

計畫編號：CCMP89-RD-029

行政院衛生署八十九年度科技研究發展計畫

連續十週經口投與歸脾湯對中年大鼠的影響

## 委託研究報告

計畫委託機關：中國醫藥學院

計畫主持人：林文川

研究人員：吳岳文、余姿瑩

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-029

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

連續十週經口投與歸脾湯對終年大鼠的影響

## 委託研究報告

計畫委託機關：中國醫藥學院

計畫主持人：林文川

研究人員：吳岳文、余姿瑩

執行期間：88年07月01日至89年06月30日

編號:CCMP89-RD-029

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

## 連續十週經口投與歸脾湯對中年大鼠的影響

執行機構：中國醫藥學院

計畫主持人：林文川

研究人員：吳岳文、余姿瑩

執行期限：民國88年7月1日至民國89年6月30 日

\*\*本研究報告僅供參考，不代表本會意見\*\*

## 目 錄

### 一、目次

中文摘要	3
英文摘要	3
前言	5
材料與方法	5
結果	11
討論	14
結論與建議	18
參考文獻	18

### 二、表次

表一、雄性老年大鼠連續投予歸脾湯十週的體重變化	23
表二、雄性老年大鼠連續投予歸脾湯十週的血液學檢查	24
表三、雄性老年大鼠連續投予歸脾湯十週對免疫細胞數目的影響	25
表四、雄性老年大鼠連續投予歸脾湯十週的血清生化學檢查	26
表五、雄性老年大鼠連續投予歸脾湯十週的尿液分析	27
表六、雄性老年大鼠連續投予歸脾湯十週臟器的絕對與相對重量	28
表七、歸脾湯對各臟器脂質過氧化之影響	29
表八、歸脾湯對各臟器穀胱甘肽含量之影響	30
表九、歸脾湯對各紅血球、肝臟、腦部抗氧化酵素活性的影響	31

### 三、圖次

圖一、歸脾湯對腦幹及心臟脂褐素含量的影響	32
圖二、歸脾湯對腎臟、皮膚及尾腱氫脯氨酸含量的影響	33
圖三、歸脾湯對大腦皮質、海馬迴及紋狀體加鐵和不加鐵誘發脂質過氧化的影響	34

四、自我評估	35
--------	----

編號：CCMP89-RD-029

# 連續十週經口投與歸脾湯對 中年大鼠的影響

林文川

中國醫藥學院藥理學科

## 摘要

本實驗探討歸脾湯對中年大鼠與衰老有關的指標，如脂褐素、氫脯氨酸、脂質過氧化、穀胱甘肽、超氧歧化酵素的影響。15月齡中年大鼠每天經口投予歸脾湯，連續十週，使用劑量為1、2、3 g / kg。結果顯示，歸脾湯明顯減少中年大鼠心臟、腦幹的脂褐素，及腎臟的氫脯氨酸。歸脾湯抑制中年大鼠海馬迴加鐵及不加鐵誘發的脂質過氧化，但對大腦皮質及紋狀體沒有影響。歸脾湯抑制中年大鼠紋狀體超氧歧化酵素的活性，但對大腦皮質及海馬迴的活性沒有影響。歸脾湯有意義增加中年大鼠肝臟及胃黏膜穀胱甘肽含量。這些結果顯示歸脾湯有減緩衰老的效應。

關鍵詞：歸脾湯、脂褐素、氫脯氨酸、脂質過氧化、超氧歧化酵素、  
穀胱甘肽

**CCMP89-RD-029**

**Effect of 10-Weeks Repeated Oral Administration of the  
Gui-Pi-Tang on Middle-Aged rats**

**Wen-Chuan Lin**

**Department of Pharmacology, China Medical College**

**ABSTRACT**

We examined the effects of Gui-Pi-Tang (GPT) on the age-related parameters, such as lipofuscin, hydroxyproline, lipid peroxidation, glutathione and superoxide dismutase (SOD) in middle aged rats. The middle aged rats (15 months) were administered with the GPT orally at dosage of 1, 2, 3 g/kg daily for 10 weeks. The results showed that GPT significantly reduced the both lipofuscin of heart, brain stem, and hydroxyproline of kidney in middle aged rats. GPT suppressed the increase in both Fe-dependent and Fe-independent induced lipid proxidation in the hippocampus, although such changes were not observed in the striatum and cerebral cortex. GPT inhibited the SOD activity in the striatum, but not in cerebral cortex and hippocampus, in middle aged rats. The concentrations of glutathione were significantly increased in the liver and gastric mucosa of middle aged rats treated with GPT. Results of this study indicated that the GPT was effective in slowing down aging.

Keywords: Gui-Pi-Tang, lipofuscin. Hydroxyproline, lipid peroxidation,  
glutathione, superoxide dismutase

## 壹、前言

歸脾湯出自宋代嚴用和的濟生方，原書早佚，今採『醫方類聚』所錄之濟生方，方由白朮、茯苓、黃耆、酸棗仁、龍眼肉、人參、木香、甘草、生薑及大棗等十味藥組成，主「思慮過制，勞傷心脾，健忘怔忡」。現今歸脾湯之製劑，其組成均沿自明朝薛立齋校註之『校註婦人良方』，除上述十味藥外，另加入當歸及遠志二味藥，主治更為廣泛：「脾經失血少寐，發熱盜汗，健忘怔忡，驚悸不寐，嗜臥少食，血虛發熱，肢體作痛」等，而將之歸為經產門或養血、理血門。

近年的研究指出，歸脾湯對年輕鼯鼠有改善學習記憶障礙之作用[1,2]，及抗氧化作用[3]。另也有文獻指出歸脾湯有增強吞噬細胞功能[4]。臺灣已進入高齡社會，抗衰老研究應是相當重要的課題，本研究基於前述的基礎，使用中年大鼠經口投與歸脾湯十週，進行與衰老相關的研究。除測定一些衰老指標如組織中所含脂褐素 (Lipofuscin) [5]、膠原蛋白[6]含量外，也探討是否有提高免疫力、及增強清除自由基的作用。同時取得的血液及各臟器也進行亞急性毒性相關的實驗。

## 貳、材料與方法

### 一、實驗藥材製備

本實驗所用歸脾湯組成係依照『校註婦人良方』所載。其方味及比率如下表。所有藥材購自中藥材行，除經本校中藥所生藥學鑑定外，並保留標本。將上述藥材按組成比率混合，煎煮4小時，共2次，合併濾液，於60°C下減壓濃縮至適當濃度，分裝儲存於-20°C。抽出率約為35%。臨用時解凍以水稀釋至所需濃度，大鼠每100公克投予1毫升。本製備物以HPLC

定兩種指標成分，即當歸的Ferulic acid，每公克乾燥抽出物含0.226 mg，和甘草的Glycyrrhizin，每公克乾燥抽出物含1.545 mg。

方藥名	基原	比率
白朮	<i>Artactylodes macrocephala</i> KOIDZ (Compositae)	4
茯神	<i>Pachyma holen</i> ROMPHIUS (Polyporaceae)	4
黃耆	<i>Astragalus membranaceus</i> (FISCH.) BGE. (Leguminosae)	4
酸棗仁	<i>Zizyphus jujiba</i> MILL var. <i>Spinosus</i> Hu (Rhamnaceae)	4
龍眼肉	<i>Euphoria longan</i> (LOUR.) STEUD. (Sapindaceae)	4
人參	<i>Panax ginseng</i> C.A. MEYER (Araliaceae)	4
木香	<i>Saussurea lappa</i> CLARKE (Compositae)	2
生薑	<i>Zingiber officinale</i> ROSC (Zingiberaceae)	2
大棗	<i>Zizyphus jujuba</i> MILL. (Rhamnaceae)	1
炙甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCHER et Dc. (Leguminosae)	1
當歸	<i>Angelica sinensis</i> (OLIV.) DIELS (Umbelliferae)	4
遠志	<i>Polygala tenuifolia</i> WILLDENOW (Polygalaceae)	4

## 二、急性毒性實驗

使用SD雄性大鼠，體重約250公克。大鼠經一晚絕食，但不絕水，經口投與歸脾湯，觀察中毒症狀，記錄兩週內體重變化，並依Litchfield and Wilcoxon [7]方法算出LD50。

## 三、亞急性毒性及抗衰老實驗步驟

實驗使用Sprague-Dawely雄性大鼠，購自國科會動物中心。飼養室溫度控制在 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，明、暗各十二小時，每一籠 ( $40.5 \times 38.5 \times 18\text{h cm}$ ) 飼

養三隻。使用福壽牌老鼠塊狀飼料，逆滲透自動供水系統給水。

待大鼠十五月齡，分成四組，每組10隻。控制組每天經口投予去離子水，實驗組每天經口投予歸脾湯(Gui-Pi-Tang; GPT) 1、2、3 g/kg。另使用6週齡SD雄性大鼠當對照，每天經口投予去離子水。

大鼠投藥之後，每天觀察大鼠健康情形一次，記錄有無死亡情形。每週測體重一次。大鼠於犧牲前一週，在乙醚麻醉下，由尾動脈採血約1 ml 供血液學分析及免疫細胞數目測定。給藥物十週後將大鼠犧牲，在乙醚麻醉下，由腹腔動脈採血供血清生化學、及抗氧化力測定。迅速摘出下列臟器稱重，腦部、心臟、肺臟、肝臟、脾臟、腎臟、腎上腺、睪丸、精囊、前列腺，並取出主動脈、胃、背部皮膚、尾腱等。左列臟器儲存於-80°C，供衰老指標測定。腦部依照Glowinski 及Iversen [8]的方法分出大腦皮質、海馬迴、紋狀體、腦幹等部位儲存備用。

#### 四、血液學檢查

使用全自動血液分析儀 (Sysmex F-800, Japan)，檢測項目含紅血球計數、血紅素、血球容積、平均紅血球容積 (MCV)，平均紅血球血紅素濃度 (MCHC)，平均紅血球血紅素量 (MCH)、血小板計數、白血球計數及分類、凝血酶時間 (PT)、活化部分凝血活酶時間 (APTT)。

#### 五、免疫細胞數目測定

使用細胞流數器(Flow Cytometer) 計數血液中B 細胞、T 細胞及自然殺手細胞的數目。上機前處理參照方法參照Carter氏的方法[9]，於冰浴中操作，每隻大鼠血液分裝於5隻流數器用試管，每管含0.5  $\mu$ l 血液，第一管不加任何抗體，第二管加 Anti-rat CD3 + Anti-rat CD4，第三管加 Anti-rat CD3 + Anti-rat CD8a，第四管加 Anti-rat NKR-P1A，第五管加 Anti-rat

CD45R，上述抗體皆購自Pharmingen公司。抗體加入後於冰浴中靜置30分鐘，而後加入3 ml 洗滌緩衝液 (PBS - 0.05 % NaN<sub>3</sub>)，離心 (400 g, 30 min, 40C)，倒棄上層液，加入紅血球溶解緩衝液 (0.8 % NH<sub>4</sub>Cl + 0.1% KHCO<sub>3</sub> + 0.0037 % Tetrasodium EDTA) 2 ml，7分鐘後離心(400 g, 30 min, 40C)，倒棄上層液，加入PBS/ 0.5 % formalin緩衝溶。

## 六、血清生化學檢查

使用生化自動分析儀 (Ciba-corning 550, USA) 測定，檢測項目包含麩氨酸草乙酸轉氨酵素 (GOT)、麩氨酸丙氨基轉氨酵素 (GPT)、乳酸去氫酵素 (LDH)、 $\gamma$ -麩氨醯轉移酵素 ( $\gamma$ -GT)、鹼性磷酸酵素(ALP)、總膽固醇 (T-CHO)、三酸甘油脂、總蛋白、白蛋白、球蛋白、總膽紅素 (T-BIL)、葡萄糖、血中尿素氮 (BUN)、肌酸甘、尿酸、鈉、鉀、氯、鈣、磷。

## 七、尿液分析

使用尿液檢驗試紙(Ames reagent strips for urinalysis; N-multistix SG-L; Japan)，測定酸鹼度、比重、蛋白質、尿膽素原、潛血、酮體、膽紅素、尿糖。另使用鈉 / 鉀 / 氯離子測定儀 (Shimadzu clinical ion meter CIN-104A; Japan) 測定尿中鈉、鉀、氯離子含量。

## 八、脂褐素 (Lipofuscin) 測定

脂褐素測定參照Sohal氏等人提出的方法[10]。取腦幹、心臟各 200 mg，用chloroform-methanol (2 : 1)液4 ml製備均質液。而後加入等量去離子水據烈振盪3分鐘，3000 rpm離心10分鐘。吸取chloroform層至另一試管中，加chloroform至5 ml。使用螢光光度計激發波長360 nm，發射波長450 nm測定樣品螢光強度。以每ml 0.05 mol / L 硫酸含0.1 (g Quinine sulfate 溶液

的螢光強度為10 單位，計算每克濕組織螢光計數單位，以U/g表示。

#### 九、氫脯氨酸(Hydroxyproline)之測定

Hydroxyproline的測定參照 Neuman 及 Logan 二式的方法[11]。濕組織烘乾後，取乾組織加入6M HCl，於100°C經16 小時消化水解。水解液加H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化後，加入p-dimethylaminobenzoaldehyde，於70°C水浴中放置16分鐘呈色，於540 nm測吸光值。Hydroxyproline的含量以 mg/g tissue 表示之。

#### 十、脂質過氧化 (lipids peroxidation) 之測定

各臟器組織的脂質過氧化測定依據Ohkawa 等人的方法[12]，使用 Thiobarbituric acid 與 malondialdehyde (MDA)呈色，於532 nm 測吸光度。脂質過氧化程度以nmol MDA /g wet weight表示之。同時依照Lowry (13)的方法，測定組織蛋白質含量。

#### 十一、腦部誘發脂質過氧化之測定

##### 1. 加鐵反應

FeCl<sub>2</sub>-ascorbic acid 誘發腦均漿LPO的測定依據Garrido et al. [14]的方法。以tris-HCl (pH 7.4)製備2-10 % (w/v) 腦均漿。取腦均漿0.3 ml加入0.0625 mM的 ascorbic acid 0.05 ml、2.5 mM FeCl<sub>2</sub> 0.05 ml及0.05 ml H<sub>2</sub>O，於37°C水浴中放置30分鐘反應。反應終了依據Ohkawa et al. [12]的方法使用2-thiobarbituric acid測定脂質過氧化的量。

##### 2. 不加鐵反應

不加鐵誘發的脂質過氧化測定方法和加鐵的方法類似，唯反應系統以相

同二次水體積取代FeCl<sub>2</sub>-ascorbic acid。

## 十二、穀胱甘肽(glutathione; GSH) 之測定

組織GSH的測定依據Sedlak 及 Lindsay 二氏的方法[15]，使用 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) 呈色，於 412 nm測吸光度。以 ( $\mu\text{mole / g wet weight}$ )表示之。

## 十三、過氧化物歧化酵素 (superoxide dismutase) 活性測定

肝組織之前處理依據Xia等人的方法[16]，活性的測定依據Marklund 氏二人的方法[17]，活性定義為抑制 Pyrogallol 自動氧化還原反應速率 50 % 所需酵素的量為一個單位 (U)，以 U / mg protein表示之。

## 十四、穀胱甘肽過氧化物酵素 (glutathione peroxidase; GSH-Px)活性測定

肝組織之前處理依具Xia等人的方法[16]，如上所敘述。穀胱甘肽過氧化物酵素活性測定依具Hafeman 等人的方法[18]。測量時分為酵素反應與非酵素反應兩部份。肝組織的 GSH-Px 活性以 U / mg protein表示之。

## 十五、過氧化氫酵素 (Catalase)活性測定

過氧化氫酵素活性測定依具Aebi氏的方法[19]。其活性定義為K (一級反應之速率常數;  $\text{min}^{-1}$ )為一個單位(U)，以 U / mg protein表示之。

## 十六、統計方法

本實驗所得之數據，均以單尾變異數分析(one-way analysis of variance)，並進行Dunnet測試，以P值小於0.05認為有顯著差異。

## 參、結果

### 一、安全性評估

#### (一)、急性毒性

歸脾湯經口投予單一劑量，最高10 g/kg，未有死亡情形，也未見特殊毒性發生。

#### (二)、亞急性毒性

在投藥期間，控制組、歸脾湯 1 g/kg、2 g/kg、3 g/kg 組，因誤投而引起死亡的隻數分別為1、2、2 和3隻。沒有不明原因死亡的情形。

##### 1、體重

如表一所示，歸脾湯經口連續投予十週，中年大鼠體重與控制組比較無明顯差異。年輕大鼠體重顯著增加。

##### 2、血液學檢查

如表二所示，中年大鼠僅血小板數目較年輕大鼠高，餘則無差異。歸脾湯 3 g/kg組的紅血球、血紅素、血球容積較控制組高。

##### 3、免疫細胞數目

如表三所示，中年大鼠的白血球數目、淋巴球的比率及淋巴球數目與年輕大鼠比較沒有差異。中年大鼠的CD3、CD4、B細胞佔淋巴細胞的百分比較年輕大鼠為低，但NK細胞的百分比較年輕大鼠高。歸脾湯的處理免疫細胞的百分比與控制組比較沒有差異。

##### 4、血清生化學檢查

如表四所示，中年大鼠除了鹼性磷酸酵素、血糖、鈉、氯、鎂外，其餘的項目皆較年輕大鼠高。歸脾湯的處理麩氨酸草乙酸轉氨酵素 (GOT)、乳酸去氫酵素 (LDH)、鈉具用量依存性的增加。歸脾湯 3 g/kg組的氯較控制組高。

## 5、尿液分析

如表五所示，中年大鼠出現尿蛋白、血尿的隻數較年輕大鼠明顯增加，其餘則無差異。歸脾湯處理血尿隻數有減少的情形，但出現尿膽素原 (Urobilinogen)的隻數有增加的情形。

## 6、臟器重量

如表六所示，中年大鼠的腦下垂體絕對重量較年輕大鼠重，但相對重量沒有差別。老年大鼠左、右睪丸明顯較年輕大鼠萎縮，其餘臟器重量則無差異。歸脾湯處理降低腦下垂體絕對重量，增加左睪丸的絕對及相對重量，對其他臟器則無影響。

## 二、抗衰老之評估

### (一)、脂褐素

如圖一所示、中年大鼠腦幹及心臟的脂褐素含量明顯較年輕大鼠為高。歸脾湯的處理可以減少此二部位脂褐素的量。

### (二)、氫脯氨酸

如圖二所示、中年大鼠腎臟的氫脯氨酸含量明顯較年輕大鼠為高，歸脾湯的處理可以減少腎臟氫脯氨酸的含量。中年大鼠尾腱的氫脯氨酸含量較年輕大鼠為低，歸脾湯的處理可以提升尾腱氫脯氨酸的含量。中年大鼠

皮膚的氫脯氨酸含量與年輕大鼠比較沒有差異，歸脾湯的處理對皮膚氫脯氨酸的含量沒有影響。

### (三)、脂質過氧化

如表七所示，中年大鼠心臟、肝臟、脾臟、肺臟、腎臟、腎上腺、睪丸、主動脈、胃黏膜、紅血球及血漿的脂質過氧化含量與年輕大鼠比較沒有差異。歸脾湯的處理可以降低主動脈及胃黏膜的脂質過氧化。

### (四)、腦部誘發脂質過氧化

如圖三所示，大腦皮質、海馬迴及紋狀體不加鐵及加鐵誘發脂質過氧化反應，中年大鼠與年輕大鼠間沒有差異。歸脾湯具用量依存性的減少海馬迴不加鐵及加鐵誘發的脂質過氧化，但對大腦皮質及紋狀體沒有影響。

### (五)、穀胱甘肽

如表八所示，中年大鼠脾臟、肺臟、胃黏膜及血漿穀胱甘肽含量較年輕大鼠為低，在心臟、肝臟、腎臟、睪丸、紅血球的含量與年輕大鼠沒有差異。歸脾湯的處理可以提升肝臟和胃黏膜穀胱甘肽含量。

### (六) 抗氧化酵素

如表九所示，中年大鼠與年輕大鼠在紅血球、肝臟及大腦皮質的超氧歧化酵素、過氧化氫酵素及穀胱甘肽過氧化酵素的活性沒有差異。歸脾湯 3 g/kg 僅提升大腦皮質超氧歧化酵素的活性。中年大鼠與年輕大鼠在海馬迴及紋狀體的超氧歧化酵素活性沒有差異，歸脾湯的處理對此二部位超氧歧化酵素的活性沒有影響。

## 肆、討論

本研究使用15月齡雄性大鼠，以自由基的學說為主，探討歸脾湯的抗衰老作用。歸脾湯屬補益類的方劑，一般認為無毒可以久服，雖然如此，卻沒有實驗證據來支持。老年用藥由於長期服用，因此藥物的安全性相當重要，因此在本實驗採得的血液也進行血液學及血清生化學的檢驗，進行安全性評估。

### 一、歸脾湯安全性評估

歸脾湯單一劑量經口投予10 g/kg，大鼠未有死亡情形，其LD50大於10 g/kg，顯示其急性毒性很低。中年大鼠十週間連續投予歸脾湯1、2、3 g/kg，雖有誤投而造成死亡，但沒有因為歸脾湯而死亡。

血液學檢查發現歸脾湯高劑量可使紅血球數目、血紅素、血球容積上升，顯示歸脾湯有促進造血的功能。歸脾湯對於白血球的數目、淋巴球的數目及免疫細胞的數目沒有影響，在本實驗看不到歸脾湯對免疫功能的改善，或許應用其他研究方法。

在血清生化學方面，歸脾湯用量依存性的增加氨基酸草乙酸轉氨酶、乳酸去氫酶。氨基酸草乙酸轉氨酶存在於心臟、肝臟、肌肉、腎臟、胰臟、脾臟、肺、紅血球[20]。乳酸去氫酶存在於心臟、腎臟、肝臟、肌肉、腦、紅血球、肺臟、脾臟 [20]。由於此二種酶非專一性的表示某種臟器受損傷，因此無法肯定何種臟器受損。由於血球數目、血紅素、血球容積增加，不排除氨基酸草乙酸轉氨酶、乳酸去氫酶的增加是因紅血球受損而引起，由於紅血球受損引發回饋作用而使造血機能亢進。

尿膽素原(Urobilinogen)是膽紅素(Bilirubin)在腸道被還原的物質，在溶血性黃膽由於膽紅素增加，因此尿膽素原也會隨著增加[21]。尿液分析

發現，高劑量歸脾湯出現尿膽素原的隻數增加，在血清生化學也發現膽紅素有上升的情形，配合氨酸草乙酸轉氨酶、乳酸去氫酶的增加，及血球數目、血紅素、血球容積增加，可以合理推論長期服用高劑量的歸脾湯會引起紅血球破壞。歸脾湯被歸為養血、理血門，應與此有關。

血尿可能是腎疾病及尿道疾病而引起。歸脾湯的處理雖可使中年大鼠血尿的隻數減少，但不具用量依存性關係。且在腎功能指標如血中尿素氮、肌酸甘並無改善作用。因此歸脾湯的處理雖可使中年大鼠血尿的隻數減少，有無實質上的意義，有待進一步探討。

歸脾湯的處理可提升血鈉及血氯的濃度，但尿中排出的鈉、氯並沒有增加，顯示血鈉、氯的增加並不是來自歸脾湯本身，因此值得留意。

在臟器重量方面，老年大鼠睪丸明顯萎縮，歸脾湯有改善作用，顯示出其有某種抗老化的作用。

由以上的資料顯示歸脾湯長期用藥，絕對安全的用量在2 g/kg/day 以下。

## 二、歸脾湯抗衰老作用之評估

老年動物細胞內常有一種帶棕色、有自發螢光的不溶性顆粒物質堆積，被稱為脂褐素[22]。脂褐素的生成與自由基有關，自由基的產物之一脂類過氧化物，分解時會產生Malondialdehyde，其可與蛋白質、磷脂或核酸交聯，形成的化合物即為脂褐素具有螢光[22]。脂褐素被認為是衰老可靠明顯的指標，尤其是在固定分裂後的心肌細胞及神經細胞[22]。歸脾湯明顯降低心肌細胞及神經細胞的脂褐素含量，顯示其有一定的抗衰老作用。

膠原蛋白是構成結締組織細胞間質膠原纖維的主要成分。隨著年齡的增加，結締組織間中的膠原蛋白交聯度增加、硬度增強、難以溶解，妨礙

細胞功能活動，導致衰老[23]。因此，組織中膠原的沉積可做為衰老的指標。尤其是腎臟的膠原蛋白含量穩定的隨著增齡而增加[24]。尾腱、皮膚的膠原蛋白含量，在生命早期含量豐富，以後隨年齡增加而逐漸減少，到老年期明顯低於青年期 [25]。氫脯氨酸是膠原蛋白中一種主要而又相對恒定的氨基酸，占12-14 %，在體內其他蛋白質中含量甚微，一般常用氫脯氨酸的含量來代表膠原蛋白量[11]。歸脾湯降低腎臟氫脯氨酸的量，提升尾腱氫脯氨酸的含量，進一步支持了其抗衰老作用。

自由基傷害的研究，脂質過氧化是最常用的指標之一。生物膜含有多價不飽和脂肪酸易受自由基攻擊引起連鎖反應，最終產物有多種，其中的malondialdehyde 與 thiobarbituric acid 經加熱結合產生粉紅色物質，可以分光光度計測量，是脂質過氧化測定最常用的方法[26]。

本研究測定心、肝、脾、肺、腎、腎上腺、睪丸、主動脈、胃黏膜、紅血球、血漿的脂質過氧化程度，發現中年大鼠的脂質過氧化值並沒有比年輕大鼠高。雖然有文獻指出，在加速老化的鼯鼠 (senescence accelerated mice)腦部及肝臟的脂質過氧化也較正常鼯鼠為高[27]。其他臟器如肝臟 [28]、腎上腺 [29]及血中[30,31]也有因老化而脂質過氧化程度上升的情形。然而事實上也有學者提出警告不能以臟器的脂質過氧化當老化的指標 [28, 32, 33]。

腦組織的抗氧化系統弱[34]，會產生自動氧化反應，使脂質過氧化增加[35]。腦部含氧自由基引起的病變，二價鐵扮演重要的角色，加鐵可以明顯誘發脂質過氧化上升[36]。抑制脂質過氧化的增加可以顯示組織的抗氧化能力 [37]。因此在本實驗腦部的脂質過氧化實驗改用加鐵誘發與不加鐵誘發兩種實驗條件，來檢討歸脾湯是否有提升腦組織的抗氧化力。

在腦部大腦皮質、海馬迴及紋狀體是與腦部神經退化性疾病相關的部位，也容易受到自由基攻擊[38]。本研究發現，加鐵誘發與不加鐵誘發兩

種實驗條件，在大腦皮質、海馬迴及紋狀體的脂質過氧化值，中年大鼠與年輕大鼠皆無差異。但歸脾湯的處理，用量依存性的抑制海馬迴加鐵誘發與不加鐵誘發的脂質過氧化值。海馬迴在學習記憶之形成佔重要地位[1]，一些文獻指出歸脾湯可以改善動物的學習記憶[1,2]，此或許與歸脾湯可以保護海馬迴減少受到自由基的損傷有關。

本研究測定心、肝、脾、肺、腎、睪丸、胃黏膜、紅血球、血漿的穀胱甘肽含量，中年大鼠除脾臟，肺臟、胃黏膜和血漿的穀胱甘肽含量明顯減少外，其他臟器穀胱甘肽含量與年輕大鼠相較並無差異。此與其他文獻指出臟器穀胱甘肽含量隨增齡 (30 ~36 月齡) 而減少並不一致[39, 40]，原因可能是於我們使用的大鼠僅17.5月齡。歸脾湯明顯提升肝臟及胃黏膜穀胱甘肽含量，但降低心臟和腎臟的穀胱甘肽含量，這些有無實質上的藥理意義尚待解明。

一般認為生物體隨著年齡遞增，機體各個臟器的生理功能逐漸下降，調節合成的功能減退，因此過氧化物歧化酶的活性會隨增齡而降低[32, 33,41,42]。然而Mizuno and Ohta [43] 指出在老年大鼠腦部皮質過氧化物歧化酶隨年齡增加而降低。另一方面，在阿爾茲海默氏癡呆病人卻發現腦部過氧化物歧化酶活性上升，支持了阿爾茲海默氏癡呆病人腦部氧化應力增加的說法 [44]。在加速老化的鼯鼠其腦部及肝臟的過氧化物歧化酶活性較正常鼯鼠為高[27]。這些說明了老化過程中，過氧化物歧化酶活性的變化與機體中整體抗氧化能力的調節有關，十分複雜，難有一致的變化。

在本實驗發現腦部大腦皮質、海馬迴、紋狀體，及紅血球、肝臟的過氧化物歧化酶活性，老年大鼠與年輕大鼠皆無差異，歸脾湯的處理降低紋狀體和肝臟過氧化物歧化酶的活性，顯示歸脾湯可以減少紋狀體和肝臟超氧陰離子的產生。在大腦皮質、紅血球、肝臟，我們也測定另兩種抗氧化酶，即過氧化氫酶素、麩胱甘肽過氧化物酶的活性，發現此老年大鼠與年

輕大鼠皆無差異，歸脾湯的處理對大腦皮質、紅血球、肝臟的過氧化氫酶素、麩胱甘肽過氧化物酶的活性也沒有影響。

## 伍、結論與建議

歸脾湯屬補益類的方劑，被歸為經產門或養血、理血門。然而，長期大劑量服用可能出現溶血情形或加速紅血球代謝，而導致血清中麩氨酸草乙酸轉氨酶、乳酸去氫酶活性上升、尿中尿膽素原增加。由於溶血作用引發造血作用亢進的回饋機轉，而使紅血球、血紅素、血球容積上升。

歸脾湯減少脂褐素及膠原蛋白的累積，顯示其有一定的抗衰老作用。另外，歸脾湯能增加海馬迴的抗氧化力，支持了其在改善學習記憶方面有一定功效的論點。提升胃黏膜穀胱甘肽的含量及降低脂質過氧化，顯示有保護胃黏膜的作用。

要瞭解補益類方劑的藥理作用，長期大量投予，而後全面性的探討是最佳方法之一。本實驗中對歸脾湯藥理作用的發現，每一點都值得進一步探討，才能真正解明其作用機轉及臨床上的實用價值。

## 陸、參考文獻

1. 謝明村、吳啟瑞、蔡輝彥、彭文煌、謝佳璋：歸脾湯對於大鼠被動迴避學習反應之影響，*中國醫藥學院雜誌* 1994;3:15-24。
2. 於慶海、吳春福、莊麗萍：歸脾湯對小鼠記憶行為和膽鹼酯酶活性的影響，*中藥藥理與臨床* 1990;6:2-3。
3. 吳春福、于慶海、庄麗萍、徐問宇、劉保成、劉雯、郭月英：歸脾湯的抗氧化作用，*中國中藥雜誌* 1991;16:752-753。

4. 邵金鶯、張磊、許哲：十全大補湯、杞菊地黃湯和歸脾湯的一些藥理作用，*中藥藥理與臨床* 1990;6:4-5。
5. Yin, A: Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Radic. Biol. & Med.* 1996;21:871-88
6. Reiser, KM: Nonenzymatic glycation of collagen in aging and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1998;218:23-37.
7. Litchfield JT, Wilcoxon F: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther* 1949;96:99-113.
8. Glowinski J and Iversen LL: Regional studies of catecholamines in the rat brain I: The disposition of [<sup>3</sup>H]norepinephrine, [<sup>3</sup>H]dopamine and [<sup>3</sup>H]dopa in various regions of the brain. *J. Neurochem.* 1966;33:655-69.
9. Carter NP: Measurement of cellular subsets using antibodies. In: Ormerod MG, ed. *Flow cytometry: A practical approach*. Oxford.: ILR Press, 1990:45-67.
10. Sohal, RS, Donato HJ: Effect of experimental prolongation of life span on lipofuscin content and lysosomal enzyme activity in the brain of the housefly, *Musca domestica*. *J. Gerontol.* 1979;34:489-96.
11. Neuman RE, Logan MA: The determination of hydroxyproline. *J. Biol. Chem.* 1950;184:299-366.
12. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 1979; 95:351-8.
13. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folinophenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193:265-75.
14. Garrido A, Garate M, Valenzulea A: Changes in the antioxidant capacity of blood plasma are produced after the ingestion of high doses of fish oil. *Res. Comm. Che. Pathol. Pharmacol.* 1983;82:367-70.
15. Sedlak J, Lindsay RH: Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl group in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 1968;

- 25;192-205.
16. Xia E, Rao G, Remmen HV, Heydari AR Richardson A: Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male Fischer 344 rats are altered by food restriction. *Biochem. Molec. Roles Nutr.* 1995;125:195-201.
  17. Marklund S, Marklund G: Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 1974;47:469-474.
  18. Hafeman DC, Sunde RA, Hoekstra WG: Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *J. Nutr.* 1974;104:580-7.
  19. Aebi H: Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;250: 121-126.
  20. Murray, R.K., Granner, DK, Mayes, PA, Rodwell VW: In: *Harper's Biochemistry*. 21 ed., East Norwalk: Lange Medical Pub.,1988:649-64.
  21. Murray RK: Prophyryns and bile pigments. In: Murray, R.K., Granner, DK, Mayes, PA, Rodwell VW, ed. *Harper's Biochemistry*. 21 ed., East Norwalk: Lange Medical Pub.,1988:319-24..
  22. Yin A: Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Radic. Biol. & Med.* 1996; 21:871-888
  23. Reiser K.M: Nonenzymatic glycation of collagen in aging and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1998;218:23-37.
  24. Abrass CK, Adcox MJ, Raugi GJ: Aging-associated changes in renal extracellular matrix. *Am. J. Pathol.* 1995;146:742-752.
  25. 錢伯初、許士凱：生物化學研究方法。許士凱、呂明芳主編，抗衰老藥物學。北京：中國醫藥科技出版社，1994:149-163。
  26. De Zwart LL, Merrman JHN, Commandeur JNM, Vermeulens NPO: Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in human. *Free. Radic. Biol. Med.* 1999;26:202-26.
  27. Liu J, Mori A: Age-associated changes in superoxide dismutase activity,

- thiobarbituric acid reactivity and reduced glutathione level in the brain and liver in senescence accelerated mice (SAM): a comparison with ddY mice. *Mech. Ageing Dev.* 1993;71:23-30.
28. Dogru-Abbasoglu S, Tamer-Toptani S, Ugurnal B, Kocak-Toker N, Aykac-Toker G, Uysal M: Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in livers and brains of aged rats. *Mech. Ageing Dev.* 1997;62:111-6.
  29. Azhar S, Cao L, Reaven E: Alteration of the adrenal antioxidant defense system during aging in rats. *J. Clin. Invest.* 1995;96:1414-24.
  30. Coudary C, Rouseel AM, Arnaud J, Favier A: Selenium and antioxidant vitamins and lipid peroxidation levels in preaging French population. EVA study group. Edude de vieillissement arteriel. *Biol. Trace Elem. Res.* 7;57:183-90.
  31. Saath, K: Serum lipid peroxides in cerebrovascular disorders determined by a new calorimetric methods. *Clin. Chim. Acta.* 1978;90:370-43.
  32. Cand F, Verdetti, J: Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats. *Free Radic. Biol. Med.* 1989;7:59-63
  33. Tian L, Cai Q, Wei H: Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. *Free Radic. Biol. Med.* 1998; 24:1477-84.
  34. Evans PH: Free radicals in brain metabolism and pathology. *Bri. Med. Bull.* 1993; 49:577-87.
  35. Stocks J, Gutteridge JMC, Sharp RJ, Dormandy TL: Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. *Clin. Sci. Molec. Med.* 1974;47:215-22.
  36. Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Free Radi. Biol. Med.* 1985;1:3-25.
  37. Janero DR: Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as