

白芍鎮痛作用機轉之研究—其主要成分 Paeoniflorin 與 NMDA 接受體間關係之研究

Studies of analgesic action mechanisms of Paeonialactiflora P_{ALL}.—The relationship between paeoniflorin and NMDA receptor.

中國醫藥學院藥理學科

陳 玉 芳

摘 要

白芍是目前中醫臨床上，內科及婦科每天門診常用之中藥，由我們先前之研究結果發現，白芍具有鎮痛、鎮靜、抗痙攣及降溫等作用；進一步分離其主成分 Paeoniflorin，發現亦具有鎮痛作用，為進一步瞭解白芍之鎮痛作用機轉，本研究利用 Paeoniflorin、NMDA 接受體拮抗劑及其反序寡去氧核甙（antisense oligodeoxynucleotides），來探討 Paeoniflorin 是否與 NMDA 接受體有關。利用 Paeoniflorin、NMDA 接受體拮抗劑（MK-801），二者單獨使用或併用，對小鼠右後足背因注射 1% 福馬林所致舔腳反應時間之影響，結果發現 MK-801 單獨使用可減少小鼠右後足背因注射 1% 福馬林所致舔腳反應時間總合（early phase, $p < 0.001$; late phase,

$p<0.05$)。單獨使用 Paeoniflorin (48, 96, 240 μ g/5 μ l, i.c.v.) 對福馬林試驗，無論是 early phase 或是 late phase 皆有明顯抑制作用 ($p<0.001$)；對脊髓注射高劑量嗎啡引起小鼠產生 seizure-like excitation 之影響，結果發現投與 MK-801 可延長小鼠脊髓注射高劑量嗎啡引起 seizure-like excitation 之發作時間 (onset)，及減少一小時內 clonic seizure-like excitation 之發作總次數 ($p<0.001$)；單獨使用 Paeoniflorin 亦可呈現劑量依存性之抑制作用 ($p<0.001$)；二者併用時，其抑帛作用更加強。使用反序寡去氧核貳 (NMDA R1, 2A, 2B, 2C) 發現可延長高劑量嗎啡引起 seizure-like excitation 之發作時間 (onset)，及減少 clonic seizure-like excitation 之發作總次數 ($P<0.001$)；併用 Paeoniflorin 亦可加強其抑制作用。由以上結果顯示，Paeoniflorin 對 NMDA 接受體所媒介之行為反應有抑制作用，其機轉將待更進一步之闡述。

關鍵詞：白芍 芍藥苷 NMDA 接受體

Department of Pharmacology

China Medical College

Yuh-Fung Chen

ABSTRACT

Paeony roots (*Paeonia lactiflora* PALL) has been used in gyneco-logical disorders as an antispasmodic and analgesic drug. From our pre-vious studies, we found that *Paeonia lactiflora* has analgesic, sedative, anticonvulsive and hypothermic effects. Its active component, paeoniflorin, was also found to have analgesic effect, In order to study the analgesic mechanism of paeony roots, paeoniflorin, NMDA antagonist and antisense oligodeoxynucleotides of NMDA receptor were used in this study, Paeoniflorin (48, 96, 240 μ g/5 μ l, i.c.v.) or MK-801 (5ng/ μ l, i.t.) was administered alone

showed significant inhibition of formalin-induced licking behavior in mice . The inhibitory effect of MK-801 on formalin- test was potentiated by co-administration with paeoniflorin. Furthermore, the seizure-like excitation behavior induced by intrathecal injection of high dose morphine was inhibited by MK-801. Paeoniflorin administration alone could inhibit morphine-induced seizure-like excitation. The effect of MK-801 on morphine-induced seizure-like excitation was potentiated by paeoniflorin. Morphine-induced seizure-like excitation was inhibited by antisense oligodeoxy-nucleotides of NMDA receptor (NMDA R1, 2A, 2B, 2C) ,and this effect was enhanced by paeoniflorin. Results above revealed that there's close relationship between paeoniflorin and NMDA receptor which needed a further study.

Keywords : *Paeonia lactiflora* PALL, paeoniflorin, NMDA receptor

壹、前 言

白芍為毛茛科多年生植物 *Paeonia lactiflora* PALL. 的乾燥根，傳統中醫方劑中，常用於活血化瘀、解痙及止痛⁽¹⁻²⁾。現代藥理學文獻指出，芍藥粗提取物除了具鎮痛作用外⁽³⁾，對犬的冠狀動脈血管及後肢血管均有擴張作用⁽⁴⁾，對豚鼠、家兔之離體腸管呈現抑制作用⁽⁵⁾；顯示確實對不同部位平滑肌有選擇性的解痙作用。白芍藥之主要成分為 paeoniflorin⁽⁶⁻⁷⁾，對於周邊血管具有擴張及降壓作用，可抑制大鼠胃及子宮平滑肌之蠕動及張力⁽⁸⁻⁹⁾，並預防壓力所致潰瘍（stress ulcer）⁽¹⁰⁻¹¹⁾，對於離體橫膈肌則可阻斷其 nerve-stimulated twitch responses⁽¹²⁻¹⁶⁾，可延長 hexobarbital 所誘發之睡眠時間，並具有輕微的降溫及抗痙攣作用⁽¹⁷⁻¹⁸⁾，此外尚能抑制 carrageenan、dextran 及 α -chymotrypsin 所致大鼠足蹠浮腫現象，及抑制血管的通透性等，至於有關 Paeoniflorin 作用機轉之探討文獻仍不多見。由本研究室之預試驗發現，Paeoniflorin 可加強嗎啡之鎮痛作用，且其作用會被 naloxone（non-selective opioid antagonist）所阻斷。另外，當由脊髓投與高劑量嗎啡時，會引起大鼠產生 allodynia，其特徵為明顯週期性產生自發性

agitation 及 vocalization⁽¹⁹⁻²¹⁾，而由 peri-aqueductal gray (PAG) 處微量注射投與高劑量嗎啡，亦引起大鼠有相同之興奮作用⁽²²⁻²³⁾，在小鼠亦觀察到類似之作用⁽²⁴⁻²⁵⁾，由脊髓投與高劑量嗎啡時會引起小鼠產生一 seizure-like motor syndrome, 其特徵為後肢伸展 (hind limb extension) 及劇烈肌陣攣 (myoclonic twitches)。此外，有些臨床報告亦指出，當病人由蜘蛛膜下腔投與高劑量嗎啡時，亦會產生此種現象 (a hyperalgesic state 及 myoclonus)⁽²⁶⁻²⁷⁾。由文獻可知，脊髓注射嗎啡所引起之 seizure-like motor behavior 並不是由 opioid-receptor 來媒介^(19,20,23,25)，例如在小鼠，此作用並不被 naloxone 所拮抗，且不會形成 tolerance⁽²⁵⁾，在大鼠亦有類似的結果^(19,20,22,23)。由最近之研究指出，strychnine 及 bicuculline 在大鼠會引起類似嗎啡所致之 seizure-like motor syndrome^(21,23,28)，且非競爭性 NMDA (N-Methyl-D-aspartate) 接受體拮抗劑會阻斷這些興奮性作用，因此 NMDA 接受體被認為對此扮演著調節角色。由本研究室先前之實驗中發現，Paeoniflorin 可減輕高劑量嗎啡所引起之興奮性作用，因此芍藥是否具有拮抗 NMDA 接受體之作用，是本研究所急欲探討。本研究擬利用 Paeoniflorin、各種不同 NMDA 接受體拮抗劑及 NMDA 接受體之反序寡去氧核甙 (anti-sense oligodeoxy-nucleotides)，來探討 Paeoniflorin 對脊髓投予高劑量嗎啡所產生 seizure-like motor syndrome 之影響，是否與 NMDA 接受體有關；以期能進一步瞭解 Paeoniflorin 是否能改善嗎啡所造成之依賴性及禁斷症狀，俾能提供白芍在傳統中醫用法外之另一種臨床應用。

貳、材料與方法

一、材料

1. formalin: wako · Japan
2. (+) -MK-801 hydrogen maleate: RBI · USA
3. N-methyl-D-aspartic acid: RBI · USA
4. Paeoniflorin: Yoneyama Standard · Japan

5. Substance P TFA salt: RBI · USA
6. Antisense NMDA R1, 2A, 2B, 2C, Sense: SIGMA · USA
7. Morphine
8. NaCl: SIGMA · USA
9. KCl: SIGMA · USA
10. CaCl₂: SIGMA · USA
11. MgSO₄: SIGMA · USA
12. NaH₂PO₄: SIGMA · USA
13. NaHCO₃: SIGMA · USA
14. Glucose: SIGMA · USA
15. 微量注射器
16. 30 號針頭: BD · USA
17. 27 號針頭: BD · USA

二、方法

(一)、白芍主成分 Paeoniflorin 之抽取與純化

白芍藥材購買後經基原鑑定無誤後，將藥材切片，以甲醇浸漬後得甲醇抽取液，連續三次相同步驟，合併其甲醇抽取液經減壓濃縮，除去甲醇後，得到甲醇粗抽物，再經己烷抽取，取水層以氯仿分離，再取分離得到之水層，以正丁醇進行分配分離，取正丁醇層利用矽膠管色層分析，以不同比例之氯仿/甲醇混合液來沖提，並配合高效液相層析儀（HPLC）及薄層色層（TLC）分析，進行純化並與市售 Paeoniflorin 標準品比對，以得到藥材中之 Paeoniflorin。

(二)、實驗動物

使用體重 18-25g ICR 品系雄性鼯鼠，5 隻飼養於一籠內，保持於 12 小時的光周期環境中，食物與飲水自由取用，隨機分組後，供實驗使用，每隻鼯鼠只使用一次。

(三)、鎮痛實驗（Antinociceptive effect）

從過去文獻指出，NMDA 接受器拮抗劑 MK-801 會阻斷福馬林

試驗的早期及晚期反應⁽²⁹⁾，故福馬林試驗的反應，被認為是透過 NMDA 接受器而來，所以，我們利用福馬林試驗來探討芍藥苷與 NMDA 接受器之間的關係。

1. 福馬林試驗 (Formalin test)

參考 Dubuisson 及 Dennis 的方法⁽³⁰⁾，經腦室給予不同劑量之芍藥苷 (Paeoniflorin, 48, 96, 240 μ g/5 μ l)，對照組則給予生理食鹽水，經 20 分鐘後，用微量注射器以 27 號針頭，在鼯鼠右後足背，皮下注射 20 μ l 的 1%福馬林溶液，立即將鼯鼠置入觀察箱中，觀察並每隔 5 分鐘紀錄鼯鼠舔足（右後腳背注射福馬林的部位）之累積秒數，共紀錄 30 分鐘。將 0-5 分鐘之累積舔秒數稱為早期或第一相 (early phase; first phase) 之痛覺反應時間，而 15-30 分鐘之累積舔秒數稱為晚期或第二相 (late phase; second phase) 之痛覺反應時間。

2. 芍藥苷 (Paeoniflorin) 對 NMDA 接受體拮抗劑在福馬林試驗之影響

根據 Lutfy K.等人 (1994 年) 所發表之方法⁽³¹⁾，NMDA 接受體拮抗劑 MK-801 (5 ng/ μ l)，以微量注射器椎管內投與鼯鼠，觀察在給予 Paeoniflorin 後，在福馬林試驗之影響。

(四)、高劑量嗎啡引起鼯鼠類痙攣興奮行為反應 (clonic seizure-like excitation) 之觀察

1. 高劑量嗎啡引起鼯鼠類痙攣興奮行為 (clonic seizure-like excitation) 之觀察

參考 Lutfy K.等人之方法⁽³²⁾，鼯鼠由椎管內投與高劑量嗎啡 (80 μ g/5 μ l) 後，觀察並記錄一小時內鼯鼠產生 clonic seizure-like excitation 之發作時間及次數。

2. NMDA 接受體拮抗劑對高劑量嗎啡引起鼯鼠類痙攣興奮行為 (clonic seizure-like excitation) 之影響鼯鼠椎管內投與 NMDA 接受體拮抗劑 MK-801 (5ng/ μ l) 5 分鐘後，再由椎管內投與高劑量嗎啡後，

觀察並記錄一小時內鼯鼠產生 clonic seizure-like excitation 之發作時間及次數。

3. 芍藥苷 (Paeoniflorin) 對 NMDA 接受體拮抗劑在高劑量嗎啡引起鼯鼠類痙攣興奮行為 (clonic seizure-like excitation) 之影響在鼯鼠由側腦室給予 Paeoniflorin (48, 96, 240 μ g) 10 分鐘後, NMDA 接受體拮抗劑 MK-801 (5ng/ μ l) 由椎管內投與後 5 分鐘, 再由椎管內投與高劑量嗎啡後, 觀察並記錄一小時內雄性鼯鼠產生 clonic seizure-like excitation 之發作時間及次數。

(五)、NMDA 接受體之反序寡去氧核貳之研究

本實驗所使用 antisense ODNs 的序列, 是參考 Standaert (1996) 等學者的報告, 其序列如下:

Subunit	Probe sequence 5'-3'	Bases
NMDAR1	G CAG GTG CAT GGT GCT CAT G	-1 to +19
NMDAR2A	CA GTA GCC CAA TCT GCC CAT	+1 to +20
NMDAR2B	CTT <u>CAT</u> CTT CAG CTA GTC GG	-14 to +6
NMDAR2C	CCC ACC <u>CAT</u> GTC ACC TGG AG	-11 to +9
NMDAR1 (sense)	C ATG AGC ACC ATG CAC CTG C	

1. NMDA 接受體之反序寡去氧核貳對高劑量嗎啡引起鼯鼠類痙攣興奮行為 (clonic seizure-like excitation) 之研究

鼯鼠使用各種不同 NMDA 接受體之反序寡去氧核貳 (antisense ODNs) 15nM 溶於 ACSF 中, 由側腦室給藥 24 小時後, 由椎管內投與高劑量嗎啡 (80 μ g/5 μ l) 後, 觀察並記錄一小時內鼯鼠產生 clonic seizure-like excitation 之發作時間及次數。

2. 芍藥苷 (Paeoniflorin) 對 NMDA 接受體之反序寡去氧核貳在高劑量嗎啡引起鼯鼠類痙攣興奮行為 (clonic seizure-like excitation) 之觀察

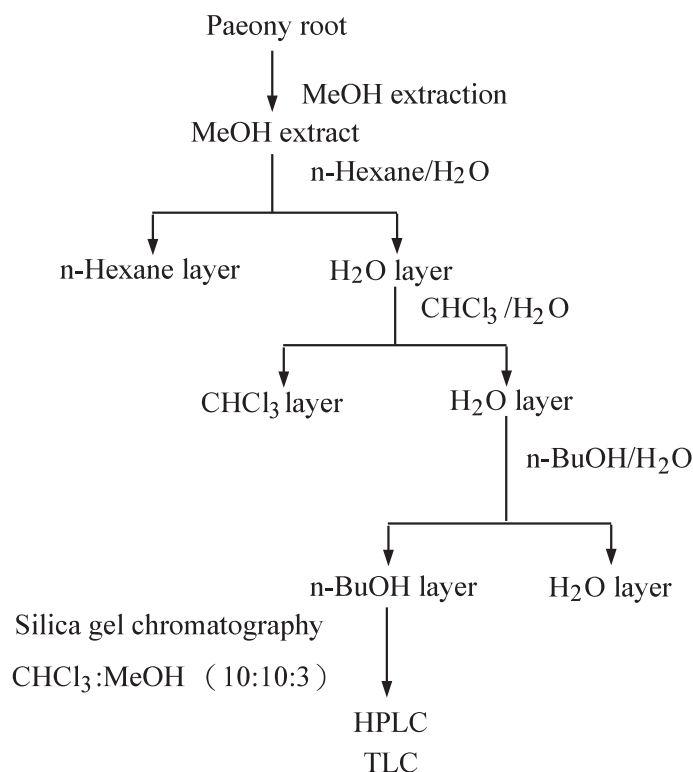
鼯鼠使用各種不同 NMDA 接受體之反序寡去氧核貳 (antisense ODNs) 15 nM 溶於 ACSF 中, 由側腦室給藥 24 小時後, 再由側腦室投與 Paeoniflorin 48 μ g/5 μ l 15 分鐘後, 再由椎管內投與高劑量嗎

啡 (80 μ g/5 μ l) 後，觀察並記錄一小時內鼯鼠產生 clonic seizure-like excitation 之發作時間及次數。

參、結 果

一、白芍主成分 Paeoniflorin 之抽取與純化

白芍藥材以甲醇浸漬後得甲醇抽取液，連續三次相同步驟，合併其甲醇抽取液經減壓濃縮，除去甲醇後，得到甲醇粗抽物，再經己烷抽取，取水層以氯仿分離，再取水層，以正丁醇進行分配分離，取正丁醇層利用矽膠管色層分析，以不同比例之氯仿/甲醇混合液來沖提，並配合高效液相層析儀 (HPLC) 及薄層色層 (TLC) 分析，進行純化並與市售 Paeoniflorin 標準品比對，以得到藥材中之 Paeoniflorin。如圖一所示：



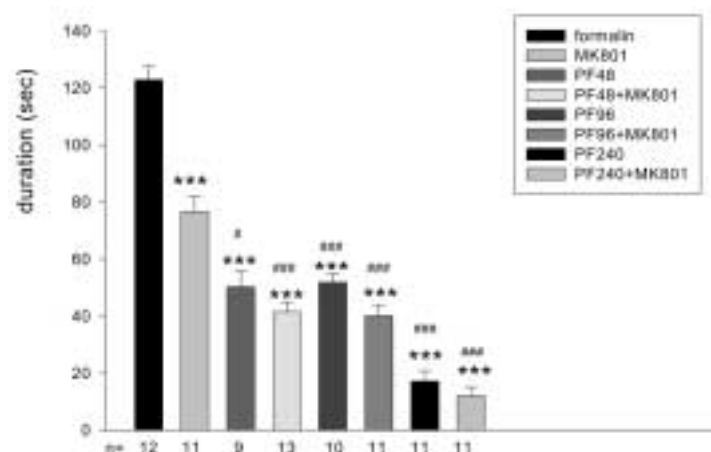
圖一、由白芍抽取及分離芍藥苷之流程圖

乾燥所得之芍藥苷為淡黃色近乎白色粉末，極易溶於水，水溶液置空氣中易氧化而使顏色變深，故芍藥苷保存時應避光冷藏保存。

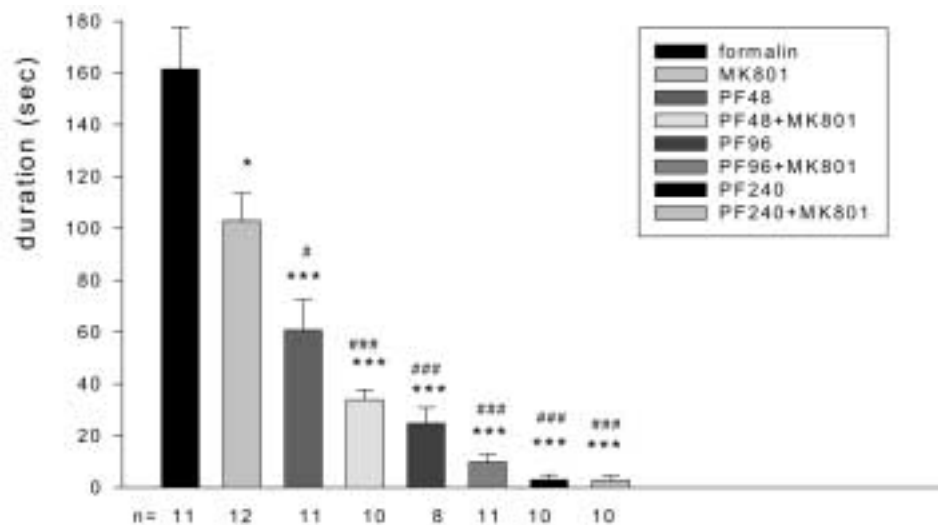
二、鎮痛實驗 (Antinociceptive effect)

芍藥苷及 NMDA 接受體拮抗劑 MK-801 對福馬林試驗早期反應之影響

在此部分的實驗，利用福馬林試驗 (Formalin test)，來作為藥效評估，分別觀察其在福馬林試驗的早期及晚期反應，有何影響。從圖二及圖三的結果可以看到 NMDA 接受器拮抗劑 MK-801 椎管內投與 5ng 時，會降低福馬林試驗的早期及晚期反應，而單獨給予芍藥苷 48, 96, 240 μ g 時，降低的程度比 MK-801 更大，但若合併二者使用時，降低福馬林試驗早期及晚期反應的現象更加明顯，而且有劑量依存性 (dose-dependent) 的關係存在。



圖二、芍藥苷及 NMDA 接受體拮抗劑 MK-801 對福馬林試驗早期反應之影響。芍藥苷 (PF) 之使用劑量為 48, 96, 240 μ g/5 μ l，由鼯鼠之側腦室給藥，15 分鐘後由鼯鼠之右後足背注射 20 μ l 1% 福馬林溶液。MK-801 (5 ng/5 μ l) 則是在注射 20 μ l 1% 福馬林溶液 5 分鐘之前由椎管投與。各條狀圖代表各組平均值 (標準誤，* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 代表各組與控制組間之比較異差，而# P<0.05, ## P<0.01, ### P<0.001 則代表芍藥苷與 MK-801 併用後，與 MK-801 group 組之比較異差。

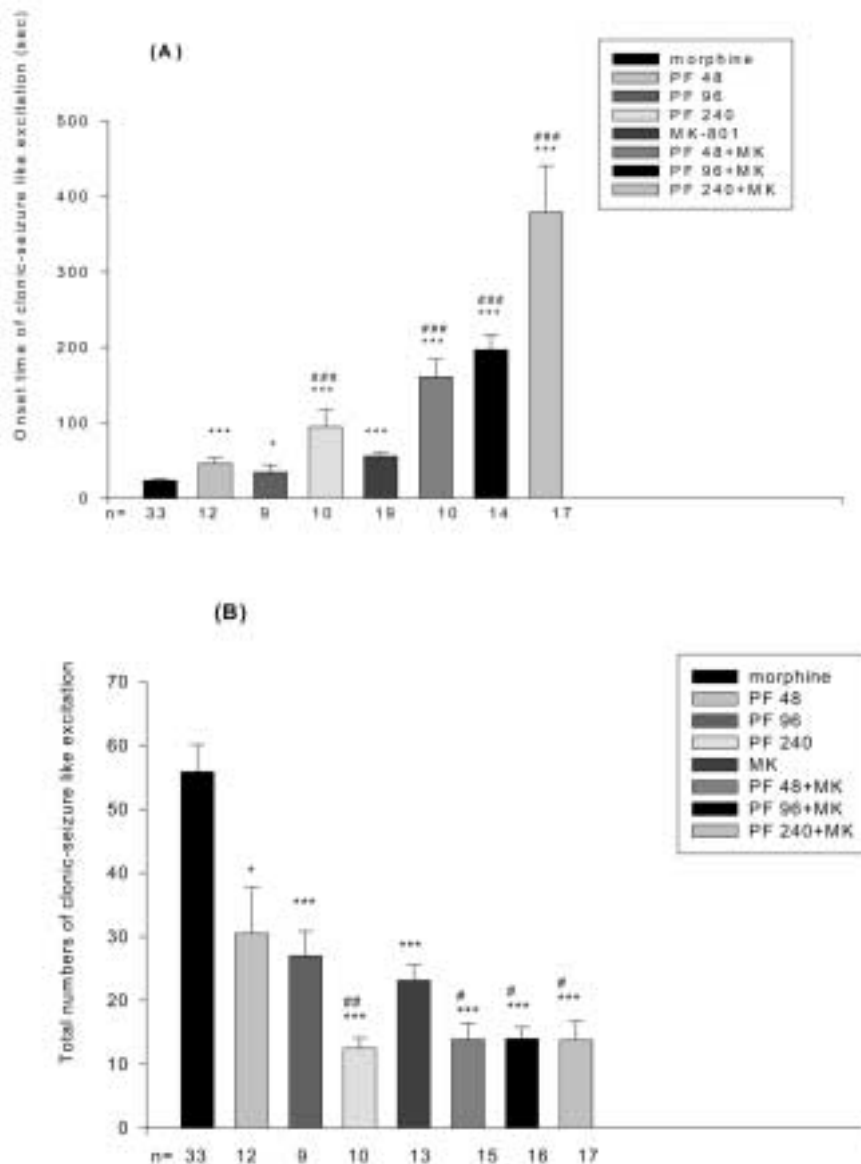


圖三、芍藥苷及 NMDA 接受體拮抗劑 MK-801 對福馬林試驗晚期反應之影響。芍藥苷 (PF) 之使用劑量為 48, 96, 240 μ g/5 μ l，由鼯鼠之側腦室給藥，15 分鐘後由鼯鼠之右後足背注射 20 μ l 1% 福馬林溶液。MK-801 (5 ng/5 μ l) 則是在注射 20 μ l 1% 福馬林溶液 5 分鐘之前由椎管投與。各條狀圖代表各組平均值 (標準誤，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 代表各組與控制組間之比較異差，而# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 則代表芍藥苷與 MK-801 併用後，與 MK-801 group 組之比較異差。

三、高劑量嗎啡引起鼯鼠類痙攣興奮反應 (clonic seizure-like excitation) 之影響

芍藥苷及 NMDA 接受體拮抗劑 MK-801 高劑量嗎啡引起鼯鼠類痙攣興奮行為反應 (clonic seizure-like excitation) 之影響

如圖四所示，(A) 代表是高劑量嗎啡引起類痙攣反應的起始時間 (onset)，(B) 表示嗎啡引起類痙攣反應後 1 小時內，鼯鼠類痙攣反應發作的次數。



圖四、芍藥苷及 NMDA 接受體拮抗劑 MK-801 對高劑量嗎啡所致小鼠類痙攣興奮反應之影響。芍藥苷 (PF) 之使用劑量為 48, 96, 240 μ g/5 μ l，由小鼠之側腦室給藥，15 分鐘後由小鼠之椎管注射高劑量嗎啡。MK-801 (5ng /5 μ l) 則是在注射高劑量嗎啡 5 分鐘之前由椎管投與。各條狀圖代表各組平均值 (標準誤，* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 代表各組與高劑量嗎啡組間之比較異差，而# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 則代表芍藥苷與 MK-801 併用後，與 MK-801 group 組之比較異差。

圖 (A) 的結果，控制組的秒數是 23.5 ± 1.96 秒，給予芍藥苷 48 (45.83 ± 8.03 秒)， $240 \mu\text{g}$ (94.70 ± 22.74 秒) 之後，可以延長高劑量嗎啡發作的起始時間 ($p < 0.001$)，而單獨給予 MK-801 亦有明顯之效果 (55.84 ± 4.55 秒， $p < 0.001$)，而二者併用後，其延長效果更加明顯 (160.90 ± 23.08 ， 196.71 ± 20.57 ， 379.06 ± 61.62 ， $p < 0.001$)，且併用芍藥苷三種劑量後均比單獨給予 MK-801 強 ($p < 0.001$)。由 (B) 圖的結果，控制組次數為 55.85 ± 4.27 ，給予芍藥苷 48，96， $240 \mu\text{g}$ (30.50 ± 7.19 ， 27.00 ± 3.85 ， 12.50 ± 1.61) 之後，可以明顯降低 1 小時內的發作次數，而且有劑量依存性的關係。單獨給予 MK-801 的藥效，亦會降低發作次數 (23.15 ± 2.44 ， $p < 0.001$)。顯示，芍藥苷亦可抑制高劑量嗎啡的反應，而且併用 MK-801 後，效果更強 (13.87 ± 2.57 ， 14.00 ± 1.81 ， 13.77 ± 2.97 ， $p < 0.001$)。由此部分結果得知，單獨給予芍藥苷及 MK-801，可以抑制高劑量嗎啡引起之類痙攣反應，但二者合併給予後效果更加明顯。

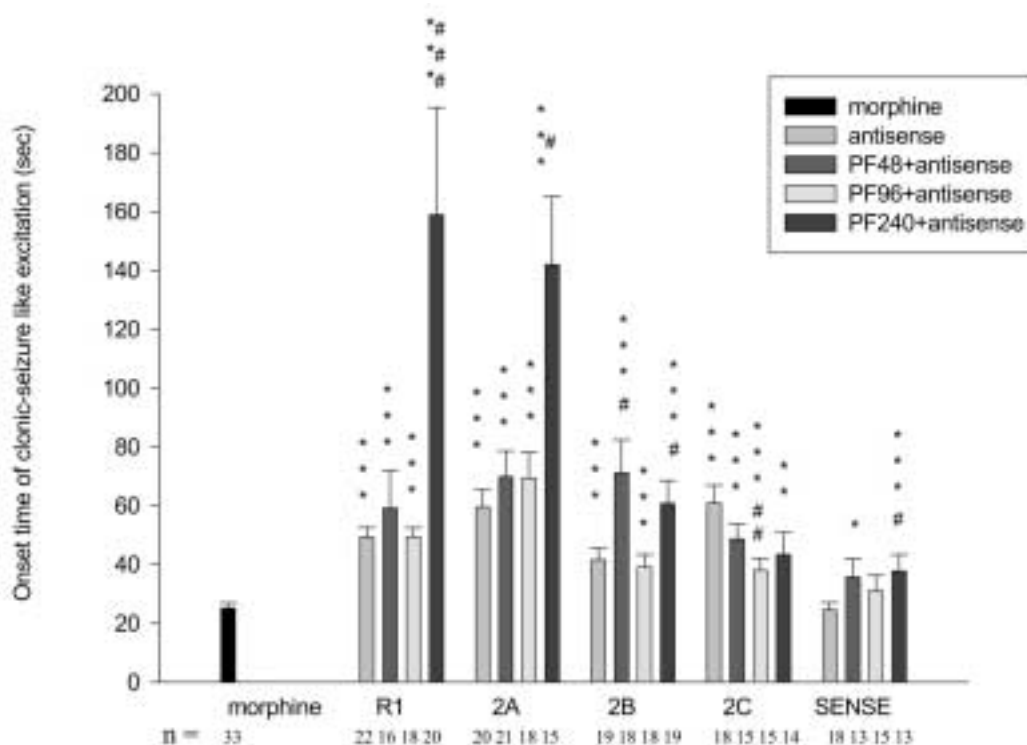
四、NMDA 接受體之反序寡去氧核甙之研究

芍藥苷 (Paeoniflorin) 對 NMDA 接受體之反序寡去氧核在高劑量嗎啡引起鼯鼠類痙攣興奮行為 (clonic seizure-like excitation) 之觀察

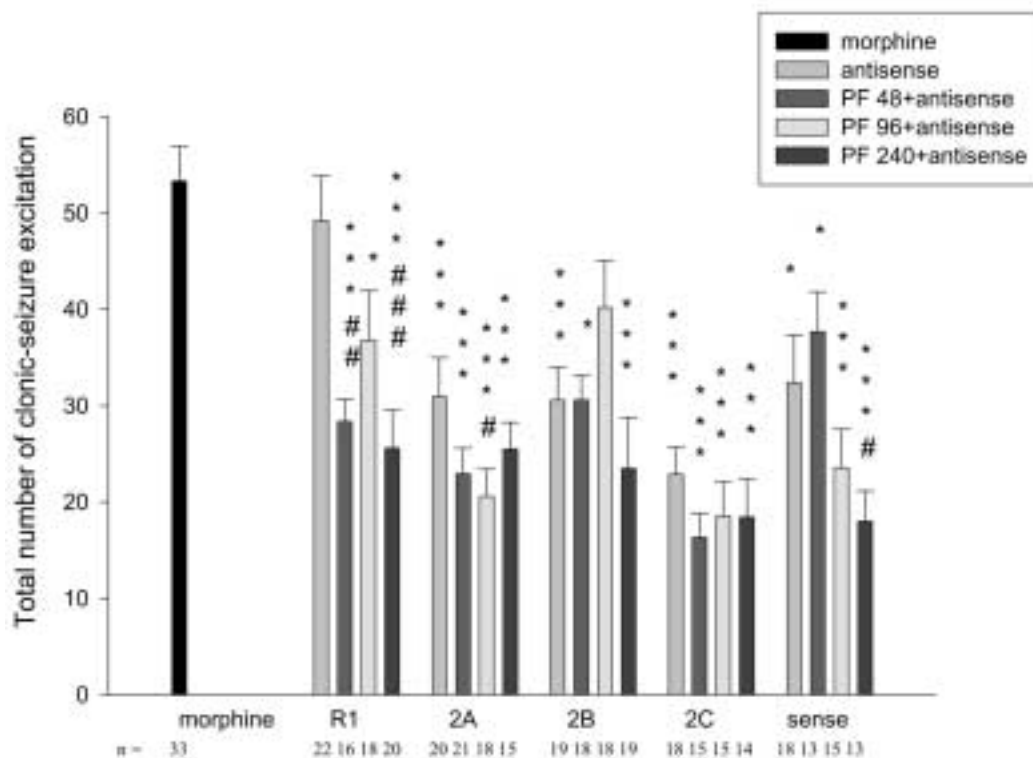
如圖五所示，為高劑量嗎啡引起類痙攣反應的起始時間 (onset)，給予反序寡去氧核-NR1、2A、2B、2C、sense，結果發現單獨給予 NR1、2A、2B、2C 後，可明顯延長高劑量嗎啡類痙攣起始反應時間 ($p < 0.001$)，類痙攣起始反應時間 ($p < 0.001$)，而併用芍藥苷 48，96， $240 \mu\text{g}$ (g，也更明顯會延長反應時間，其延長現象比單獨給予反序寡去氧核甙更長，如在 R1 併用芍藥苷 $240 \mu\text{g}$ 時 ($p < 0.001$)，2A 併用芍藥苷 $240 \mu\text{g}$ 時 ($p < 0.05$)，2B 併用芍藥苷 48 及 $240 \mu\text{g}$ 時 ($p < 0.05$)，2C 併用芍藥苷 $96 \mu\text{g}$ ($p < 0.01$)。在 sense 單獨給予時與控制組是沒有差別的，而併用芍藥苷 48， $240 \mu\text{g}$ 時，則分

別有 $p<0.05$ 及 0.001 的差異出現。

圖六表示嗎啡引起類痙攣反應後 1 小時內，谿鼠發作的次數。由此的結果，給予反序寡去氧核-NR1、2A、2B、2C、sense，結果發現單獨給予 2A、2B、2C 後，可明顯降低高劑量嗎啡類痙攣發作次數 ($p<0.001$)，而併用芍藥苷 48，96，240 μg ，也更明顯會延長反應時間，其延長現象比單獨給予反序寡去氧核更長，如在 R1 併用芍藥苷 48，240 μg 時（分別是 $p<0.01$ 及 0.001 ），2A 併用芍藥苷 96 μg 時 ($p<0.05$)。在 sense 單獨給予時與控制組是有差異存在 ($p<0.05$)，而併用併用芍藥苷 48，96，240 μg 時，則分別有 $p<0.05$ 、 0.001 及 0.001 的差異出現，而且 240 μg 時，與 sense 組亦有抑制程度的差異 ($p<0.05$)。



圖五、芍藥苷 (Paeoniflorin) 對 NMDA 接受體之反序寡去氧核甙在高劑量嗎啡引起鼯鼠類痙攣興奮行為 (clonic seizure-like excitation) 發作次數之影響 NMDA 接受體之反序寡去氧核甙 (15nM / 5 (1) 給藥 24 小時後，由椎管投與高劑量嗎啡 (80 μ g / 5 μ l)。芍藥苷 (PF 48, 96, 240 μ g / 5 μ l) 在投與高劑量嗎啡之 15 分鐘前由側腦室投與，高劑量嗎啡所引起鼯鼠類痙攣興奮行為之觀察時間為 60 分鐘。各條狀圖代表各組平均值 (標準誤, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 代表各組與高劑量嗎啡組間之比較異差，而# P<0.05, ## P<0.01, ### P<0.001 則代表芍藥苷與 NMDA 接受體之反序寡去氧核甙併用後，與 NMDA 接受體之反序寡去氧核甙組之比較異差。



圖六、芍藥苷 (Paeoniflorin) 對 NMDA 接受體之反序寡去氧核糖在高劑量嗎啡引起鼯鼠類痙攣興奮行為 (clonic seizure-like excitation) 發作次數之影響。NMDA 接受體之反序寡去氧核糖 (15nM / 5 μ l) 給藥 24 小時後，由椎管投與高劑量嗎啡 (80 μ g / 5 μ l)。芍藥苷 (PF 48, 96, 240 μ g / 5 μ l) 在投與高劑量嗎啡之 15 分鐘前由側腦室投與，高劑量嗎啡所引起鼯鼠類痙攣興奮行為之觀察時間為 60 分鐘。各條狀圖代表各組平均值 (標準誤，* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 代表各組與高劑量嗎啡組間之比較異差，而# P<0.05, ## P<0.01, ### P<0.001 則代表芍藥苷與 NMDA 接受體之反序寡去氧核糖併用後，與 NMDA 接受體之反序寡去氧核糖組之比較異差。

由圖五及圖六之結果顯示，單獨給予反序寡去氧核糖核酸-NR1、2A、2B、2C、sense，會抑制高劑量嗎啡誘發類痙攣行為的反應，而合併給予芍藥苷 48，96，240 μ g 之後，可以更明顯的延長高劑

量嗎啡發作的起始時間，及 1 小時內的發作次數。

肆、討 論

在本研究中所使用的鎮痛反應模式，是福馬林試驗。福馬林試驗是於 1977 年被提出的⁽³⁰⁾，將福馬林溶液注射於動物之足部，引起之疼痛，會使動物產生舔足及頓足之行為表現。1984 年時，經 Takahashi 等學者研究發現⁽⁴³⁾，其所產生的舔足反應，有雙向（biphasic response）的特殊作用出現，在 0-5 分鐘時，為早期反應（early phase）；在 15-30 分鐘，為晚期反應（late phase）。而早期是中樞的作用，為直接刺激疼痛接受器（nociceptor），釋放 substance P 或 bradykinin 等致痛物質，晚期則是周邊的作用，微福馬林引起之發炎反應，釋放化學傳遞物質，如 histamine, prostaglandins, serotonin, kinin 等有關⁽⁴¹⁾。

從本篇的研究中，由福馬林試驗的實驗結果得知，芍藥苷可以降低福馬林試驗的早期及晚期反應，NMDA 接受器的拮抗劑 MK-801 也可以降低早期和晚期反應，而兩者併用之後，其抑制反應的程度是更加明顯的，不管是早期或晚期反應，且有劑量依存性（dose dependent）。關於此部分福馬林實驗的結果方面，這與我們實驗室之前所發表的，芍藥苷可以抑制福馬林的早期、晚期反應及醋酸扭體反應，是相符合的。1984 年 Sugishita⁽⁴²⁾發表，芍藥苷可以抑制在小鼠身上所誘發的醋酸扭體反應，此結果亦與我們的數據相符合。所以，由此階段的結果，可以推論，芍藥苷與 NMDA 接受器之間有關連性存在。

1994 年，有學者發表 MK-801 會抑制高劑量嗎啡誘發的類痙攣行為⁽³¹⁾。認為高劑量嗎啡誘發的類痙攣行為應該是透過 NMDA 接受器而來，而由我們之實驗中亦證實，芍藥苷會明顯加強 MK-801 對高劑量嗎啡誘發的類痙攣行為之抑制作用，無論是在高劑量嗎啡誘發的類痙攣行為之發作起始時間（onset）或是 60 分鐘內類痙攣行為之發作次數上，皆呈現劑量

依存性。由此可推論，芍藥苷與 NMDA 接受器之間的確有關連存在。

基於以上的實驗數據，故我們利用 NMDA 接受器的反序寡核糖核序列，來探討在福馬林試驗及中樞興奮作用，芍藥苷所表現的與 NMDA 接受器的關係，是透過哪一次體（subunit）而來？結果，我們在高劑量嗎啡引發的類痙攣反應中，發現我們使用的反序寡核糖核序列，包括 NR1, 2A, 2B, 2C 等等，都發現可以延長其類痙攣反應的起始時間（onset）及抑制其類痙攣反應，而且併用芍藥苷之後，效果更加明顯。

根據本實驗室之前的研究結果發現，芍藥苷阻斷鈣離子管道，使細胞外鈣離子無法進入細胞內，因而減低細胞內鈣離子濃度，而拮抗藜蘆鹼的作用⁽³⁴⁾，和其他學者的研究，發現芍藥苷與鈣離子的流動有相當密切的關係。在離體大鼠心房中，芍藥苷能夠抑制藜蘆鹼所引起的收縮及心律不整的作用，且此拮抗作用與阻斷鈣離子管道相關⁽³⁵⁾。當 NMDA 接受體被過度活化時，興奮性氨基酸使離子管道過度開放，鈣離子流入細胞內過多，使得濃度過高時，會使整個神經元產生細胞毒殺性，而使神經受損，NMDA 接受器的阻斷劑，具有神經保護作用。NMDA 接受器被過度活化時，會使神經原損傷，而 NMDA 接受器阻斷劑，可以阻斷此現象⁽³⁶⁾。所以此類 NMDA 接受器的阻斷劑，如 MK-801，可以用來治療帕金森氏症等神經元異常興奮的疾病⁽³⁷⁾。所以，吾人推論，芍藥苷在福馬林試驗和藥物引起之中樞興奮作用的良好抑制效果，可能是透過抑制鈣離子流動而來。

芍藥苷及芍藥的粗抽物可以抑制在大鼠身上投與 PTZ 所誘發的痙攣反應⁽³⁸⁾，是因為芍藥苷會降低細胞外鈣離子的濃度⁽³⁹⁾，增加細胞內鈣的濃度⁽¹³⁾並抑制細胞內鈣離子的流動⁽¹³⁾。1992 年，學者發表利用腹部牽引實驗（abdominal assay），直接在椎管內注射鈣離子 72 nmol 在小鼠身上，可以抑制疼痛，而且也可抑制椎管內投與 NMDA 誘發的抓與咬的興奮行為⁽⁴⁰⁾。

所以，從本研究中觀察到的結果，可得到一個推論，芍藥苷的作用是

否是透過影響 NMDA 接受體的鈣離子通道活性而來的，有待進一步之研究證實。

伍、結論與建議

由以上之實驗結果，得到以下結論：

1. 芍藥苷會加強 NMDA 接受體拮抗劑 MK-801 對福馬林試驗之抑制作用，且此作用呈現劑量依存性。
2. NMDA 接受體拮抗劑 MK-801 抑制高劑量嗎啡所致之小鼠類痙攣興奮作用，會被芍藥苷所加強，且此作用呈現劑量依存性。
3. NMDA 接受體次單位之反序寡核糖核會抑制高劑量嗎啡所致之小鼠類痙攣興奮作用，此作用會被芍藥苷呈現劑量依存性加強。

由以上實驗結果顯示，芍藥苷對福馬林試驗之鎮痛作用以及抑制高劑量嗎啡所致之小鼠類痙攣興奮作用，可能與 NMDA 接受體之抑制有關，然而其真正作用機轉，有待進一步之探討。

至於將來有關芍藥苷作用機轉之探討，將朝下列幾個方向進行：

1. 擬以芍藥之粗抽取物口服，來進行期於小鼠體內之代謝及藥品動力學探討，以瞭解芍藥苷真正進入中樞系統之量有多少。
2. 進行芍藥苷對幾種不同接受體之 receptor binding assay，以瞭解芍藥苷究竟是作用在何種接受體。
3. 探討芍藥苷是否作用在不同於 MK-801 之 NMDA 接受體上。
4. 建立屬於中醫範疇之「虛痛」的動物模式，以評估芍藥或芍藥甘草湯對於中醫臨床之虛痛病人之療效機轉。

陸、參考文獻

1. 顏正華：中藥學（上），知音出版社，台北，162-4，831-6，1991。
2. 李念秋：“芍藥能鎮痛、鎮痛不離經”瑣談，中國中藥雜誌，14(1)：52-3，1989。
3. 劉冰青：芍藥湯新用，江西中醫藥，5:31-6，1984。
4. 王欽茂：芍藥總苷對心血管的藥理作用，中國藥理學通報，25(2)：26-8，1984。
5. 崔豐年：芍藥甘草湯的藥理學研究和臨床應用，中成藥，13(7)：36-7，1991。
6. Shibata S, Nakahara M. Studies on the constituents of Japanese and Chinese crude drugs. VIII. Paeoniflorin, A glucoside of Chinese paeony root. (1). Chem Pharm Bull 1993, 11: 372-378.
7. Shibata S, Aimi N, Nakahara M. Studies on the constituents of Japanese and Chinese crude drugs. IX. Paeoniflorin, A glucoside of Chinese paeony root. (2) Chem Pharm Bull 1963, 11:379-81.
8. Takagi K, Harada M. Pharmacological studies on herb paeony root. Effects of paeoniflorin on circulatory and respiratory systems and isolated organs. Yakugaku Zasshi 1969, 89(7): 893-898.
9. Kobayashi M, Ueda C, Aoki S, Tajima K, Tanaka N, Yamahara J. Anticholinergic action of paeony root and its active constituents. Yakugaku Zasshi 1990, 110(12): 964-968.
10. Takagi K, Harada M, Pharmacological studies on herb paeony root. II Anti-inflammatory effect, inhibitory effect on gastric juice secretion, preventive effect on stress ulcer, anti-diuretic effect of paeoniflorin and combined effects with licorice component FM 100. Yakugaku Zasshi 1969, 89(2): 887-892.
11. Yamahara J, Yamada T, Kimura H, Sawada T, Fujimura H. Biologically ac-

- tive principles of crude drugs. II. Anti-allergic principles in “Shoseiryu-To” anti-inflammatory properties of paeoniflorin and its derivatives. *J Pharmacobiodynamics* 1982, 5(11): 921-929.
12. Kimura M, Kimura I, Muroi M, Nakamura T, Shibata S. Depolarizing effects of glycyrrhizin-derivatives relating to the blend effects with paeoniflorin on mouse diaphragm muscle. *Japan J Pharmacol* 1986, 41(2): 263-65.
 13. Kimura M, Kimura I, Kimura M. Decreasing effects by glycyrrhizin and paeoniflorin on Intracellular Ca^{2+} -aequorin luminescence transients with or without caffeine in directly stimulated-diaphragm muscle of mouse. *Japan J Pharmacol* 1985, 39(3): 387-390.
 14. Kimura M, Kimura I, Nojima H. Depolarizing neuromuscular blocking action induced by electropharmacological coupling in the combined effect of paeoniflorin and glycyrrhizin. *Japan J Pharmacol* 1985, 37(4): 395-399.
 15. Kimura M, Kimura I, Takahashi K, Muroi M, Yashizaki M, Kanaoka M, Kitagawa I. Blocking effects of blended paeoniflorin or its related compounds with glycyrrhizin on neuromuscle Junction in frog and mouse. *Japan J Pharmacol* 1984, 36(3): 275-282.
 16. Dezaki K, Kimura I, Miyahara K, Kimura M. Complementary effects of paeoniflorin and glycyrrhizin on intracellular Ca^{2+} mobilization in the nerve-stimulated skeletal muscle of mice. *Japan J Pharmacol* 1995, 69:281-284.
 17. Takagi K, Harada M. Pharmacological studies on herb paeony root. I. Central effects of paeoniflorin and combined effects with licorice component FM100. *Yakugaku Zasshi* 1969, 89(7): 879-886.
 18. Sugishita E, Amagaya S, Ogihara Y. Studies on the combination of Glycyrrhizae radix in Shakuyakukanzo-To. *J Pharmacobio-Dynamics* 1984, 7 (7): 427-435.
 19. Ohta H, Ni JW, Matsumoto K, Watanabe H, Shimizu M. Paeony and its ma-

- jor constituent, paeoniflorin, improve radial maze performance impaired by scopolamine in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1993, 45(3): 719-723.
20. Ohta H, Matsumoto K, Watanabe H, Shimizu M. Involvement of beta-adrenergic systems in the antagonizing effect of paeoniflorin on the scopolamine-induced deficit in radial maze performance in rats. *Japan J Pharmacol* 1993, 62(4): 345-349.
 21. Ohta H, Matsumoto K, Watanabe H, and Shimizu M. Involvement of alpha 1-but not alpha 2-adrenergic system in the antagonizing effect of paeoniflorin on the scopolamine-induced deficit in radial maze performance in rats. *Japan J Pharmacol* 1993, 62(2): 199-202.
 22. Abdel-Hafez AA, Meselhy MR, Nakamura N, Hattori M, Watanabe H, Murakami Y, El-Gendy MA, Mahfouz NM, Mohamed TA. Effects of paeoniflorin derivatives on scopolamine-induced amnesia using a passive avoidance task in mice: structure-activity relationship. *Biol Pharm Bull* 1998, 21(11): 1174-1179.
 23. Watanabe H. Candidates for cognitive enhancer extracted from medicinal plants: paeoniflorin and tetramethylpyrazine. *Behav Brain Res* 1997, 83(1-2): 135-41.
 24. Meldrum BS. Excitotoxicity and epileptic brain damage. *Epilepsy Res* 1991, 10:55-61.
 25. Stephens DN, Meldrum BS, Weidmann R, Schneider C, Grutzner M. (Does the excitatory amino acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity? *Psycho-pharmacology* 1996, 90: 166-169.
 26. Trujillo KA, Akil H. Excitatory amino acid and drugs of abuse: A role for N-methyl-D-aspartate receptors in drug tolerance, sensitization and physical dependence. *Drug Alcohol Depend* 1995, 38: 139-154.
 27. Coderre TJ. The role of excitatory amino acid receptors and intracellular

- messengers in persistent nociception after tissue injury in rats. *Mol Neurobiol* 1993, 7: 229-246.
28. Young AB, Greenamyre JT, Hollingsworth Z, Albin RL, D'Amato C, Shoulson I, Penney JB. NMDA receptor losses in putamen from patients with Huntington's disease. *Science* (Wash. D.C.) 1988, 241: 981-983.
 29. Davidson EM, Coggeshall RE, Carlton SM. Peripheral NMDA and non-NMDA glutamate receptors contribute to nociceptive behaviors in the rat formalin test. *Neuro Report* 1997, 8: 941-946.
 30. Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977, 4: 161-174.
 31. Lutfy K, Woodward R, Keana J, Weber E. Inhibition of clonic seizure-like excitatory effects induced by intrathecal morphine using two NMDA receptor antagonists: MK-801 and ACEA-1011. *Euro J Pharmacol* 1994, 252: 261-266.
 32. Lutfy K, Shen KZ, Kwon IS, Cai SX, Woodward RM, Keana JF, Weber E. Blockade of morphine tolerance by ACEA-1328, a novel NMDA receptor/glycine site antagonist. *Euro J Pharmacol* 1995, 273(1-2): 187-189.
 33. Standaert D, Testa C, Rodolf G, Hollingsworth Z. Inhibition of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor subunit expression by antisense oligonucleotides reveals their role in striatal motor regulation. *J Pharmacol Exp Ther* 1996, 276: 342-352.
 34. 林郁茲，芍藥苷與藜蘆鹼相互作用之研究中國醫藥學院中國藥學研究所博士論文 1999, 中國醫藥學院，台中，台灣。
 35. Tsai HY, Lin YT, Chen YF, Chen CF. The interactions of paeoniflorin and veratrine on isolated rat atria. *J Ethnopharmacol* 1997, 57: 169-176.
 36. Sakaguchi Y, Kuno M, Kawasaki K. Protection of excitotoxic neuronal death

- by gluconate through blockade of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience* 1999, 92(2): 677-684.
37. Stieg EP, Sathi S, Warach S, Le DA, Lipton SA. Neuroprotection by NMDA receptor-associated open-channel blocker memantine in a photothrobotic model of cerebral focal ischemia in neonatal rat. *Eur Jpharmacol* 1999, 375: 115-120.
 38. Abdel-Hafez AA, Meselhy MR, Nakamura N, Hattori M, Watanabe H, Mohamed TA, Mahfouz NM, El-Gendy MA. Potent anticonvulsant paeoniflorin-I derivatives obtained by incubation of paeoniflorin and thiol compounds with *Lactobacillus brevis*. *Chem Pharm Bull* 1998, 46(9): 1486-1487.
 39. Sugaya A, Suzuki T, Sugaya E, Yuyama N, Yasuda K, Tsuda T. Inhibitory effect of peony root extract on pentylenetetrazol-induced EEG power spectrum changes and extracellular calcium concentration changes in rat cerebral cortex. *J Ethnopharmacol* 1991, 33(1-2): 159-167.
 40. Hornfeldt CS, Smullin DH, Schamber CD, Sun X, Larson AA. Antinociceptive effects of intrathecal taurine and calcium in the mouse. *Life Sci* 1992, 50(24): 1925-1934.
 41. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response *Pain* 1989, 38: 347-352.
 42. Sugishita E, Amagaya S, Ogihara Y. Studies on the combination of *Glycyrrhizae Radix* in shakuyakukanzoto. *J Pharmacobiodyn* 1984,7: 427-435.
 43. Takahashi M, Tokuyama S, Kaneto H. Implication of endogenous opioid mechanism in the production of antinociceptive effect induced by psychological stress in mice. *Japan J Pharmacol* 1984, 44: 283-291.

