

大黃、大黃素、抗血小板及血管擴張天然藥物對高糖培養腎小管細胞及細胞外間質之影響

Effects of rhubarb, emodin, antiplatelet and vasodilator natural products on extracellular matrices and high glucose-cultured renal tubular cells

顧進裕

高雄醫學院

摘要

根據我們以前的研究及別人的研究，糖尿病腎病變的致病機轉可能與乙型轉型生長因子(TGF- β)及其受器、tyrosine kinase 訊習傳遞等有關，而西藥的captopril(血管張力素轉換酵素抑制劑)僅對 50%的病人有效，我們去年的中藥計畫做了“大黃及其有效成分(emodin及rhatannin)對糖尿病腎病變治療效果之研究”，發現大黃及大黃素(emodin)有治療效果；而已知大黃或大黃素具有抗血小板及血管擴張的效果，且台灣天然藥物(例如：Laurotetanine 為鈣離子阻斷的血管擴張劑，而coclaurine 則為類似 aspirin 的抗血小板劑)中有一些常被用來做“活血化瘀、通血路”的臨床用途，因此為了進一步了解大黃及大黃素的作用機轉，便利用高糖培養的近端腎小管細胞(LLC-PK1)來研究這些藥物對細胞生長、TGF- β 1 mRNA(PT-PCR)、TGF- β 1 生物活性及其受器(affinity labeling)與細胞外間質(Western blotting)的影響，同時研究其細胞毒性效果。

結果發現高糖造成這株細胞的生長抑制及細胞肥大，同時也促進 TGF- β 1 與 TGF- β 第一及第二型受器及細胞外間質(collagen- α 1(I)及 fibronectin)的製造，而所有的藥物(大黃、emodin、captopril、aspirin、dipyridamole、Laurotetanine、Coclaurine、Genistein、insulin)均無細胞毒性(不導致細胞凋亡及 LDH 釋出)，

captopril (1 mM) 與我們以前的結果一樣可以逆轉高糖所致的細胞生長及 TGF- β 1 與 TGF- β 第一及第二型受器及細胞外間質的效應，大黃、dipyridamole、Genistein、insulin、Laurotetanine 及 coclaurine 則無法逆轉高糖所致的效應，Emodin 雖不能逆轉高糖所致的細胞分裂抑制與 TGF- β 1 其受器的刺激，卻能逆轉其細胞肥大及細胞外間質(collagen)的效應。

我們的結論是大黃在糖尿病腎病變的作用機轉可能不是經過血管擴張或血小板凝集的抑制，而 emodin 可能是大黃中主要的有效成份，因為 emodin 與 captopril 都可以逆轉高糖所致的細胞肥大及 collagen 的製造，而且 emodin 在本實驗所使用的劑量中，也沒有細胞毒性，因此其在治療糖尿病腎病變上的潛力，值得進一步探討。

關鍵詞：大黃、大黃素、天然藥物、糖尿病腎病變

ABSTRACT

The pathogenesis of diabetic nephropathy (DN) may be related with transforming growth factor- β /receptors and tyrosine kinase signal transduction pathway. We showed that rhubarb and its active constituent (emodin) was effective in treating diabetic nephropathy in streptozotocin-diabetic rats. It is known that rhubarb or emodin has anti-platelet and vasodilating effects. There are some Taiwanese natural products with anti-platelet (e.g. coclaurine is similar to aspirin) or vasodilating (e.g. laurotetanine has calcium channel blocking effect) effects. Therefore, to further elucidate the therapeutic effects of rhubarb and emodin, we studied the effects of various drugs and natural products on cellular growth, cellular hypertrophy, cytotoxicity, extracellular matrices, TGF- β 1/receptors in high glucose-cultured LLC-PK1 (proximal tubule-like) cells.

We found that high glucose inhibited cellular proliferation while inducing cellular hypertrophy, TGF- β 1/TGF- β receptors type I and II and extracellular matrix (collagen- α 1(IV) 及 fibronectin) production. Additionally, all tested drugs (rhubarb, emodin, captopril, aspirin, dipyridamole, laurotetanine, coclaurine, genistein and insulin) had no cytotoxic effects (i.e. no apoptosis or LDH release). Of all the drugs tested, only captopril (1mM) can reverse all of the high glucose-induced effects in

terms of cellular growth, extracellular matrices and TGF- β 1/receptors. In contrast, emodin can reverse high glucose-induced cellular hypertrophy and collagen production.

We concluded that the mechanism of the therapeutic effects of rhubarb in DN may not be mediated by its anti-platelet or vasodilating effects. Emodin may be one of its effective constituent because it (like captopril) can reverse high glucose-induced cellular hypertrophy and collagen production within doses that had no cytotoxicity. Therefore, the future therapeutic potential of rhubarb/emodin in DN is worthy of further trials.

Keywords: Rhubarb, emodin, natural product, diabetic nephropathy

壹、前言

根據我們自己及別人的研究，糖尿病腎病變的致病機轉可能與生長因子及 Tyrosine kinase (EGF 及 Insulin 受器的主要訊息傳遞路徑)有關(2-6)，目前已知的病理變化如下 (1)：腎絲球及腎小管增生及肥大、腎絲球間質增生、腎小管間質增生及腎小動脈玻璃樣化等，最後則變成不可逆的腎臟硬化(腎絲球硬化及腎小管間質纖維化)，這些變化除了細胞稍微增生外，最主要的變化還是細胞外間質的增生(例如：膠原蛋白、fibronectin 等)，而已知乙型轉型生長因子 (TGF- β) 是促進細胞外間質增生及抑制其代謝最重要的因素 (5-10)，且最近的研究也發現不管在糖尿病動物或高糖細胞培養的模式中，TGF- β 都是造成腎臟肥大及腎臟硬化最重要的原因 (6)，例如細胞培養時高糖本身可以造成腎臟細胞增生，但因促進 TGF- β 的表現反而抑制細胞的增生，並造成細胞的肥大，而最近有人證明了抗 TGF- β 的抗體能逆轉以上的現象，同時也能改善動物的糖尿病腎病變 (11)。

糖尿病腎病變的致病機轉也可能與高濃度的葡萄糖被腎臟細胞吸收有關(1, 13)，因為葡萄糖經過代謝會產生各種代謝中間產物，結果增加了細胞的 Na-K-ATPase、細胞內的蛋白質激媒 C (protein kinase C, PKC)、前列腺素(PGE2, TXA2, etc.) 等，而直接傷害了腎臟細胞 (1)，此現象稱為“葡萄糖毒性” (14)，另外也有人認為其致病機轉可能與腎小管細胞的“高代謝”有關 (15)。可惜的是，雖然糖尿病腎病變中的腎小管間質病變，並不比腎絲球病變少見 (16)，而且甚至在病人的長期腎功能預後上面具有更大的決定性(17)，但是大部份的研究均局限在腎絲球病變 (1, 9)，而我們已經針對高糖培養的腎小管研究了多年，並已發表了多篇文章，刊登在國際知名的腎臟學雜誌上(2-4, 12, 13)。

嚴格控制血糖、升壓素轉換酵素抑制劑(例如 captopril)、血小板抑制劑(例

如 dipyridamole, aspirin)、低蛋白飲食及控制高血壓(例如血管擴張劑或鈣離子阻斷劑)等都是糖尿病腎病變的治療方法 (1, 18-21), 而其中有許多可能與其能調控 TGF- β 有關 (3, 22, 23), 例如: 低蛋白飲食可以降低尿中 TGF- β , 升壓素轉換酵素抑制劑則除了可以降低腎絲球高過濾及腎內高血壓外, 也可以減少腎臟肥大, 而已知抑制 TGF- β 的作用可以改善糖尿病腎病變 (11), 因此若能找出一種新的能抑制 TGF- β 作用的治療方法, 與目前已知的方法併用, 可能就有希望能有效扼止糖尿病腎病變的惡化。而我們也證明了 captopril 減少腎臟肥大的機轉可能一部份是經由降低 TGF- β 受器的表現 (3), 一部份則是經由改善葡萄糖運送器的表現而降低了細胞內的葡萄糖 (13), 而已知抑制 TGF- β 的作用可以改善糖尿病腎病變及其間質增生性腎絲球腎炎 (11), 可惜的是這些現有的治療方法都只能延緩病人進入洗腎的時間, 而不能使病人最終免於洗腎及其對健保支出所造成的重大負擔, 因此若能找出一種新的能抑制 TGF- β 作用的治療方法, 與目前已知的方法併用, 可能就有希望能有效扼止糖尿病腎病變的惡化。

大黃 (*Rhubarb officinale*)、溫脾湯、柴苓湯、冬蟲夏草 (*Cordyceps sinensis*)、雷公藤、丹參、溫脾湯 (成份: 大黃、人參、附子、甘草、乾姜)、人參、黃蜀葵 (*Abelmoschus manihot*)、五苓散及八味地黃丸等都是目前可能可以治療腎衰竭及腎絲球病變方面的中藥 (27-35), 其中以大黃 (36-38) 及溫脾湯 (31) 最有效也被研究得最多, 但只有大黃曾被證明可以治療糖尿病老鼠糖尿病腎病變及抑制糖尿病老鼠腎絲球生長因子的表現 (29, 39-41)。大黃在中藥中的用途 (42-45), 除了可以當瀉劑、清熱及消炎之外, 最近也被大陸的醫學界發現可能可以減少糖尿病腎病變的腎臟肥大 (40), 也可能可以減少尿素氮、肌酸酐及延緩慢性腎衰竭病人變成尿毒症的時間 (29, 37-39), 至於其作用機轉以前認為可能有一部份是經由腹瀉使蛋白質、氨基酸的排泄增加所致, 但最近發現可能其主要成份大黃素 (Emodin) 可能扮演了重要的角色, 例如大黃或 emodin 具有以下與糖尿病腎病變的致病機轉 (見前所述) 有關的作用: 降低前列腺素 (46)、抑制腎小管的 Na-K-ATPase (47)、抑制腎小管細胞的增生 (48, 49)、降低蛋白質激酶 C (50) 及抑制 Tyrosine kinase (51) 等。

我們去年的中藥計畫發現了大黃及大黃素有治療效果, 台灣民間藥中有一些常被用來做“活血化瘀、通血路”的臨床用途, 本協力實驗室歷年來事台灣天然藥物的研究, 已經從台灣產藥用植物之中分離出許多具有血小板凝集抑制劑的效能者, 其有一種自楠木 (*Phoebe Nanmu*) 中所純化之 dl-coclaurine (54) 更與臨床上常用的 aspirin 具有很類似的藥理作用; 另外雖然鈣離子阻斷劑可能可以治療糖尿病腎病變, 但仍具有爭論 (23, 55), 而本協力實驗室也自天然藥物中純化出許多血管擴張劑, 其中有一種自山胡椒 (*Litsea Cubeba*) 樹皮中所純化之 laurotetanine (56, 57) 更與鈣離子阻斷劑具有類似的藥理作用, 因此我們特別選擇了這兩種純化

的天然藥物來研究，希望能進一步了解大黃及大黃素治療的作用機轉，以期將來能應用於臨床治療，並避免或延緩尿毒症的發生，如此將能使國家節省一筆龐大的醫療費用。

因此本計劃的目的如下：由於去年我們的中醫藥研究計畫初步發現大黃及大黃素具有治療大白鼠糖尿病腎病變的效果，這可能是將來臨床上一種嶄新且頗具有發展潛力的治療方式，因此我們擬進一步利用高糖培養的 LLC-PK1 細胞（類似近端腎小管），來研究大黃粗萃取物、大黃素及自台灣產藥用植物所分離出之抗血小板與血管擴張成份對細胞生長、TGF- β 1 mRNA、TGF- β 生物活性及其受器與細胞外間質的影響，同時研究其細胞毒性效果，希望能進一步了解大黃及大黃素治療的作用機轉，並進而從這些藥物中找出對糖尿病腎病變有效但不具有副作用的成份，如此則對這些病人將是一個很大的福音。

貳、材料與方法

藥物：

1. 大黃粗萃取物(科達製藥廠，基原：Rheum Officinale):
 - a. 水萃取物 (1-1,000 $\mu\text{g/ml}$), b. 酒精萃取物 (1-1,000 $\mu\text{g/ml}$)
2. 大黃素 (emodin, Sigma, U.S.A.): 0.01-10 mM
3. dl-Coclaurine (高雄醫學院天然藥物研究所); 0.03-10 μM .
4. Laurotetanine (高雄醫學院天然藥物研究所): 0.035-35 μM .
5. Dipyridamole (Sigma, U.S.A.): 0, 3.4, 11.3, 34 μM
6. Captopril (Bristol/Squibb, U.S.A.): 0.1-10 mM
7. Insulin (Novo, Denmark): 10^{-10} - 10^{-6} M
8. Genistein (30 $\mu\text{g/ml}$), Herbimycin A (2 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma, USA).

以上各種藥物將以各種濃度及作用時間篩選出對高糖培養之 LLC-PK1 細胞之生長及 TGF- β 1 mRNA 及其受器之表現最有效且最不具細胞毒性 (LDH assay & apoptosis) 者。

細胞培養 (3, 12)

簡言之，LLC-PK1 細胞 (CRL 1392) 係購自美國 (ATCC, USA)，細胞培養在 RPMI-1640 (Flow Labs, USA)，內含葡萄糖 11 mM (200 mg/dl)，10% fetal calf serum (FCS)，1 mM glutamine, penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 mg/ml，5%CO₂ incubator at 37 °C，細胞培養在塑膠培養皿上，培養基隔天換一次，細胞的存活率係以 trypan blue exclusion test 來評估。

細胞有絲分裂 (Cellular mitogenesis) 之測定 (3, 12)

簡言之，細胞有絲分裂係以 ³H-thymidine incorporation into DNA 方法來

測定，簡言之，細胞以 trypsin 搖落後，以 8×10^3 的濃度接種在 16 mm 之 24-well tray 中，一天後換成不含血清之 11 mM (200 mg/dl, 正常糖) 或 27.5 mM (500 mg/dl, 高糖) 之培養基，接著加入各種藥物 24-48 小時，在最後四小時加入 2 mCi 之 ^3H -thymidine，再以 PBS 沖洗兩次後，以 10% trichloroacetic acid 使沉澱，以 0.1% SDS 在 37 °C 溶解 30 分鐘，然後再以 liquid scintillation β counter 測定 ^3H -thymidine incorporation 之量。

細胞蛋白質之定量 (3, 12)

簡言之，細胞以 5×10^4 per well 的濃度接種在 6-well 的培養皿中，細胞長滿之後，換成不含血清之培養基 (11 mM 或 27.5 mM) 一天，然後加入各種生藥成份 24-48 小時，以 0.05% trypsin/EDTA 取出細胞後以 hemocytometer 測定細胞數目，溶解細胞之蛋白質係以 Bio-Rad protein assay (Bradford method) 定量，而以牛血清白蛋白當成標準物質，細胞蛋白質的量係代表細胞肥大。

細胞外間質之測定

簡言之，collagen 之測定係利用 ^3H -proline incorporation，然後再跑電泳看分子量來決定其屬於何種 sub-units. Fibronectin 之測定則係利用 anti-fibronectin antibody 來做 Western blotting。

細胞流體儀 (Flow cytometry) (3, 12)

簡言之，細胞大小同時以細胞流體儀測定，簡言之，細胞以 trypsin 取下後，使成均勻分佈於 $10^6/\text{ml}$ 的 PBS 中，接著以 FACScan™ (Becton-Dickinson, USA) 測定 10,000 個細胞的 forward light scattering 來代表相對細胞大小。

RNA 之萃取及逆轉錄酵素-聚合酵素鏈反應 (Reverse transcriptase chain reaction, RT-PCR) (3, 12)

簡言之，細胞之 total RNA (核糖核酸) 以 acid guanidinium thiocyanate-chloroform method 之方法萃取 (58)，然後以其在 260 nm 的分光光度計的吸光度及在 1.2% agarose gels 的電泳來定量，第一段的 cDNA 係利用 2 μg 的 total RNA 以 oligo(dT) 製造 (First-strand cDNA synthesis kit, Clontech Laboratories, Inc., USA)。在加入 200 U 的 Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase, 0.5 U 的 RNAase inhibitor 及 4 ml 的 5 X RT buffer 後，在 42 °C 培養 1 小時，接著在 95 °C 加熱 5 分鐘以停止反應，加入 100 ml 的去離子水稀釋後，冰凍在 -70 °C，PCR 的 primers 係以豬 TGF- β 1 mRNA (Genbank Accession number X12373) 的核苷酸序列設計 (TIB Molbiol Syntheselabor, Berlin, Germany)， β -actin 的 primers 係以 mouse 的核苷酸序列設計，上游的 primer 是 5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGG-3'，下游的 primer 是 5'-TAGCTCTTCTCCAGGGAGGA-3'，以 10 ml 之 cDNA 經 Thermal Cycler (Model 9600, Perkin-Elmer Cetus, CT, USA) 反應 30 cycles，其放大的 protocol 為：94 °C for

1 minute (denaturing), 56°C for 45 seconds (annealing) and 72°C for 2 minutes (extension). The final cycle included a further 5 minutes at 72°C. 所有的 RT-PCR 均重覆做 2 次, 在放大後, PCR 產物以 2% agarose gel 電泳, 照相, 然後以電腦化雷射密度分析儀分析相對密度, 逆滲透之純水及未加入逆轉錄酵素之檢體的 RNA 也用來當成 negative control。

TGF- β 受體 affinity-labeling assays (3, 12):

簡言之, 細胞以 100 pM 之 ^{125}I -TGF- β 1 在 4°C 培養 4 小時, 再以 disuccimidylsuberate cross-link, 然後以 lysis buffer (10 mM Tris, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin A and 50 mg/ml aprotinin) 溶解細胞, cross-linked proteins 以 7.5% SDS-polyacrylamide gel 電泳, 然後在 -70°C 以 autoradiography 照相。Fibronectin 酵素免疫分析 (ELISA) 簡言之, 細胞以 PBS (含 1 mM sodium orthovanadate) 清洗後, 溶解之細胞及培養液以 ELISA assay kit (Biomedical Technologies Inc, Stoughton, MA) 做 Fibronectin 酵素免疫分析, 並以操作手冊上的方法進行。

細胞毒性實驗:

簡言之, 細胞在 5000 g, 4°C 高速離心 10 分鐘, 將 50 ml 的上清液移至 96-well 的酵素分析 plate (LDH assay kit, Boeringer Mannheim, Germany), 並以操作手冊上的方法進行分析。

細胞凋死 (apoptosis) 實驗 (59):

簡言之, 細胞溶解於 lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M EDTA, 1% SDS, 500 mg/ml proteinase K), 在 37°C 培養 4 小時後, 萃取出 DNA, 沉澱之 DNA 經 1.2% agarose gel 電泳, 並以 ethidium bromide 呈色顯影。

統計方法

所有的結果都用 mean $\pm$ SD 表示, 兩組間的統計使用 unpaired Student's t-tests, 配對組間的比較採用 paired Student's t-tests, 各種變數間的相關研究則採用線性迴歸分析。

參、結果

高糖本身及各種藥物對細胞分裂及細胞蛋白質的影響

如圖一~圖三及圖六所示, 高糖本身可以抑制細胞分裂及促進細胞蛋白質, 而大黃、Laurotetanine、coclaurine 加入一天後, 不能逆轉高糖所致的生長抑制及細胞蛋白質 (insulin、genistein、aspirin 等的效果亦均類似)。只有 Captopril (圖五) 在加入一天後, 可以逆轉高糖所致的細胞生長抑制及細胞蛋白質; 而

Emodin 及 dipyridamole (圖四及圖六)在加入一天後,可呈劑量效應的逆轉高糖所致的細胞蛋白質。

高糖及各種藥物對細胞凋亡(apoptosis)的影響

如圖七所示, DNA fragmentation 分析發現 Laurotetanine, coclaurine, captopril, Rhubarb 及 emodin 皆不會造成細胞凋亡(其他藥物也是一樣)。

高糖及各種藥物對細胞毒性(LDH release)的影響

如圖八所示, 由 LDH 細胞毒性試驗發現所有的藥物均不增加 LDH 的釋放, 亦即均無細胞毒性。

高糖及各種藥物對細胞合成 fibronectin 的影響

如圖九所示, 利用 Densitometer 可見高糖可以促進 fibronectin 的合成, 而除了 captopril/insulin 以外, 其他的藥物均無法逆轉高糖所促進的 fibronectin 合成。

高糖及各種藥物對細胞合成 collagen 的影響

如圖十所示, 利用 Densitometer 可見高糖可以促進 collagen $\alpha 1(IV)$ 的合成, 而除了 captopril 及 emodin 以外, 其他的藥物均無法逆轉高糖所促進的 collagen $\alpha 1(IV)$ 合成。

高糖及各種藥物對細胞 TGF- $\beta 1$ mRNA 表現的影響(RT-PCR)

如圖十一所示, 利用 Densitometer 測定 TGF- $\beta 1/\beta$ -actin ratio, 可見高糖可以促進 TGF- $\beta 1$ mRNA 的表現, 而除了 captopril 以外, 其他的藥物均無法逆轉高糖所促進的 TGF- $\beta 1$ mRNA 表現。

高糖及各種藥物對細胞大小的影響(Flow cytometry)

如圖十二所示, 利用細胞流體儀測定細胞大小(forward light scatter), 可見高糖可以促進細胞肥大, 而除了 captopril 以外, 其他的藥物均無法逆轉高糖所促進的細胞肥大。

高糖及各種藥物對細胞 TGF- β 受器表現的影響(affinity labeling)

如圖十三所示, TGF- β 受器 (affinity labeling) 結果發現, 利用 Densitometer 可見高糖可以促進第一及第二型 TGF- β 受器的表現, 而除了 captopril 以外, 其他的藥物均無法逆轉高糖所促進的 TGF- β 受器的表現。

肆、討論

糖尿病在國人的十大死因中, 高佔了第五位, 腎臟病則佔第七位, 糖尿病尿毒症病人的復健及預後也遠不如其他的尿毒症病人 (1), 此不僅是個人及照顧之家人工作力的喪失, 也對國家及社會的財政造成重大的負擔, 因此如何防止糖尿病病人變成尿毒症, 乃是目前醫學界極重要的研究課題。

中藥或其他民俗療法經常被糖尿病腎病變及慢性腎衰竭的病人服用，這些中藥的來源及成份都非常複雜，而其中常有添加類固醇、非類固醇抗發炎劑及其他止痛劑或普拿疼等西藥的成份，甚至重金屬(如汞、鉛等)的污染也時有所聞，故臨床上常會看到濫服藥物所導致的腎小管病變及急慢性腎衰竭(24-26)，最近在比利時更發現有一種含有 aristolochic acid (誤用廣防己的成分之一)的減肥中藥造成數十人的快速進行性腎炎及急性腎衰竭，病理上的表現為不可逆的腎小管間質纖維化，結果這些不幸的病人在短期內大部份都變成尿毒症而需接受長期洗腎，此症已被正式定名為"中藥腎病變" (25)，因此中藥在治療慢性腎衰竭及糖尿病腎病變上的角色仍有待科學的評估。

我們去年的中藥計畫發現了大黃及大黃素可以逆轉糖尿病大白鼠的蛋白尿、尿中 TGF- β 1、腎臟中(尤其是腎小管)TGF- β 1 及細胞外間質的表現，而已知大黃或大黃素具有抗血小板及血管擴張的效果 (52, 53)，又已知血小板凝集抑制劑在臨床上能有效治療糖尿病腎病變 (18)，可惜的是這些藥物有許多是非類固醇抗發炎藥，因此可能有胃出血及止痛劑腎病等副作用，而抵消了其治療腎臟病的效果(18)。

本計畫延續去年的計畫，利用高糖培養的近端腎小管細胞來當成糖尿病腎病變的細胞模式，結果發現高糖可以抑制細胞的分裂，但可以促進細胞肥大及細胞外間質(collagen- α 1(I)及 fibronectin)的製造，同時也促進 TGF- β 1 與其第一及第二型受器的表現，在所研究的各種西藥(insulin、aspirin、dipyridamole、genistein、captopril)及天然藥物(大黃、emodin、laurotetanine、coclaurine)中，只有 captopril 可以逆轉高糖所致的所有生物效應，而 emodin 則只能逆轉高糖所致的細胞肥大及細胞外間質(collagen)的效應。

這些藥物中，dipyridamole 及 aspirin 雖然在臨床上有效，但因其作用機轉是抑制血小板的凝集，因此可能與糖尿病腎小球病變比較有關，genistein 是一種 tyrosine kinase 抑制劑，因此 tyrosine kinase 可能與高糖所致的腎小管病變無關，laurotetanine 是一種鈣離子阻斷的血管擴張劑，而 coclaurine 則是一種血小板凝集抑制劑，因此二者在本實驗均無法逆轉高糖所致的效應，我們推測大黃在糖尿病腎病變的作用機轉可能不是經過血管擴張或血小板凝集的抑制。

伍、結論與建議

我們的結論是 emodin 可能是大黃中主要的有效成份，因為 emodin 與 captopril 都可以逆轉高糖所致的細胞肥大及細胞外間質的製造，而且 emodin 在本實驗所使用的劑量中，也沒有細胞毒性，因此其在治療糖尿病腎病變上的潛力，值得進一步探討。

我們建議利用大黃及制大黃來進行大規模、多中心、雙盲式、安慰劑對照式之

前瞻性研究，以早日使中藥進入競爭激烈的國際藥物市場。

陸、參考文獻

1. Lapuz MH: Diabetic nephropathy. [Review] [49 refs]. Med Clin North Am 1997 May;81:679-88
2. Guh JY, Lai YH, Shin SJ, Chuang LY, Tsai JH: Epidermal growth factor in renal hypertrophy in streptozotocin-diabetic rats. Nephron 1991; 59:641-647.
3. Guh JY, Yang ML, Yang YL, Chang CC, Chuang LY: Captopril reverses high glucose-induced growth effects on LLC-PK₁ cells partly by decreasing transforming growth factor β receptor protein expressions. J Am Soc Nephrol 1996; 7:1207-1215.
4. Yang ML, Guh JY, Lai YH, Yang YL, Chang CC, Tsai JH, Chuang LY: Effects of high glucose culture on EGF effects and EGF receptors in the LLC-PK₁ cells. Am J Nephrol 1997;17:193-198.
5. Schwieger J, Fine LG: Renal hypertrophy, growth factors and nephropathy in diabetes mellitus. Semin Nephrol 1990;10:242-253.
6. Border WA, and Noble NA: TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy. Kidney Int 1997 May;51: 1388-96.
7. Sharma K. and Ziyadeh FN: Biochemical events and cytokine interactions linking glucose metabolism to the development of diabetic nephropathy. [Review] [141 refs] Semin Nephrol 1997 Mar;17: 80-92
8. Ziyadeh FN: Mediators of hyperglycemia and the pathogenesis of matrix accumulation in diabetic renal disease. [Review] [157 refs]. Miner Electrolyte Metab 1995;21:292-302
9. Striker GE, Peten EP, Caromen MA, Pesce CM, Schmidt K, Yang C-W, Elliot SJ, Striker LJ: The kidney disease of diabetes mellitus (KDDM): a cell and molecular biology approach. Diabetes/ Metabolism Rev 1993;9:37-56.
10. Border WA, Yamamoto T, and Noble NA: Transforming growth factor beta in diabetic nephropathy. [Review] [128 refs] Diabetes Metab Rev 1996 Dec;12: 309-39.
11. Sharma K. Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN: Neutralization of TGF-beta by anti-TGF-beta antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced

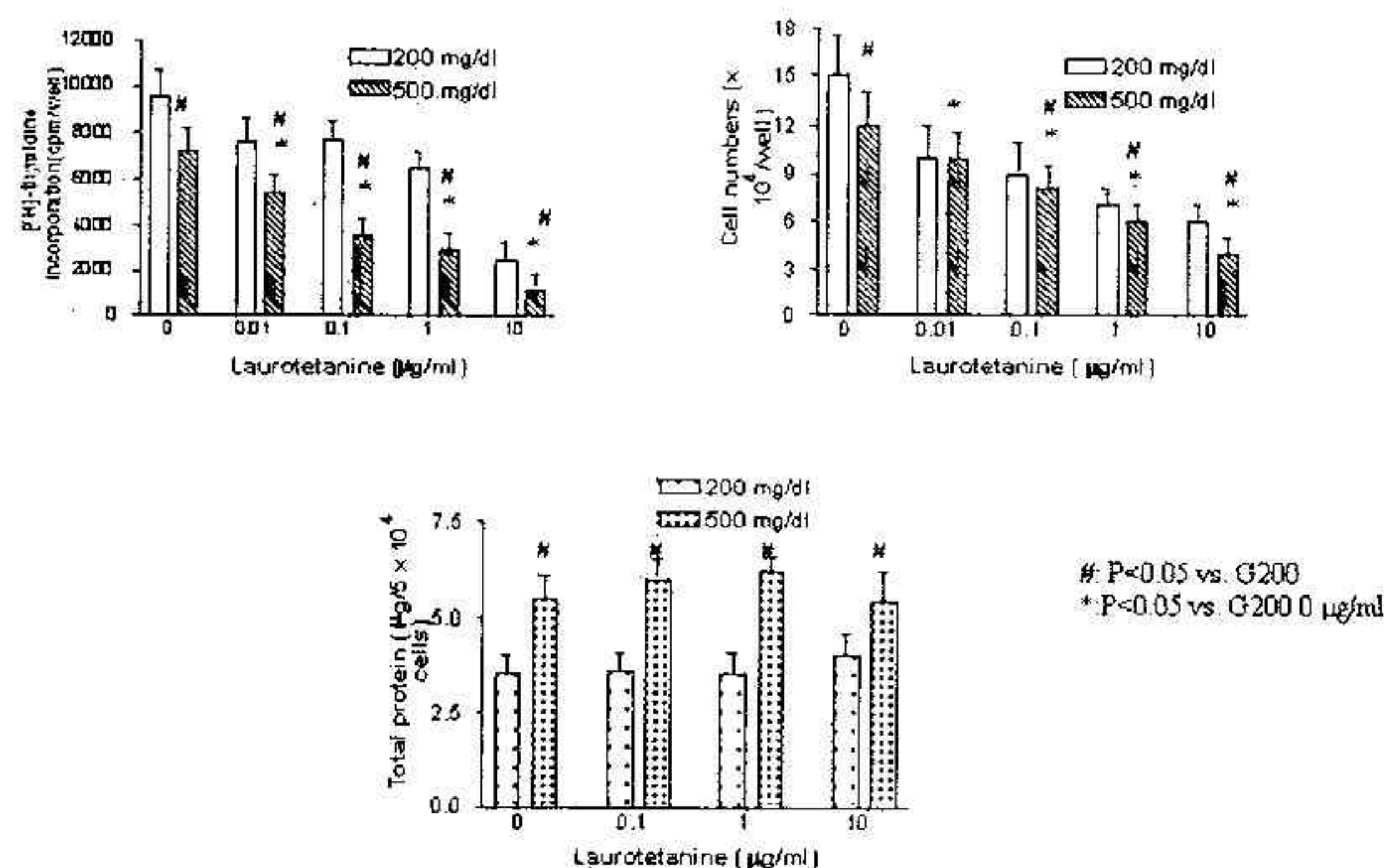
- extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes* 1996;45:522-530.
12. Yang YL, Guh JY, Yang ML, Lai YH, Tsai JH, Hung WC, Chang CC, Chuang L-Y: Interaction between high glucose and transforming growth factor- β in cell cycle protein regulations in MDCK cells. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:182-193.
 13. Yang ML, Guh JY, Yang YL, Chang CC, Chuang LY: Captopril reverses high glucose-induced effects on LLC-PK₁ cells partly by enhancing facilitative glucose transporter messenger RNA expressions. *Biochem Mol Biol Int* 1997;47:511-519.
 14. Krisberg JI: Hyperglycemia and microangiopathy. Direct regulation by glucose of microvascular cells. *Lab Invest* 1992; 67:416-426.
 15. Chobanian MC, Kern TS: Biochemical and anatomical evidence for renal tubule hypermetabolism and hypertrophy in long-standing experimental diabetes mellitus. *Contr Nephrol* 1991;92:71-77.
 16. Ziyadeh FN: Significance of tubulointerstitial changes in diabetic renal disease. *Kidney Int* 1996;54 (suppl):S10-13.
 17. Bohle A, Wehrmann M, Bogenschutz O, Batz C, Muller GA: The pathogenesis of chronic renal failure in diabetic nephropathy. *Pathol Res Pract* 1991;187:251-259.
 18. Patrono C, Davi G: Antiplatelet agents in the prevention of diabetic vascular complications. *Diabetes-Metabolism Reviews*. 1993;9:177-188.
 19. Winchester JF: Therapeutic uses of aspirin in renal diseases. *Am J Kidney Dis* 1996; 28(1 Suppl 1):S20-23.
 20. Lash JP, Bakris GL: Effects of ACE inhibitors and calcium antagonists alone or combined on progression of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transpl* 1995;10 (Suppl):56-62.
 21. Contreras I, Reiser KM, Martinez N, Giansante E, Lopez T, Suarez N, Postalian S, Molina M, Gonzalez F, Sanchez MR, Camejo M, and Blanco MC: Effects of aspirin or basic amino acids on collagen cross-links and complications in NIDDM. *Diabetes Care* 1997 May;20: 832-835.
 22. Fukui M, Nakamura T, Ebihara I, Nagaoka I, Tomino Y, Koide H: Low-protein diet attenuates increased gene expression of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta in experimental glomerular sclerosis. *J Lab Clin Med* 1993;121:224-234.

23. Bakris G, and White D: Effects of an ACE inhibitor combined with a calcium channel blocker on progression of diabetic nephropathy. [Review] [35 refs] J Hum Hypertens 1997 Jan;11:35-38.
24. Deng JF, Lin TJ, Kao WF, and Chen SS: The difficulty in handling poisonings associated with Chinese traditional medicine: a poison control center experience for 1991-1993. [Review] [37 refs] Vet Hum Toxicol 1997 Apr;39:106-114.
25. Reginster F, Jadoul M, and van Ypersele de Strihou C: Chinese herbs nephropathy presentation, natural history and fate after transplantation. Nephrol Dial Transplant 1997 Jan;12:81-86.
26. Wu MS, Hong JJ, Lin JL, Yang CW, and Chien HC: Multiple tubular dysfunction induced by mixed Chinese herbal medicines containing cadmium. Nephrol Dial Transplant 1996 May;11:867-870.
27. Dong D: Present status of nephrology in China. Chinese Medical Journal. 1995;108:73-75.
28. Li P, Fujio S: Effects of chai ling tang on proteinuria in rat models. Journal of Traditional Chinese Medicine. 1995;15:48-52.
29. Li LS: End-stage renal disease in China. Kidney Int 1996; 49:287-301.
30. Hattori T, Fujitsuka N, Kurogi A, and Shindo S: [Sairei-to may inhibit the synthesis of endothelin-1 in nephritic glomeruli]. [Japanese] Nippon Jinzo Gakkai Shi 1997 Mar;39:121-128.
31. Yokozawa T, Wu XQ, Oura H: Onpi-to prevents the progression of renal failure. 和漢醫藥學會誌 1989;6:147-151.
32. Yokozawa T, Zhou JJ, Hattori M, Inaba S, Okada T, Oura H, Nonaka G, and Nishioka I: Effects of a Dan Shen component, magnesium lithospermate B, in nephrectomized rats. Nippon Jinzo Gakkai Shi 1995 Feb;37:105-11
33. Yu JY, Xiong NN, Guo HF: Clinical observation on diabetic nephropathy treated with alcohol of Abelmoschus manihot. 中國中西醫結合雜誌 1995;15:263-265.
34. Bao ZD, Wu ZG, Zheng F: Amelioration of aminoglycoside nephrotoxicity by Cordyceps sinensis in old patients. 中國中西醫結合雜誌 1994;14:271-273.
35. 林俊清: 應用生藥學 (I) 生藥與自由基. Pp.124-136. 富山出版社, 中華民國, 台灣, 高雄市, 中華民國八十四年.

36. Ma J, Lin SY: The mechanism of rhubarb in the treatment of chronic renal failure. 中國中西醫結合雜誌 1993;13:570-571.
37. Zhang G, el Nahas AM: The effect of rhubarb extract on experimental renal fibrosis. Nephrol Dial Transpl 1996;11:186-190.
38. Yokozawa T, Fujioka K, Oura H, Nonaka G, Nishioka I: Effects of rhubarb tannins on uremic toxins. Nephron 1991;58:155-160.
39. Li LS, Liu ZH: Clinical and experimental studies of rheum on preventing progression of chronic renal failure. 中西醫結合雜誌 1991;11:392-396.
40. Yang JW, Li LS: Effects of Rheum on renal hypertrophy and hyperfiltration of experimental diabetes in rat. 中國中西醫結合雜誌 1993; 13:286-288, 261-262.
41. Yang JW, Liu ZH, Zhou H, Zhang JH: Rheum officinale down-regulates gene expression of growth factors in glomeruli from diabetic rats. Chin J Nephrol Dial Transpl 1994;3:255-258.
42. Liu XX: [Pharmacological action and clinical application of palmatum]. [Review] [11 refs] [Chinese] 中國中西醫結合雜誌 1992 Sep;12:571-3
43. Menke J: Herbal remedies. [Review] [6 refs] SD J Med 1997 Jun;50:207-8
44. Peigen X, Liyi H, and Liwei W: Ethnopharmacologic study of Chinese rhubarb. J Ethnopharmacol 1984 May;10:275-93
45. 李瑩譯: 漢方臨床診療醫典. p. 76-79. 大眾書局, 台南, 台灣, 中華民國 79 年.
46. Guo CY, Zhao SY, and Lin CR: [Effects of rhubarb on arachidonic acid metabolism of the renal medulla in the rabbit]. [Chinese] 中國中西醫結合雜誌 1989 Mar;9:161-3, 134
47. Zhou XM, and Chen QH: [Biochemical study of Chinese rhubarb. XXII. Inhibitory effect of anthraquinone derivatives on Na⁺-K⁺-ATPase of the rabbit renal medulla and their diuretic action]. [Chinese] Yao Hsueh Hsueh Pao 1988 Jan;23:17-20.
48. Tian J, Chen XM, and Li LS: [Effects of Cordyceps sinensis, rhubarb and serum renotropin on tubular epithelial cell growth]. [Chinese] 中國中西醫結合雜誌 1991 Sep;11:547-9, 518
49. Zheng F: [Effect of Rheum officinal on the proliferation of renal tubular cells in vitro]. [Chinese] Chung Hua I Hsueh Tsa Chih 1993 Jun;73:343-5, 380-381.
50. Fredenhagen A, Mett H, Meyer T, Buchdunger E, Regenass U, Roggo BE, and

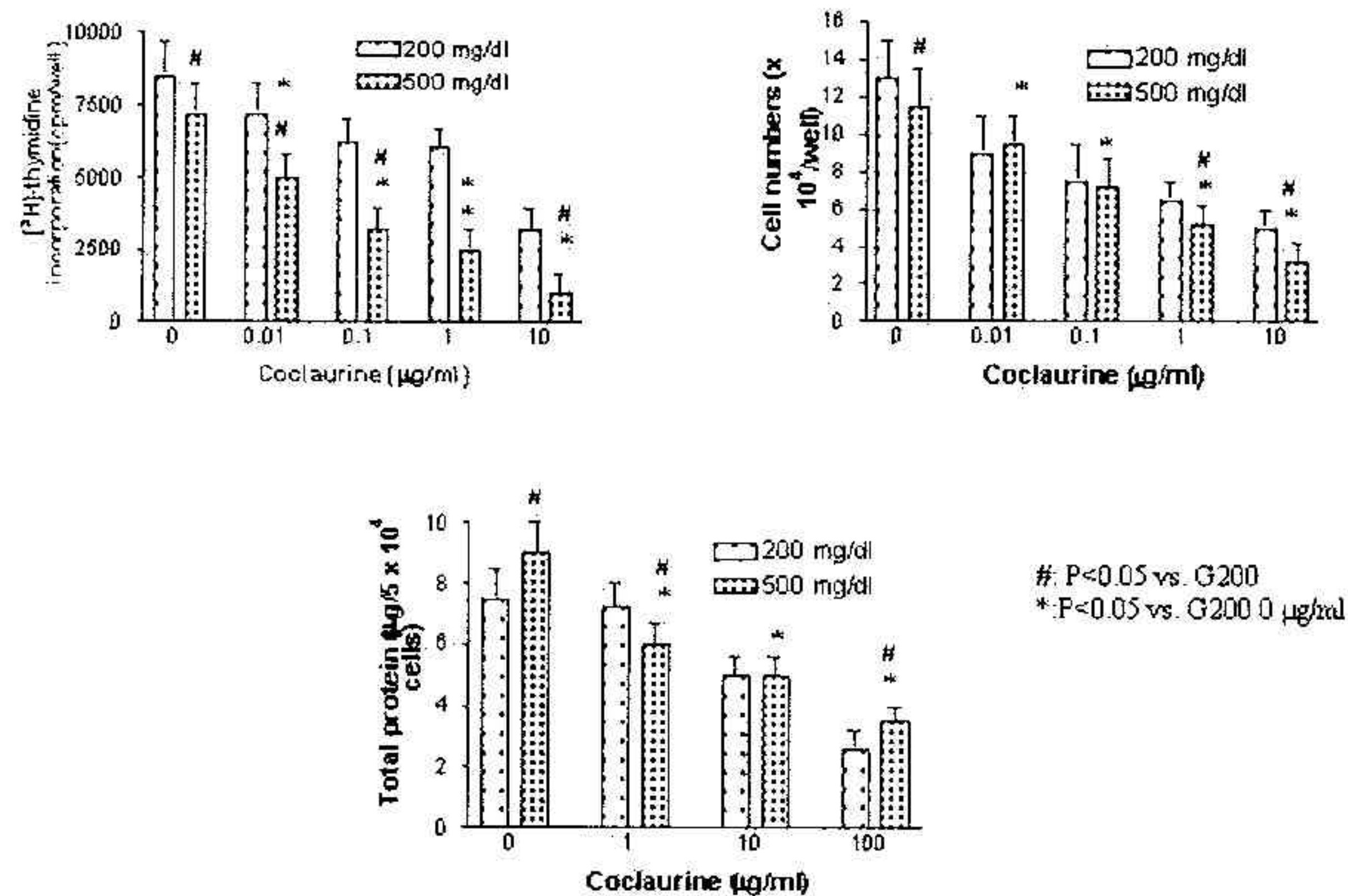
- Petersen F: Protein tyrosine kinase and protein kinase C inhibition by fungal anthraquinones related to emodin. *J Antibiot (Tokyo)* 1995 Nov;48:1355-8
51. Jayasuriya H, Koonchanok NM, Geahlen RL, McLaughlin JL, and Chang CJ: Emodin, a protein tyrosine kinase inhibitor from *Polygonum cuspidatum*. *J Nat Prod* 1992 May;55:696-698.
 52. Ren S: [Role of a virus in hemorrhagic pancreatitis and the therapeutic effect of rhubarb]. [Chinese] *中國中西醫結合雜誌* 1990 Mar;10: 162-3, 133
 53. Huang HC, Lee CR, Chao PD, Chen CC, and Chu SH: Vasorelaxant effect of emodin, an anthraquinone from a Chinese herb. *Eur J Pharmacol* 1991 Dec 3;205:289-94
 54. Chen KS, Ko FN, Teng CM, and Wu YC: Antiplatelet and vasorelaxing actions of some aporphinoids. *Planta Med* 1996 Apr;62:133-136.
 55. Cooper ME: Antihypertensive therapy and diabetic microvascular disease. *Clin Exp Hypertens* 1997 Jul-Aug;19:769-78
 56. Chen WY, Ko FN, Wu YC, Lu ST, and Teng CM: Vasorelaxing effect in rat thoracic aorta caused by laurotetanine isolated from *Litsea cubeba* Persoon. *J Pharm Pharmacol* 1994 May;46:380-2
 57. Chen KS, Ko FN, Teng CM, and Wu YC: Antiplatelet of vasorelaxing actions of some benzylisoquinoline and phenanthrene alkaloids. *J Nat Prod* 1996 May;59:531-4
 58. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.
 59. Hung WC, Chuang LY: Induction of apoptosis by sphingosine-1-phosphate in human hepatoma cells is associated with enhanced expression of bax gene product. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;229:11-15.

Laurotetanine不逆轉高糖所致的生長抑制及細胞蛋白質



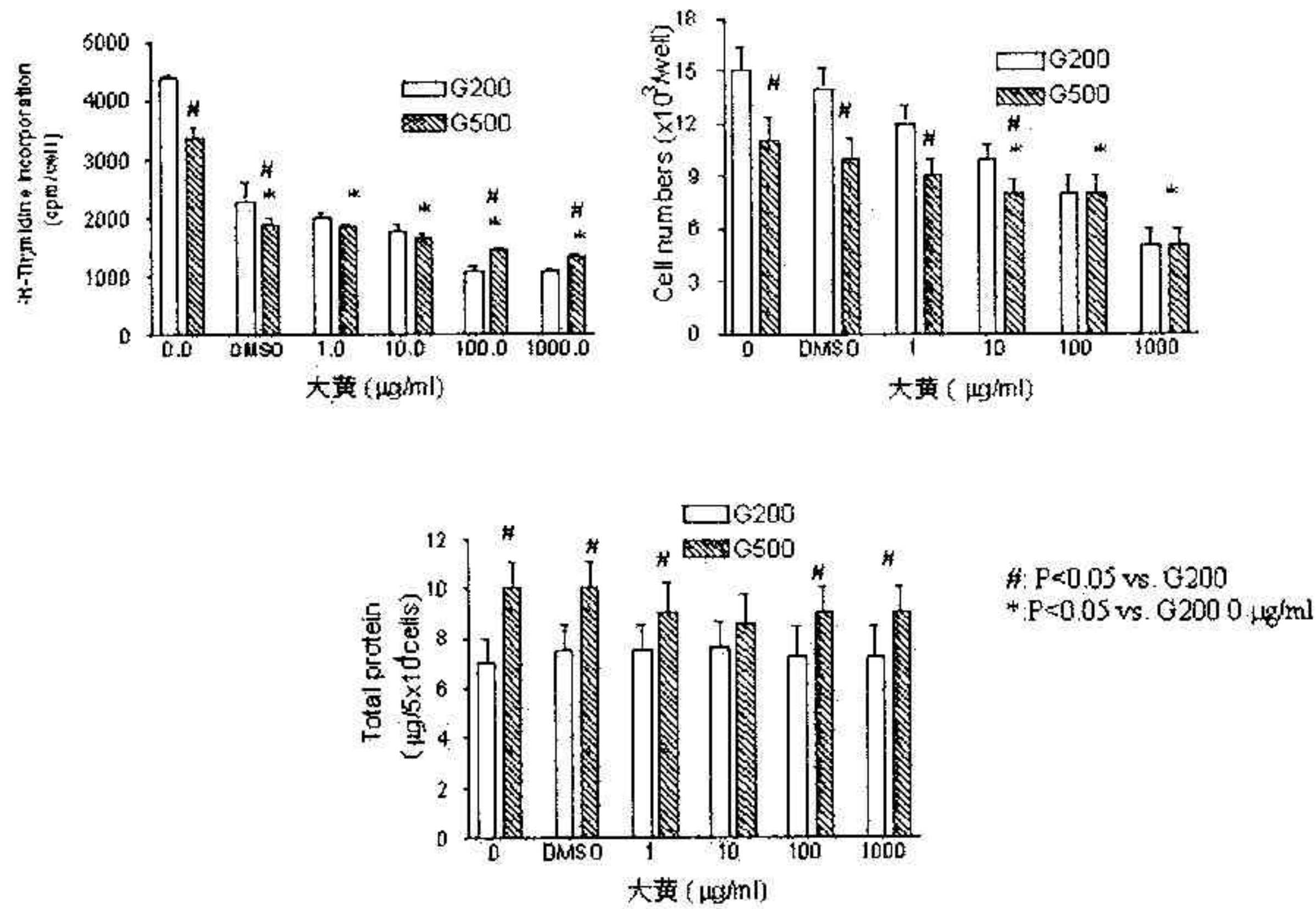
圖一、高糖本身抑制細胞分裂及促進細胞蛋白，而 Laurotetanine (0.1-10 $\mu\text{g/ml}$ or 0.3-30 μM) 加入一天後，在正常糖及高糖下均可呈劑量效應的降低細胞的分裂，但不影響細胞大小，亦即不逆轉高糖所致的生長抑制及細胞蛋白質。

Coclaurine不逆轉高糖所致的細胞分裂抑制及細胞蛋白質



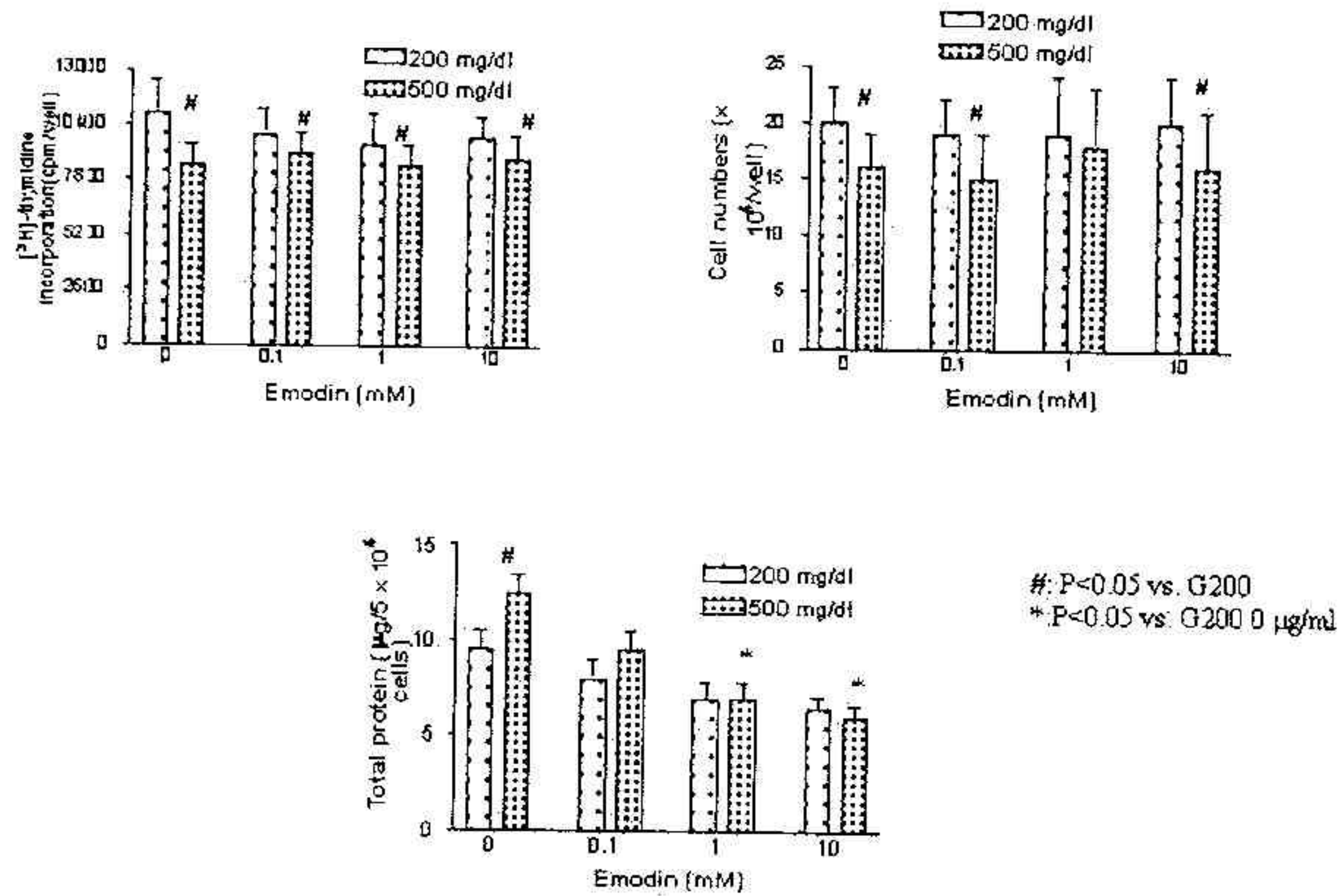
圖二、高糖本身抑制細胞分裂及促進細胞蛋白，而 Coclaurine(0.01-10 $\mu\text{g/ml}$ or 0.03-30 μM) 加入一天後，可呈劑量效應的降低細胞的分裂，也能抑制細胞蛋白質(但非逆轉高糖所致者，因為細胞比 control 還要小，而且 5 及 50 $\mu\text{g/ml}$ 均無效，亦及無劑量效應)，因此 Coclaurine 無法逆轉高糖所致的細胞分裂抑制及細胞蛋白質。

大黃不逆轉高糖所致的 細胞分裂抑制及細胞蛋白質



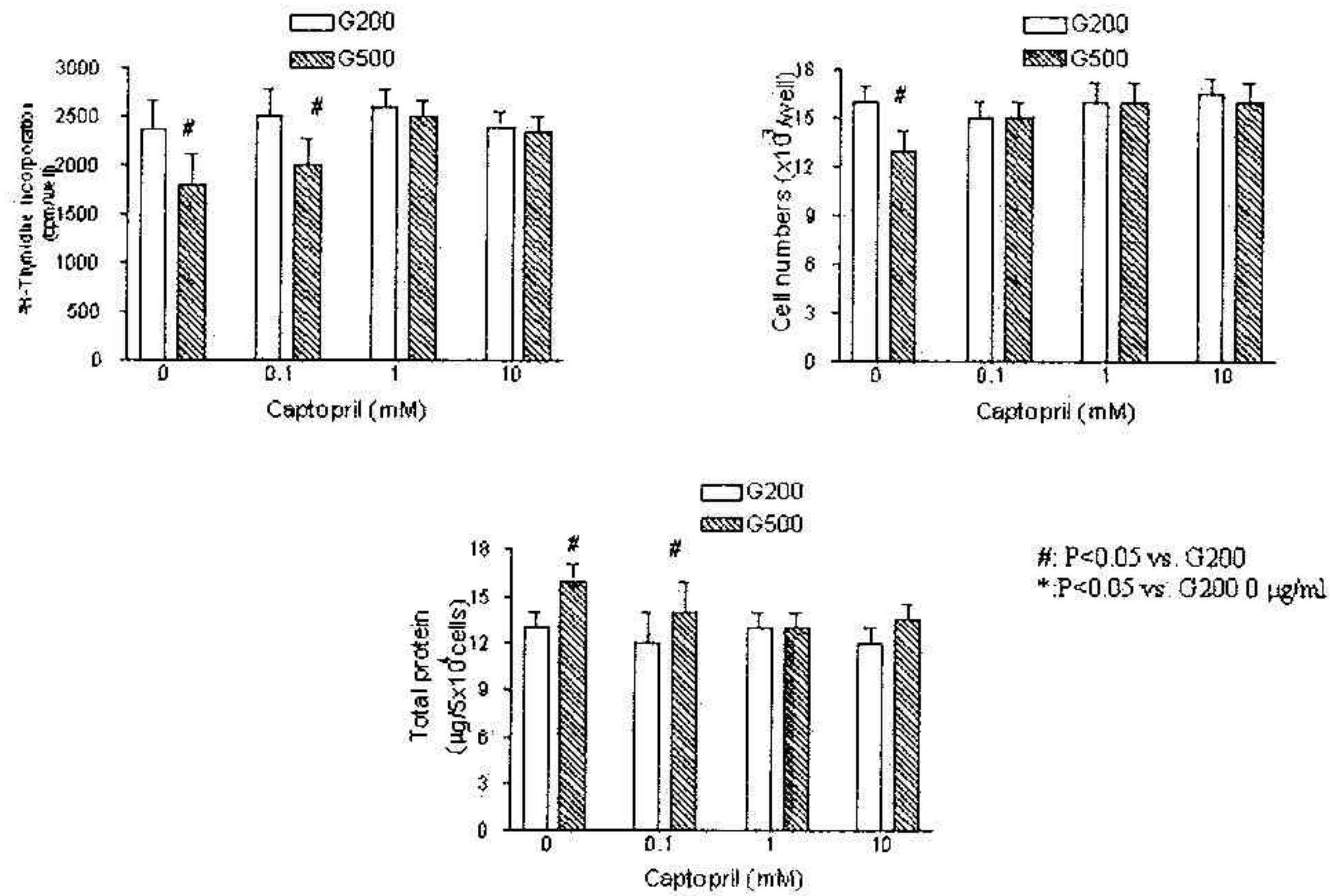
圖三、高糖本身抑制細胞分裂及促進細胞蛋白，而大黃加入一天後，可呈劑量效應的降低細胞的分裂（但非逆轉高糖所致者，因為細胞比 control 還要小），但不能抑制細胞蛋白質，因此大黃無法逆轉高糖所致的細胞分裂抑制及細胞蛋白質。#: $P<0.05$ vs. G200, *: $P<0.05$ vs. G200 0 $\mu\text{g/ml}$.

Emodin (0.1 mM) 逆轉高糖所致的 細胞蛋白質(但非細胞分裂抑制)



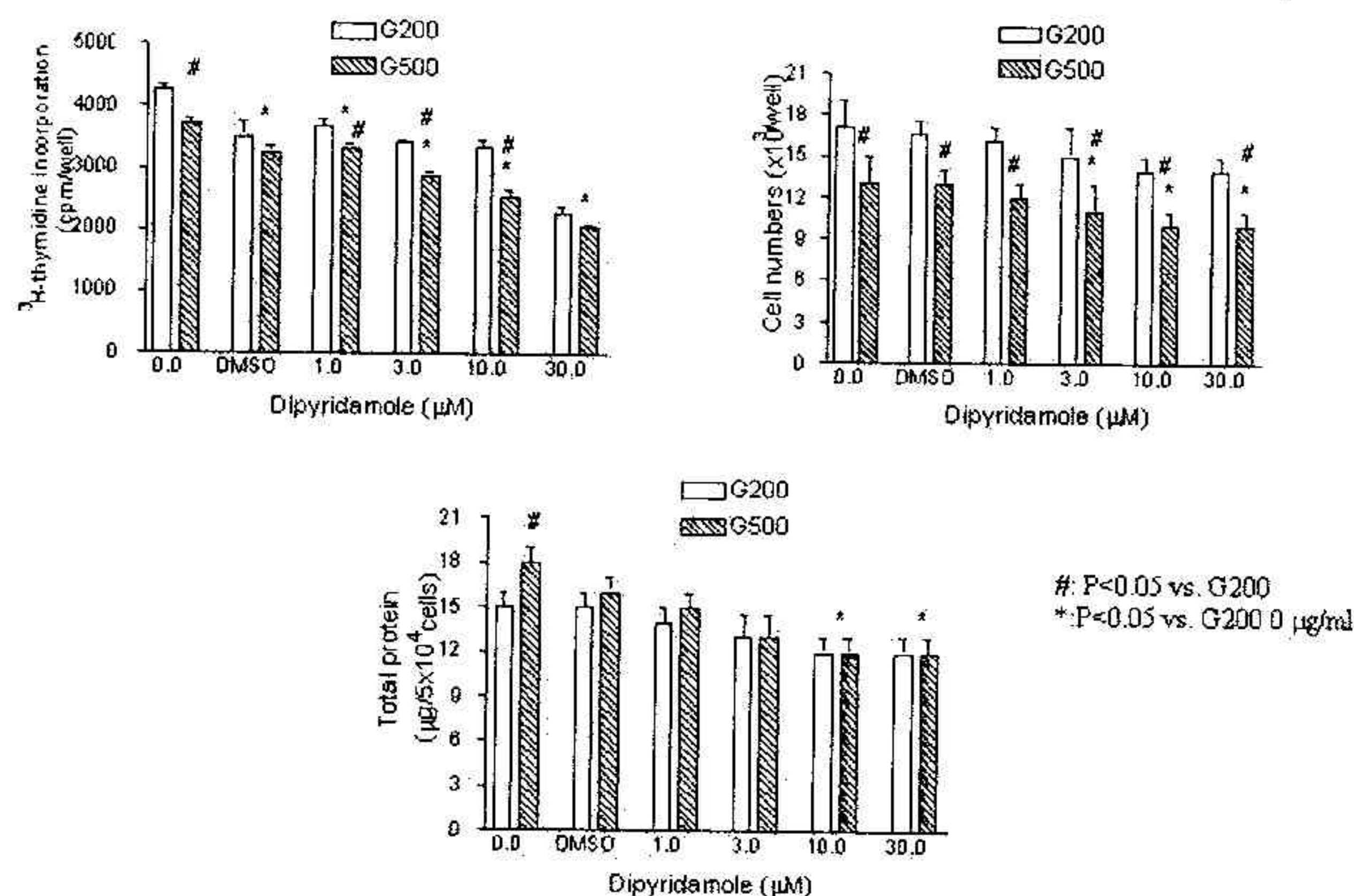
圖四、Emodin 加入一天後，不影響細胞的分裂，但可呈劑量效應的降低細胞蛋白，尤其在 0.1 mM 時細胞蛋白質就與 control 無差別(0.01 mM & 0.5 mM 也一樣，亦即有劑量效應)。#: P < 0.05 vs. G200, *: P < 0.05 vs. G200 0 mM.

Captopril (1-10 mM)可以逆轉高糖所致的 細胞分裂抑制及細胞蛋白質

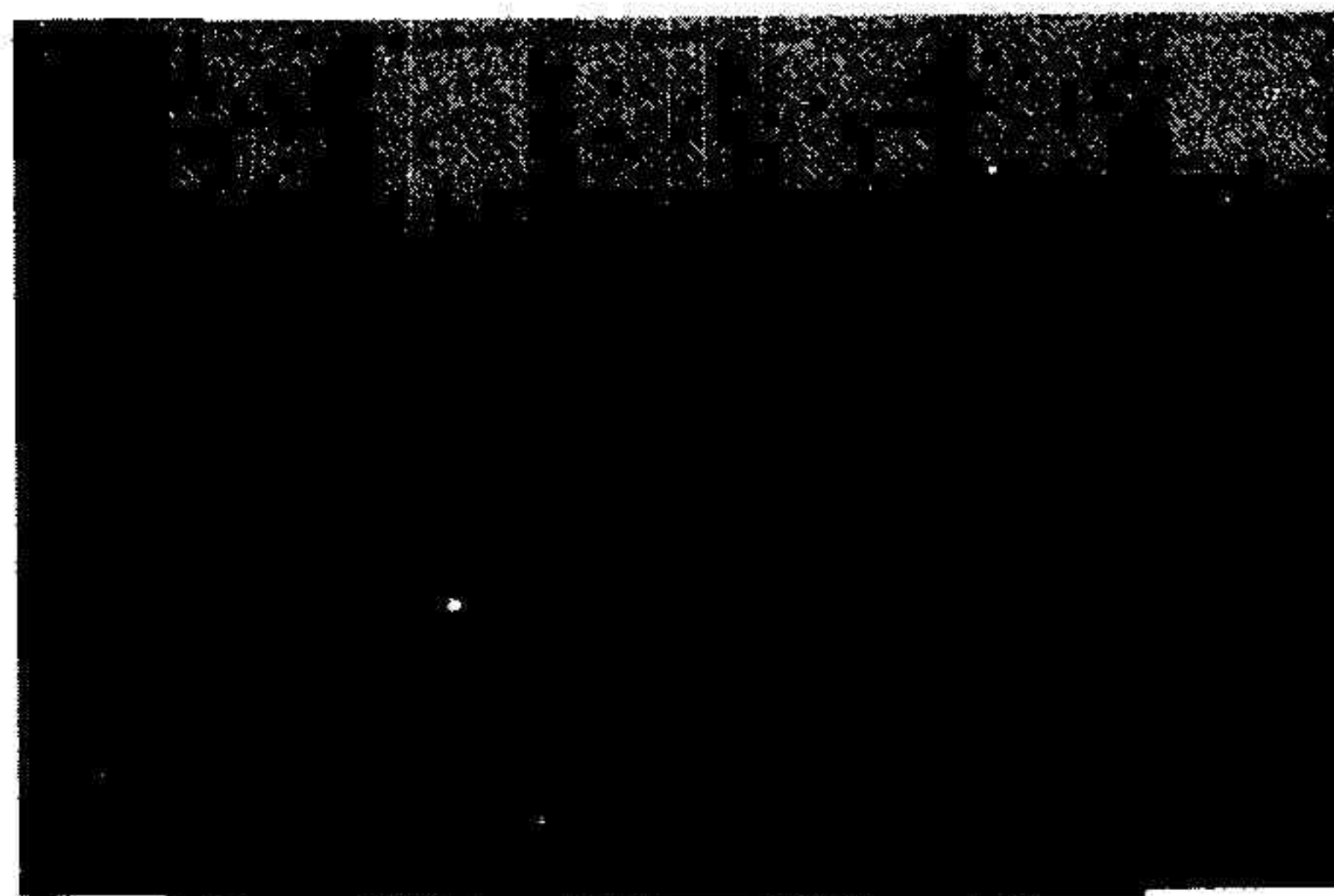


圖五、Captopril 加入一天後，可以逆轉高糖所致的細胞生長抑制及細胞蛋白。 #: P < 0.05 vs. G200, *: P < 0.05 vs. G200 0 mM.

Dipyridamole (1-3 μM) 不逆轉高糖所致的細胞分裂抑制但可逆轉細胞蛋白質

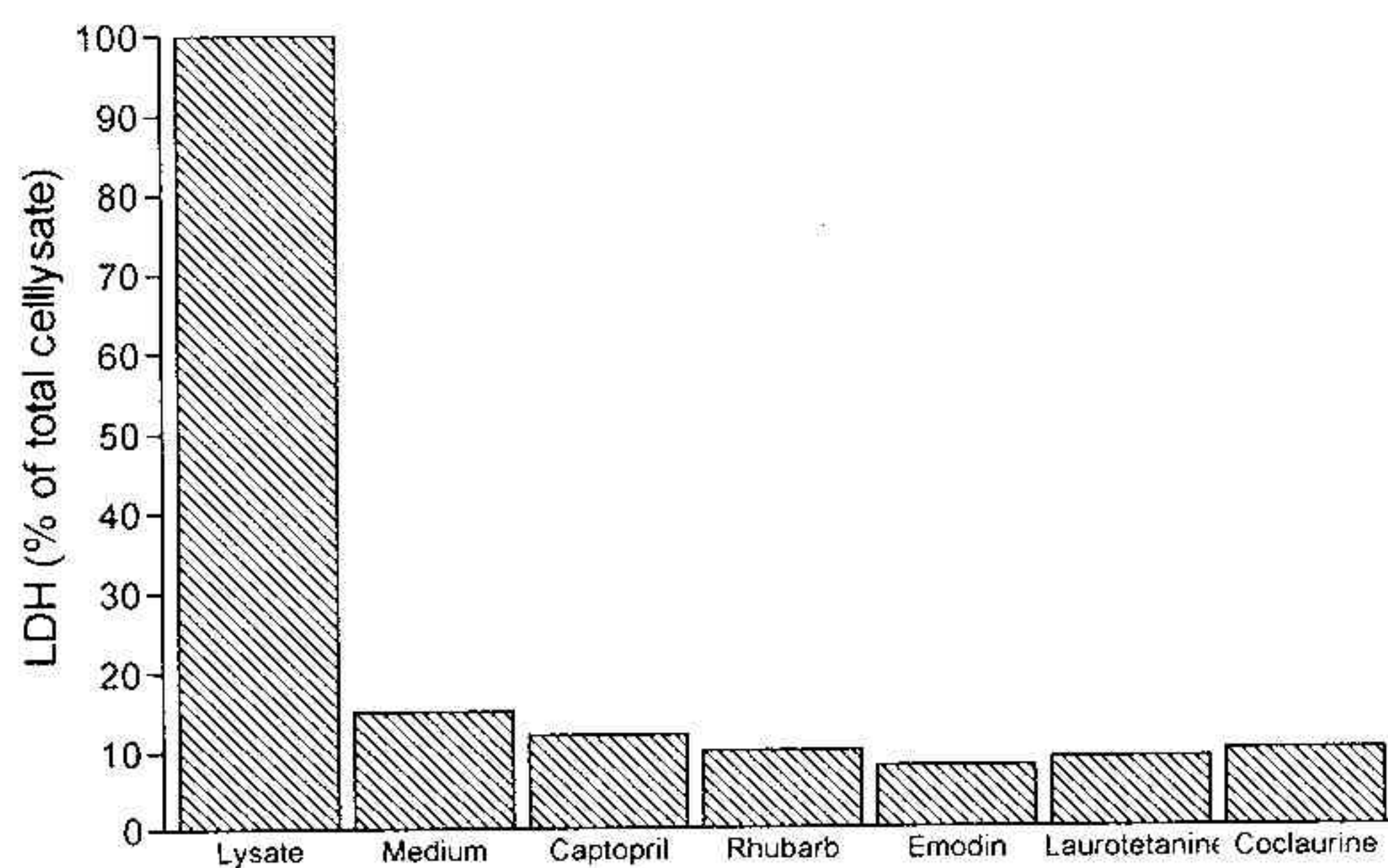


圖六、高糖本身抑制細胞分裂及促進細胞蛋白，而 Dipyridamole 加入一天後，可呈劑量效應的降低細胞的分裂，也能逆轉高糖所致的細胞蛋白質(1-3 μM)，因此 Dipyridamole 無法逆轉高糖所致的細胞分裂抑制但可逆轉細胞蛋白質。#: P < 0.05 vs. G200, *: P < 0.05 vs. G200 0 μM .



Mr C Lauro- Coclau- Capto- Rhu- Emo
tetanine rine pril barb din

圖七、DNA fragmentation 分析: C (Control, 高糖), Laurotetanine, coclaurine, captopril, Rhubarb 及 emodin 皆不會造成細胞凋亡 (其他藥物也是一樣)。

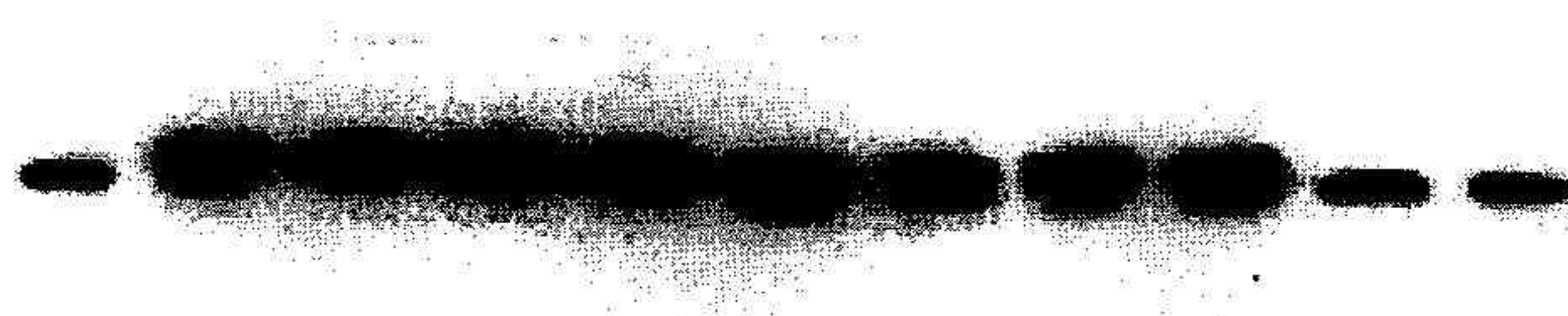


圖八、LDH 細胞毒性試驗: 所有的藥物均不增加 LDH 的釋放, 亦即均無細胞毒性。



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

圖九：控制組(lane 1)、高糖(lane 2)、大黃(lane 3)、emodin (lane 4)、aspirin (lane 5)、captopril (lane 6)、dipyridamole (lane 7)、Laurotetanine (lane 8)、Coclaurine (lane 9)、Genistein (lane 10)、Insulin (lane 11), 利用 Densitometer 可見高糖可以促進 fibronectin 的合成, 而除了 captopril/insulin 以外, 其他的藥物均無法逆轉高糖所促進的 fibronectin 合成.



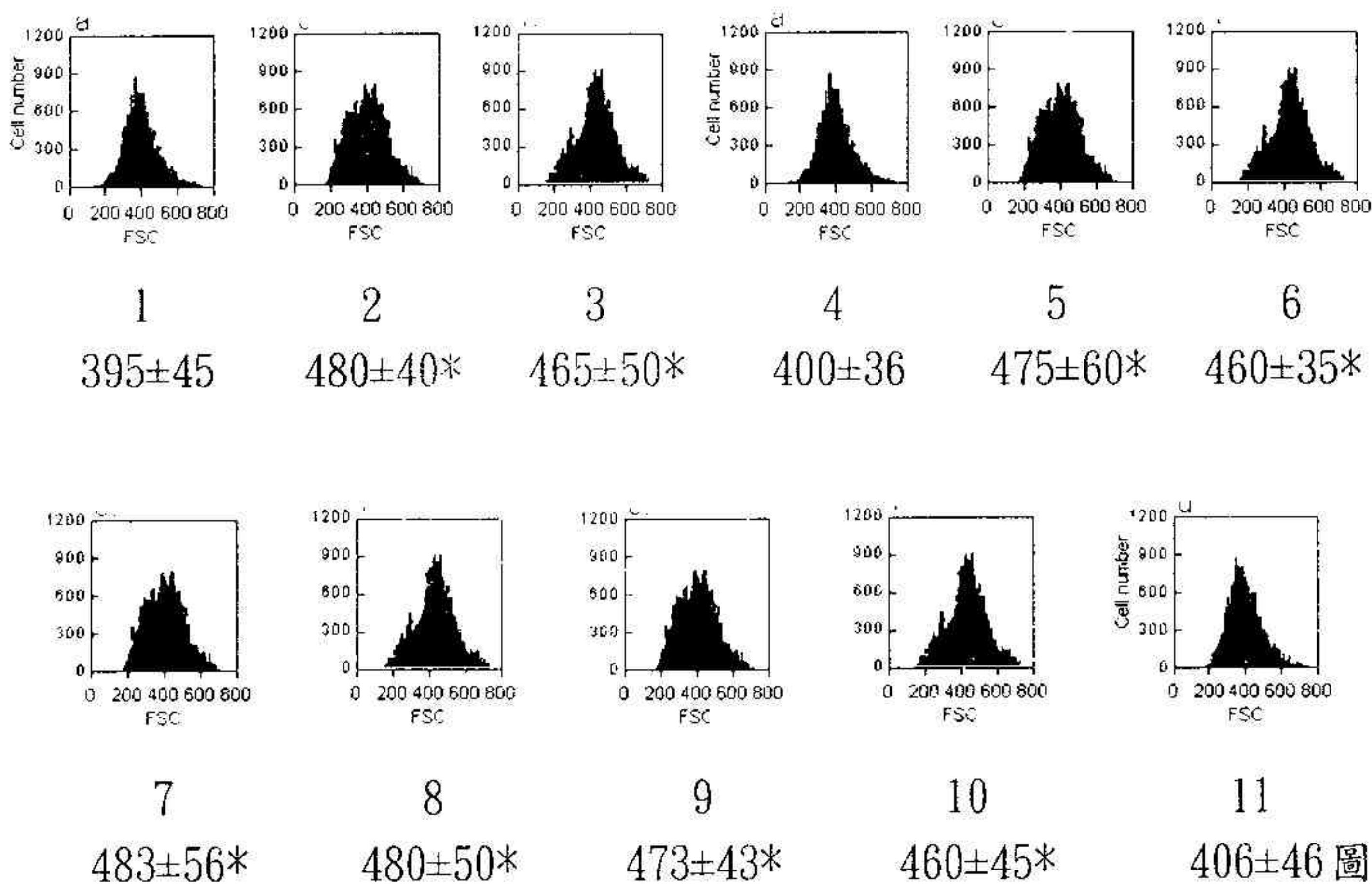
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

圖十：控制組(lane 1)、高糖(lane 2)、大黃(lane 3)、insulin (lane 4)、aspirin (lane 5)、dipyridamole (lane 6)、Laurotetanine (lane 7)、Coclaurine (lane 8)、Genistein (lane 9)、captopril (lane 10)、emodin (lane 11), 利用 Densitometer 可見高糖可以促進 collagen $\alpha 1$ (IV) 的合成, 而除了 captopril 及 emodin 以外, 其他的藥物均無法逆轉高糖所促進的 collagen $\alpha 1$ (IV) 合成.

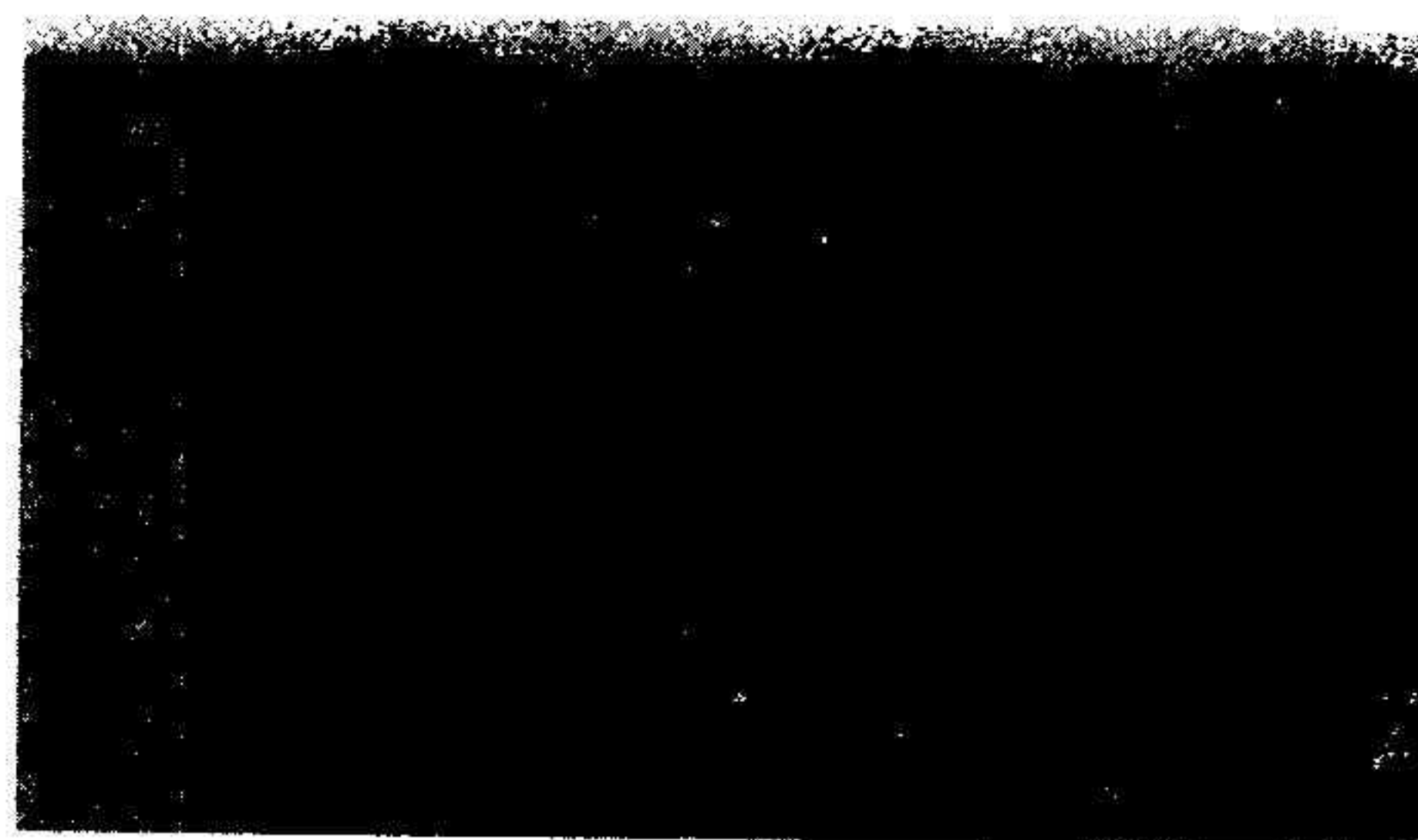


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

圖十一：RT-PCR：上面是 TGF- β 1，下面是 β -actin mRNA. 控制組(lane 1)、高糖(lane 2)、大黃(lane 3)、insulin (lane 4)、aspirin (lane 5)、dipyridamole (lane 6)、Laurotetanine (lane 7)、Coclaurine (lane 8)、Genistein (lane 9)、emodin (lane 10)、captopril (lane 11), 利用 Densitometer 測定 TGF- β 1/ β -actin ratio, 可見高糖可以促進 TGF- β 1 mRNA 的表現, 而除了 captopril 以外, 其他的藥物均無法逆轉高糖所促進的 TGF- β 1 mRNA 表現.



圖十二：利用細胞流體儀測定細胞大小(forward light scatter): 控制組(lane 1)、高糖(lane 2)、大黃(lane 3)、emodin (lane 4)、aspirin (lane 5)、dipyridamole (lane 6)、Laurotetanine (lane 7)、Coclaurine (lane 8)、Genistein (lane 9)、insulin (lane 10)、captopril (lane 11), 可見高糖可以促進細胞肥大, 而除了 captopril/emodin 以外, 其他的藥物均無法逆轉高糖所促進的細胞肥大. *:P<0.05 vs. control.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

圖十三: TGF- β 受器 (affinity labeling): 最上面是第三型, 中間是第二型, 最下面是第一型; 控制組(lane 1)、高糖(lane 2)、大黃(lane 3)、insulin (lane 4)、captopril (lane 5)、dipyridamole (lane 6)、Laurotetanine (lane 7)、Coclaurine (lane 8)、Genistein (lane 9)、aspirin (lane 10)、emodin (lane 11), 利用 Densitometer 可見高糖可以促進第一及第二型 TGF- β 受器的表現, 而除了 captopril 以外, 其他的藥物均無法逆轉高糖所促進的 TGF- β 受器的表現.