

計畫編號：CCMP89-RD-005

行政院衛生署八十九年度科技研究發展計畫

利用定量聚合酶鏈反應評估抗氧化劑對於單核球細胞及纖維母細胞超氧化物歧化酶的影響

委託研究報告

計畫委託機關：中國醫藥學院附設醫院

計畫主持人：蔡輔仁

研究人員：蔡輔仁

執行期間：88年07月01日至89年06月30日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見

計畫編號：CCMP89-RD-005

各機關研究計畫基本資料庫之計畫編號：

行政院衛生署八十九年度科技研究發展計畫

利用定量聚合酶鏈反應評估抗老化方劑對於單核球細胞及纖維母細胞超氧化物歧化酶的影響

委託研究報告

計畫委託機關：中國醫藥學院附設醫院

計畫主持人：蔡輔仁

研究人員：蔡輔仁

執行期間：88年07月01日至89年06月30日

編號：CCMP89-RD-005

行政院衛生署中醫藥委員會八十八年下半年及八十九年度
委託研究計劃成果報告

利用定量聚合酶鏈反應評估抗老化方劑對於單核
球細胞及纖維母細胞超氧化物歧化酶的影響

執行機構：中國醫藥學院附設醫院

計劃主持人：蔡輔仁

研究人員：蔡輔仁

執行期限：88年7月1日至89年6月30日

****本研究報告僅供參考，不代表本會意見****

計畫編號：CCMP89-RD-005

各機關研究計畫基本資料庫之計畫編號：

行政院衛生署八十九年度科技研究發展計畫

利用定量聚合酶鏈反應評估抗氧化劑對於
單核球細胞及纖維母細胞超氧化物歧化酶的影響

委託研究報告

計畫委託機關：中國醫藥學院附設醫院

計畫主持人：蔡輔仁

研究人員：蔡輔仁

執行期間：88年7月1日至89年6月30日

編號：CCMP89-RD-005

行政院衛生署中醫藥委員會八十九年度委託研究計畫成果報告

利用定量聚合酶鏈反應評估抗氧化劑對於單核
球細胞及纖維母細胞超氧化物歧化酶的影響

執行機構：中國醫藥學院附設醫院 優生保健部

計畫主持人：蔡輔仁

研究人員：蔡輔仁

執行期限：民國 88 年 7 月 1 日至民國 89 年 6 月 30 日

目錄

中文摘要	一
英文摘要	二
壹、前言.....	1
貳、材料與方法.....	6
參、結果.....	11
肆、討論.....	12
伍、結論與建議.....	15
陸、參考文獻.....	16
柒、圖、表.....	21

編號：CCMP89-RD-005

利用定量聚合酶鏈反應評估抗老化方劑 對於單核球胞及 纖維母細胞超氧化物歧化酶的影響

蔡輔仁

中國醫藥學院附設醫院

摘要

老化是自古以來困擾人類的課題之一，在邁向老年化社會的今天更形重要。抗老化方劑或補益方劑是傳統中醫藥中特有的一環，但其療效缺乏科學的驗證。老化的成因眾多，其中自由基學說最為吾人所接受。本研究即針對中藥能否增加人類單核球細胞超氧化物歧化酶(SOD)之活化，用分子醫學的模式，以定量聚合酶鏈反應直接測定各細胞超氧化物歧化酶的傳訊核糖核酸。我們發現六味地黃湯可增加 SOD 傳訊核糖核酸的表達，而其中以 30%的濃度表現最佳。四君子湯並無任何效果。本方法的優點為其偵測範圍度及靈敏度高且容易對中醫藥的治病機轉提出強而有力的證據。藉此技術，吾人可大量篩檢傳統中醫藥中之抗老藥方，並探討其臨床意義。

關鍵詞：定量聚合酶鏈反應、傳統中醫藥、超氧化物歧化酶、自由基

編號：CCMP89-RD-005

The effect of Chinese anti-aging medicine on superoxide dismutase evaluated by quantitative PCR

Fuu-Jen Tsai

China Medical College Hospital

Abstract

The anti-aging effects of two Chinese medicines were evaluated in monocytes. In order to search for a possible mechanism of aging, the messenger RNA (mRNA) of superoxide dismutase (SOD) was measured in monocytes. The mRNA of monocytes were measured at 0hr, 1hr, 3hr, 6hr, 18hr and 24hr after medicines were added by RT PCR. The result show Luh-Wey-Dih-Hwang-Tang can increase the mRNA of SOD and the Syh-Jiun-Tzyy-Tang can't. The anti-aging effect of Luh-Wey-Dih-Hwang-Tang may come from the activity enhancement of SOD. This method can be used for massive screening the traditional medicine efficiently.

Keywords : Chinese medicine, mRNA

壹、前言

生長衰老是生命的自然法則，老化也是人類生理過程的必然歸宿，中國傳統醫學早在素問，上古天真論中就有關於老化的記載："女子七歲，腎氣盛，齒更髮長；二七而天癸至，任脈通，太衝脈盛，月事以時下，故有子．．．；五七陽明脈衰，面皆焦，髮始墮；七七任脈虛，太衝脈衰少，天癸竭，地道不通，故形壞而無子也。丈夫八歲，腎氣實，髮長齒更；二八腎氣盛，天癸至，精氣溢瀉，陰陽和，故能有子．．．；五八腎氣衰，髮墮齒槁；六八陽氣衰竭于上，面焦，髮鬢斑白；七八肝氣衰，筋不能動；天癸竭，精少，腎脈衰，形體皆極，則齒髮去[1]。"以女七，男八為基數進行年齡分期，主要以腎氣的消長盛衰來說明隨年齡增長，人體發生的生長壯老的變化，並認為老化的機理為腎虛，後世乃至近代醫家多承此說，常用補腎方藥以抗老化之目的[2-4]。

現代醫學認為老化是生物體逐漸失去其恆定性(homeostasis)的過程，由於其過程非常複雜並無法以單一理論來作全面說明[5-7]。這些理論當中由Harman於1956年提出的自由基老化理論(free-radical theory of ageing)以來，在歷經四十年來的歷煉，迄今仍方興未艾，廣受基礎生化、遺傳及分子醫學等專家學者之重視。自由基是一種具有一個以上不成對電子的分子之總稱，由於它的極端不穩定性及強烈的反應性，不僅可使核酸、蛋白質變性，氧化體內不飽和脂肪酸形成脂質過氧化物(lipid peroxides)，進而影響細胞、組織及生物體的正常功能[9-13]，而其中超氧化物自由基是損害機體，促進老化的重要物質之一。

人體組織中有一系列有效的抗自由基損傷系統，包括酶類和維生素C、維生素E等天然抗氧化劑，當中最重要的酶有超氧化物歧化酶(superoxide dismutase; SOD)，谷胱甘肽過氧化物酶(glutathione peroxidase; GSH-Px)等，

它們有清除體內自由基作用，減輕自由基對細胞的損傷，隨著年齡的增長，體內抗氧化能力減弱，自由基氧化反應對細胞膜核酸、蛋白質和酶的攻擊、破壞作用長期累積，促進機體老化[8]。

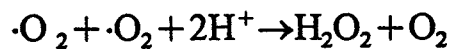
根據陳晏珍等人[4]，對 66 例腎虛証患者進行的紅血球 SOD 活性定量測定，發現腎虛者 SOD 活性明顯低於正常對照組。腎虛可導致 SOD 活性下降，氧自由基清除性減弱，這些研究證實了腎虛與老化的關係。

氧分子是需氧生物生存所必需的。生物體內的營養物質通過氧化放出能量，供各種生理活動之需。然而，在某些物質的氧化過程中，會形成自由基中間產物，例如：黃嘌呤氧化酶催化黃嘌呤氧化時生成 $O_2^{\cdot-}$ ，對生物體有損害作用。但在生物進化過程中，適應環境的變化，也形成了防禦氧毒性的酶系統，來保護機體。因此當 $O_2^{\cdot-}$ 生成後，有超氧化物歧化酶作用使之生成 H_2O_2 ， H_2O_2 可迅速被細胞內的過氧化氫酶或過氧化物酶(特別是含硒(Se)的谷胱甘肽過氧化物酶)除去。如這些酶不足，或生成的 $O_2^{\cdot-}$ 過多特別是在一些能產生 $O_2^{\cdot-}$ 的外界因素作用時，除草劑 paraquat，在體內能產生大量的 $O_2^{\cdot-}$ ，進而反應生成 H_2O_2 和 $\cdot OH$ 。尤其是 $\cdot OH$ ，是氧化能力很強的自由基，它幾乎能與細胞內的一切有機化合物反應，因此，它一旦生成，就在它所在的微環境中，與其鄰近的有機化合物反應，啟動自由基的連鎖反應，破壞核酸、蛋白質、氨基酸、醣類及脂類化合物，從而損害細胞的結構和功能[9]。

MaCord 與 Fridovich 兩位學者於 1969 年發現 SOD，這種酶可以清除過氧自由基，而自由基對生理系統是有負面影響[15]。Bartosz 等人首先比較果蠅的壽命與 SOD 活性的關係，發現一種短命的果蠅是因為缺乏 SOD 所導致[16]。但 Massie 等人又報告 SOD 與果蠅壽命並無直接關聯[17]。Ruddle 等人利用丙基沒食子酸鹽(propyl gallate)作抗氧化劑餵食果蠅可以有意義的增加果蠅的存活時間[18]。Phillips 等人更發現缺乏 SOD 活性的

突變果蠅對 paraquat 的敏感性增加，並且縮短其壽命[19]。Arking 等人亦指出某些遺傳上有較長壽命的果蠅對 paraquat 較有抗拒性[20]。無可置疑的 SOD 在果蠅的壽命上扮演著某種程度的影響，當然其他的自由基清道夫(scavenger)如 GSH-Px 和 Catalase 也有其重要性。

氧化造成 DNA 損傷(oxidative DNA damage)可能是老化的重要因素之一，這種現象可由下列幾點得到支持(一)年紀愈大，氧化損傷的程度也愈大(二)氧化造成 DNA 損傷與老化有直接關聯(三)在唐氏症(Down syndrome)的病人因其氧化損傷的程度高於常人，而其壽命也短於常人。Reznick 等人發現製造錯誤的酵素分子會隨年齡而增加，用西方墨漬法可以發現年齡愈大，超氧化物歧化酶(SOD)的原始活性(native active enzyme)就愈低[21]。SOD 可以保護細胞對抗氧毒性的原理就在它能清除超氧自由基($\cdot\text{O}_2$)。它可依下列反應來中和超氧自由基：



SOD 是一個有 135 胺基酸大的 dimer，它含有 2 個部份，可分別與銅及鋅離子結合。1956 年 Harman 提出這樣的假說：自由基隨著年齡增加，並且使 DNA、RNA 及蛋白質失去活性[8]。後來的研究者就視 SOD 為一個年齡的功能指標，因為在老年時 SOD 的活性減低意味著自由基增加。除了 SOD 之外 GSH-Px 也有相同的特性年齡愈大，活性愈低。自由基隨著年齡增長而增加已成為合理的推論。研究表明，老化期抗氧化酶活性降低，自由基濃度增高。SOD 消除自由基的能力與酶活性成正比，酶活性與生物年齡的增長成反比[22]。

目前多數學者將紅血球 SOD 酵素活性作為監測老化的一個指標[23]。

丁克祥報導了 6418 例健康中國人紅血球中 SOD 活性正常值[24]。通過相關和回歸分析，證明了健康人紅血球內 SOD 活性與年齡之間呈現非常明顯的負相關關係，即隨著增齡，紅血球中 SOD 活性呈現明顯下降趨勢。韓明向等人也觀察到類似結果[25]。陶國樞亦證實 SOD 隨年齡增加而下降，老年組與青年組相比差異非常顯著[26]。Michelson 對 200 例正常人紅血球測其 SOD 活性發現[27]，60 歲以上老人之 SOD 活性明顯低於青壯年組。

王贊舜等人測定發現[28]，自中年起 SOD 值開始下降，並維持此水平至老年，認為 SOD 與生理老化有關外，可能與老年人某些病理過程也有關係。Ceballos 則報導[29]，SOD 活性自 11-25 歲起發生明顯變化，該年齡組 SOD 活性隨增齡而下降。Gevmour 測定了 1836 名 4 歲至 97 歲男女健康者血漿和紅血球中 SOD 活性[30]，亦證明 SOD 活性隨增齡而下降同時發現 SOD 活性與性別無關，也和體重、血壓高低無關。運用密度梯度離心法，以不同年齡紅細胞的研究表明[31]，年輕紅血球 SOD 活力最高，衰老紅血球最低，隨老化進程逐漸降低。從以上各家的研究不難發現，SOD 酵素活性與老化之間有密不可分的關係。隨年齡的增長，SOD 酵素活性降低，清除自由基的能力也隨之減低，這種推論，已在各種研究中被證實 [21-31]。若能以藥物來提高 SOD 酵素或其它抗氧化酵素的活性，則可讓細胞避免受自由基的傷害以達到延緩老化的目的，過去研究中藥的方法，

偏重單味藥的成分及作用分析，這樣的方法有其價值，但很難解釋中藥方的實際作用，因一般中醫在用藥治病上，常是應用多味藥物組成的方劑，由於每一味藥的成分有數十或數百種，其成分作用已非常複雜。而由多味藥所組成的方劑更是複雜，若要一一探討其成分作用後，再綜合其整體作用，這種方法不僅不合實際，而且困難重重。因此我們將採用的方法是以整個方劑對單核球及纖維母胞之 SOD 活性作用的影響。由於 SOD 會造成人類整個個體對抗自由基的反應，因而我們就可了解該方劑對人體抗老化的影響。藉由這樣的模式，我們便可推廣至其他的組織、器官系統，因而建立中醫治病的西方醫學基礎，以達成中西醫一元化。未來我們將進一步探討其作用機轉及重要有效成份分析。

貳、材料與方法

方劑之處理：

(1)六味地黃湯：由熟地、山藥、山萸肉、茯苓、澤瀉、丹皮所組成。

六味地黃湯主治肝腎不足、真陰虧損、精血枯竭、憔悴羸弱…，原出處錢乙之小兒藥證直訣[32]。

(1)熟地：本品係玄參科(Scrophulariaceae)植物懷慶地黃 *ehmannia glutinosa* Liboschitz var. *hueichingensis* 的根。生藥名 *Rehmanniae Radix*。

(2)山藥：為薯蕷科(Dioscoreaceae)植物山藥 *Dioscorea batatas* Decaisne 的除去外皮的乾燥根莖。生藥名 *Dioscoreae Rhizoma*。

(3)山萸肉：本品係山茱萸科(Cornaceae)植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的乾燥果肉。生藥名 *Corni Fructus*。

(4)茯苓：本品係多孔菌科(Polyporaceae)植物茯苓菌 *Poria cocos* Wolff 的乾燥菌核。生藥名 *Hoelen*。

(5)澤瀉：本品係澤瀉科(Alismataceae)植物澤瀉 *Alisma plantago-aquatica* L. var. *orientale* Samuelsson 的乾燥根莖。生藥名 *Alismatis Rhizoma*。

(6)丹皮：本品係牡丹科(Paeoniaceae)植物牡丹 *Paeonia suffruticosa*

Andrews 的乾燥根皮。生藥名 Moutan Radicis Cortex。

2. 四君子湯：由人參、白朮、茯苓、甘草所組成。四君子湯主治一切陽虛氣弱脾衰肺損，飲食少思…[33]。

(1)人參：本品係五加科(Araliaceae)植物人參 *Panax ginseng*

C.A. Meyer 的乾燥根。生藥名 *Ginseng Radix*。

(2)甘草：本品係豆科(Leguminosae)植物烏拉爾甘草 *Glycyrrhiza glabra* Linn 的乾燥根，生藥名 *Glycyrrhizae Radix*。

(3)白朮：為菊科(Compositae)植物白朮 *Atractylodes ovata* A.P. De Candolle 的乾燥根莖。生藥名 *Atractylodis Rhizoma*。

(4)茯苓：本品係多孔菌科(Polyporaceae)植物茯苓菌 *Poria cocos* Wolff 的乾燥菌核。生藥名 *Hoelen*。

所有藥物之基源經中國醫藥學院附設醫院中藥局鑑定。

(1) 將以上方劑以水煎煮，至剩餘一半之液體，再將藥湯以 10000× g 離心 10 分鐘，收集上清液後，以 0.2 μ 之 minipore 濾紙無菌過濾，再以 Speed Vac 蒸乾，此淬取物視為 100% 之藥劑，實驗時依此再溶於培養液中，無菌濾過後使用。單核球之分離與培養：

由健康捐血者所得之內抗凝劑之血液，緩慢注入盛有 15 毫升之 Ficoll-Hypaque 的離心管中，在室溫中以 400× g 離心 30 分鐘，待血球分層後吸取含有單核細胞之白色中間層，單細胞以培養基洗三次後調成 2×

10⁶ cell/ml, 細胞隨後以每個 well 一毫升之量分置入 24well 細胞培養盤中, 於 37°C, 含 5% CO₂, 100% 濕度之培養箱中培養 3 小時, 洗去非附著性細胞, 再加入 0.5ml 之新鮮培養基, 其中含 50%、40%、30%、20%、10%、0%(對照組)等之方劑淬取液。細胞再放入培養箱中培養於 1 小時、3 小時、6 小時、18 小時及 24 小時後, 分別取出培養液, 測定 β -actin 及 SOD 傳訊核糖核酸的濃度。

(2) 人胚肺二倍體細胞的培養:

人胚肺二倍體細胞採用世界標準株(MRC-5)。細胞株深凍於液態氮內(-195°C)取出置於 40°C 水內快速溶化。其後十五分鐘內將細胞懸浮液移入 100mL 培養瓶內, 補加新配製的生長液至 5 mL Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco)另加 10%的 fetal bovine serum, 2mM 的 L-glutamin, penicillin 100 unit/mL 以及 streptomycin 100 ug/mL。培養瓶置於 37±0.1°C 培養。一般情況下可不換培養液, 約在三到五天內細胞可長滿單層。以胰消化酶去除間質, 分離細胞, 將細胞拍離瓶底, 接種於新瓶。分散好的細胞懸液補入新鮮培養液至原培養瓶的二倍量, 充份混勻。懸液分種於原瓶培養面積相同的兩個瓶內, 此即 1:2 分種。培養於 37±0.1°C 的保溫瓶中, 經四小時, 液體 pH 不應超過 7.4。

(3) 全部核糖核酸之分離及第一股互補去氧核糖核酸(1st strand cDNA)之合

成: 所收集之單核球細胞可以 Trizol 試劑萃取其全部核糖核酸(total

RNA)，其方法如下所示：

1. 所收集之單核細胞(1×10^6 cell)在室溫中以 $600 \times g$ 離心 10 分鐘，去除上清液後，加入 0.2 ml Trizol 試劑，利用反覆吸取以溶解細胞。室溫下五分鐘以使核蛋白分離。
2. 加入 0.04ml Chloroform，蓋緊管蓋，用手劇烈振盪 15 秒，室溫下 2-3 分鐘，於 $2-8^\circ\text{C}$ 以 $12,000 \times g$ 離心 15 分鐘，取上清水溶液，加入新鮮管中。
3. 加入 $12.5 \mu\text{l}$ isopropyl alcohol 於上述管中，室溫下 10 分鐘，於 $2-8^\circ\text{C}$ 以 $12,000 \times g$ 離心 15 分鐘，RNA 沉澱於管底。
4. 丟棄上清液後，以 75%酒精洗一次，於 $2-8^\circ\text{C}$ 以 $12,000 \times g$ 離心 15 分鐘後，以 RNase-free 之純水溶解之。
5. 所分離之 Total RNA 再利用廠商出品之第一股互補去氧核糖核酸試劑 (1st strand cDNA kit)，以 Random Hexamer 為引子(primer)合成第一股互補去氧核糖核酸，詳細步驟如下所示：於無菌 0.2ml 試管中，加入 $0.2 \mu\text{g}$ 所純化之 total RNA (以 DEPC 處理過的純水溶解 total RNA，並調節使最後體積為 $12.5 \mu\text{l}$)，以及 $1.0 \mu\text{ random hexamer primer}$ 。
6. 將 RNA 置於 70°C 兩分鐘之後，急速置於冰上冷卻。
7. 加入下列試劑：

5X reaction buffer

4.0 μl

dNTP(10mM each) 1.0 μ l

recombinant RNase inhibitor 0.5 μ l

MMLV reverse transcriptase 1.0 μ l

8. 均勻混合後，置於 42°C 反應一小時。
9. 置於 94°C 五分鐘以停止 cDNA 的合成，並破壞任何殘留 DNase 之活性。
10. 所合成之 cDNA 儲存於 -70°C 之冰箱中。

聚合酶鏈反應條件為：50°C 兩分鐘，95°C 十分鐘，四十個 95°C-10 秒鐘、60°C-10 秒鐘的循環，最後置於 25°C 十分鐘。所有聚合酶鏈反應均為 25 個重複。PCR 產物經 ethidium bromide 染色後，跑 3.5% agarose gel 後於 photodector 上測其亮度，以 β -actin 為標準可得到一個 SOD/ β -actin 的數值，此數值愈高，代表 SOD 的傳訊核醣核酸的濃度愈高，在不同濃度及不同時間點皆測此 SOD/ β -actin 的比值。

統計以 student's t test 為統計方式，當 $p < 0.05$ 時認定兩組之間有統計差異。

參、結果

單核球經六味地黃湯及四君子湯處理後，其 SOD 傳訊核糖核酸的濃度(以 SOD/ β -actin 的比值表現)很明顯的在六味地黃湯這組有提高的現象，而四君子湯則無明顯變化。依時間而言約在中藥加入 1 小時後 SOD 傳訊核糖核酸的濃度就開始提昇，而且維持到 24 小時，以三到六小時之間的反應最佳，與對照組之間有統計學上的意義($p < 0.05$)。若以藥物濃度來分析則是以 30%的六味地黃湯刺激單核球後 SOD 的傳訊核糖核酸的濃度提昇最多($p < 0.05$)。

SOD 的傳訊核糖核酸在加藥處理之前其對 β -actin 的傳訊核糖核酸比值約在 0.2 至 0.3 之間，加藥後，六味地黃湯在濃度 20-40%時可刺激單核球有最多的 SOD 傳訊核糖核酸表達，其與 β -actin 的比值高達至 0.55，在統計學上有明顯差異($p < 0.05$)(表三)。50%的六味地黃湯對於 SOD 傳訊核糖核酸表達無法全面提昇，僅在 6 小時及 24 小時這兩次測定達到統計差異。四君子湯則無法刺激單核球以增加 SOD 傳訊核糖核酸的量，無論任何濃度在任何時段都無法達到此目的(表四)。

肆、討論

在中醫典籍黃帝內經中，對老年病和虛證的關係早已有較深刻的理解。素問，上古天真論認為人年老後可致“五臟皆衰”，靈樞，天年篇則指出五十歲“肝氣始衰，肝葉始薄，膽汁始減，目始不明”。六十歲“心氣始衰，苦憂悲，血氣懈惰，故好臥”。七十歲“脾氣虛，皮膚枯”。八十歲“肺氣衰，魄離，故言善誤”。九十歲“腎氣衰，內臟經脈空衰”。百歲“五臟皆虛，神氣皆去”。內經還認為人“年四十，”陰氣自半矣”；年六十，陰痿，氣大衰。指出“老者之血氣衰----營氣衰少而衛氣內伐”。唐代醫家孫思邈在千金方中，進一步觀察到“年邁氣力稍微，非藥不救”，宜“四時勿闕補藥”[36]。宋代陳直養老奉親書更提出老人“精血衰竭，神氣浮弱，返同小兒”，以及強調“補虛中和”為治療老年病的主要方法[35]。元、明、清代以至近代和現代醫家，多將治療老年病的方藥列在著作中之“補益門”內，表明他們都支持老年病和虛證存在著密切聯繫的觀點。劉沈秋[36]對65歲以上老年病例進行分析，虛證占49%，實證占15%，虛實夾雜占36%，認為老年病以虛證和虛實夾雜證較為多見。高與劉也發現虛證中以腎虛(48.5%)、脾虛(23.7%)為常見[37]。

自從1956年Harman首先提出老化的自由基相關聯的學說以來[8]，有很多實驗證實自由基是導致老化的原因之一[9-13]。生物學的自由基反應

大都源自於不成對的電子併入氧分子而形成超氧陰離子的自由基 O_2^- ，SOD 作用於 O_2^- 產生 H_2O_2 ， H_2O_2 與另外的 O_2^- 分子作用而產生羥自由基 OH， O_2^- 與 OH 作用於生物分子而產生其它的自由基，如脂質、脂過氧基等進而形成脂質過氧化物，使膜的結構和功能遭受破壞。

依李獻平等人的研究，熟地黃可以明顯的增加小鼠 SOD、GSH-Px 及過氧化氫(catalase)的酵素活性，並且降低脂質过氧化物的含量[38]。

治療老年性疾病的重要方劑：金匱腎氣丸水提取液及其組成的單味藥均有抑制脂質过氧化物的能力，其中又以山茱萸、丹皮、澤瀉的作用較強[39]。本研究中六味地黃湯中由以上藥物所組成，本藥不僅可以明確延緩人胚肺二倍體培養細胞的老化現象，在 SOD 及 GSH-Px 活性也比對照組及四君子湯組來得高。從很多的研究都可以看出老化與 SOD 活性存在著密不可分的关系。從本研究中可以發現六味地黃湯能夠明顯提昇 SOD 傳訊核糖核酸的量，而 SOD 的酵素活性也明顯有增加的現象，這種現象似乎可以呼應 Harman 的自由基理論。

本研究中，六味地黃湯有抗老化的作用，與其能促進 SOD 抗氧化酵素活性的功效有直接的關聯，但老化的成因複雜，當六味地黃湯用於人體時除了抗氧化作用之外，不能排除其藉由改變其它系統而延緩老化的可能性。依照目前的研究發現在影響內分泌系統而達到抗老化作用的有興奮垂體-腎上腺皮質功能，或有類似腎上腺皮質激素樣作用的延緩衰老中藥如：

人蔘、黃耆、刺五加、首烏、杜仲等。具有性激素樣作用，或刺激促性腺分泌作用的中藥，則有淫羊藿、冬蟲夏草、人蔘、鹿茸等。值得一提的是以上的中藥大都以補腎為主[40]。四君子湯中雖含有人蔘的成份，但在延長細胞存活的表現上並不理想，由於體外細胞實驗無法涵蓋人體複雜的生化過程，所以四君子湯對人體的抗老化作用還須更進一步的評估才能定論。

伍、結論與建議

本研究提供一個檢驗的模式，可快速利用此模式就能否提昇 SOD 酵素活性這層面來篩檢抗老化中藥。值得思考的是老化是個複雜的程序及過程，而 SOD 酵素又是一個容易被誘導的酵素，所以思考抗老化藥物的療效，吾人建議仍要從多層面來切入，並以臨床療效為最終之依歸，但利用分子生物技術加以篩檢中藥療效，可縮短繁複的工作，仍是值得推廣的方法。

陸、參考文獻

1. 程士德編，內經，知音出版社，台北，pp.562-571,1994。
2. 韓明向，周宜軒，李平，“虛一淤一衰老”模式初探，安徽中醫學院學報 11:2-6,1992。
3. 孫永紅，中醫對衰老的認識及益壽方法，安徽中醫學院學報 11:6-7,1992。
4. 陳晏珍，江家貴，揚宏德，腎虛與超氧化物歧化酶的關係初探，中醫雜誌 4:42-3,1989。
5. Balin AK, Allen RG. Mechanisms of biologic ageing. *Dermatol Clin* 4:347-58,1986.
6. Goldstein S. The biology of ageing: looking to defense the genetic bomb. *Geriatrics* 48:76-82,1993.
7. Balin Ak, Allen RG. Molecular mechanisms of biologic ageing. In: Kligman AM, Takase Y, eds, *Cutaneous Ageing*, University of Tokyo Press. 48:76-82,1988.
8. Harman D. Ageing: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11:298-300,1956.
9. Darr D, Fridovich I. Free radicals in cutaneous biology. *J Invest Dermatol* 102:671-5,1994.
10. Harman D. Free radical theory of ageing. *Mutat Res* ;275:257-66,1992.
11. Del Maestro RF, Thaw HH, Bjork J. Free radicals as mediators of

- tissue injury. *Acta Physiol Scand* 492:43-57,1980 (supple).
12. Janssen TMW, Houten BV, Borm PJ. Cell and tissue response to oxidative damage. *Lab Invest* 69:261-74,1993.
 13. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of ageing. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7915-22,1993.
 14. Nicotera TM, Privalle C, Wang TC. Differential proliferative responses of syrian hamster embryo fibroblasts to paraquat-generated superoxide radicals depending on tumor suppressor gene function. *Cancer Res* 54:3384-8,1994.
 15. MaCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 224:6049-55,1969.
 16. Bartosz G, Leyko W, Fried R. Superoxide dismutase and life-span of *Drosophila melanogaster*. *Experientia* 35:1193-4,1979.
 17. Massie HR, Baird MB, McMahon MM. Loss of mitochondrial DNA with aging. *Gerontology* 21:231-237,1975.
 18. Ruddle PL, Yengoyan LS, Miquel J, Marcuson R, Fleming JE. Propyl gallate delays senescence in *Drosophila melanogaster*. *Age* 11:54-8,1988.
 19. Phillips JP, Campbell SD, Michard D, Charbonneau M, Hilliker AJ. Null mutation of Copper/Zinc superoxide dismutase in *Drosophila* confers hypersensitivity to paraquat and reduced longevity. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2761-5,1989.
 20. Arking R, Buck S, Berrios A, Dwyer S, Barker GT III. Elevated paraquat resistance can be used as a bioassay for longevity in a

- genetically based long-lived strain of *Drosophila*. *Dev Genet* 12:362-70,1991.
21. Reznick AZ, Rosenfelder L, Shpund S, Gershon D Identification of intracellular degradation intermediates *Proc Natl Acad Sci USA* 82:6114-8,1985.
 22. ReissU,Gershon D. Rat liver superoxide dismutase purification and age-related modifications. *Eur J Bioch* 63:617-23,1976.
 23. Pryor W A. General preface, *Free radicals in biology*, Vol.5. New York:Academic Press pp.9-10,1982.
 24. 丁克祥主編，衰老期 SOD 的量變和質變機理及其傳統中醫藥學的調節方法，SOD 臨床研究集，第一版，原子能出版社，北京，pp.18-31,1992。
 25. 韓明向，李平，倪恩茶，健康人紅細胞 SOD 活性與增齡相關性的研究 *老年學雜誌* 12:179,1992。
 26. 陶國樞，董偉，李茨芬，四項衰老指標的探討，*中華老年醫學雜誌* 7:167-170,1988。
 27. Michelson AM. *Clinical aspects of the dosage of erythrocyte superoxide and superoxide dismutase*, London, Academic Press, pp.467-499,1977.
 28. 王贊舜,馬永興,丁佩珍,紅細胞內超氧化物歧化酶含量與衰老關係的初步探討,*中華老年醫學雜誌* 49-51,1985。
 29. Ceballos P I. Age-correlated modifications of copper-zinc superoxide

- dismutase and glutathione related enzyme activities in human erythrocytes. Clin Chem 38:66-70,1992.
30. Gevmour L. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. Clin Chem 37:1932-1937,1991.
 31. 王明臣，苗健，陳本懋，血清超氧化物歧化酶同功酶活力與衰老關係初探，中華老年醫學雜誌 11:287-288,1992。
 32. (清)汪昂，醫方集解，昭人出版社，台中，pp.1-2, 1980。
 33. (清)汪昂，醫方集解，昭人出版社，台中，pp.26-7, 1980。
 34. 陳可冀、李春生：略論孫思邈對老年醫學的貢獻。中華醫史雜誌 1983; 1:38。
 35. 陳可冀、李春生：我國早期老年病學專著。養老奉親書。中醫雜誌 1982; 10: 75-7。
 36. 劉沈秋：200 例老年病例的臨床分析。中醫雜誌 1981; 22: 41-3。
 37. 高輝遠、劉沈秋：老年病防治與研究。中西醫結合雜誌 1983; 3: 245-7。
 38. 李獻平、劉敏、劉世昌、倪世孚、曹凱、李素婷：四大懷藥延緩衰老作用的研究。中西醫結合雜誌 1991; 11: 486-7。
 39. 陳文為、路雪雅、劉春梅：清宮壽桃粉劑對大鼠肝勻漿(體外)生成脂質過氧化物的影響。中西醫結合雜誌 1994; 4: 686-8。
 40. 沈自尹：腎陽虛，老年人的內分泌研究。北京中醫學院學報 1984;

4:35-6 °

柒、圖、表

表一 聚合酶鏈反應試劑組成

	β -actin	SOD
10X 緩衝液 ¹	5 μ l	5 μ l
MgCl ₂ (mM)	3.5	3.5
dATP (μ M)	300	300
dCTP (μ M)	300	300
dGTP (μ M)	300	300
dUTP (μ M)	600	600
正向引子 (nM)	200	200
負向引子 (nM)	100	100
模版	10 μ l	10 μ l
水加至	50 μ l	同左

¹10X 緩衝液含有 500mMKCl, 100mM Tris-HCl, 100mMEDTA, 室溫下酸鹼值 8.3。

表二 PCR primers and TaqMan probes

Oligo	Sequence (5'3')	orientation	Description
β -actin 1	TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA	(+)	β -actin primer
β -actin 2	CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG	(-)	β -actin primer
SOD1	AGCGAGTTATGGCGACGAA	(+)	SOD primer
SOD2	TGCTTCCCCACACCTTCAC	(-)	SOD primer

¹ 見基因銀行(GenBank) R88.0 (1995 年四月)

表三 六味地黃湯在各種不同濃度以不同時間中所表現的 SOD/ β -actin 的比值

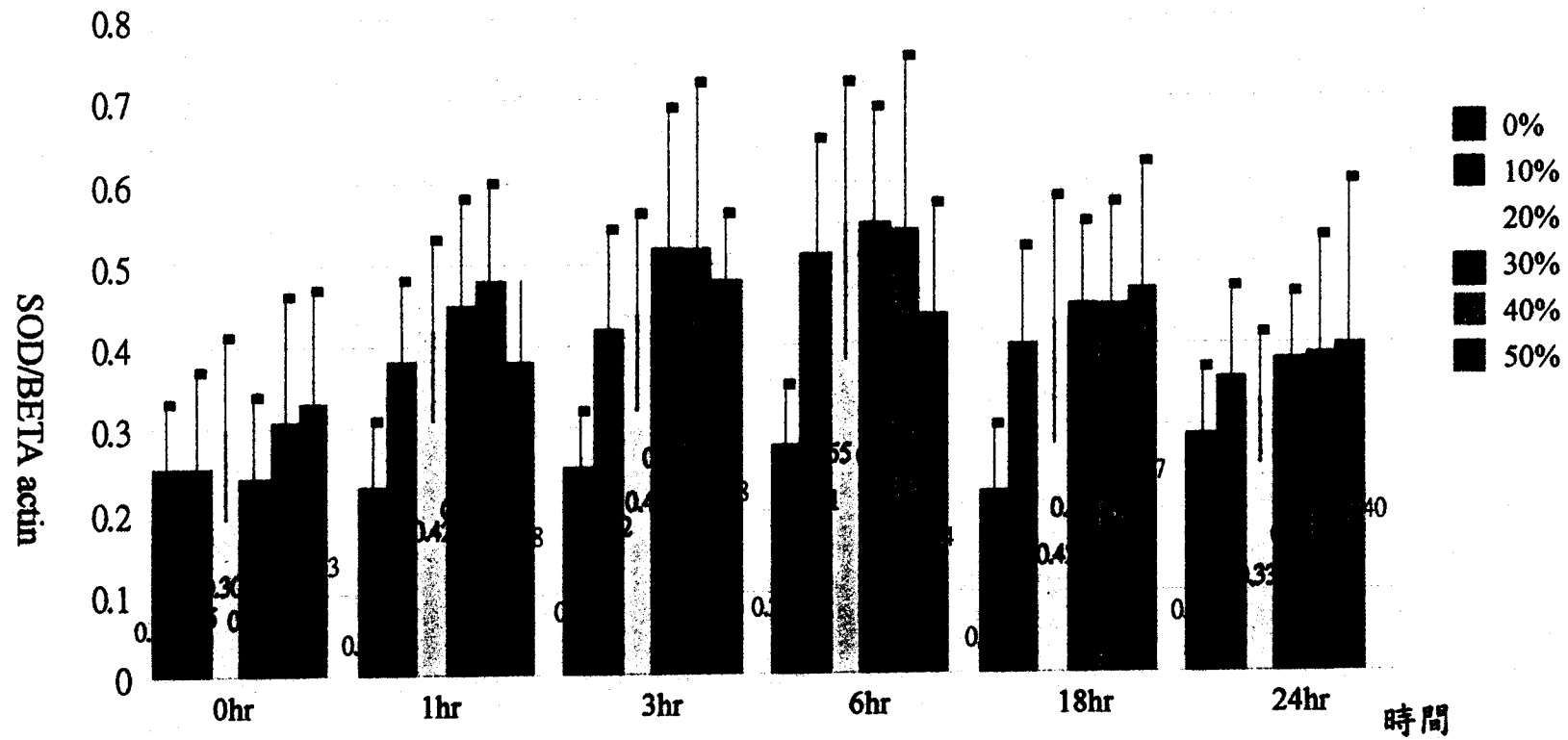
	0hr	1hr	3hr	6hr	18hr	24hr
0%	0.24±0.09	0.25±0.12	0.30±0.11	0.24±0.10	0.31±0.15	0.33±0.14
10%	0.23±0.08	0.38±0.10*	0.42±0.11*	0.45±0.13*	0.48±0.12*	0.38±0.10
20%	0.25±0.07	0.42±0.12*	0.44±0.12*	0.52±0.17*	0.52±0.20*	0.48±0.08*
30%	0.28±0.07	0.51±0.14*	0.55±0.17*	0.55±0.14*	0.54±0.21*	0.44±0.13*
40%	0.22±0.08	0.40±0.12*	0.43±0.15*	0.45±0.10*	0.45±0.12*	0.47±0.15*
50%	0.29±0.08	0.36±0.11	0.33±0.08	0.38±0.08*	0.39±0.14	0.40±0.20*

*p<0.05; student's t test

表四 四君子湯在各種不同濃度以不同時間中所表現的 SOD/ β -actin 的比值

	0hr	1hr	3hr	6hr	18hr	24hr
0%	0.27±0.09	0.25±0.08	0.30±0.09	0.28±0.15	0.42±0.23	0.37±0.12
10%	0.22±0.07	0.30±0.09	0.24±0.12	0.41±0.22	0.19±0.10	0.33±0.13
20%	0.25±0.11	0.22±0.010	0.25±0.11	0.24±0.15	0.21±0.08	0.18±0.09
30%	0.28±0.11	0.27±0.12	0.31±0.13	0.28±0.07	0.27±0.09	0.25±0.12
40%	0.24±0.10	0.28±0.13	0.35±0.13	0.36±0.13	0.26±0.10	0.26±0.07
50%	0.21±0.12	0.31±0.11	0.16±0.07	0.31±0.16	0.29±0.05	0.26±0.18

圖一、經不同濃度的六味地黃湯刺激後在不同時段所測得 SOD 與 β -actin 的比值



圖二、經不同濃度的四君子湯刺激後在不同時段所測得 SOD 與 β -actin 的比值

