

編號：CCMP94-RD-039

## 保育類藥材- 熊膽替代藥品對小鼠藥理作用之研究

謝長奇

中國醫藥大學

### 摘 要

陸棲哺乳類野生動物因長久以來民間相信具有療補功效，其皮毛、器官及體肉都成為國人食用的對象，造成強大的獵捕壓力，使族群數量日漸減少，中醫藥界認為部分救命的藥方因此不能處方、調劑，在保護保育類野生動物的前提下，開發其他具有相同或相類似之中藥基源與臨床藥效，以創造保育與醫療雙贏的局面。熊膽調劑於臨床應用上有治療急慢性肝炎、肝腹水、肝硬化、黃疸性肝炎、脂肪肝、膽結石、心臟病、高血壓、腹痛、胃痛、下痢、病毒性咽喉炎、急性扁桃腺炎、喉炎與各種腫痛等，在熊膽列為保育類藥材後而影響其藥材使用後，尋找代用或部分代用之藥品對疾病患者之醫療保健是一項非常有意義的工作。由於兔膽的有效成份較接近熊膽，具有抗驚厥與抗疲勞與鎮咳的作用，對呼吸道過度反應有緩解的趨勢，本研究在探究動物類藥材的取代性研究中，動物類中藥研究學者一致認為，以畜養型動物之藥材取代性較趨近於原藥材，故本研究嘗試使用相進的樣品以作為試驗材料，針對平喘抗發炎等進行試驗。結果顯示，在呼吸道過度反應中，各試驗動物組，經犧牲後熊膽樣品可明顯降低巨噬細胞含量，兔膽樣品高劑量亦可明顯降低巨噬細胞含量。熊膽樣品與兔膽樣品高劑量亦可明顯降低 TNF- $\alpha$  含量。體外試驗顯示熊膽樣品與兔膽樣品均具有明顯抑制 NO 產生與降低誘導發炎激素 TNF- $\alpha$  產生，TNF- $\alpha$  會誘導呼吸道與肺臟等上皮細胞 ICAM-1 與 VCAM-1 等吸附性蛋白質的表現，影響發炎細胞浸潤於呼吸道中，本試驗指出，發炎細胞激素 TNF- $\alpha$  顯著性降低，或許降低了吸附性蛋白質的呈現，進而緩解了發炎細胞的浸潤與呼吸道的過度反應，所以以畜產類動物膽汁作為開發新的藥用資源，值得在未來的研究中繼

續進行探討。

關鍵詞：保育類野生動物、熊膽、免疫調節、抗發炎

Number: CCMP94-RD-039

# **The Replacement of the Conservative Pharmaceutical Medicine - Bear Bile on the Pharmacologic Function in Mice**

Chang-Chi Hsieh

China Medical University

## **ABSTRACT**

Bear is one of the conservation animals, because of the population stress and land capacity, their survival faces the great problem. Committee on Chinese Medicine and Pharmacy, Department of Health want to guidance and assistance the employment to use the replacement drug in traditional medication. Bear bile can anti-inflammation, reduce bronchial construction and immunomodulation. They are used for two purposes. The first is to correct a deficiency in bile acids because of defective biosynthesis or intestinal conservation and thereby to restore bile acid function. This rationale may be termed replacement therapy. The second is to alter the composition of circulating bile acids and thereby to modulate cholesterol metabolism and/or decrease the cytotoxic of the circulating bile acid pool. In this study, we want to use rabbit bile to be the replacement drug of bear bile in these effects. The data present here indicated bear bile and rabbit bile can significant decrease infiltration in macrophage and down-regulated TNF- $\alpha$  and NO expression. In previous study showed that TNF- $\alpha$  can induce ICAM-1 and VCAM-1 presentation. Our data also present lower TNF- $\alpha$  presentation can down-regulated ICAM-1 and VCAM-1 expression to inhibit the inflammatory cells infiltration, and further reduce the hyperresponsiveness. Use rabbit and other farm animal product to replacement the conservation of animal product like bear will be the great idea in conserved policy.

Keywords : wild animal conservation, bear bile, immunomodulation, anti-inflammation,  
bronchial construction

## 壹、前言

陸棲哺乳類野生動物由於人口快速成長和土地持續開發，已使野生動物的棲息環境遭受劇烈改變，嚴重威脅牠們的生存，且大部分哺乳類因長久以來民間相信具有療補功效，其皮毛、器官及體肉都成為國人食用的對象，造成強大的獵捕壓力，使族群數量日漸減少<sup>(1)</sup>。

農委會指出，世界保護動物協會要求中共當局關閉中國大陸兩百多家養熊農場，並禁止囚熊抽取膽汁的殘酷行為。農委會表示，基於動物保護之立場，農委會亦反對大陸方面此一行為。至於台灣動物社會研究會所表示，相較於民國八十年至八十三年間的調查，台灣中藥商販賣熊膽產製品的比例，已從 88.24% 降至九十一年度的 30%，已減少一半以上，亦屬我國政府積極查緝取締不法行為之具體成果。熊膽係屬保育類野生動物產製品，依野生動物保育法第三十五條規定，非經主管機關之同意，不得買賣或在公共場所陳列、展示。根據法務部調查局民國八十四年所進行之國內市售熊膽品鑑定調查結果，其中 67.2% 係以牛、羊、豬等動物膽冒充熊膽者。此外農委會野生動物保護小組九十年查獲到四起合計約四百公克疑似熊膽之違案件，經鑑定其中除極少量(約五公克)為熊膽外，絕大部分均屬豬膽等偽製品<sup>(2)</sup>。

衛生署中醫藥委員會希望輔導業者使用替代品，並於 2002 年八月出版愛護保育野生動物宣導短片<sup>(3, 4)</sup>，對於使用替代藥材來取代保育類野生動物藥材不遺餘力，並於 2003 年補助計畫主持人于“保育類藥材—穿山甲替代藥品對實驗動物泌乳能力、免疫調節與抗腫瘤活性之研究，計畫編號 CCMP92-CT-07”<sup>(5)</sup>，將政策化為行動，研究並探討替代藥材之替代性。中華國醫醫藥協會香港地球人協會的一份報告顯示：目前至少有 54 種草藥具有與熊膽相似的功效，包括：常春藤、蒲公英、菊花、鼠尾草、大黃等。這些草藥作為熊膽替代品，另外免膽的成份與熊膽相近，熊膽汁中的有效成份熊去氧膽酸 1954 年首次在日本成功合成。合成的熊去氧膽酸(從豬牛膽汁中提取，甚至無需從動物身上提取)，是一種沒有副作用的安全藥物。在全世界廣泛用於治療膽結石、原發肝硬化、自身免疫性肝炎、結腸癌等疾病，效果顯著。熊去氧膽酸的藥品名一般為 ursodiol。其商品名在美國有 Actigall, Urso；在英國為：Destolit、Urdox、Ursofalk、Ursogal；在南非為 Ursotan。目前正在進行使用熊去氧膽酸治療慢性 C 型肝炎的臨床試驗。明尼蘇達州大學的斯迪爾教授致

力於使用合成熊去氧膽酸治療亨廷頓氏綜合症。中醫藥界認為部分救命的藥方因此不能處方、調劑，在保護保育類野生動物的前題下，開發其他具有相同或相類似之中藥基源與臨床藥效，以創造保育與醫療雙贏的局面。

熊膽是我國傳統珍貴中藥，具有獨特的醫療價值，是多種中成藥的重要原料。過去熊膽一直依靠“殺熊取膽”的方法，一熊一膽，來源稀少，價格昂貴，滿足不了臨床醫療的需要。活熊引流採膽技術的研製成功，不僅保護了野生熊資源，而且使熊膽這一珍貴中藥資源得到技術開發。使之在醫藥領域得到廣泛應用。熊科動物黑熊經膽囊手術引流膽汁而得的乾燥品即熊膽粉。具有清熱、平肝、明目的功能，用於驚風抽搐。外治目赤腫痛，咽喉腫痛，不良反應少<sup>(6-8)</sup>。

熊膽的主要成份為熊去氧膽酸 (Ursodeoxycholic acid, UDCA)、鵝去氧膽酸 (chenodeoxycholic acid, CDCA)、去氧膽酸 (deoxycholic acid, DCA) 和膽酸 (cholic acid, CA)。這些膽汁酸在熊膽汁中大多與牛磺酸或甘氨酸等形成結合型膽汁酸鹽存在，游離型膽汁酸含量很少。熊膽粉中還有膽色素、粘蛋白、氨基酸、膽固醇、磷脂、無機鹽、微量元素和水分等。膽汁酸是熊膽粉的主要有效成份和生物活性物質，約占熊膽粉重量的 50%-60% 以上 (結合與游離型膽汁酸)。熊去氧膽酸是熊科動物膽汁中特有成份，其他動物膽汁不含有，是熊膽粉真偽鑑別的主要依據。

熊膽的藥理作用包括：鎮靜作用、抗驚厥作用、解熱作用、抑菌作用、利膽作用、溶解膽石作用、抑制血栓形成作用、鎮咳、平喘、祛痰作用、抗發炎與免疫作用、抗疲勞作用、降血脂、降血糖、降血壓作用等。去氧熊膽酸的藥品名一般為 ursodiol。其商品名在美國有 Actigall，Urso；在英國為：Destolit、Urdox、Ursofalk、Ursogal；在南非為 Ursotan。目前正在進行使用去氧熊膽酸治療慢性 C 型肝炎的臨床試驗。現今的臨床使用為治療肝病與利膽 (成人口服，100mg 每日三次)，溶化膽固醇膽結石 (口服，5-10mg/kg/day)，引流熊膽能明顯地抑制二甲苯、巴豆油所致的小鼠耳殼腫脹，抑制小鼠腹腔毛細血管通透性，抑制角叉菜膠所致小鼠足腫脹及 Freund 完全佐劑所致大鼠關節炎，對腎上腺、胸腺、脾臟及淋巴結重量無明顯影響。抑制小鼠棉球肉芽腫增生、抑制小鼠單核巨噬細胞吞噬功能的研究表明，引流熊膽具有抑制急、慢性及免疫性炎症作用和免疫抑制作用。複方熊膽痔瘡膠囊直腸給藥，對角叉菜膠所致大鼠痔瘡模型，具有顯著的消退作用，Goto M *et al.* 於 2001 年的研究

報告指出<sup>(9)</sup>，合成的氨基水楊酸熊去氧膽酸（5-aminosalicylic acid-ursodeoxycholic acid, 5-ASA-UDCA）、鵝去氧膽酸（5-aminosalicylic acid-chenodeoxycholic acid, 5-ASA-CDCA）可有效降低 carrageenan 所引起的腳蹠發炎腫脹的遲發型過敏反應，且在口服狀態下可有效通過胃的消化。Dr. Toro R *et al.*, 於 2000 年的研究報告指出<sup>(10)</sup>，熊去氧膽酸（UDCA）並不會增加胃癌細胞原致癌基因（*c-fos*）的表達，相較於 CDCA 較無致癌性，為臨床試驗中對發炎性腸道疾病（inflammatory bowel disease, IBD）有其治療潛力。

董毅、李孟全等發現<sup>(11)</sup>，兔膽的有效成份較接近熊膽，具有抗驚厥與抗疲勞與鎮咳的作用，對呼吸道過度反應有緩解的趨勢，本研究在探究動物類藥材的取代性研究中，動物類中藥研究學者一致認為，以畜養型動物之藥材取代性較趨近於原藥材，故本研究嘗試使用相進的樣品以作為試驗材料。

熊膽調劑於臨床應用上有治療急慢性肝炎、肝腹水、肝硬化、黃疸性肝炎、脂肪肝、膽結石、心臟病、高血壓、腹痛、胃痛、下痢、病毒性咽喉炎、急性扁桃腺炎、喉炎與各種腫痛等，使用範圍廣泛，在熊膽列為保育類藥材後而影響其藥材使用後，尋找代用或部分代用之藥品對疾病患者之醫療保健是一項非常有意義的工作。

## 貳、材料與方法

### 一、熊膽及兔膽之成分分析方法

標準品:熊去氧膽酸(Ursodeoxycholic acid, UDCA, Sigma U5127) 由 Sigma 公司購得, HPLC 條件為: 移動相為甲醇:0.03 M 磷酸二氫鈉溶液(65:35, pH 4.4), 流速為 1.0mL/min, 以紫外燈(UV 210nm) 於室溫下檢測。

### 二、試驗分組

Group A: 正常對照組

Group B: 呼吸道過度反應造型組, RO 水(10mL/kg)

Group C: 呼吸道過度反應造型, 熊膽(500mg/kg/day) 治療組

Group D: 呼吸道過度反應造型, 兔膽(125mg/kg/day) 治療組

Group E: 呼吸道過度反應造型, 兔膽(250mg/kg/day) 治療組

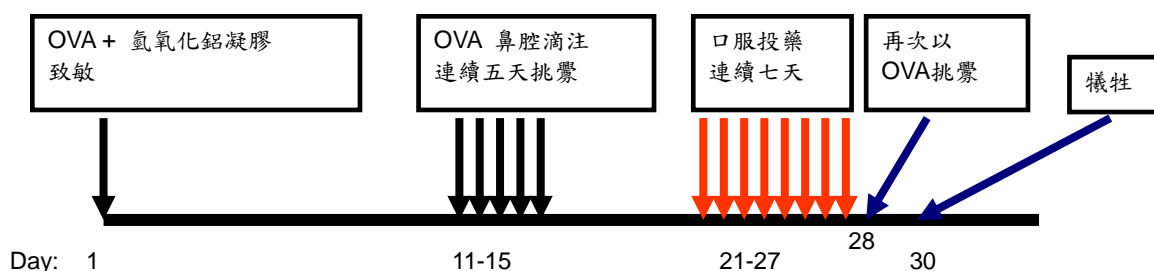
Group F: 呼吸道過度反應造型, UDCA(250 $\mu$ g/kg/day) 治療組

Group G: 呼吸道過度反應造型, Prednisolone(10mg/kg/day) 治療組

### 三、老鼠呼吸道過度反應致敏方式與給藥方式 (Immunization of mice with OVA)

老鼠呼吸道過度反應致敏方式: 在於第 1 天腹腔注射給予 OVA (20 $\mu$ g) 加上氫氧化鋁 2 mg 溶於 40 $\mu$ L 的生理食鹽水中並且在第 11-15 天連續五天予以鼻腔滴注方式誘發氣喘反應, 第 21 天至第 27 天連續給予兔膽與熊膽治療, 最後一次給藥後一小時, 再次以鼻腔滴注方式誘發氣喘反應, 在誘發氣喘反應後一小時, 評估急性期氣喘反應, 老鼠犧牲取下全血, 而沖洗肺泡沖洗液並且把肺臟取下做切片, 控制組腹腔注射使用氫氧化鋁 2mg, 鼻腔吸入使用生理食鹽水(如下圖所示)。





#### 四、肺泡沖洗液分析 (Collection of BAL fluid and lung histology)

小鼠利用乙醚麻醉，使用 1mL 針頭用 400 $\mu$ L PBS 分別三次沖洗肺泡沖洗液，離心 300 $\times$ g，4 $^{\circ}$ C，5 分鐘收集上清液分析細胞激素及抗體，底部細胞使用劉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。

#### 五、脾淋巴球細胞激素分泌分析 (Splenocyte culture and assay for cytokines)

脾臟使用尼龍篩網過篩，將細胞定數為 5 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/mL 使用 25  $\mu$ g/mL OVA，Con A 5 $\mu$ g/mL，LPS 10 $\mu$ g/mL 培養 48 小時，使用 ELISA 三重複測量 IL-4，TNF-alpha and IFN-gamma (eBioscience)

#### 六、免疫球蛋白分析 (Immunoglobulin assay)

測量 OVA 專一性抗體 IgE, IgG1, IgG2 使用 ELISA (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX) 測量，用 96 孔盤 (Nunc, Roskilde, Denmark) 使用 10 $\mu$ g/mL OVA 溶於碳酸鈣緩衝液 (pH 9.6) 中，每一孔加入 100 $\mu$ L 反應 16 小時，再使用 PBS 及，阻斷緩衝液之後，放入檢品 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 當作受質，使用吸光值 450nm ELISA reader (Multiskan, Thermo Labsystems) 去測量結果。

## 七、一氧化氮分析

本試驗利用 Griess reagent 來分析 BALF 與經 LPS 等裂殖原刺激的脾淋巴球上清液之 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>的含量，取用等量的樣品與 Griess reagent 充分混合，於 540nm ELISA reader (Multiskan, Thermo Labsystems) 去測量結果，其中以 sodium nitrite 為製作標準曲線。

## 八、抗發炎試驗

小鼠巨噬細胞株 RAW 264.7 均由食品工業發展研究所購得，並培養於 RPMI 1640 培養液，內含 10%胎牛血清、非必須氨基酸等，培養環境為 37°C 含 5%二氧化碳。試驗以熊膽與兔膽萃取液進行刺激，並分析不同時間點，包括一氧化氮與細胞激素分泌的調節。

## 九、統計分析

數值資料以單因子變異數分析 (One-way ANOVA)，經事後檢定後，分析組間差異，差異顯著性以  $P < 0.05$  表示之。

## 參、結果

### 一、熊膽樣品之成份鑑別

本試驗為確定所取得之樣品為熊膽樣品，以 HPLC 評估熊去氧膽酸，結果顯示，所取得之樣品為熊膽樣品，如圖 1A 所示，熊膽樣品 HPLC 圖譜經比對標準品號證實為熊膽樣品，內含熊去氧膽酸(a)、膽酸(b)與去氧膽酸(c)。B.兔膽樣品 HPLC 圖譜，經比對後有明顯的 a 波峰呈現，但 b 及 c 波峰不顯著。

### 二、肺部沖洗液中各發炎細胞浸潤分析

如圖 2 所示，各試驗動物組，經犧牲後以 HBSS 灌流肺臟並沖出肺洗液(BALF)，以劉氏染色法(Liu's stain)評估巨噬細胞(macrophage)，嗜中性白血球(neutrophil)與嗜酸性白血球(eosinophil)之含量，結果顯示，熊膽樣品可明顯降低巨噬細胞含量( $p<0.05$ )，兔膽樣品高劑量亦可明顯降低巨噬細胞含量( $p<0.05$ )。嗜中性白血球與嗜酸性白血球的數量在熊膽樣品與兔膽樣品的餵食組並無顯著降低。標準品 UDCA 在巨噬細胞含量與嗜中性白血球有顯著性降低( $p<0.05$ )。試驗中正對照組 Prednisolone 在巨噬細胞、嗜中性白血球與嗜酸性白血球有顯著性降低( $p<0.05$ )。

### 三、肺泡沖洗液之 NO 含量以 Griess reagent 測試

如圖 3 所示，各試驗動物組，經犧牲後以 HBSS 灌流肺臟並沖出肺洗液(BALF)，以 Griess reagent 評估 nitrite 含量，經以 sodium nitrite 為標準品定量肺部沖洗液中之 NO 含量，結果顯示，各試驗組並無顯著之變化。

### 四、肺泡沖洗液細胞激素分泌分析

如圖 4 所示，各試驗動物組，經犧牲後以 HBSS 灌流肺臟並沖出肺洗液(BALF)，以 cytokine ELISA kit (eBioscience) 分析，評估 TNF- $\alpha$ 、IL-4 與 IFN- $\gamma$ 之含量，結果顯示，在肺泡沖洗液細胞激素 TNF- $\alpha$ 、IL-4 與 IFN- $\gamma$ 之含量，造型組(OVA)均顯著性( $\#, p<0.05$ )高於負對照組(Naïve)，顯示造型成功。熊膽樣品可明顯降低 TNF- $\alpha$  含量( $p<0.05$ )，兔膽樣品高劑量亦可明顯降低 TNF- $\alpha$  含量( $p<0.05$ )。

IL-4 與 IFN- $\gamma$  的含量在熊膽樣品與兔膽樣品的餵食組並無顯著降低。標準品 UDCA 在 TNF- $\alpha$  有顯著性降低 ( $p < 0.05$ )。試驗中正對照組 Prednisolone 在 TNF- $\alpha$ 、IL-4 與 IFN- $\gamma$  之含量有顯著性降低 ( $p < 0.05$ )。

## 五、血清中 IgG 與 IgE 總量分析

如圖 5 所示，各試驗動物組，經犧牲後採集全血，以 Mouse Immunoglobulin ELISA Quantiation Kit (BETHYL) 分析，評估 IgG 與 IgE 之總量，結果顯示，在血清中 IgG, IgE 總量，造型組 (OVA) 均顯著性 (#,  $p < 0.05$ ) 高於負對照組 (Naïve)，顯示造型成功。熊膽樣品與兔膽樣品及其他試驗組並無顯著的改變。

## 六、血清中 OVA 專一性 sIgG1, sIgG2a, IgE 總量分析

如圖 6 所示，各試驗動物組，經犧牲後採集全血，以 Mouse Immunoglobulin ELISA Quantiation Kit (BETHYL) 分析，以本實驗室自備之 OVA 專一性高濃度血清為對照，評估 OVA 專一性 sIgG1, sIgG2a, IgE 總量，結果顯示，在血清中 OVA 專一性 sIgG1, sIgG2a, IgE 總量，造型組 (OVA) 均顯著性 (#,  $p < 0.05$ ) 高於負對照組 (Naïve)，顯示造型成功。熊膽樣品與兔膽樣品及其他試驗組並無顯著的改變。EU (ELISA unit) 的計算公式如下所示。

$$\text{ELISA units, EU} = (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{positive}} - A_{\text{blank}})$$

## 七、肺組織切片分析

如圖 7 所示，各試驗動物組，經犧牲後肺臟以 10% 中性福馬林固定，再以石蠟包埋進行切片，切片樣品以 HE stain 染色後封片於光學顯微鏡下觀察並拍照記錄，以呼吸道發炎與細胞浸潤之情況，結果顯示，在造型組 (OVA) 中發炎細胞浸潤嚴重，氣道明顯收縮，呼吸道平滑肌增厚，餵食熊膽樣品與兔膽樣品中 (BG500 與 RG250) 氣道較為舒張，呼吸道平滑肌較薄，但發炎細胞浸潤仍嚴重，試驗中正對照組 Prednisolone (PN10) 在發炎細胞浸潤較為減緩。

## 八、體外細胞培養(RAW 264.7)評估 NO 產生

如圖 8 所示，小鼠巨噬細胞株 RAW 264.7 均由食品工業發展研究所購得，並培養於 RPMI 1640 培養液，內含 10% 胎牛血清等，培

養環境為 37°C 含 5%二氧化碳。試驗以熊膽與兔膽萃取液進行刺激，刺激 24 小時後以 LPS 刺激 NO 產生，結果顯示，熊膽樣品於 50µg/mL 有明顯抑制 NO 產生 (\*,  $p < 0.05$ )，兔膽樣品於 100µg/mL 有明顯抑制 NO 產生 (\*,  $p < 0.05$ )。

## 九、體外細胞培養(RAW 264.7)評估 TNF- $\alpha$ 產生

如圖 9 所示，小鼠巨噬細胞株 RAW 264.7 均由食品工業發展研究所購得，並培養於 RPMI 1640 培養液，內含 10%胎牛血清等，培養環境為 37°C 含 5%二氧化碳。試驗以熊膽與兔膽萃取液進行刺激，刺激 24 小時後以 LPS 刺激 TNF- $\alpha$ 產生，結果顯示，熊膽樣品與兔膽樣品於 100µg/mL 有明顯抑制 NO 產生 (\*,  $p < 0.05$ )。

## 肆、討論

熊膽是我國傳統珍貴中藥，具有獨特的醫療價值，是多種中成藥的重要原料。過去熊膽一直依靠“殺熊取膽”的方法，一熊一膽，來源稀少，價格昂貴，滿足不了臨床醫療的需要。熊科動物黑熊經膽囊手術引流膽汁而得的乾燥品即熊膽粉。具有清熱、平肝、明目的功能，用於驚風抽搐。外治目赤腫痛，咽喉腫痛，不良反應少<sup>(6-8)</sup>。目前正在進行使用熊去氧膽酸治療慢性 C 型肝炎的臨床試驗。

熊膽的藥理作用包括：鎮靜作用、抗驚厥作用、解熱作用、抑菌作用、利膽作用、溶解膽石作用、抑制血栓形成作用、鎮咳、平喘、祛痰作用、抗發炎與免疫作用、抗疲勞作用、降血脂、降血糖、降血壓作用等。去氧熊膽酸的藥品名一般為 ursodiol。引流熊膽能明顯地抑制二甲苯、巴豆油所致的小鼠耳殼腫脹，抑制小鼠腹腔毛細血管通透性，抑制角叉菜膠所致小鼠足腫脹及 Freund 完全佐劑所致大鼠關節炎。董毅、李孟全等發現<sup>(11)</sup>，兔膽的有效成份較接近熊膽，具有抗驚厥與抗疲勞與鎮咳的作用，對呼吸道過度反應有緩解的趨勢，本研究在探究動物類藥材的取代性研究中，動物類中藥研究學者一致認為，以畜養型動物之藥材取代性較趨近於原藥材，故本研究嘗試使用相進的樣品以作為試驗材料。在兔膽的替代性藥材試驗中發現，兔膽的鎮靜效果如果以腹腔注射的方式予以小鼠 1.5mg/10g of BW 的條件下，可明顯的達到鎮靜效果 ( $p < 0.001$ )<sup>(12)</sup>，並可增加咳嗽潛伏期的時間與降低每分鐘之咳嗽次數 ( $p < 0.01$ )<sup>(12)</sup>，對抗驚厥的試驗中發現，兔膽可明顯的延長受驚厥的時間 ( $p < 0.01$ )<sup>(11,12)</sup>，另外熊膽汁中的有效成份熊去氧膽酸 1954 年首次在日本成功合成。合成的熊去氧膽酸，在全世界廣泛用於治療膽結石、原發肝硬化、自身免疫性肝炎、結腸癌等疾病，效果顯著，在熊膽列為保育類藥材後而影響其藥材使用後，尋找代用或部分代用之藥品對疾病患者之醫療保健是一項非常有意義的工作。

本研究旨在探討熊膽替代性藥品兔膽在調節動物模式的呼吸道過度反應中所扮演的角色，我們利用 OVA 作為致敏的過敏原，誘導呼吸道過度反應等發炎作用，結果顯示，在呼吸道過度反應中，各試驗動物組，經犧牲後熊膽樣品可明顯降低巨噬細胞含量 ( $p < 0.05$ )，兔膽樣品高劑量亦可明顯降低巨噬細胞含量 ( $p < 0.05$ )。熊膽樣品可明顯降低 TNF- $\alpha$  含量 ( $p < 0.05$ )，兔膽樣品高劑量亦可明顯降低 TNF- $\alpha$  含量

( $p < 0.05$ )。體外試驗顯示熊膽樣品於  $50\mu\text{g/mL}$  有明顯抑制 NO 產生 (\*,  $p < 0.05$ )，兔膽樣品於  $100\mu\text{g/mL}$  有明顯抑制 NO 產生 (\*,  $p < 0.05$ )。以熊膽與兔膽萃取液進行刺激 24 小時後以 LPS 誘導發炎激素 TNF- $\alpha$  產生，結果顯示，熊膽樣品與兔膽樣品於  $100\mu\text{g/mL}$  有明顯抑制 NO 產生 (\*,  $p < 0.05$ )。顯示對發炎作用有明顯的抑制效果，但 IL-4、IFN- $\gamma$  並無明顯的變化，顯示並無顯著性的對於 T 細胞的功能調節，其結果也在血清抗體 IgG，IgE 的含量與 OVA 專一性抗體 sIgE，sIgG1，sIgG2a 並無顯著性的改變中證實其調節作用不佳，但對於發炎細胞浸潤與呼吸道上皮細胞之收縮有顯著性的調節作用，跟據 Anderson JA et al., 於 1996 發表的論文中指出<sup>(13)</sup>，TNF- $\alpha$  會誘導呼吸道與肺臟等上皮細胞 ICAM-1 與 VCAM-1 等吸附性蛋白質 (adhesion molecular) 的表現，影響發炎細胞浸潤於呼吸道中，本試驗指出，發炎細胞激素 TNF- $\alpha$  顯著性降低，或許降低了吸附性蛋白質的呈現，進而緩解了發炎細胞的浸潤，與呼吸道的過度反應，與前人研究中<sup>(11-12)</sup>，對於緩解呼吸道過度反應所造成之咳嗽的現象有進似的功效，且本試驗更深一層的對於發炎物資與發炎細胞的浸潤更深入分析，提供細胞分子生物學的新證據，雖然對於 T 細胞並無顯著性的調節作用，但對於急性期反應有顯著性的功效，在結果中兔膽樣品於高劑量作用亦達顯著性效果，所以以畜產類動物膽汁作為開發新的藥用資源，得到優良的結果，在台灣畜產動物中大型哺乳動物以豬的飼養量最大，雖然在過去的研究中顯示豬膽的藥理作用較低，但如開發其藥用成份之精製，是否可以進一步取代熊膽為新的藥用資源，值得在未來的研究中進行探討。

## 伍、結論與建議

- 一、兔膽樣品可作為在呼吸道過度反應中對於抗發炎作用的取代性藥品。
- 二、熊膽藥品的藥理作用在相關畜產類動物膽汁的功效上極為相近，僅使用量上之差異，進一步應積極開發畜產類動物膽汁作為開發新的藥用資源，並停止使用保育類動物熊膽的使用。
- 三、在畜產檢疫與抗生素殘留把關較為嚴格的前提下，以豬膽作為未來開發較具安全性之動物用藥用資源將是未來研究重點。

## 誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP94-RD-039 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。



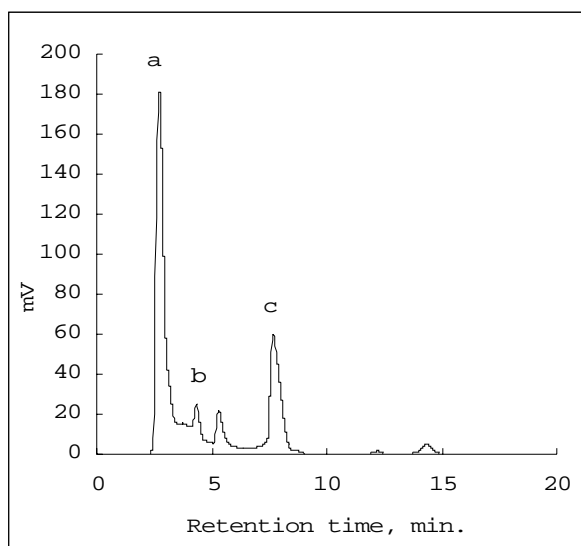
## 陸、參考文獻

1. <http://www.tesri.gov.tw/content4/mammal.htm>
2. 野生動物保育法，中華民國七十八年六月二十三日，總統華總（一）義字第三二六六號令制定公布全文四十五條，中華民國八十三年十月二十九日，總統華總（一）義字第六五二五號令修正公布。
3. 愛護保育野生動物宣導短片—主委篇（錄影帶），行政院衛生署中醫藥委員會，2002，08。
4. 愛護保育野生動物宣導短片—李興文代言篇（錄影帶），行政院衛生署中醫藥委員會，2002，08。
5. 九十二年度中醫藥研究計畫成果報告中英文摘要彙編，行政院衛生署中醫藥委員會，2004，11。
6. 王春青，熊膽的藥理作用與開發利用，當代畜牧，11：35-36，2003。
7. 姜英芝等，熊膽粉的藥用價值，中國林副特產，4：30-31，2004。
8. 李剛峰，熊膽藥理作用研究進展，海峽藥學，14(1)：3-5，2002。
9. Goto M, Okamoto Y, Yamamoto M, Aki H. Anti-inflammatory effects of 5-aminosalicylic acid conjugates with chenodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acid on carrageenan-induced colitis in guinea-pigs. *J Pharm Pharmacol.* 2001 Dec; 53(12): 1711-20.
10. Di Toro R, Campana G, Murari G, Spampinato S. Effects of specific bile acids on c-fos messenger RNA levels in human colon carcinoma Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci.* 2000 Oct; 11(4): 291-8.
11. 董毅、李孟全等，熊膽、兔膽對小鼠藥理作用的研究，牡丹江醫學院學報，18(2)：6-7，1997。
12. 顧賢臣、李美德、常洁琴、崔廣智，兔膽和熊膽的藥效比較，中國中藥雜誌，19(9)：556-558，1994。
13. Anderson JA, Lentsch AB, Hadjiminias DJ, Miller FN, Martin AW, Nakagawa

K, Edwards MJ. The role of cytokines, adhesion molecules, and chemokines in interleukin-2-induced lymphocytic infiltration in C57BL/6 mice. *J Clin Invest.* 1996 Apr 15; 97(8): 1952-9.

## 柒、圖

A



B.

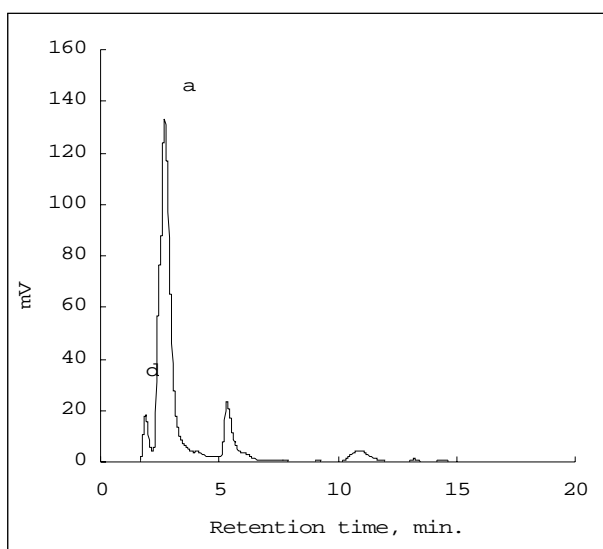


圖1 A. 熊膽樣品 HPLC 圖譜經比對標準品號證實為熊膽樣品，內含熊去氧膽酸(a)、膽酸(b)與去氧膽酸(c)。

B. 兔膽樣品 HPLC 圖譜，經比對後有明顯的 a 波峰呈現，但 b 及 c 波峰不顯著。

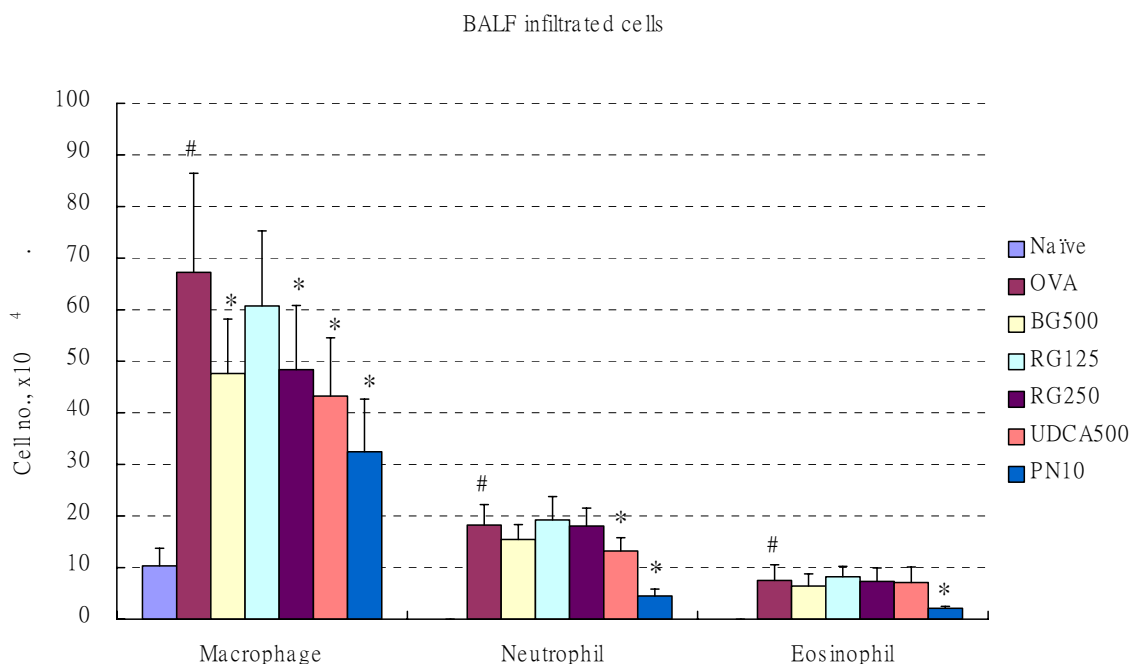


圖 2 肺部沖洗液中各發炎細胞浸潤分析

各試驗動物組，經犧牲後以 HBSS 灌流肺臟並沖出肺洗液 (BALF)，以劉氏染色法 (Liu's stain) 評估巨噬細胞 (macrophage)，嗜中性白血球 (neutrophil) 與嗜酸性白血球 (eosinophil) 之含量，結果顯示，在巨噬細胞，嗜中性白血球與嗜酸性白血球之含量造型組 (OVA) 均顯著性 (#,  $p < 0.05$ ) 高於負對照組 (Naive)，顯示造型成功。熊膽樣品可明顯降低巨噬細胞含量 (\*,  $p < 0.05$ )，兔膽樣品高劑量亦可明顯降低巨噬細胞含量 (\*,  $p < 0.05$ )。嗜中性白血球與嗜酸性白血球的數量在熊膽樣品與兔膽樣品的餵食組並無顯著降低。標準品 UDCA 在巨噬細胞含量與嗜中性白血球有顯著性降低 (\*,  $p < 0.05$ )。試驗中正對照組 Prednisolone 在巨噬細胞、嗜中性白血球與嗜酸性白血球有顯著性降低 (\*,  $p < 0.05$ )。

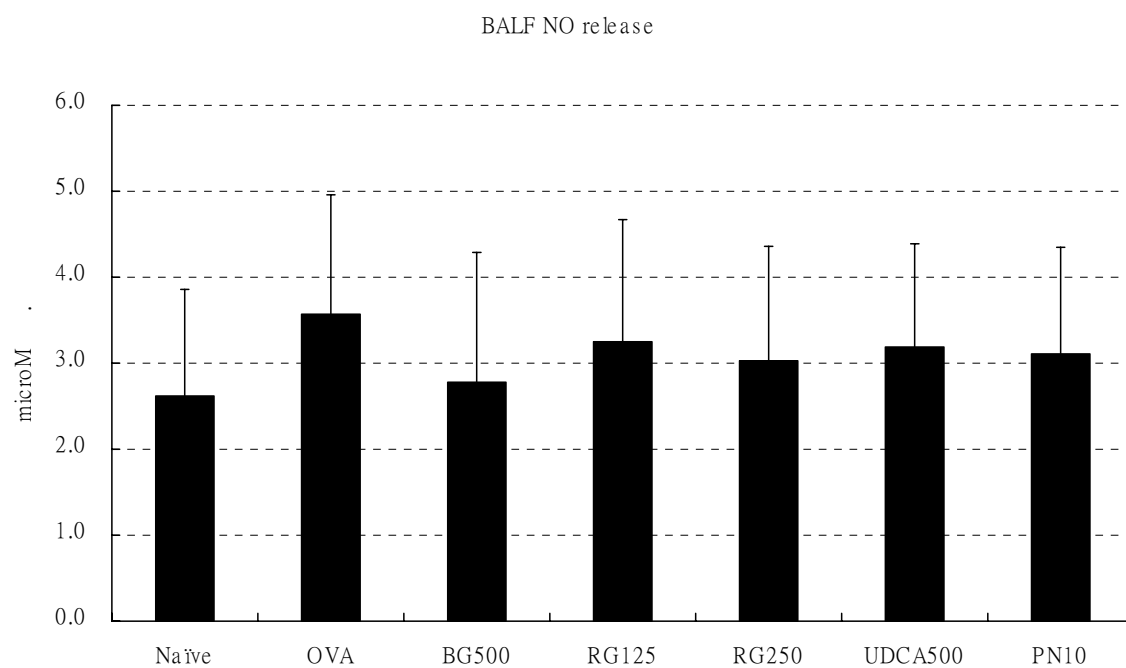


圖 3 肺泡沖洗液之 NO 含量以 Griess reagent 測試

各試驗動物組，經犧牲後以 HBSS 灌流肺臟並沖出肺洗液 (BALF)，以 Griess reagent 評估 nitrite 含量，經以 sodium nitrite 為標準品定量肺部沖洗液中之 NO 含量，結果顯示，各試驗組並無顯著之變化。

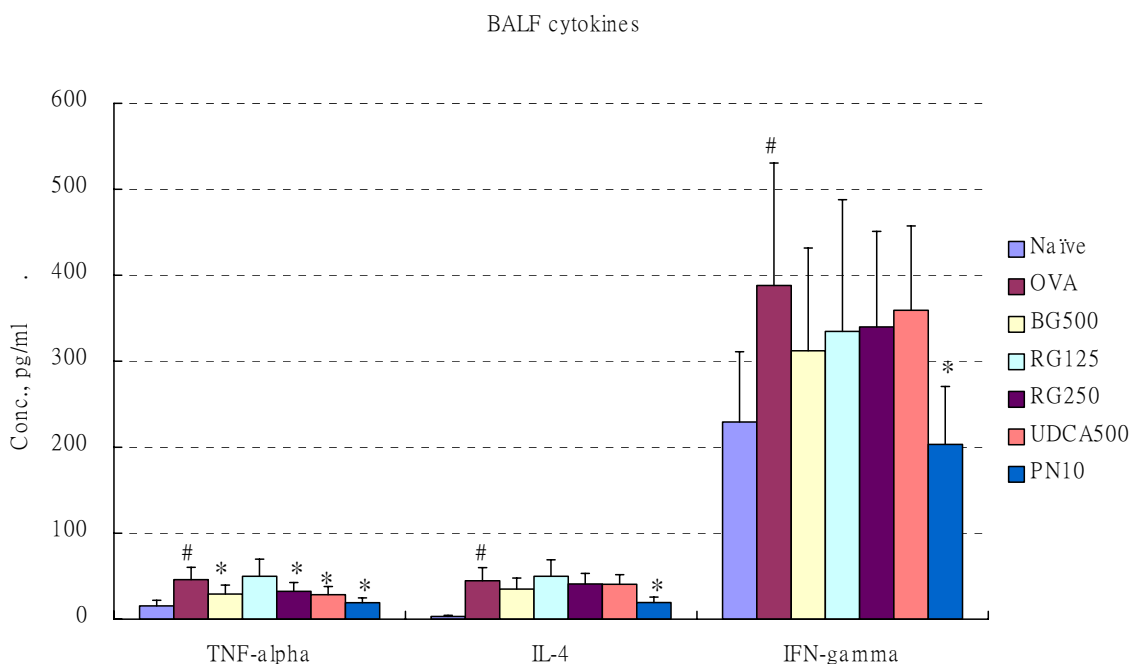


圖 4 肺泡沖洗液細胞激素分泌分析

各試驗動物組，經犧牲後以 HBSS 灌流肺臟並沖出肺洗液 (BALF)，以 cytokine ELISA kit (eBioscience) 分析，評估 TNF- $\alpha$ 、IL-4 與 IFN- $\gamma$  之含量，結果顯示，在肺泡沖洗液細胞激素 TNF- $\alpha$ 、IL-4 與 IFN- $\gamma$  之含量，造型組 (OVA) 均顯著性 ( $\#, p < 0.05$ ) 高於負對照組 (Naive)，顯示造型成功。熊膽樣品可明顯降低 TNF- $\alpha$  含量 ( $p < 0.05$ )，兔膽樣品高劑量亦可明顯降低 TNF- $\alpha$  含量 ( $p < 0.05$ )。IL-4 與 IFN- $\gamma$  的含量在熊膽樣品與兔膽樣品的餵食組並無顯著降低。標準品 UDCA 在 TNF- $\alpha$  有顯著性降低 ( $p < 0.05$ )。試驗中正對照組 Prednisolone 在 TNF- $\alpha$ 、IL-4 與 IFN- $\gamma$  之含量有顯著性降低 ( $p < 0.05$ )。

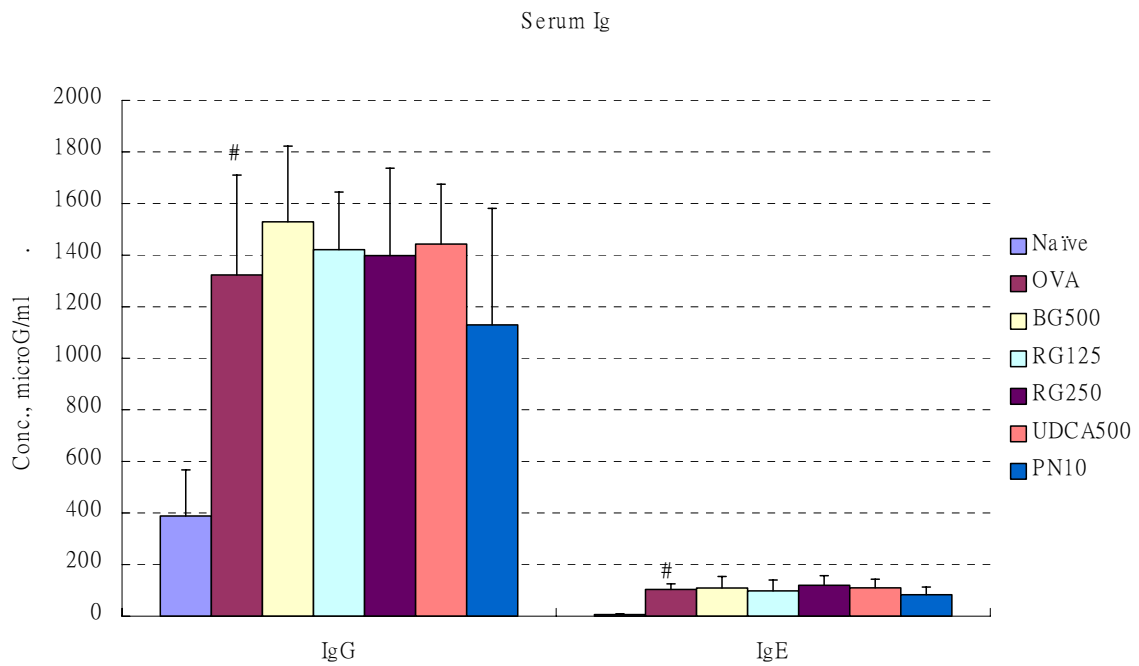


圖 5 血清中 IgG，IgE 總量分析

各試驗動物組，經犧牲後採集全血，以 Mouse Immunoglobulin ELISA Quantiation Kit (BETHYL) 分析，評估 IgG 與 IgE 之總量，結果顯示，在血清中 IgG，IgE 總量，造型組 (OVA) 均顯著性 (#,  $p < 0.05$ ) 高於負對照組 (Naïve)，顯示造型成功。熊膽樣品與兔膽樣品及其他試驗組並無顯著的改變。

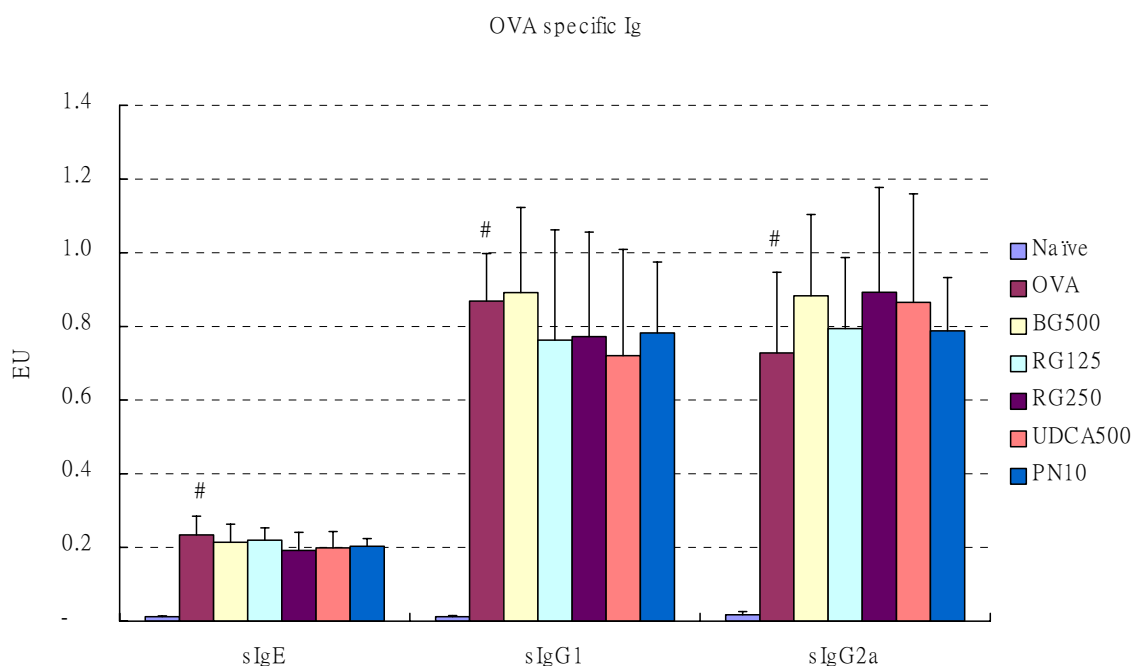


圖 6 OVA 專一性 sIgG1，sIgG2a，IgE 總量分析

各試驗動物組，經犧牲後採集全血，以 Mouse Immunoglobulin ELISA Quantiation Kit (BETHYL) 分析，以本實驗室自備之 OVA 專一性高濃度血清為對照，評估 OVA 專一性 sIgG1，sIgG2a，IgE 總量，結果顯示，在血清中 OVA 專一性 sIgG1，sIgG2a，IgE 總量，造型組 (OVA) 均顯著性 (#,  $p < 0.05$ ) 高於負對照組 (Naïve)，顯示造型成功。熊膽樣品與兔膽樣品及其他試驗組並無顯著的改變。EU (ELISA unit) 的計算公式如下所示。

$$\text{ELISA units, EU} = (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{positive}} - A_{\text{blank}})$$



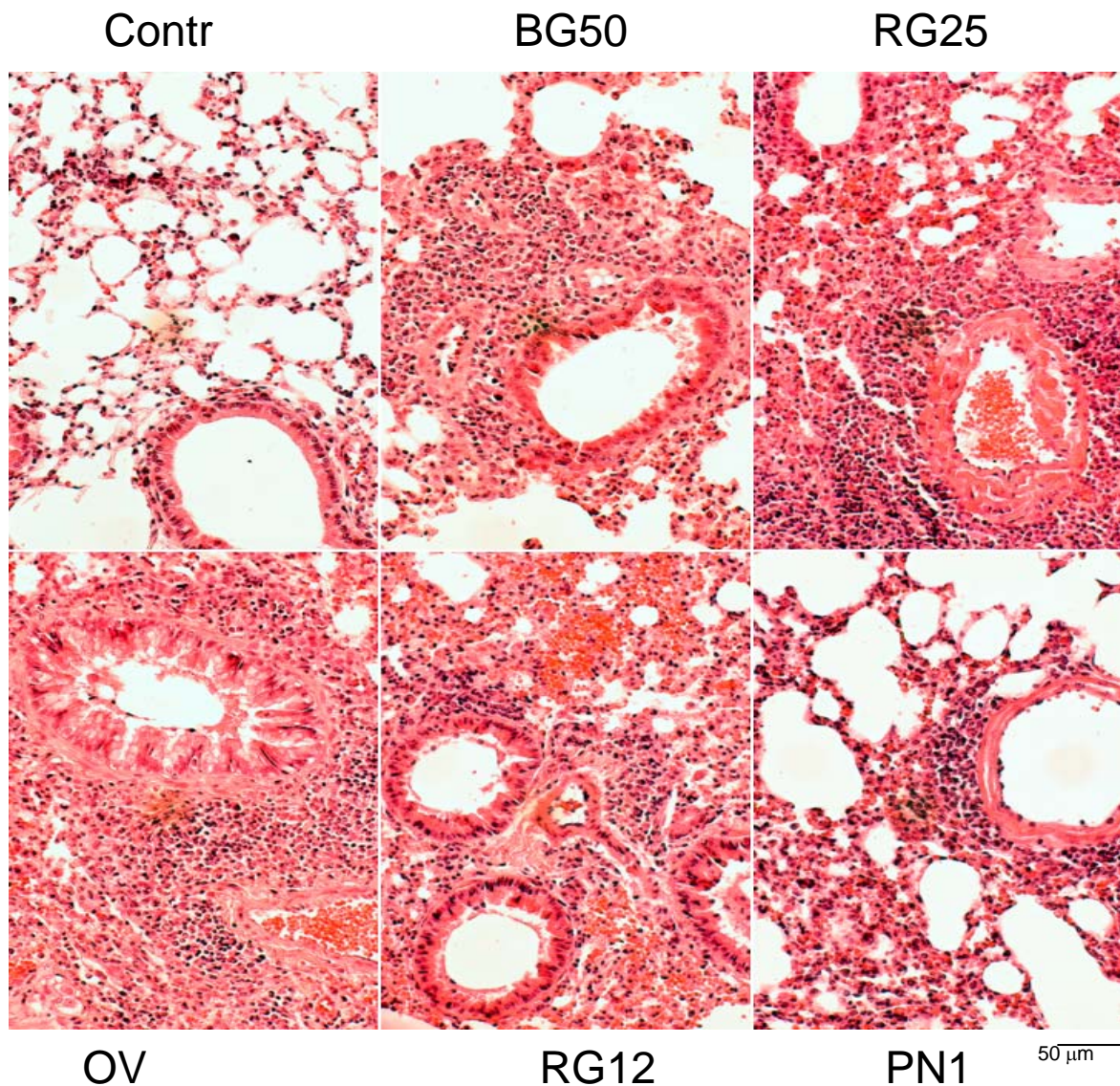


圖 7 肺組織切片分析

各試驗動物組，經犧牲後肺臟以 10% 中性福馬林固定，再以石蠟包埋進行切片，切片樣品以 HE stain 染色後封片於光學顯微鏡下觀察並拍照記錄，以呼吸道發炎與細胞浸潤之情況，結果顯示，在造型組 (OVA) 中發炎細胞浸潤嚴重，氣道明顯收縮，呼吸道平滑肌增厚，餵食熊膽樣品與兔膽樣品中 (BG500 與 RG250) 氣道較為舒張，呼吸道平滑肌較薄，但發炎細胞浸潤仍嚴重，試驗中正對照組 Prednisolone (PN10) 在發炎細胞浸潤較為減緩。

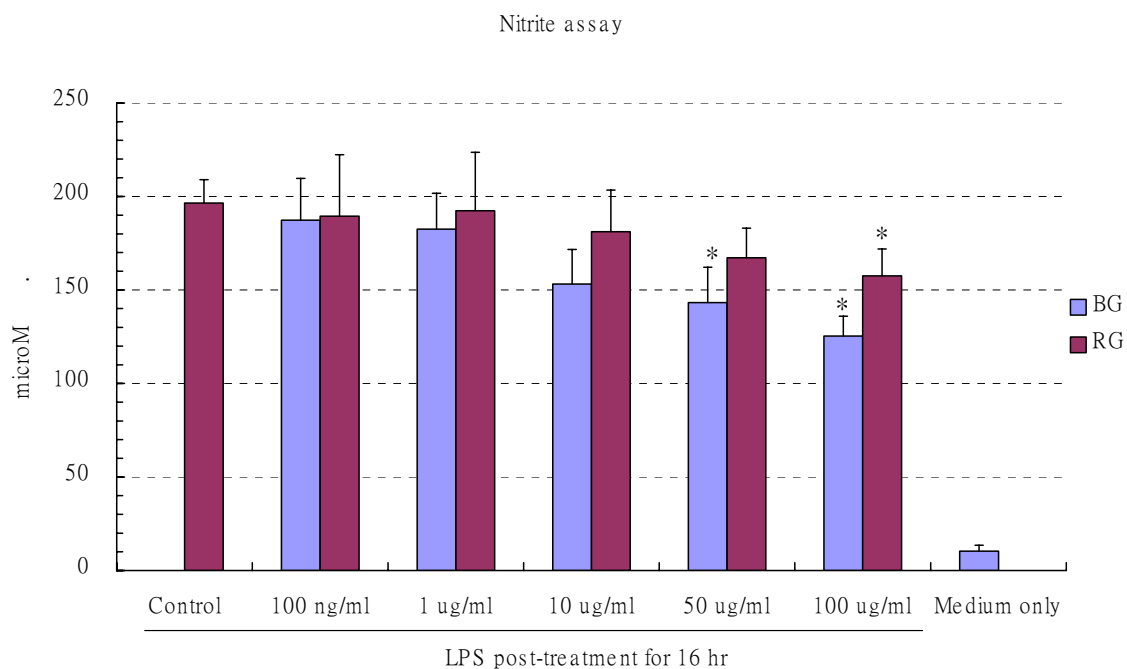


圖 8 體外細胞培養 (RAW 264.7) 評估 NO 產生

小鼠巨噬細胞株 RAW 264.7 均由食品工業發展研究所購得，並培養於 RPMI 1640 培養液，內含 10% 胎牛血清等，培養環境為 37°C 含 5% 二氧化碳。試驗以熊膽與兔膽萃取液進行刺激，刺激 24 小時後以 LPS 刺激 NO 產生，結果顯示，熊膽樣品於 50 $\mu$ g/mL 有明顯抑制 NO 產生 (\*,  $p < 0.05$ )，兔膽樣品於 100 $\mu$ g/mL 有明顯抑制 NO 產生 (\*,  $p < 0.05$ )。

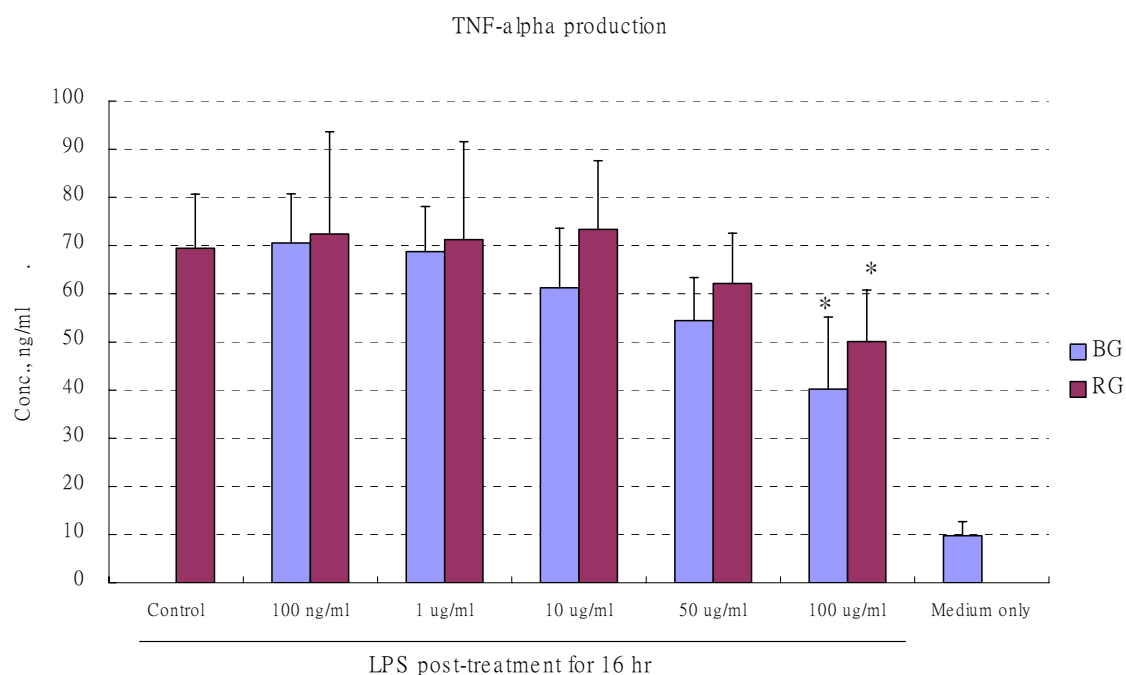


圖 9 體外細胞培養 (RAW 264.7) 評估 TNF- $\alpha$  產生

小鼠巨噬細胞株 RAW 264.7 均由食品工業發展研究所購得，並培養於 RPMI 1640 培養液，內含 10% 胎牛血清等，培養環境為 37°C 含 5% 二氧化碳。試驗以熊膽與兔膽萃取液進行刺激，刺激 24 小時後以 LPS 刺激 TNF- $\alpha$  產生，結果顯示，熊膽樣品與兔膽樣品於 100  $\mu$ g/mL 有明顯抑制 NO 產生 (\*,  $p < 0.05$ )。

