

四磨飲、桂枝茯苓丸、瀉青丸和四逆散 對實驗性老鼠急性肝損傷之影響（3-3）

Guizhi-Fuling-Wan, Syh-Mo-Yiin, Shieh-Qing-Wan and Syh-Nih-Sann on Experimental Acute Liver Damage in Rodents.

中國醫藥學院

林 國 瑞

摘 要

肝病是中國人常見的疾病，其相關病變久為台灣地區十大死亡原因之一。現代醫藥對其並無令人滿意之對策，有待改進。而中醫對此疾病之治療有悠久的歷史與豐富臨床經驗，並且有其獨特多元化的學理思路及相當的療效，給肝病患者提供了很大的希望。

為究明中醫藥之療效與作用機轉，並探討中醫學理之實質，而進行本實驗。本計畫延續第二年慢性肝損傷動物模型，以四種中醫方劑：桂枝茯苓丸（理血）、四磨飲（理氣）、瀉青丸（瀉火）和四逆散（和解）之水抽出物進行各種抗氧化酵素，包括 SOD、Catalase、GSH-Px 之試驗，並以 8-OH-dG 為生物指標檢測肝臟 DNA 受損程度。

本年度實驗結果顯示，四種方劑皆有不同之抗氧化作用。由於重複暴露致病毒物等分項目研究，方劑各成不同程度之功效，如是將可作為臨床

選方用藥之參考方針。另外由抑制脂質過氧化及相關抗氧化酵素之研究，證實其確具抗自由損傷作用與作用機轉，可茲作為中醫藥療肝上提供科學證據。

關鍵詞：肝病，中醫，中醫方劑，急性肝損傷。

China Medical Collage

Lin Kuo-Juei

ABSTRACT

As an endemic area of liver diseases in China, the hazard became one of the Ten Leading Causes of Death in Taiwan Area of years. Until recently, it has been accepted that pharmacological treatment of liver disease was difficult. Treatment of patients with liver diseases still remains to be improved. However traditional Chinese Medicine (TCM), with diverse and unique thinking-process, developed through clinical practices and proved to be useful for centuries in the remedy of liver trouble. Interest in TCM on hepatic medications has increased widely in recent years.

Chronic liver damages induced by CCl_4 in rats were conducted to elucidate the hepatoprotective effects of TCM and study the essence of it. Water extracts of four prescriptions of Chinese Materia Medical: Syn-Mo-Yiin (SMY), Guizhi-Fuling-Wan (GFW), Shieh-Qing-Wan (SQW), and Syh-Nih-Sann (SNS), used in this study, were medicinal herbs and prepared according to different factions of TCM. Their active principles were worth to investigate and exploring as up-date hepatic medication.

The results showed that the four recipes mentioned above did possess hepatoprotective activity and they also exhibited antioxidant effect in lipid peroxidation inhibitory activity. It suggested that the activity of free radical scavenging and antioxidant of

them could play one part in their hepatoprotective effects.

Keywords : Disease of the Liver, Traditional Chinese Medicine, Chinese Material,
Chronic Liver Damage

壹、前 言

一、背景與現況

肝病是危害人類健康的常見病、多發病。在國外，特別是北美和西歐以酒精引起的肝病為多。在我國由於病毒性肝炎發病率高，特別是乙型病毒性肝炎¹⁾。但由於近來生活型態的改變，國人對酒類之消耗激增，加上原住民之酗酒習性，使得肝病及其續發病變（慢性肝病及肝硬化）久居國內十大死亡原因之中²⁾。最近由於環境的污染、農藥之濫用，對國人的健康尤其是肝臟的威脅更是嚴重。保肝、療肝之醫藥資源的發展開創實刻不容緩^{60,61)}。

本病早在二千多年前，中醫即有記載和敘述，如<<靈樞·水脹>>曰：“腹脹，身皆大……色蒼黃，腹筋起，此其候也”。<<素問·大奇論>>說：“肝腎并沉為石水”。<<金匱要略·水氣>>篇：“肝水者，其腹大能自轉側，脅下腹痛”^{3,4)}。中醫根據肝病病變各階段、各類型症候表現不同，稱本病為“脅痛”、“腹脹”、“黃膽”、“癥積”、“癖塊”、“臌脹”、“單腹水”、“蜘蛛”、“水臌”、“石水”、“肝水”……等^{1,5)}。

中醫藥治療肝臟疾病有悠久的歷史、獨到的理論體系和豐富的臨床經驗，並形成了不同的學術思路和流派^{1,6)}。為深入探討中醫、中藥之保肝療效，並形成了不同的學派理論之實質以及開發肝病醫療新資源，而進行本研究。

本計畫擬以四種不同中醫治療原理且在臨床顯效之常用方劑：理氣劑—四磨飲、理血劑—桂枝茯苓丸、瀉火劑—瀉青丸、和解劑—四

逆散^{7,8,9)}等之水抽出物進行一系列之保肝評估。

方劑挑選事以藥味單純化為原則，並且不同藥方中儘量避免有相同藥物。四磨飲乃宋朝陳無擇三因方之理氣方藥，能行氣降逆，寬胸散結，主治胸膈滿悶，上氣喘急，不思飲食，對肝氣橫逆鬱結有一定療效^{9,10)}。桂枝茯苓丸是漢代張仲景金匱要略的方劑，主要用於婦女經病，盆腔炎、腹膜炎，亦有用於心血管疾病，慢性肝炎……等。曾有報導，能使淤血型、癥瘕型肝炎好轉，SSGPT 恢復正常¹¹⁾。瀉青丸是宋朝錢乙小兒藥證直訣中的方劑，有清肝瀉火之功，治療目赤腫痛，煩躁易怒，尿赤便秘，對肝火實症有一定的療效^{9,10)}。四逆散乃漢朝張仲景傷寒論之藥方，能疏肝理脾，和解去滯，是小柴胡湯之加減方，常用於肝病^{9,11)}。

1995 年張希恩曾對瀉清丸中藥材-大黃之保肝利膽研究近況進行綜述，指出大黃對化學致讀物所致動物性肝損傷及肝損傷動物型態改變均有保護或消除作用，明顯降低 SGPT 值，恢復肝細胞正常功能；促進肝細胞再生及肝細胞 RNA 合成^{67,75,76,77}。1992 年李廷利指出四逆散中藥材-柴胡之有效成分粗皂甙提取液可明顯降低 CCl₄ 所致肝損傷小鼠肝臟過氧化脂質含量^{68,69,70}。另外有學者指出瀉清丸藥材中梔子之主要生物活性成分 geniposide 藥理作用有利膽、瀉下、抗肝毒等^{71,72,73,74}。1993 年學者指出當歸能改善肝臟微循環，增加肝糖原含量和促進新成代謝作用⁷⁸⁾。

在本研究中，將以各種不同肝毒性物質（包括：四氯化碳 CCl₄ 乙醇 Alcohol、醋氨酚 Acetaminophen）誘發大白鼠不同肝損傷，以進行各方劑各療法之療效評估^{12,13,28-35)}。

肝毒性物質誘發損傷磨模式中，Acetaminophen 為一鎮痛解熱藥，服用過量或代謝異常情況下，會被代謝轉化成 N-acetyl-p-benzoquinimine (NAPQI)，再進一步與細胞膜上的分子共價鍵結，而造成細胞損傷^{15,16,17)}。大量 Alcohol 的攝取將造成 Glutathione (GSH)

之消耗，而且乙醇在肝臟組織中 microsome、cytosol 內會被代謝成 oxygen-related 自由基，是為酗酒之禍源^{18,19)}。

在上述保肝療效評估中，除了存活率的觀察²⁰⁾、測量生化 (SSGOT、SSGPT、 γ -GT、TG、ALP、Cholesterol)^{21,22,23,24,25)}之變化外，亦將就病理學之觀點，來探討肝組織的變化，如 fatty change、肝醣變化、lymphocyte 和 Kupffer cell 之浸潤、necrosis 及 ballooning degeneration……等，做為研究與評估要點¹⁴⁾。

在抗氧化方面，本計畫將以四種方劑對慢性肝損傷之抗氧化功效加以評估，即以大白鼠肝細胞抗自由基酵素 SOD、GSH-Px、Catalase 活性分析及 DNA 氧化性損傷 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) 為標誌⁵⁴⁻⁵⁹⁾。

二、研究目的

第一年：88 年度

1. 依中醫“理法方藥”理論，完成其中理氣、理血、瀉火、和解等法之方劑—四磨飲、桂枝茯苓丸、瀉青丸、四逆散對急性肝損傷之保肝評估^{36-44,52,53)}。
2. 印證中醫“理法方藥”之多元思路對治療肝病的實用性。
3. 進行相關之機轉探討，其中包括對 Lipid Peroxidation 之影響，Free Radical 清除酵素，包括 SOD、Catalase、GSH-Px 之活性作深入研究⁴⁵⁻⁴⁸⁾。

第二年：89-90 前半年度

1. 仍依第一年之“理法方藥”之中藥方劑對慢性肝損傷，作進一步的探討與研究。利用 CCl₄ 誘發肝臟纖維化之模式¹³⁾。期望了解桂枝茯苓丸、四磨飲、瀉青丸、四逆散等方藥對此等肝損傷之療效。取血清檢測生化值 (SSGOT, SSGPT, ALP, γ GT, TG, Cholesterol)。
2. 解剖取肝，並進一步做脂質過氧化 (lipid peroxidation; LPO) 測定及病理組織學檢查。

第三年：90 後半年度

1. 肝臟組織作冷凍切片做免疫組織化學染色。抗自由基酵素 SOD、GSH-Px、Catalase 活性分析及 DNA 損傷之評估⁶²⁻⁶⁵。

第一年已完成包括：四氯化碳 (CCl₄)、乙醇 (Alcohol) 和醋氨酚 (Acetaminophen) 肝毒性物質誘發各種不同急性肝損傷，實驗結果顯示四方劑皆有保肝、護腎等效果。

第二年度以四氯化碳誘發大鼠慢性肝損傷研究發現：四種方劑分別在前、中、後期表現不同程度之保肝作用，符合溫病處理溼熱病症原則，其中又以瀉青丸與四磨飲表現搶眼。而四種方劑皆具有不同程度之抗氧化（脂質過氧化）作用。

貳、材料與方法

本年度研究為延續第二年 in vivo 之實驗設計，抗氧化酵素測定及免疫組織化學染色之組織樣本皆來自第二年以四氯化碳誘毒之動物實驗模型實驗，其動物模型如下所述：

1. 動物實驗模式：隨機將大白鼠分成控制組、毒藥組、中藥治療組、對照組，其中毒藥組、中藥治療組及對照藥物組皮下注射 40 % CCl₄/ olive oil (0.3 mL/ 100 g BW)，每週兩次（星期一、四），並於星期二、三、五、六，在對照組及毒藥組以胃管灌予 normal saline，在對照藥物組灌予 Silymarin (25mg/ Kg)，在中藥治療組灌予四種方劑，共為期八週。
 2. 抗氧化酵素：最後第八週結束時全部犧牲，以頸動脈放血，並解剖取肝，均質化離心後取上清液測定 SOD、Catalase、GSH-Px 等酵素之活性。
 3. 免疫組織化學染色及 DNA 損傷測定：解剖取肝並由均質液抽取 DNA。
- 一、免疫組織化學染色 (Cytochrome P450)

1. Fix cryostat section for 10 min in acetone at -10°C, air dry, and wash in PBS.
2. Blocking for 10 min in 10% goat serum at room temperature.
3. Incubate with primary antibody for 30 min at 37°C.
4. Wash three times in PBS.
5. Incubate with biotinylated second antibody for 10 min.
6. Add enzyme conjugate streptavidin-peroxidase diluted 1:20 for 5 min..
7. Develop by adding substrate-chromogen mixture for 5 min at 37°C.
8. Wash three times in PBS.
9. Counterstain with hemalum between 1 and 10 sec.
10. Wash in tape water.
11. Dehydration
12. Mounting in Glycergel.

二、SOD、Catalase、GSH-Px 之評估方法如下：

1. 超氧化物歧化酵素 (SOD) 之測定

實驗參照 Marklund (1974)⁴⁹⁾ 等人所描述之方法進行，將肝組織用冰食鹽水 (ice-cold saline) 洗淨，在漏斗上滴乾鹽水，加入適量緩衝液 (0.32 mol/L sucrose, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl, pH=7.4)，打碎使成 10% 之均質漿 (homogenate)。高速離心 30 分鐘 (13600xg)，取上清液 50 μ L，再加上 Triscacodylic acid buffer (pH=8.20, 50mM) 100 μ L。溶液再加上二次蒸餾水，使體積成為 980 μ L，再加上 Pyrogallol 20 μ L (0.2mM)，劇烈搖盪混均，上機 (BECKMAN-DU[®]) 於 420NM 測量吸光值 (A)，每隔 20 秒測量一次，總共測量 5 分鐘，計算 $\Delta A / \Delta T$ 。分析過程中以 Sigma 公司所出品 SOD 標準品，作出標準線 (standard curve)，再進行分析。單位時間內抑制鄰苯三酚自動氧化速率達 50% 時酵素量定為一單位 (U)，肝組織酵素活性，以每單位蛋白質所含 SOD 單

位量表示 (U per milligram of protein) ^{26,27)}。

2. 過氧化氫酵素 (CAI) 之分析

實驗參照 Aebi (1984) ⁵⁰⁾所描述之方法進行，將肝組織用冰食鹽水 (ice-cold saline) 洗淨，在漏斗上滴乾鹽水，加入適量磷酸鹽緩衝溶液，打碎使成 10% 之均質漿 (homogenate)。離心 (700xg) 10 分鐘，取上層液 9 份加入 1 份 Triton X-100 (1%) 成為 stock homogenate (S.H.)。取 S.H. 加入適量之磷酸緩衝溶液進行稀釋，調整酸鹼度至 pH=7 成為 dilute homogenate (D.H.)。取 D.H. 2ml 加入 1ml H₂O₂ (0.03M)，劇烈搖盪混均，上機 (BECKMAN-DU®650 spectrophotometer) 於溫控 25°C、波長 240nm 之條件下測量吸光值 (A)，每隔 15 秒測量一次，總共測量 2 次，計算求得反應速率常數 K。

$$K = \frac{2.3}{\Delta t} \log A_1/A_2$$

Δt : 時間間隔 (15 秒鐘)

A_1 : T_1 時段，檢品之吸光值—空白吸光值 (空白校正)。

A_2 : T_2 時段，檢品之吸光值—空白吸光值 (空白校正)。

3. 谷胱甘汰過氧化酵素 (GSH-Px) 之測定

實驗參照 Hafeman (1974) ⁵¹⁾等人所描述之方法進行，將肝組織用冰食鹽水 (ice-cold saline) 洗淨，在漏斗上滴乾鹽水，加入適量緩衝液 (0.32 mol/L sucrose, 1 m mol/L EDTA, 10 n mol/L Tris-HCl, pH=7.4)，打碎使成 10% 之均質漿 (homogenate)。高速離心 30 分鐘 (13600xg)，取上清液 0.4mL，再加上 Glutathione 0.4mL，置於 37°C 水浴加熱 5 分鐘。然後再加入 H₂O₂ 0.2mL，置於 37°C 水浴加熱 5 分鐘。然後迅速置於冰水中冷浴且加入偏磷酸溶液 (metaphosphate) 4mL，再離心 10 分鐘 (3000rpm)。取上清液 2mL，加入 Na₂HPO₄ 溶液 2mL (0.4M) 與 DTNB 溶液 1mL，混和

均勻後上機 (BECKMAN-DU ⑤ 650 spectrophotometer) 於 412nm 測量吸光值 (參考流程圖)。為消除非酵素系統對 GSH 之影響，同時另設非酵素反應管。根據 GSH 標準曲線計算 GSH 消耗量。單位時間內檢品消耗之 GSH 濃度取對數值 ($\log [\text{GSH}]^E$)，扣除非酵素系統對 GSH 之影響 ($\log [\text{GSH}]^{NE}$)，所得值之千分之一為 GSH-Px 活性單位 (U)：

$$U = \frac{\log [\text{GSH}]^E - \log [\text{GSH}]^{NE}}{1000 \times \Delta t}$$

※ 肝組織酵素活性，以每單位蛋白質所含 GSH-Px 活性單位 (U) 表示之 (U per milligram of protein)。

三、肝細胞 DNA 損傷之分析

1. 鼠肝細胞核之分離以 differential centrifugation 之方法來分離細胞核及粒線體。步驟略述如下：將大鼠犧牲後取出肝臟，依肝重量比例加入緩衝液 (1/4, w/v) 以 tissue homogenizer 均質後以三層紗布過濾。細胞核以 600g 離心 10 分鐘保留沉澱物 (粗細胞核)。所得上層液以 5000g 離心 10 分鐘，以沉澱粒線體 (粗粒線體)。粗細胞核及粗粒線體使用 0.15M KCl 以均質方式清洗，再次離心 (細胞核為 600g, 10 分鐘；粒線體為 5000g, 10 分鐘) 所得之沉澱物以 0.15M KCl / 20 mM Tris (pH = 7.4) 懸溶之後備用。

2. Preparation of Nuclei from rat liver

- (1) liver weight 加上 4×vol. (w/v) buffer I
- (2) homogenize 2 times of speed "20"
- (3) centrifuge at 10g (r = 102, 300 rpm), 5 分鐘, 4°C
- (4) aspirate the supernatant to another tube, then 600 g, 10 分鐘, 4°C
- (5) wash pellete with buffer I and 600 g, 10 分鐘, 4°C
- (6) resuspend the pellete in buffer II at 1:1 ratio

3. DNA isolation

- (1)加入 0.45mL buffer IV 至 pellet，充分 vortex 以打散 pellete
- (2)56°C，100 rpm，3 小時，加入 0.45mL phenol
- (3)invert（輕輕上下翻轉搖動）tube 足 4 分鐘，室溫下以 10000g 離心 3 分鐘，將上層液移至新的 tube
- (4)加入 0.45mL phenol: CHCl₃ : iso-amyl alcohol (25:24:1)，步驟同上
- (5)加入 0.45mL CHCl₃ : iso-amyl alcohol (24:1)，步驟同
- (6)加入 1/2 vol. Ammonium acetate (7.5M) 與 2 vol. 100 % alcohol，緩慢 invert 50 次後至於 -34°C，30 分鐘
- (7)離心 10000g，10 分鐘，去上清液，再以 70 % Alc. 洗一次，1000g，10 分鐘，DNA pellet 在室溫下風乾 15 分鐘
- (8)加入 300μL ddH₂O（殺菌水），65°C，100 rpm，1 小時
- (9)取 10μL DNA sol'n 加入含有 990μL ddH₂O（殺菌水）的 tube 後測定 A₂₆₀，A₂₈₀

4. 8-OH-dG/ ECD/HPLC protocol

- (1)Isolated DNA (200 ug, from tissue) in 200 ul ddH₂O 加入 100 ul of 40nM Sodium Acetate, 0.1 nM ZnSO₄ (pH = 5.1)，再加入 20μL of Nuclease P₁ (20μg)；37°C for 1h
- (2)Add 30μL of 1 M Tris-HCL (pH = 7.4) and 5μL of Alkaline phosphatase (1.5 unit) to the tube; 37°C for 1h; Cut off particle with 0.2 um filter
- (3)2000μL for HPLC/ECD analysis, mobile phase (20 mM Ammonium Acetate, pH = 5.3:Methanol = 85:15)，1 mL/min, AppE = + 0.6v, Scale = 10nA, Output of background:0.7~1.2nA, C-18 Column (15~25 cm) with precolumn, detection limitation < 5 p mole

參、結 果

一、抗氧化酵素活性之變化

四氯化碳 (CCl₄) 損傷機制主要透過肝微粒體中細胞色素 Cytochrome P450 代謝所引起的，代謝過程中造成脂質過氧化鏈鎖反應，生成大量的自由基，再與生物巨分子反應而產生傷害，因此監測抗氧化酵素之變化情形，即可間接了解自由基所扮演的角色及四種方劑之保護作用。(Table 1) (Figure 1)

1. 過氧化物歧化酵素 (SOD)

大鼠抗自由基酵素 SOD 活性分析顯示正常對照組 (Control) 與毒藥組 (CCl₄) 無顯著差異；治療組中以桂芝茯苓丸 (GFW) 與四逆散 (SNS) 較高，但各治療組之間無統計上顯著差異。

2. 過氧化氫酵素 (Catalase)

大鼠抗自由基酵素 Catalase 活性分析顯示正常對照組 (Control) 與毒藥組 (CCl₄) 無顯著差異；治療組之間經 One Way ANOVA 檢定後發現達顯著差異 ($p=0.047<0.05$)，又經事後檢定-Duncan's test，毒藥組 (CCl₄) 顯著高於瀉青丸組 (SQW) 與水飛薊組 (Silymarin)。

3. 谷胱甘汰過氧化酵素 (GSH-Px)

大鼠抗自由基酵素 GSH-Px 活性分析經 Student's-t test 檢定顯示毒藥組 (CCl₄) 高於正常對照組 (Control)，並達統計上顯著差異 ($p=0.003<0.05$)；各治療組間則無顯著差異。

二、8-OHdG/10⁵dG 之變化：

8-OHdG/10⁵dG 為 DNA 鹼基遭受活性氧 (ROS) 攻擊時所產生之物質，被認為與細胞癌化有密切關係，許多報告指出施打致癌物質於大鼠中，會造成 8-OHdG 含量的上升。本研究結果顯示毒藥組 (CCl₄) 高於正常對照組 (Control)，但未達統計上顯著差異；各治

療組間經 One Way ANOVA 檢定之 p value=0.0207，達統計上顯著差異。又經事後檢定-Duncan's test，毒藥組（ CCl_4 ）顯著高於其他治療組。（Figure 2）

三、免疫組織化學染色（Cytochrome P450; CYP2E1）

抗體（CYP 2E1; anti-rat）經由兩種稀釋濃度 1:5,000 及 1:10,000 做免疫組織染色後均無反應（No Response）。

肆、討 論

一、抗氧化酵素

O_2^- 還原為水的過程中第一個中間物就是 O_2^- ，如果 O_2^- 及時得到清除，則產生 $\text{OH} \cdot$ 就極少。清除 O_2^- 的 SOD 是體內三大抗氧化酵素的第一個，非常重要，但在組織細胞內的 SOD 含量不同，例如細胞外液中 SOD 低於細胞質液與粒腺體。SOD 清除 O_2^- 的能力與其含量有關。生物體合成 SOD 常受 O_2^- 濃度的影響，例如經常處在 O_2 分壓較高的環境中，其體內 O_2^- 濃度高於正常者，在 O_2^- 的誘導下，SOD 的生物合成能力增高。但是 SOD 清除能力有其限度，如果 O_2^- 的生產超過清除時，對身體就會產生危害。

Catalase 可清除 H_2O_2 ，但在細胞內主要存於過氧化體，再過氧化體中生化反應產生 H_2O_2 的可被 Catalase 清除，其他胞器如粒腺體所產生的 H_2O_2 可透過細胞膜器進入細胞質。其中尚未得到清除的可進入過氧化體，最後被 Catalase 清除。

在粒腺體及細胞質液所產生的 H_2O_2 常靠 GSH-Px 清除，脂類氫過氧化物可被 GSH-Px 或 GSH 轉硫酵素清除；在這兩種酵素所產生的 GSSG 在 GSH 還原酵素作用下又可還原為 GSH，繼續參加清除活性氧的反應；同時 NADPH 氧化的 NADP^+ 需要葡萄糖-6-磷酸脫氫酵素催化才能在還原為 NADPH，以維持體內清除活性氧的能力。

此三種酵素根據最新報導，其中 Catalase 在人體內不虞匱乏，SOD 常伴隨人體許多疾病，尤其是自由基所引起或與自由基有關的疾病而變化。這種抗氧化酵素一但遭到損傷或失活，對結構功能影響將會相當嚴重，故本研究在第一、二年評估過四氯化碳誘導大鼠肝組織脂質過氧化程度外，繼續檢測此三重酵素在肝組織的變化以及方劑對其改善之程度的變化，以釐清其與臨床功效之關係⁴⁵⁻⁴⁸。

本研究以為期八週的四氯化碳多重注射誘導肝損傷，大鼠抗自由基酵素 SOD 活性分析顯示正常對照組（Control）與毒藥組（CCl₄）無顯著差異；各治療組之間無統計上顯著差異治療組中以桂枝茯苓丸（GFW）與四逆散（SNS）較高；四磨飲之酵素活性與正常對照組（Control）差異不大，此點與本研究第一年急性肝損傷大鼠四磨飲治療組表現相似；其餘各組皆有升高之趨勢，可能之原因是大鼠受環境高 O₂ 分壓影響，體內 O₂⁻濃度增高而誘導肝臟 SOD 合成能力增高，如同第一年研究之推論，實驗之結果可能是大鼠對氧化壓力（Oxidative stress）的代償反應^{54,55}。

關於過氧化氫酵素（Catalase）之研究結果顯示四磨飲、桂枝茯苓丸及四逆散治療組之 Catalase 酵素活性皆升高，推論此三種方劑之抗氧化作用是經由提高 Catalase 以清除 H₂O₂，保護 SOD 不被 H₂O₂ 滅活，達到清除自由基、抗肝損傷之保肝效果⁵⁶⁻⁵⁹。

GSH-Px 酵素活性經檢測後發現毒藥組顯著高於空白對照組，但是各治療組亦高於空白對照組且之間無顯著差異，顯示經由四氯化碳（CCl₄）誘發慢性肝損傷之大鼠的肝臟會經由升高 GSH-Px 去除自由基。治療組中瀉青丸（SQW）之 GSH-Px 略高於其他組，推論此方劑有提高肝損傷大鼠對抗自由基抗氧化酵素之功效，另外對照第一、二年之研究結果（瀉青丸組有較佳之保肝及抗氧化效果）以及稍後將討論到之 DNA 損傷之實驗結果（瀉青丸組具有較低的 8-OHdG/10⁵dG 比值），本研究團隊認為瀉青丸之保肝效果值得更深入研究其作用機

制，並將著手進行相關實驗研究。

二、8-OH-dG

當細胞受到氧化傷害時會對 DNA 造成氧化傷害，這些傷害中以 8-OH-dG 較具代表意義，可作為 DNA 氧化傷害之指標 (Bio-marker)。本實驗結果發現經由四氯化碳 (CCl₄) 誘導慢性肝損傷毒藥組之大鼠肝臟 DNA 受自由基攻擊程度是所有組別中受損最嚴重的；毒藥組比空白對照組高出大約 28 8-OHdG/10⁵dG；與治療組相比，毒藥組高於其他各組，並達統計上顯著差異 (p-value=0.0207<0.05)，事後檢定亦顯示各組之顯著不同，其中瀉青丸 (SQW) 受損最低，保護程度高達 84.23%，其次依序為四逆散 (65.08%)、桂枝茯苓丸 (58.72%)、水飛薊 (50.36%)、四磨飲 (50.17%)；所有治療藥物均具有保護作用且達 50% 以上。

對照第二年的實驗研究結果包括生化指標變化及肝臟切片病理圖樣之觀察，瀉火性質的傳統醫療方劑瀉青丸，突顯其清熱瀉火作用，發揮主治肝火鬱熱之功效，經由：清腸逐毒、護肝利膽、調整血液動力學，改善微循環…等瀉火作用。1993 學者報導：方中「大黃」在能保護肝細胞超顯微結構，增加肝細胞內糖原和核糖核酸含量，減輕肝細胞腫脹變性壞死、疏通膽小管改善膽汁鬱積⁽⁵²⁾，與本實驗所顯示之瀉青丸降低 DNA 損傷之結果相符⁽⁶⁶⁾。

重複測量後，本實驗發現空白對照組大鼠肝組織 DNA 損傷程度比中藥治療組嚴重，推論與老鼠老化情形有關，而餵食中藥除了具有抗氧化效果外亦有抗老化之功效，或者具有提高 DNA 修復系統 (DNA repair system) 之作用。但此推論需有進一步實驗，本研究團隊將提出相關計劃，以細胞生物及分子生物學技術繼續深入研究。

三、Cytochrome P450 (CYP 2E1)

四氯化碳 (CCl₄) 所引發之肝毒性乃經過肝微小體中細胞色素 Cytochrome P450 (CYP 2E1) 所代謝，在代謝過程中產生自由基

$\text{CCl}_3\text{OO} \cdot$ ，啟動脂質過氧化鏈鎖反應，產生醛、酮（如 malondialdehyde，MDA：脂質過氧化所產生的二級產物）等物質或者直接與生物巨分子（蛋白質、醣類、醣蛋白）產生共價結合，導致肝細胞中鈣離子的失衡、生物膜的破壞等等，最後造成肝臟損傷。對照前一年組織染色（H&E Stain）發現多數經 CCl_4 引發肝損傷之大鼠，其肝臟細胞已遭嚴重損傷，推論本年度實驗之無反應起因於肝微小體因細胞破壞而含量稀少。

伍、結論與建議

慢性活動性肝炎會造成肝臟進行性的破壞及肝功能受損，抗肝損傷的保肝作用成為治療慢性肝炎的重要關鍵；本年度研究針對四種方劑：桂枝茯苓丸、四磨飲、瀉青丸、四逆散之抗氧化酵素活性、抗 DNA 損傷之效果加以評估，獲得以下結論：

1. 本研究顯示四種方劑可經由改善肝細胞代謝，促進對自由基處理，抗氧化變性。因此在抗氧化酵素活性測定上，SOD、Catalase 及 GSH-Px 等酵素皆有增高趨勢。顯示四種方劑具有抗氧化效果。
2. 四種方劑可經由提高肝細胞 DNA 合成率，促進肝細胞再生以對抗 DNA 損傷，其中瀉青丸之保護作用更優於其他方劑。
3. 對照於四氯化碳誘發之急性肝損傷，顯示瀉青丸之保肝效果同時呈現於急性與慢性肝損傷，根據本年度實驗結果，瀉青丸之抗氧化作用表現強於其他各組，DNA 損傷程度最低。
4. 本研究團隊將以此三年之重要發現—瀉青丸具有優異之保肝、抗氧化效果為基礎，繼續此方劑之療效機轉、分子生物等方面研究。並已不同抗體濃度繼續追蹤細胞色素 Cytochrome P450 之分布情況。

陸、參考文獻

1. 陳桂廷，楊思澍，實用中西醫結合診斷治療學，中國醫藥科技出版社，北京，p. 476~486, 1991
2. 公務統計，中華民國台灣地區衛生統計，行政院衛生署，正中書局，台北，p.84~86, 1993, Sep
3. 馬光亞，台北臨床三十年，世界書局，台北，p.77~102, 1988
4. 趙志付，中國現名中醫治療肝膽病理法方藥精選，科學普及出版社，天津，p.27, 51, 156, 1992
5. 張伯臾，中醫內科學，知音出版社，台北，p.380~427, 1989
6. 馬光亞，台北臨床三十年，世界書局，台北，p.57~74, 1988
7. 江克明，包明蕙，簡明方劑辭典，上海科學技術出版社，上海，p.293, 296, 682, 868, 1991
8. 謝觀，中國醫學大辭典，商務印書館，台北，p.736, 742, 2087, 4351, 1988
9. 劉接寶，中西結合肝病治療研究，立得出版社，台北，p.106~152, 171~182, 1984
10. 陳偉，路一平，方劑學，上海中醫學院出版社，上海，p.125, 312, 1989
11. 陳奇，中藥名方藥理與應用，南天書局，台北，p.107, 455, 1993
12. 李儀奎，王欽茂，中藥藥理實驗方法學，上海科學技術出版社，上海，p.458~468，1991
13. 陳奇，中藥藥理研究方法學，人民衛生出版社，北京，p.724~728, 832~857
14. Reckngel R.O and Ghoshal A.K. Lipoperoxidation as a vector in carbon tetrachloride hepatotoxicity. Lab. Invest 1966; 15:132-148
15. Packer J., Slater T. and Willson R. Reaction of carbon tetrachloride-related peroxy free radical (cc 1302) with amino acids: Plus radiolysis evidence.

Life Sci 1978; 23:617-2620.

16. Mitchell J.R., Jollow D.J., Potter W.Z., Davis D.C., Gillette J.R. and Brodie B.B. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. One: role of drug metabolism. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1973; 187(1): 185-194.
17. Hyman J.Z. and Maddrey W.C. *Disease of the Liver*, 7th edition, J.B. Lippincott, Philadelphia©1993; 707-769.
18. Liu J., Liu Y., Madhu C. and Klaassen C.D. Protective effects of oleanolic acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1993; 266(3): 1607-1613.
19. Takeuchi J., Takada A., Ebata K., Sawae G. and Okumura Y. Effect of a single intoxication dose of alcohol on the liver of rats fed a choline-deficient diet or a commercial ration. *Laboratory Investigation* 1986; 19(2): 211-217.
20. Robert S. Effect of the ethanol on the liver. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1970; 23(4): 467-477.
21. Keppler D., Rudigier J., Bischoff E. and Decker K. The trapping of uridine phosphate by D-galactosamine, D-glucosamine and 20deoxy-D-galactose. A study on the mechanism of galactosamine hepatitis. *Eur.J.Biochem.* 1970; 17: 246-253.
22. Kepper D., Lesch R., Reutter W. and Decker K. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp. Mol. Pathol.* 1968; 9: 279-290.
23. Shuhei N., Tetsuo K., Tadashi T., Shinya N., Susumu S., Shuichi S., Isao M. Y., Shuzo O. and Kenzo K. Effects of Putrescine on D-galactosamine-induced acute liver failure in rats. *Hepatology* 1990; 12: 348-353
24. Reitman S. and Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol* 1975; 28:56-63.

25. Glossman M. and Neville D.M. (Glutanyl transferase in kidney brush border membrane. FEBS Lett 1972; 19: 340-344.
26. Wootton I.D.P. Plasma proteins in micro-analysis in medical biochemistry. 4th edn J. and A. Churchill Ltd, London. 1964; 138-140
27. Bergmeyer H.V., Grabl M. and Walter H.E. Enzyme. In methods of enzymatic analysis, ed. By Bergmeyer H.V. and Grabl M. Verlag-Chemie, Weinheim 1983; 267-270,
28. Quick A.J., Stanley B.M. and Bancroft F.W. A study of the coagulation defect in hemophilia and in jaundice. Am. J. Med. Sci 1935; 190: 501-511.
29. Lin S.C., Lin C.C., Lin Y.H., Shyu S.J. hepatoprotective effects of Taiwan folk medicine: *Wedelia chinensis* on three hepatotoxin-induced hepatotoxicity. American Journal of Chinese Medicine 1994; 22(22): 155-168.
30. Tsuji M., Yoshida Y., Kodama K., Okazaki M. and Oguchi K. Protective effect of Sho-saiko-to (Xiao-Chai-Hu-Tang) on primary cultured rat hepatocytes. PHYTOTHERAPY RESEARCH 1994; 8; 100-102.
31. Lin C.C., Sung T.C. and Yen M.H. the antiinflammatory and liver protective effect of *Boussingaultia gracilis* var. *pseudobaselloides* extract in rats. PHYTOTHERAPY RESEARCH 1994; 8:21-207.
32. Lin C.C and Lin J.M. pharmacological studies on the crude drug 'Hwang-Jin-Guey' from Taiwan (1) PHYTOTHERAPY RESEARCH 1994; 8:193-200.
33. Subrata D., Ravishankar B. and Bhavsar G.C. An investigation on the hepatoprotective activity of *Gymnosporia montana*. Planta med. 1994; 60: 301-304.
34. Pinzani M., Milani S., Grappone C., Frederick L. Weber Jr., Gentilini P. and Abboud H.E. Expression of platelet-derived growth factor in a model of acute liver injury. Hepatology 1994; 19; 701-707.
35. Navarro M.C., Montilla M.P., Martin A., Jimenez J. and Utrilla M.P. Free rad-

- ical scavenger and antihepatotoxic activity of *Rosmarinus yomentosus*. *Planta Med.* 1993;59: 312-314.
36. 楊春茂，楊聖信，林君穎，許桂森，張國志，人體藥理學（上冊），藝軒圖書出版社，1994; 435-444
 37. Valenzuela A., Lagos C., Schmidt K. and Luis A.V Silymarin protection against hepatic lipid peroxidation induced by acute ethanol intoxication in rat. *Biochemical Pharmacology*.1984; 34(12): 2209-2212.
 38. Lee Y.J., Pantuck C.B. and Pantuck E.J. Effect of Ginseng on plasma levels of ethanol in rat. *Planta Med.* 1993; 59:17-19.
 39. Vagra M., Buris L. and Fodor M. Ethanol elimination in man under influence of hepatoprotective Silibinin. *BLUTALKOHOL* 1991; 28: 405-408.
 40. Lamb R.G., Koch J.C., Snyder J.W., Huband S.M. and Bush S.R. An in vitro model of ethanol-dependent liver cell injury. *Hepatology* 1994; 19:174-182.
 41. Chao Y.C., Liou S.R., Chung Y.Y., Tang H.S., Hsu C.T., Li T.K. and Yin S.J. Polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenase genes and alcoholic cirrhosis in Chinese patients. *Hepatology* 1994; 19:306-366.
 42. Padova C., Roine R., Frezza M., Gentry R.T., Baraona E. and Lieber C.S. Effects of ranitidine 1992
 43. Risto J.K., Padova C.D. and Lieber C.S. Fister pass metabolism of ethanol - A gastrointestinal barrier against the systemic toxicity of ethanol. *Life Science* 1985; 37: 567-573.
 44. Shaffar M. and Stroupe S.D. A general method for routine clinical chemistry on the Abbott TDx analyzer. *Clin. Chem.* 1983; 29(6): 1251.
 45. Pablo M., Tania G., Vitor P.A., and Marisabel M. Silymarin protects against paracetamol-induced lipid peroxidation and liver damage. *Journal of Applied Toxicology* 1992; 12(6): 439-442.
 46. Liu J., Liu Y., madhu C. and Klaassen C.D. Protective effects of oleanolic

- acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1993; 266(3): 1607-1613.
47. Gonzalez R., Ramirez D., Rodriguez S., Ancheta O., Merino N. and Pascual C. Hepatoprotective effects of Propolis extract on paracetamol-induced liver damage in mice. *PHYTOTHERAPY RESEARCH* 1994; 8: 229-232.
 48. Visen P.K.S., Shukla B., Patnaik G.K. and Dhawan B.N. Andrographolide protects rat hepatocytes against paracetamol-induced damage. *Journal of Ethnopharmacology* 1993; 40: 131-136.
 49. Bonkovsky H.L., Kane R.E., Jones D.P., Galinsky R.E. and Banner B. Acute hepatic and renal toxicity from low doses of acetaminophen in the absence of alcohol abuse or malnutrition: evidence for increased susceptibility to drug toxicity due to cardiopulmonary and renal insufficiency *Hepatology* 1994; 19: 1141-1148.
 50. Mitsuhiro N., Mikio I., Katsuya K., Masaki S. and Yukio O. A comparison of the antihepatotoxic activity between glycyrrhizin and glycyrrhetinic acid. *Planta Med.* 1994; 60: 136-139.
 51. Czaja M.J., Xu J., Ju Y., Alt E. and Schmiedeberg P. Lipopolysaccharide-neutralizing antibody reduces hepatocyte injury from acute hepatotoxin administration. *Hepatology* 1994; 19: 1282-1289.
 52. Dwivedi Y., Rastogi R., Garg N.K. and Dhawan B.N. Perfusion with Picroliv reverses biochemical changes induced in livers of rats intoxicated with galactosamine or thioacetamide. *Planta Med* 1993; 59: 418-420.
 53. Jonker A.M., Dijkhuis F.W.J., Hardonk M.J., Moerkerk P., Kate J.T. and Grond J. Immunohistochemical study of hepatic fibrosis induced in rats by multiple galactosamine injections. *Hepatology* 1994; 19: 775-781.
 54. Ohkawa H., Ohishi N. and Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by Thiobarbituric Acid reaction. *Analytical Biochemistry* 1979; 95: 351-358.

55. Marklund S. and Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the oxidation of paragallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Euro. J. Biochem* 1974; 47: 469-474.
56. Hugo Aebi Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 1984; 105: 121-126.
57. Hafeman D.G., Sunde R.A. and Hoekstra W.G. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxides in rats. *J. Nutrition* 1974;104: 580-587.
58. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. and Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 1951; 193: 265-275.
59. Lin J.G. Yang S.H. and Tsai C.H. Acupuncture protection against experimental hyperbilirubinemia and cholangitis in rats. *Am. Chin. Med.*1995; 23: 131-137.
60. Nomura M., Hida T., Miyamoto K.I., Ohshima T. and Hayashi H. Synergistic effects of Inchin-ko-to and ursodeoxycholic acid on cholestasis. *Journal of Traditional Medicines*, 1994; 11: 430-431.
61. Goldfarb S., Singer E.J. and Popper H. Experimental cholangitis due to α -Naphthylisothiocyanate (ANIT) . *J. Path. And Bact.*, 1962; 40 (6): 685-698.
62. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem* 1979; 95: 351-358.
63. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 1951; 193: 265-275.
64. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the oxidation of paragallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 1974; 47: 469-474.
65. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymol.* 1984; 105: 121-126. Hafeman DG, Sunde RA, Hoekstra WG. Effect of dietary selenium on erythrocyte

and liver glutathione peroxides in the rats. J. Nut. 1974; 104:580-587.

柒、圖 表

表 1、大鼠抗自由基酵素 SOD、Catalase、GSH-Px 活性分析

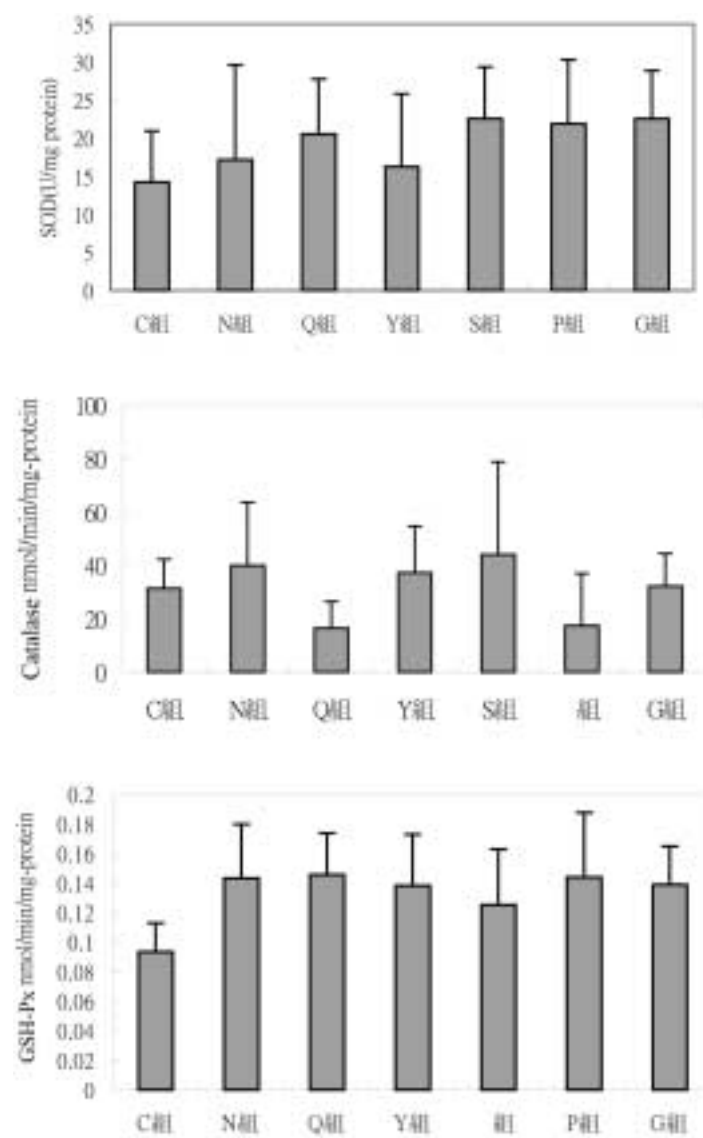
Groups	SOD	Catalase	GSH-Px	8-OHdG/10 ⁵ dG
(1)Control	14.19±6.79	31.32±10.94	0.09±0.02	68.50±23.31
(2)CCl ₄	17.20±12.40	39.90±23.62	0.14±0.04	96.23±38.18
(3)SQW + CCl ₄	20.56±7.188	16.42±9.92	0.15±0.03	15.18±1.33
(4)SMY + CCl ₄	16.22±9.64	37.15±17.50	0.14±0.03	47.95±4.05
(5)GFW + CCl ₄	22.51±6.37	32.16±12.15	0.14±0.03	39.72±4.62
(6)SNS + CCl ₄	22.57±6.77	43.97±34.85	0.13±0.04	33.60±4.48
(7)Silymarin + CCl ₄	21.91±8.38	17.40±19.50	0.14±0.04	47.77±26.20
P-Value ^a	0.2378	0.3996	0.0034*	0.3434
P-Value ^b	0.5758	0.0466*	0.8755	0.0207*
Duncan's test		2>3,7		2>3,6,5,4,7

a:正常對照組 (Control) 與毒藥組 (CCl₄) 經 Student's t-test 檢定之 p value

b:各治療組間經 One Way ANOVA 檢定之 p value

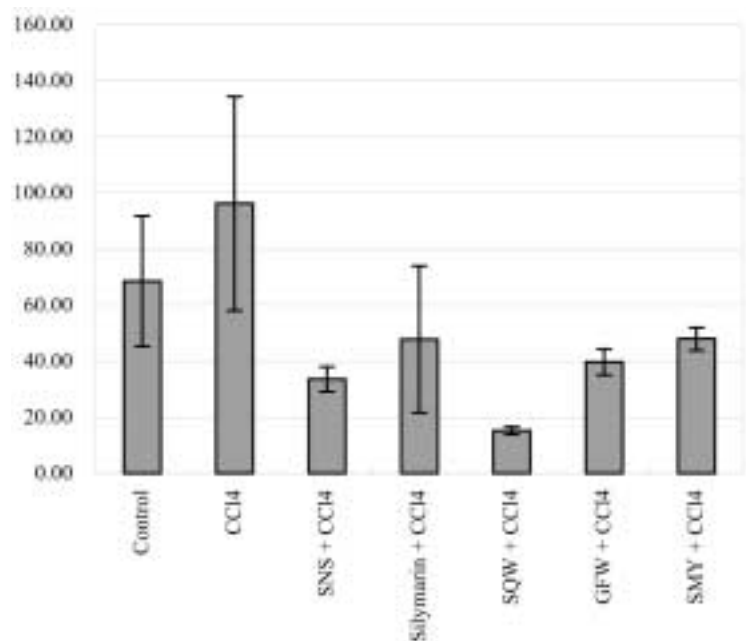
* : p<0.05

組別與劑量：(1)空白對照組、(2)毒藥組 (0.3 mL/ 100g BW (40 % CCl₄/ olive oil))、(3) 瀉青丸 (1 g/ Kg)、(4)四磨飲 (1 g/ Kg) (5)桂枝茯苓丸 (1 g/ Kg) (6)四逆散 (1 g/ Kg)、(7)參考藥物-水飛薊 (25mg/ Kg)



組別：空白對照組 (C)、毒藥組 (N)、瀉青丸 (Q)、四磨飲 (Y)、四逆散 (S)、參考藥物-水飛薊 (P)、桂枝茯苓丸 (G)

圖一、抗氧化酵素活性



組別：空白對照組 (Control)、毒藥組 (CCl₄)、瀉青丸 (SQW + CCl₄)、四磨飲 (SMY + CCl₄)、四逆散 (SNS + CCl₄)、桂枝茯苓丸 (GFW + CCl₄)、參考藥物-水飛薊 (Silymarin + CCl₄)

圖二、大鼠 DNA 損傷之評估 (8-OHdG/105dG)