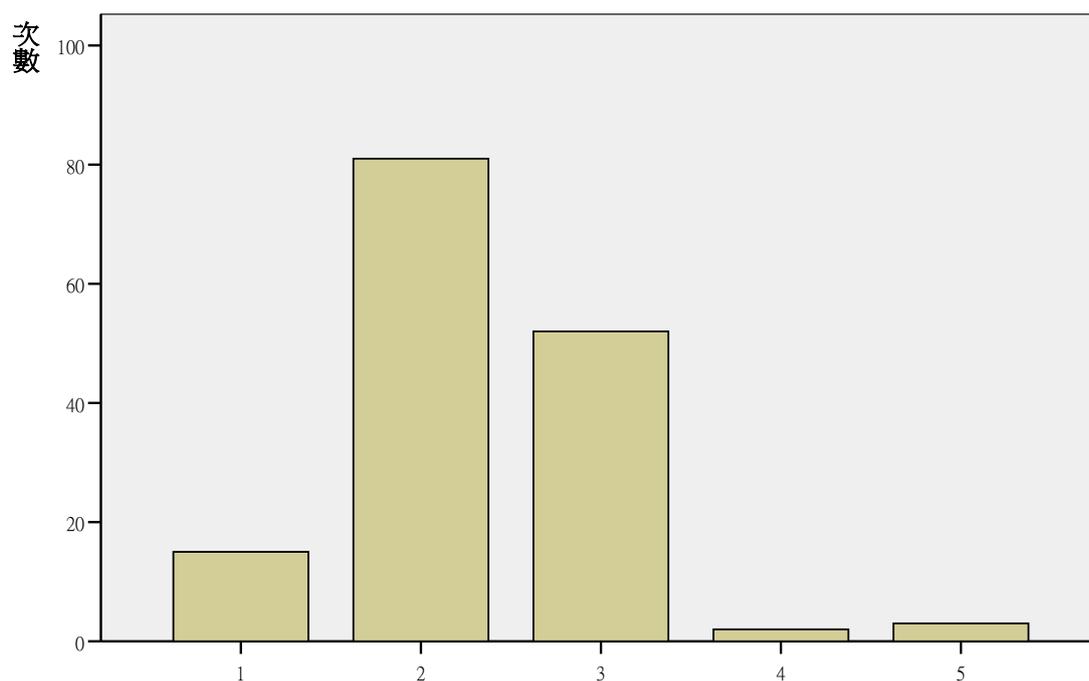
	次數	百分比
1(非常好)	17	11.1
2(不錯)	78	51.0
3(普通)	48	31.4
4(不太好)	4	2.6
5(非常不好)	4	2.6
總和	151	98.7
遺漏	2	1.3



針對「診間空氣品質的評分」，在有效問卷 153 份問卷中，覺得非常好者占 11.1%，覺得不錯者占 51.0%，覺得普通者占 31.4%，而覺得不太好者占 2.6%，非常不好者占 2.6%，而有 2 人在此題無作答占 1.3%，僅少數人認為不好。

### 診間溫度調節的滿意度

	次數	百分比
1(很滿意)	15	9.8
2(滿意)	81	52.9
3(可以接受)	52	34.0
4(不滿意)	2	1.3
5(非常不滿意)	3	2.0
總和	153	100.0

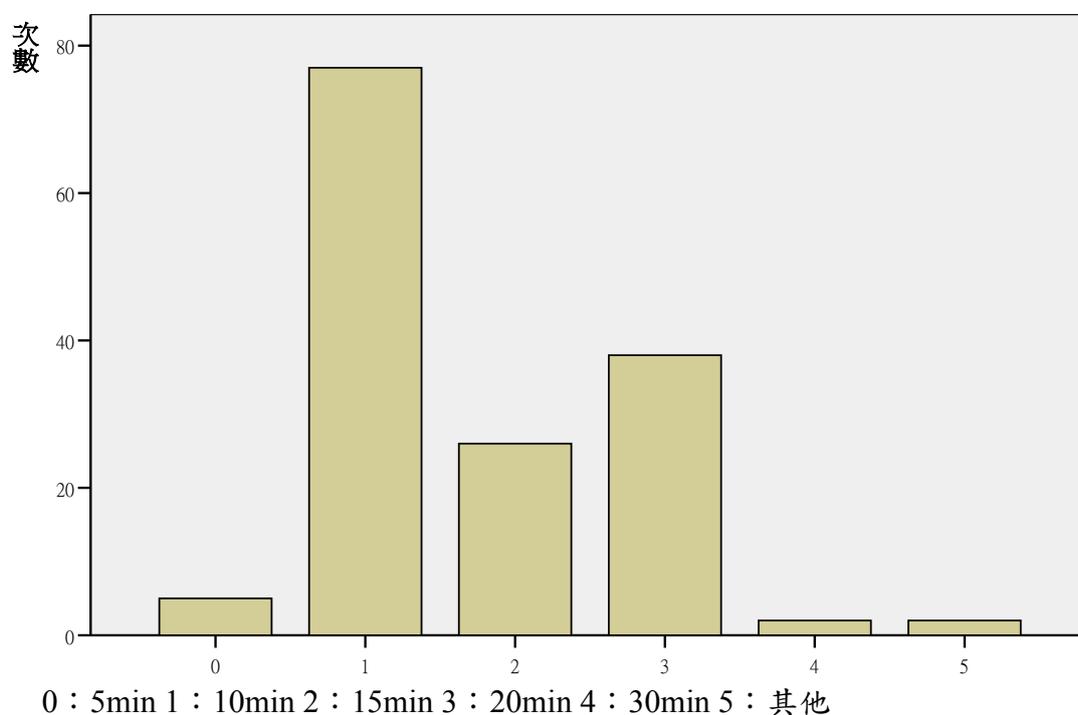


1：很滿意 2：滿意 3：可以接受 4：不滿意 5：非常不滿意

針對「診間溫度調節的滿意度」，在有效問卷 153 份問卷中，很滿意者占 9.8%，滿意者占 52.9%，可以接受者占 34.0%，而不滿意者占 1.3%，非常不滿意者占 2.0%。大部分人認為是可以接受或是滿意。

### 接觸艾草時間

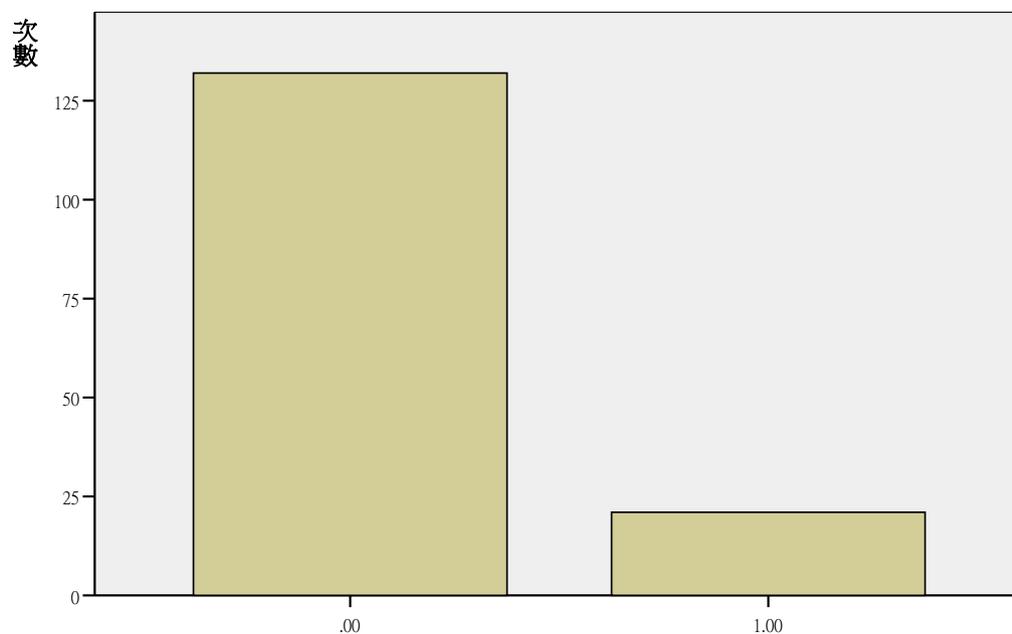
	次數	百分比
0(5分鐘)	5	3.3
1(10分鐘)	77	50.3
2(15分鐘)	26	17.0
3(20分鐘)	38	24.8
4(30分鐘)	2	1.3
5(其他)	2	1.3
總和	150	98.0
遺漏	3	2.0



針對「接觸艾草時間」，在有效問卷 153 份問卷中，絕大多數人是接觸 10 分鐘(50.3%)，其次是 20 分鐘(24.8%)，少部分的人超過 30 分鐘以上。

### 開通風器後是否有身體不適的情況

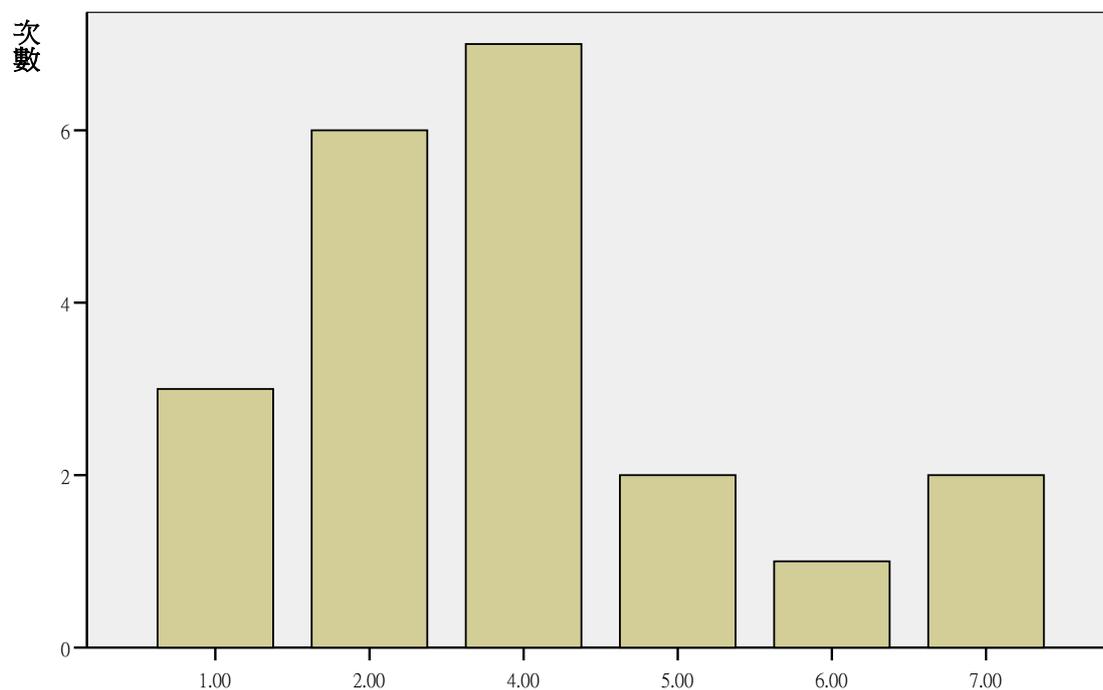
	次數	百分比
0(無)	132	86.3
1(有)	21	13.7
總和	153	100.0



在暴露艾灸有發現身體不適的人有 21 位，佔全部人數 13.7%。

### 開通風器後身體不適的情況

	次數	百分比
1(胸悶)	3	2.0
2(頭痛暈眩)	6	3.9
4(流淚)	7	4.6
5(咳嗽打噴嚏)	2	1.3
6(氣喘)	1	0.7
7(其他)	2	1.3
總和	21	13.7

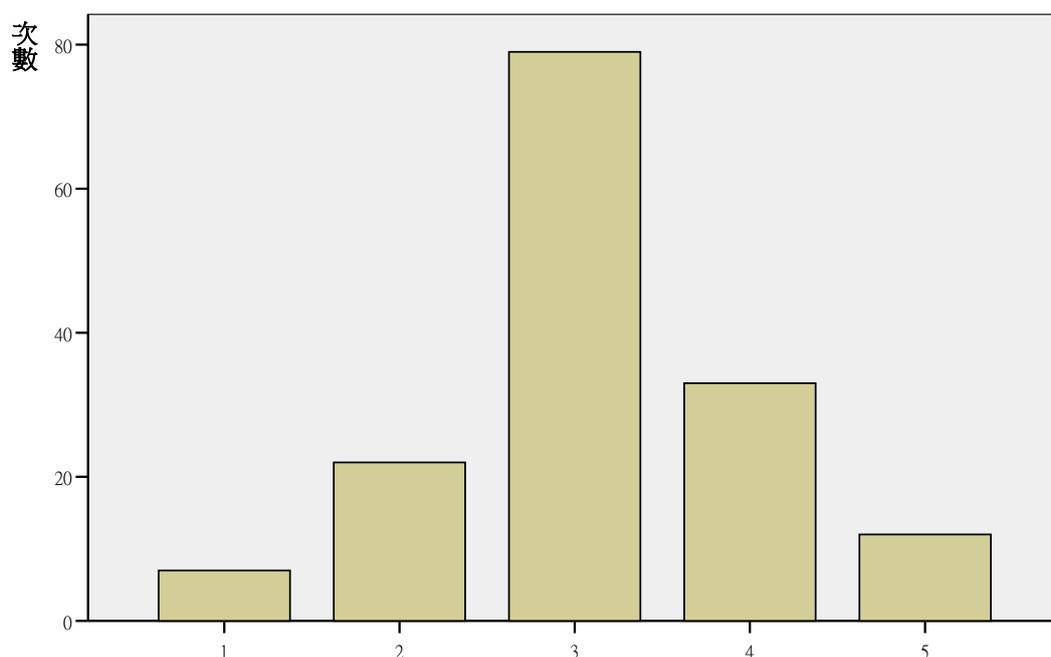


1：胸悶 2：頭痛暈眩 3：皮膚癢 4：流淚 5：咳嗽打噴嚏 6：氣喘 7：其他

針對「開通風器後身體不適的情況」，在有效問卷 153 份問卷中，多數人的症狀為流淚(7 人)、頭痛暈眩(6 人)、胸悶(3 人)、咳嗽打噴嚏(2 人)、氣喘(1 人)。

開通風器後是否喜歡本次艾草燃燒的味道

	次數	百分比
1(很喜歡)	7	4.6
2(喜歡)	22	14.4
3(可以接受)	79	51.6
4(不喜歡)	33	21.6
5(非常不喜歡)	12	7.8
總和	153	100.0

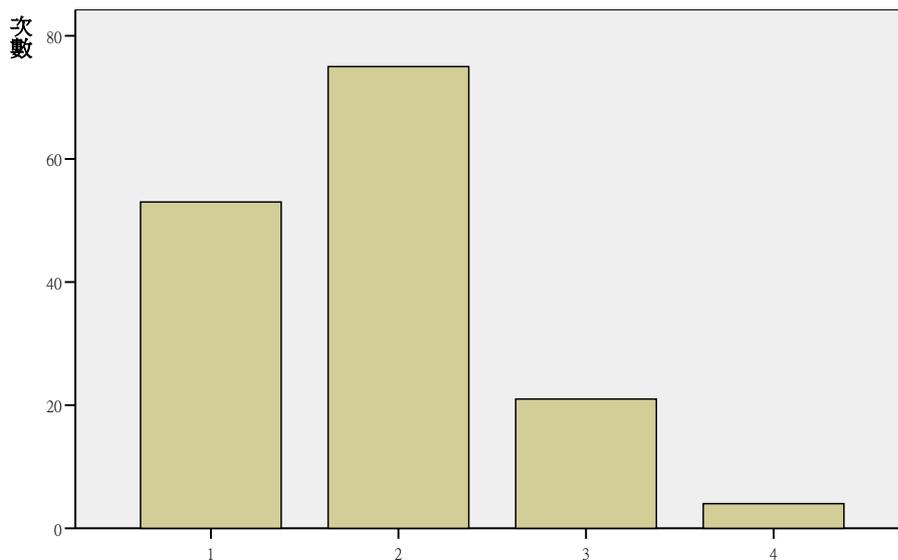


1：很喜歡 2：喜歡 3：可以接受 4：不喜歡 5：非常不喜歡

針對「開通風器後是否喜歡本次艾草燃燒的味道」，在有效問卷 153 份問卷中，很喜歡者占 4.6%，喜歡者占 14.4%，可以接受者占 51.6%，而不喜歡者占 21.6%，非常不喜歡者占 7.8%。

### 是否希望加裝通風器

	次數	百分比
1(很希望)	53	34.6
2(希望)	75	49.0
3(沒意見)	21	13.7
4(不希望)	4	2.6
總和	153	100.0



1：很希望 2：希望 3：沒意見 4：不希望 5：非常不希望

針對「是否希望加裝通風器」，在有效問卷 153 份問卷中，有 83.6%是希望加裝排煙器的。

### McNemar test

開排煙器後是否聞到艾草味 & 未開排煙器時是否有聞到艾草味

	個數	平均數	標準差	最小值	最大值
開排煙器後是否聞到艾草味	153	0.17	0.377	0	1
未開排煙器時是否有聞到艾草味	153	0.59	0.493	0	1

	未開排煙器時 無聞到艾草味	未開排煙器時 有聞到艾草味	顯著值
開排煙器後無聞到艾草味	46	81	<0.001
開排煙器後有聞到艾草味	16	10	

針對「配合艾灸排煙通風器進行艾灸治療時，您對艾灸氣味的感受」此項問題，測量開排煙器前後民眾是否感覺艾草味道的差異。列聯表中顯示，在有效問卷 153 份中，未開排煙器時有聞到艾草味的人在開排煙器之後沒聞到者有 81 位；未開排煙器時無聞到艾草味的人在開排煙器之後有聞到者有 16 位；未開排煙器與開排煙器後答案一致者共 56 位。

#### McNemar test

	開排煙器後是否聞到艾草味& 未開排煙器時是否有聞到艾草味
個數	153
卡方(a)	42.227
漸近顯著性	.000

a 連續修正

b McNemar檢定

為了檢測是否開排煙器前後民眾是否感覺艾草味的差異，我們會使用 McNemar test，測量結果有達顯著差異( $P < 0.001$ )，表示開排煙器後未聞到艾草味的人數會比未開排煙器的時候明顯增加，故通風器能明顯降低空氣中的燃艾氣味。

#### 成對樣本T檢定(Pair-T test)

原始個案為 153 位，分別對進步分數以及原始分數作成對樣本 T 檢定。

	平均數	個數	標準差	顯著值
燃燒艾草且未開排煙器時， 民眾對於室內空氣品質的評分	54.67	150	23.335	<0.001
燃燒艾草且開排煙器之後， 民眾對於室內空氣品質的評分	74.23	150	14.103	

在第一部分是看民眾對於開與未開排煙器前後對室內空氣品質的評分是否有差異，一共有 150 個個案納入此研究中，未填答者 3 位。結果發現開排煙器的評分(平均值，74.23 分。標準差，14.10)明顯比未開排煙器的評分要高(平均值 54.67 分。標準差，23.33)，經由成對樣本 T 檢定發現有達到顯著( $P < 0.001$ )

	平均數	個數	標準差	顯著值
燃燒艾草並未開排煙器時與未燃燒艾草時，民眾對於室內空氣品質的評分相減	-19.66	148	23.290	<0.001
燃燒艾草並開排煙器之後與未燃燒艾草時，民眾對於室內空氣品質的評分相減	1.45	148	12.979	

在第二部分是看民眾對於開與未開排煙器前後對室內空氣品質的評分的進步分數是否明顯上升或下降，一共有 148 個個案納入此研究，排除未填答者 5 位。

我們發現在使用艾灸後民眾會感受到醫院品質變差(平均值，-19.66)，但是開了排煙器之後民眾會覺得空氣品質變好(平均值，1.45)，在經由成對樣本 T 檢定發現是有達統計效益( $P < 0.001$ )表示民眾對於醫院的空氣品質在開了艾灸排煙器之後有明顯改善。

## 肆、討論

由新舊艾草三成份灰化之資料中得知，舊艾草所含的水分較多，可能因存放時間較過久，吸收空氣中水分引起，然而舊艾草灰化後所剩的灰份較少，可能是因某些因素（如微生物的分解）造成其較為完全燃燒，因而在單位時間內釋放到空氣的懸浮微粒揮發物質較多。

再者，本次實驗只對廢氣做定性分析，對於這些化學物質含量並無確定的值，所以無法徹底探討其對人體危害大小。未來可針對廢氣做定量分析，深入探討其對人體的危害性。

針對問卷部分，本問卷設計主要分為三部分

1. 一般未燃燒艾草時室內空氣品質問卷調查
2. 艾草燃燒時並使用艾灸排煙通風器之空氣品質滿意度調查
3. 艾灸治療未使用艾灸排煙通風器之空氣品質問卷調查

主要希望比較艾草燃燒及是否加裝艾灸排煙通風器前後，民眾對空氣品質滿意度的感受。而以第一部份一般未燃燒艾草時室內空氣品質來當對照。

針對受測者「平時是否喜歡艾草燃燒的味道」，在有效問卷 153 份問卷中，可發現無接觸過艾草的人占 27.5%，而有接觸過艾草的人占 72.5%，可知受測者中有 1/4 民眾從來未接觸過艾草，而有 3/4 民眾有接觸過，表示超過一半的民眾對於艾草是有認識的。而在接觸過艾草的人當中有正面感受（很喜歡、喜歡、包含可以接受）者，比有負面感受：如不喜歡、非常不喜歡者多，超過一半以上占 94.1%。

針對「診間空氣品質的評分」，大部分民眾有正面感受（很喜歡、喜歡、包含可以接受），占 93.5%。

針對「診間溫度調節的滿意度」，大部分民眾有正面感受（很喜歡、喜歡、包含可以接受），占 96.7%。

針對「接觸艾草時間」，受測者接觸艾草時間在 5min ~ 20min 佔大部分，為 95.4%，而一般在診間施行艾灸的時間也大約為 15 min，是可互相對照的。

針對「開通風器後是否有身體不適的情況」，無症狀出現者占大多數為 86.3%，而有症狀者占少數為 13.7%。而出現的症狀中以流淚症狀者占 4.6% 為較多，頭痛暈眩症狀者次多約占 3.9%。由此對照可知加開排煙通風器後可以有效減少受測者對吸入艾草味道後的身體不適。

針對「開通風器後是否喜歡本次艾草燃燒的味道」，以可以接受者占 51.6% 為多數，很喜歡及喜歡者占 19.0%，而不喜歡者及非常不喜歡者占 29.4%。可

了解開排煙通風器後可以大大減少受測者對艾草氣味的感受，但喜好艾草的氣味與否則與個人經驗有關。

針對「是否希望加裝通風器」，大部分民眾（包括很希望加裝通風器者、希望加裝通風器者）占 83.6% 的多數，而選非常不希望加裝通風器者為 0 人。表示民眾對加裝通風器多抱持贊成的態度。

針對「配合艾灸排煙通風器進行艾灸治療時，您對艾灸氣味的感受」此項問題，在有效問卷 153 份問卷中，在使用通風器前原本覺得艾草燃燒氣味稍強烈及強烈者而使用通風器後覺得完全聞不到艾草燃燒氣味及氣味輕微者占 52.9%，顯示使用艾灸排煙通風器後可以有效減少艾草味道。

總體來說，使用艾灸排煙通風器後可以有效減少艾草味道。

## 伍、結論與建議

結論：

本研究可解決因應 95/08/31 環保署公告「室內空氣品質管理法草案」後，對於醫療機構之室內空氣品質的指標要求，所導致在施作艾灸的中醫醫療院所之困擾。

在燃燒新艾草時，PM<sub>10</sub> 的 HI 值高達 20.16，其次 PM<sub>2.5</sub> 的 HI 值高達 5.31 表示會對健康造成一定風險，其餘污染物皆低於 1 以內。當使用抽風機時在 15 cm 時可以有效降低 PM<sub>2.5</sub> 濃度，HI 指數小於 1，而 PM<sub>10</sub> 的 HI 值可以降低到 1.5。與一般抽風機比較，新型艾灸排煙抽風機在與燃艾距離 25 cm 時去除率為 83.40 %；而一般抽風機則為 7.75 %。故建議「艾灸抽風機」距燃艾高度為 15-25cm 之間。

根據國際癌瘤研究署(International Agency for Research on Cancer, IARC) 針對人類有害致癌物質，新、舊艾燃燒廢氣產生之有機揮發成份，包括：Benzene（苯）、Ethyl-benzene（乙苯）、Toluene（甲苯）、及 Styrene（苯乙烯），分別為 Benzene（苯）屬 IARC 分類群組之 Group 1（對人類為確定之致癌物），Ethyl-benzene（乙苯）屬 IARC 分類群組之 Group 2B（對人類有可能致癌），Toluene（甲苯）屬 IARC 分類群組之 Group 3（目前尚無足夠的動物或人體的資料），Styrene（苯乙烯）屬 IARC 分類群組之 Group 2B（對人類有可能致癌）。

舊艾燃燒時尚會產生其他有機揮發成份，包括 p-Xylene（對-二甲苯）、1-Decene（癸烯）、D-Limonene（右旋-檸檬烯）、Phenol（酚）、及 1-Heptene（庚烯）；新艾燃燒時，尚會產生之有機揮發成份，包括：1-Hexene（己烯）、Furan, 2-methyl-（2-甲基呋喃）、1-Octene（辛烯）、及 Acetone（丙酮），其中以舊艾燃燒廢氣中之 D-Limonene（右旋-檸檬烯）、Phenol（酚）屬 IARC 分類群組之 Group 3（目前尚無足夠的動物或人體的資料）。舊艾燃燒產生之有機揮發成份危害甚於新艾燃燒廢氣產生之有機揮發成份。但是，由二-（四）揮發性有機物濃度比較圖可知舊艾的揮發性物質濃度低於舊艾，故若想得知燃燒舊艾時所產生的揮發性有機物是否會對吸入者造成危害，需進一步對燃燒舊艾產生的揮發性有機物作定量分析。

新、舊艾燃燒時，皆會產生包括：Benzene（苯）、ethyl-benzene（乙苯）、Toluene（甲苯）、及 Styrene（苯乙烯）等人體致癌物質外，新、舊艾燃燒產生之非致癌物質，包括：舊艾燃燒廢氣產生之 p-Xylene（對-二甲苯）、1-Decene（癸烯）、D-Limonene（右旋-檸檬烯）、Phenol（酚）、及 1-Heptene（庚烯）；

新艾燃燒產生之 1-Hexene (己烯)、Furan, 2-methyl- (2-甲基呋喃)、1-Octene (辛烯)、及 Acetone (丙酮) 等，主要危害作用於人體中樞神經、對人體產生刺激、及傷害身體代謝器官 (如：肝、腎等)

建議：

傳統艾灸效果良好但因治療過程產生的濃煙味道會因個人喜好產生不同反應及証狀，故在此一研究計畫針對各種影響因素做了具體的數據實驗，所以建議在做傳統灸療過程中應加裝新型「艾灸抽風機」以改善室內空氣品質，以減少灸療過程病患對濃煙味道產生的不良反應。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP96-RD-007 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

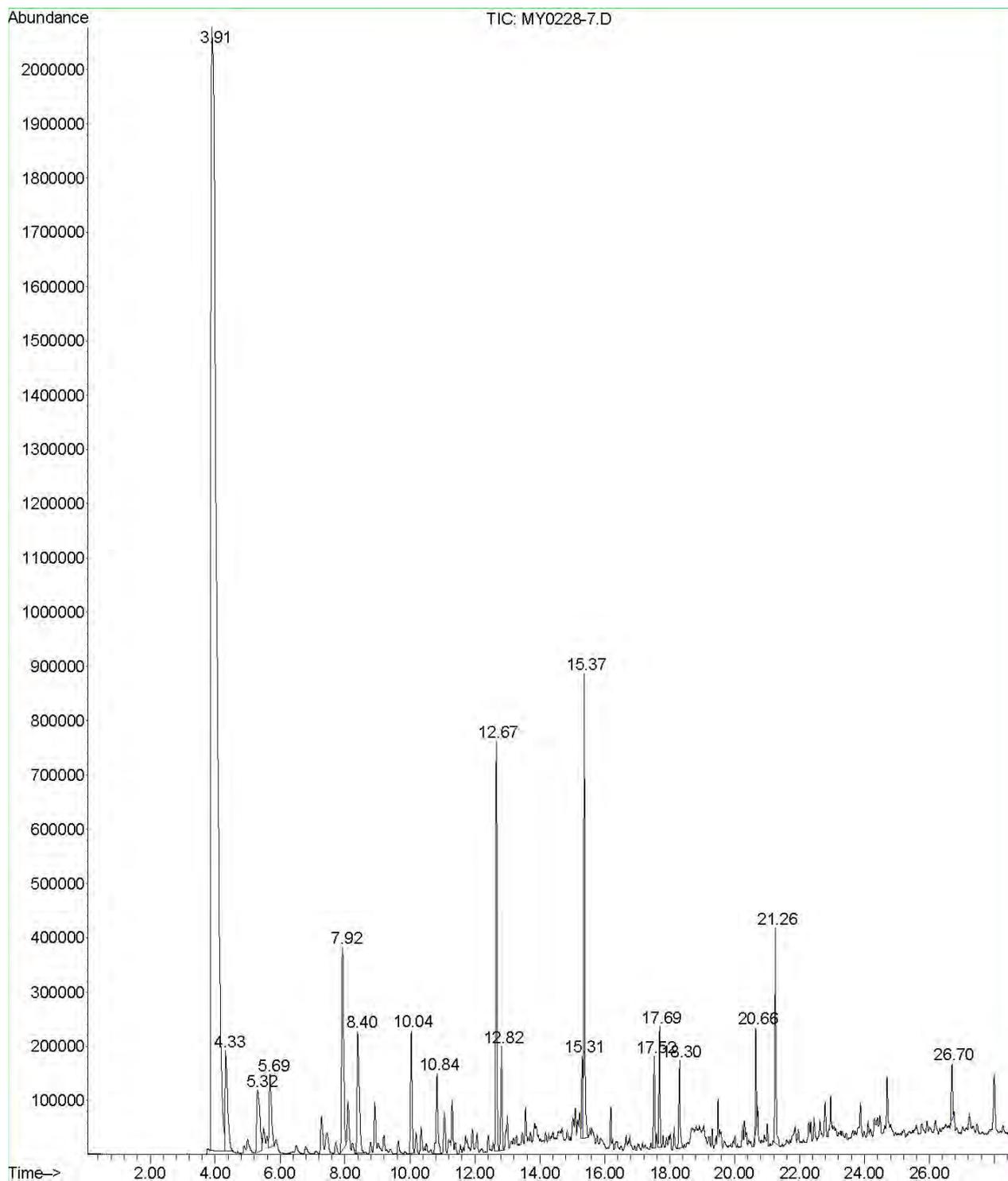
1. 環保署公告「室內空氣品質管理法(草案)」,民國95年8月31日
2. 消基會公佈「2005年消費十二大「黑」新聞」,民國94年12月27日
3. 環保署公告「室內空氣品質建議值」,民國95年1月1日
4. 消基會公佈「體檢25家醫院空氣品質」,民國94年5月4日
5. 曾昭衡、謝挺蘊,考量健康風險評估之本土化室內空氣品質指標之研擬,第十九屆空氣污染控制技術研討會,台北,Nov. 29, 2002
6. 醫院服務品質與住院病患家屬滿意度之關聯性研究—以嘉義某區域教學醫院為例,莊演文,南華大學管理研究所碩士論文,民國92年6月。
7. 郝道猛、鐘傑,有煙灸與無煙灸治療實驗性腫瘤,83年度中醫藥委員會研究計畫。
8. 江哲銘、賴啟銘,辦公建築室內空氣品質與空調設備之診斷研究,中華民國1998建築研究成果發表會, P69-72 (1998)
9. 江秀梅、殷蘊雯、賴珊瑚,基礎毒理學,高立圖書有限公司,2001年
10. K.B. Hoddinott a,\* , A.P. Lee b “The use of environmental risk assessment methodologies for an indoor air quality investigation” Chemosphere 41 (2000) 77-84
11. Air Quality Index A Guide to air quality and your health , environment protection agency , EPA-454/R-00-005(2000)
12. 黃瓊瑩、高玫鍾, AIQ 與 PSI 制度之比較探討與研析,行政院環保署科技計畫, EPA-89-FA11-03-252 (2000)
13. 蘇慧貞、江哲銘、李俊璋, 室內空氣品質標準於不同建築物之試行評估及管制策略研定, 行政院環保署專題委託研究計畫 (2000)
14. 涂玉峰、江哲銘, 室內空氣環境綜合評估指標之探討—以台灣南部工業區辦公大樓為例, 國立成功大學建築研究所第三十屆碩士論文 (1999)
15. Peder Wolkoff<sup>1</sup> “How to measure and evaluate volatile organic compound emissions from building products. A perspective” The Science of the Total Environment 227 197-213 (1999)
16. K. M. Hau,\*<sup>1</sup> D. W. Connell,\* and B. J. Richardson<sup>†</sup>, Use of Partition Models to Evaluate Guidelines for Mixtures of Volatile Organic Compounds , Regulatory Toxicology and Pharmacology 32, 36-41 (2000)
17. 楊奇儒, 低污染拜香研發: 拜香主要成分對拜香燃煙特徵之影響, 博士論

- 文，國立成功大學環境工程學系，台南，2006
18. 林嘉明，健康拜香之研發(一): 燃燒條件對拜香生成微粒與氣態污染物之影響，行政院國家科學委員會研究報告 NSC 90-2320-B002-198，2002
  19. 陳沛蓉，拜香、香菸及稻草燃燒產生微粒之細胞毒性研究，碩士論文，國立陽明大學環境衛生研究所，台北，2004
  20. 謝永昌，拜香氣膠中 PAHs 之粒徑分佈研究，碩士論文，國立成功大學環境工程學系，台南，2002
  21. 周文傑，燃燒金紙與拜香所產生氣態污染物及飛灰中金屬成份之分布，碩士論文，國立成功大學環境工程學系，台南，2007

# 柒、圖、表(GC-Mass)

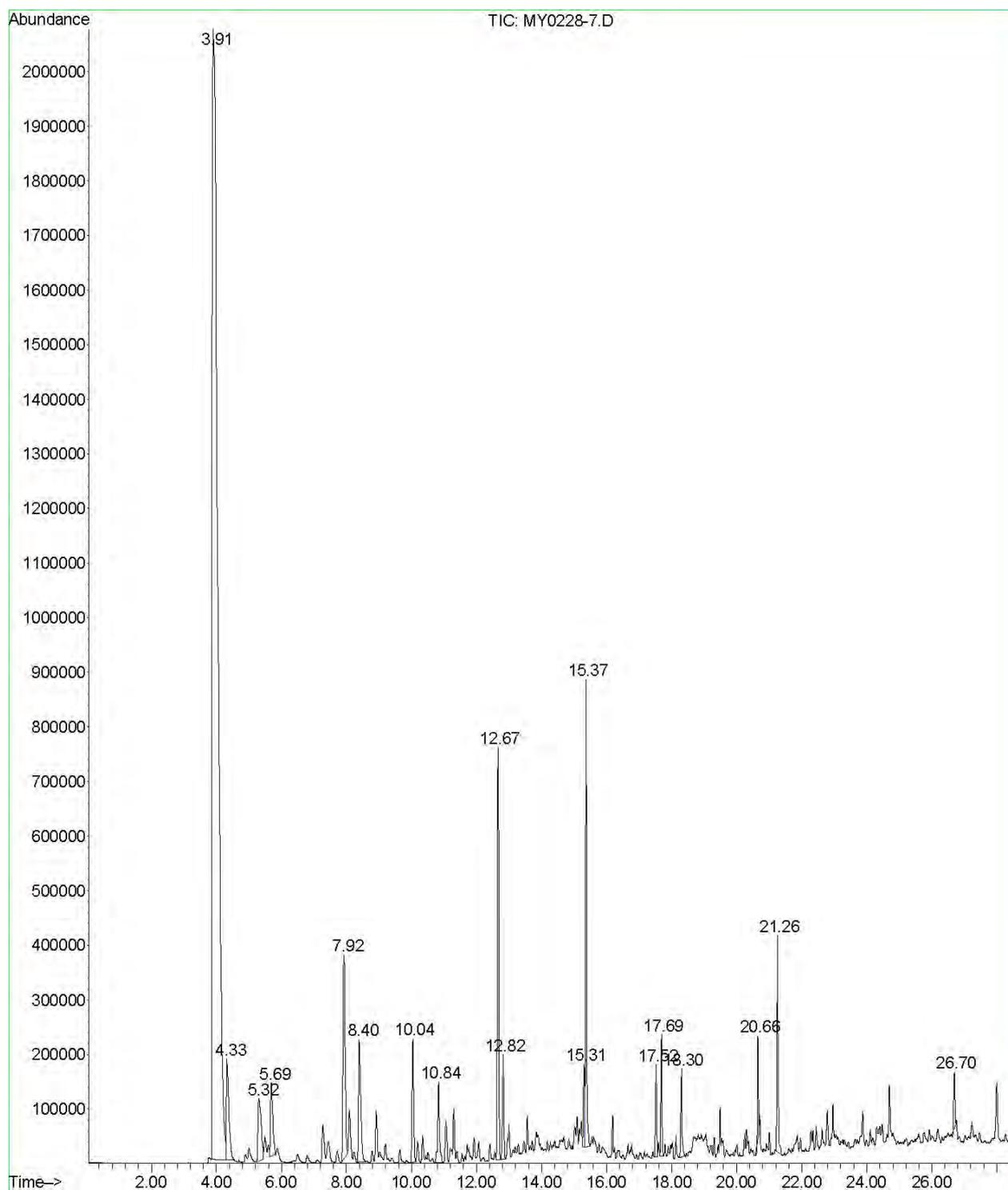
File : C:\MSDCHEM\1\DATA\IAQ\MY0229-1.D  
Operator : MY Acquired : 29 Feb 2008 8:22 am  
using AcqMethod IAQ Instrument : Instrumen Sample  
Name: SAM3 Misc Info : Vial Number: 1

新艾-第一次實驗分析



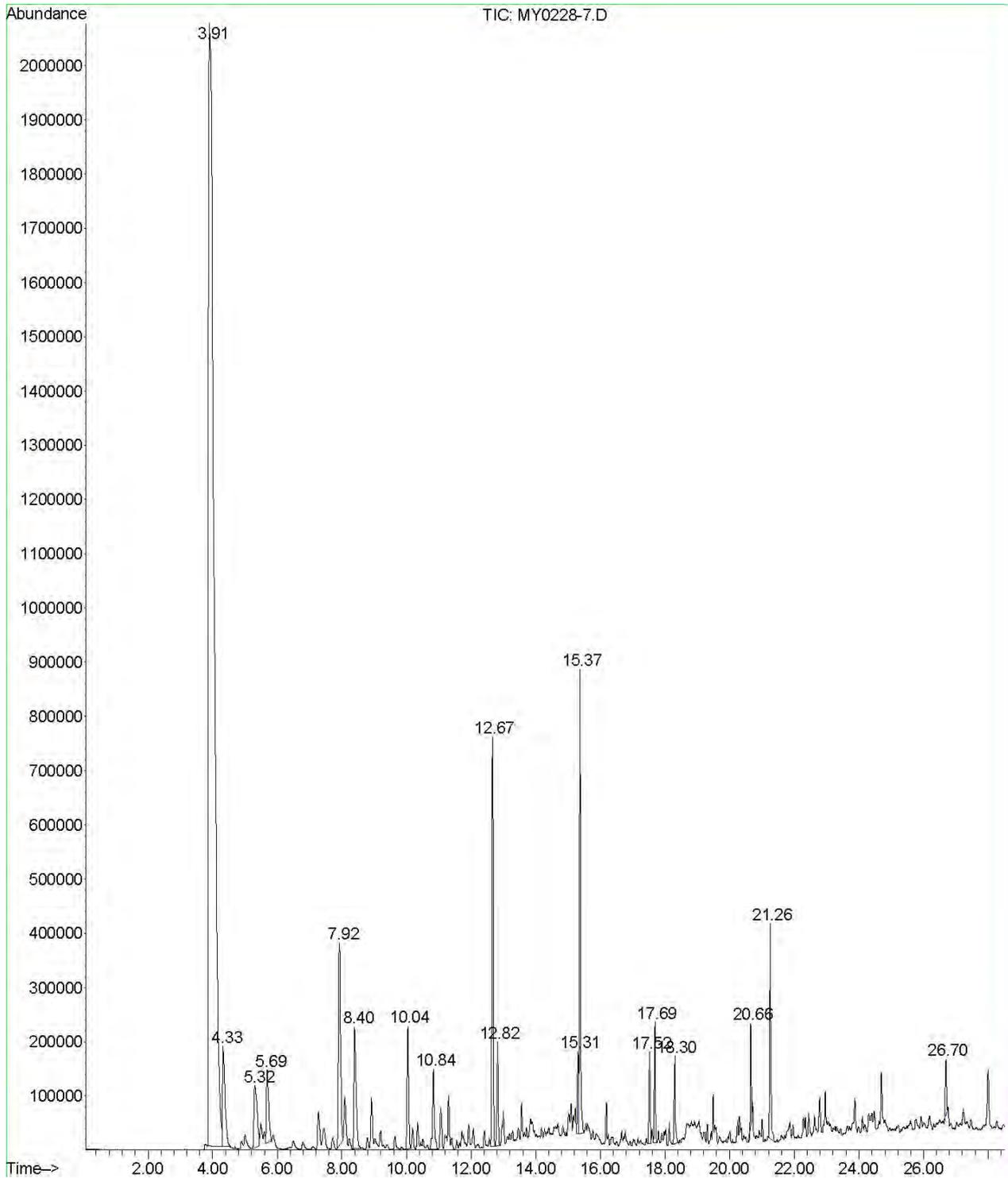
新艾-第二次實驗分析

File : C:\MSDCHEM\1\DATA\IAQ\MY0228-7.D  
Operator : MY Acquired : 28 Feb 2008 10:58 pm  
using AcqMethod IAQ Instrument : Instrumen Sample  
Name: SAM3 Misc Info : Vial Number: 1



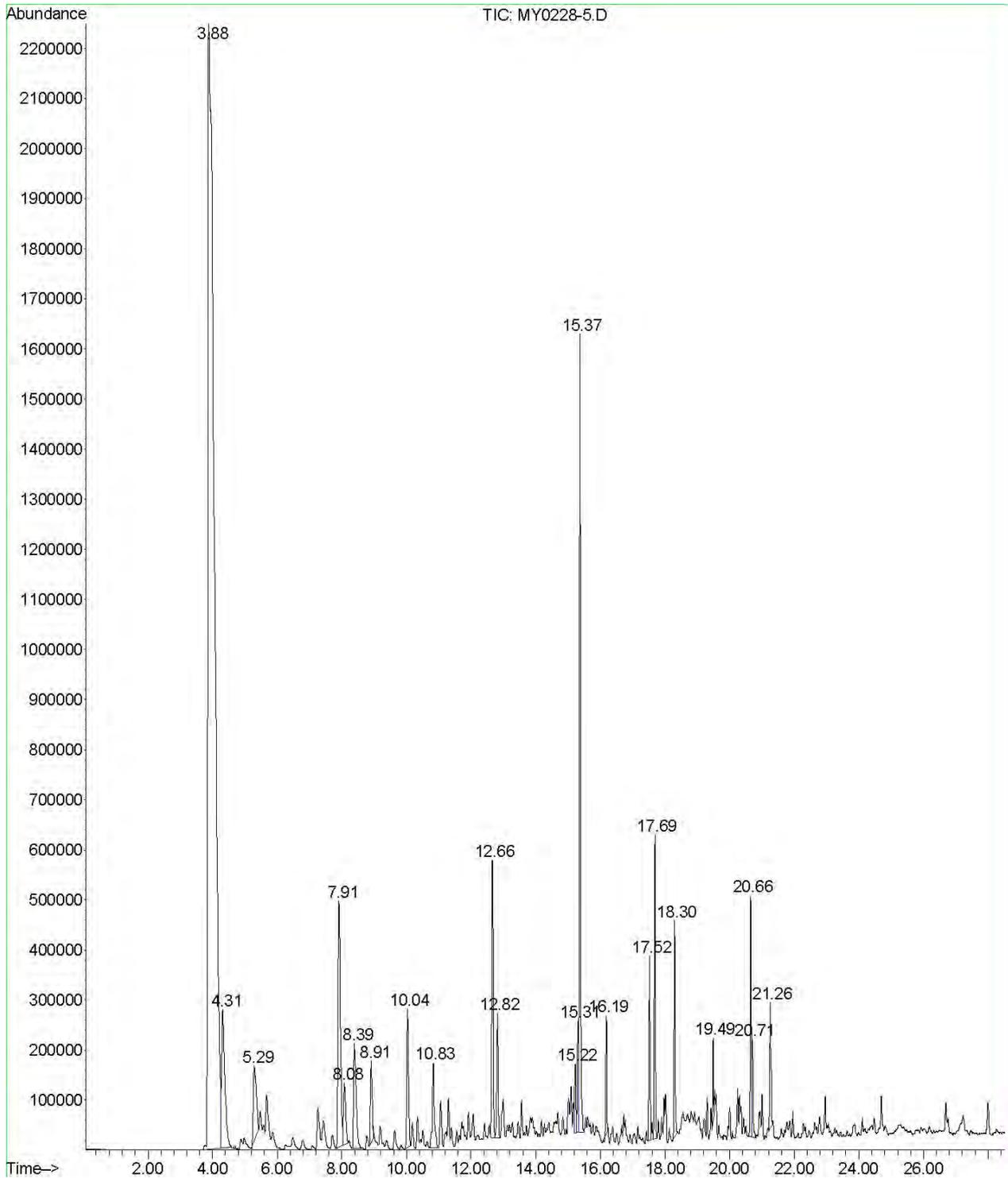
陳艾-第一次實驗分析

File : C:\MSDCHEM\1\DATA\IAQ\MY0228-5.D  
Operator : MY Acquired : 28 Feb 2008 8:24 pm  
using AcqMethod IAQ Instrument : Instrumen Sample  
Name: SAM3 Misc Info : Vial Number: 1



陳艾-第二次實驗分析

File : C:\MSDCHEM\1\DATA\IAQ\MY0228-6.D  
Operator : MY Acquired : 28 Feb 2008 9:40 pm  
using AcqMethod IAQ Instrument : Instrumen Sample  
Name: SAM3 Misc Info : Vial Number: 1



(I) 一般未燃燒艾草時室內空氣品質問卷調查

(合適的選項請打勾)

1. 您通常在此地停留時間：

不到 2 小時 2~4 小時 4~6 小時 6~8 小時 8~10 小時

2. 請問您對診間溫度調節情況之滿意度：

很滿意 滿意 可以接受 不滿意 非常不滿意

3. 請問您本次接觸艾草燃燒的時間：

0 分鐘 5 分鐘 10 分鐘 15 分鐘 20 分鐘 30 分鐘  
其他\_\_\_\_\_

4. 請問您曾經接觸過艾草的味道嗎？ 無接觸

有 (很喜歡 喜歡 可以接受 不喜歡 非常不喜歡)

5. 您暴露於此處空氣，曾經有過的健康狀況(可複選)：

無 胸悶 頭痛暈眩 皮膚癢 流淚 咳嗽打噴嚏 氣喘  
其他\_\_\_\_\_

6. 綜合而言，您對此處空氣品質感受的評分為：

非常好(>90) 不錯(90~70) 普通(70~50) 不太好(50~30)  
非常不好(30~0) 或直接評分(0~100): \_\_\_\_\_分

7. 平常在本場所會受到的空氣污染(可複選)：

香煙、二手煙 (常常 偶而，來自室內 室外)  
化學溶劑油漆 (常常 偶而，來自室內 室外)  
焚燒物品黑煙 (常常 偶而，來自室內 室外)  
炊事油煙 (常常 偶而，來自室內 室外)  
臭味:\_\_\_\_\_味 (常常 偶而，來自室內 室外)  
其他:\_\_\_\_\_ (常常 偶而，來自室內 室外)  
以上皆無

性別 男 女

年齡 18 歲以下 18~29 歲 30~39 歲 40~49 歲 50~59 歲 60 歲以上

學歷 國中或以下 高中職 大專院校 研究所或以上

身份 病患 陪同家屬 醫療人員 來院民眾

☺感謝您撥空填寫此問卷☺

## (II) 艾草燃燒時並使用艾灸排煙通風器之空氣品質滿意度調查

(合適的選項請打勾)

1. 您通常在此地停留時間：

不到 2 小時 2~4 小時 4~6 小時 6~8 小時 8~10 小時

2. 請問您對診間溫度調節情況之滿意度：

很滿意 滿意 可以接受 不滿意 非常不滿意

3. 請問您本次接觸艾草燃燒的時間：

5 分鐘 10 分鐘 15 分鐘 20 分鐘 30 分鐘 其他\_\_\_\_\_

4. 配合艾灸排煙通風器進行艾灸治療時，您對艾灸氣味的感受？

完全聞不到艾草燃燒氣味 艾草燃燒氣味輕微 艾草燃燒氣味稍強烈  
艾草燃燒氣味強烈

5. 請問您本次暴露於此處空氣中，有任何身體不舒服嗎？(可複選)

無 胸悶 頭痛暈眩 皮膚癢 流淚 咳嗽打噴嚏 氣喘  
其他\_\_\_\_\_

6. 綜合而言，您對此處空氣品質感受的評分為：

非常好(>90) 不錯(90~70) 普通(70~50) 不太好(50~30)  
非常不好(30~0) 或直接評分(0~100): \_\_\_\_\_分

7. 請問您喜歡本次試驗艾草燃燒的味道嗎？沒有聞到

聞到 (很喜歡 喜歡 可以接受 不喜歡 非常不喜歡)

8. 綜合而言，您對艾灸排煙通風器的效果評分為：

非常好(>90) 不錯(90~70) 普通(70~50) 不太好(50~30)  
非常不好(30~0) 或直接評分(0~100): \_\_\_\_\_分

☺感謝您撥空填寫此問卷☺

### (III) 艾灸燃燒未使用艾灸排煙通風器之空氣品質問卷調查

(合適的選項請打勾)

1. 您通常在此地停留時間：

不到 2 小時 2~4 小時 4~6 小時 6~8 小時 8~10 小時

2. 請問您對診間溫度調節情況之滿意度：

很滿意 滿意 可以接受 不滿意 非常不滿意

3. 請問您本次接觸艾草燃燒的時間：

5 分鐘 10 分鐘 15 分鐘 20 分鐘 30 分鐘 其他\_\_\_\_\_

4. 請問您對艾草燃燒氣味的感受？

完全聞不到艾草燃燒氣味 艾草燃燒氣味輕微 艾草燃燒氣味稍強烈  
艾草燃燒氣味強烈

5. 請問您暴露於此處空氣中，有任何身體不舒服嗎？(可複選)

無 胸悶 頭痛暈眩 皮膚癢 流淚 咳嗽打噴嚏 氣喘  
其他\_\_\_\_\_

6. 綜合而言，您對此處空氣品質感受的評分為：

非常好(>90) 不錯(90~70) 普通(70~50) 不太好(50~30)  
非常不好(30~0) 或直接評分(0~100): \_\_\_\_\_分

7. 請問您喜歡本次試驗艾草燃燒的味道嗎？

很喜歡 喜歡 可以接受 不喜歡 非常不喜歡

8. 若需要進行艾草燃燒，您是否希望加裝艾灸排煙通風器？

很希望 希望 沒意見 不希望 非常不希望

☺感謝您撥空填寫此問卷☺

# 六味地黃散品質精緻化可行性與藥劑 相等性評估

余建志  
中國醫藥大學 藥學系

## 摘 要

研究以多醣體作為防潮性包衣之賦型劑，降低六味地黃散賦型劑的使用量和吸濕性，降低藥品服用量和提升藥物安定性，提升品質精緻化。透過藥劑學一般與粉體性質試驗及藥動學研究，探討藥劑和生體相等性。

將藥材水抽後，經冷凍乾燥，製成不同形狀與加壓之六種藥劑型態，分別以海藻酸鈉、菊糖、瓜爾膠、果膠及環糊精五種多醣體當作防潮包衣，研究形狀、大小與緻密性對吸濕效應的影響，研究其藥劑學一般與粉體性質。以 HPLC 測量六味地黃丸、六味地黃散（生藥粉）、冷凍乾燥粉末和最佳成品之牡丹酚與馬錢苷含量，並透過 SD 大白鼠血中濃度，探討其生體本相等性。

研究發現多醣體確實可降低賦型劑的使用量和水分的吸收，五種賦型劑中以瓜爾膠與海藻酸鈉降低水分的吸收效果最好。結果顯示高壓錠劑搭配瓜爾膠是最佳組合，最佳檢品的牡丹酚含量約六味地黃散（生藥粉）的 1.2 倍，馬錢苷含量更是高出有 1.6 倍之多，確實可以達到縮減劑量的作用。藥動學參數證實與傳統丸散具有藥動學相等性。

關鍵詞：品質精緻化、多醣類、低賦形劑

# **Assessment of Pharmaceutical Equivalence and Quality fineness of Low-Excipient Liou-Wei-Di-Huang Powder Dosage**

Chien-Chih YU

China Medical University, School of Pharmacy

## **ABSTRACT**

The main purpose of this plan is using polysaccharides to be excipient as moisture-proof coating film, to reduce the usage and moisture absorption of Liou-Wei-Di-Huang Powder, then reduce intake and advance stability. By the general and powder analysis of pharmacy and pharmacokinetic study demonstrates the equivalence of pharmacy and bioequivalence.

Take the water extract of Liou-Wei-Di-Huang raw materials, followed by freeze-drying, to be six samples with different sharp, size, and tableted pressure, complicated with Alginic acid, inulin, Guar gun, pectin and  $\beta$ -cyclodextrin as moisture-proof coating film. Study on the moisture absorption effect of the sharp, size and density, and the general and powder analysis of pharmacy. Assay paeonol and loganin of Liou-Wei-Di-Huang powder, pill, freeze-drying sample and the optimal sample by HPLC, then assay the paeonol and loganin content of the plasma of SD rat to understand the bioequivalence.

The results show the polysaccharides do reduce the excipients usage and prohibit moisture absorption. Alginic acid and Guar gun are the better choices of the five excipients. The optimal sample are high pressured tablet with Guar gun. The content of paeonol in the optimal sample is 1.2 times of powder, and the content of loganin in the optimal sample is 1.6 times of powder. It is obviously the dosage of the patient use could be decreased. The parameters of pharmacokinetics demonstrated the optimal sample has the bioequivalence with the traditional powder and pill.

Keywords: Quality fineness, Polysaccharide, Low-Excipient

## 壹、前言

依據行政院衛生署中醫藥委員會 96 年度中藥品質管制暨中醫政策類委託研究計畫研究<sup>(1)</sup>；研究重點 1-4：就現代製藥科技與法規面達成中藥製劑品質精緻化之可行性評估，探討利用現代化製藥技術，是否可以將中藥製劑精緻化，成品量縮小，以達服藥簡便化。證實新製成之藥劑與舊有製藥方法之藥劑的一致。提高藥品效能，使中藥精緻化。

目前市面之科學濃縮中藥普遍賦形劑與乾浸膏比值都在 1.0 以上，原因有二，一為迎合中醫師的使用習慣，所以，降低賦形劑與乾浸膏比值是不智的；其二為國內科學濃縮中藥生產製程都在高溫的下進行，導致浸膏黏性加大，必須加入大量賦形劑方可成型。反觀日本津村順天堂之專利<sup>(2,3)</sup>顯示日本科學濃縮中藥製程除了藥材煎煮的部份，其他部分都是在低溫下進行，其優缺點值得深思。由其稀醇水抽率動輒 86% 以上，可以發現其賦形劑含量應低於 20%，暴露於空氣中具有極高之吸潮力（高濃度所致），故日本科學濃縮中藥包裝多為鋁箔袋單一包裝，即是因為其優良之防潮效果所致。（根據台灣各大藥廠經驗值，傳統六味地黃丸之賦形劑主要是蜜，比重大約佔 35-50%，市售六味地黃丸濃縮細粒之賦形劑主要是澱粉，比重大約佔 50-65%，六味地黃丸濃縮丸之賦形劑主要是澱粉與蜜，賦形劑可能高達 75-80%）。

本計畫擬將濃縮後的中藥粉末先進行定型抽氣加擠壓，以減小單位體積的表面積，然後再噴塗疏水性膜衣，不僅可以將容易受潮的中藥粉末包覆，防止中藥在保存期間受潮，由於整個製劑中沒有實際療效之膜衣僅薄薄的一層附著在定型中藥外表面（用量小於 5% 之樣品重），故本計畫製作後之濃縮中藥不僅不需要使用賦形劑，在單位體積中亦具有高含量療效成分，藉此達到減少服用量即具有相同療效的目的。

## 貳、材料與方法

### 一、材料

於市場上購入熟地黃、山茱萸、山藥、澤瀉、丹皮、茯苓，經生藥學組織切片與化學鑑別，確定其相關基原無誤後，打成 5-10 mm 碎片，於陰冷乾燥處保存待用。海藻酸鈉、菊糖、瓜爾膠、果膠及環糊精<sup>(4-7)</sup>等高分子天然多醣聚合物做為防潮膜衣之材料<sup>(8,9)</sup>。

### 二、試藥

中藥標準品：Manninotriose (熟地黃)、Loganin (山茱萸)、Diosgenin (山藥)、Alisol & Guanosine (澤瀉)、Paenol (丹皮)、Eburicoic acid & Ergosterol (茯苓)。

LC 級甲醇、氘甲烷與水。

藥劑理化與粉體性質測試所需之各種氣體。

其它試藥均為 GR 級。

### 三、儀器與設備

微量分析天平：XS105 Dual Range balance , USA, Mettler-Toledo company

烘箱：Constant Temperature oven DKN 612, Japan, Yamoto company

水活性測定儀：AquaLab Series 3TE, USA, Decagon company.

比表面積分析儀：SSA-3500, USA

冷凍乾燥機：EYELA Freeze drying machine, Japan, EYELA company

噴霧乾燥機：EYELA Spray-druying machine, Japan, EYELA company

真密度測定儀：Mulit-pycnometer, Japan

拍擊密度測定儀：Vanderkamp Bulk Density Apparatus, Germany

流動性分析儀：Micrometritics Flowsorb II 2300, Germany

標準篩粒度分析儀：Retsch AS200, Germany

HPLC：高效率液相層析儀，Japan, Shimadzu company

### 四、方法

(一)收集文獻及國內外專利資料。

(二)六味地黃水抽提液製備

秤取藥材量 (約 30 日飲片量)，加入適量水蓋過藥材表面，加熱至沸騰後起算 30 分鐘，濾取藥液，再重覆一次，濾去藥渣，合併濾液。即為六味地黃水抽提液。

### (三)六味地黃水抽提液冷凍乾燥

將六味地黃水抽提液先分裝於冷凍瓶，先於-20℃冷凍後，置入冷凍乾燥機中抽真空同時除去水分，將冷凍乾燥粉末收集，密閉乾燥環境貯存備用。(每一單位冷凍乾燥粉末相當於 30 日飲片量)。

(四)取一單位之冷凍乾燥粉末，以 200 磅/平方英吋加壓後粉碎，以無水酒精所含微量水分為黏著劑，製成粉末、細粒、顆粒、小球、片劑與錠劑等六種不同形態之藥劑，取等重之藥劑與凍乾粉末測量其比表面積，藉以探討彼此表面積效應。

(五)探討五種高分子天然多醣聚合物，如：海藻酸鈉、菊糖、瓜爾膠、果膠及環糊精等包衣含不同比率之脂肪酸作為防潮膜衣的材料，以膜衣鍋將(4)中所製出之產品予以包覆。轉速：50 轉/min，包衣噴霧速率 3~5 mL/min。

(六)將(四)與(五)所製成之檢品與市售濃縮細粒進行(七)所列各式檢驗，並進行比較，探討相關之藥劑學相等性。

### (七)分析檢驗方法

1. 含量測定：Loganin (馬錢苷)、Paenol (丹皮酚) 做為指標成分，依藥檢局公告 中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項 訂定標誌量，不得低於標準湯劑 70%，設定規格範圍± 50%。
2. 乾減、稀醇、水抽提率與水分測定：採用 JP 14th. Ed. 的規定進行上述實驗，同時採用 Karl-Fisher 水分測定儀進行水分變化監控。乾燥減重不得大於 8.0%，稀醇、水抽提率不得小於 90.0%，水份測定不得大於 5.0%。
3. 水活性與等溫吸濕曲線：採用標準鹽類測其相對濕度，計算樣品重量增減百分率，以五位數電子分析天平紀錄 24hr 時重量吸濕變化。並以水活性儀測試其水活性。
4. 粒徑大小及分佈(Particle size and size distribution)

稱取 100 g 之待測物，置於標準分析篩中，使用 Alpine Airjet Sieve 進行檢品之粒徑分檢測，如此重覆三次求取平均值，以評估顆粒分佈情形並求得粒子之算術平均直徑( $d_{av}$ )，其中  $d_{av} =$  (各篩留存顆粒重量所佔百分率 x 各篩間孔隙平均值) / 100。

5. 真密度(True density)；真密度測定儀 Multipycnometer

將粉體置於烘箱中，以 60 °C 乾燥 24 小時，以氦氣取代法

來測定。

#### 6. 拍擊密度及假密度 (Tapped bulk density and bulk density)

拍擊密度測定儀 Vanderkamp Bulk Density Apparatus

取 100 ml 量筒，精確稱重並記錄之。將已精稱過之量筒，傾斜一固定角度，以藥刀小心且緩慢的把粉體倒入量筒，至體積為 50 ml 為止，啟動馬達(250 rpm)，拍擊刺數從 0 至 500 次，每隔 50 次記錄其體積變化情形，重覆三次，取其平均值。

#### 7. 流動性 (Flowability)

測試其安息角可作為流動性的評估。

### (八)動物試驗<sup>(10~14)</sup>

取重量介於 200-250 gm 之 SD 大白鼠，飼養於 12 小時明暗具空調之環境。於實驗前一天進行禁食，水分無限制供應。將 SD 大白鼠隨機交叉分組以進行六味地黃丸之丸劑與新開發的低賦形劑製劑之藥物動力學實驗，每隻 SD 大白鼠以口服方式給予相當於每日飲片量(公克)x SD 大白鼠體重(公斤))/(3 餐 x 70 公斤) 之量的藥劑，以胃管方式投藥，投藥時應盡量降低 SD 大白鼠的不適感，減少排斥，以利藥物之投予。並給予一周時間作為體內藥物排空時間。

血液檢體(1.2 mL)抽樣係經由尾動脈抽取，取樣時間點為投藥後 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 與 48 小時，對照組與實驗組取樣時間相同。抽取之全血樣品需置於 9860 x g，離心 15 分鐘後，置於攝氏零下 30 度到進行六味地黃丸指標成分分析為止。

採用牡丹酚與馬錢苷做為指標成分，進行樣品血漿之含量分析。所使用之 HPLC 包括一顆幫浦(Shimadzu 10AT)、極光二列陣檢測( SPD10AD)與自動注射器。固定相為 Merck 50734 LICHrospher RP-18 4 mm x 12.5 cm endcapped，移動相為甲醇與水(1:2, v/v)，UV 檢測波長 274nm，流速 1.0 mL/min。並將對分析條件進行分析方法確效，包含同日內(一日三次)與異日間(至少三天)之準確與精密度實驗，線性與回收率試驗，最低檢測濃度與最低定量濃度的推定。

所獲得之資料進行 noncompartment model 分析。可以計算血中最大濃度(C max)及其達到時間(Tmax)。採用 paired Student t-test 進行統計學比較兩組之藥物動力學參數。

## 參、結果

- 一、本計畫 30 種實驗配方（表一）吸濕經時變化中（圖一），五種賦型劑中以瓜爾膠（T030）與海藻酸鈉（T024）降低水分的吸收效果最好。
- 二、微孔表面積、總表面積與比表面積（圖二）都顯示微孔大小的順序為凍乾粉末>凍乾顆粒>凍乾顆粒（加壓）>碎片>錠劑（小）>錠劑（中）>錠劑（IR）。恰與其吸濕能力大小成正相關（圖三）。施加於製劑本身壓力越大，發現壓力越大，吸濕性質也有下降趨勢（圖四）。
- 三、製出之檢品品質均一恆定，乾減都在 2% 以下，稀醇抽提物與水抽提物大致上都在 90% 以上，水活性均低於 0.65，粉末與顆粒之安息角介於 65-74°，拍擊密度於 80-87°，粉末粒度為 0.25 mm（60 號篩），顆粒粒度約 2.00 mm（10 號篩整粒）（表二）。
- 四、最佳檢品的牡丹酚含量約六味地黃散（生藥粉）的 1.2 倍，馬錢苷含量更是高出有 1.6 倍之多，確實可以達到縮減劑量的作用（表三）。
- 五、採用 non-compartmental pharmacokinetic analysis 進行分析，由  $T_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $T_{1/2}$ , CL, AUC 等藥動學參數證實與傳統丸散具有生體相等性（表四）。
- 六、牡丹酚檢量線（圖五）、馬錢苷檢量線（圖五）與分析方法確效參數（表五~表六）顯示本分析方法可以適用於本研究使用。

## 肆、討論

- 一、發現多醣體確實可降低賦型劑的使用量和水分的吸收。推測其原因可能與多醣體上眾多的 OH 基團有關。由於 OH 基團與水的親合力極高（極性大），所以，水分應會先被多醣體包衣所阻隔，進而保護內層的易吸潮的藥物。
- 二、比表面積越大，表示的是藥物結構孔洞的多寡，孔洞愈多表示可以與空氣中水氣接觸的面積加大，其吸濕效應就會比較明顯。冷凍乾燥粉末本身是一個蓬鬆的粉末，其與空氣接觸的表面積最大，所以，吸濕性最強，反觀，錠劑會依施加的壓力越大，使孔洞緊密見少，與空氣中水氣接觸的面積減少，其吸濕效應就會被抑制。
- 三、形狀與打錠壓力明顯影響中藥濃縮凍乾粉末之水分吸收。壓力會致使錠劑表面孔洞減少，使吸水性質變小。壓力超過 8000 psi，錠劑表面超過一定之緻密性，壓力對吸水性質之影響力，不會再加大。形狀導致表面積越小，與空氣接觸的面積變小，可有效控制水分吸收。
- 四、所製得之檢體，因為都是來自冷凍乾燥粉末座為原料，所以，品質相當恆定。雖然易吸潮，但只要管控得當，可以維持相當穩定之成品。
- 五、相同的重量，檢品的牡丹酚含量約六味地黃散（生藥粉）的 1.2 倍，馬錢苷含量更是高出有 1.6 倍之多，確實可以達到縮減劑量的作用。
- 六、牡丹酚半衰期極短，大約 5 分鐘左右就開始消失，由於分析儀器靈敏度的關係，給藥藥量基本約 40mg/kg，才可順利由血中濃度偵測到牡丹酚的含量，根據文獻，一隻兔子約 2.5-4.0 公斤，表示服用藥內必須至少有牡丹酚 100mg，換算成一般製劑服用量高達 8 克以上，超出兔子胃管給藥極限，故不可行。本計畫後來改採 SD 大白鼠，方可繼續執行後續實驗。
- 七、藥動學實驗之動物，改成 SD 大白鼠，原因為牡丹酚於血中之半衰期相當短，且 SD 大白鼠之分佈體積太大，牡丹酚需要的量極大 (>40mg/kg) 且不易被檢出，SD 大白鼠之分佈體積小，牡丹酚血中濃度變高，牡丹酚較易被檢出。
- 八、馬錢苷原型不論提高濃度(40mg/kg)或是換成 SD 大白鼠均無法被檢出，未檢出僅表示其低於檢測儀器之最低定量濃度(LOQ)，並不表示完全不存在，推測馬錢苷進入人體後，可能有大部分被代謝掉或是與血中的蛋白質結合，低於 LOQ 部分則需要更靈敏之儀器協助。

九、準確性界於 99.94~101.4%，精密度均不大於 5.0%，回收率介於 100-105%之間，結果令人滿意。

## 伍、結論與建議

- 一、多醣體確實產生水分隔絕之作用，作為賦形劑或是膜衣均有作用。**本研究結果顯示高壓錠劑搭配瓜爾膠與海藻酸鈉是最佳組合。**
- 二、初步成果，有幾個配方及劑型性狀，確實可以適度降低賦形劑的使用量與使用量。經由一日飲片量換算的高倍濃縮製劑，一般檢驗與含量檢測均相當一致，足以證明其藥劑學相等性。
- 三、製劑學與動力學上的探討，新製劑與傳統製劑並無太大之差異。
- 四、經由本計畫之研究，可提供六味地黃散品質精緻化思考的可能性，並由藥劑與生物藥劑相等性評估得到證明。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP96-RD-045 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

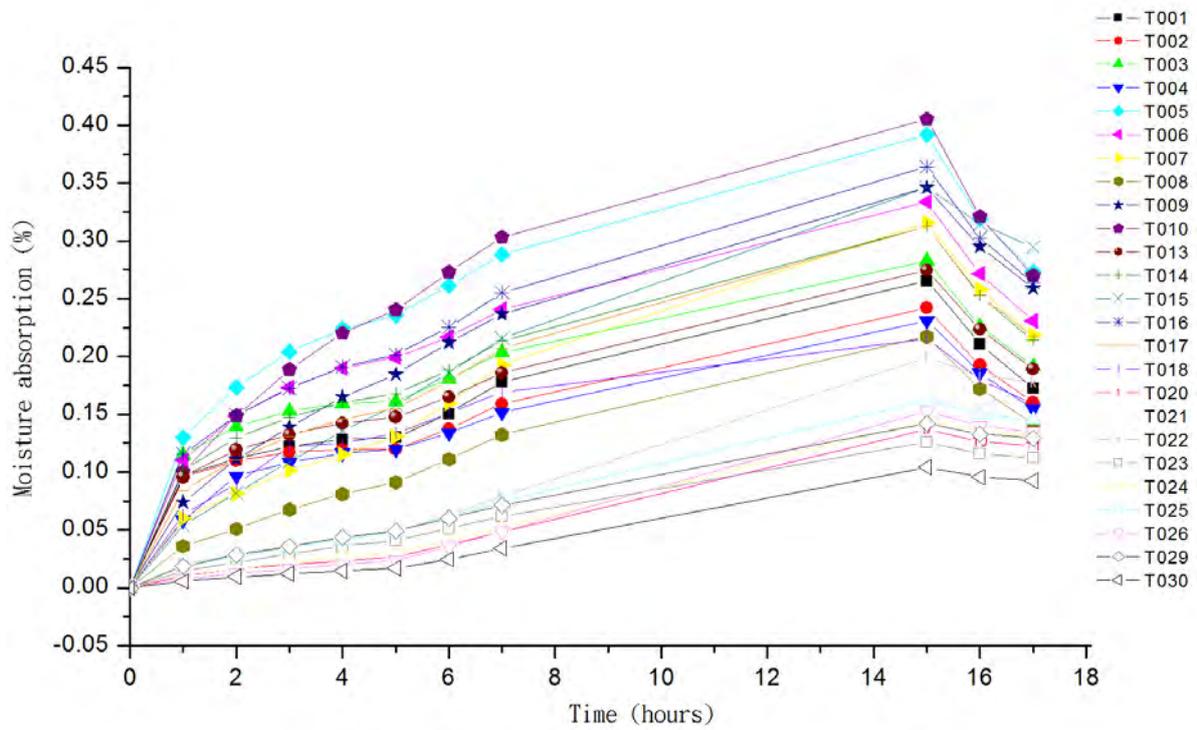
## 陸、參考文獻

1. 行政院衛生署中醫藥委員會 2007, 96 年度中藥品質管制暨中醫政策研究類委託研究計畫, 投標作業手冊, pp.17, 衛生署中醫藥委員會, 台北, 台灣
2. 行政院智財局, 1996, 智財發明公告號第 457091 號發明專利提供一種「濃縮中藥製劑之製法」, 行政院智財局, 台北, 台灣
3. 行政院智財局, 1993, 智財發明公告號第 368417 號發明專利提供一種「濃縮中藥微粒包覆劑之防潮方法」, 行政院智財局, 台北, 台灣
4. Remington, 2005, The science and practices of pharmacy, 21<sup>st</sup> ed., pp. 828t, Lippincott Williams & Wilkins, Maryland, USA.
5. 進藤精一, 石川達雄, 安部郁夫, 2005, 吸著の科學, 第二版, 東京, 日本
6. Tadeusz Kudra, Arun S. Mujumdar, 2005, Advanced Drying Technologies, Marcel Dekker, New York, USA.
7. Georg-Wilhelm Oetjen, Peter Haseley, 2006, Freeze-Drying, second, completely revised and extended edition, WILEY-VCH, New York, USA.
8. Raymond Rowe, Paul Sheskey and Sian Owen, 2003, Handbook of pharmaceutical excipients, fifth Ed.
9. 陳建海, 2005, 藥用高分子材料與現代藥劑, 科學出版社, 北京, 中國
10. 經總、徐素蘭、侯鈺琪、陳忠川、李珮端, Comparison of pharmacokinetics between glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in rabbits, Journal of Food and Drug Analysis 2001; 9(2):67-71.
11. 王孟珠、李珮端、侯鈺琪、徐素蘭、溫國慶、蔡尚元, Pharmacokinetics and conjugation metabolism of naringin and naringenin in rats after single dose and multiple dose administrations, Journal of Food and Drug Analysis 2006; 14(3):247-253.
12. 江秀梅、侯鈺琪、蔡尚元、楊詩瑩、李珮端、徐素蘭、溫國慶, Marked decrease of cyclosporin absorption caused by co administration of Cordyceps sinensis in rats, Journal of Food and Drug Analysis 2005; 13(3):239-243.
13. Dong L, Deng C, Wang J and Shen X: Fast determination of paeonol in plasma by headspace solid phase microextraction followed by gas chromatography –mass spectrometry, Analytica Chimica Acta 2007;

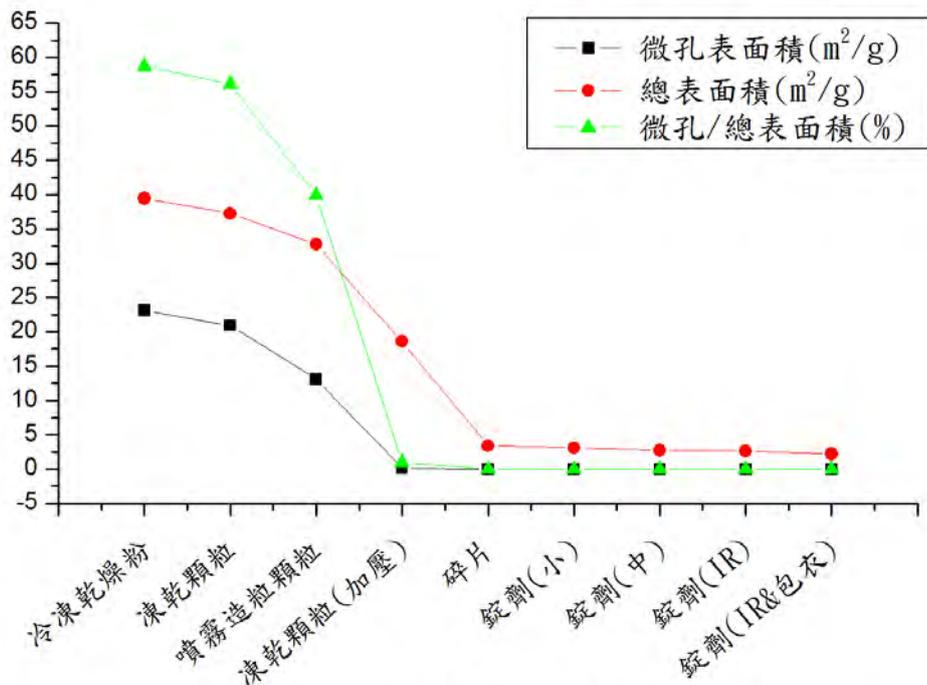
585:76-80.

14. Xie Y, Zhou H, Wong YF, Xu HX, Jiang ZH and Liu L: Study on the pharmacokinetics and metabolism of paeonol in rats treated with pure paeonol and an herbal preparation containing paeonol by using HPLC-DAD-MS method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008; 46:748-756.

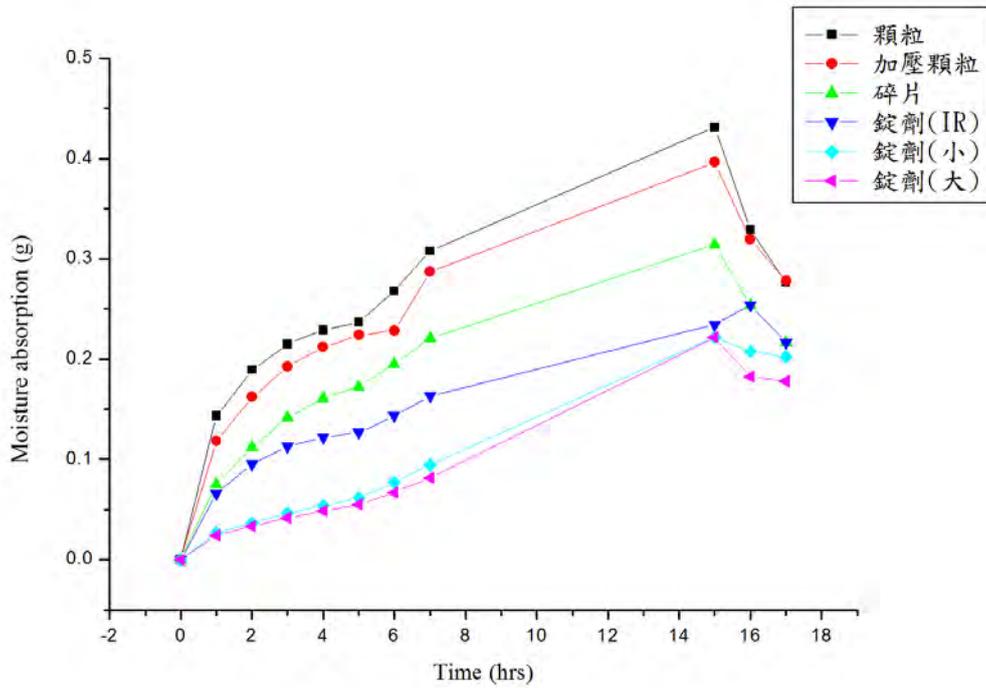
柒、圖、表



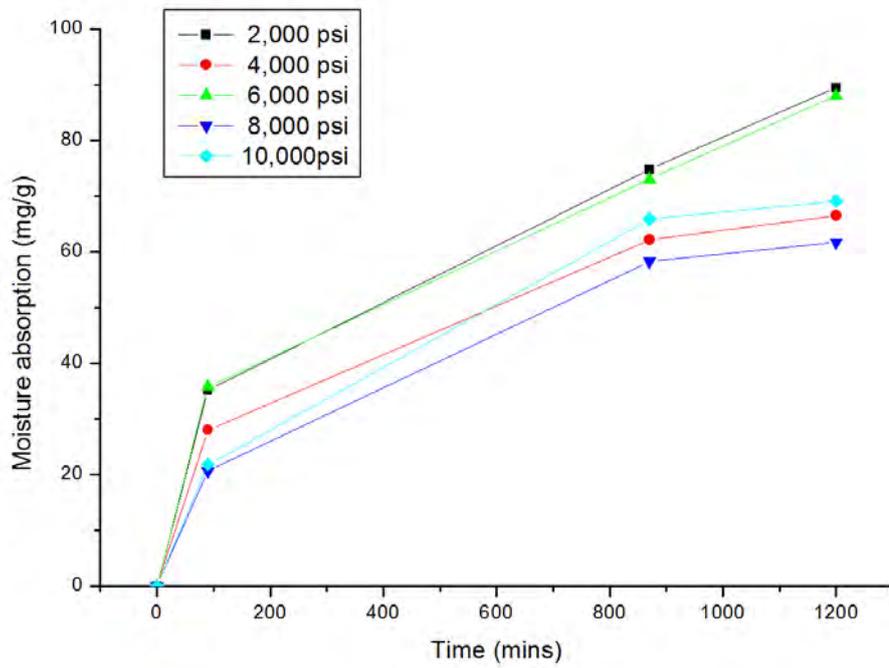
圖一、本計劃30種實驗配方吸濕性經時變化



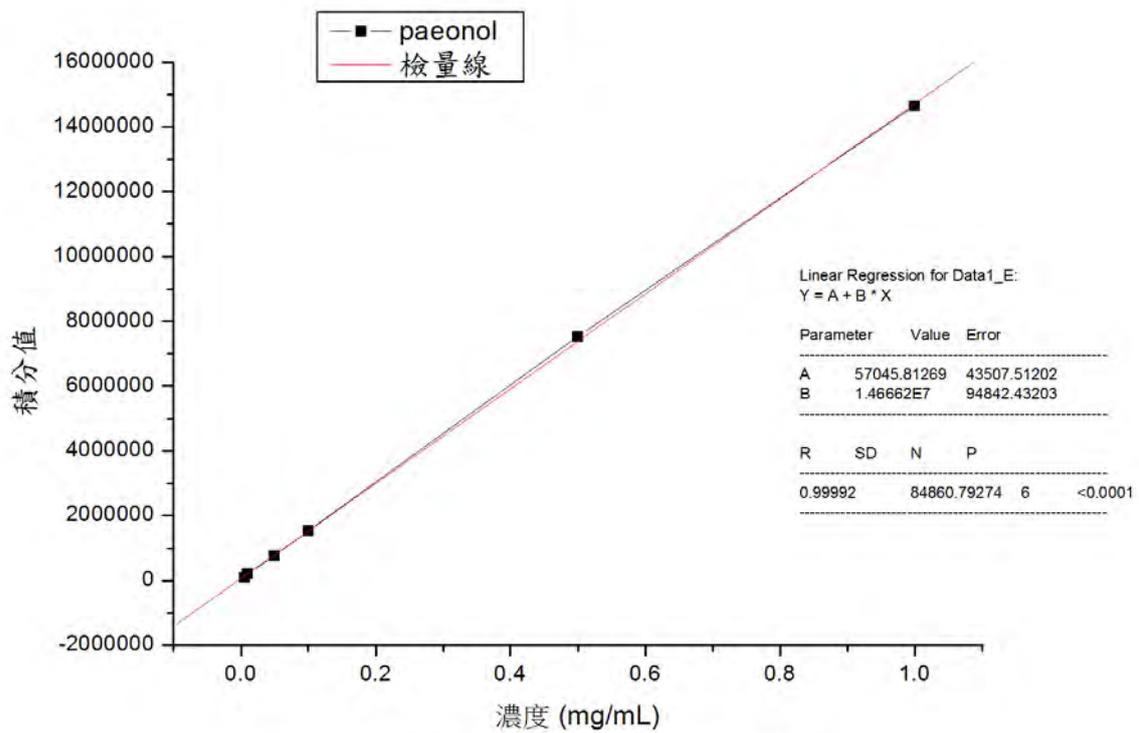
圖二、不同性質劑型之微孔，總表面積與比表面積關係



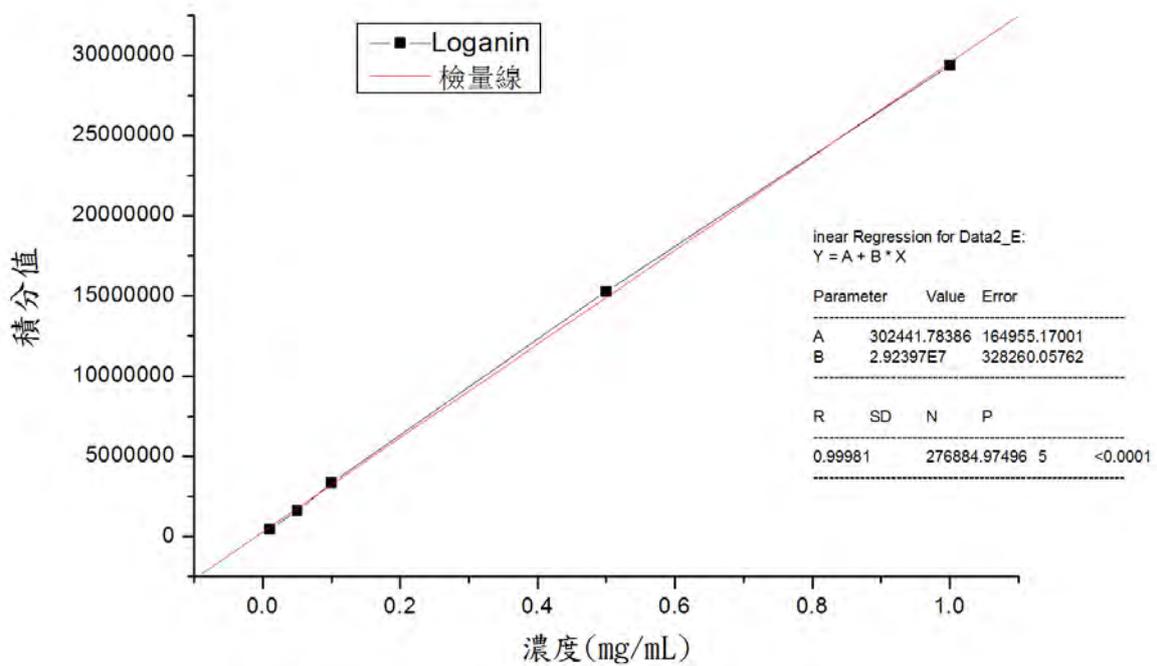
圖三、顆粒形狀對吸水效應之影響



圖四、打錠壓力對吸濕效應之影響



圖五、Paeonol 含量分析檢量線



圖六、Loganin 含量分析檢量線

表一、配方表

	凍乾粉末	凍乾顆粒 (加壓)	碎片	錠劑 (小)	錠劑 (中)	錠劑 (IR)
果膠	T001	T002	T003	T004	T005	T006
環糊精	T007	T008	T009	T010	T011	T012
菊糖	T013	T014	T015	T016	T017	T018
瓜爾膠	T019	T020	T021	T022	T023	T024
海藻酸鈉	T025	T026	T027	T028	T029	T030

表二、一般檢驗與粉體性質

	乾減(%)	稀醇(%)	水抽(%)	水活性	安息角	拍擊	粒徑(mm)
T001	1.5	93	98	0.45	74°	83%	0.25
T002	1.8	94	97	0.42	65°	87%	2.00
T003	1.7	91	100	0.42			
T004	1.6	93	98	0.41			
T005	1.3	93	97	0.42			
T006	2.1	94	99	0.42			
T007	1.4	91	97	0.40	78°	82%	0.25
T008	1.7	92	98	0.44	60°	86%	2.00
T009	1.8	91	96	0.41			
T010	1.3	91	98	0.42			
T011	1.5	92	97	0.41			
T012	1.6	94	98	0.41			
T013	1.3	91	98	0.48	78°	81%	0.25
T014	1.3	90	97	0.45	63°	87%	2.00
T015	1.4	89	99	0.47			
T016	1.3	90	98	0.46			
T017	1.6	89	97	0.44			
T018	1.7	90	98	0.47			
T019	1.1	91	96	0.48	79°	82%	0.25
T020	1.5	91	98	0.44	65°	86%	2.00
T021	1.4	92	97	0.43			
T022	1.4	90	96	0.42			
T023	1.4	89	98	0.45			
T024	1.5	89	99	0.44			
T025	1.3	90	98	0.43	79°	82%	0.25

	乾減(%)	稀醇(%)	水抽(%)	水活性	安息角	拍擊	粒徑(mm)
T026	1.1	91	97	0.48	65°	87%	2.00
T027	1.3	91	96	0.46			
T028	1.3	89	98	0.45			
T029	1.1	92	97	0.46			
T030	1.4	91	97	0.44			

表三、含量測定

	Paeonol (mg/gm)	Loganin (mg/gm)
六味地黃散	11.2 ± 0.2	7.4 ± 0.1
六味地黃丸	8.9 ± 0.2	5.3 ± 0.3
六味地黃凍晶粉	16 ± 0.3	12.84 ± 0.3
T-030	14 ± 0.4	11.22 ± 0.4

N=3

表四、動力學參數

	T <sub>max</sub> (min)	C <sub>max</sub> (mg/gm)	T <sub>1/2</sub> (min)	CL (mL/minkg)	AUC (µg min/mL)
六味地黃散	5.1 ± 0.61	2.5 ± 0.51	2.62 ± 0.32	976 ± 112.48	40.72 ± 9.32
六味地黃丸	6.3 ± 1.21	2.4 ± 0.44	2.52 ± 0.42	1002 ± 132.11	40.63 ± 10.88
六味地黃凍晶粉	4.6 ± 0.43	3.9 ± 0.48	2.51 ± 0.24	1232 ± 143.38	46.21 ± 10.54
T-030	5.3 ± 0.82	3.5 ± 0.31	2.53 ± 0.39	1094 ± 128.32	42.38 ± 9.64

\*N=3

\*口服方式給予相當 paeonol 40mg/kg

表五、分析方法之精密度與準確度

	加入量 (µg/mL)	回收率 (% , X±S.D.)	準確度 (%)	精密度 (CV%)
同日間	0.5	103.3 ± 0.4	100.5	3.38
	1.0	101.3 ± 0.5	100.6	1.12
	1.5	102.3 ± 0.3	101.3	0.39
異日間	0.5	105.3 ± 0.4	101.4	4.32
	1.0	102.3 ± 0.2	99.94	2.14
	1.5	103.3 ± 0.5	100.3	1.21

表六、本實驗指標成分之 LOD 與 LOQ

	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)
Paeonol	0.00064	0.00194
Loganin	0.00183	0.00543

# 人類癌症基因體以驗證探討抗癌中草藥- 子計畫六、中草藥調節抑癌基因對抗肝癌機制的探討(2-2)

呂紹俊  
國立臺灣大學醫學院

## 摘要

### 研究目的：

以肝細胞株 HepG2 尋找會降低肝細胞三酸甘油酯的中藥材，包括方劑或是單方藥材，進一步以動物實驗證實其效果。建立脂肪肝同時引起肝炎之動物模式，再以此動物模式進行中藥治療脂肪肝的測試。

### 研究方法：

測量中草藥萃取液對肝細胞三酸甘油酯含量的影響，以 RT-PCR 及西方墨點法分析脂肪合成相關酵素的變化，也尋找能夠促進脂肪分解的藥材。將具有抑制脂肪合成的藥材與具促進脂肪分解的藥材，組合成新的藥方，以細胞及動物實驗驗證其效果。

### 結果與討論：

這個計畫找到可以降低肝細胞脂肪（三酸甘油酯）含量的方劑兩種，分別為黃連解毒湯及柴胡疏肝湯。這兩種方劑都具降低 SREBP-1 抑制脂肪酸合成酵素(acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase)降低脂肪合成，但對於脂肪分解( $\beta$ -oxidation)則沒有影響。單方藥材中有 13 種具有抑制脂肪合成的作用，4-5 種具有促進脂肪酸氧化的作用，因此由這些藥材組合出新的藥方。藉由已建立餵養 lipogenic diet 八週引起脂肪肝及肝發炎（GOT & GPT 提高）的動物模式，確認黃連解毒湯及柴胡疏肝湯具有降低 Hep G2 細胞 TG 含量的作用。

關鍵詞：肝癌、中草藥、基因體、脂肪肝

# **Evidenced-base Studies on Anticancer of Chinese Herbs by Genomic Medicine-Subproject 6 -Studies on the Anticancer Activity of Chinese Herbs : Regulation of Apoptosis Related Genes and Tumor Suppressor-related Genes (2-2)**

Shao-Chun Lu

National Taiwan University college of medicine

## **ABSTRACT**

### **Aim:**

To screen Chinese medicines that could decrease cellular triacylglycerol that has potential to be used in the treatment of fatty liver. Set up an animal model of fatty liver with hepatosteatosis that can be used for screen herbal medicines in treatment of fatty liver.

### **Method:**

Measure the contents of cellular triacylglycerol (TG) and analyze the levels of acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase by RT-PCR and/or Western blotting at 48 h after herbal extract treatment. Another goal is to search herbal extracts that could stimulate fatty acid oxidation. Combine those could inhibit fatty acid synthase and those could stimulate fat oxidation in the treatment of fatty liver in cellular models and in an animal model.

### **Results & Discussion:**

We have identified HLJDT and CHSGT that could decrease cellular TG in HepG2 cells. Both HLJDT and CHSGT lowered SREBP-1, acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase and hence decrease fatty acid synthesis. Another 13 herbal medicines were found could decrease cellular TG, another 4 to 5 could increase oxidation of fat. A new mixture that contains herbal medicines that could decrease fat synthesis and increase fat oxidation was designed and used in an animal study. The fatty liver animal model was set up by feeding C57BL6 mice with a lipogenic diet for 8wks. The mice had fatty liver and higher plasma ALT and AST activities. The animal model is used in a fatty liver treatment study using the newly designed herbal medicine mixture.

Keywords: Hepatocarcinoma, Chinese herbs, genomic, fatty liver

## 壹、前言

於後基因時代，為提升基因體中醫藥研究，本計畫將對我國高罹患率之肝癌進行「證據基礎」(Evidenced Based)之探討，本子計畫為由來自高雄醫學大學、臺灣師範大學及台大醫學院等三所大學研究學者組成之群體計畫之一，以基因體學方法尋找可用於抗肝癌之作用之中草藥。分析可能具有抗癌保肝相關作用之中藥、草藥或方劑共 68 種之萃取液尋找能降低肝細胞脂肪含量的藥材或成分，並以動物實驗證實該中草藥萃取液抗癌作用之活性。HCC 上含有相當多的脂肪油滴(triglyceride droplets) (Okuda and Okuda, 1991; Kanno *et al.*, 1989)，越來越多的證據顯示非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)可提高 HCC 的風險(El-Serag 2007; Day CP. 2006)，報導顯示 NAFLD 的 prevalence 在 10-51%之間，因此其治療也普遍受到重視。但是到目前並沒有專門被用於治療脂肪肝的藥物，因此我們藉這次機會在所選定的單方或複方中草藥材萃取液中是否有能降低肝細胞三酸甘油酯(Triacylglycerol, TG)的成分，我們將 HepG<sub>2</sub> 細胞培養在添加胰島素的高葡萄糖 DMEM 中或是再添加 LXR agonist 以提高細胞中 TG 含量，用來篩選能使肝細胞減少 TG 累積的藥材。

## 貳、材料與方法

中草藥萃液製備由 GMP 藥廠提供下列藥材，每 1 公克藥材萃取成 1 mL 成品。

<u>方劑</u>	<u>單方藥材</u>		
小柴胡湯(水萃)	枳實	棉花根	劍葉鳳尾草
小柴胡湯(酒精萃)	白芍	細葉碎米蕨	鴉膽子
四逆散	黃耆	半枝蓮	山梔子
芎歸膠艾湯	大黃	紅花	山慈菇
桂枝加龍骨牡蠣湯	山梔子	鬱金	雞血藤
桂枝加朮附湯	黃連	莢朮	龍舌黃
桂枝茯苓丸	黃柏	夏枯草	杜仲
當歸芍藥散	半夏	川芎	苦參
黃連解毒湯(HLJDT)	厚朴	枳殼	馬齒莧
紫草根牡蠣湯	茯苓	香附	蟾酥
柴胡舒肝湯(CHSGT)	生薑	陳皮	黃獨
散腫潰堅湯	紫蘇葉	連翹	酸棗仁
血府逐瘀湯	黃芩	荊三稜	牡丹皮
半夏厚朴湯	龍膽	莢朮	長春花
香蘇散	栝樓根	當歸尾	昆布
柴胡龍骨牡蠣湯	知母	葛根	柴胡
核桃承氣湯	桔梗	生麻	
香蘇散			

**細胞培養及中藥處理：**人類肝癌細胞之 HepG2 細胞株，以含有 5% fetal bovine serum (FBS)、100U/ml penicillin 以及 100U/ml streptomycin 的 DMEM 培養在 37°C、含 5%CO<sub>2</sub> 的細胞培養箱中。細胞貼附於培養皿底部，當細胞快長滿時可進行繼代培養。將 6×10<sup>5</sup> 的 HepG2 細胞培養於 6 孔盤培養隔夜後，在細胞處理或不處理 50nM T0901317 下，加入不同劑量 (0, 2.5 or 5 μl/ml) 各種中草藥萃液，繼續培養 48 小時，收取細胞做三酸甘油酯、RT-PCR 及 Western blot 分析。

**肝細胞 TG 含量分析：**Hep G<sub>2</sub> 細胞培養於含 10%FBS 之 DMEM，每一 6 孔盤種 5 x 10<sup>5</sup> 細胞，第二天細胞貼附後更換培養液，並加入上列的藥材萃液 5-10 μl/ml，48 小時後收取細胞。以溶劑(chloroform/methanol)萃取脂質，取定量至乾淨試管中，以氮氣將溶劑吹乾後，測量 TG 含量。另一部份細胞則用於測量蛋白質含量，最後以 TG/蛋白質(TG μg/mg protein)表示，並予未加藥物處理之

對照組比較。

**RNA 分離及純化：**細胞株之 RNA 以 TRizol™ 萃取，步驟簡述如下，將  $5 \times 10^6$  細胞以 1 ml TRizol™ 均勻懸浮後，置於室溫約 5 分鐘，加入 200  $\mu$ l 氯仿( $\text{CHCl}_3$ ) 劇烈搖晃 15 秒後靜至於室溫 5 分鐘，12000 xg 於 4°C 離心 15 分鐘，取上清液至新離心管中加入 0.5 ml Isopropanol 混合均勻後靜置於室溫 10 分鐘，再以 12000 x g 於 4°C 離心 10 分鐘，倒去上清液，以 75%酒精清洗，7500 x g 離心 5 分鐘，風乾 2 分鐘，溶解於 50  $\mu$ l DEPC-ddH<sub>2</sub>O 中，可加熱至 60°C 作用 10 分鐘幫助 RNA 完全溶解。利用 spectrophotometer 測量 260 nm 與 280 nm 波長之吸光值，且 260/280 的比值應該要大於 2.0，以 260 nm 的吸光值定量 RNA 的濃度。

**反轉錄即時聚合酵素鏈鎖反應(RT-PCR)定量分析：**取定量的 RNA (1-5  $\mu$ g)加入 1-5  $\mu$ l random hexamer (50 ng/ml) 或 oligo-d(T) (1mM)，於 70°C 反應 10 分鐘，於 4°C 5 分鐘，再加入有 buffer、DTT (10 mM)及 dNTP (10 mM)的混合液，置於 42°C 5 分鐘後加入 1  $\mu$ l Superscript II™ RT，於 42°C 反應 50 分鐘、70°C 反應 15 分鐘後，於 4°C 終止反應，RNA 便完成反轉錄成 cDNA。以滅菌二次水將 cDNA 濃度調整為 50 ng/ $\mu$ l，取適量 cDNA 作為模板，加入 5 $\mu$ l 10X Taq buffer、1 $\mu$ l 10mM dNTP、3'與 5'端引子(皆 10 $\mu$ M)各 1 $\mu$ l，及 0.5 $\mu$ l 5U/ $\mu$ l Taq DNA polymerase (Bioman)，並以滅菌二次水將總體積補至 50 $\mu$ l 以下述條件進行聚合酶連鎖反應(PCR)，反應結束後以 1%洋菜膠體電泳圖譜觀察其產物。部分實驗以 RT-qPCR 做 RNA 定量，於 0.5 ml 薄壁離心管中，每管加有 5  $\mu$ l 的 4 倍稀釋的 cDNA 作 PCR 的模板，並加入特異性引子正股(sense)和反股(antisense)及 SyBr Green master mix，於聚合酵素鏈鎖反應器(ABI 7300)進行反應。所使用引子序及 PCR 條件列於下表：

表一、RT-PCR 引子序列及反應條件

基因 (GenBank)	方向	Tm (°C)	序列(5' →3')
<i>FAS</i> (NM_004104)	F	60	TGTTTGAGTTCGTGGAGCAG
	R		AACTCCAGGTTGTCCCTGTG
<i>ACC</i> (NM_001093)	F	60	CAAGAAGCAGGCAAACATCA
	R		GACAAACTCAGCGGGAGAAG
<i>ACO</i> (NM_007292)	F	60	GAACTCACCTTCGAGGCTTG
	R		CAGCTTCTCCCACAAGGAAG
<i>GPAT</i> (NM_020918)	F	60	AGTGAGGAATGGGGTGAGTG
	R		CAGTCACATTGGTGGCAAAC
<i>SREBP-1</i> (NM_001005291)	F	60	CGGAGAAGCTGCCTATCAAC
	R		GGTCAGTGTGTCCTCCACCT
<i>GAPDH</i> (NM_002046)	F	60	AAAGGATCCACTGGCGTCTTCACCACC
	R		GAATTCGTCATGGATGACCTTGGCCAG

表二、RT-qPCR 引子序列

基因 (GenBank)	方向	序列(5' →3')
<i>FAS</i> (NM_004104)	F	AGCCGCCATCTACAAC
	R	CGTCTTCCACACTATCG
<i>ACC</i> (NM_198834)	F	TTGATACTGGCTGGCTGGAC
	R	AGGAGTGAAGGAAGTTAGAGACG
<i>SREBP-1c</i> (NM_004176)	F	TCAGCGAGGCGGCTTTGGAGCAG
	R	CATGTCTTCGATGTCGGTCAG
<i>GAPDH</i> (NM_002046)	F	GCCAGTACAGCCGGGAAGAC
	R	GGAGTCGGTTAGCAGTATGTTGTC

**西方轉漬分析(Western blotting analysis)：**細胞株之蛋白質萃取，步驟簡述如下，將  $5 \times 10^6$  細胞以 lysis buffer 均勻懸浮後，樣品以沸水加熱 10 分鐘。於室溫 12000 xg 離心 10 分鐘，取上清液，經蛋白質濃度測試，進行 SDS-polyacrylamide 明膠電泳分析（電壓 200V）60 分鐘。再經以電壓 100V 將蛋白質轉漬至 PVDF membrane，70 分鐘後以特定抗體進行免疫偵測反應。在室溫下 1 小時或在 4°C 中 16 小時，移除 blocking buffer 後，加入適當稀釋的一級抗體，視個別抗體，在室溫下用震盪器反應 1-2 小時，接著以 TBST 清洗 PVDF membrane 三次，每次時間為 5 分鐘。清洗過後，加入適當稀釋的二級抗體，使其與一級抗體結合，在室溫反應 1-1.5 小時。之後同樣以 TBST 清洗 PVDF membrane 三次，每次時間為 5 分鐘。最後，利用 enhanced-chemiluminescence (ECL) 系統與二級抗體上帶有的酵素 HRP(horse radish peroxidase) 進行反應，產生冷光，並以 Kodak Biomax light film 覆蓋於 PVDF membrane 上進行壓片數分鐘，洗片後即可獲得影像。

**細胞內蛋白質定量：**將剩餘之細胞液，利用市售 DC protein assay kit (Bio-rad) 進行定量：首先配製 BSA (bovine serum albumin) 標準品，濃度包括 1.4 $\mu$ g/ $\mu$ l、0.7 $\mu$ g/ $\mu$ l、0.35 $\mu$ g/ $\mu$ l、0.175 $\mu$ g/ $\mu$ l、0 $\mu$ g/ $\mu$ l，各溶液體積為 20 $\mu$ l。另外將蛋白質樣品做適當稀釋至體積為 20 $\mu$ l，加入 100 $\mu$ l 反應試劑 A 以及 800 $\mu$ l 反應試劑 B 均勻混合，在室溫下反應 15 分鐘後，以分光光度計測量 O.D.<sub>655</sub> 之吸光值，繪製標準曲線可推算出蛋白質濃度。

#### 動物實驗：

動物實驗一：採用 C57BL/6 品系小鼠作為動物模式，十週齡的雄性 C57BL/6

小鼠共 15 隻購自台大醫學院實驗動物中心，將小鼠依體重略分為 3 組，使各組間小鼠平均體重相近；同一組小鼠皆飼養於同一鼠籠，每隔三天紀錄體重，動物房溫度維持於  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光照週期 14 小時（上午 6 時至下午 8 時），黑暗週期為 10 小時，飼養期為三週。三組動物分別為控制組餵養一般飲食，對照組及實驗組餵養自行設計配製之 lipogenic diet，實驗組以每公斤體重每天灌食相當於 4g 柴胡疏肝湯。C57BL/6 小鼠飼養 3 週後犧牲，犧牲前經過 16 小時的禁食，先秤體重後再以眼窩採血方式收集血液至含有 EDTA 抗凝劑(BD Vacutainer™)的 1.5ml 微量離心管中以防止血液凝集。之後迅速收集小鼠之肝臟組織，經秤重後以 PBS 潤洗，並迅速置於液態氮中，再儲存於  $-80^{\circ}\text{C}$  以供日後分析。另外每隻小鼠各取一小塊肝臟組織置於 4% paraformaldehyde 中（組織和固定液的體積比例至少要 1:15），在室溫下固定後，以清水洗滌並放入包埋夾中，送至台大醫院病理部進行石蠟包埋及切片。血液在  $4^{\circ}\text{C}$  下以 3000rpm 離心 20 分鐘，將血漿和血球分離後，吸取上層的血漿，小量分裝後儲存於  $-80^{\circ}\text{C}$ ，以備分析三酸甘油酯 (Triglyceride, TG)、總膽固醇 (Total cholesterol) 含量、ALT 及 AST 活性。

動物實驗二：雄性 C57BL/6 小鼠購自台大醫學院實驗動物中心，先以一般飲食（控制組）或 Lipogenic diet 餵養 8 週，各組犧牲 3 隻作，分析肝臟脂肪含量，肝組織切片及血清 GOT 及 GPT 活性。再將控制組改換餵食一般飼料並進行中藥治療（實驗組）或不治療組（對照組）。此實驗正在進行中，預計在 12 月中會結束。

## 參、結果

在對 Hep G2 細胞 TG 含量影響的測試中，我們採用了兩種模式，一是以含 10%FBS 之 high glucose (450 mg/100ml) DMEM 添加胰島素，第二種是在上述條件下再添加 T090131 (一種 LXR agonist)，來提高肝細胞 TG 含量。總共篩選 18 種中藥複方，由其中我們發現黃連解毒湯及柴胡疏肝湯具有降低 Hep G2 細胞 TG 含量的作用，因此我們繼續做深入的探討。圖一(A)及(B)是測試黃連解毒湯在這兩種模式下的結果；結果顯示，黃連解毒湯具有降低肝細胞 TG 的作用，且呈現明顯的劑量關係(0, 2.5 及 5  $\mu$ l/ml)。圖二則顯示在有或沒有添加 T0901317 的情況下，黃連解毒湯都會抑制肝細胞脂肪酸合成的關鍵酵素 acetyl-CoA carboxylase (ACC)及 fatty acid synthase (FAS) mRNA 表現量，卻都不明顯影響脂肪酸氧化酵素 Acyl-CoA oxidase (ACO) mRNA 的表現量。而圖三及四的結果顯示柴胡疏肝湯具有與黃連解毒湯相似效果，都可降低 HepG2 細胞 TG 含量，抑制 ACC 及 FAS mRNA 表現。由於 SREBP-1 是調控 ACC 及 FAS 的關鍵轉錄因子，因此我們進一步分析 SREBP-1 mRNA 的表現量是否也受黃連解毒湯及柴胡疏肝湯抑制。圖五的結果顯示在有或沒有添加 T0901317 的情況下，黃連解毒湯及柴胡疏肝湯都具有抑制 SREBP-1 mRNA 表現的作用。為了確定這些作用，我們進一步以 RT-qPCR 定量 mRNA，結果顯示雖然不如以半定量 RT-PCR 的結果明顯，黃連解毒湯及柴胡疏肝湯在 5  $\mu$ l/ml 的劑量都能有效抑制 ACC、FAS 及 SREBP-1 mRNA(圖六)。圖七及八顯示的是，黃連解毒湯及柴胡疏肝湯對 HepG2 肝細胞 FAS 蛋白質表現量都有抑制的效果。以上的細胞實驗結果顯示黃連解毒湯及柴胡疏肝湯可透過降低 SREBP-1 mRNA 表現而減少脂肪酸合成酵素 ACC 及 FAS，進而減少三酸甘油酯合成，具有改善脂肪肝的潛力。因此我們規劃一個動物實驗來測試這個可能，這個動物實驗另一主要目的是建立一個脂肪肝的動物模式。我們參考了一些文獻，設計了一種 Lipogenic diet 餵養 C57BL6 的小鼠 3 週，並有一組動物除了餵養 Lipogenic diet 外同時以胃管灌食方式給予柴胡疏肝湯，由組織切片的結果發現以 Lipogenic diet 餵養 3 週的 C57BL6 的小鼠確實已經有脂肪肝的情形，由病理科醫師的判斷是屬於 Macrovesicular steatosis(圖九)，但是同時灌食柴胡疏肝湯並沒有改善的效果(圖九 B)。不過由蛋白質分析顯示灌食柴胡疏肝湯的小鼠肝組織的 FAS 蛋白質含量卻已有明顯的比 Lipogenic diet 組減少( $p < 0.05$ ) (圖十)。我們也以 *ob/ob* 肥胖鼠測試黃連解毒湯是否能改善 *ob/ob* 肥胖鼠的脂肪肝，結果顯示 *ob/ob* 肥胖鼠有嚴重脂肪空泡堆積，且經病理醫師判斷是 microvesicular steatosis，為一種較嚴重不易復原的脂肪肝，且在血管

周圍有淋巴球(lymphocyte)聚集的情形。雖然灌食黃連解毒湯後並沒有改善脂肪堆積的情形，但卻有改善肝發炎的狀況，血管周圍有淋巴球(lymphocyte)聚集的情形明顯減少。

由於複方在動物實驗的效果並不如預期，可能是黃連解毒湯及柴胡疏肝湯在我們的分析發現它們並沒有促進脂肪分解的作用，加上這兩方劑是長久使用的方劑，不易取得專利權。因此我們也篩選了 50 種單方中草藥，試圖從這些藥材中找到能夠抑制脂肪合成及促進脂肪分解的藥材。我們從初步的篩選找到 18 種具有降低肝細胞 TG 作用的藥材，進一步我們以 Western blot 直接測量這些對 FAS 蛋白質的影響，結果發現其中 13 種藥材會抑制 FAS 蛋白質的表現量，其它 5 種則不會抑制 FAS 蛋白質的表現量，甚至有些會些微提高 FAS 蛋白質的表現量，我們判斷這 5 種藥材可能具促進脂肪合成的效果，圖十一是篩選的結果的一個代表。我們商請 GMP 藥廠安排必安研究所的所長及合作的中醫師，依他們的經驗配了兩個藥方分別都含有這兩類藥材，我們根據他們的處方測試在細胞及動物實驗的效果。圖十二顯示，這兩個藥方在細胞實驗都能有效降低 HepG2 細胞中 TG 含量，且具有劑量關係。因此我們進一步測試這兩個藥方對細胞存活率的影響，我們發現配方 A 對 HepG2 的存活率並沒有明顯的影響，但是配方 B 卻明顯的降低了 HepG2 的存活率(圖十三)，因此我們在後續的動物實驗採用了配方 A。由第一次動物實驗的經驗，我們認為應該加入具有促進脂肪氧化的藥材。除此之外，我們改變為治療的策略，將小鼠餵養 Lipogenic diet 八週之後換成一般飼料，同時給予配方 A 治療。首先我們在八週時比較了餵養 Lipogenic diet 及一般飼料對肝臟及血漿脂肪的影響，圖十四顯示 Lipogenic diet 肝臟 TG 含量是控制組的 3 倍左右，肝臟膽固醇含量是控制組的 2 倍左右。由圖十五的組織切片圖可以清楚看到，餵養 Lipogenic diet 的小鼠肝臟有大而且數量多的脂肪油滴，這與生化分析的結果相符。而且餵養 Lipogenic diet 小鼠血漿 ALT 及 AST 活性及血漿膽固醇濃度都明顯高於控制組( $p < 0.05$ )，顯示餵養 Lipogenic diet 八週可以使小鼠有脂肪肝甚至肝發炎的形態(圖十六、十七)。另外，餵養 Lipogenic diet 四週後改換為一般飼料在餵養四週，的小鼠雖然血漿 ALT 及 AST 活性與正常組沒有明顯差異，但肝臟脂肪含量仍比正常組明顯的高，顯示飲食治療有部分的效果，仍不能在短期內完全復原。

我們隨後將餵養 Lipogenic diet 八週的小鼠都改換成一般飼料，分為兩組分別不做治療或是給予配方 A 做治療，目前實驗進行二週，計畫再過一~二週後犧牲到這些小鼠做分析。

另外，在閱讀關於脂肪酸合成酶 FAS 的相關文獻，我們發現不少報導指出

carcinoma 的癌細胞（尤其是乳癌及前列腺癌）都有較高的 FAS，甚至認為 FAS 是治療的標的，因此我們也測試在 HepG2 具降低 FAS 表現的藥材是否也能降低乳癌細胞 FAS 表現。我們先以 MCF7 乳癌細胞做篩選，發現有一些藥材可明顯降低 MCF7 乳癌細胞 FAS 蛋白質（圖十八）。文獻也指出乳癌組織 HER2/neu 表現高的通常 FAS 表現高而且預後較差，我們也找了一乳癌細胞株 Au565 有較高的 HER2/neu 表現，測試一些藥材對其 HER2/neu 表現的影響。結果是有一些藥材對 HER2/neu 及 FAS 的抑制效果相當明顯（圖十九），我們選了其中兩種做劑量試驗，發現 A23 及 A24 都能有效抑制 Au565 乳癌細胞 HER2/neu 表現且具有明顯劑量效應，其中尤其是 A24 的效果更是明顯（圖二十）。

本實驗室已經建立以 LXR agonist--T0901317 促進 TG 合成，使 HepG2 以 T0901317 處理 48 小時，細胞內 TG 增加至約 1.7~2 倍（圖二十一 B），或是以 Intralipid（臨床使用之靜脈脂肪輸液）直接提供脂肪，使 HepG2 細胞內 TG 增加至約 3~4 倍（圖二十一 C）。

肝細胞參與脂肪酸合成的 fatty acid synthase(FAS)及 acetyl-CoA carboxylase (ACC)也分別提高了 3.4 倍及 2.7 倍（圖二十二 A），而控制 FAS 及 ACC 基因表現的轉錄因子 SREBP1-C mRNA 表現量提高了 4 倍多（圖二十二 B）；FAS 蛋白質表現量也明顯的提高（圖二十二 C）。用這幾種細胞條件可以用來篩選降低肝細胞 TG 含量的物質。

有幾個脂肪肝的動物模式被討論過，一些是先天遺傳缺陷或是基因剔除鼠 (ob/ob, db/db, PTEN-KO, MAT1A-KO, GNMT-KO)，高脂飼料 (high fat diet(HFD))、methyl groups deficient diet (MCD)或是 HFD+MCD 結合的飼料 (Varela-Ray et al., 2009)。其中先天遺傳缺陷或是基因剔除鼠雖然有部分可以發生 NASH，但是動物不易取得或是費用太高；而 diet induced NAFL 卻不見得會發生 NASH。因此，我們自行建立了一個以高糖+膽固醇飼料(Lipogenic Diet, LD) 餵養 C57BL6 小鼠引起 NASH 的動物模式。C57BL6 小鼠在餵養 LD 四週後肝臟 FAS 蛋白質表現明顯提高，且明顯的有脂肪油滴，形成所為的 macro-vesicular steatosis（圖二十三）。餵養 LD 八週使肝臟的脂肪油滴更明顯（圖二十四），肝臟三酸甘油酯及膽固醇提高數倍（圖二十五），而且血清 AST 及 ALT 明顯的提高（圖二十六）。

而我們也嘗試使用過 ob/ob 鼠，發現 ob/ob 鼠餵養 chow diet 就會發生 micro-vesicular steatosis，而且有 macrophage infiltration 的情形，是一種比較嚴重的 NASH（圖二十七），我們曾以中藥灌食 ob/ob 鼠，發現雖然肝臟脂肪沒有降低，但是 macrophage infiltration 的情形卻可以改善。因此我們認為以 LD 餵養

C57BL6 小鼠 4-8 週的動物模式適合用來評估降低脂肪肝及肝發炎的有效成分，而 ob/ob 鼠或許也可以嘗試。

我們總共篩選 18 種中藥複方，由其中我們發現黃連解毒湯及柴胡疏肝湯具有降低 Hep G2 細胞 TG 含量的作用（圖二十八）。深入的探討顯示在有或沒有添加 T0901317 的情況下，黃連解毒湯與柴胡疏肝湯都會抑制肝細胞脂肪酸合成的關鍵酵素 acetyl-CoA carboxylase (ACC) 及 fatty acid synthase (FASN) 與調控 ACC 及 FASN 的關鍵轉錄因子 SREBP-1 表現量，卻都不明顯影響脂肪酸氧化酵素 Acyl-CoA oxidase (ACO) mRNA 的表現量（圖二十九）。我們規劃一個動物實驗來測試並建立一個脂肪肝的動物模式。我們也篩選了 50 種單方中草藥，試圖從這些藥材中找到能夠抑制脂肪合成及促進脂肪分解的藥材。我們從初步的篩選找到 18 種具有降低肝細胞 TG 作用的藥材，進一步我們以 Western blot 直接測量這些對 FASN 蛋白質的影響，結果發現其中 13 種藥材會抑制 FASN 蛋白質的表現量，其它 5 種則不會抑制 FASN 蛋白質的表現量，甚至有些會些微提高 FASN 蛋白質的表現量，我們判斷這 5 種藥材可能具促進脂肪合成的效果，圖三十是篩選的結果的一個代表。我們商請 GMP 藥廠安排必安研究所的所長及合作的中醫師，依他們的經驗配了兩個藥方分別都含有這兩類藥材，我們根據他們的處方測試在細胞及動物實驗的效果。圖三十一顯示，這兩個藥方在細胞實驗都能有效降低 HepG2 細胞中 TG 含量，且具有劑量關係。因此我們進一步測試這兩個藥方對細胞存活率的影響，我們發現複方 A 對 HepG2 的存活率並沒有明顯的影響，但是配方 B 卻明顯的降低了 HepG2 的存活率（圖三十二），因此我們在後續的動物實驗採用了複方 A。由第一次動物實驗的經驗，我們認為應該加入具有促進脂肪氧化的藥材。我們將小鼠餵養一般飼料(control)、Lipogenic diet(LD) 或是 Lipogenic diet(LD)+mix A (A 組) 八週之後，我們發現 mix A 可以抑制脂肪肝的形成（圖三十三）。但是同一組 7 隻小鼠的反應確有相當的差異。

## 肆、討論

非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver)是常見的問題，可能演變成 cirrhosis, liver failure and hepatocellular carcinoma (Day CP, 2006)，Yahagi 等人 (Yahagi et al. 2002)報導指出在 HCC 明顯的較高的脂肪合成的酵素活性，Bugianesi(Bugianesi E, 2007)也指出脂肪肝與 HCC 的發生有密切的關連。因此我們也發展可以評肝細胞油脂(特別是 TG)的方法，T0901317 是一種 LXR agonist，可經由活化脂肪合成途徑提高肝細胞 TG (Edwards et al. 2002；Zaima et al. 2006)。我們在兩個模式中尋找能夠降低肝細胞油脂(TG)的中草藥，找到 2 種可以明顯降低肝細胞油脂(TG)的方劑--黃連解毒湯及柴胡疏肝湯，這二種方劑在幾次重複實驗中都可以看到降低細胞 TG 的效果(圖一及三)。從 mRNA 及蛋白質的分析顯示黃連解毒湯及柴胡疏肝湯抑制 SREBP-1 轉錄因子，而抑制 ACC 及 FAS 這二個負責脂肪酸的酵素的生成，而使肝細胞中 TG 含量降低。細胞實驗所使用的黃連解毒湯及柴胡疏肝湯的量並不影響細胞存活(MTT assay)，顯示並沒有明顯的毒性，因此其降低 ACC 及 FAS 的作用應不是因為藥物對細胞的毒性所造成的。對於在動物實驗雖看到餵食柴胡疏肝湯小鼠肝臟 FAS 蛋白質明顯減少，但肝臟脂肪肝並沒有改善，可能是因為柴胡疏肝湯只有抑制脂肪合成的作用，而沒有促進脂肪分解的作用，不能夠阻止 lipogenic diet 所引起的肝臟脂肪堆積；也可能是我們的實驗時間不夠長或是給的藥量不足，我們認為這個動物實驗模式有改善的空間。另外以 *ob/ob* 肥胖鼠的實驗顯示，*ob/ob* 肥胖鼠不需要特別的飼料配方就會有脂肪肝，但是脂肪肝太過嚴重且持續進行恐難以治療，加上動物費用昂貴，因此不適合於這個計畫使用。

另外，在單方藥材的測試結果發現有十多種降低 TG 的藥材，這些藥材有一些會抑制 FAS 蛋白質表現，有一些卻沒有此作用，我們發現是因為這些藥材是經由促進脂肪分解來降低肝細胞 TG 含量。因此我們請 GMP 藥廠的中醫藥專家將這些藥配製成新的藥方，裡面有抑制脂肪合成及促進脂肪分解作用的二種新配方，在細胞實驗這樣的配方都可明顯抑制肝細胞 TG 含量，但其中有一個配方對細胞具有相當強的毒性，在動物實驗我們採用不會造成細胞死亡的配方。在開始動物治療實驗之前，我們先審慎的評估我們的動物模式。我們以一般小鼠飼料或是 lipogenic diet 餵養 C57BL6 小鼠八週，我們做肝臟脂肪含量分析及組織切片發現餵養 lipogenic diet 八週的 C57BL6 小鼠有明顯的肝脂肪堆積的情形，加上血漿 ALT 及 AST 活性都提高，顯示已經達到嚴重脂肪肝的情形。這次動物實驗的策略是在引起脂肪肝之後，將飼料換成一般小鼠飼料(不會使肝臟脂肪繼

續堆積),同時給予新配方之治療。由另一實驗的結果看起來在為養 4 週 lipogenic diet 後換成一般飼料,雖然有助於脂肪肝的改善,但在 4 週後肝臟脂肪仍舊偏高。因此我們認為餵養 lipogenic diet 八週的 C57BL6 小鼠有較嚴重的脂肪肝,應該不會在換成一般飼料之後 4 週內就有明顯的改善,因此我們在這個時候給予中藥「治療」,希望能有好的成果,目前實驗仍在進行中。

不少報導指出 carcinoma 的癌細胞(尤其是乳癌及前列腺癌)都有較高的 FAS,因此 FAS 被認為是癌症治療的新標的。我們所篩選的藥材中有幾樣除了在 HepG2 會降低 FAS 蛋白質,而且也會降低乳癌細胞中 FAS 蛋白質的效果,更值得注意的是這些藥材還會降低 HER2/neu 的表現量,由於 HER2/neu 是乳癌入要的指標,當乳癌它的表現量高通常預後是不好的,因此被視為是乳癌治療的重要標的。我們有幾樣藥材在乳癌細胞具有抑制 FAS 及 HER2/neu 表現的作用,有潛力發展成治療乳癌的藥物,不過仍需要更多的實驗來確認這個作用,以及動物實驗來驗證其在動物體的作用。

## 伍、結論與建議

以目前的結果來看，有些藥材確實具有抑制肝細胞(HepG2)脂肪含量的作用，主要是抑制脂肪酸合成相關酵素基因表現。不過由初步的動物實驗看來光是抑制脂肪酸合成並不足以改善脂肪肝的情形，應該要有促進脂肪分解的藥物一起搭配才會有效果。因此我們的新配方是朝這個方向發展，不過實驗尚未完成。

執行這個計畫另外一個心得是，在細胞實驗或許可以看到很好的效果但是動物實驗未必能看得到一樣的作用，可能與藥物吸收代謝有關，也可能是因為脂肪肝並不是單純的因素造成的，因此動物實驗的測試有其必要性。不過動物實驗不易進行，耗時費工，應該要有更多的時間及經費補助，才能得到好的結果。

對我來說整個開發案才要開始進入真槍實彈的階段，但這個計畫再 2 個月就要結束。能夠脫離這個計畫繁瑣的追蹤查核，是可以讓我鬆口氣。但一路從零發展到這個階段，結束掉也是令人覺得可惜。

這個計畫有一半的經費是分給林榮耀院士使用，所以到這裡所呈現的成果實際上是使用計畫的一半經費所完成。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP96-RD-206 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

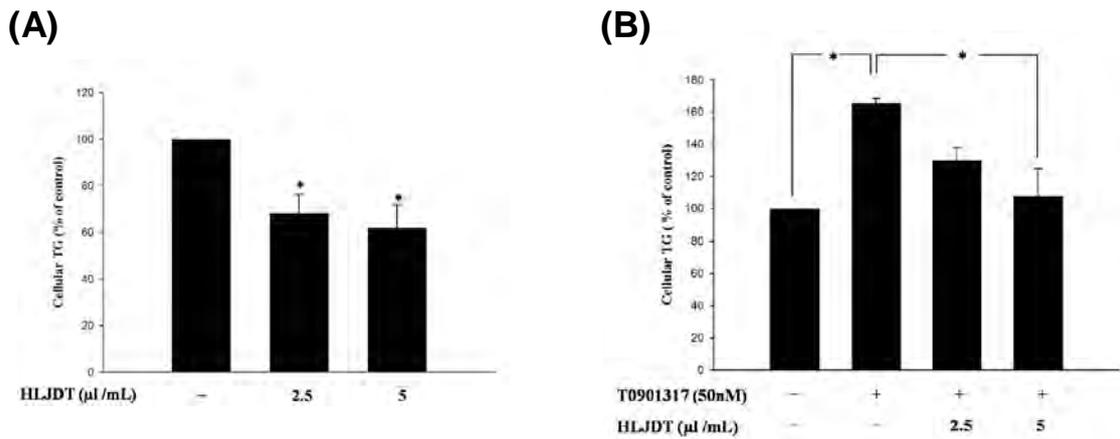
## 陸、参考文献

1. Arsur M, Cavin LG. Nuclear factor-kappaB and liver carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2005, 229:157-69.
2. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis *J. Clin. Invest.* 2005;115:209-218.
3. Bugianesi E. Non-alcoholic steatohepatitis and cancer. *Clin Liver Dis.* 2007, 11:191-207.
4. Caldwell SH, Crespo DM, Kang HS, Al-Osaimi AM. Obesity and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2004, 127(5 Suppl 1):S97-103.
5. Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: current concepts and management strategies. *Clin Med.* 2006, 6:19-25.
6. Edwards PA, Kast HR, Anisfeld AM. BAREing it all: the adoption of LXR and FXR and their roles in lipid homeostasis. *J Lipid Res.* 2002, 43:2-12.
7. El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in USA. *Hepatol Res.* 2007, 37 Suppl 2:S88-94.
8. Grisham, J.W. (2002) Molecular genetic alterations in primary hepatocellular neoplasms: Hepatocellular adenoma, hepatocellular carcinoma, and hepatoblastoma. *In: The Molecular Basis of Human Cancer*, W.B. Coleman, Tsongalis, G.J., ed. Totowa: Humana Press, pp. 269-346.
9. Herath NI, Leggett BA, MacDonald GA. Review of genetic and epigenetic alterations in hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006, 21:15-21.
10. Kanno T, Kurioka N and Kim S. Implications of hyperechoic lesions in small hepatocellular carcinoma, *Gastroenterol Jpn* 1989, 24:528–534.
11. Mosmann T Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods* 1983;65:55-63.
12. Nordeen, SK Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques.* 1988, 6:454-458.
13. Okuda K and Okuda H. Primary liver cell carcinoma. In: N. McIntyre, J.P. Benhamou, J. Bircher, M. Rizzetto and J. Rodes, Editors, *Oxford textbook of clinical hepatology*, Oxford University Press, Oxford, 1991; pp. 1019–1053.
14. Oka H, Yamamoto A, Kuroki T, Harihara S, Marumo T. Kims-R, Monna T. Prospective study of Chemopre-vention of hepatocellular carcinoma with Sho-saiko-to. *Cancer* 1995, 76:747-749.

15. Pilpel, Y., Sudarsanam, P and Church, GM, Identifying regulatory networks by combinatorial analysis of promoter elements. *Nat. Genet.* 2001, 29:153-159.
16. te Boekhorst PA, Lowenberg B, Sonneveld P. Enhanced chemosensitivity in acute myeloid leukemia by hematopoietic growth factors: a comparison of the MTT assay with a clonogenic assay. *Leukemia.* 1993, 7:1637-1644.
17. Tsai CC, Chung YD, Lee HJ, Chang WH, Suzuku Y, Sugano S, Lin JY. Large-scale sequencing analysis of the full-length cDNA library of human hepatocellular carcinoma. *J Biomed Sci.* 2003, 10:636-643.
18. Tsai CC, Huang KW, Chen HF, Zhan BW, Lai YH, Lee FH, Lin CY, Ho YC, Chao YW, Su YC, Jane SW, Chen YC, Hsu CI, Li PH, Hsu HC, Suzuki Y, Sugano S, Lin JY. Gene expression analysis of human hepatocellular carcinoma by using full-length cDNA library. *J Biomed Sci.* 2006, 13:241-249.
19. Wang XW, Hussain SP, Huo TI, Wu CG, Forgues M, Hofseth LJ, Brechot C, Harris CC. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Toxicology.* 2002, 181-182:43-7.
20. Yahagi N, Shimano H, Hasegawa K, Ohashi K, Matsuzaka T, Najima Y, Sekiya M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Nagai R, Ishibashi S, Kadowaki T, Makuuchi M, Ohnishi S, Osuga J, Yamada N. Co-ordinate activation of lipogenic enzymes in hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer.* 2005, 41:1316-22.
21. Yano H, Mizoguchi A, Fukuda K, Haramaki M, Ogasawara S, Momosaki S, Kojiro M. The herbal medicine Sho-saiko-to inhibits proliferation of cancer cell lines by inducing apoptosis and arrest at the G0/G1 phase. *Cancer Res.* 1994, 54:448-454.
22. Zaima N, Sugawara T, Goto D, Hirata T. Trans geometric isomers of EPA decrease LXRalpha-induced cellular triacylglycerol via suppression of SREBP-1c and PGC-1beta. *J Lipid Res.* 2006, 47:2712-2717.
23. 「於中國常用及試用之抗癌生藥及其處方例」, 富田齊門, 科學書院 (1981)。
24. 「現在中醫之癌治療之中藥」, 郁仁存, 東陽書店(1986)。
25. 「漢方癌治療」, Kazunori Fukuda, 角川書店(2001)。
26. 「中國本草圖錄」(Vol.1~10), 蕭培根, 臺灣商務印書館(1988~1990)。
27. 「臺灣原住民藥用植物彙編」, 行政院中醫藥委員會(2002)。

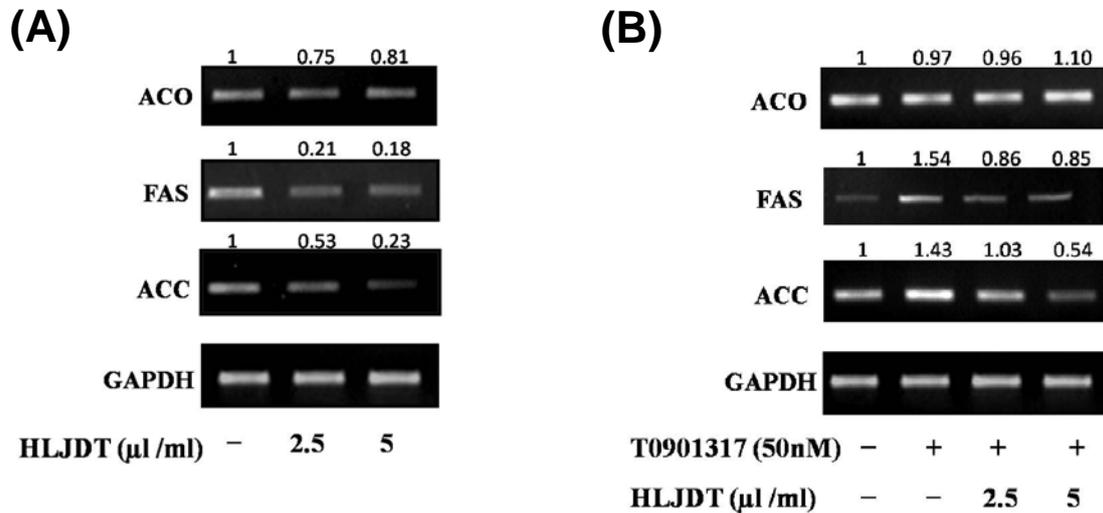
28. 「臺灣常用藥用植物圖鑑」(Vol. I、Vol. II、Vol. III)，行政院中醫藥委員會(2006)。

柒、圖、表



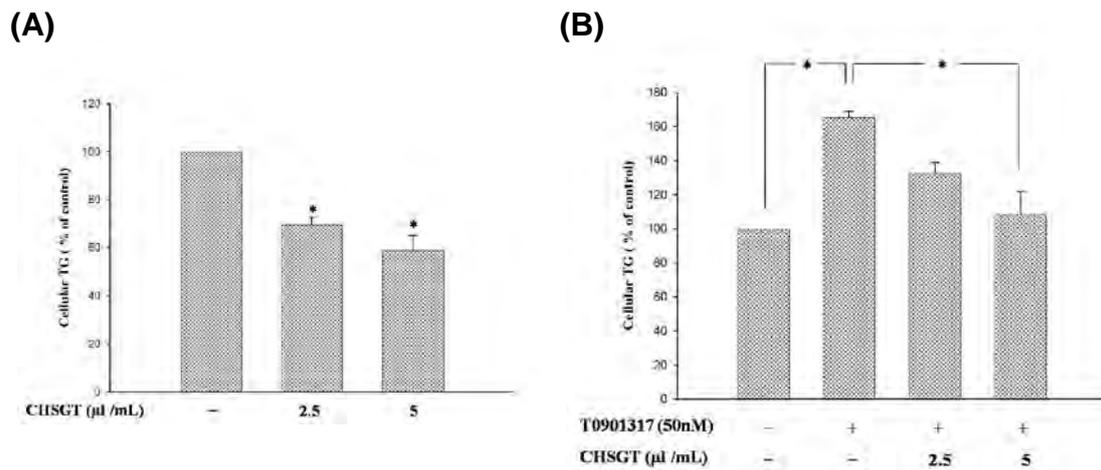
圖一、黃連解毒湯降低肝細胞三酸甘油酯濃度

HepG2 cells were treated with HLJDT (0, 2.5 or 5 µl /ml) (A) or cotreated with both HLJDT and 50 nM T0901317 (B) for 48 h. Cellular TG was detected as described in the Materials and Methods. The results were presented as cellular TG relative to the untreated cells (relative value = 100). Values are mean ± S.D. of three independent experiments. \*  $p < 0.05$  compared with the untreated control or as indicated.



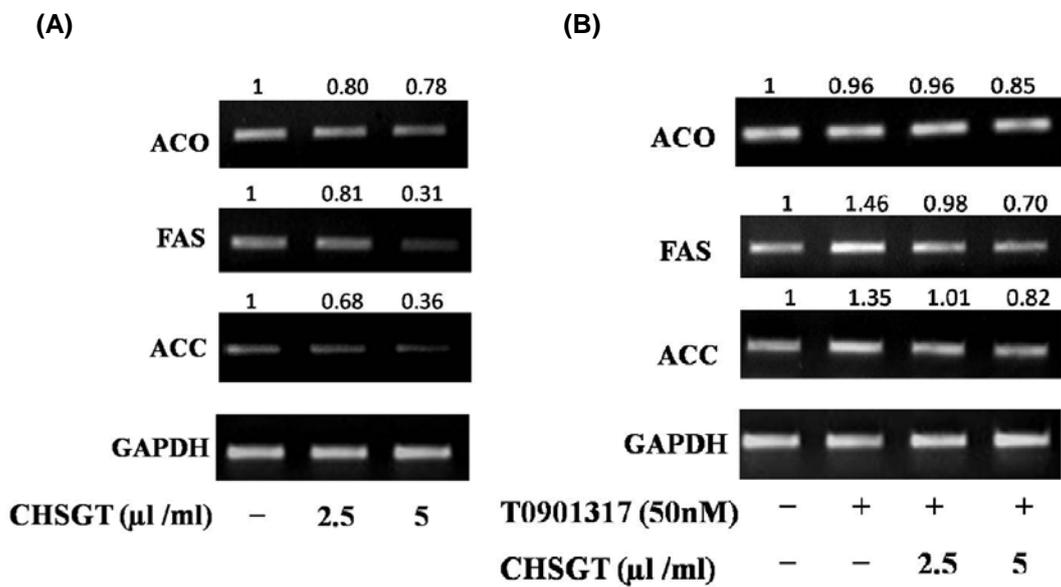
圖二、黃連解毒湯降低肝細胞脂肪合成酵素 mRNA 表現量

HepG2 cells were treated with HLJDT (0, 2.5 or 5 µl /ml) (A) or cotreated with both HLJDT and 50 nM T0901317 (B) for 48h. The levels of ACO, FAS, ACC and GAPDH mRNA were detected by RT-PCR, and their expression levels were normalized to that of GAPDH. Values showed above the image refer to fold induction relative to the untreated cells (relative value =1).



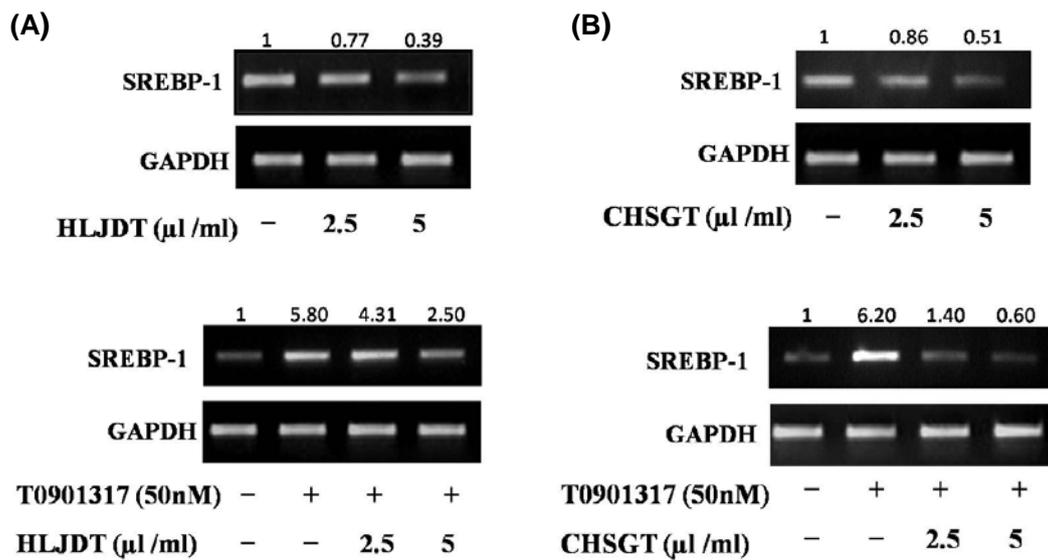
圖三、柴胡疏肝湯降低肝細胞三酸甘油酯濃度

HepG2 cells were treated with CHSGT (0, 2.5 or 5 μl /ml) (A) or cotreated with both CHSGT and 50 nM T0901317 (B) for 48 h. Cellular TG was detected as described in the Materials and Methods. The results were presented as cellular TG relative to the untreated cells (relative value = 100). Values are mean ± S.D. of three independent experiments. \*  $p < 0.05$  compared with the untreated control or as indicated.



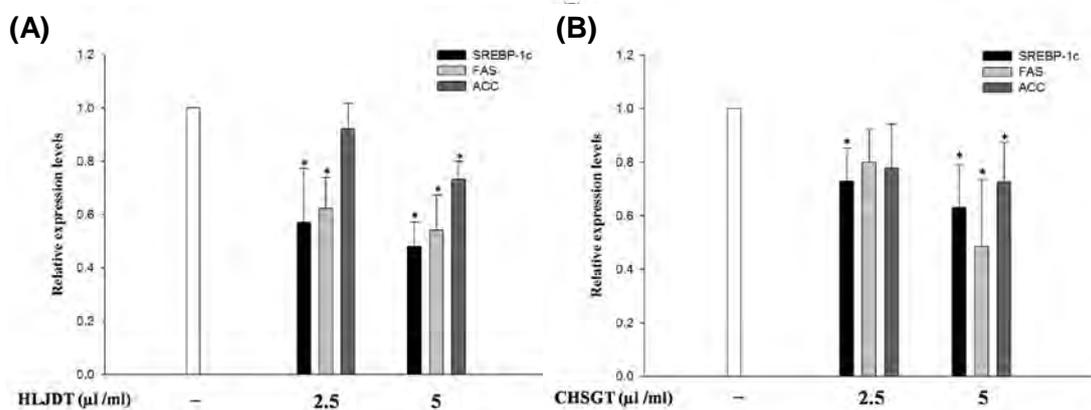
圖四、柴胡疏肝湯降低肝細胞脂肪合成酵素 mRNA 表現量

HepG2 cells were treated with CHSGT (0, 2.5 or 5 μl /ml) (A) or cotreated with both CHSGT and 50 nM T0901317 (B) for 48h. The levels of ACO, FAS, ACC and GAPDH mRNA were detected by RT-PCR, and their expression levels were normalized to that of GAPDH. Values showed above the image refer to fold induction relative to the untreated cells (relative value =1).



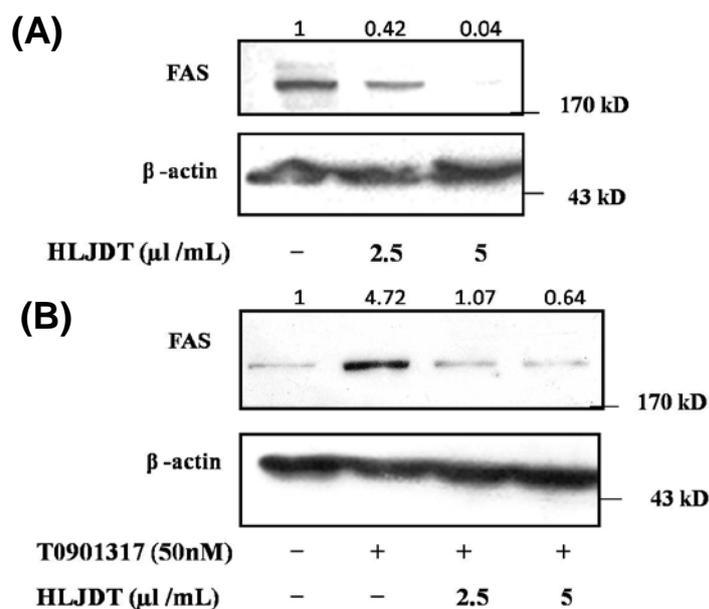
圖五、黃連解毒湯與柴胡疏肝湯對肝細胞 SREBP-1 mRNA 表現量

HepG2 cells were treated with 0, 2.5 or 5 μl /ml of HLJDT (A) or CHSGT (B) in the absence or presence 50 nM T0901317 as indicated for 48h. The level of SREBP-1 and GAPDH mRNA were detected by RT-PCR, and their expression levels were normalized to that of GAPDH. Values showed above the image refer to fold induction relative to the untreated cells (relative value =1).



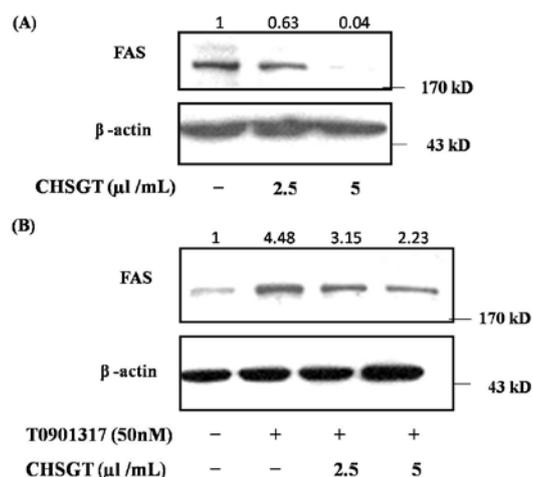
圖六、黃連解毒湯與柴胡疏肝湯對肝細胞 SREBP-1 mRNA 表現量

HepG2 cells were treated with 0, 2.5 or 5 μl /ml of HLJDT (A) or CHSGT (B) for 48 h. Relative mRNA levels of SREBP-1c, FAS, and ACC were analyzed by real-time RT-PCR, and their expression levels were normalized to the levels of GAPDH mRNA, and showed relative to the untreated cells (relative value = 1). Values are mean ± S.D. of three independent experiments. \*Significantly different from the untreated cells ( $p < 0.05$ ).



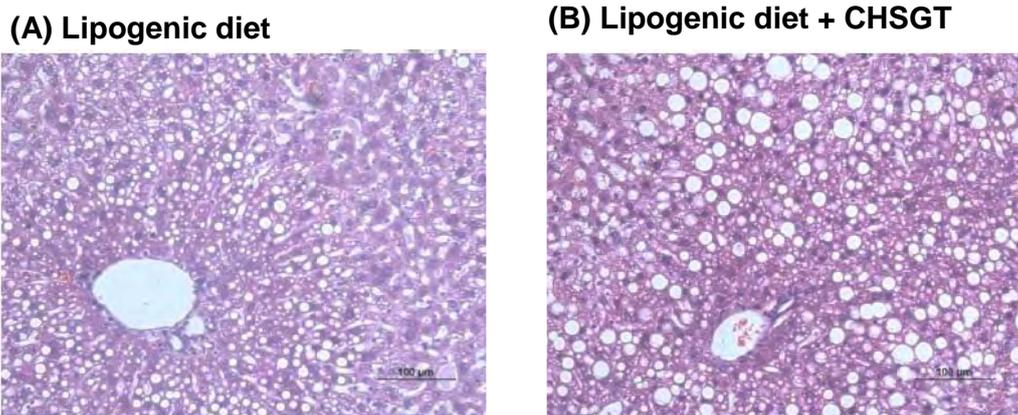
圖七、黃連解毒湯抑制肝細胞脂肪酸合成酶(FAS)蛋白質表現量

HepG2 cells were treated with HLJDT in the absence (A) or presence (B) of 50 nM T0901317 for 48 h. Sixty  $\mu$ g cell lysates were loaded in each lane. The abundance of FAS and  $\beta$ -actin protein in total cell lysates was analyzed by Western bolt. The levels of FAS protein was normalized to that of  $\beta$ -actin protein, values showed above the image refer to fold induction relative to the untreated cells (relative value =1). The results are representative of three independent experiments.

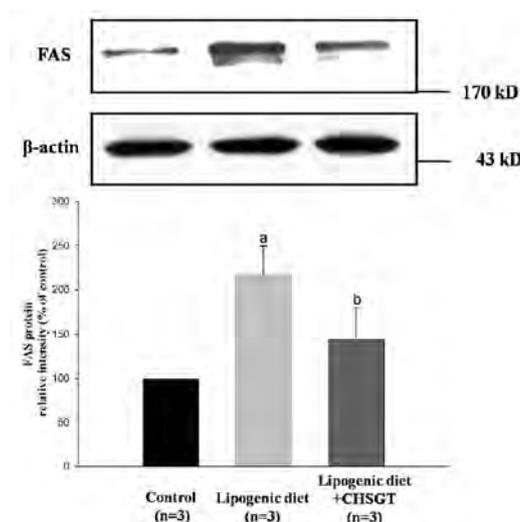


圖八、柴胡疏肝湯抑制肝細胞脂肪酸合成酶(FAS)蛋白質表現量

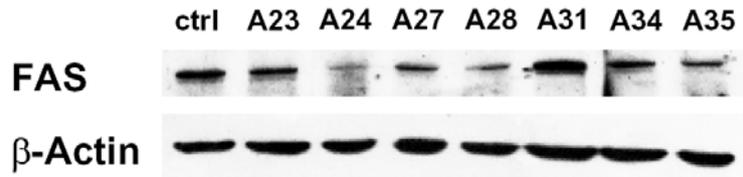
HepG2 cells were treated with CHSGT in the absence (A) or presence (B) of 50 nM T0901317 for 48 h. Sixty  $\mu$ g cell lysates were loaded in each lane. The abundance of FAS and  $\beta$ -actin protein in total cell lysates was analyzed by Western bolt as describe above.



圖九、組織切片顯示小鼠餵食 Lipogenic diet 會引起脂肪肝  
 C57BL/6 mice were fed with lipogenic diet or lipogenic diet plus CHSGT for 3 weeks. Liver specimens of the mice were stained with hematoxylin & eosin. Representative sections from each group are shown. Original magnification  $\times 200$ .

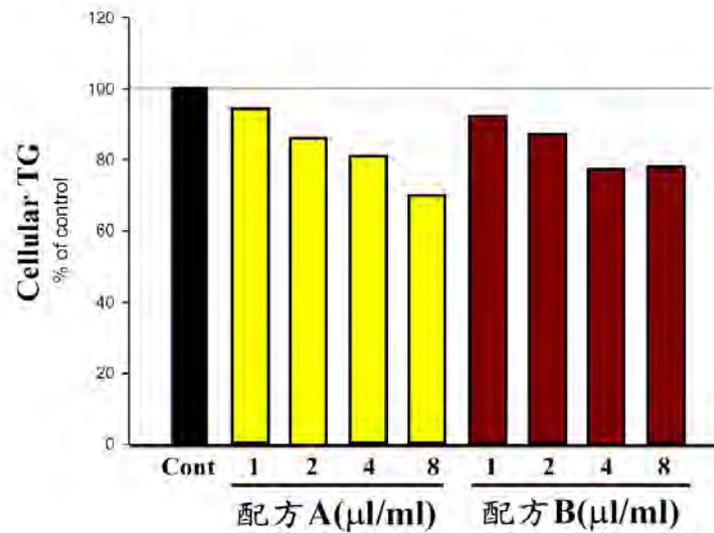


圖十、柴胡疏肝湯抑制小鼠肝臟脂肪酸合成酶(FAS)蛋白質表現量  
 The levels of FAS and  $\beta$ -actin protein in liver of C57BL/6 mice were analyzed by Western blot. The expression levels of FAS and  $\beta$ -actin were detected as described in Figure 7. The levels of FAS protein were normalized to that of  $\beta$ -actin and showed relative to the level of control group (relative value=100). Values are mean  $\pm$ S.D. with the number of mice given in parentheses for each group. \*Significantly different from control group ( $p < 0.05$ ).



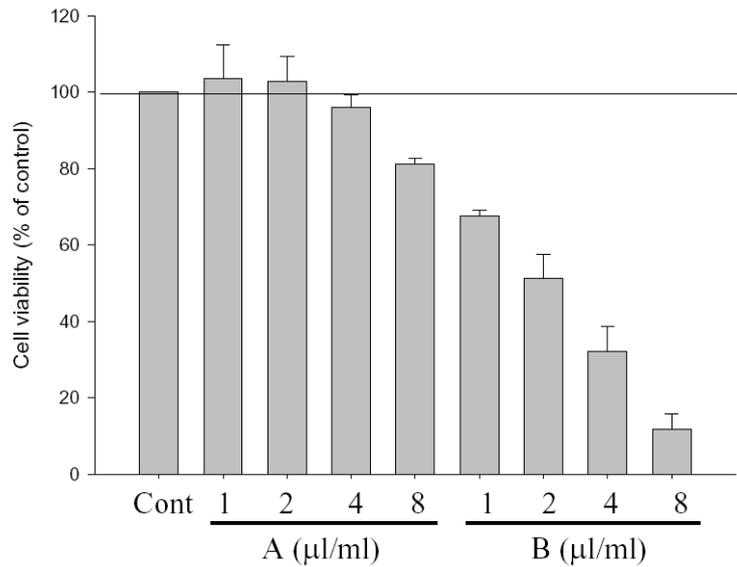
圖十一、篩選會降低肝細胞三酸甘油酯之單方中草藥具抑制脂肪酸合成酶(FAS)蛋白質表現量之藥材

Hep G2 cells were treated with a variety of herbal extracts (2  $\mu$ l/ml) for 48 h. The abundance of FAS and  $\beta$ -actin protein in total cell lysates was analyzed by Western bolt as described in Figure 7.

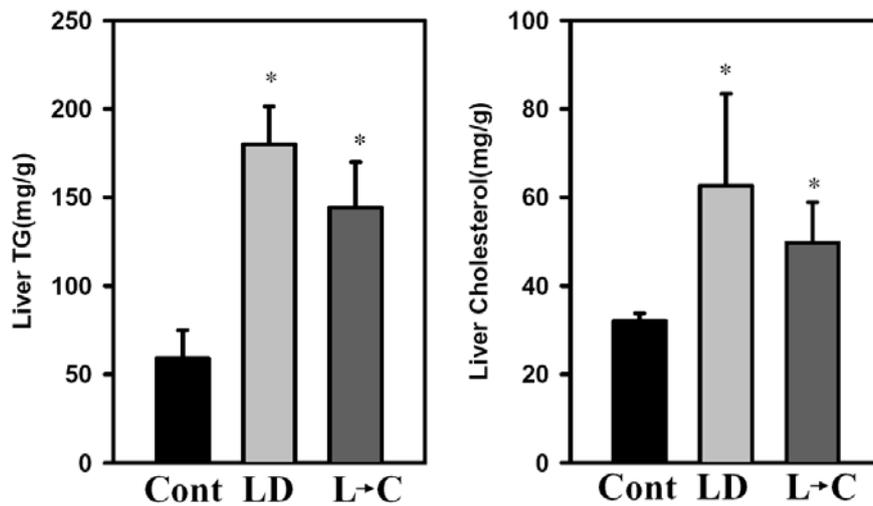


圖十二、配方 A 與 B 對肝細胞三酸甘油酯含量的影響

Hep G2 cells were treated with Mix A or B of herbal extracts (2  $\mu$ l/ml) for 48 h. Levels of cellular TG were determined and expressed as described above.

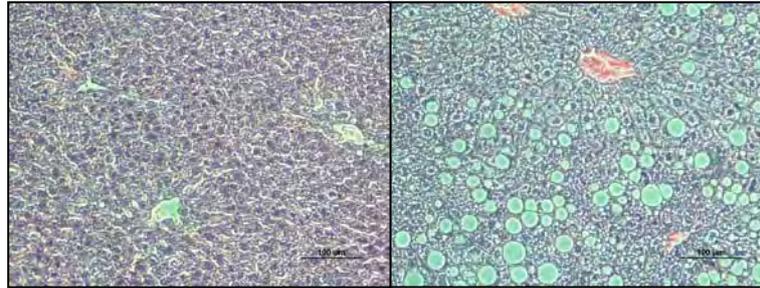


圖十三、配方 A 與 B 對肝細胞存活率的影響

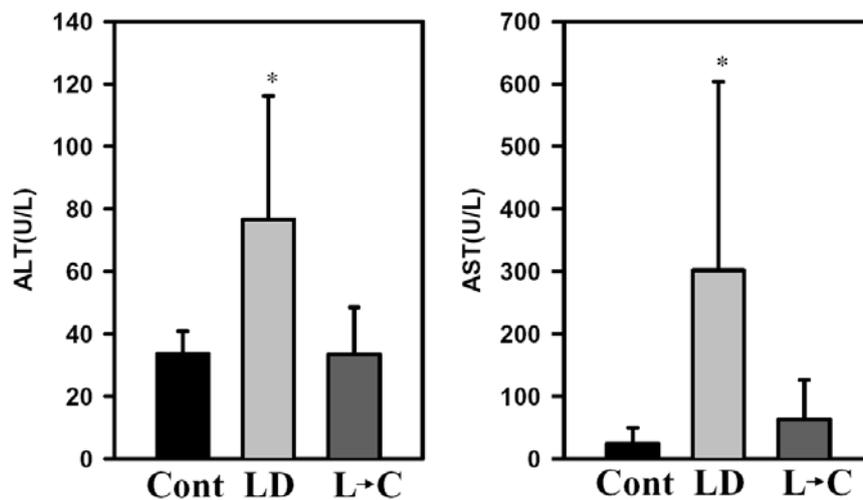


圖十四、餵食 Lipogenic diet 八週後明顯提高肝臟三酸甘油酯及膽固醇含量

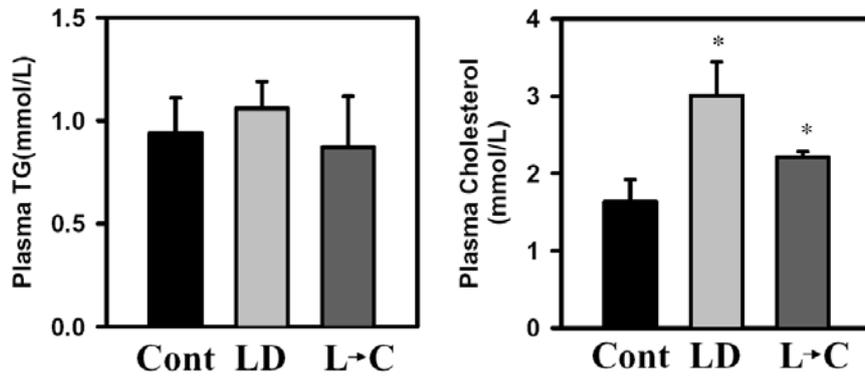
C57BL/6 mice were fed with chow diet (Cont) or lipogenic diet (LD) for 8 weeks or fed the lipogenic diet for 4 weeks then shift to chow diet for another 4 weeks (L→C). Liver lipids were extracted with chloroform and methanol (2:1; v/v), and then triacylglycerol (TG) and cholesterol were determined.  $n=3$ , \*  $p < 0.05$  compared with control group.



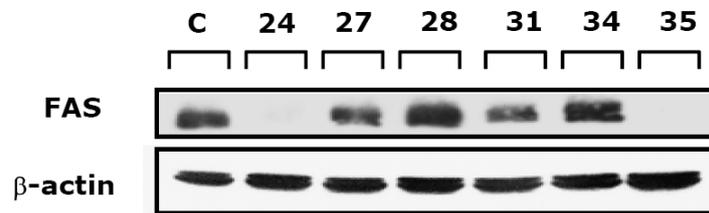
圖十五、組織切片顯示小鼠餵食 Lipogenic diet 八週會引起明顯的脂肪肝  
 C57BL/6 mice were fed with chow diet or lipogenic diet for 8 weeks. Liver specimens of the mice were stained with hematoxylin & eosin. Representative sections from each group are shown. Original magnification  $\times 200$ .



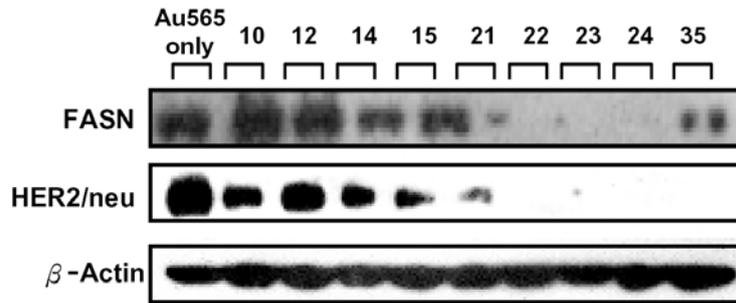
圖十六、餵食 Lipogenic diet 八週後明顯提高血漿 ALT 及 AST 活性  
 C57BL/6 mice were fed with chow diet (Cont) or lipogenic diet (LD) for 8 weeks or fed the lipogenic diet for 4 weeks then shift to chow diet for another 4 weeks (L→C). Plasma LAT and AST activities were determined using commercial kits.  $n=3$ , \*  $p < 0.05$  compared with control group.



圖十七、餵食 Lipogenic diet 八週後明顯提高血漿三酸甘油酯及膽固醇濃度  
 C57BL/6 mice were fed with chow diet (Cont) or lipogenic diet (LD) for 8 weeks or fed the lipogenic diet for 4 weeks then shift to chow diet for another 4 weeks (L→C). Concentrations of plasma TG and cholesterol were determined using commercial kits. n=3, \*  $p < 0.05$  compared with control group.

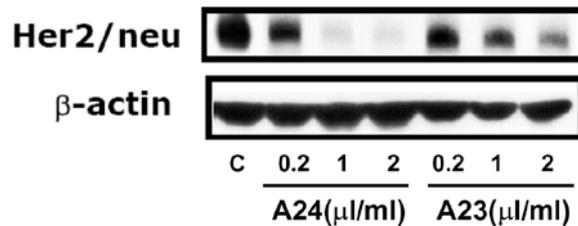


圖十八、篩選會降低乳癌細胞脂肪酸合成酶(FAS)蛋白質表現量之藥材  
 MCF 7 cells were treated with a variety of herbal extracts (2  $\mu\text{l/ml}$ ) for 48 h. The abundance of FAS and  $\beta$ -actin protein in total cell lysates were analyzed by Western bolt as described in Figure 7.



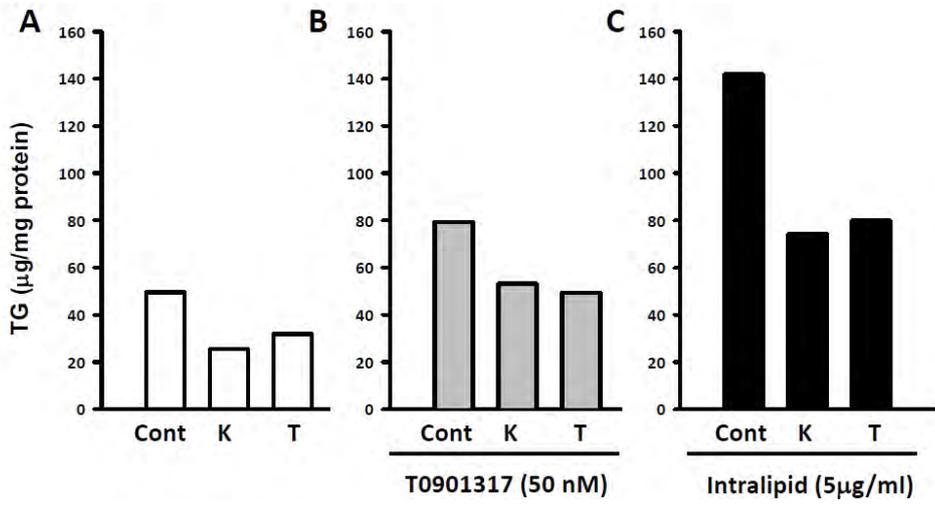
圖十九、篩選會降低乳癌細胞脂肪酸合成 酶(FAS)及乳癌標記 Her2/neu 蛋白質表現量之藥材

Au565 breast cancer cells were treated with a variety of herbal extracts (2  $\mu$ l/ml) for 48 h. The abundance of FAS, Her2/neu and  $\beta$ -actin protein in total cell lysates were analyzed by Western bolt as described in Figure 7.

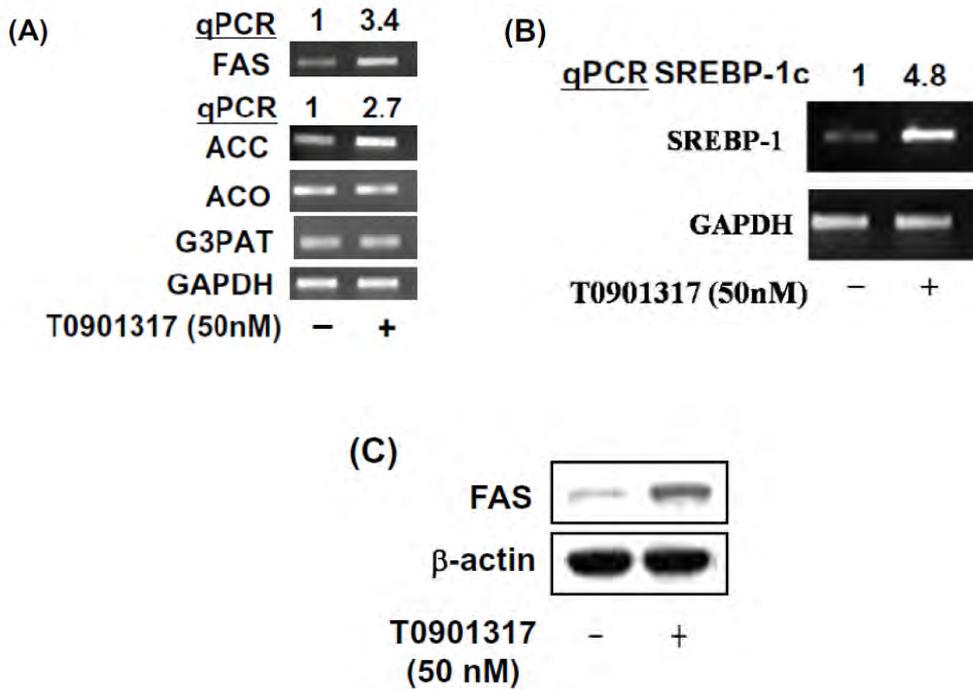


圖二十、會降低乳癌細胞 Her2/neu 蛋白質表現量之二藥材的劑量效應

Au565 breast cancer cells were treated with 0.2, 1 or 2  $\mu$ l/ml of herbal extracts A23 and A24 for 48 h. The abundance of Her2/neu and  $\beta$ -actin protein in total cell lysates were analyzed by Western bolt as described in Figure 7.

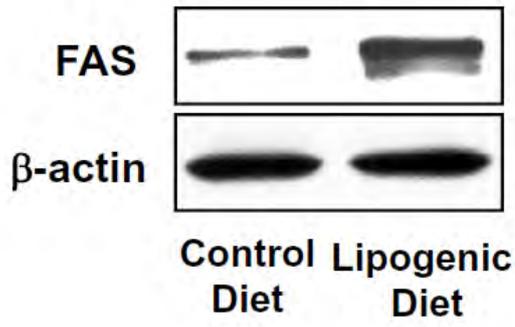


圖二十一

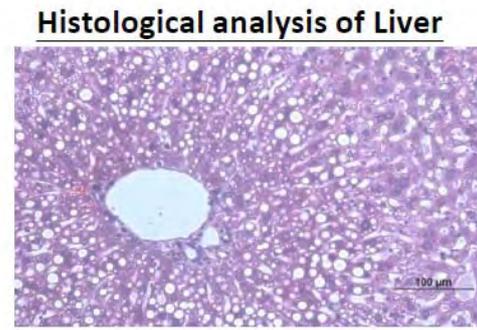


圖二十二

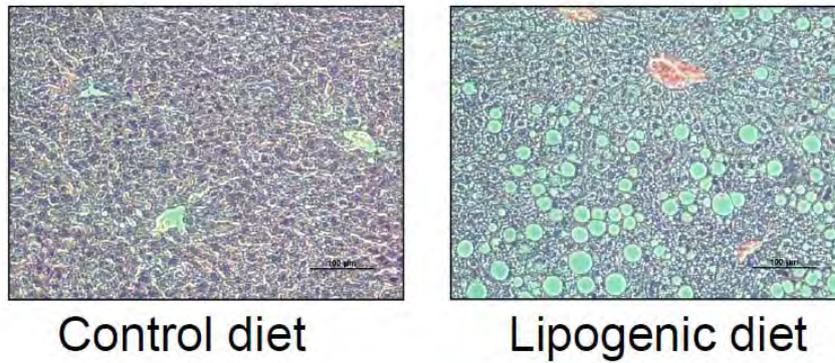
(A)



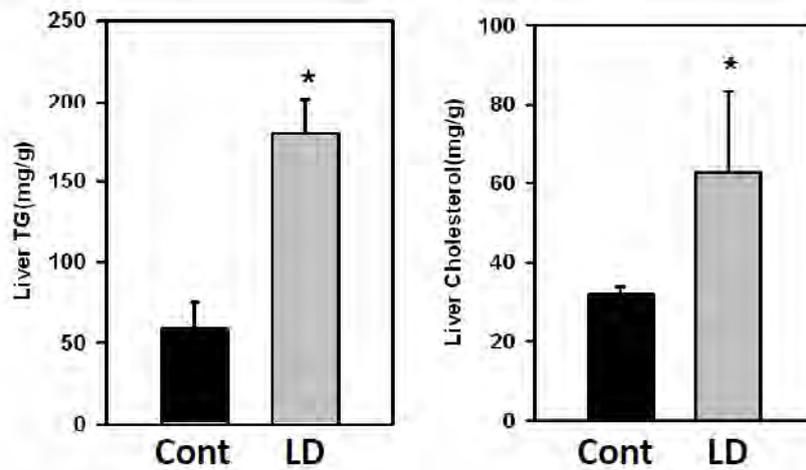
(B)



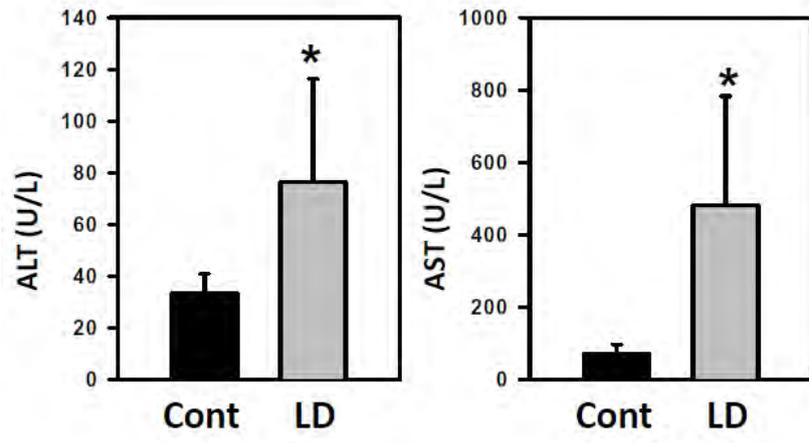
圖二十三



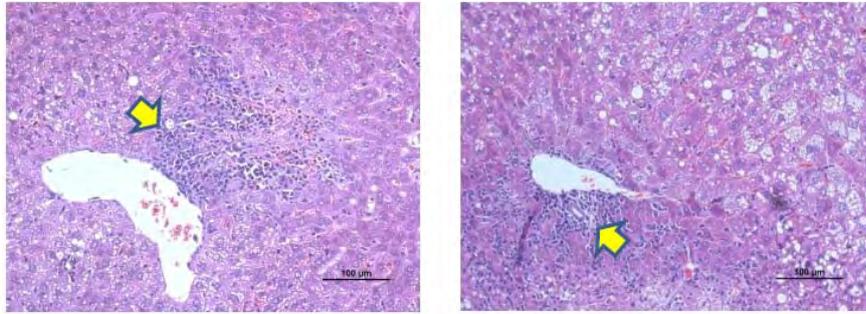
圖二十四



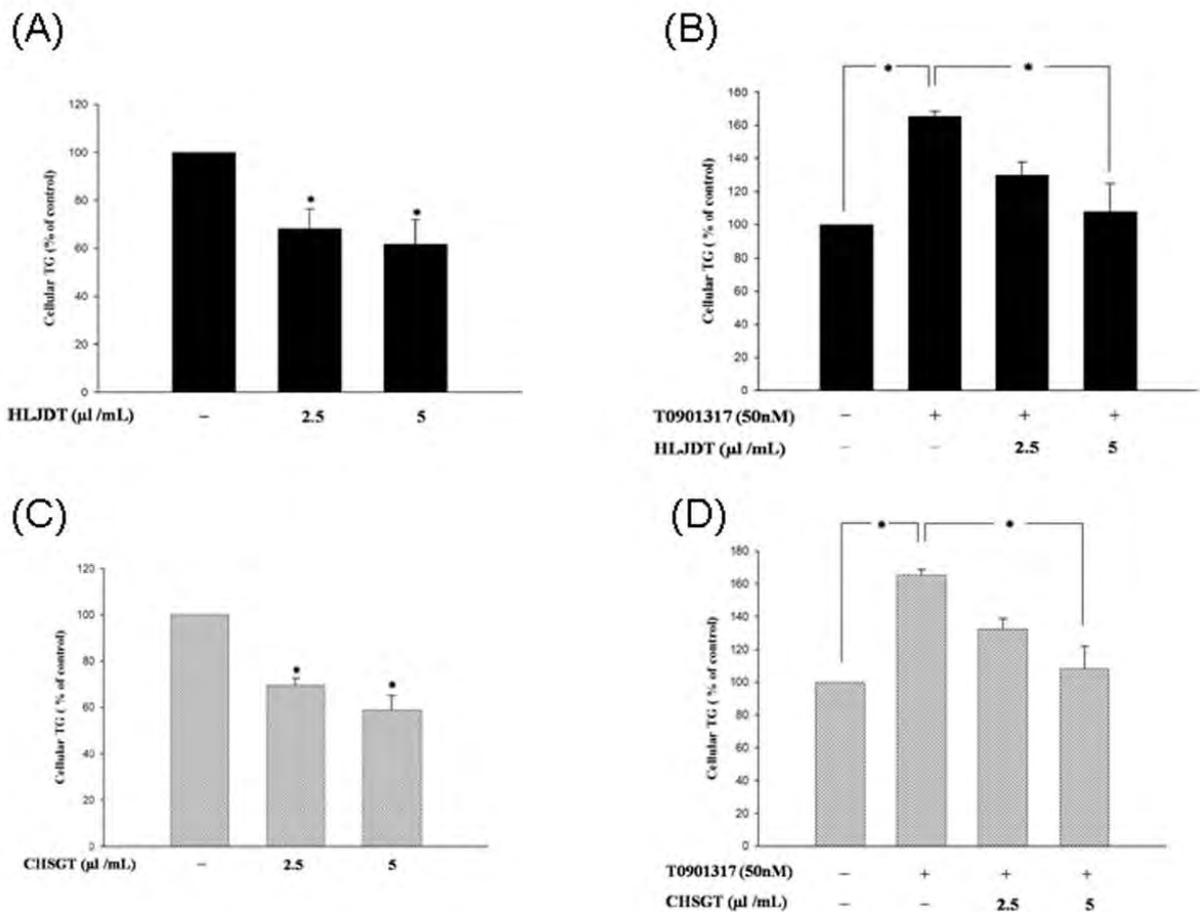
圖二十五



圖二十六

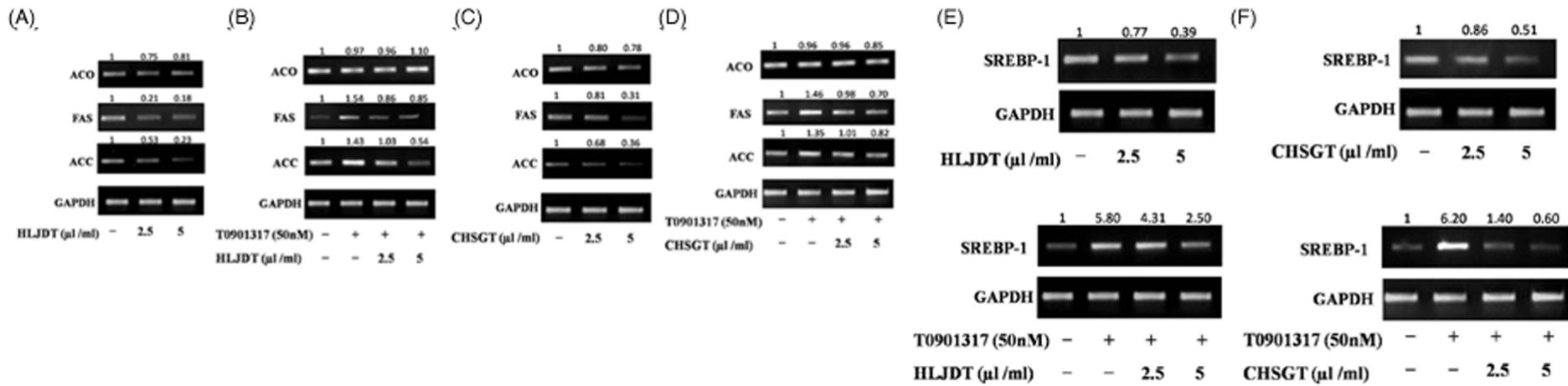


圖二十七



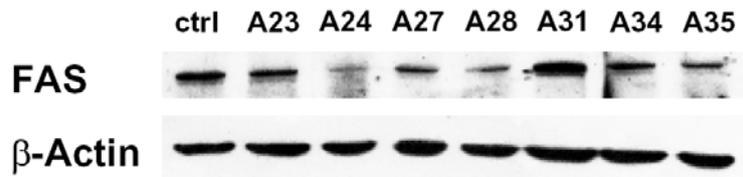
圖二十八、黃連解毒湯與柴胡疏肝湯降低肝細胞三酸甘油酯濃度

HepG2 cells were treated with HLJDT (0, 2.5 or 5 μl /ml) (A) or cotreated with both HLJDT and 50 nM T0901317 (B) for 48 h. HepG2 cells were treated with CHSGT (0, 2.5 or 5 μl /ml) (C) or cotreated with both CHSGT and 50 nM T0901317 (D) for 48 h. Cellular TG was detected as described in the Materials and Methods. The results were presented as cellular TG relative to the untreated cells (relative value = 100). Values are mean ± S.D. of three independent experiments. \*  $p < 0.05$  compared with the untreated control or as indicated.



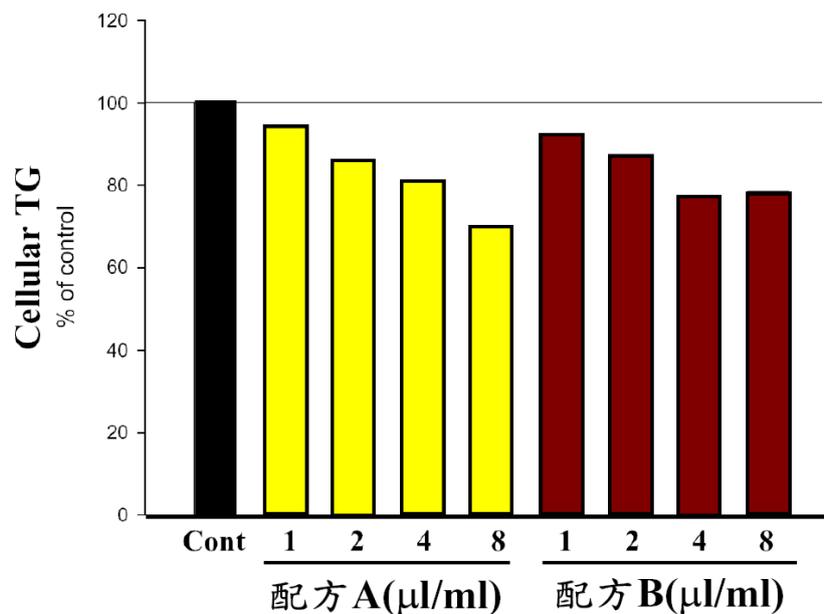
圖二十九、黃連解毒湯與柴胡疏肝湯降低肝細胞脂肪合成酵素 mRNA 表現量

HepG2 cells were treated with HLJDT (0, 2.5 or 5 μl /ml) (A) or cotreated with both HLJDT and 50 nM T0901317 (B) for 48h. HepG2 cells were treated with CHSGT (0, 2.5 or 5 μl /ml) (C) or cotreated with both CHSGT and 50 nM T0901317 (D) for 48h. The levels of ACO, FASN, ACC and GAPDH mRNA were detected by RT-PCR, and their expression levels were normalized to that of GAPDH. In addition, HepG2 cells were treated with 0, 2.5 or 5 μl /ml of HLJDT (A) or CHSGT (B) in the absence or presence 50 nM T0901317 as indicated for 48h. The level of SREBP-1 and GAPDH mRNA were detected by RT-PCR, and their expression levels were normalized to that of GAPDH. Values showed above the image refer to fold induction relative to the untreated cells (relative value =1).



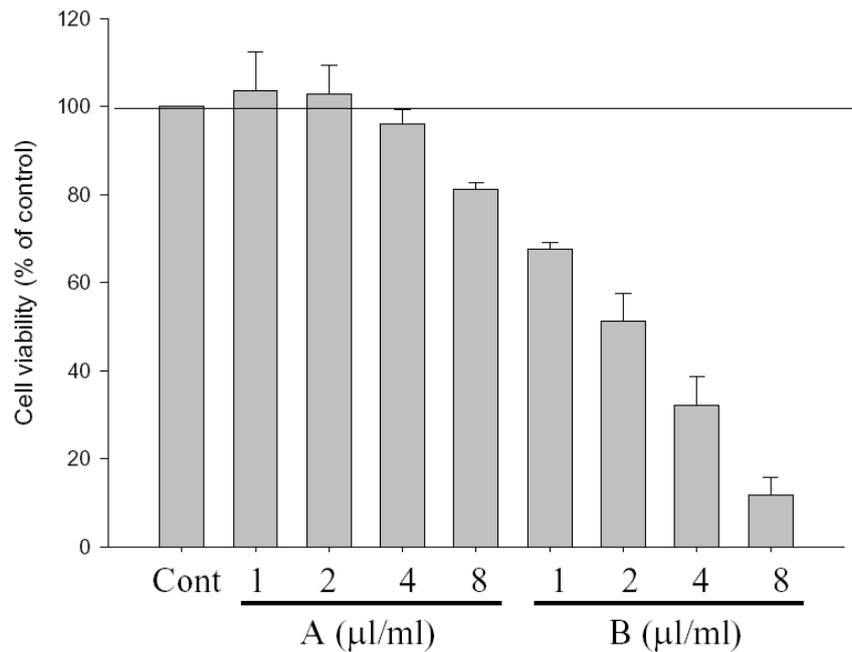
圖三十、篩選會降低肝細胞三酸甘油酯之單方中草藥具抑制脂肪酸合成酶 (FASN)蛋白質表現量之藥材

Hep G2 cells were treated with a variety of herbal extracts (2  $\mu$ l/ml) for 48 h. The abundance of FASN and  $\beta$ -actin protein in total cell lysates was analyzed by Western bolt as described in Figure 7.



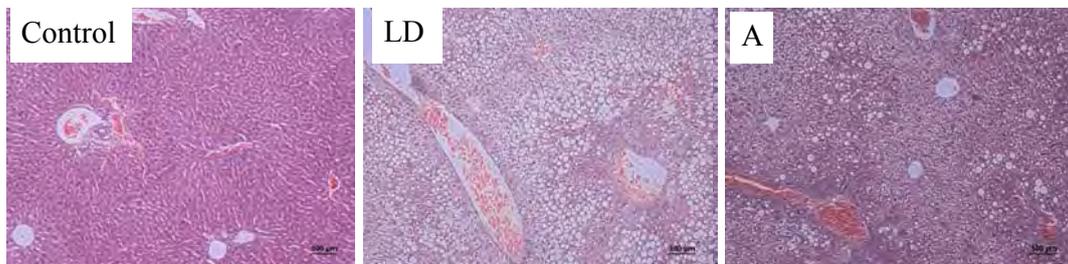
圖三十一、配方 A 與 B 對肝細胞三酸甘油酯含量的影響

Hep G2 cells were treated with Mix A or B of herbal extracts (2  $\mu$ l/ml) for 48 h. Levels of cellular TG were determined and expressed as described above.



圖三十二、配方 A 與 B 對肝細胞存活率的影響

Hep G2 cells were treated with Mix A or B of herbal extracts (2 µl/ml) for 48 h. Cell viability was determined by MTT assay and showed relative to the control (relative value=100)



圖三十三、配方 A 可抑制 Lipogenic diet 餵食所引起的脂肪肝

C57BL/6 mice were fed with chow diet (Cont) or lipogenic diet (LD) or LD plus mix A (A) for 8 weeks. Liver specimens of the mice were stained with Hematoxylin & Eosin. Representative sections from each group are shown. Original magnification  $\times 100$ .

# 利用 $\beta$ -Catenin 啟動子之報導基因平台評估 具抗血癌活性之中草藥(2-2)

郭育綺  
輔仁大學生命科學系

## 摘要

血癌已被證實具有異常活化的 Wnt 訊息傳導途徑，而該訊息的活化是由 co-activator  $\beta$ -catenin 蛋白質鍵結於 LEF/TCF transcriptional factor 所促成且被認為是造成細胞轉化成癌細胞之重要因素，甚至驅使已分化的細胞再度獲得如同幹細胞自我更生的能力。因此若能將 Wnt 訊息傳導途徑阻斷，將會使得血癌細胞生長減緩或根本由幹細胞階段移除，以達到避免復發的優勢。因此，本研究目的在建立 $\beta$ -catenin/LEF 啟動子之報導基因平台，藉由該模式從中草药或天然物中找尋具有抑制該訊息傳導之先導藥物。首先，實驗將 TOPFLASH 質體上 3 個 LEF/TCF 結合序列之 DNA (TOP element) 構築於 pGL4.3 報導質體上並將之命名為 pGL4-TOP 報導質體。該新式質體之特性為利用哺乳類細胞為轉染對象時，不需轉染其它具抗藥性的質體即可進行穩定細胞株的篩選，所以我們利用 pGL4-TOP 質體建立出穩定細胞株(HEK293-TOPrep)以作為 $\beta$ -catenin/LEF 報導系統。研究結果顯示，HEK293-TOPrep 細胞株隨著刺激劑 Wnt3a 濃度增加，活化之 $\beta$ -catenin/LEF 引導的 luciferase 活性也隨之增加，並呈現劑量相關性，且 luciferase 活性也在 GSK-3 抑制劑(LiCl 和 BIO)的處理下更加活化，確認了其功能性，可做為一個方便之篩藥平台。上述 pGL4-TOP 報導質體與 HEK293-TOPrep 穩定細胞株目前已進行專利申請(中華民國專利案號 097136573)。利用 HEK293-TOPrep 穩定細胞株為模式，我們於 97 年篩選出 7 個化合物(5271、5276、TYC85、TYC302、TYC323、TYC240、TYC247)，可以抑制由 rWnt3a 誘導之 luciferase 活性。為了確認此結果，我們亦利用血癌細胞株 Jurkat 與 HL-60 為標的細胞，以  $^3\text{H}$ -thymidine uptake assay 偵測細胞生長是否會受到化合物所抑制，結果發現上述 7 個化合物對於 Jurkat 與 HL60 細胞都有抑制活性，似乎顯示這些藥物對於 $\beta$ -catenin/LEF 無專一性。至目前為止，我們篩選到 NCTD 藥物，其在 reporter assay、增生試驗都有抑制效果，而我們仍持續利用穩定細胞株與 Jurkat 細胞進行藥物的篩選。此外，研究中我們利用 NOD/SCID 與 SCID 小鼠為模式，試圖以靜脈、腹腔與皮下注射 Jurkat 細胞，希望找出最好引起類似血癌症狀之方法，藉此評估藥物在體內之抗血癌活性。

關鍵詞：血癌、 $\beta$ -catenin/LEF、HEK293-TOPrep 穩定細胞株、Jurkat 細胞、SCID 小鼠

# **Evaluation of Anti-leukemia Activities of Chinese Herbs by $\beta$ -catenin Reporter Gene (2-2)**

Yuh-Chi Kuo

Department of Life Science, Fu-Jen University

## **ABSTRACT**

Aberrant activation of Wnt signaling pathway has been demonstrated in leukemia. Activation of this pathway was promoted by binding of co-activator  $\beta$ -catenin to LEF/TCF transcription factor and it has been considered as a crucial signaling for cancer cells transformation, even let the committed progenitors to gain self-renewal ability like stem cells. The blockade of Wnt signal can inhibit the growth of leukemia cells or eliminate the cancer cells at stem cell level. The aim of this study was to establish a  $\beta$ -catenin/LEF reporter model to screen the potential lead compounds from Chinese herbs or natural products that probably blocked this signal. The TOP element that contains 3 LEF/TCF binding sequences from TOPFLASH plasmid was constructed into pGL4.3 reporter plasmid, called as pGL4-TOP. This new reporter construct was conveniently performed in mammalian cells without co-transfect with plasmid containing selectable marker. Furthermore, we have set up a pGL4-TOP transfected HEK293 stable clone (HEK293-TOPrep) that could be as a  $\beta$ -catenin/LEF reporter system. The results of functional assay indicated that recombinant Wnt3a (rWnt3a) could activate the  $\beta$ -catenin/LEF reporter system in a dose-dependent manner and further to enhance luciferase activity by treatment with GSK3 inhibitors such as LiCl and BIO. Both pGL4-TOP reporter plasmid and HEK293-TOPrep stable cell line were filed R.O.C. patent (Patent pending No. 097136573). In this year, we found that seven compounds (5271、5276、TYC85、TYC302、TYC323、TYC240、TYC247) had inhibitory effects on luciferase activity in HEK293-TOPrep cells induced by rWnt3a. Both Jurkat cells and HL-60 cells were used as targets. By using the  $^3\text{H}$ -thymidine uptake assay, all of these seven compounds had higher inhibitory activity on Jurkat and HL60 cells. It indicated that these drugs lack specificity. Until now, only NCTD has been found to have inhibitory activity both in reporter assay and  $^3\text{H}$ -thymidine uptake assay in our research. Furthermore, in the present study, we tried to use NOD/SCID and SCID mice to set up animal models. Jurkat cells were given to animals by intravenous, intraperitoneal, or subcutaneous injections. After the best model was obtained, it would be used to evaluate bioactive compounds effects in vivo.

Keywords: leukemia,  $\beta$ -catenin/LEF, HEK293-TOPrep stable cell line, Jurkat cells, SCID mice

## 壹、前言

### 一、血癌與 Wnt signaling 的關係

94 年度行政院衛生署資料顯示 [1]，小兒血癌為小兒癌症之第一位。血癌又稱為「白血病」，在造血過程中，因為少數早期造血幹細胞 (Haematopoietic stem cell ; HSC) 或前驅細胞 (lineage-committed progenitor cell) 無法正常分化並異常的增生，使得骨髓與週邊血液中有大量未成熟的血液細胞 (blast)，因為缺乏成熟有功能的血球細胞，所以在臨床上看到病患往往因為缺乏白血球、血小板或紅血球，而容易受到嚴重感染、出血與貧血問題 [2]。造成血癌的原因包括染色體轉位 (Chromosome Translocation)，使得原本正常的轉錄因子 (transcription factors) 變成過度活化或成為沒有功能的融合蛋白質，導致細胞無法正常分化，其他基因的突變還包括：FLT3、C-kit、RAS，這群基因的突變會造成過度活化的訊息傳導 (signaling pathway)，因而增加細胞存活率與促進細胞的增生 [3]。近年來也發現異常活化的 Wnt signaling pathway 也與血癌有很大的相關性 [4]。

人類 Wnt family 已被發現有 19 種，當 Wnt 蛋白質與其接受體 frizzled family (Fz family receptor) 和副受體 low-density-lipoprotein-receptor-related protein family (LRP5 or LRP6 co-receptor) 結合後，便活化下游 transcription activator  $\beta$ -catenin 蛋白質的轉位 (translocation) 進而啟動下游基因表現 [5]。在正常細胞中， $\beta$ -catenin 本身除了屬於細胞骨架 (cytoskeletons) 中的成員外 (Reya et al., 2005)，亦在訊息傳導中扮演 transcription activator 的關鍵蛋白質。當 Wnt 不存在時， $\beta$ -catenin 會與 Axin (Axis inhibitor)、APC (Adenomatous polyposis coli)、GSK3  $\beta$  (Glycogen-synthase kinase 3  $\beta$ )、CK1  $\alpha$  (Casein kinase 1) 形成一個 destruction complex，其中 GSK3  $\beta$  與 CK1  $\alpha$  分別對  $\beta$ -catenin N 端 Ser33、Ser37、Thr41 與 Thr45 進行磷酸化 [6]，並隨之被 E3-ubiquitin-ligase complex 中的  $\beta$ -transducin-rep at-containing ( $\beta$ -TRCP) 蛋白質進行泛蛋白化 (ubiquitination)，最後被 proteasome 分解 [7]。當 Wnt 結合到 receptor 上，推測 Dvl (Dishevelled) 蛋白質會被吸引到細胞膜上且與 GSK3 $\beta$  結合抑制其活性，因此 GSK3 $\beta$  無法與 Axin、APC 形成 complex 且無法磷酸化  $\beta$ -catenin，然而其正確機制尚未明確 [6]。未被受到磷酸化的  $\beta$ -catenin 會在細胞質中累積並轉位至細胞核中，取代 TCF/LEF transcription factor 上的 Groucho (co-repressor) 蛋白質，接著吸引其他 chromatin-remodelling 的相關因子鍵結於 TCF/LEF 啟動子 [8]，加速相關基

因的轉錄反應。目前已被發現由 Wnt 與 $\beta$ -catenin 所調控的基因包括:c-myc、cyclin D1，皆與細胞生長有關[9, 10]。

造血幹細胞(Stem cells)的特徵是細胞本身具有自我更新(Self-renewal)的能力，亦即產生兩個自我幹細胞或分裂過程中其中一個維持幹細胞特性另一個則繼續分化為 committed progenitor cell 且失去自我更新能力。目前知道 Wnt、Hedgehog 與 Notch signaling 在這些早期細胞的增生與分化過程中扮演重要角色[11, 12]。Wnt 訊息傳導調控異已被證實會影響造血反應並引起血癌。於急性淋巴性白血病(Acute lymphocytic leukaemia)的研究發現，pre-B-cell leukaemia 中的 E2a-Pbx1 轉位(translocation)會促進 Wnt16 的大量表現，因而活化 Wnt 訊息傳導途徑，被認為是血癌形成的原因之一[13]。臨床研究也發現慢性淋巴性白血病患(Chronic lymphocytic leukaemia)的 B cell 也有 Wnt 蛋白質過度的表現[14]。骨髓性血癌也被發現與 Wnt 訊息傳導途徑有關，研究發現當病患從慢性期(Chronic phase)進入急性轉化期(blast crisis)時，其 Granulocyte-macrophage progenitors (GMP)相較於正常人的 GMP 細胞核內有大量 Wnt 訊息傳導下之  $\beta$ -catenin 的累積。體外研究也發現，此些 GMP 細胞具有 self-renewal 的能力，進一步將病患 GMP 大量表現 Axin 蛋白質可以抑制  $\beta$ -catenin 的活性，從該研究顯示當血球前驅細胞異常活化了  $\beta$ -catenin 的活性，會使細胞具有與幹細胞同樣 self-renewal 的能力，也再度引出血癌幹細胞(leukemic stem cells, LSC)的概念[15]。在急性骨髓性白血病(Acute myeloid leukaemia; AML)的研究也發現，將 AML 常見 translocation 所造成的融合基因例如：Promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor  $\alpha$  (PML/RAR $\alpha$ )、Promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF)/RAR $\alpha$  (X-RAR $\alpha$ )或 AML-1/ETO 利用 retroviral 感染技術送到 HSC 細胞中會活化 catenin 的 promoter，因而增加 HSC self-renewal 的能力[16]。臨床研究利用  $\beta$ -catenin 啟動子之 TCF/LEF 報導基因發現約 64%的 AML 病患其  $\beta$ -catenin 的活性高於正常血球前驅細胞，而定序結果發現 CTNNB1 ( $\beta$ -catenin)的 5 端與 APC 基因序列並沒有突變，所以可能不是造成其活性增加的原因，但發現 Wnt1、Wnt2b、LEF-1 的表現有異常的增加 [17]。而 catenin 蛋白質的累積也與不好的 Overall survival 與 Event-free survival 有正相關，可以作為預後因子的評估 [18]。

## 二、目前的抗血癌藥物與未來開發新藥之策略

癌症的治療已經過數十年，對於實體的腫瘤治療方法普遍都是利用手術來切除及合併一些非專一性的藥物來抑制癌細胞的生長，然而血癌屬於

血液疾病，癌細胞在血液中到處流動，因此只能靠化學治療、放射線療法、骨髓或幹細胞移植或給予生長因子的方式來改善 [2]。血癌的治療，一般而言會先進行誘導性化學治療(Induction chemotherapy)，目的在殺死不正常的血癌細胞以達到緩解為目的，故又稱之為緩解性治療(Remission therapy)，而依不同型態之白血病與年齡有不同的治療方法。待病患完全緩解後會接著進行緩解後治療(Post-remission therapy)，其目的在清除殘餘的癌細胞，最後再進行「維持性治療」[19]。以 AML 治療為例，連續 7 天給予病患 cytarabine (Ara-C ;  $100 \text{ mg/m}^2$ )及 3 天的 anthracycline daunorubicin ( $45 \text{ mg/m}^2$  or  $60 \text{ mg/m}^2$ )可以使 65-75%的 18-60 歲患者得到完全緩解(Martin *et al.*, 2005)。而臺灣團隊也針對兒童急性骨髓性白血病設計新的治療方式，連續 3 天給予病患 idarubicin ( $9 \text{ mg/m}^2$ )和 7 天 Ara-C ( $100 \text{ mg/m}^2$ )作為誘導緩解期之用藥，而緩解之後連續 4 個月每月使用高劑量 Ara-C ( $1 \text{ g/m}^2$ )加 etoposide ( $100 \text{ mg/m}^2$ )或 mitoxantrone ( $10 \text{ mg/m}^2$ )作緩解後治療，最後以四個月的 idarubicin ( $9 \text{ mg/m}^2$ )加 Ara-C ( $200 \text{ mg/m}^2$ )治療，可以得到 90% 緩解率，51%五年存活率(Overall survival)，而五年無事故存活率(Event free survival)為 50% [20]，其他不同用藥方法與療程也對不同 AML 病患有不同療效。

雖然針對不同類型血癌、染色體轉位種類、表面抗原與癌細胞特性(相較於正常細胞有較快的細胞週期)已發展出許多傳統的抗癌藥物，但仍然有不少病患有復發或難治的情況，其原因是忽略在異質性(Heterogeneity)的血癌細胞當中存在著一群常常處於靜止狀態且無法清除的血癌幹細胞(Leukemic stem cell; LSC)。血癌初始細胞(leukaemia-initiating cells)或血癌幹細胞(Leukaemic stem cell)的概念也在 1988 至 1997 年被提出，將人類 AML 病患的血液細胞或  $\text{CD34}^+ \text{CD38}^-$ 與  $\text{CD34}^+ \text{CD38}^+$ 血液細胞分離出來並分別打入 SCID 或 NOD/SCID 小鼠中，結果發現有帶有  $\text{CD34}^+ \text{CD38}^-$  marker 的細胞可以讓小鼠得到血癌[21, 22, 23]，在這些異質性的血癌細胞當中，部分血癌細胞 self-renewal 的能力還高於正常的 HSC [24]。目前推測血癌幹細胞的來源有兩種，可能是正常具有 self-renewal 的 HSC 發生突變而不正常的增生，或者是一些本來失去 self-renewal 的前驅細胞再度獲得 self-renewal 的能力[15, 21]。血癌細胞的組成如同整個造血系統的異質性，不同細胞具有不同 self-renewal 的能力，其中血癌的形成可能源至於少數異常活化 Wnt signaling 的細胞，使本身具有類似 HSC self-renewal 的特性而再度產生了其他新的癌症細胞[25, 26]，也就是血癌幹細胞。雖然異常活化的 Wnt 訊息傳導途徑機制尚未確定，但許多基礎與臨床研究皆顯示 Wnt signaling 的過度

活化確實在 leukaemia 初期轉化的過程中扮演重要角色，阻斷 Wnt 蛋白質主導之  $\beta$ -catenin 活性將也同時能清除血癌幹細胞，而成為新藥開發的策略。

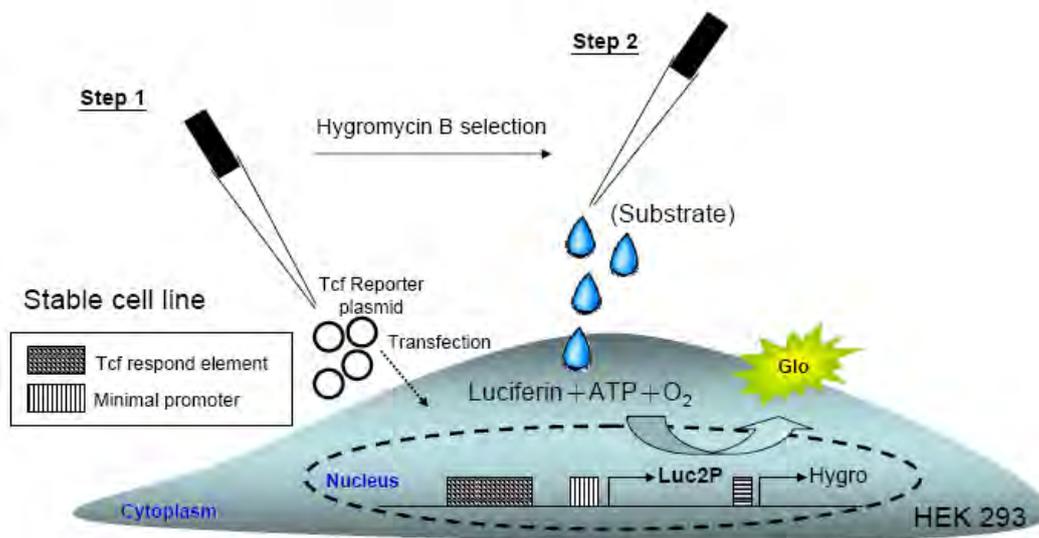
目前在臨床上，一些非類固醇抗發炎藥物 (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 的小分子已被認為是對抗 Wnt 訊息傳導的潛力藥物，例如：Indomethacin、Sulindac 與 Aspirin。體外研究顯示，低劑量 (100  $\mu$ M) 的 Indomethacin 可以抑制大腸直腸癌 (colorectal cancer; CRC) 細胞株中 Wnt- $\beta$ -catenin signaling 的活性使下游 target gene cyclin D1 也下降 (Dihlmann *et al.*, 2001)，而高劑量 (400  $\mu$ M) 會使細胞停留在 G1 phase，且隨著  $\beta$ -catenin 蛋白質的減少而走向 apoptosis [27]。每天給予大鼠 2 mg/kg Indomethacin 確實抑制腫瘤的生長 [28]。Sulindac 經過代謝後會產生 Sulindac sulfide 和 Sulindac sulfone，研究顯示這兩種分子處理 CRC 會藉由活化 caspase 使細胞走向 apoptosis 且活化 proteasome 促進  $\beta$ -catenin 的分解 [29]，然而 Li 等人的研究卻發現 Sulindac sulfone 的處理並不會活化 caspase，但同樣可以發現  $\beta$ -catenin 也藉由 proteasome 的路徑被分解 [30]。Aspirin 作用機轉不同於上述兩種 NSAIDs，可能藉由抑制 phosphatase 來影響  $\beta$ -catenin 的穩定性 [31]。

為了得到更好的藥效與減少副作用，更發展出 NO-NSAIDs，其中 NO-aspirin 抑制 CRC 腫瘤生長的效果比傳統 Aspirin 好 2000 倍，且在高劑量 (100 mg/kg/day) 對正常細胞的生長沒有影響 [32,33]。其他針對阻斷 Wnt 訊息傳導的藥物還包括針對 Wnt ligand、Fzd 接受體所發展出來的 Antibody-based 藥物 [34]，以及小分子抑制劑。利用 Enzyme-linked immunosorbent assay 與 cell-based assay ( $\beta$ -catenin/LEF reporter assay) 從大量天然物或合成化合物中，也篩選出 9 個可以針對  $\beta$ -catenin 與 TCF 或 co-activator binding site 的潛力藥物：ZTM000990、PKF118-310、PKF118-774、PKF115-584、PKF222-815、CGP049090、PNU-74654、ICG-001 [35, 36, 37, 38]。所以由天然物或中草藥當中，以  $\beta$ -catenin/LEF 啟動子之報導質體系統為抗血癌藥物篩選模式應是可行的。

### 三、本年度計畫目標與實施策略

建立穩定與快速之平台是篩藥過程中重要之環節。為了能建立該系統以進行中草藥或天然物之篩選，我們延續去年建立之 pGL4-TOP 報導質體進一步進行穩定細胞珠的篩選與功能性測試，並利用該穩定細胞珠進行藥物的篩選 (下圖一)，正常情況下，利用 rWnt3a 刺激 HEK293-TOPrep，透過與 Fzd family receptor 鍵結，可以誘導細胞內  $\beta$ -catenin 活化並位移至細

胞核鍵結於 LEF/TCF 蛋白質上以啟使細胞表現 luciferase，因此加入 substrate 可以偵測其活性。若藥物能透過某種機制來抑制 Wnt 訊息傳導（例如：降低  $\beta$ -catenin 表現或抑制其活性），就會降低 luciferase 的表現，藉由最後冷光的偵測來辨別藥物體外活性。



圖一、 $\beta$ -catenin/LEF 啟動子之報導基因藥物篩選平台(HEK293-TOPrep) 示意圖

除此，藥物體內藥理活性更是進入臨床前之重要依據，因此我們也將建立「異體移植腫瘤小鼠」模式以進行體內藥理活性分析。上述體外篩選平台與體內藥理活性評估除了提供我們研究血癌領域外，也可應用在其他癌症的研究。本年度實驗內容包括：

- (一) 將 pGL4-TOP 質體送入 HEK293 細胞中並進行穩定細胞株(stable clone)的篩選。
- (二) 以 recombinant Wnt3a (rWnt3a)與 GSK3 抑制劑(LiCl 和 MIO)進行穩定細胞株之功能性測試。
- (三) 利用穩定細胞株進行藥物之篩選。
- (四) 利用 <sup>3</sup>H-thymidine uptake 方法，篩選能夠抑制 Jurkat 細胞株生長但對 HL-60 細胞沒影響之藥物或天然物。
- (五) 以 S.C、I.P、I.V.方式建立 Jurkat 細胞腫瘤異體移植小鼠，並定期觀察小鼠之體重變化、淋巴細胞數目、脾臟重量、發病時間、發病率與存活率，以建立最好之發病模式。
- (六) 於實驗順利情況下，利用異體移植腫瘤小鼠評估先導藥物在體內藥理之活性。

## 貳、材料與方法

### 一、細胞培養

HEK293 細胞以 DMEM (Gibco)細胞培養液培養在 10cm 培養盤中，內含最終濃度為 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  碳酸氫鈉(Sodium hydrogen carbonate)、100 U/ml 青黴素 (Penicillin)、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  鏈黴素 (Streptomycin)、5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  防治黴 (Fungizone)、2 mM 麩胺酸(L-glutamine)、1.0 mM 丙酮酸鈉(sodium pyruvate) 和 10% (v/v)的胎牛血清，將細胞培養於 37°C, 5%的二氧化碳培養箱(Napco) 中。Jurkat 與 HL-60 細胞則改以 RPMI 1640 (Gibco)細胞培養液培養，內含物與培養條件同上。HEK293 TOPrep 細胞則以內含 5% 胎牛血清的 DMEM (Gibco)進行培養，其他成分與培養條件同上。

### 二、質體轉染與穩定細胞株的選殖

本研究以 PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega; Cat no. A2495) 進行 pGL4-TOP 質體之抽取。在進行質體轉染的前一天，在 24-well 細胞培養盤上種入  $2 \times 10^5$  的 HEK293 細胞使細胞數達約 90-95%，並培養於 antibiotics free 的培養液當中。隔夜培養後，準備轉染所需試劑：(1) 將 0.8  $\mu\text{g}$  之 pGL4-TOP 質體與 50  $\mu\text{l}$  之 Opti-MEM I Reduced serum medium (without serum; Invitrogen; Cat. No. 31985)均勻混和。(2) 將 2  $\mu\text{l}$  之 Lipofectamine 2000 (Invitrogen; Cat. No. 11668)與 50  $\mu\text{l}$  之 Opti-MEM I Reduced serum medium 均勻混合並在室溫下反應 5 mins。在上述(2) 之混合液反應完後與(1) 之混合液充分混合並於室溫下反應 20 mins。最後將 100  $\mu\text{l}$  之(1) 與(2) 之混合液加入培養有細胞之 24 well 盤中並培養 24 hrs，接著將再將 medium 更換為含有 Hygromycin B 的 Selective medium。經過一個星期篩選，將剩餘存活細胞以連續稀釋法將之稀釋到 96 孔培養盤(<96 顆細胞/96 well)，再經 7-10 天培養後選擇具有單一聚落培養孔之細胞進行細胞數之擴大培養，最後所培養出之細胞即為穩定細胞株。

### 三、哺乳類細胞株 DNA 萃取

本研究使用 Viogen Genomic DNA Extraction Miniprep system (GG1001) 進行細胞 DNA 純化。 $4 \times 10^6$  的細胞收取下來後以 200  $\lambda$  PBS 將細胞打散，接著依序加入 20  $\lambda$  proteinase K 與 200  $\lambda$  EX buffer 小心混合後於 60°C 下作用 20 mins，期間每 3-5 分鐘均勻搖晃。接著加入 210  $\lambda$  之無水酒精並混合，待沉澱物出現後將之加入 mini colum collection tube 並以 60000 x g 離心 2 分鐘，依序再以 0.5 mL WS 緩衝液進行沖洗 2 次，最後以滅菌之 2

次水將 DNA 溶出。

#### 四、聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction)

在 20  $\mu$ l 的聚合酶連鎖反應溶液中包含有 100 ng DNA、1x 反應緩衝液、0.5 mM dNTPs、0.5  $\mu$ M 的引子和 5 units 的 Pfu DNA 聚合酶(MDbiol)與 2 次水。混合均勻後，利用溫度循環控制器(PelsterThermal Cycler; MJ Research, Inc.)進行聚合酶連鎖反應。

#### 五、以 recombinant Wnt3a (rWnt3a)為刺激物進行穩定細胞株功能性測試

HEK293-TOP rep 穩定細胞株以 rWnt3a (100、200、400 ng/mL; R & D, Cat No. 1324-WN)刺激，其中在不同組別分別加入 GSK3 抑制劑，包括：20 mM LiCl、5  $\mu$ M MIO 與對照組藥物 MeBIO，經 24 小時刺激後收集細胞。將收集的細胞以 1x reporter lysis buffer (Promega; Cat. E3971)進行細胞質蛋白質之萃取，以 Bradford 檢測試劑進行蛋白質定量。接著將 20  $\lambda$  細胞質(取 10  $\mu$ g 蛋白質並以 Lysis buffer 補足體積至 20  $\lambda$ )與 100  $\lambda$  Luciferase assay reagent (Promega; Cat.E1501)進行反應並立即以冷光分析儀進行偵測。

#### 六、以穩定細胞株進行藥物篩選

將 HEK293-TOPrep (F9)培養於 96 孔培養盤中，接著以 rWnt3a 刺激 6 個小時後，加入固定濃度之不同藥物，24 小時後收集細胞並以 1x reporter lysis buffer 萃取細胞質蛋白質，以 Bradford 檢測試劑進行蛋白質定量，最後每組實驗分別以 10  $\mu$ g 之全蛋白質以 Luciferase assay reagent 測定冷光強度，以此作為啟動子活性分析依據(promoter activity analysis)。

#### 七、細胞增殖之分析

將 Jurkat 與 HL60 細胞進行 12 hrs starvation 後，以  $2 \times 10^4$  cells/well 培養於 96 孔平底培養盤中，分別以不同濃度之有效成分處理並培養於二氧化碳培養箱中 48 小時，接著每孔加入 1  $\mu$ Ci 的氚-胸腺嘧啶( $^3$ H-Thymidine)以標定新合成之 DNA，經 16 至 18 小時培養後，利用細胞收集器將細胞收集至到玻璃纖維過濾膜上，並加入含 1.5 ml 液態閃爍計數液於計數瓶中，以閃爍計數器測定放射性強度。有效成分對於細胞增生或抑制的活性利用下列公式計算之：

$$\text{抑制活性百分比(\%)} = \frac{\text{對照組(CPM)} - \text{實驗組(CPM)}}{\text{對照組(CPM)}} \times 100\%$$

#### 八、動物建立、有效成分餵食與病理分析

本研究使用 5-6 週之 NOD/SCID (NOD.CB17-Prkdc<sup>scid</sup>)小鼠購於台大動

物中心；SCID (C.B17/Icr-Prkdc<sup>scid</sup>/CrINarl)購於國家動物實驗動物中心，並飼養於 IVC 無菌飼養系統。實驗以 Jurkat 細胞進行腫瘤異體移植小鼠之建立。首先以 cyclophosphamide (150 mg/kg body weight) 免疫抑制劑連續兩天處理小鼠(I.P.)，第二次注射後 24 小時，將培養好適當數量之 Jurkat (1 or 2x 10<sup>7</sup>/200  $\lambda$ ) 以腹腔注射 (intraperitoneal injection; I.P.) 或皮下注射 (subcutaneous injection ; S.C.) 或尾靜脈方式 (intravenous injection ; I.V.) 打入小鼠內，接著定期觀察小鼠與測量體重直至約第 21-28 天發病。在藥物處理組別，再給與 Jurkat 細胞 7 天後開始以口服方式給與或不給予小鼠藥物連續 14 天，接著觀察小鼠存活率、週邊白血球、Jurkat 細胞浸潤現象、腫瘤形成與否與進一步進行組織染色。

#### 九、小鼠週邊血液白血球計數

採取小鼠週邊全血，白血球總數與淋巴球數目以 HEMAVET Multispecies Hematology System 血液分析儀進行白血球計數。

#### 十、肝功能與腎功能分析

分離小鼠血清，肝功能數值 aspartate aminotransferase (AST) 與 alanine aminotransferase (ALT) 及腎功能指數 butinine (BUN) 與 creatinine (CRE)，分別以富士生化試片與生化分析儀器 (Colorimetric Analyzer, DRICHEM-3000; Fujifilm) 分析。

#### 十一、蘇木紫 - 伊紅 (Hematoxylin-eosin) 組織與免疫組織染色 (Immunocytochemistry)

Hematoxylin-eosin：小鼠組織或腫瘤以 3.7 % 福馬林固定，經石蠟包埋後以切片機將檢體切成 4  $\mu$ m 厚度織切片，將平整黏著於塗有 silane 的玻璃片上，接著置於室溫進行乾燥 2-3 天。接著將組織以 Xylene 脫蠟並依序浸在遞減濃度之酒精 (100%  $\rightarrow$  95%  $\rightarrow$  80%  $\rightarrow$  70%  $\rightarrow$  0%)。復水後，標本浸潤於蘇木紫染液 10 分鐘，再以自來水沖洗。接著浸泡於 0.05% LiCO<sub>3</sub> 30 秒使細胞核顏色變深。水洗後，將玻片浸潤於伊紅染色液 10-20 秒，再分別以遞增濃度之酒精溶液脫水，接著進入 95% 酒精、100% 酒精與二甲苯內清洗兩次，最後自然風乾並以光學顯微鏡觀察組織型態。免疫組織染色：首先組織切片經過脫蠟後以 3% 過氧化氫作用以去除組織中的 peroxidase，接著以 normal serum 在室溫進行 blocking 30 分鐘。組織以 PBS 沖洗 3 次後加入一級抗體 (Anti- $\beta$ -catenin or Anti-human CD45) 室溫反應 60 分鐘，PBS 浸洗三次後加入標定有 HRP 之二級抗體室溫反應 90 分鐘，再經 PBS 沖洗 3 次，加入 DAB substrate 反應 5-15 分鐘，最後以 2 次水清洗組織切片。

## 十二、藥物來源

如表一所示，我們由台灣大學沈雅敬教授、國立中國醫藥研究所林雲蓮博士、董明兆博士與陳建志博士及台北醫學大學李慶國教授與李宗徽教授獲得篩選藥材。

## 十三、統計學分析

實驗數據以平均值加減標準誤差(mean  $\pm$  S.E.)表示，以 Student's t-test 作統計分析，當  $p < 0.05$  即視為具有統計學上的意義。

## 參、結果

### 一、HEK293-TOPrep F9 細胞株可穩定生長於含 Hygromycin B 的培養液

將 pGL4-TOP 報導質體轉染至 HEK293 細胞中，在經過 Hygromycin B (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 共培養 21 天後，利用連續稀釋法將存活之細胞培養於 96 孔培養盤中，經過 10 天的培養我們得到 6 個單一細胞所長出之聚落群，代號分別為 C12、A12、D2、F9、C7 和 D7。其中所們隨機選取 F9 細胞 (HEK293-TOPrep F9) 進行細胞之擴增。由於 pGL4-TOP 質體帶有抗藥性基因 (Hygromycin Coding gene)，因此成功轉染之細胞可在 Hygromycin B 藥物的培養液中存活。因此，為確認 F9 穩定細胞株對 Hygromycin B 藥物的耐受性，我們將其與未轉殖質體之正常 HEK293 細胞進行生長狀況之觀察比較，以確認細胞中抗藥性基因的有無。結果如圖(一)，經過連續 4 天的計數細胞發現，HEK293 細胞可正常生長於不含 Hygromycin B 之培養液，然而在含有 250 與 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Hygromycin B 的培養液下則受到抑制。在 F9 細胞的培養則發現，細胞可在 250、500 和 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Hygromycin B 的培養液下存活，其中 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  則有些許之抑制。然而，HEK293-TOPrep (F9) 細胞在 250 與 500  $\text{mg}/\text{mL}$  的培養下其生長曲線逼近於沒有 Hygromycin B 處理之細胞，代表不帶抗藥性基因之細胞已被藥物所抑制而死亡。反之，剩下之細胞皆為帶有抗藥性基因之細胞。

### 二、HEK293-TOPrep 穩定細胞株內確實含有 LEF/TCF 結合序列

HEK293-TOPrep (F9) 可在含有 Hygromycin B 的培養液中存活，我們推測細胞中應該帶有報導質體，而質體中則有 LEF/TCF 結合序列，因此我們將 HEK293 與 6 株 HEK293-TOPrep 之 DNA 抽取出來並以 PCR 方式來偵測。結果如圖(二)所示，以質體(P)為模板，利用 TOP-F265 與 TOP-R265 引子可以擴增出大約 300 bps 之 TOP element (內含 LEF/TCF 結合序列)；以 HEK293 DNA 為模板則沒有擴增出此片段；而 HEK293 細胞轉殖 pGL4-TOP 經過 3 星期 Hygromycin B 藥物篩選出來的細胞群(T)與 6 株 HEK293-TOPrep 都可以偵測出 TOP element，其中實驗以  $\beta$ -actin 為內部對照組 (Internal Control)。因此從上述結果可知，在 Hygromycin B 藥物篩選後所存活下來的細胞中，確實可以用 PCR 的方式偵測到 TOP element，其中則包含有 LEF/TCF 的結合序列。

### 三、以 rWnt3a 為刺激劑可以活化細胞中 luciferase 報導基因的表現

pGL4-TOP 報導質體中之 LEF/TCF 結合序列為 Wnt 訊息傳導中重要之

轉錄因子結合位，為了解該質體在 F9 穩定細胞當中能受到 Wnt 蛋白質的調控而活化下游報導基因 Luciferase 的表現，實驗以不同濃度之 rWnt3a 為刺激劑進行 luciferase 活性之偵測。結果如圖(三)所示，以 100、200 與 400 ng/mL 的 rWnt3a 刺激可以看到 1.3、1.6 與 2.2 倍冷光強度的增加且與劑量呈相關性，其中 rWnt3a 溶於 PBS-BSA (0.1%)，所以加入同體積的 PBS-BSA 作為實驗對照組。因此該結果顯示，HEK293-TOPrep (F9)穩定細胞株在 rWnt3a 的刺激下，確實可以活化下游 luciferase 報導基因的表現，因而看到冷光的增加。

#### 四、rWnt3a 與 GSK3 抑制劑同時處理穩定細胞株可以專一性活化細胞中 luciferase 報導基因的表現

為確認 rWnt3a 在 HEK293-TOPrep (F9)穩定細胞中活化的專一性，實驗以 LiCl (20 mM)或 MIO (5  $\mu$ M)單獨或同時給與 rWnt3a (400 ng/mL)作刺激來觀察穩定細胞株中 Wnt 訊息傳導的活化。LiCl (非專一性)與 MIO(專一性)分別為 GSK3 蛋白質之抑制劑，抑制 GSK3 會使細胞質中  $\beta$ -catenin 磷酸化減少，因而增加穩定的  $\beta$ -catenin translocate 到細胞核中啟動報導基因。結果如圖(四 a)顯示，相較於控制組(PBS-BSA)，rWnt3a 與 LiCl 分別單獨處理 F9 穩定細胞株可以增加 1.9 與 4.9 倍的冷光表現，而共同處理 rWnt3a 與 LiCl 則有 10.8 倍的增加。在處理 BIO 抑制劑的圖(四 b)結果顯示，相較於對照組 (PBS-BSA)，rWnt3a 的刺激可以達到 2.6 倍的冷光表現(Bar 3)。以處理 DMSO 為對照組，結果則顯示處理 MeBIO (Bar 5)對冷光表現沒有顯著性的影響，但處理 GSK3 專一性抑制劑 MIO (Bar 6)則有 4.9 倍的增加。同時處理 MeBIO 和 rWnt3a (Bar 7)與 MIO 和 rWnt3a (Bar 8)的兩組實驗則發現，MeBIO 與 rWnt3a 的組別仍然可以活化 luciferase 的表現(2.9 倍)，與單獨給與 rWnt3a 之組別類似，而 BIO 與 rWnt3a 同時處理確實更加強了冷光的表現(6.9 倍)。因此結果顯示，rWnt3a 促進 HEK293-TOPrep (F9)報導基因的表現是具有專一性的。

#### 五、藥物篩選

HEK293-TOPrep (F9)報導細胞的 luciferase 已確認可受到 rWnt3a 的調控。因此，我們利用此細胞進行藥物的篩選，發現部分藥物在此系統中有抑制之效果，結果如圖(五)所示，其中代號 5271、5276、TYC85、TYC302、TYC323、TYC240 與 TYC 247 對 luciferase 的表現有抑制的現象。進一步我們利用 Jurkat 與 HL-60 細胞以  $^3$ H-thymidine uptake 評估藥物對細胞抑制增生之專一性，結果如圖(六 a)所示，5271、5276、TYC85、TYC302、TYC323、

TYC240 與 TYC 247 雖然分別對於 Jurkat (依序抑制百分比為 85%、45%、79%、71%、79%、80%與 81%) 有抑制效果，但對於 HL-60 也都有顯著之抑制效果[圖(六 b)；94%、60%、54%、60%、69%、56%與 64%]，結果代表著這些藥物可能有其它的機制降低 luciferase 的活性，且對細胞的生長抑制是非專一性的。

在過去藥物篩選過程中 (如表一)，我們已篩選到甲基斑蝥素 (Norcantharidin; NCTD;  $C_8H_8O_4$ ; M.W. 168) 可有效抑制 Transient luciferase activity，為確認此活性，我們再以 HEK293-TOPrep 穩定報導細胞之 Luciferase assay 系統進行測試，結果如圖(七)所示，HEK293-TOPrep 穩定細胞株可以受到 rWnt3a 或 LiCl 與 rWnt3a 同時刺激，而 50  $\mu$ M 之 NCTD 藥物可以抑制由 rWnt3a 蛋白質所誘導之冷光活性。為排除冷光之降低是因為毒殺所造成，因此 NCTD 對於 HEK293-TOPrep 細胞之毒殺測試也以 MTT assay 進行，結果如圖(八)所示，低濃度之 NCTD 對 HEK293-TOPrep 細胞無明顯之毒殺效果，而高濃度 (100  $\mu$ M) 則有約 18% 之抑制。而利用  $^3$ H-thymidine uptake assay 的結果如圖(九)所示，NCTD 對 Jurkat 細胞的生長抑制效果呈現劑量關係 ( $IC_{50} = 24.5 \mu$ M) 圖(九 a)，而該藥物對於 HL-60 則沒有抑制的效果圖(九 b)。因此，綜合上述我們發現，50  $\mu$ M 的 NCTD 可以抑制由 Wnt 蛋白質所誘導之冷光表現，而非毒殺細胞所造成，且它對 Jurkat 細胞有抑制增生之效果但對於 HL-60 無影響，代表著 NCTD 可能對於  $\beta$ -catenin/LEF 訊息具有選擇性。

#### 六、以 Jurkat 細胞建立腫瘤異體移植小鼠動物模式

為觀察我們所篩選出來的藥物其在體內的藥理活性，我們以 Jurkat 作為小鼠模式建立之細胞。過去研究已證實 Jurkat 細胞以腹腔注射法 (intraperitoneal injection; I.P.) 打入小鼠內可以在腹腔與脾臟中增生 [41]；以皮下注射法 (subcutaneous injection; S.C.) 打入 SCID 小鼠則會有 solid 腫瘤的形成 [42]。因此實驗以 S.C. 與 I.P. 兩種方式將 Jurkat 細胞打入小鼠體內，藉此來觀察 Jurkat 細胞在不同方式的移植後，是否同樣有器官浸潤與小鼠不適而造成體重下降之病徵。結果如圖(十七)所示，圖(十七 A) 為以 S.C. 方式將 PBS 打入 5 隻小鼠 (1-5 號) 背部作為對照組。圖(十七 B) 與圖(十七 C) 則為 10 隻小鼠 (6-15 號) 以 S.C. 方式打入細胞之實驗組，結果發現只有 10 號小鼠於第 11 天後有體重下降之趨勢，而到第 18 天則死亡，8、9、12、13 和 15 小鼠在第 24 天後有體重下降之趨勢，然而這 10 隻小鼠並未發現皮下有 solid 腫瘤的形成。在 I.P. 的組別中 (16-20 號)，只有 17 號小鼠在第 18 天後

體重開始明顯下滑。

在其它次實驗以 I.P.方式給與 Jurkat 細胞的實驗組別則發現圖(十八)，相較於腹腔注射 PB 的組別，給與  $2 \times 10^7$  (High dose)圖(十八 B)與  $1 \times 10^7$  (Low dose)圖(十八 C)與圖(十八 D)的小鼠其腹腔內有疑似白色腫瘤之形成。利用血球分析儀偵測週邊白血球的結果發現，以 S.C.方式打入 Jurkat 細胞的小鼠其週邊白血球與淋巴球數與控制組相比並無明顯之差異(6-15 號)。然而以 I.P.給與 Jurkat 細胞之 17 號小鼠，結果如圖(十九 A 與 B)，其週邊白血球數與淋巴球數則有明顯偏高之現象，其結果也符合圖(十七 D)，該小鼠體重在 18 天開始下滑之趨勢，因此推測可能有小鼠移植腫瘤細胞之病徵之一。

血液腫瘤細胞 Jurkat 浸潤於脾臟會造成脾臟之腫大[41]，因此在小鼠犧牲後，我們也進行脾臟重量之量測，最後將其重量與小鼠個體體重之比值來評估脾臟腫大之程度。結果如圖(二十)所示，在 S.C 和 I.P.的組別其脾臟與體重之比值有些許之增加，其中卻以 S.C.之組別較為明顯，但目前統計上則無顯著之差異。

上述結果得知，以 S.C.方式給予 Jurkat 細胞並無法觀察到在小鼠皮膚下有 solid 腫瘤之形成，而以 I.P.方式進行腫瘤移植雖然可以看到腹腔中疑似之白色腫瘤腫塊，但其比例卻不高(低劑量  $1 \times 10^7$ : 2/10; 高劑量  $2 \times 10^7$ : 1/5)。除此，腫瘤浸潤現象雖有些許之增加，但目前統計上並無明顯之差異。因此，為了解是否因動物之品質而影響實驗，我們目前正利用國家實驗動物中心所購得 SCID 小鼠，利用 S.C.、I.P.、I.V. (intravenous injection)三種方式建立異體移植小鼠。到目前為止，我們發現給予 Jurkat 細胞( $2 \times 10^7$ )後第 11 天，以 S.C.方式給予小鼠腫瘤細胞上未發現有 solid 腫瘤之形成；以 I.P.方式給予小鼠 7 天後之組別則發現有腹腔些微腫脹之現象，且其體重(平均體重 28.7 g)相較於控制組(平均體重 23.6 g)則有明顯之增加，推測可能是因為細胞造成腹腔中腹水之形成；I.V.方式注射 11 天後發現實驗組的組別(平均體重 22.7g)其體重相較於控制組(平均體重 24.7 g)則有些許降低之趨勢。然而，Jurkat 細胞移植後對於器官浸潤、脾臟腫漲、週邊白血球、淋巴球所造成的變化，我們將於第 30 天犧牲小鼠後做進一步的觀察。

## 肆、討論

延續去年計畫之構想，為了從中草藥或天然物中篩選出可能抑制 Wnt 訊息傳導之先導藥物(lead compounds)，我們需要一個能夠偵測 Wnt 訊息傳導路徑的穩定細胞平台。目前在研究 Wnt 訊息傳導的領域中常見使用之報導質體包括有 TOPFLASH 與 Super (8x) TOPFlash 等，但這些質體上皆無哺乳類細胞當中可使用之抗藥性基因。因此，為了利用抗藥性的有無來挑選轉染成功的細胞和建立穩定細胞株，實驗必須將一個帶有抗藥性基因之質體，如帶有抗新黴素(neomycin)基因的 pcDNA3.1 (Invitrogen Corporation, California, USA; Catalog # V790-20)與 TOPFLASH 兩質體以「共同轉染」(Co-transfection)的方式將質體送入細胞內以進行實驗 [43, 44, 45]。然而，此種方式須共同轉染兩個質體，雖然有機會可挑到具有抗藥性與偵測 Wnt 訊息傳導路徑的細胞，但仍然有可能篩選到只包含帶有抗藥性基因的質體但不包含報導質體的細胞株。此外，目前方法所轉染成功之細胞僅能暫時性地帶有報導質體，無法穩定傳遞到下一代的細胞，因此不便於實驗操作，亦無法實際應用於藥物篩選工作。

為解決上述問題，我們已將 LEF/TCF 結合序列構築於一個帶有抗藥性基因之 pGL4.30 質體上，以暫時性轉染方式將我們所構築之 pGL4-TOP 報導質體送入 HEK293 細胞株已證實可以受到 rWnt3a 蛋白質的調控而促使 luciferase 報導基因的表現，代表該質體用來作為 Wnt 訊息傳導的偵測應該是可行的。pGL4-TOP 報導質體上包含有 Hygromycin coding region，可以作為穩定細胞株篩選時之標的，因此，我們將經三個星期篩選存活之細胞以連續稀釋法分成單一細胞並成功篩選到由單一細胞所長成之 6 株群落細胞，分別命名為 HEK293-TOPrep C12、A12、D2、F9、C7 和 D7 穩定細胞株(HEK293-TOPrep stable cell line)。

上述所篩選的細胞株，HEK293-TOPrep (F9)細胞在含有 0、250 與 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Hygromycin B 藥物的環境下其生長曲線非常的類似，且到第四天仍可以穩定之生長，即使給予更高量(1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )之 Hygromycin B 會有些許之抑制，但細胞數目仍然有增加的趨勢圖(一 b)，因此我們大膽認為細胞中已成功轉入我們所構築之 pGL4-TOP 質體。此外，從轉殖與篩選至今已持續培養了 7 個多月，該細胞仍然可以在 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Hygromycin B 培養液中生存與生長，更凸顯出著該細胞之穩定性。然而其它株之細胞(C12、A12、D2、C7 和 D7)是否有同樣之特性仍待測試。

穩定生長於含 Hygromycin B 的培養液中代表質體在細胞中穩定的複製與被細胞所攜帶。pGL4-TOP 質體上有我們所構築之 TOP element，其中包含有 LEF/TCF 之結合序列，因此利用 PCR 也確實可以偵測到此片段，除此該質體上之 LEF/TCF 結合序列在送入細胞前也利用定序方式證實核苷酸序列是正確的。每株細胞利用 PCR 偵測 TOP element 所產生之 PCR 電泳圖，其 DNA 電泳樣式(pattern)類似於以質體為模板所得結果圖(二)，因此也推測 pGL4-TOP DNA 是以質體的形式存在於細胞，而非插入 Genome DNA 中，而利用 $\beta$ -actin 作為內部對組的結果也推測，抽取 DNA 時已同時將 Genomic DNA 與 pGL4-TOP 質體同時萃取出來。

細胞株攜帶有 LEF/TCF 結合序列，因此利用 rWnt3a 進行 Wnt 訊息傳導之測試結果也看到隨著 Wnt 蛋白質之增加，其冷光強度也隨之增加圖(三)。一個細胞能穩定攜帶質體於細胞內並複製是需要能量的耗損(攜帶質體數有限)，在我們的系統中，rWnt3a 刺激穩定細胞株之倍數相較於暫時性轉染(短時間內有較高之質體數)是較低的，但 GSK3 蛋白質抑制劑的同時處理仍然可以看到更高倍數之冷光反應圖(四 a 與 b)，也凸顯出 HEK293-TOPrep (F9)受 Wnt 蛋白質刺激之專一性。 $\beta$ -catenin 是 Wnt 蛋白質活化下游訊息傳導之重要蛋白質，它的穩定度決定是否能 translocate 到細胞質中啟動報導基因，因此 $\beta$ -catenin 在我們的系統中是否能因為 Wnt 刺激而累積仍有待我們得確認。但本系統在不同濃度 rWnt3a 與 GSK 抑制劑的處理下仍然可以說明該系統之可行性。

Jurkat 細胞表現有大量  $\beta$ -catenin，當細胞轉染 truncated  $\beta$ -catenin 會抑制細胞的生長，因此  $\beta$ -catenin 對 Jurkat 的生長扮演重要的角色；反之，HL-60 細胞中之  $\beta$ -catenin 較少且 truncated  $\beta$ -catenin 對細胞生長則無影響[47,48]。在藥物篩選部分，我們期望利用穩定細胞株篩選可抑制該訊息傳導之藥物，接著測試先導藥物對 Jurkat 與 HL60 兩種血癌細胞生長抑制狀況，藉此評估該先導藥物之專一性；反之，若一個藥物對 Wnt 訊息傳導確實有專一性，利用 Jurkat 與 HL60 細胞進行細胞增生測試亦可「初步篩選」「可能」對 Wnt 訊息傳導有影響之藥物，接著進一步利用 LEF/TCF 報導系統做佐證。因此，兩年中我們利用  $^3\text{H}$ -thymidine uptake 增生試驗已測試了 278 種藥物，其中 5 種藥物(2317、2464、2470、2649 與 NCTD)其對 Jurkat 細胞有抑制增生之效果，但對 HL60 則沒有影響。而此 5 種藥物中，NCTD 藥物則對 reporter assay 有影響。NCTD 這個藥物在其他文獻的查詢發現在較高濃度的情況下其對 A2780 (human ovarian carcinoma)、G401 (human kidney

carcinoma)、HT29 (human colorectal carcinoma)、H460 (human lung carcinoma) and L1210 (murine leukemia) 腫瘤細胞有抑制效果，且可能是 PP2A 的抑制劑 [46]。PP2A 也參與在  $\beta$ -catenin 降解之過程，因此我們才用來測試該藥物對我們 HEK293-TOPrep 穩定細胞株的影響，然而目前尚無文獻報導 NCTD 與 Wnt 訊息傳導調控的關係。

利用 HEK293-TOPrep 報導系統進行篩藥的結果發現，50  $\mu$ M NCTD 可以抑制報導基因的表現[圖(七)]，且非毒殺所造成[圖(八)]。在  $^3$ H-thymidine uptake 模式（細胞增生測試）中也確認藥物對 Jurkat 與 HL-60 兩種血癌細胞株生長之影響，結果顯示，NCTD 藥物在不同濃度下對 Jurkat 細胞生長有明顯之抑制效果( $IC_{50}$  24.5  $\mu$ M)，而對於 HL-60 細胞無顯著性之影響[圖(九)]。

為了評估藥物在體內之藥理活性，我們已進行癌症細胞異體移植小鼠之建立。我們發現台大動物中心所提供之 NOD/SCID 以 S.C.方式給予 Jurkat 細胞無法在皮下形成 solid 腫瘤，且週邊血液中其白血球與淋巴球總數也沒有明顯之上升。實驗初步結果中，雖然我們發現小鼠（S.C.與 I.P.組別）脾臟與體重之比值有些許之上升，但並無統計上的意義，其原因推測可能是浸潤的細胞在器官當中其增生現象無法多到足以用重量去觀察脾臟重量變化。因此我們目前正在進行脾臟、肺臟、肝臟與腎臟之組織切片，藉此觀察異體移植細胞(Jurkat)浸潤現象(Infiltration)。利用人類 CD45 分子標記以確認浸潤之現象是 Jurkat 細胞所造成。 $\beta$ -catenin 是 Wnt 訊息傳導中關鍵之蛋白質，其表現量與位置決定此蛋白的活性，因此，我們也利用  $\beta$ -catenin 抗體在組織切片中初步觀察其在活體內表現量與在細胞中位置之變化。然而目前正在進行中，尚無結果之呈現。因此未來我們會針對目前所缺乏之項目進行研究並加強結果之呈現。在 I.P.的實驗則顯示，在腹腔內有形成疑似腫瘤之白色腫塊圖(十一)，但是否為 Jurkat 細胞所造成有待確認。除此，週邊白血球、淋巴球數目在 17 號小鼠(I.P.)中也有明顯之上升。利用台大動物中心所建立之小鼠模式有較低之發病率，為排除小鼠本身之問題，目前我們已利用國家實驗動物中心之小鼠進行腫瘤異體移植的建立，期望能提高 Jurkat 細胞在小鼠體內腫瘤形成的機會。因此期望未來在小鼠建立後，立即以口服方式給予小鼠藥物，藉此觀察 In vitro 所篩選出來的藥物其在 In vivo 的藥理活性，而我們會將 NCTD 列為重點藥物之一，先進行活體實驗。而其它有效藥物目前正進行結果再確認、資料分析與結構之確認，而此部分我們在有完整結果之同時也會向中醫藥委員會報備。

## 伍、結論與建議

在衛生福利部中醫藥司經費的補助下，本年度(97)研究執行進度已將 pGL4-TOP 報導質體送入 HEK293 細胞並成功挑選出 HEK293-TOPrep (F9) 穩定細胞株，且已證實該細胞株具有穩定性與功能性，是可以作為 Wnt 訊息傳導研究之工具，同時我們也針對報導質體與穩定細胞株提出專利之申請（申請中；中華民國專利案號：097136573），期待該專利在未來審核能順利獲取。利用 reporter assay system 與 <sup>3</sup>H-thymidine uptake assay 也篩選出 NCTD 可以抑制由 Wnt 蛋白質所誘導之訊息傳導，且可以影響 Jurkat 細胞生長但對 HL-60 沒影響。利用 Jurkat 細胞所建立之腫瘤異體移植小鼠模式也已初步建立，我們將利用人類 CD45 分子標記確認 Jurkat 細胞所造成之浸潤現象，並以免疫組織染色法觀察β-catenin 蛋白質在活體內其表現量與在細胞中位置之變化是否同樣會受到藥物之影響。NCTD 藥物於體內是否具有活性已持續進行分析中，期望在未來能有正面之結果。除此，在經費許可下，我們將進一步針對體內活性分析做更完整研究與該藥物之機制探討，以為抗癌先導藥物開發之依據。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP96-RD-207 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. 行政院衛生署 (2005)。縣市癌症與死因統計結果。行政院衛生署。
2. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukaemia. *N Engl J Med* 1999, 341:1051-1062.
3. Zhang Y, Rowley JD. Chromatin structural elements and chromosomal translocations in leukemia. *DNA Repair* 2006, 5:1282-1297.
4. Nusse R, Varmus HE. Wnt genes. *Cell* 1992, 69:1073-1087.
5. Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 2000, 407:530-535.
6. Kikuchi A, Kishida S, Yamamoto H. Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. *Exp Mol Med* 2006, 38:1-10.
7. Staal FJ, Clevers HC. WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation. *Nat Rev Immunol* 2005, 5:21-30
8. Barker N, Hurlstone A, Muisi H, Miles A, Bienz M, Clevers H. The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. *EMBO J* 2001, 20:4935-4943.
9. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998, 281:1509-1512.
10. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999, 398:422-426.
11. Taipale, J. & Beachy, P. A. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 2001, 411: 349–354.
12. Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, Chadwick K, Ling LE, Karanu FN, Bhatia M. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nature Immunol* 2001, 2:172–180.
13. McWhirter JR, Neuteboom ST, Wancewicz EV, Monia BP, Downing JR, Murre C. Oncogenic homeodomain transcription factor E2A-Pbx1 activates a novel WNT gene in pre-B acute lymphoblastoid leukemia. *Proc*

- Natl Acad Sci U S A 1999, 96:11464-11469.
14. Lu D, Zhao Y, Tawatao R, Cottam HB, Sen M, Leoni LM, Kipps TJ, Corr M, Carson DA. Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101:3118-3123.
  15. Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, Gotlib J, Li K, Manz MG, Keating A, Sawyers CL, Weissman IL. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med* 2004, 351:657-667.
  16. Zheng X, Beissert T, Kukoc-Zivojnov N, Puccetti E, Altschmied J, Strolz C, Boehrer S, Gul H, Schneider O, Ottmann OG, Hoelzer D, Henschler R, Ruthardt M. Gamma-catenin contributes to leukemogenesis induced by AML-associated translocation products by increasing the self-renewal of very primitive progenitor cells. *Blood* 2004, 103:3535-3543.
  17. Simon M, Grandage VL, Linch DC, Khwaja A. Constitutive activation of the Wnt/beta-catenin signalling pathway in acute myeloid leukaemia. *Oncogene* 2005, 24:2410-2420.
  18. Ysebaert L, Chicanne G, Demur C, De Toni F, Prade-Houdellier N, Ruidavets JB, Mansat-De Mas V, Rigal-Huguet F, Laurent G, Payrastre B, Manenti S, Racaud-Sultan C. Expression of beta-catenin by acute myeloid leukemia cells predicts enhanced clonogenic capacities and poor prognosis. *Leukemia* 2006, 20:1211-1216.
  19. Kolitz JE. Current therapeutic strategies for acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2006, 134:555-572.
  20. Liang DC, Chan TT, Lin KH, Lin DT, Lu MY, Chen SH, Liu HC, Lin MT, Lee MT, Shu SG, Chang TK, Chen JS, Hsiao CC, Hung IJ, Hsieh YL, Chen RL, Cheng SN, Chang WH, Lee CH, Lin KS. Improved treatment results for childhood acute myeloid leukemia in Taiwan. *Leukemia* 2006, 20:136-141.
  21. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997, 3:730-737.
  22. Kamel-Reid S, Letarte M, Sirard C, Doedens M, Grunberger T, Fulop G, Freedman MH, Phillips RA, Dick JE. A model of human acute

- lymphoblastic leukemia in immune-deficient SCID mice. *Science* 1989, 246:1597-1600.
23. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994, 367:645-648.
  24. Hope KJ, Jin L, Dick JE. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol* 2004, 5:738-743.
  25. Soltysova A, Altanerova V, Altaner C. Cancer stem cells. *Neoplasma* 2005, 52:435-440.
  26. Ravandi F, Estrov Z. Eradication of leukemia stem cells as a new goal of therapy in leukemia. *Clin Cancer Res* 2006, 12:340-344.
  27. Smith ML, Hawcroft G, Hull MA. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human colorectal cancer cells: evidence of different mechanisms of action. *Eur J Cancer* 2000, 36:664-674.
  28. Brown WA, Skinner SA, Vogiagis D, O'Brien PE. Inhibition of beta-catenin translocation in rodent colorectal tumors: a novel explanation for the protective effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs in colorectal cancer. *Dig Dis Sci* 2001, 46:2314-2321.
  29. Rice PL, Kelloff J, Sullivan H, Driggers LJ, Beard KS, Kuwada S, Piazza G, Ahnen DJ. Sulindac metabolites induce caspase- and proteasome-dependent degradation of beta-catenin protein in human colon cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2003, 2:885-892.
  30. Li H, Liu L, David ML, Whitehead CM, Chen M, Fetter JR, Sperl GJ, Pamukcu R, Thompson WJ. Pro-apoptotic actions of exisulind and CP461 in SW480 colon tumor cells involve beta-catenin and cyclin D1 down-regulation. *Biochem Pharmacol* 2002, 64:1325-1336.
  31. Dihlmann S, Klein S, Doeberitz Mv MK. Reduction of beta-catenin/T-cell transcription factor signaling by aspirin and indomethacin is caused by an increased stabilization of phosphorylated beta-catenin. *Mol Cancer Ther* 2003, 2:509-516.
  32. Williams JL, Borgo S, Hasan I, Castillo E, Traganos F, Rigas B. Nitric

- oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) alter the kinetics of human colon cancer cell lines more effectively than traditional NSAIDs: implications for colon cancer chemoprevention. *Cancer Res* 2001, 61:3285-3289.
33. Williams JL, Kashfi K, Ouyang N, del Soldato P, Kopelovich L, Rigas B. NO-donating aspirin inhibits intestinal carcinogenesis in Min (APC(Min/+)) mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 313:784-788.
  34. Rhee CS, Sen M, Lu D, Wu C, Leoni L, Rubin J, Corr M, Carson DA. Wnt and frizzled receptors as potential targets for immunotherapy in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncogene* 2002, 21:6598-6605.
  35. Emami KH, Nguyen C, Ma H, Kim DH, Jeong KW, Eguchi M, Moon RT, Teo JL, Kim HY, Moon SH, Ha JR, Kahn M. A small molecule inhibitor of beta-catenin/CREB-binding protein transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101:12682-12687.
  36. Lepourcelet M, Chen YN, France DS, Wang H, Crews P, Petersen F, Bruseo C, Wood AW, Shivdasani RA. Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. *Cancer Cell* 2004, 5:91-102.
  37. Trosset JY, Dalvit C, Knapp S, Fasolini M, Veronesi M, Mantegani S, Gianellini LM, Catana C, Sundstrom M, Stouten PF, Moll JK. Inhibition of protein-protein interactions: the discovery of druglike beta-catenin inhibitors by combining virtual and biophysical screening. *Proteins* 2006, 64:60-67.
  38. Zhang Q, Major MB, Takanashi S, Camp ND, Nishiya N, Peters EC, Ginsberg MH, Schultz PG, Moon RT, Ding S.: Small-molecule synergist of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:7444-7448.
  39. Barker N, Clevers H.: Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5:997-1014.
  40. Wu B, Crampton SP, Hughes CC: Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. *Immunity* 2007; 26:227-239.
  41. Shen C, Maerten P, Geboes K, Van Assche G, Rutgeerts P, Ceuppens JL: Infliximab induces apoptosis of monocytes and T lymphocytes in a

- human-mouse chimeric model. *Clin Immunol.* 2005; 115:250-259.
42. Wulf GG, Boehnke A, Chapuy B, Glass B, Hemmerlein B, Schroers R, Brenner MK, Truemper L: CD45 monoclonal antibody-mediated cytolysis of human NK and T lymphoma cells. *Haematologica* 2006; 91:886-894.
  43. Cho M, Gwak J, Park S, Won J, Kim DE, Yea SS, Cha IJ, Kim TK, Shin JG, Oh S.: Diclofenac attenuates Wnt/beta-catenin signaling in colon cancer cells by activation of NF-kappaB. *FEBS Lett.* 2005; 579:4213-4218.
  44. Park S, Gwak J, Cho M, Song T, Won J, Kim DE, Shin JG, Oh S.: Hexachlorophene inhibits Wnt/beta-catenin pathway by promoting Siah-mediated beta-catenin degradation. *Mol Pharmacol.* 2006; 70:960-966.
  45. Suzuki A, Ozono K, Kubota T, Kondou H, Tachikawa K, Michigami T.: PTH/cAMP/PKA signaling facilitates canonical Wnt signaling via inactivation of glycogen synthase kinase-3beta in osteoblastic Saos-2 cells. *J Cell Biochem.* 2008; 104:304-317.
  46. Hart ME, Chamberlin AR, Walkom C, Sakoff JA, McCluskey A.: Modified norcantharidins; synthesis, protein phosphatases 1 and 2A inhibition, and anticancer activity. *Bioorg Med Chem Lett.* 2004; 14:1969-1973.
  47. Chung EJ, Hwang SG, Nguyen P, Lee S, Kim JS, Kim JW, Henkart PA, Bottaro DP, Soon L, Bonvini P, Lee SJ, Karp JE, Oh HJ, Rubin JS, Trepel JB.: Regulation of leukemic cell adhesion, proliferation, and survival by beta-catenin. *Blood.* 2001; 100:982-990.
  48. Hwang SG, Lee HC, Trepel JB, Jeon BH.: Anticancer-drug-induced apoptotic cell death in leukemia cells is associated with proteolysis of beta-catenin. *Leuk Res.* 2002; 26:863-871.

## 柒、圖表

表一、兩年篩選之藥材與其抑制 Jurkat 與 HL-60 血癌細胞生長之活性。

Drugs 編號	Jurkat Inhibition (%)	HL60 Inhibition (%)
2273	-1.96	ND*
2274	3.64	ND
2275	-3.75	ND
2276	1.17	ND
2277	1.02	ND
2278	0.55	ND
2279	44.88	ND
2280	3.21	ND
2281	29.37	ND
2282	10.99	ND
2283	24.43	ND
2284	-1.81	ND
2285	0.20	ND
2286	0.53	ND
2287	-3.92	ND
2288	1.21	ND
2289	-0.88	ND
2290	-0.84	ND
2291	-5.53	ND
2292	5.14	ND
2293	ND	ND
2294	-1.34	ND
2295	-3.28	ND
2296	17.81	ND
2297	-24.53	ND
2298		ND
2299	7.38	ND
2300		ND
2301	7.29	ND
2302	-10.52	ND
2303	-13.13	ND
2304		ND

Drugs 編號	Jurkat Inhibition (%)	HL60 Inhibition (%)
2305	-10.00	ND
2306	42.71	ND
2307	-7.08	ND
2308	-6.60	ND
2309	-25.80	ND
2310	-37.80	ND
2311	-12.87	ND
2312	-1.03	ND
2313	-1.38	ND
2314	0.62	ND
2315	1.67	ND
2316	ND	ND
2317	87.59	0.02
2318	86.02	96.05
2319	81.08	74.59
2320	-18.09	ND
2321	-9.91	ND
2322	7.55	ND
2323	ND	ND
2324	-9.41	ND
2325	74.59	96.32
2326	6.23	ND
2327	76.78	96.55
2328	44.15	ND
2329	15.32	ND
2330	0.04	ND
2331	-11.33	ND
2332	ND	ND
2333	1.50	ND
2334	ND	ND
2335	-2.45	ND
2336	-22.26	ND
2337	-3.07	ND
2338	3.21	ND

Drugs 編號	Jurkat Inhibition (%)	HL60 Inhibition (%)
2339	ND	ND
2340	7.83	ND
2341	-9.93	ND
2462	92.16	94.44
2463	92.80	93.94
2464	77.18	-85.31
2465	-9.74	ND
2466	14.14	ND
2467	1.91	ND
2468	89.81	89.11
2469	22.28	ND
2470	63.12	8.40
2471	-3.00	ND
2472	-9.90	ND
2473	-5.49	ND
2474	-5.92	ND
2505	-17.68	ND
2506	-9.60	ND
2507	-5.92	ND
2508	-25.48	ND
2509	-6.75	ND
2510	-11.24	ND
2511	-12.94	ND
2512	-7.47	ND
2514	-5.24	ND
2515	-3.76	ND
2516	2.56	ND
2517	4.93	ND
2518	38.98	ND
2519	-5.13	ND
2520	8.12	ND
2521	2.67	ND
2522	9.38	ND
2523	10.99	ND

Drugs 編號	Jurkat Inhibition (%)	HL60 Inhibition (%)
2524	-13.62	ND
2525	90.87	95.14
2526	88.87	96.34
2527	79.10	84.76
2528	-9.98	ND
2529	-1.55	ND
2530	-0.43	ND
2531	-7.60	ND
2532	93.39	96.32
2533	6.86	ND
2534	-10.86	ND
2535	-18.68	ND
2544	-9.01	ND
2545	-24.78	ND
2546	-6.22	ND
2547	-5.38	ND
2548	-47.78	ND
2549	-91.32	ND
2550	17.47	ND
2551	-16.69	ND
2552	-9.72	ND
2553	-7.13	ND
2554	-31.11	ND
2555	-45.09	ND
2556	-32.49	ND
2601	6.44	ND
2602	79.83	91.92
2603	40.22	ND
2604	93.46	87.90
2605	84.34	90.69
2606	16.60	ND
2607	0.71	ND
2608	-15.98	ND
2609	-6.56	ND

Drugs 編號	Jurkat Inhibition (%)	HL60 Inhibition (%)
2610	-0.93	ND
2611	85.05	95.15
2612	-2.69	ND
2613	-1.35	ND
2614	86.76	92.45
2615	-7.35	ND
2616	-2.56	ND
2617	-10.98	ND
2618	-15.07	ND
2619	82.36	87.24
2620	-7.28	ND
2621	-27.61	ND
2622	-11.77	ND
2475	17.29	ND
2476	13.70	ND
2477	-8.31	ND
2478	3.65	ND
2591	6.54	ND
2592	-15.95	ND
2593	6.73	ND
2594	10.40	ND
2595	-6.85	ND
2596	7.21	ND
2597	7.22	ND
2598	-11.12	ND
2599	-0.27	ND
2623	8.13	ND
2627	-5.66	ND
2628	17.29	ND
2629	13.70	ND
2630	-8.31	ND
2631	3.65	ND
2632	6.54	ND
2475	-15.95	ND

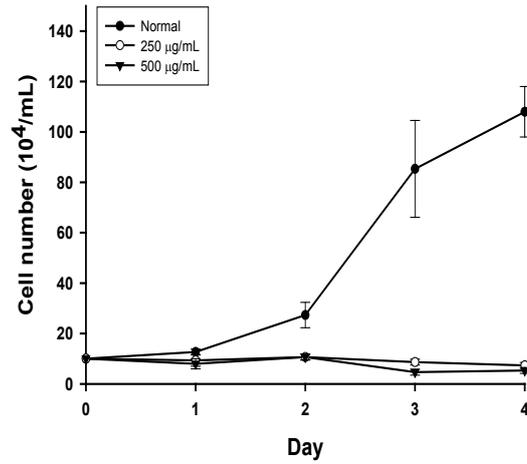
Drugs 編號	Jurkat Inhibition (%)	HL60 Inhibition (%)
2476	6.73	ND
2477	10.40	ND
2478	-6.85	ND
2591	7.21	ND
2592	7.22	ND
2593	-11.12	ND
2594	-0.27	ND
2595	8.13	ND
2596	-5.66	ND
2597	17.29	ND
2598	13.70	ND
2599	-8.31	ND
2623	3.65	ND
2627	6.54	ND
2628	-1.53	ND
2629	5.75	ND
2630	2.66	ND
2631	4.29	ND
2632	-6.92	ND
2602	84.45	ND
2604	50.06	ND
2605	74.74	ND
2611	63.89	ND
2614	44.94	ND
2619	10.55	ND
NCTD (100 $\mu$ M)	86.49	17.82
NCTD (50 $\mu$ M)	82.47	-4.95
NCTD (25 $\mu$ M)	52.00	6.03
NCTD (12.5 $\mu$ M)	34.68	0.54
NCTD (6.25 $\mu$ M)	10.15	-11.37
2642	-0.60	ND
2643	-2.85	ND
2644	5.15	ND
2645	0.96	ND

Drugs 編號	Jurkat Inhibition (%)	HL60 Inhibition (%)
2646	-2.51	ND
2647	2.77	ND
2648	5.55	ND
2649	73.93	11.79
2650	75.06	40.50
2651	71.94	51.84
2652	15.85	ND
2653	30.35	ND
2654	29.25	ND
2655	18.55	ND
2656	27.76	ND
2657	29.57	ND
2658	12.53	ND
2659	31.23	ND
2667	31.12	ND
2668	26.78	ND
2669	1.21	ND
2670	34.80	ND
2671	18.32	ND
2672	8.67	ND
2673	12.58	ND
2674	8.65	ND
2675	4.38	ND
2676	1.65	ND
2677	18.95	ND
2678	-6.03	ND
2679	-6.22	ND
2680	15.93	ND
2681	-2.00	ND
2682	9.64	ND
2683	28.85	ND
5251	29.00	ND
5252	7.64	ND
5253	25.70	ND

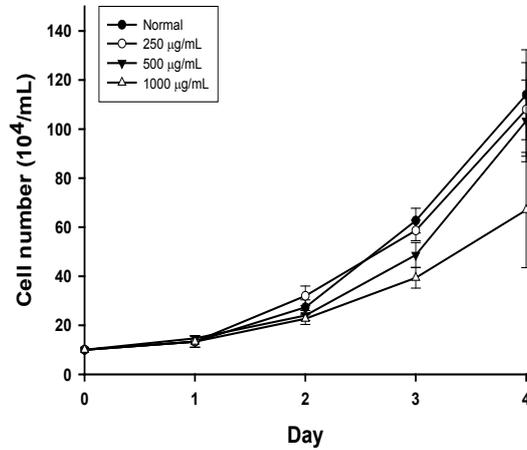
Drugs 編號	Jurkat Inhibition (%)	HL60 Inhibition (%)
5254	23.53	ND
5256	27.27	ND
5257	84.51	77.75
5271	85.94	94.08
5272	16.55	ND
5273	43.00	ND
5274	23.58	ND
5275	23.68	ND
5276	46.66	ND
5277	70.78	76.44
5278	20.42	ND
5279	18.55	ND
5280	18.37	ND
TYC85	79.41	54.11
TYC302	71.31	60.01
TYC323	79.39	69.77
TYC240	80.21	56.45
TYC247	81.51	64.90
ES25	88.28	75.48

\*ND: not determined

(a)

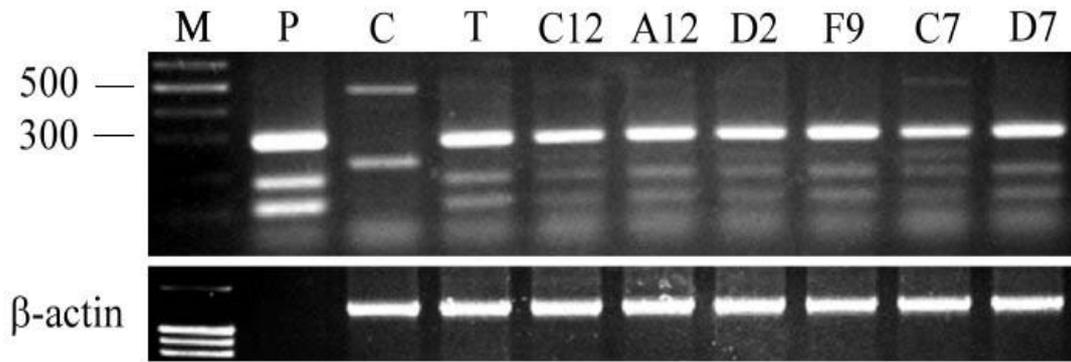


(b)



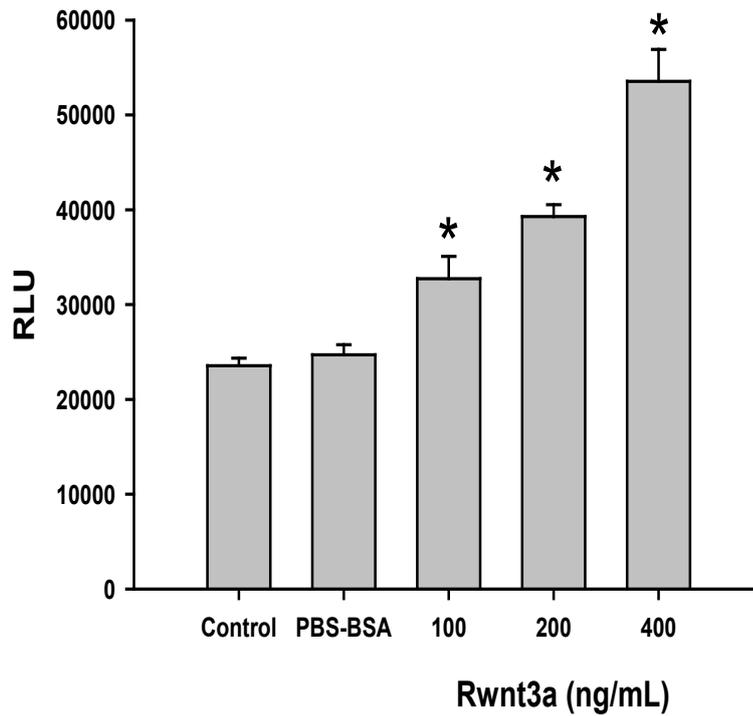
圖一、Hygromycin B 藥物對 HEK293-TOPrep 穩定細胞株生長的影響。

HEK293 與 HEK293-TOPrep (F9)細胞分別培養於 6 well 培養盤當中，並在細胞培養液當中分別加入 250、500 和 1000  $\mu\text{g/mL}$  的 Hygromycin B 共同培養，利用 Trypan blue 染色法每天計數細胞數目，連續計數 4 天所得結果，每一點為三次結果之 Mean $\pm$ SD。



圖二、以 PCR 方式偵測 6 個穩定細胞株的 LEF/TCF 結合序列。

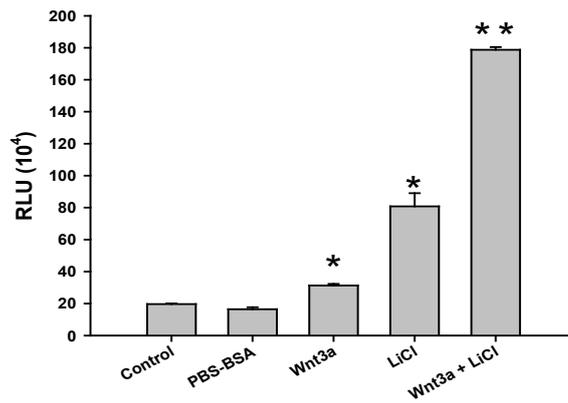
6 個經過連續稀釋所篩選出來的穩定細胞株(stable clone)在經過培養擴增後，將其 DNA 萃取出來，利用 TOP-R265 與 TOP-F265 引子進行 LEF/TCF 結合序列(TOP element)的偵測。圖中利用 HEK293 作為 negative control (C)、pGL4-TOP (P)作為 positive control、T 為 HEK293 細胞轉殖 pGL4-TOP 經過 3 星期 Hygromycin B 藥物篩選出來的細胞。



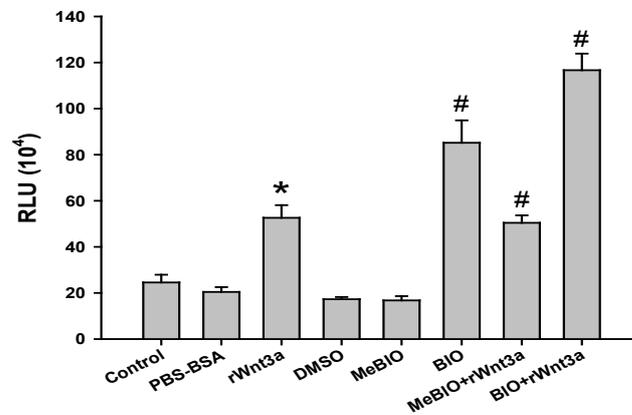
圖三、以 Recombinant Wnt3a (rWnt3a)為刺激劑進行 HEK293-TOPrep stable cell (F9)的活性分析。

HEK293-TOPrep stable cell (F9)細胞培養於 96 well 培養盤一天後，以 100、200 和 400 ng/mL 的 rWnt3a 刺激細胞 24 小時，最後收集細胞並以 luciferase assay system 進行冷光之分析。本實驗利用 Student's *t* test 方法作統計，其中第三、四和五組與第二組作比較。\*為  $p < 0.05$ 。

(a)



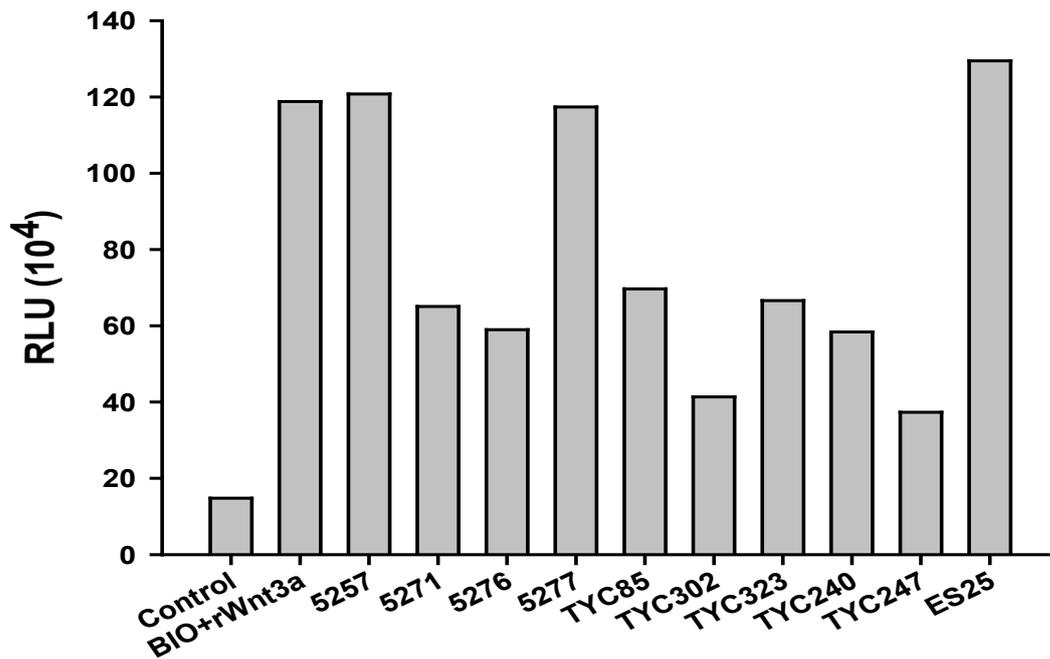
(b)



圖四、以 GSK3 抑制劑處理 HEK293-TOPrep stable (F9)穩定細胞株觀察 rWnt3a 刺激之專一性。

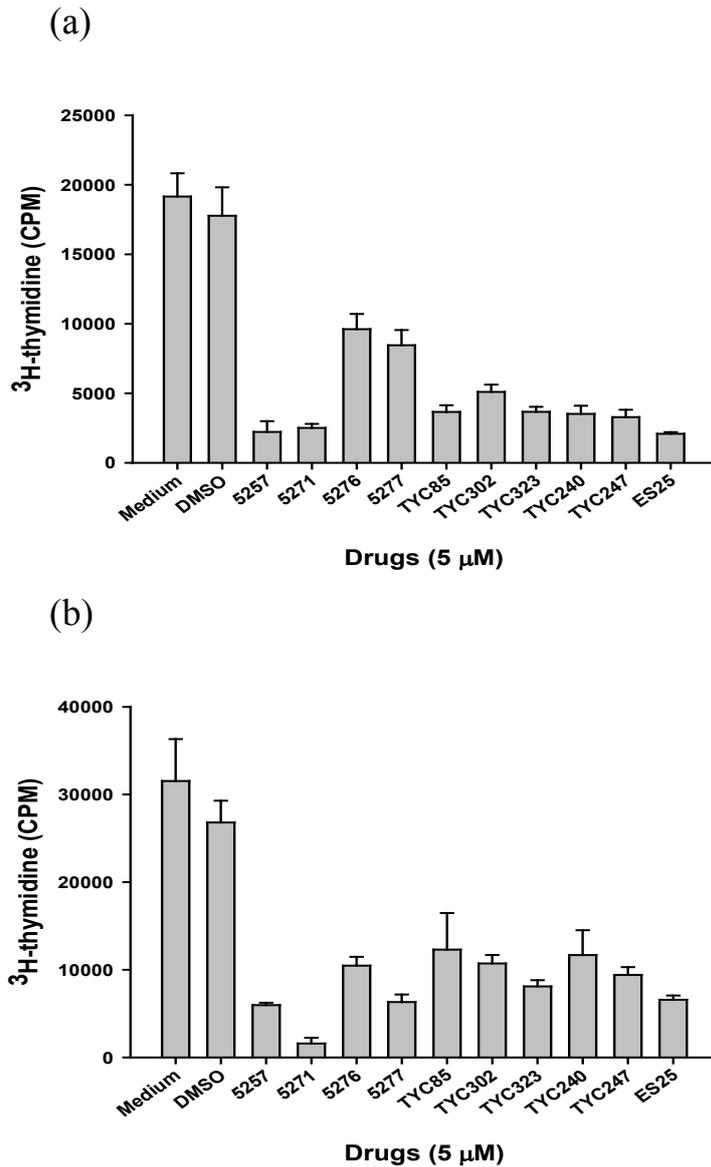
(a) F9 穩定細胞株以 20 mM 的 LiCl 單獨或前處理穩定細胞株後再以 rWnt3a (400 ng/mL)刺激。其中第三、四和五組與第二組作比較。

(b) F9 細胞以 20 mM 的 LiCl 單獨或前處理穩定細胞株後再以 rWnt3a 刺激。其中第三組與第一組作比較，第六、七和八組與第四組作比較。本實驗利用 Student's *t* test 方法作統計\*為  $p < 0.05$ ; \*\*為:  $p < 0.001$ 。



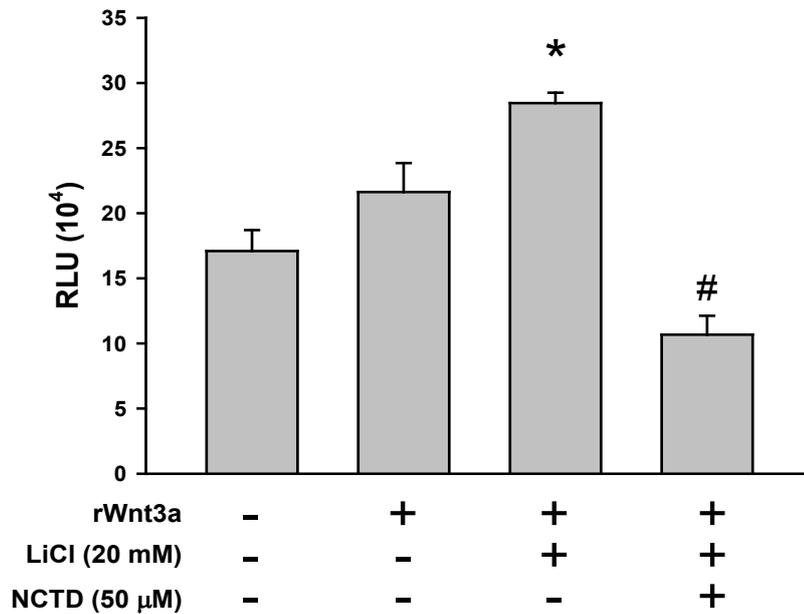
圖五、以 HEK293-TOPrep 報導細胞評估藥物抑制 luciferase 的活性

F9 穩定細胞株培養於 96 孔培養盤後，以 BIO 與 rWnt3a 對細胞作刺激，接著加入各種不同藥物(1  $\mu$ M)培養 24 小時後收集細胞並以 luciferase assay reagent 偵測冷光強度。



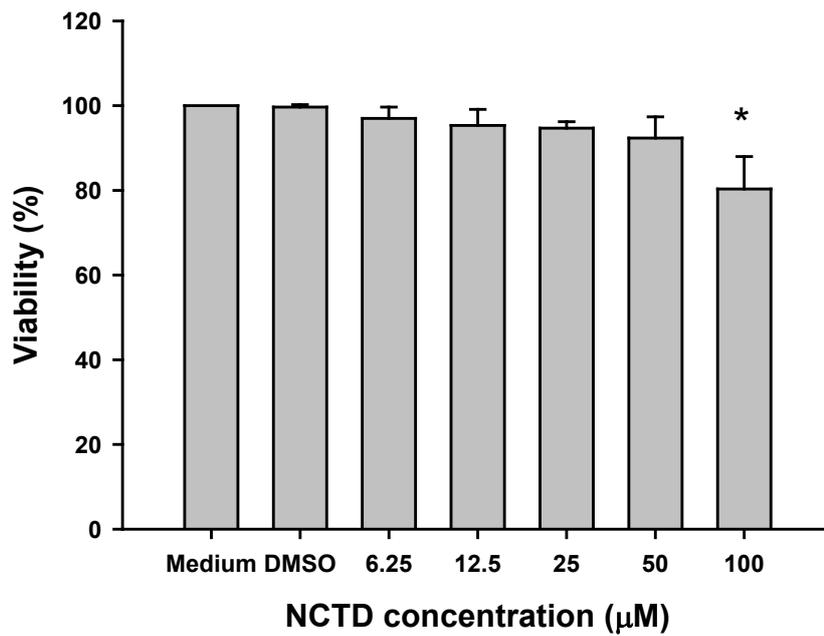
圖六、以 <sup>3</sup>H-thymidine uptake assay 評估藥物抑制 Jurkat 與 HL-60 細胞生長之活性

Jurkat (a)與 HL-60 (b)細胞培養於 96 孔培養盤後以 5 μM 藥物處理，藥物作用 48 小時後加入 <sup>3</sup>H-thymidine 反應 18 小時，最後以閃爍計數器測定放射性強度。



圖七、以 NCTD 藥物評估對 HEK293-TOPrep 冷光表現抑制之活性

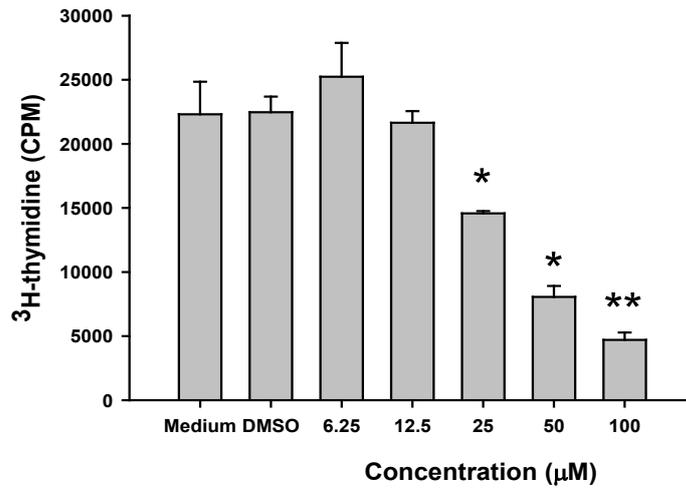
F9 穩定細胞株經過培養後以 LiCl 藥物作前處理，接著加入 NCTD 藥物共同培養後加入 rWnt3a。在經 24 小時培養後收集細胞並以 luciferase assay reagent 偵測冷光強度。本實驗利用 Student's *t* test 方法作統計，其中第三組與第一組作比較 (\*)，第四組與第三組作比較 (#)。\* 與 # 為  $p < 0.05$ 。



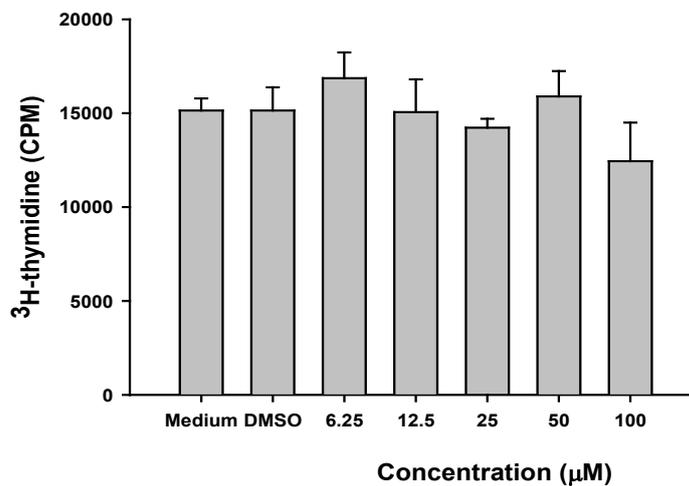
圖八、以 MTT assay 測試不同濃度 NCTD 藥物對 HEK293-TOPrep 穩定細胞株存活之影響

HEK293-TOPrep (F9)穩定細胞株培養於96孔培養盤24小時後，以0.1% DMSO 或不同濃度之 NCTD (6.25、12.5、25、50 與 100 µM)與細胞共培養24小時，最後以光譜測定儀測定570 nm之吸光值。本實驗利用 Student's *t* test 方法作統計，\*為  $p < 0.05$ 。

(a)



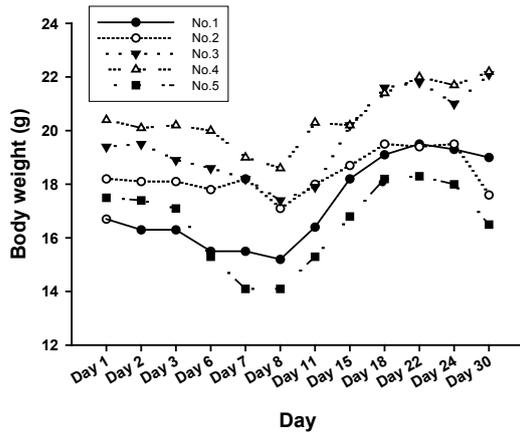
(b)



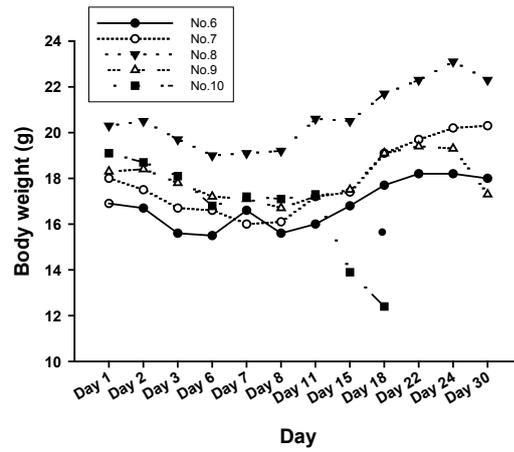
圖九、NCTD 隨濃度的增加可以抑制 Jurkat 細胞的增殖但對 HL-60 細胞沒有影響

Jurkat 與 HL-60 細胞經培養後以不同濃度之 NCTD 藥物作處理，經 48 小時培養後加入 <sup>3</sup>H-thymidine 反應 18 小時，最後以閃爍計數器測定放射性強度。本實驗利用 Student's *t* test 方法作統計，\*為  $p < 0.05$ ; \*\*為:  $p < 0.001$ ，與 DMSO 處理組別做比較。

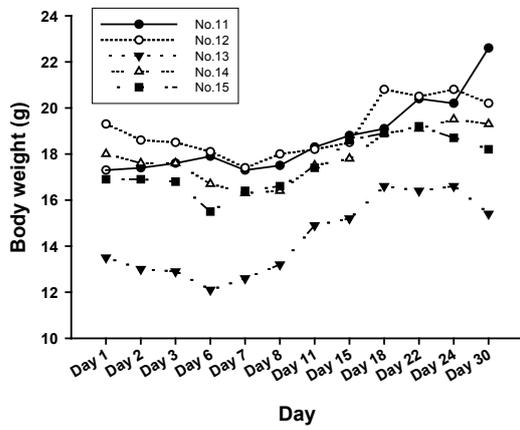
(a)



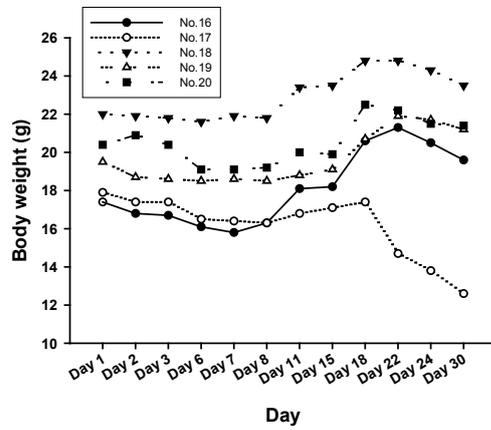
(b)



(c)

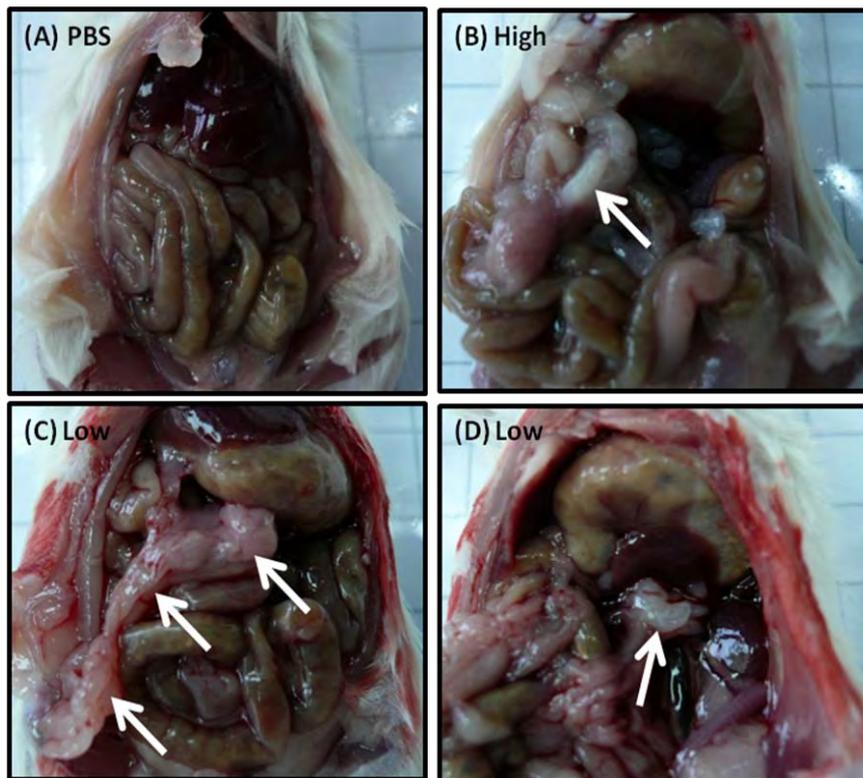


(d)



圖十、以 Jurkat 建立之腫瘤異體移殖小鼠其體重變化。

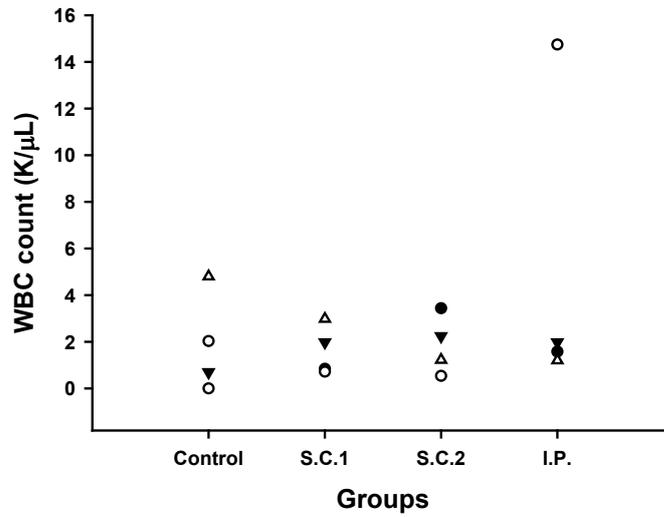
將  $2 \times 10^7$  之 Jurkat 細胞以 S.C.與 I.P.方式打入 NOD/SCID 小鼠體內，定期量測體重。圖 a 為實驗控制組，圖 b-c 為以 S.C.注射，圖 d 為 I.P.注射。



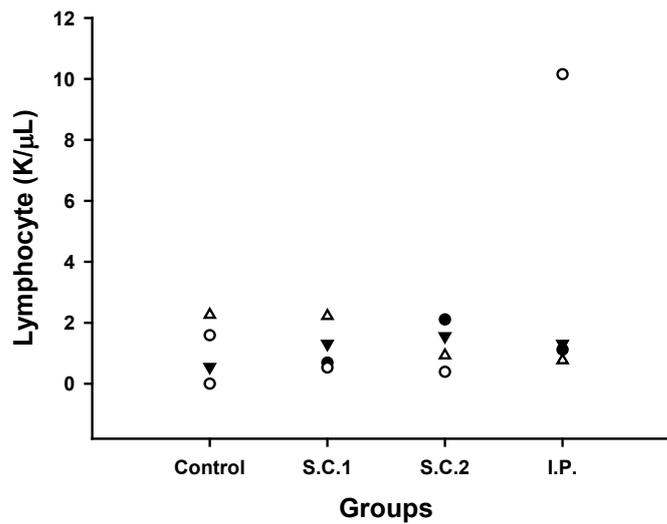
圖十一、以 Jurkat 建立之腫瘤異體移殖小鼠其腹腔中形成之腫瘤。

將 Jurkat 細胞以 I.P.方式打入 NOD/SCID 小鼠體內，在第 28 天犧牲並觀察腹腔內是否有腫瘤形成。(A) 對照組：給與 PBS；(B) 高劑量實驗組：給與  $2 \times 10^7$  之 Jurkat 細胞；(C) 低劑量實驗組：給與  $1 \times 10^7$  之 Jurkat 細胞。箭頭所指為疑似白色腫瘤。

(a)

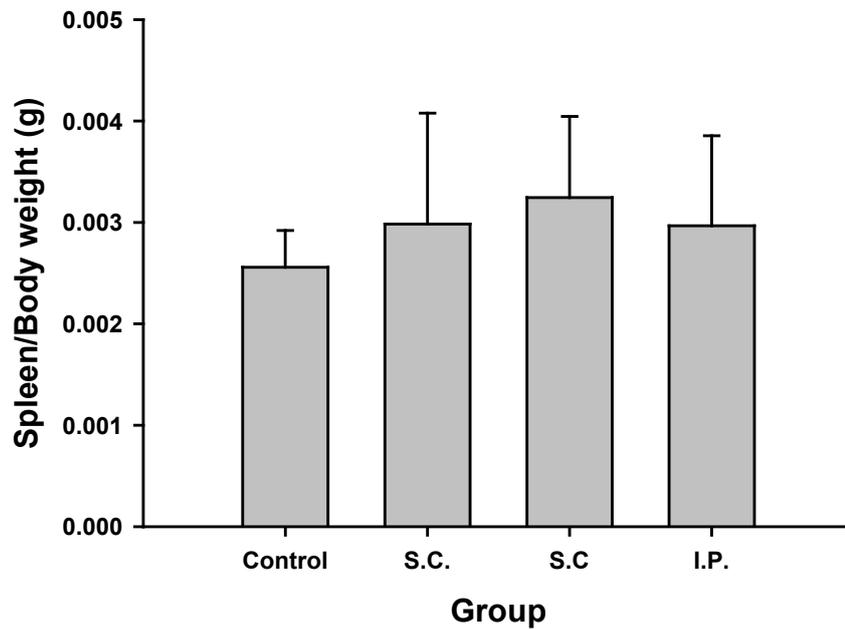


(b)



圖十二、以 Jurkat 建立之腫瘤異體移植小鼠其週邊血液白血球與淋巴球數之變化。

將  $2 \times 10^7$  之 Jurkat 細胞以 S.C. 與 I.P. 方式打入 NOD/SCID 小鼠體內，在第 30 天犧牲時以血液分析儀進行白血球與淋巴球數之偵測。



圖十三、以 Jurkat 建立之腫瘤異體移植小鼠其脾臟重量之變化

將  $2 \times 10^7$  之 Jurkat 細胞以 S.C. 與 I.P. 方式打入 NOD/SCID 小鼠體內，在第 30 天犧牲時進行小鼠個體與脾臟重量之測量，結果為每組脾臟重量與個體體重之比值之平均值。

# 茄科植物中具抗肝炎病毒之天然物及分子 演化

周昌弘

中國醫藥大學生物多樣性研究中心

## 摘 要

茄科植物(Solanaceae)是目前地球上第三大重要的經濟作物，也是目前最重要的蔬菜作物，提供給人類許多種食物與藥物。目前已知這些植物次代謝物在其他植物物種具有生物活性，包括天然抗氧化、抗菌、抗病毒及抑制病毒繁殖之醫學療效。

B 型肝炎病毒感染引起廣泛肝疾病，包括急性、慢性肝炎、肝硬化甚至肝癌。目前已知感染 B 肝病毒引起肝癌比例比未感染正常人高出 100 倍，尤其是在東南亞地區（包括台灣），B 肝帶原比例平均達到總人口的 8~15%。目前研發的疫苗對抗肝炎病毒感染的療效還是有限，因此探討有效的對抗並治療肝炎病毒引起的癌症是目前刻不容緩的課題。近來本實驗室研究顯示從山煙草、印度茄、萬桃花以及大花曼陀羅等茄科植物萃取出多種具抗癌及抗肝炎病毒之化合物。從初步結果顯示前三種植物水萃物具有肝癌細胞之毒殺性（IC50 範圍為 10~500 g/ml），進一步從山煙草及印度茄之醋酸/甲醇(3:4)有機萃取層也顯示具有抗癌活性。其中山煙草有機萃取層（SE8 及 SE9，劑量 10 g/ml）經由 9 天處理後，顯著減少 B 型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)及 e 蛋白(HBeAg)之分泌量而並不影響寄主細胞毒性，進一步分析此化合物可明顯抑制肝炎病毒之複製，因此從結果顯示此萃取層所含化合物具有抗病毒之功能，此抗肝炎病毒化合物結構經分析並命名為 (10Z,12E)-14-((E)-pent-2-enyl) oxacyclotetradeca-10,12-dien-2-one。

由於茄科植物富含生物鹼、類黃酮及萜類等相關次代謝物並且具有抗癌及抗病毒療效，但其成分目前還未完全清楚瞭解，因此本計畫旨在建立病毒性肝癌細胞模式來探討茄科植物天然化合物對肝炎病毒的抑制療效及機制探討。

關鍵詞：茄科植物、天然化合物、肝癌、B 型肝炎病毒、抗病毒、病毒複製

# Naturally Occurring Anti-hepatitis Virus Compounds and Molecular Evolution in Solanaceae Plants

Chang-Hung Chou

Research Center for Biodiversity China Medical University

## ABSTRACT

The *Solanaceae* plant family is the third important industrial crop on the Earth and is also the most important vegetable crop relevant to human nutrition and health. Recently, many secondary metabolites that revealed biological activities, such as anti-oxidation, bactericide, anti-viral effect, and inhibition of virus propagation have been isolated from other family plants.

Hepatitis B virus (HBV) infection causes a wide spectrum of liver diseases, including acute hepatitis, chronic hepatitis, cirrhosis, and eventually the hepatocellular carcinoma (HCC). To date, the relative risk to HBV carriers of developing HCC is more than 100 times compared with uninfected people. Peoples in the South-East Asia including Taiwan have 8~15% of population are HBV chronic carrier. Despite of the available vaccine for HBV treatment little information of natural products for clinical trial, the effective treatment of HBV infection is available and the study remains elusive and becomes an important medical task. Recent study from our laboratory showed that compounds with anti-tumor and/or anti-hepatitis virus were isolated from Solanaceae plants, namely, *Solanum erianthum*, *S. violaceum* Ortega, *S. torvum* Swartz, and *Brugmansia suaveolens*. The preliminary results revealed that the aqueous extracts of the above first three plants exhibited cytotoxicity of liver cancer cell (IC<sub>50</sub> ranged from 10~500 µg/ml). Investigation on the ethyl acetate/ methanol (3:4) extracts of *S. erianthum*, and *S. violaceum* also revealed anti-cancer activity. The solvent extracts isolated from *S. erianthum* (fraction SE8 and SE9, 10 µg/ml) significantly decreased the levels of hepatitis B viral HBsAg and HBeAg for 9 days treated period without having cytotoxic effect on host cells. Further study suggested that the compound within fraction exhibits significant inhibition effect on hepatitis virus DNA

replication. These results suggest that the natural compounds within these two fractions have the anti-viral function. The compound structure in response to anti-viral effects was elucidated and named in ((10Z,12E)-14-((E)-pent-2-enyl)oxacyclotetradeca-10,12-dien-2-one ).

Because *Solanaceae* plants are rich in alkaloids, flavonoids and terpenoids, which also exhibiting antibacterial and anti-viral activities, these naturally occurring compounds need to be elucidated. The purpose of this study is thus focusing on the establishment of HBV infected tumor cell culture as model to investigate the possible hepatitis viral inhibition mechanism of the natural compounds extracted from *Solanaceae* plants.

Keywords: *Solanaceae*, natural compound, hepatocellular carcinoma, hepatitis B virus, anti-viral effect, viral replication

## 壹、前言

因應世界經濟快速發展，人們的生活條件逐漸改善，加上醫藥的普及化，許多疾病都得以受到控制。然而在全球人口趨向老化及環境變遷的雙重影響下，現代人除期望壽命延長外，也漸漸重視生命品質。以行政院衛生署所發佈去年台灣地區的死亡率而言，惡性腫瘤一直位居十大死亡榜首。單就去年衛生署所公佈之國人惡性腫瘤死亡人口數就有三萬七千多人，遠高於第二位因罹患腦血管疾病的死亡人口數。由此可知，腫瘤所引起的死亡已嚴重危害到國人健康，甚至影響經濟上的耗損。在治療上，醫學技術突飛猛進，除了以外科手術切除癌細胞腫瘤外，也並用放射線與化學療法。由於癌症中，細胞增殖及設定性細胞凋亡的平衡受到干擾，而使得本身具有基因異常細胞持續增殖並逃過自身免疫系統的偵測清除。很多毒殺性跟荷爾蒙的治療，如放射線，藉由設定計畫性細胞凋亡方式特異性的毒殺癌細胞使其造成不可逆的損害。總言之，籠罩在談癌色變的此刻，開發新治癌用藥是刻不容緩的。

中醫藥治療疾病經歷數千年不衰並且日漸被歐美學者所重視，我國中醫藥學專著可溯及漢代「神農本草經」及至明清「本草綱目」，資料相當豐富，台灣民間使用的中藥也相當多。台灣民間用藥有植物藥、動物藥及礦物藥，其中植物性藥材佔絕大多數，約有 160 種之多。雖然這些具藥效的植物強調在天然物的萃取、純化及鑑定，但其欠缺有系統的研究，以致在基源及藥效使用上有混淆不清之慮。國際上，在生物多樣性的研究相當熱絡，但針對中草藥的生物多樣性闕如。所謂「生物多樣性」即涵蓋基因多樣性、物種多樣性及生態系多樣性，我們知道某種植物在不同地區所採得其藥性會有不同，這是因為棲地水土不同的影響，也就是不同生態環境所蘊含不同天然物成分，久而久之，不同地區的植物雖屬同種卻有不同藥效，這還有待跨領域及有系統的研究。

另一方面在藥物開發的觀點，不論由完全化學合成或利用天然界所蘊藏的天然物資源直接藥用或進行修飾以改善活性之方式，科學家們已行之有年，也有相當好的成果。例如美國國家癌症中心(National Cancer Institute)主導的計畫於 *Taxus brevifolia* 發現紫杉醇(Taxol)，由此並已用於臨床之乳癌與卵巢癌之治療，即是天然藥物的最佳的應證(13)，其對於相關藥物開發具有舉足輕重的重要地位。而在最近一、二十年來的新藥開發當中所分析的資料，更是顯示多元化天然物結構確實影響多種藥物的研發，可見天然物

所具有之探索開發潛力。

原發性肝癌(*Hepatocellular carcinoma*)是我國和亞非地區常見的癌症，患病率為歐美的 5~10 倍，其死亡率幾乎為 100%。以台灣為例，它占男性惡性腫瘤中死亡原因的第一位和女性惡性腫瘤死亡原因的第三位。一般發現後，即使經過外科手術、化學或放射治療，平均壽命亦不超過一年。因此了解肝癌的成因及發展新的診斷和治療方法是急迫需要的。根據流行病學的統計，世界各地 B 型肝炎病毒(*hepatitis B virus, HBV*)的高感染區都有較高的肝癌病例，例如台灣、中國大陸、東南亞和南非等地。若進一步以台灣為例，肝癌病例中百分之九十以上都是 B 型肝炎的帶原者，而非帶原者得到肝癌的機會僅為帶原者的百分之一(4, 5)，這顯示 B 型肝炎病毒感染和肝癌病變之間有密切的關係，而且產生的慢性 B 肝帶原也是世界上健康的隱憂，估計全世界因感染 B 型肝炎而成為 B 肝帶原者約有 4 億人，約佔世界總人口數的 5%，這是一個不能抹殺的潛在問題。B 型肝炎病毒感染導致廣泛的肝臟疾病一直是在台灣急待解決的公共衛生問題，雖然歷經諸多研究先驅包括宋瑞樓、陳定信、許金川及陳培哲等學者的努力，對於降低台灣原本居高不下的 B 型肝炎帶原率有所貢獻，但直至目前 B 肝感染衍生的肝臟疾病治癒率普遍還是很低。以往認為 B 型肝炎病毒感染導致的肝癌只是肝細胞本身諸多調控機制病變轉型成為癌細胞，如今學者認為 B 肝病毒本身所帶有的基因本身及其表現的蛋白質是扮演重要的「致癌因子」(1, 9, 16-19, 22, 26)，雖然感染肝炎和變成肝癌之間，相隔了二十至四十年，它們二者之間的因果關係並不十分清楚，但 B 肝病毒感染引發肝癌高罹患率卻是不爭的事實。因此如何有效抑制病毒的複製及表現蛋白質影響所感染肝細胞的正常運作是目前治療 B 肝的主要目標。臨床上用來治療的藥物目前都以干擾素(*interferon α2a*)(35)及核酸類似物 (*lamivudine* 拉美芙錠，又稱為肝安能) (14, 33)為主，但成效還是有限，大約只有 20~30%抑制效用，甚至產生抗藥性，因此有效的肝炎病毒疫苗研發是目前刻不容緩的趨勢。研究 B 型肝炎病毒能否引起肝癌的進展很慢，部分的原因在於 B 型肝炎病毒缺乏在動物體外培養的模式。這種病毒只會感染人和黑猩猩，不會感染其他實驗室常用的小動物或培養的細胞，因此無法有系統地來研究病毒感染的途徑、在細胞內的複製與基因表現及長期在體內對肝臟所造成的影響。所以我們對這個病毒之生物特性了解得很少。

近年來肝病藥物的研發有逐漸朝中草藥方向發展的趨勢，也因為中草藥所蘊含豐富的天然物，例如韓國珍珠草(*Phyllanthus urinaria L.*)已發現其

萃取物成分對肝癌腫瘤有較好的抑制作用，甚至可以抗 B 型肝炎病毒(8, 21, 32, 44)，因此為中草藥應用在病毒性肝炎及肝癌的最佳例證。目前除了珍珠草，最近一些學者也試著從其他中草藥當中找出對抗肝炎病毒的有效成分，像是周正仁等人從風藤(*Piper kadsura*)分離出七種天然化合物對抗 B 型肝炎病毒的研究(20)，以及韓國 Kim 等人從訶梨勒(*Terminalia chebula* Retz.)、地榆(*Sanguisorba officinalis* L.)、覆盆子(*Rubus coreanus* Miq.)和大黃(*Rheum palmatum* L.)萃取天然物成分分析抗 B 型肝炎病毒的效果(27)，除此之外，很少有文獻探討中草藥成分對肝炎病毒的研究。

中草藥蘊含豐富的資源，藥理成分活性分布極廣，也是眾多研究者作為新藥研發的主流之一。其中茄科植物的發展更是受到注目，不僅因茄科作物(Solanaceae)是目前地球上第三大重要的經濟作物，也是目前最重要的蔬菜作物，提供給人類許多種食物和藥物。此科中的作物包括塊根馬鈴薯，果實蔬菜（番茄、茄子、辣椒、酸醬番茄...等等），食用葉菜類(*Solanum aethiopicum*, *S. macrocarpon*)及藥用植物類（如曼陀羅屬, *Datura*，青椒屬, *Capsicum*）等，甚至其類緣植物等。茄科植物一向被視為地球上重要的水果及蔬菜的來源，也是人類維生素、纖維、碳水化合物、及各種植物成分的供應源。以台灣而言，茄科植物約有 11 屬，共 30 種，其中已有相當多的文獻探討了曼陀羅屬，枸杞屬與番茄屬等(3, 6, 7, 10, 11, 15, 24, 25, 29-31, 34, 36, 38, 39, 41-43, 45, 46)。而在茄科植物中，也蘊藏豐富多種的化學成分，如生物鹼，多酚類與固醇類等(2, 6, 11, 12, 24, 25, 29, 36)。文獻中已報導在茄科植物的成分有抗菌、抗氧化，抗潰瘍或抗癌等活性(2, 6, 11, 12, 24, 29, 36)。

此計畫著重於山煙草、印度茄、大花曼陀羅以及萬桃花等已採集之茄科植物所含的天然化合物進行抗癌及抗肝炎病毒之研究，配合各子計畫，將具有抗癌及抗病毒之活性成分進一步分析分離與鑑定，再利用分子生物方面技術探討這些茄科植物萃取成分，進一步研究其他生物藥理機轉。

## 貳、材料與方法

### 一、植物採集

本次實驗所使用的山煙草(*Solanum erianthum*)在台中都會公園旁農耕地、以及在雲林梅林社區梅南橋右岸採集。印度茄(*Solanum violaceum*)在雲林梅林社區梅南橋右岸採集。萬桃花(*Solanum torvum*)在霧峰中投公路下、以及在雲林湖山水庫採集。大花曼陀羅(*Brugmansia suaveolens*)在大雪山森林遊樂區內警察局旁空地、南投桶頭吊橋土地公廟旁空地、大雪山森林遊樂區、以及南投桶頭吊橋土地公廟旁空地採集。

### 二、植物天然物之萃取方法

#### (一)水萃物之製備

所採集之山煙草、大花曼陀羅、印度茄及萬桃花等枝葉經約1~2個星期自然陰乾後，以絞碎機將陰乾葉子絞碎成葉粉，秤取100 g乾重溶於1500 mL二次水加熱煎煮3小時，接著將煎煮後之水萃液以冷凍乾燥法濃縮成粉末狀，此水萃物經由滅菌二次水回溶成400 mg/ml濃度標準液，再以0.45 μm針筒型過濾膜過濾，經由二次水稀釋製備成不同稀釋濃度之水萃物，以提供細胞毒性測試。

#### (二)甲醇粗萃物之製備

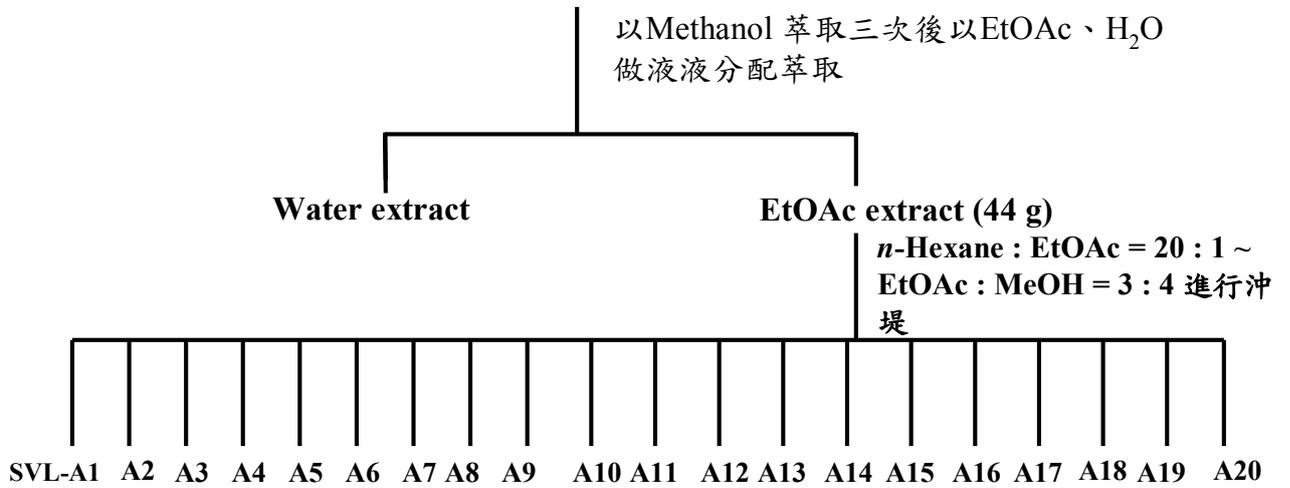
山煙草(*Solanum erianthum*)絞碎葉子乾重1.6kg，以甲醇(MeOH)在室溫下浸泡三次萃取，所取得之萃取液經由減壓濃縮機濃縮後，經由*n*-Hexane : MeOH : H<sub>2</sub>O = 4 : 3 : 1去除*n*-Hexane層後，減壓濃縮後再與H<sub>2</sub>O : EtOAc (EA) = 1 : 1進行液液分配，取得EA層62 g經由*n*-Hexane : EA以梯度進行沖提，得到1到18個fractions (SE1~18)，其中取得SE6再經由column以*n*-Hexane : Acetone梯度沖提取得3 fraction (SE61~63)將SE62經Sephadex LH-20所得之SE62-3進一步以HPLC純化得到3個化合物，取SE9經Sephadex LH-20得到3個fractions將第三個fraction經由open column以*n*-Hexane : Acetone梯度沖提取得第9、10個fractions (萃取過程參照圖一)，以上所分離之分液層部分經濃縮成膏狀物，以DMSO配成8 mg/ml之標準液，再進一步稀釋成不同濃度之稀釋液以提供癌細胞毒殺性測試。

另外印度茄(*Solanum violaceum*)部分葉子乾重0.96kg，以MeOH在室溫下浸泡三次萃取，所取得之萃取液經由減壓濃縮後，

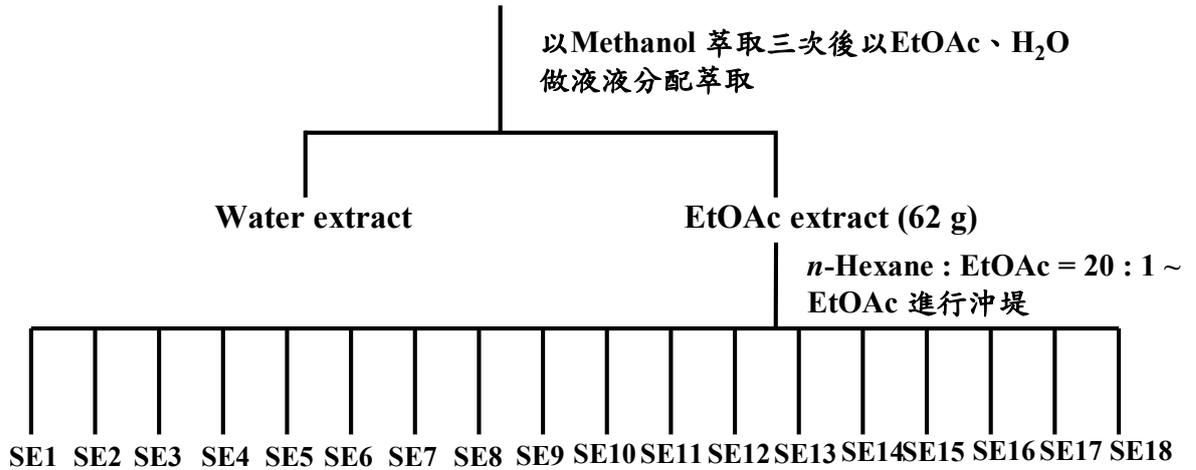
再經由  $n$ -Hexane : MeOH : H<sub>2</sub>O = 4 : 3 : 1 去除  $n$ -Hexane 層後，減壓濃縮後再以 H<sub>2</sub>O : EtOAc = 1 : 1 進行液液分配萃取，得到之 EA 層 44g，再以  $n$ -Hexane、EtOAc 以梯度沖提方式分得 20 個 fractions (SVL - A1 ~ A20) (萃取過程參照圖一)，其所得之分液層萃取膏狀物配製成標準及稀釋液之方法同山煙草分液層萃取稀釋液。

萬桃花 (*Solanum torvum*) 葉子乾重 2 kg，以丙酮在室溫浸泡萃取三次，經減壓濃縮得到粗萃物約 21g 再以不同有機溶劑比例液液分配萃取得到 7 個分液萃取層，最後經由純化，其中得到 2 個化合物成分 (萃取過程參照圖二)

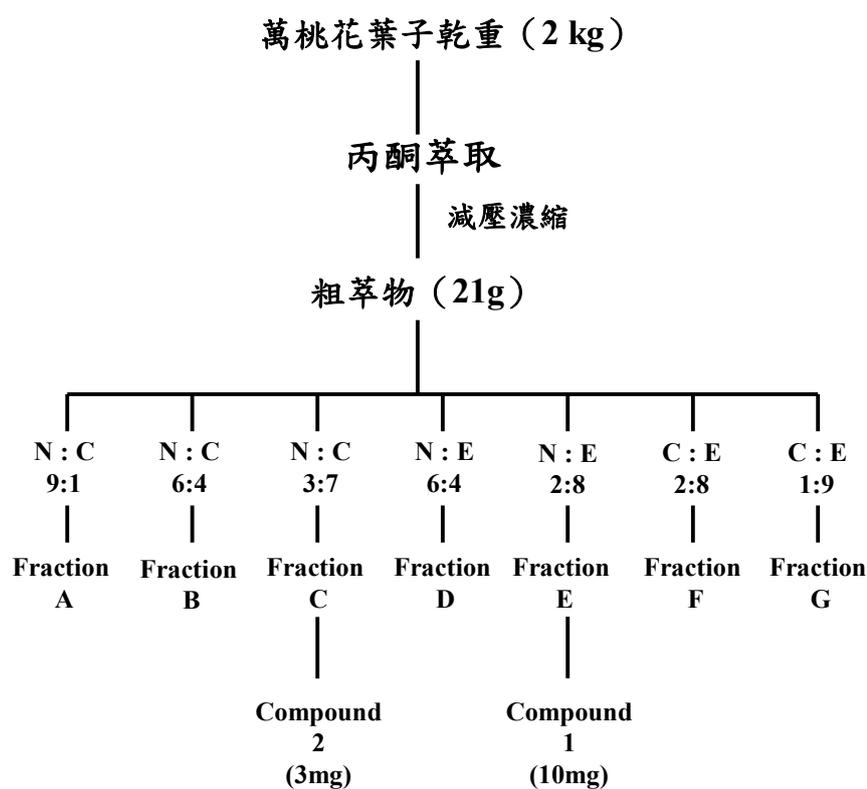
印度茄 *Solanum violaceum* 葉子 (乾重960 g)



山煙草 *Solanum erianthum* 葉子 (乾重1.7 kg)



圖一、印度茄、山煙草天然物萃取過程示意圖



Compound 1:  $\beta$ -sitosterol

Compound 2: ST-1

圖二、萬桃花天然物萃取過程示意圖

### 三、細胞培養

人類肝癌細胞株 HepG2 2.2.15 (human hepatocellular carcinoma) (由台大醫院肝炎研究中心陳培哲院士提供) 主要培養於 MEM 培養液並含有 10% 胎牛血清 (FBS) 但不含抗生素，而肝癌細胞株 HuH7 (human hepatoma) 及 HepG2 (human hepatocellular carcinoma) 主要培養於 DMEM 培養液含有 10% FBS 並添加 100U/ml penicillin 與 100 $\mu$ g/ml streptomycin; 人類胃癌上皮

細胞(human gastric cancer epithelial cell line) AGS 細胞培養於添加 10% FBS, 100U/ml penicillin 與 100µg/ml streptomycin 之 RPMI 1640 培養液中, 以上細胞株皆於 37°C 5%CO<sub>2</sub> 恆溫培養箱中培養。

#### 四、天然萃取物對肝癌細胞生長及毒殺性影響 (MTS 或 MTT assay)

將 HepG2 2.2.15 肝癌細胞株 (2×10<sup>5</sup>/well) 培養在 96-well 培養盤 (或以 HuH7 (human hepatoma cell line)、HepG2 (human hepatocellular carcinoma cell line)及 AGS (human gastric cancer epithelial cell line)為實驗對照組), 24 小時後經含有不同稀釋濃度之天然萃取物的 MEM 培養液 (不含血清) 培養 72 小時後, 將培養液移除, 以 PBS (phosphate buffered saline) 清洗三次, 加入 200 µl/well 的 MEM 培養液 (不含胎牛血清) 以及 20 µl/well 2.5mg/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium(MTS) 溶液 (Promega, Madison, WI), 培養在 37°C 暗室 3~4 小時, 接著在 O.D.490 的吸光波長下測得數值, 再進一步計算細胞生長抑制比例:

$$\text{癌細胞毒殺性百分比} = \left(1 - \frac{\text{實驗組平均吸收數值}}{\text{控制組平均吸收數值}}\right) \times 100$$

另外 AGS 細胞平均分到 96-well plate 中 (1×10<sup>4</sup> cells/well), 置於 37°C 培養箱中培養 24 小時後, 再加入不同濃度的萃取物培養。之後將上清液吸除, 用 PBS 清洗兩次, 各再加入 200µL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 溶液 (0.5mg/mL, filter sterile) 於 well 中, 培養 4 小時, 吸除培養液與 MTT 混合液, 加入 200µL DMSO 溶解細胞代謝生成的 formazan crystals, 再用 ELISA Reader 讀波長 570 nm 的吸光值。

#### 五、製備全細胞均質液(whole cell lysate)分析天然萃取物對肝癌細胞內病毒表面蛋白(HBsAg)產生的影響

培養後之細胞收集在 PBS 緩衝液清洗三次, 離心下來後溶在 RIPA (10mM Tris-HCL, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40, and 0.25% Deoxycholate, 1mM PMSF, 25 ng/ml aprotinin, 5 ng/ml leupeptin) 緩衝液, 再用微量分注器抽吸幾次, 以 14,000 rpm 離心 20 分鐘, 所得到上清液即為細胞均質液。

#### 六、西方墨點分析(Western blot)天然萃取物對B型肝炎病毒表面蛋白(HBsAg)表現的影響

西方墨點分析方法主要參考 Huang 等人論文(23), 經過蛋白質電泳後, 然後轉漬到 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Amershan

biosciences, UK)上面，然後以 4% 脫脂奶粉溶液(in PBST buffer, PBS buffer with 0.05% Tween-20)於室溫下 block 1 小時，之後以病毒表面抗原蛋白抗體血清(anti-preS, anti-preS2 or anti-major S)作用反應 1 小時，用 PBST 清洗 membrane 3 次 (5 分鐘/次)，再以 donkey anti-rabbit IgG 或 sheep anti-mouse IgG (Amersham Biosciences, UK)等二次抗體作用反應 40 分鐘，之後以 PBST 緩衝液清洗 5 次，之後用 ECL detection kit 作用反應，直接曝光在 X-ray film，再以 chemiluminescence image analyzer (FLA1000 system; Fuji Photo Film, Tokyo, Japan)定量分析蛋白質表現量。

#### 七、放射性免疫分析法(Radioimmunoassay, RIA)分析天然萃取出物對培養基病毒表面蛋白量釋放量的影響

肝癌細胞處理天然萃取出物之培養培養基(culture supernatants)收集起來，以 RIA assay kit (General Biologicals Corp., Industrial Park, Hsin Chu, Taiwan)分析量化。

#### 八、分析天然萃取出物對 B 型肝炎病毒 DNA 複製的影響 (病毒複製)

本部份採用肝癌細胞株 HepG2.2.15，此株肝癌細胞在培養中可自然產生 B 型肝炎病毒顆粒釋放到培養基，因此可以當作病毒感染模式，可作為所萃取出物之活性測試評估；將 B 型肝炎病毒 genomic DNA 從肝癌細胞株純化出來，經由南方墨點技術(Southern blot)分析；首先，病毒 DNA 從細胞內核心顆粒(core particles)純化方法請參考 Pugh 等人之發表論文(37)，此實驗中， $5 \times 10^6$  個細胞培養在 10 公分的培養皿中，經過不同濃度之天然萃取出物處理 72 小時後，將細胞收取打破離心分離出 capsid-associated viral DNA，以 1%瓊膠/1XTAE 緩衝液進行電泳，再轉漬到 Hybond N<sup>+</sup> nitrocellular membrane (Amersham Biosciences UK)，進行南方墨點分析，轉漬到 membrane 上的 B 型肝炎病毒 DNA 由 <sup>32</sup>P 標定的 B 肝病毒 DNA 探針(probe)進行雜化(hybridization) (此病毒探針由 HBV2 質體經 *EcoRI* 限制酶切取純化)、清洗及自動放射性底片(X-ray film)感光 (其詳細步驟請參考 Sambrook 等人 Molecular Cloning 書籍) (40)，底片感光所呈現之病毒 DNA 量再經由儀器掃瞄定量分析。

## 參、結果

### 一、茄科植物水萃物對肝癌細胞之毒殺作用

從山煙草、印度茄、萬桃花及大花曼陀羅陰乾葉粉經由水煎煮之水萃物經由不同濃度之稀釋處理 HepG2 2.2.15 細胞株 72 小時後，經 MTS assay 結果顯示除了大花曼陀羅(*Brugmansia suaveolens*; BS)水萃物外，其他三種之水萃物皆具有明顯之癌細胞毒殺效果(圖三)，其 EC<sub>50</sub> 值分別為：山煙草(*Solanum elaeagnifolium*; SE) (10 µg/ml)、印度茄(*Solanum violaceum*; SV) (500 µg/ml)、萬桃花(*Solanum torvum*; ST) (100 µg/ml)，為了解其毒殺效果是否具有癌細胞種類之專一性，本實驗亦以 HuH7 (human hepatoma cell)、HepG2 (human hepatocellular carcinoma)以及 AGS (human gastric cancer epithelial cell)為對照組做相同處理，結果顯示 HuH7 及 HepG2 肝癌細胞株具有類似之毒殺效果(圖四、圖五)，反觀胃癌細胞 AGS，山煙草，印度茄，萬桃花，與大花曼陀羅之水抽物中，以印度茄水抽物之細胞毒殺作用最強(圖六)，於 10 µg/ml 之濃度即有毒殺 AGS 細胞之能力，但至濃度 2 mg/ml 仍只能毒殺 40%之 AGS 細胞。其餘三種植物水抽物對 AGS 細胞無顯著毒殺作用。

### 二、茄科植物甲醇萃物對肝癌細胞之毒殺作用

經有機溶劑於山煙草或印度茄葉子之不同分液層(fraction)萃物來處理肝癌細胞株 HepG2 2.2.15，可以顯示不同分液層萃物具有不同之生物活性，由圖六結果顯示，山煙草分液層萃物 SE6~SE9 處理肝癌細胞在較低濃度對肝癌細胞並無明顯毒性(0.625 µg/ml~10 µg/ml) (圖七)，甚至有增加癌細胞增生能力，如果處理濃度大於 10 µg/ml 以上(20 µg/ml~40 µg/ml)則有明顯抑制癌細胞生長能力，甚至到處理濃度為 40 µg/ml 時，達到 90%之細胞毒殺效果(圖七)。如果肝癌細胞經由分液層萃物 SE10、SE11、SE13、SE14 以及 SE16 處理後(圖八)，SE10、SE13、SE14 之癌細胞毒殺抑制效果跟 SE6~SE9 類似外，SE11 與 SE16 分液層萃物於濃度大於 5 µg/ml 以上則具有毒殺效果(圖八)。在胃癌細胞毒殺效果方面，於 SE7，SE8，SE9，SE11，SE13 與 SE16 分液層萃物於 1 mg/ml 濃度才具細胞毒性(圖九)，而於 SE6 與 SE14 分液層萃物中，大於 64 µg/ml 之濃度具有細胞毒殺能力，但 SE10 則需大於 125µg/ml 之濃度始可毒殺 50%之 AGS 細胞(圖十)。

印度茄有機溶液分液層萃物對肝癌細胞毒殺效果方面，所分離之 SVLA2、SVLA3、SVLA4、SVLA9 分液層萃物，濃度小於 10 µg/ml 並不具有毒殺效果，甚至有促進增生現象，除了 SVLA2 及 SVLA3 分液層萃取

物外，SVLA4 及 SVLA9 萃取物大於 10  $\mu\text{g/ml}$  之濃度則具有細胞毒殺效果，最高可達到 90%之癌細胞毒殺抑制效率（圖十一）；而在 SVLA10、SVLA11L4、SVLA11L7、SVLA12、SVLA13、SVLA14、SVLA16 及 SVLA17 之分液層萃取物方面，除 SVLA10、SVLA11L4、SVLA13 分液層萃取物於處理濃度需大於 10  $\mu\text{g/ml}$  以上才具有肝癌細胞毒殺效果外（圖十二、圖十三），SVLA11L7、SVLA12、SVLA14、SVLA16、SVLA17 分層萃取物於濃度大於 0.625  $\mu\text{g/ml}$  即具有肝癌細胞毒殺抑制效果，最高處理濃度到 40  $\mu\text{g/ml}$  可達 90%之癌細胞毒殺效率（圖十二、圖十三）；而在 SVLA18、SVLA19、SVLA20 三個分液層萃取物方面（圖十四），SVLA19 及 SVLA20 於濃度小於 10  $\mu\text{g/ml}$  具有促進癌細胞增生之趨勢，如果濃度大於 10  $\mu\text{g/ml}$ ，則明顯具有癌細胞毒殺效果，最高處理濃度於 40  $\mu\text{g/ml}$  可達 85%以上之肝癌細胞毒殺效率，反觀 SVLA18 分液層萃取物，於處理濃度大於 0.625  $\mu\text{g/ml}$  即具有明顯之癌細胞毒殺抑制效果（圖十四）。

在胃癌細胞株 AGS 方面，印度茄以有機溶劑分層萃取後，於乙酸乙酯 (EA)層中，以 SVLA9、A10、A16、A18、A19、A11L4、A11L17 與 A14 分液層萃取物濃度大於於 50  $\mu\text{g/ml}$  即可抑制 70%之胃癌細胞生長（圖十五、圖十六、圖十七），而於 SVLA12、A13 及 A20 分液層萃取物中，則須至 1  $\text{mg/ml}$  才可具細胞毒性（圖十六、圖十七）。

### 三、山煙草有機溶劑萃取物成分分析

目前已在山煙草 EA（乙酸乙酯）萃取物之 SE9 分液層經由 Sephadex LH-20 分液再得到 3 個分液層(SE9-1~3)，其中 SE9-3 經由 *n*-Hexane、Acetone 以梯度沖提方式得到 10 個分液層(SE9-3-1~SE9-3-10)，然後取 SE9-3-4 及 SE9-3-6 以 HPLC 分離方式，純化得到二個化合物，解析其結構結果在 SE9-3-6 之化合物經碳、氫圖譜以及相關光譜分析結構(圖十八~圖二十四)顯示為一個具有新骨架之化合物，另外從 SE9-3-4 分液層萃取化合物經光譜分析其結構結果如圖二十五~圖二十九所示，此化合物經生物活性測試顯示具有抗 B 型肝炎病毒活性。

### 四、山煙草有機溶劑萃取物抗肝炎病毒機制初步研究

由以上就分析結果，從山煙草有機萃取層(SE8, SE9)中找到的化合物經分析顯示具有抗 B 型肝炎病毒之活性。本研究首先以 HepG2 2.2.15 肝癌細胞(培養中可自然產生釋放 B 肝病毒)為培養模式進行研究，經萃取物(SE8, SE9)處理 6~9 天後，發現可以明顯降低 B 肝病毒表面抗原(HBsAg)及 e 抗原(HBeAg)的表現與分泌呈劑量抑制效應（圖三十），另外同時測試其細胞毒

性顯示 SE9 萃取化合物並不具有細胞毒性，因此山煙草有機萃取層 SE9 具有抗 B 型肝炎病毒之功效；為了探討山煙草 SE9 萃取物是否會影響 B 型肝炎病毒基因之表現，初步將處理 6~9 天之 HepG2 2.2.15 細胞株之全細胞蛋白質萃取出來，進行蛋白質電泳，將蛋白質轉漬到 PVDF membrane，再以西方墨點方法分析病毒蛋白質表現，從圖三十一結果顯示，當處理過 SE9 萃取物 6~9 天後，病毒中型表面蛋白表現量有減少之趨勢，進一步以南方墨點分析病毒 DNA 表現量也顯示 HepG2 2.2.15 細胞株經不同劑量之 SE9 萃取物處理 9 天後，在處理劑量為 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  時，有明顯抑制病毒 DNA 表現（圖三十二），此外，如果以此劑量處理 6~9 天，則此萃取物對 B 型肝炎病毒 DNA 複製之抑制作用具有時間效應（圖三十三）。此分液層具有抑制 B 型肝炎病毒 DNA 複製之功能之萃取物，經由光譜分析其化合物結構（圖二十五~二十九）顯示為多鏈不飽和脂肪酸衍生物，有相關文獻從小麥中萃取出相似化合物具有癌細胞毒殺性(28)，而最近從蝴蝶嗅覺腺體中也萃取出類似物，但是並沒有文獻指出此化合物有抗病毒功能，因此具有抗病毒藥物開發的潛力。

#### 五、萬桃花有機溶劑萃取物抗肝癌細胞與其結構分析

在萬桃花部分，將丙酮粗萃物以矽膠色層分析法，以不同溶媒為移動相進行分離，而得到 Fraction A 至 Fraction G，共七個 Fraction（如圖二）。目前已從 Fraction E 分離得到化合物 1，與標準品核對後確認為已知化合物； $\beta$ -sitosterol。另外從 Fraction C 分離並純化得到化合物 2，正進行結構解析中，另外測試萬桃花所分離這兩種化合物之癌細胞毒殺活性，除了  $\beta$ -sitosterol 較無細胞毒殺性外，fraction C 所分離之化合物 2 之丙酮萃取層 (ST-A) 具有肝癌細胞之毒殺性（圖三十四）。

#### 六、萬桃花萃取物「抗菌試驗」與「細胞毒性試驗」

##### 「抗菌試驗」

本實驗以萬桃花之水  $\mu$  抽物 (ST-W)， $\text{CHCl}_3$  萃取物 (ST-C)，Acetone 萃取物 (ST-A)，與 MeOH 萃取物 (ST-M) 進行抗菌試驗。將不同量 (100  $\mu\text{g}$ , 200  $\mu\text{g}$ , 300  $\mu\text{g}$ ) 的萬桃花萃取物滴在濾紙（直徑為 6mm）上，置於塗滿  $10^6$  胃幽門螺旋桿菌的培養盤中，48 小時後測量抑菌圈，其中 ST-C 具最佳之抑菌能力，在 100  $\mu\text{g}$  即會產生 12.5mm 的抑菌圈，而 ST-A 與 ST-C 需在 200  $\mu\text{g}$  才能產生 8mm 的抑菌圈。但 ST-W 在 300  $\mu\text{g}$  仍未產生抑菌圈（表一）。因此得知萬桃花  $\text{CHCl}_3$  萃取物對胃幽門螺旋桿菌有較佳之抑菌作用。

「萬桃花萃取物對細胞毒性之試驗」

測試各種萬桃花萃取物對胃上皮細胞(human gastric cancer epithelial cell, AGS cell)之細胞毒性，將各種萃取物以 1mg/ml 到 8 $\mu$ g/ml 濃度處理 AGS 細胞，以 MTT assay 檢測其存活率，ST-C 對 AGS 細胞的 IC<sub>50</sub> 為 25.9 $\mu$ g/ml，ST-A 為 368 $\mu$ g/ml，ST-M 為 462.9 $\mu$ g/ml，而 ST-W 至 2mg/ml 仍對細胞不具毒性。

## 肆、討論

本研究中所採集茄科植物（山煙草、印度茄、大花曼陀羅及萬桃花）葉子經由陰乾打碎，以水煎煮冷凍乾燥後所得水萃物分析其對癌細胞 HepG2 2.2.15 之毒殺性，結果顯示除了大花曼陀羅以外，山煙草、萬桃花及印度茄之水萃物具有明顯之肝癌細胞毒殺劑量效應，當處理濃度為 4 mg/ml 時，可達最大(85~90%)之癌細胞抑制效果（參照圖三），進一步用更高劑量(4~32 mg/ml)之水萃物處理癌細胞，除了大花曼陀羅有明顯癌細胞毒殺作用外，其他三物種水萃物並無更顯著之毒殺效果（此實驗結果未列入此報告）；為了探討這些茄科物種之水萃物對肝癌細胞毒殺之特異性，也使用另外三株癌細胞株來做對照測試，其中兩株為肝癌細胞 HuH7 及 HepG2，另外一株為 AGS 胃癌細胞株，同樣以所得之水萃物處理後，結果同樣為肝癌細胞之 HuH7 及 HepG2 細胞毒殺劑量效果跟 HepG2 2.2.15 肝癌細胞株相同，除了 HuH7 肝癌細胞對大花曼陀羅水萃物在劑量 0.25~4 mg/ml 也有毒殺效果（10~45%毒殺程度）外（參照圖四），肝癌細胞株 HepG2 對大花曼陀羅水萃物並無明顯之細胞毒殺作用（參照圖五），同時，對山煙草、萬桃花及印度茄水萃物，HuH7 及 HepG2 肝癌細胞毒殺劑量效果同 HepG2 2.2.15 肝癌細胞株；在此同時，如果以胃癌細胞株 AGS 做類似處理，結果只有印度茄水萃物較具明顯癌細胞毒殺效果，但其劑量效果也較不明顯，其餘三物種對胃癌細胞之毒殺性有限（最大毒殺程度只達到~40%）（參照圖六），所以從此結果顯示山煙草、萬桃花及印度茄等茄科植物水萃物對肝癌細胞毒殺性具有敏感之劑量效果，而且這些水萃物對肝癌細胞也具有專一毒殺性，反觀胃癌細胞則較無此特異性，顯示山煙草、萬桃花、及印度茄之所含之天然物成分對肝癌細胞之毒殺抑制效果較具有特異性。

為了更進一步分析山煙草、印度茄及萬桃花所含之抗肝癌細胞之極性成分活性，目前先對山煙草及印度茄所收集之葉子進一步打碎以有機溶劑（甲醇）浸泡萃取，經由管柱分離出分液層(fraction)萃取物（請參照圖一），提供癌細胞毒殺活性測試，從山煙草有機萃取分液層萃取物對癌細胞測試結果顯示，如果以有機萃取分液層萃取物(SE6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16)處理濃度大於 10  $\mu\text{g/ml}$ ，即具有肝癌細胞 HepG2 2.2.15 毒殺性（參照圖七、八），相對於肝癌細胞，胃癌細胞 AGS 經由山煙草分液層萃取物(SE6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16)處理濃度需大於 50  $\mu\text{g/ml}$  才具有細胞毒殺活性（參照圖九、十），另外印度茄有機萃取分液層萃取物 SVLA2, 3 無明顯肝癌細胞毒殺活

性(參照圖十一),SVLA4, 9, 10, 11L4, 13 等分液層萃取物濃度大於 10 µg/ml 有明顯肝癌細胞毒殺活性(參照圖十一、十二、十三),其中 SVLA11L7, 12, 14, 16, 17 等分液層萃取物濃度只要大於 1.25 µg/ml 即具有肝癌細胞毒殺性(參照圖十二、十三),因此印度茄有機分液層萃取物 SVLA11L7, 12, 14, 16, 17 所含成分具有明顯之抗肝癌生物活性。在胃癌細胞部分,印度茄所有有機分液層萃取物,經處理測試均需濃度大於 50 µg/ml 以上才具有癌細胞毒殺性,因此從以上結果顯示肝癌細胞對山煙草及印度茄有機萃取物較具有細胞毒殺之敏感性(sensitivity),而對胃癌細胞毒殺活性需要較高之劑量,因此較不具敏感性,綜合以上山煙草及印度茄之有機萃取分液層萃取物之具有生物活性結果歸納在圖十八。

在抗病毒分析方面,本研究中將所分離之以上所述茄科植物水萃物以及有機萃取層分別處理肝癌細胞株 HepG2 2.2.15 不同天數後,再將處理過後之細胞培養基取出以 RIA 測定此所釋放之 B 型肝炎病毒表面蛋白量,經由測試結果,目前顯示只有山煙草有機萃取層 SE8 以及 SE9 具有抑制肝炎病毒表面蛋白釋放量之功效,初步分析其蛋白表現與病毒 DNA 複製顯示 SE9 明顯具有抑制 B 型肝炎病毒 DNA 複製與基因的表現,但分析 SE9 所分離之兩種化合物(SE9-3-4, SE9-3-6),其一為多鏈脂肪酸結構,另一為嶄新之化合物結構骨架,其中之多鏈脂肪酸化合物為抗肝炎病毒成分,而 SE9-3-6 之新化合物經生物活性測試結果顯示較不具細胞毒性(data not show),至於是否也具有抗肝炎病毒功效,目前正在進行測試當中。

本研究中,同時也進行測試茄科植物所萃取之化合物對幽門桿菌之抑制影響,從萬桃花之萃取物(ST)經氯仿浸泡萃取之萃取物(ST-C)由抑菌圈實驗顯示具有相當好之抑制幽門桿菌生長效果,至於其機制還有待進一步探討。

## 伍、結論與建議

由本計畫執行研究結果顯示目前所採集之茄科物種（山煙草、印度茄、萬桃花）對肝癌細胞具有毒殺之特異及敏感性（相對於胃癌細胞之非專一及非敏感性），顯見這些物種所含之天然化合物成分抗肝癌具有某種程度的療效；至於抗肝炎病毒之療效，目前由山煙草所分離之 SE9 萃取物具有抗肝炎病毒功效。在此同時，也陸續分離出相關具有抗肝癌活性（印度茄、山煙草之某些有機萃取層）及抑制幽門桿菌（萬桃花 ST-C）之成分，現正進行純化與結構分析，如能分析出抗癌化合物結構，將能進一步探討相關機制，具有衍生之應用性。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP96-RD-210 提供經費贊助，並由台大醫院肝炎研究中心陳培哲院士提供肝癌細胞株(HepG2 2.2.15)為研究模式，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. **Arbuthnot, P., and M. Kew.** 2001. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *82*:77-100.
2. **Arthan, D., P. Kittakoop, A. Esen, and J. Svasti.** 2006. Furostanol glycoside 26-O-beta-glucosidase from the leaves of *Solanum torvum*. *Phytochemistry* **67**:27-33.
3. **Balachandran, B., and V. M. Sivaramkrishnan.** 1995. Induction of tumours by Indian dietary constituents. *Indian J Cancer* **32**:104-9.
4. **Beasley, R. P.** 1988. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* **61**:1942-56.
5. **Beasley, R. P., L. Y. Hwang, C. C. Lin, and C. S. Chien.** 1981. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* **2**:1129-33.
6. **Caceres, A., B. Lopez, S. Gonzalez, I. Berger, I. Tada, and J. Maki.** 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *J Ethnopharmacol* **62**:195-202.
7. **Caceres, A., B. R. Lopez, M. A. Giron, and H. Logemann.** 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. *J Ethnopharmacol* **31**:263-76.
8. **Calixto, J. B., A. R. Santos, V. Cechinel Filho, and R. A. Yunes.** 1998. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. *Med Res Rev* **18**:225-58.
9. **Casemann, W. H., M. Meyer, A. S. Kekule, U. Lauer, P. H. Hofschneider, and R. Koshy.** 1990. A trans-activator function is generated by integration of hepatitis B virus preS/S sequences in human hepatocellular carcinoma DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:2970-4.
10. **Chah, K. F., K. N. Muko, and S. I. Oboegbulem.** 2000. Antimicrobial activity of methanolic extract of *Solanum torvum* fruit. *Fitoterapia* **71**:187-9.
11. **Franca, F., Lago, E L., Marsden, P D.,** 1996. Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **29**:229-232.

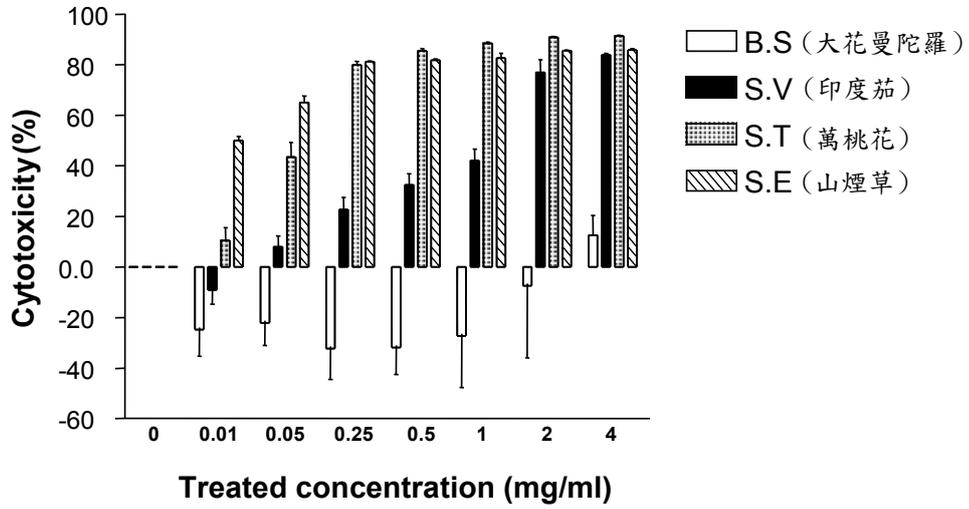
12. **Gan, K. H., C. N. Lin, and S. J. Won.** 1993. Cytotoxic principles and their derivatives of Formosan Solanum plants. *J Nat Prod* **56**:15-21.
13. **Gennari, A., D. Amadori, M. De Lena, O. Nanni, P. Bruzzi, V. Lorusso, L. Manzione, and P. F. Conte.** 2006. Lack of benefit of maintenance paclitaxel in first-line chemotherapy in metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* **24**:3912-3918.
14. **Grossi, P., D. Dalla Gasperina, M. Furione, M. Vigano, and L. Minoli.** 2001. Lamivudine treatment for HBV infection following thoracic organ transplantation. *Transplant Proc* **33**:1576-8.
15. **Higashiguchi, F., H. Nakamura, H. Hayashi, and T. Kometani.** 2006. Purification and structure determination of glucosides of capsaicin and dihydrocapsaicin from various Capsicum fruits. *J Agric Food Chem* **54**:5948-53.
16. **Hildt, E., G. Saher, V. Bruss, and P. H. Hofschneider.** 1996. The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology* **225**:235-9.
17. **Hildt, E., S. Urban, C. Eckerskorn, and P. H. Hofschneider.** 1996. Isolation of highly purified, functional carboxy-terminally truncated hepatitis B virus middle surface protein activators from eucaryotic expression systems. *Hepatology* **24**:502-7.
18. **Hildt, E., S. Urban, and P. H. Hofschneider.** 1995. Characterization of essential domains for the functionality of the MHBst transcriptional activator and identification of a minimal MHBst activator. *Oncogene* **11**:2055-66.
19. **Hildt, E., S. Urban, U. Lauer, P. H. Hofschneider, and A. S. Kekule.** 1993. ER-localization and functional expression of the HBV transactivator MHBst. *Oncogene* **8**:3359-67.
20. **Huang, R. L., Chen, C. F., Feng, H. Y., Lin, L. C.** 2001. Anti-hepatitis B virus of seven compounds isolated from Piper Kadsura(Chopisy) Ohwi. *J Chin Med* **12**:179-190.
21. **Huang, R. L., Y. L. Huang, J. C. Ou, C. C. Chen, F. L. Hsu, and C. Chang.** 2003. Screening of 25 compounds isolated from Phyllanthus species for anti-human hepatitis B virus in vitro. *Phytother Res* **17**:449-53.
22. **Huang, T. J., C. C. Lu, J. C. Tsai, W. J. Yao, X. Lu, M. D. Lai, H. S. Liu,**

- and A. L. Shiau.** 2005. Novel autoregulatory function of hepatitis B virus M protein on surface gene expression. *J Biol Chem* **280**:27742-54.
23. **Huang, T. J., and P. Shirley Li.** 2001. Dexamethasone inhibits luteinizing hormone-induced synthesis of steroidogenic acute regulatory protein in cultured rat preovulatory follicles. *Biol Reprod* **64**:163-70.
24. **Iwalewa, E. O., C. O. Adewunmi, N. O. Omisore, O. A. Adebajji, C. K. Azike, A. O. Adigun, O. A. Adesina, and O. G. Olowoyo.** 2005. Pro- and antioxidant effects and cytoprotective potentials of nine edible vegetables in southwest Nigeria. *J Med Food* **8**:539-44.
25. **Jung, K., Y. W. Chin, Y. C. Kim, and J. Kim.** 2005. Potentially hepatoprotective glycolipid constituents of *Lycium chinense* fruits. *Arch Pharm Res* **28**:1381-5.
26. **Kekule, A. S., U. Lauer, M. Meyer, W. H. Caselmann, P. H. Hofschneider, and R. Koshy.** 1990. The preS2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator. *Nature* **343**:457-61.
27. **Kim, T. G., Kang, S. Y., Jung, K. K., Kang, J. H., Lee, E., Han, M. H., Kim, S. H.** 2001. Antiviral activities of extracts isolated from *Terminidlis chebula* Retz., *Sanguisorba officinalis* L., *Rubus coreanus* Miq. and *Rheum palmatum* L. against Hepatitis B virus. *Phytother Res* **15**:718-720.
28. **Kuga, H., A. Ejima, I. Mitui, K. Sato, N. Ishihara, K. Fukuda, F. Saito, and K. Uenakai.** 1993. Isolation and characterization of cytotoxic compounds from corn. *Biosci Biotechnol Biochem* **57**:1020-1.
29. **Lee, D. G., H. J. Jung, and E. R. Woo.** 2005. Antimicrobial property of (+)-lyoniresinol-3 $\alpha$ -O-beta-D-glucopyranoside isolated from the root bark of *Lycium chinense* Miller against human pathogenic microorganisms. *Arch Pharm Res* **28**:1031-6.
30. **Lee, D. G., Y. Park, M. R. Kim, H. J. Jung, Y. B. Seu, K. S. Hahm, and E. R. Woo.** 2004. Anti-fungal effects of phenolic amides isolated from the root bark of *Lycium chinense*. *Biotechnol Lett* **26**:1125-30.
31. **Lin, C. N., and K. H. Gan.** 1989. Antihepatotoxic principles of *Solanum capsicastrum*. *Planta Med* **55**:48-50.
32. **Liu, Z., X. Fu, N. Zhang, G. Zhang, and D. Liu.** 1997. [The inhibitory effect of Chinese herb *Phyllanthus* on hepatitis B virus in vitro]. *Zhonghua*

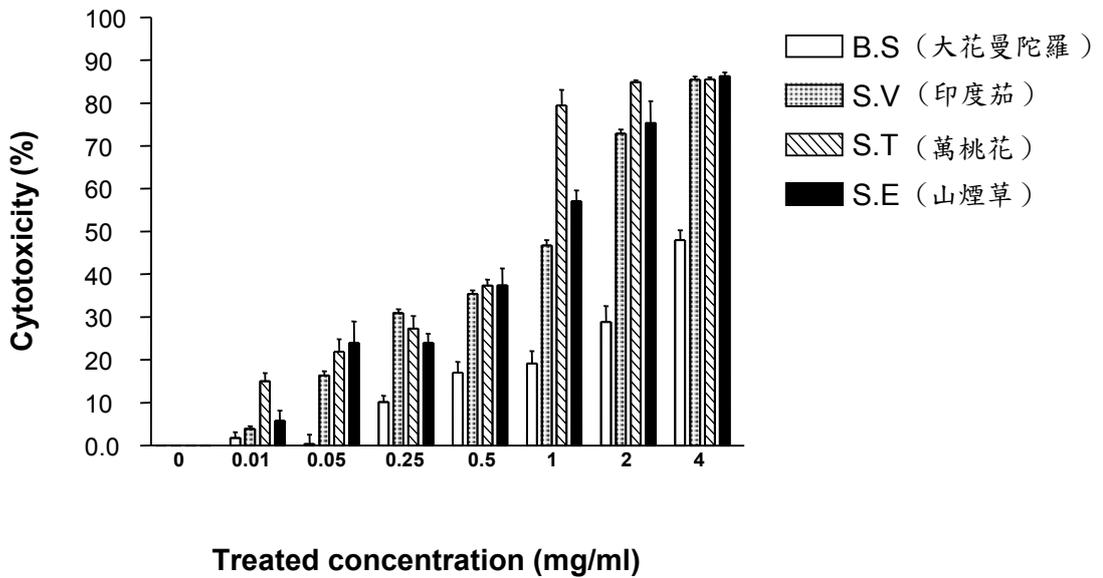
- Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi **11**:282-5.
33. **Matsuo, K., K. Takenaka, H. Shimomura, N. Fujii, K. Shinagawa, K. Kiura, and M. Harada.** 2001. Lamivudine and glycyrrhizin for treatment of chemotherapy-induced hepatitis B virus (HBV) hepatitis in a chronic HBV carrier with non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* **41**:191-5.
  34. **Morris, K. M., J. P. Simonite, L. Pullen, and J. A. Simpson.** 1979. *Solanum torvum* as a causative agent of enzootic calcinosis in Papua, New Guinea. *Res Vet Sci* **27**:264-6.
  35. **Ola, S. O., E. E. Anomneze, C. M. Chukwuani, O. S. Ojo, D. A. Ndububa, B. Onyenekwe, and A. Nasidi.** 2000. Interferon alfa-2a (Roferon-A) in the management of chronic hepatitis B infection: results of an open prospective study in Nigerian patients. *West Afr J Med* **19**:259-64.
  36. **Parr, A. J., F. A. Mellon, I. J. Colquhoun, and H. V. Davies.** 2005. Dihydrocaffeoyl polyamines (kukoamine and allies) in potato (*Solanum tuberosum*) tubers detected during metabolite profiling. *J Agric Food Chem* **53**:5461-6.
  37. **Pugh, J. C., K. Yaginuma, K. Koike, and J. Summers.** 1988. Duck hepatitis B virus (DHBV) particles produced by transient expression of DHBV DNA in a human hepatoma cell line are infectious in vitro. *J Virol* **62**:3513-6.
  38. **Ripperger, H., and A. Porzel.** 1997. Steroidal alkaloid glycosides from *Solanum suaveolens*. *Phytochemistry* **46**:1279-82.
  39. **Sadasivam, S., and E. R. Shanmugasundaram.** 1966. Studies on the flavokinase of *Solanum nigrum* L. *Enzymologia* **31**:203-8.
  40. **Sambrook, J. F., E.F; Maniatis,T.** 1989. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual".
  41. **Serrano, J., I. Goni, and F. Saura-Calixto.** 2005. Determination of beta-carotene and lutein available from green leafy vegetables by an in vitro digestion and colonic fermentation method. *J Agric Food Chem* **53**:2936-40.
  42. **Sin, S. F., and M. L. Chye.** 2004. Expression of proteinase inhibitor II proteins during floral development in *Solanum americanum*. *Planta* **219**:1010-22.
  43. **Sin, S. F., E. C. Yeung, and M. L. Chye.** 2006. Downregulation of *Solanum*

- americanum genes encoding proteinase inhibitor II causes defective seed development. *Plant J* **45**:58-70.
44. **Wang, B. E.** 2000. Treatment of chronic liver diseases with traditional Chinese medicine. *J Gastroenterol Hepatol* **15 Suppl**:E67-70.
  45. **Xu, Z. F., W. Q. Qi, X. Z. Ouyang, E. Yeung, and M. L. Chye.** 2001. A proteinase inhibitor II of *Solanum americanum* is expressed in phloem. *Plant Mol Biol* **47**:727-38.
  46. **Yin, J., Y. Tezuka, K. Kouda, Q. L. Tran, T. Miyahara, Y. Chen, and S. Kadota.** 2004. Antiosteoporotic activity of the water extract of *Dioscorea spongiosa*. *Biol Pharm Bull* **27**:583-6.

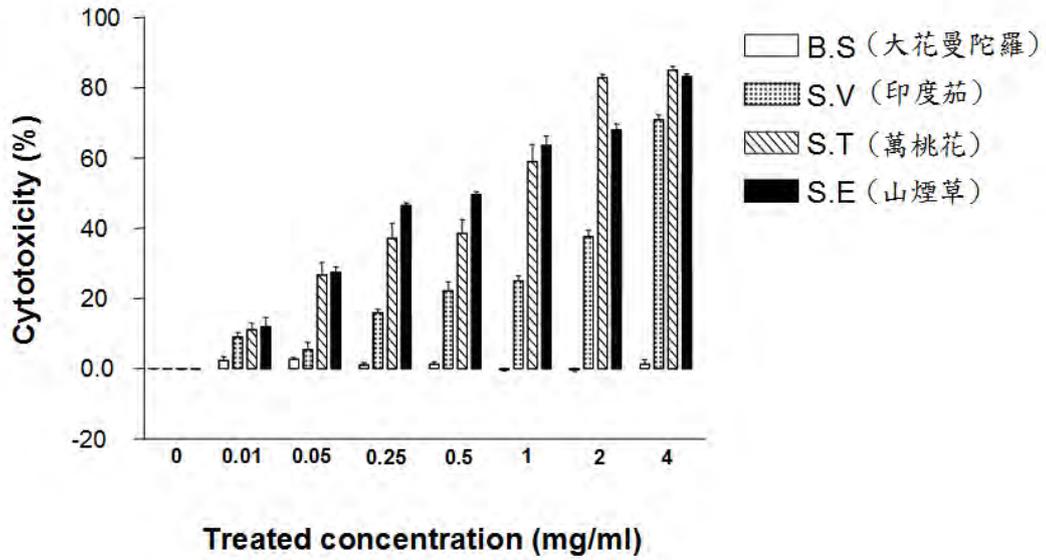
柒、圖、表



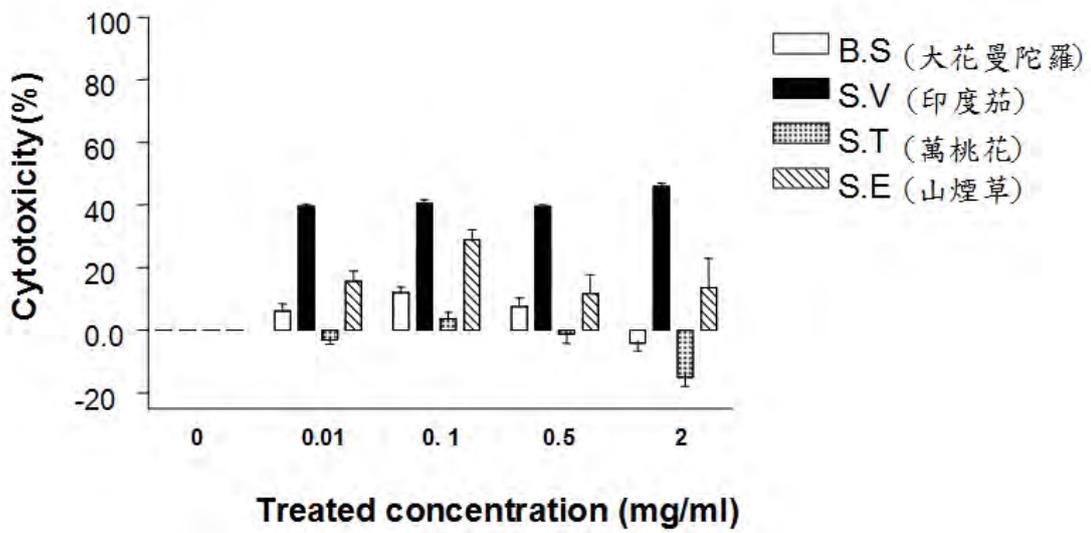
圖三、茄科植物水葷物對肝癌細胞株 HepG2 2.2.15 之細胞毒殺性試驗結果



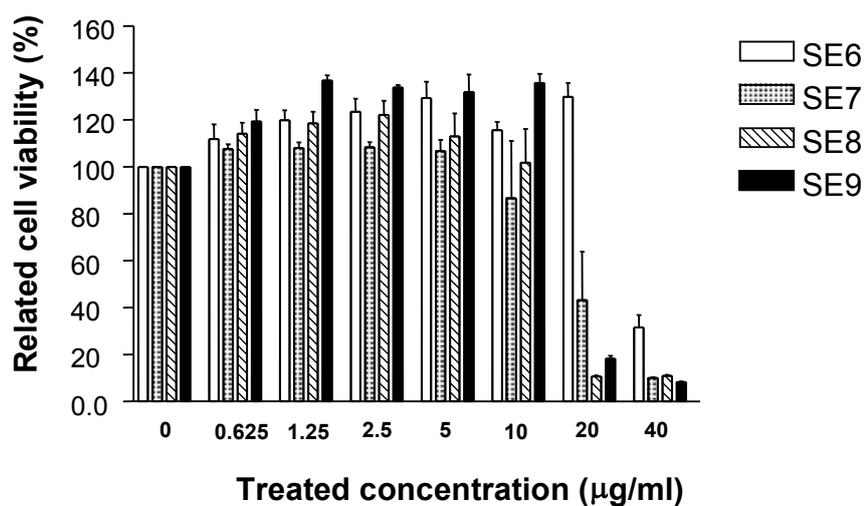
圖四、茄科植物水葷物對肝癌細胞株 HuH7 之細胞毒殺性試驗結果



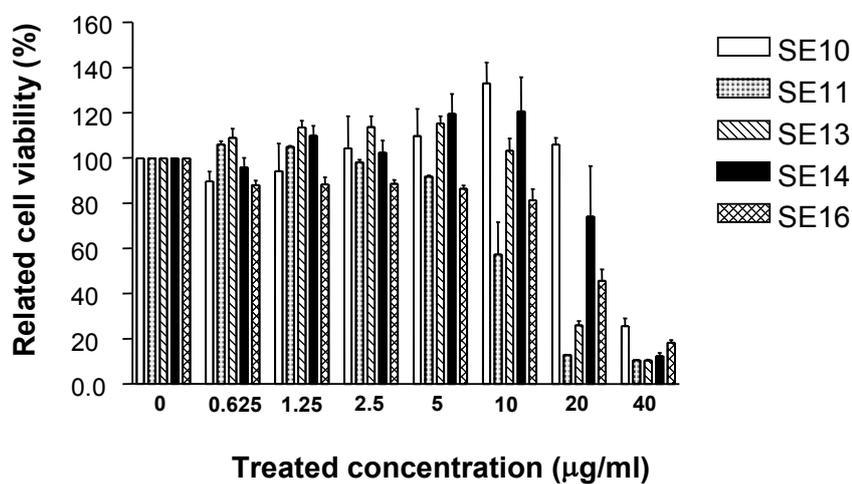
圖五、茄科植物水萃物對肝癌細胞株HepG2之細胞毒殺性試驗結果



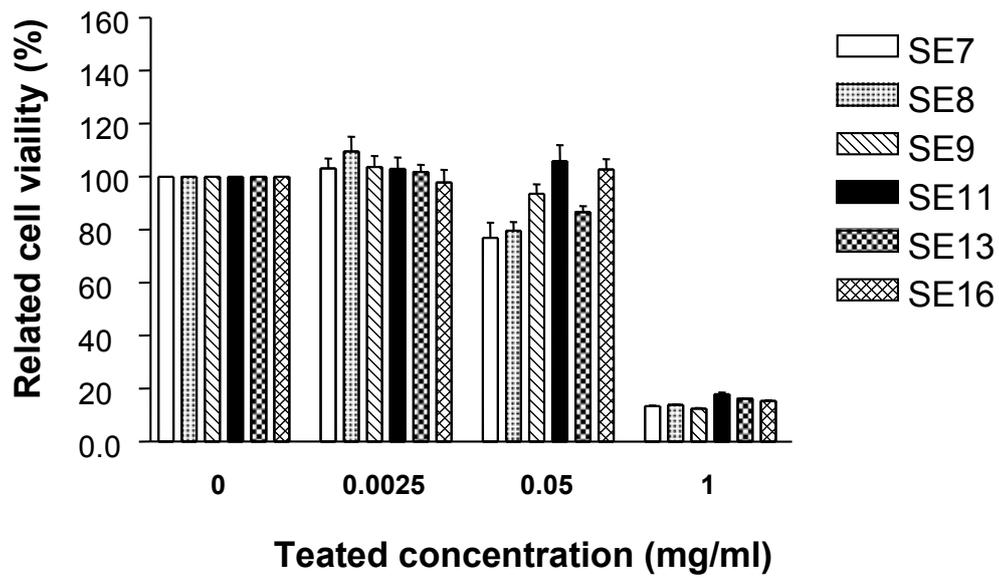
圖六、茄科植物水萃物對胃癌細胞株 AGS 之細胞毒殺性試驗結果



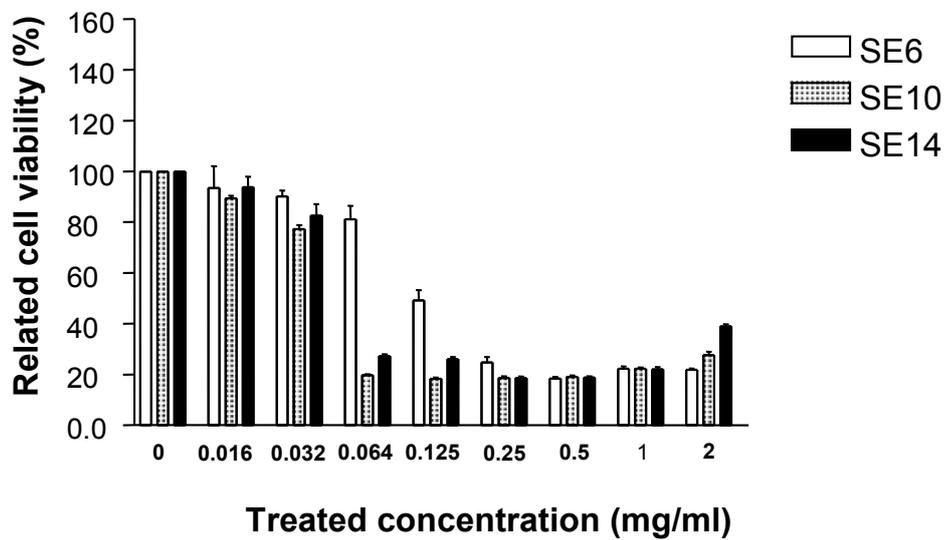
圖七、茄科植物有機溶劑萃取物對肝癌細胞株HepG2 2.2.15之細胞毒殺性試驗結果



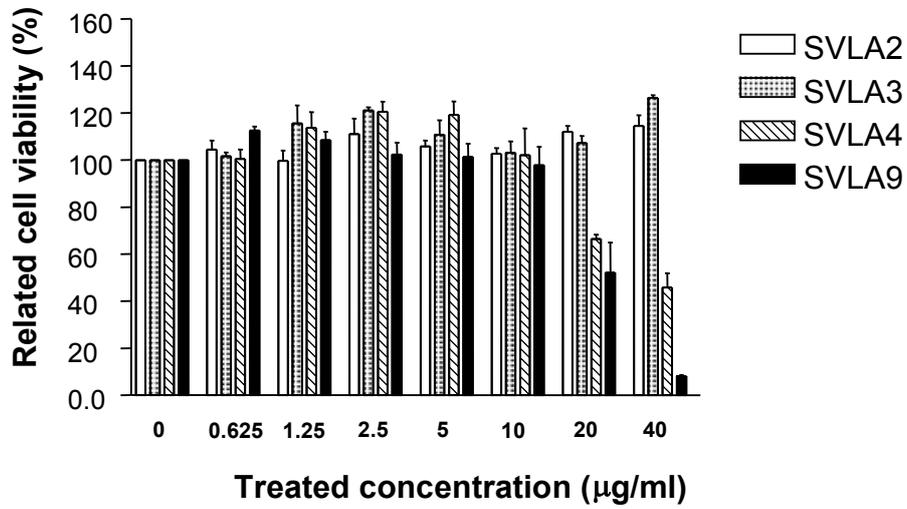
圖八、山煙草有機溶劑萃取物對肝癌細胞株HepG2 2.2.15之細胞毒殺性試驗結果



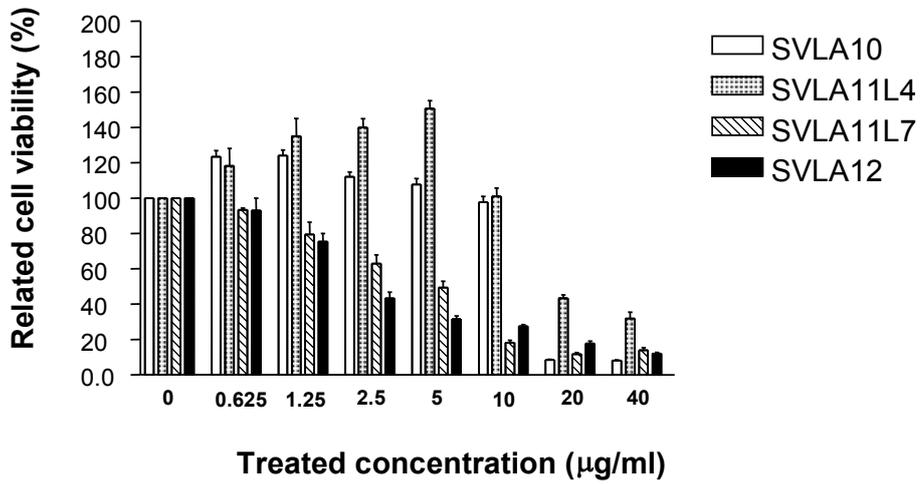
圖九、山煙草有機溶劑萃取物對胃癌細胞株AGS之細胞毒殺性試驗結果



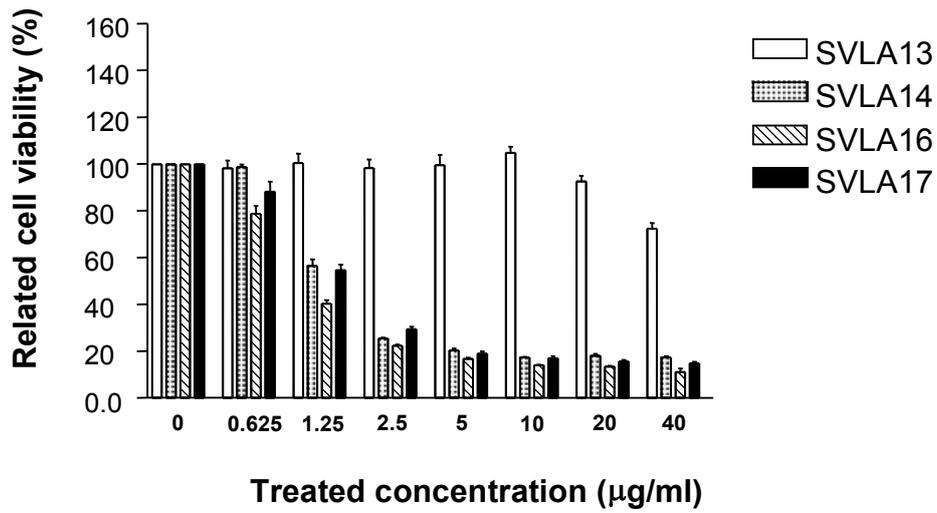
圖十、山煙草有機溶劑萃取物對胃癌細胞株AGS之細胞毒殺性試驗結果



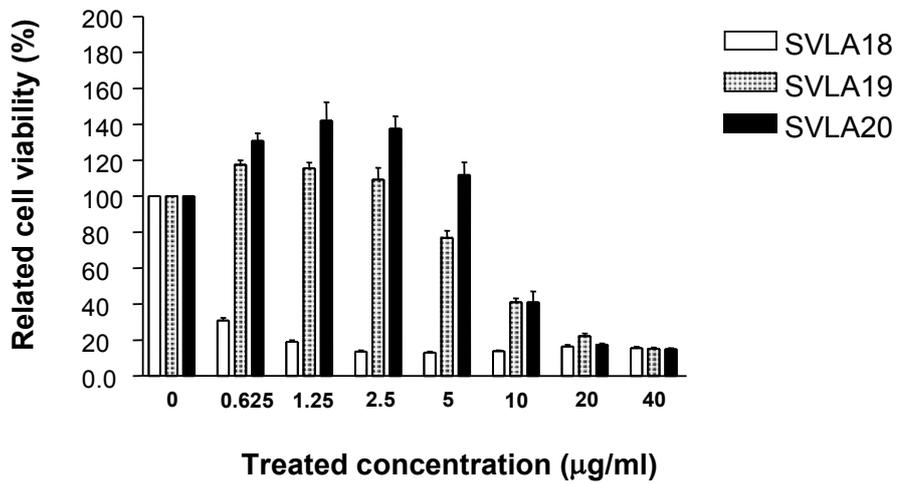
圖十一、印度茄有機溶劑萃取物對肝癌細胞株HepG2 2.2.15之細胞毒殺性試驗結果



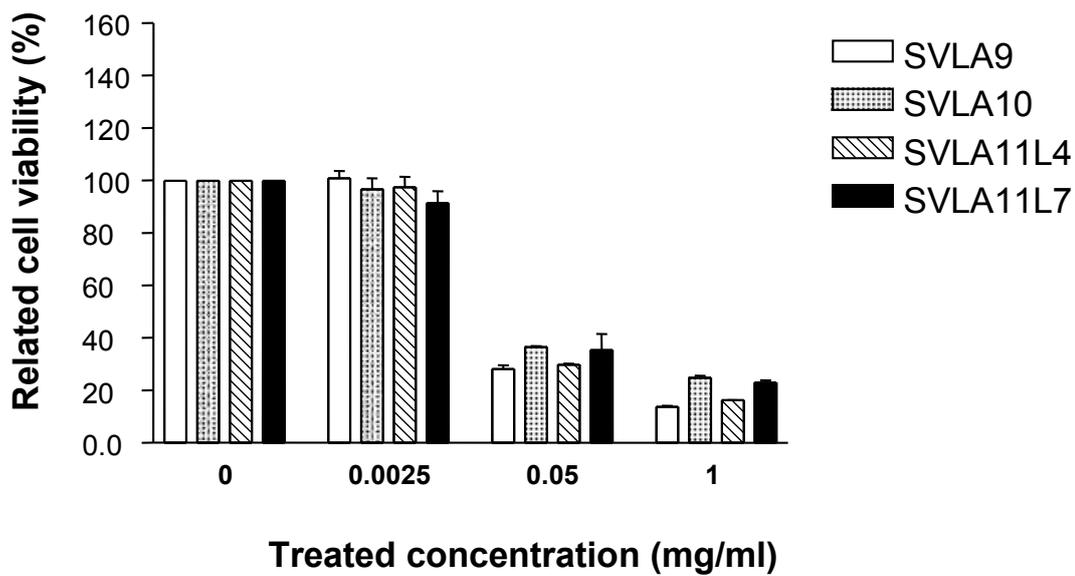
圖十二、印度茄有機溶劑萃取物對肝癌細胞株HepG2 2.2.15之細胞毒殺性試驗結果



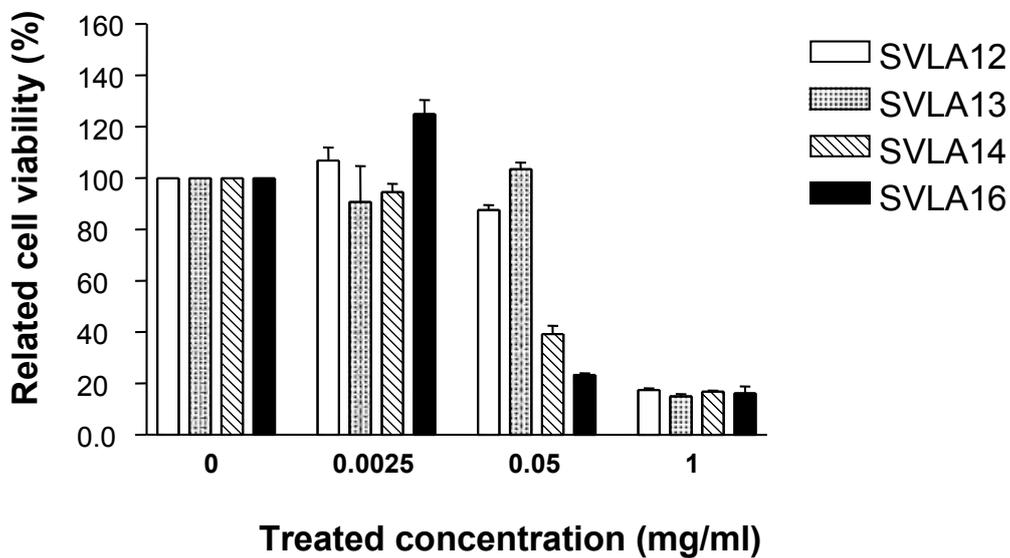
圖十三、印度茄有機溶劑萃取物對肝癌細胞株HepG2 2.2.15之細胞毒殺性試驗結果



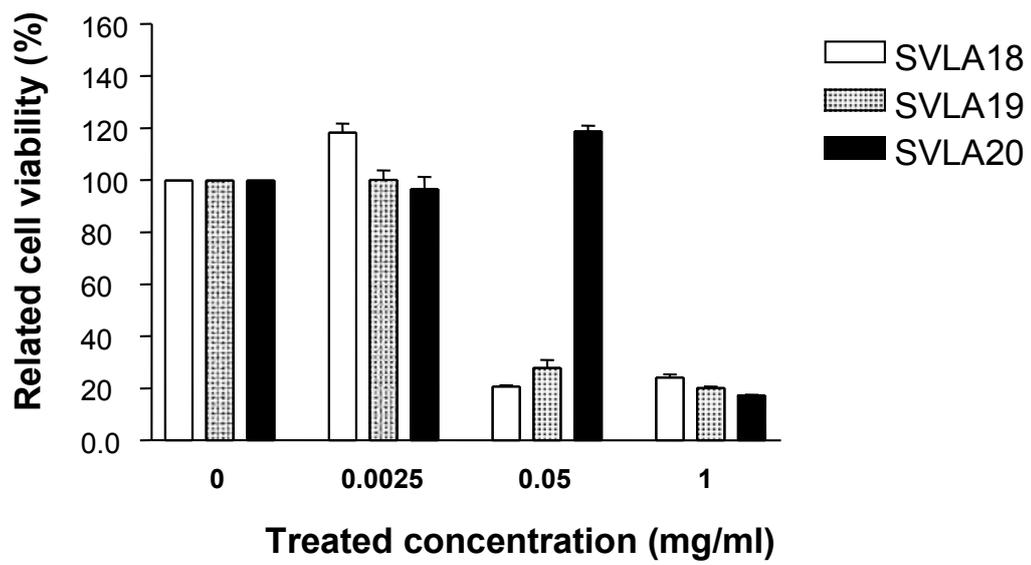
圖十四、印度茄有機溶劑萃取物對肝癌細胞株HepG2 2.2.15之細胞毒殺性試驗結果



圖十五、印度茄有機溶劑萃取物對胃癌細胞株AGS之細胞毒殺性試驗結果

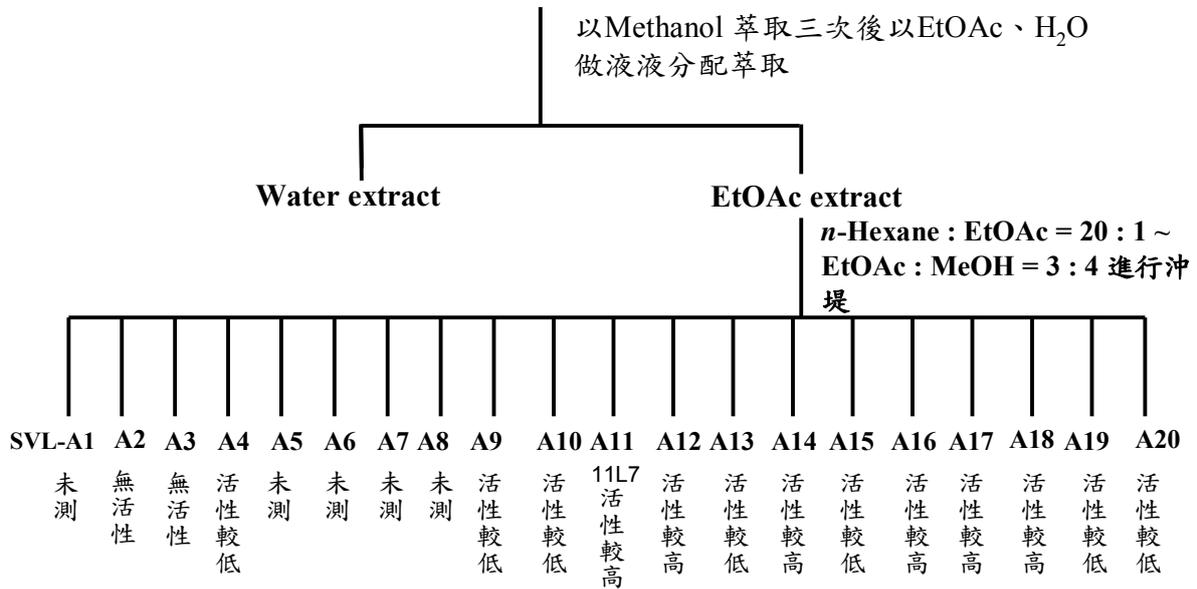


圖十六、印度茄有機溶劑萃取物對胃癌細胞株AGS之細胞毒殺性試驗結果

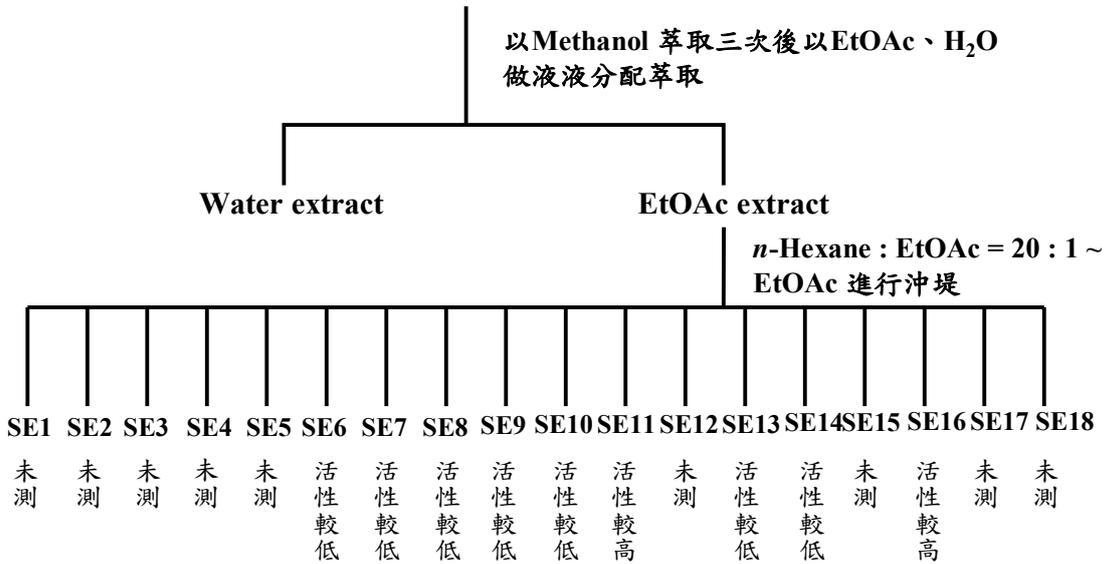


圖十七、印度茄有機溶劑萃取物對胃癌細胞株AGS之細胞毒殺性試驗結果

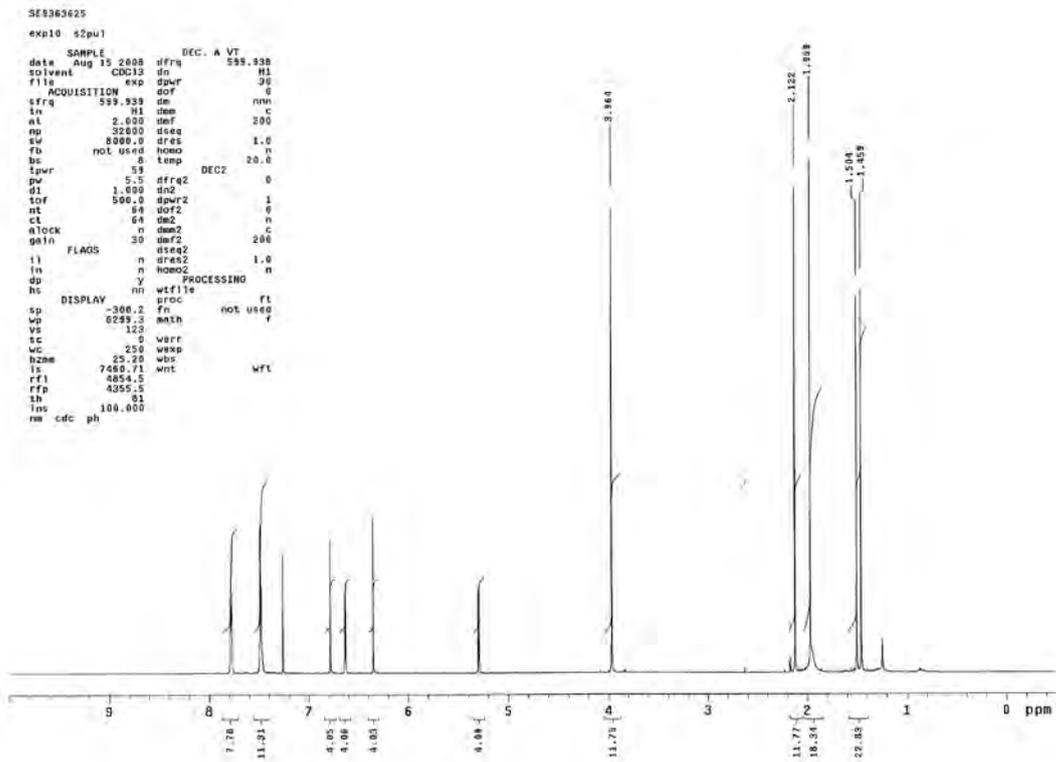
印度茄 *Solanum violaceum* 葉子 (乾重800 g)



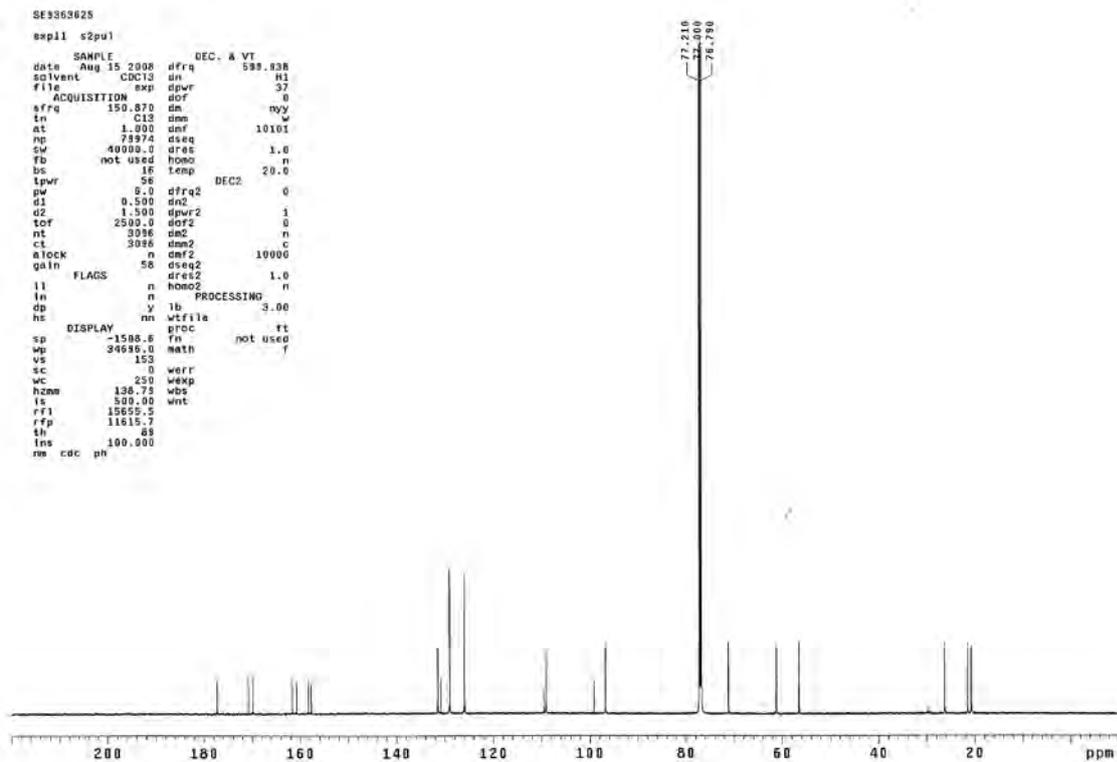
山煙草 *Solanum erianthum* 葉子 (乾重1.7 kg)



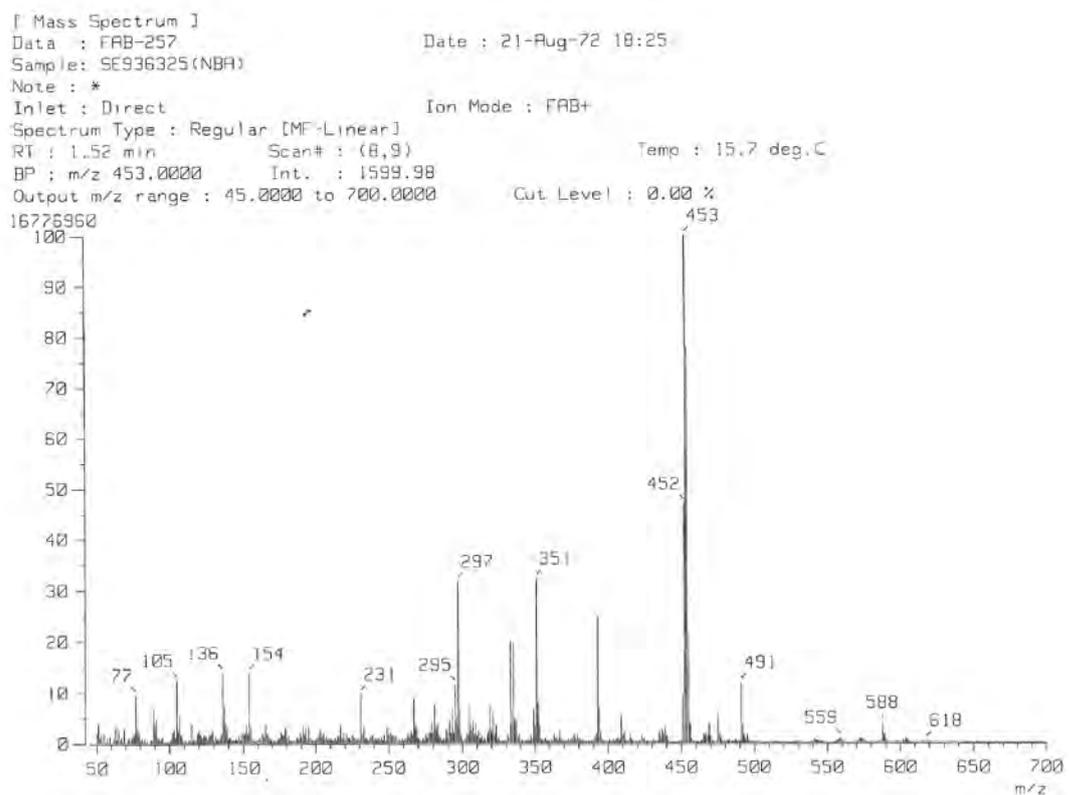
圖十八、印度茄、山煙草有機萃取分液層生物活性示意圖



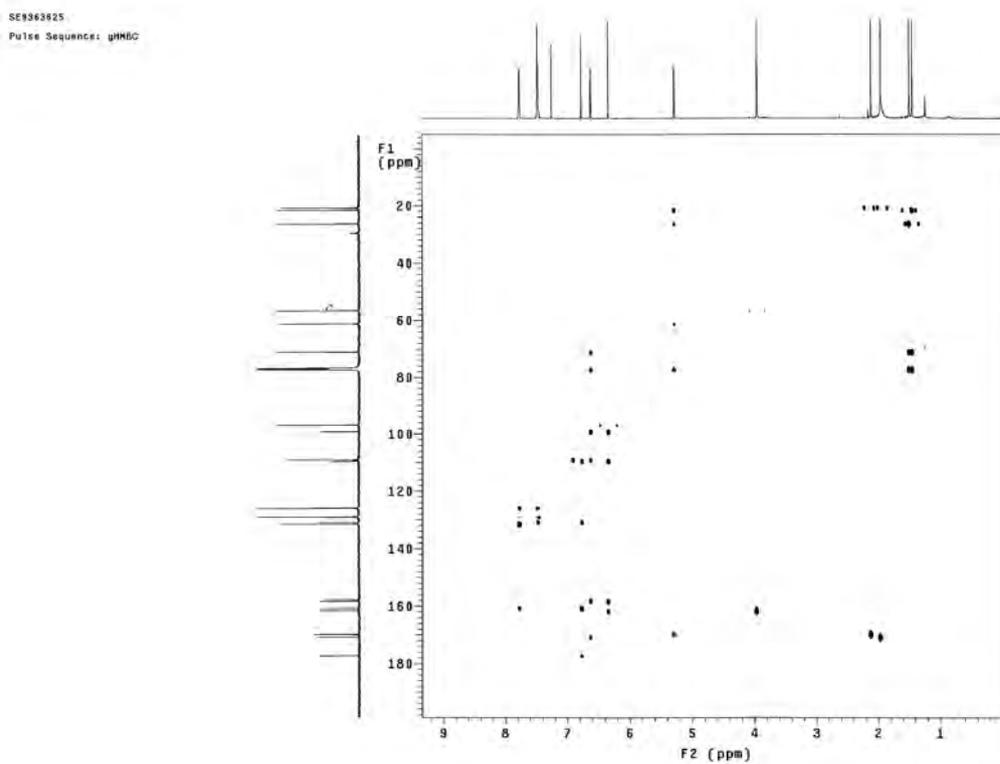
圖十九、山煙草SE9-3-6分液層萃取化合物氫譜分析結果



圖二十、山煙草SE9-3-6分液層萃取化合物碳譜分析結果

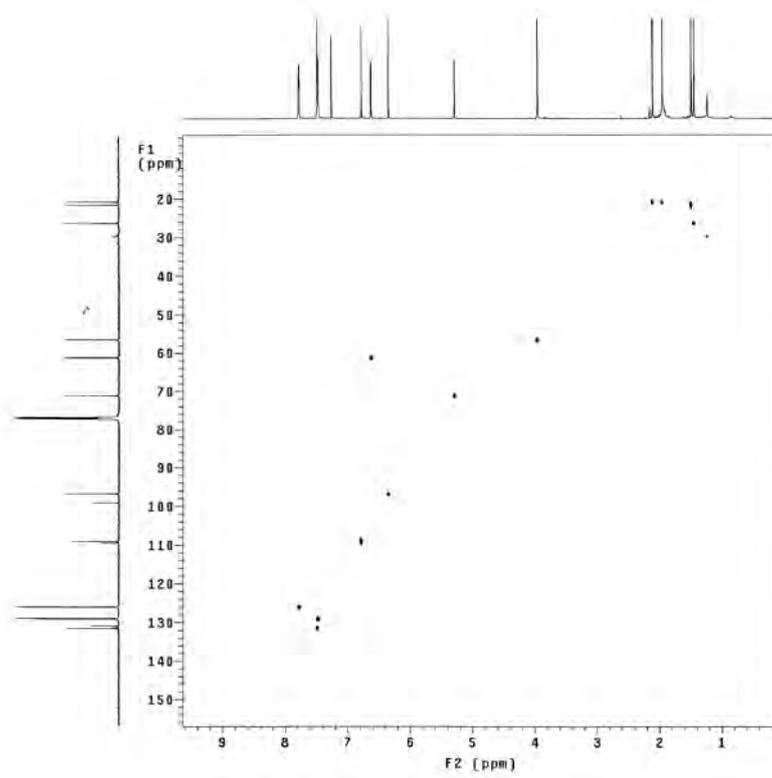


圖二十一、山煙草SE9-3-6分液層萃取化合物FAB-mass分析結果



圖二十二、山煙草SE9-3-6分液層萃取化合物HMBC分析結果

SE9363625  
Pulse Sequence: ghsqc

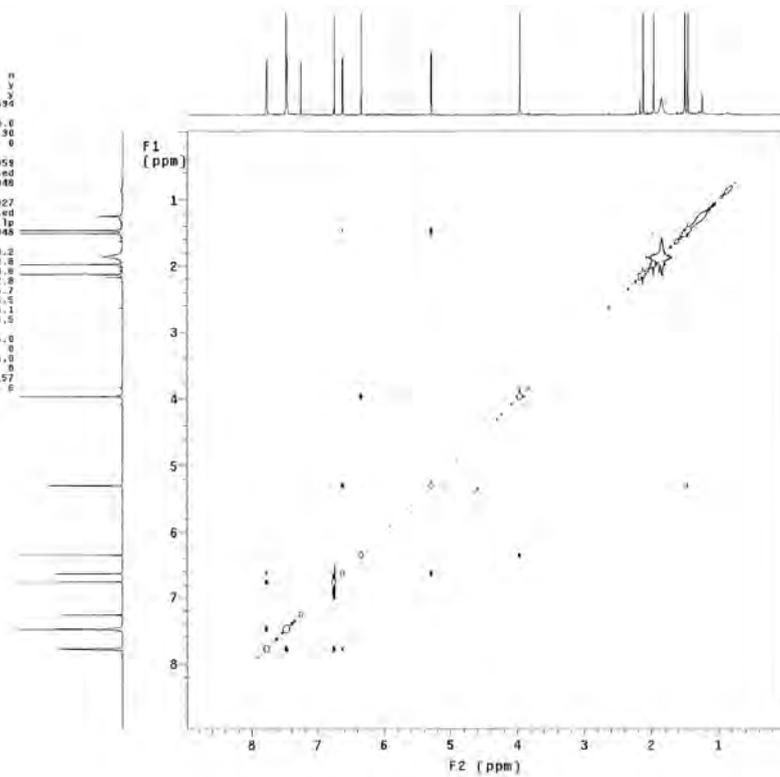


圖二十三、山煙草SE9-3-6分液層萃取化合物HSQC分析結果

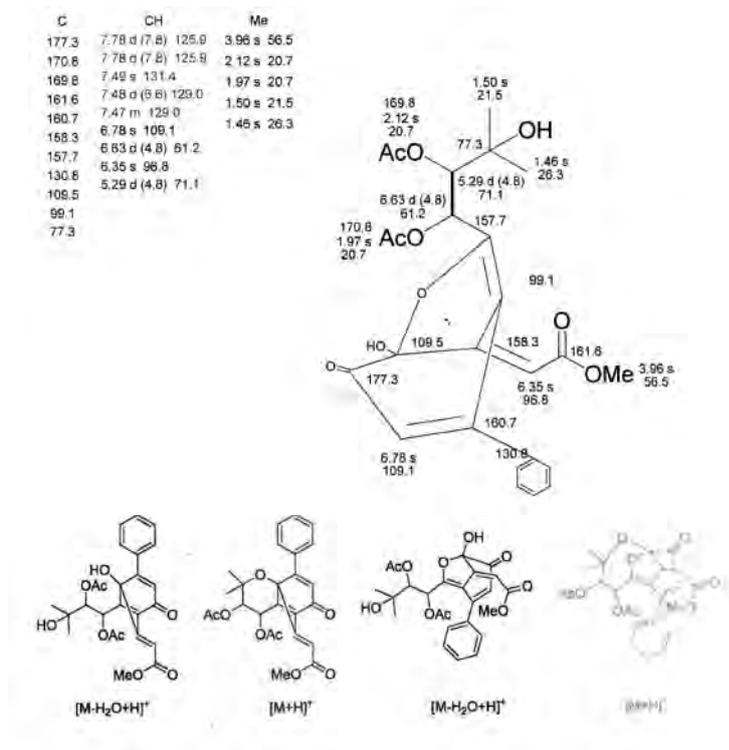
SE936-3625  
exp3 NOESY

```

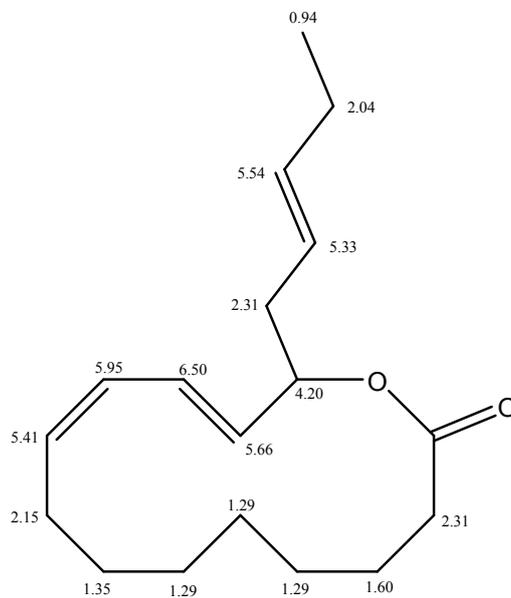
SAMPLE          FLAGS
date    Jul 16 2008    hs
solvent  CDCl3        spul
sample  undefined     pdrf13
ACQUISITION      hqiv7  6694
sw       8000.0       SPECTRAL
at       0.128      Leap    20.0
np       2048       gain    30
fb       not used   Spin    0
ss       32        F2 PROCESSING
d1       1.000      gf      not used
nt       32        gfa     not used
2D ACQUISITION  F1 PROCESSING
sw1      8000.0     F1
nt1      480       gf1    0.027
TRANSMITTER    HS      proc1   1a
sfrq       598.835  F1     DISPLAY  2048
tof        590.0
tpr       58      sp      -0.2
pw        11.600   wp      5382.8
mix        0.800   wp1     -0.8
PRESATURATION  rff1   4855.7
satmode      wnm   rfp     4355.5
satpwr       0     rff1   4856.1
satolv       0     rfp1   4355.5
satfrs      0     PLOT
DECOUPLER     WC      145.0
dn           HI      ac      0
da           mn      wc2     145.0
              ss      ac2      0
              sh      ss      2157.0
              al      cdc    ph      0
  
```



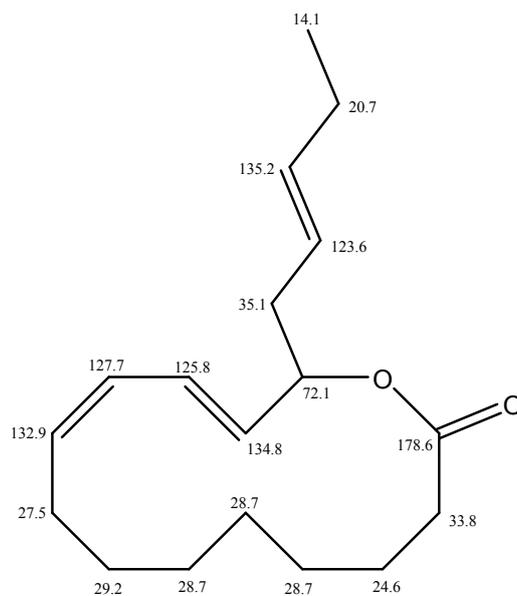
圖二十四、山煙草SE9-3-6分液層萃取化合物NOESY分析結果



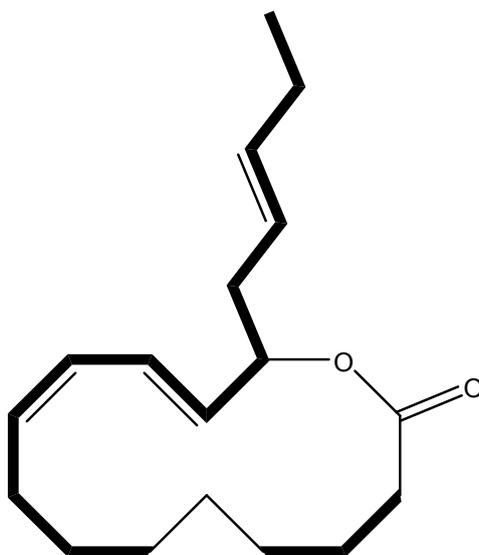
圖二十五、山煙草SE9-3-6分液層萃取化合物結構分析結果



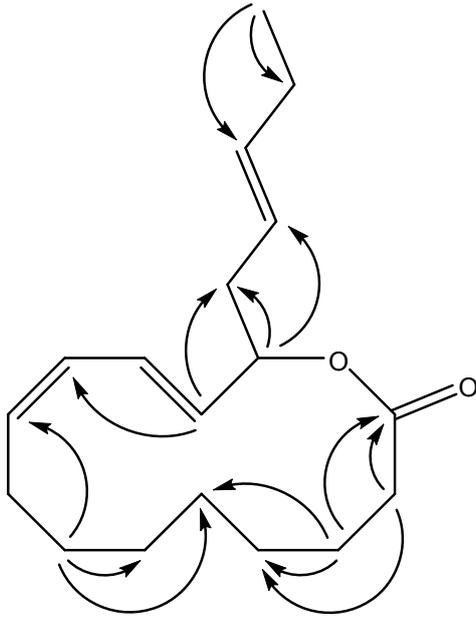
圖二十六、山煙草 SE9 分液層萃取物  $^1\text{H-NMR}$  分析結果



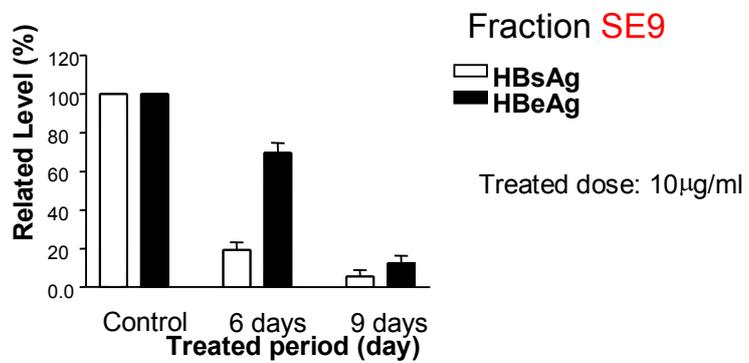
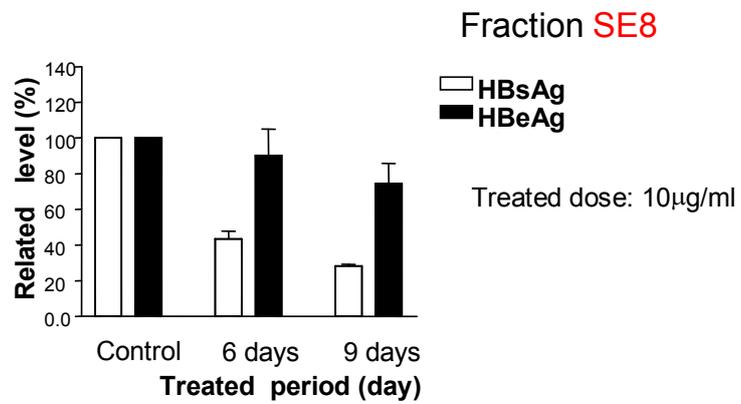
圖二十七、山煙草 SE9 分液層萃取物  $^{13}\text{C}$ -NMR 分析結果



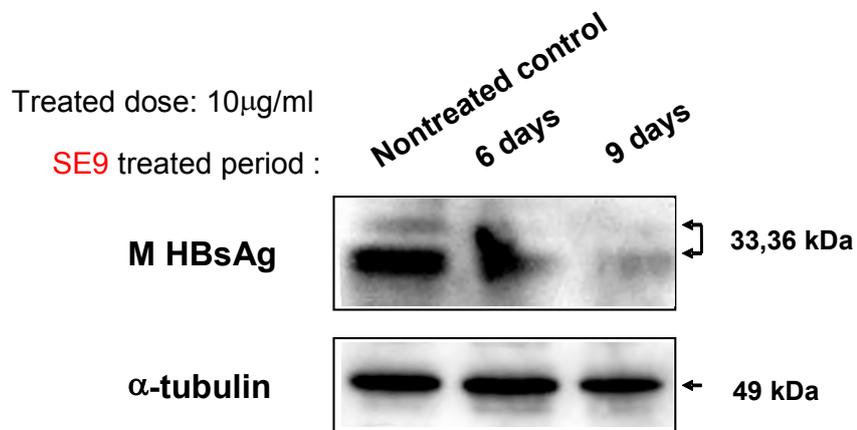
圖二十八、山煙草 SE9 分液層萃取物 COSY 分析結果



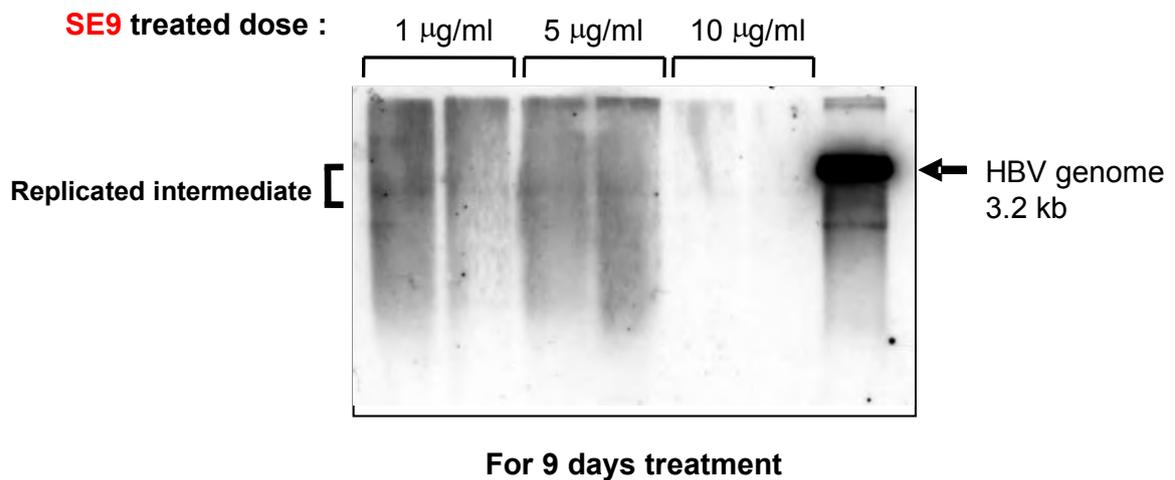
圖二十九、山煙草 SE9 分液層萃取物 HMBC 分析結果



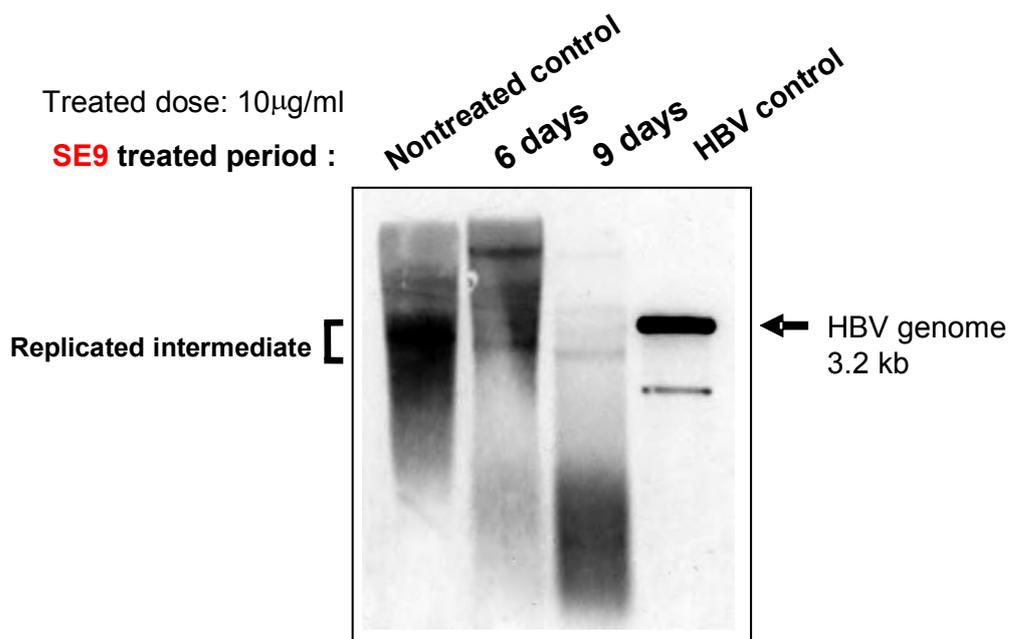
圖三十、山煙草活性萃取物對 B型肝炎病毒表面抗原及e抗原分泌之影響



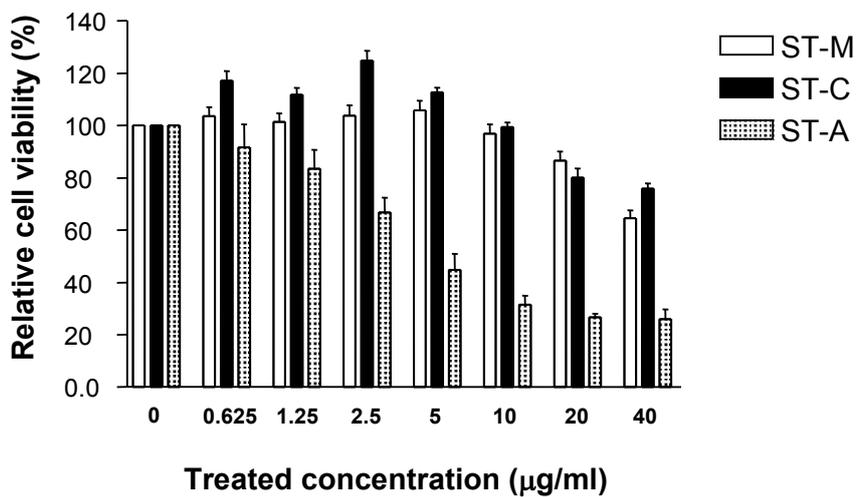
圖三十一、山煙草活性萃取物對HepG2 2.2.15 細胞中B型肝炎病毒表面蛋白表現之影響



圖三十二、山煙草活性萃取物對HepG2 2.2.15 細胞中B型肝炎病毒DNA複製之劑量效應



圖三十三、山煙草活性萃取物對HepG2 2.2.15 細胞中B型肝炎病毒DNA複製之時間效應



圖三十四、萬桃花有機溶劑萃取物對肝癌細胞株HepG2 2.2.15之毒殺性試驗結果

表一、萬桃花萃取物抑制胃幽門螺旋桿菌生長（抑菌圈）之測試

Fraction extract	Treated concentration (/ml)			(mm)
	100 µg	200 µg	300 µg	
ST-W	-	-	-	
ST-A	-	8	9	
ST-C	12.5	15	16.5	
ST-M	-	8	9.5	

ST-W : water extract from *Solanum torvum*

ST-A : Acetone extract from *Solanum torvum*

ST-C : Chloroform extract from *Solanum torvum*

ST-M : Methanol extract from *Solanum torvum*

# 網膜缺血或實驗性青光眼： 黃芩內含成分黃芩甘元之神經保護探討

趙效明

行政院退除役官兵輔導委員會台北榮民總醫院

## 摘要

缺血傷害在眼科疾病，如網膜動靜脈阻塞、青光眼與糖尿病視網膜病變中扮演重要角色；本研究目標在探討黃芩素對於網膜缺血再灌流動物模式的保護效果及機轉。

實驗採用電氣網膜生理圖、組織病理學及西方墨點法。

60 分鐘之網膜缺血再灌流，缺血眼：網膜生理圖乙型波振幅顯著下降；免疫組織染色的結果顯示：膽鹼乙醯轉化酶（ChAT; amacrine 細胞標記）顯著減少；西方墨點法測得網膜的基質金屬蛋白酶第九型（MMP-9；損傷指標）表現增加。而這些傷害可透過在缺血前給黃芩甘元(10  $\mu$ M)來緩解。總結，黃芩甘元對網膜缺血提供神經保護作用，可能透過機轉：調降 MMP-9 表現。

關鍵詞：黃芩素、神經保護、網膜缺血、實驗性青光眼

# **Therapeutic Effects/Mechanisms of Baicalein Against Retinal Ischaemia/ Experimental Glaucoma**

Hsiao-Ming Chao  
Taipei Veterans General Hospital

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to determine whether baicalein or silibinin can act as a neuroprotectant against a retinal ischemic insult. Such an insult is thought to play an important role in glaucomatous optic neuropathy and diabetic retinopathy, and so on.

The methods included are electroretinogram (ERG), histopathology and molecular biology.

Present results have indicated that 60 minutes of retinal ischemia plus reperfusion caused retinal damage characterized by a decline in electroretinographic b-wave amplitude, and a reduction in choline acetyltransferase (amacrine cell marker) immunoreactivity. The level of MMP-9 was upregulated. What is more, these damages were blunted when baicalein (10  $\mu$ M), was applied 1 hour before ischemia. Conclusively, this study supports a possible neuroprotective role for baicalein, possibly, acting through downregulating the over-expressed MMP-9.

Keywords: baicalein, retinal ischaemia, experimental glaucoma

## 壹、前言

### 一、視網膜缺血之背景與現況

#### (一) 簡介

視網膜缺血(retinal ischemia)在網膜動靜脈阻塞、青光眼(glaucoma)或糖尿病視網膜病變(diabetic retinopathy)等許多眼科疾病中扮演重要的角色；缺血發生時，會造成氧氣與營養物質無法到達組織，也會使組織產生的廢物無法排除，進而產生一連串的失衡反應，隨著缺血的時間加長，將會造成組織的損傷(Osborne et al., 2004)；簡言之，缺血導致血液無法充分到達組織，進而造成能量供需失衡的一種病理狀況。

#### (二) 視網膜缺血再灌流導致的傷害機轉

過去十幾年中有大量探討缺血機轉的研究被發表，但目前由視網膜缺血所導致視網膜損傷的機轉目前尚未完全明瞭。目前的發現顯示在視網膜缺血初期的時候，由於供應視網膜的氧氣與葡萄糖被阻斷，減少了糖解作用與氧化磷酸化的速度，導致細胞內的腺嘌呤核苷三磷酸(ATP, adenosine triphosphate)減少，造成一系列細胞膜破壞與離子平衡失調的損害(Lipton, 1999)。當細胞內的ATP減少的時候會使鈉鉀離子幫浦( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase pump)的活性受損，使細胞內鈉離子濃度梯度(gradient)增加(Lipton, 1999)，最後導致突觸前(pre-synaptic)細胞膜去極化(depolarization)，釋出麸胺酸；麸胺酸可刺激N-methyl-D-aspartate (NMDA)與kainate型的麸胺酸受器，以前者為例，NMDA受體就會受到週遭增加的麸胺酸所活化，造成了原本阻斷NMDA受體的電位依賴性鎂離子(voltage-dependent  $\text{Mg}^{2+}$ )被移除，打開配體閘控的鈣離子通道(ligand-gated calcium channel)，刺激鈣離子內流(Zeevalk and Nicklas, 1992)，造成視網膜的損害(Lipton, 1999; Lipton et al., 1994, Nishizawa et al., 2001)。另外，麸胺酸也會作用於alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA)與kainate受體，增加鈣離子、鈉離子、氯離子與水的內流，導致組織的水腫並進而使細胞破裂(Lipton, 1999; Osborne et al., 2004)。

當血液再灌流進入組織中，會產生大量自由基，原因是由於在缺血的過程中ATP排空導致hypoxanthine產生，並增加神經細

胞內鈣離子去活化鈣離子依賴性蛋白酶calpain, calpain 將 xanthine dehydrogenase 轉化為 xanthine oxidase, 而在再灌流情形下 xanthine oxidase 會將 hypoxanthine 或 xanthine 氧化成尿酸(uric acid), 造成超氧離子(superoxide anion,  $\cdot\text{O}_2^-$ )的釋放, 產生氫氧自由基( $\cdot\text{OH}$ ), 造成進一步的傷害(Osborne et al., 2004; Liu and Rosenberg, 2005)。

### (三) 視網膜缺血再灌流對神經細胞的選擇性傷害

視網膜缺血導致組織細胞的傷害已經被報導, 許多模擬青光眼視網膜病變的動物實驗報告指出, 在內側的視網膜神經細胞死亡較為明顯, 但是其他的視網膜細胞也有被報導(Osborne et al., 1999a~c)。在急性的視網膜缺血動物模式中, 以 120 mmHg 的壓力缺血 60 分鐘, 並經過七天的再灌流(reperfusion), 可以觀察到視網膜電氣生理圖(ERG, electroretinogram)的 a-wave 以及 b-wave 有明顯的減少, 而 a-wave 在圖譜中的反應代表感光(photoreceptors)及雙極(bipolar/Müller cells)細胞的電生理反應, 證明了缺血會對上述細胞造成損害(Chao and Osborne, 2001; Chao et al., 2008; Chidlow et al., 2002)。另外, 在同樣壓力與時間造成缺血後, 以 24 小時再灌流的動物模式中, 也觀察到感光細胞的凋亡(apoptotic)現象(Singh et al., 2001)。

近年來視網膜缺血由於其在許多眼科疾病, 如青光眼、前側缺血視神經病變(AION, anterior ischemia optic neuropathy)、視網膜與脈絡膜血管阻塞(retinal and choroidal vessel occlusions)、糖尿病視網膜病變、新生兒視網膜病變(ROP, retinopathy of prematurity)與創傷性視神經病變(traumatic optic neuropathy), 扮演了一部分的角色, 而以上所列疾病都有報告指出會使神經節細胞層(ganglion cell)損傷與缺失(Osborne et al., 1999c, 2004; Chao et al., 2008)。另外, 在實驗研究的結果也顯示, 目前已知的缺血損傷同樣會造成神經節細胞的損傷與缺失(Lafuente et al., 2002; Li et al., 2002; Chidlow and Osborne, 2003)。其中一種用於測定缺血後造成神經節細胞缺損的方法, 是觀察視網膜訊息核糖核酸(mRNA)的層次改變, 如 Thy-1 的 mRNA 可專一性的代表神經節細胞(Chidlow and Osborne, 2003; Nash and Osborne, 1999)。且 kainate 型與 NMDA 型的麸胺酸受體皆表現於神經節細胞上, 因此當麸胺酸的量增加時, 會直接造成對神經節細胞的傷害(Lin et al., 2002; Brandstatter et

al., 1994; Fletcher et al., 2000)。

另外一類對缺血傷害與胺酸引起興奮性細胞毒性 (glutamate-induced excitotoxicity) 也相當敏感的細胞為無軸突細胞 (amacrine cells)，當給予胺酸受體的致效劑 (agonist) 後，會造成 GABA (gamma-aminobutyric acid)、血清素 (serotonin) 或膽鹼乙醯轉化酶 (ChAT, choline acetyltransferase) 在無軸突細胞中的改變。而缺血所造成細胞死亡的機轉則與神經節細胞相似 (Osborne et al., 2004)。

## 二、高眼內壓導致視網膜缺血再灌流之背景與現況

### (一) 簡介

目前有許多的動物模式已被建立用於研究視網膜缺血，例如增加眼內壓力 (HIOP, high intraocular pressure) 造成缺血、使用縫合線結紮視神經束 (ligature of optic nerve bundle) 或結紮眼部血管 (ligature of ophthalmic vessels) 以達到完全的視網膜缺血。也有部分的方法，是部分結紮血管以達到不完全的視網膜缺血。或是利用靜脈注射打入玫瑰紅 (rose Bengal) 或其他光敏感性染劑 (photosensitive dye) 後，再以強光照射視網膜來產生視網膜血管的阻塞，可模擬分枝視網膜動脈阻塞 (BRAO, branch retinal artery occlusion; Osborne et al., 2004)。

### (二) 高眼內壓導致視網膜缺血再灌流模式

在這個研究中，使用的是高眼內壓導致視網膜缺血 (HIOP-induced retinal ischemia) 的模式，目前這個方法已被廣泛使用 (Chao and Osborne, 2001; Chao et al., 2008)。它最早在 1952 年由 Smith 與 Baird 所提出，藉直接對眼睛注入無菌的液體，使所有的血液被足夠的壓力所阻斷 (Smith and Baird, 1952)。而在 1991 年由 Buchi 等人重新建立，其使用一個水槽連接一隻針，針接在大鼠眼球前房 (anterior chamber) 的位置，升高水槽使壓力差達到 110 mmHg，讓眼內壓高過眼睛的灌流壓力 (ocular perfusion pressure) 以阻斷血流 (Buchi et al., 1991)。此動物模式可以藉著阻斷視網膜的循環 (retinal circulation) 造成全眼的缺血，並可以透過缺血過程中觀察到眼底變白 (whitening of fundus) 與網膜電氣生理圖的振幅 (amplitude) 變平來確認。在病理特徵上，此動物模式與中央視網膜血管阻塞 (CRAO, central retinal artery occlusion) 及慢性青光眼相當

類似，也可以作為模擬急性青光眼的模式(Osborne et al., 2004)。

在過去的文獻中有提到，在高眼內壓誘導缺血後，暗適應光誘導電氣網膜生理圖(dark-adapted light-evoked ERG)的 b-wave 會降低，b-wave ratio 可作為缺血損傷指標(Chao and Osborne, 2001; Safa and Osborne, 2000)，但若是給予缺血處理時間不夠長，有可能只會造成 b-wave 短暫的變化，在回復後，b-wave 可能會變回正常的狀況(Foulds and Johnson, 1974; Osborne et al., 2004)。而若要造成組織病理學上的差異，可能需要更長時間的缺血處理來達成。

### 三、基質金屬蛋白酶之背景與現況

#### (一) 簡介

組織存在於一個動態的環境中，在組織中細胞會與細胞及其周圍的基質進行交互作用，持續地維持組織的架構是由基質金屬蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的活性所控制。已知基質金屬蛋白酶是一群中性含鋅的蛋白酶，而其受質主要是細胞外基質(extracellular matrix, ECM)的成分，與細胞表面的許多分子。許多的基質金屬蛋白酶參與在損傷的修復(wound healing)、血管新生(angiogenesis)、發炎(inflammation)與腫瘤轉移(tumor metastases)等生理與病理狀況。其功能包括有降解細胞外基質的構造，摧毀細胞表面的蛋白質、細胞激素(cytokines)與蛋白酶抑制劑，活化或釋放潛伏的訊號分子(signaling molecules)或蛋白酶(Yong et al., 2001; Egeblab and Werb, 2002)。

基質金屬蛋白酶為含鋅的內切酶(endopeptidases)，一般於分泌出的時候不具活性，在細胞外基質中被活化。這些酵素通常都有某些常見的構造特色，在 N 端會有 propeptide，作用為阻擋酵素的活化區，防止含有鋅的位置外露，將 propeptide 切去會使酵素活化。而在 C 端的 hemopexin 區域，可以決定酵素對受質的專一性。目前已發現二十多種的基質金屬蛋白酶(Sivak and Fini., 2002)。

#### (二) 基質金屬蛋白酶在缺血中的角色

短暫或長時間缺血的情形下，基質金屬蛋白酶會被向上調節，並於再灌流時，對血腦障壁(blood brain barrier, BBB)受到干擾的情形負有重要的角色(Liu and Rosenberg, 2005)。目前有大量的證據證明，在腦部缺血再灌流的傷害中，活化的基質金屬蛋白酶會使血腦障壁蛋白質分解而破壞。再灌流時所產生的自由基與其所

產生的氧化壓力，會透過直接或間接的方式去影響基質金屬蛋白酶活性。直接的方式是自由基去氧化或硝化基質金屬蛋白酶使其活化(Gu et al., 2002)。而間接的方式是自由基作用於基質金屬蛋白酶轉錄過程中，影響對氧化還原敏感的轉錄因子如 NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B)與 AP-1(activating protein-1)，進一步調節基質金屬蛋白酶(Huang et al., 2001a and 2001b)。

### (三) 基質金屬蛋白酶在視網膜中的角色

近幾年中，有許多討論基質金屬蛋白酶在視網膜中所扮演的角色的相關報告陸續被提出。目前已知如基質金屬蛋白酶第一、二、三和九型有表現於人類的玻璃體及感光細胞間的基質，而基質金屬蛋白酶第九型則被發現在神經節細胞層有表現(Sivak and Fini, 2002)。而在一些常見的眼科疾病如老年黃斑部病變(age-related macular degeneration, AMD)、糖尿病視網膜病變與青光眼中，發現會有基質金屬蛋白酶會有短暫地增加現象(Sivak and Fini, 2002)。

而在動物實驗中，使用了缺失基質金屬蛋白酶第九型的基因轉殖小鼠，發現對於結紮視神經的動物模式傷害有保護的效果(Chintala et al., 2002)。若給予小鼠玻璃體腔注射 kainic acid 或氯化鉀(potassium chloride, KCl)產生興奮性細胞毒性，會造成基質金屬蛋白酶第九型的活性增加，使神經節細胞明顯死亡並造成視網膜的損傷(Mali et al., 2005; Zhang et al., 2004)。也有科學家給予玻璃體腔注射 NMDA 產生興奮性細胞毒性後，發現視網膜神經節細胞會由於一氧化氮(nitric oxide, NO)活化基質金屬蛋白酶第九型而受到損傷(Manabe et al., 2005)，並在給予基質金屬蛋白酶抑制劑後，能減少基質金屬蛋白酶活性與興奮性毒性所產生的傷害(Mali et al., 2005; Manabe et al., 2005; Zhang et al., 2004)。另外，有研究指出，利用注射高濃度的食鹽水溶液到上鞏膜靜脈(episcleral vein)提高眼內壓後，發現基質金屬蛋白酶第九型活性增加、細胞外基質降解與視網膜神經節細胞缺損都有極明顯的相互關係(Guo et al., 2005)。

## 四、黃芩甘元之背景與現況

### 黃芩甘元(baicalein)

Baicalein (黃芩甘元; 5,6,7,-trihydroxyflavone) 是中草藥黃芩萃取物的

主要活性成分之一，在結構上且是屬於 flavonoid 類，在治療上已被證實具有許多保護作用，例如：anti-oxidant effect (D. Gao et al., 1998)，anti-inflammatory effect (T. Krakauer et al. 2001)，anti-cancer effect (F.L. Chan et al., 2000)，anti-virus effect (B.Q. Li, 1993) 等。

#### 五、研究目的

在自然界，傳統中、草藥萃取物有保護效果，具有發展潛力。而目前尚未有證據指出，中藥黃芩萃取物 baicalein 可保護視網膜免於高眼內壓所產生的缺血/再灌流傷害，因此本研究所欲探討的是 baicalein 是否會對高眼內壓誘發視網膜缺血/再灌流傷害具有保護作用，以及其可能透過的分子保護機轉。

## 貳、材料與方法

### 一、藥品

baicalein, sodium chloride 購買自 Sigma, MO, USA ; ketamine (imalgene<sup>®</sup> 10 g/100 mL) 10 mL , 購買自 Merial, Bourgelat, France ; 10% xylazine (chanazine<sup>®</sup>)購買自 Chanelle, Galway, Ireland ; 0.5% proparacaine (alcaine<sup>®</sup>), 1% tropicamide (mydrical<sup>®</sup>)購買自 Alcon, Puurs, Belgium ; balanced salt solution (BSS)購買自 Alcon, Texas, USA ; phosphate buffer saline (PBS)購買自 BDH, Poole, England ; paraformaldehyde, sucrose, gelatin 購買自 Merck, Darrnstadt, Germany ; primary antibody (goat polyclonal anti-matrix metalloproteinase-9) , secondary antibody (anti-goat IgG, HRP conjugate)來自 Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA 。

### 二、儀器

電腦(computer)購買自 Apexons<sup>®</sup> ; 立體定位儀(stereotaxic frame) ; 示波器(monitor)購買自 Textronic ; 訊號放大器(amplifier P511 ; regulated power supply RPS107/Stimulator PS22)購買自 Grass Telefactor, Astro Med Inc., RI, USA ; 發光二極體(LED, Light-emitted diode) ; 發光二極體電源供應器(LED power supply; Hewlett-Packard E3630A) ; 冷凍切片機(Microtome Freezing, Leica CM1900) ; 高速離心機(centrifugator)購買自 Sigma 2K15, Harz, Germany ; 分光光度計(S2100 Diode Array Spectrophotometer) ; Versa-Doc 影像系統模型 3000 觀察(BioRad, Hercules, CA, USA) ; 大型自動正立螢光顯微鏡(Fluoromicroscope, Olympus AX-80) 。

### 三、動物

本實驗採用約 6~8 週大，200~300 g 重之 Wistar rats。飼養於臺北榮民總醫院教學研究部動物室，飲水與飼料供應充足，12 小時燈光以及 12 小時暗室的週期環境之中。環境溫度控制在  $25 \pm 1$  °C，濕度控制在 40~60 %，空調則維持 air changes 12~15/hour。

### 四、閃光網膜電器生理圖 [ flash electroretinogram (ERG) ]

動物在給予藥物前一天與再灌流第三、五、七天，進行閃光網膜電氣生理圖的測量，用以評估藥物對於視網膜生理功能的影響。在進行測量之前，先開啟電腦 (MS-DOS 系統下的 ERG 軟體)、示波器、訊號放大器 (amplifier, Grass, USA)與發光二極體(light-emitted diode, LED)電源供應器 (power supply)，動物皆須接受至少 30 分鐘以上之暗適應，其後之流程皆於

暗房中完成。完成暗適應之動物先以 ketamine (100 mg/kg, imalgene<sup>®</sup>)及 2% xylazine (5 mg/kg, chanazine<sup>®</sup>)肌肉注射麻醉。以立體定位儀固定後，滴加散瞳劑 1% tropicamide(mydracayl<sup>®</sup>)與局部麻醉劑 0.5% proparacaine (alcaine<sup>®</sup>)各一滴，將待測眼球固定。將參考電極接於舌頭，地極接於頭皮，並將白金環輕觸角膜作為紀錄電極(Block et al., 1992)。將 LED 放置於眼球前 5 公分處，啟動閃光後，視網膜產生的神經電訊號可透過電極紀錄於電腦，將檔案以 Excel 軟體開啟後紀錄 b-wave amplitude，由於不同動物的 b-wave amplitude 可能會有不同，單純比較 b-wave amplitude 可能較不客觀，因此以同一隻動物缺血眼的 b-wave amplitude 除以正常眼的 b-wave amplitude 定義為乙型波比率(b-wave ratio)，評估缺血與給藥的變化(Safa and Osborne, 2000; Chao and Osborne, 2001; Chao et al., 2008)。

#### 五、藥物的劑量與投予

將 baicalein 溶解於 1 % ethanol 中，給予劑量分別為 1, 5, 10  $\mu$ M；利用 10  $\mu$ L 的 microsyringe 接 30 號針頭作玻璃體內注射。將各給藥組動物區分為 3 個劑量組與一個溶劑組，以右眼作為正常對照組。在作缺血處理之前一天，將通過閃光網膜電器生理圖評估為正常的動物，以 ketamine (100 mg/kg, imalgene<sup>®</sup>)及 2% xylazine (5 mg/kg, chanazine<sup>®</sup>)肌肉注射麻醉，玻璃體內注射 5  $\mu$ L 的上述藥物，在 60 分鐘後作缺血處理。

#### 六、大鼠視網膜缺血一再灌流實驗模式之建立

動物先以 ketamine (100 mg/kg, imalgene<sup>®</sup>)及 2% xylazine (5 mg/kg, chanazine<sup>®</sup>)肌肉注射麻醉。麻醉後以立體定位儀固定，在兩眼滴加散瞳劑 1% tropicamide (mydracayl<sup>®</sup>, Alcon, Puus, Belgium)與局部麻醉劑 0.5% proparacaine (alcaine<sup>®</sup>, Alcon, Puus, Belgium)各一滴，選擇左眼或右眼（本實驗使用左眼），使用 30 號針刺入眼球之前房(anterior chamber)，針後連接於均衡鹽注射液(balanced salt solution, BSS, Alcon, Puus, Belgium)。本實驗中瓶內水面比眼球高 185 公分（約 136 mm-Hg），壓力造成網膜缺血可觀察到眼底變白，如此持續 60 分鐘缺血後出針，即可觀察到因缺血變白的視網膜快速充血，即已開始再灌流(Buchi et al., 1991)。在缺血前、缺血後再灌流的第 3, 5, 7 天，利用測量閃光網膜電氣生理圖觀察 b-wave amplitude 變化，並計算 b-wave ratio 以評估傷害。

#### 七、免疫組織染色(Chao and Osborne, 2001; Chao et al., 2008)

過量腹腔內注射巴比妥鹽可以犧牲掉大白鼠。免疫組織化學分析中，大鼠心臟先灌流 0.9 % 生理食鹽水，接著放在副甲醛 2 % (w/v)。視網膜很快

的被分開，並且浸潤在去鎂離子 Locke's 緩衝液（含有：154 mM 氯化鈉、5.6 mM 氯化鉀、2.3 mM 氯化鈣、3.6 mM 碳酸氫鈉、5 mM N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES)、5.6 mM 右旋-葡萄糖）。在 37°C，酸鹼值 7.4，95% 氧/5% 二氧化碳和 Locke's 緩衝液快速的達到平衡。固定網膜部分可用 2% (w/v) 副甲醛【1 份 8% 副甲醛、1 份水、2 份磷酸鈉緩衝液（0.2 M 磷酸二氫鈉  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ；0.2M 磷酸氫二鈉  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ；酸鹼值 7.4）】45 分鐘，然後換到 30 % (w/v) 蔗糖（在磷酸鈉緩衝液，酸鹼值 7.4）。視網膜定位，放在金屬座上的 O.C.T. 透明膠 (Merck Ltd)，且以乾冰快速冷凍。

取出組織以 OCT 包埋後進行冷凍切片，切片方向為自視神經到角膜，切片厚度為 10  $\mu\text{m}$ ，通常從距視神經盤中心大約相同位置切片，這樣才能做客觀比較。微切片機 (Microtome Freezing, Leica CM1900，美國) 做好的網膜冷凍切片，放在塗有一層膠質的玻璃片上，並且被保存在 -20 °C 直到被使用。

取出標本後以磷酸鈉緩衝液洗浸泡數秒去 OCT，加入一級抗體〔兔子抗乙酰膽鹼轉化酶多株抗體，rabbit anti-choline acetyltransferase (ChAT) polyclonal antibody (1:500; AB143; Chemicon, Temecula, CA)，會對 cholinergic amacrine 細胞進行標記，在 4 °C 過夜；接著將切片用磷酸鈉緩衝液洗三次，再加二級抗體（分別為 rhodamine 鍵結 affinity purified antibody (1:50; Chemicon)，在 25°C 作用 45 分鐘，接著將切片用磷酸鈉緩衝液洗三次。然後在玻片上加 50 % 甘油，蓋上蓋玻片，封好且將其陰乾。為了需要定量，視網膜切片用 1 mg/ml 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma D9542) 染核顏色，然後切片可以用螢光顯微鏡檢視。當需要比較處理過的視網膜組織，一個和實驗無關的實驗室科學家，評估出相對正常免疫螢光反應的不同級數。先假定網膜缺血的網膜組織在沒有處理過任何藥物的時候評分為 0 級，相反的，注射藥物能完全改善網膜缺血的網膜則評分為 3 級。用這個方法可以避免一些偏差。一般來說，當評分 1 時，我們認定他是缺乏神經保護效果的。

#### 八、視網膜色素上皮細胞組織培養及西方墨點法分析

前述，再灌流時所產生的自由基與其所產與其所產生的氧化壓力，會透過直接 (Gu et al., 2002) 或間接的方式 (Huang et al., 2001a and 2001b) 去影響基質金屬蛋白酶的活性；以視網膜色素上皮細胞與過氧化氫 (hydrogen peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 水溶液建立的氧化壓力模式，探討抗氧化劑黃芩甘元對 MMP-9 影響。

## (一) 細胞組織培養

### 1. 細胞株

Adult Retinal Pigment Epithelium-19 (ARPE-19)，為一種人類視網膜色素上皮細胞株，培養於 Dulbecco's Modified Eagle Medium 和 F-12 Nutrient Mixture (DMEM/F-12 Modified Mixture medium)，再外加 10 % fetal bovine serum (FBS) 與 1 % penicillin/streptomycin solution (每毫升內含 10000 units penicillin 和 10 mg streptomycin 溶於 0.9 % NaCl) 於含有 5 % 二氧化碳之 37 °C 飽和溼度之培養箱中培養。平時無需培養之細胞則在含 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) 和 95% 原來細胞生長用之新鮮培養基均勻混合後，冷凍保存於 -196 °C 的液態氮桶中。

### 2. 細胞繼代培養

繼代培養時當細胞生長至高密度時先用 1X phosphate buffer solution (PBS) 沖洗數次後，以適量的 0.25 % trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution 於 37 °C 下作用 5 分鐘，待細胞自培養皿底部脫落後，加入適量含血清之新鮮培養液以終止 trypsin 的作用，離心 (1000 rpm 即 92 xg，5 分鐘，24 °C) 後去除上清液，加入新鮮培養液混合均勻，依 1 : 3 的稀釋比例將細胞轉移至新的培養皿中，依上述培養條件繼續培養之。

## (二) 西方墨點法分析

將等量蛋白 (40 µg)，經過加熱變性，用 12 % sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 跑電泳，將他轉漬到 polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜 (Biotech, Buckinghamshire, UK) 上。此轉漬膜可以用阻斷緩衝液 (150 mM 氯化鈉、25 mM Tris-HCl、pH 7.6、0.005 % Tween、5% 脫脂奶粉)，在室溫下作用兩小時。然後，將此轉漬膜與一次抗體作用【山羊多株基質金屬蛋白酶抗體 第九型 (anti-MMP-9; 1:200; Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA); 小鼠單株乙型肌動蛋白抗體 (1:4000, Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA, USA)】，放置在 4 °C 一晚。一次抗體可以稀釋在含有 1% 的阻斷緩衝液中。將轉漬膜洗三次後，與二次抗體作用【抗羊免疫球蛋白-鏈結馬蘿蔔過氧化酶 (1:250; Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA); 鼠免疫球蛋白-鏈結馬蘿蔔過氧化酶

(Amersham;用含有 1%脫脂奶粉的阻滯緩衝液稀釋 25000 倍)】，在室溫下作用兩小時。接著，將轉漬膜用化學螢光系統顯影 (Amersham)，螢光帶可以用 Versa-Doc 影像系統模型 3000 觀察 (BioRad, Hercules, CA, USA)。

#### 九、統計方法

每次實驗各組最少三重複，實驗數據以平均值  $\pm$  標準誤差(mean  $\pm$  S.E.) 表示，二、三以上獨立組別之間分別採用unpaired Student's *t* test、one-way ANOVA (伴隨Tukey multiple-comparison test) 比較其有無差異 (缺血組、缺血加藥物治療組)， $p < 0.05$ 時視為具有統計意義。

## 參、結果

### 一、建立高眼內壓導致視網膜缺血一再灌流模式

由於利用高眼內壓導致視網膜缺血一再灌流的實驗模式，發現隨缺血處理時間不同或壓力不同，造成的傷害程度也會跟著改變，缺血損傷會導致平直的電氣網膜生理圖(Chao & Osborne, 2001)、大量的氧化游離基增產(Chao et al., 2008)。

在做缺血處理前先進行閃光網膜電氣生理圖的檢查，只選擇 b-wave ratio 介於 75.00~125.00% 的動物進行實驗。接著利用相同壓力(136 mmHg)做 60 分鐘的缺血處理，觀察再灌流 3、5、7 天後閃光網膜電氣生理圖的變化。實驗結果顯示未做缺血處理前 b-wave ratio 首先標準化為 100% (n=18)，而再灌流第三天時，b-wave ratio 為  $15.40 \pm 3.65\%$  (平均值 $\pm$ 標準誤差；n=18)。第五天時 b-wave ratio 為  $14.92 \pm 3.78\%$  (平均值 $\pm$ 標準誤差；n=18)。第七天 b-wave ratio 為  $14.03 \pm 3.55\%$  (平均值 $\pm$ 標準誤差；n=18)。由此可證明，實驗動物模式並未回復到正常，且缺血再灌流前、後有明顯差異，並具有統計上的意義。

### 二、黃芩甘元對於視網膜功能的影響

在本實驗中，在缺血處理前 1 小時，先以玻璃體腔內注射不同劑量的藥物(參考五、藥物的劑量與投予)，再以 136 mmHg 壓力下進行 60 分鐘的缺血處理。在進行缺血處理後的第 3, 5, 7 天，檢測其閃光網膜電氣生理圖的變化；實驗結果顯示給予酒精(溶劑)處理，並不會顯著影響缺血再灌流後下降的 b-wave amplitude。

缺血再灌流第 3 天之 b-ratio：只做缺血處理的動物為  $15.40 \pm 3.65\%$  (平均值 $\pm$ 標準誤差；n=18)；預處理 1 $\mu$ M baicalein 組為  $39.71 \pm 9.18\%$  (平均值 $\pm$ 標準誤差；n=4)；預處理 5 $\mu$ M baicalein 組為  $34.51 \pm 12.61\%$  (平均值 $\pm$ 標準誤差；n=3；圖未顯示)；預處理 10 $\mu$ M baicalein 組為  $68.31 \pm 19.13\%$  (平均值 $\pm$ 標準誤差；n=3；見圖一)。

缺血再灌流第 5 天之 b-ratio：只做缺血處理的動物為  $14.92 \pm 3.78\%$  (平均值 $\pm$ 標準誤差；n=18)；預處理 1 $\mu$ M baicalein 組為  $39.43 \pm 5.96\%$  (平均值 $\pm$ 標準誤差；n=4)；預處理 5 $\mu$ M baicalein 組為  $34.97 \pm 17.58\%$  (平均值 $\pm$ 標準誤差；n=3；圖未顯示)；預處理 10 $\mu$ M baicalein 組為  $74.27 \pm 20.44\%$  (平均值 $\pm$ 標準誤差；n=3；見圖一)。

缺血再灌流第 7 天之 b-ratio：只做缺血處理的動物為  $14.03 \pm 3.55\%$  (平

均值±標準誤差；n=18)；預處理 1 $\mu$ M baicalein 組為 39.57±10.96% (平均值±標準誤差；n=4)；預處理 5 $\mu$ M baicalein 組為 42.52±20.52% (平均值±標準誤差；n=3；圖未顯示)；預處理 10 $\mu$ M baicalein 組為 62.07±8.54% (平均值±標準誤差；n=3；見圖一)。

### 三、藥物對於乙醯膽鹼轉化酶 (ChAT; amacrine 細胞標記) 的影響

在缺血處理前 1 小時，先以玻璃體腔內注射處 10 $\mu$ M baicalein 或溶劑(乙醇)，再以 136 mmHg 壓力下進行 60 分鐘的缺血處理。接著探討在視網膜缺血前給予藥物處理後，對於視網膜中 ChAT 的影響；在本實驗中，在動物再灌流第七天時將其犧牲，並進行冷凍切片與免疫螢光組織染色；在 ChAT 免疫螢光反應的結果中：正常視網膜 (見圖二 A & B)，特徵為 amacrine 細胞之神經纖維在內網層(inner plexiform layer, IPL)排列成兩個帶狀的圖案 (2-band；細箭)；IPL 兩側可見細胞本體 (粗箭)；在缺血處理後，amacrine 細胞的兩個前述特徵不復存在，甚而在內核層細胞本體所在處呈現空洞〔圖未附；與缺血前給予溶劑處理相同 (見圖二 C & D)]；而在缺血處理後給予 10 $\mu$ M baicalein，呈現類似於正常視網膜之免疫螢光反應(見圖二 E& F)。

### 四、藥效機轉研究 (氧化壓力)：藥物對基質金屬蛋白酶九型(MMP-9)的影響

使用西方墨點法，分析氧化壓力後，藥物對基質金屬蛋白酶第九型(MMP-9)的變化；在實驗結果中發現 (見圖三)，相較於 DMEM/ F12 培養液中：在氧化壓力前給予溶劑乙醇增加 MMP-9 的表現 (與單純氧化壓力處理組並無明顯差異)；相較於給予溶劑組，氧化壓力處理前給予黃芩甘元 (baicalein) 則劑量相關減少 MMP-9 表現。

## 肆、討論

許多治療視網膜缺血傷害的策略被提出；其中包括有使用 NMDA 與 kainate 型的麸胺酸受器拮抗劑，來保護視網膜缺血傷害(Adachi et al., 1998; Seo et al., 2001)；利用抗氧化劑減少自由基產生的視網膜傷害(Block and Schwarz, 1997)；或投予鈣離子通道拮抗劑來減少鈣離子內流(Osborne et al., 2002)。

在本實驗中所使用的高眼內壓導致視網膜缺血一再灌流模式中，除了在缺血後再灌流第三、五、七天時發現有明顯的視網膜功能損害外(圖一)。這些實驗結果與之前的文獻所提出缺血會導致網膜功能下降一致(Chao and Osborne., 2001; Chao et al., 2008)，且視網膜受到興奮性細胞毒性傷害時，MMP-9 會表現在視網膜的位置(Mali et al., 2005; Manabe et al., 2005; Zhang et al., 2004)，和過去報導缺血易損傷內層網膜或許相關(Osborne et al., 1999a; Chao et al., 2000)。

西方墨點的結果顯示：經過氧化壓力後後 MMP-9 增加的趨勢，會因為給予黃芩甘元(baicalein)而劑量相關降低(圖二)。據此推測，透過給予黃芩甘元的處理造成 MMP-9 mRNA 表現量降低的現象，可能是使視網膜細胞存活增加的機轉之一。

本實驗高眼內壓導致視網膜缺血的傷害模式中，結果證明在給予玻璃體腔注射黃芩甘元(10  $\mu$ M)，可明顯的降低高眼內壓導致視網膜缺血的傷害(圖一)，黃芩甘元明顯緩解因缺血：1. 下降之 ERG b-wave 振幅的趨勢(見圖一)；2. 減少之膽鹼乙醯轉化酶 (ChAT; amacrine 細胞標記) 免疫螢光表現。

由於 MMP-9 可能受到自由基直接或間接的活化(Gu et al., 2002)，而被活化的 MMP-9 會進一步降解細胞外基質(Mali et al., 2005; Manabe et al., 2005; Zhang et al., 2004)，最後產生視網膜的損傷。在本實驗結果中，黃芩甘元緩解氧化壓力增加之 MMP-9 的表現，推測在給予缺血一再灌流損傷時，所產生之自由基直接或間接的向上調節 MMP-9，進而導致視網膜的損傷，並造成視網膜功能的傷害。因 MMP 與自由基之間的關係(Liu and Rosenberg, 2005)，且黃芩甘元具有抑制 MMP-9 的作用(Demeule et al., 2000)，所以黃芩甘元有可能是透過減少自由基，而減少了 MMP-9 表現量，最後減輕了視網膜所受到的損傷。

## 伍、結論與建議

網膜缺血再灌流導致：生理功能下降；膽鹼乙醯轉化酶(ChAT; amacrine 細胞標記) 免疫螢光反應表現消失；MMP-9 (損傷指標) 表現增加。黃芩甘元(10  $\mu$ M)可緩解網膜缺血傷害，且透過減少自由基而調降 MMP-9 而提供神經保護作用。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP97-RD-012 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. Hughes W. F. (1991) Quantitation of ischemic damage in the rat retina. *Exp Eye Res* 53, 573-582.
2. **Chao H. M.** (2003) Free Paper 2, Retina 1, p20. 1. A comparison in cultured induced, cortical, and retinal neurones. 2. The cell therapy in retinal ischaemia/ experimental glaucoma, & its relevance to brain diseases. (Abstract in 19<sup>th</sup> Congress of Asia-Pacific Academy of Ophthalmology, APAO, Bangkok, 29 Nov-3 Dec, 2003).
3. Paul J Foster and Gordon J Johnson. Glaucoma in China: how big is the problem? 2001;85;1277-1282 *Br. J. Ophthalmol.*
4. Congdon NG, Quigley HA, Hung PT, Wang TH, Ho TC. Screening techniques for angle-closure glaucoma in rural Taiwan. *Acta Ophthalmol Scand.* 1996 Apr;74(2):113-9.
5. **Chao, H. M.**, Chidlow, G., Melena, J., Wood, J. P. M. and Osborne, N. N. (2000) An investigation into the potential mechanisms underlying the neuroprotective effect of clonidine in the retina. *Brain Res*, 877(1): 47-57
6. Osborne, N. N., Wood, J. P., Melena, J., **Chao, H. M.**, Nash, M. S., Bron, A. J., and Chidlow, G. (2000) 5-Hydroxytryptamine<sub>1A</sub> agonists: potential use in glaucoma. Evidence from animal studies. *Eye*, 14(Pt 3b): 454-63
7. Yanoff M. and Fine B. N. (1989) Ocular pathology, 3rd edition, p387, p389, p619.
8. Siesjo B. K. (1992a) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg* 77, 169-184.
9. Grinwald P. M. (1992) Sodium pump failure in hypoxia and reoxygenation. *J Mol Cell Cardiol* 24, 1393-1398.
10. Iino M., Ozawa S. and Tsuzuki K. (1990) Permeation of calcium through excitatory amino acid receptor channels in cultured rat hippocampal neurones. *J Physiol Lond* 424, 151-165.
11. Peruche B. and Krieglstein J. (1993) Mechanisms of drug actions against neuronal damage caused by ischemia--an overview. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 17, 21-70.
12. Orrenius S. and Nicotera P. (1994) The calcium ion and cell death. *J Neural*

Transm Suppl 43, 1-11.

13. Prasad K. and Kalra J. (1988) Oxygen free radicals and heart failure [published erratum appears in *Angiology* 1988 Oct;39(10):927]. *Angiology* 39, 417-420.
14. Dawson V. L. and Dawson T. M. (1996) Nitric oxide neurotoxicity. *J Chem Neuroanat* 10, 179-190.
15. Siesjo B. K. (1992b) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg* 77, 337-354.
16. Taylor D. L., Edwards A. D. and Mehmet H. (1999) Oxidative metabolism, apoptosis and perinatal brain injury. *Brain Pathol* 9, 93-117.
17. Fuchshofer R., Welge-Lüssen U., and Lu'tjen-Drecoll E. (2003) The effect of TGF-beta 2 on human trabecular meshwork extracellular proteolytic system. *Experimental Eye Research* 77 (2003) 757-765
18. Dunnet S.B. (1990). Neural transplantation in animal models of dementia. *Eur. J. Neurosci.* 2:567-587.
19. Fisher L.J., Gage FH. (1993) Grafting in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* Jul;73(3):583-616
20. Tandon P.N. (1992) Neural transplantation: Promises and problems. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad.* B58:1-16.
21. Gage F.H., Coates P.W., Palmer T.D., Kuhn H.G., Fisher L.J., Suhonen J.O., Peterson D.A., Suhr S.T., Ray J. (1995) Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* Dec 5;92(25):11879-83
22. Weiss S., Dunne C., Hewson J., Wohl C., Wheatley M., Peterson A.C., Reynolds B.A. (1996) Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci.* Dec 1;16(23):7599-609.
23. Shihabuddin L.S., Ray J., Gage F.H. (1997) FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord. *Exp Neurol.* Dec;148(2):577-86.
24. Johansson C.B., Momma S., Clarke D.L., Risling M., Lendahl U., Frisen J. (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central

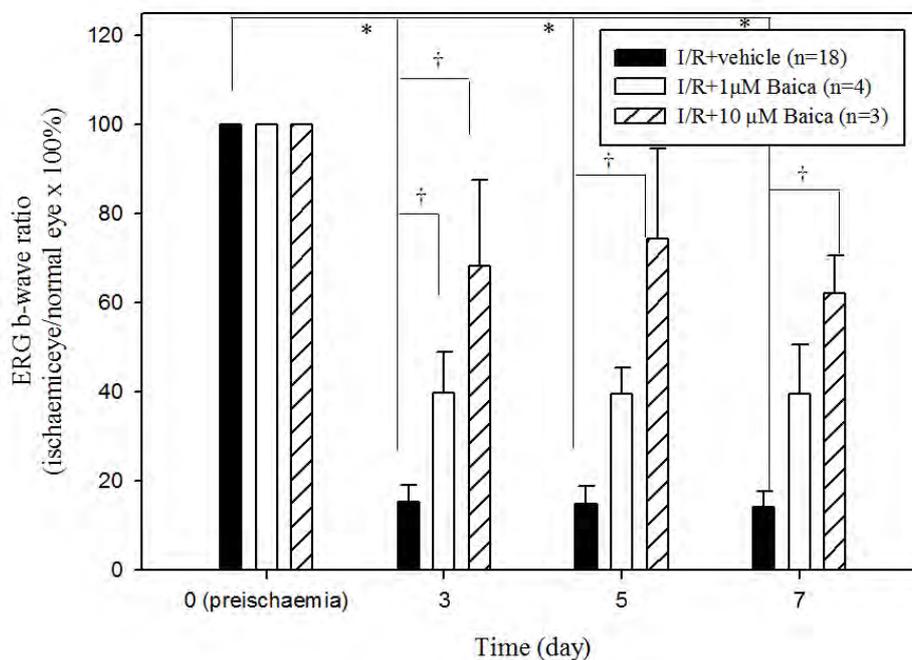
- nervous system. *Cell*. Jan 8;96(1):25-34.
25. Tropepe V., Coles B. L. K.; Chiasson B. J.; Horsford D. J., Elia A. J., McInnes R. R., van der Kooy D (2000). Retinal Stem Cells in the Adult Mammalian Eye. *Science* March 17. 287(5460): 2032-2036.
  26. Palmer TD, Takahashi J, Gage FH. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol. Cell Neurosci*. 1997; 8: 389-404.
  27. Chacko D.M., Das A.V., Zhao X., James J., Bhattacharya S., Ahmad I. Transplantation of ocular stem cells: the role of injury in incorporation and differentiation of grafted cells in the retina. *Vision Res*. 2003 Apr;43(8):937-46.
  28. Petty M. A. and Wettstein J. G. (1999) White matter ischaemia. *Brain Res Brain Res Rev* 31, 58-64.
  29. Osborne N. N., Larsen A. and Barnett N. L. (1995a) Influence of excitatory amino acids and ischemia on rat retinal choline acetyltransferase-containing cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36, 1692-1700.
  30. Safa R. and Osborne N. N. (2000) Retinas from albino rats are more susceptible to ischaemic damage than age-matched pigmented animals. *Brain Res* 862, 36-42.
  31. Chacko DM, Rogers JA, Turner JE, and Ahmad I. (2000) Survival and differentiation of cultured retinal progenitors transplanted in the subretinal space of the rat. *Biochem Biophys Res Commun*. Feb 24;268(3):842-6.
  32. Nishida A, Takahashi M, Tanihara H, Nakano I, Takahashi JB, Mizoguchi A, Ide C, Honda Y. (2000) Incorporation and differentiation of hippocampus-derived neural stem cells transplanted in injured adult rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Dec;41(13):4268-74.
  33. Tomita M, Adachi Y, Yamada H, Takahashi K, Kiuchi K, Oyaizu H, Ikebukuro K, Kaneda H, Matsumura M, Ikehara S. Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina. *Stem Cells*. 2002;20(4):279-83.
  34. Zhao L. R., Duan W. M., Reyes M., Verfaillie C. M., and Low W. C. (2003). Immunohistochemical identification of multipotent adult progenitor cells from human bone marrow after transplantation into the rat brain. *Brain Res Brain Res Protoc*. Mar;11(1):38-45.

35. Zhao L. R., Duan W. M., Reyes M., Keene C. D., Verfaillie C. M., Low W. C. (2002). Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol*. Mar;174(1):11-20.
36. Imaizumi S, Tominaga T, Uenohara H, Yoshimoto T, Suzuki J, Fujita Y: Initiation and propagation of lipid peroxidation in cerebral infarction models. Experimental studies. *Neurol Res*. 1986;8:214-220.
37. Wilhelm J: Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr*. 1990;137:1-53.
38. Hu DN, McCormick SA, Lin J, Ritch R. Comparison of cultured iris and retinal pigment epithelial cells: production and response to growth factors to growth factors and cytokines. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39:S580.
39. Ahmad I, Dooley CM, Thoreson WB, Rogers JA, Afiat S. In vitro analysis of a mammalian retinal progenitor that gives rise to neurons and glia. *Brain Res*. 1999 Jun 12;831(1-2):1-10.
40. Fu YS, Shih YT, Cheng YC, Min MY. Transformation of human umbilical mesenchymal cells into neurons in vitro. *J Biomed Sci*. 2004 Sep-Oct;11(5):652-60.
41. Liu IH, Chen SJ, Ku HH, Kao CL, Tsai FT, Hsu WM, Lo CW, Kuo YH, Kuo CD, Lee CH, Chiou SH. Comparison of the proliferation and differentiation ability between adult rat retinal stem cells and cerebral cortex-derived neural stem cells. *Ophthalmologica*. 2005 May-Jun;219(3):171-6.
42. Chiou SH, Kao CL, Peng CH, et al. A novel in vitro retinal differentiation model by co-culturing adult human bone marrow stem cells with retinal pigmented epithelium cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;326(3):578-85.
43. Ho JD, Tsai RJF, Chen SN, Chen HC. Cytotoxicity of Indocyanine Green on Retinal Pigment Epithelium: Implications for Macular Hole Surgery. *Arch Ophthalmol* 2003;121:1423-1429
44. Block F, Schwarz M. and Sontag K. H. (1992) Retinal ischemia induced by occlusion of both common carotid arteries in rats as demonstrated by electroretinography. *Neurosci Lett* 144, 124-126.

45. LeBel C. P., Ali S. F., McKee M. and Bondy S. C. (1990) Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicol Appl Pharmacol* 104, 17-24.
46. LeBel C. P. and Bondy S. C. (1991) Persistent protein damage despite reduced oxygen radical formation in the aging rat brain. *Int J Dev Neurosci* 9, 139-146.
47. Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid [published erratum appears in *Anal Biochem* 1987 May 15;163(1):279]. *Anal Biochem* 150, 76-85.
48. Tsai T. H., Mathews K., Dalley J. W. (1997) Determination of glutamate in rat brain microdialysates by microbore liquid chromatography with electrochemical detection. *J Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 20(18), 3039-3047.
49. Nash M. S. and Osborne N. N. (1999) Assessment of Thy-1 mRNA levels as an index of retinal ganglion cell damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 1293-1298.
50. Segulier-Lipszyc E, El-Ghoneimi A, Brinon C, Florentin A, Simonneau M, Aigrain Y, Peuchmaur M. (2001) GDNF expression in Wilms tumor. *J Urol.* Jun;165(6 Pt 2):2269-73.
51. Lashbrook BL, Steinle JJ. Beta-adrenergic receptor regulation of pigment epithelial-derived factor expression in rat retina. *Auton Neurosci.* 2005 Jun 13; [Epub ahead of print]
52. **Chao, H. M.** and Osborne, N. N. (2001) Topically applied clonidine protects the rat retina from ischaemia/reperfusion by stimulating  $\alpha_2$ -adrenoceptors and not by an action on imidazoline receptors. *Brain Res*, 904(1): 126-136.
53. **Hsiao-Ming Chao, Yen-Hao Chen,** Jorn-Hon Liu, Shui-Mei Lee, Fenq-Lih Lee, Ying Chang, Pen-Ho Yeh, Wynn H. T. Pan, Chin-Wen Chi, Tsung-Yun Liu, Wing-Yiu Lui, Low-Tone Ho, Cheng-Deng Kuo, D-Ean Lin, Chia-Chin Chan, De-Ming Yang, Anya M.Y. Lin, Fang-Ping Chao (2008). Iron-generated Hydroxyl Radicals Kill Retinal Cells *In Vivo*: Effect of Ferulic Acid. *Hum Exp Toxicol*, 27(4): 327-39.

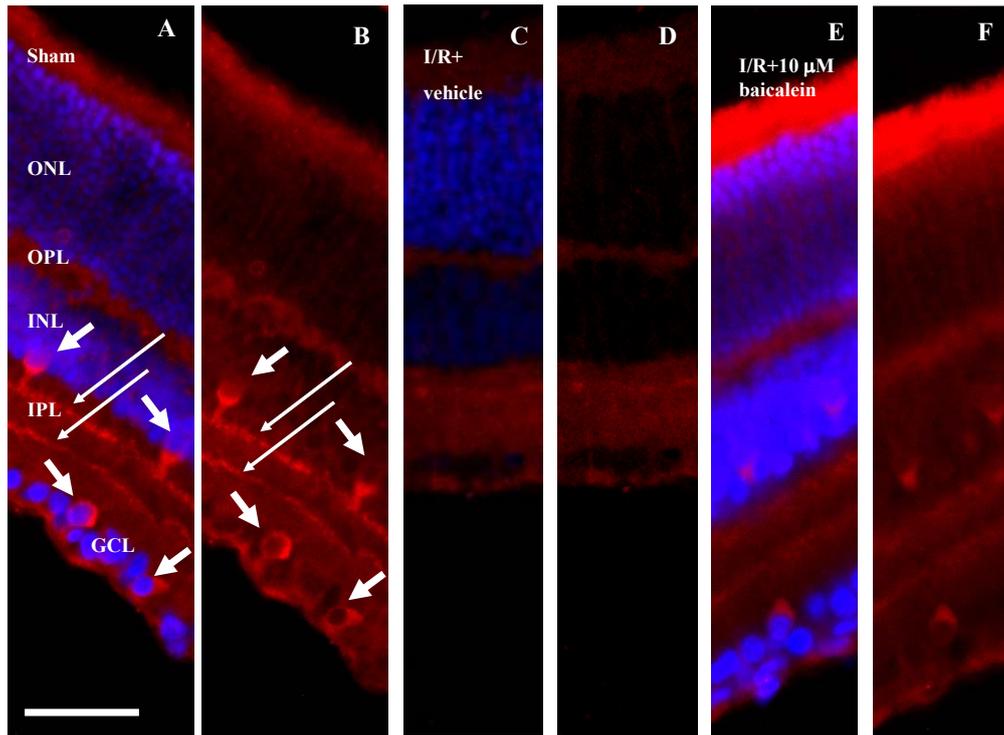
54. **Hsiao-Ming Chao, De-Ean Lin, Ying Chang, Weng-Ming Hsu, Shui-Mei Lee, Fenq-Lih Lee, Chin-Wen Chi, Wynn H. T. Pan, Tsung-Yun Liu, Wing-Yiu Lui, Low-Tone Ho, Cheng-Deng Kuo, Chia-Chin Chan, Fang-Ping Chao (2008).** Ferulic acid, but not tetramethylpyrazine, significantly attenuates retinal ischaemia/reperfusion-induced alterations by acting as a hydroxyl radical scavenger. *J Ocul Pharmacol Ther*, 24(5): 461-72.

## 柒、圖、表



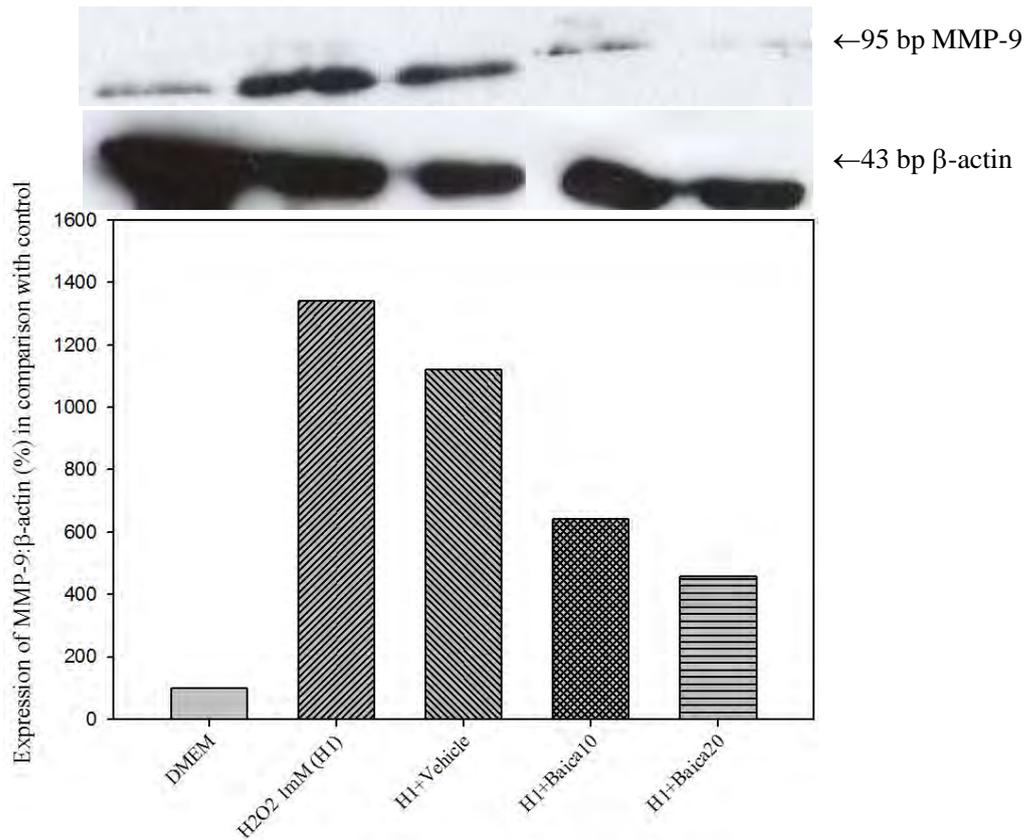
圖一、處理不同濃度黃芩甘元(baicalein)治療組，在給予 60 分鐘缺血處理後再灌流第 3、5、7 天時，電氣網膜生理圖乙型波比率(ERG b-wave ratio)的變化。

與只作缺血處理動物比較：給予溶劑乙醇處理，並不會顯著影響缺血後下降的乙型波振幅；給予 10  $\mu\text{M}$  黃芩甘元處理，顯著緩解因缺血下降之 b-wave ratio；各組結果乃為平均值 $\pm$ 標準誤差，動物數目如圖示。\*代表缺血前(0 天)與後(3、5、7 天)之比較；†代表給予不同濃度黃芩甘元治療處理與不給予治療處理的缺血組之比較，其  $p$  值小於 0.05。



圖二、預處理黃芩甘元(baicalein)治療組，在給予 60 分鐘缺血處理後再灌流第 7 天時，乙醯膽鹼轉化酶 (ChAT; amacrine 細胞標記) 在網膜中的 rhodamine 免疫螢光反應之變化。

B 為偽手術(sham)正常視網膜：amacrine 細胞之神經纖維在內網層 [(inner plexiform layer, IPL)排列成兩個帶狀 (細箭)，IPL 兩側可見細胞本體 (粗箭)]；D 缺血眼給予預處理溶劑乙醇 [(與未給予預處理酒精溶劑之缺血組結果類似，圖未附)]，前述特徵消失；F 為缺血眼預處理 10  $\mu$ M 黃芩甘元，免疫螢光反應似於正常視網膜；縮寫：外核層(outer nuclear layer, ONL)；內核層(inner nuclear layer, INL)；神經節細胞層(ganglion cell layer, GCL)。A、C、E 為 DAPI 與 rhodamine 合併照片；4',6'-diamindino-2-phenylindole (DAPI)用來染核顏色。尺規為 20  $\mu$ m。



圖三、在給予 60 分鐘缺血後再灌流，基質金屬蛋白酶第九型(matrix metalloproteinases, MMP-9)在視網膜中的變化。

相較於 DMEM/ F12 培養液組（控制組），氧化壓力後：給予溶劑乙醇組（與未給溶劑乙醇組結果類似），增加 MMP-9 的表現量；與給予溶劑組比較，給予黃芩甘元(baicalein)能劑量相關緩解增加的 MMP-9 mRNA 表現量；而 DMEM/ F12 培養液組（控制組）MMP-9 表現極低；此代表結果選自各組三隻獨立動物中之一；β-actin 為管家基因(house-keeping gene)。

# 茄科植物中具抗肝炎病毒及幽門螺旋桿菌 天然物之分子機制探討

周昌弘

中國醫藥大學生物多樣性研究中心

## 摘要

### 研究目的：

茄科植物 (Solanaceae) 是目前地球上第三大重要的經濟作物，也是目前最重要的蔬菜作物，提供給人類許多種食物與藥物。目前已知這些植物次代謝物在其他植物物種具有生物活性，包括天然抗氧化、抗菌、抗病毒及抑制病毒繁殖之醫學療效。B 型肝炎病毒感染引起廣泛肝疾病，包括急性、慢性肝炎、肝硬化甚至肝癌。目前已知感染 B 肝病毒引起肝癌比例比未感染正常人高出 100 倍，尤其是在東南亞地區 (包括台灣)，B 肝帶原比例平均達到總人口的 8~15%。目前研發的疫苗對抗肝炎病毒感染的療效還是有限，因此探討有效的對抗並治療肝炎病毒引起的癌症是目前刻不容緩的課題。而 *H. pylori* 群聚於胃黏膜中上容易造成慢性胃炎的發展，經長時間的慢性胃炎而未予治療，胃黏膜的腺體逐漸萎縮，變成萎縮性胃炎，而後者又與胃癌的形成有關。而使用抗生素一向是治療感染症之主要方式，但也因此造成許多抗藥菌株的產生，*H. pylori* 也不例外。

### 研究方法：

本計畫以具 B 型肝炎病毒基因之肝癌細胞株及幽門螺旋桿菌感染之細胞模式評估山煙草，萬桃花，大花曼陀羅與印度茄等茄科植物所含之有效成分對肝癌、B 型肝炎病毒以及治療幽門螺旋桿菌感染及其引發胃癌之療效和細部機轉。再者，本研究在評估抗幽門桿菌天然物方面將有助於減少目前因抗生素使用所引起之抗藥菌株產生之機會，增加抗 *H. pylori* 感染及其所引起胃癌之治療方式。

### 結果與討論：

從本實驗室研究顯示從茄科植物山煙草分離出一系列抗癌抗肝炎病毒天然化合物，進一步分析抗肝炎病毒活性化合物主要為亞麻油酸衍生物。此外，一個類黃素衍生物也被分離並顯示具有抑制 B 型肝炎病毒 DNA 複製及表面抗原基因之表現。另一方面，以萬桃花水抽物、chloroform 抽取物、acetone 抽取物與 methanol 抽取物，以紙錠擴散試驗進行抑制幽門桿菌(包括標準株與臨床抗藥性菌株)的試

驗。萬桃花的 chloroform 抽取物也具抑制 *H. pylori* 生長的功效，並對臨床抗藥菌株也具抑制效果，並可干擾 *H. pylori* 附著於胃上皮細胞，同時萬桃花的 chloroform 抽取物可以抑制胃上皮細胞因 *H. pylori* 感染造成的凋亡，透過抑制 caspase-8 和 Bid 的活化，防止 cytochrome *c* 由粒線體釋出，因此阻斷下游與凋亡相關蛋白如 caspase-9, 與 caspase-3 的活化，進而減緩因感染造成之細胞凋亡現象。因此本抽取物具治療 *H. pylori* 感染之潛力，應進一步探討其細部殺菌機轉與主要殺菌成分。

關鍵詞：山煙草、萬桃花、天然化合物、肝癌、B 型肝炎病毒、抗病毒、幽門螺旋桿菌、胃癌

# **The Molecular Mechanism of Natural Occurring Anti-hepatitis Virus and Anti-*Helicobacter Pylori* Compounds in *Solanaceae* Plants**

Chang-Hung Chou  
Research Center for Biodiversity China Medical University

## **ABSTRACT**

### **Aim:**

The *Solanaceae* plant family is the third important industrial crop on the Earth and is also the most important vegetable crop relevant to human nutrition and health. Recently, many secondary metabolites that revealed biological activities, such as anti-oxidation, bactericide, anti-viral effect, and inhibition of virus propagation have been isolated from other family plants. Hepatitis B virus (HBV) infection causes a wide spectrum of liver diseases, including acute hepatitis, chronic hepatitis, cirrhosis, and eventually the hepatocellular carcinoma (HCC). To date, the relative risk to HBV carriers of developing HCC is more than 100 times compared with uninfected people. Peoples in the South-East Asia including Taiwan have 8~15 % of population are HBV chronic carrier. Despite of the available vaccine for HBV treatment little information of natural products for clinical trial, the effective treatment of HBV infection is available and the study remains elusive and becomes an important medical task. *Helicobacter pylori* infection is associated with an increased risk for development of duodenal ulcer disease, gastric ulcer disease, gastric adenocarcinoma, and gastric lymphoma. However, resistant strains have developed because of antibiotic treatment.

### **Method:**

In this study, the extracts of four Solanaceae plants, *Solanum violaceum*, *Brugmansia suaveolens*, *Solanum elaeagnifolium*, *Solanum torvum*, were all tested for their ability of anti-liver cancer, anti-HBV, and anti-*H. pylori* activity. In

addition, this study would decrease the development of antibiotic-resistant strains and provide a new way to treat *H. pylori* – infection and – induced gastric cancer.

### **Results & Discussion:**

The studies from our laboratory were shown that compounds with anti-tumor and/or anti-hepatitis virus were isolated from *S. erianthum*. Further characterized the bioactive compounds which rendering the anti-HBV activity is major in linolenic acid derivatives. In addition, one of flavone derivatives was also isolated and shown the inhibition effect on HBV viral replication and surface gene expression. On the other hand, the water, acetone (ST-A), chloroform (ST-C) and methanol (ST-M) extracts of *S. toruvm* (ST) were tested to against *H. pylori*. All of ST extracts were able to inhibit the growth of *H. pylori* and showed better activities against antibiotic strains than the reference strain. Among them, ST-C possessed the strongest ability in inhibiting *H. pylori* growth. Association assay was performed by the ST-C showing that ST-C was able to interrupt the association of bacteria to host cells. Furthermore, *H. pylori* induced apoptosis could also be efficiently suppressed by the ST-C. It could interfere with the interaction between bacteria and host cells and also target *H. pylori* induced gastric injury by suppressing the apoptosis. Therefore, ST-C may offer a new approach for the treatment of *H. pylori*. Further studies on the elucidation the molecular mechanisms of the growth inhibition on *H. pylori* by ST-C and to identify active compounds in the plants are in progress.

Keywords: *Solanum erianthum*, *Solanum violaceum*, natural compound, hepatocellular carcinoma, hepatitis B virus, anti-viral effect, *Helicobacter pylori*, gastric cancer

## 壹、前言

因應世界經濟快速發展，人們的生活條件逐漸改善，加上醫藥的普及化，許多疾病都得以受到控制。然而在全球人口趨向老化及環境變遷的雙重影響下，現代人除期望壽命延長外，也漸漸重視生命品質。以行政院衛生署所發佈去年台灣地區的死亡率而言，惡性腫瘤一直位居十大死亡榜首。單就去年衛生署所公佈之國人惡性腫瘤死亡人口數就有三萬七千多人，遠高於第二位因罹患腦血管疾病的死亡人口數。由此可知，腫瘤所引起的死亡已嚴重危害到國人健康，甚至影響經濟上的耗損。在治療上，醫學技術突飛猛進，除了以外科手術切除癌細胞腫瘤外，也並用放射線與化學療法。由於癌症中，細胞增殖及設定性細胞凋亡的平衡受到干擾，而使得本身具有基因異常細胞持續增殖並逃過自身免疫系統的偵測清除。很多毒殺性跟荷爾蒙的治療，如放射線，藉由設定計畫性細胞凋亡方式特異性的毒殺癌細胞使其造成不可逆的損害。總言之，籠罩在談癌色變的此刻，開發新治癌用藥是刻不容緩的。

中醫藥治療疾病經歷數千年不衰並且日漸被歐美學者所重視，我國中醫藥學專著可溯及漢代「神農本草經」及至明清「本草綱目」，資料相當豐富，台灣民間使用的中藥也相當多。台灣民間用藥有植物藥、動物藥及礦物藥，其中植物性藥材佔絕大多數，約有 160 種之多。雖然這些具藥效的植物強調在天然物的萃取、純化及鑑定，但其欠缺有系統的研究，以致在基源及藥效使用上有混淆不清之慮。國際上，在生物多樣性的研究相當熱絡，但針對中草藥的生物多樣性闕如。所謂「生物多樣性」即涵蓋基因多樣性、物種多樣性及生態系多樣性，我們知道某種植物在不同地區所採得其藥性會有不同，這是因為棲地水土不同的影響，也就是不同生態環境所蘊含不同天然物成分，久而久之，不同地區的植物雖屬同種卻有不同藥效，這還有待跨領域及有系統的研究。

另一方面在藥物開發的觀點，不論由完全化學合成或利用天然界所蘊藏的天然物資源直接藥用或進行修飾以改善活性之方式，科學家們已行之有年，也有相當好的成果。例如美國國家癌症中心(National Cancer Institute)主導的計畫於 *Taxus brevifolia* 發現紫杉醇(Taxol)，由此並已用於臨床之乳癌與卵巢癌之治療，即是天然藥物的最佳的印證(31)，其對於相關藥物開發具有舉足輕重的重要地位。而在最近一、二十年來的新藥開發當中所分析的資料，更是顯示多元化天然物結構確實影響多種藥物的研發，可見天然物

所具有之探索開發潛力。

原發性肝癌(*Hepatocellular carcinoma*)是我國和亞非地區常見的癌症，患病率為歐美的 5~10 倍，其死亡率幾乎為 100%。以台灣為例，它占男性惡性腫瘤中死亡原因的第一位和女性惡性腫瘤死亡原因的第三位。一般發現後，即使經過外科手術、化學或放射治療，平均壽命亦不超過一年。因此了解肝癌的成因及發展新的診斷和治療方法是急迫需要的。根據流行病學的統計，世界各地 B 型肝炎病毒(*hepatitis B virus, HBV*)的高感染區都有較高的肝癌病例，例如台灣、中國大陸、東南亞和南非等地。若進一步以台灣為例，肝癌病例中百分之九十以上都是 B 型肝炎的帶原者，而非帶原者得到肝癌的機會僅為帶原者的百分之一(7, 8)，這顯示 B 型肝炎病毒感染和肝癌病變之間有密切的關係，而且產生的慢性 B 肝帶原也是世界上健康的隱憂，估計全世界因感染 B 型肝炎而成為 B 肝帶原者約有 4 億人，約佔世界總人口數的 5%，這是一個不能抹殺的潛在問題。B 型肝炎病毒感染導致廣泛的肝臟疾病一直是在台灣急待解決的公共衛生問題，雖然歷經諸多研究先驅包括宋瑞樓、陳定信、許金川及陳培哲等學者的努力，對於降低台灣原本居高不下的 B 型肝炎帶原率有所貢獻，但直至目前 B 肝感染衍生的肝臟疾病治癒率普遍還是很低。以往認為 B 型肝炎病毒感染導致的肝癌只是肝細胞本身諸多調控機制病變轉型成為癌細胞，如今學者認為 B 肝病毒本身所帶有的基因本身及其表現的蛋白質是扮演重要的「致癌因子」(2, 17, 36-39, 43, 48)，雖然感染肝炎和變成肝癌之間，相隔了二十至四十年，它們二者之間的因果關係並不十分清楚，但 B 肝病毒感染引發肝癌高罹患率卻是不爭的事實。因此如何有效抑制病毒的複製及表現蛋白質影響所感染肝細胞的正常運作是目前治療 B 肝的主要目標。臨床上用來治療的藥物目前都以干擾素(*interferon α2a*) (78)及核酸類似物 (*lamivudine* 拉美芙錠，又稱為肝安能) (32, 65)為主，但成效還是有限，大約只有 20~30%抑制效用，甚至產生抗藥性，因此有效的肝炎病毒疫苗研發是目前刻不容緩的趨勢。研究 B 型肝炎病毒能否引起肝癌的進展很慢，部分的原因在於 B 型肝炎病毒缺乏在動物體外培養的模式。這種病毒只會感染人和黑猩猩，不會感染其他實驗室常用的小動物或培養的細胞，因此無法有系統地來研究病毒感染的途徑、在細胞內的複製與基因表現及長期在體內對肝臟所造成的影響。所以我們對這個病毒之生物特性了解得很少。

B 型肝炎病毒於 1965 年首先被發現於澳洲人血清當中，因其血清當中會表現一種表面抗原蛋白(*surface antigen*)，所以又稱為澳洲抗原(*Australia*

antigen) (9)，之後被證實為肝炎病毒表面蛋白(HBsAg)，在 1970 年，Dane 等人分離出此病毒顆粒，所以 B 型肝炎病毒又稱為 Dane particle(23)，自此開始了 B 型肝炎病毒的流行病學分析與研究。B 型肝炎病毒為 DNA 病毒，其 genome 為部分雙股 DNA (partial double strand DNA)構造，並且已知是哺乳類病毒 genome 當中最小的 (約 3.2 kb)，研究也顯示此病毒只會感染肝細胞，跟此病毒同類的還有 woodchuck hepatitis virus (WHV) (99)、duck hepatitis B virus (DHBV) (64)以及 ground squirrel hepatitis virus (GSHV) (63)。近來分析表面抗原蛋白(HBsAg)變異可將 B 肝病毒分成九種血清型 (serotype, d/y 以及 w/r) (21, 54)，而從其病毒基因層面分析又可分成 8 種基因型(genotype, A-H) (1, 73, 77, 98)，至於血清型跟基因型之間的關係與對應目前並不是很清楚。B 肝病毒 genome 含有 4 個 open reading frames (ORF)，其轉錄產物(RNA)包括：3.5kb precore/pregenome RNA、2.4kb preS1 表面抗原 RNA、2.1kb S 表面抗原 RNA 以及 X RNA 等四種，分別表現病毒七種蛋白，包括「三種表面蛋白」、「核蛋白」、「核蛋白衍生物-e 蛋白」、「病毒聚合酶」、以及「X 蛋白」，目前已知這些病毒基因的轉錄起始位置含有許多細胞基因轉錄因子(transcription factor)的結合位(binding site) (33, 80, 87, 93)，可以調控病毒基因的表現。

近年來肝病藥物的研發有逐漸朝中草藥方向發展的趨勢，也因為中草藥所蘊含豐富的天然物，例如韓國珍珠草(*Phyllanthus urinaria* L.)已發現其萃取物成分對肝癌腫瘤有較好的抑制作用，甚至可以抗 B 型肝炎病毒(14, 42, 60, 104)，因此為中草藥應用在病毒性肝炎及肝癌的最佳例證。目前除了珍珠草，最近一些學者也試著從其他中草藥當中找出對抗肝炎病毒的有效成分，像是周正仁等人從風藤(*Piper kadsura*)分離出七種天然化合物對抗 B 型肝炎病毒的研究(41)，以及韓國 Kim 等人從訶梨勒(*Terminalia chebula* Retz.)、地榆(*Sanguisorba officinalis* L.)、覆盆子(*Rubus coreanus* Miq.)和大黃(*Rheum palmatum* L.)萃取天然物成分分析抗 B 型肝炎病毒的效果(49)，除此之外，很少有文獻探討中草藥成分對肝炎病毒的研究。

中草藥蘊含豐富的資源，藥理成分活性分布極廣，也是眾多研究者作為新藥研發的主流之一。其中茄科植物的發展更是受到注目，不僅因茄科作物(Solanaceae)是目前地球上第三大重要的經濟作物，也是目前最重要的蔬菜作物，提供給人類許多種食物和藥物。此科中的作物包括塊根馬鈴薯，果實蔬菜 (番茄、茄子、辣椒、酸醬番茄...等等)，食用葉菜類(*Solanum aethiopicum*, *S. macrocarpon*)及藥用植物類 (如曼陀羅屬, *Datura*, 青椒屬,

*Capsicum*) 等，甚至其類緣植物等。茄科植物一向被視為地球上重要的水果及蔬菜的來源，也是人類維生素、纖維、碳水化合物、及各種植物成分的供應源。以台灣而言，茄科植物約有 11 屬，共 30 種，其中已有相當多的文獻探討了曼陀羅屬，枸杞屬與番茄屬等(6, 12, 13, 18, 27, 35, 46, 47, 55, 56, 58, 70, 81, 84, 85, 90, 94, 95, 107, 109)。而在茄科植物中，也蘊藏豐富多種的化學成分，如生物鹼，多酚類與固醇類等(3, 12, 27, 29, 46, 47, 55, 81)。文獻中已報導在茄科植物的成分有抗菌、抗氧化，抗潰瘍或抗癌等活性(3, 12, 27, 29, 46, 55, 81)。

Alkaloid 為植物界廣泛存在的二次代謝產物(28, 57, 91)，具有強大的生理活性，亦為植物中毒的主要成分之一，中毒時會產生口乾、潮熱、幻覺、譫語、昏迷等現象。茄科植物一般都含有不同量的 alkaloid，對人類具有一定的毒性，根據其 alkaloid 含量的多少，有的品種可以作為食物，有的品種可以作為藥物。其中最重要的品種有馬鈴薯、茄子、番茄、辣椒、枸杞、等，此外如矮牽牛、曼陀羅都是著名的花卉；顛茄、曼陀羅也是提煉藥物的原料；煙草更是全世界的消費品。Glycoalkaloid 已經證實具抗癌之功效，苦茄(*Solanum dulcamara*)所含的 glycoalkaloid  $\beta$ -solamarine 於小鼠實驗中可以抑制 sarcoma tumors 的形成(52)；鬼白(*Solanum sodomaeum*)中的 solamargine 及 solasonine 可以有效治療 malignant human skin tumors，包括 basal 與 squamous cell carcinomas (19)；龍葵(*Solanum nigrum*)中的 solamargine 具毒殺 human solid tumor cell lines 的能力(40)；黃水茄(*Solanum incanum*)的新鮮葉片萃取物中含 solamargine，對 human heptoma cells (Hep3B) 經 apoptosis 途徑造成 anticarcinogenic action (51)。

Flavonoid 是植物中常見的二次代謝產物，是水溶性的營養素，也是植物化學物質界的大宗，全世界已有 4000 多種的 flavonoid 被分離出來並在結構上被確認(75)。這些 flavonoid 包括檸檬黃素、檸檬素(citrin)、芸香素(rutin)、黃酮類(flavones)、黃烷醇(flavonols)、兒茶素(catechin)、茶黃質(theaflavins)、茶紅質、槲皮素(quercetin)等。Flavonoid 是植物的天然色素，也是保護植物免於受到自由基傷害的天然抗氧化劑，flavonoid 種類非常多，因此廣泛存在於柑橘類、莓類(漿果類)、綠花菜、芹菜、黃豆、穀類、蕃茄、瓜類、薯類、茶等蔬果中。Flavonoid 在植物的代謝上扮演重要的腳色，它是一種相對沒有毒性的生物活性物質(non-toxic bio-active substances)。Flavonoid 已經證實可以抑制 cyclooxygenase，lipoxygenase，microsomal monooxygenase，glutathione S-transferase，mitochondrial

succinoxidase 及 NADH oxidase 這跟活性氧物質(reaction oxygen species, ROS)的形成有關(67, 68, 75, 88)，因此，flavonoid 為一種抗氧化劑具消除自由基的功能，更可抑制低密度脂蛋白(low-density lipoproteins)的氧化及減低血栓的形成的可能性(83)。但 flavonoid 的抗菌能力，在近年受到矚目(22, 83)。例如蜂膠，蜂膠中可分離的成分超過 46 種，最多的是 flavonoid，其中 galangin 為最主要的有效成分，不僅抗菌，galangin 亦可抗病毒及黴菌，而其主要作用機轉為破壞細菌細胞壁的完整性，使得細胞產生 osmotic lysis (22)。

Terpenoids 與植物散發的氣味相關。Terpenoids 提供了桉樹(eucalyptus)的氣味，肉桂、丁香和薑的味道，也和黃色花的顏色有關。在檸檬醛(citra)、薄荷(menthol)及大麻類植物中(Cannabis plant)的 cannabinoids 是研究較多的 terpenoids。Terpenoids 包括樟腦(camphor)，胡蘿蔔素( $\beta$ -carotene)，及毛地黃苷 (digitalin)而他們在傳統草本中也具抗菌(antibacterial)，防腫瘤(antineoplastic)及其他療效(30, 97, 106)。如甜椒(*Capsicum annum L*)中所含之 capsinosides 具抗 *Helicobacter pylori* 與抗氧化的功能(24)。

由於茄類植物富含之 alkaloid, terpenoid 與 flavonoid 等相關代謝物質，具抗菌及抗癌之效能，因此，茄類植物之萃取物極可能對治療 *H. pylori* 感染及其所造成之胃癌有其效益。本研究室已測試山煙草、印度茄、萬桃花以及大花曼陀羅等茄科植物萃取物之抗菌能力，我們將不同量 (2mg, 1mg, 0.5mg 及 0.25mg) 的茄科植物水抽物滴在濾紙上，置於塗滿  $10^6$  胃幽門螺旋桿菌的培養盤中，48 小時後測量抑菌圈，其中萬桃花水抽物具最佳之抑菌能力，在 0.5mg 即會產生 13mm 的抑菌圈，而山煙草則須 2mg 才能產生同樣大小的抑菌圈。但印度茄與大花曼陀羅即使到 2mg 仍未產生抑菌圈。我們也測試這四種水抽物對大腸桿菌(病原菌)，金黃色葡萄球菌(病原菌)與乳酸菌(益生菌)之抑菌作用，至 2mg 仍未見抑菌圈。因此萬桃花與山煙草對胃幽門螺旋桿菌有特異的抑菌作用。我們也測試萬桃花的有機萃取物 D1, D2 與 G3，其中 D2 fraction 到 62.5 $\mu$ g 仍有抑菌能力。山煙草的有機萃取物中，SE7, SE8, SE9, SE10, SE11, SE12, SE14 在 50 $\mu$ g 均有抑菌能力。印度茄的有機萃取物中只有 SVEA11-7 在 50 $\mu$ g 有抑菌能力。我們也以不同量(5 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 500 $\mu$ g/ml)的萬桃花水抽物與胃幽門螺旋桿菌、胃癌細胞共同培養 6 個小時，檢測 AGS 細胞存活率與胃幽門螺旋桿菌與胃癌細胞結合能力，發現 5 $\mu$ g/ml 與 50 $\mu$ g/ml 的萬桃花可以降低胃幽門螺旋桿菌與胃癌細胞結合能力。使用抗生素一向是治療感染症之主要方式，但也因此造

成許多抗藥菌株的產生，胃幽門螺旋桿菌也不例外。再者，目前用來治療胃幽門螺旋桿菌感染的抗生素，常常造成治療中，病患因腸道益生菌菌相改變而引起腹瀉的狀況。為解決使用抗生素造成的問題，於中草藥中篩選僅針對胃幽門螺旋桿菌之抗菌成分，應可緩解抗藥菌株的產生，並增加治療胃幽門螺旋桿菌感染之機會。

根據行政院衛生署 20 年來的統計，癌症已超過腦血管疾病，居十大死亡原因的第一位；其中胃癌僅次於肺癌、肝癌及結直腸癌居第四位。以全世界而言，日本胃癌的死亡率居第一位，其次為智利等中南美洲及東歐國家。胃癌的好發年齡以 50~70 歲佔大多數，男性比女性來得多。然而近年發現年紀在 40 歲以下者亦不在少數，尤其是年輕的女性。據統計，低收入階層者患胃癌的比率要比高收入者為高。而 *H. pylori* 的感染也經證實與胃癌的形成有密切的關係。

*H. pylori* 群聚於胃黏膜中上容易造成慢性胃炎的發展，經長時間的慢性胃炎而未予治療，胃黏膜的腺體逐漸萎縮，變成萎縮性胃炎，而後者又與胃癌的形成有關 (34)。*H. pylori* 引起胃部發炎及胃癌的原因主要為 oxidative stress 及 gastric cell proliferation (66)。*H. pylori* 的感染可能引起 oxidative stress 的原因如下：細菌本身分泌之 superoxide (72)，細菌引起胃上皮細胞分泌 reactive oxygen species (5, 102)，以及細菌感染合併之抗氧化劑(如維生素 C)的下降(15)。而 *H. pylori* 的感染引起 gastric cell proliferation 的原因大都經由 post-translational mechanisms (53)。

Proinflammatory cytokines 如 interleukin-8 (IL-8)，tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (100)，及 IL-6 (61) 在胃黏膜受 *H. pylori* 感染時表現量增多也與病程相關。慢性發炎反應造成之 oxidative stress，以及由 leukocytes 和其他 phagocytic cells 產生之 ROS，可造成增生細胞之突變累積之危險(66)。發炎反應引發組織細胞產生氧化物(oxidants)，包括 leukocytes - 釋放 ROS 及 reactive nitrogen species；cytokines - 如 TNF- $\alpha$  可增加 reactive species 的產生，而 *H. pylori* 的感染亦可以活化 lymphocytes 產生氧化物。在臨床病例中，感染患者的胃黏膜 ROS 堆積的程度，與細胞中氧化造成的 DNA 損傷 (oxidative DNA damage) 成正比(26)。在體外實驗中，感染引起之 oxidative stress 造成蛋白質體的改變 (proteome changes)，引發細胞增生、癌化 (carcinogenesis)，影響細胞支架功能 (cytoskeletal function)，及細胞防禦機制 (cellular defense mechanisms) 的啟動(4)。AP endonuclease-1 (APE-1) 是一個與 DNA 修復相關的蛋白 (base excision repair of oxidative DNA damage)，當胃上

皮細胞遭受oxidative stress或受*H. pylori*感染時，其表現量會增加，此蛋白於*H. pylori*感染時，對胃上皮細胞引發的訊息傳遞有重要的影響(25)。而組織細胞於oxidative stress或細菌感染時，為保護自身免於ROS的攻擊，細胞會產生抗氧化物，包括superoxide dismutase (SOD)，catalase，及glutathione peroxidase，而*H. pylori*也會表現抗氧化物以對抗因侵入胃上皮細胞後所遭遇之氧化物攻擊(79)。而受*H. pylori*感染的胃上皮細胞因增加抗氧化劑的表現而減低ROS造成的傷害，同時*H. pylori*本身在感染細胞後，亦會表現抗氧化酵素，因此減低胃上皮細胞因細菌感染造成的氧化傷害。但因為ROS仍然會造成細胞的DNA損傷，受*H. pylori*感染的胃上皮細胞的8-hydroxyguanine (8-OH-dG) –氧化傷害的指標蛋白(an oxidative damage marker in the DNA of gastric mucosal cells) –的表現量仍高(96)，因此受*H. pylori*感染的胃上皮細胞雖受到氧化攻擊的程度較小但DNA的損傷仍在，可能造成受感染胃細胞癌化的機率。

慢性的炎症反應(chronic inflammation)通常會加速細胞凋亡(apoptosis)的速度(103)，但也因此加速了周圍組織的增生速度 – a compensatory proliferate response (76)。細胞增生與凋亡的動態平衡對維持正常胃黏膜的平衡(mucosal homeostasis)是必要的。反之，減少細胞凋亡及增強細胞增生均可造成癌化的形成。*H. pylori* 的感染具有造成細胞增生與抑制細胞凋亡的能力(71)。一個可以調控與細胞週期(cell cycle)相關基因轉錄的蛋白(transcriptional regulatory)，c-fos，在受*H. pylori*感染的胃黏膜中表現量較於正常的胃黏膜或癌前期病變(precancerous lesions)高(108)。而cyclooxygenase 2 (COX-2)是一種促進前列腺素(prostaglandin; PGE)分泌的蛋白，PGE可以保護胃黏膜避免細胞凋亡的發生，因此也可以促進細胞的增生。COX-2在胃發炎(gastric inflammation)及潰瘍癒合(ulcer healing)時在細胞中大量表現，在*H. pylori*感染的胃黏膜中表現量也較高(20, 101)。與 c-fos 不同的是COX-2在癌前期病變、*H. pylori*引起的胃炎、萎縮性胃炎(atrophic gastritis)、腸化生(intestinal metaplasia)，及胃癌(gastric cancer)組織中均有高量的表現。因此，COX-2的大量表現可能與早期胃癌化相關。增長異常細胞的存活率，促使突變基因的堆積，會導腫瘤的形成(tumor promotion)(71, 89)，*H. pylori* 的感染會造成胃上皮細胞受ROS攻擊而使上皮細胞之DNA遭受損傷，但因上皮細胞受*H. pylori*感染而造成增生現象，使得DNA異常之上皮細胞數目增多，可能因此導致腫瘤的形成。

*H. pylori*的感染造成胃部炎症反應並進而增加胃部組織癌化的機率，但

炎症反應的發生必須在細菌群落在胃部組織後才能發生。胃部的黏膜層是為保護胃部組織免於受到酸性及水解酵素的環境破壞。在胃中，有兩種主要的黏膜素(mucins)，MUC5AC – 由上皮細胞分泌及 MUC6 – 由腺體分泌(11, 59, 105)。而MUC5AC及MUC6在受*H. pylori*感染的細胞中表現量均下降(11, 105)，而因此*H. pylori*的感染可能藉此造成胃黏膜層之損傷。Decay-accelerating factor (DAF)是一個表現在細胞膜上的蛋白，是病原菌如*Escherichia coli*，coxsackieviruses，echoviruses，及enteroviruses的細胞受器(cellular receptor)，而在感染 *H. pylori* 的胃部組織其表現量亦較正常組織為高(74)；DAF也是一個可以保護上皮細胞免於補體攻擊而崩解(complement-mediated lysis)的蛋白。因此，*H. pylori*感染造成的DAF表現量增多與細菌群落及所引發之炎症反應的嚴重程度極為相關。

除胃上皮細胞的一連串蛋白表現的結果造成感染細胞的病變之外，*H. pylori* 表現的某些特定蛋白與其後引起的病變亦相關聯，如 urease、cytotoxin、flagella、CagA、Hsps，及黏附因子(adherence factors；與細菌附著群聚在胃黏膜及逃避寄主免疫反應並造成病變相關)(66)。黏附因子中的 BabA (blood group antigen-binding adhesin)會與胃上皮細胞上的 fucosylated Lewis b (Le<sup>b</sup>) blood group antigen 相互結合(10, 45, 69)，此與細菌的 site-specific colonization 及致病性相關(53)。而另一個黏附因子 SabA (sialyl acid-binding adhesin)可與 sialylated Le<sup>x</sup> antigen 結合，此結合可以增強 BabA 與 Le<sup>b</sup> 的鍵結，進而增加細菌群聚的能力(62, 92)。此舉增加了細菌入侵細胞的機會，可避免免疫反應的攻擊，並可加速細菌將毒力因子如 CagA 與 VacA 送入細胞的機會(34)。

此計畫著重於山煙草以及萬桃花等已採集之茄科植物所含的天然化合物進行抗 B 型肝炎病毒以及抗幽門螺旋桿菌感染以及其引發胃癌之藥理機制的探討，配合各子計畫，將具有抗肝炎病毒之活性成分進一步分析分離與鑑定，再利用分子生物方面技術探討這些茄科植物萃取成分生物活性之藥理機轉，此外，針對抗幽門桿菌之研究，將有助於減少目前因抗生素使用所引起之抗藥菌株產生之風險，並增加抗 *H. pylori* 感染及其所引起胃癌之預防治療方式。

## 貳、材料與方法

本計畫從山煙草、萬桃花茄科植物全草水或甲醇萃取物測試以 HuH7、HepG2.2.15 肝癌細胞株或是以 AGS 胃癌細胞株培養為模式，探討這些物種天然萃取物對肝癌及胃癌細胞的生長抑制、抑制其 B 型肝炎病毒的複製及繁殖以及抑制幽門桿菌或其感染胃癌細胞之活性，然後進一步分析所含抗肝炎病毒、幽門桿菌等天然物其作用分子機制。

### 一、植物採集

本次實驗所使用的山煙草(*Solanum elaeagnifolium*)在台中都會公園旁農耕地、以及在雲林梅林社區梅南橋右岸採集。萬桃花(*Solanum torvum*)在霧峰中投公路下、以及在雲林湖山水庫採集。

### 二、植物天然物之萃取方法

#### (一) 水萃物之製備

所採集之山煙草及萬桃花等枝葉經約1~2個星期自然陰乾後，以絞碎機將陰乾葉子絞碎成葉粉，秤取100 g乾重溶於1500 mL 二次水加熱煎煮3小時，接著將煎煮後之水萃液以冷凍乾燥法濃縮成粉末狀，此水萃物經由滅菌二次水回溶成400 mg/ml濃度標準液，再以0.45 $\mu$ m針筒型過濾膜過濾，經由二次水稀釋製備成不同稀釋濃度之水萃物，以提供細胞毒性測試。

#### (二) 甲醇粗萃物之製備

本萃取方法由本校生物多樣性研究中心周昌弘講座教授實驗室碩士研究助理徐小嫻、林恩宏、黃春惠及生態暨演化生物學研究所周聖杰助理教授負責天然物分離及分析。天然物萃取方法如下：

##### 第一部分：

山煙草(*Solanum elaeagnifolium*)絞碎葉子乾重1.6 kg，以甲醇(MeOH)在室溫下浸泡三次萃取，所取得之萃取液經由減壓濃縮機濃縮後，經由 *n*-Hexane : MeOH : H<sub>2</sub>O = 4 : 3 : 1 去除*n*-Hexane層後，減壓濃縮後再與H<sub>2</sub>O : EtOAc (EA)= 1 : 1進行液液分配，取得EA層62 g經由*n*-Hexane : EA (20 : 1)以梯度進行沖提，得到1到18個fractions (SEL1 ~ 18)，其中以抗病毒活性測試取向取得SEL9再經由column以*n*-Hexane : Acetone梯度連續沖提純化，最後得到純化合物編號為SEL9394經Sephadex LH-20所得之SEL93944進一步

以HPLC純化得到一個化合物，另外，取SEL936沖提分液層經一系列存化步驟並以Sephadex LH-20得到3個fractions將第三個fraction經由open column以*n*-Hexane：Acetone梯度沖提取得第6個fractions（萃取過程參照圖一Part 1），最後所分離之純化合物編號SEL9363625經濃縮成粉狀物，所純化後之化合物以DMSO回溶配成8 mg/ml之測試標準液，再進一步稀釋成不同濃度之稀釋液以提供癌細胞毒殺性及抗B行肝炎病毒活性測試。

第二部分：

2008年11月採集自臺中縣之山煙草(*Solanum erianthum*)葉部(SEL)，經自然蔭乾，得乾重4.5公斤，經磨粉後以二氯甲烷：丙酮：甲醇(1:1:1)於室溫浸泡一星期後過濾，植物材料再以相同比例溶劑浸泡，重複三次，濾液收集合併減壓濃縮至乾得萃取物579.73 g。萃取物再以乙酸乙酯：水（各1公升，1:1）進行液-液分配後，合併三次乙酸乙酯層，減壓濃縮得180.98 g。水層部分繼續以正丁醇進行液-液分配三次，減壓濃縮得180.00 g。

乙酸乙酯層等分成兩部分，用矽膠管柱層析進行初步分離，以正己烷：丙酮進行沖提，逐漸增加丙酮之比例至100 %；再增加甲醇比例至100 %得到19個fractions（命名為SEL 1至SEL 19）（如圖一 Part2萃取流程部分）。另一部分以相同條件進行初步分離得到17個fracion（SEL A至SEL Q，萃取流程同圖一Part2部分）。SEL 17 (4.222 g)以矽膠管柱層析進行分離，以正己烷：丙酮(30 %)進行沖提，逐漸增加丙酮之比例至100 %得到7個fractions（SEL 17-1至SEL 17-10），SEL 17-7 (449 mg)再以Sephadex LH-20 [二氯甲烷：甲醇(2:1)]進行純化，得到5個fractions（SEL 17-7-1至SEL 17-7-5），其中SEL 17-7-4 (148 mg)以正己烷：丙酮（80 %至100 %）進行純化，得到6個fractions（SEL 17-7-4-1至SEL 17-7-4-6），其中SEL 17-7-4-2 (7 mg)為純化合物，經一維與二維核磁共振光譜與旋光度 ( $[\alpha]_D^{20} c 0.25 \text{ CH}_2\text{Cl}_2$ ) 測定並與文獻比對後為13*R*-hydroxy-9(*Z*),11(*E*)-octadecadienoic acid。SEL 17-8 (355 mg)再以Sephadex LH-20 [二氯甲烷：甲醇(2:1)]進行純化，得到3個fractions（SEL 17-8-1至SEL 17-8-3），其中SEL 17-8-3 (214 mg)再經矽膠管柱層析進行純化，以正己烷：丙酮(80 %至100 %)沖提，得到5個fractions（SEL 17-8-3-1至SEL 17-8-3-5）。SEL 17-8-3-5 (26

mg)以正相高效液相層析(normal phase HPLC)進行純化，溶劑系統[己烷(15%異丙醇)]，得到純物質SEL 17-8-3-5-1 (16 mg)，經一維與二維核磁共振光譜與旋光度( $[\alpha]_D^{25} 0.471 c 0.85 \text{ CH}_2\text{Cl}_2$ )測定並與文獻比對後為9*S*-hydroxy-10(*E*),12(*Z*),15(*Z*)-octadecatrienoic acid。SEL 17-9 (763 mg)經Sephadex LH-20 [二氯甲烷：甲醇(2:1)]進行純化，得到2個fractions(SEL 17-9-1及SEL 17-9-2)，SEL 17-9-2 (348 mg)再經正己烷：丙酮(80%至100%)沖提，得到4個fractions(SEL 17-9-2-1至SEL 17-9-2-4)。其中SEL 17-9-2-3 (320 mg)再經Sephadex LH-20 [二氯甲烷：甲醇(2:1)]與正己烷：丙酮(80%至100%)沖提得到SEL 17-9-2-3-1至SEL 17-9-2-3-3三個fractions，其中SEL 17-9-2-3-2 (172 mg)再經Sephadex LH-20 [二氯甲烷：甲醇(2:1)]純化得到SEL 17-9-2-3-2-1與SEL 17-9-2-3-2-2。SEL 17-9-2-3-2-2 (80 mg)再經正己烷：丙酮(85%至100%)沖提，得到2個fractions(SEL 17-9-2-3-2-2-1及SEL 17-9-2-3-2-2-2)。SEL 17-9-2-3-2-2-2 (69 mg)再以正相高效液相層析進行純化，溶劑系統[正己烷(20%異丙醇)]，得到SEL 17-9-2-3-2-2-2-1至SEL 17-9-2-3-2-2-2-5，SEL 17-9-2-3-2-2-2-5 (15 mg)經一維與二維核磁共振光譜測定後鑑定為loliolide。SEL 10 (3.391 g)以矽膠管柱層析進行分離，以正己烷，逐漸增加丙酮比例至100%沖提，最後以丙酮：甲醇(3:1)沖提得到9個fractions(SEL 10-1至SEL 10-9)，其中SEL 10-3 (2.5 g)再以矽膠管柱層析進行分離，首先以正己烷，接著逐漸增加丙酮比例至100%沖提，最後以丙酮：甲醇(3:1)沖提得到4個fractions(SEL10-3-1至SEL10-3-4)，其中SEL10-3-2 (1.911 g)以矽膠管柱層析進行純化，溶劑系統[正己烷：二氯甲烷：甲醇(8:8:1)至(5:5:1)]得到4個fractions(SEL10-3-2-1至SEL10-3-2-4)，其中SEL10-3-2-2 (1 g)以矽膠管柱層析進行純化，以正己烷逐漸增加氯仿的比例，最後以氯仿：甲醇(3:1)沖提得到8個fractions(SEL10-3-2-2-1至SEL10-3-2-2-8)。SEL10-3-2-2-1 (349 mg)再經Sephadex LH-20 [二氯甲烷：甲醇(2:1)]純化得到10個fractions(SEL10-3-2-2-1-1至SEL10-3-2-2-1-10)，其中SEL10-3-2-2-1-2至SEL10-3-2-2-1-4合併共61 mg以正相高效液相層析進行純化，溶劑系統[正己烷(10%異丙醇)]，得到純物質SEL10-3-2-2-1-2-1 (40 mg)與SEL10-3-2-2-1-2-2 (2 mg)。SEL10-3-2-2-1-2-1 (40 mg)經一維與

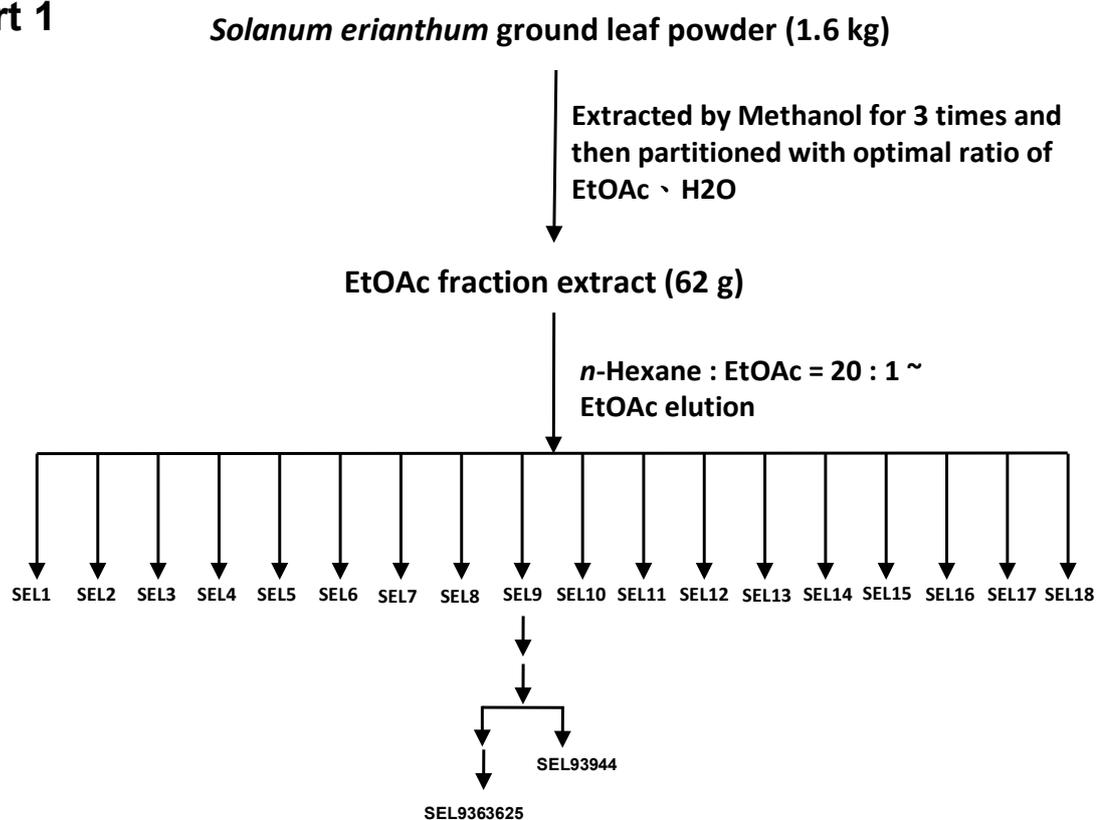
二維核磁共振光譜測定後鑑定為9Z,11E-octadecadienoic acid。SEL10-3-2-2-1-2-2 (2 mg) 經鑑定為 dihydroactinidiolide。而 SEL10-3-2-2-1-1 (130 mg) 再經正己烷：丙酮(80%至100%)沖提，與正相高效液相層析進行純化，溶劑系統[正己烷(8%異丙醇)]得到SEL10-3-2-2-1-1-1 (14 mg)，經一維與二維核磁共振光譜測定後鑑定為octadecanoic acid。SEL 12 (1.794 g) 以矽膠管柱層析進行分離，以正己烷：乙酸乙酯進行沖提，逐漸增加乙酸乙酯之比例至100%；再增加甲醇比例至100%得到11個fractions (命名為SEL 12-1至SEL 12-11)。合併SEL12-5至SEL12-11 (249 mg) 以Sephadex LH-20 [二氯甲烷：甲醇(2:1)]純化得3個fractions (SEL12-5-1至SEL12-5-3)，其中SEL12-5-3 (59 mg) 以再經正己烷：丙酮(5%至100%)沖提，得到4個fractions (SEL12-5-3-1至SEL12-5-3-4)，SEL12-5-3-2 (33 mg) 再經正相高效液相層析進行純化，溶劑系統[正己烷(8%異丙醇)]得到SEL12-5-3-2-1 (10 mg)，經一維與二維核磁共振光譜測定後鑑定為  $\alpha$ -linolenic acid。

正丁醇萃取物取2.66 g，以逆相層析管柱(RP-18 column chromatography)進行分離，以水-甲醇(80:20)，以10%增加甲醇比例至100%甲醇，得到個17個fractions (SEL4-1至SEL4-17)。其中SEL4-5 (91.9 mg) 再以Sephadex LH-20(甲醇)純化得到6個fractions (SEL4-5-1至SEL4-5-6)，其中SEL4-5-6 (26.6 mg) 再以矽膠管柱層析進行純化，以氯仿：甲醇：水(10:10:5)下層當沖提液，得到SEL4-5-6-3 (20.5 mg)，經一維與二維核磁共振光譜測定後鑑定為黃酮類配糖體camelliaside C。SEL4-11 (109.0 mg) 再以Sephadex LH-20 (甲醇) 純化得到4個fractions (SEL4-11-1至SEL4-11-4)，其中SEL4-11-4 (20.3 mg) 再以矽膠管柱層析進行純化，以氯仿：甲醇：水(10:10:5)下層當沖提液，得到SEL4-11-4-6 (12.4 mg)，經一維與二維核磁共振光譜測定後鑑定為固醇類生物鹼配糖體 solasonine。SEL4-15 (354.1 mg) 再以Sephadex LH-20 (甲醇) 純化得到4個fractions (SEL4-15-1至SEL4-15-4)，其中SEL4-15-2 (242.2 mg) 再以逆相層析管柱進行分離，以水-乙腈(80:20)，10%增加乙腈比例至80%，得到個2個fractions (SEL4-15-2-1及SEL4-15-2-2)。SEL4-15-2-2 (86.6 mg) 再以矽膠管柱層析進行純化，以氯仿：甲醇：水(10:10:5)下層當沖提液，得到10個fractions SEL4-15-2-2-1

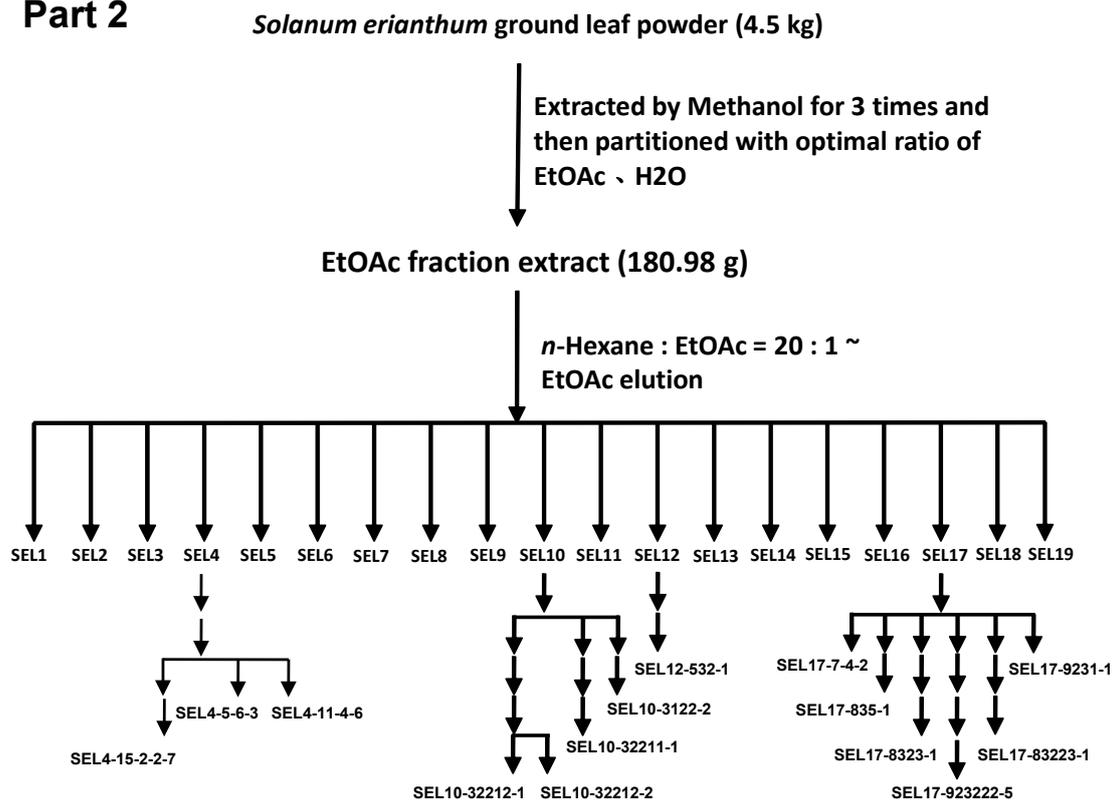
至SEL4-15-2-2-10，其中SEL4-15-2-2-7 (15.4 mg)經一維與二維核磁共振光譜測定後鑑定為固醇類生物鹼配糖體solamargine。

目前本研究共解析出十個化合物結構，其中有五個十八碳脂肪酸衍生物、兩個benzofuran類化合物、一個黃酮類與兩個固醇類生物鹼配糖體。其結構如結果附圖二十所示，其餘之純化合物之結構目前正解析中（參見圖一Part 2）。

## Part 1

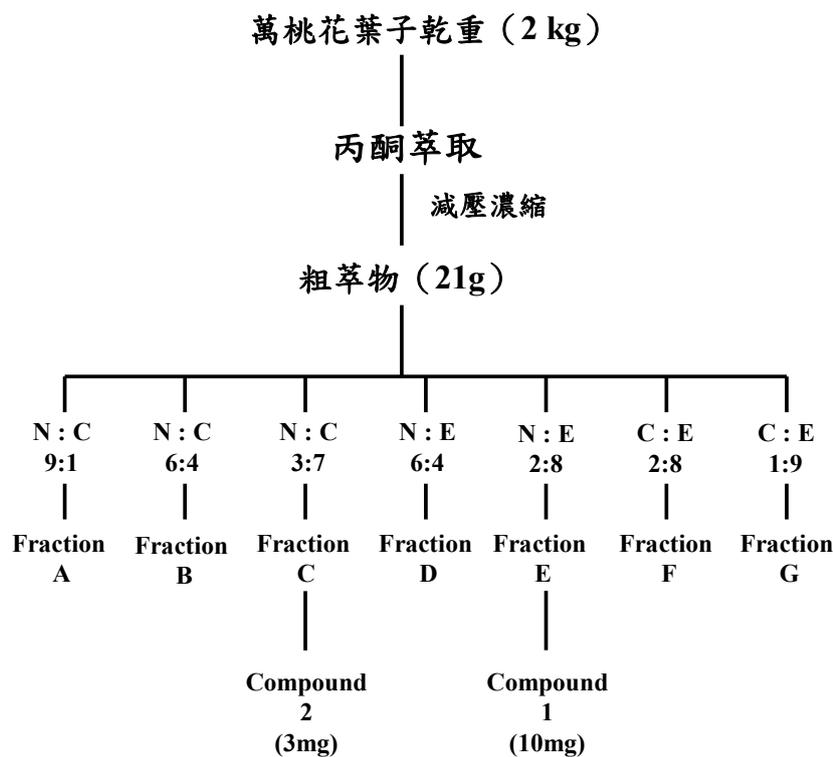


## Part 2



圖一、山煙草天然物萃取過程及所分離活性化合物示意圖

萬桃花(*Solanum torvum*)葉子乾重 2 kg，以丙酮在室溫浸泡萃取三次，經減壓濃縮得到粗萃物約 21g 再以不同有機溶劑比例液液分配萃取得到 7 個分液萃取層，最後經由純化，其中得到 2 個化合物成分（萃取過程參照圖二）



Compound 1:  $\beta$ -sitosterol

Compound 2: ST-1

圖二、萬桃花天然物萃取過程示意圖

### 三、細胞培養

人類肝癌細胞株 HepG2 2.2.15 (human hepatocellular carcinoma) (由台大醫院肝炎研究中心陳培哲院士提供) 主要培養於 MEM 培養液並含有 10% 胎牛血清(FBS) 但不含抗生素，而肝癌細胞株 HuH7 (human hepatoma) 及 HepG2 (human hepatocellular carcinoma) 主要培養於 DMEM 培養液含有 10% FBS 並添加 100 U/ml penicillin 與 100  $\mu$ g/ml streptomycin；人類胃癌上皮

細胞(human gastric cancer epithelial cell line) AGS 細胞培養於添加 10 % FBS, 100 U/ml penicillin 與 100 µg/ml streptomycin 之 RPMI 1640 培養液中，以上細胞株皆於 37°C 5 %CO<sub>2</sub> 恆溫培養箱中培養。

#### 四、天然萃取物對肝癌細胞生長及毒殺性影響 (MTS 或 XTT assay)

將 HepG2 2.2.15 肝癌細胞株( $2 \times 10^5$ /well)培養在 96-well 培養盤 (或以 HuH7 (human hepatoma cell line)、HepG2 (human hepatocellular carcinoma cell line)及 AGS (human gastric cancer epithelial cell line)為實驗對照組)，24 小時後經含有不同稀釋濃度之天然萃取物的 MEM 培養液 (不含血清) 培養 72 小時 (3 天) 後，將培養液移除，以 PBS (phosphate buffered saline) 清洗三次，加入 200 µl/well 的 MEM 培養液 (不含胎牛血清) 以及 20 µl/well 2.5 mg/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium(MTS) 溶液 (Promega, Madison, WI)，培養在 37°C 暗室 3~4 小時，接著在 O.D.490 的吸光波長下測得數值，再進一步計算細胞生長抑制比例：

$$\text{癌細胞毒殺性百分比} = \left(1 - \frac{\text{實驗組平均吸收數值}}{\text{控制組平均吸收數值}}\right) \times 100$$

在測試胃癌細胞株 AGS 活性試驗方面，將經 *H. pylori* 感染之  $7 \times 10^3$  AGS 細胞與不同濃度之茄科植物抽出物或其活性物質共同培養，於 96-well 培養盤中，於不同時間點計算細胞之增生狀況。將 XTT 與 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide 加入培養盤中，於 37°C 中反應 4 小時後，以 OD<sub>450</sub>- OD<sub>500</sub> 檢測其吸光值以計算細胞之增生情況。所有試驗將重複三次並取其平均。

#### 五、製備全細胞均質液(whole cell lysate)分析天然萃取物對肝癌細胞內病毒表面蛋白(HBsAg)產生的影響

培養後之細胞收集在 PBS 緩衝液清洗三次，離心下來後溶在 RIPA (10 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1 % SDS, 1 % Nonidet P-40, and 0.25 % Deoxycholate, 1 mM PMSF, 25 ng/ml aprotinin, 5 ng/ml leupeptin) 緩衝液，再用微量分注器抽吸幾次，以 14,000 rpm 離心 20 分鐘，所得到上清液即為細胞均質液。

#### 六、西方墨點分析(Western blot)天然萃取物對 B 型肝炎病毒表面蛋白(HBsAg)表現的影響

西方墨點分析方法主要參考 Huang 等人論文(44)，經過蛋白質電泳後，然後轉漬到 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Amersham biosciences, UK) 上面，然後以 4 % 脫脂奶粉溶液 (in PBST buffer, PBS buffer

with 0.05 % Tween-20)於室溫下block 1小時，之後以病毒表面抗原蛋白抗體血清(anti-preS, anti-preS2 or anti-major S)作用反應1小時，用PBST清洗membrane 3次(5分鐘/次)，再以donkey anti-rabbit IgG 或sheep anti-mouse IgG (Amersham Biosciences, UK)等二次抗體作用反應40分鐘，之後以PBST緩衝液清洗5次，之後用ECL detection kit作用反應，直接曝光在X-ray film，再以chemiluminescence image analyzer (FLA1000 system; Fuji Photo Film, Tokyo, Japan)定量分析蛋白質表現量。

#### 七、放射性免疫分析法(Radioimmunoassay, RIA)分析天然萃取物對培養基病毒表面蛋白量釋放量的影響

肝癌細胞處理天然萃取物之培養培養基(culture supernatants)收集起來，以RIA assay kit (General Biologicals Corp., Industrial Park, Hsin Chu, Taiwan)分析量化。

#### 八、分析天然萃取物對B型肝炎病毒DNA複製的影響(病毒複製)

本部份採用肝癌細胞株HepG2.2.15，此株肝癌細胞在培養中可自然產生B型肝炎病毒顆粒釋放到培養基，因此可以當作病毒感染模式，可作為所萃取天然物之活性測試評估；將B型肝炎病毒genomic DNA從肝癌細胞株純化出來，經由南方墨點技術(Southern blot)分析；首先，病毒DNA從細胞內核心顆粒(core particles)純化方法請參考Pugh等人之發表論文(82)，此實驗中， $5 \times 10^6$ 個細胞培養在10公分的培養皿中，經過不同濃度之天然萃取物處理72小時後，將細胞收取打破離心分離出capsid-associated viral DNA，以1 %瓊膠/1XTAE緩衝液進行電泳，再轉漬到Hybond N<sup>+</sup> nitrocellular membrane (Amsham Biosciences UK)，進行南方墨點分析，轉漬到membrane上的B型肝炎病毒DNA由<sup>32</sup>P標定的B肝病毒DNA探針(probe)進行雜化(hybridization) (此病毒探針由HBV2質體經EcoRI限制酶切取純化)、清洗及自動放射性底片(X-ray film)感光(其詳細步驟請參考Sambrook等人Molecular Cloning書籍)(86)，底片感光所呈現之病毒DNA量再經由儀器掃瞄定量分析。

#### 九、以Real-Time PCR反應分析B型肝炎病毒DNA之複製或RNA表現之程度

##### (一)反轉錄酵素反應(reverse transcription reaction, RT)

1. HepG2 2.2.15 total RNA 由 TriZol isolation kit (Invitrogen) 抽取，再取 1 µg RNA 利用 CDS III 3'PCR primer 和 SMART IV oligonucleotide，依下述反應經反轉錄作用合成 first strand cDNA。

2. 將 1 $\mu$ g RNA 與 1 $\mu$ l CDS III 3'PCR primer 及 1 $\mu$ l SMART IV oligonucleotide，於 72 °C 10 分鐘反應，結束後立即移至冰上 5 分鐘。

依序加入下列藥品，於 42 °C 1hr 進行 RT 反應：

5X first-strand buffer 4  $\mu$ l

dNTP (10 mM) 2  $\mu$ l

DDT (20 mM) 2  $\mu$ l

Reverse transcriptase 1  $\mu$ l

在研究中利用即時定量聚合酶鏈鎖反應器來做基因表現的定量。使用 ABI 7300 Real-Time PCR System 即時偵測各 PCR 產物所表現 SYBR-green 的量來做基因表現情形的相對定量。SYBR-green 為一可鑲嵌於雙股 DNA 之螢光染劑，當其起始鑲嵌於放大基因片段時螢光值之訊號會相對增加，增加的螢光量便可視為是 PCR 反應中所合成產物量的增加。研究的標的為 HBV 基因組，並以 housekeeping 基因 (housekeeping gene) 18SrRNA (18S ribosomalRNA) 作為每一次實驗中的內部基因標準對照 (endogenous reference standard)。反應試劑為 50 ng cDNA template、1 $\times$ SYBR Green PCR Master Mix，包含有 1 $\times$ SYBER Green buffer、5 mM MgCl<sub>2</sub>、200  $\mu$ M dNTP、80 % glycerol、200 nM 引子。

## (二) PCR 條件

研究中所有樣本均至少做三重複實驗，首先加熱 50 °C 2 分鐘，升溫到 95 °C 10 分鐘後，接著從 95 °C 15 分鐘到 60 °C 1 分鐘這個步驟進行 40 個循環，最後升溫至 95 °C 反應 15 分鐘。

## (三) 引子設計

研究中所使用到的 primer 均以 Primer Express 3.0 進行設計，基因序列的來源則為 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 之 GenBank。其設計片段長度約 100 bp。

## (四) 表現量分析

所得到之實驗結果數據是利用 ABI 7300 軟體來進行分析。利用 Ct 值以下列公式進行計算。

$$\Delta CT = CT_{\text{target}} - CT_{\text{reference}}$$

$$\Delta\Delta CT = CT_{\text{sample}} - CT_{\text{calibrator}}$$

$$\text{Related amount} = 2 - \Delta\Delta\text{CT}$$

#### 十、測試菌株

將 *H. pylori* 以加入 5% 綿羊血之 Columbia agar plates 培養於 37°C 之厭氧培養缸。

#### 十一、紙錠擴散試驗 (disc diffusion assay)

將供測試之菌株培養至  $\text{OD}_{600}=1$ ，取 0.1ml 塗抹於平板瓊脂表面上，以 L 型玻棒塗抹均勻。將 10 $\mu\text{l}$ 、50 $\mu\text{l}$  或 100 $\mu\text{l}$  之茄屬植物抽出物或其活性物質滴在滅菌之紙錠上，藥液便向周圍培養基擴散，置於 37°C 培養 18-24 小時後觀察結果。抗菌能力 (antimicrobial activity) 依抑菌圈的大小判定。以茄屬植物抽出物或其活性物質之溶劑為陰性對照，以 gentamicin 為檢測菌株之抗菌陽性對照。

#### 十二、細胞培養及感染

將人類胃癌上皮細胞 (human gastric cancer epithelial cell line) AGS 細胞培養於添加 10% 胎牛血清，100U/ml penicillin 與 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin 之 RPMI 1640 培養液中，並於 37°C 恆溫箱中培養。在感染實驗中，以細菌比細胞 100 比 1 之比例感染細胞，將 AGS 細胞與懸浮於 PBS 且經培養 48 小時之 *H. pylori* 共同培養，且於感染之細胞培養液中添加不同濃度之茄科植物抽出物或其活性物質，並於感染後於不同時間點收集感染之細胞，以評估其治療 *H. pylori* 感染之能力；亦或於 AGS 細胞感染 *H. pylori* 前 1、6 或 12 小時先行將細胞與以不同濃度之茄科植物抽出物或其活性物質處理，感染後於不同時間點收集感染之細胞，以評估其預防 *H. pylori* 感染之能力。

#### 十三、附著試驗 (association assay)

將以 *H. pylori* 感染之 AGS 細胞培養於不同濃度之茄科植物抽出物或其活性物質，並於感染後於不同時間點收集感染之細胞。而 *H. pylori* ( $5 \times 10^8$ ) 於感染前以 4  $\mu\text{M}$  之 PKH-2 處理 15 分鐘，隨後以含有 0.1 % gelatin 之 Hank's Balanced Salts Solution (HGS) 沖洗三次，並懸浮於 500  $\mu\text{l}$  之 HGS 中。而 AGS 細胞 ( $1 \times 10^6$ ) 也以 HGS 沖洗一次並懸浮於 500  $\mu\text{l}$  之 HGS 中。將 *H. pylori* 與 AGS 細胞混合培養一小時後收集細胞，並以含有 15% sucrose 之 PBS 沖洗一次，隨後再以 HGS 沖洗二次，以流式細胞儀分析螢光強度。所有試驗將重複三次並取其平均。

#### 十四、細胞總蛋白質之純化與西方墨點轉漬法 (Western blot) 之分析

將以 *H. pylori* 感染之 AGS 細胞培養於不同濃度之茄科植物抽出物或其活性物質，並於感染後於不同時間點收集感染細胞。細胞之總蛋白以 TRIzol

reagent 純化，而以 Bradford method 定量蛋白質後，取 100 $\mu$ l 收集的蛋白質並加入等體積之 Sample Buffer，放入 100 $^{\circ}$ C 水中煮沸 5 分鐘後，立即放在冰上，再以 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 做電泳分析。電泳完畢後之電泳膠則利用半乾式轉漬器將膠上之蛋白質轉漬(transfer)至 PVDF 膜上，條件為 100 伏特 1 小時。轉漬後之濾紙浸於含 blocking buffer 即 PBST (PBS, 0.01% tween-20) 中，室溫搖晃 1 小時後，將以 PBSTM (PBST 加 3% 脫脂奶粉) 稀釋 3000 倍之 rabbit-anti human Actin, caspase-8, Bid, Bad, Bax, cytochrome *c*, caspase-9, 與 caspase-3 抗體加入轉漬後之 PVDF 膜，並於室溫下搖晃作用 1 小時，作用後以 PBST 搖晃清洗三次，再將以 PBSTM 稀釋 1000 倍之 alkaline phosphatase donkey-anti-rabbit IgG 加入 PVDF 膜，並於室溫下作用 1 小時，作用後以 PBST 搖晃清洗三次；處理後之 PVDF 膜以 PBS 搖晃清洗兩次後，將 membrane 加入 ECL 以反應出螢光，片夾內置入 X-ray film 與 membrane 進行壓片，再取出 X-ray film，進行顯影及定影。Protein band 含量採 Kodak digital science 1D (ver.2.03) 軟體分析。

## 參、結果

### 一、茄科植物抗癌、抗 B 型肝炎病毒天然物之活性分析

#### (一) 茄科植物甲醇萃取物對肝癌細胞之毒殺作用

經由有機溶劑浸泡山煙草於前後兩次萃取所得之分液層 (fraction) (參見圖一 Part1 及 Part2 部分) 萃取物處理 HepG2 2.2.15 肝癌細胞株 3 天後，經由細胞毒性試劑組分析 (請參見方法細胞毒殺性測試部分) 可以顯示不同分液層萃取物具有不同之生物活性。在萃取流程 Part1 所得之分液層萃取物細胞毒性測試結果顯示，山煙草分液層萃取物 SEL6~SEL9 處理肝癌細胞在較低濃度對肝癌細胞並無明顯毒性 (0.625 g/ml~10 g/ml) (結果請參見 97 年度中醫藥委員會補助計畫期末成果報告)，甚至有增加癌細胞增生能力，如果處理濃度大於 10 g/ml 以上 (20 g/ml~40 g/ml) 則有明顯抑制癌細胞生長能力，甚至到處理濃度為 40 g/ml 時，達到 90% 之細胞毒殺效果。如果肝癌細胞經由分液層萃取物 SEL10、SEL11、SEL13、SEL14 以及 SEL16 處理後，SEL10、SEL13、SEL14 之癌細胞毒殺抑制效果跟 SEL6~SEL9 類似外，SEL11 與 SEL16 分液層萃取物於濃度大於 5 g/ml 以上則具有毒殺效果 (結果請參見 97 年度中醫藥委員會補助計畫期末成果報告)。在山煙草有機萃取流程 Part2 所得分液層萃取物方面，由圖三、四結果顯示，山煙草新分離之分液層 Part2 萃取物 SEL1~SEL10 處理肝癌細胞在較低濃度對肝癌細胞並無明顯毒殺性 (0.625 g/ml~40 g/ml)，而以 SEL11~15 以及 SEL17~18 萃取物處理肝癌細胞株甚直到處理濃度為 40 g/ml 才有細胞毒殺性 (參見圖五~六)。

#### (二) 山煙草有機溶劑萃取物抗 B 型肝炎病毒活性測試

本測試抗病毒活性之山煙草有機溶劑萃取物與細胞毒殺性測試之萃取物相同，來自圖一萃取流程 Part2 部分，經由 SEL1~19 萃取物處理 3 天後，其中 SEL10~18 等 9 個分液層萃取物皆顯示至少 40% 抑制 B 型肝炎病毒表面蛋白 (HBsAg) 及 e 蛋白 (HBeAg) 之分泌，其中 Part2 萃取分液層之 SEL10~13 以及 SEL17 萃取物有顯著抑制病毒蛋白質之分泌 (參見圖七~八)，平均有 40~80% 之抗原表現之抑制程度，顯示這些分液層萃取物具有抗病毒活性。

### (三)山煙草有機萃取物對 B 型肝炎病毒 DNA 複製之影響

進一步以第二部份山煙草 SEL10~13 以及 SEL17 等 4 個萃取物(參見圖一 Part2)以非細胞毒殺濃度 20 g/ml 處理 3 天後,取出細胞培養液進行病毒 DNA Real time PCR 反應以偵測病毒 DNA 複製是否受到處理之影響。由結果顯示,經萃取物處理 3 天後之細胞培養液中病毒 genomic DNA 表現有明顯減少之趨勢(data not shown),我們想進一步偵測細胞內病毒 DNA 複製有無影響,目前此實驗正在進行當中。此外,從第一部份山煙草有機萃取層(參見圖一 Part1, SEL8、SEL9)中找到的化合物經分析顯示具有抗 B 型肝炎病毒之活性。本研究首先以 HepG2 2.2.15 肝癌細胞(培養中可自然產生釋放 B 肝病毒)為培養模式進行研究,經部分純化之萃取物(SEL8, SEL9)處理 6~9 天後,發現可以明顯降低 B 肝病毒表面抗原(HBsAg)及 e 抗原(HBeAg)的表現與分泌呈劑量抑制效應(圖九、十)最高達 93%的抑制活性,另外同時測試其細胞毒性顯示 SEL8, 9 萃取化合物 9 天後,顯示並不具有細胞毒性(圖十一),因此山煙草有機萃取層 SEL9 具有抗 B 型肝炎病毒之功效;為了探討山煙草 SEL9 萃取物是否會影響 B 型肝炎病毒基因之表現,初步將處理 6~9 天之 HepG2 2.2.15 細胞株之全細胞蛋白質萃取出來,進行蛋白質電泳,將蛋白質轉漬到 PVDF membrane,再以西方墨點方法分析病毒蛋白質表現,從圖十二結果顯示,當處理過 SEL9 萃取物 6~9 天後,病毒中型表面蛋白表現量有減少之趨勢,進一步以南方墨點分析病毒 DNA 表現量也顯示 HepG2 2.2.15 細胞株經不同劑量之 SEL9 萃取物處理 9 天後,在處理劑量為 10 g/ml 時,有明顯抑制病毒 DNA 表現(圖十三),此外,如果以 10 g/ml 劑量處理 6~9 天,則 SEL9 萃取物對 B 型肝炎病毒 DNA 複製之抑制作用具有時間效應(圖十四)。此分液層具有抑制 B 型肝炎病毒 DNA 複製之功能之萃取物,經由光譜分析其化合物結構顯示為亞麻油酸(linolenic acid)衍生物(圖十五),有相關文獻從小麥中萃取出相似化合物具有癌細胞毒殺性(50),而最近從蝴蝶嗅覺腺體中也萃取出類似物,但是並沒有文獻指出此化合物有抗病毒功能,因此具有抗病毒藥物開發的潛力。

### (四)山煙草有機萃取物對病毒基因表現之影響

為進一步分析山煙草抗病毒活性之基因調控機制,分別以山

煙草第二次萃取分液層（參見圖一 Part2 萃取流程部份）SEL10、SEL11~13 混合以及 SEL17 等 3 種萃取物以非細胞毒殺濃度處理 3 天後，分別以 Real-Time PCR 反應偵測 B 肝病毒基因之表現。從反應偵測結果顯示，經萃取物 SEL10、SEL11~13 以及 SEL17 處理後，B 肝病毒基因表現(mRNA level)有明顯下降趨勢（參見圖十六~十七），處理 SEL11~13 20 g/ml 3 天後，有 28 %之抑制病毒表面基因之表現（與 ddC 100 M 處理 3 天後之抑制效果相當），而其中萃取物 SEL10 及 SEL17 之 3 天處理明顯抑制了 B 肝病毒表面基因之表現幾乎達到 90%（參見圖十七），明顯比已知抑制病毒基因表現之對照組（ddC 處理組）還要有效。在處理之劑量效應方面如圖十八所示，分別處理 5、10 以及 20 g/ml 劑量之 SEL10、SEL11~13 以及 SEL17 萃取物 3 天後，SEL10 及 SEL11~13 等混合萃取物抑制肝炎病毒表面蛋白基因之表現約分別有 78~95%以及 28~83%之抑制效果，也明顯比處理 ddC 在 25 及 50 M 之抑制效果還好。

#### (五)山煙草類黃素衍生化合物抗癌抗肝炎病毒之活性測試

從山煙草第一部分（請參見圖一 Part1 萃取流程部份）所分離之化合物編號 SEL9363625 經結構分析為類黃素衍生物（結構請參見圖十九），分子量(MW)為 452.15，經由處理 HepG2 2.2.15 肝癌細胞株之毒殺性試驗，結果顯示當處理濃度達 40 g/ml，並沒有明顯細胞毒殺性（參見圖二十一）；在抗 B 型肝炎病毒方面，經由處理 SEL9363625 非毒殺劑量（本實驗處理 20 g/ml）3~9 天後，以 RIA 分析其病毒表面抗原 HBsAg 及 e 抗原 HBeAg 表現量之時間效應，結果顯示其表現抑制約 54~67 %（參見圖二十二），在處理劑量方面，由圖二十三結果顯示當 SEL9363625 化合物處理劑量從 2.5 g/ml 至 40 g/ml 明顯具有劑量抑制效應。進一步以 Real-Time PCR 分析肝炎病毒複製情形，雖經由非細胞毒殺劑量(10 g/ml)處理 6 天，但並未發現有抑制 B 型病毒 DNA 複製之活性（參見圖二十四），此外，在劑量 20~40 g/ml 處理 6 天後，經測試無法測得病毒所複製 DNA 含量，此實驗經重複試驗結果一致，在分別處理 20 及 40 g/ml 劑量下，其病毒複製 DNA 含量均測不到。

#### (六)山煙草亞麻油酸衍生化合物抗癌抗肝炎病毒之活性測試

從山煙草第二部分（請參見材料與方法）所分離之化合物編號 SEL125321 經結構分析為亞麻油酸衍生物（結構請參見圖二

十)，進行細胞毒殺性試驗結果，除了處理劑量 40 g/ml 具有毒殺性外，在較低處理劑量較不具毒殺性（參見圖二十五），另外有關抑制 B 型肝炎病毒基因表現方面，經處理非毒殺劑量（20 g/ml）之 SEL125321 純化合物 3~9 天後，可發現具有明顯時間抑制病毒抗原表現之效應最高抑制作用達 45%（處理 9 天後）（參見圖二十六）。山煙草純化化合物編號 SEL17742 經結構解析亦為亞麻油酸衍生物（結構請參見圖二十），其細胞毒殺結果除了 20 g/ml 劑量外（參見圖二十七），較低劑量不具毒殺性，以非毒殺劑量進行抗肝炎病毒活性試驗，從圖二十八結果顯示，經由 3~9 天之處理，對 HBV 抗原之抑制作用約在 23~33 %。在純化化合物編號 SEL17832231 方面，其結構同樣為亞麻油酸衍生物（參見圖二十），經由肝癌細胞毒殺活性試驗結果顯示除處理劑量 40 g/ml 具有毒性外，其他較低處理劑量不具有毒殺性（參見圖二十九），抗肝炎病毒活性方面，因只進行一次實驗，經處理 3~9 天結果也顯示具抑制 HBV 抗原基因表現活性達 35 %（圖三十）。純化化合物編號 SEL17832231 結構目前解析當中，進行肝癌細胞毒性試驗顯示不具有毒殺性（參見圖三十一），但在抗肝炎病毒活性時，除了 HBeAg 抗原表現不受處理時間有明顯抑制外，HBsAg 抗原有約 25~30% 的抑制效果（圖三十二）。山煙草純化化合物編號 SEL10322121（結構請參見圖二十）活性測試方面，經細胞毒性試驗顯示並未具毒殺性（圖三十三），反而中間處理劑量（2.5~20 g/ml）反而有促進生長活性（最高約 45 %），在抗肝炎病毒活性結果，顯示經 3~9 天處理非毒殺劑量後，HBsAg 抗原表現較 HBeAg 明顯被抑制（圖三十四）。純化化合物編號 SEL10322111（結構請參見圖二十）活性測試方面，經細胞毒性試驗顯示不具毒殺性（圖三十五），在抗病毒活性測試結果，經 3~9 天處理非毒殺劑量後，其抑制病毒基因表現效果並不明顯（圖三十六）。

#### (七)山煙草其他純化化合物抗癌抗肝炎病毒之活性測試

除了以上已測試抗癌抗肝炎病毒活性並已解析結構之純化化合物之外，化合物成分編號 SEL10322122 經解析結構為 Dihydroactinidiolide，編號 SEL179232225 經解析結構為 Loliolide，這兩種結構非常相近，屬於 terpene 類，至於活性部分，除了 SEL10322122 正在測試當中，SEL179232225 化合物經活性測試結

果初步顯示並不具細胞毒性及抗肝炎病毒活性，至於純化化合物編號 SEL1783231 目前正在解析結構當中，活性部分尚未測試。

經由所分離純化化合物之生物活性試驗後，其具有之相關活性結果歸納彙整成表一，以當作對照用。

## 二、萬桃花萃取物「抗菌試驗」與「細胞毒性試驗」 「抗菌試驗」

本計畫首先以印度茄 (*Solanum violaceum*; SV)、大花曼陀羅 (*Brugmansia suaveolens*; BS)、山煙草 (*Solanum erianthum*; SE) 和萬桃花 (*Solanum toruvm*; ST) 水抽物(W)、chloroform 抽物(C)、acetone 抽物(A) 與 methanol 抽物(M) 進行抑制 *H. pylori* 的試驗，印度茄(SV)、大花曼陀羅(BS) 與山煙草(SE) 的各項抽物在 50-2.5mg/ml 的濃度下，對 *H. pylori* 標準株(26695) 均無抑制作用，但萬桃花(ST) 的各項抽物對 *H. pylori* 標準株有不同程度的抑制作用，其中萬桃花的 chloroform 抽物(ST-C) 在濃度 5mg/ml 即可產生抑菌的效果(如表二)。我們同時測試了 ST-C 對臨床抗藥菌株(V633、V1254、V1354 與 V2356) 的抑制效果，這些分離株均對 clarithromycin 與 metronidazole 具抗性。ST-C 對標準株與臨床抗藥菌株均有抑制效果，但有趣的是山煙草的 chloroform 抽物(SE-C)、acetone 抽物(SE-A) 與 methanol 抽物(SE-M) 雖然無法抑制標準株生長，但對臨床抗藥菌株均有效益(如表三)。

### 「細胞毒性試驗」

由於 ST-C 對 *H. pylori* 具最強抑制效果，為進一步了解其治療 *H. pylori* 感染效果，我們進行 ST-C 對 AGS 細胞之毒性測試(如圖三十九)。將 ST-C 與 AGS 細胞共同培養 24 小時後，在 32 g/ml 的濃度下，ST-C 可毒殺 57 % 的 AGS 細胞，在 8 g/ml 的濃度下，僅 5 % 的細胞受到影響，為單純探討 ST-C 對感染的影響，我們在後續實驗以低毒性的劑量(<32 g/ml) 進行。

由於 *H. pylori* 感染的第一步即為細菌的附著，因此我們檢測 ST-C 對 *H. pylori* 附著於 AGS 細胞的影響(如圖四十)。將 ST-C 與受 *H. pylori* 的感染 AGS 細胞共同培養 6 小時後，在 5 g/ml 的濃度下，ST-C 可減少 57 % 的細菌附著，但在 5-20 g/ml 的濃度範圍內，抑制細菌附著的能力大致相同。

因為 *H. pylori* 感染會造成胃上皮細胞的凋亡，我們亦測試 ST-C 對抗凋亡的能力，結果發現(如圖四十一)，ST-C 在 5-20 g/ml 的濃度下可以抑制 caspase-8, Bid, Bad, cytochrome *c*, caspase-9 與 caspase-3 等凋亡蛋白的表現，但可促進 Bax 抗凋亡蛋白的表現，因此顯示 ST-C 可以抑制因 *H. pylori* 的感染造成之胃上皮細胞之凋亡。

## 肆、討論

本研究從山煙草葉子進行有機成分萃取並得到 16 個化合物，其中具有抗 B 型肝炎病毒活性者約有 6 個，從結構角度來分析，這 6 個具抗肝炎病毒活性化合物中有 5 個屬於亞麻油酸（十八碳三烯酸，Linolenic acid）之脂肪酸衍生物，包括最早被分離純化出來編號 SEL93944（參見圖十五）之化合物，這 5 個活性化合物在結構上或多或少在一些含碳官能基上有不同之修飾，如果從生物活性測試之結果來對照分析，亞麻油酸衍生物抗肝炎病毒活性之來源似乎在這些已做修飾之官能基上，並且，經由實驗所得結果顯示只要具有雙鍵結之衍生化合物，較具有抗肝炎病毒之活性，因為此抗病毒活性之化合物過去文獻皆未明確研究與發表，因此最早被分離純化出來之化合物 SEL93944 已委由中醫藥委員會提出具新穎生物活性化合物之專利申請，相信未來這些陸續被發現具抗肝炎病毒活性之化合物也將可提出專利申請。除了分離純化所得具抗肝炎病毒之化合物外，本研究團隊未來將針對這些亞麻油酸衍生物以半合成方式進行一系列之官能基修飾，再將這些經修飾之化合物進一步測試活性以達到最大效能，這方面將有助產學進一步合作研究與開發。除此之外，其中一個從山煙草純化之化合物 SEL9363625，經結構分析為類黃酮(flavones)，此化合物結構過去已被解析並測試細胞毒性(16)，但其具抗肝炎病毒之活性為本計畫研究所最新發現，唯獨在做抗病毒活性測試，此類黃酮活性較不如以上亞麻油酸衍生物強效，未來也將不排除進一步以辦合成方式修飾官能基改善其生物活性。在抗肝炎病毒機制方面，從分析病毒抗原基因之表現上，此類黃酮能有效抑制 HBsAg 及 HBeAg 之表現分泌，然而在病毒 DNA 複製方面卻抑制有限，因此顯示此化合物對肝炎病毒之抑制機轉主要在抗原基因之表現，而非病毒複製機制。

萬桃花是一個常用來治療膿瘡、跳蚤叮咬、皮膚感染與治療疼痛的民間用藥。在本研究中，萬桃花的 chloroform 抽取物也具抑制 *H. pylori* 生長的功效，值得一提的是對臨床抗藥菌株也具抑制效果，並可干擾 *H. pylori* 附著於胃上皮細胞，同時萬桃花的 chloroform 抽取物可以抑制胃上皮細胞因 *H. pylori* 感染造成的凋亡，透過抑制 caspase-8 和 Bid 的活化，防止 cytochrome *c* 由粒線體釋出，因此阻斷下游與凋亡相關蛋白如 caspase-9 與 caspase-3 的活化，進而減緩因感染造成之細胞凋亡現象(如圖四)。因此本抽取物具治療 *H. pylori* 感染之潛力。

## 伍、結論與建議

本計畫執行較為困難部分為山煙草有機溶劑萃取物之分離與製備，在計畫執行前期大部分時間皆集中於化合物之分離鑑定，配合天然化合物之分離萃取，生物活性測試與機制探討也同時配合進行，在尚未清楚活性天然化合物之成分之前，要在短時間內大量分離及萃取，實屬不易。另一方面，所分離之許多分液層萃取成分皆須進行多方面之生物活性測試，因此需要之人力相當繁重，再者，進行生物活性測試所需之純化化合物必須多量，如在萃取純化後所得之成分含量不足之情形下，要進一步研究探討分子機制也是具有相當程度之挑戰性。儘管在計畫執行期間諸多困難，然為因應計畫執行期程與進度，本計畫有兩個方向同時進行當中，其一為天然物之分離及結構分析，另一方面則在生物活性測試平臺建立，本實驗室已建立活性測試平臺以加速抗肝炎病毒之活性測試，因此可以更快速大量篩選抗病毒成分並探討其抗病毒基因調控之機制。由於使用抗生素一向是治療感染症之主要方式，但也因此造成許多抗藥菌株的產生。目前用來治療胃幽門螺旋桿菌感染的抗生素，已產生抗藥菌株，為解決使用抗生素造成的問題，於中草藥中篩選針對胃幽門螺旋桿菌之抗菌成分，應可緩解抗藥菌株的產生，並增加治療胃幽門螺旋桿菌感染之機會，而萬桃花則具此潛力，唯應進一步探討其細部殺菌機轉與主要殺菌成分。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP97-RD-210 提供經費贊助，並由台大醫院肝炎研究中心陳培哲院士提供肝癌細胞株(HepG2 2.2.15)為研究模式，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. **Arauz-Ruiz, P., H. Norder, B. H. Robertson, and L. O. Magnius.** 2002. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* **83**:2059-73.
2. **Arbuthnot, P., and M. Kew.** 2001. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. **82**:77-100.
3. **Arthan, D., P. Kittakoop, A. Esen, and J. Svasti.** 2006. Furostanol glycoside 26-O-beta-glucosidase from the leaves of *Solanum torvum*. *Phytochemistry* **67**:27-33.
4. **Baek, H. Y., J. W. Lim, H. Kim, J. M. Kim, J. S. Kim, H. C. Jung, and K. H. Kim.** 2004. Oxidative-stress-related proteome changes in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Biochem J* **379**:291-9.
5. **Bagchi, D., G. Bhattacharya, and S. J. Stohs.** 1996. Production of reactive oxygen species by gastric cells in association with *Helicobacter pylori*. *Free Radic Res* **24**:439-50.
6. **Balachandran, B., and V. M. Sivaramkrishnan.** 1995. Induction of tumours by Indian dietary constituents. *Indian J Cancer* **32**:104-9.
7. **Beasley, R. P.** 1988. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* **61**:1942-56.
8. **Beasley, R. P., L. Y. Hwang, C. C. Lin, and C. S. Chien.** 1981. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* **2**:1129-33.
9. **Blumberg, B. S., H. J. Alter, and S. Visnich.** 1965. A "New" Antigen in Leukemia Sera. *Jama* **191**:541-6.
10. **Boren, T., P. Falk, K. A. Roth, G. Larson, and S. Normark.** 1993. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* **262**:1892-5.
11. **Byrd, J. C., and R. S. Bresalier.** 2000. Alterations in gastric mucin synthesis by *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* **6**:475-482.
12. **Caceres, A., B. Lopez, S. Gonzalez, I. Berger, I. Tada, and J. Maki.** 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13

- native plants. *J Ethnopharmacol* **62**:195-202.
13. **Caceres, A., B. R. Lopez, M. A. Giron, and H. Logemann.** 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. *J Ethnopharmacol* **31**:263-76.
  14. **Calixto, J. B., A. R. Santos, V. Cechinel Filho, and R. A. Yunes.** 1998. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. *Med Res Rev* **18**:225-58.
  15. **Capurso, G., R. Ricci, F. Panzuto, F. Baccini, S. Passi, E. Di Giulio, G. Delle Fave, and B. Annibale.** 2003. Intra-gastric ascorbic but not uric acid is depleted in relation with the increased pH in patients with atrophic body gastritis and *H. pylori* gastritis. *Helicobacter* **8**:300-6.
  16. **Carcache-Blanco, E. J., Y.-H. Kang, E. J. Park, B.-N. Su, L. B. S. Kardono, S. Riswan, H. H. S. Fong, J. M. Pezzuto, and A. D. Kinghorn.** 2003. Constituents of the Stem Bark of *Pongamia pinnata* with the Potential to Induce Quinone Reductase. *Journal of Natural Products* **67**:126-126.
  17. **Caselmann, W. H., M. Meyer, A. S. Kekule, U. Lauer, P. H. Hofschneider, and R. Koshy.** 1990. A trans-activator function is generated by integration of hepatitis B virus preS/S sequences in human hepatocellular carcinoma DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:2970-4.
  18. **Chah, K. F., K. N. Muko, and S. I. Oboegbulem.** 2000. Antimicrobial activity of methanolic extract of *Solanum torvum* fruit. *Fitoterapia* **71**:187-9.
  19. **Cham, B. E., M. Gilliver, and L. Wilson.** 1987. Antitumour effects of glycoalkaloids isolated from *Solanum sodomaeum*. *Planta Med* **53**:34-6.
  20. **Chang, Y. J., M. S. Wu, J. T. Lin, B. S. Sheu, T. Muta, H. Inoue, and C. C. Chen.** 2004. Induction of cyclooxygenase-2 overexpression in human gastric epithelial cells by *Helicobacter pylori* involves TLR2/TLR9 and c-Src-dependent nuclear factor-kappaB activation. *Mol Pharmacol* **66**:1465-77.
  21. **Courouce-Pauty, A. M., A. Plancon, and J. P. Soulier.** 1983. Distribution of HBsAg subtypes in the world. *Vox Sang* **44**:197-211.
  22. **Cushnie, T. P., and A. J. Lamb.** 2005. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring

- potassium loss. *J Ethnopharmacol* **101**:243-8.
23. **Dane, D. S., C. H. Cameron, and M. Briggs.** 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* **1**:695-8.
  24. **De Marino, S., N. Borbone, F. Gala, F. Zollo, G. Fico, R. Pagiotti, and M. Iorizzi.** 2006. New constituents of sweet *Capsicum annum* L. fruits and evaluation of their biological activity. *J Agric Food Chem* **54**:7508-16.
  25. **Ding, S. Z., A. M. O'Hara, T. L. Denning, B. Dirden-Kramer, R. C. Mifflin, V. E. Reyes, K. A. Ryan, S. N. Elliott, T. Izumi, I. Boldogh, S. Mitra, P. B. Ernst, and S. E. Crowe.** 2004. *Helicobacter pylori* and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increase AP endonuclease-1/redox factor-1 expression in human gastric epithelial cells. *Gastroenterology* **127**:845-58.
  26. **Farinati, F., R. Cardin, V. M. Russo, G. Busatto, M. Franco, and M. Rugge.** 2003. *Helicobacter pylori* CagA status, mucosal oxidative damage and gastritis phenotype: a potential pathway to cancer? *Helicobacter* **8**:227-34.
  27. **Franca, F., Lago, E L., Marsden, P D.,** 1996. Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **29**:229-232.
  28. **Friedman, M.** 2004. Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds. *J Chromatogr A* **1054**:143-55.
  29. **Gan, K. H., C. N. Lin, and S. J. Won.** 1993. Cytotoxic principles and their derivatives of Formosan *Solanum* plants. *J Nat Prod* **56**:15-21.
  30. **Gang, D. R.** 2005. Evolution of flavors and scents. *Annu Rev Plant Biol* **56**:301-25.
  31. **Gennari, A., D. Amadori, M. De Lena, O. Nanni, P. Bruzzi, V. Lorusso, L. Manzione, and P. F. Conte.** 2006. Lack of benefit of maintenance paclitaxel in first-line chemotherapy in metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* **24**:3912-3918.
  32. **Grossi, P., D. Dalla Gasperina, M. Furione, M. Vigano, and L. Minoli.** 2001. Lamivudine treatment for HBV infection following thoracic organ transplantation. *Transplant Proc* **33**:1576-8.
  33. **Guo, W. T., K. D. Bell, and J. H. Ou.** 1991. Characterization of the

- hepatitis B virus EnhI enhancer and X promoter complex. *J Virol* **65**:6686-92.
34. **Hatakeyama, M., and T. Brzozowski.** 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* **11 Suppl 1**:14-20.
  35. **Higashiguchi, F., H. Nakamura, H. Hayashi, and T. Kometani.** 2006. Purification and structure determination of glucosides of capsaicin and dihydrocapsaicin from various *Capsicum* fruits. *J Agric Food Chem* **54**:5948-53.
  36. **Hildt, E., G. Saher, V. Bruss, and P. H. Hofschneider.** 1996. The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology* **225**:235-9.
  37. **Hildt, E., S. Urban, C. Eckerskorn, and P. H. Hofschneider.** 1996. Isolation of highly purified, functional carboxy-terminally truncated hepatitis B virus middle surface protein activators from eucaryotic expression systems. *Hepatology* **24**:502-7.
  38. **Hildt, E., S. Urban, and P. H. Hofschneider.** 1995. Characterization of essential domains for the functionality of the MHBst transcriptional activator and identification of a minimal MHBst activator. *Oncogene* **11**:2055-66.
  39. **Hildt, E., S. Urban, U. Lauer, P. H. Hofschneider, and A. S. Kekule.** 1993. ER-localization and functional expression of the HBV transactivator MHBst. *Oncogene* **8**:3359-67.
  40. **Hu, K., H. Kobayashi, A. Dong, Y. Jing, S. Iwasaki, and X. Yao.** 1999. Antineoplastic agents. III: Steroidal glycosides from *Solanum nigrum*. *Planta Med* **65**:35-8.
  41. **Huang, R. L., Chen, C. F., Feng, H. Y., Lin, L. C.** 2001. Anti-hepatitis B virus of seven compounds isolated from *Piper Kadsura*(Chopisy) Ohwi. *J Chin Med* **12**:179-190.
  42. **Huang, R. L., Y. L. Huang, J. C. Ou, C. C. Chen, F. L. Hsu, and C. Chang.** 2003. Screening of 25 compounds isolated from *Phyllanthus* species for anti-human hepatitis B virus in vitro. *Phytother Res* **17**:449-53.
  43. **Huang, T. J., C. C. Lu, J. C. Tsai, W. J. Yao, X. Lu, M. D. Lai, H. S. Liu, and A. L. Shiau.** 2005. Novel autoregulatory function of hepatitis B virus M protein on surface gene expression. *J Biol Chem* **280**:27742-54.

44. **Huang, T. J., and P. Shirley Li.** 2001. Dexamethasone inhibits luteinizing hormone-induced synthesis of steroidogenic acute regulatory protein in cultured rat preovulatory follicles. *Biol Reprod* **64**:163-70.
45. **Ilver, D., A. Arnqvist, J. Ogren, I. M. Frick, D. Kersulyte, E. T. Incecik, D. E. Berg, A. Covacci, L. Engstrand, and T. Boren.** 1998. Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* **279**:373-7.
46. **Iwalewa, E. O., C. O. Adewunmi, N. O. Omisore, O. A. Adebajji, C. K. Azike, A. O. Adigun, O. A. Adesina, and O. G. Olowoyo.** 2005. Pro- and antioxidant effects and cytoprotective potentials of nine edible vegetables in southwest Nigeria. *J Med Food* **8**:539-44.
47. **Jung, K., Y. W. Chin, Y. C. Kim, and J. Kim.** 2005. Potentially hepatoprotective glycolipid constituents of Lycium chinense fruits. *Arch Pharm Res* **28**:1381-5.
48. **Kekule, A. S., U. Lauer, M. Meyer, W. H. Caselmann, P. H. Hofschneider, and R. Koshy.** 1990. The preS2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator. *Nature* **343**:457-61.
49. **Kim, T. G., Kang, S. Y., Jung, K. K., Kang, J. H., Lee, E., Han, M. H., Kim, S. H.** 2001. Antiviral activities of extracts isolated from *Terminidlis chebula* Retz., *Sanguisorba officinalis* L., *Rubus coreanus* Miq. and *Rheum palmatum* L. against Hepatitis B virus. *Phytother Res* **15**:718-720.
50. **Kuga, H., A. Ejima, I. Mitui, K. Sato, N. Ishihara, K. Fukuda, F. Saito, and K. Uenakai.** 1993. Isolation and characterization of cytotoxic compounds from corn. *Biosci Biotechnol Biochem* **57**:1020-1.
51. **Kuo, K. W., S. H. Hsu, Y. P. Li, W. L. Lin, L. F. Liu, L. C. Chang, C. C. Lin, C. N. Lin, and H. M. Sheu.** 2000. Anticancer activity evaluation of the solanum glycoalkaloid solamargine. Triggering apoptosis in human hepatoma cells. *Biochem Pharmacol* **60**:1865-73.
52. **Kupchan, S. M., S. J. Barboutis, J. R. Knox, and C. A. Cam.** 1965. Beta-solamarine: tumor inhibitor isolated from *Solanum dulcamara*. *Science* **150**:1827-8.
53. **Kusters, J. G., A. H. van Vliet, and E. J. Kuipers.** 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* **19**:449-90.

54. **Le Bouvier, G. L., and R. W. McCollum.** 1970. Australia (hepatitis-associated) antigen: physicochemical and immunological characteristics. *Adv Virus Res* **16**:357-96.
55. **Lee, D. G., H. J. Jung, and E. R. Woo.** 2005. Antimicrobial property of (+)-lyoniresinol-3 $\alpha$ -O-beta-D-glucopyranoside isolated from the root bark of *Lycium chinense* Miller against human pathogenic microorganisms. *Arch Pharm Res* **28**:1031-6.
56. **Lee, D. G., Y. Park, M. R. Kim, H. J. Jung, Y. B. Seu, K. S. Hahm, and E. R. Woo.** 2004. Anti-fungal effects of phenolic amides isolated from the root bark of *Lycium chinense*. *Biotechnol Lett* **26**:1125-30.
57. **Lee, K. R., N. Kozukue, J. S. Han, J. H. Park, E. Y. Chang, E. J. Baek, J. S. Chang, and M. Friedman.** 2004. Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HepG2) cancer cells. *J Agric Food Chem* **52**:2832-9.
58. **Lin, C. N., and K. H. Gan.** 1989. Antihepatotoxic principles of *Solanum capsicastrum*. *Planta Med* **55**:48-50.
59. **Linden, S., J. Mahdavi, J. Hedenbro, T. Boren, and I. Carlstedt.** 2004. Effects of pH on *Helicobacter pylori* binding to human gastric mucins: identification of binding to non-MUC5AC mucins. *Biochem J* **384**:263-70.
60. **Liu, Z., X. Fu, N. Zhang, G. Zhang, and D. Liu.** 1997. [The inhibitory effect of Chinese herb *Phyllanthus* on hepatitis B virus in vitro]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* **11**:282-5.
61. **Lu, H., J. Y. Wu, T. Kudo, T. Ohno, D. Y. Graham, and Y. Yamaoka.** 2005. Regulation of interleukin-6 promoter activation in gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori*. *Mol Biol Cell* **16**:4954-66.
62. **Mahdavi, J., B. Sonden, M. Hurtig, F. O. Olfat, L. Forsberg, N. Roche, J. Angstrom, T. Larsson, S. Teneberg, K. A. Karlsson, S. Altraja, T. Wadstrom, D. Kersulyte, D. E. Berg, A. Dubois, C. Petersson, K. E. Magnusson, T. Norberg, F. Lindh, B. B. Lundskog, A. Arnqvist, L. Hammarstrom, and T. Boren.** 2002. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* **297**:573-8.
63. **Marion, P. L., L. S. Oshiro, D. C. Regnery, G. H. Scullard, and W. S. Robinson.** 1980. A virus in Beechey ground squirrels that is related to

- hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:2941-5.
64. **Mason, W. S., G. Seal, and J. Summers.** 1980. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol* **36**:829-36.
  65. **Matsuo, K., K. Takenaka, H. Shimomura, N. Fujii, K. Shinagawa, K. Kiura, and M. Harada.** 2001. Lamivudine and glycyrrhizin for treatment of chemotherapy-induced hepatitis B virus (HBV) hepatitis in a chronic HBV carrier with non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* **41**:191-5.
  66. **Matysiak-Budnik, T., and F. Megraud.** 2006. Helicobacter pylori infection and gastric cancer. *Eur J Cancer* **42**:708-16.
  67. **McKay, D. L., and J. B. Blumberg.** 2006. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother Res* **20**:519-30.
  68. **McKay, D. L., and J. B. Blumberg.** 2006. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytother Res*.
  69. **Monteiro, M. A., K. H. Chan, D. A. Rasko, D. E. Taylor, P. Y. Zheng, B. J. Appelmelk, H. P. Wirth, M. Yang, M. J. Blaser, S. O. Hynes, A. P. Moran, and M. B. Perry.** 1998. Simultaneous expression of type 1 and type 2 Lewis blood group antigens by Helicobacter pylori lipopolysaccharides. Molecular mimicry between h. pylori lipopolysaccharides and human gastric epithelial cell surface glycoforms. *J Biol Chem* **273**:11533-43.
  70. **Morris, K. M., J. P. Simonite, L. Pullen, and J. A. Simpson.** 1979. Solanum torvum as a causative agent of enzootic calcinosis in Papua, New Guinea. *Res Vet Sci* **27**:264-6.
  71. **Moss, S. F.** 1998. Review article: Cellular markers in the gastric precancerous process. *Aliment Pharmacol Ther* **12 Suppl 1**:91-109.
  72. **Nagata, K., H. Yu, M. Nishikawa, M. Kashiba, A. Nakamura, E. F. Sato, T. Tamura, and M. Inoue.** 1998. Helicobacter pylori generates superoxide radicals and modulates nitric oxide metabolism. *J Biol Chem* **273**:14071-3.
  73. **Norder, H., B. Hammas, S. D. Lee, K. Bile, A. M. Courouce, I. K. Mushahwar, and L. O. Magnius.** 1993. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the

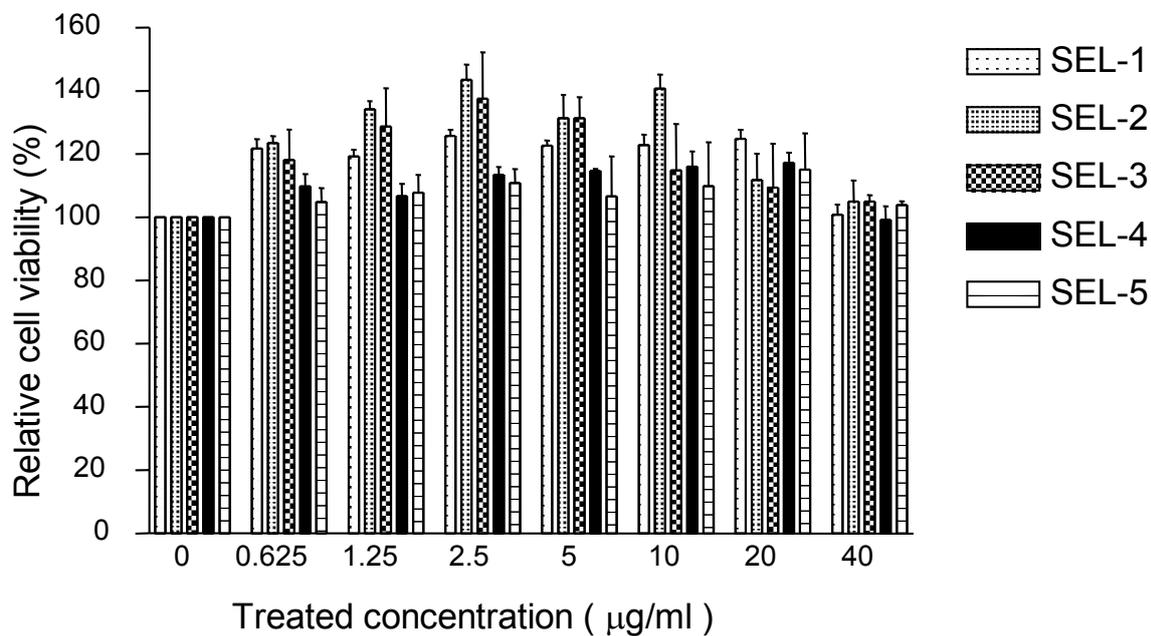
- primary structure of the surface antigen. *J Gen Virol* **74** ( Pt 7):1341-8.
74. **O'Brien, D. P., D. A. Israel, U. Krishna, J. Romero-Gallo, J. Nedrud, M. E. Medof, F. Lin, R. Redline, D. M. Lublin, B. J. Nowicki, A. T. Franco, S. Ogden, A. D. Williams, D. B. Polk, and R. M. Peek, Jr.** 2006. The role of decay-accelerating factor as a receptor for *Helicobacter pylori* and a mediator of gastric inflammation. *J Biol Chem* **281**:13317-23.
  75. **Odontuya, G., J. R. Hout, and P. J. Houghton.** 2005. Structure-activity relationship for antiinflammatory effect of luteolin and its derived glycosides. *Phytother Res* **19**:782-6.
  76. **Ohkura, Y., T. Furihata, H. Kawamata, M. Tabuchi, K. Kubota, A. Terano, T. Sakai, and T. Fujimori.** 2003. Evaluation of cell proliferation and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis using an image analysis processor. *Gastric Cancer* **6**:49-54.
  77. **Okamoto, H., F. Tsuda, H. Sakugawa, R. I. Sastrosoewignjo, M. Imai, Y. Miyakawa, and M. Mayumi.** 1988. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* **69** ( Pt 10):2575-83.
  78. **Ola, S. O., E. E. Anomneze, C. M. Chukwuani, O. S. Ojo, D. A. Ndububa, B. Onyenekwe, and A. Nasidi.** 2000. Interferon alfa-2a (Roferon-A) in the management of chronic hepatitis B infection: results of an open prospective study in Nigerian patients. *West Afr J Med* **19**:259-64.
  79. **Olivares, D., J. P. Gisbert, and J. M. Pajares.** 2005. *Helicobacter pylori* infection and gastric mucosal epithelial cell apoptosis. *Rev Esp Enferm Dig* **97**:505-20.
  80. **Ori, A., A. Zauberman, G. Doitsh, N. Paran, M. Oren, and Y. Shaul.** 1998. p53 binds and represses the HBV enhancer: an adjacent enhancer element can reverse the transcription effect of p53. *Embo J* **17**:544-53.
  81. **Parr, A. J., F. A. Mellon, I. J. Colquhoun, and H. V. Davies.** 2005. Dihydrocaffeoyl polyamines (kukoamine and allies) in potato (*Solanum tuberosum*) tubers detected during metabolite profiling. *J Agric Food Chem* **53**:5461-6.
  82. **Pugh, J. C., K. Yaginuma, K. Koike, and J. Summers.** 1988. Duck hepatitis B virus (DHBV) particles produced by transient expression of

- DHBV DNA in a human hepatoma cell line are infectious in vitro. *J Virol* **62**:3513-6.
83. **Rauha, J. P., S. Remes, M. Heinonen, A. Hopia, M. Kahkonen, T. Kujala, K. Pihlaja, H. Vuorela, and P. Vuorela.** 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol* **56**:3-12.
  84. **Ripperger, H., and A. Porzel.** 1997. Steroidal alkaloid glycosides from *Solanum suaveolens*. *Phytochemistry* **46**:1279-82.
  85. **Sadasivam, S., and E. R. Shanmugasundaram.** 1966. Studies on the flavokinase of *Solanum nigrum* L. *Enzymologia* **31**:203-8.
  86. **Sambrook, J. F., E.F; Maniatis,T.** 1989. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual".
  87. **Schaller, H., and M. Fischer.** 1991. Transcriptional control of hepadnavirus gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* **168**:21-39.
  88. **Sengupta, A., S. Ghosh, and S. Bhattacharjee.** 2004. Allium vegetables in cancer prevention: an overview. *Asian Pac J Cancer Prev* **5**:237-45.
  89. **Sepulveda, A. R.** 2001. Molecular testing of *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis and premalignant gastric lesions: clinical implications. *J Clin Gastroenterol* **32**:377-82.
  90. **Serrano, J., I. Goni, and F. Saura-Calixto.** 2005. Determination of beta-carotene and lutein available from green leafy vegetables by an in vitro digestion and colonic fermentation method. *J Agric Food Chem* **53**:2936-40.
  91. **Shakya, R., and D. A. Navarre.** 2006. Rapid screening of ascorbic acid, glycoalkaloids, and phenolics in potato using high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* **54**:5253-60.
  92. **Sheu, B. S., S. Odenbreit, K. H. Hung, C. P. Liu, S. M. Sheu, H. B. Yang, and J. J. Wu.** 2006. Interaction between host gastric Sialyl-Lewis X and *H. pylori* SabA enhances *H. pylori* density in patients lacking gastric Lewis B antigen. *Am J Gastroenterol* **101**:36-44.
  93. **Siddiqui, A., S. Jameel, and J. Mapoles.** 1986. Transcriptional control elements of hepatitis B surface antigen gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:566-70.
  94. **Sin, S. F., and M. L. Chye.** 2004. Expression of proteinase inhibitor II

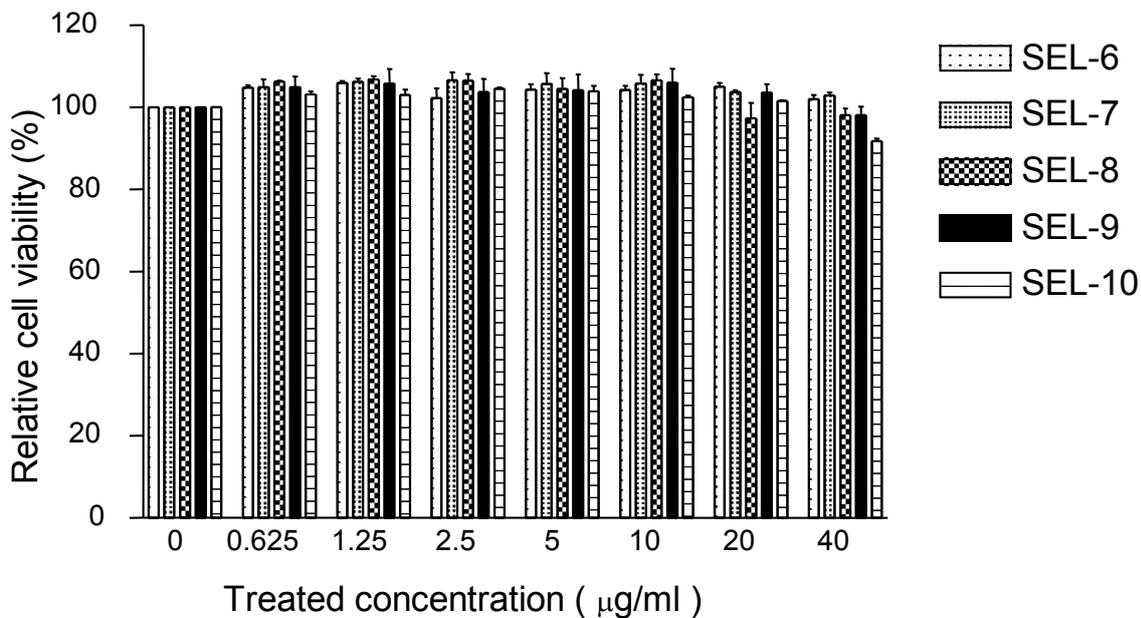
- proteins during floral development in *Solanum americanum*. *Planta* **219**:1010-22.
95. **Sin, S. F., E. C. Yeung, and M. L. Chye.** 2006. Downregulation of *Solanum americanum* genes encoding proteinase inhibitor II causes defective seed development. *Plant J* **45**:58-70.
  96. **Smoot, D. T., T. B. Elliott, H. W. Verspaget, D. Jones, C. R. Allen, K. G. Vernon, T. Bremner, L. C. Kidd, K. S. Kim, J. D. Groupman, and H. Ashktorab.** 2000. Influence of *Helicobacter pylori* on reactive oxygen-induced gastric epithelial cell injury. *Carcinogenesis* **21**:2091-5.
  97. **Stone, M. J., and D. H. Williams.** 1992. On the evolution of functional secondary metabolites (natural products). *Mol Microbiol* **6**:29-34.
  98. **Stuyver, L., S. De Gendt, C. Van Geyt, F. Zoulim, M. Fried, R. F. Schinazi, and R. Rossau.** 2000. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* **81**:67-74.
  99. **Summers, J., J. M. Smolec, and R. Snyder.** 1978. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**:4533-7.
  100. **Sun, J., K. Aoki, J. X. Zheng, B. Z. Su, X. H. Ouyang, and J. Misumi.** 2006. Effect of NaCl and *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin on cytokine expression and viability. *World J Gastroenterol* **12**:2174-80.
  101. **Tatsuguchi, A., C. Sakamoto, K. Wada, T. Akamatsu, T. Tsukui, K. Miyake, S. Futagami, T. Kishida, Y. Fukuda, N. Yamanaka, and M. Kobayashi.** 2000. Localisation of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* related gastritis and gastric ulcer tissues in humans. *Gut* **46**:782-9.
  102. **Teshima, S., K. Rokutan, T. Nikawa, and K. Kishi.** 1998. Guinea pig gastric mucosal cells produce abundant superoxide anion through an NADPH oxidase-like system. *Gastroenterology* **115**:1186-96.
  103. **van Grieken, N. C., G. A. Meijer, A. zur Hausen, S. G. Meuwissen, J. P. Baak, and E. J. Kuipers.** 2003. Increased apoptosis in gastric mucosa adjacent to intestinal metaplasia. *J Clin Pathol* **56**:358-61.
  104. **Wang, B. E.** 2000. Treatment of chronic liver diseases with traditional Chinese medicine. *J Gastroenterol Hepatol* **15 Suppl**:E67-70.

105. **Wang, R. Q., and D. C. Fang.** 2006. Effects of *Helicobacter pylori* infection on mucin expression in gastric carcinoma and pericancerous tissues. *J Gastroenterol Hepatol* **21**:425-31.
106. **Williams, D. H., M. J. Stone, P. R. Hauck, and S. K. Rahman.** 1989. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *J Nat Prod* **52**:1189-208.
107. **Xu, Z. F., W. Q. Qi, X. Z. Ouyang, E. Yeung, and M. L. Chye.** 2001. A proteinase inhibitor II of *Solanum americanum* is expressed in phloem. *Plant Mol Biol* **47**:727-38.
108. **Yang, Y. L., B. Xu, Y. G. Song, and W. D. Zhang.** 2003. Overexpression of c-fos in *Helicobacter pylori*-induced gastric precancerosis of Mongolian gerbil. *World J Gastroenterol* **9**:521-4.
109. **Yin, J., Y. Tezuka, K. Kouda, Q. L. Tran, T. Miyahara, Y. Chen, and S. Kadota.** 2004. Antiosteoporotic activity of the water extract of *Dioscorea spongiosa*. *Biol Pharm Bull* **27**:583-6.

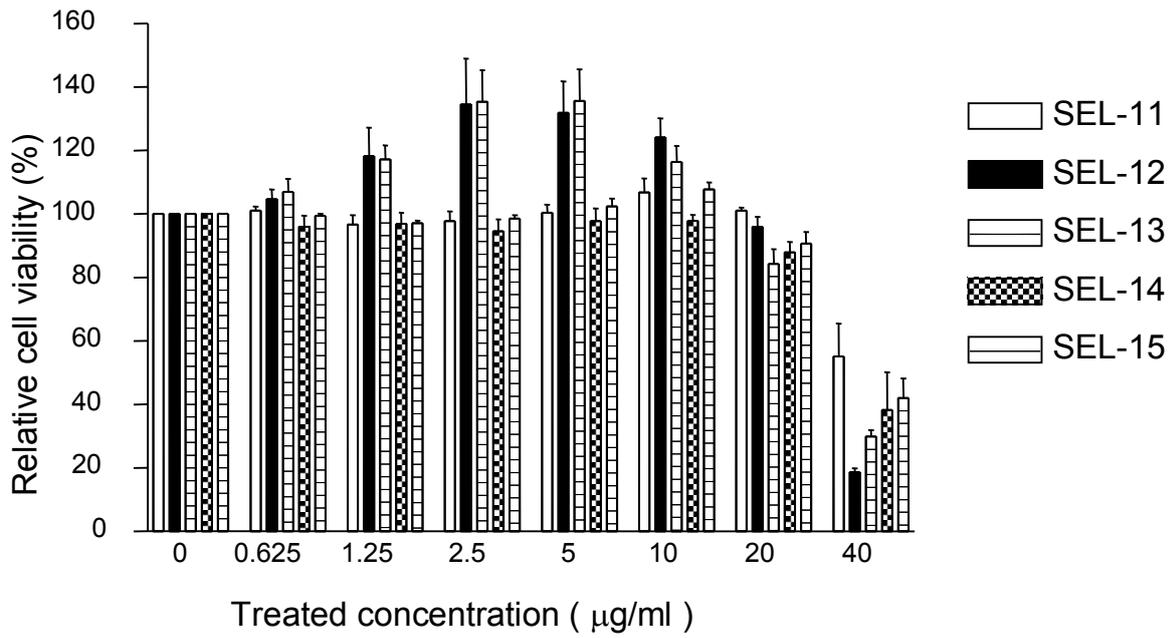
柒、圖、表



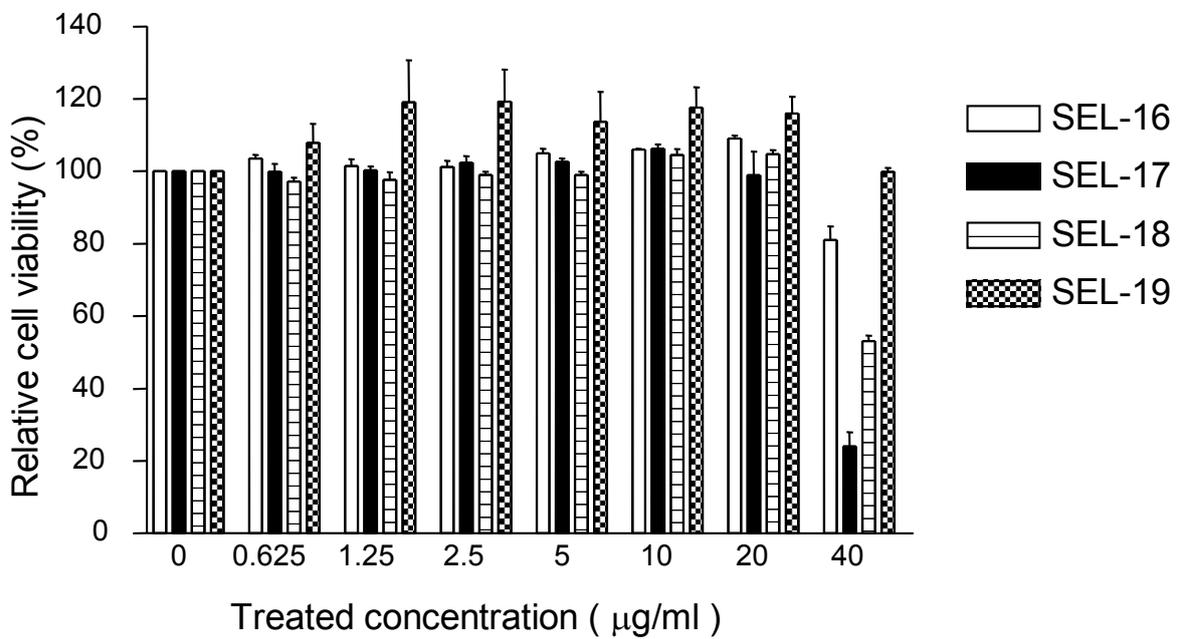
圖三、山煙草有機萃取物細胞毒性測試結果 (SEL1-5)



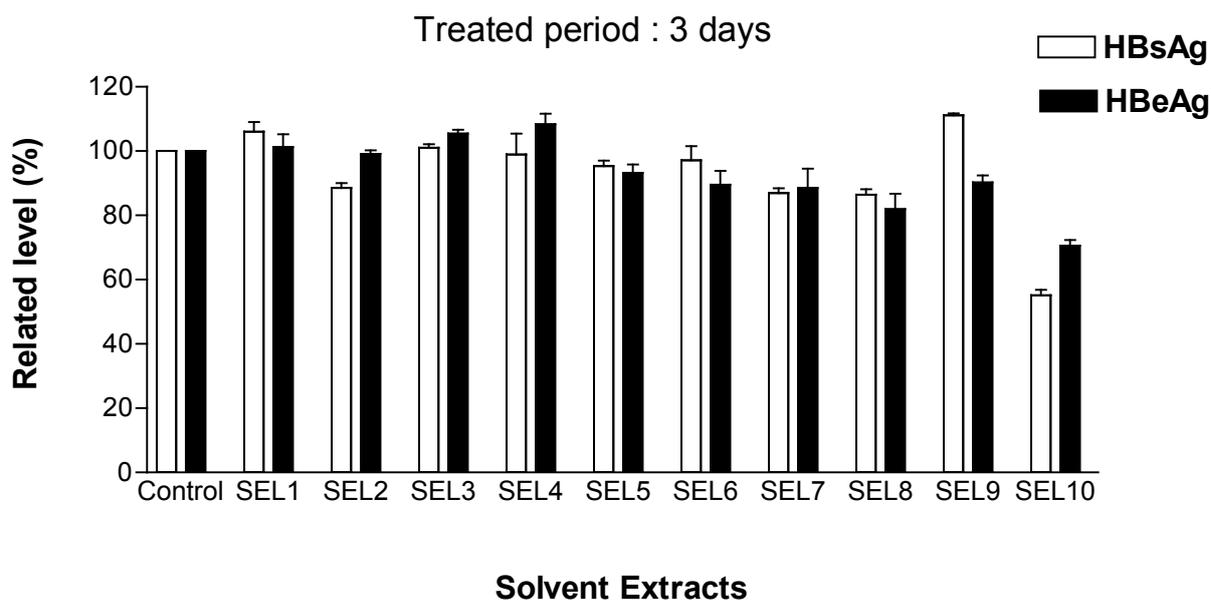
圖四、山煙草有機萃取物細胞毒性測試結果 (SEL6-10)



圖五、山煙草有機萃取物細胞毒性測試結果 (SEL11-15)



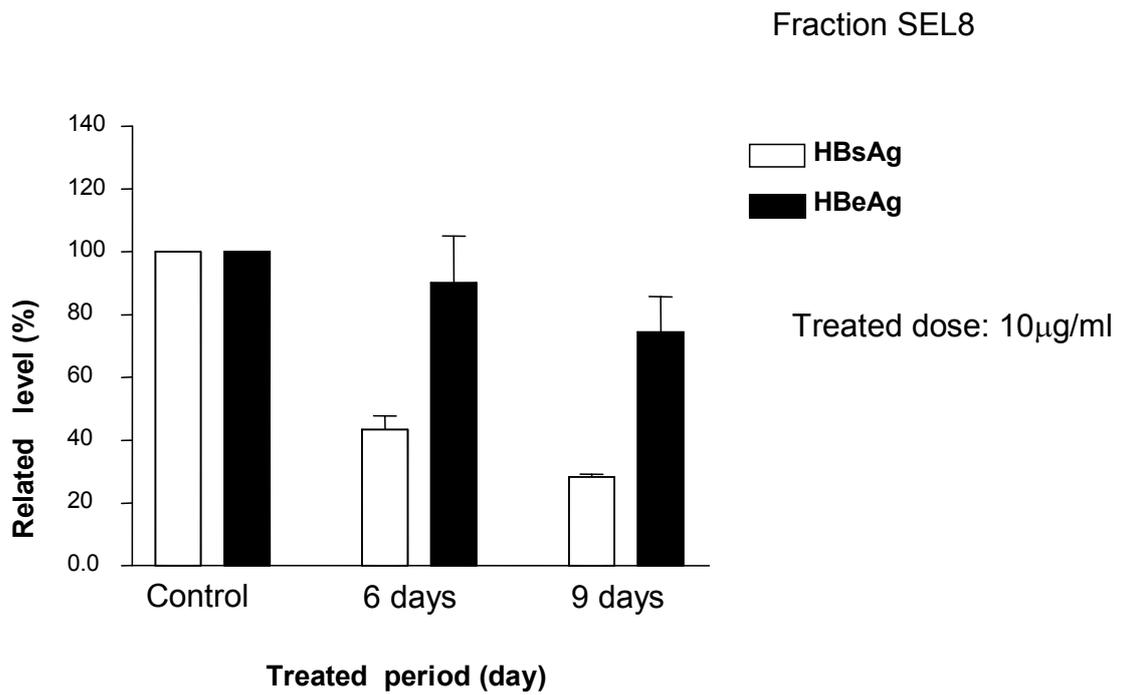
圖六、山煙草有機萃取物細胞毒性測試結果 (SEL16-19)



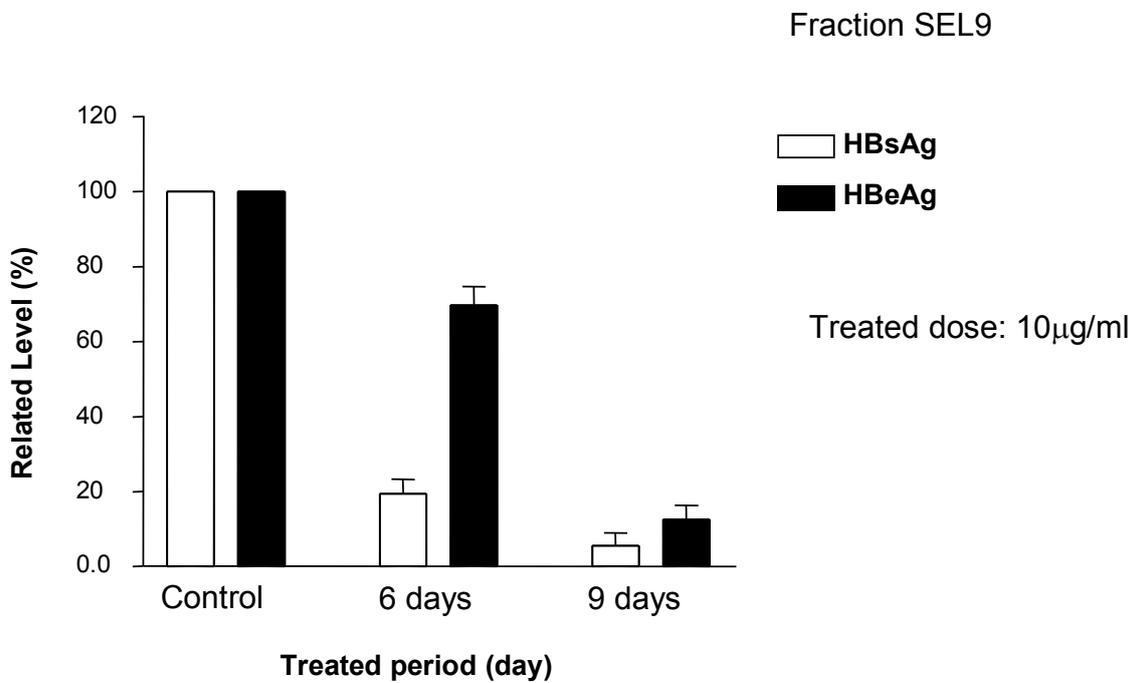
圖七、山煙草有機萃取物 (SEL1~10) 對HepG2 2.2.15 肝癌細胞分泌 B型肝炎病毒HBsAg及HBeAg之影響



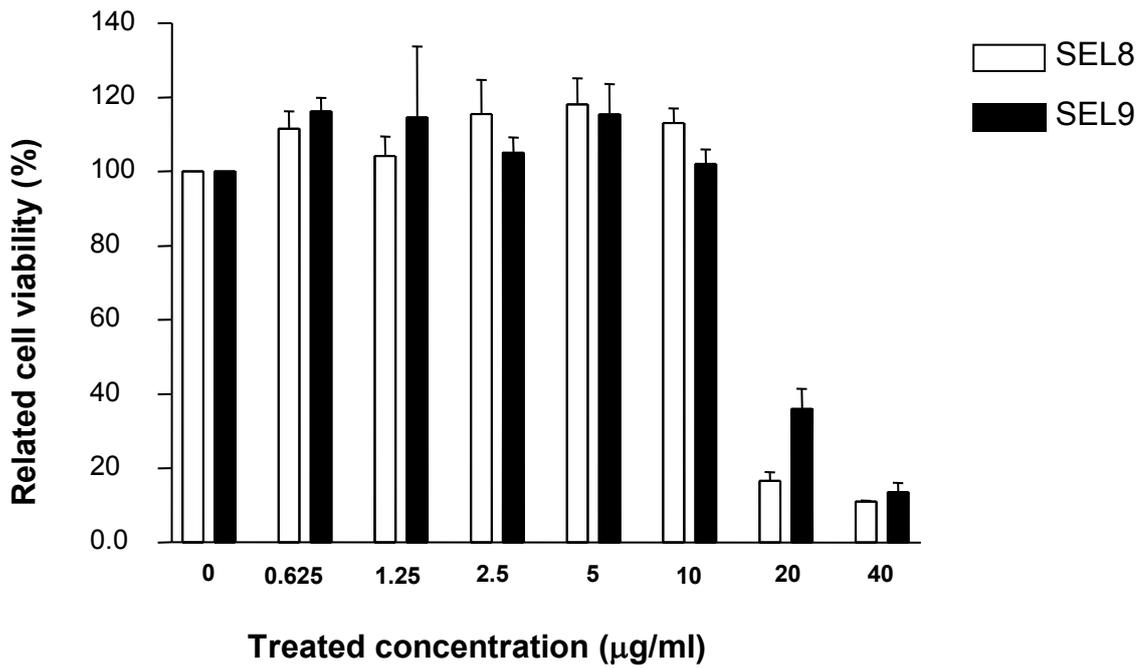
圖八、山煙草有機萃取物 (SEL11~19) 對HepG2 2.2.15 肝癌細胞分泌 B型肝炎病毒HBsAg及HBeAg之影響



圖九、山煙草有機萃取物 (SEL8) 對HepG2 2.2.15 肝癌細胞分泌B型肝炎病毒HBsAg及HBeAg之時間效應

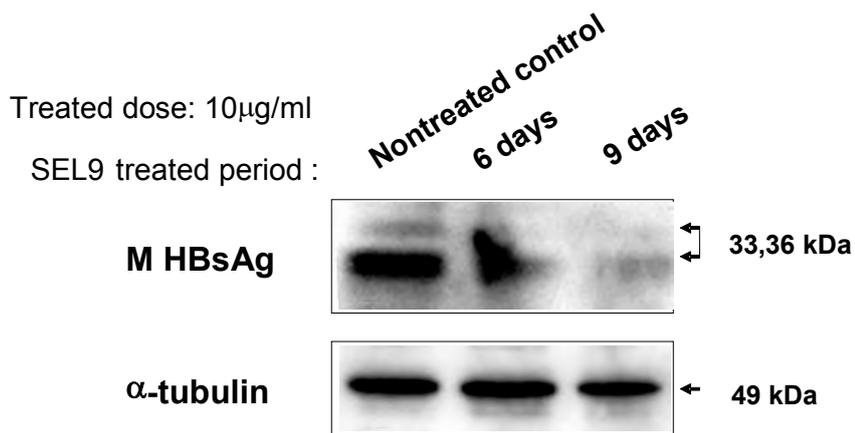


圖十、山煙草有機萃取物 (SEL9) 對HepG2 2.2.15 肝癌細胞分泌B型肝炎病毒HBsAg及HBeAg之時間效應

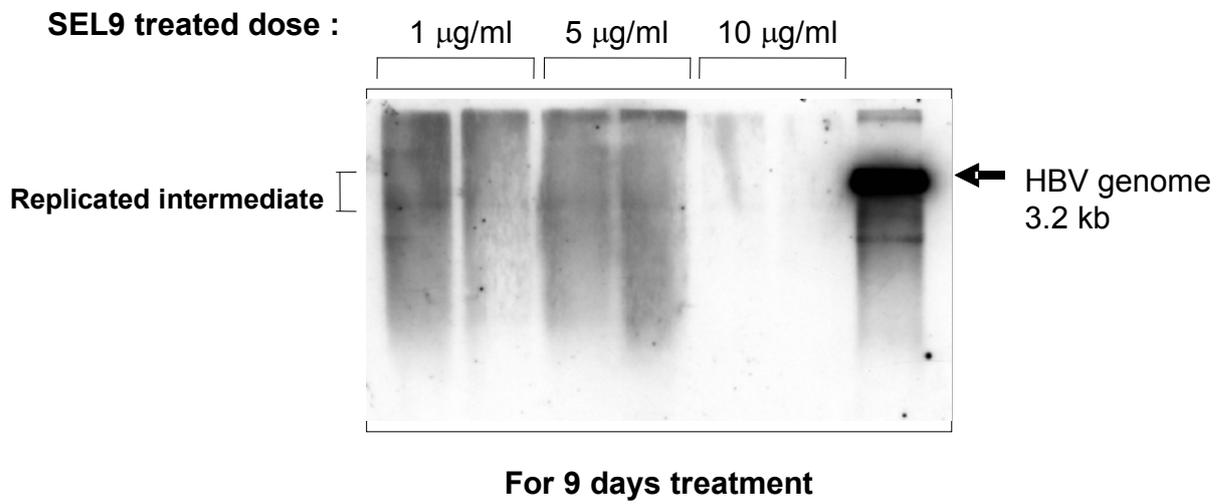


Treatment period: 9 days

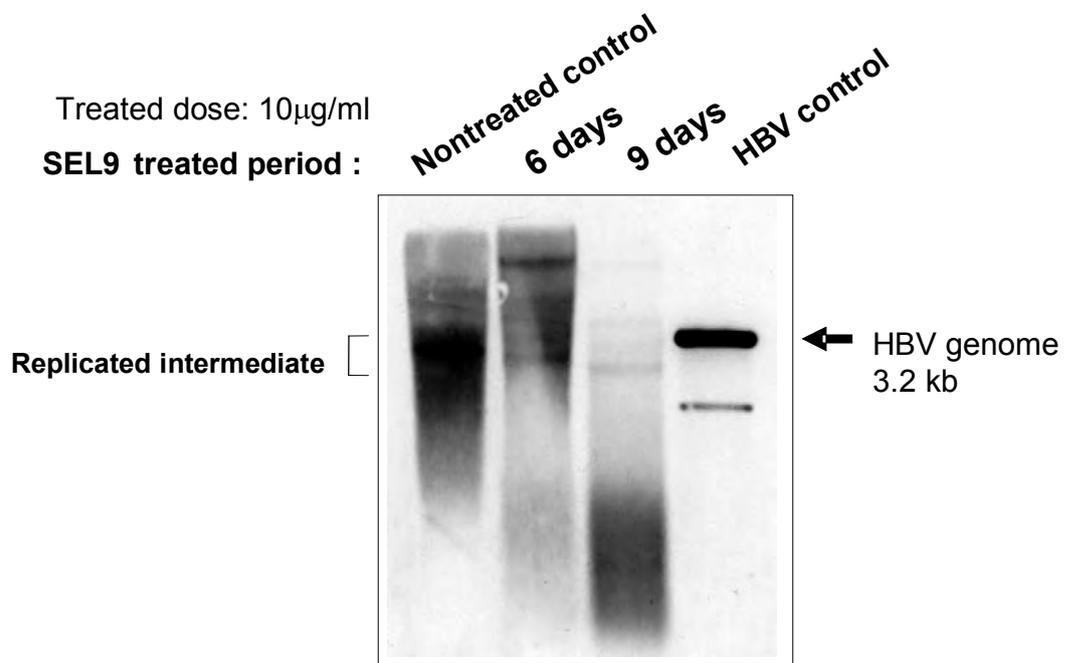
圖十一、山煙草有機萃取物 (SEL8, 9) 對HepG2 2.2.15 肝癌細胞毒性之時間效應



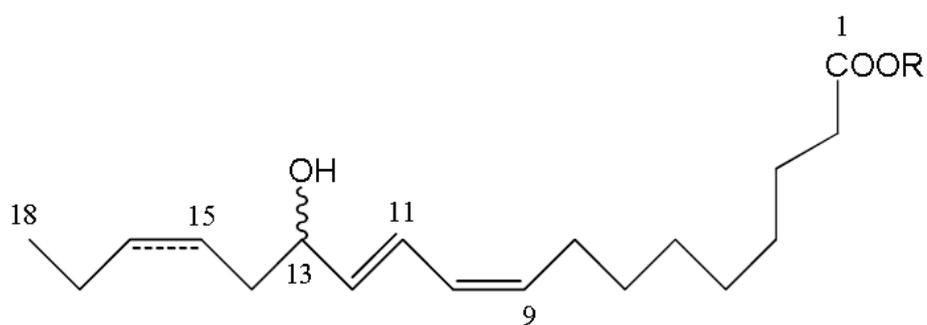
圖十二、山煙草活性萃取物對 HepG2 2.2.15 細胞中B型肝炎病毒表面蛋白表現之影響



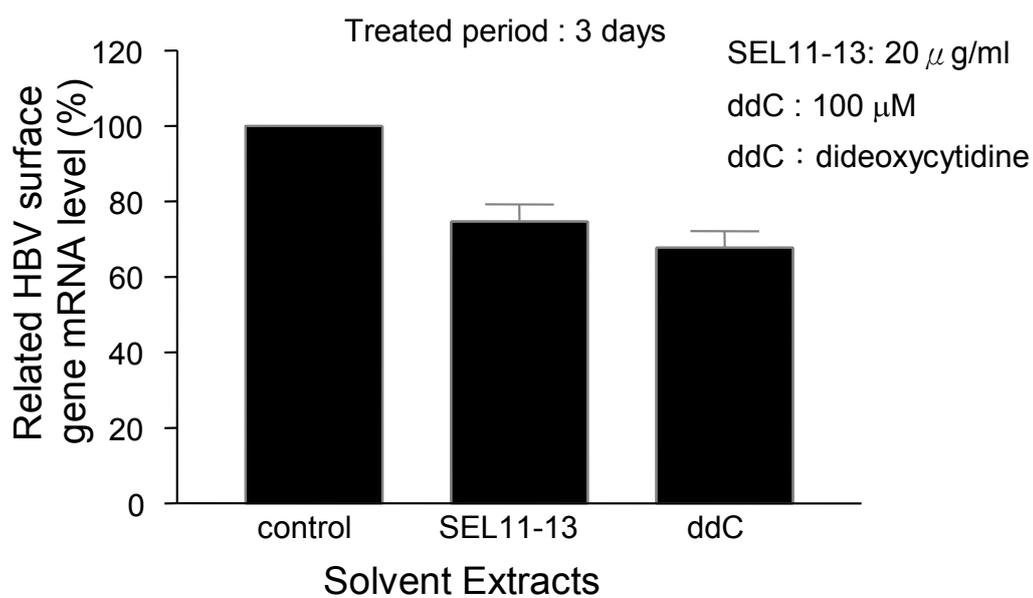
圖十三、山煙草活性萃取物對 HepG2 2.2.15 細胞中B型肝炎病毒DNA複製之劑量效應



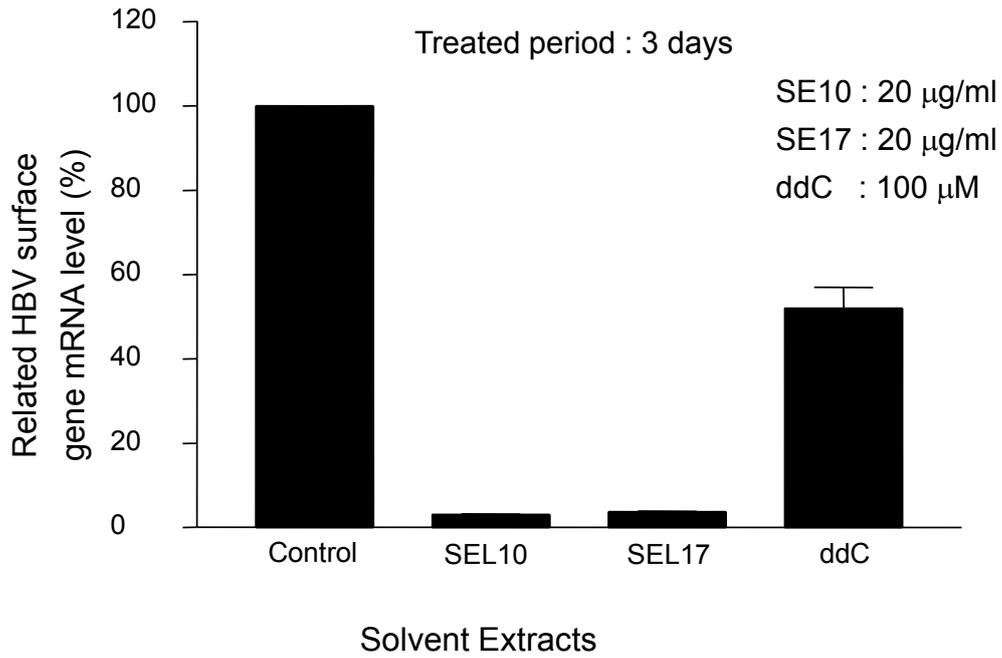
圖十四、山煙草活性萃取物對 HepG2 2.2.15 細胞中B型肝炎病毒DNA複製之時間效應



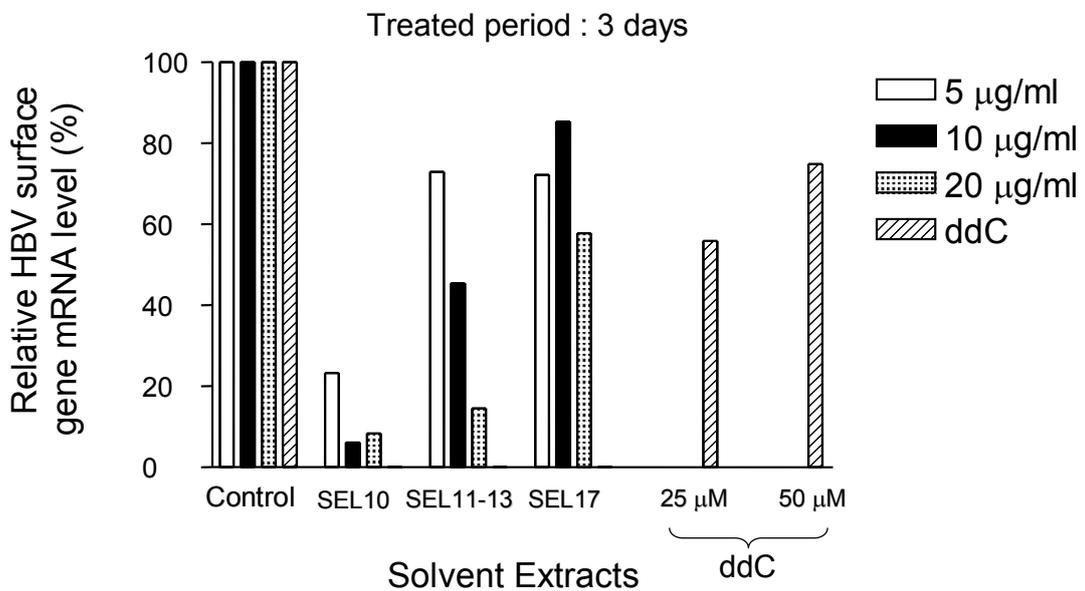
圖十五、山煙草抗肝炎病毒有機萃取層化合物 (SEL93944) 結構示意



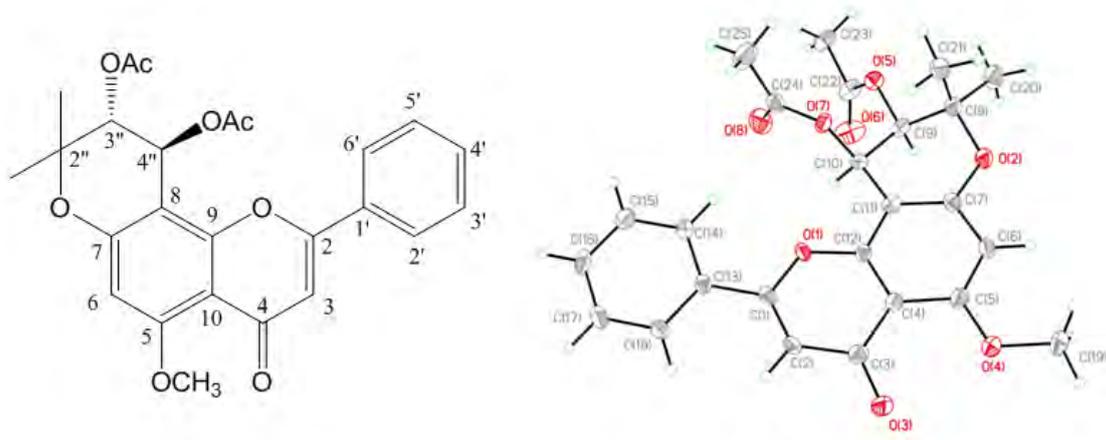
圖十六、山煙草有機萃取物對HepG2 2.2.15 肝癌細胞中B型肝炎病毒基因表現之影響



圖十七、山煙草有機萃取物對HepG2 2.2.15 肝癌細胞中B型肝炎病毒表面基因表現之影響

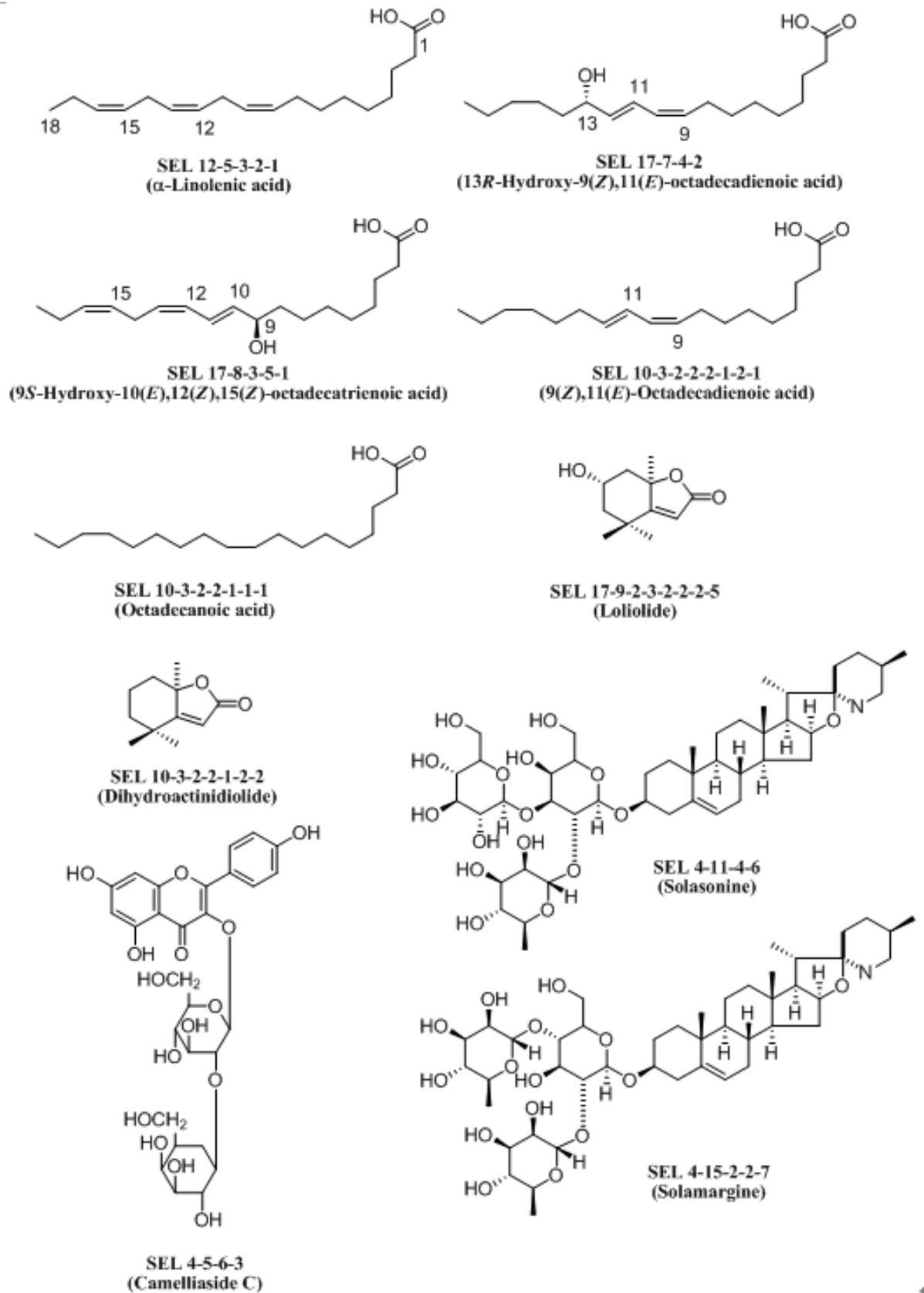


圖十八、山煙草有機萃取物對HepG2 2.2.15 肝癌細胞中B型肝炎病毒基因表現影響之初步結果

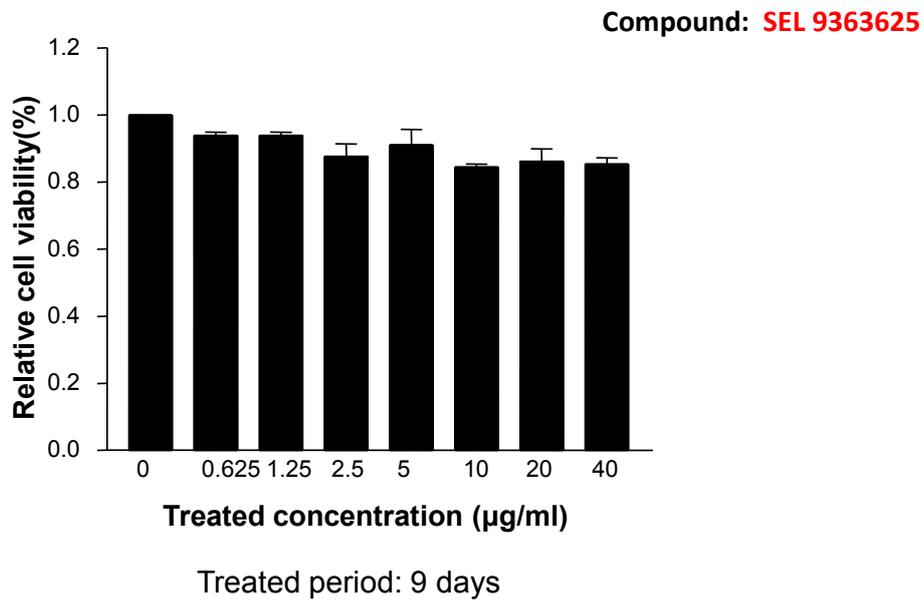


X-ray of SE 9363625  
 Recrystallize from  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  2:1  
 m.p. 124~125°C

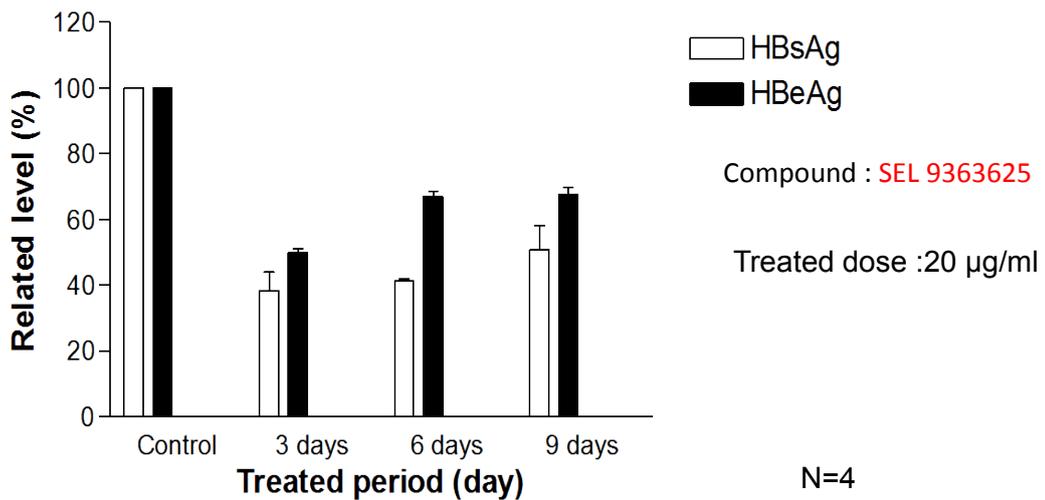
圖十九、山煙草抗肝炎病毒有機萃取層化合物 (SEL9363625) 結構示意



圖二十、從山煙草所萃取出具抗 B 型肝炎病毒等生物活性之天然化合物化學結構

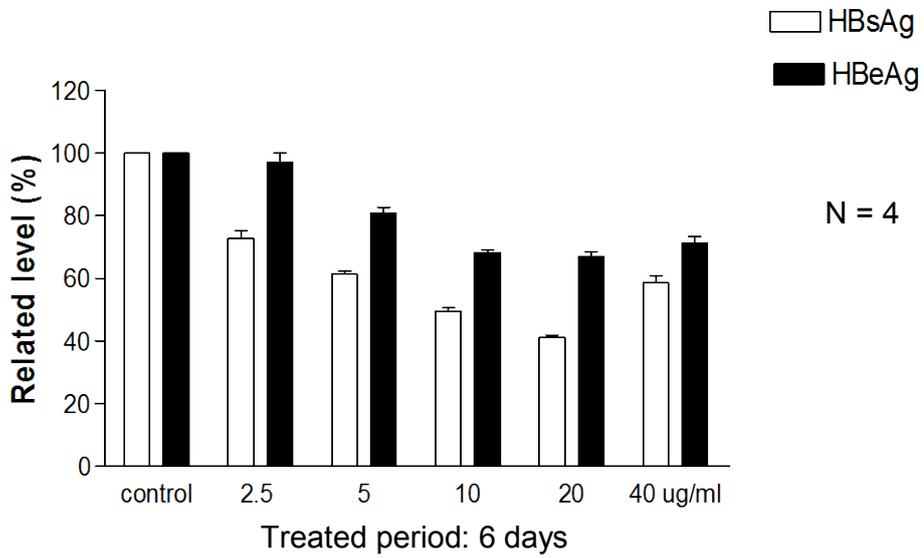


圖二十一、山煙草有機萃取物SEL9363625對HepG2 2.2.15 肝癌細胞毒殺性之影響

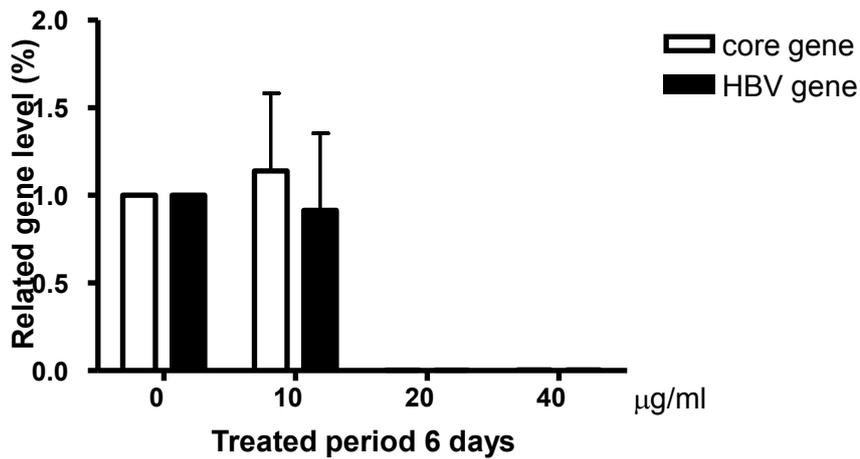


圖二十二、山煙草有機萃取物SEL9363625對HepG2 2.2.15 肝癌細胞中B型肝炎病毒表面及e抗原表現之時間效應

Compound: **SEL 9363625**

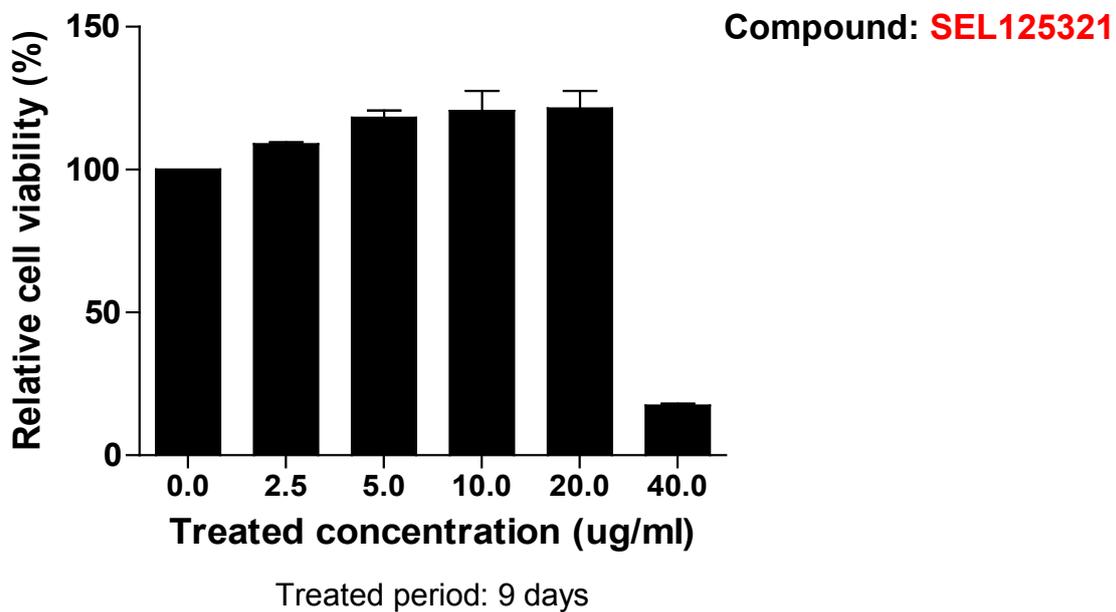


圖二十三、山煙草有機萃取物SEL9363625對HepG2 2.2.15 肝癌細胞中B型肝炎病毒表面及e抗原表現之劑量效應

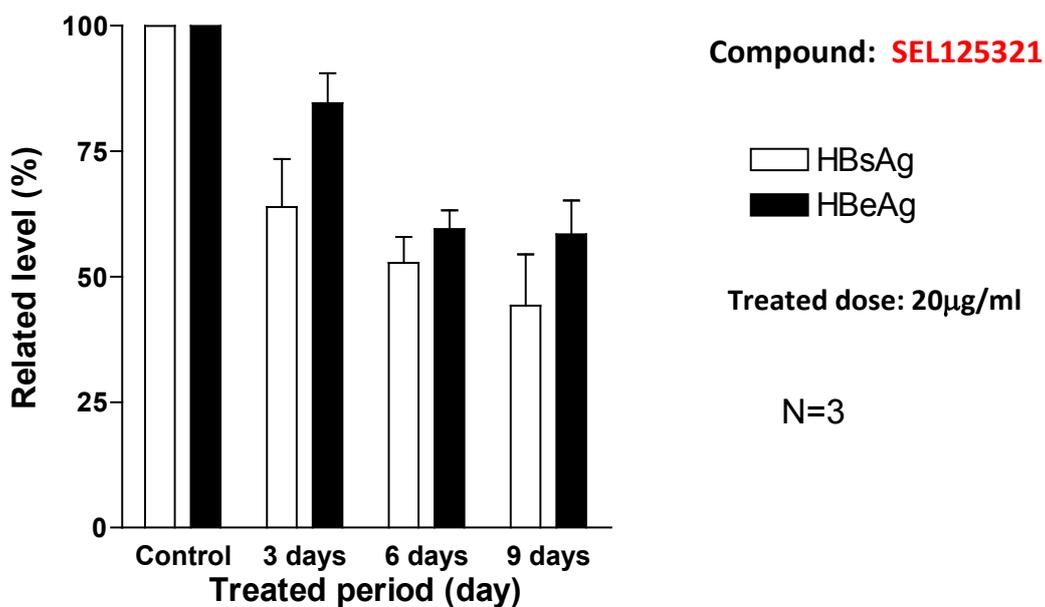


HepG2 2.2.215  
Isolate HBV from medium  
N = 4

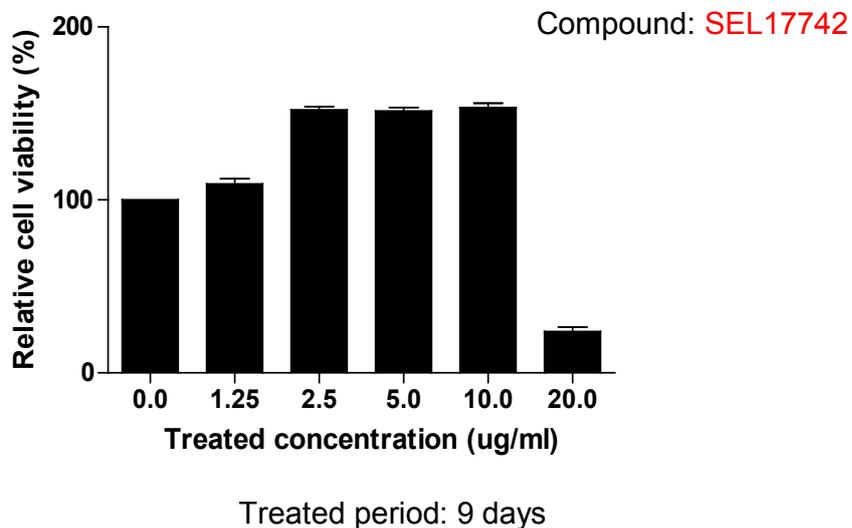
圖二十四、山煙草有機萃取物SEL9363625對HepG2 2.2.15 肝癌細胞中B型肝炎病毒DNA複製之影響



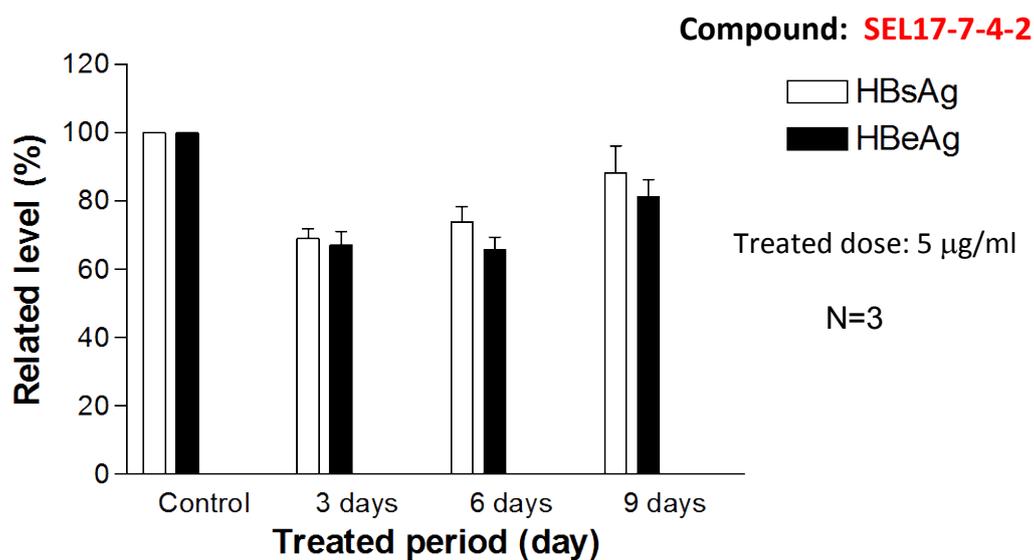
圖二十五、山煙草有機萃取物SEL125321對HepG2 2.2.15 肝癌細胞毒殺性之影響



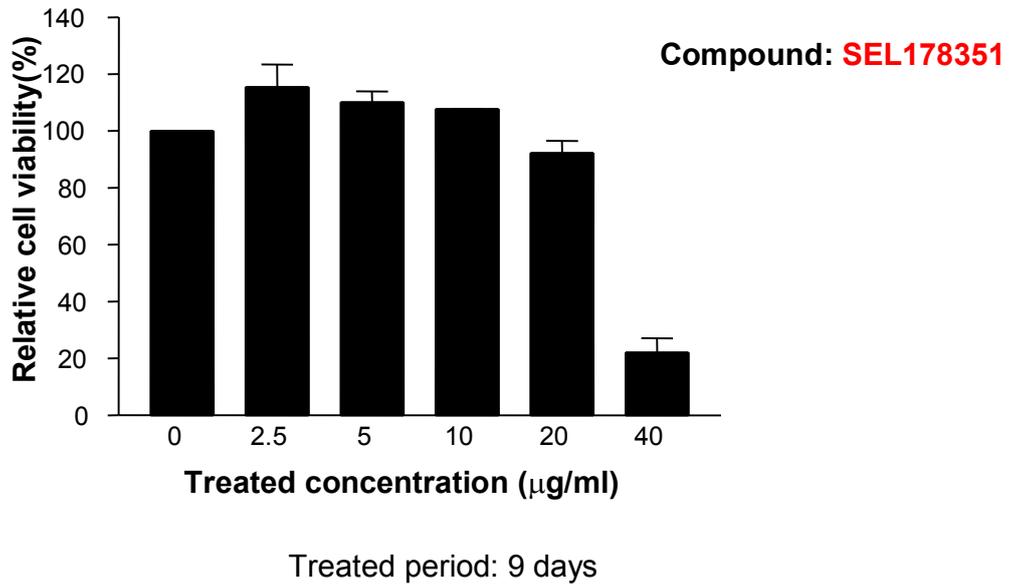
圖二十六、山煙草有機萃取物SEL125321對HepG2 2.2.15 肝癌細胞中B型肝炎病毒表面及e抗原表現之時間效應



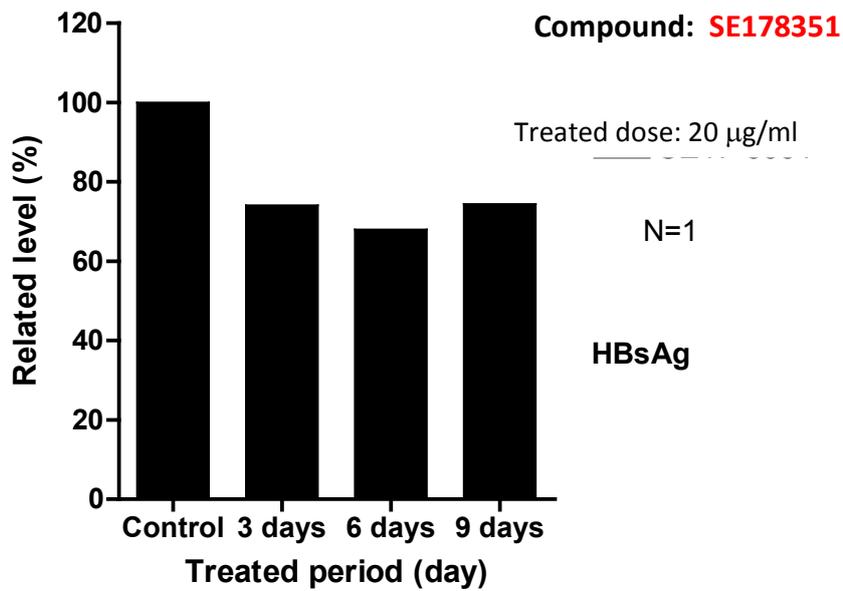
圖二十七、山煙草有機萃取物SEL17742對HepG2 2.2.15 肝癌細胞毒殺性之影響



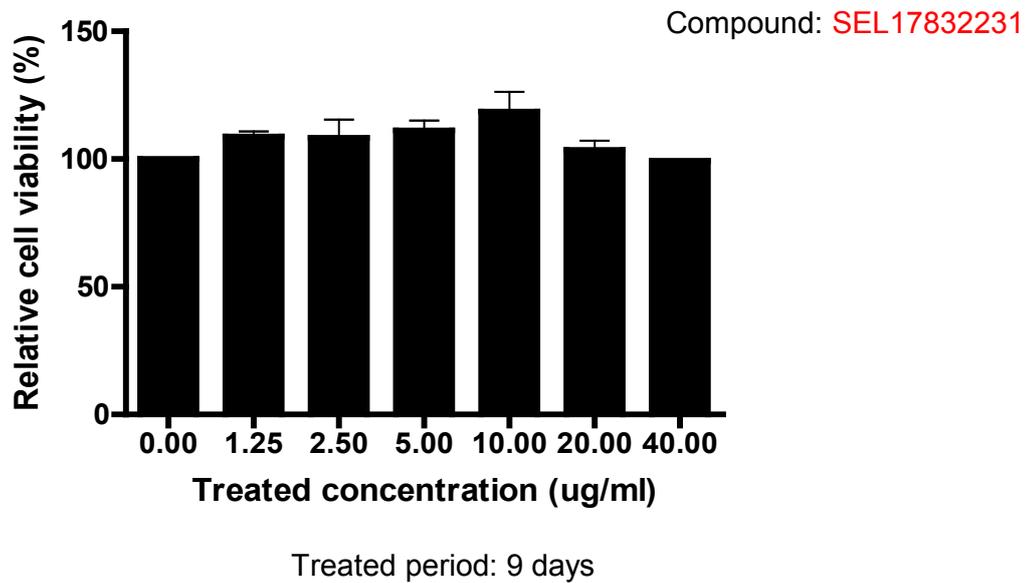
圖二十八、山煙草有機萃取物SEL17742對HepG2 2.2.15 肝癌細胞中B型肝炎病毒表面及e抗原表現之時間效應



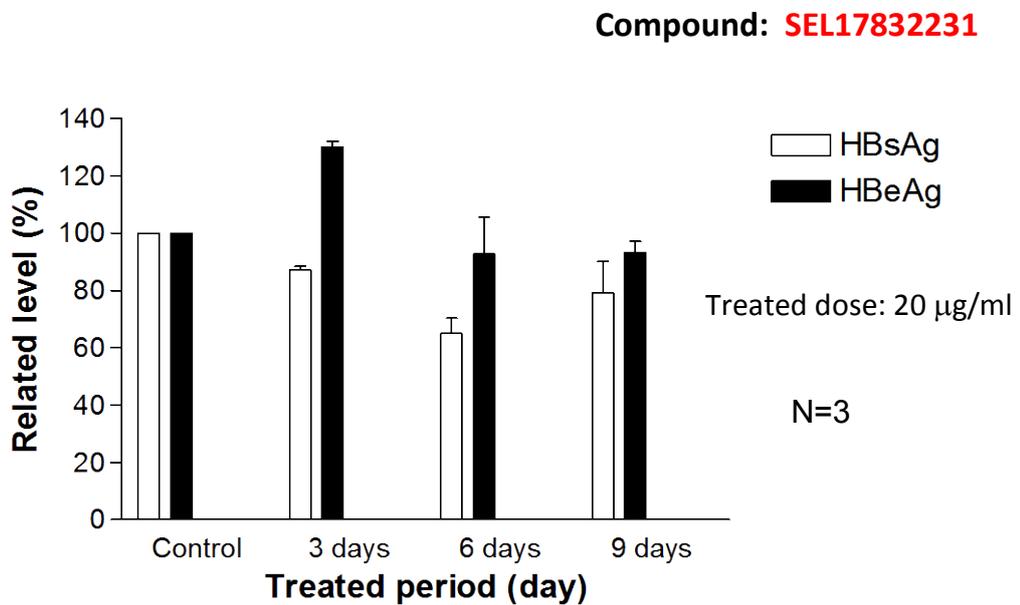
圖二十九、山煙草有機萃萃取物SEL17832231對HepG2 2.2.15 肝癌細胞毒殺性之影響



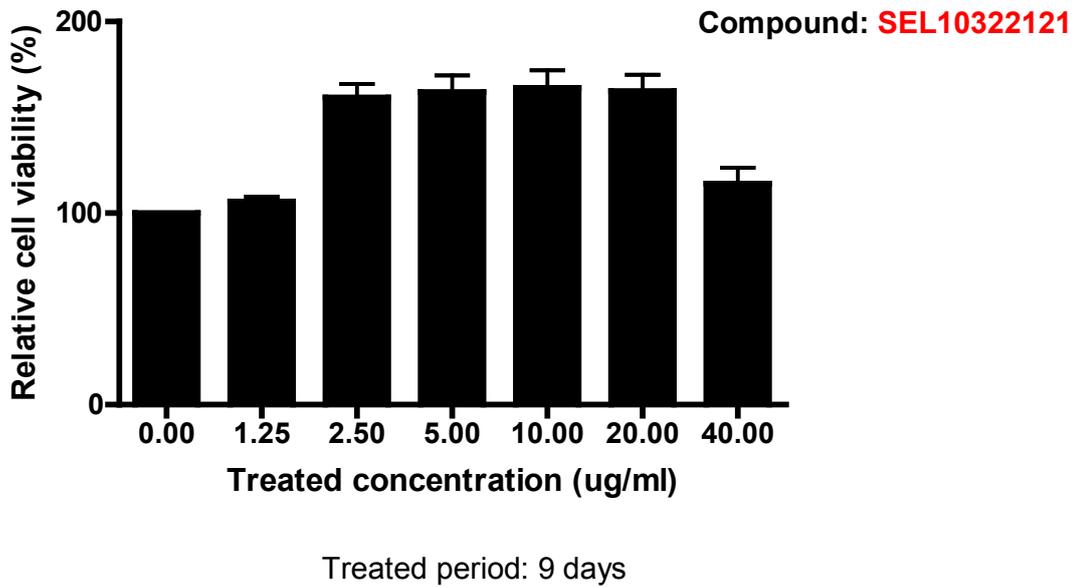
圖三十、山煙草有機萃萃取物SEL178351對HepG2 2.2.15 肝癌細胞中B型肝炎病毒表面抗原HBsAg表現之時間效應



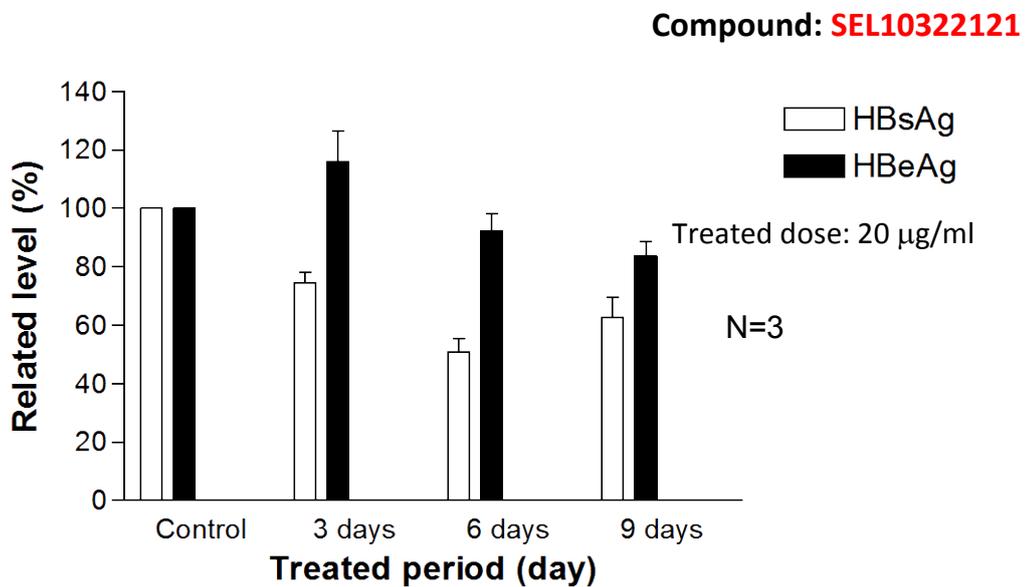
圖三十一、山煙草有機萃取物SEL17832231對HepG2 2.2.15 肝癌細胞毒殺性之影響



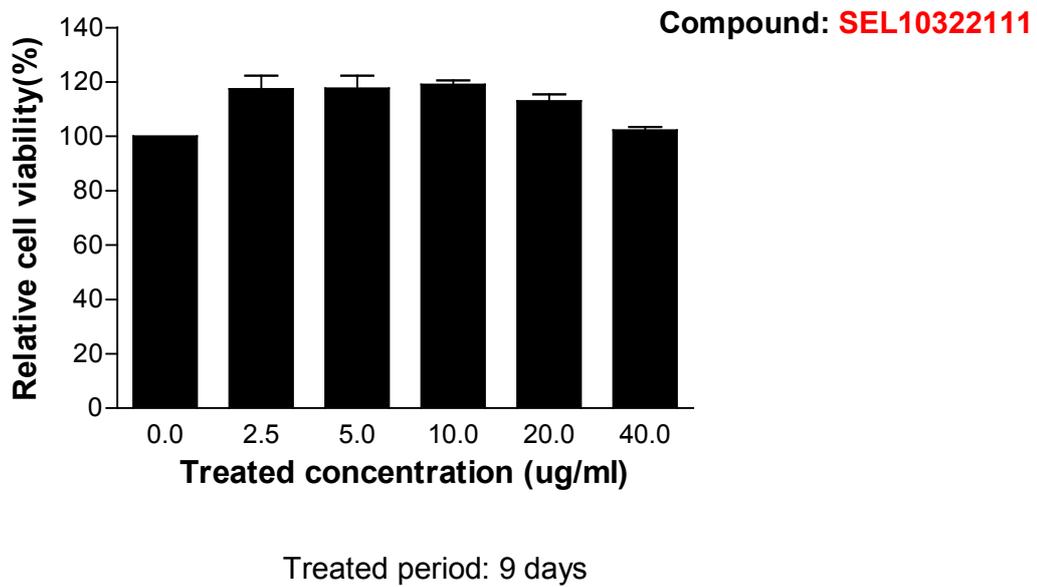
圖三十二、山煙草有機萃取物SEL17832231對HepG2 2.2.15 肝癌細胞中B型肝炎病毒表面及e抗原表現之時間效應



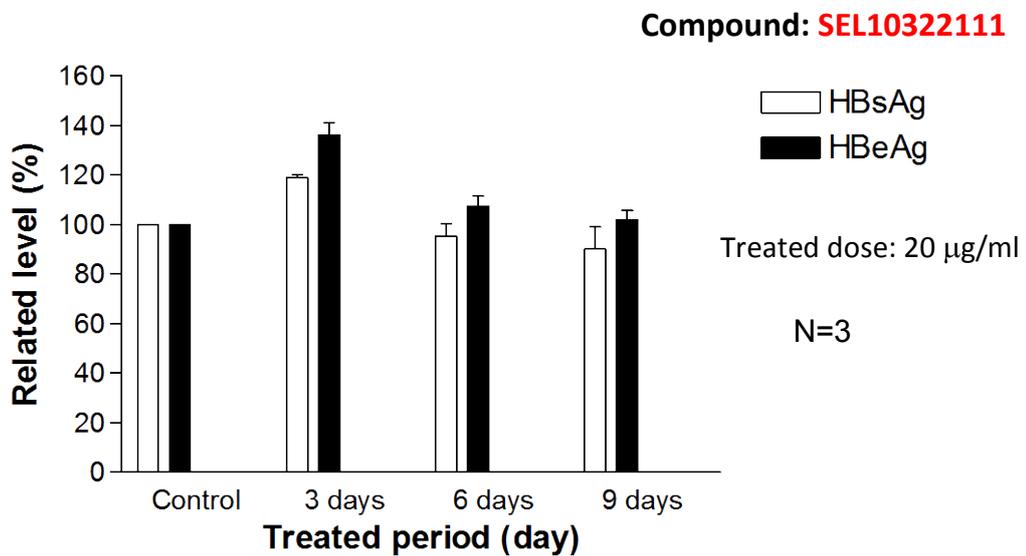
圖三十三、山煙草有機萃取物SEL10322121對HepG2 2.2.15 肝癌細胞毒殺性之影響



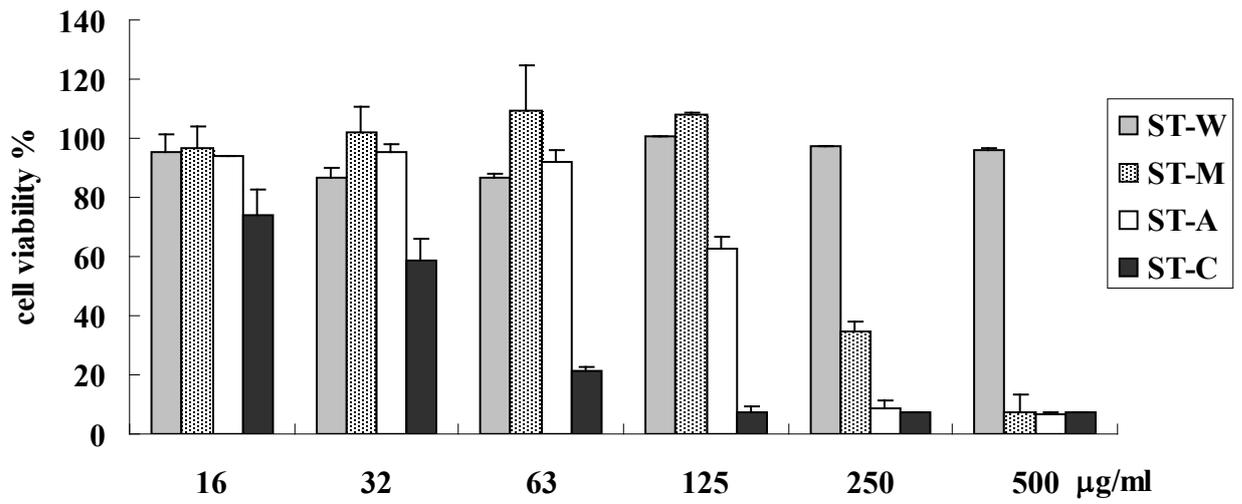
圖三十四、山煙草有機萃取物SEL10322121對HepG2 2.2.15 肝癌細胞中B型肝炎病毒表面及e抗原表現之時間效應



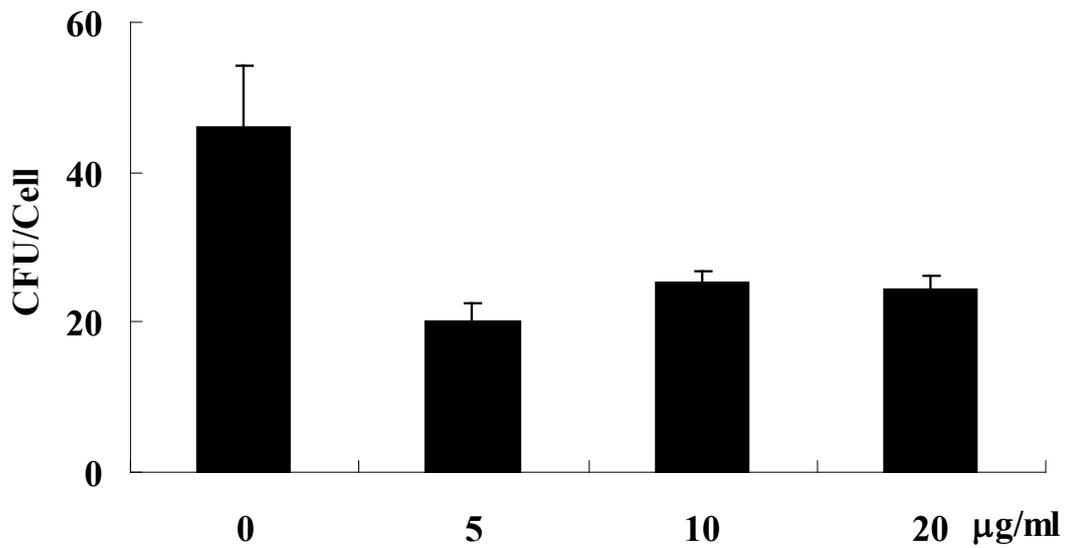
圖三十五、山煙草有機萃取出物SEL10322111對HepG2 2.2.15 肝癌細胞毒殺性之影響



圖三十六、山煙草有機萃取出物SEL10322111對HepG2 2.2.15 肝癌細胞中B型肝炎病毒表面及e抗原表現之時間效應



圖三十七、萬桃花萃取物對胃癌細胞 AGS 之毒殺效果



圖三十八、萬桃花萃取物對抑制幽門桿菌附著胃上皮細胞之效果

表一、從山煙草所分離純化之化合物活性分析總表

山煙草純化化合物 編號	細胞毒殺性		抗B型肝炎病毒	
	活性測試與否	是否具有 細胞毒殺性 ( $\mu\text{g/ml}$ )	活性測試與否	是否具抗病毒活性
SEL93944	●	>40	○	○
SEL9363625	●	>40	●	★
SEL125321	●	>20	●	★
SEL17742	●	>20	●	★
SEL178351	●	>20	●	★
SEL17832231	●	>40	●	★
SEL10322121	●	>40	●	★
SEL10322122	○	○	○	○
SEL1783231	○	○	○	○
SEL10322111	●	>40	●	☆
SEL179232225	●	○	●	☆
SEL1792311	○	○	○	○
SEL1031222	●	○	●	○

● 已測試活性      ○ 未經活性測試  
★ 具有抗B型病毒活性      ☆ 不具抗肝炎病毒活性

表二、萬桃花的抽取物對 *H. pylori* 標準株的抑菌效果

Plant extract	Inhibition zoon (mm)				
	Concentration (mg/ml)				
	50	25	10	5	2.5
ST-W	13	—	—	—	—
ST-M	10	9.5	—	—	—
ST-A	9	9	—	—	—
ST-C	17	16.5	12.5	9	—

—: No inhibition observed

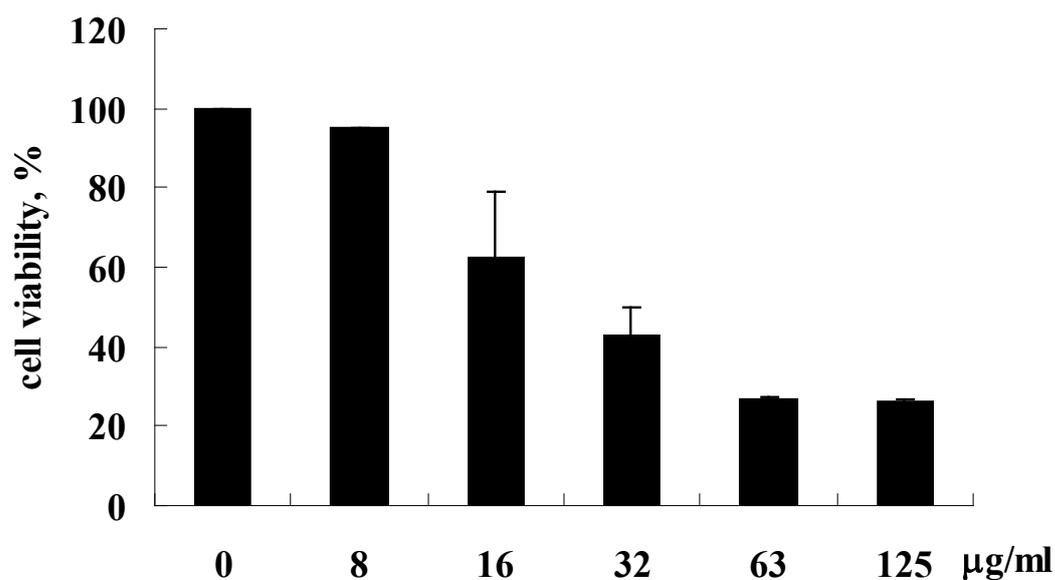
表三、山煙草與萬桃花的提取物對 *H. pylori* 標準株與臨床抗藥菌株的抑菌效果

Plant extract <sup>a</sup>	Inhibition zoon (mm)				
	<i>H. pylori</i> strain				
	26695	V633	V1254	V1354	V2356
SE-W	—	—	—	—	—
SE-M	—	10.5	13	11.25	10.75
SE-A	—	11.5	12.75	10.75	10.5
SE-C	—	13	11.5	10.75	10.5
ST-W	13	12	13.75	16.75	20.5
ST-M	10	10.5	11	9.5	10
ST-A	9	9.5	11	10	11
ST-C	17	12	14	13	12.5
CLR <sup>c</sup>	44.25	—	—	—	—
MTZ <sup>d</sup>	31	—	—	—	—

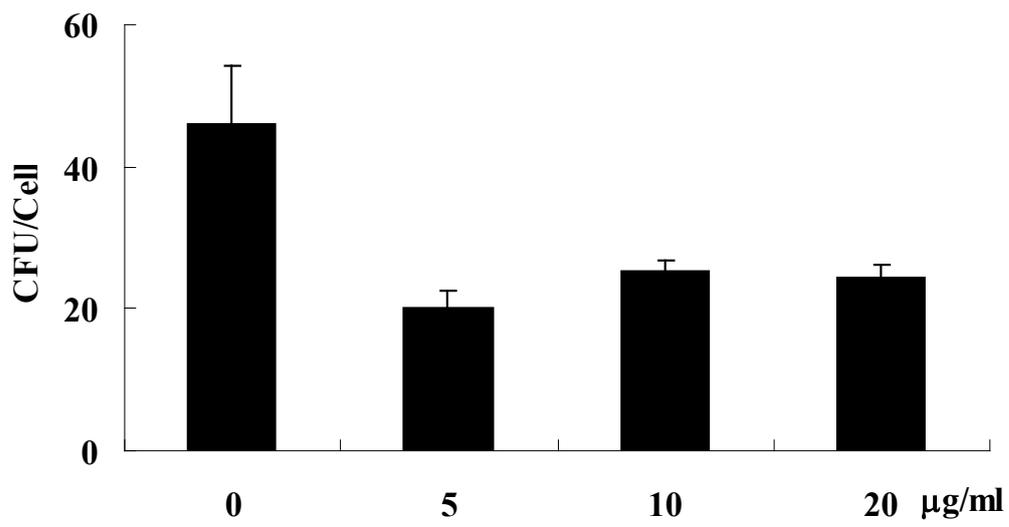
<sup>a</sup>: the amount of plant extracts in a disc were 50mg/ml

<sup>c</sup>: 0.05mg/ml of clarithromycin

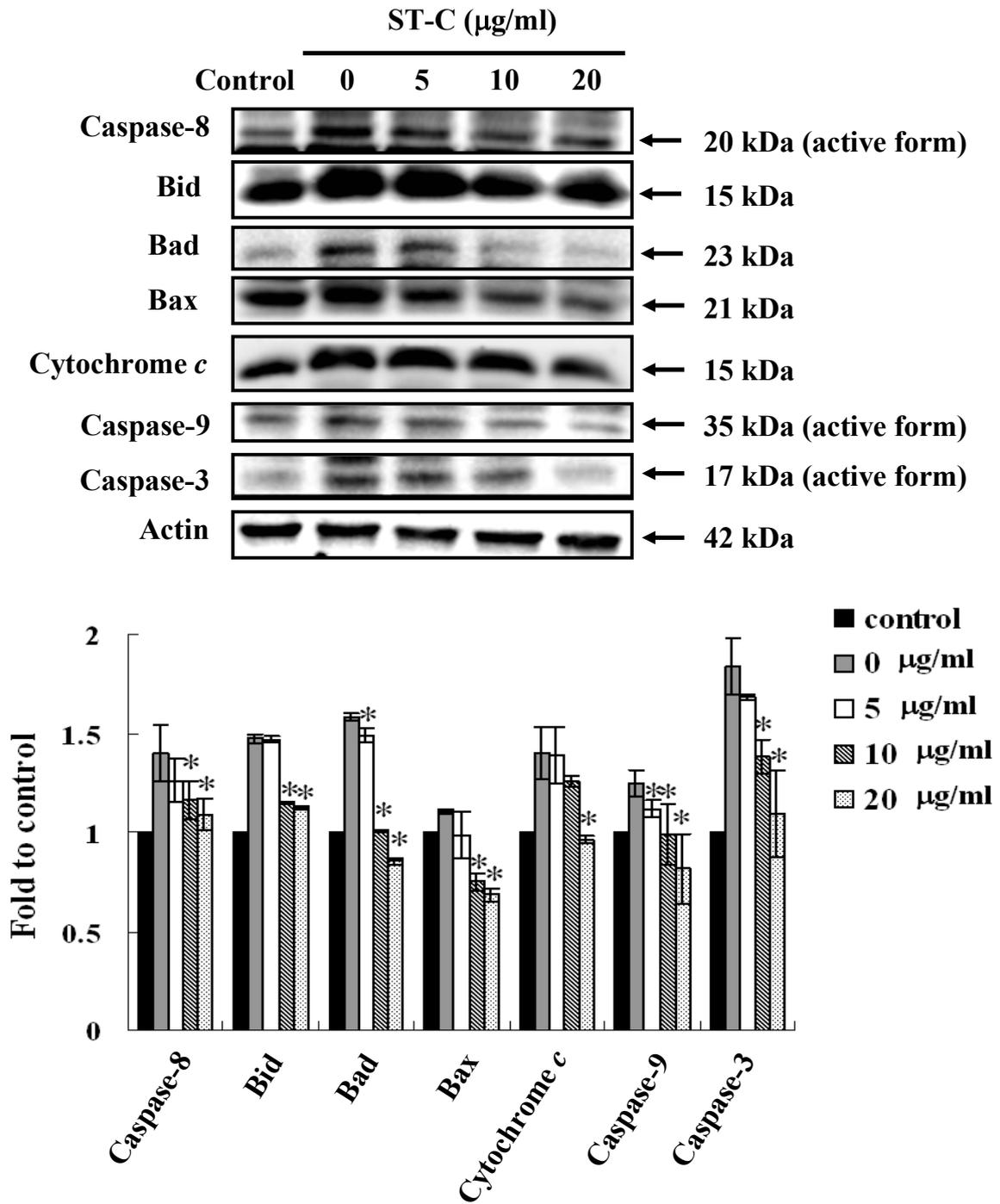
<sup>d</sup>: 0.8mg/ml of metronidazole



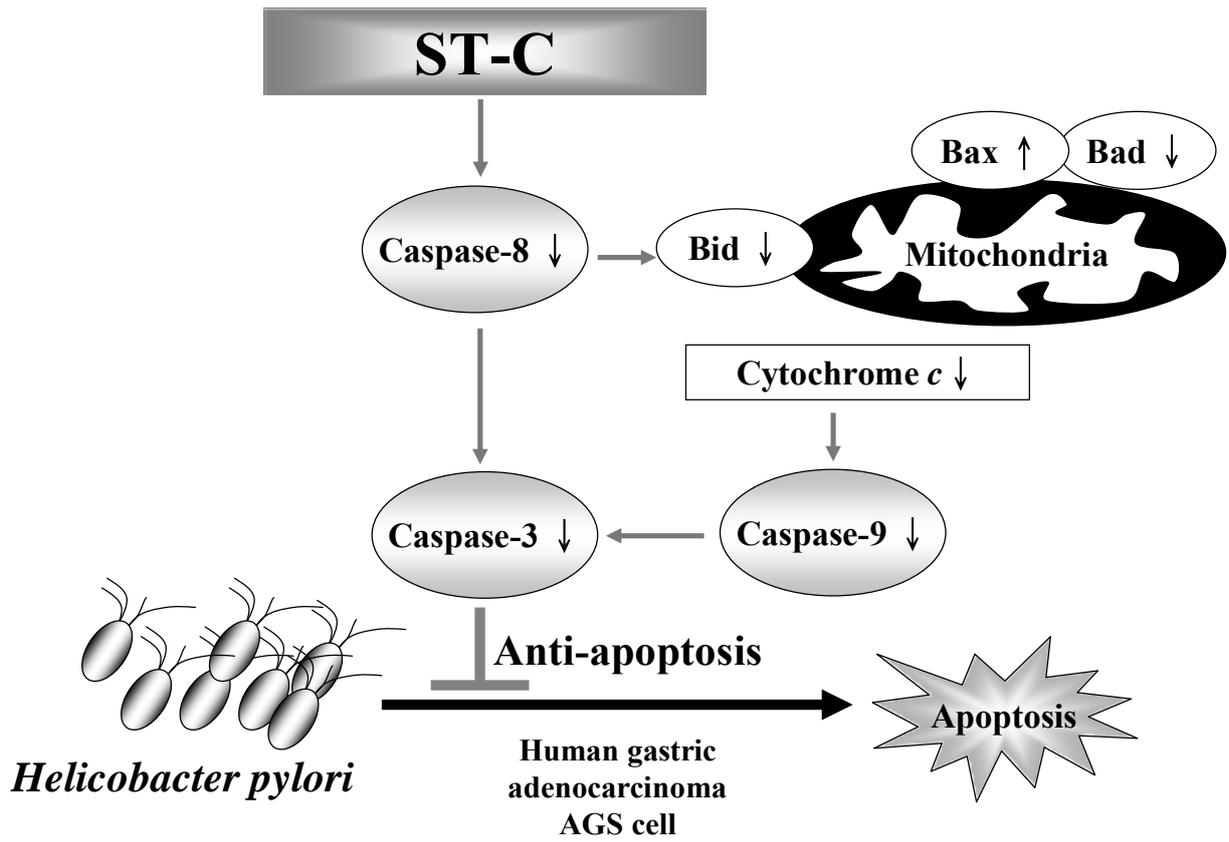
圖三十九、ST-C 對 AGS 細胞之毒性測試。



圖四十、ST-C 對 *H. pylori* 附著於 AGS 細胞之影響。



圖四十一、ST-C 對 *H. pylori* 感染引起 AGS 細胞凋亡之影響。



圖四十二、ST-C 對治療 *H. pylori* 感染胃上皮細胞 AGS 細胞之可能機轉。

# 小型可攜式舌診系統(2-1)

蔣依吾

國立中山大學資訊工程系

## 摘要

主持人執行衛生署中醫藥委員會 90 至 92 年度之中醫舌診標準化整合研究計劃(CCMP90-RD-017、90.06.01~90.12.31、CCMP91-RD-110、91.01.01~91.12.31、CCMP92-RD-102、92.01.01~ 92.12.31)中，業已發展一可自動分析舌部影像特徵之中醫舌診電腦化系統，並經中醫藥委員會申請專利，於 2008 年 4 月獲准發明專利("舌診系統及其方法"，中華民國專利證書發明第 I296110 號)，現正尋求將發明專利商業化，成為舌診臨床診治之自動化儀器；惟原有舌診系統之硬體配置計有下列面向之缺失：1.影像擷取環境：原將燈光、相機及頭部固定架均置於黑布包覆之暗房內，佔用較大空間，受檢者必須親至暗房內取像，適用範圍受限。2.影像擷取設備：原燈光、相機及頭部固定架之體積較大，不利小型化，無法達到可攜便利性。3.影像處理設備：原使用分離設置之桌上型電腦及印表機進行舌頭影像之分析與舌診判讀表之列印，體積及重量均大，不利自動化舌診儀器之可攜性。本計畫針對前述原有舌診系統缺失，提出一小型可攜式舌診系統設置，縮小燈光、相機及頭部固定架之體積及重量，使用頭戴式(head-mounted)取像方式，擷取受檢者舌頭影像，配合加強之校正程序，以補償取像環境放鬆而導致之失真，搭配小型之處理及輸出設備，令自動化舌診儀器達到可攜性及成本降低之功效。

1.首先參考國內外不同版型之頭戴式支架[8,12]，根據綜合之基本概念，先以一般紙箱瓦楞紙勾勒出雛型；2.蒐集不同材料與元件以搭建骨架，因為是頭戴式，挑選硬體元件時除體積大小外，尚需注意元件重量，故使用安全帽防震保麗龍內襯作為支架骨幹，相機選購亦以輕巧高解析度為前提，故採用八百萬畫素、具自動對焦功能之小型 webcam，以空心鋁線懸吊於大略高度，小型處理設備則使用小型筆電，傳輸模式以 USB 為主，小型列印裝置採用 SiPix 迷你隨身口袋型(A6)感應式印表機；3.考慮必須適合個人頭型，故以可調式頭戴調整器取代保麗龍，並製作一只固定長度之相機懸吊管連接相機與支架，但相機仍無法自由調整至最適合之角度；4.為了讓醫師使用時能夠簡單迅速且安全地將相機正確固定在適當位置，改以可調式伸縮管取代相機懸吊管，再以旋鈕機構將相機固定於伸縮管末端，增加可調性以利擷取受檢者舌頭影像，在支架右側（右臉頰下緣）以鵝頸管安置校正色卡，其位置可調性相當高，方便將來做判讀之用；有鑑於使用頭戴式取像方式容易因環境放鬆而導致失真，故必須發展一套校正程序[2,3,5,13]以利其結果之精確性，藉由輸入不同舌頭影像做測試，適當修正並觀察輸出結果，同時測試程式穩定度，使軟體在不同模式[17,18]之下有正確輸出資料供進一步診斷。

計畫執行迄今業已發展一可攜性高之頭戴式支架，各元件運作穩定且取像過程迅速正確，將自動化舌診系統安置於小型處理設備（小型筆電），即時判斷與處理相機所擷取之舌頭影像，再透過小型列印裝置列印判讀結果；頭戴式支架主要機構包含頭戴調整器、可調式伸縮桿件、可調式旋轉支架，頭戴調整器可依受測者頭部大小做調整，可調式伸縮桿件與可調式旋轉支架使相機分別就縱向與全角度調整至適合拍攝之位置，相機固定於旋轉支架上，藉 USB 傳輸模式將所擷取之影像即時傳輸至小型處理設備，再透過自動化舌診系統正確無誤地判斷，同時以校正程序修正參數彌補因環境所導致之失真，實現小型可攜且自動化之目標。

關鍵詞：中醫舌診電腦化系統、舌診系統、小型可攜式舌診系統、頭戴式顯示器

# Portable Tongue Diagnosis System (2-1)

John Y. Chiang

Department of Computer Science and Engineering, National Sun Yat-sen  
University

## ABSTRACT

The principal investigator has developed a computerized system for tongue diagnosis in Traditional Chinese Medicine (TCM), which can automatically analyze the imaging features of the tongue, in implementing research projects for the standardization and integration of tongue diagnosis in TCM (CCMP90-RD-017, 90.06.01~90.12.31, CCMP91-RD-110, 91.01.01~91.12.31, CCMP92-RD-102, 92.01.01~ 92.12.31) for the Committee on Chinese Medicine and Pharmacy (CCMP), DOH, from 2001 to 2003. A patent has been applied for the system by CCMP and was granted as an invention patent in April, 2008 ("Tongue diagnosis system and its method", ROC Patent: Invention No. I296110). However, several aspects of shortcoming are uncovered for the original hardware configuration of the tongue diagnosis system during the instrumentation process as the follows: 1. Image acquisition environment: originally, in order to maintain the consistency of the external environmental conditions during the image acquisition, lighting, camera, and the head holding bracket were placed in a darkroom covered with black cloth, which occupied rather large space. 2. Image acquisition equipment: the original lighting, camera, and the head holding bracket were rather bulky in size to be miniaturized to the point of easy portability. 3. Image-processing equipment: originally, separated desktop computer and printer were used to perform tongue image analysis and to print tongue diagnosis interpretation table.

1. First, different versions and types of head-mounted brackets from domestic and international sources are referenced [8,12], and outline of prototypes are sketched out initially using corrugated cardboards from common cardboard boxes based on synthesis of basic concepts. 2. The shock absorbent Styrofoam lining in safety helmet is adopted to build the frame and backbone. Lightweight and high resolution is also taken as the prerequisite for the procurement of cameras. A miniature laptop is used as the miniature processing equipment; the transmission mode is mainly USB-based. A SiPix Pocket mini-portable (A6) induction printer is used as the miniature printing device. 3. Adjustable helmet is used to replace Styrofoam. And a fixed length camera hanging tube is manufactured to connect the camera and the frame. However, the camera can't still be adjusted to the best angle freely. 4. The camera hanging tube is replaced with an adjustable telescopic pipe and the camera is fastened at the end of the telescopic pipe using a knob mechanism to enhance the adjustability in order to facilitate the acquisition of the tongue image of the subject. Correction color cards are placed on the right side of the bracket using a gooseneck. Its position is highly

adjustable to facilitate interpretation in the future. Because the head-mounted imaging method is prone to distortion due to relaxation of environment, a set of correction procedures [2, 3, 5, 13] must be developed to facilitate the accuracy of the results.

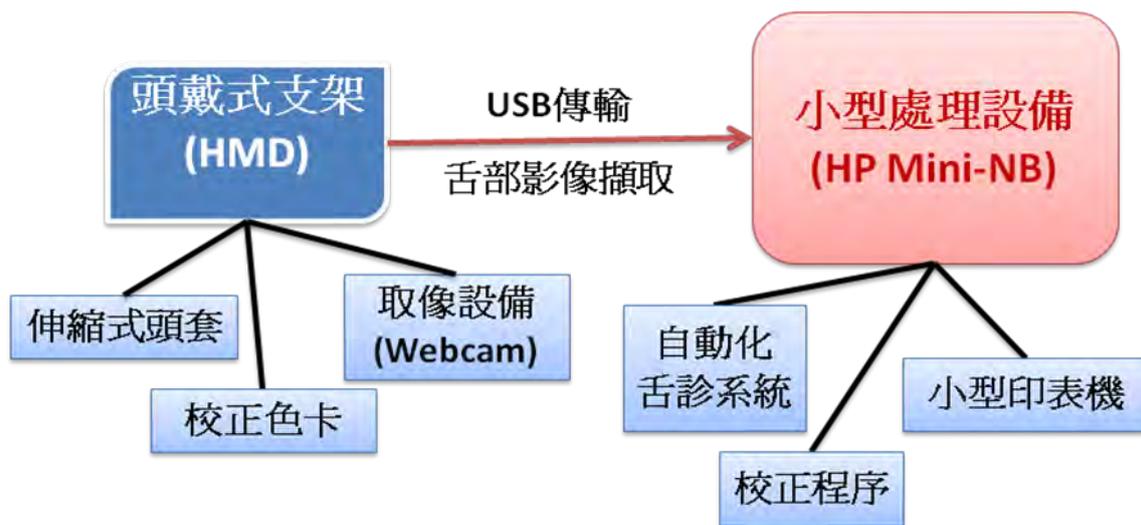
A head-mounted bracket with high portability has been developed; each component operates stably and the imaging process is quick and accurate. The automated tongue diagnosis system is installed on a mini-processing equipment (a mini-laptop) to interpret and process the tongue images captured by the camera in real time. The results are printed out through a mini-printing device for interpretation. The primary structure of the head-mounted bracket consists of an adjustable helmet, an adjustable telescopic pole, and an adjustable rotation bracket. The adjustable helmet can be adjusted according to the head size of the subject. They are then interpreted correctly without error through the automatic tongue diagnosis system and parameters are corrected using correction procedures to compensate for distortion due to environment to achieve the goal of miniature, portability, and automation.

**Keywords:** Computerized system for tongue diagnosis in Traditional Chinese Medicine, Tongue diagnosis system, Miniature Portable Tongue Diagnosis System, Head-mounted display.

## 壹、前言

主持人執行衛生署中醫藥委員會 90 至 92 年度之中醫舌診標準化整合研究計劃（CCMP90-RD-017, 90.06.01~ 90.12.31、CCMP91-RD-110, 91.01.01~ 91.12.31、CCMP92-RD-102, 92.01.01~ 92.12.31）中，業已發展一可自動分析舌部影像特徵之中醫舌診電腦化系統，並經中醫藥委員會申請專利，於 2008 年 4 月獲准發明專利（"舌診系統及其方法"，中華民國專利證書發明第 I296110 號），現正尋求將發明專利商業化，成為舌診臨床診治之自動化儀器；惟原有舌診系統之配置，於儀器化過程中，計有下列面向之缺失：1.影像擷取環境：原為求影像擷取時之外在環境條件一致性，將燈光、相機及頭部固定架均置於黑布包覆之暗房內，佔用較大空間，受檢者必須親至暗房內取像，無法遷就病情較為嚴重患者，適用範圍受限。2.影像擷取設備：原燈光、相機及頭部固定架之體積較大，不利小型化，無法達到可攜之便利性，且相機之取像解析度高，導致儲存、處理及傳送所擷取舌頭影像之額外負荷，系統成本無法降低，對自動化舌診儀器之推廣造成阻礙。3.影像處理設備：原使用分離設置之桌上型電腦及印表機進行舌頭影像之分析與舌診判讀表之列印，體積及重量均大，不利自動化舌診儀器之可攜性。

## 貳、材料與方法



本計畫針對前述原有舌診系統缺失，提出一小型可攜式舌診系統設置，縮小燈光、相機及頭部固定架之體積及重量，使用頭戴式取像方式，擷取受檢者舌頭影像，配合加強之校正程序，以補償取像環境放鬆而導致之失真，搭配小型之處理及輸出設備，令自動化舌診儀器達到可攜性及成本降低之功效。

小型可攜式舌診系統硬體結構圖如上圖，頭戴式支架主要由三個機構組成，利用不同元件材料將其組裝固定，小型處理設備搭配原自動化舌診系統及校正程序，以小型印表機列印正確判讀結果，以下針對頭戴式支架各階段使用材料與製作方式條列說明：

### 一、基本雛形



材料：  
厚紙板  
紙箱瓦楞紙  
軟墊  
訂書針  
透明膠帶  
魔鬼粘

圖 1、基本雛形

製作方法：起初參考國內外不同版型之頭戴式支架，以可攜度與配戴方便為原則，首先根據一般人頭部形狀以瓦楞紙大略圍出一環狀架構，並在上端另圍出一帶狀環扣固定頭部上緣，將攝影機固定架懸掛於懸吊架末端，攝影機懸吊架由後方左右兩側固定後往前拉至鼻頭前以降低攝影機之重量負荷，同時製作兩條側支架置於臉頰左右兩側以懸掛色卡，再用魔鬼粘將軟墊固定於支架後端內緣以增加配戴舒適性，最後以訂書針將關節部分訂牢，纏繞透明膠帶增加穩固性，即完成頭戴式支架雛形。

## 二、保麗龍骨幹



### 材料：

安全帽防震保麗龍內襯

網狀軟墊

實心鋁線

黑色防水膠布

透明膠帶

2M usb 延長線

相機

圖 2、保麗龍骨幹

製作方式：有了以上雛型，隨即開始以不同材料開始搭建骨架，考慮支架堅固性，使用安全帽防震保麗龍內襯裁切成環狀架構適合個人頭型，外皮以透明膠帶包覆，內層使用網狀軟墊以增加配戴時與頭部之摩擦力，避免因個人頭型不一而有支架滑落之疑慮，同時亦提升舒適性，下緣以黑色防水膠布環繞緊貼，避免與皮膚摩擦而造成不舒適感，相機以實心鋁線纏繞固定於保利龍頭套前端，使用鋁線具有不易生鏽、延展性佳等優點，最後將 usb 延長線接上相機並沿頭套邊緣固定，即完成保麗龍骨幹設計。

### 三、可調式伸縮頭套



材料：

頭戴調整器

實心鋁線

2M usb 延長線

相機

圖 3、可調式伸縮頭套

製作方式：將鋁線纏繞於頭戴調整器前端，另一端同樣纏繞相機，接上 usb 延長線，並調整至適合拍攝之角度，可調整度較上兩者理想，惟有色卡不易懸掛之缺失，原考慮以無線傳輸方式取代 usb 傳輸，但發送端需另加裝電池元件，且傳輸效率不如預期，故無採納。

### 四、定桿機構之可調式伸縮頭套



材料：

頭戴調整器

蝶型螺帽

球型夾具

空心鋁管

球型支架

空心塑膠相機固定架

黑色防水膠布

3M 瞬間膠

實心鋁線

usb 延長線

相機

標準校色卡 x2 (灰階、彩色)

圖 4、定桿機構之可調式伸縮頭套

製作方式：首先將空心塑膠管以及空心鋁管裁切至適合長度，利用瞬間膠將兩者併攏接合，空心鋁管末端壓成一字扁狀同樣以瞬間膠與球型支架黏合，再用黑色防水膠布包覆外皮，即完成固定桿件之相機懸吊架，利用球型夾具將頭戴調整器前端之球型固定器與相機懸吊架結合，中間鑽上螺絲孔以蝶型螺帽旋緊，以便日後手動調整鬆緊度，整體機構主要藉此關節進行相機 360 度調整動作，最後再以實心鋁線將校正色卡懸掛於前端左側，接上相機與 usb 延長線，完成整體機構設計。

## 五、頭戴式支架



圖 5、頭戴式支架

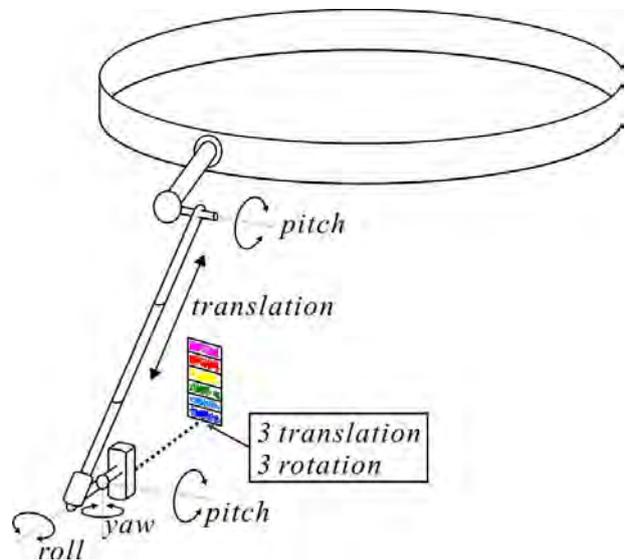


圖 6、頭戴式支架整體機構圖

材料：

- ①頭戴調整器、②碟型螺帽、③U 型螺絲、④標準色卡調整桿件
- ⑤螺帽 x2、⑥墊片 x2、⑦螺絲、⑧球型夾具
- ⑨可調式伸縮桿件（可調式範圍 10~30cm）、⑩相機
- ⑪可調式旋轉支架（縱向 0~95 度，橫向 0~360 度，擺動-10~10 度）
- ⑫標準色卡支架、⑬標準校色卡 x 2（灰階、彩色）。

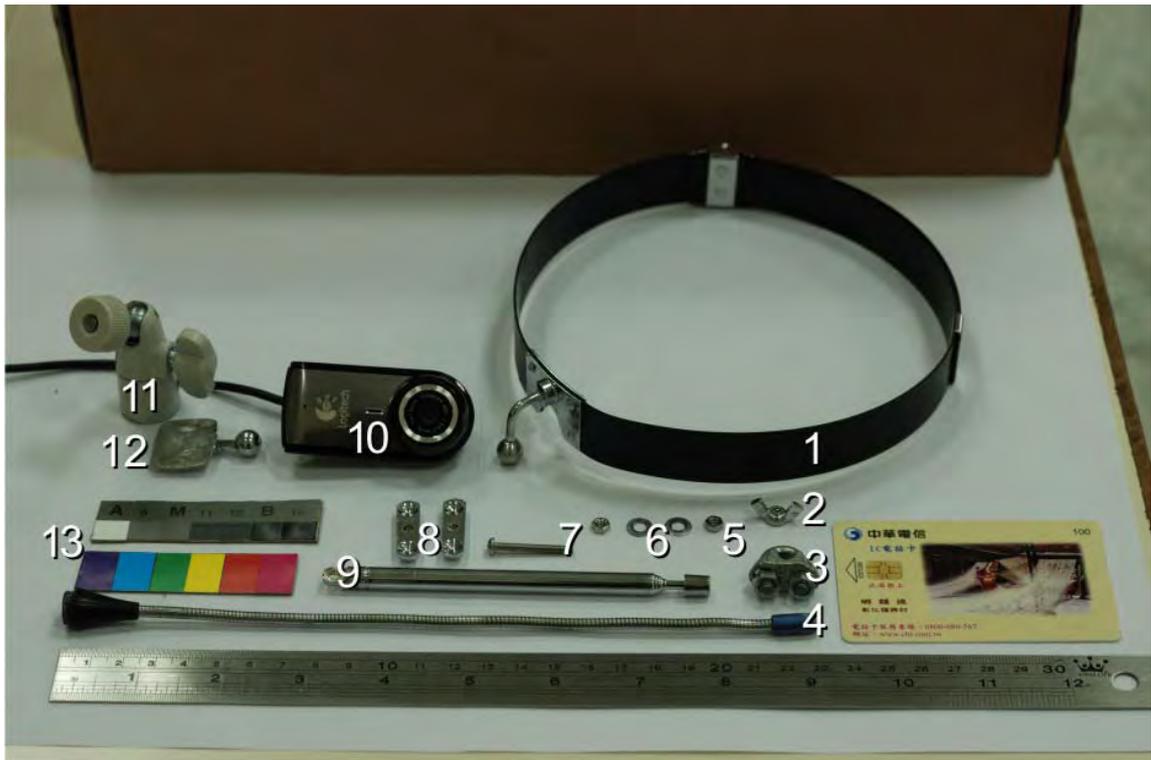


圖 7、總元件材料與編號

製作方式：「頭戴調整器」①前方具有一個球型接頭，以螺絲⑦拴緊球型夾具⑧後，即可沿用螺絲作為「可調式伸縮桿件」⑨縱向旋轉之旋轉軸，為使可調式伸縮桿件能平滑轉動，故在可調式伸縮桿件軸孔兩側加上墊片⑥提升平滑度，並採用蝶帽元件②以便於方便且快速鎖緊與鬆脫桿件，可調式伸縮桿件下端配接一組 U 型螺絲③，使之再與「可調式旋轉支架」⑪做緊配合（closed pattern），相機⑩背面端以膠黏方式與可調式旋轉支架之支撐架連結，透過可調式旋轉支架側邊之蝶型旋鈕鬆開後，即可在可調式範圍內調整旋轉支架，而改變相機三軸向之旋轉角度，標準校色卡桿件④固定於可調式伸縮桿件末端，可輕易改變色卡支架⑫位置使更準確擺放標準色卡⑬；期能利用可調式伸縮桿件之縱向旋轉與伸縮平移功能，快速將攝影機定位，定位後再利用可調式旋轉支架調整相機三軸向之旋轉角度，使相機盡可能對準並拍攝完整之取像對象。

## 參、結果

頭戴式支架各階段設計製作成果如圖 1-5，其中圖 5 為計畫執行迄今實驗配戴穩定且能夠迅速取像之版本，總元件材料與編號如圖 7，重量如表 1，依序分項參照圖與比例尺如圖 8-20；主機構如圖 6，共有五個自由度 (degree of freedom, DOF)，其中兩個為「可調式伸縮桿件」之縱向旋轉 (pitch) 與伸縮平移 (translation)，另三個為「可調式旋轉支架」之縱向旋轉 (pitch)、橫向旋轉 (roll) 與擺動 (yaw)，另標準色卡桿件為軟質鵝頸管 (gooseneck)，三軸旋轉自由度上具有明顯可調性，也可經由軸向彎曲改變三軸向之平移，此點對於標準色卡置放於擷取物旁具有高度可調性；小型處理設備如圖 21，小型印表機如圖 25，各機構元件可調自由度之示意圖與實際元件對照如圖 22-24，受測者臨床配戴情況如圖 26，舌部影像擷取結果如圖 27, 29，經校正程序 (白平衡、亮度) 後之影像如圖 28, 30。

表 1、機構、元件、材料重量表

類別	名稱	重量(單位:克)
機構	1. 基本雛型	164
	2. 保麗龍骨幹(不含攝影機)	97
	3. 保麗龍骨幹(含攝影機)	151
	4. 頭戴式支架(不含攝影機)	128
	5. 頭戴式支架(含攝影機)	182
元件 與 材料	1. 頭戴調整器	31
	2. 碟型螺帽	2
	3. U型螺絲	11
	4. 標準色卡調整桿件	11
	5. 螺帽	1
	6. 墊片	1
	7. 螺絲	1
	8. 球型夾具	10
	9. 可調式伸縮桿件	19
	10. 相機	51
	11. 可調式旋轉支架	38
	12. 標準校色卡支架	2
	13. 標準校色卡	1



圖 8、頭戴調整器



圖 9、蝶型螺帽



圖 10、U 型螺絲

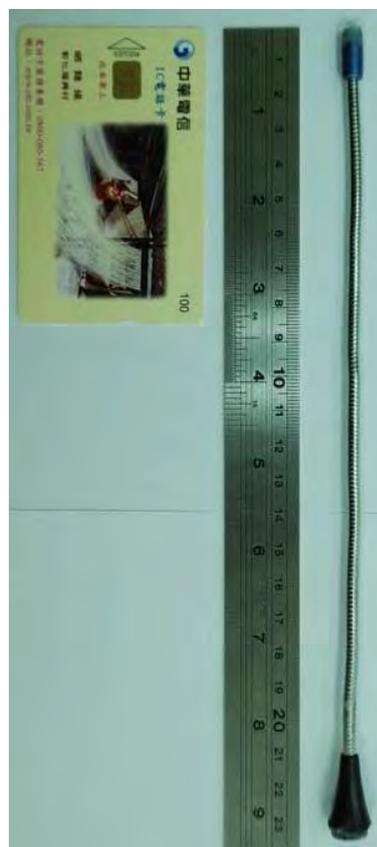


圖 11、標準色卡調整桿件



圖 12、螺帽



圖 13、墊片



圖 14、螺絲



圖 15、球型夾具

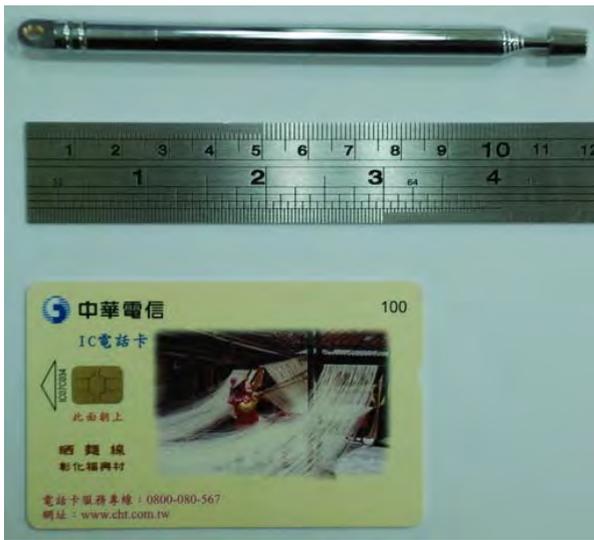


圖 16、可調式伸縮桿件（縮短）



圖 18、相機



圖 17、可調式伸縮桿件（伸長）



圖 19、可調式旋轉支架



圖 20、標準校色卡



圖 21、影像處理設備

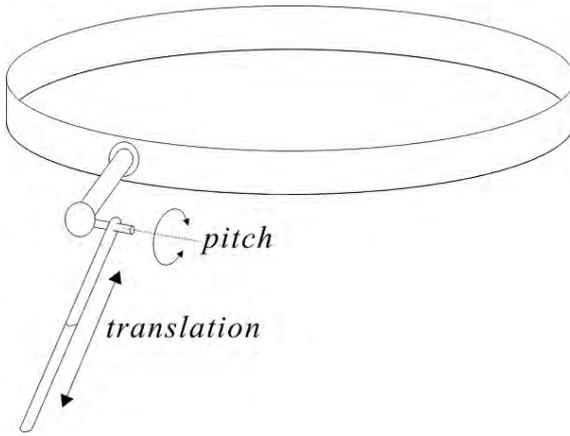


圖 22、「可調式伸縮桿件」之縱向旋轉(pitch)與伸縮平移(translation)

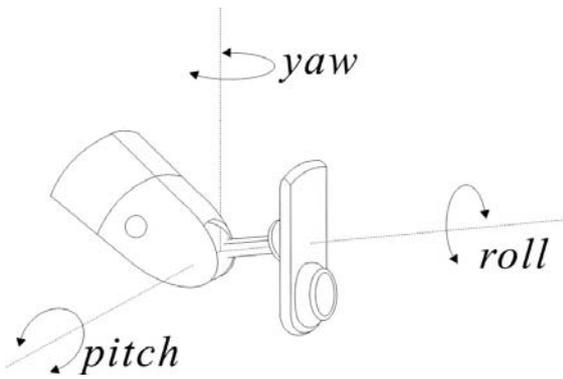


圖 23、「可調式旋轉支架」之縱向旋轉(pitch)、橫向旋轉(roll)與擺動(yaw)

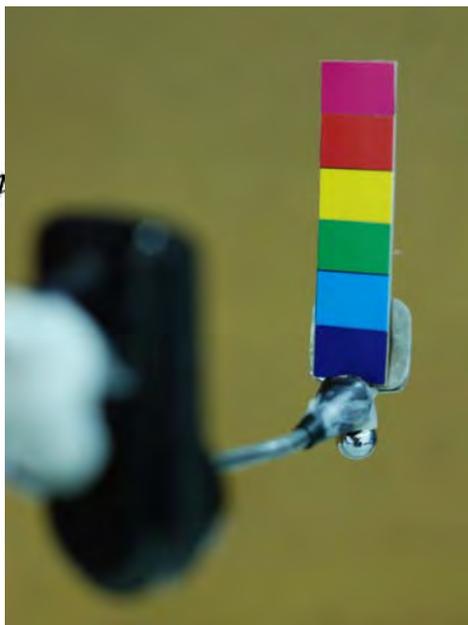
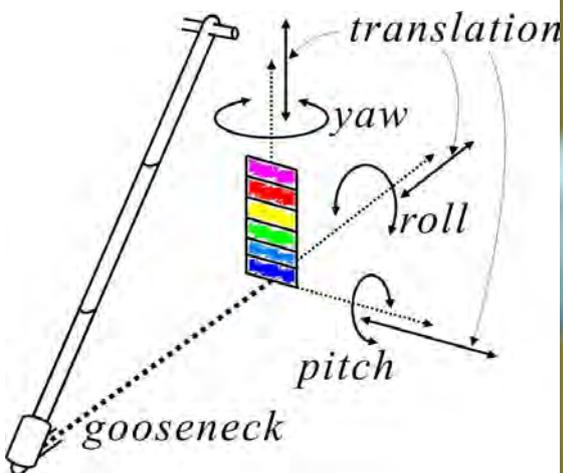


圖 24、標準校色卡調整桿件(鵝頸管 gooseneck)



圖 25、小型印表機



圖 26、受測者臨床配戴圖



圖 27、原始舌部影像 1 擷取圖



圖 28、校正後之舌部影像 1 擷取圖



圖 29、原始舌部影像 2 擷取圖

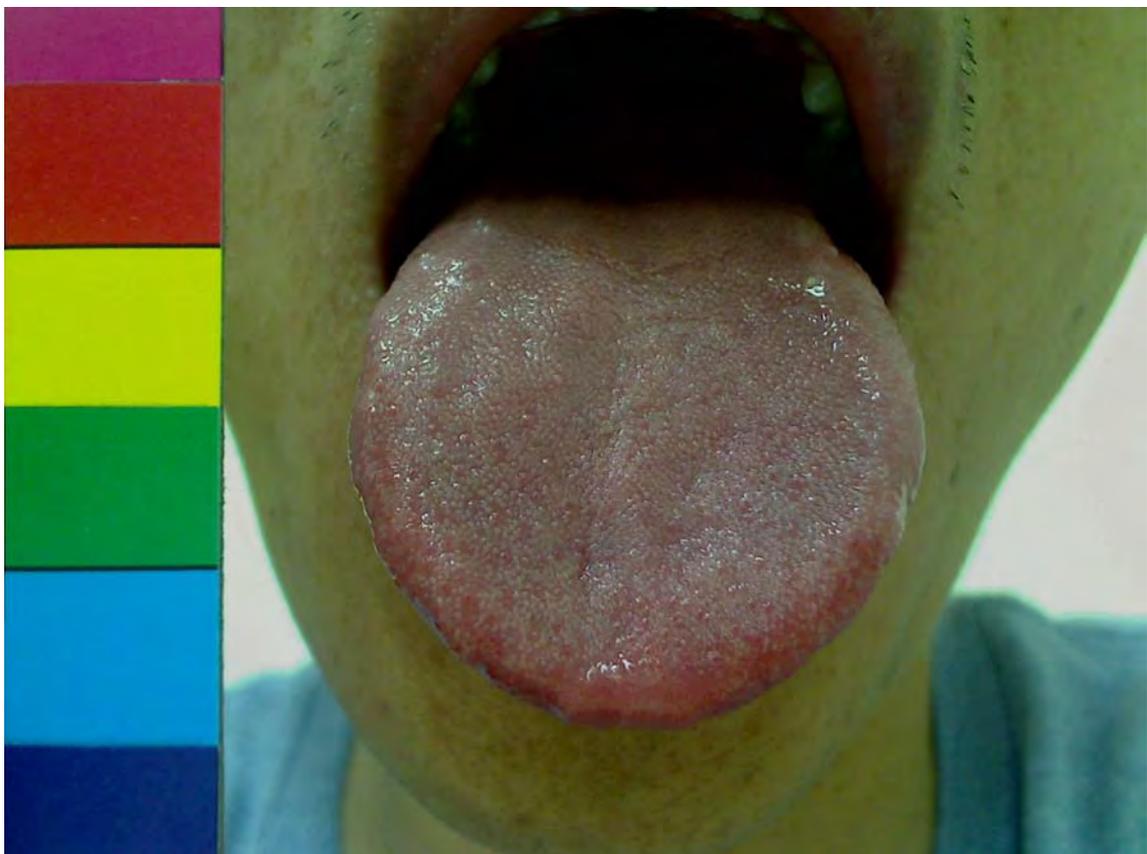


圖 30、校正後之舌部影像 2 擷取圖

## 肆、討論

整體計畫尚有以下欲改進之處：

- 一、以目前使用之頭戴調整器而言，僅於受測者頭部圍繞一圈做固定，雖可針對不同使用者頭部大小做調整，但由於整體機構重心偏向前方，穩固度仍嫌不足，可考慮以多層支架環繞頭部上緣，後端加上固定旋鈕，以提升整體穩固度，現成機構如圖 31。



圖 31、多層支架與固定旋鈕

- 二、可調式旋轉支架其內部主結構屬鐵製品，總重量有 38 克，佩戴於頭部可明顯感覺到其重量，未來考慮以塑膠或其他輕型材質取代之，以減輕配戴時不舒適感。
- 三、校正程序之開發需以大量受測者之舌部影像資料為基礎，進行細部參數調整[22]及補償因取像環境放鬆而導致之失真，一般光源下目前均可透過校正程序調整，未來期許針對不同特殊環境與光源種類進行更細部之校正。
- 四、頭戴調整器與可調式伸縮桿件目前以蝶型螺帽搭配球型夾具固定，此部分屬固定式關節，未來可以一輕量化機構取代之，而非使用拼裝方式銜接，亦可增加整體機構穩固性。
- 五、因取向環境放鬆，導致影像大小、解析度、亮度資訊發生失真，於原始自動化舌診系統[1]內應修改相關參數以適應此差異，改成適用於小型可攜式舌診系統之自動化舌診系統。

## 伍、結論與建議

計畫執行迄今業已發展一可攜性高之頭戴式支架，將自動化舌診系統安置於小型處理設備，同時以校正程序修正參數彌補因環境所導致之失真，即時判斷與處理相機所截取之舌頭影像，再將自動化之判讀結果以小型列印設備印出；未來可使用本小型可攜式舌診系統輔助中醫臨床診斷，而不必要求病人進入大型暗房取像，其取像結果亦可即時分析比對，對舌診臨床診斷具莫大助益。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP98-RD-031 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. Lun-chien Lo, Mark Chun-cheng Hou, Ying-ling Chen, John Y. Chiang and Jeng-jiun Shyu: Automatic Tongue Diagnosis System, *The 2nd International Conference on BioMedical Engineering and Informatics (BMEI'09)*; Tianjin, China, 2009/10/17-19: 140-144.
2. 林凌：光譜法舌診度量化中光源影響的研究。生命科學儀器；2008/05。
3. 宋賢杰：採集舌象用光源的光譜研究。光譜學與光譜分析；2008/05。
4. 蔣依吾, 陳建仲, 張恆鴻, 林宏任：舌診系統及其方法。中華民國專利證書發明第 I296110 號；2008/04/21。
5. 樊艷：運用自然光拍攝數字舌圖的色彩校正方案。中外健康文摘(臨床醫藥版)；2007/08。
6. 朱慶文：便攜式舌診信息獲取與分析設備。世界科學技術-中醫藥現代化；2007/05。
7. 蔣依吾, 陳建仲, 張恆鴻, 林宏任：舌診系統及其方法。中華民國學科發明公開公報第 200623017 號；2006/07/01。
8. 林巧玲：從舌像捕捉舌象-以長庚中醫舌診儀為主的討論。國立清華大學歷史研究所碩士論文；2005。
9. 肖二鋼, 王益民：中醫舌診研究的回顧與展望。天津中醫藥(TIANJIN JOURNAL OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE)；3 期，2004。
10. 井口圭子：舌診影像擷取環境控制之研究。中國醫藥學院中國醫學研究所碩士論文；2002。
11. 趙德馨：電腦化舌象診察系統研究-健診病患之舌象檢查。中國醫藥學院中西醫結合研究所碩士論文；2002。
12. 邱創乾：中醫舌診輔助儀器之環境評估與臨床驗證。行政院衛生署中醫藥年報；2001/10。
13. 蔣依吾, 陳建仲, 林宏任, 陳雅吟, 陳祁宏：電腦化舌診影像之鏡頭校正。2001 工程科技與中西醫學應用研討會；p. 34, 2001/05/26。
14. 陳冠臻, 蔣依吾, 陳建仲, 林宏任：中醫舌診電腦化教學與評量。2000 工程科技與中西醫學應用研討會；p. 50-57, 台中, 2000/05/27。
15. 蔣依吾, 陳建仲, 張恆鴻, 馬建中：電腦化中醫舌診系統。中國中西醫結合雜誌；第二十卷, 第二期, 145 至 147 頁, 2000/02。
16. 蔣依吾, 陳建仲, 林宏任, 紀智超：中醫舌診電腦化舌下絡脈特徵擷取及

- 模糊分析。1999 中醫藥工程科技與中西醫學應用研討會；p. 51-52, 台中, 1999/05/29。
17. 葉信育, 蔣依吾, 陳建仲：中醫舌診電腦化之特徵擷取方法。1998 工程科技與中西醫學應用研討會；p. 244-251, 台中, 1998/06/06。
  18. 蔣依吾, 陳建仲, 馬建中：舌診研究中影像擷取環境之探討。第六十七屆國醫節中醫學術研討會；1997/03/09。
  19. 張永賢、邱創乾：以色彩學探討中醫舌象之研究。第六十六屆國醫節中醫學術研討會 1996/3:2。
  20. 李乃民等：中國舌診大全。學苑出版社；北京 1995:1-525, 1224-1347。
  21. 王季藜等：舌診源鑑。立得出版社；台北 1993；2-15。
  22. 尚瑞梅：舌體大小臨床意義與客觀化計量化研究。浙江中醫雜誌 1993；(11):518。
  23. 靳士英、司兆學等：瘀證舌下絡脈病理組織學研究。中醫雜誌 1992；(3)：42-43。
  24. 李樹棠、沈立明等：舌下絡脈診治意義探析。寰宇中醫雜誌 1992；(1)：37-38。
  25. 洪禎徽：舌診。立得出版社；台北。
  26. 黃帝內經章句索引。啟業書局；台北。

## 小型可攜式舌診系統(2-2)

蔣依吾

國立中山大學資訊工程系

### 摘要

#### 研究目的：

主持人執行衛生署中醫藥委員會 90 至 92 年度之中醫舌診標準化整合研究計劃(CCMP90-RD-017, 90.06.01~90.12.31、CCMP91-RD-110, 91.01.01~91.12.31、CCMP92-RD-102, 92.01.01~92.12.31)中，業已發展一可自動分析舌部影像特徵之中醫舌診電腦化系統，並經中醫藥委員會申請專利，於 2008 年 4 月獲准發明專利("舌診系統及其方法"，中華民國專利證書發明第 I296110 號)，現正尋求將發明專利商業化，成為舌診臨床診治之自動化儀器。本計畫為延續小型可攜式舌診系統(CCMP98-RD-031)之第二年計畫，目前已於第一年計畫中提出一套小型可攜式舌診系統設置，將視訊攝影機及校正用色卡整合於頭部固定支架上，並以頭戴式(Head-Mounted)取像方式，擷取受檢者舌頭影像，配合校正程序，以補償取像環境放鬆而導致失真，搭配小型處理及輸出設備，令自動化舌診儀器達到可攜性及成本降低功效。本年度計畫進行整合小型可攜式舌診系統與臨床驗證，系統整合方面包含硬體元件整合與軟體程式測試與修正，將不同硬體元件以最穩定組合方式整合於頭戴式支架，並實際測試以確認每一個硬體元件均可正常運作並盡量達到輕量化的目標，軟體測試則確保以頭戴式取像裝置擷取之舌部影像，於自動化舌診系統判讀時獲得正確的輸出結果，其中程式包含許多參數與函式，藉由輸入不同舌頭影像做測試，因具有環境放鬆而導致失真情況，故必須適當修正參數值並觀察輸出結果，同時也測試程式穩定度，使系統在不同模式之下有正確輸出資料供進一步診斷；臨床驗證則是將此系統攜至醫院內，指導各中醫師如何使用本系統，針對不同受測者判讀結果與病歷資料進行分析比對，觀察是否與實際理論或醫師判讀結果相違背，並逐漸建立舌診資料庫雛形，試用一段時間則開始進行使用分析，討論是否有改進空間，透過細部修正與臨床測試使系統更趨理想化以期望達到實際應用於臨床醫學上目標。

#### 研究方法：

小型可攜式舌診系統主要訴求重點為便利性及實用性，故硬體元件必須具備小型且輕便之特性，同時還須確認小型化後判讀功能與「自動化舌診系統」實驗結果一致性，故又加入色彩校正程序，以修正小型化後因相機元件不同或取像環境放鬆而產生誤差偏量。

本年度計畫延續上年度研究成果並進行優化及改良，以目前使用頭戴式調整器而言，僅於受測者頭部圍繞一圈做固定，雖可針對不同使用者頭部大小做調整，但由於整體機構重心偏向前方，穩固度仍嫌不足；此外拍攝環境光源改變對於舌部影像判讀是一個很大挑戰，若環境光源不足，則小型取像設備本身具有自動曝光與亮度增益等機制會介入取像程序以補償影像曝光，但易造成影像雜訊偏多而使影像畫質劣化等問題，針對上述缺失於本年度計畫執行時進行改良：

#### 1. 頭戴式支架：

首先以多層支架環繞頭部上緣在後端加上固定旋鈕以提升整體穩固度，但多層支架與固定旋鈕其重量較重，佩戴於頭部可明顯感覺到其重量，因此考慮以碳纖維材質製作支架配合鬆緊帶調整大小以減輕配戴時的不舒適感，其中碳纖維材質具有重量輕、耐磨損、抗壓等特性，於支架後端加上鬆緊帶可根據使用者頭圍的大小進行調整，可同時兼具舒適性與穩固性。

#### 2. 輔助光源：

使用高亮度 LED，具有重量輕、壽命長且可以普通電池驅動特性，在於高解析度的影像擷取設備兩旁添加輔助光源可於不同環境下擷取清晰舌部影像，使用 LED 燈源及電池驅動，可同時兼顧便利性與功能性。

#### 3. 軟體程式修正：

自動化舌診系統透過大量舌部影像資料擷取及分析，進行校正程序修正及參數微調，目前舌診系統已能有效降低不同環境拍攝之影像失真，使同一位病患於不同環境拍攝舌部影像判讀結果一致。

#### 4. 臨床驗證：

本系統具備輔助光源機制與色彩校正程序經參考彰化基督教醫院中醫部的建議及自動化舌診程式參數微調後已經可於開放環境中進行現場測試，並符合預期結果。目前小型可攜式舌診系統可支援各種臨床環境影像擷取，並於期中報告時已進行實機展示，未來還需針對各種臨床環境進一步評估系統於不同環境誤差容許範圍。

### 結果與討論：

本計畫執行迄今業已發展一套小型可攜式舌診系統，其頭戴式支架各組件運作穩定且取像過程迅速準確，將自動化舌診系統安置於小型處理設備（小型筆電），即時判斷與處理相機所擷取舌頭影像，再透過小型列印裝置列印判讀結果。頭戴式支架主要機構包含碳纖維頭戴式支架、客製化可調式伸縮桿件與旋轉支架，碳纖維頭戴式支架可透過後端鬆緊帶依受測者頭部大小做調整，客製化可調式伸縮桿件與旋轉支架使相機分別就縱向與全角度調整至適合拍攝位置並提供較高的調整準確度，將小型相機與輔助光源整合並固定於旋轉支架上，藉由電池驅動輔助光源與 USB 傳輸模式將所擷取影像即時傳輸至小型處理設備，再透過自動化舌診系統正確無誤地判斷，同時以校正程序修正參數彌補因環境所導致失真，最後再將自動化舌診系統判讀結果以小型印表機輸出，以實現小型可攜且自動化目標，小型可攜式舌診系統具備可攜性、適應性與準確性對於舌診臨床診斷具莫大助益。

關鍵詞：中醫舌診電腦化系統、舌診系統、小型可攜式舌診系統

# Portable Tongue Diagnosis System (2-2)

John Y. Chiang

Department of Computer Science and Engineering, National Sun Yat-sen  
University

## ABSTRACT

### **Aim:**

Several continuous projects (CCMP90-RD-017, 90.06.01~90.12.31, CCMP91-RD-110, 91.01.01~91.12.31, CCMP92-RD-102, 92.01.01~ 92.12.31), supported by the Committee on Chinese Medicine and Pharmacy (CCMP), DOH, from 2001 to 2003, aiming at the standardization of tongue diagnosis procedure have successfully developed an automatic tongue diagnosis system. This research result has submitted for patent application by CCMP and granted invention in April, 2008 ("Tongue diagnosis system and its method", ROC Patent: Invention No. I296110). This year's project (CCMP99-RD-105) is a second-year project of two years' efforts in adapting the above system into a portable tongue diagnosis system.

In the first year, a video camera and color calibration color were successfully integrated into the head-mounted bracket. The tongue diagnosed was captured in a head-mounted fashion. Image acquired were color calibrated first to compensate the variations caused by the lighting environment. The focus of this year's project is on clinically testing the feasibility of the portable tongue diagnosis system developed, including integration, testing and refinement of both hardware and software components. The attachment and setup of all hardware components are iteratively tested to obtain the lightest weight possible. The software program is also repeatedly enhanced by capturing and analyzing more images. The program for both the original and portable tongue diagnosis systems is integrated into a single one. Regardless of the source of image acquired, the same tongue diagnosis system can following the same analysis procedure to reach the final result.

### **Method:**

For a portable tongue diagnosis system, convenience and acceptable analysis results are two indispensable requirements. All hardware components have to be small and light-weighted. In order to increase the agreement between the original and portable tongue diagnosis systems, color calibration has to be incorporated into the pre-processing procedure to increase the robustness of the system developed in the face of versatile lighting environments and different image-capturing devices.

The head bracket developed in the first year tended to tilt towards one side and was difficult to balance the weight of video camera, color calibration card and LED light source. The auto white balancing and auto-exposure of the video camera might inadvertently interfere with the image-capturing process, resulting an excessive

amount of noise and degradation of image quality. In the face of the above drawbacks, the improvements of this year's project include:

1. Head mounted bracket:

The light-weight material, graphite, is adopted for constructing of the head mounted bracket. Three layers of hardened graphite are glued together to increase the strength of the bracket. An elastic band is attached at the end of the bracket to adapt to different head size. The rod containing video camera, color calibration card and the LED light source is connected to the bracket through a fastener. Stability and flexibility are improved significantly through this arrangement.

2. Auxiliary LED light source:

Light-weight, long service life and high intensity LED is used as the auxiliary light source to compensate for the lighting variations encountered in different environments. Not only the LED itself is small and light-weight, also the power source, driven from ordinary AAA battery, is also highly portable. Satisfactory tongue image quality is obtained.

3. Software program refinement:

Successfully integrate the portable tongue diagnosis program into the existing one. The original tongue diagnosis program is fine-tuned to accommodate variations in terms of image resolution, lighting intensity and color deviation. Regardless of the source of image captured, i.e., from the portable unit or the stationary one, the same tongue diagnosis program can obtain the diagnosis through the same procedure.

4. Clinical verification:

The system developed has been tested in the Traditional Chinese Medicine department in Changhua Christian Hospital. The results obtained are feedback to correct various system parameters and setup. It can satisfactorily meet the demands of image-capturing in different light environments. The system has also demonstrated during the mid-term report of this project. Further testing aiming at deriving the system tolerances can be performed in the future.

## **Results & Discussion:**

Both the hardware and software of the first-year prototype has been refined. Light-weight graphite is adopted for constructing of the head mounted bracket. An elastic band is attached at the end of the bracket to adapt to different head size. The rod containing video camera, color calibration card and the LED light source is connected to the bracket through a fastener. Stability and flexibility are improved significantly through this arrangement. The portable tongue diagnosis program is successfully integrated into the existing one. The original tongue diagnosis program is fine-tuned to accommodate variations in terms of image resolution, lighting intensity and color deviation. The same tongue diagnosis program can perform analysis through the same procedure for images obtained through both the portable or stationary unit. The system developed has been tested clinically. The results showed that the variations in terms of different light environments can be satisfactorily compensated. The system has demonstrated during the mid-term report of this project. Further testing aiming at deriving the system tolerances can be performed in the future.

Keywords: Computerized system for tongue diagnosis, Tongue diagnosis system, Portable Tongue Diagnosis System, Head-mounted bracket.

## 壹、前言

本計畫為延續小型可攜式舌診系統(CCMP98-RD-031)之第二年計畫，目前已於第一年計畫中提出一套小型可攜式舌診系統設置[1,4,7]，將視訊攝影機及校正用色卡[19]整合於頭部固定支架上，並以頭戴式(Head-Mounted)取像方式，擷取受檢者舌頭影像[8,11,17]，配合校正程序[5]，以補償取像環境放鬆[2,3,10]而導致失真，搭配小型處理及輸出設備，令自動化舌診儀器達到可攜性及成本降低功效。於第一年計畫執行已發展一可攜性高頭戴式支架(圖 1)，整體機構如圖 2，小型處理設備採用小型筆電(圖 3)，相機選購以輕巧、高解析度為前提，故採用八百萬畫素、具自動對焦功能[13]之小型 Webcam(圖 4)，小型列印裝置採用 SiPix 迷你隨身口袋型(A6)感應式印表機(圖 5)，各元件運作穩定且取像過程迅速正確調整。



圖 1、頭戴式支架

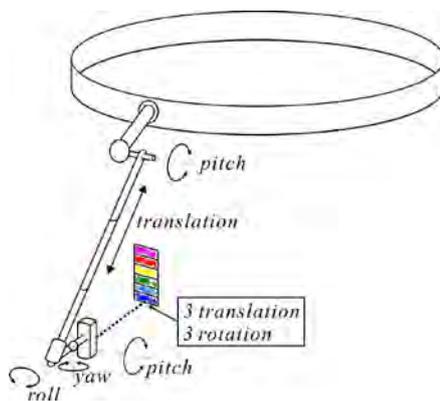


圖 2、頭戴式支架整體機構



圖 3、小型處理設備



圖 4、八百萬畫素相機



圖 5、小型列印裝置

本年度針對上年度之研究成果進行優化以達成可攜、穩定及自動化等目標[6]，以頭戴式調整器為例，本計畫使用具有重量輕、耐磨損、抗壓等特性的碳纖維材質製作以減輕配戴時不舒適感，並於支架後端加上鬆緊帶可根據使用者頭圍大小進行調整；以具體積小質量輕特性之高亮度 LED 輔

助拍攝，可支援各種臨床環境影像擷取[12,18.27]；修改自動化舌診程式校正程序以降低各種拍攝環境產生誤差偏量和使用一千萬畫素超高解析度視訊攝影機進行取像等。



製作方法：起初參考國內外不同版型頭戴式支架[9]可攜度與配戴方便為原則，首先根據一般人頭部形狀以瓦楞紙大略圍出一環狀架構，並在上端另圍出一帶狀環扣固定頭部上緣，將攝影機固定架懸掛於懸吊架末端，攝影機懸吊架由後方左右兩側固定後往前拉至鼻頭前以降低攝影機重量負荷，同時製作兩條側支架置於臉頰左右兩側以懸掛色卡，再用魔鬼粘將軟墊固定於支架後端內緣以增加配戴舒適性，最後以訂書針將關節部分訂牢，纏繞透明膠帶增加穩固性，即完成頭戴式支架雛形。

## 二、保麗龍骨幹



### 材料：

安全帽防震保麗龍內襯

網狀軟墊

實心鋁線

黑色防水膠布

透明膠帶

USB 延長線

相機

圖 8、保麗龍骨幹

製作方式：有了以上雛型，隨即開始以不同材料開始搭建骨架，考慮支架堅固性，使用安全帽防震保麗龍內襯裁切成環狀架構適合個人頭型，外皮以透明膠帶包覆，內層使用網狀軟墊以增加配戴時與頭部摩擦力，避免因個人頭型不一而有支架滑落疑慮，同時亦提升舒適性，下緣以黑色防水膠布環繞緊貼，避免與皮膚摩擦而造成不舒適感，相機以實心鋁線纏繞固定於保利龍頭套前端，使用鋁線具有不易生鏽、延展性佳等優點，最後將 USB 延長線接上相機並沿頭套邊緣固定，即完成保麗龍骨幹設計。

### 三、可調式伸縮頭套



材料：  
頭戴調整器  
實心鋁線  
USB 延長線  
相機

圖 9、可調式伸縮頭套

製作方式：將鋁線纏繞於頭戴調整器前端，另一端同樣纏繞相機，接上 USB 延長線，並調整至適合拍攝角度，可調整度較上兩者理想，惟有色卡不易懸掛之缺失，原考慮以無線傳輸方式取代 USB 傳輸，但發送端需另加裝電池元件，且傳輸效率不如預期，故無採納。

### 四、定桿機構之可調式伸縮頭套



材料：  
頭戴調整器  
蝶型螺帽  
球型夾具  
空心鋁管  
球型支架  
實心鋁線  
空心塑膠相機固定架  
黑色防水膠布  
3M 瞬間膠  
USB 延長線  
相機  
標準校色卡 x2 (灰階、彩色)

圖 10、定桿機構之可調式伸縮頭套

製作方式：首先將空心塑膠管以及空心鋁管裁切至適合長度，利用瞬間膠將兩者併攏接合，空心鋁管末端壓成一字扁狀同樣以瞬間膠與球型支架黏合，再用黑色防水膠布包覆外皮，即完成固定桿件相機懸吊架，利用球型夾具將頭戴調整器前端球型固定器與相機懸吊架結合，中間鑽上螺絲孔以蝶型螺帽旋緊，以便日後手動調整鬆緊度，整體機構主要藉此關節進行相機 360 度調整動作，最後再以實心鋁線將校正色卡懸掛於前端左側，接上相機與 USB 延長線，完成整體機構設計。

## 五、頭戴式支架



### 材料：

頭戴調整器	蝶型螺帽
U 型螺絲	螺帽 x2
球型夾具	墊片 x2
螺絲	標準色卡支架
相機	
標準色卡調整桿件	
標準校色卡 x2 (灰階、彩色)	
可調式伸縮桿件 (可調式範圍 10~30cm)	
可調式旋轉支架 (縱向 0~95 度，橫 向 0~360 度，擺動-10~10 度)	

圖 11、頭戴式支架

製作方式：「頭戴調整器」前方具有一個球型接頭，以螺絲拴緊球型夾具後，即可沿用螺絲作為「可調式伸縮桿件」縱向旋轉之旋轉軸，為使可調式伸縮桿件能平滑轉動，故在可調式伸縮桿件軸孔兩側加上墊片提升平滑度，並採用蝶帽元件方便且快速鎖緊與鬆脫桿件，可調式伸縮桿件下端配接一組 U 型螺絲，再與「可調式旋轉支架」做緊配合(Closed Pattern)，相機背面端以膠黏方式與可調式旋轉支架支撐架連結，透過可調式旋轉支架側邊蝶型旋鈕鬆開後，即可在可調式範圍內調整旋轉支架，而改變相機三軸向旋轉角

度，標準校色卡桿件固定於可調式伸縮桿件末端，可輕易改變色卡支架位置使更準確擺放標準色卡；期能利用可調式伸縮桿件縱向旋轉與伸縮平移功能，快速將攝影機定位，定位後再利用可調式旋轉支架調整相機三軸向旋轉角度，使相機盡可能對準並拍攝完整取像對象。

## 六、碳纖維頭戴式支架



### 材料：

碳纖維頭戴調整器	海綿襯墊
手轉螺絲 x 2	標準色卡支架
精密螺絲組 x 8	L 型固定片 x 2
相機	高亮度 LED x 2
標準色卡調整桿件	
塑膠製相機載具	
標準校色卡(彩色)	鬆緊帶
3M 瞬間膠	
客製化可調式伸縮桿件(可調式範圍 10~30cm)	
客製化可調式旋轉支架	
(縱向 0~360 度，橫向 0~90 度，擺動 -15~15 度)	

圖 12、碳纖維頭戴式支架

製作方式：於自製「碳纖維頭戴調整器（圖 13）」前方中心位置，以精密電鑽挖出四個直徑為 1mm 的小孔（圖 13 中紅點處），並以精密螺絲組（圖 14）分別鎖上 L 型固定片（圖 15，每個 L 型固定片鎖上兩組精密螺絲且兩 L 型固定片之間距離一公分，L 型固定片之紅點位置對應於圖 13 紅點位置）；於碳纖維頭戴調整器兩側端點末端分別挖兩個直徑為 1mm 的小孔（圖 13 中綠點處）以固定鬆緊帶（圖 16，鬆緊帶之綠點位置應對準於圖 13 綠點位置並以精密螺絲固定），於 L 型固定片及鬆緊帶組合於碳纖維頭戴調整器後，將海綿襯墊（圖 18）環繞於調整器內緣並以三秒膠固定以降低使用者頭部的壓迫感。接著採用手轉螺絲（圖 19）將客製化可

調式伸縮桿件（圖 20）固定於兩 L 型固定片之間以方便且快速鎖緊與鬆脫桿件，客製化可調式伸縮桿件下端配接「客製化可調式旋轉支架」（圖 21）並與塑膠製相機載具（圖 22）結合以便將小型相機（圖 23）固定於客製化可調式旋轉支架上，透過可調式旋轉支架下方之手轉螺絲鬆開後，即可在可調式範圍內調整旋轉支架，而改變相機三軸向之旋轉角度。最後以自製「碳纖維相機背蓋」（圖 24）取代原有相機背蓋以縮小體積、減輕重量及配合相機載具使用。兩個高亮度 LED（圖 25）及標準校色卡調整桿件（圖 26）分別固定於相機的上下方及側向位置；期能利用可調式伸縮桿件縱向旋轉與伸縮平移功能，快速將攝影機定位，定位後再利用可調式旋轉支架調整相機三軸向之旋轉角度，使相機盡可能對準並調整色卡位置使其拍攝完整之取像對象。

## 參、結果

頭戴式支架各階段設計製作成果如圖 6-12，其中圖 12 為計畫執行迄今實驗配戴穩定且能夠迅速取像版本，其主機構共有五個自由度(degree of freedom, DOF)，其中兩個為「可調式伸縮桿件」縱向旋轉(pitch)與伸縮平移(translation)，另三個為「可調式旋轉支架」縱向旋轉(pitch)、橫向旋轉(roll)與擺動(yaw)；標準色卡桿件為軟質鵝頸管(gooseneck)，三軸旋轉自由度上具有明顯可調性，也可經由軸向彎曲改變三軸向平移，此點對於標準色卡置放於擷取物旁具有高度可調性。此外各元件之間的組合盡量避免以膠黏方式固定並以螺絲固定法已加強機構的穩定度，於可調整機制處使用手轉螺絲固定能快速鎖緊與鬆脫桿件以便快速定位。

取像穩定度方面使用高亮度 LED 輔助拍攝，避免因環境亮度不足而造成相機本身具有自動曝光與亮度增益等機制介入取像程序以補償影像曝光不足的現象，其中自動曝光程序是以快門時間拉長而令電荷耦合元件(CCD, Charge-coupled Device)吸收較多環境光源，但是延長快門時間易受測者舌頭顫動而導致影像模糊；亮度增益則是將 CCD 感測光電訊號放大以平衡亮度不足，但易造成影像雜訊偏多而使影像畫質劣化等問題，此外輔助光源其體積與重量皆不為整體支架帶來額外負擔，並可藉由電池直接驅動(圖 27)，不需額外增掛電力設備於頭戴式支架上。

小型可攜式舌診系統頭戴式支架如圖 12、電池驅動裝置如圖 17、小型印表機如圖 5、小型處理設備如圖 3，各機構元件可調自由度之示意圖與實際元件對照如圖 28-30，受測者臨床配戴情況如圖 32，舌部影像擷取結果如圖 33，經色彩校正程序後之影像如圖 34，綜合上述改善與彰化基督教醫院中醫師給予的意見進行微調，本系統已可於開放環境中進行現場測試，並符合預期之結果。

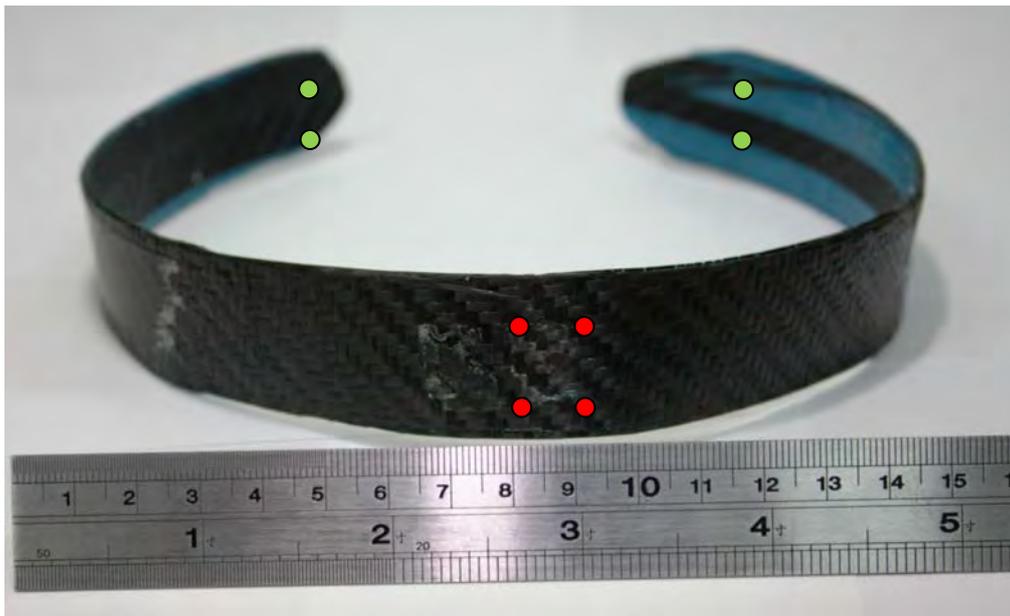


圖 13、碳纖維頭戴調整器

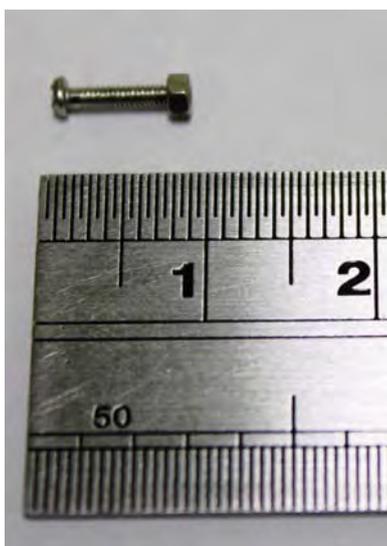


圖 14、精密螺絲組

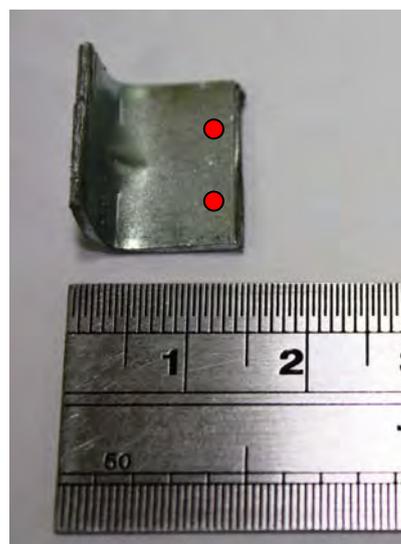


圖 15、L 型固定片



圖 16、鬆緊帶



圖 17、電池驅動裝置



圖 18、海綿襯墊



圖 19、手轉螺絲



圖 20、客製化伸縮桿件



圖 21、客製化可調式旋轉支架

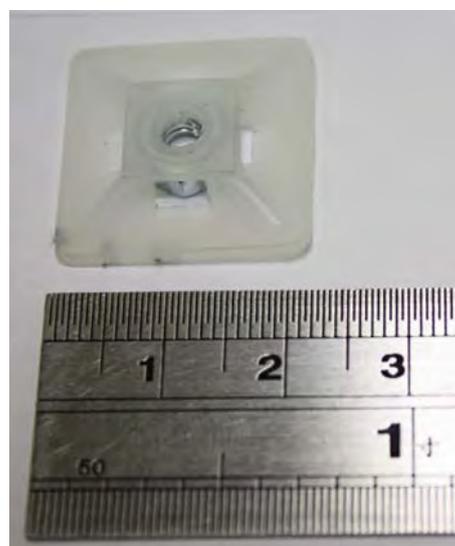


圖 22、塑膠製相機載具



- Full HD 1080p 影像錄製
- HD 720p video 高品質視訊通話
- 自動變焦卡爾蔡司鏡頭
- 內建立體聲麥克風
- 最高可達一千萬畫素照片拍攝

圖 23、千萬畫素小型相機



圖 24、碳纖維小型相機背蓋



圖 25、高亮度 LED



圖 26、標準校色卡調整桿件



圖 27、標準校正色卡

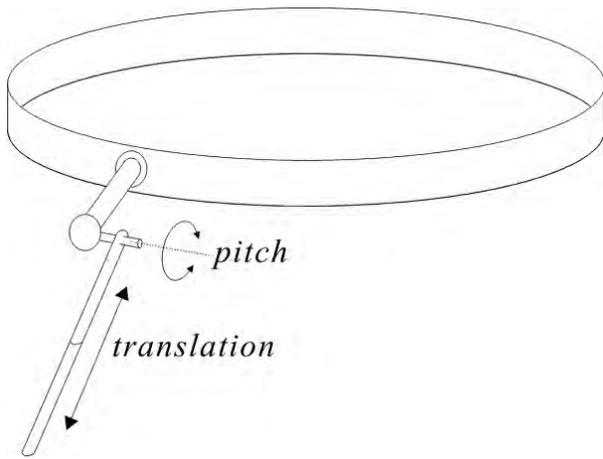


圖 28、「可調式伸縮桿件」之縱向旋轉(pitch)與伸縮平移(translation)

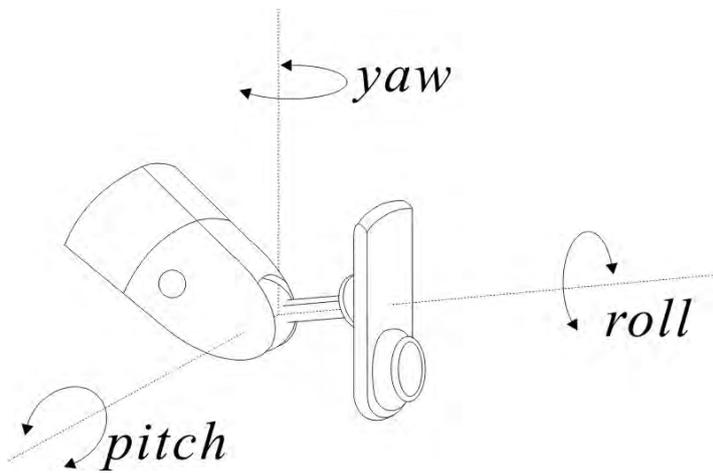


圖 29、「可調式旋轉支架」之縱向旋轉(pitch)、橫向旋轉(roll)與擺動(yaw)

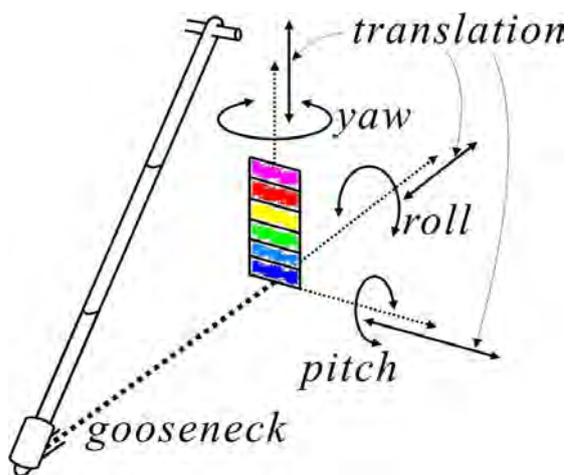


圖 30、標準校色卡調整桿件(鵝頸管 gooseneck)



圖 31、小型取像設備正視圖

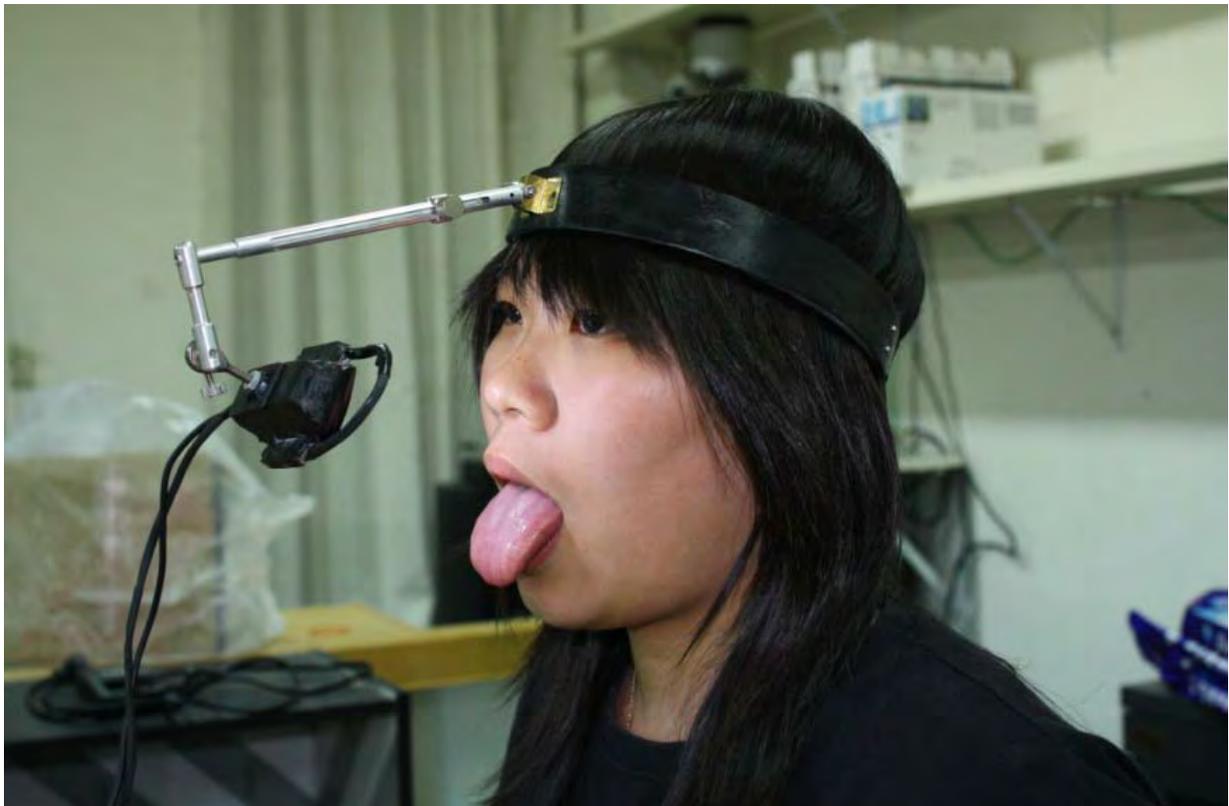


圖 32、受測者臨床配戴圖



圖 33、原始舌部影像擷取圖



圖 34、校正後之舌部影像擷取圖

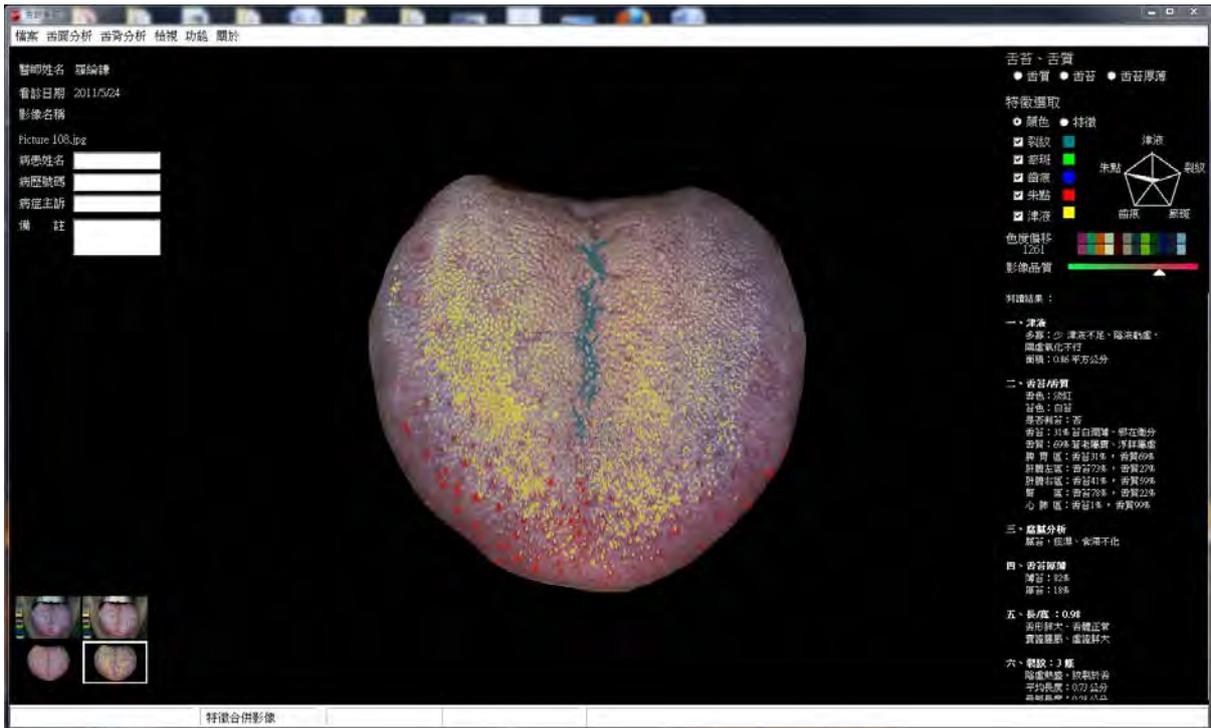


圖 35、舌診程式執行結果圖

## 肆、討論

整體計畫尚有以下欲改進之處：

- 一、目前使用之可調式伸縮桿件為鋁製材質，L型固定片為鐵製材質，若能將這兩個組件製換成碳纖維材質且能提供一樣的穩定性則對於整個系統的重量減輕有不小的助益；但於目前製程無法自行製作圓型桿件以及L型固定片無法提供足夠的強度，因此目前僅暫時使用金屬製組件。
- 二、目前以校正程序進行補償因取像環境放鬆而導致之失真以及搭配輔助光源拍攝已經可支援各種臨床環境之影像擷取，未來將針對各種特殊環境來評估本系統於嚴苛環境之容許範圍。
- 三、頭戴調整器與可調式伸縮桿件目前手轉螺絲進行固定可增加整體機構穩固性及便利性，但手轉螺絲其重量較重未來將尋找更輕盈的材質取代之。
- 四、因取像設備不同，已修改原始自動化舌診系統[1]相關參數以適應此差異，並根據中醫師意見修改程式以適用於小型可攜式裝置，未來將於自動化舌診系統內加入判斷以區分傳統取像裝置及小型化取像裝置所擷取之舌部影像，並分別運行兩套相關參數以降低舌診系統使用上的複雜度。

## 伍、結論與建議

計畫執行迄今業已發展一套具有可攜性、適應性與準確性的小型可攜式舌診系統，小型可攜式舌診系統包括頭戴式支架硬體結構及自動化舌診分析系統，頭戴式支架主要由伸縮式頭套、校正色卡及取像設備三個機構組成，透過伸縮式頭套將頭戴設備與頭部套合，並提供其餘構件支撐，校正色卡提供取像設備所感測影像之後續色彩校正參考，以補償因不同環境光線強度所導致之失真，自動化舌診分析系統則自動擷取舌頭資訊，判讀各項舌頭特徵；小型可攜式舌診系統不必配置大型暗房進行取像，設備成本較低，可應用於重症患者之床邊取像及遠距居家照護，對中醫舌診推廣及舌診資料庫之建置與判讀具有極大助益。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP99-RD-105 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. Lun-chien Lo, Mark Chun-cheng Hou, Ying-ling Chen, John Y. Chiang and Jeng-jiun Shyu : Automatic Tongue Diagnosis System, *The 2nd International Conference on BioMedical Engineering and Informatics (BMEI'09)* ; Tianjin, China, 2009/10/17-19: 140-144.
2. 林凌：光譜法舌診度量化中光源影響的研究。生命科學儀器；2008/05。
3. 宋賢杰：採集舌象用光源的光譜研究。光譜學與光譜分析；2008/05。
4. 蔣依吾, 陳建仲, 張恆鴻, 林宏任：舌診系統及其方法。中華民國專利證書發明第 I296110 號；2008/04/21。
5. 樊艷：運用自然光拍攝數字舌圖的色彩校正方案。中外健康文摘(臨床醫藥版)；2007/08。
6. 朱慶文：便攜式舌診信息獲取與分析設備。世界科學技術-中醫藥現代化；2007/05。
7. 蔣依吾, 陳建仲, 張恆鴻, 林宏任：舌診系統及其方法。中華民國學科發明公開公報第 200623017 號；2006/07/01。
8. 林巧玲：從舌像捕捉舌象-以長庚中醫舌診儀為主的討論。國立清華大學歷史研究所碩士論文；2005。
9. 肖二鋼, 王益民：中醫舌診研究的回顧與展望。天津中醫藥(TIANJIN JOURNAL OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE)；3 期，2004。
10. 井口圭子：舌診影像擷取環境控制之研究。中國醫藥學院中國醫學研究所碩士論文；2002。
11. 趙德馨：電腦化舌象診察系統研究-健診病患之舌象檢查。中國醫藥學院中西醫結合研究所碩士論文；2002。
12. 邱創乾：中醫舌診輔助儀器之環境評估與臨床驗證。行政院衛生署中醫藥年報；2001/10。
13. 蔣依吾, 陳建仲, 林宏任, 陳雅吟, 陳祁宏：電腦化舌診影像之鏡頭校正。2001 工程科技與中西醫學應用研討會；p. 34, 2001/05/26。
14. 陳冠臻, 蔣依吾, 陳建仲, 林宏任：中醫舌診電腦化教學與評量。2000 工程科技與中西醫學應用研討會；p. 50-57, 台中, 2000/05/27。
15. 蔣依吾, 陳建仲, 張恆鴻, 馬建中：電腦化中醫舌診系統。中國中西醫結合雜誌；第二十卷, 第二期, 145 至 147 頁, 2000/02。
16. 蔣依吾, 陳建仲, 林宏任, 紀智超：中醫舌診電腦化舌下絡脈特徵擷取及模糊分析。1999 中醫藥工程科技與中西醫學應用研討會；p. 51-52, 台中, 1999/05/29。

17. 葉信育, 蔣依吾, 陳建仲: 中醫舌診電腦化之特徵擷取方法。1998 工程科技與中西醫學應用研討會; p. 244-251, 台中, 1998/06/06。
18. 蔣依吾, 陳建仲, 馬建中: 舌診研究中影像擷取環境之探討。第六十七屆國醫節中醫學術研討會; 1997/03/09。
19. 張永賢、邱創乾: 以色彩學探討中醫舌象之研究。第六十六屆國醫節中醫學術研討會 1996/3:2。
20. 李乃民等: 中國舌診大全。學苑出版社; 北京 1995:1-525, 1224-1347。
21. 王季藜等: 舌診源鑑。立得出版社; 台北 1993; 2-15。
22. 尚瑞梅: 舌體大小臨床意義與客觀化計量化研究。浙江中醫雜誌 1993; (11):518。
23. 靳士英、司兆學等: 瘀證舌下絡脈病理組織學研究。中醫雜誌 1992; (3): 42-43。
24. 李樹棠、沈立明等: 舌下絡脈診治意義探析。寰宇中醫雜誌 1992; (1): 37-38。
25. 洪禎徽: 舌診。立得出版社; 台北。
26. 黃帝內經章句索引。啟業書局; 台北。
27. K. Wang, Z. Yan, and H. Zhang, "A Novel Approach to Extract Sublingual Vein from Color Image," *Proc. CBMS, 2005*, pp.9-14.
28. C.C. Chiu, C.Y. Lan, and Y.H. Chang, 2000, "Objective assessment of blood stasis using computerized inspection of sublingual veins," *revision Computer Methods and Programs in Biomedicine. (SCI)* (Impact factor: 0.729; Ranking: 22/76)
29. Hen-Hong Chang, Juei-Chao Chen and Hong-Jen Lin, 1999, "Signs of blood stasis in the sublingual vessels in cirrhotic and non-cirrhotic chronic hepatitis B patients," *China Medical College Journal* 8(2): 7-12, 1999.
30. Z. Yan, K. Wang, and N. Li, "Segmentation of sublingual veins from near infrared sublingual images," *Proc. BIBE, 2008*, pp.1-5.
31. 張緯博, 王博亮, 謝杰鎮: 舌下絡脈診斷中舌背區域自動擷取算法的研究。計算機科學與運用; 第一卷, 第一期, 17 至 19 頁, 2011
32. Zifei Yan, Naimin Li, "Adaptive Segmentation and Feature Quantization of Sublingual Veins of Healthy Humans," *ICMB 2008*: 107-114

# 臺灣八角金盤具抗肝炎病毒及幽門螺旋桿菌感染之天然物分子機轉探討

周昌弘

中國醫藥大學生物多樣性研究中心

## 摘要

### 研究目的：

五加科植物在世界上約有八十屬九百餘種，分佈於熱帶與溫帶。在中國約有二十三屬一百六十餘種，已知藥用近一百餘種，並且已知可以用於舒筋活血、解毒、祛風濕且外用於治跌打損傷、風溼痺、癰、瘡疹、腫毒。八角金盤隸屬五加科植物，全世界只有三種八角金盤，分別為日本八角金盤、小笠原八角金盤與臺灣八角金盤，分佈於東亞如日本群島與臺灣，而臺灣八角金盤為臺灣特有種，其化學成分與藥理活性尚未被探討。本研究主要在探討臺灣八角金盤對抗肝癌、肝炎病毒與幽門桿菌感染之活性成分與機轉探討。

### 研究方法：

本計畫利用生物活性導向分離臺灣八角金盤之甲醇萃取物，利用液-液分配分成二氯甲烷、乙酸乙酯與正丁醇層後利用矽膠管柱層析法、膠濾法、逆相管柱層析與高效液相層析分離純化二次代謝物，用一維/二維核磁共振與其他光譜鑑定其結構，接著以具B型肝炎病毒基因之肝癌細胞株及幽門螺旋桿菌感染之細胞模式評估臺灣八角金盤所含之有效成分對肝癌、B型肝炎病毒以及治療幽門螺旋桿菌感染。

### 結果與討論：

本研究發現臺灣八角金盤二氯甲烷與正丁醇層具有肝癌細胞毒殺活性，但在抗肝炎病毒方面，具有抑制病毒活性成分相對較少。在抗幽門螺旋桿菌方面，臺灣八角金盤之二氯甲烷層具有明顯之抗菌活性，而對胃癌細胞之毒殺活性較肝癌細胞為少。在本研究中也陸續分離出十七個化合物，其中有八個化合物已鑑定出其結構並具有抗幽門螺旋桿菌活性，但不具抑制肝炎病毒之活性。具有抗幽門螺旋桿菌活性之化合物將大量分離以進行作用機轉之研究。本研究在評估抗幽門桿

菌天然物方面將有助於減少目前因抗生素使用所引起之抗藥菌株產生之機會，增加抗幽門螺旋桿菌感染及其所引起胃癌之治療方式。

關鍵詞：臺灣八角金盤、天然物、肝癌、B型肝炎病毒、抗病毒、幽門螺旋桿菌、胃癌

# **Studies on the Molecular Mechanism of Naturally Occurring Compounds with Anti-hepatitis Virus and Anti-*Helicobacter pylori* Infection from *Fatsia Polycarpa* Hayata**

Chang-Hung Chou

Research Center for Biodiversity China Medical University

## **ABSTRACT**

### **Aim:**

Araliaceae comprises of about 80 genera, 900 species in the world. Most of them distribute in tropical and temperate areas. In China, it is estimated that there are 23 genera and 160 species, from which about 100 species are being used as medicinal purpose. Araliaceous plants were puported as effects of relaxing muscle, enhancing blood circulation, disintoxication and analgesia while applying externally in traditional Chinese medicine. *Fatsia polycarpa* Hayata, an endemic species in Taiwan, belongs to Araliaceous family. There are only three *Fatsia* species, i.e. *F. japonica*, *F. polycarpa* and *F. oligocarpella* are so far identified in east Asia area. *F. polycarpa*, *F. oligocarpella* grows exclusively in Bonin Islands and Taiwan, respectively. The ingredients and pharmacological activities from *F. polycarpa* have not been investigated before. Thus, this study aimed at the assessment of anti-hepatocarcinoma, anti hepatitis B virus and anti-*Helicobacter pylori* activities as well as their underlying mechanism from this titled plant.

### **Method:**

Methanolic extract of *F. polycarpa* was partitioned into dichloromethane, ethyl acetate, *n*-butanol and aqueous layers. By using bioassay-guided fractionation, the constituents from respective layer was obtained *via* silica gel, gel filtration, reversed-phase and high performance liquid chromatographic approaches. Their structures were identified through elaborate 1-D/2-D NMR techniques and related spectroscopic methods. Each purified compound was tested against hepatocarcinoma

cell (HepG2 2.2.15), hepatitis B virus and *H. pylori*.

### **Results & Discussion:**

The dichloromethane and *n*-butanol layers showed strong cytotoxicity towards HepG2 2.2.15., however, there was no anti-hepatitis B virus activity observed. Dichloromethane layer also demonstrated prominent activity against *H. pylori*, whereas relative weaker activity to AGS. In this study, 17 compounds were isolated, 8 were structurally identified. These constituents revealed strong anti-*H. pylori* effect, no activity observed in anti-hepatitis B virus testing. We are going to scale up the isolation procedure for these active components in order to evaluate the mechanism. The evaluation of anti-*H. pylori* activity from natural products will diminish the possibility and development of resistant strains due to misuse of antibiotics. Besides, this result will increase the therapeutic treatment for gastric cancer result from *H. pylori* infection.

Keywords: *Fatsia polycarpa* Hayata, natural products, hepatocellular carcinoma, hepatitis B virus, anti-viral effect, *Helicobacter pylori*, gastric cancer

## 壹、前言

因應世界經濟快速發展，人們的生活條件逐漸改善，加上醫藥的普及化，許多疾病都得以受到控制。然而在全球人口趨向老化及環境變遷的雙重影響下，現代人除期望壽命延長外，也漸漸重視生命品質。以行政院衛生署所發佈去年臺灣地區的死亡率而言，惡性腫瘤一直位居十大死亡榜首。單就去年衛生署所公佈之國人惡性腫瘤死亡人口數就有三萬七千多人，遠高於第二位因罹患腦血管疾病的死亡人口數。由此可知，腫瘤所引起的死亡已嚴重危害到國人健康，甚至影響經濟上的耗損。在治療上，醫學技術突飛猛進，除了以外科手術切除癌細胞腫瘤外，也併用放射線與化學療法治療。由於癌症中細胞增殖及設定性細胞凋亡的平衡受到干擾，而使得本身具有基因異常細胞持續增殖並逃過自身免疫系統的偵測清除。很多毒殺性跟荷爾蒙的治療，如放射線治療，藉由設定計畫性細胞凋亡方式特異性的毒殺癌細胞使其造成不可逆的損害。總言之，籠罩在談癌色變的此刻，開發新治癌用藥是刻不容緩的。

中醫藥治療疾病經歷數千年不衰並且日漸被歐美學者所重視，我國中醫藥學專著可溯及漢代「神農本草經」及至明清「本草綱目」，資料相當豐富，臺灣民間使用的中藥也相當多。臺灣民間用藥來源有植物藥、動物藥及礦物藥，其中植物性藥材佔絕大多數，約有 160 種之多。雖然這些具藥效的植物在以往強調在天然物的萃取、純化及鑑定，但其欠缺有系統的研究，以致在基原及藥效使用上有混淆不清之慮。國際上，在生物多樣性的研究相當熱絡，但針對中草藥的生物多樣性闕如。所謂「生物多樣性」即涵蓋基因多樣性、物種多樣性及生態系多樣性。我們知道某種植物在不同地區所採得其藥效會有不同，這是因為棲地水土不同的影響，也就是不同生態環境所蘊含不同天然物成分，久而久之，不同地區的植物雖屬同種卻有不同藥效，這還有待跨領域及有系統的研究。

2006 年 10 月 31 日 FDA 通過 Veregen™ (Polyphenon®E) 15 % Ointment，這是 FDA 第一個通過的 botanical drug，用於治療 human papilloma virus (HPV)所引起的 external genital and perianal warts，這代表 botanical drug 已被西方醫學接受及重視。另一方面在藥物開發的觀點，不論由完全化學合成或利用天然界所蘊藏的天然物資源直接藥用或進行修飾以改善活性之方式，科學家們已行之有年，也有相當好的成果。例如美國國家癌症中心 (National Cancer Institute) 主導的計畫於 *Taxus brevifolia*

發現紫杉醇 (Taxol)，由此並已用於臨床之乳癌與卵巢癌之治療，即是天然藥物的最佳的應證(50)，其對於相關藥物開發具有舉足輕重的重要地位。而在最近一、二十年來的新藥開發當中所分析的資料，更是顯示多元化天然物結構確實影響多種藥物的研發，可見天然物所具有之探索開發潛力。原發性肝癌 (Hepatocellular carcinoma) 是我國和亞非地區常見的癌症，患病率為歐美的 5~10 倍，其死亡率幾乎為 100 %。以臺灣為例，它占男性惡性腫瘤中死亡原因的第一位和女性惡性腫瘤死亡原因的第三位。一般發現後，即使經過外科手術、化學或放射線治療，平均壽命亦不超過一年。因此了解肝癌的成因及發展新的診斷和治療方法是急迫需要的。根據流行病學的統計，世界各地 B 型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 的高感染區都有較高的肝癌病例，例如臺灣、中國大陸、東南亞和南非等地。若進一步以臺灣為例，肝癌病例中百分之九十以上都是 B 型肝炎的帶原者，而非帶原者得到肝癌的機會僅為帶原者的百分之一(23, 24)，這顯示 B 型肝炎病毒感染和肝癌病變之間有密切的關係，而且產生的慢性 B 肝帶原也是世界上健康的隱憂，估計全世界因感染 B 型肝炎而成為 B 肝帶原者約有 4 億人，約佔世界總人口數的 5 %，這是一個不能抹殺的潛在問題。B 型肝炎病毒感染導致廣泛的肝臟疾病一直是在臺灣急待解決的公共衛生問題，雖然歷經諸多研究先驅包括宋瑞樓、陳定信、許金川及陳培哲等學者的努力，對於降低臺灣原本居高不下的 B 型肝炎帶原率有所貢獻，但直至目前 B 肝感染衍生的肝臟疾病治癒率普遍還是很低。以往認為 B 型肝炎病毒感染導致的肝癌只是肝細胞本身諸多調控機制病變轉型成為癌細胞，如今學者認為 B 肝病毒本身所帶有的基因本身及其表現的蛋白質是扮演重要的「致癌因子」(18, 31, 58-61, 66, 71)，雖然感染肝炎和變成肝癌之間，相隔了二十至四十年，它們二者之間的因果關係並不十分清楚，但 B 肝病毒感染引發肝癌高罹患率卻是不爭的事實。因此如何有效抑制病毒的複製及表現蛋白質影響所感染肝細胞的正常運作是目前治療 B 肝的主要目標。臨床上用來治療的藥物目前都以干擾素 (interferon  $\alpha$ 2a) (104)及核酸類似物 (Lamivudine 拉美芙錠，又稱為肝安能) (55, 92)為主，但成效還是有限，大約只有 20~30 %抑制效用，甚至產生抗藥性，因此有效的肝炎病毒疫苗研發是目前刻不容緩的趨勢。研究 B 型肝炎病毒能否引起肝癌的進展很慢，部分的原因在於 B 型肝炎病毒缺乏在動物體外培養的模式。這種病毒只會感染人和黑猩猩，不會感染其他實驗室常用的小動物或培養的細胞，因此無法有系統地來研究病毒感染的途徑、在細胞內的複製與基因表現及

長期在體內對肝臟所造成的影響。所以我們對這個病毒之生物特性了解得很少。

B 型肝炎病毒於 1965 年首先被發現於澳洲人血清當中，因其血清當中會表現一種表面抗原蛋白 (surface antigen)，所以又稱為澳洲抗原 (Australia antigen) (25)，之後被證實為肝炎病毒表面蛋白 (HBsAg)，在 1970 年，Dane 等人分離出此病毒顆粒，所以 B 型肝炎病毒又稱為 Dane particle (40)，自此開始了 B 型肝炎病毒的流行病學分析與研究。B 型肝炎病毒為 DNA 病毒，其 genome 為部分雙股 DNA (partial double strain DNA) 構造，並且已知是哺乳類病毒 genome 當中最小的 (約 3.2 kb)，研究也顯示此病毒只會感染肝細胞，跟此病毒同類的還有 woodchuck hepatitis virus (WHV) (125)、duck hepatitis B virus (DHBV) (91) 以及 ground squirrel hepatitis virus (GSHV) (88)。近來分析表面抗原蛋白 (HBsAg) 變異可將 B 肝病毒分成九種血清型 (serotype, d/y 以及 w/r) (37, 78)，而從其病毒基因層面分析又可分成 8 種基因型 (genotype, A-H) (17, 99, 103, 122)，至於血清型跟基因型之間的關係與對應目前並不是很清楚。B 肝病毒 genome 含有 4 個 open reading frames (ORF)，其轉錄產物(RNA)包括：3.5 kb precore/pregenome RNA、2.4 kb preS1 表面抗原 RNA、2.1 kb S 表面抗原 RNA 以及 X RNA 等四種，分別表現病毒七種蛋白，包括「三種表面蛋白」、「核蛋白」、「核蛋白衍生物-e 蛋白」、「病毒聚合酶」、以及「X 蛋白」，目前已知這些病毒基因的轉錄起始位置含有許多細胞基因轉錄因子(transcription factor)的結合位(binding site)(56, 106, 113, 117)，可以調控病毒基因的表現。

近年來肝病藥物的研發有逐漸朝中草藥方向發展的趨勢，也因為中草藥所蘊含豐富的天然物，例如韓國珍珠草(葉下珠)(*Phyllanthus urinaria* L.) 已發現其萃取物成分對肝癌腫瘤有較好的抑制作用，甚至可以抗 B 型肝炎病毒(29, 65, 85, 138)，因此為中草藥應用在病毒性肝炎及肝癌的最佳例證。目前除了珍珠草，最近一些學者也試著從其他中草藥當中找出對抗肝炎病毒的有效成分，像是周正仁等人從風藤(*Piper kadsura*)分離出七種天然化合物對抗 B 型肝炎病毒的研究(64)，以及韓國 Kim 等人從訶梨勒(*Terminalia chebula* Retz.)、地榆(*Sanguisorba officinalis* L.)、覆盆子(*Rubus coreanus* Miq.) 和大黃(*Rheum palmatum* L.) 萃取天然物成分分析抗 B 型肝炎病毒的效果(73)，另外中國 Wang 等人從甘草也萃取出抗病毒之成分(140)，除此之外，很少有文獻探討中草藥成分對肝炎病毒的研究。

97 年行政院中醫藥委員會委託本實驗室執行「茄科植物中具抗肝炎病

毒及幽門螺旋桿菌天然物之分子機制探討」計畫，從山煙草、印度茄、萬桃花以及大花曼陀羅等茄科植物萃取物中發現許多具有生物活性成分。其中山煙草、印度茄以及萬桃花葉部之水煎煮萃取物中含有肝癌細胞毒殺活性成分，另外在山煙草及印度茄的有機萃取物也發現肝癌細胞毒殺活性成分。從山煙草有機萃取物之部分純化物（SE8, SE9）經分析顯示具有抗 B 型肝炎病毒之活性。以 HepG2 2.2.15 肝癌細胞（培養中可自然產生釋放 B 肝病毒）為培養模式進行研究，經此萃取物處理 9 天，發現可以明顯降低 B 肝病毒表面抗原(HBsAg)及 e 抗原(HBeAg)的表現與分泌而不影響細胞毒性，另一方面以南方墨點分析病毒 DNA 也顯示此萃取物具有抑制病毒 DNA 複製功能，進一步分析抗肝炎病毒活性化合物主要為亞麻油酸衍生物。此外，一個類黃素也被分離出並顯示具有抑制 B 型肝炎病毒 DNA 複製及表面抗原基因之表現。另一方面，以萬桃花水萃取物、氯仿、丙酮與甲醇抽取物，以紙錠擴散試驗進行抑制幽門螺旋桿菌(包括標準株與臨床抗藥性菌株)的試驗。萬桃花的氯仿抽取物也具抑制幽門螺旋桿菌生長的功效，對臨床抗藥菌株也具抑制效果，並可干擾幽門螺旋桿菌附著於胃上皮細胞，同時萬桃花的氯仿抽取物可以抑制胃上皮細胞因幽門螺旋桿菌感染造成的凋亡，透過抑制 caspase-8 和 Bid 的活化，防止 cytochrome c 由粒線體釋出，因此阻斷下游與凋亡相關蛋白如 caspase-9 與 caspase-3 的活化，進而減緩因感染造成之細胞凋亡現象。因此氯仿抽取物具發展治療幽門螺旋桿菌感染之潛力，目前正進一步分離純化其中之有效成分並鑑定其結構中以探討其細部殺菌機轉。

五加科植物在世界上約有八十屬九百餘種，分佈於熱帶與溫帶。在中國約有二十三屬一百六十餘種，已知藥用近一百餘種。在臺灣五加科植物共十屬十六種三個變種，有藥用記載有七屬八種三個變種，大部分為傳統間用藥，用於舒筋活血、解毒、怯風濕而外用於治跌打損傷、風溼痺、癰、瘡疹、腫毒。本科植物主要含有皂素、類黃素與香豆素，其中以富含三萜皂素為其特點(1)。Dammarane 型之四環三萜皂素主要存在於人參、三七與西洋參中，其中人參皂素具有多方面之生理活性。Oleanane 型之五環三萜皂素主要分佈在摠木屬(*Aralia*)、刺楸屬(*Kalopanax*)、五加屬(*Acanthopanax*)與人參屬(*Panax*)等植物，具興奮中樞神經系統、抗發炎與抗胃潰瘍等作用。五加屬之細柱五加(*Acanthopanax gracilistylus*)為中藥材五加皮之基原植物；而通脫木屬(*Tetrapanax*)之通脫木(*T. papyriferus*)為通草之基原植物。五加屬的刺五加(*Acanthopanax gracilistylus*)已被開發為保健食品，而臺灣產之

三葉五加(*Acanthopanax trifoliatum*)據研究其功效與刺五加接近，值得開發為本土藥用資源(2)。臺灣八角金盤、臺灣常春藤(*Hedera rhombea* var. *formosana*)、臺灣五葉參(*Pentapanax castanopsisicola*)、臺灣鵝掌柴(*Schefflera taiwaniana*)與華參(*Sinopanax formosana*)為臺灣特有種，具有地域特殊性，其藥用潛力亦非常高。世界上只有三種八角金盤，為日本八角金盤、小笠原八角金盤與臺灣八角金盤，分佈於東亞如日本群島與臺灣。而根據親緣地理分析結果，臺灣八角金盤為冰河時期因環境氣候與地理障壁而種化成之特有種，因此深具開發價值(3)。日本八角金盤在日本已被藥廠開發成鎮咳化痰藥。臺灣八角金盤分佈於中高海拔高山區域，民間亦用於治療咳嗽，其藥用成分尚未被研究。

根據黃慧琪等的研究發現皂素是植物的二次代謝產物，為含醣基的三萜類或固醇類，存在於許多植物中。由於皂素的化學結構包含親脂性與親水性兩部份的成分所組成，特殊兩極化的結構使其肩負著協助清潔類似肥皂的任務，亦因此皂素具有相當廣泛的生物活性與藥理作用如抗癌、免疫調節、抗血小板凝集及抗菌等。皂素是植物的二次代謝產物，對植物體本身具有保護防禦功能，如對病毒、細菌、黴菌、原蟲、昆蟲或草食性動物等外來的侵略具有抵抗防禦作用，使得以在生態體系中繁衍不斷。皂素類化合物廣泛存在自然界中，如食物中含量較高的大豆和燕麥、植物中的無患子和苦茶及藥用植物中的黃耆、人參、甘草和柴胡，少部分的海洋棘皮動物中如海參和海星等和真菌亦含有。皂素具有廣泛的應用如當甜味劑、苦味劑、化妝品、乳化劑和合成賀爾蒙的前驅物等和多樣性的生物活性作用如抗癌、免疫調節、抗血小板凝集、抗生育、抗炎、殺螺、殺菌作用等(4)。

類黃素(Flavonoids)是植物中常見的二次代謝產物，是水溶性的營養素，也是植物化學物質界的大宗，全世界已有 4000 多種的類黃素被分離出來並在結構上被確認(101)。這些類黃素包括檸檬黃素、檸檬素(citrin)、芸香素(rutin)、黃酮類(flavones)、黃烷醇(flavonols)、兒茶素(catechin)、茶黃質(theaflavins)、茶紅質、槲皮素(querletin)等。類黃素是植物的天然色素，也是保護植物免於受到自由基傷害的天然抗氧化劑。類黃素種類非常多，因此廣泛存在於柑橘類、莓類(漿果類)、綠花菜、芹菜、黃豆、穀類、蕃茄、瓜類、薯類、茶等蔬果中。類黃素在植物的代謝上扮演重要的角色，它是一種相對沒有毒性的生物活性物質(non-toxic bioactive substances)。類黃素已經證實可以抑制 cyclooxygenase，lipoxygenase，microsomal monooxygenase，glutathione S-transferase，mitochondrial succinoxidase，及

NADH oxidase，這跟活性氧物質(reaction oxygen species, ROS)的形成有關(94, 101, 114)，因此，類黃素為一種抗氧化劑具消除自由基的功能，更可抑制低密度脂蛋白(low-density lipoproteins)的氧化及減低血栓的形成的可能性(111)。但類黃素的抗菌能力，在近年受到矚目(39, 111)，例如蜂膠。而蜂膠中可分離的成分超過 46 種，最多的是類黃素，其中 galangin 為最主要的有效成分，不僅抗菌，galangin 亦可抗病毒及黴菌，而其主要作用機轉為破壞細菌細胞壁的完整性，使得細胞產生 osmotic lysis(39)。

萜類化合物(Terpenoids)與植物散發的氣味相關。萜類化合物提供了桉樹(eucalyptus)的氣味，肉桂、丁香和薑的味道，也和黃色花的顏色有關。在檸檬醛(citral)、薄荷(menthol)及大麻類植物中(Cannabis plant)的cannabinoids 是研究較多的萜類。萜類包括樟腦(camphor)，胡蘿蔔素( $\beta$ -carotene)，及毛地黃苷(digitalin)。而他們在傳統草本中也具抗菌(antibacterial)，抗腫瘤(antineoplastic)及其他療效(49, 121, 141)。如甜椒(*Capsicum annuum* L)中所含之 capsianosides 具抗幽門螺旋桿菌與抗氧化的功能(42)。

香豆素(Coumarins)是一類具有芳甜香氣的二次代謝物，可以以游離態或與糖結合成配糖體的形式存在於植物中。分佈於 30 以上的科，約 150 種植物，其中以雙子葉植物如繖形科、芸香科與桑科含量最多。也存在於豆科、木犀科、茄科、菊科與蘭科中。在生物活性上，香豆素具有多樣的生物活性，如新生黴素(novobiocin)具有抗菌活性，Furan 型的香豆素具光敏感特性可以用來治療牛皮癬與蕁樣黴菌病，雙香豆素具抗凝血活性及黃麴毒素的肝毒性等。近年來從植物分離得到 calanolides 能抑制 HIV-1 逆轉錄酵素，具擴張血管作用的 khellactones，有些香豆素能抑制 NO 合成與具有雌性激素的活性(5)。

在五加科植物用於傳統中藥方面：紅毛五加(*Acanthopanax giraldii*)含有 6-isoinosine, syringaresinol diglucoside, hexacosene,  $\beta$ -stisosterol,  $\alpha$ -sesamin 與 C<sub>22</sub>-C<sub>28</sub> 脂肪酸等。具有抗關節炎、興奮平滑肌與降低血管通透性等作用。五加皮(*A. gracilistylus*)根皮含有 kaurenoic acid, syringin, stearic acid,  $\alpha$ -sesamin,  $\beta$ -stisosterol,  $\beta$ -stisosterol glucoside 與揮發油、樹脂、蛋白質、單寧酸、維生素 A 與 B 等，具抗金黃色葡萄球菌、綠膿桿菌、強壯作用、抗疲勞、促性腺、抗輻射與止血作用。刺五加(*A. senticosus*)主要含有 eleutheroside A, B, syringin, 6,8-dimethoxycoumarin 7-glucoside, ethyl- $\alpha$ -D-galactoside, syringaresinol 配糖體，三萜皂素, friedelin, isofraxidin

等。具抗疲勞、鎮靜、擴張血管、促進腦血流供應、降血壓、抗發炎、抗癌等作用。短梗五加(*Acanthopanax sessiliflorus*)根含 $\alpha$ -sesamin, savinin, acanthoside B, acanthoside D, daucosterol 等。具有抗發炎、鎮痛解熱、降血壓、興奮腸胃道與子宮平滑肌作用。短梗五加(*A. sessiliflorus*)根含有 $\alpha$ -sesamin、savinin、acanthoside B、acanthoside D、daucosterol 與水溶性多糖等。椴木(*Aralia chinensis*)含有 aralin, protocatechuic acid, 單寧酸與揮發油等, 具抗金黃色葡萄球菌作用。通草(*Tetrapanax papyriferus*)主要含肌醇與糖類等, 具利尿與促進乳汁分泌作用。而人參屬植物如人參、三七、西洋參等富含人參皂素、三七皂素、類黃素、揮發油、糖類與有機酸等, 其多樣之生理活性已被人們所廣泛了解與應用(6)。

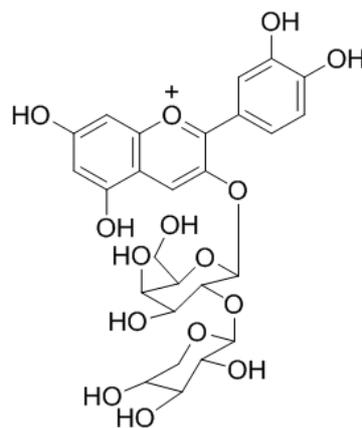
對於治療胃幽門螺旋桿菌, 使用抗生素一向是治療感染症之主要方式, 但也因此造成許多抗藥菌株的產生, 胃幽門螺旋桿菌也不例外。再者, 目前用來治療胃幽門螺旋桿菌感染的抗生素, 常常造成治療中病患因腸道益生菌菌相改變而引起腹瀉的狀況。為解決使用抗生素造成的問題, 於中草藥中篩選僅針對胃幽門螺旋桿菌之抗菌成分(20), 應可緩解抗藥菌株的產生, 並增加治療胃幽門螺旋桿菌感染之機會。近年來許多有關從中草藥中篩選抗菌成分之研究如 Martin 與 Ernst 報導中草藥在臨床上之抗菌成分(90), Kawase 與 Motohashi 整理衍生自植物抑制胃幽門螺旋桿菌之成分(70), 蔥(8)、綠茶(79)、甘草(47,142)、葉下珠(77)、桉樹(9, 10)與許多中草藥萃取物顯示對胃幽門螺旋桿菌具有抑制作用(145)。許多 diallyl sulfides (84), 酚酸類如 protocatechuic acid (84), chromane/chromanone 類(129), phthalide 類(146), 從禾本科植物 *Desmostachya bipinnata* 分離之類黃素(110), 從產於希臘之漆樹科植物 *Pistacia lentiscus* var. *chia* 特有之乳香膠(mastic gum)與三萜類化合物(107), 從 *Juniperus communis* var. *depressa* 之單萜類配糖體(98), 從使君子科植物 *Pteleopsis suberosa* 分離到之三萜皂素(81)、從大豆中之異黃酮與三萜皂素(48), 從莧科植物常見之圓仔花(千日紅)*Gomphrena globosa* 中之三萜皂素均顯示對胃幽門螺旋桿菌具有抑制作用(135)。然而, 針對抗胃幽門螺旋桿菌之作用機制之探討相對較少, 如 emodin 顯示針對胃幽門螺旋桿菌  $\beta$ -hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase 有競爭性抑制作用。因此本計畫將初步篩選具有抗胃幽門螺旋桿菌作用之分子進一步探討作用機制(35)。

八角金盤 (*Fatsia*) 為五加科 (Araliaceae) 之一屬, 分佈於日本本州以南至臺灣以北, 此屬植物全世界共有三種, 僅分佈於東亞, 其中在日本有

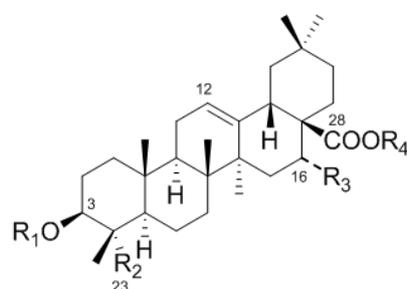
兩個特有種，包括於小笠原群島所產之小笠原八角金盤(*Fatsia oligocarpella* Koidz.) 以及日本本島及琉球群島所產之日本八角金盤 (*Fatsia japonica* (Thumb.) Decne. & Planch.)。而臺灣唯一特有種，則稱為臺灣八角金盤 (*Fatsia polycarpa* Hayata)，常分佈於 1800~2500 公尺左右之山地；八角金盤為長綠喬、灌木，經文獻記載指出八角金盤全株具有藥用功能，其中樹皮具有祛風、行血、止痛之功效，葉能治療感冒咳嗽、風濕性關節炎，而在日本因其葉型美觀、耐陰性強特性，常被用作庭園觀賞植物，被尊為庭園下木之王。

八角金盤屬之物種在過去曾利用葉綠體 DNA ITS 片段序列做分子親源地理學之研究，結果顯示此屬物種為近代擴張之結果，其中小笠原八角金盤與臺灣八角金盤經由分析屬於同一演化分支 (monophyletic lineage)，非常近緣，然小笠原八角金盤在日本之分佈較為侷限，目前已被列為瀕臨滅絕之稀有物種。另外以其擴張之路徑來看，臺灣八角金盤為此屬擴張最南端之新興物種，因受冰河時期之臺灣環境氣候與地理障壁而形成現今之分佈模式，經由特殊演化之機制漸漸與日本八角金盤特有種分化開來，成為臺灣唯一特有種，目前已知日本八角金盤已被研究分析出許多具藥用之活性成分：從葉部正己烷可溶部份分離出非揮發性的 phytyl palmitate, phytyl linoleate, phytol, stigmasterol, 十六至十八碳的脂肪酸及十六至三十一碳的烷類 (124)。從日本八角金盤花苞、花、未成熟與成熟果實中，發現主要含有 palmitic acid, linoleic acid 與 stigmasterol；steryl 與  $\beta$ -amyrenyl ester 主要在花、未成熟與成熟果實中發現但在花苞內未發現；結果過程中主要成分為 sitosterol ester；phytol 主要在開花過程被發現；triglycerides 主要發現在成熟果實中(14, 15)。從葉部分離得到 4-terpinenol, linalool 與  $\alpha$ -terpineol 等單萜類，(-)-epicubenol, (+)- $\delta$ -cadinene,  $\alpha$ -muurolene,  $\alpha$ -copaene,  $\beta$ -copaene,  $\alpha$ -cubebene,  $\beta$ -bourbonene 與 calamenene 等倍半萜類，此外亦發現有 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone (46)；從漿果(berry)中發現含有 cyanidin 3-lathyroside (132)，如圖一所示。此外，高極性部分，最主要成分為 oleanolic acid, hederagenin, echinocystic acid 與 16-epiechinocystic acid 之配糖體，如圖二所示：從種子分離出化合物 1-9, 20 (52, 53, 119)，從花苞分離出 1, 10-19, 23, 24, 25 (15, 119)，從果皮中分離出 1, 13, 14, 17, 18, 19 (120)，從葉部分離出化合物 10, 12, 13, 14, 21, 22 (54, 74, 130, 134)，從成熟果實中分離出 1, 13, 14, 26 (13)，從花、成熟果實與葉部分離出化合物 1, 2, 21, 23, 24 (16)。以上針對日本八角金盤植物化學研究顯示具有結構多樣性，然而臺灣八角金盤至

目前為止，還未被明確研究及分析其所含之天然物成分，因而此物種具有研究分析之必要。日本八角金盤葉部富含皂素，在日本民間用藥上被當做鎮咳祛痰劑使用，而利用抗 ginsenoside Rb1 的單株抗體以 Eastern Blotting 偵測並未發現有 Rb1(128)，而針對此植物藥(不少於 45 %的皂素)研究發現具有抗發炎、鎮痛與解熱的效果(72)，其中的成分 **21(OGAH)**對 Tat-SOD fusion protein 在體內與體外都有加強 transduction 的效率(80)。再者，皂素具有多樣的生物活性，如抗癌、免疫調節、抗血小板凝集、抗生育、抗發炎、殺螺與殺菌等；亦具有當甜味劑、苦味劑、化妝品、乳化劑、合成賀爾蒙前驅物等應用(4, 137)。臺灣八角金盤與日本八角金盤為同屬，日本八角金盤內成分已有大量文獻報導可供比對，而臺灣八角金盤其成分應有相同但亦有很大可能有新的化合物的存在，且此屬在世界上只有三種，在藥用資源開發與應用的角度觀之亦深具探討價值。



圖一、Cyanidin 3-lathyruside



圖二、Oleanolic acid, hederagenin, echinocystic acid 與 16-epiechinocystic acid 之配糖體結構

	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>
1	<i>Arap</i> α→	CH <sub>2</sub> OH	H	H
2	<i>Glc</i> pβ→	CH <sub>2</sub> OH	H	H
3	<i>Glc</i> pβ-(1→2)- <i>Glc</i> pβ→	CH <sub>3</sub>	H	H
4	<i>Glc</i> pβ-(1→2)- <i>Glc</i> pβ→	CH <sub>2</sub> OH	H	H
5	<i>Arap</i> α→	CH <sub>2</sub> OH	H	←β <i>Glc</i> p-(6←1)-β <i>Glc</i> p
6	<i>Glc</i> pβ→	CH <sub>2</sub> OH	H	←β <i>Glc</i> p-(6←1)-β <i>Glc</i> p
7	<i>Glc</i> pβ-(1→2)- <i>Glc</i> pβ→	CH <sub>3</sub>	H	←β <i>Glc</i> p-(6←1)-β <i>Glc</i> p
8	<i>Glc</i> pβ-(1→2)- <i>Glc</i> pβ→	CH <sub>2</sub> OH	H	←β <i>Glc</i> p-(6←1)-β <i>Glc</i> p
9	<i>Glc</i> pβ-(1→2)- <i>Glc</i> pβ→	CH <sub>2</sub> OH	H	←β <i>Glc</i> p-(6←1)-β <i>Glc</i> p-(4←1)- α <i>Rhap</i>
10	<i>Arap</i> α→	CH <sub>3</sub>	H	H
11	<i>Arap</i> α→	CH <sub>3</sub>	α-OH	H
12	<i>Arap</i> α→	CH <sub>2</sub> OH	H	H
13	<i>Glc</i> pβ-(1→2)- <i>Arap</i> α→	CH <sub>3</sub>	H	H
14	<i>Glc</i> pβ-(1→2)- <i>Arap</i> α→	CH <sub>2</sub> OH	H	H
15	<i>Arap</i> α→	CH <sub>3</sub>	H	←β <i>Glc</i> p-(6←1)-β <i>Glc</i> p-(4←1)- α <i>Rhap</i>
16	<i>Arap</i> α→	CH <sub>3</sub>	α-OH	←β <i>Glc</i> p-(6←1)-β <i>Glc</i> p-(4←1)- α <i>Rhap</i>
17	<i>Arap</i> α→	CH <sub>2</sub> OH	H	←β <i>Glc</i> p-(6←1)-β <i>Glc</i> p-(4←1)- α <i>Rhap</i>
18	<i>Glc</i> pβ-(1→2)- <i>Arap</i> α→	CH <sub>3</sub>	H	←β <i>Glc</i> p-(6←1)-β <i>Glc</i> p-(4←1)- α <i>Rhap</i>
19	<i>Glc</i> pβ-(1→2)- <i>Arap</i> α→	CH <sub>2</sub> OH	H	←β <i>Glc</i> p-(6←1)-β <i>Glc</i> p-(4←1)- α <i>Rhap</i>
20	<i>Gal</i> pβ-(1→2)- <i>Arap</i> α→	CH <sub>2</sub> OH	H	H
21	<i>Glc</i> pβ-(1→4)- <i>Arap</i> α→	CH <sub>2</sub> OH	H	H
22	<i>Glc</i> pβ→	CH <sub>3</sub>	H	H
23	<i>Glc</i> pβ-(1→4)- <i>Glc</i> pβ→	CH <sub>2</sub> OH	H	H
24	<i>Glc</i> pβ-(1→4)- <i>Arap</i> α→	CH <sub>3</sub>	H	H
25	<i>Arap</i> α→	CH <sub>3</sub>	β-OH	H

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
26	Arapα→	CH <sub>3</sub>	α-OH	←βGlcP-(4←1)-βGlcP-(4←1)- αRhap

*H. pylori* 是一個對人類具有高度感染力的病原菌，全世界約有一半的人口曾經受到感染(123)。大多數人在兒童時期就已被感染，且只有約 30 % 的感染顯現症狀，而其中有一半以上的患者會進展成十二指腸潰瘍、其他相關的消化性潰瘍疾病、淋巴增生或是胃癌等(41)。*H. pylori* 的傳染途徑主要可能經由糞口傳染、胃口傳染或口口傳染(33, 41, 89)。家族中如有人感染 *H. pylori*，則會增加家中其他成員的感染率，如果母親受到 *H. pylori* 感染引起胃炎，其小孩受到感染的機會 (20.5 %) 比未感染的母親的小孩 (5.3 %) 要高 4 倍(143)。在臺灣 *H. pylori* 感染的盛行率為 74.1 %，且成年人比年輕人的感染率要高，在 1 到 20 歲的人口中，感染率僅有 11.1 %，而在 41 到 50 歲的人口中，感染率攀升至 82.9 %，在 51 到 60 歲的族群 *H. pylori* 的感染率更高達 84 % (82)。

*H. pylori* 群聚於胃黏膜中上容易造成慢性胃炎的發展，經長時間的慢性胃炎而未予治療，胃黏膜的腺體逐漸萎縮，變成萎縮性胃炎，而後者又與胃癌的形成有關 (57)。*H. pylori* 引起胃部發炎及胃癌的原因主要為 oxidative stress 及 gastric cell proliferation (93)。*H. pylori* 的感染可能引起 oxidative stress 的原因如下：細菌本身分泌之 superoxide (97)、細菌引起胃上皮細胞分泌 reactive oxygen species (22, 133)、以及細菌感染合併之抗氧化劑 (如維生素 C) 的下降(30)。而 *H. pylori* 的感染引起 gastric cell proliferation 的原因大都經由 post-translational mechanisms (76)。

Proinflammatory cytokines 如 interleukin-8 (IL-8)，tumor necrosis factor-α (TNF-α) (126)，及 IL-6 (86)在胃黏膜受*H. pylori*感染時表現量增多也與病程相關。慢性發炎反應造成之 oxidative stress，以及由 leukocytes 和其他 phagocytic cells 產生之 ROS，可造成增生細胞之突變累積之危險 (93)。發炎反應引發組織細胞產生氧化物 (oxidants)，包括 leukocytes – 釋放 ROS 及 reactive nitrogen species；cytokines – 如 TNF-α 可增加 reactive species 的產生，而 *H. pylori* 的感染亦可以活化 lymphocytes 產生氧化物。在臨床病例中，感染患者的胃黏膜 ROS 堆積的程度，與細胞中氧化造成的 DNA 損傷 (oxidative DNA damage) 成正比(45)。在體外實驗中，感染引起之 oxidative stress 造成蛋白質體的改變 (proteome changes)，

引發細胞增生、癌化 (carcinogenesis)、影響細胞支架功能 (cytoskeletal function)、及細胞防禦機制 (cellular defense mechanisms) 的啟動(21)。AP endonuclease-1 (APE-1) 是一個與 DNA 修復相關的蛋白 (base excision repair of oxidative DNA damage)，當胃上皮細胞遭受 oxidative stress 或受 *H. pylori* 感染時，其表現量會增加，此蛋白於 *H. pylori* 感染時，對胃上皮細胞引發的訊息傳遞有重要的影響(43)。而組織細胞於 oxidative stress 或細菌感染時，為保護自身免於ROS的攻擊，細胞會產生抗氧化物，包括 superoxid dismutase (SOD)，catalase，及 glutathione peroxidase，而 *H. pylori* 也會表現抗氧化物以對抗因侵入胃上皮細胞後所遭遇之氧化物攻擊 (105)。而受 *H. pylori* 感染的胃上皮細胞因增加抗氧化劑的表現而減低ROS造成的傷害，同時 *H. pylori* 本身在感染細胞後，亦會表現抗氧化酵素，因此減低胃上皮細胞因細菌感染造成的氧化傷害。但因為ROS仍然會造成細胞的DNA損傷，受 *H. pylori* 感染的胃上皮細胞的 8-hydroxyguanine (8-OH-dG) – 氧化傷害的指標蛋白(an oxidative damage marker in the DNA of gastric mucosal cells) – 的表現量仍高 (118)，因此受 *H. pylori* 感染的胃上皮細胞雖受到氧化攻擊的程度較小但DNA的損傷仍在，可能造成受感染胃細胞癌化的機率。

慢性的炎症反應 (chronic inflammation ) 通常會加速細胞凋亡 (apoptosis) 的速度 (136)，但也因此加速了周圍組織的增生速度 – a compensatory proliferate response (102)。細胞增生與凋亡的動態平衡對維持正常胃黏膜的平衡 (mucosal homeostasis) 是必要的。反之，減少細胞凋亡及增強細胞增生均可造成癌化的形成。*H. pylori* 的感染具有造成細胞增生與抑制細胞凋亡的能力(96)。一個可以調控與細胞週期(cell cycle)相關基因轉錄的蛋白 (transcriptional regulatory)，*c-fos*，在受 *H. pylori* 感染的胃黏膜中表現量較於正常的胃黏膜或癌前期病變 (precancerous lesions) 高 (144)。*H. pylori* 的感染經由 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 活化 extracellular signal-regulated kinase I and 2 (ERK1/2)，p38 與 *c-jun* aminoterminal kinase (JNK)，而 JNK 則可促進 *c-fos* 與 *c-jun* 的表現，進而促進 AP-1 蛋白的表現，同時活化 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 與 IL8 的表現(11)。而 cyclooxygenase 2 (COX-2) 是一種促進前列腺素 (prostaglandin; PGE) 分泌的蛋白，PGE

可以保護胃黏膜避免細胞凋亡的發生，因此也可以促進細胞的增生。COX-2 在胃發炎 (gastric inflammation) 及潰瘍癒合 (ulcer healing) 時在細胞中大量表現，在 *H. pylori* 感染的胃黏膜中表現量也較高 (34, 131)。與 *c-fos* 不同

的是 COX-2在癌前期病變、*H. pylori*引起的胃炎、萎縮性胃炎 (atrophic gastritis)、腸化生 (intestinal metaplasia)，及胃癌 (gastric cancer) 組織中均有高量的表現。因此，COX-2的大量表現可能與早期胃癌化相關。增長異常細胞的存活率，促使突變基因的堆積，會導腫瘤的形成 (tumour promotion) (96, 115)，*H. pylori* 的感染會造成胃上皮細胞受ROS攻擊而使上皮細胞之DNA 遭受損傷，但因上皮細胞受*H. pylori*感染而造成增生現象，使得DNA異常之上皮細胞數目增多，可能因此導致腫瘤的形成。然而，很多細菌性的感染都會造受感染細胞的凋亡 (apoptosis) (36)，而受*H. pylori*感染的細胞也不例外(19)。所以，如果梔子的genipin與genipin-aa complex能夠改善*H. pylori*引起的氧化及發炎，就有可以降低胃細胞癌化的機會。此一論點有待研究證實。

*H. pylori* 的感染造成胃部炎症反應並進而增加胃部組織癌化的機率，但炎症反應的發生必須在細菌群落在胃部組織後才能發生。胃部的黏膜層是為保護胃部組織免於受到酸性及水解酵素的環境破壞。在胃中，有兩種主要的黏膜素 (mucins)，MUC5AC – 由上皮細胞分泌及 MUC6 – 由腺體分泌(28, 83, 139)。而MUC5AC及MUC6在受*H. pylori*感染的細胞中表現量均下降(28, 139)，而因此*H. pylori*的感染可能藉此造成胃黏膜層之損傷。Decay-accelerating factor (DAF) 是一個表現在細胞膜上的蛋白，是病原菌如*E. coli*，coxsackieviruses，echoviruses，及enteroviruses的細胞受器 (cellular receptor)，而在感染 *H. pylori* 的胃部組織其表現量亦較正常組織為高(100)；DAF也是一個可以保護上皮細胞免於補體攻擊而崩解 (complement-mediated lysis) 的蛋白。因此，*H. pylori*感染造成的DAF表現量增多與細菌群落及所引發之炎症反應的嚴重程度成極為相關。但是由於DAF為group B coxsackieviruses經由tight junctions侵入的受器 (receptor)，病毒在DAF附著會活化c-abl kinase，造成Rac-dependent actin rearrangements，使得病毒容易在tight junctions侵入細胞(38)，而*H. pylori*的感染也會引起src kinase與 abl kinase的活化，因此*H. pylori*可能藉由與DAF的結合附著在胃上皮細胞(38, 127)，並造成感染細胞的型態變化。而另一個在tight junction上的ZO-1也會和*H. pylori*分泌的CagA結合並造成受感染的胃上皮細胞型態改變，使細胞間彼此聯結性減低，造成胃細胞的移動 (migration) 變的容易(12, 75)，這可能也是受感染胃上皮細胞容易癌化的原因之一。

除胃上皮細胞的一連串蛋白表現的結果造成感染細胞的病變之外，*H. pylori* 表現的某些特定蛋白與其後引起的病變亦相關連，如 urease、

cytotoxin、flagella、CagA、Hsps，及黏附因子 (adherence factors；與細菌附著群聚在胃黏膜及逃避寄主免疫反應並造成病變相關)(93)。黏附因子中 BabA (blood group antigen-binding adhesin) 會與胃上皮細胞上的 fucosylated Lewis b ( $Le^b$ ) blood group antigen 相互結合 (26, 69, 95)，此與細菌的 site-specific colonization 及致病性相關(76)。而另一個黏附因子 SabA (sialyl acid-binding adhesin) 可與 sialylated  $Le^x$  antigen 結合，此結合可以增強 BabA 與  $Le^b$  的鍵結，進而增加細菌群聚的能力 (87, 116)。此舉增加了細菌入侵細胞的機會，可避免免疫反應的攻擊，並可加速細菌將毒力因子如 CagA 與 VacA 送入細胞的機會(57)。至今，並無研究指出梔子的 genipin 與 genipin-aa complex 能否影響這些粘附因子的產生。

目前關於 *H. pylori* 的治療，傳統的療法是使用四合一或三合一抗生素組合治療，其中包括氫離子幫浦抑制劑(PPIs)或 ranitidine bismuth citrate (RBC)為主，再合併 amoxicillin、clarithromycin、metronidazole 三種抗生素其中任何兩種(7, 32)，但常有副作用出現，如引起頭痛、腹瀉、腹痛、頭暈、皮膚疹、胸痛、無力感等，但近年來由臨床的經驗發現，使用抗生素治療 *H. pylori* 衍生的抗藥性菌株已成為治療之棘手問題(44)，其中亞洲地區對 metronidazole 抗藥性的問題又更嚴重(51)。在全球的統計中，流行的 *H. pylori* 菌株中 0-2 %對 amoxicillin 具抗藥性，10-20 %對 clarithromycin 具抗藥性，高達 30-50 %對 metronidazole 具抗藥性(27, 63, 108)。在臺灣東部分離的 *H. pylori* 菌株，有 51.9 %對 metronidazole 具抗藥性，有 13.5 %對 clarithromycin 具抗藥性，而 36.1 %則對 amoxicillin 具抗藥性(62)；在南部的醫學中心分離的 *H. pylori* 株則有 27.6 %對 metronidazole 具抗藥性，有 9.5 %對 clarithromycin 具抗藥性，而 1 %則對 amoxicillin 具抗藥性(68)。因此使得 *H. pylori* 的感染在使用抗生素的治療上出現了瓶頸，於是新藥物的開發就顯得格外重要。

本計畫中以肝癌細胞株為體外培養之細胞株做為抗癌及抗病毒之研究模式，HepG2 2.2.15 細胞是源自於 HepG2 之肝癌細胞株，經穩定轉殖 B 型肝炎病毒之 DNA 所得，於培養中可自然釋出 B 型肝炎病毒至細胞外。

本計畫選用五加科植物中八角金盤屬之臺灣特有種「臺灣八角金盤」為目標，以其所含的天然物進行抗 B 型肝炎病毒與幽門螺旋桿菌感染以及其引發胃癌之藥理機制的探討，此研究將有助於減少目前因抗生素使用所引起之抗藥菌株產生之風險，並增加抗幽門螺旋桿菌感染及其所引起胃癌之預防治療方式。本計畫將篩選臺灣八角金盤之萃取物與部分純化部依據

活性導向分離純化至純物質對抑制 B 型肝炎病毒與幽門螺旋桿菌生長的影響。由於幽門螺旋桿菌感染胃上皮細胞會引起感染細胞的凋亡現象，因此本計畫將以細胞模式探討臺灣八角金盤內含化合物對感染之胃上皮細胞之影響，並進一步探討其細部機轉。

## 貳、材料與方法

本計畫從臺灣八角金盤全株水或甲醇萃取物測試以 HepG2.2.15 肝癌細胞株或是以 AGS 胃癌細胞株培養為模式，探討這些物種天然萃取物對肝癌及胃癌細胞的生長抑制、抑制其 B 型肝炎病毒的複製及繁殖以及抑制幽門桿菌或其感染胃癌細胞之活性，然後進一步分析所含抗肝炎病毒、幽門桿菌等天然物其作用分子機制。

### 一、植物天然物之萃取方法

#### (一)臺灣八角金盤成分之萃取：

將臺灣中海拔山區(約 2000-2500 公尺)採集之臺灣八角金盤區分成葉部、莖部與樹皮等三部分。於實驗室內蔭乾後切成小塊，以磨粉機磨粉，以甲醇浸泡。相隔一星期後倒出萃取液，此步驟重覆三次，收集三次萃取液以減壓濃縮除去甲醇後得到甲醇萃取液。

#### (二)臺灣八角金盤成分之分離與純化：

##### 1. 甲醇粗萃物之製備

此部份由本校生物多樣性研究中心周昌弘講座教授實驗室博士後研究員鄭竣亦博士、碩士研究助理黃科智、林恩宏、黃春惠及生態暨演化生物學研究所周聖杰助理教授負責臺灣八角金盤葉子所含天然物的分離純化和結構鑑定。取臺灣八角金盤(*Fatsia polycarpa* Hayata)葉子乾重 7 公斤，以甲醇(MeOH)在室溫下浸泡三次萃取，所取得之萃取液經由減壓濃縮機濃縮後，經由二氯甲烷( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )、乙酸乙酯(EtOAc)和正丁醇(*n*-BuOH)進行液液分配，取得二氯甲烷( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )層粗萃物約 100 g 和乙酸乙酯(EtOAc)層粗萃物約 19 g 及正丁醇(*n*-BuOH)層粗萃物約 50 g。

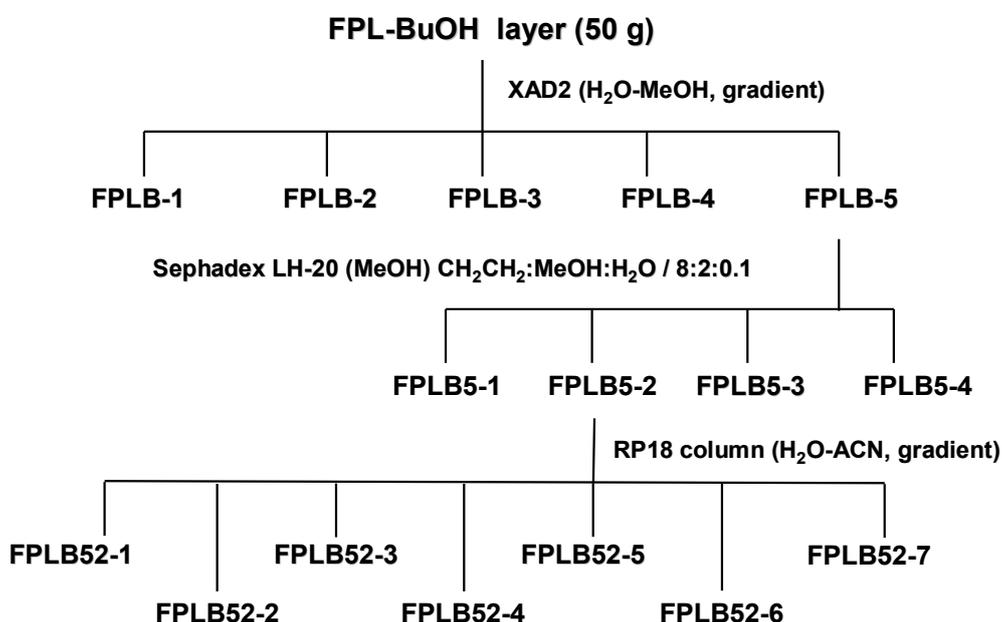
##### 2. 正丁醇(*n*-BuOH)層粗萃物之分離純化和生物活性測試

正丁醇(*n*-BuOH)層粗萃物 50 g 以逆相層析管柱 (ADX-2 column chromatography) 進行分離，從 100%  $\text{H}_2\text{O}$  開始沖提，隨後改以 10% 增加 MeOH 比例至 100% MeOH 進行梯度沖提，得到個 5 個 fractions (FPL-B-1 至 FPL-B-5)。FPL-B-5 再以 Sephadex LH-20 [ $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (8:2:0.1)] 進行分離，得到 4 個 fractions (FPL-B-5-1 至 FPL-B-5-4)，其中 FPL-B-5-2 再以逆

相層析管柱 (RP-18 gel column) 進行層析，以 H<sub>2</sub>O 和乙腈 (MeCN) 為沖提液進行梯度沖提，得到 7 個 fractions (FPL-B-5-2-1 至 FPL-B-5-2-7)(以上所分離之分液層萃取物流程詳見圖一~圖九)

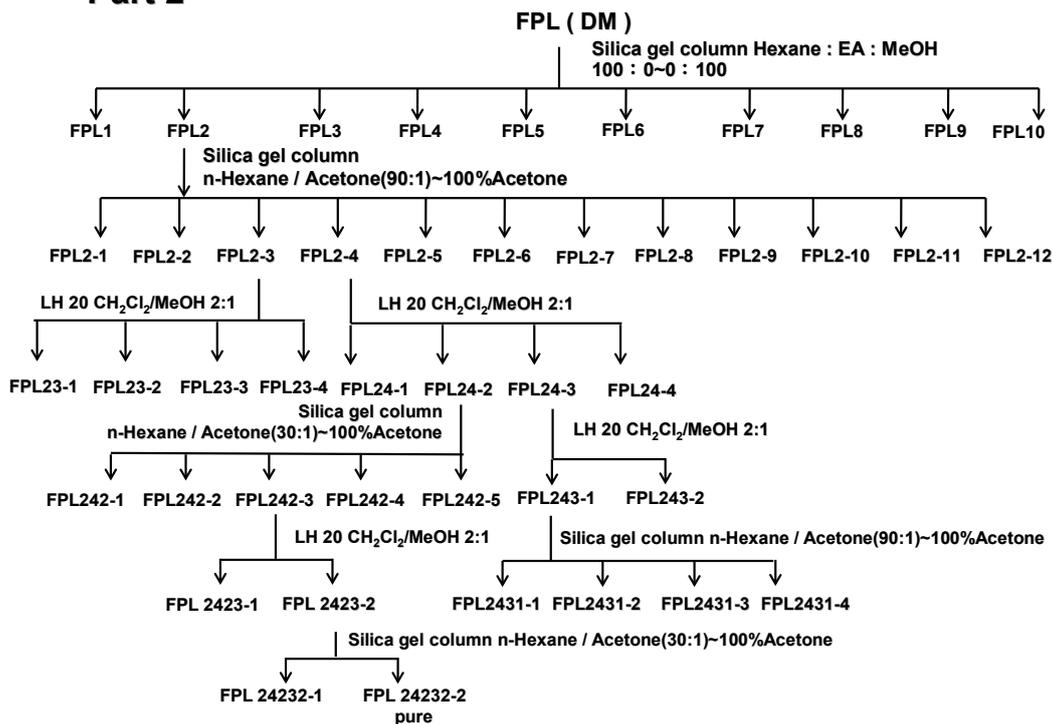
- (三)臺灣八角金盤成分之結構鑑定：純化合物以測量 1-D/2-D NMR 光譜以鑑定結構為主，輔以測量紅外線光譜(IR)鑑定官能基，紫外光-可見光譜(UV-Vis)鑑定發色團，以液相層析-質譜得到分子量 (molecular ion)或斷裂片(fragment ions)以鑑定結構資訊，以旋光度 (optical rotation)鑑定光學活性，以圓二色光譜(circular dichroism)鑑定立體化學。必要時進行化學反應(如 Mosher's method)決定立體化學或培養單晶以 X-ray 繞射以鑑定其結構或相對立體化學。
- (四)活性導向分離：所有部分分離之 fractions 將隨時以抗 B 型肝炎病毒或幽門螺旋桿菌之篩選平台追蹤活性成分，並於得到純化合物後再評估其活性。

## Part 1



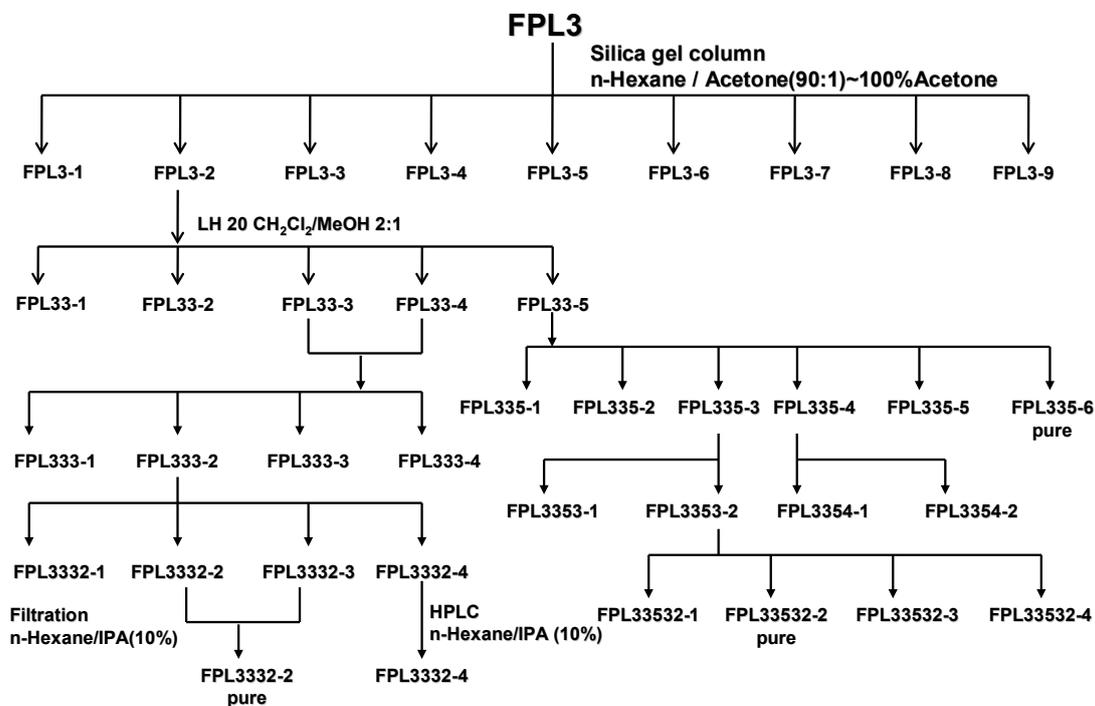
圖一、臺灣八角金盤正丁醇分液層萃取物分離示意圖

## Part 2



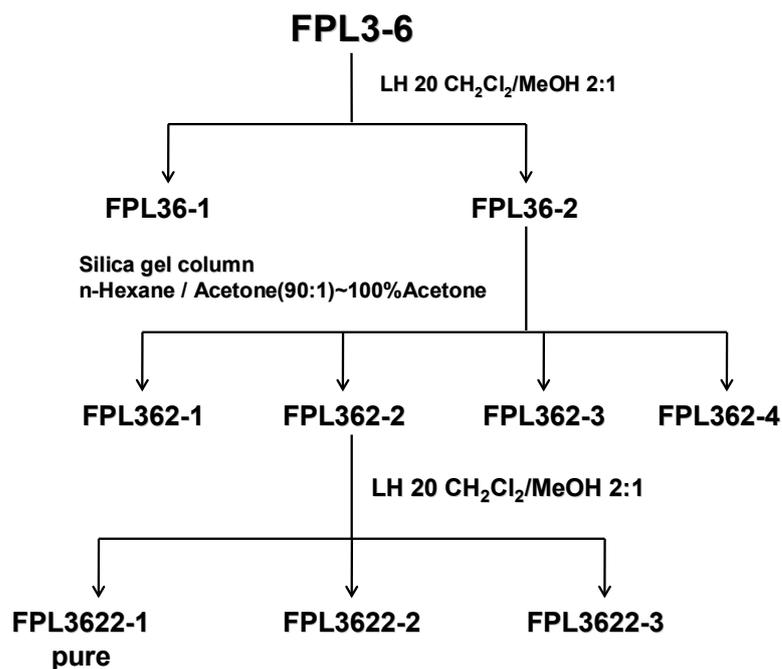
圖二、臺灣八角金盤二氯甲烷分液層萃取物分離示意圖

## Part 3



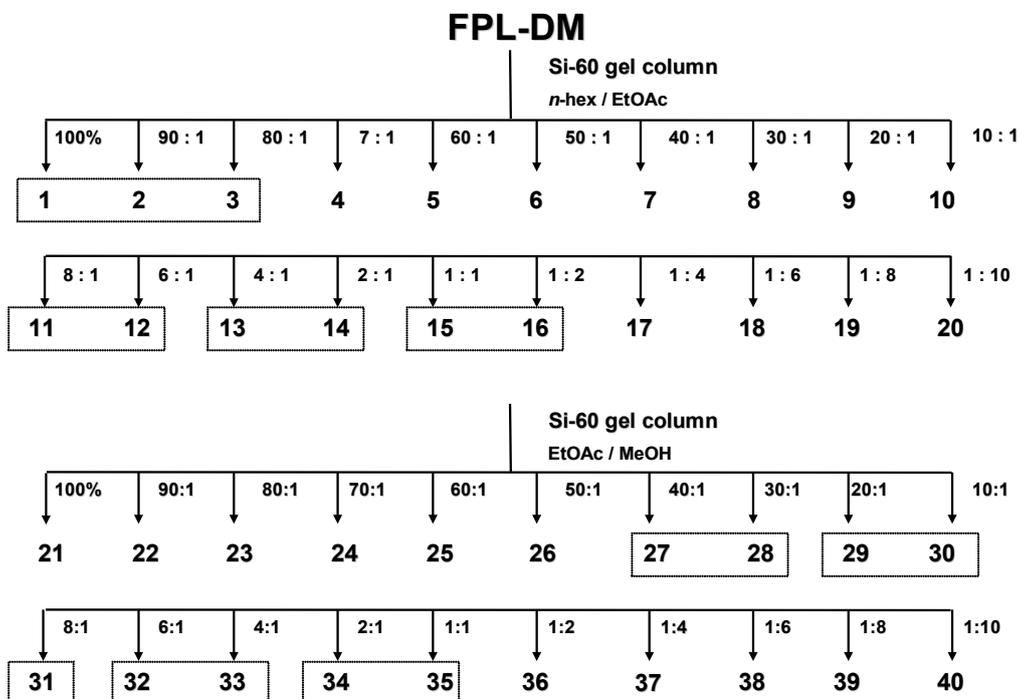
圖三、臺灣八角金盤二氯甲烷分液層萃取物後續分離示意圖

## Part 4



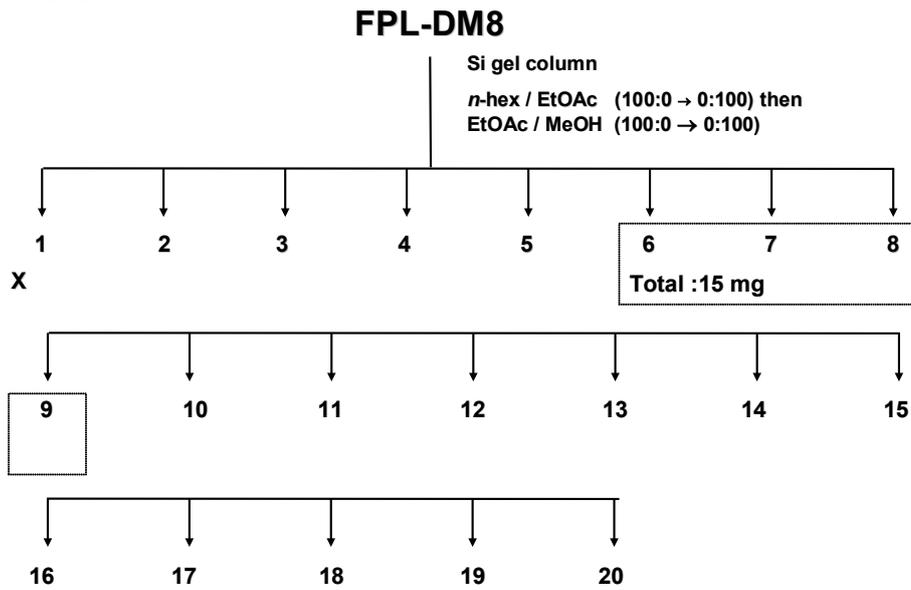
圖四、臺灣八角金盤二氯甲烷分液層萃取物後續分離示意圖

## Part 5



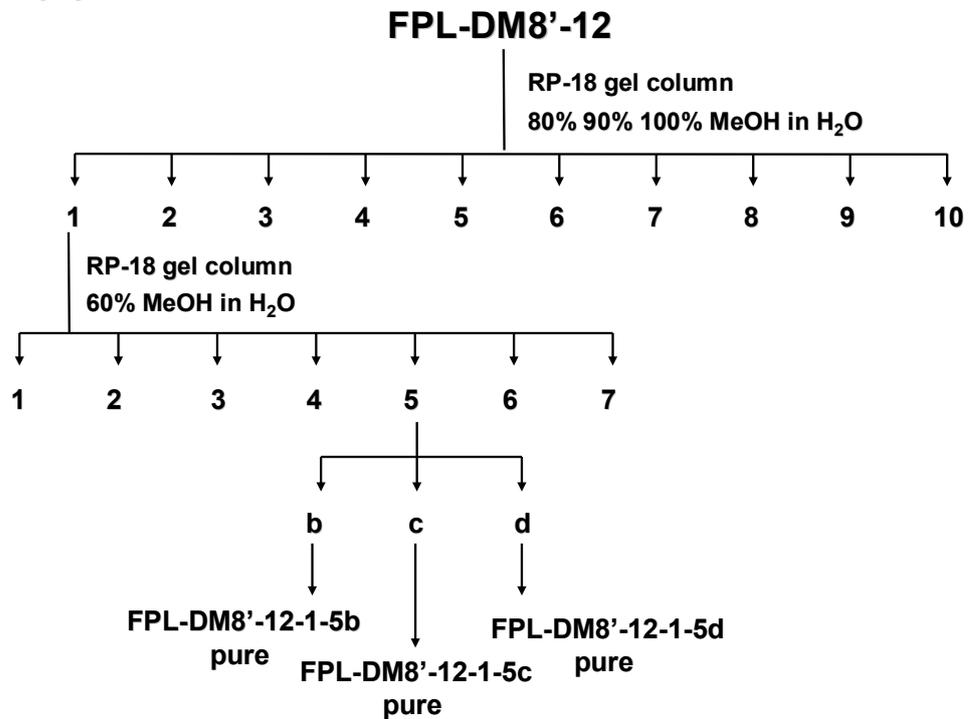
圖五、臺灣八角金盤二氯甲烷分液層萃取物後續分離示意圖

## Part 6



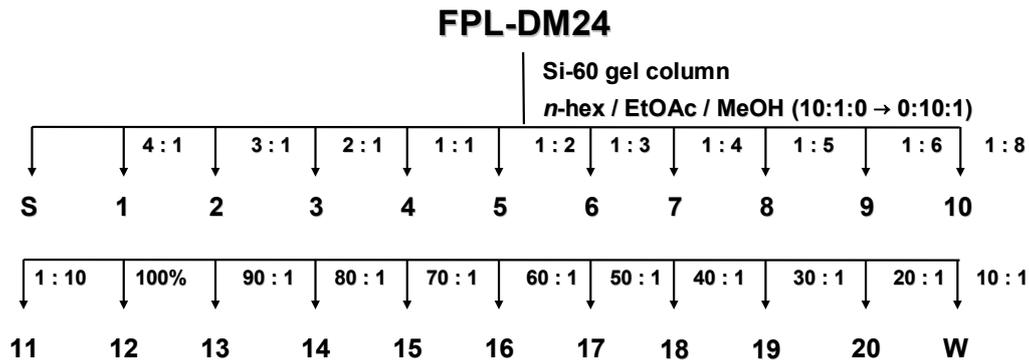
圖六、臺灣八角金盤二氯甲烷分液層萃取物後續分離示意圖

## Part 7



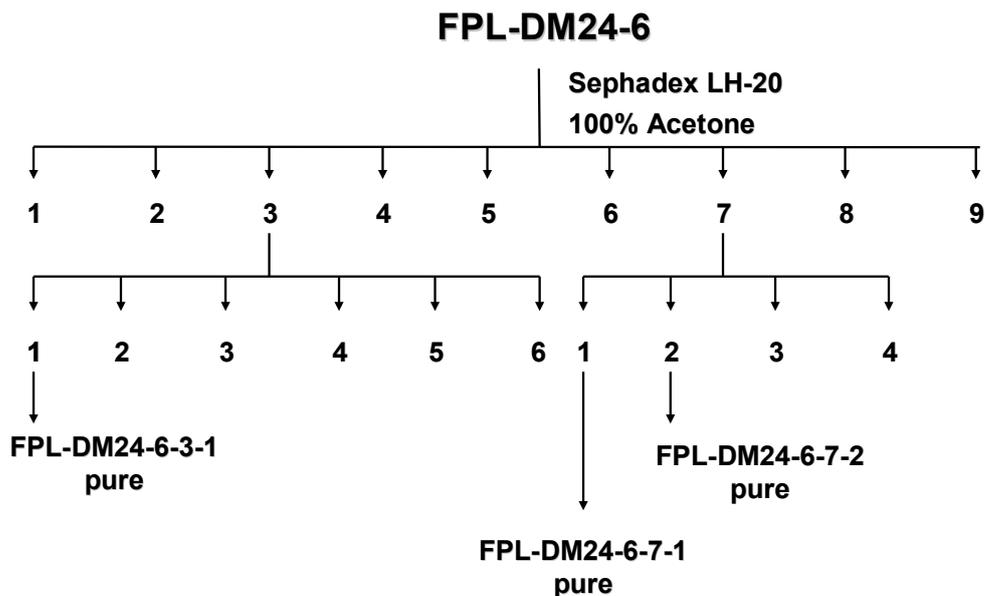
圖七、臺灣八角金盤二氯甲烷分液層萃取物後續分離示意圖

## Part 8



圖八、臺灣八角金盤二氯甲烷分液層萃取物後續分離示意圖

## Part 9



圖九、臺灣八角金盤二氯甲烷分液層萃取物後續分離示意圖

## 二、細胞培養

人類肝癌細胞株 HepG2 2.2.15 (human hepatocellular carcinoma) (由台大醫院肝炎研究中心陳培哲院士提供) 主要培養於 MEM 培養液並含有 10% 胎牛血清 (FBS) 但不含抗生素，而肝癌細胞株 HuH7 (human hepatoma) 及 HepG2 (human hepatocellular carcinoma) 主要培養於 DMEM 培養液含有 10% FBS 並添加 100U/ml penicillin 與 100 $\mu$ g/ml streptomycin; 人類胃癌上皮

細胞 (human gastric cancer epithelial cell line) AGS 細胞培養於添加 10% FBS, 100U/ml penicillin 與 100 $\mu$ g/ml streptomycin 之 RPMI 1640 培養液中, 以上細胞株皆於 37 $^{\circ}$ C 5%CO<sub>2</sub> 恆溫培養箱中培養。

### 三、天然萃取物對肝癌細胞生長及毒殺性影響 (MTS 或 XTT assay)

將 HepG2 2.2.15 肝癌細胞株 ( $2 \times 10^5$ /well) 培養在 96-well 培養盤(或以 HuH7(human hepatoma cell line)、HepG2(human hepatocellular carcinoma cell line)及 AGS(human gastric cancer epithelial cell line)為實驗對照組), 24 小時後經含有不同稀釋濃度之天然萃取物的 MEM 培養液 (不含血清) 培養 72 小時 (3 天) 後, 將培養液移除, 以 PBS (phosphate buffered saline) 清洗三次, 加入 200  $\mu$ l/well 的 MEM 培養液 (不含胎牛血清) 以及 20  $\mu$ l/well 2.5mg/ml

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium(MTS)溶液 (Promega, Madison, WI), 培養在 37 $^{\circ}$ C 暗室 3~4 小時, 接著在 O.D.490 的吸光波長下測得數值, 再進一步計算細胞生長抑制比例:

$$\text{癌細胞毒殺性百分比} = \left(1 - \frac{\text{實驗組平均吸收數值}}{\text{控制組平均吸收數值}}\right) \times 100$$

在測試胃癌細胞株 AGS 活性試驗方面, 將經 *H. pylori* 感染之  $7 \times 10^3$  AGS 細胞與不同濃度之臺灣八角金盤抽出物或其活性物質共同培養, 於 96-well 培養盤中, 於不同時間點計算細胞之增生狀況。將 XTT 與 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide 加入培養盤中, 於 37 $^{\circ}$ C 中反應 4 小時後, 以 OD<sub>450</sub>- OD<sub>500</sub> 檢測其吸光值以計算細胞之增生情況。所有試驗將重複三次並取其平均。

### 四、製備全細胞均質液 (whole cell lysate) 分析天然萃取物對肝癌細胞內病毒表面蛋白 (HBsAg) 產生的影響

培養後之細胞收集在 PBS 緩衝液清洗三次, 離心下來後溶在 RIPA (10mM Tris-HCL, 150mM NaCl, 5nM EDTA, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40, and 0.25% Deoxycholate, 1mM PMSF, 25 ng/ml aprotinin, 5 ng/ml leupeptin) 緩衝液, 再用微量分注器抽吸幾次, 以 14,000 rpm 離心 20 分鐘, 所得到上清液即為細胞均質液。

### 五、放射性免疫分析法 (Radioimmunoassay, RIA) 分析天然萃取物對培養基病毒表面蛋白量釋放量的影響

肝癌細胞處理天然萃取物之培養培養基 (culture supernatants) 收集起

來，以 RIA assay kit (General Biologicals Corp., Industrial Park, Hsin Chu, Taiwan) 分析量化。

## 六、以 Real-Time PCR 反應分析 B 型肝炎病毒 DNA 之複製或 RNA 表現之程度

### (一) 反轉錄酵素反應 (reverse transcription reaction, RT)

1. HepG2 2.2.15 total RNA 由 TriZol isolation kit (Invitrogen) 抽取，再取 1  $\mu$ g RNA 利用 CDS III 3'PCR primer 和 SMART IV oligonucleotide，依下述反應經反轉錄作用合成 first strand cDNA。
2. 將 1  $\mu$ g RNA 與 1  $\mu$ l CDS III 3'PCR primer 及 1  $\mu$ l SMART IV oligonucleotide，於 72  $^{\circ}$ C 10 分鐘反應，結束後立即移至冰上 5 分鐘。

依序加入下列藥品，於 42  $^{\circ}$ C 1hr 進行 RT 反應：

5X first-strand buffer 4  $\mu$ l

dNTP (10 mM) 2  $\mu$ l

DDT (20 mM) 2  $\mu$ l

Reverse transcriptase 1  $\mu$ l

在研究中利用即時定量聚合酶鏈鎖反應器來做基因表現的定量。使用 ABI 7300 Real-Time PCR System 即時偵測各 PCR 產物所表現 SYBR-green 的量來做基因表現情形的相對定量。SYBR-green 為一可鑲嵌於雙股 DNA 之螢光染劑，當其起始鑲嵌於放大基因片段時螢光值之訊號會相對增加，增加的螢光量便可視為是 PCR 反應中所合成產物量的增加。研究的標的為 HBV 基因組，並以 house keeping 基因 (housekeeping gene) 18SrRNA (18S ribosomal RNA) 作為每一次實驗中的內部基因標準對照 (endogenous reference standard)。反應試劑為 50 ng cDNA template、1 $\times$ SYBR Green PCR Master Mix，包含有 1 $\times$ SYBER Green buffer、5 mM MgCl<sub>2</sub>、200  $\mu$ M dNTP、80 % glycerol、200 nM 引子

### (二) PCR 條件

研究中所有樣本均至少做三重複實驗，首先加熱 50  $^{\circ}$ C 2 分鐘，升溫到 95  $^{\circ}$ C 10 分鐘後，接著從 95  $^{\circ}$ C 15 分鐘到 60  $^{\circ}$ C 1 分鐘這個步驟進行 40 個循環，最後升溫至 95  $^{\circ}$ C 反應 15 分鐘。

### (三) 引子設計

研究中所使用到的 primer 均以 Primer Express 3.0 進行設計，基因序列的來源則為 NCBI (National Center for Biotechnology Information)之 GenBank。其設計片段長度約 100 bp。

#### (四)表現量分析

所得到之實驗結果數據是利用 ABI 7300 軟體來進行分析。利用 Ct 值以下列公式進行計算。

$$\Delta CT = CT_{\text{target}} - CT_{\text{reference}}$$

$$\Delta\Delta CT = CT_{\text{sample}} - CT_{\text{calibrator}}$$

$$\text{Related amount} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

#### 七、最小殺菌濃度測試( Minimal bactericidal concentration, MBC)

將 *H. pylori* 26695 (ATCC 700392), 以加入 5%綿羊血之 Columbia agar plates 培養於 37°C之厭氧培養缸。48 小時後將供測試之菌株稀釋濃度至 10<sup>6</sup> CFU/ml, 利用 96well 進行實驗。每個 well 添加 100μl 稀釋之菌液, 再加入不同濃度之臺灣八角金盤植物抽出物或其活性物質, 置於 37°C培養 24 小時後, 再次培養於含 5%綿羊血之 Columbia agar plates, 紀錄最低的殺菌濃度。

#### 八、紙錠擴散試驗 (disc diffusion assay)

將供測試之菌株培養至 OD<sub>600</sub>=1, 取 0.1ml 塗抹於平板瓊脂表面上, 以 L 型玻棒塗抹均勻。將 10μl、50μl 或 100μl 之茄屬植物抽出物或其活性物質滴在滅菌之紙錠上, 藥液便向周圍培養基擴散, 置於 37°C培養 18-24 小時後觀察結果。抗菌能力(antimicrobial activity)依抑菌圈的大小判定。以臺灣八角金盤抽出物或其活性物質之溶劑為陰性對照, 以 gentamicin 為檢測菌株之抗菌陽性對照。

#### 九、細胞培養及感染

將人類胃癌上皮細胞 (human gastric cancer epithelial cell line) AGS 細胞培養於添加 10% 胎牛血清, 100U/ml penicillin 與 100μg/ml streptomycin 之 RPMI 1640 培養液中, 並於 37°C恆溫箱中培養。在感染實驗中, 以細菌比細胞 100 比 1 之比例感染細胞, 將 AGS 細胞與懸浮於 PBS 且經培養 48 小時之 *H. pylori* 共同培養, 且於感染之細胞培養液中添加不同濃度之臺灣八角金盤抽出物或其活性物質, 並於感染後於不同時間點收集感染之細胞, 以評估其治療 *H. pylori* 感染之能力; 亦或於 AGS 細胞感染 *H. pylori* 前 1、6 或 12 小時先行將細胞與以不同濃度之臺灣八角金盤抽出物或其活性物質處理, 感染後於不同時間點收集感染之細胞, 以評估其預防 *H. pylori* 感染之能力。

#### 十、天然萃取物對胃上皮細胞生長及毒殺性影響:

在測試胃癌細胞株 AGS 活性試驗方面，將經 *H. pylori* 感染之  $1 \times 10^4$  AGS 細胞與不同濃度之臺灣八角金盤植物抽出物或其活性物質共同培養，於 96-well 培養盤中，於 24 小時後計算細胞之增生狀況。將 MTT 與 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide 加入培養盤中，於 37°C 中反應 4 小時後，以 OD<sub>450</sub>- OD<sub>500</sub> 檢測其吸光值以計算細胞之增生情況。所有試驗將重複三次並取其平均。

## 參、結果

### 一、臺灣八角金盤抗癌、抗 B 型肝炎病毒天然物之活性分析

#### (一) 正丁醇(*n*-BuOH)層粗萃物之分離純化和生物活性測試

##### 第一部分：對肝癌細胞之毒殺作用

每個fractions的沖提物處理HepG2 2.2.15肝癌細胞株3天後，經由細胞毒性試劑組分析後，可以顯示不同fractions的沖提物具有不同之生物活性（請參見方法細胞毒殺性測試部分）。FPL-B-1、FPL-B-2、FPL-B-3、FPL-B-4和FPL-B-5處理肝癌細胞在高濃度對肝癌細胞並無明顯毒性（40  $\mu\text{g/ml}$ ）（圖十A），而FPL-B-1處理肝癌細胞在較低濃度對肝癌細胞並無明顯毒性（2.5-10  $\mu\text{g/ml}$ ），甚至有增加癌細胞增生能力。將FPL-B-5再次進行管柱層析，得到四個fractions的沖提物FPL-B-5-1、FPL-B-5-2、FPL-B-5-3和FPL-B-5-4，將前三種進行細胞毒性測試結果顯示，FPL-B-5-1和FPL-B-5-2處理肝癌細胞在高濃度對肝癌細胞並無明顯毒性（40  $\mu\text{g/ml}$ ），而FPL-B-5-3處理濃度為40  $\mu\text{g/ml}$ 時，達到60%之細胞毒殺效果（圖十一A）。將FPL-B-5-2再次進行管柱層析，得到七個fractions的沖提物，將這七個fractions的沖提物進行細胞毒性試驗結果顯示，FPL-B-5-2-1~FPL-B-5-2-5對肝癌細胞並無明顯毒性（40  $\mu\text{g/ml}$ ）（圖十二A和十三A），FPL-B-5-2-6在濃度6.52  $\mu\text{g/ml}$ 達到細胞毒殺的 $\text{IC}_{50}$ （抑制50%細胞生長之藥物濃度），具有明顯肝癌細胞毒殺性，而FPL-B-5-2-7濃度33.38  $\mu\text{g/ml}$ 達到細胞毒殺的 $\text{IC}_{50}$ （圖十三A）。

##### 第二部分：對抗B型肝炎病毒活性測試

本測試抗病毒活性之每個fractions的沖提物與細胞毒殺性測試之沖提物相同，來自圖一萃取分離流程，經由FPL-B-1-5沖提物處理3天後，其中FPL-B-4顯示可以10%抑制B型肝炎病毒表面蛋白（HBsAg）及e蛋白（HBeAg）之分泌（圖十B），而其他各分液層沖提物依據結果顯示，並無明顯抑制B型肝炎病毒表面蛋白（HBsAg）及e蛋白（HBeAg）分泌之活性。（圖十一B、十二B和十三B）。

#### (二) 二氯甲烷( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )層粗萃物之分離純化和生物活性測試

二氯甲烷( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )層粗萃物100 g分成兩部分，一部份(30 g)經由矽

膠管柱層析(Si-60 gel column)以正己烷(*n*-hexane)/乙酸乙酯(EtOAc)/甲醇(MeOH)進行梯度沖提，得到10個fractions (FPL-DM-1~FPL-DM-10) (如圖二-Part2萃取流程部分)。另一部分(70 g)以相同條件進行初步分離得到40個fractions (FPL-DM-1~FPL-DM-40) (如圖五-Part5部分)。

第一部分：對肝癌細胞之毒殺作用

分液層的沖提物處理HepG2 2.2.15肝癌細胞株3天後，經由細胞毒性試劑組分析後，可以顯示不同分液層的沖提物具有不同之生物活性 (請參見方法細胞毒殺性測試部分)。在萃取流程圖二-Part2所得之沖提物細胞毒性測試結果顯示，FPL-DM-3在濃度8.34  $\mu\text{g/ml}$ 達到細胞毒殺的 $\text{IC}_{50}$ 。FPL-DM-4在處理濃度40  $\mu\text{g/ml}$ ，抑制細胞達49.92%。FPL-DM-6在濃度35.02  $\mu\text{g/ml}$ 即達到細胞毒殺的 $\text{IC}_{50}$ 。FPL-DM-7在濃度8.78  $\mu\text{g/ml}$ 達到細胞毒殺的 $\text{IC}_{50}$ 。FPL-DM-8在濃度15.48  $\mu\text{g/ml}$ 即達到細胞毒殺的 $\text{IC}_{50}$ ，顯示FPL-DM3~DM7分液層萃取物 (參見圖三) 具有相當的肝癌細胞毒殺活性 (參見圖十四)。將FPL-DM-2再次進行管柱層析，得到12個fractions的沖提物 (參見圖二)，將此12個fractions的沖提物進行細胞毒性試驗結果顯示，FPL-2-1~2在處理濃度40  $\mu\text{g/ml}$ 並無細胞毒性。然而FPL-2-3的細胞毒性 $\text{IC}_{50}= 15.35 \mu\text{g/ml}$ 、FPL-2-4 的細胞毒性 $\text{IC}_{50}= 8.22 \mu\text{g/ml}$ 、FPL-2-5的細胞毒性 $\text{IC}_{50}= 6.072 \mu\text{g/ml}$ 、FPL-2-6 的細胞毒性 $\text{IC}_{50}= 13.87 \mu\text{g/ml}$  (圖十五A)。FPL-2-7、FPL-2-10和FPL-2-12在處理濃度40  $\mu\text{g/ml}$ 並無細胞毒性。而FPL-2-8的細胞毒性 $\text{IC}_{50}= 25.581 \mu\text{g/ml}$ 、FPL-2-9的細胞毒性 $\text{IC}_{50}= 18.516 \mu\text{g/ml}$ 、FPL-2-11的細胞毒性 $\text{IC}_{50}= 8.70 \mu\text{g/ml}$  (圖十六A)，由上述結果可以推論，此12個fractions的沖提物對肝癌細胞毒殺效果有效成分分布在FPL-2-4、FPL-2-5以及FPL-2-11等三個分液層中。將FPL-2-3再次進行管柱層析，得到四個fractions的沖提物，將此四個fractions的沖提物進行細胞毒性試驗結果顯示FPL-2-3-1和FPL-2-3-2在處理最高濃度40  $\mu\text{g/ml}$ 並無細胞毒性。而FPL-2-3-3的細胞毒性 $\text{IC}_{50}= 10.06 \mu\text{g/ml}$ 、FPL-2-3-4的細胞毒性 $\text{IC}_{50}= 5.98 \mu\text{g/ml}$  (圖十七A)、由此結果可得知，FPL-2-3-4中有毒殺肝癌細胞有效成分分布其中。將FPL-2-4再次進行管柱層析，得到四個fractions的沖提物，將此四個fractions的沖提物進行細胞毒性試驗，結果顯示FPL-2-4-1的細胞毒性 $\text{IC}_{50}= 7.71 \mu\text{g/ml}$ 、FPL-2-4-2的細胞毒性 $\text{IC}_{50}= 13.93 \mu\text{g/ml}$ 、FPL-2-4-4的細胞毒性 $\text{IC}_{50}= 21.00 \mu\text{g/ml}$  (圖十八A)，皆具有相當之肝癌細胞毒性。將FPL-2-4-3層再次進行管柱層析，得到二個fractions的沖提物，將此二

個fractions的沖提物進行細胞毒性試驗，其結果為FPL-243-1的細胞毒性 $IC_{50}=29.16\ \mu\text{g/ml}$ 和FPL-243-2的細胞毒性 $IC_{50}=7.65\ \mu\text{g/ml}$ （圖十九A），顯示在FPL-243-2分液層萃取物具有很強的肝癌細胞毒性。再者，將FPL-2431-1再次進行管柱層析，得到四個fractions的沖提物，將此四個fractions的沖提物進行細胞毒性試驗，其結果為FPL-2431-1的細胞毒性 $IC_{50}=33.47\ \mu\text{g/ml}$ ，然而FPL-2431-2~4在處理最高濃度 $40\ \mu\text{g/ml}$ 對肝癌細胞並無細胞毒性（圖二十A）。此外，將FPL-2-4-2近行一連串的柱管層析，最終得到一個化合物FPL-24232-2，將此化合物進行細胞毒性試驗，其結果為此化合物對肝癌細胞並無毒殺效果（圖二十一A）。將純化出的FPL-3332-2、FPL-33532-2、FPL-3356和FPL-3622-1（圖三-Part3、圖四-Part4）四個化合物進行細胞毒性試驗，結果為FP-3332-2的細胞毒性 $IC_{50}=29.35\ \mu\text{g/ml}$ （圖二十二A）、FPL-33532-2與FPL-3356處理最高濃度 $40\ \mu\text{g/ml}$ 對肝癌細胞並無細胞毒性（圖二十三A和二十四A），FPL-3622-1的細胞毒性 $IC_{50}=8.9\ \mu\text{g/ml}$ （圖二十五A），此分液層萃取物具有很強之肝癌細胞毒性。在萃取流程圖五-Part5所得之fractions沖提物細胞毒性測試結果（圖二十六A、二十七A）顯示，FPL-DM-4在濃度 $36.52\ \mu\text{g/ml}$ 可達到 $IC_{50}$ 。FPL-DM-5在濃度 $9.36\ \mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ ，FPL-DM-6在濃度 $6.69\ \mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ ，FPL-DM-7在濃度 $6.06\ \mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ ，FPL-DM-8在濃度 $6.21\ \mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ ，FPL-DM-9在濃度 $8.81\ \mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ ，因此，從FPL-DM-5~FPL-DM-9等分液層萃取物皆具有很強之肝癌細胞毒性。測試FPL-DM-10在濃度 $18.49\ \mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ （圖二十七A），FPL-DM-11在濃度 $27.18\ \mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ ，FPL-DM-13在濃度 $39.06\ \mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ 。測試FPL-DM-21在濃度 $19.29\ \mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ （圖二十八A），FPL-DM-22在濃度 $14.422\ \mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ ，FPL-DM-23在濃度 $15.12\ \mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ 。測試FPL-DM-24在濃度 $16.73\ \mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ （圖二十九A），FPL-DM-25在濃度 $14.01\ \mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ ，FPL-DM-26在濃度 $15.13\ \mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ ，FPL-DM-27在濃度 $16.51\ \mu\text{g/ml}$ 可達到 $IC_{50}$ ，FPL-DM-32在濃度 $31.41\ \mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ 。測試FPL-DM-34在濃度 $16.47\ \mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ （圖三十A），FPL-DM-36在濃度 $8.89\ \mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ ，FPL-DM-37在濃度 $8.07\ \mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ ，FPL-DM-38在濃度 $15.89\ \mu\text{g/ml}$ 可達

到細胞毒性 $IC_{50}$ ，FPL-DM-39在濃度18.58  $\mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ ，FPL-DM-40在濃度18.88  $\mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ （相對肝癌細胞毒性請參見總表一）。再將具有肝癌細胞毒性之FPL-8進行管柱層析，共得到二十個fractions沖提物（圖六-Part6），其中6、7、8、9之分液層萃取物用TLC點片成點結果相似，所以進行合併純化並將其中十個fractions進行細胞毒性試驗，其結果為FPL-DM-8-10在濃度28.93  $\mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ （圖三十一A），FPL-DM-8-11在濃度7.30  $\mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ ，FPL-DM-8-12在濃度2.778  $\mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ ，FPL-DM-8-13在濃度16.01  $\mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ 。測試FPL-DM-8-15在濃度33.08  $\mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ （圖三十二A）。其餘fractions的沖提物（FPL-DM-8-16~19）對癌細胞並無明顯毒殺效果。將具明顯肝癌細胞毒性之FPL-DM-8-12再次進行管柱層析，共得到十個fractions（圖七-Part7），先取前五個fractions沖提物進行細胞毒性試驗，可得到結果為FPL-DM-8-12-2在濃度17.27  $\mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ ，FPL-DM-8-12-3在濃度8.22  $\mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ （圖三十三A）。再將FPL-DM-8-12-1進一步純化出FPL-DM-8-12-1-5b、FPL-DM-8-12-1-5c和FPL-DM-8-12-1-5d三個純化合物，將此三個純化合物進行細胞毒性試驗其結果為，結果對肝癌細胞並無明顯毒性（圖三十四），至於對B型肝炎病毒之抑制活性目前正在分析階段。將FPL-DM-24進行一連串色層分析（圖八-Part8和圖九-Part9），可以得到三種純化合物分別為FPL-24-6-3-1（以解出結構，參見表三）、FPL-DM-24-6-7-1、FPL-DM-24-6-7-2（化合物結構分析中），將此三個純化合物進行細胞毒性試驗，其結果為FPL-DM-24-6-3-1在濃度16.75  $\mu\text{g/ml}$ 可達到細胞毒性 $IC_{50}$ （圖三十五A），其餘化合物如FPL-DM-24-6-7-1~2對肝癌細胞並無明顯毒殺效果（圖三十六）。

## 第二部分：對抗B型肝炎病毒活性測試

本測試抗病毒活性之臺灣八角金盤葉子的每個fractions的沖提物與細胞毒殺性測試之沖提物相同（圖二-Part2和圖三-Part3），經由FPL-DM-3、6、7、8和10的沖提物處理3天後，其中FPL-DM-3顯示處理濃度1.25  $\mu\text{g/ml}$ 可以抑制B型肝炎病毒表面蛋白（HBsAg）43%及e蛋白（HBeAg）33%之分泌（參見圖十四C）、FPL-DM-6顯示處理濃度20  $\mu\text{g/ml}$ 可以抑制B型肝炎病毒表面蛋白（HBsAg）43%及e蛋白（HBeAg）31%之分泌（參見圖十四C）、FPL-DM-7顯示處理濃度5  $\mu\text{g/ml}$ 可以抑制

B型肝炎病毒表面蛋白 (HBsAg) 22%及e蛋白 (HBeAg) 12%之分泌、FPL-DM-8顯示處理濃度 10  $\mu\text{g/ml}$ 可以抑制B型肝炎病毒表面蛋白 (HBsAg) 18%及e蛋白 (HBeAg) 11%之分泌、FPL-DM-10顯示處理濃度 20  $\mu\text{g/ml}$ 可以抑制B型肝炎病毒表面蛋白 (HBsAg) 6%及e蛋白 (HBeAg) 2%之分泌、(圖十四C)，由此實驗結果得知，八角金盤二氯甲烷沖提物抗B型肝炎病毒有效成分分布在第三層分液層到第六層分液層之間。FPL-2所分離出的12個fractions沖提物處理三天，其結果顯示FPL-2-5處理濃度0.625  $\mu\text{g/ml}$ 可以抑制B型肝炎病毒表面蛋白e蛋白 (HBeAg) 16%之分泌 (圖十五B)、FPL-2-10處理濃度5  $\mu\text{g/ml}$ 可以抑制B型肝炎病毒表面蛋白e蛋白 (HBeAg) 20%之分泌 (圖十六B)，而其他各分液層沖提物依據結果顯示，並無法明顯抑制B型肝炎病毒表面蛋白 (HBsAg) 及e蛋白 (HBeAg) 之分泌。將FPL-2-3再次進行管柱層析，得到4個fractions的沖提物，將此4個fractions的沖提物進行抗病毒試驗，結果為FPL-2-3-1處理濃度20  $\mu\text{g/ml}$ 可以抑制B型肝炎病毒表面蛋白 (HBsAg) 16%，FPL-2-3-3處理濃度1.25  $\mu\text{g/ml}$ 可以抑制B型肝炎病毒表面蛋白 (HBsAg) 12%及e蛋白 (HBeAg) 15%之分泌，FPL-2-3-4處理濃度0.625  $\mu\text{g/ml}$ 可以抑制B型肝炎病毒表面蛋白 (HBsAg) 11%(圖十七B)。而其餘fractions的沖提物依據結果顯示，並無法明顯抑制B型肝炎病毒表面蛋白 (HBsAg) 及e蛋白 (HBeAg) 之分泌 (圖十七B、十八B、十九B和二十B)。化合物 FPL-24232-2、FPL-3332-2、FPL-33532-2、FPL-3356和 FPL-3622-1 對抗B型肝炎病毒表面蛋白 (HBsAg) 及e蛋白 (HBeAg) 之分泌結果顯示並無明顯抑制活性 (圖二十一B、二十二B、二十三B、二十四B、二十五B)。

目前本研究初步分離純化出17個化合物，包含5個未知的saponin類化合物 [(FPL-DM-8'-12-1-5b)、(FPL-DM-8'-12-1-5c)、(FPL-DM-8'-12-1-5d)、(FPL-DM-8'-12-1-3b)和(FPL-DM-8'-12-1-3d)]、2個新的oleanane-type triterpenoid類化合物[3 $\alpha$ ,24-dihydroxyolean-11,13(18)-dien-28-oic acid (FPL-DM-24-6-7-3)和3 $\alpha$ ,24-dihydroxyolean-11-en-13 $\beta$ ,28-olide (FPL-DM-24-6-5-7)]、2個已知的oleanane-type triterpenoid類化合物[3 $\alpha$ -hydroxyolean-11-en-13 $\beta$ , 28-olide (FPL-DM-20-3-5-3C)和3 $\alpha$ -hydroxyolean-11,13(18)-dien-28-oic acid (FPL-DM-20-3-5-W)]、1個已知的lignan類化合物[(+)-eudesmin (FPL-DM-24-6-3-1)]、1個已知的sterol類化合物 [(22E,24R)-ergosta-5, 22-dien-3 $\beta$ -ol (brassicasterol)]

(FPL-DM-20-1)]、3個芳香族類化合物[4-(2-hydroxyethyl) phenol (FPL-DM-24-6-7-1)、8-methoxyscopoletin (isofraxidin) (FPL-DM-25-18-2-1)和syringaldehyde (FPL-DM-24-6-5-1- 10)]、1個已知的indole-type alkaloid類化合物[1*H*-indole-3-carbaldehyde (FPL-DM-24-6-7-2)]與2個已知的葉綠素化合物[13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>*S*)-pheophytin a (FPL-DM-20-3-5-2-4-H1)和13<sup>2</sup>- hydroxyl-(13<sup>2</sup>*R*)-pheophytin a (FPL-DM-20-3-5-2-4-H2)]。其結構如表三所示，其中有5個未知的saponin類化合物之結構目前正待進一步解析中，主要針對是其所含糖基的D-和L-form結構鑑定。

## 二、臺灣八角金盤萃取物「抗菌試驗」與「細胞毒性試驗」

### (一) 抗菌試驗

本計畫以臺灣八角金盤(*Fatsia polycarpa* Hayata)之甲醇提取物經化學層析分離萃取其二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇、及水層進行抑制 *H. pylori* 標準株(26695)的試驗(圖三十七、三十八)，實驗以各項提取物在1 mg/ml的濃度下，對 *H. pylori* 進行最小殺菌濃度測試，其中二氯甲烷層之粗萃物分層以 DCM-4 及 5 對 *H. pylori* 標準株有不同程度的殺菌作用(64~512 µg/ml)，其中 DCM-4-1 及 DCM-4-2 提取物在濃度 64 µg/ml 即可產生抑菌的效果(圖三十八)。正丁醇萃取出除 B-2 在濃度 512 µg/ml 可產生殺菌的效果外，其餘效果皆不佳(圖四十)。而乙酸乙酯層在 EA-2~EA-7 其最小殺菌濃度為 64 µg/ml (圖四十一)。由以上結果可知，臺灣八角金盤之甲醇提取物於乙酸乙酯層除 EA-2~EA-7 具有活性外，在正丁醇萃取出物分離過程中其 B-5-2-7 則有明顯效力提升的，證明在臺灣八角金盤之甲醇提取物於乙酸乙酯層及正丁醇萃取出物是具有抗幽門桿菌效果之化合物存在，值得進一步深入研究。

在分離出的純天然物方面，以 DM-24-6-3-1 在 4 µg/ml 有最佳殺菌效果為本次計畫中效力最好之天然物，而天然物 DM-24-6-7-4 在濃度 64 µg/ml，DM-20-3-5-2-4-H1 在 128 µg/ml 即可產生殺菌的效果，其餘天然物對幽門桿菌則無明顯效力，其最小殺菌濃度皆大於 128 µg/ml (圖三十九)。

### (二) 細胞毒性試驗

進一步了解臺灣八角金盤之甲醇提取物其治療 *H. pylori* 感染效果，我們以經化學層析分離萃取之二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇層對 AGS 胃癌細胞株進行毒性測試，實驗以各項萃取出物在不同

的濃度下，與 AGS 胃癌細胞共同培養 24 小時後，計算其 IC<sub>50</sub>(Half Maximal Inhibitory Concentration)。由結果可知，二氯甲烷層之粗萃物分層以 DCM-3、DCM-4 及 DCM-5 其效力最強，其 IC<sub>50</sub> 分別為 16.1、14 及 21 µg/ml (圖四十二)。臺灣八角金盤之正丁醇萃取物對於 AGS 胃癌細胞並無明顯毒性，其 IC<sub>50</sub> 以 B-5-2-6 之 103 µg/ml 為最佳(圖四十三)。乙酸乙酯層則以 EA-7 與 EA-10 其效力最強，其 IC<sub>50</sub> 分別為 18.6 及 15 µg/ml (圖四十四)。

## 肆、討論

從本研究一系列的臺灣八角金盤有機分液層萃取物之分離及相關生物活性測試結果，顯示在正丁醇分液萃取層並不具有肝癌細胞毒殺活性，而在 FPLB-2 分液萃取層則具有抑制非抗藥性幽門桿菌之生長活性。在臺灣八角金盤第一次分離之二氯甲烷分液萃取層（參見圖二）生物活性分析方面，分別在 FPL-2、3、6、7、8、9 等分液萃取層可發現具有明顯之肝癌細胞毒殺活性（參見圖十四 A、B），並且在 FPL-3 之非細胞毒殺劑量之處理下，也發現具有相當之抑制 B 型肝炎病毒活性（參見圖十四 C），而在更細部分離之下，FPL-2 以下之十幾個分液層萃取物具有相當之肝癌細胞毒殺活性（參見圖十五 A、十六 A、十七 A、十八 A、十九 A）。在第二次分離過程中（參見圖五），FPL-DM4~11 等八個分液層萃取物皆具有明顯之肝癌細胞毒殺活性（參見圖二十六 A、二十七 A），尤其在細部分離過程中，FPL-DM8 之下游有三個分液層萃取物具有明顯的肝細胞毒殺活性（參見圖三十三 A），相對魚細胞毒性，只有少數幾個分液層萃取物具較不明顯之抑制 B 型肝炎病毒活性（參見圖三十三 B），且這些萃取物本身也具有相當之細胞毒性（在高劑量處理下），因此在臺灣八角金盤之具生物活性天然成分大部分以具有抗肝癌最顯著，反而在抗肝炎病毒之活性較不顯著。而在抗幽門桿菌之活性分析方面，除了在 FPLB-2 分液層萃取物具有抑制活性外，在二氯甲烷分液層萃取物中，DCM-4-1、DCM-4-2、DM-24-6-3-1 以及 DM-24-6-7-4 具有明顯之抑制幽門桿菌之效果，其中 DM-24-6-3-1 以及 DM-24-6-7-4 兩個萃取物已鑑定出成分結構（請參見表三），此外，在乙酸乙酯分液層萃取物中，EA-2 至 EA-7 等六個分液層萃取物具有明顯抑制效果（請參見圖四十一結果），在抗胃癌活性方面，臺灣八角金盤二氯甲烷層之 DCM-3、DCM-4 及 DCM-5 分液層萃取物以及乙酸乙酯分液層萃取物 EA-7 與 EA-10 其胃癌細胞毒殺活性最強。因此，從此研究中發現臺灣八角金盤具抗肝癌與抗幽門桿菌之活性成分較多，反而在抗肝炎病毒以及胃癌活性成分比例相對較少。

## 伍、結論與建議

本計畫執行較為困難部分為臺灣八角金盤有機溶劑萃取物之分離與製備，在計畫執行前期大部分時間皆集中於化合物之分離鑑定，配合天然化合物之分離萃取，生物活性測試與機制探討也同時配合進行，在尚未清楚活性天然化合物之成分之前，要在短時間內大量分離及萃取，實屬不易。另一方面，所分離之許多分液層萃取成分皆須進行多方面之生物活性測試，因此需要之人力相當繁重，再者，進行生物活性測試所需之純化化合物必須多量，如在萃取純化後所得之成分含量不足之情形下，要進一步研究探討分子機制也是具有相當程度之挑戰性。儘管在計畫執行期間諸多困難，然為因應計畫執行期程與進度，本計畫有兩個方向同時進行當中，其一為天然物之分離及結構分析，另一方面則在生物活性測試平臺建立，本實驗室已從建立的活性測試平臺進行抗肝炎病毒之活性測試，也篩選抗病毒成分並探討其抗病毒基因調控之機制。由於使用抗生素一向是治療感染症之主要方式，但也因此造成許多抗藥菌株的產生。目前用來治療胃幽門螺旋桿菌感染的抗生素，已產生抗藥菌株，為解決使用抗生素造成的問題，於中草藥中篩選針對胃幽門螺旋桿菌之抗菌成分，應可緩解抗藥菌株的產生，並增加治療胃幽門螺旋桿菌感染之機會，而臺灣八角金盤則具此潛力，唯應進一步探討其細部殺菌機轉。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP99-RD-208 提供經費贊助，並由台大醫院肝炎研究中心陳培哲院士提供肝癌細胞株(HepG2 2.2.15)為研究模式，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. 鄭漢臣，藥用植物學，文光圖書，2009年4月。
2. 林慧菁，臺灣五加科藥用資源之研究，國立中興大學生命科學院碩士論文，2009年6月。
3. 陳淑芳，東亞特有八角金盤屬(五加科)之親緣地理學研究，國立成功大學生物學研究所碩士論文，2004年6月。
4. 黃慧琪與張麗杰等. "皂素的生物活性與化學成分之探討"。《化學》，六十七卷第一期，1-12頁。2007年。
5. 徐任生，天然產物化學導論，北京，科學出版社，2006年。
6. 蕭培根、連文琰，原色中藥原植物圖鑑(上)，台北，南天書局，1998年。
7. **Ables, A. Z., I. Simon, and E. R. Melton.** 2007. Update on *Helicobacter pylori* treatment. *Am Fam Physician* **75**:351-8.
8. **Adeniyi, B. A., and F. M. Anyiam.** 2004. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* potential of methanol extract of *Allium ascalonicum* Linn. (Liliaceae) leaf: susceptibility and effect on urease activity. *Phytother Res* **18**:358-61.
9. **Adeniyi, B. A., B.C. Onwubuche, F. M. Anyiam, O. Ekundayo, and Gail B. Mahady.** 2004. Anti-*Helicobacter pylori* activities of *Eucalyptus grandis*: Effects on susceptibility, urease activity and cell surface hydrophobicity. *Pharm Biol* **47**: 13-17.
10. **Adeniyi, B. A., T. O. Lawal, and G. B. Mahady.** 2009. *In vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus torelliana*. *Pharm Biol* **47**: 99-102.
11. **Aihara, M., D. Tsuchimoto, H. Takizawa, A. Azuma, H. Wakebe, Y. Ohmoto, K. Imagawa, M. Kikuchi, N. Mukaida, and K. Matsushima.** 1997. Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. *Infect Immun* **65**:3218-24.
12. **Amieva, M. R., R. Vogelmann, A. Covacci, L. S. Tompkins, W. J. Nelson, and S. Falkow.** 2003. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* **300**:1430-4.
13. **Aoki, T., K. Shido, Y. Takahashi, and T. Suga.** 1981. Structures of 3, 28-*O*-bisglycosidic triterpenoid saponins of *Fatsia japonica*. *Phytochemistry* **20**: 1681-6.

14. **Aoki, T. and T. Suga.** 1977. Hexane soluble non-volatiles in flowering to fruiting stages of *Fatsia japonica*. *Phytochemistry* **16**: 1515-17.
15. **Aoki, T. and T. Suga.** 1978. Triterpenoid saponins from the flower buds of *Fatsia japonica*. *Phytochemistry* **17**: 771-3.
16. **Aoki, T., Y. Tanio, and T. Suga.** 1976. Triterpenoid saponins from *Fatsia japonica*. *Phytochemistry* **15**: 781-4.
17. **Arauz-Ruiz, P., H. Norder, B. H. Robertson, and L. O. Magnius.** 2002. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* **83**:2059-73.
18. **Arbuthnot, P., and M. Kew.** 2001. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *Int J Exp Pathol* **82**:77-100.
19. **Ashktorab, H., S. Frank, A. R. Khaled, S. K. Durum, B. Kifle, and D. T. Smoot.** 2004. Bax translocation and mitochondrial fragmentation induced by *Helicobacter pylori*. *Gut* **53**:805-13.
20. **Bae, E. A., M. J. Han, N. J. Kim, and D. H. Kim.** 1998. Anti-*Helicobacter pylori* activity of herbal medicines. *Biol Pharm Bull* **21**: 990-2.
21. **Baek, H. Y., J. W. Lim, H. Kim, J. M. Kim, J. S. Kim, H. C. Jung, and K. H. Kim.** 2004. Oxidative-stress-related proteome changes in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Biochem J* **379**:291-9.
22. **Bagchi, D., G. Bhattacharya, and S. J. Stohs.** 1996. Production of reactive oxygen species by gastric cells in association with *Helicobacter pylori*. *Free Radic Res* **24**:439-50.
23. **Beasley, R. P.** 1988. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* **61**:1942-56.
24. **Beasley, R. P., L. Y. Hwang, C. C. Lin, and C. S. Chien.** 1981. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* **2**:1129-33.
25. **Blumberg, B. S., H. J. Alter, and S. Visnich.** 1965. A "New" Antigen in Leukemia Sera. *Jama* **191**:541-6.
26. **Boren, T., P. Falk, K. A. Roth, G. Larson, and S. Normark.** 1993. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* **262**:1892-5.
27. **Bruce, M. G., D. L. Bruden, B. J. McMahon, T. W. Hennessy, A.**

- Reasonover, J. Morris, D. A. Hurlburt, H. Peters, F. Sacco, P. Martinez, M. Swenson, D. E. Berg, D. Parks, and A. J. Parkinson.** 2006. Alaska sentinel surveillance for antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori* isolates from Alaska native persons, 1999-2003. *Helicobacter* **11**:581-8.
28. **Byrd, J. C., and R. S. Bresalier.** 2000. Alterations in gastric mucin synthesis by *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* **6**:475-482.
29. **Calixto, J. B., A. R. Santos, V. Cechinel Filho, and R. A. Yunes.** 1998. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. *Med Res Rev* **18**:225-58.
30. **Capurso, G., R. Ricci, F. Panzuto, F. Baccini, S. Passi, E. Di Giulio, G. Delle Fave, and B. Annibale.** 2003. Intra-gastric ascorbic but not uric acid is depleted in relation with the increased pH in patients with atrophic body gastritis and *H. pylori* gastritis. *Helicobacter* **8**:300-6.
31. **Casemann, W. H., M. Meyer, A. S. Kekule, U. Lauer, P. H. Hofschneider, and R. Koshy.** 1990. A trans-activator function is generated by integration of hepatitis B virus preS/S sequences in human hepatocellular carcinoma DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:2970-4.
32. **Cavallaro, L. G., B. Egan, C. O'Morain, and F. Di Mario.** 2006. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* **11 Suppl 1**:36-9.
33. **Cellini, L., L. Marzio, G. Ferrero, A. Del Vio, E. Di Campli, L. Grossi, S. Toracchio, and L. Artese.** 2001. Transmission of *Helicobacter pylori* in an animal model. *Dig Dis Sci* **46**:62-8.
34. **Chang, Y. J., M. S. Wu, J. T. Lin, B. S. Sheu, T. Muta, H. Inoue, and C. C. Chen.** 2004. Induction of cyclooxygenase-2 overexpression in human gastric epithelial cells by *Helicobacter pylori* involves TLR2/TLR9 and c-Src-dependent nuclear factor-kappaB activation. *Mol Pharmacol* **66**:1465-77.
35. **Chen, J., L. Zhang, Y. Zhang, H. Zhang, J. Du, J. Ding, Y. Guo, H. Jiang and X. Shen.** 2009. Emodin targets the  $\beta$ -hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase from *Helicobacter pylori*: enzymatic inhibition assay with crystal structural and thermodynamic characterization. *BMC Microbiol* **9**: 91.
36. **Correa, P.** 2004. The biological model of gastric carcinogenesis. *IARC Sci*

Publ:301-10.

37. **Courouce-Pauty, A. M., A. Plancon, and J. P. Soulier.** 1983. Distribution of HBsAg subtypes in the world. *Vox Sang* **44**:197-211.
38. **Coyne, C. B., and J. M. Bergelson.** 2006. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* **124**:119-31.
39. **Cushnie, T. P., and A. J. Lamb.** 2005. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *J Ethnopharmacol* **101**:243-8.
40. **Dane, D. S., C. H. Cameron, and M. Briggs.** 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* **1**:695-8.
41. **Das, J. C., and N. Paul.** 2007. Epidemiology and pathophysiology of *Helicobacter pylori* infection in children. *Indian J Pediatr* **74**:287-90.
42. **De Marino, S., N. Borbone, F. Gala, F. Zollo, G. Fico, R. Pagiotti, and M. Iorizzi.** 2006. New constituents of sweet *Capsicum annuum* L. fruits and evaluation of their biological activity. *J Agric Food Chem* **54**:7508-16.
43. **Ding, S. Z., A. M. O'Hara, T. L. Denning, B. Dirden-Kramer, R. C. Mifflin, V. E. Reyes, K. A. Ryan, S. N. Elliott, T. Izumi, I. Boldogh, S. Mitra, P. B. Ernst, and S. E. Crowe.** 2004. *Helicobacter pylori* and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increase AP endonuclease-1/redox factor-1 expression in human gastric epithelial cells. *Gastroenterology* **127**:845-58.
44. **Egan, B. J., L. Marzio, H. O'Connor, and C. O'Morain.** 2008. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* **13 Suppl 1**:35-40
45. **Farinati, F., R. Cardin, V. M. Russo, G. Busatto, M. Franco, and M. Rugge.** 2003. *Helicobacter pylori* CagA status, mucosal oxidative damage and gastritis phenotype: a potential pathway to cancer? *Helicobacter* **8**:227-34.
46. **Fujita, S., R. Hayashi, and Y. Fujita.** 1978. Miscellaneous contributions to the essential oil of the plants from various territories. XLIII. The components of the essential oil in *Fatsia japonica* Decne. et Planch. *Nippon Kagaku Kaishi* **2**: 315-7.
47. **Fukai, T., A. Marumo, K. Kaitou, T. Kanda, S. Terada, and T. Nomura.**

2002. Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract. **Life Sci 71:** 1449-63.
48. **Fumiyasu, I., N. Masato, M. Satoshi.** 1999. Isoflavones and saponins for the inhibition of *Helicobacter pylori*. Yakult Honsha Co., Ltd., Japan. Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 11012172 A.
49. **Gang, D. R.** 2005. Evolution of flavors and scents. *Annu Rev Plant Biol* **56:**301-25.
50. **Gennari, A., D. Amadori, M. De Lena, O. Nanni, P. Bruzzi, V. Lorusso, L. Manzione, and P. F. Conte.** 2006. Lack of benefit of maintenance paclitaxel in first-line chemotherapy in metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* **24:**3912-3918.
51. **Goodwin, A., D. Kersulyte, G. Sisson, S. J. Veldhuyzen van Zanten, D. E. Berg, and P. S. Hoffman.** 1998. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (rdxA) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. *Mol Microbiol* **28:**383-93.
52. **Grishkovets, V. I., E. A. Sobolev, V. V. Kachala, A. S. Shashkov, and V. Ya. Chirva.** 2002. Triterpene glycosides of *Fatsia japonica*. VI. Structures of glycosides D<sub>3a</sub> and D<sub>3b</sub>. *Chem Nat Compd* **38:** 264-267.
53. **Grishkovets, V. I., E. A. Sobolev, A. S. Shashkov, and V. Ya. Chirva.** 2000. Triterpene glycosides of *Fatsia japonica*. I Isolation and structure of glycosides from *Fatsia japonica* seeds. *Chem Nat Compd* **36:** 166-9.
54. **Grishkovets, V. I., E. A. Sobolev, A. S. Shashkov, and V. Ya. Chirva.** 2000. Triterpene glycosides of *Fatsia japonica*. II Isolation and structure of glycosides from the leaves. *Chem Nat Compd* **36:** 501-5.
55. **Grossi, P., D. Dalla Gasperina, M. Furione, M. Vigano, and L. Minoli.** 2001. Lamivudine treatment for HBV infection following thoracic organ transplantation. *Transplant Proc* **33:**1576-8.
56. **Guo, W. T., K. D. Bell, and J. H. Ou.** 1991. Characterization of the hepatitis B virus EnhI enhancer and X promoter complex. *J Virol* **65:**6686-92.
57. **Hatakeyama, M., and T. Brzozowski.** 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* **11 Suppl 1:**14-20.
58. **Hildt, E., G. Saher, V. Bruss, and P. H. Hofschneider.** 1996. The hepatitis

- B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology* **225**:235-9.
59. **Hildt, E., S. Urban, C. Eckerskorn, and P. H. Hofschneider.** 1996. Isolation of highly purified, functional carboxy-terminally truncated hepatitis B virus middle surface protein activators from eucaryotic expression systems. *Hepatology* **24**:502-7.
  60. **Hildt, E., S. Urban, and P. H. Hofschneider.** 1995. Characterization of essential domains for the functionality of the MHBst transcriptional activator and identification of a minimal MHBst activator. *Oncogene* **11**:2055-66.
  61. **Hildt, E., S. Urban, U. Lauer, P. H. Hofschneider, and A. S. Kekule.** 1993. ER-localization and functional expression of the HBV transactivator MHBst. *Oncogene* **8**:3359-67.
  62. **Hu, C. T., C. C. Wu, C. Y. Lin, C. C. Cheng, S. C. Su, Y. H. Tseng, and N. T. Lin.** 2007. Resistance rate to antibiotics of *Helicobacter pylori* isolates in eastern Taiwan. *J Gastroenterol Hepatol* **22**:720-3.
  63. **Huang, A. H., B. S. Sheu, H. B. Yang, C. C. Huang, J. J. Wu, and X. Z. Lin.** 2000. Impact of *Helicobacter pylori* antimicrobial resistance on the outcome of 1-week lansoprazole-based triple therapy. *J Formos Med Assoc* **99**:704-9.
  64. **Huang, R. L., Chen, C. F., Feng, H. Y., Lin, L. C.** 2001. Anti-hepatitis B virus of seven compounds isolated from *Piper Kadsura*(Chopisy) Ohwi. *J Chin Med* **12**:179-190.
  65. **Huang, R. L., Y. L. Huang, J. C. Ou, C. C. Chen, F. L. Hsu, and C. Chang.** 2003. Screening of 25 compounds isolated from *Phyllanthus* species for anti-human hepatitis B virus in vitro. *Phytother Res* **17**:449-53.
  66. **Huang, T. J., C. C. Lu, J. C. Tsai, W. J. Yao, X. Lu, M. D. Lai, H. S. Liu, and A. L. Shiau.** 2005. Novel autoregulatory function of hepatitis B virus M protein on surface gene expression. *J Biol Chem* **280**:27742-54.
  67. **Huang, T. J., and P. Shirley Li.** 2001. Dexamethasone inhibits luteinizing hormone-induced synthesis of steroidogenic acute regulatory protein in cultured rat preovulatory follicles. *Biol Reprod* **64**:163-70.
  68. **Hung, K. H., B. S. Sheu, W. L. Chang, H. M. Wu, C. C. Liu, and J. J. Wu.** 2009. Prevalence of primary fluoroquinolone resistance among clinical

- isolates of *Helicobacter pylori* at a University Hospital in Southern Taiwan. *Helicobacter* **14**:61-5.
69. **Ilver, D., A. Arnqvist, J. Ogren, I. M. Frick, D. Kersulyte, E. T. Incecik, D. E. Berg, A. Covacci, L. Engstrand, and T. Boren.** 1998. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* **279**:373-7.
70. **Kawase, M., and N. Motohashi.** 2004. Plant-Derived leading compounds for eradication of *Helicobacter pylori*. *Curr Med Chem - Anti-Infective Agents* **3**: 89-100.
71. **Kekule, A. S., U. Lauer, M. Meyer, W. H. Caselmann, P. H. Hofschneider, and R. Koshy.** 1990. The preS2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator. *Nature* **343**:457-61.
72. **Kemertelidze, E. P., Z. S. Kemoklidze, G. E. Dekanosidze, and A. I. Bereznyakova.** 2001. Isolation and pharmacological characterization of triterpenoid glycosides from *Fatsia japonica* cultivated in Georgia. *Pharma Chem J* **35**: 429-32.
73. **Kim, T. G., Kang, S. Y., Jung, K. K., Kang, J. H., Lee, E., Han, M. H., Kim, S. H.** 2001. Antiviral activities of extracts isolated from *Terminidlis chebula* Retz., *Sanguisorba officinalis* L., *Rubus coreanus* Miq. and *Rheum palmatum* L. against Hepatitis B virus. *Phytother Res* **15**:718-720.
74. **Kitanaka, S., I. Yasuda, Y. Kashiwada, C-Q Hu, K. F. Bastow, I. D. Bori, and K-H Lee.** 1995. Antitumor agents, 162. Cell-based assays for identifying novel DNA topoisomerase inhibitors: Studies on the constituents of *Fatsia japonica*. *J Nat Prod* **58**: 1647-54.
75. **Krueger, S., T. Hundertmark, D. Kuester, T. Kalinski, U. Peitz, and A. Roessner.** 2007. *Helicobacter pylori* alters the distribution of ZO-1 and p120ctn in primary human gastric epithelial cells. *Pathol Res Pract* **203**:433-44.
76. **Kusters, J. G., A. H. van Vliet, and E. J. Kuipers.** 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* **19**:449-90.
77. **Lai, C-H., S-H Fang, Y. K. Rao, M. Geethangili, C-H Tang, Y-J Lin, C-H Hung, W-C Wang, and Y-M Tzeng.** 2008. Inhibition of *Helicobacter pylori*-induced inflammation in human gastric epithelial AGS cells by

- Phyllanthus urinaria* extracts. J. Ethnopharmacol **118**: 522-6.
78. **Le Bouvier, G. L., and R. W. McCollum.** 1970. Australia (hepatitis-associated) antigen: physicochemical and immunological characteristics. Adv Virus Res **16**:357-96.
79. **Lee, J. H., J. S. Shim, M-S. Chung, S-T Lim and K. H. Kim.** 2009. *In Vitro* Anti-adhesive activity of green tea extract against pathogen adhesion. Phytother Res **23**:460-6.
80. **Lee, S. H., S. Y. Kim, D. W. Kim, S. H. Jang, S-S Lim, H. J. Kwon, T-C Kang, M. H. Won, II J. Kang, K. S. Lee, J. Park, W. S. Eum, and S. Y. Choi.** 2008. Active component of *Fatsia japonica* enhances the transduction efficiency of Tat-SOD fusion protein both *in vitro* and *in vivo*. J Microbiol Biotechnol **18**: 1613-9.
81. **Leo, M. D., N. De Tommasi, R. Sanogo, V. D'Angelo, M. P. Germano`, G. Bisignano, A. Braca.** Triterpenoid saponins from *Pteleopsis suberosa* stem bark. Phytochemistry **67**: 2623-9.
82. **Lin, C. W., Y. S. Chang, S. C. Wu, and K. S. Cheng.** 1998. *Helicobacter pylori* in gastric biopsies of Taiwanese patients with gastroduodenal diseases. Jpn J Med Sci Biol **51**:13-23.
83. **Linden, S., J. Mahdavi, J. Hedenbro, T. Boren, and I. Carlstedt.** 2004. Effects of pH on *Helicobacter pylori* binding to human gastric mucins: identification of binding to non-MUC5AC mucins. Biochem J **384**:263-70.
84. **Liu, W-H., C-C Hsu and M-C Yin.** 2008. *In Vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of diallyl sulphides and protocatechuic acid. Phytother Res **22**:53-7.
85. **Liu, Z., X. Fu, N. Zhang, G. Zhang, and D. Liu.** 1997. [The inhibitory effect of Chinese herb *Phyllanthus* on hepatitis B virus *in vitro*]. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi **11**:282-5.
86. **Lu, H., J. Y. Wu, T. Kudo, T. Ohno, D. Y. Graham, and Y. Yamaoka.** 2005. Regulation of interleukin-6 promoter activation in gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori*. Mol Biol Cell **16**:4954-66.
87. **Mahdavi, J., B. Sonden, M. Hurtig, F. O. Olfat, L. Forsberg, N. Roche, J. Angstrom, T. Larsson, S. Teneberg, K. A. Karlsson, S. Altraja, T. Wadstrom, D. Kersulyte, D. E. Berg, A. Dubois, C. Petersson, K. E. Magnusson, T. Norberg, F. Lindh, B. B. Lundskog, A. Arnqvist, L.**

- Hammarstrom, and T. Boren.** 2002. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* **297**:573-8.
88. **Marion, P. L., L. S. Oshiro, D. C. Regnery, G. H. Scullard, and W. S. Robinson.** 1980. A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:2941-5.
89. **Marshall, B.** 2002. *Helicobacter pylori*: 20 years on. *Clin Med* **2**:147-52.
90. **Martin, D. L., and J. B. Blumberg.** 2003. Herbal medicines for treatment of bacterial infections: a review of controlled clinical trials. *J Antimicrob Chemth* **51**: 241–46.
91. **Mason, W. S., G. Seal, and J. Summers.** 1980. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol* **36**:829-36.
92. **Matsuo, K., K. Takenaka, H. Shimomura, N. Fujii, K. Shinagawa, K. Kiura, and M. Harada.** 2001. Lamivudine and glycyrrhizin for treatment of chemotherapy-induced hepatitis B virus (HBV) hepatitis in a chronic HBV carrier with non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* **41**:191-5.
93. **Matysiak-Budnik, T., and F. Megraud.** 2006. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Eur J Cancer* **42**:708-16.
94. **McKay, D. L., and J. B. Blumberg.** 2006. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother Res* **20**:519-30.
95. **Monteiro, M. A., K. H. Chan, D. A. Rasko, D. E. Taylor, P. Y. Zheng, B. J. Appelmek, H. P. Wirth, M. Yang, M. J. Blaser, S. O. Hynes, A. P. Moran, and M. B. Perry.** 1998. Simultaneous expression of type 1 and type 2 Lewis blood group antigens by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. Molecular mimicry between h. pylori lipopolysaccharides and human gastric epithelial cell surface glycoforms. *J Biol Chem* **273**:11533-43.
96. **Moss, S. F.** 1998. Review article: Cellular markers in the gastric precancerous process. *Aliment Pharmacol Ther* **12 Suppl 1**:91-109.
97. **Nagata, K., H. Yu, M. Nishikawa, M. Kashiba, A. Nakamura, E. F. Sato, T. Tamura, and M. Inoue.** 1998. *Helicobacter pylori* generates superoxide radicals and modulates nitric oxide metabolism. *J Biol Chem* **273**:14071-3.
98. **Nakanishi, T., N. Iida, Y. Inatomi, H. Murata, A. Inada, J. Murata, F. A.**

- Lang, M, Iinuma, T. Tanaka, Y. Sakagami.** 2005. A monoterpene glucoside and three megastigmane glycosides from *Juniperus communis* var. *depressa*. Chem Pharm Bull **53**: 783-7.
99. **Norder, H., B. Hammas, S. D. Lee, K. Bile, A. M. Courouce, I. K. Mushahwar, and L. O. Magnius.** 1993. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. J Gen Virol **74 ( Pt 7)**:1341-8.
100. **O'Brien, D. P., D. A. Israel, U. Krishna, J. Romero-Gallo, J. Nedrud, M. E. Medof, F. Lin, R. Redline, D. M. Lublin, B. J. Nowicki, A. T. Franco, S. Ogden, A. D. Williams, D. B. Polk, and R. M. Peek, Jr.** 2006. The role of decay-accelerating factor as a receptor for *Helicobacter pylori* and a mediator of gastric inflammation. J Biol Chem **281**:13317-23.
101. **Odontuya, G., J. R. Hoult, and P. J. Houghton.** 2005. Structure-activity relationship for antiinflammatory effect of luteolin and its derived glycosides. Phytother Res **19**:782-6.
102. **Ohkura, Y., T. Furihata, H. Kawamata, M. Tabuchi, K. Kubota, A. Terano, T. Sakai, and T. Fujimori.** 2003. Evaluation of cell proliferation and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis using an image analysis processor. Gastric Cancer **6**:49-54.
103. **Okamoto, H., F. Tsuda, H. Sakugawa, R. I. Sastrosoewignjo, M. Imai, Y. Miyakawa, and M. Mayumi.** 1988. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. J Gen Virol **69 ( Pt 10)**:2575-83.
104. **Ola, S. O., E. E. Anomneze, C. M. Chukwuani, O. S. Ojo, D. A. Ndububa, B. Onyenekwe, and A. Nasidi.** 2000. Interferon alfa-2a (Roferon-A) in the management of chronic hepatitis B infection: results of an open prospective study in Nigerian patients. West Afr J Med **19**:259-64.
105. **Olivares, D., J. P. Gisbert, and J. M. Pajares.** 2005. *Helicobacter pylori* infection and gastric mucosal epithelial cell apoptosis. Rev Esp Enferm Dig **97**:505-20.
106. **Ori, A., A. Zauberman, G. Doitsh, N. Paran, M. Oren, and Y. Shaul.** 1998. p53 binds and represses the HBV enhancer: an adjacent enhancer element can reverse the transcription effect of p53. Embo J **17**:544-53.

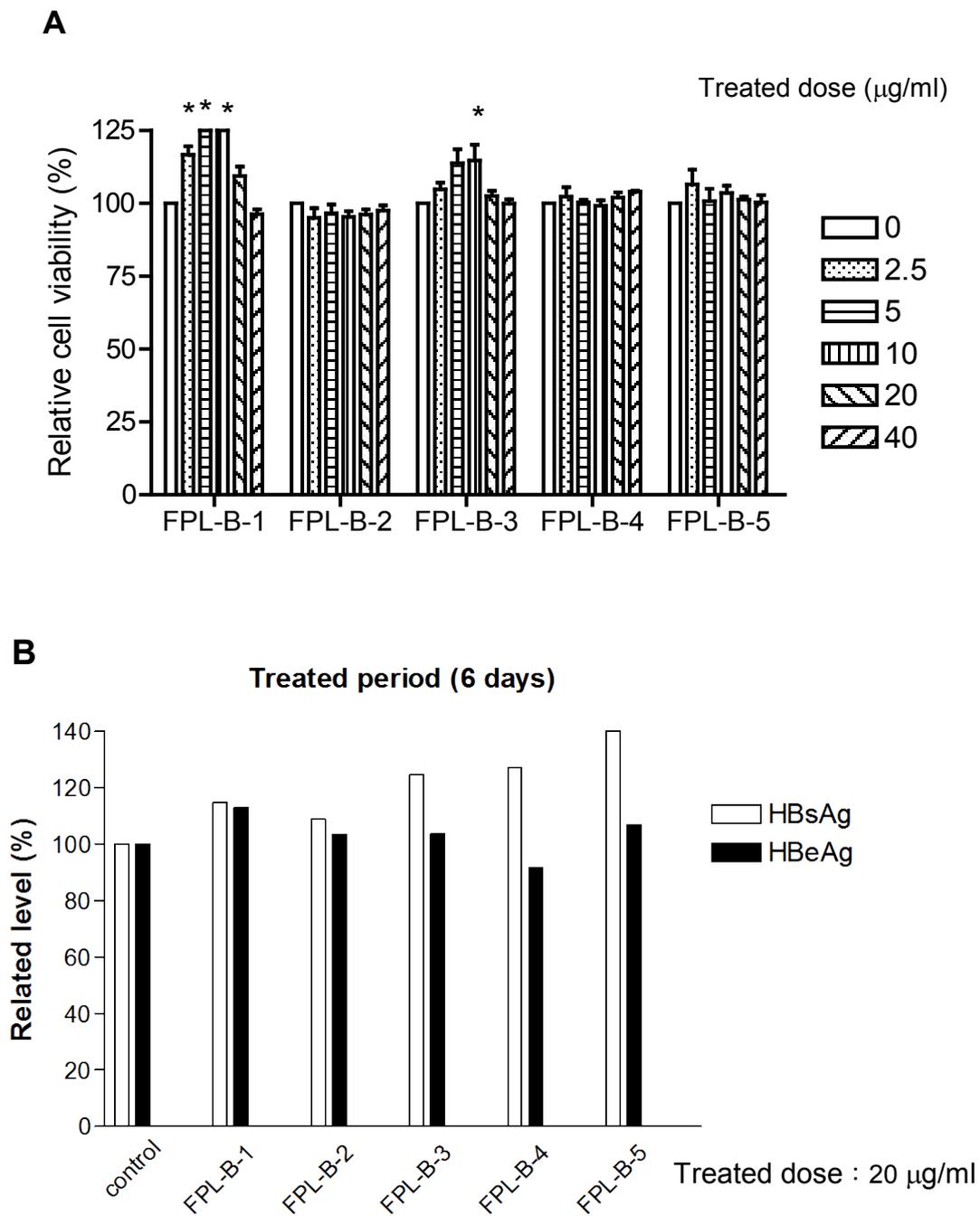
107. **Paraschos, S., P. Magiatis, S. Mitakou, K. Petraki, A. Kalliaropoulos, P. Maragkoudakis, A. Mentis, D. Sgouras, and A-L Skaltsounis.** 2007. In vitro and in vivo activities of chios mastic gum extracts and constituents against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Ch* **51**: 551-59.
108. **Poon, S. K., C. S. Chang, J. Su, C. H. Lai, C. C. Yang, G. H. Chen, and W. C. Wang.** 2002. Primary resistance to antibiotics and its clinical impact on the efficacy of *Helicobacter pylori* lansoprazole-based triple therapies. *Aliment Pharmacol Ther* **16**:291-6.
109. **Pugh, J. C., K. Yaginuma, K. Koike, and J. Summers.** 1988. Duck hepatitis B virus (DHBV) particles produced by transient expression of DHBV DNA in a human hepatoma cell line are infectious in vitro. *J Virol* **62**:3513-6.
110. **Ramadan, M. A., and N.A. Safwat.** 2009. Antihelicobacter Activity of a Flavonoid Compound Isolated from *Desmostachya Bipinnata*. *Aust J Basic & Appl Sci* **3**: 2270-77.
111. **Rauha, J. P., S. Remes, M. Heinonen, A. Hopia, M. Kahkonen, T. Kujala, K. Pihlaja, H. Vuorela, and P. Vuorela.** 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol* **56**:3-12.
112. **Sambrook, J. F., E.F; Maniatis,T.** 1989. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual".
113. **Schaller, H., and M. Fischer.** 1991. Transcriptional control of hepadnavirus gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* **168**:21-39.
114. **Sengupta, A., S. Ghosh, and S. Bhattacharjee.** 2004. Allium vegetables in cancer prevention: an overview. *Asian Pac J Cancer Prev* **5**:237-45.
115. **Sepulveda, A. R.** 2001. Molecular testing of *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis and premalignant gastric lesions: clinical implications. *J Clin Gastroenterol* **32**:377-82.
116. **Sheu, B. S., S. Odenbreit, K. H. Hung, C. P. Liu, S. M. Sheu, H. B. Yang, and J. J. Wu.** 2006. Interaction between host gastric Sialyl-Lewis X and H. pylori SabA enhances H. pylori density in patients lacking gastric Lewis B antigen. *Am J Gastroenterol* **101**:36-44.
117. **Siddiqui, A., S. Jameel, and J. Mapoles.** 1986. Transcriptional control

- elements of hepatitis B surface antigen gene. Proc Natl Acad Sci U S A **83**:566-70.
118. **Smoot, D. T., T. B. Elliott, H. W. Verspaget, D. Jones, C. R. Allen, K. G. Vernon, T. Bremner, L. C. Kidd, K. S. Kim, J. D. Groupman, and H. Ashktorab.** 2000. Influence of *Helicobacter pylori* on reactive oxygen-induced gastric epithelial cell injury. Carcinogenesis **21**:2091-5.
  119. **Sobolev, E. A., V. I. Grishkovets, V. V. Kachala, A. S. Shashkov, and V. Ya. Chirva.** 2001. Triterpene glycosides of *Fatsia japonica*. V. Structure of glycosides from flower buds. Chem Nat Compd **37**: 292-3.
  120. **Sobolev, E. A., V. I. Grishkovets, A. S. Shashkov, N. V. Tolkacheva, and V. Ya. Chirva.** 2000. Triterpene glycosides of *Fatsia japonica*. III. Isolation and structure of glycosides from fruit pericarp. Chem. Nat. Compd. **36**: 538-9.
  121. **Stone, M. J., and D. H. Williams.** 1992. On the evolution of functional secondary metabolites (natural products). Mol Microbiol **6**:29-34.
  122. **Stuyver, L., S. De Gendt, C. Van Geyt, F. Zoulim, M. Fried, R. F. Schinazi, and R. Rossau.** 2000. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. J Gen Virol **81**:67-74.
  123. **Suerbaum, S., and P. Michetti.** 2002. *Helicobacter pylori* infection. N Engl J Med **347**:1175-86.
  124. **Suga, T. and T. Aoki.** 1974. The first naturally occurring phytyl esters and hexane soluble non-volatiles from leaves of *Fatsia japonica*. Phytochemistry **13**: 1623-24.
  125. **Summers, J., J. M. Smolec, and R. Snyder.** 1978. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. Proc Natl Acad Sci U S A **75**:4533-7.
  126. **Sun, J., K. Aoki, J. X. Zheng, B. Z. Su, X. H. Ouyang, and J. Misumi.** 2006. Effect of NaCl and *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin on cytokine expression and viability. World J Gastroenterol **12**:2174-80.
  127. **Tammer, I., S. Brandt, R. Hartig, W. Konig, and S. Backert.** 2007. Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering. Gastroenterology **132**:1309-19.
  128. **Tanaka, H. N. Fukuda, S. Yahara, S. Isoda, C-S. Yuan, and Y. Shoyama.**

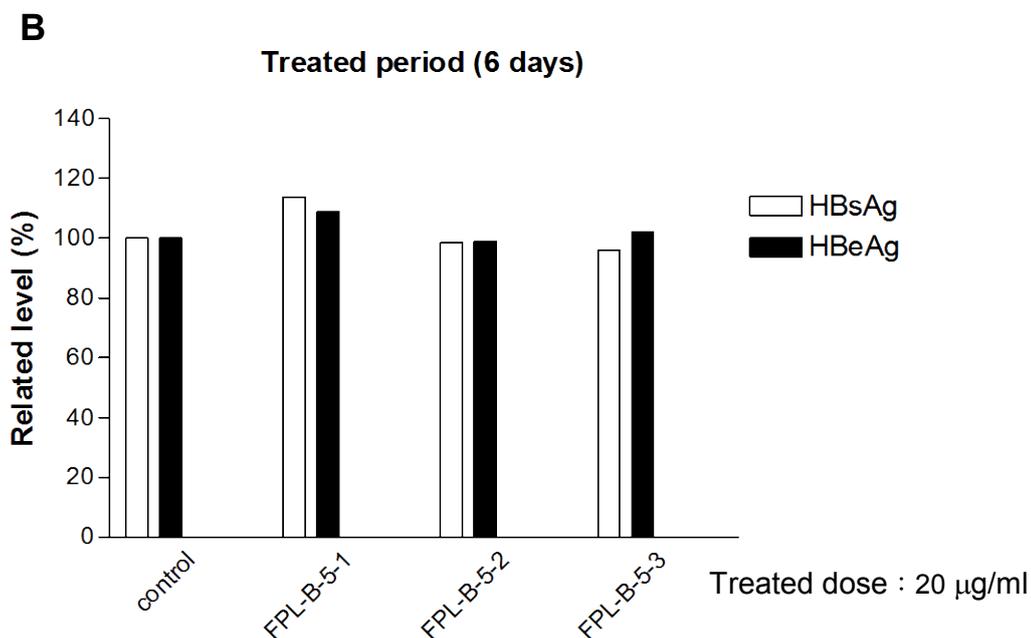
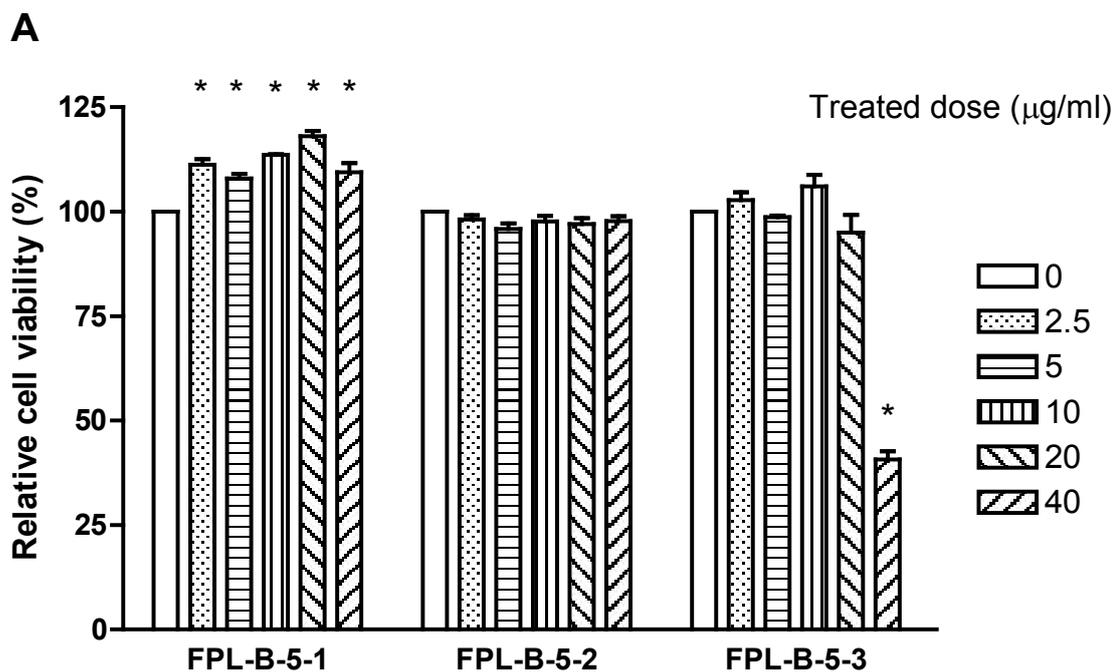
2005. Isolation of ginsenoside Rb1 from *Kalopanax pictus* by Eastern Blotting using anti-ginsenoside Rb1 monoclonal antibody. *Phytother Res* **19**: 255-8.
129. **Tanaka, N., Y. Kashiwada, T. Nakano, H. Shibata, T. Higuchi, M. Sekiya, Y. Ikeshiro, and Y. Takaishi.** 2009. Chromone and chromanone glucosides from *Hypericum sikokumontanum* and their anti-*Helicobacter pylori* activities. *Phytochemistry* **70**: 141-46.
130. **Tanemura, M. and K. Takamura.** 1975. Studies on the saponin in *Fatsia japonica* Decne et Planch. *Yakugaku Zasshi* **95**: 1-7.
131. **Tatsuguchi, A., C. Sakamoto, K. Wada, T. Akamatsu, T. Tsukui, K. Miyake, S. Futagami, T. Kishida, Y. Fukuda, N. Yamanaka, and M. Kobayashi.** 2000. Localisation of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* related gastritis and gastric ulcer tissues in humans. *Gut* **46**:782-9.
132. **Terahara, N., N. Saito, K. Toki, Y. Sakata, and T. Honda.** 1992. Cyanidin 3-lathyroside from berries of *Fatsia japonica*. *Phytochemistry* **31**: 1446-8.
133. **Teshima, S., K. Rokutan, T. Nikawa, and K. Kishi.** 1998. Guinea pig gastric mucosal cells produce abundant superoxide anion through an NADPH oxidase-like system. *Gastroenterology* **115**:1186-96.
134. **Tomimori, T. and H. Kizu.** 1979. On the saponins from the leaves of *Fatsia japonica* Decne et Planch. *Yakugaku Zasshi* **99**: 92-4.
135. **Tomoko, T., Y. Yoshiaki, Y. Kazuo, K. Ryoji, O. Kazuhiro.** 1998. Zaidan Hojin Sagami Chemical Research Center, Japan. Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 10072488.
136. **van Grieken, N. C., G. A. Meijer, A. zur Hausen, S. G. Meuwissen, J. P. Baak, and E. J. Kuipers.** 2003. Increased apoptosis in gastric mucosa adjacent to intestinal metaplasia. *J Clin Pathol* **56**:358-61.
137. **Vincken, J-P., L. Heng, A. de Groot, and H. Gruppen.** 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* **68**: 275-97.
138. **Wang, B. E.** 2000. Treatment of chronic liver diseases with traditional Chinese medicine. *J Gastroenterol Hepatol* **15 Suppl**:E67-70.

139. **Wang, R. Q., and D. C. Fang.** 2006. Effects of *Helicobacter pylori* infection on mucin expression in gastric carcinoma and pericancerous tissues. *J Gastroenterol Hepatol* **21**:425-31.
140. **Wang, W.-N., X.-B. Yang, H.-Z. Liu, Z.-M. Huang, and G.-X. Wu.** 2005. Effect of *Oenanthe javanica* flavone on human and duck hepatitis B virus infection<sup>1</sup>. *Acta Pharmacologica Sinica* **26**:587-592.
141. **Williams, D. H., M. J. Stone, P. R. Hauck, and S. K. Rahman.** 1989. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *J Nat Prod* **52**:1189-208.
142. **Wittschier, N., G. Faller, A. Hensel.** 2009. Aqueous extracts and polysaccharides from Liquorice roots (*Glycyrrhiza glabra* L.) inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. *J. Ethnopharmacol* **125**: 218-23.
143. **Yang, Y. J., B. S. Sheu, S. C. Lee, H. B. Yang, and J. J. Wu.** 2005. Children of *Helicobacter pylori*-infected dyspeptic mothers are predisposed to *H. pylori* acquisition with subsequent iron deficiency and growth retardation. *Helicobacter* **10**:249-55.
144. **Yang, Y. L., B. Xu, Y. G. Song, and W. D. Zhang.** 2003. Overexpression of c-fos in *Helicobacter pylori*-induced gastric precancerosis of Mongolian gerbil. *World J Gastroenterol* **9**:521-4.
145. **Yesilada, E., E. Sezik, T. Fujita, S. Tanaka, and M. Tabata.** 1993. Screening of some Turkish medicinal plants for their antiulcerogenic activities. *Phytother Res* **7**:263-5.
146. **Zhou, Y., B. Taylor, T. J. Smith, Z-P Liu, M. Clench, N. W. Davies, and K. D. Rainsford.** 2009. A novel compound from celery seed with a bactericidal effect against *Helicobacter pylori*. *J Pharm Pharmacol* **61**: 1067-77.

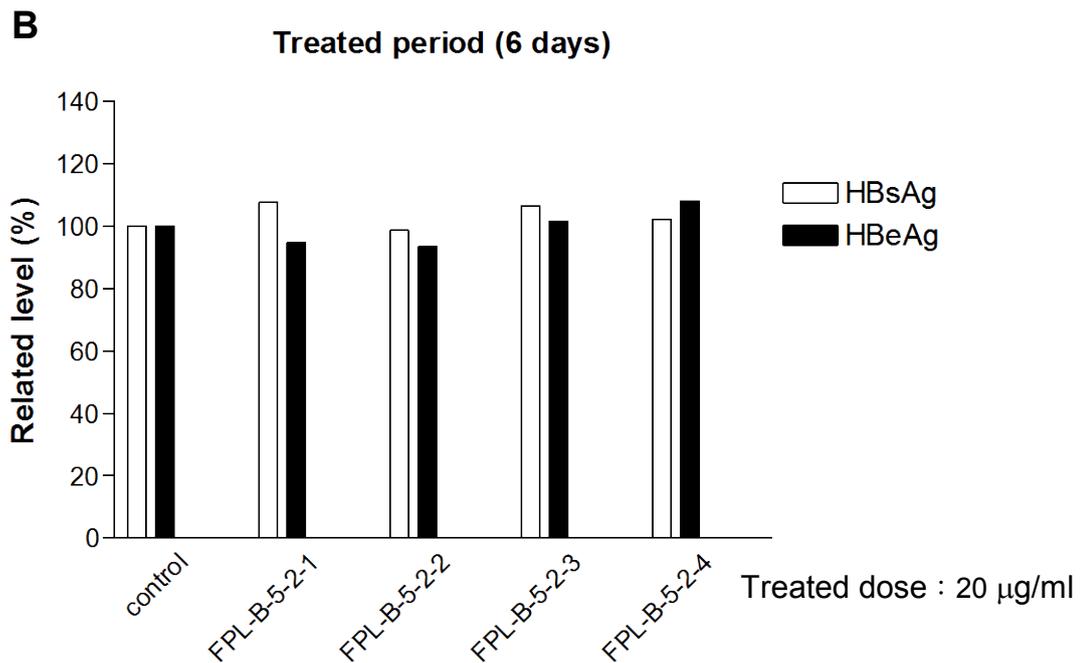
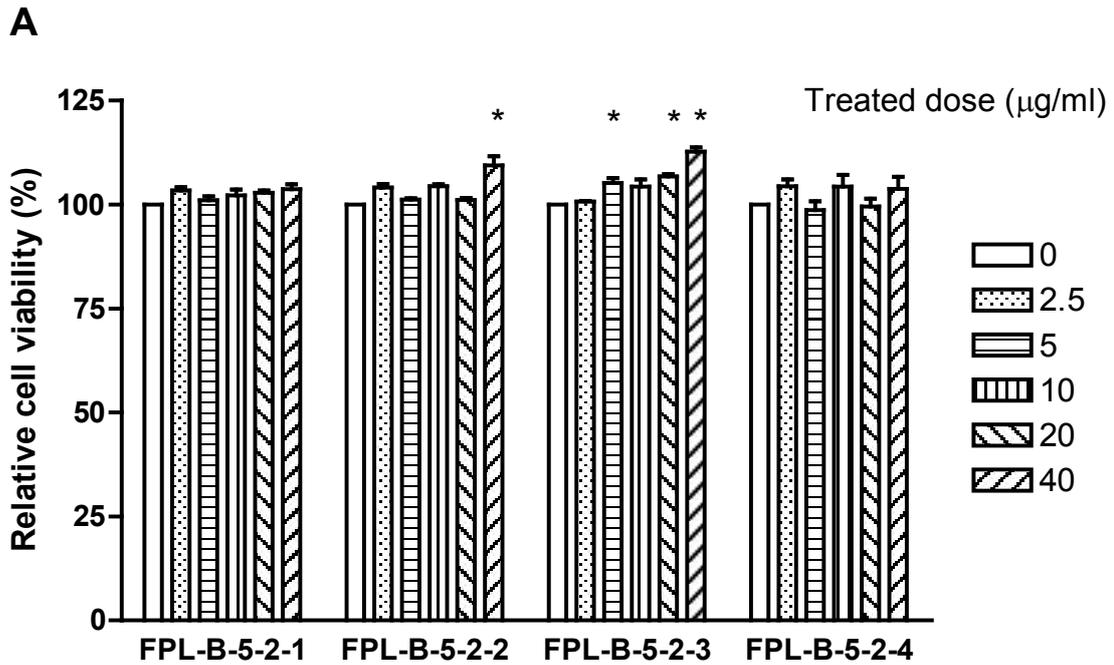
柒、圖表



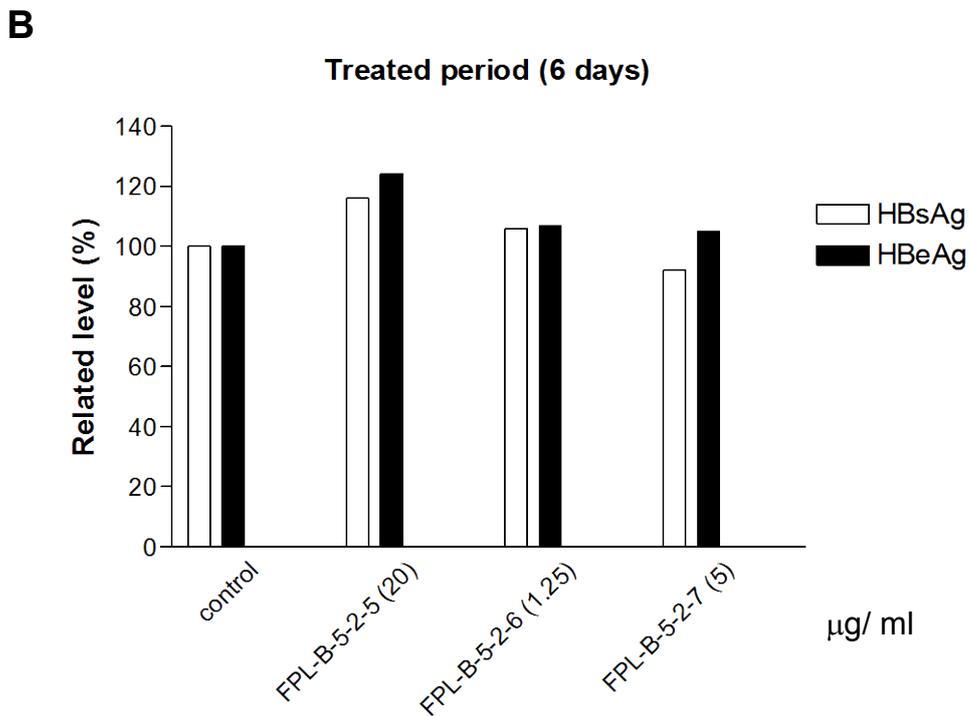
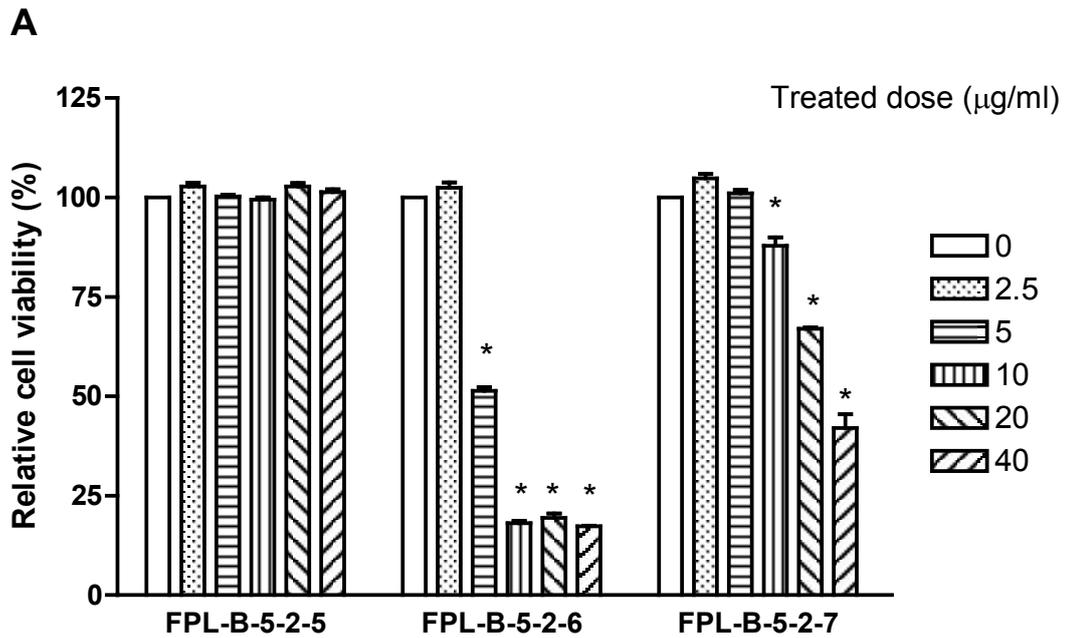
圖十、(A) 臺灣八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果 (FPLB-1~5) (B) 臺灣八角金盤有機萃取物 (FPLB-1~5) 對 HepG 2.2.15 肝癌細胞分泌 B 型肝炎病毒 HBsAg 及 HBeAg 之影響, \*  $p < 0.05$  視為有統計上的意義。



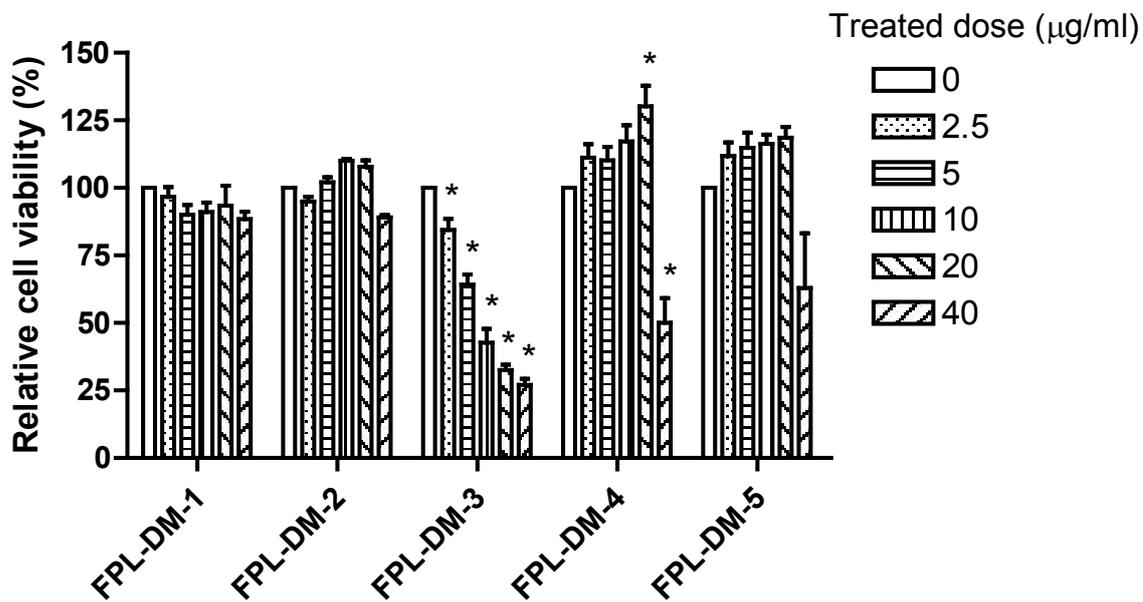
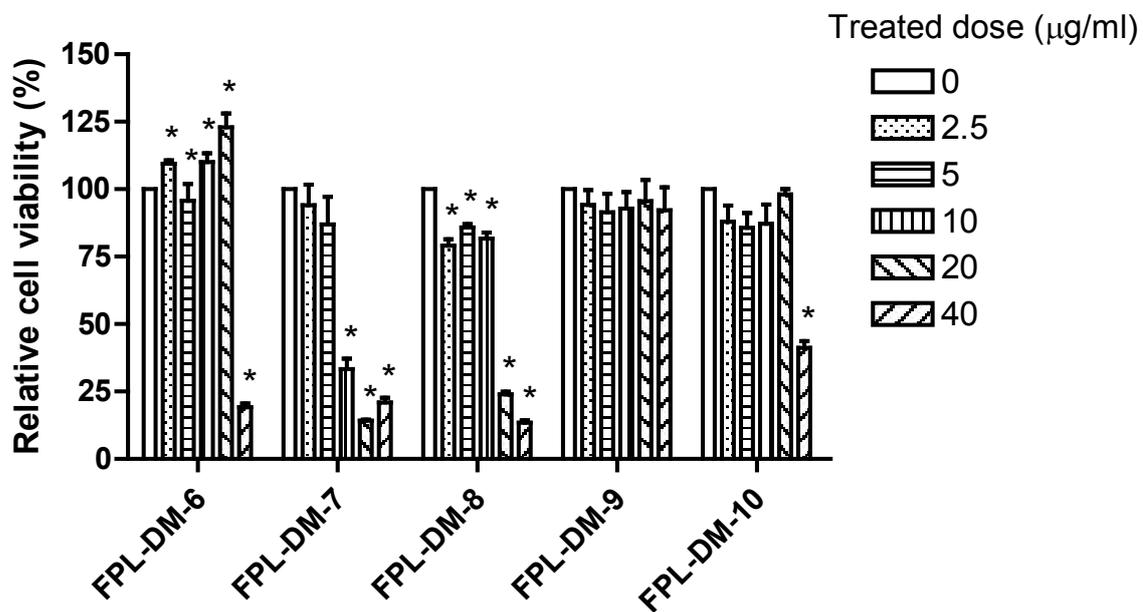
圖十一、(A) 臺灣八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果 (FPLB-5-1~3)  
 (B) 臺灣八角金盤有機萃取物 (FPL-B-5-1~3) 對 HepG 2.2.15 肝癌細胞分泌 B 型肝炎病毒 HBsAg 及 HBeAg 之影響，\*  $p < 0.05$  視為有統計上的意義。



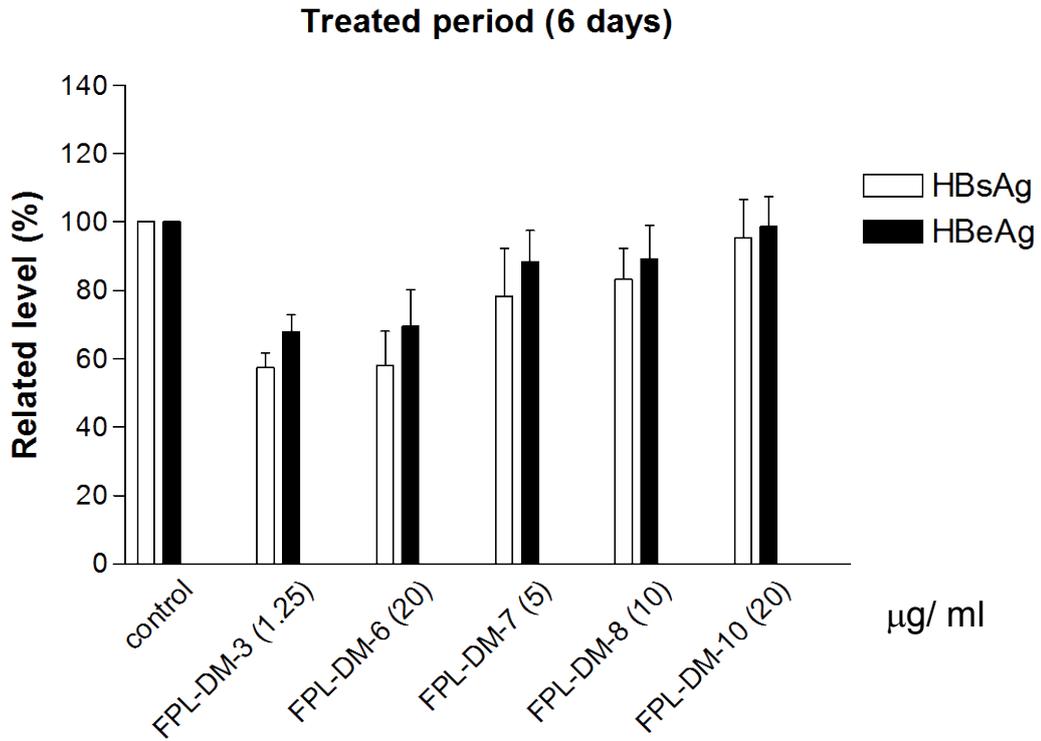
圖十二、(A) 臺灣八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果 (FPL-B-5-2-1~4)  
 (B) 臺灣八角金盤有機萃取物 (FPL-B-5-2-1~4) 對 HepG 2.2.15 肝癌細胞分泌 B 型肝炎病毒 HBsAg 及 HBeAg 之影響，\*  $p < 0.05$  視為有統計上的意義。



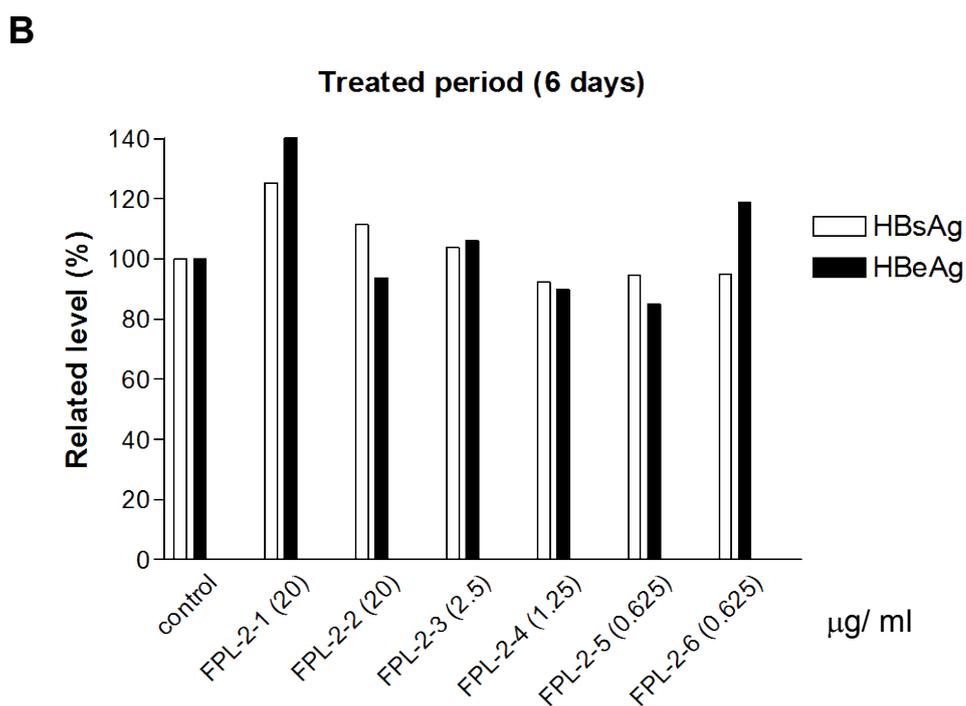
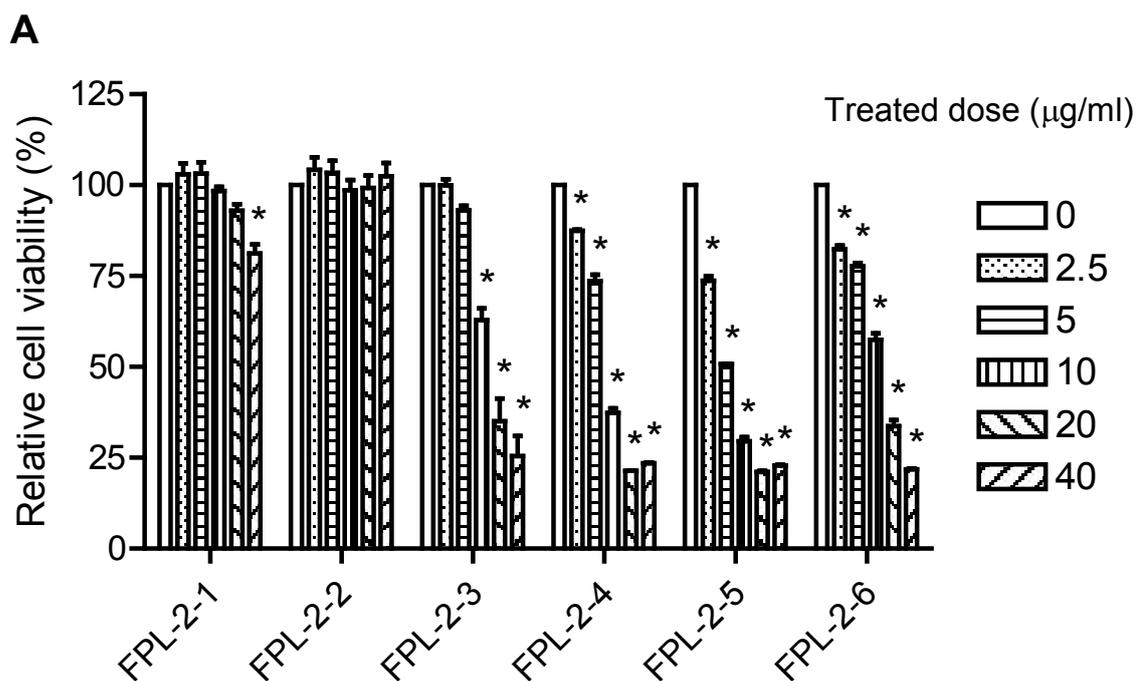
圖十三、(A) 臺灣八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果 (FPL-B-5-2-5~7)  
 (B) 臺灣八角金盤有機萃取物 (FPL-B-5-2-5~7) 對 HepG 2.2.15 肝癌細胞分泌 B 型肝炎病毒 HBsAg 及 HBeAg 之影響，\*  $p < 0.05$  視為有統計上的意義。

**A****B**

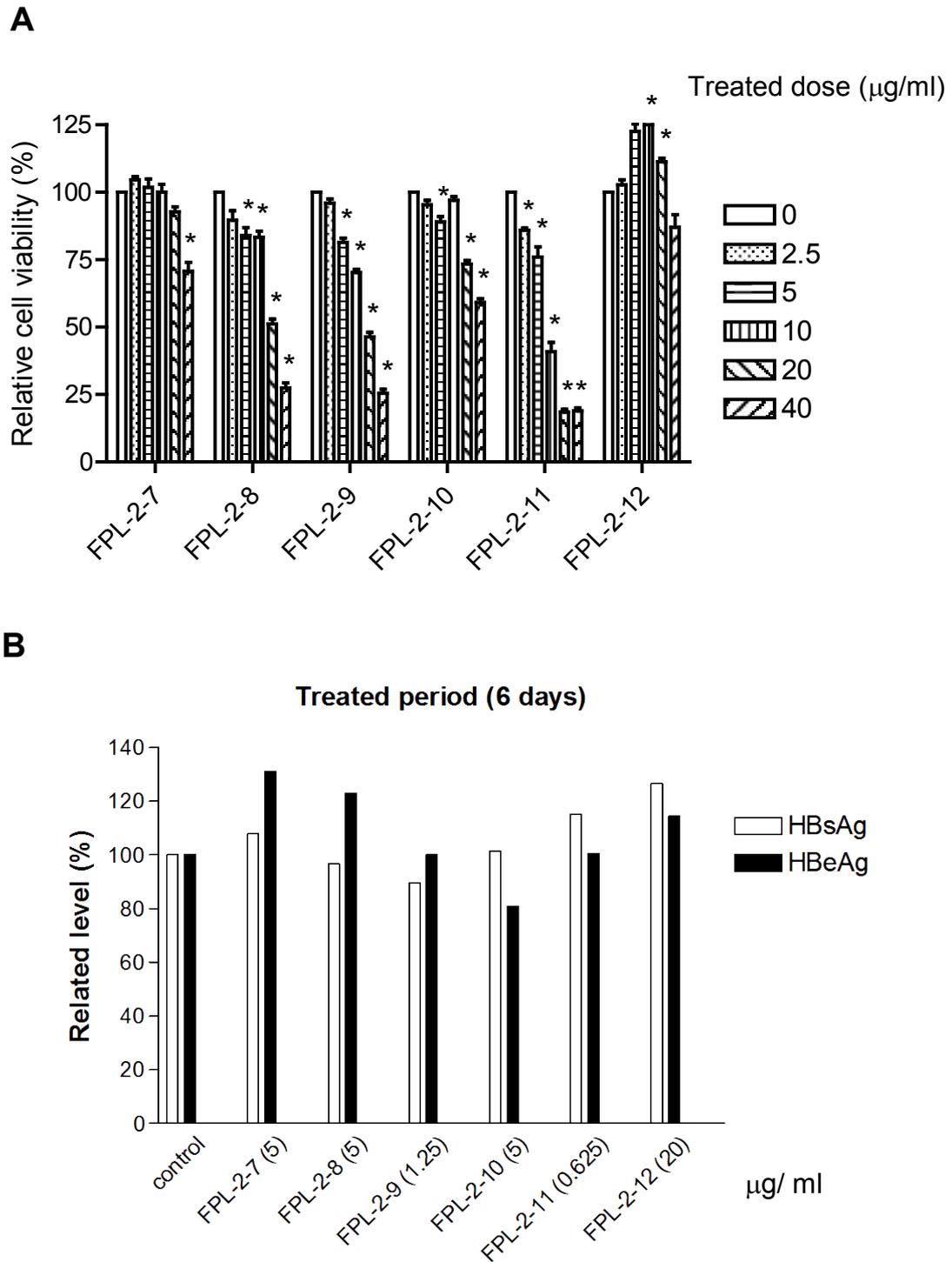
C



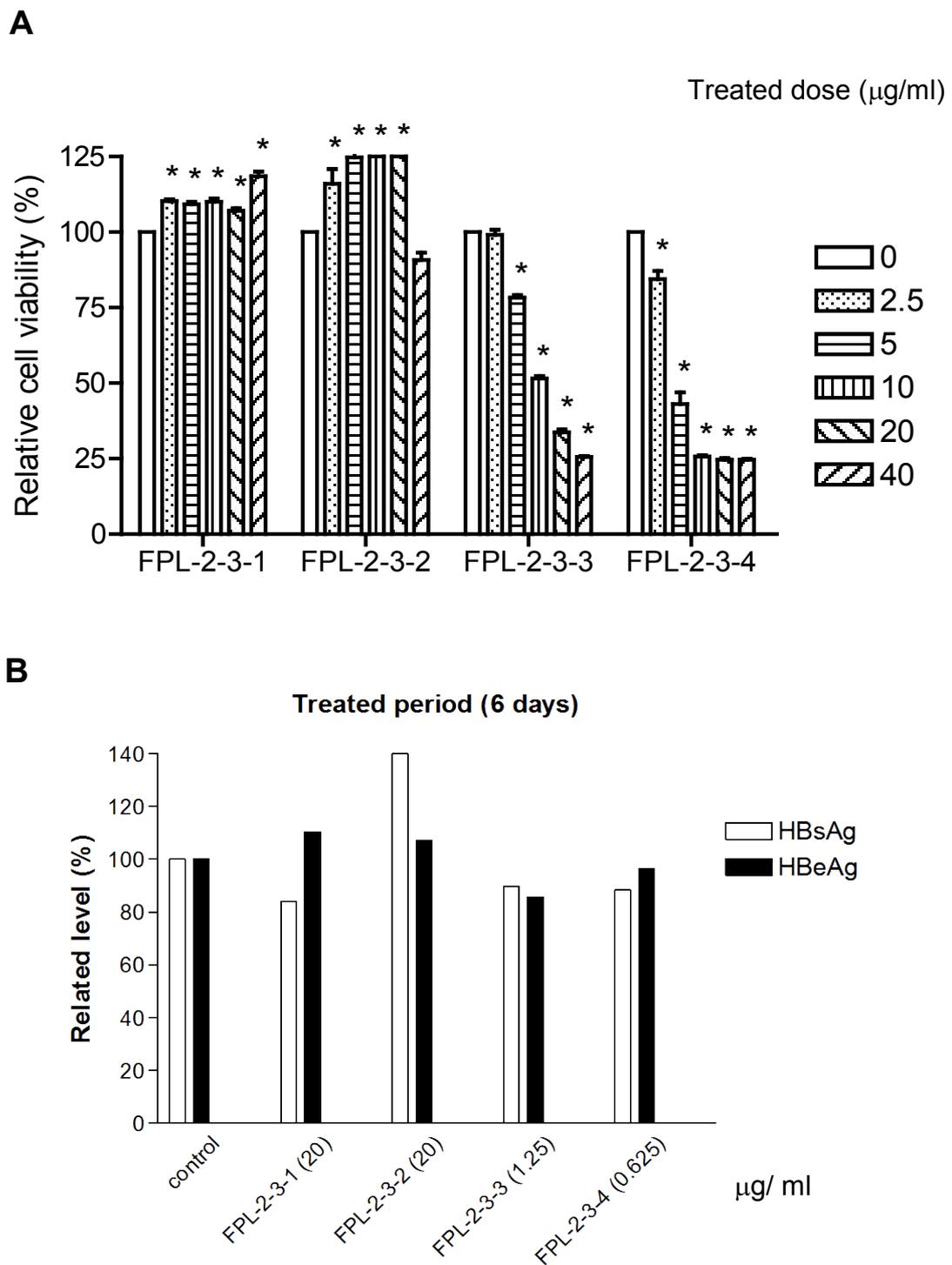
圖十四、(A) 臺灣八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果 (FPL-DM-1~5)  
(B) 臺灣八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果 (FPL-DM-6~10)  
(C) 八角金盤有機萃取物 (FPL-DM-3、6、7、8、10) 對 HepG 2.2.15 肝癌細胞分泌 B 型肝炎病毒 HBsAg 及 HBeAg 之影響，\*  $p < 0.05$  視為有統計上的意義。



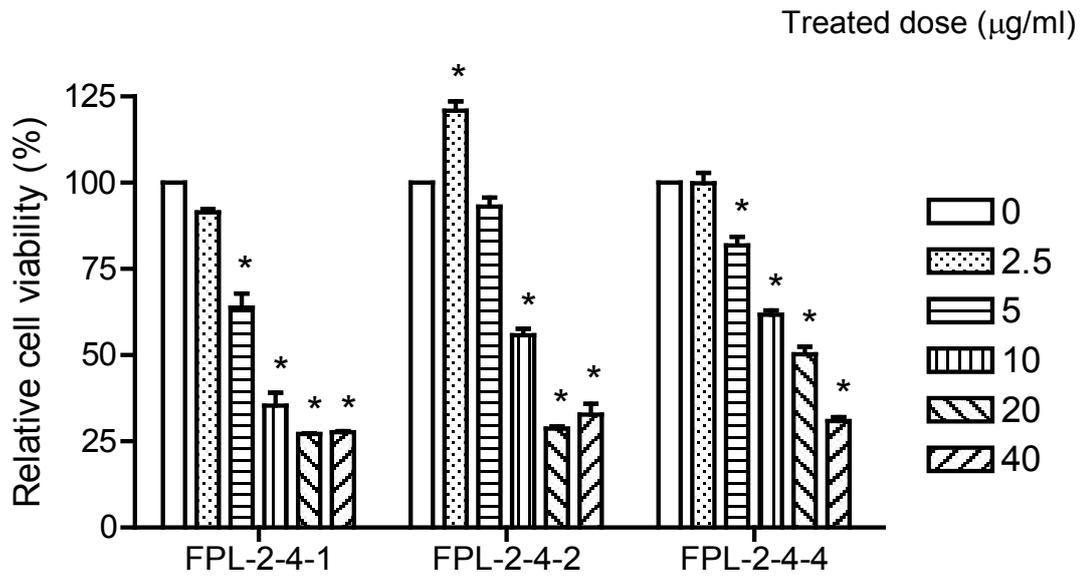
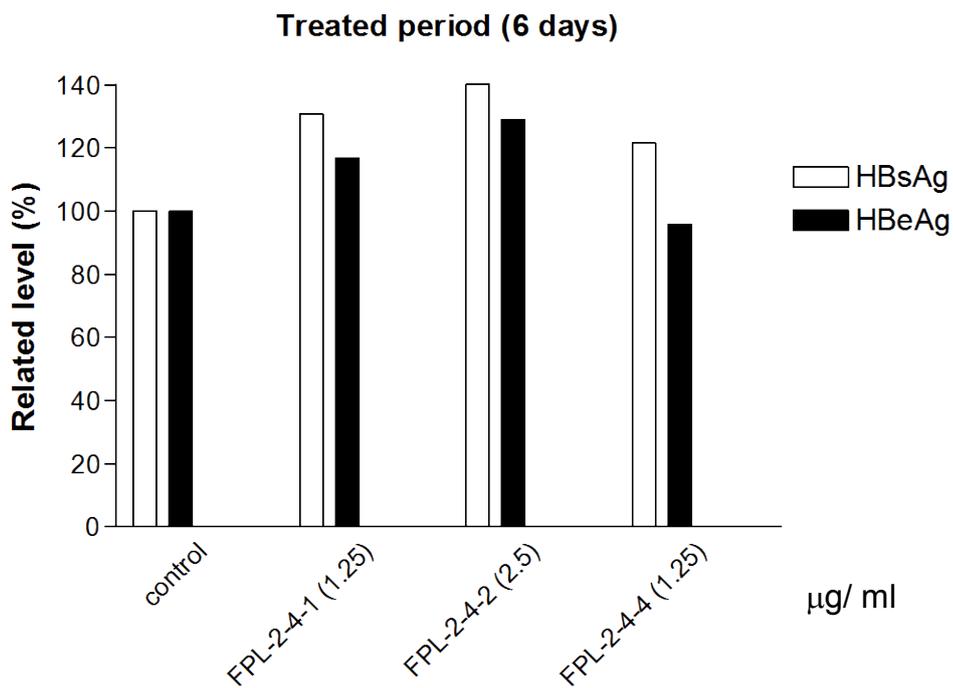
圖十五、(A) 臺灣八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果 (FPL-2-1~6) (B) 臺灣八角金盤有機萃取物 (FPL-2-1~6) 對 HepG 2.2.15 肝癌細胞分泌 B 型肝炎病毒 HBsAg 及 HBeAg 之影響，\*  $p < 0.05$  視為有統計上的意義。



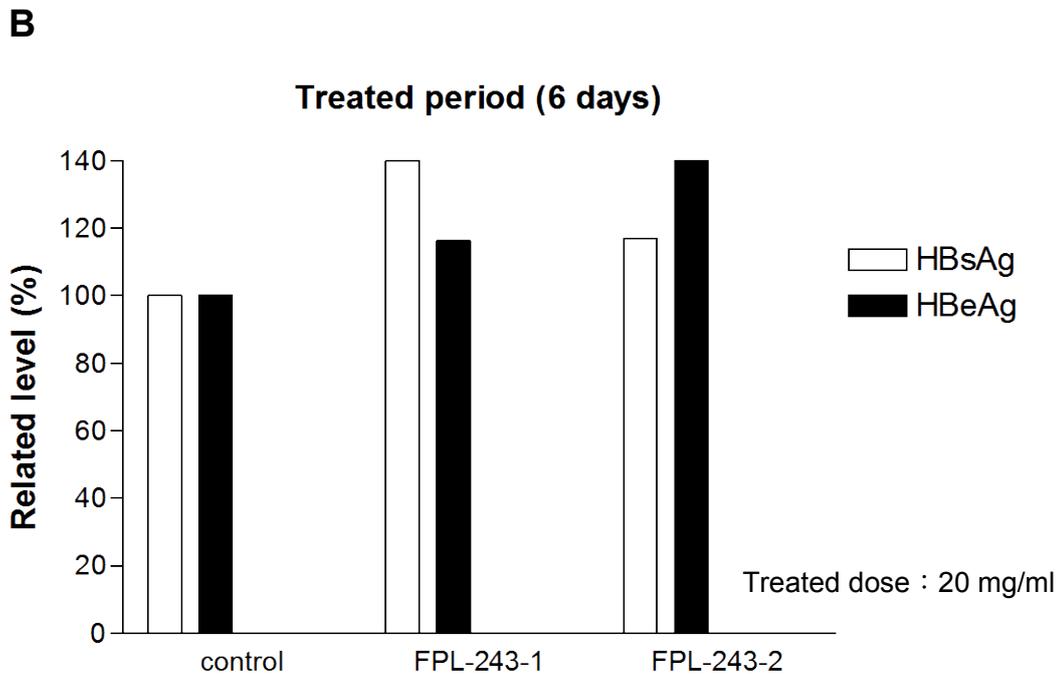
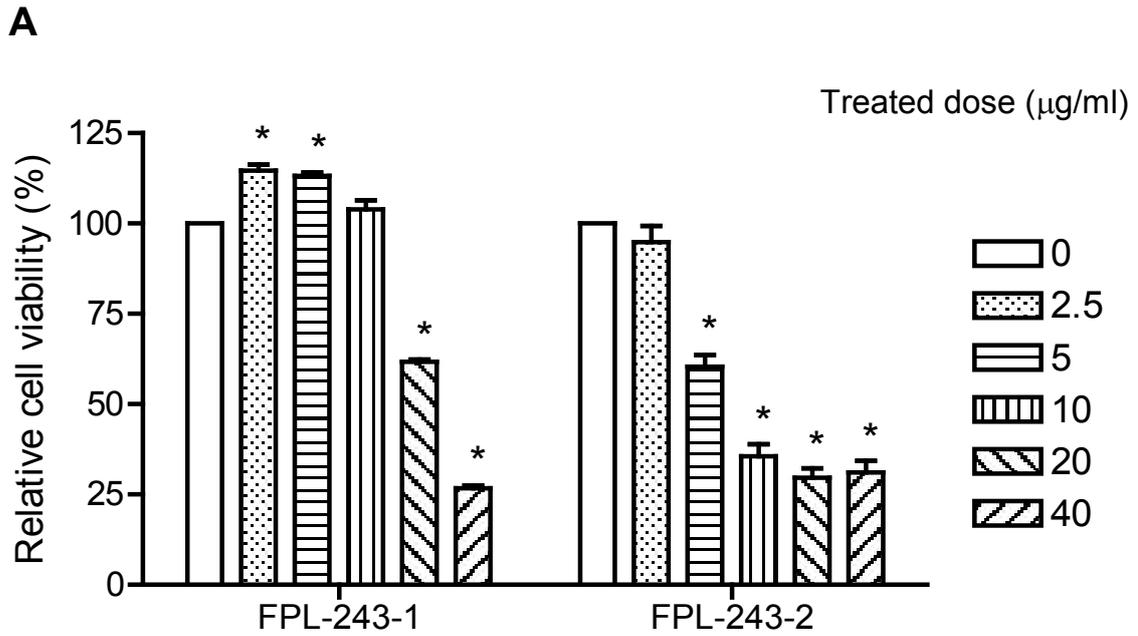
圖十六、(A) 臺灣八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果 (FPL-2-7~12)  
 (B) 臺灣八角金盤有機萃取物 (FPL-2-7~12) 對 HepG 2.2.15 肝癌細胞分泌 B 型肝炎病毒 HBsAg 及 HBeAg 之影響, \*  $p < 0.05$  視為有統計上的意義。



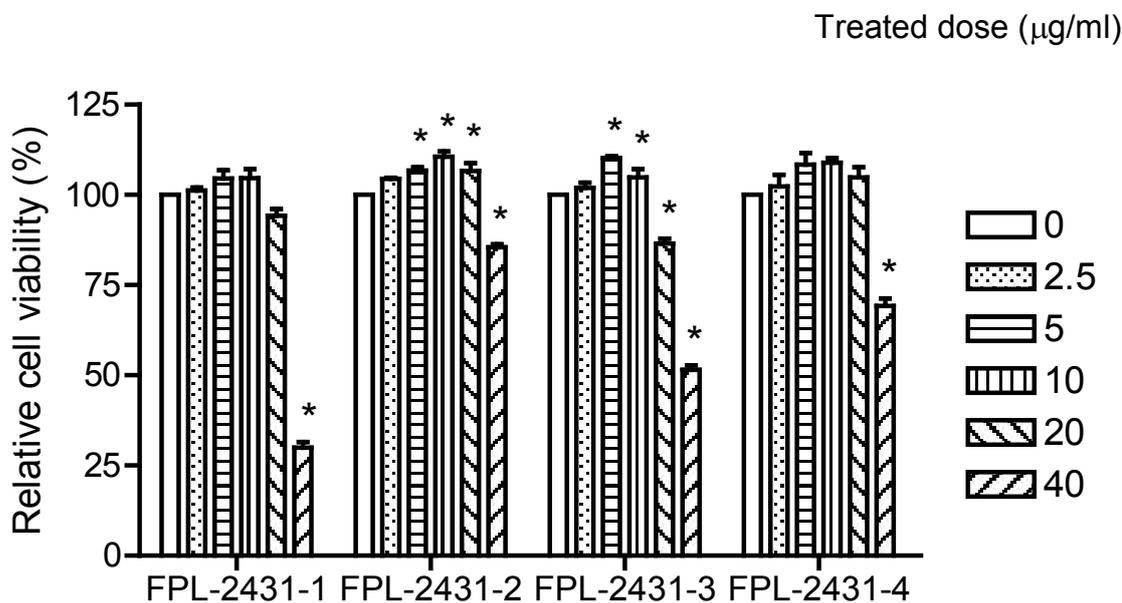
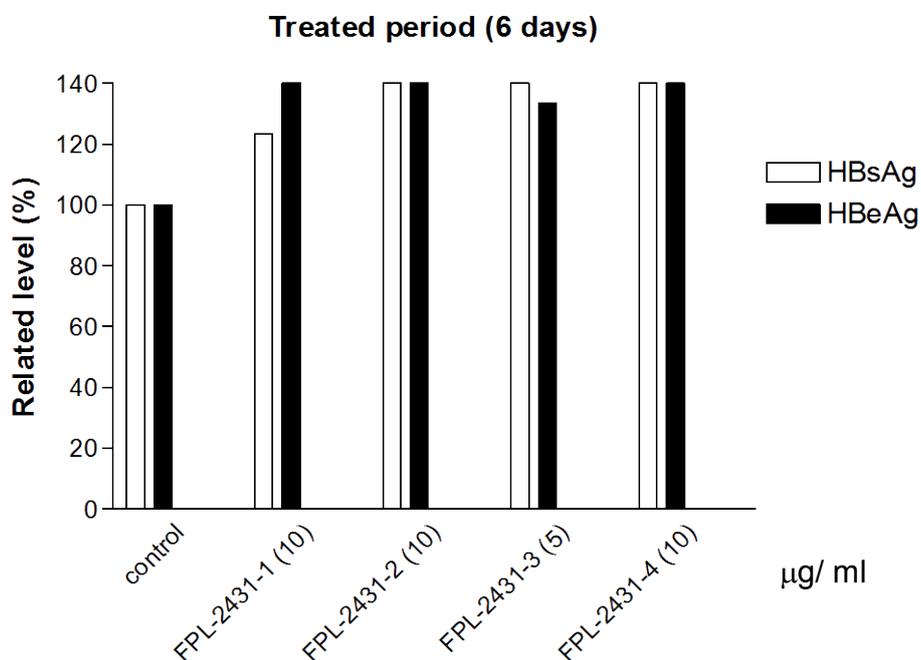
圖十七、(A) 臺灣八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果 (FPL-2-3-1~4)  
 (B) 臺灣八角金盤有機萃取物 (FPL-2-3-1~4) 對 HepG 2.2.15 肝癌細胞分泌 B 型肝炎病毒 HBsAg 及 HBeAg 之影響, \*  $p < 0.05$  視為有統計上的意義。

**A****B**

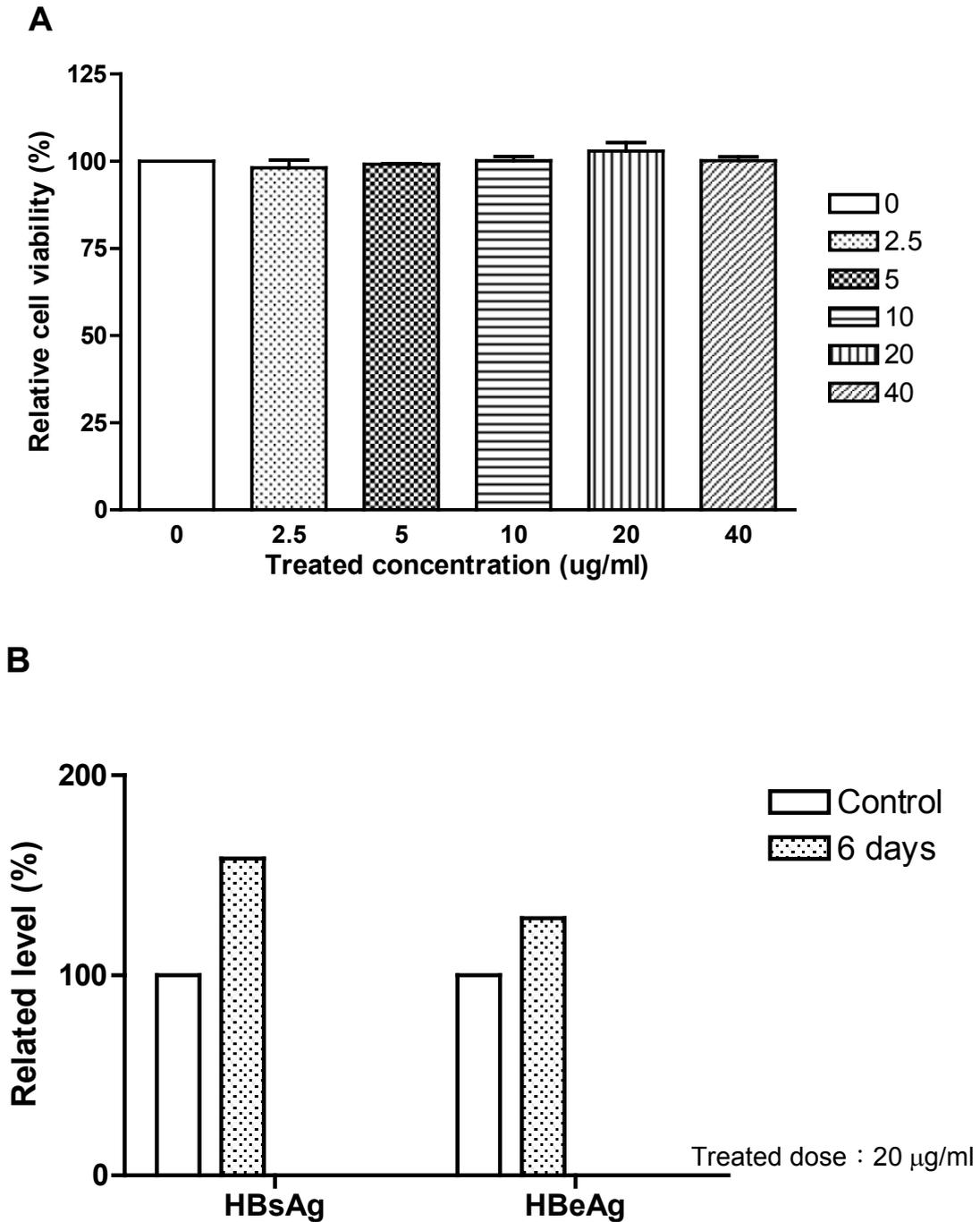
圖十八、(A) 臺灣八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果 (FPL-2-4-1~4)  
 (B) 臺灣八角金盤有機萃取物 (FPL-2-4-1、2、4) 對 HepG 2.2.15 肝癌細胞分泌 B 型肝炎病毒 HBsAg 及 HBeAg 之影響，\*  $p < 0.05$  視為有統計上的意義。



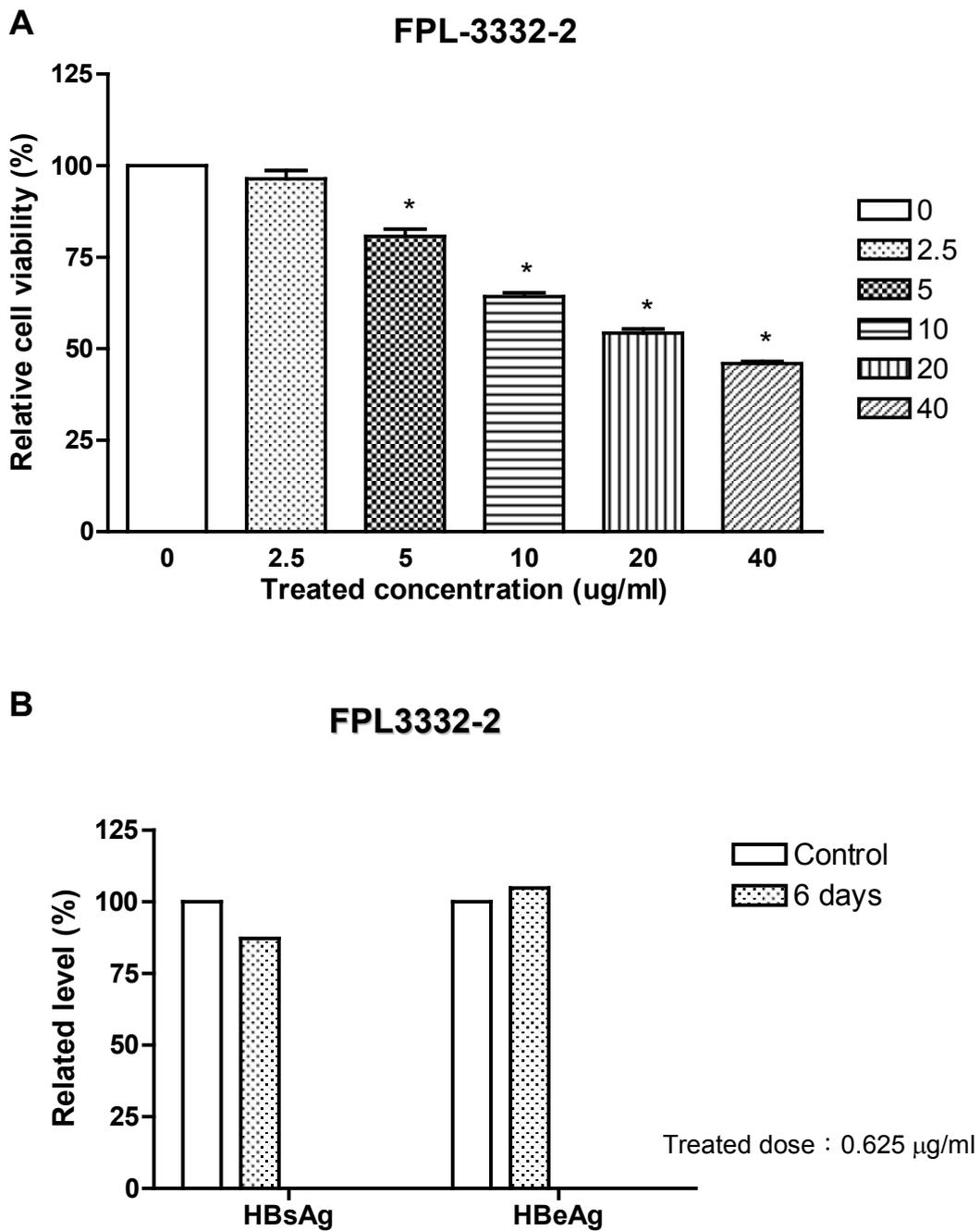
圖十九、(A) 臺灣八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果 (FPL-2-4-1~4)  
 (B) 臺灣八角金盤有機萃取物 (FPL-243-1~2) 對 HepG 2.2.15 肝癌細胞分泌 B 型肝炎病毒 HBsAg 及 HBeAg 之影響，\*  $p < 0.05$  視為有統計上的意義。

**A****B**

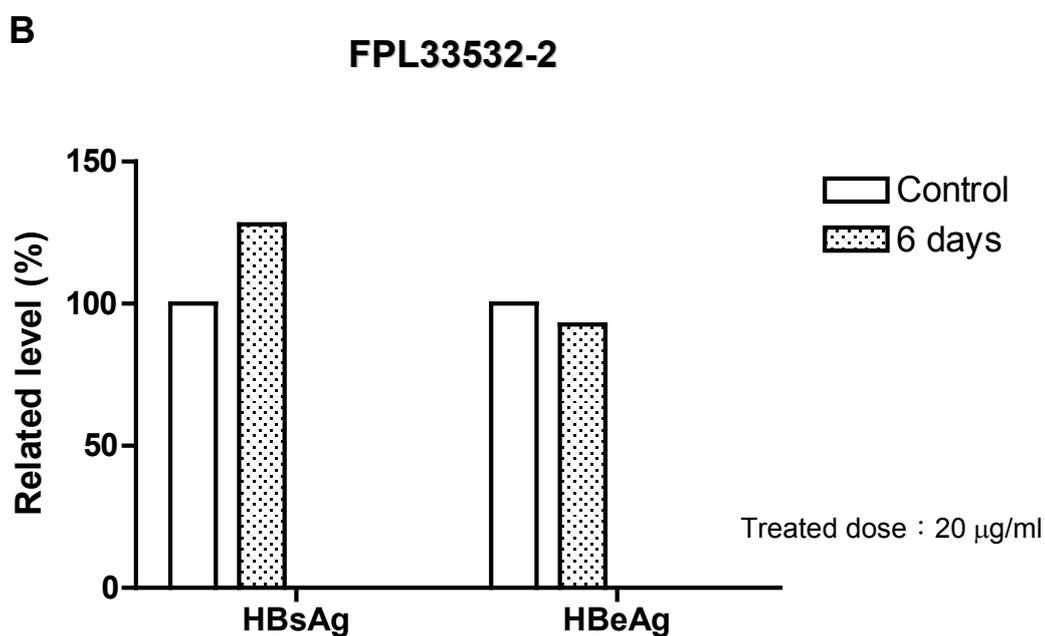
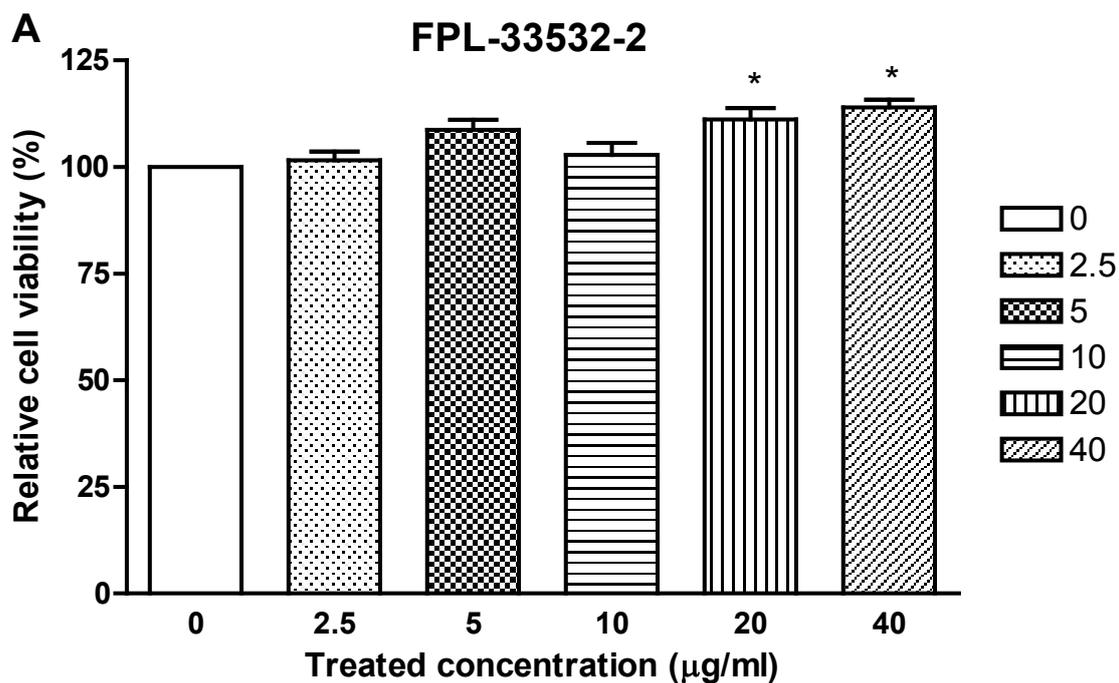
圖二十、(A) 臺灣八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果 (FPL-2431-1~4)  
 (B) 臺灣八角金盤有機萃取物 (FPL-2431~4) 對 HepG 2.2.15 肝癌細胞分泌 B 型肝炎病毒 HBsAg 及 HBeAg 之影響, \*  $p < 0.05$  視為有統計上的意義。



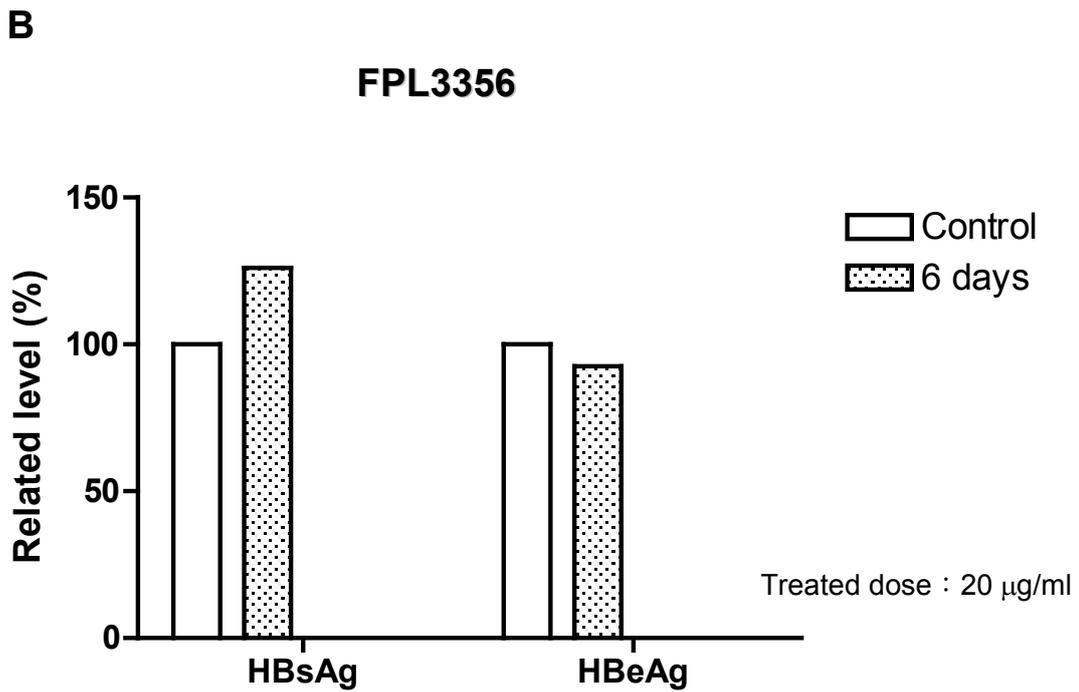
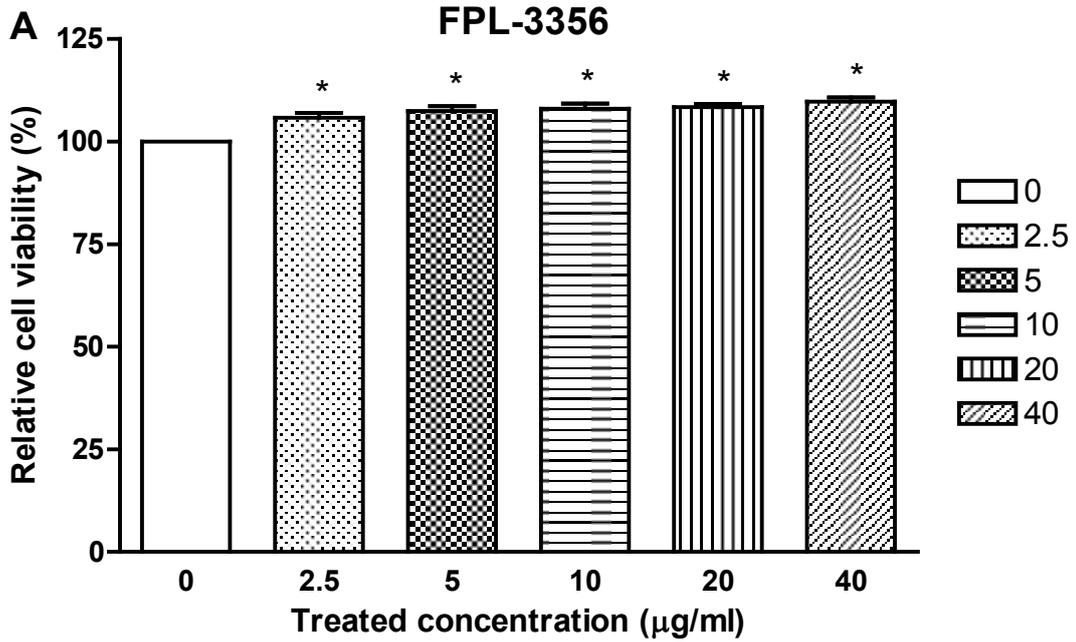
圖二十一、(A) 臺灣八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果 (FPL-24232-2)  
 (B) 臺灣八角金盤有機萃取物 (FPL-24232-2) 對 HepG 2.2.15 肝癌細胞分泌 B 型肝炎病毒 HBsAg 及 HBeAg 之影響



圖二十二、(A) 臺灣八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果 (FPL3332-2)  
 (B) 臺灣八角金盤有機萃取物 (FPL3332-2) 對 HepG 2.2.15 肝癌細胞分泌 B 型肝炎病毒 HBsAg 及 HBeAg 之影響,\*  $p < 0.05$  視為有統計上的意義。

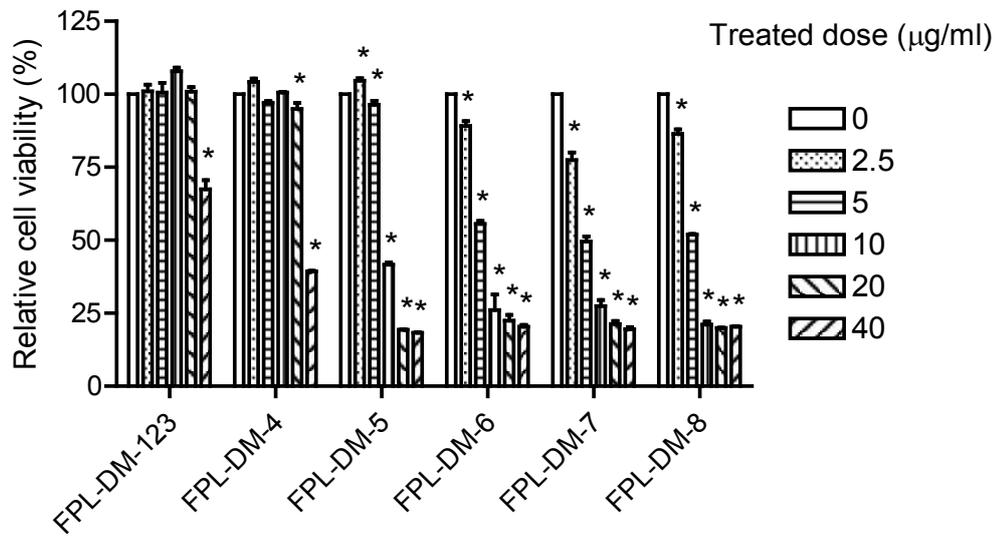
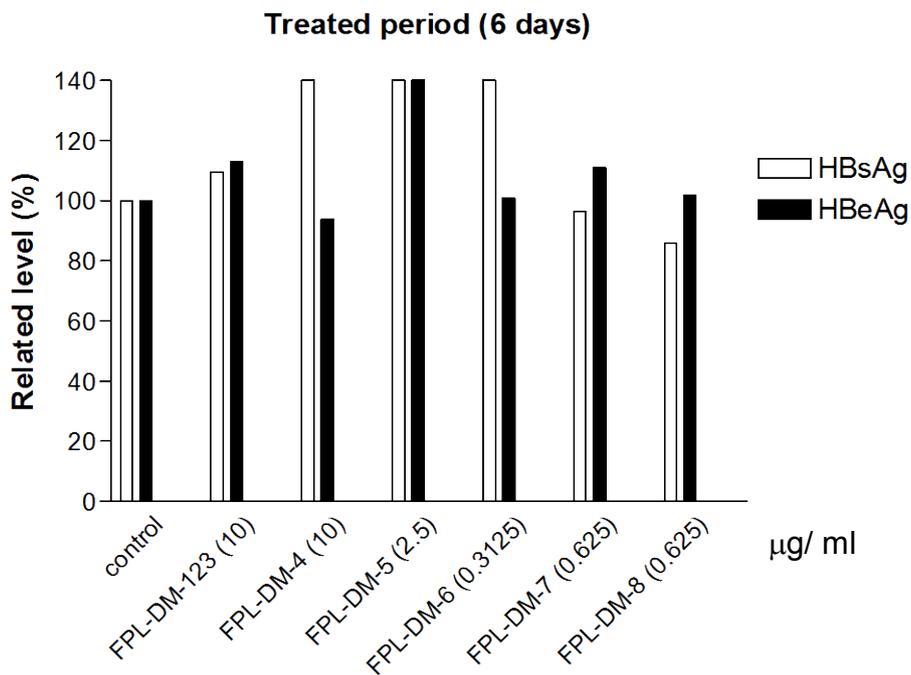


圖二十三、(A) 臺灣八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果 (FPL-33532-2)  
 (B) 臺灣八角金盤有機萃取物 (FPL-33532-2) 對 HepG 2.2.15 肝癌細胞分泌 B 型肝炎病毒 HBsAg 及 HBeAg 之影響，\*  $p < 0.05$  視為有統計上的意義。

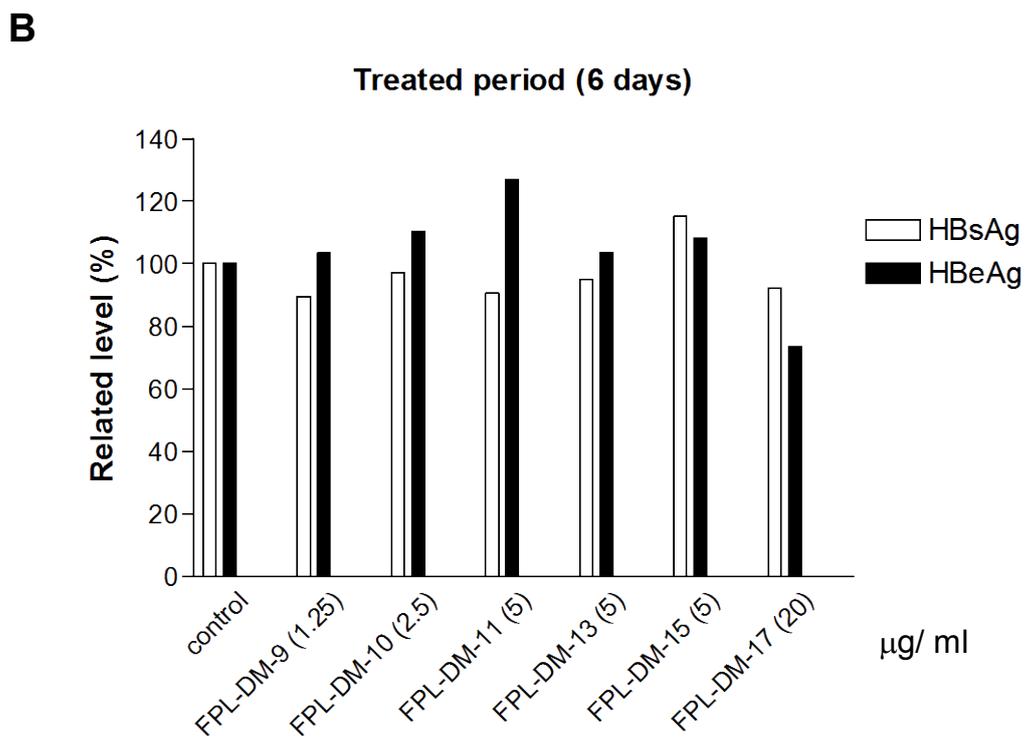
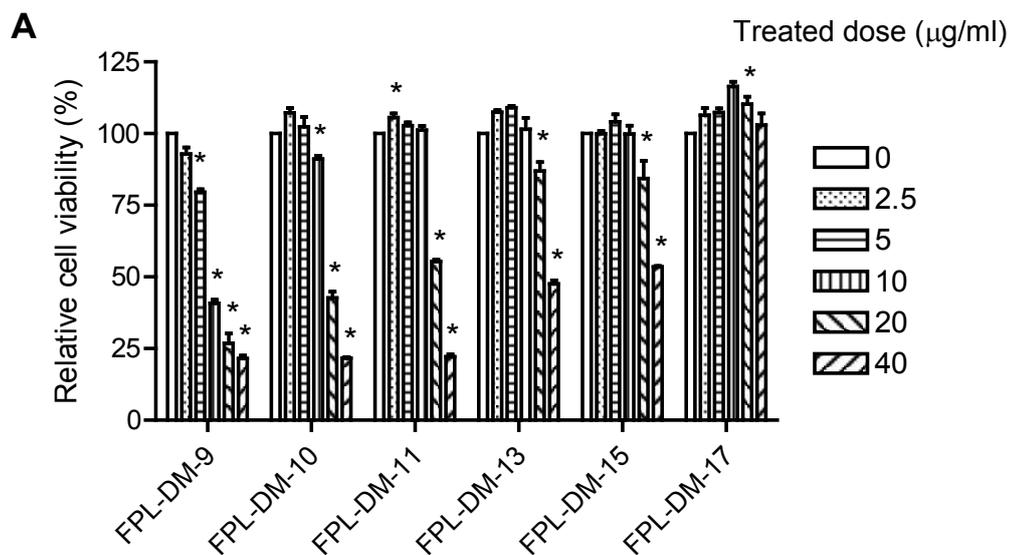


圖二十四、(A)臺灣八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果(FPL3356)(B)臺灣八角金盤有機萃取物(FPL3356)對HepG 2.2.15肝癌細胞分泌B型肝炎病毒HBsAg及HBeAg之影響，\* $p < 0.05$ 視為有統計上的意義。

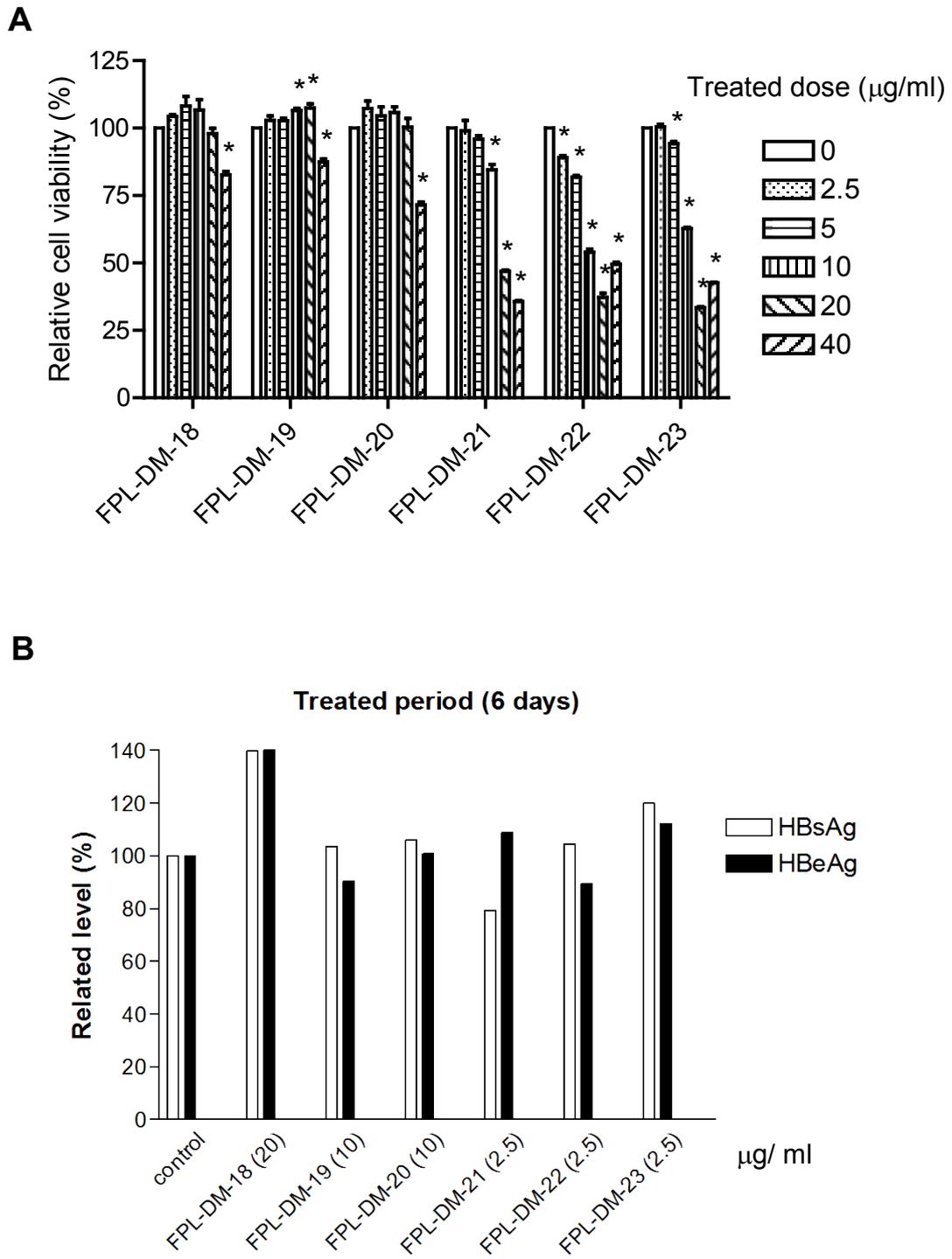


**A****B**

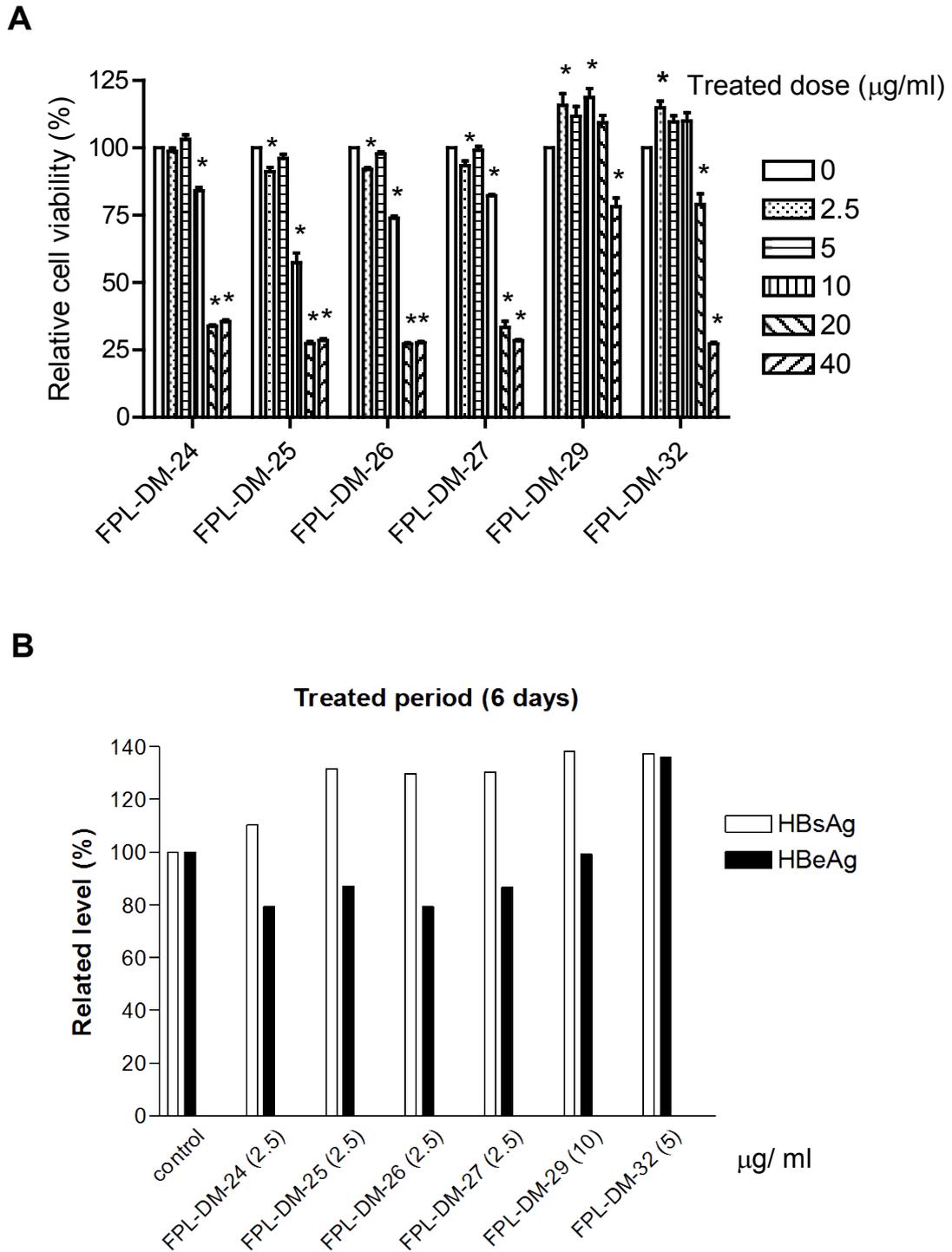
圖二十六、(A) 臺灣八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果 (FPLDM-123、4、5、6、7、8) (B) 臺灣八角金盤有機萃取物 (FPLDM-123、4、5、6、7、8) 對 HepG 2.2.15 肝癌細胞分泌 B 型肝炎病毒 HBsAg 及 HBeAg 之影響，\*  $p < 0.05$  視為有統計上的意義。



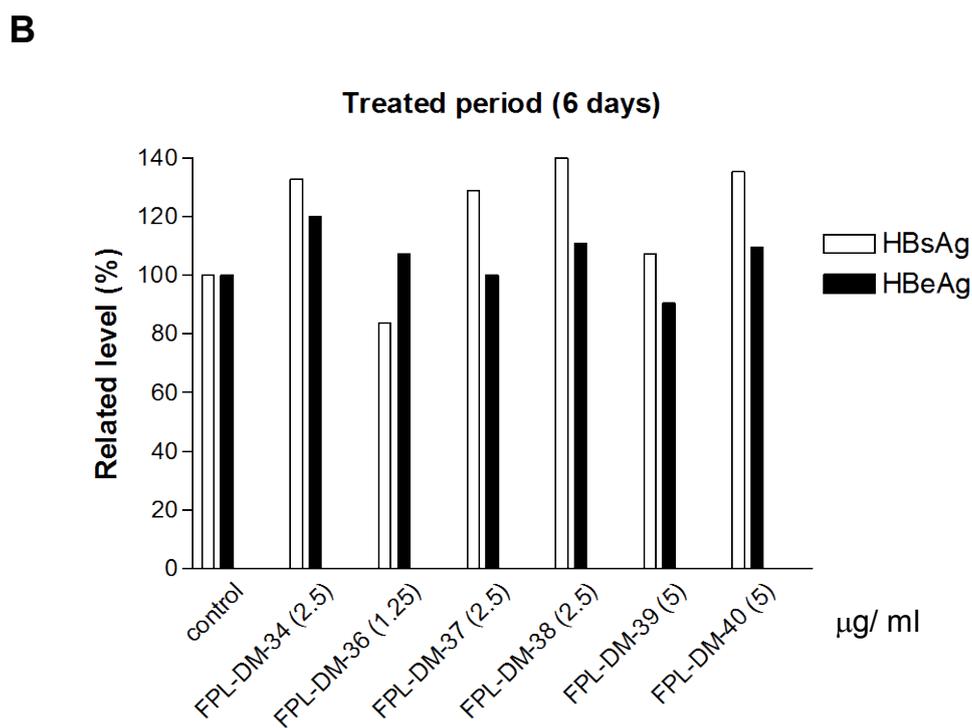
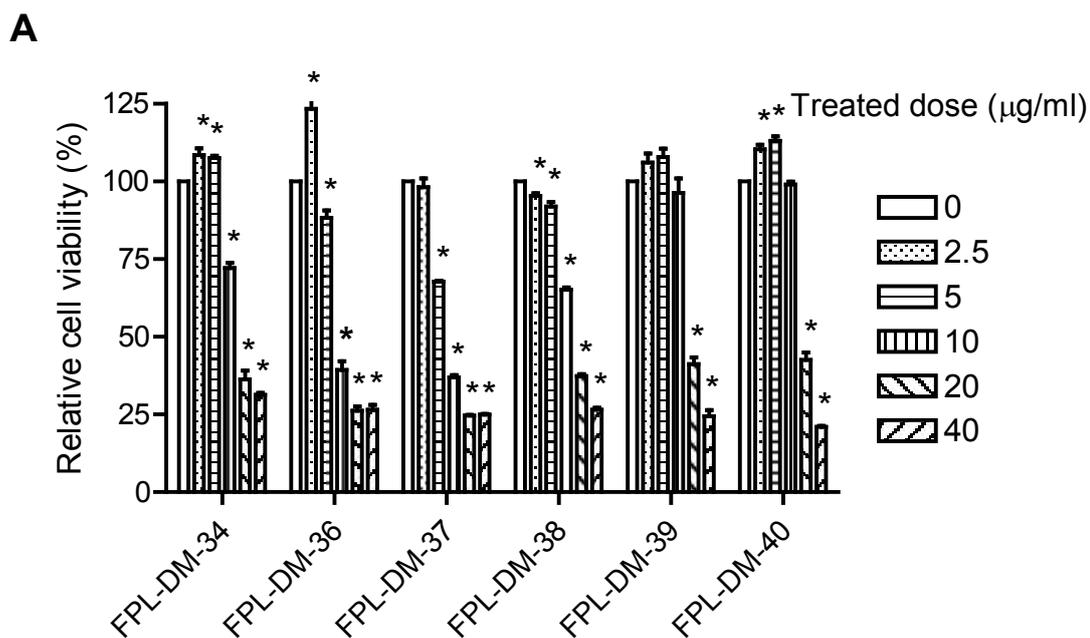
圖二十七、(A) 臺灣八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果 (FPL-DM-9、10、11、13、15、17)(B) 臺灣八角金盤有機萃取物 (FPL-DM-9、10、11、13、15、17) 對 HepG 2.2.15 肝癌細胞分泌 B 型肝炎病毒 HBsAg 及 HBeAg 之影響，\*  $p < 0.05$  視為有統計上的意義。



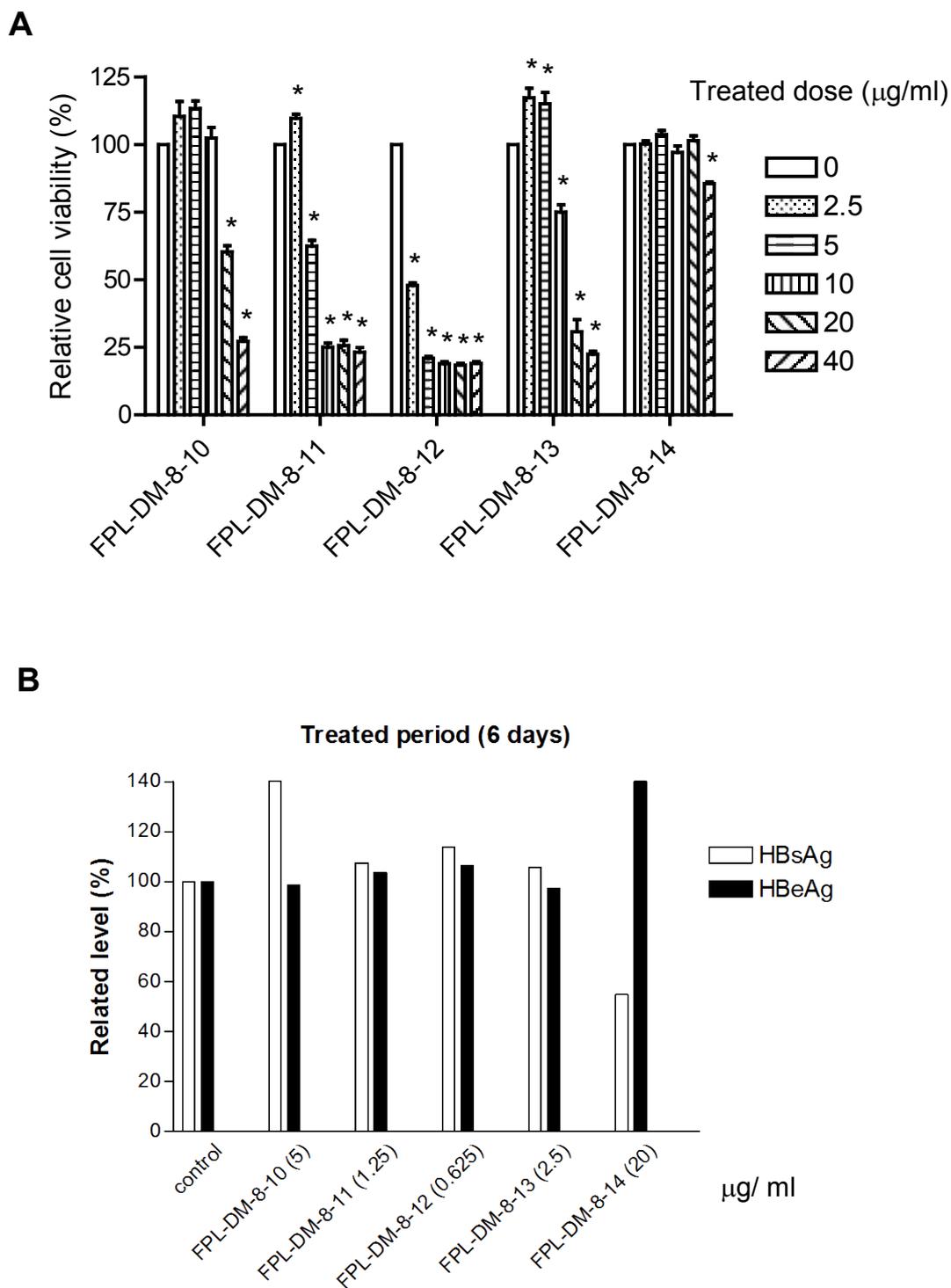
圖二十八、(A) 八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果 (FPL-DM-18、19、20、21、22、23) (B) 八角金盤有機萃取物 (FPL-DM-18、19、20、21、22、23) 對 HepG 2.2.15 肝癌細胞分泌 B 型肝炎病毒 HBsAg 及 HBeAg 之影響，\*  $p < 0.05$  視為有統計上的意義。



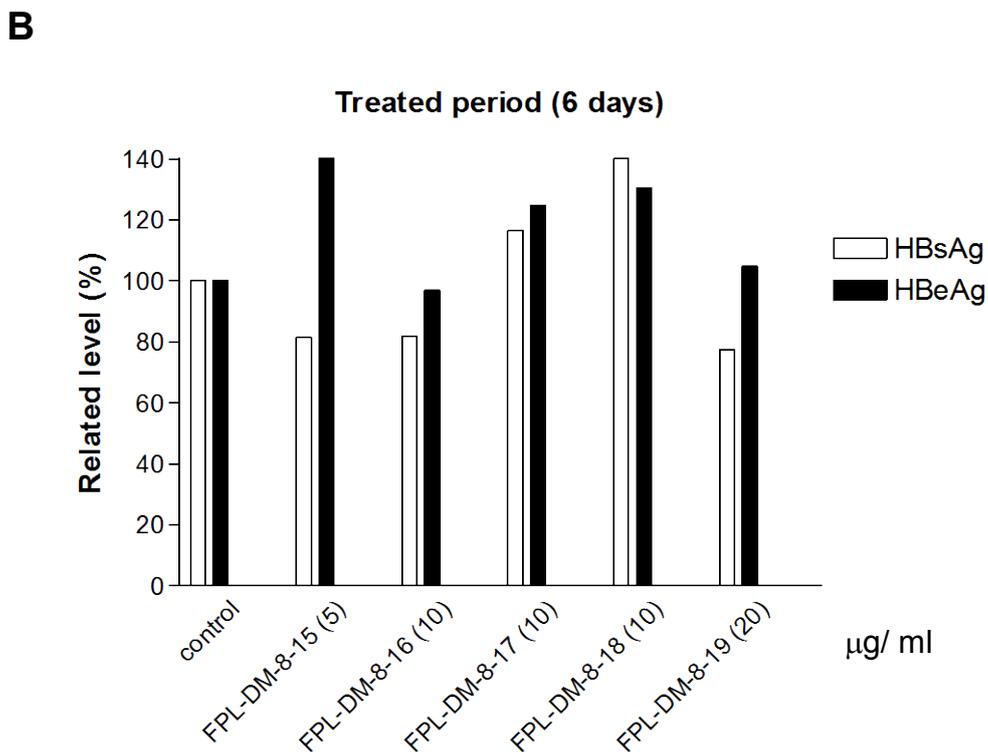
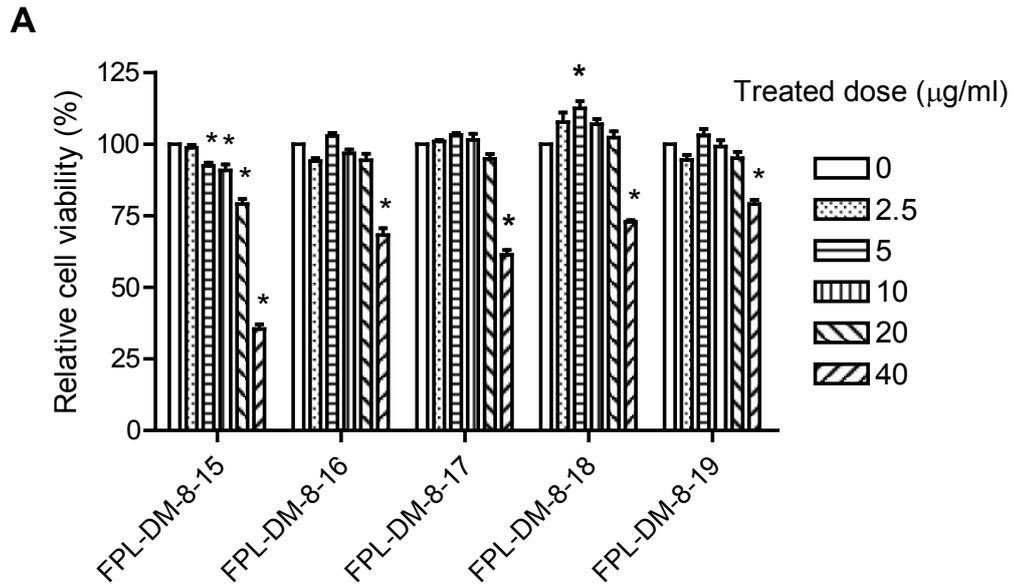
圖二十九、(A) 臺灣八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果 (FPL-DM-24、25、26、27、29、32) (B) 臺灣八角金盤有機萃取物 (FPL-DM-24、25、26、27、29、32) 對 HepG 2.2.15 肝癌細胞分泌 B 型肝炎病毒 HBsAg 及 HBeAg 之影響，\*  $p < 0.05$  視為有統計上的意義。



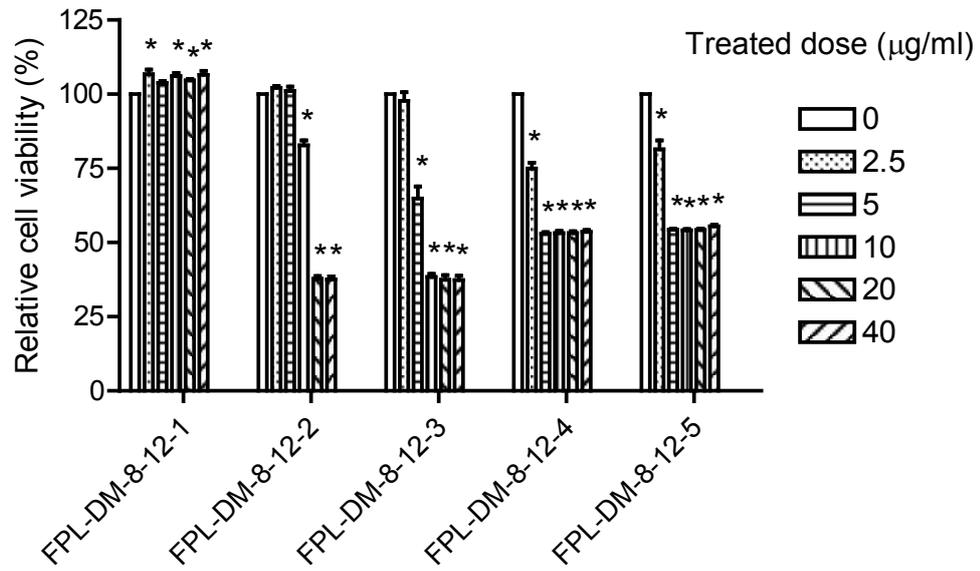
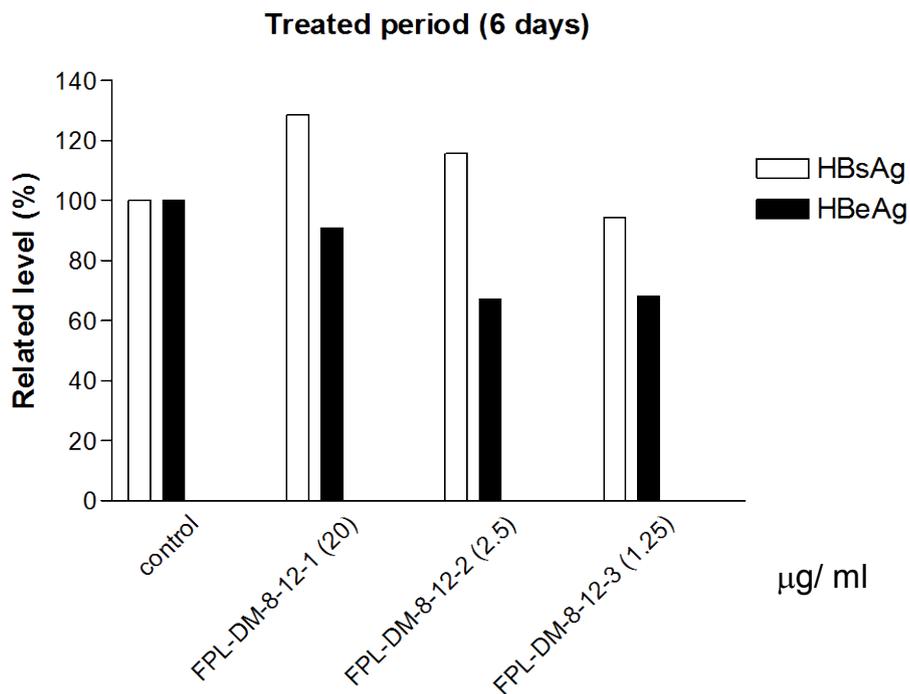
圖三十、(A) 臺灣八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果 (FPL-DM-34、36、37、38、39、40)(B) 臺灣八角金盤有機萃取物 ( FPL-DM-34、36、37、38、39、40 ) 對 HepG 2.2.15 肝癌細胞分泌 B 型肝炎病毒 HBsAg 及 HBeAg 之影響，\*  $p < 0.05$  視為有統計上的意義。



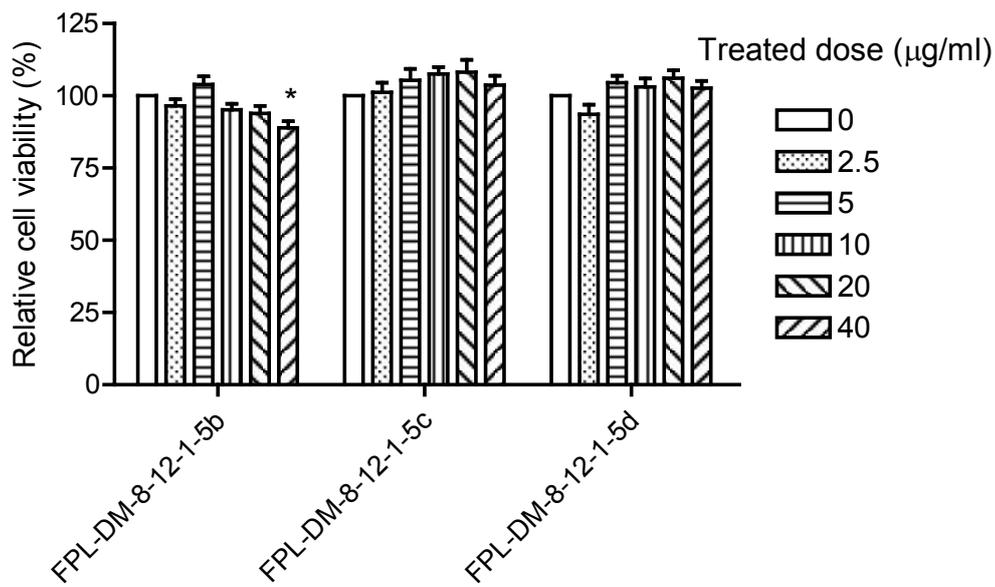
圖三十一、(A) 臺灣八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果 (FPL-DM-8-10、11、12、13、14) (B) 臺灣八角金盤有機萃取物 ( FPL-DM-8-10、11、12、13、14 ) 對 HepG 2.2.15 肝癌細胞分泌 B 型肝炎病毒 HBsAg 及 HBeAg 之影響，\*  $p < 0.05$  視為有統計上的意義。



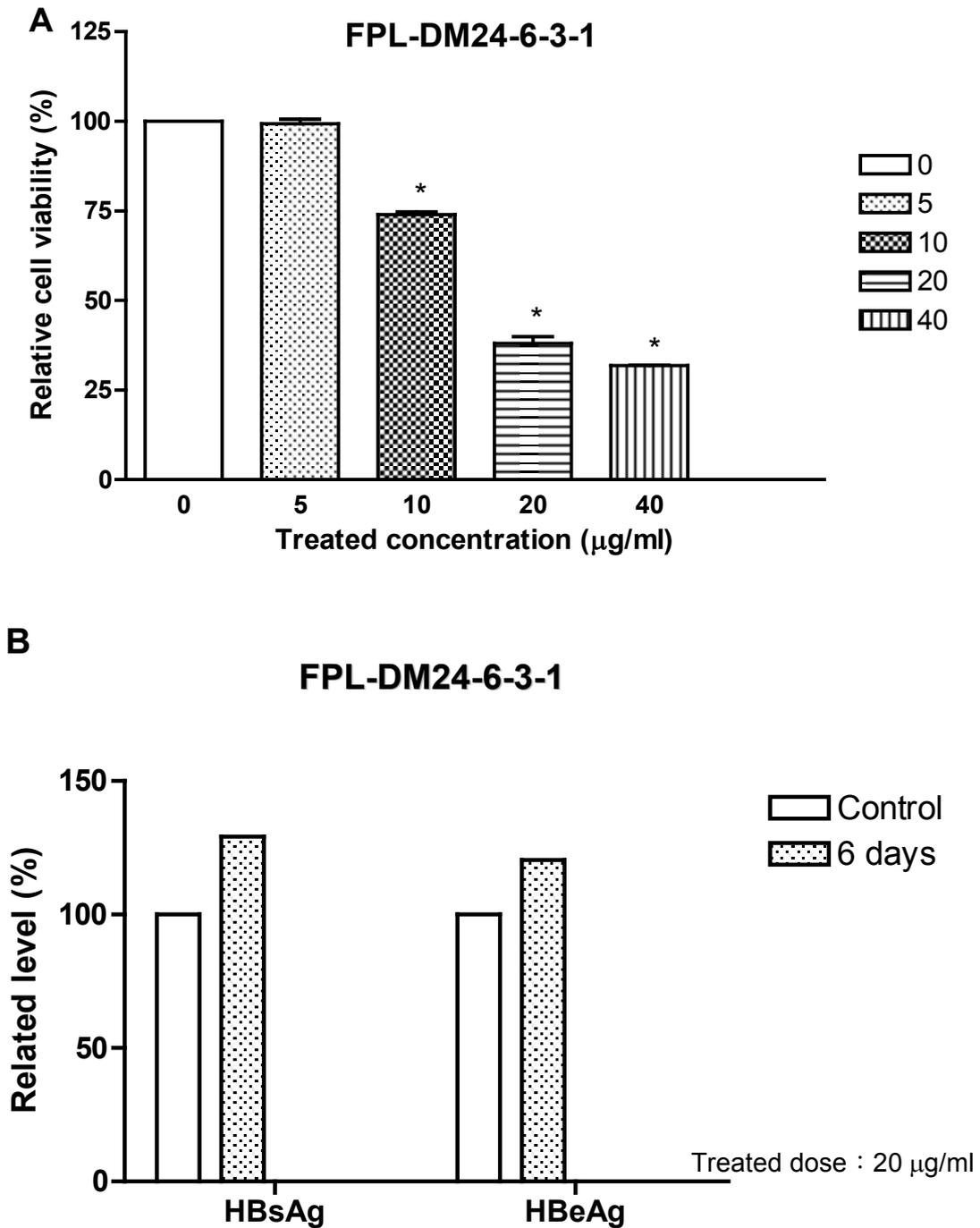
圖三十二、(A) 臺灣八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果 (FPL-DM-8-15、16、17、18、19) (B) 臺灣八角金盤有機萃取物 (FPL-DM-8-15、16、17、18、19) 對 HepG 2.2.15 肝癌細胞分泌 B 型肝炎病毒 HBsAg 及 HBeAg 之影響, \*  $p < 0.05$  視為有統計上的意義。

**A****B**

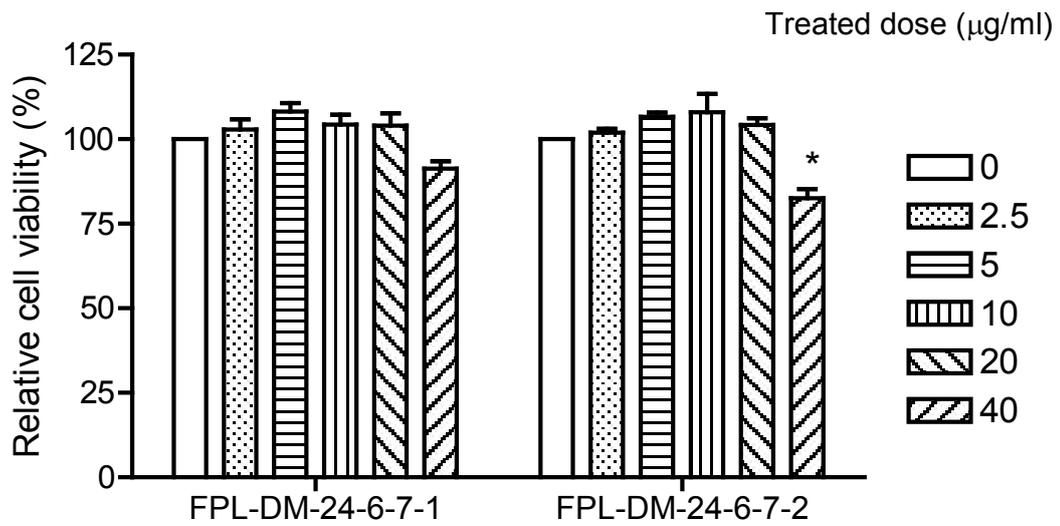
圖三十三、(A) 臺灣八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果 (FPL-DM-8-12-1~5) (B) 臺灣八角金盤有機萃取物 (FPL-DM-8-12-1~3) 對 HepG 2.2.15 肝癌細胞分泌 B 型肝炎病毒 HBsAg 及 HBeAg 之影響, \*  $p < 0.05$  視為有統計上的意義。



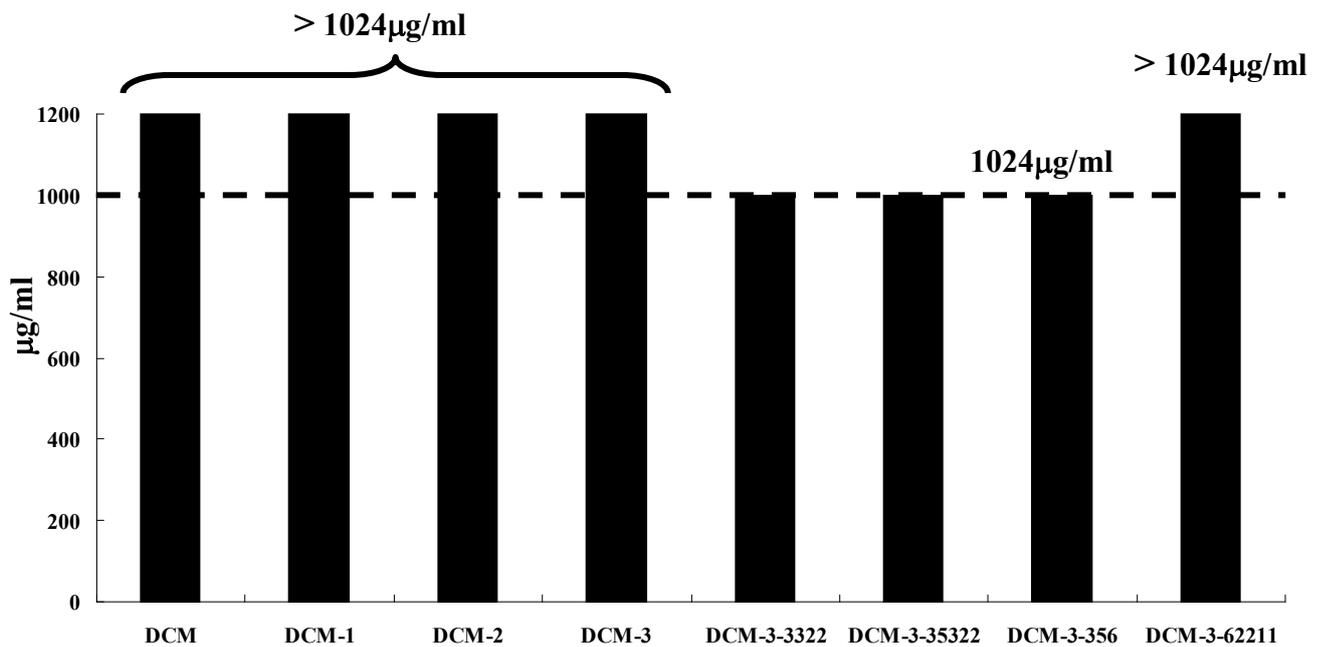
圖三十四、臺灣八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果 (FPL-DM8-12-1-5b、5c、5d)，\*  $p < 0.05$  視為有統計上的意義。



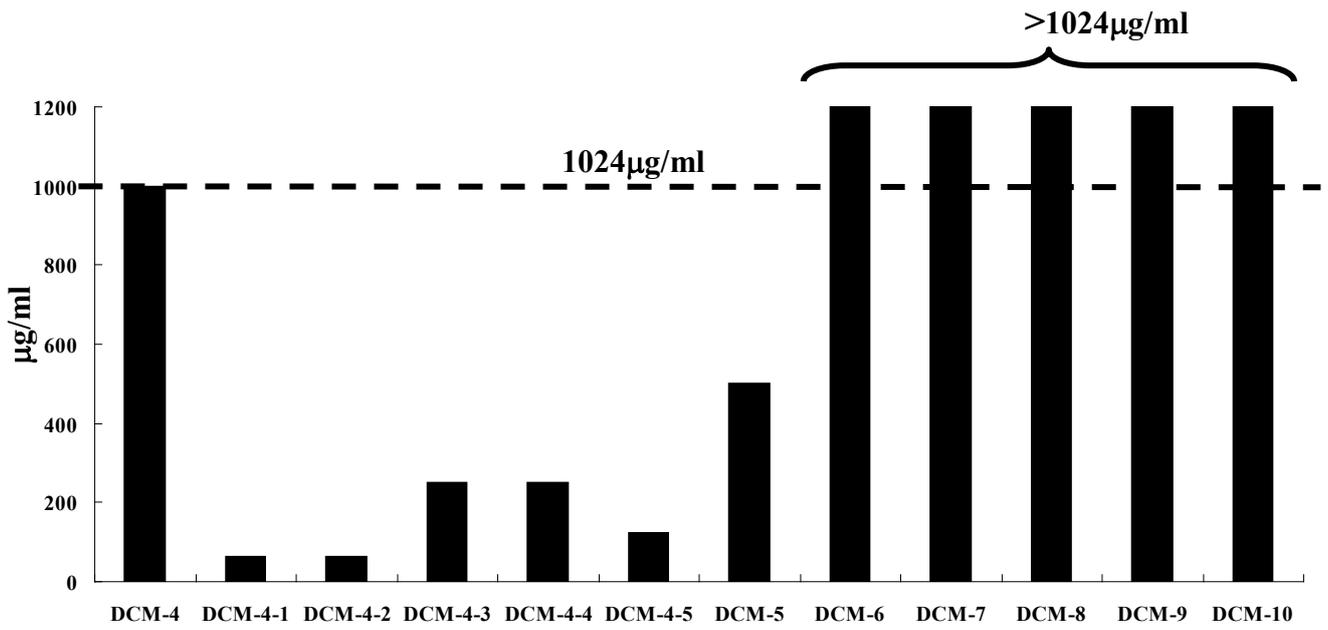
圖三十五、(A) 臺灣八角金盤有機萃取物細胞毒性測試結果 (FPL-DM24-6-3-1) (B) 臺灣八角金盤有機萃取物 (FPL-DM246-3-1) 對 HepG 2.2.15 肝癌細胞分泌 B 型肝炎病毒 HBsAg 及 HBeAg 之影響,\*  $p < 0.05$  視為有統計上的意義。



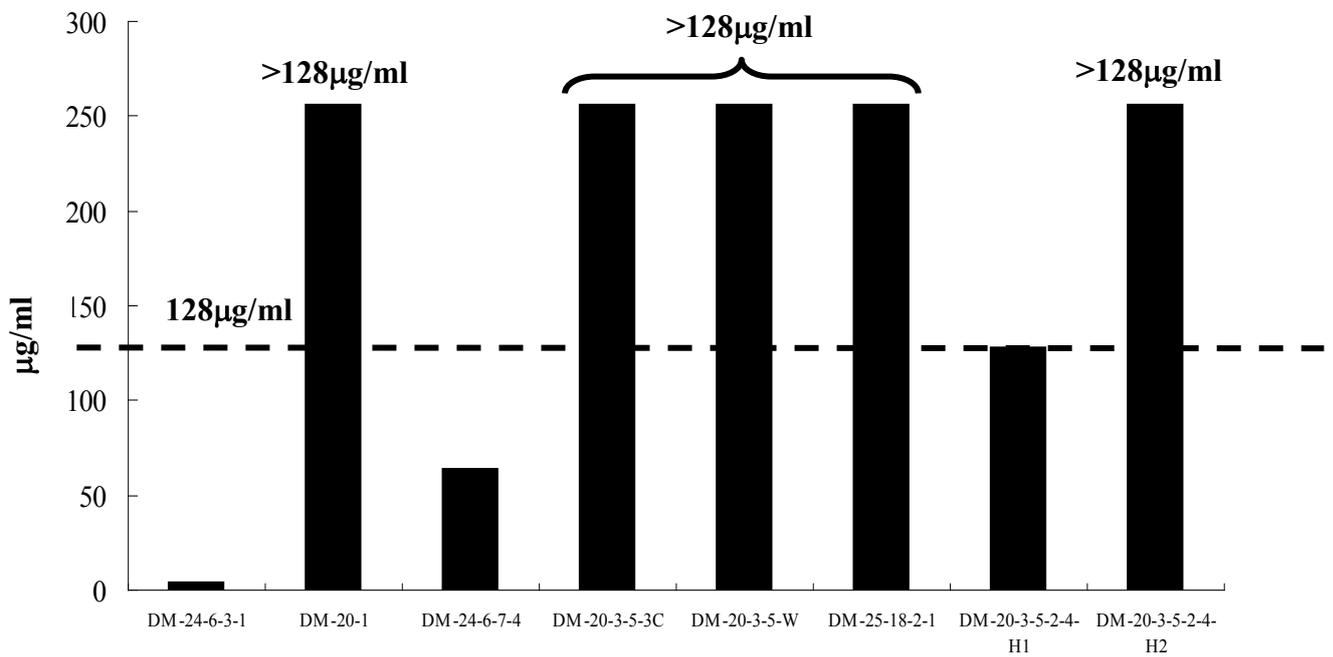
圖三十六、臺灣八角金盤有機萃取物對肝癌細胞 (HepG2 2.2.15) 毒性測試結果 (FPL-DM24-6-7-1~2), \*  $p < 0.05$  視為有統計上的意義。



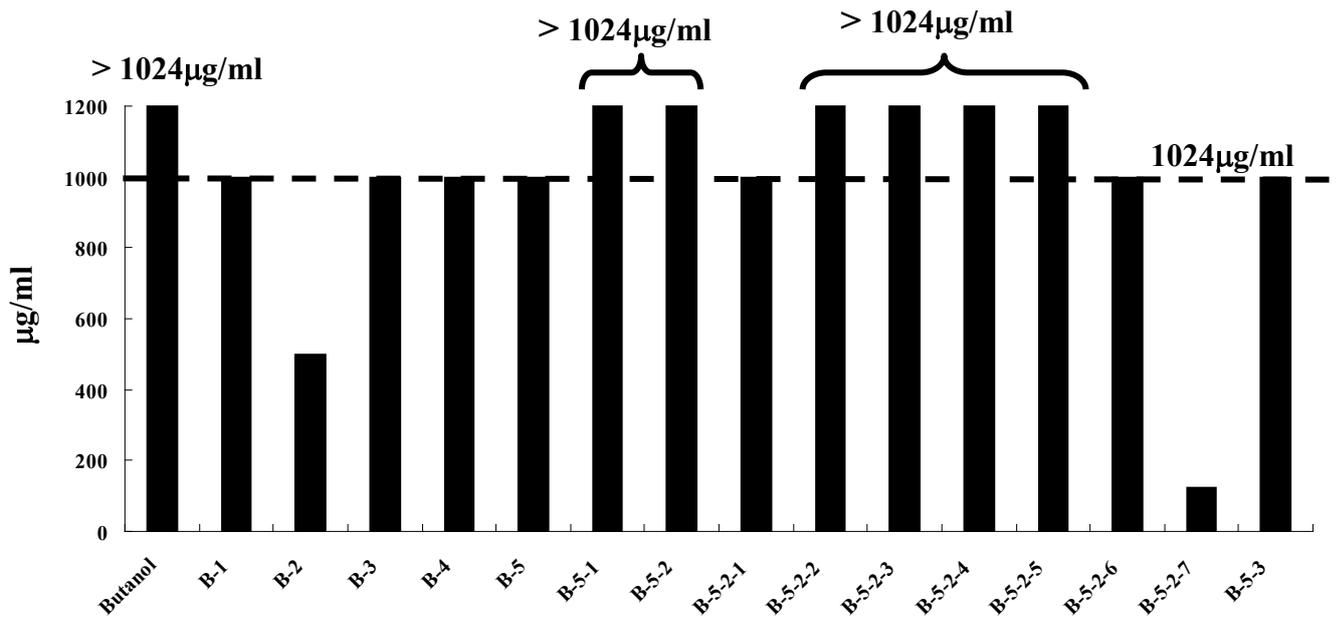
圖三十七、臺灣八角金盤二氯甲烷萃取物對幽門螺旋桿菌 (*H. pylori*) 之殺菌效果



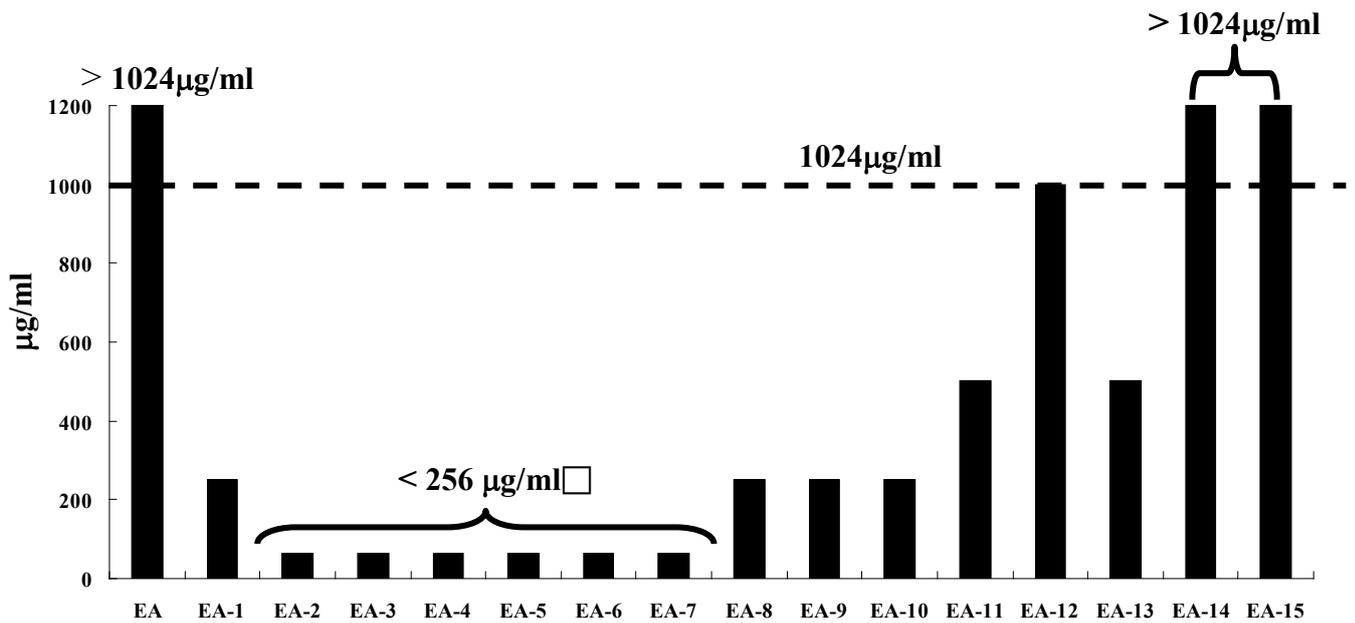
圖三十八、臺灣八角金盤二氯甲烷萃取物對幽門螺旋桿菌 (*H. pylori*) 之殺菌效果



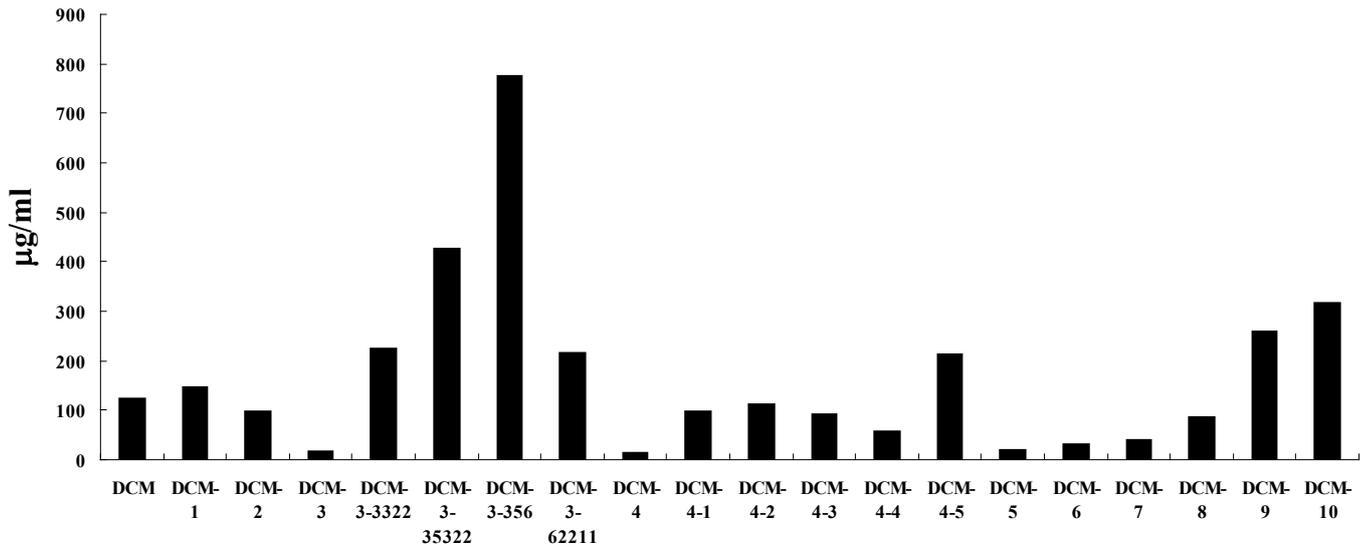
圖三十九、臺灣八角金盤二氯甲烷萃取物對幽門螺旋桿菌 (*H. pylori*) 之殺菌效果



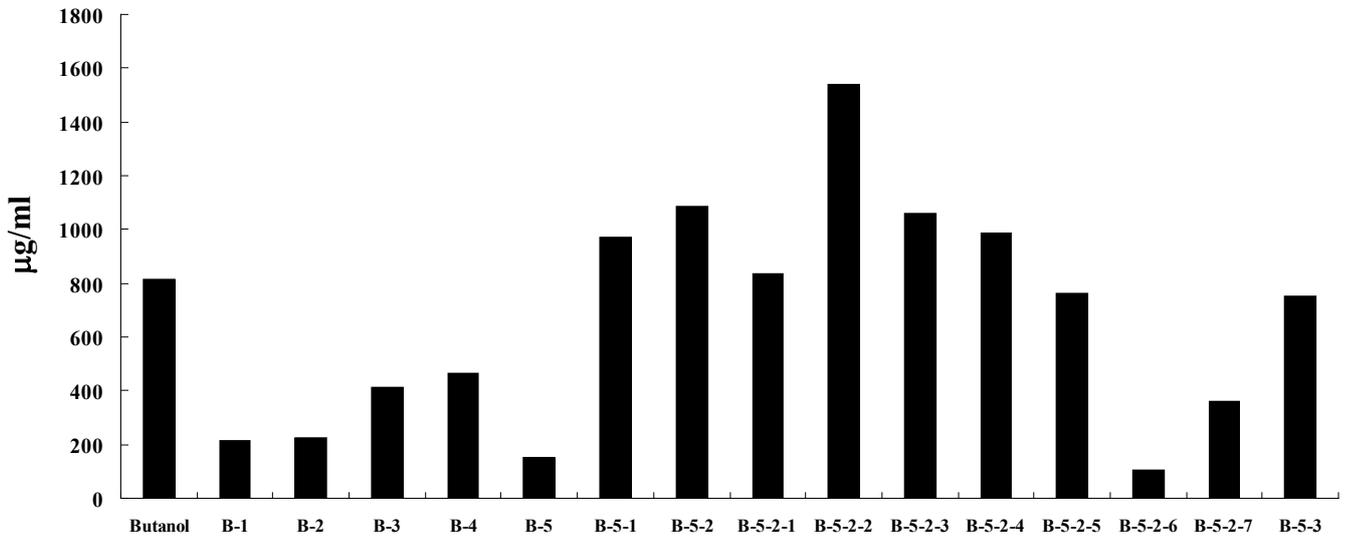
圖四十、臺灣八角金盤 Butanol 萃取物對幽門螺旋桿菌 (*H. pylori*) 之殺菌效果



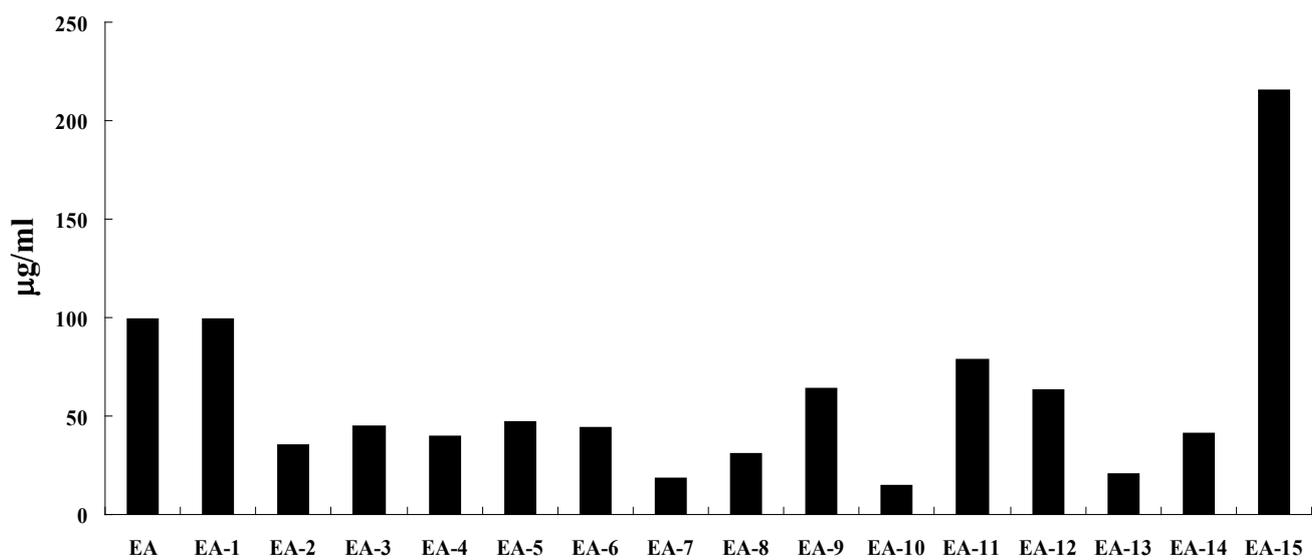
圖四十一、臺灣八角金盤 EA 萃取物對幽門螺旋桿菌 (*H. pylori*) 之殺菌效果



圖四十二、臺灣八角金盤二氯甲烷萃取物對 AGS 之 IC<sub>50</sub>(Half Maximal Inhibitory Concentration)



圖四十三、臺灣八角金盤 Butanol 萃取物對 AGS 之 IC<sub>50</sub>(Half Maximal Inhibitory Concentration)



圖四十四、臺灣八角金盤 EA 萃取物對 AGS 之 IC<sub>50</sub> (Half Maximal Inhibitory Concentration)

表一、從臺灣八角金盤所分離之分液層萃取物活性分析總表

分液層萃取物 編號	肝癌細胞毒殺 IC <sub>50</sub> (µg/ml)	處理劑量 (µg/ml)	處理 時間	B 型肝炎病毒 HBsAg 抗原相 對表現量(%)	B 型肝炎病毒 HBeAg 抗原 相對表現量(%)
FPL-DM-123	---	10	6 days	109.62	121.1
FPL-DM-4	36.52	10	6 days	157.98	113.1
FPL-DM-5	9.36	2.5	6 days	154.96	140.02
FPL-DM-6	6.69	0.3125	6 days	145.59	100.85
FPL-DM-7	6.06	0.625	6 days	137.36(96.48)	78.27(111.15)
FPL-DM-8	6.21	0.625	6 days	123.85(85.71)	80.12(101.73)
FPL-DM-9	8.81	1.25	6 days	84.20(89.53)	61.14(103.37)
FPL-DM-10	18.49	2.5	6 days	147.41(97.02)	62.40(110.34)
FPL-DM-11	27.18	5	6 days	130.46(90.67)	72.07(126.86)
FPL-DM-13	39.06	5	6 days	95.13	103.63
FPL-DM-15	---	5	6 days	115.22	108.2
FPL-DM-17	---	20	6 days	92.13	73.46
FPL-DM-18	---	20	6 days	139.81	144.54
FPL-DM-19	---	10	6 days	103.51	90.47
FPL-DM-20	---	10	6 days	105.9	100.7
FPL-DM-21	19.29	2.5	6 days	79.29	108.85
FPL-DM-22	14.42	2.5	6 days	104.51	89.42
FPL-DM-23	15.12	2.5	6 days	119.92	112.2
FPL-DM-24	16.73	2.5	6 days	110.19	79.31
FPL-DM-25	14.01	2.5	6 days	131.68	86.9
FPL-DM-26	15.13	2.5	6 days	129.74	79.18
FPL-DM-27	16.51	2.5	6 days	130.33	86.55
FPL-DM-29	---	10	6 days	138.25	99.2
FPL-DM-32	31.41	5	6 days	137.25	136.04
FPL-DM-34	16.47	2.5	6 days	132.87	119.99
FPL-DM-36	8.89	1.25	6 days	83.59	107.36
FPL-DM-37	8.07	2.5	6 days	128.86	100.17
FPL-DM-38	15.89	2.5	6 days	155.81	110.76
FPL-DM-39	18.58	5	6 days	107.23	90.58
FPL-DM-40	18.88	5	6 days	135.17	109.42
FPL-DM-8-10	28.93	5	6 days	163.35	98.6
FPL-DM-8-11	7.3	1.25	6 days	107.4	103.74
FPL-DM-8-12	2.778	0.625	6 days	113.85	106.41
FPL-DM-8-13	16.01	2.5	6 days	105.75	97.28

分液層萃取物 編號	肝癌細胞毒殺 IC <sub>50</sub> (µg/ml)	處理劑量 (µg / ml)	處理 時間	B 型肝炎病毒 HBsAg 抗原相 對表現量(%)	B 型肝炎病毒 HBeAg 抗原 相對表現量(%)
FPL-DM-8-14	---	20	6 days	54.91	141.65
FPL-DM-8-15	33.08	5	6 days	81.33	140.84
FPL-DM-8-16	---	10	6 days	81.66	96.92
FPL-DM-8-17	---	10	6 days	116.59	124.6
FPL-DM-8-18	---	10	6 days	87.99	130.29
FPL-DM-8-19	---	20	6 days	77.46	104.82
FPL-24232-2	---	20	6 days	158.4	128.52
FPL-DM-24-6-3-1	16.75	2.5	6 days	129.23	120.45
FPL-DM-8-12-1	---	20	6 days	128.45	90.86
FPL-DM-8-12-2	17.27	2.5	6 days	115.56	66.98
FPL-DM-8-12-3	8.22	1.25	6 days	94.09	68.13

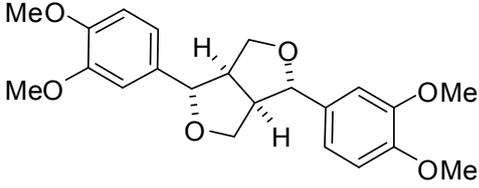
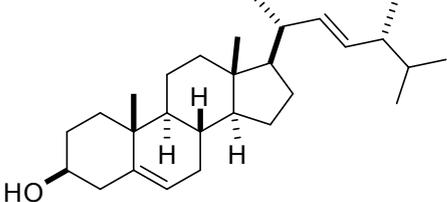
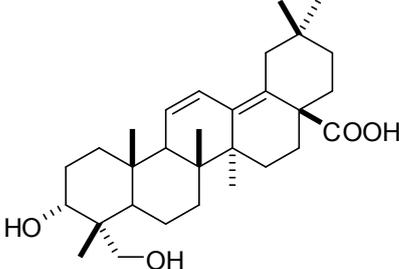
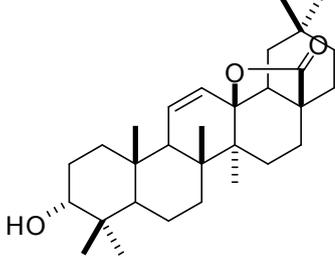
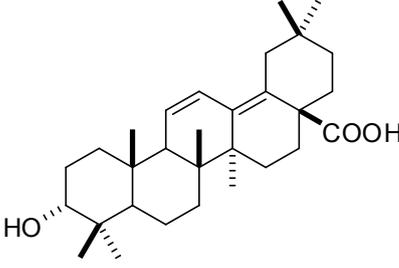
表二、臺灣八角金盤萃取物對胃上皮細胞生長及毒殺性影響

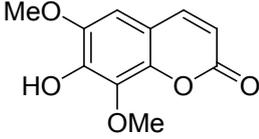
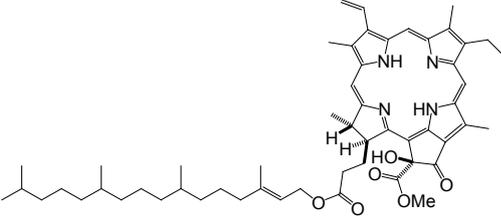
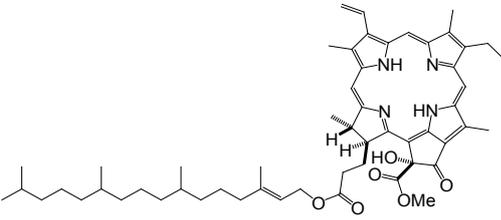
Fraction	DCM	DCM-1	DCM-2	DCM-3	DCM-3-33 22	DCM-3-35 322	DCM-3-35 6	DCM-3-62 211
IC <sub>50</sub> (μg/ml)	125	147	96.8	16.1	225	428	777	215
Fraction	DCM-4	DCM-4-1	DCM-4-2	DCM-4-3	DCM-4-4	DCM-4-5	DCM-5	DCM-6
IC <sub>50</sub> (μg/ml)	14	97	113	93	58	215	21	31.2
Fraction	DCM-7	DCM-8	DCM-9	DCM-10				
IC <sub>50</sub> (μg/ml)	40.6	87	258.3	318.7				

Fraction	Butanol	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	B-5-1	B-5-2
IC <sub>50</sub> (μg/ml)	816	213	223	414	462	149	968	1083
Fraction	B-5-2-1	B-5-2-2	B-5-2-3	B-5-2-4	B-5-2-5	B-5-2-6	B-5-2-7	B-5-3
IC <sub>50</sub> (μg/ml)	837	1540	1060	987	762	103	358	753

Fraction	EA	EA-1	EA-2	EA-3	EA-4	EA-5	EA-6	EA-7
IC <sub>50</sub> (μg/ml)	99.4	99.6	35.6	44.6	40	46.7	44.1	18.6
Fraction	EA-8	EA-9	EA-10	EA-11	EA-12	EA-13	EA-14	EA-15
IC <sub>50</sub> (μg/ml)	30.9	64	15	78.9	63.4	20.3	41.1	215.7

表三、臺灣八角金盤抗幽門桿菌活性天然化合物結構示意圖

化合物編號	化合物結構	MBC*	備考
FPL-DM-24-6-3-1	 <p>(+)-Eudesmin</p>	4.0 µg/mL	
FPL-DM-20-1	 <p>(22<i>E</i>,24<i>R</i>)-Ergosta-5,22-dien-3β-ol (Brassicasterol)</p>	128.0 µg/mL	
FPL-DM-24-6-7-3	 <p>3α,24-Dihydroxyoleane-11,13(18)-dien-28-oic acid</p>	64.0 µg/mL	
FPL-DM-20-3-5-3C	 <p>3α-Hydroxyolean-11-en-13β, 28-olide</p>	128.0 µg/mL	
FPL-DM-20-3-5-W	 <p>3α-Hydroxyoleane-11,13(18)-dien-28-oic acid</p>	>128.0 µg/mL	

FPL-DM-25-18-2-1	 <p style="text-align: center;">Isofraxidin (8-Methoxyscopoletin)</p>	>128.0 µg/mL	
FPL-DM-20-3-5-2-4-H1	 <p style="text-align: center;">13<sup>2</sup>-Hydroxy-(13<sup>2</sup>S)-pheophytin a</p>	>128.0 µg/mL	
FPL-DM-20-3-5-2-4-H2	 <p style="text-align: center;">13<sup>2</sup>-Hydroxy-(13<sup>2</sup>R)-pheophytin a</p>	>128.0 µg/mL	
*MBC: Minimal Bactericidal Concentration			

# 樟芝發酵產物微波殺菌及微波凍乾製程 研發

陳淑德

國立宜蘭大學 食品科學系

## 摘要

牛樟芝發酵產物中的多醣類和三萜類等生化活性物質，具有抗氧化能力、抑制肝癌細胞生長、抗發炎等免疫調節的功效，故本研究乃利用高價值的牛樟芝及猴頭菇發酵產物和子實體作為研究的原料進行後段工程中微波巴斯德殺菌和微波凍乾的製程研究。少量液態和固態發酵牛樟菌在 80°C 熱水浴中加熱 1 min 即可達到殺菌效果，而大量固態基質可使用微波加熱迅速升溫，以克服傳統蒸氣殺菌的熱傳導障礙，取代  $\gamma$ -ray 建立安全的製程。進一步利用微波真空冷凍乾燥技術對預先冷凍牛樟芝及猴頭菇子實體進行為冰晶的昇華，以避免熱風乾燥對有效成分的破壞及解決利用加熱板作為熱源的傳統冷凍乾燥時間需一至二天之問題。微波冷凍乾燥可視樣品重量和微波輸出功率，只需約一至四小時即可完成凍乾，此可以節省 90% 以上的能源，且不論微波冷凍乾燥和傳統冷凍乾燥的牛樟芝子實體之外表色澤和形狀及抗氧化成分並無顯著差異，且和未乾燥的冷凍牛樟芝子實體外表亦無明顯差異。不過乾燥猴頭菇的復水率和外表明亮度則以傳統冷凍乾燥 > 微波冷凍乾燥 > 熱風乾燥，但乾燥時間長短依次為傳統冷凍乾燥、熱風乾燥和微波冷凍乾燥，進一步分析其抗氧化成分和抗氧化活性以傳統和微波冷凍乾燥高於熱風乾燥，故根據此微波殺菌和微波真空冷凍乾燥處理牛樟芝和猴頭菇研究，未來可推廣於現代化製藥製程中，不僅維持較佳的品質，也可有效提升國內中草藥製程的水平。

關鍵詞：牛樟芝、猴頭菇、微波、殺菌、凍乾

# **Study of Microwave Sterilization and Microwave Freeze-dried of Fermented *Antrodia Cinnamomea***

Su-Der Chen

Department of Food Science, National Ilan University

## **ABSTRACT**

*Antrodia cinnamomea* has many bio-active compounds such as polysaccharides and triterpenoids, and they have several bio-functions such as antioxidant activities, inhibition of hepatoma cells growth and anti-inflammatory effect. Therefore, the high value of *Antrodia cinnamomea*, *Hericiium erinaceus* liquid fermented products and fruiting body became the materials in this study for further down stream operations such as microwave pasteurization and microwave freeze-drying. *Antrodia cinnamomea* in the liquid and solid-state media could be pasteurized in a 80°C water bath for 1 min heating. Microwave pasteurization can overcome heat transfer resistance in the high temperature steam sterilization and rapidly increase temperature to establish the safe processing instead of  $\gamma$ -radiation sterilization. Furthermore, microwave vacuum freeze-drying can avoid overheating bio-active components, because the polar ice can absorb microwave to vibrate and to produce heat for sublimation. Microwave freeze-drying only took 1~4 hours to obtain dried products depending on sample weight and microwave power input. Therefore, microwave freeze-drying can save over 90% energy and replace one to two-days conventional freeze-drying in industry. The color, shape and antioxidant activities of conventional and microwave freeze-dried *Antrodia cinnamomea* have no significant difference. The order of rehydraton ratio and lightness of *Hericiium erinaceus* fruiting body was conventional freeze-dried > microwave freeze dried > hot air dried; however, the order of drying time was conventional freeze-dried, microwave freeze dried, hot air dried. The antioxidant activities of conventional and microwave freeze-dried *Hericiium erinaceus* fruiting body were higher than hot air dried samples. Therefore, microwave pasteurization and microwave vacuum freeze-drying can be applied the modern medicine processing to

maintain better quality in order to improve operation technology in Chinese herb industry.

Keywords: *Antrodia camphorae*, *Hericiium erinaceus*, microwave, pasteurization, freeze-drying

## 壹、前言

牛樟芝為台灣特有品種，在分類學上的地位為真菌界(Fungi)、擔子菌門(Basidiomycota)、同擔子菌綱(Homobasidimycetes)、無褶菌目(Aphyllporales)、多孔菌科(Polyporaceae)、薄孔菌屬(*Antrodia*)，學名為 *Antrodia cinnamomea*。牛樟芝為台灣傳統藥用真菌，牛樟樹為牛樟芝之主要宿主，近年來台灣地區過度開發，濫墾牛樟樹，造成牛樟樹及牛樟芝日漸稀少，牛樟樹已被列為台灣保育類物種，且牛樟芝稀有、珍貴且生長緩慢，野生牛樟芝子實體一年約只生長五公分，價格昂貴，每斤牛樟芝可達五十多萬元，極具高商業價值，故以人工方法培養出牛樟芝之子實體或菌絲體(Chen et al., 2008)。

牛樟芝常見的活性成分有，多醣、三萜類、固醇類及半萜類等，其中多醣及三萜類是較為人所廣泛探討的，三萜類具有有效生理功能已被證實具有抗癌、解毒、保護肝臟、抑制肝腫瘤細胞(Hsu, 2007; Chen et al., 2008)以維持身體機能、抗發炎及降低血壓等功能，已有學者分離鑑定出幾種牛樟芝特有 三萜類(Ao et al., 2009)。多醣具有免疫調節，增強免疫力功能、抗過敏、抗腫瘤、抗發炎(Liu et al., 2007)、抗氧化(Shu and Lung, 2008)及調節血糖功能。此有效成分若能夠以人工方法大量培養，則可以增進人類健康也具高商業價值。

牛樟芝子實體或菌絲體的發酵的方法可分為液態發酵及固態發酵，液態發酵又可分為實驗室常用的搖瓶發酵、五升發酵槽及工廠大規模製造十噸以上的大型發酵槽；而固態發酵則可分為接種於平板上培養、太空包及椴木栽培方式。各種不同發酵方法須針對所欲得的代謝物可以改變整個發酵過程的營養來源，使得改變基質可產生不一樣的代謝產物(Shih et al., 2006)。Lin 等人(2006)在固態培養基的平板中添加微量的樟腦油可促進牛樟芝的生長，但若添加過多的樟腦油，反而會抑制牛樟芝生長，進一步比較白色菌絲、紅色菌絲、人工栽培之子實體與野生牛樟芝的甲醇萃取物之 HPLC 圖譜，發現人工栽培之子實體與野生牛樟芝所呈現圖譜非常類似，但白色和紅色牛樟芝菌絲與子實體比較，所呈現三萜類 HPLC 圖譜不盡相同。Chen 等人(2001)也比較熱水萃取牛樟芝的三萜類之 HPLC 圖譜分析，發現人工栽培與野生牛樟芝三萜類圖譜非常相近，這表示發酵方法和操作製程會影響牛樟芝代謝產物的生成。在探討液態發酵和固態發酵製程時，使用固態發酵培養，微生物亦可產生大量菌絲、甚至可產生較大量的胞外酵素

或其他代謝產物；且固態發酵並沒有大量發酵廢水，可節省大筆的離心、濃縮與冷凍乾燥等操作費用。

野生牛樟芝生長於台灣特有保育類牛樟樹的內壁，故野生的牛樟芝不只是生長緩慢且採集不容易，價格非常昂貴。許多研究和專利證實牛樟芝富含的多醣和三萜類具有具護肝、抗發炎、抗氧化及抗腫瘤的活性。很多研究和專利探討牛樟芝液態發酵的基質配方和操作方法以生產菌絲體，或以人工固態培養牛樟孢子實體，且目前業界也利用發酵技術生產牛樟芝。然而針對發酵產品的後段工程，包括殺菌、萃取、濃縮、乾燥的製程反而是花費很多操作時間和成本，但此方面的製程開發研究是相對的稀少。

但固態發酵培養有攪拌困難、固態基質熱傳阻礙大而易造成代謝熱難排除的升溫及殺菌時間較長的問題，此外發酵參數較難測量造成連續化和自動化操作的困難等缺點(廖，2003；陳等 2008；林，2008；Holker et al., 2004；Sato and Sudo, 1999)。固態發酵若殺菌時間不夠，會造成殺菌不完全而導致敗糟。即使固態發酵完畢的產物也需要殺菌才能進一步乾燥磨粉加工，故可以利用微波殺菌可克服固態基質熱傳導係數太小所造成的殺菌不完全的問題。

微波具有多項優點：加熱時間短、升溫速度快，食品表層和內部較無溫度梯度使得殺菌較均勻，並可保留食品的營養，另外微波可直接加熱食品，裝置身不被加熱也不需傳熱介質故能量損失少、熱效率高，可節省能源且操作方便(樊和黃，2007；陳，2008)。

微波殺菌的機制包括熱效應和非熱效應兩種，在熱效應方面是因為生物體中的水分等極性分子吸收微波頻率，而造成水分子相互發生碰撞，摩擦振動後將動能轉化成熱能(陳，2008)。微波作用於食品使得食品表面和內在同時加熱，通過熱傳導也使得微生物快速升溫導致菌體蛋白質變性，甚至可使微生物的細胞膜破裂，使微生物失去生理功能，適合應用殺菌(王和錢，2005)。

另一方面微波非熱效應用則可能由於微生物對微波具有選擇性吸收，因菌體內的水分較食品的含水量高，故菌體的介電常數可使內部升溫快速而被殺死，或因降低水活性而破壞微生物生存環境，或影響菌體的細胞膜上離子通道，干擾細胞的正常代謝而抑制微生物生長，或使細胞壁破裂使蛋白質核酸等物質滲透於體外或使菌體的核酸氫鍵結構破壞及蛋白質的立體結構改變，導致微生物死亡(樊和黃，2007；楊和周，2006)。

微波殺菌的應用研究，在大陸方面有甜酒釀裝經微波殺菌可以使貯藏

期延長，在冰藏下達三個月或在室溫下達一個月(魯等，2007)；果漿飲料加工(王等，2006)；在中藥製程中微波殺菌以取代原有的放射照殺菌(韓，2004)，宋等(2005)研究微波對太空包基質的殺菌效果。在美國方面已有研究將微波殺菌應用於無菌加工連續式的製程(Coronel et al., 2008)，及在微波殺菌中量測食品的介電常數(Wang, et al., 2003)和預估微波殺菌過程中的食品冷點(Pandit et al., 2007)及由 Dr. Tang, Juming 所領導的團隊向 FDA 取得微波殺菌在食品工業上的應用認證通過，故微波殺菌這項技術未來將由實驗室的研究，推廣應用於食品工業、製藥工業界，國內在這方面的研究較遠，更應大力投入此類的研究，才會符合工業的期待和需求。

另一方面微波能源也可應用於乾燥製程包括微波乾燥、微波真空乾燥、微波真空冷凍乾燥和微波膨發，其中微波乾燥機可用於檢測食品中的水分含量，此有助於食品加工製程中決策製程的進展。微波真空乾燥機是直接利用微波在真空乾燥機中作為熱源，此設備應包括微波、密閉乾燥室、抽真空的泵、冷凝系統。這方面的設計可解決乾燥機制中的熱量傳送和質量傳送兩方面的問題，因為微波可提供食品中含有水分子的共振摩擦生熱，且因為在真空系統中，不僅水分蒸發的沸點會隨系統壓力降低而降低，所產生的水蒸氣亦可以因為系統抽真空，而使食品內外的水蒸氣的濃度梯度加大，以加速水蒸氣的散失，且利用冷凝系統將蒸發的水蒸氣冷凝，而不致於影響真空泵的操作，此微波真空乾燥過程應會在 40~50 分鐘即可將食品中的水分含量由原先的 90%左右降至 15%以完成食品的乾燥(Clary et al., 2006; 陳，2008)。不過系統抽真空時要注意將系統的絕對壓力降至 85Pa 以下，以避免微波放電所產生的弧光(Duan et al., 2010)。近年來國內外已有微波真空乾燥機，可以加速乾燥且獲得品質良好的乾燥食品，未來應有很大的應用空間。

若將微波真空乾燥機配合已放置於冷凍室中的冷凍食品，且將系統的絕對壓力降至水的三相點 4.5 mmHg 以下，則微波可提供冷凍食品中冰晶的昇華熱，再配合冷凝系統將昇華的水蒸氣冷凝，則大約可使冷凍乾燥時間可節省 75%製程時間，且此冷凍乾燥過程會以恆率乾燥期進行，而沒有呈現減率乾燥期，此可大幅解決利用熱板作為食品冷凍乾燥時熱傳導障礙所造成製程的瓶頸(Abbasi & Azari, 2009; Wang et al., 2001a & b; Duan et al., 2010)，未來應可配合目前液態發酵產品或中草藥萃取液後段濃縮乾燥，以迅速獲得高單價的乾燥保健食品或中草藥粉。

微波膨發是利用微波作為食品加熱的熱源，微波加熱會使靠近食品外

層形成膜殼，而使食品深層的水分迅速蒸發而形成食品內部有較高的壓力且過熱的水蒸氣，由於內部水分的快速蒸發，會迫使食品膨發，故微波加熱可應用於水果薄片、魚胚、蝦胚、米胚及爆玉米花的膨發乾燥，雖然微波膨發和油炸膨發皆可快速達到膨發的效果，但且微波膨發可減少油脂含量較高，符合現代人的健康主張(鄭等，2005)。

整體而言，微波應用於食品乾燥技術，可穿透至含水分較多的食品內層，完全克服熱傳障礙，只有食品加熱，並不會使工廠環境溫度升高，此可以有效縮短乾燥製程的操作時間及節省能源和設備放置的空間，且可以配合自動控制操作及微波洩漏的偵測裝置，加上近年來台灣微波複合能源的設備成功的研發，已大幅領先國外的微波乾燥的研究(陳，2008)。

不論根據專利的查詢資料和學術研究的牛樟芝液態發酵的菌絲產物及固態發酵生產的牛樟芝子實體都具有生理功能，本實驗室將會利用過去進行真菌液態發酵和固態發酵的研究經驗，先生產高價值的牛樟芝液態發酵產物和固態子實體，再進一步研究發酵的下游製程，探討牛樟芝的殺菌條件，及應用微波於殺菌上，尤其可以克服固態培養基的熱傳障礙，不只可使快速升溫以縮短殺菌時間，亦可以進一步研究以微波真空冷凍乾燥牛樟芝液態發酵產物和牛樟芝子實體以維持其最佳的生理功能及品質，也能克服整個製程的瓶頸，節省時間和能源有效降低製程的成本，相信微波加工技術也可進一步應用於科學中藥製程中殺菌、萃取和乾燥。

本研究之目的是將微波技術應用於中草藥發酵產品(牛樟芝發酵產物和猴頭菇)的巴斯德殺菌和乾燥，因發酵產物內部的極性水分子可吸收微波產生共振摩擦生熱，此可以克服傳統以蒸氣或熱板作為熱源的熱傳導障礙，進而加速殺菌和乾燥的時間。且去年微波蒸氣殺菌製程才已被FDA認可是食品工業上殺菌的製程，故經過微波殺菌可以作為巴斯德殺菌製程。另一方面，配合多功能微波真空裝置，可利用微波真空冷凍乾燥牛樟芝和猴頭菇子實體以維持較佳的品質，且乾燥時間大幅由一~二天降為數小時，所以這是非常有潛力的製程研究，另外再比較傳統熱風乾燥、傳統冷凍乾燥和微波冷凍乾燥三種乾燥方法對猴頭菇子實體的乾燥速率和品質影響。

## 貳、材料和方法

### 一、牛樟芝菌的培養和預活化

將牛樟菌 *Antrodia cinnamomea* (BCRC 35396) 置於 PDA 平板培養基，在 28°C 培養箱中培養，每個月繼代培養，而長出菌落後將菌絲移至具有擋板三角瓶的 5% 葡萄糖培養液(含 5% 葡萄糖、0.1% 酵母萃取物、0.1% 磷酸氫二鉀及 0.05% 硫酸鎂，以蒸餾水定量至 150 mL) 中進行預活化七天，在 28°C、pH 5.6、150 rpm 條件下進行搖瓶培養。

### 二、牛樟芝液態發酵

牛樟芝液態培養液以大豆粉 3% 及玉米粉 2% 為主要成份加入逆滲透水，並加入醋酸以調整 pH 值至 4 後配製而成，配製後的培養基以搖瓶或發酵槽盛裝後密封滅菌、放冷後接種。將預活的牛樟菌液接種至已滅菌、冷卻的培養液中，接種量為 10% (v/v)，搖瓶接種於無菌操作台內進行，而 5 升發酵槽接種操作則控制在通氣量為 2 vvm，攪拌速率為 300 rpm，於 28°C 下進行液態發酵 7~14 天。

### 三、牛樟芝固態發酵

將預活化牛樟菌液 10 mL 接種於已殺菌的以豆渣為主的基質中，其水分含量 90%，再加入 5% 葡萄糖、1% 蛋白胨、0.1% 酵母萃取物、0.1% 磷酸氫二鉀及 0.05% 硫酸鎂，於 28°C 恆溫培養箱中培養 28 天，即可得牛樟芝固態發酵產物。

### 四、牛樟菌的殺菌條件測試

牛樟菌發酵產物需經高溫殺菌的製程，故先探討牛樟菌液態、固態培養基之升降溫曲線及在不同溫度加熱後對牛樟芝存活之影響，方可找出適合牛樟菌殺菌條件。

#### (一) 升溫、降溫曲線

微量吸管取 1 mL PDB 置於小玻璃樣品管內，於不同溫度 (60°C、70°C、80°C、90°C) 的熱水浴槽進行加熱，並插入熱電偶 (Thermocouple)，每 5 秒讀一次數值並記錄，以完成液態基質 PDB 升溫、降溫曲線。玻璃管(內徑 1.2 cm) 中加入 5 克豆渣基質和 5 mL 蒸餾水，先於直立式高壓蒸氣滅菌釜，121°C 殺菌 30 分鐘後，冷卻備用。插入熱電偶於固態基質中，分別置於不同溫度於不同溫度 (60°C、70°C、80°C、90°C) 的水浴槽中加熱，待達設定溫度後，再置入冰浴槽降溫，實驗每 5 秒讀一次數值

並記錄，以完成固態基質升溫、降溫曲線。

## (二)牛樟芝菌液態培養液之熱殺菌

微量吸管取1 mL已活化之PDB牛樟菌液，置於小玻璃樣品管內，於不同溫度(70°C、80°C、90°C)下的熱水浴槽中進行加熱，隨即冷卻後再接至PDA平板，於28°C恆溫培養箱中培養七天。

## (三)牛樟芝固態基質之熱殺菌

玻璃管(內徑1.2 cm)中加入5克固態基質和5 mL 蒸餾水，加入1 mL牛樟芝預活化菌液，於70°C、80°C及90°C水浴槽中加熱5分鐘，再置於28°C培養箱培養七天。

## 五、牛樟菌發酵產物的微波殺菌條件測試

利用微波爐進行牛樟菌發酵產物的殺菌測試，分別控制微波輸出功率及加熱時間，容器的壓力，測量樣品的溫度，以決定最適微波殺菌條件。

## 六、牛樟芝的微波真空冷凍乾燥條件測試

先將已經殺菌後的牛樟芝冷凍，方可進行後續冷凍乾燥。將微波爐連接一經真空泵密閉容器，其中放置欲凍乾的樣品，抽真空後，即可透過調節微波功率及微波加熱時間進行微波冷凍乾燥，至樣品乾燥為止，此操作過程只需在 1~2 小時內即可達成，且也可以偵測樣品的溫度和重量變化，以決定最適的微波凍乾條件。

## 七、比較傳統凍乾和微波凍乾牛樟芝的品質

先將已經殺菌後的牛樟菌發酵產物冷凍，方可進行後續冷凍乾燥，冷凍樣品在傳統以熱板作為熱源的冷凍乾燥機中，需 1~2 天方可獲得凍乾樣品。兩種不同凍乾方法製備而成的乾燥牛樟芝樣品，可利用電子顯微鏡觀察其表面組織的差異，亦可比較其色澤、復水性及分析多醣、三萜類有效成分含量。

## 八、比較不同乾燥方法對猴頭菇之品質的影響

以熱風乾燥、傳統冷凍乾燥和微波乾燥三種不同的乾燥方法分別乾燥猴頭菇，為評估乾燥後成品之品質如:顏色和復水性和抗氧化能力如:清除 DPPH 的能力、還原力和螯合亞鐵離子的能力。

## 九、牛樟芝成分分析

### (一) 牛樟芝粗多醣方法(Dubois et al., 1956)

稱取乾燥發酵產物 1 g 置於 100 mL 燒杯加入 50 mL 去離子超純水，於 100°C 水浴槽進行萃取，收集萃取液於 50 mL 離

心管，再以  $8000 \times g$  離心沉澱不溶顆粒，取其上清液 0.3 mL 置於 1.2 mL 微量離心管，並加入 1.2 mL 95% 乙醇沉澱多醣，再離心 ( $8000 \times g$ ) 去除上清液，重覆酒精沉澱及離心去除上清液動作兩次以去除小分子醣類干擾，於  $60^{\circ}\text{C}$  乾浴器烘乾，再加入 0.1 M NaOH 溶解多醣沉澱物，並以酚-硫酸比色法測定多醣濃度，取 1 mL 稀釋樣品，加入 1 mL 5% 酚溶液和 5 mL 濃硫酸，振當均勻後，冰浴冷卻 2 分鐘，於 488 nm 下測吸光值，並以葡萄糖溶液作為標準溶液製作檢量線，並於每次分析前重新製作標準檢量線。

### (二) 牛樟芝粗三萜分析(孫等, 2010)

取 0.05 g 牛樟芝樣品溶於 10 ml 乙酸乙酯超音波萃取 40 min，取 0.1 ml 於  $100^{\circ}\text{C}$  乾浴中揮發，加入 0.4 ml 5% 香草醛 (vanillin)-醋酸溶液和 1 ml 過氯酸，於  $60^{\circ}\text{C}$  乾浴加熱 15 min 後冰浴至室溫，再加入 5 ml 醋酸混合均勻，15 min 後於 548 nm 測吸光。另外精稱齊墩果酸 (oleanolic acid) 標準品 1.15 mg 溶於 10 ml 乙酸乙酯，混合均勻得標準溶液。分別吸取 0、0.1、0.2、0.4 標準溶液，在  $100^{\circ}\text{C}$  乾浴中揮發，加入 0.4 ml 5% 香草醛-醋酸溶液和 1 ml 過氯酸，於  $60^{\circ}\text{C}$  乾浴加熱 15 min 後冰浴至室溫，再加入 5 ml 醋酸混合均勻，15 min 後於 548 nm 測吸光。

### (三) 總多酚類化合物分析 (林, 2008)

分別取 0.2 mL 牛樟芝水萃取液或 0.2 mL 猴頭菇酒精萃取液，加入 1 mL 磷鉬酸酚試劑 I (Folin-Ciocalteu's phenol reagent) 及 0.8 mL 7.5% 的碳酸鈉 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )，混勻後於室溫靜置 30 分鐘，反應時要避光，並在波長 765nm 測吸光值並以沒食子酸 (Gallic acid) 為標準品製作檢量線，再將樣品的吸光值代入標準檢量線的回歸方程式，以計算樣品之總多酚之含量。

### (四) 類黃酮分析 (Christel, et al., 2000)

分別取 1 mL 牛樟芝水萃取液或 1 mL 猴頭菇熱水萃取液，加入 1 mL 2% methanolic ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )，在室溫下混勻靜置 10 分鐘，反應時要避光，並在波長 430 nm 測吸光值並以槲黃素 (quercetin) 為標準品製作檢量線，再將樣品的吸光值代入標準檢量線的回歸方程式，以計算樣品之類黃酮之含量。

## 十、猴頭菇熱水萃取物之抗氧化能力分析

(一)清除 1,1-Diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH)之能力測定(Shimada et al., 1992)

取 2 mL 的 20 mg/mL 凍乾發酵上清液，加入 2 mL 的 0.2 mM DPPH-MeOH 溶液混合均勻後，在室溫下遮光靜置 30 分鐘，波長為 517 nm 下測定吸光值，代入公式以求出 DPPH 清除率，並以 20 mg/mL 的抗壞血酸 (Ascorbic acid)、BHA 作為對照組。

$$\text{DPPH scavenging effect (\%)} = \frac{[(A_{517\text{nm}} \text{ of control}) - (A_{517\text{nm}} \text{ of sample})]}{(A_{517\text{nm}} \text{ of control})} \times 100\%$$

(二)螯合亞鐵離子能力之測定 (Dinis et al., 1994)

取 2 mL 的 20 mg/mL 凍乾發酵上清液，加入 0.1 mL 的 1 mM FeCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 溶液混合均勻後，再加入 0.2 mL 的 2.5 mM Ferrozine 溶液振盪均勻，在室溫下遮光靜置 10 分鐘，波長為 562 nm 下測定吸光值，代入下列公式以求出螯合亞鐵離子的能力，並以 20 mg/mL 的檸檬酸(Citric acid)、EDTA 作為對照組。

$$\text{Chelating effect (\%)} = \frac{[(A_{562\text{nm}} \text{ of control}) - (A_{562\text{nm}} \text{ of sample})]}{(A_{562\text{nm}} \text{ of control})} \times 100\%$$

(三) 還原力之測定 (Oyaizu, 1986)

取 2.5 mL 的 20 mg/mL 凍乾發酵上清液，加入 2.5 mL 的 0.2 M 磷酸緩衝溶液及 2.5 mL 的 1% 赤血鹽混合均勻後，50°C 水浴 20 分鐘後以冰浴使其快速冷卻，再加入 10% Trichloroacetic acid (TCA) 2.5 mL，振盪均勻後，離心 10 分鐘，取 5 mL 上清液，依序加入 5 mL 蒸餾水、0.1% Ferric chloride 1 mL 混合均勻後，室溫下遮光靜置 10 分鐘，在波長 700 nm 下測定吸光值，並以 20 mg/mL 的抗壞血酸 (Ascorbic acid)、BHA 作為對照組，測得吸光值越高則表示還原能力越佳。

## 十一、乾燥成品之品質分析

(一) 色澤判定

將不同乾燥方法乾燥成品以色差儀(Hunter Lab, Color Flex, USA)測定樣品之 Hunter L\*、a\*、b\*值。

(二) 復水性率測定

以 100°C 蒸餾水將乾燥成品浸泡於水中 5 分鐘，瀝去多餘

水分，樣品秤重複水率為  $W_r / W_d$ 。  $W_r$ ：樣品復水後質量、  
 $W_d$ ：樣品乾燥後質量。

## 十二、統計分析

試驗結果三重複，並以平均值  $\pm$  標準偏差表示，所得之數據使用 Statistical Package for Social Science (SPSS, SPSS INC. 宏德國際軟體諮詢顧問股份有限公司) 14.0 版統計套裝軟體進行統計分析，以多元全距檢定分析 (Duncan's Multiple Range Test)，以顯著水準為  $\alpha = 0.05$ ，比較其差異之顯著性。

## 參、結果和討論

### 一、牛樟菌殺菌條件

牛樟芝是台灣珍貴真菌，不論是否為牛樟芝，任何中草藥在發酵製程當中皆需進行加熱殺菌，殺菌過程當中可能會造成有效成分遭受破壞，為了避免有效成分因過度加熱而受到破壞，需先瞭解牛樟菌的耐熱程度，才可找到最適的巴斯德殺菌條件。故先瞭解整個加熱過程，裝於樣品瓶中液態基質和試管中固態基質置於固定溫度下的水浴中之溫度變化。首先圖一是液態 2 mL PDB 基質在水浴槽中加熱情形，在 70 秒後達到一個平緩無在上升的曲線，然後以冰浴 60 秒降溫即可達室溫以避免過度的加熱；圖二為 10 g 小麥固態基質裝於試管中在 60、70、80、90°C 於水浴槽中加熱 600 秒後，立即於冰浴槽中降溫 180 秒以達到約最初未經加熱時的基質溫度，以防止在殺菌過程中因餘熱的影響，結果顯示小麥固態基質不論在何種溫度下，加熱約在 300 秒後可達到所設定的溫度。

不論升溫和降溫速度，固態基質皆明顯比液態基質緩慢，此因固態基質只能藉由熱傳導的方式由試管外向內慢慢將熱量傳送進去，若是容器增大，會使熱傳的速度更慢，且小麥與小麥基質間若有空隙產生更影響到整體的熱傳速度。但若使用 PDB 液態基質不僅能藉由熱傳導方式傳遞熱量，也能利用熱對流方式讓水浴槽的熱量快速地傳至內部液態基質，故使用固態發酵時，需要考慮更長的殺菌時間方能使基質的溫度上升。

牛樟芝經預活化後分別以加入液態及固態基質中進行滅菌，加熱溫度為 60、70、80、90°C，加熱後培養以觀察生長情形，表一為含牛樟菌液態 2 mL PDB 基質經培養後生長情形，在 60°C 水浴槽中加熱 90 秒、70°C 水浴槽中加熱 50 秒可達牛樟菌停止生長效果，80°C、90°C 在加熱 20 秒後皆無法生長。表二為固態小麥基質在 60°C 水浴槽中加熱 240 秒、70°C 水浴槽中加熱 120 秒牛樟菌並無生長情形，而 80°C、90°C 加熱 60 秒後牛樟菌已被殺死，培養後只有未加熱會生長。

但以試管所裝之小麥固態基質只適合用於實驗室小型測試，模擬工業放大製程，改採以 100 g 小麥基質以相同水浴槽進行熱水浴 80°C 之加熱，在加熱 60 分鐘後，100 g 小麥基質的中心溫度仍達不到水浴槽所設定之 80°C (圖三)，由此可見，在少量 10 g 小麥基質於試管中，外壁與中心點距離較近，還可以採熱水浴方式加熱以達所需殺菌溫度，而 100 g 小麥基質的玻璃小甕中，因體積較試管大很多，而且所加入小麥基質的量也多於試管

所裝小麥的量，造成熱量傳送更加不容易，此是傳統的加熱有待突破的瓶頸。

今改以微波來取代水浴槽的加熱方式，藉由基質中的水分可吸收微波頻率產生振動摩擦生熱，可以解決熱傳導時基質的中心溫度緩慢升溫造成極大的溫度梯度和溫度分布不均勻的情形，如圖四採以 200 g 及 400 g 小麥基質進行 700 W 微波加熱，200 g 小麥基質及 400 g 小麥基質分別在 80 秒和 180 秒後中心溫度可達 100°C，相較之下，100 g 的小麥基質在水浴槽中不只加熱速度緩慢，且又不易到達所設定溫度，故採以微波加熱 200 g 及 400 g 小麥基質可更快地縮短加熱時間。故將此構想委託生技公司製造連續式微波殺菌和無菌包裝設備(圖五)，未來此設備是將中草藥材置於輸送帶上，先經過 UV 表面殺菌，再經過微波加熱殺菌，最後可於無菌操作台上進行真空包裝，此製程可維持中草藥之衛生安全的品質及延長保存期限。

## 二、牛樟芝微波冷凍乾燥製程研發及抗氧化分析

微波冷凍乾燥機的設備是自行組裝微波爐內附有 3L 可抽真空的玻璃器皿、真空幫浦、可抽真空的管件及-40°C的冷凝器(圖六)。樣品進行冷凍乾燥前，需先在冷凍庫將樣品中的水分冷凍形成冰晶後，才能移進置於微波爐中的玻璃器皿中，密閉後，再打開真空幫浦，使整個系統抽真空至壓力降低到 0.1 mmHg 以下，因為真空系統壓力在水的三相點(4.55 mmHg)以下才可以讓冰晶直接昇華為水蒸氣，至於-40°C的冷凝器可以先打開，此設備連接於玻璃器皿和真空幫浦之間，因冷凝器的溫度極低可將水蒸氣凝結成冰晶，不致於吸入真空幫浦中。

在實驗之初，使用某廠牌微波焗烤爐，此具有可調整微波輸出功率(100 W、150W、300 W、600W、750W 和 1000 W)，由於冷凍樣品的冰晶的損失因子(loss factor)遠低於水，故考慮冷凍乾燥過程中低微波輸出功率才能夠符合冰晶昇華能量需求，不致於發生冰晶轉變微波功率而成為融化熱的現象，或因為在真空系統下，太大的微波輸出功率而造成放電產生弧光的情形，Duan 等(2010)的研究結果顯示真空下微波功率控制在 3 W/g 以下即可避免放電現象。此微波爐雖然微波輸出功率可低到 100 W 和 150 W，經過功率測量器分析後，發現此二者低微波輸出功率是屬於平均值，即微波爐有時是不輸出微波，但瞬間輸出微波功率亦會高達 800 W 和 1000 W，完全不適合微波冷凍真空乾燥之操作，最後委託生技公司特地製造可調整成固定低微波輸出功率的微波爐(圖六)方解決此一操作難題。

分別將 50 g 冷凍野生牛樟芝子實體置於微波真空冷凍乾燥機中，並輸

入三種不同的 30 W、50 W 和 70 W 的微波功率，則由乾燥曲線(圖七)可知欲將牛樟芝的無因次水分含量達 0.1 以下，即分別需要乾燥 1、1.5 和 2.5 小時，此已明顯比傳統冷凍乾燥需 36 小時的操作時間縮短，且由圖八的結果得知，利用紅外線溫度測量牛樟芝樣品表面溫度在完成凍乾前均能保持在 30°C 左右，且由圖九的照片顯示冷凍(未乾燥)和微波冷凍乾燥的野生牛樟芝子實體二者的色澤和形狀皆相似。另外此三種微波功率(0.6、1 和 1.4 W/g)會使得微波冷凍乾燥呈現恆率乾燥期，其乾燥速率分別為 13.289、23.467 和 32.737 g 水/ hr (表三)，且微波冷凍乾燥過程中，增加微波功率(W)會使得乾燥速率(g 水/ hr)加大，且兩者呈現正相關性( $y=0.4862x-1.1457$ ， $r^2=0.9993$ )。由於冷凍乾燥製程尚需配合真空幫浦和冷凝系統的用電耗能，根據功率測量器量測的結果，計算整個微波冷凍乾燥製程分別需要 8388、5140 和 3499 kJ 的能量，相對於傳統冷凍乾燥牛樟芝需 36 小時，所耗電能約為 101347 kJ(表三)，故微波冷凍乾燥不只縮短乾燥時間，且至少可以節省 90%以上的電能。

進一步使用 50 W 微波冷凍乾燥不同重量(50 g、80 g、100 g 和 200 g)的野生牛樟芝子實體，則微波功率控制在 1、0.625、0.5 和 0.25 W/g 時，各需要 1.5、2、2.5 和 4 小時方使牛樟芝的無因次水分含量降至 0.1 以下(圖十)。另一方面，微波功率控制在 1~0.25 W/g，均可此微波冷凍乾燥操作過程中牛樟芝表面溫度控制在 30°C 左右(圖十一)，故此操作能保有良好的品質。然而當牛樟芝樣品重量由 50 g 增加 200 g，固定微波功率在 50 W，會造成當樣品重量增加時，無法使微波冷凍乾燥的乾燥速率成正比增加，故應考慮應適時增加微波爐的輸出功率以符合樣品重量增加冰晶昇華能量之需求，方可加快微波冷凍乾燥的速率以縮短乾燥時間及節省電能。

表四為傳統冷凍乾燥和微波冷凍乾燥牛樟芝子實體的抗氧化成分分析，由於此次野生牛樟芝子實體是由生技公司提供，子實體的大小不太一樣，採購批次也不相同，故有樣品差異，不過兩種冷凍乾燥方法均不會影響牛樟芝子實體的外形和色澤(圖十三)，傳統和微波冷凍乾燥牛樟芝子實體的抗氧化成分以粗多醣較多，分別有 5.82%和 5.99%，不過粗三萜類含量亦很高佔 3.09%和 2.79%。此兩種冷凍乾燥方法造成牛樟芝多酚和類黃酮含量各有消長，此可能採用由於不同批野生牛樟芝樣品之故，其傳統和微波冷凍乾燥之總多酚分別為 2.336 mg/g 和 1.674 mg/g，而類黃酮含量分別為 2.188 mg/g 和 2.795 mg/g。

### 三、不同乾燥方式猴頭菇的乾燥曲線

將 50g 猴頭菇分別經 50°C 及 60°C 熱風乾燥、傳統冷凍乾燥和將微波輸出功率分別控制在 30W、40W 和 50W 進行微波冷凍乾燥，取得不同乾燥操作條件的乾燥曲線(圖十二)。先將猴頭菇置於 105°C 烘箱加熱至恒重，則猴頭菇的起始水分含量為 85.36%，若要將猴頭菇濕基水分含量在 15% 以下，則此時猴頭菇的無因次水分含量已降至 0.1 以下，約為 0.03 即表示乾燥完成。由圖十二的結果得知猴頭菇分別在 50°C 及 60°C 熱風乾燥連續長達 12 及 10 個小時仍無法使猴頭菇的無因次水分含量降至 0.1 以下，且原先外表乳白色的猴頭菇因氧化褐變已呈現黑褐色，在猴頭菇體積方面，也在乾燥初期即大幅縮小，使得乾燥成品的賣相不佳。冷凍乾燥 50g 猴頭菇所需時間最長至少需 22 小時，此是由於冷凍乾燥是藉著熱傳導由猴頭菇表層傳至內部，將冰晶昇華成水蒸氣，但隨著組織中的冰晶昇華散失而留下空洞組織，這會使得靠近表層組織的熱傳導係數大幅降低，造成熱傳障礙，嚴重減緩乾燥速率和增加乾燥時間及耗費大量的能源。

當相同重量的猴頭菇利用微波冷凍乾燥，並控制三種不同微波功率在 30W、40W 和 50W，只需約 2.5、2 和 1 小時即可完成乾燥，表示大幅微波冷凍乾燥可以縮短乾燥時間約成傳統冷凍乾燥的 1/10。

Duan 等人(2010)亦分別利用 60°C 熱風乾燥、冷凍乾燥及微波冷凍乾燥海參，根據其操作條件，所花的乾燥時間條件分別為 8、18 及 11 小時。再進一步探討耗能研究，可發現 Duan 等人的海參所使用微波功率為 1.6 W/g，故使海參乾燥完成需耗能 49566.8 kJ/kgH<sub>2</sub>O；而本研究的猴頭菇所使用微波功率只有 0.4 W/g，到乾燥完成只需耗能 30361.45 kJ/kgH<sub>2</sub>O，二者的耗能皆顯著較傳統冷凍乾燥為低。因為相對於傳統冷凍乾燥操作時，除熱板或外界空氣可作為熱源外，亦都要配合真空泵及 -40°C 的冷凝系統，此後二者約佔總共耗能的 80% 以上，故利用微波作為冰晶昇華的熱能，可以大幅節省電能至 80~90%。

進一步探討不同猴頭菇重量對於微波冷凍乾燥猴頭菇冰晶昇華速率的影響，當猴頭菇重量較多時，其中的冰晶可以有效地吸收微波所給的能量產生水分子快速振動生熱而昇華，且樣品重量會和乾燥速率呈現線性關係，因此樣品重量增加時，亦適合加大微波輸出功率，更加速微波冷凍乾燥及縮短乾燥時間。

進一步探討不同微波輸出功率對 100g 猴頭菇的乾燥曲線和溫度曲線，由圖十三的結果可以發現利用微波冷凍乾燥猴頭菇，樣品的溫度變化不

大，其中以 30 W 最為溫和，40 W 次之，相較於 Wang 等(2010b)所使用的微波冷凍乾燥系統，其最終溫度約 50~60°C，本研究凍乾猴頭菇樣品的最終溫度則落在 15~30°C，故只需控制適量的微波輸出功率，微波冷凍乾燥過程中所產生的熱對樣品的破壞是相對低。而針對不同微波輸出功率，該重量下的猴頭菇在 30 W、40W 和 50W 下分別需要 4、4 和 6 小時才能完成乾燥。

故綜合上述微波冷凍乾燥操作條件，控制微波輸出功率在 40 W 再進行不同重量的猴頭菇微波冷凍乾燥，由圖十四的乾燥曲線結果得知 40 W 微波冷凍乾燥 50 g、100 g 及 200 g 猴頭菇分別需要 2、4 及 6 小時達到無因次水分含量 0.1 以下。相較於本研究微波冷凍乾燥給予 0.4 W/g 微波功率在 4 小時即能完成乾燥，Wang (2010b)等人與 Huang 等人 (2006)的研究，則是使用 1.6 W/g 的能量進行薯片乾燥，完成乾燥的時間約需要 5~7 小時，故適當的微波功率只用於冷凍乾燥時的冰晶昇華熱，不只可以避免過熱及放電現象(Duan et al., 2010)，更可縮短乾燥時間及節省能源。

#### 四、不同乾燥方法對猴頭菇復水率及色澤的影響

由表五不同乾燥方式對猴頭菇的復水率及色澤影響結果顯示，在 50°C 熱風乾燥、40W 微波冷凍乾燥及冷凍乾燥三種乾燥方法對猴頭菇的復水率，以冷凍乾燥最佳達 4.56，微波冷凍乾燥猴頭菇復水率次之，此可能由於猴頭菇的組織較軟會隨著微波冷凍乾燥速率增加而有縮小的情形，但熱風乾燥對猴頭菇質地破壞最為嚴重，且外形嚴重短縮，其復水率只有 2.27。這種相仿的結果亦出現在 Wang et al., (2010b) 和 Huang et al., (2006) 進行冷凍乾燥及微波冷凍乾燥馬鈴薯片時，兩種乾燥方法在薯片的色澤上差異不大，且冷凍乾燥薯片的復水率約達 5~6 左右，但微波冷凍乾燥薯片的復水率約達 3~5 左右。

另外由表五的三種乾燥猴頭菇之顏色，以冷凍乾燥猴頭菇在色澤上較明亮，微波冷凍乾燥猴頭菇次之，而熱風乾燥處理後的猴頭菇已呈現微褐色。由  $L^*a^*b^*$  作進一步的分析，冷凍乾燥猴頭菇的明亮度( $L^*$ 值)為 65.91 最高，微波冷凍乾燥猴頭菇的  $L^*$ 值為 53.05 次之，熱風乾燥猴頭菇的  $L^*$ 值為 47.19 最差。經統計分析，不同乾燥方式對於猴頭菇的復水率及色澤上都有顯著差異，且都是以冷凍乾燥最佳，微波冷凍乾燥次之，熱風乾燥最差(圖十五)。

#### 五、不同乾燥方式對猴頭菇之抗氧化成分和抗氧化能力的影響

表六為不同乾燥方式對猴頭菇的抗氧化成分影響，在 20mg/mL 熱水萃取液的粗多糖含量，三種乾燥方法對多糖含量並無顯著差異，熱風乾燥、冷凍乾燥及微波冷凍乾燥的多糖含量分別為 5.85%、5.51%和 5.75%，相較

於賈等(2005)利用熱水進行猴頭菇萃取所得多醣 6.4%略低一點，但因為菇的產地不同，也可能造成多醣含量有所差異。

以 85%乙醇萃取猴頭菇的總多酚，製備萃取液濃度為 20 mg/mL，則此三種乾燥方法對猴頭菇的總多酚含量，以冷凍乾燥的 9.22 mg/g 最佳，但熱風乾燥的 8.31 mg/g 和微波冷凍乾燥的 8.13 mg/g，並沒有顯著差異。相較於 Mau 等(2002)對 40°C 熱風乾燥猴頭菇進行甲醇萃取後其總多酚含量為 12.05±0.07 mg/g 而言，其含量略少，可能原因是因為 Mau 等是利用甲醇在 25°C，150 rpm 下萃取 24 小時，所以其萃取所得知總多酚含量才會略高於本研究。

以熱水萃取猴頭菇的類黃酮，製備萃取液濃度為 20 mg/mL，三種不同乾燥方法對猴頭菇萃取液中的類黃酮含量有所不同，其類黃酮含量以冷凍乾燥的 0.842 mg/g 大於微波冷凍乾燥 0.726 mg/g，又大於熱風乾燥的 0.272 mg/g，此說明類黃酮為容易受熱而破壞此抗氧化物質。

表七為由不同乾燥方法對猴頭菇的抗氧化能力之影響，在 DPPH 的清除能力上，在 20 mg/mL 的濃度下以維生素 C 及 BHA 作為正對照組，其清除 DPPH 的能力分別達 97.69%和 99.87%，可以發現猴頭菇 85%乙醇萃取液，配製在 20 mg/mL 濃度下的 DPPH 的清除能力以冷凍乾燥的 93.8%及微波冷凍乾燥的 92.9%極佳，且兩者之間並沒有顯著的差異，然而熱風乾燥對於清除 DPPH 能力降為 88.6%，較前兩種冷凍乾燥處理法略低。相較於 Mau 等(2002)在甲醇萃取液 1~7mg/mL 的濃度之下其 DPPH 清除能力最高可達 60~70%，隨著萃取液濃度提升，其 DPPH 清除能力也會相對性的成長。

在螯合亞鐵的能力上，正對照組為濃度 20mg/mL 的檸檬酸及 BHA，其螯合亞鐵的能力分別為 98.72%和 100%，可以發現將猴頭菇 85%乙醇萃取液，配製在 20mg/mL 的濃度下的螯合亞鐵的能力以冷凍乾燥的 93.1%大於微波冷凍乾燥的 87.8%，再大於熱風乾燥的 83.6%，故以冷凍乾燥的猴頭菇最佳，而熱風乾燥的猴頭菇最差，但都明顯優於 Mau 等(2002)在相同濃度下以甲醇萃取所測定出螯合亞鐵的能力值，其值約在 30~40%，故本研究的微波冷凍乾燥猴頭菇仍然存在良好之抗氧化能力。

在探討猴頭菇的還原力時，以濃度為 20mg/mL 的維生素 C 及 BHA 作為正對照組，其吸收值分別為 2.226 和 2.323，可以發現猴頭菇的 85%乙醇萃取液，配製在 20mg/mL 的濃度下的還原力以冷凍乾燥的 1.31 及微波冷凍乾燥的 1.28，二者並無顯著的差異，但熱風乾燥對猴頭菇的還原力降低，影響較大，其還原力只有 0.03。相較於相同濃度下 Mau 等(2002)所進行之

實驗的還原力為 1.5 左右較本實驗的結果為高，可能原因除了猴頭菇個體上的差異之外，萃取溶劑的濃度也可能為原因之一。

#### 六、微波冷凍乾燥對猴頭菌固態發酵產物之抗氧化成分及能力影響

進一步研究本研究室的猴頭菌固態發酵之菌絲和子實體，其發酵基質為糙米，水分含量為 50%，在接入預活化菌液後經由 14 天暗室培養及 14 天光照培養(25°C 下)，即可收成期子實體及富含菌絲體之糙米基質進行深入抗氧化分析。

在抗氧化成分方面，由表八中的結果顯示微波冷凍乾燥對猴頭菇子實體及菌絲體之影響，發現發酵子實體及菌絲體多醣含量就明顯以富含菌絲體之糙米基質較多達 14.31%、子實體次之達 8.11% 都相較於一般猴頭菇多醣含量約 6.4% 多(賈等，2005)。總多酚含量在子實體中為 8.04 mg/g，而在富含菌絲體之糙米基質為 7.92 mg/g，它們的總多酚含量雖較低，但和市售猴頭菇子實體的 8.13 mg/g 並無顯著差異。但相較於 Mau 等(2002)對 40°C 熱風乾燥猴頭菇進行甲醇萃取後其總多酚含量為 12.05 mg/g 而言，其含量略少。類黃酮的含量則是以富含菌絲體之糙米基質的 736.9 $\mu$ g/g 最多，子實體的 726.3 $\mu$ g/g 次之，且與市售猴頭菇子實體的 745.8 $\mu$ g/g，並沒有顯著差異。

而在抗氧化性質活性方面，以清除 DPPH 能力，可以發現富含菌絲體之糙米基質的 95% 大於子實體的 91.7%。Mau 等(2002)的實驗是以甲醇萃取液 1~7mg/mL 的濃度之下其 DPPH 清除能力最高可達 60~70%，隨著濃度提升其 DPPH 清除能力也會相對性的成長。因此本實驗清除 DPPH 能力高於該實驗可能是因為本實驗所適用的濃度高於 Mau 等之結果。

針對在 85% 乙醇萃取液 20mg/mL 的濃度下猴頭菇發酵產物之萃取液的螯合亞鐵能力，子實體為 71.7% 明顯大於富含菌絲體之糙米基質的 62.6%。Mau 等(2002)在相同濃度下以甲醇萃取所測定出螯合亞鐵的能力值，其值約在 30~40% 明顯低於本實驗室的猴頭菌發酵產物。

針對還原力在 700nm 下的吸光值而言，猴頭菌發酵產物的子實體為 1.8 較富含菌絲體之糙米基質的 0.9 高；相較於相同濃度下 Mau 等(2002)利用子實體所得到之還原力吸光值則是在 1.5 左右，還原能力略低於猴頭菌發酵產物。

## 肆、結論與建議

少量液態和固態發酵牛樟菌在 80°C 熱水浴中加熱 1 min 即可完成殺菌效果，但大量固態基質則較難升溫，建議使用微波加熱迅速升溫，以克服熱傳障礙達到殺菌效果。在乾燥速率方面以微波冷凍乾燥大於熱風乾燥，再大於傳統冷凍乾燥，微波冷凍乾燥可大幅縮短乾燥時間，進而可比傳統冷凍乾燥節省 90% 以上的能源。傳統和微波冷凍乾燥對於牛樟芝外觀的顏色、形狀及抗氧化成分方面並無顯著差異。比較乾燥猴頭菇的復水率和外表明亮度則以傳統冷凍乾燥>微波冷凍乾燥>熱風乾燥，進一步分析其抗氧化成分和抗氧化活性則以傳統和微波冷凍乾燥高於熱風乾燥。至於微波冷凍乾燥的操作，除控制真空壓力外，微波輸入功率尚需考慮乾燥樣品的重量以低於 3 W/g 為原則以避免放電情形發生。故根據微波殺菌和微波真空冷凍乾燥處理牛樟芝和猴頭菇的研究，未來可推廣於中草藥製程中，不只縮短製程時間、節省能源又可維持較佳的品質，有助提升國內中草藥製程的水平。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP100-RD-022 提供經費贊助，及合作的生技公司提供野生牛樟芝子實體進行微波冷凍乾燥試驗，提供椴木栽培牛樟芝子實體進行成分和抗氧化分析試驗及提供微波設備以利製程研究，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 伍、參考文獻

1. 王紅梅，錢建應：微波技術在食品工業中的應用。揚州大學烹飪學報 2005； 3: 61-64。
2. 王麗，馬學良，楊翔華，劉瑩，冉華松，徐軍祥：山楂、胡蘿蔔漿飲料的生產及微波殺菌技術。遼寧石油化工大學學報 2006；26(4): 83-85，88。
3. 宋安東，劉存祥，葛新鋒，張建，彭迎革：微波食用菌生產用固體物料的試驗研究。微波學報 2005；21(6): 66-70。
4. 林秀芸：冬蟲夏草發酵物之抗氧化活性及免疫調節之研究。國立宜蘭大學食品科學系碩士論文 2008。宜蘭。
5. 陳淑德：食品微波乾燥技術的應用。台北國食品展&台北國際食品機械暨包裝展專刊 2008；57-61。食品資訊雜誌社出版，台北。
6. 孫中文，劉漢清，黃一平，鞠建明：藏藥印度獐芽菜總三萜和齊墩果酸的含量測定。中國民族民間醫藥 2010；1：21。
7. 賈聯盟，劉柳，董群，方積年：猴頭菇子實體中的主要多糖成分。中草藥 2005； 36(1)：10-12。
8. 楊國峰，周建新：食品微波殺有關問題的探討。食品科學 2006；27(10): 593-596。
9. 魯海波，羅莉范，胡常春：甜酒釀罐裝滅菌工藝的研究。釀酒科技 2007；160:48-50。
10. 廖仁宏：固態培養生產靈芝菌絲體之研究。私立東海大學化學工程學系碩士論文 2003。台中。
11. 鄭藝梅，王明才，華平：發芽糙米微波乾工藝研究。糧食與飼料工業 2005； 11：1-2。
12. 韓德權：微波殺菌在中藥生產中的應用研究。黑龍江大學自然科學學報 2004；21(2)：138-140。
13. 樊偉偉，黃惠華：微波殺菌技術在食品工業中的應用。食品與機械 2007；23(1)：143-147。
14. Abbasi S, and Azari S: Novel microwave-freeze drying of onion slices. *Int J Food Sci Tech* 2009; 44(5): 974-979.
15. Ao ZH, Xu ZH, Lu Z-M, Xu HY, Zhang XM, and Dou WF: *Niuchangchih (Antrodia camphorata)* and its potential in treating liver diseases. *J*

- Ethnopharmacol* 2009; 121(2): 194-212.
16. Chen CJ, Su CH, and Lan MH: Study on solid cultivation and bioactivity of *Antrodia camphorata*. *Fung Sci* 2001; 16(1,2): 65-72.
  17. Chen YS, Pan JH, Chiang BH, Lu FJ, and Sheen LY: Ethanolic extracts of *Antrodia cinnamomea* mycelia fermented at varied times and scales have differential effects on hepatoma cells and normal primary hepatocytes. *J Food Sci* 2008; 73(7): H179-185.
  18. Christel, QD, Bernard, G, Jacques, V, Thierry, D, Claude, B, Michel, L, Micheline, C, Jean-Cluade, C, Francois, B, and Francis, T: Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *J Ethnopharmacol* 2000; 72: 35-42.
  19. Clary C, Gamache A, Cliff M, Fellman J, and Edwards C: Flavor and aroma attributes of riesling wines produced by freeze concentration and microwave vacuum dehydration. *J Food Processing Pres* 2006; 30(4): 393-406.
  20. Coronel P, Simunovic J, Sandeep KP, Cartwright GD, and Kumar P: Sterilization solutions for aseptic processing using a continuous flow microwave system. *J Food Eng* 2008; 85(4): 528-536.
  21. Dinis TCP, Madeira VMC, and Almeida LM: Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-amino salicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys* 1994; 315: 161-169.
  22. Dubois, M, Gilles, KA, Hamilton, JK, Rebers, PA, and Smith, F: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1956; 28: 350-356.
  23. Duan X, Zhang M, Mujumdar AS, and Wang S: Microwave freeze drying of sea cucumber (*Stichopus japonicus*). *J Food Eng* 2010; 96(4): 491-497.
  24. Hsu YL, Kuo PL, Cho CY, Ni WC, Tzeng TF, Ng LT, Kuo YH, and Lin CC: *Antrodia cinnamomea* fruiting bodies extract suppresses the invasive potential of human liver cancer cell line PLC/PRF/5 through inhibition of nuclear factor [kappa]B pathway. *Food Chem Toxicol* 2007; 45(7): 1249-1257.
  25. Holker U, Hofer M, and Lenz J: Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biot*

- 2004; 64: 175-182.
26. Huang SJ, Tsai SY, and Mau JL: Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agrocybe cylindracea*. *LWT - Food Sci Tech* 2006; 39(4): 379-387.
  27. Lin JH, Wu TZ, and Chou JC: In vitro induction of fruiting body in *Antrodia cinnamomea*-a medicinally important fungus. *Bot Stud* 2006; 47(3): 267-272.
  28. Liu DZ, Liang HJ, Chen CH, Su CH, Lee TH, Huang CT, Hou WC, Lin SY, Zhong WB, Lin PJ, Hung LF, and Liang YC: Comparative anti-inflammatory characterization of wild fruiting body, liquid-state fermentation, and solid-state culture of *Taiwanofungus camphoratus* in microglia and the mechanism of its action. *J Ethnopharmacol* 2007; 113(1): 45-53.
  29. Mau JL, Lin HC, and Song SF : Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Res Int* 2002; 35: 519–526.
  30. Oyaizu M: Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* 1986; 44: 307-315.
  31. Pandit RB, Tang J, Liu F, and Mikhaylenko G: A computer vision method to locate cold spots in foods in microwave sterilization processes. *Pattern Recogn* 2007; 40: 3667-3676.
  32. Sato K, and Sudo S: Small-scale solid-state fermentations. *Manual Ind Microbiol Biot* 1999; 2: 61-63.
  33. Shih IL, Pan K, and Hsieh C: Influence of nutritional components and oxygen supply on the mycelial growth and bioactive metabolites production in submerged culture of *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochem* 2006; 41(5): 1129-1135.
  34. Shimada K, Fujikawa K and Nakamura T: Anti-oxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J Agric Food Chem* 1992; 40: 945-948.
  35. Shu CH, and Lung MY: Effect of culture pH on the antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture. *J Chin Inst Chem Eng* 2008; 39(1): 1-8.

36. Wang Y, Wig TD, Tang J and Hallberg LM: Dielectric properties of foods relevant to RF and microwave pasteurization and sterilization. *J Food Eng* 2003; 57: 257-268.
37. Wang R, Zhang M, and Mujumdar AS: Effect of food ingredient on microwave freeze drying of instant vegetable soup. *LWT - Food Sci Tech* 2010a; 43(7): 1144-1150.
38. Wang R, Zhang M, and Mujumdar AS: Effects of vacuum and microwave freeze drying on microstructure and quality of potato slices. *J Food Eng* 2010b; 101(2): 131-139.

## 陸、圖表

表一、裝有 2 mL 含牛樟菌之 PDB 樣品瓶在 60-90°C 水浴槽中加熱後的存活情形

Table 1. The survivor of *Antrodia cinnamomea* in heating 2 mL PDB at 60-90°C after 11-days cultivation.

Temperature (°C)	Time (s)					
60	0	30	60	90	120	150
	Y	Y	Y	N	N	N
70	0	25	50	75	100	125
	Y	Y	N	N	N	N
80	0	20	40	60	80	120
	Y	N	N	N	N	N
90	0	20	40	60	80	120
	Y	N	N	N	N	N

Y: growth, N: death

表二、裝有 10 g 含牛樟菌之小麥基質試管在 60-90°C 水浴槽中加熱後的存活情形

Table 2. The survivor of *Antrodia cinnamomea* in 10 g solid-state wheat medium at 60-90°C after 5-days cultivation

Temperature(°C)	Time(s)						
	0s	60s	120s	180s	240s	300s	600s
60	Y	Y	Y	Y	N	N	N
70	Y	Y	N	N	N	N	N
80	Y	N	N	N	N	N	N
90	Y	N	N	N	N	N	N

Y: growth, N: death

表三、微波輸出功率對微波冷凍乾燥 50 g 牛樟芝子實體之乾燥速率和能量損耗的影響

Table 3. Effect of microwave input power on drying rate and energy consumption of 50 g *Antrodia cinnamomea* fruiting body by microwave freeze-drying

Power (W)	Drying rate (g water /hr)	Regression	r <sup>2</sup>	Energy (kJ)
30	13.289	$y = -13.289x + 45.625$	0.999	8388
50	23.467	$y = -23.467x + 53.948$	0.978	5140.8
70	32.737	$y = -32.737x + 54.246$	0.962	3499.2
FD				101347.2

表四、不同凍乾方法對牛樟芝子實體之抗氧化成分的影響

Table 4. Effect of freeze-drying methods on antioxidant components of *Antrodia cinnamomea* fruiting body

Components	Freeze-drying	Microwave freeze-drying
Crude polysaccharides (%)	5.82±0.27	5.99±0.54
Total phenol (mg/g)	2.336±0.129*	1.674±0.102
Flavonoid (mg/g)	2.188±0.085	2.795±0.079
Crude triterpenoids (%)	3.09±0.12	2.79±0.24

Data are expressed as mean ± S.D. (n=3).

\* Means in the same raw with different superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

表五、不同乾燥方法對猴頭菇之復水率及色澤的影響

Table 5. Effect of drying methods on rehydration ratio and color of *Hericium erinaceus* fruiting body

	Freeze-drying	Microwave freeze-drying	50°C Hot drying
Rehydration ratio	4.56±0.15 <sup>c</sup>	2.73±0.21 <sup>b</sup>	2.27±0.45 <sup>a</sup>
L*	65.91±0.01 <sup>c</sup>	53.05±0.22 <sup>b</sup>	47.19±0.79 <sup>a</sup>
a*	7.67±0.03 <sup>b</sup>	7.34±0.13 <sup>a</sup>	9.77±0.19 <sup>c</sup>
b*	27.19±0.03 <sup>b</sup>	33.3±0.06 <sup>c</sup>	23.32±0.46 <sup>a</sup>

Data are expressed as mean ± S.D. (n=3).

<sup>a-c</sup> Means in the same raw with different superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

表六、不同乾燥方法對猴頭菇之抗氧化成分的影響

Table 6. Effect of drying methods on antioxidant components of *Hericium erinaceus* fruiting body

Components	Freeze-drying	Microwave freeze-drying	50°C Hot drying
Polysaccharide (%)	5.51±0.08 <sup>a</sup>	5.75±0.08 <sup>a</sup>	5.85±0.5 <sup>a</sup>
Total phenol (mg/g)	9.22±0.05 <sup>b</sup>	8.13±0.02 <sup>a</sup>	8.31±0.25 <sup>a</sup>
Flavonoid (mg/g)	0.842±0.006 <sup>c</sup>	0.726±0.003 <sup>b</sup>	0.272±0.003 <sup>a</sup>

Data are expressed as mean ± S.D. (n=3).

<sup>a-c</sup> Means in the same raw with different superscript letters are significantly different (p < 0.05).

表七、不同乾燥方對猴頭菇之抗氧化能力的影響

Table 7. Effect of drying methods on antioxidant activity of *Hericium erinaceus* fruiting body

Antioxidant activities	Freeze-drying	Microwave freeze-drying	50°C hot drying
Scavenging DPPH ability (%)	93.78±0.07 <sup>b</sup>	92.88±0.39 <sup>b</sup>	88.56±0.99 <sup>a</sup>
Chelating Fe <sup>2+</sup> ability (%)	93.05±0.32 <sup>c</sup>	87.75±0.63 <sup>b</sup>	83.55±2.25 <sup>a</sup>
Reducing power (Abs700nm)	1.31±0.04 <sup>b</sup>	1.28±0.11 <sup>b</sup>	0.03±0.01 <sup>a</sup>

Data are expressed as mean ± S.D. (n=3).

<sup>a-c</sup> Means in the same raw with different superscript letters are significantly different (p < 0.05).

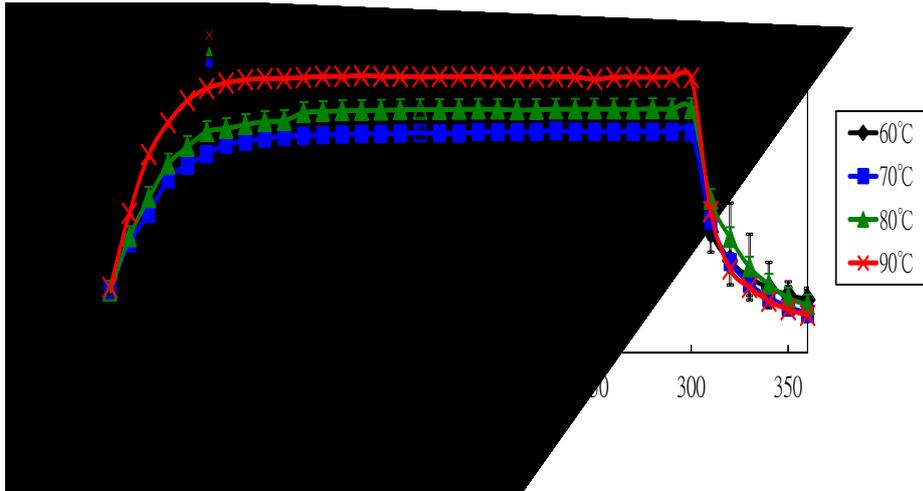
表八、微波冷凍乾燥對固態發酵猴頭菇子實體及菌絲體之抗氧化性質的影響

Table 8. Effect of microwave freeze-drying on antioxidant properties of *Hericium erinaceus* solid-state fermented fruiting body and mycelium

Antioxidant properties	Fruiting body	Mycelium
Polysaccharide (%)	8.11±0.14*	14.31±1.06
Total phenol (mg/g)	7.92±0.04*	8.04±0.05
Flavonoid (mg/g)	0.726±0.003*	0.734±0.004
Scavenging DPPH ability (%)	91.68±0.15*	94.98±0.22
Chelating Fe <sup>2+</sup> ability (%)	71.66±0.32*	62.56±3.02
Reducing power (Abs700nm)	1.8±0.05*	0.9±0.16

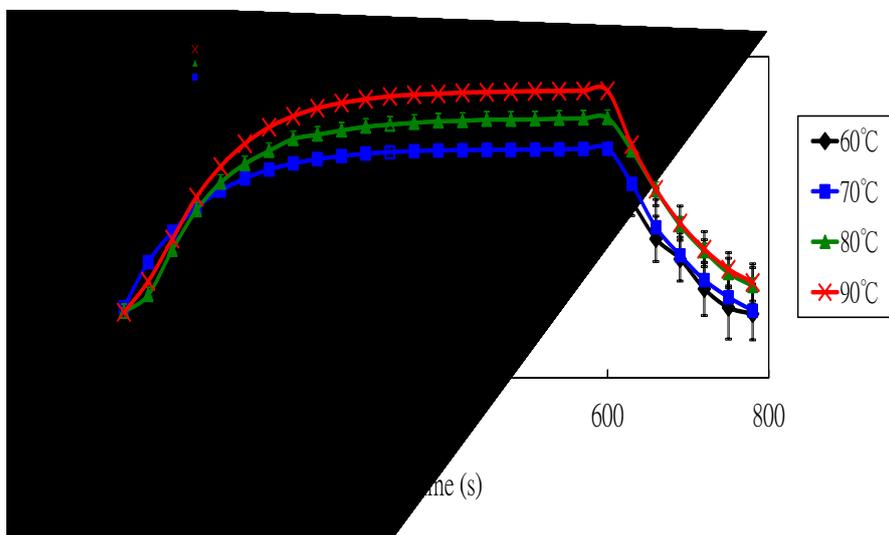
Data are expressed as mean ± S.D. (n=3).

\* Means in the same row with different superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).



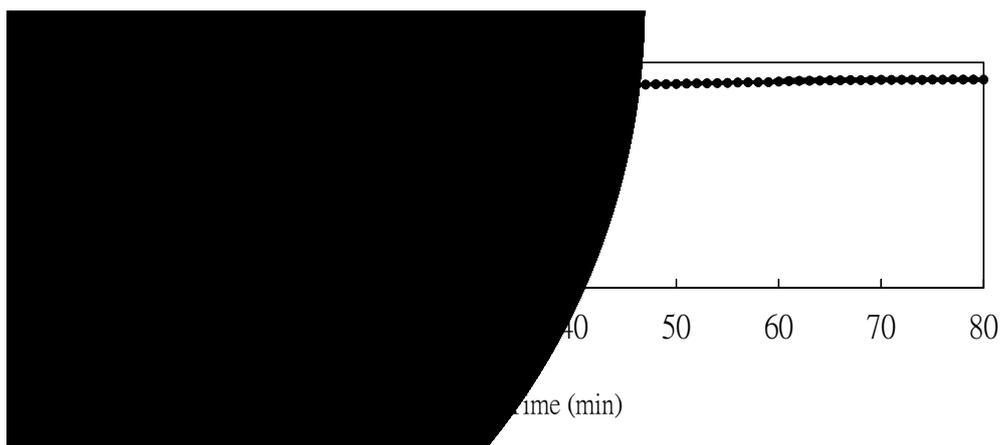
圖一、裝有 2 mL PDB 樣品瓶在不同溫度水浴槽中加熱及冰浴冷卻的溫度曲線

Fig. 1. Temperature profiles of 2 mL PDB by different temperature heating and cooling.

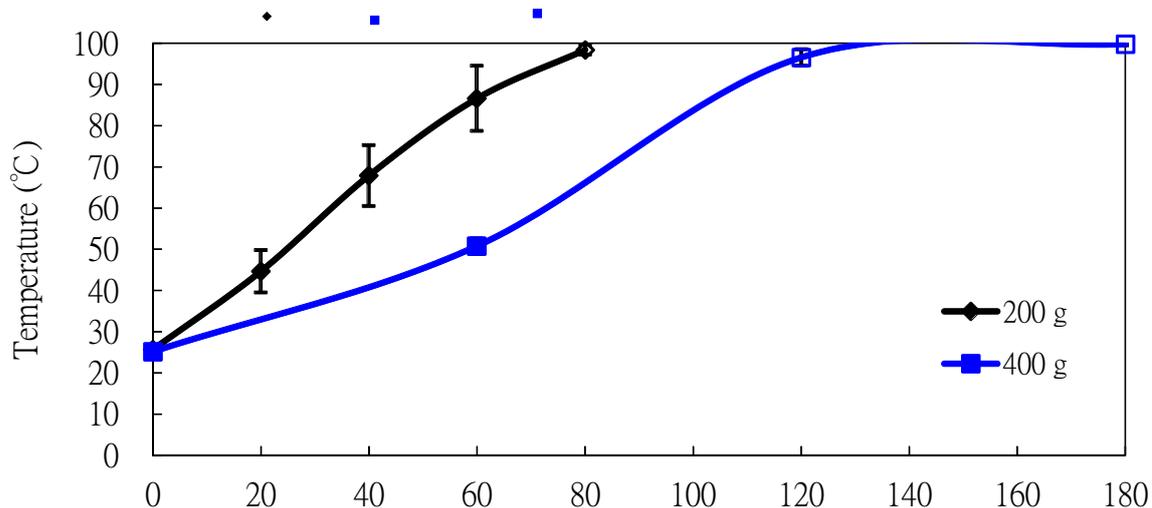


圖二、裝有 10 g 小麥基質的試管在不同溫度水浴槽中加熱及冰浴冷卻的溫度曲線

Fig. 2. Temperature profiles of 10 g solid-state wheat medium by different temperature heating and cooling.



圖三、裝於玻璃瓶的 100 g 小麥固態基質於 80°C 水浴槽中加熱的升溫曲線  
 Fig. 3. Temperature profile of 100 g solid-state wheat medium in a glass jar heating at 80°C water bath.

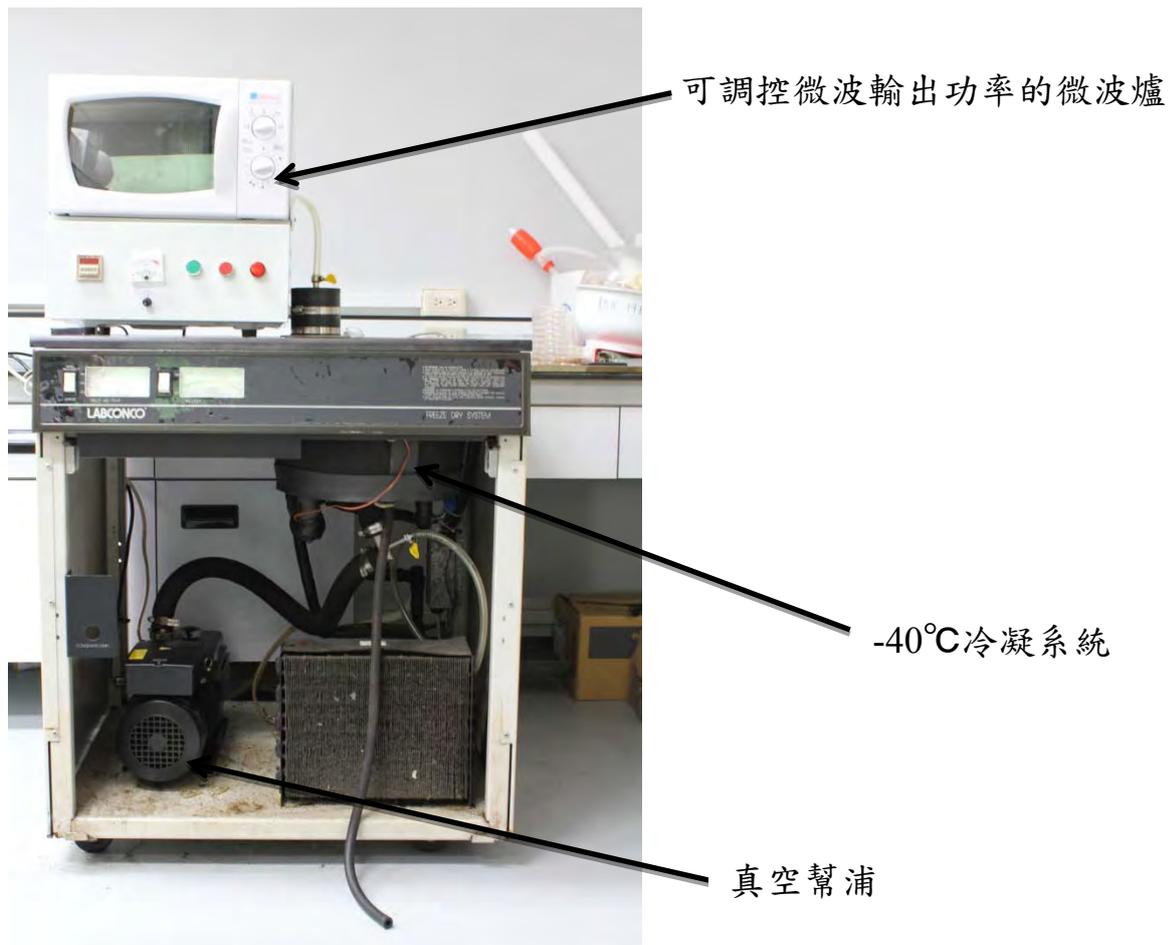


圖四、分別裝於玻璃瓶的 200 g 和 400 g 小麥固態基質於 700 W 微波爐中加熱的升溫曲線。  
 Fig. 4. Temperature profiles of 200 g and 400 g solid-state wheat medium in a glass jar heating at a 700 W microwave oven.



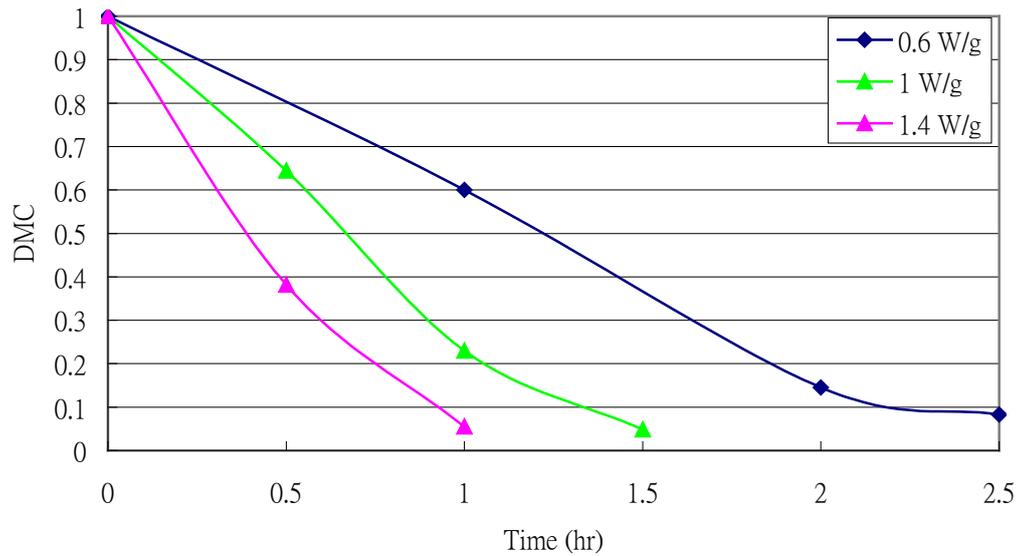
圖五、連續式微波殺菌及無菌包裝設備

Fig. 5. Continuous microwave pasteurization and aseptic package apparatus.



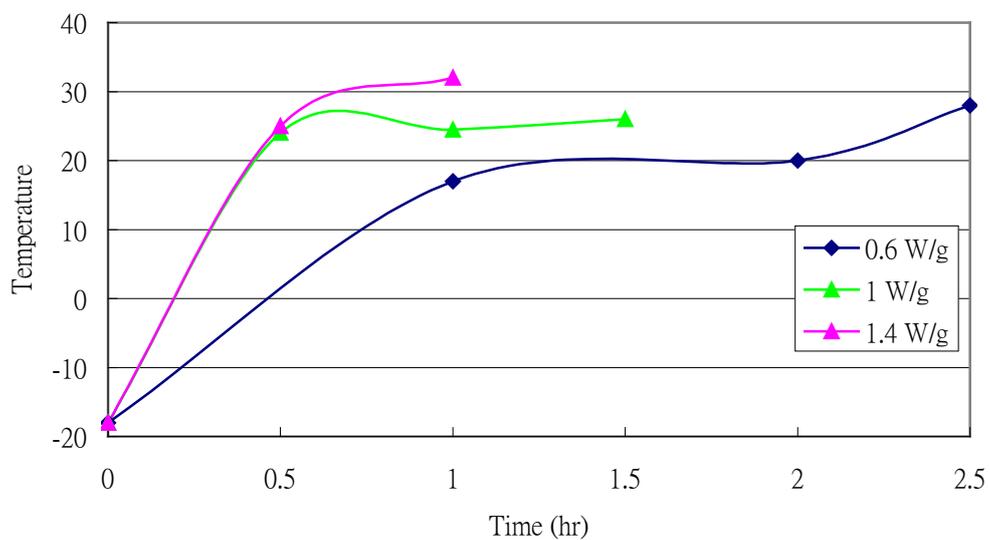
圖六、微波冷凍乾燥機(本實驗室自行研發組裝)

Fig. 6. Microwave freeze drier.



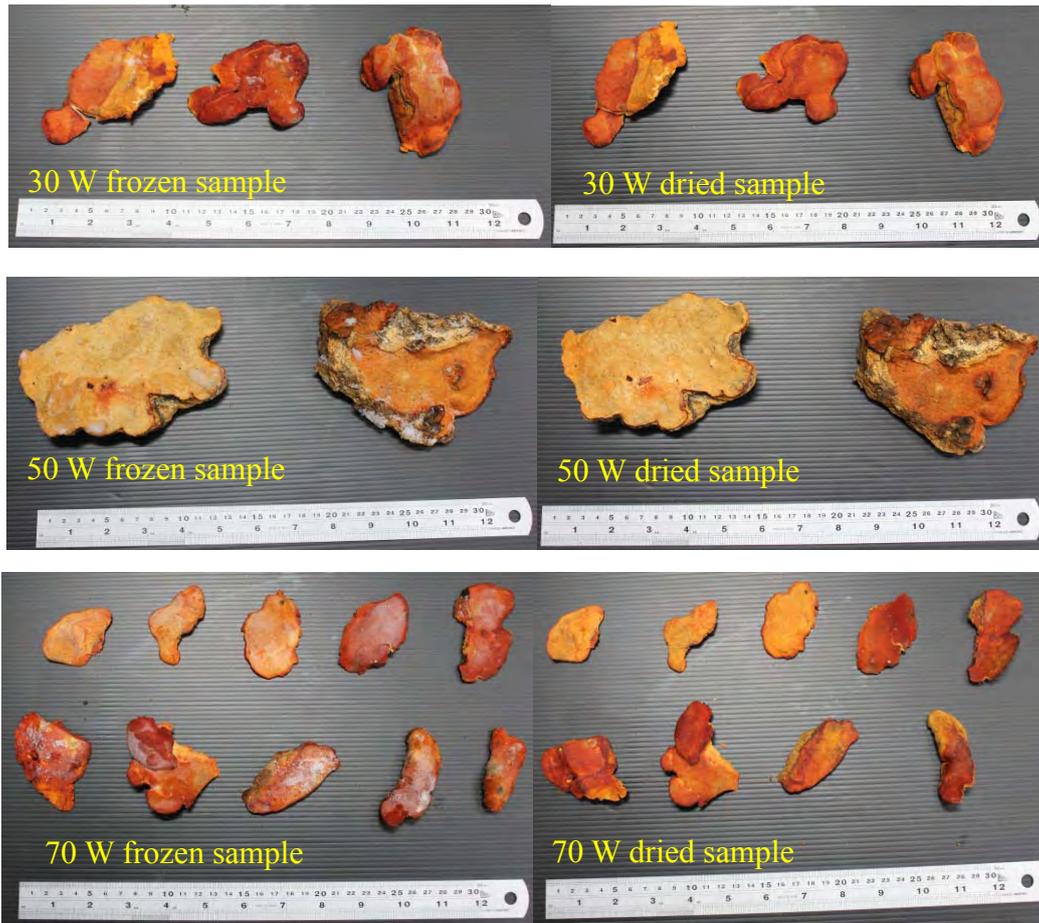
圖七、不同微波功率下微波冷凍乾燥牛樟芝子實體的乾燥曲線。

Fig. 7. Drying curves of *Antrodia cinnamomea* fruiting body by microwave freeze-drying with different microwave power inputs.



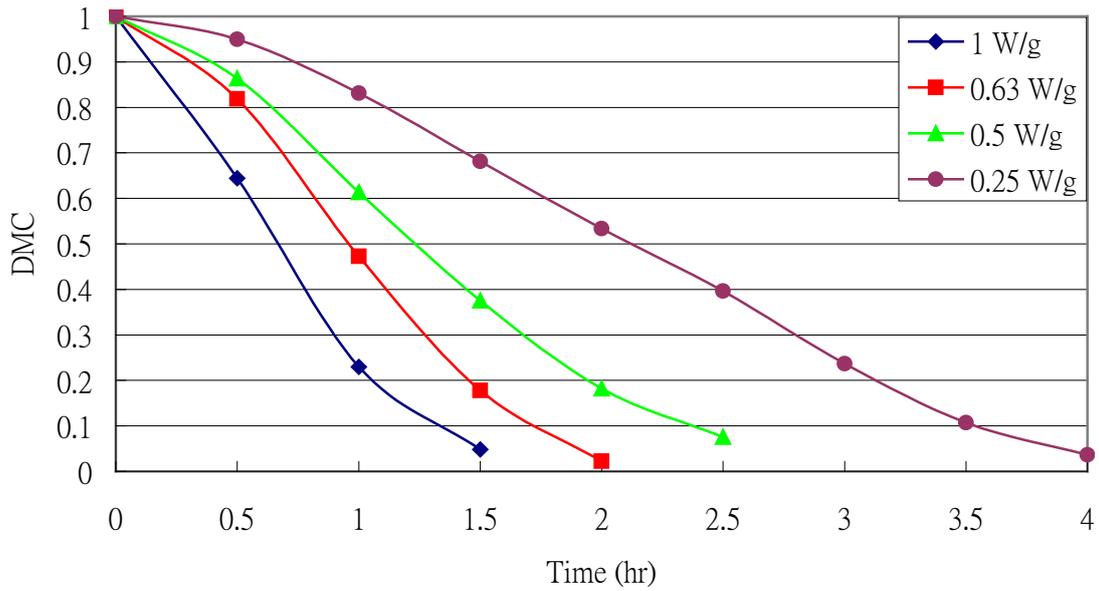
圖八、不同微波功率下微波冷凍乾燥牛樟芝子實體的溫度變化曲線。

Fig. 8. Temperature-time profiles of *Antrodia cinnamomea* fruiting body by microwave freeze-drying with different microwave power inputs.



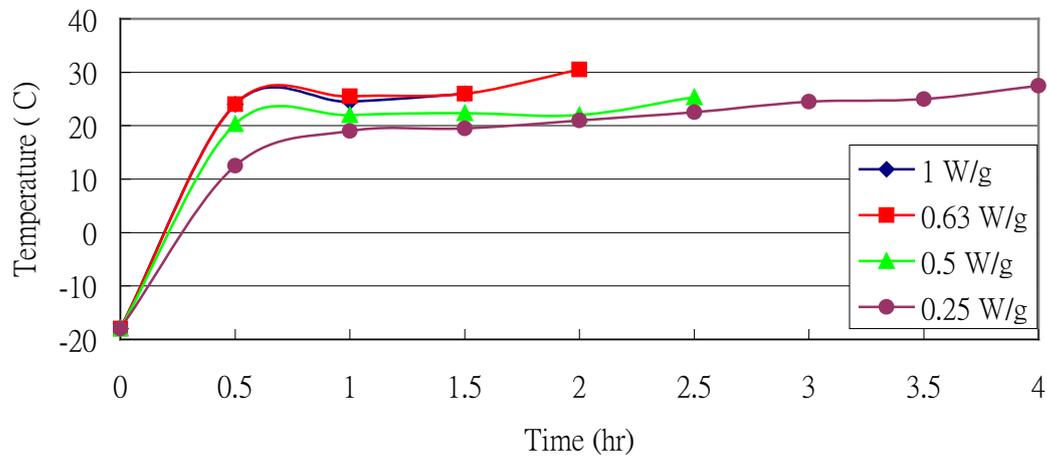
圖九、微波冷凍乾燥前和後牛樟芝子實體的相片(a) 30 W (b) 50W 和 (c) 70W。

Fig. 9. Pictures of *Antrodia cinnamomea* fruiting body by microwave freeze-drying with different microwave power inputs (a) 30 W (b) 50W and (c) 70W.



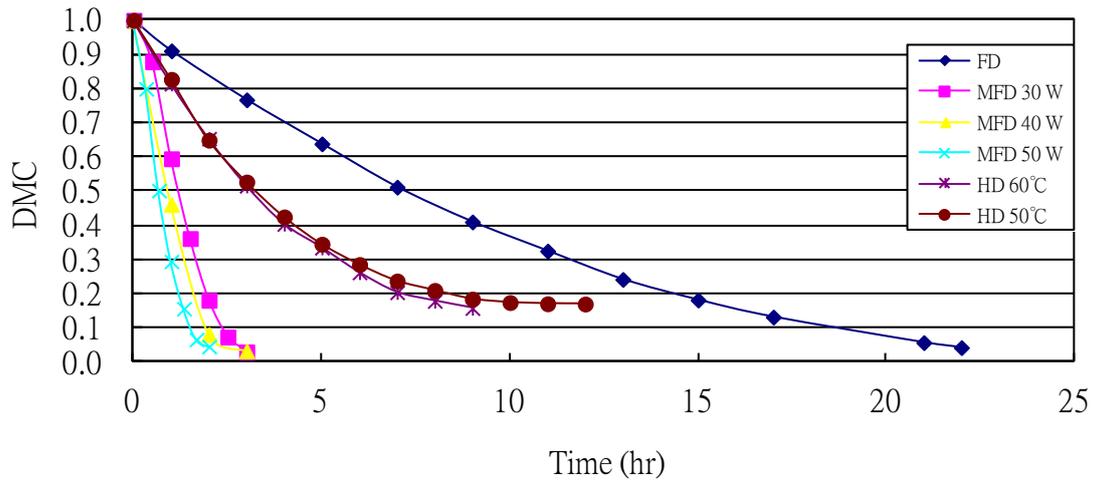
圖十、不同重量牛樟芝子實體之固定 50 W 微波冷凍乾燥之乾燥曲線。

Fig. 10. Drying curves of different weight of *Antrodia cinnamomea* fruiting body by 50 W microwave freeze-drying.



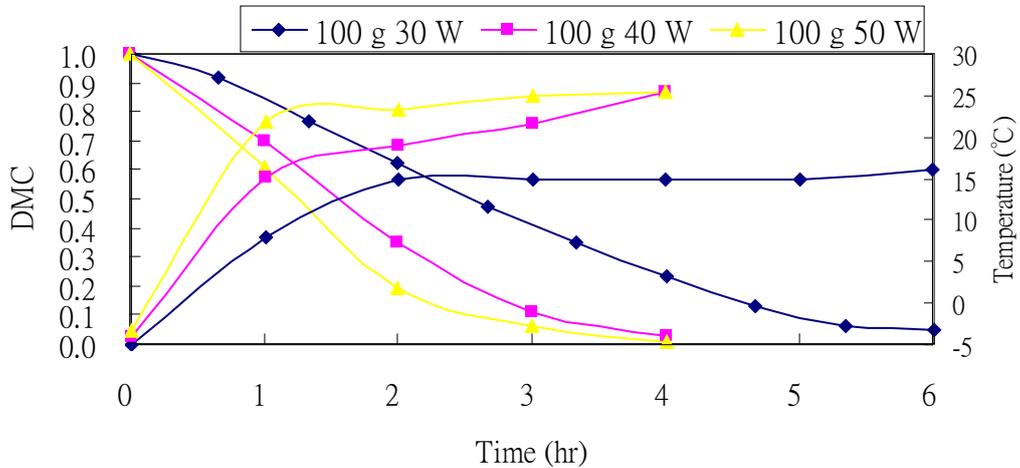
圖十一、不同重量牛樟芝子實體之固定 50 W 微波冷凍乾燥之溫度變化曲線。

Fig. 11. Temperature-time profiles of different weight of *Antrodia cinnamomea* fruiting body by 50 W microwave freeze-drying.



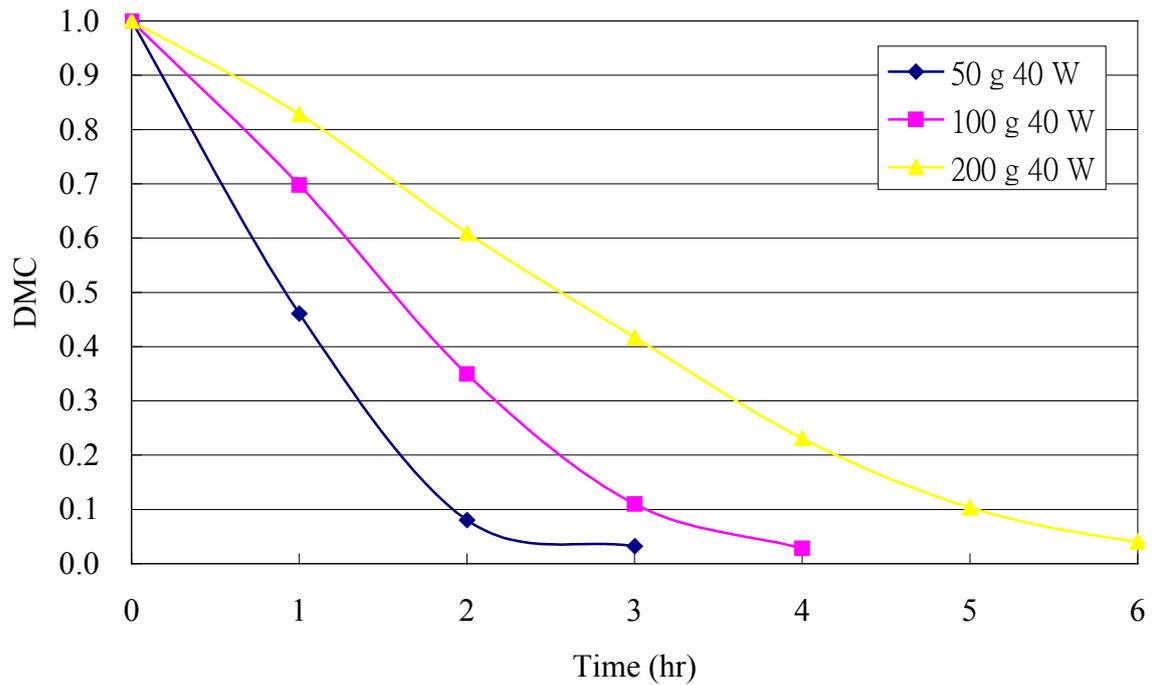
圖十二、不同乾燥方法之猴頭菇乾燥曲線

Fig. 12. Drying curves of *Hericium erinaceus* fruiting body by different drying methods (FD: Freeze-drying, MFD: Microwave freeze-drying, HD: Hot air drying).



圖十三、不同微波功率之微波冷凍 100g 猴頭菇的乾燥曲線及溫度變化曲線

Fig. 13. Drying curves and temperature-time profiles of 100 g *Hericium erinaceus* fruiting body by microwave freeze-drying with different microwave power inputs.



圖十四、40W 微波冷凍乾燥對不同重量乾燥猴頭菇之乾燥曲線。

Fig. 14. Effect of microwave power and sample weight on drying curves of *Hericium erinaceus* fruiting body by 40 W microwave freeze-drying.



圖十五、不同乾燥方法之乾燥猴頭菇子實體相片。 a: 熱風乾燥 b: 冷凍乾燥 c: 微波冷凍乾燥

Fig. 15. Pictures of different dried *Hericium erinaceus* fruiting body. a: hot air drying b: freeze-drying c: microwave freeze-drying

## 台灣產黃花石斛健康食品之開發(2-2)

林文川  
中國醫藥大學醫學系

### 摘 要

多醣在保健功效扮演重要的角色，多醣是石斛類藥材主要成分。在第二年計畫，我們設計了實驗模式來評估黃花石斛多醣及金皇石斛多醣對小鼠先天免疫、塵蟎誘發過敏及氧化偶氮甲烷誘發小鼠大腸息肉的效果。結果顯示，黃花石斛多醣及金皇石斛多醣兩者可以調節免疫功能、抗過敏及預防大腸癌產生。本試驗也進行黃花石斛粗萃物及黃花石斛多醣的安全性評估。連續 13 週對雌、雄大鼠經口投予黃花石斛粗萃物，無明顯有害效應劑量高於 2.1g/kg。小鼠致畸性試驗無明顯有害效應劑量高於 2.1g/kg，基因毒性試驗包含 Ames 試驗、染色體異常分析及微核試驗，結果顯示沒有基因毒性。連續 4 週對雌、雄大鼠經口投予黃花石斛多醣，無明顯有害效應劑量高於 0.6g/kg。結論，這些結果顯示黃花石斛多醣有潛力開發成健康食品。

關鍵詞：黃花石斛、金皇石斛、免疫調節、抗過敏、大腸癌、安全性評估

# Health Foods Development in *Dendrobium* *Tosaense* of Taiwan (2-2)

Wen-Chuan Lin  
School of Medicine, China Medical University

## ABSTRACT

The polysaccharides play an important role on the health benefits. Polysaccharide is major component of *Dendrobii Herba*. In the second year of the plan, we design the experimental models to evaluate the effect of both polysaccharide fraction of *D. tosaense* (DTPS) and *D. Taiseed Tosnobile* (DTTPS) on innate immunity, mite induced allergy and azoxymethane-induced aberrant crypt foci in mice. The results showed that both DTPS and DTTPS possessed immunomodulatory activities, anti-allergy and colon cancer prevention. In addition, the safety evaluation of crude extract of *D. tosaense* (DTE) and DTTPS also performed. Repeated dosing toxicity study was carried out by orally administering of DTE to groups of male and female rats for 13 weeks. The no-observed adverse effect level is higher than 2.1 g/kg in rats. Reproductive test study indicated no-effect dose level of DTE was greater than 2.1 g/kg in mice. The results of three genotoxicity studies, including Ames test, CHO-K1 chromosomal aberration test, and micronucleus test, demonstrated that DTE had no genotoxicity. Repeated dosing toxicity study was carried out by orally administering of DTTPS to groups of male and female rats for 4 weeks. The no-observed adverse effect level is higher than 0.6 g/kg in rats. In conclusion, these results showed that DTTPS has the potential to develop into a health food.

Keywords: *Dendrobium tosaense*, *Dendrobium Taiseed Tosnobile*, immunomodulation, anti-allergy, colon cancer, safety evaluation

## 壹、前言

石斛類藥材為蘭科(Orchidaceae)石斛蘭屬(*Dendrobium*)之藥用植物，被稱之為中藥中的仙草，始載於《神農本草經》上品。根據沈氏對石斛的考證指出，霍山石斛是傳統應用石斛的正品；在《本草綱目拾遺》中所記載的霍山石斛應包括霍山石斛(*Dendrobium huoshanense*)、黃花石斛(*D. tosaense*)及鐵皮石斛(*D. candidum*)等 3 種<sup>1</sup>。2005 年版的大陸中藥典收載的石斛是鐵皮石斛(*D. candidum*)、金釵石斛(*D. nobile*)及馬鞭石斛(*D. fimbriatum*)。由於霍山石斛(*D. huoshanense*)的生長條件極為苛刻和長期無節制採集，因此產量很少市場根本無法買到，基於保育的觀點，因此沒有被大陸藥典收載。大陸石斛的研究以金釵石斛及鐵皮石斛為主<sup>2,3</sup>。

黃花石斛屬台灣原生種<sup>4</sup>，被認為是霍山石斛正品之一。霍山石斛植株較小不易量產，黃花石斛所具的黏性與霍山石斛相近，但植株較大，易於量產。在台中縣新社鄉的「種苗改良繁殖場」可以提供大量組織培養的黃花石斛，由於研究材料可以掌控，因此在保健產品的開發上有其優勢。

開發黃花石斛成為健康食品首要工作應先確認其可能的保健功效，本計畫是第二年延續性計畫，繼續評估黃花石斛是否有免疫調節、改善過敏體質及預防大腸癌的效果。同時以種苗場提供的金皇石斛(*Dendrobium Taiseed Tosnobile*)為對照品。金皇石斛是黃花石斛與金釵石斛的交配種，是種苗場培育的新品種。為奠立黃花石斛開發為健康食品的基礎，本年度也將安全性評估包括 90 天餵食毒性試驗、致畸性試驗及基因毒性試驗列入計畫。這些結果是黃花石斛進一步研發的重要依據。

## 貳、材料與方法

### 一、試驗材料製備

黃花石斛(*D. tosaense*)及金皇石斛(*D. Taiseed Tosnobil*)由「種苗改良繁殖場」提供，兩種材料乾品以熱水萃取，減壓濃縮後儲存於-20°C 備用。黃花石斛水萃物簡稱 DTE。

黃花石斛多糖(DTPS)及金皇石斛多糖(DTTPS)之製備，黃花石斛或金皇石斛水懸浮液以 4 倍體積 95%酒精沉降得到粗多糖，以此粗多糖進行動物實驗。

粗多糖以  $\alpha$ -amylase、protease 及 amyloglucosidase (Megazyme, Wicklow, Ireland)消化後得到不可消化石斛多醣，不可消化石斛多醣進一步經管柱流洗純化後，以 HPLC (Metrohm, Zofingen, Switzerland)定單醣組成及分子量，以 GC-Mass (Agilent, CA)分析鍵結型式。使用市售的分析試劑(Megazyme, Ireland)定 glucomannan 含量。

### 二、動物

28 天及 90 天餵食毒性試驗使用 SD 大鼠，致畸性試驗及微核試驗使用 ICR 小鼠，皆購自樂斯科生物科技股份有限公司。飼養室溫度控制在  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ，明、暗各十二小時的環境。使用飼料為 LabDiet (PMI Nutrition LLC, Brentwood, USA)，飲水經過逆滲透處理。所有動物實驗過程皆依照中國醫藥大學實驗動物管理小組規定。

### 三、DTPS 及 DTTPS 抑制大腸息肉試驗

每批使用 BALB/c 小鼠 80 - 96 隻分成 5 - 6 組，每組 16 隻。其中 1 組為控制組，4 - 5 組為腸息肉造型組，造型組 4 - 5 組分別為水組、試驗物質 2 - 3 個劑量組及正對照組(使用 aspirin 或 butyric acid;購自 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。在實驗第一與第二週，小鼠腹腔注射 Azoxymethane (AOM; 10 mg/kg; Sigma-Aldrich)以誘導腸息肉發生，同時每日經口投與試驗物質，實驗進行滿六周將動物犧牲取其結腸。每組 8 隻之結腸進行息肉數目計數，另 8 隻之結腸黏膜組織進行 RT-PCR 分析。

#### (一) 異常腺窩與異常腺窩灶計數

結腸以冰冷的生理食鹽水清洗，移去腸內容物，縱剖開來，攤平在吸滿 10%中性福馬林緩衝液的濾紙上，24 小時後以 0.2% methylene blue 染色 30 min，然後在顯微鏡下以觀察 AOM 所誘發之小鼠腸道異常腺窩 (aberrant crypt, AC) 及異常腺窩灶 (aberrant

crypt foci, ACF) 的生成數量。

## (二) RT-PCR 分析

結腸黏膜組織以玻璃片刮取，再用 Trizol 抽取總 RNA。利用反轉錄酶在 37°C 下反應一小時，得 cDNA。而後以此 cDNA 為模板加入目標基因的引子進行 PCR 分析，與探討 AOM 與石斛多醣對腸黏膜細胞基因表現上的關係與可能的機制。使用的引子序列如下表：

Gene (mRNA)	bp		Primer sequence
Aldose reductase	184	F R	CACATTTGCCGGTCCGGGTT GTACACCTGGGCGCAGTCAA
$\beta$ -catenin	394	F R	GGTGGACTGCAGAAAATGGT GCTGCACTAGAGCCCAAGG
COX-2	601	F R	GCATTGCCTCTGAATTCAACACAC GGACACCCCTTCACATTATTGCAG
Caspase3	331	F R	TCAGAGAGACATTCATGGGC CAAGCCATCTCCTCATCAGT
GSH reductase	283	F R	TGAGCCGCCTGAACACCATC TCCACAGCAATGTACCCGGC
GAPDH	77	F R	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA CCTGCTTCACCACCTTCTTGA
(HO-1)	200	F R	GAGCAGAACCAGCCTGAACTA GGTACAGAAAAGCCATCACCA
iNOS	286	F R	TCACCTTCGAGGGCAGCCGA TCCGTGGCAAAGCGAGCCAG

## 四、DTPS 及 DTTPS 調節先天性免疫功能試驗

每批使用 BALB/c 小鼠 48 隻分成 4 組，每組 12 隻。其中 1 組為控制組，試驗物質兩個劑量組及正對照組。小鼠每日經口投與試驗物質，實驗進行滿六周將動物犧牲，收集血清置於 -80°C 保存。摘取其脾臟與腸繫膜淋巴結，進行單細胞分離。

### (一) 表面標記分析

單細胞分離後，以螢光標定的抗體進行染色，然後利用流式細胞儀 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 進行分析。評估石斛多醣對 T 細胞、B 細胞、樹突細胞以及 NK 細胞活性的影響。

## (二)細胞增殖分析

單細胞分離並計數後，加入 96 孔盤中培養，以 ConA (Sigma-Aldrich)、LPS(Sigma-Aldrich)來測試脾臟或是淋巴結對 T 細胞與 B 細胞的增殖反應。培養時間終了，以 MTS 進行細胞增殖分析。

## (三)細胞激素分泌實驗

單細胞分離並計數後，以  $2 \times 10^6$ /mL 的濃度加入 24 孔盤中培養。利用 Con A 以及 LPS 來刺激這些免疫細胞。經過 24 到 48 小時的培養後，取其上清液。利用 ELISA 的方法測定其分泌的細胞激素含量。

## (四)自然殺手細胞活性

先培養自然殺手細胞的標的細胞 (YAC-1 細胞株)。並先將 YAC-1 細胞與螢光染劑 BCECF-AM (Sigma-Aldrich) 在一起培養 30 分鐘，洗去未噬入細胞的螢光染劑。此時再加入不同數目的單核球與已經與螢光標定 YAC-1 標的細胞一起培養，在培養一段時間後取出上清液，利用盤式螢光分析儀(Dynex technology, VA), 中以 485 nm 之激發光激發，再以 538 nm 之偵測波長測定螢光放射，經記錄後計算其毒殺活力。

## (五)吞噬細胞活性

測定單核球(monocyte)或是中性白血球的吞噬能力，利用 FITC label E. coli (Invitrogen, OR)，在細胞吞噬後加入 Trypan Blue solution 遮蔽未被吞入的 E coli，然後利用盤式螢光分析儀中以 485 nm 之激發光激發，再以 538 nm 之偵測波長測定螢光放射，經記錄後計算其吞噬能力。

## 五、DTPS 及 DTTPS 改善過敏體質試驗

依照衛生署公告的「健康食品之輔助調整過敏體質功能評估方法」，實驗動物使用 BALB/c 小白鼠以塵蟎抗原誘導呼吸道過度反應，以非麻醉呼吸道阻抗儀(Buxco, Troy, NY)進行分析。

每批使用 BALB/c 小鼠 70 隻分成 6 組，其中 1 組為控制組，5 組為過敏造型組，造型組 5 組分別為試驗物值各兩個劑量組，水組及正對照組(prednisolone)各一組。DTPS 或 DTTPS 經口投予 6 週後，腹腔注射 50  $\mu$ g/100  $\mu$ L/mice 之塵蟎(Derp, *Dermatophagoides pteronyssinus*, ImmunoCAP, Thermo Fisher Scientific, Phadia AB, Uppsala, Sweden) 與鋁膠佐劑致敏小

鼠(0.5 mg Derp with 2 mg AHG /kg mice)，隔週再免疫一次，經十四天後鼻腔滴注方式連續五天誘導呼吸道過敏反應，於最後一天抽血評估 Derp 特异性 IgE 之含量，並測定呼吸道阻力。

#### (一) 肺泡沖洗液分析

肺泡沖洗液分析為評估氣喘過敏小鼠肺部發炎浸潤中，發炎細胞分類之變化，推論其免疫調節之作用，小鼠利用二氧化碳麻醉，以 1 mL 針頭吸曲 1000  $\mu$ L PBS 三次分別沖洗肺泡，沖洗液離心 300  $\times$ g、4°C、5 分鐘收集上清液分析細胞激素及抗體，底部細胞使用流氏染色法分析細胞種類，肺臟使用 10%福馬林固定做 H&E 染色(Merck)染色。

#### (二) 脾淋巴球細胞激素分泌分析

脾淋巴球細胞激素分泌分析為評估具氣喘免疫調節小鼠之脾淋巴細胞再接觸過敏原之後之免疫調節作用，脾臟使用尼龍篩網過篩，將細胞定數為  $5 \times 10^6$  cells/mL 使用 25  $\mu$ g/mL Derp、5  $\mu$ g/mL Con A、10  $\mu$ g/mL LPS 培養 24、48、72 小時，使用 ELISA 三重複測量 IL-4、IL-5、IL-2、GCSF、TNF- $\alpha$ 及 IFN- $\gamma$  (eBioscience)。

#### (三) 免疫球蛋白分析

免疫球蛋白分析為評估調節免疫之健康食品，在抑制過敏性抗體上所扮演角色之評估，試驗以測量 Derp 專一性抗體 IgE, IgG1, IgG2 為主。以 ELISA (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX) 測量，10  $\mu$ g/ml Derp 溶於碳酸鈣緩衝液(pH 9.6)中，使用 96 孔盤 (Nunc, Roskilde, Denmark)，每一孔加入 100  $\mu$ L 反應 16 小時，再使用內含 BSA 之 PBS 為阻斷緩衝液之後，放入血清檢品與實驗室自製高單位 Derp 抗血清(positive)各 100  $\mu$ L 培養兩小時，使用 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgE antibody (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX)加入培養後清洗之後，使用 Tetramethyl- benzidine (TMB)當作受質，使用吸光值 450 nm ELISA reader (Multiskan, Thermo Labsystems)去測量結果。其濃度計算以 TMB 呈色後之吸光值 (Absorbencies,  $A$ )計算之，單位為 ELISA Unit (EU)，計算公式如下所示。

$$\text{ELISA units, EU} = (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})/(A_{\text{positive}} - A_{\text{blank}})$$

#### (四) 淋巴細胞分型

淋巴細胞分型為評估免疫組織、肺部沖洗液等部位之免疫細

胞分化之變化，具有評估免疫過度反應抑制之抗原表現與活化之免疫抗原指標。細胞經單離懸浮於培養液後，調整細胞數為 $1 \times 10^7$ ，取樣 $5 \times 10^5$ 細胞以 CD45、3、4、8、19、25、69, PanNK 等抗體分析 T、B、Treg、NK 等細胞。

#### (五) 組織切片

組織切片用來評估過敏反應中之肺部發炎細胞浸潤，肺臟經福馬林固定，以石蠟包埋後切片(5  $\mu$ M)，以 HE 及 PAS 染色法染色，經脫水封片後，於 100 $\times$ 光學顯微鏡下觀察拍照。

### 六、DTE 90 天餵食毒性試驗

實驗前雄鼠及雌鼠體重分別約為 187 g 及 166 g。分成四組，每組 20 隻(雌、雄各 10 隻)，每天一次分別經口投予 DTE 0.7、14、2.1 g/kg 或去離子水。

投藥期間每天觀察動物兩次，每週稱體重一次，於投藥終了前以代謝籠收集 20 小時尿液進行尿液分析。投藥終了，經一晚禁食後，在二氧化碳麻醉下，由腹腔動脈採血，供血液學及血清生化學檢查。取出臟器如腦、腦下垂體、甲狀腺、副甲狀腺、胸腺、心臟、肺臟、主動脈、肝臟、脾臟、腎臟、腎上腺、胃、腸、精囊、睪丸、前列腺、膀胱、子宮、卵巢、陰道、脊髓、坐骨神經等等浸於 10% 中性福馬林溶液，供病理切片檢查用。主要臟器如腦下垂體、腦、心臟、肝臟、脾臟、腎臟、腎上腺、睪丸、卵巢於浸泡中性福馬林溶液前稱重。

#### (一) 血液學檢查

使用全自動血液分析儀(Sysmex F-800, Nutley, USA)，檢測項目含紅血球計數、血紅素、血球容積、平均紅血球容積，平均紅血球血紅素濃度，平均紅血球血紅素量、血小板計數、白血球計數及分類。另使用血液凝固分析儀(CA-1500 Sysmex, Deerfield, IL, USA) 測定凝血酶時間、活化部分凝血活酶時間

#### (二) 血清生化學檢查

使用生化自動分析儀(Cobas Mira, Plus, Roche, Rotkreuz, Switzerland)測定，檢測項目包含麩氨酸草乙酸轉氨酶、麩氨酸丙氨基轉氨酶、 $\gamma$ -麩氨醯轉移酶、鹼性磷酸酶、總蛋白、白蛋白、球蛋白、總膽紅素、葡萄糖、血中尿素氮、肌酸 苷。鈉、鉀、氯、鈣、磷使用電解質分析儀(Bayer 644 Electrolyte Analyzer, Nutley, NJ, USA)分析。

### (三) 尿液分析

使用尿液檢驗試紙測定酸鹼度、比重、蛋白質、尿膽素原、膽紅素、尿糖。

### (四) 病理組織學檢查

大鼠臟器取出後浸於 10 % 中性福馬林溶液，高劑量組及對照組的臟器固定後進行石蠟包埋及切片製作，以蘇木青與伊紅染色法染色，供病理檢查。病理評估標準參照 Shackelford 氏等人的方法<sup>5</sup>。

病理評估委託國立中興大學獸醫學院廖俊旺教授判讀，標準如下表。

#### 病理評估標準

---

Observation fate:

---

#### **Gross finding:**

No abnormalities (NA)

Left (L); Right (R)

Bilateral (B)

Slight, +

Mild, ++

Moderate, +++

Severe, ++++

#### **Histopathological nomenclatures:**

No significant lesions (NSL)

Distribution: Focal, Multifocal, Local Extensive and Diffuse

Degree<sup>1</sup>: Slight, Moderate, and Severe

Duration: Acute, Subacute, and Chronic

Exudate: Serous, Fibrinous, and Purulent

Modification: Degeneration, Necrosis, ...

---

Severity of lesions was graded according to the methods described by Shackelford et al.<sup>5</sup> Degree of lesions was graded from one to five depending on severity: 1 = minimal (< 1%); 2 = slight (1-25%); 3 = moderate (26-50%); 4 = moderate/severe (51-75%); 5 = severe/high (76-100%).

## 七、DTE 致畸性試驗

### (一) 動物及交配

ICR 小鼠購自樂斯科生物科技股份有限公司。飼養室溫度控制在  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ，明、暗各十二小時的環境。使用飼料為 LabDiet (PMI Nutrition LLC, Brentwood, USA)，飲水經過逆滲透處理。懷孕母鼠的配種選擇發情期的雌鼠（可由陰道口腫大變紅判斷）與雄鼠共處一晚，隔天由雌鼠陰道殘留精栓判斷有無交配，交配成功的母鼠經 6 天後開始投予試驗物質。

### (二) 母鼠生長情況

懷孕母鼠 83 隻分成 4 組，每組 20-22 隻，懷孕第 6 天起至第 15 天，每天一次分別經口投與去離子水或 DTE 0.7、1.4、2.1 g/kg。投與劑量以懷孕第 6 天體重為準，不隨著體重增加而增加。

測量母鼠懷孕第 6、9、12、15 及 18 天體重，測量母鼠懷孕 6-9、9-12、12-15、15-18 天的攝食量。每天觀察一次以上並記錄動物死亡率、臨床症狀。

懷孕第 18 天，犧牲小鼠，剖開腹腔，以肉眼觀察是否有不正常組織。取出兩側卵巢，浸泡於中性福馬林溶液，供組織切片計數黃體數目。取出子宮，記錄著床數、早期或晚期被吸收數、及活與死仔鼠數。每一仔鼠稱重、分辨雌雄。每一胎盤稱重並檢視外觀是否異常。

### (三) 仔鼠檢查

將仔鼠含皮膚浸泡於 10% 中性福馬林溶液中 2~3 週，取出沖洗後，首先觀察外觀是否有腦部外露、眼球突出、脊椎歪裂、缺腳及手趾等異常。水組及最高劑量組每一胎中一半的仔鼠進行骨骼檢查，另一半進行仔鼠內臟組織檢查。

內臟檢查：將胎鼠沿口經耳作水平切面(Fig. 1A)，檢查上及下顎是否有異常(Fig. 1B)；頭部橫切 5 個切面 (Fig. 2A)，第 1 切面自鼻道中間橫切，觀察鼻道是否擴大，是否單鼻道等(Fig. 2B)；第 2 切面自眼球前沿切面及第 3 切面自眼球正中垂直切面，檢查眼球大小(Fig. 2C)，第 4 及 5 切面自眼球後沿垂直切面，檢查有無腦水腫等(Fig. 2D, 2E)；然後沿腹中線和肋下緣水平線各切一刀，檢查各臟器大小、位置等，再取出肝、腎及腸管等，觀察有

無病變，並檢查子宮和睪丸。

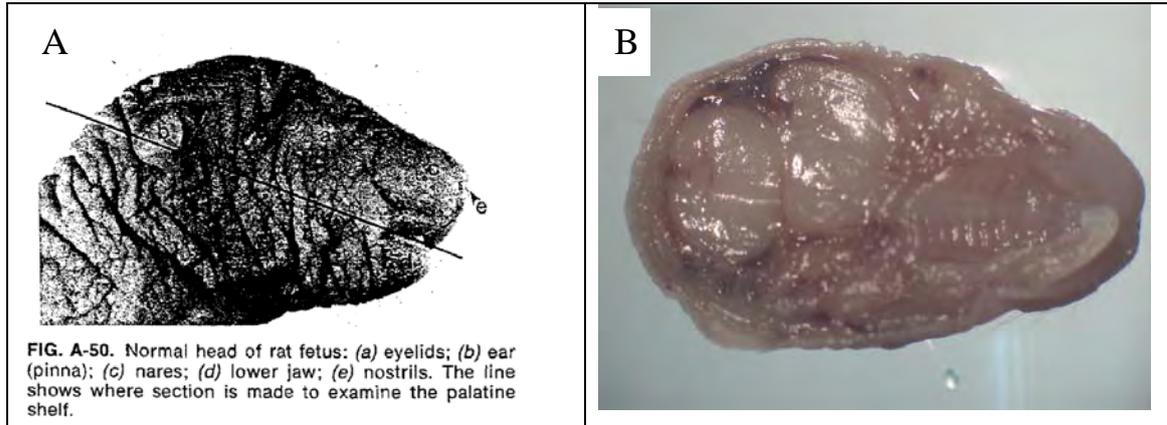


Fig. 1.

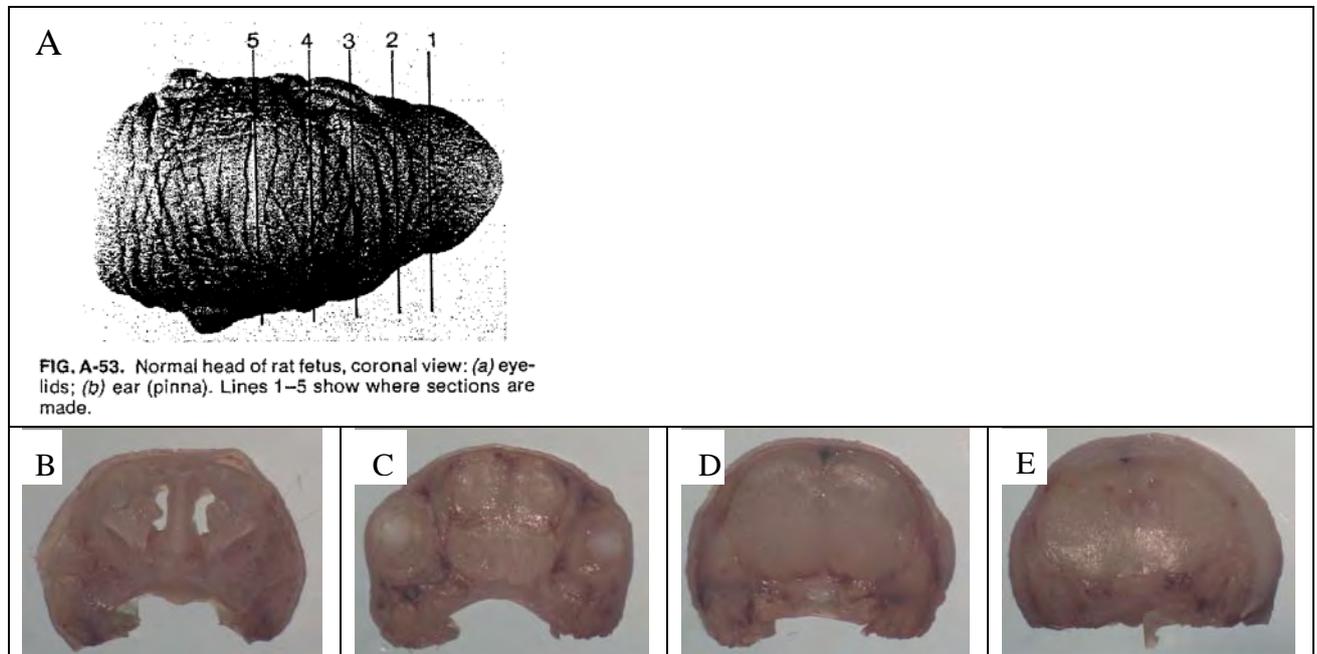


Fig. 2.

骨骼檢查：將仔鼠放入 10% 中性福馬林溶液中固定一週後，取出仔鼠置入 2% KOH 溶液 1 至 2 天，再置入 1% KOH 茜素紅溶液 2 至 3 天，其中每隔 12 至 24 小時換新鮮溶液一次。用自來水沖洗幾次，再放入新透明液(甘油 200 ml、KOH 10g 加去離子水至一公升)中 1 至 3 天，放入 50% 甘油中待檢查。用放大鏡觀察骨骼形態。

仔鼠內臟及骨骼檢查由國立中興大學獸醫學院廖俊旺教授判讀。

## 八、DTE 基因毒性試驗

### (一) 沙門氏菌(*Salmonella typhimurium*)回復突變試驗

依照 Maron 及 Ames 進行沙門氏菌回復突變之試驗<sup>6</sup>，使用之 TA98, TA100 菌株購自財團法人食品工業發展研究所(新竹，台灣)。TA102, TA1535, TA1537 菌株購自 Discovery Partners International (California, USA)。試驗前均進行菌株基因型確認試驗。先以 DTE 0.3、0.6、1.2、2.5 及 5 mg/plate 等濃度與菌株共同作用 18 小時，確認 DTE 在 5 mg/plate 以下對 5 種菌株皆無顯著毒性。回復突變之試驗使用平板混合測試(plate incorporation assay)。另，進行加入肝臟活化酵素 S9 (Lot#1452, Aroclor 1254-induced rat liver, Moltax<sup>TM</sup>, USA)處理。不加肝臟活化酵素的試驗，TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537 使用的陽性對照藥物分別為 2.5 µg/plate 4-nitroquinoline-*N*-oxide、5 µg/plate Sodium azide、0.5 µg/plate Mitomycin C、5 µg/plate Sodium azide、50 µg/plate 9-aminoacridine。經 S9 活化代謝之試驗，所有菌株使用的陽性對照藥物皆為 5 µg/plate 2-aminoanthracene。上述 5 種藥物皆購自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。

取最高無毒性濃度為最高測試濃度，並向下連續兩倍稀釋取 5 個濃度，陰性對照組使用無菌滲透水。取 100 µL 之 DF 加入 0.2 mL 之 0.5 mM histidine (Merck, kGaA, Germany)與 0.5 mM biotin (Sigma-Aldrich)混合液及 100 µL 菌液。加肝臟活化酵素處理者，另加 200 µL S9 混合液，再混入 45°C 之 2 mL 0.75% 軟性瓊脂內含 0.5 % NaCl，混合後倒入培養皿待室溫凝固後，倒置於 37°C 培養箱中培養 48 小時。計算培養皿之回復突變菌落數，各劑量組為 3 個重覆數。進行組間比較分析。

### (二) 體外哺乳類細胞株染色體異常分析

本實驗使用中國倉鼠卵巢細胞(Chinese hamster ovary cell; CHO-K1)，購自財團法人食品工業發展研究所(編號為 BCRC 60006;新竹，台灣)。細胞培養基為 90% Ham F-12 medium 及 10% Fetal bovine serum，培養條件為 37°C、5% CO<sub>2</sub>。

先進行 DTE (5、2.5、1.2 及 0.6 mg/mL)對 CHO-K1 細胞存活率試驗。使用 96 孔細胞培養盤，調整細胞數目為  $2 \times 10^5$ ，加入不同濃度 DTE 培養 24 小時。以 0.4% Trypan blue 染色觀察細胞並評

估存活率，結果顯示 DTE 最高濃度對 CHO-K1 細胞具輕微毒性作用，但仍有 70% 存活率。

參照 Bruckmann 氏等人的方法<sup>7</sup>。以 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 洗滌細胞兩次，加入新的細胞培養液 4.5 mL 加或不加 S9 混合物及 10 % 體積之 DTE，最終濃度分別為 1.2、2.5 與 5.0 mg/mL，培養 24 小時後，加入秋水仙素(Colcemid)終止其細胞循環之分裂期。

測試物質使用的溶劑(DMSO)作為陰性對照組。陽性對照藥物，不加 S9 的試驗使用 mitomycin C (2.5  $\mu$ g/mL)，加 S9 的試驗使用 cyclophosphamide (25  $\mu$ g/mL)。

細胞培養 24 小時後，加入 0.1  $\mu$ g/mL 之秋水仙素作用一晚。以 Trypsin (0.05%)-EDTA (0.53 mM)處理並收集細胞，以 900 rpm 離心 5 分鐘。倒去上清液，打散細胞團，加入 5 ml 的 0.5% KCl，靜置 5 分鐘。以 900 rpm 離心 5 分鐘，去掉 0.5% KCl。加入 5 ml 新鮮配置的固定液(甲醇：冰醋酸=3：1)，1500 rpm 離心 5 分鐘。去上清液，加入 10 ml 新鮮配置之固定液，室溫靜置 30 分鐘後，以 1500 rpm 離心 5 分鐘，此步驟重覆 3 次。倒去上清液，以黃色微量吸管吸取細胞液，高舉約離載玻片 20 cm 處，由上往下滴，盡量保持於玻片中央位置。玻片以 5 % Giemsa's 染劑作用 4 分鐘，將玻片以阿拉伯膠封片並觀察染色體。

每個劑量組製備兩片染色體玻片，於一般光學顯微鏡 1000 倍油鏡下觀察，每片至少觀察 100 個分裂中期細胞，計數染色體結構變異與多套染色體(polyploidy)之數目，染色體變異頻率(%)=(異常細胞數÷計數總細胞數)×100。

測試樣品對細胞造成之染色體結構變異頻率(%)超過陰性對照 2 倍以上，且有劑量與反應正相關性者，視為具有染色體結構變異正反應作用。

### (三) 小鼠週邊血微核試驗

使用 ICR 雄性小鼠，體重 25 ~ 30 g。控制組及三個 DTE 劑量組分別經口投與去離子水、0.7、1.4、2.1 g/kg。陽性對照藥物使用 Cyclophosphamide (0.1 g/kg)由腹腔注射投與。投與試驗物質 48 小時後，由眼眶採血。使用 prototype MicroFlow Mouse Micronucleus Analysis kit (FITC-anti CD71、propidium iodide)，以流式細胞儀

(Becton Dickinson FASCScan) 進行計數 1000 個網織紅血球 (reticulocytes)；計算微核(micronuclei)發生的數目及網織紅血球佔全部紅血球的比例<sup>8</sup>。

#### 九、DTPS 28 天餵食毒性試驗

實驗前雄鼠及雌鼠體重分別約為 200 及 185g。分成四組，每組 20 隻 (雌、雄各 10 隻)，每天一次分別經口投予 DTPS 100、300、600 mg/kg 或去離子水。

投藥期間每天觀察動物兩次，每週稱體重一次，於投藥終了前以代謝籠收集 20 小時尿液進行尿液分析。投藥終了，經一晚禁食後，在二氧化碳麻醉下，由腹腔動脈採血，供血液學及血清生化學檢查。取出臟器如心臟、肝臟、脾臟、腎臟、腎上腺、睪丸、卵巢等浸於 10% 中性福馬林溶液，供病理切片檢查用。主要臟器如心臟、肝臟、脾臟、腎臟、腎上腺、睪丸、卵巢於浸泡中性福馬林溶液前稱重。

##### (一) 血液學檢查

如同 DTE 90 天餵食毒性試驗。

##### (二) 血清生化學檢查

如同 DTE 90 天餵食毒性試驗。

##### (三) 尿液分析

如同 DTE 90 天餵食毒性試驗。

##### (四) 病理組織學檢查

大鼠臟器取出後浸於 10% 中性福馬林溶液，高劑量組及對照組的臟器固定後進行石臘包埋及切片製作，以蘇木青與伊紅染色法染色，供病理檢查。病理評估標準參照 Shackelford 氏等人的方法<sup>5</sup>。

#### 十、統計方法

本實驗所得之數據，均以單尾變異數分析(one-way analysis of variance)，並進行 Dunnet 測試，以 P 值小於 0.05 認為有顯著差異。

## 參、結果

### 一、試驗物質製備

黃花石斛乾品萃出物(DTE)的產率為 24.7%，金皇石斛乾品之萃出物(DTTE)的產率為 20.3%。動物實驗給藥時，DTE 使用去離子水配成適當濃度的懸浮液使用。

DTE 或 DTTE 水懸浮液以 4 倍體積 95%酒精沉降，沉降得到的黃花石斛粗多糖(DTPS)約 70.4%，金皇石斛粗多糖(DTTPS)約 36.3%。

粗多糖以  $\alpha$ -amylase、protease 及 amyloglucosidase 消化後分別得到黃花石斛不可消化粗多糖(IDTPS)及金皇石斛不可消化粗多糖(IDTTPS)。DTPS 約含 56%的 IDTPS。DTTSPS 約含 70% IDTTSPS

### 二、單糖組成、分子量及鍵結之分析

#### (一) IDTPS

IDTPS 使用 DEAE-650M 離子交換管柱，以 20 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.8)流洗，收集液以 phenol-sulfuric acid 法定糖含量。如圖 1A 所示可得到一個主要的分層。該分層經 metholysis 的產物，以 high performance anion exchange chromatography with a Pulsed amperometric detector 系統分析單糖組成(圖 1B)，其單糖比率如下：Galactose : Glucose : Mannose = 1 : 12.2 : 262.5。以 Pullulan 當標準品(圖 1D)，使用 high performance size-exclusion chromatography 分析 IDTPS 分子量，其數量分子量為 190 kDa (圖 1C)。

IDTPS 經 methylation、silylation 衍生化處理後，再由 metholysis 水解成單糖，經 GC-MS 分析後得到多糖不同鍵結的片段。以 inositol 做為內標。inositol 在 GC 出現的 retention time 為 29.21 分鐘。MS 圖譜解析結果顯示，末端鍵結的有 T-Man 和 T-Glc，占 5.22%。另外 IDTPS 以直鏈、不分支的鍵結為主，占了 78.65%，這些直鏈的鍵結有 3-Glc, 3-Man, 4-Man, 6-Man 四種，尤其中 4-Man 占了 59.42%。而分支上的鍵結占 16.12%，以 3,4-Man 的型態出現。另外，在氫譜結果中，溶劑 D<sub>2</sub>O 出現的位置在 4.7 ppm 處。而 1H 出現在 4.56 ppm 和 5.55 ppm 的位置。另外自 3.38~4.16 ppm 處出現的為 2H~6H 的波峰位置(圖 2)。

## (二) IDTTPS

IDTTPS 使用 DEAE-650M 離子交換管柱，以 20 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.8)流洗，收集液以 phenol-sulfuric acid 方法定糖含量。如圖 3A 所示可得到一個主要的分層。該分層經 metholysis 的產物，以 high performance anion exchange chromatography with a Pulsed amperometric detector 系統分析單糖組成(圖 3B)，其單糖比率如下: Arabinose: Galactose : Glucose : Mannose : Xylose = 1 : 1.4 : 3.0 : 30.0 : 1.3。以 Pullulan 當標準品(圖 3D)，使用 high performance size-exclusion chromatography 分析 IDTTPS 分子量，其數量分子量為 281 kDa(圖 3C)。

IDTTPS 的結構上幾乎全為直鏈鍵結，占 99.47%，其多糖的末端為葡萄糖，僅 0.53%。在直鏈的主幹上以 4-Man 所占比例最高，為 55.25%，其次 3-Man 占 28.90%，其他如 2-Ara, 6-Glc, 2-Glc 亦被偵測到，但是比例不高，推估分布在甘露糖直鏈主幹當中。氫譜的結果中，溶劑 D<sub>2</sub>O 出現的位置在 4.7 ppm 處，此外樣品參雜有部分的 H<sub>2</sub>O，因此在 5.04 ppm 的地方出現水峰。1H 出現在 4.50~4.53 ppm 和 5.29 ppm 的兩個區域。2H~6H 則分布在 3.50~4.42 ppm 的範圍內(圖 4)。

### 三、多糖 glucomannan 之分析

(一) DTTPS 與 IDTTPS 的 glucomannan 含量分析，分別含有 2.07% 與 2.60% (w/w)。

(二) DTTTPS 與 IDTTTPS 的 glucomannan 含量分析，分別含有 4.69% 與 6.65% (w/w)。

### 四、DTTPS 及 DTTTPS 抑制大腸息肉試驗

#### (一) 異常腺窩與異常腺窩灶計數

1. DTTPS 劑量依存性抑制 AOM 誘發小鼠腸道異常腺窩 (aberrant crypt) 及異常腺窩灶 (aberrant crypt foci) 的生成(圖 5)。正對照藥物 butyric acid 也具抑制作用。
2. DTTTPS 劑量依存性抑制 AOM 誘發小鼠腸道異常腺窩及異常腺窩灶的生成(圖 6)。正對照藥物 aspirin 也具抑制作用。

#### (二) RT-PCR 分析

1. DTTPS 和 DTTTPS 劑量依存性抑制 AOM 誘發小鼠腸道黏膜 iNOS、COX-2、 $\beta$ -catenin 及 caspase 3 mRNA 的表現 (圖 7 及 8)。

2. DTPS 和 DTTPS 劑量依存性抑制 AOM 誘發小鼠腸道黏膜 glutathione reductase、HO-1 及 aldose reductase mRNA 的表現(圖 9 及 10)。

## 五、DTPS 及 DTTPS 調節先天性免疫功能試驗

### (一) 表面標記分析

單細胞分離後，以螢光標定的抗體進行染色，然後利用流式細胞儀進行分析。評估 DTTPS 及 DTSP 對 T 細胞、B 細胞以及 NK 細胞次族群分布的影響。

1. DTTPS 及 DTSP 對脾淋巴細胞次族群 T4 細胞與 T8 細胞的分布沒有影響(圖 11A)。
2. DTTPS 及 DTSP 對脾淋巴細胞次族群 T 細胞與 B 細胞的分布沒有影響(圖 11B)。
3. DTTPS (100、300 mg/kg)及 DTSP (100、300 mg/kg)能增加脾淋巴細胞次族群 NK 細胞的分布(圖 11C)。

### (二) 細胞增殖分析

單細胞分離並計數後，加入 96 孔盤中培養，以 ConA、LPS 來測試脾臟或是淋巴結對 T 細胞與 B 細胞的增殖反應。培養時間終了，以 MTS 進行細胞增殖分析。

DTTSP (100、300 mg/kg)及 DTSP (100、300 mg/kg) 能促進脾淋巴細胞在 ConA (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )或 LPS (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )裂殖原刺激下的增生作用(圖 12)。

### (三) 細胞激素分泌實驗

單細胞分離並計數後，以  $2 \times 10^6/\text{mL}$  的濃度加入 24 孔盤中培養。利用 Con A 以及 LPS 來刺激這些免疫細胞。經過 24 到 48 小時的培養後，取其上清液。利用 ELISA 的方法測定其分泌的細胞激素含量。

1. DTTSP (300 mg/kg)及 DTSP (100、300 mg/kg)能促進脾淋巴細胞在 ConA (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )裂殖原刺激下增加 IL-2 的分泌作用(圖 13A)。但對 LPS (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )刺激下則無影響(圖 13A)。
2. DTTSP 及 DTSP 對脾淋巴細胞在 ConA (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )或 LPS (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )裂殖原刺激下 IL-4 的分泌無影響(圖 13B)。
3. DTTSP 及 DTSP 對脾淋巴細胞在 ConA (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )或 LPS (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )裂殖原刺激下 IL-6 的分泌無影響(圖 13C)。

4. DTTPS (300 mg/kg)及 DTSP (100、300 mg/kg)能促進脾淋巴細胞在 ConA (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )裂殖原刺激下增加 IFN- $\gamma$  的分泌作用(圖 13D)。但對 LPS (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )刺激下則無影響(圖 13D)。

#### (四) 自然殺手細胞活性

先培養自然殺手細胞的標的細胞 (YAC-1 細胞株)。並先將 YAC-1 細胞與螢光染劑 PKH67 在一起培養 30 分鐘，洗去未標定細胞的螢光染劑。此時再加入不同數目的單核球與已經與螢光標定 YAC-1 標的細胞一起培養，在培養一段時間後取出上清液，利用流式細胞儀分析，經記錄後計算其毒殺活力。在 Effect cells / Target cells =10 的培養條件下，DTTSP (100、300 mg/kg)、DTSP (300 mg/kg)能顯著增強自然殺手細胞毒殺活性(圖 14A)。

#### (五) 吞噬細胞活性

測定單核球(monocyte)或是中性白血球的吞噬能力，利用 FITC label E. coli，在細胞吞噬後加入 Trypan Blue solution 遮蔽未被吞入的 E coli，然後利用盤式螢光分析儀中以 485 nm 之激發光激發，再以 538 nm 之偵測波長測定螢光放射，經記錄後計算其吞噬能力。在 MOI = 1、5 及 25 的不同培養條件下，DTTSP (100、300 mg/kg)、DTSP (100、300 mg/kg)與對照組相比均能促進吞噬細胞吞噬作用(圖 14B)。

#### (六) 血清抗體的調節

測定小鼠犧牲時血清抗體的含量變化。

1. DTTSP (100、300 mg/kg)及 DTSP (100、300 mg/kg)能增加血清抗體 IgG 濃度(圖 15A)。
2. DTTSP (100、300 mg/kg)及 DTSP (100、300 mg/kg)能增加血清抗體 IgM 濃度(圖 15B)。
3. DTTSP (100、300 mg/kg)及 DTSP (100、300 mg/kg)能增加血清抗體 IgA 濃度(圖 15C)。
4. DTTSP (100 mg/kg)及 DTSP (100 mg/kg) 能降低血清抗體 IgE 濃度(圖 15D)。

### 六、DTSP 及 DTTSP 改善過敏體質試驗

#### (一) 呼吸道阻力

DTTSP (100、300 mg/kg)、DTSP (100、300 mg/kg)及對照藥物 Prednisolone (10 mg/kg)能減弱塵蟎誘導呼吸道過度反應

(Enhanced Pause, Penh) (圖 16)。

(二) 血清抗體的影響

1. DTTPS (100、300 mg/kg)及對照藥物 Prednisolone (10 mg/kg)能減弱塵蟎誘導血清中 anti-Derp IgE 含量。但 DTPS (100、300 mg/kg) 對此沒有影響(圖 17A)。
2. DTTPS (100、300 mg/kg) 及 DTPS (100、300 mg/kg)對塵蟎誘導血清中 anti-Derp IgG1 含量沒有影響。但 Prednisolone (10 mg/kg)能減弱 anti-Derp IgG1 活性。
3. DTTPS (100、300 mg/kg) 及 DTPS (100、300 mg/kg)對塵蟎誘導血清中 anti-Derp IgG2a 含量沒有影響。但 Prednisolone (10 mg/kg)能減弱 anti-Derp IgG2a 活性。

(三) 對呼吸道沖洗液抗體的影響

DTTPS (100、300 mg/kg)、DTPS (100、300 mg/kg)及對照藥物 Prednisolon (10 mg/kg)能減弱塵蟎誘導呼吸道 anti-Derp IgE 活性(圖 17B)。

(四) 對呼吸道沖洗液淋巴 T 輔助細胞次族群的影響

1. DTTPS (100、300 mg/kg)明顯增加 Th1 細胞( $\text{Tim-3}^+\text{CD4}^+$ ) (圖 18A)。DTPS (100、300 mg/kg)及對照藥物 Prednisolone 明顯增加 Th2 細胞( $\text{CD278}^+\text{CD4}^+$ ) (圖 18A)。
2. DTTPS (100、300 mg/kg)明顯增加 Treg 細胞( $\text{CD25}^+\text{CD4}^+$ )。DTPS (100、300 mg/kg)及對照藥物 Prednisolone 對 Treg 細胞( $\text{CD25}^+\text{CD4}^+$ )沒有影響(圖 18B)。
3. DTTPS (100、300 mg/kg)、DTPS (100、300 mg/kg)及對照藥物 Prednisolone 對 NKT 細胞( $\text{NKT}^+\text{CD3}^+$ )沒有影響。

(五) 脾淋巴球細胞激素分泌分析

脾淋巴球細胞激素分泌分析為評估具氣喘免疫調節小鼠之脾淋巴細胞再接觸過敏原之後之免疫調節作用，脾臟使用尼龍篩網過篩，將細胞定數為  $2 \times 10^7$  cells/ml 使用 25  $\mu\text{g/ml}$  Derp, 5  $\mu\text{g/ml}$  Con A, 10  $\mu\text{g/ml}$  LPS 培養 24、48、72 小時，使用 ELISA 測量細胞激素之分泌。

1. DTTPS (100、300 mg/kg)及 DTPS (100、300 mg/kg)增強 ConA 刺激塵蟎誘導小鼠呼吸道過度反應的脾淋巴細胞 IL-2 細胞激素的釋放(圖 19A)。DTTPS 及 DTPS 對 LPS、Derp 的刺激沒有影

響。

2. DTTPS (100、300 mg/kg) 增強 ConA 刺激塵蟎誘導小鼠呼吸道過度反應的脾淋巴細胞 IFN- $\gamma$  的釋放(圖 19B)，但 DTSP 沒有影響。DTTSP 及 DTSP 對 LPS、Derp 的刺激沒有影響。
3. DTTPS 及 DTSP 對 ConA、LPS、Derp 刺激塵蟎誘導小鼠呼吸道過度反應的脾淋巴細胞 IL-4、IL-5、IL-12、G-CSF、TNF- $\alpha$  細胞激素的釋放沒有影響。

#### (六) 組織切片

組織切片用來評估過敏反應中之肺部發炎細胞浸潤，肺臟經福馬林固定，以石蠟包埋後切片(5  $\mu$ M)，以蘇木紫/伊紅染色法染色，經脫水封片後，於 100 $\times$ 光學顯微鏡下觀察拍照。

1. HE 染色，水組有明顯的發炎細胞浸潤。DTTSP (100、300 mg/kg) 及 DTSP (100、300 mg/kg)對發炎細胞浸潤有減輕的作用(圖 20)。
2. PAS 染色，水組有明顯的黏液分泌。DTTSP (100、300 mg/kg) 及 DTSP (100、300 mg/kg)對黏液分泌有減輕的作用(圖 21)。

### 七、DTE 90 天餵食毒性試驗

#### (一) 體重變化

每組大鼠 10 隻，連續 90 天經口投予 DTE 0.7、1.4 及 2.1 g/kg，雌、雄大鼠皆無死亡情形，亦無明顯副作用產生。與控制組比較，體重並無明顯變化。雄鼠最終體重控制組及 DTE0.7、1.4 及 2.1 g/kg 組分別為 453.8  $\pm$  23.8、455.2  $\pm$  19.1、452.6  $\pm$  27.9 及 452.1  $\pm$  22.7 公克。雌鼠最終體重控制組及 DTE0.7、1.4 及 2.1 g/kg 組分別為、286.9  $\pm$  16.3、282.2  $\pm$  9.8、284.4  $\pm$  18.8 及 291.4  $\pm$  15.8 公克(表 1)。

#### (二) 血液學檢查

如表 2 所示，連續 90 天經口投予 DTE 0.7、1.4 及 2.1 g/kg，僅高劑量組對雄鼠 lymphocytes 比率有減少作用，對 Segmented neutrophil 有增加作用，餘則無影響。若以實際數目計則各投藥組與控制組間 lymphocytes 及 Segmented neutrophil 的數目無明顯差異。控制組及 DTE 0.7、1.4、2.1 g/kg 各組 lymphocytes 數目分別為 8.4  $\pm$  2.9、7.8  $\pm$  4.4、7.5  $\pm$  2.2、7.0  $\pm$  1.9 ( $10^3/\mu$ l)。

#### (三) 血漿生化學檢查

如表 3 所示，雄鼠 0.7 g/kg 組的 ALT 活性較控制組低，1.4 g/kg

組的 creatinine 濃度較控制組低，皆不具用量依存性，餘則無影響。

#### (四) 尿液分析

如表 4 所示，大鼠犧牲前收集 16 小時尿液，進行尿液分析，與控制組比較並無異常情形。

#### (五) 眼睛檢查

眼睛肉眼檢查及顯微檢查沒有發現異常。

#### (六) 臟器重量

如表 5 所示，DTE 對肝臟、脾臟、腎臟、腎上腺、睪丸及卵巢等臟器的絕對重量及相對重量並無影響。

#### (七) 病理檢驗

如表 6 所示，以高劑量組的臟器進行病理切片檢驗，雌鼠及雄鼠皆無特殊病變產生。

### 七、DTE 致畸性試驗

#### (一) 一般性狀和死率

所有 DTE 處理組母鼠之一般性狀與控制組相似，沒有任何死亡或出現臨床症狀。

#### (二) 母鼠體重與攝食量

所有 DTE 處理組母鼠之體重變化、體重增重及攝食量與控制組比較沒有差異(表 7、8 及 9)。母鼠最終體重控制組及 DTE 0.7、1.4 及 2.1 g/kg 組分別為  $55.6 \pm 2.8$ 、 $54.2 \pm 5.7$ 、 $53.6 \pm 3.8$  及  $53.1 \pm 3.9$  公克。母鼠體重總增重控制組及 DTE 0.7、1.4 及 2.1 g/kg 組分別為  $23.8 \pm 2.9$ 、 $23.5 \pm 3.8$ 、 $21.4 \pm 5.8$  及  $22.2 \pm 3.2$  公克。

#### (三) 母鼠解剖病變

所有 DTE 處理組母鼠懷孕第 18 天解剖，各臟器外觀及子宮均無任何病變產生(表 10)。

#### (四) 母鼠生殖性狀

所有 DTE 處理組母鼠懷孕第 18 天解剖，計數著床數、活仔鼠數、早期及晚期吸收數與控制組比較沒有差異(表 11)。DTE (0.7 - 2.1) 組的雄、雌仔鼠平均重量較控制組低，但胎盤重量不受 DTE 影響(表 12)。母鼠黃體數在解剖顯微鏡下不容易辨識，經石蠟包埋切片染色觀察，計數到的黃體鼠與仔鼠數有很大的差距，因此此項結果沒有列在表 11 中。

#### (五) 仔鼠外觀檢查

仔鼠外觀檢查如表 13 及圖 22 所示，DTE 各劑量組與對照組之間無明顯差異。

#### (六) 仔鼠內臟檢查

仔鼠以切割法檢查內臟，結果如表 14 所示，DTE 高劑量組與對照組之間無明顯差異。

#### (七) 仔鼠透明骨檢查

仔鼠以透明骨檢查骨骼，結果如表 15 及圖 23、24 所示，DTE 高劑量組與對照組之間無明顯差異。

### 八、DTE 基因毒性試驗

#### (一) 沙門菌回復突變試驗(Ames test)

試驗先以 DTE (1.25、2.5 及 5 mg/plate)與菌株共同作用 18 小時，進行細菌毒性試驗。結果顯示，DTE 5 mg/plate 以下對所有菌株皆無顯著毒性。以 DTE 對菌株無顯著毒性之最高濃度向下連續 2 倍稀釋，選取 0.3、0.6、1.2、2.5 及 5 mg/plate 等 5 個濃度作為 Ames 正式試驗。分別進行 DTE 直接作用於菌株，以及經大鼠肝臟活化酵素抽出液(S9)與 DTE 各濃度共同作用 48 小時，藉以模擬 DTE 經動物體內肝臟酵素(S9)代謝後之代謝產物對各菌株之基因致變異性。

不加 S9 之試驗，TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537 分別使用陽性對照藥物 4-nitroquinoline-*N*-oxide (1 µg/plate)、Sodium azide (5 µg/plate)、Mitomycin C (0.5 µg/plate)、9-aminoacridine (50 µg/plate)、Sodium azide (5 µg/plate)，其細菌回復突變菌數分別約為陰性對照組的 87、10、2、25、141 倍以上(表 16)。

加 S9 之試驗，TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537 皆使用陽性對照藥物 2-aminoanthracene (5 µg/plate)，其細菌回復突變菌數分別約為陰性對照組的 66、2、4、31、20 倍以上(表 17)。

不論 DTE 直接或經 S9 作用後，對 5 種菌株細菌回復突變菌數均未大於陰性對照組回復突變菌數 2 倍以上。即 DF 對沙門氏菌回復突變之 Ames 試驗並不具有致變異性，對細菌基因突變測試結果為陰性反應(non genetic mutation in Ames test)。

## (二) 體外哺乳類細胞株染色體異常分析

試驗先以 4 種測試劑量 1、0.5、0.25 及 0.125 mg/mL 進行細胞毒性試驗，結果顯示，DTE 對中國倉鼠卵巢細胞(Chinese hamster ovary cell；CHO-K1 細胞的半致死劑量濃度約為 0.8 mg/mL。取一半致死劑量為最高濃度進行此試驗，DTE 0.2、0.4 與 0.8 mg/ml，配製樣品溶液於每個細胞培養皿中經加入或不加入 S9 混合物共同培養 24 小時。結果顯示，在不含有 S9 混合液代謝活化系統之測試條件下陽性對照組 Mitomycin C (2.5 µg/mL) 染色體變異比率為高於陰性對照組 3 倍，具顯著性增加(表 18)。DTE 3 個劑量所造成之 CHO-K1 細胞染色體異常頻率與陰性對照組比較並無明顯增加(表 13)。

在含有 S9 混合液代謝活化系統之測試條件下陽性對照組 Cyclophosphamide (25 µg/mL) 染色體變異比率高於陰性對照組 4 倍，具顯著性增加(表 13)。在 DF 3 個劑量所造成之 CHO-K1 細胞染色體異常頻率與陰性對照組比較並無明顯增加，其數值控制組加+ S9 與不加 S9 分別為  $2.3 \pm 2.5$  及  $5.0 \pm 3.6$  % (表 18)，對細胞染色體變異位置亦無明顯變化，顯示 DF 對體外哺乳類細胞株 CHO-K1 之染色體不具致變異作用。

## (三) 小鼠週邊血細胞微核試驗

正對照藥物 Cyclophosphamide 使多染性紅血球比例下降，微核明顯增加(表 19)，顯示 Cyclophosphamide 具基因毒性。DTE (0.7、1.4、2.1 g/kg) 對多染性紅血球與正紅血球比例及微核數目沒有影響(表 19)。

## 九、DTPS 28 天餵食毒性試驗

### (一) 體重變化

每組大鼠 10 隻，連續 28 天經口投予 DTPS 100、300 及 600 mg/kg，雌、雄大鼠皆無死亡情形，亦無明顯副作用產生。與控制組比較，體重並無明顯變化(表 20)。

### (二) 血液學檢查

如表 21 所示，雄鼠 DTPS 100 mg/kg 組的紅血球數目、血紅素濃度、紅血球容積高於控制組。DTPS 600 mg/kg 組的血紅素濃度、積高於控制組，但還在正常生理值範圍內<sup>9</sup>。雌鼠 DTPS 100 mg/kg 組的 PT、APTT 時間較控制組短。二者皆不具劑量-反應

關係。其餘則無影響

### (三) 血漿生化學檢查

如表 22 所示，連續 28 天經口投予 DTSP 100、300 及 600 mg/kg，雌、雄大鼠對血漿生化學檢查皆無影響。

### (四) 尿液分析

如表 23 所示，大鼠犧牲前收集 16 小時尿液，進行尿液分析，與控制組比較雌鼠尿易量明顯增加，於無異常情形。

### (五) 眼睛檢查

眼睛肉眼檢查及顯微檢查沒有發現異常。

### (六) 臟器重量

如表 24 所示，DTSP 對雄、雌鼠的脾臟、腎臟、腎上腺、睪丸及卵巢等臟器的絕對重量及相對重量並無影響。雄鼠 DTSP 100 mg/kg 組的肝臟絕對重量低於控制組，但相對重量則無差異。

### (七) 病理檢驗

如表 25 所示，以高劑量組的臟器進行病理切片檢驗，雌鼠及雄鼠皆無特殊病變產生。

## 肆、討論

### 一、化學分析

#### (一) IDTPS 鍵結

IDTPS 多醣鍵結的結果指出，黃花石斛多醣以直鏈鍵結為主，主幹上以 4-Man 為主。直鏈、支鏈分支比來看，多醣主幹上平均每 5.88 個單醣就會有一個 3,4 甘露糖的分支點。本研究中，末端鍵結的多醣比例為 5.22% 較分支鍵結 16.12% 低，推論可能是在甲基衍生化的過程中，降解損失的影響。雖然在 HPAEC 單醣組成分析的結果指出，IDTPS 以甘露糖、葡萄糖和半乳糖所組成，但是半乳糖的含量比例太低，以致在鍵結分析的時候偵測不到半乳糖在黃花石斛多醣中的鍵結方式。就鍵結分析的結果來看，黃花石斛多醣是一種葡甘露聚糖，以甘露糖為主幹，葡萄糖則分布在主幹及末端分支上。

<sup>1</sup>H 顯示其 anomeric carbon 鍵結的方式。4.56 ppm 為  $\beta$  糖苷鍵結出現的波峰，5.55 ppm 為  $\alpha$  糖苷鍵結出現的波峰，由此可知黃花石斛多醣中有兩種糖苷鍵結的方式。過去研究曾指出，植物半纖維素的葡甘露聚糖，多以  $\beta$ -1,4 Man 為主幹<sup>10</sup>，推測本研究中黃花石斛多醣應該有  $\beta$ -1,4 Man 的結構。另外，氫譜 3.38~4.16 ppm 中，peak 相當的寬，這是黏稠性溶液的特徵，可見黃花石斛多醣溶於 D<sub>2</sub>O 時是具黏性的液體。

#### (二) IDTTPS 鍵結

IDTTPS 多醣鍵結的結果顯示，IDTTPS 為一種以 4-Man 和 3-Man 為主的直鏈多醣，4-Man 與 3-Man 的比例為 1.91:1，幾乎是每 2 個 4-Man 和 1 個 3-Man 為單位組成的多醣。IDTTPS 的單醣組成較 DTPS 為複雜，這個情況在 GC-MS 與氫譜鍵結分析上也可以發現。如 IDTTPS 可以偵測到 6-Gal 與 2-Ara 的存在，而 IDTPS 則只能偵測到葡萄糖與甘露糖。同時在氫譜分析上 IDTTPS 同樣是具有  $\alpha$  糖苷鍵結和  $\beta$  糖苷鍵結。其中  $\beta$  糖苷鍵結相當的複雜，並非以單一波峰的形式出現，而是在 4.50~4.53 ppm 有 6 個波峰的出現，由此推估在直鏈的主幹上不只以  $\beta$  糖苷為主，而且  $\beta$  糖苷鍵結方式相當豐富多變。此外，IDTTPS 氫譜分析下 2H~6H 的分布範圍相當的廣闊，比 IDTPS 還要寬，此結果

亦指出 IDTTPS 是具黏性的溶液，且溶於水後的黏度比 DTTPS 還高，顯示 IDTTPS 具有高水合的能力。

### (三) glucomannan 含量分析

由 glucomannan 在 DTTPS 與 IDTTPS 的含量差異可以推知，DTTPS 中澱粉含量為 20.3%，此結果與消化酵素處理結果相近。此分析也顯示 glucose 與 mannose 的含量比例為 1:4.2。但以 HPLC 分析 IDTTPS 單糖組成，glucose 與 mannose 的含量比例為 1:21.5，此結果與 glucomannan 分析結果相差頗大，推測可能是因為黃花石斛 glucomannan 的結構較為複雜，限制 glucomannan 消化酵素處理分析的功能。

DTTPS 與 IDTTPS 的 glucomannan 含量分析，分別含有 4.69% 與 6.65% (w/w)。由 glucomannan 在 DTTPS 與 IDTTPS 的含量差異可以推知，DTTPS 中澱粉含量為 29.3%，此結果與消化酵素處理結果相近。此分析也顯示 glucose 與 mannose 的含量比例為 1:6.6。以 HPLC 分析 IDTTPS 單糖組成，glucose 與 mannose 的含量比例為 1:10.1，其差異原因可能是因為 IDTTPS 仍有其他非 glucomannan 存在，此外酵素處理多醣時，會因多醣結構的不同而對酵素消化功能有所限制。

## 二、大腸瘻肉

結腸癌動物實驗模式可分為遺傳模式與化學致癌物誘發模式兩類<sup>11</sup>。化學致癌物誘發模式常採用 azoxymethane (AOM) 腹腔注射來誘導腸瘻肉或是腸癌的發生。AOM 是由肝臟酵素 CYP 450IIE1 代謝成 methylazoxymethanal (MAM)<sup>12</sup>，MAM 主要在肝臟與結腸被進一步代謝成是高活性的親電子化合物 (methyl diazonium ion)，導致該組織高度的氧化壓力，與 DNA 損傷，致使細胞癌化<sup>13</sup>。因此利用 AOM 誘導小鼠腸癌發生。癌化之前先產生異常腺窩與異常腺窩灶，計數異常腺窩與異常腺窩灶數目，DTTPS 及 IDTTPS 兩者皆有減少的作用，顯示此兩種石斛有預防腸癌產生的作用。

$\beta$ -catenin 說是前期癌症發生時的重要生物指標<sup>14</sup>。許多化學誘導的腸癌上，都可以找到  $\beta$ -catenin 的突變表現。本研究中，AOM 處理的組別其  $\beta$ -catenin 的表現相較於控制組，有明顯增加的現象。然而 AOM 小鼠投與 DTTPS 和 IDTTPS 處理後，其  $\beta$ -catenin 的基因表現均下降。DTTPS 和 IDTTPS 在癌化前期生物指標  $\beta$ -catenin 的表現上，有顯著抑制的效果。

AOM 誘導結直腸道癌化病變，其原因之一是因為 AOM 會提高結直腸上

皮細胞的氧化壓力，造成發炎、進而引起脂質過氧化<sup>15,16</sup>。Aldose reductase(AR)是一種會隨著氧化壓力的增加而表現的酵素<sup>7</sup>。在AOM的處理下，AR的表現會顯著的增加<sup>15</sup>。AR會經由活化p-PKC-β2/NF-κB signaling cascade的路徑，而增加了iNOS與COX-2的發炎反應<sup>16,17</sup>。在本研究中，經AOM處理的小鼠，其腸道上皮細胞AR的基因表現顯著地上升，本研究中進一步分析由AR引起的iNOS與COX-2的基因表現也都顯著地提升。投與DTPS與DTTPS均能使這些和氧化、發炎途徑有關的基因表現下降。這些結果顯示DTPS與DTTPS能夠在AOM誘導腸癌的動物模式下，具有抗氧化與抗發炎的作用，同時能藉此氧化壓力的減低而改善腸癌的發生。

當細胞膜表現氧化壓力過高時，會透過bcl-2和bax蛋白的表現，活化粒線體，進而促進caspase-3的表現，致使細胞凋亡<sup>18,19</sup>。在本研究當中，AOM的處理會導致腸上皮細胞caspase-3的表現增加。然而投與DTPS和DTTPS後，並不會增高使caspase-3的表現，反倒是觀察到DTPS和DTTPS處理的組別其caspase-3的表現與AOM控制組相較下，有抑制caspase-3表現的情況。研究結果顯示DTPS和DTTPS並不會活化受傷細胞其自我凋亡的表現，推測DTPS和DTTPS對細胞具抗發炎與抗氧化保護作用，在此機制作用下，腸上皮細胞氧化傷害的壓力變小，進而對caspase-3的活化也較AOM控制組來的低。

另外，在AOM引起腸道上皮細胞脂質過氧化的同時，也會起動細胞自身的保護機制，即活化Nrf2途徑。Nrf2是一種轉錄因子，當細胞氧化壓力過大時，Nrf2會活化並進入到細胞核內，促使細胞抗氧化酵素如Heme oxygenase-1, HO-1和Glutathione reductase, GR的表現增加<sup>20</sup>。在過去的研究中即指出，HO-1和GR在由腸癌發生時，具有保護的作用(Chemoprevention effects)<sup>21</sup>。而當AR表現過多時，造成細胞的氧化傷害，此時就會活化Nrf2的路徑，進而使HO-1和GR的表現增多。本研究中，AOM會經由AR的影響致使HO-1與GR的表現增加。在此狀態下，DTPS和DTTPS能抑制因AOM導致的HO-1和GR的異常表現。此結果顯示，DTPS和DTTPS能保護常到免於化學致癌劑的傷害，當腸道氧化傷害壓力小時，自然也不會增加抗氧化酵素HO-1與GR的表現。

DTPS和DTTPS經由減少AOM造成的氧化壓力，降低腸道黏膜的發言，抑制腸黏膜癌化的產生。

### 三、免疫調節

宿主防禦機制是一個複雜且多元的機制，包括先天性免疫力(innate

immunity)與特異性免疫力(adaptive immunity)兩類。先天性免疫，主導最初的保護作用以防感染；特異性免疫主導較晚期但更有效地對抗感染。先天性免疫，是由上皮屏障、特化的細胞和在上皮層的自然抗體所組成，功能是阻斷微生物的入侵。如果微生物穿過上皮層和進入組織或循環系統或癌化的細胞就會受到巨噬細胞、自然殺手細胞和幾種血漿蛋白(包括補體系統的蛋白質)攻擊。

在先天性免疫的初期相關的淋巴細胞有:顆粒球，單核球/巨噬細胞和自然殺手細胞。這些細胞對病原菌與癌細胞的吞噬、自由基的產生、細胞素(cytokine)的生成與對淋巴細胞抗原的呈現等功用，扮演著重要的角色<sup>22</sup>。

在本試驗，小鼠持續6週投予DTPS和DTTPS，在細胞功能性試驗中，自然殺手細胞比例與自然殺手細胞毒殺腫瘤細胞能力提高，並且增加單核球或中性白血球的吞噬能力。這些結果顯示DTPS和DTTPS有提升先天性免疫的能力。

免疫球蛋白有五種，分別為IgG、IgA、IgM、IgE、IgD。其中IgG是人體正常血液中最多的一型，是藉由與吞噬細胞上接受器結合，作為調理素(opsonin)的作用，增加吞噬能力。IgM則佔所有全部約10%，且都分布在血管內，是對抗外來抗原之初級反應所產的第一種免疫球蛋白。IgA是一種外分泌性的免疫球蛋白主要是由消化道、呼吸道及其他的粘膜細胞所分泌，約佔血漿中總免疫球蛋的10~15%，是抵禦細菌和病毒的重要防線。IgE抗體含量非常少，只存在嗜鹼性白血球及肥大細胞，具有調節過敏反應的作用，會引起局部肥大細胞的活化，以促進不同細胞的聚集。而IgD 在血漿中含量在1%之下<sup>23</sup>。DTPS和DTTPS可增加血清抗體IgG, IgM及IgA濃度，並降低IgE含量。由於降低IgE含量，顯示DTPS和DTTPS不會產生過敏反應。增加血清抗體IgG, IgM及IgA濃度，有助於DTPS和DTTPS活化吞噬作用。

DTPS和DTTPS對ConA與LPS所誘導的細胞增生有增加作用，對脾淋巴細胞經ConA刺激後IL-2與IFN- $\gamma$ 含量也有促進的效果。IFN- $\gamma$ 是由T細胞和自然殺手細胞所分泌的細胞激素，在先天免疫反應中可活化巨噬細胞。IL-2是由抗原活化的T細胞所製造的細胞激素，會刺激自然殺手細胞的增生和分化。

除NK細胞外，DTPS和DTTPS對對T細胞、B細胞次族群的分布沒有。顯示DTPS和DTTPS沒有過度活化免疫化作用。

#### 四、改善過敏體質

過敏性氣喘的致病機轉，當過敏源進入已致敏的氣喘動物體內後，過

敏源特異性IgE會與肥大細胞或嗜檢性白血球上的IgE接受器結合，使肥大細胞或嗜檢性白血球釋放出組織胺及過敏性物質，引起呼吸到平滑肌的收縮，造成氣喘發作<sup>24</sup>。

在塵蟎誘導的呼吸道過度反應中，DTPS和DTTP兩者對最終指標氣喘、肺臟病理染色所呈現出發炎細胞的浸潤及黏液細胞的分泌，皆有顯著改善的效果。也明顯抑制肺泡沖洗液中IgE濃度。這些顯示DTPS和DTTP兩者皆能抑制塵蟎誘導的呼吸道過度反應。

但DTPS和DTTP對T輔助細胞次族群的影響不同，如DTTPS增加Th1細胞，DTTPS卻增加Th2細胞。DTTPS明顯增加Treg細胞，而DTPS對Treg細胞沒有影響。兩者作用機轉的探討需要更多其他實驗數據的支持。

## 五、DTE 安全性評估

保健食品或健康食品首重食用的安全性，本試驗評估了DTE的毒理作用，其內容包含大鼠90天餵食毒性試驗、小鼠致畸胎試驗，及微生物、哺乳類細胞和小鼠週邊血微核等三種基因毒性試驗。

DTE 90天餵食毒性試驗，雌、雄大鼠連續90天每天分別經口投與DTE 0.7、1.4、2.1 g/kg。DTE投與13週期間，對每週的平均體重沒有影響。血液學的檢察，雄鼠高劑量組0.27 g/kg組的淋巴球比率較控制組高低，分葉中性球比率較控制組低高，但以血球數目計則沒有影響不具用量依存性。血液生化學方面，雄鼠0.7 g/kg組的鹼性磷酸酶活性較控制組低，1.4 g/kg組的肌酐濃度較控制組低，但不具用量依存性。尿液分析沒有異常發現。DTE組的臟器絕對及相對重量和控制組比較沒有差異。高劑量組病理顯微檢察也沒有發現因DTE的處理引起的組織或器官病理變化。本實驗確立DTE的無明顯效應劑量(no-observed adverse effect level；NOAEL)大於2.1 g/kg。無明顯效應劑量可用於推估人的參考使用劑量(reference dose)，若動物與人體之間劑量換算其安全系數設定為100<sup>25</sup>，則DTE對於60公斤體重的人其參考使用劑量為每天1260毫克。

懷孕小鼠從妊娠第67天至第18產後第21天，每天分別投與DTE 0.7、1.4、2.1 g/kg。得到下列結果。1) DTE對母鼠體重及攝食量沒有影響。2) DTE對母鼠平均著床數、平均活仔鼠，及早期、晚期吸收數和死胎數沒有影響。3) DTE組的對仔鼠體重較控制組低。4) DTE個劑量組的仔鼠外觀檢查，及高劑量組的內臟和骨骼檢察，和控制組比較沒有差異。雖然DTE無致畸胎的作用，但仔鼠體重減輕，因此懷孕婦女應該避免使用DTE。

基因毒性測試之目的為偵測試驗物質直接或間皆引發基因傷害及程

度，可用於預測試驗物質致癌性之預測。一般基因毒性測試包含：微生物基因突變分析、體外哺乳類細胞基因毒性分析，及動物體內基因毒性分析。

沙門氏菌回復突變試驗是Ames教授所建立，因此又稱Ames試驗。其原理為利用histidine缺陷型的沙門氏菌突變株(即培養基內沒有histidine不能生長之突變株)，經誘變後可以使突變型回復野生型(即培養基內沒有histidine也能生長之菌株)。TA98和TA1537可用於偵測致突變物質造成DNA鹼基的加入或刪除(frame shift)。TA100、TA102、TA1535可用於偵測致突變物質造成DNA鹼基配對的取代<sup>26</sup>。某些突變劑是要經代謝才會有作用，但沙門氏菌本身沒有代謝酵素，因此要添加由大鼠肝臟微粒體製備的S9。在Ames試驗，DTE誘發的突變數和控制組相當，遠低於正對照藥物。此結果說明了DTE再使用的劑量範圍內沒有致突變的作用。

CHO-K1(中國倉鼠卵巢細胞Chinese hamster ovary cell)染色體變異試驗廣泛用於測試化學物質引起的染色體變異。會導致染色體變異的物質如mitomycin C及cyclophosphamide加入CHO-K1細胞，不論S9是否存在，可使染色體變異提升4到5倍，而DTE所造成的染色體變異率和控制組相當，此顯示DTE不論在有無S9是否存在下皆不會造成染色體變異。

微核實際上是紡錘體著絲點功能障礙形成的染色體和染色單體的斷片。從微核形成機制來說，主要是由於毒藥物造成染色體變異，如染色體裂隙、染色體斷裂及染色體斷片等，導致在有絲分裂後期形成無著絲點斷片，因無紡錘絲牽拉而游離於子細胞漿中。因此，微核率和染色體變異有很好的相關性<sup>27</sup>。微核試驗是用來測量周邊血或骨髓中血球細胞發生微核事件頻率的技術。血球細胞中以紅血球為微核試驗的最佳樣品，因為紅血球在生成過程中會丟失細胞核後，在72小時形成網織紅血球(reticulocyte, RET)，並在48小時內成為成熟紅血球。網織紅血球與成熟紅血球因其胞漿內只殘留少量的核酸物質，便提供一相對低背景值，故而這些細胞如帶有微核，因富含核酸物質，很容易可以核酸特異性染劑來辨識<sup>28</sup>。在本試驗，小鼠注射對照藥物cyclophosphamide，明顯使微核比率增加，DTE的投予對微核的比率沒有影響，顯示DTE沒有染色體的傷害作用。

## 六、DTPS 安全性評估

28天餵食毒性試驗，雌、雄大鼠連續28天每天分別經口投與DTPS 100、300、600 mg/kg。DTPS投與4週期間，對每週的平均體重沒有影響。血液學的檢察，雄鼠DTPS 100 mg/kg組的紅血球數目、血紅素濃度、紅血球容積高於控制組。DTPS 600 mg/kg組的血紅素濃度高於控制組，但還在

正常生理值範圍內<sup>9</sup>。雌鼠DTPS 100 mg/kg組的PT、APTT時間較控制組短。二者皆不具劑量-反應關係。血漿生化學檢查未發現有異常情形。尿液檢查，雌鼠尿流量明顯增加，餘未發現有異常情形。DTE低劑量組的肝臟絕對重量低於控制組，但相對重量則無差異。心臟、腎臟、脾臟、睪丸及卵巢的絕對及相對重量和控制組比較沒有差異。高劑量組病理顯微檢察也沒有發現因DTE的處理引起的組織或器官病理變化。本實驗確立DTPS的無明顯效應劑量(no-observed adverse effect level；NOAEL)大於0.6 g/kg。無明顯效應劑量可用於推估人的參考使用劑量(reference dose)，若動物與人體之間劑量換算其安全系數設定為100<sup>25</sup>，則DTE對於60公斤體重的人其參考使用劑量為每天360毫克。

## 伍、結論與建議

黃花石斛及金皇石斛是本土產的石斛，極為珍貴。本年度進行的功效及安全性評估試驗，得到的具體結果如下：

- 一、黃花石斛及金皇石斛明顯抑制Azoxymethane誘發的小鼠大腸息肉，其作用機轉主要是抑制Azoxymethane產生的氧化傷害，減輕發炎反應，因此減緩癌變的產生。
- 二、黃花石斛及金皇石斛可以增強先天免疫的活性，如增加NK細胞的毒殺作用，及促進巨噬細胞的吞示作用，也可停生抗體濃度。
- 三、黃花石斛及金皇石斛可以抑制塵蟎誘導過敏反應，如抑制呼吸道過度收縮、減少肺泡沖洗液中 IgE 抗體的量、病理切片染色也誠先低發炎及年液分泌情形。
- 四、黃花石斛大鼠 90 天餵食毒性試驗，其無明顯效應劑量(no-observed adverse effect level；NOAEL)大於 2.1 g/kg。
- 五、黃花石斛小鼠致畸胎試驗，其無明顯效應劑量(no-observed adverse effect level；NOAEL)大於2.1 g/kg。
- 六、黃花石斛進行沙門氏菌回復突變試驗、中國倉鼠卵巢細胞(Chinese hamster ovary cell)染色體變異試驗、及小鼠週邊血為何試驗等，皆顯示無基因毒性。
- 七、黃花石斛多醣大鼠28天餵食毒性試驗，其無明顯效應劑量大於0.6 g/kg。

這些結果確認黃花石斛及金皇石斛本試驗確認其使用安全性高，具有明確的調節免疫及抗過敏作用，應可開發成健康食品。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP100-RD-108 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. 沈保安: 石斛與霍山石斛的本草考證及植物鑑定. 中國中醫藥出版社 1998.
2. 馬忠仙;王剛: 金釵石斛研究概況. 遵義醫學院學報 2008;31:536-9.
3. 高正華;楊兵勛;陳立鈞: 鐵皮石斛的研究進展. 中國現代應用藥學雜誌 2008;25:692-5.
4. 陳富永;蔡奇助: 台灣原生石斛蘭植物種源蒐集、保存及種原基因庫建立. *GRB* 2006:GR9503-4032.
5. Shackelford C, Long G, Wolf J, et al: Qualitative and quantitative analysis of nonneoplastic lesions in toxicology studies. *Toxicol Pathol* 2002;30:93-96.
6. Maron DM, Ames BN: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 1983;113:173-215.
7. Bruckmann E, Wojcik A, Obe G: X-irradiation of G1 CHO cell induces SCE which are both true and false in BrdU-substituted cell but only biotin-dUTP-substituted cells. *Chromosome Res* 1999;7: 277-288.
8. Hayashi M, Morita T, Kodama Y, et al: The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res* 1990;245:245-249.
9. Giknis MLA, Clifford CB: *Clinical laboratory parameters for CrI:WI (Han)*, 2008 Charles river.
10. Scheller HV, Ulvskov P: Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol* 2010;61:263-89.
11. Hosono K, Endo H, Takahashi H, et al: Metformin suppresses azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci by activating AMP-activated protein kinase. *Mol Carcinog* 2010;49, (7), 662-71.
12. Sohn OS, Ishizaki H, Yang CS, et al: Metabolism of Azoxymethane, Methylazoxymethanol and N-Nitrosodimethylamine by Cytochrome-P450IIE1. *Carcinogenesis* 1991;12:127-131.
13. Fiala ES, Sohn OS, Hamilton SR: Effects of chronic dietary ethanol on in vivo and in vitro metabolism of methylazoxymethanol and on methylazoxymethanol-induced DNA Methylation in rat colon and liver. *Cancer Res* 1987; 47: 5939-5943.

14. Ashokkumar P, Sudhandiran G: *Luteolin* inhibits cell proliferation during Azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis via Wnt/beta-catenin pathway. *Invest New Drugs* 2011;29:273-84.
15. Tammali R, Reddy AB, Ramana KV, et al: Aldose reductase deficiency in mice prevents azoxymethane-induced colonic preneoplastic aberrant crypt foci formation. *Carcinogenesis* 2009;30:799-807.
16. Tammali R, Ramana KV, Srivastava SK: Aldose reductase regulates TNF-alpha-induced PGE2 production in human colon cancer cells. *Cancer Lett* 2007;252:299-306.
17. Tammali R, Ramana KV, Singhal SS, et al: Aldose reductase regulates growth factor-induced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human colon cancer cells. *Cancer Res* 2006;66:9705-9713.
18. Feregrino-Perez AA, Berumen LC, Garcia-Alcocer G, et al. Composition and chemopreventive effect of polysaccharides from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on azoxymethane-induced colon cancer. *J Agric Food Chem* 2008; 56:8737-8744.
19. Reuter S, Eifes S, Dicato M, et al: Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2008;76:1340-1351.
20. Chiou YS, Tsai ML, Nagabhushanam K, et al. Pterostilbene is more potent than resveratrol in preventing azoxymethane (AOM)-induced colon tumorigenesis via activation of the NF-E2-related factor 2 (Nrf2)-mediated antioxidant signaling pathway. *J Agric Food Chem* 2011;59:2725-2733.
21. Denkert C, Koch I, von Keyserlingk N, et al. Expression of the ELAV-like protein HuR in human colon cancer: association with tumor stage and cyclooxygenase-2. *Mod Pathol* 2006;19:1261-1269.
22. Lake DF, Briggs AD, Akporiaye ET. Immunopharmacology In: *Basic and clinical pharmacology*. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ (eds), Mc Graw Hill Medical, New York 2012, pp.977-1000.
23. Abbas AK, Lichtman AH, In: *Basic immunology: Functions and disorders of the immune system*. Elsevier Taiwan LLC. 2010, pp. 67-87.
24. Boushey HA Drugs used in asthma. In: *Basic and clinical pharmacology*. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ (eds), Mc Graw Hill Medical, New

York, 2012, pp.977-1000.

25. Faustman EM, Osmenn GS. Risk assessment. In: Casaett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. Klaassen CD. (eds) McGraw-Hill, New York, pp. 107-128.
26. Mortelmans K, Zeiger E: The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Muta Res* 2000;455:29-60.
27. Schmid, W: The micronucleus test. *Mutat Res* 1975;31:9-15.
28. De Boeck M, Van Der Leede BJ, Van Goethem F, et al: Flow cytometric analysis of micronucleated reticulocytes: time- and dose-dependent response of known mutagens in mice, using multiple blood sampling. *Environ Mol Mutagen* 2005;46:30-42.

# 柒、圖、表

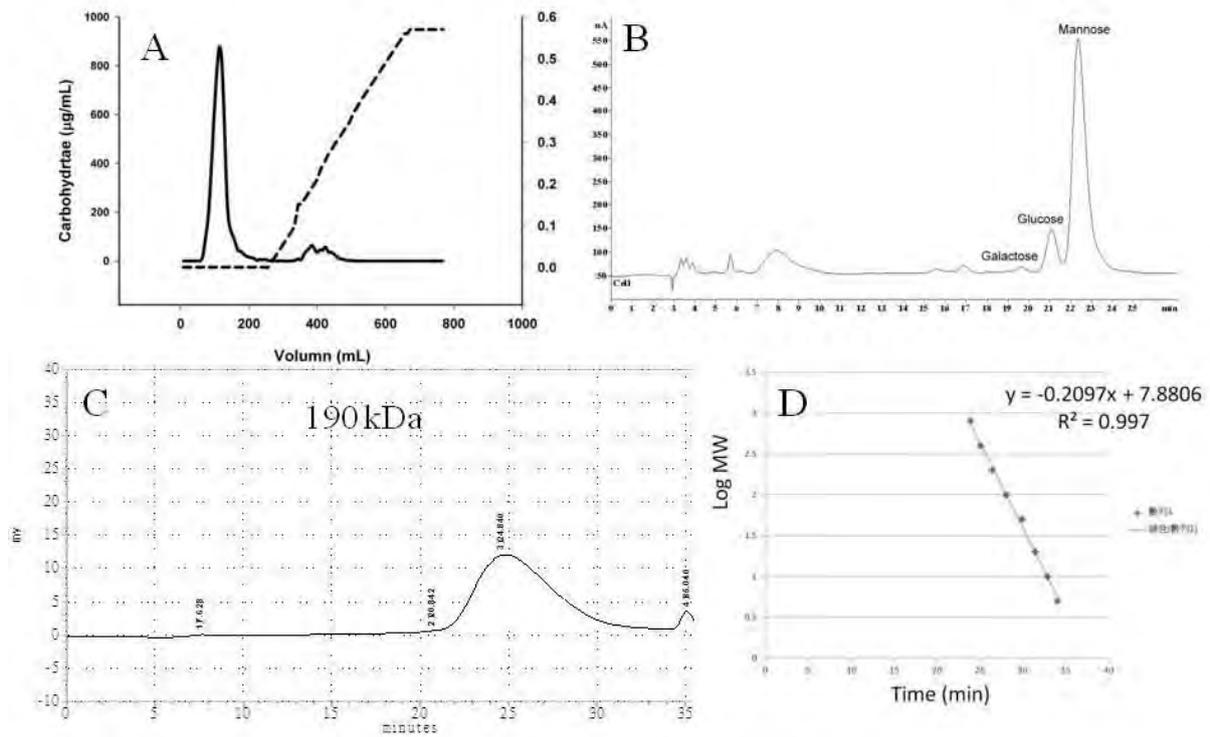
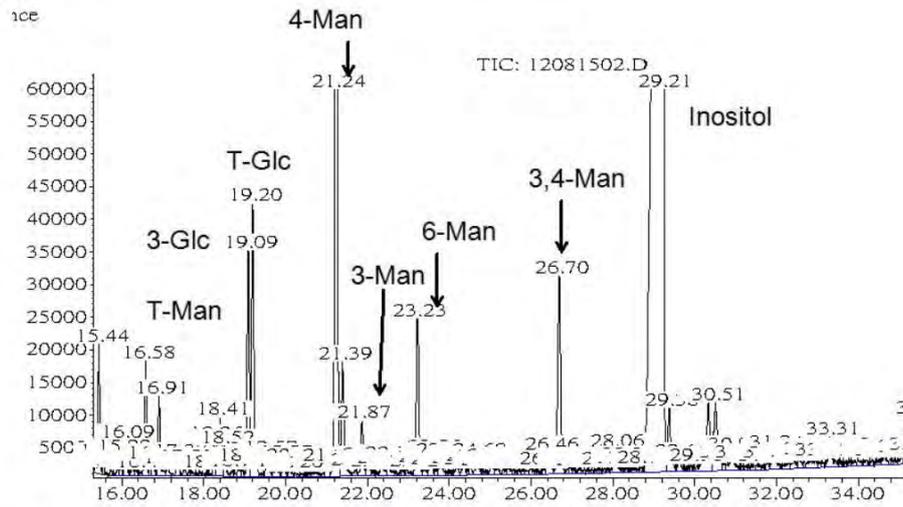


圖 1、IDTPS 純化、單糖組成及分子量分析

A

Mol%	Terminal		Non-branch				Branch
	T-Glc	T-Man	3-Glc	3-Man	4-Man	6-Man	3,4-Man
	0.54	4.68	3.90	3.73	59.42	11.61	16.12
	5.22%		78.65%				16.12%

B



C

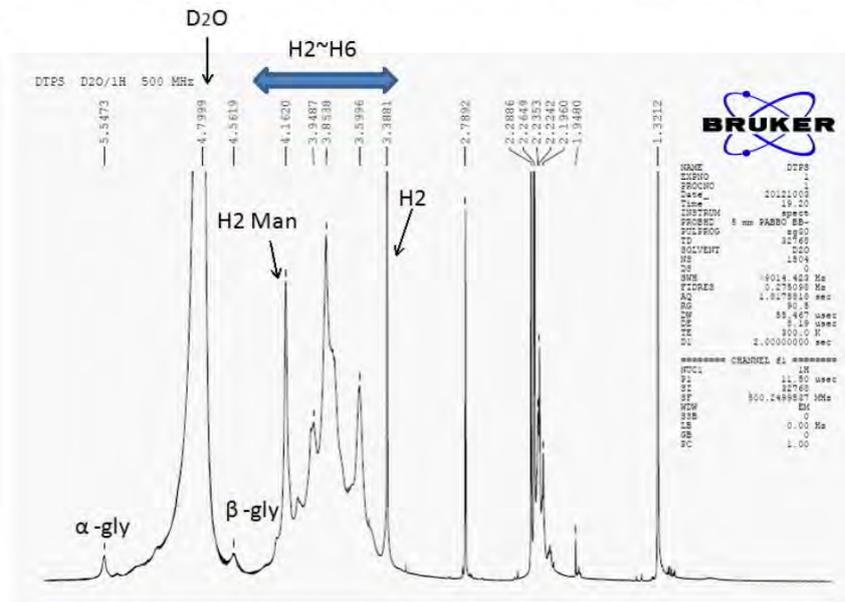


圖 2、IDTPS 結構分析

(A)各種鍵結漢耳百分率、(B)氣相質普串連分析圖譜、(C)氫譜 NMR

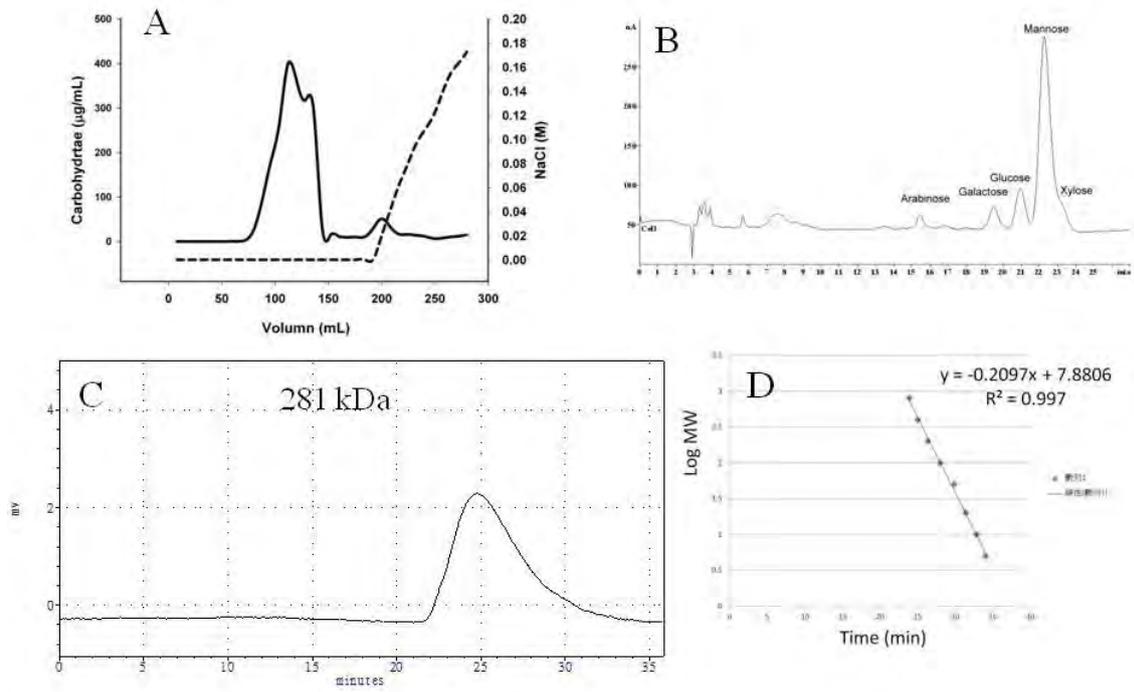
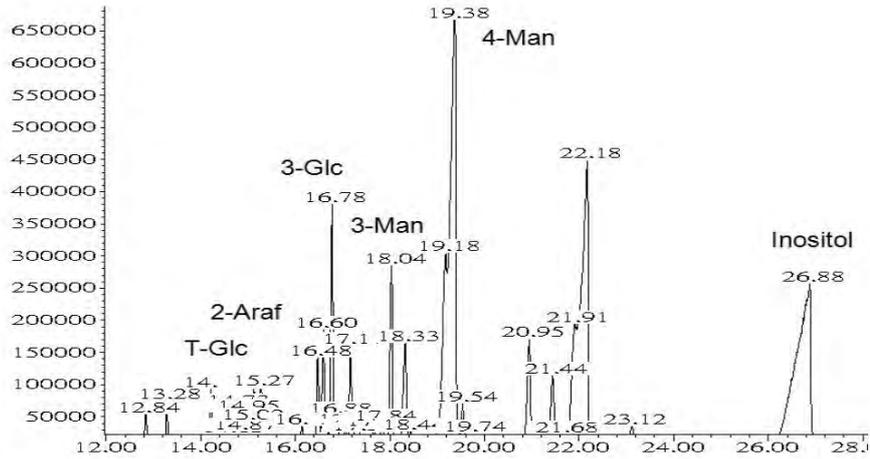


圖 3、IDTTPS 純化、單糖組成及分子量分析

A

	Terminal	Non-branch					
Mol%	T-Glc	2-Ara	6-Gla	2-Glc	3-Glc	3-Man	4-Man
	0.53	3.45	4.07	0.46	7.34	28.90	55.25
	0.53%	99.47%					

B



C

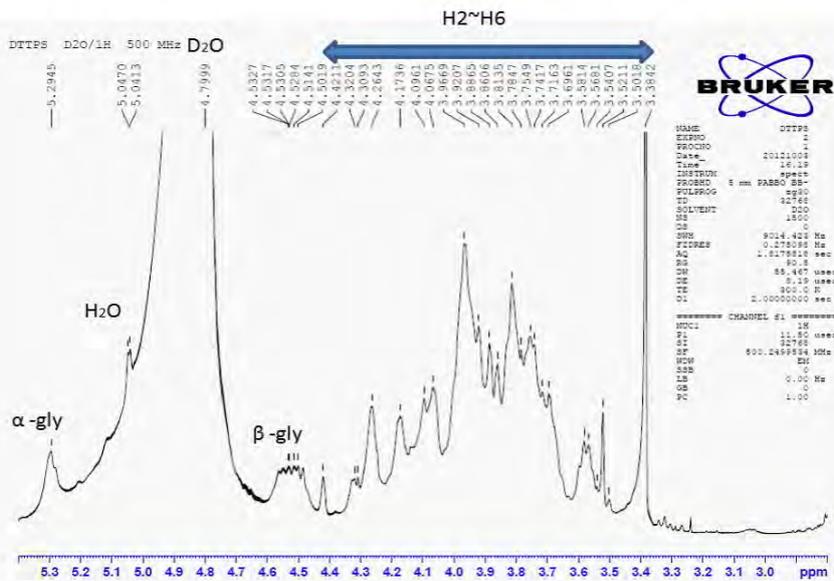


圖 4、IDTTPS 結構分析

(A) 各種鍵結糖耳百分率、(B) 氣相質普串連分析圖譜、(C) 氫譜 NMR

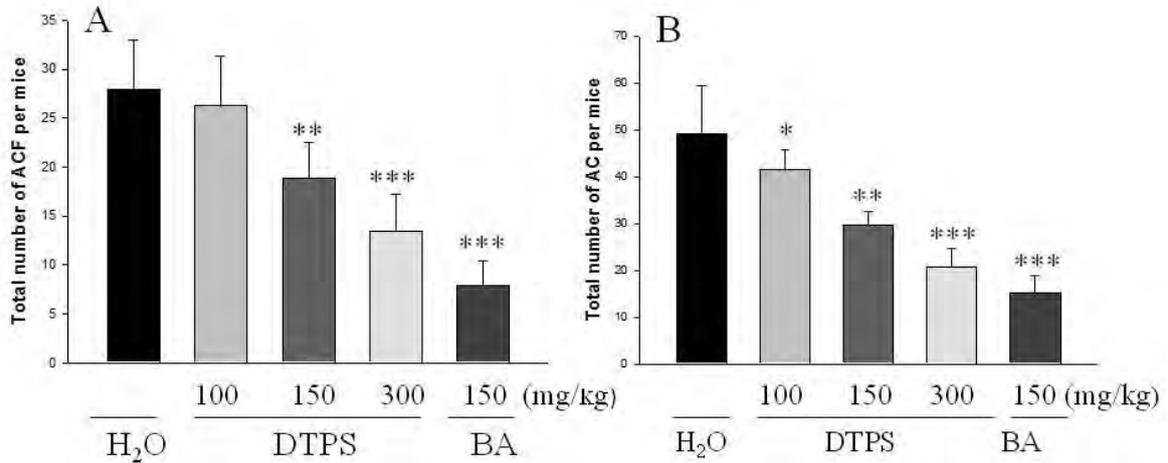


圖 5、DTTPS 對 AOM 誘發小鼠腸道 ACF 及 AC 的影響。

All values are means  $\pm$  SD (n = 8). \* $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  as compared with the control group. BA: butyric acid

ACF: aberrant crypt foci, AC: aberrant crypt

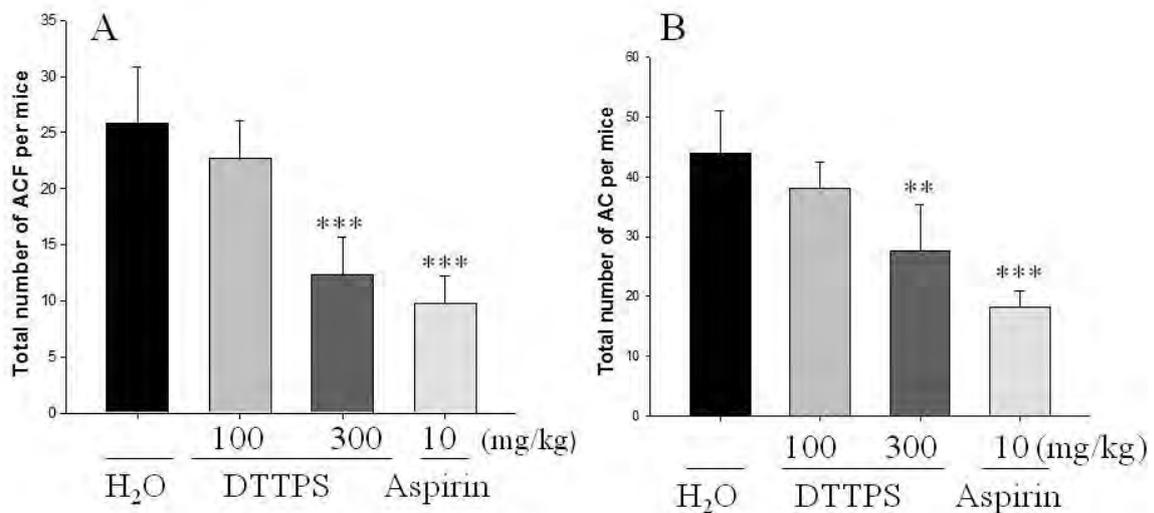


圖 6、DTTPS 對 AOM 誘發小鼠腸道 ACF 及 AC 的影響。

All values are means  $\pm$  SD (n = 8). \* $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  as compared with the control group.

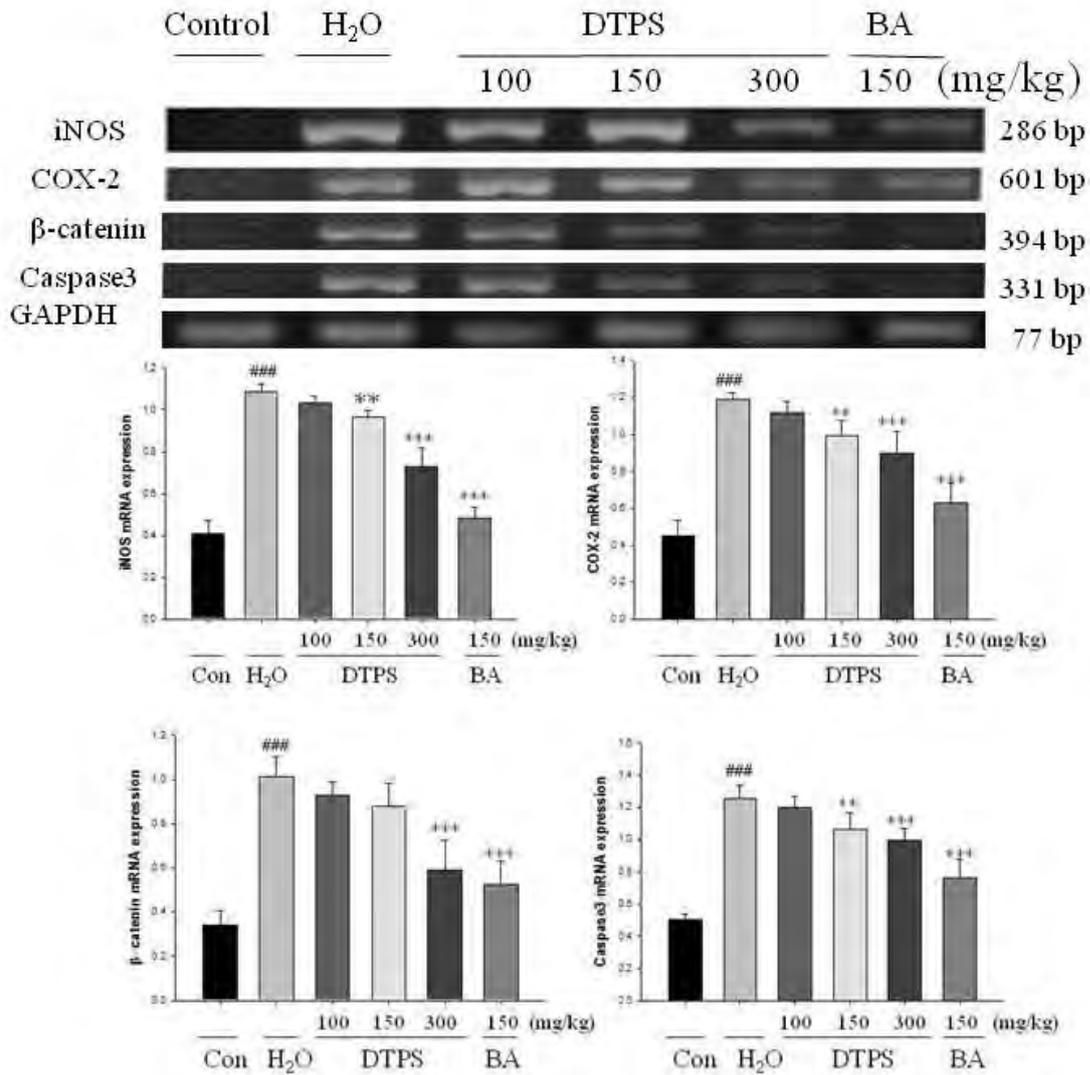


圖 7、DTSPS 對 AOM 誘發小鼠腸道黏膜 iNOS、COX-2、β-catenin 及 caspase 3 mRNA 表現的影響

All values are means  $\pm$  SD (n = 8). \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  as compared with the control group. BA: butyric acid

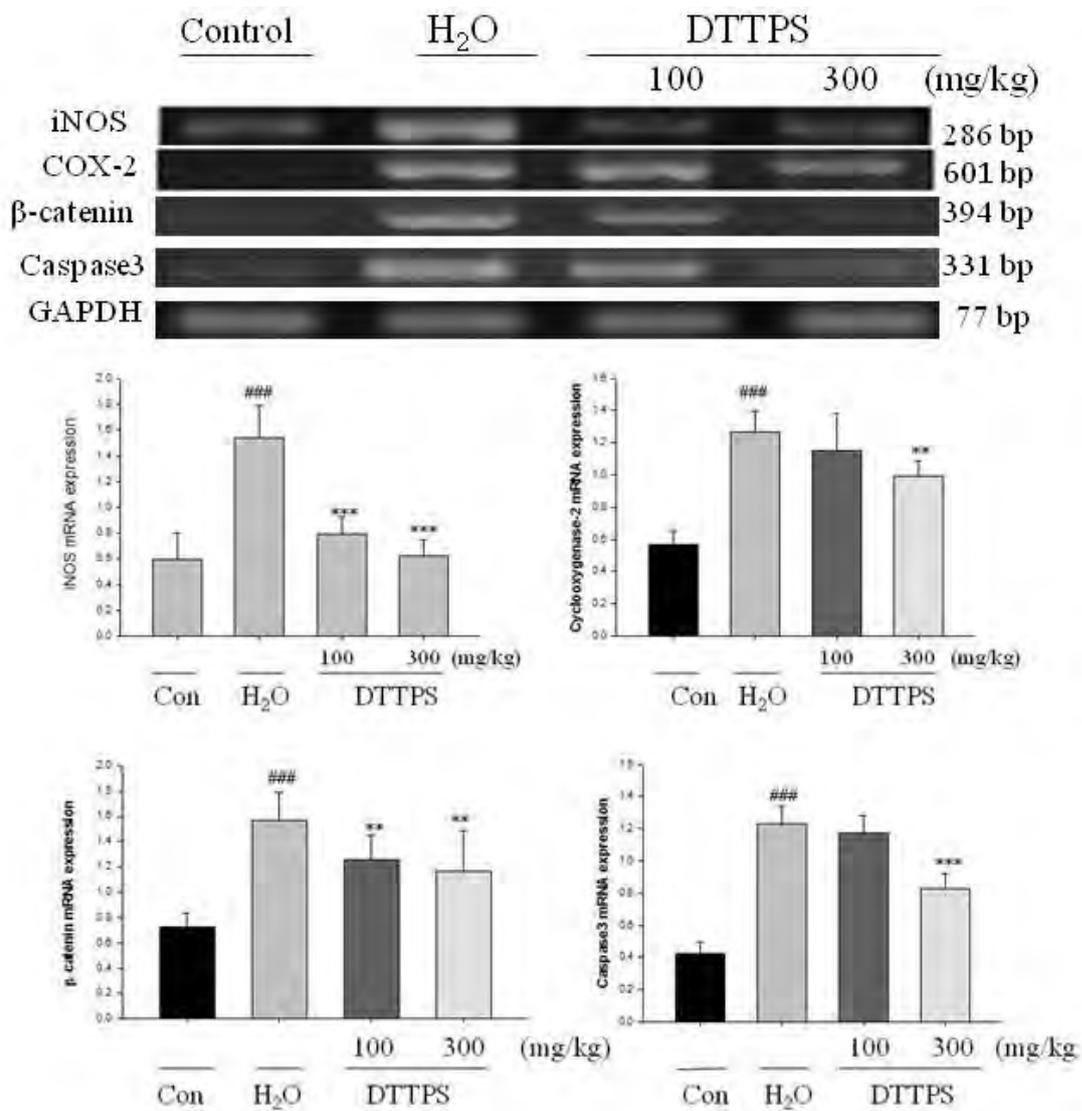


圖 8、DTTPS 對 AOM 誘發小鼠腸道黏膜 iNOS、COX-2、β-catenin 及 caspase 3 mRNA 表現的影響

All values are means  $\pm$  SD (n = 8). \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  as compared with the control group.

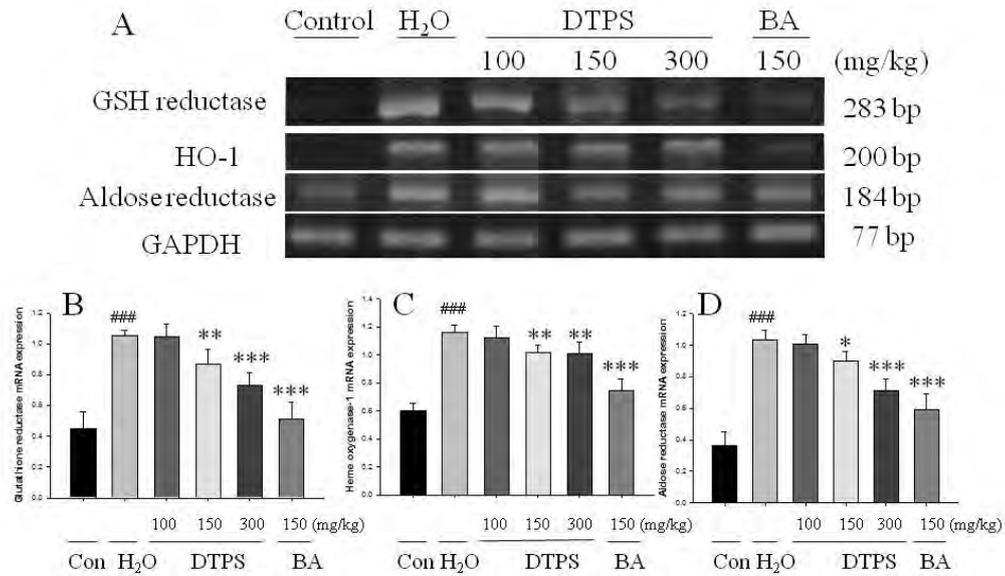


圖 9、DTSPS 對 AOM 誘發小鼠腸道黏膜 GSH reductase、HO-1 及 aldose reductase mRNA 表現的影響

All values are means  $\pm$  SD (n = 8). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  as compared with the control group.

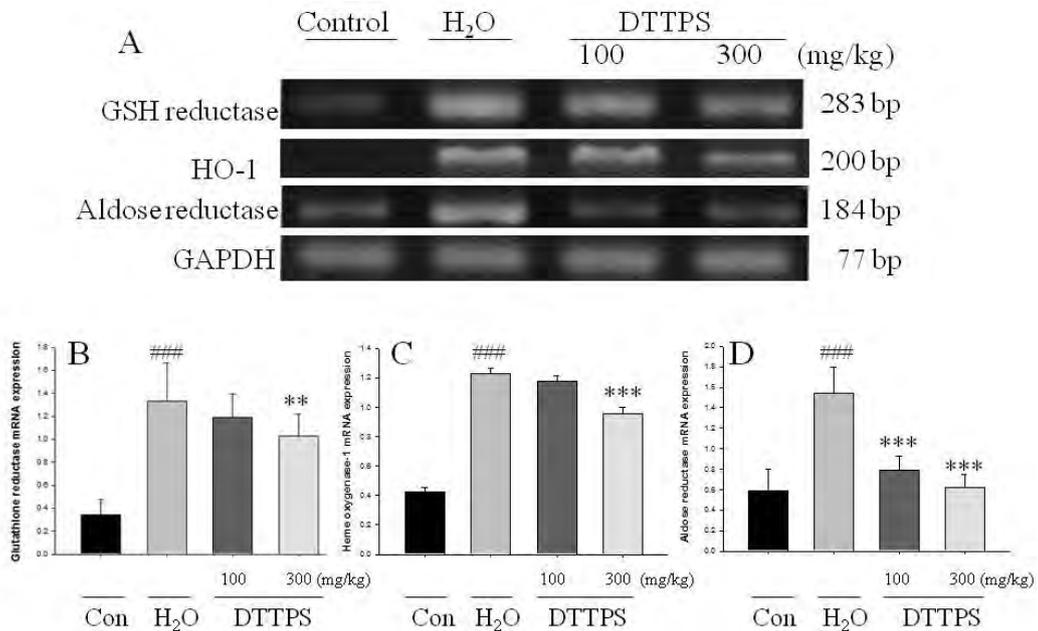


圖 10、DTTSPS 對 AOM 誘發小鼠腸道黏膜 GSH reductase、HO-1 及 aldose reductase mRNA 表現的影響

All values are means  $\pm$  SD (n = 8). \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  as compared with the control group.

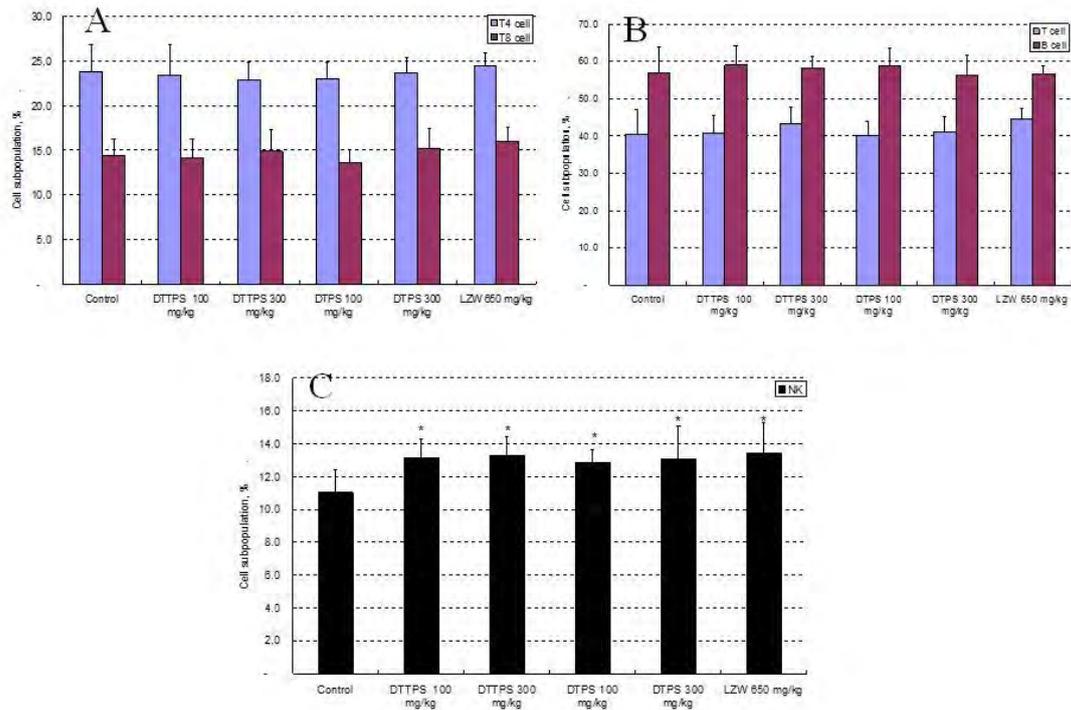


圖 11、DTTPS 及 DTSP 對小鼠之先天免疫系統脾淋巴細胞次族群分布的影響

All values are means  $\pm$  SD (n = 10). \* $P < 0.05$  as compared with the control group. LZW: 市售對照品靈芝

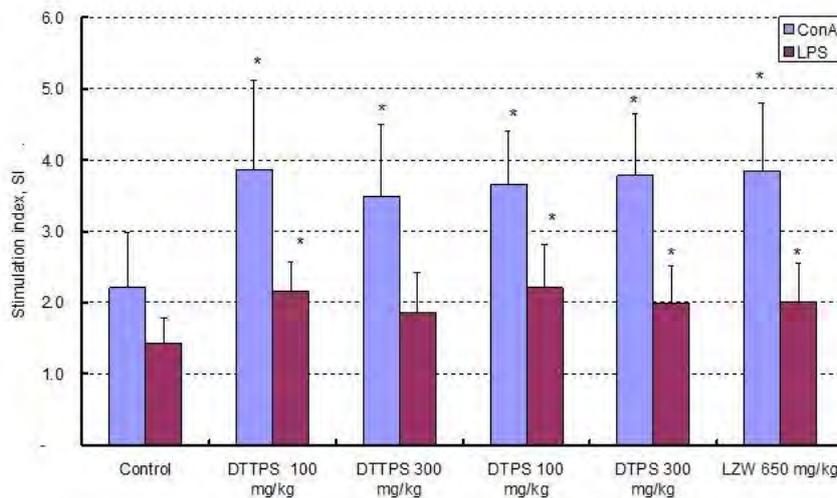


圖 12、DTTPS 及 DTSP 對小鼠之先天免疫系統脾淋巴細胞經裂殖原刺激下細胞增生的影響

All values are means  $\pm$  SD (n = 10). \* $P < 0.05$  as compared with the control group. LZW: 市售對照品靈芝。ConA: 5  $\mu$ g/mL ; LPS:10  $\mu$ g/mL

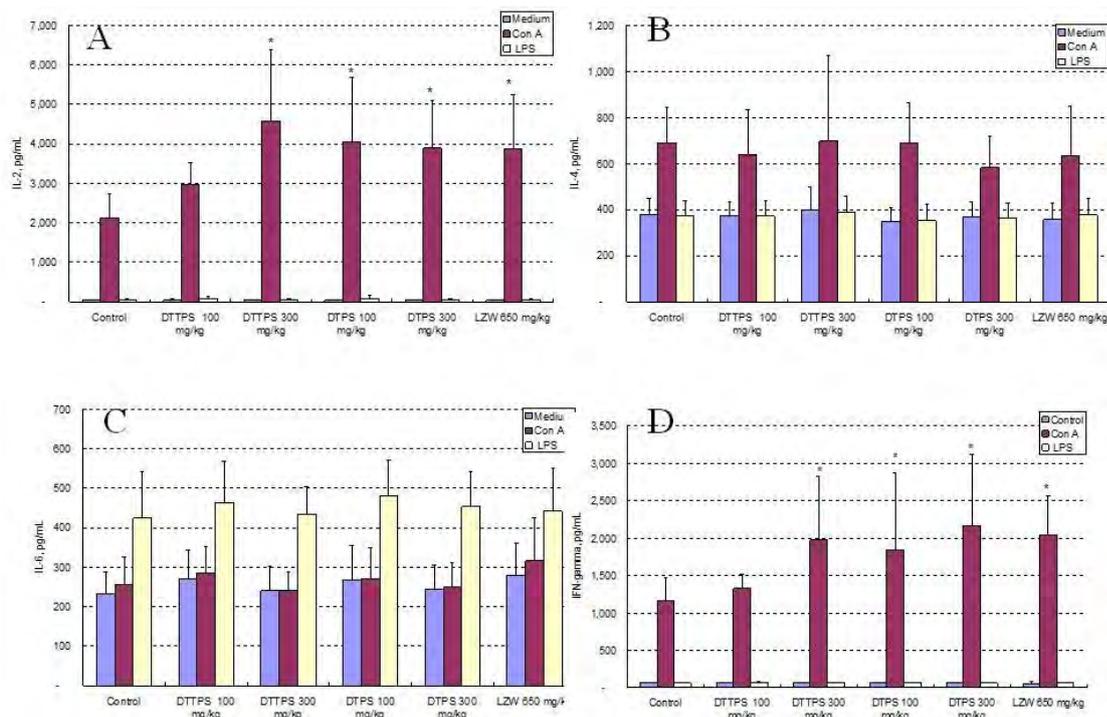


圖 13、DTTSP 及 DTSP 對小鼠之先天免疫系統脾淋巴裂殖原刺激下細胞激素分泌的影響

All values are means  $\pm$  SD (n = 10). \*P < 0.05 as compared with the control group. LZW: 市售對照品靈芝。ConA: 5  $\mu$ g/mL ; LPS:10  $\mu$ g/mL

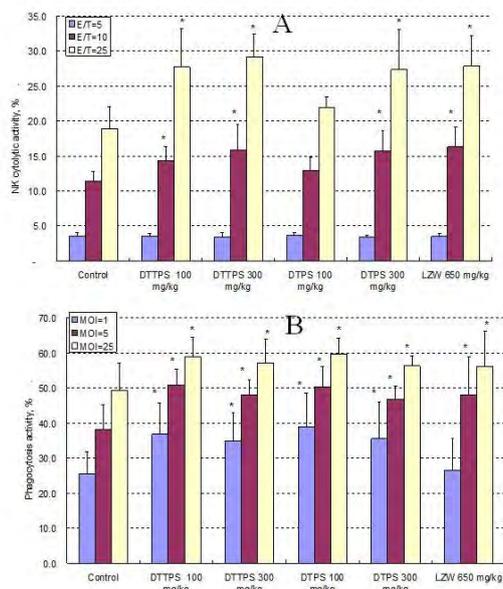


圖 14、DTTSP 及 DTSP 對小鼠之先天免疫系統脾 NK 細胞毒殺腫瘤細胞活力及吞噬細胞吞噬大腸桿菌活力的影響

All values are means  $\pm$  SD (n = 10). \*P < 0.05 as compared with the control group. LZW: 市售對照品靈芝

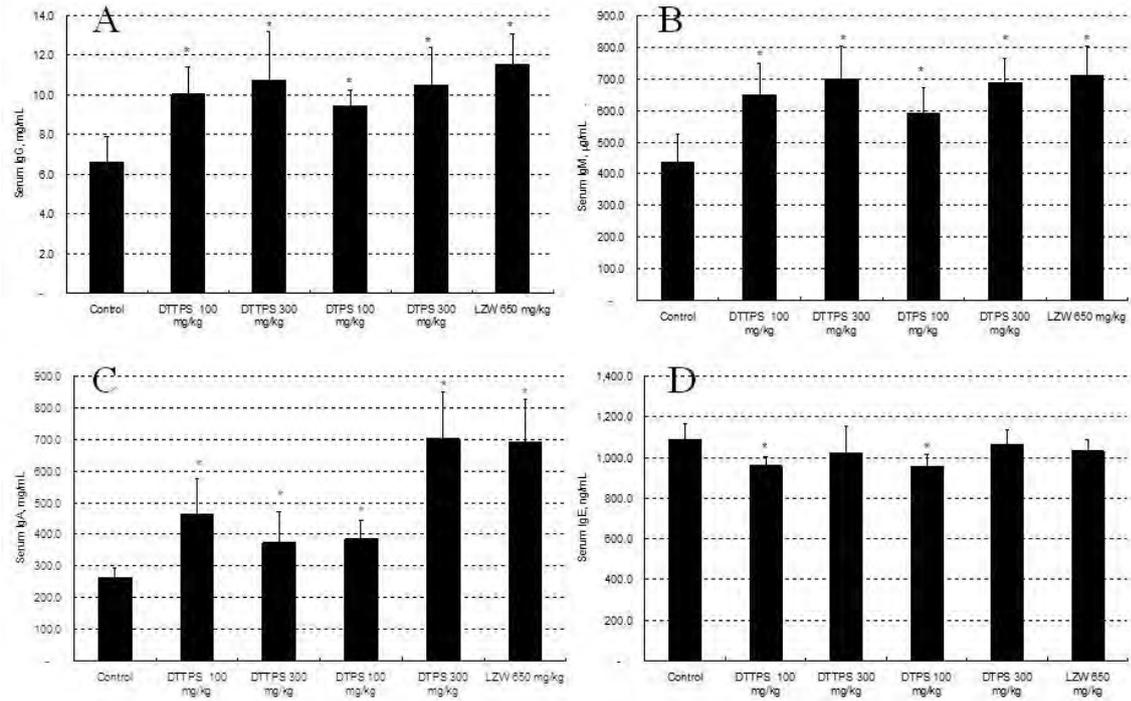


圖 15、DTTPS 及 DTSP 對小鼠之先天免疫系統血清中抗體的影響

All values are means  $\pm$  SD (n = 10). \* $P < 0.05$  as compared with the control group. LZW: 市售對照品靈芝

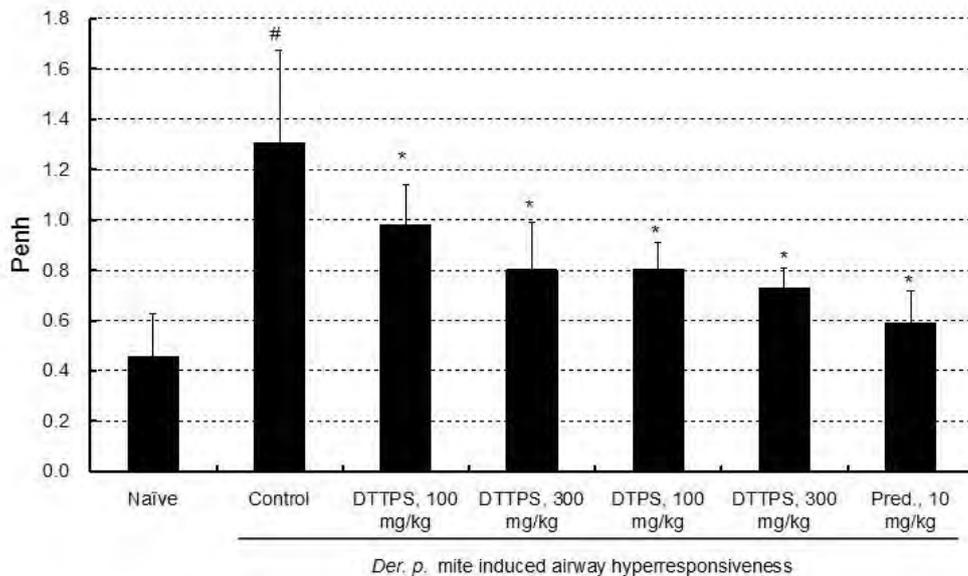


圖 16、DTTPS 及 DTSP 對塵蟎誘導小鼠呼吸道過度反應之影響

All values are means  $\pm$  SD (n = 10). \* $P < 0.05$  as compared with the control group. Pred : Prednisolone

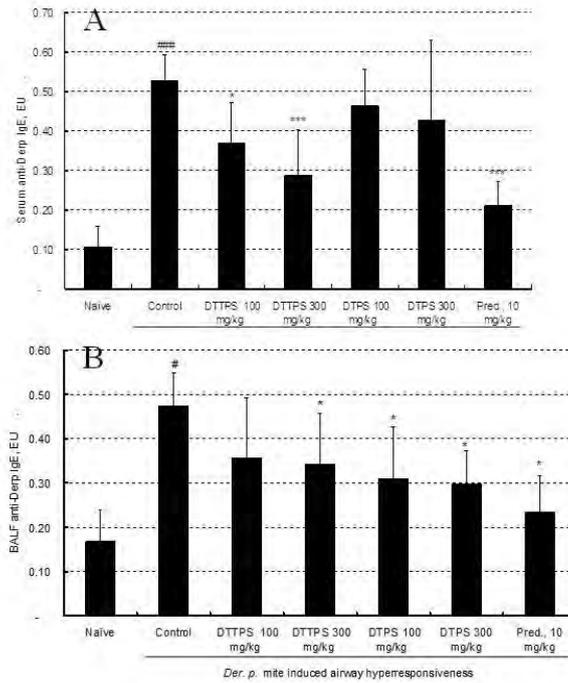


圖 17、DTTPS 及 DTSP 對塵蟎誘導小鼠呼吸道過度反應血清及肺泡沖洗液中抗體 IgE 活性的影響

All values are means  $\pm$  SD (n = 10). \* $P$  < 0.05 as compared with the control group. Pred : Prednisolone BALF: 肺泡沖洗液

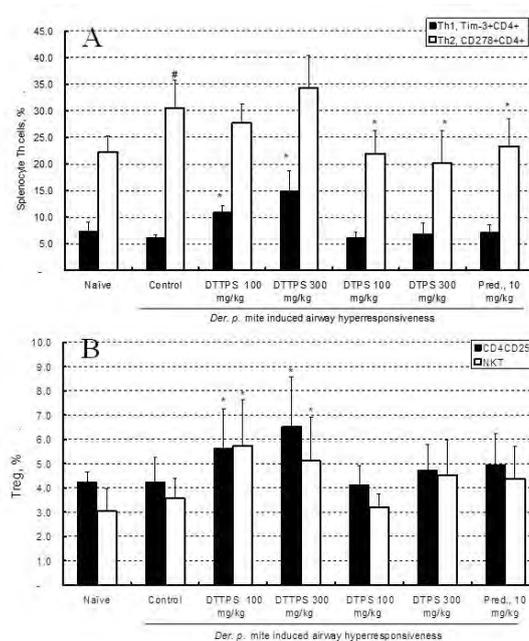


圖 18、DTTPS 及 DTSP 對塵蟎誘導小鼠呼吸道過度反應的脾淋巴 T 輔助細胞次族群分布的影響

All values are means  $\pm$  SD (n = 10). \* $P$  < 0.05 as compared with the control group. Pred : Prednisolone

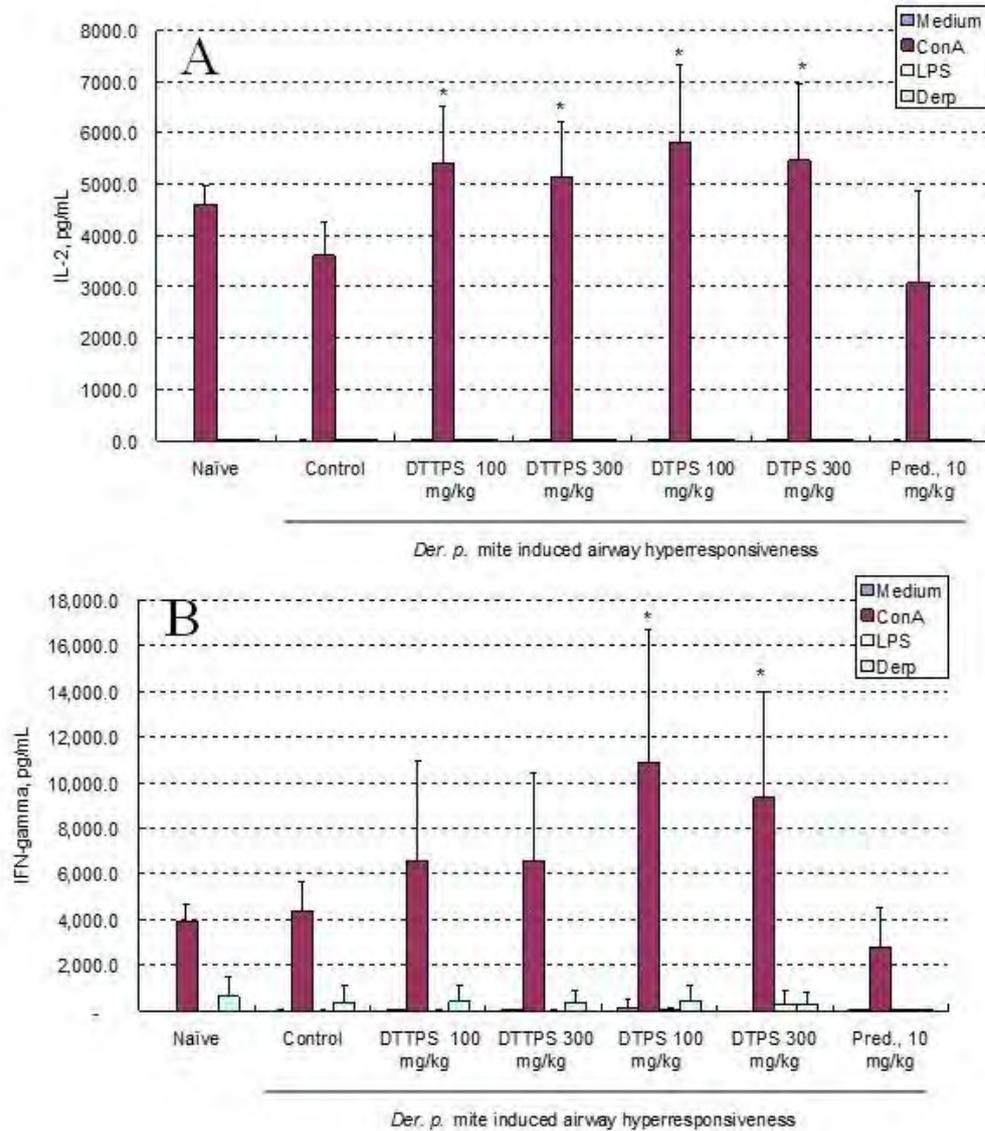


圖 19、DTTPS 及 DTSPS 對塵蟎誘導小鼠呼吸道過度反應的脾淋巴細胞細胞  
 激素釋放的影响

細胞以 Derp (25  $\mu\text{g/mL}$ ), Con A (5  $\mu\text{g/mL}$ ), LPS (10  $\mu\text{g/mL}$ ) 培養 48 hr。

All values are means  $\pm$  SD (n = 10). \* $P < 0.05$  as compared with the control group. Pred : Prednisolone

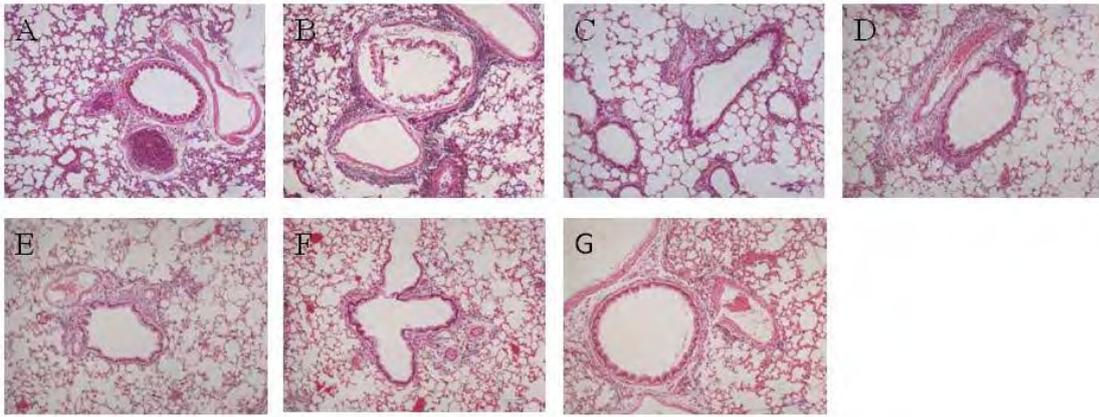


圖 20、DTTPS 及 DTPS 對塵蟎誘導小鼠呼吸道過度反應的肺組織切片(H&E 染色)。

(A) Control、(B) H<sub>2</sub>O：明顯發炎細胞浸潤、(C) DTTPS 100 mg/kg、(D) DTTPS, 300 mg/kg、(E) DTPS 100 mg/kg、(F) DTPS 300 mg/kg 及(G) Prednisolone (Pred) 10 mg/kg

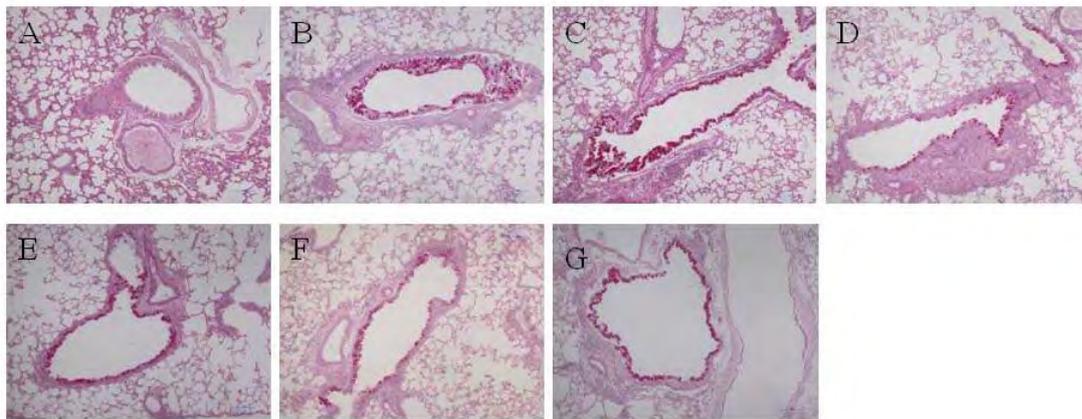


圖 21、DTTPS 及 DTPS 對塵蟎誘導小鼠呼吸道過度反應的肺組織切片(PAS 染色)

(A) Control、(B) H<sub>2</sub>O：明顯杯狀細胞黏液形成、(C) DTTPS 100 mg/kg、(D) DTTPS, 300 mg/kg、(E) DTPS 100 mg/kg、(F) DTPS 300 mg/kg 及(G) Prednisolone (Pred) 10 mg/kg

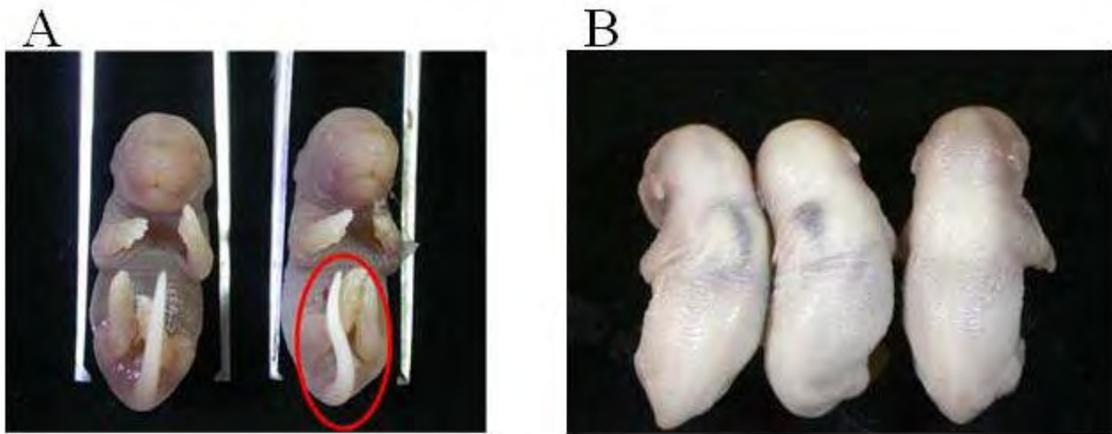


圖 22、畸胎試驗之仔鼠肉眼變化之畸型胎鼠 (A)短尾、(B)及柱側彎

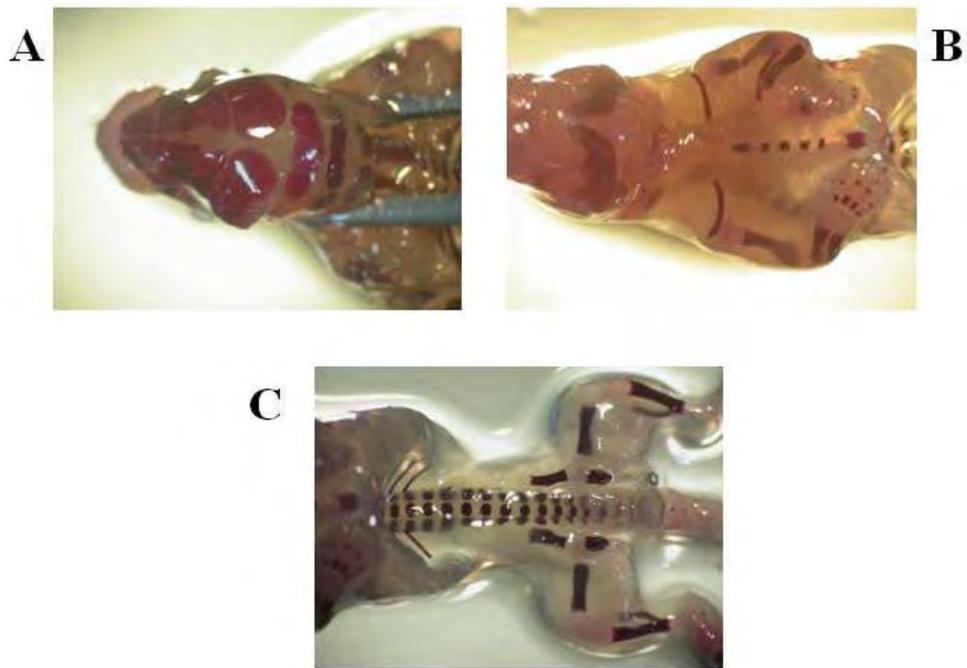


圖 23、正常骨骼之仔鼠

(A) normal skull, dorsal view, (B) normal sternum, and long bone of forelimb, (C) normal lumbar, sacral, caudal vertebrae, and long bone of hindlimb.

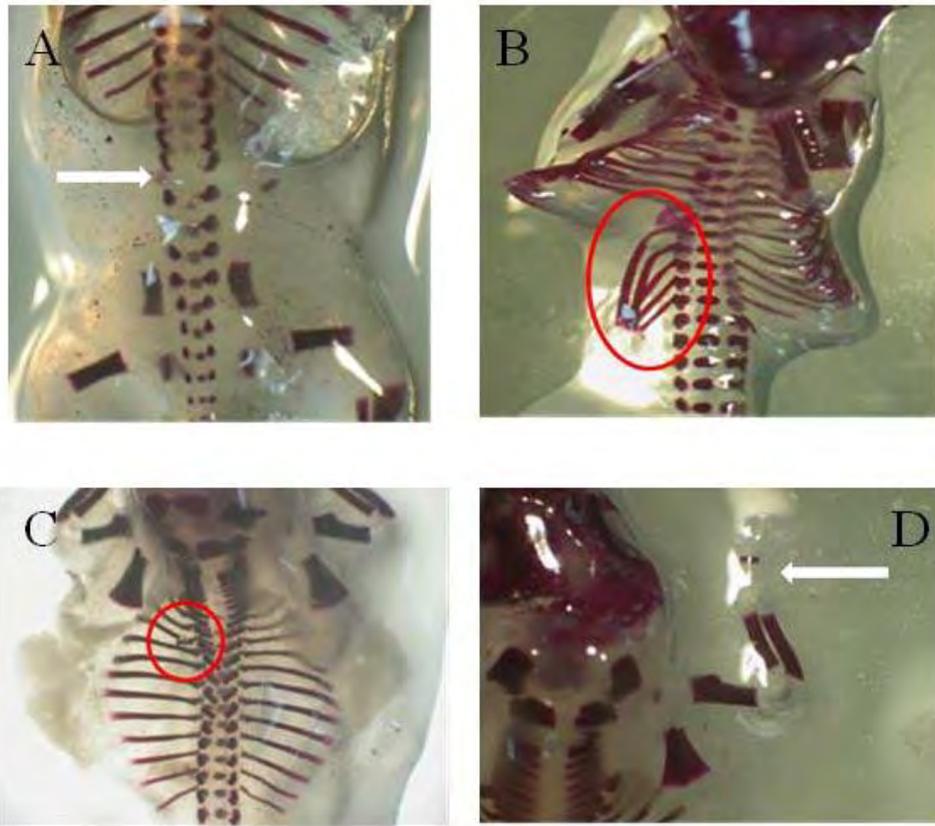


圖 24、不正常骨骼之仔鼠

(A) missing thoracic center、(B) break ribs、(C) break rib、  
 (D) missing metacarpal

表 1、DTE 大鼠 90 天餵食毒性試驗體重變化

Weeks	Body weight (g)			
	Control	0.7g/kg	1.4 g/kg	2.1g/kg
<b>Male</b>				
0	185.1 ± 7.0	187.3 ± 4.6	189.0 ± 8.6	184.8 ± 7.5
1	238.3 ± 10.7	240.7 ± 8.2	244.2 ± 10.2	242.5 ± 10.3
4	345.8 ± 18.7	349.5 ± 17.2	342.3 ± 13.1	351.5 ± 16.4
8	413.7 ± 22.9	420.7 ± 13.2	408.4 ± 25.4	413.0 ± 26.5
13	453.8 ± 23.8	455.2 ± 19.1	452.6 ± 27.9	452.1 ± 22.7
<b>Female</b>				
0	167.3 ± 9.5	166.3 ± 4.6	163.3 ± 8.1	167.5 ± 8.2
1	194.5 ± 10.7	198.8 ± 5.5	193.8 ± 8.1	196.5 ± 13.0
4	244.9 ± 15.2	243.1 ± 8.7	236.4 ± 12.8	240.7 ± 13.6
8	271.2 ± 13.2	267.6 ± 8.5	267.3 ± 14.6	275.6 ± 12.5
13	286.9 ± 16.3	282.2 ± 9.8	284.4 ± 18.8	291.4 ± 15.8

All values are means ± S.D. (n = 10).

表 2、DTE 大鼠 90 天餵食毒性試驗血液學檢查

Parameters		Control	0.7 g/kg	1.4 /kg	2.1 g/kg
Erythrocytes (10 <sup>6</sup> /μ L)	M	6.5 ± 0.3	6.9 ± 0.3	6.7 ± 0.3	6.8 ± 0.5
	F	7.7 ± 0.6	8.0 ± 1.0	7.8 ± 1.1	7.1 ± 0.8
Hemoglobin (g/dL)	M	14.3 ± 0.3	14.5 ± 0.6	14.3 ± 0.5	14.4 ± 0.6
	F	16.4 ± 1.7	17.4 ± 2.6	17.2 ± 2.8	15.5 ± 2.1
Hematocrit (%)	M	41.2 ± 1.1	42.3 ± 1.8	41.5 ± 1.4	42.0 ± 2.1
	F	47.6 ± 3.4	49.9 ± 6.7	49.1 ± 7.4	44.8 ± 5.4
MCV (μ <sup>3</sup> )	M	63.3 ± 1.5	61.8 ± 1.2*	62.3 ± 0.7	62.3 ± 1.3
	F	61.9 ± 2.2	62.3 ± 1.0	62.7 ± 1.5	62.7 ± 1.4
MCH (pg)	M	22.0 ± 0.6	21.2 ± 0.6	21.4 ± 0.7	21.4 ± 0.8
	F	21.5 ± 1.1	21.8 ± 0.6	21.9 ± 0.9	21.7 ± 0.7
MCHC (g/dL)	M	34.7 ± 0.3	34.3 ± 0.5	34.4 ± 0.9	34.3 ± 0.7
	F	34.8 ± 1.0	34.9 ± 0.7	35.0 ± 0.8	34.5 ± 0.7
Platelets (10 <sup>3</sup> /μL)	M	1214 ± 93	1275 ± 198	1199 ± 180	1216 ± 95
	F	1324 ± 143	1130 ± 255	1195 ± 111	1149 ± 248
Leukocytes (10 <sup>3</sup> /μL)	M	9.2 ± 3.2	10.0 ± 5.5	8.5 ± 2.8	7.9 ± 2.2
	F	10.0 ± 1.8	10.7 ± 2.2	10.7 ± 3.0	8.9 ± 1.5
Lymphocytes (%)	M	91.2 ± 1.7	87.8 ± 3.8	88.9 ± 3.8	77.4 ± 24.6*
	F	87.5 ± 4.1	83.1 ± 5.9	87.5 ± 4.1	88.7 ± 4.7
Seg. Neu (%)	M	8.8 ± 1.7	12.2 ± 3.8	11.1 ± 3.8	22.6 ± 24.6*
	F	12.5 ± 4.1	16.9 ± 5.9	12.5 ± 4.1	11.3 ± 4.7
PT (sec)	M	11.7 ± 0.8	11.6 ± 0.4	12.2 ± 1.4	11.3 ± 0.2
	F	10.0 ± 0.2	10.6 ± 1.8	9.9 ± 0.3	10.1 ± 0.4
APTT (sec)	M	23.2 ± 3.9	25.4 ± 4.8	27.7 ± 7.7	24.0 ± 2.8
	F	17.1 ± 0.4	21.5 ± 4.9	17.8 ± 0.7	17.8 ± 1.2

All values are means ± S.D. (n= 10).

M: male; F: female; Seg. Neu: segmented neutrophil

表 3、DTE 大鼠 90 天餵食毒性試驗血漿生化學檢查

Parameters		Control	0.7 g/kg	1.4g/kg	2.1g/kg
ALP (U/L)	M	57.0 ± 9.2	48.6 ± 4.6	49.3 ± 9.7	49.4 ± 5.6
	F	35.9 ± 9.6	36.7 ± 2.7	30.9 ± 5.6	34.1 ± 9.6
AST (U/L)	M	82.1 ± 7.0	79.7 ± 11.2	89.7 ± 14.1	82.6 ± 5.20
	F	74.9 ± 4.3	68.9 ± 6.6	68.0 ± 6.1	75.8 ± 6.8
ALT (U/L)	M	47.7 ± 11.4	36.8 ± 6.4*	43.7 ± 5.5	49.1 ± 10.5
	F	37.9 ± 7.4	38.3 ± 7.1	37.4 ± 4.2	44.5 ± 7.5
γ-GT (IU/L)	M	5.0 ± 2.3	4.5 ± 4.5	5.1 ± 5.0	4.5 ± 3.6
	F	2.1 ± 0.8	2.4 ± 1.3	3.1 ± 1.2	nd
Total-protein (g/dL)	M	6.1 ± 0.2	6.2 ± 0.4	6.1 ± 0.2	6.0 ± 0.9
	F	5.7 ± 0.3	5.7 ± 0.3	5.6 ± 0.2	5.7 ± 0.3
Albumin (g/dL)	M	4.1 ± 0.2	4.4 ± 0.3	4.3 ± 0.2	4.4 ± 0.1
	F	3.8 ± 0.2	3.8 ± 0.2	3.8 ± 0.2	3.9 ± 0.2
Globulin (g/dL)	M	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.4	1.8 ± 0.2	1.9 ± 0.2
	F	1.9 ± 0.2	1.9 ± 0.3	1.8 ± 0.2	1.8 ± 0.2
T-Bilirubin (mg/dL)	M	1.4 ± 0.2	1.5 ± 0.4	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.21
	F	1.5 ± 0.0	1.6 ± 0.18	1.6 ± 0.1	1.4 ± 0.3
Glucose (mg/dL)	M	97.1 ± 16.6	90.7 ± 19.0	94.5 ± 15.9	101.4 ± 14.6
	F	84.2 ± 18.1	87.8 ± 11.9	76.1 ± 12.2	85.7 ± 14.7
BUN (mg/dL)	M	19.8 ± 3.1	17.4 ± 3.3	18.0 ± 2.9	19.5 ± 2.9
	F	16.9 ± 3.6	17.9 ± 2.0	17.9 ± 2.3	19.5 ± 3.1
Creatinine (mg/dL)	M	0.6 ± 0.07	0.5 ± 0.16	0.50 ± 0.08*	0.6 ± 0.0
	F	0.5 ± 0.04	0.5 ± 0.18	0.47 ± 0.15	0.5 ± 0.05
Na (mEq/L)	M	147.1 ± 2.4	145.2 ± 1.7	147.2 ± 3.2	147.2 ± 2.2
	F	146.5 ± 2.9	147.6 ± 3.6	147.9 ± 2.9	148.1 ± 2.5
K (mEq/L)	M	3.4 ± 0.2	3.4 ± 0.3	3.5 ± 0.4	3.5 ± 0.4
	F	2.9 ± 0.2	3.2 ± 0.4	3.2 ± 0.3	3.1 ± 0.2
Cl (mEq/L)	M	104.5 ± 1.8	104.0 ± 1.2	104.5 ± 1.6	105.4 ± 2.0
	F	103.5 ± 2.4	104.0 ± 1.7	104.9 ± 2.8	102.9 ± 2.0
Ca (mg/dL)	M	10.8 ± 0.3	10.8 ± 0.2	10.9 ± 0.3	11.0 ± 0.4
	F	11.1 ± 0.3.	11.1 ± 0.4	11.1 ± 0.3	10.9 ± 0.4
P (mg/dL)	M	10.6 ± 0.8	10.4 ± 0.7	10.4 ± 1.2	11.1 ± 0.8
	F	9.0 ± 1.1	9.1 ± 1.2	9.3 ± 0.9	9.3 ± 1.1

T-Bili: total bilirubin;

All values are means ± S.D. (n = 10). \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with control group .M: male; F: female. nd: not detectable

表 4、DTE 大鼠 28 天餵食毒性試驗尿液檢查

Drug	Doses (g/kg)	Volume (ml)	pH	Specific gravity
Male				
Control		7.0 ± 2.5	8.1 ± 0.6	1.023 ± 0.019
	0.7	7.8 ± 2.0	7.9 ± 0.7	1.014 ± 0.007
	1.4	7.6 ± 2.8	7.8 ± 0.5	1.013 ± 0.004
	2.1	7.7 ± 2.6	7.9 ± 0.7	1.013 ± 0.007
Female				
Control		6.4 ± 1.2	7.6 ± 0.7	1.015 ± 0.009
	0.7	6.2 ± 0.8	7.6 ± 0.5	1.016 ± 0.005
	1.4	6.8 ± 1.4	7.6 ± 0.7	1.017 ± 0.007
	2.1	5.7 ± 0.8	7.4 ± 0.6	1.016 ± 0.006

All values are means ± S.D. (n = 10).

表 4、DTE 大鼠 28 天餵食毒性試驗尿液檢查(續)

Drug Doses (g/kg)	Urobilinogen (mg / dL)					Protein (mg / dL)						
	0.2	1	2	4	8	–	15	30	100	300	2000	
Male												
Control	10 <sup>a</sup>	0	0	0	0	1	3	1	5	0	0	
0.7	10	0	0	0	0	0	5	3	2	0	0	
1.4	9	0	0	1	0	2	5	2	1	0	0	
2.1	10	0	0	0	0	0	7	3	0	0	0	
Female												
Control	10	0	0	0	0	1	7	1	0	0	0	
0.7	10	0	0	0	0	1	7	2	0	0	0	
1.4	10	0	0	0	0	2	7	1	0	0	0	
2.1	10	0	0	0	0	1	7	2	0	0	0	

a: 大鼠隻數

表 4、DTE 大鼠 28 天餵食毒性試驗尿液檢查(續)

Drug Doses (g/kg)	Bilirubin (mg / dL)				Glucose (mg / dL)					
	-	1	2	4	-	100	250	500	1000	>2000
Male rats										
Control	9 <sup>a</sup>	1	0	0	10	0	0	0	0	0
0.7	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0
1.4	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0
2.1	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0
Female rats										
Control	1	9	0	0	10	0	0	0	0	0
0.7	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0
1.4	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0
2.1	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0

a: 大鼠隻數

表 4、DTE 大鼠 28 天餵食毒性試驗尿液檢查(續)

Drug Doses (g/kg)	Occult blood					Ketones (mg / dL)					
	-	±	+	++	+++	-	5	15	40	80	160
Male rats											
Control	1 <sup>a</sup>	9	0	0	0	3	4	3	0	0	0
DTE 0.7	10	0	0	0	0	3	7	0	0	0	0
1.4	10	0	0	0	0	2	7	1	0	0	0
2.1	10	0	0	0	0	3	4	3	0	0	0
Female rats											
Control	10	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0
DTE 0.7	10	0	0	0	0	6	2	2	0	0	0
1.4	10	0	0	0	0	7	3	0	0	0	0
2.1	10	0	0	0	0	7	3	0	0	0	0

a: 大鼠隻數

表 5、DTE 大鼠 90 天餵食毒性臟器重量變化

Parameters		Control	0.7 g/kg	1.4g/kg	2.1g/kg
Pituitary (mg) (mg/100 g BW)	M	2.0 ± 0.1 (0.4 ± 0.0)	2.0 ± 0.1 (0.4 ± 0.0)	2.0 ± 0.1 (0.4 ± 0.0)	1.9 ± 0.0 (0.5 ± 0.0)
	F	1.9 ± 0.1 (0.6 ± 0.1)	1.8 ± 0.1 (0.7 ± 0.0)	1.9 ± 0.1 (0.7 ± 0.1)	1.9 ± 0.1 (0.7 ± 0.1)
Brain (g) (g/100 g BW)	M	2.0 ± 0.1 (0.4 ± 0.0)	1.9 ± 0.1 (0.4 ± 0.0)	2.0 ± 0.1 (0.4 ± 0.0)	1.9 ± 0.1 (0.4 ± 0.0)
	F	1.8 ± 0.1 (0.6 ± 0.0)	1.8 ± 0.1 (0.6 ± 0.0)	1.8 ± 0.1 (0.6 ± 0.0)	1.8 ± 0.1 (0.6 ± 0.0)
Heart (g) (g/100 g BW)	M	1.3 ± 0.0 (0.3 ± 0.0)	1.3 ± 0.1 (0.3 ± 0.0)	1.3 ± 0.1 (0.3 ± 0.0)	1.3 ± 0.0 (0.3 ± 0.0)
	F	0.9 ± 0.0 (0.3 ± 0.0)	0.9 ± 0.1 (0.3 ± 0.0)	0.9 ± 0.0 (0.3 ± 0.0)	0.9 ± 0.0 (0.3 ± 0.0)
Liver (g) (g/100 g BW)	M	11.5 ± 0.7 (2.5 ± 0.2)	11.4 ± 0.8 (2.5 ± 0.1)	10.9 ± 1.3 (2.4 ± 0.2)	11.1 ± 1.2 (2.5 ± 0.2)
	F	7.6 ± 0.7 (2.6 ± 0.3)	7.3 ± 0.5 (2.6 ± 0.2)	7.4 ± 0.4 (2.6 ± 0.2)	7.9 ± 0.6 (2.7 ± 0.3)
Spleen (g/100 g BW)	M	1.0 ± 0.1 (0.2 ± 0.0)	0.9 ± 0.1 (0.2 ± 0.0)	0.9 ± 0.1 (0.2 ± 0.0)	0.9 ± 0.1 (0.2 ± 0.0)
	F	0.7 ± 0.1 (0.2 ± 0.0)	0.7 ± 0.1 (0.2 ± 0.0)	0.7 ± 0.1 (0.2 ± 0.0)	0.7 ± 0.1 (0.2 ± 0.0)
Kidney (L; g) (g/100 g BW)	M	1.4 ± 0.1 (0.3 ± 0.0)	1.4 ± 0.2 (0.3 ± 0.0)	1.3 ± 0.1 (0.3 ± 0.0)	1.4 ± 0.1 (0.3 ± 0.0)
	F	0.9 ± 0.1 (0.3 ± 0.0)	0.9 ± 0.0 (0.3 ± 0.0)	0.9 ± 0.0 (0.3 ± 0.0)	0.9 ± 0.0 (0.3 ± 0.0)
Kidney (L; g) (g/100 g BW)	M	1.4 ± 0.1 (0.3 ± 0.0)	1.4 ± 0.2 (0.3 ± 0.0)	1.4 ± 0.2 (0.3 ± 0.0)	1.4 ± 0.1 (0.3 ± 0.0)
	F	0.9 ± 0.1 (0.3 ± 0.0)	0.9 ± 0.0 (0.3 ± 0.0)	0.9 ± 0.0 (0.3 ± 0.0)	0.9 ± 0.0 (0.3 ± 0.0)
Adrenal (L; mg) (mg/100 g BW)	M	47.3 ± 4.6 (10.4 ± 1.0)	41.9 ± 7.2 (9.2 ± 1.6)	47.2 ± 6.1 (10.5 ± 1.6)	44.6 ± 7.9 (9.9 ± 7.7)
	F	51.9 ± 8.8 (18.0 ± 2.5)	51.7 ± 9.9 (18.2 ± 3.1)	52.0 ± 0.6 (18.3 ± 3.4)	52.1 ± 9.9 (17.9 ± 3.7)
Adrenal (R; mg) (mg/100 g BW)	M	45.6 ± 5.1 (10.0 ± 0.9)	40.7 ± 5.9 (8.9 ± 1.2)	46.5 ± 12.1 (10.3 ± 2.6)	45.7 ± 8.6 (10.1 ± 2.0)
	F	53.6 ± 0.9 (18.6 ± 3.5)	60.5 ± 12.5 (21.2 ± 4.4)	51.3 ± 7.2 (18.1 ± 2.8)	57.4 ± 7.4 (19.7 ± 3.2)
Testis (L; g) (g/100 g BW)	M	1.8 ± 0.1 (0.4 ± 0.0)	1.9 ± 0.2 (0.4 ± 0.0)	1.7 ± 0.4 (0.4 ± 0.0)	1.9 ± 0.1 (0.4 ± 0.0)
	(R; g) (g/100 g BW)	M	1.8 ± 0.1 (0.4 ± 0.0)	1.9 ± 0.1 (0.4 ± 0.1)	1.8 ± 0.0 (0.4 ± 0.0)

Parameters		Control	0.7 g/kg	1.4g/kg	2.1g/kg
Ovary (L; mg)	F	80.2 ± 16.0	80.4 ± 12.7	76.0 ± 8.0	80.0 ± 11.9
(mg/100 g BW)		(27.9 ± 5.4)	(28.3 ± 4.7)	(26.7 ± 3.3)	(27.5 ± 4.1)
(R; mg)	F	75.5 ± 9.9	76.9 ± 11.9	82.3 ± 15.3	75.8 ± 10.0
(mg/100 g BW)		(26.1 ± 3.6)	(26.2 ± 4.1)	(28.9 ± 5.3)	(26.7 ± 3.3)

All values are means ± S.D. (n = 10).

( ): relative weight; b.w.: body weight; M: male; F: female; L: left; R: right

表 6、DTE 大鼠 90 天餵食高劑量組臟器病理檢查

Organ	Lesions	Male		Female	
		H <sub>2</sub> O	2.1 g/kg	H <sub>2</sub> O	2.1 g/kg
Adrenal		0/10 <sup>1</sup>	0/10	0/10	0/10
Aorta		0/10	0/10	0/10	0/10
Brain		0/10	0/10	0/10	0/10
Heart	Infiltration, mononuclear cell, minimal	0/10	0/10	1/10	0/10
Intestine		1/10	0/10	0/10	0/10
Kidney	Cast, focal, minimal	1/10	0/10	0/10	0/10
	Mineralization, focal, slight	0/10	1/10	0/10	0/10
Liver		0/10	0/10	0/10	0/10
Lung	Necrosis, focal, slight	1/10	0/10	0/10	0/10
Ovary				0/10	0/10
pancreas		0/10	0/10	0/10	0/10
Parathyroid		0/1			0/10
Pituitary		0/5	0/7	0/8	0/10
Sciatic nerve		0/10	0/10	0/10	0/10
Seminal vesicle		0/10	0/10	-	-
Skeletal muscle		0/10	0/10	0/10	0/10
Spinal cord		0/10	0/10	0/10	0/10
Stomach		0/10	0/10	0/10	0/10
Spleen		0/10	0/10	0/10	0/10
Testis		0/10	0/10		
Thymus	Cyst, focal, moderate severe	0/10	0/10	0/10	0/10
Thyroid		0/8	0/10	0/10	0/10
Urinary bladder		0/10	0/10	0/10	0/10
Uterus		-	-	1/10	3/10
vagina		-	-	0/10	0/10

<sup>1</sup> Incidence: no. of affected rats/ no. of rats were examined.

-: no tissue

表 7、DTE 對懷孕母鼠體重的影響

Treatments Dose (g/kg)	Body weight (g)					No. of mice
	Day 6	Day 9	Day 12	Day 15	Day 18	
Control -	31.7 ± 1.0	33.0 ± 1.3	38.4 ± 1.3	45.2 ± 1.6	55.6 ± 2.8	21
DTE 0.7	30.7 ± 3.3	32.3 ± 3.1	39.4 ± 9.1	43.9 ± 4.1	54.2 ± 5.7	20
1.4	31.1 ± 1.4	32.3 ± 2.0	36.8 ± 1.9	43.0 ± 2.6	53.6 ± 3.8	20
2.1	30.8 ± 1.6	32.0 ± 1.7	36.7 ± 2.3	43.0 ± 3.0	53.1 ± 3.9	22

All values were means ± SD.

表 8、DTE 對懷孕母鼠體重增重的影響

Treatments Dose (g/kg)	Increased Body weight (g)				No. of mice
	Day 6 - 9	Day 6 - 12	Day 6 - 15	Day 6 - 18	
Control -	1.2 ± 1.3	6.7 ± 1.5	13.5 ± 1.9	23.8 ± 2.9	21
DTE 0.7	1.6 ± 1.7	7.2 ± 1.9	13.2 ± 2.6	23.5 ± 3.8	20
1.4	1.2 ± 1.3	5.7 ± 1.5	11.8 ± 2.1	21.4 ± 5.8	20
2.1	1.2 ± 0.7	5.8 ± 1.3	12.1 ± 2.2	22.2 ± 3.2	22

All values were means ± SD.

表 9、DTE 對懷孕母鼠攝食量的影響

Treatments Dose (g/kg)	Food intake (g)				No. of mice
	Day 6 - 9	Day 9 - 12	Day 12 - 15	Day 15 - 18	
Control	25.4 ± 3.4	25.6 ± 3.1	24.5 ± 2.7	28.0 ± 2.0	21
DTE 0.7	23.3 ± 2.5	23.1 ± 1.6	25.9 ± 1.5	26.7 ± 2.5	20
1.4	24.3 ± 4.8	23.6 ± 3.1	24.3 ± 2.1	27.0 ± 1.7	20
2.1	23.6 ± 2.1	24.9 ± 2.2	26.8 ± 1.9	26.4 ± 2.8	22

All values were means ± SD.

表 10、懷孕第 18 天母鼠大體解剖觀察

	Control	DTE 0.7 g/kg	DTE 1.4 g/kg	DTE 2.1 g/kg
No. of animals examined	21	20	20	21
Head-brown staining on muzzle	0 <sup>a</sup>	0	0	0
Ureter hydroureter	0	0	0	0
Kidney hydronephrosis	0	0	0	0
Urinary bladder contains hard pale stone	0	0	0	0
Uterus agenesis	0	0	0	0

a: Number of maternal mouse

表 11、懷孕母鼠帝王切開的觀察

	Control	DTE 0.7 g/kg	DTE 1.4 g/kg	DTE 2.1 g/kg
No. of animals examined	21	20	20	22
No. of implants total	252	266	259	278
No. of implants (means ± SD)	12.1 ± 4.1	13.3 ± 2.1	13.0 ± 1.7	12.6 ± 2.6
No. of live fetuses total	238	251	242	258
No. of live fetuses means ± SD	11.2 ± 3.8	12.6 ± 2.2	12.1 ± 1.6	11.7 ± 2.1
No. of live fetuses male	134	118	112	108
No. of live fetuses female	104	133	130	150
Sex ratio	0.56	0.47	0.46	0.40
No. of fetal resorption early	15(5.9)	11(4.1)	14 (5.4)	14 (5.0)
late	3(1.2)	1(0.4)	0	2(0.7)
Total (%)	18 (7.1)	12 (4.5)	14 (5.4)	16(5.8)
No. of fetal death (%)	4 (1.6)	0(0)	0(0)	3(1.1)

Sex ratio: total no. of male fetuses / total no. of live fetuses

% resorption = No. of total resorption / No. of total implants

% fetal death = No. of fetal death / No. of (live fetuses + dead fetuses)

表 12、DTE 對仔鼠及胎盤重量的影響

Treatments	Dose (g/kg)	Fetal weight (g)		Placenta weight (g)	
		Male	Female	Male	Female
Control		1.09 ± 0.11 (n = 134)	1.06 ± 0.09 (n = 104)	0.12 ± 0.10 (n = 135)	0.11 ± 0.07 (n = 104)
DTE	0.7	1.02 ± 0.11*** (n = 118)	1.00 ± 0.16*** (n = 133)	0.11 ± 0.11 (n = 118)	0.09 ± 0.02 (n = 133)
	1.4	1.04 ± 0.13* (n = 112)	1.01 ± 0.12* (n = 130)	0.12 ± 0.02 (n = 0.02)	0.11 ± 0.02 (n = 0.02)
	2.1	1.05 ± 0.10* (n = 105)	1.00 ± 0.13** (n = 154)	0.12 ± 0.03 (n = 105)	0.12 ± 0.09 (n = 154)

All values were means ± SD. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 as compared with the control group.

表 13、仔鼠外觀檢察

	Control	DTE 0.7g/kg	DTE 1.4 g/kg	DTE 2.1g/kg
No. fetuses/litters examined	238 (21)	251(20)	242 (20)	258 (21)
No. litters with abnormalities (%) <sup>1</sup>	3 (14.3)	4 (20)	2 (10.0)	3 (14.2)
No. fetuses with anomalies, N (mean %)	3 (1.3)	4 (2.0)	3 (1.2)	3 (1.2)
Type of anomalies, N (mean %)²				
Head				
Hydrocephalic	0 (0)	1 (0.4)	0 (0)	2 (0.8)
Abdominal				
Umbilical hernia	1 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0.0)
limbs				
Phocomelia	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0.0)
Tail				
Bending	1 (0.4)	1(0.4)	0 (0.0)	0 (0.0)
Other				
Torticollis	0 (0)	1(0.4)	2 (0.8)	0 (0.0)
Vertebra side bend	0 (0)	1(0.4)	0 (0)	0 (0.0)
Anatomy closed not entire	1 (0.4)	0(0)	1 (0.4)	1 (0.4)

<sup>1</sup> % = Number of litters affected/total litters examined x 100.

<sup>2</sup> % = Number of fetuses affected/total fetuses examined x 100.

表 14、仔鼠内臓検査

Group	Control	DTE 2.1 g/kg
No. fetuses/litters examined	111 (21)	136 (22)
No. litters with abnormalities (%) <sup>1</sup>	0 (0.0)	0 (0.0)
No. fetuses with anomalies, N (mean %)	0 (0.0)	0 (0.0)
Type of anomalies, N (mean %) <sup>2</sup>	0 (0.0)	0 (0.0)

<sup>1</sup> %= Number of litters affected/total litters examined x 100.

<sup>2</sup> %= Number of fetuses affected/total fetuses examined x 100.

a: No.C17 lost 1 fetus.

表 15、仔鼠透明骨検査

Group	Control	DTE 2.1 g/kg
No. fetuses/litters examined	127(21)	122 (22)
No. litters with abnormalities <sup>1</sup>	9 (21)	3 (13.6)
No. fetuses with abnormalities, N (mean %) <sup>2</sup>	14 (11.6)	5 (4.0)
Type of anomalies, N (mean %)		
Skull		
Braincase		
Missing	1 (0.8)	0 (0)
Break	1 (0.8)	0 (0)
Axial skeleton		
Sternal		
Missing	0 (0)	1 (0.8)
Vertebrae		
Missing	2 (1.6)	1 (0.8)
Break	1 (0.8)	0 (0)
Winding	1 (0.8)	0 (0)
Tail		
Winding	1 (0.8)	0 (0)
Ribs		
Missing	6 (4.9)	0 (0)
Break	1 (0.8)	2 (1.6)
Pelvic Girdle		
Metacarpals		
Missing		1(0.8)

<sup>1</sup> %= Number of litters affected/total litters examined x 100.

<sup>2</sup> %= Number of fetuses affected/total fetuses examined x 100.

表 16、DTE 對沙門氏菌 TA102、TA1535、TA1537、TA98 及 TA100 的致突變作用(不含 S9)

Treatments	Conc. (mg/plate)	Number of revertants (colony/plate)				
		TA98	TA100	TA102	TA1535	TA1537
Control		23.3± 0.5	188.0± 5.4	268.0± 4.3	14.3± 1.7	10.7± 0.9
PC <sup>1</sup>		119± 27*	2717± 210*	1458± 169*	744± 37*	2009± 304*
DTE	0.31	28.0± 5.1	189.5± 6.2	272.3± 3.9	14.7± 2.1	8.3± 1.2
	0.62	22.7± 0.5	188.7± 4.2	270.3± 7.3	11.3± 2.1	7.7± 1.7
	1.25	23.0± 2.2	187.0± 3.7	274.3± 9.2	15.7± 0.5	9.3± 1.2
	2.5	24.7± 2.1	186.0± 4.5	271.3± 5.0	12.0± 0.8	9.0± 2.2
	5	25.3± 2.6	185.3± 1.7	268.7± 2.6	15.7± 2.6	9.7± 2.58

<sup>1</sup>Positive reagents were 2.5 µg/plate 4-nitroquinoline-N-oxide for TA98, 5 µg/plate sodium azide for TA 100 and TA1535, 0.5 µg/plate mitomycin C for TA102, 50 µg/plate 9-aminoacridine for TA1537.

Data was presented as mean±SD. \*Significant difference of colonies more than two folds of control and treated groups.

表 17、DTE 對沙門氏菌 TA102, TA1535, TA1537, TA98 and TA100 的致突變作用(含 S9)

Treatments	Conc. (mg/plate)	Number of revertants (colony/plate)				
		TA98	TA100	TA102	TA1535	TA1537
Control		27.7± 4.1	177.7± 8.7	380.0± 2.4	14.0± 1.4	10.0± 0.8
PC <sup>1</sup>		3242±151*	3177± 145*	817± 27*	326± 29*	203± 11*
DTE	5.0	25.7± 2.1	182.3± 7.4	373.3± 8.2	15.3± 1.7	11.3± 0.9
	2.5	28.7± 4.2	168.3± 5.2	374.0± 5.4	13.3± 1.7	8.7± 1.2
	1.2	28.7± 2.9	179.0± 6.7	370.3± 9.2	12.7± 1.2	8.0± 1.6
	0.6	28.3± 1.7	177.3± 3.7	373.3± 10.7	13.3± 1.7	8.7± 0.5
	0.3	32.0± 5.4	177.7± 2.1	375.7± 6.6	13.0± 2.2	8.7± 1.7

<sup>1</sup> Positive reagent was 5 µg/plate 2-aminoanthracene for all *Salmonella* strains.

Data was presented as mean±SD. \*Significant difference of colonies more than two folds of control and treated groups.

表 18、DTE 對哺乳類細胞 CHO-K1 染色體變異之測試

Group	Concentration	Frequency of chromosomal aberration (%) <sup>1</sup>	
		-S9	+S9
Control		5.0 ± 3.6	2.3 ± 2.5
Mitomycin C	2.5 µg/mL	20.3 ± 3.8*	-
Cyclophosphamide	25 µg/mL	-	11.0 ± 2.0*
DTE	1.25 mg/mL	6.7 ± 3.5	3.7 ± 1.2
	2.50 mg/mL	3.3 ± 0.6	3.7 ± 1.5
	5.00 mg/mL	6.0 ± 1.7	4.0 ± 1.0

<sup>1</sup> Two slides were prepared and stained with 5% Giemsa solution for 5 min and a total number of 100 metaphases were counted for each dosage. All results were expressed in number of aberration per plate.

<sup>2</sup> The number of cells with damage chromosomes was recorded from which the rate of mutation was calculated. Aberration rate (%) = (number of cells with damage chromosomes/100) × 100.

- Not done.

\* Significant difference between the control and treated groups at  $p < 0.05$ .

表 19、DTE 對小鼠週邊血微核形成的影響

Treatment	Dose (g/kg)	No. of RET	% of MN in RET	RET/NCE (%)
24 hours				
Control	-	1007 ± 19	3.6 ± 0.8	5.7 ± 2.3
DTE	0.7	965 ± 13	3.9 ± 1.0	5.5 ± 0.8
	1.4	938 ± 29	4.2 ± 1.5	4.4 ± 1.7
	2.1	949 ± 19	4.7 ± 0.8	5.3 ± 0.8
	cyclophosphamide	0.1 <sup>a</sup>	994 ± 21	9.2 ± 0.8***
48 hours				
Control		1034 ± 38	3.5 ± 0.6	5.1 ± 0.6
DFa-1	2.1	1014 ± 32	4.9 ± 0.5	5.2 ± 1.2
	1.4	1013 ± 25	5.3 ± 1.2	5.1 ± 1.3
	0.7	1027 ± 5	4.9 ± 0.5	4.4 ± 0.8
	cyclophosphamide	0.1 <sup>a</sup>	1020 ± 15	12.4 ± 1.7***

All values are means ± SD (n = 6). \*\*\* $P < 0.001$  as compared with the control group.

a: i.p.

RET: reticulocytes ; NCE: normochromatic erythrocyte; MN: micronucleus

表 20、DTPS 對大鼠 28 天餵食毒性試驗體重變化

Weeks	Body weight (g)			
	Control	100 mg/kg	300 mg/kg	600 mg/kg
<b>Male</b>				
0	202.2 ± 7.8	198.2 ± 8.8	199.6 ± 8.4	201.5 ± 6.1
1	253.4 ± 14.5	255.1 ± 13.5	257.6 ± 13.5	264.1 ± 14.4
2	291.3 ± 18.0	286.0 ± 19.3	294.8 ± 16.1	294.9 ± 15.3
3	324.4 ± 24.9	311.1 ± 23.1	326.1 ± 19.1	325.1 ± 27.1
4	342.4 ± 29.2	325.7 ± 24.6	343.0 ± 23.0	339.5 ± 30.4
<b>Female</b>				
0	185.6 ± 1.8	185.4 ± 2.5	182.2 ± 1.5	182.0 ± 2.1
1	209.2 ± 3.4	209.3 ± 3.5	205.1 ± 2.3	204.3 ± 4.2
2	226.6 ± 4.4	227.0 ± 3.9	222.0 ± 2.8	220.2 ± 5.5
3	239.9 ± 5.2	243.9 ± 4.8	233.1 ± 3.8	233.9 ± 5.9
4	239.5 ± 4.7	246.9 ± 4.4	234.1 ± 3.6	237.6 ± 6.2

All values are means ± S.D. (n = 10).

表 21、DTPS 對大鼠 28 天餵食毒性試驗血液學檢查

Parameters		Control	100 mg/kg	300 mg/kg	600 mg/kg
Erythrocytes ( $10^6/\mu\text{L}$ )	M	7.6 ± 0.4	8.2 ± 0.5*	7.9 ± 0.4	8.0 ± 0.5
	F	6.9 ± 0.1.	6.9 ± 0.1	7.2 ± 0.1	7.0 ± 0.2
Hemoglobin (g/dL)	M	15.3 ± 0.7	16.4 ± 0.9**	15.9 ± 0.7	16.2 ± 0.9*
	F	14.7 ± 0.2	15.1 ± 0.3	15.3 ± 0.2	14.3 ± 0.2
Hematocrit (%)	M	45.0 ± 2.3	48.8 ± 3.2*	47.0 ± 2.3	46.8 ± 3.2
	F	41.7 ± 0.5	42.1 ± 0.7	43.0 ± 0.6	41.5 ± 0.8
MCV ( $\mu^3$ )	M	58.9 ± 1.6	59.7 ± 1.3	59.3 ± 0.8	58.6 ± 1.5
	F	60.4 ± 0.5	60.7 ± 0.4	59.6 ± 0.2	59.8 ± 0.3
MCH (pg)	M	20.0 ± 0.6	20.1 ± 0.8	20.0 ± 0.3	20.4 ± 1.1
	F	21.3 ± 0.2	21.8 ± 0.3	21.2 ± 0.3	20.6 ± 0.2
MCHC (g/dL)	M	34.0 ± 0.3	33.7 ± 1.0	33.7 ± 0.4	34.7 ± 1.9
	F	35.3 ± 0.1	35.9 ± 0.2	35.6 ± 0.4	34.6 ± 0.2
Platelets ( $10^3/\mu\text{L}$ )	M	1238 ± 120	1175 ± 243	1222 ± 157	1156 ± 153
	F	1174 ± 50	1232 ± 38	1116 ± 100	1219 ± 45
Leukocytes ( $10^3/\mu\text{L}$ )	M	10.2 ± 3.1	9.4 ± 2.4	10.2 ± 3.0	10.4 ± 1.9
	F	7.6 ± 0.7	9.0 ± 0.9	8.6 ± 0.7	9.5 ± 1.3
Lymphocytes (%)	M	86.8 ± 1.3	85.3 ± 0.9	85.8 ± 1.4	87.1 ± 1.0
	F	87.4 ± 1.1	88.8 ± 1.2	87.9 ± 3.0	86.7 ± 1.1
Seg. Neu (%)	M	13.2 ± 1.3	14.7 ± 0.9	14.2 ± 1.4	12.9 ± 1.0
	F	12.6 ± 1.1	11.2 ± 1.2	12.2 ± 3.0	13.3 ± 1.1
PT (sec)	M	10.5 ± 0.6	11.6 ± 1.2	10.4 ± 0.4	11.5 ± 1.4
	F	11.6 ± 0.8	10.0 ± 0.2***	10.8 ± 0.4	11.0 ± 0.7
APTT (sec)	M	24.9 ± 4.1	25.7 ± 3.3	23.4 ± 2.4	22.2 ± 4.6
	F	27.6 ± 2.4	19.2 ± 1.5***	23.9 ± 5.8	24.7 ± 2.0

All values are means ± S.D. \* $P < 0.05$  compared with control group.

M: male; F: female; Seg. Neu: segmented neutrophil

表 22、DTPS 對大鼠 28 天餵食毒性試驗血漿生化學檢查

Parameters		Control	100 mg/kg	300 mg/kg	600 mg/kg
ALP	M	131.4 ± 28.6	151.5 ± 27.3	156.1 ± 29.7	151.6 ± 32.3
(U/L)	F	78.4 ± 26.0	82.1 ± 22.4	73.2 ± 17.8	73.1 ± 22.4
AST	M	72.8 ± 10.0	74.5 ± 5.1	72.2 ± 5.0	79.3 ± 8.5
(U/L)	F	70.3 ± 9.7	67.9 ± 9.0	78.7 ± 25.0	77.4 ± 5.7
ALT	M	43.0 ± 16.9	43.3 ± 4.9	44.5 ± 5.7	51.9 ± 6.3
(U/L)	F	44.5 ± 13.2	39.8 ± 8.6	44.9 ± 21.4	46.4 ± 6.5
γ-GT	M	1.7 ± 1.3	2.0 ± 0.8	2.5 ± 1.9	2.2 ± 2.1
(IU/L)	F	3.4 ± 1.7	2.4 ± 1.1	3.1 ± 1.4	2.5 ± 1.5
T-protein	M	5.9 ± 0.2	5.8 ± 0.2	5.9 ± 0.2	5.9 ± 0.2
(g/dL)	F	6.1 ± 0.2	6.0 ± 0.1	6.0 ± 0.2	6.0 ± 0.3
Albumin	M	4.1 ± 0.1	4.0 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.1 ± 0.1
(g/dL)	F	4.4 ± 0.1	4.5 ± 0.2	4.5 ± 0.2	4.4 ± 0.3
Globulin	M	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.1
(g/dL)	F	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.6 ± 0.1
T-Bili	M	2.1 ± 0.4	2.3 ± 0.6	2.2 ± 0.4	2.2 ± 0.5
(mg/dL)	F	2.5 ± 0.4	2.1 ± 0.3	2.6 ± 0.5	2.2 ± 0.3
Glucose	M	103.4 ± 6.1	97.9 ± 6.3	106.4 ± 8.0	95.4 ± 3.5
(mg/dL)	F	97.6 ± 5.7	95.6 ± 4.5	110.3 ± 8.0	123.6 ± 7.3
BUN	M	19.2 ± 7.2	20.3 ± 2.5	20.0 ± 4.4	20.1 ± 2.7
(mg/dL)	F	21.8 ± 3.3	19.4 ± 2.3	19.6 ± 2.8	19.9 ± 2.1
Crea	M	0.52 ± 0.04	0.50 ± 0.02	0.52 ± 0.04	0.57 ± 0.11
(mg/dL)	F	0.59 ± 0.03	0.54 ± 0.03	0.52 ± 0.06	0.55 ± 0.07
Na	M	139.8 ± 0.9	138.9 ± 1.0	139.3 ± 0.9	139.9 ± 1.2
(mEq/dL)	F	138.3 ± 0.3	137.5 ± 1.5	137.9 ± 0.9	138.3 ± 3.1
K	M	3.4 ± 0.2	3.5 ± 0.5	3.5 ± 0.3	3.6 ± 0.2
(mEq/dL)	F	3.5 ± 0.4	3.1 ± 0.2	3.2 ± 0.4	3.3 ± 0.3
Cl	M	107.2 ± 0.9	108.0 ± 1.3	105.8 ± 1.5	106.5 ± 1.4
(mEq/dL)	F	105.3 ± 1.3	107.5 ± 1.2	105.8 ± 1.3	105.2 ± 3.1
Ca	M	10.7 ± 0.3	10.4 ± 0.3	10.7 ± 0.4	10.9 ± 0.7
(mg/dL)	F	10.3 ± 0.2	10.6 ± 0.3	10.5 ± 0.6	10.6 ± 0.3
P	M	9.0 ± 0.6	8.7 ± 0.7	9.0 ± 0.4	8.9 ± 0.9
(mg/dL)	F	6.8 ± 1.0	7.3 ± 0.4	7.2 ± 0.9	7.2 ± 1.1

T-Bili: total bilirubin; Crea: creatinine

All values are means ± S.D. (n = 10). \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with control group. M: male; F: female.

表 23、DTPS 大鼠 28 天餵食毒性試驗尿液檢查

	(mg/kg)	Volume (mL)	pH	Specific gravity
Male				
Control		10.3 ± 1.4	8.2 ± 0.5	1.010 ± 0.005
DTPS	100	13.3 ± 5.4	8.1 ± 0.5	1.012 ± 0.003
	300	13.2 ± 3.4	7.9 ± 0.4	1.013 ± 0.003
	600	13.2 ± 3.2	8.2 ± 0.5	1.009 ± 0.002
Female				
Control		7.7 ± 2.5	7.8 ± 0.9	1.015 ± 0.009
DTPS	100	11.2 ± 2.5**	8.3 ± 0.3	1.010 ± 0.000
	300	11.8 ± 1.5***	8.3 ± 0.3	1.011 ± 0.002
	600	10.4 ± 1.8*	8.4 ± 0.5	1.010 ± 0.003

All values are means ± S.D. (n = 10).

表 23、DTPS 大鼠 28 天餵食毒性試驗尿液檢查(續)

Drug	Doses (mg/kg)	Urobilinogen (mg / dL)					Protein (mg / dL )					
		0.2	1	2	4	8	–	15	30	100	300	2000
Male rats												
Control		7 <sup>a</sup>	0	2	1	0	0	0	6	4	0	0
DTPS	100	10	0	0	0	0		5	5	0	0	0
	300	10	0	0	0	0	0	4	6	0	0	0
	600	10	0	0	0	0	0	2	8	0	0	0
Female rats												
Control		9	1	0	0	0	0	0	7	1	2	0
DTPS	100	10	0	0	0	0	1	3	6	0	0	0
	300	10	0	0	0	0	2	4	4	0	0	0
	600	10	0	0	0	0	0	4	6	0	0	0

a: 大鼠隻數

表 23、DTPS 大鼠 28 天餵食毒性試驗尿液檢查(續)

Drug	Doses (g/kg)	Bilirubin (mg / dL)					Glucose (mg / dL)				
		-	1	2	4	-	100	250	500	1000	>2000
Male rats											
Control		1 <sup>a</sup>	7	3	0	10	0	0	0	0	0
DTPS	100	7	3	0	0	10	0	0	0	0	0
	300	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0
	600	5	5	0	0	10	0	0	0	0	0
Female rats											
Control		6	3	1	0	10	0	0	0	0	0
DTPS	100	9	1	0	0	10	0	0	0	0	0
	300	8	2	0	0	10	0	0	0	0	0
	600	8	2	0	0	10	0	0	0	0	0

a: 大鼠隻數

表 23、DTPS 大鼠 28 天餵食毒性試驗尿液檢查(續)

Drug	Doses (g/kg)	Occult blood					Ketones (mg / dL)					
		-	±	+	++	+++	-	5	15	40	80	160
Male rats												
Control		10 <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	4	5	0	1	0
DTPS	100	10	0	0	0	0	0	7	3	0	0	0
	300	10	0	0	0	0	0	4	6	0	0	0
	600	9	1	0	0	0	0	7	3	0	0	0
Female rats												
Control		10	0	0	0	0	1	7	2	0	0	0
DTPS	100	10	0	0	0	0	7	3	0	0	0	0
	300	10	0	0	0	0	6	4	0	0	0	0
	600	10	0	0	0	0	3	7	0	0	0	0

a: 大鼠隻數

表 24、DTPS 對大鼠 28 天餵食毒性臟器重量變化

Item		Control	100 mg	300 mg	600 mg
Heart (g) (g/100 g b.w.)	M	1.11 ± 0.18 (0.30 ± 0.04)	1.02 ± 0.08 (0.31 ± 0.02)	1.07 ± 0.07 (0.31 ± 0.01)	1.09 ± 0.08 (0.32 ± 0.02)
	F	0.76 ± 0.05 (0.31 ± 0.02)	0.76 ± 0.09 (0.32 ± 0.02)	0.79 ± 0.05 (0.34 ± 0.02)	0.75 ± 0.05 (0.31 ± 0.03)
Liver (g) (g/100 g b.w.)	M	9.64 ± 0.38 (2.63 ± 0.14)	8.26 ± 0.31** (2.53 ± 0.15)	8.85 ± 0.24 (2.58 ± 0.09)	8.64 ± 0.27 (2.54 ± 0.12)
	F	6.29 ± 0.44 (2.63 ± 0.09)	6.45 ± 0.55 (2.61 ± 0.13)	5.84 ± 0.56 (2.49 ± 0.20)	6.41 ± 0.51 (2.70 ± 0.18)
Spleen (g) (g/100 g b.w.)	M	0.69 ± 0.04 (0.19 ± 0.03)	0.61 ± 0.02 (0.19 ± 0.03)	0.67 ± 0.05 (0.19 ± 0.04)	0.69 ± 0.04 (0.20 ± 0.02)
	F	0.54 ± 0.06 (0.23 ± 0.02)	0.56 ± 0.06 (0.22 ± 0.02)	0.52 ± 0.06 (0.22 ± 0.03)	0.49 ± 0.17 (0.20 ± 0.07)
Kidneys (g) (g/100 g b.w.)	M	2.40 ± 0.22 (0.66 ± 0.04)	2.19 ± 0.27 (0.67 ± 0.05)	2.25 ± 0.17 (0.66 ± 0.06)	2.22 ± 0.27 (0.65 ± 0.06)
	F	1.54 ± 0.13 (0.64 ± 0.05)	1.57 ± 0.11 (0.63 ± 0.04)	1.55 ± 0.20 (0.66 ± 0.06)	1.54 ± 0.13 (0.65 ± 0.04)
Adrenals (mg) (mg/100 g b.w.)	M	51.2 ± 6.2 (14.9 ± 1.8)	54.2 ± 11.8 (14.0 ± 1.1)	53.5 ± 8.0 (15.7 ± 2.4)	50.3 ± 4.7 (16.6 ± 3.2)
	F	71.8 ± 11.6 (30.2 ± 6.2)	73.2 ± 6.1 (29.5 ± 2.7)	77.2 ± 8.6 (32.7 ± 3.7)	72.9 ± 6.8 (30.9 ± 4.7)
Testis (g) (g/100 g b.w.)	M	2.95 ± 0.15 (0.87 ± 0.07)	3.16 ± 0.25 (0.86 ± 0.06)	3.14 ± 0.23 (0.92 ± 0.06)	3.08 ± 0.24 (0.95 ± 0.10)
Ovaries (mg) (mg/100 g b.w.)	F	137.7 ± 15.0 (57.7 ± 7.8)	136.3 ± 27.4 (54.9 ± 9.3)	132.4 ± 16.3 (56.5 ± 6.0)	145.1 ± 12.0 (61.3 ± 5.9)

All values are means ± S.D. (n = 10).

( ): relative weight; b.w.: body weight; M: male; F: female; L: left; R: right

表 25、DTPS 對大鼠 28 天餵食毒性試驗高劑量組臟器病理檢查

Organ	Lesions	Group			
		Male		Female	
		Control	High	Control	High
Adrenal		-	-	-	-
Heart		-	-	-	-
Kidney					
	Fibrosis, interstitial, focal, minimal	1/10	1/10	-	-
	Infiltration, mononuclear cell, focal, minimal to slight	1/10	1/10	-	-
	Regeneration, tubule, focal, minimal	1/10	2/10	-	-
Liver					
	Infiltration, mononuclear cell, focal, minimal	2/10	2/10	-	-
Ovary		-	-	-	-
Spleen		-	-	-	-
Testes		-	-	-	-

-: No significant lesions; N: no tissue.

<sup>1</sup> Incidence: no. of affected rats/ no. of rats were examined.

<sup>2</sup> Degree of lesions was graded from one to five depending on severity: 1 = minimal (< 1%); 2 = slight (1-25%); 3 = moderate (26-50%); 4 = moderate/severe (51-75%); 5 = severe/high (76-100%).

# 香砂六君子湯改善逆流性食道炎症狀及預防復發的效果(2-1)

陳明豐  
中醫臨床試驗中心

## 摘要

胃食道逆流疾病(Gastro-esophageal reflux disease; GERD)是國人常見的上消化道疾病，其罹患率逐年增加，約佔人口的 10-20%。GERD 病患者經常有上腹部燒灼感、胸悶或喉痛等症狀，嚴重影響其生活品質。目前 GERD 的治療以質子幫浦抑制劑(proton-pump inhibitor; PPI)為主，其治療的成功率約為 80-90%，但在停藥半年到一年之間，疾病復發率高達 40-80%。因此，有必要尋求安全的治療藥物，以預防疾病的復發。

本研究中我們將觀察香砂六君子湯是否具有加強 PPI 的療效果，並預防 GERD 復發的效果。我們預定招募 80 名臨床上具 GERD 症狀，且經胃鏡證實有逆流性食道炎(reflux esophagitis)，依洛杉磯分類嚴重度屬於 A 或 B 級的患者進入臨床試驗。他們在簽署受試同意書後，將被隨機分成兩組。一組(治療組)將每日一次口服西藥 Rabepazole(PPI 的一種)20mg 合併濃縮科學中藥粉末香砂六君子湯每日 2 次，一次 3.5 公克；另外一組(對照組)則每日一次口服西藥 Rabepazole 20mg 合併安慰劑(含 1/20 濃度之香砂六君子湯的澱粉)每日 2 次，一次 3.5 公克。治療期共 16 週，我們將以症狀量表每 4 週一次，評估受試者症狀的變化。治療 16 週後，將進入第二階段(觀察復發期)，所有受試者將服用制酸劑 Toppal(每日 3 次，一次一顆)取代 rabepazole。觀察復發期治療共 24 週。我們將每 8 週一次，以症狀量表評估受試者的症狀，直至其症狀出現或以胃鏡證實逆流性食道炎復發為止。我們將以 unpaired Student's t-test，分析比較兩組治療期間症狀指數的差異及預防復發期之復發率，並比較男女性別在療效上的差異。我們相信，此研究將有助於 GERD 的治療及預防。

自 101 年 4 月 1 日至 101 年 10 月 20 日，我們共篩選了 121 位臨床上具胃食道逆流症狀且胃鏡檢查呈現食道發炎(A 及 B 級)的患者，其中有 110 位患者加入臨床試驗。他們當中有 36 位(32.7%)已完成 16 週的治療，有 42 位(38.2%)尚在服藥中，有 32 位(29.1%)受試者退出試驗。退出原因以症狀沒有改善(28.1%)及回診時間無法配合(18.8%)佔最大比例。我們已針對退出比例高進行因應對策，包括：縮短追蹤期及增加收案數。目前因尚未解盲，無法提供臨床療效的分析，但迄今為止，本案尚未出現嚴重不良反應，顯示香砂六君子湯和 rabepazole 合併治療的

安全性。我們期待衛生署中醫藥委員會能繼續支持本臨床研究團隊，完成第二階段觀察期的臨床試驗。

關鍵詞：香砂六君子湯、逆流性食道炎、胃食道逆流症狀量表

# **The Effects of Xiangsha-Liujunzi-Tang to Improve Symptoms and to Prevent the Recurrence of Reflux Esophagitis. (2-1)**

Ming-Feng Chen

The clinical trial center of traditional Chinese medicine

## **ABSTRACT**

Gastro-esophageal reflux disease (GERD) is a common disease of upper gastrointestinal tract in Taiwan. The prevalence of GERD in Taiwan is about 10-20% in population. The patients with GERD usually suffer from epigastric burning, chest compression and sore throat, which influences their quality of life. So far the most effective therapy for GERD is proton-pump inhibitor (PPI). The successful cured rates of PPIs for GERD are about 80-90%. However, 40-80% of patients have recurrence of symptoms after stop drug for half to one year. It is necessary to find another safe drug to prevent the recurrence of GERD.

In this study we will observe the effectiveness of Xiangsha-liujunzi-tang (XSLZT) in augmenting the effect of PPI and preventing the recurrence of GERD. We will include 80 patients with clinical symptoms of GERD and endoscopic findings with reflux esophagitis by a severity of to A or B degree according to the classification of Los Angeles. After signing informed consent, subjects will be randomly divided into two groups. The subjects in treatment group will be given one tablet of Rabeprazole (one kind of PPI) 20mg per day combined with 3.5 grams of concentrated extracted powder of XSLZT after each meal twice per day. The subjects in other group (control group) will be given the same dosage of rabeprazole and starch placebo (containing 1/20 concentration of XSLZT) as treatment group. The therapeutic period will be 16 weeks. During this period, we will evaluate the severity of symptoms in subjects with a questionnaire form for GERD. After then, all subjects will enter 2<sup>nd</sup> stage(observation period), and continue to receive Toppal (a kind of anti-acid agent) in place of rabeprazole for 24 weeks. We will further evaluate the symptoms of patients every 8 weeks until subjects have recurrence of GERD symptoms and endoscopic findings of reflux esophagitis. We will analyze the differences in symptomatic severity and recurrent rates of GERD between two groups by unpaired Student's t-test. We believe that, this study will be helpful in the treatment and prevention for recurrence of GERD.

From April 9, 2012 until October 20, 2012, we have screened 121 patients with symptoms of reflux esophagitis (degree A and B) under diagnosis by upper gastrointestinal endoscopic examination, and 110 patients agreed to joint clinical trial. Among the subjects, 36 (32.7%) have completed treatmentfor 16 weeks, 42 (38.2%)

are still under treatment, and 32 (29.1%) quitted from clinical trial. The most common etiologies for quitting from study are unimproved symptoms (28.1%) and no fit time for returning (18.8%). Ffor a high quitted proportion, We have made strategies, including shortening the period for follow-up and increase of studied subjects. Because this is a double-blind trial, we can not afford the analytical data for clinical effects. However, so far there are no cases with severe adverse effect. These results suggest the safety for combination of PPI and XSLZT. We hope that, this study can be supported to be continued.

Keywords: Xiangsha-liujunzi-tang, reflux esophagitis, quantitative questionnaire for symptoms of gastroesophageal reflux

## 壹、前言

近年流行病學的統計，明確的指出胃食道逆流症(Gastroesophageal reflux disease；GERD)與某些反覆性發作的氣喘、慢性乾咳甚至夜間睡眠呼吸暫停症候群、非心源性胸痛或胸悶、慢性支氣管炎以及慢性咽喉炎等疾病有著不等程度的因果關係<sup>1</sup>。事實上，胃食道逆流病對罹患者的傷害並不只僅止於胃食道逆流本身的結果，而是因逆流所導致合併症的發生，其中包括有食道炎症病變(如糜爛、潰瘍、出血、纖維化甚至食道狹窄)、短食道、惡變傾向的 Barrett 食道(其將來衍生癌症的或然率是健康人口群的30-125 倍不等)以及食道腺癌的癌前病變<sup>2</sup>。

輕度胃食道逆流症者，數月的藥物治療，症狀消失後，可以停藥，重度者往往需要長期維持藥物，外科抗逆流手術治療則有 10 %復發率，併有巴羅氏食道症者，應定期接受內視鏡追蹤，以早期檢測癌性病變。目前以 PPI 治療 GERD 為期 8 至 16 週後，其有效率可達 80-90%，問題是停藥半年至一年後，其復發率高達 40-80%<sup>3</sup>。由於，因此，有必要尋求更好的替代或輔助的治療藥物。

近幾年的實驗上研究上發現香砂六君子湯具有保護胃粘膜的功效<sup>4-8</sup>，傅智敏等通過觀察香砂六君子湯對應激性胃粘膜損傷大鼠療效的影響，發現香砂六君子湯能明顯降低大鼠的胃粘膜點狀、條索狀出血性損害程度，能顯著降低 HCl 引起的胃粘膜損傷，促進上皮修復，達到保護胃粘膜的作<sup>4</sup>。另一方面，六君子湯則被發現具有促進腸胃蠕動的功能<sup>5</sup>以及提高調節腸道功能相關之胜肽，如 somatostatin、motilin、gastrin、vasoactive intestinal peptide (VIP)<sup>6</sup>，被應用於治療功能性消化不良症(functional dyspepsia)<sup>7-11</sup> 及 GERD<sup>12-14</sup>，此外也被發現可以和 PPI 合併，改善以 PPI 治療失敗的 GERD<sup>15</sup>。因此，本研究中將排除有內熱或胃鏡呈現急性充血性胃炎的患者納入受試者。

本計劃乃是以香砂六君子湯對逆流性食道炎之臨床實證研究，希望第一階段有助於證實香砂六君子湯是否改善逆流性食道炎之症狀男女性別之臨床效益；第二階段有助於證實香砂六君子湯是否能預防降低逆流性食道炎之男女性別復發率。相信本臨床試驗後配以精準的統計，可得更有意義的結果。

另外，若本計劃實驗組較對照組改善之程度，已達統計學上之顯著差異，則於本研究上可做出香砂六君子湯具有改善逆流性食道炎之預防復發

結論，真正的目的是在利用中西藥結合特有的優勢下，證實是否可提高病人的生活品質為最終目的。

## 貳、材料與方法

本研究計畫第一階段首先從逆流性食道炎病人中，在接受胃鏡檢查後需使用 Rabeprazole (PPI)藥物治療，不分男女，年齡在 20 歲(含)以上，將病人分隨機為兩組:實驗組為香砂六君子湯合併使用西藥 PPI (n=40)；對照組為安慰劑合併使用西藥 PPI (n=40)，每個受試者各服用時間 16 週，在實驗當中醫師與病人採雙盲之隱匿分配；第二階段為延續第一階段的實驗組(n=40)及對照組(n=40)，兩組受試者皆服用治酸劑 Toppal(每日 3 次，一次一顆)取代 rabeprazole，為 24 週時間。研究工具為胃食道逆流問卷。

本研究將採用 unpaired Student's t-test 進行統計檢定。經由第一年兩組病人在臨床上有服用實驗組為香砂六君子湯合併使用西藥 PPI (n=40)；對照組為安慰劑合併使用西藥 PPI (n=40)，服用時間為 16 週的療效評估及統計學的差異，及第二年兩組病人在臨床上實驗組(n=40)與對照組(n=40)皆為服用制酸劑 Toppal(每日 3 次，一次一顆)，服用時間為 24 週，追蹤期兩組皆不使用香砂六君子湯，觀察實驗組的復發率是否比對照組差異，由此兩階段藉以判定我們使用六君子湯對於逆流性食道炎的降低或預防、及改善生活品質是否有男女性別臨床效益。

### 第一年

(一)接受試驗者數目：逆流性食道炎病人共 80 名；實驗組 40 名，對照組 40 名。

香砂六君子湯合併西藥 PPI 藥物使用，每天服用 2 次，早、晚飯後服用，一次 3.5 克(濃縮科學中藥粉末)，每 4 週回診一次，回診時給予問卷訪問，維期 16 週。

(二)試驗設計及進行方法：隨機雙盲、胃食道逆流問卷。

(三)試驗期限及進度：101 年 03 月 01 日 ~ 102 年 12 月 31 日。

(四)評估及統計方法：問卷調查，unpaired Student's t-test。

(五)研究人員追蹤訪問：回診後 14 天，以電話聯絡訪問就診及用藥狀況。

(六)受試者納入及排除條件如下：

1. 選擇標準：

(1) 不分男女。

(2) 大於 20 歲(含)之病患。

(3) 經胃鏡確定診斷逆流性食道炎症，依洛杉磯分類屬於 A 或 B 級



## 參、結果

### 一、收案狀況(表一及圖一)

如表一及圖一所示，自 101-04-09 本院 IRB 通過本臨床試驗案後，於 101-04-20 以後開始收入第一個個案。我們自 101-04-20 迄今(101-10-19)，由西醫腸胃科門診篩選了 121 位臨床上具胃食道逆流症狀且胃鏡檢查呈現食道發炎(A 及 B 級)的患者，其中有 6 位經中醫師評估具陰虛火旺證，不符合香砂六君子湯使用之中醫證型；另有 5 位患者不同意加入臨床試驗。因此，共有 110 位患者簽署受試同意書，加入臨床試驗，篩選成功率為 90.9%。

### 二、治療狀況及退出率(表一及圖一)

接受治療的 110 位受試者(含治療組及對照組)中，有 36 位(32.7%)已完成 16 週的治療，有 32 位(29.1%)退出試驗，有 42 位(38.2%)尚在服藥中。

### 三、追蹤及復發狀況(表一及圖一)

36 位已完成治療的受試者中，有 4 位症狀未完全改善，有一位不願加入追蹤計畫，因此，只有 31 位受試者加入第二階段的追蹤計畫。

### 四、退出原因分析(表二及圖二)

由於有高達 32 位(29.1%)受試者退出試驗，因此，我們針對退出原因進行分析。如表二所示，退出原因有：症狀沒有改善(28.1%)、回診時間無法配合(18.8%)、服用藥物初期剛好出現其他疾病及症狀(6.3%)、服用多種藥物(6.3%)、自行停止服用西藥 PPI(6.3%)及自覺症狀有改善(6.3%)等，但是另有 28.1% 的退出者由於無法聯繫或不願說明原因，因而無法得知退出試驗的原因。由以上可知，已知的退出原因中以「症狀沒有改善(28.1%)」佔最大比例。此乃由於逆流性食道炎症狀相當嚴重而困擾病人，如果治療效果不佳，患者就會失去信心而不願繼續接受治療。過去的研究中服用 PPI 的胃食道逆流患者有 10-20% 無法達到效果，因此，本試驗中有 8.2% 受試者因無效而退出試驗尚屬合理範圍。「回診時間無法配合(18.8%)」佔退出原因第二位。此可能由於本試驗治療期間長達 16 週，回診多達五次，再加上本院地屬偏僻地區，而執行計畫期間又適逢颱風滯留，以致於受試者無法於規定期限內回診拿藥，只好退出試驗所致。因服用多種藥物而退出試驗的受試者雖然不多(佔退出者之 6.3%)，但日後可由儘量篩選單獨只有胃食道逆流症狀，而無其他疾病(如：高血壓或糖尿病)的受試者，以減少因服用多種藥物而退出試驗的比例。至於其他退出原因：服用藥物初期剛好出

現其他疾病及症狀(6.3%)、自行停止服用西藥 PPI(6.3%)及自覺症狀有改善(6.3%)等，都是進行中西藥合併治療時常見的病人反應，可由研究護士加強對受試者之教育及追蹤聯絡去改善。

#### 五、藥物不良反應(ADR)(表三)

本試驗案進行中共有 12 位患者出現不良反應，其症狀包括：腹脹(3 人)、腹痛加重(1 人)、上腹部不適(1 人)、打嗝(1 人)、排便次數增加(1 人)、頻尿(1 人)、上呼吸道感染(1 人)、解黑便(1 人)、下咽癌(1 人)及痛風(1 人)。其中頻尿的患者經院外 LMD 檢查證明是急性膀胱炎，以抗生素治療後痊癒。解黑便患者乃經急診聯絡主治醫師(本案協同主持人)，經緊急胃鏡檢查，發現有胃潰瘍出血，繼續於門診投與 *rabeprazole* 後病情穩定並未住院。主治醫師認為此胃潰瘍出血乃由於病患本身精神壓力誘發，而與研究用藥無關。其他的病症--上呼吸道感染、下咽癌及痛風也被認為是偶發事件，而與研究用藥無關。另一方面，腹脹、腹痛、上腹部不適、打嗝皆為胃食道逆流常見症狀，由於尚未解盲，很難判定是否為研究用藥所引起，但中醫師認為應與研究用中藥無關。排便次數增加有可能是受試者本身有大腸急躁症或 *rabeprazole* 所引起。所有個案的腸胃症狀皆屬輕度，他們經停藥(退出計畫)或於使用藥物治療後，症狀都快速緩解。本研究案進行期間，所有受試者並未出現須住院或死亡之嚴重不良反應(SAE)。

#### 六、計畫變更及預定收案人數及截止收案日期

本計畫原預定於完成第一階段 16 週之治療後，追蹤是否復發達 48 週，但考量過長的追蹤期，恐造成受試者無法按時回診而退出試驗，因此，已於今年 7 月在衛生署中醫藥委員會進行期中報告時，提出縮短第二階段追蹤期為 24 週的構想，並於今年 9 月份向本院 IRB 提出變更，於今年 10 月初獲得審查通過。有鑑於退出計畫的受試者比率偏高，因此，我們擬增加收案人數到 140 人，但因每位受試者皆需經過 16 週的治療及 24 週的追蹤，再加上至少必須保留至少一個月期間進行統計分析及結案報告，因此，即使未達到預定收案人數 140 人，我們將於 11 月底截止收案。

#### 七、研究結果分析

本研究試驗案為兩年期之雙盲隨機試驗，至目前研究尚進行中無法進行解盲，因此，目前尚無法提供藥物治療的成果分析。

## 肆、討論

胃食道逆流是國內常見的胃腸疾病，而且有逐漸增加的趨勢。雖然目前以西藥質子幫浦抑制劑治療效果可高達 80%，但其復發率高，有待開發更有效及安全的治療模式。過去日本學者曾報告以中藥方劑六君子湯可以加強 rabeprazole 改善胃食道逆流症狀的效果，但其研究期間只有四週，與目前標準治療模式(使用 PPI 達 16 週)並未符合。本研究試驗案為第一個長期以 PPI 合併中方劑六君子湯藥治療胃食道逆流之臨床試驗案。

本臨床試驗案自 101-04-20 以後開始收入第一個個案，迄(101-10-19)，共篩選了 121 位臨床上具胃食道逆流症狀且胃鏡檢查呈現食道發炎(A 及 B 級)的患者，共有 110 位患者簽署受試同意書，加入臨床試驗。其中有 36 位(32.7%)已完成 16 週的治療，另外有 42 位(38.2%)尚在服藥中。在完成治療的 36 位受試者中，有 31 位受試者症狀完全消失，並已加入第二階段半年的追蹤計畫。

本計畫中有高達 32 位(29.1%)受試者退出試驗，其退出原因以症狀沒有改善(28.1%)及回診時間無法配合(18.8%)佔最大比例，此可能由於胃食道逆流患者中有 10-20% 患者對藥物治療反應不佳，再加上臨床試驗時間長達 16 週及本院位於偏遠地區(燕巢)，影響受試者配合的程度。

由於考慮到追蹤時間太長可能影響第二階段觀察期受試者繼續接受追蹤配合的意願，我們已申請變更將原定停藥後觀察 48 週改為 24 週，並增加收案人數(目標 140 人)，以增加將來可供統計分析的個案數。由於本案為兩年期的隨機雙盲之臨床試驗，目前尚未解盲，無法提供藥物治療的分析結果。然而迄今為止，本案尚未有嚴重不良反應的報告，顯示香砂六君子湯和 rabeprazole 合併治療是安全的組合。至於香砂六君子湯是否具有加強 rabeprazole 改善胃食道逆流症狀的效果，則有待將來的分析結果。

## 伍、結論與建議

至目前為止(約半年)，我們共篩選了 121 位臨床上具胃食道逆流症狀且胃鏡檢查呈現食道發炎(A 及 B 級)的患者，其中有 110 位患者加入臨床試驗。他們當中有 36 位(32.7%)已完成 16 週的治療，有 42 位(38.2%)尚在服藥中，有 32 位(29.1%)受試者退出試驗。退出原因以症狀沒有改善(28.1%)及回診時間無法配合(18.8%)佔最大比例。我們已針對退出比例高進行因應對策，包括：縮短追蹤期及增加收案數。目前因尚未解盲，無法提供臨床療效的分析，但迄今為止，本案尚未出現嚴重不良反應，顯示香砂六君子湯和 rabeprazole 合併治療的安全性。我們期待衛生署中醫藥委員會能繼續支持本臨床研究團隊，完成第二階段觀察期的臨床試驗。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP101-RD-020 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. Eisen GM, Sandler RS, Murray S, et al: The relationship between gastroesophageal reflux disease and its complications with Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 1997; 92 :27-31.
2. Isolauri J, Luostarinen M, Isolauri E, et al.: Natural course of gastroesophageal reflux disease: 17-22 year follow-up of 60 patients. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 37-41.
3. Jeong YJ, Lee DH, Choi TH, Hwang TJ, Lee BH, Nah JC, Lee SH, Park YS, Hwang JH, Kim JW, Jeong SH, Kim N, Jung HC, Song IS. Clinical analysis of recurrence rate and symptom improvement in gastro-esophageal reflux disease patients. *Korean J Gastroenterol*. 2010 ; 55(2):100-8.
4. 傅智敏、朱曙東，香砂六君子湯對大鼠急性胃粘膜損傷的保護作用，*浙江中醫學院學報*，2000; 24(4): 52。
5. Tominaga, K., et al. The Traditional Japanese Medicine Rikkunshito Promotes Gastric Emptying via the Antagonistic Action of the 5-HT3 Receptor Pathway in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* (2009).
6. Naito T, Itoh H, Yasunaga F, Takeyama M. Rikkunshi-to raises levels of somatostatin and gastrin in human plasma. *Biol Pharm Bull*; 2001, 24(7):841-3.
7. Arai, M., Matsumura, T., Yoshikawa, M., Imazeki, F. & Yokosuka, O. Analysis of the Rikkunshito efficacy on patients with functional dyspepsia. *Nippon yakurigaku zasshi* 137, 18-21 (2011).
8. Kusunoki, H., et al. Efficacy of Rikkunshito, a traditional Japanese medicine (Kampo), in treating functional dyspepsia. *Internal medicine (Tokyo, Japan)* 49, 2195-2202 (2010).
9. Harasawa S. The role of rikkunshito against NUD (non-ulcer dyspepsia) – especially its efficacy in dysmotility-like NUD. *Progress in Medicine* 19: 843-8 (1999).
10. Harasawa S, Miyoshi A, Miwa T, et al. Double-blind multicenter post-marketing clinical trial of TJ-43 TSUMURA Rikkunshi-to for the treatment of dysmotility-like dyspepsia. *Igaku no Ayumi (Journal of Clinical and Experimental Medicine)* 187: 207-29 (1998).

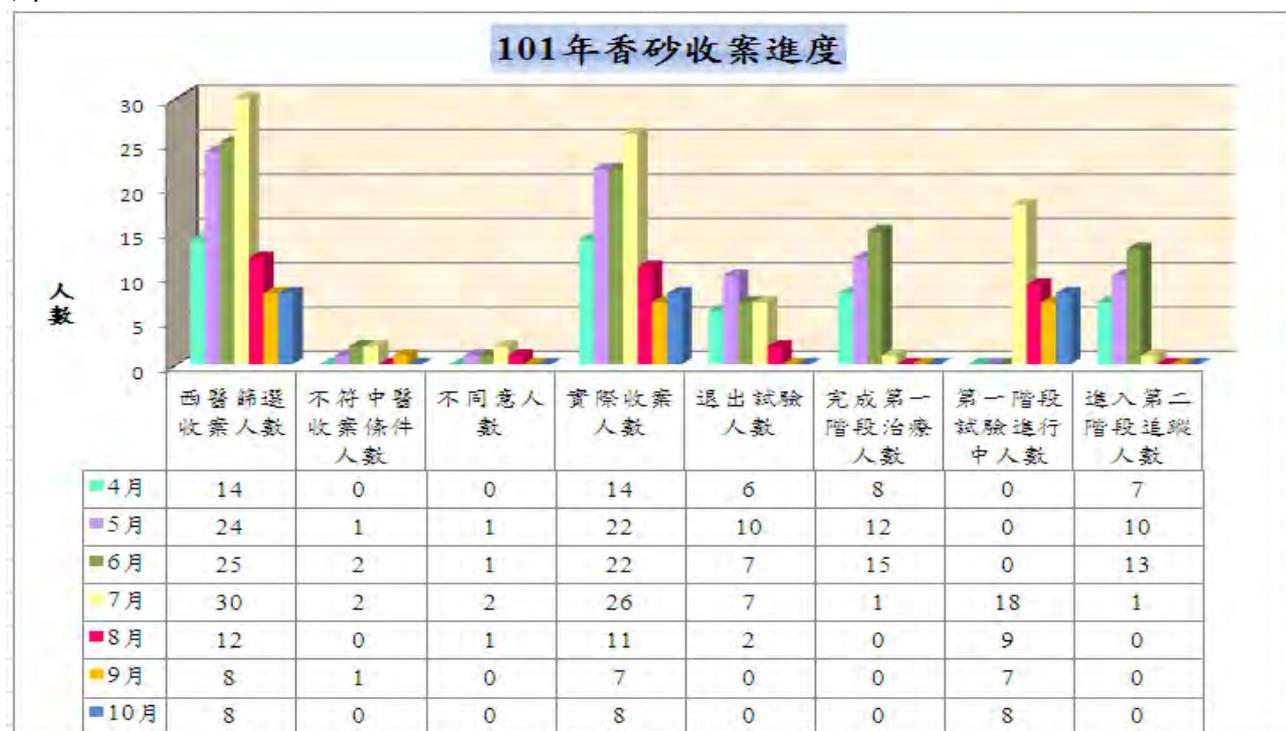
11. Tatsuta, M. & Iishi, H. Effect of treatment with liu-jun-zi-tang (TJ-43) on gastric emptying and gastrointestinal symptoms in dyspeptic patients. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 7, 459-462 (1993).
12. Kawahara, H., et al. Effects of rikkunshito on the clinical symptoms and esophageal acid exposure in children with symptomatic gastroesophageal reflux. *Pediatric surgery international* 23, 1001-1005 (2007).
13. Yamaguchi T, Koide A. Usefulness of Rikkun-shi-to (TJ-43), a Chinese herbal medicine, for the treatment of gastro-esophageal reflux disease (GERD). *Medical Science Digest* 33: 748-52 (2007).
14. Mizuno S, Yamagiwa K, Iwata M, et al. Effect of early treatment with TSUMURA Rikkunshito on gastrointestinal symptoms after resection of gastric cancer – focusing on reflux esophagitis. *Progress in Medicine* 21: 1366-7 (2001).
15. Tominaga K, Iwakiri R, Fujimoto K, Fujiwara Y, Tanaka M, Shimoyama Y, Umegaki E, Higuchi K, Kusano M, Arakawa T; and the GERD 4 Study Group. Rikkunshito improves symptoms in PPI-refractory GERD patients: a prospective, randomized, multicenter trial in Japan. *J Gastroenterol*. 2011 Nov 15. [Epub ahead of print]

柒、圖、表

表一

101年香砂收案進度								
收案月份	西醫篩選收案人數	不符中醫收案條件人數	不同意人數	實際收案人數	退出試驗人數	完成第一階段治療人數	第一階段試驗進行中人數	進入第二階段追蹤人數
4月	14	0	0	14	6	8	0	7
5月	24	1	1	22	10	12	0	10
6月	25	2	1	22	7	15	0	13
7月	30	2	2	26	7	1	18	1
8月	12	0	1	11	2	0	9	0
9月	8	1	0	7	0	0	7	0
10月	8	0	0	8	0	0	8	0
總計	121	6	5	110	32	36	42	31

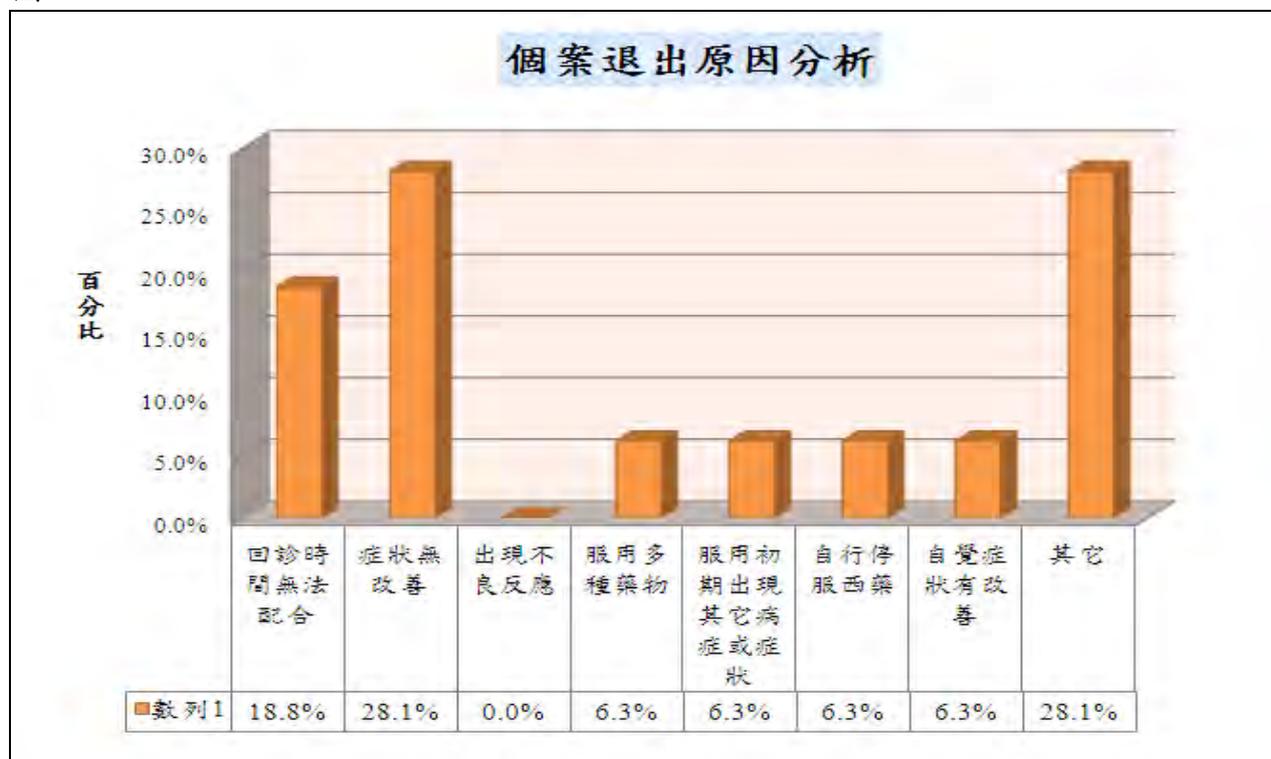
圖一



表二

個案退出原因分析		
退出原因	人數	比例
回診時間無法配合	6	18.8%
症狀無改善	9	28.1%
出現不良反應	0	0.0%
服用多種藥物	2	6.3%
服用初期出現其它病症或症狀	2	6.3%
自行停服西藥	2	6.3%
自覺症狀有改善	2	6.3%
其它	9	28.1%
總計	32	100.0%

圖二



表三

## 藥物不良反應

編號	症狀	嚴重度	藥物相關性	處置
EF001	個案約服用一個月中藥後，於第二個月回診時，表示仍有腹脹情形，不想繼續參與試驗。	輕度	有可能	退出試驗。
EF002	個案約服用中藥二個多禮拜，覺得消化不佳，且有腹脹情形。	輕度	有可能	退出試驗。
EF019	個案約服用二個禮拜中藥，表示有胃脹情形，不想繼續參與試驗。	輕度	有可能	退出試驗。
EF023	大約於 101.07.12，因於高醫被診斷出下咽癌。	輕度	無	退出試驗。
EF026	服藥約第四天，出現頻尿情形。	輕度	無	於解釋說明頻尿並非此中藥引起之副作用，建議檢查確定是急性膀胱發炎，經抗生素治療已改善。
EF047	個案表明，排便次數增加，很困擾，不想繼續參加試驗。	輕度	有可能	因香砂六君子湯具有促進腸胃蠕動的功能，且 Rabeprazole 亦有產生腹瀉之副作用。
EF050	家屬轉述個案因服用中藥一個禮拜後，痛風發作。	輕度	無	於解釋說明此中藥，不會引發痛風發作。
EF054	於電話提醒回診時，個案表示於第二個月回診前兩天胃痛情形突然加劇掛本院急診，暫停服用中藥，之後表明會去別間醫院檢查。	輕度	無	退出試驗。
EF058	個案服用中藥約 12 天，因感冒二個多禮拜停服，表明吃了西藥會忘了吃中藥，不想繼續參與試驗。	輕度	無	退出試驗。
EF079	個案服用一個禮拜覺得胃不舒服，不想繼續參與試驗，故退出試驗。	輕度	無	退出試驗。
EF038	個案表示服用西藥反而不舒服，會有打嗝情形，自覺不吃西藥只服用中藥就有改善，故自行停藥，予評估不符合試驗流程，予終止試驗。	輕度	無	退出試驗。
EF081	於 10/09 回診(西醫)，訴解 Tarry stool(+) last week, 予安排胃鏡檢查： 1. Reflux esophagitis, Grade B by LA classification with bleeding 2. Advise admission. (急診)。	中度	無	退出試驗。

# 榮陽治肝湯對慢性 C 型肝炎病人之療效評估；一隨機雙盲對照及交叉研究(2-1)

黃信彰  
臺北榮民總醫院

## 摘要

慢性 C 型肝炎的病人約有百分之十至三十在十至二十年之追蹤會發展成肝硬化，甚至導致成肝癌發生。因此，慢性 C 型肝炎雖然時常沒有症狀，但是，積極而有效的治療確是必須的。西藥干擾素加上抗病毒藥物雷巴威靈 (ribavirin) 治療成功率約 50%~79%，但其副作用仍使部份病人無法忍受。而傳統的中藥治療慢性 C 型肝炎已為民間廣為使用，但因尚未有一明確的科學研究及嚴謹的血清生化及病毒核酸指數作為治療效果的評估。

本研究目的即在探討榮陽治肝湯 (龍膽瀉肝湯、加味逍遙散、丹參和厚朴的組合，在慢性 C 型肝炎病人的治療療效，尤其瞭解其對血清肝轉氨酶及 C 型肝炎病毒核酸的影響。研究對象為曾經接受干擾素為主的標準治療，且治療失敗(含不反應及復發)，或不適合接受干擾素治療的慢性 C 型肝炎患者，第一年我們將收集符合收案條件之慢性 C 型肝炎病人且經中醫師辯證屬於肝鬱血瘀合併肝經濕熱的證型者同時願意接受榮陽治肝湯治療者，研究對象隨機分成二組，一組給予榮陽治肝湯每天三次，每次五公克，為期十二週，另一組給予外形及味道相似但內容為澱粉之安慰劑，每天服用三次，為期十二週，於十二週結束後，停藥二週，再將二組互換，原來接受榮陽治肝湯者換成接受安慰劑，原來接受安慰劑組換成接受榮陽治肝湯為期十二週。研究治療期間定期評估其臨床症狀、副作用以及中醫證型變化，同時抽血偵測血清肝轉氨酶以及血中 C 型肝炎病毒核酸濃度之變化。更利用疲倦量表及生活品質問卷來了解對病人生活品質之影響。預期將可知道榮陽治肝湯是否對慢性 C 型肝炎病人是否有降血中肝轉氨酶以及血中 C 型肝炎病毒核酸濃度之能力。本研究將以嚴謹及科學的研究方法來評估榮陽治肝湯治療慢性 C 型肝炎的療效及安全性，本研究結果將提供中西醫界在治療慢性 C 型肝炎之重要參考。

本計畫因為人體試驗委員會一直到 101 年 8 月 15 日才通過，101 年 9 月 3 日和中醫藥委員完成簽訂研究契約書，加上實驗藥品打錠，穩定性測試及安慰劑製造耗時一個多月，影響計畫進行進度，開始收案時間為 101 年 9 月 25 日，目前共收案 19 位病人，已達 101 年 12 月底預定收案人數 18 人，目前收案 19 人中，有一位男性病人二次 HCVRNA 均呈現陰性不符收案條件，其餘 18 位病人，男性 2 人，女性 16 人，年齡平均  $65.9 \pm 11.5$  (範圍從 38 歲至 87 歲)，血清 Anti-HCV 均成陽性，均為慢性 C 型肝炎診斷，且為干擾素/雷巴威林治療失敗者 9 人，不

適合干擾素／雷巴威林治療 3 人（年齡大，憂鬱症），不願意干擾素／雷巴威林治療 6 人，治療前 ALT 平均  $121\pm 95$  U/L（42-402 U/L），AST 平均  $96.9\pm 59.6$  U/L（34-237 U/L），血中 C 型肝炎病毒濃度平均  $1,037,900\pm 1,580,630$  IU/ml（119-5240000 IU/ml），中醫證型分析濕熱蘊結證平均分數  $35.2\pm 11.2$ （24-71 分），血瘀證平均分數  $31.3\pm 8.0$  分（22-44 分），肝鬱脾虛證平均分數  $33.7\pm 11.4$ （21-59 分），疲倦程度平均分數  $22.8\pm 14.6$ （17-49 分）；生活品質量表八大面向：身體功能  $68.6\pm 23.7$ （20-100）、身體角色限制  $55.6\pm 48.9$ （0-100）、身體疼痛  $72.4\pm 17.5$ （41-90）、一般健康知覺  $60.2\pm 26.2$ （15-97）、活力狀況  $64.4\pm 18.9$ （30-100）、社會功能  $80.6\pm 15.6$ （50-100）、情緒角色限制  $64.8\pm 46.4$ （0-100）和心理健康  $68.2\pm 19.7$ （160-100）。

目前治療超過 1 個月有結果分析比較者 6 人，其中 1 人治療前肝功能 ALT/AST： $42/34$  U/L，HCVRNA： $19800$  IU/ml，治療後 1 個月肝功能為 ALT/AST： $40/31$  U/L，HCVRNA： $6690$  IU/ml，治療第 2 個月肝功能 ALT/AST 為  $39/29$ U/L；第 2 位治療前肝功能 ALT/AST： $46/65$  U/L，HCVRNA： $5240000$  IU/ml，治療後一個月肝功能為 ALT/AST： $82/61$  U/L，HCVRNA： $4120000$  IU/ml，治療第 2 個月肝功能 ALT/AST 為  $84/60$ U/L；第 3 位治療前 ALT/AST： $73/69$  U/L，HCVRNA： $1750000$  IU/ml，治療後一個月 ALT/AST 為  $51/62$  U/L，HCVRNA  $7370000$  IU/ml，治療第 2 個月肝功能 ALT/AST 為  $57/51$ ；第 4 位治療前肝功能 ALT/AST 為  $169/126$  U/L，HCVRNA 為  $33700$  IU/ml，治療後 1 個月肝功能 ALT/AST 為  $112/82$  U/L，HCVRNA 為  $106000$  IU/ml；第 5 位治療前肝功能 ALT/AST 為  $213/196$  U/L，HCVRNA 為  $123,000$  IU/ml，治療後 1 個月肝功能 ALT/AST 為  $101/100$  U/L，HCVRNA 為  $72700$  IU/ml；第 6 位治療前肝功能 ALT/AST 為  $69/47$  U/L，HCVRNA 為  $1710,000$  IU/ml，治療後 1 個月肝功能 ALT/AST 為  $64/39$  U/L，HCVRNA 為  $4,700,000$  IU/ml。所有病人腎功能治療前均在正常範圍，治療後一個月（6 人）均無腎功能之異常變化，服藥中除了一位 71 歲女性有極輕度之軟便及一位 70 歲女性有偶發性頭痛現象（治療前已有）外，均無副作用之報告，三位已經接受一個月藥物之治療病人其濕熱蘊結證分數 3 人下降（ $29\rightarrow 10\rightarrow 10$  分， $48\rightarrow 33\rightarrow 60$  分， $33\rightarrow 24$  分），3 人上升（ $29\rightarrow 39\rightarrow 24$  分， $38\rightarrow 43$  分， $43\rightarrow 48$  分），血瘀證分數二人不變（ $33\rightarrow 33\rightarrow 37$  分， $33\rightarrow 33$  分），3 人下降（ $30\rightarrow 26\rightarrow 55$  分， $26\rightarrow 15\rightarrow 7$  分， $26\rightarrow 19$  分），一人上升（ $22\rightarrow 26$  分），肝鬱脾虛證分數 4 人下降（ $33\rightarrow 15\rightarrow 15$  分， $59\rightarrow 26\rightarrow 54$  分， $38\rightarrow 26\rightarrow 26$  分， $31\rightarrow 21$  分）二人上升（ $26\rightarrow 31$  分， $38\rightarrow 41$  分），疲倦程度分數 3 人下降（ $41\rightarrow 21\rightarrow 49$  分， $44\rightarrow 28\rightarrow 15$  分），2 人上升（ $13\rightarrow 24$  分， $19\rightarrow 38$  分），目前研究進度穩定進行中，因是雙盲研究，且依西醫治療慢性 C 型肝炎之指標包括榮陽治肝湯對血清肝轉氨酶及 C 型肝炎病毒核酸的影響，副作用評估以及中醫證型變化和疲倦量表及生活品質之影響，如此嚴謹之研究結果將可了解榮陽治肝湯對慢性 C 型肝炎之真正療效。

關鍵詞：榮陽治肝湯、慢性 C 型肝炎、血清肝轉氨酶、C 型肝炎病毒核酸、中醫證型、疲倦量表、生活品質問卷

# **Clinical Efficacy of Rong-Yang-Jyh-Gan-Tan on Patients with Chronic Hepatitis C: a Double-blinded Randomized Placebo-controlled Cross-over Study (2-1)**

Shinn-Jang Hwang

Taipei Veterans General Hospital Center for traditional medicine

## **ABSTRACT**

10 to 30% of patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection will progressive insidiously to cirrhosis after 10 to 20 years' follow-up, and some will develop hepatocellular carcinoma. Combination of interferon with ribavirin has 50%~79% sustained response rate in treating chronic hepatitis C patients, but the side effects often lead to intolerance of patients. Traditional Chinese medicine has been widely used by the publics in Taiwan due to its safety and good patients' tolerance. However, the efficacy of traditional Chinese medicine has not been confirmed because there were no evidence-based results or scientific parameters such as serum liver transaminase or viral load available in the evaluation of treatment response.

This study evaluates the clinical efficacy of Rong-Yang-Jyh-Gan-Tang (a combination of long-dan-xie-gan-tang, jia-wei-xia-yao-san, dan-shen and hou-po) on patients with chronic hepatitis C. The purpose of this study is to evaluate the clinical efficacy of Rong-Yang-Jyh-Gan-Tang in treating patients with chronic hepatitis C, particularly emphasize on the effect on serum liver transaminase and HCV RNA. In the first year, we will enroll patients with chronic hepatitis C who were not response or not suitable for standard interferon-based therapy into this study. Patients will be diagnosed first by Chinese herbal doctor to identified as "dampness heat stasis" and "liver Qi stagnation" by Bian-Zheng-lun-zhi and then randomized and allocated to receive Rong-Yang-Jyh-Gan-Tang/placebo 5gm three time a days or placebo for 12weeks. After 2 weeks' washout period, patients will be crossed over to receive placebo/ Rong-Yang-Jyh-Gan-Tang for another 12 weeks. Patients will return to clinics as schedule and blood tests for liver biochemistries and HCV RNA will be performed. Clinical symptoms and side effects of Rong-Yang-Jyh-Gan-Tang will also be recorded in detail during and after treatment. We also apply Chinese Medicine symptoms score, fatigue severity score and quality of life questionnaire to evaluate the change of quality of life in these patients. This study will in a rigid and scientific way to evaluate the clinical efficacy of Rong-Yang-Jyh-Gan-Tang on patients with chronic hepatitis C.

Because of the long reviewing course of IRB and the preparation of Rong-Yang-Jyh-Gan-Tang and placebo, we started to enrolled patients since September 25, 2012. Current we enrolled 18 patients and will enroll 18-20 patients at the end of this year as schedule. Among these 18 patients, there were 2 male, 16 female, the mean age was  $67\pm 12$  years (range from 38 to 87 years), All were positive for anti-HCV, 5 patients were not responded to previous interferon/ribavirin treatment, 3 were not suitable to interferon/ribavirin treatment, 4 refused to receive interferon/ribavirin treatment, the pretreatment mean serum ALT :  $121\pm 95$  U/L, AST:  $96.9\pm 59.6$  U/L, HCV RNA:  $1,037,900\pm 1,580,630$  IU/ml. mean dampness heat stasis score:  $35.2\pm 11.2$ , blood stagnation score:  $31.3\pm 8.0$  liver Qi stagnation score :  $33.7\pm 11.4$ , fatigue severity scale:  $22.8\pm 14.6$ .

Six patient complete one month's follow up, three had decrease of ALT/AST and HCV RNA. All patients tolerated the medication well, only one patient suffered from mild loose stool and one suffered from headache. There was no patient with renal function impairment. Mean dampness heat stasis and blood stagnation score decrease in 3 patients, liver Qi stagnation score decreased in 4 patients, fatigue severity scale decrease in 3 patients. Currently, the study is going smoothly. We will evaluate the clinical efficacy of Rong-Yang-Jyh-Gan-Tang on patients with chronic hepatitis C, using strict criteria of western medicine such as interferon/ribavirin.

Keywords: Rong-Yang-Jyh-Gan-Tang, chronic hepatitis C, serum liver transaminase, hepatitis C viral RNA, Bian-Zheng-lun-zhi, Fatigue severity score, quality of life

## 壹、前言

### 一、研究背景

C 型肝炎病毒是一種單鏈 RNA 病毒，其基因序列與人類 flavivirus 和動物的 pestivirus 相類似。C 型肝炎病毒之基因（尤其在外套基因部份）突變較速，不同基因的突變型已經在世界各地被分離出來<sup>1-2</sup>。據估計每年在全世界各地約有二千五百萬新的 C 型肝炎病毒感染發生，然而，大部分是沒有明顯的臨床症狀，百分之二十五會有黃疸或肝炎的症狀。總括說來，全世界約有五億人曾經感染過 C 型肝炎病毒，而流行病學的研究亦顯示有將近百分之四十八的病人的感染機轉不明<sup>3-5</sup>；其他感染的機轉則包括了輸血、血液透析、性接觸以及靜脈注射。台灣慢性 C 型肝炎之盛行率在大城市如台北約為全人口的百分之二至四，但在中南部及澎湖地區某些鄉鎮有高達百分之二十至五十的盛行率，是繼慢性 B 型肝炎之後，對全民健康影響甚大之慢性疾病<sup>6-8</sup>。

急性感染 C 型肝炎之病人超過百分之八十會進展至慢性肝炎，而慢性 C 型肝炎病人無接受治療時，很少能自然痊癒，且在平均追蹤十年至二十年，會有百分之十至三十的病人產生肝硬化，同時有相當比例的病人會形成肝癌<sup>4</sup>。肝癌佔台灣癌症的第一位，而且肝硬化之死亡率亦佔十大死亡原因之第六位。所以慢性 C 型肝炎對全民健康的影響十分重大。加上 C 型肝炎病毒其基因之突變率很快，疫苗之發展上有困難。所以藥物治療慢性 C 型肝炎是刻不容緩的<sup>9-10</sup>。

### 二、慢性 C 型肝炎在西醫治療的現況

C 型肝炎病毒（Hepatitis C virus, HCV）依基因型可分為 6 種主要基因型，在台灣主要為基因型 1b 及 2a，而基因型 1b 屬於困難治療的基因型。目前對於慢性 C 型肝炎西醫的標準治療為長效型干擾素加雷巴威靈（Ribavirin）的合併治療，治療的時間目前有二種方式：一是依病毒基因型決定，若為第 1 型治療 48 週，第 2 型則治療 24 週；第二種是依病毒反應決定治療時間，若在治療的 4 週後，病毒可達到偵測不到的程度，稱之為快速病毒反應（Rapid virological response, RVR），則治療的時間為 24 週。若沒有達到 RVR，但在治療的 12 週時，其血中病毒量有下降 100 倍以上時，稱之為早期病毒反應（Early virological response, EVR），則治療時間為 48 週，若是沒有 EVR，則治療成功的機會趨近於 0，故不再治療。目前國內的治療方式皆依據治療中病毒反應來決定。因此治療後第 12 週的病毒量可

作為停藥的依據<sup>11-15</sup>。

若以治療結束停藥後 6 個月時的病毒量仍可維持偵測不到的狀況稱之為持續病毒反應(sustained virologic response, SVR)，長效型干擾素加雷巴威靈(Ribavirin)的合併治療對基因型第一型的 SVR 比率介於 50%~79%，而基因型第 2 型達到 SVR 比率為 75%~94%。對於第一次治療失敗的患者，可分為兩種狀況，第一種是對標準治療完全沒有病毒反應，第二種是有病毒反應，但在停止治療後病毒復發；第一次使用標準治療失敗再度使用標準治療的 SVR 大約為 10-20%，若是先前是屬於不反應者，其 SVR 更小於 10%<sup>14-15</sup>。

目前由於有 C 型肝炎病毒 NS3/4 非結構蛋白分解酶(protease)的抑制劑 Telaprevia 及 Boceprevia 問世，對於第一次標準治療失敗的病患以標準治療加上 NS3/4 分解酶抑制劑治療其 SVR 可達 30-50%之間<sup>16-17</sup>，但目前 NS3/4 分解酶抑制劑短期內台灣還不能上市。因此對於慢性 C 型肝炎患者，以標準治療第一次失敗之後，現在尚無適當的治療方法。

此外目前的標準治療藥物包括長效型干擾素及雷巴威靈其副作用不低，干擾素之治射有相當大之副作用，病人須忍受發燒、頭痛、疲倦等副作用，而且又會造成白血球及血小板降低，以及有精神上、免疫異常之副作用，所以遵醫療性(compliance)較低。雷巴威靈所造成之溶血性貧血，常使治療者不適，或因原有心肺疾病而加重，造成無法完成整個療程<sup>9,13</sup>。並不是每位病患都適合干擾素及雷巴威靈治療，特別是肝硬化患者、血球低下者、有憂鬱傾向者，皆不適合標準治療，因此對於此類患者，及第一次治療失敗的患者，仍需要尋新的治療方式。

### 三、慢性 C 型肝炎的中醫病機

中醫雖然沒 C 型肝炎的名詞，但從中醫對肝的生理功能來了解。肝主疏泄的功能，包括疏泄氣血，調達情志，促進膽汁的分泌、排泄以協助脾胃的運化。濕熱蘊結等可導致肝失疏泄、氣機失常，而引起一系列病理改變。

如肝氣鬱結，使膽汁分泌減少或排泄不暢，以致脾胃運化功能失調，則可見訥呆、暖氣、腹脹、倦怠乏力等症；若膽汁排泄不暢而犯溢肌膚，則發生黃疸。氣血疏泄之職失司，則氣機不暢、血行受阻，進而形成氣滯血瘀之證。肝主調達情志，可使人情緒保持穩定，若肝失疏泄，如疏泄太過則表現為急躁、易怒；疏泄不及，便可見情緒抑鬱、心志低沉等。急性肝炎所表現得過性精神症狀，以及肝腦病變等所見的易激動或抑鬱，則與

中醫所謂肝調節情志的功能失常有關<sup>18</sup>。

肝炎的早中期多表現以邪實為主，兼見虛象的病理特點，然邪正交爭的過程也就意味著邪氣犯人尤在傷正，而正氣抗邪，勢必自耗，故慢性肝炎常見於邪實之中必兼見正氣不足之象，而成實中挾虛之證<sup>19</sup>。肝炎後期併發肝硬變、肝癌有密切關係。然而在肝硬化、肝癌等病的晚期，則當以虛多實少看待之<sup>20</sup>。

慢性肝炎常見之肝脾腫大、以及其併發之肝硬化、肝癌等，按照中醫的認識，均屬癥積之範疇。而頑痰、痰血停蓄凝結，則是形成癥積的主要病理因素<sup>20</sup>。

邪毒外感、飲食失宜、七情內傷等可引起肝病，而肝病最易傳脾，脾失健運，水濕停聚，則生痰濁；肝疏泄調暢氣血之職失常，則可形成氣血瘀滯。痰濁性膩而黏，若停留蓄積於肝膽，與氣血相互搏結，久則可形成以痰瘀為主的癥積。瘀血性滯澀，作為病因，又可阻礙氣血的運行，若痰積肝膽，或與痰濁、邪毒相合，成為以瘀為主的癥積。癥積一證，雖有以痰、以瘀為主之不同，但仍以痰濁裹血，瘀血夾痰，相互膠結而致之者為多見<sup>21</sup>。

#### 四、慢性 C 型肝炎的中醫辯證與治療原則

肝炎疾病的變化在不同階段有不同的病理變化及臨床表癥。根據中醫治療肝病的文獻記載和臨床經驗，可依各個階段所表現出不同的證候，根據中醫的辯證論治法則詳分為各種證型，如：濕熱蘊結證、肝膽瘀熱證等，再依證型進行辯證論治<sup>22-23</sup>。將中醫醫籍的論述與現代醫學的發展相結合，在掌握中國醫學辯證施治的原則之下，將臨床辯證與辨病相結合。

根據高尚德教授於 2004 年對慢性 C 型肝炎的中醫證型的研究，慢性 C 型肝炎的中醫證型主要包含濕熱證、肝鬱脾虛證、肝鬱血瘀證和肝胃不和證<sup>22</sup>。其證型治療原則詳述如下：

##### (一)濕熱證：

肝膽濕熱證多見於急性病毒性肝炎、慢性活動性肝炎等病。面目及全身發黃，脅肋脹痛，肝臟腫大(在中醫視為有形之血瘀阻)，或兼有灼痛感，右脅觸痛明顯，脘腹脹滿，五心煩熱，口乾口苦，渴欲飲水，但飲而不多，胃納呆，不喜食油膩食物，噁心欲嘔，大便秘結，小便黃赤，身倦乏力，或出現肝掌、蜘蛛痣，面部毛細血管擴張，舌質紅，苔黃厚膩，脈弦滑數。若濕重於熱者，頭重身困，苔白膩微黃，脈濡緩或弦滑；熱重於濕者，發熱尿赤，苔黃膩，脈

弦滑數；濕熱兼表，則畏寒發熱，苔黃白膩，脈浮弦或浮數。

本證為肝膽疾病中最常見之證候，多因外感濕熱之邪或內傷飲食，使濕熱蘊結，燻蒸肝膽，肝失疏泄，氣機不暢，致肝膽氣鬱，血行不暢，瘀血阻滯，日久化熱而成。膽汁橫溢所致。屬實熱證。實指邪氣盛實，起病迅速，病程短，黃色鮮明如橘子色。其病變部位在肝膽，與中焦脾胃亦密切相關。治療以清熱化濕，涼血利膽為法則。

#### (二)肝鬱脾虛證：

本證多見於慢性肝炎、重症肝炎的恢復期。臨床表現以脅肋脹滿疼痛，胸悶善太息，精神抑鬱或性情急躁，納食減退，口淡，脘痞腹脹，四肢倦怠，面色萎黃，少氣懶言，大便溏，腹鳴腹脹，苔白，脈沉弦細。本證多因肝鬱之病因而引致脾虛之果，肝氣鬱結，疏泄失職，肝木橫逆犯脾土，致脾失健運，水穀不化所致，肝脾同病，其病位主要在肝脾，亦可涉及到胃腸。治療以疏肝解鬱，健運脾氣為原則。

#### (三)肝鬱血瘀證：

本證多見於慢性活動性肝炎。臨床表現以身目發黃而晦暗，面色黧黑，口唇紫黯，脅下有癥塊，脅腹刺痛不移，按之痛甚，脘腹脹滿，得矢氣後稍緩解，腹部青筋顯露，頭頸胸背有血痣，皮膚可見赤紋絲縷，手掌赤痕，舌質紫黯或有瘀斑，舌下青筋怒張，脈弦細澀。本證多由病久，肝鬱氣滯，血行不暢，瘀血留著所致。瘀血內聚，結於脅下，漸成癥塊，使絡道滯塞而出現赤紋絲縷；膽汁受阻，而發為黃疸。證屬虛實夾雜之候。其病位主要在肝膽，病變發展，亦可影響到脾、胃、腎等臟腑。治療以活血化瘀，疏肝退黃為原則。

#### (四)肝胃不和證：

本證多見於急、慢肝炎。臨床表現以脅肋脹痛，痛無定處，胸悶太息，精神抑鬱或急躁易怒，噁心嘔吐，噯氣呃逆，嘈雜吞酸，或吐出酸苦水，胃脘脹滿疼痛，食慾不振；舌苔薄白、脈弦。本證因肝氣犯胃，胃失和降，故噁心嘔吐，噯氣呃逆，嘈雜吞酸，甚則胃脘疼痛，肝鬱氣滯，經絡不通，故肝經所過之脅肋部位疼痛。肝先條達則胸悶太息，精神抑鬱或急躁易怒，屬實證，病久亦有虛者。其病位主要在肝胃，與脾亦密切相關。治療疏肝解鬱，理氣和胃原

則。

由以上文獻回顧清熱化濕解毒、活血化癥和健脾是治療慢性 C 型肝炎主要原則。目前應用的固定組方，其組方原則多是以上述三大治則為主的多法聯用。從現代藥理研究來看，清熱化濕解毒類藥多具有抑制病毒的作用，健脾、活血化癥類藥則具有調整身體免疫功能的作用。因此，選用這三大治則進行組方有其合理性。

## 貳、材料與方法

研究方法：西醫慢性 C 型肝炎患者之收集

### 一、納入條件：

- (一)慢性 C 型肝炎患者年紀大於二十歲；Anti-HCV 陽性
- (二)HCV RNA 陽性(大於 15IU/ml) ，ALT 大於標準正常值(40U/L)
- (三)曾經接受干擾素為主的標準治療，且治療失敗(含不反應及復發)，或不適合接受干擾素治療的 C 型肝炎患者。
- (四)孕齡女性在參與試驗前將進行懷孕檢測。

### 二、排除條件：

- (一)近二周有急性腹瀉症狀者
- (二)懷孕女性或正在哺乳的女性
- (三)代償失常之肝臟疾病或肝硬化，如食道、胃靜脈曲張出血、腹水、肝性腦病變、膽紅素 $\geq 2.0\text{mg/dl}$ ，和過去六個月有自發性細菌性腹膜炎
- (四)有肝癌或其它治療中惡性腫瘤
- (五)合併 B 型肝炎病毒或 HIV 感染
- (六)目前有藥物或酒精濫用
- (七)以前對中藥製劑有過敏
- (八)嚴重系統性疾病如嚴重心肺疾病或有疾病會影響臨床研究之進行及評估者。

受試者提前退出試驗之條件包含 1. 受試者參與意願減低，不願意繼續配合本計畫執行 2. 受試者出現肝功能代償失常如黃疸(Bilirubin  $> 2\text{mg/dL}$ )、腹水狀況。

### 三、中醫診斷：

中醫證型量表經轉化分公式計算後單一量表總分 $>20$ 分，即濕熱量表總分 $>20$ 分+肝鬱血虛量表總分 $>20$ 分，即符合條件之慢性 C 型肝炎患者經中醫辯證屬於肝鬱血瘀合併肝經濕熱的證型者，辯證方法採用高尚德教授和林宏任醫師在 2004 和 2005 年所發展出的肝炎體質量表作為參考，經三位醫學中心執業超過五年以上的經驗中醫師加以重新整理成一份問卷量表，作為辯證客觀的依據。

### 四、中藥

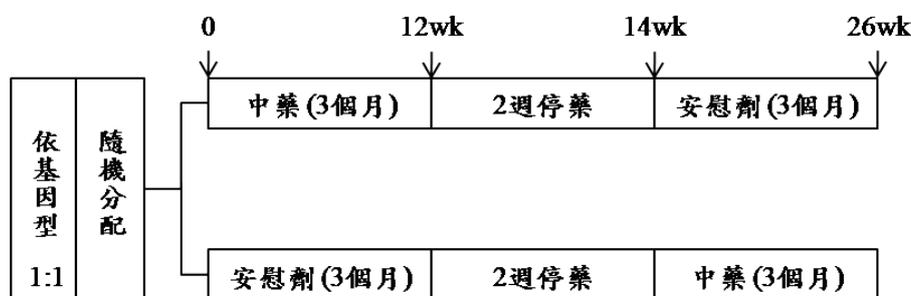
治療中藥為每天服用滎陽治肝湯(龍膽瀉肝湯 3gm，加味逍遙散 10gm，

丹參 1.5gm 及厚朴 0.5gm，共 15gm，其劑型為錠劑，每一錠劑為 0.75gm) 分成一天三次服用，早中晚各服用 7、6、7 錠，安慰劑則為利用澱粉所製成和治療中藥同型、同色、同量之錠劑一天三次服用，早中晚各服用 7、6、7 錠。研究藥物包括治療中藥（滎陽治肝湯）及安慰劑，均委由合格 GMP 中藥廠製造，錠劑均有成份及穩定度之測試通過，安慰劑型亦製成與治療中藥同型、同色、同量之錠劑，製成之研究藥物，交由台北滎總藥劑部研究藥品管理處保存及管理。

## 五、研究設計：

研究第一年，我們預計收集符合條件之慢性 C 型肝炎病人 36 人，在同意本臨床研究及簽署受試者同意書後，隨機雙盲分成二組(依亂數表)，一組給予滎陽治肝湯每天三次，為期十二週，另一組給予外形味道相似但內容為澱粉之安慰劑，每天服用三次，為期十二週，於十二週結束後，停藥二週，再將二組互換，原來接受滎陽治肝湯者成接受安慰劑，原來接受安慰劑組換成接受滎陽治肝湯為期十二週。研究第二年我們將針對第一年有療效之慢性 C 型肝炎病人(血清肝轉氨酶或 HCV viral load 有下降)進行滎陽治肝湯二十四週之治療及評估其停藥後二十四週之持續療效。

### (一) 隨機對照雙盲交叉研究(第一年)



收案個案依收案順序依亂數表 (random number table) 隨機接受治療中藥或安慰劑組，治療中藥及安慰劑均放於藥劑部研究藥品管理處，研究助理至藥劑部由藥師給予研究藥物，醫師及病人完全不知服用藥物種類。本計劃已經台北滎總 IRB，並依 GCP guideline 執行。

研究治療期間定期評估其臨床症狀、副作用以及中醫證型變化(如附件 2)，同時抽血偵測血清肝轉氨酶以及血中 C 型肝炎病毒核酸濃度之變化。更利用疲倦量表及生活品質問卷來了解對病人生活品質之影響。研究主要療效指標包括血清肝轉氨酶(ALT/AST)

下降/正常及血清 HCV viral load 下降 2 個 log 之比率，研究次要療效指標包括病人中醫証型改變、疲倦量表(如附件 3)及生活品質評量(以 SF-36 測量，如附件 4)。

(二) 檢測追蹤項目：

- 臨床症狀及副作用
  - 血清肝轉氨酶(ALT/AST)(第 0、4、8、12、14、18、22、26 週)
  - CBC 及腎功能 (BUN/Cr.) (第 0、12、14、26 週)
- HCV viral Load (第 0、4、12、14、18、26 週)
- HCV 基因型(第 0 週)
- 中醫證型評估(第 0、4、8、12、14、18、22、26 週)
- 疲倦量表(第 0、4、12、14、18、26 週)
- 生活品質量表(第 0、12、14、26 週)
- 研究主要療效指標：1. 血清肝轉氨酶(ALT/AST)下降/正常  
2. HCV viral load 下降 2 個 log
- 研究次要療效指標：1. 中醫證型改變  
2. 生活品質評量(以 SF-36)  
3. 疲倦量表評量

(三) 研究樣本數分析：

本研究樣本數分析引用 1998 年發表於 Journal of Gastroenterology and Hepatology 使用 19 種中藥組成之 CH-100 對於慢性 C 型肝炎病人之研究及 1998 年發表於 Hebei Journal of Traditional Chinese Medicine 使用中藥 Bing-gan-ling 對於慢性 C 型肝炎病人之研究，綜合兩篇研究之血清肝轉氨酶之正常率為 1.9% 而安慰劑之對照組為 0%，故本臨床研究預估達到 power：0.8 而 two-side signficancy level=0.05 所需之樣本數為 36 人(滎陽治肝湯及安慰劑組各 18 人)。

(四) 統計分析：

研究結果統計分析將由生統專家林明薇博士負責，接受滎陽治肝湯治療組及安慰劑組兩組間男女性別分層分析血清肝轉氨酶有降低或至正常、HCV viral load 有降低比率之比較採用 Fisher's Exact test 分析；中醫證型、疲倦量表及 SF-36 生活品質改善情形兩組間比較，類別變數採用 Fisher exact test 分析，量化(包含轉化

後數量)變數則採用 Mann Whitney U test 分析；接受榮陽治肝湯治療組在接受榮陽治肝湯後血清肝轉氨酶值及 HCV viral load 之下降值及其他量化指標採用 Wilcoxon signed rank test 分析，類別變數則採用 McNemar Chi-Square test 分析。

## 參、結果

本計畫因為人體試驗委員會一直到 101 年 8 月 15 日才通過，101 年 9 月 3 日和中醫藥委員完成簽訂研究契約書，加上實驗藥品打錠，穩定性測試及安慰劑製造耗時一個多月，影響計畫進行進度，開始收案時間為 101 年 9 月 25 日，目前共收案 19 位病人，已達 101 年 12 月底預定收案人數 18 人，

目前收案 19 人中，有一位男性病人二次 HCVRNA 均呈陰性不符收案條件，其餘 18 位病人，男性 2 人，女性 16 人，年齡平均  $65.9 \pm 11.5$  (範圍從 38 歲至 87 歲)，血清 Anti-HCV 均成陽性，均為慢性 C 型肝炎診斷，且為干擾素／雷巴威林治療失敗者 9 人，不適合干擾素／雷巴威林治療 3 人 (年齡大，憂鬱症)，不願意干擾素／雷巴威林治療 6 人，治療前 ALT 平均  $121 \pm 95$  U/L (42-402 U/L)，AST 平均  $96.9 \pm 59.6$  U/L (34-237 U/L)，血中 C 型肝炎病毒濃度平均  $1,037,900 \pm 1,580,630$  IU/ml (119-5240000 IU/ml)，中醫證型分析濕熱蘊結證平均分數  $35.2 \pm 11.2$  (24-71 分)，血瘀證平均分數  $31.3 \pm 8.0$  分 (22-44 分)，肝鬱脾虛證平均分數  $33.7 \pm 11.4$  (21-59 分)，疲倦程度平均分數  $22.8 \pm 14.6$  (17-49 分)；生活品質量表八大面向：身體功能  $68.6 \pm 23.7$  (20-100)、身體角色限制  $55.6 \pm 48.9$  (0-100)、身體疼痛  $72.4 \pm 17.5$  (41-90)、一般健康知覺  $60.2 \pm 26.2$  (15-97)、活力狀況  $64.4 \pm 18.9$  (30-100)、社會功能  $80.6 \pm 15.6$  (50-100)、情緒角色限制  $64.8 \pm 46.4$  (0-100) 和心理健康  $68.2 \pm 19.7$  (160-100)。

目前治療超過 1 個月有結果分析比較者 6 人，其中 1 人治療前肝功能 ALT/AST：42/34 U/L，HCVRNA：19800 IU/ml，治療後 1 個月肝功能為 ALT/AST：40/31 U/L，HCVRNA：6690 IU/ml，治療第 2 個月肝功能 ALT/AST 為 39/29U/L；第 2 位治療前肝功能 ALT/AST：46/65 U/L，HCVRNA：5240000 IU/ml，治療後一個月肝功能為 ALT/AST：82/61 U/L，HCVRNA：4120000 IU/ml，治療第 2 個月肝功能 ALT/AST 為 84/60U/L；第 3 位治療前 ALT/AST：73/69 U/L，HCVRNA：1750000 IU/ml，治療後一個月 ALT/AST 為 51/62 U/L，HCVRNA 7370000 IU/ml，治療第 2 個月肝功能 ALT/AST 為 57/51；第 4 位治療前肝功能 ALT/AST 為 169/126 U/L，HCVRNA 為 33700 IU/ml，治療後 1 個月肝功能 ALT/AST 為 112/82 U/L，HCVRNA 為 106000 IU/ml；第 5 位治療前肝功能 ALT/AST 為 213/196 U/L，HCVRNA 為 123,000 IU/ml，治療後 1 個月肝功能 ALT/AST 為 101/100 U/L，HCVRNA 為 72700 IU/ml；

第 6 位治療前肝功能 ALT/AST 為 69/47 U/L，HCVRNA 為 1710,000 IU/ml，治療後 1 個月肝功能 ALT/AST 為 64/39 U/L，HCVRNA 為 4,700,000 IU/ml；所有病人腎功能治療前均在正常範圍，治療後一個月（6 人）均無腎功能之異常變化，服藥中除了一位 71 歲女性有極輕度之軟便及一位 70 歲女性有偶發性頭痛現象（治療前已有）外，均無副作用之報告，三位已經接受一個月藥物之治療病人其濕熱蘊結證分數 3 人下降（29→10→10 分，48→33→60 分，33→24 分），3 人上升（29→39→24 分，38→43 分，43→48 分），血瘀證分數二人不變（33→33→37 分，33→33 分），3 人下降（30→26→55 分，26→15→7 分，26→19 分），一人上升（22→26 分），肝鬱脾虛證分數 4 人下降（33→15→15 分，59→26→54 分，38→26→26 分，31→21 分）二人上升（26→31 分，38→41 分），疲倦程度分數 3 人下降（41→21→49 分，44→28→15 分），2 人上升（13→24 分，19→38 分），目前研究進度穩定進行中，因是雙盲研究，且依西醫治療慢性 C 型肝炎之指標包括榮陽治肝湯對血清肝轉氨酶及 C 型肝炎病毒核酸的影響，副作用評估以及中醫證型變化和疲倦量表及生活品質之影響，如此嚴謹之研究結果將可了解榮陽治肝湯對慢性 C 型肝炎之真正療效。

## 肆、討論

目前研究進度穩定進行中，因是雙盲研究，且依西醫治療慢性 C 型肝炎之指標包括榮陽治肝湯對血清肝轉氨酶及 C 型肝炎病毒核酸的影響，副作用評估以及中醫證型變化和疲倦量表及生活品質之影響，如此嚴謹之研究結果將可了解榮陽治肝湯對慢性 C 型肝炎之真正療效。

## 伍、結論與建議

本研究由於在本院送 IRB 審查的過程中有許多的波折，於九月底時收到兩個病人，有不少個案反應無意願服用中藥，更是增加了收案的困難度，10 月份收 3 位病人，10 月底時再找兩位胃腸科醫師幫忙篩選與轉介病人增加了 3 位個案，直到 12 月時共收到 18 位病人來參加，雖然收案不易，但持續努力於此研究。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP101-RD-028 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. Weiner AJ, Kuo G, Bradley DW et al. Detection of hepatitis C virus sequences in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1990;335:1-3.
2. Houghton M, Weiner A, Han J et al. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* , 1991;14:381-8.
3. Ray KW. Global epidemiology and burden of hepatitis C. *Microbes & Infection* 2002;4:1219-25.
4. Seeff LB. Natural history of hepatitis C. *Hepatology* 1997;6:S21-8.
5. Liang TJ, Rehermann B, seeff LB, Hoofnagle JH. Pathogenesis, natural history, treatment and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med* 2000;132:296-305.
6. Lee SD, Chan CY, Wang YJ et al. Seroepidemiology of hepatitis C virus infection in Taiwan. *Hepatology* 1991;13:830-3.
7. Hwang SJ. Hepatitis C virus infection: an overview. *Journal of Microbiology, Immunology & Infection* 2001;34:227-34.
8. Chen Ds, Kuo GC, Sung JL et al. Hepatitis C virus infection in an area hyperendemic for hepatitis B and chronic liver disease: the Taiwan experience. *J Infect Dis* 1990;162:817-22.
9. Poynard T, Leroy V, Cohard M et al. Meta-analysis of interferon randomized trials in the treatment of viral hepatitis C: effect of dose and duration. *Hepatology* 1996;21:778-89.
10. Tong MJ, Hwang SJ, Lefkowitz M et al. Correlation of serum HCV RNA and alanine aminotransferase levels in chronic hepatitis C patients during treatment of ribavirin. *J Gastroenterol Hepatol* 1994;9:587-91.
11. Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004;140:346-55.
12. Rumi MG, Aghemo A, Prati GM, et al. Randomized study of peginterferonalpha2a plus ribavirin vs peginterferonalpha2b plus ribavirin in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2010;138:108-15.
13. McHutchison JG, Lawitz EJ, Shiffman ML, et al. Peginterferon alfa-2b or

- alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. *N Engl J Med* 2009;361:580-93.
14. Ghany MG, Nelson DR, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB; An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. 2011 ;54:1433-44.
  15. Sarrazin C, Hézode C, Zeuzem S, Pawlotsky JM. Antiviral strategies in hepatitis C virus infection *J Hepatol.* 2012;56 Suppl 1:S88-100.
  16. Zeuzem S, Andreone P, Pol S, et al. Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N Engl J Med* 2011;364:2417-28.
  17. Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, et al; Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med.* 2011 Mar 31;364(13):1207-17.
  18. 肝病用藥十講·尹常健，中國中醫藥出版社，1998
  19. 新看仁齋直指·楊士瀛、朱崇正，新聞豐出版社，1982
  20. 中醫內科學·張伯實，知音出版社，1989
  21. 中醫如何診治肝病·馬光亞，九思出版社，1998
  22. 高尚德，常見疾病症型診斷基準 (3-2)-慢性 C 型肝炎中醫證型診斷基準研究·*Yearbook of Chinese Medicine and Pharmacy* 2004:22:61-106.
  23. 林宏任，五種常見疾病中醫證型診斷基準之研究 (3-1)-慢性 B 型肝炎中醫證型診斷基準·*Yearbook of Chinese Medicine and Pharmacy* 2004:22:107-176.
  24. Huang, R.L., Chen, C.C., Huang, H.L., Chang, C.G, Chen, C.F., Chang, C., Hsieh, M.T., Anti-hepatitis B virus effects of wogonin isolated from *Scutellaria baicalensis*. *Planta Medica.* 2000;66:694-8.
  25. Kakuda, R., Iijima, T., Yaoita, Y., Machida, K., Kikuchi, M., 2002. Triterpenoids from *Gentiana scabra*. *Phytochemistry* 59, 791-94.
  26. Kim, J.K., Oh, S.M., Kwon, H.S., Oh, Y.S., Lim, S.S., Shin, H.K., Anti-inflammatory effect of roasted licorice extracts on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in marine macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006;345:1215-23.
  27. Kim, S.S., Son, Y.O., Chun, J.C., Kim, S.E., Chung, G.H., Hwang, K.J., Lee, J.C., Antioxidant property of an active component purified from the leaves

- of paraquat-tolerant *Rehmannia glutinosa*. *Redox Rep* 2005;10: 311-8.
28. Koo, H.J., Song, Y.S., Kim, H.T., Lee, Y.H., Hong, S.M., Kim, S.J., Kim, B.C., Jin, C., Lim, C.J., Park, E.H., Anti-inflammatory effects of genigin, an active principle of gardenia. *European Journal of Pharmacology* 2004;495: 201-8.
  29. Ling, S., Dai, A., Guo, Z., Yan, X., Komesaroff, P.A., Effects of a Chinese herbal preparation on vascular cells in culture, mechanism of cardiovascular protection. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2005; 32:571-8
  30. Matsuda, H., Tomohiro, N., Yoshikawa, M., Kubo, M., Studies of *Alismatis Rhizoma*. II. Anti-complementary activities of methanol extract and terpene components from *Alismatis Rhizoma* (dried rhizome of *Alisma orientale*). *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 1998;21:1317-1321.
  31. Mikamo, H., Kawazoe, K., Izumi, K., Sato, Y., Tamaya, T., Therapeutic effects of herbal medicines (Juzen-Taiho-To and Ryutan-Shakan-To) in a rat intrauterine infection (pyometra) model. *Curr Thera Res* 1997;58:454-58.
  32. Mikamo, H., Kawazoe, K., Izumi, K., Sato, Y., Tamaya, T., Effects of crude herbal ingredients on intrauterine infection in a rat model. *Curr Thera Res* 1998;59:122-27.
  33. Park, E., Kum, S., Wang, C., Park, S.Y., Kim, B.S., Schuller-Levis, G., Anti-inflammatory activity of herbal medicines, inhibition of nitric oxide production and tumor necrosis factor-alpha secretion in an activated macrophage-like cell line. *American Journal of Chinese Medicine* 2005;33:415-24.
  34. Ushiroyama, T., Ikeda, A., Sakuma, K., Ueki, M., Changes in serum tumor necrosis factor (TNF-alpha) with kami-shoyo-san administration in depressed climacteric patients. *American Journal of Chinese Medicine* 2004;32:621-9.
  35. Wu, S.J., Ng, L.T., Lin, C.C., Antioxidant activities of some common ingredients of traditional Chinese medicine, *Angelica sinensis*, *Lycium barbarum* and *Povia cocos*. *Phytotherapy Research* 2004;18:1008-12.
  36. Zhou, L., Zuo, Z., Chow, M.S., Danshen, an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. *J Clin Pharmacol*

2005;45:1345-59.

37. Chen FP, Kung YY, Chen YC, Jong MS, Chen TJ, Chen FC, Hwang SJ. Frequency and pattern of prescriptions Chinese herbal medicine for chronic hepatitis in Taiwan. *J Ethnopharmacol* 2008 ;117:84-91.
38. Liu JP, Manheimer E, Tsutani K, Gluud C. Medicinal herbs for hepatitis C virus infection: A Cochrane Hepatobiliary systematic review of randomized trials. *Am J gastroenterol* 2003;98:538-44.
39. Batey R, Bensoussan A, Fan YY, Bollipo S, Hossain M. Preliminary report of a randomized, double-blind placebo-controlled trial of a Chinese herbal medicine preparation CH-100 in the treatment of chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:244-7.
40. Chen , Han XY, Miao YX, et al. Clinical study of Bingganling for treatment of hepatitis C. *Hebei Journal of Traditional Chinese Medicine* 1998;20:137-8.
41. Gastaminza P, Whitten-Bauer C, Chisari FV. Unbiased probing of the entire hepatitis C virus life cycle identifies clinical compounds that target multiple aspects of the infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:291-6.
42. Lan KH, Wang YW, Lee WP, Lan KL, Tseng SH, Hung LR, Yen SH, Lin HC, lee SD. Multiple effects of honokiol on the life cycle of hepatitis C virus. *Liver Int* 2012 (in press)

## 柒、圖、表

表一、肝腎功能報告

Random NO. (給藥用編號)	ALT	AST	BUN	Cr.	Total Bilirubin	備註
001-1	42	34	16	1.02	0.85	101/09/25 V1
001-2	40	31	13	1.06	1.00	101/11/8 V2
001-3	39	29	19	1.14	0.70	101/11/29 V3
002-1	46	65	27	1.28	0.60	101/9/25 V1
002-2	82	61	24	0.83	0.41	101/11/19 V2
002-3	84	60	27	1.15	0.73	101/12/3 V3
003-1	73	69	13	0.42	0.52	101/10/15 V1
003-2	51	62	14	0.54	0.70	101/11/21 V2
003-3	57	51	17	0.65	0.46	101/12/5 V3
004-1	169	126	17	0.82	0.76	101/10/23 V1
004-2	112	82	21	0.97	0.77	101/11/29 V2
005-1	213	196	13	0.64	0.50	101/10/25 V1
005-2	101	100	11	0.66	0.44	101/12/3 V2
006-1	69	47	17	0.49	0.60	101/11/9 V1
006-2	64	39	17	0.68	0.46	101/12/10V2
007	58	51	14	0.62	0.65	101/11/19 V1
008	154	143	13	0.79	0.48	101/11/26V1
009	402	181	15	0.68	0.84	101/11/26V1
010	79	116	15	0.71	0.67	101/11/27V1
011	253	237	14	0.62	0.89	101/11/29 V1
012	196	121	15	0.69	0.65	101/11/30 V1
013	52	42	11	0.67	0.33	101/12/5 V1
014	101	87	12	0.73	0.56	101/12/10 V1
015	65	46	19	0.72	0.67	101/12/10 V1
016	52	53	17	0.76	1.95	101/12/11 V1
017	74	60	14	0.75	1.51	101/12/11 V1
018	80	71	10	0.47	0.98	101/11/1 V1

表二、C 型肝炎病毒濃度

Random NO.	HCV viral load IU/C.C.	備註
001-1	19800	101/09/25 V1
001-2	6690	101/11/8 V2
002-1	5240000	101/9/25 V1
002-2	4120000	101/11/19 V2
003-1	1750000	101/10/15 V1
003-2	7370000	101/11/21 V2
004-1	33700	101/10/23 V1
004-2	106000	101/11/29 V2
005-1	123000	101/10/25 V1
005-2	72700	101/12/3 V2
006-1	1710000	101/11/9 V1
006-2	4700000	101/12/10 V2
007	383000	101/11/19 V1
008	32000	101/11/26 V1
009	888	101/11/26 V1
010	119	101/11/27 V1
011	218000	101/11/29 V1
012	345000	101/11/30 V1
013	4500000	101/12/5 V1
014	1970000	101/12/10 V1
015	241000	101/12/10 V1
016	1970000	101/12/11 V1
017	132000	101/12/11 V1
018	13600	101/11/1 V1

表三、中醫證型及疲倦程度分數

個案	濕熱蘊結分數	血瘀證分數	肝鬱脾虛證分數	疲倦程度分數
001 V1	29.00	33.00	33.00	13.00
001 V2	10.00	33.00	15.00	24.00
001 V3	10.00	37.00	15.00	8.00
002 V1	48.00	30.00	59.00	41.00
002 V2	33.00	26.00	26.00	21.00
002 V3	60.00	55.00	54.00	49.00
003 V1	29.00	26.00	38.00	44.00
003 V2	39.00	15.00	26.00	28.00
003 V3	24.00	7.00	26.00	15.00
004 V1	38.00	26.00	26.00	43.00
004 V2	48.00	19.00	31.00	33.00
005 V1	43.00	33.00	38.00	49.00
005 V2	48.00	33.00	41.00	
006 V1	33.00	22.00	31.00	19.00
006 V2	24.00	26.00	21.00	38.00
007 V1	33.00	22.00	31.00	27.00
008 V1	24.00	22.00	33.00	14.00
009 V1	71.00	44.00	56.00	23.00
010 V1	38.00	37.00	41.00	39.00
011 V1	33.00	44.00	26.00	20.00
012 V1	38.00	37.00	38.00	2.00
013 V1	38.00	22.00	21.00	7.00
014 V1	24.00	30.00	23.00	7.00
015 V1	24.00	37.00	21.00	28.00
016 V1	24.00	33.00	21.00	7.00
017 V1	33.00	44.00	26.00	20.00
018 V1	33.00	22.00	30.00	13.00

# 高氏柴胡防治 C 型肝炎病毒感染與應用安全性評估(2-1)

林俊清  
高雄醫學大學

## 摘要

### 研究目的：

全球目前有 1 億七千萬人左右感染 C 型肝炎病毒而它所帶來的肝疾病(肝炎、肝硬化及肝癌)是全球嚴重的健康與醫療負擔，包括臺灣。現有的臨床治療藥物 IFN/ribavirin 相當昂貴且對於最普遍的 genotype 1 的治療效果並不理想(治癒率約 50%)加上副作用大，造成許多患者身體無法承受療程及經濟負擔。因此開發 C 型肝炎病毒及其引起的肝病治療藥物乃是值得優先考慮的一大問題，為了研發經濟、有效且副作用少的抗 C 型肝炎藥物，本計畫採取臺灣特有種高氏柴胡，同時也開發臺灣本土生藥資源。

### 研究方法：

我們以最新的 C 型肝炎病毒感染模式觀察藥物如何影響病毒感染週期(infection cycle)包括單病毒顆粒感染、吸附、融合、複製、轉譯、合成、釋放及細胞間的傳遞。

### 結果與討論：

第一年的成果中高氏柴胡其活性成分主要作用於抑制病毒的侵入(entry)，並非作用在複製、轉譯、合成、釋放或細胞間的傳遞。而我們發現 BK-2 為高氏柴胡中最有效的活性成分，因此更深入探討其與病毒醣蛋白的影響，證實 BK-2 能與 C 型肝炎病毒醣蛋白 E2 (glycoprotein E2)作用而干擾病毒侵入細胞。另外 BK-2 除了可抑制 JC1-HCVcc(genotype 2a)，還能夠抑制基因型 2b, 3a, 7a 的 C 型肝炎病毒感染，證實其應用範圍可更廣，甚至未來能應用於換肝手術中預防新的肝細胞被病毒感染。另一方面 BK-2 亦能防止第一型皰疹病毒(HSV-1)、麻疹病毒(MV)、呼吸道融合病毒(RSV)、呼腸孤病毒(Reovirus)及登革熱病毒(DENV)侵入細胞，為廣效性的病毒侵入抑制劑(broad spectrum entry inhibitor)，因此未來不只能夠開發為治療藥物，亦可應用在口罩、手套、防蚊液、洗手乳、乾洗手(消毒劑)、與各種清潔用品中，讓防疫工作變得更容易。第二年欲觀察藥物是否進入及如何影響宿主細胞，以及其保肝作用與動物安全性評估。

關鍵詞：高氏柴胡、抗 C 型肝炎藥物、C 型肝炎、侵入抑制劑

# Assessment of Efficacy and Drug Application Safety of *Bupleurum kaoi* Against Hepatitis C Virus Infection (2-1)

Chun Ching Lin  
Kaohsiung Medical University

## ABSTRACT

### **Aim:**

Approximately 170 million people are infected with hepatitis C virus (HCV) worldwide. Patients were treated with standard therapy (IFN/ribavirin) on the most common genotype 1 infection is suboptimal, which is also associated with high cost and serious side effects. It is necessary to develop novel anti-HCV therapeutics that result in minimal side effects with high patient adherence. We have previously screened anti-HCV crude extractions from the natural medicinal plant *Bupleurum kaoi* (*B. kaoi*) that is acclimated for culture in Taiwan. For this study, we therefore pursued to further evaluate the anti-HCV activity of *B. Kaoi* and its related components with mechanistic details.

### **Methods:**

Antiviral assessment of *B. kaoi* and its active compounds on HCV infection cycle consisted of using the latest HCVcc infectious system.

### **Results and Discussion:**

Our first year study of results demonstrated that BK and its different components inhibited HCV entry while leaving replication, translation, assemble, release, and cell-to-cell spread relatively unaffected. BK-2 is the active compound of highest SI in value from *B. kaoi*. Bk-2 influenced HCV glycoprotein E2 and blocked viral entry. On the other hand, BK-2 can inhibit other genotype viruses (2b, 3a, 7a) suggesting that it acts in a genotype-independent fashion. BK-2 also acted as an entry inhibitor against HSV-1, MV, RSV, RV, and DENV. These data also suggest that BK-2 may possess broad-spectrum antiviral potential. In year 2, experiments include analyzing its effect on host cell and animal toxicity for preliminary drug safety evaluation.

Keywords: *Bupleurum kaoi*, anti-viral therapy for HCV, hepatitis C virus, entry inhibitor

## 壹、前言

過去的 10 幾年，科學家致力於找尋更強效藥物取代干擾素，通常是作用在抑制病毒的 non-structural protein 而影響病毒的複製，但 protease inhibitor 價格仍然不是一般民眾負擔的起。而近年來，隨著 C 型肝炎全病毒感染模式被發明，許多生藥之活性成分陸續在此模式中被證實具有抑制 C 型肝炎病毒感染之能力，例如 silymarin、silibinin 藉由透過抑制多重 HCV life cycle 步驟達到良好的抗病毒效果，包括抑制病毒 fusion 及 egress，針對細胞本身可提升免疫反應並減少 LDL 的釋放，達到抗病毒的目的。Naringenin 則是減少細胞 LDL release，以致於病毒透過在 ER membrane 合成病毒時直接勾上同時也在 ER membrane 合成的脂蛋白策略失敗，病毒能利用脂質的幫助釋放，也能利用細胞的 LDL receptor 進入而感染新的細胞。另外 quercetin 則為 heat shock protein 70(HSP-70) inhibitor，C 型肝炎病毒的 translation 須由 NS5A protein 調控，quercetin 抑制 HSP-70/NS5A interaction 使病毒蛋白轉譯階段減少，於是能夠減少病毒的 production。綠茶成分 EGCG 則可結合病毒 glycoprotein E1,E2 防止病毒進入細胞。這些例子暗示著各國科學家開始傾向於較具經濟價值之生藥做為新藥開發之方向，另外也說明病毒與宿主細胞產生複雜的交互作用，包括氧化壓力、脂質的合成與釋放、細胞內特殊蛋白質與病毒複製轉譯的交互作用對於抗病毒藥物的研發是相當重要的方向，開創了不同於對於過去十幾年將重點放在研發病毒本身的 protease 及 polymerase inhibitor 作為藥物直接抑制病毒複製以外的新課題，也有希望找出更理想的藥物。

**計畫總目標：**開發本土的藥用植物抑制 C 型肝炎病毒感染的活性，與作用機轉探討，並將此結果作為將來推動本土藥用植物往分子醫學領域與世界同步。

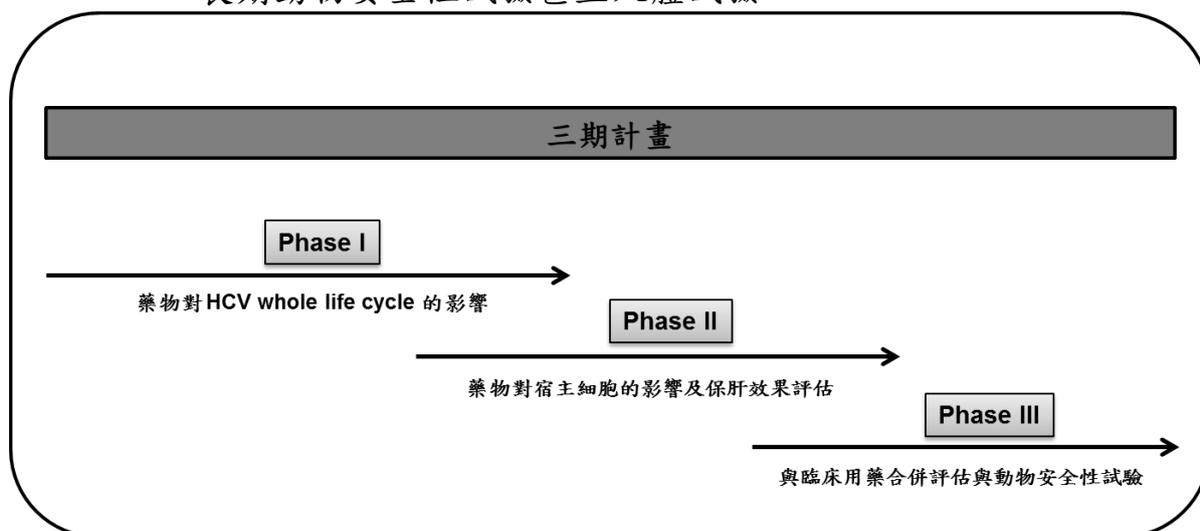
### 三期之計畫：

**Phase I**—觀察高氏柴胡及其相關活性成分對於直接控制病毒感染周期(life cycle)的藥效。並觀察對其他基因型(2b, 3a, 7a)及其他病毒是否具抑制作用，證明其為專一性或廣效性抑制劑。

**Phase II**—觀察高氏柴胡及其成分對於影響宿主細胞免疫或脂質調控導致病毒感染過程受控制及保護肝細胞之作用。

**Phase III**—評估高氏柴胡及成分與臨床用藥併用情形以及動物安全性（14 天急性毒性試驗或 28 天亞急性毒性試驗），評估高氏柴胡及其

活性成分是否具好的動物安全性未來可被推行進入正式臨床前長期動物安全性試驗甚至人體試驗。



**Phase I (101 年 6~12 月): 以最新的 C 型肝炎病毒感染模式 Luc-JC1 HCVcc 觀察高氏柴胡及其活性成分直接控制 C 型肝炎病毒之能力**

Luc-JC1 HCVcc 為 *in vitro* 製造出來的 C 型肝炎病毒，感染宿主細胞後經由細胞與病毒本身的蛋白酶 protease 將 structural 和 non-structural protein 切開後釋放出可發冷光的物質在上清液中，作為病毒是否感染的監測目標。本團隊從數種生藥萃取物中篩選，並優先選擇臺灣本土產藥用植物，發現高氏柴胡醇萃取物(Fig.1) (由顏銘宏副教授提供專業基源鑑定，並以 ITS 定序法證實其 DNA 序列與 NCBI 提供之序列 100%符合)及活性成分對 C 型肝炎病毒蛋白質具顯著的抑制作用，因此選為做深入探討。在病毒的初步感染週期中，首先 HCV 以 E1E2 protein 與細胞 CD81、SR-BI、OCLN、CLDN receptor 結合後經由 clathrin-mediated endocytosis 的方式進入細胞，接著病毒 RNA 在 ER membrane 上進行複製及轉譯，此時細胞內的脂蛋白也同樣在細胞的 ER 蛋白釋放作用也同時幫助病毒的釋放，另外也可透過與脂肪的結合與其它細胞 LDL receptor 結合而進入細胞，又開始展開新的感染週期抑或是病毒也能夠透過細胞與細胞間的傳遞而擴散。因此機轉探討方面會我們先觀察藥物對 HCV 感染週期(infection cycle)的影響包括藥物可能藉由直接破壞病毒顆粒(viral free particle)或與病毒直接結合而影響其進入，或是抑制病毒與宿主細胞之間的吸附(binding)與融合(fusion)，用溫度控制的方法 (4°C 與 37°C 的轉換) 使病毒和細胞進行 binding 而無法進入細胞或病毒能夠進入細胞後的感染觀察藥物對此階段是否有影響，也可利用直接的方式以病毒 E1E2 抗體直接定量黏在細胞上的病毒蛋白。進入細胞後以

qPCR 觀察 HCV RNA level 而判斷藥物是否可影響病毒複製、以 protein level 觀察病毒轉譯、同時監測細胞內(intra-cellular)及細胞外(extra-cellular RNA) 觀察病毒釋放、最後病毒的細胞與細胞間傳遞作用則用以同時培養 (co-culture)被轉殖綠色螢光的 recipient cell 和 producer cell 釋放的病毒再染上其他顏色的螢光，以螢光顯微鏡觀察病毒的顏色是否與 recipient cell 交疊，代表著病毒藉由細胞與細胞間傳遞而感染。此階段藉由觀察 HCV whole life cycle 的改變包括 free particle neutralization、binding、fusion、replication、assemble、release、cell-to-cell transmission 可讓我們更了解高氏柴胡及其活性成分與病毒直接的相關性。

### Phase II (102 年 1 月~8 月)：探討藥物作用機轉尤其在觀察高氏柴胡及其活性成分對宿主細胞造成之影響是否達到抑制病毒之作用

第二階段先探討高氏柴胡對宿主細胞造成的影響，是否達成抑制病毒的目標。並將活性成分做成具有螢光標幟藥物(fluorescent-labeled)、放射線標幟(radio-labeled drug)或是以抗體偵測(antibody detection)的方式探討藥物是否可進入細胞中作用或是在細胞外直接與病毒粒子作用。

1. 以 clathrin-mediated endocytosis inhibitor 觀察藥物是否影響細胞吞噬作用(endocytosis)，而抑制病毒 fusion。
2. 觀察藥物是否活化細胞免疫反應而抑制病毒感染。第一型干擾素(Type 1 interferon  $\alpha$ 、 $\beta$ )為細胞先天性免疫對廣泛性病原菌入侵體內後的第一道防線，因此首先以 qPCR 定量加入藥物後宿主細胞是否活化干擾素(interferon)的表現，接著再以 interferon inhibitor 與高氏柴胡及其活性成分同時加入細胞觀察是否會改變其抗病毒藥效，以此證明藥效是否與免疫活化有直接關聯性
3. 以螢光顯微鏡觀察 ORO 染劑處理過後的細胞釋放脂肪小滴的情形是否受藥物影響，接著再觀察細胞內的脂蛋白(ApoB、E protein)是否減少，觀察藥物是否影響細胞脂質與脂蛋白而抑制病毒釋放。因為 C 型肝炎病毒的感染會導致肝細胞產生大量自由基(ROS)及發炎反應，因此觀察藥物是否能夠以其他保護細胞的作用來減低病毒感染之傷害，將以 DCF-DA 來觀察在加藥後對自由基(ROS)產生的影響，接著也分析 TNF- $\alpha$  誘導的細胞激素表現(cytokine profiling)是否有被藥物抑制來觀察高氏柴胡及其活性成分是否能夠緩解肝細胞發炎反應。此階段可了解高氏柴胡及其活性成分對宿主細胞造成的影響是否能夠達到控制病毒的作用。

**Phase III (102 年 8 月~12 月)：觀察高氏柴胡及其活性成分是否在體外試驗中能夠與臨床用藥 IFN 併用，降低 IFN 劑量，及體內動物安全性及溶血試驗之評估**

此階段著重於藥物的應用性，首先將高氏柴胡及其活性成分與臨床治療藥物 interferon (IFN)- $\alpha$  合併使用，觀察是否有加乘作用的效果，如此可降低 IFN- $\alpha$  的使用量，減少副作用、經濟負擔及抗藥性的產生。另外評估動物安全性試驗—進入臨床人體試驗前，需委託通過國家法規由認證通過之實驗室進行雌雄至少各 10 隻的老鼠，亞急性連續 28 天給藥期間每日觀察死亡情形，28 天結束後進行臟器組織肉眼檢查、血清生化檢查、血液檢查、組織病理檢查、臟器秤重、基因毒性試驗、致癌性試驗、致畸試驗等嚴格試驗。在此之前本實驗室將先行以急性毒性試驗觀察評估，急性試驗之定義乃給藥後觀察老鼠 14 或 28 天，過程紀錄老鼠體重或死亡，觀察期結束後解剖觀察臟器組織是否正常，並採集血清進行心、肝膽、腎、胰、電解質及血球健康度檢測，最後以體外紅血球溶血性試驗觀察製劑是否會造成溶血情形。以上述方式評估藥物是否具良好的動物安全性可進入正式臨床前安全性試驗，也做為確保藥物安全的基礎。

## 貳、材料與方法

### **高氏柴胡醇抽萃物製備：**

藥材來源購買於廣興生物科技股份有限公司。高氏柴胡根部首先經由乾燥過後加入 10 倍重量的甲醇(含有 2% KOH，為保護其中 saponin 類成分不被酸水解)並加熱萃取 2 次，收集上清液且濃縮，接著以二級水回溶後再使用冷凍乾燥機取得高氏柴胡萃取出物。純物質由嘉南藥理科技大學王貴弘副教授依生物活性導向由高氏柴胡純抽萃取出物中分離出 4 種純物質。

### **觀察藥物對 HCV whole life cycle 的影響：**

#### **1. 觀察高氏柴胡及其活性成分是否抑制病毒的 binding—Attachment assay**

Huh7.5 cells 先放入 4°C 冰箱一小時，以冰的 media 配製病毒與高氏柴胡及其活性成分後同時加入 Huh7.5 cells，在 4°C 培養 3 小時，(因為 4°C 的情況下病毒顆粒可 bind 上細胞，但卻無法進行 fusion)，培養結束後用冰的 PBS wash，將培養盤轉移到 37°C 使病毒顆粒可進入細胞，72 小時後以冷光觀察細胞是否有被病毒感染。

#### **2. 觀察高氏柴胡及其活性成分是否影響病毒的 fusion—Fusion assay**

Huh7.5 cells 先放入 4°C 冰箱一小時，以冰的 media 配製病毒，在 4°C 下使病毒顆粒 bind 上細胞 3 小時，培養結束後用冰的 PBS wash，以冰的 media 配製藥物，加入細胞後將培養盤轉移至 37°C，使病毒可 fusion，培養 3 小時後 Luc-JC1 HCVcc 從 4°C → 37°C 後需 3 小時才可順利完成 fusion，培養完成後，以 PBS wash 掉藥物與細胞外的病毒，72 小時後以冷光觀察細胞是否有被病毒感染。

#### **3. 觀察高氏柴胡及其活性成分是否具有 Viral free particle neutralization 的作用—**

Luc-JC1 HCVcc 與高氏柴胡及其活性成分在 cell free 的狀況下於 37°C 分別作用 0、1 和 3 小時，3 小時後將病毒與藥物的 mixture 稀釋 20 倍，(確認藥物在稀釋 20 倍後已無抗病毒之藥效) 加入所有的 mixture 於 Hu7.5 cells，72 小時後以冷光觀察細胞是否有被病毒感染。

### **以直接性方法確認藥物如何干擾病毒 entry：**

#### **4. HCVcc ELISA binding assay—**

以最直接之方式觀察藥物確實可影響病毒 binding，則用直接性的 HCV E2 抗體(AUSTRAL Biologicals)做為病毒定量之觀察。先將細胞放於 4°C 1 小時，以冰的 media 配置病毒與藥物 mixture，配置完成後立刻加到細胞上，

在 4°C incubate 3 小時，作用完成後，以 PBS wash，接著用 4% paraformaldehyde 固定 1 小時，以 PBS wash 後加入 blocking buffer，blocking over night 之後，直接加入 HCV E2 抗體作用 1 小時，接著將 1° 抗 wash 掉後，加入 2° 抗 (goat anti- mouse IgG-HRP, Invitrogen) 作用 1 小時，將 2° 抗 wash 掉後加入 TMB substrate，約 20 分鐘後加入 stop reagent (1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)，最後以 ELISA reader OD450 偵測 bind 在細胞上的病毒蛋白質表現量。

#### **5. sE2 ELISA binding assay –**

原理和 HCVcc ELISA binding assay 相同，但將病毒粒子用 soluble E2 取代，最後以 ELISA reader OD450 偵測 bind 在細胞上的病毒 E2 protein 表現量。為再次證實藥物可抑制 HCV glycoprotein E2 和細胞的 binding。有效為 type I interferon independent，而藥物變得沒效則反之。

#### **6. 觀察高氏柴胡及其活性成分影響病毒的複製 – Replication assay**

使用 sbJFH1-B2 (genotype 2a) replicon cell (由 Christopher D. Richardson 教授提供) 加入藥物後，分別在 1、3 及 5 天萃取細胞 total RNA (Trizol method)，將 50 ng RNA 反轉錄為 cDNA (ABI)，接著用專一性 Taqman probe (5'UTR sequence) (ABI) 的方法做定量 (7900, ABI) 實驗，觀察病毒 RNA 是否減少，確認藥物是否可直接影響病毒複製。

#### **7. 觀察高氏柴胡及其活性成分是否影響病毒的轉譯 – Translation assay**

病毒感染 Huh7.5 細胞的同時加入藥物，在病毒尚未 release 及進行 cell-to-cell spread (約 24 小時) 之前萃取 total protein，以 western blot 觀察 HCV E2、NS3、NS5A 是否減少，以觀察藥物是否可影響病毒蛋白的轉譯。

#### **8. 觀察高氏柴胡及其活性成分是否影響病毒的細胞間傳遞 – Cell-to-cell transmission assay**

以高濃度病毒感染細胞作為 donor cell (可提供病毒的釋放)，將此 cell trypsinize，再與未被感染的 Huh7.5 co-culture (1:1) 在一起，為防止 free particles 的二次感染，所以加入 1% agarose，經過 24 小時 co-culture 之後加入藥物，讓藥物滲透到 agarose 下面，繼續培養，直到細胞長滿，可增加細胞間傳遞的機率，將 agarose 移除，用 PBS wash 後以事先凍於 -20°C 的 methanol 固定細胞後，接著用 BSA 做 blocking，blocking 結束後，加入 1° HCV NS5A 抗體 (由 Christopher D. Richardson 教授提供)，最後用 Alexa 488 (Invitrogen) 做為 2° 抗，以螢光顯微鏡分別觀察病毒 foci 是否變小。

#### **9. 觀察高氏柴胡及其活性成分是否影響病毒的釋放 – Release assay**

病毒感染細胞 24 小時後，加入藥物，分別在 24、48 和 72 小時後分別

萃取 extracellular 和 intracellular RNA。將上清液收集起來，離心 4000 rpm 先去除細胞碎片，加入 PEG-8000 (sigma) 沉澱病毒蛋白質，沉澱過夜後，高速離心後將上清液小心移除，加入 Trizol。細胞則是用 PBS wash 後直接加入 Trizol 萃去 intracellular RNA，RNA 經過反轉錄之後以 Taqman probe qPCR 分析病毒 RNA 含量。

#### 10. 觀察藥物是否為HCV專一性藥物—

為了觀察高氏柴胡及其活性成分是否為抗HCV專一性的藥物或是廣效性的多種病毒 entry inhibitor，先以宿主細胞測試毒性後，以 HSV-1、MV、RSV、Reovirus 及 Dengue virus 觀察藥物對其他病毒的 entry 是否有影響，並計算出  $CC_{50}$ 、 $EC_{50}$  與 SI 值。

## 參、結果

為確定植物正確基源，我們萃取新鮮高氏柴胡 DNA 進行序列比對，首先利用 NCBI blast 比對，結果顯示植物基源為高氏柴胡的機率高達 100 % (Fig. 1)。接著我們更進一步依照 Lin 等人的論文指出柴胡的 DNA 由 604 bp 組成，而高氏柴胡、北柴胡及三島柴胡之序列相當類似，能夠鑑別高氏柴胡品種的特異性位置共有 site 1~5 (綠色標示)，比對結果也顯示所有的序列 100 % 與高氏柴胡吻合 (Fig. 1)。

另外與王貴弘博士合作(嘉南藥理科技大學副教授)進行分離及萃取、結構鑑定等從十種 fraction 中以生物活性導向進行篩選，找出 4 種活性成分 BK-1、BK-2、BK-3、BK-4，經由 HPLC 定量各種成分濃度，發現 BK-4 > BK-1 > BK-3 > BK-2 (Fig. 2)，在活性方面的結果顯示所有的高氏柴胡及以上所有的成分在不對宿主細胞產生毒性的濃度下皆具有抑制 C 型肝炎病毒感染之能力，並呈現劑量依賴性(dose-dependent) (Fig. 3)。接著選擇單一劑量作為以下機轉探討之濃度 BK: 50 $\mu$ g/ml、BK-1: 8 $\mu$ M、BK-2: 50 $\mu$ M、BK-3: 200 $\mu$ M、BK-4: 2 $\mu$ M。

首先為探討完整的病毒 life cycle 初步依 3 種不同方式加入病毒與藥物 (Fig. 4)，我們觀察到高氏柴胡及 BK-1、2、4 在 Co-addition (病毒和藥物同時加入，3 小時後一起移除) 的實驗中皆具有良好的抑制作用，證實藥物可干擾病毒 entry；而在 pre-treatment (藥物作用在細胞 24 小時移除，再加入病毒) 的實驗中，所有的藥物皆無效，因此初步推測藥物並非作用在保護細胞而防止病毒感染。在 post-infection (病毒感染 3 小時後再加入藥物) 的結果中發現所有的藥物皆無效，證實藥物可能並非作用於病毒的複製或轉譯作用。接著以更直接的實驗設計探討藥物在整個病毒 life cycle 的影響。在 Inactivation 及 attachment 的實驗中觀察到僅有 BK-2 可中和病毒顆粒及抑制病毒附著細胞 (Fig. 5)，而 fusion 的實驗中發現高氏柴胡及 BK-1、2 皆可防止病毒融合 (Fig. 5)，以上的結果可證實高氏柴胡及其活性成分抗病毒的主要機制是作為 entry inhibitor。

複製及轉譯方面首先以 replicon 的模式觀察，所有的藥物對於 sbJFH1-B2 cells 內的 HCV RNA 並無抑制效果 (Fig. 6A)，或將 SGR-Luc-JFH1 RNA 電入細胞內後再加入藥物，發現所有的藥物皆對 replicon 系統的複製及轉譯無抑制效果 (Fig. 6B)；接著以全病毒模式 JC1 RNA 電入細胞後分別在 1、3、6 天內以冷光觀察病毒蛋白的表現因病毒複製及轉譯而持續增加，

而所有的藥物皆無法抑制病毒蛋白表現(Fig. 6C)，另外利用第 6 天的細胞萃取液(intracellular RNA)及上清液(extracellular RNA)的 RNA 觀察病毒的合成(assembly)及釋放(release)，結果顯示所有的藥物都對於病毒的合成與釋放無抑制效果(Fig.7A)。而使用 J6/JFH(p7-Rluc2A)及 J6/JFH(p7-Rluc2A)/ $\Delta$ E1E2 (E1E2 Deletion) RNA 電入細胞後分別偵測細胞內(intracellular core)及上清液(extracellular core)的 core protein，在此實驗中觀察到所有的藥物也同樣確實不影響病毒的合成(intracellular core)與釋放(extracellular core)(Fig.7B)。細胞間的傳遞(cell-to-cell transmission)則是利用細胞被 JC1 RNA 轉殖後 NS5A-positive foci 會隨著培養的時間變大，首先比較轉殖後的 Huh7.5 cells 24 小時及 144 小時的 foci 約有 60 倍的差異，S29 (缺乏 CD81 receptor，無法進行 spread)作為陽性對照組，結果顯示加藥後所有的藥物皆無法抑制病毒的細胞間傳遞(Fig.8)。最後在 whole life cycle 的觀察上顯示 BK 及其活性成分 BK-1, 2, 4 皆主要作用於病毒的 entry，其中 BK 及 BK-1 只抑制在病毒 fusion，而 BK-2 可作用於 particle inactivation、binding 及 fusion，所有的藥物都並非作用於病毒的 replication、translation、assembly、release 與 cell-to-cell transmission (Fig.9)。另外 BK-3 及 BK-4 則未找出確切作用在病毒的機制，第二年將繼續探討其對宿主細胞的影響，包括對細胞膜的作用、細胞吞噬作用、免疫調節及脂質調控等，完整的討論高氏柴胡及各種活性成分之藥效及機轉。

在劑量依賴性的實驗當中發現 BK-2 為 SI 值最高 (毒性最低且抑制病毒效果最好) 的活性成分(Fig.3)，並可作用於任何早期的 entry step (Fig.5)，因此挑選其為最具開發價值性的成分。首先進一步以更直接性的 HCVcc ELISA binding assay 及 sE2 ELISA binding assay 發現 BK-2 主要是藉由直接干擾 C 型肝炎病毒的糖蛋白(E2)與細胞結合(Fig.10)，進而抑制病毒的 binding，才能夠防止病毒 entry。

另外除探討 JC1 (genotype 2)外，也發現 BK-2 能夠抑制 J8/JFH1 (genotype 2b)、S52 (genotype 3a)、QC69 (genotype 7)感染(Fig.11)。最後為觀察 BK-2 為專一性的抗病毒藥物或是廣效性抗病毒藥物則選擇第一型皰疹病毒(HSV-1)、麻疹病毒(MV)、呼吸道融合病毒(RSV)、呼腸孤病毒(Reovirus)及登革熱病毒(DENV)，結果顯示 BK-2 無論對於 DNA 或 RNA 病毒、single strand 或 double strand、有套膜或無套膜的病毒皆具抑制效果(Fig.12)。

## 肆、討論

在此計畫第一年的結果中我們發現臺灣特有種高氏柴胡及其 4 種活性成分能夠抑制 C 型肝炎病毒的感染，其中高氏柴胡及 BK-1, 2, 4 主要抗病毒機轉為病毒侵入抑制劑(entry inhibitor)。所有的藥物當中以 BK-2 的 SI 最高，被認為最具開發價值，因此我們更進一步的探討其作用為藉由干擾病毒的醣蛋白 E2 (glycoprotein E2)而抑制病毒 binding 細胞，進而阻擋了病毒的侵入，並與病毒的複製(replication)、轉譯(translation)、合成(assembly)、釋放(release)與細胞間傳遞(cell-to-cell transmission)皆無關，此類藥物將來可開發應用於肝臟移植手術中，避免新移植的肝臟被 C 型肝炎病毒感染。此階段我們完成了探討藥物與病毒本身的關係，也將好於 phase II 繼續探討藥物對宿主細胞產生的影響是否也能夠造成抑制病毒感染的原因，包括藥物是否進入細胞中作用、對細胞膜的影響、細胞吞噬作用(endocytosis)、細胞免疫調節、細胞脂質調控等。

另外我們發現 BK-2 並非專一性只針對 genotype 2a 的病毒，同時也可抑制 genotype 2b, 3a, 7 病毒的感染，顯示 BK-2 能夠更廣泛的運用於防治多種基因型的 C 型肝炎病毒感染，以往唯一的臨床治療藥物 IFN/ribavirin 對於 genotype 1 的治療效果相當有限(約 50%)，雖 2011 年 5 月美國 FDA 核准了兩個新藥 boceprevir 及 telaprevir (HCV genotype 1NS3/4A protease inhibitor)，為 genotype 1 病毒感染的患者帶來新希望，但必須與 IFN/ribavirin 合併治療，無法做單一治療(monotherapy)的限制仍無法解決 IFN/ribavirin 帶來的副作用及經濟負擔，因此開發多種基因型的治療藥物仍為相當重要的課題。

BK-2 是否為專一性的 C 型肝炎病毒侵入抑制劑也是我們相當關心的，我們選擇了第一型皰疹病毒(HSV-1)、麻疹病毒(MV)、呼吸道融合病毒(RSV)、呼腸孤病毒(Reovirus)及登革熱病毒(DENV)，結果顯示 BK-2 無論對於 DNA 或 RNA 病毒、單股或雙股、有套膜或無套膜的病毒皆具抑制效果，亦證實 BK-2 為廣效性的病毒侵入抑制劑(broad spectrum entry inhibitor)。其中 Reovirus 為無套膜病毒，則可說明藥物的作用機轉可能與病毒套膜無關，而與病毒醣蛋白較具相關性，(我們將會於第二階段的實驗中提出其他方法進一步證實)，這項發現可能提高了將來藥物的應用範圍，例如一般的酒精性乾洗手只能夠殺死有套膜的病毒，而對無套膜病毒則束手無策，例如好發於幼兒的腸病毒(enterovirus)，因此可用添加此天然成分的

方式使乾洗手的抗病毒效果更廣泛。

而我們發現 BK-2 對於同樣屬於黃病毒科(flaviviridae)的登革熱病毒及 C 型肝炎病毒都具有較高的 SI 值(分別為 30.55 及 45.9)，顯示 BK-2 對黃病毒科病毒具有特別好的抑制效果。每年夏季於臺灣南部及其他東南亞國家爆發的登革熱疫情對於第一次感染的人通常為典型性登革熱主要造成發燒、肌肉痠痛及關節疼痛，但第二次感染則為登革出血(斷骨)熱通常伴隨著典型性登革熱的主要症狀及胃腸道、子宮出血、血尿、因血漿滲出造成的腹水及腹膜腔積水等，使病人會有休克症狀甚至生命危險，因此若能將 BK-2 若能於添加於防蚊液中，可能使登革熱防疫工作更方便。

每年臺灣皆固定爆發幾種常見的病毒傳染疾病，未來將可針對其他臺灣常見流行性病毒，例如腸病毒(enterovirus)、流感病毒(Influenza virus)、輪狀病毒(Rotavirus)、諾華克病毒(Norwalk virus)等進行探討，此類藥物可廣泛性的添加於口罩、手套、防蚊液、洗手乳、酒精性乾洗手液、與各種清潔用品中，降低病毒傳播機率，甚至讓各國公共場所的防疫工作及醫療工作者對於職場風險管理變得更容易。

為實現以上的可能性，我們將準備好進入 phase III，以動物安全性試驗評估 BK-2 是否對於老鼠會產生致死性或以血清及血球檢測方式觀察老鼠健康狀況產生嚴重副作用，評估未來是否可被推行進入正式臨床前長期動物安全性試驗甚至人體試驗。

## 伍、結論與建議

本團隊已成功完成第一階段(Phase I)以最新的 C 型肝炎病毒感染模式 Luc-JC1 HCVcc 觀察高氏柴胡及其活性成分直接控制 C 型肝炎病毒之能力。

結果顯示高氏柴胡及其活性成分具有顯著抑制 C 型肝炎病毒 entry 的作用，並更進一步了解其活性成分 BK-2 作用為藉由干擾病毒的醣蛋白 E2 (glycoprotein E2)而抑制病毒 binding 細胞，進而阻擋了病毒的侵入，而與病毒的複製(replication)、轉譯(translation)、合成(assemble)、釋放(release)與細胞間傳遞(cell-to-cell transmission)皆無關。此階段以最新的 HCV 病毒感染模式取代過去傳統的 replicon 模式，並奠定將來研發其他具有抗 C 型肝炎病毒活性之藥物之基礎。同時也能發現新的抗病毒標的，也對於生藥及其化學成分與病毒的互動有更深層的了解。

另外發現 BK-2 為廣效性抗病毒藥物，能夠抑制多種基因型 C 型肝炎病毒感染，具足廣泛性的應用特質，相當具有開發價值。

而我們已準備進入第二及第三階段，以另一層面繼續探討高氏柴胡及其活性成分新療效的發現，達到舊藥新用並推動傳統生藥邁入分子醫學與世界同步，並期望能夠投稿到高點數期刊，以 Journal of virology 或是 Hepatology 等做為主要目標，並同時提出申請專利

**Phase II—探討藥物作用機轉尤其在觀察高氏柴胡及其活性成分對宿主細胞造成之影響是否達到抑制病毒之作用以及是否具有保肝活性。**

C 型肝炎病毒與宿主細胞之間有著複雜的相互作用關係，因此我們希望透過全面性的探討包括細胞吞噬作用、細胞先天性免疫調節(IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、ISG-15、ISG-56、IP-10、etc)、脂質控制(Apo B、Apo E)等方向找到新的控制病毒的目標，同時也觀察抗氧化壓力(ROS)及發炎模式(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6)評估藥物保護肝細胞的效果，另外並為藥物對肝細胞的保護作用找到新的療法，此階段為釐清藥物是否作為單純病毒的抑制劑或是作為宿主細胞調節者而抑制病毒。

**Phase III—觀察高氏柴胡及其活性成分是否能夠與臨床用藥 IFN 併用，降低 IFN 劑量，及動物安全性及溶血試驗之評估。**

最後階段主要著重加強於藥物的應用價值，將藥物與臨床用藥 IFN 合併治療是否可減低 IFN 用量，結果可供於臨床上參考，同時也觀察藥物是否可與 NS3 protease inhibitor，可考慮藥物是否可與其他藥物作為 cocktail，

減低 IFN 使用造成的負擔。最後觀察高氏柴胡及其活性成分是否具良好的動物安全性，未來可被推行進入正式臨床前長期動物安全性試驗甚至人體試驗，此實驗成果不僅可觀察藥物在活體內造成之影響，也可評估藥物在活體內的運送是否需要進行製劑之改良。依以上的兩年三階段性實驗期望開發出高氏柴胡及相關成分抗 C 型肝炎病毒之感染與肝疾病。

一另項值得重視的議題是，自 2000 年後中國進口生藥價格年年上漲，由於資源過度消耗、野生藥材已枯竭、人工種植的回收期長，若條件不好的農民負荷不起長時間無收成的壓力導致藥材大量減產。因此本計畫的總目標是找尋臺灣本土栽培之藥用植物，免受進口生藥的漲價與牽制，並可能為藥農開創一線契機。根據前行政院農委會農業試驗所/臺灣省農業試驗所劉新裕博士表示利用現代醫藥研發之國際規範藥用植物之 GAP 栽培管理措施，臺灣具有條件可成功栽培出品質更為優良之藥用植物，例如高氏柴胡、山藥、丹參等含有之有效成分濃度都較進口藥材高，將來也希望能夠開發出屬於我國專有之生藥保健產品，進而推廣到全世界。中國大陸雖地大物博，為世界主要原藥材輸出國，並累積了幾千年來的藥物運用典籍與歷史，但在市面上中國所屬的保健藥物植物產品卻僅佔市場上的 5%，反之日本根據金匱要略及傷寒論之處方製成僅 200 多種方劑，且 75% 之原料同樣來自中國，而日本生藥產品在國際的市佔率上卻高達 80%，這是個值得令所有臺灣人民省思的數據，也說明了除優良的高品質藥用植物栽培，生藥保健產品之品質提升必定可為我國生藥科技發展開創出一條新的道路。本計畫期望能夠以最新的分子病毒學方法，藉由掌握高氏柴胡能夠抑制 C 型肝炎病毒之活性與機轉探討的科學證據，因此研究高氏柴胡抗肝炎病毒之活性不但可為全世界需要 IFN 治療之肝炎病人減輕經濟重擔，使人人都可以有能力接受治療。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP101-RD-029 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

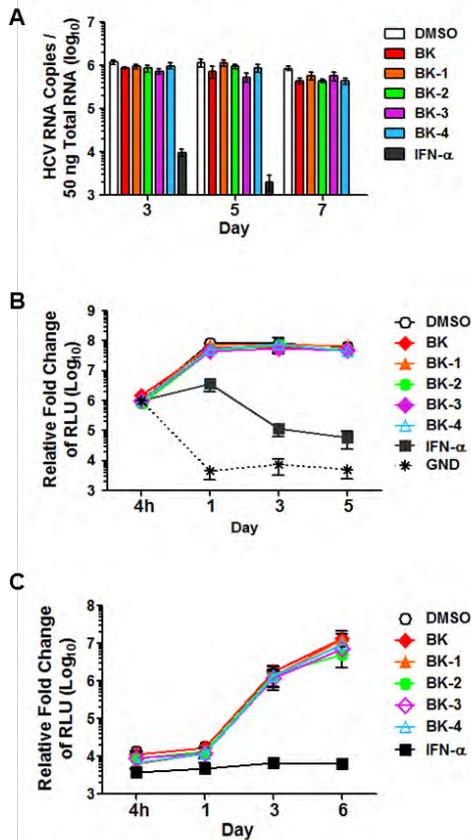
## 陸、参考文献

1. Kato, T., T. Date, A. Murayama, K. Morikawa, D. Akazawa, and T. Wakita: Cell culture and infection system for hepatitis C virus. *Nat Protoc* 2006; 1:2334-2349.
2. Lindenbach, B. D., M. J. Evans, A. J. Syder, B. Wolk, T. L. Tellinghuisen, C. C. Liu, T. Maruyama, R. O. Hynes, D. R. Burton, J. A. McKeating, and C. M. Rice: Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005; 309:623-626.
3. Polyak, S. J., C. Morishima, V. Lohmann, S. Pal, D. Y. Lee, Y. Liu, T. N. Graf, and N. H. Oberlies: Identification of hepatoprotective flavonolignans from silymarin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:5995-5999.
4. Polyak, S. J., C. Morishima, M. C. Shuhart, C. C. Wang, Y. Liu, and D. Y. Y: Inhibition of T-cell inflammatory cytokines, hepatocyte NF-kappaB signaling, and HCV infection by standardized Silymarin. *Gastroenterology* 2007; 132:1925-1936.
5. Wagoner, J., A. Negash, O. J. Kane, L. E. Martinez, Y. Nahmias, N. Bourne, D. M. Owen, J. Grove, C. Brimacombe, J. A. McKeating, E. I. Pecheur, T. N. Graf, N. H. Oberlies, V. Lohmann, F. Cao, J. E. Tavis, and S. J. Polyak: Multiple effects of silymarin on the hepatitis C virus lifecycle. *Hepatology* 2010; 51:1912-1921.
6. Nahmias, Y., J. Goldwasser, M. Casali, D. van Poll, T. Wakita, R. T. Chung, and M. L. Yarmush: Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology* 2008; 47:1437-1445.
7. Gonzalez, O., V. Fontanes, S. Raychaudhuri, R. Loo, J. Loo, V. Arumugaswami, R. Sun, A. Dasgupta, and S. W. French: The heat shock protein inhibitor Quercetin attenuates hepatitis C virus production. *Hepatology* 2009; 50:1756-1764.
8. Ciesek, S., T. von Hahn, C. C. Colpitts, L. M. Schang, M. Friesland, J. Steinmann, M. P. Manns, M. Ott, H. Wedemeyer, P. Meuleman, T. Pietschmann, and E. Steinmann: The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, inhibits hepatitis C virus entry. *Hepatology* 2011;

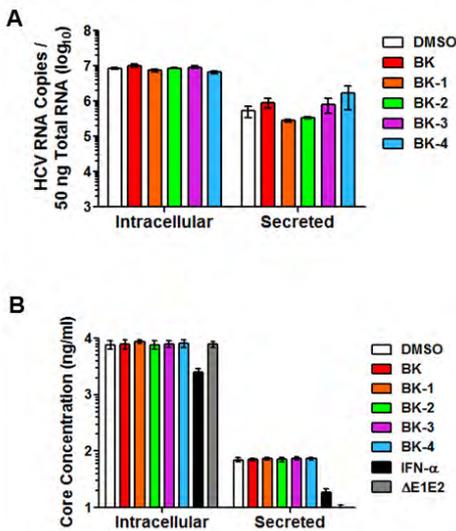
- 54:1947-1955.
9. Falkowska, E., F. Kajumo, E. Garcia, J. Reinus, and T. Dragic: Hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 glycans modulate entry, CD81 binding, and neutralization. *J Virol* 2007; 81:8072-8079.
  10. Flint, M., C. Maidens, L. D. Loomis-Price, C. Shotton, J. Dubuisson, P. Monk, A. Higginbottom, S. Levy, and J. A. McKeating: Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol* 1999; 73:6235-6244.
  11. Grove, J., S. Nielsen, J. Zhong, M. F. Bassendine, H. E. Drummer, P. Balfe, and J. A. McKeating: Identification of a residue in hepatitis C virus E2 glycoprotein that determines scavenger receptor BI and CD81 receptor dependency and sensitivity to neutralizing antibodies. *J Virol* 2008; 82:12020-12029.
  12. Lin, W. Y., L. R. Chen, and T. Y. Lin: Rapid authentication of Bupleurum species using an array of immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Planta Med* 2008; 74:464-469.



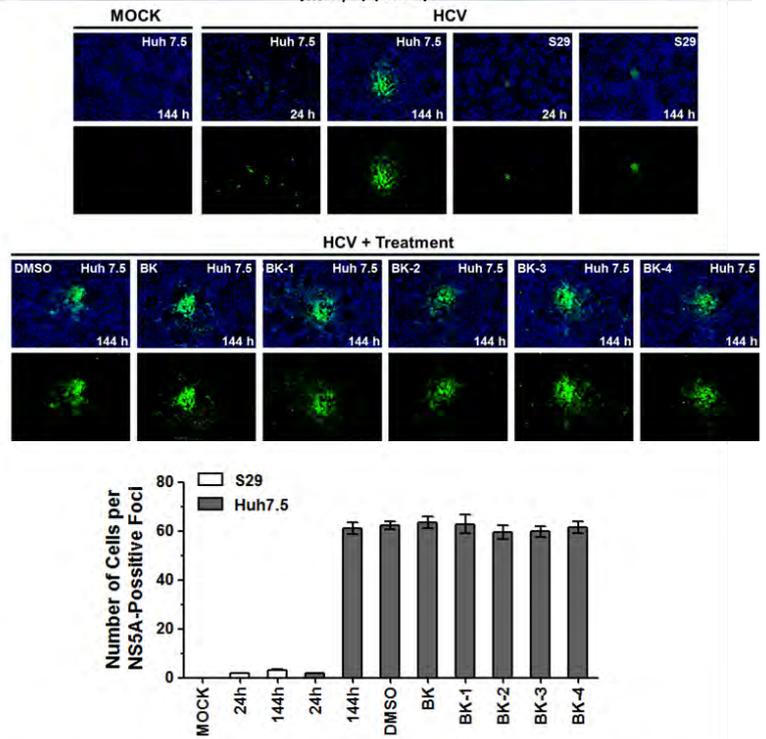
**Fig 6. 高氏柴胡及其活性成分對病毒複製及轉譯無抑制效果**



**Fig 7. 高氏柴胡及其活性成分對病毒合成與釋放無抑制效果**



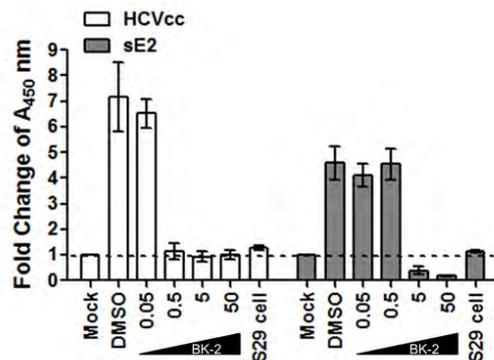
**Fig 8. 高氏柴胡及其活性成分對病毒細胞間傳遞無抑制效果**



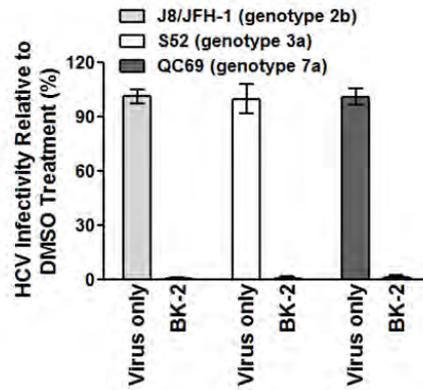
**Fig 9. 高氏柴胡及其活性成分對C型肝炎病毒完整感染周期的影響**

	Viral Life Cycle	Co-addition	Entry			Replication	Translation	Assemble	Release	Cell-to-Cell Transmission
			Particle Inactivation	Binding	Fusion					
BK	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
BK-1	+	+	-	-	+	-	-	-	-	
BK-2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
BK-3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
BK-4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	

**Fig 10. BK-2抑制sE2及HCVcc binding**



**Fig 11. BK-2抑制多種基因型C型肝炎病毒**



**Fig 12. BK-2抑制多種病毒entry**

	Envelope	Genome	CC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub>	SI
Measles virus	+	(-)ssRNA	629.18 ±43.01	118.14 ± 1.20	5.32
Respiratory syncytial virus	+	(-)ssRNA	985.18 ±27.98	105.35 ± 1.69	9.35
Dengue virus	+	(+)ssRNA	945.92 ±25.09	30.96 ±62.94	30.55
Reovirus	-	(+)dsRNA	721.26 ±62.94	139.03 ± 3.51	5.19
Herpes simplex virus	+	dsDNA	736.79 ±24.43	52.92 ± 1.7	13.92

# 中西藥或食品間交互作用參考手冊編纂

蔡東湖  
陽明大學

## 摘 要

本計畫以健保資料庫進行探勘，找尋使用頻率最高的中藥與西藥，利用疾病分類，共挑選高血壓、糖尿病、失眠、感冒、心臟病、胃潰瘍、慢性肝炎、關節炎、便秘、更年期與不孕症，建立編輯小組，分別依據中藥單方與複方之功效、主治、性味，以及處方、出典、效能、適應症整理，並整理西藥藥效、藥名、商品名、副作用，中西藥物交互作用則是根據西藥種類、西藥學名、實驗種類、可能交互作用機轉、可能交互作用結果與建議處理方式整理，並附上參考文獻，將『中西藥交互作用』專業內容，以淺顯易懂的圖表，建立參考手冊，以期達到中西醫交互作用藥知識普及化，讓民眾與醫療人員了解正確用藥知識，以確保用藥安全。

關鍵字：健保資料庫、中西藥交互作用

# **Compilation of a Reference Book for the Interaction on Food, Medicinal Herb and Western Medicine**

Tung-Hu Tsai  
National Yang-Ming University

## **ABSTRACT**

As the incidence and severity of herb-drug pharmacokinetic interactions increase due to a worldwide rise in the use of herbal preparations, more clinical data regarding herb-drug pharmacokinetic interactions are needed to make informed decisions regarding patient safety. The aim of this project is data mining in “National Health Insurance Research Database” to find the most frequently used TCM and western medicine. We choose hypertension, diabetes, insomnia, common colds, heart disease, gastric ulcers, chronic hepatitis, arthritis, constipation, menopause and infertility. This reference book contained Chinese medicine prescription and introduced the performance indications. The mechanisms covered include those that affect oral drug absorption and drug biotransformation. A critical evaluation of certain herb-drug pharmacokinetic interactions was reported in the scientific literature. We popularized herb-drug interactions knowledge to the the public and the medical personnel to ensure the safe use of drugs.

Keywords: National Health Insurance Research Database, herb-drug interaction

## 壹、前言

在臺灣的醫療環境中，傳承古代的中醫藥學與源自西方的現代醫學，皆有廣大的應用，且中醫西醫並行更是行之有年，中草藥使用歷史悠久經驗豐富，也常常讓人有「有病治病，沒病強身」、或是「久服延年益壽」對健康無虞的印象，尤其在民國八十九年以後，中醫開始加入健保支付制度，除了中醫診所外，各大型醫院陸續成立中醫部門，因此在接受西醫治療的同時，也輔助以中草藥治療或藉由天然草藥所製成的健康食品來加強對病情的改善，民眾在同一病程中可能同時服用中藥及西藥，因此中西藥併用治療疾病在臨床上已相當普遍，且中醫藥強調平日的保健與養身，以藥食同源的基礎上，食物與藥物更是緊密地結合。然而部分醫院內雖設有西醫與中醫門診，但真正“中西醫合作”、“中西醫整合”門診，卻是少之又少，民眾雖可能在地方接受中醫及西醫的診斷，卻沒有中醫師與西醫師會診與溝通，且對中西藥間的交互作用也不甚明瞭，不論是醫師、藥師及民眾，都需要吸收此方面的知識，避免中西藥並用可能造成的影響。

## 貳、材料與方法

### 一、全民健保資料庫探勘

利用 1997~2007 健保資料庫一百萬人的歸檔，研究國人就醫習慣，找尋最常就診中醫的疾病，與最常開立的中藥複方與單方，並根據性別將疾病分別討論，將其 ICD-9 代碼整理。

### 二、文獻收集整理

#### (一)中、西醫疾病治療與用藥標準

本計畫透過專業中、西醫師與藥師，針對每個疾病，中醫與西醫診斷、判別的指標，中西醫病名對照。並介紹各種疾病，中醫與西醫用藥標準與常使用的藥物，中醫以症型介紹，西醫以藥物分類介紹，包含藥物機制分類、藥物商品名稱與可能產生的副作用，此外增加中西醫合併治療的可能性，例如：治療時機、減少副作用等等。

#### (二)全民健保資料庫檢索中醫臨床常用之方劑與單方探勘

利用 1997~2007 健保資料庫一百萬人的歸檔，將國人最常就診中醫的疾病，依照疾病分類，整理中醫最常開立的中藥處方與單方。根據藥效進行分類，而後每個藥物進行個別的介紹，參考古代典籍，整理處方的成分、出典、效能、性味與適應症。

#### (三)藥物交互作用

本計畫透過專業藥師利用資料庫，包括中國數字化期刊醫藥衛生類（中國全文電子期刊資料庫 1998-2009 年）全國碩博士論文、www.ncbi.nlm.nih.gov（美國國家生物技術資訊中心）Elsevier ScienceDirect OnSite (SDOS) Database、Ovid Medline Database、Pubmed 等資料庫搜尋 1980-2012 年間與中西藥物交互作用相關科學期刊論文，依照中藥名稱與各西藥進行檢索，將具有相互作用的文獻，依照體外酵素實驗、細胞實驗，體內動物實驗與人體試驗分類，將可能的作用機轉，與可能的交互作用結果，以表格方式呈現，並提供建議的處理方式，以利專業醫師、藥師及民眾進行評估。

### 三、專家諮詢會議

為使本研究資料蒐集更為完善、嚴謹，於期中報告前舉行專家會議，邀請中西醫研究相關領域專家提供意見。計畫主持人針對研究主題做一階

段性簡報整理。在專家會議前，將整理之資料先寄送給各領域代表及專家，並在專家會議中達成初步的結論。

#### 四、民眾講座推廣

經專家建議修改後提出『中西藥或食品交互作用參考手冊編纂』，於台北市立聯合醫院各院區，舉辦一般民眾講座，進行推廣。

## 參、結果

### 一、利用健保資料庫評估常使用之中藥與西藥

本計畫利用 1997~2007 健保資料庫一百萬人的歸檔，研究國人就醫習慣，找尋最常就診中醫的疾病，如表一。中醫最常開立的中藥處方與單方，如表二。此外根據性別將疾病分別討論，如表三、表四。根據上述的統計資料，選擇關節炎、便秘、心臟病、糖尿病、高血壓、不孕症、感冒、肝炎、失眠、更年期、胃潰瘍等疾病，其 ICD-9 代碼整理如表五。

表一、1997~2007 年一百萬人健保資料，開立中藥最常使用的疾病碼

排名	診斷碼*	疾病名	頻次	%
1	460	Acute nasopharyngitis [common cold]	840,181	7.86
2	786.2	Cough	487,525	4.56
3	A469	Remainder of Signs, symptoms and ill-defined conditions	449,300	4.20
4	A312	Other acute upper respiratory infections	427,101	4.00
5	784.0	Headache	268,356	2.51
6	A349	Remainder of Diseases of other parts of the digestive system	213,969	2.00
7	724.2	Lumbago	205,982	1.93
8	477.9	Allergic rhinitis cause unspecified	188,428	1.76
9	A434	Other dorsopathies	180,948	1.69
10	564.0	Constipation	178,965	1.67

\*第一診斷

表二、1997~2007 年一百萬人健保資料，最常開立的中藥

排名	複方	頻次	%	單方	頻次	%
1	加味逍遙散	658,726	2.71	延胡索	577,273	2.19
2	疏經活血湯	624,927	2.57	桔梗	545,131	2.06
3	辛夷清肺湯	554,011	2.28	貝母	523,527	1.98
4	葛根湯	538,639	2.21	甘草	491,824	1.86
5	銀翹散	529,197	2.17	黃芩	472,294	1.79
6	川芎茶調散	495,451	2.04	丹參	430,045	1.63
7	麻杏甘石湯	488,869	2.01	白芷	397,008	1.50
8	芍藥甘草湯	461,182	1.89	葛根	367,288	1.39
9	平胃散	427,475	1.76	杏仁	364,027	1.38
10	小青龍湯	392,625	1.61	香附子	340,393	1.29

表三、健保資料庫中 1997~2007 年，一百萬人健保資料，男性病人開立中藥最常使用的疾病碼

排名	診斷碼	疾病名	頻次	%
1	460	Acute nasopharyngitis [common cold]	334,324	7.87
2	786.2	Cough	216,531	5.10
3	A469	Remainder of Signs, symptoms and ill-defined conditions	183,838	4.33
4	A312	Other acute upper respiratory infections	178,761	4.21
5	724.2	Lumbago	101,096	2.38
6	477.9	Allergic rhinitis cause unspecified	98,498	2.32
7	A349	Remainder of Diseases of other parts of the digestive system	96,429	2.27
8	A434	Other dorsopathies	83,820	1.97
9	477	Allergic rhinitis	76,893	1.81
10	784.0	Headache	72,312	1.70

表四、健保資料庫中 1997~2007 年，一百萬人健保資料，女性開立中藥最常使用的疾病碼

排名	診斷碼	疾病名	頻次	%
1	460	Acute nasopharyngitis [common cold]	505,334	7.86
2	786.2	Cough	270,737	4.21
3	A469	Remainder of Signs, symptoms and ill-defined conditions	265,284	4.13
4	A312	Other acute upper respiratory infections	248,233	3.86
5	784.0	Headache	195,692	3.04
6	564.0	Constipation	142,596	2.22
7	A349	Remainder of Diseases of other parts of the digestive system	117,469	1.83
8	626	*Disorders of menstruation and other abnormal bleeding from female genital tract	112,664	1.75
9	724.2	Lumbago	104,661	1.63
10	A375	Menstrual disorders	104,168	1.62

表五、常就診中醫之疾病與代碼

疾病名稱	英文	ICD-9 代碼
關節炎	Arthritis	715
便秘	Constipation	564
心臟病	Heart disease	398.91, 402.01, 402.11, 402.91, 404.01, 404.03, 404.11, 404.13, 404.91, 404.93, 425.4, 425.5, 425.6, 425.7, 425.8, 425.9, 428
糖尿病	Diabetes melitus	250
高血壓	Hypertension	401, 402, 403, 404, 405
不孕症	Infertility	606, 628
感冒	Influenza	462, 464, 465, 487, 488
肝炎	Hepatitis	070.22, 070.23, 070.32, 070.33, 070.44, 070.54, 070.6, 070.9, 570, 571, 573.3, 573.4, 573.8, 573.9
失眠	Insomnia	307.4, 780.5
更年期	Menopausal	626, 627
胃潰瘍	Gastric ulcer	530.2, 531-534

## 二、資料收集整理

文獻收集，依照實驗種類分為臨床試驗、動物試驗、細胞試驗、與化學試驗等不同等級的證據，寫出可能的作用機制和可能產生的影響及建議處理方式。目前，許多的臨床和藥理實驗證明，中西藥物合理並用，可產生有益相物作用，具有提高療效、減輕毒副反應、擴大適應症範圍、縮短療程、標本兼顧、減少用藥量、節省藥材，並能發揮單獨使用中藥或西藥所沒有的治療作用。然而中西藥物不良的相互作用，可能導致治療作用減弱，而使治療失敗，或是毒副作用增強，引起不良反應，又或是治療作用過度增強，引起不良反應。詳細內容參見手冊內容。

## 三、國內、外與中西藥或食品間交互作用之有關書籍及資料庫

由於中西藥物並用的頻率增加，國內、外有許多書籍及資料庫介紹有關中西藥物交互作用的資訊，本參考書整理目前常見的工具書與網站，提供民眾對於中西藥物交互作用查詢時參考。

書籍：

1. Drug Interaction Facts
2. Herbal-Drug Interactions and Adverse Effects
3. Herb Toxicities & Drug Interactions
4. Herb Nutrient & Drug Interactions
5. 中西藥物相互作用

網站：

1. 中西藥交互作用資訊網 <http://dhi.cmu.edu.tw/query/>
2. 奇美醫學中心藥劑部中藥局  
[http://www.chimei.org.tw/main/right/right01/cmh\\_department/55500/DIS/cdi\\_search.asp](http://www.chimei.org.tw/main/right/right01/cmh_department/55500/DIS/cdi_search.asp)
3. 國家網路醫院 <http://www.kingnet.com.tw/>
4. 臺灣中醫網 <http://www.tcm.tw/>
5. Medline Plus  
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginformation.html>
6. Medscape  
<http://reference.medscape.com/drug-interactionchecker>

四、舉辦『中西藥或食品交互作用參考手冊編纂』專家座談會

**第一次專家會議**

開會時間：中華民國 101 年 08 月 09 日（星期四）

11 時 30 分～13 時 00 分

開會地點：陽明大學 陽明大學傳統醫藥研究所（護理館）會議室 120

主持人：蔡東湖

出席者：王靜瓊、黃怡超、蔡東湖、賴榮年、許中華、林麗純、楊榮季、  
林聖興、黃林煌

列席者：中醫藥委員會代表

會議討論主題：

中西藥或食品間交互作用參考手冊編纂

1. 目前國人就診中醫習慣與健保資料庫探勘簡報
2. 綜合文獻收集結果提出『中西藥或食品間交互作用參考手冊編纂大綱』

會議結論：

1. 本計畫內容充實，但是所提供之交互作用應以臨床研究為主，依據證據

等級與實驗方式將以分類，給予民眾清楚參考

2. 內容書寫的文字，應該謹慎、保守

### 第二次專家會議

開會時間：中華民國 101 年 10 月 15 日（星期一）

12 時 00 分～13 時 00 分

開會地點：陽明大學 陽明大學傳統醫藥研究所（護理館）會議室 120

主持人：蔡東湖

出席者：蔡東湖、賴榮年、林麗純、楊玲玲

列席者：中醫藥委員會代表

會議討論主題：

中西藥或食品間交互作用參考手冊編纂第二修

『中西藥或食品間交互作用參考手冊編纂初稿』

會議結論：

本計畫內容充實，可作為很好的參考資料，但是內容過於複雜充實，宜以更簡單的方式整理呈現，給予民眾清楚參考

### 五、中西藥或食品間交互作用參考手冊-審稿委員意見

本計畫邀請中國醫藥研究所林麗純副研究員、陽明大學賴榮年副教授、長庚醫院中藥局楊榮季主任、中國醫藥大學林香汶助理教授、長庚醫院楊賢鴻主任、中國醫藥大學唐娜櫻教授，擔任審查委員，並依將審稿委員之意見進行回覆與修改。

### 六、舉辦『中西藥或食品交互作用參考手冊編纂』民眾講座

舉辦時間：中華民國 101 年 12 月 12 日（星期三）

15 時 00 分～15 時 30 分

開會地點：臺北市立聯合醫院 仁愛醫院

主講者：蔡東湖

民眾詢問：

#### 1. 中西藥物併用，需間隔多少時間服用？

在現代科學論文中，尚無確切的證據，隨著藥物種類的不同，而有不同程度的變化，一般在原來西藥用藥的基礎上，可以間隔 30 分鐘，以減少藥物直接在胃腸道物理反應與作用，若對藥效的改變，則可以間隔兩個小時再輔以中藥治療，以減少藥物藥效間的相互作用。



## 肆、結論

中西藥併用治療疾病在臨床上已相當普遍，因此民眾在同一病程中很可能同時服用中藥及西藥，且中醫藥強調平日的保健與養身，以藥食同源的基礎上，食物與藥物更是緊密地結合。部分醫院設有西醫與中醫門診，但真正“中西醫合作”、“中西醫整合”門診，卻是少之又少，民眾雖可能在不同地方接受中醫及西醫的診斷，卻沒有中醫師與西醫師會診與溝通，且對中西藥間的交互作用也不甚明瞭，不論是醫師、藥師及民眾，都需要吸收此方面的知識，避免中西藥並用可能造成的影響。由於目前中西藥物交互作用，尚無公認的標準答案，本參考手冊利用全民健保資料庫，找到國人常就診中醫的疾病，以民眾的角度出發，介紹疾病的起因、症狀，並告知民眾常見的治療藥物，不論西藥與中藥，透過精美的照片與完整的表格，讓民眾瞭解藥物的性狀與功效即可能的副作用，本手冊的內容與文章，皆收載自國際醫學期刊，專業的醫師與藥師分析整理，經過專業的專家學者重復確認校正，希望對不論醫師、藥師與民眾，都能提供更完整的中西藥物交互作用觀念。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP101-RD-030 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

# 雷公藤對 Cisplatin 抑制腫瘤生長及血管新生之影響(2-1)

王寧

慈濟大學醫學科學研究所

## 摘要

### 研究目的：

本研究的目的是在以低劑量化療藥物合併雷公藤進行單獨或併用處理胃癌細胞之抗癌活性及降低副作用之評估。

### 研究方法：

以細胞存活分析方法評估細胞之毒性、以流式細胞儀和彗星試驗分析 SC-M1 細胞之 DNA 損傷，並以抗體微陣列測定血管新生相關蛋白質之表現情形。並以人類臍靜脈內皮細胞株(HUVECs)分析其轉移及管柱生成之實驗，另以 RT-PCR 及西方西墨法探討其血管新生相關基因及蛋白質之變化。

### 結果與討論：

本研究之初步結果顯示：雷公藤及化療藥物合併處理後有效抑制癌細胞之存活率，且具有促進細胞走向凋亡、減少細胞分化及抑制血管新生之功效。然而合併藥物處理亦可降低促血管新生相關蛋白質之表現量。

合併雷公藤與化療藥物除具有協同抑制胃癌細胞增生的效果，也可減少腫瘤細胞周圍血管內皮細胞的血管新生。此研究結果證實，雷公藤合併低劑量化療藥物將有助於胃癌治療之評估。

關鍵詞：雷公藤、順鉑、細胞凋亡、血管新生

# Effect of Triptolide on Cisplatin-induced Growth Inhibition and Angiogenesis on Tumor (2-1)

Ling Wang  
Institute of Medical Sciences, Tzu Chi University

## ABSTRACT

### **Aim:**

Low-dose chemotherapy represents a new strategy to treat solid tumors by stronger anti-angiogenic activity and reduce side effects. The aim of the study is to evaluate the role of cisplatin combined with triptolide in preclinical settings of gastric cancer.

### **Method:**

The cytotoxicity was measured by MTT assay for cell viability, and by flow cytometry and comet assay for detecting DNA damage in SC-M1 cells. In addition, we also used the antibody array to detect the expression of angiogenic-related proteins in SC-M1 cells. Migration of HUVEC cells, the ability of HUVEC cells to form tubes, and proliferative capacity of human gastric cells were tested the presence of triptolide and cisplatin alone and in combination. RT-PCR and Western blot angiogenesis was utilized to assess therapy-induced gene expression changes.

### **Results & Discussion:**

Combination of triptolide and cisplatin inhibits growth of gastric cancer SC-M1 cells which was found by cellular apoptosis, the decreased proliferation and angiogenesis. The decreased expression of pro-angiogenic growth factors, resulting in a decreased migration ability and microvessel density in response to triptolide/cisplatin combination, was also observed *in vitro*.

The combination of triptolide and cisplatin had synergistic therapeutic effects on not only gastric cancers but the endothelial cells of microvessels. These findings

suggest that evaluation of triptolide in combination with low dose chemotherapy is potentially warranted for gastric cancer.

Keywords: triptolide, cisplatin, apoptosis, angiogenesis.

## 壹、前言

胃癌與其他具高度轉移特質的癌症一樣，因 DNA 缺失、易位、不正常複製或異常的刺激導致訊息傳導路徑失控，就會不斷地分裂生長及不死化 (immortalization)。癌細胞除了生長失控外，還會局部侵入 (invasion) 周遭正常組織，甚至經由血液轉移到身體其他部分，造成所謂的遠端轉移 (distal metastasis)，而治療策略中最大的考驗都是在於同時抑制腫瘤細胞的增生與轉移。根據過去的研究，癌細胞的轉移機制是導因於如 Myc、Ras 及 p53 等基因的突變，當 Myc 發生變異時，會誘發 Bcl-xL 白質的表現，使細胞不斷的分裂，腫瘤細胞會因而不斷的增生 [1]。而 Ras 的突變已被證實與腫瘤細胞的轉移有關，其可能原因為 Ras-MAPK 訊息持續被活化而誘發 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) 的大量表現，促使腫瘤細胞分解其細胞外的基質而造成轉移 [2-4]。p53 為轉錄因子，具調節細胞週期、DNA 修復以及引發不正常細胞凋亡並抑制癌化等功能 [1]。而造成腫瘤細胞轉移的其他機制，還包括生長因子及其受體過度表現或活化所致，常見的相關生長因子有 FGF、EGF、IGF、HGF、PDGF 等 [5]。由於血管新生是腫瘤生長及轉移的必經過程，因此抑制血管新生 (anti-angiogenesis) 為現今抑制腫瘤生長相當重要的課題。雖然已經有研究指出雷公藤之有效成份 triptolide 可以有效的降低血管內皮新生因子的釋放及其受體之含量 [6]，但目前尚未有 triptolide 及臨床化療藥物 (cisplatin) 抑制胃癌血管新生之相關報告，因此本研究將藉由分析 triptolide 合併化療藥物之抗胃癌增生能力及對人類胃癌細胞所誘導血管新生之影響，探討 triptolide 與化療藥物間之交互作用。

### 一、腫瘤之血管新生 (Tumor angiogenesis)

由於哺乳動物細胞之生長需要氧氣與養分，而為了獲取必須之養氣與養分因此細胞之生長需要 100 至 200  $\mu\text{m}$  之血管。對於多細胞生物，則需要更多血管以供應細胞所需之養分以維持細胞之生長，因此細胞便需要促使血管之新生。這個過程是受制於 pro-及 anti-血管新生因子所調控，以達到一個平衡，但是疾病的產生，便會破壞原先之平衡，特別是癌症。1907 年時便有研究指出腫瘤生長超過 3 mm 時，便需要透過新生血管供給養分才得以持續生長 [7,8]，於 1968 年便有研究提出腫瘤會經由血管擴散至其他部位之假說 [9,10]。Folkman 亦提出由於腫瘤主要是透過血管以獲取養分而不斷的增生並進一步造成轉移的情形，因此，可以透過抑制血管之生成進而抑制腫瘤的增生及轉移 [11]。腫瘤自鄰近血管所誘導之新生血管為腫瘤獲取生

長所需養分之主要來源。癌細胞、內皮細胞、血液及細胞外基質皆能釋放 pro-及 anti-血管新生因子[12]，因此它們得以促進腫瘤之生長、類型與轉移之部位，甚至於復發之情況[13]。腫瘤血管之結構與功能相較於正常之血管，腫瘤血管較為雜亂，管徑大小不均勻且較多分支，這可能是由於血管內皮新生因子及血管生成素所調節之血管生成作用不平衡所導致，因此腫瘤血管之流量較為混亂[14]，導致腫瘤內部產生缺氧的部位[15]，缺氧之部位會導致腫瘤之細胞凋亡[16]。就其細部結構而論，腫瘤血管亦異於其他，於血管管壁上擁有許多開口，像是內皮細胞窗孔(endothelial fenestrae)、囊泡(vesicles)以及細胞穿孔(transcellular holes)。而腫瘤之血管內皮細胞之型態異常，易向外及腔室內生長，而這會導致腫瘤血管的滲漏[17-19]。腫瘤血管之通透性及生成，取決於腫瘤之類型及生長之器官[17,20]，由於每個器官都有不同之基質細胞，而這些細胞會產生不同之 pro-及 anti-血管新生因子[12,21]。腫瘤之低滲透壓會導致血管生成素 1(Angiopoietin-1; Ang 1)、血管生長因子及胎盤生長因子(placental growth factor; PlGF)之過度表達，反之高滲透性則可能是缺乏血管生成素 1 或高度表達其拮抗劑血管生成素 2 [22]。於癌症之治療，克服這種異質性(heterogeneity)成為相當重要之課題，必須了解血管新生因子間之分子機制。腫瘤及免疫細胞所釋放之細胞生長因子及血管生長因子間之分子機制，可調控腫瘤內皮細胞之細胞黏附分子(cellular adhesion molecules)及表面標記物(surface markers)之表達，例如血管內皮生長因子及腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor- $\alpha$ ; TNF- $\alpha$ )之表達，纖維母細胞生長因子(basic fibroblast growth factor; bFGF)及轉化生長因子(transforming growth factor- $\beta$ 1; TGF- $\beta$ 1)向下調控細胞黏附分子[23]。血管的形成主要是由血管內皮細胞所組成，而腫瘤之血管生成主要是由原先已存在之血管經由抽芽分枝(sprout)及套疊式(intussusception)的方式產生新的血管。從血管壁或骨髓脫落之周邊血液之循環血管內皮細胞(circulating endothelial cells; CECs)及血管內皮前體細胞(circulating endothelial precursors; CEPs)皆可有效的協助腫瘤之血管新生[24,25]。腫瘤亦可生長於內臟周圍之原有血管之圍管現象(perivascular cuffs)。已知血管管脈之生成由許多不同分子機制所調控[26]，其中包含血管生成素家族(angiopoietin; Ang)及血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)，其中以血管內皮新生因子最為主要[27,28]。除血管內皮新生因子之外，於腫瘤血管管脈之生成仍涉及血管生成抑制劑。腫瘤血管之管壁並非由血管內皮細胞

所架構[29]，可能是由血管內皮細胞與癌細胞所堆砌而成[30]，此外腫瘤血管相較於正常血管之生長缺乏其保護機制，例如缺少功能性血管周圍細胞(perivascular cells)，以維持血管之新陳代謝及管脈之氧氣及荷爾蒙之平衡[31]。

## 二、雷公藤(Triptolide)

雷公藤屬天然中草藥的一種，其植物全株具有毒性。自古以來人們就發現其根部是極具有效的除蟲療效之藥物，亦可去風濕、活血消腫、消炎止痛，治療慢性關節炎的功用。近代學術研究不斷證實雷公藤具有免疫抑制作用，是治療關節炎的熱門藥物，因為療效強劑量低而受到矚目，其作用機制、萃取有效成份、開發新藥是目前科學家鍥而不捨的目標。但是雷公藤的生物鹼具有累積性，長期服用雷公藤會導致腎臟損壞而致死，因此如何控制其有效劑量而不造成正常生物體之不利作用乃為重要的研究課題。美國 Stanford 大學於 1991 年成立的「中藥科學研究中心」，公佈了他們研究雷公藤的報告，發現這種草藥的有效成分能夠阻止感染，使癌細胞走向細胞凋亡之途徑。研究證實了從雷公藤中萃取的有效成分雷公藤內脂醇(triptolide)，能夠阻止激活 DNA 互相結合的蛋白質 NF- $\kappa$ B，此蛋白質一旦被激活，即可活化其它具免疫相關性之基因，進而加速免疫反應[32]。此研究表明，Triptolide 比任何免疫抑制劑更具療效，可用來治療器官移植患者、感染疾病和一些自主免疫性疾病；該團隊亦發現，僅 Triptolide 可殺死癌細胞，如現在非常流行的抗癌藥 Paclitaxel (紫杉醇) 一樣，能使對化療藥物具抗藥性的癌細胞達到致死功效。Triptolide 是由 *Tripterygium wilfordii hook. f.*(TWHF) 萃取純化的有效成分，屬於衛茅科雷公藤植物，結構具有六個氧(oxygenated diterpene)的化合物，於 1990 年便有以 Triptolide 治療類風濕關節炎(Rheumatoid arthritis)等文獻報告[33]。而近年研究發現 Triptolide 除具有抑制免疫力功能外，同時亦具有抗腫瘤的活性[34,35]。文獻指出，當 TRAIL/Apo2L 併用 Triptolide 時，可增加細胞表面 TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor (TRAIL-R)所造成的細胞凋亡現象。TRAIL/Apo2L 是屬於 tumor necrosis factor family 之一，當 TRAIL/Apo2L ligand 結合於細胞膜上的 TRAIL-R1 及 TRAIL-R2 的 Death receptor 時，將產生 death inducing signal complex (DISC)與 caspase 8 互相結合，並引發其他 caspase protease 之活化作用，導致細胞走向凋亡[36-38]。而 Triptolide 可增加肺癌細胞對 TRAIL/Apo2L 的敏感性增加，使得肺癌細胞的死亡情形更

為顯著，其中 ERK2 的活化扮演重要角色，若抑制 ERK2 的活性，則會降低 TRAIL/Apo2L 引發的細胞凋亡[39]。同樣在動物實驗中亦證實 Triptolide 對於乳癌、膀胱癌及胰臟癌等腫瘤細胞都具明顯的抑制腫瘤作用[40,41]，研究學者認為這將成為對未來有重大影響的重要藥物，具有多元機能探討及開發的潛力。

### 三、化療藥物(Cisplatin)

化學藥物治療為目前臨床上治療癌症中常用的方式之一，而 Cisplatin 是種含有鉑的抗腫瘤藥物，對人類腫瘤具有一定的療效。其主要作用機轉為與癌細胞中的 DNA 結合並以共價鍵結至 DNA，雙股 DNA 間交叉鏈結 (intrastrand cross-linking) 的形式結合，影響 DNA 的功能並干擾其 DNA 複製、轉錄進而阻斷癌細胞的分裂(Nishiyama et al., 2004)。

由於腫瘤轉移的過程是由細胞內外許多活化分子的調控結果，所涉及的反應都相當複雜，更加深治療上的困難度。除了已經使用的抗癌藥物外，為強化治療效果並減少正常細胞的傷害，目前許多研究都從天然衍生物著手，期能尋找出抑制癌症發展或轉移的有效成分。胃癌為一種高度惡性發展的腫瘤，可藉由淋巴及血液循環擴散到身體其他的組織器官，即使經由手術切除、放射線治療及全身性的化學治療，降低癌細胞轉移至其他臟器的風險。但由於癌細胞大多具有高度的轉移能力，以及化療藥物所產生的副作用，促使本研究將以降低化療藥物之濃度，並以天然中草藥有效成份及臨床藥物合併使用，以達到減輕人體經化療藥物所造成的副作用，但亦有效抑制癌細胞之血管增生、誘發癌細胞死亡及降低癌細胞生長。

## 貳、材料與方法

### 一、細胞株之培養與繼代

本研究採用的細胞株包括臺灣本土人類胃癌細胞株(SC-M1)、正常小鼠肝臟細胞株(FL83B)、人類胚胎腎臟細胞(HEK293)及人類臍靜脈內皮細胞株(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)等，所使用的培養基分別為 RPMI、F-12K、DMEM 及 ECM，均在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 及相對溼度為 100% 的條件下，以含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)與抗生素(penicillin-streptomycin)之培養液培養。當細胞於培養皿內長滿單層約 80 至 90% 時，便進行繼代培養。去除培養皿內舊有之培養液後，取 10 mL 之 1×PBS 洗去細胞表面之殘留培養液，去除 PBS 後加入適量之 0.1% trypsin-EDTA 溶液使細胞剝落，加入含 10% 胎牛血清之新鮮培養液，經吸放數次以沖散細胞，再加入其他新之培養皿中繼續培養。而細胞之計數則經 Trypan blue 染劑染色後，將細胞置於血球計數器(Hemocytometer)上，於顯微鏡下觀察細胞存活並進行計數，存活之細胞外觀完整且圓亮，若死亡之細胞則因染劑之進入而呈現藍色。

### 二、細胞存活率分析 MTT 試驗

將細胞種在培養皿中，使細胞穩定貼附於培養皿底部後，便可進行藥物處理。細胞在固定的處理時間後，避光進行操作，加入 0.5 mg/mL MTT，繼續培養作用 4 個小時，MTT 在被活細胞中還原酵素代謝之後會變成紫藍色的 formazan，細胞活性越高，其所呈現的顏色就越深。細胞經 4,000 rpm 離心 15 分鐘後，倒掉上清液，底部 MTT 的結晶沈殿以 DMSO 溶解，而後再以 ELISA reader 測定 570 nm 波長下 OD 值的變化，即可評估細胞活性及相對存活率之情形。

### 三、流式細胞儀之分析

#### (一)細胞凋亡之分析

將  $2 \times 10^5$  細胞分養於培養皿中，使細胞貼附 24 小時後將原培養液移除，以含有不同濃度藥物之培養液處理 24 小時，吸除培養液，以 PBS 清洗 2 次，以 trypsin-EDTA 溶液使細胞剝落，加入培養液中中和 trypsin 後以 1,000 離心 5 分鐘，再移除上清液，接著進行 annexin V-FITC/PI 染色。細胞先加入含有 10 µg/mL annexin V-FITC 及 20 µg/mL PI 的緩衝液作用 15 分鐘，用緩衝液清洗 2 次，以流式細胞儀測定細胞在不同波長螢光下的分佈

情形，並以 CellQuest 3.0.1 軟體分析其實驗結果。

## (二)細胞週期之分析

將細胞分養於培養皿中，細胞貼附 24 小時後將原培養液吸除，以含有不同濃度藥物之培養液處理 24 小時，吸除培養液，以 PBS 清洗 2 次，以 trypsin-EDTA 溶液使細胞剝落，加入培養液中和 trypsin 後以 1,000 離心 5 分鐘，再移除上清液。以 75% 酒精固定細胞至少 2 小時後進行離心，再加入 100  $\mu$ L 的 PI solution (20  $\mu$ g/mL PI, 0.1 mg/mL RNase A, 1% Triton X-100)沖散細胞後，避光於 37°C 下反應 30 分鐘，加入 2 mL cold PBS 後，再以流式細胞儀進行分析。

## 四、傷口癒合分析(Wound healing assay)

將細胞分養於培養皿中，待細胞長至幾乎全滿時以吸管尖(white tips)在每一 well 中劃線，移除培養液續以 PBS 清洗，將懸浮的細胞洗去，加入含有藥物之培養液後，以顯微鏡進行細胞生長及擴生情形之觀察並作影像之截取，此時為 0 小時，而後持續觀察不同時間點，截取各時間點癌細胞移動之影像變化，並分別比較不同時間點細胞移動之數目，再作數據統計，以利分析癌細胞癒合之能力。

## 五、血管內皮細胞管柱形成試驗 (Tube formation assay)

預先將 100  $\mu$ L matrigel 鋪覆 (coating) 於培養皿中，放置於 37°C 下靜置 2 小時，待 matrigel 凝固。將 HUVEC 細胞種於含有 matrigel 培養皿中 1 小時，待細胞貼附後，同時加入培養液及含有藥物之培養液，置於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 8 小時，再使用顯微鏡觀察血管內皮細胞之形態，是否產生改變而形成的網狀管柱分佈情形。將癌細胞種植至培養皿中一天，加入培養液之組別作為控制組，加入藥物培養液之組別為對照組，待培養不同時間點後，分別收集其細胞之培養液。將 HUVEC 細胞種於含有 matrigel 之培養皿中，待細胞貼附後，同時加入基底培養液(basal medium)作為負控制組(negative control)、含有 50 ng/mL 血管內皮生長因子(VEGF)之基底培養液作為正控制組(positive control)、含有控制組癌細胞培養液之基底培養液作為控制組、含有經藥物處理之癌細胞培養液之基底培養液作為對照組，置於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 8 小時，再使用顯微鏡觀察血管內皮細胞是否會經由癌細胞所釋放之血管內皮細胞生長因子之刺激使形態產生改變，而形成網狀管柱之分佈。

## 六、RT-PCR 之表現

### (一) Total RNA 之分離

取經藥物處理後之胃癌細胞株，加入 1 mL Trizol™ reagent 使細胞破碎後，置於室溫下 5 分鐘；加入 200  $\mu$ L 氯仿上下均勻振盪 20 秒，置於室溫靜置 5 分鐘，以 13,000 rpm 高速離心 5 分鐘；取 500  $\mu$ L 之上層水溶液，加入等體積之異丙醇(isopropanol)，混合均勻後於室溫靜置 5 分鐘，之後以 13,000 rpm 高速離心 15 分鐘；倒掉上清液，以 1 mL 之 DEPC-70%酒精清洗 RNA 沈澱物，再以 13,000 rpm 高速離心 5 分鐘，倒掉上層液後，將 total RNA 置於室溫乾燥約 5 分鐘；另再溶入 50~100  $\mu$ L 之 DEPC-H<sub>2</sub>O 中，並測量 total RNA 之濃度。

### (二) 合成 cDNA

取 5  $\mu$ g RNA 當模板(template)，加入 oligo-dT、dNTP，補足 DEPC-ddH<sub>2</sub>O 至 12  $\mu$ L，於 65°C 反應 10 分鐘，置於冰上冷卻 3 分鐘，再加入 5 $\times$  cDNA synthesis buffer、DTT，RNaseOut，混合均勻後，於 55°C 下作用 50 分鐘，再移至 85°C 作用 5 分鐘後，迅速冷卻並保存於 -20°C 下。

### (三) 聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)

將 cDNA 加入含有 10 $\times$  PCR 緩衝液、2.5 mM dNTP、50 mM MgCl<sub>2</sub>、及 5'端引子(primer)及 3'端引子加入 PCR 反應於離心管中，再加入 0.1  $\mu$ L Taq DNA polymerase 於 PCR 反應之微量離心管中，加入滅菌水至總反應體積為 25  $\mu$ L，混合均勻後離心將反應液集中在管底部。將反應管置入 DNA 熱增幅儀中，設定條件進行反應：94°C 解離 5 分鐘；94°C 解離 30 秒；48°C 引子黏合 30 秒；72°C 酵素合成 1 分鐘；再以解離、引子黏合、合成步驟重複 35 個循環最後於 72°C 補齊(final extension)10 分鐘後於 4°C 下保存。

### (四) 電泳分析(Electrophoresis)

以 1.5%瓊脂膠體進行 PCR 產物分析，取 1.5 g agarose 加入 100 mL 1 $\times$  TAE 緩衝液並加熱將其溶解，待溫度稍降後倒入塑膠盤(plastic tray)中並架上尺梳(comb)，靜置待其凝固後，放置於電泳槽中，另加入 1 $\times$  TAE 電泳緩衝液至蓋過膠體；取 25  $\mu$ L 之 PCR

產物，與 1  $\mu$ L 5  $\times$  DNA loading dye 混合均勻後注入瓊脂膠體中，並加入 DNA Marker 於 100 伏特下直至染劑泳動至膠體底端；將膠體取出，並以 0.5  $\mu$ g/mL 溴化乙錠染色 3 分鐘，以 UV-light box 照相系統截取影像。

#### 七、西方點墨法(Western blot)

取等量濃度之細胞蛋白質加入 2 $\times$  SDS/protein sample buffer，於 95~100  $^{\circ}$ C 煮沸 5 分鐘，再置於冰上 5 分鐘，將蛋白質注入 12% 膠體孔洞中，加入電泳緩衝液，在 200 mA 及 80V 的條件下進行電泳分離 1~1.5 小時，當電泳完成後隨即進行電泳膠的轉印。將膠體自電泳槽取出後，切除膠體上層膠部分，而後置於 Electroblothing buffer 內，剪下相符膠體大小之硝化纖維膜，並避免以手指直接觸碰硝化纖維膜。依順序正極-吸水海綿、3M paper、硝化纖維膜、膠體、3M paper-負極之組合於轉漬槽內，注意膠體與硝化纖維膜之間應避免氣泡之產生，再注滿 Electroblothing buffer 之後，在室溫下以 400 mA 電轉印 2 小時。將電轉印完成之硝化纖維膜以夾子取出，以 PBS 溶液去除殘留於膜上之電轉緩衝液。後配製 10 mL 內含 5% 脫脂奶粉之 blocking buffer 並添加至硝化纖維膜之盒內，於室溫下震盪 1 小時，以降低非專一性之背景值，而後倒掉 blocking buffer 且加入稀釋初級抗體，亦於 4  $^{\circ}$ C 震盪雜交反應 12~16 小時後，以 PBS/Tween 溶液清洗三次，每次 5 分鐘。再加入稀釋二級抗體，於室溫下進行雜合反應 1 小時。倒掉溶液，加入 PBS/Tween 溶液清洗三次，每次 5 分鐘；再以 PBS 洗 5 分鐘以去除殘留之 Tween-20。於暗房內利用 ECL 套組之顯影劑 A 和 B 等量各 1 mL 加入後混勻，加入硝化纖維膜之盒內，輕晃 30 秒，將硝化纖維膜置於卡匣內之透明膜中，於 UVP 呈色系統進行影像截取。

#### 八、統計分析

此研究所得之數據資料皆以 SPSS 13.0 版之軟體進行統計，以單因子變異數分析(One-way ANOVA)進行組內之比較，再以 Tukey's HSD test 比較各組間之差異顯著性，實驗結果之數值皆以平均值 $\pm$ 標準誤差(means  $\pm$  SE)表示，以 "\*" 或 "\*\*" 分別表示差異之顯著程度為  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ 。

## 參、結果

### 一、TPL 及 CDDP 對胃癌細胞之影響

由實驗結果可知，胃癌細胞在控制組為 100% 存活率的比較下，以 TPL 5 ng/mL 及 CDDP 2  $\mu$ g/mL 之合併藥物處理 24 小時可有效抑制約 50% SC-M1 細胞之生長；而 FL83B 及 HEK293 等正常細胞之存活率雖受 CDDP 之毒性影響，但並未因合併處理而增加 CDDP 對正常細胞之毒性（圖一）。因此，本實驗分別選用 TPL 之處理濃度為 5 ng/mL、CDDP 之處理濃度為 2  $\mu$ g/mL 等條件進行 TPL 及 CDDP 抑制胃癌細胞增生之測試，並針對 SC-M1 細胞完成其合併藥物指數(combination index)之分析，以利後續血管新生劑量之測試(表一)。

### 二、TPL 及 CDDP 對胃癌細胞形態之影響

由細胞存活率之試驗，顯示 SC-M1 細胞在單獨及合併處理後，均出現生長抑制之現象，進一步透過明視野及以 DAPI 進行細胞核染色，觀察胃癌細胞經藥物處理後 24 小時之細胞形態變化，則經 TPL 處理後之細胞形態與並無明顯變化，而經 CDDP 處理後，部份細胞核出現皺縮之現象，合併處理後之胃癌細胞則出現大量的細胞分裂碎片，細胞死亡亦相對明顯（圖二 A）。在細胞凋亡的中、後期，核酸內切酶被活化，啟動一連串凋亡訊號之傳遞，造成 DNA 斷裂，將核小體較接處切斷，形成 160-180 bp 倍數之 DNA 片段，DNA 片段化為細胞凋亡之重要特徵之一。本研究以電泳進行處理細胞之 DNA 分析，結果顯示，合併藥物處理之細胞，DNA 片段化之情形較其他單獨處理之細胞明顯（圖二 B）。因細胞可經電泳分析及由細胞核片段拖尾(tail)之長度評估 DNA 之損傷，本研究乃另以彗星試驗法(Comet assay)分析 TPL 及 CDDP 對細胞中 DNA 所造成之損傷。如圖二 B 之結果顯示，合併處理之細胞有明顯拖尾之現象，由實驗結果得知，合併藥物處理 24 小時，對 SC-M1 細胞造成明顯的 DNA 損傷。

### 三、TPL 與 CDDP 誘發 SC-M1 胃癌細胞的細胞凋亡現象

為確認 SC-M1 細胞經單獨及合併 cisplatin 處理後所造成細胞之傷害，本研究以 Annexin V 及 PI 染色，並以流式細胞儀分析，以觀察細胞之死亡膜式。當細胞處於凋亡晚期時，細胞膜表面的磷脂(PS)會從細胞膜內轉移到細胞膜外，使得 PS 暴露在細胞膜表面，而 Annexin V 具有與 PS 高度親合的能力，可與轉移至外膜上的 PS 結合，而細胞凋亡的早期，其細胞膜完整，PI 不會和細胞結合，當細胞壞死或凋亡晚期時，細胞膜通透性增加，PI 會

進入細胞中（圖三）。以 PI 單染 SC-M1 胃癌細胞，顯示經 TPL 及 CDDP 處理 24 小時後之 SubG1 phase 細胞比例由控制組為 1.5% 之情況增加至合併處理組的 44.3%，由此結果可知 TPL 及 CDDP 處理之 SC-M1 胃癌細胞，出現大量的細胞死亡，而 SubG1 phase 的比例增加則表示細胞的 DNA 出現大量的斷裂損傷。

#### 四、低濃度之 TPL 及 CDDP 對胃癌細胞及內皮細胞之影響

以 TPL 及 CDDP 對 SC-M1 細胞作用的 IC<sub>10</sub> 及 IC<sub>20</sub> 等兩項低濃度條件分別進行胃癌細胞及內皮細胞存活率之測試，顯示 SC-M1 細胞經 IC<sub>10</sub> 及 IC<sub>20</sub> 合併藥物處理後，其存活率明顯降低；各自單獨處理則對細胞不具明顯的毒性，且合併藥物處理對內皮細胞(HUVECs)之存活率並無顯著之影響（圖四）。

#### 五、TPL 及 CDDP 對胃癌細胞血管新生相關基因表現之影響

本實驗以 RT-PCR 觀察 TPL 及 CDDP 對胃癌 SC-M1 細胞與血管新生相關因子 mRNA 表現之影響，並以 GAPDH 作為試驗之內對照組（internal control），以為量化之定量依據。在以 IC<sub>20</sub> 條件進行之合併處理，細胞之 VEGF-A 表現量明顯低於其他處理（圖五），顯示以 TPL 及 CDDP 為 IC<sub>20</sub> 合併條件進行 SC-M1 細胞之處理後，除抑制細胞之增生外，細胞之 VEGF-A 表現量亦受到抑制。

#### 六、以抗體微陣列分析合併藥物對癌細胞血管新生蛋白之調控

以血管新生抗體之微陣列(angiogenesis antibody array)分析 TPL 及 CDDP 之合併處理對細胞血管新生相關蛋白質表現之影響，結果顯示 VEGF、FGF 及 Ang 等三項蛋白質之表現，於處理條件為 IC<sub>10</sub> 及 IC<sub>20</sub> 的奇況下，與控制組之量化結果相較，含量顯著低於控制組。因此三者為調控血管生成的重要蛋白，由此結果顯示 TPL 及 CDDP 乃透過此相關血管新生之蛋白調控癌細胞之血管生成。

#### 七、TPL 及 CDDP 對胃癌細胞誘導血管內皮細胞管柱生成之影響

由於胃癌細胞會經由釋放血管內皮新生因子誘導血管之新生以獲取養分，因此，本研究以血管內皮細胞管柱形成試驗觀察經單獨及合併藥物處理 SC-M1 細胞後，其各自對胃癌細胞誘導血管新生之影響。

SC-M1 細胞經 TPL 及 CDDP 不同濃度處理 24 小時後，收取其細胞培養液作為條件培養液(condition medium; CM)、以基底培養液(basal medium)作為負控制組(negative control)、以含有 50 ng/mL 血管內皮生長因子(VEGF)

之基底培養液作為正控制組(positive control)、以含有 SC-M1 細胞培養液之基底培養液作為控制組以及以含有經單獨及合併藥物處理 24 小時後，收集條件培養液之基底培養液作為對照組，分別處理 8 小時後，觀察血管內皮細胞管脈生成之情形。

由結果可知，經基底培養液處理之負控制組並無管脈生成之情形，含有 50 ng/mL 血管內皮生長因子之基底培養液及含有控制組 SC-M1 細胞培養液之基底培養液皆有明顯管脈生成之情形，但以含有 TPL 及 CDDP 條件處理 24 小時所收集條件培養液所為之對照組基底培養液，相較於控制組之管脈生成量明顯減少（圖七）。

#### 八、TPL 及 CDDP 抑制內皮細胞轉移之能力

本研究以傷口癒合分析法觀察 HUVECs 細胞之移動情形，以 IC<sub>10</sub> 及 IC<sub>20</sub> 處理 SC-M1 細胞後收取其上清液，而後評估其對 HUVECs 細胞移動之影響。

HUVECs 細胞經以單獨及合併處理後，控制組於 24 小時已有明顯癒合之情形，而經以 TPL 及 CDDP 處理後之 SC-M1 細胞上清液處理者，其內皮細胞移動之情形均明顯降低（圖八）。將重複三次實驗之結果量化後顯示，IC<sub>20</sub> 處理後之 SC-M1 細胞上清液，具明顯抑制內皮細胞移動之能力。

#### 九、TPL 及 CDDP 調控內皮細胞之 PI3K/AKT 訊息傳遞路徑

由於血管新生因子會經由酪氨酸 1175 位置之磷酸化，誘導 PI3K/AKT 訊息傳遞路徑之活化，本研究進一步探討經 TPL 及 CDDP 處理 SC-M1 細胞後之上清液，對血管內皮細胞透過 AKT/ERK/P38/FAK 等訊息傳遞路徑所誘導血管新生作用之影響。

經 IC<sub>20</sub> 合併處理後，胃癌細胞所釋放之 VEGF 含量明顯降低，連帶造成內皮細胞中 VEGFR-2 之蛋白質表現量減少，進而抑制下游一連串與轉移、分化及血管通透性之相關蛋白質之表現（圖九）。

## 肆、討論

由 TPL 及 CDDP 單獨或合併處理對胃癌細胞生長之抑制作用，顯示 TPL 與 CDDP 併用對胃癌 SC-M1 細胞的毒性遠高於其對正常細胞的影響；TPL 與 CDDP 合併處理所誘發的胃癌細胞死亡現象，與 DNA 損傷及細胞凋亡有關。此外，在以低於正常細胞毒性劑量的併用條件處理下，TPL 具有明顯的 cisplatin (CDDP) 化療加成效果。

TPL 已被證實在單獨處理的情況下，可同時抑制甲狀腺腫瘤細胞及血管內皮細胞的生長[42]。本研究團隊過去以 TPL 併用 CDDP 的研究結果，證實對本土性胃癌 SC-M1 細胞的抗癌活性可在不明顯影響正常細胞的條件下作用[43]，對癌症治療始終因併發症而受限的劑量限制情況，顯示以 TPL 作為中西醫整合治療癌症之策略，似有未來發展的可行性。於本研究中，TPL 抑制胃癌細胞生長所需之劑量約為前述 Zhu 等人報告之十分之一，TPL 對正常細胞的傷害亦相對較低；而有關血管內皮細胞管脈形成的試驗結果，TPL 及 CDDP 單獨或合併處理均可以間接抑制 SC-M1 細胞所誘導之管脈形成，尤其以合併者為甚，更值得注意的是 TPL 及 CDDP 抑制管脈形成所需之劑量，僅需抗腫瘤活性劑量之半，突顯 TPL 及 CDDP 在體內所具抗腫瘤功能外，對腫瘤周邊組織及微環境的影響，在以 TPL 進行化療藥物合併治療腫瘤時，其所扮演的角色將不僅止於抑制腫瘤細胞的生長。就 Zhu 及 Li 等人所進行之研究結果，兩種腫瘤細胞對 TPL 的耐受性明顯不同，其中尤以本研究所使用的 SC-M1 胃癌細胞對 TPL 具有較高的敏感性。Zhu 等人證實 TPL 在以高於本研究約 10 倍劑量的單獨處理條件下，會抑制甲狀腺癌細胞及血管內皮細胞的生長；而本研究之實驗結果，除證實 TPL 及 CDDP 可各別透過直接抑制內皮細胞的生長而影響管脈形成之外，其合併之效果較之單獨處理者為高，且所需劑量亦不會對正常細胞有明顯的影響。

本實驗以西方點墨法(western blot)及聚合酶連鎖反應(PCR)評估血管新生因子相關基因及蛋白質之表現結果，顯示以 TPL 及 CDDP 處理 24 小時後，胃癌 SC-M1 細胞中蛋白質及 mRNA 之表現量便開始下降，證實 TPL 及 CDDP 可以經由抑制胃癌細胞中血管新生因子 mRNA 之轉錄，進而抑制其蛋白質之表現量。活化 PI3K/AKT 之路徑已被證實可誘導產生血管生長因子[44-46]，ERK-1 及 ERK-2 可以經由活化細胞內基質及細胞核內轉錄因子以調控細胞之活性與血管生長因子之表現[47-51]。當血管生長因子與其受體結合後，可透過活化 PI3K/AKT 及 MAPK/ERK 等路徑產生血管生長因

子，再經血管生長因子與細胞受體的作用，形成一個正回饋(positive feedback)之訊息傳遞路徑[46,52]。

雖然血管生長因子與其受體結合能有效的活化 PI3K/AKT 及 MAPK/ERK 等訊息傳遞路徑，但並非為唯一能活化此路徑之受體，研究指出，透過活化人類表皮生長因子之受體(human epidermal growth factor receptor 2, HER2; epidermal growth factor receptor, EGFR)，亦可調控 PI3K/AKT 及 MAPK/ERK 路徑之活化[53-55]。

本研究之結果顯示以 TPL 及 CDDP 處理 24 小時後，血管內皮細胞 PI3K/AKT 及 MAPK/ERK 訊息傳遞路徑之活化便開始受到抑制，同時血管新生因子之 mRNA 之表現量亦同時開始下降，顯示因 TPL 及 CDDP 抑制血管內皮新生因子與其受體之結合，連帶影響其下游 VEGFR-2/AKT/MAPK/ERK 之傳導路徑。

綜合上述內容，TPL 及 CDDP 不僅於 IC<sub>50</sub> 具促使胃癌細胞走入細胞凋亡之作用外，在以 IC<sub>10</sub> 及 IC<sub>20</sub> 等低劑量處理下，亦可抑制內皮細胞調控血管新生之路徑。本研究將進一步以動物活體進行探討，將有助於釐清 TPL 及 CDDP 在活體內之作用，作為評估未來開發於臨床應用之參考。

## 伍、結論與建議

### 一、結論

- (一) 臺灣本土胃癌細胞株 SC-M1 經由 TPL 及 CDDP 單獨及合併處理 24 小時後，以 MTT 細胞存活率分析法，證實合併處理 IC<sub>50</sub> 之濃度可抑制 SC-M1 細胞之增生，但對正常細胞的毒性則遠低於胃癌細胞。
- (二) SC-M1 細胞經低劑量 IC<sub>10</sub> 及 IC<sub>20</sub> 處理後之上清液，以傷口癒合法證實低劑量之 TPL 及 CDDP 有效抑制 SC-M1 細胞之移行 (motility)。
- (三) 人類臍靜脈內皮細胞株 HUVECs 經由低劑量 TPL 及 CDDP 處理癌細胞之上清液測試，可以觀察到 HUVECs 管脈生成之能力明顯的降低，證實低劑量 TPL 及 CDDP 具有有效抑制 SC-M1 細胞所誘導 HUVECs 管脈生成之能力。
- (四) 經由聚合酶連鎖反應之結果，證實胃癌細胞 SC-M1 經低劑量 TPL 及 CDDP 處理，可以有效抑制其血管新生因子之表現。
- (五) 經由西方點墨法之結果，證實胃癌細胞 SC-M1 經低劑量 TPL 及 CDDP 處理後之上清液，可有效抑制內皮細胞之 VEGFR-2/AKT/MAPK/ERK 訊息傳遞路徑。

本研究計畫初步成果，已經整理並著手撰寫相關研究論文。

### 二、建議

- (一) 本研究計畫所規劃之實驗項目及測試組別繁多，但在細胞測試皆有正面之功效，盼能於第二年度計畫進一步測試其動物活體抗血管新生之功效。
- (二) 本研究計畫合併效果具有潛在發展之可能性，但其合併藥物對抗癌細胞之作用機制仍待深入探討，若能釐清其合併藥物之機制將有助於改善臨床抗癌藥物所產生之副作用及抗癌療效。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP101-RD-031 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. Conner EA, Teramoto T, Wirth PJ, Kiss A, Garfield S, et al. (1999) HGF-mediated apoptosis via p53/bax-independent pathway activating JNK1. *Carcinogenesis* 20: 583-590.
2. Bos JL (1989) ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49: 4682-4689.
3. Webb CP, Taylor GA, Jeffers M, Fiscella M, Oskarsson M, et al. (1998) Evidence for a role of Met-HGF/SF during Ras-mediated tumorigenesis/metastasis. *Oncogene* 17: 2019-2025.
4. Zhang Y, Thant AA, Machida K, Ichigotani Y, Naito Y, et al. (2002) Hyaluronan-CD44s signaling regulates matrix metalloproteinase-2 secretion in a human lung carcinoma cell line QG90. *Cancer Res* 62: 3962-3965.
5. Giatromanolaki A, Sivridis E, Brekken R, Thorpe PE, Anastasiadis P, et al. (2001) The angiogenic "vascular endothelial growth factor/flk-1(KDR) receptor" pathway in patients with endometrial carcinoma: prognostic and therapeutic implications. *Cancer* 92: 2569-2577.
6. He MF, Huang YH, Wu LW, Ge W, Shaw PC, et al. (2010) Triptolide functions as a potent angiogenesis inhibitor. *Int J Cancer* 126: 266-278.
7. Goldmann E (1908) The Growth of Malignant Disease in Man and the Lower Animals, with special reference to the Vascular System. *Proc R Soc Med* 1: 1-13.
8. Algire GH (1954) Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. VII. Observations on vascular reactions in destruction of tumor homografts. *J Natl Cancer Inst* 15: 483-491.
9. Ehrmann RL, Knoth M (1968) Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy. *J Natl Cancer Inst* 41: 1329-1341.
10. Greenblatt M, Shubi P (1968) Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J Natl Cancer Inst* 41: 111-124.
11. Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182-1186.

12. Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, et al. (1998) Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 94: 715-725.
13. Ramanujan S, Koenig GC, Padera TP, Stoll BR, Jain RK (2000) Local imbalance of proangiogenic and antiangiogenic factors: a potential mechanism of focal necrosis and dormancy in tumors. *Cancer Res* 60: 1442-1448.
14. Baish JW, Jain RK (2000) Fractals and cancer. *Cancer Res* 60: 3683-3688.
15. Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK (1997) Interstitial pH and pO<sub>2</sub> gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* 3: 177-182.
16. Giaccia AJ (1996) Hypoxic Stress Proteins: Survival of the Fittest. *Semin Radiat Oncol* 6: 46-58.
17. Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, et al. (1998) Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4607-4612.
18. Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM (1999) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 237: 97-132.
19. Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, et al. (2000) Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* 156: 1363-1380.
20. Fukumura D, Yuan F, Monsky WL, Chen Y, Jain RK (1997) Effect of host microenvironment on the microcirculation of human colon adenocarcinoma. *Am J Pathol* 151: 679-688.
21. Fidler IJ (1995) Modulation of the organ microenvironment for treatment of cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 87: 1588-1592.
22. Jain RK, Munn LL (2000) Leaky vessels? Call Ang1! *Nat Med* 6: 131-132.
23. Jain RK, Koenig GC, Dellian M, Fukumura D, Munn LL, et al. (1996) Leukocyte-endothelial adhesion and angiogenesis in tumors. *Cancer Metastasis Rev* 15: 195-204.
24. Rafii S (2000) Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and

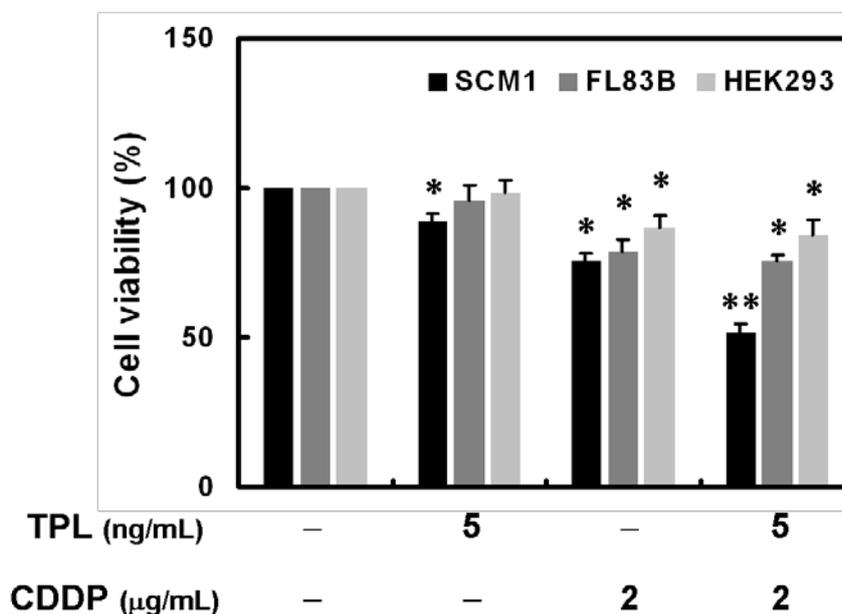
- promise. *J Clin Invest* 105: 17-19.
25. Asahara T, Kalka C, Isner JM (2000) Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther* 7: 451-457.
  26. Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-395.
  27. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, et al. (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380: 435-439.
  28. Ferrara N, Alitalo K (1999) Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* 5: 1359-1364.
  29. Jain RK (1988) Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Res* 48: 2641-2658.
  30. Carmeliet P, Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407: 249-257.
  31. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E (1999) Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 103: 159-165.
  32. Lee KY, Chang W, Qiu D, Kao PN, Rosen GD (1999) PG490 (triptolide) cooperates with tumor necrosis factor- $\alpha$  to induce apoptosis in tumor cells. *J Biol Chem* 274: 13451-13455.
  33. Tao X, Davis LS, Lipsky PE (1991) Effect of an extract of the Chinese herbal remedy *Tripterygium wilfordii* Hook F on human immune responsiveness. *Arthritis Rheum* 34: 1274-1281.
  34. Chang WT, Kang JJ, Lee KY, Wei K, Anderson E, et al. (2001) Triptolide and chemotherapy cooperate in tumor cell apoptosis. A role for the p53 pathway. *J Biol Chem* 276: 2221-2227.
  35. Fidler JM, Li K, Chung C, Wei K, Ross JA, et al. (2003) PG490-88, a derivative of triptolide, causes tumor regression and sensitizes tumors to chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 2: 855-862.
  36. Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, et al. (2000) FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* 12:

599-609.

37. Choi YJ, Kim TG, Kim YH, Lee SH, Kwon YK, et al. (2003) Immunosuppressant PG490 (triptolide) induces apoptosis through the activation of caspase-3 and down-regulation of XIAP in U937 cells. *Biochem Pharmacol* 66: 273-280.
38. Lee KY, Park JS, Jee YK, Rosen GD (2002) Triptolide sensitizes lung cancer cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by inhibition of NF-kappaB activation. *Exp Mol Med* 34: 462-468.
39. Frese S, Pirnia F, Miescher D, Krajewski S, Borner MM, et al. (2003) PG490-mediated sensitization of lung cancer cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis requires activation of ERK2. *Oncogene* 22: 5427-5435.
40. Shamon LA, Pezzuto JM, Graves JM, Mehta RR, Wangcharoentrakul S, et al. (1997) Evaluation of the mutagenic, cytotoxic, and antitumor potential of triptolide, a highly oxygenated diterpene isolated from *Tripterygium wilfordii*. *Cancer Lett* 112: 113-117.
41. Yang S, Chen J, Guo Z, Xu XM, Wang L, et al. (2003) Triptolide inhibits the growth and metastasis of solid tumors. *Mol Cancer Ther* 2: 65-72.
42. Zhu W, He S, Li Y, Qiu P, Shu M, et al. (2010) Anti-angiogenic activity of triptolide in anaplastic thyroid carcinoma is mediated by targeting vascular endothelial and tumor cells. *Vascul Pharmacol* 52: 46-54.
43. Li CJ, Chu CY, Huang LH, Wang MH, Sheu LF, et al. (2012) Synergistic anticancer activity of triptolide combined with cisplatin enhances apoptosis in gastric cancer in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 319: 203-213.
44. Nyberg P, Salo T, Kalluri R (2008) Tumor microenvironment and angiogenesis. *Front Biosci* 13: 6537-6553.
45. Stoeltzing O, Meric-Bernstam F, Ellis LM (2006) Intracellular signaling in tumor and endothelial cells: The expected and, yet again, the unexpected. *Cancer Cell* 10: 89-91.
46. Dai J, Peng L, Fan K, Wang H, Wei R, et al. (2009) Osteopontin induces angiogenesis through activation of PI3K/AKT and ERK1/2 in endothelial cells. *Oncogene* 28: 3412-3422.

47. Kolch W (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351 Pt 2: 289-305.
48. Schulze A, Lehmann K, Jefferies HB, McMahon M, Downward J (2001) Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells. *Genes Dev* 15: 981-994.
49. Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Cardo M, Herrero C, et al. (2001) Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis. *Immunobiology* 204: 543-550.
50. Sananbenesi F, Fischer A, Schrick C, Spiess J, Radulovic J (2002) Phosphorylation of hippocampal Erk-1/2, Elk-1, and p90-Rsk-1 during contextual fear conditioning: interactions between Erk-1/2 and Elk-1. *Mol Cell Neurosci* 21: 463-476.
51. Halaschek-Wiener J, Wacheck V, Kloog Y, Jansen B (2004) Ras inhibition leads to transcriptional activation of p53 and down-regulation of Mdm2: two mechanisms that cooperatively increase p53 function in colon cancer cells. *Cell Signal* 16: 1319-1327.
52. Amiri KI, Richmond A (2005) Role of nuclear factor-kappa B in melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 24: 301-313.
53. She QB, Chandarlapaty S, Ye Q, Lobo J, Haskell KM, et al. (2008) Breast tumor cells with PI3K mutation or HER2 amplification are selectively addicted to Akt signaling. *PLoS One* 3: e3065.
54. Moulder SL, Yakes FM, Muthuswamy SK, Bianco R, Simpson JF, et al. (2001) Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 61: 8887-8895.
55. Schoeberl B, Eichler-Jonsson C, Gilles ED, Muller G (2002) Computational modeling of the dynamics of the MAP kinase cascade activated by surface and internalized EGF receptors. *Nat Biotechnol* 20: 370-375.

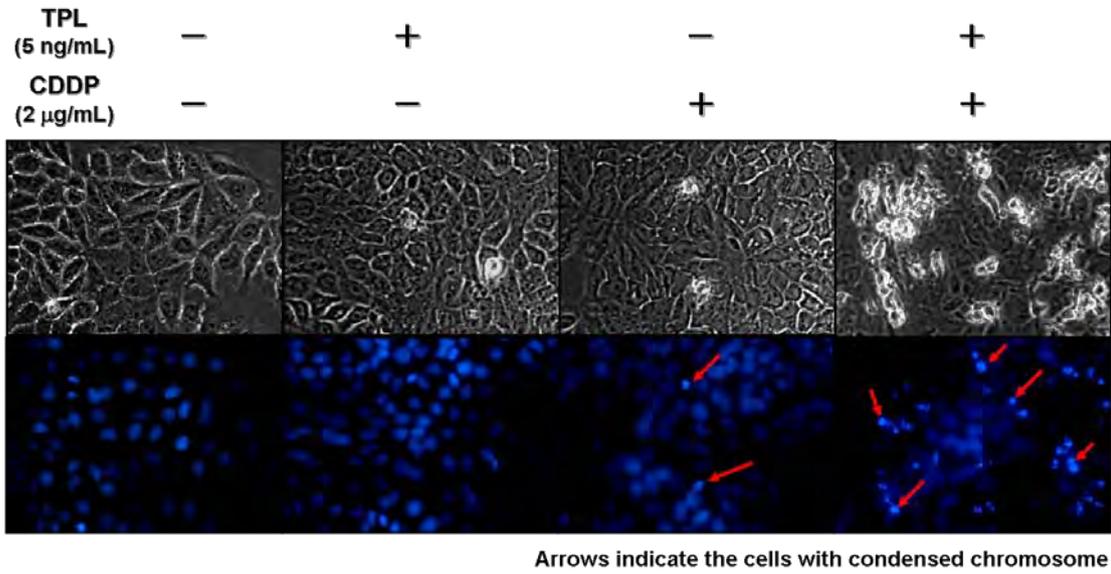
## 染、圖、表



圖一、Triptolide 及 cisplatin 對細胞存活率之影響

胃癌細胞(SC-M1)、正常小鼠肝臟細胞(FL83B)及正常人類腎臟細胞(HEK293)以 triptolide 及 cisplatin 分別依不同藥物濃度各別處理 24 小時後，以 MTT 測試進行觀察細胞存活率之測定。不同藥物處理條件之細胞，分別各以控制組所測得吸光值設為 100%，算出其相對百分比，量化其各藥物濃度所得之參數。其中，triptolide 及 cisplatin 之  $IC_{50}$  濃度分別約為 5 ng/mL 及 2  $\mu$ g/mL，並以 triptolide 作為降低 cisplatin 處理濃度之輔助藥物。\*： $P < 0.05$  及\*\*： $P < 0.01$  表示各組別間之比較具有各自不同的顯著差異。

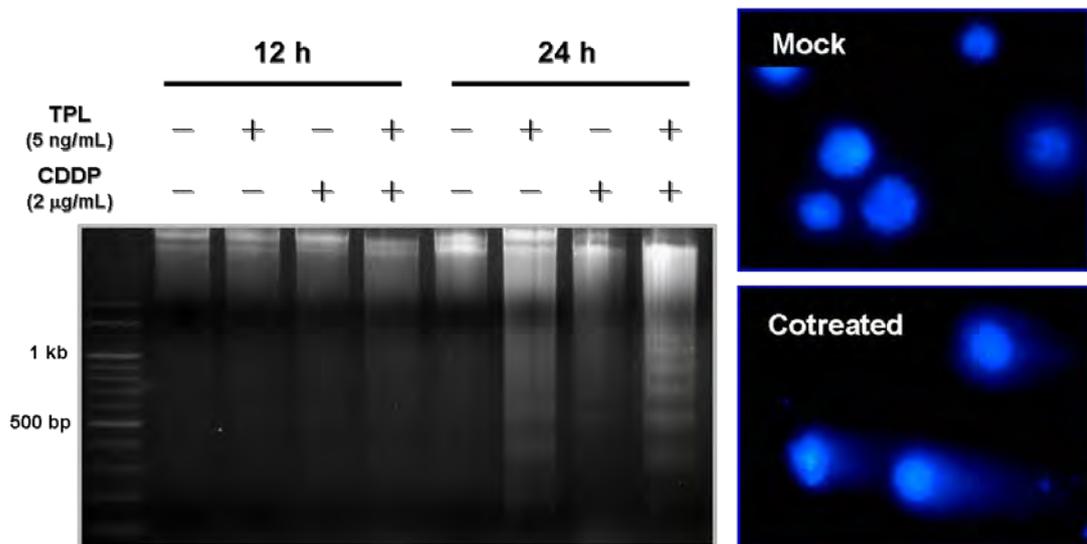
A



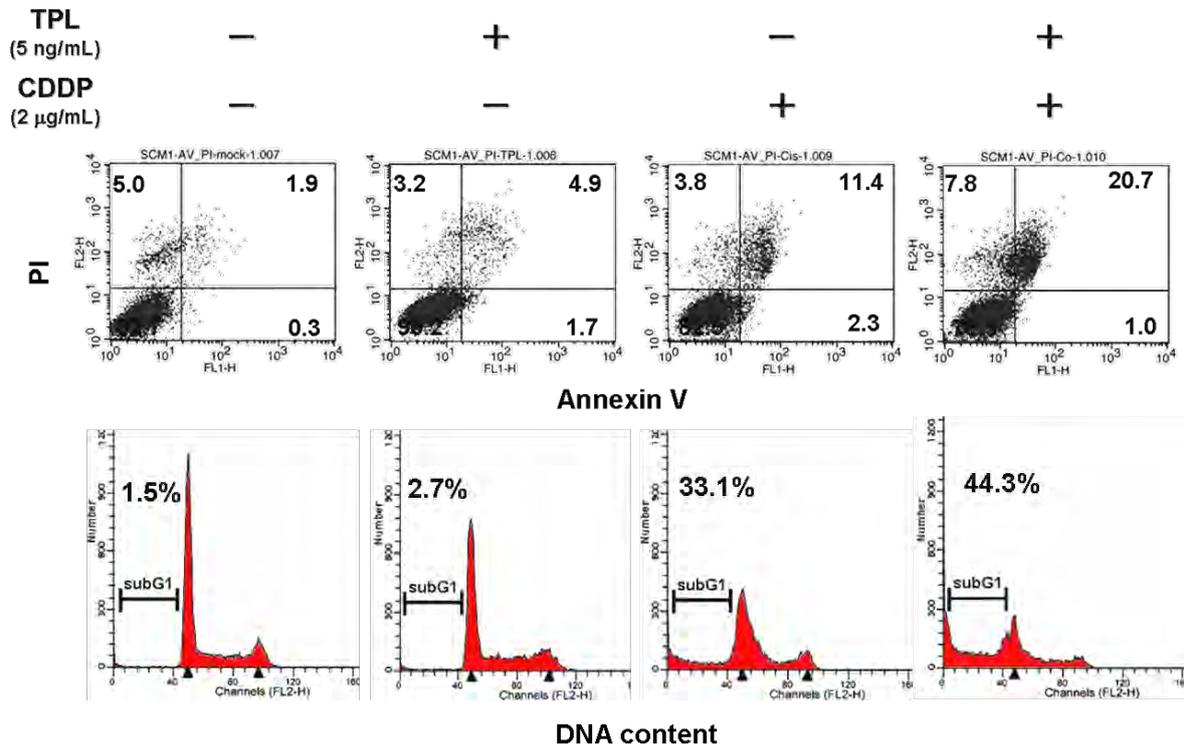
圖二、Triptolide 及 cisplatin 對胃癌 SC-M1 細胞 DNA 之影響

A、本實驗以 DAPI 染色觀察細胞之細胞核形態變化。經以不同藥物單獨或合併處理後 24 小時之明視野影像及細胞染色之螢光表現情形，下圖為控制組(mock)及經藥物處理之細胞核影像，顯示細胞以單獨 triptolide 或 cisplatin 處理之細胞核皺縮數量，明顯低於合併藥物處理之組別。

B

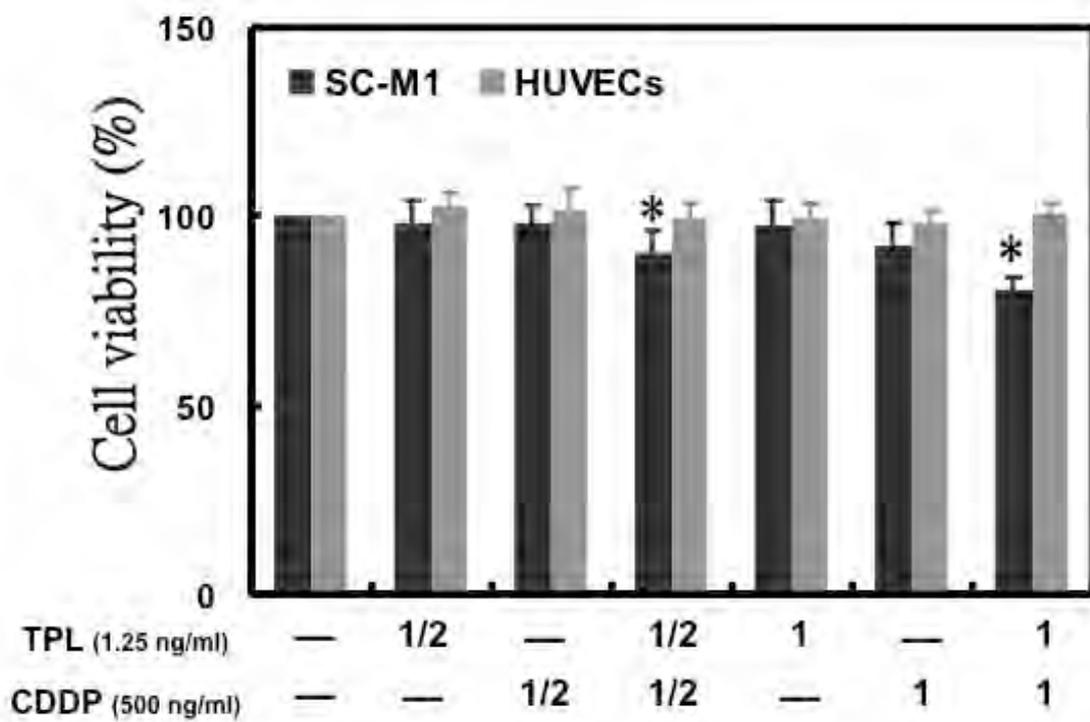


B、DNA 片段化(fragmentation)為細胞凋亡的重要特徵之一，並產生以大約 180 bp 為倍數的 DNA 片段為標示。最左邊一欄為 DNA marker，每個 band 間隔離 100 bp。右圖以彗星試驗法(comet assay)觀察控制組及合併藥物處理組之 DNA 斷裂程度；另外，經合併藥物處理後 24 小時之胃癌細胞，其尾端出現 DNA 拖曳之情形，亦可證實合併藥物處理所造成 DNA 片段化之現象。



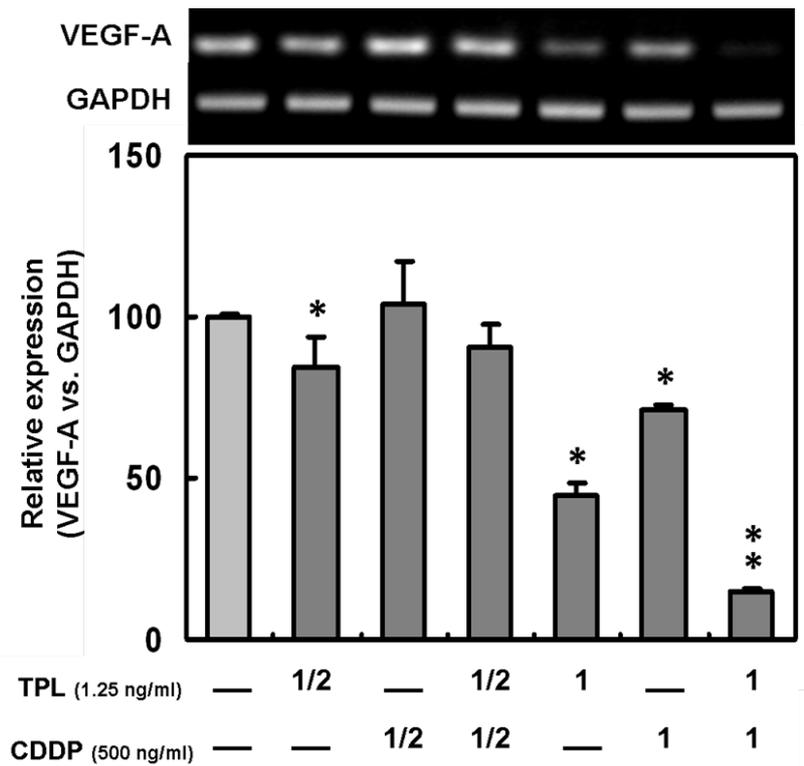
圖三、Triptolide 及 cisplatin 對胃癌 SC-M1 細胞之影響

由流式細胞儀所進行之細胞死亡現象分析，上圖：左下角表示存活細胞，右下角是細胞只有 Annexin V 染色，表示 early apoptosis 的細胞群落，右上角為細胞同時有 Annexin V 及 PI 兩種染色，亦即表示 late apoptosis 的細胞，左上角為只有 PI 染色，表示壞死之細胞。下圖：以 PI 單染觀察其細胞經藥物處理後 SubG1 之含量。結果顯示：經 TPL 及 CDDP 併用處理將誘導高比例的胃癌 SC-M1 細胞發生細胞凋亡。



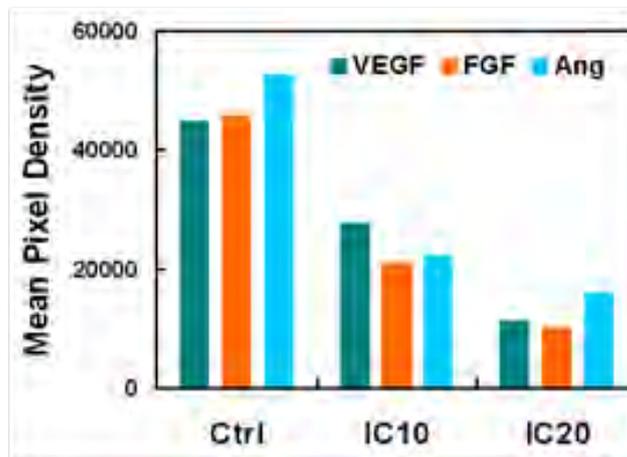
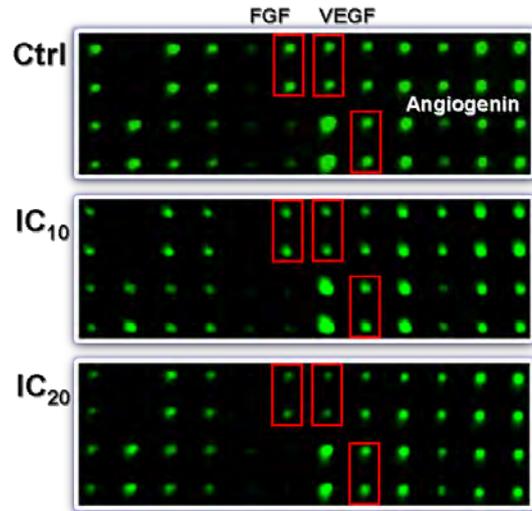
圖四、Triptolide 及 cisplatin 對胃癌 SC-M1 細胞及正常人類臍靜脈內皮細胞 (HUVECs) 之影響

胃癌 SC-M1 細胞與正常人類臍靜脈內皮細胞(HUVECs)經由 triptolide 及 cisplatin 分別經不同濃度的單獨或合併處理 24 小時後，以 MTT 測試其細胞之存活率。藥物處理之細胞以控制組所測得吸光值設為 100%，分別算出其各自的百分比，本實驗是以 triptolide 及 cisplatin 對 SC-M1 細胞作用之  $IC_{10}$  及  $IC_{20}$  濃度作為測試其抑制血管新生之有效劑量。\*： $P < 0.05$ 。結果顯示：以  $IC_{10}$  及  $IC_{20}$  濃度進行 triptolide 及 cisplatin 之合併處理，對胃癌 SC-M1 細胞具有明顯的生長抑制作用，但是對血管內皮細胞的影響並不明顯。



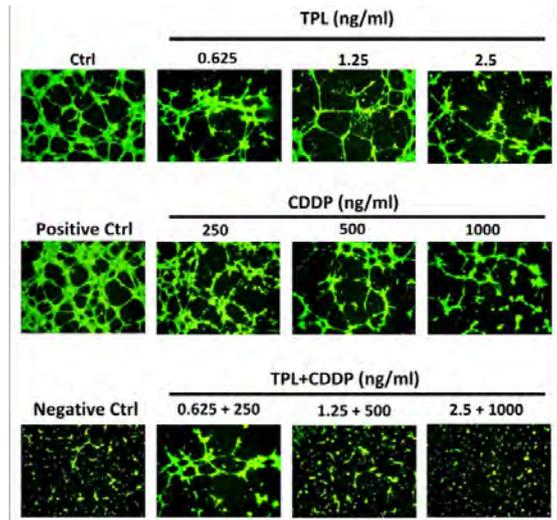
圖五、Triptolide 及 cisplatin 對胃癌細胞與血管新生相關基因表現之影響

以單獨及合併藥物處理胃癌細胞 24 小時，經 RT-PCR 分析細胞內誘發血管新生之基因(VEGF-A)mRNA 的表現情形。以控制組之螢光強度設為 100%，量化各藥物濃度所得之參數。\*： $P < 0.05$ 、\*\*： $P < 0.01$ 。

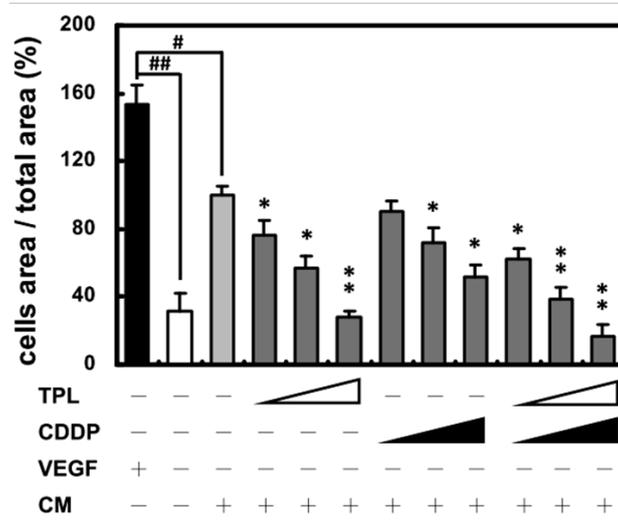


圖六、Triptolide 及 cisplatin 對胃癌細胞血管新生相關蛋白質表現之影響

以蛋白質微陣列分析合併藥物處理對胃癌細胞中與血管新生相關蛋白質表現之影響，並以量化軟體量化其螢光強度。結果顯示：以 IC<sub>10</sub> 及 IC<sub>20</sub> 濃度進行 triptolide 及 cisplatin 之合併處理，均能明顯抑制胃癌 SC-M1 細胞之 VEGF、FGF、Angiogenin 等與血管新生相關蛋白質之表現。



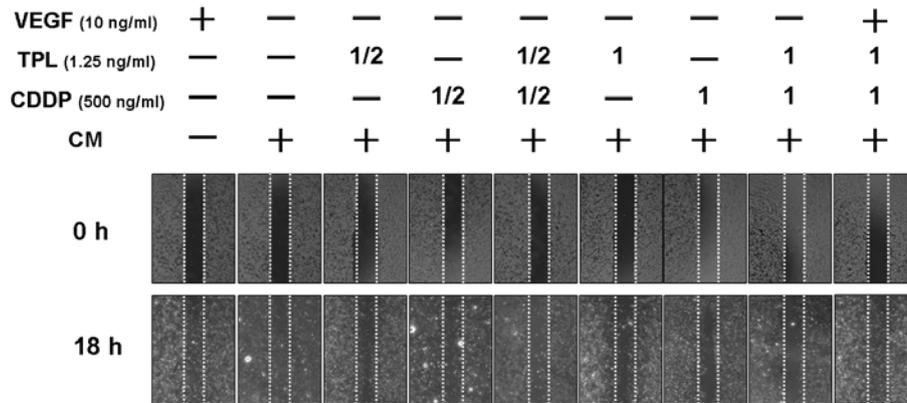
CM: Condition medium  
 Positive Ctrl: VEGF 10 ng/ml  
 Negative Ctrl: basal medium



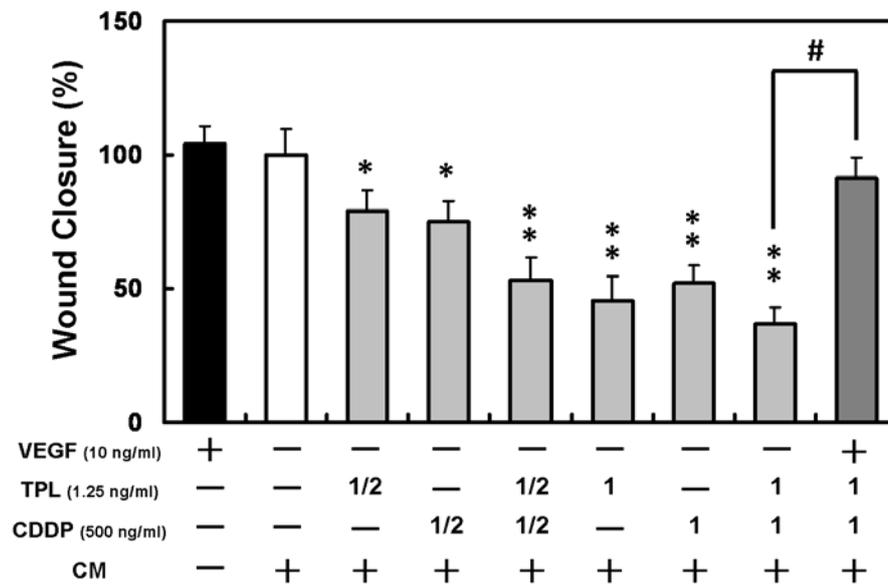
圖七、Triptolide 及 cisplatin 對胃癌細胞釋放血管生長因子之影響

以不同濃度之單獨及合併藥物處理胃癌細胞後，收取培養過胃癌細胞之上清液，進行內皮細胞血管管柱之生成實驗，藉此觀察胃癌細胞釋放至細胞外並影響血管內皮細胞進行血管新生之生長因子的含量變化。將全視野與細胞作量化統計，並以胃經藥物處理者作為 100%，以量化各處理之所得。 $*$ ： $P < 0.05$ 、 $**$ ： $P < 0.01$ 、 $\#$ ： $P < 0.05$ 、 $\#\#$ ： $P < 0.01$ 。

A



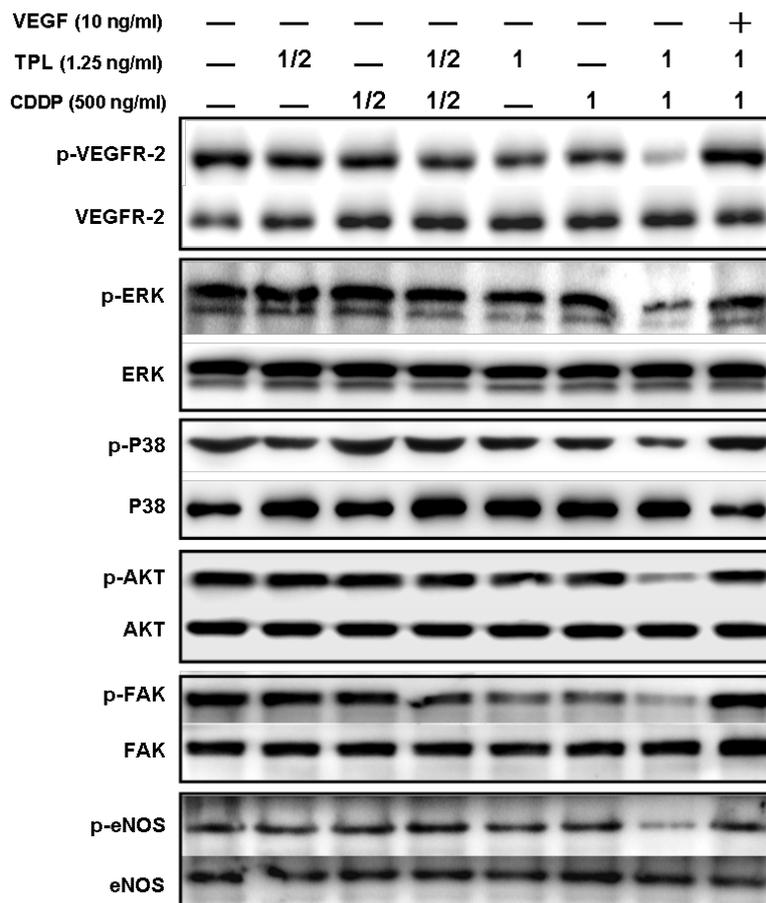
B



圖八、Triptolide 及 cisplatin 處理之胃癌細胞對內皮細胞轉移能力之影響

圖 A、以不同濃度之單獨及合併藥物處理胃癌細胞，收取培養過癌細胞之上清液，進行內皮細胞轉移能力之分析。

圖 B、將轉移至白線內之細胞作量化統計，並以 CM (condition medium) 組別作為 100%，以量化各處理之所得。\*： $P < 0.05$ 、\*\*： $P < 0.01$ 、#： $P < 0.05$ 。



圖九、Triptolide 及 cisplatin 處理之胃癌細胞對內皮細胞蛋白質表現之影響

本實驗收取經藥物處理之胃癌細胞上清液，與內皮細胞共同培養 24 小時，而後收取細胞並分析內皮細胞中與血管新生相關蛋白質之表現量。

表一、Triptolide 及 cisplatin 對胃癌細胞作用之合併指數(combination index)

		TPL		CDDP	
		Concentration (ng/mL)		Concentration ( $\mu$ g/mL)	
Percentage of inhibition	Combination index	Alone	Mix	Alone	Mix
Drug combinations					
10	0.29	5	0.625	1.5	0.25
20	0.42	7.5	1.25	2	0.5
40	0.47	11.5	2.5	4	1
50	0.78	13	5	5	2
70	1.17	15	10	8	4

# 少腹逐瘀湯加減對疼痛性糖尿病周圍神經病變療效研究(2-1)

蔡宗璋  
中國醫藥大學

## 摘要

糖尿病是一種很常見的慢性疾病，據估計，臺灣現約有 140 萬左右的糖尿病患者(全人口的 6%)。糖尿病患者由於長期血糖偏高，再加上各種代謝、血循環以及免疫系統機能異常，因此很容易發生神經病變。根據流行病學調查，糖尿病患者於診斷確定一年內約有 10% 合併神經病變，如果超過 25 年，則可高達 50% 以上，整體而言，盛行率約為 30% 左右。糖尿病神經病變，依不同的定義標準，有各種不同的分類，臨床上，最普遍的一類是遠端肢體感覺/運動多發性神經病變，這種神經病變是一種慢性、對稱性、由肢體(特別是下肢)遠端逐漸向近側擴展的神經學異常，通常呈現“襪子”與“手套”狀的分布範圍，臨床症狀起初以感覺減退或感覺異常為主，隨著時間進行，一大部分患者會合併有疼痛感，理學檢查可見肢體末端感覺(壓覺及振動覺)減退及跟腱反射減退或消失，不過，確認診斷仍須以神經傳導速率檢查的結果為依據。糖尿病多發性神經病變所引起的疼痛通常是以針刺感、觸電感或是燒灼感來表現，嚴重者，常會影響到肢體功能及生活品質，是一個相當困擾患者及醫師的問題。傳統上，西醫治療糖尿病多發性神經病變是以控制血糖為主，如果合併有疼痛的症狀，則加上一些藥物做為症狀治療，如：非類固醇類止痛劑、三環抗憂鬱劑、抗癲癇藥、嗎啡類止痛藥…等，這些藥物的效果通常都不理想，很難有效的緩解疼痛，而且還有各種副作用的發生。本病在中醫文獻屬於消渴病，日久損及肝腎，導致肝腎氣陰虧損，久病入絡，絡脈閉阻，不通則痛，不通則肌膚失榮，而出現肢體麻木、疼痛、局部發涼等症狀。糖尿病周圍神經病變的病機特徵為本虛標實，標實為痰濁閉阻，瘀血阻滯，痰瘀交阻，脈絡不通。標實(痰瘀阻絡)是糖尿病周圍神經病變發病的直接病因，而且痰瘀始終是穿於糖尿病周圍神經病變整個過程。

本計畫擬進行一雙盲、隨機且有控制安慰劑的交叉試驗，嘗試以中醫臨床有效治療方劑少腹逐瘀湯加減來治療糖尿病多發性神經病變，評估其對糖尿病神經病變疼痛緩解及其對周邊神經功能(壓覺、振動覺及神經傳導速率)改善情形，因 101 年 8 月 6 日接獲中國醫學大學附設醫院 IRB 核准文件後，開始進行計畫，目前有 77 位糖尿病患者進入篩選，共有 20 為符合入組標準，13 位簽署受試者同意書進入研究。

關鍵詞：糖尿病周圍神經病變、少腹逐瘀湯、中醫

# **The Study of Modified Shao-Fu-Zhu-Yu-Tang in Treating Diabetic Periphery Neuropathy (2-1)**

Tzung-Chang Tsai  
China Medical University

## **ABSTRACT**

Diabetic polyneuropathy is one of the most common long-term complications of diabetes affecting ~50% of all diabetic people. The neuropathies developing in patients with diabetes are known to be heterogeneous by their symptoms, pattern of neurologic involvement course rich covariates, pathologic attenuations, and underlying mechanisms. The typical diabetic peripheral neuropathy is a chronic, symmetric, length-dependent sensor motor polyneuropathy and is through to be the most common variety. It develops on a background of long standing hyperglycemia, accumulation of advanced glycation and products, oxidative stress and lipid attenuations among other metabolic abnormalities, and cardiovascular risk factor. Pharmacological management of painful diabetic peripheral neuropathy almost inclusively counts of symptomatic therapies. First line therapies for painful diabetic peripheral neuropathy are a typical antidepressant, duloxetine, pregabalin, or gabapentin, taking into account patient comorbidities and cost. In the research, we will evaluate the modified Shao-Fu-Zhu-Yu-Tang in treating painful diabetic peripheral neuropathy.

**Keywords:** Diabetic peripheral neuropathy, Shao-Fu-Zhu-Yu-Tang, Traditional Chinese Medicine

## 壹、前言

糖尿病是一種很常見的慢性疾病，據估計，臺灣現約有 140 萬左右的糖尿病患者（全人口的 6%）。糖尿病患者由於長期血糖偏高，再加上各種代謝、血循環以及免疫系統機能異常，因此很容易發生神經病變。根據流行病學調查，糖尿病患者在診斷確定一年內約有 10% 合併神經病變，如果超過 25 年，則可高達 50% 以上，整體而言，盛行率約為 30% 左右(1-4)。糖尿病神經病變，依不同的定義標準，有各種不同的分類，臨床上，最普遍的一類是遠端肢體感覺/運動多發性神經病變，這種神經病變是一種慢性、對稱性、由肢體（特別是下肢）遠端逐漸向近側擴展的神經學異常，通常呈現“襪子”與“手套”狀的分布範圍，臨床症狀起初以感覺減退或感覺異常為主，隨著時間進行，一大部分患者會合併有疼痛感，理學檢查可見肢體末端感覺（壓覺及振動覺）減退及跟腱反射減退或消失，不過，確認診斷仍須以神經傳導速率檢查的結果為依據。糖尿病多發性神經病變所引起的疼痛通常是以針刺感、觸電感或是燒灼感來表現，嚴重者，常會影響到肢體功能及生活品質，是一個相當困擾患者及醫師的問題(5-11)。傳統上，西醫治療糖尿病多發性神經病變是以控制血糖為主，如果合併有疼痛的症狀，則加上一些藥物做為症狀治療，如：非類固醇類止痛劑、三環抗憂鬱劑、抗癲癇藥、嗎啡類止痛藥…等，這些藥物的效果通常都不理想，很難有效的緩解疼痛，而且還有各種副作用的發生(12)。

中醫文獻對糖尿病周圍神經病變無確切記載和專病病名，但據其臨床表現，可歸屬於消渴、痹証、痿證、脈痺、血痺、不仁、麻木等範疇(13)。如李東垣《蘭室秘藏》記載消渴病患者有“四肢痿弱”(14)。朱丹溪《丹溪心法》中載：“腎虛受之，腿膝枯細，骨節酸疼。”(15)《王旭高臨證醫案》中紀載：“消渴日久，但見手足麻木，肢涼如冰。”(16)《類證治裁》紀載：“諸氣血凝滯，久而成痺。”(17) 依臨床經驗累積，臨床上常見下列證型：氣陰內虛型、脾虛濕滯型、肝腎陰虛型、痰瘀交阻型、血虛寒凝型。本病是消渴病日久損及肝腎，導致肝腎氣陰虧損，久病入絡，絡脈閉阻，不通則痛，不通則肌膚失榮，而出現肢體麻木、疼痛、局部發涼等症狀。糖尿病周圍神經病變的病機特徵為本虛標實，本虛在於氣陰不足，陰津耗損，兼內有虛熱；標實為痰濁閉阻，瘀血阻滯，痰瘀交阻，脈絡不通。其中標實（痰瘀阻絡）是糖尿病周圍神經病變發病的直接病因，而且痰瘀始終是貫穿於糖尿病周圍神經病變整個過程(18-24)。

本計畫進行一雙盲、隨機且有控制安慰劑的交叉試驗，嘗試以中醫臨床有效治療方劑少腹逐瘀湯加減來治療糖尿病多發性神經病變，評估其對糖尿病神經病變疼痛緩解及其對周邊神經功能（壓覺、振動覺及神經傳導速率）改善情形。

## 貳、材料與方法

### 一、研究方法：

採隨機、雙盲、有控制安慰劑組的兩階段式交叉性試驗，預計收集 80 個糖尿病合併下肢神經疼痛的患者、進行 26 週左右的研究。

### 二、研究對象篩選

#### (一)受試者納入條件

1. 年齡於 30 至 80 歲間之患者。
2. 具疼痛性糖尿病神經病變的第 I 型或第 II 型糖尿病患者。
3. 沒有接受治療的疼痛性糖尿病神經病變患者，或至少接受 3 個月治療但神經性疼痛仍存在的患者。
4. 沒有嚴重疾病，在試驗期間不須要住院治療之疼痛性糖尿病神經病變患者。
5. 了解試驗的治療程序及潛在風險與益處，並願意簽訂受試者同意書者。

#### (二)受試者排除條件

1. 處於治療期的癌症患者。
2. 活動期疾病(如：甲狀腺機能亢進、甲狀腺機能低下症、慢性腎衰竭、嚴重貧血、肝硬化、急性感染疾病)，目前正在接受規則治療。
3. 其他原因造成的周邊神經病變。
4. 血糖控制不穩定(糖化血色素 $\geq 12\%$ )
5. 血小板 $\leq 80000$
6. 急性足潰瘍或感染者
7. 三個月前曾參與任何藥物臨床試驗者
8. 藥物或酒精成癮，影響試驗進行及試驗結果。
9. 哺乳及懷孕婦女或試驗期間拒絕採用適當避孕法者。

### 三、藥物組成與製備：

本病在中醫文獻屬於消渴病日久損及肝腎，導致肝腎氣陰虧損，久病入絡，絡脈閉阻，不通則痛，不通則肌膚失榮，而出現肢體麻木、疼痛、局部發涼等症狀。糖尿病周圍神經病變的病機特徵為本虛標實，標實為痰濁閉阻，瘀血阻滯，痰瘀交阻，脈絡不通。標實（痰瘀阻絡）是糖尿病周圍神經病變發病的直接病因，而且痰瘀始終是貫穿於糖尿病周圍神經病變

整個過程。

本研究方劑是少腹逐瘀湯去乾薑加入白芥子、地龍、地別蟲加強化痰化瘀通絡作用，再加入牛膝，以牛膝、地龍之力引至下肢治療神經病變，這方藥是臨床上本院新陳代謝與中醫內科作治療糖尿病周圍神經病變有效之方藥。

(一) 藥物基原：

小茴香 *Foeniculum Vulgere* Mill  
元胡索 *Corydalis turtschaninovii*  
Bess. f. yan husno Y.H.Chouet C.C.Hsii  
沒藥 *Commiphora myrrha* Engl  
當歸 *Angelica sinensis* (Oliv)  
川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort.  
桂枝 *Cinnamomum cassia* Presl  
赤芍 *Paeonia lactiflora* Pall  
黃耆 *Typha angutifolia* L.  
五靈脂 *Trogopterus xanthipes* Milne-Edwards  
白芥子 *Brassica alba* (L.) Boiss  
地龍 *Pheretima aspergillum* (Perrier)  
地別蟲 *Eupolyphoga sinensis* Walker  
懷牛膝 *Achyranthes bidentata* Blumb

(二) 處方組成與比例

小茴香1 元胡索1 沒藥1 當歸3 川芎3 桂枝1 赤芍2  
蒲黃3 五靈脂3 白芥子3 地龍3 地別蟲3 懷牛膝2

(三) 製備：

研究用藥由本校藥學院教授作基原鑑定後，委託科達GMP藥廠採購與製作，製備成每顆含750mg方藥浸膏之錠劑。

(四) 安慰劑之製備：

澱粉安慰劑：取澱粉做造粒並使用焦糖作著色，顏色類似但氣味上無法做特別處理。

(服用劑量)一日量12錠劑，分3次服用。

四、樣本數評估：

以下肢神經疼痛改善程度為評估指導，假設以治療後改善下降4分為療效目標，intention-to-treatment，使用ANOVA作分析，具統計意義水準

為 0.05，統計檢力為 0.90，病人流失率為 20%，經統計檢力軟體(G.power)計算，每組需樣本為 40 人，共需 80 人。

#### 五、研究設計：

本計畫以 2 星期 run-in period 來選擇合適之患者，依隨機、雙盲、平行分為實驗組與對照組二組，採交叉(cross-over design)進行研究。先進行基本資料蒐集整理、神經疼痛評估、各科神經檢查及實驗室檢查，每位患者都必須停止原先在使用治療神經病變(包括神經疼痛)的藥物，但是其他藥物可以繼續使用；隨後開始進行第一階段 12 星期的分組試驗：實驗組 40 位患者接受實驗藥物治療，對照組 40 位患者服用安慰劑，實驗藥物與安慰劑皆每日服用 12 錠，每日三次，每次 4 錠三餐飯後服用。每位患者每 4 星期回診一次，接受疼痛程度及神經學檢查(跟腱反射、大拇趾振動覺)，第 12 星期時同時也必須接受第二次的神經傳導速率檢查及填寫生活品質問卷；接著是 2 星期的 washout period 及第二階段 12 星期的交叉試驗，進行的方式與第一階段相同，原來接受實驗藥物治療的患者改服用安慰劑，而原先服用安慰劑者改服用實驗藥物。

#### 六、療效安全性評估：

治療期內紀錄研究對象各項服藥後之反應，依臨床經驗，適當使用少腹逐瘀湯，少具服藥之副作用。

#### 七、臨床療效評估方法：

(一) 疼痛程度(0 到 10 分；11-point Likert scale)

(二) 填寫生活品質問卷(SF36)

(三) 針對每位收案患者做兩側下肢的神經學檢查：跟腱反射、大拇趾振動覺及神經傳導速率檢查

(四)實驗室抽血檢驗的項目包括：

一般血液檢查、肝功能(GOT/GPT)、腎功能(creatinine)、甲狀腺功能(Free T4/TSH)、電解質(鈉、鉀、鈣)、糖化血紅素及葉酸，心電圖檢查及尿液妊娠試驗(女性患者)。

#### 八、療效評估：

(一) Primary endpoint: 1.疼痛緩解 2. 生活品質改善

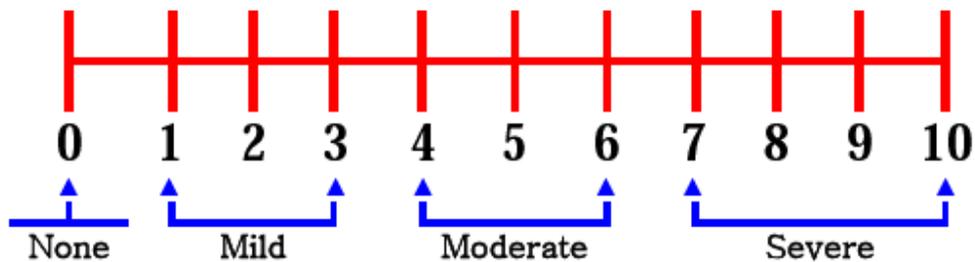
(二) Secondary endpoint: 神經功能改善: 1.跟腱反射 2.大拇趾振動覺

#### 九、檢測方法：

(一)神經疼痛程度評估

利用 0 – 10 Numeric pain scale (見下圖) 數字量化疼痛程度，

首先向病患說明：當無疼痛時分數是 0，在可以想像當中最嚴重的疼痛分數定為 10，請病患將現在自己身上疼痛的嚴重程度以圈選數字的方式標示在介於 0 至 10 之間。



0-10 Numeric Pain Rating Scale

## (二)神經學檢查項目與執行方法：

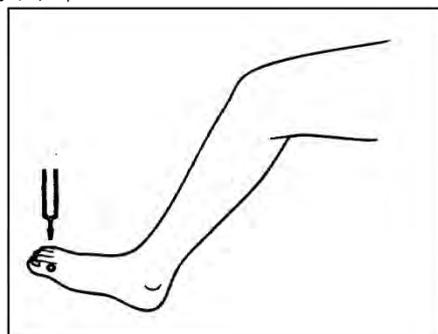
### 1. 深肌腱反射測驗(Deep tendon reflex test)

執行方法：只需測驗跟腱反射，使用扣診槌敲擊跟腱並觀察是否有引發反射。以下兩種狀況判定為深肌腱反射減弱。

跟腱反射微弱(Decreased ankle reflex)：使用扣診槌敲擊跟腱先以一般正常方式檢查顯示跟腱反射消失，但經反射增強步驟(enhancement procedure)後可見微弱反射跟腱反射消失(Absent ankle reflex)：經反射增強步驟依然無法跟腱反射。

### 2. 震動感覺測驗

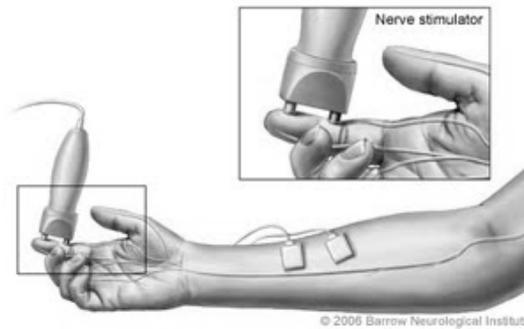
執行方法：要求患者在測驗中全程閉上眼睛，將 128Hz 音叉激發震動後放在大腳趾趾背趾間關節骨頭最突出之處（見下圖），這時詢問病患有無震動感覺，再將音叉停止，詢問病患何時震動感覺停止，在左右大腳趾各做兩次。當患者無法感覺到音叉震動即為異常。



### 3. 神經傳導檢查 Nerve conduction test

患者依約定時間至中國醫藥大學附設醫院神經部電生理檢查室檢查。神經傳導檢查是利用神經及肌肉的電生理特性，以電流刺激神經，記錄其運動和感覺的反應；有對稱性的至少兩

處神經檢查結果異常即符合糖尿病周邊神經病變，診斷標準依據以下醫學期刊文獻(1. Diabetes Metab Res Rev 2011; 27: 620–628. 2. DIABETES CARE , VOLUME 33, NUMBER 10, OCTOBER 2010)。



(三)生活品質問卷：SF36

## 參、結果

- 一、通過中國醫藥大學附設醫院人體試驗委員會審查，101年8月6號收到〈人體試驗計畫同意書〉核准文件。
- 二、委託科達 GMP 藥廠完成製作臨床試驗藥品：  
少腹逐瘀湯加味組成與比例：  
小茴香1 元胡索1 沒藥1 當歸3 川芎3 桂枝1 赤芍2  
蒲黃3 五靈脂3 白芥子3 地龍3 地別蟲3 懷牛膝2  
研究用藥由本校藥學院教授作基原鑑定後，委託GMP藥廠採購與製作，製備成每顆含750mg方藥浸膏之錠劑。  
安慰劑之製備：  
取澱粉做造粒並使用焦糖作著色，顏色類似但氣味上無法做特別處理。
- 三、完成申請 SF36 問卷授權使用。
- 四、完成受試者海報印製及張貼。
- 五、完成臨床試驗中心”臨床試驗院內相關部門配合執行表”，且知會各醫院部門可行性評估計畫。
- 六、目前有 77 位糖尿病患者進入篩選，共有 20 位符合入組標準，13 位簽署受試者同意書進入研究。
- 七、持續篩選適合參與臨床試驗之受試者。

## 肆、討論

糖尿病患者於診斷確立後一年內約有 10% 合併神經病變，如果超過 25 年，則可達 50% 以上，平均而言，盛行率約為 30% 左右，IRB 核准後開始執行研究計畫，有 77 位糖尿病患者進入篩選，符合本計畫入組標準者計 20 位，符合率約 26%，共有 13 位進入研究，現持續與西醫部新陳代謝科醫師合作，篩選符合本計畫之糖尿病患者。

## 伍、結論與建議

一、目前收案 13 位，人數繼續累積中，各方配合亦順利，收案進度將會加快，符合研究進度。

二、本研究增進收案人數之措施

(一)與本院新陳代謝科其他主治醫師合作，推薦符合條件之患者參加本研究計畫，未來論文發表時列為作者群具名發表。

(二)與本院中醫內科與中西整合科新陳代謝科專科領域之主治醫師合作，推薦推薦符合條件之患者參加本研究計畫，未來論文發表時列為作者群具名發表。

(三)與台中市內醫院（澄清、仁愛、林新）新陳代謝科主治醫師合作，請其推薦符合條件之患者參加本研究計畫，未來論文發表時列為作者群具名發表。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP101-RD-033 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

# 台灣金銀花與川芎有機及 GAP 栽培模式與 生物活性研究

陳柏青

明道學校財團法人明道大學

## 摘 要

本研究目的在建立台灣金銀花(*Lonicera japonica* Thunb.)與川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort.)有機及 GAP 栽培規範。蒐集珍貴金銀花與川芎植物種原，鑑定其正品基原，研發金銀花與川芎健康種苗繁殖技術。將有機農法與全球優良農業操作規範(Global Good Agriculture Practice, GLOBAL GAP)導入台灣中藥生產栽培管理系統，嚴格控管以提昇藥材品質，建立台灣金銀花與川芎有機及 GAP 栽培模式與規範。篩選評估適合台灣氣候環境栽培之金銀花與川芎種原，規劃建立台灣金銀花與川芎有機及 GAP 生產栽培基地範本，並分析台灣產金銀花與川芎藥材之成分與生物活性，以確保在台灣生產無污染、高品質之金銀花與川芎藥材原料。相關結果將提供台灣相關中藥材產官學等研究單位參考。本年度之研究成果已蒐集金銀花與川芎中藥基原植物，建立台灣金銀花與川芎種原，並將所蒐集川芎與金銀花種原進行基原鑑定，調查其型態與生育習性，研究其健康種苗繁殖與栽培技術。此外在生物活性分析部分，本研究所使用之金銀花與川芎皆具有很好之生物活性功能，皆顯示有抗發炎與抗病毒之效果，但詳細的機制與模式還需要透過更進一步的酵素免疫分析法測量發炎相關的細胞激素。後續研究將建立組織培養苗之技術，於台灣建立無病毒種苗體系，期能滿足台灣當地種植川芎所需之種苗需求。

關鍵詞：金銀花、川芎、有機、優良農業操作

# **Research on GAP and Biological Activities for Organic Planting of *Lonicera japonica* Thunb. and *Ligusticum chuanxiong* Hort. in Taiwan**

Chen, Bo-Ching  
MigDao University

## **ABSTRACT**

This research aims to establish organic planting and GAP for *Lonicera japonica* Thunb. and *Ligusticum chuanxiong* Hort. in Taiwan. High value potential *Lonicera japonica* and *Ligusticum chuanxiong* are collected to establish germplasmic resources center for developing breeding techniques and providing healthy seedling supply. Organic farming and Global GAP will be applied to the medicinal herbs production and quality control system. Furthermore, this project will screen and evaluate high potential *Lonicera japonica* and *Ligusticum chuanxiong* which are suitable for local environment in Taiwan and analyzes their ingredients and biological activities to produce *Lonicera japonica* and *Ligusticum chuanxiong* with non-pollution and high quality. The manual for organic planting and GAP production including cultivation approaches will be published for references of producers and farmers in Taiwan. In this year, *Lonicera japonica* and *Ligusticum chuanxiong* were set up germplasmic center. Then, germplasm identification and GAP production model were conducted for these medicinal herbs. Moreover, healthy seedling propagation and planting techniques were set up in seedling center. This research was carried out at MingDao University. *Lonicera japonica* and *Ligusticum chuanxiong* were chosen as examples to implement GAP and organic farming in the field. Besides that, the biological activities for *Lonicera japonica* and *Ligusticum chuanxiong* were analyzed. This project is expected to promote medicinal herbs organic and GAP production in next year. Also, safety and non-pollution of medicinal herbs production will be established. The qualities and

yields of medicinal herbs will be enhanced and thus well developed for the industry of medicinal herbs.

Keywords: *Lonicera japonica* Thunb., *Ligusticum chuanxiong* Hort., Organic, GLOBAL GAP

## 壹、前言

### 一、金銀花與川芎

金銀花與川芎自古即為中醫清熱解毒與行氣活血之常用重要中藥材。金銀花，本品為忍冬科多年生半常綠纏繞性木質藤本植物忍冬(*Lonicera japonica* Thunb.)的花蕾。其乾燥莖葉稱為忍冬藤可入藥。金銀花古稱忍冬，其名始見於《本草綱目》，《本草綱目》曰：「一切風濕氣，及諸腫毒、癰疽疥癬、楊梅諸惡瘡。散熱解毒。」以忍冬收載於《名醫別錄》列為上品，陶弘景云：「今處處皆有，似藤生，凌冬不凋，故名忍冬。」忍冬自古多用藤莖，故《別錄》謂十二月采，直至宋代，雖有金銀花之名，但使用花者不多。明代《本草綱目》曰：忍冬「莖葉及花，功用皆同」，並於清代乾隆年間開始，重花而賤藤。金銀花初開時蕊及瓣呈白色，經二、三日後變黃色，新舊相參，黃白相映，因此稱為金銀花。《本草拾遺》曰：「主熱毒、血痢、水痢，濃煎服之。」清代慈禧太后把金銀花視為延年益壽的珍品，每天必飲一杯金銀花茶。《台灣中藥典》、《中國藥典》均收載忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 及同屬近緣植物（灰氈毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz.、紅腺忍冬 *Lonicera hypoglauca* Miq.、山銀花（華南忍冬）*Lonicera confusa* DC.、毛花柱忍冬 *Lonicera dasystyla* Rehd. 或黃褐毛忍冬 *Lonicera fulvotomentosa* Hsu et S. C. Cheng 之的乾燥花蕾或帶初開的花，為中藥金銀花的法定正品基原植物。忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的乾燥莖枝為中藥忍冬藤的法定正品基原植物。金銀花主產於河南密縣、溫縣等地，稱「懷銀花」，又名「淮銀花」，產山東平邑、費縣等地者稱「東銀花」或「濟銀花」，尤以河南密縣產者為道地，商品特稱「密銀花」。另外，安徽、江蘇、浙江、四川、湖北、湖南、貴州等地亦有產出。金銀花於台灣生長良好。金銀花以花入藥，其性寒，味甘，歸肺、心、胃經。具清熱解毒，疏散風熱等功效。現代藥理研究顯示金銀花具有抗病毒、抗菌、抗發炎及抗 SARS 等效用，民間藥也用來治療腦炎、流行性感冒、肺炎、解毒、痢疾、癰腫、疔瘡等皮膚疾病。金銀花於中醫臨床使用量大，含金銀花藥材之方劑如：托裏消毒飲、八味帶下方、真人活命飲、銀翹散、五味消毒飲、清咽利膈湯等 33 個方劑，金銀花為治療感冒等呼吸道疾病要中藥材。

川芎原名芎藭為繖形科多年生草本植物川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort.)的根莖。川芎，始載於《神農本草經》，列為上品，原名芎藭。李時

珍曰：「人頭芎隆窮高，天之像也。此藥上行，專治頭腦諸疾，故有芎窮之名。」因它為四川特產藥材，故習稱川芎。《神農本草經》曰：味辛，溫。主治中風入腦頭痛，寒痺，筋攣緩急，金創，婦人血閉無子。《名醫別錄》曰：無毒。主除腦中冷動，面上游風去來，目淚出，多涕唾，忽忽如醉，諸寒冷氣，心腹堅痛，中惡，卒急腫痛，溫中內寒。《藥性賦》曰：味辛，氣溫，無毒。升也，陽也。其用有二：上行頭角，助清陽之氣止痛；下行血海，養新生之血調經。《本草綱目》曰：川芎，血中氣藥也。肝苦急，以辛補之，故血虛者宜之。辛以散之，故氣鬱者宜之。《台灣中藥典》、《中國藥典》均收載繖形科多年生草本植物川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort.)的乾燥根莖，為中藥川芎的法定正品基原植物。川芎主產於四川及貴州、雲南、陝西等地。味辛、性溫。歸肝、膽、心包經。具活血行氣、祛風止痛之功效。臨床用名有川芎、酒川芎。現代藥理研究顯示川芎具有保護心腦血管、促進血液循環，防止肝、肺纖維化，預防肺動脈高壓等作用。可用來治療心血管與腦血管的疾病，它能通過血腦障壁到達中樞分佈及增加腦血流量，預防血栓的形成，並對動物中樞神經有鎮靜作用。

川芎於中醫臨床使用量大，含川芎藥材之方劑如：十全大補湯、十全流氣飲、十神湯、七味蒼朮散、七味降下湯、八珍湯、八仙湯、九味姜活湯、人參順氣散、川芎茶調散、川芎散與川芎姜活散等 24 個方劑，川芎為活血行氣之重要補血止血中藥材。

目前我國所用金銀花與川芎藥材，皆自中國進口為主，臺灣並未生產。近年來由於許多病毒傳染病對於抗生素等藥劑，逐漸產生嚴重抗藥性，使此類疾病蔓延更迅速，範圍更廣闊，未來疫情也可能更加劇。預測未來全世界對金銀花與川芎等具治療心血管疾病、抗菌、抗病毒類中藥材之需求，將更為殷切。於台灣建立這些藥材 GAP 栽培模式，生產品質穩定均一的優良藥材，應為當務之急。中藥材金銀花與川芎 GAP 模式之建立、成分分析及多元化利用等研究對於台灣中藥產業之發展，具有指標性與建設性的意義與價值。

## 二、金銀花與川芎有機栽培及優良農業操作模式之建立

有機農法(Organic farming)不允許施用任何化學肥料及農藥，以乾淨、無污染的方式生產乾淨品質優良的農產品，對消費者的健康與生態環境保育具有正面意義。「GAP」為Good Agriculture Practice之縮寫，意思是優良農業操作。優良農業操作是為確保農產品的質量，以最合乎自然的耕作生產條件來種植農作物，減少因農業帶來對自然生態的傷害，能適時適地適

種，合理使用農業資材（包括肥料及農藥..等），並完整記錄生產履歷及嚴格遵守相關規範（包括生態環境、種源、土壤、水、作物栽培過程、採收、加工、包裝、儲藏、運輸..等規範），依此原則生產的農業生產過程，即為GAP。有機農業與GAP之差異為有機農業強調完全不施用任何合成化學物質，而GAP則可以合理適當使用農業資材（包括肥料及農藥等），但共同目標皆為保護自然生態，生產自然、健康、安全、衛生的農產品。因此，以有機農法及優良農業操作規範應用於建立中草藥栽培模式，以生產健康自然、質量均一、安全之中草藥，應為未來台灣中草藥產業發展重要生產研究方向。

臺灣地處亞熱帶與熱帶氣候的交會處，三千公尺以上的山峰百座，由於特殊的地理位置與地形影響，植物種類相當豐富。但是國人所需的中草藥材九成來自中國，價格與品質無法保持穩定，嚴重影響醫療效果。為保證醫療效果以及管制品質，必須從中草藥的種植開始，也就是建立中草藥的優良農業操作（Good Agriculture Practice；GAP）生產規範。篩選優良基原植物，探討影響生產潛力及品質的關鍵條件，如土壤的理化及生物特性、施肥種類及田間管理技術等，開發一系列應用於中草藥之栽培技術，期望在短時間內生產大量高品質及高有效成分的藥草原料，同時阻絕重金屬、化學肥料及農藥殘留的污染。

明道大學有機農場積極研究中草藥有機栽培與優良農業操作模式之建立。明道大學有機農場位於彰化溪州鄉，佔地 12 公頃，多年來均施行有機栽培的田間操作方法，不施用任何化學農藥與化學肥料。生產的作物種類繁多，包括有機稻米、有機香蕉、紅龍果、以及有機蔬菜等，為完全使用有機栽培的農場，近年來並成功栽植有機板藍根、大青葉、有機薑黃、有機紫蘇..等藥材。未來擬繼續以本場做為台灣地區中草藥有機栽培及 GAP 栽培示範農場，提供從事中草藥栽培工作者建立有機農法模式，熟悉有機操作技術，生產健康無污染之中草藥原料。

### 三、金銀花與川芎之引種與繁殖

引種(Introduction)由其他國家或地區引入育種材料。目的在樹立新作物之栽培事業，改良品系與充實育種材料。引種先須由地方品系著手，並考慮氣候之相似性（盧，1961）。評估為種源保育與利用的前提，評估步驟包括：1.種子繁殖與初步評估。2.系統化的農藝型態特性調查。3.利用大規模篩選選拔性狀。4.精密測試（張，1997）。評估工作必須符合作物改良目標，需評估項目包括：外觀性狀、抗病蟲性、品質性狀、對環境之抗逆性

與適應性...等（蕭，1995）。經過一系列試驗選留下來的材料才能推廣利用。

本研究目前共蒐集有3種金銀花、5個金銀花收集系與1種川芎，以進行有機栽培、基原鑑定、繁殖與相關性狀之評估與調查，並進一步進行GAP栽培試驗與指標成分分析，以期選育出適合臺灣栽培之金銀花與川芎品系並建立其優良農業操作規範與模式。

## 貳、材料與方法

### 一、金銀花與川芎材料種原蒐集及基原鑑定

蒐集金銀花與川芎基原材料，進行植物性狀調查與鑑別，並進行有機栽培試驗研究。臺灣地區市場所售金銀花與川芎藥材以中國生產之金銀花與川芎為主。本年度已蒐集材料有 3 種金銀花、5 個金銀花收集系與 1 種川芎之藥用薑黃種原材料，分別於明道大學校區及名間八卦山台地(海拔 400 公尺)進行栽培試驗(附件 1)。蒐集採料來源分別為：

#### (一)金銀花材料：

已蒐集 3 種忍冬品種，分別為 1. 忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.、2. 追分忍冬(玉山忍冬)*Lonicera oiwakensis* Hayata.、3. 阿里山忍冬 *Lonicera acuminata* Wall.，及 6 個忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 族群，分別為 1. 忍冬-台中、2. 忍冬-霧峰、3. 忍冬-名間、4. 忍冬-日月潭、5. 忍冬-埔里、6. 忍冬-田尾。忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 經由植物組織切片與 TLC 鑑定為金銀花正品基原(金銀花 TLC 鑑定方法係根據台灣中藥典方法)。

#### (二)川芎材料：

由中國四川等引種 1 個川芎種原。

#### (三)金銀花與川芎基原鑑定

植物組織石蠟切片法(蔡，1975。)

(忍冬植物組織鑑定係委託財團法人台灣必安研究所進行鑑定)

##### 1. 固定 Fixation

F.A.A. 固定液：Formalin：Acetic acid：70%EtOH= 5 mL：5 mL：90 mL。

##### 2. 脫氣

放入材料後立即以真空脫機進行脫氣，脫氣效果佳者，約 0.5-1 小時；脫氣效果不佳時，可將時間延長至 3-4 小時，原則上是氣泡不再產生，材料由浮起變下沈，此時即可取出。注意脫氣時瓶蓋不可關緊，是鬆開而不是打開；脫氣時壓力約維持在 65-70bar 左右。

##### 3. 脫水 Dehydration

由材料置入固定液起，固定 12-24 小時後進行脫水。若無法立即脫水，則可將固定液置換為 70%酒精暫時保持。注意固

定時間不可太長，易使材料變硬，切片時不易進行。脫水之前先利用 50%酒精洗滌三次，每次間隔十分鐘。

脫水步驟：(共六步驟，可每隔兩小時更換下一步驟，或一天更換一個步驟)

TBA(t-butyl-alcohol)系列脫水

第一步驟：TBA：95%EtOH：disH<sub>2</sub>O =10：40：50 mL

第二步驟：TBA：95%EtOH：disH<sub>2</sub>O =20：50：30 mL

第三步驟：TBA：95%EtOH：disH<sub>2</sub>O =35：50：15 mL

第四步驟：TBA：95%EtOH：disH<sub>2</sub>O =55：45：0 mL

第五步驟：TBA：100%EtOH：disH<sub>2</sub>O =75：25(無水酒精)：0

第六步驟：TBA：100%EtOH：disH<sub>2</sub>O =100：0：0

☆ 進行最後一個步驟時，TBA 的量以能蓋過材料為原則，其量不可太多，以利滲蠟後能揮發完全。

☆ TBA 藥品於夏天常為液體應用方便，但於冬天溫度過低時會結晶，使用須注意，可加溫使其溶解再使用。

#### 4. 滲蠟

脫水第六步驟完成後，放置 12-24 小時，之後進行滲蠟。將固定瓶內之標籤、材料和 TBA 溶液一起倒入滲蠟瓶。將濾紙剪長方形條狀，其上放入 2-3 塊小蠟塊(舊蠟)，和軟木塞一起塞入滲蠟瓶口，注意濾紙不可露出滲蠟瓶口，然後置入烘箱(溫度設定約攝氏 60 度左右)，每隔二小時加一次小蠟塊，或一天加一次小蠟塊，共加六次，於最後一次加入時，於兩小時後將軟木塞及濾紙橋取出，脫水最後一個步驟使 TBA 揮發，置於烘箱隔夜至無 TBA 味道，即可進行埋蠟工作。

#### 5. 埋蠟

於烘箱中取出滲蠟瓶，並立即將材料從熱蠟中取出，置入已加熱且有熱蠟之埋蠟盒中，當蠟略凝固後，置於冰塊上，使其加速凝固，但不可太早置於冰塊上，以防裂縫產生。待凝固後從埋蠟盒中取出，供切片用。

#### 6. 切片

已埋蠟之材料視欲觀察目的修成適當角度之小蠟塊，固定於木塊上，利用轉動式切片機(rotary microtome)切成厚度為 8-10 mm 之連續蠟帶。

## 7. 製片

取放置於 70%酒精之玻片，以面紙拭境，滴一滴黏著劑(1%gelatin)，塗抹於整個玻片，再加上數滴 3%福馬林，取出連續蠟帶，整齊排列於其上，在置於加熱器上(加熱器之溫度設定攝氏 35-45 度，和 3%福馬林一起使用，以利連續拉帶拉平，溫度不可太高—60 度以上，以防蠟溶解)。過夜或待藥品乾後再進行染色，若未乾即進行染色或 3%福馬林太多均會使材料於染色過程中脫落。

## 8. 染色

可單獨以 Safranin O 染色，但常用為 Delafields hematoxylin and Safranin O 或 fast green and Safranin O 雙重染色。

- (1) 二甲苯溶蠟\*(溶兩次)————各 10mins
- (2) 二甲苯：無水酒精————3mins
- (3) 無水酒精————3mins
- (4) 95% ETOH————3mins
- (5) 85% ETOH————3mins
- (6) 70% ETOH————3mins
- (7) 50% ETOH————3mins
- (8) 0.5% Safranin O————over night
- (9) 水洗
- (10) Delafield's hematoxylin————40-120sec(test)
- (11) 水洗
- (12) 50% ETOH————3mins
- (13) 70% ETOH————3mins
- (14) 85% ETOH————3mins
- (15) 95% ETOH————3mins
- (16) 1% Fast Green————40-120sec(test)
- (17) 以 95%-100% ETOH 脫水

## 9. 封片

於染色最後一個步驟完成後，一片一片以封片劑 (euparal) 封片，未封之片子仍於染色最後一個步驟之溶液，勿一次取出於抽氣櫃下，時間長易使材料脫水，反之可使染色保持鮮豔。再置入 40°C 下烘乾。

## 10. 光學顯微鏡下觀察，拍照及記錄

### \* 黏著劑 (1%gerlite) 之配製：

向 Sigma 公司購買 gerlite 藥品，以水加熱溶解，之後於抽風櫃內加入一滴 phenol，取少量供使用，其餘置入冷凍庫中保存，必要時再加熱溶解供使用之。此藥品配製後於夏天高溫下為液體，冬天低溫下則凝固，使用時，需加熱至 35-40℃使之溶解，方可使用。

### \* 染劑配製

Delafield's hematoxylin：直接向廠商購買 0.5%Safranin O：向 Sigma 公司購買暗紅色之粉狀藥品，以 50%酒精配成 0.5% Safranin O，過濾，放置 1-2 天，使其略氧化再使用。材料被染上後，可於酒精中退染，酒精濃度愈高，退染效果愈好。1%Fast Green：整個過程需在抽氣櫃內進行。向 Sigma 公司購買暗紅色之粉狀藥品，以燒杯裝 xylene:100% ETOH =1:1 為溶劑，溶解 Fast Green，攪拌之，燒杯上用 parafilm 封兩層，蓋上培養皿壓住，再蓋上塑膠袋，用橡皮筋封住，至少攪拌一個晚上至 24 小時，一邊過濾一邊攪拌，待過濾完後，即可使用。攪拌過程會部分揮發，故配製用量需較使用量多，一旦配製後需快速使用，否則易揮發而乾掉。

Gelatin (切片時黏貼蠟片) 配製法：

- (1) 定量 100mL 水 (二次水)
- (2) 稱取 1g Gelatin
- (3) Gelatin1 g 加入 100 mL 水中
- (4) 一邊以磁石攪拌並加熱，以溫度計測量溫度維持其溫度在 30-40℃之間，約半小時 (30-40mins) (Gelatin 需於微加熱下可溶解)
- (5) 加入 1-2 滴 phenol
- (6) 少許倒入使用之瓶中，餘冰入冰箱中 (0℃貯藏)
- (7) PS. Phenol (有毒)，千萬不可接觸至皮膚，會使 DNA 死亡而呈現褐斑。室溫下結晶之 Phenol 隔水加熱並攪拌(均勻)至完全溶解取 1-2 滴加入 (5) 使步驟所有過程需於 hood 中進行。PS.於 0℃貯藏後 (凝膠狀)，使用前，先使其回溫，故於回溫後再加熱至 30-40℃溶解後再使用。

薄層層析法 (TLC) (參考:台灣中藥典, 薄層層析鑑定條件)

1. 金銀花檢液之調製: 精稱金銀花樣品粉末0.5g, 置入25 mL樣品瓶中, 加入5 mL 70% 甲醇, 超音波震盪30分鐘, 過濾, 濃縮至1 mL, 取濾液作為檢品溶液。另取金銀花對照藥材0.5g, 同法製成對照藥材溶液。
2. 薄層層析條件:
  - (1)層析板: Silics gel 60 F<sub>254</sub>
  - (2)展開溶媒: 金銀花—乙酸丁酯: 甲酸: 水 (7:2.5:2.5)
  - (3)點注量: 各10 $\mu$ l
  - (4)展開距離: 10cm
  - (5)檢出方法: 溶媒頂端上升至距原點約5~10cm於U.V.366nm下檢視。

## 二、金銀花生育習性調查與種原繁殖

### (一)金銀花健康種苗繁殖技術研究

#### 不同介質對金銀花無性繁殖之影響

2013年8月15日將忍冬以紅壤、紅壤混稻殼(1:1)、紅壤混椰纖(1:1)、椰纖粉、泥碳土混稻殼(1:1)、紅土混泥碳土(1:1)、泥碳土混椰纖粉(1:1)、椰纖粉混稻殼(1:1)、泥炭土等共9種介質進行扦插繁殖, 比較不同栽培介質對忍冬扦插繁殖之影響。試驗區採逢機完全區集設計(RCBD), 每處理3重複, 每重複24盆(2.5吋盆)試驗。所有盆栽放置於塑膠網室, 內遮兩層黑色遮陰網(70%+80%百吉網), 每天時自動噴水2次, 每次噴水時間為25秒鐘。於扦插試驗30與60天後進行調查。調查項目包括株高、根長及成活率...等。

### (二)金銀花生育習性調查與品系評估

#### 金銀花基原生育習性調查與品系評估

將蒐集到的金銀花進行種原、馴化與品系評估, 並將金銀花種苗移植到田間進行生育習性調查。將所蒐集的金銀花與川芎種原移至田間定植, 藉以篩選評估高產量與高有效成分之品系。試驗材料為所蒐集之金銀花植物種原, 以育成種苗定植至田間進行試驗, 兩週後進行疏苗、補植與調查。金銀花行株距為60\*60cm, 每畦66株。畦之長寬高為20m\*2.1m\*0.6m。田間有蝸牛、白粉蝶、夜盜蛾幼蟲與雞母蟲危害情形, 分別以苦茶粕、蘇力菌與蓖麻粕

防制。試驗區採逢機完全區集設計，每品系為 3 重複區集。以牛糞有機肥作基肥與追肥，有機肥施用量為 6,000 Kg/ha。調查內容包括株高、葉長、葉寬、莖徑...等，並分析其其指標成分含量。牛糞堆肥係採用：農委會國產有機質肥料推薦品牌-田樂牌田樂 1 號高級有機質肥料（25 Kg/包，粉狀肥，品目: 5-09 禽畜糞堆肥，全氮：2.3%、全磷酐：2.7%、全氧化鉀：2.0%、有機質：68.7%）

### 三、金銀花有機栽培試驗

#### (一) 金銀花之有機肥料施用量試驗

金銀花以不同有機肥料施用量進行試驗，評估有機肥料對金銀花與忍冬藤產量及成分之影響。有機肥料處理為 4 個有機肥施用量，分別為 2,000 Kg/ha (O2)、4,000 Kg/ha (O4)、6,000 Kg/ha (O6)、8,000 Kg/ha (O8)，對照組為化學肥處理 (CK)，每處理 3 重複。金銀花行株距為 60\*60cm，產量以單位面積產量 (Kg/m<sup>2</sup>) 進行計算。調查內容包括株高、分枝數、葉長、葉寬、莖徑、銀花鮮重、銀花乾重、銀花鮮重產量、銀花乾重產量..等，並分析其其指標成分含量。

#### (二) 不同採收期對金銀花產量與成分之影響

將健康金銀花種苗移至田間定植，評估不同採收期對金銀花產量與成分含量之影響。試驗材料為所蒐集之金銀花植物種原，以種苗定植至田間進行試驗，兩週後進行疏苗、補植。行株距：30\*20cm，每畦 30 株。畦之長寬高為 7m\*1m\*0.3m。畦面覆蓋 5 尺寬銀黑色塑膠布，畦溝覆蓋花生穀粉以抑制雜草。試驗區採逢機完全區集設計，每處理為 3 重複區集。以牛糞有機肥作基肥與追肥，有機肥施用量為 6000 Kg/ha。

#### (三) 乾燥方法與溫度對金銀花與川芎之成分影響

採收台灣產金銀花與川芎，以不同加工方法進行處理，評估不同加工法對金銀花與川芎產量與成分含量之影響。試驗材料為所蒐集之金銀花與川芎植物種原，以種苗與塊莖定植至田間進行試驗，兩週後進行疏苗、補植。行株距：60\*60cm，每畦 66 株。畦之長寬高為 20m\*2.1m\*0.3m。畦面覆蓋 5 尺寬銀黑色塑膠布，畦溝覆蓋花生穀粉以抑制雜草。試驗區採逢機完全區集設計，每處理為 3 重複區集。以牛糞有機肥作基肥與追肥，有機肥施用量

為 6000 Kg/ha。建立金銀花與川芎 GAP 田間田間操作應注意事項與規範。

#### 四、金銀花成分分析

(金銀花成分分析係委託財團法人台灣必安研究所(TAF實驗室)進行分析)

##### (一) 試藥與試劑

1. 綠原酸 (Chlorogenic acid) :
2. 藥用酒精 (ethanol) : 台灣菸酒公賣局
3. 甲醇溶液 (methanol) : TEDIA Co. (Fairfield, Ohio, USA)

##### (二) 實驗儀器設備及裝置材料

1. 超音波震盪器 : Sonorex supper PK 225H (Bandelin, Switzerland)
2. 震盪器 : Thermolyene 376000 (Mixer, USA)
3. 微量天秤 : AP 210S (OHAUS, Switzerland)
4. 高效液相層析儀 (HPLC) :
  - (1) 溶媒輸送系統:Waters 600 controller Pump(Waters, USA)
  - (2) 檢測器 : Waters 2996 PDA (Waters, USA)
  - (3) 檢品注射器 : 20  $\mu$ l ; 717plus Autosampler (Waters, USA)
  - (4) 層析管柱 : Cosmosil 5C18-MS-II (5 mm, 4.6  $\times$  250 mm, Nacalai tesque, Tokyo, Japan)
5. 微孔徑過濾膜 : 0.45  $\mu$ m HV, Durapore Membrane Filters (Millipore, Ireland)

##### (三) 高效液相層析法之分析條件

1. 層析管柱 : Cosmosil 5C18-MS-II (5 mm, 4.6  $\times$  250 mm, Nacalai tesque, Tokyo, Japan)
2. 檢測波長 : 330 nm
3. 移動相流速 : 0.1 mL/min
4. 移動相(mobile phase) : 甲醇 : 水 : 甲酸=40 : 60 : 1 , 最後再經 0.45  $\mu$ m微孔徑薄膜濾網來過濾雜質並驅趕氣泡。
5. 注入量 : 20  $\mu$ L

##### (四) 標準品檢量線製作

###### 綠原酸檢量線

將綠原酸標準品以 70%methanol 進行配製後，分別取標準品溶液 0.375 ug /mL、0.75 ug /mL、1.5 ug /mL、3.0 ug /mL 及 4.5 ug /mL，經 0.45  $\mu$ m 微孔徑薄膜過濾後，注入 HPLC 進行定量分析

後，以其波峰面積（Y 軸）及其所對應濃度（X 軸）做圖，由線性回歸分析可求得檢量線之回歸方程式（ $y = ax + b$ ）及決定係數（ $R^2$ ）。

#### (五) 樣品萃取

金銀花 HPLC 樣品萃取：取 2.0g 樣品，在 50°C 恆溫乾燥 30 分鐘，研碎，過 40 目篩，在 50°C 恆溫下烘烤 90 分鐘，精確秤取 1.0g，加入 10mL 70% 甲醇，浸泡 10 小時，再以超音波震盪 30 分鐘後，濾去殘渣，取此抽提液定容，作為檢品溶液，分析前再以 0.45um 濾膜過濾。將已製備完成之金銀花檢品濾液 20  $\mu$ L 重複注射 3 次，依所得線性迴歸方程式推算各金銀花樣品之綠原酸含量。

#### 五、台灣產金銀花之生藥檢驗、微生物、重金屬及農藥殘留分析

台灣產金銀花之生藥檢驗、微生物、重金屬及農藥殘留分析（生藥檢驗、微生物、重金屬及農藥殘留分析係委託台灣檢驗科技股份有限公司(SGS)進行檢測）

#### 六、金銀花有機栽培及優良農業操作模式

(一) 金銀花有機栽培標準作業程序（SOP）。

(二) 金銀花有機和 GAP 栽培模式。

(三) 試驗區已完成土壤、灌溉用水水質及有機肥料重金屬之檢測，皆符合有機農業法規之土壤、灌溉用水水質及有機肥料重金屬標準。

#### 七、統計分析

將金銀花試驗所得資料經 SAS 9.2 版軟體（SAS Institute, 2008）進行 LSD 分析，比較各處理間的差異(differences)，其中  $P < 0.05$  表示在統計上有顯著差異。

## 參、結果

### 一、忍冬不同品種與族群之種原蒐集與生育習性調查

#### (一)忍冬不同品種之型態與生育習性調查

《台灣中藥典，第一版與第二版》均收載的金銀花藥材基源，分別為忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. (圖 1. a)、紅腺忍冬 *Lonicera hypoleuca* Miq. (圖 1. b)、山銀花 *Lonicera confusa* DC. (圖 1. c) 與毛花柱忍冬 (又稱水忍冬) *Lonicera dasystyla* Rehd. (圖 1. d)。而《中國藥典，2010 版》僅收載之忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的乾燥花蕾或帶初開的花為金銀花正品基原。並另外收載山銀花藥材基原為灰氈毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz. (金翠蕾) (圖 1. e)、紅腺忍冬 *Lonicera hypoleuca* Miq.、華南忍冬 *Lonicera confusa* DC. (圖 1. f) 或黃褐毛忍冬 *Lonicera fulvotomentosa* Hsu et S. C. CHENG。

《台灣中藥典，第二版》與《中國藥典，2010 版》均收載的忍冬藤的藥材基源，僅忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的乾燥莖枝 1 種。而紅腺忍冬、山銀花與毛花柱忍冬或灰氈毛忍冬 (金翠蕾)、華南忍冬、黃褐毛忍冬的乾燥莖枝並不能作為忍冬藤藥材使用。

根據《中國藥典，2010 版》資料顯示，金銀花與忍冬藤的正品基原為忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.，山銀花則為藥材名，係指灰氈毛忍冬(金翠蕾)、紅腺忍冬、華南忍冬或黃褐毛忍冬的乾燥花蕾或帶初開的花。而《台灣中藥典》收載的紅腺忍冬、山銀花與毛花柱忍冬 (又稱水忍冬) 係為山銀花藥材來源。

本研究努力透過多方管道，希望由中國引種《台灣中藥典》所收載的忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.、紅腺忍冬 *Lonicera hypoleuca* Miq.、山銀花 *Lonicera confusa* DC. 與毛花柱忍冬 (又稱水忍冬) *Lonicera dasystyla* Rehd.，但相關忍冬種原之無菌組培材料，因中國研究單位不願提供而無法取得。本研究另外嘗試申請引種相關忍冬種苗，但均因土壤問題遭到行政院農業委員會動植物防疫檢疫局駁回申請。而根據上述資料顯示，金銀花正品基原應為忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.，而《台灣中藥典》所收載的紅腺忍冬、山銀花與毛花柱忍冬 (又稱水忍冬) 或《中國藥典，2010 版》所收載的灰氈毛忍冬 (金翠蕾)、華南忍冬與黃褐毛忍冬

均為山銀花，而非金銀花藥材基原。因此本研究蒐集台灣現有忍冬品種與品系材料，並希望由目前台灣現有忍冬種原中篩選出適合台灣生產栽培之忍冬族群。本研究共蒐集有 3 種忍冬品種材料，分別為：

### 1. 忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.

忍冬為忍冬科 (Caprifoliaceae) 忍冬屬 (*Lonicera*) 多年生常綠纏繞性木質藤本植物。忍冬於台灣中低海拔及平地相當常見，葉單生，對生，有短葉柄，橢圓形、卵形至橢圓狀卵形，長 5~8 cm，寬 2.5~3.5 cm，先端銳尖或鈍或圓，基部圓或近似心形，紙質或薄革質，全緣或略呈波狀緣，表面有光澤略帶茸毛，背面密生茸毛，尤其在葉脈部分，中肋於表裏兩面均隆起，側脈每邊 4~5 枚，小脈網狀，不十分明顯，葉柄長 0.5~0.7 cm，有粗毛 (圖 2. a)。莖可長達數公尺，嫩莖有毛，老莖表皮粗糙，成棕灰色。花成對生長，子房相連，花瓣先是白色 (圖 1. b)，開花後隔天逐漸轉變為黃色 (圖 1. c)，長 1.5~3.5 cm，直徑 1~1.5 cm，腋生，花梗較短，兩花共一花梗，長 0.45~0.65 cm，有茸毛；苞片 2 枚，對生，卵形或卵狀橢圓形，長 0.7~0.8 cm，寬 0.4~0.6 cm，先端鈍或銳尖，邊緣有茸毛；花萼小，花萼筒呈卵形，5 裂，裂片三角形，長 0.2~0.3 cm，先端銳尖，有茸毛；花冠有細長的花冠筒，外面有毛且有腺體，筒長 2~2.5 cm，瓣片 2 唇裂，長 1~1.5 cm，上唇有短裂片 4 枚；雄蕊 5 枚，着生於花冠外，長 3.5~4.5 cm，柱頭頭狀。果實為漿果，球形，初為青綠色，成熟時為黑色，直徑 0.5~0.8 cm (圖 2. d)；種子少數，扁卵形，褐色，直徑 0.3~0.4 cm。春夏秋開花，花初開為白色，後轉為黃色，隨著時間的增加會逐漸變黃，因有白色與黃色混雜其間故稱金銀花，採其花蕾曬乾，就是中藥材的金銀花，俗稱忍冬花。中國南北各地均有分佈。夏初當花蕾含苞未放時採摘，晾曬或陰乾，生用或炒用。

### 2. 追分忍冬 *Lonicera oiwakensis* Hayata.

追分忍冬，別名玉山忍冬、玉山金銀花，為忍冬科忍冬屬多年生常綠纏繞性木質藤本植物。主要生長分布於台灣北部及中部中海拔約 1,800~2,300 m 的山地，叢林或路旁。落葉灌木或小喬木，樹高可達 5m，分枝有稜角，小枝條直立或斜上昇，有

粗毛（圖 3. a）。單葉，對生，橢圓形或橢圓狀長橢圓形，長 2.5~3 cm，寬 1.5~1.8 cm，先端鈍而凹頭，基部圓或鈍，革質，全緣而有茸毛，表裏兩面均有茸毛，中肋及側脈於表面凹下而於背面隆起，小脈呈網狀，略於表面凹下而於背面隆起；葉柄長 0.2~0.3 cm，有粗毛，表面有溝紋（圖 3. b）。花白色，有時帶有粉紅色暈，成對生長，開放時徑約 1~1.2 cm，花柄單生，腋生，細長，長 1~1.2 cm，有茸毛；苞片對生，線形或線狀鐮刀形，長 0.7~0.8 cm，寬約 0.1 cm，先端漸尖，表面有剛毛，背面沿著中肋處有粗毛；花萼綠色，花萼筒倒圓錐狀圓柱形，長 0.2~0.25 cm，徑 0.15 cm，光滑，先端 5 尺裂，齒不明顯，圓形，邊緣有毛；花冠 2 唇裂，筒長 0.7~0.8 cm，寬約 0.2 cm，基部歪，有茸毛；上唇長 0.7~0.8 cm，寬亦同，光滑，反捲，先端 4 裂；下唇線狀長橢圓形，長 0.8~0.85 cm，寬 0.4 cm，先端鈍，雄蕊 5 枚，伸出於花冠外，花絲長 0.6~0.65 cm，近似光滑，花藥長橢圓狀線形，長約 0.25 cm，花柱白色，長 1~1.2 cm，先端略呈頭狀，柱頭綠色；子房下位，3 室，每室有胚珠 4~5 枚（圖 3. c）。果實為漿果，球形，直徑約 0.4~0.5 cm。

### 3. 阿里山忍冬 *Lonicera acuminata* Wall.

阿里山忍冬，別名高山忍冬、阿里山金銀花、銳葉忍冬、漸尖葉忍冬、淡紅忍冬、石山金銀花，為忍冬科忍冬屬多年生常綠纏繞性木質藤本植物。主要生長分布於台灣全島海拔高約 2,000~3,400m 的山地，草生地或森林邊緣，極為常見。半落葉或落葉木質藤本，莖具纏繞性，具有多數分枝，小枝條上常具有粗毛，有時亦呈光滑無毛狀（圖 4. a）。幼嫩心葉被柔毛，成長後漸脫去，葉對生，柄長 0.7~1.1 cm，葉片長卵形或披針狀長橢圓形，長 4.5~9 cm，寬 2~3 cm，基部鈍形或近圓形，先端漸尖，全緣，葉脈明顯，被毛（圖 4. b）。花腋生，梗長 1~2.5 cm，花成對生；萼壺狀鐘形，5 裂，裂片三角狀卵形；花筒長 1.4~1.6 cm，外被腺毛，花蕾期成淡紫色或帶紫色斑點，開白色花而帶紫暈，漸變為金黃色，先端 2 唇裂，上唇 4 唇裂，兩側之裂片稍大，中間者略小，內部具茸毛；雄蕊 5 枚，略伸出花冠外；雌蕊 1 枚，稍比雄蕊長，花柱及柱頭被長毛（圖 4. c）。漿果球形，熟時呈紫黑色。花期 6~8 月，果期 8~10 月。

根據《台灣中藥典》與《中國藥典，2010 版》資料顯示，金銀花與忍冬藤的正品基原為忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.，而追分忍冬與阿里山忍冬雖然同樣是忍冬屬植物，相關性狀也有部分雷同，但並不能作為中藥使用。

## (二) 忍冬不同族群之型態與生育習性調查

植物生長在不同的時間與空間中，遭受到自然環境不同的壓力，為適應這些多變的壓力，各地區族群間的外表性狀常呈顯著差異。植物族群也常因基因突變、遺傳的漂流(genetic drift)、繁殖的方式、地理隔離、自然淘汰等因素而產生遺傳變異，因而形成不同的生態型，並使其差異的性狀在後代族群中表現。根據《中國藥典，2010 版》的資料顯示，金銀花正品基原應僅有忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 一種，其餘係屬於山銀花。而不同地區的忍冬可能會因環境的差異有不同的變異。因此本研究蒐集 6 個忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 族群，分別為 1. 忍冬-台中、2. 忍冬-霧峰、3. 忍冬-名間、4. 忍冬-日月潭、5. 忍冬-埔里、6. 忍冬-田尾 (圖 5.)。

初步調查，忍冬各族群植物性狀為：葉單生，對生，有短葉柄，橢圓形、卵形至橢圓狀卵形，長 5~8 cm，寬 2.5~3.5 cm，先端銳尖或鈍或圓，基部圓或近似心形，紙質或薄革質，全緣或略呈波狀緣，表面有光澤略帶茸毛，背面密生茸毛，尤其在葉脈部分，中肋於表裏兩面均隆起，側脈每邊 4~5 枚，小脈網狀，不十分明顯，葉柄長 0.5~0.7 cm，有粗毛。莖可長達數公尺，嫩莖有毛呈綠色或紅色，老莖表皮粗糙，成棕灰色。花成對生長，子房相連，花瓣先是白色，開花後隔天逐漸轉變為黃色，長 1.5~3.5 cm，直徑 1~1.5 cm，腋生，花梗較短，兩花共一花梗，長 0.45~0.65 cm，有茸毛；苞片 2 枚，對生，卵形或卵狀橢圓形，長 0.7~0.8 cm，寬 0.4~0.6 cm，先端鈍或銳尖，邊緣有茸毛；花萼小，花萼筒呈卵形，5 裂，裂片三角形，長 0.2~0.3 cm，先端銳尖，有茸毛；花冠有細長的花冠筒，外面有毛且有腺體，筒長 2~2.5 cm，瓣片 2 唇裂，長 1~1.5 cm，上唇有短裂片 4 枚；雄蕊 5 枚，着生於花冠外，長 3.5~4.5 cm，柱頭頭狀。目前已將 6 個不同地區收集之族群移植至明道大學溫室中種植，以剔除環境的影響。下年度計畫將針對各族群性狀進行詳細的調查其株高、葉長、葉寬、葉柄長、

節間數、莖葉乾物重及花乾物重等性狀，進行 6 個族群所調查 7 種性狀平均值向量間之多重比較。

## 二、金銀花之基原鑑定

目前已蒐集 3 種忍冬品種，分別為 1. 忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.、2. 追分忍冬(玉山忍冬) *Lonicera oiwakensis* Hayata.、3. 阿里山忍冬 *Lonicera acuminata* Wall.，及 6 個忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 族群，分別為 1. 忍冬-台中、2. 忍冬-霧峰、3. 忍冬-名間、4. 忍冬-日月潭、5. 忍冬-埔里、6. 忍冬-田尾。本研究將忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 台中族群其花與莖葉材料進行組織切片。

### (一)金銀花

花蕾(圖 6. a) 表面的腺毛有兩種：一種頭部倒圓錐形，頂端平坦，側面觀 10~33 細胞，排成 2~4 層，直徑 48~108 $\mu\text{m}$ ，柄部 1~5 細胞，長 70~700 $\mu\text{m}$ ；另一種頭部類圓形或略扁圓形，4~20 細胞，直徑 30~64 $\mu\text{m}$ ，柄 2~4 細胞，長 24~80 $\mu\text{m}$ 。厚壁非腺毛單細胞，長 45~900 $\mu\text{m}$ ，直徑 14~37 $\mu\text{m}$ ，壁厚 5~10 $\mu\text{m}$ ，表面有微細疣狀或泡狀突起，有的具角質螺紋。薄壁非腺毛單細胞，甚長，彎曲或皺縮，表面有微細疣狀突起。草酸鈣簇晶直徑 6~45 $\mu\text{m}$ ，稜角細尖。花粉粒類圓形或圓三角形，具 3 孔溝，表面有細密短刺及細小顆粒狀雕紋(圖 6. b.c.)。

### (二)忍冬藤

莖橫切面表皮細胞 1 列，呈類方形(圖 6. d)。具單細胞非腺毛(圖 6. e. f.)，細胞壁厚。皮層細胞方形，充滿黃棕色物質，多因壓縮而頹廢。其下為 1~2 列皮層纖維，纖維明顯，壁稍厚，木化；纖維內側尚有數列皮層細胞，呈類方形至長橢圓形，徑 20~65 $\mu\text{m}$ ，或已形成木栓層，細胞多徑向延長，壁薄，常於此處環狀脫落。維管束為雙韌型。韌皮部細胞多擠壓頹廢，細胞內可見草酸鈣簇晶(圖 6. g. h.)。形成層成環狀排列。木質部發達，導管呈類圓形或類橢圓形，徑 10~40 $\mu\text{m}$ ，多單個存在，散列，導管以螺紋及孔紋導管為主(圖 6. i)，除導管外，餘幾乎全為木部纖維；木部髓線 1~2 列細胞，有紋孔。髓部廣大，細胞圓形，徑 10~50 $\mu\text{m}$ ，細胞壁略木化，中央呈空洞狀，內含澱粉粒。葉橫切面表皮為 1 層薄壁細胞(圖 6. j)。上下表皮細胞類方形或類長方形，但下表皮細胞較小，細胞界限較不明顯。上下表皮均被單細

胞非腺毛。葉肉柵狀細胞 1 列，未通過主脈；海綿細胞形狀不規則，細胞間隙大（圖 6. k）。上下表皮內側有厚角組織，柔細胞偶見草酸鈣簇晶。主脈維管束一個，雙韌型，呈新月形；木質部導管 8~10 列，每列 3~5 個（圖 6. 1）。

忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 經由植物組織切片鑑定為金銀花正品基原。

### 三、忍冬之健康種苗及無性繁殖技術

忍冬可以使用有性繁殖法繁殖健康種苗，但主要繁殖仍以無性繁殖為主，以保留母本優良特性，避免變異。

#### (一) 忍冬無性繁殖育苗技術

忍冬無性繁殖以半硬木插（成熟枝條帶成熟葉片）繁殖為主（圖 7. a），扦插後需以 75% 遮光網進行遮光 4 週（圖 7. b. c.），以避免失水。春秋季忍冬扦插繁殖 15-21 天即可發根，30-45 天移出噴霧床進行馴化，75-90 天約 30-45cm 高即可定植於田間（圖 7. d-f.）。

#### (二) 不同介質對忍冬無性繁殖之影響

2013 年 8 月 15 日將忍冬以紅壤(A)、紅壤混稻殼(B) (1:1)、紅壤混椰纖(C) (1:1)、椰纖粉(D) (1:1)、泥碳土混稻殼(E) (1:1)、紅土混泥碳土(F) (1:1)、泥碳土混椰纖粉(G) (1:1)、椰纖粉混稻殼(H) (1:1)、泥炭土(I) (1:1) 等共 9 種介質進行扦插繁殖，比較不同栽培介質對忍冬扦插繁殖之影響（圖 8. ）。結果顯示，介質對忍冬半硬木插扦插存活率有顯著差異，忍冬以紅土、椰纖混稻殼、泥炭土扦插存活率較高，分別為 90.3%、80.5%、80.5%，次之紅土混泥碳土、紅壤混椰纖、泥碳土混稻殼，以紅壤混稻殼存活率最差為 41.6% (表 2.)。由於扦插試驗仍在進行，相關忍冬材料仍陸續長根中，仍尚未萌芽，因此株高並無顯著差異。

### 四、金銀花有機栽培試驗

#### (一) 金銀花之有機肥料施用量試驗

金銀花以不同有機肥料施用量進行試驗，肥料處理分別為 2,000 Kg/ha (O2)、4,000 Kg/ha (O4)、6,000 Kg/ha (O6)、8,000 Kg/ha (O8)，對照組為化學肥處理 (CK)，評估有機肥料對金銀花與忍冬藤產量及成分之影響。目前試驗田已經完成相關種植與搭網作

業，下年度即可進行有機肥料施用量試驗，並評估出金銀花最適當之有機肥料施用量(圖 9)。

## (二) 不同採收期對金銀花產量與成分之影響

將健康金銀花種苗移至田間定植，評估不同採收期對金銀花產量與成分含量之影響。目前試驗田已經完成相關種植與搭網作業，下年度即可進行不同採收期對金銀花產量與成分試驗，並評估出金銀花最適當之採收期。

## (三) 不同乾燥溫度及方法對金銀花成分含量之影響

忍冬 GAP 試驗栽培田已經建置完成，下年度即可開始採摘金銀花進行不同乾燥溫度及方法試驗。試驗處理分別以日曬法(35℃)、室內蔭乾法(28℃)、低溫乾燥機烘乾法(溫度分別為50℃、60℃、70℃、80℃、90℃及100℃)，每處理4重複，每重複為2Kg新鮮金銀花蕾。測定其對金銀花內含物綠原酸含量之影響。

# 五、台灣金銀花有機栽培及優良農業操作模式草案

## (一) 概說

金銀花又名銀花、雙花、二花，為常用中藥材之一。於《台灣中藥典》與《中國藥典》均記載，本品為忍冬科(*Caprifoliaceae*)植物忍冬(*Lonicera japonica* Thunb.)之乾燥花蕾或帶初開花的花蕾。金銀花為名醫別錄草部上品，陶弘景謂處處有之，藤生凌冬不凋，故名忍冬。金銀花始稱於本草綱目，李時珍謂其花長瓣垂鬚，黃白相半，而藤左纏，故有金銀鴛鴦以下諸名。又謂忍冬莖葉與花功用皆同，為消腫散毒治瘡要藥。忍冬採花入藥稱為金銀花，採莖葉入藥稱為忍冬藤。金銀花味甘、性寒、入肺散熱解毒，用於治療癰腫疔瘡、喉痹、單毒、熱毒血痢、風熱感冒、溫病發熱等症，具有抗菌、消炎、抗病毒等功效。金銀花含綠原酸(chlorogenic acid)、異綠原酸(isochlorogenic acid)、白果醇(ginnol)、β-谷甾醇(β-sitosterol)、豆甾醇(stigmasterol)、芳樟醇(linalool)、棕櫚酸乙酯(ethylpalmitate)、咖啡酸(caffeic acid)、木犀草素 B(sapindoside B)等。金銀花主要有效成分為綠原酸，綠原酸具有抗癌、抗菌、抗病毒、抗潰瘍、抗過敏及保肝等作用，因此金銀花目前為 SARS、H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> 與禽流感等重要傳染疾病之治療中藥材。

## (二)植物特徵與生長習性

### 1. 植物特徵：

金銀花屬於常綠藤木，幼枝暗紅褐色，密被黃褐色、開展的硬直糙毛、腺毛及短柔毛，下部常無毛。葉如卵形至短圓狀卵形，有時呈卵形披針形，至少有 1 至數個鈍缺刻，長 4~9cm，頂端間或漸尖，少有鈍圓或微凹缺，基部圓或近心形，有糙緣毛，上面深綠色，下面淡綠色，小枝上部葉通常兩面均密被短糙毛，下部葉常平滑無毛多帶青灰色；葉柄長 4~8cm，密被短柔毛。總花梗通常單生於小枝上部葉腋，與葉柄等長或稍短，下方者則長達 2~4cm，密被短柔毛；苞片大，葉狀，卵形至橢圓形，長達 2~3cm，兩面均有短柔毛或有時近無毛；小苞片頂端圓形或截形，長約 1mm，有短糙毛和腺毛；萼筒長約 2mm，無毛，萼齒卵狀三角形或長三角形，頂端尖而有長毛，外面和邊緣都有密毛；花冠白色，有時基部向陽面成微紅，後變黃色，長 3~6cm，脣形，筒稍長於唇瓣，外被多少倒生的開展或半開展糙毛和長腺毛，上唇裂片頂端鈍形，下唇帶狀而反曲；雄蕊和花柱均高出花冠。果實圓形，直徑 6~7mm，熟時藍黑色，有光澤；種子卵圓形或橢圓形，褐色，長約 3mm，中部有一凸起的脊，兩側有淺的橫溝紋。花期 4~6 月(秋季亦常開花)，果熟期 10~11 月。

### 2. 生長習性：

金銀花植株根系發達，細根很多，生根力強，插枝和下垂觸地的枝，在適宜的溫濕度下，15 天即可生根，10 年生植株根冠分佈的直徑可達 300~500cm，根深 150~200cm，主要根系分佈在 10~15cm 深的表土層，鬚根則多在 5~30cm 的表土層中生長，根以 4 月上旬至 8 月下旬生長最快。光照不足會影響植株的光合作用，枝嫩細長，葉小，纏繞性更強，花蕾分化減少，並且花多著生在植株外圍陽光充足的枝條上。土壤濕度過大時，植株葉片易發黃脫落。

金銀花植株花芽的分化發育屬於多分枝先後多次分化花芽的類型，於 3 月初開始進入葉芽萌動期，3 月底為展葉期，5 月初為現蕾期，5 月中旬進入花期，通常年產花四次。5 月中下旬

產頭次花，6月下旬至7月中旬產二次花，7月下旬至8月下旬產三次花，9月中旬至10月初產四次花。

### (三)有機 GAP 栽培模式

#### 1. 栽培環境與地點選定

金銀花在中國自然分佈區域很廣，北起中國之遼寧、吉林、西至陝西、甘肅、南達湖南、江西，西南至雲南、貴州，在北緯 $22^{\circ}$ ~ $43^{\circ}$ 、東經 $98^{\circ}$ ~ $130^{\circ}$ 之間到處均有分佈。在此範圍內，又以中國山東、河南兩省的低山丘陵、平原灘地、沿海淤沙輕鹽地帶分佈較廣而集中，尤其是山東南部的沂蒙山區為金銀花的適生自然環境，也是進行金銀花規範化種植的重要栽培基地。紅腺忍冬的分佈範圍處於北緯 $22^{\circ}$ ~ $32^{\circ}$ 、東經 $104^{\circ}$ ~ $122^{\circ}$ ，主要是安徽南部、湖北東南部、浙江、江西大部至湖南西南部以及廣東北部、廣西、貴州、雲南西北部至南部以及四川東部和西南部。在金銀花的上述4種原植物中，以忍冬的藥用價值最高、質量最好、產量最大，其栽培歷史至少已長達200餘年為目前的主要栽培種。

金銀花對環境的適應性較強，對土壤與氣候的選擇性不強。具有喜光、耐陽，耐旱、耐寒性較強，喜肥沃質壤土等特性。喜溫暖濕潤、日照充足的溫帶大陸性氣候區和亞熱帶海洋性氣候，生長適溫為 $20\sim 30^{\circ}\text{C}$ ，一年四季只要有一定的濕度，一般氣溫不低於 $5^{\circ}\text{C}$ ，便可發芽、生長。因此台灣氣候地理環境極適合金銀花枝栽培與生產，雖然金銀花在中國栽培歷史悠久，但由於用量及技術水準等方面的限制，在20世紀80年代之前期栽培管理比較粗放，產量很低。直至80年代開始，才相繼對其生物學特性、修剪技術、採收適期、病蟲害防治、加工乾燥、規模化種植等內容進行了系統研究、金銀花的產量與質量均有了較大幅度的提高。

#### 2. 種源繁殖：

繁殖方式有播種、扦插、分株、壓條等，在實際生產中多採用扦插。

(1)種子繁殖：在果實成熟呈黑色時即時採摘，置清水中搓揉，漂去果皮及雜質，撈出沉底的飽滿的種子，晾乾儲藏備用，亦可隨採隨播。若行春播時，須在播前2個月將種子用溫水

浸泡 24h 後，撈出與 3 倍量濕沙層積催芽，當種子大部分裂口時即可播種。在整好的畦面上按行距 30cm 開橫溝，加強管理，在苗高 20cm 時摘心，以促進分枝。一般第 2 年即可移栽定植。每公頃用種 1.5~2.2Kg。

(2) 扦插繁殖：

① 扦插時間：春、夏、秋三季均可進行，由於夏季氣溫較高，蒸散作用強烈，扦插後的小苗容易發黴腐爛，成活率較低，所以各地多在春、秋季進行扦插，山東多在 8 月上中旬進行。具體扦插時宜選擇雨後陰天進行，因此此時氣溫適宜，空氣、土壤濕潤，扦插後成活率較高，小苗生長發育良好。春季扦插用枝條，是二年生枝條，夏、秋季用的扦插枝條是當年生枝條。

② 扦插方式：扦插的方式包括直接扦插和扦插育苗兩種

扦插育苗：在 7~8 月，從優良金銀花母樹上剪取無病蟲害、組織充實、青褐色的枝條作為扦插繁殖材料。早上隨剪隨插，避免枝條失水。枝條長 15~20cm、粗 0.3cm，具 2~3 個腋芽，下截切口斜剪，切口平滑，皮層不可破損，摘去下部葉片。將枝條下方切口沾取發根粉，後將枝條扦插於盛有培養土之 2 吋塑膠盆或穴盤中，枝條露出地面約 10cm。將扦插好之金銀花盆栽澆水至介質濕透，並注意盆栽之遮蔭與保濕以提高其發根率。15~25 天左右即可生根發芽成活，馴化健化 4~6 個月後即可移栽定植。

直接扦插：剪取生長勢旺盛、無病蟲害植株之 1~2 年生的健壯枝條，剪成 30cm 長的插枝，使其下部斷面成斜形，並摘去下部葉片，隨即斜插於事先準備好的穴中。每穴斜放 5~6 根插條，露出地面 10~15cm，填土壓緊。插後要即時澆水，平時還要保持濕潤。有的品種枝條的節較長，如果剪的太短，則很難成活，可選取長枝條，將其下端盤成環狀，然後栽植入穴。

(3) 定植：一般於秋、冬季休眠期或早春萌芽前進行。將種苗 6~8 棵種植於栽植地面上挖好的穴內，覆土壓實，澆水，待水滲下後，培土保濕。

### 3. 整地與作畦

金銀花對土壤要求不嚴，但要選擇海拔在 200~500m，背風向陽的山坡，光照不足、土壤黏重，排水不良等處不宜栽培。如果土壤肥沃、水份肥份充足、陽光充足、則植株開花早，壽命長，單產高。山區種植時，在坡度小的土地進行全面耕犁；如荒山、荒地坡度大，在改成梯地後再整地。在深翻土地的基礎上，按株行距 1.2m×1.5m~1.4m×1.7m 挖穴，穴徑 50cm 左右，深 30~50cm。挖鬆底土，每穴施腐熟有機肥 1~2Kg，與底土混勻，待種。

### 4. 水分管理

保持土壤水分適宜，金銀花植株才能生長旺盛。金銀花植株較為耐旱，一般情況不須澆水，但天氣過於乾旱時要適當澆水。特別是在早春萌芽期間和初冬季節，適當澆水可有效地促進植株生長發育，提高藥材產量。金銀花植株不耐澇，雨季要注意排水，田間不能出現積水情況。

### 5. 中耕除草與肥料管理

(1)中耕除草：在定植成活後的前 2 年，每年中耕鋤草 3~4 次，第 1 次在植株春季萌芽展葉時，第 2 次在 6 月，第 3 次在 7~8 月，第 4 次於秋末冬初。中耕時，在植株根際周圍宜淺，其他地方宜深，避免傷根。第 3 年以後，視雜草的生長情況，可適當減少中耕除草的次數。進入盛花期，每年春夏之交，需中耕除草 1 次，每 3~4 年深翻改土 1 次，結合深翻，增施有機肥，促使土壤熟化。

#### (2)追肥

金銀花植株為多年生植物，除在栽植時充分施用基肥外，在生長期間還要多追肥。追肥以有機肥料為主，有機肥料主要是堆肥、綠肥、草木灰等。可於土壤追施，亦可葉面追施。土壤追肥施用有機肥每公頃 2000Kg；葉面追施宜用有機液肥。土壤追施宜在冬季進行，葉面追施宜在每次花蕾孕育之前進行。土壤追施時，在植株株基周圍 40cm 處，開寬 30cm、深 40cm 的環狀溝(注意勿將主要根系切斷)，將肥料施入溝內與土混勻，然後覆土；葉面追施，將有機肥料溶解於水，稀釋至適宜濃度約 500~1000 倍，噴

灑於植株葉面。追肥次數在春季植株發芽後，及一、二、三次花採收後，分別施用 1 次，每年 4 次。追肥可促進植株的枝葉生長，豆粕之氮肥可有效增加新生枝條長度，複合有機肥可全面促進枝葉生長。追肥不同有機肥料能促進植株的花蕾發育，增加花蕾數量，提高藥材的產量。

## 6. 修剪

(1) 整形修剪的時期：分為休眠期修剪和生長期修剪。休眠期修剪在 12 月至翌年 3 月上旬進行；生長期修剪在 5 月至 8 月上旬進行。

(2) 整形修剪的方法

### ① 幼齡植株的修剪：

1~5 年生的植株為幼齡植株，要以整形為主。重點培養好的一、二、三級骨幹枝，為以後的豐產奠定基礎。幼齡植株的修剪要在休眠期進行。1 年生植株的修剪，選擇健壯枝條 1~3 個，保留其下部 3~5 節，上部剪去，其他枝條全部去除。2 年生植株的修剪，重點培養一級骨幹支，第一年修剪後，一般會長出 6~10 個健壯枝，從中選取 3~6 個枝條，繼續保留下部 3~5 節，剪去上部。3 年生植株的修剪，重點培養二級骨幹枝，一級骨幹枝基部抽生出的枝條比較健壯，從中選留 8~15 個，保留其基部 3~5 節，上部剪去，培養成二級骨幹枝，其他枝條全部去除。4 年生植株的修剪，重點是培養三級骨幹枝，調整二級骨幹枝，其他枝條全部去除。5 年生植株的修剪，植株骨架基本形成，重點在於促進植株多結花，要注意選擇足夠的結花母枝，並利用新生枝條調整骨幹枝的角度，選擇的結花母枝基部直徑必須在 0.5cm 以上，每個二級骨幹枝留節母枝 2~3 個，三級骨幹枝留 4~5 個，全株留 80~120 個，結花母枝間的距離保持在 8~10cm，每個結花母枝仍保留 3~5 節，上部剪去，其他枝條全部疏除。

### ② 盛花期植株的修剪：

主要任務是選留健壯花母枝及調整更新二、三級骨幹枝，選到去弱留強、復壯株勢、豐產穩產的目的。盛花期植株的修剪分為休眠期修剪和生長期修剪。休眠期修剪主

要是疏除交叉枝、下垂枝、枯弱枝、病蟲枝及不能結花的無效枝。對所有的結花母枝進行短截，壯旺者要輕截，保留4~5節，中等者要重截，保留2~3節，作到枝枝均截，使結花母枝分佈均勻，佈局合理。修剪的次序為先下部後上部、先裡面後外面、先大枝後小枝、先疏枝後短截。修剪的程度與土肥條件要相互協調，土肥條件好，植株生長壯旺時，要輕剪，反則要重截。健壯植株的結花母枝應保留在100~120個。生長期修剪目的在於促進植株多次花的形成，提高藥材產量。在每次花的盛花期後進行，第一次在5月下旬修剪春梢，第二次在7月中旬修剪夏梢，第三次在8月中旬修剪秋梢。剪除全部無效枝，壯旺枝條留4~5節，中等枝條留2~3節短截，枝間距保持在8~10cm左右。

### ③老齡植株的修剪：

樹齡20年以上的忍冬植物逐漸衰老，修剪時除留下足夠的結花母枝外，重點進行骨幹枝的更新復壯，以多生新枝，使其株齡老而枝齡小，達到穩定藥材的產量的目的。具體方法是疏截並重、抑前促後。

(3)整形修剪對植株生長發育及藥材產量的影響：適當的整形修剪可有效地增加植株結花枝及每枝上花蕾的數量，從而提高藥材的產量。

## 7. 病蟲害及其防治

台灣金銀花栽培常見的主要病害有忍冬褐斑病與葉斑病等，主要危害植株葉片。主要蟲害為蚜蟲、金銀花尺蠖、天牛、木蠹蛾等，此病蟲害危害嚴重。

建議金銀花病蟲害可以採用綜合防治：(1)清理雜草、適時修剪老枝，冬季修剪要掌握「旺枝輕剪、弱枝重剪、重枝與徒長枝全剪」的原則(2)加強田間管理、發現被害枝即時除掉或燒掉，可使金銀花提高抗蟲力。(3)害蟲孵化期可以施用各類適用之除蟲藥防治。(4)多施磷、鉀肥，並控制氮肥。(5)病害防治預防勝於治療。

## 8. 採收、加工方法

### A.採收：

5~10月均可進行，宜選擇晴天。忍冬以花蕾入藥，其花蕾發育可以人為地劃分為不同的時期，不同時期花蕾的重量及成分含量是不同的。根據藥材的外觀性狀與各類成分的總收率，在花蕾由青轉白的二白期採收量最適宜。

#### B. 乾燥：

(1) 乾燥方法的選擇：採收後的金銀花必須即時進行乾燥。乾燥的方法有多種，不同乾燥方法加工出的金銀花藥材質量有較大差異。金銀花加工乾燥方法中以乾燥機乾燥效果較好。

#### (2) 乾燥機乾燥的具體方法

乾燥機預熱至 30°C 後，將金銀花平鋪於乾燥機之框架上，平鋪厚度約 4~5cm，裝好後，關閉門與進排氣孔，以 50°C 進行加熱烘烤，在溫度達到 40~50°C 後，鮮花開始排水時，可以打開氣孔排除水氣，當水器大量排出時，可以微開乾燥機門板以便水氣能夠迅速排出。待 10h 後，鮮花的大部分水氣已經排出，可提高溫度達到 55°C，使金銀花迅速乾燥，並保持通風透氣，直至金銀花握之頂手，有響聲，達到八九成乾時，就可將溫度降低至 40~50°C 在乾燥 2~3 小時，使金銀花完全乾燥後取出裝袋，金銀花乾燥後之裝袋溫度宜為 35°C 以避免吸濕。

#### 9. 包裝與儲藏

(1) 包裝：烘乾後的金銀花於包裝前宜再以 50°C 乾燥 2~3 小時，使金銀充分乾燥，含水量控制在 10% 以下，清除劣質品及雜質異物後，即可包裝。所用之包裝材料為聚乙烯塑料袋，密封，每袋 1Kg，外包裝用瓦楞紙箱，每箱裝 10 袋。包裝袋與包裝箱上，應註明品名、規格、產地、批號、包裝日期、生產單位，並附有關質量合格的標誌。

(2) 儲藏：乾燥後的金銀花如不馬上出售，包裝後應置於室內乾燥冷涼的地方儲藏，避免陽光直射及防止老鼠危害。

#### 10. 藥材規格

《台灣傳統藥典》規定金銀花之稀乙醇抽提物應在 22.0% 以上，水抽提物應在 24.0% 以上，所含綠原酸應在 1.0% 以上。雜質檢查及其他規定：

(1)乾燥減重——本品以 105°C 乾燥五小時，其減重不得超過 12.0%。

(2)總灰分——本品之總灰分不得超過 10.0%。

(3)酸不溶性灰分——本品酸不溶性灰分不得超過 5.0%。

《中華人民共和國藥典》規定金銀花所含綠原酸不得少於 1.5%。

雜質檢查及其他規定：

(1)總灰分——不得超過 10.0%。

(2)酸不溶性灰分——不得超過 3.0%。

(3)花梗與碎葉等雜質不得超過 5%。

## 六、生物活性分析：

除計畫書中規定執行項目外，本年度亦額外進行金銀花與川芎之生物活性分析，生物活性分析方法及材料敘述如下

### (一) 免疫調節功能評估：

高抗氧化物質的免疫調節功能評估，是針對包括非特異性及特異性免疫功能之評估。所謂非特異性免疫力主要包括如中性白血球(neutrophils)及單核球(monocytes)的吞噬能力或是自然殺手細胞的活性(natural killer activity)。而特異性免疫力主要是針對一些特定的抗原作進一步的評估，在老鼠身上可以利用外加注射一些特定的抗原，再進行抗原特異性免疫反應的評估，其中可以包括如特異性抗體的測定或是抗原特異性的 T 細胞增殖反應和細胞激素的研究。同時，如果要評估免疫細胞的功能時，應該分別由質與量兩方面來加以分析。量方面主要是測定各種免疫細胞的數目，本研究預期將利用螢光流體計數儀來計算免疫細胞正確的數目。特異性免疫能力功能性評估的分析方法包括下列幾項，(1)老鼠巨噬細胞株(Raw264.7)之細胞毒性分析(MTT assay)；(3) LPS 誘導 Raw 264.7 細胞株相關 cytokine 變化(包含:IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ )及 NO 表現；(4)動物實驗：LPS 刺激下之保護功能分析(存活率、血液生化指數、臟器發炎相關蛋白分析)。

### (二) 細胞培養：

將冷凍保存的 PK-15 (豬腎細胞)細胞株(由中山醫學大學微免科張元衍老師所贈與)與 RAW264.7 細胞株自液態氮筒取出後，迅速以 1 mL 之 low-glucose medium 溶解，再加入 5 mL 之 PBS 以

pipetman 吸放數次後以 4000 rpm 離心 3 分鐘去除冷凍保存液。PK-15 細胞株，培養於含 10 %胎牛血清(Hyclone)之 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium; Hyclone)生長培養液中；PK-15 細胞株，培養於含 10%胎牛血清(Hyclone)之 DMEM 生長培養液中，RAW264.7 細胞株，培養於含 10 %胎牛血清(Hyclone)之 RPMI-1640 生長培養液中，並培養於 37°C 含 5% CO<sub>2</sub> 之培養箱中。待其成長至單層細胞後進行繼代。繼代方式為先倒去舊培養液，以酌量的 1X PBS (0.2g KCl, 0.2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8g NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.14g 溶於 1 公升的滅菌水)清洗一次，倒去後再加入微量剛好潤濕細胞即可)之 STV 消化液，靜置數分鐘，待細胞均呈現圓型化並開始剝離，便輕拍瓶身以震落細胞。加入適量生長培養液以稀釋細胞，分裝至培養瓶或圓孔盤中，培養於 37°C 含 5% CO<sub>2</sub> 之培養箱，待後續實驗使用。

### (三) 病毒株及病毒增殖：

假性狂犬病毒(PRV)是由國立自然科學博物館所贈與。假性狂犬病毒利用 PK15 細胞進行大量增殖。當 PK15 細胞長成 9 分滿時倒掉就培養液並以 1X PBS 清洗一次，並接種含 0.1 MOI 的病毒液，於 37°C 感染 1 小時，讓病毒吸附細胞。接著倒掉上清液並加入含 2%的的胎牛血清培養液，置於 37°C 繼續培養，至 90-95%細胞產生明顯的細胞病變時，將細胞拍打下來並以 2500 rpm 離心 10 分鐘，去除 cell pellet 並收集上清液。將上清液以 13000 rpm 離心 1.5 小時，去除上清液並利用 X DMEM 清洗病毒，再以 13000 rpm 離心 2 小時，重複清洗 2 次。將所得之病毒以 1-2 ml 的 1X DMEM 混合均勻，以每管 50µl 分裝並儲存於-80°C 以待後續實驗所需。

### (四) 細胞毒性分析(MTT assay)：

活細胞會將 tetrazolium 代謝成藍紫色之結晶，且此結晶可溶於異丙醇，故測其吸光可得知活細胞的數目。將 2 X 10<sup>5</sup> 的 RAW264.7 細胞培養於 24 孔的培養盤，讓細胞貼壁後，吸乾培養液，換取新鮮的培養液。再分別加入不同濃度金銀花與川芎萃取物共培養於 37°C 含 5% CO<sub>2</sub> 之培養箱中 24 小時及 48 小時後，吸乾培養液，細胞以 PBS 輕洗兩次後，換上新鮮的培養液 1 ml，加入 20µl tetrazolium (25 mg/ml)。培養 4 小時，移除培養液，加入 1ml isopropanol，以 pipetman 來回打散均勻，再使用全波長酵素免

疫分析儀 ELISA reader (Molecular Device, Spec384) 以 450nm/595nm 的波長分別在 0、30、60、90 分鐘去測量其 OD 值，再以 Excel 作圖得到最佳濃度。

(五) 病毒斑試驗(Plaque assay)：

將  $2 \times 10^5$  的 RAW264.7 細胞培養於 24 孔的培養盤。分別加入不同濃度金銀花與川芎萃取物培養於  $37^\circ\text{C}$  含 5%  $\text{CO}_2$  之培養箱中 2 小時後，移除舊的培養液並以 1 X DMEM 清洗 2 次後，每孔加入 900  $\mu\text{l}$  的 1 X RPMI，等待處理。其中一組只加 1X RPMI，另組則加入的 0.1 或 1 PFU/cell 的 PRV 病毒液，以每孔 100  $\mu\text{l}$  病毒液，加入上述處理的細胞中。於  $37^\circ\text{C}$  中培養 1.5 小時。之後倒吸掉上清液，再分別加入不同濃度金銀花與川芎萃取物培養於  $37^\circ\text{C}$  含 5%  $\text{CO}_2$  之培養箱中 16 及 24 小時後收集上清液。之後上清液進行 NO 產量測試、ELISA 與病毒力價測試。

將 PK-15 細胞培養於 24 孔培養盤約 9 成滿時，移除舊的培養液並以 1 X DMEM 清洗 2 次後，每孔加入 900  $\mu\text{l}$  的 1 X DMEM，等待處理。將上述收集的上清液(含有病毒新子代)以 1X DMEM 做 10 倍稀釋至  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ ，以每孔 100  $\mu\text{l}$  病毒液，加入上述處理的細胞中。於  $37^\circ\text{C}$  中培養 1.5 小時，每 10 分鐘搖勻一次。之後倒掉上清液，並加入含 2% 血清及 1% methylcellulose 的細胞維持培養液(Maintenance medium, MM)，於  $37^\circ\text{C}$  繼續培養 2~3 天。待細胞病變效應(cytopathic effect, CPE)放大至肉眼可見，吸去細胞培養液，加入含 1% 結晶紫之染劑去反應 1~2 小時，以清水緩和清洗，晾乾後並計數病毒斑的量。

(六) 亞硝酸鹽含量分析(NO production)：

將 24-well plate 從培養箱中拿出，馬上置於冰上，再將上述方式所收集的樣本，取出 100  $\mu\text{L}$  之細胞培養液加入 100  $\mu\text{L}$  之 Griess reagent (1% sulfanilamide、0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride 及 2% phosphoric acid)，利用 nitrite 與 Griess 試劑反應呈現藍紫色，以 FLUO star galaxy spectrophotometer (BMG Labtechnologies, Germany)測定 550 nm 下之吸光值，並且以 sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ )作為標準品建立標準曲線定量，計算出培養基中所含 nitrite 的濃度。

(七) 免疫酵素沉澱法 ELISA (IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ ) :

將 cytokines 的 capture Ab 以 coating buffer 稀釋 250 倍後，取 100  $\mu$ l 加入 96 孔盤，於 4 $^{\circ}$ C 靜置一夜。去除多餘的 capture Ab，並以 wash buffer (1X PBS+0.05% Tween-20) 清洗 3 次(250 $\mu$ l/well)，在加入套組中所附的 assay diluents reagent (Amershan)於室溫反應 1 小時，接著以 wash buffer 清洗 3 次，再於盤中指定之位置加入待測的檢體及各 cytokines 的標準稀釋品(100  $\mu$ l/well)，於室溫反應 2 小時，接著以 wash buffer 清洗 3 次，然後加入 100  $\mu$ l/well 的 Detection Ab (250 倍稀釋)，於室溫反應 1 小時，接著以 wash buffer 清洗 5 次，再加入 100  $\mu$ l/well 的 Avidin-HRP 於室溫反應 15 分鐘，接著以 wash buffer 清洗 7 次，最後在加入 100  $\mu$ l/well 的 substrate solution (1X TMB)於室溫作用 5-10 分鐘，再加入 50 $\mu$ l stop solution (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)去終止反應。以全波長酵素分析儀以 450nm 去測量其 OD 值，並以標準品來推算帶測檢體之濃度。

(八) 細胞各種基因的 mRNA 表現量(RT-PCR)分析(PPAR、TNF、COX、NF-kB) :

檢體 total cellular RNA 是以傳統在 4M guanidine thiocyanate-acid phenol method 或以 RNA 萃取套組 RNA Isolation Kit (Ultraspec<sup>TM</sup>)進行分離；取利用 1.0  $\mu$ M oligo-d(T) 15 為 primer 以 MMLV-RTase (200units)在 70  $\mu$ L 反應溶液中(RT Buffer, 1 mM deoxyguanosine triphosphate, 1 mM deoxyadenosine triphosphate, 1 mM deoxycytidine triphosphate, 1 mM deoxythymidine triphosphate, 1 U/ $\mu$ L RNase inhibitor, 4 U/ $\mu$ L RTase (MMLV)進行 cDNA 合成，利用 Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700 儀器，at 42 $^{\circ}$ C for 60 minutes 和 at 90 $^{\circ}$ C for 5 minutes 與 at 4 $^{\circ}$ C for 5 minutes；取 5  $\mu$ l cDNA 至 PCR 反應溶液中(1 mM deoxyguanosine triphosphate, 1 mM deoxyadenosine triphosphate, 1 mM deoxycytidine triphosphate, 1 mM deoxythymidine triphosphate, Dyna PCR Buffer II, 2 U/ $\mu$ L AmpliTaq DNA polymerase, 0.5  $\mu$ M concentration human  $\beta$ -amyloid protein precursor primers, 最終為 25  $\mu$ L)以下表之 primers 資料的預估溫度，利用 Taq polymerase 進行 30 cycles PCR 反應(300 seconds at 95  $^{\circ}$ C as an initial step, followed by 30 cycles of 60 seconds each at 95  $^{\circ}$ C and 60 seconds each at 51 $^{\circ}$ C and finally 2

minutes at 72°C)，其產物再以 1.8 % agarose gel 電泳分離，以 ethidium bromide 染色並觀察(for mRNA of  $\beta$ -amyloid protein precursor)，並運用軟體 Fujifilm Image Gauge program (version 3.1; Fuji)定量之。

(九) 酵素連結免疫吸附試驗(ELISA)：

利用酵素連結免疫吸附試驗(ELISA)來探討金銀花與川芎萃取物對 RAW264.7 之各種細胞激素的影響。首先將不同濃度之金銀花與川芎萃取物加入 RAW264.7 細胞中培養不同的時間點後，將收集之上清液，取 50  $\mu$ l 置於各種細胞激素之 ELISA plate 的槽中，裝入塑膠袋中置於 37°C 培養箱中培養箱中 1 小時進行吸附作用。接著每孔以 100  $\mu$ l wash buffer (PBST) 清洗二次後甩乾，每孔再加入 100  $\mu$ l 的 blocking buffer (0.5% BSA+PBS) 以填補抗原附著空缺的部分，於 37°C 感作一小時。以 PBST 清洗兩次後甩乾，每孔再加入 50  $\mu$ l 用 blocking buffer 2000 倍稀釋之過氧化酶標示的山羊抗鼠免疫球蛋白 IgG 進行第二抗體反應，於 37°C 感作一小時以後，以 PBST 清洗五次後甩乾，每孔再加入 50  $\mu$ l 過氧化酶呈色液 ABTS，於 37°C 感作 15 分鐘至陽性對照組顯出綠色，以 Dynatech 580 ELISA 判讀機於 405 nm/450 nm 下判讀。

(十) 定量反轉錄聚合酵素連鎖反應：

以定量反轉錄聚合酵素連鎖反應(Quantitative Reverse transcriptase- polymerase chain reaction; QRT-PCR)來探討金銀花與川芎萃取物對 PBMC 之各種細胞激素的影響。

1. 抽取 RNA

將不同濃度之金銀花與川芎萃取物加入 RAW264.7 細胞中培養不同的時間點後，收集細胞以 1,200 轉離心，將收集上清液另外收集，加入 1 ml 的 RareRNA kit (Blossom, 伯森)，置於室溫反應 5 分鐘，將細胞溶解液抽取至新的試管內加入 200  $\mu$ l chloroform: isoamylalcohol (24:1) (Sigma)混合均勻，置於冰上反應 5 分鐘，離心(4°C) 14,000 rpm、5 分鐘，取上清液至另一新的 eppendorf 並加入等量的 isopropanol 混合均勻，置於-20°C)、30 min 後離心 14,000 rpm (4°C)、5 min，倒掉上清液，加入 70% 的酒精 500  $\mu$ L，搖晃清洗，再離心 8,000 rpm (4°C)、1 min，倒

掉上清液，然後 air dry 最後將沉澱物溶於 50  $\mu$ L 的滅菌水，O.D. 保存於 -70°C 備用。

## 2. 以定量反轉錄聚合酵素連鎖反應

將 RAW264.7 細胞添加不同濃度之金銀花與川芎萃取物，取不同時間點的 Total RNA 溶液 1  $\mu$ L 於 0.5 ml 之微量離心管中，加入 15.5  $\mu$ L RNase free 的純水，於 70°C 中作用 5 分鐘，立刻置於冰上，以去除二級結構，再加入 1  $\mu$ L (20  $\mu$ m) 可與病毒 RNA 之 3' 端互補之引子或任意引子 (random primer)，5  $\mu$ L 之 10X RTase buffer 及 4  $\mu$ L 1.25 mM 之 dNTP、0.4  $\mu$ L 之 RNase inhibitor (40 U/ $\mu$ L) (Promega) 和 0.3  $\mu$ L 之 AMV reverse transcriptase (9.5 U/ $\mu$ L) (Promega)，混合離心後，置於 42°C 中作用 60 至 120 分鐘，以合成 cDNA。之後再將各種反應好的 cDNA 各取 1  $\mu$ L (0.1  $\mu$ g/ $\mu$ L)，加入各種細胞激素的引子與 GAPDH 引子各 10  $\mu$ M 混合、5  $\mu$ L 10X Acc buffer、5  $\mu$ L DMSO 及 1.0  $\mu$ L Taq DNA polymerase (5 U/ $\mu$ L) (Qiagen)，以純水補至總體積 50  $\mu$ L，離心混合，於 thermal cycle reactor 中進行 PCR 反應，反應條件為 94 °C 預跑 (prerun) 5 分鐘；再以 94 °C 30 秒 (denaturation)，52.5 °C 30 秒 (annealing)，72 °C 2 分鐘 (extension) 進行 20 個循環 (cycle)；94 °C 30 秒，55 °C 30 秒，72 °C 2 分鐘 (extension) 進行 10 個循環；94 °C 30 秒，57.5 °C 30 秒，72 °C 2 分鐘進行 10 個循環；最後再以 72 °C 反應 7 分鐘，即完成反應。而在上述 PCR 的反應過程中，我們在 28 個循環後，每兩個循環取出 10  $\mu$ L 的反應物，於 40 個循環反應後，將的反應物於含 ethidium bromide 之 2 % agarose gel 上，以 1X TAE (40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA) 作為緩衝液進行電泳，並利用數位影像分析系統來做定量，以 GAPDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) 的 PCR 產物為基準，以其避免 PCR 的產物達到過飽和，如此才可達到定量的目標。在此我們亦準備在上述 PCR 的反應中，一次加入五對引子一起反應，如此一來可下降每次反應的誤差，更可在一次的反應中比較不同的細胞激素表現量，以達到快速檢驗的目的。

生物活性分析初步結果如圖 12~21 所示。結果顯示金銀花正品富含綠原酸、木犀草素，而川芎之正品富含阿魏酸、川芎

嗉，本實驗利用甲醇或水的方式去分離金銀花與川芎粗萃物，初步發現在小鼠巨噬細胞(RAW 264.7 cells line)中，以甲醇萃取的金銀花與川芎產物並無顯著之抑制 LPS (Lipopolysaccharde)所誘發的 NO 效果，因此我們以不同濃度的金銀花與川芎水萃取物處理由 LPS 誘導的巨噬細胞並探討其發炎相關的基因與蛋白質的表現。實驗結果顯示，LPS 誘導的 Raw264.7 細胞在添加各種濃度的金銀花與川芎水萃取物後明顯的抑制了 NO 的分泌及 iNOS、COX-2 的表現量，與對照組木犀草素標準品處理皆顯示相同之劑量效應。細胞毒性分析結果顯示金銀花與川芎水萃取物對小鼠巨噬細胞株的半致死率濃度不明顯，在抗病毒與抗氧化的實驗中目前發現，金銀花與川芎水萃取物可能透過誘發 NO、IL6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、MCP-1 的表現誘使受感染的細胞死亡率增加，依目前實驗結果推測金銀花與川芎水萃取物可能會誘發細胞 Apoptosis，進而抑制病毒的複製來阻止感染，綜合目前之初步結果顯示，本研究所使用之金銀花與川芎皆具有很好之生物活性功能，皆顯示有抗發炎與抗病毒之效果，但詳細的 pathway 還需要透過更進一步的酵素免疫分析法測量發炎相關的細胞激素。後續除了繼續以西方墨點法與酵素免疫分析法測發炎相關蛋白質與細胞激素外，以確定其更詳細的發炎機制，並做為不同田間栽培模式之篩選平台，並確認不同肥培管理下之萃取物的成分分析，金銀花與川芎是否具有增加細胞抗氧化以減緩病毒感染能力有待進一步的實驗證明。

## 肆、討論

### 一、篩選適合台灣栽培並可用以生產金銀花藥材之忍冬品系

本研究所蒐集的忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.種原，經由植物組織切片鑑定為金銀花正品基原。而根據《台灣中藥典》與《中國藥典，2010 版》資料顯示，金銀花與忍冬藤的正品基原為忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.，而追分忍冬與阿里山忍冬雖然同樣是忍冬屬植物，相關性狀也有部分雷同，但並不能作為中藥使用。此外，而追分忍冬與阿里山忍冬均為高山植物，對於平地氣候可能無法適應。因此建議台灣若要生產金銀花與忍冬藤藥材，需種植忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 才能獲得正品金銀花與忍冬藤藥材。

### 二、不同介質對忍冬無性繁殖之影響

介質對忍冬半硬木扦插存活率有顯著差異，忍冬以紅土、椰纖混稻殼、泥炭土扦插存活率較高，分別為 90.3%、80.5%、80.5%，以紅壤混稻殼存活率最差為 41.6%。建議忍冬無性繁殖可使用紅壤或泥炭土作為繁殖介質，以提高存活率。

### 三、有機肥料肥料施用量對金銀花與忍冬藤產量與成分之影響

由於金銀花為多年生植物，其種苗繁殖時間較長，且其初期生長較為緩慢。而目前忍冬試驗田已經完成相關種植與搭網作業，下年度即可進行有機肥料施用量試驗，並評估出金銀花最適當之有機肥料施用量。

### 四、台灣金銀花有機栽培及優良農業操作模式草案

本年度計畫已有些許成果，相關結果與參考資料進行彙整，初步建立台灣金銀花有機栽培及優良農業操作模式草案，下年度計畫研究完成後，相關成果將再一併匯入草案中。

### 五、生物活性分析部分

本研究供試之目標作物金銀花與川芎，金銀花蒐集自本島各地，已適應台灣風土氣候性，金銀花有機農法與全球優良農業操作規範目前正在建立中。而川芎引種自中國大陸四川省，種原地與本地氣候差異頗大，導致田間栽培不易，不耐台灣夏季高溫多濕之氣候環境。本研究嘗試以組織培養之方式進行川芎種原無性繁殖，其以人工氣候室之條件與環境大量增殖川芎種原，以提供後續進行田間栽培試驗使用，目前已有初步結果，期以建立川芎有機農法與全球優良農業操作規範。金銀花正品富含綠原酸、木犀草素等生物活性成分，而川芎之正品富含阿魏酸、川芎嗪等生物活性成

分。本研究比較分別以甲醇與水萃取之粗萃取物抗發炎或抗病毒表現之差異。實驗結果顯示在小鼠巨噬細胞(RAW 264.7 cells line)中，以甲醇萃取的金銀花與川芎產物並無顯著之抑制 LPS (Lipopolysaccharde)所誘發的 NO 效果，而不同濃度的金銀花與川芎水萃取物明顯的抑制了 NO 的分泌及 iNOS、COX-2 的表現量。依目前實驗結果推測金銀花與川芎水萃取物可能會誘發細胞 Apoptosis，進而抑制病毒的複製來阻止感染，西方墨點法與酵素免疫分析法測發炎相關蛋白質與細胞激素之結果亦顯示如此，雖金銀花與川芎皆具有一定能力之抗發炎效果，但二者作用之機制似乎不盡相同，後續還需要透過更進一步的分析，且不同肥培管理下之金銀花與川芎萃取物的成分，是否仍具有增加細胞抗氧化以減緩病毒感染能力有待進一步的分析與實驗證明。

## 伍、結論與建議

- 一、本研究所蒐集的忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.種源，經由植物組織切片鑑定為金銀花正品基原。根據《台灣中藥典》與《中國藥典，2010版》資料顯示，金銀花與忍冬藤的正品基原為忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.，因此建議台灣若要生產金銀花與忍冬藤藥材，需種植忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.才能獲得正品金銀花與忍冬藤藥材。
- 二、介質對忍冬半硬木扦插存活率有顯著差異，建議忍冬無性繁殖可使用紅壤或泥炭土作為繁殖介質，以提高存活率。
- 三、本研究初步顯示實驗用所使用之材料金銀花與川芎皆為正品，並經必安研究所協助確認其有效成分含量，金銀花與川芎粗萃取物經細胞實驗之結果顯示其具有抗發炎與抗病毒之生物活性，為其作用機制仍需進一步的研究分析。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP102-RD-004 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. 中華民國行政院農業委員會。2003。有機農業法規。行政院農業委員會。台灣。台北。pp.1。
2. 中華民國衛生署中醫藥委員會。1999。中藥材品質管制組織型態學鑑定。行政院衛生署中醫藥委員會。台灣。台北。pp.17-18、71-72、137-138。
3. 中華民國衛生署中醫藥委員會。2002。易混淆及誤用藥材之鑑別（I）。行政院衛生署中醫藥委員會。台灣。台北。pp. 1-30。
4. 中華民國衛生署中醫藥委員會。2002。中藥對照用指標成分物理化學資料彙編。行政院衛生署中醫藥委員會。台灣。台北。pp. 19-20。
5. 中華民國衛生署中醫藥委員會。2004。台灣中醫藥防治 SARS 關鍵成果報告彙編（一）。行政院衛生署中醫藥委員會。台灣。台北。pp.205-211。
6. 中華民國衛生署中醫藥委員會。2004。中華中藥典。行政院衛生署中醫藥委員會。台灣。台北。pp. 94、102。
7. 中華民國衛生署中醫藥委員會。2009。中草藥產業年鑑 2009。行政院衛生署中醫藥委員會。台灣。台北。pp.7~18、77~96。
8. 中國醫學科學院藥用植物研究所。2010。中華人民共和國藥典-中藥材及原植物彩色圖鑑（上冊）。人民衛生出版社。中國北京。pp.119-120、594-595。
9. 中國醫學科學院藥用植物研究所。2010。中華人民共和國藥典-中藥材及原植物彩色圖鑑（下冊）。人民衛生出版社。中國北京。pp.692。
10. 方靜文。2005。金銀花活性成分綠原酸之定量研究，中國醫藥大學中國藥學研究所。
11. 王家葵、王佳黎、賈君君。2007。中藥材品系沿革及道地性。中國醫藥科技出版。中國北京。pp.10-232。
12. 安徽中醫學院。2009。亳州藥用植物資源與栽培加工。安徽大學出版社。pp.1~266。
13. 李敏。2002。中藥材規範化生產與管理（GAP）方法及技術。中國醫藥科技出版社。中國北京。pp. 3-361、532-540、793-803。
14. 李燕、趙彥宜、于海平、宋紅麗。2010。中華人民共和國藥典一部。中國醫藥科技出版社。中國北京。pp. 28、38、179、205。
15. 余懋群。2006。藥用植物資源評價及品系選育。中國醫藥科技出版。中國北京。pp.3-324。

16. 吳銳、梁勇。2007。中藥材 GAP 管理系統與軟件開發。中國醫藥科技出版。中國北京。pp.1-267。
17. 邱年永。1973。藥用植物栽培法，大學圖書出版社。台北。pp.210-215。
18. 林依霈。2009。紫錐菊花藥及小孢子培養與根尖染色體鏡檢之研究，國立中興大學農藝系研究所。
19. 高木敬次郎。1992。和漢藥物學，國立中國醫藥研究所。台北。pp.202-203、313-317。
20. 童承福、何玉玲、蔡輝彥、張永勳。1999。台灣市售易誤用、混用中藥品系之調查，中國醫藥學院雜誌。台中；8(1)：35-46。
21. 陳康、李敏。2006。中藥材種植技術。中國醫藥科技出版。中國北京。pp.1-221、269-273、369-373。
22. 陳世雄、謝瑞裕。2007。板藍根與中草藥的好農業。科學發展月刊：26-35。
23. 黃璐琦、郭蘭萍。2007。中藥資源生態學研究，上海世紀出版股份有限公司。中國上海。pp.1-226。
24. 黃璐琦、王永炎。2008。藥用植物種質資源研究，上海世紀出版股份有限公司。中國上海。pp.1-309。
25. 張德慈。1997。植物遺傳資源-未來植物生產的關鍵。台灣省農業試驗所。台中霧峰。pp.1-98。
26. 張永勳、何玉鈴、黃世勳。2008。中藥學概論。文興出版事業有限公司。台中。pp.1-42、61、91-92。
27. 秦玲、張簡懿芬、陳榮斌、黃成禹、林哲輝。2006。中藥材中黃麴毒素污染之調查。藥物食品檢驗局調查研究年報。24：143-150。
28. 秦民堅、郭玉海。2008。中藥材採收加工學。中國林業出版社。中國北京。pp.1-149、185、228-231。
29. 許博文。2002。藥用植物動物之栽培與飼養，九州圖書文物有限公司。台北。pp.44-48、253-259。
30. 許詩穎。2005。氮肥及栽培密度對馬藍產量與生物活性之影響，國立中興大學農藝系研究所。
31. 楊榮光。2003。川藥炮製規範學。國立中國醫藥研究所，台北。pp. 49、144、180。
32. 蔡淑華。1975。植物組織切片技術綱要，茂昌圖書有限公司。台北。pp.30-46。

33. 麼厲、程惠珍、楊智。2006。中藥材規範化種植（養殖）技術指南。中國農業出版社。中國北京。pp.3-292、341-351、1076-1091。
34. 趙中振。2005。中藥顯微鑑別圖鑑，遼寧科學技術出版社。中國瀋陽。pp.16-39、302-304。
35. 趙文婉、林碧鳳。2006。中藥材的免疫調節功能。科學發展月刊。405：54-63。
36. 劉明哲。1988。藥用植物栽培技術，五洲出版社。台北。pp.1-21、60-67。
37. 劉新裕、林俊義、張成國。2002。藥用植物專輯，行政院農委會農業試驗所。台中。pp. 47、85。
38. 劉芄孜。2004。台灣栽培蒙古黃耆（*Astragalus mongholicus*）與多序岩黃耆（*Hedysarum polybotrys*）之鑑別研究，國立中興大學農藝系研究所。
39. 劉新裕、林俊義、林宜信、謝伯舟。2005 藥用植物資源之開發與利用，行政院農委會農業試驗所。台中。pp.263。
40. 謝明村。1988。中國藥材學。正中書局股份有限公司。台北。pp.131-135、387-389。
41. 謝瑞裕。2005。菘藍之引種與 GAP 模式之研究，國立中興大學農藝系研究所。
42. 謝瑞裕、陳世雄、林宜信。2006。菘藍之引種與 GAP 模式之研究。中華農藝學會 95 年年會論文宣讀研討會，臺中。
43. 謝宗穎。2007。市售含金銀花濃縮中藥方劑之活性成分定量研究，中國醫藥大學中國藥學研究所。
44. Bodyl, A. 1999. Evolutionary pathway of the apicomplexan plastids and its implications. *Microbiology* 7:266-267
45. Delwche. C.F. and J.D. Palmer. 1996. Rampant horizontal transfer and duplication of rubisco gene in eubacteria and plastids. *Mol. Biol. Evol.* 13:873-882.
46. Fang XC., Yu BY, Xiang BR, and An DK., 1990. Application of pyrolysis-high-resolution
47. gaschromatography-pattern recognition to the identification of the Chinese traditional medicine Mai Dong. *Journal of Chromatography.* 514 (2) ,287-92。

48. Ge, S., A. Li, B.R. Lu, S.Z. Zhang and D.Y. Hong. 2002. A phylogeny of the rice *Oryzae* (Poaceae) based on *matK* sequence data. *Am. J. Bot.* 89:1967-1972.
49. Gernandt, D.S., A. Liston and D. Piñero. 2003. Phylogenetics of *Pinus* subsections *Cembroides* and *Nelsoniae* inferred from cpDNA sequences. *Systematic Bot.* 28: 657-673.
50. Liang., M. J., L. C. He and G. D. Yang. 2005. Screening, analysis and in vitro vasodilatation of effective components from *LigusticumChuanxiong*. *Life sci.* 78:128-133.
51. Nalawade S. M. and H. S. Tsay. 2004. In vitro propagation of some important Chinese medicinal plants and their sustainable usage. *In vitro cell. Dept. Biol.-Plant* 40:143-154.
52. Nalawade S. M., A. P. Sagare, C. Y. Lee, C. L. Kao and H. S. Tsay. 2003. Studies on tissue culture of Chinese medicinal plant resources in Taiwan and their sustainable utilization. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45:143-147.
53. Takayuki. A., Tetsuya M, Yasuaki H, and Junzo S., 1993. Comparative Stsdies on Constituents of Ophiopogonis Tuber and Its Congegers. VII. Studies on the Homoisoflavonoids of the Subterranean Part of Ophiopogon japonicus KER-GAWLER cv. Nanus. ( 1 ) .*Chem. Pharm. Bull.* 41 ( 2 ) , 391-3.
54. Takayuki. A., Tessuya M. , Yasuaki H. and Junzo S., 1993. Comparative Stsdies on Constituents of Ophiopogonis Tuber and Its Congegers. VIII. Studies on the Glycosides of the Subterranean Part of Ophiopogon japonicus KER-GAWLER cv. Nanus. ( 2 ) .*Chem. Pharm. Bull.* 41 ( 3 ) ,566-70.
55. Xiang, Q.Y., D.E. Soltis and P.S. Solits. 1998. Phylogenetic relationships of Cornaceae and close relatives inferred from *matK* and *rbcL* sequences. *Am. J. Bot.* 85: 285-297.
56. Yuan., J. F., Z. Q. Zhang, Z. C. Fan And J. X. Yang. 2008. Antioxidant effects and cytotoxicity of three purified polysaccharides from *LigusticumChuanxiong* Hort. *Carbohydr. Polym.*74:822-827.
57. Yan., R., S. L. Li, H. S. Chung, Y. K. Tam. and G. Lin.2005. Simultaneous quantification of 12 bioactive components of *LigusticumChuanxiong* Hort.

by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37:87-95.

## 柒、圖表



圖 1、不同品種忍冬之植株型態。a. 忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.、b. 紅腺忍冬 *Lonicera hypoleuca* Miq.、c. 山銀花 *Lonicera confusa* DC.、d. 毛花柱忍冬 *Lonicera dasystyla* Rehd.、e. 灰氈毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz.、f. 華南忍冬 *Lonicera confusa* DC.。

(1) 紅腺忍冬照片來源：

<http://www.organictheworld.com/picture/show/85.aspx>

(2) 山銀花照片來源：

<http://finance.takungpao.com.hk/food/industry/drinks/2013-04/1536733.html>

(3) 毛花柱忍冬照片來源：

[http://tupian.baikē.com/a1\\_13\\_29\\_01200000197647134433296210601\\_jpg.html?prd=zhengwenye\\_left\\_neirong\\_tupian](http://tupian.baikē.com/a1_13_29_01200000197647134433296210601_jpg.html?prd=zhengwenye_left_neirong_tupian)

(4) 灰氈毛忍冬(金翠蕾)照片來源：

[http://www.hnfulin.org/showproduct.asp?pro\\_id=197](http://www.hnfulin.org/showproduct.asp?pro_id=197)

(5) 華南忍冬照片來源：

<http://baikē.baidu.com/picview/3513875/3513875/10021000000/9358d109b3de9c82a8ece1b86d81800a19d8437f.html#albumindex=2&picindex=1>



圖 2、忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.之植株型態。a. 葉片、b. 花蕾與銀花、  
c. 金花及 d. 果實。



圖 3、追分忍冬 *Lonicera oiwakensis* Hayata.的植株形態：a. 全株、b. 葉片、  
c. 銀花。



圖 4、阿里山忍冬 *Lonicera oiwakensis* Hayata. 的植株形態：a. 全株、b. 葉片、c. 銀花。



圖 5、忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 不同族群的植株形態：a. 台中、b. 霧峰、c. 名間、d. 忍冬-日月潭、e. 忍冬-埔里、f. 忍冬-田尾。



圖 6、忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 不同部位的細胞形態：a. 花蕾、b. 雄蕊、c. 花粉、d. 莖、e. 非腺毛、f. 腺毛、g. 莖-簇晶分布於髓、h. 簇晶、i. 導管、j. 葉片橫切面、k. 葉片細胞、l. 篩管與導管。



圖 7、忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 扦插繁殖與定植：a. 半硬木枝、b. 插穗扦插入土、c. 大量繁殖、d. 3 個月後可移置田間種植、e. 工人種植忍冬、f. 定植完成的忍冬植株。



圖 8、不同介質對忍冬扦插之影響。a. 紅壤、b. 紅壤混稻殼、c. 紅壤混椰纖、e. 椰纖粉、f. 泥碳土混稻殼、g. 紅土混泥碳土、h. 泥碳土混椰纖粉、i. 椰纖粉混稻殼、j. 泥炭土。



圖 9、不同有機肥料施用量對忍冬之金銀花與忍冬藤產量與成分之影響。

a. 忍冬定植 1 周後、b. 忍冬定植 2 個月後、c.d. 搭建網架、e. 網架搭建完成、f. 忍冬開始攀附於網架上。

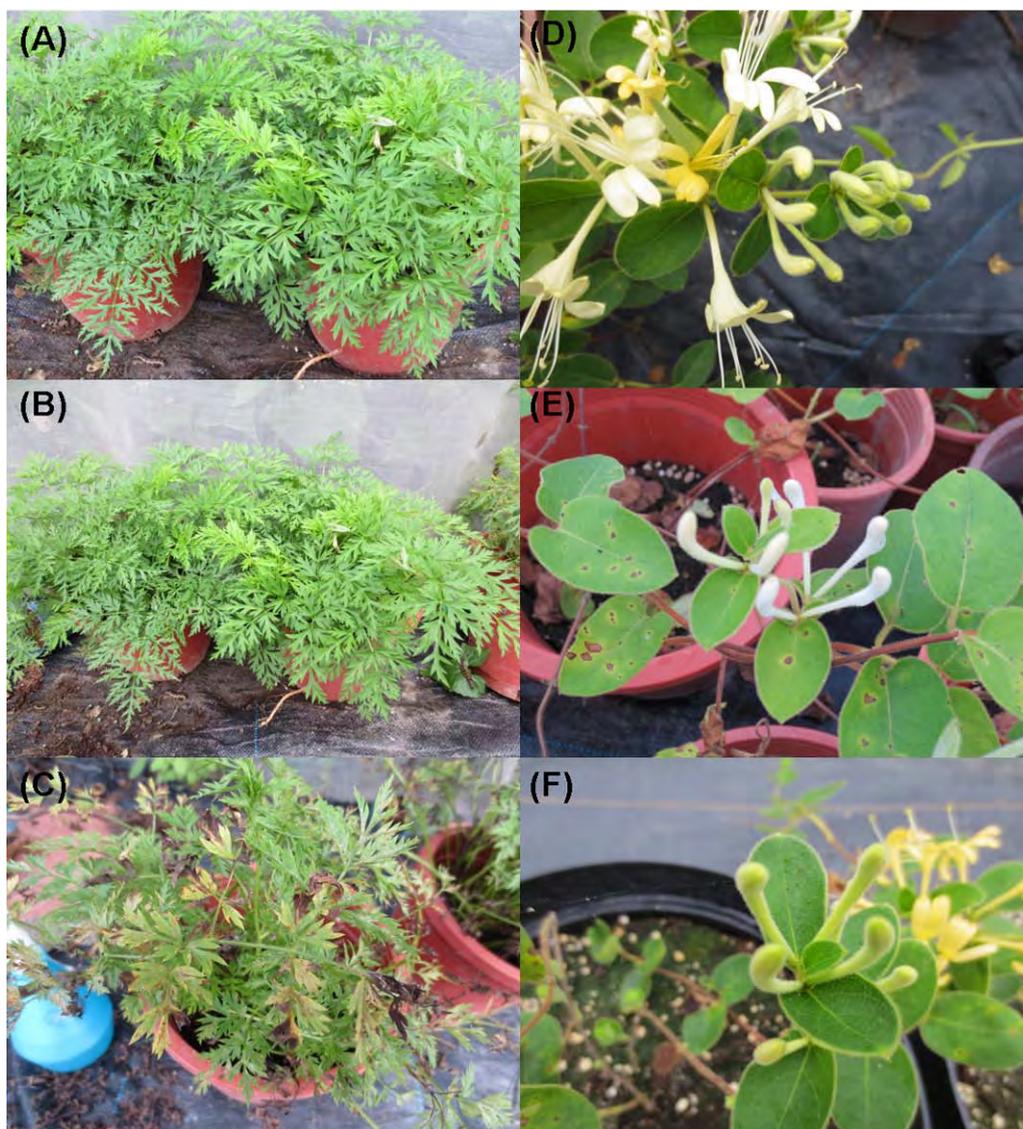


圖 10、本實驗所蒐集並進行田間栽培與觀察之川芎與金銀花種原材料。  
(A) 川芎種原田間馴化期之外觀型態；(B) 川芎種原田間馴化期之  
品種特性評估；(C) 川芎種原田間馴化期之品種特性評估；(D) 金  
銀花種原田間馴化期之外觀型態；(E) 金銀花田間栽培園藝性狀、  
外觀型態與生長習性之調查與分析；(F) 金銀花品種選拔。

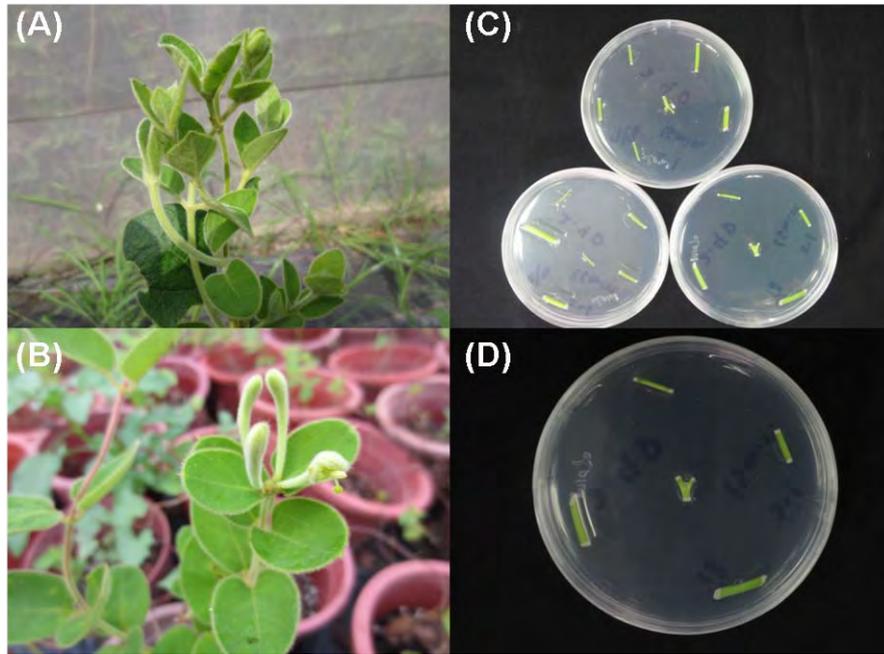


圖 11、金銀花與川芎種原以無性繁殖方式增殖情形。(A) 取田間觀察園藝性狀佳、具高生物活性成分與分蘖數之金銀花種原，以扦插方式進行田間無性繁殖選；(B) 金銀花無性繁殖之後裔；(C) (D)以不同川芎部位進行無性繁殖增殖情形。

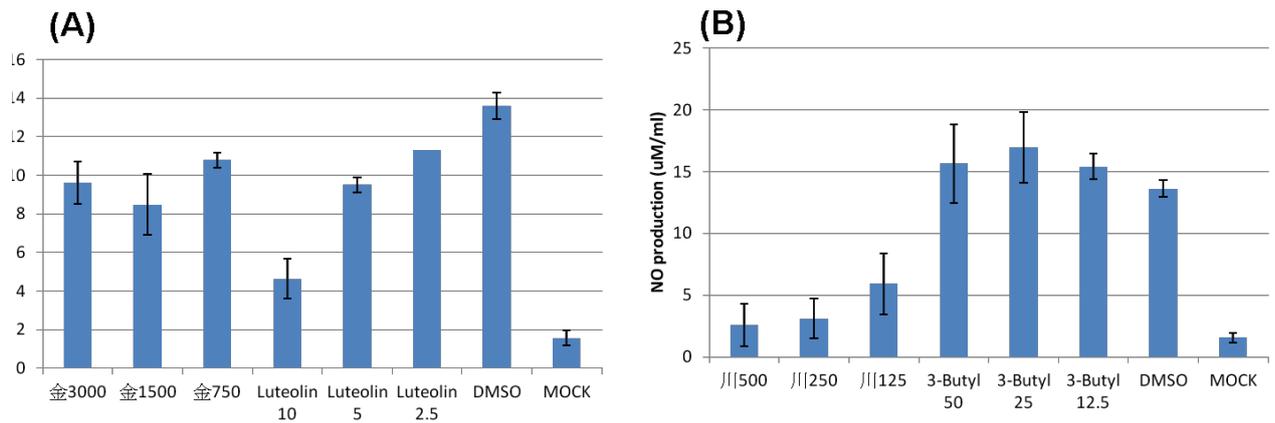


圖 12、不同濃度金銀花萃取物、川芎萃取物，木犀草素(luteolin)標準品與正丁烯基苯酞(3-Butylidene-phthalide) 標準品對已感染 PRV 病毒之 RAW 264.7 細胞株分泌 NO 的影響。(A) 金銀花萃取物與木犀草素；(B) 川芎萃取物與正丁烯基苯酞；將 RAW 264.7 細胞分盤，每孔細胞數為  $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。待其貼附後分別加入各種濃度的金銀花萃取物、川芎萃取物與木犀草素、正丁烯基苯酞，培養 1.5 小時後，再加入 0.1MOI 的 PRV 進行感染，並放入培養箱繼續培養後等 24 小時後收細胞培養液測 NO 濃度。MOCK 未感染病毒之對照組。DMSO 為相對溶劑的劑量組，有感染病毒。

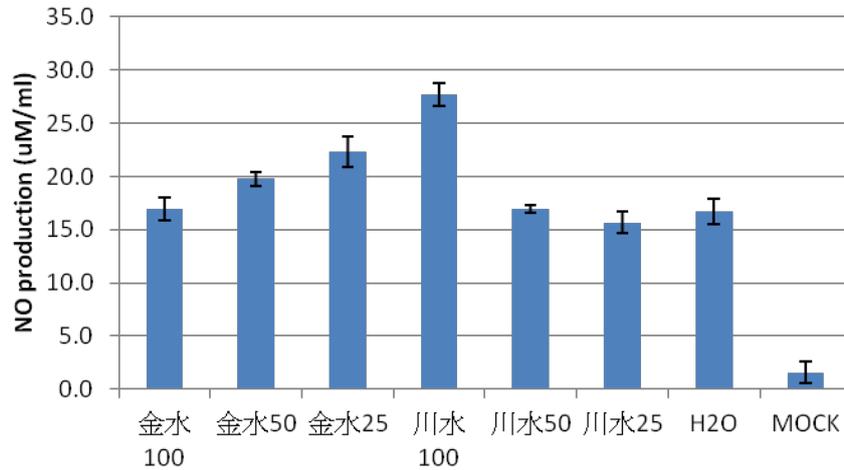
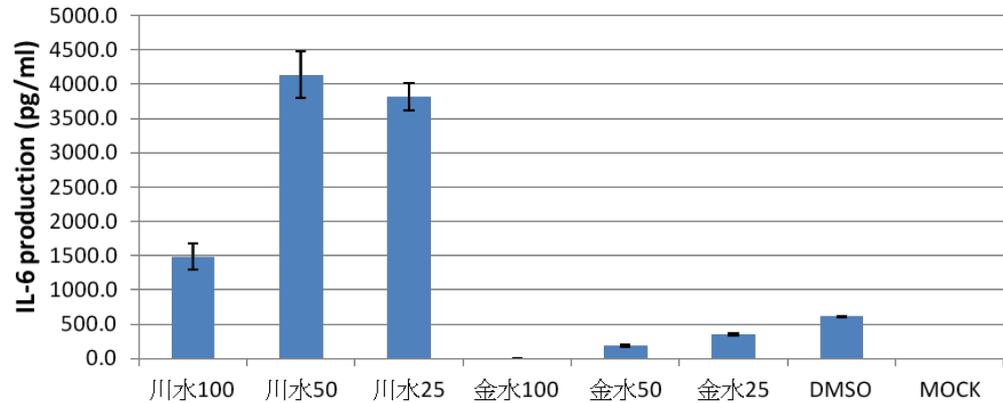


圖 13、不同濃度金銀花萃取物、川芎萃取物對已感染 PRV 病毒之 RAW 264.7 細胞株分泌 NO 的影響。將 RAW 264.7 細胞分盤，每孔細胞數為  $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。待其貼附後分別加入各種濃度的金銀花萃取物、川芎萃取物，培養 1.5 小時後，再加入 0.1MOI 的 PRV 進行感染，並放入培養箱繼續培養後等 24 小時後收細胞培養液測 NO 濃度。Lane 1~10 感染 0.1 MOI 的 PRV。Lane 1~3：金銀花；Lane 4~6：川芎；Lane 7：H<sub>2</sub>O 控制組；Lane 8：未感染病毒之對照組。

(A)



(B)

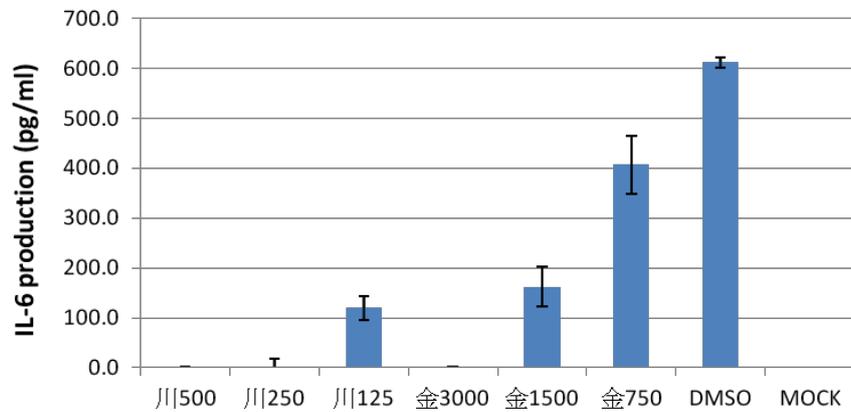


圖 14、不同濃度金銀花、川芎萃取物對已感染 PRV 病毒之 RAW 264.7 細胞株分泌 IL-6 的影響。(A) 金銀花、川芎水萃取物；(B) 金銀花、川芎甲醇萃取物；將 RAW 264.7 細胞分盤，每孔細胞數為  $1 \times 10^6$ /ml。待其貼附後分別加入各種濃度的金銀花萃取物、川芎萃取物，培養 1.5 小時後，再加入 0.1MOI 的 PRV 進行感染，並放入培養箱繼續培養後等 24 小時後收細胞培養液進行 ELISA 分析 IL-6 的濃度。MOCK 未感染病毒之對照組。DMSO 為相對溶劑的對照組，有感染病毒。

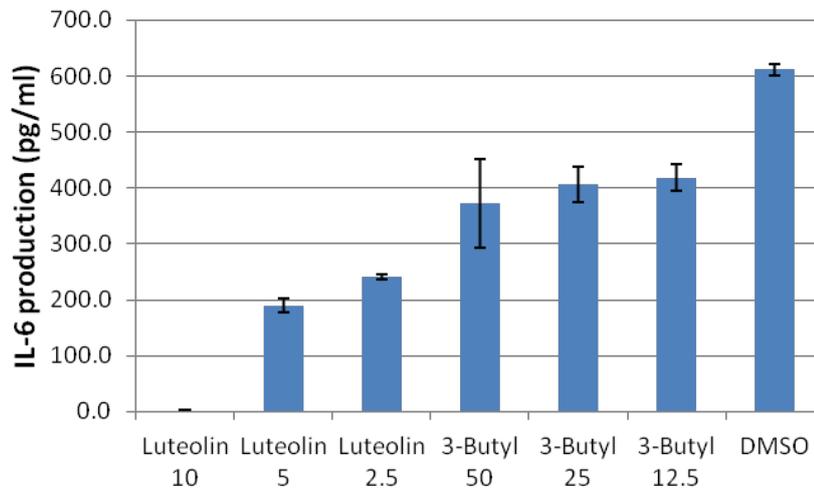


圖 15、不同濃度木犀草素(luteolin)與正丁烯基苯酞(3-Butylidenephthalide)標準品對已感染 PRV 病毒之 RAW 264.7 細胞株分泌 IL-6 的影響。將 RAW 264.7 細胞分盤，每孔細胞數為  $1 \times 10^6$ /ml。待其貼附後分別加入各種濃度的木犀草素與正丁烯基苯，培養 1.5 小時後，再加入 0.1MOI 的 PRV 進行感染，並放入培養箱繼續培養後等 24 小時後收細胞培養液進行 ELISA 分析 IL-6 的濃度。MOCK 未感染病毒之對照組。DMSO 為相對溶劑的對照組，有感染病毒。

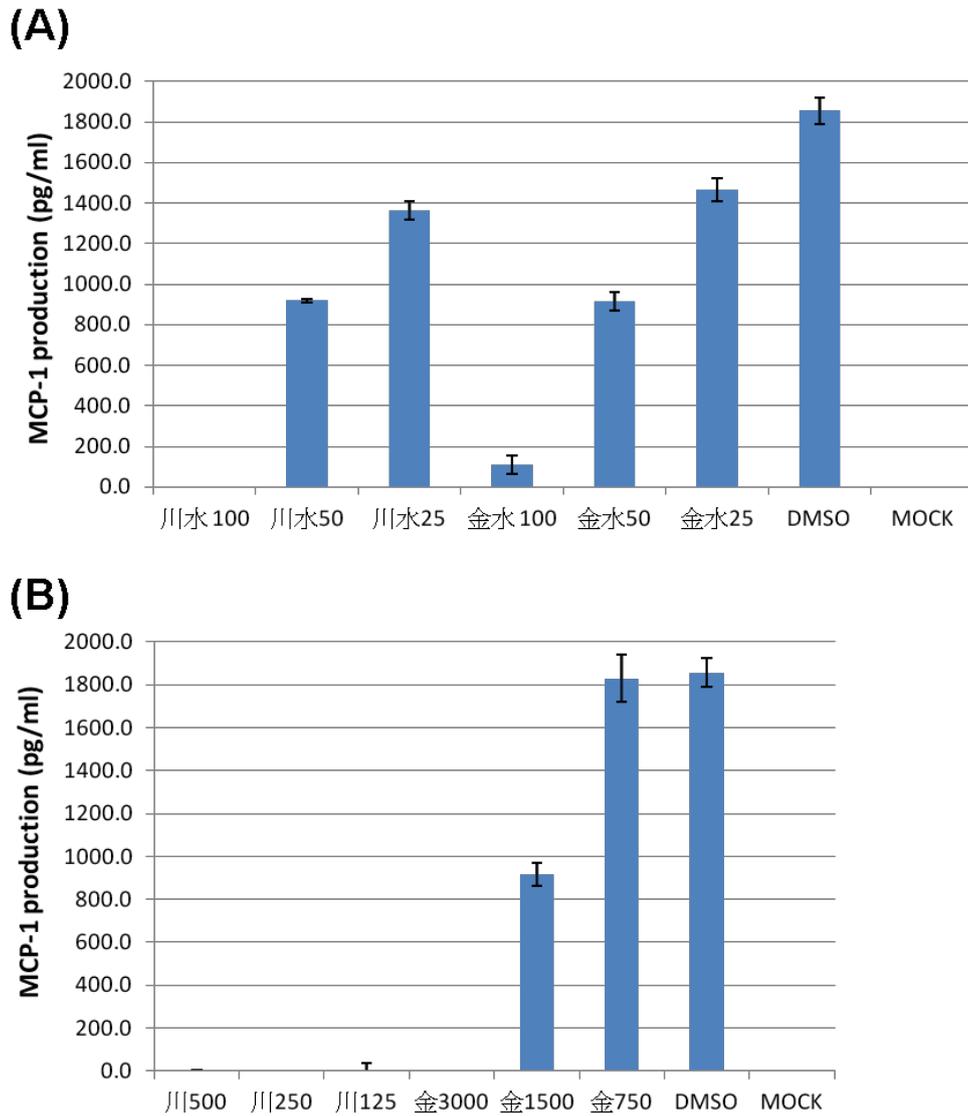


圖 16、不同濃度金銀花、川芎萃取物對已感染 PRV 病毒之 RAW 264.7 細胞株分泌 MCP-1 的影響。(A) 金銀花、川芎水萃取物；(B) 金銀花、川芎甲醇萃取物；將 RAW 264.7 細胞分盤，每孔細胞數為  $1 \times 10^6$ /ml。待其貼附後分別加入各種濃度的金銀花萃取物、川芎萃取物，培養 1.5 小時後，再加入 0.1MOI 的 PRV 進行感染，並放入培養箱繼續培養後等 24 小時後收細胞培養液進行 ELISA 分析 MCP-1 的濃度。MOCK 未感染病毒之對照組。DMSO 為相對溶劑的對照組，有感染病毒。

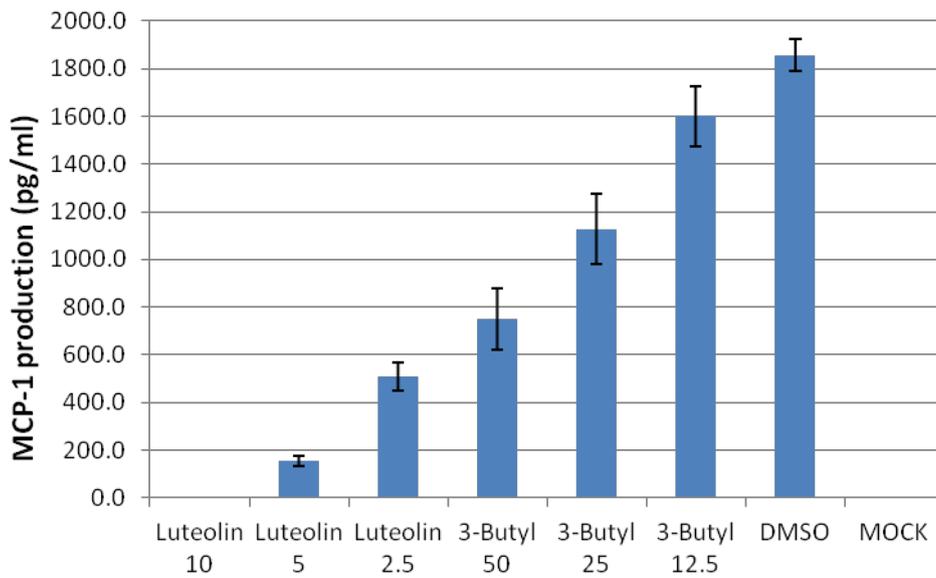


圖 17、不同濃度木犀草素(luteolin)與正丁烯基苯酞(3-Butylidene-phthalide)標準品對已感染 PRV 病毒之 RAW 264.7 細胞株分泌 MCP-1 的影響。將 RAW 264.7 細胞分盤，每孔細胞數為  $1 \times 10^6$ /ml。待其貼附後分別加入各種濃度的木犀草素與正丁烯基苯，培養 1.5 小時後，再加入 0.1MOI 的 PRV 進行感染，並放入培養箱繼續培養後等 24 小時後收細胞培養液進行 ELISA 分析 IL-6 的濃度。MOCK 未感染病毒之對照組。DMSO 為相對溶劑的對照組，有感染病毒。

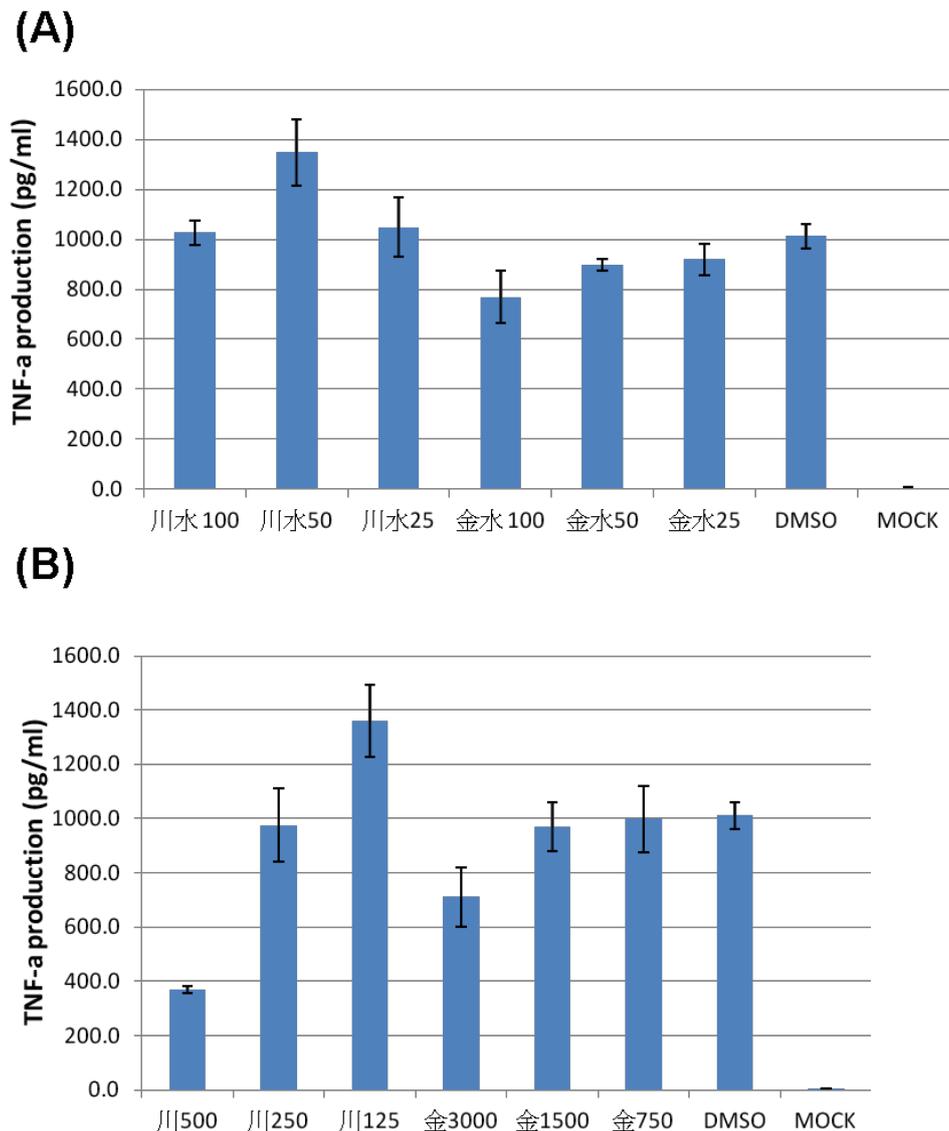


圖 18、不同濃度金銀花、川芎萃取物對已感染 PRV 病毒之 RAW 264.7 細胞株分泌 TNF- $\alpha$  的影響。(A) 金銀花、川芎水萃取物；(B) 金銀花、川芎甲醇萃取物；將 RAW 264.7 細胞分盤，每孔細胞數為  $1 \times 10^6$ /ml。待其貼附後分別加入各種濃度的金銀花萃取物、川芎萃取物，培養 1.5 小時後，再加入 0.1MOI 的 PRV 進行感染，並放入培養箱繼續培養後等 24 小時後收細胞培養液進行 ELISA 分析 TNF- $\alpha$  的濃度。MOCK 未感染病毒之對照組。DMSO 為相對溶劑的對照組，有感染病毒。

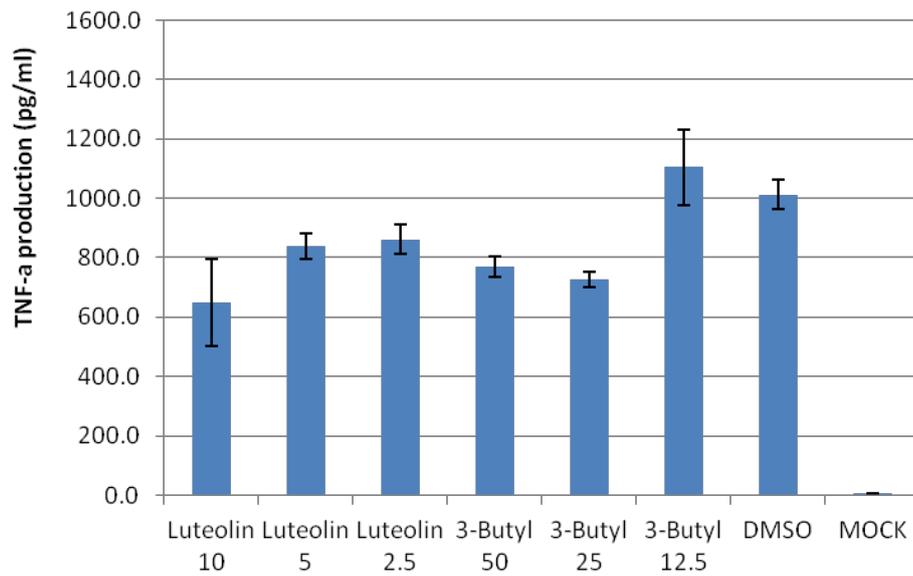


圖 19、不同濃度木犀草素(luteolin)與正丁烯基苯酞(3-Butylidenephthalide)標準品對已感染 PRV 病毒之 RAW 264.7 細胞株分泌 TNF- $\alpha$  的影響。將 RAW 264.7 細胞分盤，每孔細胞數為  $1 \times 10^6$ /ml。待其貼附後分別加入各種濃度的木犀草素與正丁烯基苯，培養 1.5 小時後，再加入 0.1MOI 的 PRV 進行感染，並放入培養箱繼續培養後等 24 小時後收細胞培養液進行 ELISA 分析 TNF- $\alpha$  的濃度。MOCK 未感染病毒之對照組。DMSO 為相對溶劑的對照組，有感染病毒。

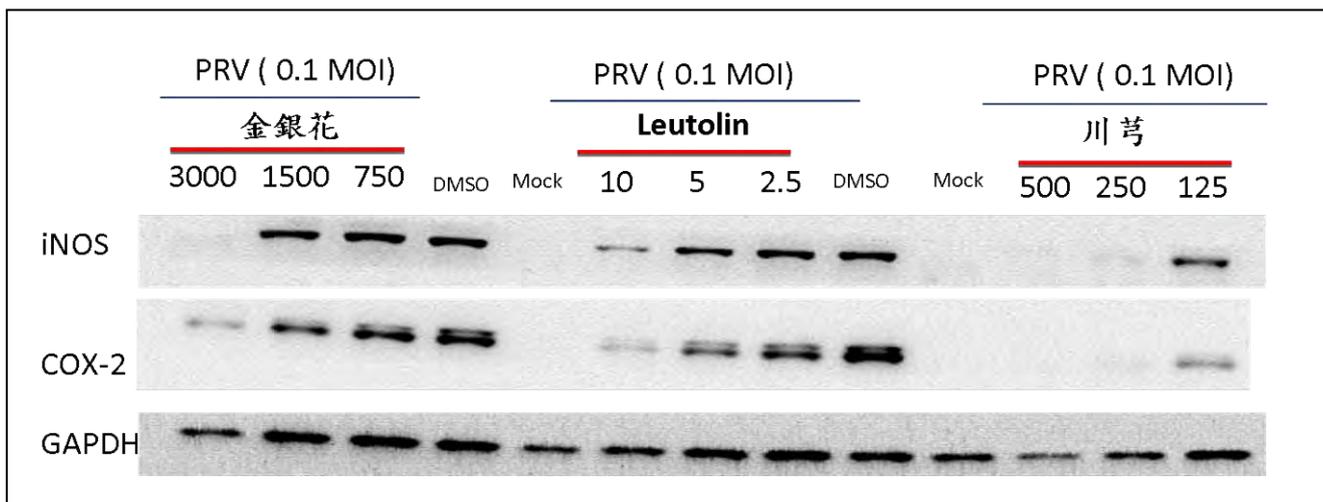


圖 20、利用西方墨點法(western blot)分析金銀花萃取物、川芎萃取物與木犀草素(luteolin)對於 PRV 感染 RAW264.7 細胞後所誘導的發炎性蛋白 iNOS 與 COX-2 之影響。將 RAW 264.7 細胞分盤，每孔細胞數為  $1 \times 10^6$ /ml。待其貼附後分別加入各種濃度的金銀花萃取物、川芎萃取物與木犀草素(luteolin)，培養 1.5 小時，再加入 0.1MOI 的 PRV 進行感染，並放入培養箱繼續培養後等 24 小時後收細胞細胞溶解液進行西方墨點法的分析。DMSO：相對溶劑的對照組；Mock：未感染病毒之對照組。

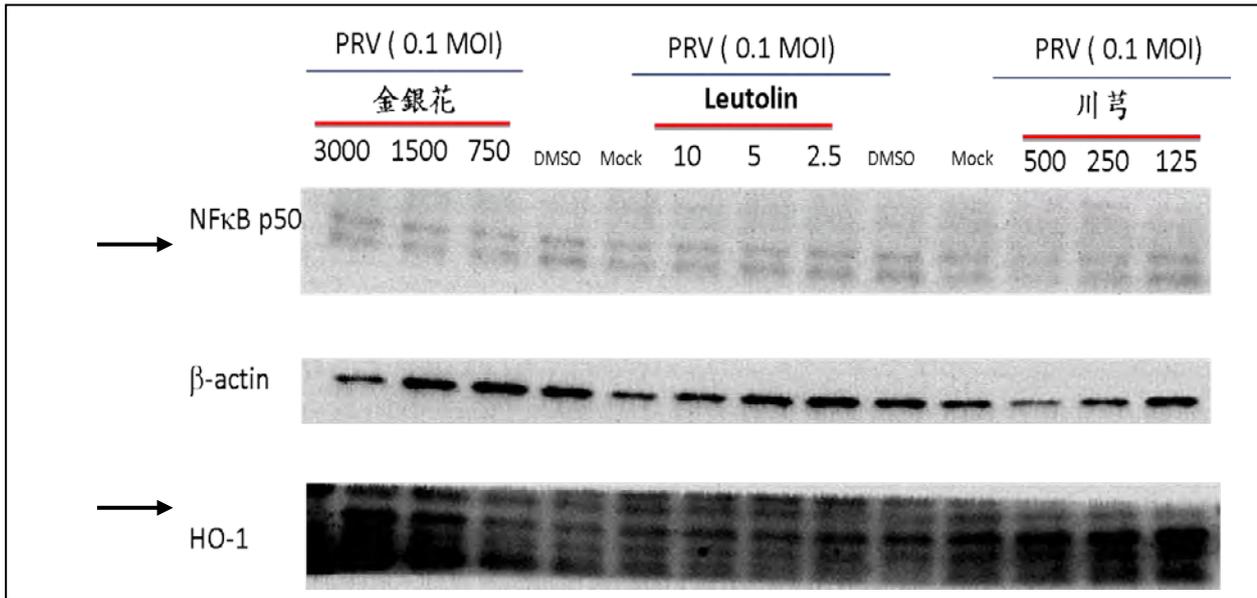


圖 21、利用西方墨點法(western blot)分析金銀花萃取物、川芎萃取物與木犀草素(luteolin)對於 PRV 感染 RAW264.7 細胞後所誘導的發炎性蛋白 NF-κB 與 HO-1 之影響。將 RAW 264.7 細胞分盤，每孔細胞數為  $1 \times 10^6$ /ml。待其貼附後分別加入各種濃度的金銀花萃取物、川芎萃取物與木犀草素(luteolin)，培養 1.5 小時，再加入 0.1MOI 的 PRV 進行感染，並放入培養箱繼續培養後等 24 小時後收細胞細胞溶解液進行西方墨點法的分析。DMSO:相對溶劑的對照組；Mock:未感染病毒之對照組。NF-κB 與 HO-1 蛋白質位置如箭頭所示，NF-κB 分子量 50kD，HO-1 分子量 32kD。

Table 1. 忍冬不同品種農藝性狀

部位/品系	忍冬	追分忍冬	阿里山忍冬
學名	<i>Lonicera japonica</i> Thunb.	<i>Lonicera oiwakensis</i> Hayata.	<i>Lonicera acuminata</i> Wall.
科屬別	忍冬科 忍冬屬	忍冬科 忍冬屬	忍冬科 忍冬屬
別名	金銀花	玉山忍冬	阿里山 金銀花
生長期	多年生	多年生	多年生
分佈地點	台灣全島	台灣北部及中部	台灣全島
海拔	1~1,000 m	1,800~2,300 m	2,000~3,400m
株高	2~4 m	2~4 m	2~4 m
葉位	對生	對生	對生
葉色	綠色	綠色	綠色
葉形	卵形或橢圓形	橢圓形或長橢圓形	披針狀長橢圓形
葉緣	全緣	全緣	全緣
葉脈	網狀脈	網狀脈	網狀脈
老莖顏色	黃棕色	黃棕色	黃棕色
莖形	圓形有稜	圓形有稜	圓形有稜
花序	聚繖花序	聚繖花序	聚繖花序
雌雄花	雌雄同花	雌雄同花	雌雄同花
花色	白色花，開花後 隔天轉金黃色	白色花帶有粉紅色 暈，開花後隔天轉金 黃色	白色花帶紫暈，開花 後隔天轉金黃色
花期	3~11月	6~7月	6~8月
果期	10~11月	7~9月	8~10月

表 2、不同介質對忍冬扦插發根率及植株生育之影響

Reproduce days	Compart	Rooting rate(%)	Plant height(cm)
30Days	A	90.3 a <sup>Z</sup>	1.9
	B	41.6 e	1.5
	C	65.2 c	1.6
	D	58.3 d	1.4
	E	61.1 c	1.7
	F	75.0 bc	1.6
	G	62.5 c	1.8
	H	80.5 ab	1.6
	I	80.5 ab	1.7
F		**	NS

<sup>Z</sup>; Means with the same letter in a column are not significantly different by LSD test at 5% level.

<sup>y</sup>; NS, \*, \*\*, \*\*\* nonsignificant or significant at  $P \leq 0.05$ , 0.01 or 0.001, respectively.

# 中草藥標靶肝型脂肪酸結合蛋白治療肝癌

林榮耀、吳忠信  
國立臺灣師範大學

## 摘要

### 研究目的：

肝細胞癌(HCC)在台灣地區是最常見且致死率排名第二的癌症。致癌基因，肝型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)在肝癌中具高度表現量。我們先前的研究成果指出 L-FABP 可以藉由促進 VEGF-A 及 MMP-2 表現，增加 HEK293 以及 Hus (Immortalized human hepatocyte)細胞轉移與侵襲的能力。最近許多研究證明中草藥藉由促進抗癌藥物的毒殺能力、減少化學療法毒性及抑制癌細胞之侵犯與轉移而可能做為治療腫瘤療法。因此，在此計畫中，我們利用穩定表現 L-FABP 蛋白之細胞株作為篩選中草藥與化合物的平台，並研究其細胞毒殺及抑制細胞移行、侵襲與血管新生的能力。利用免疫缺陷小鼠模式可進一步確定這些化合物是否具有發展為肝細胞癌化療藥物之潛力。

### 研究方法：

一、利用穩定表現 L-FABP 的細胞株 (Hus/L-FABP & Huh7)，從四十種中草藥中篩選並找出兼具低細胞毒殺性與顯著抑制細胞移行、侵襲及血管新生之目標。

方法：Cell viability assay (MTT), Transwell migration & invasion assay

二、探討目標中草藥抑制穩定表現 L-FABP 細胞株中 VEGF-A 及 MMP-2 表現量之機制與其相關訊息傳遞路徑之作用。

方法：Western blot analysis, Confocal microscopy analysis

三、找出目標中草藥中具抗癌作用之有效成分，及其對現有之抗癌化療藥物治療之輔助療法。

方法：HPLC analysis, CI (Combination index) assay

四、利用免疫缺陷小鼠模式進一步確定目標化合物是否具有發展為肝細胞癌化療藥物之潛力。

方法：Xenograft mice model, *in vivo* angiogenesis assay (Matrigel plug in assay)

## 結果與討論：

研究結果顯示，藤梨 (*Actinidia Chinensis*) 的水萃物於 0.4 mg/ml (小於 IC<sub>50C</sub> 之五分之一) 對肝癌細胞株 Huh7 具有 95% 的移行抑制效果。進一步實驗也發現藤梨是一種以 L-FABP 為目標抑制肝細胞癌移行之中草藥。而此一作用可能是藤梨抑制細胞膜上 VEGF-A/VEGFR-2 之活化，導致下游訊息傳遞路徑：Src/ Akt/ mTOR/ 4EBP1 的磷酸化程度降低。將藤梨經由 HPLC analysis 分析出抑制 Huh7 細胞移行之主成分：Corosolic acid，其約占水萃之固型物之 8.4%，並測得其與現行之抗癌標靶藥物 Sorafenib (Nexavar、蕾莎瓦) 有相近之癌細胞移行抑制強度。其機制主要是藉由抑制 VEGF-A/VEGFR2 及其下游 Src/FAK/cdc42 之活化，進而影響肌絲蛋白(Actin)的重組。以 Corosolic acid 合併 Sorafenib 處理 Huh7 細胞，在低濃度下即可對細胞移行產生加成性抑制效果。免疫缺陷小鼠模式亦證實以 5 mg/kg 的濃度每天給予 Corosolic acid，在 21 天後可抑制腫瘤生長達 82%。本研究發現 Corosolic acid 可做為發展新穎抗癌藥物之中草藥有效成分。

關鍵詞：肝細胞癌、中草藥、肝型脂肪酸結合蛋白、移行、血管新生

# Chinese Herbal Medicine Targeting Liver Type Fatty Acid Binding Protein (L-FABP) for Anti-hepatocellular Carcinoma

Jung-Yaw Lin, Chung-Hsin Wu  
National Taiwan Normal University

## ABSTRACT

### Aim:

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common cancers and the second cause of cancer-related deaths in Taiwan. Oncogenic gene, liver type-fatty acid binding protein (L-FABP), was shown to be highly expressed in liver cancer. Our preliminary results showed that L-FABP increased the migration and invasion level of HEK293 and immortalized human hepatocyte (Hus) cells by up-regulating the expression level of VEGF-A and MMP-2. Recent studies showed that Chinese herbal medicines (CHMs) could serve as cancer synergistic therapy by promoting the functions of anti-cancer drugs, reducing the toxicity of chemotherapy, and inhibiting the invasion and metastasis of cancer cells. In this project, we took advantage of the oncogene: L-FABP stably expressed cell lines to screen the water extracts of CHMs and compounds by studying their cytotoxicity and the inhibitory effects on cell migration, invasion and angiogenesis. Immuno-deficient mice model could further verify whether these CHMs have potential for developing clinical chemotherapeutic drugs for HCC therapy.

### Methods:

1. We screened 40 kinds of CHMs and identify CHMs with higher ratio of cytotoxicity/ inhibitory activity of migration, invasion and angiogenesis of L-FABP stably expressed cells.
  - ◎ Cell viability assay (MTT), Transwell migration & invasion assay
2. The mechanisms of Teng Li (*Actinidia Chinensis*) inhibiting the VEGF-A and MMP-2 expression on L-FABP stably expressed cells were elucidated.
  - ◎ Western blot analysis, Confocal microscopy analysis

3. One of active components in Teng Li (*Actinidia Chinensis*) was identified by HPLC analysis, and the synergistic effects with anti-cancer drugs.  
⊙ HPLC analysis, CI (combination index) assay
4. We performed *in vivo* NOD/SCID mice model experiments to examine whether these compounds have potentials for developing novel anti-cancer drugs.  
⊙ Xenograft mice model, *in vivo* angiogenesis assay (Matrigel plug in assay)

## Results:

The water extracts of Teng Li (*Actinidia Chinensis*) (AC) showed 95% migration-inhibitory effect on Huh7 cells at less than on fifth of IC<sub>50C</sub> concentration (0.4 mg/ml), and L-FABP expression Hus cells. Furthermore, AC inhibited the activation of VEGF-A/ VEGFR-2 on cell membrane and reduced the phosphorylation level of down-stream signal transduction: Src/ Akt/ mTOR/ 4EBP1. By HPLC analysis, we examined the active component of AC, corosolic acid, which is about 8.4% of dried weight of AC. Corosolic acid (CA) showed a comparable migration-inhibitory effects with Sorafenib (Nexavar), one of the targeted anti-cancer drugs, on the activation of VEGF-A/ VEGFR-2 and its downstream kinases: Src/ FAK/ cdc42 to reduce the rearrangement of actin. Synergistic effects were also studied by the combination of Corosolic acid and Sorafenib. The results of xenograft model showed that intraperitoneal injection (IP) of Corosolic acid (5 mg/kg/day) decreased tumor growth by 82% after 21 days, and had no effects on body weight of mice.

## Discussion

Among 20 CHMs, AC was found to be active inhibitor suppressing the migration, invasion and angiogenesis of Huh7 cells or Hus/L-FABP cells. The mechanism of the inhibitory activity was elucidated, and AC blocked the VEGF-A/ VEGFR-2 signaling via Src/ FAK/ cdc42 to reduce the rearrangement of actin. One of the active components was identified as corosolic acid, and it showed the similar inhibitory activity as that of AC. The synergistic effects of CA and Sorafenib were carried out, and the effects of CA on the growth of Huh7 cells in NOD/SCID mice model revealed that CA has the potential for developing novel anti-cancer drug will be accomplished in the near future.

Keywords: HCC, CHMs, L-FABP, migration, angiogenesis

## 壹、前言

肝細胞癌(HCC)，簡稱肝癌，在台灣位居癌症致死率之第二名(1)，同時全世界各類癌症的發生率和死亡率統計上，肝癌也始終名列前茅。肝癌的臨床治療上對系統性治療具有強烈的抵抗性，也往往在局部治療後仍復發(2-4)。即使已開發許多抗血管新生之藥物，但肝細胞癌本身即具有抗藥性，患者也常常無法承受高劑量的化學治療而導致存活率降低(5)。因此，在肝癌臨床治療上新的治療標靶仍然有待研發。

此前的研究指出，致癌基因：肝型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP)在肝癌中具高度表現量(6, 7)。本實驗室先前的研究成果也發現 L-FABP 可以藉由促進 VEGF-A 及 MMP-2 表現增加 HEK293 以及 Hus (Immortalized human hepatocyte)細胞移行與侵襲的能力，在小鼠實驗模式上 L-FABP 也能顯著促進腫瘤生長、腫瘤附近的血管新生與經由尾靜脈注射而轉移至肺臟的腫瘤生成。

中草藥在過去的研究中被視為具有預防與治療腫瘤的能力，最近研究亦證明中草藥藉由促進抗癌藥物的毒殺能力、減少化學療法的毒性及抑制癌細胞之侵犯與移行而可能做為治療腫瘤療法之一(8-10)。本計畫將以穩定表現致癌基因：肝型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP)之細胞株作為篩選中草藥的平台，並研究其抑制細胞之增生、移行、侵襲與血管新生的能力。結合免疫缺陷小鼠模式進一步確定這些中草藥中的有效成分具有發展為肝細胞癌化療藥物之潛力。

## 貳、材料與方法

### 一、細胞培養(Cell culture)

本實驗室建立之穩定表現 L-FABP 細胞株培養於含有 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, Logan, Utah)、2 mM L-glutamine、100 U/ml penicillin 與 100 U/ml streptomycin 之 DMEM (Invitrogen) 培養液，並置於 37°C 及 5% CO<sub>2</sub> 之培養箱中。

### 二、MTT assay

Huh7 細胞( $1 \times 10^3$  cells)以不同濃度之中藥處理 24 小時後，移除舊 medium，將 100  $\mu$ l 含 MTT (0.5 mg/ml) 之 medium 加入各 well，於 37°C 培養 4 小時，加入 100  $\mu$ l 含 10% SDS 與 0.01N HCl 的溶液作用，以 ELISA reader 測定其在波長 570 nm 的吸光度。其 IC<sub>50C</sub> (C: cytotoxicity) 即代表藥物能抑制 50% 癌細胞生長之毒殺濃度。

### 三、細胞移行能力分析(Transwell cell mobility assay)

細胞移行能力以 Transwell Boyden Chamber (BD Biosciences) 測定。經中草藥處理之細胞(Huh7:  $1 \times 10^5$  cells, Hus:  $1 \times 10^4$  cells) 以不含 FBS 之 medium 接種於 transwell chamber 並培養 12 小時後，以 10% formaldehyde/PBS 固定及 0.5% 結晶紫染色，再以倒立顯微鏡觀察並記錄移行至 transwell chamber 底部的細胞，其 IC<sub>50M</sub> (M: migration) 即代表藥物能抑制 50% 癌細胞生長之毒殺濃度。

### 四、細胞侵犯能力分析(Matrigel invasion assay)

侵犯能力分析進行之前，先於 transwell chamber 先覆蓋 Matrigel (Colaborative Biomedical)。懸浮 Huh7 細胞( $1 \times 10^5$  cells) 於不含 FBS 之 medium 並接種至覆蓋 Matrigel 之 transwell chamber 中培養 18 小時，以 10% formaldehyde/PBS 固定及 0.5% 結晶紫染色，再以倒立顯微鏡觀察並記錄侵犯至 transwell chamber 底部的細胞。

### 五、以 Tumor cell xenograft mice 分析中草藥抗癌作用

#### (一) 抑制腫瘤增生之分析

Huh7 細胞 ( $5 \times 10^6$  cells) 以皮下注射於免疫缺陷小鼠 (NOD-SCID mice) 後大腿，待腫瘤大小達 50 mm<sup>3</sup> 後 (約 10 天) 開始給予待測藥物並記錄小鼠體重及腫瘤體積。腫瘤體積計算公式為： $0.5 \times (\text{腫瘤寬度})^2 \times (\text{腫瘤長度})$ 。45 天後犧牲小鼠取其腫瘤紀錄其重量，另外亦將取肝臟與肺臟觀察是否有發生腫瘤轉移，

經福馬林固定後進行組織切片染色以觀察藥物是否可抑制腫瘤轉移與生長。

## (二) 抑制腫瘤血管新生之分析

Huh7 細胞( $2 \times 10^6$  cells)與 Matrigel 及藥物混合之後以皮下注射方式打入 NOD-SCID mice 腹部右側接近大腿處，並給予待測藥物，每日記錄小鼠體重。經 10 天後，犧牲小鼠並將 Matrigel 取出，經福馬林固定後進行組織切片染色(CD31 抗體)，以觀察藥物是否可抑制腫瘤細胞血管新生。

本計畫之動物實驗遵照國立臺灣大學醫學院與國立臺灣師範大學實驗動物中心管理辦法並經實驗動物管理委員會核准。

## 六、即時聚合酶連鎖反應定量分析(Quantitative real-time PCR analysis)

Huh7 細胞( $1 \times 10^6$  cells)之 total RNA 以 TRIzol™ (Invitrogen)試劑萃取並以 RNase-free DNase I (Takara)處理以去除 DNA，再將 2  $\mu$ g 以 SuperScript™ II Reverse Transcriptase kit 反轉錄成 cDNA。即時 PCR 反應以 iCycler iQ Real-time PCR detection system (Bio-Rad)進行。GAPDH 基因表現量將做為 internal control。相對基因表現量以  $-\Delta Ct = (Ct_{\text{gene}} - Ct_{\text{GAPDH}})$  呈現，而基因表現變化量則以  $2^{(-\Delta Ct)}$  計算之。

## 七、西方轉漬分析(Western blot analysis)

經中草藥處理之 Huh7 或 Hus 細胞( $1 \times 10^6$  cells)先以 PBS 清洗後，再以 RIPA buffer (含 1% Nonidet P-40、0.1% SDS、0.5% sodium deoxycholate、5 mM EDTA 與 Roche protease inhibitor) 溶解。以 bicinchoninic acid protein assay kit (Pierce)測定蛋白質濃度後，進行 SDS-PAGE 並轉漬至 PVDF membrane，經 blocking 後加入一級抗體並於 4°C 反應 18 小時，接以 TBST 清洗 PVDF membrane 三次。之後加入適當之二級抗體於室溫反應 1 小時，再以 TBST 清洗三次。最後，利用 enhanced chemiluminescence (ECL)系統與二級抗體上所結合之 Horseradish peroxidase 進行反應產生冷光，並以 FUJIFILM 冷光影像分析系統觀察記錄。

## 八、高效液相色層分析(High-Performance Liquid Chromatography, HPLC)

中草藥水萃物將採用 Agilent Series 1100 (Agilent, Wilmington, Germany)系統進行 HPLC 分析。使用 Alltima C18 管柱(4.6mm\_250 mm, 5m m, Alltech, Illinois, U.S.A.)進行成分分離。Mobile phase 使用 Solvent A (water/MeCN/formic acid, 90 : 10 : 0.4, v/v) 與 solvent B (MeCN) (1.0 ml/min)。

## 九、資料分析 (Statistics analysis)

實驗所得結果將以平均值±標準差顯示，並利用 SigmaPlot 統計軟體進行統計分析，當  $p < 0.05$  表示具顯著差異。

## 參、結果

### 一、二十種中草藥對 Huh7 細胞之 IC<sub>50</sub> cytotoxicity 及 IC<sub>50</sub> migration 之分析

我們以 MTT assay 分析 20 種常見中草藥對肝癌細胞株 Huh7 ( $1 \times 10^3$  cells) 的細胞毒殺效果(cytotoxicity)，並計算出毒殺 50% 細胞的濃度，定義為 IC<sub>50C</sub>；另外以 Boyden chamber transwell assay 計算出這些中草藥抑制 50% 細胞移行(migration)的濃度，定義為 IC<sub>50M</sub>，並以 IC<sub>50C</sub>/IC<sub>50M</sub> 為參考值，找出在低細胞毒殺濃度下能有效抑制 Huh7 細胞移行能力的中草藥，所示如表一。

### 二、羌活、枳椇根、藤梨、官真 癩及山梔子抑制 Hus/L-FABP 細胞 Migration 之分析

我們從中初步篩選出 5 種目標中草藥進行下一步分析，分別為羌活、枳椇根、藤梨、官真癩、山梔子，並以本實驗室培養之穩定表現肝型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) 的 Hus cell (immortalized cell line derived from human primary hepatocytes) ( $1 \times 10^4$  cells)，以及降低 L-FABP 表現的肝癌細胞株 Huh7 ( $1 \times 10^5$  cells) 進行實驗。初步實驗發現，藤梨水萃物對 Hus/L-FABP 及 Huh7 細胞都有良好的移行抑制效果(圖一-A & -B)。進一步探討藤梨水萃物是否對 L-FABP 表現量多的細胞有較好的移行抑制效果，結果顯示藤梨水萃物於 0.2 mg/ml 對於 L-FABP 穩定表現之 Hus/L-FABP 細胞( $1 \times 10^4$  cells) 具有 95% 明顯的移行抑制效果，但對正常 Hus 細胞則只有 45% 抑制作用；相對的，藤梨水萃物於 0.4 mg/ml 也對表現 L-FABP 較多的 Huh7 細胞 ( $1 \times 10^5$  cells) 有 95% 的移行抑制效果(圖一-C)，但對 Huh7/shL-FABP 細胞只有 55% 抑制效果。因此，我們初步確定藤梨可能是一種以 L-FABP 為目標去抑制肝癌細胞移行的中草藥。

### 三、藤梨對 Huh7 癌細胞 Migration 之作用機轉為抑制 VEGF-A/VEGFR2 之訊息傳導

我們利用 Western blot analysis 分析並發現， $1.5 \times IC_{50M}$  濃度(0.3 mg/ml) 藤梨水萃物可抑制 Huh7 細胞藉由處理 VEGF 所引起的 VEGF-A、MMP-2 與 HIF-1 $\alpha$  上升，其抑制各為 82%、55% (與 control 組比較)、及 63% (與 control 組比較) (圖二-A)。進一步去探討藤梨抑制 Huh7 細胞移行的機制，我們發現在短時間(1.5 小時)內，藤梨水萃物(0.3 mg/ml)即可有效抑制 Src、FAK、Akt、mTOR 及 4EBP1 的磷酸化，各為 71、70、64、72 及 81% (圖二-B)，

此結果顯示藤梨水萃物可經 VEGF-A/VEGFR-2 抑制下游訊息傳遞路徑的訊息傳遞。另一方面，我們利用共軛焦顯微鏡觀察短時間內，藤梨是否具有抑制 VEGFR-2 受體在細胞膜上的 dimerization，進而阻止 VEGFR-2 下游訊息傳遞。實驗結果指出，加入藤梨水萃物 (0.3 mg/ml)，在 15 分鐘後，可明顯觀察到 VEGFR-2 的 dimerization 減少達 71% (圖三-A 左)。此一現象可能是因為藤梨水萃物可抑制 L-FABP 在細胞膜上與 VEGFR-2 Co-localization (圖三-A 右)。我們也以 Western blot analysis 觀察 VEGFR-2 的磷酸化情形，藤梨水萃物於 30 分鐘~1 小時即可抑制 VEGFR-2 的磷酸化各 86 及 107% (圖三-B)。

#### 四、由藤梨水萃物分離出抑制 Huh7 細胞 Migration 之主成分-Corosolic acid

我們以 Ursolic acid (之後稱為 UA) 與 Corosolic acid (之後稱為 CA) 當標準品，利用 HPLC analysis 分析藤梨中的有效化合物。結果顯示 CA 在藤梨水萃物中為含量第二多的化合物，約占藤梨固體之 8.4% (圖四-A)，並測得 CA 對 Huh7 細胞的  $IC_{50C}$  為 15  $\mu\text{g/ml}$ ，而  $IC_{50M}$  為 1  $\mu\text{g/ml}$ ，因此其  $IC_{50C}/IC_{50M}$  的比值  $>10$  (圖四-B)，代表 CA 具有在低細胞毒殺濃度下有效抑制細胞爬行能力的特性。之後將 CA 與已在臨床上使用之肝癌標靶藥物 Sorafenib (Nexavar, 蕾莎瓦) 做比較，發現 Corosolic acid 對於抑制肝癌細胞株 Huh7 移行的能力與 Sorafenib 相似 (圖四-C)，而 UA 對於 Huh7 細胞移行能力幾乎無抑制效果。由於 Sorafenib 是以抑制 VEGFR-2 磷酸化為治療標靶，而前面的實驗已經發現藤梨能抑制 VEGFR-2 磷酸化以降低肝癌細胞的移行能力，推測 CA 可能是藤梨中主要的有效活性化合物。

#### 五、Corosolic acid 抑制 Huh7 細胞之 Migration、VEGF-A/VEGFR-2 及 cdc42 之活化

接著我們利用 Western blot analysis 分析並發現，1  $\mu\text{g/ml}$  的 CA 即可抑制 Huh7 細胞藉由處理 VEGF-A 所引起的 VEGFR-2 與 Src kinase 活化，其抑制各為 45 及 64%，並與劑量成正相關 (圖五-A)。由於 Src kinase 也會影響 FAK 活化，而 FAK 下游的 Rho GTPase 亦為影響細胞爬行的重要機制，因此我們利用 Rho-GTPase binding assay 觀察 cdc42、RhoA 與 Rac1 是否參與 CA 所抑制之細胞爬行。結果顯示 CA (1  $\mu\text{g/ml}$ ) 可有效抑制 FAK 的活化達 51% 與 GTP-cdc42 (有活性之 cdc42) 達 45% (圖五-B)。進而影響肌絲蛋白 (Actin) 重組。

#### 六、Corosolic acid 與 Sorafenib 對抑制 Huh7 細胞移行的協同性分析

Sorafenib (Nexavar) 為目前臨床上治療肝癌的一線用藥，然而在許多病

人上的治療效果並不顯著。因此我們利用不同劑量的 CA (0.25~1  $\mu\text{g/ml}$ )與 Sorafenib (0.5~4  $\mu\text{M}$ )組合並處理 Huh7 細胞株，結果發現在 CA 與 Sorafenib 不同組合下對抑制 Huh7 細胞移行皆具有協同性作用，其中以 CA (1  $\mu\text{g/ml}$ )結合 Sorafenib (1  $\mu\text{M}$ )其 combination index 最為顯著(CI=0.13) (圖六-A)。以西方墨點法進行實驗亦證實 CA 與 Sorafenib 對抑制 Huh7 細胞內 Src、FAK 及 Akt 活化有加成效果 (圖六-B)。另外我們也發現以 CA 處理一些針對 Sorafenib 有強烈的抗藥性的細胞株，例如 Hep3B，有良好的移行抑制效果(圖八)。以上實驗顯示 CA 可以做為現行抗癌藥物 Sorafenib 的輔助治療藥物，並且有可能抑制一些具強烈抗藥性癌細胞的細胞移行。

#### 七、Corosolic acid 可抑制異種皮移植小鼠模式中的腫瘤生長

利用異種皮移植 (xenograft)模式將 Huh7 細胞 ( $2.5 \times 10^6$  cells/mice)打入 NOD/SCID 小鼠的背側皮下，7 天後待腫瘤長出後開始給藥，以腹腔注射(IP)的方式每天投與每隻小鼠 Corosolic acid (5 mg/kg)。21 天後犧牲小鼠並取出腫瘤，測量重量及體積，並以福馬林固定後做切片分析。結果顯示，CA 可有效抑制小鼠皮下腫瘤生長達 82% (圖七)，而小鼠體重並無明顯變化，顯示 CA 並不會造成細胞或活體毒性。本實驗證實了 CA 在活體(*in vivo*)模式下仍具有顯著的抗癌效果。

## 肆、討論

血管新生對腫瘤成長是非常重要的過程，而腫瘤細胞也可藉由新生之血管侵襲並轉移到其他組織(11)。血管內皮因子(VEGF)對誘導血管內皮細胞增生為血管非常重要，組織切片結果也顯示，肝癌患者體內其 VEGF 表現量高於正常人。因此，在臨床治療上已開發許多抗血管新生之藥物，例如：Sorafenib (Nexavar), Sunitinib (Sutent), Pazopanib (Votrient)等(12)。即使已開發許多抗血管新生之藥物，但肝細胞癌本身即具有抗藥性、患者也常常無法承受高劑量的化學治療而導致存活率降低(13)。因此，在臨床治療上針對血管新生的新標的仍然有待被研發。

之前的研究指出，致癌基因：肝型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP)在肝癌中具高度表現量(6-7)，且 L-FABP 與 VEGF-A 表現量成正相關(6)。本實驗室先前的研究成果也發現 L-FABP 可以藉由促進 VEGF-A 及 MMP-2 表現增加 HEK293 以及 Hus (Immortalized human hepatocyte)細胞移行與侵襲的能力。小鼠實驗也發現皮下注射表現 L-FABP 細胞而形成腫瘤之小鼠，體內的 VEGF-A 表現量高於對照組。

因此，在本計畫中我們利用已建立之穩定表現 L-FABP 的正常肝細胞株 (Hus/L-FABP)，與肝癌細胞株 Huh7 作為平台，在二十種中草藥水萃物中篩選出五種對肝細胞癌移行能力有顯著抑制效果的中草藥，分別為：羌活、括樓根、藤梨、官真癩及山梔子。這些中草藥同時兼具低細胞毒殺性與顯著的細胞移行抑制效果，因此在做為臨床用藥時可能較不會對人體產生過量用藥之副作用。

將這些中草藥同時處理表現 L-FABP 與否的細胞株 (Hus/Vector & Hus/L-FABP、Huh7/Control & Huh7/L-FABP shRNA)發現，只有藤梨水萃物對 L-FABP 表現量高的細胞有較顯著的移行抑制效果，意即藤梨是一種以 L-FABP 為目標抑制肝細胞癌移行之中草藥。而此一作用可能是藤梨水萃物抑制細胞膜上 VEGF-A/VEGFR-2 之活化，導致下游訊息傳遞路徑：Src/ Akt/ mTOR/ p70S6K/ 4EBP1 的磷酸化程度降低。進而降低細胞內 VEGF-A 的生成並抑制細胞移行。

為了找出藤梨水萃物中的活性成分，我們以 Corosolic acid 與 Ursolic acid 為標準品，利用 HPLC analysis 分析出藤梨中抑制 Huh7 細胞移行之主成分：Corosolic acid，而其組成約占藤梨水萃物內化合物總量之 8.4%。之後實驗計算出 Corosolic acid 有效抑制細胞移行 50% (IC<sub>50M</sub>)劑量為 1 µg/ml，

並測得其與現行之抗癌標靶藥物 Sorafenib (Nexavar、蕾莎瓦)有相近之癌細胞移行抑制效果。

細胞移行受到細胞內結構分子—肌絲蛋白(Actin)的動態分布所影響。而肌絲蛋白重組主要是被細胞內三種 Rho GTPase 調控，分別為：cdc42、RhoA 及 Rac1，其中以 cdc42 為最主要之調控路徑(14)。進一步實驗發現其機制主要是藉由抑制 VEGF-A/VEGFR-2 及其下游 Src/FAK/cdc42 之活化，進而影響肌絲蛋白(Actin)的重組，降低癌細胞的移行能力。

## 伍、結論與建議

研究結果顯示，藤梨 (*Actinidia Chinensis*)的水萃物於低細胞毒殺濃度 (0.4 mg/ml)對肝癌細胞株 Huh7 具有 95%的移行抑制效果。進一步實驗也發現藤梨是一種以 L-FABP 為目標抑制肝細胞癌移行之中草藥。而此一作用可能是藤梨抑制細胞膜上 VEGF-A/VEGFR-2 之活化，導致下游訊息傳遞路徑：Src/ Akt/ mTOR/ p70S6K/ 4EBP1 的磷酸化程度降低。將藤梨經由 HPLC analysis 分析出抑制 Huh7 細胞移行之主成分：Corosolic acid 約占水萃物內化合物總量之 8.4%，並測得其與現行之抗癌標靶藥物 Sorafenib (Nexavar、蕾莎瓦)有相近之癌細胞移行抑制效果。其機制主要是藉由抑制 VEGF-A/VEGFR2 及其下游 Src/FAK/cdc42 之活化，進而影響肌絲蛋白 (Actin)的重組。

Corosolic acid 在活體 (*in vivo*)小鼠模式相關實驗中能顯著抑制腫瘤生長，而其與 Sorafenib 一起作用下也有明顯的協同性 (Synergistic effects)抗細胞移行作用，這些實驗證實 Corosolic acid 可做為發展新穎抗癌藥物之中草藥有效成分。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP102-RD-006 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

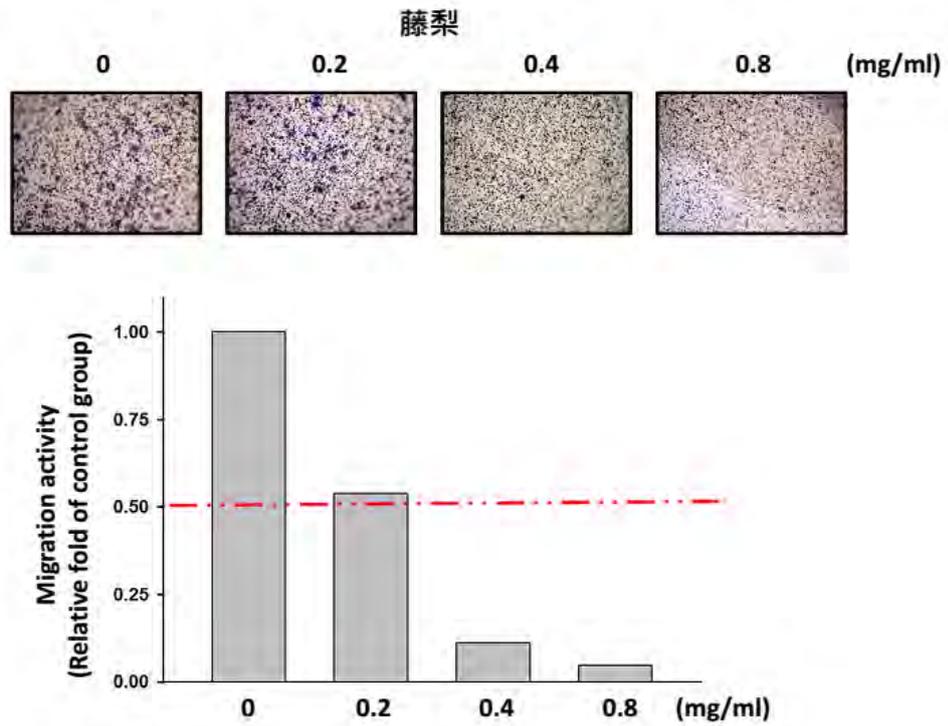
1. 行政院衛生署 101 年死因統計，102 年 10 月 20 日取自行政院衛生署統計  
(<http://health99.doh.gov.tw/txt/HealthyHeadlineZone/HealthyHeadlineDetail.aspx?TopIcNo=6798>)
2. Paola S, Luca M, Cinzia C, Deniz T, Antonio B. *AJP-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2006, 290:624-632.
3. Caecilia HC, Natalia R, Lory SC, Claudio T. *World J Hepatol* 2010, 3:114-126.
4. Naoki O, Xin WW. *Int J Biol Sci* 2011, 5:517-535.
5. Redmond K. *Eur J Cancer Care (Engl)* 1996, 5:1-7.
6. Dong LH, Li H, Wang F, Li FQ, Zhou HY, Yang HJ. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2007, 3:318-321.
7. Toshimitsu S, Kazuo W. *J Pathol* 1990, 161:79-83.
8. Konkimalla VB, Efferth T. *J Ethnopharmacol* 2008, 116:207-210.
9. Cui Y, Shu XO, Gao Y, Wen W, Ruan ZX, Jin F, Zheng W. *Breast Cancer Res Treat* 2004, 85:263-270.
10. Richardson MA, Sanders T, Palmer JL, Greisinger A, Singletary SE. *J Clin Oncol* 2000, 18:2505-2514.
11. Hanahan D, Weinberg RA. *Cell* 2000, 100:57-70.
12. David S, Jean FD. *Journal of Hepatology* 2004, 41:864-880.
13. Huynh C, Hung P. *Anti-cancer Res* 2012, 32:1379-1386.
14. Satyajit K, David D. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, 6:56-58

柒、圖、表

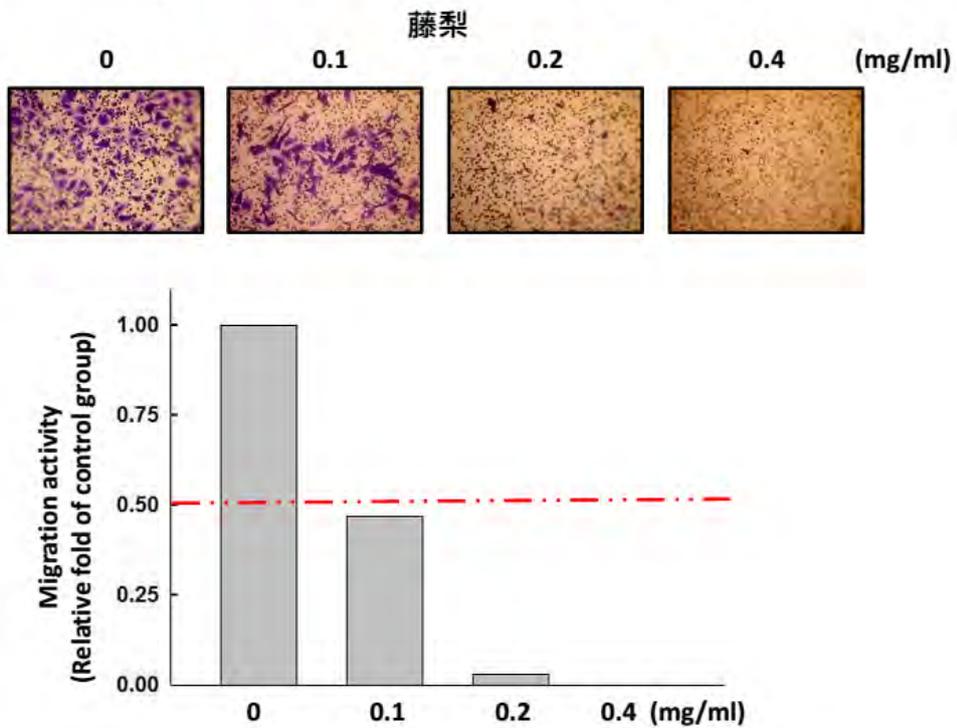
表一. 擬分析之中草藥對Huh7細胞的細胞毒殺及移行抑制效果 (本表未換算乾重)

	學名	IC <sub>50C</sub> (mg/ml)	IC <sub>50M</sub> (mg/ml)	IC <sub>50C</sub> /IC <sub>50M</sub>
山梔子	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	30	<2.5	>12
木香	<i>Saussurea lappa</i>	>20	2.5	>8
括樓根	<i>Gardenia jasminoides</i>	>40	0~5	>8
藤梨	<i>Actinidia chinensis</i>	>40	5~10	>8
香附子	<i>Cyperus rotundus</i>	>40	<5	>8
官真癩	<i>Aeginetia indica</i>	10~20	<2.5	4~8
白藜	<i>Ampelopsis tinctoria</i>	20~40	5~10	4~8
拳蓼	<i>Polygonum bistorta</i>	7.5	1.4	5
羌活	<i>Notopterygium incisum</i>	20	5~10	2~4
牡丹皮	<i>Paeonia suffruticosa</i>	10~20	5	2~4
枸杞子	<i>Lycium chinensis</i>	40	16.8	2.5
板藍根	<i>Isatis indigotica</i>	>40	>20	2
地黃	<i>Rehmannia glutinosa</i>	20~40	10~20	1~2
黃耆	<i>Astragalus membranaceus</i>	>10	14.8	<1
薑黃	<i>Curcuma longa</i>	>40	*	
白芍	<i>Paeoniae lactiflorae</i>	*	<2	
知母	<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	*	<2.5	
川芎	<i>Ligusticum rhizome</i>	*	2~4	
黃芩	<i>Scutellaria baicalensis</i>	*	4~8	
五味子	<i>Schisandra chinensis</i>	*	5	
當歸	<i>Angelica sinensis</i>	*	>10	

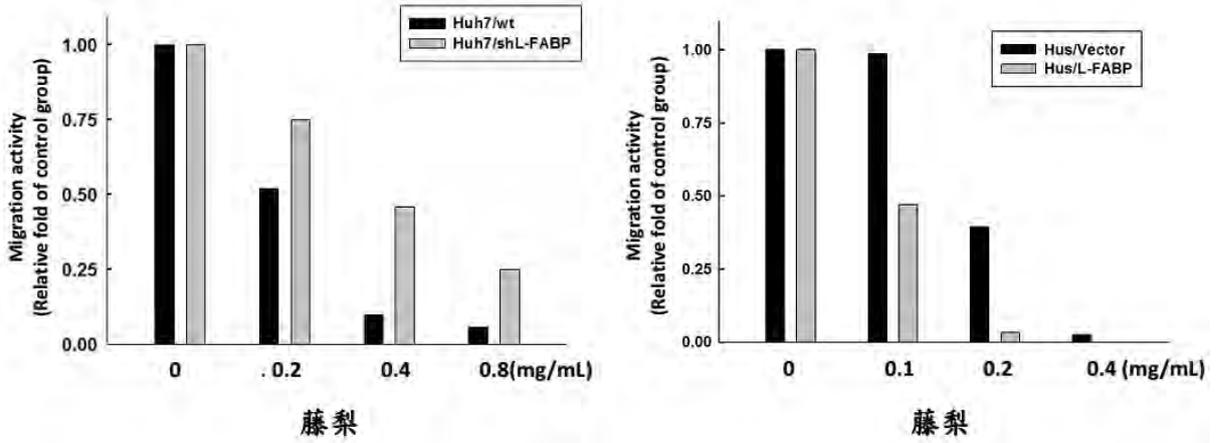
圖一-A 藤梨於 0.2 mg/ml可抑制Huh7細胞爬行能力53%



圖一-B 藤梨於 0.1 mg/ml可抑制Hus/L-FABP細胞爬行能力48%

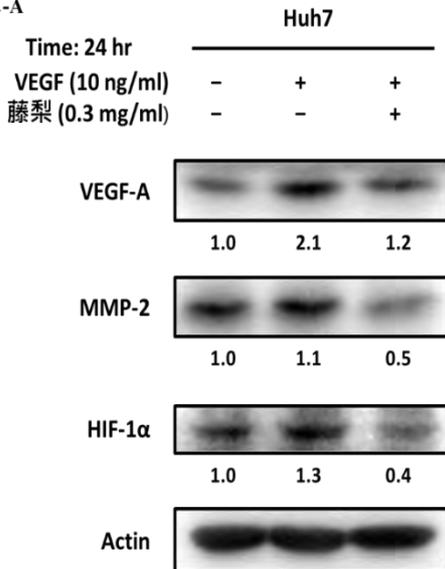


圖一-C 藤梨對顯著表現L-FABP的細胞有較好的爬行抑制效果

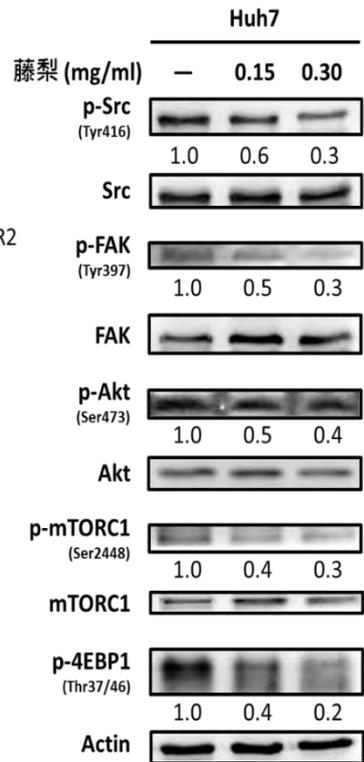
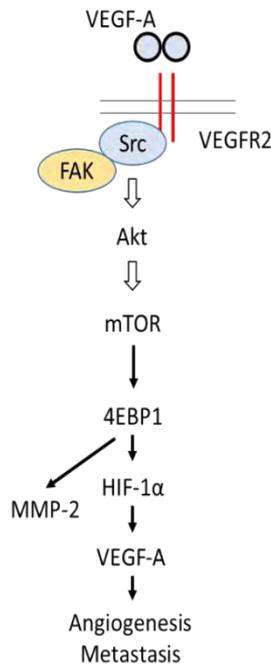


圖二 二-A. 藤梨抑制Huh7細胞內VEGF-A,MMP-2及HIF-1 $\alpha$ 的表現  
二-B. 藤梨抑制Huh7細胞內VEGFR2之下游訊息傳遞

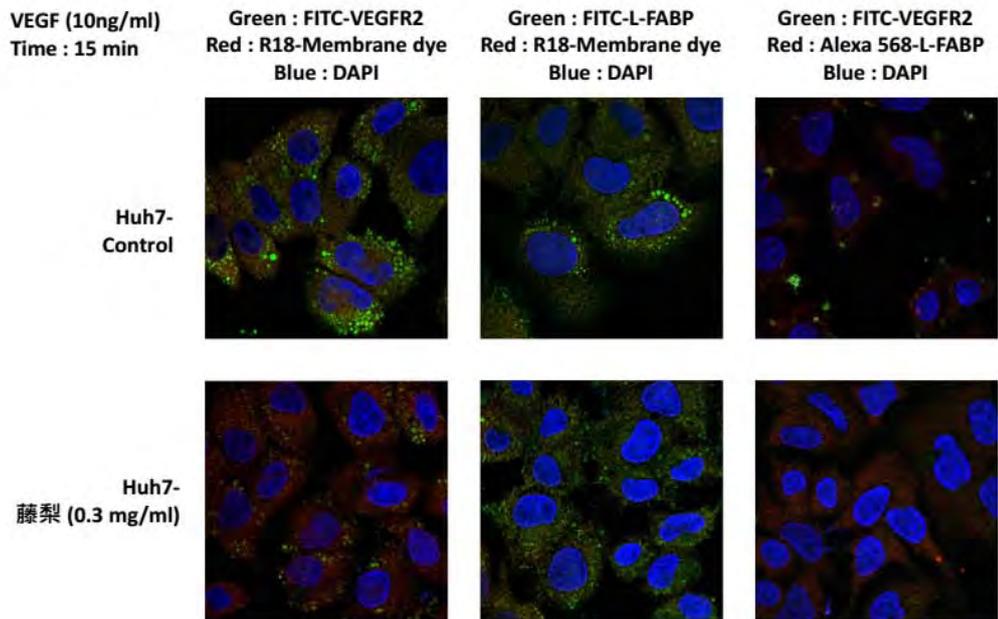
圖二-A



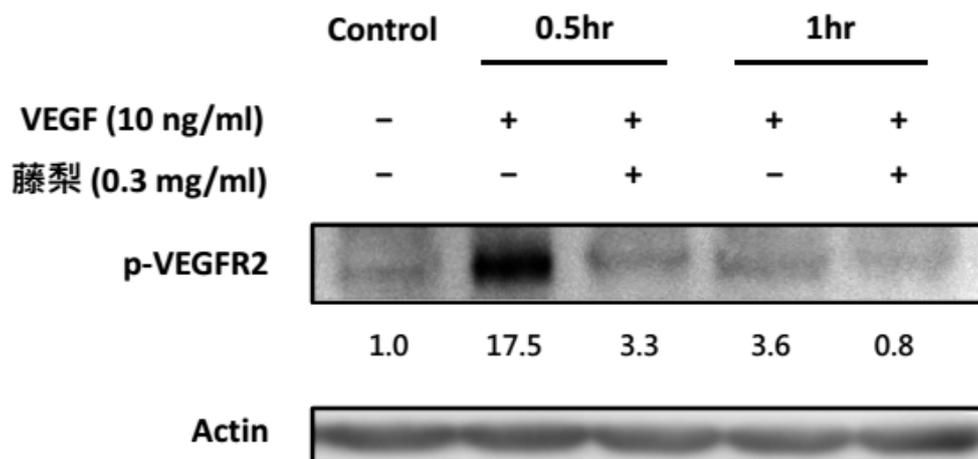
圖二-B



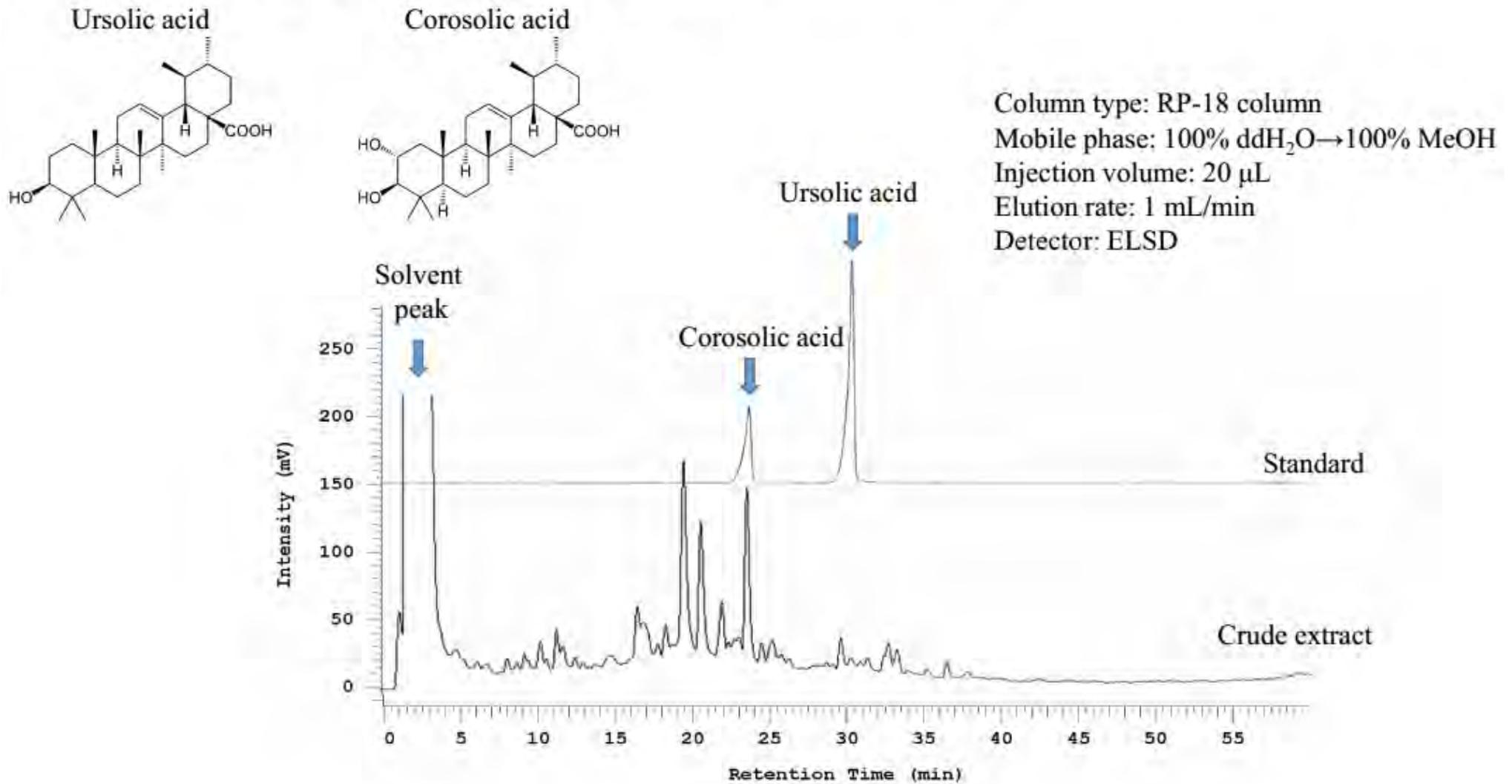
圖三-A 藤梨抑制Huh7細胞其VEGFR2在細胞膜上之分布



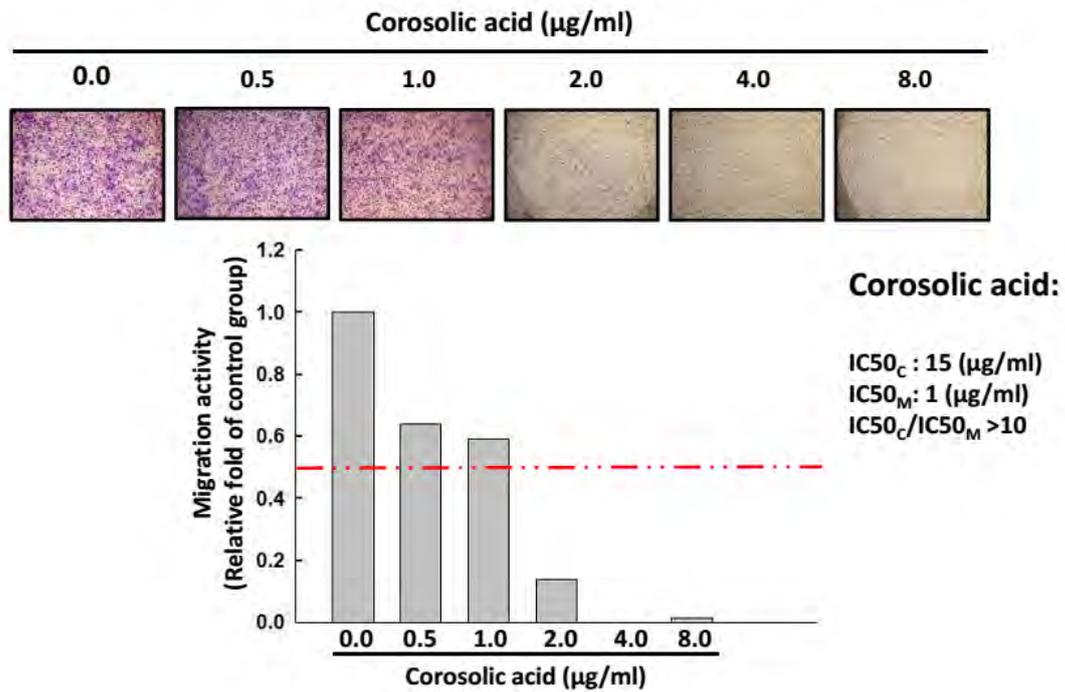
圖三-B 藤梨抑制Huh7細胞其VEGFR2之活化



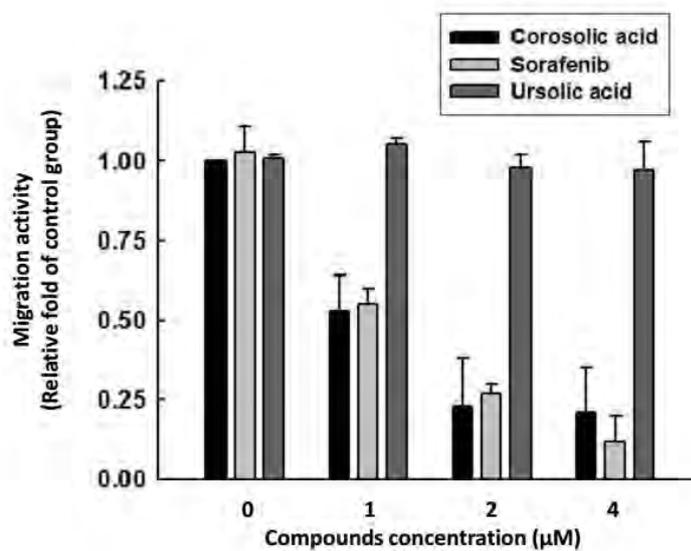
圖四-A 以HPLC分析藤梨中的有效化合物：Corosolic acid



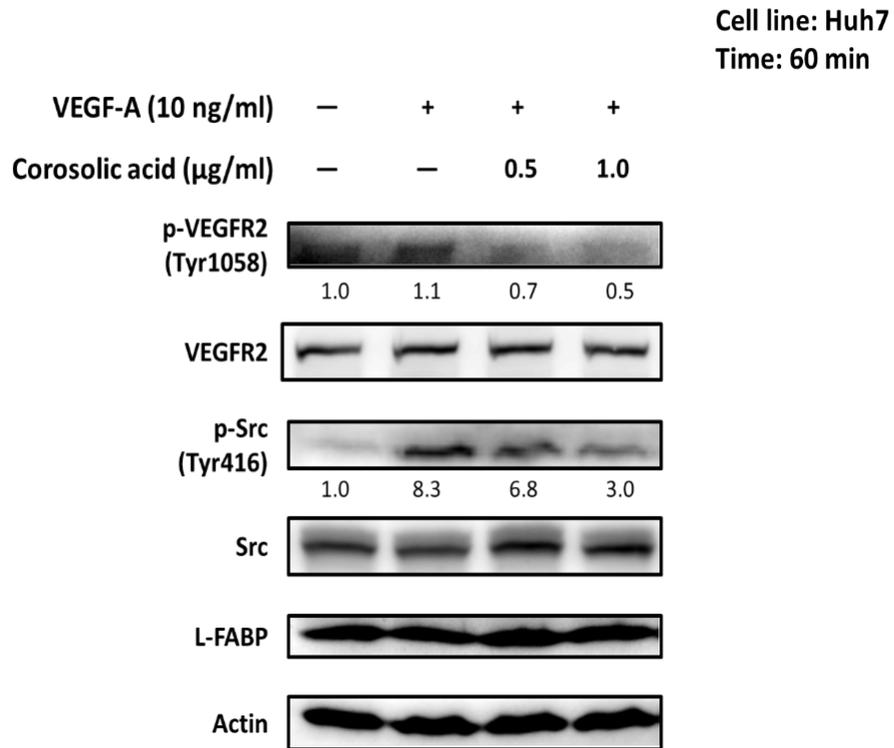
圖四-B Corosolic acid在1  $\mu\text{g/ml}$ 的濃度可有效抑制Huh7細胞移行能力47%



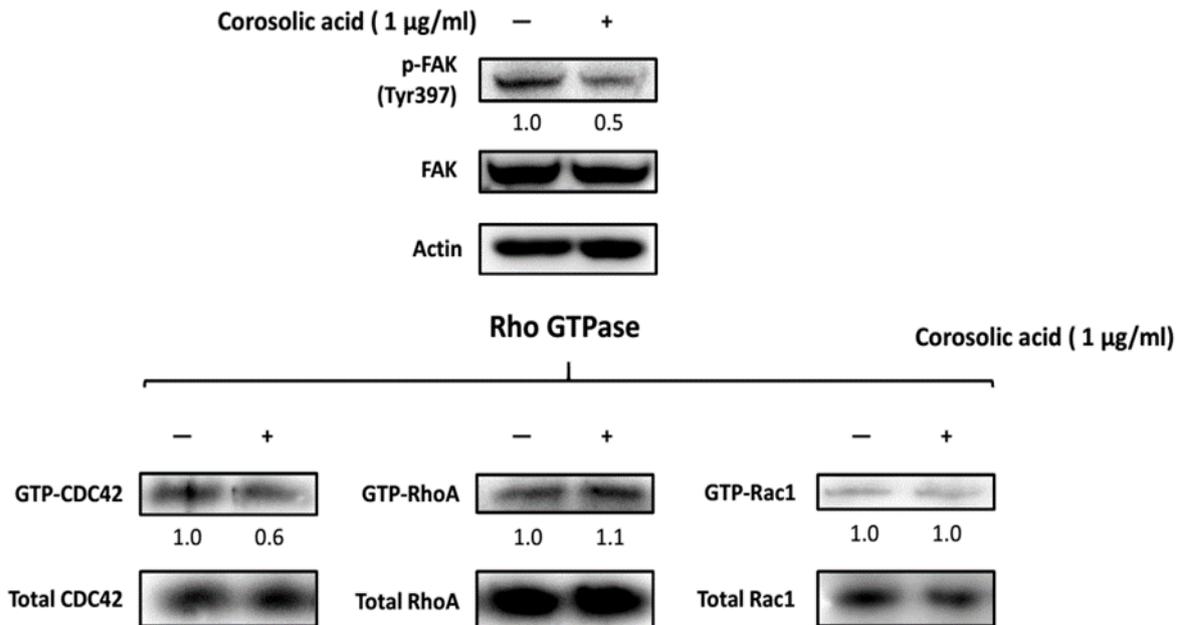
圖四-C Corosolic acid與抗癌標靶藥物Sorafenib (Nexavar)有相近的抑制細胞移行能力



圖五-A Corosolic acid抑制Huh7細胞中VEGFR2與Src kinase的活化

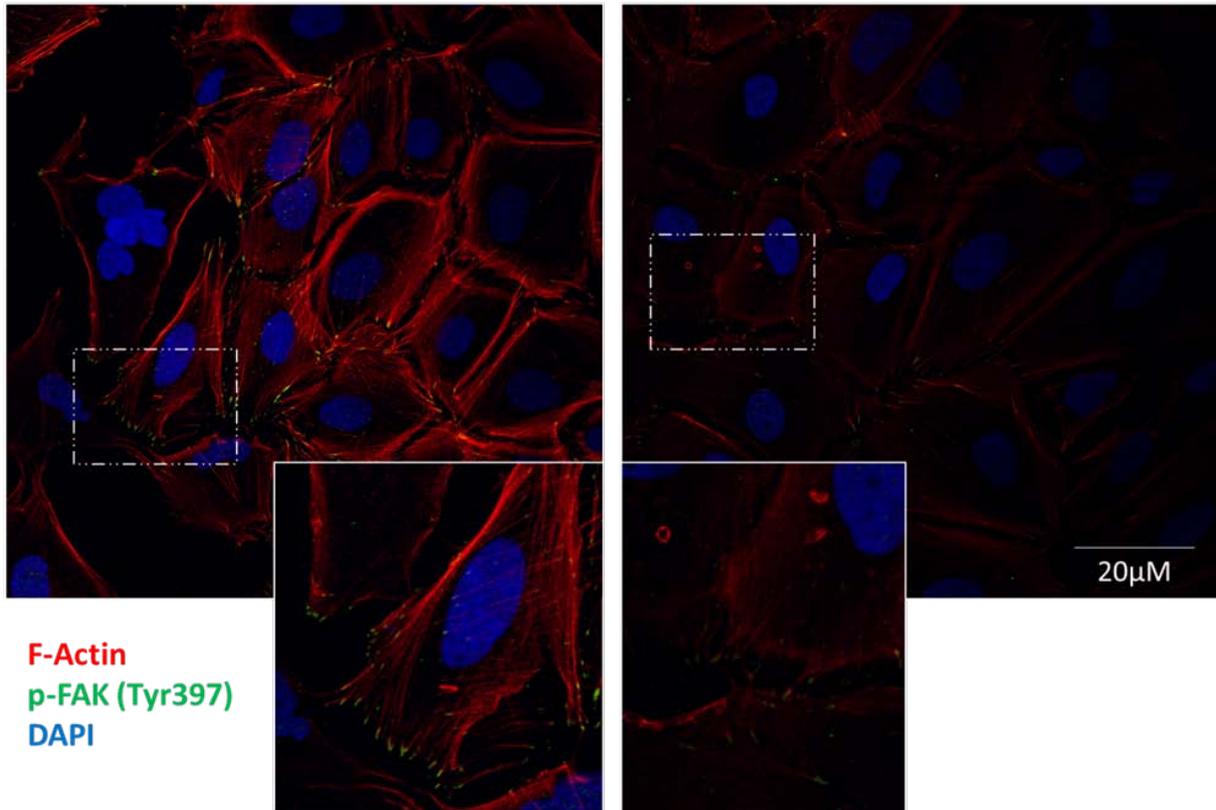


圖五-B Corosolic acid抑制Huh7細胞中FAK活化51%與下游GTPase:cdc42的活化45%

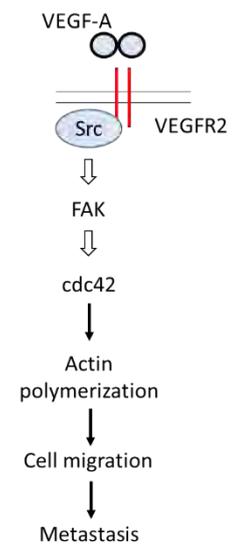
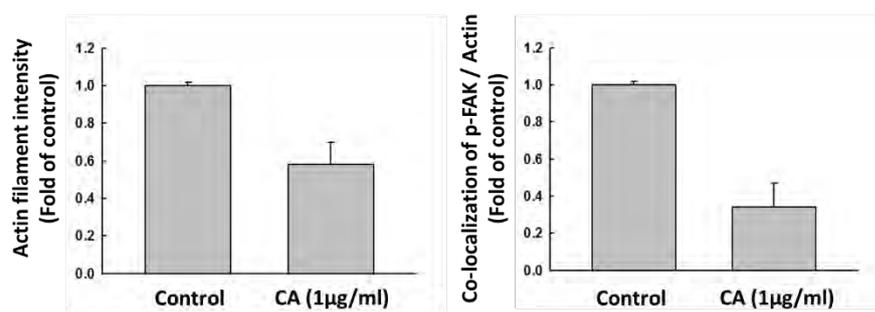


Huh7\_Control

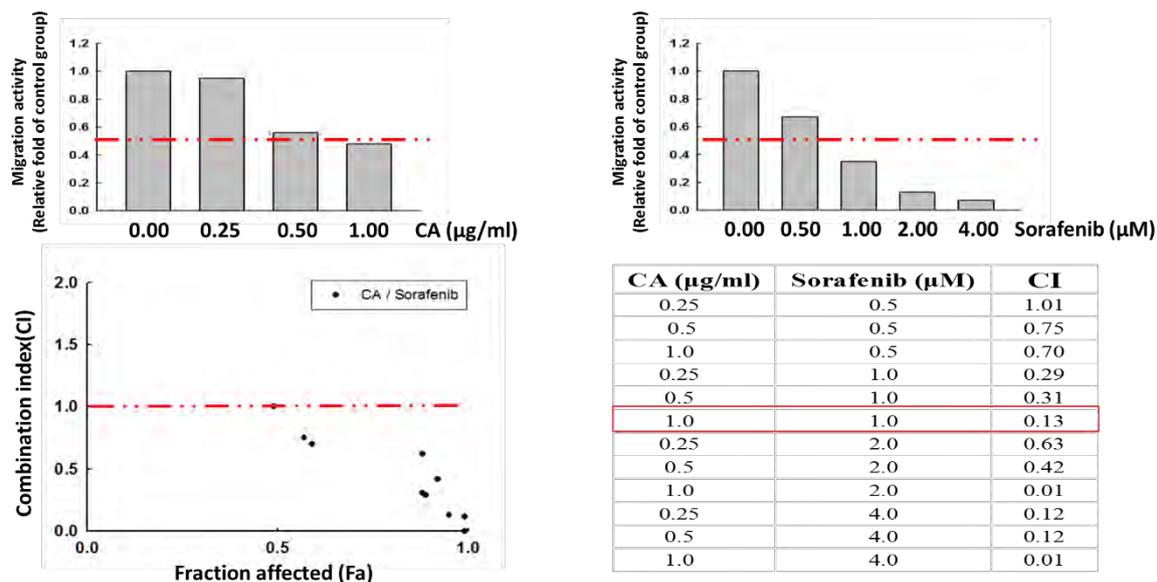
Huh7\_Corosolic acid (1 µg/ml)



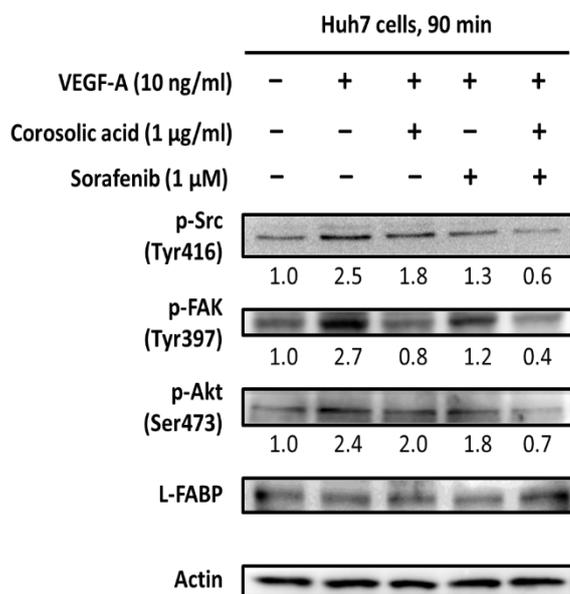
圖五-C Corosolic acid (1µg/ml)抑制Huh7細胞中具活性之Actin filament的密度41%  
及其與活化態FAK的co-localization 64%



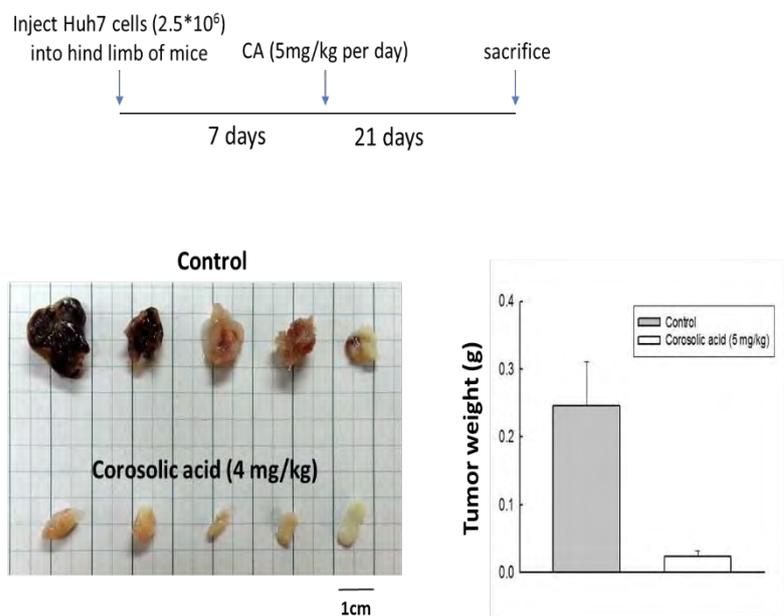
圖六-A Corosolic acid與 Sorafenib對抑制Huh7細胞移行的協同作用分析



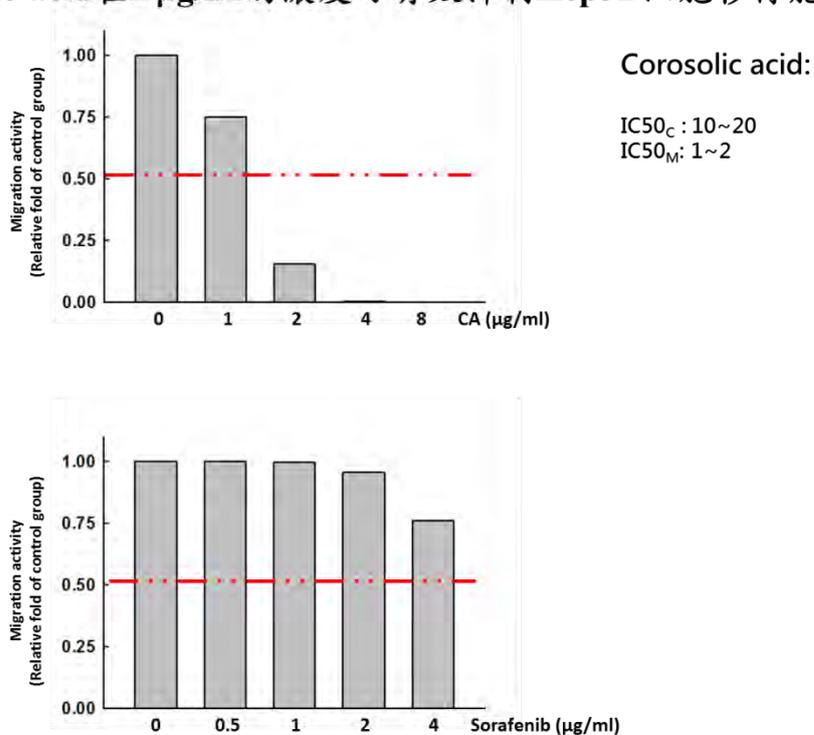
圖六-B Corosolic acid (1  $\mu\text{g/ml}$ )與 Sorafenib (1  $\mu\text{M}$ )對抑制Huh7細胞 Src, FAK 及Akt的活化有加成效果

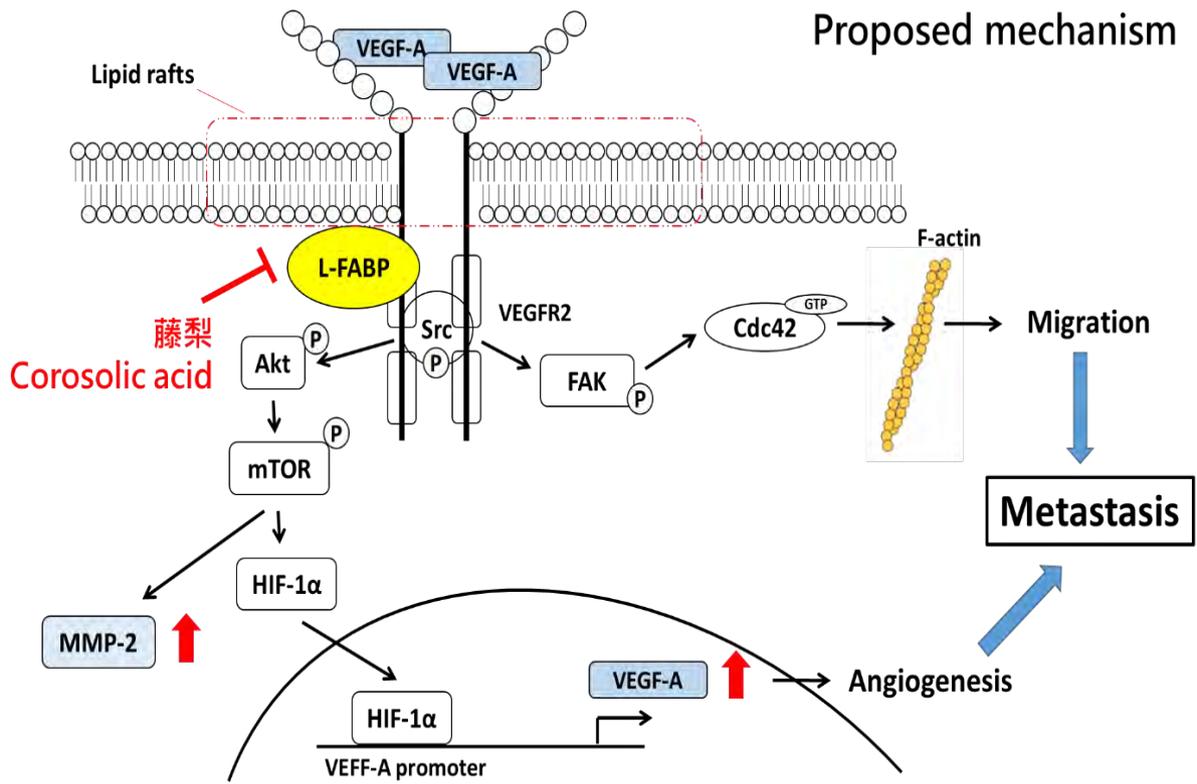


圖七 Corosolic acid (5 mg/kg) 可抑制Huh7細胞在異種皮移植小鼠模式腫瘤生長達82%



圖八 Corosolic acid在2 μg/ml的濃度可有效抑制Hep3B細胞移行能力85%





表二

Cell line: Huh7

	IC <sub>50C</sub>	IC <sub>50M</sub>
藤梨水萃物(mg)	40.00	5.50
化合物乾重(mg)	1.56	0.21
水萃物中之Corosolic acid含量(推算)( $\mu$ g)	124.80	17.16
Corosolic acid( $\mu$ g)	15	1

# 中醫藥計畫治療子宮內膜異位婦女之療效 評估及對助孕酮受器表現之影響

賈愛華  
國立陽明大學

## 摘要

### 研究目的：

目前台北市立聯合醫院之陽明院區設有中西醫整合中心專門服務照顧解決不孕症夫妻之不孕問題，經本院醫師團隊整合的治療經驗發現在婦女方面引起不孕症的最棘手為首的是子宮內膜異位引起的不孕症。目前臺灣地區有關於子宮內膜異位症的臨床研究並不多，致使許多婦女轉向本團隊整合門診之中醫求助。中醫依據患者的主訴進行治療，在治療婦科疾病上已累積並記載多年的人體用藥經驗。因此本研究目的在評估中藥臨床療效及安全性，以中醫治療治療子宮內膜異位症為主題，針對改善婦女子宮內膜異位症狀與受孕之療效及中藥不良反應，做主動且系統性的分析評估外，本計畫引入西醫的轉譯醫學的研究概念進行中醫的轉譯醫學的基礎研究，以病人周邊血之免疫細胞偵測助孕酮受器種類之變化、反應作為指標，來驗證中醫治療後，對臨床與轉譯醫學預設之項目評估作為影響的證據以及與探討臨床徵狀改善的相關性。

### 研究方法：

本研究計畫以觀察子宮內膜異位症女性經過二個月中醫治療後其症狀、生活品質、中醫證型及轉譯醫學基礎研究免疫細胞反應變化並主動與經期正常之女性為對照。

結論：子宮內膜異位之婦女，治療前的免疫細胞受助孕酮刺激後，與健康婦女相比鈣離子濃度上升的情形有較弱的趨勢。且健康婦女與子宮內膜異位婦女其免疫細胞膜助孕酮受器表現量有所不同，中藥治療後能發現原子宮內膜異位婦女較健康婦女表現低的  $mPR\alpha$  及  $mPR\beta$ ，經過兩個月的治療後表現量有上升的情形。

### 討論：

健康婦女與未治療前子宮內膜異位之婦女，所取出之 T 細胞其對助孕酮的反應有不同的現象。由於助孕酮對免疫細胞具有免疫抑制之功效，而實驗發現子宮

內膜異位之婦女其免疫 T 細胞受助孕酮刺激後反應較弱，可能證實子宮內膜異位之婦女其免疫 T 細胞與健康婦女相比不易受體內環境中的免疫抑制劑所抑制，因此造成子宮內膜異位婦女痛經及經期間不適症狀較健康婦女嚴重。也暗示 mPR  $\alpha$  及 mPR  $\beta$  可能與子宮內膜異位婦女經期不適的症狀有關，中藥治療則能改變免疫細胞 mPR  $\alpha$  及 Mpr 的表現量使得患者經期不適的症狀改善。

關鍵詞：子宮內膜異位症、免疫細胞、助孕酮受器

# **The Effect of Traditional Chinese Medicine on Women with Endometriosis and the Association with Expression of Membrane Progesterone Receptors, Responses and Inflammation on Peripheral Immune Cells**

Eileen Jea Chine  
National Yang-Ming University

## **ABSTRACT**

### **Aim:**

The aim of this study was to evaluate the effects of traditional Chinese medicine (TCM) on women with endometriosis and the association with expressions of membrane progesterone receptors, responses and inflammation on peripheral immune cells

Method: We will perform an observational follow-up study to examine the efficacy and safety of TCM between among women with endometriosis. We will also compare the change of expression of membrane progesterone receptors, responses and inflammation on peripheral immune cells between women with and without endometriosis.

### **Methods:**

A prospective follow-up study will be carried out in Yang Ming branch of Taipei City Hospital between January 2013 and October 2013. 20 women with endometriosis will receive traditional Chinese medicine for eight weeks. Baseline scores will be measured on pain scales, followed by further measures at the end of weeks 4, and 8. The World Health Organization Quality of Life (WHOQOL) assessment and the Menstrual Disorder Questionnaire will be undertaken as secondary outcomes. Regression models were constructed to explore the score differences between the

baseline and at weeks 4 and 8 by various determinants including age, body mass index (BMI), and severity of baseline menstrual pain.

Peripheral blood immune cell from patients will be used to detect the changes on different types of progesterone receptors, cell responses as indicator to verify the improvement of clinical symptoms after treating with traditional Chinese medicine.

### **Results:**

Of the initial 19 intent-to-treat participants, 6 completed the 4-month study. A similar severity pattern in menstrual cramp, menstrual distress and quality of life were found at the baseline examination between Gui-Zhi-Fu-Ling-Wan and Shao-Fu-Zhu-Yu-Tang groups. After 3 months of TCM treatment, the women with dysmenorrhea in both groups reported significant improvements in pain during menstruation and the scores in the MDQ and WHOQOL decreased over time. Shao-Fu-Zhu-Yu-Tang group was more effective in improving duration of pain, while the deterioration in pain scores was found in Gui-Zhi-Fu-Ling-Wan group after end of treatment. And, none of them developed a serious adverse event after treatment cessation. Responses of T cells stimulated by progesterone from patient with endometriosis were weaker than health women.

### **Discussion:**

T cells from patient with endometriosis and health women react different to progesterone. As progesterone is an immunosuppressor, immune cells from patient with endometriosis could be much more difficult to be suppressed. And the changes of membrane progesterone receptor expression also shown TCM treatment may improve menstrual distress by regulating mRNA expression.

Keywords: endometriosis, T cell, progesterone receptor

## 壹、前言

不孕症在現代社會中，對大家而言已經不再是陌生的名詞，根據世界衛生組織估計約有 10~15% 的夫婦經歷過不孕的問題，目前臺灣發生率為 8.5-13.9%。不孕症是人類生殖系統的一種疾病；若夫妻在一年內有規律的性行為，且無避孕的情形下仍無法受孕時就可稱為不孕(infertility) (Bulletti et al., 2010)。而在諸多造成不孕的因素中，子宮內膜異位，可算是造成不孕的頭號殺手！原本子宮內膜是體內正常的腺體組織，覆蓋在子宮的內壁上，這個組織每個週期受賀爾蒙的作用而增厚，然後剝落，剝落時所產生的出血由陰道流出，就是「月經」血；但當子宮內膜這種組織，出現在子宮腔以外的器官或組織時，就稱為「子宮內膜異位症」(Mounsey et al., 2006)。在身體的組織方面，由於子宮內膜異位細胞，在骨盆腔內隨著每個月的週期，刺激子宮、卵巢、輸卵管、直腸，膀胱等它們接觸到的器官表面，進行出血及發炎等反應。腹腔內的免疫細胞，則在腹腔中盡責的針對這些迷路的內膜與經血，一一吞噬、破壞、分解，最後身體的修復大隊，跟在後面，搶修被破壞的部位，也因此留下一處處的疤痕，這些不可回復的疤痕，就是發炎後修復組織的纖維化。由於破壞的面積往往是一片一片的斷壁殘垣，而在這樣的基礎上重建，就導致所謂的「粘黏」，不僅改變了原來的結構，往往卵巢被周邊組織包圍蓋住，或輸卵管末端喇叭開口，被固定粘住，失去了柔軟擺動抓卵的能力。性行為時，也因為上述的變化，造成器官表面結疤、變厚，且固定在骨盆腔中，而於陰莖深入時，無法如正常器官彈性的緩衝間隙，產生明顯的性交疼痛感。這些都直接的影響精子、卵子的結合及受精卵的運送及間接的失去性行為的愉悅，而導致不易懷孕。子宮內膜異位症，除了身體組織的變化外，常與免疫所引發的慢性發炎相關，因此腹腔可見高於正常婦女的白血球增生，細胞間質等大量分泌，抗內膜抗體的出現，以及產生過多的自由基，這些充斥著毒素的環境，是不利於懷孕最重要的排卵、抓卵、受精及運送等步驟的(Leyendecker et al., 2009)。在先前國立陽明大學傳統醫藥學研究所賴榮年老師回溯型資料庫的研究中發現，在臺灣有 2.7% 生育年齡婦女因為子宮內膜異位所引發的各種病症需尋求醫療的協助治療，研究也顯示包含已婚、未婚的所有臺灣生育年齡婦女中，有高達 11% 的婦女因為子宮內膜異位的不孕尋求治療，而子宮內膜異位症臨床症狀最常見也最困擾的症狀就是痛經，嚴重時不僅需要臥床休息或服用止痛藥，有時還會伴隨著生理與心理的種種不適(Attaran et

al., 2002; Fauconnier, 2005)，加上有生兒育女不孕症的壓力，影響著許多婦女的生活品質及學習工作能力，因此子宮內膜異位症不僅影響婦女的個人健康，還造成社會生產力下降以及龐大的經濟損失，在近年來的婦女健康議題中逐漸受到重視。

目前臨床上治療子宮內膜異位的藥物機轉主要集中在改變月經週期中激素的變化，利用藥物產生假性懷孕(Pseudopregnancy)、假性停經(Pseudomenopause)和長期無排卵(Anovulation)的狀態，不僅對異位的內膜有作用，同時也會影響正常內膜的功能狀態，雖可改善痛經症狀，但也影響著正常生殖功能(Kennedy et al., 2005)。而近代研究已發現，子宮內膜異位引起痛經的病因與前列腺素(Prostaglandins)有著直接的關係，異位的內膜組織會隨著體內激素的生理週期變化，在經期期間受雌激素與黃體激素的影響充血增生，吸引發炎細胞聚集，誘發後續的發炎反應，造成前列腺素過度生成及釋放，刺激子宮過度收縮，引起下腹部疼痛(May et al., 2010)。因此臨床治療子宮內膜異位痛經主要有三個對策：(1)抑制動情激素生成路徑中重要的合成酶來降低體內過多的動情激素，(2)抑制 cyclooxygenase-2 (COX-2)避免前列腺素的生成，(3)增強助孕酮的作用，發現透過此三對策皆可降低疾病所引發的骨盆腔疼痛，若以腹腔鏡觀察則發現經治療後患者子宮內膜異位的組織銳減(Guzick et al., 1997; Kettel et al., 1996; Hayes et al., 2002; Vercellini et al., 1993)。其中以助孕酮對子宮內膜異位症改善機制仍有很多尚待研究探討之處，例如：(1)子宮內膜異位症婦女經其他方式治療無效後，此時再施予助孕酮則發現其對疼痛的改善有較顯著的效果；(2)有趣的是同時施與病患助孕酮的 agonist 與 antagonist 混合劑，皆可降低因子宮內膜異位症所引發經期的疼痛；(3)研究發現子宮內膜異位組織雖然會產生大量的助孕酮，但研究發現其內膜異位組織中之胞內助孕酮接受器數目與正常子宮內膜組織相比含量下降(Serdar, 2009)；(4)另有報導顯示助孕酮反而會刺激子宮內巨噬細胞分泌發炎因子 PGE2 引發經期之的疼痛(Yagel et al., 1987)。無論是在腹腔鏡下，或手術時打開腹腔用肉眼看，西醫依據子宮內膜異位牽涉的範圍大小，器官的多寡，訂出診斷子宮內膜異位症的嚴重度分級，這部分，絕對是中醫治療上一重要的參考。現代醫學雖然對生理病理有不少的了解，但令人沮喪的是，目前並沒有辦法，用簡易的方法，來準確診斷腹腔內子宮內膜異位症，發炎或被破壞的嚴重程度或是其治療的成效。

而如前述，西醫治療子宮內膜異位的方法可能會導致不孕或不利於要懷孕的荷爾蒙環境，同時也存在著療效不佳與副作用的問題，所以許多婦女轉而求助於中醫藥療法，希望緩解其相關症狀並提高受孕的機率。而在過去的研究亦發現，不孕症婦女在進行生殖科技治療時，有 100% 會使用西醫療法，而尋求中醫療法亦高達 72.2%，甚至於民俗療法也有 54.4%，可見中醫療法已成為不孕症婦女治療過程中大部分人會選擇的治療模式之一 (Senapati and Barnhart, 2011)。中醫在治療婦科疾病上已累積並記載多年的診治經驗，而中醫古籍中並無子宮內膜異位的病名記載，但根據其臨床症狀，散見於中醫的痛經、癥瘕、月經不調及不孕等病的論述中，中醫學家對於子宮內膜異位痛經證型的認知不盡相同，但都以「血瘀」立論，因此中醫治療子宮內膜異位痛經，會以「活血化瘀」為原則，再根據其臨床症狀的不同兼以疏肝、理氣、補腎、清熱、利濕、化痰、散結等治療(孫宏, 張榮華 et al., 2008; 朱惠云 2009; 馬小娜, 任國輝 et al., 2011)。中醫認為：外來導致的「寒主收引」，在經期間無論是冰冷的食物，特別是吃冰、或待在寒冷環境、或感冒的風寒、洗頭、吃止痛藥……都讓經血凝滯或不產生，或會讓子宮頸緊縮不開，使經血排不出來、積在子宮或倒灌腹腔。加上個人內在的情緒內傷，是造成子宮內膜異位症形成的原理。而在台北市立聯合醫院陽明院區針對上述特殊的病症，5 年前就由英國複製羊的先驅諾丁漢醫學中心訓練的不孕症醫師翁紹評與具西醫婦產科背景的中醫科賴榮年主任開設中西醫不孕症整合門診，提供子宮內膜異位不孕症的中西醫整合療法。

雖然目前臺灣地區有關於子宮內膜異位症的臨床研究並不多，以中醫藥為主題的更是稀少，不過，近年來陽明院區中西醫不孕症整合門診的一個以子宮內膜異位婦女接受中醫論治療法的追蹤觀察研究中發現，這些婦女接受中醫藥療法後，其症狀由原來依賴服用止痛藥才能緩解痛經的狀態有明顯改善的效果，其中 26.5% 的婦女痛經症狀改善、8.8% 的婦女痛經症狀消失，而且研究期間陸續有子宮內膜異位的不孕婦女，因為懷孕而退出研究，可惜其真正能改善疼痛並達到懷孕的機轉並不明瞭，因此值得以實證醫學的臨床研究方法並結合基礎醫學來進行轉譯醫學的探討及研究希望能解開中藥有效的可能機轉。因此本計畫有兩個目標，一個目標為評估中醫藥療法對子宮內膜異位症不孕婦女的痛經療效評估，第二個目標為在探討子宮內膜異位病人用上述中藥製劑前後是否影響助孕酮對免疫 T 細胞與 LPS 刺激巨噬細胞的生理變化和 Th1(發炎)和 Th2(抗發炎)細胞數量與發炎

因子 PGE2 之變化，故本計畫取病人服中藥製劑前後的血液做臨床轉譯醫學基礎研究，探討子宮內膜異位病人與正常婦女比較是否因經前體內助孕酮濃度下降影響 LPS 引發病人巨噬細胞鈣上升與前列腺素釋放之關係發生，此外本研究亦以病人用藥前後的免疫 T 細胞觀察其胞膜助孕酮接受器之變化與經助孕酮刺激後，觀察其胞鈣上升變化，與刺激 6 小時後是否引起 Th1(發炎)和 Th2(抗發炎)細胞數量是否因服用中藥或不同組成中藥而發生變化。故期望經此研究以中醫治療前後子宮內膜異位症患者找出免疫細胞變化之因子為疾病改善指標與造福病患，改善國內婦女因子宮內膜異位所導致的病苦與不孕現象。

中醫臨床研究分為三個項目進行：(1) 比較中醫治療對子宮內膜異位症婦女痛經療效評估，(2) 比較中醫治療法對子宮內膜異位症婦女生活品質改善療效評估。(3) 比較中醫治療法對子宮內膜異位症婦女接受西藥治療副作用之影響。

中醫轉譯醫學基礎研究分為三個項目進行：(1) 比較病人免疫 T 細胞於治療前後與正常婦女 Th1 與 Th2 (註一) 於血液中族群的差異，以及膜助孕酮受器的表現類型(註二)，(2)以助孕酮刺激觀察 T 細胞內鈣離子上升程度、細胞激素(Th1: INF-gamma, TNF-alpha; Th2: IL-10, IL-13)mRNA 表現的差異，以及膜助孕酮受器表現類型的變化。

#### (註一) 雌激素與免疫系統之關係

雌激素與女性免疫系統疾病間存有某種調控的關係(Billingham et al., 1953)。因證據顯示男性與女性在免疫系統是具性別差異的，女性比較容易誘發免疫耐受性(Grossman., 1984)。以 Estrogen 為例，不但可刺激 immunoglobulins (Igs)分泌，使得女性血液中 Igs 的濃度明顯地高於男性(Paavonen et al., 1981; Grossman, 1984; 1985)。婦女於懷孕期或更年期間體內助孕酮變化亦使女性自體免疫疾病之病情發生變化，例如多發性硬化症(multiple sclerosis)於病人懷孕期間的復發率降低(Confavreux et al., 1998)，更年期婦女因創傷得敗血症之存活率遠高於男性(Schröder et al., 1998; Wohltmann et al., 2001)，且男女周邊淋巴球在與免疫相關之基因表現上具有性別差異(Whitney et al., 2003)。而女性的經期變化也會影響念珠性陰道炎之好發，念珠性陰道炎盛行於懷孕時期以及月經黃體期後期，念珠菌所引發的淋巴細胞增生反應會在月經的第二週達到高峰而在第四週則最低(Kalo-Klein and Witkin, 1989)，且其周邊血液淋巴細胞與 Interferon 相關基因

於月經黃體期相對於濾泡期活性亦降低(Dosiou et al., 2004)。因此懷疑助孕酮對婦女的确是免疫調節因子！

輔助型 T 細胞(T helper cells)與女性荷爾蒙及月經週期之關係

助孕酮具有免疫抑制的功能，能抑制 Th1 的分化，增加 Th2 的發展與刺激 Th2 相關細胞激素分泌(Szekeres-Bartho et al., 1991; Piccinni et al., 1995; Miyaura and Iwata, 2002)。動物研究發現以 *Leishmania* 感染 C57BL/6 孕鼠與沒孕母鼠相比較，發現孕鼠體內的淋巴細胞會產生較少的 IFN- $\gamma$  及較多的 IL-4、IL-5 和 IL-10 (Krishnan et al., 1996)。至於如何區分 Th1 及 Th2 細胞，一般研究上採用 T 細胞所分泌的細胞激素做細胞內螢光標定辨別之。Th1 分泌細胞激素: IL-2 和 TNF- $\beta$  主要調控細胞媒介型免疫反應，而 Th2 分泌細胞激素: IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和 IL-13 可刺激體液免疫(Abbas et al., 1996)。

愈來愈多的證據顯示免疫系統缺陷會影響子宮內膜異位症的疾病進程(Bulun et al., 2009)。早期的研究曾把子宮內膜異位症歸類為自體免疫疾病的一種，近年來的研究發現，免疫細胞對於腹腔內的子宮內膜異位組織無法適時的偵測及消滅，可能是造成子宮內膜異位症狀嚴重化的一個因素。除此之外，腹腔內的子宮內膜異位組織會進一步刺激免疫細胞分泌發炎前驅細胞激素(pro-inflammation cytokine)以及細胞趨化因子(Chemokine)，招募更多血液中與發炎有關的免疫細胞使子宮內膜組織持續發炎、增生，加重疾病的病程。(Dmowski et al., 1989; Osteen et al., 1997; Taylor et al., 2002; Dmowski et al., 2001; Beliard et al., 2004)。這些反應與助孕酮的濃度有正相關，而助孕酮對於 T 細胞種類(Th1/Th2)也有影響。因此探討子宮內膜異位症婦女其免疫 T 細胞種類是偏向發炎反應的 Th1 或是抗發炎反應的 Th2？再和正常女性做比較觀察疾病對 T 細胞的影響，並可以此種觀察方法作為疾病進程與改善的指標。

(註二) T 細胞胞膜上助孕酮接受器

本團隊的先前研究結果發現 T 細胞膜上具有助孕酮細胞表面受器(助孕酮胞膜受器  $\alpha$ 、助孕酮胞膜受器  $\beta$ 、助孕酮胞膜受器  $\gamma$  及 PGMRC1)因此助孕酮可刺激 T 細胞產生快速的生理反應，刺激 T 細胞內鈣離子濃度上升引起 pH 值下降與抑制 T 細胞膜上鈉氫交換蛋白的活性以抑制 T 細胞之活化增生能力(Chien et al., 2006; 2007; 2008; 2009; Lai et al., 2012)，如上所述有趣的是同時施與病患助孕酮的 agonist 與 antagonist 混合劑，亦可降低因子宮內膜異位症所引發經期的疼痛(Chwalisz et al., 2005; Madauss et al.,

2007)；這可能因助孕酮的 agonist 與 antagonist 混合劑作用於助孕酮胞膜受器作用不一致所致，因此是否助孕酮胞膜受器於細胞之變化，導致助孕酮反而會刺激子宮內巨噬細胞分泌發炎因子 PGE2 引發經期之的疼痛？以 T 細胞為例，在月經前的 T 細胞會因為給予助孕酮刺激而有較大量 PGRMC1 的表現,但在其他 mPRs 則還沒有顯著的差異發現(本研究室先前研究結果)。子宮內膜異位症婦女其 T 細胞是否因疾病的荷爾蒙濃度變化而對助孕酮的反應與正常女性 T 細胞有所差異，而此差異在經過中醫治療後是否有所改善與改變？因此本研究之結果除了可瞭解子宮內膜異位不孕症婦女與正常婦女間免疫細胞功能上的差異，提供新的疾病研究方向。期以周邊血液作為判斷疾病進程以及治療後改善的指標，提升中醫治療科學化的判斷。

## 貳、材料與方法

### 一、研究流程

本試驗採用追蹤觀察研究，對受試者用過的所有中西藥處方，進行安全性及療效的整體評估，這樣的研究設計能夠以較小樣本、在短時間內提供初步的療效及副作用資料，本試驗更結合臨床與基礎研究設計，使臨床療效的評估探討其可能的機轉。

(一) 研究對象及地點：經台北市立聯合醫院人體試驗委員會的許可，從陽明院區及中醫院區之中西醫不孕整合門診收集個案。

#### 1. 對照組(Group I 和 Group II)

以健康受試者為主，於月經開始前 7 天內抽血(經前, Group I)，以及月經結束後 7 天內抽血(經後, Group II)，並且填寫相關問卷，做為後續研究的對照組。

#### 2. 實驗組(Group III 和 Group IV)

以符合本試驗所有納入排除條件之患者為主要研究目標(疼痛數字量表>3 分)，於月經開始前 7 天內抽血(Group III)，同時填寫相關問卷，在接受中醫治療流程二個月後的月經前 7 天再抽一次血(Group IV)，並再次填寫相關問卷，以觀察治療前後之改變。

(1) 納入條件：

- A. 20~45 歲經西醫確診為子宮內膜異位者。
- B. 最近 3 個月的月經週期持續出現痛經症狀者。
- C. 月經週期介於 21~35 天，且最近 6 個月內，月經週期規則者。

(2) 排除條件：

- A. 有任何一種癌症，且正接受治療者。
- B. 有心律不整及心臟病且正在接受治療者。
- C. 肝、腎、甲狀腺功能異常者。
- D. 疑似懷孕者或正哺乳者。

(二) 研究流程

符合所有納入排除條件的患者，在簽署受試者同意書後，登錄其基本資料，同時評估其身體狀態，受試者持續追蹤觀察 2 個月經週期，每次週期填寫痛經日記，並且在每次返診時填寫相關

問卷。追蹤觀察期間，受試者接受中醫師的治療，被開立的所有中藥處方與同時服用的其它西藥均詳實記錄，其醫囑的遵從性與用藥行為亦被持續觀察，另外受試者在追蹤觀察期間所發生之任何身體或心理上的不良反應，也會被紀錄建檔並密切追蹤，其中無法配合工作流程或服用中藥不適應的受試者，則退出研究並且進行最後的評估。

### (三) 評估工具

#### 1. 疼痛數字量表(Numerical Scale)

此量表為 10 公分的直線，每 1 公分代表 1 分，由左到右疼痛程度增加，由受試者自行標出代表其疼痛程度的位置，用以評估其疼痛的主觀感受，使用方法簡單方便，在疼痛自我評量上被廣為使用。

#### 2. Moos 經期不適問卷(Menstrual Distress Questionnaire, MDQ)

此問卷是 Moos 於 1968 年為測量經期徵候有標準化工具所編製，用以評估月經前、後及行經期間的各種月經不適症狀，問卷內容由 47 個問題組成，包含痛、注意力、行為改變、自主反應、水分滯留、負向情緒、正向情緒與控制反應等八個面向，每項分五個等級來代表症狀強度，計分方式分為 0-4 分，分數越高表示不適感受程度越高。效標關聯效度方面，兩種形式問卷之 Pearson's  $\gamma$  為 0.75，重測信度方面，前後 Pearson's  $\gamma$  為 0.83。

#### 3. 世界衛生組織生活品質問卷臺灣簡明版(WHOQOL-BREF, Taiwan version)：

臺灣版世界衛生組織生活品質問卷是一個廣用的生活品質測量工具，包含生理、心理、環境與健康等四個向度，具備發展良好之信效度指標。問卷第一部份為正式問卷之試題部分共 28 題；第二部分為綜合性自我評估滿意度題目，內容涵蓋健康相關生活品質的六大範疇及四十一層面，計分方式分為從 1 分至 5 分。內容效度方面，各題目與所屬層面間 Pearson's  $\gamma$  介於 0.57-0.91，各題目與所屬範疇間 Pearson's  $\gamma$  介於 0.41-0.85；內在信度方面，層面而言 Cronbach's  $\alpha$  介於 0.59-0.92，範疇而言 Cronbach's  $\alpha$  介於 0.78-0.92。

#### 4. 中醫體質問卷(Body Constitution Questionnaire, BCQ)：

本問卷由蘇亦彰教授所領導的研究團隊所編製，可提供中醫體質診斷之客觀標準及臨床研究之評估工具。此問卷根據中醫傳統概念將體質分為陰虛、陽虛及痰濕瘀滯三型，依各體質類型擬訂題目，問卷題目共 44 題，各類型題目數包含陰虛體質 19 題、陽虛體質 19 題及痰濕瘀滯體質 16 題，同一問項可能重複在不同體質類型，每題答案給予 1~5 分，分數越高表示身體特徵發生頻率越多及強度越強。建構效度方面，所有題目 factor loading 皆大於 0.4，內容信度方面，各體質類型 Cronbach's  $\alpha$  介於 0.75-0.84。

(四) 記錄子宮內膜異位症之西醫治療：

1. 止痛藥物中最常被使用的非固醇類消炎藥 (Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAID)。
2. 排卵藥
3. 賀爾蒙藥物中常被使用雌激素 (Estrogen) 與黃體激素 (Progesterone)。
4. Gestrinone 則為抑制黃體激素的藥物 (Antiprogestogens)。
5. 促性腺激素釋放素的類似物 (Gonadotropin-releasing hormone analogs, GnRH analogs)，如：Leuprolide、Goserelin、Nafarelin 等。
6. Danazol 則為類雄性激素藥物 (Androgenic agent)。

(五) 記錄子宮內膜異位症之中醫治療：

子宮內膜異位主證為血瘀，且貫穿整個疾病過程，因此中醫治療子宮內膜異位痛經，以「活血化瘀」為原則，再根據其臨床症狀的不同兼以疏肝、理氣、補腎、清熱、利濕、化痰、散結等治療。

## 二、細胞實驗

### (一) 實驗流程

從各組收集到的血液，以 Ficoll-Hypaque 密度梯度細胞分離法將細胞分層取出周邊血液單核球細胞，以含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培養液將細胞置於 25T 細胞培養瓶並培養於 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 之濕式二氧化碳細胞培養箱中兩小時，再分離懸浮型 T 細胞來做後續的研究。

1. 利用 RT-PCR 進行 Th1/Th2 分析:Th1/Th2 胞內細胞激素 mRNA 表現的種類(Th1: INF-gamma, TNF-alpha, IL-2, IL-6 ; Th2:IL-4, IL-10, IL-13)
2. 利用 RT-PCR 進行 mPRs 以及 PGRMC1 之 mRNA 表現
3. 鈣離子流入:以 Fura-2 觀察細胞內鈣離子受助孕酮刺激的變化, 比較各組間的差異。

## (二) 實驗方法

### 1. 血液取得及 T 細胞分離

本研究主要的研究目標是女性不同月經時期 T 細胞的變化, 因此抽取的周邊血液做 T 細胞的分析。採血時間點分別在月經開始前七天內之黃體期(助孕酮相對高點)(GPI) 以及月經結束後七天內之濾泡期(動情激素相對高點以及助孕酮相對低點)(GPII)的早晨, 在空腹的狀態使用經肝素處理過之無菌空針抽取 50c.c 之上臂周邊血液來進行實驗。新鮮之周邊血液經 2500rpm 離心分離血清及血漿, 並以等量之磷酸鹽緩衝溶液(10 mM PBS, pH 7.3) 混合血漿再以 Ficoll-Hypaque 密度梯度細胞分離法取得周邊血液單核球細胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)。使用 MSCs 磁珠純化 CD4+ T 細胞系統, 將實驗所需數量之 CD4+ T 細胞自單核球細胞群中分離出來(每 20/1 之磁珠可分離  $2 \times 10^6$  T 細胞), 以含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培養液將細胞懸浮於 25T 細胞培養瓶並培養於 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 之濕式二氧化碳細胞培養箱中。

### 2. 細胞內鈣離子濃度變化測定

使用 Fura-2/AM 螢光劑測定細胞內鈣離子濃度之改變, T 細胞( $2 \times 10^7$  cells/ml)懸浮於 1ml 10% FCS RPMI-1640 中並給予 fura-2/AM (5M)共同處理 30 min 於 25°C。清洗並分裝成  $2 \times 10^6$  cells/tube 於 1ml 10% FCS RPMI-1640 培養液中待用。測量時將細胞離心並懸浮於 2.5ml 之 loading buffer (152mM NaCl, 1.2mM MgCl<sub>2</sub>, 1.6mM CaCl<sub>2</sub>, 5mM KCl, 10mM glucose, 10mM HEPES, pH 7.4)於實驗用塑膠透明管內, 置入溫度設定於 37°C 之雙激發光-光譜螢光儀(Spex Industries, model CM1T111, Edison, NJ)內測量。以 340nm 及 380nm 激發光激發螢光, 505nm 吸收波長測量螢光之變化, 細胞刺激前後所產生之螢光變化使用機

器內建軟體(Spex DM3000 software)計算，可得知細胞內鈣離子濃度之變化(Gryniewicz et al, 1985)。

### 3. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

萃取 T 細胞內的核糖核酸 (total RNA) T 細胞( $1 \times 10^7$ )，經離心去除上清液，以 Trizo-Chloroform 的方式將 RNA 分離出來最後溶解於 20 $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O 中，以比色計測量波長 260 nm 及 280 nm 的吸光度，換算得知萃取出 RNA 的產量及純度為多少 ( $OD_{260} / OD_{280} \geq 1.8$ )，並置於 -70 °C 冰箱儲存。以反轉錄酶反應(reverse transcriptase reaction、RT)合成 cDNA 將萃取出 T 細胞的 total RNA，用 SuperScript™ III First-strand Synthesis Systemkit(Invitrogen)，將 Total RNA 中的 mRNA 反轉錄成 cDNA 備用。以聚合 酶鏈反應 (polymerase chain reaction、PCR) 來分析 mRNA 在 T 細胞的表現。PCR product 以 1 % agarose gel electrophoresis 分析產物大小及表現量。用紫外線照光裝置呈色後，拍照，存檔，以 Image J 分析比較每一條 band 的亮度，並將其數值化。

## 二、統計分析

臨床療效統計分析為疼痛、經期不適症狀問卷及生活品質問卷比較治療前後療效，藉 t-test 或 Wilcoxon Rank Sum Test 進行評估。實驗數據以中醫體質及疼痛、生活品質治療前後有改善與無改善者分層，均以平均  $\pm$  standard error of the mean (SEM) 表達，先以變方分析(ANOVA)處理，若差異顯著，再以丹肯氏多變域測驗(Duncan's multiple range test, MRT)分析，以  $P < 0.05$  為顯著標準，以  $P < 0.01$  為極顯著標準。

## 參、結果

### 一、痛經婦女收案過程

本研究共篩選 50 名中醫門診患者，其中不符合入案條件者 17 人(沒有痛經症狀 14 人、月經週期不規則 2 人、生理條件不適合 1 人)、詳讀計畫後拒絕參加者 13 人，最後入案的患者共 20 人，在追蹤觀察期間 7 位受試者從未回診(撤回同意書 7 人)，期間退出研究者 3 人(失聯 1 人、無法遵行流程 2 人)，最後結案 10 人完成療程。實驗對照組共徵得 21 位健康捐血者，有痛經症狀 11 人，無痛經症狀 10 人，期間撤回同意書 5 人，無法遵循流程 2 人，失聯 1 人，結案 13 人。

### 二、痛經婦女之基本資料分布

本研究所有入案受試者中，子宮內膜異位患者年齡較大，健康婦女的 Autonomic reaction 較子宮內膜異位患者強烈。生活品質量表 Global 及 Physiological domain 方面子宮內膜異位患者較佳，其餘基本資料皆無統計上顯著差異 (Table 1)。

### 三、痛經婦女治療後之療效評估

所有受試者接受三個月經週期的中醫藥治療後，列入問卷分析的 13 位病人中，有 6 人服用桂枝茯苓丸加減方，有 7 人服用少腹逐瘀湯加減方，服用桂枝茯苓丸加減方及少腹逐瘀湯加減方的婦女中，經期血量及疼痛時間皆有顯著改善。經期不適問卷中的疼痛指數、注意力、及自主反應皆有顯著減緩。生活品質問卷並無任何顯著差異 (Table 2)。進一步分析經期不適問卷的各症狀可發現，其中服用少腹逐瘀湯加減方的婦女頭暈嘔吐、Hot flashes、胸痛、及腦筋變糊塗現象明顯改善，並因經期不適須待在家中休息的時間顯著減少 (Table 3)。

在生活品質方面，服用三個月經週期的少腹逐瘀湯加減方後，其工作能力顯著上升 (Table 2)。

### 四、痛經婦女治療後之安全性評估

在追蹤觀察期間，所有受試者共蒐集到 3 件不良事件，桂枝茯苓丸加減方 2 件(腹瀉 1 件、經血量異常 1 件)；少腹逐瘀湯加減方 1 件(皮膚癢 1 件)。輕微至中度的不良反應中，服用少腹逐瘀湯加減方的婦女其喉嚨中有痰的情形增加，服用桂枝茯苓丸加減方的婦女則發現小便量變少、大便變乾硬。而少腹逐瘀湯加減方及桂枝茯苓丸加減方的婦女都發現手腳麻木的情形增多 (Table 5、Table 6)。

## 五、子宮內膜異位婦女經中醫治療後免疫細胞的變化

### (一) 刺激助孕酮後 T 細胞內鈣離子濃度上升的情形

健康女性經前及經後取出之免疫 T 細胞於助孕酮刺激後，經前黃體期取出之免疫 T 細胞受助孕酮刺激後鈣離子濃度由  $89.435 \pm 5.442$  上升至高原期  $150.208 \pm 11.687$  (Figure 1)。經後濾泡期取出之免疫 T 細胞受助孕酮刺激後鈣離子濃度由  $85.888 \pm 5.725$  上升至高原期  $125.834 \pm 5.818$  (Figure 2)。

而子宮內膜異位病人治療前，經前黃體期取出之免疫 T 細胞受助孕酮刺激後鈣離子濃度由  $89.426 \pm 1.191$  上升至高原期  $110.747 \pm 4.531$  (Figure 3)。經後濾泡期取出之免疫 T 細胞受助孕酮刺激後鈣離子濃度由  $90.544 \pm 1.920$  上升至高原期  $104.286 \pm 4.554$  (Figure 4)。

而從 Figure 5 中發現子宮內膜異位病患黃體期及濾泡期所取出之免疫細胞，受助孕酮刺激後其胞內鈣離子濃度上升的能力皆顯著下降。

### (二) 健康婦女與子宮內膜異位患者治療前 mPR 及 PGRMC1 的 mRNA 表現之比較

從 Figure 6 使用 RT-PCR 技術檢測 mPR $\alpha$ 、mPR $\beta$ 、mPR $\gamma$  及 PGRMC1 的表現，並以 luteal phase (經前) / follicular phase (經後) mRNA expression ratio 的方式表示，能從圖中發現子宮內膜異位患者經前 mPR $\alpha$ 、mPR $\beta$  及 mPR $\gamma$  表現量比健康婦女低，顯示子宮內膜異位患者與健康婦女的免疫細胞有所不同。

### (三) 子宮內膜異位患者治療前後 mPR 及 PGRMC1 的 mRNA 表現之比較

從 Figure 7，能發現子宮內膜異位患者再經過中藥治療後，經前 mPR $\alpha$  及 mPR $\beta$  表現量上升，mPR $\gamma$  表現量下降，顯示中藥治療能改變子宮內膜異位患者免疫 T 細胞助孕酮受器的表現量。

### (四) 健康婦女與子宮內膜異位患者治療前後 mPR $\alpha$ 及 mPR $\beta$ 的 mRNA 表現之比較

將 mPR $\alpha$  及 mPR $\beta$  挑出來做比較後，我們能發現治療前子宮內膜異位患者的 mPR $\alpha$  及 mPR $\beta$  的 mRNA 表現量比健康婦女低。而經過中藥治療後，其 mPR $\alpha$  及 mPR $\beta$  的 mRNA 表現量均上升，顯示中藥治療可能藉由改變子宮內膜異位患者其免疫細胞助孕酮受器，改善子宮內膜異位患者不適之症狀。

## 肆、討論

本研究雖以自填式問卷排除可能的干擾因素，如年齡、社經地位及生活型態等，仍然無法排除安慰劑效應(Placebo effect)的影響，所以在分析療效時不能過度推論其因果關係。本研究發現痛經婦女經三個月經週期的桂枝茯苓丸加減方或少腹逐瘀湯加減方治療後，其痛經程度會隨著治療時間逐漸減輕，經痛的時間及止痛藥的使用頻率明顯減少，兩組婦女的經期不適症狀及整體生活品質治療後也有明顯的進步，而且少腹逐瘀湯加減方相較於桂枝茯苓丸加減方更能縮短痛經的時間，因此本研究結果仍然支持桂枝茯苓丸加減方與少腹逐瘀湯加減方皆具有治療痛經及經期不適症狀的療效，只是還需要更多臨床試驗數據對此提供佐證。

相較於現行的西醫治療方式，本研究在追蹤觀察期間並未發現嚴重的不良反應事件，而期間所發生的不適症狀在停藥後便有所緩解，其發生原因有可能與本加減方由眾多方劑及單味藥組成，本試驗所使用之加減方分別為：

少腹逐瘀湯加減方：少腹逐瘀湯 7 克、龍膽瀉肝湯 3 克、香附 1 克、厚朴 1 克、延胡索 1 克、枳實 1 克、大黃 0.4 克(共 14.4 克)。

桂枝茯苓丸加減方：桂枝茯苓丸 7 克、龍膽瀉肝湯 3 克、香附 1 克、厚朴 1 克、延胡索 1 克、枳實 1 克、大黃 0.4 克 (共 14.4 克)。

其加減之藥方是為消炎並理氣止痛，本試驗中所觀察到得腹瀉可能因龍膽瀉肝湯、枳實、大黃所致，因龍膽瀉肝湯其組成多為苦寒藥，服久易傷脾胃，且枳實破氣消積，配合大黃可處理燥屎不下的問題。但上述之藥恐致使脾胃運化功能失調，升清降濁失職，可能為產生腹瀉的原因。但所觀察得不良反應與藥物之間的相關性還需要進一步釐清。

細胞實驗部分已觀察得健康婦女與未治療前子宮內膜異位之婦女，所取出之 T 細胞其對助孕酮的反應有不同的現象。由於助孕酮對免疫細胞具有免疫抑制之功效，而實驗發現子宮內膜異位之婦女其免疫 T 細胞受助孕酮刺激後反應較弱，可能證實子宮內膜異位之婦女其免疫 T 細胞與健康婦女相比不易受體內環境中的免疫抑制劑所抑制，因此造成子宮內膜異位婦女痛經及經期間不適症狀較健康婦女嚴重。且從 RT-PCR 的實驗中我們也觀察得健康婦女與子宮內膜異位婦女其免疫細胞膜助孕酮受器表現量有所不同，中藥治療後能發現原子宮內膜異位婦女較健康婦女表現低的 mPR $\alpha$  及 mPR $\beta$ ，經過兩個月的治療後表現量有上升的情形。顯示 mPR $\alpha$  及 mPR $\beta$

可能與子宮內膜異位婦女經期不適的症狀有關，中藥治療則能改變免疫細胞 mPR $\alpha$  及 Mpr 的表現量使得患者經期不適的症狀改善。目前已有多篇文獻討論子宮內膜異位患者的助孕酮受器表現量 (Bunch et al., 2013)，但本研究首次以中醫藥治療為主題，輔以此一轉譯醫學之概念探討中醫藥治療之機轉，結果也顯示出中醫藥的轉譯醫學研究執得深入探討並極具潛力。

本研究最大的限制在於樣本數目小及非標準的對照組，因本試驗首先以轉譯醫學角度討論中藥療效，故須病人配合抽血以取得足夠之免疫細胞，但因抽取血量較多病人配合意願降低，因此造成樣本流失數目減小，使臨床證據等級強度無法對中醫藥療效作出最確切的結論，因此增加解釋研究結果的困難。但由於本研究仍對初步驗證中醫藥治療痛經的療效及安全性，提供參考價值的臨床數據，也提供古籍未有的實證。

## 伍、結論與建議

建議未來能有多年期計畫及更大規模的臨床試驗，以利進一步以轉譯醫學證實中醫藥治療的機轉及其不良反應預測。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP102-RD-009 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*.1996. 383:787-93.
2. Attaran M, Falcone T, Goldberg J. Endometriosis: still tough to diagnose and treat. *Cleve Clin J Med*. 2002. 69:647-53.
3. Béliard A, Noël A, Foidart JM. Reduction of apoptosis and proliferation in endometriosis. *Fertil Steril*. 2004. 82:80-5.
4. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*.1953. 172:603-6.
5. Bulun SE. *N. Engl. J. Med*. Endometriosis.2009. 360:268–279
6. Bulletti C, Coccia ME, Battistoni S, Borini A. Endometriosis and infertility. *J Assist Reprod Genet*. 2010. 27:441-7.
7. Bunch K, Tinnemore D, Huff S, Hoffer ZS, Burney RO, Stallings JD. Expression Patterns of Progesterone Receptor Membrane Components 1 and 2 in Endometria From Women With and Without Endometriosis. *Reprod Sci*. 2013.
8. Chein EJ, Chang CP, Lee WF, Su TH and Wu CH. Non-genomic immunosuppressive actions of progesterone inhibits PHA-induced alkalization and activation in T cells. *J Cell Biochem*. 2006. 99: 292.
9. Chien EJ, Liao CF, Chang CP, Pu HF, Lu LM, Shie MC, Hsieh DJ, Hsu MT. The non-genomic effects on Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchange 1 by progesterone and 20alpha-hydroxyprogesterone in human T cells. *J Cell Physiol*. 2007. 211(2):544-50.
10. Chwalisz K, Perez MC, Demanno D, Winkel C, Schubert G, Elger W. Selective progesterone receptor modulator development and use in the treatment of leiomyomata and endometriosis. *Endocr Rev*. 2005.26:423-38.
11. Confavreux C, Hutchinson M, Hours MM, Cortinvis-Tourniaire P, Moreau T. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. *Pregnancy in Multiple Sclerosis Group*. *N. Engl. J. Med*. 1998. 339: 285-91.
12. Dmowski WP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernandez BB, Braun DP. Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis. *Hum Reprod* 2001.16:1802-8.

13. Dmowski WP, Gebel HM, Rawlins RG. Immunologic aspects of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1989.16:93-103.
14. Dosiou C, Lathi RB, Tulac S, Huang ST, Giudice LC. Interferon-related and other immune genes are downregulated in peripheral blood leukocytes in the luteal phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004.89: 2501-4.
15. Fauconnier A, Chapron C. Endometriosis and pelvic pain: epidemiological evidence of the relationship and implications. *Hum Reprod Update.* 2005. 11:595-606.
16. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004.364:1789–1799.
17. Grossman CJ. Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocr Rev.* 1984. 5:435-55.
18. Guzick DS, Silliman NP, Adamson GD, Buttram VC Jr, Canis M, Malinak LR, Schenken RS. Prediction of pregnancy in infertile women based on the American Society for Reproductive Medicine's revised classification of endometriosis. *Fertil Steril* 1997.67:822-9.
19. Hayes EC, Rock JA. COX-2 inhibitors and their role in gynecology. *Obstet Gynecol Surv* .2002.57:768-80.
20. Kalo-Klein A, Witkin SS. *Candida albicans*: cellular immune system interactions during different stages of the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol.* 1989.161: 1132-6.
21. Kettel LM, Murphy AA, Morales AJ, Ulmann A, Baulieu EE, Yen SS. Treatment of endometriosis with the antiprogestosterone mifepristone (RU486). *Fertil Steril* 1996. 65:23-8.
22. Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, Hummelshoj L, Prentice A, Saridogan E; ESHRE Special Interest Group for Endometriosis and Endometrium Guideline Development Group. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod.* 2005. 20:2698-704.
23. Krishnan L, Guilbert LJ, Russell AS, Wegmann TG, Mosmann TR, Belosevic M. Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response

- and increased production of T helper 2 cytokines. *J Immunol.* 1996. 156: 644-52.
24. Lai JN, Wang OY, Lin VH, Liao CF, Tarng DC, Chien EJ. The non-genomic rapid acidification in peripheral T cells by progesterone depends on intracellular calcium increase and not on Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchange inhibition. *Steroids.* 2012. 77:1017-24.
  25. Leyendecker G, Wildt L, Mall G. The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair. *Arch Gynecol Obstet.* 2009. 280:529-38.
  26. Madauss KP, Grygielko ET, Deng SJ, Sulpizio AC, Stanley TB, Wu C, Short SA, Thompson SK, Stewart EL, Laping NJ, Williams SP, Bray JD. A structural and in vitro characterization of asoprisnil: a selective progesterone receptor modulator. *Mol Endocrinol.* 2007. 21:1066-81.
  27. May KE, Conduit-Hulbert SA, Villar J, Kirtley S, Kennedy SH, Becker CM. Peripheral biomarkers of endometriosis: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 2010. 16:651-74.
  28. Mounsey AL, Wilgus A, Slawson DC. Diagnosis and management of endometriosis. *Am Fam Physician.* 2006 Aug 15;74(4):594-600.
  29. Osteen KG, Sierra-Rivera E. Does disruption of immune and endocrine systems by environmental toxins contribute to development of endometriosis? *Semin Reprod Endocrinol.* 1997.15:301-8.
  30. Paavonen T, Anderson LC, Adlercreutz H. Sex hormone regulation of in vitro immune response. Estradiol enhances human B cell maturation via inhibition of suppressor T cells in pokeweed mitogen-stimulated cultures. *J. Exp. Med.* 1981. 154: 1935-45.
  31. Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, Parronchi P, Manetti R, Annunziato F, Livi C. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J. Immunol.* 1995. 155: 128-33.
  32. Schröder J, Kahlke V, Staubach KH, Zabel P, Stüber F. Gender differences in human sepsis. *Arch Surg.* 1998. 133:1200-5.

33. Szekeres-Bartho J, Kinsky R, Kapovic M, Chaouat G. Complete Freund adjuvant treatment of pregnant females influences resorption rates in CBA/J x DBA/2 matings via progesterone-mediated immunomodulation. *Am J Reprod Immunol.* 1991. 26:82-3.
34. Senapati S, Barnhart K. Managing Endometriosis-associated Infertility. *Clin Obstet Gynecol.* 2011. 54:720-6.
35. Takenaka Y, Taniguchi F, Miyakoda H, Takai E, Terakawa N, Harada T. Lipopolysaccharide promoted proliferation and invasion of endometriotic stromal cells via induction of cyclooxygenase-2 expression. *Fertil Steril.* 2010.93:326–7.
36. Taylor RN, Lebovic DI, Mueller MD. Angiogenic factors in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2002.955:89-100.
37. Vercellini P, Trespidi L, Colombo A, Vendola N, Marchini M, Crosignani P. A gonadotropin-releasing hormone agonist versus a low-dose oral contraceptive for pelvic pain associated with endometriosis. *Fertil Steril* 1993;60:75-9.
38. Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nat. Immunol.* 2001.2:777-80.
39. Whitney AR, Diehn M, Popper SJ, Alizadeh AA, Boldrick JC, Relman DA, Brown PO. Individuality and variation in gene expression patterns in human. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003. 100:1896-901.
40. Wohltmann CD, Franklin GA, Boaz PW, Luchette FA, Kearney PA, Richardson JD, Spain DA. A multicenter evaluation of whether gender dimorphism affects survival after trauma. *Am. J. Surg.* 2001. 181: 297-300.
41. Yagel S, Hurwitz A, Rosenn B, Keizer N. Progesterone enhancement of prostaglandin E2 production by fetal placental macrophages. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1987. 14:45–8.
42. 朱惠云. 子宮內膜異位症診治進展. 遼寧中醫藥大學學報.2009. 11: 227-9
43. 孫宏, 張榮華, et al. 從血瘀論治子宮內膜異位症. 陝西中醫. 2008. 29: 1507-8.
44. 馬小娜, 任國輝, et al.子宮內膜異位症的中醫辨治思路與方法.中醫藥學報 . 2011. 39: 50-2.

柒、圖、表

Table 1 Baseline demographic and clinical characteristics for the 26 participants

Definition	Normal (N=13)	Endometriosis (N=13)	P value
Age (years)	<b>33.9±4.48</b>	<b>46.7±7.88</b>	<b>0.000*</b>
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	<b>22.6±2.97</b>	<b>21.7±2.07</b>	<b>0.478</b>
Marital states (%)			
Unmarried	<b>100</b>	<b>53.8</b>	
Married	<b>0</b>	<b>46.2</b>	
Divorced/Widowed/Separated	<b>0</b>	<b>0</b>	
Education level (%)			
Junior high or below	<b>0</b>	<b>7.7</b>	
University or above	<b>100</b>	<b>92.3</b>	
Menstrual duration	<b>2.7±0.95</b>	<b>2.9±0.33</b>	<b>0.566</b>
Blood volume	<b>23.5±8.58</b>	<b>32.1±21.37</b>	<b>0.256</b>
Blood clots (%)			
NO	<b>7.7</b>	<b>9.1</b>	
YES	<b>92.3</b>	<b>90.9</b>	
Blood color (%)			
Soft	<b>0</b>	<b>0</b>	
Fresh	<b>30.8</b>	<b>45.5</b>	
Dark	<b>46.2</b>	<b>27.3</b>	
Duration of pain	<b>1.4±0.70</b>	<b>1.4±0.88</b>	<b>0.904</b>
Use of painkillers	<b>3.7±1.86</b>	<b>4.5±1.76</b>	<b>0.557</b>
Pain in VAS <sup>a</sup>	<b>6.1±1.52</b>	<b>4.4±3.90</b>	<b>0.273</b>
MDQ scores <sup>b</sup>			
Pain	<b>3.5±1.21</b>	<b>2.6±1.32</b>	<b>0.108</b>
Concentration	<b>2.6±1.52</b>	<b>1.5±0.62</b>	<b>0.052</b>
Behavioral change	<b>3.0±1.18</b>	<b>2.2±1.18</b>	<b>0.088</b>
Autonomic reaction	<b>2.4±1.14</b>	<b>1.6±0.63</b>	<b>0.047*</b>
Control	<b>1.5±0.70</b>	<b>1.4±0.45</b>	<b>0.661</b>
Water retention	<b>2.3±0.73</b>	<b>2.2±0.95</b>	<b>0.700</b>
Negative affect	<b>2.7±1.50</b>	<b>2.1±1.13</b>	<b>0.251</b>
Arousal	<b>2.2±0.46</b>	<b>1.9±0.77</b>	<b>0.176</b>
WHOQOL-BREF scores <sup>c</sup>			
Global	<b>13.1±1.84</b>	<b>14.3±1.12</b>	<b>0.047*</b>

Definition	Normal (N=13)	Endometriosis (N=13)	P value
Physiological domain	<b>12.1±2.36</b>	<b>14.3±1.96</b>	<b>0.014*</b>
Psychological domain	<b>12.7±2.14</b>	<b>13.8±1.96</b>	<b>0.191</b>
Social domain	<b>14.0±1.83</b>	<b>14.4±1.50</b>	<b>0.573</b>
Environment domain	<b>14.1±2.53</b>	<b>15.0±1.50</b>	<b>0.281</b>

<sup>a</sup> VAS refer to the Visual Analogue Scale; <sup>b</sup> MDQ refers to the Menstrual Distress Questionnaire;

<sup>c</sup> WHOQOL-BREF refers to the World Health Organization Quality of Life - brief version;

\*Significance at the P<0.05 level.

Table 2 Means and Standard deviation of major variable measured at baseline and week 4 and 8

Variable definition	桂枝茯苓丸 (N=6)			少腹逐瘀湯 (N=7)			Time effect p value	Time*group effect p value
	Baseline	Week 4	Week 8	Baseline	Week 4	Week 8		
<b>Endpoint (scores)</b>								
<b>Domains of QOL</b>								
健康相關生活品質的滿意程度	70.4±11.84	68.3±12.11	63.3±10.80	73.9±22.53	61.9±25.84	64.0±24.85	0.761	0.110
經痛症狀之前健康相關生活品質的滿意程度	80.4±8.65	80.0±8.37	82.5±8.22	78.7±17.18	69.1±27.05	64.0±27.70	0.717	0.445
<b>Pain in VAS<sup>a</sup></b>	6.7±1.78	4.8±3.08	6.1±2.87	6.3±1.68	5.4±2.41	6.6±1.39	0.107	0.784
Menstrual duration	3.0±0.63	2.7±0.52	2.5±0.84	2.6±0.98	2.4±0.54	2.6±0.55	0.526	0.509
Blood volume	30.2±12.14	24.8±15.86	25.5±14.67	30.3±23.16	28.3±19.95	21.6±15.90	0.044*	0.767
Duration of pain	1.5±0.84	2.5±1.64	2.7±1.63	1.1±0.38	3.1±1.35	4.2±1.64	0.000*	0.085
Use of painkillers	3.7±1.86	4.3±2.08	4.6±1.52	4.5±1.76	5.0±0.00	4.0±1.73	0.897	0.328
<b>MDQ score<sup>b</sup></b>								
Pain	3.4±0.77	2.5±0.96	2.7±0.95	3.5±1.27	2.5±1.22	2.9±1.22	0.011*	0.998
Concentration	2.4±1.22	1.7±0.71	1.6±0.77	2.3±1.61	1.7±1.22	1.7±1.00	0.040*	0.992
Behavioral change	2.6±1.46	2.3±1.24	2.2±1.07	2.9±1.00	2.3±1.01	2.3±1.04	0.526	0.509
Autonomic reaction	2.3±0.22	1.5±0.55	1.9±1.11	2.5±1.37	2.1±1.13	1.6±0.84	0.014*	0.275
Control	1.6±0.44	1.3±0.38	1.4±0.36	1.6±0.75	1.5±0.87	1.4±0.70	0.198	0.844
Water retention	2.3±0.65	2.3±0.64	2.4±0.52	2.3±0.53	2.4±1.46	2.1±1.12	0.643	0.555
Negative affect	2.8±1.34	1.8±0.90	1.9±0.84	2.3±1.35	1.9±1.39	2.2±1.35	0.110	0.798
Arousal	2.2±0.57	1.9±0.83	2.2±0.79	2.3±0.46	2.1±0.45	2.2±0.42	0.205	0.965
<b>WHOQOL-BREF score<sup>c</sup></b>								
Global	13.1±0.86	13.8±0.92	13.2±1.72	13.2±1.95	13.1±2.96	12.4±2.87	0.373	0.911
Physiological domain	12.3	13.3±1.83	12.3±2.36	12.0±2.51	13.2±3.15	11.2±3.54	0.526	0.509
Psychological domain	12.7±1.63	13.3±1.46	12.9±2.41	13.1±2.33	13.7±2.80	12.5±2.23	0.303	0.984
Social domain	14.5±1.76	14.7±1.51	14.3±1.97	14.0±1.73	12.7±3.08	13.6±2.07	0.524	0.305

Variable definition	桂枝茯苓丸 (N=6)			少腹逐瘀湯 (N=7)			Time effect	Time*group effect
	Baseline	Week 4	Week 8	Baseline	Week 4	Week 8	p value	p value
Environment domain	<b>13.6±0.73</b>	<b>14.2±1.35</b>	<b>13.9±1.42</b>	<b>14.2±2.47</b>	<b>14.0±2.92</b>	<b>13.2±3.96</b>	<b>0.676</b>	<b>0.677</b>

<sup>a</sup> VAS refer to the Visual Analogue Scale; <sup>b</sup> MDQ refers to the Menstrual Distress Questionnaire; <sup>c</sup> WHOQOL-BREF refers to the World Health Organization Quality of Life - brief version. Data presented with mean±standard deviation. \*Significance at the P<0.05 level

Table 3 Means and Standard deviation of Menstrual Distress Questionnaire (MDQ) subscale measured at baseline and week 4 and 8

Variable definition	桂枝茯苓丸 (N=6)			少腹逐瘀湯 (N=7)			Time effect	Time*group effect
	Baseline	Week 4	Week 8	Baseline	Week 4	Week 8	p value	p value
<b>Pain</b>								
Muscle stiffness	2.5±1.52	1.8±0.98	2.0±0.89	2.3±1.98	2.0±1.83	1.6±0.89	0.981	0.718
Headache	2.8±0.41	1.8±0.98	2.5±1.52	3.3±1.89	2.3±1.38	2.6±1.82	0.018	0.896
Cramps	4.3±1.21	3.2±1.72	4.0±1.67	4.6±1.51	3.0±1.29	4.4±1.82	0.526	0.509
Backache	4.0±1.27	2.8±1.60	2.8±1.17	4.1±1.46	2.9±1.57	3.0±2.00	0.351	0.886
Fatigue	4.3±1.51	2.8±1.17	3.2±1.33	4.0±1.73	2.7±1.80	3.4±1.82	0.418	0.909
General aches and pains	2.5±1.52	2.3±1.21	1.7±0.82	2.9±1.46	2.3±1.38	2.6±1.82	0.165	0.92
<b>Concentration</b>								
Insomnia	3.5±1.64	2.2±1.33	2.0±1.27	2.9±1.95	1.9±1.46	1.8±1.10	0.258	0.955
Forgetfulness	2.0±1.67	1.3±0.82	1.3±0.82	2.1±2.04	1.7±1.11	1.4±0.89	0.403	0.352
Confusion	2.2±1.84	1.3±0.82	1.7±1.21	2.3±2.22	1.7±1.11	1.8±1.10	0.526	0.509
Lowered judgment	2.2±1.47	1.8±0.98	1.7±1.21	2.4±1.90	1.6±1.13	1.8±1.30	0.752	0.546
Difficulty concentrating	3.3±2.16	2.2±1.17	1.5±0.55	2.4±1.40	1.6±1.13	1.6±1.34	0.159	0.454
Distractible	2.8±1.72	1.5±0.84	1.5±0.84	2.7±1.80	1.7±1.11	1.8±1.30	0.686	0.985
Accidents	1.0±0.00	1.0±0.00	1.2±0.41	1.6±1.13	1.6±1.51	1.2±0.45	0.212	0.965
Lowered motor coordination	2.5±1.64	2.2±1.60	1.7±1.21	2.0±1.53	2.0±1.53	1.8±1.30	0.551	0.448
<b>Behavioral change</b>								
Lowered school or work performance	2.2±1.60	2.2±1.60	1.7±0.82	2.7±1.60	2.1±1.07	2.0±1.00	0.526	0.509
Take naps	2.2±1.84	1.5±1.23	1.7±1.21	3.0±1.41	2.9±1.57	2.2±0.84	0.059	0.953
Stay at home	3.2±2.04	2.5±1.23	3.2±1.84	3.1±1.35	2.1±1.07	2.6±1.34	0.009*	0.532
Avoid social activities	2.7±1.51	2.7±1.51	2.7±1.37	3.0±1.63	2.4±1.40	2.6±1.34	0.791	0.915
Decreased efficiency	2.8±1.60	2.5±1.76	1.8±1.33	2.6±1.27	1.9±1.22	2.0±1.41	0.149	0.809

Variable definition	桂枝茯苓丸 (N=6)			少腹逐瘀湯 (N=7)			Time effect p value	Time*group effect p value
	Baseline	Week 4	Week 8	Baseline	Week 4	Week 8		
<b>Autonomic reaction</b>								
Dizziness, Faintness	3.8±1.84	1.8±1.17	2.3±1.21	3.1±1.86	2.4±1.62	2.0±1.41	0.774	0.913
Cold sweats	2.5±1.05	1.7±0.82	1.8±0.98	2.6±1.51	2.0±1.00	1.4±0.55	0.526	0.509
Nausea, Vomiting	1.7±1.21	1.3±0.52	1.8±1.60	2.3±1.80	1.9±1.22	1.6±1.34	0.021*	0.998
Hot flashes	1.0±0.00	1.2±0.41	1.7±1.63	2.0±1.53	2.0±1.53	1.4±0.55	0.010*	0.668
<b>Control</b>								
Feeling of suffocation	1.7±1.63	1.3±0.82	1.3±0.82	1.7±1.50	1.6±1.13	1.6±1.34	0.109	0.876
Chest pains	2.5±1.98	1.7±1.03	2.0±1.10	2.4±1.81	1.9±1.57	1.4±0.89	0.021*	0.965
Ringing in the ears	1.2±0.41	1.2±0.41	1.2±0.41	1.3±0.49	1.1±0.38	1.0±0.00	0.339	0.345
Heart pounding	1.8±0.98	1.7±0.82	1.7±0.82	2.3±1.38	2.0±1.53	1.8±1.10	0.526	0.509
Numbness, tingling	1.2±0.41	1.2±0.41	1.3±0.52	1.1±0.38	1.4±1.13	1.6±1.34	0.963	0.186
Blind spots, fuzzy vision	1.2±0.41	1.2±0.41	1.2±0.41	2.1±1.77	1.9±1.86	1.6±1.34	0.032*	0.620
<b>Water retention</b>								
Weight gain	2.3±1.21	2.0±0.89	2.2±0.75	2.1±1.22	2.6±1.27	2.4±1.14	0.607	0.503
Skin disorders	2.3±1.03	2.0±1.10	2.3±1.03	2.4±0.98	2.6±1.90	2.0±1.41	0.549	0.506
Painful breasts	2.2±1.17	2.7±1.03	2.5±1.05	2.7±1.60	2.6±1.81	2.0±1.41	0.393	0.592
Swelling	2.2±1.47	2.5±1.38	2.5±1.64	2.0±1.00	2.0±1.41	1.8±0.84	0.526	0.509
<b>Negative affect</b>								
Crying	2.3±1.97	1.3±0.82	1.2±0.41	2.0±1.83	1.9±1.46	1.8±0.84	0.804	0.629
Loneliness	2.7±2.25	1.3±0.82	1.5±0.84	1.7±1.89	1.6±1.51	1.8±1.79	0.560	0.226
Anxiety	2.8±1.33	1.8±0.98	1.8±0.98	2.4±1.40	2.1±1.46	2.4±1.95	0.238	0.498
Restlessness	3.7±1.63	2.3±1.51	2.5±1.38	3.0±1.83	2.3±1.38	2.8±2.05	0.347	0.738
Irritability	3.5±1.38	2.3±1.51	2.3±1.51	2.3±1.50	1.9±1.46	2.6±2.07	0.300	0.637
Mood swings	3.5±1.64	2.7±1.37	2.5±1.76	2.6±1.62	1.9±1.07	2.6±2.07	0.526	0.509
Depression	2.5±1.64	1.5±0.84	2.0±0.89	2.3±1.80	1.7±1.50	1.8±1.30	0.070	0.852

Variable definition	桂枝茯苓丸 (N=6)			少腹逐瘀湯 (N=7)			Time effect	Time*group effect
	Baseline	Week 4	Week 8	Baseline	Week 4	Week 8	p value	p value
Tension	<b>1.7±1.03</b>	<b>1.7±1.03</b>	<b>1.8±1.33</b>	<b>2.1±1.77</b>	<b>1.9±1.46</b>	<b>2.0±1.23</b>	<b>0.231</b>	<b>0.847</b>
<b>Arousal</b>								
Affectionate	<b>1.0±0.00</b>	<b>1.3±0.82</b>	<b>1.0±0.00</b>	<b>1.0±0.00</b>	<b>1.4±1.13</b>	<b>1.2±0.45</b>	<b>0.529</b>	<b>0.939</b>
Orderliness	<b>1.0±0.00</b>	<b>1.0±0.00</b>	<b>1.3±0.82</b>	<b>1.0±0.00</b>	<b>1.1±0.38</b>	<b>1.0±0.00</b>	<b>0.526</b>	<b>0.896</b>
Excitement	<b>1.5±1.23</b>	<b>1.5±1.23</b>	<b>1.5±1.23</b>	<b>1.6±0.54</b>	<b>1.3±0.76</b>	<b>1.4±0.89</b>	<b>0.687</b>	<b>0.547</b>
Feeling of well-being	<b>1.0±0.00</b>	<b>1.0±0.00</b>	<b>1.0±0.00</b>	<b>1.7±1.89</b>	<b>1.1±0.38</b>	<b>1.0±0.00</b>	<b>0.526</b>	<b>0.509</b>
Bursts of energy, activity	<b>1.0±0.00</b>	<b>1.0±0.00</b>	<b>1.0±0.00</b>	<b>1.0±0.00</b>	<b>1.0±0.00</b>	<b>1.2±0.45</b>	<b>0.248</b>	<b>0.265</b>

Data presented with mean±standard deviation. \*Significance at the P<0.05 level

Table 4 Means and Standard deviation of the World Health Organization Quality of Life - brief version (WHOQOL-BREF) questionnaire subscale measured at baseline and week 4 and 8

Variable definition	桂枝茯苓丸 (N=6)			少腹逐瘀湯 (N=7)			Time effect p value	Time*group effect p value
	Baseline	Week 4	Week 8	Baseline	Week 4	Week 8		
<b>Global</b>								
Overall QOL	3.2±0.41	3.3±0.52	3.2±0.75	2.9±0.90	3.0±1.00	2.8±0.45	0.762	0.839
General health	2.7±0.52	3.0±0.63	2.8±1.17	2.9±0.90	2.9±1.07	2.2±1.10	0.459	0.640
<b>Physiological domain</b>								
Pain and discomfort	3.7±1.03	3.3±1.03	3.5±1.05	3.3±0.76	2.4±0.98	3.6±1.14	0.127	0.406
Dependence on medical substances and medical aids	2.7±1.21	2.2±0.98	2.8±1.33	2.7±1.11	2.3±0.95	3.4±1.14	0.526	0.509
Energy and fatigue	2.5±0.55	2.8±0.41	2.7±0.52	2.7±0.95	2.9±1.07	2.6±1.14	0.303	0.780
Mobility	3.8±0.75	4.0±0.63	3.7±0.82	3.9±0.69	3.7±0.95	3.6±1.14	0.881	0.560
Sleep and rest	2.8±0.75	3.0±0.63	2.7±0.82	2.3±1.11	2.6±0.98	2.2±1.10	0.395	0.969
Activities of daily living	3.2±0.75	3.5±0.55	3.3±0.82	3.1±0.90	3.4±1.13	3.0±1.23	0.432	0.582
Work capacity	3.5±0.55	3.5±0.55	3.5±0.84	3.0±0.82	3.3±1.11	3.2±0.84	0.006*	0.641
<b>Psychological domain</b>								
Positive feelings	3.3±0.82	3.5±0.84	3.2±0.98	3.7±0.95	3.6±0.98	3.6±1.14	0.526	0.509
Spirituality/religion/ personal beliefs	3.0±0.63	3.0±0.63	2.8±1.17	3.4±0.54	3.3±0.76	2.8±0.84	0.761	0.361
Thinking, learning, memory and concentration	2.7±0.52	2.8±0.75	2.7±0.52	2.9±1.07	3.0±0.58	2.6±0.55	0.498	0.564
Body image and appearance	3.3±0.52	3.3±0.52	3.5±0.55	3.6±0.54	3.7±0.76	3.2±0.45	0.890	0.566
Self- esteem	3.3±0.82	3.8±0.41	3.5±0.84	3.3±0.76	3.7±0.76	3.4±0.55	0.336	0.532
Negative feelings	2.7±0.82	2.5±0.84	2.3±0.52	3.1±1.07	2.7±1.11	2.8±0.84	0.452	0.717
<b>Social domain</b>								
Personal relationships	3.5±0.84	3.7±0.52	3.5±0.55	3.6±0.54	3.6±0.54	3.8±0.84	0.526	0.509
Sexual activity	3.7±0.82	3.8±0.75	3.8±0.75	3.4±0.98	3.0±1.27	2.8±1.10	0.409	0.996

Variable definition	桂枝茯苓丸 (N=6)			少腹逐瘀湯 (N=7)			Time effect	Time*group effect
	Baseline	Week 4	Week 8	Baseline	Week 4	Week 8	p value	p value
Practical social support	<b>4.0±0.63</b>	<b>3.8±0.41</b>	<b>3.7±0.52</b>	<b>3.9±0.69</b>	<b>3.4±0.79</b>	<b>3.8±0.84</b>	<b>0.682</b>	<b>0.721</b>
Being respected/accepted	<b>3.3±0.52</b>	<b>3.3±0.52</b>	<b>3.3±0.52</b>	<b>3.1±0.69</b>	<b>3.0±0.82</b>	<b>3.2±1.10</b>	<b>0.092</b>	<b>0.985</b>
<b>Environment domain</b>								
Freedom, physical safety and security	<b>3.0±0.00</b>	<b>3.5±0.55</b>	<b>3.3±0.52</b>	<b>3.3±0.49</b>	<b>3.3±0.76</b>	<b>3.0±1.23</b>	<b>0.591</b>	<b>0.492</b>
Physical environment (pollution/noise/traffic/climate)	<b>3.0±0.63</b>	<b>3.5±1.05</b>	<b>3.0±0.63</b>	<b>2.7±0.95</b>	<b>3.0±0.82</b>	<b>2.4±0.89</b>	<b>0.400</b>	<b>0.077</b>
Financial resources	<b>3.2±0.75</b>	<b>3.2±0.75</b>	<b>3.2±0.75</b>	<b>3.7±0.76</b>	<b>3.6±0.98</b>	<b>3.2±1.48</b>	<b>0.526</b>	<b>0.509</b>
Opportunities for acquiring new information and skills	<b>3.7±0.52</b>	<b>3.8±0.75</b>	<b>3.7±0.52</b>	<b>4.0±0.58</b>	<b>3.7±0.49</b>	<b>3.8±0.84</b>	<b>0.858</b>	<b>0.447</b>
Participation in and opportunities for recreation /leisure activities	<b>3.7±0.82</b>	<b>3.7±0.82</b>	<b>3.5±0.84</b>	<b>3.7±0.95</b>	<b>3.3±1.11</b>	<b>3.4±1.14</b>	<b>0.131</b>	<b>0.887</b>
Home environment	<b>3.7±0.52</b>	<b>3.8±0.41</b>	<b>3.7±0.52</b>	<b>3.6±0.98</b>	<b>3.3±1.11</b>	<b>3.2±1.10</b>	<b>0.708</b>	<b>0.769</b>
Health and social care: accessibility and quality	<b>3.3±0.82</b>	<b>3.5±0.55</b>	<b>3.7±0.52</b>	<b>3.3±0.76</b>	<b>3.7±0.76</b>	<b>3.6±0.89</b>	<b>0.062</b>	<b>0.757</b>
Transport	<b>3.3±0.52</b>	<b>3.3±0.82</b>	<b>3.5±0.55</b>	<b>3.6±0.79</b>	<b>3.7±0.76</b>	<b>3.6±1.14</b>	<b>0.481</b>	<b>0.631</b>
Eating/food	<b>3.8±0.75</b>	<b>3.7±0.82</b>	<b>3.8±0.75</b>	<b>4.0±0.58</b>	<b>4.0±0.58</b>	<b>3.6±0.89</b>	<b>0.526</b>	<b>0.509</b>

Data presented with mean±standard deviation. \*Significance at the P<0.05 level

Table 5 Means and Standard deviation of 中醫體質問卷 measured at baseline and week 4 and 8

Variable definition	桂枝茯苓丸 (N=6)			少腹逐瘀湯 (N=7)		
	Baseline	Week 12	P value	Baseline	Week 12	P value
1 雖然沒有感冒，我喉嚨中會有痰。	2.6±1.14	1.8±1.60	0.394	1.1±0.38	2.0±0.71	0.021*
2 我會覺得手心、腳掌心或身體會熱熱的。	2.6±1.14	1.8±0.98	0.261	1.4±1.13	2.0±1.41	0.454
3 我會覺得自己怕冷、手腳冰冷或需穿比較多的衣服。	3.2±1.30	3.2±1.72	0.972	1.9±1.46	2.2±1.30	0.685
4 我會覺得頭重、頭昏不舒服。	2.2±1.30	2.3±0.82	0.840	2.6±1.27	2.8±1.10	0.753
5 我會覺得疲倦或無力不想動。	3.0±1.41	2.3±0.52	0.364	3.0±0.82	2.6±0.89	0.439
6 我會覺得口中黏黏的或口水黏稠。	2.4±1.14	1.8±1.60	0.525	1.9±1.46	1.6±0.55	0.682
7 我會覺得身體或下半身重重的。	2.0±1.41	2.5±1.05	0.517	2.0±1.41	3.0±1.23	0.232
8 突然站起來時，我會覺得眼前發黑。	1.6±1.34	2.3±1.03	0.332	2.4±1.62	2.6±1.82	0.867
9 我會覺得疲倦不想說話或沒力氣說話。	1.6±1.34	2.0±0.63	0.530	2.9±1.07	3.0±1.00	0.820
10 我的舌頭或口腔會破。	1.2±0.45	2.0±1.27	0.214	1.7±1.25	2.8±1.79	0.242
11 我會覺得眼睛乾澀，或看東西不清楚。	2.4±1.14	3.0±1.27	0.434	1.9±1.46	3.2±1.30	0.133
12 我的胸、腹部或四肢會悶痛不舒服。	2.4±1.52	2.2±1.17	0.779	1.7±1.25	2.6±0.55	0.173
13 我的胸、腹部或四肢會刺痛不舒服。	1.2±0.45	1.7±1.03	0.350	1.4±1.13	2.4±0.55	0.109
14 我會覺得睡眠時間夠，但仍想睡覺或睡不飽。	3.2±1.48	2.7±1.21	0.527	2.7±1.25	3.4±1.52	0.411
15 我會覺得氣不夠，需要深呼吸。	2.2±1.30	2.2±1.17	0.965	2.7±1.70	2.4±1.52	0.749
16 我的身體或手腳會有麻木感。	1.2±0.45	2.2±0.41	0.005*	1.1±0.38	1.8±0.45	0.020*
17 我會覺得胸口悶悶或緊緊的，好像有東西壓著。	2.0±1.23	1.8±0.75	0.787	2.4±1.81	2.2±0.84	0.776
18 我會耳鳴。	1.6±1.34	1.5±0.55	0.870	2.4±1.81	1.4±0.55	0.198
19 我的皮膚會無故出現瘀血烏青。	1.6±1.34	1.7±0.82	0.921	1.6±1.51	1.8±0.84	0.745
20 我的皮膚會乾燥、龜裂、變厚或變硬。	1.8±1.30	1.8±0.75	0.959	1.4±1.13	1.8±1.30	0.610
21 我的身體或四肢會看到扭曲變形的血管（靜脈曲張）。	1.2±0.45	1.7±0.52	0.148	1.0±0.00	2.0±1.23	0.142
22 我會感到腰部、膝蓋或足跟酸軟、疼痛、無力或發冷。	2.4±1.95	2.7±1.21	0.787	1.7±1.25	2.4±1.14	0.356
23 沒有劇烈運動時，我會抽筋。	2.0±1.41	1.7±0.82	0.635	1.9±1.22	1.4±0.55	0.454

24 我會覺得呼吸深度短淺或喘。	1.6±1.34	2.2±0.75	0.399	1.7±0.95	2.6±1.52	0.240
25 我的身體側面或兩側上腹肋骨處（位置見右圖中打×範圍）會有悶、脹或疼痛的覺。	1.2±0.45	1.5±0.55	0.353	1.4±1.13	2.0±1.23	0.895
26 我會口渴、嘴巴乾、嘴唇乾燥龜裂，且喝水後很快又口渴。	2.6±1.52	2.0±0.63	0.398	2.6±1.81	2.6±0.89	0.975
27 我的四肢、身體、臉部或眼睛周圍會浮腫。	1.8±1.30	2.8±0.98	0.168	2.1±1.68	8.6±13.69	0.352
28 平躺時我的呼吸會變喘。	1.0±0.00	1.2±0.41	0.363	1.1±0.38	1.4±0.89	0.506
29 我的臉頰會發紅。（部位請見附圖）	1.2±0.45	1.3±0.82	0.753	1.7±1.50	1.4±0.55	0.667
30 我會覺得喉嚨乾，但嘴巴或嘴唇不會乾燥。	1.8±1.30	1.7±0.52	0.822	1.0±0.00	1.6±0.55	0.070
31 姿勢改變時，我會覺得天旋地轉。	1.4±0.55	1.7±0.82	0.550	1.7±1.11	2.0±0.71	0.626
32 我覺得我的聽力減退。	1.2±0.45	1.5±0.84	0.492	1.6±0.98	1.6±0.89	0.960
33 我吹到風會不舒服。	2.4±1.67	2.3±0.82	0.933	1.3±0.49	1.6±0.89	0.448
34 我的舌苔會厚厚或黏黏的。	1.4±0.89	1.0±0.00	0.374	1.9±1.22	2.2±0.45	0.513
35 我會覺得身體或頭面突然一陣熱熱的。	1.0±0.00	1.8±1.17	0.141	2.0±1.16	2.4±1.67	0.633
36 我會喜歡喝溫熱的東西。	3.2±1.48	4.2±0.75	0.194	1.9±1.22	2.8±0.84	0.167
37 沒有劇烈運動時，我的腰部會容易扭傷。	1.2±0.45	1.7±0.82	0.285	1.0±0.00	1.0±0.00	0.595
38 除了早上第一次解尿外，我的小便顏色深黃或茶色。	1.0±0.00	1.5±0.55	0.074	1.6±1.13	2.2±1.10	0.360
39 我的小便量少。	1.2±0.45	2.5±1.05	0.030*	1.1±0.38	2.6±1.82	0.148
40 我的大便乾硬。	1.2±0.45	1.8±0.41	0.036*	1.4±1.13	2.2±1.30	0.300
41 我的大便不成形。	1.6±0.89	2.0±1.27	0.568	1.7±1.11	2.0±0.71	0.626
42 我會覺得嘴巴淡淡的沒有味道。	1.4±0.89	1.5±0.84	0.852	1.1±0.38	1.6±0.89	0.331
43 沒有喝很多水，我仍覺得小便量多。	1.2±0.45	1.2±0.41	0.900	1.9±1.22	1.6±1.34	0.736
44 我在天亮前會因拉肚子而起床。	1.0±0.00	1.2±0.41	0.363	1.1±0.38	1.2±0.45	0.815

Table 6 Means and Standard deviation of 中藥安全監測評估問卷 measured at baseline and week 4 and 8

Variable definition	桂枝茯苓丸 (N=6)			少腹逐瘀湯 (N=7)			Time effect p value	Time*group effect p value
	Baseline	Week 4	Week 8	Baseline	Week 4	Week 8		
1. 腹痛	<b>0.6±0.89</b>	<b>0.2±0.45</b>	<b>0.8±1.79</b>	<b>0.4±1.13</b>	<b>0.7±1.25</b>	<b>2.0±2.12</b>	<b>0.058</b>	<b>0.540</b>
2. 腹脹	<b>1.2±1.64</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>1.1±1.68</b>	<b>2.1±2.34</b>	<b>1.8±1.79</b>	<b>0.232</b>	<b>0.281</b>
3. 腹瀉	<b>0.8±1.10</b>	<b>0.4±0.55</b>	<b>0.6±0.89</b>	<b>0.4±1.13</b>	<b>0.6±0.79</b>	<b>2.2±2.28</b>	<b>0.033*</b>	<b>0.078</b>
4. 嘔吐	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.2±0.45</b>	<b>0.4±0.89</b>	<b>0.1±0.38</b>	<b>0.6±1.13</b>	<b>1.2±2.68</b>	<b>0.526</b>	<b>0.509</b>
5. 噁心	<b>0.6±1.34</b>	<b>0.2±0.45</b>	<b>0.4±0.89</b>	<b>1.4±1.81</b>	<b>1.7±2.63</b>	<b>1.2±2.17</b>	<b>0.418</b>	<b>0.448</b>
6. 身體起疹子，並經醫師診斷為蕁麻疹	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.0±0.00</b>		
7. 身體發癢	<b>1.0±1.41</b>	<b>1.4±2.61</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>1.6±2.70</b>	<b>0.9±1.86</b>	<b>0.4±0.89</b>	<b>0.085</b>	<b>0.921</b>
8. 皮膚有紫斑	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.1±0.38</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.0±0.00</b>		
9. 黃疸(皮膚泛黃)	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.0±0.00</b>		
10. 皮膚起水泡或局部紅腫	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.1±0.38</b>	<b>0.4±1.13</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.526</b>	<b>0.509</b>
11. 身體水腫	<b>0.6±0.89</b>	<b>0.6±1.34</b>	<b>0.4±0.89</b>	<b>1.0±1.53</b>	<b>1.7±2.36</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.051</b>	<b>0.583</b>
12. 血壓過低(收縮壓低於 100 毫米汞柱，舒張壓低於 60 毫米汞柱)	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.2±0.45</b>	<b>0.4±0.89</b>	<b>0.7±0.95</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.343</b>	<b>0.344</b>
13. 心搏徐緩(心跳每分鐘少於 50 下)	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.0±0.00</b>		
14. 呼吸困難	<b>0.4±0.89</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.9±1.22</b>	<b>0.6±0.98</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.405</b>	<b>0.431</b>
15. 發燒(體溫高於 38 度)	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.2±0.45</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.3±0.49</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.629</b>	<b>0.415</b>
16. 咳嗽	<b>1.2±1.79</b>	<b>1.2±2.68</b>	<b>1.2±2.68</b>	<b>1.1±0.90</b>	<b>1.0±2.24</b>	<b>1.2±2.17</b>	<b>0.526</b>	<b>0.509</b>
17. 流鼻水	<b>1.4±1.67</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>2.0±1.92</b>	<b>0.3±0.49</b>	<b>1.0±1.73</b>	<b>0.407</b>	<b>0.188</b>
18. 喉嚨痛	<b>1.0±1.73</b>	<b>0.6±1.34</b>	<b>0.6±0.89</b>	<b>1.6±1.72</b>	<b>0.6±0.98</b>	<b>1.0±1.73</b>	<b>0.561</b>	<b>0.854</b>
19. 抽筋	<b>1.0±1.41</b>	<b>0.4±0.89</b>	<b>0.4±0.89</b>	<b>0.6±0.98</b>	<b>0.4±1.13</b>	<b>0.0±0.00</b>	<b>0.300</b>	<b>0.549</b>
20. 嗜睡	<b>2.5±2.65</b>	<b>1.6±2.61</b>	<b>1.8±2.68</b>	<b>2.5±1.23</b>	<b>1.3±2.22</b>	<b>0.6±0.55</b>	<b>0.942</b>	<b>0.857</b>

Data presented with mean±standard deviation. \*Significance at the P<0.05 level

Table 7 Major variables measured at baseline and week 8

Variable definition	Normal(N=13)	Endometriosis(N=13)		p value (NB vs EB)	p value (NB vs E8)	p value (EB vs E8)
	Baseline	Baseline	Week 8			
<b>CA125</b>	<b>15.3±12.48</b>	<b>24.4±17.02</b>	<b>28.0±21.30</b>	<b>0.190</b>	<b>0.001*</b>	<b>0.299</b>
≥ 35 U/mL	<b>48.1</b>	<b>46.3±6.38</b>	<b>55.8±7.04</b>	<b>0.820</b>	<b>0.323</b>	<b>0.049</b>
< 35 U/mL	<b>10.9±4.34</b>	<b>13.0±6.87</b>	<b>16.0±9.64</b>	<b>0.344</b>	<b>0.043*</b>	<b>0.391</b>
Platelet	<b>297.5±31.56</b>	<b>310.5±64.96</b>	<b>291.2±68.63</b>	<b>0.576</b>	<b>0.468</b>	<b>0.235</b>
WBC	<b>5.7±1.51</b>	<b>6.3±1.32</b>	<b>6.1±1.48</b>	<b>0.327</b>	<b>0.349</b>	<b>0.719</b>
RBC	<b>4.6±0.43</b>	<b>4.6±0.28</b>	<b>4.5±0.24</b>	<b>0.942</b>	<b>0.382</b>	<b>0.045*</b>
Hemoglobin	<b>12.8±1.45</b>	<b>12.8±1.28</b>	<b>12.6±1.02</b>	<b>0.910</b>	<b>0.694</b>	<b>0.513</b>
Hematocrit	<b>39.3±3.92</b>	<b>38.9±2.68</b>	<b>38.7±2.72</b>	<b>0.793</b>	<b>0.530</b>	<b>0.711</b>
MCV	<b>85.8±5.81</b>	<b>84.8±6.75</b>	<b>86.8±4.33</b>	<b>0.729</b>	<b>0.907</b>	<b>0.329</b>
MCH	<b>27.8±2.39</b>	<b>28.0±3.14</b>	<b>28.4±1.79</b>	<b>0.906</b>	<b>0.721</b>	<b>0.744</b>
MCHC	<b>32.4±1.12</b>	<b>32.9±1.53</b>	<b>32.7±0.74</b>	<b>0.390</b>	<b>0.402</b>	<b>0.465</b>
GOT	<b>19.8±1.99</b>	<b>22.3±5.68</b>	<b>21.0±5.47</b>	<b>0.199</b>	<b>0.276</b>	<b>0.300</b>
GPT	<b>12.2±2.63</b>	<b>11.0±2.05</b>	<b>12.1±2.43</b>	<b>0.382</b>	<b>0.775</b>	<b>0.486</b>
Albumin	<b>0.7±0.11</b>	<b>0.6±0.09</b>	<b>0.7±0.08</b>	<b>0.231</b>	<b>0.158</b>	<b>0.115</b>
BUN	<b>5.1±1.30</b>	<b>4.3±0.76</b>	<b>4.4±0.55</b>	<b>0.231</b>	<b>0.809</b>	<b>0.080</b>
Creatinine	<b>88.3±7.63</b>	<b>84.2±7.55</b>	<b>84.1±5.74</b>	<b>0.680</b>	<b>0.734</b>	<b>0.725</b>
Uric acid	<b>88.3±56.37</b>	<b>78.6±32.61</b>	<b>69.6±37.13</b>	<b>0.101</b>	<b>0.037*</b>	<b>0.587</b>
Glucose	<b>197.4±24.09</b>	<b>177.2±36.22</b>	<b>178.9±24.47</b>	<b>0.229</b>	<b>0.165</b>	<b>0.475</b>
Triglyceride	<b>15.3±12.48</b>	<b>24.4±17.02</b>	<b>28.0±21.30</b>	<b>0.629</b>	<b>0.144</b>	<b>0.792</b>
Cholesterol	<b>197.4±24.09</b>	<b>177.2±36.22</b>	<b>178.9±24.47</b>	<b>0.153</b>	<b>0.015*</b>	<b>0.742</b>

Data presented with mean±standard deviation. \*Significance at the P<0.05 level

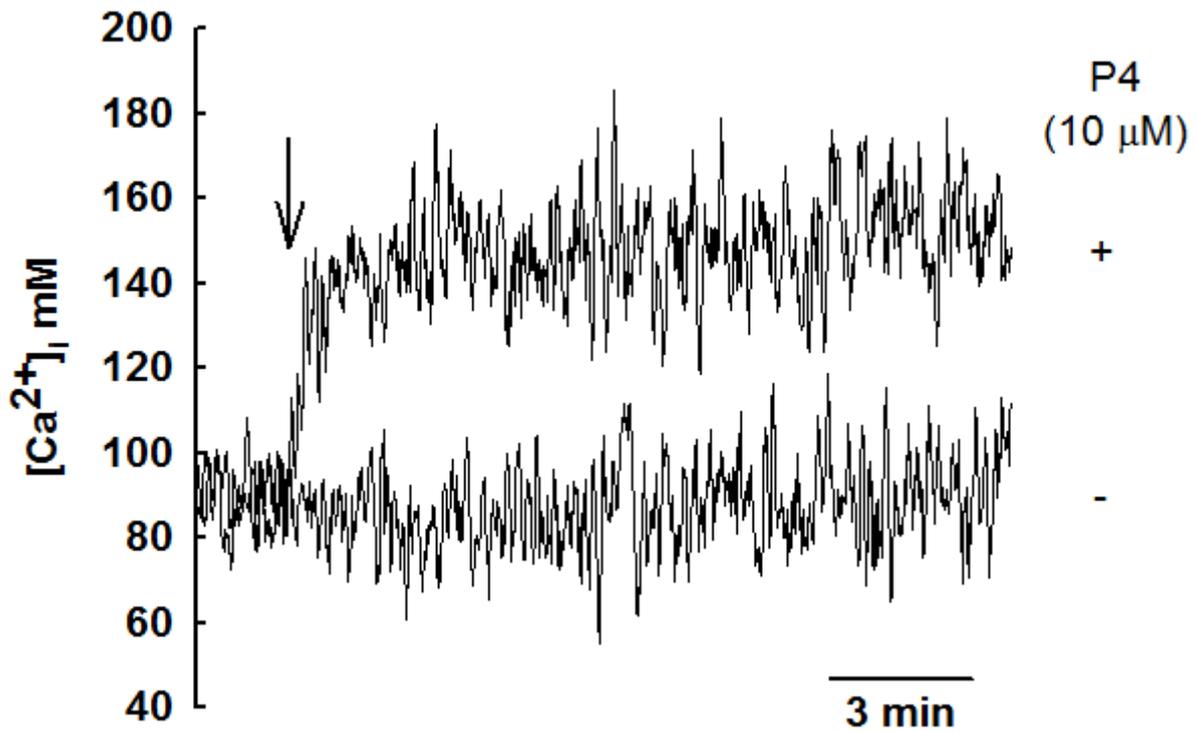


Figure 1 The progesterone-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase from health female with luteal phase

Fura-2-loaded human T cell ( $2 \times 10^6$ ) from health female with luteal phase were stimulated with progesterone (P4, 0, 10  $\mu$ M). The arrow indicates the time of addition of stimulants. The traces were representative of at least 3 experiments.

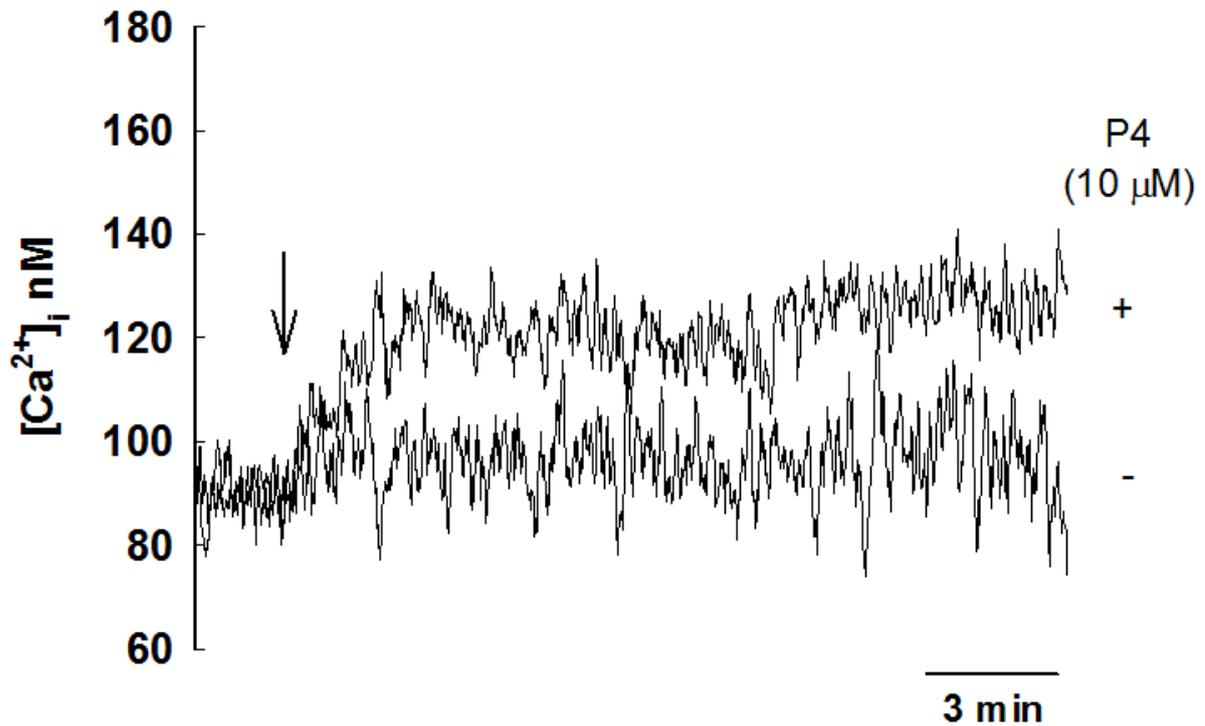


Figure 2 The progesterone-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase from health female with follicular phase

Fura-2-loaded human T cell ( $2 \times 10^6$ ) from health female with luteal phase were stimulated with progesterone (P4, 0, 10  $\mu$ M). The arrow indicates the time of addition of stimulants. The traces were representative of at least 3 experiments.

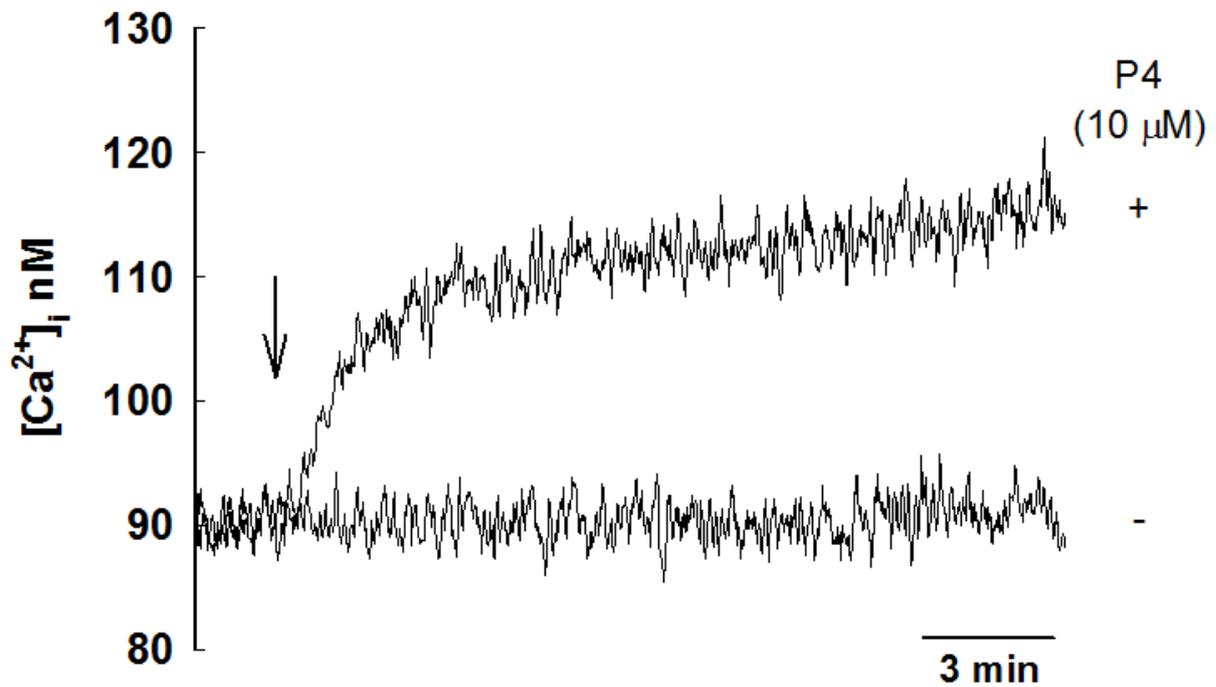


Figure 3 The progesterone-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase from patient with endometriosis with luteal phase

Fura-2-loaded human T cell ( $2 \times 10^6$ ) from patient with endometriosis with luteal phase were stimulated with progesterone (P4, 0, 10  $\mu$ M). The arrow indicates the time of addition of stimulants. The traces were representative of at least 3 experiments.

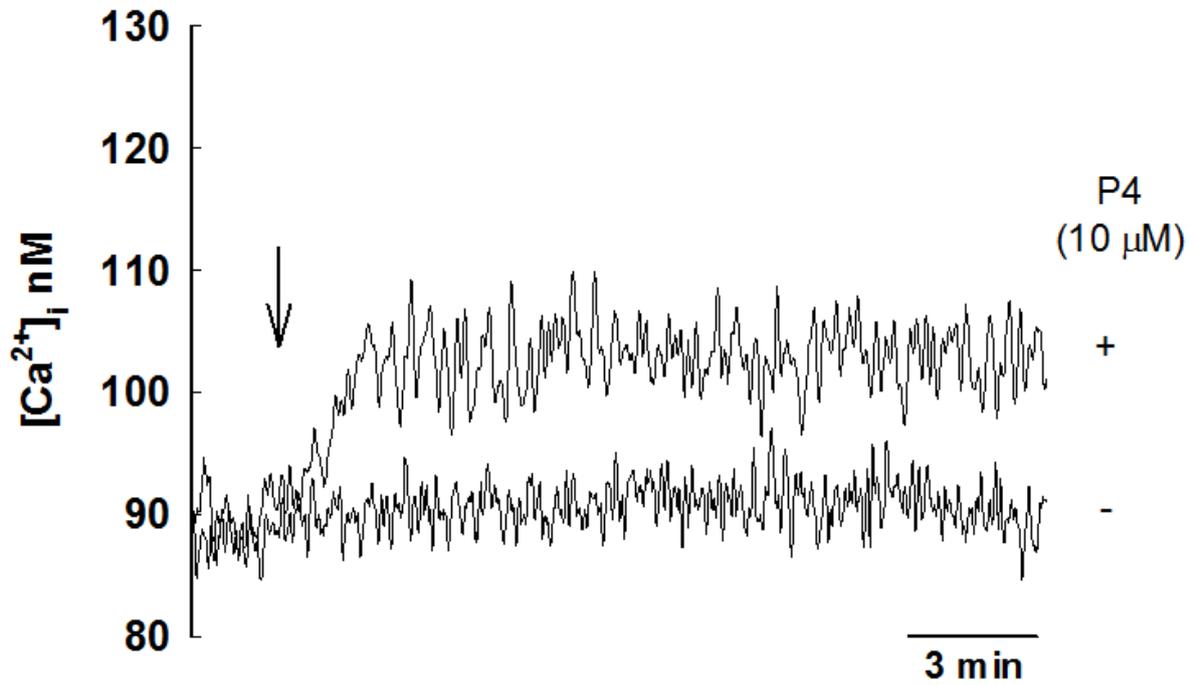


Figure 4 The progesterone-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase from patient with endometriosis with follicular phase

Fura-2-loaded human T cell ( $2 \times 10^6$ ) from patient with endometriosis with luteal phase were stimulated with progesterone (P4, 0, 10  $\mu$ M). The arrow indicates the time of addition of stimulants. The traces were representative of at least 3 experiments.

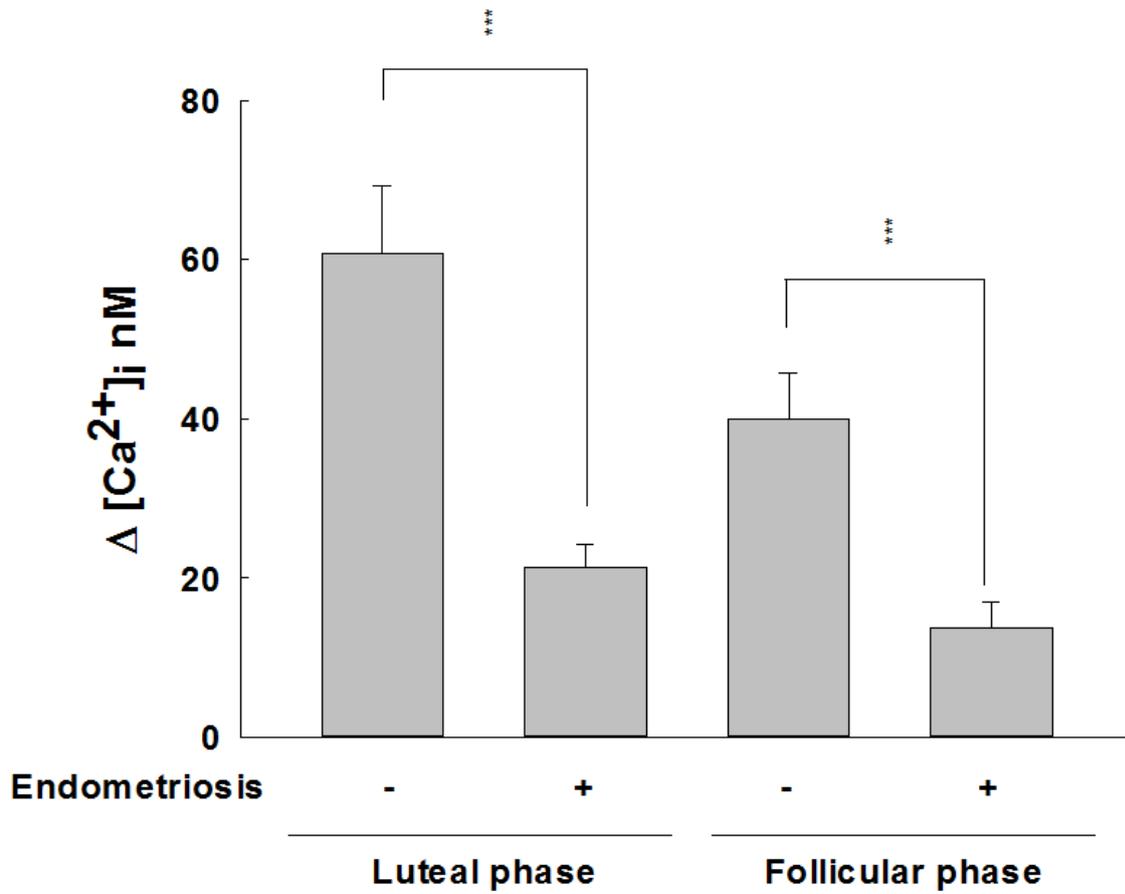


Figure 5

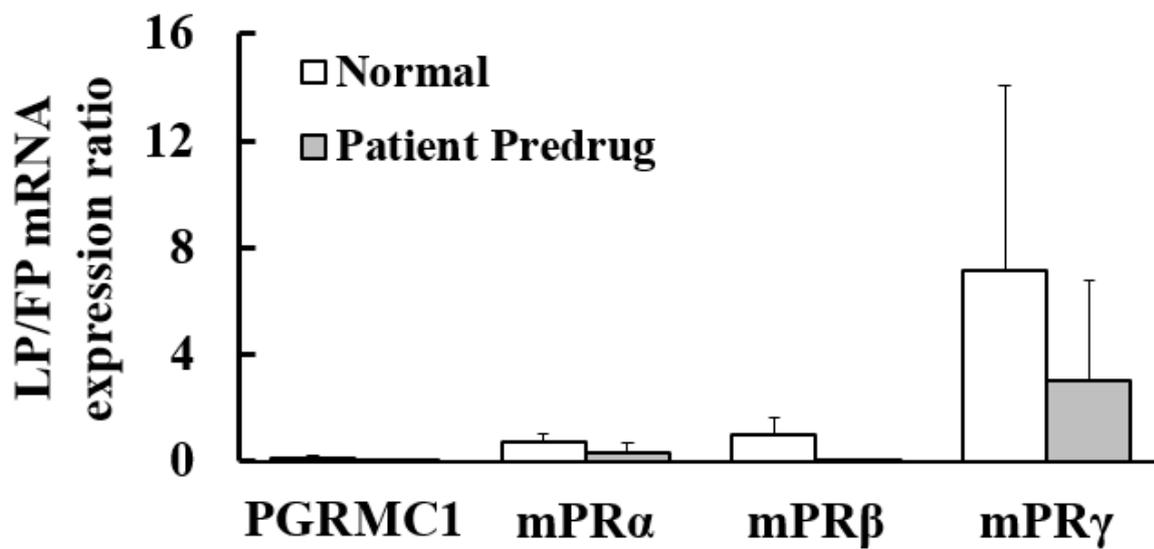


Figure 6

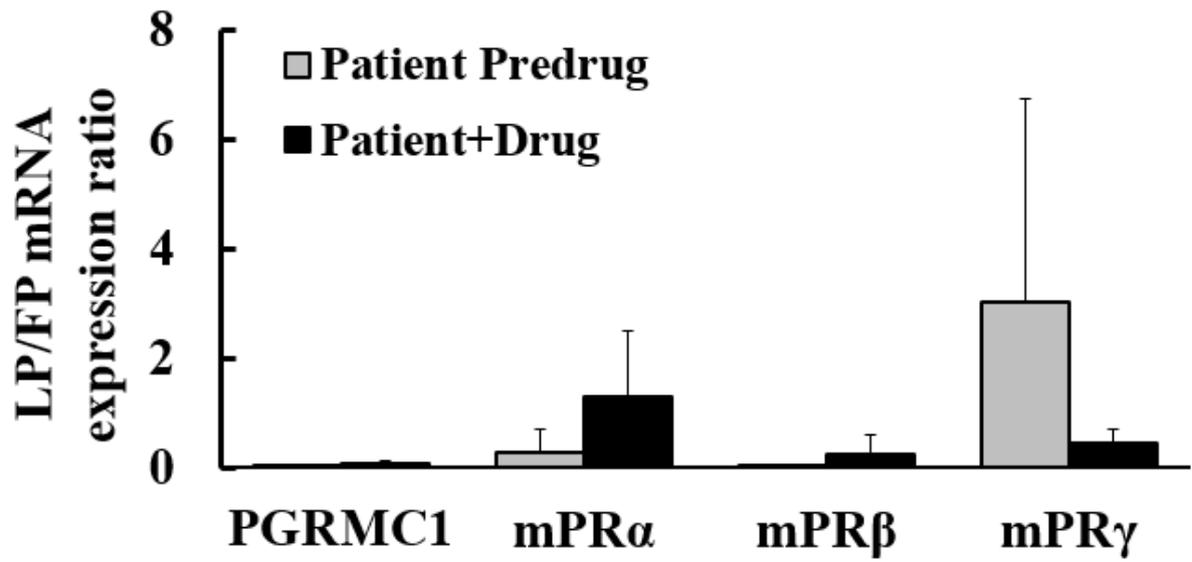


Figure 7

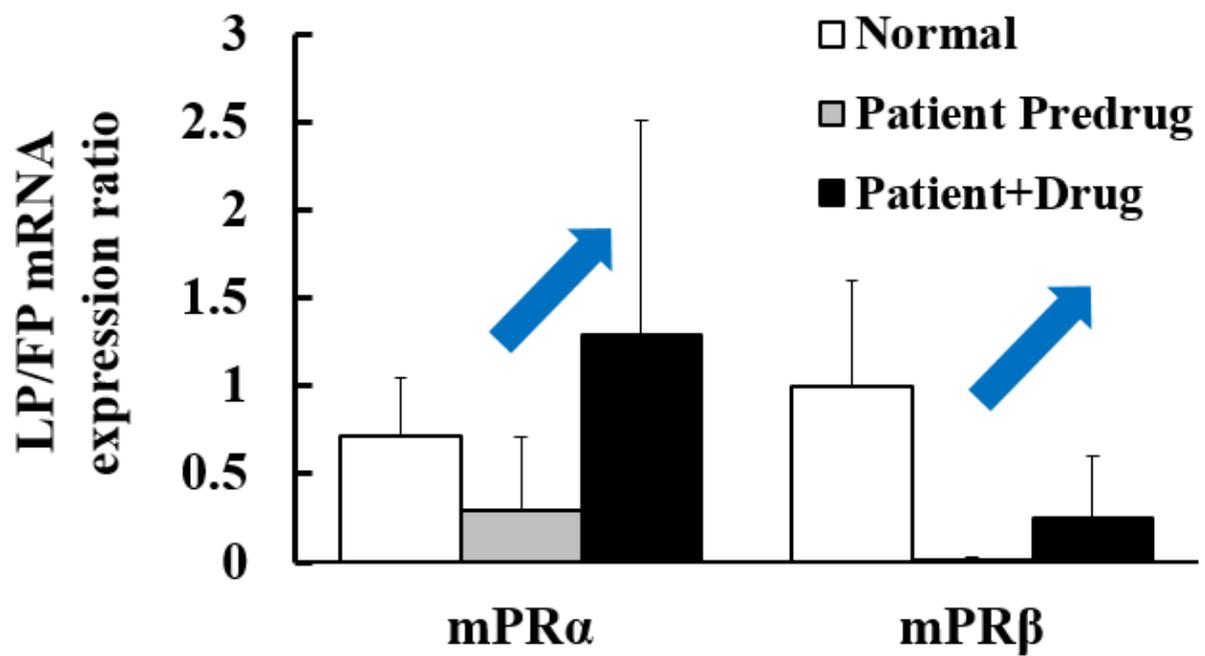


Figure 8

# 台灣常用中藥方劑與抗凝血藥物 warfarin、 消炎止痛藥 ibuprofen 之交互作用分析(2-2)

蔡金川  
義守大學

## 摘 要

### 研究目的：

中西藥可否併用?如何併用藥物才會達到安全，有效降低副作用和毒性之系統分析迄目前為止尚無完整之數據可提供醫療參考。中藥配合現代醫療之輔助療法已深受世界之重視與許多研究亦發現其對疾病治療能提升疾病治癒率、緩和症狀或縮短病程，由此可提高治癒效益、改善病患疾痛及降低醫療成本。因此如何建立完善中西藥併用方法之相關安全資料，減少中西藥併用所生之毒性或造成血中藥物濃度過量之副作用，方可提升民眾就醫信心，增加預後療效及對維護醫療品質均會有相當的助益並具正向的價值，更開啟臺灣醫療發展新頁。近年來有許多藥物中毒之報告，而將中毒怪罪於是中藥之毒性，此有待急需澄清中藥對人體之毒性印象。另民眾在慢性病及難治疾病常會接受中西醫治並同時服用中西藥或含中草藥之健康食品，令現在許多醫院也都開設中西醫聯合門診。然而其間之中西藥併用所生之毒性或副作用，迄今國內外之研究之草藥或單一之中藥，鮮有中藥方劑相關之文獻。

### 研究方法：

本計畫選擇台灣最常用之中藥方劑(衛生署公告之標準方劑 100 種)為準則。以消炎止痛藥 ibuprofen 為研究對象，進行中藥與人類血清蛋白結合能力之藥物定量分析。ibuprofen 都會與血漿中之白蛋白 (albumin) 結合，因此，常會與競爭白蛋白結合則會使游離的 ibuprofen 增加。另 ibuprofen 將使得藥物不良反應發生的機率提高如肝傷害。研究方式將以模擬人血清蛋白濃度於攝氏溫度 37 度分別將 ibuprofen 及中藥方劑作用 1 小時，利用 10 kDa 的分子篩分離游離態的 ibuprofen 以高效能液相層析儀 (HPLC) 定性及定量。利用楊教授實驗室已建立多年之分析平台將可快速進行目前市售或常用之中藥方劑與西藥之交互作用分析。再選擇影響 ibuprofen 與人血清蛋白結合之中藥方劑，進一步利用螢光光譜

分析探討中藥方劑影響 ibuprofen 與蛋白結合的變化。最後研究 ibuprofen 與中藥方劑併用時與蛋白質之結合能力在動物體內之吸收、分佈、代謝、排泄情形。過量 ibuprofen 將造成肝傷害後續並利用動物模式研究中藥方劑與 ibuprofen 合併使用影響肝臟功能與代謝的關係。本研究結果將提供中藥方劑在臨床應用上與 ibuprofen 臨床治療上參考依據，減少病患治療上不良情形及副作用。

### 研究結果：

本計畫調製 100 種中藥方劑，並計算其產率，後以所建構之人類血清蛋白分析平台快速篩選所調製生產之 100 種中藥方劑，並參酌百萬歸人檔中藥方劑次數統計，找出結合取代值(replacement value)較明顯影響的方劑並考慮兩性之議題選擇——加味逍遙散與溫經湯(婦科常用之方劑)，以螢光光譜分析蛋白結合結構之改變一致，確定挑選中藥方劑與人類血漿蛋白競爭 ibuprofen 結合的關係，並以中藥方劑中活性成分 Paeoniflorin 及 Glycyrrhizin 作為 HPLC 分析定量指標成分，經 HPLC 分析發現中藥方劑抑制 ibuprofen 與小鼠血清蛋白質的結合；小鼠口服給予中西藥物可能產生交互作用，在 12 小時中藥物動力學分析顯示加味逍遙散或溫經湯均降低血漿中 ibuprofen 的濃度，但不影響其清除率，而此交互作用在性別上並無明顯差異，分析小鼠肝臟細胞 P450 酵素活性 (CYP2C9)，顯示中西藥物於試驗劑量下同時使用，並無明顯造成肝臟毒性。

關鍵詞：中藥方劑、Ibuprofen、人類血清蛋白、中西藥物交互作用、快速分析平台、血中 Ibuprofen 濃度影響、血小板與血液凝集作用、肝功能、cytochrome P450、肝功能、性別議題

# **Analysis of Drug Interaction between Warfarin, Ibuprofen and Regular Chinese Medicinal Prescriptions in Taiwan (2-2)**

Jin-Chuan Tsai  
I Shou University

## **ABSTRACT**

In this study, we use the western drug and traditional Chinese medicinal prescriptions (TCMP) together. So far, there is not yet complete as of data can provide medical information which is efficient and reliable between western drugs and TCMP. Chinese medicine and modern medical care has been well received adjuvant therapy can improve the treatment of diseases, alleviate symptoms or shorten the disease course, which can improve the healing benefits, reduce pain and patient's illness medical costs. So, how to establish and improve the methods used in medicine and related safety information, and use of Chinese medicine to reduce toxic drug concentrations in blood or cause side effects overdose. To seek medical treatment only to enhance public confidence, increase efficiency and maintain good prognosis for quality of care they will have considerable help benefits and a positive value, but also open a new page in Taiwan's medical development. Recent years, many reports of drug and herb interactions need to clarify the toxicity of TCMP on the body. We choose to focus on the common chronic diseases to see the impact on the human body that combined intake the TCMP and western medicine. Otherwise, the department of integrated Chinese and western medicine was established in many hospitals. The researches on the interactions between Western drug and TCMP are rare. The studies were focus on the interaction between on one single herbal medicine and western drug.

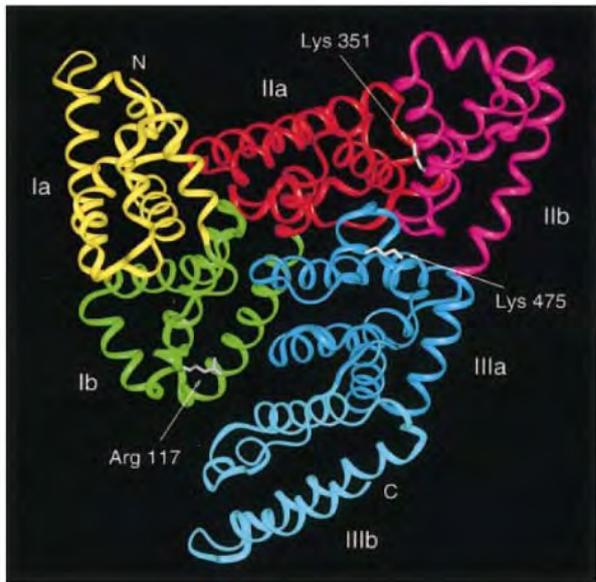
This project uses top-hundreds of Chinese medicinal formulas (100 standard TCMP published by Department of Health, Executive Yuan, R.O.C.), and commonly used drug- warfarin and ibuprofen for analysis their herb drug interaction. In this study, we evaluated drugs interaction by carried out with human serum albumin (HSA) as our model which is a transfer protein and 90% mainly content of vascular system,

drugs have to be bound with it before arrived at destination. So, a first, fast, and reliable analysis mode is setup to analyze the HSA binding capacity. It is reported that ibuprofen could bind with HSA. Ibuprofen combined with TCMP which would affect human serum albumin, the concentration change of free form of warfarin would change the clotting time of patients. The side effect of ibuprofen combined with TCMP would increase the injury of liver. Initial screening to a fixed concentration of HSA incubated at 37°C which contained with ibuprofen and TCMP for 1 hour, using 10 kDa molecular sieves for separation of the unbound form of ibuprofen and determinates the qualitative and quantitative by HPLC. Therefore, the use of the laboratory analysis platform to quickly create commonly used TCMP is currently commercially available, or interaction of conditions to reduce the drugs on the human body under the unknown cause of toxicity. Besides, we use the method of fluorescence spectra to analysis the effects between warfarin and HSA. Furthermore, we choose the TCMP that affects the binding between ibuprofen and HSA to analysis the absorption, distribution, and elimination of ibuprofen. Besides, the effect on platelet and blood coagulation function and the side effect will be analyzed. The animal model will be used to study on the injury of liver and the interaction between ibuprofen and TCMP. The results of this study demonstrated the two screened TCMP had lower replacement value which would reduce ibuprofen uptake. Fluorescence analysis of structure on the TCMP and HSA binding further proved the competitive interaction between TCMP and ibuprofen. In animal study, blood samples of both genders were collecting in 12 hours period from mice gavage TCMP and ibuprofen, the kinetic analysis of serum ibuprofen level shown TCMP has slightly affected C<sub>max</sub> but T<sub>max</sub> of serum ibuprofen in both genders, and the clearance of ibuprofen from blood was not influenced. The hepatotoxicity generated due by the interaction of TCMP and ibuprofen was studied by examining liver specific P450 enzyme CYP2C9 activity. Since no gender effect, data were pooled and shown CYP2C9 activities were not significantly affected due to drugs interaction. The current study provides information on drug interaction between ibuprofen and TCMP and successfully determines the other criteria drugs for a better future, the detail information of medicines and other related protein binding parameters is valuable collected and referred. Finally, our results provided a useful fast screening platform, and evaluating protocols on the drug kinetics and liver functional evaluation to classify the TCMP interactions with common used western drug such as ibuprofen.

Keywords: traditional Chinese medicinal prescriptions, ibuprofen, human serum albumin, herb-drug interaction,, high-throughput platform, pharmacokinetic, platelet and blood coagulation function, liver function, gender issue

## 壹、前言

在過去 CCMP 的計劃中，CCMP98-RD-016 的研究指出<sup>1</sup>，2005 年的 100 萬健保抽樣歸人檔中，其 1997-2007 年所有健保資料檔為母群體，做為研究材料，其中使用 Warfarin 同時並用含抗凝血中藥複方（使用率最高的前四名包含補陽還五湯、血府逐瘀湯、身痛逐瘀湯、疏經活血湯、獨活寄生湯）。因此，Warfarin 並用中藥方劑的現象確實有發生，並且使用 Warfarin 並用中藥方劑（內含當歸，川牛膝、川芎、白芍、桃仁、紅花等）亦有產生不良反應的報導。同時蒐集各大醫院（包含亞東醫院、台北新光醫院）的衛教單張上面都宣導病人不要同時並用丹參、當歸、人參等中藥。在過去文獻當中，也有記載 Warfarin、Ibuprofen 會與銀杏<sup>2</sup>、薑等產生藥物不良反應的記錄<sup>3</sup>。然而目前對於並用產生的風險尚無正式的研究。本研究計畫將選擇衛生署公告之標準方劑 100 種為準，進行處方之調劑、萃取、濃縮、乾燥。方劑煎液以冷凍乾燥。探討中藥方劑煎液與已知 Ibuprofen 西藥競爭人類血清蛋白相同結合位置之影響(site II 如圖一)<sup>4</sup>，本研究將針對中藥影響 Ibuprofen 與人類血清蛋白結合能力之藥物定量分析，並利用螢光檢測中西藥合併使用後對其蛋白質結合的影響。同時，利用肝臟酵素(P450)快速篩選模式來探討中藥方劑影響 Ibuprofen 經由肝臟代謝的反應。綜合以上實驗結果，挑選合併使用可能對 Ibuprofen 影響最顯著的中藥方劑進行動物體內實驗研究中藥方劑合併使用 Ibuprofen 對 Ibuprofen 代謝的影響與對肝臟毒性的影響。



<p>Site I : Warfarin (subdomain IIA)<sup>4, 5</sup>          Site II : Ibuprofen, Diazepam          (subdomain IIIA)<sup>4</sup>          Site III : Aspirin, Digitoxin<sup>5, 6</sup></p>
--

圖一、 Specific albumin protein binding site for common western drugs is demonstrated. Warfarin and ibuprofen bind to site I and site II of albumin respectively.

## 貳、材料與方法

本年度以進行台灣臨床常用之清熱、解毒、消炎、止痛等中藥方劑 100 種為準則與 Ibuprofen 之交互作用分析，本計畫主要執行工作項目如以下六點所述：

### 一、中西藥併用之國內外研究文獻資訊收集

透過國內外搜尋站及文獻查詢，包括：(a) 國際相關資料文獻搜尋，(b) 收集統計義大附醫近三年中藥與 Ibuprofen 之併用頻率及發生臨床副作用反應之調查。(c) 收集國內不良反應通報系統資料，以分析全國中藥方劑與 Ibuprofen 併用之臨床副作用、毒性症狀及頻率（表一）。

### 二、100 項常用中藥方劑處方之調劑及萃取含量

台灣臨床常用之清熱、解毒、消炎、止痛等中藥方劑 100 種為準則(以參考健保百萬人資料庫之排行)，將依中藥委員會公告基準方進行調劑及煎劑萃取處理(不包含非方劑之物質，如澱粉、滑石粉等賦形劑)。本計畫預定購買的藥材行也均會選擇有經過檢驗為原則同時亦選定有信譽之中藥行。藥材來源也均會請藥材行提供並由共同主持人楊玲玲教授及本院中藥局主任吳宗修鑑定以確保藥材之品質。煎劑後以減壓濃縮、冷凍乾燥及稱重以建立分析用方劑標準品成分及萃取含量(如附件表二)。

### 三、建立中藥方劑與 Ibuprofen 併用藥物之體外快速分析平台與完成上述 100 個中藥方劑之交互作用分析

本研究群於 100 及 101 年計畫分別已順利完成中藥與 Aspirin 及 Warfarin 藥物交互作用之快速分析平台，本年度(102 年度)將進行常用中藥方劑對 Ibuprofen 同時用藥是否有交互作用或不良反應之影響。其研究方法如下：

- (一) 利用人類血清蛋白(4.2% HSA)進行 Ibuprofen (0-6000 ug/mL)分析  
Ibuprofen 與 HSA 結合最佳濃度，再與 100 種中藥方劑分析對影響 Ibuprofen 結合力的實驗。蛋白結合模式詳列於實驗方法中，主要利用 HPLC 偵測人類血清蛋白中游離態的 Ibuprofen (吸收波長為 220 nm)。HPLC 移動相包含 30% MeCN and 70 % Phosphate buffer (running time is 20 min). 管柱 LiChroCART<sup>®</sup> 100 RP-18e (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, Merck) reversed-phase column was used. 流速設定為 1.0 mL/min with UV absorbance detection at 220 nm. The analysis involved 10 μL of standard solution.

- (二) 以螢光光譜分析 HSA 與 Ibuprofen 蛋白結合能力之螢光光譜變化數據，再以特定中藥方劑分析與 Ibuprofen 同時競爭結合位置，以證實其交互作用。激發波長為 282 nm，放射光譜為測定 340 nm，以分析螢光強度減弱之影響。
- (三) 設計模擬人類血清蛋白濃度的狀態來偵測中藥方劑與 Ibuprofen 併用藥物交互作用之體外快速分析平台。
- (四) 以建立之快速分析平台，完成 100 個中藥方劑與 Ibuprofen 之交互作用分析。
- (五) 動物血清結合模式分析是以小鼠血液分離之血漿進行 Ibuprofen 之結合率分析，不同濃度之 Ibuprofen 與小鼠血漿進行結合，並經過蛋白質篩選後，以 HPLC 分析游離與結合血漿蛋白之 Ibuprofen。

#### 四、具有明顯增加或減少與人類血清蛋白結合之中藥方劑再以下列兩項實驗分析

##### (一) 螢光光譜分析測定蛋白結合能力

由前四項實驗結果分析快速蛋白結合模式分析平台測定，發現會影響 Ibuprofen 與人類血清蛋白結合之中藥方劑在波長 282 nm 下可觀察蛋白結合前後的影響狀態，此將進一步建立螢光光譜變化數據以再證實其交互作用。可供醫藥相關人員臨床實用上對於中西藥交互作用發生風險評估之參考，以期能減少可能因中西交互作用而產生的不良反應或副作用，以增進醫療資源的有效利用，及保障民眾用藥安全。

##### (二) 肝臟 CYP450 酵素活性分析 — 快速篩選會影響代謝酵素的中藥方劑，由前四項實驗結果經快速蛋白結合模式分析平台測定，篩選出可能會影響 Ibuprofen 與人類血清蛋白結合之中藥方劑，進一步以肝臟細胞共同培養處理下，分析肝臟 CYP450 酵素活性，以瞭解影響 Ibuprofen 代謝的中藥方劑。

#### 五、綜合分析結果發現會影響 Ibuprofen 與人類血清蛋白結合之中藥方劑進行動物實驗分析其吸收、代謝與副作用的影響

##### (一) 口服給予 Ibuprofen 與中草藥方劑，分析在動物體內之吸收與代謝之藥物動力學實驗。160 隻 ICR 小鼠雌雄各半逢機分入對照組，Ibuprofen，中藥方劑組或 Ibuprofen+中藥方劑四組，以中藥方劑連續給予五天後，最後一天給予 Ibuprofen，投藥後之 0、0.5、1、3、6、9、12 小時分別經由靜脈採集血液樣本，收集之血漿以 HPLC

進行定量分析。

(二) 利用動物模式觀察 Ibuprofen 併用中藥方劑後 Ibuprofen 在肝臟之代謝情況，ICR 小鼠以單次口服 Ibuprofen 或 Ibuprofen+中草藥方劑投藥，動物於最後一次口服藥物後 3 小時犧牲，肝臟細胞經 collagenase 酵素消化結構蛋白後，收集細胞以每孔  $1 \times 10^6$  種植於 96 孔盤中後，進行肝臟細胞 P450 酵素活性分析。並以 rifamicin 或 sulfaphenazole 作為促進與抑制之對照處理。以動物模式觀察 Ibuprofen 合併使用中藥方劑後 Ibuprofen 在體內隨時間餵食對吸收與代謝之血液濃度變化之影響情況，同時觀察併用 Ibuprofen 對於肝臟 P450 酵素活性功能的影響。

六、編輯中藥用藥安全教育之「Warfarin」及「Ibuprofen」併用中草藥用藥安全與預防保健健康小手冊(附件一)。

## 參、結果

### 一、中西藥併用之國內外研究文獻資訊收集

透過國內外搜尋站及文獻查詢，搜尋中藥方劑與 Ibuprofen 之合併使用之交互作用相關資料文獻分析，已收集國內外研究文獻與 Ibuprofen 產生交互作用之相關文獻。整理造成藥物毒性及其副作用，如丹參，當歸，生薑等常用的中藥材，在與 Ibuprofen 產生交互作用及其相關之文獻記載。在先前毒劑及文獻回顧分析發現，有中藥方劑或單方中藥均有相關研究，其結果顯示如下附件表一所示。

### 二、100 項常用中藥方劑處方之調劑

台灣臨床常用之清熱、解毒、消炎、止痛等以及參考健保百萬人資料庫排行之衛生署中藥委員會公告基準方之中藥方劑 100 種進行調劑及煎劑萃取處理(不包含非方劑之物質，如澱粉、滑石粉等賦型劑)經冷凍乾燥精秤，並計算其萃取產率。本計畫實驗已調製完成 100 種中藥方劑萃取及含量測定，每種方劑依中委會公布之標準中藥方劑基準方為準則進行中藥方劑材料比例內容配置，其萃取方式為重量之 10 倍體積的二次水進行浸煮 2-4 小時，經過濾後冷凍乾燥儲存備用，並進行產率換算結果，其結果如附件表二所示。

### 三、建立中藥方劑與 Ibuprofen 併用藥物之體外快速分析平台與完成上述 100 個中藥方劑之交互作用分析

(一) 利用人類血清蛋白進行 Ibuprofen 與中藥方劑影響 Ibuprofen 結合力的實驗。蛋白結合模式詳列於實驗方法中，主要利用 HPLC 偵測人類血清蛋白中游離態的 Ibuprofen。以固定濃度的 4.2% HSA 及 4.0 mg/ml Ibuprofen 與 100 µg/ml TCM 萃取物於 37°C (每次分成十組)，進行 30 分鐘實驗結合反應後再離心管(10 kDa)進行離心分離分析，並且以 3-5 次進行試驗。再分別以 HPLC 分析進行 3 組(實驗組及控制組)測試，其流速為 1.0 mL/min，20 分鐘的偵測時間，所得之數據經比對得知濃度進行計算，求得之 RV 值以 = 0、> 0 及 < 0 為三大類，可分別表示出中藥方劑與西藥 Ibuprofen 沒有交互作用(= 0)，或中藥方劑促進西藥 Ibuprofen 與人類血清蛋白結合(> 0)，或中藥方劑抑制西藥 Ibuprofen 與人類血清蛋白結合能力(< 0)，其結果如附件表三中 RV (%) ± SD 所示。

(二) 以螢光光譜分析蛋白結合能力之螢光光譜變化分析其交互作用。

經由上述體外快速篩選平台測得之 RV 值，選出具有明顯與 Ibuprofen 產生交互作用之五種中藥方劑如加味逍遙散、再造散、連翹敗毒散、溫經湯、及獨活寄生湯等，再以固定濃度的 4.2% HSA 及 4.0 mg/mL Ibuprofen 與 100 µg/mL TCM 萃取物於 37°C 下進行 10 分鐘實驗反應後以進行螢光光譜儀進行分析。依照螢光光譜的結果分析，可以觀察五種中藥方劑均會影響 Ibuprofen 與 HSA 的結合，其結果如圖二所示，其結果相符合 RV 值的結果(表三)，然而發現其中連翹敗毒散呈現-37.67%，其結果我們推論其中藥方劑-連翹敗毒散可能含有活性成分會顯著影響其 HSA 的螢光強度，未來可為詳細分析其作用機制，以釐清中藥方劑-連翹敗毒散對 Ibuprofen 與 HSA 結合能力的差異，以探討其作用機轉，以提供臨床醫療資料的建立。

- (三) 設計模擬人類血清蛋白(HSA) 4.2%濃度的狀態來偵測 100 種中藥方劑與 Ibuprofen 合併使用對藥物交互作用之體外分析平台，其結果如附件表三所示。
- (四) 完成 100 個中藥方劑與 Ibuprofen 之交互作用之篩選後，並從中挑選出具有代表性結果之方劑-加味逍遙散及溫經湯，並以兩種中藥方劑主要兩種活性成分-Paeoniflorin 及 Glycyrrhizin 作為分析 HPLC 指紋圖譜鑑定其加味逍遙散中 Paeoniflorin 及 Glycyrrhizin 含量分別為 2.53 mg/g 及 1.18 mg/g (如附件圖三)，其溫經湯中 Paeoniflorin 及 Glycyrrhizin 含量分別為 1.48 mg/g 及 0.95 mg/g (如附件圖四)，同時將兩種中藥方劑繼續進行方劑與蛋白質結合能力之確認與毒性影響。
- (五) 螢光光譜的結果分析佐證上述快速簡易分析交互作用之結果，其結果顯示加味逍遙散會減少 HSA 與 Ibuprofen 的結合能力為 -17.99%，而溫經湯只減少 HSA 與 Ibuprofen 的結合能力為 -10.12%，其結果雖與 RV 值減少有相類似之現象，然而其效果以連翹敗毒散最為顯著(-37.67%)，可能連翹敗毒散中有些活性成分會明顯影響減少 HSA 與 Ibuprofen 的結合能力之螢光結果。

經由 HPLC 光譜及螢光光譜分析的結果互相佐證 Ibuprofen 在 mimic 與人相同血清條件之 HSA 下與中藥方劑交互作用是相符的。其結果顯示，中藥方劑-加味逍遙散及溫經湯是影響 HSA 對 Ibuprofen 結合能力有減少的趨勢，綜合以上之結果選擇中藥方劑加味逍遙散及溫經湯將進一步進行動物

體內試驗及中西藥物交互作用之探討。

#### 四、建立中藥方劑與合併使用 Ibuprofen 藥物之體外快速分析平台與完成上述 100 個中藥方劑之交互作用分析

本計畫已進行分析常用中藥方劑對 Ibuprofen 同時用藥是否有交互作用或不良反應之影響，透過 HPLC 偵測人類血清蛋白中游離態的 Ibuprofen，其分析結果以深入了解中藥方劑對 HSA 與 Ibuprofen 結合能力的影響，透過實驗結果可提供臨床中西藥合併使用參考依據，避免治療影響及減少其副作用。

- (一) 利用人類血清蛋白(HSA)進行分析 Ibuprofen 與中藥方劑影響 Ibuprofen 結合力的實驗。蛋白結合模式詳列於實驗方法中，主要利用 HPLC 偵測人類血清蛋白中游離態的 Ibuprofen，其 RV 值分析結果如附件表三，大部分中藥方劑對於 HSA 與 Ibuprofen 結合能力均有減少的情形發生，特別幾種中藥方劑如加味逍遙散、再造散、連翹敗毒散、溫經湯、及獨活寄生湯等五種中藥方劑，其結果發現均能減少 Ibuprofen 對 HSA 結合能力分別為-23.47%、-21.97%、-23.34%、-22.28%及-14.18%，因此常用五種中藥方劑對 Ibuprofen 同時用藥時大部分是有交互作用或不良反應之影響，尤其是加味逍遙散及溫經湯，對於臨床治療止痛劑 Ibuprofen 在中藥方劑合併使用下，本計畫結果夠能提供臨床治療止痛劑 Ibuprofen 使用上之參考依據，以減少病患的副作用的產生。
- (二) 以螢光光譜分析 HSA 蛋白與 Ibuprofen 結合能力，五種中藥方劑-加味逍遙散、再造散、連翹敗毒散、溫經湯、及獨活寄生湯等在螢光光譜變化數據分析 HSA 與 Ibuprofen 其交互作用分別減少 17.99%、20.80%、37.67%、10.12%及 14.77%的情形發生，如圖二所示，此結果與 HPLC 分析 RV 值有相同的結果，顯示五種中藥方劑均會明顯影響 HSA 與 Ibuprofen 的交互作用。
- (三) 設計模擬人類血清蛋白濃度的狀態來偵測中藥方劑與 Ibuprofen 合併使用藥物交互作用之體外分析平台，使用小鼠血清與 Ibuprofen 分析結合能力，在 Ibuprofen 濃度為 2.0 mg/mL 時，對小鼠血清結合能力為 54.90%，如附件圖六所示，因此本實驗依據此濃度進行中藥方劑對 Ibuprofen 結合能力的影響。其結果有發現中藥方劑對小鼠血清與 Ibuprofen 結合能力有顯著的影響，並且評估動物模式測試方式與實驗架構，以深入了解在中藥方劑-加味逍遙散對

Ibuprofen 在動物模式中吸收與代謝的影響。

- (四) 動物模式進行 Ibuprofen 之動物體內藥物動力學分析實驗，並與中藥方劑-加味逍遙散對 Ibuprofen 在動物模式中吸收與代謝的影響。結果如圖五及表四所示，Ibuprofen 於口服後 1.5 小時達最高血液濃度，並於 12 小時內代謝，而同時給予中藥方劑加味逍遙散或溫經湯時，血液中 Ibuprofen 的最高濃度下降 10%，而自血液中清除的速度也加快。動物模式分析加味逍遙散處理及未處理對 Ibuprofen 在體內吸收與代謝影響之曲線圖，如圖七結果顯示，其結果顯示在 1.5 小時中未加加味逍遙散的組別，其血液中 Ibuprofen 含量  $C_{max}$  為 120.46  $\mu\text{M}$ ，而合併使用加味逍遙散的組別，其血液中 Ibuprofen 含量  $C_{max}$  為 106.03  $\mu\text{M}$ ，降低比列為 11.98%。同時，分析  $AUC_{0-12h}$  其結果為顯示在 0-12 小時中未加加味逍遙散的組別，其  $AUC_{0-12h}$  為 521.94，而合併使用加味逍遙散的組別，其  $AUC_{0-12h}$  為 399.47，降低比列為 23.46%。其結果與先前在體外試驗結果互相符合。同樣，溫經湯也相類似的結果。其顯示 Ibuprofen 在同時餵食中藥方劑-加味逍遙散或溫經湯後，小鼠體內血液中 Ibuprofen 含量明顯造成減少，因此 Ibuprofen 在體內吸收與代謝之影響，加味逍遙散或溫經湯中主要活性成分競爭血漿蛋白結合而影響其吸收與代謝，但不改變於 12 小時間 Ibuprofen 之血液中清除速率。
- (五) 以動物模式進行 Ibuprofen 之動物體內藥物動力學以雄鼠與雌鼠方開分析實驗，並與中藥方劑-加味逍遙散對 Ibuprofen 在動物模式中吸收與代謝的影響，其結果如圖八所示，中藥方劑-加味逍遙散在雄性動物影響 Ibuprofen 之血清濃度較雌性為明顯，因此服用西藥止痛劑 Ibuprofen 在合併使用中藥方劑-加味逍遙散，對於雄鼠較有明顯抑制 Ibuprofen 的吸收與代謝，因此在臨床治療中要注意服用止痛劑 Ibuprofen 在合併使用中藥方劑-加味逍遙散時，可能會影響其藥性及產生不良反應。

## 五、具有明顯增加或減少與人類血清蛋白結合之中藥方劑再以下列兩項實驗分析

### (一) 螢光光譜分析測定蛋白結合能力

由前面四項實驗結果可以證實經由快速蛋白結合模式分析平台測定發現會影響 Ibuprofen 與人類血清蛋白結合之中藥方劑在波

長 282 nm 下為激發波長，分析 HSA 在 340 nm 發射光譜的情形，可觀察蛋白結合前後的影響狀態，此將進一步建立螢光光譜變化數據以再證實其交互作用，其結果如附件圖二所示。可供醫藥相關人員臨床實用上對於中西藥交互作用發生風險評估之參考，以期能減少可能因中西交互作用而產生的不良反應或副作用，以增進醫療資源的有效利用，及保障民眾用藥安全。

## (二) 肝臟細胞 CYP450 酵素活性分析探討影響代謝酵素的中藥方劑

在先前實驗結果經由快速蛋白結合模式分析平台分析發現，會影響 Ibuprofen 與人類白清蛋白結合之中藥方劑-加味逍遙散，經以動物口服藥物後，肝臟細胞分離培養分析其 CYP2C9 酵素活性，並以已知促進或抑制活性的藥物如 rifamicin 或 sulfaphenazole 作為對照組，分析中藥方劑-加味逍遙散對於 Ibuprofen 在肝臟中 P450 酵素活性 CYP2C9 的影響。其結果如圖九所示，實驗結果顯示其在雄鼠與雌鼠沒有明顯差異，但在雌鼠表現 CYP2C9 酵素活性有些微高於雄鼠。在促進或抑制活性的藥物如 rifamicin 或 sulfaphenazole 作為對照組時，發現在 sulfaphenazole 對照組沒有 CYP2C9 酵素活性。而 rifamicin 作為對照組時，其結果雖沒有生物統計上顯著的差異，但仍然發現在 Ibuprofen 與加味逍遙散合併使用下有減少的趨勢。

## 六、動物實驗分析 Ibuprofen 其吸收、代謝與副作用與人類白清蛋白結合之中藥方劑-加味逍遙散的影響

利用動物模式分析 Ibuprofen 在合併使用中藥方劑-加味逍遙散後，其 Ibuprofen 在肝臟代謝情況，P450 酵素與外來物質之降解代謝有關，其中 CYP2C9 活性與 Ibuprofen 代謝有關，本試驗將以口服方式給予 Ibuprofen、中藥方劑或共同給予下，取出肝臟細胞進行分析。而其試驗結果為主，目前正進行分析中之 P450 活性結果，將於結報中完整呈現。以期藉由瞭解肝臟 P450 活性功能的影響之動物模式，以證明分析 Ibuprofen 在同時合併使用中藥方劑-加味逍遙散是否會影響 Ibuprofen 吸收及代謝，有些微影響其 CYP2C9 酵素活性，因此其在臨床治療中在服用止痛劑 Ibuprofen 在合併使用中藥方劑-加味逍遙散時，可能會影響其 Ibuprofen 藥性及產生臨床上不良反應。

## 七、編輯並經專家會議完成「Warfarin」及「Ibuprofen」併用中草藥用藥安全與預防保健健康小手冊(附件一)

## 肆、討論

本計畫先以經過國內外搜尋站及文獻查詢中西藥併用之國內外研究文獻資訊收集，搜尋 100 種中藥方劑對 Warfarin 與 Ibuprofen 之合併使用之交互作用相關資料文獻進行分析發現國內外對於這方面研究相當少，在收集國內外研究文獻與 Ibuprofen 產生交互作用之相關文獻中發現很少人針對中西藥合併使用在體外及體內的影響，特別是中藥方劑更少為了中藥用藥安全有待我們去研究，目前臨床使用之中藥標準方有三百種，為加速了解中藥與西藥是否有交互作用因此本計畫乃應用蛋白質研究中之已知人類血清蛋白與西藥之結合之特性建立快速篩選平台(CCMP100-RD-010)。文獻報告會造成藥物毒性及其副作用，如丹參、當歸、生薑等常用的中藥材，發現其與 Ibuprofen 產生交互作用及其相關之文獻記載。本研究先快速篩檢台灣臨床常用之清熱、解毒、消炎、止痛等生理活性中藥方劑，以及參考健保之百萬人資料庫排行之衛生署中藥委員會公告基準方之 100 種中藥方劑經由萃取及含量測定，每種方劑依中委會公布之標準中藥方劑基準方為準則進行中藥方劑材料比例內容配置，將來編輯用藥安全手冊以提供醫院臨床治療中參考依據。

在建立中藥方劑與 Ibuprofen 併用藥物之體外快速分析平台與完成上述 100 種中藥方劑之交互作用分析，利用 HPLC 偵測人類血清蛋白中游離態的 Ibuprofen 及螢光光譜分析結果顯示大部分中藥方劑會影響 Ibuprofen 在體外與人類血清蛋白結合能力。

利用人類血清蛋白(HSA)進行分析 Ibuprofen 與中藥方劑影響 Ibuprofen 結合能力的實驗，主要利用 HPLC 偵測人類血清蛋白中游離態的 Ibuprofen，其分析結果發現大部分中藥方劑對於 HSA 與 Ibuprofen 結合能力均有減少的情形發生，特別幾種中藥方劑如加味逍遙散、再造散、連翹敗毒散、溫經湯、及獨活寄生湯等五種中藥方劑，其結果發現均能減少 Ibuprofen 對 HSA 結合能力，因此常用中藥方劑對 Ibuprofen 同時用藥時大部分是有交互作用或不良反應之影響，尤其是加味逍遙散及溫經湯，對於臨床治療消炎止痛症狀時在使用 Ibuprofen 與中藥方劑合併使用下，能夠有效地提供臨床治療上參考依據，以減少病患的副作用的產生。

利用動物模式分析 Ibuprofen 在合併使用中藥方劑加味逍遙散或溫經湯後，其 Ibuprofen 在體內之吸收與代謝情況，在動物實驗研究 Ibuprofen 不同

時間檢測小鼠血清中含量，以及在合併使用中藥方劑加味道遙散或溫經湯後，Ibuprofen 在體內之影響吸收與代謝之血液濃度變化影響，其結果發現 Ibuprofen 在同時合併使用中藥方劑會明顯減少 Ibuprofen 的吸收及代謝，對於肝臟正常功能的影響。

透過本計畫建立中藥方劑與合併使用 Ibuprofen 藥物之體外快速分析平台與完成上述 100 個中藥方劑之交互作用分析，具有明顯增加或減少與人類血清蛋白結合之中藥方劑的相關實驗分析結果，選擇影響蛋白結合及配合兩性平衡議題之中藥方劑，再進一步進入動物實驗模式分析 Ibuprofen 在合併使用中藥方劑加味道遙散或溫經湯（女性常用方劑之一）處理後，其 Ibuprofen 在體內之吸收與代謝有明顯減少情況發生，而綜合以上研究分析結果發現會影響 Ibuprofen 與人類血清蛋白結合之中藥方劑進行動物實驗分析其吸收、代謝與副作用的影響，在臨床治療消炎止痛症狀中，本研究能夠提供西藥 Ibuprofen 及 100 個中藥方劑之交互作用分析，在臨床治療上能夠有效減少治療過程中對於不良反應及可能產生副作用，以提供醫師及病患在用藥上造成生理不良反應及健保醫療的浪費，以增加國人用藥的正確觀念。

動物模式進行 Ibuprofen 之動物體內藥物動力學分析實驗中，探討中藥方劑-加味道遙散或溫經湯對 Ibuprofen 在動物模式中吸收與代謝的影響。其結果發現 Ibuprofen 於口服後 1.5 小時達最高血液濃度，並於 12 小時內代謝完全，而同時給予中藥方劑加味道遙散或溫經湯時，血液中 Ibuprofen 的最高濃度下降 11.98% 及 8.21%，而自血液中 Ibuprofen 含量的速度也加快。同時，分析  $AUC_{0-12h}$  其結果為顯示在 0-12 小時中未加加味道遙散的組別，其  $AUC_{0-12h}$  也降低比列為 23.46%，其結果與先前在體外試驗(RV 值)結果互符合，因此 Ibuprofen 在同時餵食中藥方劑-加味道遙散後，小鼠體內血液中 Ibuprofen 含量會明顯減少，而且也會影響 Ibuprofen 在體內之吸收與代謝，加味道遙散競爭血漿蛋白結合，而影響其吸收與代謝，但不改變於 12 小時間 Ibuprofen 之血液中代謝速率。以動物模式進行 Ibuprofen 之動物體內藥物動力學以雄鼠與雌鼠方開分析實驗，中藥方劑-加味道遙散在雄性動物影響 Ibuprofen 吸收與代謝的影響之血清濃度較雌性為明顯，因此服用西藥止痛劑 Ibuprofen 在合併使用中藥方劑-加味道遙散，對於雄鼠較有明顯抑制 Ibuprofen 的吸收與代謝。

利用動物模式分析 Ibuprofen 在合併使用中藥方劑-加味道遙散後，其 Ibuprofen 在肝臟 P450 酵素活性與外來物質之降解代謝有關，其中 CYP2C9

活性與 Ibuprofen 代謝有關，本試驗將以口服方式給予 Ibuprofen、中藥方劑-加味逍遙散或共同給予下，取出肝臟細胞進行分析，而其試驗結果分析中肝臟 P450 之 CYP2C9 酵素活性。在肝臟 P450 活性功能的影響之動物模式，結果分析發現 Ibuprofen 在同時合併使用中藥方劑-加味逍遙散會些微影響其 CYP2C9 酵素活性，實驗結果顯示其在雄鼠與雌鼠沒有明顯差異，但在雌鼠表現 CYP2C9 酵素活性有些微高於雄鼠。在促進或抑制活性的藥物如 rifamicin 或 sulfaphenazole 作為對照組時，發現在 sulfaphenazole 對照組沒有 CYP2C9 酵素活性。而 rifamicin 作為對照組時，其結果雖沒有生物統計上顯著的差異，但仍然發現在 Ibuprofen 與加味逍遙散合併使用下有減少的趨勢。因此，在臨床治療中要注意服用止痛劑 Ibuprofen 在合併使用中藥方劑-加味逍遙散時，可能會影響其止痛劑 Ibuprofen 藥性及產生臨床不良反應及動物體內含量均會因加味逍遙散合併使用而產生減少現象，對於目前臨床消炎止痛治療藥劑使用上，需要更加仔細分析與考量中西藥合併使用上所產生不良反應及可能的副作用。

”用藥安全教育手冊”係針對預防及治療血栓疾病的口服抗凝血劑（warfarin）以及常用的消炎止痛藥（ibuprofen）為對象收集國內外相關文獻及國內各大醫院相關之用藥安全及中西藥交互作用之臨床用藥注意事項資訊，提供國人在使用心血管預防血栓之抗凝血劑（warfarin）；以及發燒、感冒、關節痛、發炎常用之消炎解熱止痛劑（ibuprofen）之衛教與中藥併用時之用藥安全注意事項。Warfarin 為抗凝血劑與中藥活血化癥藥或血小板凝集抑制藥物或食物併用，一旦有出血症狀將會產生出血不止之副作用(包括一般民眾、老人及婦幼)。本手冊內容首先收集中草藥與西藥併用之交互作用資訊，主要以中藥方劑在臨床應用上與 warfarin 或 ibuprofen 併用所產生之交互作用和副作用資訊為題，並編彙成衛教資料，提供國人作為用藥安全之教材。將可預防或降低副作用以及減少藥害之發生。

## 伍、結論與建議

本計畫綜合以上結果發現止痛劑 Ibuprofen 在合併使用於衛生福利部中醫藥司核准 100 種中藥方劑時，發現許多中藥方劑會影響止痛劑 Ibuprofen 或在臨床治療上可能發生的不良反應及副作用。在本年度計畫結果發現中，其中加味逍遙散及溫經湯對人類血清蛋白(HSA)與 Ibuprofen 交互作用會明顯的影響，其在動物實驗結果中也發現相同結果，顯示 Ibuprofen 在合併使用加味逍遙散及溫經湯時可能會產生血清與 Ibuprofen 的結合能力，進而影響生理作用及治療上的不良反應及副作用。在 HPLC 指紋圖譜中加味逍遙散及溫經湯均以兩種指標成分-Paeoniflorin 及 Glycyrrhizin 作為分析 HPLC 指紋圖譜鑑定含量分別為 2.53 mg/g 及 1.18 mg/g。而中藥方劑-溫經湯中 Paeoniflorin 及 Glycyrrhizin 以分析 HPLC 含量分別為 1.48 mg/g 及 0.95 mg/g，顯示這兩種活性成分是否會影響 Ibuprofen 對 HSA 的結合作用？將來將深入探討兩種活性成分是否與 Ibuprofen 合併使用時在治療止痛效果時的影響，以做為臨床治療醫師與民眾用藥參考之用。

在動物實驗中，明顯發現在小鼠血清中有減少 Ibuprofen 的含量及吸收與代謝情形，在藥物動力學試驗中結果發現 Ibuprofen 在動物試驗中以 1.5~3 小時吸收率為最高，在 12 小時後其含量幾乎已代謝完畢，雖然加味逍遙散及溫經湯均會影響 Ibuprofen 在動物體內吸收及代謝，但不會縮短或延長 Ibuprofen 在動物體內滯留時間。另外，實驗結果顯示其在雄鼠與雌鼠雖然沒有明顯差異，但在雌鼠表現 CYP2C9 酵素活性有些微高於雄鼠，仍然發現在 Ibuprofen 與加味逍遙散合併使用下有減少的趨勢。綜合以上結果，因此 Ibuprofen 在合併使用中藥方劑時會影響治療止痛之藥效，將來再深入探討加味逍遙散與兩種指標成分 Paeoniflorin 及 Glycyrrhizin 在動物試驗及臨床治療研究中，將是一項非常重要課題。

用藥安全教育手冊針對預防及治療血栓疾病的口服抗凝血劑(warfarin)以及常用的消炎止痛藥(ibuprofen)為對象收集國內外相關文獻及國內各大醫院相關之用藥安全及中西藥交互作用之臨床用藥注意事項資訊，提供國人在使用心血管預防血栓之抗凝血劑(warfarin)；以及發燒、感冒、關節痛、發炎常用之消炎解熱止痛劑(ibuprofen)之衛教與中藥併用時之用藥安全注意事項。Warfarin 為抗凝血劑與中藥活血化瘀藥或血小板凝集抑制藥物或食物併用，一旦有出血症狀將會產生出血不止之副作用(包括一般民眾、老人及婦幼)。本手冊內容首先收集中草藥與西藥併用之交互作用資訊，主

要以中藥方劑在臨床應用上與 warfarin 或 ibuprofen 併用所產生之交互作用和副作用資訊為題，並編彙成衛教資料，提供國人作為用藥安全之教材。將可預防或降低副作用以及減少藥害之發生。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP102-RD-105 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. 賴榮年。台灣抗凝血西藥及非類固醇止痛藥與科學 中藥併用及交互作用之藥物流行病學研究。中醫藥 年報，第28 期，第 8 冊，pp 291-388。
2. Na D.H., Ji H.Y., Park E.J., Kim M.S., Liu K.H., Lee H.S. Evaluation of Metabolism-Mediated Herb-Drug Interactions. *Arch. Pharm. Res.*, **2011**, *34*, 1829-1842.
3. Izzo1 A.A., Ernst E. Interactions Between Herbal Medicines and Prescribed Drugs: an update systematic review. *Drugs*, **2009**; *69*, 1777-1798.
4. Mandula H., Parepally J.M.R., Feng R., Smith R.. Role of Site-Specific Binding to Plasma Albumin in Drug Availability to Brain. *The Journal of Pharmaceutical Sciences and Experimental Therapeutics*, **2006**, *317*(2) 667-675.
5. Ulrich, K. H.. Relations between high-affinity binding sites of markers for binding regions on human serum albumin. *Biochemistry Journal*, **1985**, *225*, 629-638.
6. Herve F., Urien S., Albengres E., Duche J.C., and Tillement J.P. Drug binding in plasma. A Summary of Recent Trends in the Study of Drug and Hormone Binding. *Clinical Pharmacokinetics*, **1994**, *26*(1), 44-58.
7. Chen K., Lo A.C., Yeung J. H. K., Woo K. S.. The effect of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) on warfarin pharmacodynamics and pharmacokinetics of warfarin enantiomers in rats. *Journal of Pharmacy & Pharmacology*, **1995**, *47*, 402-406.
8. Adriane F.B.. Herb-Drug Interactions. *The Lancet*, **2000**, *355*, 134-138.
9. Makino T., Wakushima H., Okamoto T., Okukubo Y., Deguchi Y., Kano Y.. Pharmacokinetic interaction between warfarin and kangen-karyu, a Chinese traditional herbal medicine, and their synergistic action. *Journal of Ethnopharmacology*, **2002**, *82*, 35-40.
10. Lockwood G.F., Albert K.S., Szpunar G.J., Wagner J.G. Pharmacokinetics of Ibuprofen in Men--III: Plasma Protein Binding. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, **1983**, *11*(5), 469-482.
11. Foye W.O., Lemke T.L., Williams D.A. Foye's principles of medicinal

- chemistry. *Lippincott Williams & Wilkins; Sixth Edition Edition*, **2007**, 267-268.
12. Zhu M., Chan K.W., Ng L.S., Chang Q., Chang S., Li R.C.. Possible influence of ginseng on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in rats. *Journal of Pharmacy & Pharmacology*, **1998**, *51*, 175-180.
  13. Ishida S., Kinoshita M., Sakiya Y., Taira Z., Ichikawa T.. Glycyrrhizin binding site on human serum albumin. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **1992**, *40*(1), 275-278.
  14. Ishida S., Sakiya Y., Ichikawa T., Kinoshita M., Awazu S.. Binding of glycyrrhizin to human serum and human serum albumin. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **1989**, *37*(1), 226-228.
  15. Kosa T., Maruyama T., Otagiri M.. Species differences of serum albumins: drug binding sites. *Pharmaceutical Research*, **1997**, *14*(11), 1607-1613.
  16. Silva D., Cortez C.M. Louro S.R.W. Quenching of the intrinsic fluorescence of bovine serum albumin by chlorpromazine and hemin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **2004**, *37*(7), 963-968.
  17. Rohacova J., Marin M.L., Miranda M.A.. Complexes between Fluorescent Chlorophenol Acid Derivatives and Human Serum Albumin. A Photophysical Approach To Investigate the Binding Behavior. *Journal of Physical Chemistry B*, **2010**, *114*, 4710-4716.
  18. Xie G, Sun Y, Nie T, Mackenzie GG, Huang L, Kopelovich L, Komninou D, Rigas B. Phospho-ibuprofen (MDC-917) is a novel agent against colon cancer: efficacy, metabolism, and pharmacokinetics in mouse models. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2011**, *337*(3), 876-886.
  19. Sun Y, Huang L, Mackenzie GG, Rigas B. Oxidative stress mediates through apoptosis the anticancer effect of phospho-nonsteroidal anti-inflammatory drugs: implications for the role of oxidative stress in the action of anticancer agents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2011**, *338*(3), 775-783.
  20. Mattheolabakis G, Nie T, Constantinides PP, Rigas B. Sterically stabilized liposomes incorporating the novel anticancer agent phospho-ibuprofen

- (MDC-917): preparation, characterization, and in vitro/in vivo evaluation. *Pharm. Res.*, **2012**, 29(6), 1435-1443.
21. Ioannides C, Lewis, DFV. Cytochromes P450 in the bioactivation of chemicals. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2004**, 4, 1767-1788.
  22. Ooi JP, Kuroyanagi M, Sulaiman SF, Muhammad TST, Tan ML. Andrographolide and 14-deoxy-11, 12 – Didyhydroandrographolide inhibit cytochrome P450s in HepG2 hepatoma cells. *Life Sci.*, **2011**, 88, 447-454.
  23. Canaparo R, Muntoni E, Zara GP, Pepa CD, Berno E, Costa M, Eandi M. Determination of ibuprofen in human plasma by high performance liquid chromatography: validation and application in pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, **2000**, 14, 219-226.
  24. Bendele A, Hulman JF, White S, Brodhecker C, Bendele R. Hepatocellular proliferation in ibuprofen-treated mice. *Toxicologic Pathology*, **1993**, 21(1), 15-20.
  25. Hassan AS, Sapin A, Ubrich N, Maincent P. Simple and sensitive HPLC method with fluorescence detection for the measurement of ibuprofen in rat plasma: application to a long lasting dosage form. *Drug Develop. Industri. Pharm.*, **2008**, 34, 1064-1070.

## 柒、圖、表

表一、中藥與 ibuprofen 合併使用之交互作用相關資料文獻。

中藥名	西藥學名	可能交互作用機轉	可能交互作用結果	建議處理方式	原文性質	篇名	作者	原文出處
葛根黃連黃芩湯	ibuprofen	改變藥物與白蛋白的結合，增加游離藥物的量	改變藥物的血中有效濃度	避免併用	文獻回顧	Interactions between Warfarin, Ibuprofen, Salicylic Acid and Main Components of Siwu Decoction on HSA Binding=四物湯主成分與 Warfarin, Ibuprofen, Salicylic Acid在血漿蛋白結合之交互作用	林友鈞;楊玲玲	臺灣科學. 2004; 54(1):22-31.
四物湯	ibuprofen	四物湯減少HAS(human serum albumin) 中的結合率	改變藥物的血中有效濃度	避免併用	文獻回顧	Interactions between Warfarin, Ibuprofen, Salicylic Acid and Main Components of Siwu Decoction on HSA Binding=四物湯主成分與 Warfarin, Ibuprofen, Salicylic Acid在血漿蛋白結合之交互作用	林友鈞;楊玲玲	臺灣科學. 2004; 54(1):22-31.
甘草	ibuprofen	glycyrrhizic acid分別減少28% ibuprofen與HSA的結合率	改變藥物的血中有效濃度	避免併用	文獻回顧	Interactions between Warfarin, Ibuprofen, Salicylic Acid and Main Components of Siwu Decoction on HSA Binding=四物湯主成分與 Warfarin, Ibuprofen, Salicylic Acid在血漿蛋白結合之交互作用	林友鈞;楊玲玲	臺灣科學. 2004; 54(1):22-31.
銀杏葉	ibuprofen	腦內出血	增加出血的危險	避免併用	個案報告	Fatal intracerebral mass bleeding associated with Ginkgo biloba and ibuprofen	Meisel C, Johne A, Roots I	Atherosclerosis. 2003; 167(2):367.
銀杏葉	ibuprofen	降低血小板凝集反應	增加出血的危險	避免併用	cross-sectional study	Incidence and severity of potential drug-dietary supplement interactions in primary care patients: an exploratory study of 2 outpatient practices.	Peng CC, Glassman PA, Trilli LE, Hayes-Hunter J, Good CB	Arch Intern Med. 2004; 164(6):630-6.

表二、100種中藥方劑及其產率。

No.	中藥基準方劑	藥材總重	產率
			(冷凍乾燥粉末重量/藥材總重 x100) (w/w, %)
		g	
1	乙字湯	43	12.5
2	九味羌活湯	52	13.72
3	人參敗毒散	64	21.05
4	人參養榮湯(丸)	66	29.09
5	八正散	56	9.38
6	八味帶下方	52	23.1
7	八珍湯(丸)	55	29.13
8	十全大補湯(丸)	70	25.99
9	三痹湯	54	21.98
10	上中下通用痛風丸	55	19.36
11	大建中湯	58	20.02
12	大柴胡湯	60	17.17
13	大黃牡丹皮湯	56	22.16
14	小承氣湯	56	21.92
15	小陷胸湯	54	22.56
16	小續命湯	58	17.34
17	川芎茶調散	49	18.9
18	五淋散	51.2	16.07
19	六君子湯(丸)	60	27.67
20	升麻葛根湯	54	17.22
21	加味逍遙散	66	22.24
22	四君子湯	52	30.06
23	四物湯	60	33.2
24	正骨紫金丹	59.2	21.23
25	玉屏風散	60	27.52
26	玉泉丸	54	27.72
27	甘露消毒丹	57.6	10.54
28	甘露飲	50	31.54
29	白虎加人參湯	70	16.36
30	白虎湯	64	11.75

No.	中藥基準方劑	藥材總重 (g)	產率(w/w, %) (冷凍乾燥粉末重量/藥材總重 x100)
31	再造散	63	20.37
32	安中散	48	14.42
33	托裏消毒飲	60	25.08
34	百合固金湯(丸)	52.4	41.83
35	竹葉石膏湯	78	13.18
36	血府逐瘀湯	75.2	25.11
37	抑肝散	58	25.97
38	芍藥甘草湯	48	31.88
39	芍藥湯	50	29.5
40	芍歸膠艾湯	57	38.68
41	辛夷清肺湯	51	27.24
42	防風通聖散	64	19.13
43	定喘湯	60	21.88
44	治濁固本丸	58	15.45
45	炙甘草湯	63	34.1
46	保產無憂方	52.4	17.33
47	柴陷湯	53	20.47
48	柴葛解肌湯	51	10.13
49	桂枝芍藥知母湯	62	22.87
50	桂枝茯苓丸	60	10.33
51	桃紅四物湯	50	34.04
52	桑菊飲	63	18.25
53	消風散	60	22.23
54	消痔丸	54	35
55	益氣聰明湯	54	20.5
56	秦艽鱉甲散	52	20.5
57	茵陳五苓散	48	8.6
58	茵陳蒿湯	60	10.83
59	荊芥連翹湯	51	17.8

No.	中藥基準方劑	藥材總重 (g)	產率(w/w, %) (冷凍乾燥粉末重量/藥材總重 x100)
60	健脾丸	61	24.9
61	參苓白朮散	49.6	23.13
62	參蘇飲	62	23.52
63	排膿散	52	22.13
64	梔子豉湯	50	17.54
65	涼膈散	56	12.78
66	清心利膈湯	69	19.19
67	清心蓮子飲	66	18.73
68	清胃散	57.6	25.52
69	清涼散	66	22.89
70	清暑益氣湯	56	28.82
71	疏經活血湯	55	25.4
72	連翹敗毒散	50	21.2
73	復元活血湯	54	24.78
74	散腫潰堅湯	64	11.69
75	普濟消毒飲	52.8	27.33
76	滋陰地黃丸(熟乾地黃丸)	52	39.31
77	紫菀湯	51	41.53
78	越婢加朮湯	52	17.23
79	黃耆五物湯	56	14.09
80	黃連上清丸	57.2	18.58
81	黃連湯	60	18.82
82	黃連解毒湯	48	12.31
83	溫清飲(解毒四物湯)	56	26.93
84	溫經湯	56	31.88
85	當歸六黃湯	56	25.98
86	當歸芍藥散	54	24.81
87	當歸拈痛湯	66	24.18
88	當歸飲子	60	21.17

No.	中藥基準方劑	藥材總重 (g)	產率(w/w, %) (冷凍乾燥粉末重量/藥材總重 x100)
89	當歸補血湯	60	26.78
90	葛根黃芩黃連湯	48	19.71
91	補陽還五湯	48	24.33
92	槐花散	48	16.77
93	蒼耳散	68	8.79
94	銀翹散	60	17.47
95	調經丸	64	20.41
96	豬苓湯	60	19.98
97	橘皮竹茹湯	52	21.85
98	獨活寄生湯	62	21.42
99	龍膽瀉肝湯(丸)	52	23
100	瀉白散	58	7.45

表三、探討 Ibuprofen 與常用 100 種中藥方劑組成分及對 HSA 結合能力之影響。n = 5。

$RV = [(C_{[IBP+TCM]} - C_{[HSA+IBP+TCM]}) - (C_{[IBP+TCM]} - C_{[HSA+IBP]}) * 100] - 100$ RV > 0, 表示 TCM 促進 Ibuprofen 與 HSA 之結合 RV < 0, 表示 TCM 取代或抑制 Ibuprofen 與 HSA 之結合			
中藥基準方劑	RV (%) ± SD	中藥基準方劑	RV (%) ± SD
1. 乙字湯	-21.33 ± 1.54	51. 桃紅四物湯	-15.55 ± 2.54
2. 九味羌活湯	-19.05 ± 2.30	52. 桑菊飲	-4.78 ± 2.44
3. 人參敗毒散	-18.86 ± 3.54	53. 消風散	-10.15 ± 3.84
4. 人參養榮湯(丸)	-20.32 ± 4.28	54. 消痔丸	-8.85 ± 0.14
5. 八正散	+10.49 ± 3.02	55. 益氣聰明湯	-5.44 ± 1.53
6. 八味帶下方	-20.51 ± 5.54	56. 秦艽鱉甲散	-13.58 ± 2.50
7. 八珍湯(丸)	-2.74 ± 0.94	57. 茵陳五苓散	-10.55 ± 2.57
8. 十全大補湯(丸)	-18.10 ± 2.11	58. 茵陳蒿湯	-10.24 ± 1.91
9. 三痹湯	+13.02 ± 3.68	59. 荊芥連翹湯	-9.1 ± 1.08
10. 上中下通用痛風丸	-16.45 ± 0.68	60. 健脾丸	-8.34 ± 3.45
11. 大建中湯	-8.23 ± 1.69	61. 參苓白朮散	-5.51 ± 0.54
12. 大柴胡湯	-4.21 ± 0.14	62. 參蘇飲	-0.39 ± 1.00
13. 大黃牡丹皮湯	-1.47 ± 0.54	63. 排膿散	-8.81 ± 5.04
14. 小承氣湯	-3.08 ± 2.45	64. 梔子豉湯	-5.65 ± 0.32
15. 小陷胸湯	+7.96 ± 2.14	65. 涼膈散	-2.10 ± 1.39
16. 小續命湯	-1.80 ± 2.65	66. 清心利膈湯	-4.98 ± 1.29
17. 川芎茶調散	-10.37 ± 4.69	67. 清心蓮子飲	-3.51 ± 0.94
18. 五淋散	-13.06 ± 0.69	68. 清胃散	-7.51 ± 5.30
19. 六君子湯(丸)	-12.96 ± 1.10	69. 清涼散	+3.26 ± 3.97
20. 升麻葛根湯	-13.69 ± 4.34	70. 清暑益氣湯	-16.32 ± 3.17
21. 加味逍遙散	-23.47 ± 1.80	71. 疏經活血湯	-11.35 ± 4.40
22. 四君子湯	-8.22 ± 1.94	72. 連翹敗毒散	-23.34 ± 0.50
23. 四物湯	-12.01 ± 3.59	73. 復元活血湯	-2.17 ± 0.94
24. 正骨紫金丹	-12.67 ± 1.19	74. 散腫潰堅湯	-16.36 ± 0.63
25. 玉屏風散	-7.44 ± 0.69	75. 普濟消毒飲	-18.07 ± 2.72
26. 玉泉丸	-16.97 ± 2.31	76. 滋陰地黃丸	-14.09 ± 1.77
27. 甘露消毒丹	-13.43 ± 1.99	77. 紫菀湯	-14.79 ± 2.97
28. 甘露飲	-14.47 ± 1.57	78. 越婢加朮湯	-11.05 ± 0.67
29. 白虎加人參湯	-10.92 ± 0.99	79. 黃耆五物湯	+0.56 ± 1.66
30. 白虎湯	-12.87 ± 1.30	80. 黃連上清丸	0 ± 1.02
31. 再造散	-21.97 ± 1.09	81. 黃連湯	-2.95 ± 0.11
32. 安中散	-14.83 ± 2.93	82. 黃連解毒湯	-3.71 ± 1.08

$$RV = [(C_{[IBP+TCM]} - C_{[HSA+IBP+TCM]}) - (C_{[IBP+TCM]} - C_{[HSA+IBP]}) * 100] - 100$$

RV > 0, 表示 TCM 促進 Ibuprofen 與 HSA 之結合

RV < 0, 表示 TCM 取代或抑制 Ibuprofen 與 HSA 之結合

中藥基準方劑	RV (%) ± SD	中藥基準方劑	RV (%) ± SD
33. 托裏消毒飲	-18.67 ± 1.75	83. 溫清飲	-9.96 ± 0.89
34. 百合固金湯(丸)	-10.34 ± 4.02	84. 溫經湯	-22.28 ± 1.94
35. 竹葉石膏湯	-5.69 ± 2.91	85. 當歸六黃湯	-8.33 ± 1.66
36. 血府逐瘀湯	-2.78 ± 2.96	86. 當歸芍藥散	-8.60 ± 0.01
37. 抑肝散	-7.78 ± 1.05	87. 當歸拈痛湯	-9.62 ± 1.69
38. 芍藥甘草湯	-13.22 ± 2.89	88. 當歸飲子	-14.00 ± 3.10
39. 芍藥湯	-7.33 ± 1.92	89. 當歸補血湯	-9.31 ± 2.48
40. 芎歸膠艾湯	-11.83 ± 2.07	90. 葛根黃芩黃連湯	-4.01 ± 0.39
41. 辛夷清肺湯	-9.12 ± 2.24	91. 補陽還五湯	-9.71 ± 1.03
42. 防風通聖散	-9.72 ± 3.52	92. 槐花散	-8.75 ± 1.19
43. 定喘湯	-10.24 ± 2.58	93. 蒼耳散	-13.46 ± 2.05
44. 治濁固本丸	-7.82 ± 0.99	94. 銀翹散	-10.25 ± 2.83
45. 炙甘草湯	-9.09 ± 1.34	95. 調經丸	-13.17 ± 1.34
46. 保產無憂方	-7.52 ± 1.09	96. 豬苓湯	-7.61 ± 1.20
47. 柴陷湯	-9.45 ± 3.36	97. 橘皮竹茹湯	-10.27 ± 1.03
48. 柴葛解肌湯	-4.87 ± 0.94	98. 獨活寄生湯	-14.18 ± 2.23
49. 桂枝芍藥知母湯	-4.01 ± 2.94	99. 龍膽瀉肝湯(丸)	-23.60 ± 0.65
50. 桂枝茯苓丸	-15.16 ± 5.22	100. 瀉白散	-13.42 ± 2.08

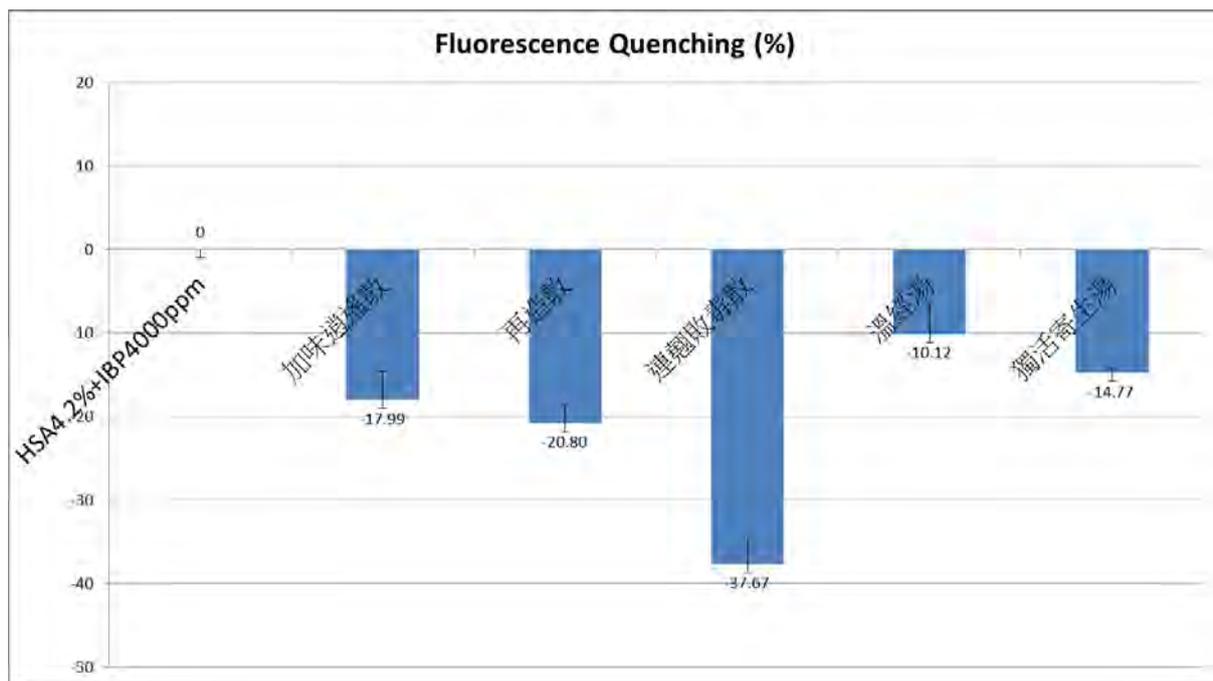
表四、動物模式口服 Ibuprofen 或合併使用中藥方劑(A)加味逍遙散及(B)溫經湯後，於服藥後不同時間點 Ibuprofen 之血液濃度作為其藥物動力影響之分析。Data presented as mean  $\pm$  SE, n = 5。

(A)

作用時間 (h)	Ibuprofen ( $\mu$ M)	Ibuprofen + 加味逍遙散 ( $\mu$ M)	相對比值 (RV, %)
0	0	0	0
0.5	72.13 $\pm$ 22.54	65.83 $\pm$ 23.6	-8.73
1.5	120.46 $\pm$ 3.08	106.03 $\pm$ 6.05	-11.98
3	88.28 $\pm$ 5.42	62.44 $\pm$ 16.61	-29.27
6	25.81 $\pm$ 4.54	16.60 $\pm$ 9.05	-35.68
12	0.83 $\pm$ 1.11	0.79 $\pm$ 1.17	-4.82

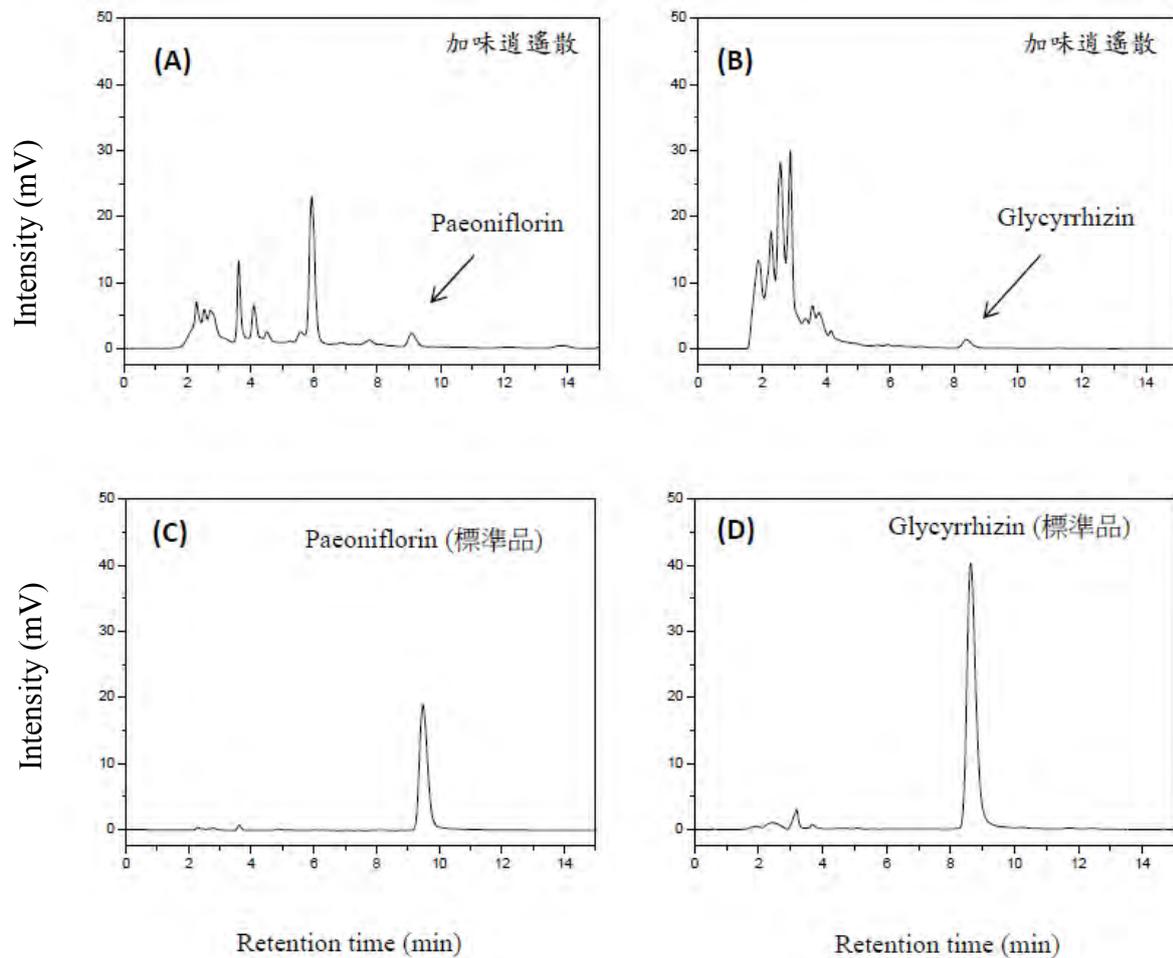
(B)

作用時間 (h)	Ibuprofen ( $\mu$ M)	Ibuprofen + 溫經湯 ( $\mu$ M)	相對比值 (RV, %)
0	0	0	0
0.5	55.23 $\pm$ 12.18	50.91 $\pm$ 18.62	-7.82
1.5	135.78 $\pm$ 6.51	118.03 $\pm$ 10.98	-13.07
3	98.36 $\pm$ 8.49	78.69 $\pm$ 12.34	-20.01
6	26.83 $\pm$ 3.72	22.45 $\pm$ 4.95	-16.33
12	1.33 $\pm$ 0.41	1.26 $\pm$ 0.78	-5.26

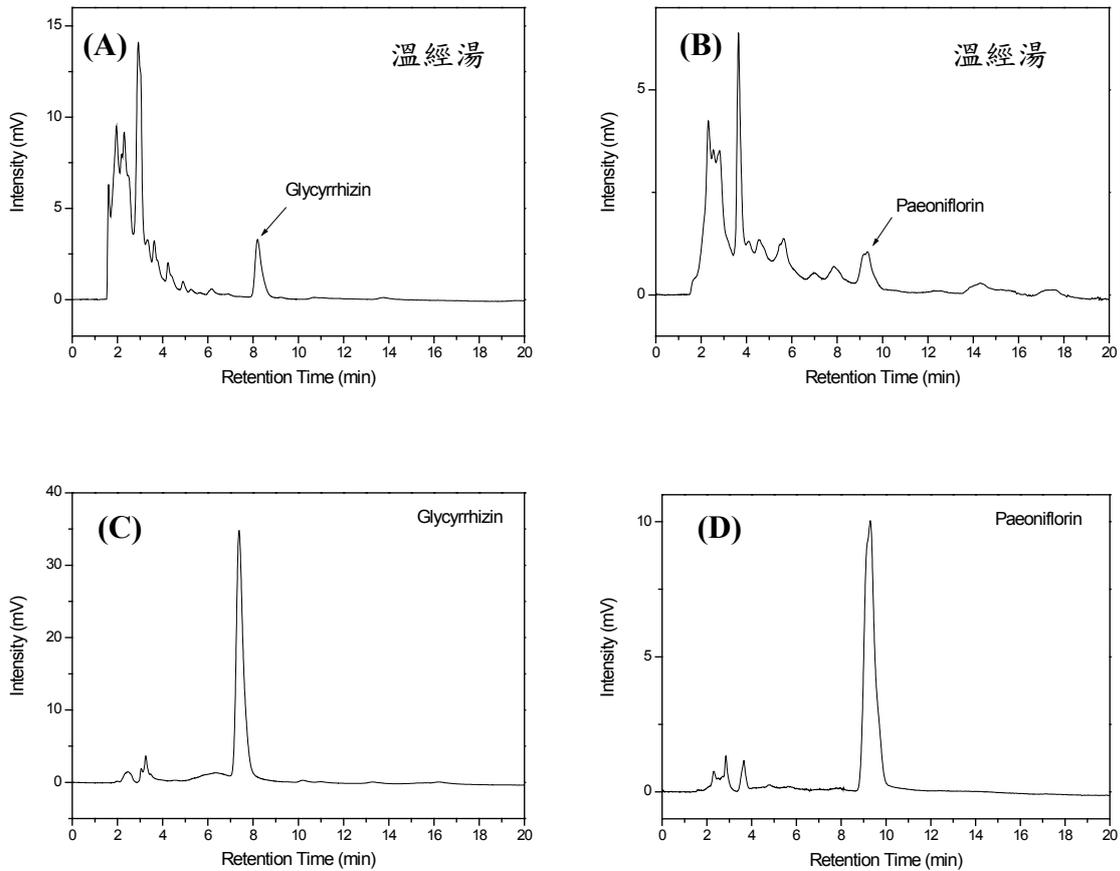


圖二、Ibuprofen (4.0 mg/mL)與五種中藥方劑合併使用後影響人類血清蛋白結構(4.2% HSA)螢光之變化之影響。

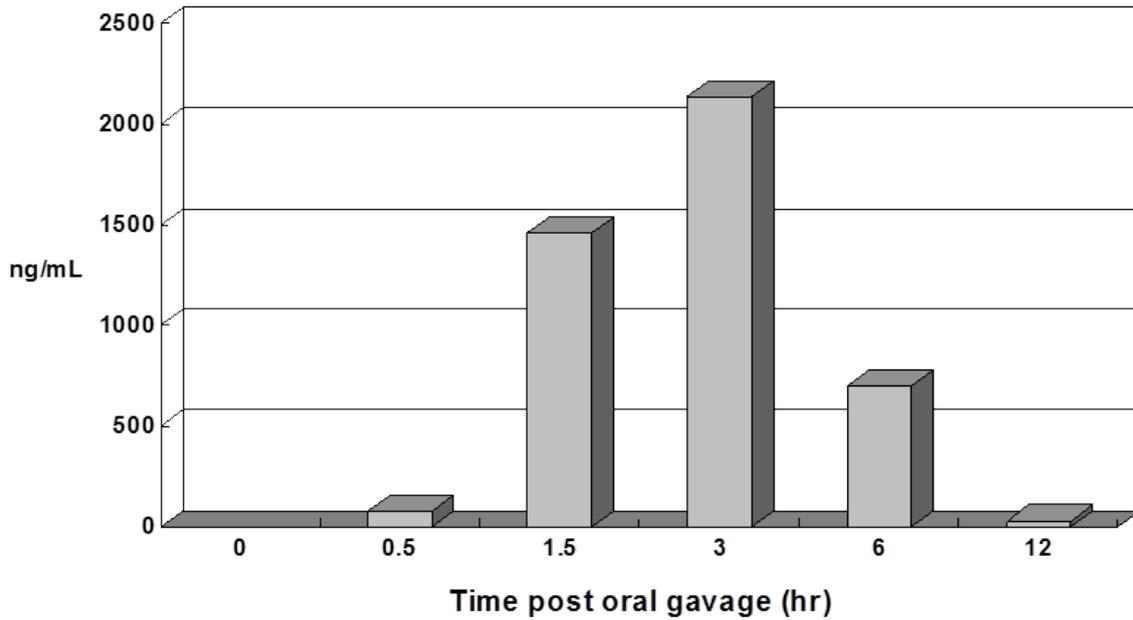
Data presented as mean  $\pm$  SE, n = 5



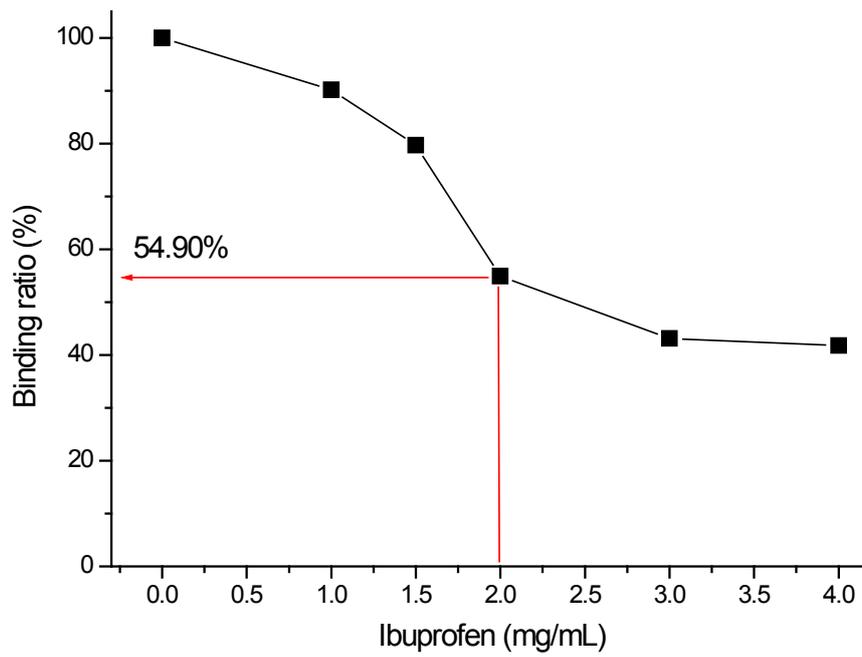
圖三、HPLC 分析中藥方劑加味逍遙散主要活性成分 Paeoniflorin 及 Glycyrrhizin 兩種成分指紋圖譜。(A) (C) 以偵測加味逍遙散中 Paeoniflorin 是使用 RP-C18 為管柱(46 × 250 mm, 5 μm), MeCN/0.1 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> = 17/83 為沖提液, 偵測波長為 243 nm; (B) (D)以偵測加味逍遙散中 Glycyrrhizin 是使用 RP-C18 為管柱(46 × 250 mm, 5 μm), MeCN/0.1 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> = 40/60 為沖提液, 偵測波長為 254 nm。



圖四、HPLC 分析中藥方劑溫經湯主要活性成分 Paeoniflorin 及 Glycyrrhizin 兩種成分支指紋圖譜。(A) (C) 以偵測溫經湯中 Paeoniflorin 是使用 RP-C18 為管柱(46 × 250 mm, 5 μm)，MeCN/0.1 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> = 17/83 為沖提液，偵測波長為 243 nm；(B) (D)以偵測溫經湯中 Glycyrrhizin 是使用 RP-C18 為管柱(46 × 250 mm, 5 μm)，MeCN/0.1 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> = 40/60 為沖提液，偵測波長為 254 nm。

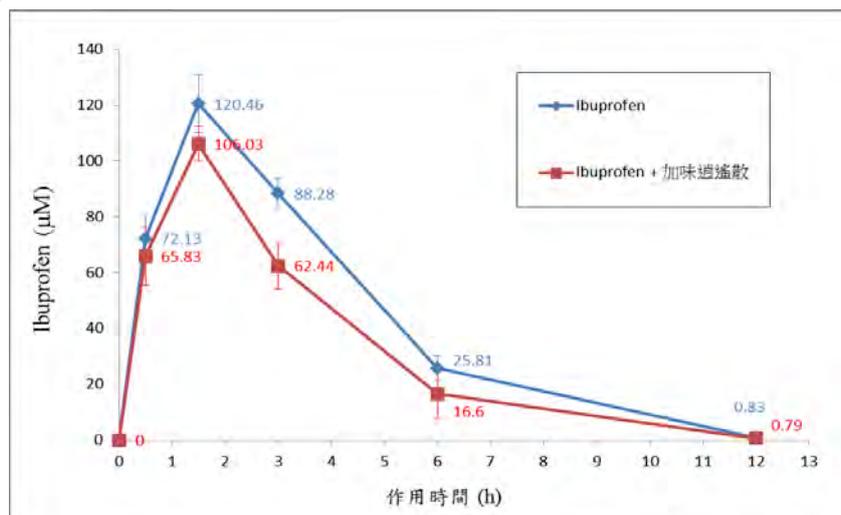


圖五、比較參考文獻 Bendele A et al., *Toxicologic Pathology*, 1993 之自行初步試驗，小鼠口服 50 mg/kg BW Ibuprofen 在不同時間點 Ibuprofen 血液濃度之吸收分析。本分析測定之結果與參考文獻相似，最大吸收約在 1.5 至 3 小時間。Data presented as pooled mean, n = 5。



圖六、小鼠血清與不同濃度 Ibuprofen 鍵結能力%的影響，隨著濃度增加，結合曲線呈現 S 狀的彎曲，顯示最佳飽和結合比例約 54.9%。Data presented as pooled mean, n = 5。

(A)



(B)

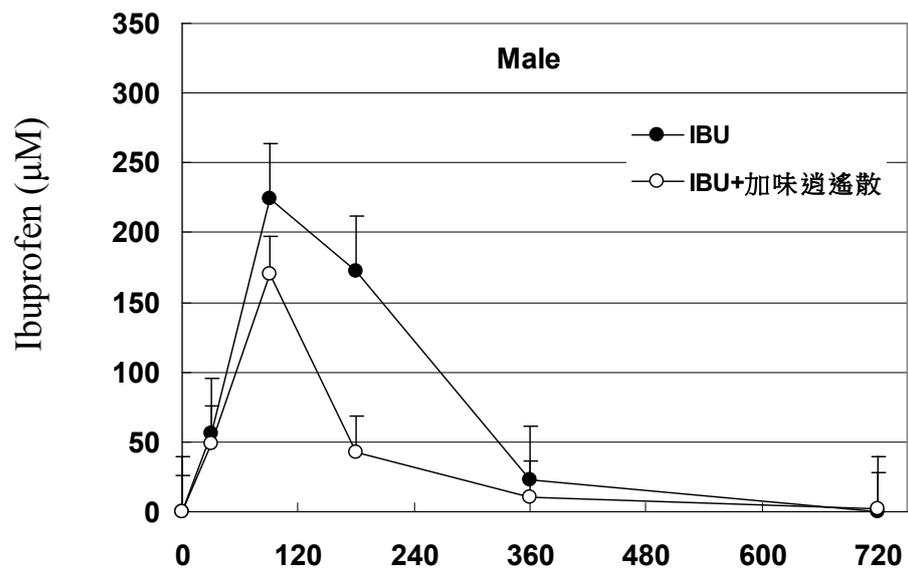
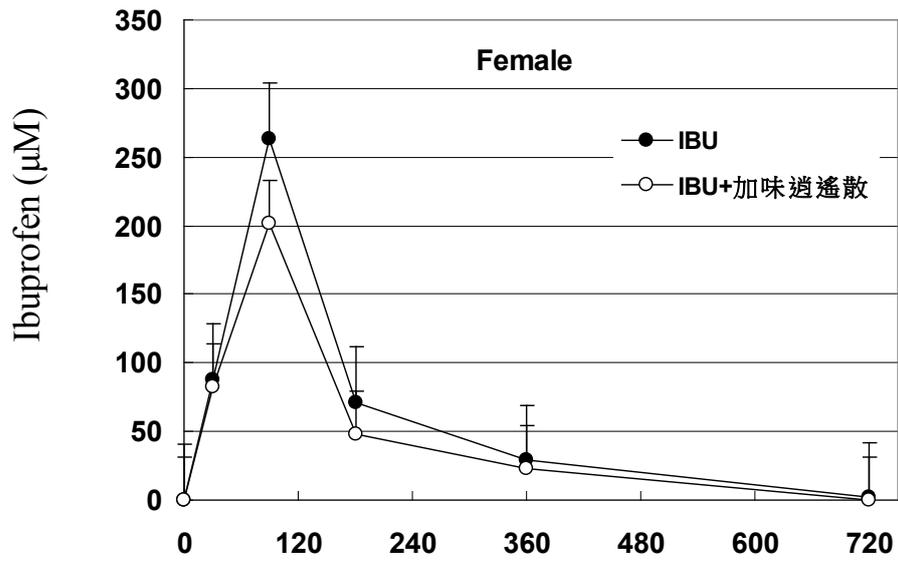
藥物動力學 參數	Ibuprofen	Ibuprofen+ 加味逍遙散	相對差異 (%)
$C_{max}(\mu\text{M})$	120.46	106.03	-11.98
$T_{max}(\text{h})$	1.5	1.5	-
$AUC_{0-12\text{h}}$	521.94	399.47	-23.46

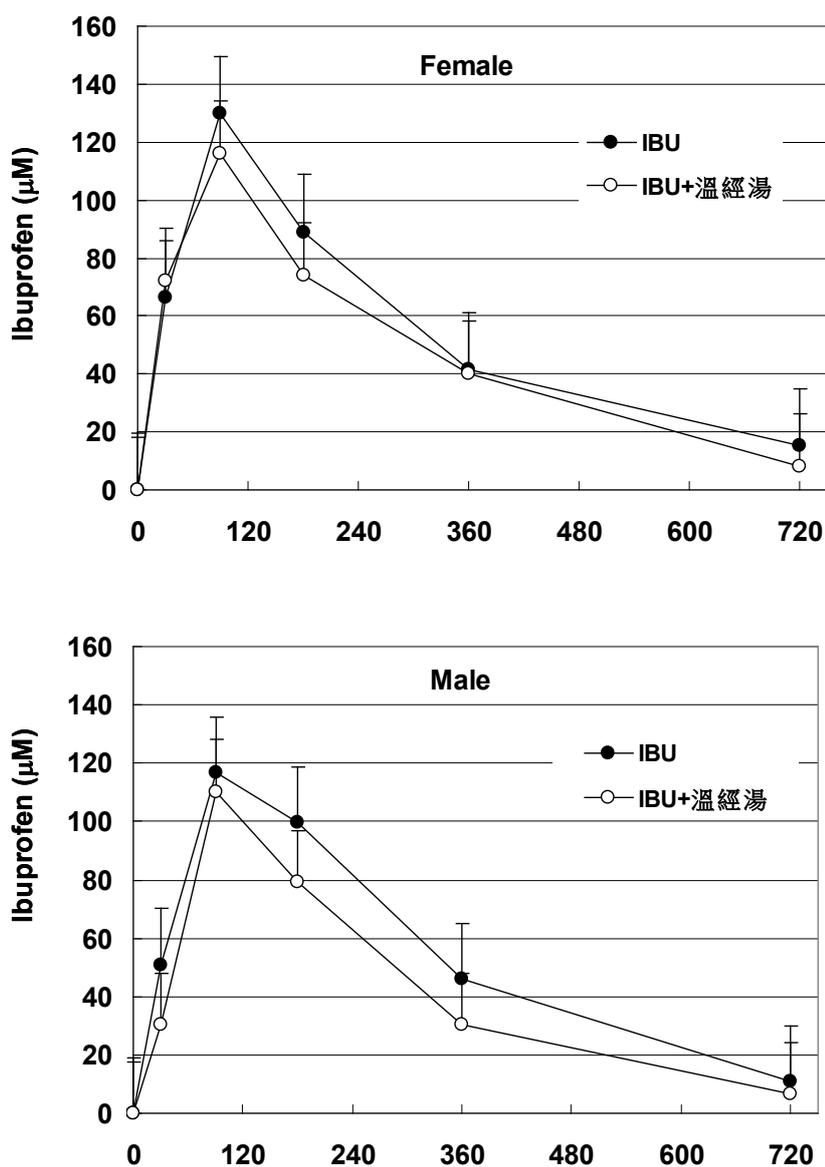
	Ibuprofen	Ibuprofen+ 溫經湯	相對差異 (%)
$C_{max}(\mu\text{M})$	135.78	118.03	-13.07
$T_{max}(\text{h})$	1.5	1.5	-
$AUC_{0-12\text{h}}$	639.03	516.93	-26.71

圖七、(A)動物模式分析加味逍遙散處理及未處理對 Ibuprofen 在體內吸收與代謝之影響，加味逍遙散競爭血清蛋白結合，加速 Ibuprofen 之血液中清除速率；溫經湯之結果相似(data not shown)。(B)動物試驗分析其藥物動力學對 Ibuprofen 在加味逍遙散或溫經湯處理及未處理小鼠血液體內  $C_{max}$ 、 $T_{max}$  及  $AUC_{0-12\text{h}}$  之影響。

(A)

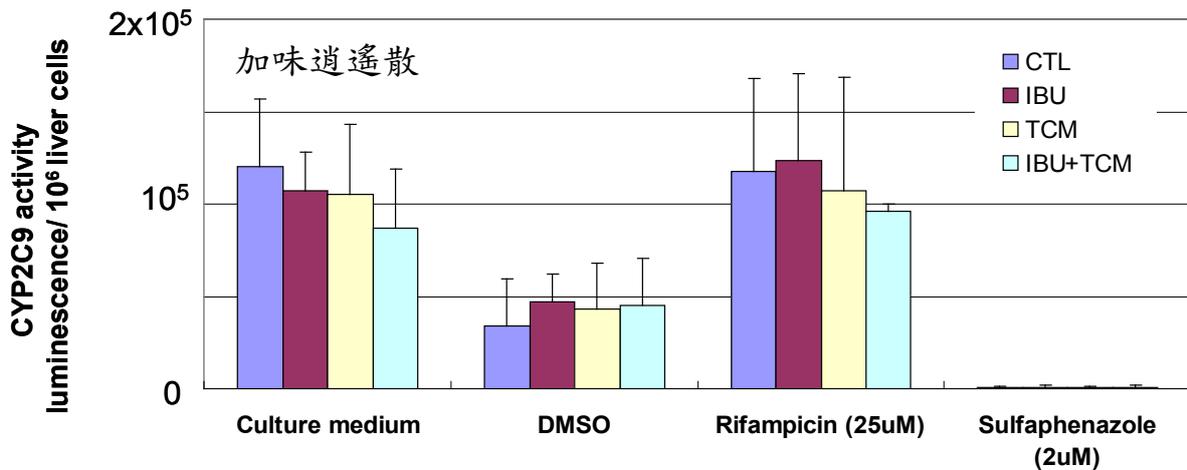


(B)

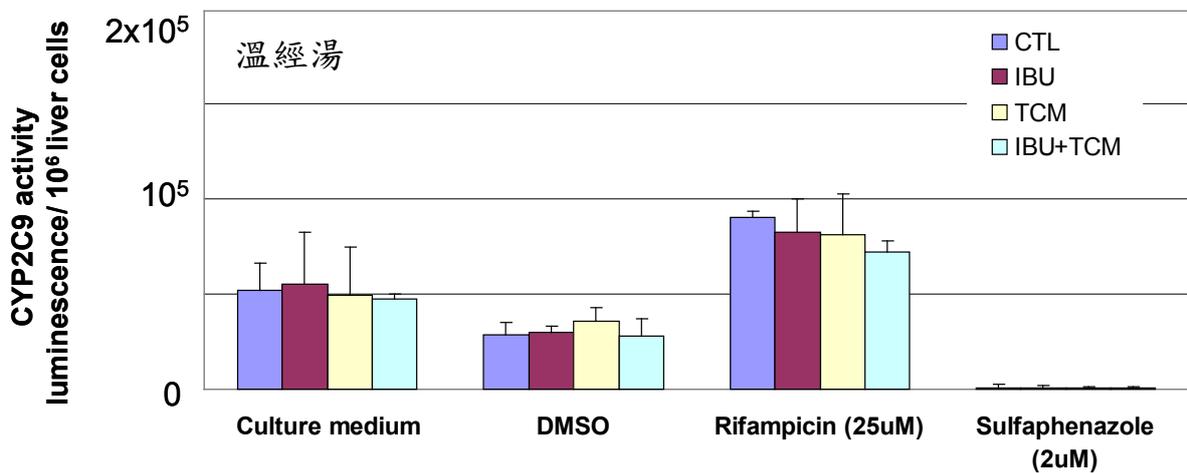


圖八、動物模式口服 Ibuprofen 或合併使用中藥方劑-加味逍遙散(A)或溫經湯 (B) 後，於服藥後在 12 小時 (720 分鐘) 內不同時間點 Ibuprofen 之血液濃度作為其藥物動力影響之分析，雌性及雄性動物之 Ibuprofen 在體內吸收與代謝之影響，一般而言加味逍遙散或溫經湯均會競爭血漿蛋白結合 Ibuprofen，血液中濃度下降。Data presented as mean  $\pm$  SEM, n= 3.

(A)



(B)



圖九、動物實驗分析口服 Ibuprofen 與中藥方劑-加味逍遙散 (A) 或溫經湯 (B) 交互作用對於肝臟 P450 CYP2C9 酵素活性之影響；於服藥處理 3 小時後，將動物犧牲分離肝臟細胞，以  $1 \times 10^6$  肝臟細胞經直接培養或含有 DMSO 培養基，促進劑 rifamicin 或抑制劑 sulfaphenazole 以分析中藥方劑(TCM)對於 Ibuprofen 代謝酵素 CYP2C9 的影響；經由統計分析，性別間無明顯差異，此結果為雌性及雄性動物整合之結果；小鼠給予 Ibuprofen 合併使用中藥方劑對於 CYP2C9 酵素活性之影響，各處理組間並無顯著差異 ( $P > 0.05$ )。Data presented as mean  $\pm$  SD, n= 3/sex/treatment.

附件一、「Warfarin」及「Ibuprofen」併用中草藥用藥安全與預防保健健康  
小手冊

# 中藥用藥安全教育

「Warfarin」及「Ibuprofen」併用中草藥用藥安全  
與預防保健健康小手冊

## 前言

中藥配合現代醫療之輔助療法已深受世界之重視與許多研究亦發現其對疾病治療能提升疾病治癒率、緩和症狀或縮短病程。中藥是否有毒？是否安全？中、西藥可否併用？如何併用相關藥物才會達到安全，有效降低副作用和毒性之系統分析迄目前為止尚無完整之數據可提供醫療參考。然而，以上之問題是大家都想知道之用藥安全知識。雖然許多研究亦發現中藥對疾病治療能提升疾病治癒率、緩和症狀或縮短病程，由此可提高治癒效益、改善病患疾痛及降低醫療成本。因此如何建立完善中西藥併用方法之相關安全資料，減少中西藥併用所生之毒性或造成血中藥物濃度過量之副作用，方可提升民眾就醫信心，增加預後療效及對維護醫療品質均會有相當的助益並具正向的價值，更開啟臺灣醫療發展新頁。

近年來有許多藥物中毒之報告，而將中毒怪罪於是中藥之毒性，此亦有待急需建立安全使用中藥之衛教，讓一般民眾能配合醫療正確使用中藥。方能澄清改變中藥對人體是有毒性印象。另民眾在慢性病及難治疾病常會接受中西醫治並同時服用中西藥或含中草藥之健康食品，令現在許多醫院也都開設中西醫聯合門診。然而其間之中西藥併用所生之毒性或副作用，迄今國內外之研究之草藥或單一之中藥，鮮有中藥方劑相關之文獻。

本用藥安全教育手冊針對預防及治療血栓疾病的口服抗凝血劑（warfarin）以及常用的消炎止痛藥（ibuprofen）為對象收集國內外相關文獻及國內各大醫院相關之用藥安全及中西藥交互作用之臨床用藥注意事項資訊，提供國人在使用心血管預防血栓之抗凝血劑（warfarin）；以及發燒、感冒、關節痛、發炎常用之消炎解熱止痛劑（ibuprofen）之衛教與中藥併用時之用藥安全注意事項。Warfarin 為抗凝血劑與中藥活血化癥藥或血小板凝集抑制藥物或食物併用，一旦有出血症狀將會產生出血不止之副作用(包括一般民眾、老人及婦幼)。本手冊內容首先收集中草藥與西藥併用之交互作用資訊，主要以中藥方劑在臨床應用上與 warfarin 或 ibuprofen 併用所產生之交互作用和副作用資訊為題，並編彙成衛教資料，提供國人作為用藥安全之教材。將可預防或降低副作用以及減少藥害之發生。

## 第一章 口服抗凝血劑（Warfarin）與中藥併用之注意事項

Warfarin(可邁丁錠)為抗凝血劑，可用來預防血栓之形成或增大，可以阻止血液凝固而防止血栓的形成或變大。因為有一些疾病使得您的血液容易凝固，可能造成：腦中風、腳深部靜脈血栓、心肌梗塞、肺部栓塞……等。服用 Warfarin 可使血液不會過度凝固(預防及治療血塊阻塞造成的疾病)。

Warfarin 所給予的劑量是根據抽血測量“PT(凝血酶原時間)或 INR(國際標準化凝血酶原時間比值)”值，如果劑量不足，抗凝血效果不好；但劑量太高，則易產生出血情況。所以病患在使用 warfarin 時，請小心遵照醫師指示的用法與藥量，服藥後請記錄，並應定期抽血檢查“PT/INR”值。

### 一、口服抗凝血劑（Warfarin）有何作用？

Warfarin 為一種『抗凝血劑』。它主要的作用是能夠干擾血液凝固過程中，幾個重要的步驟，因此能避免血管內的血液，因為不正常凝固而產生血塊的機會。我們體內的血液必須順暢地流動，才可使血液攜帶的氧氣成功地運送到身體各組織，但是如果血管被不正常形成的血塊阻塞，則會造成阻塞部位細胞的缺氧並導致壞死的現象。Warfarin 可以防止血塊在腦部及心臟等血管的阻塞，因此又能夠預防腦中風，深部靜脈栓塞、肺栓塞、某些因凝血功能異常而導致血栓容易生成的疾病等；及心臟缺氧壞死所造成的併發症；亦可以用於預防手術後，由於血塊阻塞住血管而造成的併發症。

Warfarin 一般有心臟、肺臟動靜脈栓塞的病人或接受心臟瓣膜置換的病人要服用此藥防止血栓。亦常用於靜脈血栓栓塞（包括肺栓塞）、心房纖維顫動、心肌梗塞後、人工瓣膜置換後及復發全身性栓塞。

Warfarin 可用來避免血塊形成或增大。常於某些心律不整及心臟病發或心臟瓣膜置換手術後使用。對於引發血塊的物質，此藥具有阻斷其形成的作用。此藥也可能用於治療其他病症，詢問您的醫師或藥師以獲得更多相關資訊。

### 二、市售抗凝血劑（Warfarin）只有一種嗎？有哪幾種？有那些禁忌呢？

在醫院藥局常常被使用到，但因各藥廠之名稱不同 亦即市售之口服抗凝血劑（Warfarin）成藥為同物不同名稱常見之市售成藥有多種名稱如下：

COFARIN TAB (可化凝錠，政德)；COUMADIN (可邁丁錠，Dupont)；COUMADIN (可邁丁錠，BMS/華宇)；COUMADIN SODIUM (可密定，安度)；LENNON-WARFARIN (瓦化寧錠，LENNON/恆振)；MAREVAN (華

法林、華法林鈉、華福定，Glaxo)；ORFARIN（歐服寧錠，健橋信元）。錠劑劑量有分為 2、2.5、3、5、7.5 和 10mg；另外也有注射劑 50mg(Amp)。

### 三、如何減少口服抗凝血劑（Warfarin）之過量使用？

過量使用 Warfarin 將易導致臨床出血不止 因此須謹慎依治療量小心服用外所給予的劑量是根據抽血測量“PT（凝血酶原時間）或 INR（國際標準化凝血酶原時間比值）”值，如果劑量不足，抗凝血效果不好；但劑量太高，則易產生出血情況。所以病患在使用 warfarin 時，請小心遵照醫師指示的用法與藥量，服藥後請記錄，並應定期抽血檢查“PT/INR”值。

### 四、口服抗凝血劑（Warfarin）可能有那些不良反應？

嘴巴或喉嚨痛、發燒或發冷、疲倦、小便困難或小便疼痛、臉或腳腫脹、眼睛或皮膚變黃。如有上述情形可與藥師及醫師連絡，他們會協助提供進一步的說明或處理。

Warfarin 導致的副作用並不常見，但還是可能發生。Warfarin 導致不良反應有可能改變尿液顏色呈橘紅色，此現象並無害。但若發現尿液帶血，需即刻與醫師聯絡。若有以下症狀發生嚴重的情形或是無法消除時，請盡快告知您的醫師。頭痛、胃不舒服、腹瀉、發燒、皮膚紅疹。若您有下列任一症狀，請立刻通知醫師：不尋常出血或瘀青、黑便或血便、血尿、倦怠、不明原因的發燒、惡寒、喉嚨痛、胃痛。

### 五、口服抗凝血劑（Warfarin）有何注意事項？

1. 有許多因素會影響體內“PT/INR”值，進而影響 warfarin 的抗凝血效果，包括：旅行、飲食改變（食用大量綠色蔬菜）、環境、身體狀況、中草藥與西藥。所以服用 warfarin 期間應避免以上這些因素的發生。
2. 服藥前應先告知醫師是否對 warfarin、阿斯匹靈、tartrazine（黃色色素）或其他藥物過敏。其中 acetaminophen(如：普拿疼，每日劑量 2~4 公克)或葡萄糖胺 glucosamine(如：維骨力，每日劑量超過 500 毫克)與 warfarin 併用也可能會增加出血風險。
3. warfarin 具有致畸胎的副作用，所以使用前或服用期間應告訴醫師是否懷孕、計劃懷孕或餵哺母乳；且此藥也容易造成出血情況，所以也應告知醫師是否有以下病史如：最近動過手術、胃潰瘍、經血過多或經期過長、糖尿病、腎臟病、肝臟疾病、腦中風、高血壓等等，除此之外，酒精會影響此藥的作用，應避免飲用過量的酒。
4. 服用此藥期間，應避免割傷自己、拔牙、痔瘡出血，以避免血液不易凝結而出血過多；所以儘量使用軟毛牙刷及電動刮鬍刀。

5. 忘記吃藥時怎麼辦？1.超過原來吃藥時間的 8 小時內一趕快服用。2.超過原本吃藥時間的 8 小時以上一當天份不要吃。3.絕對不要一次吃雙倍的藥量。
6. 請隨身攜帶警示的卡片或手圈，以防意外發生時，讓醫護人員知道你目前正在服用 warfarin。
7. 請勿自行更換不同廠牌的藥品。
8. 請勿將 warfarin 交給其他人使用，並將此藥放置於小孩無法取得的地方儲存。
9. 若不小心服藥過量，立即與附近醫院急診室或毒藥物管制中心聯繫。
- 10.如有吃降膽固醇藥物、抗生素、消炎解熱鎮痛劑、Aspirin、抗黴菌劑、安眠藥、胃藥和維他命 K 時，請告之醫生或藥師。
- 11.如果您將要進行手術(包含牙科手術、拔牙、整型)，請記得告訴醫師或牙醫師您正在使用 Warfarin。
- 12.若有任何疑問，請與醫師或藥師聯繫。

#### 六、口服抗凝血劑 (Warfarin) 會與那些中藥有交互作用？

具抗凝血有關的中藥有當歸、川芎、白芍、桃仁、川牛膝、赤芍、紅花、地龍、牡丹皮、酸棗仁、知母、沒藥、五靈脂、延胡索、薑黃、烏藥、菟絲子、茵陳蒿、丹參、高良薑、益母草、栝樓實、雞血藤、蘇木、茅根、血竭等，皆有可能會增加口服抗凝血劑 (Warfarin) 凝血不全的副作用產生。而銀杏、大蒜、生薑、菊花、魔鬼爪、木瓜蛋白酶、輔酶 Q10 和貫葉連翹等等保健室食品，也容易與口服抗凝血劑 (Warfarin) 產生交互作用。日常食物中有：葡萄柚、蔓越莓、石榴、諾麗果汁、苜蓿芽和納豆，也是容易出現不良影響。

#### 七、服用 Warfarin 時為什麼用藥指示要減少或避免過多維他命 K 的攝取？

維他命 K 是什麼？維他命 K 是維持人體鈣質與維生素 D 對骨骼分非常重要，維生素 K 是鈣質轉化成骨頭的重要元素，維生素 K 攝取不足，恐讓女性面臨骨質流失；除了存骨本，維生素 K 本來的功能是抗凝血，缺乏維生素 K 也容易有牙齦出血等問題；另外，國外研究發現，維生素 K 可以降低血管鈣化風險、幫助胰島素分泌。

服用 warfarin 時，應要盡量避免過多維他命 K 的攝取，降低 wafarin 之作用，維持規則的飲食習慣，不要自行服用其他營養補充品或維生素，或不規則食用大量蔬菜和飲用綠茶。另外，酪梨雖含低量的維他命 K，卻有拮抗 warfarin(預防血栓)的作用，但其確實機轉仍不明瞭。富含維他命 K 的

食物，包括甘藍菜、花椰菜、動物肝臟和一些食品添加物，會降低 warfarin (預防血栓)的抗凝血藥效反應，若僅一餐還不至於造成，但持續一週每天進食富含維他命 K 的食物，則必須要增加 warfarin 的劑量。

#### 八、那些食物或中藥含有維他命 K 之成分？

含維他命 K 的食物可能會降低 Warfarin 藥品的抗凝血的作用。但不是不能吃，只要讓每天所吃的維他命 K 總量維持穩定，就沒有什麼關係了。以下列出含有維他命 K 的食物：花椰菜、碗豆、萵苣、肝臟、芹菜、蘆筍、納豆、菠菜、紅茶、九層塔、甘藍菜、菜籽油、蝦夷蔥、帶皮黃瓜、芥菜、大豆油等。所以服用 Warfarin 期間如有攝取含維他命 K 之食物皆須定量攝取，避免突然攝取過多影響藥效或不吃影響健康。

衛福部 CCMP98-RD-016 的研究指出，2005 年的 100 萬健保抽樣歸人檔，其 1997-2007 年所有健保資料檔為母群體，做為研究材料，其中使用 Warfarin 同時併用含抗凝血中藥複方（使用率最高的前四名包含補陽還五湯、血府逐瘀湯、身痛逐瘀湯、疏經活血湯、獨活寄生湯。）因此 Warfarin 併用中藥方劑的現象確實有發生，並且使用 Warfarin 並用中藥方劑（內含當歸，川牛膝、川芎、白芍、桃仁、紅花等）亦有的報導。同時蒐集各大醫院（包含亞東醫院、台北新光醫院）的衛教單張上面都宣導病人不要同時並用丹參、當歸、人參等中藥。在相關醫學文獻中，也有記載 Warfarin、Ibuprofen 會與銀杏、薑等產生藥物不良反應的記錄。

## 第二章 非固醇類消炎止痛劑(Ibuprofen)與中藥併用之注意事項

Ibuprofen (異丁苯丙酸,常用名為:普羅芬、布洛芬、異丁洛芬)(屬於非固醇類消炎止痛劑,常被用來緩解關節炎、經痛、發熱等症狀。此外它也是一種鎮痛藥,特別是用於炎症引發的疼痛,亦有抑制血小板的效用。口服吸收迅速,排泄亦快,半衰期約2小時,投藥後24小時內,70%之代謝物會經尿液排泄。消炎作用為「阿斯匹靈」的16~32倍強,鎮痛作用也為「阿斯匹靈」的30倍強,解熱作用為「阿斯匹靈」的20倍。24小時內會由尿中完全排出,毒性少、無耐藥性、無類固醇劑等副作用。過量使用常見腎、肝及心臟毒性,因此務必依照醫師囑咐使用或請教臨床專業藥師。用法用量:

1. 口服~治療輕度及重度疼痛:每4~6小時一次,每次400mg。
2. 治療關節炎:1天3~4次,每次300~600mg,每天大量不宜超過2400mg。
3. 解熱:成人200mg每4~6小時。若仍發燒可增至400mg,每日最高劑量1.2g。兒童(6個月~12歲)5~10mg/kg,每日最高劑量40mg/kg。

此成藥隨時在藥局即可買到,但因各藥廠之名稱不同亦即市售之消炎止痛劑Ibuprofen成藥為同物不同名稱常見之市售成藥有多種名稱如下:

NAFEN(台灣東洋); ANFLAGEN (日•Ohta); ANNA-FRIEND (台灣東洋); Arbufen Granules 速治解顆粒(大楠); ARFENINJ (Lisapharma); BERUFEN (政德); BLOOM (永信); BROBEN (優生); BROFEN (瑞士); BRUFEN (科研); BUBURON (Towa); BUPROFEN (利達); DEGITON (羅得、利國); DOLGITCREAM (德•Dolorgiet); EASIFON (永豐); EBUFEN 易伏炎膜衣錠(十全); IBUFEN (正氏、井田、居禮); IBUFEN (國嘉、成大、世紀); IBUGEN (培力); IBUPROCIN (日•Nisshin); IBUPROFOFEN (元宙); IBUTEN 伊普顆粒(安主); IBUTEN GRANULES 伊普顆粒(安主); ILLUME (安主); IPROFEN (杏輝、瑞士); IPROFEN (皇佳、順生、應元); IPUFEN (井田); IPUTON (內外); IVUPROFEN (強生、正和、永信); IVUPROFEN (信元、北進、世達); IVUPROFEN (永新、合誠、元宙); IVUPROFEN (聯邦、王子、西華); KORTUTON (好漢賓); LEDERPROFEN (氰胺); LIBROFEN (汽巴嘉基); LIFEN (葡•Luso); MAC SAFESUPP (回春堂); METROFEN (國際); MOGIFEN (日•竹島); MOTRIN (普強); NOBAFON (大亞); OUTINFLAME (華興); PROFENIL (順華); PRPFEN (新豐); PURFEN (瑞安); RELCOFEN (英•Arthur); SCOTON (寶齡富錦); SERVIPIROFEN (瑞士•SVP);

SHOUENLIN 伊普 (應元);SHUENJITON (台光); TAITUYEN (臺大); TAREIN (永吉); TON FONLIN (陽生);TONZOUGE F.C (臺裕化學製藥廠股份有); UPROFEN (優良、應元、杏輝、瑞士)

#### 一、非固醇類消炎止痛劑 (Ibuprofen)有何作用？

Ibuprofen 是一種 NSAID 類的止痛藥，常用於緩解關節炎、經痛、發熱等症狀，其為消旋 (racemic) 的混合物，由兩種不同活性的立體異構物 R-Ibuprofen 與 S-Ibuprofen 所組成。FDA 於 1984 年核准可用於成藥(OTC)銷售，因此在市面上的藥局等均可購得。

#### 二、肝或腎臟功能不好的人可服用非固醇類消炎止痛劑 Ibuprofen 成藥?有禁忌嗎？

台灣位於亞熱帶潮濕多雨，老人風濕疼痛:工作忙碌壓力大及愛吃冰冷食物造成女性經痛及婦女更年期期之身體不適，消炎止痛劑 Ibuprofen 已成為必備之成藥之一。而肝或腎臟功能不好的人之比率在國人之比率甚高，因此不宜自行購買成藥服用 一定要找合格醫師診斷後開處方。

#### 三、非固醇類消炎止痛劑 Ibuprofen 有哪些副作用和禁忌呢？

非固醇類消炎止痛劑 Ibuprofen 副作用雖比較低，但過量服用可引起噁心、消化不良、腹瀉、流鼻血、頭昏以及高血壓。不常見的副作用包括食道潰瘍、心衰竭、腎衰竭等。2010 年的一項研究結果表明經常性地服用非甾體抗炎藥還會促進落髮[7]。若長期高劑量服藥的人也會有增加心肌梗死的風險。

禁忌：消化性潰瘍患者、重症之血液異常患者、重症之肝障害患者、重症之腎障害患者、重症之心機能不全患者、對 Ibuprofen 過敏之患者、患有阿斯匹靈氣喘或曾有其病歷之患者、15 歲以下兒童及青少年、懷孕 6 個月後。可能引發再生不良性貧血、顆粒性白血球缺乏症、血小板減少、或是過敏反應 (發熱、發疹、誘發氣喘.....等)、視覺異常、重聽或耳鳴、肝臟黃疸或是氨基轉移值異常、胃腸出血、腹痛、噁心、便秘、頭痛、暈眩...等。根據動物胎兒實驗，具有毒性，但對於孕婦或哺乳婦人的安全性尚未確立，藥廠僅提醒懷孕 6 個月後在生產前請勿投藥，以免在分娩時有危險。

#### 四、非固醇類消炎止痛劑 (Ibuprofen)會與那些中藥產生交互作用？

從文獻回顧，會與 Ibuprofen 有交互作用的中藥有葛根、黃連、黃芩湯、四物湯、甘草、銀杏葉等。其中葛根黃連黃芩湯會改變藥物與白蛋白的結合，增加游離藥物的量，進而改變藥物的血中有效濃度。而四物湯會減少 HSA(human serum albumin) 中的結合率，進而改變藥物的血中有效濃度。另與甘草併用時，甘草 Glycyrrhizic acid 分別減少 28 % Ibuprofen 與 HSA 的

結合率，亦會改變藥物的血中有效濃度。

而與銀杏葉併用時，會降低血小板凝集反應，增加出血的危險，故應避免併用，必要時則應諮詢醫師及藥師的意見。

#### 五、服用非固醇類消炎止痛劑 (Ibuprofen) 可能有那些不良反應？

雖然副作用不常見，但是仍有可能會發生。噁心，嘔吐，胃灼熱，胃痛，腹瀉，食慾不振隱發性出血等胃腸障礙；皮疹或 SGOT 升，頭暈，頭痛，水腫。

#### 六、服用非固醇類消炎止痛劑 (Ibuprofen) 有何注意事項？

1. 儘量避免與其他消炎鎮痛劑合併使用。欲服用其他治感冒之止痛藥品(特別是 aspirin)，應告知醫師。
2. 本藥可能會遮蔽感染症狀之顯現，因此用於感染所引其起之炎症，必須合併使用適當之抗菌劑。
3. 對於大量脫水病人應小心使用，因此藥主要由腎臟排泄。
4. 請將本劑連同藥袋放置於室溫之陰涼乾燥處避光儲存，請勿冷藏或冷凍。請勿放在孩童可以取得的場所。
5. 氣喘、消化道潰瘍病史、肝腎受損者、老人、高血壓、心肺功能不全患者及使用抗凝血藥物者須注意服用。
6. 如果出現皮疹、搔癢、視力障礙、體重增加、水腫、黑便或其他消化問題，或持續頭痛應告知醫師。
7. 嚴重或復發疼痛或持續高燒可能表示有嚴重疾病。如果疼痛持續 5 天以上或患有關節炎及風濕性疾病的 12 歲以下兒童出現紅腫時，應立刻告知醫師。

### 第三章 常見抗凝血有關的中藥

衛福部的計畫 CCMP98-RD-016 的研究指出，使用 warfarin 同時並用含抗凝血中藥複方（使用率最高的前四名包含補陽還五湯、血府逐瘀湯、身痛逐瘀湯、疏經活血湯、獨活寄生湯。）因此 warfarin 併用中藥方劑的現象確實有發生，並且使用 warfarin 併用中藥方劑（內含當歸，川牛膝、川芎、白芍、桃仁、紅花等）亦有產生不良反應的報導。同時蒐集各大醫院（包含亞東醫院、台北新光醫院）的衛教單張上面都宣導病人不要同時並用丹參、當歸、人參等中藥。在過去文獻當中，也有記載 warfarin、ibuprofen 會與銀杏、薑等產生藥物不良反應的記錄。

具抗凝血有關的中藥有當歸、川芎、白芍、桃仁、川牛膝、赤芍、紅花、地龍、牡丹皮、酸棗仁、知母、沒藥、五靈脂、延胡索、薑黃、烏藥、菟絲子、茵陳蒿、丹參、高良薑、益母草、栝樓實、雞血藤、蘇木、茅根、血竭等。

### 第四章 正確的中草藥用藥觀念及用藥安全資訊

#### 一、常見中藥名詞

##### 濃縮中藥

由於中藥湯劑煎煮不便，藥廠利用現代設備，將方劑的藥材配合在一起後煎煮、濃縮，再加輔料製成散劑、顆粒、膠囊，濃縮中藥是安全、均一的製劑，且服用與攜帶較為方便。目前健保給付之中藥劑型以此為主。

##### 飲片

中藥飲片是中藥材經由中醫藥理論、中藥炮製方法，經過加工炮製後的，可直接用於中醫臨床的中藥。

##### 方劑

指在傳統中醫理論基處下，選擇合適的藥物、酌定用量、按照配伍原則、適宜劑型及服用法等一系列過程之中藥治療用處方，為中醫之辨證論治的主要形式。

#### 二、中草藥基本用藥觀念

##### 「藥即是毒」的觀念

每一種藥物皆有其特定的藥理作用，使用得當就是藥，用之不當即是毒；如同水能載舟亦能覆舟，所以想要讓藥物達到我們理想中的治療目標，

就必須先明白各種藥物的特性及具備「藥即是毒」的觀念。

### **就醫訊息**

衛福部中醫藥司會提醒民眾，我國中藥廠已全面實施 GMP 制度，製藥業技術已趨成熟。中醫方面也不斷提升服務品質，目前國內已有超過 2500 家中醫診所，且大部分屬健保給付範圍，民眾就醫十分便利。又我國中藥廠已全面實施 GMP 制度，製藥業技術成熟，所有藥品均須經查驗登記、檢驗合格，取得藥品許可證後，才可上市販售。因此，呼籲民眾，若有生病，應找合格中醫師，不買非醫療場所或其他來源不明產品，如於出國時購買當地藥品，仍應小心注意。

### **就診時應告訴醫師的事**

※若您曾經服用中藥、西藥、食物或對其他物品引起過敏反應或身體異常現象。

※若您正在服用西藥或健康食品，一定要告知醫師，最好提供名稱或樣品。

※若您有計劃懷孕或已懷孕或哺乳期的婦女。

### **領藥時注意事項**

※確認藥袋上姓名是否正確，當面點清藥品種類及數量。

※看清楚藥袋指示藥品名稱、用法、用量、注意事項等。

※問清處使用方法，口服中藥有分為：藥粉、藥丸或沖服、煎服，外用中藥有貼布、塗擦不同使用方法。

### **服藥時的飲食禁忌**

在服藥期間，凡屬生冷、辛熱、黏膩、腥臭等，不易消化及有特殊刺激性食物，都應酌情避忌以免引起消化不良、胃腸刺激或助熱、助升散、及斂邪等副作用。

寒性病不宜生冷食物

熱性病不宜辛辣、油膩、煎炸類食物

肝陽上亢者，不宜辛熱助陽之品瘡瘍及皮膚病者，忌食魚、蝦、蟹等，

### **腥羶或辛辣刺激性食品**

脾胃虛弱者，忌油炸黏膩、寒冷固硬，不易消化之食物。

外感表証者，亦忌食油膩類。

### **懷孕用中藥有禁忌嗎？**

婦女在懷孕期間，為避免藥物影響母親及胎兒安全，凡是會造成胎動不安的滑胎藥物及藥性太過劇烈的藥物，如通經活血藥、行氣破滯藥、辛熱藥、瀉下滑利藥等均列入。孕婦中藥用藥安全須知：一般凡具有大毒有

毒及藥力峻猛之中藥，皆為孕婦禁用藥：如巴豆、巴豆、牽牛子、大戟、甘遂、番瀉葉、商陸、麝香、千金子、水蛭、鬩羊花、藜蘆、乾漆、木鼈子、蟾酥、蜈蚣、生川烏、水銀、砒石、生草烏、雄黃、輕粉、生附子、硫黃、芫花等；而小毒性之中藥，則為孕婦慎用藥，如桃仁、紅花、大黃、枳實、乾姜、肉桂、半夏、常山、炮附子、益母草、天南星等。若要使用應由醫師診斷後方能使用。

餵孩子吃藥要注意什麼？可以補吃嗎？

#### (一)將藥品放置安全地方

不論是醫師開的處方藥或自行購買的藥品，都要放置在孩童無法自行拿到的地方。注意防潮，避免陽光直接照射，說明書仿單註明須冷藏藥品，就應放置冰箱以避免藥品變質。

#### (二)不可擅自停、增減藥量

盡量在固定時間，按醫師指示劑量給孩童服藥。父母親絕對不可因孩子的症狀減輕就自行停藥，如病情尚未完全控制，一旦停藥可能導致復發。尤其是感染性疾病服用抗生素，必須吃完醫師指示的用藥數量，以避免細菌產生抗藥性。

服用抗生素最好能固定吃藥的時間間隔，譬如說應以每六小時吃一次，不要按早/中/晚餐及睡前吃的方式，以確保藥品血中濃度的穩定性。

#### (三)不可用手捏鼻灌藥

有些孩子怕藥的味道，但餵藥時不要用手捏著孩童的鼻子灌藥，若不慎可能導致吸入性肺炎，甚至有窒息的危險。

孩童吃藥後若立即嘔吐，不要立刻再嘗試灌食藥品。最好先安撫孩童的情緒，待平靜後再補服一個藥品劑量。通常若孩童吃藥後一小時左右又嘔吐，則還須補服一半藥品劑量；若在服藥兩小時後才嘔吐，則藥品已離開胃到十二指腸了，所以不必再補服藥品劑量。

#### (四)忘記吃藥，可以補吃嗎？

應該在想起時立刻服藥，如果已經接近下一次的服藥時間，則只服用下一次的劑量，忘記吃的劑量不要補服，也就是不要同時服用兩個劑量。

#### (五)服藥需知

服藥時一定要配著喝水，最好能喝下 250cc 的水，盡量不要喝咖啡、茶、可樂、牛乳，以避免可能的交互作用而影響藥效。

不同的藥物依藥性，吃藥的時間點有可能是飯前、飯後、空腹或睡前。飯前通常是指吃飯前的 30 分鐘吃藥。飯後是指吃飯之後立刻吃藥。有些脂溶性的藥物，飯後胃內仍有食物時，吸收較佳。空腹是指飯前一小時或飯後兩小時吃藥（此時胃內無食物影響藥品的吸收）。睡前是指睡覺前 30 分鐘之內吃藥。

(六)緊急的特殊的情況下，若要用成人常備藥品或成藥給孩童服用可以嗎？

可以，但須注意劑量的量取。最好是由醫師決定使用何藥品及何劑量，而不要家長們來決定。唯有在緊急特殊狀況下，必須使用成人藥品給孩童服用時，有下列公式，依據年齡、體重、體表面積等參數，用不同公式計算出孩童的用藥劑量：

1. 依年齡調整劑量：

$$\text{孩童劑量} = \text{成人劑量} \times (\text{孩童年齡} / \text{孩童年齡} + 12)$$

2. 依體重：

$$\text{幼兒劑量} = \text{成人劑量} \times (\text{幼兒體重(磅重)} / 150) \quad 1 \text{ 公斤} = 2.2 \text{ 磅}$$

3. 一歲以下：嬰兒劑量 = 成人劑量  $\times$  (出生月數 / 150)

4. 體表面積：孩童劑量 = 成人劑量  $\times$  (孩童體表面積 / 1.73)

$$\text{孩童體表面積} = \sqrt{(\text{體重 kg} \times \text{身高 cm} / 3600)}$$

換算的實例：9 歲的小明，如果成人的劑量是 250mg，給小明的劑量大約是  $250 * (9/9+12) \div 107\text{mg}$

### 中藥的使用方法與注意事項

中藥一般有內用與外用兩種方法：

內用以口服為主，一般常用劑型包括丸劑、散劑、膏劑、丹劑、膠囊、錠劑、顆粒、濃縮中藥、湯劑等，目前健保給付的中藥以濃縮中藥為主。一般中藥是以溫開水配服，不要與牛奶、咖啡、茶、飲料、果汁同服；湯劑通常都是趁溫熱時飲服，基本上，服用中藥的適當時間，必須根據病患的病情及所處方藥物的藥性，遵守醫師或藥師的指示服用，勿擅自停藥或減藥量。局部外用給藥法如吹喉藥、洗藥和膏藥等，都是把藥料製成一定的劑型直接敷用於局部病灶以產生療效的。

就醫後如果在服藥上有任何問題，中藥使用後出現心悸、頭暈、皮膚紅疹等不良反應症狀，最好先停藥，可以撥打藥袋上醫療院所或藥局聯絡電話，立即與藥師或醫師聯絡。

◎藥材使用時最好先用清水洗乾淨，因為有些大陸進口的中藥材曾使用二

氧化硫薰過，其目的是為了漂白、防蟲蛀，過量二氧化硫將有害健康，所以建議一定要用清水洗乾淨以後才能使用。

◎藥材的購買，建議民眾要到合格中藥行購買，以免買到來路不明的偽劣藥材；生病應找合格中醫師，勿聽信一些沒有學理根據的”偏方及秘方”，認為”有病治病，沒病強身”的錯誤觀念，而造成長期誤服與濫用一些不知名的中草藥而中毒。

◎合法製造的中藥製劑都有完整包裝及中文標示，包括品名、成分、用法、用量、廠商名稱及地址、使用時注意事項、效能或適應症、批號、製造日期、有效期限或保存日期。最重要的是有衛生署核准的藥品許可證字號，例如：衛署成製字第 XXXXXXX 號、衛署藥製字第○○○○○號、衛署中藥輸字第△△△△△號。第五章 常見老人及婦兒用藥諮詢問答

**女孩子在服用轉骨方期間，遇到經期時，是否可以服用？**

轉骨方中常含有活血成分如三七、紅花、當歸、川芎、雞血藤、牛膝、菝葜、薑黃...等抗凝血中藥材經期來的前三天血量較多時，有時會造成大量出血因此最好停用轉骨方；若想服用則請教中醫師，再繼續服用。

**中藥可以空腹吃嗎？**

大部份中藥都是飯後服用，有利藥效吸收，但如果醫師有特別交代，請依醫師指示。

**在服藥期間發現懷孕了可以繼續服藥嗎？**

在懷孕期間如果需要服用中藥，應該先向醫師諮詢過後才使用。

**月經期間可以服藥嗎？服藥會影響月經量嗎？**

婦女在月經期間，用藥應更加謹慎，有些藥物不宜過量。另含抗凝血中藥材之中藥方劑不宜隨便自己買來服用或進補。服藥期間若遇到月經週期，請先告知醫師，或詢問醫師如何服用，可以減少藥品不良反應的發生機會。

**中藥會影響哺乳嗎？**

會，有些中藥會進入乳汁中，使乳汁變黃，如大黃等。或有回奶作用如人參、麥芽及其製品，以免影響乳汁的正常分泌。婦女產後過度進補，不只會影響體重，部分藥物也會被喝母乳的嬰兒吸收，因而影響寶寶，所以建議民眾坐月子進補或服用中藥前，應先徵詢醫師的建議。

**藥膳是藥物？還是食物？**

藥膳主以食材配佐中藥材料理之食膳 一般因使用目標不同可分下列三種：一、養生之食：平常健康的人為求更健康，注意每日攝取之飲食，

以能達到保健、預防之目的。二、**食療之食**：生病初期時，根據疾病之病況，配供以食物藥膳，以達早日康復之目的。三、**藥補之食**：生病後，在恢復期擬借用中藥湯液以治病。服之即可加速恢復健康之目的。

第一類之藥膳主要是透過中藥材之功效與食物之營養成分，調整失調之生理機能，因此此類藥膳理當以藥物視之，而非將根據疾病之病況，配供以食物藥膳以食物視之，藥膳過量或取用藥材不當時仍會導致其他病症，如過食薑母鴨、燒酒雞；過食四神湯會偏燥或血壓上升等；若從此觀點出發，藥食同源與藥即是毒便是一體之說，而非互相抵觸之說；況且中藥本身成分多又複雜，所以第二和三種應由醫師或專業藥師視個人的體質評估下，選用對證的食物與藥材，才能發揮效用，故適量、適時及適合體質也許有益健康，但過食則不會有正面效果反而會有副作用。

### **服用中藥後感覺身體不舒服，應該怎麼辦？**

病人若疑似發生不良反應建議應先停藥，可以撥打藥袋上醫療院所或藥局聯絡電話，立即與藥師或醫師聯絡，症狀嚴重者應先行就醫。

### **服藥期間，可以併用茶葉嗎？**

1. 一般來說，濃縮中藥最好以溫開水送服，而湯劑則應溫服(約攝氏 40 度)為佳。
2. 除非在特殊情況下，如「川芎茶調散」等需以茶飲來增強其藥效。
3. 國人有喝茶的習慣，則因茶葉中的成分與含多酚成分之中草藥後會起化學變化產生沉澱使藥效減低而影響療效。

### **可以加冰糖減少苦味嗎？**

1. 中藥化學成分複雜，某些成分可能與糖起作用而影響療效，因此未經醫師許可，服用中藥時最好不要加糖併服。
2. 若是真的怕苦，可用吸管直接吸服藥汁，佐以溫開水；若是使用湯劑，因其溫度與人的體溫(約攝氏 37 度)相近時感覺苦味最為強烈，故服藥溫度可調整至攝氏 37 度以上或以下吞服，苦味將會明顯的減弱。

### **服用中藥可以吃葡萄柚嗎？**

由於葡萄柚汁會抑制肝臟中的酵素，造成許多藥物的代謝速率變慢，藥量容易在體內蓄積而導致藥物的藥效被加強甚至產生副作用或毒性，所以不論是西藥或中藥，服藥期間都不建議吃葡萄柚。

### **服用中藥可以吃蘿蔔或喝蘿蔔湯嗎？**

一般來說，若是服用補益類的中藥就不適合吃蘿蔔或喝蘿蔔湯，至於其他中藥則請向醫師諮詢。

## 中西藥可以一起服用嗎？

由於中西藥的藥理特性可能互相強化，使毒性與副作用增強或相互干擾與對抗，導致降低雙方療效，甚至產生反效果。建議民眾無論在中醫或西醫就診時，均應告知醫師目前正在使用的中或西藥，並且為了避免錯記藥品名稱，最好將藥品或藥袋給看診醫師參考。

## 若忘記服藥該如何處理？

以早上八點及中午十二點服藥為例，在十點之前則可以立即補服，在。若已經接近下次服藥時間，則跳過不服，下次恢復正常時間服藥，使用正常劑量，不要使用雙倍的量。

## 素食者有哪些中藥不能使用？是否要先告知醫師？

就醫前應先告知醫師，醫師可以選擇療效相近的藥物來替代動物性藥材。

## 若服用後覺得效果不理想可以增加服用次數嗎？

至於服用次數到底要多少才恰當，必須根據病人的病情，及所處方劑藥效強弱而定。所以，最安全的方法是遵守醫生的指示，不要隨意增減服用次數。

## 餵母乳時中藥可以吃嗎？

有些藥物會影響到乳汁分泌，請先詢問醫師後再服用。

## 發燒時中藥可以吃嗎？

發燒時除了經醫師指示所服用的藥物外，一般發燒時應先暫停所正在服用的中藥，等退燒病情穩定後再詢問醫師後是否可以服用。

## 即將施打疫苗，請問中藥可易繼續吃嗎？

建議施打預防針的前一天先停藥，打完後再停3天，觀察是否有發燒情形，如果無發燒，可以繼續服用中藥；如果有發燒請先暫時停止服用中藥，並向醫師諮詢。

## 沒吃完的中藥可以保存多久？

盡量於有效期限內使用完畢，過期藥品應即丟棄。

## 膏布一般需貼多久才有效？一天要貼幾次？

中藥貼布屬於中藥，必須取得衛生署的許可證始可販售。當中藥貼布長時間與身體緊密貼合時，極易因身體排汗及透氣度不良而引發悶熱、搔癢的情形，因此，使用貼布的時間最好不要超過六小時，若皮膚有傷口、潰瘍或化膿則不建議使用。尤其是對藥物或化粧品易有過敏反應者，使用中藥貼布前最好先做小面積皮膚測試，以免發生藥物過敏的情形。如使用

後仍有起疹子、紅腫、發癢時，就應立即停用，並將產品交給醫師或藥師檢視。

### **為什麼濃縮中藥粉會結塊？**

可能放置時間過久空氣中溼氣引起的，建議放入真空防潮盒或密塑膠袋或冰箱冷藏保存，濃縮中藥粉應在醫師指示日期內服用完畢。

### **濃縮中藥會摻西藥嗎？**

我國中藥廠已全面實施GMP制度，製藥業技術已趨成熟，所有藥品均須經查驗登記、檢驗合格，取得藥品許可證後，才可上市販售，故不會摻西藥。

### **不要的藥品該如何回收？**

藥事公會全聯會與環保署、衛生署的討論「廢舊藥處理機制」會議中已決議，由於台灣多數縣市皆有焚化爐，因此支持廢舊藥可與一般垃圾一起處理。無焚化爐縣市，因有良好設計的土埋場具有汙水處理設備，故支持環保局暫時的土埋處理。除化療藥物、針頭等須拿至醫院處理，其他多數藥品可隨家用垃圾丟棄，民眾在家自行處理廢棄藥品的流程，包括：1. 將剩餘的藥水倒入夾鏈袋中。2. 將藥水罐用水沖一下，沖過藥水罐的水也要倒入夾鏈袋中。3. 將剩餘的藥丸從包裝（如鋁箔包裝、藥袋等）中取出，全部藥丸集中在夾鏈袋中。4. 把泡過的茶葉、咖啡渣或用過的擦手紙等，把它們和藥水藥丸混合在一起。5. 把夾鏈袋密封起來，就可以隨一般垃圾清除。6. 乾淨的藥袋和藥水罐回收。

## 請問哪裡有中藥摻西藥或重金屬的檢驗？

檢驗單位	地址	電話
食品藥物管理局	台北市南港區昆陽街161-2號	02-2787-8200
中華民國消費者文教基金會	台北市復興南路一段390號10樓之二	02-2754-0309 02-2218-9423
台北榮民總醫院	臺北市北投區石牌路二段201號	02-2871-2121轉7287, 7288
三軍總醫院	臺北市內湖區成功路二段325號	02-8792-3311轉88105
華友科技股份有限公司	台北縣泰山鄉明志路三段423號4樓	02-2906-0887, 0930
昭信科技股份有限公司	台北縣泰山鄉明志路三段517號6樓	02-2906-4369
中國醫藥大學	台中市育德路2號 <a href="http://btic.cmu.edu.tw/">http://btic.cmu.edu.tw/</a>	04-22053366#1580

表一、含有抗凝血中藥之常用 100 個中藥方劑

	中藥方劑		中藥方劑		中藥方劑		中藥方劑
1	六味地黃丸 牡丹皮	26	逍遙散 白芍當歸	51	玉女煎 牛膝	76	大黃牡丹皮湯 牡丹皮桃仁
2	八味地黃丸 牡丹皮	27	加味逍遙散 當歸白芍牡丹皮	52	荊芥連翹湯 當歸白芍川芎	77	芍藥湯 白芍當歸
3	知柏地黃丸 牡丹皮	28	烏藥順氣散 烏藥川芎	53	滋陰降火湯 白芍當歸	78	桂枝茯苓丸 牡丹皮桃仁赤芍
4	杞菊地黃丸 牡丹皮	29	蘇子降氣湯 當歸	54	當歸龍薈丸 當歸	79	當歸拈痛湯 當歸茵陳篙知母
5	四物湯 白芍當歸川芎	30	越鞠丸 川芎	55	清肺湯 當歸	80	當歸四逆湯 當歸白芍
6	補中益氣湯 (丸) 當歸	31	疏經活血湯 當歸白芍牛膝 桃仁川芎	56	金沸草散 赤芍	81	真武湯 白芍
7	歸脾湯 當歸	32	抵當湯 桃仁	57	當歸六黃湯 當歸	82	小建中湯 白芍
8	養心湯 當歸川芎	33	血府逐瘀湯 當歸桃仁紅花 赤芍川芎牛膝	58	散腫潰堅湯 白芍當歸尾	83	羌活勝濕湯 川芎
9	人參養榮湯 (丸) 白芍當歸	34	補陽還五湯 赤芍川芎桃仁 紅花	59	排膿散 白芍	84	茵陳篙湯 茵陳篙
10	百合固金湯 (丸) 白芍當歸	35	正骨紫金丹 血竭紅花當歸 白芍牡丹皮	60	如意金黃散 薑黃	85	薏苡仁湯 白芍當歸
11	秦艽鱉甲散 當歸	36	桃紅四物湯 桃仁紅花當歸 川芎白芍	61	完帶湯 白芍	86	潤腸湯 當歸桃仁
12	益氣聰明湯 白芍	37	消風散 當歸	62	調經丸 川芎白芍當歸 延胡索烏藥	87	響聲破笛丸 川芎
13	八珍湯(丸) 當歸川芎白芍	38	上中下通用痛 風丸 川芎桃仁紅花	63	聖愈湯 川芎當歸白芍	88	安中散 延胡索
14	濟生腎氣丸 牡丹皮牛膝	39	蠲痺湯 當歸赤芍	64	十神湯 川芎赤芍	89	乙字湯 當歸
15	十全大補湯 (丸) 白芍當歸 川芎	40	三痹湯 當歸白芍牛膝 川芎	65	升麻葛根湯 白芍	90	消痔丸 當歸赤芍

	中藥方劑		中藥方劑		中藥方劑		中藥方劑
16	還少丹 牛膝	41	獨活寄生湯 牛膝川芎當歸 白芍	66	辛夷散 川芎	91	紫雲膏 當歸
17	黃耆五物湯 白芍	42	小續命湯 川芎白芍	67	桃仁承氣湯(桃 核承氣湯) 桃 仁	92	八味帶下方 當歸川芎
18	桂枝湯 白芍	43	清暑益氣湯 當歸	68	大柴胡湯 白芍	93	溫經湯 當歸川芎白芍 牡丹皮
19	小青龍湯 白芍	44	葶藶分清飲 烏藥	69	防風通聖散 川芎當歸白芍	94	芎歸膠艾湯 川芎當歸白芍
20	葛根湯 白芍	45	茵陳五苓散 茵陳蒿	70	柴胡桂枝湯 白芍	95	當歸芍藥散 當歸白芍川芎
21	柴葛解肌湯 白芍	46	五淋散 當歸赤芍	71	芍藥甘草湯 白芍	96	生化湯 當歸川芎桃仁
22	人參敗毒散 川芎	47	甘露飲 茵陳蒿	72	柴陷湯 枳椇仁	97	黃連上清丸 當歸尾川芎
23	川芎茶調散 川芎	48	龍膽瀉肝湯 (丸) 當歸	73	四逆散 白芍	98	瓜蒌枳實湯 枳椇當歸
24	荊防敗毒散 川芎	49	清胃散 當歸牡丹皮	74	橘核丸 桃仁延胡索	99	連翹敗毒散 川芎
25	五積散 白芍川芎當歸	50	甘露消毒丹 茵陳蒿	75	七寶美髯丹 當歸菟絲子 補骨脂	100	補陰湯 當歸白芍知母

表二、中藥與 Warfarin 產生交互作用-1

中藥名	可能交互作用機轉	可能交互作用結果	篇名	作者	原文出處
四物湯	明顯延長 prothrombin time 與 INR	當歸含 Coumarins	心血管疾病常用西藥與中藥的交互作用	林育是, 吳宗修, 陳立奇	醫院藥學. 2004; 21:61-64.
香蘇散	對 arachidonic acid、collagen 有抑制作用, 減少 Warfarin 的排除及增加吸收率, 降低血小板的凝集作用及增加 INR	使 warfarin 作用顯著增加	心血管疾病常用西藥與中藥的交互作用	林育是, 吳宗修, 陳立奇	醫院藥學. 2004; 21:61-64.
芎歸膠艾湯	明顯延長 prothrombin time 與 INR	當歸含 Coumarins	心血管疾病常用西藥與中藥的交互作用	林育是, 吳宗修, 陳立奇	醫院藥學. 2004; 21:61-64.
冠心二號方	冠心二號(Kangen-karyu)顯著抑制 warfarin 的代謝, 使濃度過高, 實驗鼠尾部出血時間延長	丹參降低 Warfarin 的排除	Pharmacokinetic interactions between warfarin and kangen-karyu, a Chinese traditional herbal medicine, and their synergistic action.	Makino T, Wakushima H, Okamoto T, Okukubo Y, Deguchi Y, Kano Y.	J Ethnopharmacol. 2002 ;82(1):35-40.
丹參	減少 Warfarin 的排除及增加吸收率, 降低血小板的凝集作用及增加 INR	使 warfarin 作用顯著增加	心血管疾病常用西藥與中藥的交互作用	林育是, 吳宗修, 陳立奇	醫院藥學. 2004; 21:61-64.
丹參	原篇 journal 建議不要合併使用, 未詳述理由	原篇 journal 建議不要合併使用, 未詳述理由	Herbal remedies: drug-herb interactions.	Kuhn MA	Crit Care Nurse. 2002; 22(2):22-8, 30, 2; quiz 4-5.
丹參	增加 INR	胃出血	Warfarin interactions with Chinese traditional medicines: danshen and methyl salicylate medicated oil.	Tam LS, Chan TY, Leung WK, Critchley JA	Aust N Z J Med. 1995; 25(3):258.
丹參	增加 INR, 增加 PT/PTT	丹參降低 Warfarin 的排除	Interactions between modern and Chinese medicinal drugs: a general review.	Cheng KF, Leung KS, Leung PC	Am J Chin Med. 2003; 31(2):163-9.
丹參	增加 INR	丹參降低 Warfarin 的排除	A taste of Chinese medicine!	Izzat MB, Yim AP, El-Zufari MH	Ann Thorac Surg. 1998; 66(3):941-2.
丹參	增加 INR	丹參降低 Warfarin 的排除	Chinese herbs and warfarin potentiation by 'danshen'.	Yu CM, Chan JC, Sanderson JE	J Intern Med. 1997; 241(4):337-9.

中藥名	可能交互作用機轉	可能交互作用結果	篇名	作者	原文出處
丹參	丹參萃取物使 R-warfarin 及 S-warfarin 的吸收率增加，血清濃度時間曲線下面積 (AUC) 變大，半衰期延長	丹參降低 Warfarin 的排除	The effects of Danshen (Salvia miltiorrhiza) on warfarin pharmacodynamics and pharmacokinetics of warfarin enantiomers in rats.	Chan K, Lo AC, Yeung JH, Woo KS	J Pharm Pharmacol. 1995; 47(5):402-6.
丹參	過度抗凝血	過度抗凝血	A taste of Chinese medicine!	Izzat MB, Yim AP, El-Zufari MH	Ann Thorac Surg. 1998; 66(3):941-2.
丹參	大鼠實驗，丹參使 warfarin 的濃度峰值上升，半衰期縮短。在併用頭兩個星期 PT 延長，之後 PT 無顯著影響	丹參降低 Warfarin 的排除	The effects of Danshen (Salvia miltiorrhiza) on pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in rats.	Lo AC, Chan K, Yeung JH, Woo KS	Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 1992; 17(4):257-62.
白芷	抗凝血作用增強	白芷含 Coumarins	心血管疾病常用西藥與中藥的交互作用	林育是, 吳宗修, 陳立奇	醫院藥學. 2004; 21:61-64.
黃芩	原篇 journal 建議不要合併使用，未詳述理由	原篇 journal 建議不要合併使用，未詳述理由	Herbal remedies: drug-herb interactions.	Kuhn MA	Crit Care Nurse. 2002; 22(2):22-8, 30, 2; quiz 4-5.
當歸	明顯延長 prothrombin time 與 INR	當歸含 Coumarins	心血管疾病常用西藥與中藥的交互作用	林育是, 吳宗修, 陳立奇	醫院藥學. 2004; 21:61-64.
當歸	原篇 journal 建議不要合併使用，未詳述理由	原篇 journal 建議不要合併使用，未詳述理由	Herbal remedies: drug-herb interactions.	Kuhn MA	Crit Care Nurse. 2002; 22(2):22-8, 30, 2; quiz 4-5.
當歸	抗凝血作用增強	可能發生出血反應	Are emergency department patients at risk for herb-drug interactions?	Rogers EA, Gough JE, Brewer KL	Acad Emerg Med. 2001; 8(9):932-4.
當歸	增加 INR，廣泛瘀血	當歸含 Coumarins	Interactions between modern and Chinese medicinal drugs: a general review.	Cheng KF, Leung KS, Leung PC	Am J Chin Med. 2003; 31(2):163-9.

中藥名	可能交互作用機轉	可能交互作用結果	篇名	作者	原文出處
當歸	PT (prothrombin time)超過兩倍的延長。停用當歸一個月後，PT 回復到可接受範圍	當歸含 Coumarins	Potential of warfarin by dong quai.	Page RL, 2nd, Lawrence JD	Pharmacotherapy. 1999; 19(7):870-6.
當歸	兔的實驗，合併 warfarin 及當歸，PT 輕度延長(不顯著)，但六隻實驗兔在七天後有兩隻死亡。	PT 輕度延長	Danggui (Angelica sinensis) affects the pharmacodynamics but not the pharmacokinetics of warfarin in rabbits.	Lo AC, Chan K, Yeung JH, Woo KS	Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 1995; 20(1):55-60.
參(高麗)	中藥降低 Warfarin 的作用	降低 INR 使抗凝血作用降低	Herbal remedies: adverse effects and drug interactions.	Cupp MJ	Am Fam Physician. 1999; 59(5):1239-45.
參(高麗)	中藥降低 Warfarin 的作用	降低 INR 使抗凝血作用降低	Panax ginseng.	Kiefer D, Pantuso T	Am Fam Physician. 2003; 68(8):1539-42.
參(高麗)	中藥降低 Warfarin 的作用	降低 INR 使抗凝血作用降低	Drug-herb interaction among commonly used conventional medicines: a compendium for health care professionals.	Brazier NC, Levine MA	Am J Ther. 2003; 10(3):163-9.
參(高麗)	中藥降低 Warfarin 的作用	降低 INR 使抗凝血作用降低	The convergence of herb pharmacodynamics and herb-drug interactions on hemostasis.	Shaw HS, Kroll DJ	Altern Ther Health Med. 2001; 7(6):46-7.
參(高麗)	中藥降低 Warfarin 的作用	降低 INR 使抗凝血作用降低	Incidence and severity of potential drug-dietary supplement interactions in primary care patients: an exploratory study of 2 outpatient practices.	Peng CC, Glassman PA, Trilli LE, Hayes-Hunter J, Good CB	Arch Intern Med. 2004; 164(6):630-6.
參(高麗)	在藥物動力學及藥物效力學方面不顯著影響	在藥物動力學及藥物效力學方面不顯著影響	Possible influences of ginseng on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in rats.	Zhu M, Chan KW, Ng LS, Chang Q, Chang S, Li RC	J Pharm Pharmacol. 1999; 51(2):175-80.

中藥名	可能交互作用機轉	可能交互作用結果	篇名	作者	原文出處
參(高麗)	中藥降低 Warfarin 的作用	INR 降低至 1.5	Probable interaction between warfarin and ginseng.	Janetzky K, Morreale AP	Am J Health Syst Pharm. 1997; 54(6):692-3.
參(高麗)	在藥物動力學及藥物效力學方面不顯著影響	在藥物動力學與藥物效力學方面，對於 S-warfarin 或 R-warfarin 皆無顯著影響	Effect of St John's wort and ginseng on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in healthy subjects.	Jiang X, Williams KM, Liauw WS, Ammit AJ, Roufogalis BD, Duke CC, Day RO, McLachlan AJ	Br J Clin Pharmacol. 2004; 57(5):592-9.
參(西伯利亞)	中藥降低 Warfarin 的作用	降低 INR 使抗凝血作用降低	Understanding drug-herb interactions.	Brazier NC, Levine MA	Pharmacoepidemiol Drug Saf. 2003; 12(5):427-30.
參(亞洲)	原篇 journal 建議不要合併使用，未詳述理由	原篇 journal 建議不要合併使用，未詳述理由	Herbal remedies: drug-herb interactions.	Kuhn MA	Crit Care Nurse. 2002; 22(2):22-8, 30, 2; quiz 4-5.
參(美洲)	原篇 journal 建議不要合併使用，未詳述理由	原篇 journal 建議不要合併使用，未詳述理由	Herbal remedies: drug-herb interactions.	Kuhn MA	Crit Care Nurse. 2002; 22(2):22-8, 30, 2; quiz 4-5.
大黃	中藥降低 Warfarin 的作用	降低 INR 使抗凝血作用降低	Herbal remedies: drug-herb interactions.	Kuhn MA	Crit Care Nurse. 2002; 22(2):22-8, 30, 2; quiz 4-5.
銀杏	含血小板活化因子(PAF)拮抗劑 Ginkgolides，併用 Warfarin 會導致凝血時間延長	可能發生出血反應	心血管疾病常用西藥與中藥的交互作用	林育是, 吳宗修, 陳立奇	醫院藥學. 2004; 21:61-64.
銀杏葉	使 warfarin 作用顯著增加	使 warfarin 作用顯著增加	Drug-herb interaction among commonly used conventional medicines: a compendium for health care professionals.	Brazier NC, Levine MA	Am J Ther. 2003; 10(3):163-9.

中藥名	可能交互作用機轉	可能交互作用結果	篇名	作者	原文出處
銀杏葉	使 warfarin 作用顯著增加	使 warfarin 作用顯著增加	Herbal remedies: drug-herb interactions.	Kuhn MA	Crit Care Nurse. 2002; 22(2):22-8, 30, 2; quiz 4-5.
銀杏葉	影響 INR 及 PT	使 warfarin 作用顯著增加	Understanding drug-herb interactions.	Brazier NC, Levine MA	Pharmacoepidemiol Drug Saf. 2003; 12(5):427-30.
銀杏葉	抗凝血作用增強	可能發生出血反應	Are emergency department patients at risk for herb-drug interactions?	Rogers EA, Gough JE, Brewer KL	Acad Emerg Med. 2001; 8(9):932-4.
銀杏葉	降低血小板凝集反應	增加出血的危險	Incidence and severity of potential drug-dietary supplement interactions in primary care patients: an exploratory study of 2 outpatient practices.	Peng CC, Glassman PA, Trilli LE, Hayes-Hunter J, Good CB	Arch Intern Med. 2004; 164(6):630-6.
銀杏葉	腦內出血	增加出血的危險	Association of Ginkgo biloba with intracerebral hemorrhage.	Matthews MK, Jr.	Neurology. 1998; 50(6):1933-4.
銀杏葉	腦內出血	增加出血的危險	Herbal remedies: drug-herb interactions.	Kuhn MA	Crit Care Nurse. 2002; 22(2):22-8, 30, 2; quiz 4-5.
銀杏	腦內出血	增加出血的危險	Herbal remedies: adverse effects and drug interactions.	Cupp MJ	Am Fam Physician. 1999; 59(5):1239-45.
生薑	對 arachidonic acid、collagen 有抑制作用	使 warfarin 作用顯著增加	心血管疾病常用西藥與中藥的交互作用	林育是, 吳宗修, 陳立奇	醫院藥學. 2004; 21:61-64.
生薑	原篇 journal 建議不要合併使用, 未詳述理由	原篇 journal 建議不要合併使用, 未詳述理由	Herbal remedies: drug-herb interactions.	Kuhn MA	Crit Care Nurse. 2002; 22(2):22-8, 30, 2; quiz 4-5.

中藥名	可能交互作用機轉	可能交互作用結果	篇名	作者	原文出處
蘆薈	降低 warfarin 的作用	降低 warfarin 的作用	Herbal remedies: drug-herb interactions.	Kuhn MA	Crit Care Nurse. 2002; 22(2):22-8, 30, 2; quiz 4-5.

保健風潮盛行，正在服藥的患者，要當心藥品與保健品併用，可能的交互作用！像是目前服用糖尿病藥、心血管藥與抗憂鬱藥品的人，就要特別留意藥品與大蒜、人參、銀杏與紅麴等保健品的副作用。

根據經濟部 2008 年統計，國人一年吃掉的保健食品高達 670 億，足夠蓋一棟 101 大樓，不過全民瘋保健，健康知識卻必須要加油，調查指出，超過九成不清楚食物跟藥品也有交互作用，像是牛奶跟抗生素、富含維生素 K 食品與抗凝血劑，就不可以同時使用。日前衛生署蒐集大蒜、人參、銀杏與紅麴等四類常見保健食品，與藥物併用可能發生的交互作用，像是正在服用降血糖藥物的患者，要是又吃人參、大蒜，可能增加降血糖藥物的副作用或提高低血糖發生率，至於接種流感疫苗又併用人參，可能讓免疫力反應過度，出現副作用。

食品藥物管理局科長王慧英說：「目前研究上面還沒有特別去定量，只是說如果是平常有服用藥物的病人，因為身體狀況與一般民眾不同，所以可能在這方面要特別再注意一下，最好是在服用藥物，我們剛剛所說的這些藥物，可能就避免。」至於食用銀杏與紅麴也要留意，如果又吃降血壓藥或心血管疾病藥物，可能降低藥物作用、增加出血風險，另外併用抗憂鬱藥物，也有增加昏迷、讓患者出現輕躁症的可能，衛生署呼籲，民眾不論食用任何食物或者保健食品，都不應該大量攝取，如果有病或者身體不舒服，仍須就醫，不能以保健食品取代該服用的藥品或醫療。

### 保健食品配藥吃 當心副作用

很多人如果精神不好，就會來碗人參雞湯提神補氣，或是肩頸僵硬，就會服用銀杏，讓血路暢通，不過如果您正在生病吃藥，就要小心健康食品和藥物產生的副作用。

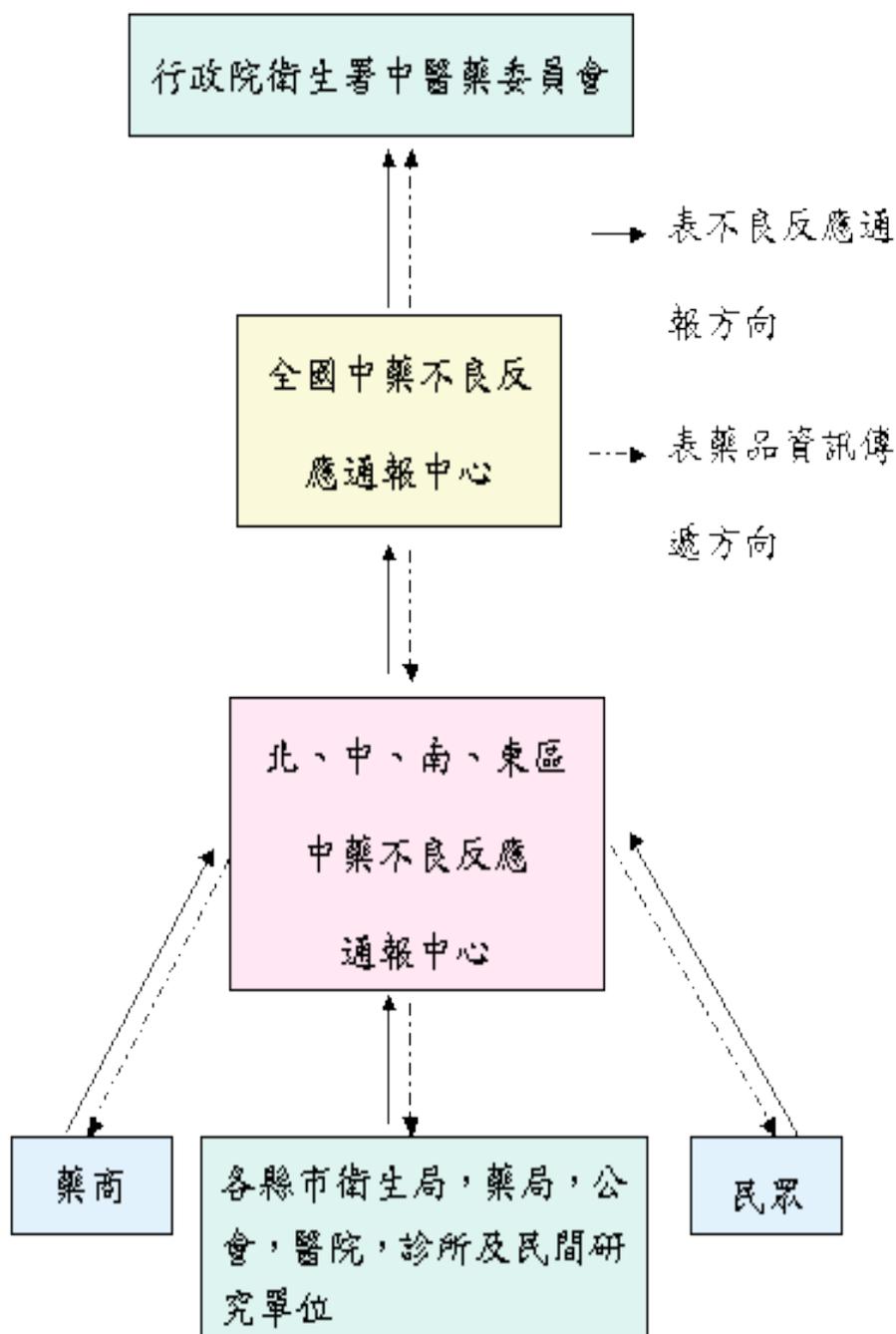
日前衛生署蒐集大蒜、人參、銀杏與紅麴等四類常見保健食品，與藥物併用可能發生的副作用及交互作用，發現像是正在服用降血糖藥物的患者，要是又吃人參、大蒜，可能增加降血糖藥物的副作用或提高低血糖發生率，至於接種流感疫苗又併用人參，可能讓免疫力反應過度，出現副作用，而大蒜配抗病毒藥物服用，會造成腸胃不適，提醒您特別注意。

至於食用銀杏與紅麴也要留意，紅麴和許多藥物併用會干擾肝臟功能、引發橫紋肌溶解症，而如果銀杏併用降血壓藥或心血管疾病藥物，可能降低藥物作用、增加出血風險，和利尿劑一起吃則會血壓上升，另外併用鎮定劑或抗憂鬱藥物，也有增加昏迷、讓患者出現輕躁症的可能。不過目前研究上面還沒有特別去定量，只是說如果是平常有服用藥物的病人，因為身體狀況與一般民眾不同，所以可能在這方面要特別再注意一下。

衛生署呼籲，民眾不論食用任何食物或者保健食品，都不應該大量攝取，如果有病或者身體不舒服，仍須就醫，不能以保健食品取代該服用的藥品或醫療。服用保健食品時，最好先諮詢醫生，同時服用多種保健食品，也要掌握成分是否重疊，以免想補健康，越補越大洞。

## 附錄二、中藥不良反應通報系統

### 一、中藥不良反應通報流程圖



## 二、中藥不良反應通報原則

依據行政院衛生署中醫藥委員會中藥不良反應通報中心所訂定之通報原則及聯絡方式。

### 1. 通報項目：

中藥不良反應的通報範圍包含中藥、青草藥及中醫使用之醫療器材。

### 2. 有下列情形之嚴重的中藥不良反應，請務必通報：

導致死亡、危及生命、病人住院或延長病人住院時間、造成永久性殘疾或先天性畸形、或需作處置以防止永久性傷害等。

### 3. 通報的情況：

無論不良反應為嚴重或非嚴重個案，或不確定是由中醫藥品引起，或並未獲得所有的相關性資料之個案，仍需通報。

### 4. 如有產品之相關性問題，例如：

懷疑有污染、懷疑藥品安定性有問題、產品不良、包裝或標示不佳等，請填於其他欄內。

### 5. 如何取得通報表：

可自衛生署中藥不良反應通報網站上下載，或與各區中藥不良反應通報中心連絡。

### 6. 通報方式：

每個病例使用一個表格，將填好之通報表以郵寄或傳真的方式，傳送至各區域之中藥品不良反應通報中心。

### 7. 機密性：

請務必填寫通報者的姓名、電話、服務機構、地址等，識別代號欄請填寫可供通報者確認追蹤病人之代號。除非通報者有特別要求，必要時廠商可以得知通報者之身份。衛生署及中藥不良反應通報中心有責任維護病人及通報者的權益，保持資料的機密性，不得擅自公開，亦不得作為醫療糾紛案件使用。

### 8. 其他注意事項：

(1) 請用黑色或深色原子筆填寫，各項資料請儘可能詳列。

(2) 填表時，若遇該欄資料不明的情況，請使用：  
**UNK**：不知道，**NA**：不適用，

**NI**：填表時尚無資料(如檢查報告)，但往後可能會有資料

(3) 供應者包括中醫診所/醫院、中藥舖、青草店、廟宇、廣告郵購、自行採集、大陸成藥...等；請詳細說明。

(4) 如果表格欄位空間不夠時，可另用 A4 大小紙張繕寫，並請註明相關欄位編號及名稱。

## 三、各區中藥不良反應通報中心連絡方式

請利用下列住址通報

	電話	傳真	通訊住址
全國	(03)396-0053	(03)396-0053	桃園縣龜山鄉復興街 5 號
北區	(02)2370-1704	(02)2370-1711	林口長庚醫院中醫分院
中區	(04)2359-2539	(04)2359-2539	台北郵政 84-664 號信箱
南區	(07)732-8206	(07)731-7123#2703	台中市港路三段 160 號
東區	(038)561-825#3297	(038)580-160	台中榮民總醫院藥劑部
			高雄縣烏松鄉大埤路 123 號
			高雄長庚醫院藥劑部
			花蓮市中央路三段 707 號
			花蓮慈濟醫院藥劑科學術組

## 四、中藥不良反應通報系統網站

<http://www.ccmp.gov.tw>

## 五、行政院衛生署中醫藥委員會中藥不良反應通報表

行政院衛生署 中醫藥委員會

個案編號 (由通報中心填寫) :

醫療人員及民眾填寫之格式 (01)

<h3>中藥不良反應通報表</h3> <p>網址 : <a href="http://www.ccmp.gov.tw">http://www.ccmp.gov.tw</a></p>	1. 發生日期： 年 月 日	2. 填表日期： 年 月 日
	3. 通報者 姓名： 服務機構： 電話： 地址： 是否為醫療人員 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 是，職稱： _____ * 若為臨床試驗用藥，請填寫下列資料： 試驗名稱： 試驗案號： _____ (登記於衛生署) 報告類別： <input type="checkbox"/> 初始報告 <input type="checkbox"/> 追蹤報告，編號： _____	
<b>I. 病人基本資料</b>		
4. 識別代號： _____ (供通報者辨識用)	5. 性別： <input type="checkbox"/> 男 <input type="checkbox"/> 女	7. 體重： _____ 公斤
	6. 出生日期： 年 月 日， _____ 歲	8. 身高： _____ 公分
<b>II. 不良反應情況/ 產品所致問題</b>		
9. <input type="checkbox"/> 不良反應 <input type="checkbox"/> 產品問題 <input type="checkbox"/> 其他： _____		12. 相關檢查及檢驗數據 (請附日期) (例如：藥品血中濃度、肝/腎功能指數.....等)
10. 不良反應結果 <input type="checkbox"/> A. 死亡 日期： 年 月 日 診斷： _____ <input type="checkbox"/> B. 危及生命 <input type="checkbox"/> C. 導致病人住院 <input type="checkbox"/> D. 造成永久性殘疾 <input type="checkbox"/> E. 延長病人住院時間 <input type="checkbox"/> F. 需作處置以防永久性傷害 <input type="checkbox"/> G. 先天性畸形 <input type="checkbox"/> H. 其他 (請敘述) _____		
11. 不良反應之描述 (請依事件發生日期順序填寫) (應包括發生不良反應之部位、嚴重程度及處置)		13. 其他相關資料 (例如：診斷、懷孕、過去病史、個人病史、個人習慣、家族史、可疑食物...等)
有無他人使用相同藥品，是否發生不良反應？ <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 不知道 停藥後不良反應是否減輕？ <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 無法得知 再投藥是否發生不良反應？ <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 無法得知		
<b>III. 疑似引起不良反應的醫療器材</b>		
14. 商品名		
15. 器材種類		
16. 廠商名稱，地址及電話		17. 規格
		型號 # _____ 序號 # _____ 批號 # _____ 效期 _____ 年 月 日
18. 器材是否可獲得 <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 已於 年 月 日 退還給廠商		
19. 同時使用之醫療產品及使用日期		
<b>IV. 懷疑藥品</b>		
藥名      劑型      給藥途徑      劑量/服用次數      起迄日期      *供應者      廠牌/批號      效期		
20. 可疑藥品 <input type="checkbox"/> 處方 <input type="checkbox"/> 飲片 <input type="checkbox"/> 中成藥		
21. 併用藥品 (請務必填寫起迄日期)		

本通報表中病患及相關醫師的姓名都不會記錄存檔，本中心將以代號編碼來代表

# 少腹逐瘀湯加減對疼痛性糖尿病周圍神經病變療效研究

陳榮興  
中國醫藥大學

## 摘要

糖尿病是一種很常見的慢性疾病，據估計，台灣現約有 140 萬左右的糖尿病患者（全人口的 6%）。糖尿病患者由於長期血糖偏高，再加上各種代謝、血循環以及免疫系統機能異常，因此很容易發生神經病變。根據流行病學調查，糖尿病患者中在診斷確定一年內約有 10% 合併神經病變，如果超過 25 年，則可高達 50% 以上，整體而言，盛行率約為 30% 左右。糖尿病神經病變，依不同的定義標準，有各種不同的分類，臨床上，最普遍的一類是遠端肢體感覺/運動多發性神經病變，這種神經病變是一種慢性、對稱性、由肢體（特別是下肢）遠端逐漸向近側擴展的神經學異常，通常呈現“襪子”與“手套”狀的分布範圍，臨床症狀起初以感覺減退或感覺異常為主，隨著時間進行，一大部分患者會合併有疼痛感，理學檢查可見肢體末端感覺（壓覺及振動覺）減退及跟腱反射減退或消失，不過，確認診斷仍須以神經傳導速率檢查的結果為依據。糖尿病多發性神經病變所引起的疼痛通常是以針刺感、觸電感或是燒灼感來表現，嚴重者，常會影響到肢體功能及生活品質，是一個相當困擾患者及醫師的問題。傳統上，西醫治療糖尿病多發性神經病變是以控制血糖為主，如果合併有疼痛的症狀，則加上一些藥物做為症狀治療，如：非類固醇類止痛劑、三環抗憂鬱劑、抗癲癇藥、嗎啡類止痛藥...等，這些藥物的效果通常都不理想，很難有效的緩解疼痛，而且還有各種副作用的發生。本病在中醫文獻屬於消渴病日久損及肝腎，導致肝腎氣陰虧損，久病入絡，絡脈閉阻，不通則痛，不通則肌膚失榮，而出現肢體麻木、疼痛、局部發涼等症狀。糖尿病周圍神經病變的病機特徵為本虛標實，標實為痰濁閉阻，瘀血阻滯，痰瘀交阻，脈絡不通。標實（痰瘀阻絡）是糖尿病周圍神經病變發病的直接病因，而且痰瘀始終是穿於糖尿病周圍神經病變整個過程。

本計畫進行一雙盲、隨機且有控制安慰劑的交叉試驗，嘗試以中醫臨床有效治療方劑少腹逐瘀湯加減來治療糖尿病多發性神經病變，評估其對糖尿病神經病變疼痛緩解及其對周邊神經功能（壓覺、振動覺及神經傳導速率）改善情形，目前收案數共 55 名，現尚有 8 位受試者仍進行試驗中，研究試驗尚未完成，待受

試者試驗全部完成後再解盲，整理資料統計分析，撰寫結果。目前完成試驗之受試者男性平均年齡 61.7 歲，平均罹病年 13.9 年，女性平均年齡 58.3 歲，平均罹病年 20.8 年，其 WBC、RBC、Hb、Hct、RDW、Platelet、MCV、MCH、MCHC、GOT、GPT、Creatinine、Free T4、TSH、鈉、鉀、鈣、糖化血色素、葉酸等服藥完成試驗後並無異常現象。

關鍵詞：糖尿病周圍神經病變、少腹逐瘀湯、中醫

# **The Study of Modified Shao-Fu-Zhu-Yu-Tang in Treating Diabetic Periphery Neuropathy**

Rong-Hsing Chang  
China Medical University

## **ABSTRACT**

Diabetic polyneuropathy is one of the most common long-term complications of diabetes affecting~50% of all diabetic people. The neuropathies developing in patients with diabetes are known to be heterogeneous by their symptoms, pattern of neurologic involvement course rich covariates, pathologic attenuations, and underlying mechanisms. The typical diabetic peripheral neuropathy is a chronic, symmetric, length-dependent sensor motor polyneuropathy and is through to be the most common variety. It develops on a background of long standing hyperglycemia, accumulation of advanced glycation and products, oxidative stress and lipid attenuations among other metabolic abnormalities, and cardiovascular risk factor. Pharmacological management of painful diabetic peripheral neuropathy almost inclusively counts of symptomatic therapies. First line therapies for painful diabetic peripheral neuropathy are a typical antidepressant, duloxetine, pregabalin, or gabapentin, taking into account patient comorbidities and cost. In the research, we will evaluate the modified Shao-Fu-Zhu-Yu-Tang in treating painful diabetic peripheral neuropathy. The research has not been completed, after the research is completed, then we will collate the data, analyze data and write reports.

Keywords: Diabetic peripheral neuropathy, Shao-Fu-Zhu-Yu-Tang, Traditional Chinese Medicine

## 壹、前言

糖尿病是一種很常見的慢性疾病，據估計，台灣現約有 140 萬左右的糖尿病患者(全人口的 6%)。糖尿病患者由於長期血糖偏高，再加上各種代謝、血循環以及免疫系統機能異常，因此很容易發生神經病變。根據流行病學調查，糖尿病患者在診斷確定一年內約有 10% 合併神經病變，如果超過 25 年，則可高達 50% 以上，整體而言，盛行率約為 30% 左右(1-4)。糖尿病神經病變，依不同的定義標準，有各種不同的分類，臨床上，最普遍的一類是遠端肢體感覺/運動多發性神經病變，這種神經病變是一種慢性、對稱性、由肢體(特別是下肢)遠端逐漸向近側擴展的神經學異常，通常呈現”襪子”與”手套”狀的分布範圍，臨床症狀起初以感覺減退或感覺異常為主，隨著時間進行，一大部分患者會合併有疼痛感，理學檢查可見肢體末端感覺(壓覺及振動覺)減退及跟腱反射減退或消失，不過，確認診斷仍須以神經傳導速率檢查的結果為依據。糖尿病多發性神經病變所引起的疼痛通常是以針刺感、觸電感或是燒灼感來表現，嚴重者，常會影響到肢體功能及生活品質，是一個相當困擾患者及醫師的問題。傳統上，西醫治療糖尿病多發性神經病變是以控制血糖為主，如果合併有疼痛的症狀，則加上一些藥物做為症狀治療，如：非類固醇類止痛劑、三環抗憂鬱劑、抗癲癇藥、嗎啡類止痛藥...等，這些藥物的效果通常都不理想，很難有效的緩解疼痛，而且還有各種副作用的發生。

中醫文獻對糖尿病周圍神經病變無確切記載和專病病名，但據其臨床表現，可歸屬於消渴、痺証、痿證、脈痺、血痺、不仁、麻木等範疇(5)。如李東垣《蘭室秘藏》記載消渴病患者有“四肢痿弱”(6)。朱丹溪《丹溪心法》中載：“腎虛受之，腿膝枯細，骨節酸疼。”(7)《王旭高臨證醫案》中紀載：“消渴日久，但見手足麻木，肢涼如冰。”(8)《類證治裁》紀載：“諸氣血凝滯，久而成痺。”(9) 依臨床經驗累積，臨床上常見下列證型：氣陰內虛型、脾虛濕滯型、肝腎陰虛型、痰瘀交阻型、血虛寒凝型。本病是消渴病日久損及肝腎，導致肝腎氣陰虧損，久病入絡，絡脈閉阻，不通則痛，不通則肌膚失榮，而出現肢體麻木、疼痛、局部發涼等症狀。糖尿病周圍神經病變的病機特徵為本虛標實，本虛在於氣陰不足，陰津耗損，兼內有虛熱；標實為痰濁閉阻，瘀血阻滯，痰瘀交阻，脈絡不通。其中標實（痰瘀阻絡）是糖尿病周圍神經病變發病的直接病因，而且痰瘀始終是穿於糖尿病周圍神經病變整個過程(10-16)。

本計畫進行一雙盲、隨機且有控制安慰劑的交叉試驗，嘗試以中醫臨床有效治療方劑少腹逐瘀湯加減來治療糖尿病多發性神經病變，評估其對糖尿病神經病變疼痛緩解及其對周邊神經功能(壓覺、振動覺及神經傳導速率)改善情形。

## 貳、材料與方法

### 一、研究方法：

採隨機、雙盲、有控制安慰劑組的兩階段式交叉性試驗，預計收集 80 個糖尿病合併下肢神經疼痛的患者、進行 26 週左右的研究。

### 二、研究對象篩選

#### (一)受試者納入條件

1. 年齡逾 30 至 80 歲間之患者。
2. 具疼痛性糖尿病神經病變的第 I 型或第 II 型糖尿病患者。
3. 沒有接受治療的疼痛性糖尿病神經病變患者，或至少接受 3 個月治療但神經性疼痛仍存在的患者。
4. 沒有嚴重疾病，在試驗期間不須要住院治療之疼痛性糖尿病神經病變患者。
5. 了解試驗的治療程序及潛在風險與益處，並願意簽訂受試者同意書者。

#### (二)受試者排除條件

1. 處於治療期的癌症患者。
2. 活動期疾病(如：甲狀腺機能亢進、甲狀腺機能低下症、慢性腎衰竭、嚴重貧血、肝硬化、急性感染疾病)，目前正在接受規則治療。
3. 其他原因造成的周邊神經病變。
4. 血糖控制不穩定
5. 血小板 $\leq 80000/\mu\text{l}$
6. 急性足潰瘍或感染者
7. 三個月前曾參與任何藥物臨床試驗者
8. 藥物或酒精成癮，影響試驗進行及試驗結果。
9. 哺乳及懷孕婦女或試驗期間拒絕採用適當避孕法者。

### 三、藥物組成與製備：

#### (一)處方組成與比例

少腹逐瘀湯加味組成與比例 (750mg/錠(單位))

當歸	4.216
赤芍	2.816
五靈脂	2.816

延胡索	1.408
川芎	1.408
沒藥	1.408
小茴香	0.032
桂枝	1.408
蒲黃	4.216
白芥子	2.816
地龍	2.816
地鱉蟲	2.816
懷牛膝	1.408

(二)藥物基原：

小茴香	<i>Foeniculum Vulgare</i> Mill.
延胡索	<i>Corydalis yanhusuo</i> W.T.Wang
沒藥	<i>Commiphora myrrha</i> Engler
當歸	<i>Angelica sinensis</i> (Oliv)
川芎	<i>Ligusticum chuanxiong</i> Hortorum
桂枝	<i>Cinnamomum cassia</i> Presl.
赤芍	<i>Paeonia lactiflora</i> Pall.
蒲黃	<i>Typha angustifolia</i> L.
五靈脂	<i>Trogopterus xanthipes</i> Milne-Edwards
白芥子	<i>Sinapis alba</i> L.
地龍	<i>Pheretima aspergillum</i> (E.Perrier)
地鱉蟲	<i>Eupolyphogasinensis</i> Walker
懷牛膝	<i>Achyranthes bidentata</i> Blume

(三)製備：

研究用藥委託GMP藥廠採購作基原鑑定後製作，製備成每顆含750mg方藥浸膏之錠劑。

(四)安慰劑之製備：750mg/錠(單位)

澱粉安慰劑：取澱粉做造粒並使用焦糖作著色，顏色類似但氣味上無法做特別處理。

四、研究設計：

本計畫以2星期 run-in period 來選擇合適之患者，依隨機、雙盲、平行分為實驗組與對照組二組，採交叉(cross-over design)進行研究。先進行基本

資料蒐集整理、神經疼痛評估、各科神經檢查及實驗室檢查，每位患者都必須停止原先在使用治療神經病變(包括神經疼痛)的藥物，但是其他藥物可以繼續使用；隨後開始進行第一階段 12 星期的分組試驗：實驗組 40 位患者接受實驗藥物治療，對照組 40 位患者服用安慰劑，實驗藥物與安慰劑皆每日服用 12 錠，每日三次，每次 4 錠三餐飯後服用。每位患者每 4 星期回診一次，接受疼痛程度及神經學檢查(跟腱反射、大拇趾振動覺)，第 12 星期時同時也必須接受第二次的實驗室抽血檢查及填寫生活品質問卷；接著是 2 星期的 washout period 及第二階段 12 星期的交叉試驗，進行的方式與第一階段相同，原來接受實驗藥物治療的患者改服用安慰劑，而原先服用安慰劑者改服用實驗藥物。

#### 五、療效安全性評估：

治療期內紀錄研究對象用藥情形，依受試者服藥後之反應，並未發生明顯副作用。

#### 六、臨床療效評估方法：

(一) 疼痛程度(0 到 10 分；11-point Likert scale)

(二) 填寫生活品質問卷(SF36)

(三) 針對每位收案患者做兩側下肢的神經學檢查：跟腱反射、大拇趾振動覺及神經傳導速率檢查

(四) 實驗室抽血檢驗的項目包括：

一般血液檢查、肝功能(GOT/GPT)、腎功能(creatinine)、甲狀腺功能(Free T4/TSH)、電解質(鈉、鉀、鈣)、糖化血紅素及葉酸，心電圖檢查及尿液妊娠試驗(女性患者)。

#### 七、療效評估：

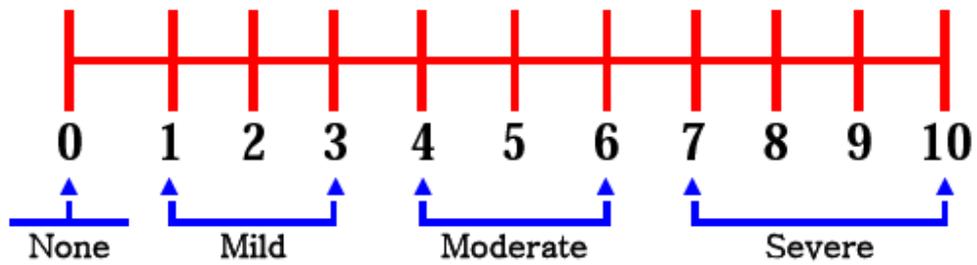
(一) Primary endpoint：1.疼痛緩解 2. 生活品質改善

(二) Secondary endpoint：神經功能改善: 1.跟腱反射 2.大拇趾振動覺

#### 八、檢測方法：

(一)神經疼痛程度評估

利用 0 – 10 Numeric pain scale (見下圖)數字量化疼痛程度，首先向病患說明：當無疼痛時分數是 0，在可以想像當中最嚴重的疼痛分數定為 10，請病患將現在自己身上疼痛的嚴重程度以圈選數字的方式標示在介於 0 至 10 之間。



0-10 Numeric Pain Rating Scale

(二)神經學檢查項目與執行方法：

1. 深肌腱反射測驗 (Deep tendon reflex test)

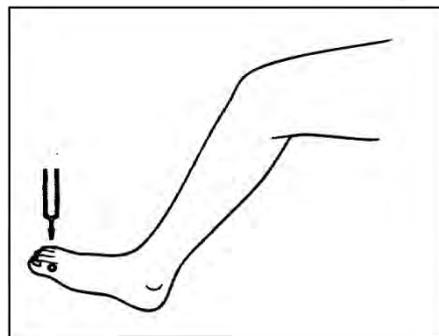
執行方法：只需測驗跟腱反射，使用扣診槌敲擊跟腱並觀察是否有引發反射。以下兩種狀況判定為深肌腱反射減弱。

跟腱反射微弱(Decreased ankle reflex)：使用扣診槌敲擊跟腱先以一般正常方式檢查顯示跟腱反射消失，但經反射增強步驟(enhancement procedure)後可見微弱反射跟腱反射消失

(Absent ankle reflex)：經反射增強步驟依然無法跟腱反射

2. 震動感覺測驗

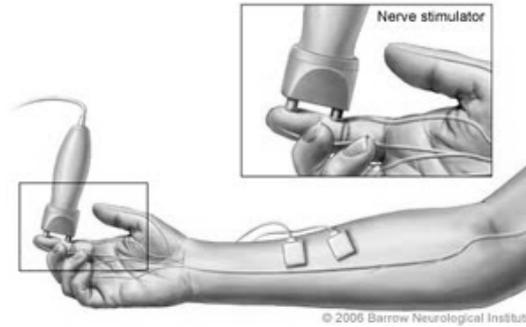
執行方法：要求患者在測驗中全程閉上眼睛，將 128Hz 音叉激發震動後放在大腳趾趾背趾間關節骨頭最突出之處(見下圖)，這時詢問病患有無震動感覺，再將音叉停止，詢問病患何時震動感覺停止，在左右大腳趾各做兩次。當患者無法感覺到音叉震動即為異常



3. 神經傳導檢查 Nerve conduction test

患者依約定時間至中國醫藥大學附設醫院神經部電生理檢查室檢查。神經傳導檢查是利用神經及肌肉的電生理特性，以電流刺激神經，記錄其運動和感覺的反應；有對稱性的至少兩

處神經檢查結果異常即符合糖尿病周邊神經病變，診斷標準依據以下醫學期刊文獻(1. Diabetes Metab Res Rev 2011; 27: 620–628. 2. DIABETES CARE , VOLUME 33, NUMBER 10, OCTOBER 2010)。



(三)生活品質問卷：SF36

## 參、結果

計畫原訂 11 月份需完成研究案件數達 100%。現收案數共 55 名，完成之研究個案共 47 位(包含完成兩階段試驗及退出試驗個案數)，尚有 8 位受試者正進行試驗中。待受試者全部完成試驗後，再解盲，整理資料統計分析，撰寫報告。現繼續完成研究。本研究總收案數為 55 人，男 25 人平均年齡 62.2 歲，女 30 人平均年齡 62.9 歲。目前完成試驗之受試者男 16 人平均年齡 61.7 歲，平均罹病年 13.9 年，女性平均年齡 58.3 歲，平均罹病年 20.8 年其 WBC、RBC、Hb、Hct、RDW、Platelet、MCV、MCH、MCHC、GOT、GPT、Creatinine、Free T4、TSH、鈉、鉀、鈣、糖化血色素、葉酸等服藥完成試驗後並無異常現象。(表一)、(表二)

表一、少腹逐瘀湯加減對疼痛性糖尿病周圍神經病變療效

102 年 12 月完成試驗人數資料表

性別	男	人數	16 人
		平均年齡	61.7 歲
		平均糖尿病罹病年	13.9 年
	女	人數	6 人
		平均年齡	58.3 歲
		平均糖尿病罹病年	20.8 年

表二、少腹逐瘀湯加減對疼痛性糖尿病周圍神經病變療效

102 年 12 月完成受試者服藥前後血液生化電解質檢查資料表

	服藥前 Mean±SD	服藥後 Mean±SD
WBC(x 10 <sup>3</sup> /ul)	6.87±1.44	7.46±2.30
RBC(x10 <sup>6</sup> /ul)	4.62±0.75	4.53±0.72
Hb (gm/dl)	13.37±1.59	13.10±1.64
Hct %	39.18±3.99	37.93±3.96
RDW %	13.22±1.23	13.20±1.08
Platelet (x10 <sup>3</sup> /ul)	226.45±54.18	220.05±69.58
MCV (fl)	85.99±9.94	84.92±10.18
MCH (pg)	29.35±3.76	29.32±3.94
MCHC (g/dl)	34.09±1.19	34.45±1.08
GOT	28.91±7.99	28.36±12.05
GPT	26.50±12.64	26.45±18.94
creatinine	1.11±0.50	1.24±0.69
Free T4	1.15±0.69	0.92±0.10
TSH	1.62±0.70	1.56±0.74
鈉	138.68±3.06	136.68±2.90
鉀	4.53±0.56	4.54±1.19
鈣	9.24±0.41	9.03±1.05
糖化血紅素	8.18±1.79	8.50±1.90
葉酸	15.13±5.34	11.67±4.63

## 肆、討論

研究尚未完成，尚未解盲，待完成後就結果再討論。目前完成試驗之受試者其 WBC、RBC、Hb、Hct、RDW、Platelet、MCV、MCH、MCHC、GOT、GPT、Creatinine、Free T4、TSH、鈉、鉀、鈣、糖化血色素、葉酸等服藥完成試驗後並無異常現象。

## 伍、結論與建議

研究尚未完成，尚未解盲，現繼續執行研究，待研究完成解盲後，資料整理分析就結果做討論與建議。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP102-RD-107 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. Dyck PJ, Kratz KM, Karnes JL, Litchy WJ, Klein R, Pach JM, Wilson DM, O'Brien PC, Melton LJ 3rd, Service FJ. The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Neurology* 1993;43:817–824
2. Llewelyn JG, Tomlinson DR, Thomas PK. Diabetic Neuropathies. In *Peripheral Neuropathy*. 4th ed. Dyck PJ, Thomas PK, Eds. Philadelphia, Elsevier 2005, p. 1951–1992
3. Thomas PK. Classification, differential diagnosis and staging of diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes* 1997;46(Suppl. 2): S54 –S57
4. Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, Malik RA, Maser RE, Sosenko JM, Ziegler D, American Diabetes Association. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2005; 28:956 –962
5. 朱曉丹. 糖尿病周圍神經病變的辨證論治. 《求醫問藥》2011;3:630
6. 金元四大家名醫集成. 中國中醫藥出版社. 1995
7. 元.朱震亨. 丹溪醫集. 中國中醫藥出版社. 1997
8. 王旭高. 臨證醫案. 人民衛生出版社. 1996
9. 清. 林佩琴. 類證治裁. 旋風出版社. 1986
10. 節陽華, 吳深濤教授治療糖尿病周圍神經病變經驗. *現代中西醫結合雜誌*, 2011;20(24):3067-3068
11. 梁正宇, 糖尿病周圍神經病變治療體會. *新中醫*, 2011;43(7):152-153
12. 候君等, 糖尿病周圍神經病變的中醫藥治療近況及展望. *西部中醫藥*, 2011;24(10):107-109
13. 谷葛里, 史載祥教授治療糖尿病周圍神經炎驗案. *新中醫* 2006;38(5):81-82
14. 李舒敏, 糖尿病周圍神經病變的中西醫研究進展. *醫學綜述*, 2011;17(20):3126-3128
15. 五明選等, 張發紫教授治療糖尿病周圍神經病變經驗介紹. *新中醫*. 2008;40(2):14-15

16. 張蘭, 姜維娜, 糖尿病周圍神經病變常見中醫證型與相關指標的關係研究. 中國中醫藥訊息雜誌. 2011; 18(11); 23-25.

# 榮陽治肝湯對慢性 C 型肝炎病人之療效評估；一隨機雙盲對照及交叉研究(2-2)

黃信彰  
臺北榮民總醫院

## 摘 要

慢性 C 型肝炎的病人約有百分之十至三十在十至二十年之追蹤會發展成肝硬化，甚至導致成肝癌發生。因此，慢性 C 型肝炎雖然時常沒有症狀，但是，積極而有效的治療確是必須的。西藥干擾素加上抗病毒藥物雷巴威靈(ribavirin)治療成功率約 50%~79%，但其副作用仍使部份病人無法忍受。而傳統的中藥治療慢性 C 型肝炎已為民間廣為使用，但因尚未有一明確的科學研究及嚴謹的血清生化及病毒核酸指數作為治療效果的評估。

本研究為榮陽治肝湯對慢性 C 型肝炎病人之療效評估；一隨機雙盲對照及交叉研究之二年連續計畫，目的即在探討榮陽治肝湯（龍膽瀉肝湯、加味逍遙散、丹參和厚朴的組合，是中醫界常用來治療肝炎且在細胞及動物研究模式中具抗病毒、抗發炎、抗氧化及免疫調節功能）在慢性 C 型肝炎病人的治療療效，尤其瞭解其對血清肝轉氨酶及 C 型肝炎病毒核酸的影響。研究對象為曾經接受干擾素為主的標準治療，且治療失敗（含不反應及復發），或不適合接受干擾素治療的慢性 C 型肝炎患者，第一期我們收集 36 位符合收案條件之慢性 C 型肝炎病人，且經中醫師辨證屬於肝鬱血瘀合併肝經濕熱的證型者同時願意接受榮陽治肝湯治療者，研究對象隨機分成二組，一組給予榮陽治肝湯每天十五公克，分三次服用，為期十二週，另一組給予外形及味道相似但內容為澱粉之安慰劑，每天服用三次，為期十二週，於十二週結束後，停藥二週，再將二組互換，原來接受榮陽治肝湯者換成接受安慰劑，原來接受安慰劑組換成接受榮陽治肝湯為期十二週。研究治療期間定期評估其臨床症狀、副作用以及中醫證型變化，同時抽血偵測血清肝轉氨酶以及血中 C 型肝炎病毒核酸濃度之變化。更利用疲倦量表及生活品質問卷來了解對病人生活品質之影響。預期將可知道榮陽治肝湯是否對慢性 C 型肝炎病人是否有降血中肝轉氨酶以及血中 C 型肝炎病毒核酸濃度之能力。研究第二期我們將針對將繼續收集對第一期有療效之慢性 C 型肝炎病人(肝指數下降或 HCV RNA 下降 2 log) 進行二十四週之治療及評估其停藥後二十四週之長期持續療效

(sustained response)，本研究以嚴謹及科學的研究方法來評估榮陽治肝湯治療慢性 C 型肝炎的療效及安全性。

本研究第二階段及針對第一階段接受榮陽治肝湯中，肝指數 ALT/AST 有下降或 HCV RNA 有下降 2 個 log 以上者，為了瞭解其服用六個月之較長療效而進行第二階段治療。目前總共收集 13 位符合進入第二階段條件之慢性 C 型肝炎病人，5 位男性、8 位女性，平均年齡 64.0±歲 9.1 歲 (49~81 歲)，HCV 基因型：9 位 1b、3 位 2a、1 位 2b，目前已進入第二個月以上治療療程有資料與分析者共有 10 位，目前服用榮陽治肝湯其肝指數(ALT/AST)有下降者 5 人，其他 5 人未見 ALT 下降，但血中 HCV RNA 下降者有 8 位(80%)，未下降者只有 2 位，目前仍繼續進行研究中。從 HCV RNA 下降之比率有高達 8 成，分析榮陽治肝湯治療慢性 C 型肝炎，雖然 HCV RNA 於四週時 8 位 HCV RNA 濃度有下降，但治療快速病毒反應(rapid virological response,完全偵測不到病毒)仍為 0 位，至於有 4 位追蹤至第 3 個月(第十二週)有 2 位達到部份治療早期病毒反應(partial early virological response)立即病毒 HCV RNA 濃度下降 2 個 log 以上。第二期研究進行中服用榮陽治肝湯均未有發生臨床副作用。第二期研究中 13 位病人中醫證型分析濕熱蘊結證分數 12 人下降，1 人上升，血瘀證分數 5 人下降，8 人上升，肝鬱脾虛證分數 10 人下降，3 人上升，疲倦量表分數 6 人下降，7 人上升。

102 第二期之研究結果可證實第一階段之發現榮陽治肝湯有抑制病毒 HCVRNA 之療效，唯目前研究尚在進行中，待研究完成之後當可有更完整之資料分析。研究中榮陽治肝湯且明顯改善中醫之濕熱蘊結及肝鬱脾虛證型，值得進一步探討其原因並進行進一步大型之臨床研究。

關鍵詞：榮陽治肝湯、慢性 C 型肝炎、血清肝轉氨酶、C 型肝炎病毒核酸、中醫證型、疲倦量表、生活品質問卷

# **Clinical Efficacy of Rong-Yang-Jyh-Gan-Tang on Patients with Chronic Hepatitis C: a Double-blinded Randomized Placebo-controlled Cross-over Study (2-2)**

Shinn-Jang Hwang  
Taipei Veterans General Hospita

## **ABSTRACT**

10 to 30% of patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection will progressive insidiously to cirrhosis after 10 to 20 years' follow-up, and some will develop hepatocellular carcinoma. Combination of interferon with ribavirin has 50%~79% sustained response rate in treating chronic hepatitis C patients, but the side effects often lead to intolerance of patients. Traditional Chinese medicine has been widely used by the publics in Taiwan. However, the efficacy of traditional Chinese medicine has not been confirmed because there were no evidence-based results or scientific parameters such as serum liver transaminase or viral load available in the evaluation of treatment response.

This study evaluates the clinical efficacy of Rong-Yang-Jyh-Gan-Tang (a combination of long-dan-xie-gan-tang, jia-wei-xia-yao-san, dan-shen and hou-po) on patients with chronic hepatitis C. Rong-Yang-Jyh-Gan-Tang and its ingredients have been proven to have *in vitro* or *in vivo* anti-viral, anti-inflammatory, immune modulation effect, and been commonly used in clinical practice of Chinese Medicine in Taiwan. The purpose of this study is to evaluate the clinical efficacy of Rong-Yang-Jyh-Gan-Tang in treating patients with chronic hepatitis C, particularly emphasize on the effect on serum liver transaminase and HCV RNA. In the first part, we enrolled 36 patients with chronic hepatitis C who were not response or not suitable for standard interferon-based therapy into this study. Patients were diagnosed first by

Chinese herbal doctor to identified as “dampness heat stasis” and “liver Qi stagnation” by Bian-Zheng-lun-zhi and then randomized and allocated to receive Rong-Yang-Jyh-Gan-Tang/placebo 15gm per day and three time a day or placebo for 12weeks. After 2 weeks’ washout period, patients will be crossed over to receive placebo/ Rong-Yang-Jyh-Gan-Tang for another 12 weeks. In the second part project, we continued to enroll patients in the first part study and those patients who had response will receive a 24 weeks course of Rong-Yang-Jyh-Gan-Tang to evaluate the sustained response 24 weeks after stopping treatment. Patients returned to clinics as schedule and blood tests for complete blood count, liver biochemistries and HCV RNA will be performed. Clinical symptoms and side effects of Rong-Yang-Jyh-Gan-Tang will also be recorded in detail during and after treatment. We also applied Chinese Medicine symptoms score, fatigue severity score and quality of life questionnaire to evaluate the change of quality of life in these patients.

Results of the second part study showed that 13 patients (male:5, female:8, mean age: 64.0±9.1 years) enrolled in the six month Rong-Yang-Jyh-Gan-Tang treatment study. When we analyzed the available data, results showed that 5 out of 10 patients (50%) had serum ALT/AST decrease. However, 8 out of 10 patients (80%) had serum HCVRNA decreased. No clinical side effect or severe adverse event noted during the study period. During the study, Chinese medicine syndrome identified as “dampness” and “liver Qi stagnation” showed decreased in 12/13 and 10/13 patients. Chinese medicine syndrome identified as “heat stasis”, fatigue severity score decreased in 5/13 and 6/13 patients.

In conclusion, Chronic hepatitis C patients received Rong-Yang-Jyh-Gan-Tang treatment had significantly serum HCVRNA decrease ratio, improved Chinese medicine syndrome identified as “dampness” and “liver Qi stagnation”. Our results deserved further evaluation and larger clinical trials.

Keywords: Rong-Yang-Jyh-Gan-Tang, chronic hepatitis C, serum liver transaminase, hepatitis C viral RNA, Bian-Zheng-lun-zhi, Fatigue severity score, quality of life

## 壹、前言

慢性 C 型肝炎病人在平均追蹤十年至二十年，會有百分之十至三十的病人產生肝硬化，同時有相當比例的病人會形成肝癌。<sup>1-8</sup> 所以慢性 C 型肝炎對全民健康的影響十分重大。<sup>9-10</sup> 目前合併使用干擾素加上抗病毒藥物雷巴威靈(ribavirin)須可使治療成功率約 50%~79%，但其副作用大仍使部份病人無法忍受。<sup>11-17</sup> 而傳統的中藥治療慢性 C 型肝炎以為民間廣為流傳使用且因無副作用較為病人所接受。

本臨床研究研究對象為曾經接受干擾素為主的標準治療，且治療失敗（含不反應及復發），或不適合接受干擾素治療的 C 型肝炎患者。第一年我們收集三十六位，經中醫辨證屬於肝鬱血瘀合併肝經濕熱的證型者且自願接受榮陽治肝湯治療之慢性 C 型肝炎病人，研究第一期隨機分成二組，一組給予榮陽治肝湯每天十五公克，分三次服用，為期十二週，另一組給予外形，味道相似但內容為澱粉之安慰劑，每天服用三次，為期十二週，於十二週結束後，停藥二週，再將二組互換，原來接受榮陽治肝湯者成接受安慰劑，原來接受安慰劑組換成接受榮陽治肝湯為期十二週。研究治療期間定期評估其臨床症狀、副作用以及中醫證型變化，同時抽血偵測血清肝轉氨酶以及血中 C 型肝炎病毒核酸濃度之變化。更利用疲倦量表及生活品質問卷來了解對病人生活品質之影響。預期將可知道榮陽治肝湯是否對慢性 C 型肝炎病人是否有降血中肝轉氨酶以及血中 C 型肝炎病毒核酸濃度之能力。研究主要目標包括血清肝轉氨酶(ALT/AST)下降/正常及血清 HCV viral load 下降 2 個 log 之比率，研究次要目標包括病人中醫證型改變、疲倦量表及生活品質評量(以 SF-36 測量)。

102 年第二期研究我們將繼續收集第一期之病人至 36 位同時將第一期有療效之慢性 C 型肝炎病人(肝指數下降或 HCRNA 下降 2 log)進行二十四週之治療及評估其停藥後二十四週之長期持續療效 (sustained response)，期望能比照西醫合併使用干擾素加上抗病毒藥物 ribavirin 之臨床研究，以嚴謹及科學的研究方法來評估榮陽治肝湯治療慢性 C 型肝炎的療效及安全性。研究主要目標包括治療快速病毒反應(rapid virological response, RVR)、治療早期病毒反應(early virological response, EVR)、治療持續病毒反應(sustained virological response, SVR)的比率及 ALT/AST 的持續正常率；研究次要目標包括病人中醫證型改變、疲倦量表及生活品質評量（以 SF-36 測量）。

本研究將以嚴謹及科學的研究方法來評估滎陽治肝湯治療慢性 C 型肝炎的療效及安全性，我們以實證研發中草藥來治療國人常見肝病，落實中草藥為現代醫療體系的一環，以實證來解決病人之疾患，以達中草藥現代化之目標。本研究結果可提供中西醫界在治療慢性 C 型肝炎之重要參考。

## 貳、材料與方法

本研究為滎陽治肝湯對慢性 C 型肝炎病人之療效評估；一隨機雙盲對照及交叉研究之二期連續計畫，目的即在探討滎陽治肝湯（龍膽瀉肝湯、加味逍遙散、丹參和厚朴的組合，是中醫界常用來治療肝炎且在細胞及動物研究模式中具抗病毒、抗發炎、抗氧化及免疫調節功能）在慢性 C 型肝炎病人的治療療效，尤其瞭解其對血清肝轉氨酶及 C 型肝炎病毒核酸的影響。研究對象為曾經接受干擾素為主的標準治療，且治療失敗（含不反應及復發），或不適合接受干擾素治療的慢性 C 型肝炎患者，第一期我們收集 36 位符合收案條件之慢性 C 型肝炎病人，且經中醫師辨證屬於肝鬱血瘀合併肝經濕熱的證型者同時願意接受滎陽治肝湯治療者，研究對象隨機分成二組，一組給予滎陽治肝湯每天十五公克，分三次服用，為期十二週，另一組給予外形及味道相似但內容為澱粉之安慰劑，每天服用三次，為期十二週，於十二週結束後，停藥二週，再將二組互換，原來接受滎陽治肝湯者換成接受安慰劑，原來接受安慰劑組換成接受滎陽治肝湯為期十二週，其療效藥以及安慰劑均委由合格 GMP 中藥廠製造，錠劑均有成份及穩定度之測試通過。研究治療期間定期評估其臨床症狀、副作用以及中醫證型變化，同時抽血偵測血清肝轉氨酶以及血中 C 型肝炎病毒核酸濃度之變化。更利用疲倦量表及生活品質問卷來了解對病人生活品質之影響。預期將可知道滎陽治肝湯是否對慢性 C 型肝炎病人是否有降血中肝轉氨酶以及血中 C 型肝炎病毒核酸濃度之能力。

102 年第二期研究我們將針對第一期研究有療效之慢性 C 型肝炎病人（血清肝轉氨酶或 HCV viral load 有下降者）進行滎陽治肝湯二十四週之治療及評估其停藥後二十四週之持續療效。研究治療期間定期評估其臨床症狀、副作用以及中醫證型變化，同時抽血偵測血清肝轉氨酶以及血中 C 型肝炎病毒核酸濃度之變化。更利用疲倦量表及生活品質問卷來了解對病人生活品質之影響。研究主要療效指標包括治療快速病毒反應 (rapid virological response, RVR)、治療早期病毒反應 (early virological response, EVR)、治療持續病毒反應 (sustained virological response, SVR) 的比率及血清肝轉氨酶 (ALT/AST) 的持續正常率；研究次要療效指標包括病人中醫證型改變、疲倦量表及生活品質評量（以 SF-36 測量）。



## 參、結果

本研究第二期乃針對第一期接受榮陽治肝湯中，肝指數 ALT/AST 有下降或 HCV RNA 有下降 2 個 log 以上者，為了瞭解其服用六個月之較長療效而進行第二階段治療。目前總共收集 13 位符合進入第二階段條件之慢性 C 型肝炎病人，5 位男性、8 位女性，平均年齡  $64.0 \pm 9.1$  歲(49~81 歲)，HCV 基因型：9 位 1b、3 位 2a、1 位 2b，目前已進入第二個月以上至療程有資料與分析者共有 10 位，目前服用榮陽治肝湯其肝指數(ALT/AST)有下降者 5 人，其他 5 人未見 ALT 下降，但血中 HCV RNA 下降者有 8 位，未下降者只有 2 位，目前仍繼續進行研究中。從 HCV RNA 下降之比率有高達 8 成，分析榮陽治肝湯治療慢性 C 型肝炎，雖然 HCV RNA 於四週時 8 位 HCV RNA 濃度有下降，但治療快速病毒反應(rapid virological response, 完全偵測不到病毒)仍為 0 位，至於有 4 位追蹤至第 3 個月(第十二週)有 2 位達到部份治療早期病毒反應(partial early virological response)立即病毒 HCV RNA 濃度下降 2 個 log 以上。第二期研究病人肝指數(ALT/AST)及血中 HCV RNA 之變化第二期研究可證實第一階段之發現榮陽治肝湯有抑制病毒之療效，唯目前研究尚在進行中，待研究完成之後當可有更完整之資料分析。

第二期研究進行中服用榮陽治肝湯均未有發生臨床副作用。第二期研究中 13 位病人中醫證型分析濕熱蘊結證分數 12 人下降，1 人上升，血瘀證分數 5 人下降，8 人上升，肝鬱脾虛證分數 10 人下降，3 人上升，疲倦量表分數 6 人下降，7 人上升。

## 肆、討論

本研究計畫由於 IRB 核准晚了 3 個月，研究進行較遲，但均已完成第一階段之榮陽治肝湯/安慰劑之收案，共有 36 位慢性 C 型肝炎病人加入研究，雖然尚有 6 位病人尚未完成最後一次之追蹤，但在 11 月中旬均能完成第一階段之研究。本研究第二階段及針對第一階段接受榮陽治肝湯中，肝指數 ALT/AST 有下降或 HCV RNA 有下降 2 個 log 以上者，為了瞭解其服用六個月之較長療效而進行第二階段治療。目前總共收集 13 位符合進入第二階段條件之慢性 C 型肝炎病人，預計 103 年中旬將有完整之結果。

102 年第二期研究榮陽治肝湯治療慢性 C 型肝炎，8/10 位(80%)病人血中 HCV RNA 於四週時濃度有下降，但治療快速病毒反應 (rapid virological response，完全偵測不到病毒) 仍為 0 位，至於有 4 位追蹤至第 3 個月 (第十二週) 有 2 位達到部份治療早期病毒反應 (partial early virological response) 立即病毒 HCV RNA 濃度下降 2 個 log 以上。第二期研究可證實第一期之發現榮陽治肝湯有抑制病毒 HCV RNA 之療效，唯目前研究尚在進行中，待研究完成之後當可有更完整之資料分析。

榮陽治肝湯中之包含龍膽瀉肝湯、加味逍遙散、丹參及厚朴等研究用藥皆為衛生福利部核准上市之中藥，且研究藥物包括治療中藥 (榮陽治肝湯) 及安慰劑，均委託合格 GMP 中藥廠—科達製藥股份有限公司製造，四味中藥中唯龍膽瀉肝湯藥方偏苦寒恐傷胃氣，凡脾胃虛寒，大便溏瀉者慎用，可能之副作用包括輕微腹瀉、腸胃不適等症狀。本研究受試者中服用榮陽治肝湯，只有二位有短暫輕微腹瀉及腸胃不適等症狀，這亦是榮陽治肝湯成分四味中藥常見副作用，可見榮陽治肝湯用於慢性 C 型肝炎病人是安全的。

榮陽治肝湯中之龍膽瀉肝湯、加味逍遙散及丹參有清熱、疏肝鬱利脾及活血化瘀等作用，臨床上使用可以明顯降低濕熱蘊結及肝鬱脾虛證型，但未能對臨床疲倦及生活品質量表有改善，值得進一步探討其原因。

## 伍、結論與建議

102 第二期之研究結果可證實第一階段之發現榮陽治肝湯有抑制病毒 HCVRNA 之療效，唯目前研究尚在進行中，待研究完成之後當可有更完整之資料分析。研究中榮陽治肝湯且明顯改善中醫之濕熱蘊結及肝鬱脾虛證型，<sup>22,23</sup> 值得進一步探討其原因並進行進一步大型之臨床研究。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP102-RD-109 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. Weiner AJ, Kuo G, Bradley DW et al. Detection of hepatitis C virus sequences in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1990;335:1-3.
2. Houghton M, Weiner A, Han J et al. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* , 1991;14:381-8.
3. Ray KW. Global epidemiology and burden of hepatitis C. *Microbes & Infection* 2002;4:1219-25.
4. Seeff LB. Natural history of hepatitis C. *Hepatology* 1997;6:S21-8.
5. Liang TJ, Rehermann B, seeff LB, Hoofnagle JH. Pathogenesis, natural history, treatment and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med* 2000;132:296-305.
6. Lee SD, Chan CY, Wang YJ et al. Seroepidemiology of hepatitis C virus infection in Taiwan. *Hepatology* 1991;13:830-3.
7. Hwang SJ. Hepatitis C virus infection: an overview. *Journal of Microbiology, Immunology & Infection* 2001;34:227-34.
8. Chen Ds, Kuo GC, Sung JL et al. Hepatitis C virus infection in an area hyperendemic for hepatitis B and chronic liver disease: the Taiwan experience. *J Infect Dis* 1990;162:817-22.
9. Poynard T, Leroy V, Cohard M et al. Meta-analysis of interferon randomized trials in the treatment of viral hepatitis C: effect of dose and duration. *Hepatology* 1996;21:778-89.
10. Tong MJ, Hwang SJ, Lefkowitz M et al. Correlation of serum HCV RNA and alanine aminotransferase levels in chronic hepatitis C patients during treatment of ribavirin. *J Gastroenterol Hepatol* 1994;9:587-91.
11. Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004;140:346-55.
12. Rumi MG, Aghemo A, Prati GM, et al. Randomized study of peginterferonalpha2a plus ribavirin vs peginterferonalpha2b plus ribavirin in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2010;138:108-15.
13. McHutchison JG, Lawitz EJ, Shiffman ML, et al. Peginterferon alfa-2b or

- alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. *N Engl J Med* 2009;361:580-93.
14. Ghany MG, Nelson DR, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB; An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. 2011 ;54:1433-44.
  15. Sarrazin C, Hézode C, Zeuzem S, Pawlotsky JM. Antiviral strategies in hepatitis C virus infection *J Hepatol.* 2012;56 Suppl 1:S88-100.
  16. Zeuzem S, Andreone P, Pol S, et al. Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N Engl J Med* 2011;364:2417-28.
  17. Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, et al; Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med.* 2011 Mar 31;364(13):1207-17.
  18. 肝病用藥十講·尹常健，中國中醫藥出版社，1998
  19. 新看仁齋直指·楊士瀛、朱崇正，新聞豐出版社，1982
  20. 中醫內科學·張伯實，知音出版社，1989
  21. 中醫如何診治肝病·馬光亞，九思出版社，1998
  22. 高尚德，常見疾病症型診斷基準 (3-2)-慢性 C 型肝炎中醫證型診斷基準研究·*Yearbook of Chinese Medicine and Pharmacy* 2004:22:61-106.
  23. 林宏任，五種常見疾病中醫證型診斷基準之研究 (3-1)-慢性 B 型肝炎中醫證型診斷基準·*Yearbook of Chinese Medicine and Pharmacy* 2004:22:107-176.
  24. Huang, R.L., Chen, C.C., Huang, H.L., Chang, C.G., Chen, C.F., Chang, C., Hsieh, M.T., Anti-hepatitis B virus effects of wogonin isolated from *Scutellaria baicalensis*. *Planta Medica.* 2000;66:694-8.
  25. Kakuda, R., Iijima, T., Yaoita, Y., Machida, K., Kikuchi, M., 2002. Triterpenoids from *Gentiana scabra*. *Phytochemistry* 59, 791-94.
  26. Kim, J.K., Oh, S.M., Kwon, H.S., Oh, Y.S., Lim, S.S., Shin, H.K., Anti-inflammatory effect of roasted licorice extracts on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in marine macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006;345:1215-23.
  27. Kim, S.S., Son, Y.O., Chun, J.C., Kim, S.E., Chung, G.H., Hwang, K.J., Lee, J.C., Antioxidant property of an active component purified from the leaves

- of paraquat-tolerant *Rehmannia glutinosa*. *Redox Rep* 2005;10: 311-8.
28. Koo, H.J., Song, Y.S., Kim, H.T., Lee, Y.H., Hong, S.M., Kim, S.J., Kim, B.C., Jin, C., Lim, C.J., Park, E.H., Anti-inflammatory effects of genigin, an active principle of gardenia. *European Journal of Pharmacology* 2004;495: 201-8.
  29. Ling, S., Dai, A., Guo, Z., Yan, X., Komesaroff, P.A., Effects of a Chinese herbal preparation on vascular cells in culture, mechanism of cardiovascular protection. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2005; 32:571-8
  30. Matsuda, H., Tomohiro, N., Yoshikawa, M., Kubo, M., Studies of *Alismatis Rhizoma*. II. Anti-complementary activities of methanol extract and terpene components from *Alismatis Rhizoma* (dried rhizome of *Alisma orientale*). *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 1998;21:1317-1321.
  31. Mikamo, H., Kawazoe, K., Izumi, K., Sato, Y., Tamaya, T., Therapeutic effects of herbal medicines (Juzen-Taiho-To and Ryutan-Shakan-To) in a rat intrauterine infection (pyometra) model. *Curr Thera Res* 1997;58:454-58.
  32. Mikamo, H., Kawazoe, K., Izumi, K., Sato, Y., Tamaya, T., Effects of crude herbal ingredients on intrauterine infection in a rat model. *Curr Thera Res* 1998;59:122-27.
  33. Park, E., Kum, S., Wang, C., Park, S.Y., Kim, B.S., Schuller-Levis, G., Anti-inflammatory activity of herbal medicines, inhibition of nitric oxide production and tumor necrosis factor-alpha secretion in an activated macrophage-like cell line. *American Journal of Chinese Medicine* 2005;33:415-24.
  34. Ushiroyama, T., Ikeda, A., Sakuma, K., Ueki, M., Changes in serum tumor necrosis factor (TNF-alpha) with kami-shoyo-san administration in depressed climacteric patients. *American Journal of Chinese Medicine* 2004;32:621-9.
  35. Wu, S.J., Ng, L.T., Lin, C.C., Antioxidant activities of some common ingredients of traditional Chinese medicine, *Angelica sinensis*, *Lycium barbarum* and *Povia cocos*. *Phytotherapy Research* 2004;18:1008-12.
  36. Zhou, L., Zuo, Z., Chow, M.S., Danshen, an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. *J Clin Pharmacol*

2005;45:1345-59.

37. Chen FP, Kung YY, Chen YC, Jong MS, Chen TJ, Chen FC, Hwang SJ. Frequency and pattern of prescriptions Chinese herbal medicine for chronic hepatitis in Taiwan. *J Ethnopharmacol* 2008 ;117:84-91.
38. Liu JP, Manheimer E, Tsutani K, Gluud C. Medicinal herbs for hepatitis C virus infection: A Cochrane Hepatobiliary systematic review of randomized trials. *Am J gastroenterol* 2003;98:538-44.
39. Batey R, Bensoussan A, Fan YY, Bollipo S, Hossain M. Preliminary report of a randomized, double-blind placebo-controlled trial of a Chinese herbal medicine preparation CH-100 in the treatment of chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:244-7.
40. Chen , Han XY, Miao YX, et al. Clinical study of Bingganling for treatment of hepatitis C. *Hebei Journal of Traditional Chinese Medicine* 1998;20:137-8.
41. Gastaminza P, Whitten-Bauer C, Chisari FV. Unbiased probing of the entire hepatitis C virus life cycle identifies clinical compounds that target multiple aspects of the infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:291-6.
42. Lan KH, Wang YW, Lee WP, Lan KL, Tseng SH, Hung LR, Yen SH, Lin HC, lee SD. Multiple effects of honokiol on the life cycle of hepatitis C virus. *Liver Int* 2012 (in press)

柒、圖、表

表一、第二期研究病人肝指數(ALT/AST)及血中 HCV RNA 之變化

編號	療程	ALT	AST	HCV RNA
R001	治療前 V0 102/06/25	92	54	110000
	治療後 V1 102/07/25	99	47	17400
	治療後 V2 102/08/23	126	62	—
	治療後 V3 102/09/24	91	52	628
R004	治療前 V0 102/06/28	58	48	7270000
	治療後 V1 102/07/26	59	49	418000
	治療後 V2 102/08/30	82	64	—
	治療後 V3 102/09/27	67	57	39200
R006	治療前 V0 102/07/16	54	44	12900000
	治療後 V1 102/08/13	41	34	8250000
	治療後 V2 102/09/11	35	30	—
	治療後 V3 102/10/16	32	30	3700000
R007	治療前 V0 102/08/05	59	59	2260000
	治療後 V1 102/09/02	57	56	203000
	治療後 V2 102/10/07	78	55	—
	治療後 V3 102/11/04	80	72	422000
R008	治療前 V0 102/07/22	80	74	243000
	治療後 V1 102/08/19	125	114	399000
	治療後 V2 102/09/16	64	67	—
	治療後 V3 102/10/14	57	63	72600
R009	治療前 V0 102/08/05	479	215	265000
	治療後 V1 102/09/02	223	80	1030
	治療後 V2 102/10/08	39	29	—
	治療後 V3 102/11/11	35	26	305
R011	治療前 V0 102/07/31	100	76	4280000
	治療後 V1 102/08/28	121	91	1320000
	治療後 V2 102/09/25	102	73	—

編號	療程	ALT	AST	HCV RNA
	治療後 V3 102/10/22	132	90	853000
R012	治療前 V0 102/08/09	28	31	13000000
	治療後 V1 102/09/10	42	40	15100000
	治療後 V2 102/10/08	37	32	—
	治療後 V3 102/11/07	34	32	4070000
R016	治療前 V0 102/08/20	58	48	8340000
	治療後 V1 102/09/17	35	30	808000
	治療後 V2 102/10/23	49	43	—
	治療後 V3 102/11/20			
R018	治療前 V0 102/07/30	98	73	841000
	治療後 V1 102/08/27	59	45	1120000
	治療後 V2 102/09/24	81	68	—
	治療後 V3 102/11/29			
R020	治療前 V0 102/08/14	82	72	25800000
	治療後 V1 102/09/11	91	89	4280000
	治療後 V2 102/10/09	101	92	—
	治療後 V3	退出		
R024	治療前 V0 102/10/07	75	54	846000
	治療後 V1 102/11/06	104	67	1130000
	治療後 V2 102/12/04			
	治療後 V3 103/01/02			
R025	治療前 V0 102/10/09	317	229	5250000
	治療後 V1 102/11/06	264	168	5250000
	治療後 V2 102/12/04			
	治療後 V3 103/01/02			

## 建構中西醫合作治療癌症研究平台(2-2)

陳方佩、邱仁輝  
臺北榮民總醫院

### 摘要

隨著西方醫學科技的進步，明確診斷與治療的方針已經成為全世界上癌症防治上的共識(NCCN 癌症治療共識)。但是癌症病患因治療期間所產生的副作用，已經嚴重地影響到病患的生活品質，也造成全球補充替代療法(complimentary and alternative medicine, CAM)或整合醫學盛行的趨勢。如何結合現代醫學與傳統中醫的菁華，應用於癌症的治療，是一重要且極待解決的課題。

這是一個兩年期計劃的第二年，為了延續第一年中西醫整合治療癌症門診，第二年度則進入住院病人的中西治療癌症會診制度的建立。報告中包含了臨床、教學與研究。(一) 臨床實務方面，針對住院癌症病人，由西醫確診住院之後，經西醫師會診中醫，經由中醫的辨症(辨證)論治，雙方面依序討論出治療共識，並分別開列治療方針與處方。(二) 教學方面，在第二年期間，定期舉辦中醫對癌症治療有幫助的相關課程。(三) 研究方面，從2013年8月至2013年11月22日，在臺北榮總住院之癌症病患使用住院會診中醫者共有22人次，使用中藥者共收案7人，同期間本研究無使用中藥之對照組共收案2人。由於計畫收案時間過於短暫，使用本平台後的分析結果，仍需進一步追蹤。

隨著時代的進步，癌症病患對治療期中所需要的支持與幫助，都有極高的期待與盼望。本計劃所提的中心思想，乃是藉著中醫與現代醫學互補，找到具有實證(evidence-based)，又對病人較無傷害(favorable benefit/risk ratio)的癌症治療方針，以期在未來能對癌症病人找到最具成本效益的中西醫合作治療照護的常規模式。

關鍵詞：癌症、中醫、整合醫療、實證

# **Platform Establishment of Integrative Chinese-Western Medical Treatment for Cancer Patients (2-2)**

Fang-Pey Chen, Jen-Hwey Chiu  
Taipei Veterans General Hospital

## **ABSTRACT**

There is consensus that cancer treatment in modern medicine or Western medicine follows the generally accepted NCCN guideline. However, cancer patients seek complementary & alternative medicine (CAM) to relieve their discomfort or mental stress induced by modern medicine. How to integrate TCM and modern medicine in treatment of cancer patients remains a challenging problem and an important issue in Taiwan.

This is the 2<sup>nd</sup> year of this project. In the 2<sup>nd</sup> year project, the platform that has been well established at the end of 1<sup>st</sup> year is applied in hospitalized patients. On clinical aspect, a platform for both TCM and modern medicine doctors to care hospitalized cancer patients is established, which is based on a common language from patient's chief complaints and a definite diagnosis provided by an international ICD-9 code, followed by treatment plans proposed by each specialists. On teaching aspect, education programs in TCM provided for those medical and paramedical personnel. On research aspect, there were 22 hospitalized patients followed from Aug. 2013 to Nov. 2013. Among these patients, there were 7 patients with TCM, while there were 2 patients for controlled group. Due to time limited, more patients and longer duration are needed to complete the study.

The results of this 2-year project will provide an impact on TCM and modern medicine doctors and also provide an evidence-based health care for those patients with different cancers in Taiwan.

Keywords: cancer, Chinese medicine, integrative medicine, evidence-based

## 壹、前言

隨著西方醫學科技的進步，明確診斷與治療的方針已經成為全世界上癌症防治上的共識 (National Comprehensive Cancer Network, NCCN 癌症治療共識)。但是癌症病患因治療期間所產生的副作用，已經嚴重地影響到病患的生活品質，許多癌症病人因此去尋找現代醫學以外的醫療系統以改善症狀或是心理的慰藉。根據美國國家補充及另類療法研究中心(NCCAM)的定義，非慣用醫療(unconventional medicine)，是相對於現今主流醫學(西醫或現代醫學)的名稱，包含了五大部分。1. 另類醫療。2. 身心醫學(Body-mind intervention)。3. 生物性療法。4. 肢體操作療法。5. 能量醫學。根據一九九七年的統計，接近百分之四十的病人，一年約六億兩千九百萬人次，消費達二百一十億美元用於非慣用療法，而最重要的是百分之五十以上的金額出自病人的自費項目。(1) 造成如此大的使用量，就其原因有三。其一，病人的迫切需求：病人在心理上或實際生理上，感覺到現今主流醫學在治療疾病(尤其是癌症)種種層面上的不滿與不足。其二，廠商的大力推銷。其三，衛生單位的樂見其成。

即便如此，傳統中醫在臺灣已經存在許久(2)，有著嚴謹的教育制度與法律規範。因此如果依 NCCAM 的定義，補充另類療法是當今社會無法律規範也沒有教育制度的醫療系統，然而傳統中醫在臺灣是被認可具有正統性，不屬於補充另類療法的。相較於中國大陸的醫療制度中，中西醫整合的醫療系統比較混亂，臺灣的中醫與西醫則分別有嚴謹的規範，是有其重要的歷史背景與應用價值。

### 現行整合醫療的情況

	國外	台灣	大陸
內容	CAM	中醫/西醫分治	中西醫結合
中醫佔 CAM比例	< 10%	70%	90%
保險給付	沒有	有	有

一般而言，癌症是危害人類生命甚鉅的一種疾病。國內外的專家學者都致力於尋求解決各種癌病患的臨床問題。以乳癌為例，目前全世界的醫師對乳癌的治療已具有全球廣泛的共識，臺灣健保局乳癌醫療給付改善方案試辦計畫，在各醫院已經結合外科、血液腫瘤科、放射腫瘤科、放射診

斷科、病理科、整形外科、復健科、營養師等多專科整合醫療團隊開始運作。針對乳癌病例治療前診斷、分期、治療狀況、治療新知分享、乳癌治療品質指標等，更加能促進乳癌治療的照護品質，再加上個案管理師提供定期的追蹤及諮詢，可提高病人對治療的遵從性。

然而，為了尋求症狀的改善，許多癌症病人自行尋求補充另類療法的比例越來越高。根據國外統計，約有三分之一的病人會使用補充另類療法，但這種比例在乳癌病人更高。(3-5)反觀在臺灣，中醫藥的使用有其傳統文化社會背景，因此中醫藥佔臺灣使用補充另類療法約百分之七十。(2) 根據國人的健保資料庫顯示，臺灣有使用中醫藥的比例在攝護腺癌、肝癌及乳癌病人分別為 24.9-26.9% (6,7)，25% (8)，35.6% (9)。但是由於中國傳統醫學在華人地區早已融入民眾的生活中，然而對草藥的概念而言，中國人常有吃中草藥可以「有病治病，沒病強身」的錯誤觀念。除此之外，國人尋訪中醫幾乎未曾也不敢讓西醫的主治醫師知道，造成中醫與西醫在治療上面的困擾，甚至在中藥合併使用西藥時，是否有造成可能的交互作用，都是會影響癌症治療上的重要考量。(10,11)

近年來，中醫與西醫在政策上或實質上的溝通有著重大的進展。許多醫療院所都有中西醫聯合門診。但是由於在觀念上及實際執行上(如健保給付等細節問題)，此種門診大多是病人分別看診中醫與西醫，中醫師與西醫師在病情上並無實質溝通，造成病人的看診負擔與醫師之間的誤會。實際上，如何讓中醫師與西醫師在面對同一病人時，可於問診與治療處方時相互溝通，給病人方便，是一重要且極待改善的課題。本計劃提出 1. 中西醫同時看病人，2. 中西醫有溝通的門診或會診平台，應是臺灣中西整合治療癌症病人的良好模式。

為了提供良好的中醫與西醫配合的癌症治療策略，過去我們已經著手癌症整合醫療臨床實務的討論與執行，發現中西醫整合治療乳癌病人，經過針灸的治療，不僅在症狀的程度上有改善，在心理上也有極大的助益。但是這都是初步的結果，需要一個合理可行的中西整合治療癌症平台的建立，才能找到合適的臨床路徑。本計劃所提的中心思想，乃是藉著中醫與現代醫學互補，找到具有實證(evidence-based)，又對病人較無傷害(favorable benefit/risk ratio)的癌症治療方針，以期在未來能對癌症病人找到最具成本效益的中西醫合作治療照護的常規模式。

## 貳、材料與方法

一、住院癌症病人，經過辨病(診斷)之後，分別經過中醫(辯證論治)及西醫(診斷治療)的雙向溝通，提出共同治療的共識與治療方針。由研究人員解釋研究內容後，簽署同意書，並於使用中藥前、使用後一個月、六個月及十二個月追蹤檢驗血清中女性相關的荷爾蒙，例如女性荷爾蒙(E2)及卵巢刺激素(FSH)。若非乳癌病患，則改以檢測相關的腫瘤指標(tumor markers)。(如圖一)

### 二、受試者數目

第二年預計收集 40 名受試者，一組(20 名)會診中醫要求服用中藥者，另一組(20 名)無服用中藥之對照組，參與中西醫會診整合計畫。截至 2013 年 10 月 30 日，共收案 7 人(其中實驗組 5 人，對照組 2 人)。

### 三、選擇標準

(一)納入條件：自 102 年 1 月至 102 年 12 月，在台北榮總治療的癌症病患，不分何種癌症，不分期數(stage 0, 1, 2, 3, 4)，年齡 20 歲至 80 歲，住院會診主動要求使用中藥的病患。

(二)排除條件：孕婦，有慢性肝病(Bilirubin>2mg/dl)，慢性腎病(Creatinine>2mg/dl)，急性心肌梗塞病患，裝置心律調節器的病患，非癌症病患、癌症末期有合併心肺衰竭之重症病患，高度傳染患者，術後經精神科診斷為憂鬱的病患及個案不願簽署同意書者將予排除。

(三)病人問卷如附錄一、二、三。

(四)相關配合檢驗：於中藥使用前，使用一個月，六個月及十二個月檢驗血清中腫瘤標記指數、女性荷爾蒙(E2)及卵巢刺激素(FSH)、甲型胎兒蛋白 AFP( $\alpha$ -Fetoprotein)、前列腺特異抗原(PSA)、CEA、CA19-9、CA125 等。

## 參、結果

第二年以建構中西醫整合會診（住院）平台為主。

### 一、臨床實務方面

住院癌症病人，經過辨病（診斷）之後，分別經過中醫（辨證論治）及西醫（診斷治療）的雙向溝通，提出共同治療的共識與治療方針。於 102 年 5 月確立臺北榮總中西醫癌症會診流程：(1)西醫主治醫師同意開立會診傳統醫學科醫囑。(2)電話聯絡傳統醫學科會診管理師，了解病情，並安排會診醫師與會診時段，同時聯絡研究人員。(3)一般病患至傳統醫學科門診，特殊病患由醫師至病房看診。(4)出院後請病人至中醫門診追蹤。（如圖二）

### 二、教學方面

本院利用此平台，共同舉行中西醫癌症整合醫療臨床實務討論會，於第二年（102 年）三月份講題為常用中藥對乳癌細胞 HER2 及 ER-alpha 表現的影響，四月份講題為同心緣乳癌病友團體經驗分享，五月份講題為中醫草藥與癌症治療，六月份講題為淺談乳癌病患使用中草藥及保健食品之安全性，八月份講題為化療引致噁心嘔吐非藥物處置群集照護成效，九月份講題為癌症患者的心理照顧（詳如表一），於 2013 年 11 月 22 日在臺北榮總舉辦癌症非藥物處置研習會，主題包含癌症的中西醫整合醫療概況、中醫經絡與穴位按摩、芳香療法及正念冥想在癌症中的應用（詳如表二），參與人員共 90 人。本次研討會以發放問卷形式評估其成效，共發放 90 份，回收 80 份，回收率 88.9%。在基本資料方面，於臺北榮總服務的人居多（90.00%），其他有志工與病友，佔 10.00%；年齡多為 30-39 歲（37.50%），其次為 20-29 歲（25.00%）；職務以護士最多（31.25%），其次為護理師和契約護士（分別佔 23.75%、21.25%），工作年資 10-14 年者佔 22.5%（最多），1-2 年者次之（17.50%）；參與動機主要為工作需要及單位指派，佔 30.00%，顯示臺灣的醫護人員對癌症的另類輔助療法有其需求性，以其吸收更多相關知識充實自身能力。對於課程的了解程度及滿意度方面，癌症的中西醫整合醫療現況中，了解度達 96.25%，滿意度達 95.00%；中醫經絡與穴道按摩中，透過操作的了解程度與理論課相當，同有 96.25%，操作課（95.00%）的滿意程度高於理論課（93.75%）；芳香療法課程教授中，理論闡述（98.75%）的了解度高於實際操作（94.32%），而滿意度相同，皆達 96.25%；在正念冥想課程中，冥想操作（98.75%）的了解度高於解說課程（97.50%），但滿意度卻相反；對於課程內容設計，覺得符合需要又有收穫者達 98.75%；對於此次研

討會最大的收穫為可應用在工作上及生活上並增加個人知識(75.00%)，第二為可應用在生活上並增加個人知識(12.50%)。會後建議有希望可多多安排研討會課程，並於課程中加入中醫穴位按摩和正念冥想進階課程(分析資料詳如表三)，以上結果可以看出幾點：(1)參會人員多為醫護人員，一般民眾佔極少數，期許往後舉辦此類研討會朝向普及化發展；(2)與會人員對實際操作課程的參與度較高，可以推測是醫護人員工作上的需求，以期透過操作應用加深對理論的理解，而能夠明確地向病患及其家屬傳達。同時並規劃臨床中西藥物合併治療之藥物資訊，由專病臨床中西藥合併治療之藥物資訊，建立臨床中西藥物合併治療之藥物資訊架構。根據所提治療臨床路徑，建立中西整合治療癌症的護理照護常規。

### 三、研究方面

從 2013 年 8 月至 2013 年 11 月 22 日，在台北榮總住院之癌症病患使用住院會診中醫者共有 22 人次，使用中藥者共收案 7 人(其中口腔癌 1 人，大腸癌 1 人，腹膜癌 1 人，胃癌 1 人、喉癌 1 人、鼻咽癌 1 人和胰臟癌 1 人)，平均年齡 57 歲。同期間本研究無使用中藥之對照組共收案 2 人(其中乳癌 1 人及食道癌 1 人)，平均年齡 53.5 歲(受試者基本資料詳如表三)。

將受試者資料歸納整理，初步看到使用中藥之 7 名受試者，不分何種癌症，經由西醫確診住院之後，皆接受西醫規範治療：單用手術根除者 2 人、手術根除合併化療者 1 人、手術根除合併化療及放療(電療)者 1 人、手術根除合併化療、放療(電療)與標靶治療者 1 人、合併化療和放療(電療)者 1 人及合併化療與標靶治療者 1 人，但因其為非乳癌患者，而排除荷爾蒙治療。7 名癌症受試者所使用之西醫抗癌藥物，化療藥物包括 Paclitaxel、Cisplatin、Fluorouracil-5 及 Leucovorin，標靶治療藥物包含 Gemcitabine 與 Erlotinib，其共同的副作用有噁心和嘔吐等胃腸道反應、免疫力降低、疲倦或焦慮等全身不適症狀，而現代醫學採取的治療措施為對症處理，有鎮痛(Morphine HCl 與 Ultracet)、調整腸胃道功能(Metoclopramide)、補充液(Taita No. 3)和抗焦慮藥物(Lorazepam)。此 7 名受試者為加強自己的免疫能力、減輕西醫治療帶來的副作用及使癌症痊癒(考慮使用中醫的目的前三名)要求會診中醫使用中藥(使用中醫的目的詳如表四)，中醫結合辨病與辯證雙原則論治，常用方劑包括散腫潰堅湯、真人活命飲以軟堅散結消瘀，使用半枝蓮、蛇舌草、蒲公英等具有抗癌藥理的中藥，加上兼證治療：以香砂六君子湯促進腸胃蠕動或甘麥大棗湯鎮靜安眠等，以求整體治療的效果(服用之中西藥詳如表五)。在生活品質方面，

由於個案數不足，無法將癌症病人的期數，末期影響評估的干擾因素排除。由於個案數不多，若要達到分層分析，必須要有夠長的時間(通常一年至兩年)與足夠的個案數，方能適當的執行之。

## 肆、討論

延續第一年中西醫整合治療癌症門診，第二年度進入住院病人的中西治療癌症會診制度的建立。臨床實務方面，針對住院癌症病人，以確立完整的住院中西醫會診平台。教學方面，延續第一年的中西整合治療癌症門診的經驗，在第二年期間，定期舉辦中醫對癌症治療有幫助的相關課程，並加強實證的臨床教學課程並提供中醫教學與中醫護理及中醫藥交互作用的教育課程，參與的人包含西醫各科部，護理部，藥劑部，社工及病友會等。

研究方面，本研究計畫第二年度規畫，遵循衛生署中醫藥委員會委員審查建議，變更研究設計：住院會診增加 20 名對照組受試者。從 2013 年 8 月至 2013 年 11 月 22 日，在台北榮總住院之癌症病患使用住院會診中醫者共有 22 人次，使用中藥者共收案 7 人（其中口腔癌 1 人，大腸癌 1 人，腹膜癌 1 人，胃癌 1 人、喉癌 1 人、鼻咽癌 1 人和胰臟癌 1 人），平均年齡 57 歲。同期間本研究無使用中藥之對照組共收案 2 人（其中乳癌 1 人及食道癌 1 人），平均年齡 53.5 歲。

由於時間較短，僅將受試者資料歸納整理，看出住院癌症病患使用中醫會診者，不分何種癌症，以第 3、4 期病人為主（第 2 期 1 人，第 3 期 3 人，第 4 期 3 人），且未住院前皆有使用中藥的經驗。而個案數不足的原因，有幾點可解釋：(1)由於 IRB 審查在 2013 年 8 月 14 日通過，造成計畫執行與收案時間較短；(2)住院病人會診率低，答因於醫院的特性，由門診收住入院確診的癌症病患，於住院期間完成各項必要檢驗，以供醫師訂定治療方案（如手術，或放療、化療）於下次回診施用，導致住院期間過於短暫，無法收到足夠個案數。(3)西醫主治醫師對於中西醫整合醫療的知識不充足，無法對病人提出具體的醫療建議；(4)病患對中西醫會診治療的需求，因住院期間長期使用抗癌藥物，會診要求使用中藥之法，對中西藥交互作用懷有存疑，而改以針灸方式以改善局部不適症狀。若要達到完整的分層分析，必須要有夠長的時間（通常一年至兩年）與個案數，並加強中醫與西醫的互相溝通，方能適當的執行之。

## 伍、結論與建議

本年度計劃延續第一年中西醫整合治療癌症門診，第二年度進入住院病人的中西治療癌症會診制度的建立，由於時間短暫，再者醫院的特性，由門診收住入院確診的癌症病患，於住院期間完成各項必要檢驗，以供醫師訂定治療方案(如手術或放、化療)於下次回診施用，導致住院期間過於短暫，住院病人會診率低，個案數不足，無法立即看到病人在生活品質包括生理上或心理上的改善。

有鑑於此，建議住院癌症患者的中西醫治療研究計畫，可於具有中醫藥教學研究之醫學中心(如中國醫藥大學)實施之，理由如下：(1)醫院特性，中國醫藥大學為中西醫結合醫療機構，醫生普遍接受中西醫整合醫療教育，知識完善，可提供良好的中西醫整合醫療策略；(2)人文特色，中國醫藥大學地處中部，中部傳統文化濃厚，中醫治療接受度較北部高，中西醫合作治療較易推行。以期藉著中醫與現代醫學互補，找到具有實證，又對病人較無傷害的癌症治療方針，以期在未來能對癌症病人找到最具成本效益的中西醫合作治療照護的常規模式，也加強中醫與西醫的互相了解與信任。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP102-RD-110 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. Eisenberg DM et al. Unconventional medicine in the United States: Prevalence, cost and pattern of use. *N Eng J Med* 1993; 328:246-252.
2. Shih SF et al. Insurance covered and noncovered complementary and alternative medicine utilization among adults in Taiwan. *Soc Sci Med* 2008;67:1183-1189.
3. Ernst E & Cassileth BR. The prevalence of complementary & alternative medicine in cancer: a systematic review. *Cancer* 1998;83:777-782.
4. Lin YH, Chen KK, Chiu JH. Use of Chinese medicine among prostate cancer patients in Taiwan: A retrospective longitudinal cohort study. *Int J Urol.* 2011;18:383-386.
5. Lin YH, Chiu JH. Use of Chinese medicine among liver cancer patients in Taiwan. *J Altern Complement Med* 2010;16: 527-528.
6. Lin YH, Chiu JH. Use of Chinese medicine by women with breast cancer: A nationwide cross-sectional study in Taiwan. *Complement Ther Med.* 2011;19:137-143.
7. Chang CJ, Chiu JH, Tseng LM, Chang CH, Chien TM, Wu CW, Lui WY. Si-Wu-Tang and Its Constituents Promote Mammary Duct Cell Proliferation by Upregulation of HER-2-signaling. *Menopause* 2006;13:967-976.
8. Chang CJ, Chiu JH, Tseng LM, Chang CH, Chien TM, Wu CW, Lui WY. Modulation of HER2 expression by ferulic acid on human breast cancer MCF7 cells. *Eur J Clin Invest* 2006;36:588-596.
9. Fang-Pey Chen, Tzeng-Ji Chen, Yen-Ying Kung, Yu-Chun Chen, Li-Fang Chou, Fan-Jou Chen, Shinn-Jang Hwang. Usage frequency of traditional Chinese medicine in Taiwan. *BMC Health Serv Res.* 2007;7:26.
10. Chen FP, Kung YY, Chen YC, Jong MS, Chen TJ, Chen FJ, Hwang SJ. Frequency and pattern of Chinese herbal medicine prescriptions for chronic hepatitis in Taiwan. *J Ethnopharmacol.* 2008;17;117(1):84-91.
11. Fang-Pey Chen, Maw-Shiou Jong, Yu-Chun Chen, Yen-Ying Kung, Tzeng-Ji Chen, Fun-Jou Chen, Shinn-Jang Hwang. Prescriptions of Chinese herbal medicines for insomnia in Taiwan during 2002. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2009 Apr 1.

12. Maw-Shiou Jong, Shinn-Jang Hwang, Yu-Chun Chen, Tzeng-Ji Chen, Fun-Jou Chen, Fang-Pey Chen. Prescriptions of Chinese Herbal Medicine for Constipation under the National Health Insurance in Taiwan. *Journal of Chinese Medical Association*;73(7):375-383.

## 柒、圖、表

表一、癌症整合醫療臨床實務討論會題目

日期	講題	講員
102.3.19	常用中藥對乳癌細胞 HER2 及 ER-alpha 表現的影響	邱仁輝
102.4.16	同心緣乳癌病友團體經驗分享	林佩蓉
102.5.21	中醫草藥與癌症治療	賴東淵
102.6.18	淺談乳癌病患使用中草藥及保健食品之安全性	王苾如
102.7.	暫停一次	
102.8.20	化療引致噁心嘔吐非藥物處置群集照護成效	陳美碧
102.9.17	癌症患者的心理照顧	塗千慧
102.10.15	肺癌的中西醫互補療法	吳景崇

時間：每個月固定一次的星期二中午 12:30-13:30

地點：癌病中心中正樓地下一樓會議室

表二、舉辦癌症非藥物處置研習會議程表

時間	主 題	主講人
08:00~08:20	報到	齊珍慈護理長 羅家儀護理師 林信偵護理師 蕭玉雪護士
08:20~08:30	長官致詞	副院長
08:30~09:10	癌症的整合醫療現況	邱仁輝教授
09:10~10:00	中西醫治療癌症的經驗	許中華副教授
10:00~10:10	茶敘	
10:10~11:10	中醫經絡與穴位按摩	賴榮年副教授
11:10~12:00	穴位按摩實際操作	賴榮年副教授 明金蓮督導長
12:00~13:00	午餐	
13:00~13:40	芳香療法	林貴春執行長
13:40~14:30	芳香療法實際操作	林貴春執行長
14:30~14:40	茶敘	
14:40~15:30	正念冥想在癌症治療的角色	石世明臨床心理師
15:30~17:20	正念冥想實際操作	石世明臨床心理師
17:20~17:30	綜合討論	邱仁輝教授 賴榮年副教授 明金蓮督導長 林貴春執行長 許中華副教授 石世明老師 陳方佩主任

表三、共識會議結果分析

參與者基本資料(N=80)	人數	百分比
服務機關		
台北榮總	72	90.00
同心緣志工	5	6.20
病友	3	3.80
年齡		
20-29歲	20	25.00
30-39歲	30	37.50
40-49歲	17	21.25
≥50歲	13	16.25
職稱		
護理長	7	8.75
副護理長	2	2.50
護理師	19	23.75
護士	25	31.25
契約護理	17	21.25
其他	10	12.50
工作年資		
<1年	4	5.00
1-2年	14	17.50
3-4年	6	7.50
5-9年	11	13.75
10-14年	18	22.50
15-19年	6	7.50
20-24年	8	10.00
25-29年	5	6.25
≥30年	4	5.00
未填	4	5.00
最大收穫(複選)		
可應用在工作上	3	3.75
可應用在生活上	3	3.75

可增加個人知識	1	1.25
可應用在工作上及生活上	0	0
可應用在工作上並增加個人知識	3	3.75
可應用在生活上並增加個人知識	10	12.50
可應用在工作上及生活上並增加個人知識	60	75.00

#### 研討會內容評值(N=80)

人數 百分比

##### 參與動機(複選)

個人興趣	12	15.00
工作需要	0	0
單位指派	21	26.25
個人興趣及工作需要	12	15.00
個人興趣及單位指派	8	10.00
工作需要及單位指派	3	3.75
個人興趣及工作需要及單位指派	24	30.00

##### 課程內容(複選)

符合需要又有收穫	79	98.75
不符合需要但有收穫	1	1.25

##### 瞭解程度及滿意程度

##### (1)癌症的整合醫療現況

##### 瞭解程度

完全不瞭解	3	3.75
小部分瞭解	0	0
部分瞭解	7	8.75
大部份瞭解	46	57.50
完全瞭解	24	30.00

##### 滿意程度

普通	4	5.00
滿意	23	28.75
很滿意	53	66.25

##### (2)中醫經絡與穴位按摩

##### 瞭解程度

完全不瞭解	3	3.75
小部分瞭解	4	4.00
部分瞭解	13	16.25
大部份瞭解	45	56.25
完全瞭解	15	18.75
滿意程度		
普通	5	6.25
滿意	33	41.25
很滿意	42	52.50
(3)穴位按摩的臨床應用		
瞭解程度		
完全不瞭解	1	1.25
小部分瞭解	2	3.50
部分瞭解	13	16.25
大部份瞭解	43	53.75
完全瞭解	21	26.25
滿意程度		
普通	5	6.25
滿意	31	38.75
很滿意	44	55.00
(8)正念冥想實際操作		
瞭解程度		
完全不瞭解	1	1.25
小部分瞭解	3	3.75
部分瞭解	5	6.25
大部份瞭解	40	50.00
完全瞭解	31	38.75
滿意程度		
普通	5	6.25
滿意	23	28.75
很滿意	52	65.00

表五、使用中醫會診的主要目的

目的	人數	百分比
加強自己的免疫力	2	28.57
減輕西醫治療帶來的副作用	2	28.57
使癌症痊癒	2	28.57
減輕癌症的症狀	1	14.29

表六、病患接受之中西藥

(A) 抗癌西藥

名稱	藥理作用	副作用
Paclitaxel	毒殺破壞癌細胞，促使它們死亡。	致吐性；白血球低下、血小板減少及貧血的現象；可能會較容易感到疲勞。
Cisplatin	毒殺破壞癌細胞，促使它們死亡。	腎毒性；神經毒性；噁心、嘔吐。
Fluorouracil-5	毒殺破壞癌細胞，促使它們死亡。	致吐性；白血球低下、血小板減少及貧血的現象；可能會較容易感到疲勞。
Leucovorin	加強 5-Fu 的抗癌作用。	類過敏性反應和蕁麻疹。
Gemcitabine	毒殺破壞癌細胞，促使它們死亡。	致吐性；白血球低下、血小板減少及貧血的現象；可能會較容易感到疲勞。
Erlotinib	對於癌症的發展生長與轉移背後的控制系統，進行反調控。	皮疹、掉髮、疲倦、發燒。

### (B)對症處理之西藥

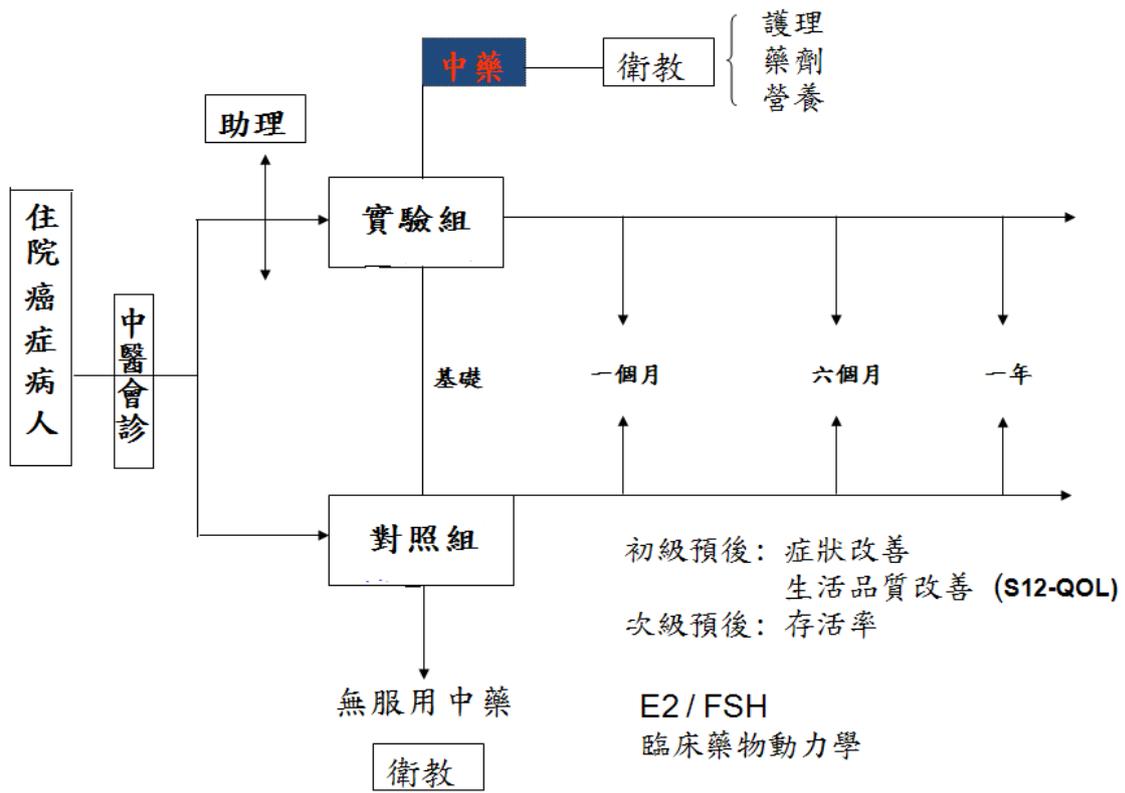
名稱	適應症	藥理作用
Morphine HCl	鎮痛。	通過作用於中樞神經組織內的立體結構特異的、可飽和的阿片受體而起效用。阿片類藥可選擇性地抑制某些興奮性神經的衝動傳遞，發揮競爭性抑制作用，從而解除對疼痛的感受和伴隨著的心理行為反應。
Ultracet	使用非鴉片類止痛劑無效的中度至嚴重性疼痛。	作用於中樞之止痛化合物。
Metoclopramide	預防嘔吐、逆流性消化性食道炎，糖尿病引起之胃腸蠕動異常。	可刺激上消化道的運動，加速胃部及十二指腸排空，並抑制嘔吐中樞，減緩嘔吐症狀。
Taita No. 3	水份、電解質、養份補充、維持液等張性下痢及真性糖尿病引起之酮病的治療。	為綜合電解質及基礎營養補充液。
Lorazepam	短期治療焦慮或失眠。	作用於 GABA 接受器，具有抗焦慮、鎮靜、抗痙攣等作用。

### (C)方劑

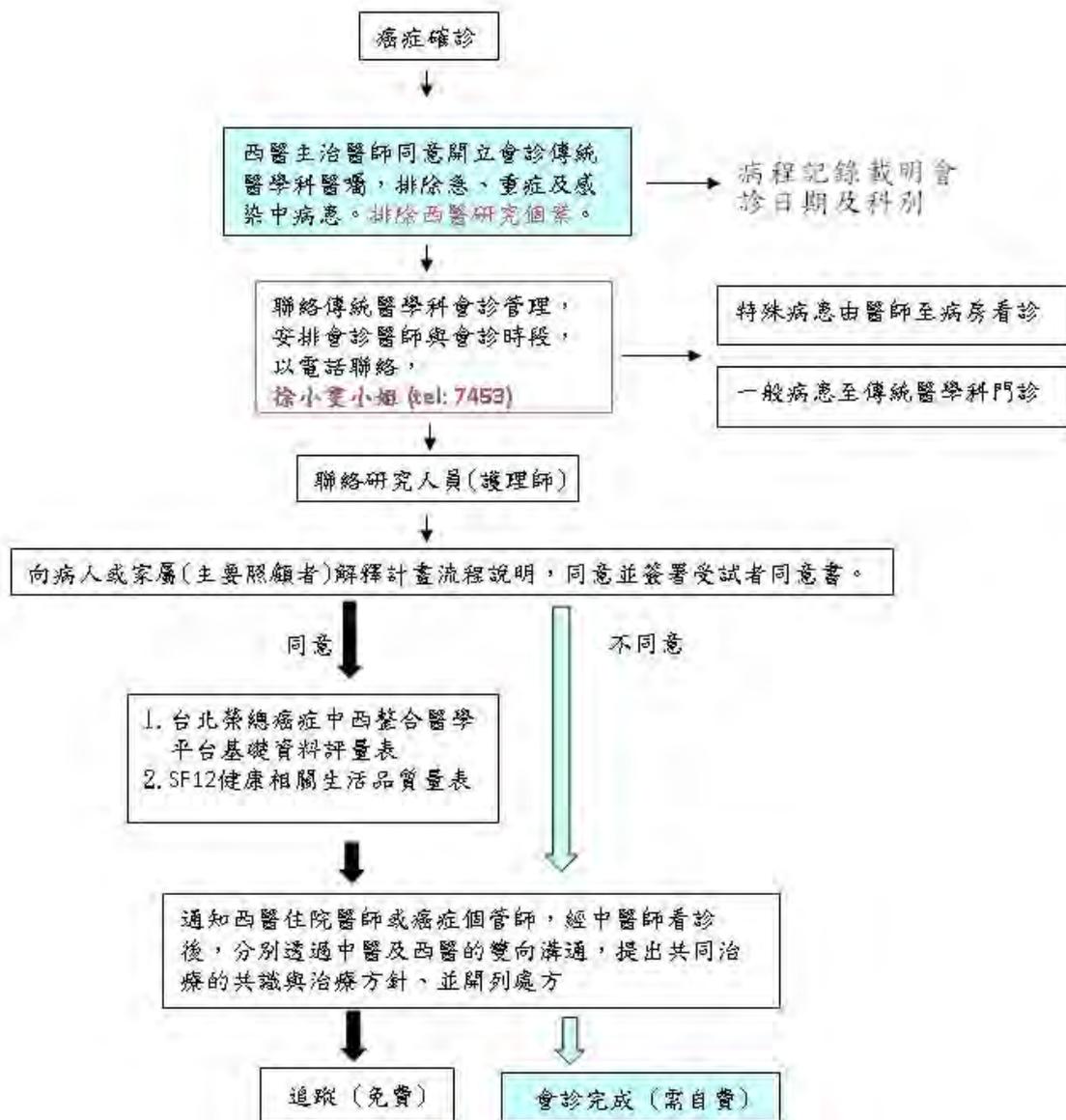
名稱	藥物組成	功效
散腫潰堅湯	黃芩、知母、黃柏、龍膽草、天花粉、桔梗、昆布、柴胡、升麻、連翹、甘草、三稜、莪朮、葛根、當歸尾、芍藥、黃連。	瀉火解毒、消堅散腫。
真人活命飲	金銀花、當歸、陳皮、防風、白芷、甘草節、天花粉、貝母、皂角刺、穿山甲、乳香、沒藥。	清熱解毒，消腫潰堅，活血止痛。

(D) 中藥

名稱	功效	藥理作用
半枝蓮	敗毒抗癌，消腫散結，祛瘀止血。	1. 對急性粒細胞型白血病血細胞有輕度的抑制作用。 2. 具有顯著的抗發炎、抗氧化與保肝作用。 3. 半枝蓮成分具有很好的抗血癌活性。
白花蛇舌草	清熱解毒，利濕通淋。	白花蛇舌草有抗腫瘤作用。給小鼠腹腔注射白花蛇舌草液可以出現鎮痛，鎮靜、催眠作用。
蒲公英	清熱解毒，消腫散結。	抗腫瘤作用類似 <u>香菇多糖</u> ，是通過 <u>免疫機制</u> 實現的。



圖一、研究流程



圖二、受試者流程

附錄一

臺北榮總中西醫學整合會診－基礎資料評量表

會診日期：\_\_\_\_年/\_\_\_\_月/\_\_\_\_日；編號：\_\_\_\_\_

一、基本資料

- [1] 連絡電話：(H)\_\_\_\_\_ (手機)\_\_\_\_\_
- [2] 教育程度：1未受正規教育 2國小/小學 3國(初)中 4高中(職) 5大專/大學  
6研究所級以上 7其它：\_\_\_\_\_
- [3] 婚姻狀況：1未婚/單身 2已婚/同居 3離婚/分居 4喪偶 5其它：\_\_\_\_\_
- [4] 宗教信仰：1無任何宗教信仰 2燒香、拜拜或是民間傳統信仰 3佛教 4道教  
5一貫道 6基督教 7天主教 8回教 9其它：\_\_\_\_\_

二、為了調查中西醫學整合治療癌症患者的效益，請回答您覺得最適合的答案。

[5] 在癌症治療過程中，您曾出現哪些不舒服的副作用？請依序選出三個分別填入(1)、(2)、(3)

(1) ( ) (2) ( ) (3) ( )

- ①疲倦 ②噁心 ③嘔吐 ④關節肢體疼痛 ⑤失眠 ⑥食慾降低 ⑦腹瀉 ⑧便秘 ⑨臉潮紅 ⑩掉頭髮  
⑪陰道出現分泌物或乾燥 ⑫白血球數目降低 ⑬內臟疼痛 ⑭焦慮不安 ⑮手臂水腫 ⑯骨質疏鬆  
⑰口腔炎或口乾舌燥 ⑱情緒低落 ⑲心悸 ⑳容易發怒 ㉑緊張 ㉒肌肉強度降低 ㉓頭痛 ㉔高膽固醇或高血脂 ㉕血栓 ㉖其它：\_\_\_\_\_

[6] 其中，您最想消除的3種副作用？請依序選出三個分別填入(1)、(2)、(3)

(1) ( ) (2) ( ) (3) ( )

- ①疲倦 ②噁心 ③嘔吐 ④關節肢體疼痛 ⑤失眠 ⑥食慾降低 ⑦腹瀉 ⑧便秘 ⑨臉潮紅 ⑩掉頭髮  
⑪陰道出現分泌物或乾燥 ⑫白血球數目降低 ⑬內臟疼痛 ⑭焦慮不安 ⑮手臂水腫 ⑯骨質疏鬆  
⑰口腔炎或口乾舌燥 ⑱情緒低落 ⑲心悸 ⑳容易發怒 ㉑緊張 ㉒肌肉強度降低 ㉓頭痛 ㉔高膽固醇或高血脂 ㉕血栓 ㉖其它：\_\_\_\_\_

[7] 您過去是否找過其他的治療方法來改善這些症狀？.....0否 1是 2其它：\_\_\_\_\_

承上題，答案為『是』者，請繼續下列的問題。



[8] 除了西醫的治療外，您目前開始合併使用下列的另類療法？

※請依註一內容，選擇適合的選項填入括號中

名稱	過去*有無使用	目前*有無使用	目前繼續使用情形 (註一) ①完全停止 ②很少 ③偶爾 ④常常
(1) 傳統中草藥	0 <input type="checkbox"/> 無 1 <input type="checkbox"/> 有	0 <input type="checkbox"/> 無 1 <input type="checkbox"/> 有	( )
(2) 針灸	0 <input type="checkbox"/> 無 1 <input type="checkbox"/> 有	0 <input type="checkbox"/> 無 1 <input type="checkbox"/> 有	( )
(3) 能量康復：氣功、太極拳	0 <input type="checkbox"/> 無 1 <input type="checkbox"/> 有	0 <input type="checkbox"/> 無 1 <input type="checkbox"/> 有	( )
(4) 民俗療法：推拿、刮痧	0 <input type="checkbox"/> 無 1 <input type="checkbox"/> 有	0 <input type="checkbox"/> 無 1 <input type="checkbox"/> 有	( )
(5) 健康食品(含保健食品)	0 <input type="checkbox"/> 無 1 <input type="checkbox"/> 有	0 <input type="checkbox"/> 無 1 <input type="checkbox"/> 有	( )
(6) 整脊療法：瑜珈	0 <input type="checkbox"/> 無 1 <input type="checkbox"/> 有	0 <input type="checkbox"/> 無 1 <input type="checkbox"/> 有	( )
(7) 按摩及芳香療法	0 <input type="checkbox"/> 無 1 <input type="checkbox"/> 有	0 <input type="checkbox"/> 無 1 <input type="checkbox"/> 有	( )
(8) 心靈康復，收驚	0 <input type="checkbox"/> 無 1 <input type="checkbox"/> 有	0 <input type="checkbox"/> 無 1 <input type="checkbox"/> 有	( )
(9) 催眠	0 <input type="checkbox"/> 無 1 <input type="checkbox"/> 有	0 <input type="checkbox"/> 無 1 <input type="checkbox"/> 有	( )

(10) 其它：_____	0 <input type="checkbox"/> 無 1 <input type="checkbox"/> 有	0 <input type="checkbox"/> 無 1 <input type="checkbox"/> 有	( )
---------------	---	---	-----

註一：使用頻率之情形如下：

- ①完全停止：不再使用      ①很少：一個月內使用一次  
 ②偶爾：一個月內使用二次    ③常常：一個月內使用四次以上

[9] 您會考慮使用這些另類療法最主要的目的是什麼？請依序選出三個分別填入(1)、(2)、(3)

(1) ( )                      (2) ( )                      (3) ( )

- ④使癌症痊癒    ①預防癌症復發    ②減緩癌症的進行    ③減輕癌症的症狀  
 ④減輕西醫治療帶來的副作用    ⑤加強西醫治療的效果  
 ⑥加強自己的免疫能力    ⑦因為他人的推薦介紹，所以姑且試一試  
 ⑧使他人安心    ⑨無    ⑩其它(請說明)：\_\_\_\_\_

### 三、整合醫療療程 1—問題列表及照顧計畫

[10] 病人主訴

※請依註二內容，選擇適合的選項填入括號中

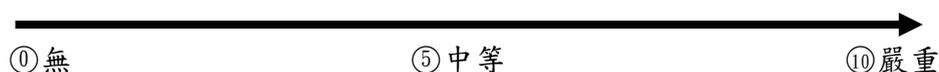
日期	優先處理的症狀 (註三)	註二：病人主訴，請選擇一個填入括號
	(1) ( )：主要症狀 (2) ( )：次要症狀 (3) ( )：第三症狀	①諮詢 ①疼痛 ②失眠 ③焦慮 ④腸胃道功能 ⑤更年期/停經 ⑥化療的副作用：噁心、嘔吐、白血球數目降低 ⑦免疫調節 ⑧關節肢體疼痛 ⑨無 ⑩其它：_____

[11] 症狀實際改善評估

※請依註三內容，選擇適合的選項填入括號中

初次症狀表現程度	追蹤症狀表現程度 (註三)
( ) 主要症狀 [10-1] 的分數	(a) ( ) 1 <sup>m</sup> (b) ( ) 3 <sup>m</sup> (c) ( ) 6 <sup>m</sup> (d) ( ) 12 <sup>m</sup>
( ) 次要症狀 [10-2] 的分數	(a) ( ) 1 <sup>m</sup> (b) ( ) 3 <sup>m</sup> (c) ( ) 6 <sup>m</sup> (d) ( ) 12 <sup>m</sup>
( ) 第三症狀 [10-3] 的分數	(a) ( ) 1 <sup>m</sup> (b) ( ) 3 <sup>m</sup> (c) ( ) 6 <sup>m</sup> (d) ( ) 12 <sup>m</sup>
( ) QOL	(a) ( ) 1 <sup>m</sup> (b) ( ) 3 <sup>m</sup> (c) ( ) 6 <sup>m</sup> (d) ( ) 12 <sup>m</sup>

註三：症狀表現程度量表，由①無→⑩嚴重，共 11 個等級，請選擇一個適當等級填入括號



[ 12 ] 檢驗數值紀錄

(1) 項目：女性荷爾蒙 E2

( / )0 : \_\_\_\_\_ ( / )1<sup>m</sup> : \_\_\_\_\_ ( / )3<sup>m</sup> : \_\_\_\_\_ ( / )6<sup>m</sup> : \_\_\_\_\_ ( / )12<sup>m</sup> : \_\_\_\_\_

(2) 項目：卵巢刺激素 FSH

( / )0 : \_\_\_\_\_ ( / )1<sup>m</sup> : \_\_\_\_\_ ( / )3<sup>m</sup> : \_\_\_\_\_ ( / )6<sup>m</sup> : \_\_\_\_\_ ( / )12<sup>m</sup> : \_\_\_\_\_

(3) 其他腫瘤指標 \_\_\_\_\_

( / )0 : \_\_\_\_\_ ( / )1<sup>m</sup> : \_\_\_\_\_ ( / )3<sup>m</sup> : \_\_\_\_\_ ( / )6<sup>m</sup> : \_\_\_\_\_ ( / )12<sup>m</sup> : \_\_\_\_\_

[ 13 ] 未完成的理由： \_\_\_\_\_



附錄三、MOS SF-12 健康相關生活品質

◎ 個案代碼： \_\_\_\_\_ or \_\_\_\_\_      ◎ 填表日期：\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日

1. 一般來說，您認為您目前的健康狀況是？(請僅勾選一項答案)

1. 極好的    2. 很好    3. 好    4. 普通    5. 不好

2. 下面是一些您日常可能從事的活動，請問您目前健康狀況會不會限制您從事這些活動？  
如果會，到底限制有多少？(每行請僅勾選一項答案)

活 動	1. 會, 受到很多限制	2. 會, 受到一些限制	3. 不會, 完全不受限制
a. 中等程度活動，例如搬桌子、拖地板、打保齡球、或打太極拳			
b. 爬數層樓樓梯			

3. 在過去四週內，您有多少時間曾因為身體健康問題，而在工作上或其他日常活動方面有下列任何的問題？(每行請僅勾選一項答案)

	1. 一直都是	2. 大部份時間	3. 有時	4. 很少	5. 從不
a. 完成的工作量比您想要完成的較少					
b. 可以做的工作或其他活動的種類受到限制					

4. 在過去四週內，您有多少時間曾因為情緒問題(例如，感覺沮喪或焦慮)，而在工作上或其他日常活動方面有下列的問題？(每行請僅勾選一項答案)

	1. 一直都是	2. 大部份時間	3. 有時	4. 很少	5. 從不
a. 完成的工作量比您想要完成的較少					
b. 做工作或其他活動時不如以往小心					

5. 在過去四週內，身體疼痛對您的日常工作(包括上班及家務)妨礙程度如何？  
(請僅勾選一項答案)

1. 完全沒有妨礙    2. 有一點妨礙    3. 中度妨礙    4. 相當多妨礙    5. 妨礙到極點

6. 下列各項問題是關於過去四週內您的感覺及您對周遭生活的感受，請針對每一問題選一最接近您感覺的答案。在過去四週內有多少時候.....(每行請僅勾選一項答案)

	1. 一直都是	2. 大部份時間	3. 有時候	4. 很少	5. 從不
a. 您覺得心情平靜？					
b. 您精力充沛？					
c. 您覺得悶悶不樂和憂鬱？					

7. 在過去四週內，您的身體健康或情緒問題有多少時候會妨礙您的社交活動  
(如拜訪親友等)？(請僅勾選一項答案)

1. 一直都會    2. 大部份時間會    3. 有時候會    4. 很少會    5. 從不會

# 高氏柴胡防治 C 型肝炎病毒感染與應用安全性評估(2-2)

林俊清  
高雄醫學大學

## 摘要

### 研究目的：

全球目前有 1 億七千萬人左右感染 C 型肝炎病毒而它所帶來的肝疾病(肝炎、肝硬化及肝癌)是全球嚴重的健康與醫療負擔，包括台灣。因此開發 C 型肝炎病毒及其引起的肝病治療藥物乃是值得優先考慮的一大問題，為了研發經濟、有效且副作用少的抗 C 型肝炎藥物，本計畫採取台灣特有種高氏柴胡，同時也開發台灣本土生藥資源。

### 研究方法：

我們探討藥物對於宿主細胞之間的調控是否造成影響，包括免疫及脂質調控最後以動物毒性試驗及體外溶血性試驗評估其安全性。

### 結果與討論：

第一年的成果中高氏柴胡其活性成分主要作用於抑制病毒的侵入(entry)，並非作用在複製、轉譯、合成、釋放或細胞間的傳遞。而我們發現 BK-2 為高氏柴胡中最有效的活性成分，因此更深入探討其與病毒醣蛋白的影響，證實 BK-2 能與 C 型肝炎病毒醣蛋白 E2 (glycoprotein E2)作用而干擾病毒侵入細胞。另外本年度我們繼續探討 BK-2 對宿主細胞影響包括免疫調控，證實 BK-2 並不藉由誘導第一型干擾素來達到防止病毒感染的效果，也不藉由調控脂蛋白 B 及 E 的表現以抑制病毒釋放。安全性評估的結果顯示 BK-2 作用後老鼠的心、肝、腎、膽等各大器官功能皆正常，並無貧血、發炎反應、血小板低下等問題，有效劑量下也不會造成人類紅血球溶血，因此相當具有發展潛力。

關鍵詞：高氏柴胡、抗 C 型肝炎藥物、C 型肝炎、侵入抑制劑

# **Assessment of efficacy and drug application safety of *Bupleurum kaoi* against hepatitis C virus infection (2-2)**

Chun Ching Lin  
Kaohsiung Medical University

## **ABSTRACT**

### **Aim:**

Approximately 170 million people are infected with hepatitis C virus (HCV) worldwide. It is necessary to develop novel anti-HCV therapeutics that result in minimal side effects with high patient adherence. We have previously screened anti-HCV crude extractions from the natural medicinal plant *Bupleurum kaoi* (*B. kaoi*) that is acclimated for culture in Taiwan. For this study, we therefore pursued to further evaluate the anti-HCV activity of *B. Kaoi* and its related components with mechanistic details.

### **Method:**

Antiviral assessment of *B. kaoi* and its active compounds on immune and lipid regulation of host cell.

### **Results and Discussion:**

Our first year study of results demonstrated that BK and its different components inhibited HCV entry while leaving replication, translation, assemble, release, and cell-to-cell spread relatively unaffected. BK-2 is the active compound of highest SI in value from *B. kaoi*. Bk-2 influenced HCV glycoprotein E2 and blocked viral entry. On the other hand, BK-2 could not prevent virus infection by inducing Type 1 interferon of host cell or block virus release by decrease cellular lipoprotein B and E expression. In our animal toxicity assay show that BK-2 could not induce toxicity in heart, liver, kidney and gall of rats. And also could not cause hemolysis in human erythrocyte at effective dosage on antiviral.

Keywords: *Bupleurum kaoi*, anti-viral therapy for HCV, hepatitis C virus, entry inhibitor.

## 壹、前言

過去的 10 幾年，科學家致力於找尋更強效藥物取代干擾素，通常是作用在抑制病毒的 non-structural protein 而影響病毒的複製，但 protease inhibitor 價格仍然不是一般民眾負擔的起。而近年來，隨著 C 型肝炎全病毒感染模式被發明，許多生藥之活性成分陸續在此模式中被證實具有抑制 C 型肝炎病毒感染之能力，例如 silymarin、silibinin 藉由透過抑制多重 HCV life cycle 步驟達到良好的抗病毒效果，包括抑制病毒 fusion 及 egress，針對細胞本身可提升免疫反應並減少 LDL 的釋放，達到抗病毒的目的。Naringenin 則是減少細胞 LDL release，以致於病毒合成時直接結合上同時也在 ER membrane 合成的脂蛋白策略失敗，因此抑制了病毒的釋放。病毒能利用脂質的幫助釋放，也能利用細胞的 LDL receptor 進入而感染新的細胞。另外 quercetin 則為 heat shock protein 70(HSP-70) inhibitor，C 型肝炎病毒的 translation 須由 NS5A protein 調控，quercetin 抑制 HSP-70/NS5A interaction 使病毒蛋白轉譯階段減少，於是能夠減少病毒的 production。綠茶成分 EGCG 則可結合病毒 glycoprotein E1, E2 防止病毒 entry。這些例子暗示著各國科學家開始傾向於較具經濟價值之生藥做為新藥開發之方向，另外也說明病毒與宿主細胞產生複雜的 interaction，包括氧化壓力、脂質的合成與釋放、細胞內特殊蛋白質與病毒複製轉譯的交互作用對於抗病毒藥物的研發是相當重要的方向，開創了不同於對於過去十幾年將重點放在研發病毒本身的 protease 及 polymerase inhibitor 作為藥物直接抑制病毒複製以外的新課題，也有希望找出更理想的藥物。

**計畫總目標：**開發本土的藥用植物抑制 C 型肝炎病毒感染的活性，與作用機轉探討，並將此結果作為將來推動本土藥用植物往分子醫學領域與世界同步。

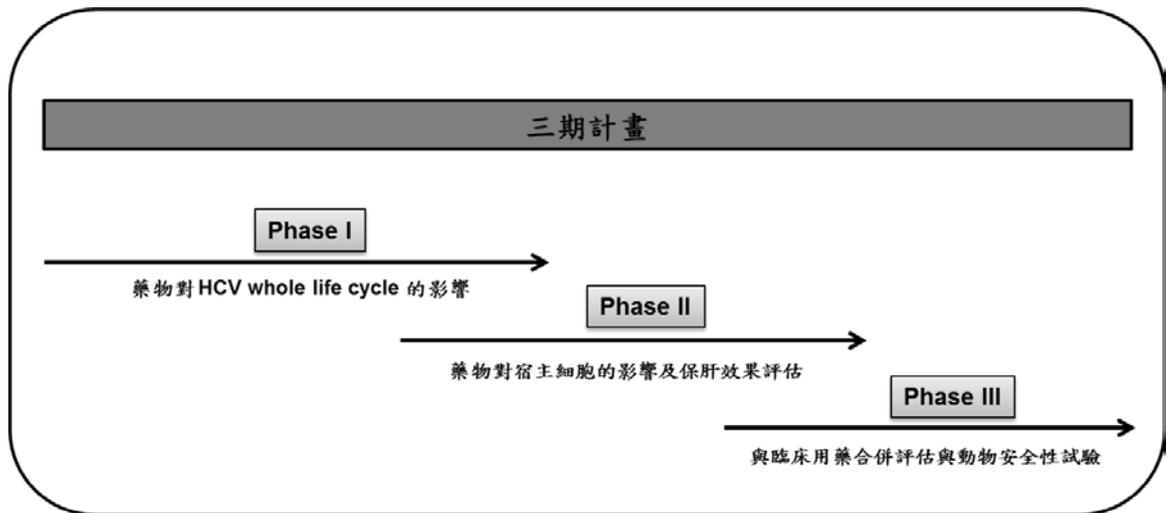
### 三期之計畫：

**Phase I**—觀察高氏柴胡及其相關活性成分對於直接控制病毒感染周期(life cycle)的藥效。並觀察對其他基因型(2b, 3a, 7a)及其他病毒是否具有抑制作用，證明其為專一性或廣效性抑制劑。

**Phase II**—觀察高氏柴胡及其成分對於影響宿主細胞免疫或脂質調控導致病毒感染過程受控制及保護肝細胞之作用。

**Phase III**—評估高氏柴胡及成分與臨床用藥併用情形以及動物安全性(14 天急性毒性試驗或 28 天亞急性毒性試驗)，評估高氏柴胡及其活

性成分是否具好的動物安全性未來可被推行進入正式臨床前長期動物安全性試驗甚至人體試驗。



### Phase I (101 年 6~12 月): 以最新的 C 型肝炎病毒感染模式 Luc-JC1 HCVcc 觀察高氏柴胡及其活性成分直接控制 C 型肝炎病毒之能力

Luc-JC1 HCVcc 為 *in vitro* 製造出來的 C 型肝炎病毒，感染宿主細胞後經由細胞與病毒本身的蛋白酶 protease 將 structural 和 non-structural protein 切開後釋放出可發冷光的物質在上清液中，作為病毒是否感染的監測目標。本團隊從數種生藥萃取物中篩選，並優先選擇台灣本土產藥用植物，發現高氏柴胡醇抽萃物(Fig.1)(由顏銘宏副教授提供專業基源鑑定，並以 ITS 定序法證實其 DNA 序列與 NCBI 提供之序列 100% 符合)及活性成分對 C 型肝炎病毒蛋白質具顯著的抑制作用，因此選為做深入探討。在病毒的初步感染週期中，首先 HCV 以 E1E2 protein 與細胞 CD81、SR-BI、OCLN、CLDN receptor 結合後經由 clathrin-mediated endocytosis 的方式進入細胞，接著病毒 RNA 在 ER membrane 上進行複製及轉譯，此時細胞內的脂蛋白也同樣在細胞的 ER 蛋白釋放作用也同時幫助病毒的釋放，另外也可透過與脂肪的結合與其它細胞 LDL receptor 結合而進入細胞，又開始展開新的感染週期抑或是病毒也能夠透過細胞與細胞間的傳遞而擴散。因此機轉探討方面會我們先觀察藥物對 HCV 感染週期(infection cycle)的影響包括藥物可能藉由直接破壞病毒顆粒(viral free particle)或與病毒直接結合而影響其進入，或是抑制病毒與宿主細胞之間的吸附(binding)與融合(fusion)，用溫度控制的方法(4°C 與 37°C 的轉換)使病毒和細胞進行 binding 而無法進入細胞或病毒能夠進入細胞後的感染觀察藥物對此階段是否有影響，也可利用直接的方式以病毒 E1E2 抗體直接定量黏在細胞上的病毒蛋白。進入細胞後以 qPCR 觀察 HCV RNA level 而判斷藥物是否可影響病毒複製、以 protein level

觀察病毒轉譯、同時監測細胞內(intra-cellular)及細胞外(extra-cellular RNA)觀察病毒釋放、最後病毒的細胞與細胞間傳遞作用則用以同時培養(co-culture)被轉殖綠色螢光的 recipient cell 和 producer cell 釋放的病毒再染上其他顏色的螢光，以螢光顯微鏡觀察病毒的顏色是否與 recipient cell 交疊，代表著病毒藉由細胞與細胞間傳遞而感染。此階段藉由觀察 HCV whole life cycle 的改變包括 free particle neutralization、binding、fusion、replication、assemble、release、cell-to-cell transmission 可讓我們更了解高氏柴胡及其活性成分與病毒直接的相關性。

### **Phase II (102 年 1 月~8 月)：探討藥物作用機轉尤其在觀察高氏柴胡及其活性成分對宿主細胞造成之影響是否達到抑制病毒之作用**

第二階段先探討高氏柴胡對宿主細胞造成的影響，是否達成抑制病毒的目標。並將活性成分做成具有螢光標幟藥物(fluorescent-labeled)、放射線標幟(radio-labeled drug)或是以抗體偵測(antibody detection)的方式探討藥物是否可進入細胞中作用或是在細胞外直接與病毒粒子作用。1. 以 clathrin-mediated endocytosis inhibitor 觀察藥物是否影響細胞吞噬作用(endocytosis)，而抑制病毒 fusion。2. 觀察藥物是否活化細胞免疫反應而抑制病毒感染。第一型干擾素(Type 1 interferon  $\alpha$ 、 $\beta$ )為細胞先天性免疫對廣泛性病原菌入侵體內後的第一道防線，因此首先以 qPCR 定量加入藥物後宿主細胞是否活化干擾素(interferon)的表現，接著再以 interferon inhibitor 與高氏柴胡及其活性成分同時加入細胞觀察是否會改變其抗病毒藥效，以此證明藥效是否與免疫活化有直接關聯性3.以螢光顯微鏡觀察 ORO 染劑處理過後的細胞釋放脂肪小滴的情形是否受藥物影響，接著再觀察細胞內的脂蛋白(ApoB、E protein)是否減少，觀察藥物是否影響細胞脂質與脂蛋白而抑制病毒釋放。因為 C 型肝炎病毒的感染會導致肝細胞產生大量自由基(ROS)及發炎反應，因此觀察藥物是否能夠以其他保護細胞的作用來減低病毒感染之傷害，將以 DCF-DA 來觀察在加藥後對自由基(ROS)產生的影響，接著也分析 TNF- $\alpha$  誘導的細胞激素表現(cytokine profiling)是否有被藥物抑制來觀察高氏柴胡及其活性成分是否能夠緩解肝細胞發炎反應。此階段可了解高氏柴胡及其活性成分對宿主細胞造成的影響是否能夠達到控制病毒的作用。

### **Phase III (102 年 8 月~12 月)：觀察高氏柴胡及其活性成分是否在體外試驗中能夠與臨床用藥 IFN 併用，降低 IFN 劑量，及體內動物安全性及溶血試驗之評估**

此階段著重於藥物的應用性，首先將高氏柴胡及其活性成分與臨床治

療藥物 interferon (IFN)- $\alpha$  合併使用，觀察是否有加乘作用的效果，如此可降低 IFN- $\alpha$  的使用量，減少副作用、經濟負擔及抗藥性的產生。另外評估動物安全性試驗—進入臨床人體試驗前，需委託通過國家法規由認證通過之實驗室進行雌雄至少各 10 隻的老鼠，亞急性連續 28 天給藥期間每日觀察死亡情形，28 天結束後進行臟器組織肉眼檢查、血清生化檢查、血液檢查、組織病理檢查、臟器秤重、基因毒性試驗、致癌性試驗、至畸試驗等嚴格試驗。在此之前本實驗室將先行以急性毒性試驗觀察評估，急性試驗之定義乃給藥後觀察老鼠 14 或 28 天，過程紀錄老鼠體重或死亡，觀察期結束後解剖觀察臟器組織是否正常，並採集血清進行心、肝膽、腎、胰、電解質及血球健康度檢測。最後以體外紅血球溶血性試驗觀察製劑是否會造成溶血情形，以上述方式評估藥物是否具良好的動物安全性可進入正式臨床前安全性試驗，也做為確保藥物安全的基礎。

## 貳、材料與方法

### **Phase II :**

#### **確認藥物是否能夠進入細胞中作用：**

##### **1. HPLC analysis—**

為了確認藥物是否可進入到細胞裡面作用或是在細胞外直接與病毒粒子作用，我們以 HPLC 之方法證實 BK-2 是否能夠進入細胞，或是在細胞外直接與病毒作用，干擾病毒侵入細胞。

#### **繼續探討藥物作用機轉並觀察藥物是否能夠進入細胞中並影響 endocytosis 作用：**

##### **2. Fusion/Endocytosis assay—**

HCV 附著至細胞表面後進入細胞之過程，目前被認為是藉由 clathrin-mediated endocytosis (CME) 而 fusion 至細胞內產生一連串的複製機制(40)。因此本計畫欲研究藥物是否會藉由影響細胞的 CME 而抑制病毒的 fusion。首先、先將細胞前處理不同的 CME 抑制劑，包括 chlorpromazine (clathrin-dependent endocytosis 抑制劑)、dynasore (dynamine-dependent endocytosis 抑制劑)，再加入接有螢光之試驗藥物並搭配共軛焦螢光顯微鏡觀測試驗藥物是否會影響細胞之 CME。同時會使用以 CME 為媒介之接有螢光的 transferrin 作為對照組。

#### **觀察藥物是否活化細胞免疫反應—Immune activation：**

##### **3. VSV interferon assay—**

Huh7.5 cells 加入藥物後，在 24 後以 PBS wash 2 次再加入 VSV-EGFP 感染細胞，最後以 Typhoon scanner 觀察病毒感染情形。

##### **4. B18R pretreatment assay—**

B18R 為 type I interferon 抑制劑，與細胞先作用兩小時後，再同時加入病毒與藥物 72 小時後取上清液以冷光儀偵測病毒是否感染細胞，若加入抑制劑後藥物仍然有效，代表藥效為 type I interferon independent，而藥物變得沒效則反之。

##### **5. Apolipoprotein expression—**

細胞加入 BK-2 作用 3 天後以 western blot 觀察細胞 Apo B 及 Apo E 是否減少，以達到減少病毒釋放的效果。

#### **動物安全性試驗：**

##### **動物急性毒性試驗及體外紅血球溶血性試驗—**

動物安全性試驗(台灣健康食品法單一劑量毒性試驗)－進入臨床人體試驗前，需委託通過國家法規由認證通過之實驗室進行雌雄至少各 10 隻的老鼠，亞急性連續 28 天給藥期間每日觀察死亡情形，28 天結束後進行臟器組織肉眼檢查、血清生化檢查、血液檢查、組織病理檢查、臟器秤重、基因毒性試驗、致癌性試驗、致畸胎試驗等嚴格試驗。在此之前本實驗室將先行以急性毒性試驗觀察評估(6 週大的 Sprague-Dawley [SD] rats 購買於台灣樂斯科生技公司)，急性試驗之定義乃給藥後觀察老鼠 14 天，過程紀錄老鼠體重或死亡，14 天後解剖觀察臟器組織是否正常，並採集血清檢測 Alkaline phosphatase、ALT、AST、 $\gamma$ -glutamyltransferase、Glucose、Total bilirubin、Direct bilirubin、Creatinine、Blood urea nitrogen、Total protein、Albumin、Albumin/Globulin ratio、Sodium、Potassium、Chloride、Calcium、Phosphorus、Cholesterol、Triglycerides、Lactate dehydrogenase、Creatine phosphate kinase、Uric acid 等 22 個基本生化項目。另一方面觀察血球分析 Red blood cells、Hemoglobin、Hematocrit、Mean corpuscular volume、Mean corpuscular Hb、Mean corpuscular Hb concentration、Platelets count、White blood cells、Neutrophils、Lymphocytes、Monocytes、Eosinophils、Basophils。以上動物實驗皆符合 NIH Good Laboratory Practices guidelines，依照 the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* 進行。最後以體外紅血球溶血性試驗觀察製劑是否會造成溶血情形以進一步確定安全性，以上述急性或亞急性試驗評估高氏柴胡及其活性成分是否具良好的動物安全性可進入正式臨床前安全性試驗。

## 參、結果

去年度第一年計畫中發現 BK-2 能夠藉由直接與病毒 glycoprotein E2 作用達到防止病毒進入細胞之機轉。今年度主要探討 BK-2 對於宿主細胞的影響，包括藥物是否能夠進入細胞及影響 endocytosis 等作用或是影響細胞免疫反應及脂質釋放達到抗病毒藥效。完整的探討了 BK-2 抑制 C 型肝炎病毒之機轉。

首先以 HPLC 之方法證實 BK-2 無法進入細胞，而是在細胞外直接與病毒作用，干擾病毒侵入細胞(Fig.1)。

另外為了觀察藥物是否為 Interferon inducer 而抑制病毒感染，我們使用對 IFN 敏感的 VSV (Vesicular stomatitis virus)作為細胞在經由藥物作用 24h 後是否產生 IFN 的指標，結果顯示細胞經由 BK-2 作用後，仍可被 VSV 感染，證實 BK-2 抗病毒機轉與 IFN 無關(Fig.2)。另一方面使用 Type 1 interferon 抑制劑 B18R 先與細胞作用後再同時加入病毒與藥物，結果顯示無論是否加入抑制劑，BK-2 抑制 C 型肝炎病毒的程度並未受到影響，再次證實 BK-2 抗病毒機轉與 IFN 無關，IFN- $\alpha$  為陽性對照組，加入抑制劑後失去抗病毒藥效(Fig.3)。

為了觀察細胞 Apo B 及 Apo E 是否減少，以達到減少病毒釋放的效果，細胞加入 BK-2 作用 3 天後以 western blot，結果顯示 BK-2 無法直接使 Apo B 及 Apo E 表現減少(Fig.4)。本研究亦證實，若將藥物與干擾素合併可減少約一半的干擾素使用量。IFN- $\alpha$  單獨抑制 HCV 感染之 EC50 為 0.83 IU/ml，與 BK-2 合併使用後 IFN- $\alpha$  之 EC50 降為 0.38 IU/ml，減少了 2.83 倍的干擾素使用量，因此證實 BK-2 與干擾素合併使用可減少臨床藥物使用量，以減少病人副作用(Fig.5)。

在動物安全性試驗的結果顯示顯示老鼠的心、肝、腎、膽等各大器官功能皆正常，並無貧血、發炎反應、血小板低下等問題(Fig.6)。於體外溶血性試驗結果中在有效的藥物劑量下並不會對人類紅血球造成溶血(Fig.7)。

## 肆、討論

在此計畫第一年的結果中我們發現台灣特有種高氏柴胡及其 4 種活性成分能夠抑制 C 型肝炎病毒的感染，其中高氏柴胡及 BK-1, 2, 4 主要抗病毒機轉為病毒侵入抑制劑(entry inhibitor)。所有的藥物當中以 BK-2 的 SI 最高，而認為最具開發價值，因此我們更進一步的探討其作用為藉由干擾病毒的醣蛋白 E2 (glycoprotein E2)而抑制病毒 binding 細胞，進而阻擋了病毒的侵入，並與病毒的複製(replication)、轉譯(translation)、合成(assemble)、釋放(release)與細胞間傳遞(cell-to-cell transmission)皆無關，此類藥物將來可開發應用於肝臟移植手術中，避免新移植的肝臟被 C 型肝炎病毒感染。此階段我們完成了探討藥物與病毒本身的關係。於今年度 phase II 的結果中我們繼續探討藥物對宿主細胞產生的影響是否也能夠造成抑制病毒感染的原因，包括證實藥物無法進入細胞中作用而是在細胞外接觸到病毒醣蛋白就能夠使病毒失去感染力也不透過細胞免疫及脂質調控等達到抗病毒作用。

另外我們將 BK-2 與干擾素合併使用後可減少干擾素使用量，可減少臨床病人副作用，並評估了 BK-2 的動物安全性，證實其對老鼠的心、肝、腎、膽等各大器官功能皆正常，並無貧血、發炎反應、血小板低下等問題。有效濃度下也不會造成人類紅血球溶血，是安全且具有開發潛力的藥物。

## 伍、結論與建議

高氏柴胡及其活性成分具有顯著抑制 C 型肝炎病毒 entry 的作用，並更進一步了解其活性成分 BK-2 作用為藉由干擾病毒的醣蛋白 E2 (glycoprotein E2) 而抑制病毒 binding 細胞，進而阻擋了病毒的侵入，而與病毒的複製 (replication)、轉譯 (translation)、合成 (assemble)、釋放 (release) 與細胞間傳遞 (cell-to-cell transmission) 皆無關。此階段以 HCV 病毒感染模式取代過去傳統的 replicon 模式，並奠定將來研發其他具有抗 C 型肝炎病毒活性之藥物之基礎。同時也能發現新的抗病毒標的，也對於生藥及其化學成分與病毒的互動有更深層的了解。

另外發現 BK-2 為廣效性抗病毒藥物，能夠抑制多種基因型 C 型肝炎病毒感染，具足廣泛性的應用特質，相當具有開發價值。

本年度我們證實藥物無法進入細胞中作用而是在細胞外接觸到病毒醣蛋白就能夠使病毒失去感染力並不透過細胞免疫及脂質調控等達到抗病毒作用，與臨床藥物干擾素合併使用也可減少其用量。同時評估了 BK-2 的動物安全性，證實其對老鼠的心、肝、腎、膽等各大器官功能皆正常，並無貧血、發炎反應、血小板低下等問題。有效濃度下也不會造成人類紅血球溶血，是安全且具有開發潛力的藥物。

本計畫探討高氏柴胡及其活性成分新療效的發現，達到舊藥新用並推動傳統生藥邁入分子醫學與世界同步，除進行投稿而同時已提出中華民國 (102119835) 及 PCT 世界專利申請。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP102-RD-111 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. Kato, T., T. Date, A. Murayama, K. Morikawa, D. Akazawa, and T. Wakita: Cell culture and infection system for hepatitis C virus. *Nat Protoc* 2006; 1:2334-2349.
2. Lindenbach, B. D., M. J. Evans, A. J. Syder, B. Wolk, T. L. Tellinghuisen, C. C. Liu, T. Maruyama, R. O. Hynes, D. R. Burton, J. A. McKeating, and C. M. Rice: Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005; 309:623-626.
3. Polyak, S. J., C. Morishima, V. Lohmann, S. Pal, D. Y. Lee, Y. Liu, T. N. Graf, and N. H. Oberlies: Identification of hepatoprotective flavonolignans from silymarin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:5995-5999.
4. Polyak, S. J., C. Morishima, M. C. Shuhart, C. C. Wang, Y. Liu, and D. Y. Inhibition of T-cell inflammatory cytokines, hepatocyte NF-kappaB signaling, and HCV infection by standardized Silymarin. *Gastroenterology* 2007; 132:1925-1936.
5. Wagoner, J., A. Negash, O. J. Kane, L. E. Martinez, Y. Nahmias, N. Bourne, D. M. Owen, J. Grove, C. Brimacombe, J. A. McKeating, E. I. Pecher, T. N. Graf, N. H. Oberlies, V. Lohmann, F. Cao, J. E. Tavis, and S. J. Polyak: Multiple effects of silymarin on the hepatitis C virus lifecycle. *Hepatology* 2010; 51:1912-1921.
6. Nahmias, Y., J. Goldwasser, M. Casali, D. van Poll, T. Wakita, R. T. Chung, and M. L. Yarmush: Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology* 2008; 47:1437-1445.
7. Gonzalez, O., V. Fontanes, S. Raychaudhuri, R. Loo, J. Loo, V. Arumugaswami, R. Sun, A. Dasgupta, and S. W. French: The heat shock protein inhibitor Quercetin attenuates hepatitis C virus production. *Hepatology* 2009; 50:1756-1764.
8. Ciesek, S., T. von Hahn, C. C. Colpitts, L. M. Schang, M. Friesland, J. Steinmann, M. P. Manns, M. Ott, H. Wedemeyer, P. Meuleman, T. Pietschmann, and E. Steinmann: The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, inhibits hepatitis C virus entry. *Hepatology* 2011;

- 54:1947-1955.
9. Falkowska, E., F. Kajumo, E. Garcia, J. Reinus, and T. Dragic: Hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 glycans modulate entry, CD81 binding, and neutralization. *J Virol* 2007; 81:8072-8079.
  10. Flint, M., C. Maidens, L. D. Loomis-Price, C. Shotton, J. Dubuisson, P. Monk, A. Higginbottom, S. Levy, and J. A. McKeating: Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol* 1999; 73:6235-6244.
  11. Grove, J., S. Nielsen, J. Zhong, M. F. Bassendine, H. E. Drummer, P. Balfe, and J. A. McKeating: Identification of a residue in hepatitis C virus E2 glycoprotein that determines scavenger receptor BI and CD81 receptor dependency and sensitivity to neutralizing antibodies. *J Virol* 2008; 82:12020-12029.
  12. Lin, W. Y., L. R. Chen, and T. Y. Lin: Rapid authentication of Bupleurum species using an array of immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Planta Med* 2008; 74:464-469.

染、圖、表

Fig 1. 細胞內BK-2含量分析

Loading (μM)	Intracellular (μM, in 50% MeOH)*	Extracellular (μM, in 50% MeOH)*	Drug Entry Efficiency (%)#
50	0	74.80 ± 11.94	0

\* Determined using standard curve generated from known concentrations of SSB2 (dilution range: 0.64 μM to 640.20 μM; R<sup>2</sup> = 1):  
 - Limit of detection (LOD) = 0.47 ± 0.06 μM.  
 - Limit of quantification (LOQ) = 1.45 ± 0.21 μM.  
 # Drug entry efficiency was calculated as:  
 $[\text{intracellular concentration} / (\text{intracellular concentration} + \text{extracellular concentration})] \times 100$ .

Fig 2. 高氏柴胡及其活性成分不透過誘導Type 1 interferon 保護細胞不受病毒感染 (VSV interferon assay)

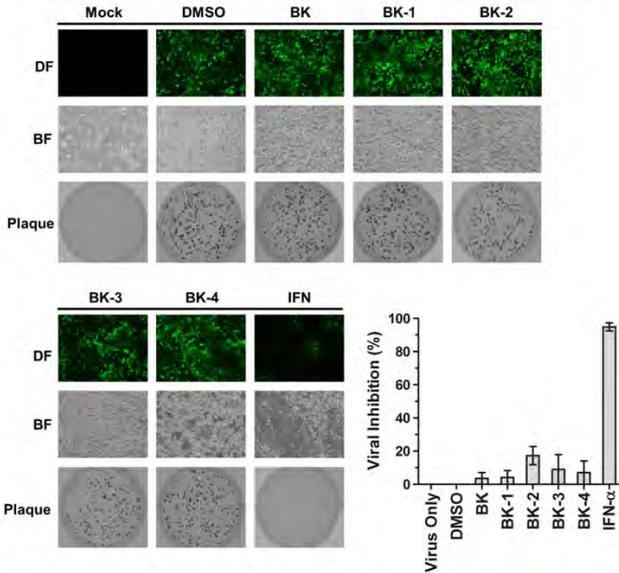


Fig 3. 高氏柴胡及其活性成分不透過誘導Type 1 interferon 保護細胞不受病毒感染 (B18R pretreatment assay)

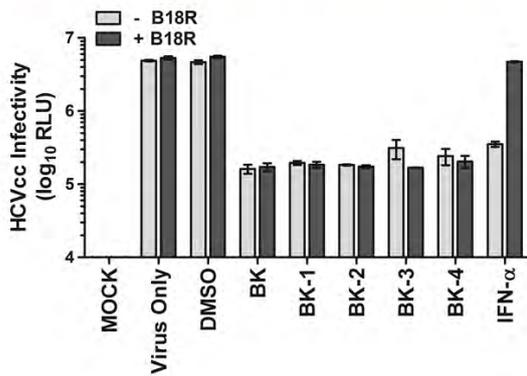


Fig 4. 高氏柴胡及其活性成分不透過抑制 Apolipoprotein B及E的表現抑制病毒釋放

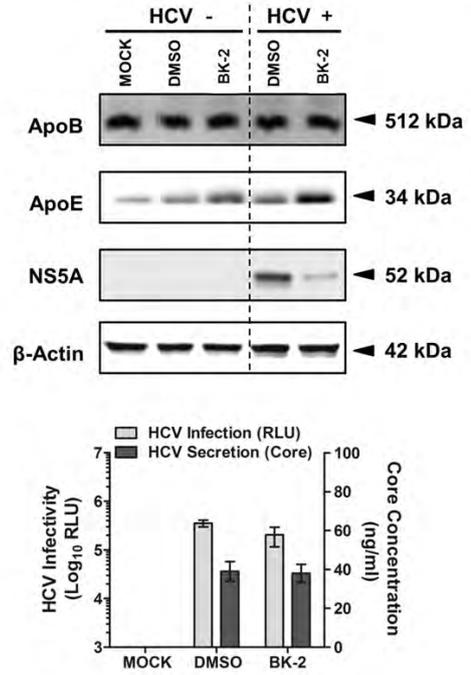


Fig 5. BK-2 與干擾素合併使用後可減少干擾素用量

	BK-2 alone (μM)	IFN-α alone (IU/ml)
EC50	16.13	0.83
↓ Combine 16.13 μM BK-2		
EC50		0.38
IFN-α dosage decrease		2.83 fold

Fig 6. BK-2急性動物毒性試驗

Blood Biochemistry Parameters	BK-2 injection (i.p)		
	Mock	1 mg/ml	4 mg/ml
ALT (U/L)	154.5 ± 8.0	180.8 ± 19.3	174.2 ± 16.7
AST (U/L)	82.0 ± 4.1	90.7 ± 7.8	103.8 ± 3.5
BUN (mg/dl)	13.0 ± 0.8	13.5 ± 1.2	14.3 ± 1.1
Creatinine (mg/dl)	0.5 ± 0.02	0.5 ± 0.03	0.5 ± 0.1
Uric Acid (mg/dl)	3.4 ± 0.7	3.2 ± 0.5	2.5 ± 0.3
Cholesterol (mg/dl)	93.5 ± 3.0	94.2 ± 5.4	83.3 ± 2.8
Triglyceride (mg/dl)	82.0 ± 9.3	68.5 ± 6.3	61.3 ± 5.5
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	9.7 ± 0.2	7.5 ± 0.9	8.9 ± 0.9
RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	7.2 ± 0.2	7.3 ± 0.2	7.1 ± 0.3
Hemoglobin (g/dl)	15.3 ± 0.3	15.4 ± 0.3	15.2 ± 0.4
Hematocrit (%)	47.8 ± 1.3	47.4 ± 1.0	46.1 ± 1.6
Platelet ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	1027.5 ± 65.1	911.2 ± 43.1	946.0 ± 72.6

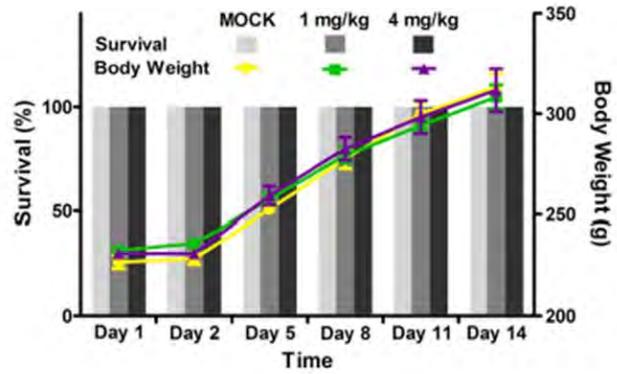
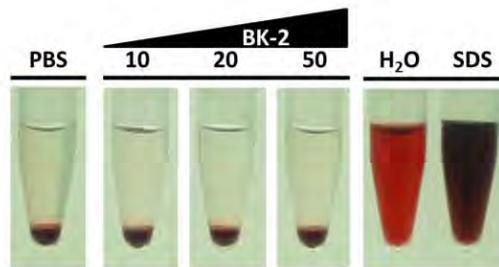


Fig 7. BK-2體外溶血性試驗



# 雷公藤對 Cisplatin 抑制腫瘤生長及血管新生 之交互作用(2/2)

王寧

慈濟學校財團法人慈濟大學

## 摘 要

### 研究目的：

本研究依藥物併用所產生的加成效應，進行雷公藤合併化療藥物 cisplatin 之處理，探討其對胃癌的抑癌活性及其作用機制。

### 研究方法：

體外實驗是同時以胃癌細胞及血管內皮細胞進行蛋白質表現之分析；活體動物實驗是以雷公藤合併 cisplatin 對罹癌小鼠生理代謝作用的影響，進行雷公藤合併低劑量 cisplatin 有效抗癌劑量及處理方式之評估，並以藥物對血管增生的抑制作用及腫瘤轉移相關化學激素及細胞激素表現的影響，探討雷公藤與 cisplatin 併用之抗胃癌活性。

### 結果：

本研究以雷公藤合併 cisplatin 進行抗胃癌作用的動物體內腫瘤測試結果，顯示在大量減少雷公藤及 cisplatin 的使用劑量及細胞毒性條件下，兩者併用可在調控腫瘤細胞之生長及血管新生等作用下，有效抑制腫瘤的發展。

### 討論：

雷公藤具有加強 cisplatin 治療胃癌的效果，其作用與抑制腫瘤細胞的生長及血管新生有關。以雷公藤與 cisplatin 對個體無明顯毒性的使用條件下，合併進行活體腫瘤之治療，除可減少單獨以 cisplatin 進行治療所造成的生理毒性，亦可強化治療的效果。

關鍵詞：雷公藤、順鉑、抗癌、血管新生

# Effect of Triptolide on Cisplatin-induced Growth Inhibition and Angiogenesis on Tumor (2/2)

Danny Ling Wang  
Tzu Chi University

## ABSTRACT

### **Aim:**

In accordance to the synergism of combined drugs, this study is aimed to evaluate the effect and mechanism of anticancer activity by triptolide in combination with cisplatin on gastric cancer.

### **Methods:**

Expression of proteins was evaluated by treating with gastric cancer cells as well as vascular endothelial cells *in vitro*. The effective anticancer doses of triptolide in combination with cisplatin at a lower dose for gastric cancer was evaluated *in vivo*, through the physiological and metabolic effects in the tumor-bearing mice. Additionally, the anticancer activity of triptolide in combination with cisplatin was investigated through the effect of anti-angiogenesis and changes of cytokines/chemokines expressed for tumor metastasis.

### **Results:**

Under a decreased cytotoxic condition by attenuating the treated doses of triptolide and/or cisplatin, tumor inhibitory effect can be found by regulating both the tumor growth and angiogenesis.

### **Discussion:**

Triptolide enhances the therapeutic effect of cisplatin on gastric cancer. The synergistic therapeutic effect of triptolide and cisplatin on gastric cancers was shown

by the inhibitory effect of tumor cell growth and angiogenesis and reduced the potential toxicity of cisplatin. These findings suggest that the clinical trials evaluating triptolide in combination with low dose chemotherapeutic drugs without significant physiological toxicity are potentially warranted for gastric cancer.

Keywords: triptolide, cisplatin, anti-cancer, angiogenesis.

## 壹、前言

胃癌與其他具高度轉移特質的癌症一樣，因 DNA 缺失、易位、不正常複製或異常的刺激導致訊息傳導路徑失控，就會不斷地分裂生長及不死化 (immortalization)。癌細胞除了生長失控外，還會局部侵入 (invasion) 周遭正常組織，甚至經由血液轉移到身體其他部分，造成所謂的遠端轉移 (distal metastasis)，而治療策略中最大的考驗都是在於同時抑制腫瘤細胞的增生與轉移。根據過去的研究，癌細胞的轉移機制是導因於如 Myc、Ras 及 p53 等基因的突變，當 Myc 發生變異時，會誘發 Bcl-xL 蛋白質的表現，使細胞不斷的分裂，腫瘤細胞會因而不斷的增生 [1]。而 Ras 的突變已被證實與腫瘤細胞的轉移有關，其可能原因為 Ras-MAPK 訊息持續被活化而誘發 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) 的大量表現，促使腫瘤細胞分解其細胞外的基質而造成轉移 [2-4]。p53 為轉錄因子，具細胞週期調節、DNA 修復以及引發不正常細胞凋亡並抑制癌化等功能 [1]。而造成腫瘤細胞轉移的其他機轉，還包括生長因子及其受體過度表現或活化所致，常見的相關生長因子有 FGF、EGF、IGF、HGF、PDGF 等 [5]。由於血管新生是腫瘤生長及轉移的必經過程，因此抑制血管新生 (anti-angiogenesis) 為現今抑制腫瘤生長相當重要的課題。雷公藤之有效成份 triptolide 具降低血管內皮新生因子的釋放及其受體含量之作用 [6]，我們在前一年度的研究計畫中，已經證實 triptolide 在合併 cisplatin 的處理下，以低於各自單獨處理的有效劑量，即可抑制胃癌細胞的生長；在以低於 triptolide 合併 cisplatin 的有效抗癌劑量處理下，血管內皮細胞之生長亦受到明顯的抑制。本研究將繼續以活體動物實驗分析 triptolide 合併 cisplatin 之抗胃癌能力，另再就胃癌細胞所誘導血管新生之作用，探討 triptolide 與 cisplatin 合併之抗胃癌作用機制。

### 腫瘤之血管新生 (Tumor angiogenesis)

動物細胞必須獲取足夠的養氣與養分以維持活性，對於大型的生物個體，就需要更多的血管供應細胞之所需，必須在細胞數逐漸增加的同時伴隨周邊血管的新生，以維持所需。血管新生的過程受制於各種不同血管新生因子之調控，並達到 pro-angiogenesis 與 anti-angiogenesis 間的平衡，當疾病特別是惡性質腫瘤發生時，血管新生因子調控之平衡現象便會遭受破壞。1907 年便有研究指出當腫瘤生長超過 3 mm 時，便需要透過新生的血管供給養分才得以持續生長 [7,8]，於 1968 年的研究也提出腫瘤會經由血管

轉移至身體其他部位之假說[9,10]。Folkman 認為腫瘤主要是透過血管獲取養分、持續增生並進一步造成轉移的情形，故可透過抑制血管之生成而抑制腫瘤的增生及轉移[11]。腫瘤自鄰近血管所誘導之新生血管為腫瘤獲取生長所需養分之主要來源。癌細胞、內皮細胞、血液及細胞外基質皆能釋放 pro-及 anti-angiogenic factors [12]，藉此衍生細胞生長所需之血管網絡，促進腫瘤之生長、類型與轉移之部位，甚至於造成腫瘤復發之情況[13]。腫瘤血管之結構與正常之血管不同，其管徑大小不均勻且較多分支，這可能是由於血管內皮新生因子及血管生成素所調節之血管生成作用不平衡所致，因此腫瘤血管之流量較為混亂[14]，導致腫瘤內部的缺氧現象[15]，缺氧之部位將引起腫瘤之細胞凋亡[16]。就其細部結構而論，腫瘤血管之管壁上有許多像是內皮細胞窗孔(endothelial fenestrae)、囊泡(vesicles)以及跨細胞孔(transcellular holes)的孔洞；腫瘤之血管內皮細胞易向外及腔室內生長等，均會導致腫瘤血管的滲漏[17-19]。腫瘤血管之通透性及生成，取決於腫瘤之類型及生長之器官[17,20]，由於每個器官都有不同之基質細胞，而這些細胞會產生不同之 pro-及 anti-angiogenic factors [12,21]。腫瘤之低滲透壓會導致血管生成素 1(Angiopoietin-1；Ang 1)、血管生長因子及胎盤生長因子(placental growth factor；PlGF)之過度表達，反之高滲透性則可能造成血管生成素 1 之減少或高度表達其拮抗作用之血管生成素 2 [22]。癌症治療時，為克服這種異質性(heterogeneity)調控之影響，必須了解血管新生因子間之分子作用機制。腫瘤及免疫細胞所釋放之細胞生長因子及血管生長因子之分子機制，可調控腫瘤內皮細胞之細胞黏附分子(cellular adhesion molecules)及表面標記物(surface markers)之表達，例如血管內皮生長因子及腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor- $\alpha$ ；TNF- $\alpha$ )之表達，纖維母細胞生長因子(basic fibroblast growth factor；bFGF)及轉化生長因子(transforming growth factor- $\beta$ 1；TGF- $\beta$ 1)可調控細胞黏附分子之作用[23]。血管的形成是來自血管內皮細胞之增生，而腫瘤之血管生成主要是由原先已存在之血管經由抽芽分枝(sprout)及套疊式(intussusception)的方式產生新的血管。從血管壁或骨髓脫落之周邊血液之循環血叢皮細胞(circulating endothelial cells；CECs)及血管內皮前體細胞(circulating endothelial precursors；CEPs)皆可有效的協助腫瘤之血管新生[24,25]。腫瘤亦可生長於內臟周圍之原有血管之圍管結構中(perivascular cuffs)。已知血管管脈之生成由許多不同分子機制所調控[26]，其中包含血管生成素家族(angiopoietin；Ang)及血管內皮生長因子

(vascular endothelial growth factor ; VEGF)，其中以血管內皮新生因子最為主要；除血管內皮新生因子之外，腫瘤血管脈絡之生成亦與血管生成抑制劑之調控有關[27,28]。研究指出腫瘤血管之管壁並非由血管內皮細胞所架構[29]，可能是由血管內皮細胞與癌細胞所堆砌而成[30]，此外腫瘤血管相較於正常血管之生長，其保護機制則較為欠缺，例如缺少功能性血管用以維持新陳代謝及管脈氧氣及荷爾蒙之平衡之周邊細胞(perivascular cells) [31]，故與正常組織之血管內皮細胞具有某些程度的差異性，也因此成為以抑制血管新生為途徑的腫瘤治療新標的。

### 雷公藤(Triptolide)

雷公藤屬天然中草藥的一種，屬於衛茅科雷公藤植物，其植物全株具有毒性，古時以根部組成作為除蟲之藥物；亦常用以去風濕、活血消腫、消炎止痛，或治療慢性關節炎等。雷公藤因其免疫抑制作用，是傳統醫學中用以治療關節炎的熱門藥物，因為療效強且有效劑量低而受到矚目。雷公藤的生物鹼具有累積性，長期服用雷公藤會導致腎臟損壞，嚴重者甚而致死，因此如何控制其有效劑量而不造成正常生物體之正常組織傷害，乃為重要的研究課題。美國 Stanford 大學於 1991 年成立的「中藥科學研究中心」，公佈了他們研究雷公藤的報告，發現這種草藥的有效成分能夠阻止感染，使癌細胞走向細胞凋亡之途徑。研究證實了從雷公藤(*Tripterygium wilfordii hook. F.*(TWHF))中萃取的有效成分雷公藤內脂醇(triptolide)，能夠抑制 NF- $\kappa$ B 的活化，從而抑制因 NF- $\kappa$ B 活化而影響其下游包括與免疫功能相關基因之表現[32]。該研究亦指出 triptolide 比任何免疫抑制劑更具療效，可用來治療器官移植患者、感染疾病和一些自身免疫性疾病。Triptolide 是結構上具有六個氧的 diterpene 化合物，過去多以治療類風濕關節炎(Rheumatoid arthritis)為其主要之生物活性[33]，而近年許多研究顯示，triptolide 亦具有抗腫瘤的活性[34,35]。單獨使用 triptolide 即具有明顯的抗癌活性，在合併其他化療藥物的使用下，能強化對化療藥物具抗藥性的癌細胞的治療效果。當 TRAIL/Apo2L 併用 triptolide 時，可增加細胞表面 TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor (TRAIL-R)所造成的細胞凋亡現象。TRAIL/Apo2L 是屬於 tumor necrosis factor family 之一員，當 TRAIL/Apo2L ligand 結合於細胞膜上的 TRAIL-R1 及 TRAIL-R2 的 Death receptor 時，將誘使 death inducing signal complex (DISC)與 caspase 8 結合，並引發後續一連串 caspase protease 之活化作用，導致細胞之凋亡反應

[36-38]。研究顯示 triptolide 可增加肺癌細胞對 TRAIL/Apo2L 的敏感性，透過調控而強化肺癌細胞的死亡，其中 ERK2 的活化扮演重要角色，若抑制 ERK2 的活性，則會降低 TRAIL/Apo2L 引發的細胞凋亡[39]。以動物實驗模式中亦證實 triptolide 對於乳癌、膀胱癌及胰臟癌等腫瘤細胞都具明顯的抑制腫瘤作用[40,41]。因 triptolide 已被證實的各項重要生物機能，被認為具有多元功能探討及開發潛力的藥物。

## 化療藥物 Cisplatin

藥物治療為目前臨床上常用以治療癌症的方式之一，其中化療藥物 cisplatin 是結構上含有鉑的抗腫瘤藥物，主要作用機轉是在細胞內直接與 DNA 以共價鍵結合形成雙股 DNA 間交叉鏈結(intrastrand cross-linking)的形式，從而影響 DNA 的功能並干擾其 DNA 複製、轉錄，以阻斷癌細胞的分裂[42]。然而，大部分癌細胞經 cisplatin 等化療藥物處理後所出現的抗藥性，可能引起後續的復發及轉移，也相對增加腫瘤治療上的困難，目前許多治療策略都是以兩種或兩種以上的抗癌藥物合併使用，藉由各項藥物的不同作用機制及彼此間的加成作用，強化腫瘤治療的效果[43,44]。

由於腫瘤轉移的過程是由細胞內外許多活化分子的調控結果，所涉及的反應都相當複雜，更加深治療上的困難度。除了已經使用的抗癌藥物外，為強化治療效果並減少正常細胞的傷害，目前許多研究都從天然衍生物著手，期能尋找出抑制癌症發展或轉移的有效成分。胃癌為一種高度惡性發展的腫瘤，可藉由淋巴及血液循環擴散到身體其他的組織器官，即使經由手術切除、放射線治療及全身性的化學治療，腫瘤仍具復發或轉移的風險。Cisplatin 是臨床上最常用以治療胃癌的化療藥物之一，但由於癌細胞對 cisplatin 處理所產生的抗性，發展可降低 cisplatin 誘發癌細胞抗性的治療模式，是近年主要的研究議題。過去以雷公藤併用 cisplatin 處理胃癌細胞的分析結果，已經證實雷公藤與 cisplatin 在以低於 IC<sub>50</sub> 的劑量合併處理下，對胃癌細胞仍具有明顯的抗癌加成作用：以 IC<sub>20</sub> 劑量之雷公藤與 cisplatin 處理後，均可明顯抑制血管內皮細胞的生長及血管的新生。顯示雷公藤合併 cisplatin 除具有顯著的抗癌加成效果外，也可能因抑制血管內皮細胞之生長而間接阻礙胃癌細胞的增生與轉移。本研究除繼續探討雷公藤併用 cisplatin 對胃癌細胞與血管內皮細胞的調控機制外，另以小鼠動物模式之活體分析，評估雷公藤併用 cisplatin 對胃癌細胞之體內作用。研究結果證實雷公藤

合併 cisplatin 之處理，在個體未出現明顯生理代謝的劑量條件下，可抑制胃癌細胞的體內生長與發展。

## 貳、材料與方法

### 一、細胞株之培養

本研究採用的細胞株包括國防醫學院自行建立的台灣本土人類胃癌細胞株(SC-M1)及人類臍靜脈內皮細胞株(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)，所使用的培養基分別為 RPMI 及 ECM，均在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 及相對溼度為 100%的條件下，以含 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)與抗生素(penicillin-streptomycin)之培養液培養。而細胞之計數則經 Trypan blue 染劑染色後，將細胞置於血球計數器(Hematocytometer)上，於顯微鏡下觀察並計數存活之細胞。

### 二、實驗動物

所有實驗之動物選擇條件如下：選擇 20-30g 重(約 5 週齡)之 SCID 小鼠；大鼠則選購 100-120g 重(約 8 週齡)之 SD 品系大鼠，實驗動物分別購買自慈濟大學實驗動物中心及樂斯科生物科技股份有限公司，每組隨機選擇 10 隻進行分析。

### 三、藥物治療

小鼠分組後，將  $5 \times 10^6$  個胃癌細胞種植至每隻小鼠( $5 \times 10^6$  cell/100  $\mu$ L/mouse)之股部皮下。將實驗組別分為單獨及合併等組分別處理藥物，未經藥物處理之控制組則以 0.9% saline 處理，每組 9~10 隻。治療過程：於細胞種植後之第 7 天進行藥物或生理食鹽水之處理，依據細胞實驗的有效抗癌劑量，經以藥物各別之 1~100 倍體內併用之耐受劑量測試，雷公藤(TPL)的注射劑量為 0.4 mg/kg，而 cisplatin (CDDP)的注射劑量為 3 mg/kg，進行連續處理 3 週，每日觀察及測量每組小鼠之體重及腫瘤變化情形，腫瘤體積計算方式為  $\text{length} \times \text{width}^2 \times 0.5$ 。處理後一天，將小鼠安樂死後，解剖並觀察腫瘤內細胞增生及血管新生之變化情形，而後摘取腫瘤組織並作組織染色。

### 四、免疫組織化學染色法(Immunohistochemistry)

以 75%酒精擦拭玻片後再以試鏡紙去除殘留毛屑，並取 25 mL 之 poly-lysine (P8920, Sigma)均勻塗於玻片上，再置於玻片烘乾機(slide warm plate, HI 1220, Leica, Heidelberg, Germany)上烘乾備用之。將組織浸漬於 10%三聚甲醛溶液(Formaldehyde)，於室溫下靜置 6~12 小時，再利用不同濃

度之酒精(70、80、90、95 及 100%)於室溫下輕微震盪 2 小時，以進行脫水反應，續以二甲苯(xylene)輕微震盪 2 小時，另經 3 次 60%之石蠟(paraplast)脫脂 12 小時後進行石蠟之包埋。將包埋好之組織置於冰上，待石蠟凝固變硬後，修飾片匣(cassette)多餘之石蠟，後利用旋轉式切片機將包埋好之組織進行連續切片(厚度約為 5  $\mu\text{m}$ )，切下後置於蠟浴槽中進行展片，再將展片後之組織以玻片承接，並置於玻片烘乾機上烘乾。將上述烘乾之切片置於二甲苯中脫蠟後，經由不同濃度之酒精(100、90、80 及 70%)進行水和(rehydration)，水和後之組織以 PBS 進行清洗各兩次。將洗清後之組織置於 95 °C 之 10 mM 檸檬酸鹽溶液(citrate acid buffer pH 6.0)中 30 分鐘，再於室溫下冷卻，分別以 5% NP-40 及 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  之甲醇溶液中浸泡 15 分鐘，以去除過氧化酶(peroxidase)之活性，再經由 PBS 清洗組織三次後，分別添加適當稀釋倍數之抗體，於 4°C 反應 16 小時，後以 PBS 清洗三次每次 5 分鐘。隨即加入 100  $\mu\text{L}$  之二級抗體，於室溫下反應 30 分鐘，待以 PBS 清洗三次每次 5 分鐘，再加入 100  $\mu\text{L}$  之受質，於室溫下反應約 5~10 分鐘，而後以 PBS 清洗。另以蘇木紫(hematoxylin)進行對比染色(counterstain)後固定封片。

## 五、血管新生之活體試驗

### (一)大鼠主動脈環試驗(rat aortic ring assay)

將 Matrigel (10 mg/mL)加至培養盤中，待 Matrigel 乾固後，取下 8~12 週大的 Sprague-Dawley 大鼠主動脈置於含有 4% gentamycin PBS 的培養盤中，以鑷子小心將主動脈旁之結締組織清除乾淨。並將主動脈橫切成數段，每段約 2~3 mm，將動脈置於培養盤中，並再次加入 matrigel 使液體與動脈凝固成膠狀。加入培養液於膠上，置於 37°C 及 5%  $\text{CO}_2$  培養箱培養 14 天，並觀察其血管增生之情形。

### (二) The matrigel plug assay

將藥物與 Matrigel 混和並且以皮下注射的方式植入五週大之嚴重免疫不全(Severe combined immunodeficiency, SCID)小鼠皮下，注入後，Matrigel 會立即凝固且形態可維持五天左右。經 7 天後取出 Matrigel plug，並觀察血管生長的情況及其形態變化。另外，藉由偵測 hemoglobin 含量的變化可間接定量血管生長之情形。

## 六、血液採集

依據分析內容之不同，小鼠血液之採集為經藥物處理後，以心臟採血所得全血進行血清分離後，以生化檢測儀進行 ALT、AST、Creatinine、Blood urea nitrogen (BUN)等生化指數之測定。

## 七、西方點墨法(Western blot)

取等量濃度之蛋白質加入  $2\times$  SDS/protein sample buffer，於  $95\sim 100^{\circ}\text{C}$  煮沸 5 分鐘，再置於冰上 5 分鐘，將蛋白質注入 12%膠體孔洞中，加入電泳緩衝液，在 200 mA 及 80V 的條件下進行電泳分離 1~1.5 小時，當電泳完成後隨即進行電泳膠的轉印。將膠體自電泳槽取出後，切除膠體上層膠部分，而後置於 Electroblothing buffer 內，剪下相符膠體大小之硝化纖維膜，並避免以手指直接觸碰硝化纖維膜。依順序正極-吸水海綿、3M paper、硝化纖維膜、膠體、3M paper-負極之組合於轉漬槽內，注意膠體與硝化纖維膜之間應避免氣泡之產生，再注滿 Electroblothing buffer 之後，在室溫下以 400 mA 電轉印 2 小時。將電轉印完成之硝化纖維膜以夾子取出，以 PBS 溶液去除殘留於膜上之電轉緩衝液。後配製 10 mL 內含 5%脫脂奶粉之 blocking buffer 並添加至硝化纖維膜之盒內，於室溫下震盪 1 小時，以降低非專一性之背景值，而後倒掉 blocking buffer 且加入稀釋初級抗體，亦於  $4^{\circ}\text{C}$  震盪雜交反應 12~16 小時後，以 PBS/Tween 溶液清洗三次，每次 5 分鐘。再加入稀釋 1:10000 之二級抗體溶液於含 5%脫脂奶粉之 blocking buffer，於室溫下進行雜合反應 1 小時。倒掉溶液，加入 PBS/Tween 溶液清洗三次，每次 5 分鐘；再以 PBS 洗 5 分鐘以去除殘留之 Tween-20。於暗房內利用 ECL 套組之顯影劑 A 和 B 等量各 1 mL 加入後混勻，加入硝化纖維膜之盒內，輕晃 30 秒，將硝化纖維膜置於卡匣內之透明膜中，放上 X 光底片，在暗房中使用高感光底片並經顯影、定影等步驟，由沖洗後的底片觀察標的蛋白質的變化情形。

## 八、統計分析

此研究所得之數據資料皆以 SPSS 13.0 版之軟體進行統計，以單因子變異數分析(One-way ANOVA)進行組內之比較，再以 post-Hoc Tukey's test 比較各組間之差異顯著性，實驗結果之數值皆以平均值 $\pm$ 標準誤差(means  $\pm$  SE)表示，差異之顯著程度為  $P<0.05$ 。

## 參、結果

### 一、TPL 及 CDDP 併用對胃癌細胞之影響

由 101 年度之實驗結果可知，胃癌細胞在控制組為 100% 存活率的比較下，以 5 ng/mL TPL 合併 2  $\mu$ g/mL CDDP 之處理 24 小時後，可有效抑制約 50% SC-M1 細胞之生長、以 0.625 ng/mL TPL 合併 0.25  $\mu$ g/mL CDDP 或以 1.25 ng/mL TPL 合併 0.5  $\mu$ g/mL CDDP 之處理 24 小時後，可各別抑制約 10% 或 20% 細胞之生長（如表一所示）。以上述半致死劑量（即 TPL 處理濃度為 5 ng/mL、CDDP 之處理濃度為 2  $\mu$ g/mL 之條件）所造成的胃癌細胞凋亡，已說明如 101 年度研究計畫期末報告中所列內容，本研究另再以造成較低胃癌細胞傷害 (IC<sub>10</sub> 及 IC<sub>20</sub>) 之合併劑量，進行其抑制胃癌細胞之調控分析，藉以評估低劑量 TPL 與 CDDP 併用對胃癌細胞之影響。圖一所示，TPL 合併 CDDP 之處理後，SC-M1 細胞在單獨以 0.625 或 1.25 ng/ml 之 TPL 處理後，除了有少數細胞死亡的情形外，細胞形態與控制組相較，變化並不明顯。經分別以 0.25 及 0.5  $\mu$ g/mL CDDP 單獨處理後之 SC-M1 細胞，除了細胞數量略為減少外，細胞之延展性亦明顯增加。以 TPL 合併 CDDP 處理之 SC-M1 細胞，則隨處理劑量之增加，細胞數量的減少與形態的變化情形也隨之加劇，於 TPL 與 CDDP 在 IC<sub>20</sub> 併用條件處理下，SC-M1 細胞之變化最為明顯；當在該處理條件下，另合併以 10 ng/ml VEGF 進行處理，則增加 TPL 併用 CDDP 對 SC-M1 細胞之作用。

### 二、TPL 及 CDDP 對胃癌細胞作用之調控分析

以同時處理 TPL 及 CDDP 的 SC-M1 細胞培養基，探討胃癌細胞釋放之細胞激素對內皮細胞之影響，結果已列述於 101 年度研究計畫期末報告中。然仍未說明在該條件 (IC<sub>20</sub>) 處理下，抑制胃癌細胞生長的調控情形；本研究乃另外針對可抑制內皮細胞增生的處理條件，探討 SC-M1 細胞表現與細胞存活及轉移相關蛋白質的活化情形，藉以說明 TPL 及 CDDP 對胃癌細胞作用的主要機制。如圖所示，經單獨以 1.25 ng/ml TPL、0.625 ng/ml TPL 併用 0.25  $\mu$ g/ml CDDP 或再合併以 10 ng/ml 之 VEGF 處理後，會增加 Erk (Erk2) 的活化；JNK 的活化則不論是經各項 TPL、CDDP 單獨或合併的處理後，均有增加的情形。與細胞轉移有關之蛋白質表現，除了以 1.25 ng/ml 之 TPL 單獨處理者外，經處理後，細胞 FAK 的活化都受到抑制。單獨以 TPL 處理之細胞，會增加 MMP-2 的表現，而以 VEGF 合併 TPL 及 CDDP 的處理，

則會減少 MMP-2 的表現;經以 TPL、CDDP 單獨或合併處理之 SC-M1 細胞, MMP-9 的表現量均較未處理者為少。經單獨以 1.25ng/ml 的 TPL 或是 TPL 合併 CDDP 的處理後, SC-M1 細胞的 VEGF 明顯減少, Src 的表現與活化則是略微降低。由 Src 所調控下游 AKT 之表現與活化亦隨之降低。經各項處理後,細胞 Hsp70 的表現量均降低,而 p62 及 LC3-II 之表現則相對增加,顯示 SC-M1 細胞在 TPL 及 CDDP 處理後,細胞發生的自噬現象。

以經 TPL 與 CDDP 處理 SC-M1 胃癌細胞後的培養基,接續處理內皮細胞後,對內皮細胞的調控情形,另如圖三所示。TPL 與 CDDP 單獨或合併處理後,內皮細胞之細胞核中 C-Jun、C-Fos 與 NF- $\kappa$ B 等轉錄調控因子均減少,尤其以 1.25 ng/ml 之 TPL 合併 0.5  $\mu$ g/ml 之 CDDP 處理為甚。此外,C-Jun 與 C-Fos 在細胞經以 0.5  $\mu$ g/ml 之 CDDP 單獨處理後之減少情形,也較其他單獨或合併處理之表現為少;經各項處理之後,細胞中 NF- $\kappa$ B 的總表現量並沒有明顯的變化,除了單獨以 0.25 或 0.5  $\mu$ g/ml 之 CDDP 處理後,NF- $\kappa$ B 於細胞質及細胞核的表現量沒有明顯變化外,其他各項以 TPL 單獨或合併 CDDP 的處理,細胞核中的 NF- $\kappa$ B 均明顯減少,且有累積於細胞質的情形。

由上述蛋白質表現之分析結果,推測 SC-M1 細胞透過 membrane receptor 相關之途徑,活化 Src、FAK 及其下游包括 AKT、JNK 及 ERK 等分子的作用,影響細胞核的轉錄,增加 MMPs 及 VEGF 的表現,從而加速血管內皮細胞的增生及後續 angiogenesis 等現象(圖九)。以 triptolide 合併 cisplatin 處理之 SC-M1 細胞,可能藉由 Ras/Raf/ERK pathway 活化 ERK,進而造成 ERK-induced cell apoptosis,或因 triptolide 及 cisplatin 造成細胞的 DNA damage,抑制 SC-M1 細胞藉由 receptor 及其相關下游分子活化所表現的 MMPs 及 VEGF,血管內皮細胞的增生及後續 angiogenesis 等現象也因此受到抑制。

### 三、低濃度之 TPL 及 CDDP 對小鼠血管新生之作用

本研究是以主動脈內皮細胞的血管新生情況與 metrigel plug assay 評估低濃度 TPL 及 CDDP 併用對 SC-M1 細胞在體內誘發血管新生的影響。經 TPL 及 CDDP 處理之胃癌細胞培養液對大鼠主動脈內皮細胞生長與延展的影響如圖四所示。TPL 及 CDDP 各別處理胃癌細胞的培養液,對主動脈內皮細胞生長的抑制能力,較之以 TPL 及 CDDP 合併處理者為低。而經 TPL 及 CDDP 合併處理時,另同時加入 VEGF 之胃癌細胞培養液,結果顯示 VEGF 無法回復 TPL 合併 CDDP 所造成主動脈內皮細胞的生長抑制現象。

再就以 TPL 及 CDDP 各別或合併處理主動脈內皮細胞的結果，顯示 TPL 與 CDDP 均具有抑制內皮細胞血管新生的功能。圖五上圖以 TPL 及 CDDP 單獨或合併處理進行對 SC-M1 細胞誘發血管新生抑制作用之體內分析，結果顯示 SC-M1 細胞與 metrigel 混合，在小鼠體內會誘發明顯的血管新生現象，而單獨或合併以 TPL 及 CDDP 處理後，血管新生的情況即出現不同程度的減少。血管新生的情況，藉由均質化測試之 metrigel plug 後，其中所含 hemoglobin 經量化分析的結果，如下圖所示。本研究欲了解在體外可抑制 SC-M1 細胞生長的劑量條件，在體內複雜的環境中對 SC-M1 細胞調控血管新生的作用情形，故仍以 TPL 及 CDDP 之  $IC_{10}$  與  $IC_{20}$  兩項條件進行單獨與合併的處理。結果顯示，單獨 TPL 及 TPL 合併 CDDP 的處理，對 SC-M1 細胞所誘發小鼠血管新生之抑制作用較其他處理所得結果為明顯。

#### 四、TPL 併用 CDDP 對罹癌小鼠的影響

依據表一所示 TPL 併用 CDDP 對 SC-M1 細胞之影響，及上列圖一、二以較低生長抑制濃度所評估之細胞存活及型態變化之分析內容，本研究先以 0.4 mg/kg 之 TPL 併用 3 mg/kg 之 CDDP 為處理條件，進行以 SC-M1 細胞種植於小鼠並產生皮下腫瘤的抗癌活性評估，該處理條件經測試對罹癌小鼠之體重及代謝功能並無明顯之影響(表二、表三)。TPL 及 CDDP 單獨或合併藥物處理後，小鼠體重的變化情形，如表二所示。小鼠經 TPL 與 CDDP 單獨或合併的處理後，小鼠的體重與單獨注射 PBS 之控制組小鼠之體重無統計上的差異。皮下腫瘤的變化情形，則如圖六所示，經 TPL 或 CDDP 單獨處理之小鼠皮下腫瘤體積，均較單獨注射 PBS 之控制組小，單獨以 TPL 處理之小鼠腫瘤縮小的程度不及單獨以 CDDP 處理者；其中又以 TPL 合併 CDDP 之處理結果，對小鼠皮下腫瘤的生長有明顯的抑制作用。罹癌小鼠經不同方式處理後，所得之生化功能分析結果，顯示各不同方式的處理對罹癌小鼠 GOT、GPT、BUN 與 creatinine 等均無明顯的影響。

為降低 CDDP 在腫瘤治療過程中對個體造成的傷害，本研究除重複測試以 0.4 mg/kg 之 TPL 併用 3 mg/kg 之 CDDP 連續靜脈注射 21 天對罹癌小鼠的影響外，另以 0.5 mg/kg 之 TPL 併用 2 mg/kg 之 CDDP、0.5 mg/kg 之 TPL 併用 1 mg/kg 之 CDDP 等降低 CDDP 劑量之條件，連續靜脈注射 21 天；再以 0.5 mg/kg 之 TPL 併用 1 mg/kg 之 CDDP 連續股部皮下注射 3 天，藉此比較降低 CDDP 處理劑量或以不同注射方式的處理，對於以 TPL 併用 CDDP 進行抗癌加成作用之影響。如表四及圖七所示，當 TPL 由 0.4mg/kg 增加為

0.5mg/kg 時，即可明顯的抑制腫瘤之生長；當 CDDP 的處理劑量由 3mg/kg 依次遞減為 2mg/kg 及 1mg/kg 時，其對腫瘤生長的抑制作用亦同時降低。然上述各項以尾靜脈注射進行藥物合併的各項處理結果，其對腫瘤生長的抑制作用皆與控制組間存在著顯著的差異性。當改以股部皮下注射藥物時，腫瘤生長的抑制現象亦相當明顯。此外，對腫瘤生長的抑制作用，各項處理間並無顯著的差異。TPL 與 CDDP 之合併處理，均能有效抑制皮下腫瘤的生長與腫瘤血管之增生，由圖八腫瘤細胞免疫染色的分析結果，經合併 0.4 mg/kg 之 TPL 與 3 mg/kg 之 CDDP，而以連續靜脈注射方式處理 21 天後，罹癌小鼠的腫瘤組織出現細胞壞死的現象。

## 肆、討論

TPL 在近年已陸續被研究之抗癌活性與化療加成之作用外，本研究於去年度以 TPL 合併 CDDP 進行 SC-M1 胃癌細胞之抗癌及抗血管新生的研究結果，發現以低劑量的 TPL 合併低劑量的 CDDP，能有效抑制血管內皮細胞的生長，顯示 TPL 合併 CDDP 的體內腫瘤生長抑制活性，可能也涉及腫瘤血管的增生現象。為深入探討 TPL 合併 CDDP 的加成抗癌作用並釐清其對腫瘤血管增生的作用情形，本研究先以包括  $IC_{10}$  與  $IC_{20}$  等兩種低於  $IC_{50}$  之 SC-M1 細胞抗癌劑量，進行 TPL 與 CDDP 之單獨及合併處理。實驗結果可知，低劑量之 TPL 及 CDDP 可造成較低比例的細胞數量減少並抑制細胞的增生。此種以低劑量 TPL 合併 CDDP 所進行的 SC-M1 細胞作用，若再合併 VEGF 進行處理，將強化 TPL 併用 CDDP 對 SC-M1 細胞之生長抑制。由調控細胞存活及轉移等相關蛋白質的表現情形，顯示以  $IC_{10}$  及  $IC_{20}$  之 TPL 併用 CDDP 處理 SC-M1 細胞後，可增加 Erk 以及 JNK 的活化、降低 FAK 的活化以及 MMP-9 的表現。亦即，依前一年度研究計畫的結果，以對 SC-M1 細胞有抑制生長活性之  $IC_{10}$  及  $IC_{20}$  等劑量之處理，可同時抑制血管內皮細胞之增生、管脈形成，並抑制 SC-M1 細胞之生長。

活化 PI3K/AKT 之路徑已被證實可誘導產生血管生長因子[45-47]，ERK-1 及 ERK-2 亦被認為可以經由活化細胞內基質及細胞核內轉錄因子以調控血管生長因子之表現[48-52]。當血管生長因子與其受體結合後，可透過活化 PI3K/AKT 及 MAPK/ERK 等路徑產生血管生長因子，再經血管生長因子與細胞受體的作用，形成一個正回饋(positive feedback)之訊息傳遞路徑[47,53]。VEGF 是血管增生的重要調控因子，也與腫瘤的血管新生有關，本實驗對 SC-M1 細胞所作分析結果，以  $IC_{10}$  與  $IC_{20}$  之 TPL 及 CDDP 合併處理 24 小時後，SC-M1 細胞之 VEGF 表現量均明顯減少。以 SC-M1 細胞之培養基處理的主動脈環，其內膜的內皮細胞增生，即受到明顯的抑制。以  $IC_{20}$  之 TPL 及 CDDP 合併處理，可抑制 SC-M1 細胞中 AKT 的活化；然而 ERK1/2 之活化卻在經 TPL 及 CDDP 之單獨或合併處理後增加，尤以  $IC_{20}$  之 TPL 合併 CDDP 同時加入 VEGF，對 SC-M1 細胞 ERK1/2 的活化作用最為明顯。雖然 VEGF 等血管生長因子與其受體之結合，可以有效的活化 PI3K/AKT 及 MAPK/ERK 等訊息傳遞路徑，本研究的體外實驗結果則說明 TPL 合併 CDDP 的處理，可能藉由 PI3K/AKT 路徑抑制 SC-M1 細胞中 VEGF

的表現，而後抑制血管內皮細胞的 c-Fos、c-jun 及 NF- $\kappa$ B 等轉錄因子的調控與後續之細胞增生。在以 IC<sub>20</sub> 之 TPL 及 CDDP 合併處理 SC-M1 細胞的同時，若加入 VEGF，除大量的 ERK1/2 活化外，對 SC-M1 細胞的存活及與 VEGF 調控相關的作用機制也大多無明顯的影響。

因 VEGFR 並非唯一能活化 PI3K/AKT 及 MAPK/ERK 路徑之受體，其他如人類表皮生長因子之受體(human epidermal growth factor receptor 2, HER2; epidermal growth factor receptor, EGFR)等，亦可調控 PI3K/AKT 及 MAPK/ERK 等路徑[54-56]，顯示在體外以低劑量 TPL 及 CDDP 合併處理後，SC-M1 細胞除 VEGF 外的其他調控反應與基因表現，亦可能間接抑制血管內皮細胞的增生。由活體實驗的結果可知，TPL 與 CDDP 所具抗腫瘤活性，雖依處理劑量及處理方式的不同而異，對腫瘤的抑制作用，TPL 的劑量調整幅度遠低於以 CDDP 所進行的調整；TPL 與 CDDP 對腫瘤生長的抑制，與腫瘤細胞的生長及腫瘤血管的發展等兩項因素的調控有關。

由目前的研究結果可知，TPL 及 CDDP 除在以 IC<sub>50</sub> 劑量的處理下，可誘導 SC-M1 胃癌細胞的凋亡外，在低劑量的 IC<sub>10</sub> 及 IC<sub>20</sub> 等條件下，亦可直接或間接透過 SC-M1 細胞的調控，抑制內皮細胞的基因表現及血管新生。

## 伍、結論與建議

### 一、結論

- (一)本研究以台灣本土胃癌之細胞株 SC-M1 細胞為 TPL 及 CDDP 抗癌實驗的細胞，證實在降低 CDDP 使用劑量及對正常細胞無明顯傷害的情況下，TPL 可明顯增加 CDDP 所造成的細胞毒性。
- (二)以 IC<sub>10</sub> 與 IC<sub>20</sub> 之 TPL 合併 CDDP，即可有效抑制 SC-M1 細胞中 MMP9 的表現，對 Src 及其下游 FAK 的活化也有相對的作用。同時若加入 VEGF，則可能透過 ERK 的活化，強化 TPL 及 CDDP 對 SC-M1 細胞的作用。
- (三)TPL 及 CDDP 在以 IC<sub>10</sub> 與 IC<sub>20</sub> 之合併處理下，SC-M1 細胞之 VEGF 表現量明顯減少，其細胞微環境也同時具有抑制血管內皮細胞增生的作用。顯示胃癌 SC-M1 細胞在低劑量 TPL 及 CDDP 之合併處理下，可以透過 PI3K/AKT 之調控，有效抑制其血管新生因子之表現，從而降低內皮細胞藉由 VEGF/VEGFR 所誘導之細胞核內 NF- $\kappa$ B，及其他包括 c-Fos、c-jun 等在內的基因轉錄作用，最終達到腫瘤生長的抑制。
- (四)動物模式之分析，顯示 TPL 及 CDDP 合併處理的條件設計，調整 TPL 較之調整 CDDP 處理劑量的幅度變化為小；靜脈注射較之皮下注射的效果為低。以 TPL 及 CDDP 進行體內抗腫瘤活性的分析，說明以 TPL 合併 CDDP 之抗癌治療，除可減少因單獨使用 CDDP 所造成的正常細胞傷害、強化 CDDP 的抗腫瘤活性外，也可藉由抑制血管內皮細胞的增生，達到抑制腫瘤生長的目標。

### 二、建議

- (一)本研究計畫以 TPL 合併臨床化療用藥的抗癌效果具有中西醫臨床治療之參考價值，但因合併藥物各自採用的劑量高低及處理方式，攸關治療的效果，另外在抗癌作用之外，微幅增加 TPL 並相對降低 CDDP 的劑量條件，對個體其他機能是否有潛在的影響，仍待後續深入的探討。
- (二)本研究計畫成果初步報告已著手撰寫文章，準備投稿國外期刊。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP102-RD-112 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. Conner EA, Teramoto T, Wirth PJ, Kiss A, Garfield S, et al. (1999) HGF-mediated apoptosis via p53/bax-independent pathway activating JNK1. *Carcinogenesis* 20: 583-590.
2. Bos JL (1989) ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49: 4682-4689.
3. Webb CP, Taylor GA, Jeffers M, Fiscella M, Oskarsson M, et al. (1998) Evidence for a role of Met-HGF/SF during Ras-mediated tumorigenesis/metastasis. *Oncogene* 17: 2019-2025.
4. Zhang Y, Thant AA, Machida K, Ichigotani Y, Naito Y, et al. (2002) Hyaluronan-CD44s signaling regulates matrix metalloproteinase-2 secretion in a human lung carcinoma cell line QG90. *Cancer Res* 62: 3962-3965.
5. Giatromanolaki A, Sivridis E, Brekken R, Thorpe PE, Anastasiadis P, et al. (2001) The angiogenic "vascular endothelial growth factor/flk-1(KDR) receptor" pathway in patients with endometrial carcinoma: prognostic and therapeutic implications. *Cancer* 92: 2569-2577.
6. He MF, Huang YH, Wu LW, Ge W, Shaw PC, et al. (2010) Triptolide functions as a potent angiogenesis inhibitor. *Int J Cancer* 126: 266-278.
7. Goldman E (1908) The Growth of Malignant Disease in Man and the Lower Animals, with special reference to the Vascular System. *Proc R Soc Med* 1: 1-13.
8. Algire GH (1954) Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. VII. Observations on vascular reactions in destruction of tumor homografts. *J Natl Cancer Inst* 15: 483-491.

9. Ehrmann RL, Knoth M (1968) Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy. *J Natl Cancer Inst* 41: 1329-1341.
10. Greenblatt M, Shubi P (1968) Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J Natl Cancer Inst* 41: 111-124.
11. Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182-1186.
12. Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, et al. (1998) Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 94: 715-725.
13. Ramanujan S, Koenig GC, Padera TP, Stoll BR, Jain RK (2000) Local imbalance of proangiogenic and antiangiogenic factors: a potential mechanism of focal necrosis and dormancy in tumors. *Cancer Res* 60: 1442-1448.
14. Baish JW, Jain RK (2000) Fractals and cancer. *Cancer Res* 60: 3683-3688.
15. Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK (1997) Interstitial pH and pO<sub>2</sub> gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* 3: 177-182.
16. Giaccia AJ (1996) Hypoxic Stress Proteins: Survival of the Fittest. *Semin Radiat Oncol* 6: 46-58.
17. Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, et al. (1998) Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4607-4612.
18. Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM (1999) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 237: 97-132.
19. Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, et al. (2000) Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* 156: 1363-1380.

20. Fukumura D, Yuan F, Monsky WL, Chen Y, Jain RK (1997) Effect of host microenvironment on the microcirculation of human colon adenocarcinoma. *Am J Pathol* 151: 679-688.
21. Fidler IJ (1995) Modulation of the organ microenvironment for treatment of cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 87: 1588-1592.
22. Jain RK, Munn LL (2000) Leaky vessels? Call Ang1! *Nat Med* 6: 131-132.
23. Jain RK, Koenig GC, Dellian M, Fukumura D, Munn LL, et al. (1996) Leukocyte-endothelial adhesion and angiogenesis in tumors. *Cancer Metastasis Rev* 15: 195-204.
24. Rafii S (2000) Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest* 105: 17-19.
25. Asahara T, Kalka C, Isner JM (2000) Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther* 7: 451-457.
26. Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-395.
27. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, et al. (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380: 435-439.
28. Ferrara N, Alitalo K (1999) Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* 5: 1359-1364.
29. Jain RK (1988) Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Res* 48: 2641-2658.
30. Carmeliet P, Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407: 249-257.
31. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E (1999) Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 103: 159-165.
32. Lee KY, Chang W, Qiu D, Kao PN, Rosen GD (1999) PG490 (triptolide) cooperates with tumor necrosis factor-alpha to induce apoptosis in tumor cells. *J Biol Chem* 274: 13451-13455.

33. Tao X, Davis LS, Lipsky PE (1991) Effect of an extract of the Chinese herbal remedy *Tripterygium wilfordii* Hook F on human immune responsiveness. *Arthritis Rheum* 34: 1274-1281.
34. Chang WT, Kang JJ, Lee KY, Wei K, Anderson E, et al. (2001) Triptolide and chemotherapy cooperate in tumor cell apoptosis. A role for the p53 pathway. *J Biol Chem* 276: 2221-2227.
35. Fidler JM, Li K, Chung C, Wei K, Ross JA, et al. (2003) PG490-88, a derivative of triptolide, causes tumor regression and sensitizes tumors to chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 2: 855-862.
36. Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, et al. (2000) FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* 12: 599-609.
37. Choi YJ, Kim TG, Kim YH, Lee SH, Kwon YK, et al. (2003) Immunosuppressant PG490 (triptolide) induces apoptosis through the activation of caspase-3 and down-regulation of XIAP in U937 cells. *Biochem Pharmacol* 66: 273-280.
38. Lee KY, Park JS, Jee YK, Rosen GD (2002) Triptolide sensitizes lung cancer cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by inhibition of NF-kappaB activation. *Exp Mol Med* 34: 462-468.
39. Frese S, Pirnia F, Miescher D, Krajewski S, Borner MM, et al. (2003) PG490-mediated sensitization of lung cancer cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis requires activation of ERK2. *Oncogene* 22: 5427-5435.
40. Shamon LA, Pezzuto JM, Graves JM, Mehta RR, Wangcharoentrakul S, et al. (1997) Evaluation of the mutagenic, cytotoxic, and antitumor potential of triptolide, a highly oxygenated diterpene isolated from *Tripterygium wilfordii*. *Cancer Lett* 112: 113-117.
41. Yang S, Chen J, Guo Z, Xu XM, Wang L, et al. (2003) Triptolide inhibits the growth and metastasis of solid tumors. *Mol Cancer Ther* 2: 65-72.

42. Zhu G, Song L, Lippard SJ (2013) Visualizing Inhibition of Nucleosome Mobility and Transcription by Cisplatin-DNA Interstrand Crosslinks in Live Mammalian Cells. *Cancer Res.*
43. Wei Y, Shen N, Wang Z, Yang G, Yi B, et al. (2013) Sorafenib sensitizes hepatocellular carcinoma cell to cisplatin via suppression of Wnt/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biochem.*
44. Choudhary S, Sood S, Wang HC (2013) Synergistic induction of cancer cell death and reduction of clonogenic resistance by cisplatin and FK228. *Biochem Biophys Res Commun* 436: 325-330.
45. Nyberg P, Salo T, Kalluri R (2008) Tumor microenvironment and angiogenesis. *Front Biosci* 13: 6537-6553.
46. Stoeltzing O, Meric-Bernstam F, Ellis LM (2006) Intracellular signaling in tumor and endothelial cells: The expected and, yet again, the unexpected. *Cancer Cell* 10: 89-91.
47. Dai J, Peng L, Fan K, Wang H, Wei R, et al. (2009) Osteopontin induces angiogenesis through activation of PI3K/AKT and ERK1/2 in endothelial cells. *Oncogene* 28: 3412-3422.
48. Kolch W (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351 Pt 2: 289-305.
49. Schulze A, Lehmann K, Jefferies HB, McMahon M, Downward J (2001) Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells. *Genes Dev* 15: 981-994.
50. Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Cardo M, Herrero C, et al. (2001) Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis. *Immunobiology* 204: 543-550.
51. Sananbenesi F, Fischer A, Schrick C, Spiess J, Radulovic J (2002) Phosphorylation of hippocampal Erk-1/2, Elk-1, and p90-Rsk-1 during contextual fear conditioning: interactions between Erk-1/2 and Elk-1. *Mol Cell Neurosci* 21: 463-476.

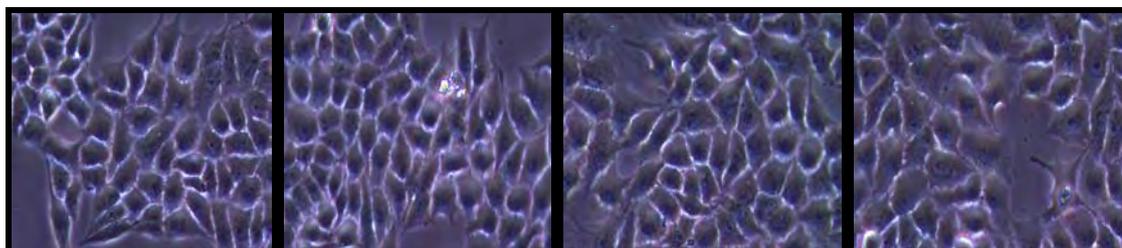
52. Halaschek-Wiener J, Wacheck V, Kloog Y, Jansen B (2004) Ras inhibition leads to transcriptional activation of p53 and down-regulation of Mdm2: two mechanisms that cooperatively increase p53 function in colon cancer cells. *Cell Signal* 16: 1319-1327.
53. Amiri KI, Richmond A (2005) Role of nuclear factor-kappa B in melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 24: 301-313.
54. She QB, Chandarlapaty S, Ye Q, Lobo J, Haskell KM, et al. (2008) Breast tumor cells with PI3K mutation or HER2 amplification are selectively addicted to Akt signaling. *PLoS One* 3: e3065.
55. Moulder SL, Yakes FM, Muthuswamy SK, Bianco R, Simpson JF, et al. (2001) Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 61: 8887-8895.
56. Schoeberl B, Eichler-Jonsson C, Gilles ED, Muller G (2002) Computational modeling of the dynamics of the MAP kinase cascade activated by surface and internalized EGF receptors. *Nat Biotechnol* 20: 370-375.

## 染、圖、表

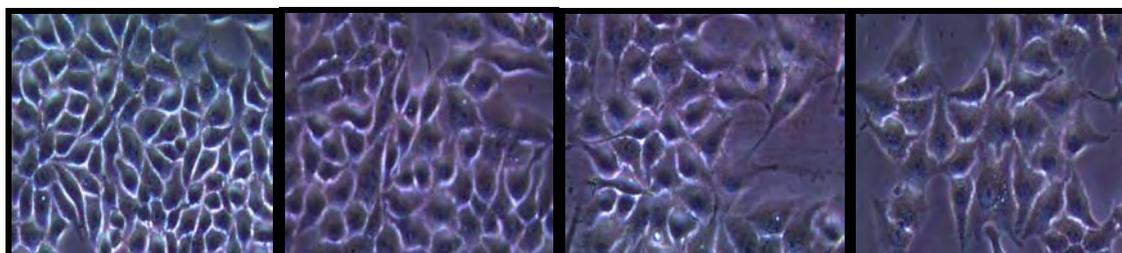
表一、Triptolide 併用 cisplatin 對胃癌細胞生長之抑制作用

		TPL		CDDP	
		Concentration (ng/mL)		Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	
Percentage of inhibition	Combination index	Alone	Mix	Alone	Mix
Drug combinations					
10	0.29	5	0.625	1.5	0.25
20	0.42	7.5	1.25	2	0.5
40	0.47	11.5	2.5	4	1
50	0.78	13	5	5	2
70	1.17	15	10	8	4

TPL (ng/ml)	0.625	1.25	—	—
CDDP( $\mu\text{g/ml}$ )	—	—	0.25	0.5

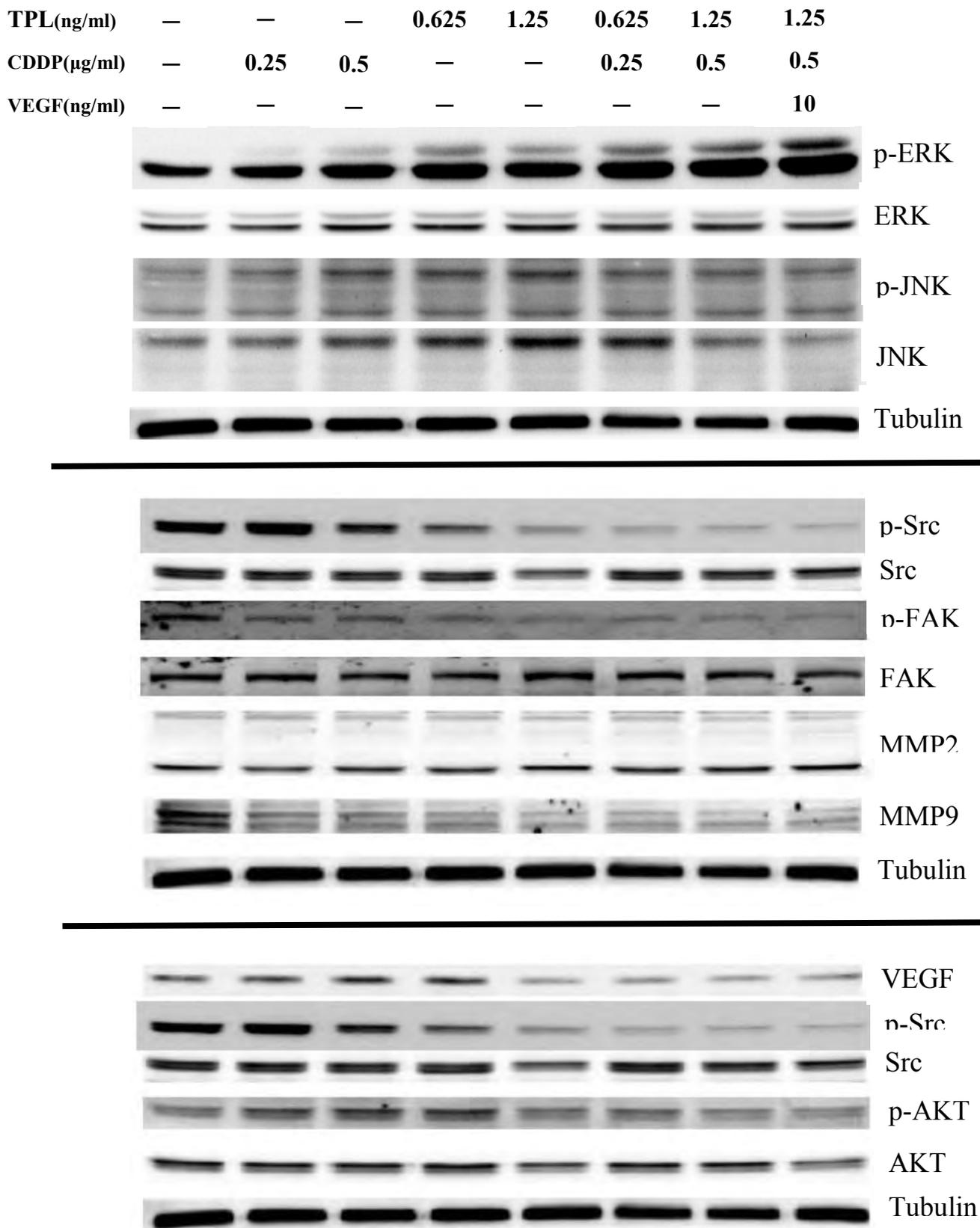


TPL(ng/ml)	—	0.625	1.25	1.25
CDDP( $\mu\text{g/ml}$ )	—	0.25	0.5	0.5
VEGF(ng/ml)	—	—	—	10

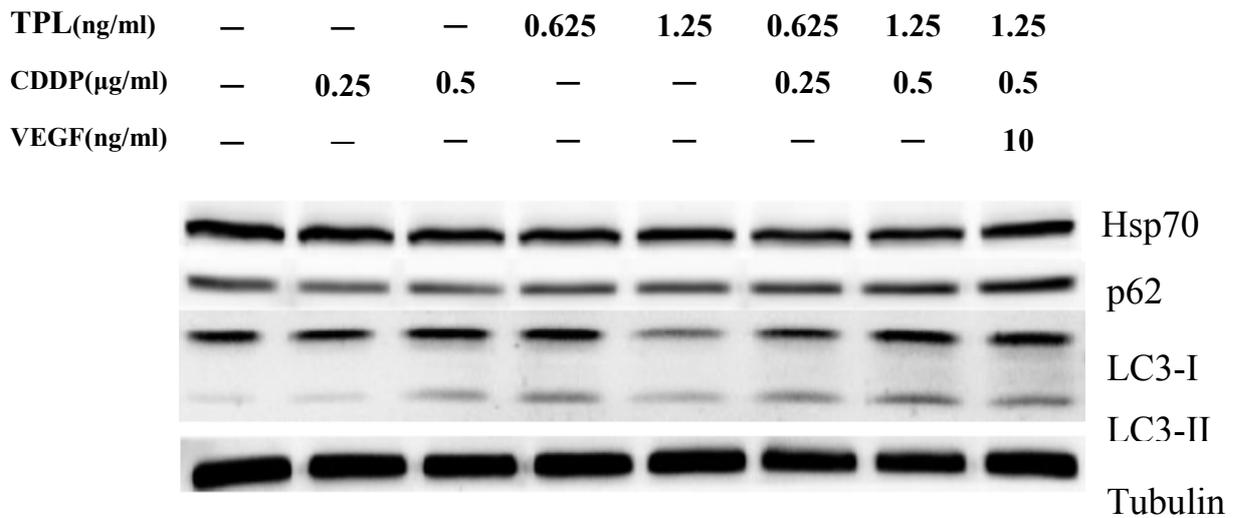


圖一、IC<sub>10</sub> 及 IC<sub>20</sub> 之 triptolide 與 cisplatin 併用處理對胃癌細胞之影響

SC-M1 細胞以 triptolide 及 cisplatin 分別依 IC<sub>10</sub> 及 IC<sub>20</sub> 之併用條件各別處理 24 小時後，細胞數量及形態的變化情形。下圖最右為另合併 10 ng/ml VEGF 之結果，顯示 VEGF 可增加 TPL 及 CDDP 併用對細胞的破壞。



圖二-A、Triptolide 併用 cisplatin 對 SC-M1 胃癌細胞蛋白質表現之影響

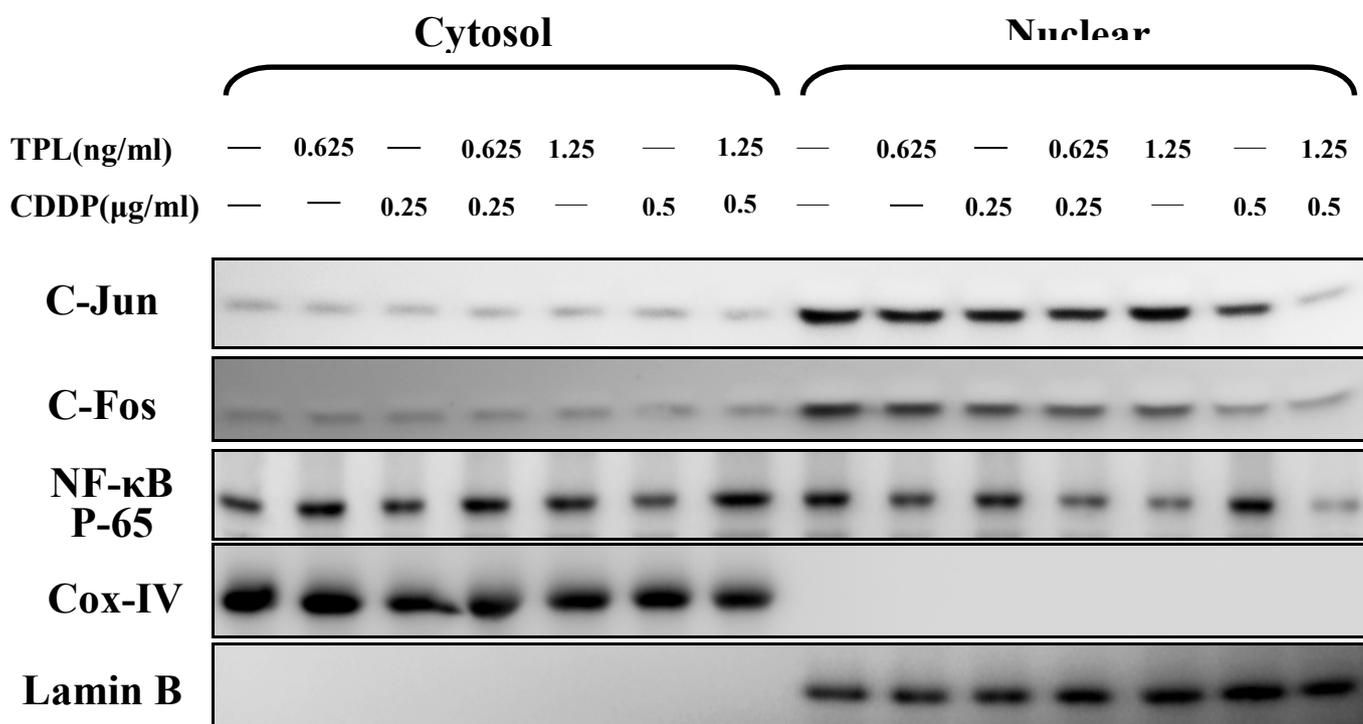


圖二-B、Triptolide 併用 cisplatin 對 SC-M1 胃癌細胞蛋白質表現之影響

經 TPL 及 CDDP 單獨或合併處理 SC-M1 細胞後，與細胞存活及轉移相關蛋白質之表現情形。圖二之 A 上半部為 Erk 與 JNK 的表現與活化分析；中間部份為 Src、FAK、MMP-2 與 MMP-9 的分析結果；下半部為 VEGF、AKT 的表現與活化分析。經 TPL 及 CDDP 合併處理後，ERK、JNK 都有明顯的活化，其中以 1.25 ng/ml 之 TPL 合併 0.5 μg/ml 之處理，細胞 ERK1/2 的活化最為明顯；VEGF 合併 TPL 及 CDDP 進行之處理，ERK 的活化最為明顯，各項 TPL 及 CDDP 之單獨或合併處理後，FAK 的活化均明顯增加，其下游 MMP2 的表現量也略微增加，MMP9 的表現量則相對受到抑制。經單獨以 1.25ng/ml 的 TPL 或是 TPL 合併 CDDP 的處理後，SC-M1 細胞的 VEGF 明顯減少，Src 的表現與活化則是略微降低。由 Src 所調控下游 AKT 之表現與活化亦隨之降低。

經各項處理後，細胞 Hsp70 的表現量均降低，而 p62 及 LC3-II 之表現則相對增加，顯示 SC-M1 細胞在 TPL 及 CDDP 處理後，細胞發生的自噬現象。

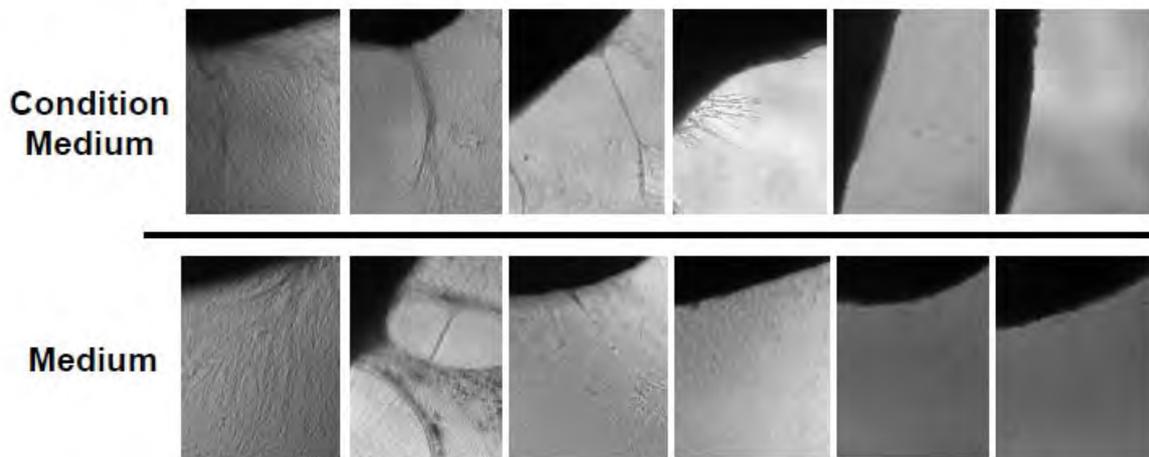
本研究有關蛋白質表現之變化分析，皆是以重複三至五次的處理結果評估所得。



圖三、TPL 併用 CDDP 對血管內皮細胞之調控

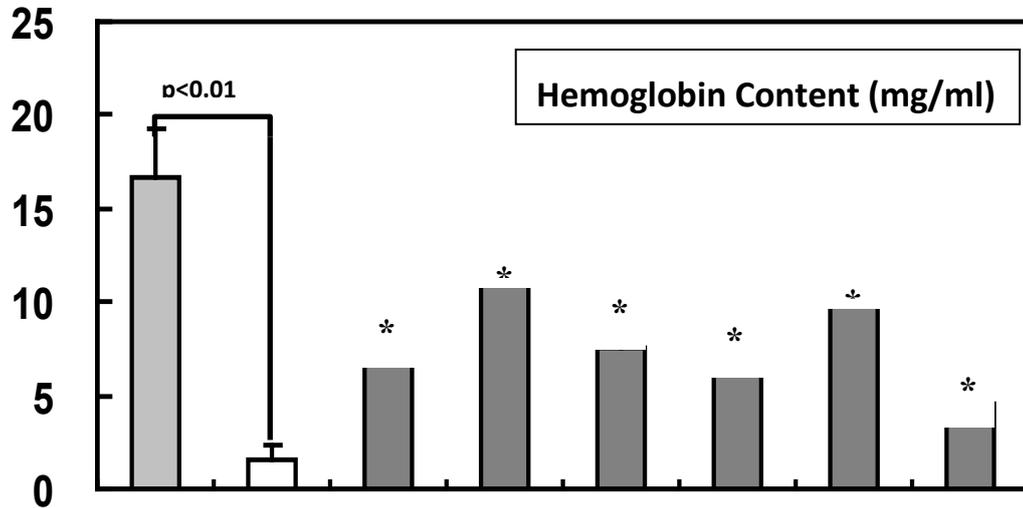
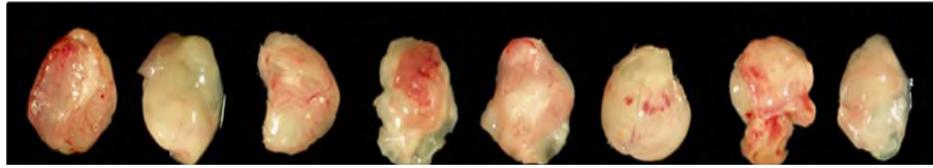
經 TPL 與 CDDP 單獨或合併處理 SC-M1 細胞，再以該培養基處理內皮細胞後，內皮細胞核中 C-Jun、C-Fos 與 NF-κB 等轉錄調控因子均減少，而以 1.25 ng/ml 之 TPL 合併 0.5 μg/ml 之 CDDP 處理後的細胞為甚。細胞經以 0.5 μg/ml 之 CDDP 單獨處理後，C-Jun 與 C-Fos 即較其他單獨或合併處理之表現為少。經各項處理之後，細胞中 NF-κB 的總表現量並沒有明顯的變化，除了單獨以 0.25 或 0.5 μg/ml 之 CDDP 處理，NF-κB 於細胞質及細胞核的表現量沒有明顯變化外，其他各項以 TPL 單獨或合併 CDDP 的處理，細胞核中的 NF-κB 均明顯減少，且有累積於細胞質的情形，其中尤以 1.25 ng/ml 之 TPL 合併 0.5 μg/ml 之 CDDP 處理的細胞為甚。

TPL(ng/mL)	—	—	1.25	—	1.25	1.25
CDDP( $\mu$ g/mL)	—	—	—	0.5	0.5	0.5
VEGF(ng/mL)	—	10	—	—	—	10



圖四、TPL 與 CDDP 處理對主動脈血管新生的影響

圖四所示為以大鼠主動脈環進行 TPL 及 CDDP 單獨或合併處理的結果。上半部是以處理 SC-M1 細胞後的培養基(condition media)進行測試，下半部是直接以 TPL 及 CDDP 處理的結果。未加入藥物的 condition media 對主動脈內膜(tunica intima)上 endothelial cells 的生長，與未加入藥物的 media 之作用結果相似，當主動脈環處理有加入 VEGF 的 media 後，血管增生與延長的情形即相對明顯。經 TPL 或 CDDP 各別處理後，血管內皮細胞的增生即較未經藥物處理者減少，尤以 CDDP 處理後所抑制的血管增生現象最為明顯。當以 TPL 合併 CDDP 處理主動脈環後，不論 condition media 或 media，均可明顯地抑制內皮細胞之血管增生現象；在 TPL 合併 CDDP 時，雖加入 VEGF，然仍無法回復內皮細胞受到抑制之血管增生現象。



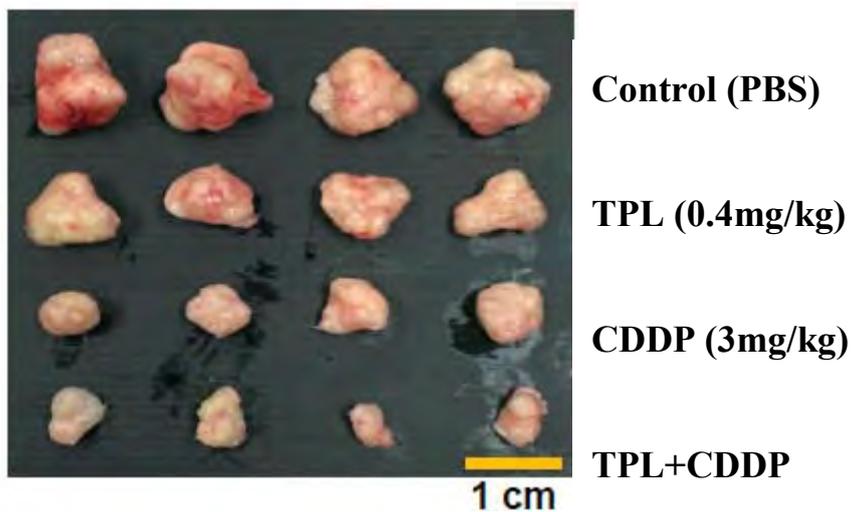
SC-M1 cells	+	-	+	+	+	+	+	+
TPL (ng/ml)	-	-	0.625	-	0.625	1.25	-	1.25
CDDP(μg/ml)	-	-	-	0.25	0.25	-	0.5	0.5

圖五、TPL 與 CDDP 對血管新生之抑制作用

圖上所示為以 metrigel plug assay 進行 TPL 及 CDDP 單獨或合併處理對 SC-M1 細胞誘發血管新生抑制作用之分析，結果顯示混合於 metrigel 之 SC-M1 細胞在小鼠體內即會誘發明顯的血管新生現象，而以 TPL 及 CDDP 經各項單獨或合併的處理後，血管新生的情況即出現不同程度的減少。下圖所示為將測試之 metrigel plug 均質化後，所含 hemoglobin 的量化分析結果。當 TPL 及 CDDP 以 IC<sub>10</sub> 或 IC<sub>20</sub> 進行單獨與合併的處理後，對 SC-M1 細胞所誘發血管新生之抑制作用，是以單獨 TPL 及 TPL 合併 CDDP 的處理結果較為明顯。

表二、TPL 與 CDDP 處理對罹癌小鼠體重的影響

Group	Pre-treatment	Post-treatment
PBS	28.2 ± 1.8 (g)	35.3 ± 1.4 (g)
TPL (0.4mg/kg)	28.5 ± 1.7 (g)	32.8 ± 1.1 (g)
CDDP (3mg/kg)	28.1 ± 1.5 (g)	33.4 ± 0.9 (g)
TPL+CDDP	28.6 ± 1.2 (g)	32.9 ± 1.4 (g)



圖六、TPL 與 CDDP 合併抑制胃癌細胞生長之體內評估

表二結果顯示各組小鼠體重之變化並無統計上的差異。上圖所示則顯示以 SC-M1 細胞誘發皮下腫瘤之小鼠，經以 0.4mg/kg TPL 與 3mg/kg CDDP 之單獨或合併處理後，各組小鼠腫瘤生長的抑制程度不一。單獨以 TPL 進行處理之小鼠腫瘤平均值，較之控制組為小，但仍不如單獨以 CDDP 或 TPL 合併 CDDP 處理之小鼠腫瘤減少的程度。

表三、TPL 與 CDDP 處理對罹癌小鼠生化功能的影響

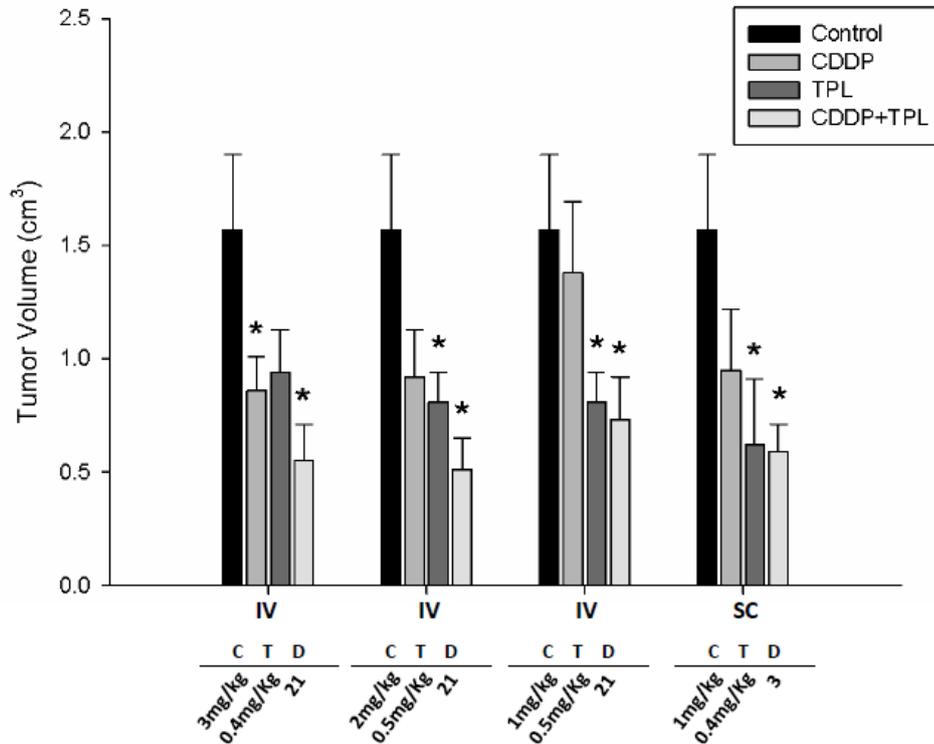
Biochemical parameters	Control	Treatments											
		IV			IV			IV			SC		
		C 3mg/Kg	T 0.4mg/Kg	D 21	C 2mg/Kg	T 0.5mg/Kg	D 21	C 1mg/Kg	T 0.5mg/Kg	D 21	C 1mg/Kg	T 0.5mg/Kg	D 3
SGOT (IU/L)	54.8±3.7	60.3±4.7			50.2±3.9			56.6±2.8			59.4±3.3		
SGPT (IU/L)	38.7±2.1	42.3±3.7			39.1±1.8			44.0±3.4			42.2±2.9		
BUN (mg/dL)	18.8±1.7	19.6±1.8			20.7±1.8			21.6±2.1			19.8±1.6		
Creatinine (mg/dL)	0.93±0.25	0.96±0.16			1.09±0.26			0.91±0.18			0.98±0.16		

各項處理條件對罹癌小鼠生化功能之影響，如表三所示。結果顯示：本研究所列各項 TPL 及 CDDP 的單獨或合併處理，雖可抑制皮下腫瘤之生長，但對罹癌小鼠之生化功能並沒有明顯的影響。

表四、TPL 與 CDDP 處理對罹癌小鼠腫瘤生長的影響

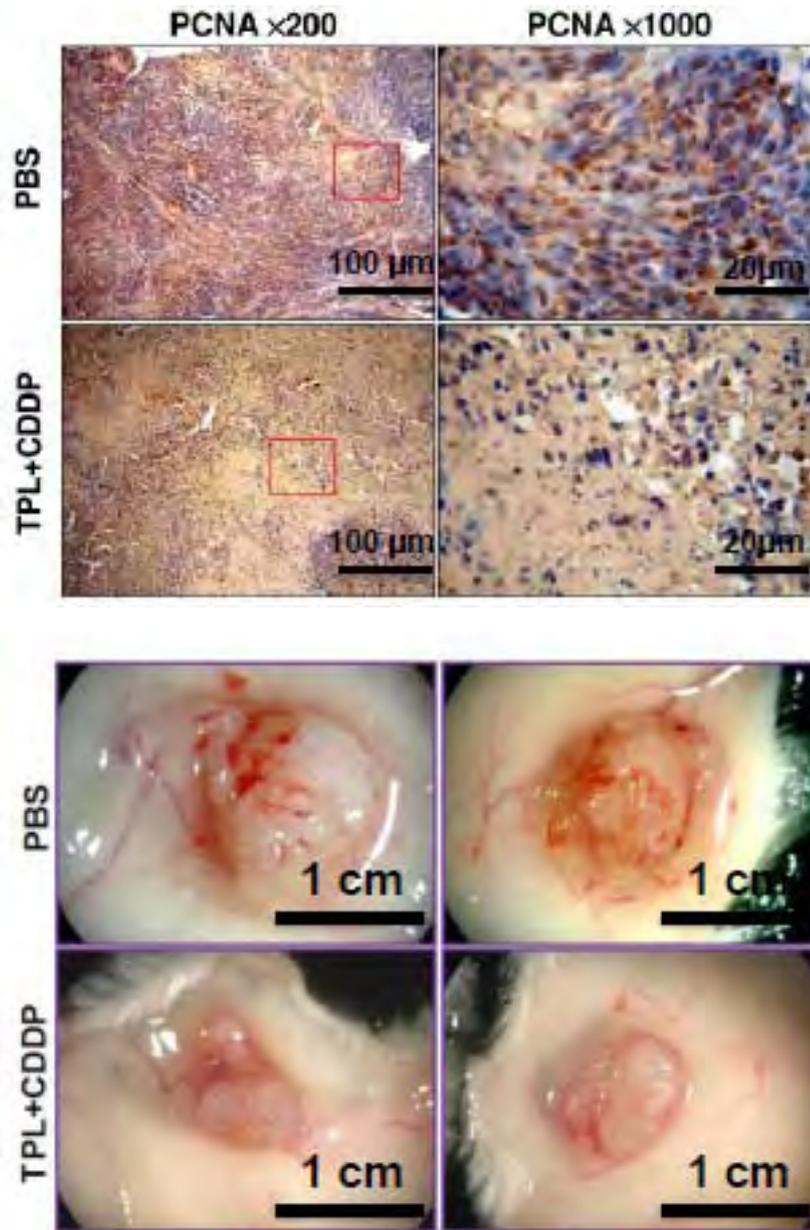
	Tumor Volume (cm <sup>3</sup> ) of Treatments											
	IV			IV			IV			SC		
	C 3mg/Kg	T 0.4mg/Kg	D 21	C 2mg/Kg	T 0.5mg/Kg	D 21	C 1mg/Kg	T 0.5mg/Kg	D 21	C 1mg/Kg	T 0.5mg/Kg	D 3
Control	1.57±0.33											
Cisplatin	0.86±0.15 <sup>a</sup>			0.92±0.21			1.38±0.31			0.95±0.27		
Triptolide	0.94±0.19			0.81±0.13 <sup>a</sup>			0.81±0.13 <sup>a</sup>			0.62±0.29 <sup>a</sup>		
	0.55±0.16 <sup>a</sup>			0.51±0.14 <sup>a</sup>			0.73±0.19 <sup>a</sup>			0.59±0.12 <sup>a</sup>		

TPL 合併 CDDP 之處理，對腫瘤生長的抑制作用，與 TPL 及 CDDP 的處理之劑量條件有關。



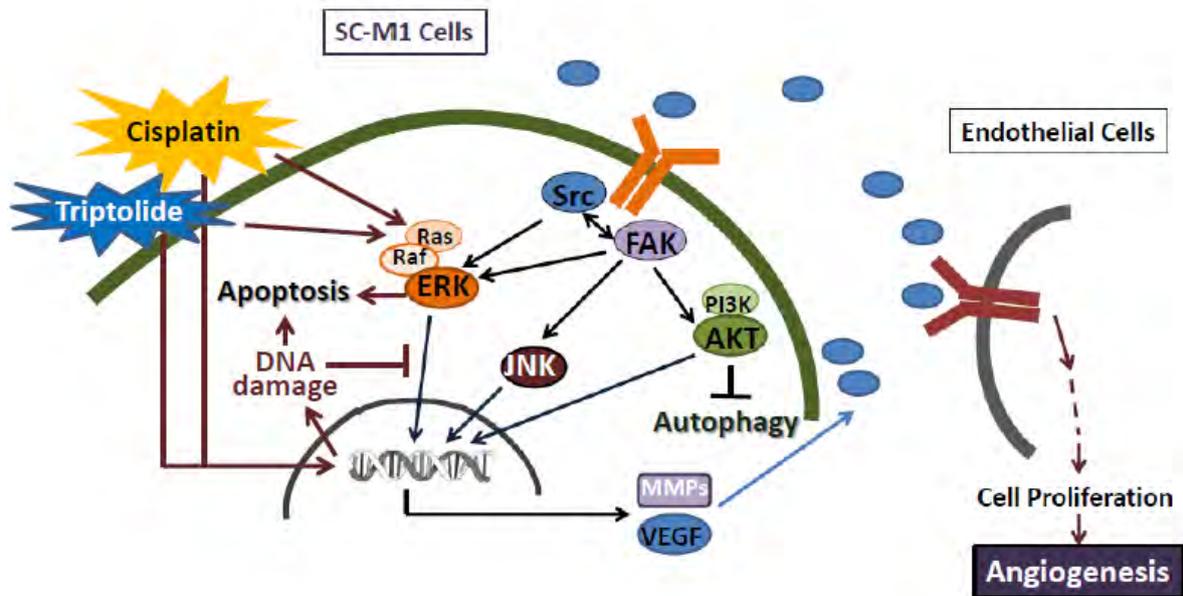
圖七、TPL 與 CDDP 處理對罹癌小鼠腫瘤生長的影响

表四與圖七所示，以尾靜脈注射進行藥物處理時，當 TPL 由 0.4mg/kg 增加為 0.5mg/kg 時，腫瘤生長的抑制作用即與控制組間具有顯著的差異性；當 CDDP 的處理劑量由 3mg/kg 依次遞減為 2mg/kg 及 1mg/kg 時，其對腫瘤生長的抑制作用亦同時降低，且與控制組間沒有顯著的差異性。然上述各項以尾靜脈注射進行藥物合併的各項處理結果，其對腫瘤生長的抑制作用皆與控制組間存在著顯著的差異性。與尾靜脈注射處理的結果相比較，在以股部皮下注射藥物的處理條件下，皆有較明顯的腫瘤生長抑制現象。此外，對腫瘤生長的抑制作用，各項處理間並無顯著的差異。



圖八、TPL 與 CDDP 處理對皮下腫瘤及腫瘤血管新生的影響

罹癌小鼠以尾靜脈注射 0.4mg/kg TPL 及 3mg/kg CDDP 後，腫瘤表面與腫瘤周邊血管的生長與分佈情形，如圖八所示，經 TPL 合併 CDDP 的處理，除腫瘤的體積明顯縮小外，腫瘤表面與其周邊血管的延伸情形亦較不明顯。腫瘤組織以免疫染色分析之結果，顯示腫瘤細胞之生長明顯受到 TPL 及 CDDP 之抑制。不同之 Scale bar 則分別標註各圖像之大小範圍。



圖九、TPL 併用 CDDP 對 SC-M1 細胞及血管內皮細胞之調控機制

上圖所示，SC-M1 細胞透過 membrane receptor 相關之途徑，活化 Src、FAK 及其下游包括 AKT、JNK 及 ERK 等分子的作用，影響細胞核的轉錄，增加 MMPs 及 VEGF 的表現，從而加速血管內皮細胞的增生及後續 angiogenesis 等現象。以 triptolide 合併 cisplatin 處理之 SC-M1 細胞，可能藉由 Ras/Raf/ERK pathway 活化 ERK，進而造成 ERK-induced cell apoptosis，或因 triptolide 及 cisplatin 造成細胞的 DNA damage，抑制 SC-M1 細胞藉由 receptor 及其相關下游分子活化所表現的 MMPs 及 VEGF，血管內皮細胞的增生及後續 angiogenesis 等現象也因此受到抑制。

# 中醫症狀術語作業標準化(2-2)

羅綸謙  
彰化基督教醫院

## 摘要

### 研究目的：

中醫在歷代醫家的傳承當中以師徒制及文字傳承為主要方式。時至今日亦是如此，但是在現今資訊化的時代，資訊資料的取得與儲存已較已往方便許多，對於中醫學的學習與臨床的歧異也日漸明顯，中醫診斷建立在主觀的症狀與客觀的證候之上，而中醫學者及臨床醫師對於症狀以及證候的定義、取得方式以及認知存在明顯的差異，因此建立中醫名詞術語的標準化為使中醫學發揚光大之基礎。

### 研究方法：

本年度廣邀北區、中區及南區醫學中心中醫部、基層資深中醫師及中醫診斷學專家召開專家會議討論症狀術語，並接續去年利用各醫院醫師內部組成專家小組分組研討，收集並統整意見資料，定期召開專家委員會，討論症狀術語並於會議中提出各小組對於症狀的涵義即操作型定義之意見。

此外亦統整去年度症狀術語之涵義與操作型定義寄發問卷給全國各縣市醫學中心中醫部醫師及基層中醫師，針對涵義及操作型定義之內容提供意見，並進行整理分析，期望能達到多數中醫師的共識並推廣。

### 主要發現：

本年度共完成三十四項症狀術語標準化，從去年成果延伸之症狀、頭面部五官、腸胃道、婦科、泌尿道等五項系統主題症狀，煩躁、關節痠痛、畏風、畏寒、發熱、身重、頭昏、頭重、口苦、口臭、口淡、目昏、耳鳴腦鳴、眼睛乾澀、鼻涕、呃逆、噯氣、噁心、反胃、吞酸(泛酸)、嘔吐、嘈雜、消穀善飢、水腫、癢閉、小便不利、小便短赤、小便疼痛、往來寒熱、咽痰感/喉中梗阻、月經後期、月經量少、胎動不安、產後惡露不斷，相關症狀的術語之涵義與操作型定義。

### 結論及建議事項：

本年度之症狀術語討論初起接續去年較易混淆之症狀進行討論，之後以系統性部位相關症狀為開會討論重點，並邀請各中醫專科專家與會提供意見加強對於症狀涵義及操作流程的可信度。在症狀術語中有些屬於主觀症狀、客觀症狀、主觀及客觀混用的症狀，在涵義上較無明顯問題，但是在操作型定義中必須針對這

些部分加強說明、並考慮與西醫使用該術語時的意義及客觀指標相參酌，做為日後臨床中醫師使用術語及與西醫討論時可有共同的語言。

關鍵詞：中醫、症狀、診斷、標準化

# **The Consensus of Standard Operating Procedure for Terminology of Symptoms in Traditional Chinese Medicine (2-2)**

Lun-Chien Lo  
Changhua Christian Hospital

## **ABSTRACT**

### **Aim:**

Syndrome differentiation is the characteristic of traditional Chinese medicine (TCM) diagnosis, and symptom inquiry is one of the most important part of TCM syndrome differentiation. It is also important to enable patients to obtain an objective, clear and scientific TCM services. Thus, our mission is to integrate differences and establish a unified diagnostic criterion in Taiwan.

### **Methods:**

In this study, we expect to standardize the definition and operational procedure of TCM symptoms by panel meeting. The panel was composed of the experts from TCM department in medical center, senior clinician from TCM clinic, and diagnostics professional. We hope to form a consensus by a regular monthly meeting of discussion, get opinions from all sides by holding a national seminar, and reach a consensus of the standardization of definition and operational procedure for diagnostic terms in TCM symptoms by the medical profession.

### **Major findings:**

In this year, we have completed standardization of definition and operational procedure for TCM symptoms such as dizziness, edema, and swift digestion with rapid hungering, gastric upset,

### **Conclusion and Suggestion:**

Initially, we discussed the TCM symptoms which the experts considered may confuse by clinical doctors. Thereafter, the expert discussed TCM symptoms by physiological system in every panel meeting, such as ENT, GI, etc. Some of the symptoms are subjective symptoms, objective symptoms or mix of subjective and objective symptoms. In the operational definition of these parts must be strengthened

for the description of the subjective and objective symptoms. In the future, clinical practitioners may use these terms, and discussions with Western medicine. We should made these terms may have a common language with Western Medicine.

Keywords: Traditional Chinese Medicine, Symptom, Diagnosis, Standardization

## 壹、前言

中醫是一門具有悠遠歷史的醫學，對生命觀照，深植於東方文化最高精神---天人合一的理念上，亦即將人與自然視為一體，認為人對自然規律的違背，是罹病的一大主因，並從整體觀出發，重視人體各生理功能系統間的有機連結，藉由較為自然的方式，以調治生病的「人」去治病，而不單將焦點置於病灶，予以破壞或壓抑。隨著世世代代不斷地實踐、修正、傳承、整理與累積，先輩浩瀚的經驗，最終匯聚成中醫獨特而有效的理論體系與治療方式。相較於世界各地的傳統醫療，中醫非但展現了無比的壽命與韌性，更具備不可思議的高度與成熟度。

目前公認，中醫診療的精髓，是為辨證論治。辨證中的「證」字，普遍之定義乃指證候（一說為證型）言。證候具體是指個體在發生疾病後的特殊臨床表現，這些表現會隨著疾病的不同階段、個體體質、飲食起居、風土環境、以及時間等條件而有所差異，並富有中醫生理病理學的獨特色彩。而蒐集歸納患者的臨床表現---包含主觀的症狀與客觀的徵候，依照中醫理論，藉由邏輯析辯的過程，以確立證候（或證型），名之為「辨證」（即中醫之診斷），再依證候訂立治則，遣方用藥，是為辨證論治。由此可知，辨證論治的首要關鍵，正在於運用中醫「望、聞、問、切」四診，對症狀與徵候作正確地擷取與判定。

然而長期以來，不論在臺灣、中國、日本、韓國或西方國家學習中醫者，中醫學者與臨床專家對於每個症狀與徵候的具體定義和擷取方式的認知常存在著差異，對於各證候之意涵，以及所提出之辨證標準，亦有所不同，且一般皆未提及具體評量指標。這般多頭馬車的情形，不僅深深妨害了醫師間對於病情的溝通，也影響到病患照護的連續性與品質。雖說不同的術語與規範可以彰顯不同體系或領域的獨特性與正統性，但實際上卻對知識的交流和醫學的進步造成了阻礙。綜觀現代醫學的發展，即可知曉其快速普及與成長的一大原因，就在於能運用明確且具一致性的方式診斷疾病，並使用客觀的數據予以量化描述，作為療效評估的指標與研發新療法的依據。換而言之，確立症狀與徵候的名詞定義與操作規範，縮小辨證差距，並凝聚臨床醫療人員對診斷標準產生共識，無疑是非常重要的並且是建立中醫醫療品質與推展醫療業務的重要基礎。

近年來，臺灣中醫學者在證候診斷的基準化方面已做了許多貢獻<sup>(1-8)</sup>，並取得了長足的進展，為證候診斷規範化的研究奠定了基石。中國學者梁

茂新更對中醫症狀量化的方法提出獨到見解<sup>(9)</sup>。

如何在可操縱的環境下，經由客觀而科學的方法和程序，將感官經驗的素材，整理成具普遍性和規律性的知識，是本研究的精神。希冀藉由定義出症狀與徵候診斷之涵義和操作規範，初步凝聚起中醫界之共識，作為日後持續發展中醫療效研究的充要條件；而最終標準化後的術語也將更能清楚且有效率地與其他領域溝通，而非以往雞同鴨講、各說各話的局面。自內而外都能有共同的語言，所謂「車同軌、書同文」，對於達到中醫現代化與國際化的理想，應是重要而關鍵的一步。

由於近代公共衛生、糧食供給、以及醫學知識與技術的進步，許多傳染病與急重症已能得到良好地控制，人類的壽命得以不斷延長。然而，也因為壽命的延長，社會結構逐漸趨向老化，傳染病與急重症的控制也使疾病譜發生改變，一些好發於老年人的慢性病，諸如糖尿病、高血壓、和心腦血管病變等，已然成為社會醫療資源支出的主軸，並且有不斷攀升的趨勢。罹患慢性病之患者，多需長期照護與服藥，且因為慢性病併發症所造成的失能與失用，更形成了社會的重擔。目前常見的就醫模式，是病患在被現代醫學診斷後，或因不願接受其治療、或不滿足於其治療選項、或在接受其治療後仍不符期待等情況下，往往會再主動尋求非主流醫學的治療。

依國際期刊統計，中醫非但被華人所運用，即使在非華人族群，使用中醫療法的比率也正逐漸增加。在歐美地區，中醫被西醫療體系將定義為補充療法 (complementary therapy) 之一 (NCCAM, 2002)。Lim, Sadarangani, Chan 與 Heng (2005) 於新加坡不同族群的調查結果顯示，華人僅佔受訪者的 73.9%，卻有 88% 受訪者使用中醫療法。66% 接受調查的印度人在過去一年內使用中醫療法，僅 24% 使用其傳統的 Ayurvedic Medicine<sup>(10)</sup>。

老年人接受中醫治療的比率佔 41%，遠高於年輕族群。臺灣相關的報告指出中醫醫療服務使用率增加與老年人口比率增加呈正相關的現象<sup>(11,12)</sup>。尤其是老年人口每增加 1%，平均每人每年中醫醫療使用率增加 8.2%，此現象可能與老年人罹患慢性病或是疾病嚴重度的比例較高，因而提升其求助傳統中醫服務的意願<sup>(11)</sup>。

另一方面，已有許多調查指出癌症病患使用中醫藥/中草藥治療的現象<sup>(13)</sup>。針對早期癌症適當使用整合手術、化學治療、放射治療等各種不同的策略，能有很好的治療效果。但對於轉移擴散的末期癌症，上述療法除短暫延長生命、減輕疼痛外，「治癒」仍遙不可及，此時，臺灣固有的中醫醫療體系往往成為民眾的主要求助對象之一。杜(1992)針對25位乳癌病人的

問卷調查結果，發現僅32%病患單純尋求西醫治療，68%的病人會同時使用中醫或其他民俗療法（如草藥、推拿）等<sup>(14)</sup>。辛、邱、胡、程、陳(1996)針對某醫學中心緩和病房194位癌末病患的調查結果，超過5成的受訪者使用草藥來治療或減緩癌症的進展<sup>(15)</sup>。

由以上文獻可知，中醫體系在於老化、慢性病或是癌症造成的耗損性需求，提供了大量的服務，然而因症狀、徵候與證型定義的不明確，使得中醫臨床研究難以呈現成果，或是因研究的不統一而容易遭受質疑。對單一病人而言，在主動尋求中醫診療時，若能以疾病的根本問題為主軸，正確評估病患病情變化、評值服藥前後反應與療效，方能針對病患需求提供適當的服務；對研究而言，如能有統一的症狀與徵候定義和操作模式，就更能夠呈現研究成果。

訂定中醫症狀術語定義與操作規範，近程的目標的主要是使醫者能對病患臨床表現的判定達到一致性，並提高精準度。按本研究計劃之成果於臨床層面有助於臨床醫師在診治病患時，提高中醫辨證的實用性與精準度，從而提高療效。在研究層面可以提供中醫辨證診斷的操作規範，在臨床試驗與中藥新藥開發上，中醫藥療效評估將有共通的語言，以提高研究品質及發展。另外於教學層面，本成果有關中醫四診症狀與徵候蒐集與判定的操作規範，將可作為醫學院學生、見實習生及住院醫師學習中醫診斷學時之教材，以提升學習中醫診斷學的有效性與正確性。

長久以來臺灣中醫教育所使用之教科書，都以中國中醫學者所編撰的教材為主，出自臺灣中醫專家學者之手者，數量著實有限，質量皆精者，更是屈指可數，這般情形，對臺灣中醫藥之發展與國際化，實非良好的發展。除此之外，基於臺灣與中國風土民情實非相同，長年下來臺灣之中醫藥早已發展出不同於中國之特色，且臺灣中醫老中青三代，並不乏學藝兼優的傑出醫者，另外亦因整合醫學的抬頭，如今世界各地鑽研中醫的學者與醫師越來越多，其中尤以美國、加拿大、英國與德國等最為活躍，這些學人在研討中醫時，亦都由基礎中醫名詞研讀，在學術領域，對名詞術語的定義做規範，有著無比的象徵意義，近年來臺灣不遺餘力在中醫藥臨床、研究與產業投入的時間、人力、財力與物力，更應該在中醫基礎領域上領先國內外中醫界。

再者，如前已述及的，整合醫學是未來醫療的趨勢，中醫藥將在其中扮演舉足輕重的角色，就現實層面考量，這是相當驚人的商機，亦是臺灣能在國際嶄露頭角的機會。中國政府針對中醫藥在世界的發展已積極佈局

多年，臺灣在諸多主客觀因素的影響下，卻落後甚多，若再無法奮起直追，發展出屬於臺灣中醫己身的標準，導入我們的特色，勢必將被中國邊緣化且被韓國取代，這肯定會是國家的損失。綜上所述，本計劃訂立中醫症狀斷術語作業標準化之成果，在教育、醫療、保健、研究、產業、文化與國家發展等諸層面，皆會有不同程度的影響。對於解決現今中醫界因名詞術語不一致所導致的誤解與空耗，更有迫切的需求。

## 貳、材料與方法

102 年度持續以分組研討、定期專家討論、舉辦大型研討會等方式建構中醫症狀標準操作定義規範為主要目標。

### 一、分組研討會議

透過各院定期小組會議，針對各症狀術語以及操作流程進行細部討論，並訂定三十項症狀涵義與症狀標準化操作流程，形成小組共識。

### 二、專家討論會議與意見收集

定期召開專家討論會議，通過專家會議分享各小組對症狀操作標準作業操作模式進行的經驗與成果，邀請全國中醫診斷學專家學者進行相關討論歸納，以提供規範建構之參考並建立共識。

第二年除持續討論另外 30 項症狀外，同時將第一年討論之 31 項症狀內容持續加強，使之能更具有臨床應用性，並能於臨床辨證論治使用，將第一年討論之成果整理並以郵寄或電子郵件方式提供出席之各教學醫院及診所中醫專家，由專家針對成果提供意見回饋，使本計劃更具共識性並能推廣使用。

### 三、舉辦研討會

預計在彰化基督教醫院舉辦研討會，並與地方中醫師公會及相關學會合辦，開放臨床中醫師參與討論。針對專家討論會議決議之症狀操作標準規範及臨床應用結合並提出建議共同研討，期盼能初步達到臺灣中醫界的共識。

### 四、成果發表

整理經由專家討論會議確定之症狀術語作業規範，透過研討會進行成果發表。此外亦將第一年初步成果發表於相關學術期刊如新醫藥周刊，並將相關成果請教各教學醫院及診所中醫專家使更多醫師能參與並提供意見，使症狀之標準化共識更加完善並推廣。

## 參、結果

### 一、102 年度專家諮詢會議

本年度於三月份召開第一次專家會議，針對去年度工作內容與願景及本年度計劃對中醫界之重要性進行介紹報告，並由與會專家學者針對症狀術語標準化之流程以及未來之方向進行討論。本年度第一次會議接續 101 年度較無法釐清之議題如關節痠痛、頭暈頭重、畏寒畏風、煩躁、發熱等，繼續深入探討，之後的討論以生理系統定位相關症狀討論，第二次專家會議討論頭面部眼耳鼻咽喉相關症狀，如口苦、口臭、口淡、耳鳴腦鳴、鼻涕、眼睛乾澀、目昏目糊。第三次專家會議以討論腸胃道症狀如噁心、反胃、嘔吐、嘈雜、呃逆、噯氣。第四次專家會議討論婦科相關症狀如月經後期、月經量少、胎動不安、產後惡露不斷和往來寒熱、咽痰感/喉中梗阻，每次邀請相關中醫各專科專家進行討論。第五次專家會議於十一月舉行，討論泌尿道相關症狀。本年度共討論三十四個症狀術語，其涵義及臨床操作模式概列如下：

#### (一)煩躁：

1. 涵義：患者自覺情緒不佳、心中不寧，坐立難安。
2. 臨床操作模式：詢問患者平日精神、工作及生活情形，目前是否自覺有壓力，及內心情緒狀況、是否有坐立難安的狀況，最近是否有感冒或是身體其他病理狀況。

#### (二)身重：

1. 涵義：以軀體沉重困倦為主的不適感，可兼有痠楚感，甚或活動不利，難以轉側等表現。
2. 臨床操作模式：請患者描述不適感，並儘量指出部位，當以軀體之沉重困倦為主。再者可鑑別症發之新久、身重之程度，最後可詢問兼夾症，如表證、發熱、頭重、便溏、便秘、跗腫等。

#### (三)頭重：

1. 涵義：頭部不輕鬆、或有負擔的感覺。
2. 臨床操作模式：確認不適感在頭部，並當以沉緊、沉甸、沉墜、或如布帶困裹等感覺為主。可更明確不適位置，如全頭、額頭、太陽穴一帶、枕部連項處、或如頭箍狀等。需鑑別屬有形之物積滯所造成者，如嚴重鼻塞等。後可詢問其它兼症，如脾胃狀況、是否外感等。

#### (四)頭昏：

1. 涵義：一種頭腦混沌不清爽，精神不易集中的狀態，或可伴隨頭重腳輕、乃至失去平衡、或眼花、甚至眼前發黑等，但不存在眼震顫、景物旋轉等。
2. 臨床操作模式：本症狀之操作可善用排除法。當以精神不佳、頭腦混沌不清爽為主要表現，雖可兼有頭重，但不同於單純的頭重或頭痛，亦不會有視物旋轉。
3. 區分頭昏之頻率、持續時間與程度，例如偶發或反覆，持續長或短，僅是頭腦混沌不清爽、或已難以集中精神、或已出現眼花、甚至眼前發黑。了解發作前的動作、從事的行為、以及平時身體狀況等。

#### (五)發熱：

1. 涵義：指身體的溫超過正常標準，或患者自覺身體或身體局部發熱的不適感覺。
2. 臨床操作模式：醫者以溫度計測量病人體溫或以手背接觸病人肌膚，感覺是否溫度較正常人高。
3. 依發熱類型：有微熱、惡熱、潮熱、壯熱、暴熱、發熱惡寒、往來寒熱、五心煩熱等。依發熱時間：有平旦熱、晝熱、日晡發熱、夜熱等。依發熱部位：有肌熱、膝裏熱、肩上熱、背熱、肘熱、尺膚熱、手心熱、手背熱、足熱、四肢熱等又有食積發熱、痰積發熱、飲酒發熱、血瘀發熱、病後遺熱等。

#### (六)畏寒：

1. 涵義：患者見寒冷則感覺身體及四肢發涼，但多穿衣或在室內則不感覺冷，平素較正常人怕冷者。
2. 臨床操作模式：詢問患者是否遇寒則身體怕冷、四肢發涼，或與常人比較易怕冷。並詢問是否有發燒、頭痛之症狀，並經由臨床四診判斷屬於外感或內傷。

#### (七)畏風：

1. 涵義：患者吹風覺身體難耐不適厭惡感，避風可緩解
2. 臨床操作模式：詢問患者是否因風直接吹拂體表而有不適感如皮毛聳起、身冷、寒顫等見症而有厭惡感、下意識欲穿衣或換位置避之。若無風吹拂時症狀是否緩解無厭惡感。問診時亦同時詢問伴隨症狀，以判斷屬於外感或內傷。

(八)關節痠痛：

1. 涵義：患者自覺關節疼痛、痠軟感。
2. 臨床操作模式：詢問患者不適之部位，是否有痠軟、疼痛的感覺，疼痛性質，發病新久，發作時間、誘發症狀、持續時間、是否有伴隨症狀、緩解症狀。並以望診觀察患處外觀是否有紅腫，觸診感覺患部是否有溫度上的變化。

(九)口苦：

1. 涵義：自覺口中苦味
2. 詢問患者何時起有口中苦味，口中苦味發生的時間、頻率、持續時間、伴隨症狀，食慾、消化狀況。

(十)口臭：

1. 涵義：口中散發異常氣味、氣味臭穢、可為自覺或他人感覺。
2. 臨床操作模式：詢問患者何時起有口中臭味、口腔衛生習慣、進食食物習慣、食慾、消化狀況。

(十一)口淡：

1. 涵義：口中味覺減退、進食覺食物較無味道。
2. 臨床操作模式：詢問患者何時起覺食物無味，相關伴隨症狀，如食慾、食量、消化狀況等。

(十二)腦鳴/耳鳴：

1. 涵義：指外界沒有聲音，患者卻有聽見聲響的症狀。
2. 臨床操作模式：首先詢問耳鳴為新發或慢性：新發者，當問過去是否有類似的經驗；慢性者，則應問耳鳴是否有所變化。
3. 聲響可能被描述來自單耳、雙耳或腦中發出，末者又常稱為腦鳴或腦響。今日尚將耳鳴區分為自覺性耳鳴與他覺性耳鳴。再問持續或間歇；好發時間；加劇與緩解因素；高頻或低頻；聲響位置，如單耳、雙耳、遠處、耳外、耳內、腦內等；是否成搏動狀；響度為何，清楚與否等。另外亦當探究過去病史，如耳疾、腦部損傷、顳頷關節疾患、及其他內科病史、手術史、藥物史等。生活史、抽菸、睡眠、情緒、壓力、工作環境、噪音暴露等亦當問及。

(十三)鼻涕：

1. 涵義：鼻內所生之分泌物。
2. 臨床操作模式：首問鼻涕出現屬新發或遷延，再分別就「味、

色、質、量」來詢問，尤重與平時相較，了解變化；並問好發時間、加重與緩解因子、兼證、以及特殊形式如涕倒流之有無等

(十四)眼睛乾澀：

1. 涵義：眼睛乾燥少津，甚或似有異物入目般不適等感覺。
2. 臨床操作模式：臨床上可先詢問症狀發作的時間長短並檢查患者眼睛是否有異物存在，並詢問患者眨眼頻率、眨眼時是否不流利、閉上眼症狀是否會緩解、吹風是否會加重症狀及視物是否易感疲勞。再以四診合參診斷其證型。

(十五)目糊/目昏：

1. 涵義：患者出現視物不清或視物昏暗不明之症狀。
2. 臨床操作模式：臨床上先詢問患者出現此症狀是急或慢性，並檢查患者眼睛外觀是否有異常，包括紅、腫、熱、痛或異物存在，詢問是否有局部視覺喪失、視物出現閃光或複視。再以四診分析其臨床證型。

(十六)噁心：

1. 涵義：指胃中不舒，心中泛泛，欲吐不吐的不適感，一般無聲無物。
2. 臨床操作模式：詢問患者症狀是否屬欲吐感，卻未真有嘔吐發生，再詢問胃部一帶的不適型態，並就發作時間、發作頻率、誘發因子、加重因子、緩解因子、和伴隨症狀等資訊加以蒐集。

(十七)反胃：

1. 涵義：古代的反胃，是指食物入胃，停而不化，終至反出的症狀。其表現或朝食暮吐，或暮食朝吐、或食入一二時而吐，或積至一晝夜而吐等。今人所稱的反胃，則指胃逆欲吐，甚或嘔吐、乾嘔的不適感。
2. 臨床操作模式：詢問患者是否有胃逆翻騰的感受，再問是否有噁心、嘔吐、乾嘔等症狀發生，並就發生頻率、發作時間、誘發因子、加重因子、緩解因子與伴隨症狀等資訊加以蒐集。

(十八)嘔吐：

1. 涵義：胃中內容物自胃中逆流從口而出，可伴有聲音。
2. 臨床操作模式：詢問患者平日進食狀況，消化情形(是否易

脹氣、消化不良、排便狀況)、最近飲食情形(是否有進食不潔食物),嘔吐物之質量、味道、嘔吐與進食時間間隔、是否伴隨腹痛。

(十九)呃逆:

1. 涵義:胃脘部不適,感覺似饑不饑,似痛不痛的一種症狀,病人往往無法明確描述其感受。
2. 臨床操作模式:患者自覺胃部不適,躁擾不寧,飢餓時覺胃悶不適,進食稍可緩解、但一段時間後亦覺不適,難以形容其感覺。另可請患者指出不適之部位,與進食之相關性。

(二十)嘈雜:

1. 涵義:是指發出於咽喉間,聲短而頻、呃呃作響,不能自制的聲音。
2. 臨床操作模式:詢問患者症狀發作時,聲音發出的位置是否在咽喉間、呃逆聲的頻率是否連續性、呃逆聲型態是否短促而頻,呃逆聲是否無法自止。並詢問是否伴有酸腐氣味或吐出東西,以鑑別診斷。若能聽見患者發作情形則分辨其聲高亢,短而有力或呃聲低沉,聲弱無力以區分證型。

(二十一)吞酸:

1. 涵義:酸水自胃中上至咽喉,不及吐出而下咽,並可感覺到酸味刺激性的表現。
2. 臨床操作模式:自覺咽喉有酸液逆出,欲吞下。

(二十二)噯氣:

1. 涵義:指氣從胃中上沖,經食道由口排出並發出聲音,時兼酸腐氣味,與飲食情況較為相關。
2. 臨床操作模式:詢問患者發作頻率是否固定(單一次或連續)、聲音型態(緩而沉長或急而短促)、是否伴隨吐出東西及酸腐氣味、是否常有胃脹感。

(二十三)月經後期:

1. 涵義:月經週期延長較平時超過七天以上。
2. 臨床操作模式:詢問患者平日月經週期,經行日期、月經之質、量、色、血塊有無、其他經行症狀、是否有懷孕可能、目前是否為更年期。

(二十四)月經量少：

1. 涵義：經量較平時減少、甚則點滴即淨。
2. 臨床操作模式：詢問患者平日月經週期，經行日期、月經之質、量、色、血塊有無、其他經行症狀、是否有懷孕可能、目前是否為更年期，目前月經之質、量、色、及其他相關症狀。

(二十五)胎動不安：

1. 涵義：指妊娠期不時小腹墜脹，腰酸腹痛，或兼見陰道少量流血者。
2. 臨床操作模式：胎動不安以腹痛、腰酸、下墜感、或陰道出血等為主要症狀，當了解過去特殊病史，懷孕週數與發病時間，並就個別症狀詢問包括程度、性質、頻率、誘發因子、加重因子、緩解因子等。胎動不安常為墮胎、小產之先兆。

(二十六)產後惡露不斷：

1. 涵義：產後由陰道排出的瘀濁敗血，稱為惡露。一般應在產後二十天左右排盡。如果超過這段時間，仍淋漓不斷者，稱為"惡露不斷"，又稱"惡露不絕"。
2. 臨床操作模式：惡露在產後四天之內呈紅色，漸變為淡紅；經過十至十二天左右，其色更淡，呈黃白或白色。惡露由紅到白，可持續三周左右。但紅色的惡露最長為十至十四天。若超過這個時期，當詢問胎次、生產時間，生產方式過程，過去特殊病史，產後飲食起居狀況，及哺乳與否等，並就惡露的味、色、質、量、加重因子、緩解因子和伴隨症狀等詳加詢問。

(二十七)往來寒熱：

1. 涵義：惡寒與發熱交替發作。
2. 臨床操作模式：詢問患者是否發熱時無惡寒，惡寒時不發熱。惡寒與發熱交替發作是一日一發或一日數發，並詳問發病新久、發作程度、發作時間(好發時間)、發作頻率(是指有節律性，或日，或周、或月規律的出現或沒有明顯的節律，時發時止)、持續時間、誘發因子、加重因子、緩解因子、伴隨症狀等。排除惡寒與發熱同時出現。

(二十八)咽痰感、喉中梗阻：

1. 涵義：咽喉部有異物感。
2. 臨床操作模式：詢問患者平日咽喉梗阻狀況，並詳問發病新久、發作頻率、發作程度、發作時間(好發時間)、持續時間、誘發因子、加重因子、緩解因子、伴隨症狀等。

(二十九)水腫：

1. 涵義：體內水濕停留於肌表，使外觀出現浮腫
2. 臨床操作模式：詢問患者水腫起病新久、觀察水腫部位並詢問發病順序、以切診判斷水腫嚴重程度、是否按之凹陷不易恢復、詢問發作時間、加重因子、伴隨症狀、加重或緩解因子。

(三十)小便疼痛：

1. 涵義：排尿時尿道有疼痛感，疼痛感亦可見於小腹或會陰部。
2. 臨床操作模式：先了解平時解尿的狀況，進而詢問本症狀出現的時間、疼痛的程度、型態、位置、有無特殊誘發事件、過去病史、近日飲食起居狀況、有無服用藥物、加重因子、緩解因子，以及伴隨症狀(常伴有小便點滴不暢、尿頻、尿急等症狀)等。

(三十一)小便短赤

1. 涵義：解尿的尿量減少，且尿色呈深黃或茶褐色。
2. 臨床操作模式：先了解平時解尿的尿量、頻率和色澤等，再與現下的尿量、頻率和色澤作比較，應符合尿量減少，且尿色呈深黃或茶褐色的特徵，(或可伴有解尿疼痛感)，進而詢問症狀出現的時間、有無特殊誘發事件、過去病史、近日飲食起居的狀況、有無服用藥物、加重因子、緩解因子，以及伴隨症狀等。

(三十二)小便不利

1. 涵義：指小便量減少、排尿困難的症狀。
2. 臨床操作模式：詢問患者平日小便狀況，是否有尿意但解不出來，是否伴隨小便疼痛症狀，並詳問發病新久、發作頻率、發作程度、發作時間(好發時間)、持續時間、誘發因子、加重因子、緩解因子等。

### (三十三)癃閉

1. 涵義：癃是小便點滴而出，閉是小便點滴不出。
2. 臨床操作模式：詢問患者平日小便狀況，是否有尿意但解不出來(點滴而出)，是否伴隨小便疼痛症狀，並詳問發病新久、發作頻率、發作程度、發作時間(好發時間)、持續時間、誘發因子、加重因子、緩解因子等。

### (三十四)消穀善饑

1. 涵義：進食後容易感到飢餓、可兼見食量較平時增加。
2. 臨床操作模式：詢問患者平日飲食狀況，三餐進食時間及食量，並詢問目前飲食狀況，是否有未到進食時間即覺飢餓感，進食前後是否有不適，並詢問持續時間、伴隨症狀、加重或緩解因子。

## 二、中醫臨床常見症狀共識問卷

102 年度續將 101 年度所討論之 31 項症狀內容持續加強，成更具有臨床應用性，並能於臨床辨證論治使用之症狀，將 101 年度所討論之症狀成果，製作成中醫臨床常見症狀共識問卷，並以郵寄及電子郵件方式調查，調查對象主要為參與本計畫相關院所之臨床執業之中醫師和學校教師，續以蒐集症狀的涵義與臨床操作模式的合適性調查臨床中醫師共識性為目的，完整中醫常見症狀名詞的涵義與操作規範，期盼未來能於臨床推廣使用。

問卷設計使用李克特氏量表(Likert scale)計分，分別有五個向度表達非常合適、合適、普通、不合適、非常不合適，各為 5 分、4 分、3 分、2 分、1 分。

調查對象主要為參與本計畫相關院所之臨床執業之中醫師和學校教師，總發放問卷數 200 份，回收 171 份，回收率 0.86%。

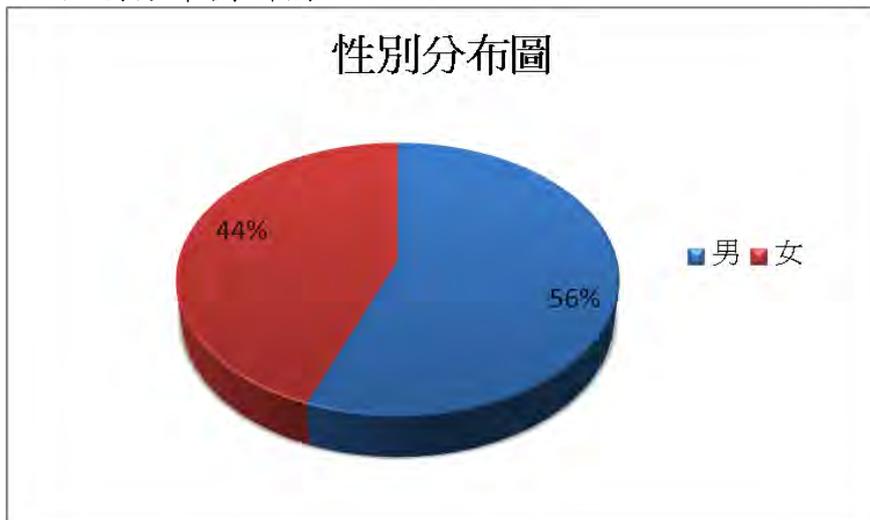
### (一)描述性統計

針對被調查者之背景作描述性統計，分別將年齡、性別、所屬地區、執業年資、中醫師資格、職稱及所屬醫院層級製作成圓餅圖分析。

#### 1. 年齡分布

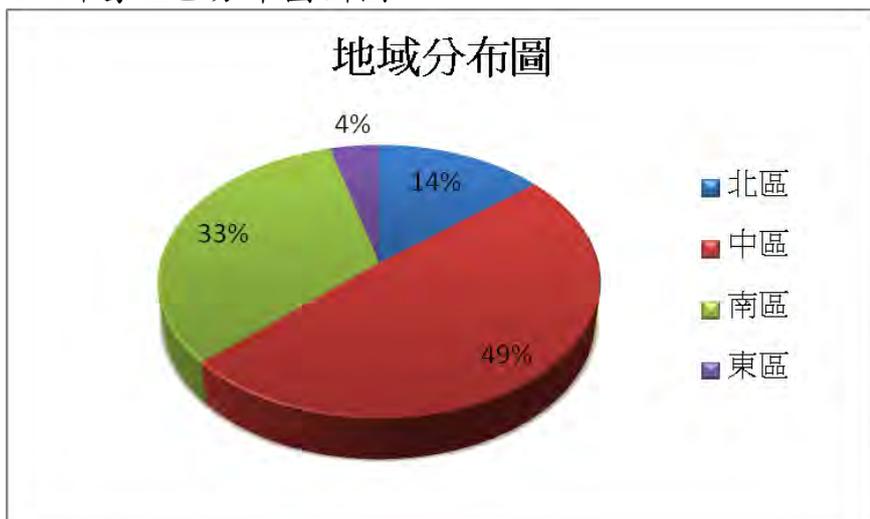
個數	平均年齡	年齡中位數	年齡眾數
171	35.26	33	33

## 2. 性別分布圓餅圖



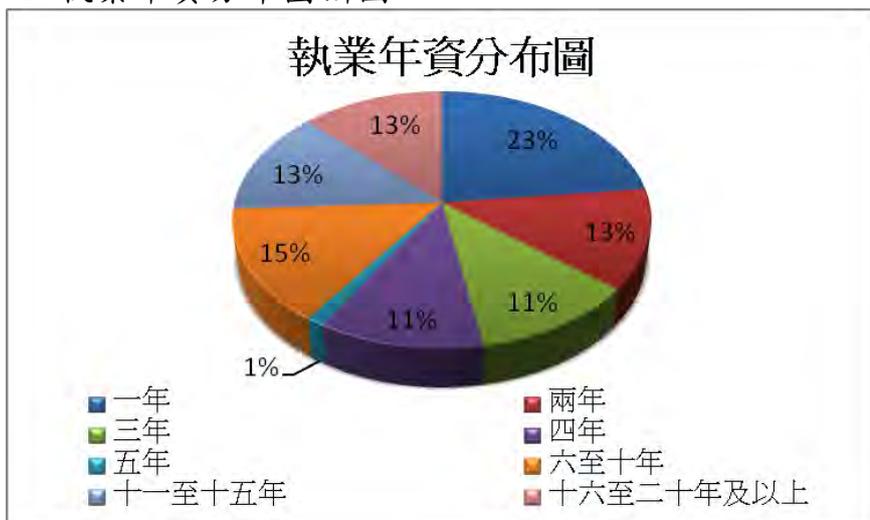
性別：男性約占 56%；女性約佔 44%。

## 3. 所屬地區分布圓餅圖



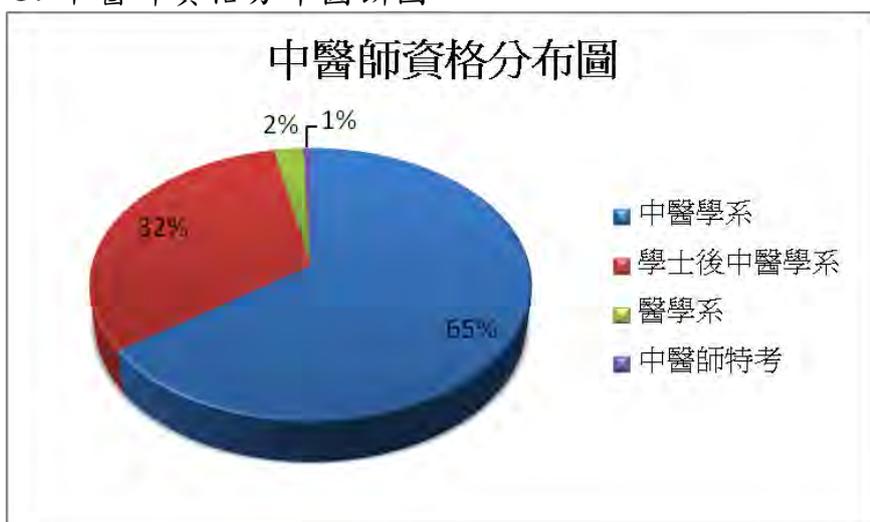
所屬地區分布：北部包含基隆、台北、桃園、新竹及苗栗地區，約佔 14%；中部包含台中、彰化、南投，約佔 79%；南部包含雲林、嘉義，臺南、高雄及屏東，約佔 33%；東部包含花蓮、台東，約佔 4%。

#### 4. 執業年資分布圓餅圖



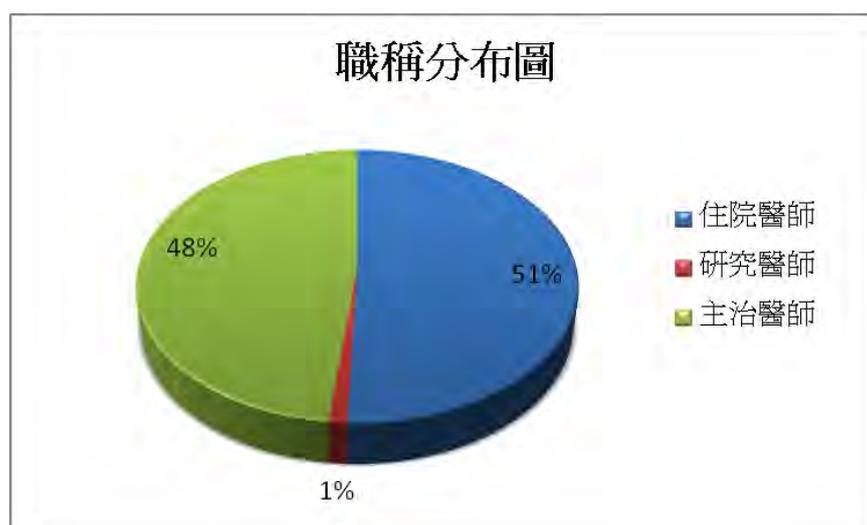
執業年資分布：分為一年到五年、六至十年、十一至十五年和十六至二十年以上。

#### 5. 中醫師資格分布圓餅圖



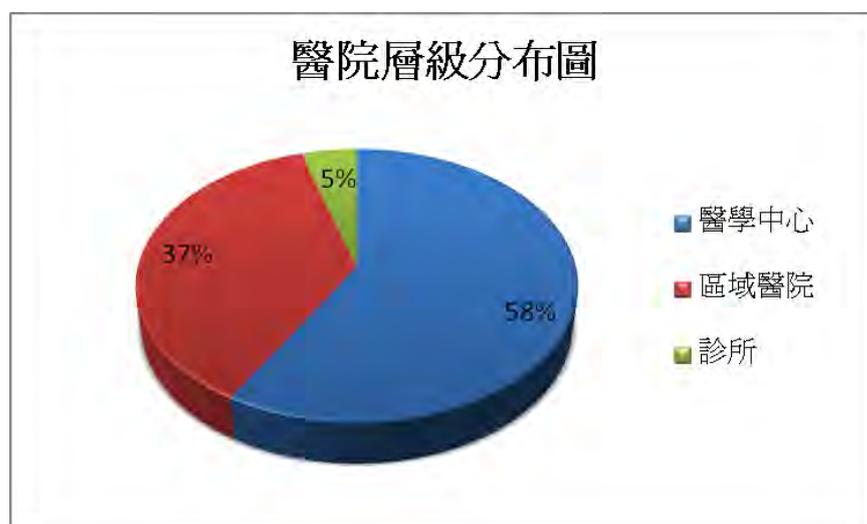
中醫師資格分布：分為中醫學系、學士後中醫學系、醫學系、中醫師特考，分別佔 65%、32%、2%及 1%。

## 6. 職稱分布圓餅圖



職稱分布：分為住院醫師、研究醫師及主治醫師，住院醫師佔 48%、主治醫師佔 51%，各佔一半，研究醫師佔 1%。

## 7. 所屬醫院層級分布圓餅圖



院所層級	醫學中心	其他醫院	一般診所
家數	8 家	15 家	7 家

所屬醫院層級：分為醫學中心、區域醫院及一般診所，醫學中心佔 58%、區域醫院佔 37%、一般診所佔 5%。

## (二) 問卷信度評估

### 1. 評估方法

使用能夠測量內部一致性的 Cronbach's  $\alpha$ ，判斷穩定性。

### 2. 評估工具

使用統計軟體 SPSS18.0 進行問卷信度評估。

### 3. 信度結果及評估

可靠性統計量

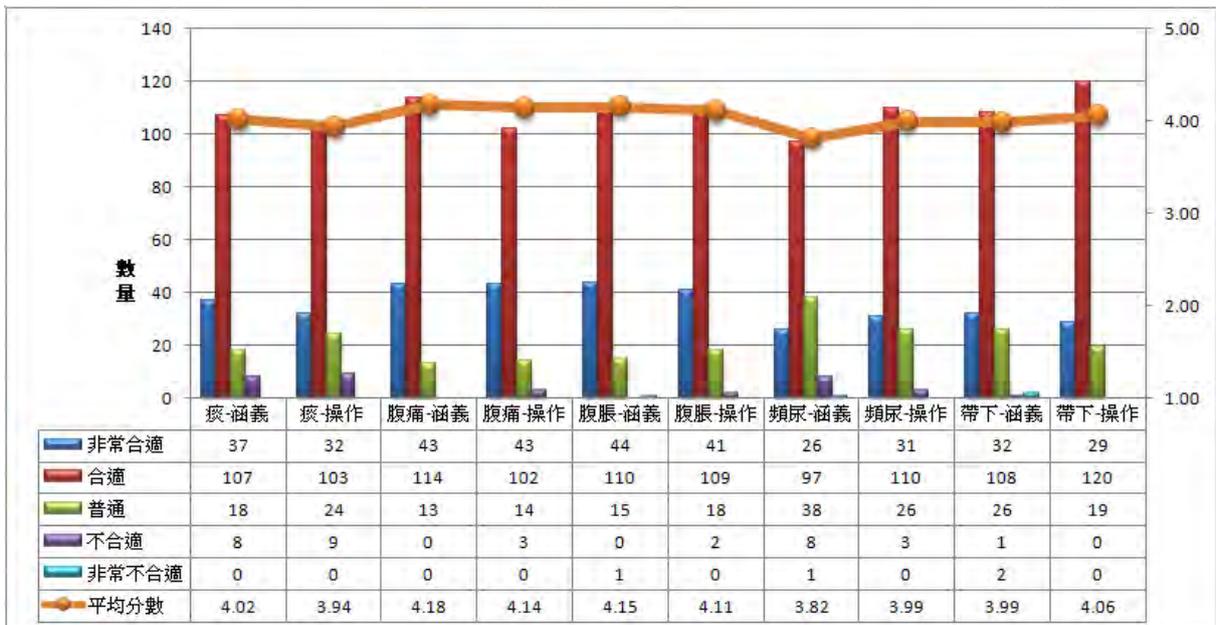
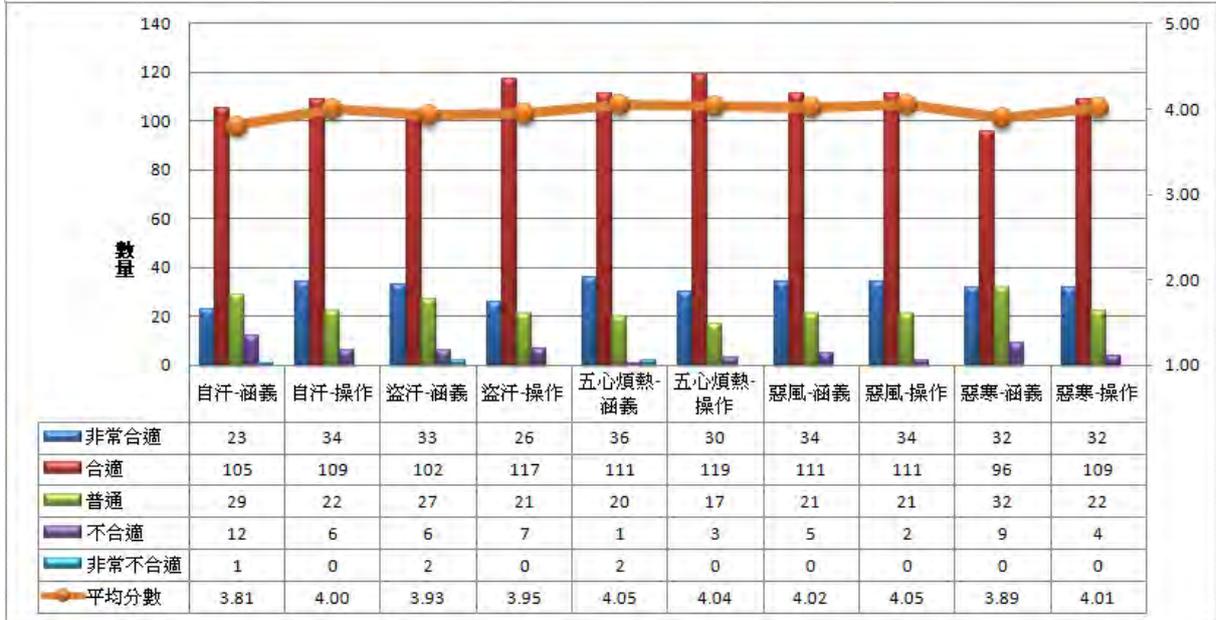
Cronbach's Alpha值	以標準化項目為準的 Cronbach's Alpha值	項目的個數
0.984	0.985	62

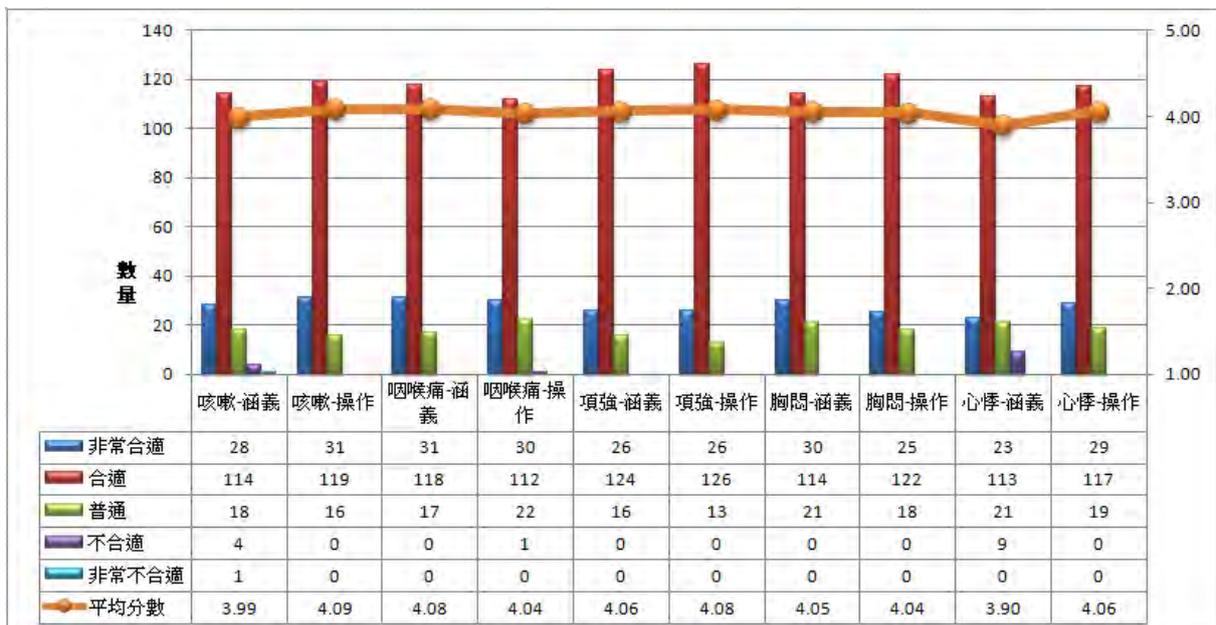
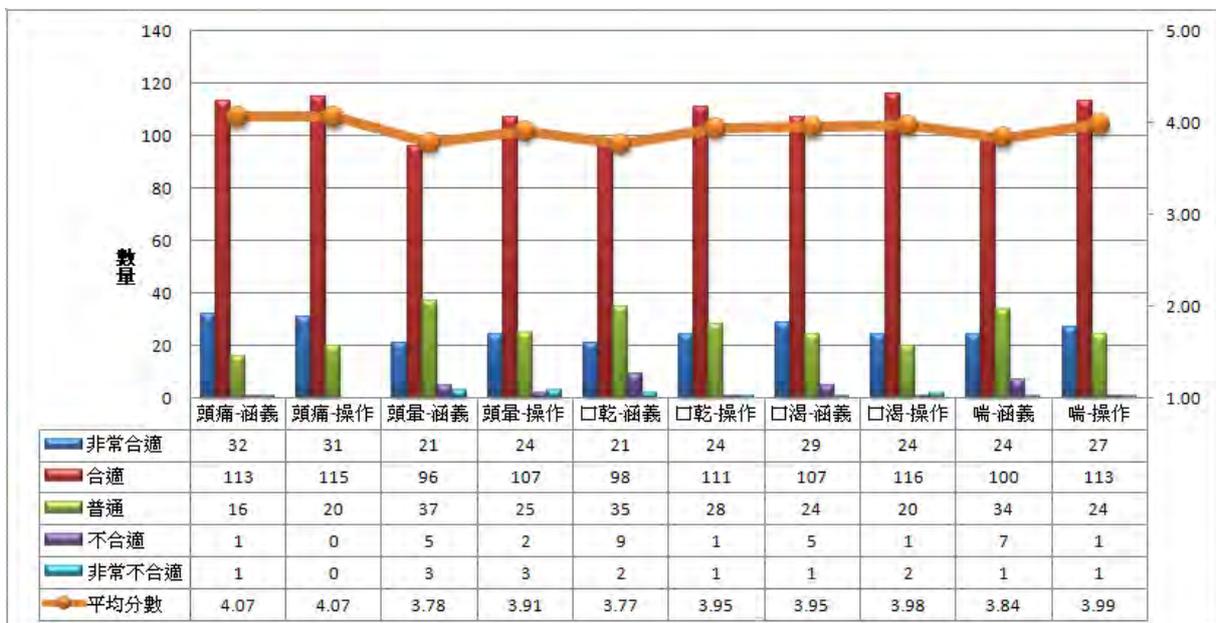
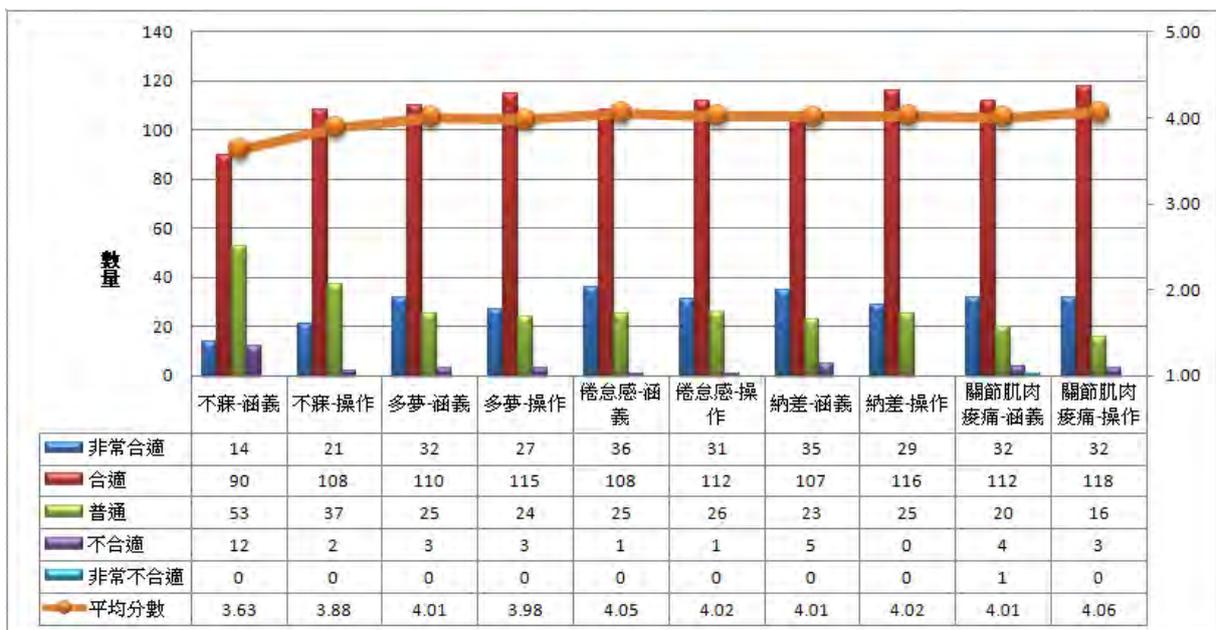
Cronbach's Alpha 係數越高，代表量表的內部一致性越高。係數值越高表示由此份問卷所做出的結果可相信的程度越高，由中醫臨床常見症狀共識問卷的 62 個問項中，所得的資料，於統計軟體中執行信度分析，得到 Cronbach's Alpha 值為 0.984，大於 0.9，顯示問卷穩定度相當高結果非常可信。

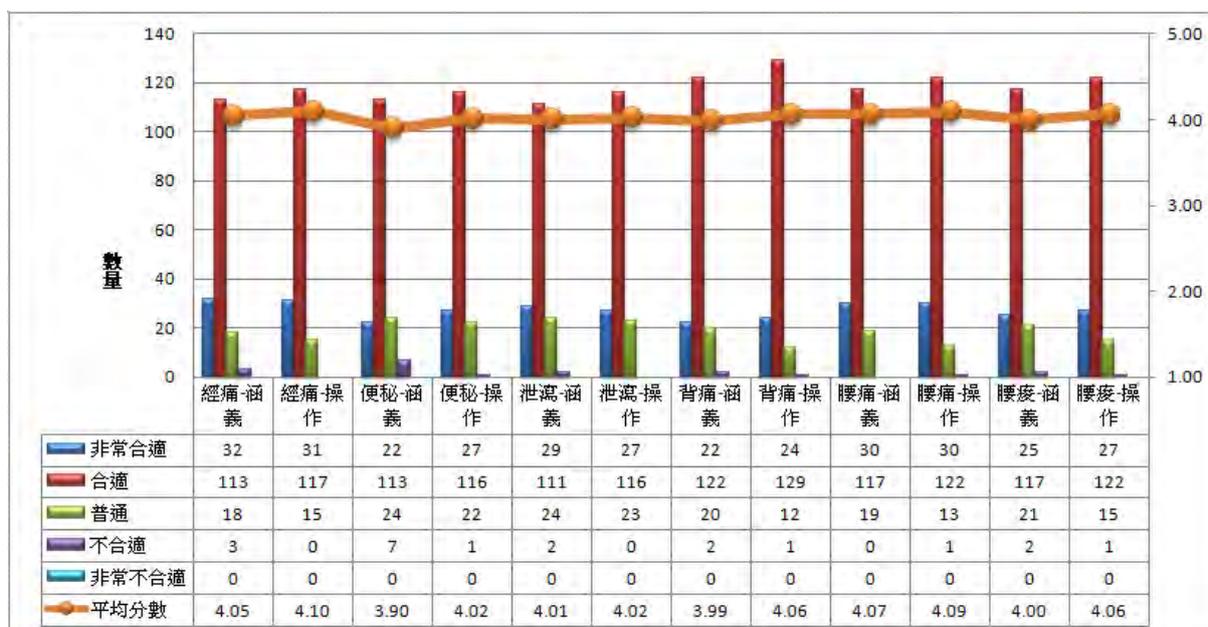
### (三) 結果一致性

使用李克特氏量表(Likert scale)計分，分別有五個向度表達非常合適、合適、普通、不合適、非常不合適，各為 5 分、4 分、3 分、2 分、1 分。

將各題項的總分除以答題個數，求得各題項的答題平均分數，各題項的答題平均分數皆接近 4 分，表填答者認為症狀涵義及臨床操作模式多屬合適。







### 三、舉辦常見疾病之中醫臨床診斷與治療學術研討會

本計劃於102年11月3日於彰化基督教醫院舉辦常見疾病之中醫臨床診斷與治療學術研討會，希望能藉由討論使中醫專家學者對於本計畫探討中醫症狀術語與臨床之重要性，研討會詳細成果請參照附錄二研討會成果報告。

#### 四、新醫藥週刊

撰寫新醫藥周刊專欄文章，推廣症狀 101 年度成果至全中醫相關領域人士，週刊每次發行數量約五千份，六成讀者為中醫師，目前已將 15 項症狀，包含頭暈、頭痛、咳嗽、帶下、心悸、便秘、泄瀉、口乾、胸悶、口渴、項強、經痛、咽喉痛、惡寒、惡風，主題之文章刊載於週刊。

出刊日期	週刊期數	主題症狀
102/04/01	2484	頭暈
102/04/22	2487	頭痛
102/05/06	2489	咳嗽
102/06/03	2493	帶下
102/07/01	2497	心悸
102/07/15	2499	便秘
102/07/29	2501	泄瀉
102/08/09	2508	口乾
102/08/12	2503	胸悶
102/08/23	2512	口渴
102/09/02	2506	項強
102/09/30	2510	經痛
102/10/28	2514	咽喉痛
102/11/11	2516	惡寒
102/12/09	2520	惡風

## 肆、討論

中醫的診斷主要是以症狀的採集為基礎，並依據中醫的辨證理論進行病因病機的分析。因此，症狀是中醫辨證的基本元素，也是臨床診療的基礎。而目前中醫四診診斷症狀術語在表述時是繁雜且細瑣，長期以來，一直缺乏客觀及有共識的診斷標準，亦難將診察結果予以精確的量化，而究其原因都是由於診斷症狀術語的判定未被重視。

與會專家學者多數認為，同樣一個症狀名詞，散於不同經典醫書，所呈現或表達的涵義可能都不盡相同，更何況時至今日，在西方醫學的感染之下，許多原本傳統中醫術語必須與西醫接軌，或是逐漸被西醫的概念取代，其結果造成醫者之間症狀的談論容易因學習及臨床的經驗而產生歧異，使得學生在學校及臨床學習上難以適應及使用，而如何討論出針對症狀的涵義令其可以為大多數醫家接受，同時又可與現代醫學結合成為日後與西醫討論的基本準則為專家會議之努力方向。

如煩躁為中醫臨床上常見病人主訴症狀，臨床醫師常因病人主訴心煩或覺坐立難安即使用此一術語，但其實煩較屬於心理上的問題，客觀上較不易觀察；而躁比較偏躁動不安、坐立難安，客觀上較可觀察到病人手足躁動之情形，此屬於自覺與他覺症狀的結合，但臨床上兩個症狀又會互相影響，因此在涵義及操作型定義可將這部分寫得比較詳細，另外也可參考西醫精神科相關症狀對於煩躁的描述以及定義。

另外如發熱此一症狀臨床上多以病人主訴身體或身體發熱不適使用的術語，較屬於主觀之證狀，在客觀指標方面若體溫偏高亦有臨床醫師使用此一術語，但依發熱類型、時間、部位可在細分如往來寒熱、五心煩熱、潮熱、四肢熱等等，因此認為在現代醫學術語中若體溫偏高有發燒此一術語，應將主觀身熱定義在發熱範疇，而客觀體溫上升則使用發燒此一術語。

## 伍、結論與建議

### 一、結論

今年度本計畫將臨床常見三十四項症狀之涵義與臨床操作模式依系統分類討論並透過各教學醫院及專家諮詢形成共識呈現。另將 101 年度 31 項症狀術語。製作問卷請各醫學中心、教學醫院中醫部及基層中醫診所廣泛徵詢中醫師建議及回饋，並希望能於臨床推廣使用，透過問卷調查，問卷信度結果高，各題項平均分數皆接近 4 分，多屬合適且一致性佳。

### 二、建議

- (一) 症狀涵義：症狀涵義內容應盡量精簡、淺顯易懂，若過度描述則容易造成臨床使用上的困擾。
- (二) 症狀操作：操作型定義以症狀的病位、症狀的性質、發作頻率、時間等針對症狀詳細描述來進行症狀的操作及確認，並詢問伴隨症狀、緩解及加重因子等作為輔助臨床辨證的資料，進一步可與證型、徵候相結合。
- (三) 其餘如症狀的文字起源(如說文解字)、鑑別診斷、相似及相關症狀、可幫助醫者在學習及臨床應用更加有感覺。在臨床意義部分，針對中西醫臨床上的診斷意義，同時可納入西醫參考名詞及定義，有些症狀名詞在西醫已經有詳細的定義可參考，另外也可利用已有的客觀指標或量表，做為與西醫溝通之平台，亦可討論相關期刊或 EBM，實證醫學是目前趨勢，若有相關資料可以一起補充。

## 誌謝

本研究計畫承蒙衛生福利部計畫編號 CCMP102-RD-113 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. 高尚德 五種常見疾病中醫證型診斷基準之研究 (3-1) --慢性 C 型肝炎中醫證型診斷基準之研究。中醫藥年報 第 22 期 第 4 冊, 1-60, 2004
2. 高尚德 五種常見疾病中醫證型診斷基準之研究 (3-2) --慢性 C 型肝炎中醫證型診斷基準之研究。中醫藥年報 第 22 期 第 4 冊, 61-106, 2004
3. 林宏任 五種常見疾病中醫證型診斷基準之研究 (3-1) --慢性 B 型肝炎中醫證型診斷基準之研究。中醫藥年報 第 22 期 第 4 冊, 107-176, 2004
4. 林宏任 五種常見疾病中醫證型診斷基準之研究 (3-2) --慢性 B 型肝炎中醫證型診斷基準之研究。中醫藥年報 第 22 期 第 4 冊, 177-218, 2004
5. 林建雄 五種常見疾病中醫證型診斷基準之研究 (3-1) --糖尿病主要證型診斷基準之研究。中醫藥年報 第 22 期 第 4 冊, 219-238, 2004
6. 林建雄 五種常見疾病中醫證型診斷基準之研究 (3-2) --糖尿病主要證型診斷基準之研究。中醫藥年報 第 22 期 第 4 冊, 239-304, 2004
7. 馮曄 五種常見疾病中醫證型診斷基準之研究 (3-1) --停經後婦女骨質疏鬆症主要證型診斷基準之研究。中醫藥年報 第 22 期 第 4 冊, 305-322, 2004
8. 馮曄 五種常見疾病中醫證型診斷基準之研究 (3-2) --停經後婦女骨質疏鬆症主要證型診斷基準之研究。中醫藥年報 第 22 期 第 4 冊, 323-416, 2004
9. 梁茂新 洪志平, 中醫症狀量化的方法初探, 中國醫藥學報, 1994, 9(3):37-39
10. M.K. Lim, P. Sadarangani, H.L. Chan, J.Y. Heng. Complementary and alternative medicine use in multiracial Singapore. *Complementary Therapies in Medicine*, 2005;13, 16-24
11. 蔡文正、龔佩珍·中醫醫療利用成長與醫師數增加之關係·臺灣公共衛生雜誌, 2001;20(6)463-474·
12. 康健壽; 李金鳳; 陳介甫; 周碧瑟·病患利用中西醫門診相關因素·臺灣醫學會雜誌, 1994;93 (Suppl·1), 49-55。
13. Chatwin J. & Tovey P. Complementary and alternative medicine (CAM), cancer and group-based action: a critical review of the literature *Journal of Cancer Care*, 2004;13, 210-218
14. 杜異珍·文化對女性乳癌病患醫療行為之影響。榮總護理, 1992;9(2),

127-133。

15. 辛隆士、邱泰源、胡文郁、程劭儀、陳慶餘· 癌末病人之另類治療行為·  
中華家醫誌，1996;6(3)，127-137

## 柒、附錄

### 附錄一、中醫臨床常見症狀共識問卷

# 中醫臨床常見症狀共識問卷

各位臨床中醫師及專家學者您好：

症狀涵義與臨床操作模式的問卷項目，為過去一年由衛生福利部中醫藥司委託彰化基督教醫院中醫部進行之中醫症狀術語作業標準化之共識計畫之初步成果，共有多家醫學中心、醫院及診所共同參與，並舉辦六場專家諮詢會議，加入各家醫院及診所之資深臨床中醫師及專家之寶貴意見所呈現之成果，相關內容請參閱問卷。

此份問卷列出三十一項常見的中醫臨床症狀，並列有兩個部份，敘述症狀的涵義與臨床操作模式，將邀請目前在台灣執行臨床醫療業務的中醫師及中醫相關專家填寫，蒐集症狀的涵義與臨床操作模式的合適性，並擴大臨床中醫師及專家們的想法及意見，更臻完整中醫常見症狀名詞的涵義與操作規範，以尋求台灣中醫對臨床常見症狀之共識。

答題時請依題號填答，謝謝。

竭誠邀請您並感謝您填寫此份問卷！ 敬頌

醫安

中醫症狀術語作業標準化之共識(2-2)計畫主持人  
彰化基督教醫院體系中醫部 主任

謝淪諱 敬上  
2013/09/01

## 填答者基本資料表

年齡	_____ 歲
性別	<input type="checkbox"/> 男性 <input type="checkbox"/> 女性
年資	<input type="checkbox"/> 一年 <input type="checkbox"/> 二年 <input type="checkbox"/> 三年 <input type="checkbox"/> 四年 <input type="checkbox"/> 五年 <input type="checkbox"/> 六至十年 <input type="checkbox"/> 十一至十五年 <input type="checkbox"/> 十六至二十年 <input type="checkbox"/> 二十一年以上
畢業學系	<input type="checkbox"/> 中醫學系 <input type="checkbox"/> 學士後中醫學系 <input type="checkbox"/> 醫學系 <input type="checkbox"/> 中醫師特考
職稱	<input type="checkbox"/> 住院醫師 <input type="checkbox"/> 研究醫師 <input type="checkbox"/> 主治醫師

## 中醫臨床常見症狀共識問卷

※請在您覺得最適當的□中，打勾或標記“■”符號。

症狀一、自汗	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
1.1 涵義：清醒時汗出異常。	<input type="checkbox"/>				
1.2 臨床操作模式：詢問患者平日出汗狀況，目前汗出部位、汗的質、量、味、色。並詳問發作頻率、發作時間、持續時間、誘發因子、加重因子、緩解因子、伴隨症狀等。通常與勞動、氣候炎熱，服用發汗藥物等因素無關。	<input type="checkbox"/>				

1.3 建議：

症狀二、盜汗	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
2.1 涵義：入睡後汗出異常，醒後汗出即止。	<input type="checkbox"/>				
2.2 臨床操作模式：詢問患者平日睡眠出汗狀況，目前睡眠汗出部位、汗的質、量、味、色。並詳問發作頻率、發作時間、持續時間、誘發因子、加重因子、緩解因子、伴隨症狀等。	<input type="checkbox"/>				

2.3 建議：

症狀三、五心煩熱	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
3.1 涵義：患者自覺兩手心、足心發熱，或伴有胸口發熱，甚至煩躁不安感。	<input type="checkbox"/>				
3.2 臨床操作模式：詢問患者發熱部位，應以手足掌心或胸口為主，並詢問是否有煩躁、坐立難安之感受，醫者可以手背觸摸患者手心及手背判別溫度差異。並詳問發作頻率、發作程度、發作時間、持續時間、誘發因子、緩解因子、伴隨症狀等。排除全身發熱發燒症狀。	<input type="checkbox"/>				

3.3 建議：

症狀四、惡風	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
4.1 涵義:吹風覺身體難耐不適感，避風可緩解。	<input type="checkbox"/>				
4.2 臨床操作模式：詢問患者是否因風直接吹拂體表而有厭惡感，下意識欲穿衣或換位置避之。若無風吹拂時症狀是否緩解無厭惡感。並詢問好發時間、持續時間、誘發因子、加重因子、緩解因子、伴隨症狀等。	<input type="checkbox"/>				
4.3 建議：					
症狀五、惡寒	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
5.1 涵義:雖不當風亦覺寒冷、身體難耐不適感。	<input type="checkbox"/>				
5.2 臨床操作模式：詢問患者是否覺身冷而有厭惡感欲穿衣，雖穿多衣物仍覺身冷，並詢問好發時間、持續時間、誘發因子、加重因子、緩解因子、伴隨症狀等。	<input type="checkbox"/>				
5.3 建議：					
症狀六、痰	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
6.1 涵義：有狹義和廣義之分，狹義的痰指呼吸道的分泌物；廣義的痰則停留在身體的經絡與臟腑各處。	<input type="checkbox"/>				
6.2 臨床操作模式：(針對狹義的痰)詢問患者的痰是否可咳出，並詳問痰的質、量、味、色，以及發作時間、持續時間、誘發因子、緩解因子、伴隨症狀等。	<input type="checkbox"/>				
6.3 建議：					
症狀七、腹痛	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
7.1 涵義:患者自覺腹部的疼痛不適感。	<input type="checkbox"/>				
7.2 臨床操作模式：請患者明確表示出不適位置(應在鳩尾以下、曲骨以上之範圍)。並請患者描述發病新久、疼痛的程度、性質、發作頻率、好發時間、持續時間、誘發因子、加重因子、緩解因子、伴隨症狀等。醫者	<input type="checkbox"/>				

可進行腹部理學檢查。

7.3 建議：

症狀八、腹脹	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
8.1 涵義：患者自覺腹部的脹滿不適感。	<input type="checkbox"/>				
8.2 臨床操作模式：請患者明確表示出不適位置(應在鳩尾以下、曲骨以上之範圍)。並請患者描述發病新久、脹滿的程度、性質、發作頻率、好發時間、持續時間、誘發因子、加重因子、緩解因子、伴隨症狀等。醫者可進行叩診理學檢查。	<input type="checkbox"/>				

8.3 建議：

症狀九、頻尿	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
9.1 涵義：患者自覺排尿次數增加，甚則一日十餘行之情形。	<input type="checkbox"/>				
9.2 臨床操作模式：詢問患者平日排尿頻率、尿量，以此為基準再詢問患者目前之排尿頻率、尿量以及好發時間、誘發因子、緩解因子、伴隨症狀等。	<input type="checkbox"/>				

9.3 建議：

症狀十、帶下	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
10.1 涵義：產自陰道的分泌物。	<input type="checkbox"/>				
10.2 臨床操作模式：詢問患者平日分泌物情形，以此為基準再詢問患者目前分泌物的質、量、味、色，以及發作時間、持續時間、誘發因子、加重因子、緩解因子、伴隨症狀等。每月月經前期、排卵期、及妊娠早期會稍微增加，這是正常生理現象，停經後則稍微減少。	<input type="checkbox"/>				

10.3 建議：

症狀十一、不寐	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
11.1 涵義:睡眠時間減少或品質不佳。	<input type="checkbox"/>				
11.2 臨床操作模式:詢問患者睡眠時間、形態及品質,是否導致白天的情緒、生活與工作受影響。發作頻率、好發時間、持續時間、誘發因子、加重因子、緩解因子、伴隨症狀等。另外睡眠前的思維狀態,行為等亦當詢問;最後,尚應詢問患者生活各方面明顯的或潛在的可能壓力。	<input type="checkbox"/>				

11.3 建議:

症狀十二、多夢	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
12.1 涵義:自覺睡眠時夢境不斷。	<input type="checkbox"/>				
12.2 臨床操作模式:詢問患者睡眠時間、形態、品質及夢境內容,是否導致白天的情緒、生活與工作受影響。發作頻率、好發時間、持續時間、誘發因子、加重因子、緩解因子、伴隨症狀等。另外睡眠前的思維狀態,行為等亦當詢問;最後,尚應詢問患者生活各方面明顯的或潛在的可能壓力。	<input type="checkbox"/>				

12.3 建議:

症狀十三、倦怠感	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
13.1 涵義:患者自覺精神萎靡困倦,肢體怠惰乏力。(精神或身體均可)	<input type="checkbox"/>				
13.2 臨床操作模式:詢問患者平日精神、工作、家庭狀況,是否整日均覺精神不濟,詢問相關身體症狀、心理狀態。倦怠感發作頻率、好發時間、持續時間、誘發因子、加重因子、緩解因子、伴隨症狀等。	<input type="checkbox"/>				

13.3 建議:

<u>症狀十四、納差</u>	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
14.1 涵義:患者自覺食慾不佳、不欲飲食或食少即覺飽脹，食量較以往減少。	<input type="checkbox"/>				
14.2 臨床操作模式：詢問患者平日飲食狀況以及消化情形，與目前不適症狀相比較；並詢問發病新久、最近飲食狀況是否有不正常、排便狀況是否有改變或是有生活、工作環境等壓力。發作頻率、好發時間、持續時間、誘發因子、加重因子、緩解因子、伴隨症狀等。	<input type="checkbox"/>				
14.3 建議：					
<u>症狀十五、關節肌肉痠痛</u>	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
15.1 涵義:患者自覺身體骨骼與骨骼之間或肌肉痠楚疼痛不適感。(關節疼痛、肌肉痠痛)	<input type="checkbox"/>				
15.2 臨床操作模式：請患者明確指出痠痛的部位。並請患者描述疼痛的程度、性質、發作頻率、持續時間、誘發因子、加重因子、緩解因子、伴隨症狀等。	<input type="checkbox"/>				
15.3 建議：					
<u>症狀十六、頭痛</u>	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
16.1 涵義:頭部的疼痛感。	<input type="checkbox"/>				
16.2 臨床操作模式：首先確認疼痛發生在頭部，並請患者儘量指明疼痛的部位及是否會轉移，接著詢問過去相關傷病史、頭痛病程的久暫、發病時間、疼痛的型態、程度、好發時間、誘發因子、加重因子、緩解因子、以及伴隨症狀等等。頭痛需要和眩暈做鑑別。	<input type="checkbox"/>				
16.3 建議：					
<u>症狀十七、頭暈</u>	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
17.1 涵義:頭腦不清爽，以致精神難以集中的一種不適	<input type="checkbox"/>				

感。部分患者所言頭暈，多近似頭昏、頭重或頭脹等症狀；另有一部分則將感覺自身或周圍景物旋轉者稱為頭暈。

17.2 臨床操作模式：首先確認不適感是頭昏、頭重或頭脹、或屬天旋地轉者，並詢問過去相關病史、病程的久暫、發病時間、頭暈的程度、好發時間、誘發因子、加重因子、緩解因子、以及伴隨症狀等等。並詢問目前使用藥物。	<input type="checkbox"/>				
---	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

17.3 建議：

症狀十八、口乾	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
18.1 涵義：自覺口中乾燥少津，可伴見飲水需求。	<input type="checkbox"/>				
18.2 臨床操作模式：詢問患者平日飲水量、飲水次數、飲水溫度、飲水後是否解渴。並詢問口乾是否有特定時間、加重因子、緩解因子。	<input type="checkbox"/>				

18.3 建議：

症狀十九、口渴	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
19.1 涵義：口乾想喝水。	<input type="checkbox"/>				
19.2 臨床操作模式：詢問患者平日飲水量、飲水次數、飲水溫度、飲水後是否較不口渴。並詢問口渴是否有特定時間、加重因子、緩解因子。	<input type="checkbox"/>				

19.3 建議：

症狀二十、喘	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
20.1 涵義：呼吸頻率較快或呼吸型態異常。	<input type="checkbox"/>				
20.2 臨床操作模式：詢問患者平日呼吸型態、目前呼吸是否較快、呼吸不順暢或呼吸困難，並詢問發病新久、發作頻率、持續時間、誘發因子、加重因子、緩解因子、伴隨症狀等。並詢問患者可能致喘的相關疾	<input type="checkbox"/>				

病如心血管疾病、呼吸疾病。

20.3 建議：

症狀二十一、咳嗽	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
21.1 涵義:突然的用力且有聲響的由咽喉排出肺部空氣,常伴咯痰特徵的一種症狀,“咳”是指有聲無痰,“嗽”是指有痰無聲,“咳嗽”是指有聲有痰。	<input type="checkbox"/>				
21.2 臨床操作模式:可聽患者咳嗽的聲音大小、頻率、是否有痰聲等,若患者無自咳,可請患者咳出聲。詢問患者咳嗽時間已多久、平日咳嗽狀況、發作程度、發作時間(好發時間)、持續時間、誘發因子、加重因子、緩解因子、伴隨症狀等並詢問目前使用藥物。	<input type="checkbox"/>				

21.3 建議：

症狀二十二、咽喉痛	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
22.1 涵義:是指咽喉部位的疼痛而言,或稱喉嚨痛、咽嗝痛。	<input type="checkbox"/>				
22.2 臨床操作模式:咽喉泛指口咽部和喉咽部。首先確認不適感發生在咽喉部,可儘量請患者指出自覺不適的部位,並詢問過去相關病史、病程的久暫、發病時間、疼痛的型態、程度、好發時間、誘發因子、加重因子、緩解因子、以及伴隨症狀等等。	<input type="checkbox"/>				

22.3 建議：

症狀二十三、項強	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
23.1 涵義:指項部有肌肉強直感,可伴隨俯仰及轉動不利。	<input type="checkbox"/>				
23.2 臨床操作模式:首先確認不適感在項部(指肩背上,枕骨粗隆以下的部位),可請患者指出自覺僵硬的位置與範圍,注意有否牽連至頸項以外的區域,並	<input type="checkbox"/>				

詢問過去相關傷病史、病程的久暫、發病時間、僵硬的程度、好發時間、誘發因子、加重因子、緩解因子、以及伴隨症狀等。

23.3 建議：

症狀二十四、胸悶	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
24.1 涵義：胸中堵塞、憋悶、壓迫等不適感。	<input type="checkbox"/>				
24.2 臨床操作模式：患者自覺胸中堵塞感、憋悶、壓迫等不適感(如：胸口被壓住、胸口不爽快、想要擴胸、想深呼吸)。胸部：兩乳中(臍中穴)之上謂之胸。胸下兩乳中間至鳩尾處。須詢問患者胸痛與否(若胸痛則不屬此範疇)，也可伴見呼吸不暢、心悸、咳嗽、痰、灼熱感。詢問患者發作時間(好發時間)、持續時間、誘發因子、加重因子、緩解因子、伴隨症狀等。	<input type="checkbox"/>				

24.3 建議：

症狀二十五、心悸	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
25.1 涵義：自覺心臟在跳動。	<input type="checkbox"/>				
25.2 臨床操作模式：詢問患者平日心悸狀況，是突發性或是持續性、心跳變快或是變慢、是否有其他誘發事件或因素，並詢問發作時間(好發時間)、持續時間，發病新久、發作頻率、發作程度、加重因子、緩解因子、伴隨症狀(如疲倦或虛弱感、想吐、呼吸不順、汗出、發熱、脈促結代等)。若容易被驚嚇而心悸或是容易心悸而驚恐則稱驚悸。	<input type="checkbox"/>				

25.3 建議：

症狀二十六、經痛	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
26.1 涵義：經期前、後或正值經期，發生於下腹部的疼痛。	<input type="checkbox"/>				
26.2 臨床操作模式：詢問患者疼痛部位是否在下腹部及疼痛發作的時間。並詢問患者平時月經疼痛的型態	<input type="checkbox"/>				

(抽痛、刺痛、悶痛、隱痛及脹痛等)，發病新久、發作頻率、發作程度、持續時間、誘發因子、加重因子、緩解因子、伴隨症狀等。

26.3 建議：

症狀二十七、便秘	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
27.1 涵義：排便次數減少，或排便困難(無論便軟、便硬)。	<input type="checkbox"/>				
27.2 臨床操作模式：詢問患者平日排便習慣、糞便型態、及目前排便狀況、是否伴隨其他症狀。並詢問排便間隔時間、排便花費時間、糞便型態，是否覺大便排出困難，並詢問目前使用藥物。	<input type="checkbox"/>				

27.3 建議：

症狀二十八、泄瀉	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
28.1 涵義：大便質軟不成形或如水樣，可伴見排便次數增加。	<input type="checkbox"/>				
28.2 臨床操作模式：詢問患者平日排便習慣、糞便型態、及目前排便狀況、是否伴隨其他症狀。並詢問排便間隔時間、排便次數、糞便型態。是否見完穀不化(食物未消化完全之殘渣)，並詢問目前使用藥物。	<input type="checkbox"/>				

28.3 建議：

症狀二十九、背痛	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
29.1 涵義：指背部因某種原因引起疼痛的一種自覺症狀，可引及肩、胸、心下、腰部。	<input type="checkbox"/>				
29.2 臨床操作模式：首先確認不適感在背部，可請患者指出自覺疼痛的部位與範圍(T1-T12)，注意有否牽連至肩、胸、心下、腰等部位，並詢問過去相關傷病史、病程的久暫、發病時間、疼痛的型態、程度、好發時間、誘發因子、加重因子、緩解因子、以及	<input type="checkbox"/>				

伴隨症狀等。

29.3 建議：

症狀三十、腰痛	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
30.1 涵義：指腰部發生疼痛。	<input type="checkbox"/>				
30.2 臨床操作模式：首先確認疼痛在腰部(L1-L5)，可請患者指出自覺疼痛的部位與範圍，有否牽連至其他部位，並詢問過去相關傷病史、病程的久暫、發病時間、疼痛的型態、程度、好發時間、誘發因子、加重因子、緩解因子、以及伴隨症狀等。其疼痛部位或以腰部正中脊部為重，或在脊柱兩側為甚，故一般稱腰脊痛，或稱為腰痛。部分腰痛是生殖泌尿系統或消化系統的疾患所導致，非骨骼肌肉的問題，需鑑別。	<input type="checkbox"/>				

30.3 建議：

症狀三十一、腰痠	非常 不合適	不合適	普通	合適	非常 合適
31.1 涵義：指以腰部痠楚不適，綿綿不已為主的症狀。	<input type="checkbox"/>				
31.2 臨床操作模式：首先確認痠楚感在腰部(L1-L5)，可請患者指出自覺痠楚的部位與範圍，有否牽連至其他部位，並詢問過去相關傷病史、病程的久暫、發病時間、痠楚的程度、好發時間、誘發因子、加重因子、緩解因子、以及伴隨症狀等等。部分腰痠是生殖泌尿系統或消化系統的疾患所導致，非骨骼肌肉的問題，需鑑別。	<input type="checkbox"/>				

31.3 建議：

~~~~~問卷結束，謝謝您的填答！~~~~~

附錄二、研討會成果報告

壹、成果報告

CCMP102-RD-113

常見疾病之中醫臨床診斷與治療  
學術研討會  
**Symposium on Diagnosis and Treatment of  
Common Disease of Traditional Chinese  
Medicine**

彰化基督教醫院中醫部

Changhua Christian Hospital, Department of Chinese Medicine

成果報告

Report of Achievements

時間：102 年 11 月 3 日

地點：彰化基督教醫療財團法人彰化基督教醫院二期 11 樓連瑪玉講堂

摘要：

本研討會邀請資深中醫師針對常見中醫疾病之臨床診斷與治療進行演講，希望能藉由討論使各中醫專家學者對於本計畫探討之中醫症狀術語與臨床診斷及治療相互連結。

The seminar invited senior Chinese medicine practitioners to speak for common TCM diagnosis and treatment of diseases. We hope through discussion that TCM experts and scholars could realize the importance among TCM symptoms terminology, clinical diagnosis and treatment.

內文：

中醫診斷建立於症狀之上，而本次研討會邀請中醫臨床及診斷學有專精資深中醫師探討中醫在臨床診斷與治療之相關性與應用。會議內容分為四部份

首先由張恒鴻副院長提出辨證診斷術語之涵義和臨床應用規範，是進一步發展中醫研究和診療的先決條件。藉由「辨證診斷術語」共識之建構，

可搭建知識溝通平台，可促進中醫學術與臨床的交流。建立中醫辨證診斷術語涵義及臨床應用之共識，就中醫辨證的常用術語字彙，探討其涵義和臨床應用，期能形成中醫界共識，並能在中醫相關領域交流使用。最終是要建立中醫診斷共通語言、中醫臨床診斷作業規範及中醫診療服務系統化。

接著為許堯欽醫師講解心率不整的中醫診療經驗，如西醫認知心律不整為心臟失去正常應有的規則性節律，臨床分類有：(1)快速心律：心房震顫、心房撲動心室上頻脈、心室頻脈 (2)慢性心律：病竇綜合徵(Sick sinus syndrome) 房室傳導阻礙 (3)不規則早期收縮：心房早期收縮 病人脈律異常。而中醫對心律不整的認知：快速心律：數脈、疾脈、促脈，慢速心律：遲脈、緩脈，不規則脈象：結脈、代脈、雀啄、屋漏、蝦游，病人臨床症狀：心悸、怔忡、胸痺、暈厥、虛勞等症候，藉由西醫與中醫對心律不整的認知相結合，使中醫能在心律不整的領域有更好的發揮。

再來是楊中賢醫師以深入淺出方式講解膀胱的生理病理機轉:在《素問·靈蘭秘典論》:「膀胱者，州都之官，津液藏焉，氣化則能出矣。」有相關論述，也就是說膀胱要通過「氣化」的過程才能開闔有度，使尿液排泄正常。而我為氣化指的就是陽氣運化津液或水液的過程。膀胱氣化與西醫生理 BLADDER COOLING REFLEX 有關聯性。加強中醫常使用的方劑如五苓散、寄生腎氣丸的認識與臨床應用，可讓臨床中醫師在治療排尿問題更能得心應手。

最後由陳建霖醫師講解中醫調經策略，對於月經的生理定義：月經是有規律的、週期性的子宮出血。以月為期，經常不變。在治法的選擇上，應根據患者的病因、病證與體質進行辨證施治；臟腑、氣血的病變以內治為主；虛則補之，實則瀉之。月經病、不孕症宜採用周期療法；陰戶、陰道及胞中的病變可選用外治法，或內外合治。另一方面中藥周期療法則為根據月經周期中陰陽氣血的變化規律，進行分期用藥的一種調經方法。經後期可使用滋腎陰、養精血；經間期則以溫腎助陽、活血為主；經前期則以補腎為主，佐以滋陰；在月經期可選用疏肝理氣，活血調經。

本研討會與會人數共計約八十五人，與會貴賓及學者均對中醫之術語與臨床有熱烈的討論。本次研討會雖只有舉辦半日，但與會同道及學者均獲益良多、並提出日後可以再舉辦相關性質的研討會，讓中醫同道及學者可以有更大的收穫。

最後，謹感謝衛生福利部中醫藥司共同舉辦，並提供經費贊助，使本次學術研討會得以順利進行，圓滿閉幕。

# 常見疾病之中醫臨床診斷與治療 學術研討會

## Symposium on Diagnosis and Treatment of Common Disease of Traditional Chinese Medicine

程序表

Agenda

指導單位：衛生福利部中醫藥司

Ministry of Health and Welfare Chinese Medicine and Pharmacy

主辦單位：彰化基督教醫院中醫部 Changhua Christian Hospital、臺灣中醫診  
斷學會 Formosan Association Of Clinical Diagnosis in Traditional  
Chinese Medicine

協辦單位：中國醫藥大學附設醫院中醫部 China Medical University Hospital  
Traditional Chinese Medicine、奇美醫療財團法人奇美醫院中醫  
部 Chi Mei Medical Center Chi Mei Hospital Chinese Medicine、佛  
教慈濟綜合醫院台北分院中醫部 Buddhist Tzu Chi Medical  
Foundation Taipei Tzu Chi General Hospital

舉辦場次：第一場/共一場

舉辦時間：102年11月3日（星期日）至102年11月3日（星期日）

舉辦地點：彰化基督教醫療財團法人彰化基督教醫院  
二期11樓連瑪玉講堂

研討會會議議程：

| 主持人         | 羅綸謙、陳建仲、林宏任               |                                 |    |
|-------------|---------------------------|---------------------------------|----|
| 時間          | 演講題目                      | 主講人                             | 備註 |
| 13:00~13:15 | 報到、領取資料                   |                                 |    |
| 13:15~13:30 | 開幕儀式暨貴賓致詞                 |                                 |    |
| 13:30~14:20 | 中醫辨證術語臨床應用商榷              | 張恒鴻教授<br>/長庚醫院中醫副院長、中醫診斷學會榮譽理事長 |    |
| 14:20~15:10 | 泌尿系統相關症狀探討-<br>排尿問題之處理    | 許堯欽主任<br>/奇美醫療財團法人奇美醫院中醫部       |    |
| 15:10~15:30 | 茶敘時間                      |                                 |    |
| 15:30~16:20 | 心血管相關症狀探討-<br>心臟疾病的中醫診療經驗 | 楊中賢主任<br>/中國醫藥大學附設醫院中醫內科        |    |
| 16:20~17:10 | 婦科相關症狀探討-<br>經血易出之中醫調經策略  | 陳建霖主任<br>/中醫診斷學會理事長、台北慈濟醫院中醫部   |    |
| 17:10~18:00 | 綜合討論                      |                                 |    |
| 18:00~      | 賦歸                        |                                 |    |

參、研討會照片集



圖一、中醫辨證術語臨床應用之探討



圖二、排尿問題之處理



圖三、心臟疾病的中醫診療經驗



圖四、研討會學員聽講情形



圖五、研討會學員聽講情形



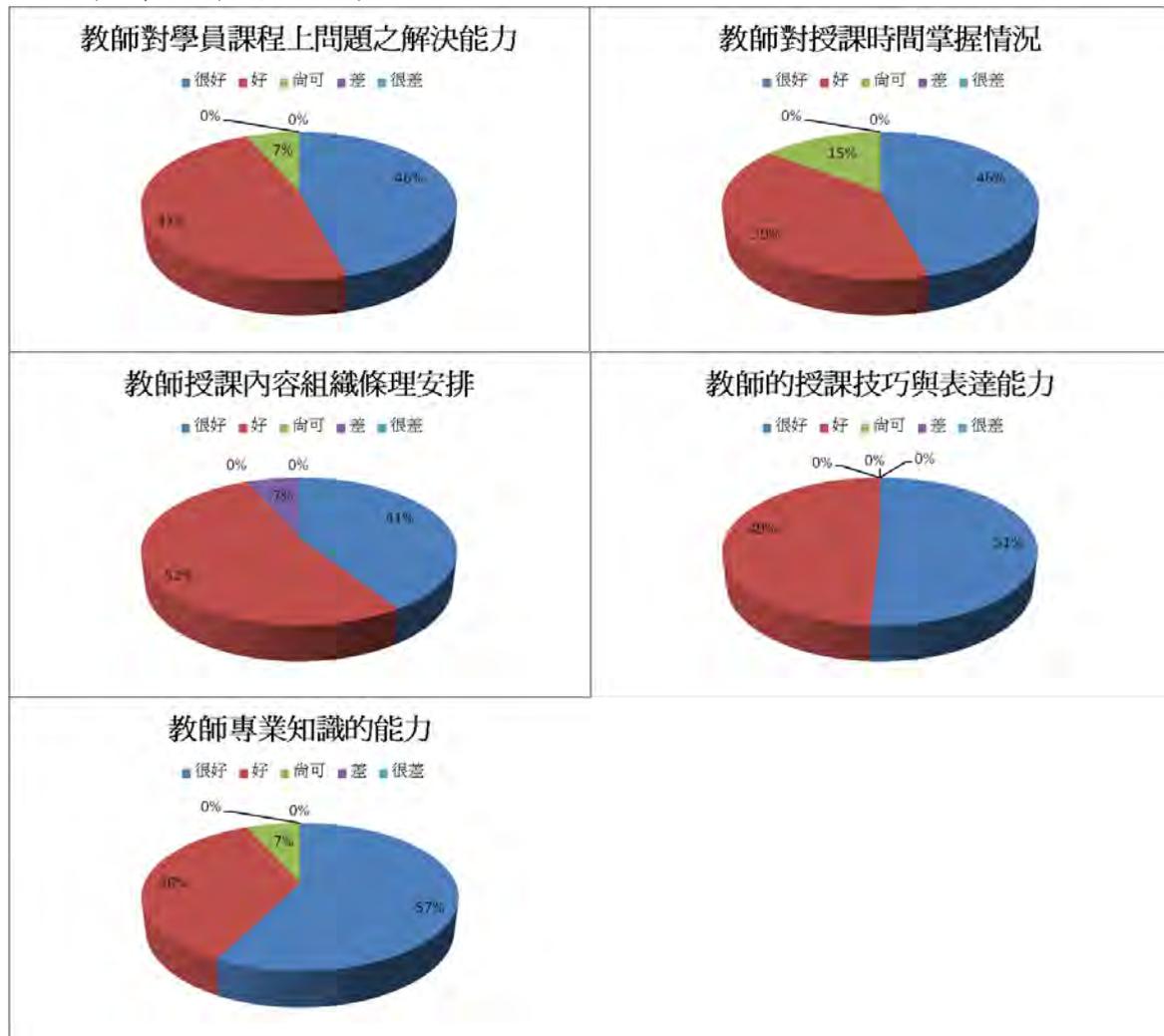
圖六、經血易出之中醫調經策略



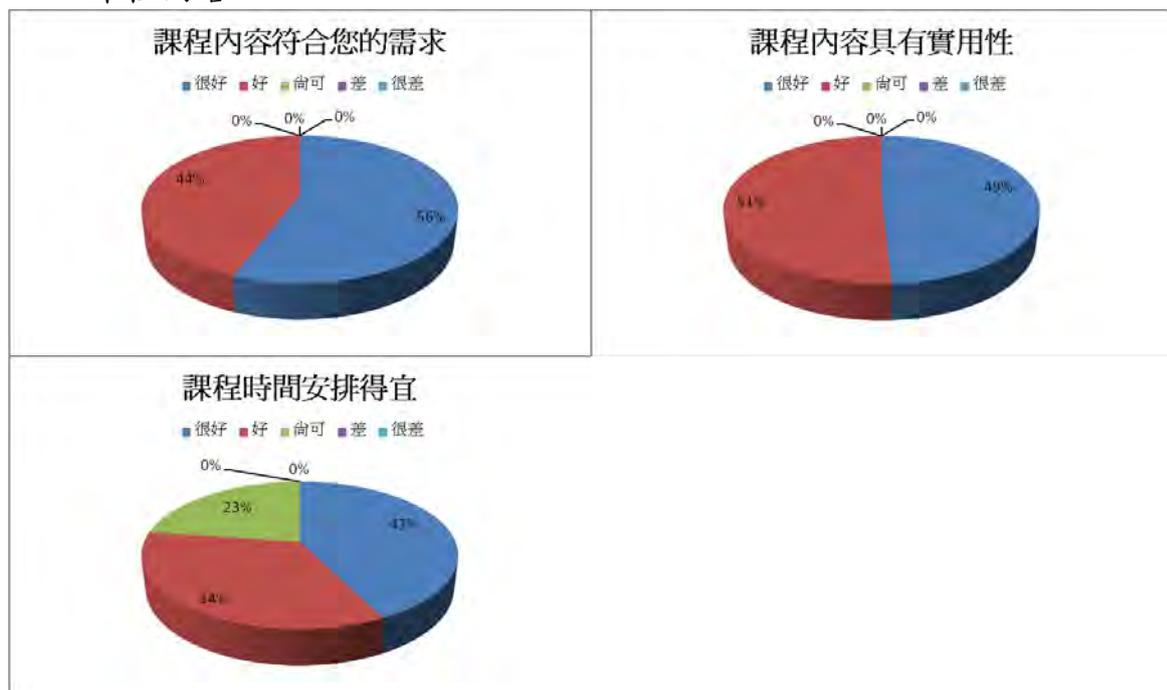
圖七、與會演講專家學者

## 肆、研討會活動滿意度調查

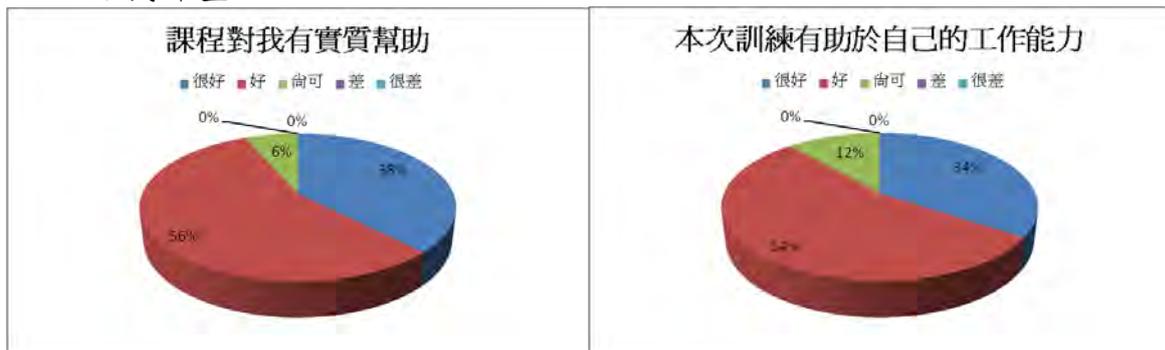
### 一、教師授課的整體表現



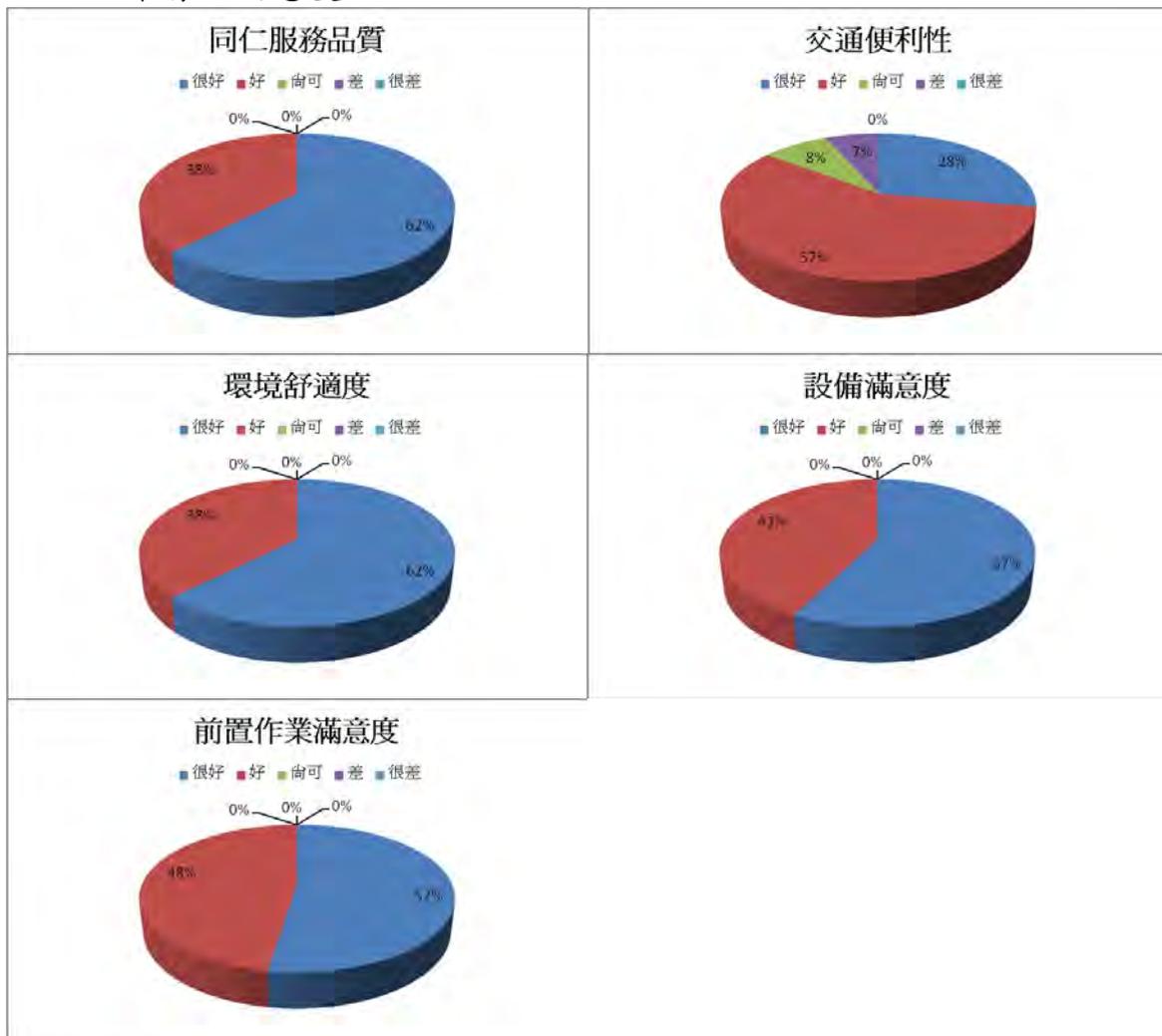
### 二、課程內容



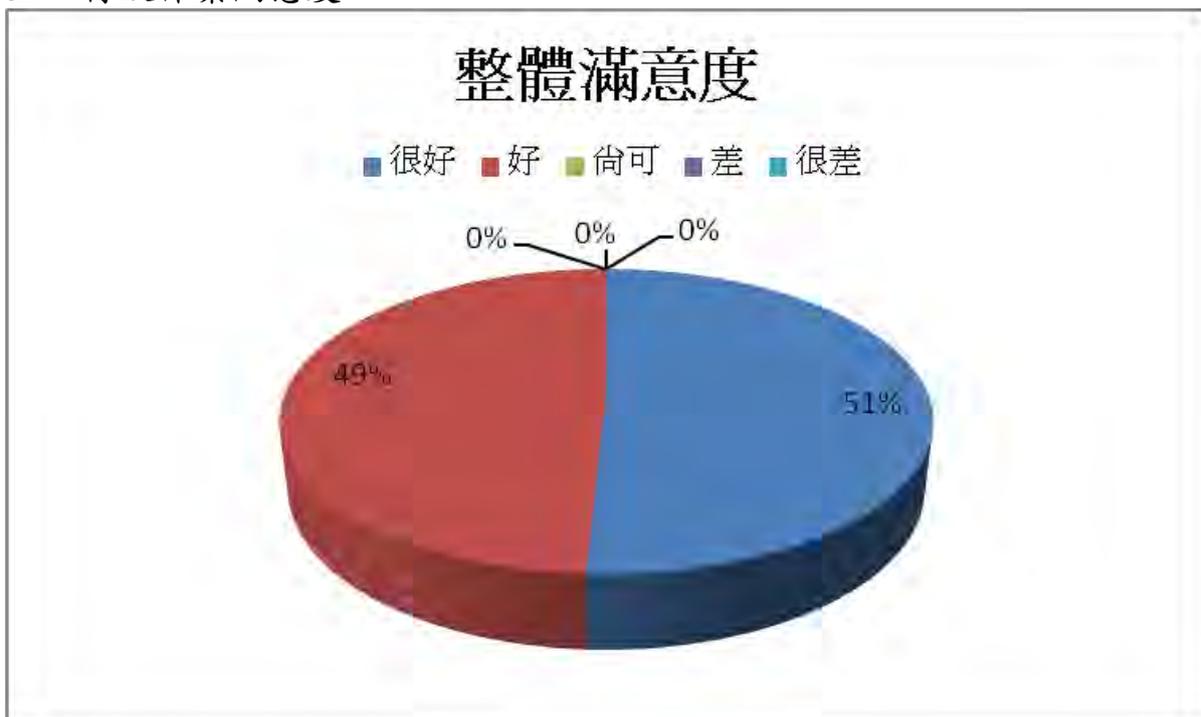
### 三、自我評量



### 四、上課場地滿意度



## 五、行政作業滿意度



# 常見臨床疾病之中醫臨床診斷與治療學術研討會 滿意度調查表

各位學員大家好：

102 年 11 月 3 日

首先，非常感謝您參與本次的研討活動，希望整體的活動安排與課程設計能滿足您的需求並帶給您新的知識。為了讓活動的舉辦能更貼近參與者的期待，請您依參加本次活動的感受提供寶貴的建議與回饋，以作為日後舉辦類似活動之參考。再次感謝您！

彰化基督教醫院 中醫部 敬上

## 第一部分：基本資料

### 一、基本資料

- (一)性別 男 女
- (二)年齡 \_\_\_\_\_年次
- (三)職類 中醫師 藥師 護理師 社區民眾 其他\_\_\_\_\_
- (四)得知活動管道 網路資訊 海報 傳單 他人告知 其他\_\_\_\_\_

## 第二部分：課程滿意度

### 一、教師授課的整體表現

很好 好 尚可 差 很差

- (一)教師對授課時間掌握情況
- (二)教師專業知識的能力
- (三)教師的授課技巧與表達能力
- (四)教師對學員課程上問題之解決能力
- (五)教師對授課內容組織條理

### 二、課程內容

很好 好 尚可 差 很差

- (一)課程內容符合您的需求
- (二)課程內容具有實用性
- (三)課程時間安排得宜

### 三、自我評量

很好 好 尚可 差 很差

- (一)我認為上完此課程對我有實質的幫助
- (二)本次訓練有助於提昇自己的工作能力

<<提醒您，背面還有喔!!>>

| 四、上課場地滿意度 | 很好                       | 好                        | 尚可                       | 差                        | 很差                       |
|-----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| (一)環境舒適度  | <input type="checkbox"/> |
| (二)交通便利性  | <input type="checkbox"/> |
| (三)設備滿意度  | <input type="checkbox"/> |
| 五、行政作業滿意度 | 很好                       | 好                        | 尚可                       | 差                        | 很差                       |
| (一)前置作業   | <input type="checkbox"/> |
| (二)同仁服務品質 | <input type="checkbox"/> |
| (三)整體滿意度  | <input type="checkbox"/> |

五、其他建議事項：

◎問卷填妥後請放入場外「問卷回收盒」，再次感謝您提供寶貴之意見。

◎提請您記得攜帶隨身物品，以免遺失。

本活動為衛生福利部中醫藥司【中醫症狀術語作業標準化之共識】計畫經費補助舉辦，感謝您的參與。

刊 名：中醫藥年報（光碟版）

副刊名：第五期

出版機關：衛生福利部

發行人：林奏延

編輯委員：黃怡超 高文惠 褚文杰 蔡素玲 陳聘琪 陳昭蓉 游婉如

助理編輯：康靖華 張舜智 謝采蓓 劉舜華 吳宗達 黃景堂 郭勁麟 黃琮祐  
蘇葦娟

地 址：臺北市南港區忠孝東路六段 488 號

網 址：<http://www.mohw.gov.tw>

電 話：(02)8590-6666

傳 真：(02)8590-7076

出版年月：2016 年 12 月

創刊年月：2012 年 10 月

期刊頻率：年刊

版 次：第 1 版第 1 刷

其他類型版本說明：本刊另登載於中醫藥資訊網（網址為：<http://www.mohw.gov.tw>）

印製單位：尚曄文化事業有限公司

電 話：(02)2958-6010

地 址：220 新北市板橋區板新路 103 號 4 樓之 1

展售處：國家書店松江門市

地址：104 臺北市松江路 209 號 1 樓

電話：(02)2518-0207

<http://www.govbooks.com.tw>

五南文化廣場

地址：400 臺中市中山路 6 號

電話：(04)2226-0330 轉 821

<http://www.wunanbooks.com.tw>

定 價：新臺幣 115 元整

GPN：4610202502

ISSN：2305-087X

◎欲利用本書全部或部分內容者，須徵求衛生福利部同意或書面授權◎



衛生福利部  
Ministry of Health and Welfare  
促進全民健康與福祉

◎欲利用本書全部或部分內容者，須徵求衛生福利部同意或書面授權◎