

編號：CCMP94-RD-101

天南星嚴重毒性的評估—— 發展科學方法測定生製及炮製天南星 之藥效、毒性及安全劑量 (2-2)

楊榮森¹、蕭水銀²

國立台灣大學 醫學院骨科¹、國立台灣大學醫學院 藥理學研究所²

摘 要

一、研究主旨

天南星塊莖的味性具有苦、辛、溫、燥烈，藥理作用很強，既能理脾胃濕痰，又善治經絡風痰而解癱。故通治中風痰壅，風痰所致的肢體麻痺、眩暈、驚癇口噤、口眼喎斜等病症，另尚有散血消腫祛痰作用，對腫瘤及外傷瘀腫均有功效。天南星依照其不同炮製方法，常用的有三種，即生南星、制南星（以生薑、白矾等輔料加以炮製）及胆南星（以牛胆汁炮製而成），這些天南星製劑乃是數千年來傳統中醫藥常使用的藥物之一。

有鑒於天南星辛燥而專走經絡，故散風寒，除經絡間之風痰濕之攻捷，專治中風及癲癇引起之風痰，吐逆，頭暈及目眩之症狀不可或缺的重要藥物。但是天南星它又是有毒植物，不當劑量或過度的使用則毒性特強，通常是會產生口腔黏膜糜爛，運動神經末端麻痺，並逐漸影響身體運動中樞，產生驚厥，呼吸不規則，嚴重時，呼吸麻痺而致死。天南星的毒性與其麻辣味有關，而麻辣味又與天南星所含的 Caoxylate 及強心苷有平行關係，經炮製後，毒性成分的破壞與麻味的消除有密切關係。因此發展科學方法來定量天南星的藥效及毒性之間的劑量反應關係，乃是目前急迫等待解決的問題。

二、研究方法

今年的研究項目則是針對在較低計量的使用之下，對於天南星之鎮靜 (sedation)、鎮痛 (analgesia) 及抗腫瘤 (anticancer) 作用等藥理作用及運動經末梢麻痺之毒性作用作更詳盡的探討。針對天南星這些作用我們擬使用：(1) Locomotor activity 用於測量動物活動力是否受到天南星的鎮靜作用而降低。(2) Pentobarbital induced sleeping times 也適用於測量動物否受到天南星的鎮靜作用而延長 sleeping times。(3) 閃尾 (Tail flick) 方法用於定量天南星鎮痛作用。(4) 分別使用 Rota-rod motor activities 及分析腦組織 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性抑制的程度 (專一性的定量強心苷的致毒作用) 來測量運動神經末梢的麻痺作用及強心苷之麻辣味致毒作用。(5) 子宮頸癌細胞 (HeLa cells)、口腔癌細胞 (KB-4) 及鼯鼠巨嗜細胞株 (mouse macrophage cell line-RAW 264.7) 用於評估天南星的抗癌作用及所產生的細胞毒性。

三、結果與討論

(一) 由第二年的研究結果發現

1. 此三種天南星製劑只有生南星 (0.33g/Kg) 有鎮靜作用出現，在餵食後 2 天即出現顯著的作用 (降低自發性運動能力)，且在停藥後 11 天，這些作用仍然無些微恢復的跡象。而生南星在餵食 0.1g/Kg 濃度組在餵食後 3 天鎮靜作用才出現，而隨著停藥時間的增長，鎮靜作用的效果也隨之減弱，在停藥後 11 天幾乎全部回復。
2. 三種天南星製劑稀釋後 (制南星及膽南星劑量-0.33g/Kg，而生南星則分別為-0.33g/Kg 及-0.1g/Kg) 餵食鼯鼠，結果制南星、膽南星(0.33g/Kg)及生南星(0.1g/Kg)有顯著的鎮痛作用，且在停藥後 11 天仍有作用。而生南星在-0.33g/Kg 濃度則是在餵食過程中沒有出現鎮痛作用，而在停藥後 4 天才有鎮痛作用產生且停藥後 11 天作用仍存在。
3. 此三種天南星製劑稀釋後 (制南星及膽南星劑量-0.33g/Kg，而生南星則分別為-0.33g/Kg 及-0.1g/Kg) 對於運動平衡協調作用均無明顯的影響，即對運動神經系統無毒性作用產生。

4. 三種天南星製劑稀釋後（制南星及膽南星劑量-0.33g/Kg，而生南星則分別為-0.33g/Kg 及-0.1g/Kg）餵食鼯鼠一天後，發現制天南星及膽南星製劑會增加血中 NO_x 量，而生南星則是短暫降低血液中一氧化氮（ NO_x ）含量。給藥三天後，則三種天南星製劑均有顯著增加血液中一氧化氮（ NO_x ）含量的跡象，而生南星（0.33g/Kg）則持續到停藥後第 4 天。
5. 三種天南星製劑對於 brain tissue Na^+/K^+ -ATPase 活性抑制效果以生南星的作用最強，其次是製南星，而膽南星的作用最弱。此外，生南星對於紅血球(RBC) Na^+/K^+ -ATPase 活性也有顯著的抑制作用。
6. 三種天南星製劑對於癌細胞的毒殺作用(抗癌作用)均有不錯的效果。由初步的細胞實驗結果我們推估此三種天南星製劑以膽南星抑癌效果較好，且對於正常細胞的毒性作用較小。
7. 生南星所產生的毒性作用可能與 ROS(reactive oxygen species) 有關。

（二）由我們的研究結果發現

天南星的藥效確實，不論是在鎮靜安神方面(抑制自發性運動量、延長 pentobarbital 所誘導睡眠時間增加)、在鎮痛作用上(增加 tail flick 反應時間)或是抗癌作用方面(抑制癌細胞生長，但因經費短缺,無法作 in vivo 研究)。且經過炮製後，確實可見藥效增加而毒性減小，尤以膽南星良。此外，由我們的研究結果推估天南星製劑使用的安全劑量及使用時間:生南星的安全劑量 0.1g/kg, 連續使用三天，而膽南星及制南星則是 0.33g/kg, 連續使用三天。

由我們第二年規劃的實驗所獲得的證據，的確證明天南星在不同炮製方法下，確實能提高藥效及有降低毒性的功效。同時我們所設計的一系列實驗方法及研究的結果，能提供給藥廠在製備過程中能正確且簡便的方法來評估不同炮製的天南星製劑其藥效與毒性。更重要是提供給相關藥政機構查驗及偵測市售成品是否都經正確的炮製操作方法，真正獲得去毒的製劑。

關鍵詞：天南星、藥效及毒性的研究、安全劑量

Number:CCMP94-RD-101

Evaluation of Severe Toxicities of Tien-Nan Shin —Development of Quantitative Methods for Estimation of Pharmacological and Toxicological Effects (safty margin) of the Crude and Processing Preparations (2-2)

Rong-Sen Yang¹, Lin-Shiau S.Y.²

Department of Orthopaedics, National Taiwan University, Medical College & Hospital¹

Institute of Pharmacology, College of Medicine, National Taiwan University²

ABSTRACT

The Chinese traditional drug Tien-Nan Shin (TNS, 天南星) possesses bitter, warm, dry and toxic properties. Its pharmacological effects are potent including sedation, stomachic, expectorant, analgesic, anticonvulsant, anti-coagulation, anti-inflammation, antitumor and enhanced circulation (Gen-Dou, 通經絡). Therefore, its clinical indications are for management of stroke, paralysis, hemiplegia, vertigo, tetanus, cancer etc. However, the specific preparation procedures for removing the toxic components of TNS is especially emphasized. The most frequent used adjuvants for removing toxic components are ginger, aluminum sulfate and bovine bile salts.

The whole plant of TNS is toxic, the intoxication symptoms include mucus membrane necrosis, paralysis of motor nerve terminals and center motor area, convulsion and irregular respiration. The cause of death is respiratory paralysis. Moreover, TNS caused mental retardation in children and impairment of learning in language and movement disorder. It was noted that the degree of numbness

produced by TNS was proportional to its toxicity. The numbness property is probably due to the existence of Ca oxalate and cardiac glycosides. The preparatory procedure by adding the adjuvants (ginger, aluminum sulfate or bile salts) is claimed to be effective in removing the toxic component and diminishing the numbness feeling. However, it is still not reported whether the removal of cardiac glycoside diminished the numbness and other toxicity.

Because of the potent pharmacological effects of TNS, it has become indispensable for management of vertigo, epilepsy, tetanus, stroke, hemiparalysis and cancer for thousand years. However, improper dosage of TNS may lead to serious toxicity. Therefore, the quantitative determinations of safety margin and therapeutic dosage of the different TNS preparations are urgent. In this research project, we aimed at elucidating the efficacy of ginger with aluminum sulfate or bile salts in removal of toxic components. We will compare the pharmacological effects (anticonvulsion, sedation, analgesia and anticancer) and toxic effects (imbalance in motor function and inhibition of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$) of three TNS preparations (crude drug, ginger-aluminum sulfate processing TNS and bile salt treated TNS). The expected results of this research are the determination of pharmacological effective and toxic doses of three different preparations respectively. It will clearly provide the information about the efficacy of the traditional processing procedure for removal of toxic components of TNS and establishing the standardized procedure for processing the crude TNS drug. The safety margin, effective dosage range and the toxic dosage of the three TNS preparations will be obtained.

Results & Discussion

Locomotor activities:

As shown on Fig.1, the spontaneous locomotor activities in the open field were markedly decreased after oral feeding of TNSc (0.33g/Kg and 0.1g/Kg) once everyday for consecutive two and three days. This effect was persistent even after a long periods (11 days for TNSc-0.33mg/Kg) of discontinuous administration. A lower dose of TNSc-0.1mg/Kg still exerted a long lasting effect and recovered after 11days discontinuous administration.

Analgesic effect:

By means of tail flick method, the three kinds of TNSa(0.33g/Kg), TNSb

(0.33g/Kg) and TNSc(0.1g/Kg) exerted prominent analgesic effects. In addition, all TNS (0.33g/Kg) exerted prominent analgesic effects even after a period of 4-11 days discontinuous administration (Fig.2).

Motor coordination performance testing:

As revealed by the retention time on the rotated rod, all kinds of TNSs(TNSa-0.33g/Kg, TNSb-0.33g/Kg, TNSc-0.33g/Kg and 0.1g/Kg) were not significantly influence the retention time on the rotating rod (60rpm), suggesting that neither the functions of the motor nerve nor central equilibrium system or body weight (Fig.5) were impaired by TNS treatment (Fig.3).

Nitric oxide (NO_x) levels of whole blood:

As shown on Fig.4, NO_x levels of whole blood were increased by all kinds of TNS (0.33g/Kg) on day1 and day3 after administration. Blood NO level recovered to the normal range after 4days discontinuous administration (Fig.4). It was noted that the initial dose of TNS at 0.33g/Kg but not at 0.1g/Kg transiently decreased the whole blood NO level, and then persistently increased NO level even after 4 days discontinuous administration.

The Na⁺-K⁺-ATPase activity assay:

As shown on Fig.6, at a concentration of 1 mg/Kg, only TNSc could significant inhibit the Na⁺-K⁺-ATPase activity of brain tissue. Increasing concentration to 2mg/Kg, both TNSa and TNSc but not TNSb markedly inhibited Na⁺-K⁺-ATPase activity. The potency of this effect in order is NSc>NSa>NSb, respectively. We also found that TNSc could also remarkedly inhibited the Na⁺-K⁺-ATPase of erythrocyte membranes (Fig.15).

Conclusion:

The studies carried out in this research program provided the results in supporting our working hypothesis that the safety margin (dose) of TNSc was lower, a dose of 0.1g/Kg for consecutive administration for three days could be tolerated, while the safty margin (dose) of TNSa and TNSb were higher, it was estimated that 0.33g/Kg for three consecutive days was still safe.

Keywords : Tien-Nan Shin(TNS), sedation, analgesia, motor coordination, safty margin

壹、前言

天南星為天南星科 (Araceae) 植物天南星 (*Arisaema consanguineum* Schott) 乃多年生草本植物。天南星的塊莖呈扁球形，高 1-2 cm，直徑 1.5-6.5 cm。表面類白色或淡棕色，較平滑，有的有皺縮，頂端有凹陷的莖痕，周圍有麻點狀根痕，質堅硬，不易碎，斷面不平坦，白色，粉性，氣微，味麻辣。

天南星為常用中藥，始載於《本草拾遺》。《神農本草經》列為下品，以虎掌原名收載，至宋朝《開寶本草》始易名為天南星。歷代醫藥典籍指出天南星主要功效：《本經》：“主心痛，寒熱，結氣，積聚，伏梁，傷筋，痿，拘緩，利水道。”《別錄》：“除陰下濕，風眩。”《藥性論》：“治風眩目轉，主疝瘕腹痛。”《本草拾遺》：“主金瘡傷折瘀血。碎敷傷處。”《本草綱目》“治惊癇，口眼喎斜，喉痹，口舌汪瘡糜，結核，解顛。”而現代研究証明天南星含有化學成分 (三萜皂苷, triterpene saponin; 安息香酸, 澱粉及氨基酸)，具有特異性的藥理作用：

- 一、對中樞神經系統的作用，包含：鎮靜 (sedation) 及止痛 (analgesic) 等作用。
- 二、抗腫瘤 (anticancer) 作用。
- 三、祛痰 (expectorant) 作用。
- 四、對心血管系統作用和清除氧自由基作用。

主要功效是治療中風痰壅，口眼喎斜，半身不遂，癲癇，破風傷，蛇虫咬傷，癰腫，心律不整等疾病。然天南星全株有毒，根、莖等部份都含有有毒的生物鹼及苛辣性毒素。皮膚與之接觸會發生搔癢，而過量中毒的致毒症狀是口腔黏膜糜爛 (mucus membrane necrosis)，甚至部份壞死脫落，咽喉乾燥燒灼感，舌體腫大、口唇水腫，大量流涎，口舌麻木，味覺喪失，聲音嘶啞，張口困難。另外，對神經系統作用產生運動神經系統末梢麻痺，驚厥，呼吸困難而致死、神經智力之發育也有明顯的延緩作用而對於陰虛燥痰及孕婦禁止服用。

天南星炮制後能解毒並增加療效，因此為了提高天南星的藥效及減低毒性，最常用的天南星炮製方法有兩種：

1. 使用炮製輔料：生薑、白矾及甘草等三藥，其解毒機制可能為吸附毒物、改變毒物的理化性質、生理活性及增強機體解毒能力。其中生薑本身有解毒功能，並與天南星有協同功能；白矾 ($Al_2(SO_4)_3$) 在水中離解為氫氧化鋁，氫氧化鋁在水中呈凝膠狀態 (兩性電離)，本身負有電荷，易與天南

星中的有毒成分結合或吸附毒質而降低毒性；而甘草酸具類似活性碳的吸附作用。將此三藥加入天南星，經水浸，炮製，加熱及晒片後的製品，稱制南星，具有提高藥效及降低毒性的作用，以增強燥濕化痰作用，多用於頑痰咳嗽。

2. 膽南星是使用苦寒的牛膽汁製過，使其燥烈之氣大減，性味由辛轉為苦涼，以清化熱痰，息風定惊力強，多用於熱痰咳喘，急風惊，癲癩等症。

然而在文獻上搜索有關測量此三種天南星製劑（生南星，制南星，膽南星）的藥效及毒性的比較研究尚缺，我們認為發展簡易的科學方法，提供給藥廠製備過程中，用於評估其炮製之功效，更重要是提供給相關藥政機構查驗及偵測市售成品是否都經正確的炮製操作方法，真正獲得去毒的製劑。另外，有關天南星製劑之臨床使用的安全劑量，我們想最好也必須有科學方法，使用於精確定性及定量。為此目標，本研究計畫擬於發展三種評估藥效及二種評估毒性的方法，並以此科學方法用於比較研究三種天南星製劑（生南星、制南星、膽南星經由水浸泡後的抽取液）之藥效及毒性，以驗證所使用方法的正確性及其應用的價值。

貳、材料與方法

一、實驗動物

(一) 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。動物室中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。

(二) 材料

本計畫中所使用的天南星, 為天南星科 (Araceae) 植物虎掌天南星 (*Pinellia pedatisecta* Schott)。基源鑑定感謝順天堂生物科技李明宗副總經理及科技研發長莊武璋協助基源鑑定。

本計畫中使用三種不同之天南星製劑制南星 (NSa)、膽南星 (NSb)、生南星 (NSc) 及順天堂生物科技研發長莊武璋所提供不同來源之生天南星 (*Arisaema erubescens* (Wall) Schott), 經由水浸泡一週後的抽取液, 作為本研究之材料。

(三) 實驗方法

我們採用鼯鼠 (ICR mice) 4-6 週大, 以胃管分別餵食不同種類之天南星製劑 (生南星、制南星、膽南星經由水浸泡後的抽取液), 每日一次, 連續 3 天, 並於每天測量鼯鼠體重、鼯鼠自發性運動量、運動協調平衡、閃尾痛覺及血液中一氧化氮 (NO) 濃度等之變化情形。而在連續給藥 3 天後測量天南星製劑對於鼯鼠所產生鎮靜作用 (延長 pentobarbital 誘發睡眠時間之影響) 之評估。並於第 4 天開始停止給藥, 並且分別於停藥後第 4 及 11 天時紀錄鼯鼠體重、自發性運動量、運動協調平衡、閃尾痛覺等之變化情形。

1. 鼯鼠自發性運動量 (spontaneous locomotor activity) 之測定:

運動量之測量是依據我們實驗室之研究方法 (Chuu et al., 2001.) 並參考 Caston et al., 1995. 及 Page et al., 1997. 等人的方法加以修飾。運動量之測定是使用「動物運動量測定裝置」(TruScan photobeam Tracking), 記錄鼯鼠給予不同種類之天南星製劑後 (生南星、制南星、膽南星經由水浸泡後的抽取液)

之各種活動行為的變化(包括水平的走動 (horizontal locomotor)、休息時間 (rest time)、跳躍次數 (jump)、直立修飾性行為 (V-plane entries)、印版行為 (Stpy-1 episodes) 等。鼯鼠在給予不同劑量之天南星後，於不同給藥時間將動物放入裝置內適應 5 分鐘，再開始記錄，觀察並連續記錄 30 分鐘。(每隔 30 分鐘記錄一次 Ambulatory distance、Resting time、V-plane episodes、jumps、stereotypic episodes 等)。實驗時間為上午九時至下午五時，對照組均給予生理食鹽水。

2.鎮靜作用(延長 pentobarbital 誘發睡眠時間之影響)之評估：

ICR 雄性鼯鼠給予不同不同種類之天南星藥物後(生南星、制南星、膽南星經由水浸泡後的抽取液)，於給藥三天後給予鼯鼠腹腔注射麻醉劑 (pentobarbital—50mg/kg)，誘發睡眠。觀察並記錄從注射 pentobarbital 後至鼯鼠直立反射 (righting reflex) 消失之時間 (onset) 及從直立反射消失至恢復之時間 (sleeping time, duration)。對照組給予蒸餾水。

3.運動協調平衡測定：

運動協調平衡的測量是依據我們實驗室之研究方法 (Chuu et al.,2001.) 並參考 Caston et al.,1995.等人的方法加以修飾。運動協調平衡的測定是使用「動物滾輪式運動力測定裝置」(TruScan Rota-rod Tracking)。此裝置是用來記錄鼯鼠在給予不同種類之天南星製劑後(生南星、制南星、膽南星經由水浸泡後的抽取液)，評估天南星對運動神經系統的損傷程度。鼯鼠在給予不同種類之天南星後，於不同時間將動物放在裝置上，以 40 rpms/min 及 60 rpms/min 之轉速，測量並紀錄鼯鼠運動的時間(需重複記錄 2 次)及觀察鼯鼠在滾輪上運動的情形。實驗時間為上午 9 時至下午 5 時，對照組均給予生理食鹽水。

4.閃尾痛覺 (Tail flick reflex) 的測定：

閃尾痛覺測定方法是依據我們實驗室之研究方法 (Chuu et al.,2001.) 並參考 Hara et al.,1999.等人的方法加以修飾。錄鼯鼠在給予不同種類之天南星後(生南星、制南星、膽南星經由水浸泡後的抽取液)，將鼯鼠固定，並給予尾巴熱源刺激(利用放射器將 50 瓦燈泡紅線熱源放大)，紀錄鼯鼠尾巴受

到熱刺激產生痛覺時，閃尾移開熱源刺激之反應時間，以便評估在給予天南星後，對於痛覺反應閾值 (threshold level) 的改變情形，即評估天南星鎮痛作用的效價。實驗時間為上午九時至下午五時，對照組均給予生理食鹽水。

5. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 測定：

依據我們實驗室之研究方法 (Young et al.,2001.) 並參考 Liang et al.,1999. 等人的方法加以修飾。以 ATP 為 substrate，測反應後磷酸 (PO_4^{3-}) 產生的量。以 Malachite green (0.045%)，4.5% Ammonium Molybdate 做為 PO_4^{3-} 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 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activity，因此測得 $\text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ ，另一組沒加 Ouabain 所得的值為 Total $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ ，二者相減即為 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activity，以尋求給予不同種類之天南星後 (生南星、制南星、膽南星經由水浸泡後的抽取液) 對鼯鼠腦組織之 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性所造成之影響。

6. 抗癌作用：

我們將子宮頸癌細胞 (HeLa cell) 培養於 96 孔細胞培養皿中，於細胞貼附後 (12-16 小時)，暴露不同濃度之天南星藥物後，加入 MTT(3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)。MTT 為一黃色染劑，會被活細胞代謝還原成藍紫色 formazan 結晶；使細胞代謝還原成藍紫色結晶後，加入 DMSO 融出結晶成藍紫色，再利用 ELISA reader 測定 570nm 吸光值，最後與未加藥組作比較來評估細胞受到藥物作用後的存活情形。此外，我們也使用口腔癌細胞 (KB-4) 及 RAW-264.7 細胞，利用 Trypan blue exclusion 及 DNA 螢光染劑 PI: Propidium Iodide 進入活細胞中的量評估細胞在給予天南星藥物後對於細胞的毒殺作用，來做為評估細胞存活率的實驗方法。

7. 其他：

我們也分析比較順天堂生物科技李明宗副總經理及科技研發長莊武璋所提供不同來源之生天南星 (*Arisaema erubescens*(Wall) Schott,NScT) 與本實驗中所使用生南星

(*Pinellia pedatisecta* Schott, NSc) 的藥效與毒性反應之差異。我們給予鼯鼠餵食此兩種生天南星(NSc 與 NScT,1g/Kg 及 0.33g/Kg)連續 8 天，分析鼯鼠餵食此兩種生天南星後對於鎮痛作用、鎮靜作用、自由基的產生、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性之影響及對於中樞—腦幹系統(聽力測量)之影響。

8. 實驗數據之統計：

實驗數據以平均值±標準偏差 (Mean±S.E.) 表示，而每組實驗動物數目皆大於 6 ($n>6$)。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。

參、結果與討論

天南星之藥理作用：

天南星具有鎮靜，鎮痛，及抗癌等藥理作用，但不當劑量或過度的使用則會產生不良的毒性作用。因此今年我們的研究項目則是更進一步的針對鎮靜及鎮痛兩種藥理作用及運動神經末梢麻痺之毒性，即使用低劑量(0.33g/Kg)，比較研究三種天南星：生天南星 (NSc)，制天南星 (NSa) 及膽天南星 (NSb) 的藥理作用，以便能求得天南星製劑使用的安全劑量。所得結果如下：

一、鼯鼠活動量 (Locomotor activities)

我們給予鼯鼠餵食三種天南星製劑 (制南星及膽南星劑量-0.33mg/Kg，而生南星劑量則分別為-0.33g/Kg 與-0.1g/Kg)，結果發現只有生南星有鎮靜作用出現，餵食 0.33g/Kg 組在餵食後 2 天即出現顯著的作用 (降低 ambulatory distance，增加 rest time 及 stpy-1 episode，降低 jump 次數及 V-plane episode)，且在停藥後 11 天，這些作用仍然無些微恢復的跡象。而在餵食 0.1g/Kg 組在餵食後 3 天鎮靜作用才出現，而隨著停藥時間的增長，鎮靜作用的效果也隨之減弱，在停藥後 11 天幾乎全部回復 (圖一)。

二、鎮痛作用 (Tail flick analgesic assay)

三種天南星製劑 (制南星及膽南星劑量-0.33mg/Kg，而生南星劑量則分別為-0.33g/Kg 與-0.1g/Kg) 餵食鼯鼠，結果制南星、膽南星及生南星(0.1g/Kg 劑量下)有顯著的鎮痛作用，且在停藥後 11 天仍有鎮痛作用。而生南星-0.33g/Kg 劑量則是在餵食過程中沒有出現鎮痛作用，而在停藥後 4 天有鎮痛作用產生且停藥後 11 天作用仍存在 (圖二)。

三、運動平衡協調作用

三種天南星製劑 (制南星及膽南星劑量-0.33g/Kg，而生南星劑量則分別為-0.33g/Kg 與-0.1g/Kg) 對於運動平衡協調作用均無明顯的影響，即對運動神經系統無毒性作用產生 (圖三)。

四、對血中一氧化氮 (NO_x) 含量之作用

三種天南星製劑 (制南星及膽南星劑量-0.33g/Kg, 而生南星劑量則分別為-0.33g/Kg 與-0.1g/Kg) 餵食鼯鼠一天後, 發現制天南星及膽南星製劑會增加血中 NO_x 量, 而生南星則是短暫降低血液中一氧化氮 (NO_x) 含量。給藥三天後, 則三種天南星製劑均有顯著增加血液中一氧化氮 (NO_x) 含量的跡象, 而生南星 (0.33g/Kg) 則持續到停藥後第 4 天 (圖四)。

五、對體重的影響

三種天南星製劑不論是在較高劑量或是較低劑量, 在實驗期間對於鼯鼠體重變化均沒有影響 (圖五)。

六、對 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影響

有報告指出天南星所含強心苷與其麻辣感及毒性成平行關係, 而強心苷 (cardiac glycosides) 最特異的作用, 乃是抑制神經或心臟的 Na^+/K^+ -ATPase 活性。因此, 我們比較三種天南星製劑對大腦組織 Na^+/K^+ -ATPase 活性抑制作用的大小, 即能定量炮製天南星是否去除致毒成分, 而降低毒性。由圖八的結果發現三種天南星製劑對於 Na^+/K^+ -ATPase 活性抑制效果以生南星的作用最強, 其次是製南星, 而膽南星的作用最弱 (圖六)。由此結果我們得知天南星在經由炮製後毒性有明顯的降低, 尤以膽南星的去毒成分最明顯。

七、天南星製劑對毒殺癌細胞效果之評估

天南星製劑在中醫藥古籍中提到有抗腫瘤 (anticancer) 作用, 且近代中醫臨床使用來治療子宮頸癌, 然而天南星製劑抗腫瘤的詳細作用機轉目前仍未有詳細的研究。我們於本年度的研究中利用子宮頸癌細胞 (HeLa cell)、口腔癌細胞 (KB-4 cell) 及鼯鼠巨嗜細胞株 (mouse macrophage cell line-RAW 264.7) 用於評估天南星的抗癌作用及所產生的細胞毒性。由我們的實驗結果發現: 此三種天南星製劑對於子宮頸癌細胞 (圖七) 及口腔癌細胞 (圖八) 都有明顯的毒殺作用, 且對於鼯鼠巨嗜細胞株的毒殺作用以制南星的毒性較低 (圖九)。由以上初步的實驗結果我們推估此三種天南星製劑以膽南星抑癌效果較好, 且對於正常細胞的毒性作用較小。然而這只是從細胞實驗的結果所得到的結果, 我

們需要再進行更多且更詳細的動物實驗來驗證此推論。由於經費不足，以至於無法再進行更詳盡的動物實驗，因此我們希望明年能夠再獲得中醫藥委員會的資助，來進行天南星製劑抑癌作用的動物實驗。

八、其他

此外，我們也分析比較不同來源之生天南星(*Arisaema erubescens* (Wall) Schott,由順天堂生物科技李明宗副總經理及科技研發長莊武璋所提供(NScT))與本實驗中所使用生南星 (*Pinellia pedatisecta* Schott, NSc) 的藥效與毒性反應之差異。由圖十的結果發現此兩種生南星(NSc 及 NScT)在 0.33g/Kg 與 0.1g/Kg 的劑量下皆有顯著的鎮痛作用出現(圖十)，在餵食鼯鼠第四天時，即有顯著的鎮靜作用(延長 pentobarbital 誘發睡眠時間之影響)且隨著餵食時間的增加而延長(圖十一)，而在實驗過程中並不會影響體重的變化(圖十二)。在餵食此二種生南星(NSc 及 NScT)製劑三天後我們測量鼯鼠的聽力腦幹反應(Auditory Brainstem response, ABR)，結果發現並不會造成鼯鼠聽力閾值(hearing threshold)的增加(圖十三)，即此二種生南星(NSc 及 NScT)製劑不會對中樞-腦幹系統產生損傷作用。我們也於餵食鼯鼠此二種生南星(NSc 及 NScT)製劑第四天及第八天時測量實驗動物 Plasma 脂質過氧化(自由基(ROS))的量及第八天時測量紅血球(RBC) $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性。由實驗結果發現此二種生南星(NSc 及 NScT)製劑皆會造成 Plasma 自由基(ROS)顯著的增加(圖十四)，同時也明顯的抑制紅血球(RBC) $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性(圖十五)。

肆、結論與建議

綜合以上的實驗結果，我們將所獲得的結果整理如下：

- 一、此三種天南星製劑以較低劑量使用下（制南星及膽南星劑量-0.33mg/Kg，而生南星劑量則分別為-0.33g/Kg 與-0.1g/Kg）只有生南星有鎮靜作用出現。生南星餵食 0.33g/Kg 組在餵食後 2 天即出現顯著的降低自發性運動能力（spontaneous locomotor activity）的作用，且在停藥後 11 天，這些作用仍持續，未恢復正常。而在連續餵食 0.1g/Kg 組 3 天後，鎮靜作用才出現，並在停藥後 11 天幾乎全部回復。
- 二、鎮痛作用只有制南星、膽南星-0.33g/Kg 及生南星-0.1g/Kg 劑量下有鎮痛作用出現，且在停藥後 11 天仍有作用。而生南星-0.33g/Kg 劑量則是要在停藥後 4 天(第七天)才有鎮痛作用產生，且停藥後 11 天作用仍存在。此結果顯示生南星內含多種複雜成分，可能有互相拮抗作用，以至經由稀釋或作用時間長久後，另一種有效成分的藥理作用才能出現。
- 三、此三種天南星製劑對運動神經系統並無明顯的影響，即對運動神經系統無毒性作用產生。
- 四、三種天南星製劑對於 Na^+/K^+ -ATPase 活性皆有顯著抑制效果，而抑制的程度為：生南星>製南星>膽南星。由此結果可以明確的推估天南星在經由炮製後毒性有明顯的降低，尤其以膽南星的去毒成分最明顯。
- 五、由我們初步的癌細胞實驗結果，發現三種天南星製劑皆有不錯的抑癌效果，而綜合所有的實驗結果推估以膽南星抑癌效果較好，且對於正常細胞的毒性作用較小。
- 六、不同來源之生天南星(NSc 與 NScT)在 0.33g/Kg 與 0.1g/Kg 的劑量下有顯著的鎮痛作用、鎮靜作用（延長 pentobarbital 誘發睡眠時間之影響）出現，且在短時間使用下(3 天)並不會造成聽力閾值(hearing threshold)的增加(不會對中樞—腦幹系統產生損傷作用)。此外，我們也發現此二種生南星(NSc 及 NScT)製劑皆會明顯的抑制紅血球(RBC) Na^+/K^+ -ATPase 活性，且產生的毒性作用可能與自由基所造成的傷害有關(Plasma 自由基(ROS)顯著的增加)。

由以上的實驗設計及研究項目所得到的研究結果發現：天南星的藥效確實，不論是在鎮靜安神方面(抑制自發性運動量、延長 pentobarbital 所誘導睡眠時間增加)、在鎮痛作用上(增加 tail flick 反應時間)或是抗癌作用方面(抑制癌細胞生長，但因經費短缺,無法作 in vivo 研究)。且經過炮製後，確實可見

藥效增加而毒性減小，尤以膽南星良。此外，由我們的研究結果推估天南星製劑使用的安全劑量及使用時間：生南星的安全劑量 0.1g/kg,連續使用三天，而膽南星及制南星則是 0.33g/kg,連續使用三天。

由我們第二年規劃的實驗所獲得的證據，的確證明天南星在不同炮製方法下，確實能提高藥效及有降低毒性的功效。同時我們所設計的一系列實驗方法及研究的結果，能提供給藥廠在製備過程中能正確且簡便的方法來評估不同炮製的天南星製劑其藥效與毒性。更重要是提供給相關藥政機構查驗及偵測市售成品是否都經正確的炮製操作方法，真正獲得去毒的製劑。

誌謝

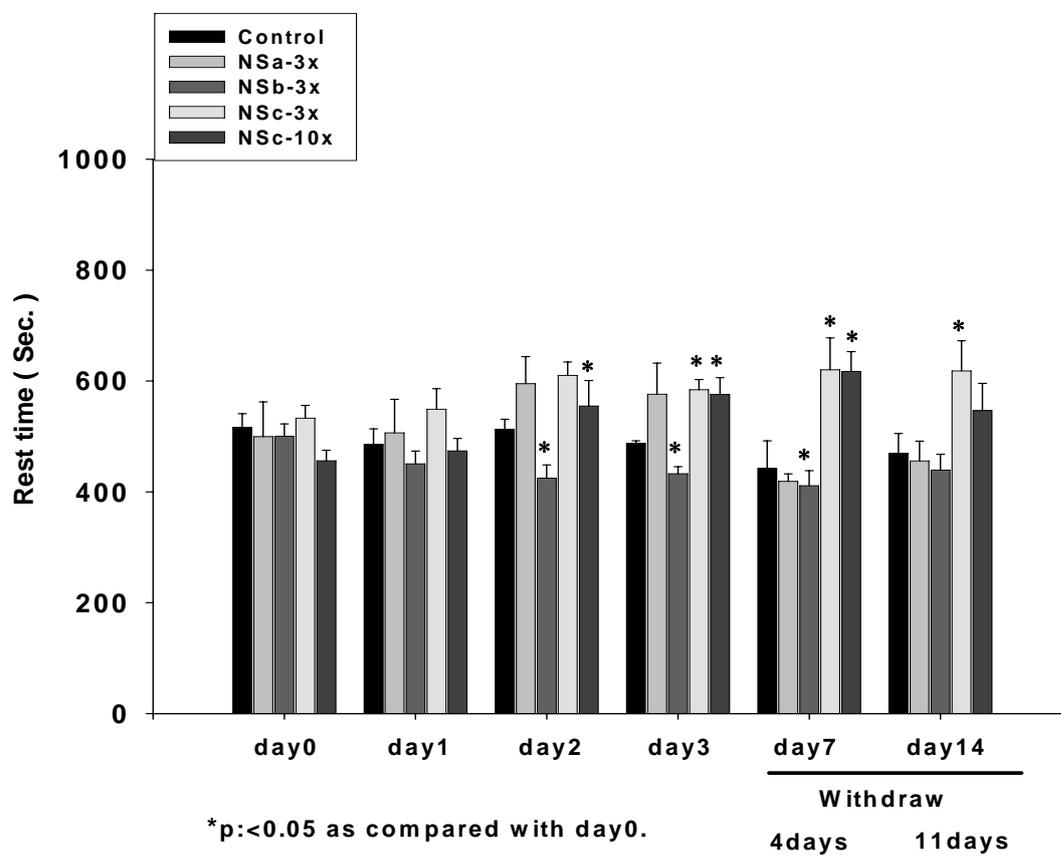
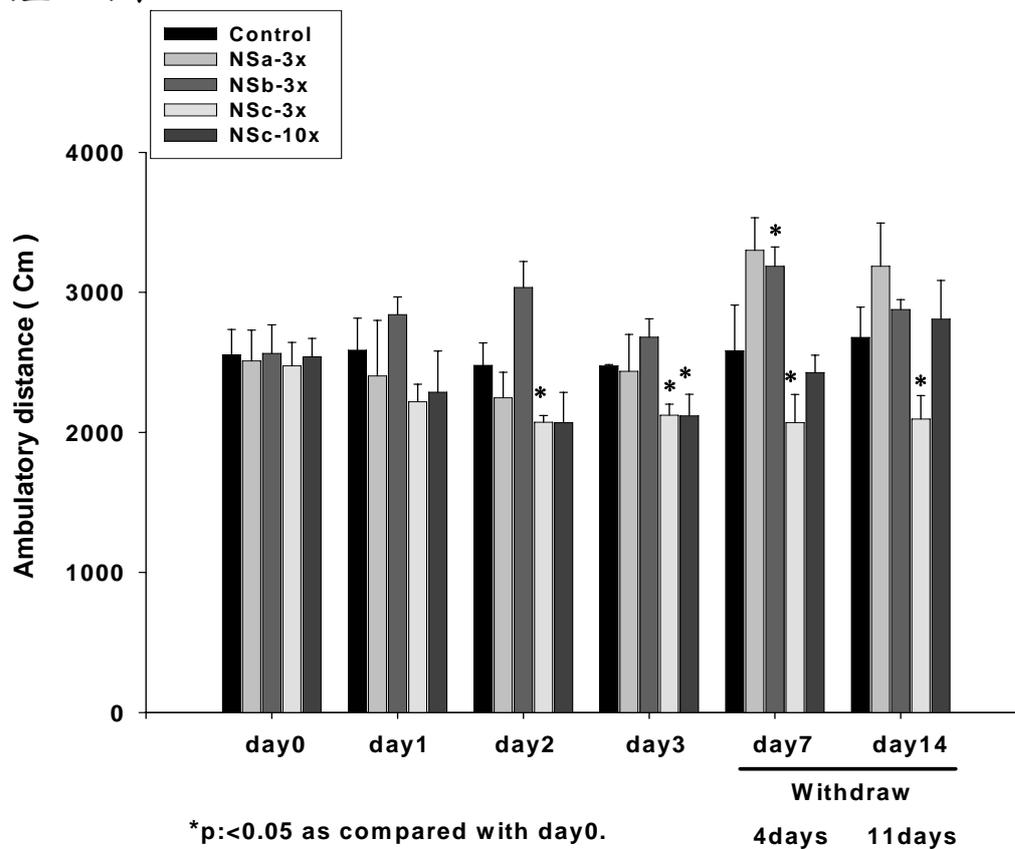
本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會計畫編號，CCMP94-RD-101 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此致謝！

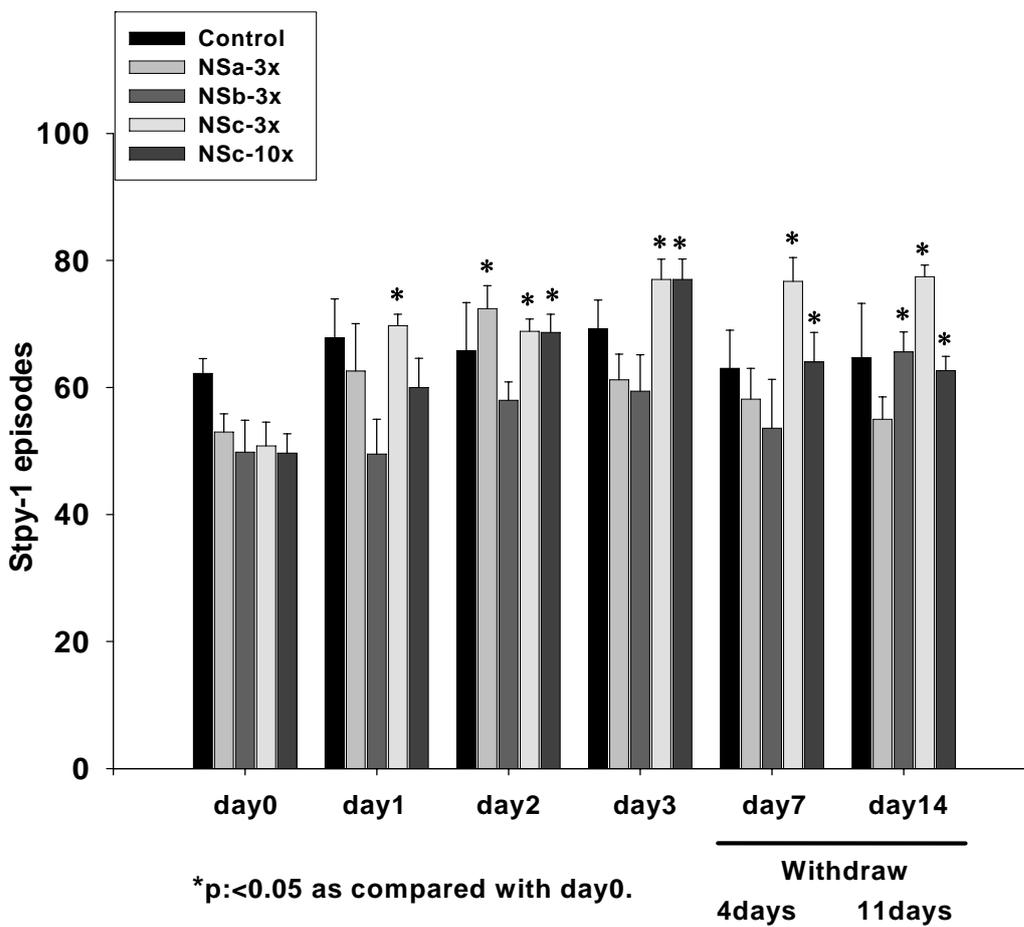
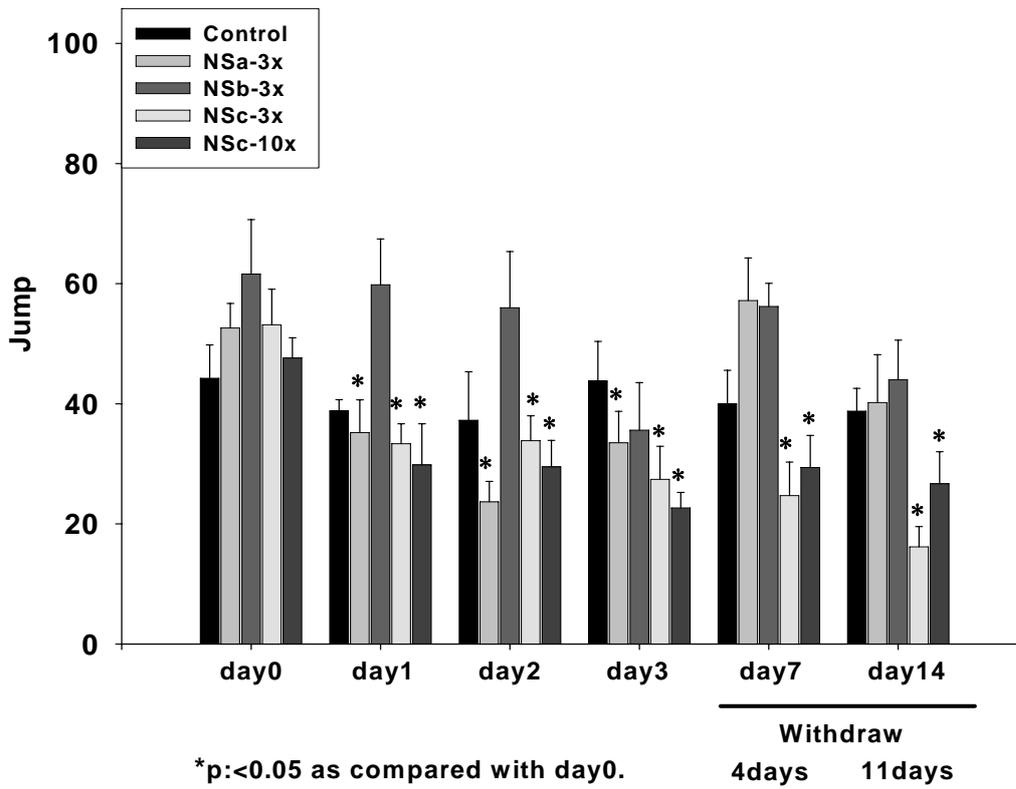
伍、參考文獻

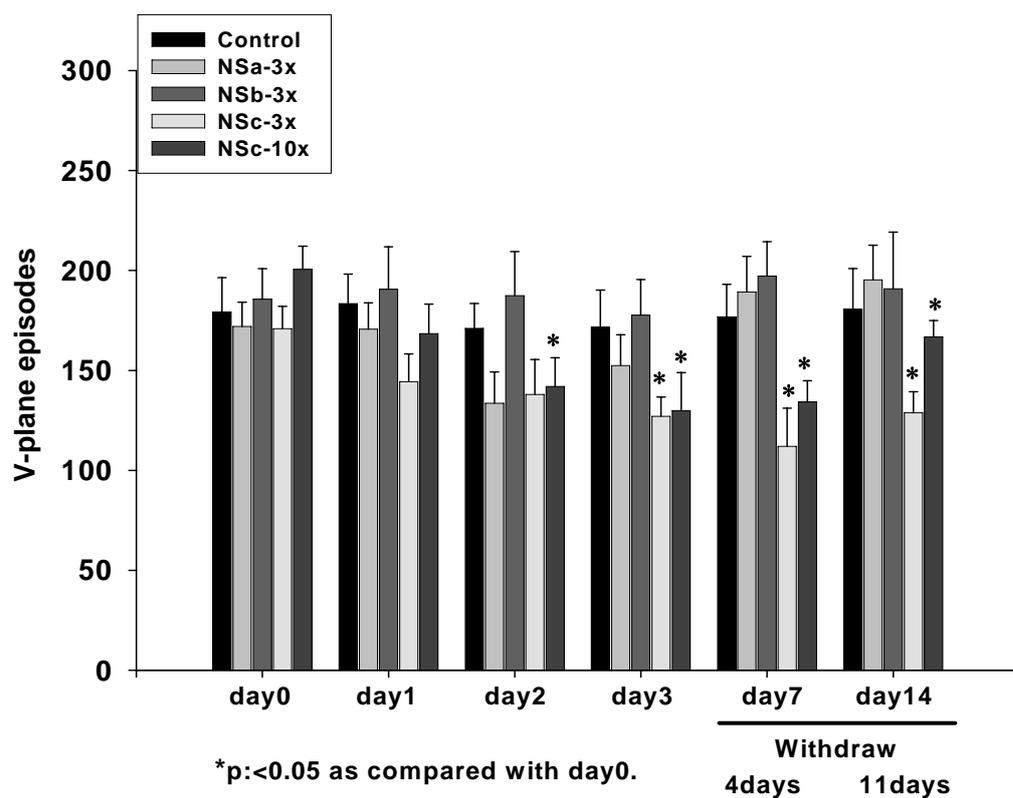
1. 行政院衛生署中醫藥委員會編著，台灣原住民藥用植物彙編，2005。
2. 行政院衛生署編印，中華中藥典，2004。
3. 行政院衛生署中醫藥委員會編著，台灣常用藥用植物圖鑑一至三冊，2002。
4. 許鴻源、陳玉盤、許順吉、許照信、陳建志、張憲昌，簡明藥材學，新醫藥出版社，1985，台北。
5. 唐·蘇敬等，新修本草，聯群出版社，1955。
6. 明·李時珍，本草綱目，人民衛生出版社，1957。
7. Shao Y. Poobrasert O. Ho CT. Chin CK. Cordell GA. An echinocystic acid saponin derivative from *Kalimeris shimadae*. *Phytochemistry*. 43(1):195-200, 1996.
8. 中藥毒理學，第一、二章 中藥毒理學史，啟業書局，台北，1989。
9. 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, 2001.
10. 沈映君主編，中藥藥理學，人民衛生出版社，2000。
11. Jiunn-Jye Chuu, Shing-Hwa Liu, Shoei-Yn Lin-Shiau. Effects of methyl mercury, mercuric sulfide and cinnabar on active avoidance responses, Na^+/K^+ -ATPase activities and tissue mercury contents in rats. *Proceedings of the National Science Council*. 25,128-136, 2001.
12. 張貴君主編，現代中藥材商品通鑑，中國中醫藥出版社，2001。
13. Jiunn-Jye Chuu, Chuan-Jen Hsu, Shoei-Yn Lin-Shiau. Abnormal auditory brainstem responses in mice treated with mercurial compounds: Involvement of excessive nitric oxide. *Toxicology*. 162,11-22,2001.
14. 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.
15. 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.*67, 256-263, 2001.
16. 鄭虎占等主編，中藥現代研究與應用（第一卷），學苑出版社，1997。
17. Yen, C.C., Liu, S.H., Chen, W.K., Lin, R.H., and Lin-Shiau, S.Y.: Tissue distribution of different mercurial compounds analyzed by the improved FI-CVAAS. *J. Anal. Toxicol.*: Aug. 2002.

18. Matsuda H, Li Y, Yamahara J, Yoshikawa M. Inhibition of gastric emptying by triterpene saponin, momordin Ic, in mice: roles of blood glucose, capsaicin-sensitive sensory nerves, and central nervous system. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*. 289(2):729-34, 1999.
19. 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。
20. 李家實主編，中藥鑑定學，上海科學技術出版社，1996。
21. 中藥毒理學，第一、二章，中藥毒理學史，啟業書局，台北，1989。
22. Liang, M. and Knox, F.G. Nitric oxide activates PKC α and inhibits Na⁺-K⁺-ATPase in opossum kidney cells. *Am J Physiol*. 277: F859-65, 1999.
23. 冉懋雄等主編，現代中藥栽培養殖與加工手冊，中國中醫藥出版社，1999.
24. http://nricm2.nricm.edu.tw/pages/show.php?qry_dtnbr=28&qry_dsnbr=230(國立中國中醫藥研究所)。
25. 凌一揆、顏正準編著，中藥學，上海科學技術出版社，1984。
26. 雷載權主編，中藥學，上海科學技術出版社，1995。
27. 江金德，中藥科學藥性大辭典，大眾書局，台北，1991。
28. Victor J. Johnson, Sang-Hyun Kim, and Raghbir P. Sharma. Aluminum-Maltolate Induces Apoptosis and Necrosis in Neuro-2a Cells: Potential Role for p53 Signaling. *Toxicological Sciences*. 2005;183, 329-339.

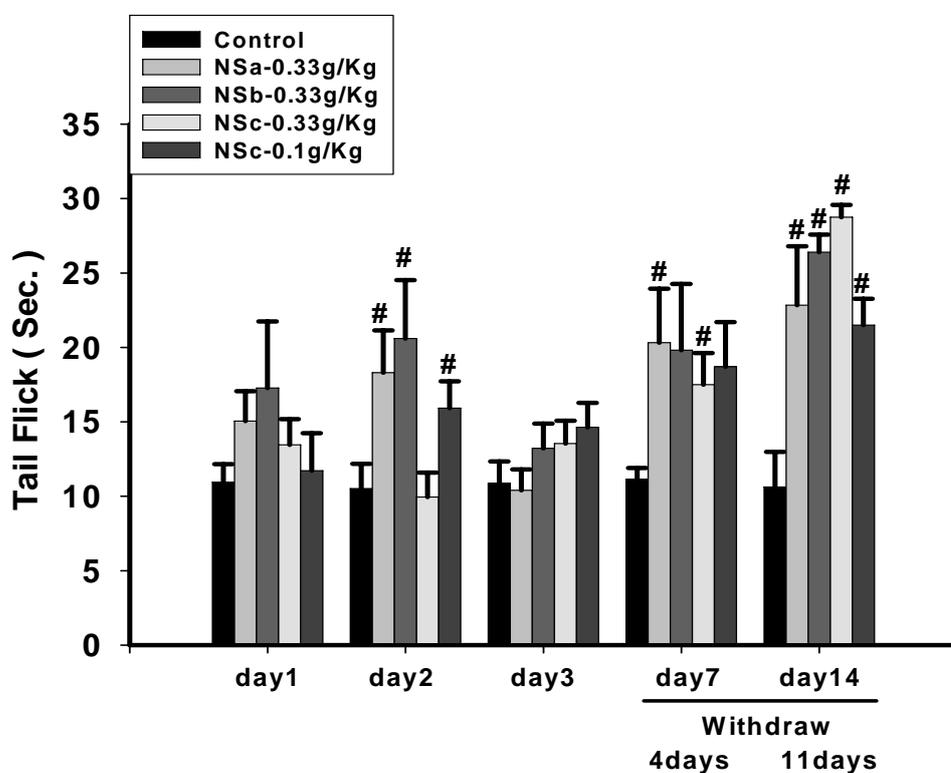
陸、圖



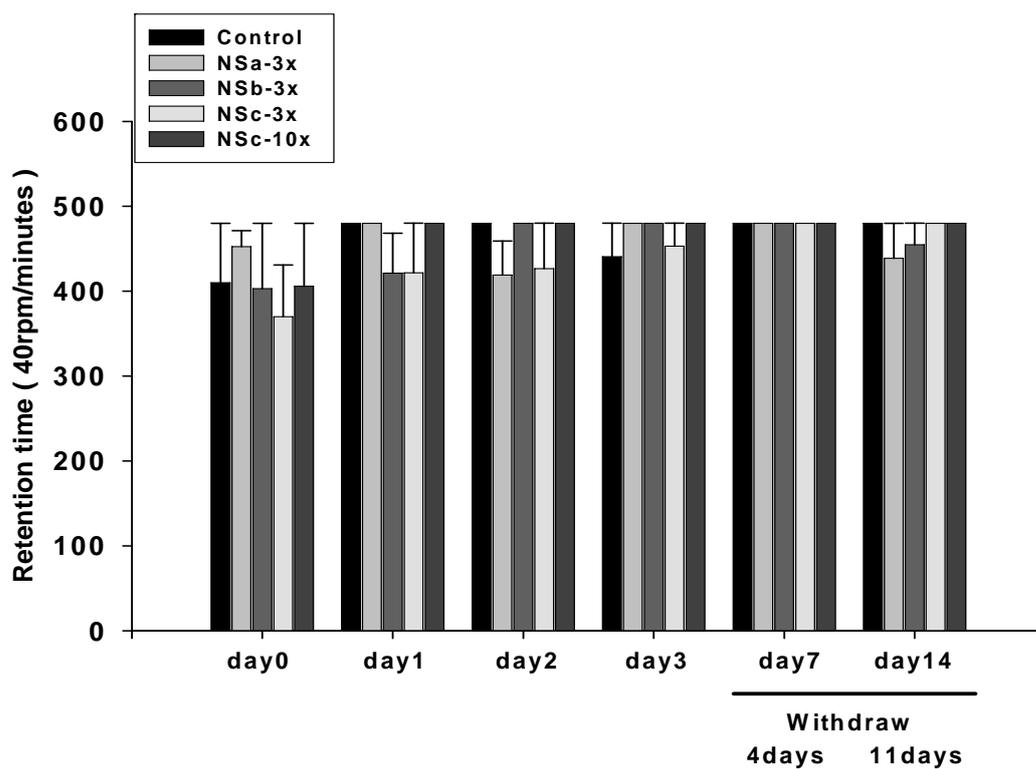




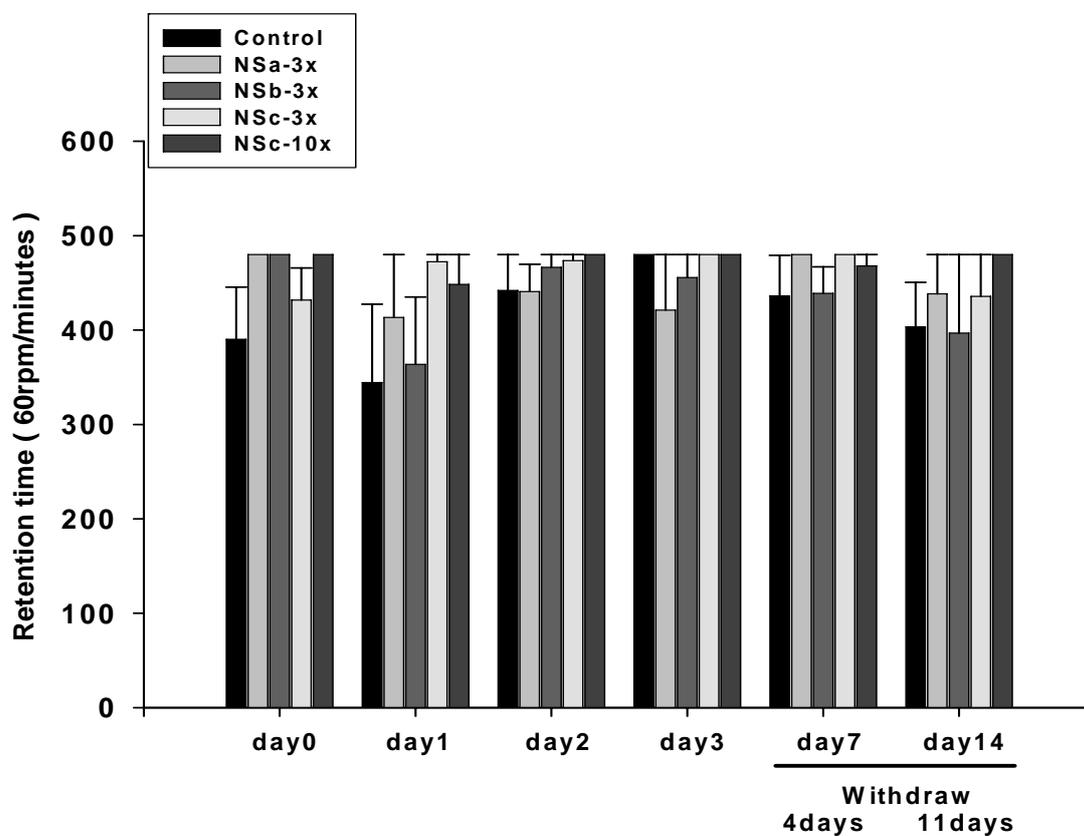
圖一 三種較低劑量天南星製劑對鎮靜作用鼯鼠活動量 (Locomotor activities) 之影響



圖二 三種天南星製劑對鼯鼠鎮痛作用 (Tail flick analgesic assay) 之影響

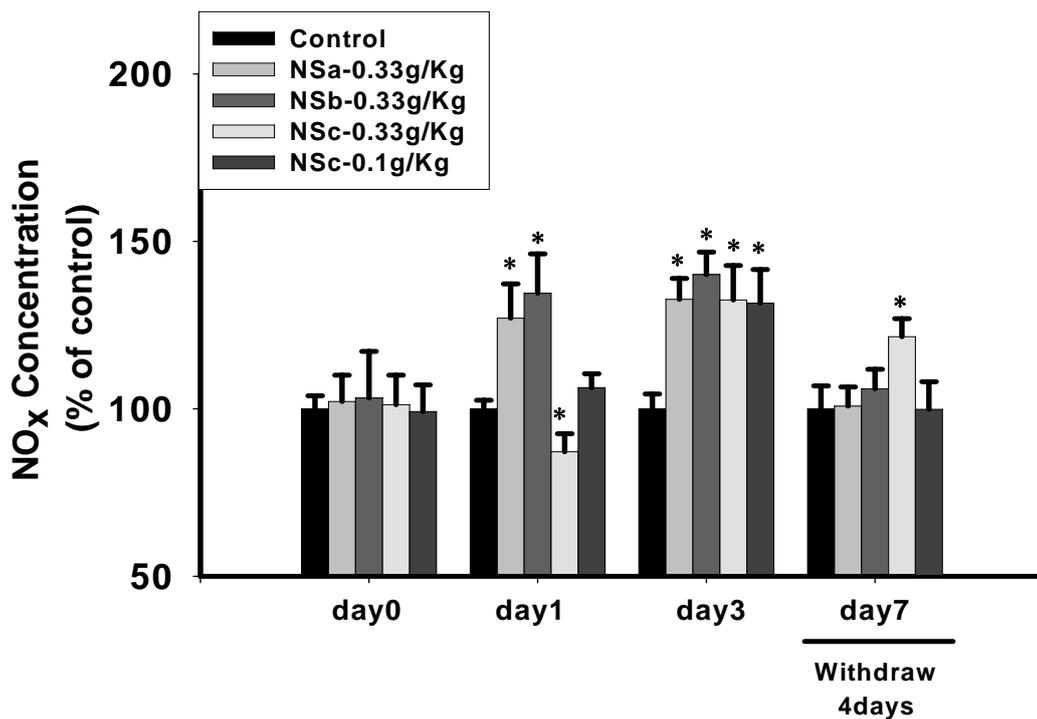


(圖三-A)

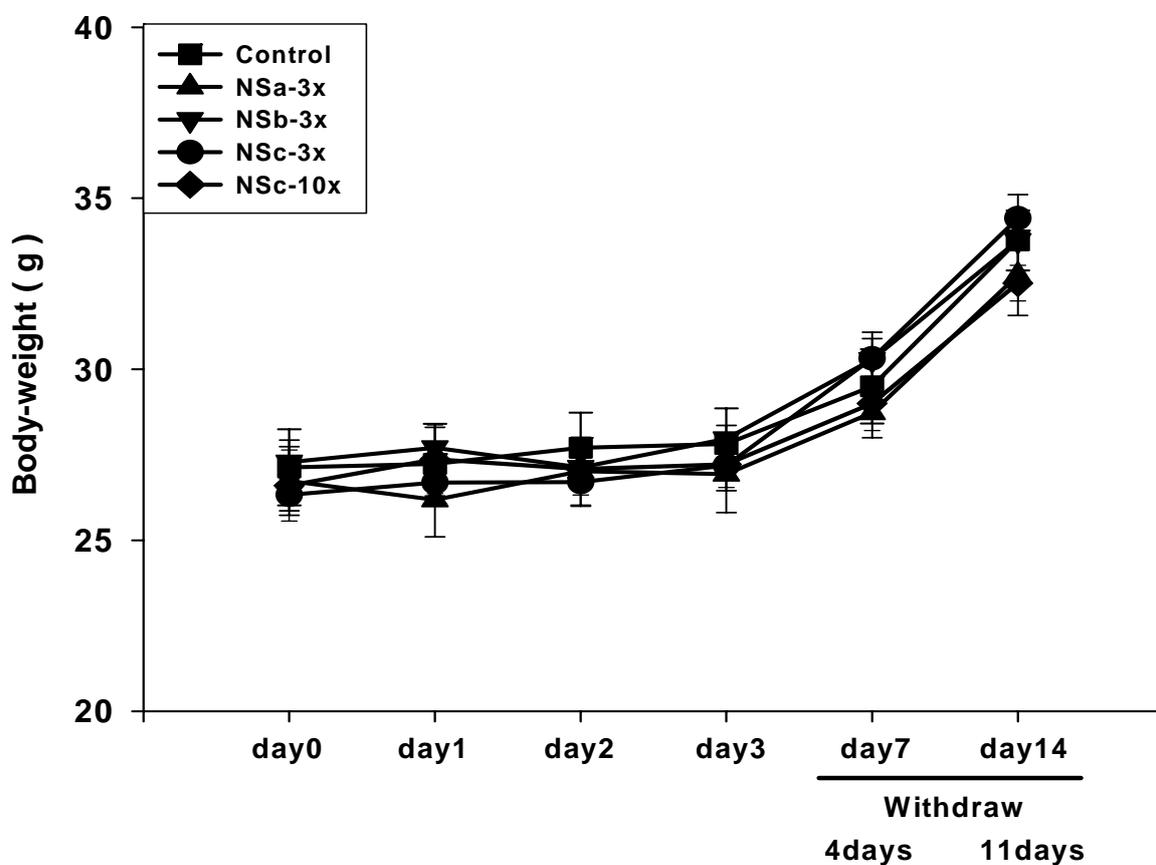


(圖三-B)

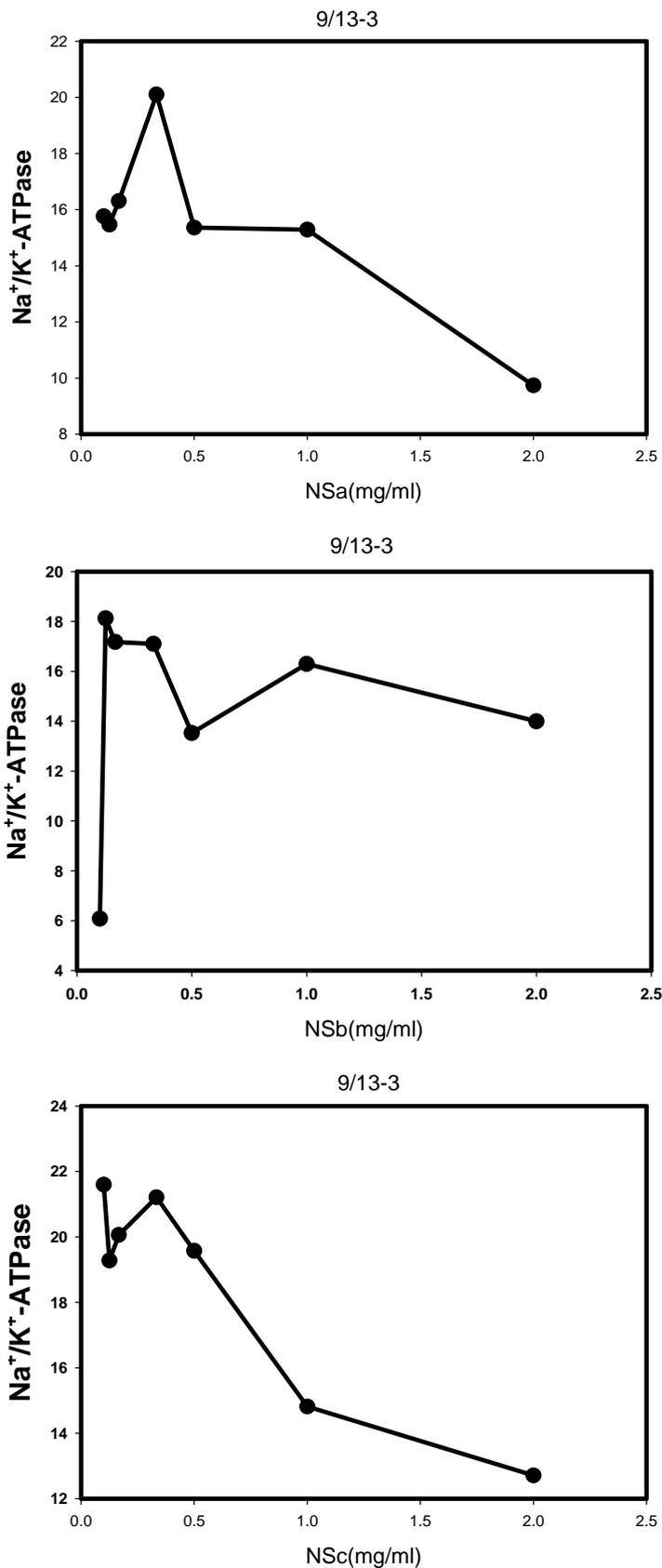
圖三 三種天南星製劑對鼯鼠運動平衡協調作用之影響



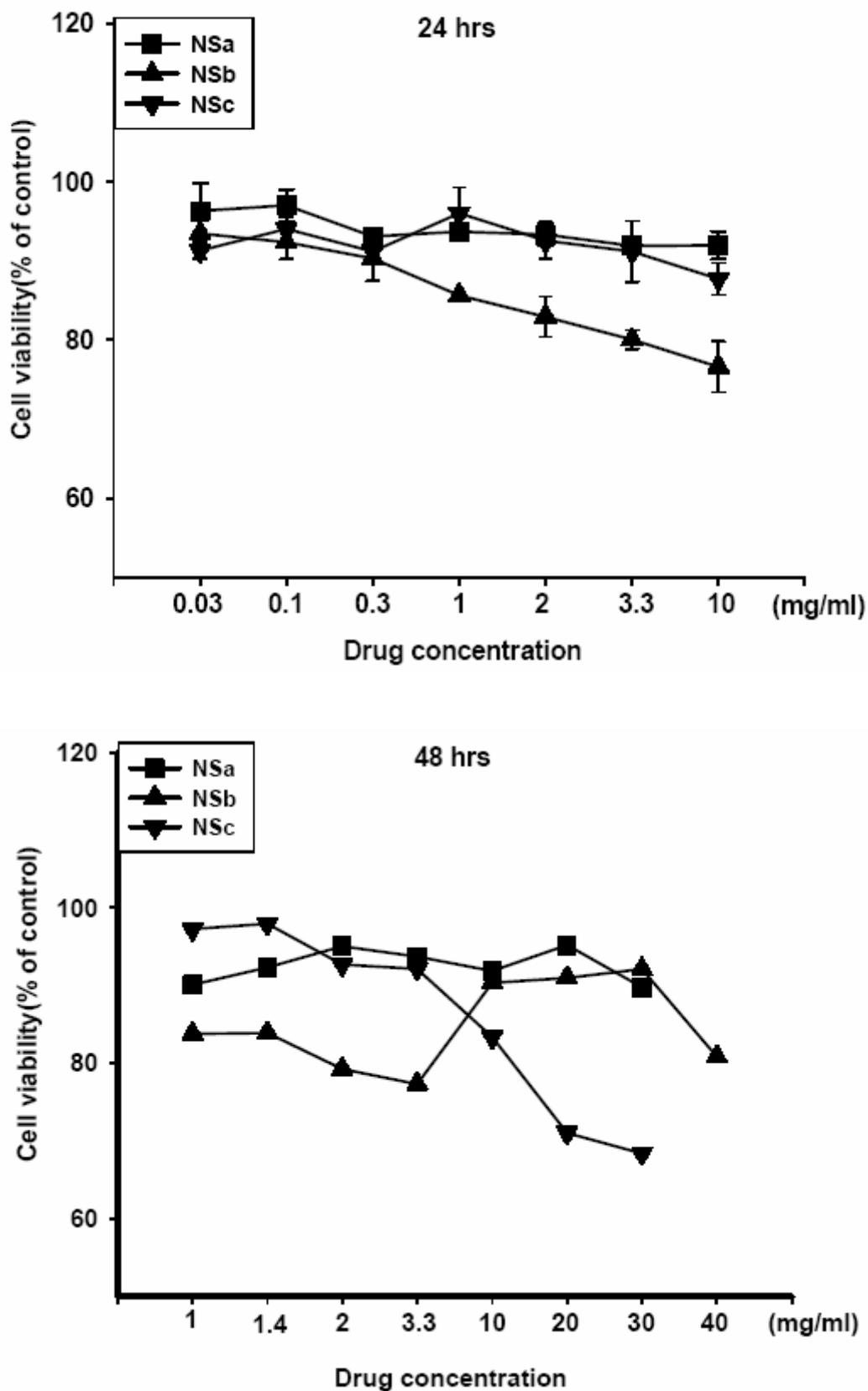
圖四 三種天南星製劑對鼯鼠血中 NO_x 量之作用之影響



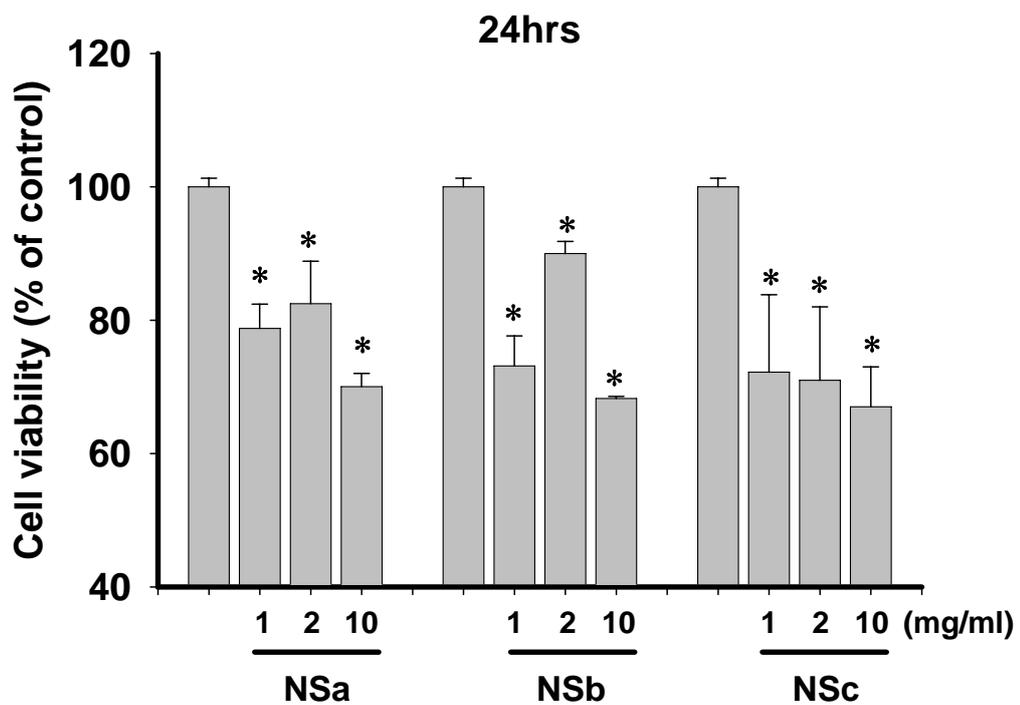
圖五 三種天南星製劑鼯鼠對體重的影響



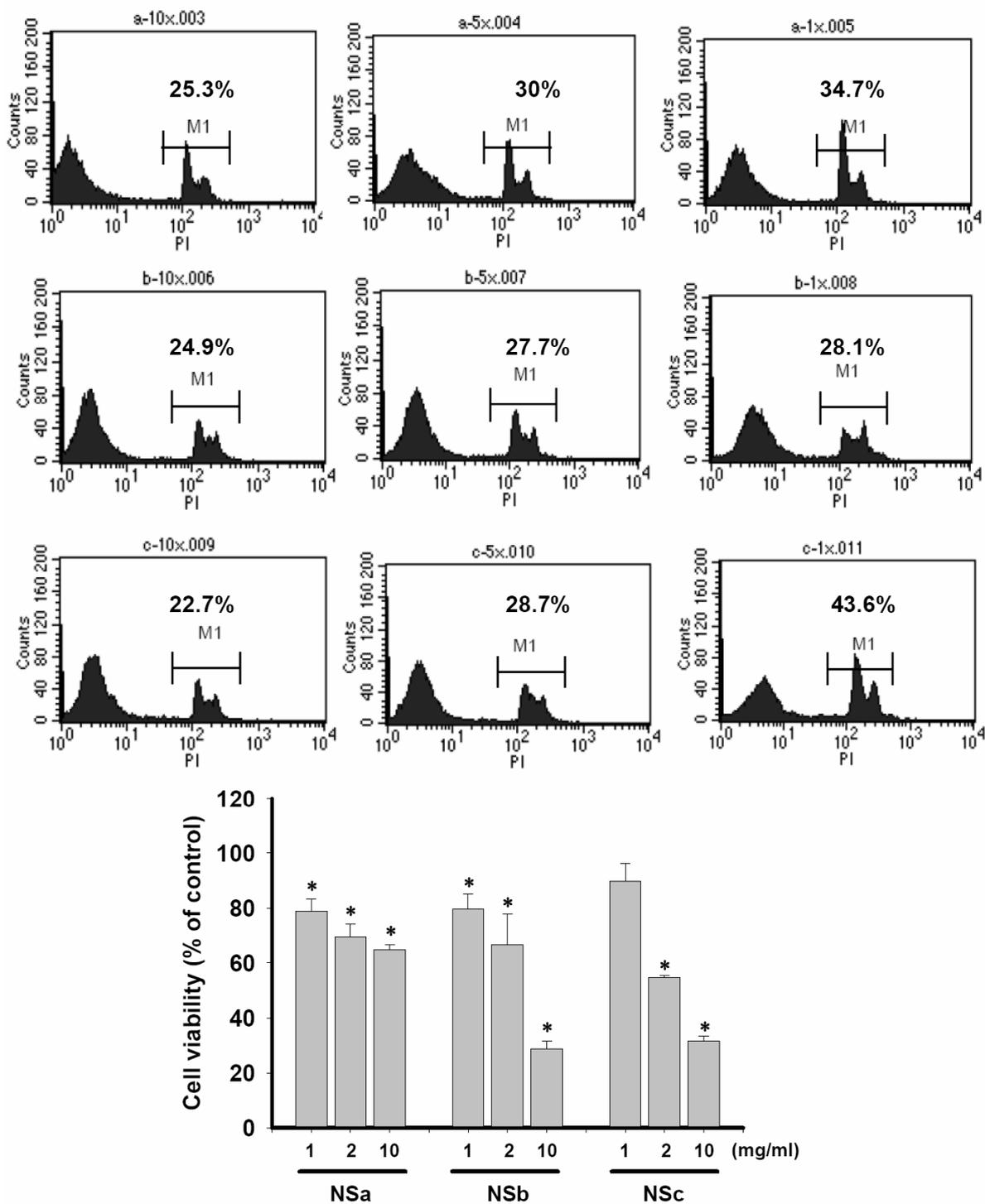
圖六 三種天南星製劑對鼯鼠大腦組織 Na⁺/K⁺-ATPase 活性之影響



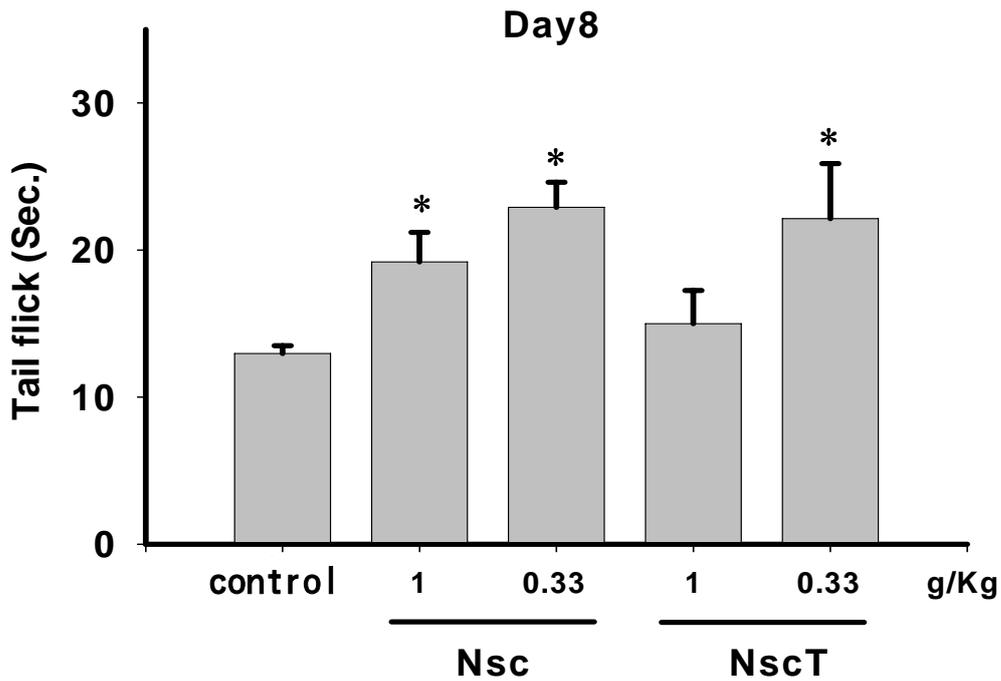
圖七 三種天南星製劑對子宮頸癌細胞 (HeLa cell) 存活率 (毒殺作用) 之影響



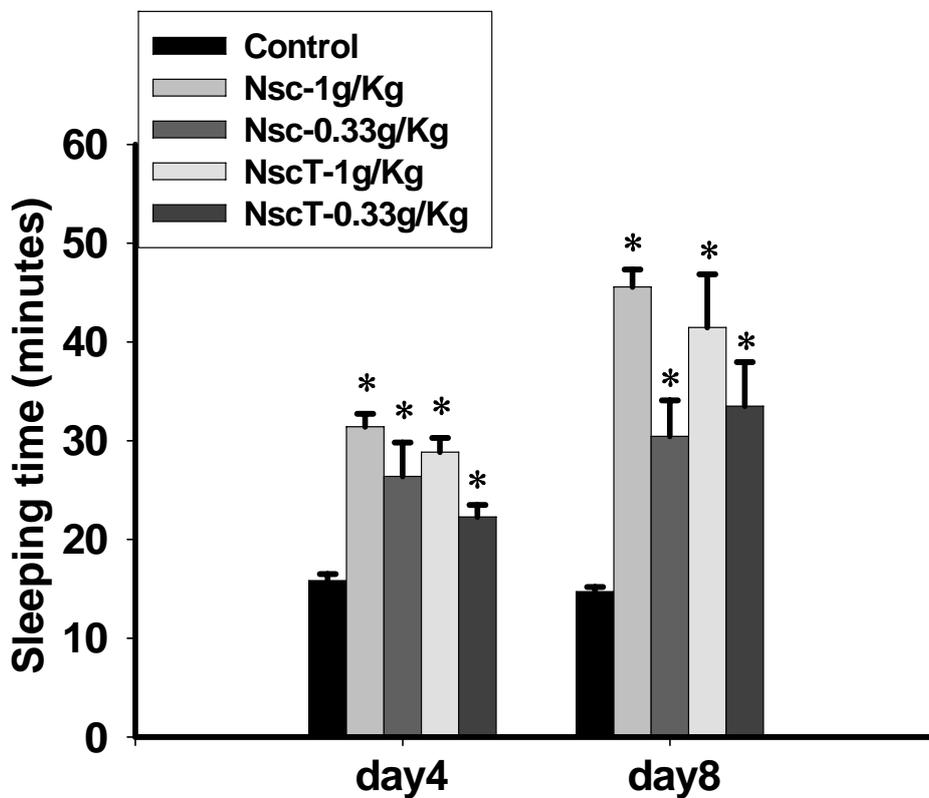
圖八 三種天南星製劑對口腔上皮黏膜癌細胞 (KB-4 cell) 存活率 (毒殺作用) 之影響



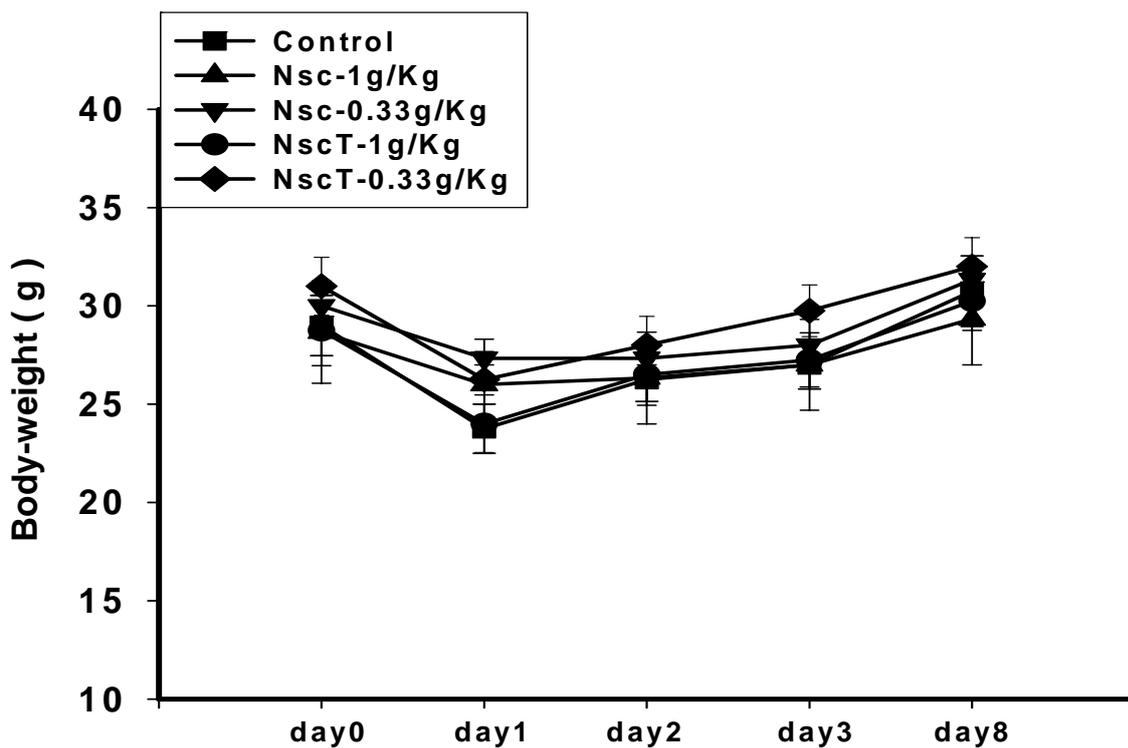
圖九 三種天南星製劑對 RAW-264.7 cell 之細胞存活率 (毒殺作用) 之影響



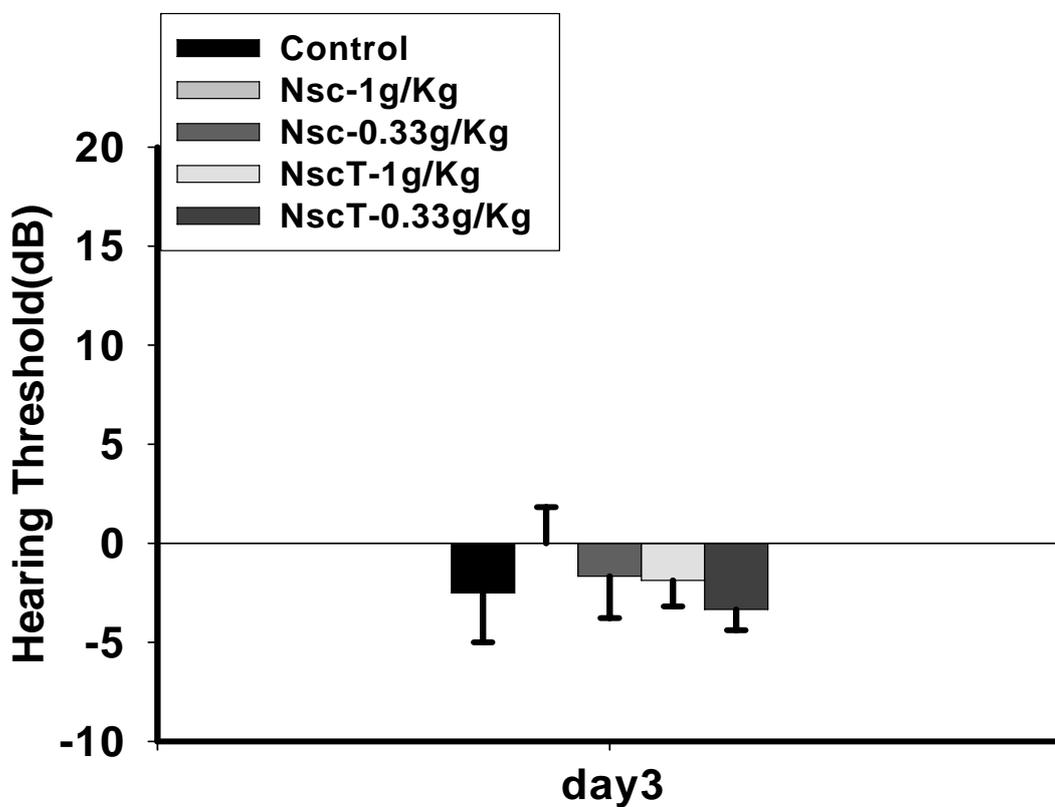
圖十 不同來源之生天南星製劑(NSc 及 NScT)對鎮痛作用 (Tail flick analgesic assay) 之影響



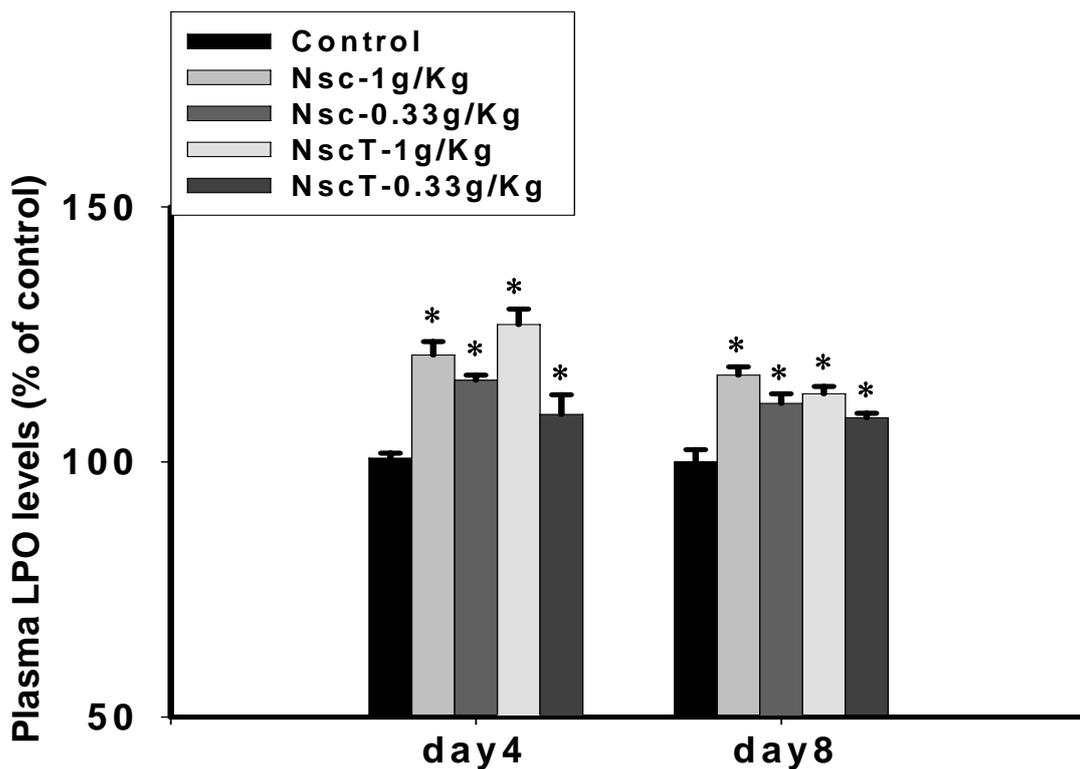
圖十一 不同來源之生天南星製劑(NSc 及 NScT)對鎮靜作用 (延長 pentobarbital 誘發睡眠時間之影響) 之影響



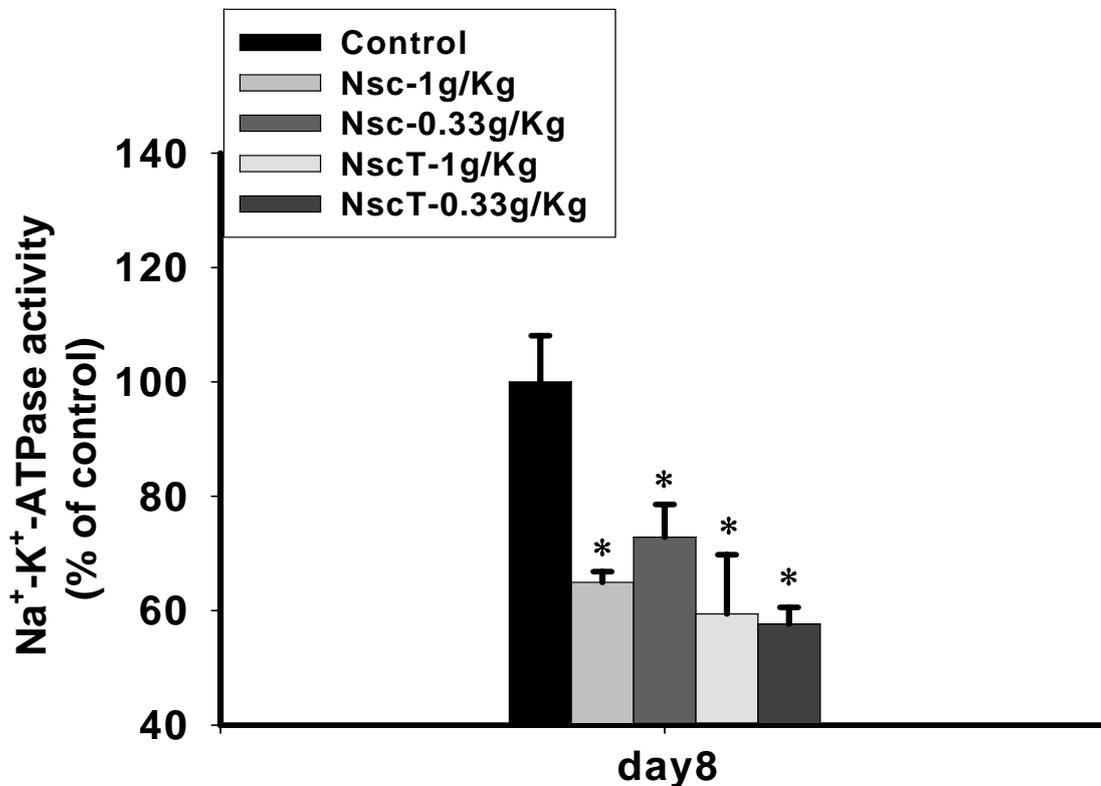
圖十二 不同來源之生天南星製劑(NSc 及 NScT)對體重之影響



圖十三 不同來源之生天南星製劑(NSc 及 NScT)對聽力腦幹反應 (Auditory Brainstem response, ABR)之影響



圖十四 不同來源之生天南星製劑(NSc 及 NScT)對誘導 Plasma 自由基 (ROS) 增加之影響



圖十五 不同來源之生天南星製劑(NSc 及 NScT)對紅血球(RBC) Na⁺-K⁺-ATPase 活性抑制之影響

