

血府逐瘀湯與冠心二號方活性成分與 藥理作用之研究（3-2）

Studies on the Blood Stasis Abolition Soup and Coronary Heart Disease Regimen II（3-2）

台北榮民總醫院

蕭 明 熙

摘 要

心血管疾病是國人健康上的重大威脅，此疾病主要乃因動脈粥狀硬化所導致。中國傳統醫學的活血化瘀理論中，明確關乎老年退化性疾病的部份，與西方醫學之動脈粥狀硬化最為相容。血府逐瘀湯與冠心二號方二種複方分別是先賢與現代大陸學者所提出之活血化瘀複方。審視此二複方的生藥天然物組成、藥理學與臨床應用，並依據動脈粥狀硬化之分子病因形成之特徵乃提出以下假說：血府逐瘀湯較著重於病因形成前期之預防，而冠心二號方則較著重於動脈粥狀硬化的治療，然其中均仍有改進的空間，故提出此三年研究計劃。第一年工作完成生藥抽取，引入 apoE（-）小鼠模式探討二複方在動脈粥狀硬化形成之防治角色，顯示冠心二號方確能中程度抑制動脈粥狀硬化。血府逐瘀湯無此效果，推論乃是組成生藥種類過多，無效組成佔太多所致。丹參一方即呈現抗動脈粥狀硬化效果，最值得深入研究。

今（第二年）則依據特定抗動脈粥狀硬化指標設計離體實驗，找出二複方組成生藥或活性成份之效果，並建立活性指標成份與天然物的分析方法。以人類肝癌細胞株 HepG2 為模式探討二複方之組成生藥何者可以抑制膽固醇生合成，結果顯示血府逐瘀湯與冠心二號方共十三種組成生藥中，並無明顯抑制膽固醇生合成的藥理功效，採抑制低密度脂蛋白（LDL）氧化修飾篩選，獲知血府逐瘀湯生藥中最具保護 LDL 免於氧化破壞者為當歸、赤芍、甘草，冠心二號方則為丹參、降香、赤芍。緊接其後者，在二複方中均為紅花與川芎。就抑制 LDL 氧化之抗氧化劑可能具抗動脈粥狀硬化之角度而言，冠心二號方五種生藥佔其三。以 J774 巨噬細胞吞入 OxLDL 為模式，探討二複方之組成生藥是否可以抑制巨噬細胞藉表現出清除受體而攝入 OxLDL 變成泡細胞的能力，顯示只有丹參甲醇提取物明顯具有抑制巨噬細胞清除受體攝入 OxLDL 的活性。平行於上述離體藥理活性研究，亦採用液相層析法為主要分析工具，確認離體藥理作用有效生藥之天然物指標成分，特別著重在丹參上。本年度之工作大致均已按原規劃完成，已獲知二種複方之組成藥何者對於抑制動脈粥狀硬化形成之關鍵步驟具有貢獻，且於離體試驗中表現出對趨動脈粥狀硬化的一些因素具有抑制效果，此成果有助於未來建立新複方。

關鍵詞：活血化瘀；動脈粥狀硬化；血府逐瘀湯；冠心二號方

Department of Medical Research and Education,
Veterans General Hospital-Taipei

Ming-Shi Shiao

ABSTRACT

Coronary heart disease (CHD) causing by atherosclerosis is a severe health risk

in Taiwan. The theory of blood stasis in traditional Chinese medicine, in a particular aspect, is most compatible with atherosclerosis. The regimens called "Blood Stasis Abolition Soup (BSA-S)" and "Coronary Heart Disease regimen II (CHD-2)" are originated from ancient wisdom and modern science. We propose that BSA-S may be effective in a preventive manner in the early stage of atherosclerosis and CHD-2 is effective in the treatment of advanced atherosclerosis. This three-year study is proposed to verify this working hypothesis and to develop a superior regimen. In the previous study, we have used apoE (-) mice, a pathological animal model of LDL oxidation and spontaneous atherosclerosis, to confirm that CHD-2 moderately reduced atherosclerosis but BSA-S, which contains eleven herbal plants, did not. *Salvia miltiorrhiza* alone was effective to reduce atherosclerosis.

In this year, we have established several key pathogenesis-based in vitro assays to correlate the above-mentioned in vivo pharmacology. The component herbs in these two regimens did not contain potent cholesterol biosynthesis inhibitors as determined by the incorporation of labeled acetate as precursor into cholesterol by HepG2 cells. Based on the inhibition of in vitro LDL oxidation, we identified *Angelica sinensis*, *Paeonia lactiflora*, and *Glycyrrhiza uralensis* in BSA-S and *Salvia miltiorrhiza*, *Dalbergia odorifera*, and *Paeonia lactiflora* in CHD-2 that contributed to the antioxidant activities. In the inhibition assay of OxLDL uptake by cultured macrophage J774 cells, *Salvia miltiorrhiza* was the only herb that exhibited significant scavenger receptor inhibitory activity. We established the chemical profiles of effective fractions, and in some cases the chemical markers, by using HPLC as a tool. In conclusion, this study has been carried out according to the original design. Many effective component herbs in these two regimens have been identified based on the key events in the pathogenesis of atherosclerosis. The information may greatly shed light on the future development of more effective regimen in the treatment of atherosclerosis.

Keywords : blood stasis; atherosclerosis; blood stasis abolition soup; coronary heart disease regimen II.

壹、前 言

本計劃探討血府逐瘀湯與冠心二號方二種活血化瘀複方抑制動脈粥狀硬化 (atherosclerosis) 的藥理功效。首先，藉能否在實驗動物模式 (apoE-deficient mice) 表現抗動脈粥狀硬化，做為二複方是否有效之依據 (第一年)。再藉二種活血化瘀複方的組成生藥在動脈粥狀硬化形成過程中，抑制一些關鍵性過程之效果為指標，以確認二複方由預防到延緩動脈硬化進展之功效，以離體方式行之 (第二年)。最終目標則盼能去蕪存菁，發展出一種新穎且更合於抗動脈粥狀硬化分子醫學基礎，並確具藥理功效之新複方 (第三年)。本年度 (89 年度, 第二年) 之研究採離體方式，探討血府逐瘀湯與冠心二號方組成生藥之藥理活性與作用機轉，以掌握何種組成生藥可表現關鍵性之藥理作用。茲再就背景、假說與研究設計說明如下。

動脈粥狀硬化是造成心血管疾病的主因 (1)，好發於老年人口，且常危及患者生命和導致殘障，患者因而失去生活品質和尊嚴，須仰賴他人和社會照護，是國內公共衛生和社會福利的重大課題。不論在預防或治療上，均值得政府、民間、學界大力投入 (2)。

脂質與脂蛋白代謝異常是導致動脈粥狀硬化的主因，動脈粥狀硬化涉及血管壁變性、單核球滲入而活化成巨噬細胞、巨噬細胞攝取浸入於血管腔下方之氧化低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, OxLDL)、平滑肌細胞移位和增生 (3, 4)。病理上，依序可見到血管內壁損傷、脂肪條塊堆積、動脈硬化斑塊形成、斑塊鈣化壞死剝離、血栓形成等歷程 (1)。流行病學和病理動物試驗等證據顯示，下列三種脂質與脂蛋白代謝異常和動脈粥狀硬化的形成最具正相關性。

1. 血液中的低密度脂蛋白 (LDL) 濃度過高，此與膽固醇新陳代謝失控和肝臟表現之 LDL 受體太少有關。
2. 血液中的高密度脂蛋白 (HDL) 濃度太低 (HDL-C < 35 mg/dL) 且

伴有三酸甘油 (TG) 值太高，此不利的脂蛋白譜型常出現於第 2 型糖尿病患者，且於血糖控制不良之長期糖尿病患者尤然。這類患者血液中也常出現小而密的低密度脂蛋白 (small, dense-LDL; sd-LDL)，這些血脂變異可能也是第 2 型糖尿病患者常伴有心血管病變的原因 (2)。

3. 血液中或飲食中一些抗氧化成分 (如維生素 E 和多酚類) 較低，LDL 易遭氧化修飾；反之，上述抗氧化劑濃度較高者，罹患心血管疾病的機率較低 (3)。

目前，分子醫藥學研究顯示：血脂質與脂蛋白代謝異常導致動脈粥狀硬化，進而形成心血管疾病。這是多重危險因子交叉作用，體內的代謝調適又不足以因應，且隨著老化而惡化的結果。動脈粥狀硬化是一種早期預防可延緩病因形成，後期治療則較困難，且已不易僅藉抑制單一病因而中止，老年退化性疾病基於多種病因交相形成的特質，西方醫學藥物治療上採行單一 (抑制膽固醇合成、膽酸再吸收或降壓等) 手段，其效果並非十分成功 (4)。

傳統中國醫藥學中的活血化瘀是一門建構於瘀証的整體性辨証論治，其理論基礎與經驗法則以清代王清任所著醫林改錯為主流，指出治療症之要訣在明白氣血，氣血不通謂之瘀，久病必有瘀 (5)。後人乃採行通絡、行氣、清熱、軟堅、攻下、利水、扶正等逐瘀療法 (6, 7)。醫林改錯所列血府逐瘀湯 (含柴胡、桔梗、枳殼、牛膝、生地、赤芍、川芎、當歸、桃仁、紅花與甘草共 11 種生藥) 則為活血化瘀療法之代表。多年前，大陸學者結合「通絡逐瘀」和生藥藥理學，而推出冠心二號方 (含丹參、赤芍、川芎、紅花、降香)，應用於冠心病的治療，証實對高血脂症、高血壓、心絞痛等具療效 (5)。最近更推出丹參滴丸和芍芍膠囊。綜觀瘀証一辭，很難用西方醫學的任何一個學門所涵述，勉強行之且極易引起雙方爭議。但就其較狹義的定義範圍和治療對象，再証諸目前有關活血化瘀單複方藥材現代藥理學之研究，顯示活血化瘀經驗療法與西方醫學比較，最

能相容不悖者實為預防與治療動脈粥狀硬化所導致之心血管疾病，血府逐瘀湯與冠心二號方有三種通用的生藥材（赤芍、川芎、紅花），冠心二號方另使用高劑量的丹參（8,9），血府逐瘀湯則含有數種源自植物種子（含較高之抗氧化活性成分）與保肝之生藥。

本研究計畫依據最近分子醫學對動脈粥狀硬化形成過程之機轉，並以組生藥可能開發作用之階段審視前述二種複方，提出假說（working hypothesis）如下：血府逐瘀湯與冠心二號方對動脈粥狀硬化效果有別，前者較重於動脈粥狀硬化形成過程前期的預防，而後者較著眼於動脈粥狀硬化病因已進展到較後期的治療。為証實此假說且進而提昇其內涵，並再創新複方，乃提出此三年期計劃。本計劃探討血府逐瘀湯與冠心二號方二種活血化瘀複方防治動脈粥狀硬化的藥理與作用機轉，並藉動脈粥狀硬化形成過程中一些關鍵性階段（1, 4）及進展程度受抑制之效果為依據，以探討其藥效。將以此二種複方在活體實驗動物模式（apoE 缺陷小鼠）和離體活性表現（如抑制脂質合成與 LDL 氧化等）為依據（10-13），以確認二複方由預防到延緩動脈粥狀硬化進展之功效。

依活血化瘀與目前動脈粥狀硬化形成理論（1），本研究在設計上假設血府逐瘀湯的功能較合於前階段之預防角色。在疾病較後期且已形成動脈硬化斑塊，則冠心二號方之角色較相近，若前二年研究可證實此推論，則本研究第三年將進而歸納出二型複方中藥理活性，最終目標則盼能去蕪存菁，再發展出一種更新複方且合於抗動脈粥狀硬化科學基礎並確具藥理功效之新複方。

本三年期計劃各年度工作目標如下。

第一年：

抽取生藥材，確認血府逐瘀湯與冠心二號方於 apoE 缺陷小鼠病理模式中（10-13），是否具有減緩或中止動脈粥狀硬化形成的藥理效果。明確上述二複方使用在活體病理動物模式是否有效，並藉此動物模式去凸顯二複方之作用，是呈現於病因形成過程的那些特定階段

(4)。

第二年：

以藥理活性指標為導引，建立下列藥理活性指標之離體檢測法，探討二複方中何種生藥成分是表現前述活性指標之成分。1. 在脂質代謝上以最接近於人類肝細胞之肝癌細胞株（HepG2）為模式探討其抑制膽固醇活性，Lovastatin 做為正控。2. 以人類 LDL 離體氧化導致其 PUFA 與 apoB 受損為指標，探討二複方中可抑制 LDL 氧化修飾之活性成分與發展潛力。3. 配合生藥材粗分劃與液相層析質譜法（LC-MS），以掌握各極性分劃表現出上述活性之成分。

第三年：

藉前二年之進展為指引，重組二複方中具明確藥理活性之材料（或粗分劃）以發展新複方。再藉 apoE 缺陷小鼠之動脈粥狀硬化模式（10-13），以証實新複方之優越性。

茲將第二年（88.7.1～9.1 2.31）進展報告如後。

貳、材料與方法

一、生藥材來源：

生藥材購自台北市迪化街，並經國立中國醫藥研究所專家鑑定。
科學中藥購自順興堂（順天堂）。

二、生藥材之抽取

血府逐瘀湯（柴胡、桔梗、枳殼、牛膝、赤芍、川芎、當歸、桃仁、紅花、甘草等十一種生藥）與冠心二號方（丹參、赤芍、川芎、紅花、降香等五種）等十三種生藥均將每種生藥材由中低至高極性之抽取。亦完成合併如複方組成後，再同步進行抽取。於小規模抽取過程中，每種分取 4 份（各 30g）分別採乙酸乙酯、丙酮、甲醇和水（1:10, v/v）於室溫震盪抽取 24 小時。抽取液中，水層採冷凍乾燥，其

餘採減壓濃縮。

三、篩檢二複方之組成生藥何者可以抑制膽固醇生合成

以接近人類肝細胞膽固醇新陳代謝表現之人類肝癌細胞株 HepG2 為模式，篩檢二複方之組成生藥何者可以抑制膽固醇生合成及其抑制活性之大小。將 HepG2 細胞培養於含 FCS 的 DMEM 培養基中長至五至六分滿時，移到含已去除脂蛋白之 FCS 的 DMEM 培養基中培養 24 hr，以誘生細胞的膽固醇生合成。之後，將更換新的上述培養基，使用 [2-³H] acetate 當追蹤劑，正控制組則加入 lovastatin (acid form)。膽固醇生合成追蹤實驗於 37°C 下進行 2 小時，後將細胞全脂皂化 (KOH/56/°C/2hr) 回收膽固醇，以液相閃爍計數儀測其放射性，推算膽固醇生合成受抑制的程度 (14)。

四、抑制人類低密度脂蛋白 (LDL) 氧化篩檢

採用獲自超高速離心法分離而得之人類 LDL (density range 1.006-1.063)，並對二複方組成生藥之分別四種抽取物進行抗 LDL 氧化之篩檢。其流程如下：將甫分離之人類 LDL 透析 (4 oC, 24 hr)，以除去水溶性抗氧化劑，並以 5 μ M 或 10 μ M Cu (II) 誘導 LDL 氧化 (15)，其氧化進度過程則以共軛雙鍵型產物 (conjugated dienes) 為指標，用光譜法連續偵測 234 nm 之吸光值得知，抗 LDL 氧化以 probucol 和 trolox 當 positive control (16)。

五、篩檢巨噬細胞清除受體抑制劑

以 J774 巨噬細胞吞入 OxLDL 為模式，篩檢二複方之組成生藥是否可以抑制巨噬細胞藉表現出清除受體 (Scavenger receptor, SR) 而攝入 OxLDL 變成泡細胞的能力。將小鼠巨噬細胞株 (J774) 培養至約 8 分滿，更換成胎牛血清之 DMED 培養基中。並置入 OxLDL 再培養 6 h，最後將細胞以 Oil red 染色以判定其脂質堆積度為指標。抑制 J774 細胞之清除受體攝入 OxLDL 篩檢以 helvolic acid (25 μ g/mL) 做 positive control。

六、一般脂質與脂蛋白分析

超高速離心法分離 LDL：成年健康者厥隔夜空腹屈屈抽血，血液移入不加抗凝血劑之微量離心管中於室溫下靜置凝血。全血經 3000 rpm ($1200\times g$) 離心 15 min 後取得血清，於 4°C 下進行超高速離心 (44k rpm ($152,000\times g$)、16hr)。離心後吸取最上層 2 mL 呈乳白色的 VLDL 部份 ($\rho < 1.019\text{ g/mL}$)，管內剩下的部份再加入 2 mL NaBr ($\rho = 1.22\text{ g/mL}$)，於 4°C 下進行之超高速離心 (44k rpm ($152,000\times g$)、20hr)。離心後吸取最上層 2mL 淡乳白色之 LDL ($\rho = 1.019\text{-}1.063\text{ g/mL}$)，充氮氣後於 4°C 下避光保存備用，保存期不超過 1 星期。LDL 氧化實驗前用 PBS 透析。

膽固醇濃度之測定：採用酵素法測定膽固醇濃度。其原理為利用 cholesterol esterase 將膽固醇酯 (esterified cholesterol) 水解成膽固醇，再利用 cholesterol oxidase 氧化膽固醇以產生過氧化氫 (H_2O_2)，而再由 peroxidase 催化，可將 H_2O_2 與 4-aminoantipyrine 及 phenol 反應產生 quinonimine 的紅色物質以呈色 (17)。以膽固醇標準液 (200 mg/dL) 製作標準曲線，分別取 0、5、10、20、25 μL 加入 1mL 反應液中，混合均勻後室溫下靜置 10 min，測定 500 nm 下之吸光值，並作成校正曲線。取透析後之 LDL 10 μL 加入 1mL 反應液，由其 500 nm 吸光值配合校正曲線可換算得膽固醇濃度。

三酸甘油酯 (TG) 濃度之測定：採用酵素法進行。其原理為以專一性之 lipase 將 TG 水解為甘油與脂肪酸，甘油再經過 glycerol kinase 與 glycerol-3-phosphate oxidase 催化生成過氧化氫，而由 peroxidase 催化可將 H_2O_2 與 4-aminoantipyrine 及 2-chlorophenol 反應產生紅色物質以呈色 (18)。以 TG 標準液 (200 mg/dL) 製作標準曲線，分別取 0、5、10、20、25 μL 加入 1mL 反應液中，混合均勻後室溫下靜置 10 min，測定 500 nm 下之吸光值，並作成校正曲線。取稀釋過之小鼠血清 10 μL 加入 1mL 反應液，由其 500 nm 下之吸光值配合校正

曲線可換算得 TG 濃度。

利用電泳檢測脂蛋白：取 10 μ L 稀釋血清與 10 μ L Sudan Black 混合染色 1.5 hr，其電泳操作方法如下所述。

1. 膠片之前處理：將已鑄膠完成之套裝 polyacrylamide gel (Sebia, France) 置入 100 mL 已稀釋 10 倍之 Lipofilm buffer 中，於 4 $^{\circ}$ C 下靜置溼潤 2 hr。電泳進行前取出已溼潤完成之膠片，以無纖紙小心吸乾膠片表面與樣品槽中之水分，注意不可刮傷膠片。
2. 電泳：取 10 μ L serum、VLDL 與 LDL 分別與 10 μ L Sudan black dye 在室溫下進行染色 1.5hr，再取染色完成之樣本 4.5 μ L 加入膠片之樣品槽內，進行電泳 50 min。操作條件：電壓：170 V；電流：50 mA；功率：5 W；時間：50 min。
3. 電泳片固定保存：電泳完成後立將電泳片浸於保存液（acetic acid：ethylene glycol：H₂O = 5：2：93, v/v/v）中 1hr，再將膠片置於 40-50 $^{\circ}$ C 烘箱中進行乾燥，以保存夾於室溫下保存。

參、結 果

茲簡述第一年之進展以連接本年度成果，血府逐瘀湯與冠心二號方均已完成將每種生藥材由中低至高極性之抽取。亦完成合併如複方組成後，再同步進行抽取。於小規模抽取過程中，每種分取 4 份（各 30 g）分別採乙酸乙酯、丙酮、甲醇和水（1:10, v/v）於室溫震盪抽取 24 小時。抽取液中，水層採冷凍乾燥，其餘採減壓濃縮。將各粗抽取成分推算回按原生藥在各複方中之比例，配成動物實驗用複方組成，例如，冠心二號方之 5 種生藥，採用將各分別抽取物回算生藥材用量後，即按丹參用量為 2 其餘 4 種均為 1 之比例混合，組成動物試驗用之冠心二號方（簡稱 CHD-2）。

臨床上冠心二號方並非五種生藥材等量運用，而是以加倍使用丹參者較常見（5-7），本計畫中，冠心二號方採下列配製方式：先合併原等重

量之任一種生藥材的四種抽取物成為該生藥之全抽取物，然後將各生藥全抽取物依丹參：赤芍：川芎：紅花：降香 = 2:1:1:1:1，w/w 的比例混合 (CHD-2)。此 CHD-2 之抗氧化能力（抑制 LDL 氧化為指標）可達 probucol 之 50% (9,16)。血府逐瘀湯亦依上述原則配製（此重組複方稱 BSA-S），所按比例為當歸、生地、桃仁、紅花、赤芍、川芎各占 1，而其餘五種各用 0.5 之比例。依此配法，CHD-2 與 BSA-S 二種新配複方中之共同之三種生藥（赤芍、川芎、紅花）間維持同一用量比例。

本研究以 apoE (-) 小鼠為模式進行抗動脈粥狀硬化動物試驗 (10-13)，目前已完成二批動物試驗。共 5 組 apoE (-) 小鼠進入試驗流程 (8-10 animals / 組)，其中控制組 (control) 僅飼以另含 0.15% (w/w) 膽固醇之正常飼料 (CTL)，另 4 組飼以含 0.15% (w/w) 膽固醇之正常飼料，另含 DPPD (0.5%, as positive control) (11)、VGH-SM1 (0.5%, w/w)、CHD-2 (1.0%, w/w)，結果顯示 DPPD 組及 VGH-SM1 組有抗動脈硬化效果，其程度分別為抑制 45% 及 50%，冠心二號方 (CHD-2) 有中度抑制動脈硬化效果 (-27.5%)。本年度進展如下述：

一、以人類肝癌細胞株 HepG2 為模式探討二複方之組成生藥何者可以抑制膽固醇生合成

以接近人類肝細胞膽固醇新陳代謝表現之人類肝癌細胞株 HepG2 為模式，探討二複方之組成生藥何者可以抑制膽固醇生合成，及其抑制活性之大小。將 HepG2 細胞培養於含 FCS 的 DMEM 培養基中，至長至 5 至 6 分滿時，移到含已去除脂蛋白之 FCS 的 DMEM 培養基中培養一天，以誘生細胞的膽固醇生合成。之後，將更換新的上述培養基，使用 [2-³H] acetate 當追蹤劑 (14)，正控制組則加入 lovastatin (acid form)。膽固醇生合成追蹤實驗於 37°C 下進行 2 小時，之後將細胞全脂皂化後回收膽固醇，以液相閃爍計數儀 (liquid scintillation counter) 測其放射性，推算膽固醇生合成受抑制的程度。結果顯示血府逐瘀湯與冠心二號方共十三種組成生藥中，並無明顯抑制膽固醇生

合成的藥理功效（指 40 μ g/mL 下抑制膽固醇生合成能力不及 lovastatin 4 μ g/mL 的 5%。

二、探討可抑制低密度脂蛋白氧化修飾之抗氧化劑

採可相關連至低密度脂蛋白（LDL）氧化修飾與動脈粥狀硬化之離體活性測驗，做為抗氧化之依據（3, 15）。其理論基礎如下：可抑制 LDL 氧化之抗氧化活性成分，可能會抑制動脈粥狀硬化較早期之進展。本研究採用獲自超高速離心法分離而得之人類 LDL（d=1.006-1.063），並對上述二複方組成生藥之抽取物進行抗 LDL 氧化之篩檢。

其簡述流程如下：將甫分離之人類 LDL 進行透析以除去水溶性抗氧化劑，並以 Cu（II）誘導 LDL 氧化，其氧化進度過程則以共軛雙鍵型產物（conjugated dienes）為指標，可用光譜法連續偵測 234 nm 之吸光值得知（15）（Fig. 1），採用 Probucol（0.5-5.0 μ M）和 Trolox（1.0-5.0 μ M）為 positive control。

結果顯示：冠心二號方中，較極性層之抗 LDL 氧化能力最強者為丹參、降香、赤芍，並確認丹參抗氧化能力主要是由於所含丹參酚酸 B（Salvianolic acid B; Sal B）所致（19）（Table 1）（Fig. 4）。血府逐瘀湯中較極性層抗 LDL 氧化能力最強者為當歸、甘草、赤芍。

三、篩檢可抑制巨噬細胞藉表現清除受體（SR）而攝入 OxLDL 的清除受體抑制劑

以 J774 巨噬細胞吞入 OxLDL 為模式，探討二複方之組成生藥是否可以抑制巨噬細胞藉表現出清除受體（Scavenger receptor, SR）而攝入 OxLDL 變成泡細胞的能力。大致流程如下：將小鼠巨噬細胞株（J774）培養至約 8 分滿，更換成胎牛血清之 DMED 培養基中，並置入 OxLDL 再培養 6 h，最後將細胞以 Oil Red 染色以判定其轉化成泡細胞的程度（以脂質堆積程式為指標）。抑制 J774 細胞之清除受體攝入 OxLDL 篩檢以 helvolic acid（25 μ g/mL）做 positive control

(20) (Fig. 2)。

結果顯示：只有丹參甲醇提取物 (40 µg/mL) 具有明顯抑制巨噬細胞清除受體攝入 OxLDL 的活性 (Table 2, Table 3) (Fig. 2)。過去所知巨噬細胞清除受體的 ligands 包括：lipopolysaccharides (bacterial endotoxins)、anionic phospholipids (PL)、oxidized LDL、polyribonucleotide (poly (I) and poly (G))、ikarugamycin、helvolic acid 等，活血化癥中草藥在這方面的潛力，未來可再深入探討。

四、利用液相層析法呈現前述藥理活性分劃中的天然物譜型

平行於上述離體藥理活性研究，亦採用液相層析-質譜法 (liquid chromatography-mass spectrometry; LC-MS) 為主要分析工具，確認一些離體藥理作用有效生藥之天然物指標成分，特別著重在丹參上，亦關聯出呈現前述藥理活性之分劃中的天然物譜型，以做為活性指標相對應之粗分劃的天然物指紋譜。此部分的結果較多，故僅以丹參水醇提取物含 salvianolic acid B (Sal B) 層為例示於 Fig. 3。

肆、討 論

本年度之進展大均可按原規劃完成。已獲知二種複方之組成藥何者對於抑制動脈粥狀硬化形成之關鍵步驟具有貢獻，且掌握到對趨動脈粥狀硬化的一些階段，於離體試驗具有明顯的抑制效果的生藥，有助於新複方如何選出。目前將先申請專利，新複方則另行申請經費研發。

從中醫藥理論觀點而言，中藥複方乃建構於中醫理論體系之下的產物。過去，若無法按此理論體系去重現証的模式，就不被認為足以用來驗證其療效，故不論單複方，若採用從西方藥理角度介入之研究成果，並不容易被中醫藥界所接受。在中藥科學化上，複方研究爭議一向極大，也造成許多人不願投入複方研究。西方醫學講求實驗証據，藥物的療效取決於人體試驗上的特定臨床與生化指標，中藥複方成分太多，且基源不一，又

常會因產地、季節、採收後加工等因素造成變化，就西方新藥研發模式觀之，中藥複方確實也不是容易掌握的研究對象。

目前，西方醫藥的研發上力有未及之處乃是在一些退化性疾病（degenerative diseases）上，包括：癌症、心血管疾病、糖尿病、失智症等。對病毒所引起的疾病，亦無大突破。上述退化性疾病均有危險因子不一、病因形成期長、內生與外源（生活習慣與飲食）交相作用的特質，西方醫藥採用單標的藥物開發模式未必最佳。西方醫藥學的弱處未必即為中醫藥的強點，然中醫藥著重整體的辨証論治和扶正去邪，長久以來即以人為對象，一些複方及其組成生藥，不因年代久遠而被淘汰，且能隨著時間經驗而更被廣泛使用者，當屬可研究之對象（5）。本計畫乃藉瘀症與動脈粥狀硬化之關聯性，探討二種活血化瘀複方（血府逐瘀湯與冠心二號方）抗動脈粥狀硬化之藥理基礎。

目前，動脈粥狀硬化的分子病因學是建構於低密度脂蛋白（LDL）氧化損傷和血管內皮層功能變異的假說上（2,3,21），且早期血管內皮層功能變異可能亦主要由低密度脂蛋白氧化損傷所造成，故本計畫中詳盡評估血府逐瘀湯十一種生藥和冠心二號方五種生藥的離體抑制 LDL 氧化損傷能力。此實驗以人的 LDL 為對象，並以具抗氧化、降膽固醇、抗動脈粥狀硬化的藥物 probucol 為正控制組。

本研究證據顯示：冠心二號方中，抑制 LDL 氧化損傷有效者五居其三（降香、赤芍、丹參）（粗提取物以 $IC_{50} \leq 40 \mu g/mL$ 為依據），血府逐瘀湯則只十一佔其三（當歸、赤芍、甘草），評估複方抗 LDL 氧化能力，血府逐瘀湯明顯不及冠心二號方。五種明顯抗 LDL 氧化生藥中，甘草與降香均屬豆科植物，最近許多研究顯示：豆科植物中含量甚多而高的 isoflavones 有抗氧化與化學防癌的效果，有些 isoflavones 並具有 phytoestrogens 活性，極值得關注。若以化瘀生藥之植物分類學視之，則繖形科（Umbelliferae）與豆科（Leguminosae）生藥使用頻率最高（5）。

本研究引進 apo E 缺陷小鼠，做為動脈粥狀硬化病理實驗動物模式，

並建立定量動脈粥狀硬化流程，顯示丹參與冠心二號方三組都有抗動脈粥狀硬化效果（DPPD 為 positive control），但冠心二號方效果仍不及丹參或 DPPD。本研究室先前研究，亦證實丹參的水與酒精混合抽出物即對飼以高膽固醇的紐西蘭兔造成抗動脈粥狀硬化效果（9）。國外最近研究亦證實，甘草中的 glabridin 和含此活性成分的甘草抽出物可在 apo E (-) 小鼠造成抗動脈硬化效果（12）。血府逐瘀湯和冠心二號方二複方組成中，各有一生藥可藉西方醫藥研發考驗，證實對與人類動脈粥狀硬化最相近之病理動物模式上有效。未來對合併此二複方之有效組成，並去蕪存菁減方而成新複方，亦推斷可行。本研究採用與國外主要研究單位和藥廠使用之轉殖動物（apoE (-) mice）為自發式（spontaneous）動脈粥狀硬化病理動物模式，成果上，亦較具可評比性和說服力。

目前，自國外進口實驗動物的不方便處實仍太多，例如，國內核發之動物輸入許可的有效期限只有二個月，一方面須向國外申購待貨，另一方面申請人與審核者主管單位公文往返亦須時日，第一線的研究人員須投入太多不可預期的協調與等待，重大影響研究進度與工作士氣。本計劃不擬執行第三年工作，此為最大原因。國內動物中心動物品質也常有疑慮，所提供的動物模型有限，且大都並非以藥物研發為目的，亦不能行政支援進口實驗動物。上述行政效率與瓶頸，均有待大幅改善。

伍、結論與建議

冠心二號方因含有效生藥項較多，可抑制 LDL 氧化損傷，與抑制巨噬細胞清除受體攝入 OxLDL，而呈現中等程度的抗動脈粥狀硬化效果。冠心二號方中抗 LDL 氧化有效成份五居其三，且以丹參為首。血府逐瘀湯組成生藥種類過多（十一種），且僅少數生藥能在離體試驗中呈現抑制 LDL 氧化的效果，在抑制巨噬細胞清除受體攝入 OxLDL 與降脂作用上均不顯著，故抗動脈粥狀硬化（apoE (-) mice）效果亦不彰。依本研究目

前進展評估，合併此二複方在關鍵藥理作用上之共同或具互補性的有效成分，且減方成三種生藥，可能最有利於發展成新的抗動脈粥狀硬化新複方。

陸、參考文獻

1. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis, *Nature* 1993, 362: 801-809.
2. National Guidelines for the Diagnosis and Management of Lipid Disorders. 110 pp. Department of Health, Executive Yuan, Taipei, 1997.
3. Steinberg D. Oxidative modification of LDL and atherosclerosis. *Circulation* 1997, 95: 1062-1071.
4. Lusis AJ, Nabab M. Lipoprotein oxidation and gene expression in the artery wall. New opportunities for pharmacological intervention in atherosclerosis. *Biochem Pharmacol* 1993, 46: 2119-2126.
5. Practical Application on Blood Stasis Studies. Chen KJ and Su JS. eds. 733 pp. (in Chinese) People Health Publisher, 1999.
6. Clinical Practice of Blood Activation and Clot Abolition, New Edition. Yan DS eds. 244 pp. (in Chinese) Chi Yeh Publisher, Taipei, 1996.
7. The Pharmacognostical Therapy in Treatment of Blood Stasis. Lin CC eds. 388 pp. (in Chinese) Kaohsiung Medical College, Kaohsiung, 1992.
8. Liu GT, Zhang TM, Wang BE, Wang YW. Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes. *Biochem Pharmacol* 1992, 43: 147-152.
9. Wu YJ, Hong CY, Lin SJ, Wu P, Shiao MS. Increase of vitamin E content in LDL and reduction of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by a water-soluble antioxidant-rich fraction of *Salvia miltiorrhiza*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998, 18: 481-486.

10. Palinski W, Ord V, Plump AS, Breslow JL, Steinberg D, Witztum JL. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherosclerosis: demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler Thromb* 1994, 14: 605-616.
11. Tangirala RK, Casanada F, Miller E, Witztum JL, Steinberg D, Palinski W. Effect of the antioxidant N, N'-diphenyl 1,4-phenylenediamine (DPPD) on atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995, 15: 1625-1630.
12. Fuhrman B, Buch S, Vaya J, Belinky PA, Coleman R, Hayek T, Aviram M. Licorice extract and its major polyphenol glabridin protect low-density lipoprotein against lipid peroxidation: in vitro and ex vivo studies in human and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J. Clin Nutr* 1997, 66: 267-275.
13. Lee TS, Shiao MS, Pan CC, Chau LY. Iron-deficient diet reduces atherosclerotic lesions in apoE-deficient mice. *Circulation* 1999, 99: 1222-1229.
14. Cheng HC, Yang CM, Shiao MS. Zonation of cholesterol and glycerolipid synthesis in regenerating liver. *Hepatology* 1993, 17: 280-286.
15. Wallin B, Rosengren B, Shertzer HG, Camejo G. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. *Anal Biochem* 1993, 208: 10-15.
16. Barnhart RL, Busch SJ, Jackson RL. Concentration-dependent antioxidant activity of probucol in low density lipoproteins in vitro: probucol degradation precedes lipoprotein oxidation. *J Lipid Res* 1989, 30: 1703-1710.
17. Allian CC, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974, 20: 470-475.

18. McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR, Zak B. A peroxide-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. Clin Chem 1983, 29: 538-542.
19. Shiao MS, Wu YJ, Lin E, Kuo WJ, Chang BW. Antioxidants and anti-atherosclerotic effects of Chinese medicinal herb *Salvia miltiorrhiza*. American Chemical Society Monograph, 2001, Washington, in press.
20. Shinohara C, Hasumi K, Endo A. Inhibition of oxidized low-density lipoprotein metabolism in macrophage J774 by helvolic acid. Biochim Biophys Acta 1993, 1167: 303-306.
21. Daiz AN, Frei B. Antioxidants and atherosclerotic disease. N Engl J Med 1997, 337: 408-416.

柒、圖、表

Table 1、Lag phase and relative potency of salvianolic acid B and several other antioxidants in the inhibition of LDL oxidation in Vitro.

	T _{lag} (min)	T _{lag} (min)	Rel. Potency
-	151	-	-
Probucol	302	151	1.00
Trolox	251	100	0.66
Quercetin	422	271	1.79
Genistein	216	65	0.43
Sal B	1286	1135	7.52

1. Oxidation of LDL (50µg/mL) was induced by Cu²⁺ (5.0µM) at 25°C.
2. Conjugated diene formation was monitored continuously in a 96-well microtiter plate (quartz) by the increase of UV absorption at 234 nm.
3. The potency of an antioxidant is defined as its capability to prolong the lag phase (T_{lag}, min) .
4. The relative potency of probucol was set as 1.00.
5. Results are mean values of three determinations.

Table 2、Potency of herbal extracts (冠心二號方) and helvolic acid to inhibit the uptake of OxLDL by cultured J774 macrophages.

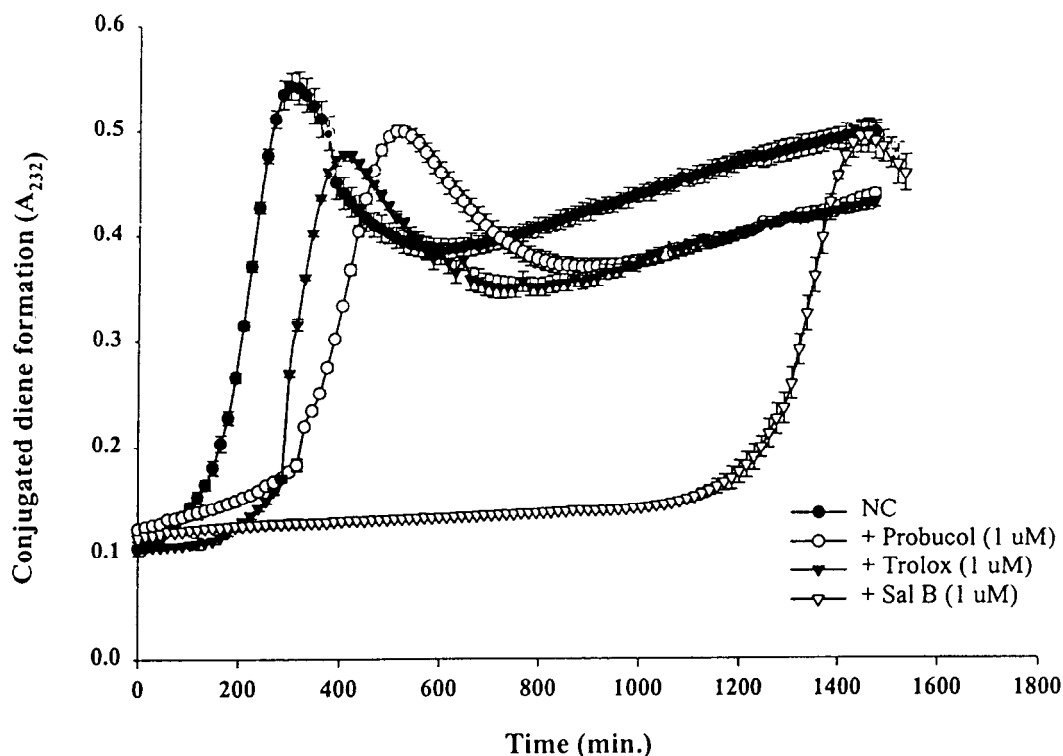
生藥	學名	Inhibition %Rel	potency
丹參 (SM)	Salvia miltiorrhiza	60	1.2
赤芍 (PL)	Paeonia lactiflora	<10	-
川芎 (LC)	Ligusticum chuanxiong	<10	-
紅花 (CT)	Carthamus tinctorius	<10	-
降香 (DO)	Dalbergia odorifera	<10	-
Helvolic acid (HVA)		50	1.0

1. Helvolic acid (HVA) (25 µM) was used as a positive control.
2. The crude methanolic extracts (40 µg/mL) of each herbal material in CHD-2 were used.
3. Uptake of OxLDL (50 µg/mL) by J774 macrophages was determined by Oil Red staining.
4. Results are mean values of three determinations.

Table 3 、 Estimated potency of herbal extracts to inhibit OxLDL uptake by J774 macrophages.

生藥	學名	Potency
柴胡	Bupleurum chinense	-
桔梗	Platycodon grandiflorum	-
枳殼	Citrus aurantium L	-
牛膝	Achyranthes bidentata	-
生地	Rehmannia glutinosa	-
當歸	Angelica sinensis	-
甘草	Glycyrrhiza uralensis	+
桃仁	Prunus persica	-
赤芍	Paeonia lactiflora	-
川芎	Ligusticum chuanxiong	-
紅花	Carthamus tinctorius	-
連翹	Forsythia suspensa	++
赤芝	Ganoderma lucidum	++

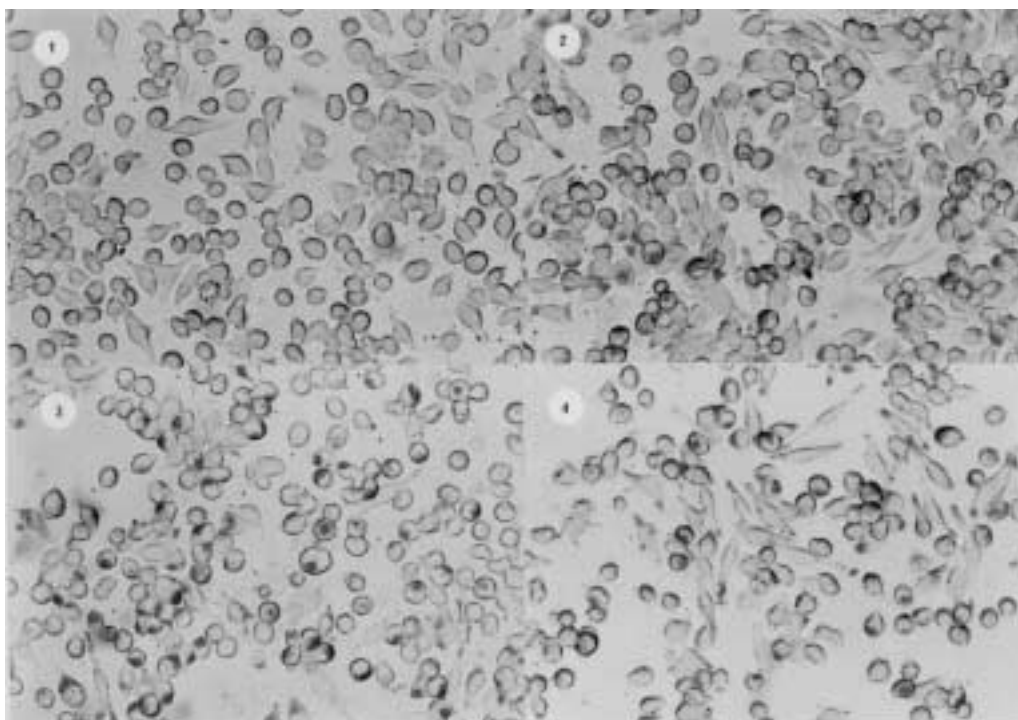
1. Helvolic acid (HVA) and betulinic acid (BTA) were separately used as a positive control.
2. Herbal extracts (40µg/mL) exhibiting >10% HVA (at 25 µg/mL) or BTA (at 40 µg/mL) activities were indicated as positive (+). A 50% inhibition was marked as ++.
3. The top 11 herbs listed in this table are the components of BSA-S.



圖一、篩檢可抑制低密度脂蛋白氧化修飾之抗氧化活性

Fig 1. Assay of effective antioxidants to inhibit LDL oxidation.

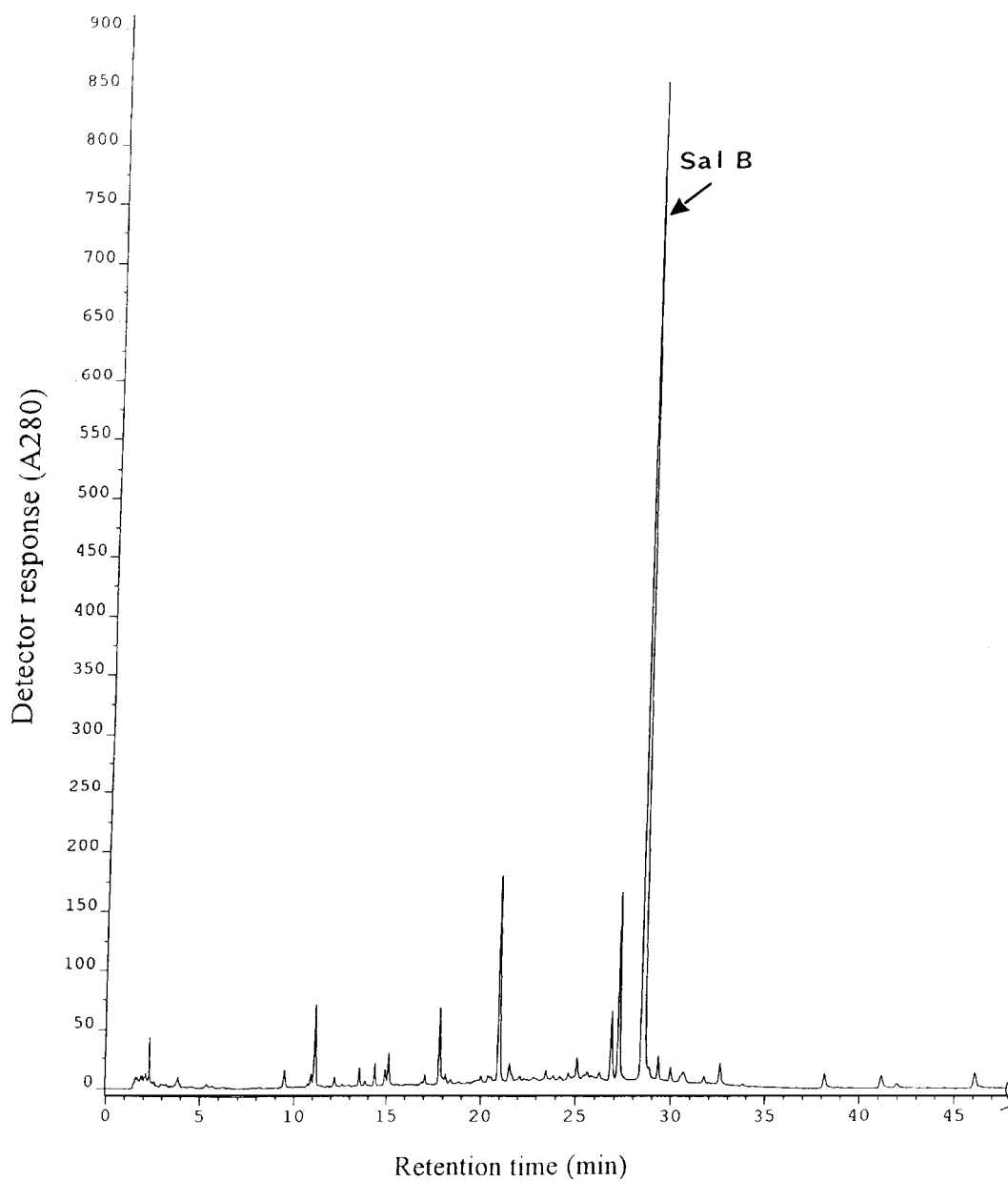
採用超高速離心法分離而得之人類 LDL，對二複方組成生藥之抽取物進行抗 LDL 氧化之篩檢。流程如下：將甫分離之人類 LDL 進行透析以除去水溶性抗氧化劑，並以 Cu (II) 誘導 LDL 氧化，其氧化過程則以共軛雙鍵型產物 (conjugated dienes) 為指標，用光譜法連續偵測 234 nm 之吸光值，採用 probucol 0.5-5.0 μ M) 和 trolox (1.0-5.0 μ M) 為 positive control。The representative time course assays of Salvianolic acid B (Sal B) and several known antioxidants in the inhibition of LDL oxidation were illustrated.



圖二、以 J774 巨噬細胞藉表現清除受體吞入 OxLDL 為模式探討二種複方中可以抑制巨噬細胞攝入 OxLDL 之清除受體抑制劑

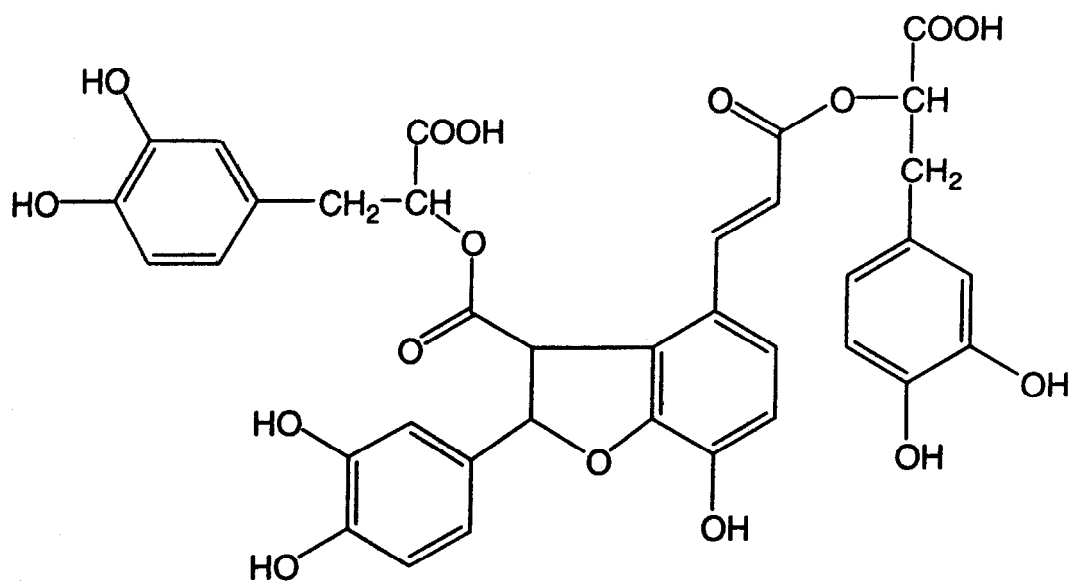
Fig 2. In search of scavenger receptor inhibitors in two regimens based on the inhibition of OxLDL uptake by J774 macrophages.

將 J774 巨噬細胞株培養至約 8 分滿，更換成胎牛血清之 DMED 培養基中。並置入 OxLDL (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 再培養 6 h，最後將細胞以 Oil Red 染色以判定其轉化成泡細胞的程度（以脂質堆積程度為指標）。抑制 J774 細胞攝入 OxLDL 能力乃以 helvolic acid (HVA) 做正控制組。1. Blank; 2. OxLDL; 3. OxLDL + HVA (25 μM) ; 4. OxLDL + *Salvia miltiorrhiza* (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 甲醇抽出物)。



圖三、利用逆相式液相層析法分析丹參可抑制低密度脂蛋白氧化修飾分劃的天然物譜型

Fig. 3. Reversed-phase HPLC profile of effective fraction in *Salvia miltiorrhiza* capable of inhibiting LDL oxidation. Salvianolic acid B (Sal B) is marked by an arrow. A binary solvent system of methanol-water with low volume % of acetic acid (HOAc) was used for gradient elution.



Salvianolic Acid B (from *Salvia miltiorrhiza*)

圖四、冠心二號方主要藥理活性生藥丹參（*Salvia miltiorrhiza*）的水醇層中可抑制 LDL 氧化之抗氧化劑 Salvianolic acid B 的化學結構

Fig. 4. Chemical structure of Salvianolic acid B (Sal B) that is a potent antioxidant in *Salvia miltiorrhiza* to inhibit LDL oxidation.