

# 炎症和過敏疾患之中藥治療機轉之研究(一)

高雄醫學院·藥理學科

邱慧芬·林俊清·楊俊毓

## 摘要

將台灣產中藥木棉(*Bombax malabarica*)，山豆根(*Sophorae subprostrata*)，白花蛇舌草(*Hedyotis diffusa*)，赤芝(*Ganoderma lucidum*)，白毛藤(*Solanum lyratum*)之生藥抽取液以 1.0g/Kg 的劑量注射在大白鼠背部皮下，1小時後再注入 1% Carrageenan 0.05ml 以觀察這些中藥之抗炎藥效，本實驗之結果顯示對 Carrageenan 之第 1 小時內之浮腫作用以山豆根 ( $P < 0.005$ )，赤芝 ( $P < 0.005$ )，白毛藤 ( $P < 0.005$ ) 三者之藥效較為明顯，然而在第 2-4 小時內之浮腫抑制作用，則以山豆根 ( $P < 0.005$ ) 之藥效較為顯著。

在  $\text{CCl}_4$  (3.0ml/Kg) 皮下注射導致之肝毒性中，木棉 ( $P < 0.001$ )，半隻蓮 ( $P < 0.001$ ) 之藥效較大陸產北柴胡為明顯，而且木棉和半隻蓮對中心小葉性的壞死與肝細胞之脂肪變性現象都比北柴胡有較佳之保肝作用，本研究將繼續進行其他藥物之抗炎與保肝作用之實驗，以作為藥效之比較和深入的藥理作用機轉的探討。

## 總論

此篇報告是我們以 Carrageenan 誘發大白鼠後肢炎症浮腫反應和四氯化碳誘發肝急性炎症損害的動物模式，以篩選台灣產具有抗炎作用的藥物之一系列實驗的研究結果之一。

Carrageenan 是由 Irish sea moss (*chondrus crispus*) 所衍化出來的一種多醣體 (polysacharide)，Winter et al (21) 曾在 1962 年將這種物質注入未經麻醉的大白鼠後肢腳掌以誘發局部浮腫反應，其觀察抗炎藥物之藥效，在臨床上具有強效抗炎作用之類固醇藥物 (Steroid) 可有效預防 Carrageenan 所誘導之浮腫，因此本實驗中以 Dexamethasone 做藥效的參考對照組，將木棉，山豆根，白花蛇舌草，赤芝，白毛藤等藥物注射組作藥效的比較，以評估其對

Carrageenan 所誘發之炎症浮腫之藥理作用。

在四氯化碳誘發肝急性的動物模式中，以木棉，半隻蓮，北柴胡等抽取液注入大白鼠，三天後抽血檢驗肝臟功能，及隨機抽樣採取肝小葉組織製成切片，在顯微鏡下觀察肝組織細胞之病理變化，以確立中藥之肝臟保護作用。

## 材料與方法

(1)動物：本實驗採用國立成大醫院動物室飼養之純種 Wistar 大白鼠，體重在  $200 \pm 25$  克。

(2)材料：

(A) 抗炎症實驗： $\lambda$ -Carrageenan 購自美國 Sigma 公司，另外生藥成分以熱水抽取木棉 (*Bombax malabarica*)，山豆根 (*Sophorae subprostrata*)，白花蛇舌草 (*Hedyotis diffusa*)，赤芝 (*Ganoderma lucidum*)，白毛藤 (*Solanum lyratum*) 等生藥之水溶性成分，並濃縮至 1.0g/ml 的濃度。

(B) 肝臟保護作用實驗：以 Mark 公司四氯化碳 3.0ml/Kg 注入大白鼠皮下，並且同時給予木棉，半隻蓮，北柴胡，山豆根，白花蛇舌草，赤芝，白毛藤等生藥抽提液 1.0g/Kg。

(3)大白鼠後肢浮腫體積之測定：

實驗以 1962 年 Winter, B(21) 所提出浮腫體積測量方法為主，以足趾浮腫體積測量器 Plethysmometer (Ugobasile, Italy) 作為測定大白鼠後肢浮腫體積變化量的裝置，Carrageenan 注入大白鼠後肢所引起的浮腫體積變化，為浮腫作用強度及不同中藥抽取液藥效判斷的依據，大白鼠每 8 隻為一組，分別在每隻左後肢的足蹠關節處以性色筆劃線，作為測定浮腫體積測量的界限，然後自左腳掌皮內注入 0.05ml 含不同劑量的檢品作為實驗組時，自右後肢注入同體積的生理食鹽水作為對照組，注射後將大白鼠的後肢自足蹠關節劃線處以下之部分浸入水銀槽中，經壓力改變推動相連之水柱上升，以記錄出浮腫的體積變化，在第一小時以內每間隔 15 分鐘測量一次，然後每隔 1 小時測量一次，連續觀察注射後 5 小時內的浮腫體積變化量。

(4)生藥抽提物對肝臟的保護作用：

將大白鼠每 8 隻為一組，以四氯化碳 3.0ml/kg 背部皮下注射後，以 1.0g/kg 劑量同時給予木棉，半隻蓮，北柴胡等抽提液後分別於第 24,48 小時再追藥物，另外以注射 Olive oil (CCl<sub>4</sub>溶劑) 作為對照組。

(5) 老鼠肝功能測定與肝組織切片製備：

在給予四氯化碳及生藥抽取液 72 小時後，即將動物犧牲頸動脈取得血液後以 3000 轉 10 分鐘離心（照 Reitman and Frankel (18) 所描述方法來操作，並測定 SGOT, SGPT 的血清活性，取得老鼠血液後，再將肝組織隨機在每一肝小葉選取微小部份檢品 (1mm)，並以 10 % 福馬林及 50 % - 90 % 之乙醇液作脫水步驟，最後將組織包埋在石蠟 (paraffin) 中，並製成小切片，以 Hematoxylin-Eosin 染色液染色並於光學顯微鏡下觀察肝細胞組織病理變化。

(6) 統計學分析：

本研究之結果均以平均值 ± 標準誤來顯示，並以 Student's test 和變異數分析 (ANOVA) 二種不同的檢定方法在不同的 P 值之下呈現統計學上的差異。

## 結果與討論

抗炎作用以 Carrageenan 誘發的大白鼠後肢浮腫，經 6 小時觀察其變化量後顯示，Carrageenan 於 60 分鐘達到 33.62 % 之浮腫率，在 2-4 小時內由 54.74 % 增加到 89.32 % 的浮腫百分率，在經木棉，山豆根，白花蛇舌草，赤芝，白毛藤 1.0g/kg 1 小時前投予後，可使 Carrageenan 之浮腫率由 88 % 降到 39 % 減少 49 %，而山豆根和白花蛇舌草亦有相似之抑制作用（表一），另外在赤芝與白毛藤兩組亦觀察到強度的抗浮腫作用，因此各中藥抽取液均在不同的時間內，呈現不同程度之強效到中等程度藥效抗炎藥理作用，而彼此之間差異並不明顯 (ANOVA  $P > 0.01$  無顯著差異)，Dexamethasone 與木棉 (1.0g/kg) 的劑量比較後，雖然發現 Dexamethasone (2.0mg/kg) 對 Carrageenan 誘發的炎症反應有較強抑制作用，然而木棉之抗炎作用亦非常明顯，因為此

實驗中木棉與 Dexamethasone 劑量相異，因此繼續進行木棉不同劑量 (dose-response) 之抗炎藥效評估，其結果將在下次的報告中詳細說明。

另外在肝臟保護實驗中，四氯化碳導致的肝毒性類似急性肝炎的細胞損傷 (2,3,7,8, 10-17,19,20)，在先前已發表的報告 (19,20) 指出，在正常情況下以四氯化碳注射於老鼠皮下會誘導急性 SGOT.SGPT 上升，另外以大陸產北柴胡為對照標準 (1, 4-6) 台灣產木棉及半隻蓮，山豆根，白毛藤，白花蛇舌草，赤芝，對 CCl<sub>4</sub> 導致之肝毒性，均能有效地降低急性之 SGOT 和 SGPT 上升，並且在中央靜脈周圍的脂肪變性和中央小葉之病理上的變化均可在木棉及半隻蓮之肝組織見到改善的保護作用。

總而言之，目前篩選之生藥均具有強度到中等程度之抗炎作用，至於肝臟之保護作用則呈現木棉與半隻蓮，山豆根，白花蛇舌草均比柴胡還具有明顯的保肝作用，而更深入探討這些藥的抗炎作用機轉與藥理劑量反應及其在過敏作用中，對肥胖細胞之 histamine 釋出和 prostaglandins, leukotrienes 之合成的抑制效果為何 (22-33)，將在未來的實驗中繼續研究。

## 參考文獻

1. Shibata M., A. Isomura, T. Inoue and M. Nagai Some pharmacological studies on the crude drugs possessing antiinflammatory properties-on the root of Bupleurum and leaves of fig. Shoyakugaku Zasshi, 30, 62, 1976.
2. Kiso Y., Y.Suzuki, C.Konno, H.Hikino, I.Hashimoto and Y.Yagi Application of Carbon tetrachloride-induced liver lesion in mice for screening of liver protective crude drugs. Shoyakugaku Zasshi, 36(3), 238, 1982.
3. Wang C.J., J.H. Lai and S.J. Shioh Protective effect of Bupleurum falcatum L. extract on the hepatic damage induced by carbon tetrachloride. Nat. Sci. Coun. Mon.(R.O.C.). 11, 6, 1983.
4. Yamamoto M., A. Kumagai and Y. Yamamura Structure and actions of

- saikosaponins isolated from *bupleurum falcatum* L. I. antiinflammatory action of saikosaponins. *Arzneim. Forsch.* 25, 1021, 1975.
5. Yamamoto M., A. Kumagai and Y. Yamamura Structure and action of saikosaponins isolated from *Bupleurum falcatum* L. II. metabolic actions of saikosaponins, especially a plasma cholesterol-lowering action. *Arzneim. Forsh.* 25, 1240, 1975.
  6. Marumoto M., T. Maeda, K. Shinozuka, M. Kato and E. Hayashi Effects of saiko-zai prescriptions including saiko (*Bupleuri Radix*), on experimental liver injury. *Shoyakugaku Zasshi* 15, 95, 1982.
  7. Oshima Y., Y. Kawakami, Y. Kiso, H. Hikino, L.L. Yang and K.Y. Yen Antihepatotoxic principles of *Aeginetia indica* herbs. *Shoyakugaku Zasshi* 38, 198, 1984.
  8. Yang L.L., K.Y. Yen, Y. Kiso and H. Hikino Antihepatotoxic principles of formosan plant drugs. *J. Ethnopharma*, 19, 103, 1987.
  9. Kiso Y., M. Tohkin and H. Hikino Assay method for antihepatotoxic activity using galactosamine-induced cytotoxicity in primary-cultured hepatocytes. *J. Natu. Prod.* 46, 841, 1983.
  10. Akahori a., M. Masui and M. Ando Change of serum glutamic oxaloacetic transaminase activities after administration of carbon tetrachloride to mice. *Chem. Pharm. Bull.* 26, 2316, 1978.
  11. Kiso Y., S. Ogasawara, K. Hirota, N. Watanabe, Y. Oshima, C. Konno and H. Hikint Antihepatotoxic principles of *artemisia capillaris* buds. *Planta Medica* 122, 143. 1984.

12. Molander D.W. and M.M. Friedman Transaminase levels in experimental liver injury. Clin. Res. Proc. 4, 39, 1956.
13. Cornish H.H. and W.D. Black A study of CCl<sub>4</sub> II. the effect of CCl<sub>4</sub> inhalation on serum and tissue enzymes. A.M.A. Arch. Envirom. Heal. 1, 96, 1960.
14. Fry W.A., J.M. Smith and J.R. Suker Acute CCl<sub>4</sub> intoxication report of a case of inhalation intoxication with severe liver damage followed by complete recovery. Quart. Bull. Northwestern Univ. M. School 33, 346, 1959.
15. Reynolds Ess., R.E. Thiers and B.L. Valles Mitochondrial function and metal content in carbon tetrachloride posioning. J. Biol. Chem. 237, 35, 1962.
16. Smuckler E.A., O.A. Iseri and E. P. Benditt A defect in protein synthesis induced by carbon tetrachloride. J. Exp. Med. 116, 55, 1962.
17. Smuchker E.A. and E.p Benditt Studies on CCl<sub>4</sub> intoxication III. A Subcellular defect in protein synthesis. Biochemistry 4, 671, 1965.
18. Reitman S. And S. Frankel A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. Am. J. Clin. Path. 25, 940, 1957.
19. Chiu H.F., Lin C.C., Yang C.C. and Yang F. The Pharmacological and Pathological Studies on Several Hepatic Protective tive Crude Drugs from Taiwan (I)." Am. J. Chinese Med., 16(3-4), 127-137, 1988.
20. Chiu H.F., Lin C.C., Yang C.C. and Yang F. The Pharmacological and

Pathological Studies on Several Hepatic Protective Crude Drugs from Taiwan (II)." Am. J. Chinese Med., 17 (1-2), 17-23, 1989.

21. Winter C. A., Risley E. A., and Nuss G. W.: Carrageenin- induced cedema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111: 544-547, 1962.
22. Madeleine Ennis, P.W. Ind, F. L. Pearce C. T. Dollery "Calcium antagonist and histamine secretion from rat peritoneal cells." Agent and action 13:144-148, 1983.
23. Shore P.A., A. Burkhalter and V.H. Cohn "A method for the fluorometric assay of histamine in tissue." J. Pharmacol. Exp. Ther. 127:182-186, 1959.
24. Gaetani D. And C.F. Laureui "High pressure liquid chromatography: Separation and dosage of imidazole base." J Farmaco-ED-pr. Vol. 33:1, 1978.
25. Weiss B. "Techniques for measuring the interaction of drugs with calmodulin." Methods in Enzymology 102:171-185, 1983.
26. Levine L., Morcan R.A., Lewis R.A. :Radioimmunoassay of the leukotrienes of slow reacting substance of anaphylaxis. Proc Natl Acad Sci USA 78:7692,1981.
27. Lindgren J.A. , Goetzl E.J. : A Sensitive and specific radioimmunoassay for leukotriene C4. FEBS LETTERS, 152, p.83, 1983.
28. Goetzl E.J., Woods J.M., Gorman R.R.: Stimulation of human eosinophil and neutrophil polymerphuclear leukocyte chemotaxis and random migration by 12-L-hydroxy-5,8,10,14-eicosa- tetraenoic acid. J.Clin Invest

59:179, 1977.

29. Goetzl E.J. , Picket W.C. :The human PMN leukocyte chemotactic activity of complex hydroxy--eicosatetraenoic acids (HETES). J.Immunol, 125 pl785-91, 1960.
30. Desiderio D.M.; Cunningham M.D. and Trimble T.A. : High performance(pressure) liquid chromatography separation and quantification of picomole amounts of prostaglandins utilizing a novel triethylamine formate buffer. J. liq. Chroma. 4, p. 1261-1266, 1981.
31. Yabuno N.: Prostacyclin and thromboxane in cerebral vasospasm :effects of prostacyclin on experimentally -induced cerebral vasospasm. Acta Med. Okayama 38, P. 147-158, 1984.
32. Lawson, D. "Anti-immunoglobulin-induced histamine release secretion by rat peritoneal mast cell studied by immunofluorescent electron microscopy. J. Exp. Med. 142:391, 1975.
33. Burwen, S.J., B.H. Satir "Plasma membrane fold on the mast cell surface and their relationship to secretory activity." J. Cell Biol. 74:690, 1977.

<表一> 各中藥細收(皮)對 Carrageenan 誘發後肢(浮腫)之生理抑制作用

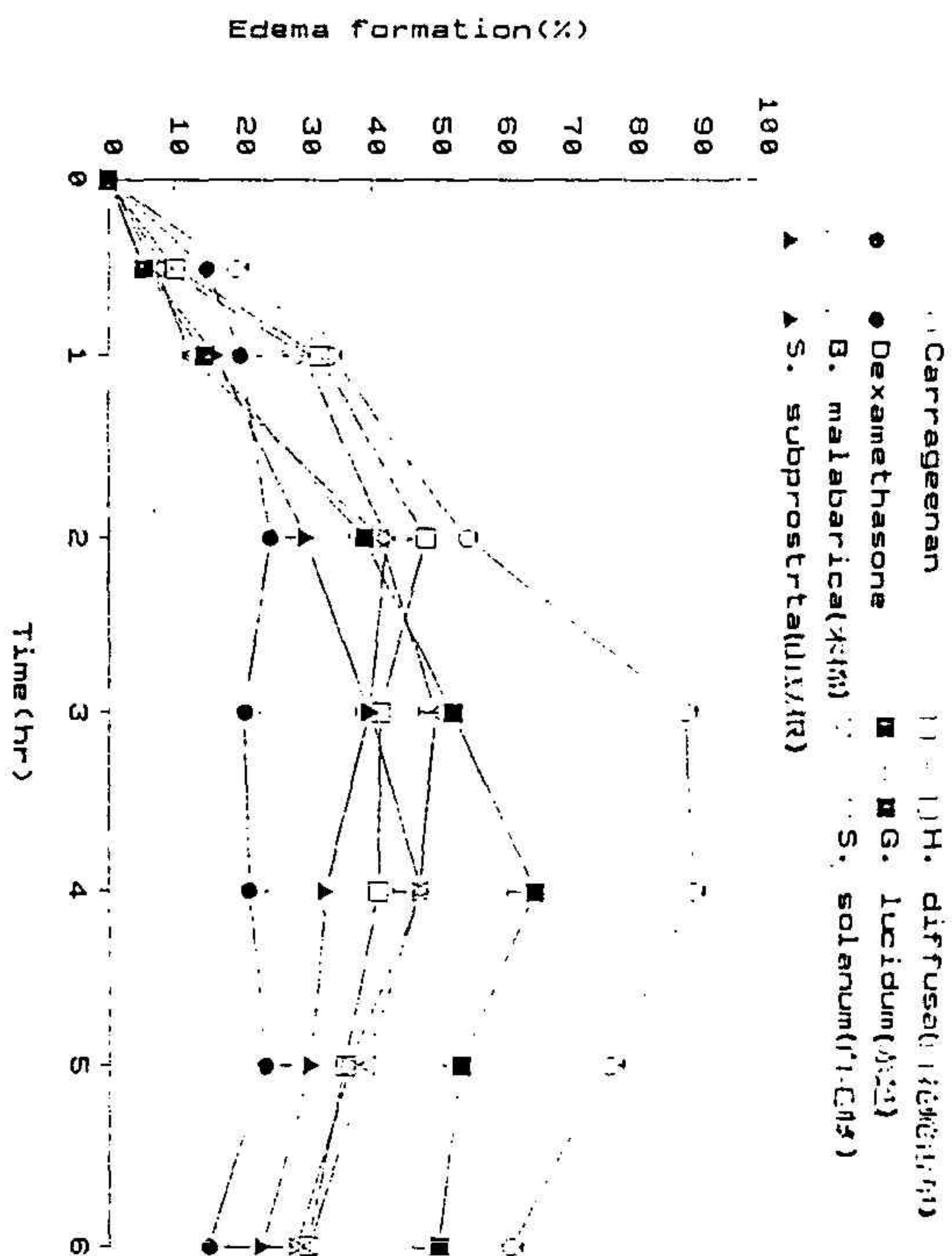
| 藥 物            | 劑 量<br>(g/kg) | 時 間 ( 小 時 ) |             |             |             |             |             |             |
|----------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                |               | 0.5         | 1           | 2           | 3           | 4           | 5           | 6           |
|                |               | 浮腫百分率 (%)   |             |             |             |             |             |             |
| 1% Carrageenan | 0.05ml        | 10.14±1.47  | 33.62±1.55  | 54.74±1.1   | 88.12±1.49  | 89.32±0.92  | 76.47±2.36  | 61.21±2.05  |
| Dexamethasone  | 2.0mg         | 14.79±1.96* | 19.96±3.24* | 24.49±3.81* | 20.43±2.32* | 21.29±2.79* | 23.59±3.92* | 15.17±0.12* |
| 木 棉            | 1.0           | 8.5 ±1.79*  | 29.62±3.2   | 42.30±4.55* | 39.70±2.25* | 47.57±4.35* | 36.58±0.79* | 28.42±4.21* |
| 山豆根            | 1.0           | 5.60±0.94*  | 16.25±1.38* | 29.98±2.45* | 39.46±1.54* | 32.87±0.84* | 30.92±1.64* | 23.06±1.75* |
| 白花蛇舌草          | 1.0           | 9.99±0.79*  | 31.96±2.97  | 48.41±2.88  | 41.2 ±1.84* | 40.95±1.48* | 35.81±1.72* | 30.13±2.73* |
| 赤 芝            | 1.0           | 5.21±0.49*  | 14.62±3.23* | 38.78±2.35* | 52.38±5.24* | 65.12±4.26* | 53.69±2.85* | 50.19±4.19* |
| 白毛勝            | 1.0           | 7.25±0.96*  | 12.21±1.09* | 41.31±2.25* | 49.81±1.96* | 47.31±0.86* | 38.96±1.47* | 30.34±1.78* |

\*P < 0.005      \*\*P < 0.01      與 Carrageenan 對照組比較為顯著有意義差別 (t test)

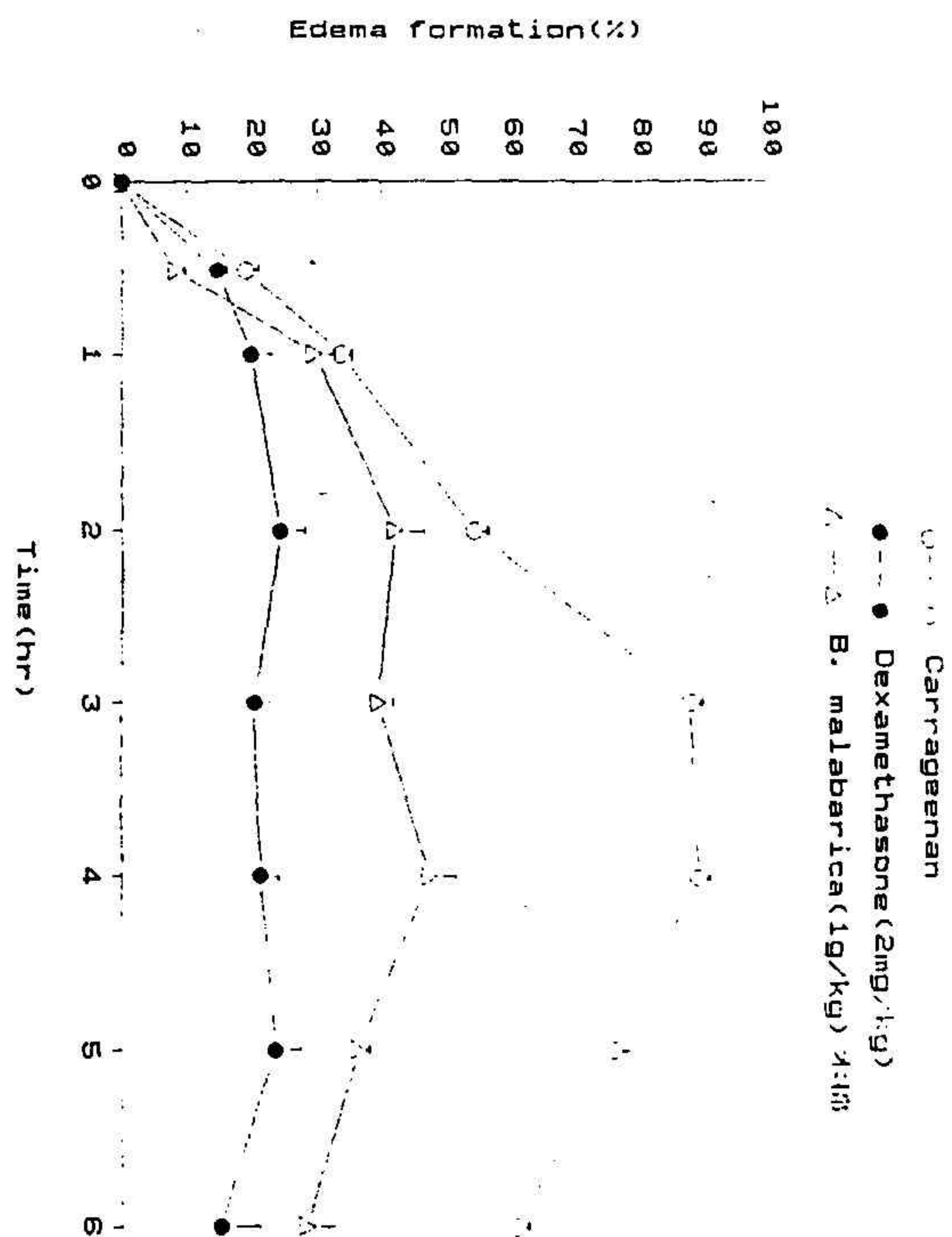
表二. 各中藥抽取成分對 CCL<sub>4</sub> 誘發肝臟 SGOT 和 SGPT 上升之抑制作用

| group \ liver function test     | dose (ml/kg) | SGOT (IU/l)    | SGPT (IU/l)    |
|---------------------------------|--------------|----------------|----------------|
| (1) normal rat                  | 0            | 119.2± 2.7     | 50.8± 1.3      |
| (2) CCL <sub>4</sub> /olive oil | 3.0          | 386.0±32       | 255.9± 4.8     |
| (3) B. chinese (柴胡)             | 1.0          | 221.2±18.4*    | 147.6±22.6*    |
| (4) B. malabarica (木棉)          | 1.0          | 153.0± 4.5**** | 87.0± 3.6****  |
| (5) S. rivularis (半雙蓮)          | 1.0          | 162.3±12.3*    | 90.1± 6.6****  |
| (6) S. subprostrata (山豆根)       | 1.0          | 288.6±23.6**   | 165.7±24.1*    |
| (7) H. diffusa (白花蛇舌草)          | 1.0          | 344.0±22.9     | 218.0±10.6**** |
| (8) G. lucidum (赤芝)             | 1.0          | 334.6±17.4     | 185.0± 6.5*    |
| (9) S. lyratum (白毛朮)            | 1.0          | 206.0±28.0*    | 124.4±17.9**** |

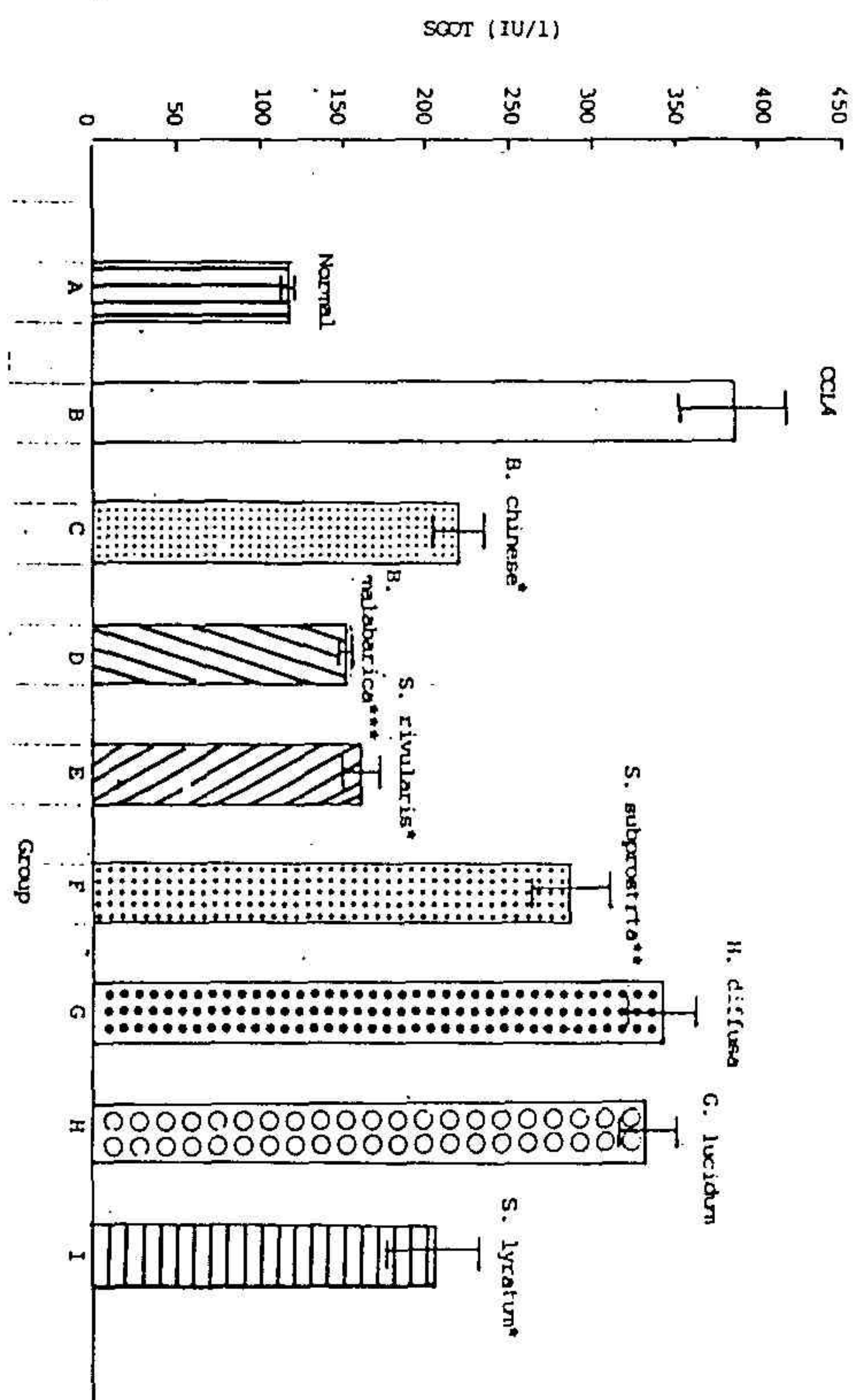
\*P < 0.01, \*\*P < 0.05, \*\*\*\*P < 0.001  
與 CCL<sub>4</sub> 對照組比較為顯著有意義差別 (t test)



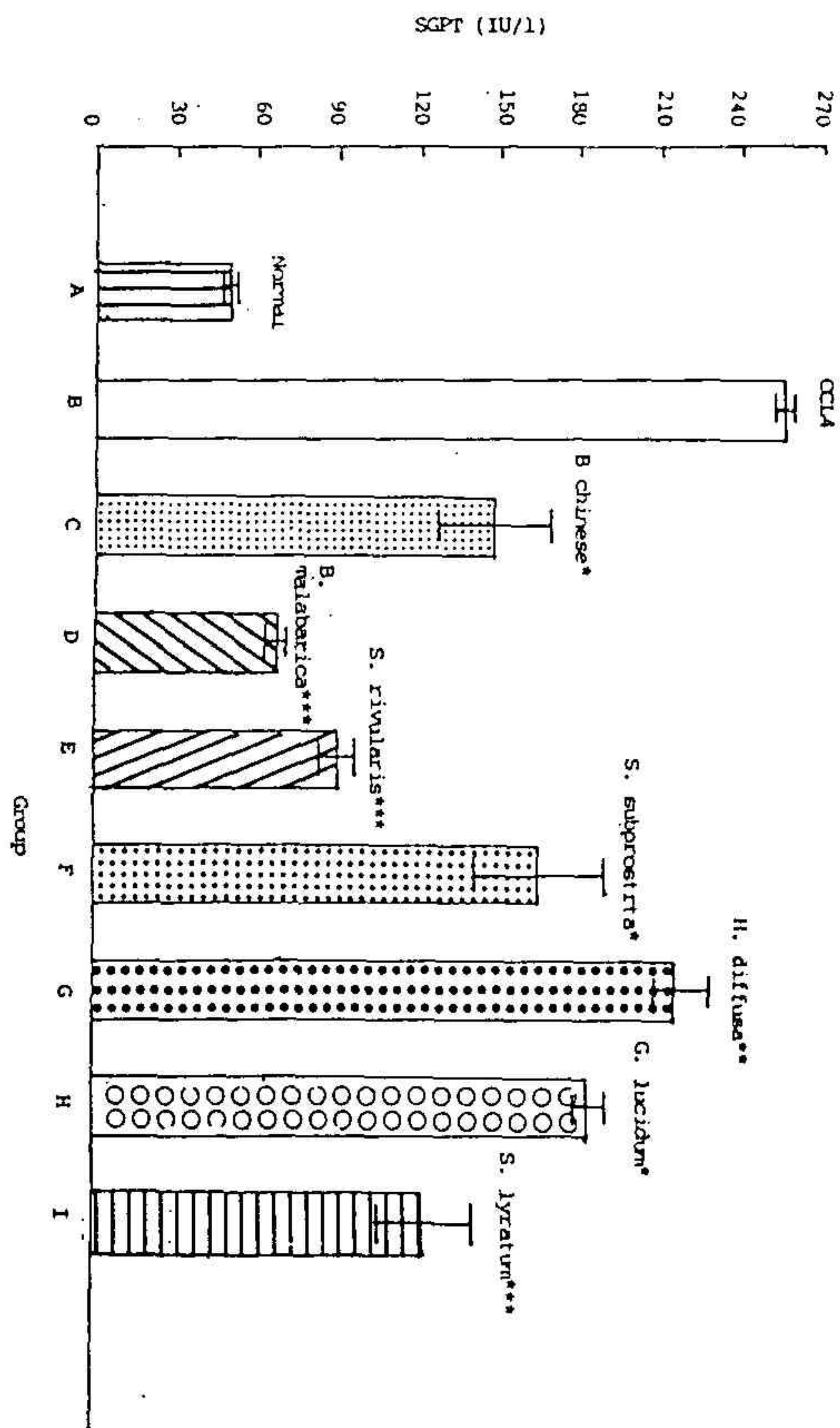
圖一 各種植物液對 Carrageenan 引起之浮腫之抑制作用



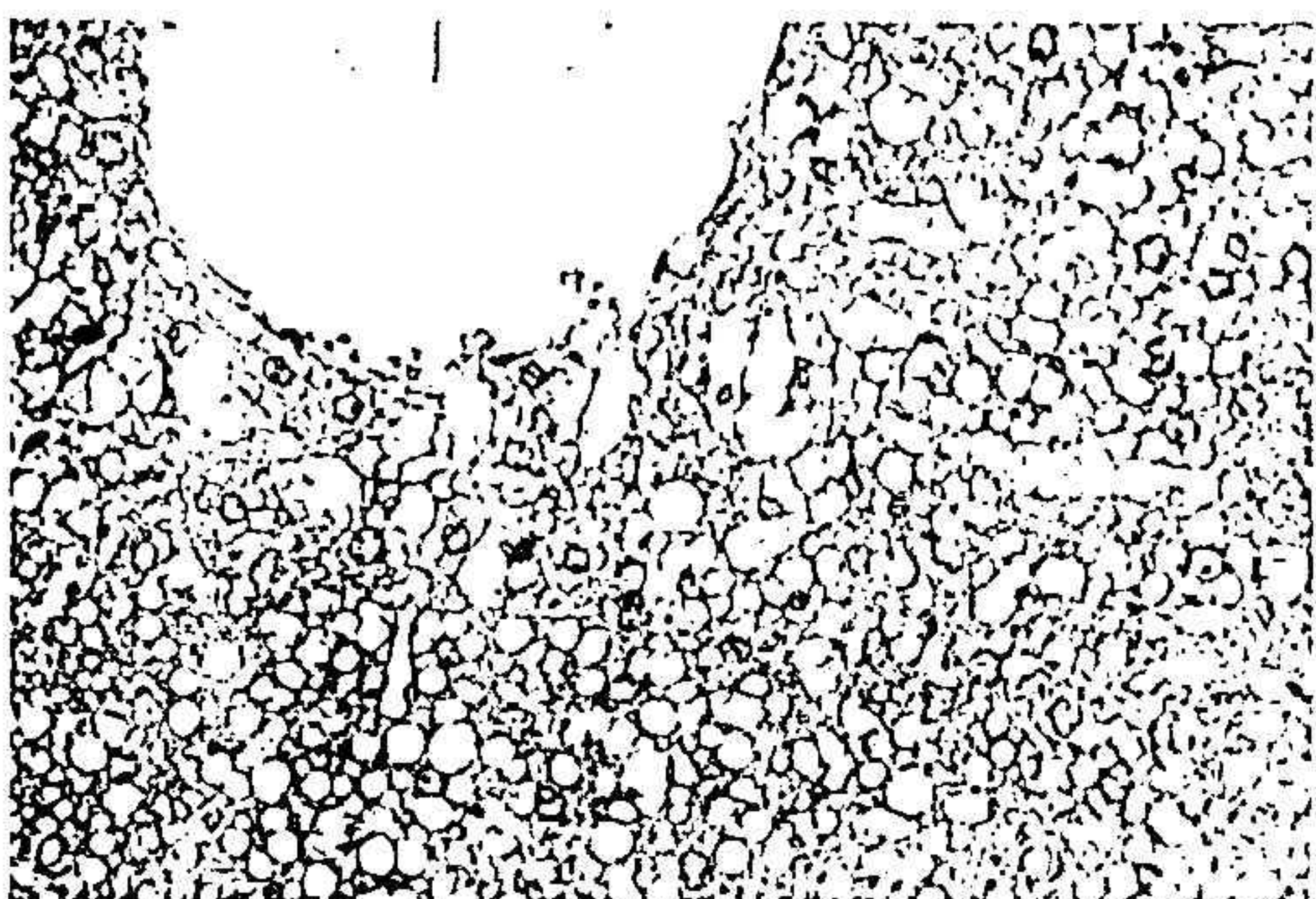
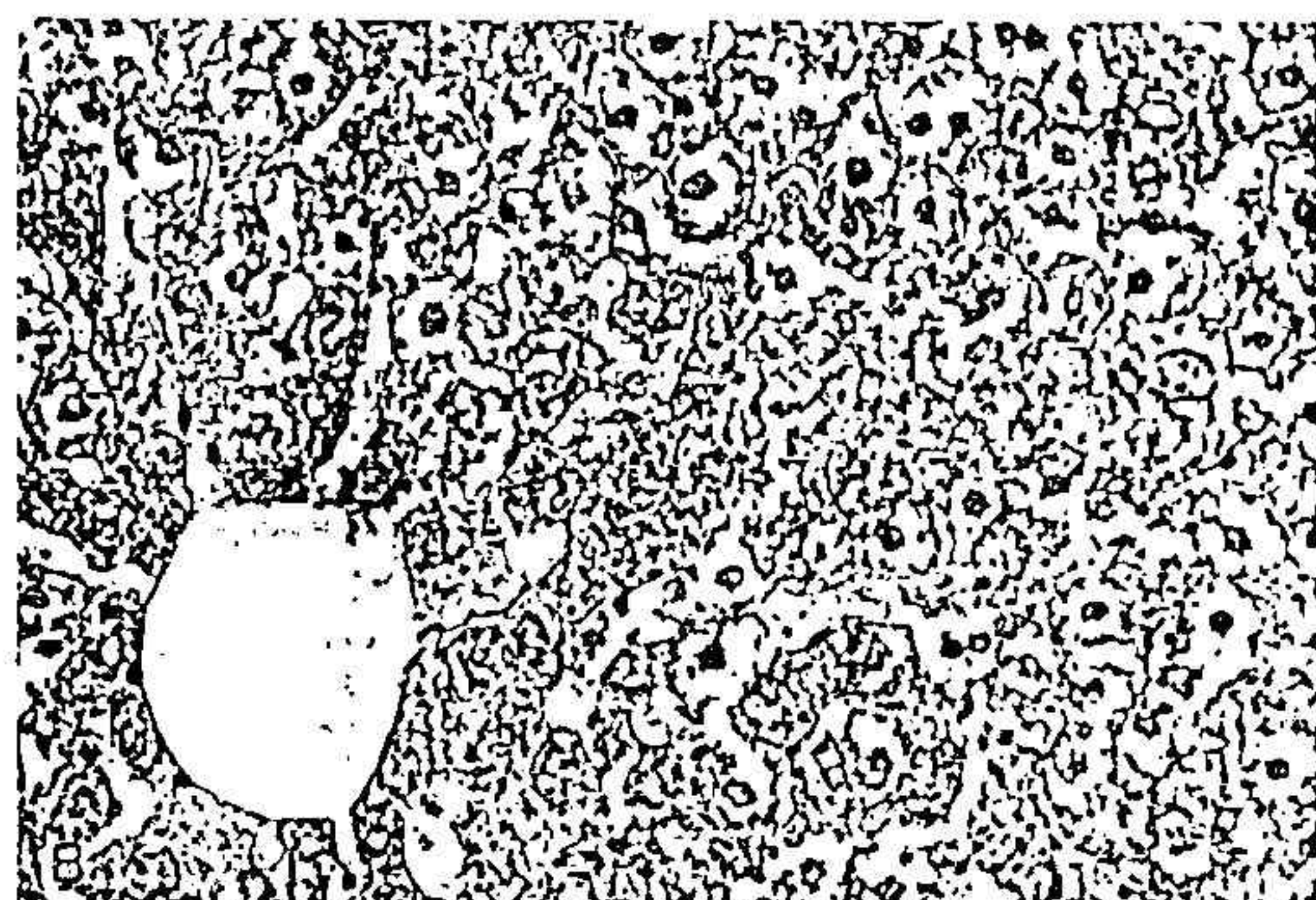
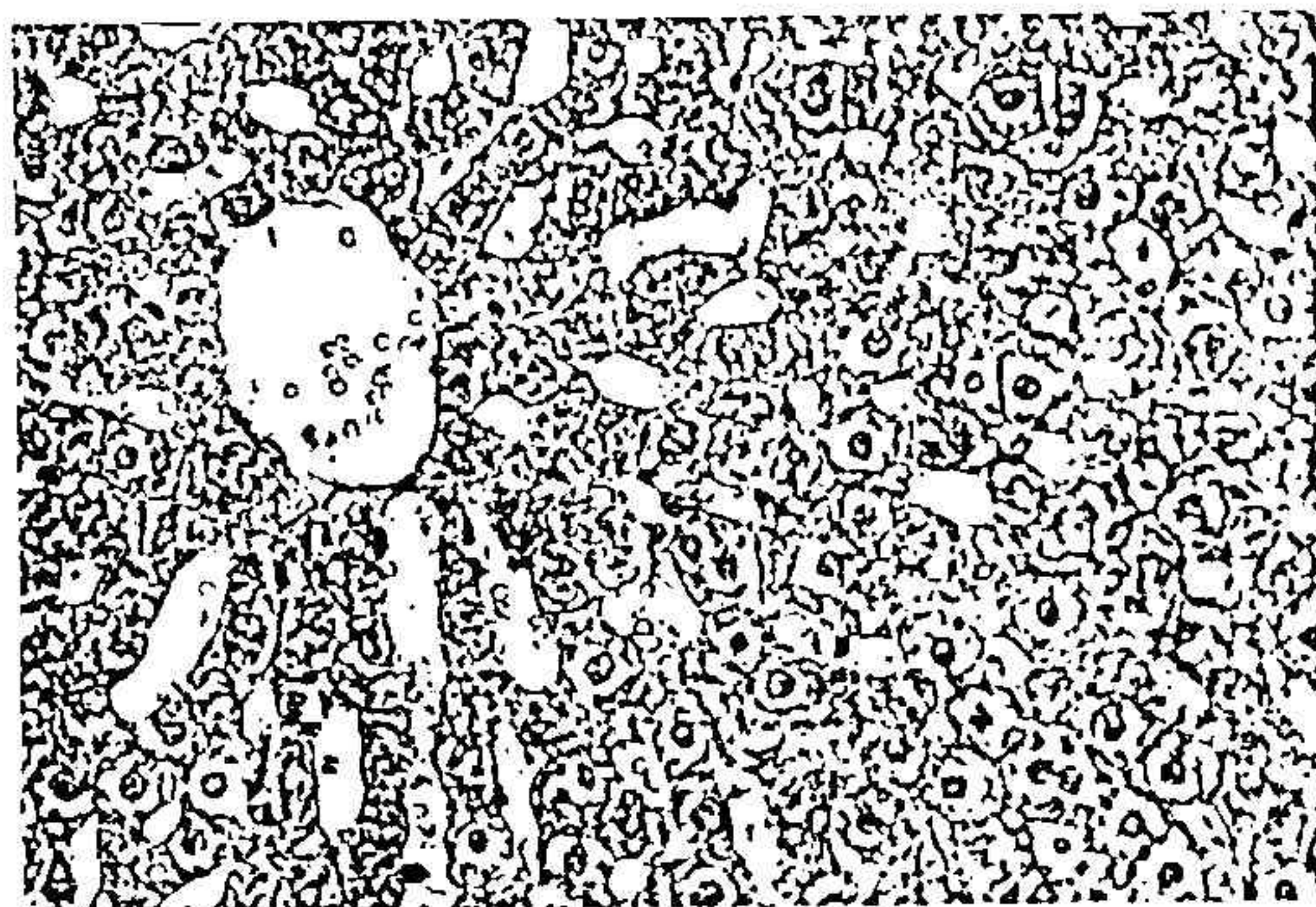
圖二 木棉與 Dexamethasone 對 Carrageenan 引起後肢浮腫之藥理抑制作用

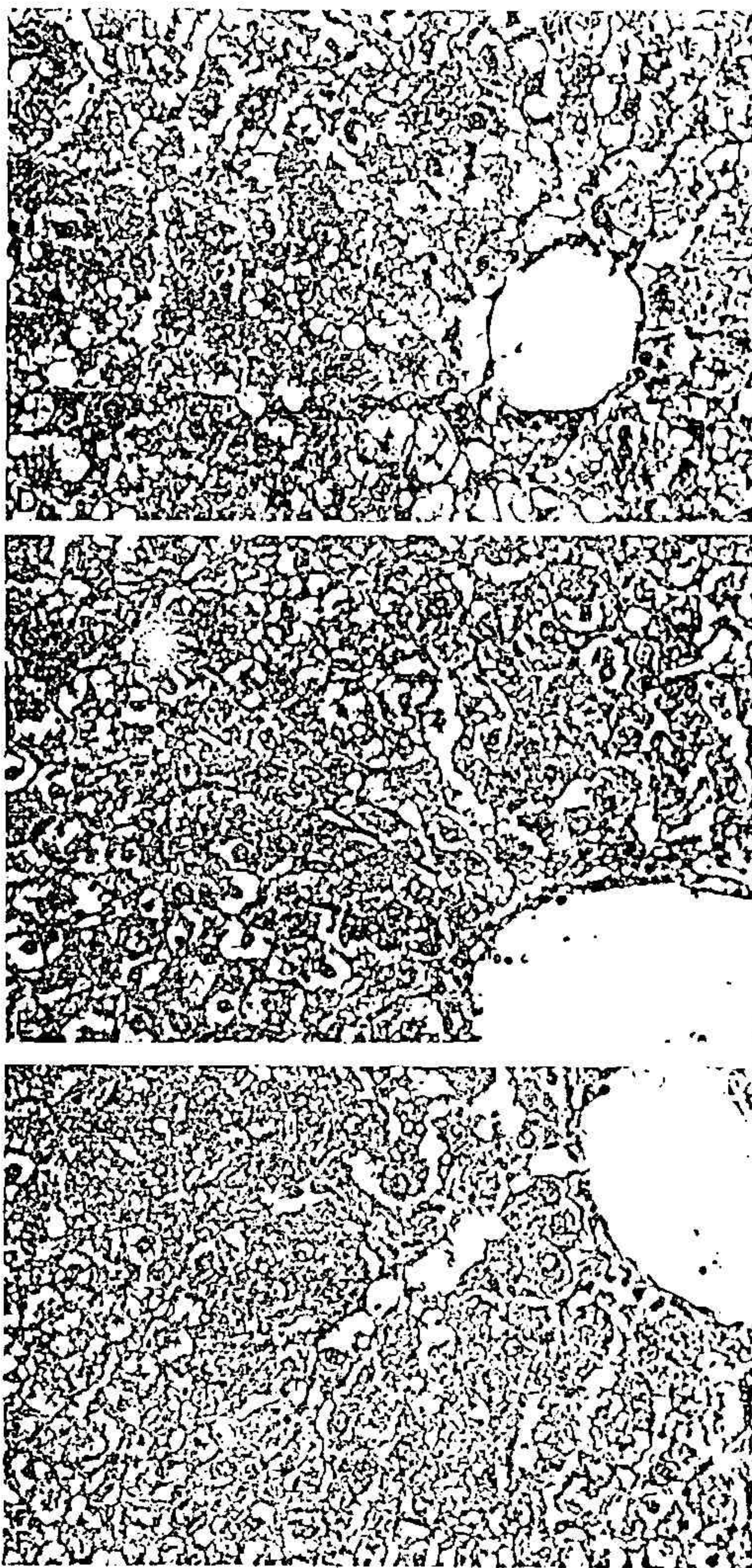


圖三 各中藥抽出成分對 CCL4 誘發肝臟 SGOT 上升之抑制作用



图四 各种霉菌/成分对 CCL4 引起肝酶 SGPT 上升之抑制作用





圖六

Fig 5. The hepatic fatty degeneration caused by CCL4-treated rat

(A) Normal rat

(B) Oliver oil group

(C) CCL4-injected group (50%, 3.0 ml/kg)

The histopathological changes induced by CCL4 were marked with fatty ballooning degeneratio , diffused sinasoid enlargement and cell necrosis around the central vein area . The cytoplasm of hepatocytes are noted with liquid vacuoli. (H-E stain, 4,000x)

Fig 6. The histopathological protective effect of three drugs treatment on the CCL4-induced hepatic injury

(D) Bupleurum Chinese

(E) Bombax malabarica

(F) Scutellaris rivularis

The ballooning fatty change around the centrial vein, diffused sinasoid enlargement and necrosis of hepatic tissue were significantly depressed by B. malabarica and S. rivularis. In contrast, the B. chinese only showed a moderated improvment on CCL4-induced hepatic toxicity. All drugs were given S.C. as dose 1.0 g/kg. (H-E stain, 4,000x)