

編號：CCMP95-TP-028

常用中藥方劑與阿斯匹靈類藥物併用 對鼯鼠肝臟及腎臟功能的影響

楊榮森、蕭水銀

國立臺灣大學

摘要

阿斯匹靈類藥物中，我們選擇最常使用的 Acetaminophen (act.) 研究其對鼯鼠的肝腎毒性，中藥方劑則選常用的六種分別為（代號）：小柴胡湯(1)，半夏瀉心湯(2)，龍膽瀉肝湯(3)，歸脾湯(4)，疏經活血湯(5)及血府逐瘀湯(6)。以上藥物均以十倍人體使用的劑量除以體重，以每斤餵食鼯鼠。結果發現與正常鼠比較，有關 Act 單用或併用中藥方劑產生肝腎毒性的作用機制，所得結果，似乎與氧自由基的產生有關連，如 Act 對腎臟產生毒性，排尿量先增後減，腎臟組織之 glomeruli hypertrophy 近端腎小管細胞壞死，以及 lipid peroxidation (LPO) 增加， Na^+K^+ -ATPase 下降，Act 分別併用六種中藥方劑，結果發現龍膽瀉肝湯在初期有改善 Act 之腎毒性，但後期此作用消失。比較重要的發現是血府逐瘀湯在後期，明顯加強 Act 腎毒性，產生無尿狀態，尿蛋白增加，腎臟組織 glomerular 萎縮，tubular cells 壞死，並增加腎臟 LPO 及 NO 產生量， Na^+K^+ -ATPase 活性下降。另外，發現疏經活血湯在後期加強 Act 肝毒，血中 GOT 及 GPT 上升，Cholesterol 與 Triglyceride 也升高。其餘三種中藥方劑在此研究期限內，尚無明顯影響。本計劃的研究結果顯示適當使用龍膽瀉肝湯有緩解 Act 腎毒性但也有中藥方劑（5 及 6）分別對 Act 之肝腎毒性有加強作用，因此中西藥併用務必小心謹慎，民眾不可擅自服用，務必由醫師指導，而且同時看中醫及西醫時，所服用的藥要告知醫師，以便衡量併用的優缺點。

編號：CCMP95-TP-028

Influences of the Combinative Usage of Common Chinese Medicine Prescription and Aspirin on Mice's Hepatic and Renal Functions

Yang Rong-Sen, Lin-Shiau S.Y.
National Taiwan University

Abstract

According to the recent epidemiological studies, we were aware that the number of patients with renal dysfunction required hemolytic reached 40,000 ; These number were progressively increased by 10 % per yeas and pond 200×108 \$ NT of health case insurance budget in Taiwan. Although the cares of renal dysfunction were not totally understood, some clinical observations auspicated that the drugs aloes woo possibly involved, especially the combined use of orthodox drugs with TCM (traditional Chinese medicine) However, the scientific evidence for these suspicion were few. Leis segment for us to expose this possibility involved in the increasing detrimental incidence of renal function in Taiwan. Therefore, we palmed to explore possibility that the combined use of the frequently used compounding TCNs (中藥方劑) including (Shiau China Hu Tang, Ban Shan Shen Shin Tang, Fun Dan Shen gon Tang, gue pie Tang Shu gen Hao Sheu Tang, Sheu Fu Tsu Iu Tang) with aspirin-like drugs (either aspirin or acetaminophen) which were known capable of inducing hepatic and seal dysfunction after long use of large closes.

The hepatic functions of the mice were monitored by the change of GOT and GPT in fold. Production of NOx and lipid per oxidation in flood and liver tissues were also assayed before and after drug treatment. The renal functions were monitored by measuring Urine protein, flood BUN and cretonne. In addition, NO and LPO production ao well ao mitochondria seductive and ATPase activities of hepatic and renal tissues were also measured. We believe that these investigations could shed some light on the combined egests of these frequently used TCM with aspirin-like drugs on the musine hepatic and seal function. The findings obtained certainly provide useful information on two possibilities : (1) the severe adverse egests of these combined use on hepatic and seal functions. (2) the keneftiol egests of TCNs for attenuating the sideekeets of aspirin – like drugs.

貳、前言

本來國人的肝病盛行率是居世界首位，但近二十年來的努力研究及宣導，如 B 一型肝炎病毒疫苗之發展，已使肝病減少的趨勢，重現曙光，然而不幸的事件又發生了，最近五年來的流行病學及台灣腎臟醫學會的統計數據，顯示國人腎病罹患率已超越肝病，每年洗腎病人約 4 萬人，花掉健保費約 200 億元，而且已呈現繼續每年 10% 增加的趨勢，為了國人的健康，我們務必重視肝腎病的研究，探究其產生的可能原因，為此，我曾於 2002 年生物醫學會舉辦中草藥及保健食品對肝腎功能的影響的研討會，會中謝適中主任指出由洗腎病人的資訊及病歷中，發現約 25% 的病因不明，有些迹象指出與藥物濫用有關聯，然而此領域的研究很少，因此我們認為這次中醫藥委員會擬定研究中西藥併用對肝腎功能的影響，非常有遠見，乃是很重要的課題，我們希望能發揮所長，對中西藥併用的藥理及毒理作用，尤其是在選用藥方及其劑量及作用期限的適量與不適量來探究其併用的好處及壞處。

我們研究的策略是：(1) 中藥方劑的選擇：自中醫藥委會公布的常用前 30 種中藥方劑中，選擇六種方劑，即小柴胡湯（具有鎮痛解熱抗炎作用，並有保肝、鎮靜及抗癌作用，主治肝炎、腸胃炎、支氣管炎及感冒；半夏瀉心湯（方劑成分與小柴胡湯相同，只有其中柴胡被黃連取代，主治胃炎、腸炎、十二指腸潰瘍、肝炎及肝硬化，並有降低血壓及抗過敏）；龍膽瀉肝湯具保肝利膽，增強免疫、抗炎、解熱、血管鬆弛及利尿作用，主治肝炎及肝硬化、腎、中耳炎、角膜炎及帶狀疱疹，並治高血壓及偏頭痛；歸脾湯（具造血、抗貧血、增強免疫、鎮痛抗炎、鎮靜催眠及血管鬆弛作用、主治貧血、血小板缺乏紫癍，消化道及子宮出血，心臟病、神經衰弱及更年期綜合症）；疏經活血湯（具造血，抗貧血、鎮痛解熱、抗炎抗菌、保肝利膽、增強免疫、抗血栓、抗過敏、利尿及血管鬆弛作用，主治風濕性關節炎、關節疼痛、坐骨神經痛及僵直性脊椎炎）；血府逐瘀湯（具增強免疫、抗凝血、抗血小板凝集，降血脂及降肝脂作用，主治心律不整、心絞痛、動脈硬化、高血脂、視網膜病變、偏頭痛、三叉神經痛、癲癇及精神分裂症）。至於西藥，我們選擇最常使用的阿斯匹靈及阿西太米諾芬（acetaminophen，普拿騰），具鎮痛解熱作用，大量阿斯匹靈用於治療風濕性關節炎，而惱人嚴重的副作用是損傷肝腎功能。基於以上各種中西藥的藥理作用及用途，我們選擇這些中西藥併用的研究主旨在於：(1) 它們的作用標地在肝臟、腎臟及血管，腎臟是調控全身

血流及血壓的主要器官之一，而腎臟本身的功能與血流的調控有密切關係，許多研究指出強烈降血壓劑、利尿劑、因降低腎臟血流及減少前列腺素生合成，均能導致腎衰竭的惡果，基於此論點，以上六種中藥方劑與阿斯匹靈類藥作用，即有可能發生交互作用，而影響肝腎血流，對前列腺素生合成或肝腎組織巨噬細胞 Kupffer Cells 及 Mesangial Cells 之活化，因而導致肝腎組織破壞的機制發生，因此我們將設計實驗證明：(1) 適當的劑量，中藥方劑可能減小阿斯匹靈類之肝腎毒性 (2) 劑量太大及頻繁濫用中藥方劑，將加強阿斯匹靈類肝腎毒性。這些預期結果，將提供科學證據，警告病人不可擅自看西醫又看中醫，或自己在藥房買西藥及中藥，胡亂濫用，造成肝臟代謝藥物加重，導致藥物本身的肝腎毒性或加重肝臟代謝及腎臟排泄的負荷，由於許多複雜的藥物交互作用的結果，沒把原先小病如感冒頭痛治好，反而引發嚴重的肝腎臟病變，喪失個人的健康，造成社會健康成本巨大負荷，我們務必趕緊努力，揭發中西藥併用及濫用，可能產生肝腎病變的嚴重問題。

我們身體的肝臟功能主要代謝外來物 (xenobiotics, 藥物, 毒物), 並代謝及合成體內必須的類固醇, 生合成 albumin, ceruloplasmin 及 metallothionine, 尤其重要的是調控血中及肝臟本身的膽固醇、脂質蛋白、LDL, HDL, Triglycerides 等等, 肝臟組織細胞除肝細胞外, 另有內膜細胞 (endothelial cells), Stellate (Ito) cells 及 Kupffer cells (肝組織巨噬細胞)。許多藥物及其代謝物對肝細胞本身有作用外, 也有些會活化 Kupffer cells 產生大量 NO、ROS 及 Cytokines, 這些產物適量可加強免疫, 但超量則會破壞肝細胞, 造成肝細胞內酶 GOT 及 GPT, 滲入血中。肝臟是富含高血流量的組織, 雙重血流供應, 來自 hepatic artery 及 portal vein。因此全身的藥物及毒物都會大量存在肝臟中, 發揮作用。而腎臟的複雜構造及重要功能不亞於肝臟, 它負責全身廢物的排泄, 調控全身電解質及細胞外體液量的恒定, 尤其是控制荷爾蒙的分泌, Vitamin D₃ 活化, 血紅素荷爾蒙 (erythropoitin) 生合成, 及 renin, prostaglandins 及 bradykinins 之生合成, 調控全身性血壓, 它的微細構造是許多腎單位 (nephron) 組成, 每腎單位含腎小管、腎絲球、Bowman capsule、mesangial cells (腎組織巨噬細胞) 等等, 有些毒性廢物或藥物代謝物在排出體外前, 置留腎臟, 有機會損傷腎臟組織及功能, 活化 mesangial cells, 產生大量 NO 及 ROS 或 Cytokines 分泌。腎小管細胞膜 Na⁺-K⁺-ATPase 是鈉鉀吸收及排泄的重要管道, 若被抑制, 將造成鈉排量增加, 附帶加多尿量。

小柴胡湯乃是一種和解劑¹⁻⁶，成分是人參、半夏、柴胡、黃芩、生薑、甘草及大棗、治傷寒少陽症及口苦咽乾目眩，治療各種慢性炎症及感染如肝炎、胃炎、胰臟炎、心肌炎、支氣管炎、膽囊炎、過敏性皮膚炎及感冒。最近的研究報告指出小柴胡湯可治腎炎有效⁷⁻¹⁴。半夏瀉心湯與小柴胡湯比較，僅一成分之差，以黃蓮代替柴胡，但其適應症不盡相同，半夏瀉心湯主治胃炎、十二指腸炎、腸炎、肝炎及肝硬化，口腔潰瘍也有效¹⁵⁻¹⁸，我們選擇這二種抗炎中藥方劑，擬比較研究其與阿斯匹靈類藥之交互作用是否有異？探求及比較它們對阿斯匹靈類藥之肝腎毒性減小或加強的劑量範圍有何差異性。

龍膽瀉肝湯屬於瀉肝膽實火，清下焦濕熱。成分含龍膽草、車前子、木通、黃芩、山梔子、當歸、生地、澤瀉、柴胡及生甘草。本方多苦寒，多服易傷脾胃，由於本方對肝炎及腎炎有緩解作用¹⁹⁻²³，推想在適當劑量，是否可減緩阿斯匹靈類藥的肝腎毒性，反之，由於此方可活化巨噬細胞，若在不適當的高劑量，是否此作用太強，導致大量 NO 及 ROS 產生，會加強阿斯匹靈類藥的肝腎性，值得我們探究。

歸脾湯具有益氣補血、健脾養心的作用，主要成分含人參、茯苓、白朮、炙甘草、黃耆、龍眼肉、遠志、酸棗仁、木香、當歸、大棗及生薑。治健忘失眠、食少體倦或失血、心悸怔忡及神經衰弱²⁴⁻²⁵。由於此方特別促使血管擴張、降低血壓及增強免疫力作用。我們推測若此方高劑量明顯降血壓，導致腎血流異常，對阿斯匹靈類藥的腎毒性可能有所影響，值得探究。

疏經活血湯主舒筋活血¹⁵⁻¹⁸，成分含當歸、白芍、生地黃、川芎、蒼朮、牛膝、陳皮、桃仁、威靈仙、防己、羌活、白芷、龍膽、茯苓、甘草及生薑。而血府逐瘀湯具有活血祛瘀及行氣止痛的作用主成分，含當歸、白芍、生地黃、川芎、牛膝、桃仁、紅花、枳殼、桔梗、柴胡及甘草。此二方均具活血化瘀的作用²⁶⁻³⁰，增強免疫，選擇此二方劑的目的是推想其與前述四種方劑之作用標地比較不同，值得一起比較研究不同中藥方劑與西藥併用的交互反應的差異性。

阿斯匹靈類藥物的製劑很多，我們選擇最常使用的二種，阿斯匹靈 (aspirin) 及阿西太米諾非 (acetaminophen, 普拿騰)。阿斯匹靈已使用 100 多年，現仍常使用於感冒、頭痛、牙痛、月經痛、發燒，小劑量 (50-100mg/day) 對心肌梗塞及中風之預防，治療風濕性關節炎則必須使用大劑量才有效，阿西太米諾非的臨床應用與阿斯匹靈同，因其胃部不適的副作用較小，所以更廣泛使用。雖然它們的作用機制很多，但主要是抑制 cyclooxygenases，抑制前列腺素 (PGs) 合成

有關，若長期大量使用，因抑制 PGs 生合成，導致腎血流異常，結果產生腎衰竭。另阿西太米諾非在肝臟的中間代謝物，可與肝細胞膜蛋白質結合成的複合物，造成抗體—抗原反應，嚴重破壞肝細胞。我們推想這二種廣泛使用的西藥與前述六種廣泛使用的中藥方劑，如感冒、頭痛（阿斯匹靈類藥與小柴胡湯、龍膽瀉肝湯）、風濕性關節炎（與疏經活血湯合用）、中風（與血府逐瘀湯合用），抗肝炎及抗腎炎等等均有機會併用，因此我們擬計劃研究：（1）分別六種中藥方劑單獨使用產生肝腎毒性所需的劑量。（2）選擇該六種中藥方劑本身不產生肝腎毒性的小劑量與阿斯匹靈類合併使用，研究其交互作用對肝腎功能的影響。嘗試解析它們交互作用的好處，是否會減小肝腎毒，或有壞處會加強肝腎毒性的作用。（3）探求它們交互作用的可能機制。

參、研究方法及進行步驟：

實驗策略及規劃：

第一年(95 年度 3 個月)預先準備實驗藥材及實驗動物。訓練研究助理熟練全程的研究技術，並先試驗阿斯匹靈誘導鼯鼠產生肝腎毒性的劑量及期限，然後研究阿斯匹靈與小柴胡湯的交互作用，對肝腎毒性的影響。

第二年(96 年度)全程完成所擬的研究工作項目。

我們策劃研究所選六種中藥方劑與阿斯匹靈類藥的交互作用，對肝腎功能產生變化的指標及實驗方法如下：

1. 尿蛋白：正常尿液、蛋白量很低，但腎絲球損傷，大分子的蛋白質通過腎絲球，經由腎小管至尿道排出，將於尿液中驗出蛋白質。
2. 血中 BUN 及 creatinine
3. 血中 NO 及脂質過氧化產生量：藥物經胃腸吸收後，進入血液循環系統中，若藥物刺激血中巨噬細胞活性後，將引發 NO 及 ROS 增加，ROS 馬上把脂質過氧化，同時把 RBC 膜上 Na⁺-K⁺-ATPase 蛋白氧化，降低酶活性（實驗證明 Na⁺-K⁺-ATPase 是 ROS 產生量的最敏感的指標）。
4. 血中 GOT 及 GPT 活性的變化：肝細胞若遭受藥物破壞，細胞膜滲透性增加，導致肝細胞內 GOT 及 GPT 大分子蛋白質滲出細胞外，進入血液中，因此血液中含高量 GOT 及 GPT 值，表示肝細胞損傷。
5. 肝腎組織學的顯微變化：鼯鼠於中西藥單用或併用處理後，在血

液及尿液測得肝腎功能有衰退的指標後，犧牲鼯鼠，取得肝臟及腎臟，其中一部分以 4% paraformaldehyde 固定，作切片及 H-E 染色，在顯微鏡下，觀察記錄各種組織細胞的變化，與對照組作比較。另外，取另一部分的肝臟及腎臟組織，測量 NO, LPO 及 Na⁺-K⁺-ATPase 之變化，以便探究藥物引起肝腎組織的損傷，是否經由氧自由基及 NO 產生過量而引起的。

藥物單用或併用的劑量及作用期限的規劃：

一般動物使用藥物的劑量，以人類使用劑量的十倍量為準，亦即動物對藥物的敏感度為人類的十分之一。以此為基礎，我們調整餵食鼯鼠的藥劑量是人類劑量的 3-20 倍之範圍內，選擇不同劑量測試，例如最初測試單用各種中藥方劑或西藥之肝腎毒性時，先以 20 倍人類劑量開始做實驗，在不同餵食期間如 1wk, 2wks, 3wks 測量尿蛋白及血液各種指標，待確認已有肝腎損傷的指標出現後，再分離肝腎，直接確認肝腎組織細胞損傷的實驗。併用西藥的實驗劑量規劃，分成二方面：(1) 測試中藥方劑是否對阿斯匹靈類藥之肝腎毒性具有防治療效，則先試以本身無肝腎毒性的中藥方劑約 1/3~1/5 的致毒劑量，或以人類劑量的三倍量開始作實驗，再視所得結果再調整。(2) 測試中藥方劑與阿斯匹靈類藥併用，肝腎毒性是否有互相加強的作用，首先應使用二者單用均無肝腎毒性的劑量的 1/2，合併餵食鼯鼠，在不同餵食期間，繼續偵測肝腎功能的指標，直至毒性的指標出現為止。

我們準備全心全力投入測試此六種中藥方劑與阿斯匹靈類藥的交互作用，對肝腎功能的影響，本研究的規劃、實驗及工作量很大，感謝二位有經驗的研究助理（黃梓寧、卜慶鎔）將一起打拼，期望獲得良好的研究成果，期望以科學的方法，闡明：(1) 這六種中藥方劑單用是否具有肝腎毒性。(2) 這六種中藥方劑是否具有防治阿斯匹靈類藥的肝腎毒性。(3) 這六種中藥方劑是否具有加強阿斯匹靈類藥的肝腎毒性。這些預期的研究成果，將提供有利的科學證據，勸告國人不可輕易相信「中藥具有病治病、無病健身的口號」，凡是藥物有沒有毒性，劑量的適量與否是一個重要因素，適量劑量的取得，一定要靠有經驗的醫師指示來使用才安全。另外，重要的資料將提供有關中西藥併用是利或有害，也將有科學的實證數據來說明。

研究進行步驟：

一、實驗藥材：

中藥方劑（小柴胡湯、半夏瀉心湯、龍膽瀉肝湯、歸脾湯、疏經活血湯及血府逐瘀湯）將購買順天堂或勝昌的濃縮中藥方劑，劑量預先估算使用 100mg/kg/day, 300mg/kg/day 及 1g/kg/day 或依標示劑量，再如上述換算鼯鼠飼食的劑量。

二、鼯鼠組別：

每組 6-8 隻鼯鼠，藥物稱重溶於水飼食，每次實驗，一組對照組只餵水。共有 8 種藥物，分別單用，每一種劑量，都需 9 組鼯鼠，以不同劑量測定，求得單用使用引發肝腎毒性所需的劑量。然後再降低劑量，以本身無肝腎毒性的低劑量的中藥方劑測試其對阿斯匹靈類藥物（分別二種，阿斯匹靈及阿西太米諾非 acetaminophen）之肝腎毒性是否具有防治的療效。第三層次的實驗則規劃該六種中藥方劑分別與二種阿斯匹靈類藥併用時，是否會互相加強產生肝腎毒性，最後探究其可能產生的作用機制是否與 NO 及 ROS 之產生有關聯。

三、實驗動物之飼養：

我們採用雄性 ICR 品種鼯鼠（約 4-6 周大），分別供以下的實驗使用。動物室具有中央空調系統及照明設備，將室溫維持於攝氏 $22 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ ，濕度則維持在 40~60%，人工照明設備以 12 小時為單位進行日夜變化。每星期秤體重一次。

四、血清生化值之測定（GOT, GPT, BUN, Creatinine）³⁹：

鼯鼠（正常鼯鼠、糖尿病鼯鼠及腎病鼠、肝功能輕微不正常鼯鼠及酒精性肝病鼠）於飼食藥物後，分別於不同時間（30 天或 60 天或更久，依照產生的作用再作決定），利用 pentobarbital（50mg/Kg）給予麻醉或使用 CO_2 ，之後，從鼯鼠眼窩靜脈血採集全血血液。以 3000 轉轉速離心，收集上清液（即血清），分別以血清生化值檢測試劑（委託臺大醫院院檢驗科測定）測定鼯鼠血中生化值（GOT, GPT, BUN, Creatinine）變化之情形。

五、尿液中尿蛋白之測定（Urine protein）：

鼯鼠（正常鼯鼠、糖尿病鼯鼠及腎病鼠、肝功能輕微不正常鼯鼠及酒精性肝病鼠）於飼食藥物後，分別於產不同時間（30 天或 60 天或更久，依照產生的作用再作決定），收集鼯鼠尿液，以蛋白檢測試劑測（BCA 試劑）定鼯鼠尿液中尿蛋白之變化。

六、肝臟及腎臟組織學上及酵素活性的研究³³：

依據我們實驗室之研究方法 (Young et al.)⁴⁰，鼯鼠於作完上述實驗後，

利用 pentobarbital (50mg/Kg) 給予鼯鼠麻醉後犧牲或使用 CO₂，之後將其犧牲，取出肝臟及腎臟組織，其中一半給予 4% 福馬林 (Para-formaldehyde) 將組織固定後，我們將肝臟及腎臟，復經一系列不同濃度的酒精脫水、石蠟包埋，連續切片及 H-E (hematoxylin-eosin) 染色，以進行形態學上之研究。另一半組織則製作均質並分離粒腺體，測量 Reductase 活性及 MgATPase 活性。

七、一氧化氮變化測定³³⁻³⁴：

血液及組織一氧化氮分析方法是依據我們實驗室之研究方法 (Chuu et al.

And Young et al.)⁴⁰⁻⁴² 並參考 Bolanos et al. 等人的方法加以修飾。

(a). 鼯鼠在給予餵食藥物，於不同的時間取小鼠眼窩靜脈血 75ul，加 95% 酒精 75ul (1:1)，混合均勻後，置入 4°C 冰箱約 12-16 小時去蛋白質。取出樣品，以 12000rpm 速度離心，取上清液 10ul，注入一氧化氮分析儀 (NOA-280) 分析。

(b). 鼯鼠在給予餵食藥物後，於實驗結束時，利用 pentobarbital (50mg/Kg) 給予麻醉後或使用 CO₂，將鼯鼠犧牲並取出肝臟及腎臟組織至於 -70°C 冰箱中保存。取 20 毫克組織置於 1 cc 之緩衝液中，以均質機將其均質化。取出均質液 100 μ l 並加入過氯酸 (0.4N HClO₄) 100 μ l，以 4°C，12000rpm 速度離心，取上清液 10 μ l，注入一氧化氮分析儀 (NOA-280)，在 VCl₃ 還原作用下，將 NO₂⁻ 及 NO₃⁻ 還原成 NO⁻，再與 O₃ 反應成活化態 NO₂^{*}，以化學發光感測器偵測 NO₂^{*} 的濃度。

八、肝臟及腎臟組織細胞脂質過氧化 (Lipid per-oxidation) 之測定³⁵：

血液及組織脂質過氧化 (Lipid per-oxidation) 之測定是參考參考 Kim, et al., 2001. 等人的方法加以修飾。

(a). 鼯鼠在給予餵食藥物，於不同的時間取小鼠眼窩靜脈血，取 20 μ l 之樣品於 96-Well 中，加入 65 μ l R1 reagent (10.3 mM *N*-methyl-2-phenylindole in acetonitrile) 及 15 μ l 37% HCl，於 45°C 反應 60 分鐘後利用 ELISA Reader-測定 590nm 吸光值，並與標準樣品 -MDA 作比較，即可得知脂質過氧化之變化情形。

(b). 鼯鼠在給予餵食藥物後，於實驗結束時，利用 pentobarbital

(50mg/Kg) 給予麻醉後或使用 CO₂，將鼯鼠犧牲並取出肝臟及腎臟組織至於-70°C 冰箱中保存。取 20 毫克組織置於 1 cc 之緩衝液中，以均質機將其均質化。取 20 ul 之均質液於 96-Well 中，加入 65 ul R1 reagent (10.3 mM *N*-methyl-2-phenylindole in acetonitrile)及 15 ul 37% HCl，於 45°C 反應 60 分鐘後利用 ELISA Reader-測定 590nm 吸光值，並與標準樣品-MDA 作比較，即可得知脂質過氧化之變化情形。

九、Na⁺K⁺-ATPase 測定³⁶⁻³⁷：

依據 Lanzatta (1985) 等人之發表的方法測定，參考我們實驗室之研究方法

(Chuu et al. And Young et al.) 方法加以修飾，是一種相當好用來偵測汞金屬毒性的指標。以 ATP 為 substrate，測反應後磷酸 (PO₄³⁻) 產生的量。以 Malachite green (0.045%)，4.5% Ammonium Molybdate 做為 PO₄³⁻ 的呈色劑，用 34% sodium citrate 來終止 ATPase 的反應，使用 spectrophotometer 測 630nm 的吸光值。用 ouabain (1mM) 抑制 Na⁺-K⁺-ATPase activity，因此測得 Mg²⁺-ATPase，比較藥物處理及對照組之肝臟及腎臟組織中 Mg²⁺-ATPase 之活性之差異性。另一組沒加 Ouabain 所得的值為 Total Na⁺-K⁺-Mg²⁺-ATPase，二者相減即為 Na⁺-K⁺-ATPase activity，以尋求藥理劑量 (10mg/Kg) 給予後對 Na⁺-K⁺-ATPase 活性所造成之影響。鼯鼠在給予餵食藥物，於不同的時間取小鼠眼窩靜脈血，取 100 ul 之全血血液以低張之生理食鹽水將紅血球打破，以超高速離心機(100000 rpm, 30mins, 4°C)離心後，取沉澱物分析 Na⁺-K⁺-ATPase activity。

十、實驗數據之統計：

實驗數據以平均值±標準偏差 (Mean±S.E.) 表示，而每組實驗數目皆在三次以上。實驗組別相互間之差異以 ANOVA followed by Dunnett 加以評估，P<0.05 者表示具統計學上的差異。

肆、研究結果：

餵飼鼠阿西達密諾菲

(acetaminophen, act) 單獨或併用中藥方劑：(1)小柴胡湯(2)半夏瀉心湯(3)龍膽瀉肝湯(4)歸脾湯(5)疏經活血湯(6)血府逐瘀湯，長達七週期間連續追縱尿中蛋白濃度變化，運動量及行為變異性，最後分析血漿及尿液生化值，並測量腎組織一氧化氮及過氧化脂質含量。

如期順利完成，所得結果詳如下列。

一、尿量及尿蛋白量之變化：

Act 單用，尿量先減少，再增加，最後趨於穩定（圖一），小柴胡湯併用，首先明顯增加尿量（圖二），後來趨於稍減現象。併用半夏瀉心湯，中期（一星期後）增加尿量，後來下降再又上升（圖三），併用龍膽瀉肝湯後，初期尿量沒多大改變，後逐漸增加，最後有減少趨勢（圖四）。併用歸脾湯尿量趨於穩定（圖五），併用疏經活血湯，尿量減少然有時突發增加現象（圖六），實際繼續改行徑，至後期又明顯減少（圖七）。

Act 單用後，尿蛋白量逐漸增加（圖八）。併用小柴胡湯，促進加速尿蛋白量增加（圖九）。併用半夏瀉心湯，在十日內，顯示促進尿蛋白量，廿日後，尿蛋白量增加（圖十）。併用龍膽瀉肝湯，在前卅天內，降低 Act 增加尿蛋白量，但卅天，已無明顯降低 Act 作用（圖十一）。併用歸脾湯十天內，明顯促進 Act 增加尿蛋白量，十天後，有短暫促使尿蛋白量降低，但卅天後，又促進 Act 增加尿蛋白量（圖十二）。併用疏經活血十天前，促進 Act 增加尿蛋白量，十天後，抑制 Act 增加尿蛋白量（圖十三）。併用血府逐瘀湯，十天後，促進 Act 尿蛋白量十天後，尿量明顯減少。（圖十四、圖十五、圖十六及圖十八）。另外，歸脾湯及疏經活血湯增加尿液 uric acid（圖十七）及 creatinine（圖十九）及 glucose（圖二十）。

二、腎臟組織過氧化脂質及 AtPase 活性：

小柴胡湯降低但血府逐瘀湯增加腎臟組織過氧化脂質（圖二十一）， Na^+K^+ -ATPase 活性被血府逐瘀湯抑制最明顯（圖二十二），歸脾湯及疏經活血湯稍微抑制，其他三種中藥方劑中等抑制作用。而 Mg^{2+} -ATPase 活性稍為促進（圖二十三）。

三、鼯鼠活動量及跳躍探索行為：

由圖二十四至圖二十八顯示，小柴胡湯及半夏瀉心湯比較無作用外其餘四種中藥方劑能抑制鼯鼠活動量及跳躍探索和垂直行為，增加休止期及印板行為。

其他血中生化值之變化顯示 BUN 及 creatinine，併用疏經活血湯明顯增加血中膽固醇，LDL 及三酯甘油 (Triglyceride) 及 glucose 值 (圖三十一)，其餘除血府逐瘀增加 LDL 值外，皆無明顯影響，此結果也顯示疏經活血湯有加強損傷肝功能之虞。

四、龍膽瀉肝湯及血府逐瘀湯單用或併用對腎臟作用

圖二十九顯示，acetaminophen (act)單用尿量逐漸減少，可為龍膽瀉肝湯改善，而血府逐瘀湯在後期有促進 act 更減少尿量，此二種中藥方劑使用一段時期後，有短暫減少尿量後來又逐漸恢復 (圖二十九 A)。血中 NO_x 值可為龍膽瀉肝湯增加，而腎臟組織中 NO_x 可為這三種藥方單用所增加，龍膽瀉肝湯併用 Act 則促進腎 NO_x 值趨於正常 (圖二十九 C)。腎過氧化脂質 (LPO) 之增加與 NO_x 值受藥物作用的情況類同 (圖二十九 D)。

五、血漿變化各種生化值：

Act 單用及併用六種常用中藥方劑對鼯鼠肝功能的影響，測量 GPT 指標，發現 Act 單用或併用小柴胡湯、半夏瀉心湯、龍膽瀉肝湯或歸脾湯，對肝功能影響不大 (圖三十 A 及 B)，可是併用疏經活血湯或血府逐瘀湯，則明顯增加 GPT 值 (圖三十 B)，顯示肝功能受損，另外測量 GOT 值，也顯示併用疏經活血湯明顯增加 GOT 值，但併用其他五種中藥方劑，則無明顯影響。

伍、討論：

鑑於台灣腎衰竭洗腎病人的盛行率，幾乎是全世界第一，而且不斷的每年以 10% 增加率進行性的暴增，這種現象對我國國民健康社會祥寧及經濟繁榮的衝擊非常大。造成洗腎病人增加的原因很多，比較明確的病因包括糖尿病、高血壓、血管硬化及老年等，根據臨床醫師的經驗，用藥不當，可能有關，對腎臟有毒性的藥物，最常見的有阿斯匹靈類藥物，其中以 acetaminophen 使用最多，另外，比較不明確的可能相關因素，是中草藥及中藥方劑的使用，自從馬兜鈴酸腎毒事件發生後，許多人關心中草藥使用的安全性，有一種可能令人濫用中草藥的觀念是認為中藥具有「無病養生，有病治病」，且副作用比西藥少的藥物，可是有些中草藥是有毒性的，必須要有經驗的中醫師來指示使用才安全，一般民眾不遵循此途徑，擅用在中藥房購買使用，另外，也有些民眾生病時，中西醫都看，中西藥併用，在這種情況下，是否容易造成嚴重的肝腎毒性，我們很感謝中醫藥委員會資助得以順利研究常用中藥方劑對 acetaminophen 的肝腎毒性的影響，所得結果顯示龍膽瀉肝湯在初期有降低 acetaminophen 腎毒性，但長時間使用後期的效果就沒有，因此適當的劑量及使用期限，有些中藥方劑有好處。然而所選六種中藥方劑中，卻有二種分別為疏經活血湯及血府逐瘀湯，它們分別對 acetaminophen 的肝毒性及腎毒性有明顯的加強作用，由此結果，可知中藥是不能隨意使用。

有關 Act 單用或併用中藥方劑產生肝腎毒性的作用機制，所得結果，似乎與氧自由基的產生有關連，如 Act 對腎臟產生毒性，排尿量先增後減，腎臟組織之 glomeruli hypertrophy 近端腎小管細胞壞死，以及 lipid peroxidation (LPO) 增加， Na^+K^+ -ATPase 下降，Act 分別併用六種中藥方劑，結果發現龍膽瀉肝湯在初期有改善 Act 之腎毒性，但後期此作用消失。比較重要的發現是血府逐瘀湯在後期，明顯加強 Act 腎毒性，產生無尿狀態，尿蛋白增加，腎臟組織 glomerular 萎縮，tubular cells 壞死，並增加腎臟 LPO 及 NO 產生量， Na^+K^+ -ATPase 活性下降。另外，發現疏經活血湯在後期加強 Act 肝毒，血中 GOT 及 GPT 上升，Cholesterol 與 Triglyceride 也升高。其餘三種中藥方劑在此研究期限內，尚無明顯影響。本計劃的研究結果顯示適當使用龍膽瀉肝湯有緩解 Act 腎毒性但也有中藥方劑 (5 及 6) 分別對 Act 之肝腎毒性有加強作用，因此中西藥併用務必小心謹慎，民眾不可擅自服用，務必由醫師指導，而且同時看中醫及西醫時，所服用的藥要告知醫

師，以便衡量併用的優缺點。

陸、結論與建議：

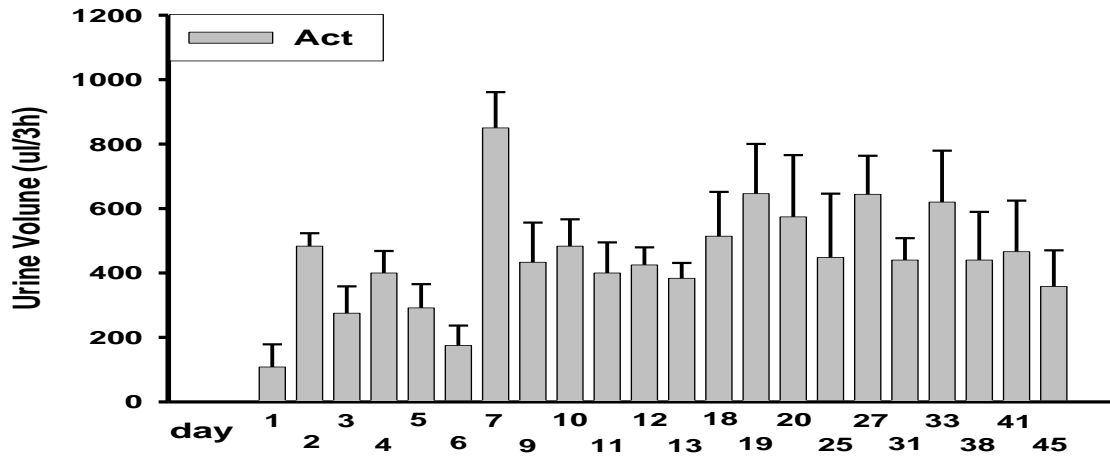
本研究計劃很幸運選得的六種常用中藥方劑，探究其與acetaminophen併用產生肝腎毒性的結果，顯示血府逐瘀湯明顯加強腎毒性，而疏經活血湯加強肝毒性，因此我們提供有用的資訊，加強一般民眾慎用中西藥，二者併用時，有加強肝腎毒性之虞。

柒、重要參考文獻：

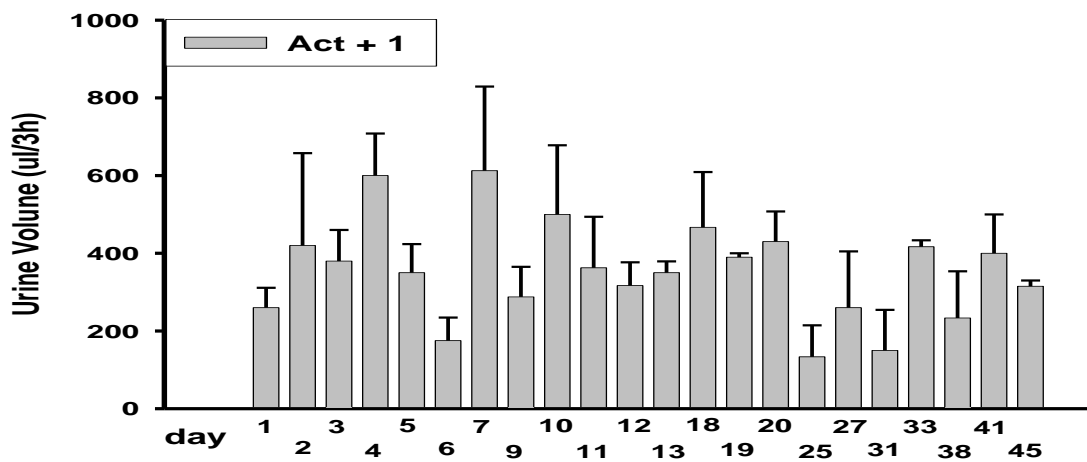
1. 明·李時珍,本草綱目,人民衛生出版社,1957.
2. 許鴻源、陳玉盤、許順吉、許照信、陳建志、張憲昌,簡明藥材學,新醫藥出版社,1985.
3. 樓之岑、秦波主編,常用中藥材品種整理與質量研究,北京醫科大學、中國協和醫科大學聯合出版社,1995.
4. 李家實主編,中藥鑑定學,上海科學技術出版社,1996.
5. 凌一揆、顏正準編著,中藥學,上海科學技術出版社,1984.
6. 神農本草經 商務印書館,台北,1955.
7. 蔣波. 小柴胡湯加減治療久咳 162 例[J]. 新中醫. 1999, 31(3): 45-46
8. 高雲亭,劉玉剛. 小柴胡湯加味治療支氣管哮喘 36 例[J]. 中國民間療法. 2003, 11(1): 46
9. 畢志紅,任 川. 小柴胡湯治療病毒性心肌炎 30 例[J]. 中醫藥學刊. 2003, 21 (5): 779
10. 李克勤. 洛汀新並用加味小柴胡湯治療慢性腎小球腎炎 36 例[J]. 中國社區醫師[J]. 2003, 18(10): 40
11. 陳亦工,陳強,陳萌. 小柴胡湯治療急性腎盂腎炎 200 例[J]. 國醫論壇. 2000, 15(3): 9
12. 楊麗珍,丁麗萍等. 小柴胡湯加減治療小兒癲癇 45 例臨床觀察[J]. 中國醫學報. 1999(2): 40-41
13. 朱曉紅. 小柴胡湯合澤瀉湯治療耳蝸前庭疾患 48 例[J]. 遼寧中醫雜誌. 2003, 30 (7): 545
14. 胡碩龍. 加減小柴胡湯治療頭痛 56 例[J]. 湖南中醫雜誌. 2004, 20(2): 33-34
15. 江金德, 中藥科學藥性大辭典, 大眾書局, 台北, 1991.

16. 沈映君主編，中藥藥理學，人民衛生出版社,2000.
17. 張貴君主編，現代中藥材商品通鑑，中國中醫藥出版社，2001.
18. 鄭虎占等主編，中藥現代研究與應用(第一卷)，學苑出版社，1997.
19. 翁祖輝、康照洲、汪徽五. 龍膽瀉肝湯與藥物代謝酵素之交互作用. 八十六年度中草藥國際研會論文摘要
20. 鄧哲明 . 龍膽瀉肝湯免疫機轉研究 .
<http://www.ccmp.gov.tw/search.asp>(行政院衛生署中醫藥委員會)
21. 黃慧珍 . 龍膽瀉肝湯免疫機轉研究 .
<http://www.ccmp.gov.tw/search.asp>(行政院衛生署中醫藥委員會)
22. 許秀蘊. Evaluate the potential effects of the Decoction of Gentianae and Bolus of Angelicae Sinensis and Gentianae by using the screening model on the inactivated protein kinase and anti-oxidative enzyme 以去活化蛋白激酶及抗氧化酶系統篩選模式評估龍膽瀉肝湯及當歸龍薈丸之療效 .
<http://www.ccmp.gov.tw/search.asp>(行政院衛生署中醫藥委員會)
23. 吳龍源、徐曉萍、陳怡欣、林乃女、陳旺全、鄭振鴻、彭文煌、邱雲棕. 龍膽瀉湯變方對 Dimethylnitrosamine 誘發大鼠肝損傷的療效探討. <http://www.ccmp.gov.tw/search.asp>(行政院衛生署中醫藥委員會)
24. 林文川. 連續十二週經口投與歸脾湯對老年大鼠的影響.
<http://www.ccmp.gov.tw/search.asp>(行政院衛生署中醫藥資訊網)
25. 劉慶憲、宋永建. 固本解鬱法論治中風後抑鬱症(poststroke depression)對照研究. J Chin Med 13(2): 81-88, 2002.
26. 蔡輝彥. 中醫傳統方劑對於大鼠實驗性心律不整之研究.
<http://www.ccmp.gou.tw/search.asp>(行政院衛生署中醫藥資訊網)
27. 張恒鴻. 血府逐瘀湯對硬皮症患者微循環療效之評估.
<http://www.ccmp.gou.tw/search.asp>(行政院衛生署中醫藥資訊網)
28. 蕭明熙. 血府逐瘀湯與冠心二號方活性成分與藥理作用之研究.
<http://www.ccmp.gou.tw/search.asp>(行政院衛生署中醫藥資訊網)
29. 林俊清. 常用治療中風方劑抗氧化活性之研究---血府逐瘀湯、烏藥順氣散、補陽還五湯、小續命湯、柴胡加龍骨牡蠣湯.
<http://www.ccmp.gou.tw/search.asp>(行政院衛生署中醫藥資訊網)
30. 何東燦. 血府逐瘀湯與 Mitomycin C 對實驗性肝腫瘤體內及體外的研究. <http://www.ccmp.gou.tw/search.asp>(行政院衛生署中醫藥資訊網)

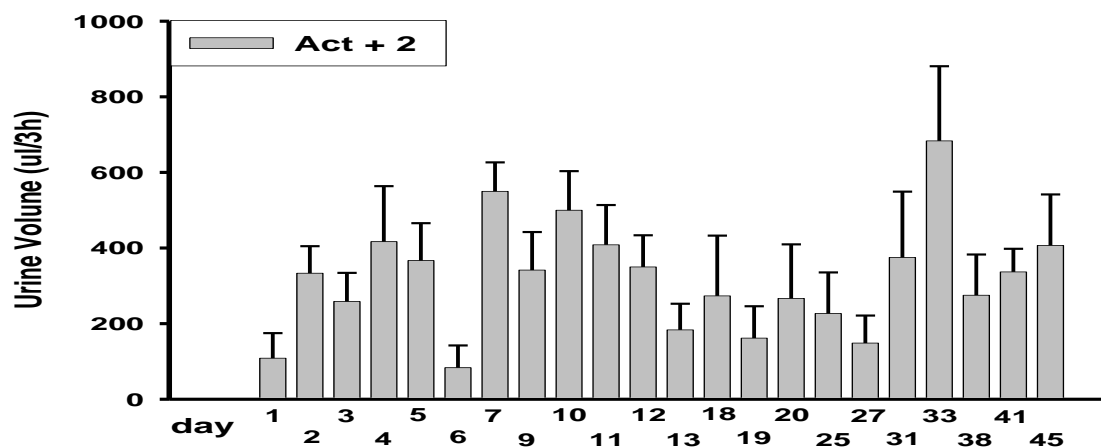
31. <http://www.kidney.org.tw/> 財團法人中華民國腎臟基金會
32. Wong, M.K., Raymond, R. M., Alan R.Parrish. Effects of selenium and mercury on the enzymatic activities and lipid peroxidation in brain, liver, and blood of rats. *Journal of Environmental Science & Health - Part B: Pesticides, Food Contaminants, & Agricultural Wastes*. 2001;36(4):489-99.
33. Yi-Ho Young , Jiunn-Jye Chuu, Shing-Hwa Liu , Shoei-Yn Lin-Shiau. Neurotoxicological mechanism of cinnabar and mercuric sulfide on vestibular-ocular reflex system in guinea-pigs. *Toxicol.Sci*.2001, 67,256-263.41.Liu SH. Lin-Shiau SY. Studies on mercury-induced myotonia in the mouse diaphragm. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*. 1992; 319,86-100.
34. Jiunn-Jye Chuu, Yi-Ho Young, Shing-Hwa Liu, Shoei-Yn Lin-Shiau. Neurotoxicity of mercury sulfide in the vestibular ocular reflex system of guinea-pigs. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology*.2001;364, 249-258.
35. Kim HJ.,Soh Y.,Jang JH., Lee JS.,Oh YJ. and Surh YJ. Differential Cell Death Induced by Salsolinol with and without Copper: Possible Role of Reactive Oxygen Species.*Mol Pharmacol* 2001;60:440–449.
36. Balestrino M. Young J. Aitken P.Block of (Na⁺,K⁺)ATPase with ouabain induces spreading depression-like depolarization in hippocampal slices. *Brain. Res*. 838: 37-44, 1999.
37. Liang, M. and Knox, F.G. Nitric oxide activates PKCalpha and inhibits Na⁺-K⁺-ATPase in opossum kidney cells. *Am J Physiol*.277: F859-65,1999.



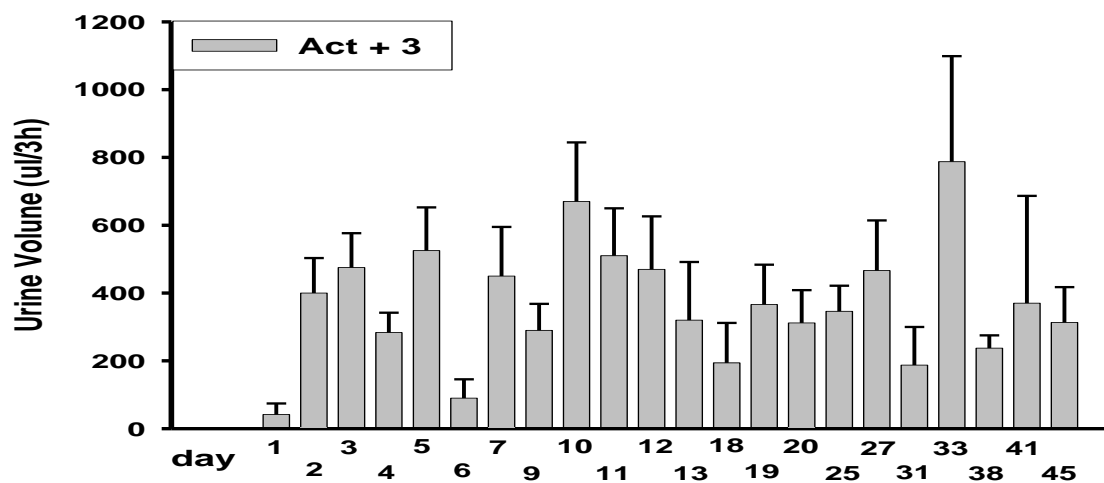
圖一、Acetaminophen 對小鼠排尿體積的影響



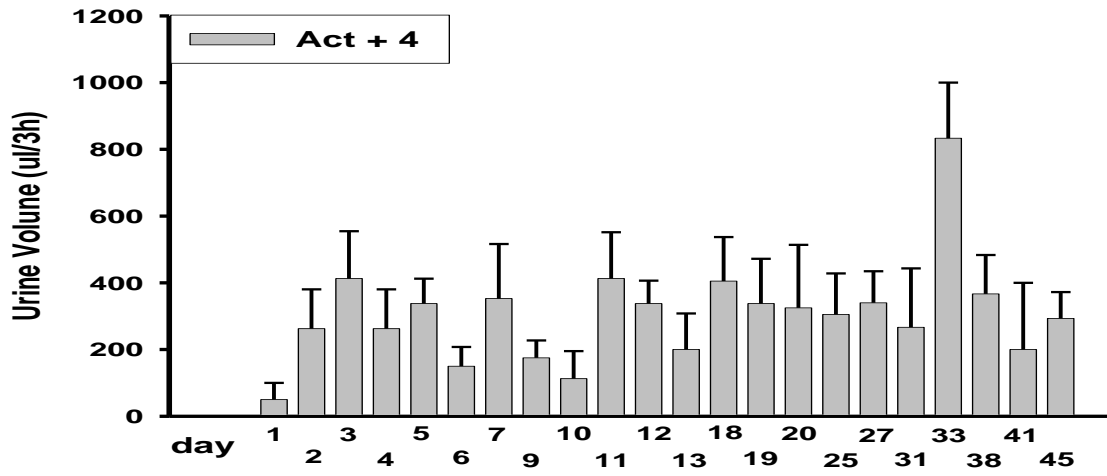
圖二、Acetaminophen 併用小柴胡湯對小鼠排尿體積的影響



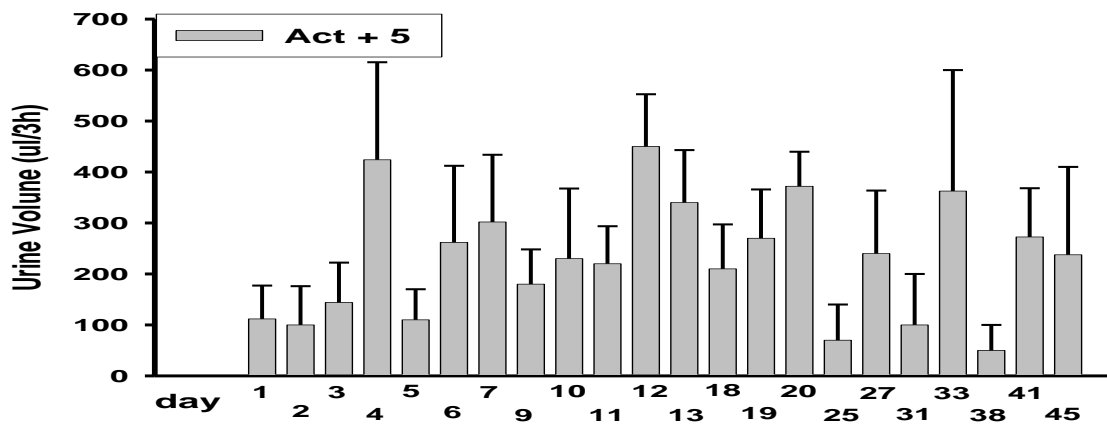
圖三、Acetaminophen 併用半夏瀉心湯對小鼠排尿體積的影響



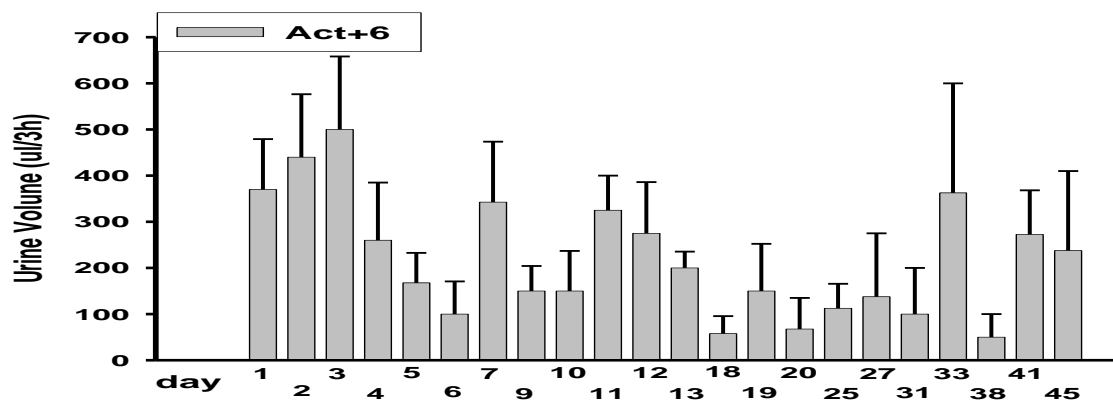
圖四、Acetaminophen 併用龍膽瀉肝湯對小鼠排尿體積的影響



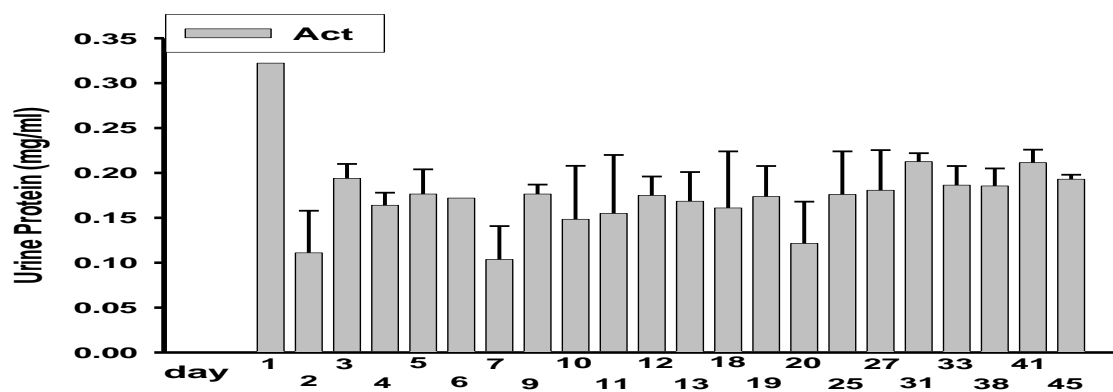
圖五、Acetaminophen 併用歸脾湯對小鼠排尿體積的影響



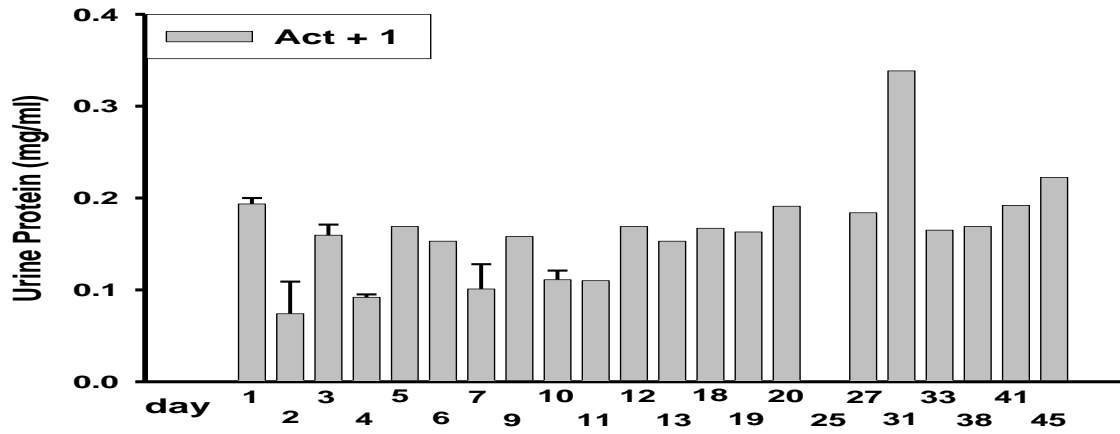
圖六、Acetaminophen 併用疏經活血湯對小鼠排尿體積的影響



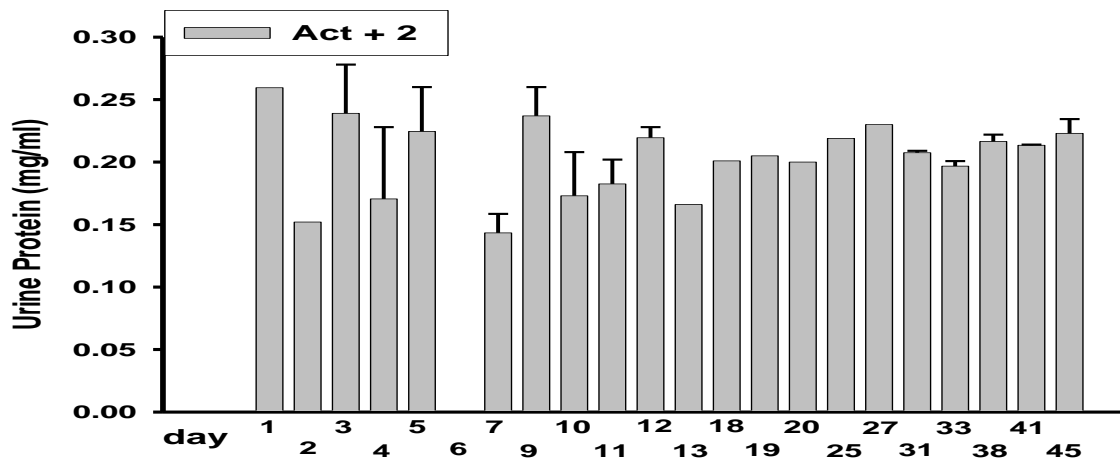
圖七、Acetaminophen 併用血府逐瘀湯對小鼠排尿體積的影響



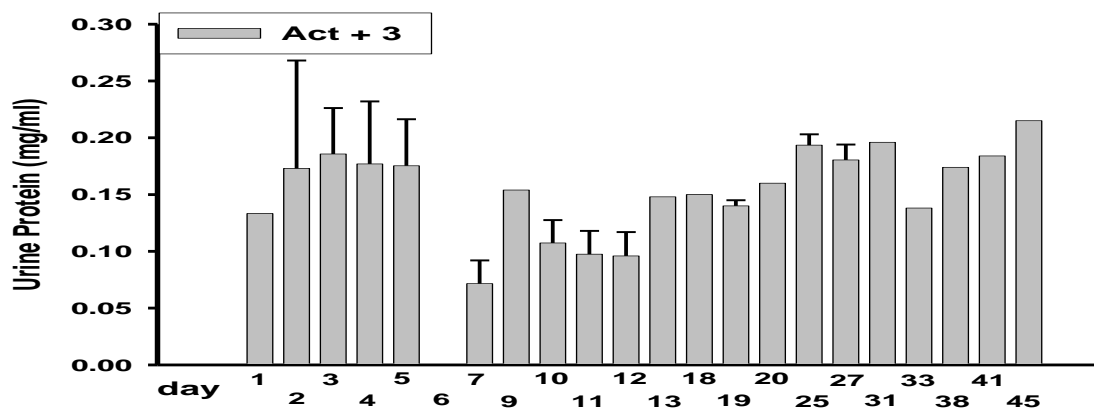
圖八、Acetaminophen 對小鼠尿蛋白量的影響



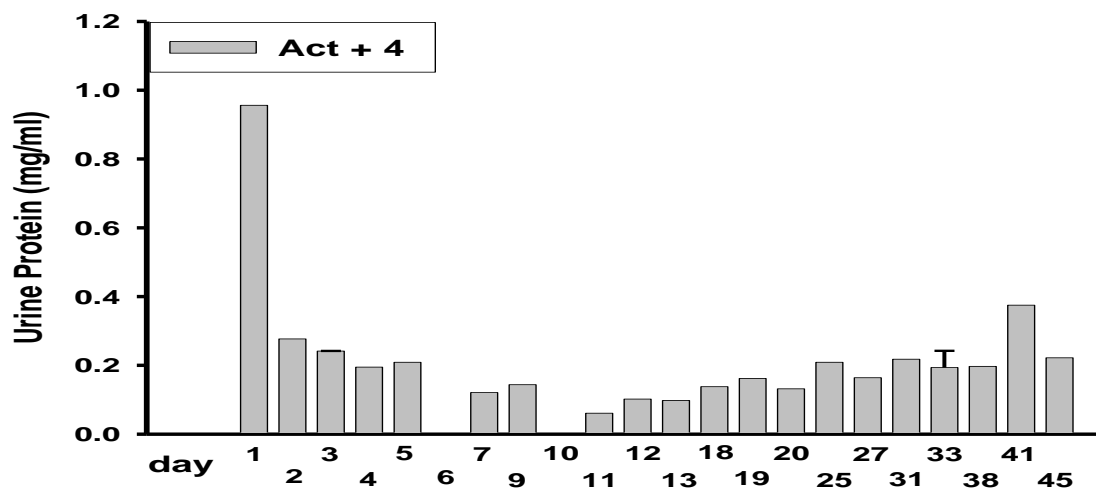
圖九、Acetaminophen 併用小柴胡湯對鼯鼠尿蛋白量的影響



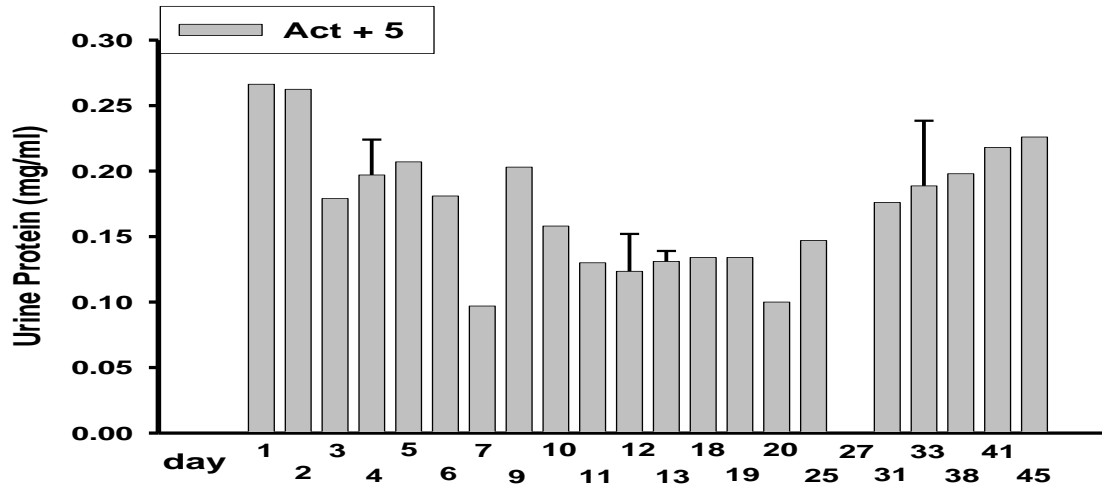
圖十、Acetaminophen 併用半夏瀉心湯對鼯鼠尿蛋白量的影響



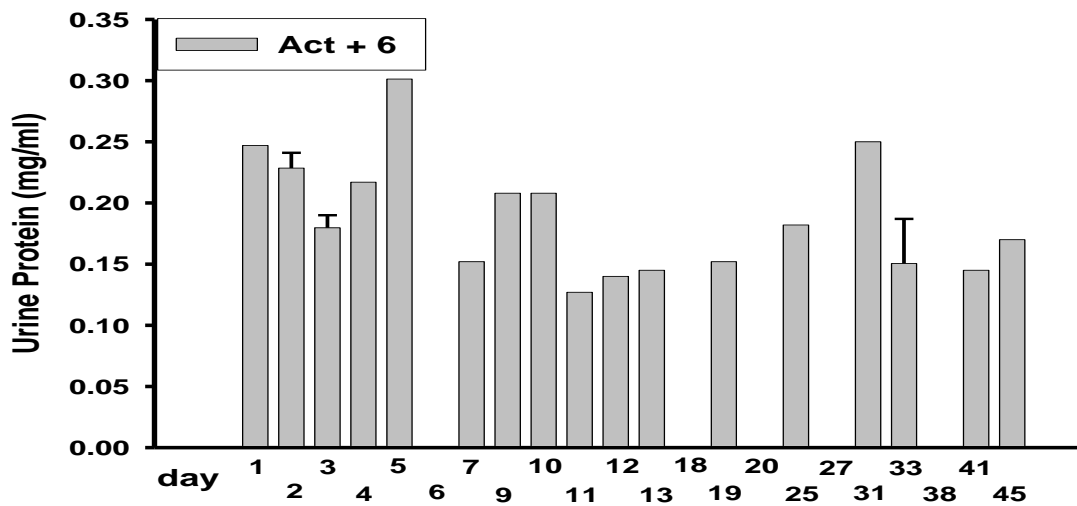
圖十一、Acetaminophen 併用龍膽瀉肝湯對小鼠尿蛋白量的影響



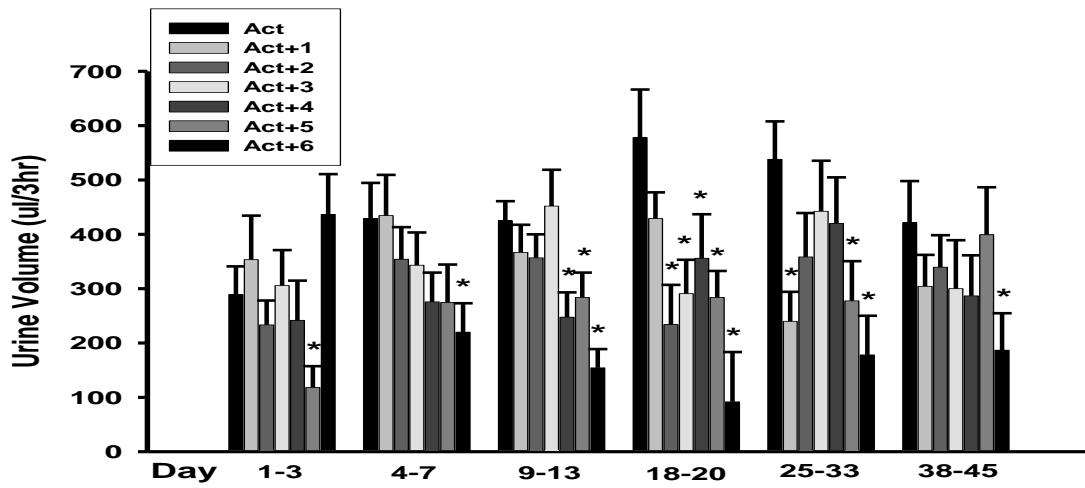
圖十二、Acetaminophen 併用歸脾湯對小鼠尿蛋白量的影響



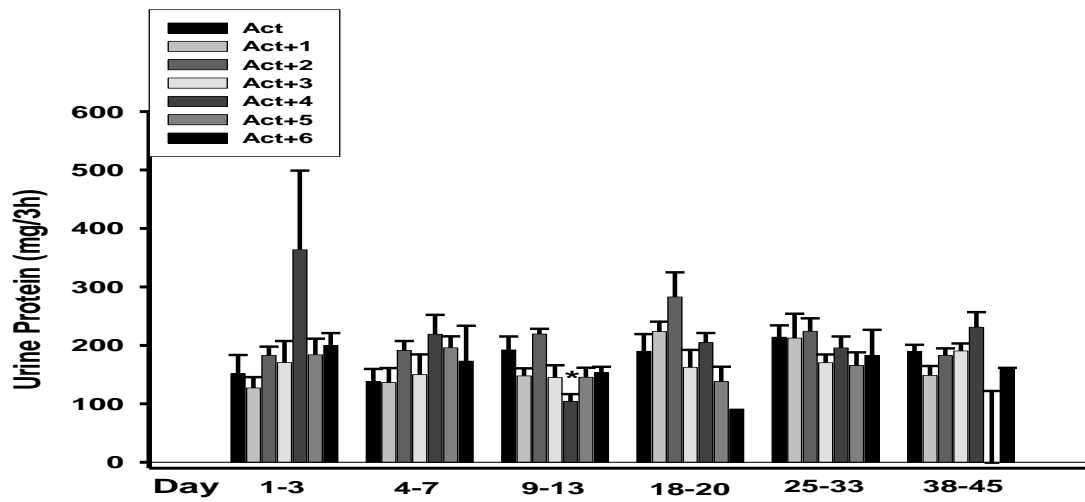
圖十三、Acetaminophen 併用疏經活血湯對小鼠尿蛋白量的影響



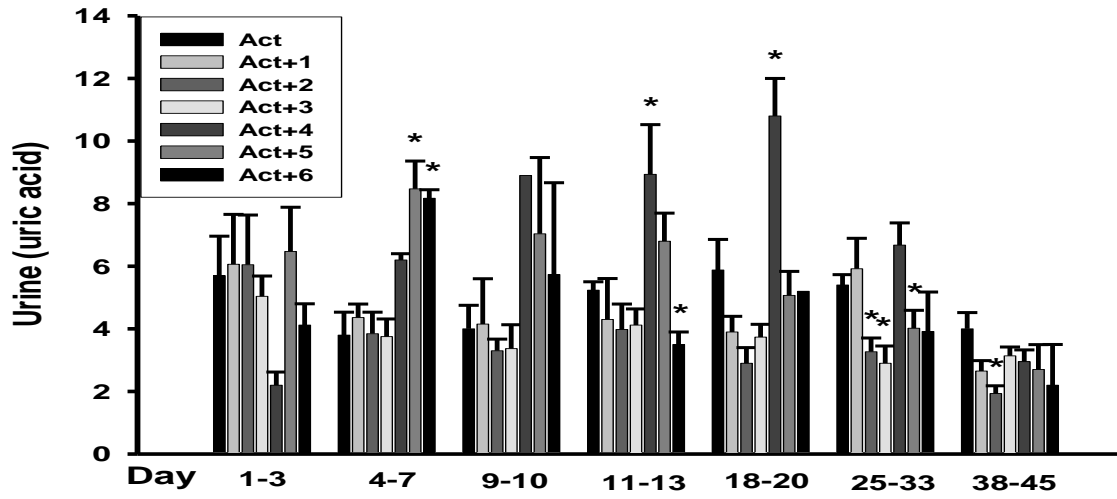
圖十四、Acetaminophen 併用血府逐瘀湯對小鼠尿蛋白量的影響



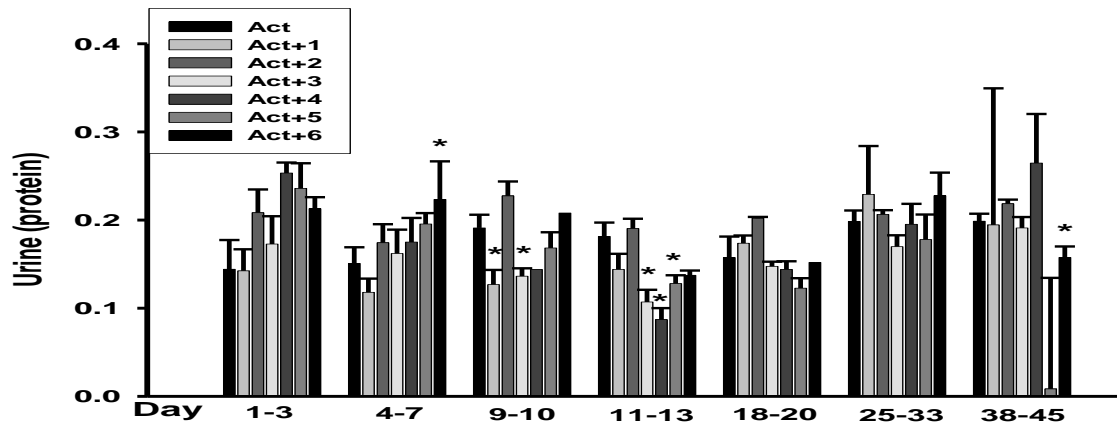
圖十五、Acetaminophen 併用六種常用中藥方劑對小鼠排尿體積的影響



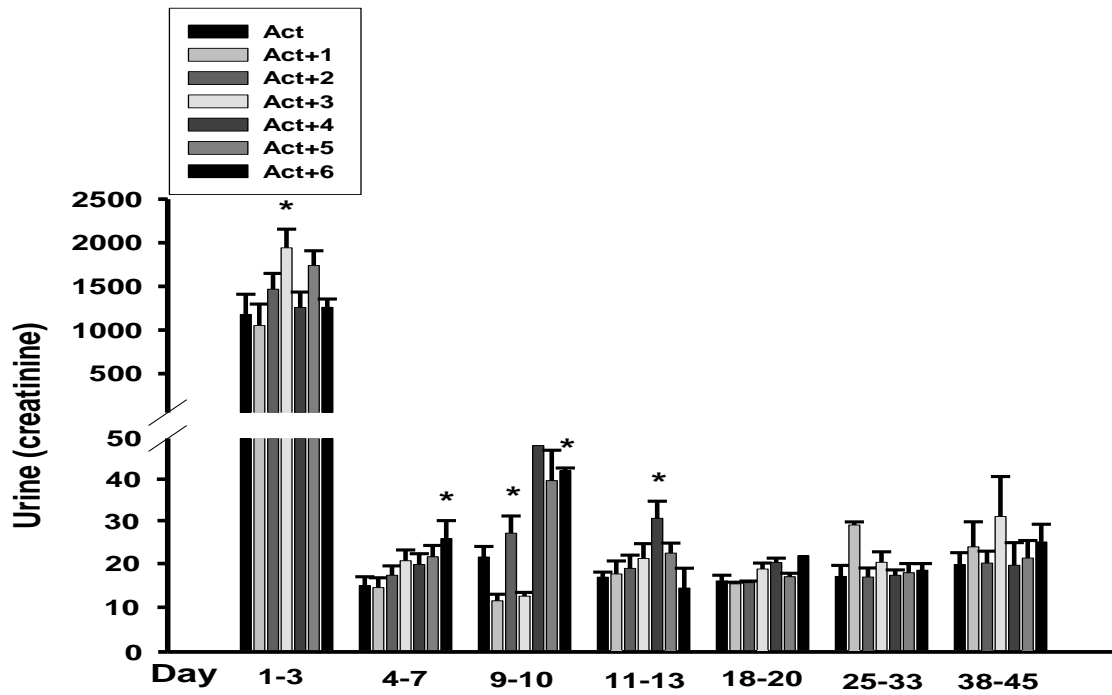
圖十六、Acetaminophen 併用六種常用中藥方劑對小鼠尿蛋白量的影響



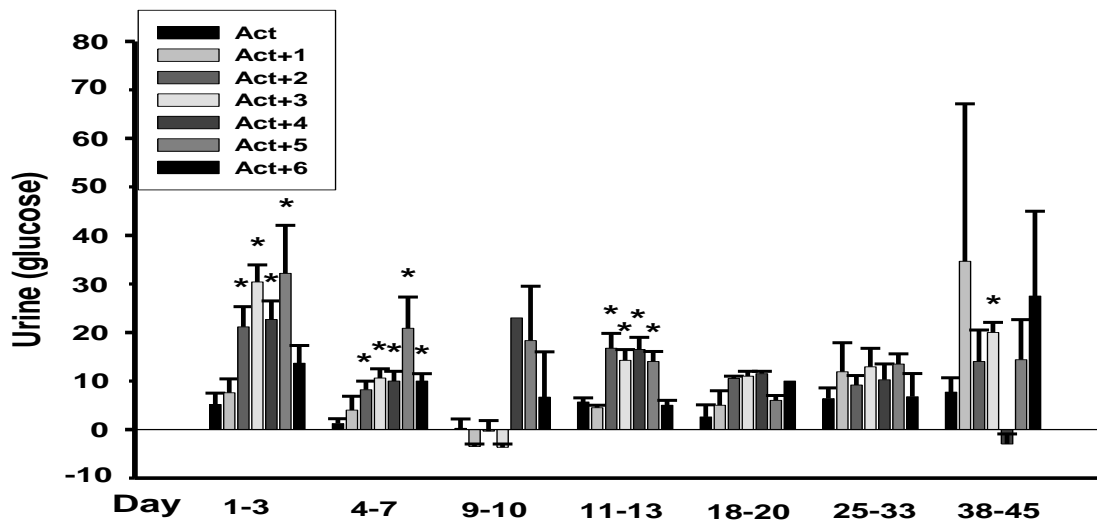
圖十七、Acetaminophen 併用中藥方劑對小鼠尿中 uric acid 之影響



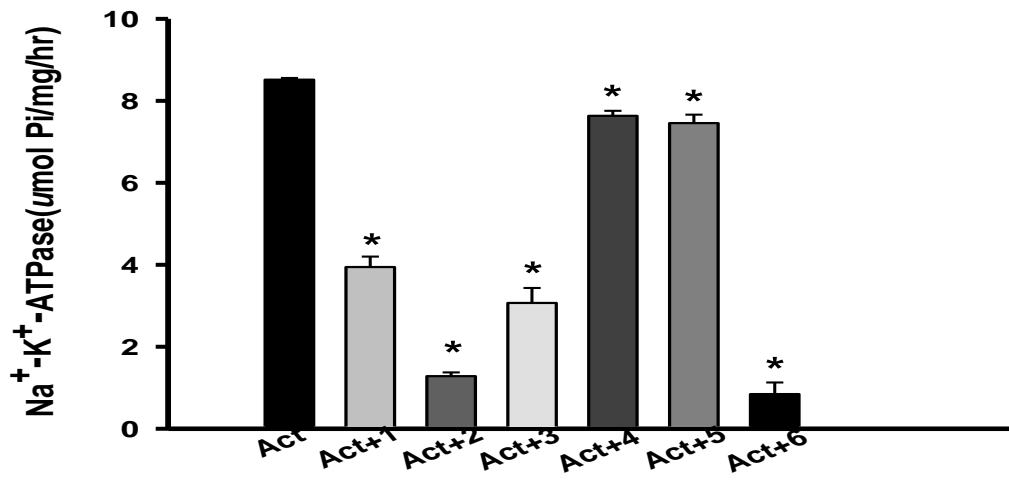
圖十八、Acetaminophen 併用中藥方劑對小鼠尿中 Protein 之影響



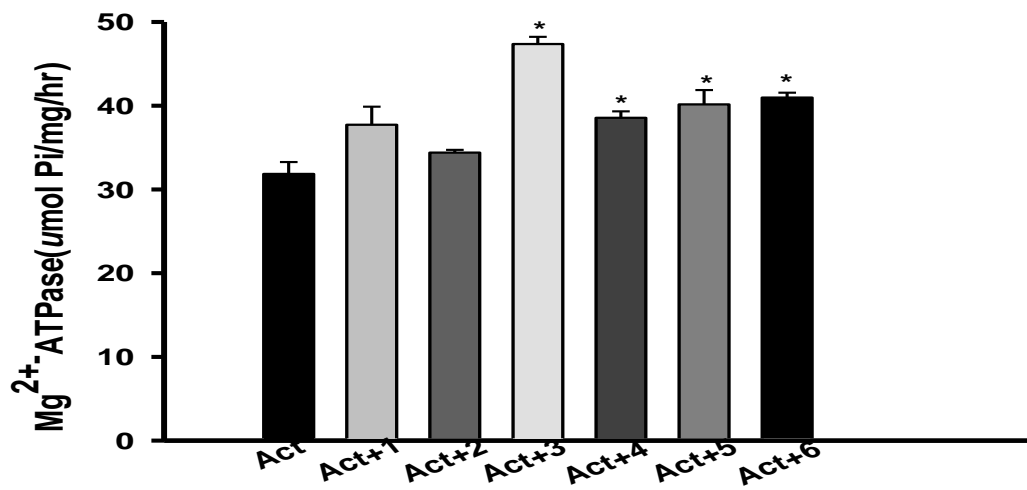
圖十九、Acetaminophen 併用中藥方劑對小鼠尿中 creatinine 之影響



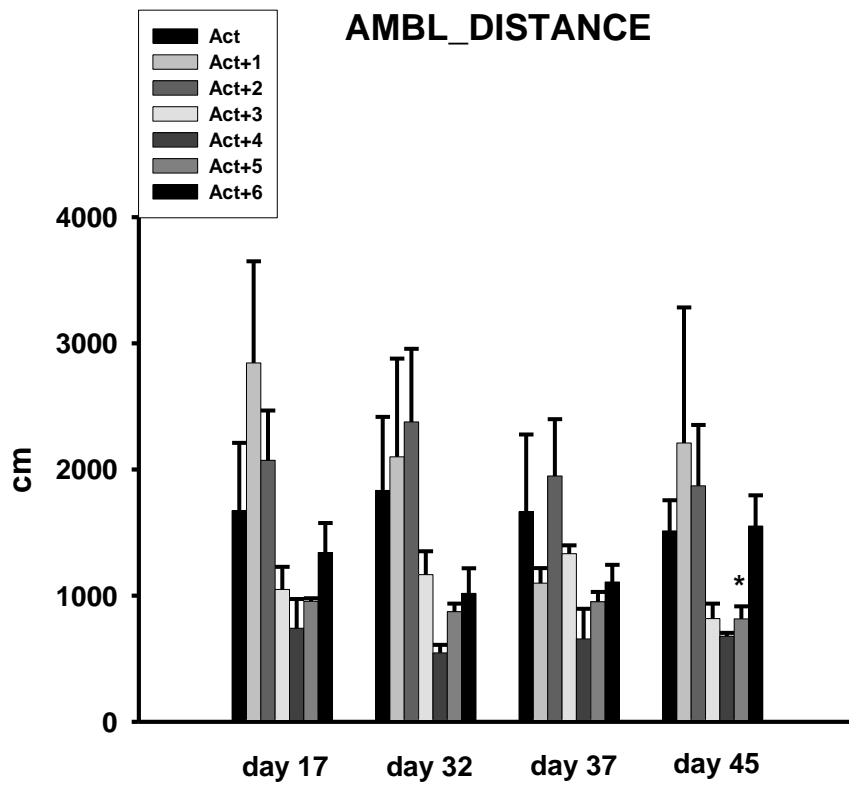
圖二十、Acetaminophen 併用中藥方劑對小鼠尿中 glucose 之影響



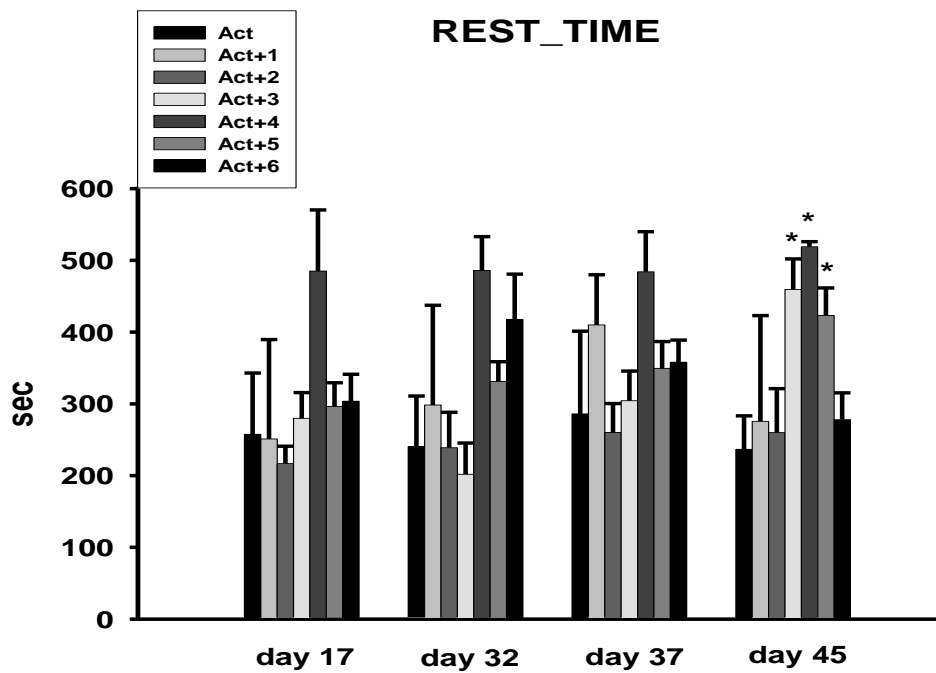
圖廿二、Acetaminophen 併用中藥方劑對小鼠尿中腎臟 Na⁺K⁺-ATPase 之影響



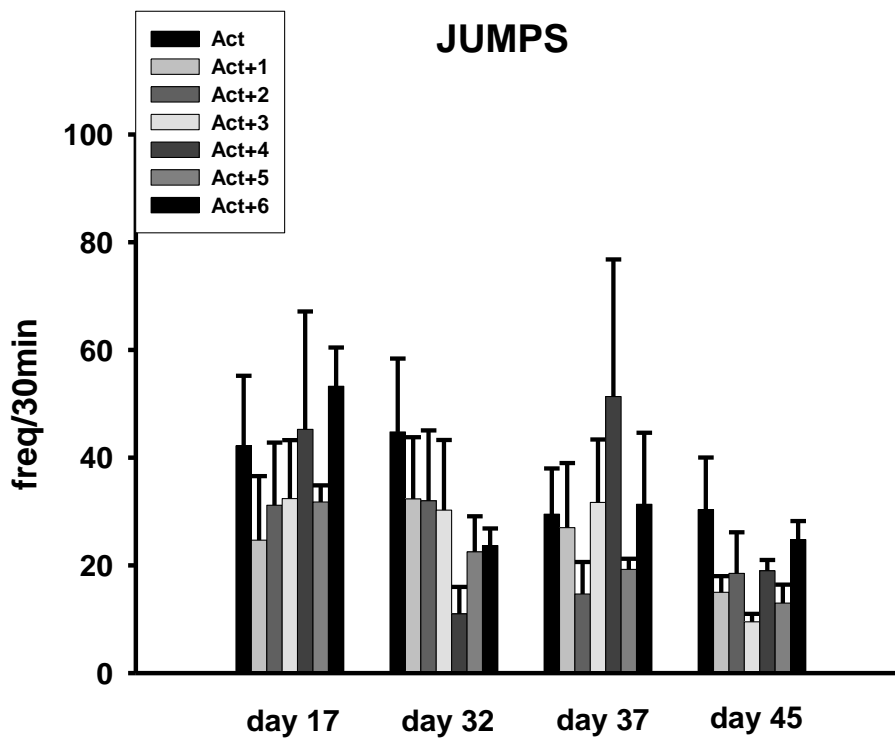
圖廿三、Acetaminophen 併用中藥方劑對腎臟 Mg²⁺-ATPase 活性的影響



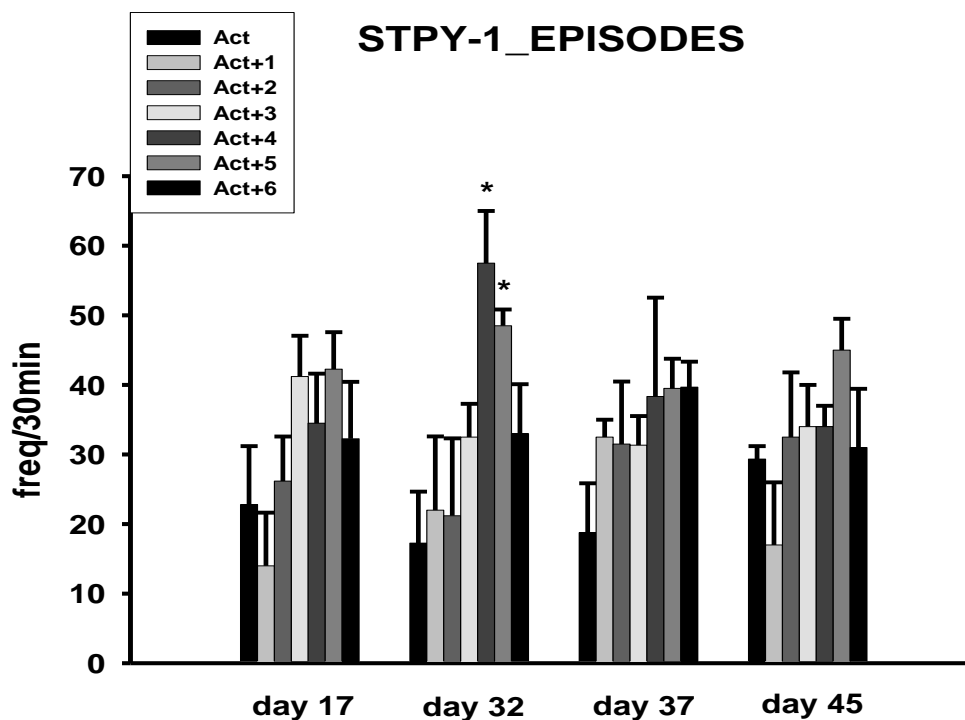
圖廿四、Acetaminophen 併用中藥方劑對小鼠活動量的影響



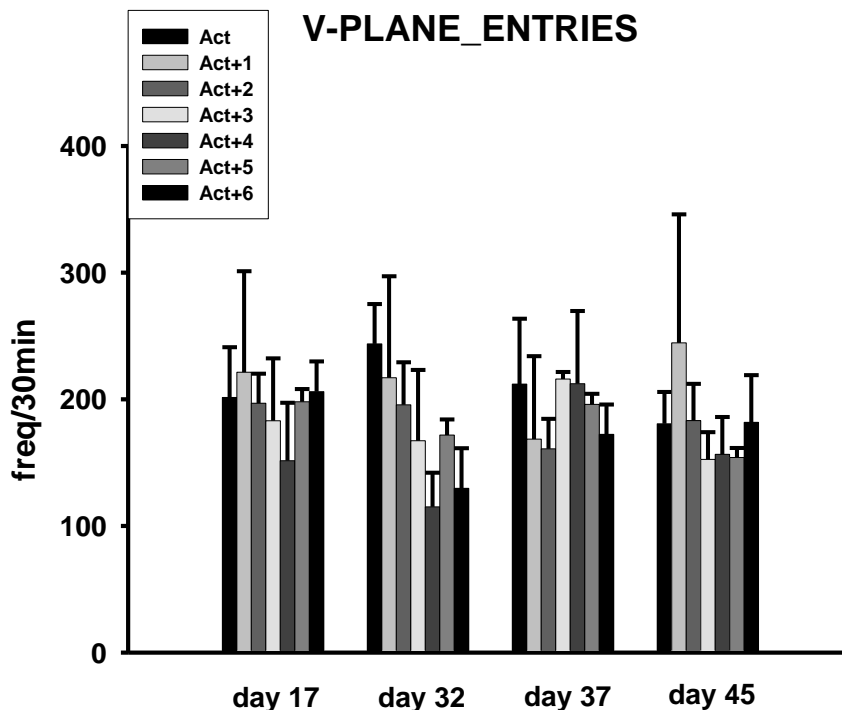
圖廿五、Acetaminophen 併用中藥方劑對小鼠休止期的影響



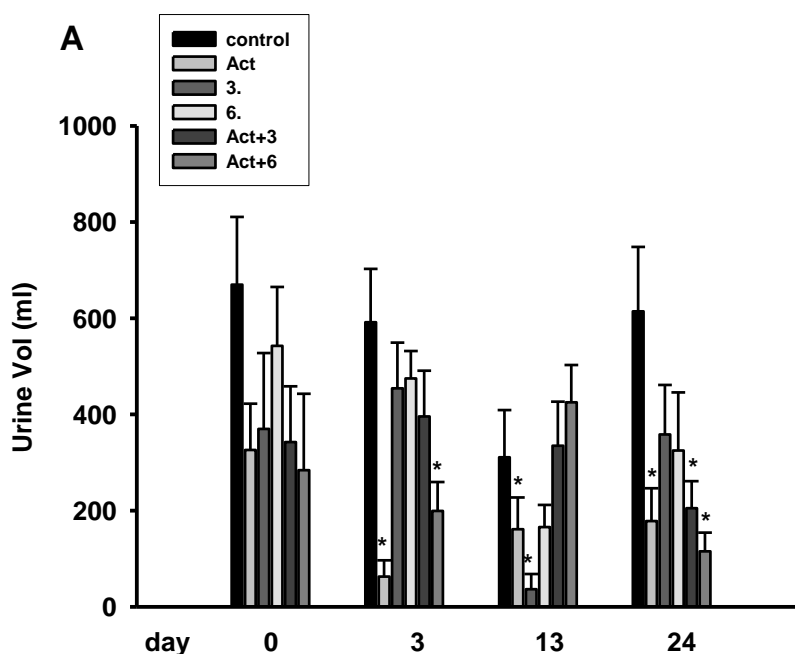
圖廿六、Acetaminophen 併用中藥方劑對鼯鼠跳躍的影響



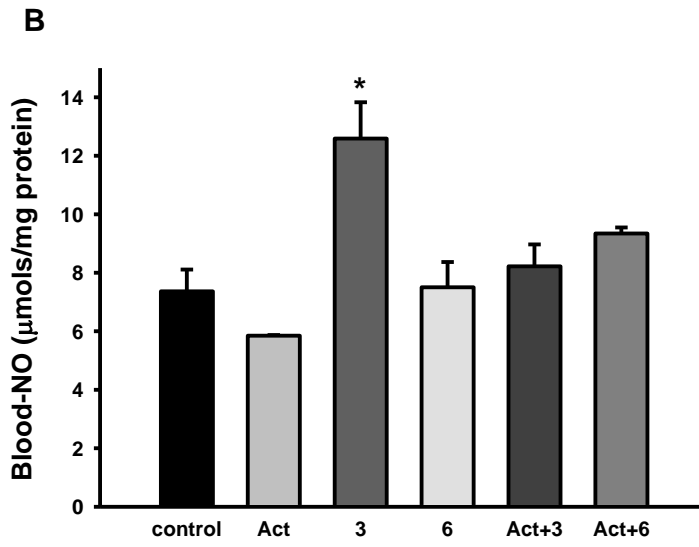
圖廿七、Acetaminophen 併用中藥方劑對鼯鼠印板行為的影響



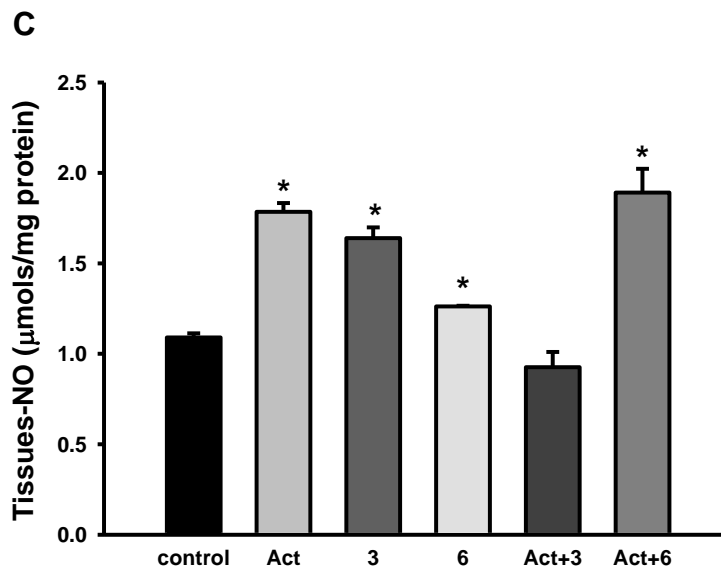
圖廿八、Acetaminophen 併用中藥方劑對小鼠垂直行為的影響



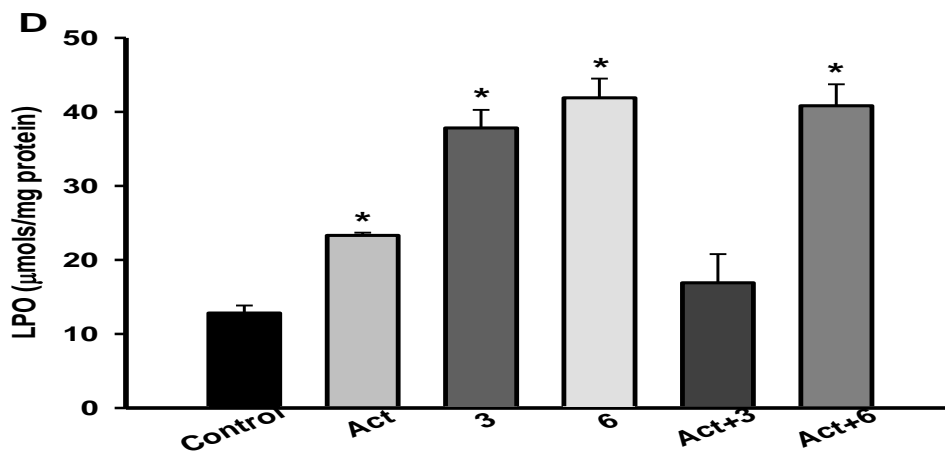
圖二十九. 龍膽瀉肝湯(3),血府逐瘀湯及 Acetaminophen(act)單獨或併用對排尿量(A),血中 Nox(B),腎組織 Nox(C)及腎組織過氧化脂質(LPO,D)之影響



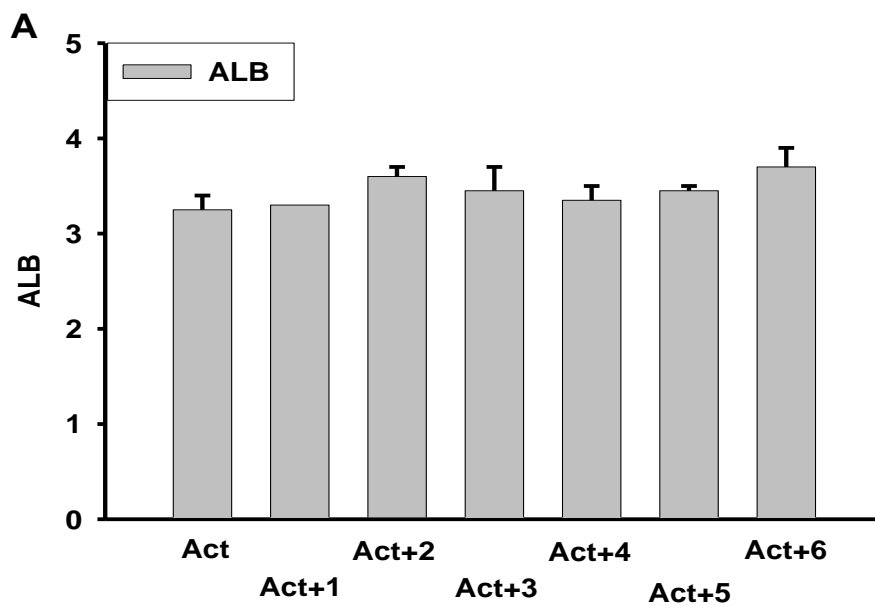
圖二十九 之 B



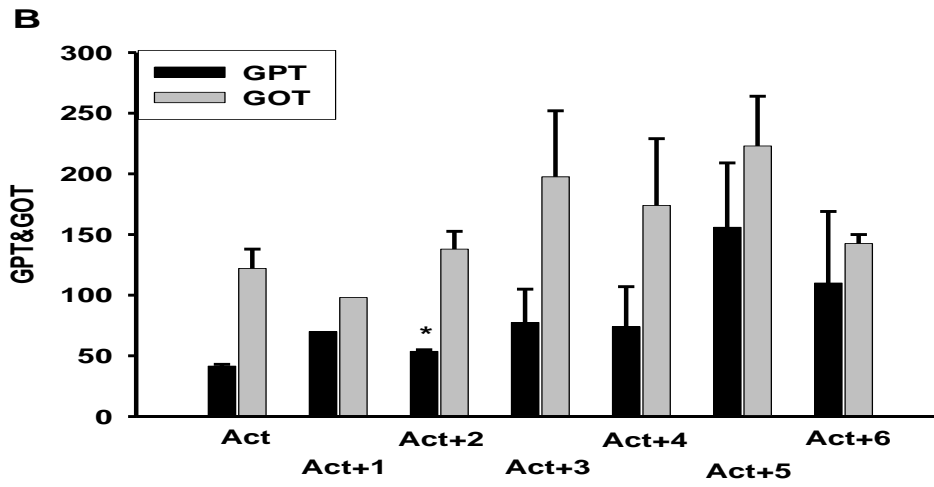
圖二十九 之 C



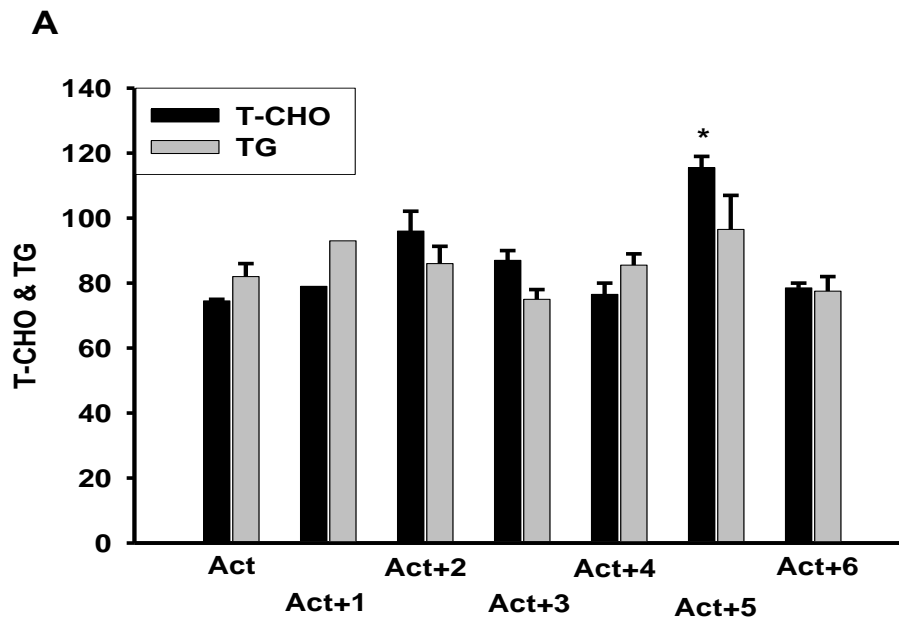
圖二十九 之 D



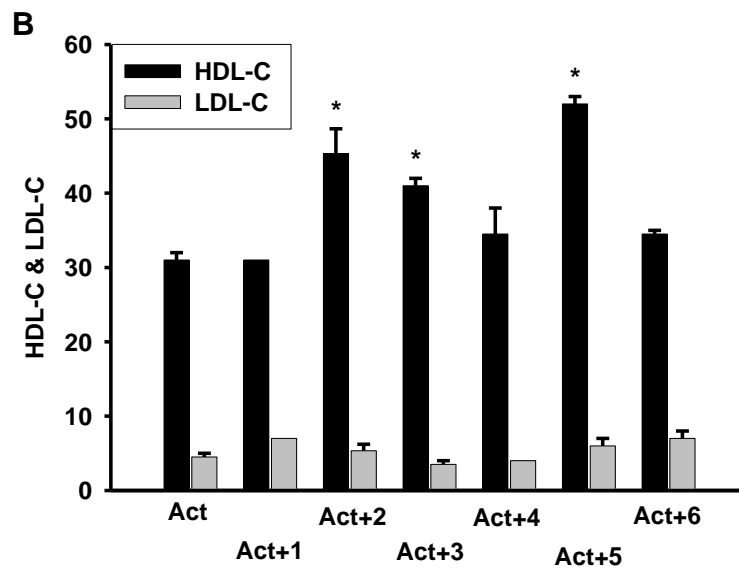
圖三十、Acetaminophen 併用中藥方劑對血漿 albumin(A)and GPT 和 GOT(B) 的影響



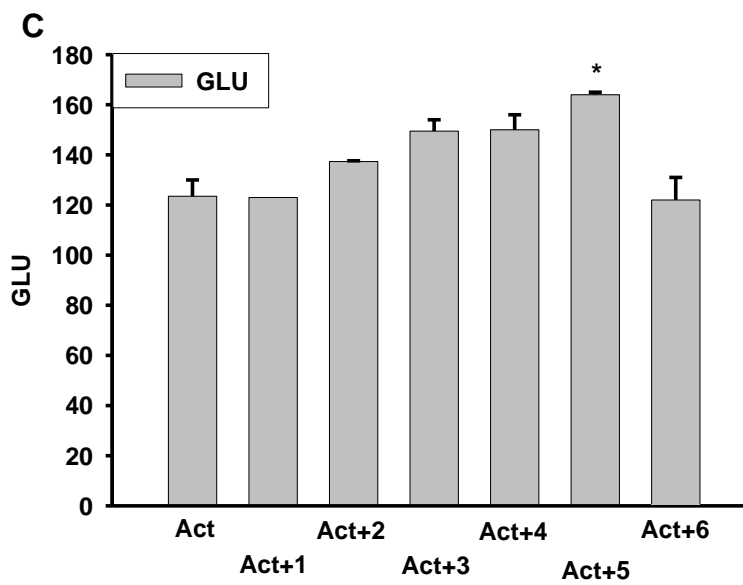
圖三十 之 B



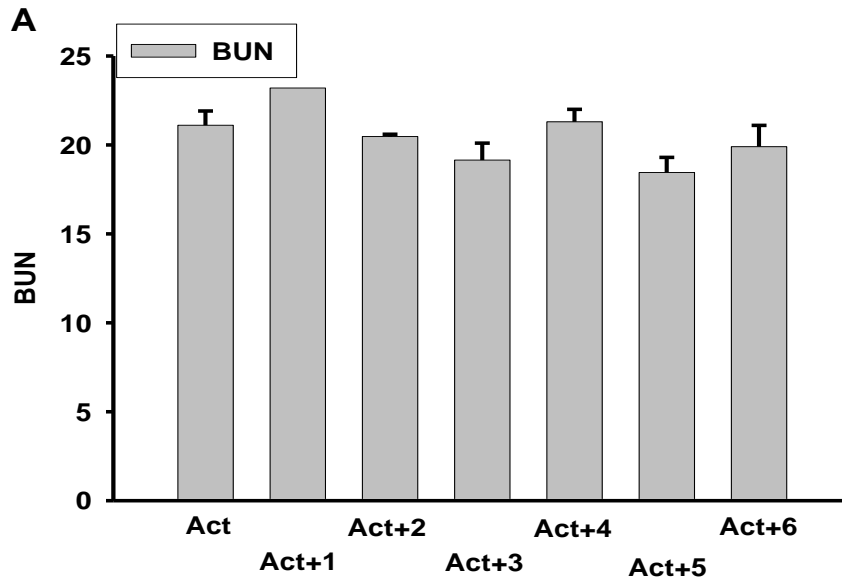
圖三十一、Acetaminophen 併用中藥方劑對血漿中 cholesterol 及 triglyceride(A),HDL 及 LDL(B)和 glucose(C)的影響



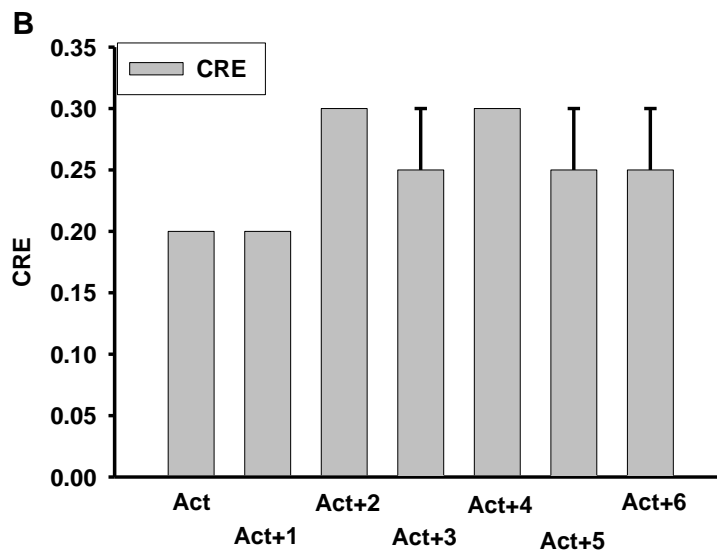
圖三十一之B



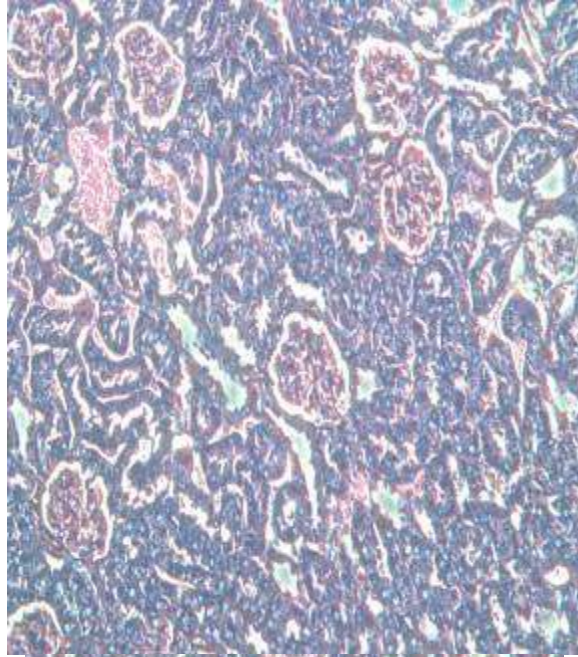
圖三十一之C



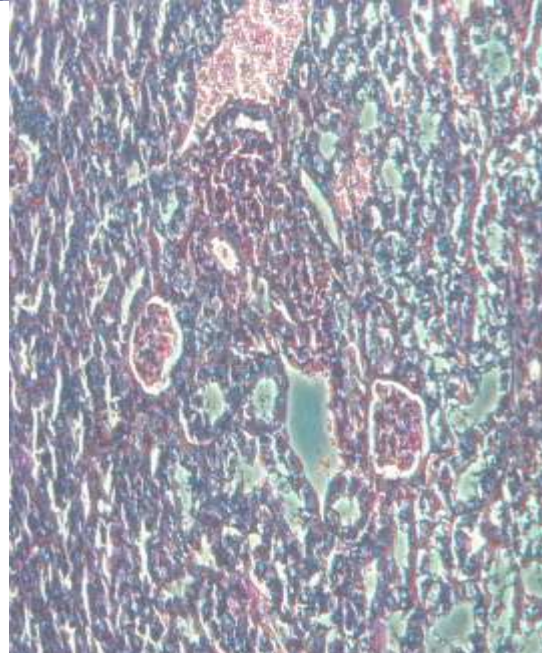
圖三十二、Acetaminophen 併用中藥方劑對血漿中 BUN(A)and creatinine 的影響



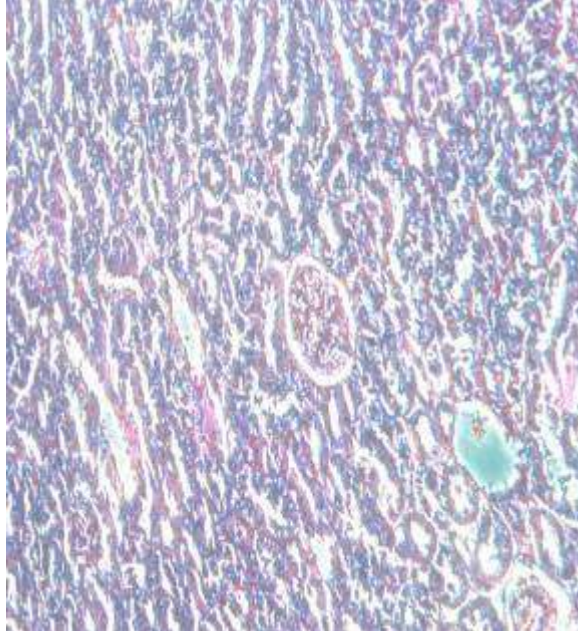
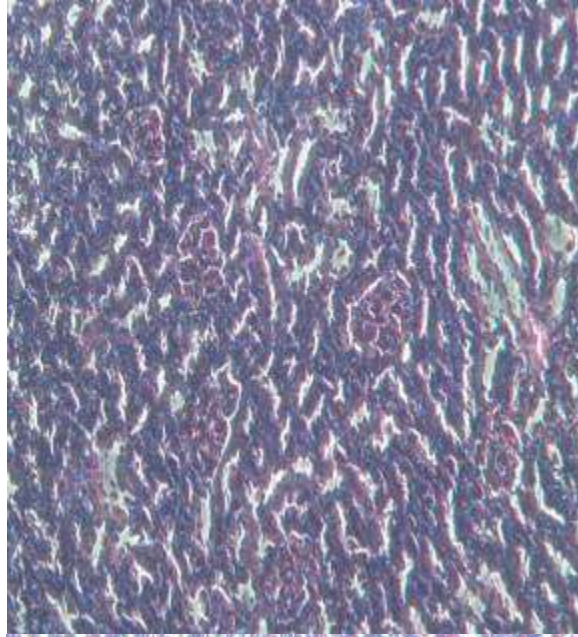
圖三十二 之 B



Control

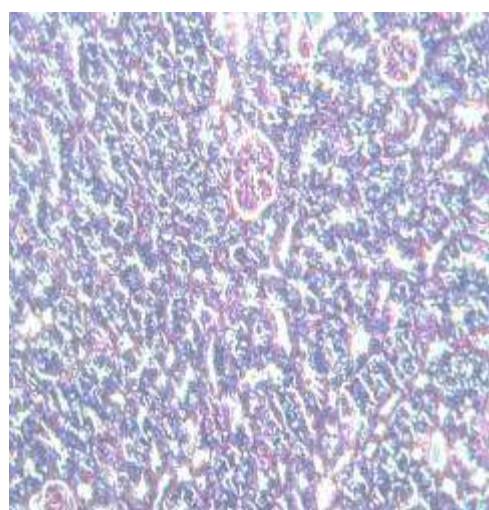


Act

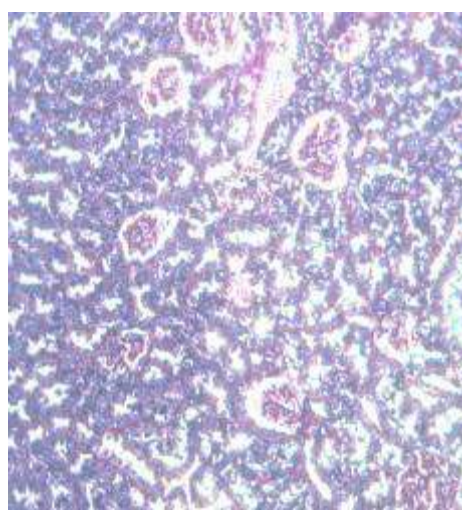


Act+1

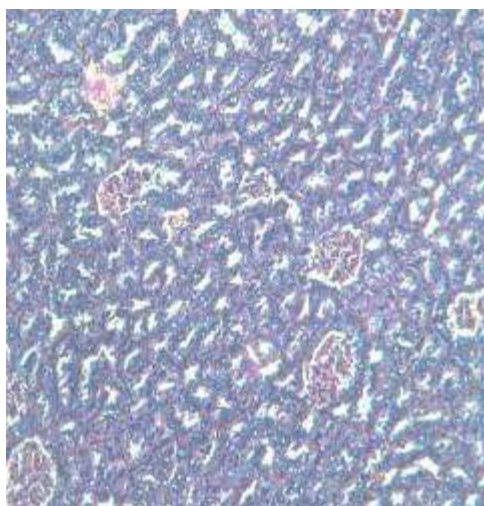
Act+2



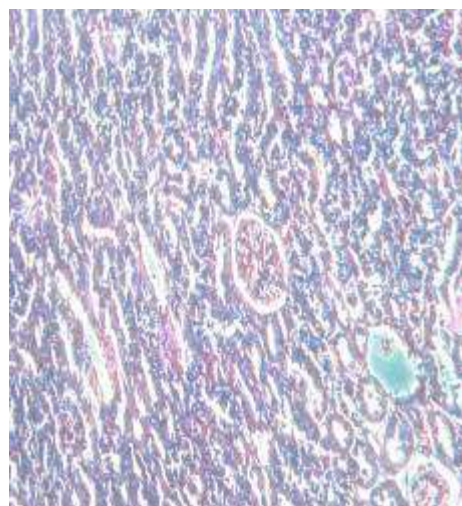
Act+3



Act+4



Act+5



Act+6

圖三十三 Act 單用與中藥方劑並用對鼯鼠腎臟組織的影響。與對照組腎臟組織對比，發現 Act 單用引發 proximal tubules (P.T)細胞破碎不整，細胞間隙有許多+浸潤細胞，近端腎小管有萎縮現象，此現象在 act 與龍肝瀉肝湯(3)並用明顯改善，趨於正常化，與此相反的，act 與血府逐瘀湯並用，加重 P.T 細胞破碎不整，近端腎小管萎縮變小，另外 Act 與疏經活血湯並用(5)腎臟組織之損壞比 act 單用有改善現象，其他三種中藥方劑並用則影響不大。