

中醫藥委員會

中醫藥年報

第十五期第二冊



行政院衛生署中醫藥委員會編印
中華民國八十六年五月出版

中醫藥委員會

中醫藥年報

第十五期第二冊

行政院衛生署中醫藥委員會編印
中華民國八十六年五月出版

中醫藥年報第十五期第二冊

目 錄

1. 抗癌中藥單離成分實驗腫瘤細胞生長抑制之分析.....林榮耀..... 1
2. 活血化癥中藥成分對人類前列腺肥大組織之藥效評估.....鄧哲明..... 48
3. 眼科用中藥生物活性的探討(三).....張由美..... 69
4. 活血化癥中藥血管新生調管物質的研究.....吳榮燦..... 87
5. 活血化癥中藥對人體白血球功能的影響與效果.....洪傳岳..... 101
6. 蟾酥對大鼠下視丘—腦下腺—睪丸軸之效應.....王錫崗..... 113
7. 中藥漢防己、馬兒鈴致突變性作用之研究.....廖志飛..... 136
8. 中藥促進動物骨折癒合及促進人體母細胞株生長的評估.....李芬瑤..... 162
9. 台灣產生藥抗脂質過氧化及活性氧清除作用之研究.....林俊清..... 175
10. 以台灣產茄科中藥調控肝細胞腫瘤中p53及Rb抑癌基因表現與調節修補DNA變異之酵素活性及其在抗腫瘤機轉上的研究.....郭國華..... 259
11. 台灣產樟科及番荔枝科藥理活性成分之研究(四).....吳永昌..... 289
12. 中藥及台灣產天然物抗病毒抗癌及抗血栓活性之研究(四).....杜昌益..... 306
13. 延胡索成分四氫巴馬汀對癲癇之影響(二).....林茂村..... 316
14. 厚朴的抗氧化成分magnolol對大白鼠心肌保護作用的研究.....蔡勝國..... 334
15. 探討berberine, tetramethylpyrazine, baicalin, tert andrine及paeonol等五種中藥抽取物對大白鼠心臟血管系統的作用機轉.....吳勝男..... 347

16.象牙樹抗癌成分之研究.....	郭曜豪.....	374
17.抗血管平滑肌細胞增生有效中藥成分之篩選及其作用機制之研究.....	余淑美.....	387
18.探討天然海綿有效成分之衍生物BN-063於心肌缺血及再循環時的保護作用.....	顏茂雄.....	407
19.天王補心丹對大白鼠單向被動迴避學習反應之影響.....	謝明村.....	450
20.台灣市售防己、牛膝類藥材及含其製劑之研究(一).....	張永勳.....	476
21.中藥材之鑑定研究(九).....	陳忠川.....	625
22.台灣產中藥材資源之調查研究(四)－花蓮縣藥用植物資源之調查報告.....	謝文全.....	734
23.藥用植物之引種觀察及標本製作(五).....	劉新裕.....	756
24.湖北貝母組織培養之研究(一).....	蔡新聲.....	785

序

目前科技雖然發達，但現階段對生命科學的認識仍然有限，因此在持續現代醫學研究之餘，加強中醫藥的研究發展是相階段醫學研究的重心，期望透過研究，充分理解及發揮幾千年來先賢在醫藥方面所累積的許多寶貴經驗與傳承。

重視，民醫民第，條院大通籌委
重，中，」務組織法員讀的藥
極單位負責視法事組立法院個中
向詢仍益組行員送立法院十署
府諮會日署項委日之立經生
政之員的生各藥一藥經歷衛
，會委藥衛藥醫十中。日。院
寶員藥中院中中二、五施政
瑰委醫醫政醫置月醫十實行
的藥中中行中生一中月布立
中醫，對「理衛十心中公成
化中後界正掌院年關十統式
文有立各修會政六與年總正
統設成於日員行十促三由日
傳就署由九委「七敦十日一
國司生。十藥之國之八十月
我生衛業務二醫擬民界國三十
是衛院業月中研於藥民月十
藥部政詢七訂所則醫於二年
中政行諮年明定，中，十四
醫內年之六，規定，中，十
中於十關十條此草。持同八
期六有七七依」議支，會
早國藥國十而例審力過備員

業務研究，究八研項進、瞭業均
業藥研究至來四所院人從也
要醫研項加年十於學國藥果
重中項九漸近六至藥使醫成
的行四十逐，行。醫，中究
署進十六算研究進畫國會內研
生來二行預研度計中表國的
衛費行進究項年究在發供年
院經進度研四三研流果提每
政籌元年而十十項輪成也。
行寬萬十，七八一果究時會
是均千八究行過十成研同機
，年一，研進不六究辦，的
展每約究項元，了研舉形識
發來費研六萬元行其院情知
究年經項十餘萬進，學展新
研近究十六百餘度則畫醫發收
的署研三行七千度計雄究吸
藥生度行進千三年究高研、
醫衛年進度四為四研、藥育
中此八度年之縮十藥院醫教
強因十年一度緊八醫學中續
加，七九十年算，中醫內繼
一，十八二預算，中醫內繼
之究七，十究研行台解人

刊載於行政院衛生署中醫藥年報，以提供國內外學者專家之參考，自民國七十年出版年報第一期，迄今已出版至第十五期，未來每年將配合年度研究成果報告定期出版年報一期，以提供各界之參考。

目前中醫藥委員會設有中醫組、中藥組、研究發展組及資訊典籍組四個組，中醫組的業務，未來將加強與中醫醫藥及界連繫與溝通，輔導進行的醫師繼續教育，提昇中醫醫藥服務的水準；在中藥組的業務方面，則加強中藥藥品查驗與管理，中藥廠的輔導與獎勵，以提升中藥製藥工業水準，促進中藥科學化；在研究發展組方面，未來將加強中醫藥與針灸的基礎與臨床的研究，加強中醫診斷儀器的開發，配合野生動物保育進行有關保育類動物性中藥材的開發，以鼓勵學術界進行中醫藥的研究。以往中醫藥的研究，近幾年來，每年申請中醫藥研究項目的研究，同委託辦理約六、七十項，足見從事中醫藥研究者確實大幅增加；由於國人十大死因中的心臟疾病、糖尿病、高血壓及氣喘等疾病的現狀，現代醫學目前並無適當的治療法，因此未來中醫藥的研究將在慢性疾病方面有進一步的貢獻；資訊典籍主要業務係由中醫藥典籍的電腦化，建立中醫藥查詢系統，屆時醫藥學界的使用者，藉著電腦連線作業，即可順利查詢到所需要的中醫藥相關資料；期望未來在本會四個組的配合下，使中醫藥行政與研究能密切配合，加速中醫的現代化與中藥的科學化，爰為序

主任委員 蘇 貫 中 謹誌

中華民國八十六年五月一日

抗癌中藥單離成分對實驗腫瘤細胞生長抑制之分析

林榮耀教授

國立台大醫學院生化學研究所

中文摘要

細胞內DNA的拓樸狀態 (topology) 受拓樸酶 (topoisomerase) 所主宰。拓樸酶參與複製 (replication) 轉譯 (transcription)、重組 (recombination) 及修復 (repair) 等DNA代謝中重要反應。喜樹精 (camptothecin) 因為它能穩定拓樸酶與DNA所形成的共價化合物，使DNA的缺口無法連接回來，而造成細胞毒性 (cytotoxicity)，所以被拿來作為因能有效抑制第一型拓樸酶的抗癌藥物。本計畫利用 Topoisomerase I relaxation assay 証實了兩大類有效第一型拓樸酶活性的抑制物，分別來自中藥波羅蜜的單離成分及Quinolone類的化學合成藥物。由於藥物作用到DNA與拓樸酶共價化合物上，使細胞內堆積許多有缺口的DNA與蛋白的化合物，這時候拓樸酶的存在反而成為細胞的毒性物。因DNA的斷裂，接著許多重要的代謝也被迫停止，最後造成細胞死亡 (apoptosis)。已有報告指出 camptothecin 會造成人類血癌細胞株HL-60進行計畫性死亡 (apoptosis)，本計畫篩選出的兩類藥物，也藉由一些細胞進行有計畫性死亡的特徵，來觀察這些藥物對HL-60細胞株的毒性；這些特徵在本論文主要分成兩大類，分別是：(1) 當細胞進行 apoptosis 由於活化了細胞內核酸分解酶 (endonuclease)，而造成DNA小片段的斷裂，藥處理過後的細胞株，可將萃取出來DNA交由凝膠電泳 (agarose gel electrophoresis) 分析出小片段的DNA。(2) 在細胞型態

(cell morphology) 方面，進行apoptosis的細胞也可以觀察出特殊的型態，如細胞質內有泡狀物 (vacuolated cytoplasm) 形成及染色質被染色後有較深 (chromatin condensation) 的特徵出現。經由本計畫研究的結果，我們希望能進一步藉由研究造成細胞進行有計畫性死亡的基因產物，而能深入瞭解細胞對藥物的敏感性 (sensitivity) 或抗藥性 (resistance)；以期將來發展新一代的抗腫瘤藥物。

關鍵字：拓撲酶，計畫性死亡，抗腫瘤

ABSTRACT

In the cells , the topology of DNA is orchestrated by enzymes known as topoisomerases . Topoisomerases are involved in many aspects of DNA metabolism such as replication , transcription , recombination , and repair reactions . Camptothecin , which stabilizes the covalent intermediate of topoisomerase I and DNA is an effective drug for cancer chemotherapy . In this study , two new kinds of topoisomerase I inhibitor purified from the Chinese herb (Artocarpus heterophyllus) and synthetic quinolone derivatives have been demonstrated to be strong topoisomerase inhibitors by using ' topoisomerase I relaxation assay' . The topoisomerase I inhibitor camptothecin , was shown to induce apoptosis (programmed cell death) of human promyelogenous leukemia HL-60 cells . The two new kinds of topoisomerase I inhibitors which we have identified in this study , also can induce apoptosis of HL-60 cells through the following mechanisms : 《a》 activation of an endonuclease in apoptotic cells resulted in the formation of low molecular weight DNA fragments which were confirmed by agarose gel electrophoresis . 《 b 》 Changes in cellular morphology of apoptotic cells resulted in the early appearance of shrunken cells with vacuolated cytoplasm and regions of

intense chromatin staining around the nuclear periphery . By this study , we hope to identify the compounds which induce the programmed cancer cell death , which will be important sources for new types of antitumor drugs .

Key words : Topoisomerase, Apoptosis, Cancer chemotherapy

前言

拓樸酶 (topoisomerase) 是種可以改變及調節DNA拓樸狀態 (topology) 的一種酵素，追溯1970s topoisomerase剛被發現時，這酵素被稱為缺口縫補酵素 (nicking-closing enzyme)，主要是因為在細胞核中長鏈的DNA序列上有核基質 (nuclear matrix) 結合在上面，進而阻礙了DNA自由旋轉的能力，所以細胞需要另外的酵素來幫忙細胞順利完成一些重要的DNA代謝，這酵素就是拓樸酶，它參與了許多細胞內需要解開DNA雙股螺旋的代謝過程 [1-5]，如：DNA的複製 (replication)、轉譯 (transcription)、重組 (recombination) 及修復 (repair) 等過程。拓樸酶研究目前根據解開DNA的型式主要分為兩型，第一型拓樸酶主要是在雙股DNA其中一股，造成一個短暫的缺口 (nick)，利用這缺口使DNA鬆解它的超螺 (supercoil) 狀態[6]，所以可以改變一個單位的連結數目 (linking number)。而第二型拓樸酶 (topoisomerase Ⅱ) 是同時在兩股DNA都產生缺口，所以可以改變兩單位的連結數目 [1,2,7]，而且第二型拓樸酶進行反應時需腺票呤核甘三磷酸 (ATP) 參與，反應才能順利的進行。

近來對於真核細胞top1的催化機制 (catalytic mechanisms) 的研究指出，主要可分為四個步驟：第一個步驟是拓樸酶結合到DNA上 (binding top1 to DNA)：在原核細胞拓樸酶是結合到單股DNA [8,9]，而在真核細胞拓樸酶是結合到雙股DNA [10-13]。第二個步驟是拓樸酶藉由C端酪胺酸的氫氧基 (-OH) 與DNA 5端磷酸根共價結合 [14,15]，而使DNA產生一個缺口，並露出3端氫氧基。(DNA cleavage of strand with covalent attachment of top1 to one of the termini of nicked DNA)：top1藉由酪胺酸 (tyrosine) 上的-OH基經由轉酯作用 (

transesterification) [16]，結合至DNA其中一股5'端的磷酸根上（而在原核細胞top1是結合到5'端的磷酸根上），造成3'端產生一個OH基，並在DNA形成一個缺口（nick）。第三個步驟是單股的通過（single-strand passage）：由於top1與DNA以共價結合，使得缺口產生，而一股DNA便可通過這個缺口，使DNA的連結數目（linking number）改變。使得原來扭曲程度很高的雙股DNA有機會鬆解其扭力。第四個步驟是黏接DNA上的缺口（ligation of cleavage DNA strand）：藉由第二次的轉酯作用（transesterification），將在第二個步驟所造成的DNA缺口補起來。此時拓撲酶便離開剛才DNA的作用位置，再去尋找另一個新的作用位置。

自從1971年拓撲酶被發現至今，前述有關於它的生物活性及催化機轉都已經有更深入瞭解，而近年來由於癌症化學治療愈來愈受重視，拓撲酶在這方面也被視為一個重要的藥物作用目標。在1970s有 Kohn, Ross等一些科學家經由觀察adriamycin及ellipticin干擾拓撲酶對所造成DNA缺口的縫補（religation），而提出第一個有關拓撲酶的抗癌假說 [17,18]。這個假說主要建立在藥物所引發的DNA斷裂，在經由DNA alkaline elution assay 實驗時發現具兩個顯著的特色：（1）在完全將蛋白去除（full deproteinization）後，可被偵測出。所以稱這是有蛋白與DNA結合而造成缺口的產生。（2）此種現象出現的頻率與蛋白質與DNA交互連結（protein-DNA cross-links）出現的頻率相等。後來有Liu等科學家藉由研究真核細胞第二型拓撲酶發現許多可以誘導產生蛋白質與DNA交互連結（protein-DNA crosslinks），而使DNA產生缺口的化學物質，也可以誘導產生第二型拓撲酶所造成的DNA缺口（top2-mediated DNA breaks）[19]，有關於第一型拓撲酶的抑制物喜樹精（camptothecin）是近年來的新發現，雖然從喜樹（*Camptotheca acuminata*）萃取出喜樹精是1970s年早期就被Wall完成，但直到1980年晚期才被確認為第一型拓撲酶的特別抑制物（specific inhibitor），接下來幾年並有水溶性的camptothecin的類似物（analogs）topotecan及CPT-11 被合成並應用到臨床上。瞭解藥物與拓撲酶間分子作用，而達到抗癌選擇性，是我們目前最迫切的課題 [20,21]，並且找出藥物在拓撲酶上的特殊作用位置，進而能建立一個堆積模型的假說（stacking-model hypothesis）[22]，才能合成或萃取出更有效新的抗癌藥物，

camptothecin 或是它的衍生物 (topotecan, CPT-11, 9-aminocamptothecin) [23] 是目前應用於臨床上真核第一型拓撲酶的抑制物，這些藥物主要是藉由阻礙top1 所主導單股DNA缺口縫補的功能，造成DNA的斷裂。有關這些藥物結構方面的探討指出其活性位置主要是在第五個lactone環上。

目前有研究指出造成蛋白質與DNA交錯連結 (cross-links)，而使DNA永久的斷裂並不是細胞死亡 (cell death) 的唯一因素；造成細胞死亡的因子，可能還包括致癌基因 (oncogene) 的活化 (activate)，接下來造成細胞內許多特定的訊息傳遞 (signal transduction) 因子被活化，而促使細胞走向死亡之途。這就是所謂的細胞計畫性死亡 (programmed cell death; PCD or apoptosis)。研究 camptothecin 的細胞毒性 (cytotoxicity) 中發現，短暫的藥物處理，就算細胞內有些DNA被斷裂且與蛋白質形成化合物，但細胞仍具有修復 (repair) 的能力，可以使細胞不至於走向死亡之途。所以延長藥物作用於癌細胞的時間，才能有效的殺死癌細胞。除此之外藥物對細胞的毒性，還必須有效的控制藥物作用的細胞週期 (cell cycle)，倘若能避免藥物作用於細胞週期的G1或G2期，則可以阻止癌細胞進行有效的修復；就能累積對細胞的傷害，最後造成細胞的死亡。所以細胞內的細胞動素 (cell cyclin)、細胞週期調節激酶及磷酸酶 (cell cycle-regulated kinase and phosphatase) 或致癌基因的活化，就可以提昇拓撲酶抑制物對癌細胞株的毒性。

辨別細胞是否進行apoptosis，目前有幾種指標 (indicator) 可以參考。首先就細胞型態 (cell morphology) 而言，由於Apoptosis活化了許多內生性的蛋白質酶 (endogenous proteases)，導致細胞骨架的破壞 (cytoskeletal disruption)、細胞萎縮 (cell shrinkage)、細胞膜上會有泡狀物 (membrane blebbing) 的產生、並有染色質濃縮 (chromatin condensation) 的現象 [24,25]。另外就細胞核的變化而言，由於活化了細胞內核酸分解酶 (endonuclease)，造成此酵素吸附到DNA的核間區域 (internucleosomal spacer DNA regions)，使核內DNA斷裂 (fragmentation) 成片段；分析此結果可藉由洋菜凝膠電泳 (agarose gel electrophoresis) 觀察到DNA呈梯狀的排列 (DNA ladder)。

本計畫利用分離自中藥中的各種成分，以期篩選出抑制拓撲酶的有効藥物；同時也選用了幾種癌細胞株，如HL-60及HeLa，來觀察這些天然物的萃取物是否也對癌細胞株有毒性；以便增加這些化合物的抗癌效用。在癌細胞的實驗中除了觀察對癌細胞株有毒性外，也同時想知道這些天然物的萃取物是否也能使癌細胞株進行有計畫的死亡，所以實驗也從細胞進行有計畫的死亡的特性著手，如造成DNA斷裂而有DNA小片段的產生，可由洋菜凝膠電泳中看出是否有DNA片段（DNA ladder）的產生，另外還可利用癌細胞的外觀形態（cell morphology）來決定癌細胞株進行有計畫的死亡的證據；即以細胞核內染色質濃縮（chromatin condensation）的情形作為癌細胞株進行有計畫的死亡的指標。希望藉由以上的實驗而能篩選出新一代的抗癌藥物。

實驗材料與方法

壹：實驗材料

1. 從波羅蜜分離出中藥單離成分，係由高雄醫學院藥學系林忠男教授惠賜。
2. 合成化合物係由中國醫藥學院藥學系郭盛助教授及台灣大學化學系郭悅雄教授所提供。
3. 酵素：
 - (1) Topoisomerase I 購自 Promega公司。
 - (2) Proteinase K 購自 BRL公司。
4. 一般試劑：
 - (1) Tris - (hydroxymethyl) - aminomethane, Potassium chloride, Magnesium chloride, Ethylene diaminetetracetic acid, Sodium dodecyl sulfate, Dithiothreitol, Ethidium bromide, Morpholino propane sulphonic acid, Acetylated Bovine serum albumin, Ampicillin購自 Sigma公司。
 - (2) Agarose 購自 BRL公司。
 - (3) 拍立得底片型號667購自康谷公司。
 - (4) Dimethyl sulfoxide, 2,5-Diphenyloxazole benzene, 1,4-Bis (2-(5-phenyl) -oxazolyl) 購自Merk公司。

(5) Polyr (A) n, Primer d (T) 15, dATP, dTTP, dCTP, dGTP 購自 Boehringer Mannheim 公司。

(6) HIV-1 reverse transcriptase 購自 HT Biotechnology 公司。

(7) Trichloroacetic acid, 5-Bromo-4-chloro-indolyl - β -D-galactoside Isopropyl-D-Thiogalactopyranside 購自 GIBCO 公司。

(8) Yeast Extract, Tryptone 購自 DIFCO 公司。

(9) 95% 酒精購自台灣菸酒公賣局。

(10) Cesium chloride 購自 EM 公司。

5. 細胞培養用藥：

RPMI medium 1640 10.4g/pkg, Fetal bovine serum, Penicillin, Streptomycin, Trypsin-EDTA 購自 GIBCO 公司。

6. 儀器：

(1) Beckman J2/21 M/E centrifuge

(2) Beckman L8-80M centrifuge

(3) Beckman TL1 centrifuge

(4) Beckman rotor JA-14, JA-20

(5) Forma scientific water jacket CO₂ incubator

(6) Hitachi U-3200 spectrophotometer

(7) Dwyer Mark II lamina flow

(8) Hotech water bath

(9) Dynatech MR2000 microplate reader

(10) Sigma 3K-2 refrigerated bench centrifuge

(11) Millipore sample manifold

(12) Olympus microscope

(13) Water temperature control module

(14) Amicon stirred cell ultrafiltration modle 52 & modle 12

(15) Eppendorf centrifuge model 5414

貳：實驗方法

一、中藥單離成分之製備：

中藥單離成分之粉末在乾燥之室溫下存放，分析時將粉末100%

DMSO溶解，存放於-20°C下儘速分析。

二、pBR322質體 (plasmid) 之製備：

1. 轉型作用 (transformation)：

(a) 勝任菌體 (competent bacterial cells) 之製備

前夜在37°C培養單一菌落的大腸桿菌 (E.coli) TG1，於5毫升的LB+Ap (每毫升含100微克ampicillin) 培養液中，第二天取2毫升菌液至500毫升的培養液中，於37°C震盪培養3小時後，在4°C離心8000 rpm (Beckman JA-14 rotor) 5分鐘，取得菌體沈澱，以35毫升的transformation buffer (10 mM MOPS、100 mM CaCl₂、30 mM dextrose and 15% glycerol, pH 6.5) 懸浮菌體，接著以4°C離心8000 rpm 5分鐘，得到菌體沈澱，再以20毫升的transformation buffer懸浮菌體，置於冰浴中1小時後，分裝儲存於-70°C冰箱。

(b) 轉形作用之步驟：

取勝任菌體100微升加入，10微升的質體pBR322混合後，置於冰浴上30分鐘後，再置於42°C水浴中1分鐘行使熱休克 (heat shock) 效應，最後加入200微升的LB培養液於37°C培養30分鐘。取不同體積的反應液 (15、100微升) 至eppendorf管中，分別加入20微升IPTG (100 mM) 及10微升之100%X-gal，混合後用接種環塗抹於LB+Ap agar plate (每毫升含50微克的ampicillin)，置於37°C培養箱培養，第二天挑藍色菌落。

2. 大量質體 (large plasmid) DNA的抽取：

首先將帶有pBR322之質體的E.coli養於500毫升LB+Ap (每毫升LB培養液中含100微克ampicillin) 培養液，於37°C震盪培養，待O.D. 達0.5時加入inducer 25 ml/250 ml (chloramphenicol 134 mg/ml)，培養液繼續於37°C震盪培養14小時後，收集菌液至250 ml離心管中，於4°C離心8000rpm (Beckman JA-14 rotor) 5分鐘，取得菌體沈澱，將菌體沈澱溶於5毫升的溶液A (25 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, 9% glucose)，待沈澱物完全溶解後，將菌液轉移至50 ml離心管中，並加入10毫升的溶液B (1% SDS, 1 N NaOH)，混合均勻後於冰上靜置5分鐘菌體沈澱；再加入7.5毫升的溶液C (3 M醋酸鉀, 11.5%冰醋酸) 及10 ml的酚：氯仿 (1:1)，vortex後，於

冰上靜置5分鐘，並於4°C離心12000 rpm (Beckman JA-20 rotor) 10分鐘，移出上層水溶液至新離心管中，再加入20毫升IPA混合均勻後4°C離心12000rpm (Beckman JA-20 rotor) 10分鐘，保留沈澱物。將沈澱物溶於3毫升TE (10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA) 緩衝溶液，並加入已秤好4.8克的CsCl及200微升EtBr (10 mg/ml)，待完全溶解後移至top-sealed tube (Beckman)，於Vti 65.2 rotor 15°C離心65K rpm 6小時，利用高速離心後CsCl形成之分層，於UV燈照射下會出現深紅色亮帶，以針筒抽取亮帶區的溶液 (即含有質體pBR322)，將抽取液放入15毫升的離心管，並加入isopropanol (H₂O/CsCl飽和溶液) 萃取抽取液中的EtBr。再加入2倍體積的2次水、10分之1依體積的冰醋酸及一倍體積的IPA溶液。4°C，離心 8000 rpm (ss34 rotor) 10分鐘，保留沈澱物並溶於300微升的TE緩衝溶液，待完全溶解後移至新的eppendorf管中，且加入2倍體積的100%酒精，於4°C，13000 rpm離心 (Sigma 2k15) 10分鐘。保留沈澱物，以75%酒精清洗之，待沈澱物去除酒精抽乾後。將沈澱物溶於100微升的TE緩衝溶液中，並測其260 nm的吸光值 (Hitachi U-3200 spectrophotometer) 以估算其濃度。

三、Topoisomerase I 酵素稀釋液的配製：

稀釋液內含有300 mM potassium phosphate (pH 7.5)，5 mM DTT，0.2 mM EDTA，0.2 mg/ml acetylated BSA，50% (v/v) glycerol將外鈎濃度為10 units/ul之topoisomerase I加入80微升稀釋液，而使最終濃度為2 unit/ul。

四、Topoisomerase I 活性分析方法：

本實驗主要是參考K.F.Bastow [26] 之方法，取40.5微升的緩衝溶液 (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA) 加入2毫升 (0.125 ug/ul) 之pBR322，及0.5毫升中藥單離成分 (溶於100%DMSO中)，最後加入1.5微升 (2 units/ul) topoisomerase I，在37°C下反應30分鐘後。加入5微升11%SDS (溶於50 mM Tris-HCl pH 7.5) 停止反應，並隨即加入2.5微升proteinase K (25 mg溶於50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol)，在37°C下反應30分鐘。最後於1%洋菜凝膠電泳 (agarose gel electrophoresis)，電壓40V，跑隔夜，再以EtBr溶液染色，於UV

燈下觀察結果。以拍立得667底片拍下膠體的相片，並於densitometer分析其結果。中藥單離成分抑制拓撲酶活性 (topoisomerase I relaxation activity) 計量分析方法：酵素殘存活性：100%-(S-A) %抑制能力以IC₅₀ (50% inhibitory concentration) 表示。

五、哺乳類細胞的培養：

1. 培養基 (medium) 之配製

RPMI-1640購自GIBCO公司之粉狀培養基，溶於1000毫升之二次去離子水中，加上2克碳酸氫鈉，並以6 N HCl將pH值調至7.2，通過無菌之Millipore過濾，加入10%胎牛血清 (fetal bovine serum) 及2500單位之青黴素和鏈黴素，以此法配得10%FBS/RPMI-1640供細胞培養用。

2. 細胞培養：

(1) HeLa細胞以10% FBS/RPMI-1640培養液培養，以總體積為 50毫升之培養瓶培養，置於37°C，5%CO₂之恆溫培養箱 (incubator) 中，待細胞在培養瓶長滿 (confluency) 後，用含0.02%EDTA，0.25%胰蛋白酶 (trypsin/EDTA) 之磷酸緩衝溶液 (PBS) 將細胞由培養瓶剝落 (trypsinization) 下來。50毫升之培養瓶加入1毫升 trypsin-EDTA在37°C，5%CO₂之恆溫培養箱處理2到3分鐘，再加入10毫升之培養液消除胰蛋白酶對細胞的作用，取出離心 (1000 rpm，5分鐘) 將細胞沈澱下來，再分裝次培養 (subculture) 於培養瓶中。

(2) HL-60 細胞以10% FBS/RPMI-1640培養液培養，以總體積為 50毫升之培養瓶培養，置於37°C，5%CO₂之恆溫培養箱 (incubator) 中。

3. 細胞的種植 (plating)：

依上法取出細胞液，以細胞計數器 (hemocytometer) 計算細胞濃度，在取定量細胞做稀釋，調整成適當濃度 (10000 cells/ml) 種植於培養皿中。

4. 對細胞生長的抑制

(a) HeLa細胞：藥以最大溶解度於100%DMSO中，而DMSO最後以濃度1%存在於測試培養液，將細胞種植於96 wells 微盤 (microplate) 中，其細胞濃度為2X10⁵ cells/ml。待一定時間

藥處理後，細胞經24小時培養，再以1971年由Amstrong所發表的半微量染料結合法 (semi-micro dye-binding assay) 處理。每well先以100 μ l的 PBS沖洗，再以50 μ l的染色液[見註]浸漬20分鐘後，吸掉染色液，以蒸餾水沖洗兩次，吸乾水分並風乾，再以microplate photometer 測其 540 nm的吸光值。

(註)：染色液含有0.5% methylrosaniline chloride, 0.85% NaCl, 5% formamide, 50% ethanol。

(b)對HL-60：藥以最大溶解度於100%DMSO中，而DMSO最後以濃度1%存在於測試培養液，將細胞種植於24 wells 微盤 (microplate) 中，其細胞濃度為105 cells/ml，待一定時間藥處理後，再以trypan blue exclusion 方法檢測細胞 (活的細胞不會被染上顏色，而死的細胞被染上藍色) 30分鐘後，於細胞計數器 (hemocytometer) 觀察細胞存活數目。

5. 中藥單離成分對癌細胞株DNA合成的抑制：

將長滿的癌細胞株培養液，離心將細胞沈澱下來，取少量計算其細胞濃度，再以細胞培養液稀釋含 2×10^5 個細胞。將0.2毫升細胞液加入24孔培養皿內，在37°C 5% CO₂恆溫培養箱內培養24小時後，吸去培養液，加入含合成物培養液0.2毫升。其配法如下：每毫升 RPMI-1640培養液內含10、1、0.1、0.01、0.001 μ g/ml之中藥單離成分。於37°C 5% CO₂恆溫培養器培養2小時後，加入0.5 μ Ci之 3H-thymidine繼續培養2小時後，吸去培養液，加入1 ml 0.1 N氫氧化鉀終止培養。30分鐘後再加入1 ml 10% TCA冰溶液沈澱，靜置30分鐘後，以玻璃纖維濾紙 (Whatman DE-81) 過濾，再將濾紙以5% TCA冰溶液沖洗5次，最後以水及95%酒精沖洗2次。抽乾濾紙，將濾紙置於3毫升的閃爍計數液中，以液體閃爍計數儀測定3H之放射強度。測得之放射強度對藥濃度作圖 (放射強度Y軸，藥濃度為X軸)，可得藥的抑制50%的濃度。

6. 藥物對HeLa細胞RNA合成抑制試驗：

將長滿之HeLa細胞以Trypsin-EDTA處理下來，取少量計算其細胞濃度，再以細胞培養液稀釋成每毫升含 2×10^5 個細胞。將0.2毫升細胞液加入24孔培養皿內，在37°C 5% CO₂恆溫培養器內培養24小時後，吸去培養液，加入含合成物培養液0.2毫升。其配法如下：

每毫升MEM培養液內含10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 ug/ml之 158G, 159A, 159B及Doxorubicin。於37°C 5% CO₂恆溫培養器培養1小時後加入0.5 uCi之³H-Uridine繼續培養2小時後，吸去培養液，加入1 ml 0.1N氫氧化鈉終止培養。再加入1 ml 10% TCA冰溶液沉澱，靜置30分鐘後以玻璃纖維濾紙(Whatman GF/C)過濾，再將濾紙以5% TCA冰溶液沖洗，最後以絕對酒精洗乾淨。抽乾濾紙，再將濾紙置於閃爍計數瓶內，加入閃爍計數液，以Beckman Liquid Scintillation Counter 5801測定其放射線含量。

7. 藥物對HeLa細胞蛋白質合成抑制試驗：

將長滿之HeLa細胞以Trypsin-EDTA處理下來，取少量計算其細胞濃度，再以細胞培養液稀釋成每毫升含 2×10^4 個細胞。將0.2毫升細胞液加入24孔培養皿內，在37°C 5% CO₂恆溫培養器內培養24小時後，吸去培養液，加入含藥物培養液0.2毫升。其配法如下：每毫升 Leucine-free MEM培養液內含10, 1, 0.1, 0.01, 0.001ug/ml之 158G, 159A, 159B及Doxorubicin。於37°C 5% CO₂恆溫培養器1小時後加入0.5 uCi之³H-Leu繼續培養2小時後，吸去培養液，加入1 ml 0.1N氫氧化鉀終止培養。30分鐘後再加入1 ml 10% TCA冰溶液沉，靜置 30分鐘後以玻璃纖維濾紙(WHATMAN GF/C)過濾，再將濾紙以5% TCA冰溶液沖洗，最後以絕對酒精洗乾淨。抽乾濾紙，再將濾紙置於閃爍計數瓶內，加入閃爍計數液，以Beckman Liquid Scintillation Counter 5801測定其放射線含量。

8. 動物實驗

選取鼠齡約6-8週大，體重約15公克的裸鼠，性別不拘。飼養在籠子，飼料及水都經過消毒殺菌的無菌環境下。每組測試藥各準備三隻裸鼠做試驗。準備 5×10^6 個HeLa細胞將其懸浮於0.5 ml PBS，而後放在冰浴上準備接種。以22號針頭吸取活細胞，挑起裸鼠背部側面皮下打入細胞，注意大要讓細胞液流出來。三天後選取長出約80 mm²大的腫瘤的裸鼠，長出太大或太小的腫瘤的裸鼠都不要。一種施行注射的方法是，每組測試藥直接打入腫瘤生長部位，亦即施Intralesional administration皆打單一濃度，每隔四天注射一次，共兩星期。二十天後觀察腫瘤生長情形。最後計算抑制腫瘤生長百分比，其計算方法為：

1 試驗組平均腫瘤大小
控制組平均腫瘤大小

另一種施行注射的方法是從尾巴靜脈注射 (Intravenous administrations) 測試藥。方法是先將老鼠放進一個挖好小孔的50 ml大試管內，露出尾部，以日光燈照其尾部，按摩之。尾巴兩側血管即其靜脈，打入0.1ml不同濃度的測試藥，最後計算抑制腫瘤生長百分比，其計算方法同上。

六、癌細胞進行細胞計畫性死亡 (apoptosis) 實驗：

1. 癌細胞的細胞形態 (cell morphology) 觀察

<HeLa細胞形態觀察>：先拿蓋玻片 (cover slip) 用1%gelatin處理24小時後，以滅過菌的PBS緩衝液清洗蓋玻片，再將每毫升有105個HeLa細胞的培養液種於蓋玻片上，待藥處理後；以PBS緩衝液清洗後，再以10% FBS/RPMI-1640於培養箱培養24小時後，以Wright/Giesma染細胞，於一般光學顯微鏡觀察細胞型態的變化並照相之。

<HL-60細胞型態觀察>：將每毫升有105個HL-60細胞的培養液種植於24孔培養皿上，待藥處理後；以PBS緩衝液清洗後，再以10% FBS/RPMI-1640於培養箱培養24小時後，以Wright/Giesma染細胞，於一般光學顯微鏡觀察細胞型態的變化並照相之。

2. 洋菜凝膠電泳分析細胞進行有計畫死亡 (apoptosis) 所造成細胞內去氧核糖核酸片段《DNA fragmentation, DNA ladder》的產生：將生長處於對數期 (log phase) 的癌細胞株，以1000 rpm離心將細胞沈澱下來，倒掉舊培養液後，先以PBS緩衝液清洗細胞兩次，用細胞計數器 (hemocytometer) 將細胞濃度調成每毫升含 3×10^6 個細胞。以藥處理特定時間後，將細胞取至eppendorf內，離心使細胞沈澱下來，以PBS清洗一次，再將細胞懸浮於100微升的解離溶液 (lysis buffer) (10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5% sarkosyl, 0.5 mg/ml proteinase K 《proteinase K於使用前才加入》) 中，待細胞完全溶解後，置於50°C加熱板反應24小時以後，加入10微升去核糖核酸酵素 (RNase A, 10 mg/ml)，置於50°C加熱板1.5小時後。利用200微升酚：氯仿 (1:1) 萃取上述細胞溶解液，混合均

勻後，13000 rpm離心10分鐘，將上層水溶液轉移至新的eppendorf管中，管中DNA的濃度，根據需要調整成適當濃度。最後於1.5%洋菜凝膠電泳中分析結果。

結果

1. 由波羅蜜 (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) 分離出單離成分對第一型拓模酶活性抑制的影響：

本實驗所用波羅蜜單離成分共五種：分別是cycloheterophyllin (cHI)、heterophyllin (HI)、artonin A (AA)、artonin B (AB)、heterophyllol (HO)，其化學結構式，見Fig.1，經由topoisomerase I relaxation assay分析這些化合物對拓模酶活性抑制影響，結果對拓模酶有抑制的反應的單離成分是cHI、HI、AA、及AB這四種化合物，見Fig.2在本實驗中拿第一型拓模酶專一的抑制物camptothecin (CPT)，當正控制組 (positive control)，接下來以各種不同抑制物，不同濃度變化所求得藥物的抑制曲線，見Fig.3及 $IC_{(50)}$ ，見Table 1。

2. 合成的Quinolone衍生物對第一型拓模酶活性抑制的影響：

本實驗所用Quinolone衍生物共有6種，分別是Kchao-1 (K1)、Kchao-2 (K2)、Kchao-3 (K3)、Kchao-4 (K4)、Kahao-7 (K7)、Kchao-8 (K8) 其結構式，見Fig.4，經topoisomerase I relaxation assay分析結果，只有K1及K2有抑制作用，見Fig.5，接下來以各種不同抑制物不同濃度變化所求得藥物的抑制曲線，見Fig.6及 IC_{50} ，見Table 2。

3. 由波羅蜜分離出單離成分，對HL-60 (前骨髓性白血病細胞株) 細胞株去氧核糖核酸 (DNA) 合成的抑制情形，經由不同藥物濃度處理24小時得到其抑制曲線，見Fig.7。(在經由換算可得其 $IC_{(50)}$)，見Table 3。

4. 合成quinolone類化合物K1、K2，對HL-60 (前骨髓性白血病細胞株) 細胞株去氧核糖核酸 (DNA) 合成的抑制情形，經由不同藥物濃度處理24小時得到其抑制曲線，見Fig.8。在經由換算可得其 $IC_{(50)}$ ，見Table 4。

5. 由波羅蜜分離出單離成分對HL-60 (前骨髓性白血病細胞株) 的細胞毒

性 (cytotoxicity) : HL-60細胞株經藥處理24小時後，CPT處理的細胞株只剩25.1%的存活率，而HI、AA、cHI、AB、HO處理的細胞株，存活率分別是46%、37.4%、41.4%、71.7%、84.3%，見Fig.9及Table 5。

6. Quinolone衍生物對HL-60細胞株的細胞毒性：HL-60細胞株經藥處理24小時後，CPT處理的細胞株只剩27.8%的存活率，而K1、K2、K3、K4、K7、K8處理的細胞株，存活率分別是38.2%、32.8%、74%、77.8%、84.4%、72.2%，見Fig.10。

7. 篩選出158G, 159A及159B對HeLa Cell做蛋白質生合成抑制試驗：本實驗是以不同濃度之158G包括0, 10⁻³, 10⁻², 10⁻¹, 0.5, 1, 5, 10 ug/ml取200微毫升處理HeLa Cell，並以Doxorubicin為對照組，以3[H]-Leucine標誌蛋白質，二小時後分析其蛋白質生合成活性，由Fig.11顯示158G對HeLa Cell具有蛋白質生合成抑制作用，其抑制百分之五十蛋白質生合成活性之濃度為0.05 ug/ml。159A及158B，也有蛋白質生合成抑制能力，其抑制百分之五十蛋白質生合成活性之濃度分別為0.91 ug/ml及0.89 ug/ml。

8. 測試158G, 159A及159B對核糖酸生合成抑制之能力：

本實驗取200微毫升不同濃度之158G，包括0, 10⁻³, 10⁻², 10⁻¹, 0.5, 1, 5, 10 ug/ml處理HeLa Cell，並以Doxorubicin為對照組，以3[H]-Uridine標識核糖核酸，二小時後分析其核糖核酸生合成活性，由Fig.12顯示158G對HeLa Cell抑制百分之五十核糖核酸生合成活性之濃度為5.0 ug/ml。159A及159B對HeLa Cell抑制百分之五十核糖核酸生合成活性之濃度分別為0.74 ug/ml及0.55 ug/ml。

9. 測試158G, 159B對植入HeLa Cell裸鼠的腫瘤消除能力：

本實驗屬於in vivo試驗要測試在試管(in vitro)內有效的抗癌藥，實際用在生物體是否有治療效果。施行的方式分兩種，一為直接打入腫瘤長出部位的(Intralesional administration)，一為從尾靜脈(Intracauda; veom ad, omostratopm)打入合成藥。

(1)以doxorubicin為對照組施行intralesional administration時，當打10 ug時腫瘤消忌32.1%，為劑量增加時腫瘤逐漸消退，高達1000 ug時已有80.1%的腫瘤被抑制。

若施行Intravenous administration時，由Table 6.可知以250 ug

打入時約有60.2%的消退。

(2)以158G施行Intralesional administration時由Table 7.可知，當打入10 ug時腫瘤幾乎沒有消退，增加至50 ug時約消退了45%，1000 ug時已有一半以上60.1%的腫瘤消退了。

若以158G施行尾部靜脈注射時，由Table 8.可知，打入500 ug時有36%的腫瘤消退。

(3)以159A施行Intralesional administration時，由Table 9.可知，當打入10 ug時，腫瘤有11.2%的消退，打入50 ug時可消退32.3%當增加至250 ug時60.2%的腫瘤被消退；高達500 ug時有69.2%被消退，至1000 ug時有73.4%腫瘤被消退。

以159A施行尾部靜脈注射時，由Table 10.可知打入250 ug有52%的腫瘤被消退。

(4)以159B施行Intralesional administration時由Table 11.可知，當打入10 ug時腫瘤有10.2%的消退，打入50 ug時可消退36%當增加至250 ug時，59.6%的腫瘤被消退，提高至500 ug時有64.1%被消退，至1000 ug時則有71.2%腫瘤消退。

若以159B施行尾部靜脈注射時，由Table 12.可知打入250 ug有 48%的腫瘤被消退。

10.波羅蜜單離成分及Quinolone衍生物對癌細胞株的細胞型態 (cell morphology) 的影響：HeLa (子宮頸癌細胞株) 或HL-60 (前骨髓性白血病細胞株) 細胞株先以藥處理24小時，再以Giesma/Wright染色，於一般光學顯微鏡下觀察細胞的型態，見Fig.13,14，由實驗的結果可看出不論camptothecin或對第一型拓撲酶有抑制的藥物 (HI、cHI、AA、K1、K2) 皆會造成細胞株有染色質濃縮 (chromatin condensation) 及細胞分裂死亡 (mitotic death) 的現象。

11.波羅蜜單離成分對HL-60細胞株DNA完整性的影響：將 2×10^6 cells/ml，先以藥處理24小時後，將細胞收集起來經lysis buffer處理後 (詳細處理過程見實驗方法)，經1.5%洋菜凝膠電泳分析結果，發現除CPT正控制組以外，AA、cHI、HI都會造成細胞內DNA斷裂成規則的片段，所以拿洋菜凝膠電泳結果經ethidium bromide染色後可看到DNA ladder的呈現，見Fig.15。

12.Quinolone衍生物對HL-60細胞株DNA完整性的影響：將 $2 \times 10^{(6)}$ cells/

ml, 先以藥處理24小時後, 將細胞收集起來經lysis buffer處理後(詳細處理過程見實驗方法), 經1.5%洋菜凝膠電泳分析結果, 發現除CPT正控制組以外, K1、K2都會造成細胞內DNA斷裂成規則的片段, 所以拿洋菜凝膠電泳結果經ethidium bromide染色後可看到DNA ladder的呈現, 見Fig.16。

討 論

目前臨床上使用的許多抗癌的化學藥物, 都已被證實能夠有效的抑制細胞內第一型及第二型拓樸酶缺口縫補的功能(breakage-reunion reactions), 造成細胞內堆積許多拓樸酶與斷裂DNA的複合物, 因而阻礙正常細胞內DNA的複製。本實驗選用了傳統中藥的藥方波羅蜜所萃取出來的單離成分及合成的quinolone類衍生物, 經過對第一型拓樸酶活性抑制的檢測結果, 顯示出其中波羅蜜的單離成分AA、AB、HI、cHI及quinolone類K1、K2化合物, 對真核細胞第一型拓樸酶的活性有明顯的抑制作用。這些化合物的IC₅₀分別是: cHI 3.87 μ M、AA 3.54 μ M、HI 20.1 μ M、AB 5.99 μ M、K1 20.23 μ M、K2 29.56 μ M, 經過與第一型拓樸酶已被證實的專一性抑制物 camptothecin [64-66]的抑制活性比較(CPT的IC₅₀為2.29 μ M), 雖然這些中藥萃取出來的化合物的IC₅₀明顯比CPT低, 但就topoisomerase I relaxation assay的結果, 推測這些化合物對拓樸酶的抑制形式可能與 CPT相似, 也就是抑制了top 1再縫合(religation)的功能, 而造成細胞內堆積許多斷裂DNA與拓樸酶共價的化合物, 所以推測這些藥物可能造成的細胞毒性, 是藉由穩定拓樸酶與DNA間的共價結合[27-31]。雖然CPT是最早被分離出來具有抑制第一型拓樸酶的抗癌植物鹼, 但由於CPT應用於臨床上產生了許多嚴重的副作用[32-35]如: 白血球減少(leukopenia)、血小板減少(thrombocytopenia)、噁心、腹瀉、虛弱、囊性出血(hemorrhagic cystitis)等症狀。所以陸續就有科學家合成有關CPT的類似物(TPT、9-AC、CPT-11), 及其它新藥(saintopin、ellipticine、erbstatin、flavones)[36-40]的萃取與合成。有關CPT的抑制活性位置經由研究指出, CPT結構中最重要的位置是在第五個lactone環上, 倘若lactone環被破壞, 則CPT失去它的抑制活性; 因為CPT是一種拒水性(hydrophobic)的化合物, 不易應用於臨床上的治療,

所以就有科學家嘗試將CPT水解成親水性 (hydrophillic)且具-COOH基的化合物，雖然解決了CPT的親水性，但因破壞了lactone環，使得CPT失去了對第一型拓撲酶的抑制活性[83—85]。後來科學家就在CPT的第9個位置以氨基(-NH₂)取代氫原子，結果不但增加CPT的親水性，而且也增加CPT的抑制能力。另一方面也有人嘗試在CPT第9、10、11的位置以OH基取代原來的

氫原子，不僅未影響CPT的抑制能力，同時也改進了CPT的親水性。而本實驗所檢測出來波羅蜜中具有抑制第一型拓撲酶的單離成分：cHI、HI、AA、AB，就這些化合物的結構分析，可看出這幾個具抑制能力的化合物與CPT似乎具有相類似重要的第五個環，相反的波羅蜜單離成分中不具抑制能力的化合物HO，可能因為不具類似第五個環的構造；所以便失去了抑制拓撲酶的能力。另外HI、cHI、AA、AB這些單離成分其結構上與CPT比較，有許多利於親水性OH基的存在，根據以前對CPT的研究，可推測這些單離成分將來若能應用於臨床上，希望能藉由他們具有親水性的特性，進一步增加臨床上抗癌的應用。

接著在本實驗的Fig.9，10得知由波羅蜜分離出來的單離成分HI、cHI、AA、及quinolone類衍生物K1、K2，這些經由本實驗測試得知，是屬於第一型拓撲酶的抑制物，將這些藥物拿來處理癌細胞株24小時後，觀察這些藥物對細胞株的細胞毒性；發現這些化合物皆能有效抑制人類血癌細胞株HL-60的分裂增長。根據目前研究知道各種不同抗癌藥物如：camptothecin、etoposide、bufalin、cisplatin等可以誘導各種不同癌細胞株進行apoptosis及分化(differentiation)，所以本實驗另一方面也想知道這些化合物是否也會在人類癌細胞株造成apoptosis，實驗的結果(見Fig.13,14)，HL-60及HeLa細胞株經CPT或波羅蜜單離成分處理24小時後，這些第一型拓撲酶的抑制物，的確能夠造成癌細胞株細胞型態的改變，經Giemsa/Wright染色後於光學顯微鏡下，可看到典型細胞進行apoptosis的特徵：染色質濃縮(chromatin condensation)及核的裂片(fragmented nuclei)。而另一種常被使用的細胞進行apoptosis的特徵是：DNA ladder形成與否，實驗時將HL-60細胞株以藥處理24小時後，萃取細胞所有的DNA，於洋菜凝膠電泳分析，發現這些第一型拓撲酶的抑制物：CPT、HI、cHI、AA、K1、K2都能在HL-60細胞株，造成規則的DNA小片段的生成(大約180-200鹼基對的倍數)(見Fig.15，16)，這

就是近年來常被用來當作細胞進行apoptosis的指標 [41-46]，但是DNA ladder只有在HL-60細胞株有觀察到，而在HeLa細胞株並未看到DNA ladder的形成，雖然DNA ladder是一個常被用來當作細胞進行apoptosis的指標，但是近年來的研究 [47,48]指出，DNA ladder的形成與否並非唯一的指標，有的細胞株在進行apoptosis時，可能只容易檢測到細胞型態的改變，而不容易看到小片段DNA ladder的形成，就像本實驗的HeLa細胞株一樣；甚至有的細胞株是形成大片段的DNA（分子量約為20- 50 Kbp），就像U937細胞株經CPT或VP-16處理24小時後，萃取出來的DNA只能分析到大片段的DNA斷裂的情形 [49]。

有關癌症的研究知道，癌症的發生是由於細胞不正常的大量增生，而妨礙到正常細胞的生理機能，使細胞無法正常的進行有計畫的死亡（apoptosis），而蔓無止境的增生。近年來科學家對癌症化學治療，已逐漸著重在有關誘導癌細胞進行apoptosis方面著手。所以探討癌細胞株進行apoptosis的機轉，以期能有效控制癌細胞株的生長分裂。截至目前知道影響apoptosis的因子很多，而且也深入到分子層次方面，許多與apoptosis有關的基因產物，也已被發現並深入研究中；像在 HL-60細胞株最常被提及的前致癌基因（proto-oncogene）bcl-2， bcl-2最早是在人類B型淋巴球細胞被發現、分離出來的；BCL-2這個蛋白主要的生理機能，並不是直接造成癌細胞株過度不死的增生，而是間接藉由抑制細胞對apoptosis訊息的接收，最後造成細胞無法正常的走向死亡，所以有癌症的產生。人類血癌細胞株HL-60就是典型bcl-2過度表現的不死細胞株，近年來科學家更進一步指出BCL-2的確是控制細胞是否走向apoptosis成員中的重要一員 [50-53]。BCL-2在細胞株中防禦細胞被化學藥物攻擊的角色，越來越受到科學家們的重視，而有關BCL-2在癌症化學治療中，對藥物的敏感性或抗藥性，截至目前都尚未有更明確的結果被報導；本實驗所使用的這些中藥單離成分，既然能在HL-60細胞株造成細胞進行有計畫死亡；若能進一步知道這些藥物對bcl-2基因表現的影響，就能更深入瞭解藥物在細胞內的作用機制，有關藥物在細胞內可能的作用機制見Fig.15：首先必須確定藥物可以順利通過細胞膜及核膜，在這過程中藥物可能經過適當的代謝，或被細胞膜上的膜蛋白（PgP）排出細胞外。倘若藥物能順利與DNA上的top1作用，細胞內top1若表現的較多，就對藥物較敏感，相反的就對藥物有抗性。接著由於藥物與top1間的作用，造成

DNA的斷裂，使的細胞內基因的表現、訊息的傳遞及細胞循環都受到影響，最後誘導細胞祇好進行細胞計畫性死亡。另一個被廣泛研究的致癌基因是p53，經研究知道p53這個蛋白在細胞中擔任的角色，主要適當細胞內DNA受到傷害時，p53是負責誘導細胞進行apoptosis [54,55]，倘若不幸p53這個基因發生突變，造成p53無法正常執行它的功能，最後造成細胞無法進行 apoptosis 而導致癌症。影響細胞進行有計畫死亡的因子除了bcl-2、p53以外，還有其他因子也被深入研究像細胞激素（cytokines、TNF、TGF- β 、etc），病毒的基因（E1A，p35、NAIP、etc），或化學藥物（CPT、VP-16、m-AMSA、VM-26、etc）及物理（X-ray、UV、heat shock、etc）的傷害等都與細胞是否進行apoptosis有關。本實驗的主要目的，就是希望能由中藥的單離成分中，以抑制真核細胞第一型拓撲酶與否，為最初的篩選依據；接下來藉由對癌細胞株的抑制特性，並進一步找出藥物的作用機轉，以期將來能夠發展應用到臨床的治療上。

結論與建議

經由本計畫研究的結果，我們希望能進一步藉由研究造成細胞進行有計畫性死亡的基因產物，而能深入瞭解細胞對藥物的敏感性（sensitivity）或抗藥性（resistance）；以期將來發展新一代的抗腫瘤藥物。

參考文獻

1. Gellert, M. DNA topoisomerases. (1981) Annu. Rev. Biochem. 50: 879-910.
2. Wang, J. C. DNA topoisomerases. (1985) Annu. Rev. Biochem. 54: 665-697.
3. Wang, J. C. Recent studies of DNA topoisomerases. (1987) Biochem. Biophys. Acta. 909: 1-9.
4. Wang, J. C. DNA topoisomerase: Why so many? (1991) J. Biol. Chem. 266: 6659-6662.
5. Osheroff, N., Zecherich, E. L. and Gale, K. C. Catalytic function

- of DNA topoisomerase II. (1991) BioEssays 13 : 269-275 .
6. Chempoux, J.J. (1978) Mechanism of the reaction catalyzed by the DNA untwisting enzyme : attachment of the enzyme to 3'-terminus of the nicked DNA . J.Mol.Biol.118 : 441-446 .
 7. Sander, M. and Hsieh, T. (1983) Double strand DNA cleavage by type II DNA topoisomerase from *Drosophila melanogaster* . J . Biol.Chem. 258 : 8421-8428 .
 8. Staedic J.Froelich-Ammon and Neil Osheroff (1995) Topoisomerase poisons : harnessing the dark side of enzyme mechanism . J.Biol.Chem.270 : 21429-21432 .
 9. Been, M.D. and Chempoux, J.J. (1984) Breakage of single -stranded DNA by eukaryotic type-I topoisomerase occurs only at regions with the potential for base- pairing .J.Mol.Biol.180 : 515-531 .
 10. Christiansen, K., Svejstrup, B.D., Andersen, A.H. and Westergaard, O. (1993) Eucaryotic topoisomerase I -mediated cleavage requires bispartite DNA interaction. J.Biol.Chem.268 : 9690-9701 .
 11. Shumam, S. (1991) Site-specific interaction of vaccinia virus topoisomerase I with duplex DNA . J.Biol.Chem.266 : 11372-11379 .
 12. Jaxel, C., Campranico, G., Kerrigan, D., Kohn, K.W. and Pommier, Y. (1991) Effect of local DNA sequence on topoisomerase I cleavage in the presence or absence of camptothecin . J.Biol.Chem.266 : 20418-20423 .
 13. Champoux, J.J. (1981) DNA is linked to the rat liver DNA nicking-closing enzyme by a phosphodiester bond to tyrosine . J. Biol.Chem.256 : 4805-4809 .
 14. Lynn, R.M., Bjornsti, M.A., Caron, P.R. and Wang, J.C. (1989) Peptide sequencing and site-directed mutagenesis identify tyrosine-727 as the active site tyrosine of *Saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase I . Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86 :

- 3559-3568 .
15. Tse, Y.C., McCarron, B.G., Arentzen, R. and Chowdhry, V. (1983) Mechanistic study of E.coli DNA topoisomerase I : cleavage of oligonucleotides . *Nucleic Acids Res.* 11 : 8691-8701 .
 16. Tse, Y.C., Kirkegaard, K. and Wang, J.C. (1980) Covalent bonds between protein and DNA . *J.Biol.Chem.* 255 : 5506-5565 .
 17. Ross, W.E., Glaubiger, D.L. and Kohn, K.W. (1978) Protein- associated DNA breaks in cells treated with adriamycin or ellipticine . *Biochem.Biophys.Acta.* 519 : 23-30 .
 18. Ross, W.E., Glaubiger, D.L. and Kohn, K.W. (1979) Qualitative and quantitative aspects of intercalator-induced DNA strand breaks . *Biochem.Biophys.Acta.* 562 : 41-50 .
 19. Nelson (1984) Mechanism of antitumor drug action : Poisoning of mammalian DNA topoisomerase II on DNA by 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfonamide . *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 81 : 1361-1365 .
 20. Gupta M., Fujimori A. and Pommier Y. (1995) Eucaryotic DNA topoisomerase I . *Biochem.Biophys.Acta.* 1262 : 1-14 .
 21. Yves, D., Pharm, D., Mark, R.F., Akira, F., Richard, B., Eric, S., Glenda, K. and Kurt, W.K. (1994) Cellular determinants of sensitivity and resistance to DNA topoisomerase inhibitors . *Cancer Investigation* 12 (5) : 530-542 .
 22. Wigley D.B., Davies G.J., Dodson E.J. and Maxwell A. (1991) . Crystal structure of an N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein . *Nature* 351 : 624-629 .
 23. Slichemeyer W.J., Rowinsky E.K., Donehower R.C. and Kaufmann S. H. (1993) The current status of camptothecin analogues as antitumor agents . *J.Nat'l Cancer Inst.* 85 : 271-291 .
 24. Dive C. and Hickman J.A. (1991) Drug-target interactions : only the first step in the commitment to a programmed cell death ? *Br.J.Cancer* 64 : 192-196 .
 25. Goldman A.S., Baker M.K., Piddington R. and Herold R. (1983)

Inhibition of programmed cell death in mouse embryonic palate in vitro by control and phenytoin receptor involvement and requirement of protein synthesis . Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 174 : 239-343 .

26. Bastow K.F. and Bori I.D. (1992) *Planta Med.* 59 : 240-245 .
27. Horwitz M., Horwitz S. (1971) Intracellular degradation of HeLa and adenovirus type 2 DNA induced by camptothecin . *Biochem.Biophys. Res.Comm.* 45 : 723-727 .
28. Horwitz S.B. (1973) Effects of camptothecin on the breakage and repair of DNA during the cell cycle . *Cancer Res.* 33 : 2834-2836 .
29. Spataro A., Kessel D. (1973) The effects of camptothecin on mammalian DNA . *Biochem.Biophys. Acta.* 331 : 194-201 .
30. Gottlieb J.A., Guarino A.M. and Call J.B. (1970) Preliminary pharmacologic and clinical evaluation of camptothecin sodium (NSC-100880) *Cancer Chemother. Rep* 54 : 461-470 .
31. Schaeppi U., Fleischman R.W. and Cooney D.A. (1974) Toxicity of camptothecin (NSC-100880) . *Cancer Chemother. Rep.* 5 : 25-36 .
32. Muggia E.M., Creaven P.J. and Hansen H. Phase I clinical trial of weekly and daily treatment with camptothecin (NSC-10080) : correlation with preclinical studies . *Cancer Chemother. Rep.* 56 : 515-521 .
33. Svejstrup J., Christiansen K. and Gromova I. (1991) New technique for uncoupling the cleavage and religation reactions of eukaryotic topoisomerase I : The mode of action of camptothecin at a specific 222 : 669-678 .
34. Porter S.E. and Champoux J.J. (1989) The basis for camptothecin enhancement of DNA breakage by eucaryotic topoisomerase I . *Nucleic Acid Res.* 17 : 8521- 8532 .
35. Jaxel C., Kohn K.W. and Pommier Y. (1988) Topoisomerase I interaction with DNA in the presence and absence of camp-

- tothecin . Nuclei Acid Res.16 : 11157- 11170 .
36. Leteurtre F.,Fujimori A.,Tanizawa A.,Chhabra A.,Mazumder A., Kohlhausen G.,Nakano H. and Pommier Y. (1994) J.Biol.Chem. 269 : 28702-28707 .
 37. Yoshinari T.,Yamada A.,Uemura D.,Nomura K.,Arakawa H., Kojiri K.,Yashida E.,Suda H. and Okura A. Cancer Res. 53 : 490-494 .
 38. Markovits J.,Larsen A.K.,Segal-Bendirdjian E.,Fossen P., Saucier J.M.,Gazit A.,Levitzki A.,Umezawa K. and Jacquemin-Sablon A. (1994) Inhibition of DNA topoisomerase I and II and induction of apoptosis by erbstatin and ryrphostin derivatives .
 39. Boege F.,Straub T.,Kehr A.,Boesenberg C.,Christiansen K., Andersen A.,Jakob F. and Kohrle J (1996) Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eucaryotic topoisomerase I . J.Biol.Chem.271 : 2262-2270 .
 40. Yoshinari T.,Yamada A.,Uemura D.,Nomura K.,Arakawa H., Kojiri K.,Yashida E.,Suda H. and Okura A (1993) Induction of topoisomerase I mediated DNA cleavage by a new indolocarbazole,ED-110 .
 41. Wyllie A.H. (1980) Glucocorticoid induced thymocyte apoptosis associated with endogenous activation . Nature 284 : 555-556 .
 42. Wyllie A.H.,Kerr J.F.R. and Currie A.R. (1980) Cell death : the significance of apoptosis . Int.Rev.Cytol. 68 : 251-306 .
 43. Schwartzman R.A. and Cidlowski J.A. (1993) Apoptosis : the biochemistry and molecular biology of programmed cell death . Endocrine Rev. 14 : 133-151 .
 44. Cohn J.J. and Duck R.C. (1984) Glucocorticoid activation of a calcium dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death . J.Immunol. 132 : 38-42 .
 45. Martin S.T.,Lennon S.V.,Bonham A.M. and Cotter T.G. (1990)

- Induction of apoptosis (programmed cell death) in human leukemia HL-60 cells by inhibition of RNA or protein synthesis . J.Immunol. 145 : 1859-1867 .
46. Cohn G.M.,Sun X.M.,Snowden R.T.,Dinsdale D. and Skilleter D. N. (1992) Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation . Biochem.J.286 : 331-334 .
 47. Oberhammer F.,Fitsch G.,Schmied M.,Pavelka M.,Printz D., Purchio T.,Lassmann H. and Schulte-Hermann R. (1993) Condensation of the chromatin in the membrane of an apoptotic nucleus is not associated with activation of an endonuclease . J.Cell.Sci . 104 : 317-326 .
 48. Sun X.M.,Snowden R.T.,Skilleter D.N.,Dinsdale D.,Ormerod M.G. and Cohan G.M. (1994) Change in nuclear chromatin precede internucleosomal DNA cleavage in the induction of apoptosis by etoposide . Biochem.Pharmacol.47 : 187-195 .
 49. Bicknell G.R.,Snowden R.T. and Cohen G.M. (1994) Formation of high molecular mass DNA fragments is a marker of apoptosis in the human leukaemic cell line ' U937 . J.Cell Science 107 : 2483-2489 .
 50. Boise L.H.,Gonzalez-Garcia M.,Posteman C.E.,Ding L.,Lindston T.,Turka L.A., Mao X.,Nunez G. and Thompson C.B. (1993) bcl-x , a bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptosis cell death . Cell 74 : 597-608 .
 51. Lin E.Y.,Orloffsky A.,Berger M.S. and Prystowsky M.B. (1993) Characterization of A1 , a novel hemopoietic specific early response gene with sequence similarity to bcl-2 . J.Immunol. 151 : 1979-1988 .
 52. Kozopas K.M.,Yang T.,Bunchan H.L.,Zhou P. and Craig R.W. (1993) MCL1 , a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation , has sequence similarity to BCL-2 . Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A. 90 : 3516-3520 .

53. Oltrai Z.N., Milliman C.L. and Korsmeyer S.J. (1993) BCL-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog 'Bax' that accelerated programmed cell death. Cell 74 : 609-619 .
54. Lowe S.W., Schmitt E.M., Smith S.W., Osborne B.A. and Jacks T. (1993) p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. Nature 362 : 847-849 .
55. Lee J.M. and Bernstein A. (1993) p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 90 : 5742-5746 .

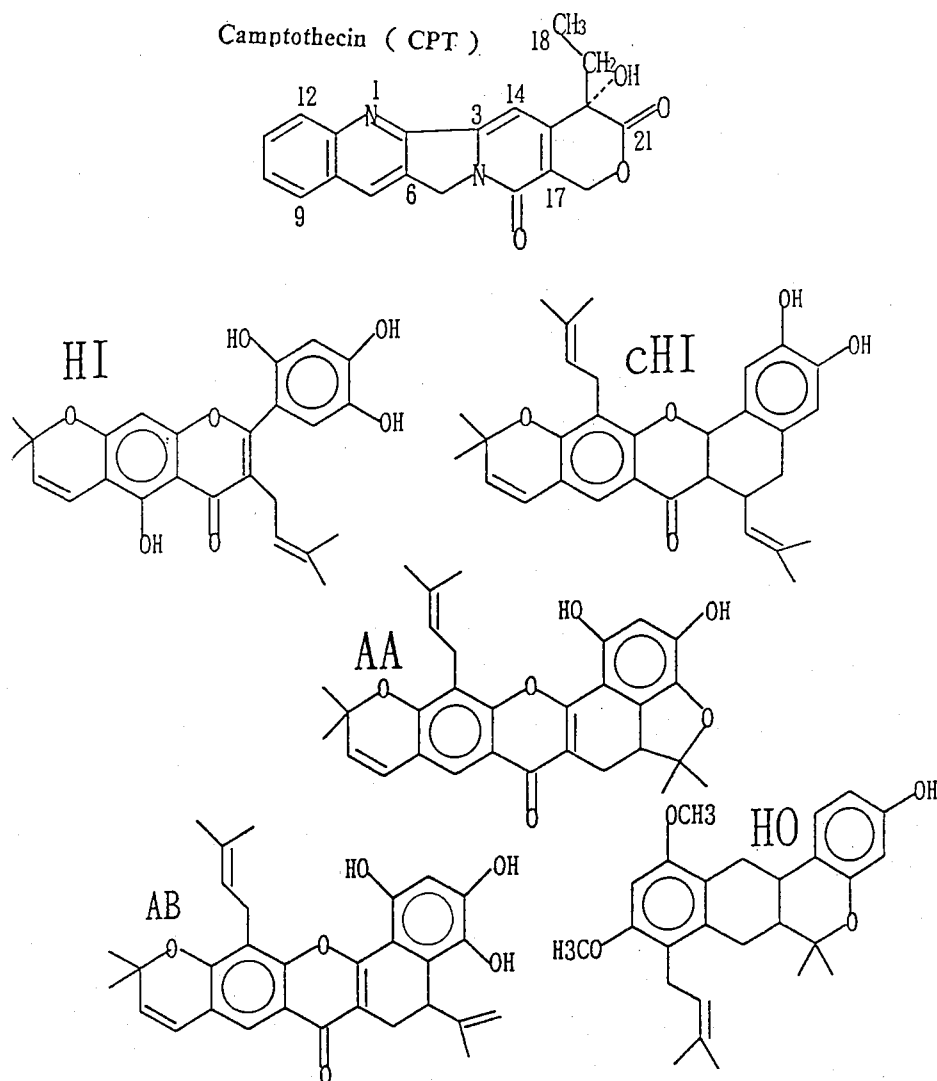


Fig.1 Structure formulae of camptothecin and compounds purified from *Artocarpus heterophyllus* .

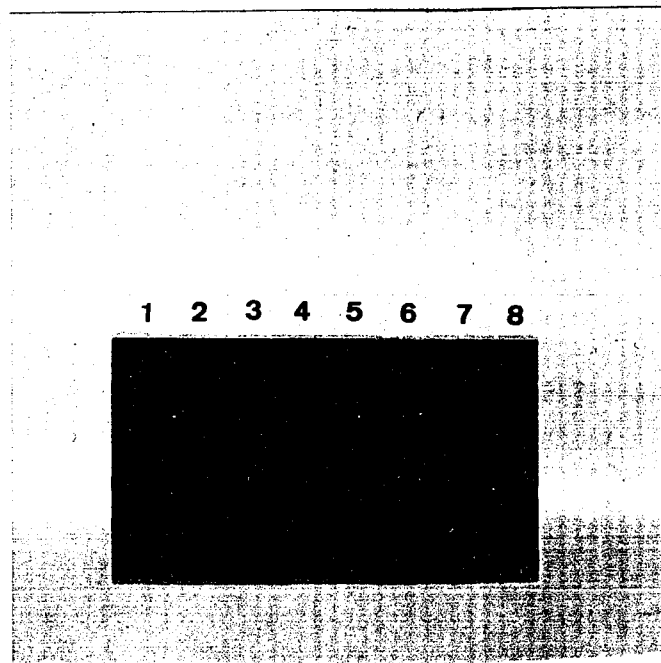


Fig.2 Inhibitory effects of five compounds purified from *Artocarpus heterophyllus* on the topoisomerase I activity . Lane 1 pBR322 DNA was incubated without topoisomerase I . Lane 2 pBR322 DNA was incubated with topoisomerase I in presence camptothecin (10 ug/ml) . Lane 3-7 pBR322.DNA were incubated with topoisomerase I in presence 10 ug/ml purified compounds (cHI , HI , AA , AB , and HO) . Lane 8 pBR322 DNA was incubated with topoisomerase I alone .

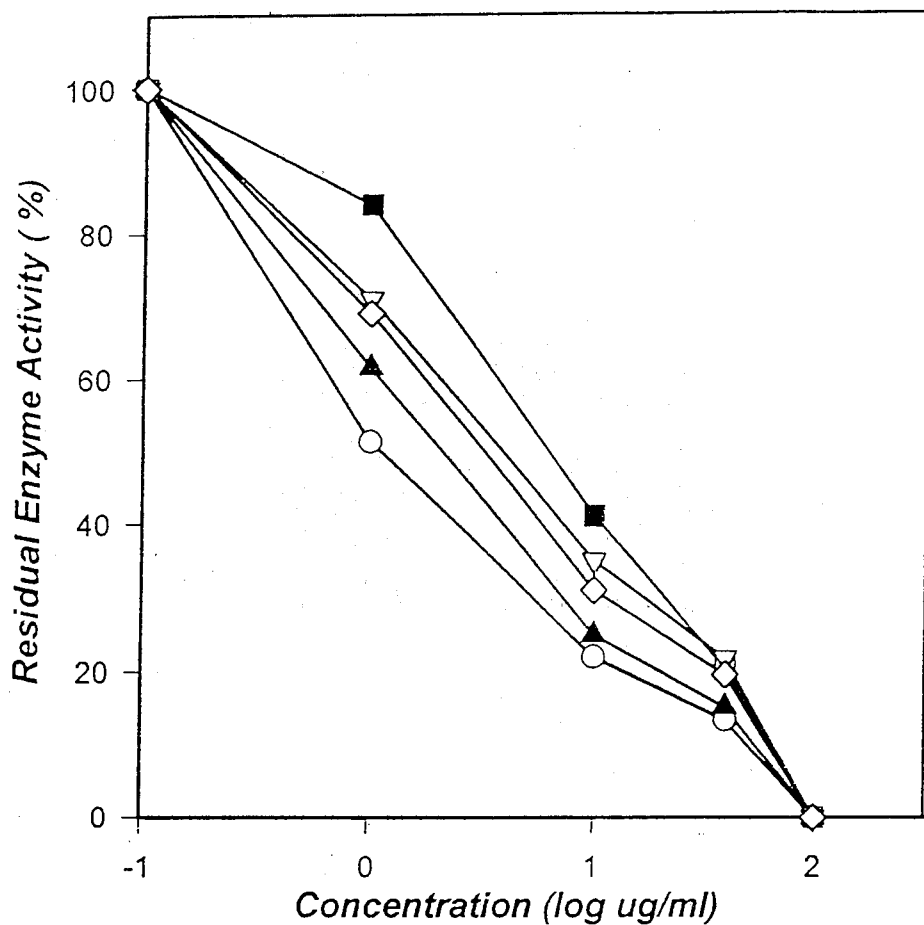
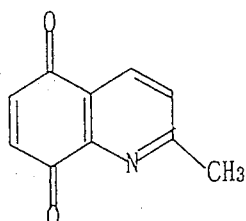
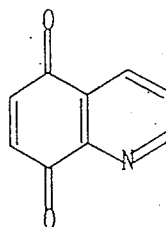


Fig. 3 Inhibitory effects of various concentrations four compounds purified from *Artocarpus heterophyllus* on the topoisomerase I activity .
 camptothecin -○-, cHI -□-, AA -▲-, AB -△-, HI -■-

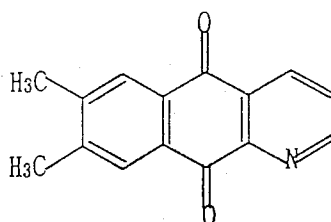
KCHAO-01



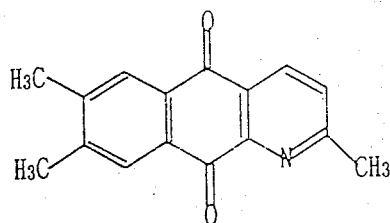
KCHAO-02



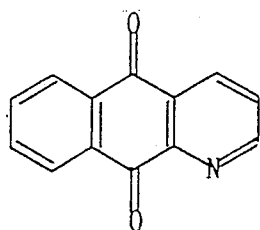
KCHAO-03



KCHAO-04



KCHAO-07



KCHAO-08

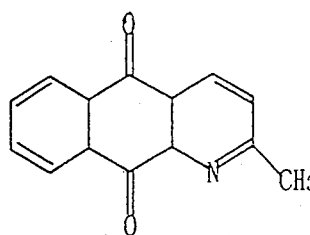
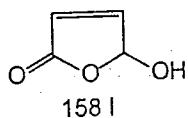
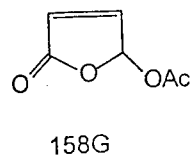


Fig. 4 Structure formulae of synthetic quinolone derivatives °

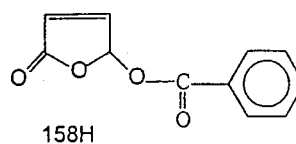
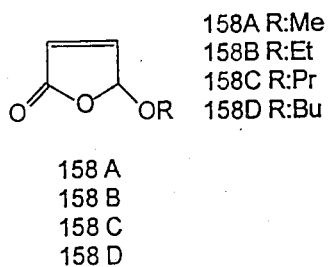
(Fig. 4. continue)



(註：158 I 極易潮解。)

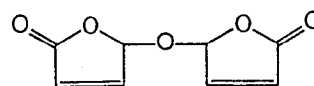


158 G = 4-acetoxybutenolide



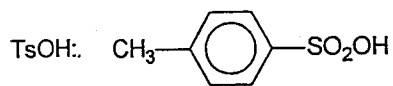
158 H = 4-benzoyloxybutenolide

- 158 A R=CH₃(4-methoxybutenolide)
B R=CH₂CH₃(4-ethoxybutenolide)
C R=(CH₂)₂CH₃(4-propoxybutenolide)
D R=(CH₂)₃CH₃(4-butoxybutenolide)

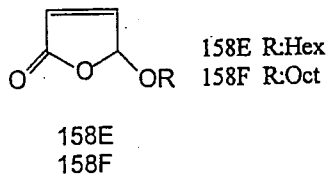


159 A erythroform
159 B threoform

註：



p-toluenesulfonic acid



158 E = 4-hexoxybutenolide

158 F = 4-octoxybutenolide

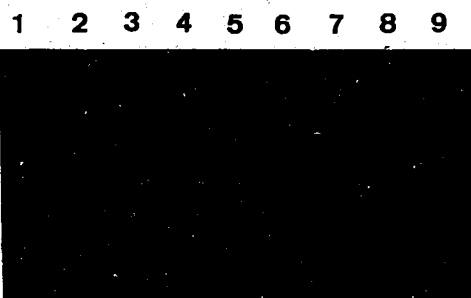


Fig.5 Inhibitory effects of six synthetic quinolone derivatives on the topoisomerase I activity . Lane 1 pBR322 DNA was incubated without topoisomerase I . Lane 2 pBR322 DNA was incubated with topoisomerase I in presence camptothecin (10 ug/ml) . Lane 3-8 pBR322 DNA were incubated with topoisomerase I in presence 10 ug/ml synthetic quinolone derivatives (K1 , K2 , K3 , K4 , K7 and K8) . Lane 9 pBR322 DNA was incubated with topoisomerase I alone .

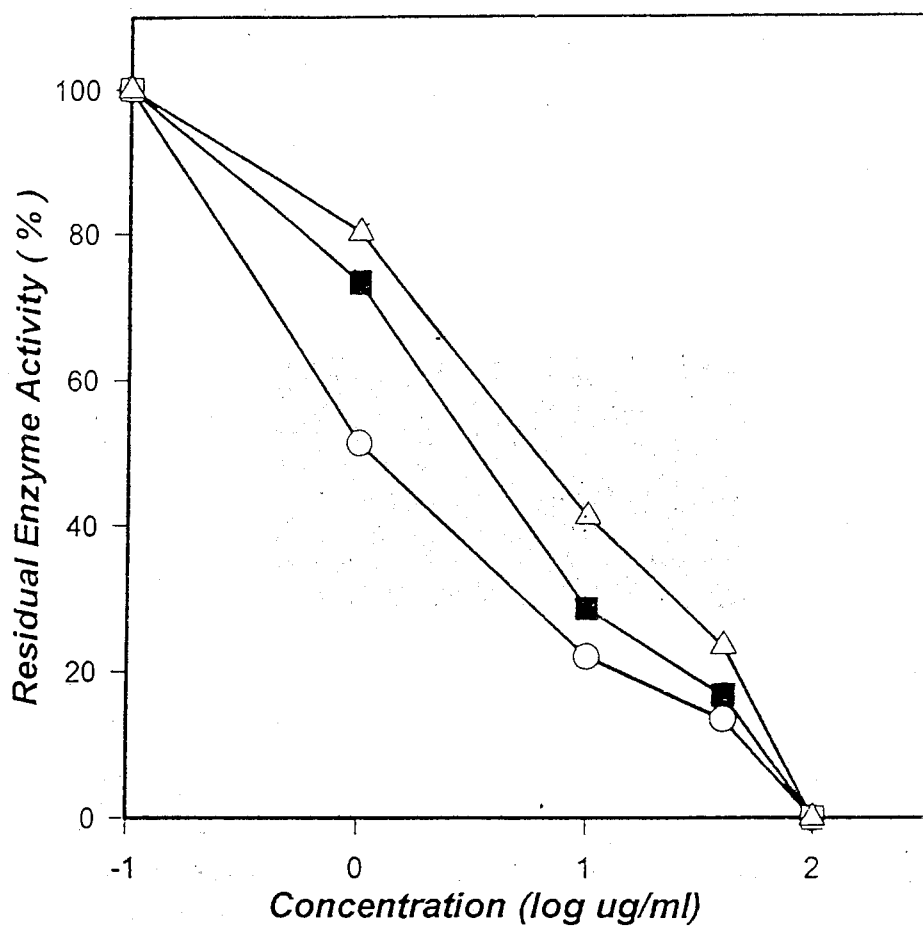


Fig.6 Inhibitory effects of various concentrations two synthetic quinolone derivatives on the topoisomerase I activity .
camptothecin -○-, K1 -◆-, K2 -△- .

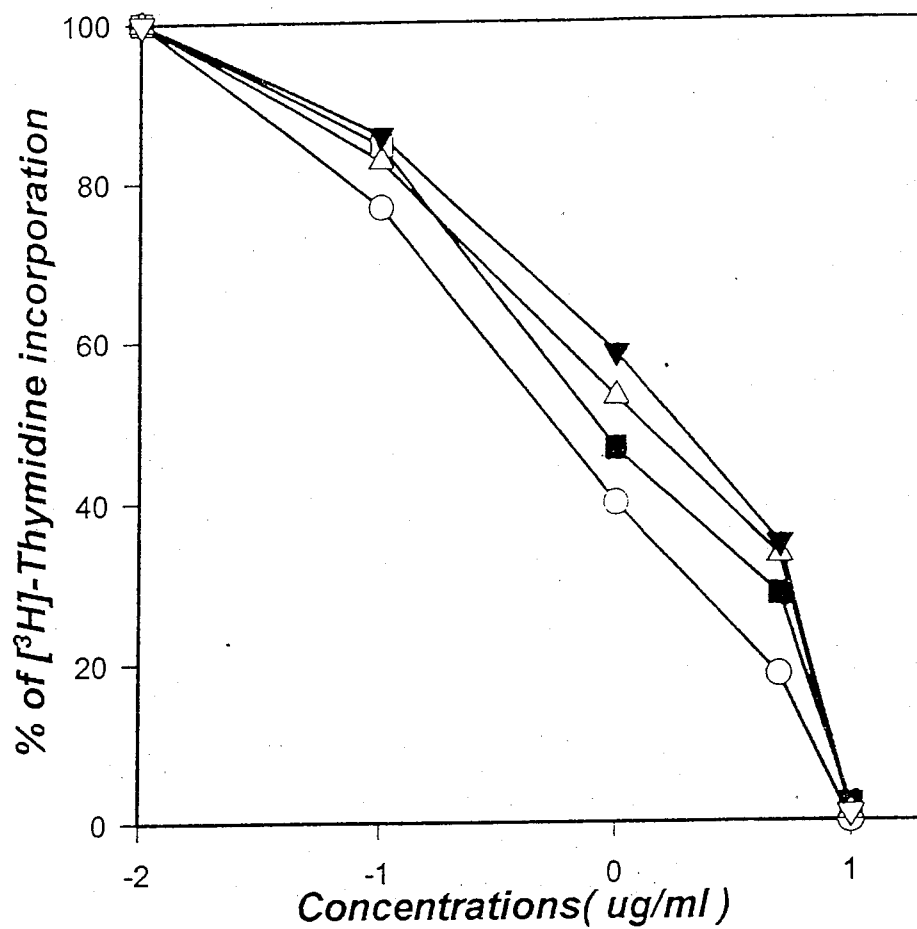


Fig.7 Inhibitory effects of compounds cHI , HI , and AA purified from *Artocarpus heterophyllus* on the DNA biosynthesis of HL-60 cells .
camptothecin -○- , cHI -◆- , AA -△- , HI -▲- .

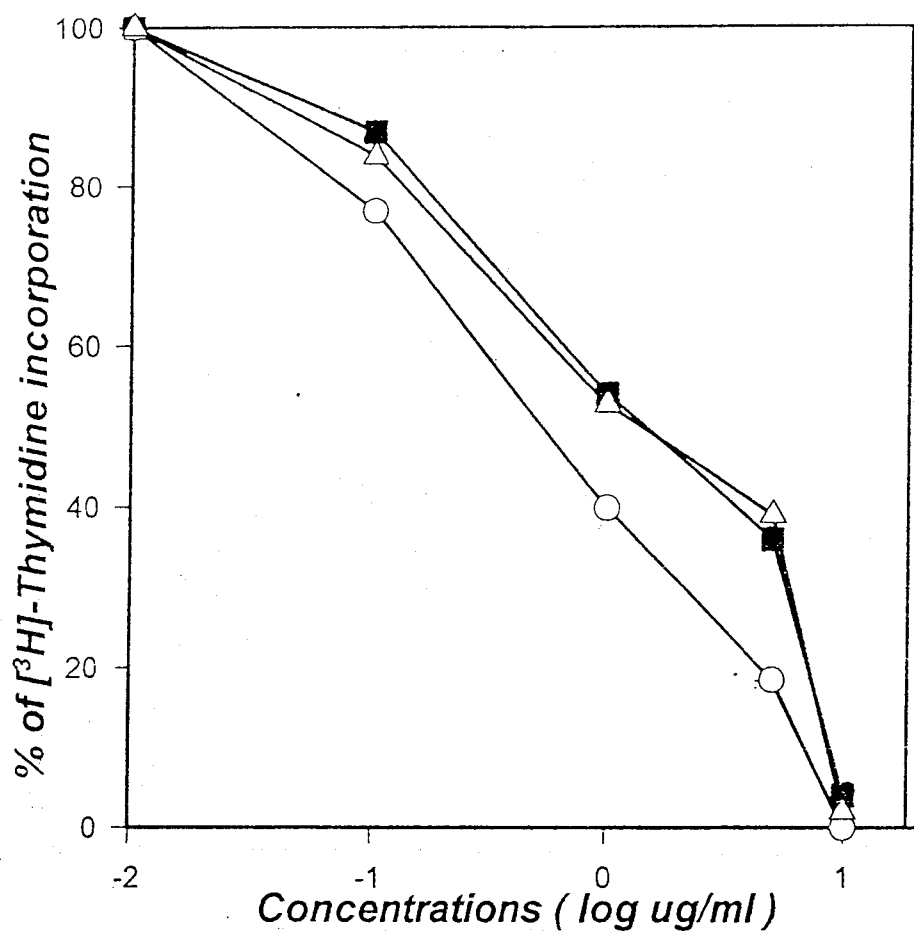


Fig. 8 Inhibitory effects of synthetic quinolone derivatives K1 and K2 on the DNA biosynthesis of HL-60 cells .
 camptothecin -○-, K1 -◆-, K2 -△-

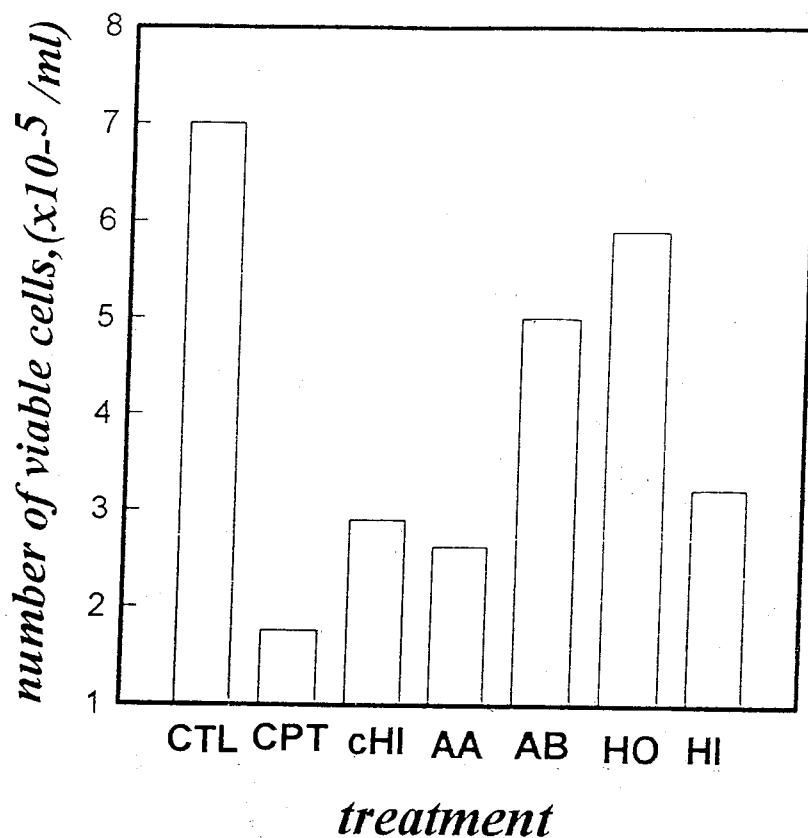


Fig. 9 Effects of five compounds (10 ug/ml) purified from *Artocarpus heterophyllus* on the cell viability of HL-60 cells .

Compounds were added to exponentially growing cultured HL-60 cells .

After 24 h , the aliquots of drug-treated and untreated control cells were taken and stained with trypan blue . The viable cells was determined by counting with a hemacytometer .

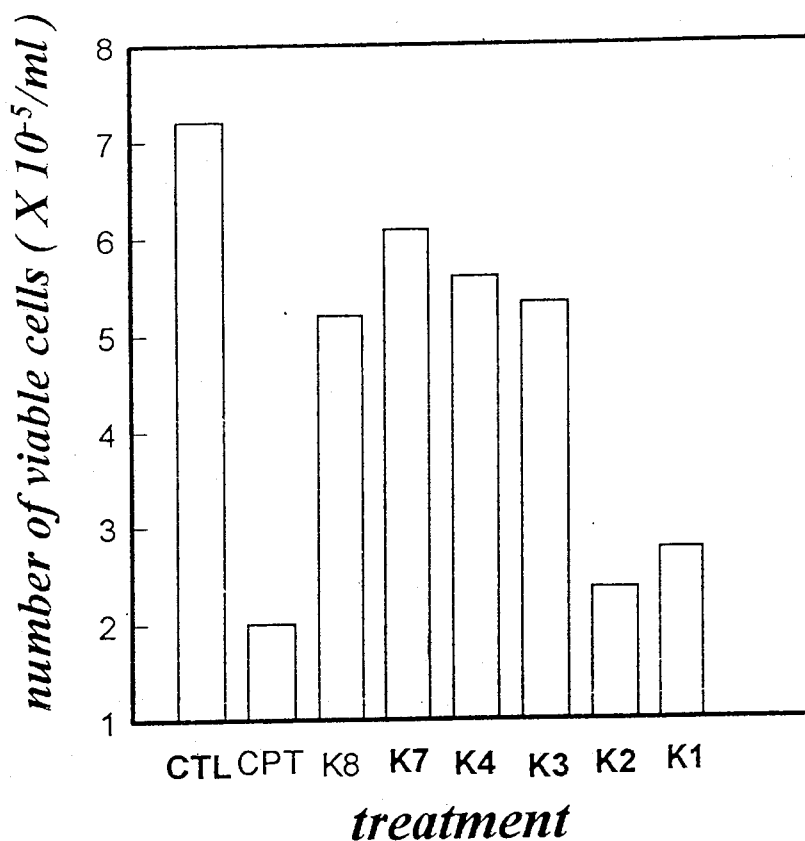


Fig. 10 Effects of six synthetic quinolone derivatives (10 ug/ml) on the cell viability of HL-60 cells .

Compounds were added to exponentially growing cultured HL-60 cells

After 24 h , the aliquots of drug-treated and untreated control cells were taken and stained with trypan blue . The viable cells was determined by counting with a hemacytometer .

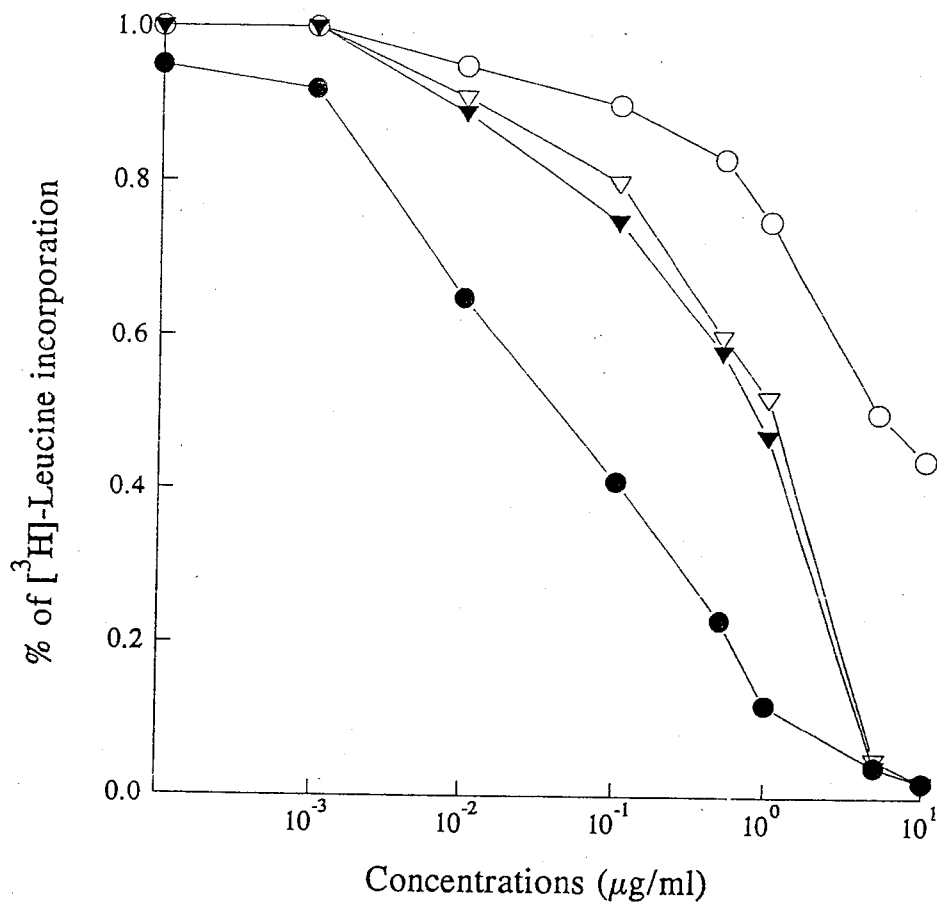


Fig.11 Effect of 158G, 159A and 159B on the protein biosynthesis in Hela cell in the presence of various concentrations.

○ Doxorubicin; ● 158G; ▽ 159A; ▼ 159B.

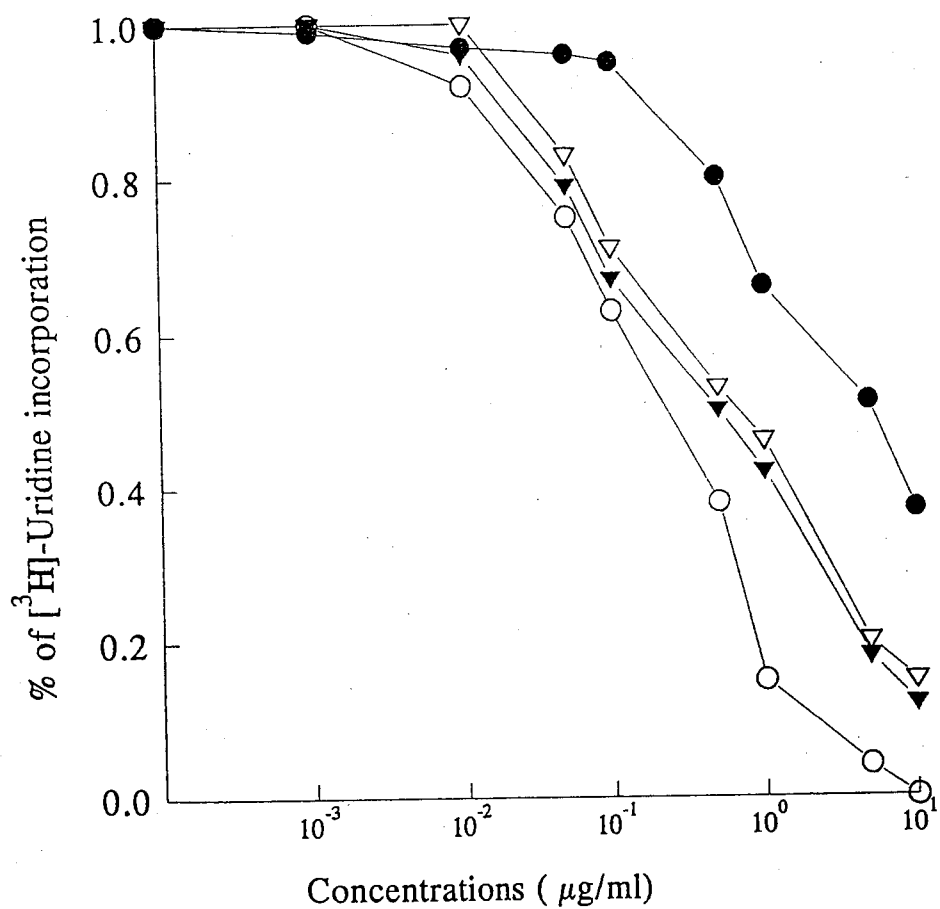


Fig. 12. Effect of 158G, 159A and 159B on the RNA biosynthesis in HeLa cells in the presence of various concentrations.

○ Doxorubicin; ● 158G; ▽ 159A; ▼ 159B

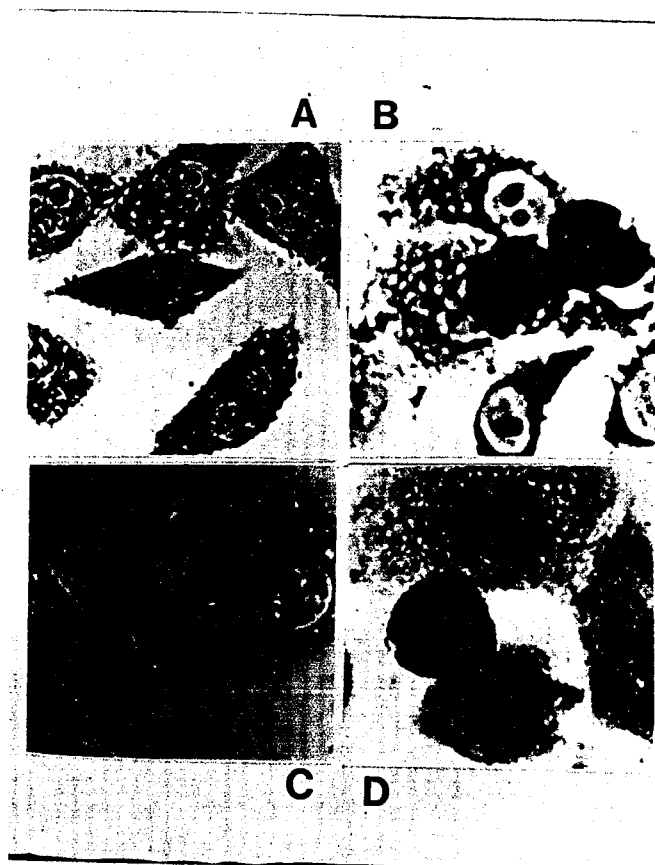


Fig. 13 Effects of CPT , cHI , and K1 (10 ug/ml) compounds on the morphological changes of HeLa cells . The HeLa cells were treated with the solvent as a control (A) , camptothecin (B) and drugs (K1 and cHI) (C , D) , then incubated in drug free medium for 24 h . The cells were harvested and stained with Wright/Giesma . Apoptotic cells (ap) are present in B and D .

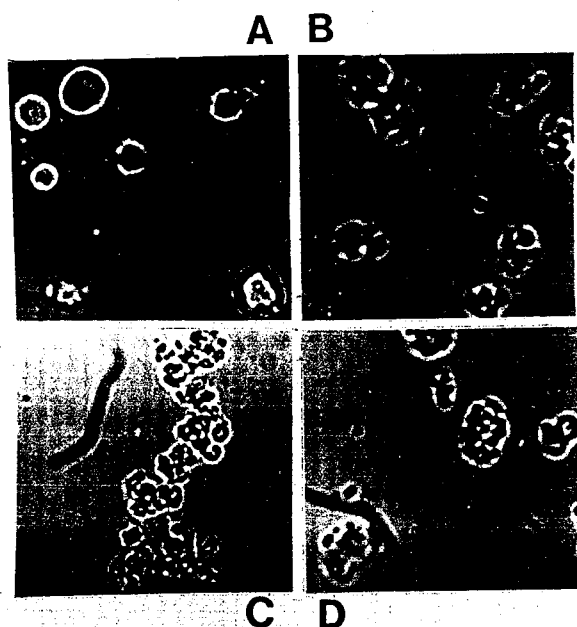


Fig.14 Effects of CPT , cHI , and K1 (10 ug/ml) compounds on the morphological changes of HL-60 cells . The HL-60 cells were treated with the solvent as a control (A) , camptothecin (B) and drugs (cHI and K1) (C , D) , then incubated in drug free medium for 24 h . The cells were harvested and stained with Wright/Giesma . Apoptotic cells (ap) are present in B ,C and D .

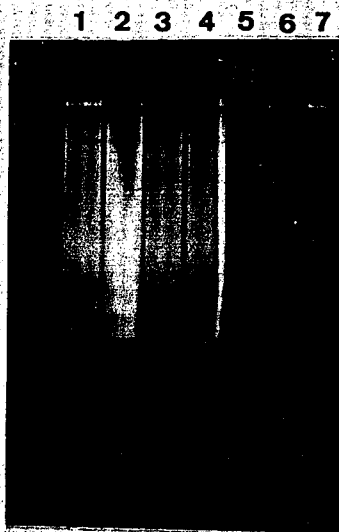


Fig. 15 1.5 % Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from HL-60 cells treated with five compounds (10 ug/ml) purified from *Artocarpus heterophyllus* for 24 h . Lane 1 , DNA from camptothecin treated cells . Lane 2-6 , DNA from cHI , HI , AA and AB treated cells . Lane 7 , DNA from untreated cells .

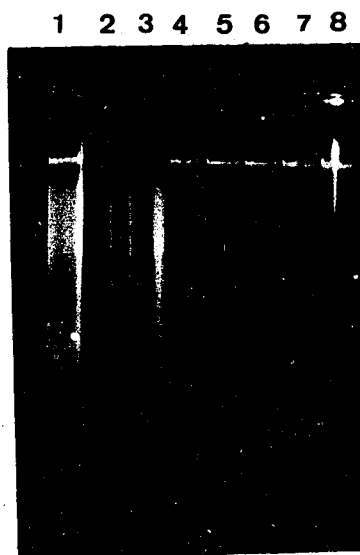


Fig.16 1.5 % Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from HL-60 cells treated with six synthetic quinolone derivatives (10 ug/ml) . Lane 1 , DNA from camptothecin treated cells . Lane 2-7 , DNA from K1 , K2 , K3 , K4 , K7 and K8 treated cells . Lane 8 , DNA from untreated cells .

Table 1. IC₅₀ of compounds for inhibiting the topoisomerase I activity .

compound	IC ₅₀ , μ M
HI	20.1
cHI	3.87
AA	3.54
AB	5.99
K1	20.23
K2	29.56
CPT	2.29

Table 2. Effects of compounds (10 ug/ml) purified from *Artocarpus heterophyllus* on the viability of HL-60 cells .

compound	viability , %
HI	46
cHI	41.4
AA	37.4
AB	71.7
HO	84.3
CPT	25.1

Table 3. Effects of synthetic quinolone derivatives (10 ug/ml) on the viability of HL-60 cells .

compound	viability , %
K1	38.3
K2	32.8
K3	74
K4	77.8
K7	84.4
K8	72.7
CPT	27.8

Table 4. IC₅₀ of compounds for inhibiting DNA biosynthesis of HL-60 cells .

compound	IC ₅₀ , μ M
HI	5.91
cHI	1.81
AA	2.94
K1	9.19
K2	9.31
CPT	1.54

Table 5. IC₅₀ of synthetic quinolone derivatives for inhibiting reverse transcriptase activity .

compound	IC ₅₀ , μ M
K1	38.73
K2	47.17

Table 6. Inhibition of growth of HeLa cells in nude mice by I.V. treatment with antitumor drug Doxorubicin (Doxorubicin).

Treatment dose (μ g)	Tumor size (mm ²)	Inhibition of tumor growth (%)
0	89.1	-
250	34.7	60.2

2×10^5 HeLa cells were inoculated subcutaneous into each nude mouse. Four days after tumor inoculation, they were given I.V. treatment every four days for two weeks in the doses indicated. Twenty days after, tumor size were measured and the tumors were expressed as the mean obtained from length (mm) \times width (mm) of the solid tumors. Each value represents the mean of 3 mice.

Table 7. Inhibition of growth of HeLa cells in nude mice by intralesional treatment with antitumor drug 158G.

Treatment dose (μg)	Tumor size (mm^2)	Inhibition of tumor growth (%)
0	88.4	-
10	85.7	3.1
50	48.4	45.2
250	45.9	48.1
500	43.1	51.2
1000	35.3	60.1

2×10^5 Hela cells were inoculated subcutaneous into each nude mouse. Four days after tumor inoculation, they were given intralesional treatment every four days for two weeks in the doses indicated. Twenty days after, tumor size were measured and the tumors were expressed as the mean obtained from length (mm) \times width (mm) of the solid tumors. Each value represents the mean of 3 mice.

Table 8. Inhibition of growth of HeLa cells in nude mice by I.V. treatment with antitumor drug 158G.

Treatment dose (μg)	Tumor size (mm^2)	Inhibition of tumor growth (%)
0	81.2	-
500	52.0	36.1

2×10^5 Hela cells were inoculated subcutaneous into each nude mouse. Four days after tumor inoculation, they were given I.V. treatment every four days for two weeks in the doses indicated. Twenty days after, tumor size were measured and the tumors were expressed as the mean obtained from length (mm) \times width (mm) of the solid tumors. Each value represents the mean of 3 mice.

Table 9. Inhibition of growth of HeLa cells in nude mice by intralesional treatment with antitumor drug 159A.

Treatment dose (μg)	Tumor size (mm^2)	Inhibition of tumor growth (%)
0	85.6	-
10	75.3	11.2
50	58.2	32.3
250	34.2	60.2
500	25.5	69.2
1000	22.8	73.4

2×10^5 Hela cells were inoculated subcutaneous into each nude mouse. Four days after tumor inoculation, they were given intralesional treatment every four days for two weeks in the doses indicated. Twenty days after, tumor size were measured and the tumors were expressed as the mean obtained from length (mm) \times width (mm) of the solid tumors. Each value represents the mean of 3 mice.

Table 10. Inhibition of growth of HeLa cells in nude mice by I.V. treatment with antitumor drug 159A.

Treatment dose (μg)	Tumor size (mm^2)	Inhibition of tumor growth (%)
0	84.3	-
250	43.8	52.0

2×10^5 Hela cells were inoculated subcutaneous into each nude mouse. Four days after tumor inoculation, they were given I.V. treatment every four days for two weeks in the doses indicated. Twenty days after, tumor size were measured and the tumors were expressed as the mean obtained from length (mm) \times width (mm) of the solid tumors. Each value represents the mean of 3 mice.

Table 11. Inhibition of growth of HeLa cells in nude mice by intralesional treatment with antitumor drug 159B.

Treatment dose (μg)	Tumor size (mm^2)	Inhibition of tumor growth (%)
0	80.1	-
10	71.9	10.2
50	51.3	36.1
250	32.4	59.6
500	28.8	64.1
1000	22.3	71.2

2×10^5 HeLa cells were inoculated subcutaneous into each nude mouse. Four days after tumor inoculation, they were given intralesional treatment every four days for two weeks in the doses indicated. Twenty days after, tumor size were measured and the tumors were expressed as the mean obtained from length (mm) \times width (mm) of the solid tumors. Each value represents the mean of 3 mice.

Table 12. Inhibition of growth of HeLa cells in nude mice by I.V. treatment with antitumor drug 159B.

Treatment dose (μg)	Tumor size (mm^2)	Inhibition of tumor growth (%)
0	87.2	-
250	45.5	48.0

2×10^5 HeLa cells were inoculated subcutaneous into each nude mouse. Four days after tumor inoculation, they were given I.V. treatment every four days for two weeks in the doses indicated. Twenty days after, tumor size were measured and the tumors were expressed as the mean obtained from length (mm) \times width (mm) of the solid tumors. Each value represents the mean of 3 mice.

活血化癥中藥成份對人類前列腺肥大組織之藥效評估

鄧 哲 明

國立臺灣大學醫學院

中文摘要

本研究目的是要來探討經由活血化癥的中藥及半合成成份中篩選出的 α_1 -腎上腺受體拮抗劑，對於人類前列腺肥大組織的藥理作用及其藥效評估；本研究探討其中之 N-allylsecoboldine、(-)-discretamine、(±)-govadine、(±)-THP 及 N-methyl-actinodaphnine 等五種藥物，以前列腺肥大組織的張力收縮、電場刺激及 [3H]noradrenaline 釋放等實驗來研究藥物的作用強度及其機轉為何。這五種藥物都能夠以濃度有關的方式來抑制 PE 以及電場刺激所引發的前列腺組織的收縮作用，其拮抗 PE 的 pA_2 值分別為 5.74 ± 0.11 、 6.57 ± 0.07 、 6.07 ± 0.07 、 6.02 ± 0.05 及 6.91 ± 0.09 ；其對抗電場刺激的 pIC_{50} 值分別為 5.78 ± 0.07 、 5.99 ± 0.02 、 5.53 ± 0.10 、 5.50 ± 0.03 及 6.07 ± 0.06 。由以上結果知道，上述五種藥物對於電場刺激與 PE 所引發收縮作用的抑制強度之比值分別為 4.1、1.0、1.1、1.1 及 0.5。若以大鼠輸精管及脾臟的收縮作用分別做為 α_{1A} -以及 α_{1B} -腎上腺受體亞型的實驗模式，則 N-allylsecoboldine、(-)-discretamine、(±)-govadine、(±)-THP 及 N-methyl-actinodaphnine 對於 α_1 -腎上腺受體作用劑所引發大鼠輸精管收縮的抑制作用強度，分別為其在大鼠脾臟之抑制強度的 7.78、0.76、0.57、0.96 以及 0.20 倍。另一方面的實驗，以 $0.3 \mu M$ prazosin 來抑制與 α_1 -腎上腺受體有關的作用後，以高鉀溶液 (60 mM) 來引發前列

腺組織的收縮作用，這五種藥物皆不能明顯抑制高鉀溶液所引發的收縮作用；而 nifedipine ($10\ \mu\text{M}$) 則幾乎完全抑制高鉀溶液所引發的收縮作用，證明上述五種藥物對於人類前列腺組織的 dihydropyridine-sensitive 鈣離子通道沒有明顯的抑制作用。對於電場刺激所引發 $[^3\text{H}]$ NA 的釋放反應，是以第三次 (S_3) 與第二次 (S_2) 電場刺激所引發的 $[^3\text{H}]$ NA 釋放作用的比值 (S_3/S_2)，來探討藥物的抑制作用；結果顯示上述五種藥物對於電場刺激所引發 $[^3\text{H}]$ NA 的釋放反應都沒有明顯的抑制作用，其 S_3/S_2 比值分別為 0.92 ± 0.01 、 0.90 ± 0.02 、 0.92 ± 0.01 、 0.94 ± 0.01 以及 0.90 ± 0.01 。由以上結果知道，這五種 α_1 -受體結抗劑在人類前列腺組織皆有拮抗 PE 與電場刺激所引發的收縮作用；相對於 prazosin 而言，N-allylsecoboldine 對於電場刺激的抑制作用比其對於 PE 的抑制作用強，而 N-methyl-actinodaphnine 則是對於 PE 的抑制作用較強，可能是由於 N-allylsecoboldine 與 N-methyl-actinodaphnine 分別對於 α_{1A} -及 α_{1B} -腎上腺受體亞型有較高選擇性的結果。而活化 α_{1A} -腎上腺受體亞型正是交感神經興奮引發前列腺肥大組織收縮的主要機轉，因此，N-allylsecoboldine 在前列腺肥大症上較有其發展性。

關鍵字：前列腺肥大症；電場刺激； α_1 -腎上腺受體亞型

ABSTRACT

The perspective of this study is to investigate the effects of several α_1 -adrenoceptor antagonists, including N-allylsecoboldine, (-)-discretamine, (\pm)-govadine, (\pm)-THP and N-methyl-actinodaphnine which were obtained from Chinese herbs or semisynthetic products, in human hyperplastic prostates. This study was carried out via tension experiments, electrical field stimulation and $[^3\text{H}]$ noradrenaline release reaction in human prostatic tissues. The results showed that all of these agents inhibited concentration-dependently the tension responses to phenylephrine (PE) and electrical field stimulation; the pA_2 values to PE were 5.74 ± 0.11 , 6.57 ± 0.07 , 6.07

± 0.07 , 6.02 ± 0.05 and 6.91 ± 0.09 , respectively. The pIC_{50} values of the above five agents to electrical field stimulation were 5.78 ± 0.07 , 5.99 ± 0.02 , 5.53 ± 0.10 , 5.50 ± 0.03 and 6.07 ± 0.06 , respectively. The potency ratios N-allylsecoboldine, (-)-discretamine, (\pm)-govadine, (\pm)-THP and N-methyl-actinodaphnine against contractions to field stimulation and that to PE were 4.1, 1.0, 1.1, 1.1 and 0.5, respectively. In addition, the potency ratios of these five agents against α_1 -adrenoceptor agonist-induced contractions in rat vas deferens and that in rat spleen were 7.78, 0.76, 0.57, 0.96 and 0.20. In the presence of prazosin ($0.3 \mu M$) to block α_1 -adrenoceptor-mediated responses, nifedipine ($10 \mu M$), but not the five α_1 -adrenoceptor blockers, significantly blocked KC1 ($60 mM$)-induced tension responses in human prostates. The effects of prazosin, N-allylsecoboldine, (-)-discretamine, (\pm)-govadine, (\pm)-THP and N-methyl-actinodaphnine on electrical field stimulation-induced [3H]NA release were studied on the S_3/S_2 ratios; the data showed that they all had little effect on this release reaction with the S_3/S_2 ratios of 0.92 ± 0.01 , 0.90 ± 0.02 , 0.92 ± 0.01 , 0.94 ± 0.01 and 0.90 ± 0.01 , respectively. These data reveal that N-allylsecoboldine exhibits greater potency against contraction to electrical field stimulation than that to PE, while N-methyl-actinodaphnine has greater potency against PE-induced contraction than that to electrical field stimulation in human prostate. It is due mainly to the high affinities of N-allylsecoboldine and N-methyl-actinodaphnine for the α_{1A} - and α_{1B} -adrenoceptor subtypes, respectively. It has been suggested that the activation of α_{1A} -adrenoceptor subtype is the major action mechanism for the contraction elicited by the excitation of adrenergic nerves in human hyperplastic prostate, and it shows that N-allylsecoboldine has the potential in the treatment of benign prostatic hyperplasia.

Keywords: Benign prostatic hyperplasia; Electrical field stimulation; α_1 -Adrenoceptor subtype.

前言

良性前列腺肥大 (benign prostatic hyperplasia, BPH) 是中老年男性最常見的疾病之一。由醫學上的前列腺切除術 (prostatectomy), 或是屍體解剖 (autopsy) 的研究報告指出, 前列腺組織的增生早在 30 歲以前便已開始了 (Berry et al., 1984), 而 BPH 的發生率隨著年齡的增加而增加; 由組織學的研究發現, 60 歲的男性約有 50% 的發生率; 而 80 歲的男性, 其發生率更超過了 80% (Berry et al., 1984; Isaacs and Coffey, 1989), 由此可知其嚴重性。BPH 的臨床症狀主要分為兩類, 一類為阻塞性症狀 (obstructive symptoms), 另一類為刺激性症狀 (irritative symptoms), 而經由交感神經的刺激, 進而活化組織平滑肌細胞的 α -腎上腺受體, 導致肌肉收縮張力的增加, 乃為造成 BPH 患者尿路的阻塞的動態 (dynamic) 因素, 因此, 其主要治療藥物有 α_1 -腎上腺受體拮抗劑。

截至目前為止, 至少有三種 α_1 -腎上腺受體亞型被發現, 包括 α_{1A} -、 α_{1B} -及 α_1 -腎上腺受體亞型 (Cotecchia et al., 1988; Han et al., 1987; Lomasney et al., 1991; Aboud et al., 1993; Perez et al., 1991)。Chapple 等人 (1991) 認為, 在人類前列腺組織主要為 α_{1B} -腎上腺受體亞型, 而 Lepor 等人 (1993) 及 Testa 等人 (1993) 則利用放射線標定物的結合試驗, 認為在人類前列腺組織主要為 α_{1A} -腎上腺受體亞型; 此外, 經由本實驗室的研究發現, 人類前列腺組織的交感神經興奮所釋放出的 noradrenaline (NA), 主要是作用於 α_{1A} -腎上腺受體亞型 (Guh et al., 1995a)。

近年來, 本實驗室發現了多種植物成份及化學合成物, 具有拮抗 α_1 -腎上腺受體的作用 (Ko et al., 1993, 1996; Yu et al., 1994; Guh et al., 1995b), 因此, 本研究設計了一連串的實驗模式, 對這些 α_1 -腎上腺受體拮抗劑做一探討, 以研究出其對人類前列腺組織的作用情形, 並進而了解其對於 α_1 -腎上腺受體亞型的選擇性。

實驗材料與方法

實驗材料

N-allylsecoboldine 是經由植物成份 boldine 修飾而來，由臺大醫學院藥學系李水盛教授提供；(-)-Discretamine 與 N-methyl-actinodaphnine 分別是由白葉瓜馥木 (*Fissistigma glaucescens*) (Lu et al., 1985) 與呂宋青藤 (*Illigera luzonensis*) 所分離出的成份，由高雄醫學院藥學系吳永昌教授提供；(±)-Govadine 與 (±)-THP [(±)-2, 3, 10, 11-tetrahydroxy-tetrahydroprotoberberine HBr] 為兩種 tetrahydroprotoberberine 生物鹼，由臺北醫學院藥學系陳繼明教授提供 (Fig. 1)。

Krebs 溶液 (pH 7.4) 的組成如下 (mM)：NaCl 118.4、KCl 4.7、MgSO₄ · 7H₂O 1.2、KH₂PO₄ 1.2、NaHCO₃ 25.0、CaCl₂ 1.9 以及 glucose 11.7；此外，Krebs 溶液內含有 1 μM propranolol。Prazosin HCl、boldine 以及 nifedipine 是購自 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA；CEC 以及 5-MU 是購自 Research Biochemicals, Natick, MA, USA；PE 是購自 Demarks Apotekerforening, Copenhagen；1-(7, 8)-[³H]NA (specific activity: 12.0 Ci/mmol) 是購自 Amersham International, UK。藥物若溶在 DMSO，則 DMSO 作用於組織的濃度為 0.1%，而且對於組織的收縮不會有影響。

實驗方法

人類前列腺組織的收縮

人類前列腺組織是取自前列腺肥大患者 (年齡為 55 到 80 歲)，經開放性前列腺切除術 (open prostatectomy) 或是經尿道前列腺刮除術 (TURP) 所取得；所有患者皆有前列腺肥大病史，而且經由肛門指診、經肛門前列腺超音波檢查以及尿路動力學試驗等診斷確定患有良性前列腺肥大症。組織檢體取得後，將其表層電燒部份小心剪除，並剪成一條薄片約 3x15 mm 長，將其裝置於浴器中，一端綁在 L 型的固定架上，另一端接到 force-displacement transducer (Grass, model 7DAG)，然後將其固定於含有 5 ml Krebs 溶液的浴器中，給予 1 g 的靜止張力及通以 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合氣，於 37°C 下平衡 90 分鐘之後，在

拮抗劑或抑制劑的存在與否下，以各種濃度的 NA 來使組織做連續性的收縮而得到濃度-反應曲線，藉以求得各拮抗劑或抑制劑對組織的 pA_2 值以及抑制作用的強度。電場刺激是用電刺激器 (Grass model S88) 以方波刺激，方波條件為 0.2 ms 刺激間期，80 V 的超大電壓以及 20 Hz 的頻率來刺激 5 秒；電場刺激引發組織的收縮，能夠被 0.1 μM TTX 幾乎完全抑制掉，來證明此收縮為神經所主導的。

大鼠輸精管

將大鼠 (Wistar rats, 250-300 g) 敲昏，迅速取出輸精管放入 Krebs 溶液中，將週圍的脂肪和結締組織小心清除後，將輸精管縱向剪開，一端綁在 L 型的固定架上，另一端接到 force-displacement transducer (Grass, model 7DAG)，然後將其固定於含有 5 ml Krebs 溶液的浴器中，給予 0.5 g 的靜止張力，並通以 95% O_2 和 5% CO_2 的混合氣，於 37°C 下平衡 90 分鐘，平衡完後以 10 μM NA 使組織收縮 (兩次)，之後將 NA 洗去，再平衡 30 分鐘後才開始做實驗。實驗是在拮抗劑或抑制劑的存在與否下進行，以各種濃度的 NA 來使組織做不連續的收縮而得到濃度-反應曲線，藉以求得各拮抗劑或抑制劑對組織的 pA_2 值以及抑制作用的強度。

大鼠脾臟

將大鼠脾臟週圍的脂肪和結締組織小心清除後，將之橫切成兩半，其裝置與固定於浴器的方法如同前述，給予 1 g 的靜止張力，並通以 95% O_2 和 5% CO_2 的混合氣，而後將之平衡於 37°C 下 90 分鐘之後，在拮抗劑或抑制劑的存在與否下，以各種濃度的 PE 來使組織做連續性的收縮而得到濃度-反應曲線，藉以求得各拮抗劑或抑制劑對組織的 pA_2 值以及抑制作用的強度。

電場刺激引發前列腺組織 [3H]NA 的釋放作用

將組織浸浴於含有 1-(7, 8)-[3H]NA (3 $\mu Ci/ml$) 的 37°C Krebs 溶液中並通以 95% O_2 和 5% CO_2 的混合氣，一個小時後以 Ca^{2+} -free / 0.04 mM EDTA 的 Krebs 溶液洗 90 分鐘 (每 10 分鐘換一次溶液)；之後再將組織浸浴於一般的 Krebs 溶液 20 分鐘。經過上述的過程之後

，將組織溫浴於 5 ml 的 Krebs 溶液中，每 3 分鐘換一次溶液並將之收集起來，以測定組織的放射線含量（此即 $[^3\text{H}]\text{NA}$ 的釋放量），此含量以 fractional rates of loss (FRL, 每 3 分鐘) 來表示；也就是每次收集的放射線量佔了收集前的總放射線量多少比例。在實驗的終了，將組織輕微拭乾，將其置於 75°C 的 37% perchloric acid 中，待其溶解後測定其放射線含量。在實驗進行中，電場刺激是在第 3、13 以及 23 次的收集液時進行（即分別在第 6、36 以及 66 分鐘時給予電場刺激），而刺激的條件為 0.2 ms 的間期、80V 的電壓以及 20 Hz 的頻率刺激 5 秒鐘；以第 2 次的電場刺激 (S_2) 做為控制組，而第 3 次的電場刺激 (S_3) 是在拮抗劑的存在與否下進行，而拮抗劑是在 S_3 之前 15 分鐘加入溶液中來與組織反應。藥物對於電場刺激所引發的 $[^3\text{H}]\text{NA}$ 的釋放作用的影響，是以 S_3/S_2 的值來表示。

資料與數據分析

本實驗是以控制組（即不加拮抗劑或抑制劑）的作用劑引發組織的最大收縮為 100%，而在各種不同濃度的拮抗劑存在下，作用劑引發組織最大收縮的一半所需的濃度 (EC_{50})，除以控制組的 EC_{50} ，即可得到濃度比 (dose ratio)，以 Arunlakshana 及 Schild (1959) 的方法作圖，以 $-\log$ (antagonist concentration M) 為橫軸， \log (dose ratio - 1) 為縱軸，此圖即為 Schild plot，而當 dose ratio 為 2 時，所得到的 $-\log$ (antagonist concentration) 即為 pA_2 值 (Mackay, 1978)。實驗結果以 means+S.E.M. 來表示，統計上的分析是以 Student's t-test 來評估，當 P 值小於 0.05 時，即視為具有統計意義。

實驗結果

α_1 -腎上腺受體拮抗劑對於電場刺激所引發的前列腺組織收縮的抑制作用

電場刺激 (0.2 ms 的間期、80V 的電壓以及 20 Hz 的頻率) 會引發人類前列腺組織的收縮作用，此作用能夠被 prazosin、N-allylsecoboldine、(-)-discretamine、(±)-govadine、(±)-THP 及 N-methyl-actinodaphnine 以濃度有關的方式所抑制 (Fig. 2)。其抑

制的 pIC_{50} 值分別為 8.87 ± 0.06 、 5.78 ± 0.07 、 5.99 ± 0.02 、 5.53 ± 0.10 、 5.50 ± 0.03 及 6.07 ± 0.06 (Table 1)，若是以 prazosin 的 pIC_{50} 值當參考數 1，則 N-allylsecoboldine、(-)-discretamine、(±)-govadine、(±)-THP 及 N-methyl-actinodaphnine 在人類前列腺組織的相對值分別為 8.13×10^{-4} 、 1.32×10^{-3} 、 4.57×10^{-4} 、 4.27×10^{-4} 及 1.58×10^{-3} (Table 1)。

α_1 -腎上腺受體拮抗劑對於 PE 所引發的前列腺組織收縮的抑制作用

PE 能夠以濃度有關的方式來引發人類前列腺組織的收縮作用；Prazosin、N-allylsecoboldine、(-)-discretamine、(±)-govadine、(±)-THP 及 N-methyl-actinodaphnine 都能夠以濃度有關的方式將 PE 的濃度-反應曲線平行右移 (圖未示出)。經由這些濃度-反應曲線可畫出其 Schild plots，其迴歸線斜率都接近於 -1，而 pA_2 值分別為 9.44 ± 0.06 (prazosin)、 5.74 ± 0.11 (N-allylsecoboldine)、 6.57 ± 0.07 [(-)-discretamine]、 6.07 ± 0.07 [(±)-govadine]、 6.02 ± 0.05 [(±)-THP] 及 6.91 ± 0.09 (N-methyl-actinodaphnine) (Table 1)；若是以 prazosin 的 pA_2 值當參考數 1，則 N-allylsecoboldine、(-)-discretamine、(±)-govadine、(±)-THP 及 N-methyl-actinodaphnine 在人類前列腺組織的相對值分別為 2.00×10^{-4} 、 1.35×10^{-3} 、 4.27×10^{-4} 、 3.80×10^{-4} 及 2.95×10^{-3} (Table 1)。

由以上結果知道，上述五種藥物對於電場刺激與 PE 所引發收縮作用的抑制強度之比值分別為 4.1 (N-allylsecoboldine)、1.0 [(-)-discretamine]、1.1 [(±)-govadine]、1.1 [(±)-THP] 及 0.5 (N-methyl-actinodaphnine)。

α_1 -腎上腺受體拮抗劑對於 PE 所引發的大鼠輸精管與脾臟收縮的抑制作用

PE 能夠以濃度有關的方式來引發大鼠輸精管與脾臟的收縮作用；Prazosin、N-allylsecoboldine、(-)-discretamine、(±)-govadine、(±)-THP 以及 N-methyl-actinodaphnine 都能夠以競爭性的方式來抑制 PE 所引發的收縮作用，這些拮抗劑在大鼠輸精管的 pA_2 值分別為 9.38、6.48、6.21、5.99、5.94 以及 6.58，若是以 prazosin 的 pA_2 值當

參考數 1，則 N-allylsecoboldine、discretamine、(±)-govadine、(±)-THP 以及 N-methyl-actinodaphnine 在大鼠輸精管的相對值分別為 1.26×10^{-3} 、 6.76×10^{-4} 、 4.07×10^{-4} 、 3.63×10^{-4} 以及 1.58×10^{-3} (Table 2)。Prazosin、N-allylsecoboldine、(-)-discretamine、(±)-govadine、(±)-THP 以及 N-methyl-actinodaphnine 在大鼠脾臟的 pA_2 值分別為 9.49、6.44、5.70、6.34、6.07 以及 7.38 (Table 2)；若是以 prazosin 的 pA_2 值當參考數 1，則 N-allylsecoboldine、(-)-discretamine、(±)-govadine、(±)-THP 以及 N-methyl-actinodaphnine 在大鼠脾臟的相對值分別為 1.62×10^{-4} 、 8.91×10^{-4} 、 7.08×10^{-4} 、 3.80×10^{-4} 以及 7.76×10^{-3} (Table 2)。

由以上結果知道，N-allylsecoboldine、(±)-govadine 以及 (±)-THP 對於 α_1 -腎上腺受體作用劑所引發大鼠輸精管收縮的抑制作用強度，分別為其在大鼠脾臟之抑制強度的 7.78、0.76、0.57、0.96 以及 0.20 倍。

α_1 -腎上腺受體拮抗劑以及 nifedipine 對於高鉀所引發的前列腺組織收縮的影響

以 $0.3 \mu\text{M}$ prazosin 來抑制與 α_1 -腎上腺受體有關的反應後，將前列腺組織置於 Ca^{2+} -free 的高鉀溶液 (60 mM) 中使其去極化，在此情況下，外加的鈣離子能夠以濃度有關的方式 (0.1 到 3 mM) 來引發前列腺組織的收縮作用，而 3 mM Ca^{2+} 所引發的最大收縮 ($0.57 \pm 0.03 \text{ g}$) 當做 100%。N-allylsecoboldine ($10 \mu\text{M}$)、(-)-discretamine ($10 \mu\text{M}$)、(±)-govadine ($30 \mu\text{M}$)、(±)-THP ($30 \mu\text{M}$) 及 N-methyl-actinodaphnine ($10 \mu\text{M}$) 皆不能顯著的抑制高鉀溶液所引發的收縮作用，然而 nifedipine ($10 \mu\text{M}$) 卻幾乎完全抑制此收縮作用 (Fig. 3)。

α_1 -腎上腺受體拮抗劑對於電場刺激所引發的 $[^3\text{H}]\text{NA}$ 釋放反應的影響

電場刺激能夠明顯的增加前列腺組織的 $[^3\text{H}]\text{NA}$ 釋放作用，其第一次 (S_1)、第二次 (S_2) 以及第三次 (S_3) 的電場刺激所釋放出的放射線量分別為 5.8 ± 1.4 、 4.7 ± 1.2 以及 $4.4 \pm 1.1\%$ (Fig. 4)，因此，以 S_3/S_2 比值來測定 α_1 -腎上腺受體拮抗劑對於 $[^3\text{H}]\text{NA}$ 釋放作用的影響；實驗結

果得知這些拮抗劑的 S_3/S_2 比值分別為 0.95 ± 0.01 (prazosin, $10 \mu\text{M}$)、 0.92 ± 0.01 (N-allylsecoboldine, $10 \mu\text{M}$)、 0.90 ± 0.02 [(-)-discretamine, $10 \mu\text{M}$]、 0.92 ± 0.01 [(±)-govadine, $30 \mu\text{M}$]、 0.94 ± 0.01 [(±)-THP, $30 \mu\text{M}$] 及 0.90 ± 0.01 (N-methyl-actinodaphnine, $10 \mu\text{M}$) (Table 3); 此外, clonidine ($0.1 \mu\text{M}$) 的 S_3/S_2 比值為 0.48 ± 0.02 。

α_1 -腎上腺受體拮抗劑急性毒性分析

在急性毒性方面之測定顯示: N-allylsecoboldine 以靜脈注射由 0.3 至 30 mg/kg 劑量下, 對動物 (小鼠與大鼠) 均無毒性; 但在 100 mg/kg 劑量下, 則動物在注射5分鐘內均死亡, 其死亡因可能為心臟血管之休克而來。其它 α_1 -受體拮抗劑因樣品不足, 尚未完成毒性試驗。

討 論

本篇研究探討了 N-allylsecoboldine、(-)-discretamine、(±)-govadine、(±)-THP 及 N-methyl-actinodaphnine 五種 α_1 -腎上腺受體拮抗劑在人類前列腺組織的作用。由實驗結果知道, 以上五種藥物都有拮抗 PE 以及電場刺激引發人類前列腺組織的收縮作用; N-allylsecoboldine 對於電場刺激引發組織收縮的抑制作用有較高的選擇性 (約 4 倍), N-methyl-actinodaphnine 則對於 PE 所引發收縮的抑制作用有較高的選擇性 (約 2 倍), 而 (-)-discretamine、(±)-govadine 及 (±)-THP 對於電場刺激與 PE 所引發收縮反應之抑制作用則差不多。

Hedlund 等人 (1985) 的研究報告指出, 以電場刺激的方式可以引起人類前列腺組織內生性 NA 的釋放, 並引發其組織收縮, 而此作用可被選擇性的 α_2 -腎上腺受體作用劑 clonidine 所抑制。在本實驗室先前的研究報告得知, 電場刺激所引發的人類前列腺組織的收縮作用, 主要是經由活化 α_{1A} -腎上腺受體亞型的結果 (Guh et al., 1995a), 而外加 PE 所引發組織的收縮作用, 則有 α_{1A} - 以及 α_{1B} -腎上腺受體亞型的參與 (Teng et al., 1994); 此外, 由 Han 等人 (1987) 的實驗得知, 經由活化 α_{1A} -腎上腺受體亞型所引發的平滑肌的收縮, 需要細胞外鈣離子經

由 dihydropyridine-sensitive 的鈣離子通道進入，此作用可被 nifedipine 所抑制，而經由活化 α_{1B} -腎上腺受體亞型所引發的平滑肌的收縮，則不需要細胞外鈣離子經由 dihydropyridine-sensitive 的鈣離子通道進入，因此，此作用不會被 nifedipine 抑制。綜合以上的研究報告，我們推論 N-allylsecoboldine 對於電場刺激所引發的組織收縮有較強的抑制作用，其可能的原因主要有三：(1) N-allylsecoboldine 對於 α_{1A} -腎上腺受體亞型有較高的選擇性；(2) N-allylsecoboldine 對於 dihydropyridine-sensitive 的鈣離子通道有部份的抑制作用；(3) N-allylsecoboldine 有部份的 α_2 -腎上腺受體作用劑的功能，而抑制了組織 NA 的釋放作用，因此，本篇論文便針對這些原因來逐一加以探討。

首先，對於 α_1 -腎上腺受體亞型的選擇性方面，是以大鼠輸精管以及脾臟的收縮作用分別做為 α_{1A} -以及 α_{1B} -腎上腺受體亞型的實驗模式 (Hanft and Gross, 1989; Han et al., 1987)。由實驗結果得知，N-allylsecoboldine、(-)-discretamine、(±)-govadine、(±)-THP 及 N-methyl-actinodaphnine 對於 PE 所引發的大鼠輸精管收縮的抑制作用強度，分別為其抑制 PE 所引發的大鼠脾臟收縮作用的 7.78、0.76、0.57、0.96 及 0.20 倍，由此結果顯示，N-allylsecoboldine 對於 α_{1A} -腎上腺受體亞型有較高的選擇性，而 N-methyl-actinodaphnine 則是對於 α_{1B} -腎上腺受體亞型有較高的選擇性。

對於 dihydropyridine-sensitive 的鈣離子通道方面的探討，是以高鉀溶液 (60 mM) 將前列腺組織去極化，使得鈣離子通道打開，藉著增加細胞外鈣離子的濃度，來引發前列腺組織的收縮作用；N-allylsecoboldine、(-)-discretamine、(±)-govadine、(±)-THP 及 N-methyl-actinodaphnine 在高濃度下皆不能明顯的抑制高鉀溶液所引發的收縮作用，而 nifedipine (10 μ M) 則幾乎完全抑制掉這種收縮作用，這些實驗結果證明上述五種拮抗劑對於人類前列腺組織的 dihydropyridine-sensitive 的鈣離子通道沒有明顯的抑制作用。

接著對於人類前列腺組織的 NA 釋放作用作一探討。本篇研究是以電場刺激所引起的 [3 H]NA 的釋放反應，來探討藥物在這一方面的作用。由實驗結果知道，第一次電場刺激 (S_1) 所引發的 [3 H]NA 釋放作用較第二次 (S_2) 與第三次 (S_3) 的作用為大，而第二次以後的刺激所引起的釋放作用則為定值，故以第三次與第二次電場刺激所引發的 [3 H]NA 釋放作

用的比值 (S_3/S_2)，來探討藥物的抑制作用；結果顯示上述五種拮抗劑的 S_3/S_2 比值都接近 1，因此證明其對於電場刺激所引發 [3 H]NA 的釋放反應都沒有明顯的抑制作用，亦即是上述五種拮抗劑都不是經由活化胞突前 α_2 -腎上腺受體使 NA 的釋放減少，而抑制電場刺激所引發組織的收縮作用。

結論與建議：由以上的實驗結果証實，N-allylsecoboldine、(-)-discretamine、(±)-govadine、(±)-THP 及 N-methyl-actinodaphnine 在人類前列腺組織皆有拮抗 PE 與電場刺激所引發的收縮作用；N-allylsecoboldine 對於電場刺激的抑制作用比其對於 PE 的抑制作用強，而 N-methyl-actinodaphnine 則是對於 PE 的抑制作用較強，可能是由於 N-allylsecoboldine 與 N-methyl-actinodaphnine 分別對於 α_{1A} -及 α_{1B} -腎上腺受體亞型有較高選擇性的結果。

由於 α_1 -腎上腺受體拮抗劑能夠改善 BPH 患者的尿路阻塞情形，增加其尿流速度，因此具有研究開發的價值，而本實驗室今後的一個工作重點，便是繼續從事 α_1 -腎上腺受體亞型拮抗劑的開發工作，而且以本研究的各種實驗模式，來研究出更強、更具有選擇性的 α_{1A} -腎上腺受體亞型拮抗劑。

參考文獻

Aboud, R., Shafii, M. and Docherty, J.R. (1993). Investigation of the subtypes of α_1 -adrenoceptors mediating contractions of rat aorta, vas deferens and spleen. Br. J. Pharmacol., 109, 80-87.

Arunlakshana, O. and Schild, H.O. (1959). Some quantitative uses of drug antagonists. Br. J. Pharmacol. Chemother., 14, 48-52. Berry, S.J., Coffey, D.S., Walsh, P.C. and Ewing, L.L. (1984). The development of human benign prostatic hyperplasia with age. J. Urol., 132, 474-479.

Chapple, C.R., Burt, R.P. and Marshall, I. (1991). α_1 -Adrenoceptor subtypes in the human prostate and inferior epigastric artery. Neurourol. Urodyn., 10, 306-308.

Cotecchia, S., Schwinn, D.A., Randall, R.R., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. and Kobilka, K.K. (1988). Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster α_1 -adrenoceptors. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 85, 7159-7163.

Guh, J.H., Chueh, S.C., Ko, F.N. and Teng, C.M. (1995a). Characterization of α_1 -adrenoceptor subtypes in tension response of human prostate to electrical field stimulation. Br. J. Pharmacol., 115, 142-146.

Guh, J.H., Ko, F.N., Yu, S.M., Wu, Y.C. and Teng, C.M. (1995b). Pharmacological evaluation of N-methyl-actinodaphnine, a new vascular α -adrenoceptor antagonist, isolated from *Illigera luzonensis*. Eur. J. Pharmacol., 279, 33-41.

Han, C., Abel, P.W. and Minneman, K.P. (1987). α_1 -Adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca^{2+} in smooth muscle. Nature, 329, 333-335.

Hanft, G. and Gross, G. (1989). Subclassification of α_1 -adrenoceptor recognition sites by urapidil derivatives and other selective antagonists. Br. J. Pharmacol., 97, 691-700.

Hedlund, H., Andersson, K.E. and Larsson, B. (1985). Alpha-adrenoceptors and muscarinic receptors in the isolated human prostate. J. Urol., 134, 1291-1298.

Isaacs, J.T. and Coffey, D.S. (1989). Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. Prostate, 2(Suppl.), 33-50.

Ko, F.N., Chang, Y.L., Chen, C.M. and Teng, C.M. (1996). (\pm)-Govadine and (\pm)-THP, two tetrahydroprotoberberine alkaloids, as selective α_1 -adrenoceptor antagonists in vascular smooth muscle cells. J. Pharm. Pharmacol., (in press).

Ko, F.N., Yu, S.M., Su, M.J., Wu, Y.C. and Teng, C.M. (1993). Pharmacological activity of (-)-discretamine, a novel vascular α -adrenoceptor and 5-hydroxytryptamine receptor antagonist, isolated from *Fissistigma glaucescens*. 110, 882-888.

Lepor, H., Tang, R., Meretyk, S. and Sapira, E. (1993). Alpha- adrenoceptor subtypes in the human prostate. *J. Urol.*, 149, 640-642. Lomasney, J.W., Cotecchia, S., Lorenz, W., Leung, W.Y., Schwinn, D.A., Yand-Feng, T.L., Brownstein, M., Lefkowitz, R.J. and Caron, M.G. (1991). Molecular cloning and expression of the cDNA for the α_{1A} -adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.*, 266, 6365-6369.

Lu, S.T., Wu, Y.C. and Led, S.P. (1985). Alkaloids of Formosan Fissistigma and Goniothalamus species. *Phytochemistry*, 24, 1829- 1834.

Mackay, D. (1978). How should values of pA_2 and affinity constants for pharmacological competitive antagonists be estimated? *J. Pharm. Pharmacol.*, 30, 312-313.

Perez, D.M., Piascik, M.T. and Graham, R.M. (1991). Solution-phase library screening for the identification of rare clones: isolation of an α_{1D} -adrenergic receptor cDNA. *Mol. Pharmacol.*, 40, 876-883.

Teng, C.M., Guh, J.H. and Ko, F.N. (1994). Functional identification of α_1 -adrenoceptor subtypes in human prostate: comparison with those in rat vas deferens and spleen. *Eur. J. Pharmacol.*, 265, 61-66.

Testa, R., Guarneri, L., Ibba, M., Strada, G., Poggesi, E., Taddei, C., Simonazzi, I. and Leonardi, A. (1993). Characterization of α_1 -adrenoceptor subtypes in prostate and prostatic urethra of rat, rabbit, dog and man. *Eur. J. Pharmacol.*, 249, 307-315.

Yu, S.M., Lee, S.S., Hou, Y.S. and Teng, C.M. (1994). Mechanisms of vasorelaxation induced by N-allylsecoboldine in rat thoracic aorta. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, 349, 637-643.

Table 1.

各種 α_1 -腎上腺受體拮抗劑對 phenylephrine 及電刺激所引起之人類前列腺組織收縮之作用強度比較。

Drugs	Phenylephrine			Electrical field stimulation		
	pA ₂	Relative potency	n	pA ₂	Relative potency	n
Prazosin	9.44±0.06	1	6	8.87±0.06	1	6
N-allylsecoboldine	5.74±0.11	2.00×10 ⁻⁴	6	5.78±0.07	8.13×10 ⁻⁴	3
(-)-Discretamine	6.57±0.07	1.35×10 ⁻³	6	5.99±0.02	1.32×10 ⁻³	3
(±)-Govadine	6.07±0.07	4.27×10 ⁻⁴	6	5.53±0.10	4.57×10 ⁻⁴	3
(±)-THP	6.02±0.05	3.80×10 ⁻⁴	6	5.50±0.03	4.27×10 ⁻⁴	3
N-methyl-actinodaphnine	6.91±0.09	2.95×10 ⁻³	6	6.07±0.06	1.58×10 ⁻³	3

Values are expressed as means±S.E.M. n=number of individual experiments.

Table 2.

各種 α_1 -腎上腺受體拮抗劑對 phenylephrine 所引起大鼠輸精管與脾臟收縮之影響

Drugs	Vas deferens (α_{1A})		Spleen (α_{1B})	
	pA ₂	Relative potency	pA ₂	Relative potency
Prazosin	9.38 \pm 0.08	1	9.49 \pm 0.11	1
N-allylsecoboldine	6.48 \pm 0.09	1.26 $\times 10^{-3}$	5.70 \pm 0.05	1.62 $\times 10^{-4}$
(-)-Discretamine	6.21 \pm 0.08	6.76 $\times 10^{-4}$	6.44 \pm 0.07	8.91 $\times 10^{-4}$
(\pm)-Govadine	5.99 \pm 0.11	4.07 $\times 10^{-4}$	6.34 \pm 0.09	7.08 $\times 10^{-4}$
(\pm)-THP	5.94 \pm 0.06	3.63 $\times 10^{-4}$	6.07 \pm 0.09	3.80 $\times 10^{-4}$
N-methyl-actinodaphnine	6.58 \pm 0.21	1.58 $\times 10^{-3}$	7.38 \pm 0.11	7.76 $\times 10^{-3}$

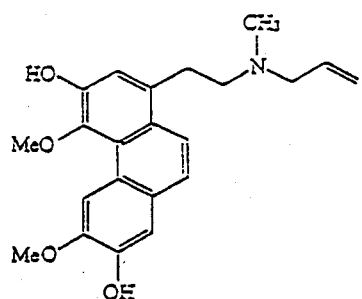
Values are expressed as means \pm S.E.M. of six to eight individual experiments.

Table 3.

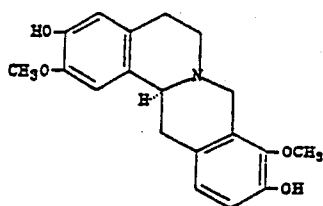
各種 α_1 -腎上腺受體拮抗劑對電場刺激人類前列腺組織引起 [^3H]noradrenaline 釋放之影響

Addition	S_3/S_2
Control	0.94 \pm 0.01
Prazosin	0.95 \pm 0.01
N-allylsecoboldine	0.92 \pm 0.01
(-)-Discretamine	0.90 \pm 0.02
(\pm)-Govadine	0.92 \pm 0.01
(\pm)-THP	0.94 \pm 0.01
N-methyl-actinodaphnine	0.90 \pm 0.01

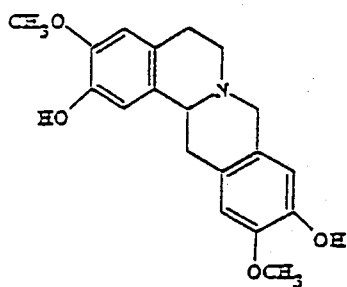
The effects of α_1 -adrenoceptor antagonists on the release of [^3H]noradrenaline are expressed as change of the S_3/S_2 ratios. Prazosin (10 nM), N-allylsecoboldine (10 μM), (-)-discretamine (10 μM), (\pm)-Govadine (30 μM), (\pm)-THP (30 μM) or N-methyl-actinodaphnine (10 μM) was administered between S_2 and S_3 , 15 min prior to the third (S_3) stimulation. Values are expressed as means \pm S.E.M. of three to four individual experiments.



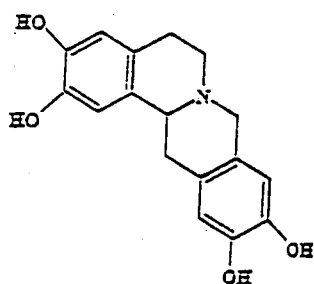
N-allylsecoboldine



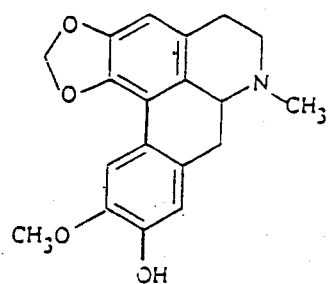
(-)-Discretamine



(±)-govadine



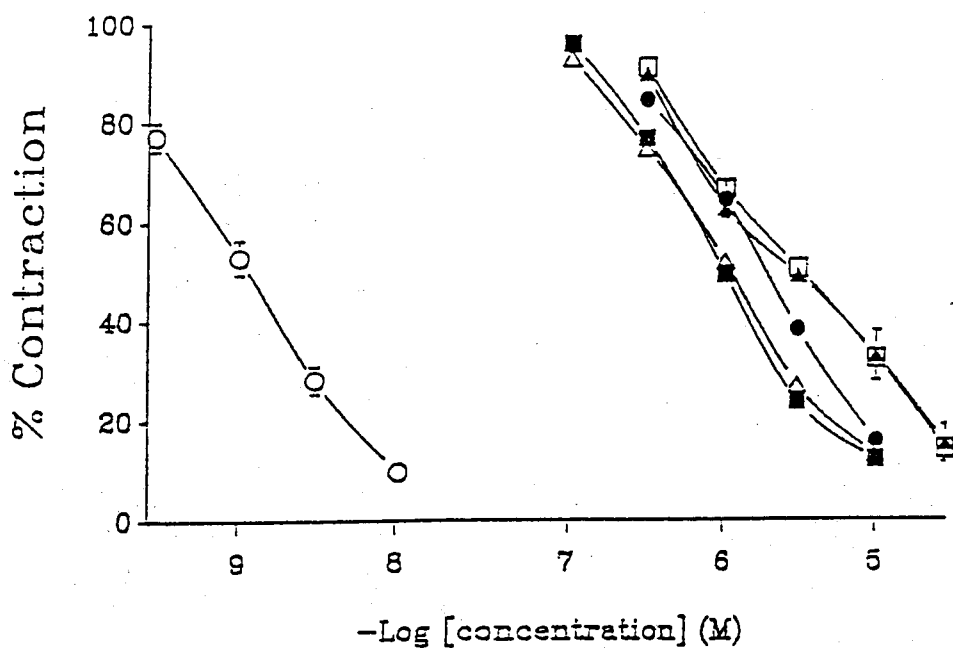
(±)-THP



N-methyl-actinodaphnine

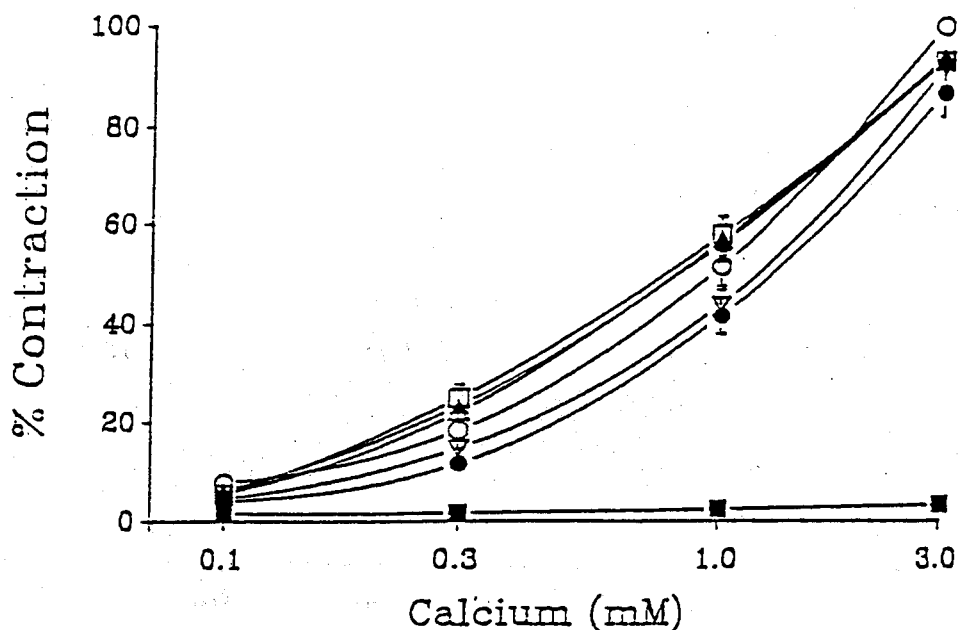
圖一：

N-allylsecoboldine、(-)-discretamine、(±)-govadine、(±)-THP 及 N-methyl-actinodaphnine 之化學結構式。



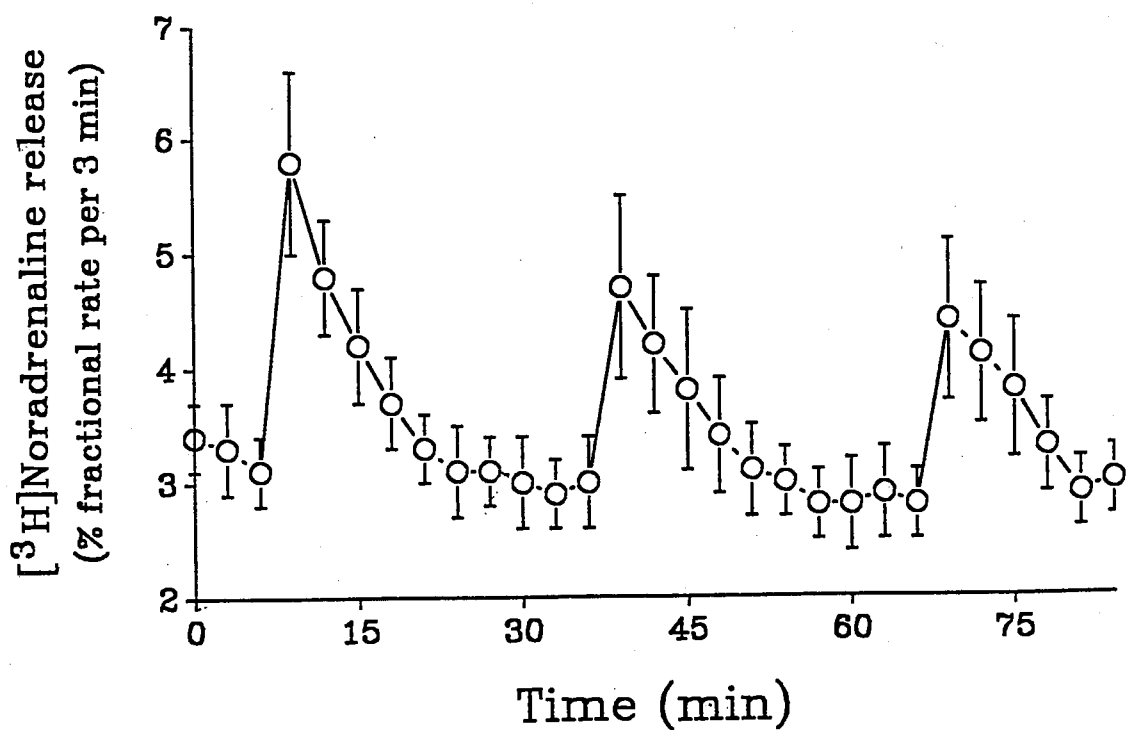
圖二：

Prazosin (○)、N-allylsecoboldine (●)、(-)-discretamine (△)、(±)-govadine (▲)、(±)-THP (□) 或 N-methyl-actinodaphnine (■) 在人類前列腺組織對於電場刺激引發收縮反應的作用。將組織與所指示藥物先溫浴 15 分鐘，再以電場刺激 (0.2 ms duration, 80 V and 20 Hz) 來引發收縮反應。每一作用點為 3 到 6 次實驗之平均值 (mean±S.E.M.)。



圖三：

一些 α_1 -腎上腺受體拮抗劑及nifedipine在人類前列腺組織對於KCl引發 Ca^{2+} 相關的收縮反應之作用。在 Ca^{2+} -free但含有KCl (60 mM) 及 0.3 μM prazosin 的情況下，將組織與 0.1% dimethylsulfoxide (○)、N-allylsecoboldine (10 μM , ●)、(-)-discretamine (10 μM , △)、(±)-govadine (30 μM , ▲)、(±)-THP (30 μM , □)、N-methyl-actinodaphnine (10 μM , ▽) 或nifedipine (10 μM , ■) 先溫浴 15 分鐘，再以連續的 Ca^{2+} (0.1 到 3 mM) 來引發收縮反應。每一作用點為 6 次實驗之平均值 (mean±S.E.M.)。



圖四：

電場刺激引發前列腺組織³H]noradrenaline的釋放作用。將組織事先標定³H]noradrenaline，再以電場刺激 (0.2 ms duration, 80 V and 20 Hz) 來引發³H]noradrenaline的釋放作用。³H]noradrenaline的釋放是以放射線 tritium 釋放的速率 (fractional rate) 來計算，詳見於Material and methods 部份。每一作用點為4次實驗之平均值 (mean±S.E.M.)。

眼科用中藥生物活性的探討

Studies on the biological activity of ophthalmic herbal medicine - Lycium chinense Mill. and Cassia tora.

張 由 美

國立陽明大學

中文摘要

我們以眼網膜色素上皮細胞(RPE) 作為標的(target)，探討其生長及吞吃的機能。我們選了常用眼科中藥決明子，枸杞子為研究對象。探討這些眼科用中草藥對網膜色素上皮細胞(RPE) 的調節作用。

本年度我們以超臨界流体萃取法探討中藥枸杞子，決明子的活性成份萃取。目前已克服二氧化碳純度不足，含水量過高，流量過大所造成結冰及塞管線等技術上問題，成功的以添加少量甲醇的方式，萃取出不同極性的區分，我們亦將其容量由原廠之 10cc 擴充至 80 cc. 我們相信此一萃取法的進展，除對有效成份的研究有所助益以外，更重要的是對中藥科學化濃縮的幫助是一大突破。

在活性方面，我們已將上述不同區分以微量培養皿法測定 RPE 的 DNA 合成作為其促進生長的指標，並以 FITC-ROS 法作為網膜色素上皮細胞 (RPE) phagocytosis 的指標。在枸杞子方面，在 3% MeOH + 97% CO₂, 4500psi, 45°C 的條件下萃取物有促進網膜色素上皮細胞 (RPE) RPE cell 增生的作用，其有效濃度在 10ug/ml 為對照組的 1.31 倍。

在 RPE cell 吞噬 (phagocytosis) 功能上, 以 1%MeOH + 99% CO₂, 4500 psi, 45 °C extraction 後再經 Sephadex LH20 gel 分離得到 Fr1 其有效濃度在 1 μ g/ml 的刺激指數為對照組的 1.6 倍. 在促進脾臟細胞的生長方面在 1%MeOH + 99% CO₂, 4500 psi, 45 °C extraction 後可溶再經 Sephadex LH20 gel 分離得到 Fr2 其有效濃度在 0.1 μ g/ml 為對照組的 1.30 倍.

決明子在 100% CO₂, 4500psi, 45°C 的條件下有促進 RPE cell 增生的作用, 其有效濃度在 1 μ g/ml 為對照組的 1.22 倍. 在 RPE cell 吞噬 (phagocytosis) 功能上, 以 100% CO₂, 4500psi, 45°C extraction 後其有效濃度在 1 μ g /ml 為對照組的 1.35 倍. 在促進脾臟細胞的生長方面在 2%MeOH, 4500psi, 50°C 條件下有促進脾臟細胞的生長, 其有效溶度在 1 μ g/ml 為對照組的 1.48 倍. 經 Sephadex LH20 gel 分離得到 8 個主要真正有效成份有待進一步分離。

關鍵詞：眼科，中藥，決明子，枸杞子，
網膜色素上皮細胞，生物活性

ABSTRACT

In this study, we investigated the biological activity of ophthalmic herbal medicine, *Lycium chinense* Mill. and *Cassia tora*. on proliferation and phagocytic activity of retinal pigment epithelial cells.

We developed the supercritical fluid technology for the extraction of *Lycium chinense* Mill. and *Cassia tora*. We overcome the trouble shouting including impurity of carbon dioxide, over flow leading freezing etc. and sucessfully developed a protocol for a reproducible modifier used supercritical fluid technology. Also, the volume of SFE container increased to 80

cc instead of original 10 cc. We do believe the SFE technology would help not only the purification of active compounds from Chinese herbs, but also a break through in developing the condensed formulation for Chinese herbs.

We investigated these fractions extracted by SFE on the biological activity of retinal pigment epithelial cells and mouse spleen cells. Both the fractions from *Lycium chinense* Mill. and *Cassia tora*. showed different biological activity on these different bioassay system. The active principles of these ophthalmic herbal medicine are under our current study.

Key Words: Retinal Pigment Epithelial Cell, function, Chinese herbs.

眼科用中藥生物活性的探討

1. 研究目的:

眼睛為靈魂之窗，在逐漸老年化的現代社會中，視力的保健和維護愈形受到重視。在升學主義的壓力下，學童及年輕人視力的普遍不良已成為國內特殊的問題。而在目前西方所發展的眼科藥物中，只有治療用抗生素及固醇類何爾蒙，所謂保健用僅止于維他命類點眼藥。加以國人傳統上有使用中藥及民間藥的習慣，復經報章雜誌喧嚷，有一些藥效不明的民間藥普遍被用來作為視力保健或治療。在這樣的社會背景下，我們認為有必要結合國內研究人員來探討及評估其藥效及作用機轉。

我們選定網膜色素上皮細胞(RPE)作為探討的標的(target)。網膜色素上皮細胞(RPE)位於網膜的最外層，和視神經細胞相接，和視神經功能的運作，有相當密切的相關。網膜色素上皮細胞(RPE)一般被認為和光的吸收，維他命 A 的儲藏，rhodopsin 的合成，視細胞養分及代謝產物的輸送，吞吃桿細胞外節 (rod outer segments, ROS), 供給 ROS 再生 (renewal) 時所須的物質，subretinal 一些多糖類 extracellular

matrix 的合成，提供 physical 或 chemical barrier 以阻止 subretinal 內皮細胞的侵入，形成網膜的接著力等機能有關。在增殖性網膜病變 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 所導至網膜剝離的過程中，活的網膜色素上皮細胞 (RPE) 的游離進入 vitreous cavity 而逐漸的附著在網膜上被認為是發病的起始步驟。根據最近的報告顯示，網膜色素上皮細胞 (RPE) 可能分泌一些生長因子 (growth factors)，來促進網膜色素上皮細胞 (RPE)，astrocyte，及角膜纖維芽細胞 (corneal fibroblast) 之生長，而造成增殖性網膜病變。

此外，糖尿病眼內新生血管的生成常易造成病人視力的逐漸喪失而最後導至失明。根據最近的報告指出，網膜色素上皮細胞 (Retinal Pigment Epithelial Cells) 可以釋放出一些不明的新生血管抑制因子來抑制網膜新生血管的形成。而造成老人失明最大原因的眼內黃斑部變性 (Macular Degeneration) 即為形成脈絡膜新生血管薄膜 (Choroidal neovascular membrane) 所至。最近的報告指出，其可能為網膜色素上皮細胞 (RPE) 的退化 (Dysfunction) 所造成。

網膜色素上皮細胞具有具有免疫細胞的特性，可以表現 HLA-DR antigen，在實驗性自体免疫葡萄膜炎 experimental autoimmune uveitis 可以觀察到 Ia antigen 的表現，具有 phagocytic 機能類似 macrophage 的性質，和一些眼內葡萄膜炎 (uveitis) 的發生亦可能有密切的相關。因此，我們相信眼科用民間藥經由調節此細胞之機能而達到其效果的可能性很大。我們選了常用眼科中藥決明子，枸杞子等民間眼科藥為研究對象。

決明子在《本經》：“治青盲，目淫膚赤白膜，眼赤痛，淚出，久服益經光。”在《湖南藥物誌》：“明目，利尿。治昏眩，腳氣，浮腫，肺癰，胸痺。[異名]：草決明、羊明、羊角、馬蹄決明、還瞳子、馬屎豆、假綠豆、馬蹄子、千里光、芹決、羊角豆、野青豆、豬骨明、豬屎藍豆、細葉豬屎豆、夜拉子、羊尾豆。[原植物]：決明 《本經》 Cassia tora L.，又名：夜關門、羊觸足、假羊角菜、假花生、夜合草、野花生。[成分]：新鮮種子含大黃酚 (Chrysophanol)、大黃素 (Emodin)、蘆薈大黃素 (Aloe-

emodin)、大黃酸(Rhein)、大黃素葡萄糖苷、大黃素蒽酮、大黃素甲醚(Physcion)、決明素(Obtusin, 即 1, 6, 7-三甲氧基-2, 8-二羥基-3-甲基蒽琨)、橙黃決明素(Aurantio-obtusin, 即 1, 7-二甲氧基-2, 6, 8-三羥基-3-甲基蒽琨), 以及新月孢子菌玫瑰色素(Rubrofusarin)、決明松(Torachryson)、決明內酯(Toralactone)。尚含維生素A. 枸杞子Lycium chinense Mill., 功用主治: 滋腎, 潤肺, 補肝, 明目, 治肝腎陰虧, 腰膝酸軟, 頭暈, 目眩, 目昏多淚, 虛勞咳嗽, 消渴, 遺精。"藥性論": "能補益精諸不足, 易顏色, 變白, 明目, 安神。" "綱目": "滋腎, 潤肺, 明目" "本草經疏": "枸杞子, 潤而滋補, 兼能退熱, 而專於補腎、潤肺、生津、益氣, 爲肝腎真陰不足、勞乏內熱補益之要藥。老人陰虛者十之八九, 故服食家爲益精明目之上品。昔人多謂其能生精益氣, 除陰虛內熱明目者, 蓋熱退則陰生, 陰生則精血自長, 肝開竅於目, 黑水神光屬腎, 二臟之陰氣增益, 則目自明矣。" "枸杞雖爲益陰除熱之上藥, 若病脾爲薄弱, 時時泄瀉者勿入, 須先治其脾胃, 俟泄瀉已止, 乃可用之。即用, 尚須同山藥、蓮肉、車前、茯苓相兼, 則無潤腸之患矣。"

以上民間藥由陽明大學生物藥學研究所吳榮燦教授提供製作粗萃物或部份純化區分及純化物, 眼科方面之有關生物活性則由本研究室負責探討。

2. 研究方法及進行步驟.

a. 網膜色素上皮細胞 (Retinal Pigment Epithelial Cell) 組織培養網膜色素上皮細胞 (RPE) 的初代培養

新鮮牛眼自屠宰場取得或自7-9 天雞胚胎取出整眼, 解剖後除去水晶体. 玻璃体. sensory retinal 後, 剩餘的 posterior cup 將其分切成細塊, 以 0.02% EDTA/PBS 在室溫處理40-60分鐘, RPE 細胞層可以由脈絡膜毯 (Tapetum) 脫離, 將其用 0.5% Trypsin/PBS 在37°C處理 15 分鐘, 以吸管輕吸幾次後即可得單一分散的 RPE 細胞. 放入含有 10% 胎牛血清的 Eagle's MEM培養基中在37°C中, 5% CO₂ 培養箱, 每隔2-3 換

新培養基.

b. 牛眼網膜桿細胞外節的製備

Preparation of Bovine Retinal Rod Outer Segment

↓ 20 frozen bovine retinas

↓ shake with 45% sucrose ,0.1M phosphate buffer(PH=7)

↓ pass through 300#mesh

↓ The suspension is centrifuged in an TL100.3 rotor (Beckman) for 31 min at 30Krpm and 4* C.

↓ phosphate buffer resuspended

↓ pass through 300# mesh

↓ The suspension is centrifuged in a TL100.3 rotor for 85min at 23000rpm and 4* C.

[SS-34 rotor (Sorvall) for 20 min at 15000rpm and 4* C]

↓ resuspended in 40% sucrose phosphate buffer

↓ pass through 300# mesh

↓ TL100.3 rotor for 85 min at 23000rpm and 4* C

↓ resuspended in phosphate buffer

↓ pass through 300# mesh

↓ pass through 55# mesh

↓ store in 40% sucrose in phosphate buffer -20* C

c. 牛眼網膜桿細胞外節的螢光染色

↓ 將 Ros-FITC= 1:1/1000 (w/w) 在 4 °C 染 1.5 hr in Borate buffer+

10% sucrose pH8.0

↓ Wash 4 times with Tris-acetate+20% sucrose pH7.2 (12000 rpm 10min)

d. 網膜色素上皮細胞 FITC-ROS 吞吃機能的測定.

Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cell

↓ PE cell 5×10^4 /ml in DMEM + 2% FCS 180ul/well
 ↓ 37°C overnight
 ↓ drug 20ul/well with 2%FCS
 ↓ 37°C overnight
 ↓ Labelling Ros (FITC-ROS) 1×10^7 /ml 50ul/well
 ↓ 37°C 3hr
 ↓ washed 4 times with PBS+2.5% sucrose
 ↓ Cyto-Fluorometer reading EX Filter 485/20nm ,Em Filter 530/25nm

e. 檢品對分裂原 concanavalin A 活化之脾臟細胞反應性的檢定法

1. 脾臟細胞的製備:

無菌下取出 C3H 老鼠的脾臟細胞，置於含 RPMI-1640 液之培養皿 (petri dish) 內，用鑷子完全捏碎，過尼龍網後即得單細胞懸浮液。

2. 生物活性檢測法:

脾臟細胞 (40萬 cells/well) 培養於 10% 胎牛血清，1-3 ug/ml Con A之 RPMI-1640，加入 sample 培養 48 小時，再 pulse [Me-3H]-thymidine 24小時後，收集細胞於玻璃濾紙上，以 beta counter 測量 DNA 合成指數。

f. 中藥標品製作:

決明子及枸杞子約 50 克經超臨界流體萃取。條件如下:

壓力	超臨界流體	溫度
4000psi	100%CO ₂	40°C
4500psi	98%CO ₂ +2%MeOH	50°C
5000psi	95%CO ₂ +5%MeOH	60°C

萃取物乾燥後分別製成 1mg/ml，進行進一步生物活性檢定。

3. 進度及成果.

超臨界流体萃取枸杞子，決明子的活性成份.

我們以枸杞及決明做有效成份分析，本實驗室採用超臨界流體萃取法 (Supercritical Fluid Extraction)，以 CO₂ 及 MeOH 做為萃取的溶媒，在不同的壓力及溫度下，得到不同的氣液態共存的萃取物。

Table 1. Extraction of 枸杞 (Lycium chinense Mill.) by Supercritical fluid technology.

Extraction condition	Weight(mg)	Yield (%)
Crude Lych	40000	
4500psi 100%CO ₂ 45°C	1.98	0.005
4500psi +1%MeOH 45°C	46.32	0.116
4500psi +3%MeOH 45°C	378.77	0.945

Table 2. Extraction of 決明 (Cassia tora) by Supercritical fluid technology.

1st

Extraction condition	Weight(mg)	Yield (%)
Crude Cato	64500	
4500psi 100%CO ₂ 45°C	3.44	0.005
4500psi 1%MeOH 45°C	15.38	0.024
4500psi 3%MeOH 45°C	41.23	0.064
4500psi 5%MeOH 45°C	32.26	0.050
Total	92.31 mg	0.144%

2nd modification

Extraction condition	Weight(mg)	Yield (%)
Crude Cato	56630	
4000psi 100%CO ₂ 40°C	267.69	0.473
4000psi 100%CO ₂ 40°C	oil 1283.45	2.266
4500psi 2%MeOH 50°C	454.71	0.803
4500psi 2%MeOH 50°C	oil 193.65	0.342
5000psi 5%MeOH 60°C	207.80	0.367
Total	2407.3 mg	4.251%

枸杞子的生物活性

枸杞子在 100%CO₂, 4500psi, 45°C 的條件下有促進 RPE cell 增生，其有效濃度在 10ug/ml 為對照組的 1.34 倍，在 3% MeOH, 4500psi, 45 °C 的條件下後可溶在 Ethylacetate 亦有促進 RPE cell 增生，其有效濃度在 10ug/ml 為對照組的 1.31 倍 (Table 3)。在 RPE cell 吞噬功能上 (phagocytosis) 以 1%MeOH + 99% CO₂, 4500 psi, 45 °C extraction 後再經 Sephadex LH20 gel 分離得到 Fr1 其有效濃度在 1ug/ml 的刺激指數為對照組的 1.6 倍 (Table 4)，Fr2 其有效濃度在 10 ug/ml 為對照組的 1.36 倍 (Table 4)。在促進脾臟細胞的生長方面在 1%MeOH extra 後可溶在 Ethylacetate 再經 Sephadex LH20 gel 分離得到 Fr2 其有效溶度在 0.1ug/ml 為對照組的 1.30 倍，3% MeOH 萃取條件下其有效溶度在 0.1ug/ml 為對照組的 1.29 倍，5% MeOH 萃取條件下其有效溶度在 0.1ug/ml 為對照組的 1.27 倍 (Table 5)。

決明子的生物活性

決明在 100% CO₂, 4500psi, 45°C 的條件下有促進 RPE cell 增生，其有效濃度在 1ug/ml 為對照組的 1.22 倍 (Table 6)。在 RPE cell 吞噬 (phagocytosis) 功能上以 CO₂ extraction 後其有效濃度在 1ug/ml 為對照組的 1.35 倍 (Table 7)，在促進脾臟細胞的生長方面在 2%MeOH, 4500psi, 50°C 條件下有促進脾臟細胞的生長，其有效溶度在 1ug/ml 為對照組的 1.48 倍 (Table 8) 且經 Sephadex LH20 gel 分離得到 8 個主要真正有效成份有待進一步分離。

Table 3. Effects of Lych. on the proliferative response on RPE cells.

Group	MEAN	STD	%	Index	T Prob.
Ctrl	23141.25	1420.97	0.06	1.00	0.01 A
	23167.75	1937.64	0.08	1.00	-0.01 A
枸杞 4500psi 100%CO2 45°C					
100ug	25334.00	2935.74	0.12	1.09	-1.71 B
10	30947.75	3808.20	0.12	1.34	-5.16 G
1	25853.25	2349.61	0.09	1.12	-2.39 D
枸杞 4500psi 1%MeOH 45°C ethylacetate diss → LH20 Fr1					
100ug	20625.50	2403.58	0.12	0.89	2.22 C
10	19991.33	3332.77	0.17	0.86	2.23 C
1	21111.50	424.97	0.02	0.91	1.75 B
枸杞 4500psi 1%MeOH 45°C ethylacetate diss → LH20 Fr2					
100ug	21587.50	1069.90	0.05	0.93	1.78 B
10	26826.00	926.23	0.03	1.16	-4.25 F*
1	23566.67	1315.12	0.06	1.02	-0.40 A
枸杞 4500psi 1%MeOH 45°C ethylacetate diss → LH20 Fr3					
100ug	24091.50	964.74	0.04	1.04	-1.08 B
10	25666.25	3149.83	0.12	1.11	-1.89 C
1	26656.00	1611.26	0.06	1.15	-3.61 F*
枸杞 4500psi 1%MeOH 45°C ethylacetate diss → LH20 Fr4					
100ug	19947.00	2270.73	0.11	0.86	2.89 E*
10	27386.75	587.72	0.02	1.18	-5.10 G*
1	24189.50	1693.06	0.07	1.04	-1.05 B
T Prob.:		D	E	F	G
		0.05>p>	0.02>p>	0.01>p>	0.001>p>
Group	MEAN	STD	%	Index	T Prob.
Ctrl	25714.00	1561.42	0.06	0.96	1.05 B
	27812.00	1004.47	0.04	1.04	-1.15 B
枸杞 4500psi 1%MeOH 45°C CHCl3/MeOH diss					
100ug	29799.25	545.58	0.02	1.11	-3.50 F*
10	29948.00	2883.37	0.10	1.12	-2.48 D*
1	29517.50	882.28	0.03	1.10	-3.07 E*
枸杞 4500psi 3%MeOH 45°C MeOH diss					
100ug	17357.25	2838.56	0.16	0.65	7.38 G*
10	28031.50	2080.35	0.07	1.05	-1.16 B
1	33735.25	3891.23	0.12	1.26	-4.48 F*
枸杞 4500psi 3%MeOH 45°C ethylacetate diss					
100ug	28102.50	1478.90	0.05	1.05	-1.36 B
10	35061.25	4045.34	0.12	1.31	-5.19 G*
1	31258.50	3526.79	0.11	1.17	-3.09 E*
T Prob.:		D	E	F	G
		0.05>p>	0.02>p>	0.01>p>	0.001>p>

Table 4. Effects of Lych on the phagocytosis of ros outer segments by retinal pigment epithelial cells.

Group	MEAN	STD	%	Index	T Prob.
Ctrl	1138.33	126.71	0.11	1.00	0.00 A
10%FCS	1361.80	52.16	0.04	1.20	-3.67 F*
枸杞 4500psi 1% MeOH 45°C Ethylacetate diss →LH20 Fr1					
100ug	890.80	83.74	0.09	0.78	3.73 F*
10ug	892.33	899.02	0.11	0.78	3.75 F*
1ug	1821.60	122.66	0.07	1.60	-9.03 G*
枸杞 4500psi 1% MeOH 45°C Ethylacetate diss →LH20 Fr2					
100ug	11175.50	124.09	0.11	1.03	-0.46 A
10ug	1544.67	102.01	0.07	1.36	-4.78 F*
1ug	1003.50	144.31	0.14	0.88	1.72 B
枸杞 4500psi 1% MeOH 45°C Ethylacetate diss →LH20 Fr3					
100ug	979.17	47.65	0.05	0.86	2.88 E*
10ug	1099.80	141.37	0.13	0.97	0.48 A
1ug	1049.80	116.98	0.11	0.92	1.19 B
枸杞 4500psi 1% MeOH 45°C Ethylacetate diss →LH20 Fr4					
100ug	1098.33	87.63	0.08	0.96	0.64 A
10ug	1189.75	130.29	0.17	1.05	-0.62 A
1ug	1116.00	77.27	0.07	0.98	0.37 A

T Prob.:	D	E	F	G	
	0.05>p>	0.02>p>	0.01>p>	0.001>p>	

Table 5. Effects of Lych. on the proliferation of spleen cell

Group	MEAN	STD	%	Index	T Prob.
Ctrl	14082.17	701.24	0.05	1.00	0.00 A
	709.50	99.58	0.14	0.05	46.25 G*
枸杞 100%CO ₂					
100	15315.25	1999.96	0.13	1.09	-1.42 B
10	16294.50	830.66	0.05	1.16	-4.99 G*
1	15920.50	1246.39	0.08	1.13	-3.15 E*
0.1	15544.50	1214.79	0.08	1.10	-2.55 D*
枸杞 3%MEOH					
100	14094.33	1240.56	0.09	1.00	-0.02 A
10	17677.33	862.02	0.05	1.26	-7.92 G*
1	17737.00	450.66	0.03	1.26	-9.14 G*
0.1	18204.50	611.47	0.03	1.29	-10.85 G*
枸杞 5%MEOH					
100	14483.50	1003.73	0.07	1.03	-0.80 B
10	17078.83	632.54	0.04	1.21	-7.77 G*
1	18557.50	1504.10	0.08	1.32	-6.61 G*
0.1	17865.60	1313.68	0.07	1.27	-6.13 G*

T Prob.:	D	E	F	G	
	0.05>p>	0.02>p>	0.01>p>	0.001>p	
Group	MEAN	STD	%	Index	T Prob.
Ctrl	12519.33	1290.30	0.10	1.00	0.00 A
	686.00	79.00	0.12	0.05	22.42 G*
枸杞 2b-1					
100	9636.50	447.35	0.05	0.77	5.17 G*
10	11105.67	1061.48	0.10	0.89	2.07 C
1	13055.83	789.95	0.06	1.08	-2.36 D*
0.1	13001.67	629.72	0.05	1.08	-2.52 D*
枸杞 2b-2					
100	6665.67	476.22	0.07	0.55	16.48 G*
10	13727.17	771.23	0.06	1.14	-4.02 F*
1	14829.00	386.48	0.03	1.23	-8.95 G*
0.1	15710.50	839.44	0.05	1.30	-8.40 G*

T Prob.:	D	E	F	G	
	0.05>p>	0.02>p>	0.01>p>	0.001>p	

Table 6. Effects of Cato. on the proliferative response of RPE cells.

Group	MEAN	STD	%	Index	T Prob.
Ctrl	25714.00	1561.42	0.06	0.96	1.05 B
	27812.00	1004.47	0.04	1.04	-1.15 B
决明 4500psi 100% CO ₂ 45°C					
100ug	26890.50	3032.65	0.11	1.00	-0.10 A
10	26430.50	2329.63	0.09	0.99	0.29 A
1	32637.50	1517.47	0.05	1.22	-5.94 G*
决明 4500psi 1%MeOH 45°C					
100ug	20453.75	1668.95	0.08	0.76	6.21 G*
10	24415.00	2844.86	0.12	0.91	1.84 C
1	24061.75	2340.37	0.10	0.90	2.34 D*
决明 4500psi 3%MeOH 45°C					
100ug	8678.00	1279.37	0.15	0.32	16.93 G*
10	18969.50	919.64	0.05	0.71	8.64 G*
1	22807.75	2458.56	0.11	0.85	3.35 F*
决明 4500psi 5%MeOH 45°C					
100ug	13666.75	2423.22	0.18	0.51	11.15 G*
10	24872.25	1419.30	0.06	0.93	1.95 C
1	31149.33	3806.18	0.12	1.16	-2.80 D*
T Prob.: D E F G					
0.05>p> 0.02>p> 0.01>p> 0.001>p>					

Table 7. Effects of Cato. on the phagocytosis of ros outer segments by retinal pigment epithelial cell

Group	MEAN	STD	%	Index	T Prob.
Ctrl	1133.50	69.71	0.06	1.00	0.00 A
决明 4500psi 100% C02 45°C					
100ug	971.50	102.10	0.11	0.86	3.21 F*
10ug	989.33	64.03	0.06	0.87	3.73 F*
1ug	1533.00	88.25	0.06	1.35	-8.02 G*
决明 4500psi 1% MeOH 45°C					
100ug	1321.83	149.36	0.11	1.17	-2.80 E*
10ug	1140.67	93.22	0.08	1.01	-0.13 A
1ug	1113.75	88.20	0.08	0.98	0.40 A
决明 4500psi 3% MeOH 45°C					
100ug	682.50	53.29	0.08	0.60	12.59 G*
10ug	1046.00	76.67	0.07	0.92	2.07 C
1ug	1151.50	162.88	0.14	1.02	-0.25 A
决明 4500psi 5% MeOH 45°C					
100ug	934.00	125.80	0.13	0.82	3.40 F*
10ug	1104.33	81.00	0.07	0.97	0.67 A
1ug	1055.40	110.30	0.10	0.93	1.43 B
T Prob.: D E F G					
0.05>p> 0.02>p> 0.01>p> 0.001>p>					

Table 8. Effects of Cato. on the proliferation of spleen cell.

Group	MEAN	STD	%	Index	T Prob.
Blank	1409.60	61.48	0.04	0.21	14.10 G*
Ctrl	6780.33	841.87	0.12	1.00	0.00 A
决明 4000psi 40°C 100%CO ₂					
100ug/ml	5274.80	798.60	0.15	0.78	3.02 E*
10	7905.83	880.07	0.11	1.17	-2.26 D*
1	7892.00	684.85	0.09	1.16	-2.51 D*
0.1	7079.80	629.40	0.09	1.04	-0.66 A
决明 4500psi 50°C 2%MeOH					
100ug/ml	11112.17	1167.87	0.11	1.64	-7.37 G*
10	9172.00	1034.59	0.11	1.35	-4.24 F*
1	10014.00	1482.84	0.15	1.48	-4.45 F*
0.1	6228.75	408.84	0.07	0.92	1.20 B
决明 5000psi 60°C 5%MeOH					
100ug/ml	6214.40	330.85	0.05	0.92	1.41 B
10	8049.40	1438.71	0.18	1.19	-1.83 B
1	5981.75	721.66	0.12	0.88	1.55 B
0.1	5305.60	914.23	0.17	0.78	2.78 D*
决明 H ₂ O extra					
100ug/ml	6160.00	340.40	0.06	0.91	1.54 B
10	7363.17	549.68	0.07	1.09	-1.42 B
1	4571.25	453.37	0.10	0.67	4.75 F*
0.1	4486.50	542.36	0.12	0.66	4.78 F*
T Prob.: D E F G					
0.05>p> 0.02>p> 0.01>p> 0.001>p					

結論

經由本研究得知，由枸杞子，決明子對網膜色素上皮細胞機能的作用初步證實了民間眼科用中藥確實對視力的維護有其科學的根據存在。

本年度我們以超臨界流体萃取法探討中藥枸杞子，決明子的活性成份萃取。目前已克服二氧化碳純度不足，含水量過高，流量過大所造成結冰及塞管線等技術上問題，成功的以添加少量甲醇的方式，萃取出不同極性的區分，我們亦將其容量由原廠之 10cc 擴充至 80 cc. 我們相信此一萃取法的進展，除對有效成份的研究有所助益以外，更重要的是對中藥科學化濃縮的幫助是一大突破。我們我們解決一些困難，最初其總萃取率只有 100mg 以下為總樣本之 1/500 到 1/1000 (Table 2)，且每次萃取樣品再現性不好，在每個條件的區分性並不很清楚。這些問題經過本實驗室的摸索調整終於可以找出適當的條件。以決明為例可達到萃取 2g 左右為總樣本之 1/25 到 1/50 (Table 2)，提高了 20 倍的產量這對於繼續做分離是有很大幫助。

經由本研究得知，由枸杞子，決明子對網膜色素上皮細胞機能的作用初步證實了民間眼科用中藥確實對視力的維護有其科學的根據存在。枸杞子，決明子對網膜色素上皮細胞生長及吞噬作用有明顯的促進，我們相信在如此低濃度下有生物活性，枸杞子，決明子在眼科中藥所扮演的角色應可得到良好的佐証。我們期望在得到純化物後，能進一步探討其對網膜色素上皮細胞多采多姿的調節作用。由於網膜色素上皮細胞多方面的功能與視力的維持息息相關，傳統中藥對眼睛視力的維護可以說得到了科學的印證，至於何種成份使它具有這種活性則有待今後進一步證實。我們可以初步的了解一些眼科用民間藥對 RPE 細胞的確有相當強的調節作用，希望對因 RPE dysfunction 的眼科臨床治療上有所幫助。

我們也觀察出這些對網膜色素上皮細胞生長及吞噬作用有明顯的促進的區分，對老鼠脾細胞的生長反應也同樣具有促進作用 (Table 5,8)，由於網膜色素上皮細胞也被認為有免疫細胞的特性，枸杞子，決明子含有免疫調節作用是可以理解的。

根據最近 Reh 在 Nature (1987) 的報告顯示，網膜色素上皮細胞 (RPE) 在 laminin 的存在下，可以被 transdifferentiation 成為 neurons，換言之，網膜色素上皮細胞 (RPE) 提供一個非常好的網膜再生 (regeneration) 時新 neurons 的來源。因此，我們認為，網膜色素上皮細胞 (RPE) 的機能及枸杞子，決明子中之調節因子，有待我們進一步去廣汎而深入的探討其作用機轉。

参考文献

1. Glaser, B.M., P.A. Campochiaro, J.L. Davis and M. Sato, Retinal pigment epithelial cells release an inhibitor of neovascularization. Arch.Ophthalmol, 103: 1870-1875, 1985.
2. JR, B.N., D. Armstrong, R.D. Stratton, W.W. Dawson, K.K. Kelley, A. Ellis and A.I. Webb, Culture of retinal pigment epithelium from chorio-retinal biopsies. Acta. Ophthalmol. 63: 129-134, 1985.
3. Hayashi, M., K. Asayama and S. Ueno, Tissue culture of the retinal pigment epithelial cells. Acta. Ophthalmol. 56: 83-94, 1978.
4. Campochiaro, P.A. and B.M. Glaser, Endothelial cells release a chemoattractant for retinal pigment epithelial cells in vitro. Arch. Ophthalmol. 103: 1876-1880, 1985.
5. Essner, E., J.R. Roszka and J.H. Schreiber, Phagocytosis and surface morphology in cultured retinal pigment epithelial cells Invest. Ophthalmol. Visual Sci. 17: 1040-1048, 1978.
6. Mayerson, P.L. and M.O. Hall, Rat retinal pigment epithelial cells show specificity of phagocytosis in vitro. J Cell Biol, 103: 299-308, 1986.
7. Chan, C.C., J.J. Hooks, R.B. Nussenblatt and B. Detrick, Expression of Ia antigen on retinal pigment epithelium in experimental autoimmune uveoretinitis. Curr Eye Res, 5: 325-330, 1986.
8. Vollmer, G. and P.G. Layer, Reaggregation of chick retinal and mixtures of retinal and pigment epithelial cell, Neurosci Lett, 63: 91-95, 1986.
9. Boulton, M., J. Marshall and H.C. Wong, The generation of dense granules within cultured human retinal pigment epithelial cells at senescence. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 224: 106-109, 1986.

10. Wiedemann, P., S.J. Ryan, P. Novak and N. Sorgente, Vitreous stimulates proliferation of fibroblasts and retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res*, 41: 619-628, 1985.
11. Weiter, J.J., F.C. Delori, G.L. Wing and K.A. Fitch, Retinal pigment epithelial lipofuscin and melanin and choroidal melanin in human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 27: 145-152, 1986.
12. Campochiaro, P.A. and B.M. Glaser, Endothelial cells release a chemoattractant for retinal pigment epithelial cells in vitro. *Arch Ophthalmol*, 103: 1876-1880, 1985.
13. Boulton, M. and J. Marshall, Repigmentation of human retinal pigment epithelial cells in vitro. *Exp Eye Res*, 41: 209-218, 1985.
14. Mayerson, P.L., M.O. Hall, V. Clark and T. Abrams, An improved method for isolation and culture of rat retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 26: 1599-1609, 1985.
15. Rosenbaum, J.T., L. O'Rourke, G. Davies, C. Wenger, L. David and J.E. Robertson, Retinal pigment epithelial cells secrete substances that are chemotactic for monocytes. *Curr Eye Res* 6: 793-800, 1987.
16. Burke, J.M. and S.S. Twining, Vitreous macrophage elicitation: generation of stimulants for pigment epithelium in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 28: 1100-1107, 1987.
17. Schweigerer, L., B. Malerstein, G. Neufeld and D. Gospodarowicz, Basic fibroblast growth factor is synthesized in cultured retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 143: 934-940, 1987.
18. Williams, D.S. and S.K. Fisher, Prevention of rod disk shedding by detachment from the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 28: 184-187, 1987.
19. Boulton, M. and J. Marshall, Effects of increasing numbers of phagocytic inclusions on human retinal pigment epithelial cells in culture: a model for aging. *Br J Ophthalmol*, 70: 808-815, 1986.
20. Miller, H., B. Miller and S.J. Ryan, The role of retinal pigment epithelium in the involution of subretinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 27: 1644-1652, 1986.

活血化癥中藥血管新生調節物質的研究

Studies on the angiogenesis modulators in Chinese Herbs.

吳 榮 燦

陽明大學

中文摘要

中醫活血化癥藥一般指可以消除淤滯，調理血行的作用。最早“內經”記載“血凝滯”，“血不通”，“留血”，“神農本草經”已有四十一種活血化癥藥的記載，唐容川“血証論”專論血證提及“活血以止血，祛癥以生新”。中醫瘀血可能指的是一些疾病引起的血液循環障礙，例如“血脈不通”“污穢之血”“離經之血”“血液內結”“久病入血”，活血化癥的治療則包括“通其閉阻”“化其瘀滯”“去其陳積”“調合氣血”，“促其新生”，以血管新生的研究模型來探討中藥的活血化癥作用，應為非常合理的研究方向。尤其中藥的跌打損傷用藥，經由促進血管新生的能力來達到組織修復及再生應可預期。而中醫對腫瘤的患者有“氣滯，血瘀，濕聚，氣虛，血虧”治療原則“軟堅散結”“補益氣血”，亦讓我們了解腫瘤的新生血管應為中藥可能的作用對象。因此，我們將針對活血化癥中藥作一個有系統的研究。我們選列下述中藥：養血活血—當歸，雞血藤，白芍，赤芍，丹參。活血化癥—川芎，紅花，益母草，蘇木，山楂。化癥止痛—乳香，沒藥，郁金，五靈脂。破血散結—三棱，莪朮，劉寄奴，桃仁，穿山甲。我們就上述中藥進行其對人類臍靜脈內皮細胞DNA合成作用的探討。

在含5 % FCS, 50 unit/ml Heparin, 50 μ g/ml ECGS之活血化癥藥粗萃取物對人類臍靜脈內皮細胞 DNA 合成促進作用的篩選實驗模式中，見到對人類臍靜脈內皮細胞 DNA 合成具明顯促進作用之藥材有：川芎、牛膝、延胡索、郁金、三七、山楂、桃仁、益母草、牡丹皮、劉寄奴。

在 serum free, bFGF1ng/ml 之活血化癥藥粗萃取物對人類臍靜脈內皮細胞 DNA 合成促進作用的篩選實驗模式中，大多數藥材之活性均明顯提高。

活性特別高者有：三七、王不留行、益母草、三棱、雞血藤、牛膝、莪朮、延胡索、山楂、川紅花、川芎、丹蔘、劉寄奴，此結果與前述之篩選結果，大致上作用趨勢相符。其中川紅花、丹蔘之活性在較低濃度(100 ng/ml)下才明顯表現出來。

由以上活血化癥藥之篩選結果，可明顯看出大多數活血化癥對人類臍靜脈內皮細胞DNA合成有促進作用。因此活血化癥藥在血管新生(angiogenesis)過程中所扮演的角色值得進一步的探討。

關鍵詞：中藥，新生血管，內皮細胞，生物活性

ABSTRACT

Applied blood-quicking and stasis-dispelling agent (BQSDA) for circulation obstruction is a special and exclusive therapy in Chinese traditional medicine. Chinese traditional medicine consider that the treatment mechanism of BQSDA included to free the circulation obstruction, to transform the stasis accumulation, to dispel the vintage accumulation, to harmonize Qi and circulation, to promote the repairing, and etc. So, we try to study the effects and mechanisms of BQSDA on the angiogenesis regulation. We adopted all kinds of crude drug having blood-quicking and stasis dispelling capability, included blood-

nourishing and blood quickening agent : *Angelica sinensis* 、
Paeonia lactiflora 、*Salvia miltiorrhiza* 、*Spatholobus suberectus*
; blood-quicking and stasis-dispelling agent : *Ligusticum wal-*
luchii 、*Carthamus tinctorius* 、*Leonurus heterophyllus* 、*Caesal-*
pinia sappan 、*Crataegus pinnatifida* 、*Panax pseudo-ginseng*, etc.
: blood-breaking and dissipated stasis agent: *Sparganium stolo-*
niferum 、*Curcuma zedoaria* 、*Artemisia anomala* 、*Prunus davidiana*
、*Vaccaria segetalis* 、*Achyranthes bidentata* 、*Manis pentadactyla*,
etc.; and transform stasis and suppress pain agent: *Curcuma*
aromatia 、*Corydalis yanhusuo*, etc.. By traditional decoction of
herbal medicines, we got crude extracts, and initially to observe
effects of these crude extract on morphology and DNA synth-
-
esis of human umbilical vein endothelial cell(HUVEC).

As the results of our screening, most of the BQSDA crude
extracts can stimulated HUVEC growth, assembling, elongation,
and DNA synthesis. We strongly suggested that the BQSDA might
play an important role in angiogenesis and worth of further
study.

Key words: Chinese herbs, Angiogenesis, Endothelial cells, Bio-
logical activity

序論:

血管新生(Angiogenesis)是一個非常複雜的過程,包括:局部分解小
靜脈或微血管底膜,讓內皮細胞游走(migration)及生長增殖(
proliferation)及進一步分化形成新的微血管.血管新生對於正常組織之
發育成長是不可或缺的步驟,但是就一個發育成熟的個體來說,它發生的

機會卻是微乎其微的，除了一些特殊的生理現象，如女性排卵，懷孕期胎盤發育及傷口癒合，仍然有血管新生之伴隨發生，而且它們所發生的時間相對地比較短暫並受到非常嚴格的控制。另一方面在一些病理現象，失控的血管新生往往扮演著致病因上的決定性角色，如糖尿病性視網膜病變（diabetic retinopathy），乃因視網膜之血管發生增生，最後常常導致失明；又如腫瘤生長必須要有新生血管以供給養分；其它尚有新生兒視網膜病變（retinopathy of prematurity），脈絡膜血管新生（choroidal neovascularization）及類風濕關節炎（rheumatoid arthritis）等疾病都有血管新生涵蓋其中。因此血管新生不論是在生理上或在病理上都是一個非常值得研究的課題。

活血化癥療法是我國傳統醫學中一種治療由血癥而引起的疾病的一種特有療法，而應用於此治法中，凡以消除癥滯，調理血行為主要作用的方藥，即稱活血化癥方藥（1）。由於傳統醫學與西方醫學對“癥血”的定義不同：西方醫學對“癥血”所下的定義只單純指靜脈迴流受阻，血液淤積，含義較局限。而傳統醫學所談的癥血病理則是廣泛的指疾病所引起的全身或局部血液循環障礙。包括心臟、血管、血液成份等的結構、功能、代謝發生改變所引起的一系列病變。例如傳統醫學中對癥證的描述“血脈不通”、“污穢之血”、“離經之血”、“血液內結”、“久病入血”等，以現代醫學的說法則包括如血流緩慢、癥滯；血液黏、濃、凝、聚；血液滲入組織間隙，腔竇發生淤積、變性；血栓形成；組織缺血，變性、萎縮、壞死、組織異常增生...等血液循環障礙所導致的生理紊亂狀態等（1）。並且透過臨床經驗，中醫也發現一些久治不癒的慢性病，與診斷不明，症狀複雜的一些疾病均具癥血指徵，且應用活血化癥療法也能取得較好療效，從而提出“久病必癥，怪病必有癥”的觀點，直接影響傳統醫學的病理，診斷與治則（2）。

發展到近代，許多醫家們更認為活血化癥療法可視為對疾病機體反應的一種平衡手段，而發展出傳統治則“八法”——“汗、吐、下、和。溫、清、補、消”之外的另一法，稱為“衡法”（2）（3）。也因此，活血化癥療法成為傳統醫學獨具的治療方法之一，而關於活血化癥療法的理論探討

及活血化癥方藥的機轉研究，也越來越成為當前醫學界及藥學界相當重視的研究課題。

此外，【神農本草經】共載365種藥，其中明確說明有活血化癥作用的藥物達 41 種，不少為今日臨床常用藥。(1)(2)(3)

由於傳統醫學中認為癥症是因血液循環障礙所引起的一系列病變。因此，應用活血化癥方藥治療的基本原理即包括了："通其閉阻"、"化其鬱滯"、"去鬱滯"、"去其陳積"、"調和氣血"、"促其新生"等。若以現代醫學較為具體的說法則是包括擴張血管、疏通循環、降脂溶栓、改善血液流態、清除病理產物、代謝接物、有毒物質、"抑制增生病變、改善神經體液調節、代謝調整、促近組織細胞修復、新生、提高殘存細胞代償功能、恢復器官組織正常反應性、糾正紊亂功能...等，希望有多個層次，多個環節上抑制癥血病理過程，綜合產生治療效果(1)(2)。

依傳統中醫性能作一粗略的分類，活血化癥類中藥可略分為 4 類，其代表藥物如下：

養血活血類：當歸、芍藥(白、赤芍)、雞血藤、丹參。

活血化癥類：川芎、紅花、益母草、(蒲葇)、蘇木、山楂、三七。

化癥止痛類：乳香、沒藥、(玄胡)、(血竭)、鬱金、(石靈脂)、延胡索。

破血散結類：三棱、莪朮、劉寄奴、桃仁、王不留行、牛膝、(水蛭)、穿山甲。

因此，除了一些動物類生藥及不易取得之生藥材(括弧處)，將四類活血化癥藥全部採用，以傳統水煎煮方法、萃取出粗萃液，另外再不設限選取一些非活血化癥類常見生藥，以同法萃取，做為對照組選擇對內皮細胞在 DNA 合成促進的篩選實驗中有強烈活性的藥物做進一步的成份分離、分析，並以實驗室中已於動物實驗中見到具強烈血管新生作用的七葉蓮成份 Formosanin-C 做為 positive control (正對照組)，進一步於內皮細胞模型下，觀察血管新生的過程中，內皮細胞會出現的游走、增殖、等現象與藥物的作用是否有關。

方法：

(一)藥材粗萃取：

所買的活血化癥類及非活血化癥類生藥材經稱重後，取定量的 dis-H₂O以正好水蓋過藥材的傳統煎煮藥材方式，浸泡 1 小時後，水浴滾沸 1 小時，以紗布過濾，再經 3000 rpm 離心 30 分鐘，捨棄沈澱部份，定量各生藥煎煮後之粗萃取液體積，再經冷凍乾燥後可得到藥材粗萃後之重量，換算回原 ml 數，可定量出每一味生藥經粗萃取量(mg/ml)。進行組織培養實驗前，稱取定量的藥物 (10mg 或 1mg)，以 dis-H₂O 或有機溶媒完全溶解後，經 0.22um 無菌過濾膜，再將所溶的H₂O或有機溶媒抽乾，以無菌水溶之，進行內皮細胞的各項生物檢測。

(二)人類臍靜脈內皮細胞的分離與培養

自榮總產房取之新鮮臍帶置於內含M199培養液瓶中，保存於4 °C直至操作。在無菌操作下，將取得之臍帶以無菌器械取出，以 Hank's balanced salt solution (HBSS) 浸泡及沖洗之，用無菌紗布擦拭外圍血塊及黏液，然後以注射針筒注射 HBSS solution 入靜脈，沖出靜脈血及凝結之血塊。以止血鉗將臍帶一端夾住，自另一端注入0.1% Collagenase type I solution,再以止血鉗夾住此端，將整條臍帶浸入37°C 的 HBSS solution 中，允許 collagenase type I 酵素作用10~15分鐘。再解開止血鉗，將此 collagenase type I 酵素及打下的細胞懸浮溶液收集於含2% 胎牛血清的M199 培養液中，以中和酵素反應。再重覆上述動作，以止血鉗夾注二端，靜脈中灌入含 Trypsin-EDTA-Glucose 的 NEG solution，置於 37°C 的 HBSS solution 中 Trypsin 酵素作用 2-3 分鐘，再收集此含 Trypsin 酵素之細胞懸浮液於含 2% 胎牛血清的 M199 培養液中。最後再以 M199 培養液沖洗臍帶靜脈，收集殘餘細胞，經 1200 rpm 離心 10 分鐘後；取得內皮細胞，培養於 25% 平方公分，經白明膠覆蓋 (Gelatin-coating) 的組織培養瓶，內含 5%胎牛血清，50 μ g/ml ECGS (endothelial cell growth supplement)，50 units/ml Heparin 的M199 培養液中，於 5% CO₂，37°C的培養箱培養

(三)人類臍靜脈內皮細胞生長能力分析(Growth activity assay)

(1)細胞增殖能力分析—利用細胞數目的測定下人類臍帶靜脈內皮細胞細胞於 24 格之組織培養盤，組織培養事前已以 1% Gelatine 覆蓋細胞濃度為 5×10^4 cells/ml，1 ml cell 懸浮液 /well，培養於含 5 % 胎牛血清 50 μ g/ml ECGS, 50 μ /ml Heparin 之 M199 培養液中，於 5 %CO₂ ,37°C 培養箱中培養 16~18小時後，以不含胎牛血清M199 培養液沖洗2次，再以不含胎牛血清(serum free condition)但含1ng bFGF (basic Fibroblast growth factor)/ml 之 M199 培養液培養 4~6小時後，加不同濃度之待測藥品，於37°C 5%CO₂ 培養箱中培養 3 天後，將原培養液吸掉，以200 μ l/well的TEG solution(內含 0.05% Trypsin, 0.02%EDTA,0.05% Glucose) 作用3~5分鐘，將打下之細胞懸浮液取定量體積，以trypan blue 染色液作一定比例稀釋染色後，使用血球細胞計數器 (hemocytometer)計數細胞數目，再推出正確之細胞總數。

(2)細胞DNA 合成能力之分析—利用3H-thymidine incorporation(嵌入)。(I)下人類臍帶靜脈內皮細胞於96格已以1%Gelatine coating 之組織培養盤，細胞濃度為 5×10^4 cell/ml，每格加入細胞懸浮液180 μ l，培養於含 5% 胎牛血清， 50 μ g/ml ECGS, 50 μ /ml Heparin 之 M199 培養液，於5%CO₂，37°C 培養箱中培養 4hrs，待內皮細胞 adhesion 至培養盤後加入不同濃度的待測藥品20 μ l 於原細胞培養液中，再置於培養箱中培養24小時後，加入 methyl-3H-thymidine 入細胞培養液中，其最後濃度為 2 μ Ci/ml，再於培養箱中培養16~18小時，之後，將細胞冰於-20°C，冰凍解凍2次，利用此冰凍及解凍的過程，使細胞溶解，再以細胞收集器 (cell harvester) 分別以冰PBS solution 洗2次，5% 冰 TCA(trichloro-acetic acid)buffer 洗 3次，冰 methanol 洗 1 次，將細胞之去氧核糖核酸 (DNA) 收集在玻璃纖維 (glass fiber) 濾紙上，待濾紙乾後，夾入計數瓶 (counting vial)，加入 counting solution，利用 β -液體閃爍計數器 (LKB.1211.Rackbeta Liquid Scintillation Counter)測量放射強度，檢測 methyl-3H-

thymidine 嵌入內皮細胞 DNA 的量。(II)下人類臍靜脈內皮細胞於 96 格已經 1% Gelatin coating 之組織培養盤，細胞濃度為 5×10^4 cell/ml，每格加入細胞懸浮液 $180 \mu\text{l}$ ，培養於含 5% 胎牛血清， $50 \mu\text{g/ml}$ ECGS， $50 \mu\text{g/ml}$ Heparin 之 M199 培養液，於 5% CO_2 ， 37°C 培養箱中培養 16~18 小時，將原培養液吸掉，以不含胎牛血清之 M199 沖洗培養盤 2 次後，換成不含胎牛血清但含 bFGF 1 ng/ml 之 M199 培養液，置入培養箱中培養，約 4~6 小時取出，加入不同濃度待測藥品，再置入培養箱中，經過 8 小時加入 3H -thymidine $2 \mu\text{Ci/ml}$ ，再經培養箱中培養 16~18 小時， -20°C 冰凍，經冰凍解凍 2 次，以冰 PBS buffer 及冰 TCA buffer，冰 methanol 洗之，利用細胞收集器(cell harvester) 收集細胞之去氧核糖核酸 (DNA) 於玻璃纖維濾紙(glass fiber)上，利用 β -液體閃爍計數器 (LKB1211, Packbeta Liquid Scintillation Counter) 檢測 methyl- 3H - thymidine 嵌入內皮細胞 DNA 的情形。

結果:

活血化癥藥對人類臍靜脈內皮細胞 DNA 合成促進作用之篩選結果在選擇了實驗藥材後，首先模擬傳統中藥使用方法的水煎煮過程，以經過稱量後的藥材及蒸餾水煎煮，於水滾沸後再煎煮 1 小時，之後去除藥材殘渣，並經初步過濾及離心，將殘渣再去除，經冷凍乾燥後，換算出此藥粗萃取物的濃度。之後取定量溶於水，經 $0.22 \mu\text{m}$ 無菌過濾後備用，以備進行藥物對人類臍靜脈內皮細胞 DNA 合成作用的初步篩選。

在含 5% FCS, 50 unit/ml Heparin, $50 \mu\text{g/ml}$ ECGS 之活血化癥藥粗萃取物對人類臍靜脈內皮細胞 DNA 合成促進作用的篩選實驗模式中，見到對人類臍靜脈內皮細胞 DNA 合成具明顯促進作用之藥材有：川芎、牛膝、延胡索、郁金、三七、山楂、桃仁、益母草、牡丹皮、劉寄奴。(Table 1)在 serum free, bFGF 1 ng/ml 之活血化癥藥粗萃取物對人類臍靜脈內皮細胞 DNA 合成促進作用的篩選實驗模式中，大多數藥材

Table 1. Effect of crude extracts from blood-quicking and stasis-dispelling agent(活血化癥藥) on ^3H -thymidine incorporation of HUVECs in vitro. HUVECs (5×10^4) were cultured with 5% FCS, 50 units/ml Heparin, and various conc. of drugs were added 4 hours later. After 24 hours, ^3H -thymidine $2 \mu\text{Ci/ml}$ were added, and 16-18 hours later, cells were freeze and thawed twice, then cells were collect by cell harvester and counted by β -counter.

	Index
CTRL (dil H ₂ O)	1

藥材	濃度ug/ml	Index	P value	藥材	濃度ug/ml	Index	P value
川芎	100	0.52	p<0.001*	川紅花	100	0.29	p<0.001*
*	10	1.13	p<0.05*		10	0.93	p<0.5
	1	1.31	p<0.001*		1	1.10	p<0.05*
牛膝	100	1.07	p<0.5	劉寄奴	100	1.01	p<1
*	10	1.41	p<0.001*	*	10	1.41	p<0.001*
	1	1.39	p<0.001*		1	1.39	p<0.001*
延胡索	100	0.31	p<0.001*	蘇木	100	0.03	p<0.001*
*	10	1.10	p<0.05*		10	0.30	p<0.001*
	1	1.29	p<0.01*		1	1.09	p<0.05*
郁金	100	0.95	p<0.5	山楂	100	0.98	p<1
*	10	1.31	p<0.01*		10	1.20	p<0.001*
	1	1.26	p<0.001*		1	1.12	p<0.02*
三棱	100	0.82	p<0.01*	王不留	100	0.77	p<0.001*
	10	1.20	p<0.01*	行	10	1.05	p<0.5
	1	1.14	p<0.02*		1	1.17	p<0.01*
澤瀉	100	0.57	p<0.001*	穿山甲	100	0.57	p<0.001*
	10	0.94	p<0.5		10	1.01	p<1
	1	0.89	p<0.5		1	1.04	p<0.5
菝葜	100	0.26	p<0.001*	桃仁	100	1.13	p<0.001*
	10	0.75	p<0.01*	*	10	1.38	p<0.001*
	1	0.95	p<0.5		1	1.31	p<0.001*
雞血藤	100	0.19	p<0.001*	益母草	100	0.97	p<0.05*
	10	1.09	p<0.1	*	10	1.38	p<0.001*
	1	1.01	p<1		1	1.44	p<0.001*
丹參	100	0.05	p<0.001*	三七	100	0.95	p<0.01*
	10	0.81	p<0.01*	*	10	1.35	p<0.001*
	1	0.99	p<1		1	1.44	p<0.001*
芍藥	100	0.03	p<0.001*	牡丹皮	100	0.29	p<0.001*
	10	1.04	p<0.5	*	10	1.11	p<0.001*
	1	1.03	p<0.5		1	1.33	p<0.001*

表一：活血化癥中藥粗萃液對人類臍靜脈內皮細胞去氧核糖核酸合成作用的影響。人類臍靜脈內皮細胞（五萬）以百分之五胎牛血清及每毫升五十單位肝素培養，四小時後加入不同濃度的各種藥物二十四小時後加入每毫升二微克居里的放射性胸腺核苷，十六到十八小時後將細胞冰凍解凍二次，以細胞收穫機將其收集後測其放射性指數。

Table 2 Effect of crude extracts from blood-quickening and stasis-dispelling agent(活血化癥藥) on ^3H -thymidine incorporation of HUVECs in vitro. HUVECs (5×10^4) were cultured with 5% FCS, 50 units/ml Heparin, 50 $\mu\text{g/ml}$ ECGS. After 16-18 hours at 37°C , cultured HUVECs were changed with serum free medium, and various conc. of drugs with 1ng/ml bFGF were added after 4-6 hours. 8 hours later, ^3H -thymidine 2 $\mu\text{Ci/ml}$ were added, and 16-18 hours later, freeze and thawed twice, then cells were collected by cell harvester and counted by β -counter.

		Index	
CTRL (bFGF 1ng/ml, H ₂ O)		1	

藥材	濃度ug/ml	Index	P value	藥材	濃度ug/ml	Index	P value
牡丹皮	100	0.46	p<0.001*	菝葜	100	1.43	p<0.001*
	10	0.76	p<0.01	*	10	2.01	p<0.001*
	1	1.69	p<0.001*		1	1.56	p<0.001*
	0.1	1.71	p<0.001*		0.1	1.40	p<0.001*
澤瀉	100	0.50	p<0.001*	延胡索	100	1.71	p<0.001*
	10	0.87	p<0.1	*	10	2.36	p<0.001*
	1	1.05	p<0.5		1	2.39	p<0.001*
	0.1	0.95	p<0.5		0.1	1.58	p<0.001*
三七	100	1.50	p<0.001*	穿山甲	100	1.71	p<0.001*
*	10	2.03	p<0.001*	*	10	1.71	p<0.001*
	1	1.95	p<0.001*		1	1.91	p<0.001*
	0.1	1.01	p<1		0.1	2.10	p<0.001*
王不留行	100	0.97	p<1	山楂	100	0.38	p<0.001*
	10	1.81	p<0.001*	*	10	1.44	p<0.001*
	1	1.58	p<0.001*		1	2.94	p<0.001*
	0.1	1.40	p<0.001*		0.1	1.63	p<0.001*
益母草	100	0.82	p<0.01*	川紅花	100	0.87	p<0.01*
*	10	1.20	p<0.01*	*	10	1.32	p<0.01*
	1	2.03	p<0.001*		1	1.91	p<0.001*
	0.1	1.34	p<0.001*		0.1	2.17	p<0.001*
三棱	100	1.22	p<0.001*	郁金	100	0.77	p<0.001*
*	10	1.88	p<0.001*		10	1.40	p<0.001*
	1	1.95	p<0.001*		1	1.36	p<0.001*
	0.1	1.34	p<0.01*		0.1	0.95	p<0.5
蘇木	100	1.31	p<0.001*	川芎	100	1.67	p<0.001*
	10	1.69	p<0.001*	*	10	2.07	p<0.001*
	1	1.51	p<0.001*			1.66	p<0.001*
	0.1	1.05	p<0.5		1	1.57	p<0.001*

表二：活血化癥中藥粗萃液對人類臍靜脈內皮細胞去氧核糖核酸合成作用的影響。人類臍靜脈內皮細胞（五萬）以百分之五胎牛血清，每毫升五十單位肝素，每毫升五十毫克內皮細胞生長因子萃物培養。在三十七度培養十六到十八小時後，先以無血清培養基置換，四到六小時後加入每毫升一毫微克鹼性纖維芽生長因子，加入不同濃度的各種藥物。二十四小時後加入每毫升二微毫居里的放射性胸腺核甘，十六到十八小時後將細胞冰凍解凍二次，以細胞收穫機將其收集後測其放射性指數。

Table 3 Effect of crude extracts from blood-quicking and stasis-dispelling agent(活血化癥藥) on ^3H -thymidine incorporation of HUVECs in vitro. HUVECs (5×10^4) were cultured with 5% FCS, 50 units/ml Heparin, 50 $\mu\text{g/ml}$ ECGS. After 16-18 hours at 37°C , cultured HUVECs were changed with serum free medium, and various conc. of drugs with 1ng/ml bFGF were added after 4-6 hours. 8 hours later, ^3H -thymidine 2 $\mu\text{Ci/ml}$ were added, and 16-18 hours later, freezed and thawed twice, then cells were collected by cell harvester and counted by β -counter.

	Index
CTRL (bFGF 1ng/ml, H ₂ O)	1

雞血藤	100	1.05	p<0.5	丹參	100	0.40	p<0.001*
*	10	1.83	p<0.001*	*	10	1.19	p<0.5
	1	1.75	p<0.001*		1	1.74	p<0.001*
	0.1	1.47	p<0.001*		0.1	2.39	p<0.001*
牛膝	100	1.96	p<0.001*	劉寄奴	100	0.77	p<0.01*
*	10	2.22	p<0.001*	*	10	1.40	p<0.001*
	1	1.91	p<0.001*		1	2.50	p<0.001*
	0.1	1.44	p<0.001*		0.1	1.71	p<0.001*
川牛膝	100	1.17	p<0.01*	懷牛膝	100	1.27	p<0.02*
	10	1.99	p<0.001*		10	1.65	p<0.001*
	1	2.00	p<0.001*		1	1.53	p<0.001*
	0.1	1.61	p<0.010*		0.1	1.51	p<0.001'

表三：活血化癥中藥粗萃液對人類臍靜脈內皮細胞去氧核糖核酸生合成作用的影響。人類臍靜脈內皮細胞（五萬）以百分之五胎牛血清，每毫升五十單位肝素，每毫升五十毫克內皮細胞生長因子萃物培養。在三十七度培養十六到十八小時後，先以無血清培養基置換，四到六小時後加入每毫升一毫微克鹼性纖維芽生長因子，加入不同濃度的各種藥物。八小時後加入每毫升二毫居里的放射性胸腺核甘，十六到十八小時後將細胞冰凍解凍二次，以細胞收穫機將其收集後測其放射性指數。

Table 4. Effect of crude extracts from non-blood quicking and stasis-dispelling agent(非活血化癥藥) on ^3H -thymidine incorporation of HUVECs in vitro. HUVECs (5×10^4) were cultured with 5% FCS, 50 units/ml Heparin, 50 $\mu\text{g/ml}$ ECGS. After 16-18 hours at 37°C , cultured HUVECs were changed with serum free medium, and various conc. of drugs with 1ng/ml bFGF were added after 4-6 hours. 8 hours later, ^3H -thymidine 2 $\mu\text{Ci/ml}$ be added, and 16-18 hours later, freeze and thawed twice, then cells were collected by cell harvester and counted by β -counter.

	Index
CTRL (bFGF 1ng/ml, H ₂ O)	1

藥材	濃度ug/ml	Index	P value	藥材	濃度ug/ml	Index	P value
蓮子	100	0.92	p<0.01*	黃耆	100	0.61	p<0.001*
	10	1.00	p<1		10	1.30	p<0.001*
	1	1.17	p<0.001*		1	1.42	p<0.001*
	0.1	1.08	p<0.01*		0.1	1.29	p<0.001*
山藥	100	1.03	p<0.5	甘草	100	1.10	p<0.01*
	10	1.40	p<0.001*	*	10	1.61	p<0.001*
	1	1.38	p<0.001*		1	1.78	p<0.001*
	0.1	1.35	p<0.001*		0.1	1.46	p<0.001*
芡實	100	0.99	p<1	人參	100	1.22	p<0.001*
	10	1.25	p<0.001*	*	10	1.47	p<0.001*
	1	1.24	p<0.001*		1	1.52	p<0.001*
	0.1	1.26	p<0.001*		0.1	1.40	p<0.001*
絞股藍	100	0.99	p<1	茯苓	100	0.95	p<0.5
*	10	1.44	p<0.001*		10	1.45	p<0.001*
	1	1.71	p<0.001*		1	1.37	p<0.001*
	0.1	1.39	p<0.001*		0.1	1.10	p<0.001*
白朮	100	1.18	p<0.001*				
	10	1.29	p<0.001*				
	1	1.38	p<0.001*				
	0.1	1.27	p<0.001*				

表四：活血化癥中藥粗萃液對人類臍靜脈內皮細胞去氧核糖核酸合成作用的影響。人類臍靜脈內皮細胞（五萬）以百分之五胎牛血清，每毫升五十單位肝素，每毫升五十毫克內皮細胞生長因子萃物培養。在三十七度培養十六到十八小時後，先以無血清培養基置換，四到六小時後加入每毫升一毫微克鹼性纖維芽生長因子，加入不同濃度的各種藥物。八小時後加入每毫升二微毫居里的放射性胸腺核甘，十六到十八小時後將細胞冰凍解凍二次，以細胞收穫機將其收集後測其放射性指數。

之活性均明顯提高。

活性特別高者有：三七、王不留行、益母草、三棱、雞血藤、牛膝、莪朮、延胡索、山楂、川紅花、川芎、丹蔘、劉寄奴，此結果與 crude assay system 之篩選結果，大致上作用趨勢相符。其中川紅花、丹蔘之活性在較低濃度 (100ng/ml) 下才明顯表現出來。(Table 2,3,4) 由以上活血化癥藥之篩選結果，可明顯看出大多數活血化癥對人類臍靜脈內皮細胞 DNA 合成有促進作用。因此活血化癥藥在血管新生 (angiogenesis) 過程中所扮演的角色值得進一步的探討。

而對照非活血化癥藥粗萃取物對人類臍靜脈內皮細胞 DNA 合成作用的初步分析，在 serum free, 但含 bFGF 1ng/ml 的作用模式下，可見到諸如蓮子、白朮、芡實 (Table 4) 澤瀉 (Table 3) 對人類臍靜脈內皮細胞的作用並不明顯。但甘草、人參、絞股藍三味藥材的粗萃液對人類臍靜脈內皮細胞則有十分明顯的促進 DNA 合成的作用 (Table 4)，值得進一步的研究。

參考文獻

1. 孫孝洪 (1992) 中醫治療學原理, P.246. 四川科技出版社。
2. 活血化癥療法臨床實踐, (1982) 啓業書局, P36-38.
3. 姜春華 (1981) 活血化癥研究 P.194-213. 上海科技出版社。
4. Folkman J., Haudenschild C.C., Zetter B.R. 1979. Long-term culture of capillary endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5217.
5. Gross J.L., Moscatelli D., and Rifkin D.B. 1983. Increase activity in response to angiogenic stimuli in vitro. Proc. Natl. Sci. USA 80:2623-2627.
6. Kalebic T., Garbisa S., and Liotta L>a. 1983. Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells. Science 221: 281-283.

7. Banda M.J., Dwyer K.S. and Beckmann a. 1985. Wound fluid angiogenic factor stimulates the directed migration of capillary endothelial cells. J. Cell. Physiol. 29:183-193.
8. Form D.M., Pratt B.M., and Madri J.a., 1986. Endothelial cell proliferation during angiogenesis. Lab. Invest. 55: 521-530.
9. Montesano R. and Orci L. 1985. Tumor-promiting phorbol esters induce angiogenesis in vitro. Cell. 42: 469-477.
10. Furcht L.T. 1986. Critical factors controlling angiogenesis: cell products, cell matrix, and growth factors. Lab. Invest. 55: 505-509.
11. Klagsbrum M. and D'amore P.a. 1991. Regulators of angiogenesis. annu. Rev. Physiol. 53: 217-239.
12. Folkman J. and Shing Y. 1992. angiogenesis. J. Biol. Chem. 267: 10931-10934.

活血化癥中藥對人體白血球功能的影響

洪 傳 岳

國立陽明大學

中文摘要

三亞油酸是一種三酸甘油脂，是中藥三七之活性成分之一，其甘油的三個酯化位置之脂肪酸都是亞油酸，近來被報告可經由 nitric oxide - cyclic GMP 途徑而產生抗血小板活性，本研究，我們也將針對三亞油酸在人類多形核白血球產生 cyclic GMP 方面之效應做研討，結果顯示三亞油酸與多形核白血球反應10分鐘之後，在 0.1nM 到 10 μ M 之濃度範圍，可增加 cyclic GMP 之形成，以 methylene blue (1 μ M)、NG- monomethyl-L-arginine (1 μ M) 或d-sphingosine (10 μ M) 做前處理，都可降低三亞油酸的效應，此外，我們亦發現 xanthine oxidase 可阻斷三亞油酸的效應。

中藥三七之活性成份，三亞油酸之所以能增加多形核白血球之 cyclic GMP，可能部分藉由nitric oxide的形成，部分活化 protein kinase C，同時，superoxide anion 的增加可阻斷三亞油酸誘導 cyclic GMP 增加。中藥與白血球功能之關係，值得進一步之探討。

關鍵詞：三亞油酸，環狀GMP，氧化氮，蛋白激酶C，過氧陰離子，多形核白血球。

ABSTRACT

Trilinolein, a triacylglycerol with linoleic acid as the

only type of fatty acid residue in all three esterified positions of glycerol, was recently found to be an active ingredient in Panax Notoginseng. It was reported to have an antiplatelet effect mediated through stimulating nitric oxide and cyclic GMP formation. In this study, the effect of trilinolein on cyclic GMP formation in human polymorphonuclear leukocytes was investigated.

Trilinolein at concentrations ranged from 0.1nM to 10 μ M increased cyclic GMP formation after 10min incubation with polymorphonuclear leukocytes. Pretreated with 1 μ M methylene blue, 1 μ M MN^{G} -monomethyl-L-arginine or 10 μ M d-sphingosine attenuated the stimulatory effect of trilinolein on cyclic GMP formation. Besides, we found that the stimulatory effect of trilinolein on cyclic GMP was abolished by xanthine oxidase which increased superoxide anion. We concluded that trilinolein increased cyclic GMP in polymorphonuclear leukocytes partly by stimulating nitric oxide formation and partly by activating protein kinase C, and an increase in superoxide anion abolished the trilinolein-induced increase in cyclic GMP.

Key words: trilinolein, cyclic GMP, nitric oxide, protein kinase C, superoxide anion, polymorphonuclear leukocytes.

前 言

三亞油酸是一種三酸甘油脂，其甘油的三個酯化位置之脂肪酸都是亞油酸，是中藥三七之活性成分之一，三亞油酸曾被報告可改善人類紅血球之變形能力，近來則被發現有抗血小板活性及血管鬆弛作用，這些效應都與增加 cyclic GMP 相關，而且是透過 nitric oxide 合成的刺激，三亞油酸同時可清除多形核白血球產生之氧衍生自由基，此活性乃因每個三亞油酸分子存在有六個雙鍵。

多形核白血球是血液循環中，主要吞噬細胞，在組織受傷時，它們

最早到達感染位置，從這角色來看，它們必須對影響區域的化學訊息有反應，與血管壁產生相互作用，移動到感染位置，及辨識、吞噬、殺死外來物，這些步驟都代表了多形核白血球之功能。

多形核白血球能產生 nitric oxide，nitric oxide 可透過cyclic GMP依賴型之 protein kinase 機轉來增加 cyclic GMP 及調節多形核白血球之活性，有報告指出，nitric oxide 可使多形核白血球增加趨化性，且由多形核白血球產生之 nitric oxide 可調節本身與血管壁之作用，抑制 thrombin 所誘導的血小板凝集，及調整紅血球的變形能力。

Superoxide anion 可由多形核白血球產生，其為多形核白血球進行殺菌作用時所必須，它也是一種細胞毒性的自由基，當釋放大量時，可能造成組織傷害，有些報告指出，nitric oxide 能和 superoxide anion 產生交互作用，兩者間平衡之維持對於人類一些疾病的產生有重要的決定性，像心肌缺血再灌注之傷害便是一例。

以我們先前的研究，顯示三亞油酸對 cyclic GMP、nitric oxide 和氧衍生自由基都有影響，本研究中，我們旨在了解，是否三亞油酸可以增加多形核白血球產生cyclic GMP，且該效應是否與 nitric oxide 及 superoxide anion 相關，這樣的訊息將有助於解釋三亞油酸保護心臟的作用。

材料和方法

(一)多形核白血球之製備：

取健康自願者的血，以 Histopaque (Sigma, USA) 兩種不同密度的試劑分別為 Histopaque 1119 及 Histopaque 1077，在室溫下，700xg 離心30分鐘，收集在 Histopaque 1119 及 Histopaque 1077 間的界面層，收集後懸浮在PBS中，再以250xg 在 4°C 下離心6分鐘，去除上清液，而沉降物利用低張食鹽水(0.2%)，再懸浮30秒以溶解掉殘餘的紅血球，接著加入等體積的1.6%食鹽水以成等張，再以250xg離心6分鐘，取沉降物，懸浮到含10mM葡萄糖的PBS中，以 trypan blue 排除法，計算活細胞數，存活率約達95%，製備所得多形核白血球數達90-95%，最後濃度調到 5×10^6 cells/ml。

(二)三亞油酸對於胞內 cyclic GMP 含量影響之評估：

在加三亞油酸之前，將多形核白血球在37°C之水浴中恆溫30分鐘，之後加三亞油酸反應10分鐘，再以冰冷的 10% trichloroacetic acid 加入15分鐘而終止反應，然後以超音波振盪2分鐘，及在 4°C、7000xg 下離心10分鐘，取上清液萃取且以水飽和之乙醚連洗三次，殘餘的乙醚再以高速真空做冷凍乾燥，樣本被存於 -20°C 中，隔天以cyclic GMP 分析組測量。

進行酵素抑制劑影響之實驗時，則酵素抑制劑應在三亞油酸 加入前，先與多形核白血球作用。而進行 xanthine oxidase 影響之實驗時，多形核白血球宜先與三亞油酸作用，再加入xanthine oxidase。

(三)資料分析：

數據皆以 mean±S.E.M 表示，三亞油酸不同濃度間的差異，採 one-way ANOVA 做統計，不同曲線間的差異，則以 two-way ANOVA 做統計，當 ANOVA 有意義時，再以Student-Newman-Keuls test 找出有意義的濃度，而 $P < 0.05$ 被認為是有統計上的差異。

結 果

(一)三亞油酸對 cyclic GMP 之影響：

以 0.1nM 和 1nM 之三亞油酸，刺激多形核白血球產生 cyclic GMP，發現反應在10分鐘效果最佳（見圖一）。依此所得濃度反應曲線（見圖二），其控制組所得 cyclic GMP 數值為 $7.02 \pm 0.12 \text{ fmol}/5 \times 10^6 \text{ cells}$ ，以 $100 \mu\text{M}$ 之 Sodium nitroprusside 作用5分鐘，其增加 cyclic GMP 的量，為控制組的 $3450 \pm 250\%$ ，而以 0.1nM 之三亞油酸作用，所產生最大 cyclic GMP 的量，是控制組的 $186.46 \pm 12.91\%$ 。

(二)酵素抑制劑的作用：

以 $1 \mu\text{M}$ 之 methylene blue，在三亞油酸加入前，先反應3分鐘，可降低三亞油酸刺激 cyclic GMP 產生之效應（見圖三）。以 $1 \mu\text{M}$ 之 L-NMMA，在三亞油酸加入前，先反應1小時，亦可降低三亞油酸刺激 cyclic GMP 產生之效應（見圖四）。以 $10 \mu\text{M}$ 之 d-sphingosine，在三亞油酸加入前，先反應3分鐘，仍可降低三亞油酸刺激 cyclic GMP 產生之效應（見圖五）。

(三)Xanthine oxidase 的作用：

Xanthine oxidase 可增加 superoxide anion 之產生，實驗結果顯示其可阻斷三亞油酸刺激 cyclic GMP 產生之效應（見表一）。

討 論

由實驗顯示，三亞油酸可增加多形核白血球之 cyclic GMP 產生，其機轉從 nitric oxide synthase 抑制劑（L-NMMA）及可溶性 guanylate cyclase 抑制劑（methylene blue）能降低三亞油酸的作用結果，可知與 nitric oxide - cyclic GMP 途徑相關，這與我們先前

三亞油酸在人類血小板及鼠動脈環的報告是相符合的，但在刺激血小板和多形核白血球產生 cyclic GMP 的效果上，三亞油酸較 sodium nitroprusside 弱。

當多形核白血球表現防禦力時，其趨化性與去顆粒作用是透過 cyclic GMP 依賴型之 protein kinase 作用所產生之 cyclic-GMP 來調節。除此，對於多形核白血球附著到內皮細胞之調節作用，cyclic GMP 亦扮演著一重要角色。

類多形核白血球含有 nitric oxide-sensitive guanylate cyclase，而 nitric oxide synthase 近來亦被證實存在其中，部份研究顯示這 nitric oxide synthase 為誘導性的，且不依賴鈣離子，其它則認為亦存有結構性 nitric oxide synthase，本實驗中，我們以 nitric oxide synthase 抑制劑 L- NMMA，可降低三亞油酸刺激 cyclic GMP 產生的效果，這支持了結構性 nitric oxide synthase 存在於多形核白血球中。

Protein kinase C（PKC）在一些活性化合物之傳導訊息上扮演了重要角色，其異構型隨著多形核白血球之趨化性而重新分佈，有研究指出 PKC 能使可溶性 guanylate cyclase 磷酸化，在我們的實驗中，亦發現以 PKC 抑制劑（d-sphingosine）作前處理，能降低三亞油酸刺激 cyclic GMP 產生的效果，因此，我們認為三亞油酸之作用，可能部份透過 PKC，PKC 乃由 phosphoinositide 所轉變的 diacylglycerol 快速活化，在我們以往的研究顯示，三亞油酸的作用與胞外鈣離子濃度無關，但與胞內鈣離子濃度則有些許相關，由於 phosphoinositide 之轉變須仰賴鈣離子，所以，三亞油酸不像能誘導 phosphoinositide 之轉變，而三亞油酸的結構為三酸甘油酯，其是否像 diacylglycerol 直接活化

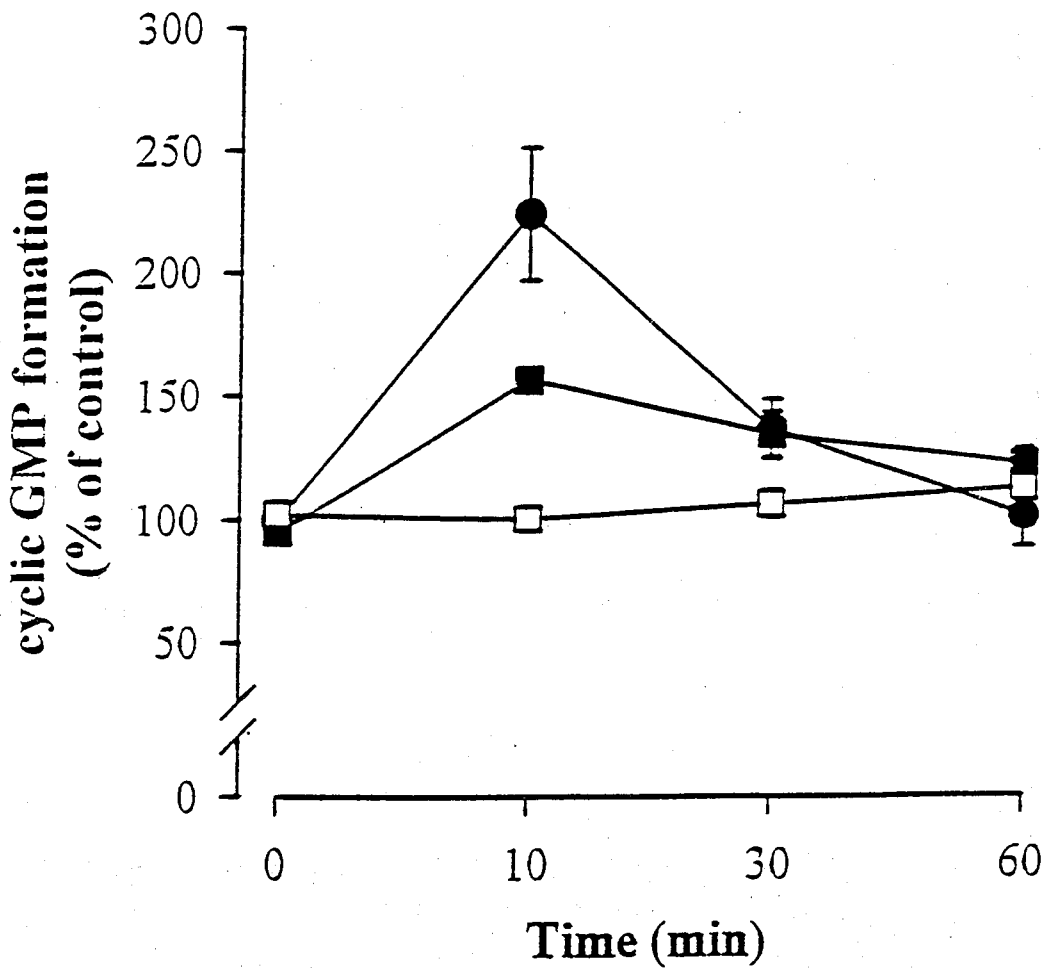
PKC，這問題值得進一步探討。

Superoxide anion 已知能抑制 guanylate cyclase 之活性，且與 nitric oxide 之平衡關係和彼此濃度有關，這實驗中，我們也同時發現可增加 superoxide anion 的 xanthine oxidase 能阻斷三亞油酸之作用，在過去的研究，我們已知三亞油酸可抑制PMA所誘導產生的氧衍生自由基，由於，PMA可同時刺激自由基及 cyclic GMP 的形成，這就是為何三亞油酸能清除PMA所誘導生成的自由基，而 xanthine oxidase 產生之自由基可阻斷三亞油酸刺激 cyclic GMP 形成之理由。

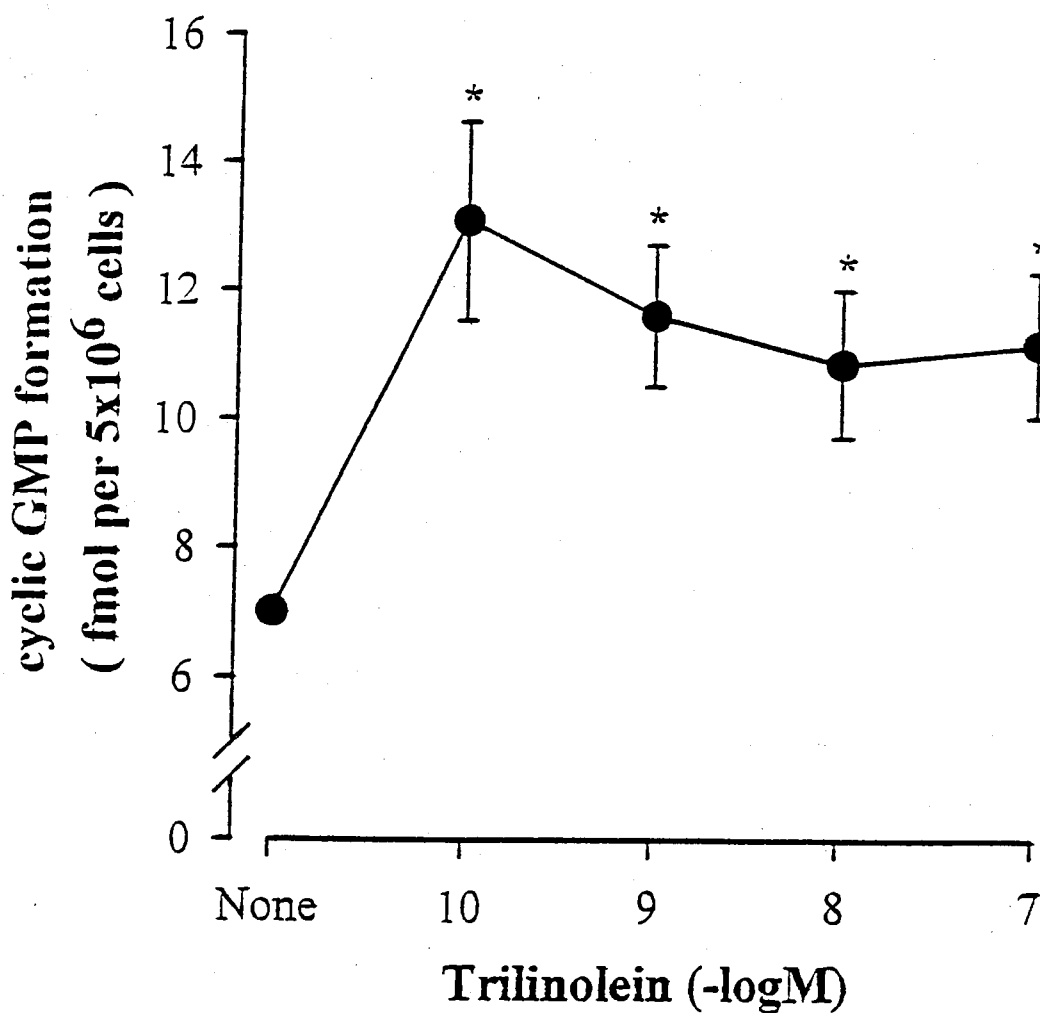
三亞油酸近來被證實可抑制冠狀結紮鼠，在缺血及再灌注期間之心室心律不整，由於，三亞油酸不能改變心肌細胞之電生理特性，其抗心律不整活性因而改以心肌保護作用來說明，同時，藉由三亞油酸可降低冠狀結紮鼠之中風面積的結果而更加証實，除了紅血球、血小板、血管活性及自由基的作用外，在多形核白血球中，三亞油酸對 nitric oxide - cyclic GMP途徑之刺激，亦可用以解釋三亞油酸對心肌的保護作用，而相關的深入問題，將有待於往後進一步探討。

本計畫預定『自正常人血液中分離出白血球，利用白血球過膜趨化性試驗凝集試驗、過氧化自由基及leukotriene B₄的測定方法，研究中藥粗提取物（紅花、當歸、蒲黃、三七、丹參、川芎）及主成份是否可影響白血球功能』，但因時間限制，目前只完成三七活性成份 trilinolein對白血球cyclic GMP作用之研究。

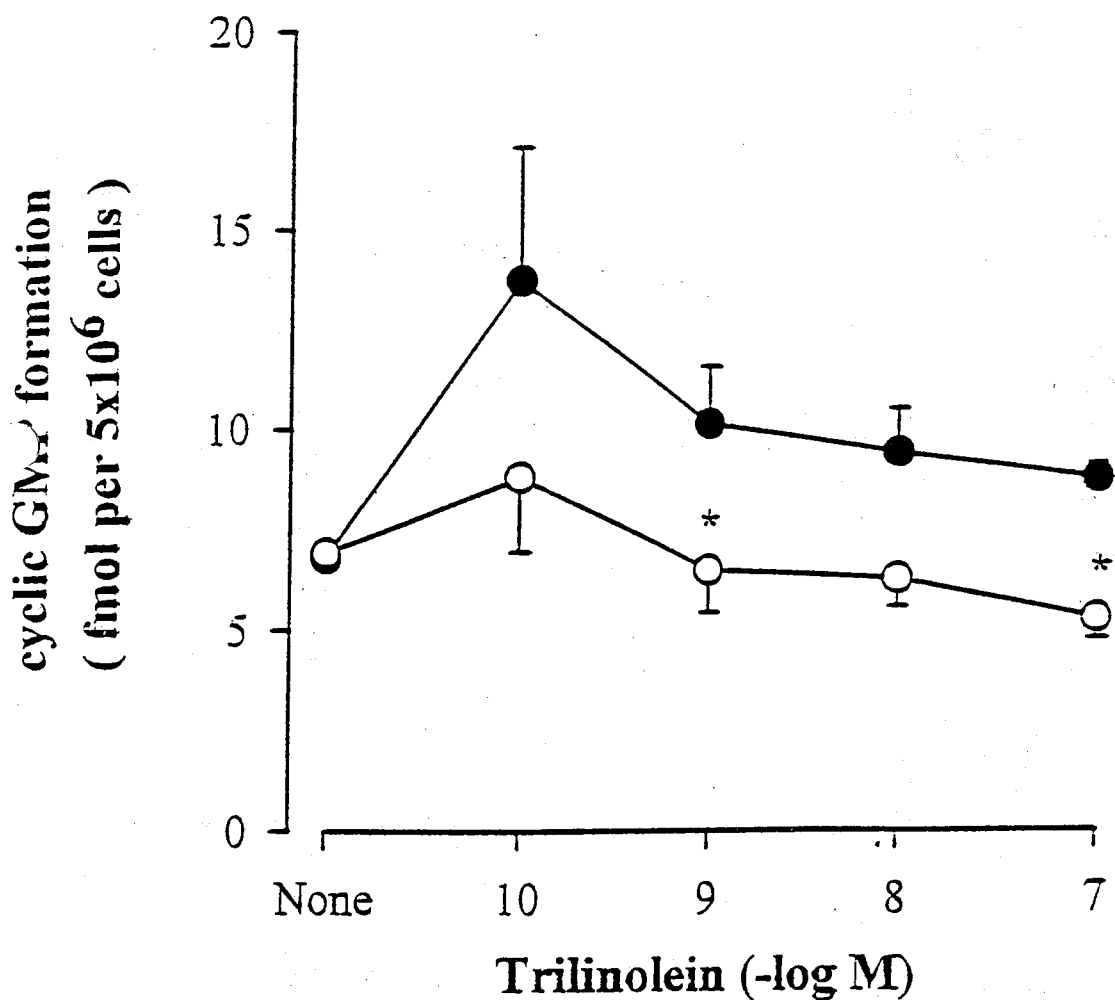
(圖形說明)



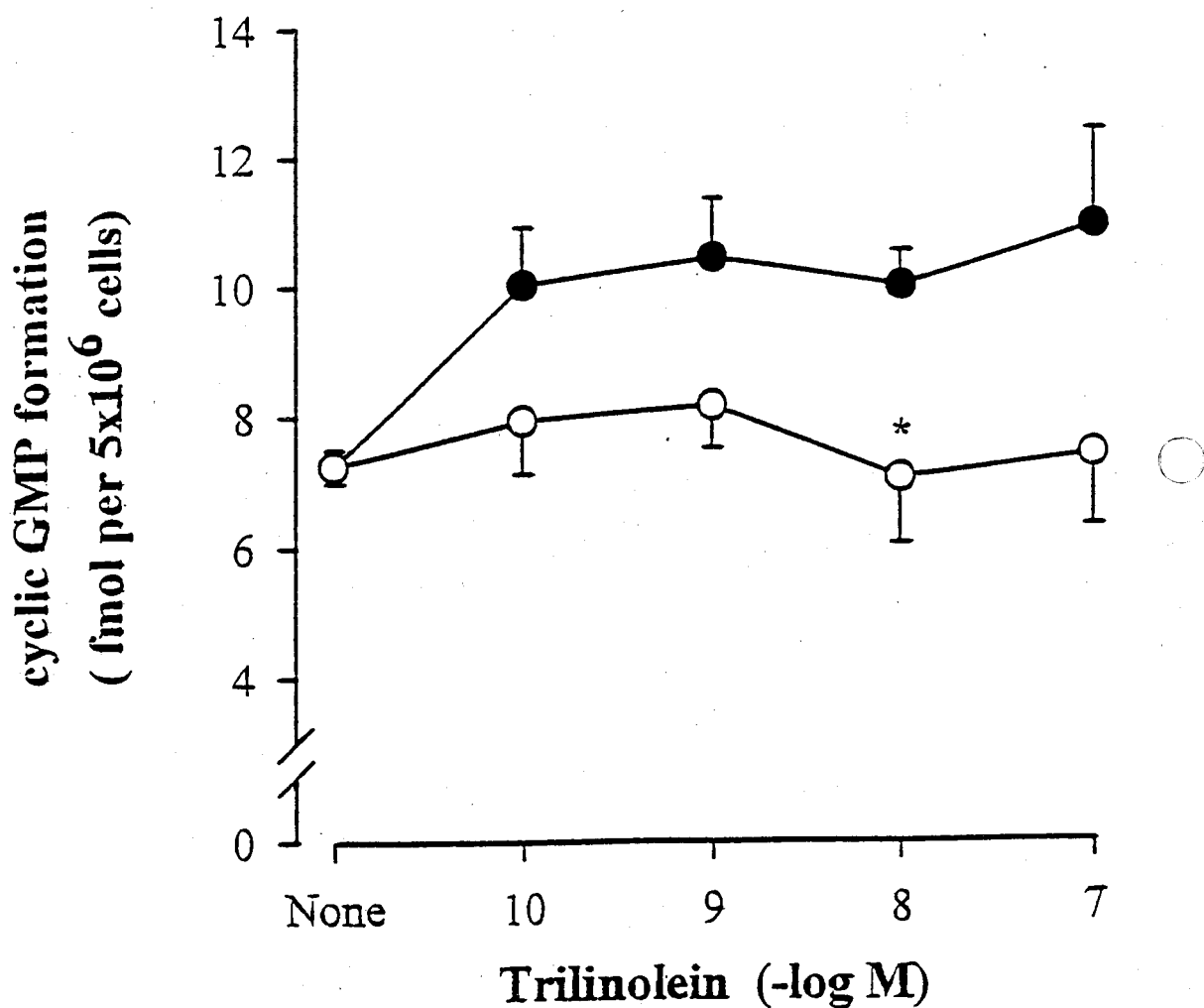
(圖一) 本圖為三亞油酸 0.1nM (●) 及 1nM (■) 刺激多形核白血球產生 cyclic GMP 的時間反應曲線。三亞油酸與多形核白血球反應，其產生 cyclic GMP 的高峰時間是 10 分鐘，不含三亞油酸的 DMSO 溶媒(□)對於 cyclic GMP 之生成並無影響，三次實驗數據以 mean \pm S.E.M 表示。



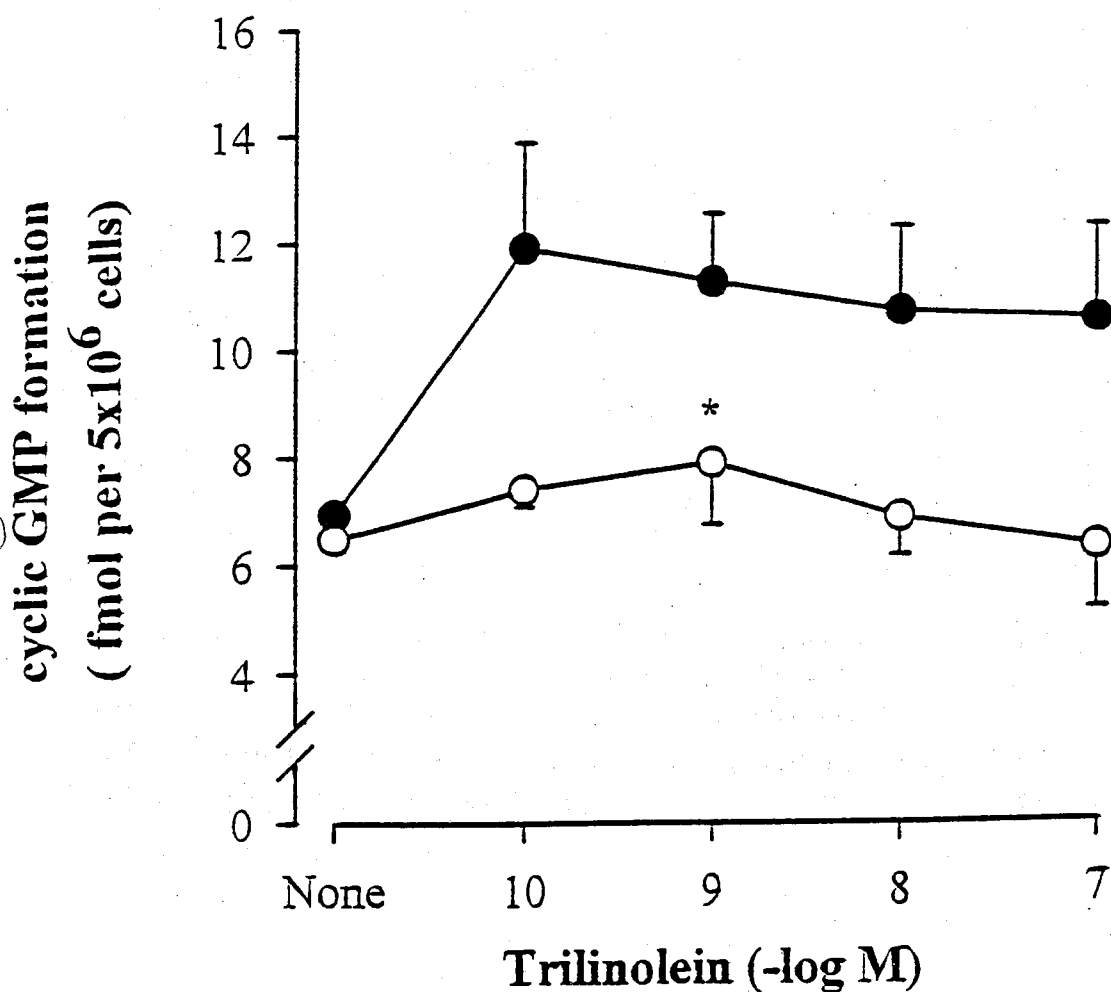
(圖二) 本圖為三亞油酸 (●) 刺激多形核白血球產生 cyclic GMP 的濃度反應曲線。三亞油酸與多形核白血球反應 10 分鐘，不含三亞油酸的 DMSO 溶媒被視為控制組，六次實驗數據在 one-way ANOVA 統計之後，再以 Student-Newman-Keuls test 找出與控制組差異的濃度，並以 * 表示，採 $P < 0.05$ 為具有統計上差異。



(圖三) 本圖為 $1 \mu\text{M}$ methylene blue (○) 降低三亞油酸 (●) 刺激多形核白血球產生 cyclic GMP 的濃度反應曲線。三亞油酸與多形核白血球反應前， $1 \mu\text{M}$ methylene blue 先反應 3 分鐘，三次實驗數據在 two-way ANOVA 統計之後，再以 Student-Newman-Keuls test 找出兩曲線間差異的濃度，並以 * 表示，採 $P < 0.05$ 為具有統計上差異。



(圖四) 本圖為 $1 \mu\text{M}$ L-NMMA (○) 降低三亞油酸 (●) 刺激多形核白血球產生 cyclic GMP 的濃度反應曲線。三亞油酸與多形核白血球反應前， $1 \mu\text{M}$ L-NMMA 先反應 1 小時，四次實驗數據在 two-way ANOVA 統計之後，再以 Student-Newman-Keuls test 找出兩曲線間差異的濃度，並以 * 表示，採 $P < 0.05$ 為具有統計上差異。



(圖五) 本圖為 $10 \mu\text{M}$ d-sphingosine (○) 降低三亞油酸 (●) 刺激多形核白血球產生 cyclic GMP 的濃度反應曲線。三亞油酸與多形核白血球反應前， $10 \mu\text{M}$ d-sphingosine 先反應 3 分鐘，三次實驗數據在 two-way ANOVA 統計之後，再以 Student-Newman-Keuls test 找出兩曲線間差異的濃度，並以 * 表示，採 $P < 0.05$ 為具有統計上差異。

(表一) 在人類多形核白血球 (註一) 產生 cyclic GMP 方面，xanthine oxidase 與三亞油酸之相互作用。

三亞油酸	Xanthine oxidase	Cyclic GMP (註二) (fmol/5 × 10 ⁶ cells)
None	None	7.64 ± 0.18
0.1nM	None	12.08 ± 0.59
0.1nM	5 μ U/ml	4.22 ± 0.64**
0.1nM	10 μ U/ml	5.17 ± 0.36**
0.1nM	50 μ U/ml	4.44 ± 0.53**

(註一)：多形核白血球被以 0.1nM 三亞油酸前處理 3 分鐘，再加入 xanthine oxidase 作用 10 分鐘。

(註二)：每個數據皆以 mean ± S.E.M. 表示，在 one-way ANOVA 統計之後，再以 Student-Newman-Keuls test，將各組與只有三亞油酸的組做比較，採 P < 0.05 有統計上差異，並以 ** 表示，n=3。

(結 論)

中藥三七之活性成份，三亞油酸之所以能增加多形核白血球之 cyclic GMP，可能部分藉由 nitric oxide 的形成，部分活化 protein kinase C，同時，superoxide anion 的增加可阻斷三亞油酸誘導 cyclic GMP 增加。中藥與白血球功能之關係，值得進一步之探討。

蟾酥對大鼠下視丘—腦下腺—睪丸軸之效應

王 錫 崗

國立陽明大學

中文摘要

本研究旨在探討蟾酥對睪丸-腦下腺-下視丘軸線激素分泌之效應。文內所用蟾酥精 bufalin 係購自美國 Sigma 公司。另由中藥房購得蟾酥以 acetonitrile 經 C18 萃取逕稱 Extract of Chan-Su (ECS)。雄鼠於右頸靜脈植一軟管，休息一夜，由插管注射 (1) 蟾酥萃取物 ($1 \mu\text{g/kg}$)，(2) 蟾酥精 ($1 \mu\text{g/kg}$) (3) 人絨性促素 (5 IU/kg)，(4) 人絨性促素加蟾酥萃取物 (5) 人絨性促素加蟾酥精，(6) 性釋素 ($2 \mu\text{g/kg}$)，(7) 性釋素加蟾酥萃取物，或 (8) 性釋素加蟾酥精；並於注射前及注射後定時採血，每次 0.5 毫升，離心分出血漿，或以乙醚萃取，藉放射免疫法檢測睪固酮濃度；或不萃取，逕以放射免疫法檢測黃體促素濃度。另有離體實驗，取出雄鼠睪丸組織，切成八等分，與不同劑量 ($0-10 \mu\text{g/ml}$) 之蟾酥萃取物或蟾酥精 ($10^{-11} \sim 10^{-5} \text{ M}$) 及 0.5 mM IBMX 在 34°C 共同培養一小時後，以 65 % 酒精萃取睪丸組織，繼以放射免疫法檢測 cAMP 濃度；收集培養液，以放射免疫法檢測睪固酮濃度。腦下腺前葉亦取出，與不同劑量之蟾酥萃取物及 0 或 10 nM 性釋素於 37°C 共同培養半小時後，稱得腦下腺組織重量並收集培養液，以放射免疫法檢測黃體促素濃度。中底下視丘取出後，則與不同劑量之蟾

酥萃取物共同培養半小時，收集培養液及組織，各以鹽酸萃取，以放射免疫法檢測性釋素濃度。所得結果顯示，蟾酥萃取物已不含 bufalin, cinobufagin, 及 digoxin 之活性，可以直接作用於雄鼠睪丸組織，抑制 cAMP 及睪固酮之合成，並抑制黃體促素之基礎分泌及性釋素刺激後之分泌，但刺激中底下視丘釋放性釋素，導致活體睪固酮之基礎分泌及對性促素之反應均因蟾酥萃取物之處理降低，唯黃體促素之活體基礎分泌卻未受影響。蟾酥精 bufalin 亦可抑制血漿睪固酮濃度之基礎值及其對性釋素之反應以及血漿黃體促素對性釋素之反應，同時亦可抑制離體睪丸組織合成睪固酮及 cAMP。顯然，蟾酥萃取物具有抑制睪丸及腦下腺前葉分泌之能力，但該能力並非因 bufalin 或 cinobufagin 等成分所致。建議服用中藥「救心」或「六神丸」者宜注意其蟾酥成份抑制睪固酮合成與分泌之作用。

關鍵詞：蟾酥、蟾酥精、睪固酮、黃體促素、性釋素、cAMP、大鼠

ABSTRACT

The effects of the extract of Chan-Su (ECS) on the hypothalamus-pituitary-testes axis were studied. Chan-Su was extracted by acetonitrile via C18 cartridge. Male rats were catheterized through the right jugular vein and then challenged with (1) ECS ($1 \mu\text{g/kg}$), (2) bufalin ($1 \mu\text{g/kg}$), (3) human chorionic gonadotropin (hCG, 5 IU/kg), (4) hCG + ECS, (5) hCG + bufalin, (6) gonadotropin-releasing hormone (GnRH, $2 \mu\text{g/kg}$), (7) GnRH + ECS, (8) GnRH + bufalin. Blood samples (0.5 ml each) were collected before and at intervals following the injection. The concentrations of luteinizing hormone (LH) in rat plasma and that of testosterone in ether-extracted plasma were measured by the radioimmunoassay (RIA). In the in vitro experiments,

each testis was cut into 8 pieces and then incubated with ECS (0- 10 μ g/ml) or bufalin ($10^{-11} \sim 10^{-5}$ M) and 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) at 34°C for 1 h. The media were collected and measured for testosterone by RIA. The testicular tissues were extracted by 65 % ethanol. The concentration of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) was measured by RIA. The anterior pituitary glands (APs) were bisected and incubated with or without GnRH (10 nM) plus ECS at 37°C for 30 min. The media and MBH were then extracted by HCl before measuring the concentration of GnRH by RIA. After analysis by HPLC, no activity of bufalin, cinobufagin, or digoxin was found in the ECS. The basal and hCG- stimulated levels of plasma testosterone were decreased by ECS in male rats. The GnRH-stimulated rather than basal levels of plasma LH were decreased by ECS.

Administration of ECS in vitro inhibited the production of cAMP and testosterone in the testicular tissues, as well as the basal and GnRH-stimulated release of LH from rat APs. The release of GnRH from rat MBH was increased by the administration of ECS. Bufalin inhibited the basal and hCG-stimulated levels of plasma testosterone, GnRH- stimulated level of plasma LH, as well as the in vitro release of testosterone. These results suggest that ECS may inhibit testosterone secretion by acting directly at testis level via mechanisms involving the decrease of cAMP production and by acting directly at AP level via inhibition of LH response to GnRH in male rats. We also suggest that the inhibitory effects of the bufalin and non-bufalin components in the Chan-Su on the production and secretion of testosterone should be cared during the treatment of Chinese medicine containing Chan-Su.

Key words: Chan-Su, bufalin, testosterone, LH, GnRH, cAMP, rats

前 言

蟾酥 (Chan-Su) 是由中國蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* 皮膚毒腺之毒液乾製而成 (1, 2) 也是中藥「救心」的主成份之一。目前, 已有不少類似類固醇的成份由蟾酥中純化而出, 諸如 bufalin, cinobufagin 以及 cinobufotalin 等。有研究証實蟾酥精 bufalin 可以藉抑制 Na/K-ATPase 抑制血管擴張, 增強血管收縮, 增加血管阻力, 升高血壓 (3-6)。而蟾酥精 cinobufagin 亦具有抑制 Na/K-ATPase 之活性 (7, 8), 而且 cinobufagin 之起始效應比 digitoxin 尚快, 但時效較短 (9)。以上結果顯示兩種蟾酥精 bufalin 及 cinobufagin 皆具有類似毛地黃素的特性, 而它們抑制 Na/K-ATPase 之潛力甚至超過 ouabain (10)。

雖然毛地黃素及蟾酥精對於心血管之作用已有不少文獻報告, 但有關它們對內分泌效應的研究卻十分缺乏。曾有研究指出健康男子服用毛地黃素 35 天對血漿睪固酮濃度並無影響 (11), 但服用 2 年毛地黃素之男子, 血漿睪固酮濃度會降低 (12)。毛地黃素可以改變大鼠二氫睪固酮 (DHT) 與前列腺受體之結合 (13), 但在人的前列腺, 卻不見此效應 (14)。蟾酥是否會影響睪固酮之合成, 至今不明。

本研究除以蟾酥精 bufalin, 並以 acetonitrile 經 C18 萃取蟾酥分離 bufalin, cinobufagin 及毛地黃素特性, 進行活體及離體實驗探討蟾酥精及蟾酥萃取物對於睪固酮合成之效應, 以及其調控機轉是否涉及 cAMP 之合成。

材料與方法

1. 蟾酥萃取物之製備與成份分析

蟾酥購自台北市的中藥房。仿前人方法略加修改而成 (15)。以 20 克蟾酥混合 300 毫升 HPLC 級的甲醇, 用均質機均質化, 於 4°C 靜置 1

小時，繼以高速離心 ($30,000\times g$) 20分鐘，丟棄沉澱物，上液則於抽風櫃中以氮氣吹乾，乾後殘物則以20毫升之去離子水溶解，經高速離心 ($10,000\times g$) 20分鐘，取上清液通過Sep-Pak C_{18} 萃取管柱。 C_{18} 萃取管柱先以 5 毫升之甲醇活化，再通過 5 毫升去離子水兩次，洗清多餘之甲醇。取蟾酥水溶物 4 毫升通過 C_{18} 萃取管，流速控制為每分鐘 0.5 毫升，繼以 4 毫升 60 % acetonitrile 沖洗液收集後，冷凍乾燥，保存於 -75°C 。實驗前可以去離子水溶解至每毫升內含 1 毫克原蟾酥量使用。該蟾酥萃取物則定義為ECS (Extract of Chan-Su)。

ECS製備後，取20 μl 以高壓液相色層分析儀 (HPLC) 分析。該HPLC分析系統係使用 $0.46\times 25\text{ cm}$ Inersil 10 ODS管柱及 UV 220 μm 之檢測電極。載液 (mobile phase) 為20 %-90 % $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (內含 0.1 % H_3PO_4)，流速為每分鐘 1 毫升。所得結果顯示，蟾酥萃取物 (ECS) 中已不再含有蟾酥精bufalin及 cinobufagin之活性 (圖一)。

本實驗所用之蟾酥精bufalin係購自美國Sigma公司。

2. 實驗動物

取Sprague-Dawley種系體重300-350克之雄性大鼠飼養於室溫 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光照14小時 (6-20時) 之環境中，飲水及飼料不限。

3. 蟾酥萃取物及蟾酥精對睪固酮分泌之效應

雄鼠於右頸靜脈植一軟管 (16, 17)，20 小時後，由靜脈插管注入蟾酥萃取物 ($1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}/\text{kg}$)，蟾酥精 ($1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}/\text{kg}$)，人絨性促素 ($5\text{ IU}/\text{ml}/\text{kg}$)，蟾酥萃取物和人絨性促素之混合液，或蟾酥精和人絨性促素之混合液並於靜注後0, 15, 30, 60, 120, 240, 480, 及1440 min，各採血0.5 毫升，隨即補償相同體積之肝素生理鹽水，血樣於 $10000\times g$ 離心一分鐘，分出血漿，以放射免疫法檢測睪固酮濃度 (17)。

4. 蟾酥萃取物及蟾酥精對黃體促素分泌之效應

仿前，由雄鼠右頸靜脈注入蟾酥萃取物 ($1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}/\text{kg}$)，蟾酥精 (

1 $\mu\text{g/ml/kg}$), 性釋素 (2 $\mu\text{g/ml/kg}$), 蟾酥萃取物及性釋素之混合液或蟾酥精及性釋素之混合液, 並於靜注後 0, 15, 30, 60, 120, 及 180 分鐘抽血, 離心分出血漿, 以放射免疫法檢測黃體促素濃度。

5. 蟾酥萃取物及蟾酥精對於睪固酮及 cAMP 離體合成之效應

雄鼠犧牲後, 取出睪丸, 除鞘, 切成 8 片, 再與內含 10 mM 葡萄糖, 0.003 % bacitracin, 及 0.05 % Hepes 之 Locke 溶液於 34°C 下培養 90 分鐘 (17), 每一培養瓶內含一片睪丸組織及 2 毫升培養液並充足 95 % 氧-5 % 二氧化碳。預培養之後, 各組織再與蟾酥萃取物 (0-10 $\mu\text{g/ml}$) 或蟾酥精 ($10^{-11}\sim 10^{-5}$ M) 培養一小時。培養結束後, 取出組織稱重, 培養液則收集, 保存於 -20°C 供日後以放射免疫法檢測睪固酮濃度。

為探討蟾酥萃取物及蟾酥精對 cAMP 堆積之效應, 取大鼠睪丸組織與 2 毫升內含 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, 一種 phosphodiesterase 之抑制劑) 之培養液在 37°C 培養 1 小時, 取出組織, 加 2 毫升之 65 % 酒精以均質機磨碎, 於 2000 \times g 下離心 15 分鐘, 取上清液冷凍濃縮機內乾燥, 再以檢測專用之緩衝液 (0.05 M acetate buffer with 0.01 % sodium azide, pH 6.2) 恢復, 繼以放射免疫測定法檢測 cAMP 濃度。另以 Lowry 氏法檢測組織萃取物中蛋白質之濃度 (18)。

6. 蟾酥萃取物對於黃體促素及性釋素離體釋放之效應

雄鼠去頭犧牲後, 取出腦下腺前葉及中底下視丘進行離體培養。將腦下腺前葉切半與性釋素 (0 或 10 nM) 以及蟾酥萃取物 (0-10 $\mu\text{g/ml}$) 於 37°C 下一齊培養 30 分鐘, 每一培養瓶放入半片腦下腺前葉組織, 培養結束後, 組織稱重, 培養液則收集後保存於 -20°C, 待日後以放射免疫法檢測黃體促素濃度。

取中底下視丘與蟾酥萃取物 (0, 0.01, 0.1, 或 1 $\mu\text{g/ml}$) 在 37°C 一齊培養 30 分鐘。一個培養瓶放入一個中底下視丘。培養結束後, 以 20 μ l 5N 鹽酸萃取培養液, 繼以 20 μ l 5N 氫氧化鈉中和。組織

則以 0.1 N 鹽酸萃取 (19)，培養液及組織萃取物中性釋素之濃度將以放射免疫法檢測 (19)。

7. 激素放射免疫測定法

血漿及培養液中睪固酮之濃度均以自行發展之放射免疫測定系統檢測 (17)。其敏感度為每管 2 pg，測定內及測定間之變異係數各為 4.1 % (n = 6) 及 4.7 % (n = 10)。

培養液黃體促素之濃度則以美國國家衛生院所贈之檢測材料檢測 (19)。

培養液性釋素之濃度則以本室自行建立之放射免疫系統檢測 (19)。

睪丸組織萃取物之 cAMP 濃度係以美國國家衛生院所贈之抗體 CV-27 所檢測 (20)。

8. 統計分析

所有的數據均以平均±機差表示。先以變方分析處理，若呈顯著，則繼以丹肯氏多變域測驗分析兩組平均間差異之顯著性。唯活體實驗部份，則以學生氏 t- 測驗分析各時間點之 ECS 效應 (21)。

結 果

1. 蟾酥萃取物對於雄鼠血漿睪固酮濃度之影響

由雄鼠靜脈注入一劑蟾酥萃取物 (1 μ g/kg) 後 30 分鐘，血漿睪固酮濃度便開始下降，至注入後 4 小時達最低，隨後雖略見回升，但仍未達基礎值 (圖二)。

由雄鼠靜脈注入一劑人絨性促素 (hCG, 5 IU/kg) 後 30 分鐘，血漿睪固酮濃度開始上昇，至 24 小時後仍不見回降。同時注射人絨性促素及蟾酥萃取物後 30 分鐘，血漿睪固酮濃度雖見增加，但至 2 小時後，其濃度均不及僅注射人絨性促素組高 (圖二)。

2. 蟾酥精對於雄鼠血漿睪固酮濃度之影響

由雄鼠靜脈插管單一注射蟾酥精 (bufalin) 後 30 至 240 分鐘，血漿睪固酮濃度逐漸下降，至 180 分鐘達最低 (圖三)。注射後 8 小時即回升至基礎值。

同時注射蟾酥精及人絨性促素後，雖升高血漿睪固酮，但在注射後 30, 60 及 120 分鐘各點所得濃度均低於僅注射人絨性促素組 (圖三)。

3. 蟾酥萃取物對於雄鼠血漿黃體促素濃度之影響

由雄鼠靜脈插管注射一劑蟾酥萃取物 ($1 \mu\text{g}/\text{kg}$)，並不影響血漿黃體促素濃度 (圖四)。

靜脈注射一劑性釋素 ($2 \mu\text{g}/\text{kg}$) 15分鐘後即可使雄鼠血漿黃體促素上升至最高點，隨後開始下降，唯至注射後3小時，仍未達基礎值。同時注射性釋素及蟾酥萃取物後15分鐘，雖見黃體促素濃度上昇，卻不及僅注射性釋素組，由15 ~ 180分鐘，同時注射性釋素及蟾酥萃取物之雄鼠血漿黃體促素濃度表現均低於僅注射性釋素者 (圖四)。

4. 蟾酥精對於雄鼠血漿黃體促素濃度之影響

靜脈注射一劑蟾酥精不影響血漿黃體促素濃度之基礎值，但完全抑制血漿黃體促素對性釋素之反應 (圖五)。

蟾酥萃取物對於睪固酮之離體分泌及睪丸組織 cAMP 合成之效應使用蟾酥萃取物 $0.01 \sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ，均可降低睪固酮之離體分泌，唯僅有 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 之蟾酥萃取物具有顯著效應 (圖六)。

離體處理蟾酥萃取物對於睪丸組織 cAMP 之合成產生抑制效應。隨著蟾酥萃取物劑量之增加可增加其抑制 cAMP 合成之效應 (圖六)。

6. 蟾酥精對於睪固酮之離體分泌及睪丸組織 cAMP 合成之效應

處理 10^{-5} M 之蟾酥精可以同時抑制離體睪丸組織睪固酮之基礎分泌及人絨性促素刺激之效應 (圖七)，唯 10^{-9} M 之蟾酥精即可抑制 90 %

睪丸 cAMP 之合成 (圖八)。

7. 蟾酥萃取物對黃體促素離體分泌之效應

無論有無性釋素之存在，蟾酥萃取物均可顯著地抑制離體腦下腺前葉黃體促素之分泌 (圖九)。

8. 蟾酥萃取物對雄鼠中底下視丘性釋素之含量及分泌之效應

離體處理蟾酥萃取物可以增加雄鼠中底下視丘性釋素之分泌 (圖十，上方)。在劑量達 0.1 或 1 $\mu\text{g/ml}$ ，可造成顯著差異，唯不影響性釋素在中底下視丘之含量 (圖十，下方)。

討 論

本研究發現蟾酥精 bufalin 可以直接作用於雄鼠睪丸組織抑制 cAMP 之合成以及睪固酮之合成與分泌，同時尚可抑制血漿黃體促素對性釋素之反應。而蟾酥萃取物，分離 bufalin 及 cinobufagin 之後，可以 (1) 抑制睪固酮合成及分泌，(2) 抑制睪固酮對人絨性促素之反應，(3) 抑制睪丸 cAMP 之合成，(4) 抑制黃體促素對性釋素之反應，(5) 刺激下視丘釋放性釋素。

早有報告指出蟾酥成份之一的 bufalin 及 cinobufagin 皆具有藉抑制 Na/K-ATPase 而抑制心血管活性的潛能。現利用 acetonitrile 活化 C18 分離柱之方法純化蟾酥萃取物，已去除 bufalin 及 cinobufagin 等成份，則所得之生物效應實應與 bufalin, cinobufagin 以及 digoxin 活性無關。

本研究活體實驗結果顯示，蟾酥萃取物不但可以抑制雄鼠睪固酮之基礎分泌及睪固酮對性促素之反應，而且可以抑制黃體促素對性釋素之效應。至於離體實驗結果則顯示蟾酥萃取物可以直接作用於睪丸組織，藉抑制 cAMP 之合成而抑制睪固酮之合成，亦可直接作用於雄鼠腦下腺前葉，抑制黃體促素的基礎釋放及黃體促素對性釋素的反應。

因此，蟾酥萃取物所以能抑制睪固酮活體之分泌，至少有兩個原因，一是蟾酥萃取物與 cAMP 合成有關之直接效應，一是抑制睪固酮對性促素之反應。因為在本研究離體實驗顯示蟾酥萃取物對 cAMP 合成之抑制呈劑量-反應效應，但對睪固酮之合成雖有抑制表現，卻未形成劑量-反應效應。顯然，除上述之原因，蟾酥萃取物可能尚藉助其他機轉抑制睪固酮之合成。因為睪固酮在萊氏細胞之合成，受到 P450C17 酵素之調控 (22)，故推測蟾酥萃取物藉抑制 P450C17 活性而抑制睪固酮之合成，此項推測尚須未來以實驗証實。

有關蟾酥萃取物對腦下腺前葉黃體促素之分泌，本研究之活體及離體實驗結果似不完全一致。在離體實驗結果顯示，蟾酥萃取物可同時抑制黃體促素之基礎釋放及性釋素之刺激效應，而在活體實驗，蟾酥萃取物雖可抑制黃體促素對性釋素之反應，卻不影響黃體促素之基礎分泌，推測原因，可能是由於蟾酥萃取物刺激中底下視丘分泌性釋素 (圖十) 所致。

本研究結果並顯示，蟾酥精 bufalin 亦可直接作用於睪丸組織，藉抑制睪丸 cAMP 合成而抑制睪固酮之合成與分泌，效果與 ECS 極相似。蟾酥精亦可抑制血漿黃體促素對性釋素之反應，唯其作用較 ECS 更具抑制之效力。

綜合以上，本研究結果顯示，不含蟾酥精 bufalin, cinobufagin, 及毛地黃素活性之蟾酥萃取物可以直接作用於雄鼠睪丸，抑制 cAMP 及睪固酮之合成，並可直接作用於腦下腺前葉，抑制黃體促素對性釋素之反應，導致活體睪固酮顯著降低。蟾酥精 bufalin 亦具部份相似之作用。

結論與建議

一、結論

蟾酥成份中除了 bufalin 及 cinobufagin 之外的部份具有抑制睪丸合成及分泌睪固酮之作用。其機轉現知至少包括 (1) 直接作用於睪丸

組織降低 cAMP 之合成及睪固酮對性促素之反應，(2)直接作用於腦下腺降低黃體促素對性釋素之反應。

蟾酥精亦具有抑制睪丸 cAMP 合成及睪固酮合成和分泌之功能。

二、建議

- (1)服用中藥「救心」，「六神丸」時，宜考慮其蟾酥成份含有抑制睪固酮分泌之作用。
- (2)請準時撥款。(本計畫約訂七月一日開始執行，唯至十月下旬方撥款，拖延近 4 個月)。
- (3)有關研究報告格式中參考文獻之部份，是否可請勿硬性規定按臺灣醫學會雜誌編排方式繕寫。因該雜誌之參考文獻規定作者至多僅列三人，超過三人則以 et al 印出，現有之國內外期刊如此寫法者不多。請考慮改用完整列出之範例。

參考文獻

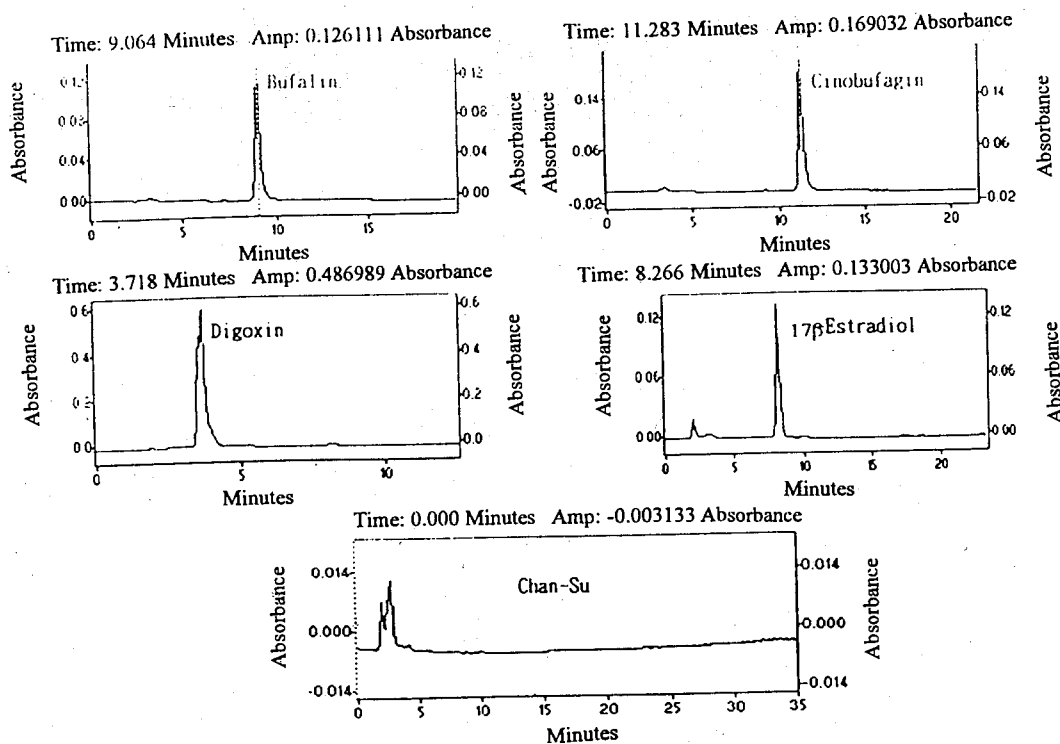
1. Hong Z, Chan K, Yeung HW: Simultaneous determination of bufadienolides in the traditional Chinese medicine preparation, Liu-Shen-Wan, by liquid chromatography. J Pharm Pharmacol 1992;44:1023-1026.
2. Panesar NS: Bufalin radioimmunoassays: in search of the endogenous digitalis-like substance. J Immunoassay 1994;15: 371-391.
3. Bagrow AY, Roukoyatkina NI, Fedorova OV, et al: Digitalis-like and vasoconstrictor effects of endogenous digoxin-like factor(s) from the venom of Bufo marinus toad. Eur J Pharm 1993;234:165-172.
4. Eliades D, Swindall B, Johnston J, et al: Hemodynamic effects of bufalin in the anesthetized dog. Hypertension 1989;

13:690-695.

5. Pamnani MB, Chen S, Bryant HJ, et al: Effects of three sodium-potassium adenosine triphosphatase inhibitors. *Hypertension* 1991;18:316-324.
6. Pamnani MB, Chen S, Yuan CM, et al: Chronic blood pressure effects of bufalin, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in rats. *Hypertension* 1994;23 (Suppl I):I106-I109.
7. Toma S, Morishita S, Kuronuma K, et al: Metabolism and pharmacokinetics of cinobufagin. *Xenobiotica* 1987;17:1195-1202.
8. Hirai Y, Morishita S, Ito C, et al: Effects of bufadienolides and some kinds of cardiotonics on guinea pig hearts. *Folia Pharmacol Jap* 1992;100:127-135.
9. Morishita S, Saito T, Mishima Y, et al: Pharmacological studies of cinobufagin, in comparison with digitoxin. *Folia Pharmacol Jap* 1985;86:269-292.
10. Brownlee AA, Johnson P, Mills IH: Actions of bufalin and cinobufagin, two bufadienolides respectively more active and less active than ouabain, on ouabain binding and ^{86}Rb uptake by human erythrocytes. *Clin Sci* 1990;78:169-174.
11. Kley HK, Muller A, Peerenboom H, et al: Digoxin does not alter plasma steroid levels in healthy men. *Clin Pharmacol Ther* 1982;32:12-17.
12. Neri A, Zukerman Z, Aygen M, et al: The effect of long-term administration of digoxin on plasma androgens and sexual dysfunction. *J Sex Marital Ther* 1987;13:58-63.
13. Pita JC Jr, Lippman ME, Thompson EB, et al: Interaction of spironolactone and digitalis with the 5α -dihydrotestosterone (DHT) receptor of rat ventral prostate. *Endocrinology* 1975;97:1521-1527.

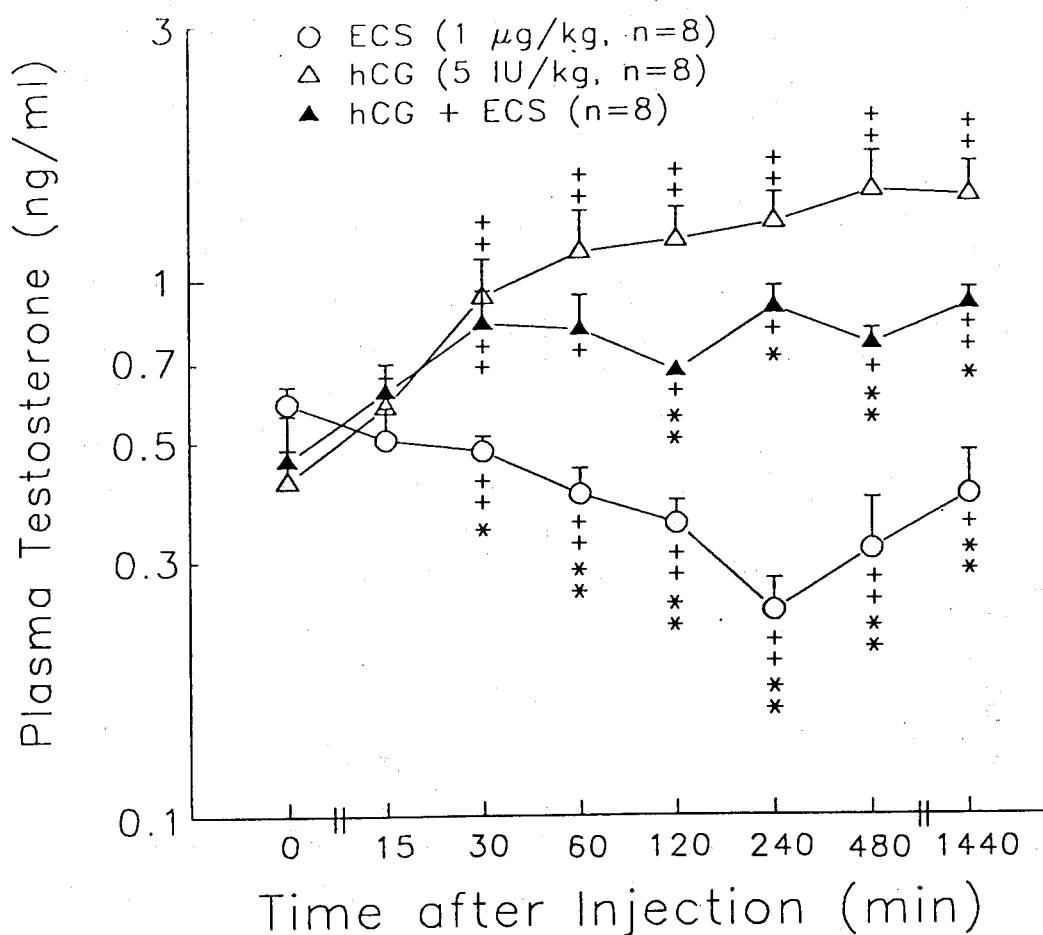
14. Rifka SM, Pita JC, Vigersky RA, et al: Interaction of digitalis and spironolactone with human sex steroid receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 1977;46:338-344.
15. Lichtstein D, Gati I, Haver E, et al: Digitalis-like compounds in the toad *Bufo viridis*: tissue and plasma levels and significance in osmotic stress. *Life Sci* 1992;51:119-128.
16. Wang PS, Liu JY, Hwang CY, et al: Age-related differences in the spontaneous and thyrotropin-releasing hormone stimulated release of prolactin and thyrotropin in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 1989;49:592-596.
17. Wang PS, Tsai SC, Hwang GS, et al: Calcitonin inhibits testosterone and luteinizing hormone secretion through a mechanism involving an increase in cAMP production in rats. *J Bone Miner Res* 1994;9:1583-1590.
18. Lowry OH, Rosenborough NJ, Farr AL, et al: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
19. Hwang C, Pu HF, Hwang CY, et al: Age-related differences in the release of luteinizing hormone and gonadotropin-releasing hormone in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 1990;52:127-132.
20. Lu SS, Lau CP, Tung YF, et al: Lactate stimulates progesterone secretion via an increase in cAMP production in exercised female rats. *Am J Physiol* 1996;271:E000-E000. (In press).
21. Steel RD, Torrie JH: *Principles and Procedures of Statistics*. New York: McGraw-Hill 1960.
22. Ganong WF: The adrenal medulla and adrenal cortex. In: *Review of Medical Physiology*, chapter 20, 17th edition, Appl-

eton & Lange, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1995. pp.333.

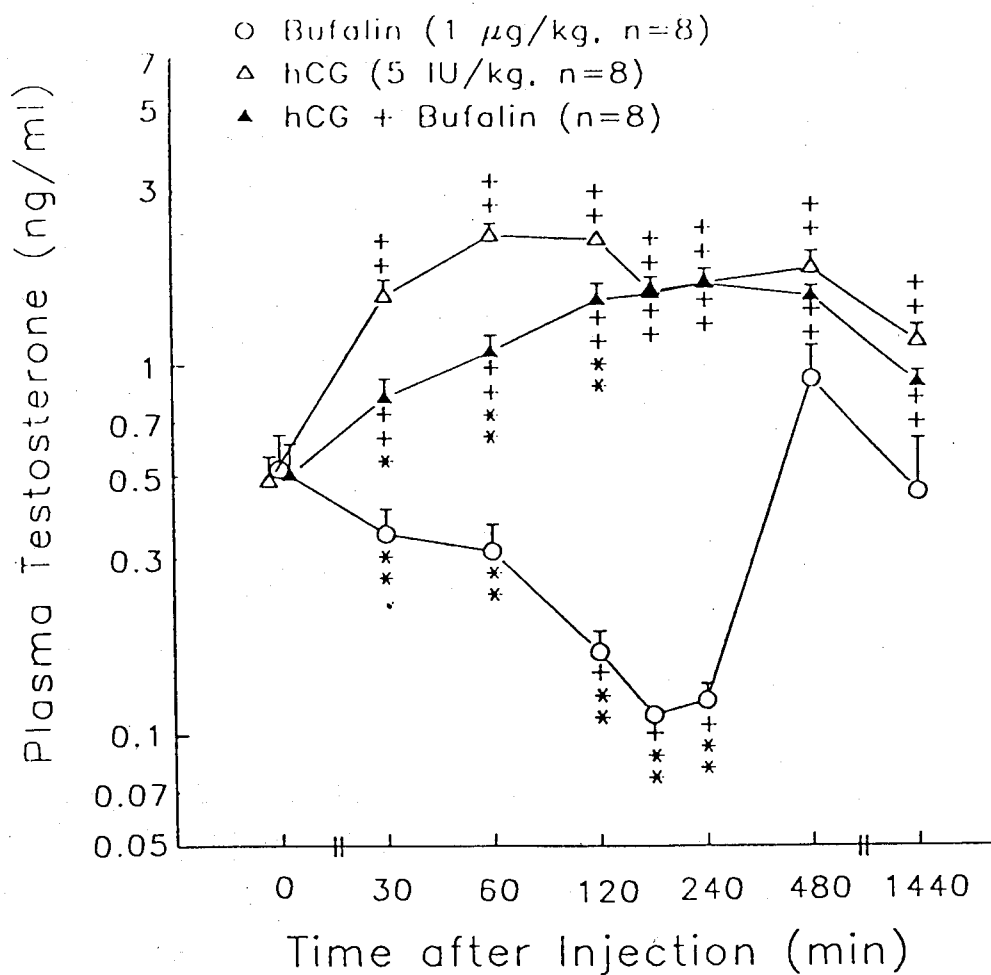


Column : 0.46*25 cm Inertsil 10 ODS column
 Mobile phase : 50% to 90% CH₃CN/ H₂O (containing 0.1% H₃PO₄) during 30 min.
 Flow rate : 1 mL/min.
 Detector : UV 220 nm.
 Inj. vol. : 20 μL.

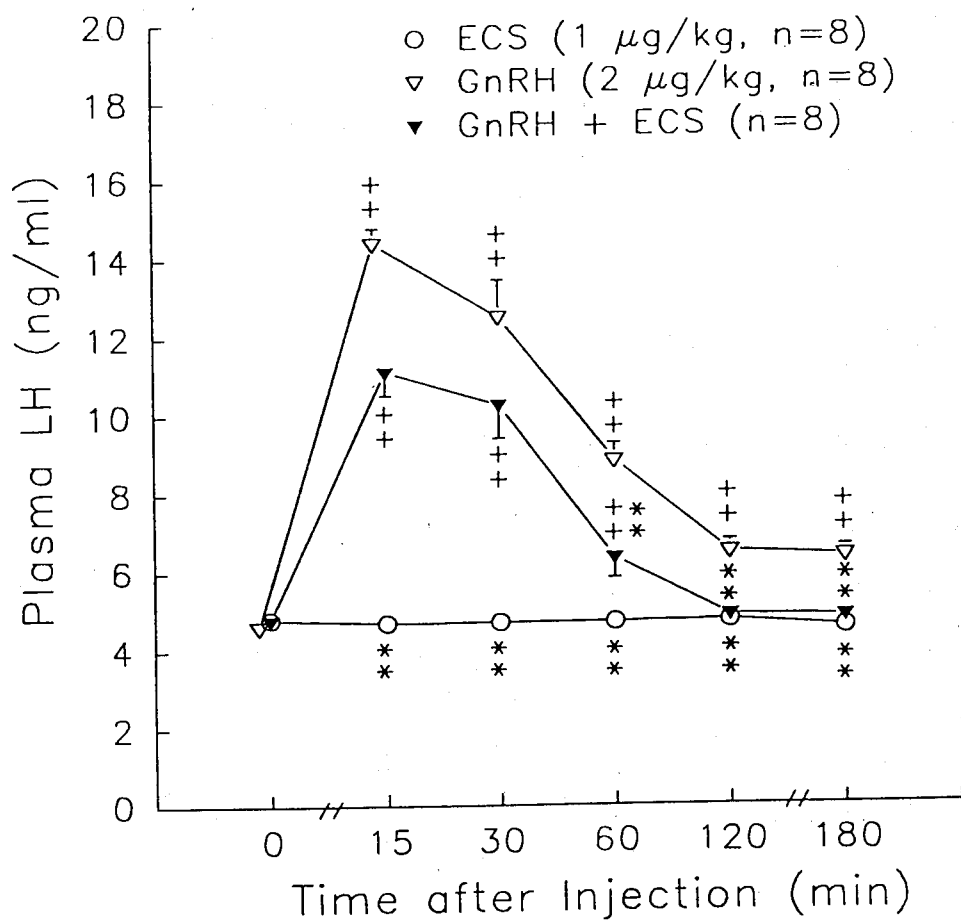
圖一、蟾酥萃取物，bufalin，cinobufagin，digoxin，及 estradiol 以高壓液相色層分析後之吸光表現。



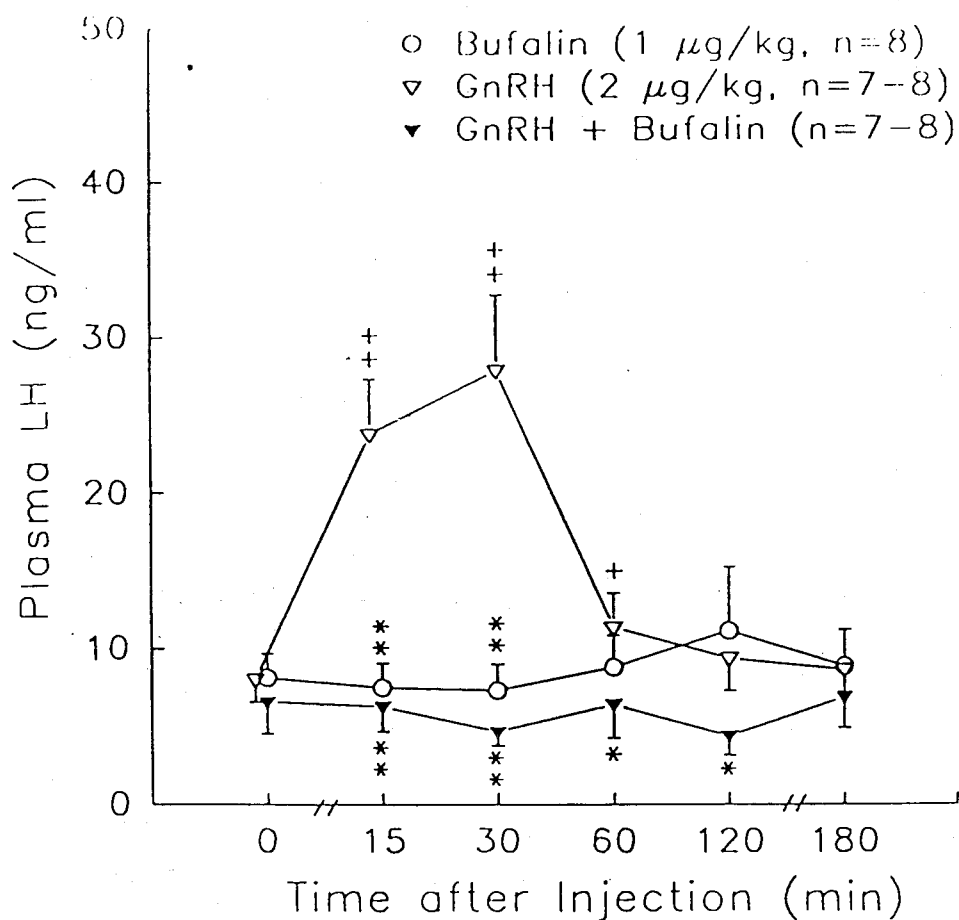
圖二、靜脈注射蟾酥萃取物，人絨性促素，或人絨性促素及蟾酥萃取物之後對雄鼠血漿睪固酮濃度之效應。+，++ 表與 0 分鐘數值有顯著及極顯著差異。*，** 表與人絨性促素處理組，呈顯著及極顯著之差異。



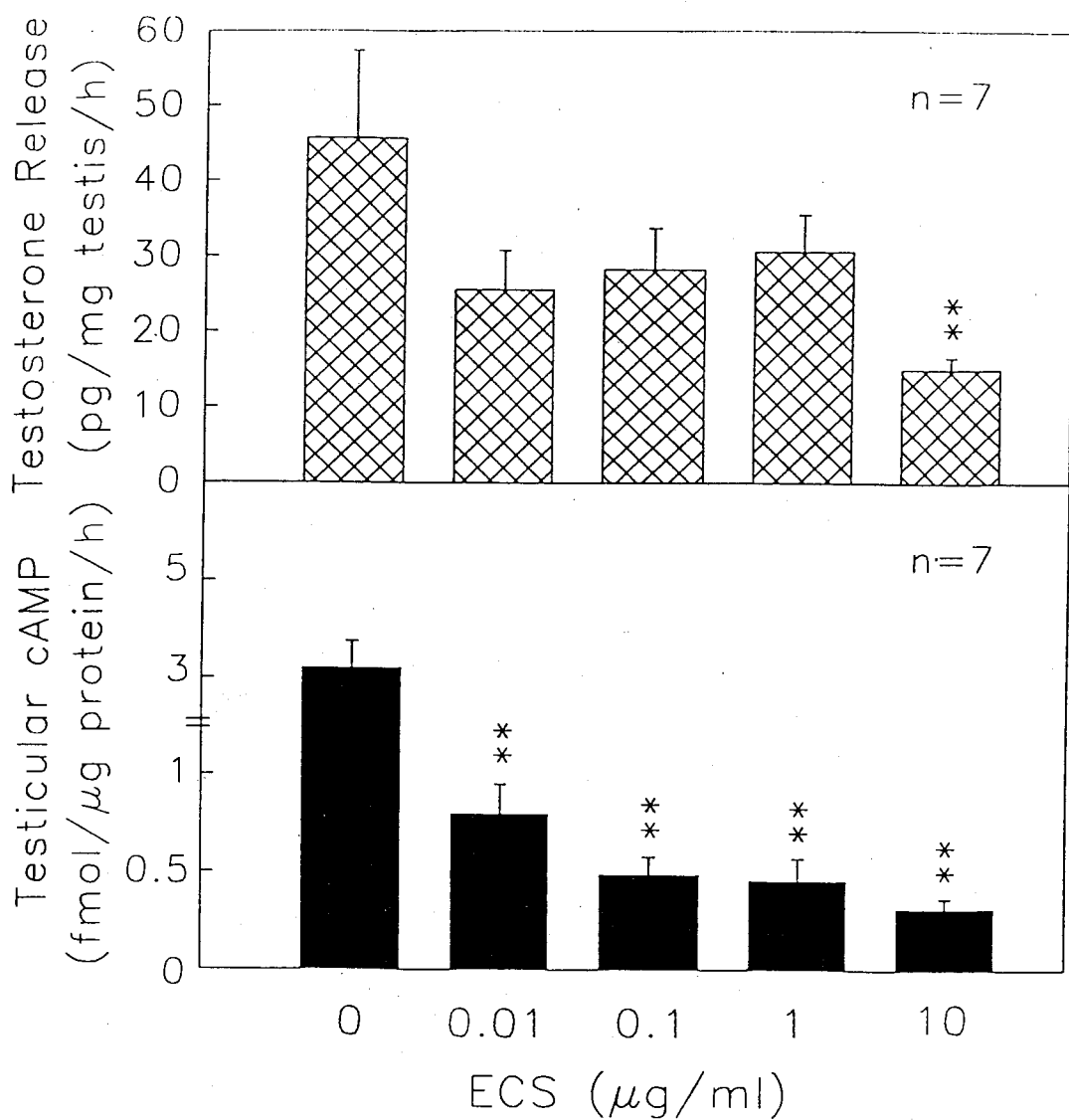
圖三、靜脈注射蟾酥精 (bufalin)，人絨性促素，或人絨性促素及蟾酥精對於血漿睪固酮濃度變化之效應。+，++ 表與基礎值 (0 分鐘) 有顯著及極顯著差異。*，** 表與人絨性促素處理組有顯著及極顯著之差異。



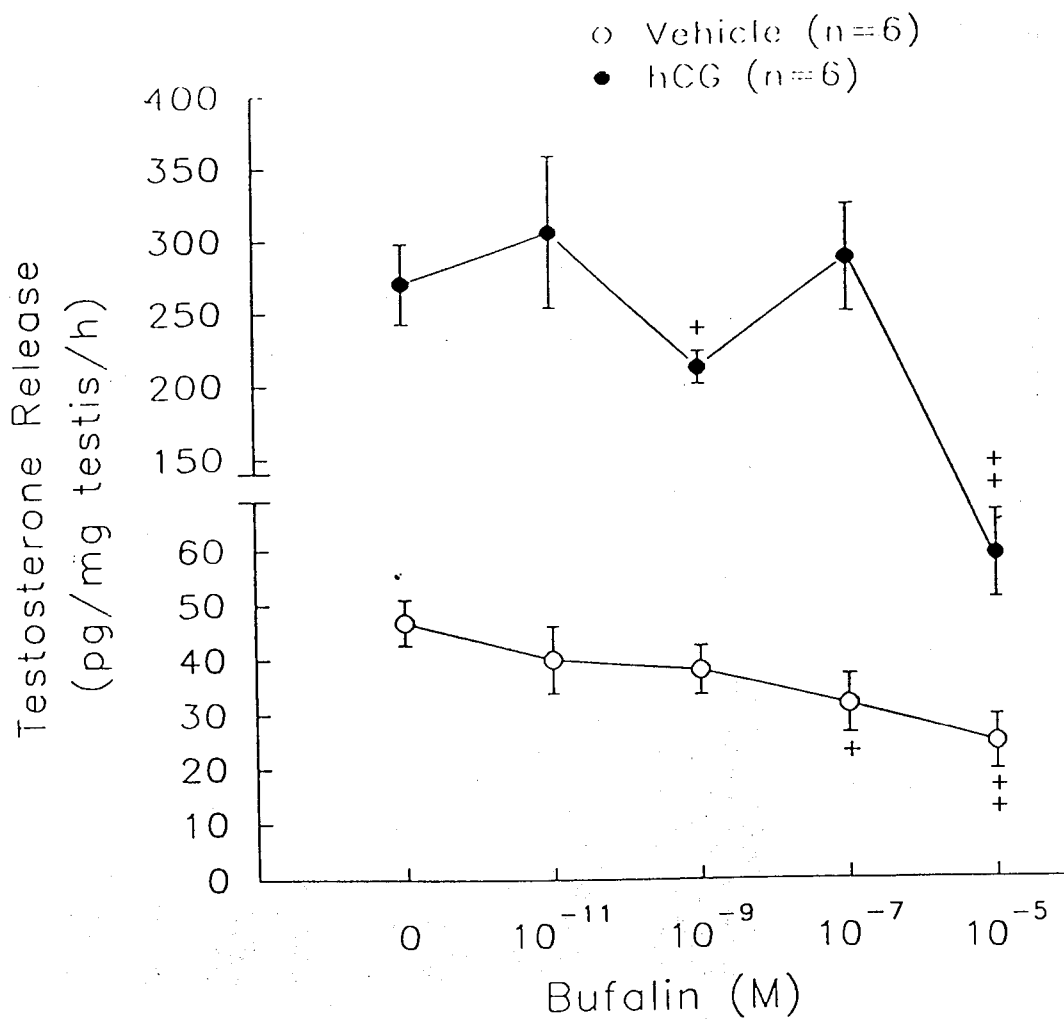
圖四、靜脈注射蟾酥萃取物，性釋素，或性釋素及蟾酥萃取物之後，對雄鼠血漿黃體促素濃度之效應。++ 表與 0 分鐘數值有極顯著差異。** 表與性釋素處理組有極顯著之差異。



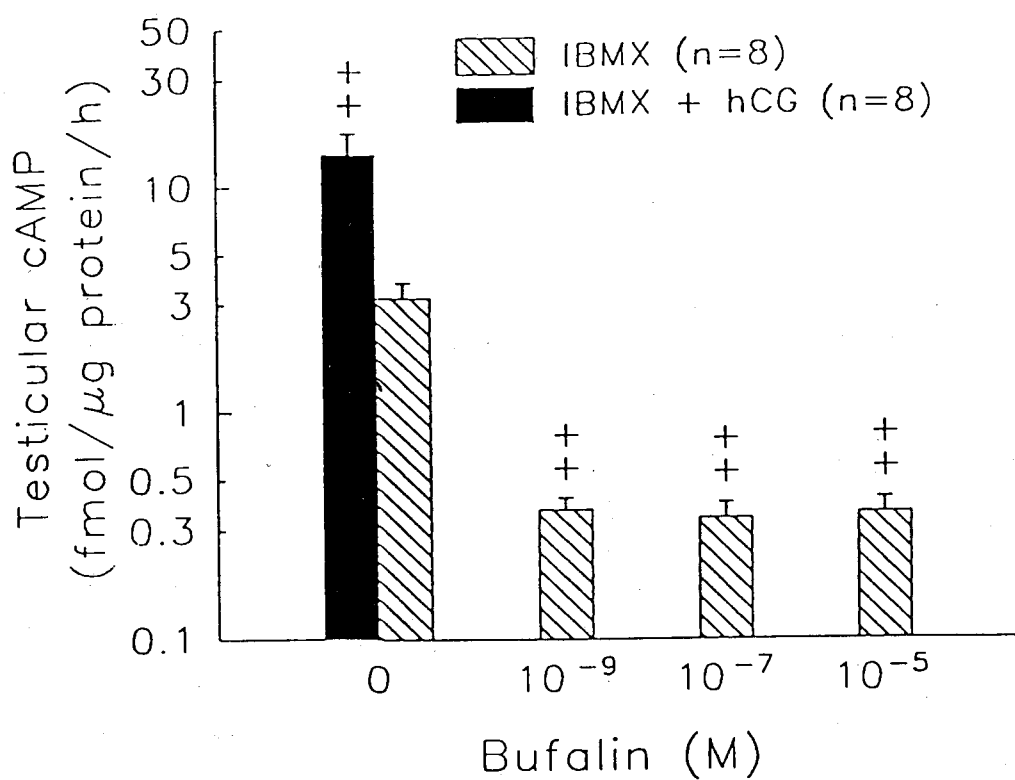
圖五、靜脈注射蟾酥精 (bufalin)，性釋素，或性釋素及蟾酥精對於血漿黃體促素濃度變化之效應。+，++ 表與基礎值 (0 分鐘) 有顯著及極顯著差異。*，** 表與性釋素處理組有顯著及極顯著之差異。



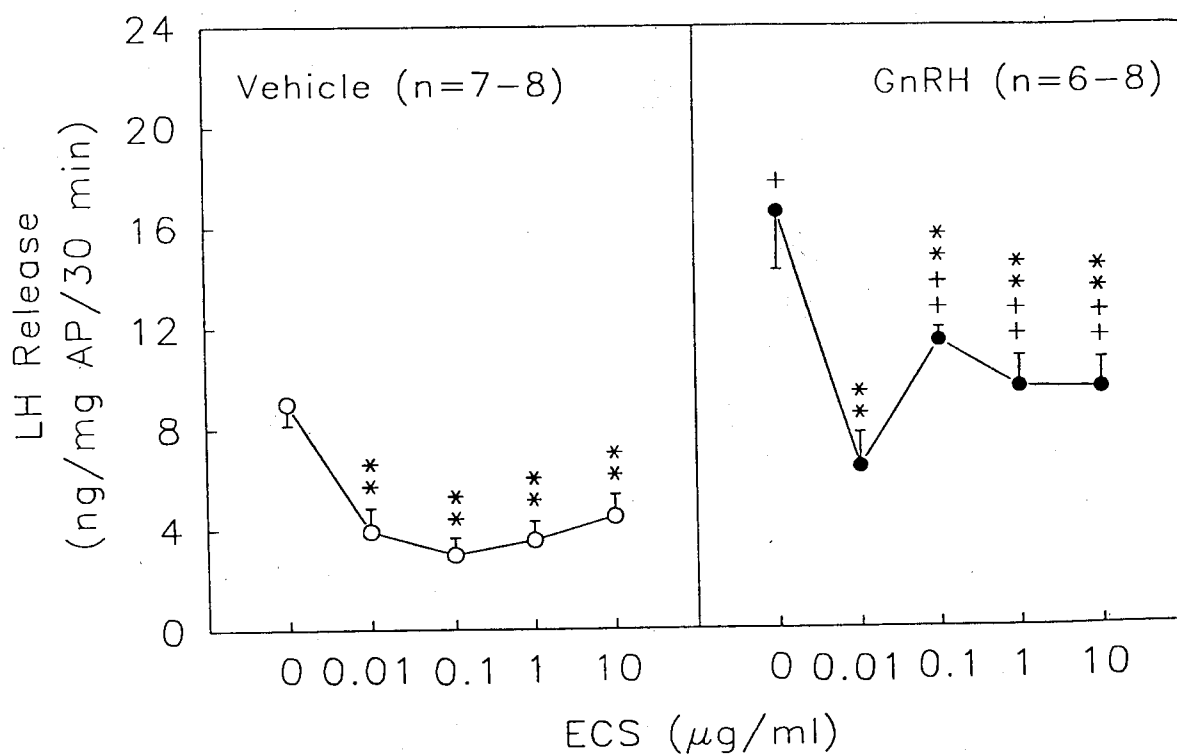
圖六、不同濃度之蟾酥萃取物對於離體睪丸處理 0.5 mM IBMX 後，睪固酮分泌及睪丸組織合成 cAMP 之效應。** 表與對照組 (0 劑量) 呈極顯著差異。



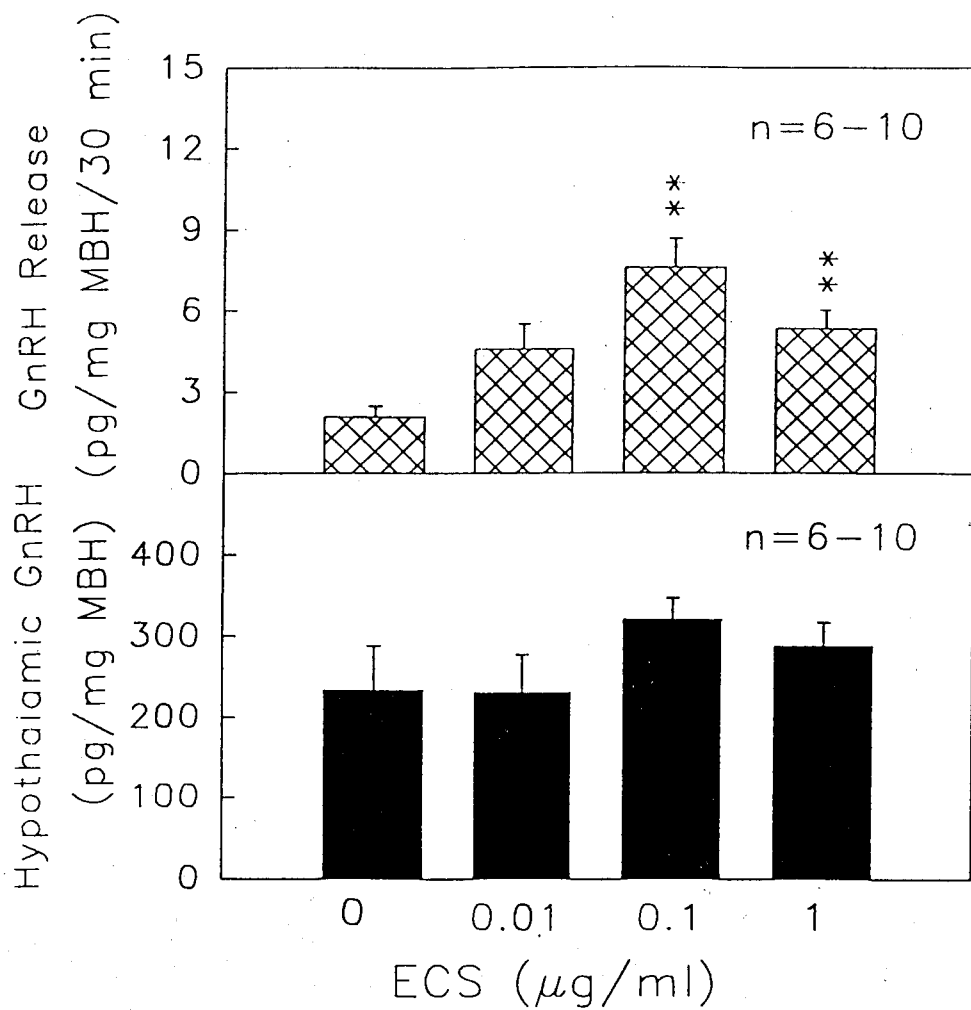
圖七、不同劑量之蟾酥精 (bufalin) 對睪丸離體分泌睪固酮之效應。+，++ 表與對照組 (0 劑量) 有顯著及極顯著差異。



圖八、不同劑量之蟾酥精 (bufalin) 對於 IBMX 刺激離體睪丸組織合成 cAMP 之效應。++ 表與對照組 (0 劑量) 有極顯著差異。



圖九、不同濃度之蟾酥萃取物對於離體雄鼠腦下腺前葉黃體促素之基礎分泌及其對性釋素反應之效應。*表與對照組(0劑量)呈極顯著差異。



圖十、不同濃度之蟾酥萃取物對於離體雄鼠中底下視丘性釋素之含量及其離體分泌之效應。** 表與對照組 (0 劑量) 呈極顯著差異。

中藥漢防己及馬兜鈴致突變性作用之研究

Mutagenicity study of Chinese herbal drugs Hanfangchi Radix and Aristolochiae Fructus

廖 志 飛

國立陽明大學

中文摘要

先前研究發現中藥漢防己及馬兜鈴之熱水抽提物，於沙門菌回復突變測試及活體小鼠小核仁測試中具有致突變性。已知漢防己來自漢中防己或粉防己的乾燥根，而馬兜鈴來自馬兜鈴與北馬兜鈴的乾燥成熟果實，因此爲了探討來自不同基源之漢防己或馬兜鈴是否具有相似之致突變性，本研究以先前所建立之沙門菌回復突變測試法及活體小鼠小核仁測試法，針對臺北市與臺中市藥行出售之漢防己及馬兜鈴藥材之熱水抽提物，做致突變性評估並加以比較。又已知漢防己與馬兜鈴之成份馬兜鈴酸 (aristolochic acid) 是一直接致突變劑，因此本研究又以高壓液相層析法 (HPLC) 初步分離被測藥材水抽提物之成份並測定馬兜鈴酸之含量，以了解馬兜鈴酸在這些藥材之致突變作用中扮演之角色。由臺北市及臺中市藥行購得之五種藥材經鑑定分別爲中藥防己(2種來自廣防己，1種來自粉防己)及中藥馬兜鈴(2種來自北馬兜鈴)。這五種藥材之水

抽提物經上述致突變測試法測試，結果顯示有不等之致突變作用。由所含馬兜鈴酸含量及比對馬兜鈴酸本身之作用，結果顯示馬兜鈴酸僅扮演部份角色。

綜合上述，本研究檢出市售中藥防己及馬兜鈴具有致突變潛力，可能與其含有馬兜鈴酸及其他致突變劑有關。

關鍵詞：致突變性評估，中藥，防己，馬兜鈴，馬兜鈴酸

ABSTRACT

In the previous study, it was found that the water extracts of Chinese herbal drugs Hanfangchi Radix and Aristolochiae Fructus had mutagenic activities in Salmonella/microsome (Ames) test and in vivo micronucleus test in mice. Hanfangchi Radix comes from the dry root of *Aristolochia heterophylla* Hemsl. or *Stephania tetrandra* S. Moore, while *Aristolochiae Fructus* comes from the dry ripe fruit of *Aristolochia debilis* Sieb. et Zucc. and *Aristolochia contorta* Bge. In order to evaluate whether Hanfangchi Radix or *Aristolochiae Fructus* from different plants had similar mutagenic activities, the water extracts from these plant materials, purchased from Taipei and Taichung Chinese drug stores, were tested and compared with the established Ames test and in vivo micronucleus test in mice. It has been reported that aristolochic acid, one constituent of Hanfangchi Radix or *Aristolochiae Fructus*, is a direct mutagen. To understand the role of aristolochic acid in the mutagenicity of these plant materials, the chemical constituents of the water extracts from these plant materials were separated and the content of aristolochic acid was determined with HPLC. Five

Chinese drug materials purchased from Taipei and Taichung Chinese drug stores were identified as Fangchi Radix (2 from *Aristolochia fangchi* Wu and 1 from *Stephania tetrandra* S. Moore) and Aristochiae Fructus (2 from *Aristolochia contorta* Bge.). The results from above-mentioned mutagenicity testing showed that the water extracts from these 5 drug materials had various mutagenic effects. By comparing the mutagenic effects according to the content of aristolochic acid and the mutagenic effect of aristolochic acid itself, it indicated that aristolochic acid only provided partial explanation. In summary, this study demonstrated that Chinese drug Fangchi Radix and Aristochiae Fructus had mutagenic potential, which might related to aristolochic acid and other mutagen in its constitution.

Key Words: Mutagenicity Testing ; Chinese herbal drugs ; Fangchi Radix; Aristolochiae Fructus; Aristolochic Acid

前 言

一些馬兜鈴屬 (*Aristolochia* spp.) 之植物廣被用於傳統中國醫藥或民間醫藥中。中藥大辭典 (1) 收錄者有馬兜鈴 (編號 #603)、朱砂蓮 (#1837)、關木通 (#1917)、尋骨風 (#1971)、防己 (#1984)、青木香 (#2496)、南木香 (#3250)、通城虎 (#4056)、假大薯 (# 4508)、管南香 (#5351) 及鼻血雷 (#5354)；而行政院衛生署所編之「中華民國中藥典範」(2) 則僅收錄漢防己 (正文 288 頁) 及馬兜鈴 (正文 415 頁) 兩種。漢防己爲馬兜鈴科植物漢中防己 (又名:異葉防己, *Aristolochia heterophylla* Hemsl.) 或粉防己 (*Stephania tetrandra* S. Moore) 之乾燥根 (2)；而中藥大辭典收錄之防己則爲防己科植物粉防己、木防己 (*Cocculus trilobus* (Thunb.) DC.) 及馬兜鈴科植物廣防己 (

Aristolochia fangchi Wu)、異葉馬兜鈴(即漢中防己)的根 (1)。其功用包括利小便，通腠理，利九竅，消水腫，清濕熱；主治小便不通，水腫腳氣，癰腫結毒，手足攣痹 (2)。馬兜鈴為馬兜鈴科植物馬兜鈴 (*Aristolochia debilis* Sieb. et Zucc.) (2) 或北馬兜鈴 (*Aristolochia contorta* Bge.) 的乾燥成熟果實 (1)。其功用包括清肺熱，降氣平喘，化痰止咳；主治痰嗽喘促，肺熱咳血，血痔瘰瘡 (2)。

基於保障全民健康及使中藥科學化之原則，先前五年計畫 (八十至八十四年度) 已陸續就「中華民國中藥典範」第一輯醫師處方常用 400 種中藥中 (2)將近 150 種之中藥做安全性，特別是致突變性之毒理測定，發現至少有 27 種中藥包括漢防己及馬兜鈴之水抽提物具有致突變潛力 (3-8)。先前研究發現漢防己 (152 mg/plate 以上) 及馬兜鈴 (138 mg/plate 以上) 於沙門菌回復突變測試 (*Salmonella*/microsome (Ames) test) 中可使沙門菌種 TA 100 產生致突變性，而於活體外非排定 DNA 合成測試 (in vitro unscheduled DNA synthesis (UDS) assay) 中未能檢出漢防己 (5-20 mg/ml) 及馬兜鈴 (2.5-10 mg/ml) 會破壞 DNA (5)。但於活體小鼠小核仁測試 (in vivo micronucleus test in mice) 中發現漢防己 (10.5 g/kg) 及馬兜鈴 (9.6 g/kg) 腹腔注射至 ICR 小鼠 48 小時後，於股骨之骨髓中會增加小核仁出現率，顯示漢防己及馬兜鈴確有致突變性 (6)。

由上述知漢防己之植物基源來自漢中防己與粉防己的乾燥根，而馬兜鈴來自馬兜鈴與北馬兜鈴的乾燥成熟果實，但於前述計畫中並未詳細探討來自不同基源之漢防己或馬兜鈴之熱水抽提物是否具有相似之致突變性，所以本研究以所建立之沙門菌回復突變測試法及活體小鼠小核仁測試法，針對臺北市與臺中市中藥行出售之漢防己及馬兜鈴藥材之水抽提物，做突變性評估並加以比較。

已知漢防己與馬兜鈴均含有馬兜鈴酸 (aristolochic acid) (9-11)。馬兜鈴酸之生物活性包括抗革蘭氏陽性細菌 (50-200 mg/ml)、抗革蘭氏陰性細菌及黴菌 (> 200 mg/ml) (12)、抗腫瘤 (13)、刺激免疫力作用 (14) 及有避孕之作用 (15)。Xing 等人則報導兜鈴酸無抗腫瘤及刺

激免疫力之作用(16)。有關馬兜鈴酸之致突變性與致癌性亦有一些報導(17-19)。Robisch 等人(17)證明兜鈴酸對於沙門菌TA100菌株是一直接致突變劑，而對TA98菌株則無作用。此結果與我們先前研究漢防己或馬兜鈴熱水抽提物之結果(5)類似。

因此本計畫又以高壓液相層析法 (HPLC) 初步分離漢防己及馬兜鈴熱水抽提物之成份並測定馬兜鈴酸之含量，另外經由相似之致突變測試來了解馬兜鈴酸在漢防己或馬兜鈴之致突性中扮演之角色。

材料與方法

I. 被測藥材：

購自臺北市與臺中市藥行之藥材經專家鑑定品種，經磨碎後取適量以五倍量之二次水煮沸60分鐘，取抽提液，如此反覆抽提三次。把抽提液經 Whatman 1 號濾紙過濾後經 60°C 加熱濃縮至約 500 毫升後冷凍，再經冷凍真空乾燥以製得粉末狀水抽提物。取適量之水提取物以適量之 DMSO 或三次水配成之溶液用於致突變性之測試。

II. 致突變性測試：

利用先前建立之沙門菌回復突變測試法 (Ames test) 及活體小鼠小核仁測試法，進行有關之致突變性實驗 (3-5)。

A. Ames test

Ames test 測試法簡述如下：於 2 ml 上層培養基 (45°C) 中依序加入 0.1 ml 被測樣品，0.1 ml *Salmonella typhimurium* TA 98 或 TA 100 菌種懸浮液，視需要加入 0.5 ml microsomal S9 mix，均勻搖盪後傾倒覆蓋於底層培養基平板上，於 37°C 培養箱中培養48小時，然後計算 his^+ 逆突變 (his^+ revertant) 菌落數。TA 98 菌株之自然突變數為 22-25 (不含S9) 及 37-59 (含S9)；而 TA 100 為 112-145 (不含S9) 及 136-206 (含S9)。若被測之樣品引起逆突變菌落數超過上述自然突變菌落數二倍以上，即視為該樣品具有致突變能力。陽性對照組於TA98使用

2-aminofluorene(含 S9)與picrolonic acid(不含 S9); 而於 TA 100 使用2-aminofluorene(含 S9)與4-nitorquinoline-N- oxide (不含 S9)。

B. 活體小鼠小核仁測試法

活體小鼠小核仁測試法之測法步驟大致如下: 取 3-5 隻公 ICR 小白鼠 (20-25 克) 為一處理組。每一次評估實驗均包括一陰性對照組、一陽性對照組、三個不同劑量之中藥處理組。陽性對照組使用 cyclophosphamide。每隻實驗動物以水或藥物處理後, 經 48 小時後犧牲取股骨, 取出骨髓與胎牛血清混和均勻後平塗在載玻片上, 經絕對甲醇固定 5 分後以 May-Grunwald 與 Giemsa-staining 混合染色法染色。以 1000 倍顯微鏡觀看, 每隻實驗動物骨髓樣品至少觀看 500 個 polychromatic erythrocytes (PCE) 並檢出其中有多少個含小核仁 (micronuclei) 及算出其百分比。實驗數據整理後以 Student's t test 或 one way ANOVA 統計分析。

C. 藥物測試濃度或劑量

依各種藥材抽提物之溶解度, 以最少量之 DMSO 或三次過濾水製得被測藥材之最濃溶液。於 Ames test 中以此藥物溶液或以藥物使測試系統中之細胞 50% 增殖抑制或產生細胞毒性之濃度當最高之測試濃度, 再依比率遞減。

在活體小鼠小核仁測試法中以被測藥材之最濃水溶液(0.5 g/ml)依 10 g 體重由腹腔給予 0.1 ml 之劑量當起試劑量, 再以兩倍遞減之比率, 測試至少三個不引致動物死亡之不同劑量。

III. HPLC 分析

馬兜鈴酸 (Aristolochic acid, Extrasynthese, F 69730 GENAY) 以 acetonitrile 溶解後經超音波振盪器 (Ultrasonic Cleaner, Branson) 振搖 10 分鐘, 以 0.22 mm 針筒過濾器 (Millex-GV13, Millipore) 過濾後, 注入 HPLC 系統分析。標準檢量曲線係以 5 個劑量 (0.5-10 mg) 及所得之波峰下面積值來製作。中藥水抽提物以水溶解配製

成100 mg原生藥重/ml之中藥水抽提液後以超音波振盪器振搖 10 分鐘後置於1.5 ml microtube，以離心機 (Biofuge 15, Heraeus Spatech)離心三分鐘(10,000 rpm)後取上清液，再經0.22 μ M之針筒過濾器過濾後，取10 μ l(相當於打入1 mg原生藥量)注入HPLC系統分析。爲了確認馬兜鈴酸之波峰所在，將中藥水抽提液(100 mg/ml)與馬兜鈴酸(100 mg/ml)等比率混合，取 20 μ l(相當於打入原生藥 1 mg與馬兜鈴酸1 mg)注入HPLC系統，觀察原生藥 HPLC 圖譜中所檢測馬兜鈴酸波峰處是否有明顯增加。

結 果

本研究由臺北市、臺中市藥行購得之藥材編爲1.臺北防己、2.臺中木防己、3.臺中漢防己、4.臺北馬兜鈴、5.臺中馬兜鈴。經藥材鑑定1.臺北防己、2.臺中木防己同爲廣防己(*Aristolochia fangchi* Y.C. Wu ex L.D. Chow)的乾燥根；而3.臺中漢防己爲粉防己(*Stephania tetradra* S. Moore)的乾燥根。4.臺北馬兜鈴與5.臺中馬兜鈴同爲北馬兜鈴(*Aristolochia contorta* Bge.)的乾燥成熟果實。先前計畫留下之漢防己與馬兜鈴水抽提物則編爲漢防己(老)與馬兜鈴(老)，因原藥材樣品未保留，以致不能做藥材鑑定。

五種藥材經熱水抽提後所得之粉狀水抽提物之重量與原藥材重量之百分比(即抽提率)列於表二。由表二知 3.臺中漢防己之抽提率最高，而以4.臺北馬兜鈴之抽提率最低。這些藥材水抽提物及先前之漢防己(老)與馬兜鈴(老)抽提物經 HPLC 初步分離顯示有不同之 HPLC 圖譜(圖一至圖七)。在波長 254 nm 檢測下，1.臺北防己(圖一)、2.臺中木防己(圖二)及漢防己(老)(圖六)之 HPLC 圖譜非常相似，但與3.臺中漢防己(圖三)則差別很大。4.臺北馬兜鈴(圖四)與5.臺中馬兜鈴(圖五)之 HPLC 圖譜亦有差別，特別是5.臺中馬兜鈴含有較多之成份。由馬兜鈴(老)之 HPLC 圖譜知 20 分前出現之成份波峰有點類似5.臺中馬兜鈴，而 20 分後出現之成份波峰與4.臺北馬兜鈴更類似。

馬兜鈴之 HPLC 圖譜與 1. 臺北防己、2. 臺中木防己、3. 臺中漢防己均不類似。於所述之 HPLC 分離條件下，馬兜鈴酸之滯留時間 (retention time) 為 24.63 ± 0.03 分 (圖八)，依此指標及外加馬兜鈴酸以確認馬兜鈴酸之波峰位置，經標準檢量曲線內插可得各藥材水抽提物之馬兜鈴酸含量；依各藥材之抽提率校正，表三列出各藥材所含馬兜鈴酸之含量。由表三知馬兜鈴(老)之馬兜鈴酸含量最高，其次為 5. 臺中馬兜鈴，而 3. 臺中漢防己水抽提物於測定之條件下無法測出。

表四顯示以 Ames Test 測致突變性之結果。於測試之劑量下，在 TA98 菌 顯示 2. 臺中木防己(+S9 與 -S9)、4. 臺北馬兜鈴(+S9)及 5. 臺中馬兜鈴(+S9 與 -S9)有致突變性，其中以 5. 臺中馬兜鈴作用最強，而於 S9 存在下其致突變作用會加強。在 TA100 菌顯示 2. 臺中木防己(+S9 與 -S9)、4. 臺北馬兜鈴(-S9)及 5. 臺中馬兜鈴(-S9)有致突變性，其中亦以 5. 臺中馬兜鈴作用最強，但於 S9 存在下其致突變作用消失。於測試之劑量下，於 TA98 或 TA100 菌均未檢出 1. 臺北防己及 3. 臺中漢防己有致突變性。馬兜鈴酸(0.01 mg/plate)對 TA98 菌無致突變性，但對 TA100 菌則有致突變性，且於 S9 存在下其致突變作用沒顯著改變。較高劑量(0.03 mg/plate)馬兜鈴酸對 TA100 菌亦有致突變性，但其作用低於小劑量者(0.01 mg/plate)，可能較高劑量之馬兜鈴酸已對 TA100 菌有稍為殺菌作用。

ICR 小白鼠經腹腔注射陽性對照藥物 cyclophosphamide (5-50 mg/kg) 48 小時後犧牲，取股骨內骨髓塗片(每隻動物製 3 片)，經固定及染色後，以 1000 倍顯微鏡觀看抹片中至少各 500 個 polychromatic erythrocytes (PCE)，發現小核仁之數目有明顯增加(表五)。經以所配製之最高劑量(5 g/kg)再二倍稀釋共三個劑量來評估中藥水抽提物，結果如表五所示。各中藥於劑量 2 g/kg 或 5 g/kg 下均會增加小核仁之數目，其中 2. 臺中木防己與 4. 臺北馬兜鈴之作用隨劑量增加(2 g/kg 增為 5 g/kg)而大減。

討 論

中藥有品管困難之缺點，即藥材來有不同之產地或來自不同之植物來源，而其所含之成份亦常隨採收季節不同或製作方式不同，而變化很大。雖然中藥之鑑定有法可循，如行政院衛生署所編之「中華民國中藥典範」第一輯 (2) 列有醫師處方常用藥計四百種藥材之鑑定法，又中藥材進口商亦本商業道德進口道地優良藥材，但市面還是有低劣品或冒代品充斥。爲了使中藥之使用更安全，有關中藥之藥理及毒理之研究是不可缺少的，但此方面之研究常因研究之藥材未經詳細鑑定，而產生無法比對或差異很大之結果。因爲本研究目的之一爲探討同一中藥材名但來自不同種或科之植物，其抽提物是否有致突變能力及是否有明顯差異性，所以必須把欲評估之中藥材作藥材鑑定；另外本研究亦希望了解市售有關此類藥材之情形，因此至臺北市及臺中市不同中藥行依中藥名採買，但僅購得 5 種作爲本研究之材料。經藥材鑑定，知臺北購得之防己 (1. 臺北防己) 及臺中購得之木防己 (2. 臺中木防己) 均來自馬兜鈴科植物廣防己的乾燥根；而臺中購得之漢防己 (3. 臺中漢防己) 則來自防己科植物粉防己的乾燥根。雖然上述藥材之稱謂有些也許有誤但均爲中藥大辭典收錄之防己。中藥大辭典收錄之防己爲防己科植物粉防己、木防己及馬兜鈴科植物廣防己、異葉馬兜鈴 (漢中防己或異葉防己) 的根 (1)。

因中藥水抽提物溶液比較符合國人服用中藥方劑之煎煮藥湯，所以本研究以水抽提物來評估。上述三種藥材之水抽提物經 HPLC 分離分析，發現 1. 臺北防己與 2. 臺中木防己之 HPLC 圖譜非常相似而與 3. 臺中漢防己之差別則很大。此結果與藥材鑑定之結果很吻合，即來自同植物其所含成份應很相近而來自不同植物其所含成份應有明顯差異。另外，於 3. 臺中漢防己 (即粉防己) 未能檢出馬兜鈴酸含量，與粉防己未含馬兜鈴酸吻合 (20)。雖然先前研究之漢防己 (老) 無法做藥材鑑定，但因購自臺北市同一中藥行且其 HPLC 圖譜與 1. 臺北防己非常相似，所以可能爲相同藥材。

先前研究之馬兜鈴 (老) 之 HPLC 圖譜與 4. 臺北馬兜鈴較相似，但所含成份較多，而此部份之 HPLC 圖譜又與 5. 臺中馬兜鈴有點像。由臺北市及臺中市購得之馬兜鈴 (即 4. 臺北馬兜鈴與 5. 臺中馬兜鈴)，雖經藥材

鑑定同為馬兜鈴科植物北馬兜鈴的乾燥成熟果實，但由 HPLC 之成份圖譜比較，發現差別不小；因馬兜鈴(老)與4.臺北馬兜鈴均購自臺北市同一中藥行，但購買時已相隔三年，又由外觀色澤比較知4.臺北馬兜鈴較5.臺中馬兜鈴為暗，所以此種差別可能係4.臺北馬兜鈴已庫存較久，較不新鮮而導致成份喪失所致。

由於中藥每次抽提之程度一定會有差異，為了標準化，所以本研究測試結果之劑量或濃度均以原藥材重量計，而不是以水抽提物之重量表示。先前研究使用活體外非排定 DNA 合成(UDS)測試法未能檢出漢防己(老)(5-20 mg/ml)及馬兜鈴(老)(2.5-10 mg/ml)會破壞 DNA (5)。本研究於預試驗時亦測試過馬兜鈴酸(10⁻⁶-10⁻⁵ M)，但同樣地未能檢出其會破壞 DNA (實驗數據未列出)。因此於本研究未再使用 UDS 測試法來評估這些藥材之水抽提物在此測試法，是否有致突變能力。

先前研究發現漢防己(老)(152 與 303 mg/plate)於沙門菌回復突變測試中可使沙門菌種 TA 100 產生致突變性，但於 S9 存在下則作用消失 (5)。如上述，漢防己(老)可能與1.臺北防己同來自廣防己，所以本研究於測試1.臺北防己所用之劑量(23.9 mg/plate)下無作用，應很吻合。但是，同樣來自廣防己之2.臺中木防己，則於相似劑量(21.8 mg/plate)下對於 TA98、TA100 菌均有致突變性。如假定馬兜鈴酸是2.臺中木防己產生致突變性之主要成份，而由其馬兜鈴酸含量及與馬兜鈴酸本身之作用作比較，則於 TA100 菌之實驗結果似很吻合 (即 4.34 mg/plate, 2.61倍對照組 vs. 10 mg/plate, 4.82倍對照組菌落數)；但於 TA98 菌則不吻合，因馬兜鈴酸對 TA98 菌無致突變性。此結果暗示2.臺中木防己含有其他致突變劑。

先前研究發現馬兜鈴(老)(138 mg/plate 以上)於沙門菌回復突變測試中可使沙門菌種 TA 100 產生致突變性，對於 TA98 菌雖然會出現菌落小而多之現象，但視為無致突變作用(5)。本研究發現4.臺北馬兜鈴於 25.4 mg/plate對 TA100 有致突變作用；而5.臺中馬兜鈴於 6.4 mg/plate對 TA98 及 TA100菌均有致突變作用，且於高劑量下在 TA98 會產生菌落小而多之現象。相似地，如以馬兜鈴酸含量及作用作比對，則

發現馬兜鈴酸對 4. 臺北馬兜鈴之致突變作用僅提供部份解釋，而對於 5. 臺中馬兜鈴之致突變性，則難予解釋。主要是 5. 臺中馬兜鈴於 12.9 mg/plate(即含 0.284 mg 馬兜鈴酸/plate)下，在 TA100 菌已有相當之致突變作用，而在 TA98 菌則顯示更強之致突變作用。這些結果暗示 5. 臺中馬兜鈴含有其他致突變劑。

先前研究於活體小鼠小核仁測試中發現漢防己(老)(10.5 g/kg)及馬兜鈴(老)(9.6 g/kg)腹腔注射至 ICR 小鼠 48 小時後，於股骨之骨髓中會增加小核仁出現率，顯示漢防己(老)及馬兜鈴(老)有致突變性(6)。於本研究重複實驗亦發現漢防己(老)在 1 g/kg 劑量下即顯著增加小核仁之出現率，而馬兜鈴(老)於 5 g/kg 劑量下亦有顯著之作用，再度證實漢防己(老)及馬兜鈴(老)確有致突變性。此外，本研究新測試之中藥於劑量 2 g/kg 或 5 g/kg 下亦均會增加小核仁之出現率，顯示來自廣防己、粉防己之中藥防己及來自北馬兜鈴之中藥馬兜鈴均有致突變性。至於馬兜鈴酸於活體小鼠小核仁測試是否有致突變性，則還繼續評估中。

如在「前言」部份所述馬兜鈴酸具有很多生物活性如抗革蘭氏陽性、陰性細菌及黴菌、抗腫瘤、刺激免疫力作用及有避孕之作用，但有關馬兜鈴酸之致突變性與致癌性亦有一些報導(12-19)。早在 1964 年，即有人報導馬兜鈴酸對人類有腎臟毒性(21)。1982 年，Menges 等人報導馬兜鈴酸在大鼠是一強致癌劑(19)，而 Schmeiser 實驗室接著闡示馬兜鈴酸之致突變與致癌作用與馬兜鈴酸-DNA 鍵結物之形成有關(22,23)。最近他們闡示患有所謂「中草藥腎病變症 (Chinese herbs nephropathy)」之病人腎臟組織中含有馬兜鈴酸-DNA 鍵結物，而提供這類病人有尿道上皮細胞異型與癌症之解釋，同時亦升高馬兜鈴酸使 DNA 突變而導致腎臟破壞性之纖維化病變之可能性(24)。因此，如把馬兜鈴酸之療用與毒害作一考量，似應呼籲國人要小心使用含有馬兜鈴酸之中藥。

建 議

經文獻檢索知某些中藥所含之黃酮類化合物(25)或 isoquinoline

生物鹼(26)具有致突變能力；而四種含槲皮素之醫用植物乙醇抽提物製劑已被報導具有致突變性(27)。日本 Morimoto 等人(28)及大陸 Yin 等人(29)亦已報導某些中藥具有致突變潛力，而先前五年來之計畫研究結果亦顯示某些中藥具有致突變潛力(3-8)，而本研究針對中藥防己及馬兜鈴再度測試亦證實這類中藥具有致突變潛力。最近在比利時發生服用中草藥處方當減肥藥產生之所謂「中草藥腎病變症」，被懷疑原處方之粉防己被同為中藥防己之廣防己代用，而廣防己所含之馬兜鈴酸可能是致病之因(24)。因此有關中藥之毒理包括遺傳學毒性之研究，值得繼續進行，其成果除可提供中藥安全性之依據外，對於那些經各類評估而被確認具有危險毒性之中藥則應宣導少用或不用。

參考文獻

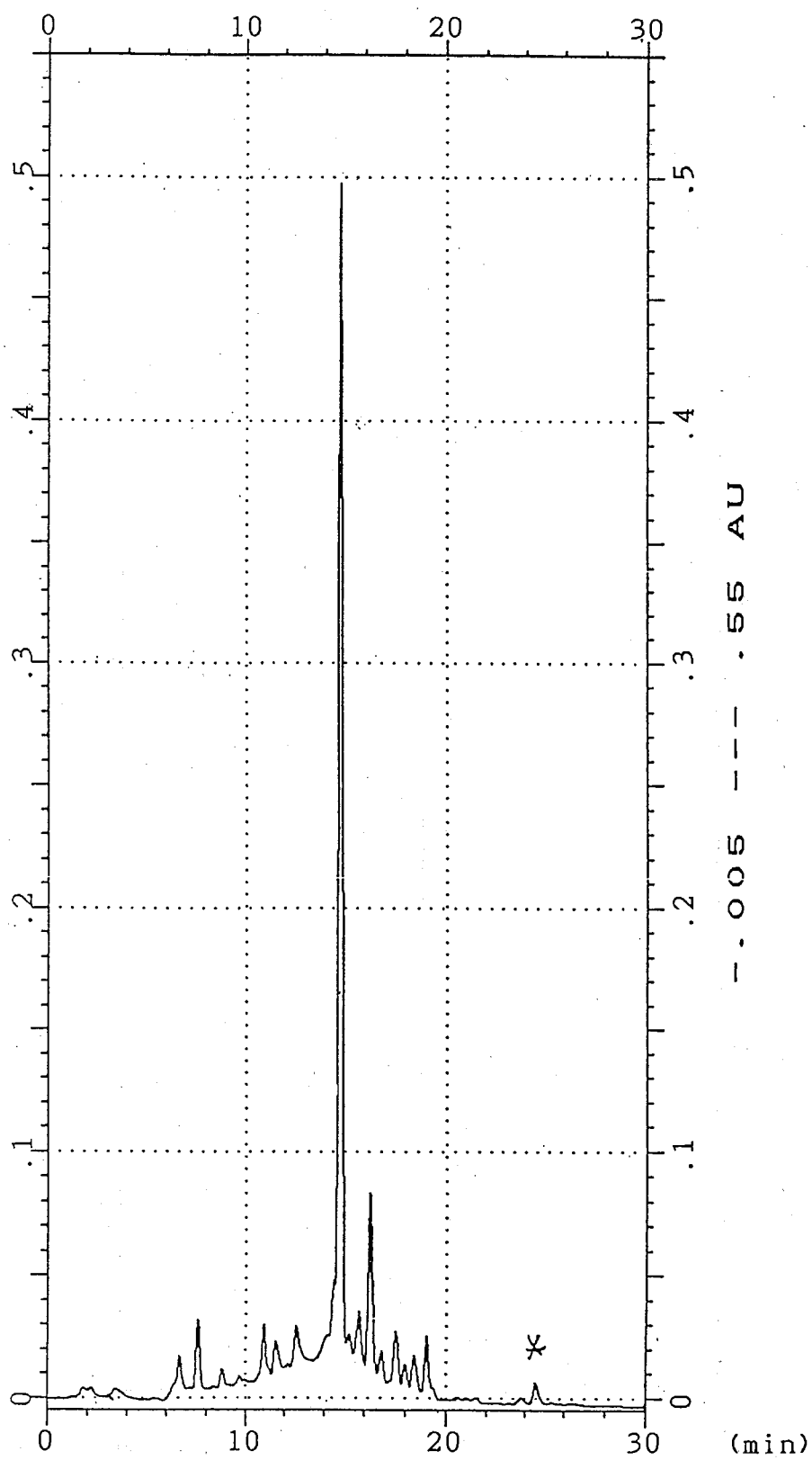
1. 江蘇新醫學院。中藥大辭典，商務印書館，香港，1979。
2. 行政院衛生署。中華民國中藥典範，臺北，1985。
3. Liao, J.F., Chang, S.C., and Chen, C.F. Mutagenicity testing of the crude extracts of 30 Chinese drugs. J. Chin. Med. 3: 73-85, 1992.
4. 廖志飛。中藥毒理作用之測定。行政院衛生署中醫藥年報，第十期，第二冊，296-316 頁，1993。
5. 廖志飛。中藥致突變性作用之測定(2)川烏頭等三十種藥材。行政院衛生署中醫藥年報，第十一期，第二冊，539-564 頁，1994。
6. 廖志飛、張勝祺、陳介甫。中藥毒理作用之測定(三)。中醫藥年報，第十二期，第三冊，193-212 頁，1996。
7. 廖志飛。中藥致突變性作用之測定(四)苦杏仁等三十種藥材。中醫藥年報，第十三期，第三冊，223-246 頁，1996。
8. 廖志飛。中藥致突變性作用之測定(V)知母等三十種藥材。中醫藥年報，第十四期，第二冊，37-65 頁，1996。
9. Ho, M.S., Li, X.L., Lo, J.Q., and Liu, J.C. Studies on che-

- mical constituents of *Aristolochia heterophylla*. Chin. Trad. Herb. Drugs 14: 158, 1983.
10. Tseng, K.F. and Ku, Y.T. Chemical studies on *Aristolochia* species. Relation between isoaristolochic acid and aristolochic acid. Acta. Pharm. Sin. 6: 174-177, 1958.
 11. Lou, F.C., Ding, L.S., Li, L.L., and Wu, M.Y. Chemical constituents of Bei Madouling (*Aristolochia contorta*). Chin. Trad. Herb. Drugs 17: 390-391, 1986.
 12. Komatsu, N., Nawata, H., Kimino, T., Tsunoda, H., Nagumo, N., Koike, K., Shoji, J., and Tada, A. Biological activity of aristolochic acid. I. Antimicrobial spectrum and effects on bacterial toxins. Showa Igakkai Zasshi 33: 769-775, 1973.
 13. Komatsu, N., Nawata, H., Kimino, T., Shoji, J., and Tada, A. Biological activities of aristolochic acid. II. Effect on experimental tumor, bacterial infection and RES (reticulo-endothelial system) function. Showa Igakkai Zasshi 33: 776-782, 1973.
 14. Wagner, H., Porksch, A., Vollmar, A., Kreutzkamp, B., and Bauer, J. In vitro phagocytosis stimulation by isolated plant materials measured in the phagocytosis-chemoluminescence (CL) model. Planta Med. 51: 139-144, 1985.
 15. Wang, W.H. and Zheng, J. H. Pregnancy terminating effect and toxicity of an active component of *Aristolochia mollissima* Hance, aristolochic acid A. Acta. Pharm. Sin. 19: 405-409, 1984.
 16. Xing, B.H., Zhao, L.Q., Lou, B., and Jin, L. Pharmacology of aristolochic acid. Guanxi Yixue 2-4, 1981.
 17. Robisch, G., Schimmer, O., and Goggelmann, W. Aristolochic acid is a direct mutagen in *Salmonella typhimurium*. Mutat.

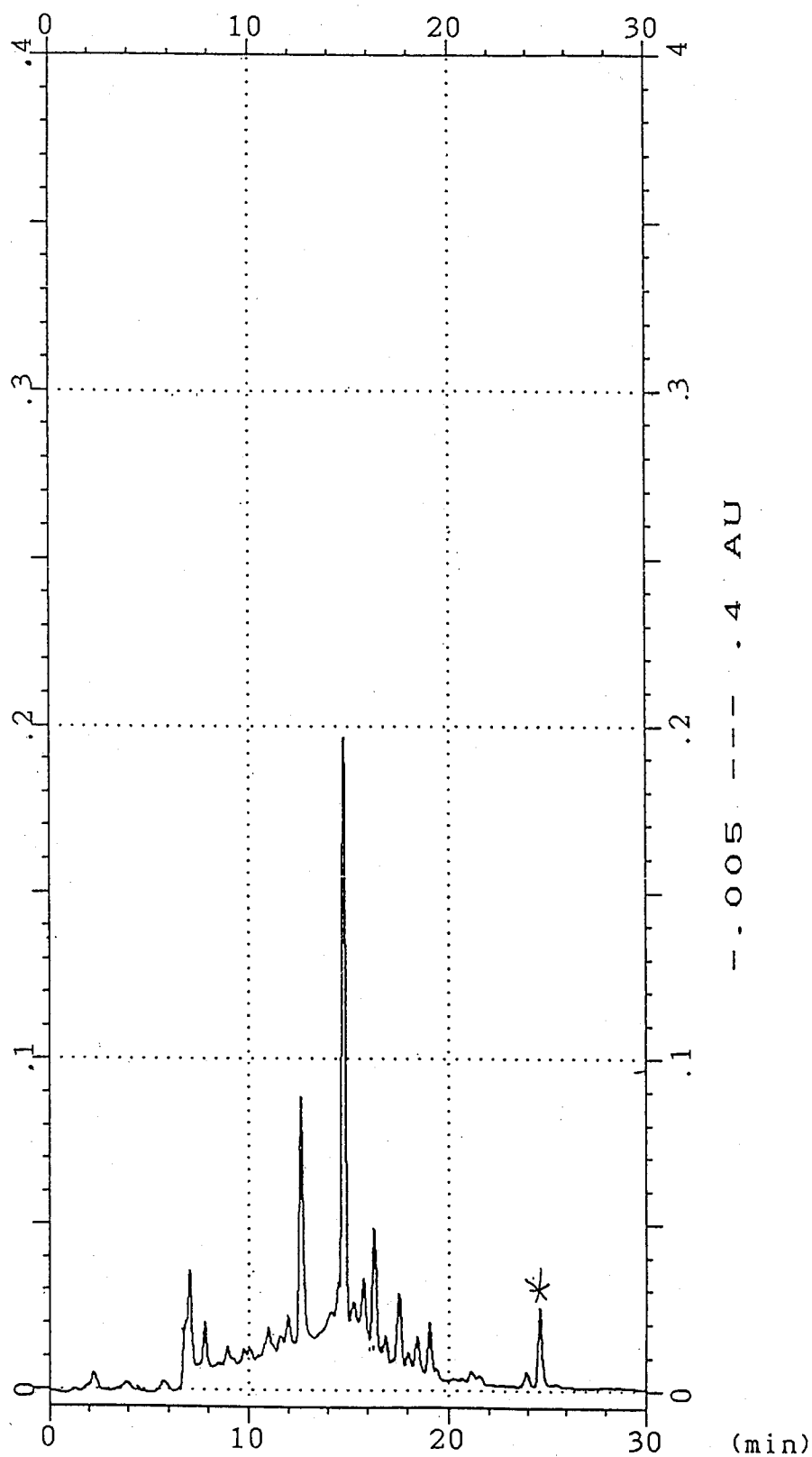
Res. 105: 201-204, 1982.

18. Mengs, U., Lang, W., and Poch, J.A. The carcinogenic action of aristolochic acid in rats. *Arch. Toxicol.* 51: 107-119, 1982.
19. Mengs, U. On the histopathogenesis of rat forestomach carcinoma caused by aristolochic acid. *Arch. Toxicol.* 52: 209-220, 1983.
20. Tang, W. and Eisenbrand, G. *Chinese Drugs of Plant Origin.* Springer-Verlag, Berlin, pp. 963-978, 1992.
21. Jackson, L., Kofman, S., Weiss, A., and Brodovsky, H. Aristolochic acid (NSC-50413): Phase I clinical study. *Cancer Chemother. Rep.* 42: 35-37, 1964.
22. Schmeiser, H.H., Janssen, J.W.G., Lyons, J., Scherf, H.R., Pfau, W., Buchmann, A., Bartram, C.R., and Wiessler, M. Aristolochic acid activates ras genes in rat tumors at deoxyadenosine residues. *Cancer Res.* 50: 5464-5469, 1990.
23. Broschard, T.H., Wiessler, M., von der Lieth, C.W., and Schmeiser, H.H. Translesional synthesis on DNA templates containing site- specifically placed deoxyadenosine and deoxyguanosine adducts formed by the plant carcinogen aristolochic acid. *Carcinogenesis (Lond.)* 15: 2331-2340, 1994.
24. Schmeiser, H.H., Bieler, C.A., Wiessler, M., van Ypersele de Strihou, C., and Cosyns, J.-P. Detection of DNA adducts formed by aristolochic acid in renal tissue from patients with Chinese herbs nephropathy. *Cancer Res.* 56: 2025-2028, 1996.
25. MacGregor, J.T. Genetic toxicology of dietary flavonoids. In: *Genetic Toxicology of the Diet* (Knudsen, I. ed.), Alan R. Liss, New York, pp 33-43, 1986.

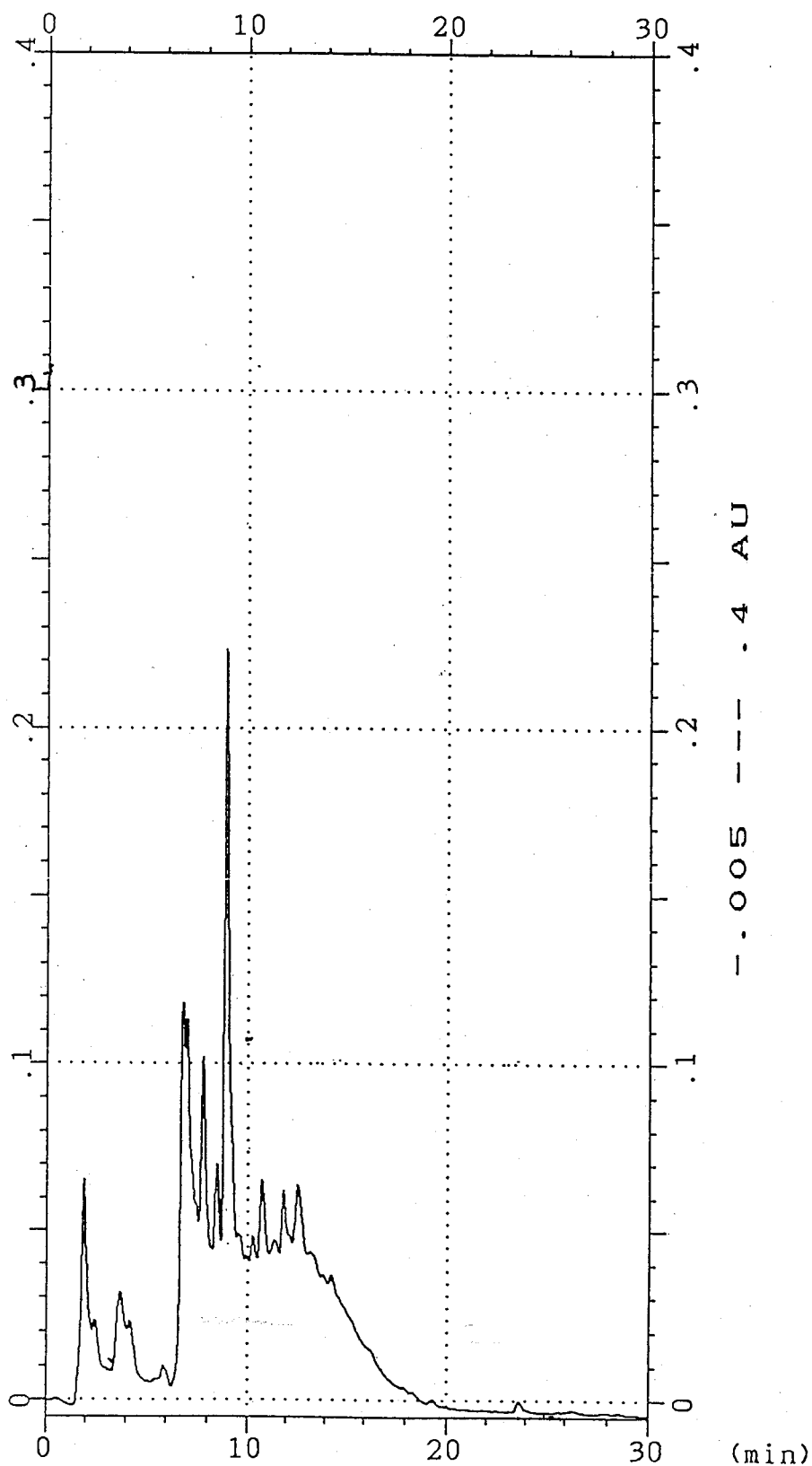
26. Nozaka, T., Watanabe, F., Tadaki, S., Ishino, M., Morimoto, I., Kunitomo, J., Ishii, H., and Natori, S. Mutagenicity of isoquinoline alkaloids, especially of the aporphine type. *Mutat. Res.* 240: 267-279, 1990.
27. Schimmer, O., Hafele, F., and Kruger, A. The mutagenic potencies of plant extracts containing quercetin in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. *Mutat. Res.* 206: 201-208, 1988.
28. Morimoto, I., Watanabe, F., Osawa, T., Okitsu, T.: Mutagenicity screening of crude drugs with *Bacillus subtilis* reversion assay and *Salmonella*/microsome reversion assay. *Mutat. Res.* 97: 81-102, 1982.
29. Yin, X.J., Liu, D.X., Wang, H., Zhou, Y.: A study on the mutagenicity of 102 raw pharmaceuticals used in Chinese traditional medicine. *Mutat. Res.* 260: 73-82, 1991.



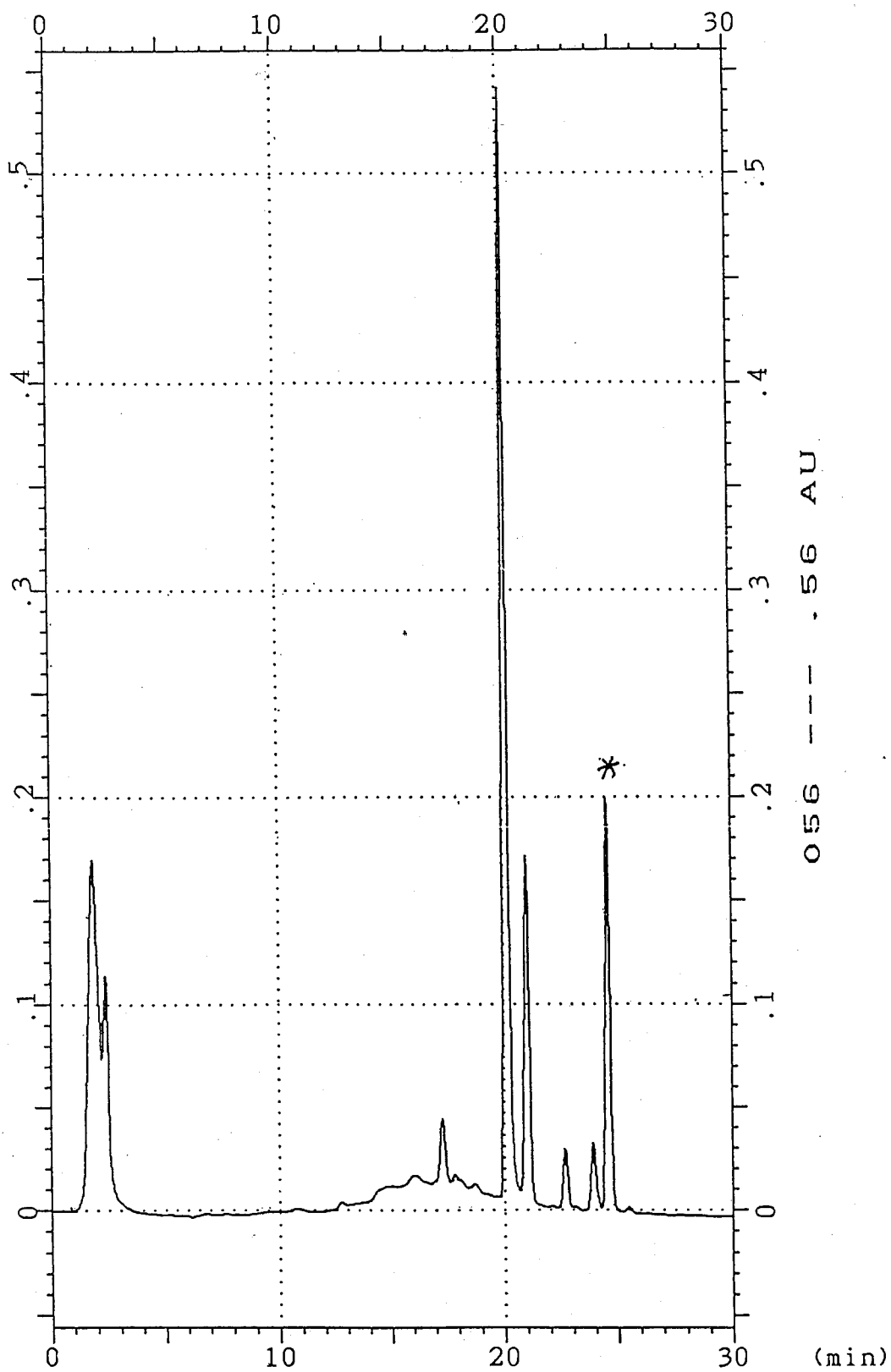
圖一、臺北防己之 HPLC 圖



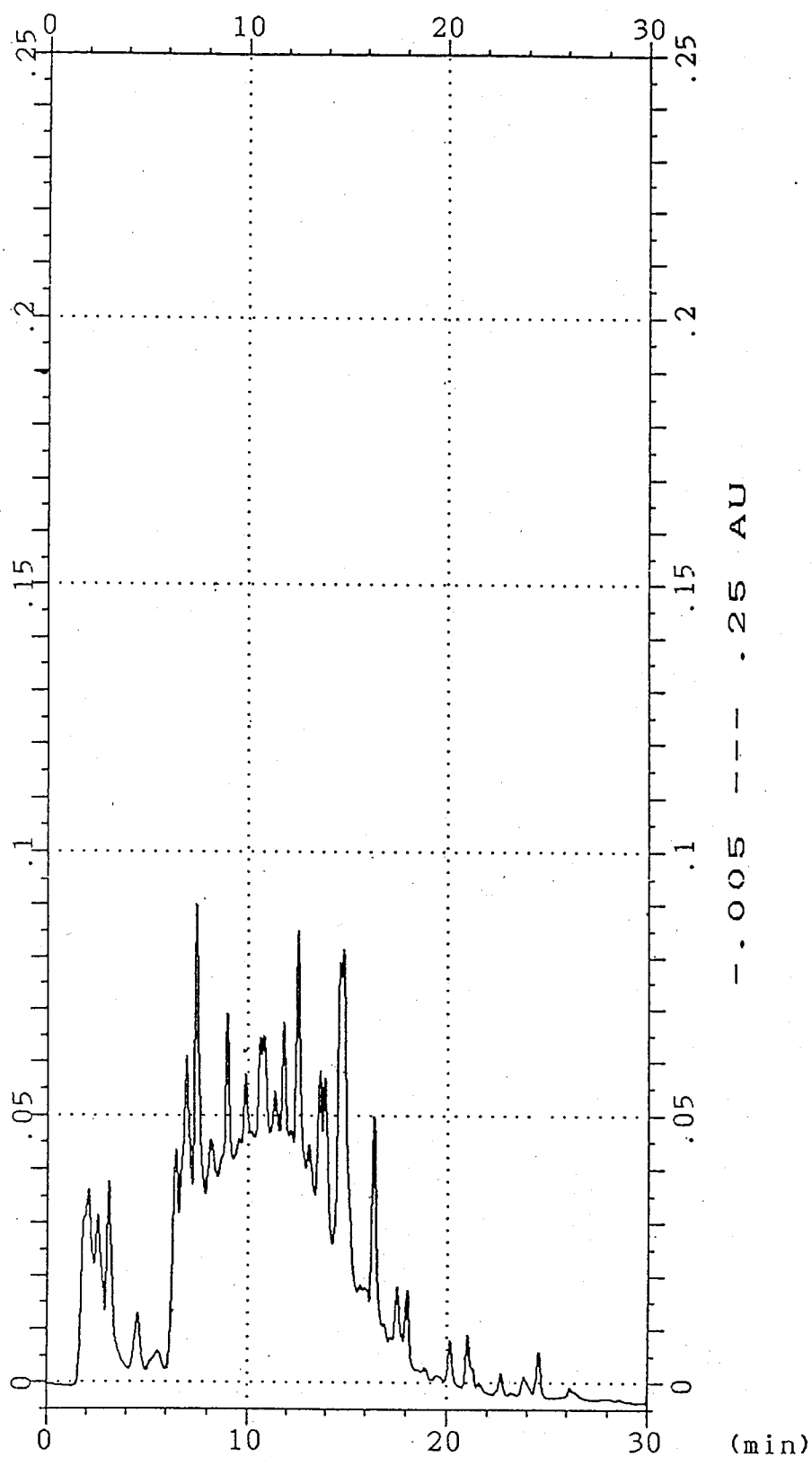
圖二、臺中木防己之 HPLC 圖



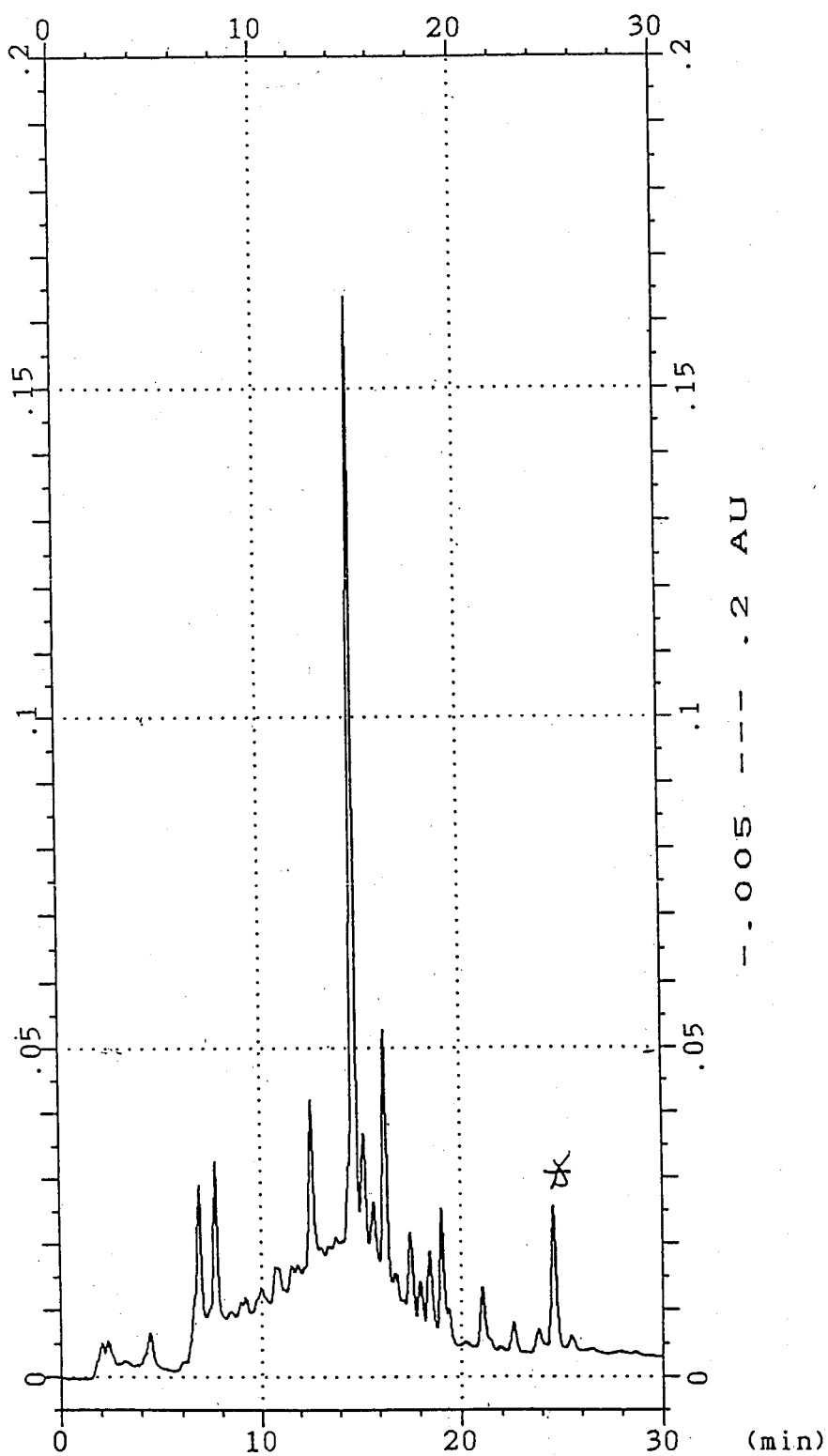
圖三、臺中漢防己之 HPLC 圖



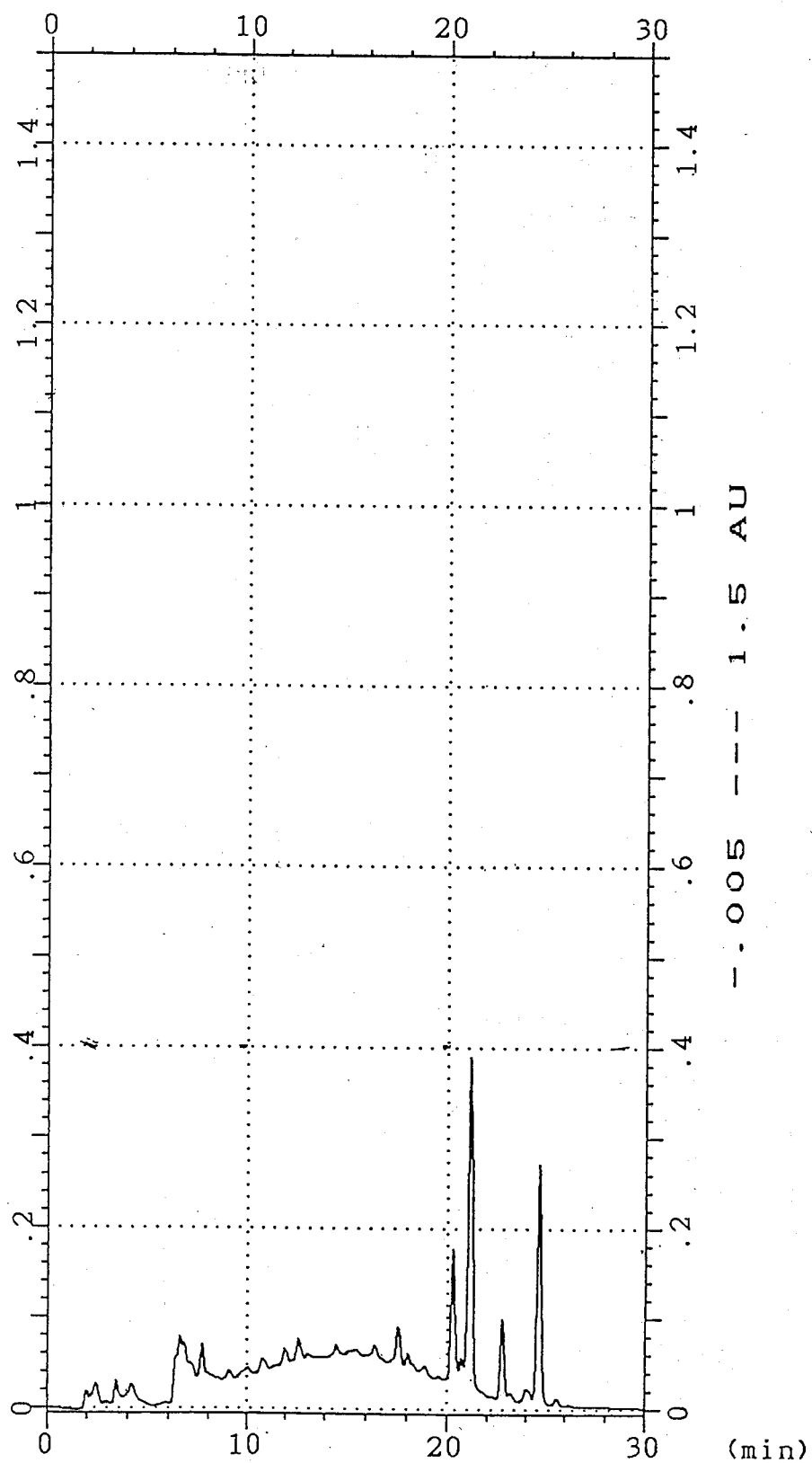
圖四、臺北馬兜鈴之 HPLC 圖



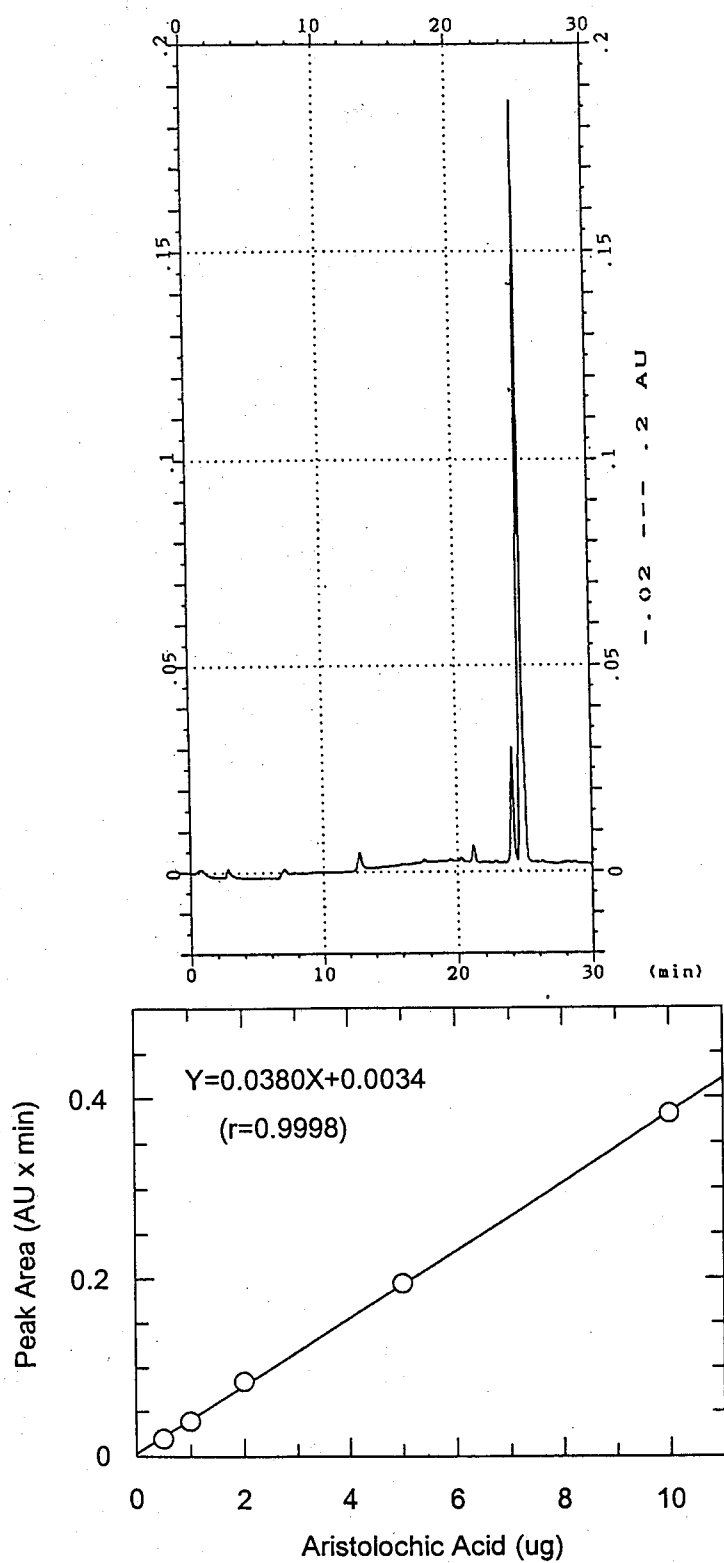
圖五、臺中馬兜鈴之 HPLC 圖



圖六、漢防己(老)之 HPLC 圖



圖七、馬兜鈴 (老)之 HPLC 圖



圖八、馬兜鈴酸之 HPLC 圖及馬兜鈴酸之標準檢量圖

表一、 被測中藥藥材之基源

藥 材	來 源
1. 臺北防己	廣防己(<i>Aristolochia fangchi</i> Y.C. Wu ex L. D. Chow)的乾燥根
2. 臺中木防己	廣防己(<i>Aristolochia fangchi</i> Y.C. Wu ex L. D. Chow)的乾燥根
3. 臺中漢防己	粉防己(<i>Stephania tetradra</i> S. Moore)的乾燥根
4. 臺北馬兜鈴	北馬兜鈴(<i>Aristolochia contorta</i> Bge.)的乾燥成熟果實
5. 臺中馬兜鈴	北馬兜鈴(<i>Aristolochia contorta</i> Bge.)的乾燥成熟果實

表二、 中藥水抽提物之抽提率

藥 材	抽 提 率 (%)*
1. 臺北防己	13.38
2. 臺中木防己	13.31
3. 臺中漢防己	26.84
4. 臺北馬兜鈴	6.69
5. 臺中馬兜鈴	16.61

* 抽提率 (%) = (水抽提物重量 / 原藥材重量) x 100

表三、中藥之馬兜鈴酸含量

藥 材	馬兜鈴酸含量 (mg/g)
1. 臺北防己	0.047±0.001
2. 臺中木防己	0.199±0.033
3. 臺中漢防己	0
4. 臺北馬兜鈴	1.242±0.002
5. 臺中馬兜鈴	0.022±0.006
漢防己 (老)	0.224±0.004
馬兜鈴 (老)	2.119±0.04

實驗數據以平均值±標準誤差值 (n=3) 表示

表四、中藥水抽提物對沙門菌致突變性之測定

	劑量 (mg/Plate)	Revertants/Plate			
		TA98		TA100	
		+S9	-S9	+S9	-S9
對照組		48±5#	24±1	164±17	122±8
1. 臺北防己	23.9	90	24	220	113
2. 臺中木防己	21.8	384*	88*	356*	319*
3. 臺中漢防己	6.7	55	28	143	147
4. 臺北馬兜鈴	25.4	103*	24	317	311*
	12.7	65	45	270	210
	6.4	62	42	186	147
5. 臺中馬兜鈴	25.9	1192*	3584※	219	3300※
	12.9	1420*	470*	236	658*
	6.4	1026*	289*	296	393*
馬兜鈴酸	0.01	84	40	826*	588*
	0.03	47	27	353*	328*

#：對照組以四次測定之平均值±標準誤差值表示，藥物組以兩次測定之平均值表示

*：表示突變菌落數大於兩倍對照組

※：表示菌落小而多

表五、中藥水抽提物對小核仁出現率之影響

被測藥物	劑量	n	小核仁#	小核仁出現率 (%)
對照組		15	0.33±0.16	0.07±0.03
Cyclophosphamide	5 mg/kg	9	0.67±0.29	0.13±0.16
	10 mg/kg	9	1.11±0.20**	0.22±0.04**
	25 mg/kg	9	1.00±0.24*	0.20±0.05*
	50 mg/kg	6	1.17±0.31*	0.23±0.06*
1.臺北防己	1 g/kg	9	0.56±0.24	0.11±0.05
	2 g/kg	9	0.44±0.24	0.08±0.05
	5 g/kg	9	1.56±0.34**	0.31±0.07**
2.臺中木防己	1 g/kg	9	0.56±0.18	0.11±0.04
	2 g/kg	9	1.89±0.45**	0.38±0.09**
	5 g/kg	9	0.33±0.16	0.20±0.07
3.臺中漢防己	1 g/kg	9	1.00±0.24*	0.20±0.05*
	2 g/kg	9	0.89±0.20*	0.18±0.04*
	5 g/kg	9	1.56±0.34**	0.31±0.07**
4.臺北馬兜鈴	1 g/kg	9	0.56±0.24	0.11±0.05
	2 g/kg	9	1.22±0.32*	0.24±0.06*
	5 g/kg	9	0.44±0.24	0.09±0.05
5.臺中馬兜鈴	1 g/kg	9	0.78±0.22	0.16±0.04
	2 g/kg	9	1.22±0.32*	0.24±0.07*
	5 g/kg	9	2.11±0.42**	0.42±0.08**
漢防己(老)	1 g/kg	9	1.11±0.26*	0.22±0.05*
	2 g/kg	9	1.33±0.29**	0.27±0.06**
	5 g/kg	9	1.11±0.26*	0.22±0.05*
馬兜鈴(老)	1 g/kg	9	0.78±0.22	0.16±0.04
	2 g/kg	9	0.89±0.26	0.18±0.05
	5 g/kg	9	1.00±0.26*	0.20±0.05*

#: 觀看 3-5 隻 ICR 小白鼠左腿股骨內骨髓抹片標本 (每隻 3 片), 每片觀看 500 個 polychromatic erythrocytes (PCE) 中出現之小核仁數目, 實驗數據以 n 片數據之平均值±標準誤差值表示

* p < 0.05, ** p < 0.01, 藥物組 vs. 對照組

中藥促進動物骨折癒合及促進人骨母細胞株生長的評估

Evaluation of the Chinese medicine on the fracture healing and on the metabolism of the osteoblast cell line.

李 芬 瑤

國立陽明醫學院

中文摘要

本計劃是要探討中藥藥物治療的效果，本實驗是用人骨母細胞的體外培養，測試中藥方劑的單項藥品以便知道那幾種單項藥品有促進骨母細胞生長的效果。經過初步實驗結果顯示骨碎補為補骨脂，自然銅，地鱉虫，續斷，木瓜，杜仲，骨碎補中最能刺激骨母細胞生長代謝者，即使在極低濃度下（ 10^{-10} mg/ml）亦有刺激骨母細胞生長代謝的效果。希望這些結果有助於人體測試及臨床應用，更希望能將傳統醫學的豐富及西方科學加以調合融匯使其相輔相成。

ABSTRACT

The project is designed to evaluate the traditional Chinese medicine on the metabolism of the osteoblasts. Seven herb drugs, including 補骨脂, 自然銅, 地鱉虫, 續斷, 木瓜, 杜仲, 骨碎補 were screened in the in vitro osteoblast culture system to evaluate the possibility of stimulation effects on the cultured osteob-

last cell lines. According to our preliminary daatas, the 骨碎補 has the greatest stimulating effects on the osteoblasts at concentration as low as 10 (-10) g/ml. Hopping that the in vitro osteoblast culture system is useful in screening the Chinese herb drugs. Clinical trial and Chinese herb on animal fracture healing will be further evaluated.

前 言

骨折是臨床常見的問題，尤其是在交通事故頻傳與老年人口增加的今日，傷骨科在傳統醫學中佔有重要地位，也有許多方劑留傳，本計畫利用骨母細胞株培養及動物實驗等科學方法，檢視若干中藥藥材與方劑促進人骨母細胞生長及骨折癒合的可能性。

傳統醫學對骨折的治療，根據文獻記載已有兩千多年的歷史，。在本世紀60年代初，已總結出一套較完整和科學的閉合性骨折三期分治理論與方法。骨折癒合過成分成去瘀，新生和骨合三階段；一般認為骨折開始的前兩週左右為初期，此時損傷局部瘀血凝結，腫脹疼痛，宜用活血化瘀，理氣止痛之劑；2-4週的時間為中期，這時瘀化腫退，骨折斷端已初步連接，治宜接骨續筋，和營通絡；骨折4週直至癒合為後期，這階段治宜補氣養血，補益肝腎。這就是一般中醫所謀的骨折三期分法(1)比較中西醫的觀點，發現中醫骨折第一期以西醫所說的出血 (hemorrhage , hematoma) , fibrin及組織腫脹 (edema) 為主；中醫骨折第二期與西醫所說的osteoid callus及woven bone的形成相當；而中醫骨折第三期則與西醫的callus的成熟與bone remodeling相似且時間亦大致吻合。故相信傳統醫學中有許多實用的知識等待實驗證實及合於科學的解釋。

中醫骨傷科除了以手法復位之外，尚有中藥外敷及內服，西醫治療骨折注重復位固定，一般不用藥物作輔助治療，在西醫方面，已知許多因素可促進骨母細胞及其原始母細胞之增生，如Insulin-like growth factor I and II , platelet derived growth factor, transform growth factor beta等(2-6)，但這些因子多有其副作用，而不適於臨床使用，若能中西合用，以西醫方式確保骨折部份固定及復位，而以適當之中藥促進骨母細胞之生長，更能促進骨折癒合，減少病患的痛苦及

醫藥花費，是非常有意義而實用的研究題目。

中醫在傷骨科中有許多外用內服藥及方劑，可大致區分為骨折初期及中後期用藥，其作用各為去瘀行血及新生合骨。初期用藥如接骨丹，接骨四黃膏，接骨散，三大藥酒，正骨湯，傷藥丸，活血止痛等皆是，而地鱉虫，骨程補，紅花，血竭，川芎，乳香，沒藥，為這些方劑中常含的用藥。骨折中後期用藥如補傷丸，李氏接骨丹，和營續骨湯，堅骨壯筋湯，壯筋續骨丹，自然銅，骨程補，川芎，川斷，當歸，為這些藥方的常用藥（1,7,8,9）。據中醫藥典所載，紅花（*Carthamus tinctorius* linn）性溫，味辛，入心肝二經，其功能為破瘀生血，活血止痛，消腫通筋。川芎性溫，味辛，入肝，膽心胞絡二經，其功能為驅風止痛，理氣活血，長肉排膿。骨程補味苦，性溫，可補腎鎮痛，活血壯筋，治跌打損傷和閉合性骨折，可取其活血鎮痛作用。血竭味甘，鹹，性平，有止血止痛，活血生肌的作用，主要用於跌打損傷，有活血化瘀，消腫止痛作用。乳香味辛，苦，性溫，有活血，止痛，舒筋，鎮痛和消炎的作用。沒藥味苦，性平，有活血散瘀鎮痛作用。當歸（*Angelica sinensis* Diels）性溫，味甘辛，入心肝脾三經，補血活血，潤燥潤腸，主治跌打損傷，止血養血。自然銅味辛，性平，含硫化鐵，具散血止痛，促進骨折癒合的作用（10,11）。

本實驗室有人骨母細胞株，可利用此細胞做各種中藥促進人骨母細胞生長代謝的實驗，初步體外細胞培養實驗鎖定補骨脂，自然銅，地鱉虫，續斷，木瓜，杜仲，骨碎補七種藥。經由體外細胞培養實驗及動物體實驗（*in vitro* and *in vivo* experiments）將有助於瞭解補骨脂，自然銅，地鱉虫，續斷，木瓜，杜仲，骨碎補七種中藥中那些可在細胞培養狀況下，促進人骨母細胞株之生長與代謝。若有結果，則可選擇適當之藥材進行臨床測試。

材料與方法

用人骨母細胞株體外培養評估中藥促進骨母細胞生長的可能性。人骨母細胞株及其培養狀況：CRL1547，MNNG/HOS clone#5細胞是由13歲白人，骨癌（osteogenic sarcoma）分離出之細胞株。目前用Eagle's MEM with non-essential amino acids and Earle's BSS 99%及胎牛血清1

%培養於37°C，5%二氧化碳的培養箱中，以9cm直徑培養皿培養到monolayer，取出細胞種於96 well-plate，並加不同濃度中藥於培養液三天後以MTT test檢測細胞生長情況。

補骨脂0.25gm加入1ml之60% alcohol，得400 lambda 之萃取液，加入culture media 3.6 ml start solution [10(-1)]，再依序以culture media析釋得10(-2)，10(-3)，10(-4)，10(-5)，10(-6)，10(-7)，10(-8) alcohol萃取液。此外也以ethyl acetate，或methyl alcohol以一樣的方法進行萃取及析釋，則得ethyl acetate 或methyl alcohol之不同濃度萃取液。自然銅，地鱉虫，續斷，木瓜，杜仲，骨碎補也以同法萃取及析釋。

各種中藥對人骨母細胞株的生長評估：各種不同濃度之中藥萃取物（約10(-3)ug /ml到10(-12)ug/ml），將其加入細胞培養液中，並以MTT kit測試細胞之代謝活性及生長繁殖。

結 果

實驗結果顯示骨碎補為補骨脂，自然銅，地鱉虫，續斷，木瓜，杜仲，骨碎補中最能刺激骨母細胞生長代謝者，即使在極低濃度下（10(-10)mg/ml）亦有刺激骨母細胞生長代謝的效果，七種中藥與骨母細胞之生長情況依序討論如下。

補骨脂 之 alcohol 萃取液結果如下

concentration	MTT OD reading
control	0.428 + 0.755
10 (-1)	0.018 + 0.0061
10 (-2)	0.0403 +0.014
10 (-3)	0.3117 +0.1215
10(-4)	0.334 + 0.0733
10(-5)	0.377 + 0.0622
10 (-6)	0.3613 +0.0631
10 (-7)	0.3417 +0.0646
10(-8)	0.2997 + 0.0944

no effects on stimulating osteoblast growth

補骨脂 之 ethyl acetate 萃取液結果如下

concentration	MTT OD reading
control	0.428 + 0.0755
10 (-1)	0.133 + 0.0445
10 (-2)	0.4263 + 0.043
10 (-3)	0.386 + 0.0282
10 (-4)	0.406 + 0.0414
10 (-5)	0.4683 + 0.0589
10 (-6)	0.4777 + 0.0122
10 (-7)	0.408 + 0.0632
10 (-8)	0.4297 + 0.1018

無明顯刺激效果

補骨脂 之 methyl alcohol 萃取液結果如下

concentration	MTT OD reading
control	0.428 + 0.0755
10 (-1)	0.0037 + 0.0035
10 (-2)	0.1167 + 0.0059
10 (-3)	0.3547 + 0.0386
10 (-4)	0.3813 + 0.0838
10 (-5)	0.535 + 0.1596
10 (-6)	0.56 + 0.085
10 (-7)	0.5463 + 0.0456
10 (-8)	0.441 + 0.0092

無明顯刺激效果

自然銅 之 alcohol 萃取液結果如下

concentration	MTT OD reading
control	0.249 + 0.1115
10 (-1)	0.005 + 0.0087
10 (-2)	0.1587 + 0.0586
10 (-3)	0.2143 + 0.0336
10(-4)	0.3293 + 0.0656
10(-5)	0.3177 + 0.0465
10 (-6)	0.268 + 0.0571
10 (-7)	0.298 + 0.0608
10(-8)	0.296 + 0.0452

some effects on stimulating osteoblast growth [10(-4) and 10(-5)]

自然銅 之 ethyl acetate 萃取液結果如下

concentration	MTT OD reading
control	0.249 + 0.1115
10 (-1)	0.0323 + 0.0227
10 (-2)	0.2153 + 0.0394
10 (-3)	0.3533 + 0.0512
10 (-4)	0.365 + 0.0056
10 (-5)	0.4113 + 0.1282
10 (-6)	0.4513 + 0.1217
10 (-7)	0.4453 + 0.0777
10 (-8)	0.3763 + 0.0456

在10 (-3) 到 10(-8) 有刺激效果

自然銅 之 methyl alcohol 萃取液結果如下

concentration	MTT OD reading
control	0.249 + 0.1115
10 (-1)	0.0007 + 0.0012
10 (-2)	0.0773 + 0.024
10 (-3)	0.3693 + 0.0962
10 (-4)	0.4443 + 0.049
10 (-5)	0.4633 + 0.0299
10 (-6)	0.501 + 0.0537
10 (-7)	0.4037 + 0.0401
10 (-8)	0.3477 + 0.0234

在10 (-3) 到 10(-8) 有刺激效果

地蠟虫之 alcohol 萃取液結果如下

concentration	MTT OD reading
control	0.5685 + 0.2487
10 (-1)	0.133 + 0.0159
10 (-2)	0.53 + 0.0817
10 (-3)	0.6103 + 0.0616
10 (-4)	0.5303 + 0.0954
10 (-5)	0.541 + 0.0722
10 (-6)	0.6333 + 0.132
10 (-7)	0.652 + 0.0832
10 (-8)	0.581 + 0.0276

no effects on stimulating osteoblast growth

地蠟虫 之 ethyl acetate 萃取液結果如下

concentration	MTT OD reading
control	0.5685 + 0.2487
10 (-1)	0.0 + 0.0
10 (-2)	0.504 + 0.1105
10 (-3)	0.7003 + 0.1026
10 (-4)	0.706 + 0.0568
10 (-5)	0.7323 + 0.1653
10 (-6)	0.726 + 0.033
10 (-7)	0.7993 + 0.181
10 (-8)	0.584 + 0.0098

在10 (-3) 到 10(-7) 有刺激效果

地蠟虫 之 methyl alcohol 萃取液結果如下

concentration	MTT OD reading
control	0.5685 + 0.2487
10 (-1)	0.00 + 0.0
10 (-2)	0.1547 + 0.0095
10 (-3)	0.62 + 0.034
10 (-4)	0.7183 + 0.0485
10 (-5)	0.7277 + 0.0457
10 (-6)	0.78 + 0.0246
10 (-7)	0.7367 + 0.041
10 (-8)	0.771 + 0.0686

在10 (-3) 到 10(-8) 有刺激效果

續斷 之 alcohol 萃取液結果如下

concentration	MTT OD reading
control	0.6938 + 0.1002
10 (-1)	0.0833 + 0.011
10 (-2)	0.067 + 0.0545
10 (-3)	0.824 + 0.0436
10 (-4)	0.8627 + 0.0909
10 (-5)	0.7707 + 0.0689
10 (-6)	0.756 + 0.0702
10 (-7)	0.7613 + 0.1033
10 (-8)	0.6647 + 0.046

some effects on stimulating osteoblast growth [10(-3) and 10(-4)]

續斷 之 ethyl acetate 萃取液結果如下

concentration	MTT OD reading
control	0.6938 + 0.1002
10 (-1)	0.0497 + 0.0055
10 (-2)	0.5177 + 0.149
10 (-3)	0.8703 + 0.1289
10 (-4)	0.831 + 0.0322
10 (-5)	0.6733 + 0.0896
10 (-6)	0.7387 + 0.1042
10 (-7)	0.698 + 0.0541
10 (-8)	0.623 + 0.521

在10 (-3) 到 10(-4) 有刺激效果

續斷 之 methyl alcohol 萃取液結果如下

concentration	MTT OD reading
control	0.6938 + 0.1002
10 (-1)	0.0823 + 0.006
10 (-2)	0.13 + 0.0061
10 (-3)	0.777 + 0.0575
10 (-4)	0.7487 + 0.0206
10 (-5)	0.662 + 0.1422
10 (-6)	0.657 + 0.0355
10 (-7)	0.6713 + 0.036
10 (-8)	0.6 + 0.0971

沒有刺激效果

木瓜 之 alcohol 萃取液結果如下

concentration	MTT OD reading
control	0.4316 + 0.1792
10 (-1)	0.111 + 0.0364
10 (-2)	0.148 + 0.0443
10 (-3)	0.3787 + 0.126
10(-4)	0.3177 + 0.1103
10(-5)	0.339 + 0.1187
10 (-6)	0.32 + 0.0719
10 (-7)	0.324 + 0.0322
10(-8)	0.234 + 0.0822

some effects on stimulating osteoblast growth [10(-4) and 10(-5)]

木瓜 之 ethyl acetate 萃取液結果如下

concentration	MTT OD reading
control	0.4316 + 0.1792
10 (-1)	0.0557 + 0.0245
10 (-2)	0.2567 + 0.0372
10 (-3)	0.4627 + 0.0321
10 (-4)	0.355 + 0.1192
10 (-5)	0.4877 + 0.0657
10 (-6)	0.4057 + 0.64
10 (-7)	0.344 + 0.0436
10 (-8)	0.408 + 0.0937

沒有刺激效果

木瓜 之 methyl alcohol 萃取液結果如下

concentration	MTT OD reading
control	0.4316 + 0.1792
10 (-1)	0.0533 + 0.0212
10 (-2)	0.0897 + 0.0032
10 (-3)	0.365 + 0.0359
10 (-4)	0.4987 + 0.0246
10 (-5)	0.4953 + 0.1173
10 (-6)	0.455 + 0.081
10 (-7)	0.422 + 0.117
10 (-8)	0.613 + 0.0135

沒有刺激效果

杜仲之 alcohol 萃取液結果如下

concentration	MTT OD reading
control	0.5789 + 0.1721
10 (-1)	0.0213 + 0.009
10 (-2)	0.3797 +0.0117
10 (-3)	0.5953 +0.0568
10(-4)	0.6283 + 0.0625
10(-5)	0.6093 + 0.0745
10 (-6)	0.6593 +0.1672
10 (-7)	0.6717 +0.804
10(-8)	0.5757 + 0.0692

沒有刺激效果

杜仲之 ethyl acetate 萃取液結果如下

concentration	MTT OD reading
control	0.5789 + 0.1721
10 (-1)	0.0973 + 0.0045
10 (-2)	0.6097 + 0.0898
10 (-3)	0.657 + 0.08
10 (-4)	0.65 + 0.0981
10 (-5)	0.7397 + 0.0771
10 (-6)	0.7627 + 0.1294
10 (-7)	0.7303 + 0.0825
10 (-8)	0.5203 + 0.0844

在10 (-5) 到 10(-7) 有刺激效果

杜仲之 methyl alcohol 萃取液結果如下

concentration	MTT OD reading
control	0.5789 + 0.1721
10 (-1)	0.034 + 0.0078
10 (-2)	0.1817 + 0.0405
10 (-3)	0.65 + 0.0974
10 (-4)	0.7374 + 0.2441
10 (-5)	0.8163 + 0.1556
10 (-6)	0.5387 + 0.1329
10 (-7)	0.5627 + 0.0455
10 (-8)	0.5963 + 0.0131

在10 (-4) 到 10(-5) 有刺激效果

骨碎補之 alcohol 萃取液結果如下

concentration	MTT OD reading
control	0.3662 + 0.1684
10 (-1)	0.158 + 0.0298
10 (-2)	0.058 + 0.01
10 (-3)	0.7253 + 0.3967
10 (-4)	0.6773 + 0.1071
10 (-5)	0.6637 + 0.0372
10 (-6)	0.5683 + 0.0885
10 (-7)	0.666 + 0.0948
10 (-8)	0.6537 + 0.091

在10 (-3) 到 10(-8) 有刺激效果

骨碎補之 ethyl acetate 萃取液結果如下

concentration	MTT OD reading
control	0.3662 + 0.1684
10 (-1)	0.1353 + 0.0235
10 (-2)	0.3657 + 0.0719
10 (-3)	0.7007 + 0.2076
10 (-4)	0.6017 + 0.0381
10 (-5)	0.8773 + 0.0239
10 (-6)	0.6503 + .038
10 (-7)	0.7763 + 0.0405
10 (-8)	0.616 + 0.0235

在10 (-3) 到 10(-8) 有刺激效果

骨碎補之 methyl alcohol 萃取液結果如下

concentration	MTT OD reading
control	0.3662 + 0.1684
10 (-1)	0.1143 + 0.0123
10 (-2)	0.247 + 0.087
10 (-3)	0.5097 + 0.2243
10 (-4)	0.4993 + 0.2436
10 (-5)	0.5293 + 0.0419
10 (-6)	0.4273 + 0.094
10 (-7)	0.61 + 0.1604
10 (-8)	0.4997 + 0.2464

在10 (-3) 到 10(-8) 有刺激效果

結論與建議

自然銅，地鱉虫，骨碎補的 alcohol, 或 ethylacetate, 或 methyl alcohol 萃取液對骨母細胞有不錯之刺激生長的效果。續斷，杜仲的 alcohol, 或 ethylacetate, methyl alcohol 萃取液對骨母細胞似有微弱刺激生長的效果。而骨補脂，木瓜的 alcohol, 或 ethylacetate, 或 methyl alcohol 萃取液對骨母細胞無刺激生長的效果。

七種測試中藥材中有自然銅，地鱉虫，骨碎補的萃取液對骨母細胞有不錯之刺激生長的效果，比例已很高，可見中藥材的確值得我們重視與加強研究。而在骨傷科藥材之研究或可著重於自然銅，地鱉虫，骨碎補的有效成分分析，及含自然銅，地鱉虫，骨碎補的復方與其臨床測

參考文獻

1. 現代中醫各科教材系列 (1-14) .Vol.10.中醫傷科學, 迅雷出版社, 卜寶雲等著
2. Wergedal JE, Mohan, S, Lundy M, and Baylink D. Skeletal growth factor and other growth factors known to be present in bone matrix stimulate proliferation and protein synthesis in human bone cells. Journal of Bone and Mineral Research 5(2): 179-186, 1990.
3. Pfeilschifter J, Oechsner M, Naumann A, Gronwald RGK, Minne HW, and Ziegler R. Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors: a comparison between Insulin-like growth factor I, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor beta. Endocrinology 127(1):69-75, 1990.
4. Pfeilschifter J and Mundy G. Modulation of type beta transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2024-2028, 1987.
5. Aspenberg P, Albrektsson T, Thorngren K. Local application of growth-factor IGF-1 to healing bone. Experiments with a

- titanium chamber in rabbits. *Acta Orthop Scand* 60 (5): 607-610, 1989.
7. Luyten FP, Hascall VC, Nissley SP, Morales TI, and Reddi AH. Insulin-like growth factors maintain steady-state metabolism of proteoglycans in bovine articular cartilage explants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 267 (2):416-425, 1988.
 8. 中國中醫秘方大全Vol.4. (Encyclopedia of Eteric Prescription in Traditional Chinese Medicine Vol.) 外科分卷(下). 傷骨科分卷 胡熙明主編, 渡假出版社. 1992.
 9. 高等醫學研究系列 I . 中醫學概論. 孟景春, 周仲英主編. 知音出版社. 1991.
 10. 白話中國秘方全書. 周洪範主編. 好兄弟出版社. 1983.
 11. 中國藥用植物名實圖考(1)成一, 楊永裕編著. 1987.
 12. 藥用植物學, 甘偉松著. 國立中國醫藥研究所出版.

臺灣產生藥—桶鉤藤（扛香藤）與靈芝之抗脂質過氧化及活性氧清除作用的研究

林俊清教授

高雄醫學院

中文摘要

“桶鉤藤”為本省民間藥，具驅風、解熱、鎮痛、止癢、殺蟲等作用，被用治關節腫痛、風濕痺痛、毒蛇咬傷、外用治跌打損傷，民間尚廣泛用來治療肝炎、肝硬化。先前之生藥學研究，作者已經證實本省市售桶鉤藤之基源為：(1)大戟科(Euphorbiaceae)植物扛香藤 *Mallotus repandus* (Willd.) Muell.-Arg. 的莖部或根、莖之混合物；(2)豆科(Leguminosae)植物菊花木 *Bauhinia championii* (Benth.) Benth. 莖部粗大的藤；(3)茜草科(Rubiaceae)植物台灣鉤藤 *Uncaria hirsuta* Haviland 帶鉤的莖部枝條(4)茜草科(Rubiaceae)植物鉤藤 *U. rhychophylla* (Mig.) Jacks. 帶鉤的莖部枝條。

為了評估以上各種市售“桶鉤藤”的藥理活性，進行了以 FeCl_2 誘發老鼠肝臟均質液脂質過氧化之藥理學研究，並以ESR spin trapping技術評估各種桶鉤藤之活性氧清除作用。結果顯示，市售各種“桶鉤藤”皆具抑制脂質過氧化及活性氧清除活性；而先前之研究顯示市售各種“桶鉤藤”皆具抗炎及保肝作用，綜合以上這些結果，可為“桶鉤藤”在台灣被用來當作抗炎及保肝藥物提供科學上的證據。

經由生藥學及藥理學之研究，筆者建議以大戟科植物扛香藤 *Mallotus repandus* (Willd.) Muell.-Arg. 作為“桶鉤藤”較適當。為進一

步探討其有效成分，進行了扛香藤之各分餾成分之抗氧化活性研究。實驗結果顯示以莖部的乙酸乙酯層之superoxide radical scavenger活性最高；而莖部及根部的正己烷層則顯示最強之消除hydroxyl radical活性。

此外爲了解明台灣常用市售三種靈芝*G. lucidum*, *G. formosanum*及*G. neo-japonicum*之保肝活性與抗氧化活性之關係，作者亦進行以CC14誘發急性肝毒性、以FeCl₂誘發老鼠肝臟均質液脂質過氧化及以ESR-spintrapping技術，探討其藥理活性與抗氧化活性之關係。實驗結果顯示，市售三種靈芝*G. lucidum*, *G. formosanum*及*G. neo-japonicum*皆能有效抑制因投與CC14所導致之GOT、GPT及LDH值上升現象，亦具抑制脂質過氧化及活性氧清除活性，其中以*G. formosanum*具最佳之保肝活性及自由基清除活性。

關鍵詞：桶鉤藤；扛香藤；菊花木；台灣鉤藤；鉤藤；赤芝；黑芝；紫芝；保肝作用；抗指質過氧化；活性氧清除活性。

ABSTRACT

"Thang-kau-tin", a folk medicine of Taiwan, has been used as an insecticide, to stop itching and as remedy for fever, rheumatic arthritis, snake-bite, hepatitis and liver cirrhosis.

It has been demonstrated that the origin of "Thang-kau-tin" on Taiwan market is derived from the following species: (1) the stem or the mixture of stem and root of *Mallotus repandus* (Willd) Muell.-Arg. (2) the stem of *Bauhinia championii* (Benth.) Benth. (3) the stem with hooks of *Uncaria hirsuta* Haviland and (4) the stem with hooks of *U. rhynchophylla* (Miq.) Jacks.

To examine the pharmacological activities of these crude drugs, the following experimental models were employed: FeCl₂-induced rat liver homogenate lipid peroxidation. Using ESR (electron spin resonance) and spin trapping technique, the free radical scavenger activity of these crude drugs were investig-

ated. The results indicated that the different of "Thang-kau-tin" on Taiwan market showed anti-lipid peroxidation and free radical scavenger activities. It has been reported that "Thang-kau-tin" on Taiwan market also showed anti-inflammatory and hepatoprotective activities. These results provided the scientific basis for the usefulness of "Thang-kau-tin" on Taiwan to be used as anti-inflammatory and hepatoprotective agents. Through pharmacognostical and pharmacological studies, it was suggested that *M. repandus* should be taken as the name of "Thang-kau-tin".

Since *M. repandus* which has been reported to possess anti-inflammatory and hepatoprotective activities, has the possibility of a scavenging effect on free radicals as one of the mechanisms of action, we investigated the scavenging ability of the fractional extracts from *M. repandus* by ESR (electron spin resonance) spectrometry using 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) as a spin trap. The ethyl acetate fraction of *M. repandus* (stem) showed the greatest superoxide radical scavenger activity and the n-hexane fraction of *M. repandus* (stem as well as root) the greatest hydroxyl radical scavenger activity.

There are many kinds of "Reishi" were found in Taiwan market. In order to realize the relationship between hepatoprotective effect and antioxidant effect of three different kinds of "Reishi" on Taiwan market, *Ganoderma lucidum*, *G. formosanum* and *G. neo-japonicum*, the following experimental models were employed: CCl_4 -induced hepatotoxicity in rats, FeCl_2 -induced rat liver homogenate lipid peroxidation and the active oxygen scavenging activity were also investigated by using ESR-spin trapping technique. The results indicated that the levels of glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and lactic dehydrogenase (LDH) in the serum caused by CCl_4 were markedly decreased by treatment of water extracts of these three kinds of "Reishi".

on Taiwan market. Furthermore, these three kinds of "Reishi" also exhibited antioxidant effect in active oxygen scavenging and lipid peroxidation inhibitory activity. *G. formosanum* showed the greatest antihepatotoxic activity and the greatest free radical scavenging activity.

Keyword: Thang-kau-tin; *Mallotus repandus*; *Bauhinia championii*; *Uncaria hirsuta*; *U. rhychophylla*; *Ganoderma lucidum*; *G. formosanum*; *G. neo-japonicum*; Hepatoprotective effect; Anti-lipid peroxidation; Free radical scavenging activity.

第一篇 台灣產生藥“桶鉤藤”的藥理學與病理學研究

前言

在臺灣市場上，扛香藤 *Mallotus repandus* (Willd.) Muell.-Arg. 的根、莖部，菊花木 *Bauhinia championii* (Benth.) Benth. 之莖部粗大的藤，鉤藤 *Uncaria rhychophylla* (Miq.) Jacks. 及臺灣鉤藤 *U. hirsuta* Haviland 之帶鉤的莖部，被當作“桶鉤藤”使用。目前已確認其具有消炎及保肝作用，據最近的研究報告指出，在 carrageenan 及 CCl_4 所誘發的炎症反應過程中，活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 扮演著重要角色。為了解明台灣市售“桶鉤藤”的抗炎、保肝活性與其抗氧化活性的關係，首先以 TBA (thiobarbituric acid) 法測試市售各種“桶鉤藤”的脂質過氧化抑制作用，接著利用電子自旋共振 (electron spin resonance, ESR) 及電子捕捉 (spin-trapping) 技術，直接觀測台灣市售各種“桶鉤藤”對 superoxide radical (O_2^- , 55.OH) 及 hydroxyl radical (55.H) 之清除能力，希望能藉此對市售各種“桶鉤藤”的抗炎、保肝活性作用機轉，有進一步的瞭解，以作為國人用藥之參考指標。

另外，據作者調查本省市售桶鉤藤之基源結果，發現市場品大部份以大戟科植物扛香藤 *M. repandus* 之莖或根為主，其他同名異物品，應為具類似藥效，一時被代用或混用。經藥效評估後，亦證實 *M. repandus*

之抗炎症及保肝作用較爲顯著。爲了避免基源混亂，及確保藥效，作者建議以大戟科植物扛香藤 *M. repandus* 作爲“桶鉤藤”較適切。爲進一步解明扛香藤 (*M. repandus*) 之主要有效活性成分，擬進一步以有機溶媒萃取各分餾部份 (fraction)，以 ESR 技術測其抗氧化活性 (superoxide radical and hydroxyl radical scavenger activity)。然後再進一步分離出其主要成分，接著對主要成分之抗炎症、保肝以及抗氧化活性再進一步作探討，以明瞭其是否爲有效成分。

第一章 台灣產生藥“桶鉤藤”對脂質過氧化作用之評估

摘要

經由 TBA 反應物質測定之方法，我們初步證實台灣市售各種“桶鉤藤”對於因 FeCl_2 引起之大白鼠肝臟均質溶液之脂質過氧化現象，呈現明顯之抑制效果，初步證實台灣市售“桶鉤藤”確具抗氧化作用。

第一節 緒言

脂質過氧化反應 (lipid peroxidation) 是生物體在氧化壓力 (oxidative stress)⁽¹⁾ 下產生的自由基對生物體所造成的一種傷害現象。脂質過氧化亦是造成細胞變性壞死、藥物毒性、放射線傷害等病理生理學的重要因素⁽²⁾。雖然生物體本身具有種種抗氧化能力以抵抗氧化壓力，但當氧化壓力與生體內抗氧化能力失去平衡時，從藥理學觀點上，由於抗氧化物的使用或許可保護細胞免於遭受不可逆的傷害⁽³⁾。

台灣產生藥“桶鉤藤”，據先前之研究結果，證實對 carrageenan 所誘發之足蹠浮腫及 CCl_4 所導致之急性肝損傷具有抑制及防治效果⁽⁴⁾，而 carrageenan 與 CCl_4 所導致之炎症，其病理機轉部份與自由基有關⁽⁵⁻¹⁴⁾。本研究乃針對此機轉，以 TBA 法來評估市售各種“桶鉤藤”對於因自由基所導致之脂質過氧化情形是否具抑制作用，以便初步瞭解市售各種“桶鉤藤”之抗氧化作用情形。

第二節 實驗材料與方法

一、台灣市售各種“桶鉤藤”水抽出物的製備

取市售各種“桶鉤藤”[扛香藤(*M. repandus*)之莖部、*M. repandus*之根部、菊花木(*B. championii*)、臺灣鉤藤(*U. hirsuta*)及鉤藤(*U. rhynchophylla*)]各250公克，以1公升之蒸餾水，於水浴中煮沸1小時，然後過濾，如此重覆三次，合併三次濾液，將其濃縮、冷凍乾燥。其產率依序為9.2%、8.42%、12.8%、9.85%及10.1%。

二、實驗藥品及器材

1. Thiobarbituric acid (TBA): Sigma
2. Sodium dodecyl sulphate (SDS): WaKo
3. Iron (II) chloride (FeCl_2): 和光純藥工業
4. n-butanol: Merck
5. Tris-HCl: Sigma
6. Spectrophotometer: HITACHI U-2000

三、實驗方法

(一) 老鼠肝臟均質液(homogenate)之製備

取雄性wistar大白鼠，約180公克重，斷頭取肝。稱取約2公克重之老鼠肝臟，以25 mM Tris-HCl (pH 7.2)之緩衝液10 cc，利用均質機磨碎(20500芽，3分鐘)製成肝均質液，分為A、B、C、D、E、F、G 7組備用。

A組為normal control、B組為 FeCl_2 -treated control、C-G組為各種藥物組，其劑量依序為1、3、10 mg/ml。

(二) FeCl_2 誘發老鼠肝臟脂質過氧化反應

本實驗步驟乃依Yoden¹⁵⁾及Kimura¹⁶⁾等人之方法作部份修正而成。其實驗方法詳如以下之流程圖：

	A	B	C → G
Homogenate	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
Tris-HCl	0.9 ml	0.8 ml	0.7 ml
FeCl_2	—	0.1 ml	0.1 ml
生藥抽出物	—	—	0.1 ml

↓
將A.B.C.D.E.F.G液各自混合均勻

↓
於37°C下incubation 2小時

↓
將前處理完畢後之Homogenate分別加入下列各管

↓

	A	B	C → G	H
Homogenate	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	—
d.H ₂ O	—	—	—	0.5 ml

↓
A - H各加SDS 0.2 ml

↓
混合均勻

↓
各加入TBA 1.5 ml及20% Acetic acid 1.5 ml

↓
混合均勻，於95°C水浴1小時，冰浴，待冷

↓
各加n-butanol 5 ml，充份混合

↓
於25°C，1000 莨下，離心15分鐘

↓
取n-butanol層於532 nm下測吸光度。

過氧化脂質抑制率之計算如下：

$$\text{過氧化脂質抑制率(I \%)} = \frac{\text{Tabs} - \text{Dabs}}{\text{Tabs} - \text{Dabs}} \times 100\%$$

Tabs: FeCl₂-treated control之吸光度

Babs: normal control之吸光度

Dabs: 藥物組之吸光度

註：H組為水在本條件下之吸光度，作為blank，校正用。

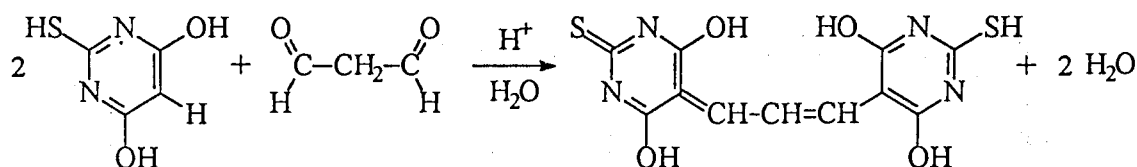
第三節 結果與討論

市售各種“桶鉤藤”對於FeCl₂造成大白鼠肝臟均質液 (homogenate) 產生脂質過氧化現象的抑制情形如表一所示。投予3, 10 mg/ml之M. repandus 莖部水抽出物，可達100%之抑制效果。其餘各組亦顯現極佳之抑制脂質過氧化活性(87~98%)。

脂質 (RH) 比蛋白質及核酸更易與活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 反應⁽¹⁷⁾ (圖1)。此反應由 (RH→R·) 開始，接著增幅反應

($R \cdot \xrightarrow{O^2} ROO \cdot \xrightarrow{RH} ROOH + R \cdot \rightarrow \dots$)，直至($2R \cdot \rightarrow R-R$, $R \cdot ROO \cdot \rightarrow ROOR$, $2ROO \cdot \rightarrow ROOR + O^2$)之終止反應為止，之間有無

數的連鎖反應，而主要的起始反應，是由像 $O^2 \div$, $\cdot OH$, $\cdot CCl_3$ 等free radical 或 ROS 所引發 (圖2)。在酸性下加熱過氧化脂質 (如 malondialdehyde, MDA, $CHO-CH^2-CHO$)，便可與TBA(thiobarbituric acid)反應，並藉此來定量MDA之量，其反應如下所示：



過氧化脂質 (Lipid peroxide) 的上升，一般都被視為ROS上升而與脂質產生連鎖反應的結果，而研究亦指出，自由基 (free radical)、活性氧 (ROS) 及過氧化脂質 (lipid peroxide) 在炎症反應及老化過程中扮演著重要角色⁽¹⁸⁾。同時亦有研究報導指出在風濕性關節炎 (rheumatoid arthritis) 患者之關節腔液中，其過氧化脂質明顯地增加⁽¹⁹⁾，而且過氧化脂質與分解微粒酵素 (lysosomal enzyme) 有高度地關連性。在炎症動物模式中，若使用活性氧清除劑例如 superoxide dismutase (SOD) 或維他命E，便能減輕及改善水腫 (edema) 及關節發炎現象。這些研究結果指出活性氧 (ROS) 及過氧化脂質在發炎過程中所扮演的重要角色⁽²⁰⁻²¹⁾。

本研究以TBA法評估台灣市售“桶鉤藤”水抽出物對脂質過氧化的抑制情形。結果顯示，在 1, 3, 10 mg/ml的濃度下，*M. repandus* (stem), *M. repandus* (root), *B. championii*, *U. hirsuta* 及 *U. rhynchophylla* 皆顯示具強大的抗氧化能力，此結果與其具有抗炎症及保肝效果互相得到印證，亦即市售各種“桶鉤藤”的抗炎症及保肝作用，應該是透過其抗氧化作用之藥理活性所獲致的。

一般而言，由生體試料所測得之TBA值，包含了除MDA以外的反應物質，而測得的是活性氧與脂質反應後的最終產物，並非直接測得其清除活性氧的能力，因此擬再進一步以電子自旋共振(electron spin resonance, ESR)及電子捕捉技術(spin-trapping)，來評估生藥是否具有對活性氧(包括 $O_2\cdot^-$ 及 $55H$)直接捕捉之抗氧化能力。

參考文獻

1. Halliwell, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Med.*, 91: 14S- 22S, 1991.
2. Sies, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.*, 91: 31S-38S, 1991.
3. Bast, A., G.R.M.M. Haenen, C.J.A. Doelman. Oxidants and anti-oxidants: state of art. *Am. J. Med.*, 91: 2S-13S, 1991.
4. Chun-Ching Lin, Jer-Min Lin and Hui-Fen Chiu Studies on Folk Medicine "Thang-kau-tin" from Taiwan (I): The Anti-inflammatory and Liver-protective Effect. *Am. J. Chin. Med.*, 20(1), 37-50, 1992.
5. Winter, C.A., E.A. Risley and C.W. Nuss Carrageenan-induced edema in hind paw of the rats as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 111, 544-547, 1962.
6. Vinegar, R., J.F. Truax, J.L. Selph, P.R. Johnston, A.L. Venable and K.K. Mckenzie Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of that rat. *Federation Proceedings*, 46(1), 118-126, 1987.
7. Yuda Y., J. Tanaka, F. Hirano, K. Igarashi and T. Satoh Participation of lipid peroxidation in rat pertussis vaccine pleurisy. III Thiobarbituric acid (TBA) Reactant and Lysosomal Enzyme. *Chem. Pharm. Bull.*, 39(2), 505-506, 1991.
8. Di Rosa, M. and L. Sorrentino The mechanism of the inflammatory effect of carrageenan. *Eur. J. Pharmacol.*, 4: 340-342, 1968.
Christie, G. and J. Judah Mechanism of action of CC14 on liver cells. *Proc. R. Soc. Lond. Ser.*, 142(B): 241-257, 1954.
10. Clawson G.A. Mechanisms of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pathol. Immunopathol. Res.*, 8: 104-112, 1989.

11. Recknagel, R.O. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol. Rev.*, 19(2): 145-208, 1967.
12. Packer, J., T. Slater and R. Willson Reactions of the carbon tetrachloride-related peroxy free radical (CCl_3O_2) with amino acids: Pulse radiolysis evidence. *Life Sci.*, 23, 2617-2620, 1978.
13. Recknagel, R.O., and A.K. Ghoshal Lipoperoxidation as a vector in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Lab. Invest.*, 15: 132-148, 1966.
14. Reynold, E. Liver parenchymal cell injury. I. Initial alterations of the cells following poisoning with carbon tetrachloride. *J. Cell. Biol.*, 19: 139, 1963.
15. Yoden, K., T. Iio and T. Tabata. Measurement of thiobarbituric acid value in tissue homogenate solubilized with sodium dedecyl- sulphate. *Yakugaku Zasshi* 100, 553-559, 1980.
16. Kimuya, K., M. Kubo, T. Tani, S. Arich and H. Okuda. Studies on *Scutellariae Radix*. IV. Effects on lipid peroxidation in rat liver. *Chem. Pharm. Bull.* 29, 260-2617, 1981.
17. Pryor, W. A., T.P. Stanley and E. Blair: Autoxidation of polyunsaturated fatty acids (II). *Lipids* 11: 370-379, 1976.
18. Halliwell. B. and J.M.C. Gutteridge Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.*, 219: 1-14, 1989.
19. Yoshikawa. T., N. Yokoe, S. Takemura, H. Kato, K. Hosokawa and M. Kondo. Studies on the pathogenesis of rheumatoid arthritis. I. Lipid peroxide and lysosomal enzymes in rheumatoid joints. *Jpn. J. Med.* 18: 199-204, 1979.
20. Yoshikawa, T., H. Tanaka and M. Kondo. Effect of vitamin E on adjuvant arthritis in rats. *Biochem. Med.* 29: 227-234, 1983.
21. Yoshikawa, T., H. Tanaka, N. Yoshida, O. Seto, N. Sugino

and M. Kondo. Adjuvant arthritis and lipid peroxide. Protection by superoxide dismutase. Lipid Peroxide Res. 7: 108-110, 1983.

Table 1. Inhibitory effect of "Thang-Kau-tin" on FeCl₂-induced lipid peroxidation in a rat liver homogenate in vitro

Drug	Concentration (mg/ml)	% Inhibition
<i>M. repandus</i> (stem)	1	92
	3	105
	10	108
<i>M. repandus</i> (root)	1	98
	3	96
	10	95
<i>B. championii</i>	1	95
	3	95
	10	89
<i>U. hirsuta</i>	1	93
	3	94
	10	92
<i>U. rhynchophylla</i>	1	92
	3	96
	10	87

The absorbance of reaction solution at 532 nm was measured and compared

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Tabs} - \text{Dabs}}{\text{Tabs} - \text{Babs}} \times 100\%$$

Tabs: FeCl₂-treated control 之吸光度

Babs: normal control 之吸光度

Dabs: drug-treated group 之吸光度

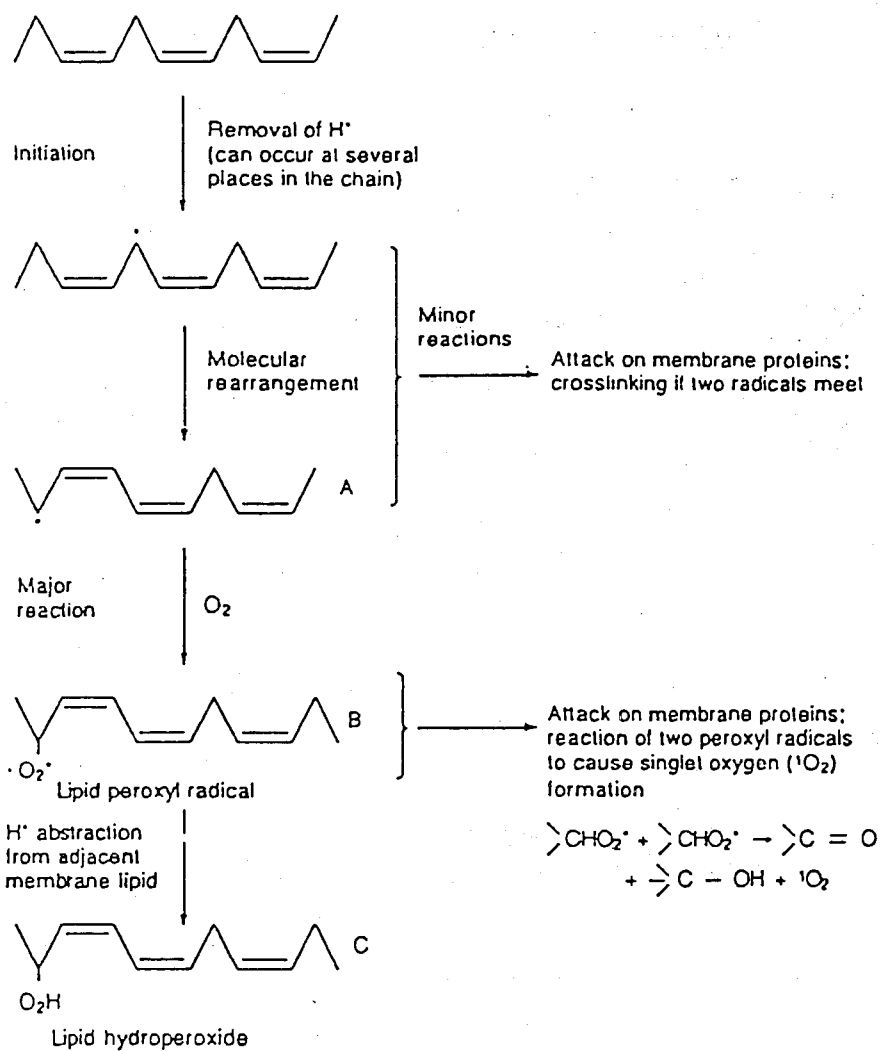


Figure 1. An outline mechanism of lipid peroxidation.

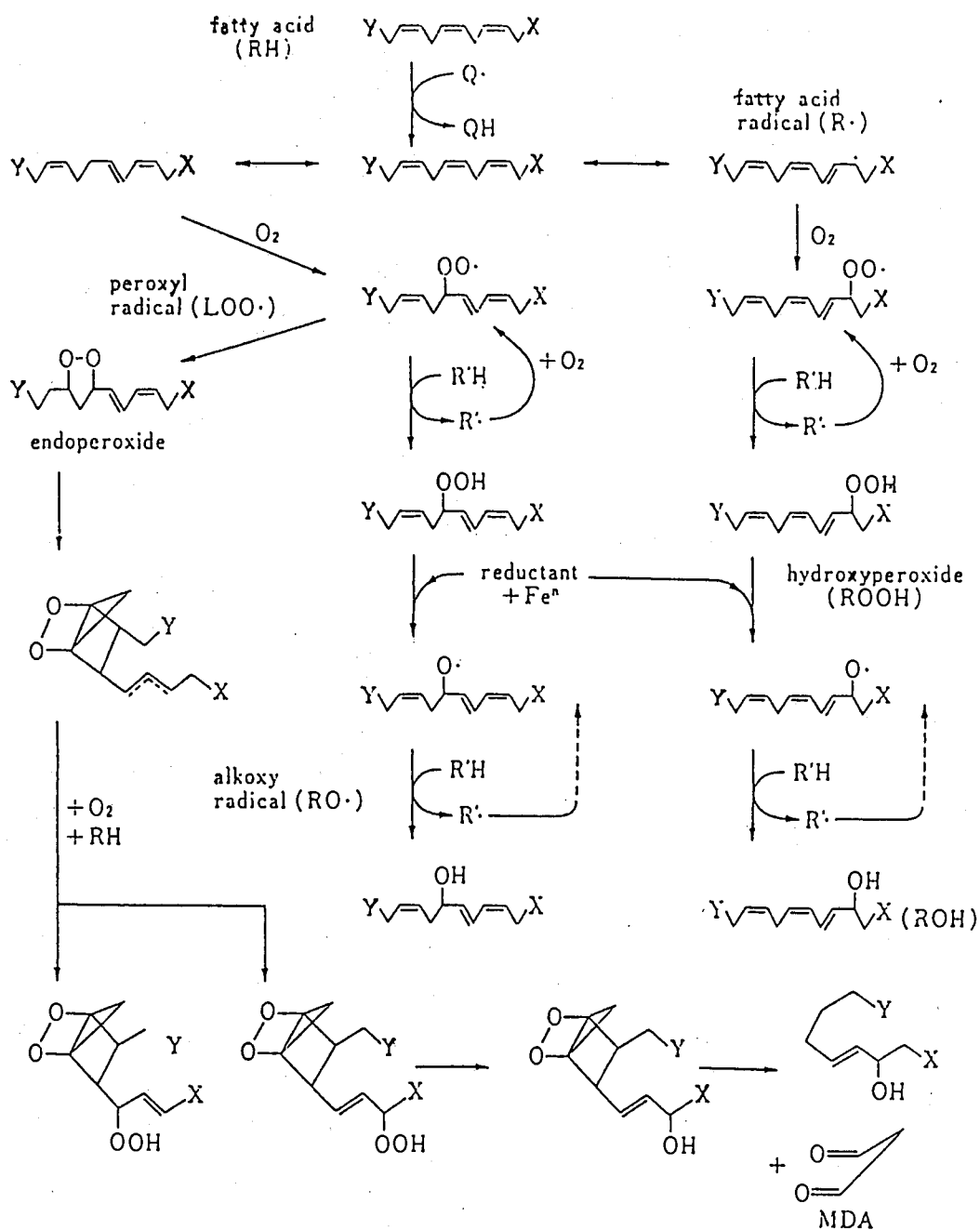


Fig. 2 The metabolism of LPO (lipid peroxide)



第二章 台灣產生藥桶鉤藤之抗氧化作用評估

摘要

經由電子自旋共振(ESR)及電子捕捉技術，確證由台灣市售不同桶鉤藤所得之水抽出物，能清除由hypoxanthine-xanthine oxidase system所產生之superoxide radical ($O_2\div$)及由Fenton reaction所產生之hydroxyl radical ($\cdot OH$)。Superoxide radical清除活性(SOD-like activity)分別為Mallotus repandus (stem): 2.69×10^5 unit/g; M. repandus (root): 2.77×10^5 unit/g; Bauhinia championii: 4.71×10^5 unit/g; Uncaria hirsuta: 4.93×10^4 unit/g; U. rhynchophylla: 1.49×10^5 unit/g。Hydroxyl radical清除活性則為M. repandus (stem): 108 unit/g; M. repandus (root): 114 unit/g; B. championii: 120 unit/g; U. hirsuta: 40 unit/g; U. rhynchophylla: 51 unit/g。

第一節 緒言

近年來，對於活性氧(Reactive oxygen species, ROS)之superoxide anion radical ($O_2\div$)，以及可以選擇性消除它的酵素如superoxide dismutase (SOD)之討論非常熱烈。

由於生物以呼吸形式吸入體內之氧氣(3O_2)，除了大部份被利用為能源外，其一部份則因嗜中性白血球之生體防禦功能而將 3O_2 改變為($O_2\div$)形式，並將其利用來殺菌。另一方面，因放射線、紫外線、過氧化物等外在原因或stress，缺血再灌流等內在原因而產生過量 $O_2\div$ 時，對生體會帶來不良影響，所以 $O_2\div$ 便成為雙刃之劍，同時也開始了解由SOD所代表之消除物質(歧化酵素、抗氧化劑)與各種疾患之關係。因此希望確立能更直接且正確測定 $O_2\div$ 生產量及SOD活性之方法，作為研究各種疾病及對各種生體成分之superoxide scavenger活性之指標。

Superoxide之SOD定量測定法最初由McCord(1)於1969年發表，亦稱為Fridovich法或cytochrome法，此法利用cytochrome C被 $O_2\div$ 還原為還原型cytochrome C，在550nm顯示極大吸收，再以分光光度計測定吸收量之變化(圖一)，即能間接求出 $O_2\div$ 量。此種測定法，因為是比色定量法，不適用於測定如hemoglobin等具有有色色素之生體，再則因為不直接測定 $O_2\div$

，有可能xanthine oxidase inhibitor亦被認為具有清除 $O_2\div$ 之能力。所以我們利用能直接測定free radical之電子自旋共振法(electron spin resonance, ESR)及電子捕捉技術(spin-trapping)來直接測定free radical,例如55.H, $O_2\div$ 之變化情形。

“桶鉤藤”為台灣民間藥，被用來治療關節炎、肝炎^(2,3)。先前的研究報告，已證實台灣市售“桶鉤藤”對carrageenan誘發大白鼠足蹠浮腫及 CCl_4 誘發之急性肝損傷具有顯著意義之抑制及防治效果⁽⁴⁾。然而其作用機轉則並未明瞭，據文獻報導指出，在四氯化碳及carrageenan所造成的炎症反應過程中，活性氧(包括 $O_2\div$, $\cdot OOH$, $\cdot OH$)扮演著相當重要之角色^(5,9)。活性氧(Reactive oxygen species, ROS)在因carrageenan或 CCl_4 所導致之炎症過程當中，會攻擊細胞膜形成過氧化脂質(lipidperoxide)，而造成細胞傷害等等發炎現象，在動物發炎實驗模式中，若使用活性氧清除劑，例如superoxide dismutase (SOD), vitamine E等，則可改善發炎現象。

在前一章中，已經以TBA法證實台灣市售各種“桶鉤藤”具抑制脂質過氧化作用。為了進一步探討台灣市售各種桶鉤藤的消炎及保肝活性是否與抗氧化活性(活性氧清除作用)有關，擬以電子自旋共振技術(electron spin resonance, ESR)及電子捕捉劑 DMP0 (5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide)，來評估市售桶鉤藤的抗氧化活性，以進一步解明其藥理作用機轉。

第二節 實驗材料及方法

一、台灣市售桶鉤藤水抽出物的製備

取市售各種桶鉤藤(M. repandus 之莖部, M. repandus 之根部, B. championii 之莖, U. hirsuta 的帶鉤之莖, U. rhyncho-phylla 的帶鉤之莖)各250公克，以1公升之蒸餾水，於水浴中煮沸 1小時然後過濾，如此重覆三次，合併三次濾液，將其濃縮，冷凍乾燥。產率依序為9.2%, 8.42%, 12.8%, 9.85%及10.1%。取各種“桶鉤藤”之水抽出物各100 mg，於40°C下，置於10 ml 0.1 M PBS (phosphate buffer saline)(pH=7.8)中溶解備用。稀釋水抽出物時，採用純水。

二、實驗藥品及器材

本實驗中全部採用分析級的化學試藥，以下是所使用的藥品、器具

及生產之公司。

1. 自旋捕捉劑 (spin trapping reagent) 5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide, DMPO (Labotec Co., Ltd.)
2. 微量金屬螯合劑 (trace metal impurities chelating agent) diethylenetriamine pentaacetic acid, DETAPAC (Sigma Chemical)
3. 抗氧化對照藥物
L(+)-ascorbic acid, (Wako Pure Chemical Ins., Ltd.)
superoxide dismutase, SOD (Toyobo Co., Ltd.)
4. Superoxide radical 來源：
hypoxanthine, HPX (Sigma Chemical) xanthine oxidase, XOD (Boehringer Mannheim)
5. Hydroxyl radical 來源：
ferrous sulfate (Wako Pure Chemical Ins., Ltd.) hydrogen peroxide (Wako Pure Chemical Ins., Ltd.)
6. 電子自旋共振光譜儀 (ESR spectrometer, JEOL-FR80, JEOL Ltd., Tokyo)

三、實驗方法

1. Superoxide radical 產生系統

Superoxide radical (O_2^-) 的產生，採用 hypoxanthine-xanthine oxidase 反應體系，產生之 O_2^- 由 DMPO 捕捉，spin adduct (DMPO-OOH) 再由 ESR spectrometer 分析，其步驟如下：

- | | |
|--|-------|
| A. 2.0 mM Hypoxanthine/PBS | 50 ul |
| B. 5.5 mM DETAPAC
(diethylene triaminepentaacetic acid)/PBS | 35 ul |
| C. crude drug extracts or SOD | 50 ul |
| D. 9.2 M DMPO (5.5-dimethyl-1-pyrroline-oxide) | 15 ul |
| E. 0.4 units/ml Xanthine oxidase/PBS | 50 ul |

將 A, B, C, D, E 配製備用，E 液則置於冰浴 (ice bath) 中，以防酵素失去活性，首先將 A, B, C, D 混合，然後加入 E 液，將此混合液移入 ESR quartz cell (160 μ l) 然後放置入 ESR spectrometer 中觀測 DMPO-OOH 圖譜。

2. Hydroxyl radical產生系統

Hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$)的產生，採用ferrous sulfate-hydrogen peroxide反應體系(Fenton reaction)，產生之 $\cdot\text{OH}$ ，由DMPO捕捉，spin adduct (DMPO-OH)再由ESR spectrometer分析，其步驟如下：

A. 1 mM Ferrous sulfate/PBS	37.5 μl
B. 5.5 mM DETAPAC/PBS	37.5 μl
C. crude drug extracts or ascorbic acid	50 μl
D. 0.92 M DMPO	20 μl
E. 1 mM Hydrogen peroxide	75 μl

將A, B, C, D, E配製備用。首先將A, B, C, D混合，然後加入 E液。將此混合液移入ESR quartz cell (160 μl)，然後置入ESR spectrometer中觀測DMPO-OH圖譜。

3. ESR spectrometry^(10,11)

當XOD或hydrogen peroxide加入各反應體系時，便產生 $\text{O}_2\cdot^-$ 或 $\cdot\text{OH}$ 。在ESR波譜中，所呈現的則為DMPO-OOH或DMPO-OH spin adduct。為求得DMPO-OOH及DMPO-OH訊號(signal)之相對強度(relative intensity)，採用 Mn^{2+} (MnO)作為內部標準訊號 (internal standard signal)，並由電子計算機求得DMPO-OOH，DMPO-OH與 Mn^{2+} 的訊號相對比值。

ESR spectrometer之操作條件如下：

TEMP : 25°C

POWER : 8.0 mW (9.416GHz)

FIELD : 334.7 \pm 5.0 mT for superoxide radicals

335.4 \pm 5.0 mT for hydroxyl radicals

SWEEP TIME : 2 min.

MODULATION FREQUENCY : 100 KHz

MODULATION AMPLITUDE : 0.79 \times 0.1 mT

RESPONSE TIME : 0.1 S

RECEIVER GAIN : 2 \times 100 for superoxide radicals

1 \times 100 for hydroxyl radicals

第三節 結 果

一、Superoxide radical ($O_2\cdot$)清除作用

在實驗1中，首先以PBS代替C液。則在DMPO加入HPX-XOD反應體系時，spin adduct, DMPO-OOH便形成(Figure 2)，接著C液使用不同濃度之superoxide dismutase (SOD，一種 superoxide radical清除劑)，則DMPO-OOH之訊號強度隨著SOD濃度之提昇而逐漸降低(Figure 3, Table 2)。顯示DMPO與 $O_2\cdot$ 之反應被SOD抑制下來。同樣的結果在C液使用不同濃度之生藥水抽出物時一樣產生(Figure 4)。由Table 2所得之檢量線(calibration curve, Figure 5)，及加入不同濃度之生藥所得之DMPO-OOH訊號強度，便可獲得市售各種桶鉤藤的superoxide清除活性(SOD-like activity)。從Table 3可得知清除 $O_2\cdot$ 之活性依序為*B. championii* : 4.71×10^5 unit/g; *M. repandus* (root): 2.77×10^5 unit/g; *M. repandus* (stem): 2.69×10^5 unit/g; *U. rhynchophylla* : 1.49×10^5 unit/g; *U. hirsuta* : 4.93×10^4 unit/g。

二、Hydroxyl radical ($\cdot OH$)清除作用

在實驗2中，首先以PBS代替C液，則在DMPO加入ferrous sulfate-hydrogen peroxide反應體系時，spin adduct, DMPO-OH便形成(Figure 6)。而在hydroxyl radical 清除劑，Ascorbic acid加入時，隨著ascorbic acid之濃度增加，DMPO-OH的訊號強度逐漸減弱(Figure 7及Table 4)。顯示DMPO與 $\cdot OH$ 之反應被ascorbic acid抑制下來。相同的情形亦發生在加入市售各種桶鉤藤水抽出物於該反應體系時(Figure 8)。爲了求得生藥之hydroxyl radical清除活性，從Table 4獲得一檢量線(Figure 9)。從該檢量線，以及加入不同濃度所得之DMPO-OH訊號強度，便可獲得市售桶鉤藤的 hydroxylradical清除活性(Table 5)，其活性依序為*B. championii* : 120unit/g; *M. repandus* (root): 114 unit/g; *M. repandus* (stem): 108 unit/g; *U. rhynchophylla* : 51 unit/g; *U. hirsuta* : 40 unit/g。

第四節 討 論

活性氧(Reactive oxygen species, ROS)，是細胞利用氧氣行各種複雜無比的代謝反應時，所產生的具未配對電子的氧分子及其衍生物。活性氧的氧化活性極高，可以攻擊細胞的任何部份，尤其是攻擊細胞膜

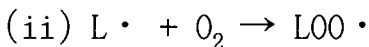
上具不飽和脂肪酸的脂質後，能奪取不飽和脂肪酸上的電子，而造成脂質自由基(lipid radical)，形成一連串連鎖反應，直至細胞膜瓦解為止。另外lipid radical也能通過細胞膜攻擊種種具生理活性的物質，使其失去活性，並且能引起核酸之變異⁽¹²⁾(Table 6)。由上可知，許多疾病及老化的過程，都牽涉到過多活性氧的產生，在本篇第一章，第二章也曾討論carrageenan誘發大白鼠足蹠浮腫及四氯化碳誘發急性肝炎的動物炎症實驗模式，與活性氧的產生有關。在這些實驗模式中，使用活性氧清除劑也能改善炎症反應現象。所以具抗炎、保肝活性的生藥，是否也同樣具有清除活性氧的能力，便是促進作者進行此研究的動機。

炎症是個體局部組織受到傷害，而發生將受傷害的組織除去並回復到原來狀態的防禦反應。發炎時，首先受傷害的組織，釋放出prostaglandin的代謝產物，吸引白血球從旁邊的血管向該部位集中，白血球在吞噬異物(包括菌體或受傷害組織)後，會產生大量之 O_2^- 、 $\cdot OH$ 、 H_2O_2 等活性氧來消滅異物。從先天性慢性肉芽腫症患者(chronic granulomatous disease, C.G.D.)，因其白血球缺乏產生superoxide的能力，導致反覆感染之事實，可推知活性氧是殺菌上不可或缺的因子。但另一方面，活性氧(包括 O_2^- 、 $\cdot OH$ 、 H_2O_2 、 OCl^- 等)過量時，會傷害細胞膜，而引起高分子化合物(ex. hyaluronic acid, collagen等)之不可逆脫聚合反應，導致組織傷害。例如慢性風濕性關節炎(RA)，因其關節液之hyaluronic acid脫聚合之變性使黏度降低現象，可由catalase (一種 H_2O_2 清除劑)或SOD (一種 O_2^- 清除劑)來防止，由此便可說明活性氧對上述高分子化合物之作用，可能即是組織傷害及發炎的原因⁽¹³⁾。

Kuehl自1977年以來，便一直主張 O_2^- 或 $\cdot OH$ 在發炎現象中的重要性，並以MK-447證明其主張(14-15)。MK-447與常用之抗炎劑NSAID不同，並不對cyclooxygenase產生抑制作用，反而促進 arachidonic acid之代謝(Fig. 10)，使 PGE_2 增加。另外由日本小野藥品公司所開發之ONO-3144，具有與MK-447相似之構造(Fig. 10)及藥理特性，不能對PG合成酵素cyclooxygenase產生抑制作用，反而促進由 PGG_2 變換成 PGH_2 。MK-447與ONO-3144已被證明能減少活性氧之生成，並對carrageenan誘發大白鼠足蹠浮腫及 adjuvant關節炎等動物炎症模式具防治效果(16)。此外，SOD(O_2^- 清除劑)亦被證實在上述動物炎症模式中具抗炎作用⁽¹⁶⁾。

以上結果，顯示活性氧在炎症反應中所扮演的角色，並證實活性氧清除劑具抗炎活性。

以CCl₄所誘發之肝炎機轉^(17,19)經證實為CCl₄在肝臟microsome中，被cytochrome P450代謝成trichloromethyl或peroxytrichloromethyl等自由基(free radical)，這些自由基與cell membrane上之phospholipid的不飽和脂肪酸在O₂存在下，造成脂質的過氧化作用，而導致細胞膜之功能上和形態上的改變⁽²⁰⁻²²⁾(如下列所示)。



所以，對CCl₄所誘發之肝炎具有保護作用的藥物，據推測是經過下列途徑來改善因CCl₄所導致之脂質過氧化現象。

(1) 抑制CCl₄代謝物之產生，亦即抑制trichloromethyl或peroxytrichloromethyl等自由基之形式⁽²³⁻²⁴⁾。

(2) 藥物本身具有抗氧化效果，亦即能清除O₂÷及55.H等致病因子⁽²⁵⁾。

綜合以上對carrageenan或CCl₄所導致之炎症抑制作用機轉的討論，可知作者以抗氧化(抑制脂質過氧化及活性氧清除作用)觀點來探討生藥抑制carrageenan誘發大白鼠足蹠浮腫之抗炎症作用機轉，以及生藥對CCl₄誘發急性肝損傷的防治作用機轉，是合理，且具有相當高之價值性。

據先前之研究，初步結果證實市售“桶鉤藤”確具抗炎及保肝效果⁽⁴⁾，本計畫爲了以抗氧化觀點來探討抗炎及保肝藥理作用機轉，首次應用了TBA法及電子自旋共振—電子捕捉技術(ESR spin-trapping)，對市售“桶鉤藤”水抽出物進行抗氧化作用評估。結果顯示M. repandus (stem or root), B. championii, U. hirsuta及U. rhynchophylla對FeCl₂所引起之rat肝臟均質液脂質過氧化現象具有意義之抑制作用。

以電子自旋共振(electron spin resonance, ESR)及電子捕捉(spin-trapping)技術則確證了市售“桶鉤藤”對因hypoxanthine-xanthine oxidase反應體系所產生之DMPO-OOH信號及由Fenton反應體系所產生之DMPO-OH信號，皆能有效抑制下來，顯示在台灣市售“桶鉤藤”中，皆存有抗氧化成分，能將superoxide radical (O₂÷)及hydroxyl radical (·OH)有效地清除。其清除superoxide radical之活性，以抑

制DMP0-OOH之spin adduct 50%所須之量(IC_{50})來比較，可得到如下之結果：
: *B. championii* ($12.55 \mu\text{g/ml}$) < *M. repandus* (root) ($21.34 \mu\text{g/ml}$) < *M. repandus* (stem) ($21.97 \mu\text{g/ml}$) < *U. rhynchophylla* ($39.67 \mu\text{g/ml}$) < *U. hirsuta* ($119.84 \mu\text{g/ml}$)。顯示 *B. championii* 清除superoxide radical的活性最強。

台灣市售“桶鉤藤”清除hydroxyl radical之活性，以抑制 DMP0-OH spin adduct 50%所須之量(IC_{50})來比較，則得到如下結果：
B. championii (4.20 mg/ml) < *M. repandus* (root) (4.42 mg/ml) < *M. repandus* (stem) (4.66 mg/ml) < *U. rhynchophylla* (9.87 mg/ml) < *U. hirsuta* (12.59 mg/ml)，也顯示 *B. championii* 清除hydroxyl radical的活性最強。

由以上結果可推論，台灣市售“桶鉤藤”水抽出物的抗炎及保肝活性，有一部份是透過其抗氧化作用來達成。

以往生藥之抗氧化作用，大部份以TBA法測其脂質過氧化抑制作用或以cytochrome c之方法觀察其superoxide清除能力。然而此兩種方法仍存在部份問題，而使其結果產生爭議性。

(1)以TBA結合MDA之方法，由於MDA只是lipid peroxide之一種，而除了superoxide或hydroxyl radical攻擊細胞不飽和脂肪酸外，亦有其他因素會造成lipid peroxide之產生，這點便使得以 TBA來測試TBA reactive substances (TBARS)方法顯得不精確而受爭議，而且此法並不能直接測得superoxide或hydroxyl radical的清除活性。

(2)以cytochrome c (Fridovich法)來測SOD活性值，其主要問題點在於若以xanthine oxidase inhibitor加入該反應體系，可降低superoxide ($O_2\div$)之生成，這可能會影響測試物質之準確性，因為可能測得具SOD活性之物質並不能直接清除superoxide，而是具 xanthine oxidase inhibitor特性而使其產生具SOD般清除superoxide之假象。而若試料中具有能將 Fe^{+++} 還原成 Fe^{++} 的成分存在，也可能得到相同的結果，導致cytochrome c法之結果受到爭議。此外由於本法是比色定量法，並不適於測定具有色素之生體，使其應用範圍大大受限，因為往往天然物中之flavonoid，會存在活性氧清除活性。

本研究採用之電子自旋共振技術(electron spinresonance, ESR)，

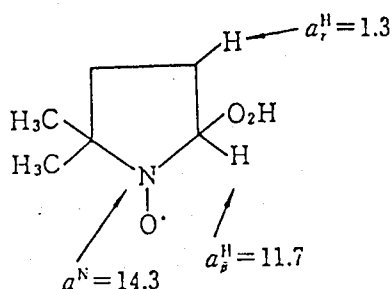
具有以下特點：

(1)能夠選定只測定free radical(定量及定性)。

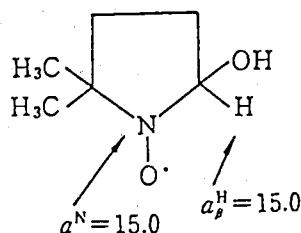
(2)可非破壞性、高靈敏度性測出 10^{-11} mol (試料量0.13 cc)濃度的有機free radical。

(3)採用不影響試料的狀態及形態(液體、固體、氣體等)的一種分光法(Energy來源採用微波，相當於分光光度計中的光源)，擁有分光法所沒有的優點。

(4)一般測定法只能測定free radical，而不能明確證明活性氧之種類。ESR法可透過其spectrum來測定各活性氧特有固定之hfs值(Hyperfine structure)，hfsc值(hyperfine splitting constant, a值)及g值，而依此便可判斷活性氧之種類。(如下圖所示)



DMPO- O_2H .



DMPO-OH.

本研究以ESR spin-trapping技術來評估生藥之抗氧化活性 (superoxide及hydroxylradical清除活性)，該技術簡便、迅速、精確度高，為今後檢測生藥抗氧化活性建立一個新的模式。

此外台灣市售“桶鉤藤”中的*U. hirsuta* 及*U. rhynchophylla*在傳統生藥中，是以“鉤藤”之生藥名被使用來作為鎮靜，鎮痙及降血壓⁽²⁶⁾。其降血壓作用及降壓成分3 alpha-dihydrocadambine及Uncarine A亦曾被研究報導⁽²⁷⁻²⁹⁾。Ferrari⁽³⁰⁾及Ambrosio⁽³¹⁾亦指出，心臟是活性氧所攻擊傷害的臟器之一，而所有氧化還原反應在mitochondria中最活躍，所以心臟細胞中的mitochondria亦承受相當大的氧化壓力⁽³²⁾。Fukuchi⁽³³⁾之研究亦證實在心肌細胞中的 mitochondria所產生的活性氧、過氧化脂質在

心臟血管功能異常的病理機轉中扮演一種相當重要的角色。本次研究中，首度以 ESR 及 spin-trapping 技術，證實 *U. hirsuta* 及 *U. rhynchophylla* 具有直接清除活性氧的抗氧化能力，這也是第一次以抗氧化觀點來探討 *U. hirsuta* 及 *U. rhynchophylla* 對心臟血管的作用機轉，並且可以解釋 *U. hirsuta* 及 *U. rhynchophylla* 在中國傳統醫療中被使用來治療心臟血管疾患的理由。

總而言之，本研究首次採用 ESR 及 spin-trapping 技術，從抗氧化藥理觀點來探討生藥抗炎及保肝的作用機轉，而獲得令人振奮的成果。作者相信，藉由此模式及技術之開發應用，將可大量評估生藥所具有之抗氧化特性。而中國傳統生藥，常具多元化之藥理活性，導致藥理作用機轉難以確定。而當今研究潮流，是以自由基、活性氧、過氧化脂質與疾病之關係作為中心，或許藉由 ESR spin-trapping 技術，來探討生藥的抗氧化活性，可以解開生藥多元化藥理作用之謎，期待有心致力於將中國傳統醫學現代化的學者，能攜手並進。此外，目前常用之 NSAID 消炎藥物，長期服用會有消化性潰瘍等副作用(ex. Aspirin)，據推測，這是因為 NSAID 在抑制 cyclooxygenase 外，亦活化了 lipoxxygenase，而隨著 HPETE (Hydroperoxyeicosatetraenoic acid) 之產生，活性氧也會產生，因此造成了 NSAID 對胃腸之副作用(34-36)。據本研究結果顯示，市售“桶鉤藤”除了具消炎作用，亦具有活性氧清除作用，而 *M. repandus* 植物，亦曾被分離出具抗潰瘍藥理活性成份，所以這類生藥，值得進一步開發為消炎藥物。

參考文獻

1. McCord, J.M. and I. Fridovich. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte cuprein (hemo cuprein). J.B.C. 244(22), 6049-6055, 1969.
2. Kan, W.S. Manual of Vegetable Drugs in Taiwan. Part 2, p. 22-23, 1973. Chinese medicine publishing Inc., Taipei, Taiwan, R.O.C. (Chinese)
3. Lin, C.C. and W.S. Kan. Medicinal plants used for the treatment of hepatitis in Taiwan. Am. J. Chin. Med. 18, 35-43, 1990.
4. Lin, C.C., J.M. Lin and H.F. Chiu. Studies on Folk medicine "Thang-kau-tin" from Taiwan (I) The anti-inflammatory and liver-protective effect. Am. J. Chin. Med. 20, 37-50, 1992.
5. Reddrop, C.J., K.H. Cheesman and T.F. Slater. Correlations between common tests for assessment of liver damage: indices of the hepatoprotective activity of promethazine in carbon tetrachloride hepatotoxicity. Cell. Biochem. Funct. 1, 55-63, 1983.
6. Yoshikawa, T., H. Tanaka and M. Kondo. Effect of vitamin E on adjuvant arthritis in rats. Biochem. Med. 227-234, 1983.
7. Yoshikawa, T., H. Tanaka, N. Yoshida, O. Seto, N. Sugino and M. Kondo. Adjuvant arthritis and lipid peroxide. Protection by superoxide dismutase. Lipid peroxide Res. 7, 108-110, 1983.
8. Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. Lancet, 1396-1397, 1984.
9. Yuda, Y., J. Tanaka, F. Hirano, K. Igarashi and T. Satch. Participation of lipid peroxidation in rat pertussis vaccine pleurisy. Chem. Pharm. Bull. 39(2), 505-506, 1991.

10. Kohno, M., M. Yamada, K. Mitsuta, Y. Mizuta and T. Yoshikawa. Spin-Trapping studies on the reaction of Iron complexes with peroxides and the effect of water-soluble antioxidants. Bull. Chem. Soc. Jpn. 64, 1447-1452, 1991
11. Mitsuta, K., Y. Mizuta, M Kohno, M. Hiramatsu and A. Mori. The application of ESR Spin-Trapping technique to the evaluation of SOD-like activity of biological substances. Bull. Chem. Soc. Jpn. 63, 187-191, 1990.
12. 奥田拓男, 吉川敏一, Free radical與和漢藥。P.14 1990, 東京, 株式會社 國際醫書出版。
13. Munthe, E., E. Kass & E. Jellum: Evidence for Enhanced Radical Scavenging Prior to Drug Response in Rheumatoid Arthritis. In: Advances in Inflammation Research, Vol. 3 (ed. by Gorini, S., et al.). Raven Press, N. Y., 1982, pp. 211-218.
14. Kuehl, F. A., J.L. Humes, M.L. Torchiana, E.A. Ham & R.W. Egan: Oxygen-centered Radicals in Inflammatory Processes. In: Advances in Inflammation Research, Vol. 4 (ed. by Weissmann, G. et al.), Raven Press, N.Y., 1979, pp. 419-430.
15. 竹重公一朗, 水上茂樹: 活性酸素。炎症 抗炎症療法(水島 裕, 鹽川優一編), 醫齒藥出版, 1982, pp. 142-146.
16. 二木銳雄, 島崎弘幸: 活性酸素, 活性酸素與抗炎症劑, 醫齒藥出版, 1989, pp 327-332.
17. Christie, G. and J. Judah Mechanism of action of CCl_4 on liver cells. Proc. R. Soc. Lond. Ser., 142(B), 241-257, 1954.
18. Clawson, G.A. Mechanisms of carbon tetrachloride hepatotoxicity. Pathol. Immunopathol. Res., 8, 104-112, 1989.
19. Recknagel, R.O. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. Pharmacol. Rev., 19(2), 145-208, 1967.
20. Packer, J., T. Slater and R. Willson Reactions of the carbon tetrachloride-related peroxy free radical (CCl_3O_2) with amino

- acids: pulse radiolysis evidence. *Life Sci.*, 23, 2617-2620, 1978.
21. Recknagel, R.O. A new direction in the study of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Life Sci.*, 33, 401-408, 1983.
 22. Reynold, E. Liver parenchymal cell injury. I. Initial alterations of the cells following poisoning with carbon tetrachloride. *J. Cell. Biol.*, 19, 139, 1963.
 23. Casto, J.A., G.C. de Ferreyra, C.R. de Castro, H. Sasame, O. M. de Fenos and J.R. Gillette. Prevention of carbon tetrachloride-induced necrosis by inhibitors of drug metabolism. Further studies on the metabolism of their action. *Biochem. Pharm.* 23, 295-302, 1974.
 24. Maling, H.M., F.M. Eichelbaum, W. Saul, I.G. Sipes, G.A.B. Brown and J.R. Gillette. Nature of the protection against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity produced by pretreatment with dibenamine N-chloroethyldipenzylamine. *Biochem. Pharm.* 23, 1479-1491, 1974.
 25. Yasuda, H., N Izugami, O. Shimadar, Y. Koba and M. Nakanishi. The protective effect of tinoridine against carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharm.* 52, 407-413, 1980.
 26. Hsu, H.Y. *Oriental Materia Medica*. Oriental healing arts institute, Long Beach, U.S.A., PP670-671, 1986.
 27. Aisaka, K., Y. Hattori, T. Kihara, T. Ishihara, K. Endo and H. Hikino. Hypotensive action of 3 alpha-dihydrocadambine, an indole alkaloid glycoside of *Uncaria hooks*. *Planta Med.* 5, 424-427, 1985.
 28. Endo K., Y. Oshima, H. Kikuchi, Y. Koshihara and H. Hikino. Hypotensive principles of *Uncaria hooks*. *Planta Med.* 49(3), 188-190, 1983.
 29. Chang C.C., L.H. Tung, R.R. Chen and C.C. Chiueh A study on

the antihypertensive action of uncarine A, an alkaloid of *Uncaria formosana* used in Chinese herb medicine. Taiwan I Hsueh Hui Tsa Chih-Journal of the formosan Medical Association. 78(2): 61- 69, 1979.

30. Ferrari, R., C. Ceconi, S. Curello, A. Cargnoni, O. Alfieri, A. Pardini, P. Marzollo and O. Visioli. Oxygen free radicals and myocardial damage: protective role of thiol-containing agents. Am. J. Med, 91: 95S-121S, 1991.
31. Ambrosio, G. Myocardial reperfusion injury mechanism and management-a review. Am. J. Med. 91: 86S-88S, 1991.
32. Wiswedel, I., O. Ulbricht and W. Augustin Studies of lipid peroxidation in isolated rat heart mitochondria. Biomed. Biochem. Acta, 2: S73-76, 1989.
33. Fukuchi, T., A. Kobayashi, M. Kaneko, A. Ichiyama and N. Yamazaki. Possible involvement of free radicals and antioxidants in the early stages of development of cardiomyopathy in BIO 14.6 Syrian hamster. Jpn. Heart J. 32: 655-666, 1991.
34. Cross, C.E., B. Halliwell, E.T. Borish, W.A. Pryor, B.N. Ames, R.L. Saul and J.M. McCord Oxygen radicals and human disease. Ann. Int. Med. 107, 526-545, 1987.
35. Reilly, P.M., H.J. Schiller and G.B. Bulkley Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. Am. J. Surg. 161, 448-502, 1991.
36. Kuehl, F.A. and R.W. Egan. Prostaglandins, arachidonic acid, and inflammation. Science, 210, 978-984, 1980.

Table 1. O_2^- spin adduct 的定量再现性

		SOD concentration (unit/mL)			
		0.000	0.390	1.560	6.250
Relative peak height of DMPO- O_2^-	1	3.19	2.84	1.95	0.81
	2	3.24	2.83	1.92	0.86
	3	3.21	2.85	1.97	0.79
	4	3.28	2.80	2.03	0.86
	5	3.30	2.82	1.85	0.77
	6	3.24	2.91	1.85	0.82
	7	3.39	2.82	1.98	0.84
	8	3.35	2.67	1.93	0.79
	9	3.38	2.87	1.99	0.75
	10	3.32	2.78	1.95	0.76
n		10	10	10	10
\bar{X}		3.29	2.82	1.94	0.81
SD		0.07	0.06	0.06	0.04
CV(%)		2.1	2.1	3.1	4.9

Table 2. ESR signal activity of Mn^{2+} and superoxide radical in various concentrations of SOD

SOD (unit/ml)	ESR Signal Peak Height		Averaged Relative Peak Height
	Mn^{2+}	Radical	
0.000	84.800	203.000	2.394
1.850	85.800	165.600	1.930
4.625	79.400	112.400	1.416
9.250	81.800	74.400	0.910
13.875	86.800	57.600	0.655
18.500	82.000	47.400	0.547

Calibration curve: $Y=0.193756X-0.145256$ $R=0.998457$

Where $Y = \left[\frac{I_0}{I} - 1 \right]$, $X = [SOD(\text{unit})]$

I indicates the averaged relative peak height in various concentrations of SOD

Table 3. SOD-like (Superoxide radical scavenger) Activity Assay

Sample	Conc. g/ml	Signal Peak Height		^a SOD Activity	SOD-like Activity unit/g	IC ₅₀ (μ g/ml)
		Mn^{2+}	Radical			
<i>M. repandus</i> (stem)	4.08×10^{-5}	91.20	73.20	10.98	2.69×10^5	21.97
<i>M. repandus</i> (root)	4.36×10^{-5}	96.80	72.60	12.06	2.77×10^5	21.34
<i>B. championii</i>	2.06×10^{-5}	84.80	77.20	9.71	4.71×10^5	12.55
<i>U. hirsuta</i>	2.15×10^{-4}	87.60	74.80	10.61	4.93×10^4	119.84
<i>U. rhynchophylla</i>	6.18×10^{-5}	91.20	86.20	9.21	1.49×10^5	39.67

^a Calibration curve: $Y=0.193756X-0.145256$

Where $Y = \left[\frac{I_0}{I} - 1 \right]$, $X = [SOD(\text{unit})]$

$I_0 = 2.394$ (from table 2, without SOD or crude drug.)

I : the averaged relative peak height in various concentration of crude drugs.

Table 4. ESR signal activity of Mn^{2+} and hydroxyl radical in various concentration of Ascorbic acid.

Ascorbic acid (mM)	ESR Signal Peak Height		Averaged Relative Peak Height
	Mn^{2+}	Radical	
0.0	45.6	514.6	11.31
0.2	45.4	417.9	9.21
0.4	44.4	293.9	6.62
0.6	46.0	200.4	4.36
0.8	46.8	124.0	2.65

Calibration curve: $Y=0.05921X^3-0.36267X^2+0.79380X+0.01279$

$$\text{where } Y=[AsA \text{ (mM)}], X=\left[\frac{I_0}{I}-1\right]$$

I indicates the averaged relative peak height in various concentration of Ascorbic acid (AsA)

Table 5. Hydroxyl radical scavenger activity assay

Sample	Conc. g/ml	Signal Peak Height		^a Ascorbic acid conc. (mM)	^b Hydroxyl radical scavenger activity (unit/g)	IC ₅₀ (mg/ml)
		Mn^{2+}	Radical			
<i>M. repandus</i> (stem)	5.48×10^{-3}	44.60	198.80	0.59	108	4.66
<i>M. repandus</i> (root)	5.07×10^{-3}	42.20	198.20	0.58	114	4.42
<i>B. championii</i>	5.16×10^{-3}	46.20	135.00	0.62	120	4.20
<i>U. hirsuta</i>	1.32×10^{-2}	44.00	235.20	0.53	40	12.59
<i>U. rhynchophylla</i>	1.09×10^{-2}	44.80	223.40	0.56	51	9.87

^aCalibration curve: $Y=0.05962X^3-0.36267X^2+0.79380X+0.01279$

$$\text{Where } Y=[AsA \text{ (mM)}], X=\left[\frac{I_0}{I}-1\right]$$

I_0 : 11.31 (from table 4)

I : the averaged relative peak height in various concentration of crude drugs.

^bReaction System: 1mM $FeSO_4$ 37.5 μ l, 5.5mM DETAPAC 37.5 μ l, 0.92M DMPO 20 μ l, 1 mM H_2O_2 75 μ l and test solution 50 μ l

1 unit means the hydroxyl radical scavenger activity by 1 mM ascorbic acid in this reaction system.

Table 6. Free radical對生體內標的分子引起之障害

Target	Consequence
Lipids	peroxidation, organelle and membrane changes
Nucleic acids	cell-cycle change, mutation, strand scission, base modification
Amino acids	protein denaturation, cross-linking, degradation, polymerization, enzyme inhibition
Carbohydrate	cell surface receptor changes
Cofactors	metabolic changes
Hyaluronic acid	depolymerization
Biological factors	inactivation (α_1 -antitrypsin, chemotatic factors, mediators, neurotransmitters)

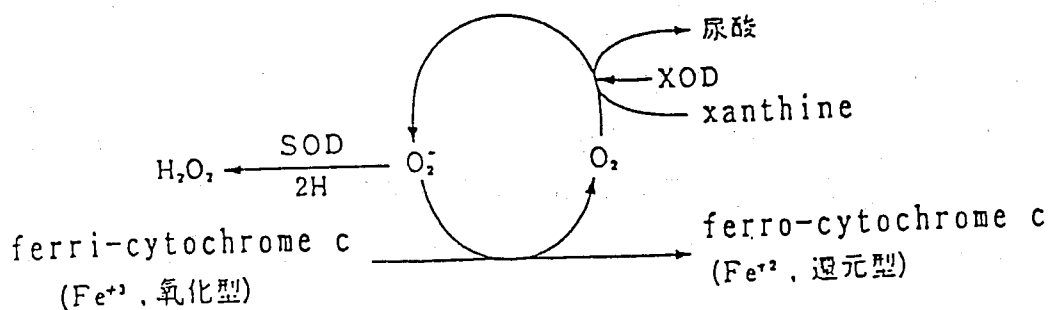


Figure 1. Cytochrome C法來測定 O_2^- 含量
(McCord & Fridovich法)

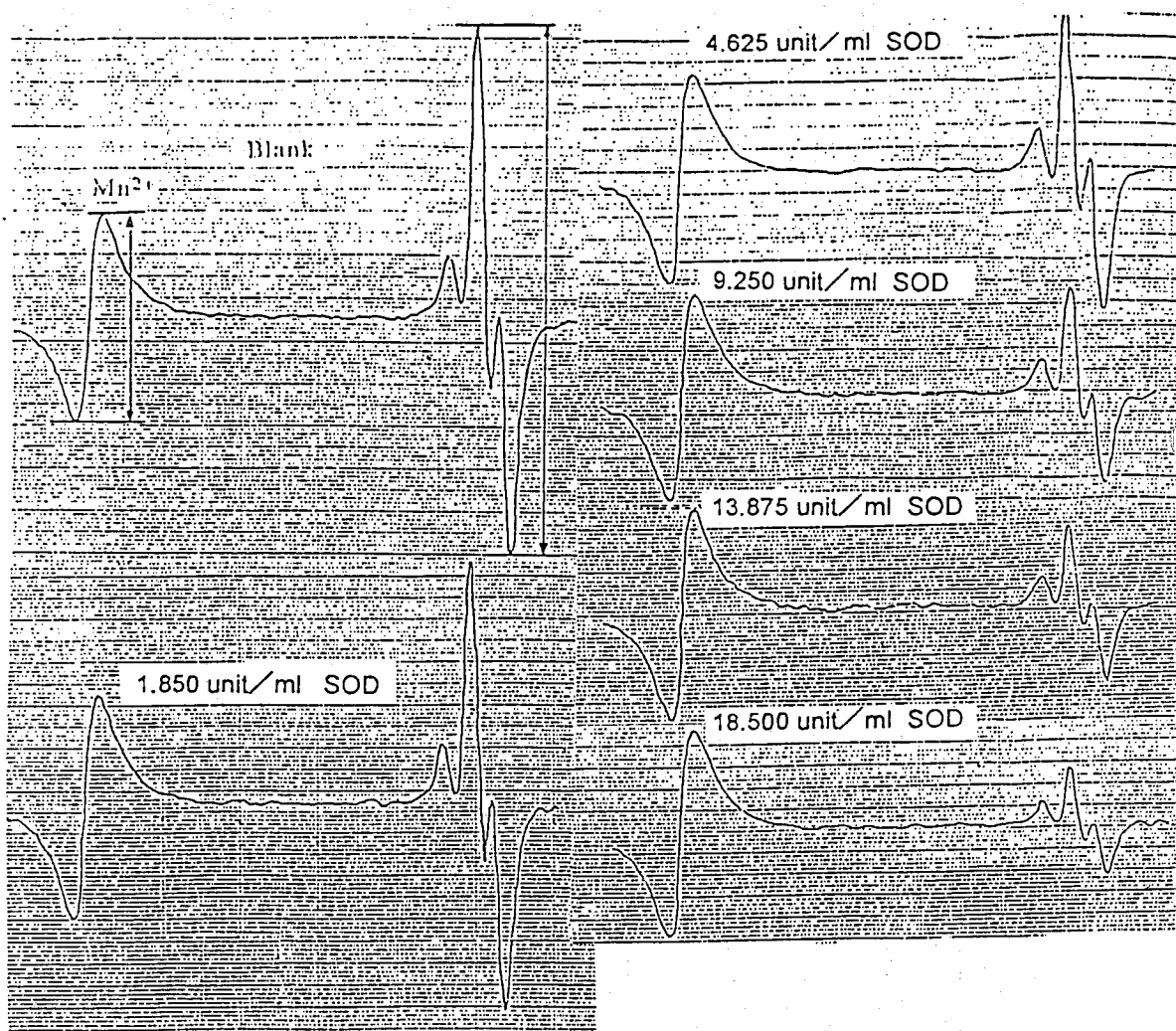


Fig. 3 The ESR spectra of DMPO-OOH and the inhibition effect of SOD on ESR signals of superoxide radical.

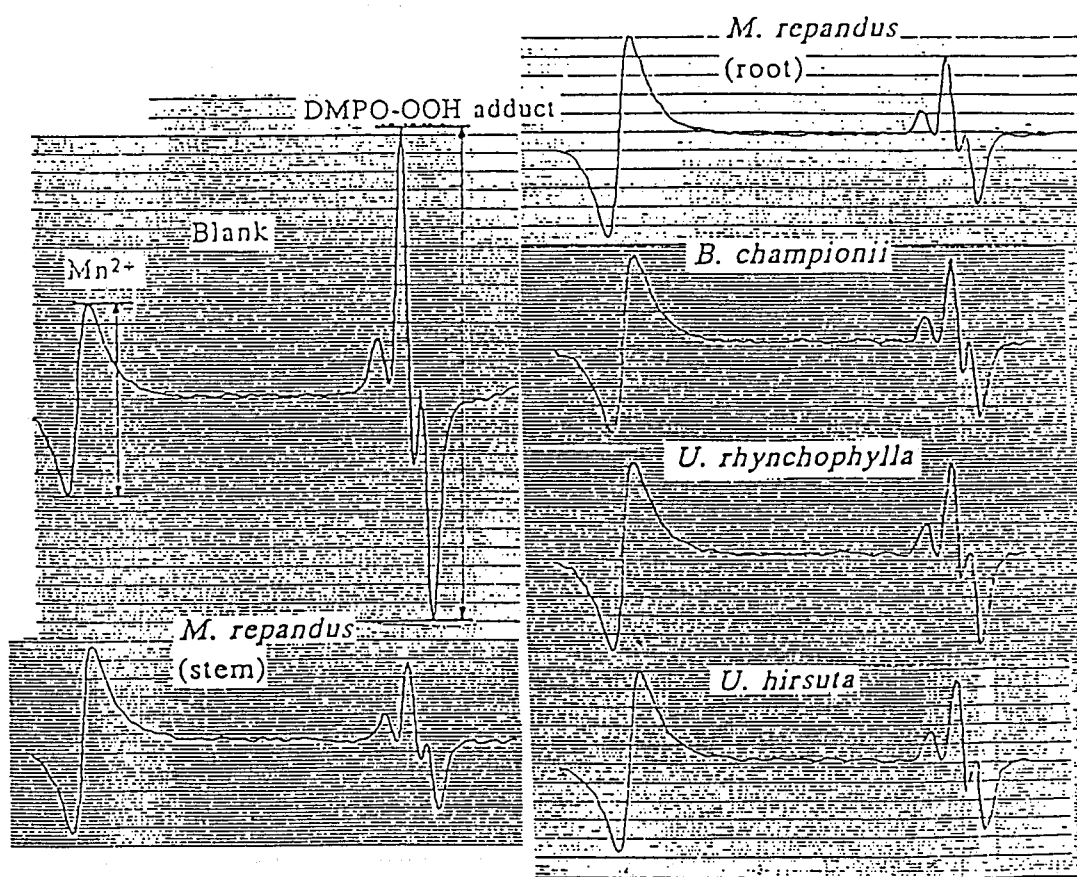


Fig. 4 The ESR spectra of DMPO-OOH and the inhibition effect of crude drugs on ESR signals of superoxide radical.

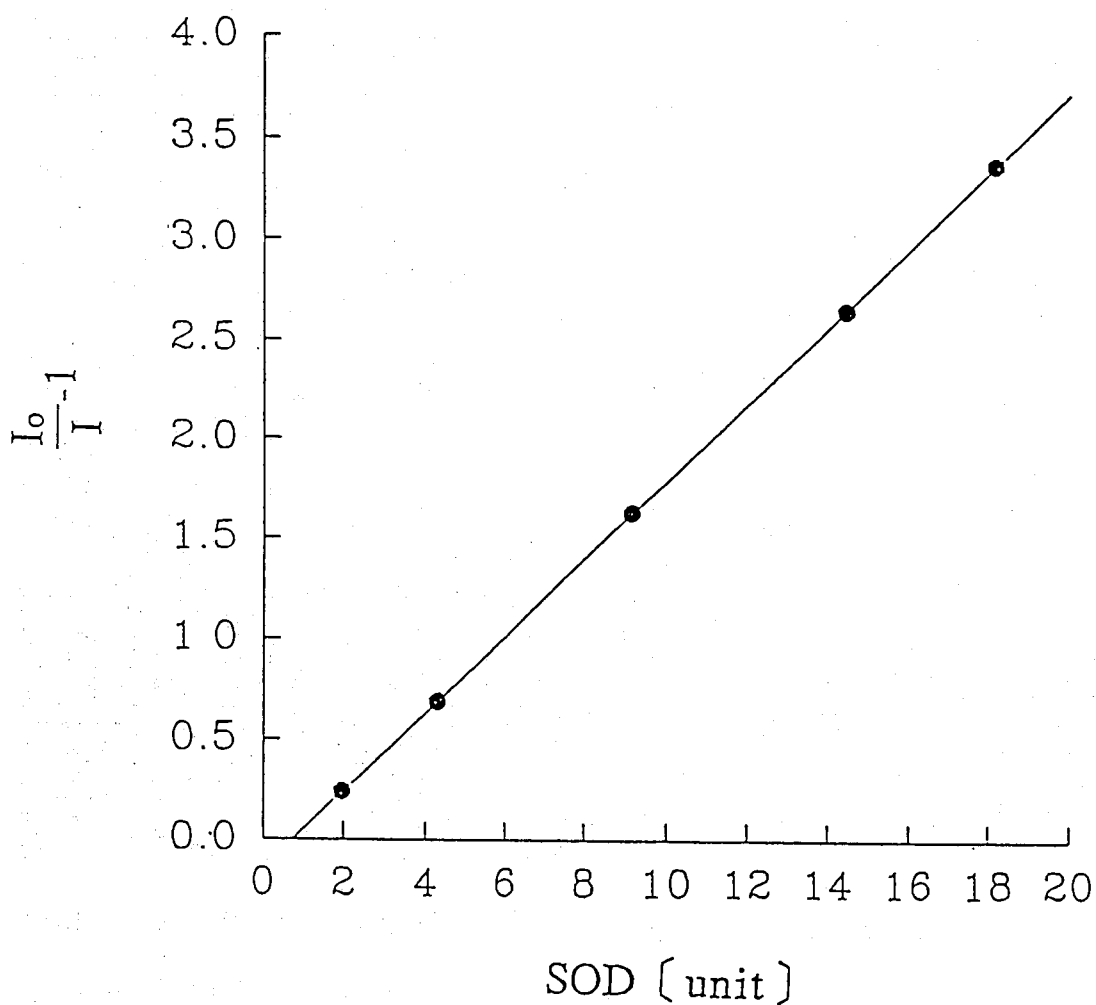


Fig. 5 The relationship between [SOD] and $\frac{I_0}{I} - 1$

Calibration curve : $Y=0.193756X-0.145256$ $R=0.998457$

I indicates the averaged relative peak height in various concentration of SOD.

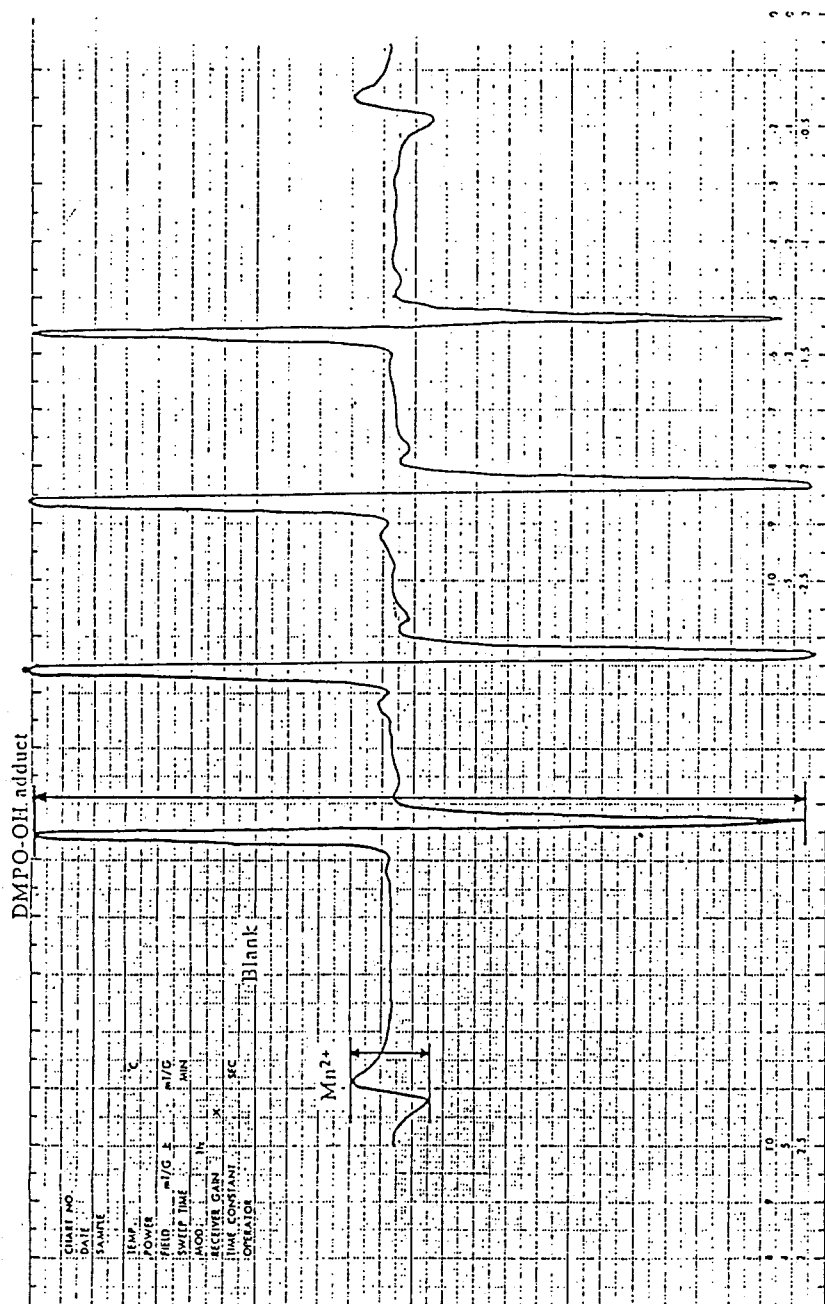


Figure 6 Inhibitory effect of ascorbic acid on ESR signals of the hydroxyl radical.
 The reaction mixture contained 1.0mM ferrous sulfate, 37.5 μ l;
 5.5mM DETAPAC, 37.5 μ l; 0.092M DMPO, 20 μ l and 1mM
 hydrogen peroxide 75 μ l.

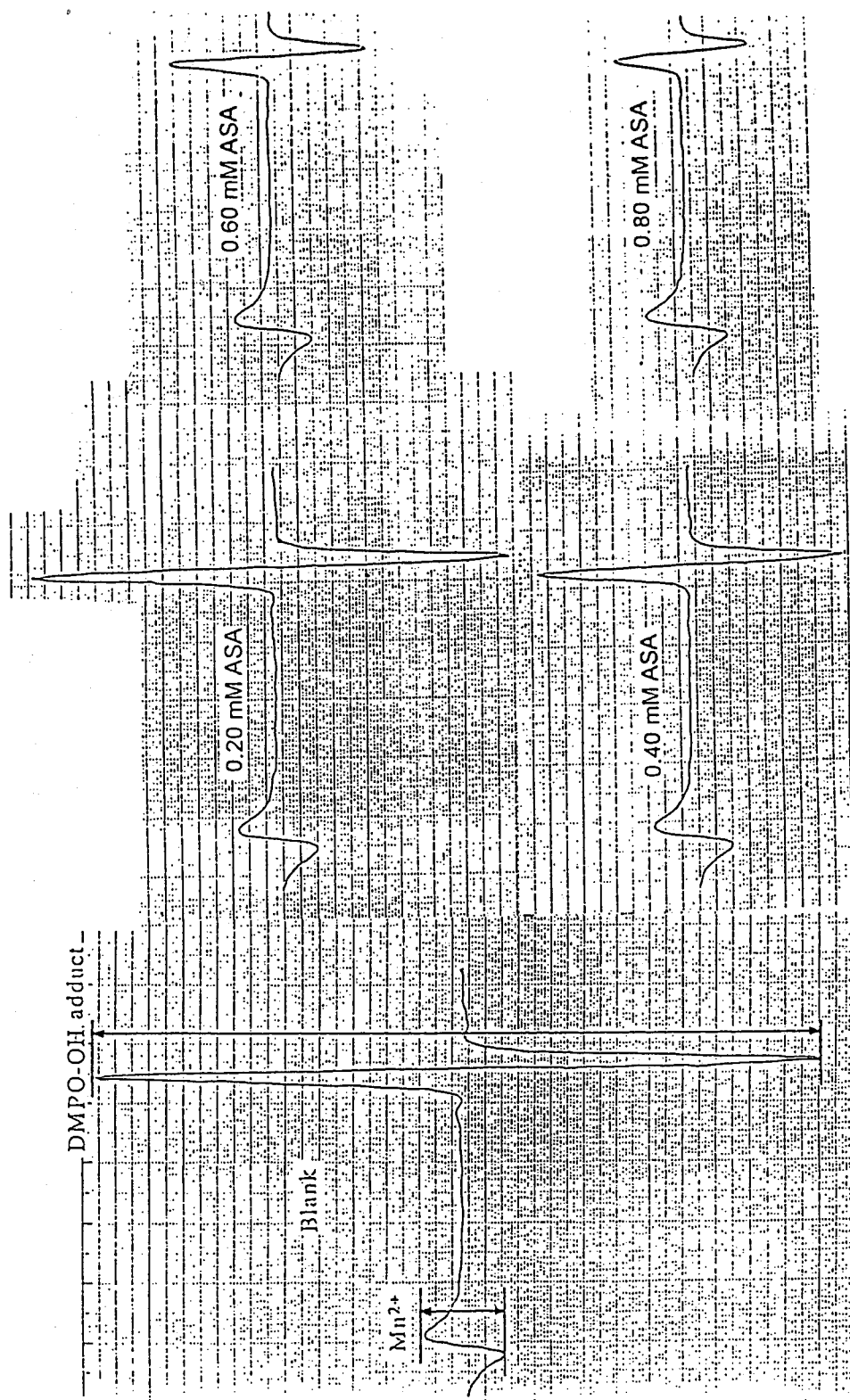


Fig. 7 The ESR spectra of DMPO-OH and the inhibition effect of Ascorbic acid on ESR Signals of hydroxyl radical.

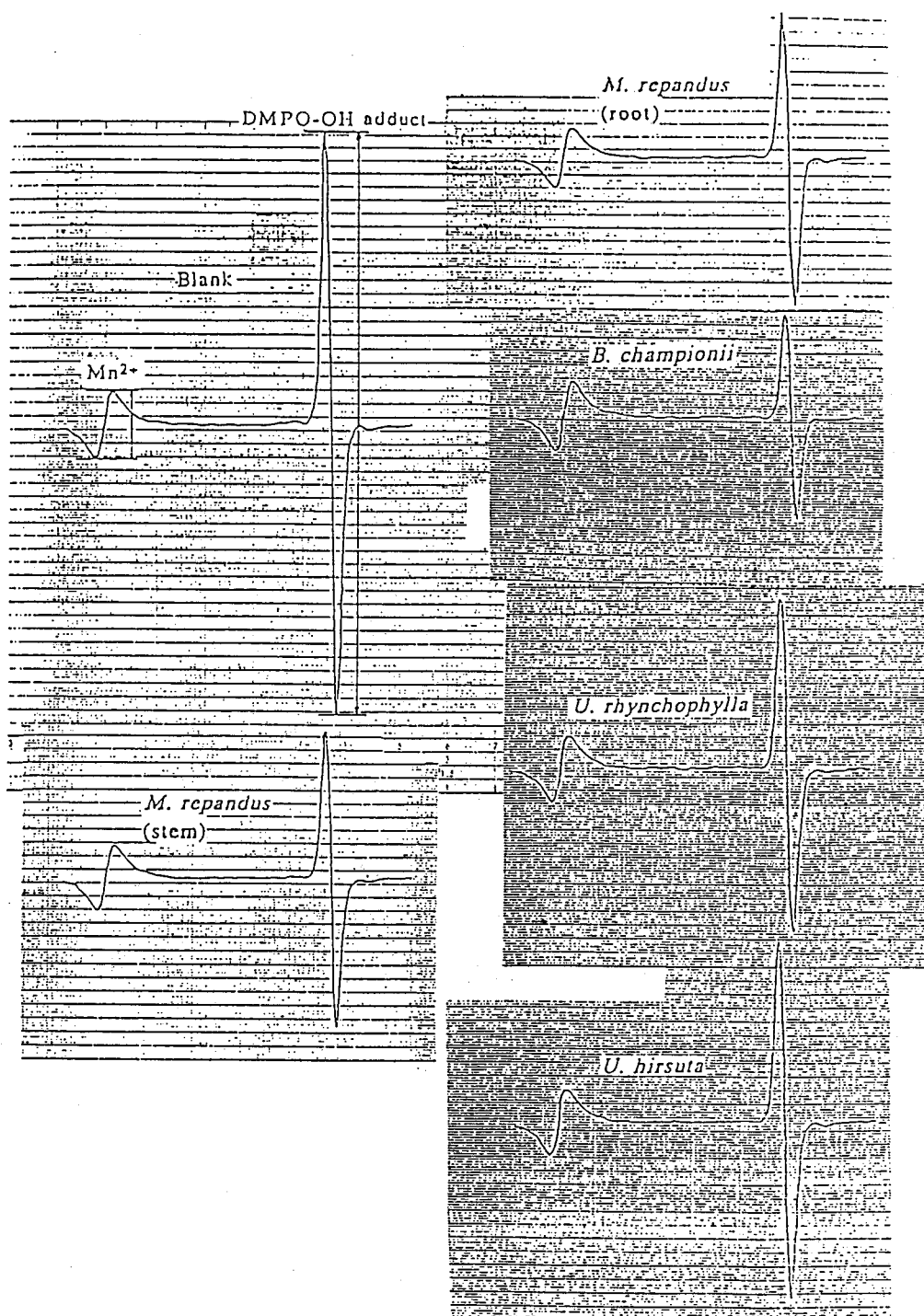


Fig. 8 The ESR spectra of DMPO-OH and the inhibition effect of crude drugs on ESR signals of hydroxyl radical.

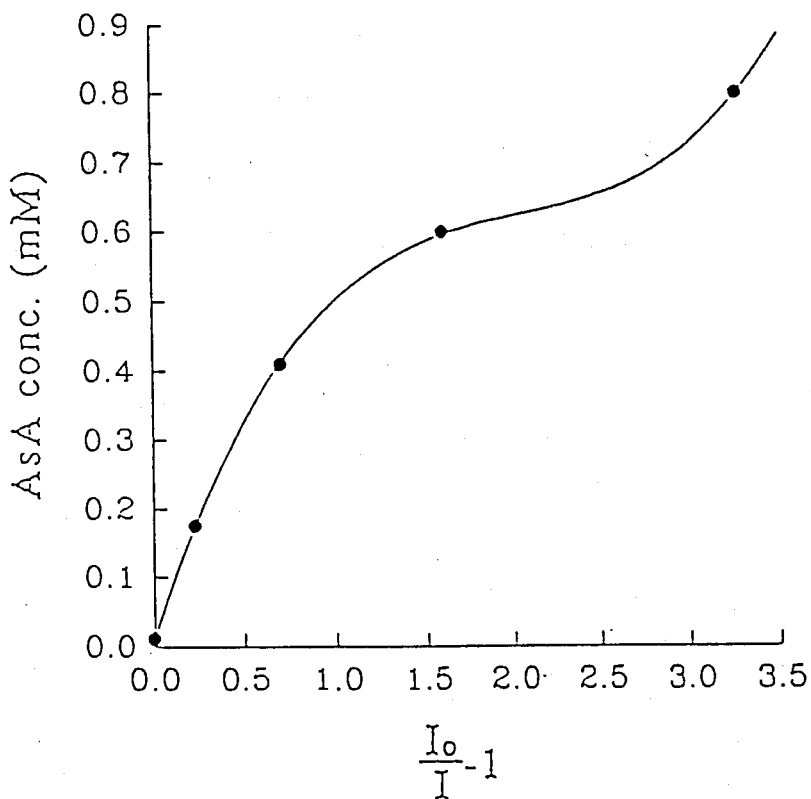


Fig. 9 The relationship between [AsA] and $\frac{I_0}{I} - 1$

$$Y = 0.05962X^3 - 0.36267X^2 + 0.79380X + 0.01279$$

I indicates the averaged relative peak height in various concentration of Ascorbic acid (AsA)

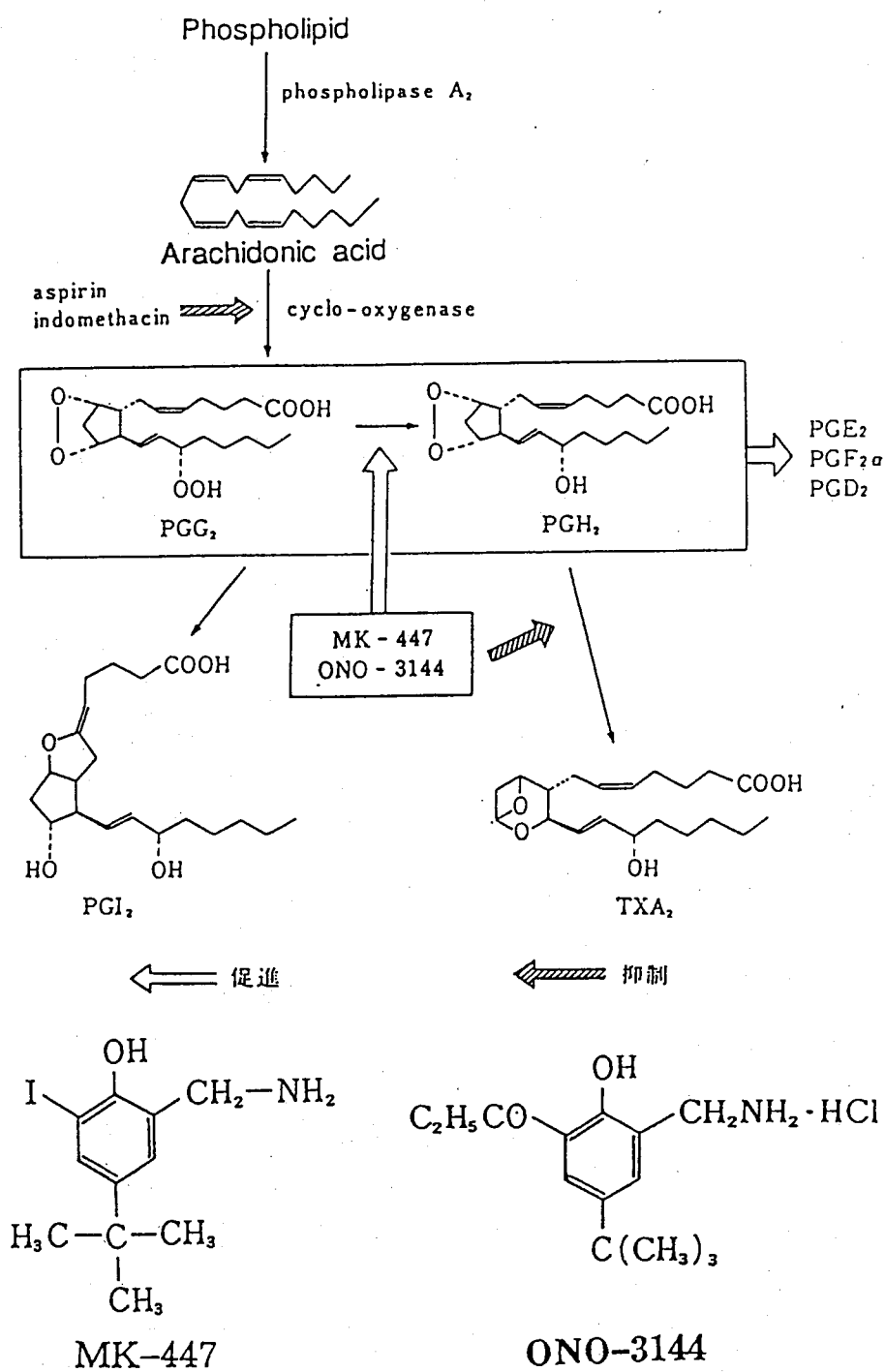


Fig. 10 MK-447及ONO-3144之作用機序

第三章 大戟科(Euphorbiaceae)植物扛香藤Mallotus repandus (Willd.) Muell.-Arg.各分餾(fraction)成分之抗氧化活性

摘 要

以電子自旋共振及電子捕捉技術(ESR spin-trapping)測試了大戟科植物扛香藤M. repandus 之莖部及根部各有機溶媒分餾成分 (fraction) 之活性氧清除活性。結果顯示M. repandus 莖部乙酸乙酯層分餾成分對HPX-XOD體系所產生之 $O_2^{\cdot -}$ 具最強的清除活性 (SOD-like Activity 3.75×10^5 unit/g) M. repandus (莖部及根部)之正己烷層分餾成分對Fenton反應體系所產生之 $\cdot OH$ 具有最佳的清除活性(180 unit/g)。

第一節 緒 言

據作者調查本省市售桶鉤藤之基源結果，發現市場品大部份以大戟科植物扛香藤Mallotus repandus (Willd.) Muell.-Arg.之莖或根為主，其他同名異物品，應為具類似藥效，而被代用或混用⁽¹⁾。為了避免基源混亂，及確保藥效，作者建議以大戟科植物扛香藤M. repandus 作為“桶鉤藤”較適切。

大戟科(Euphorbiaceae)植物扛香藤M. repandus (Willd.) Muell.-Arg.為台灣民間藥，具殺蟲、止癢效果，並被用來治療關節炎、肝炎及肝硬化⁽²⁻³⁾。作者先前報告M. repandus 具抗炎症及保肝活性⁽⁴⁾，並證實其抗炎症及保肝作用之機轉，應該與其抗氧化活性(superoxide及hydroxyl radical清除作用)有關⁽⁵⁾。為進一步解明扛香藤(M. repandus)之主要有效活性成分，擬進一步以有機溶媒萃取各分餾部份(fraction)，以電子自旋共振(ESR)及電子捕捉技術來探討M. repandus 各分餾(fraction)成分之抗氧化活性，以便尋找出其有效成分。

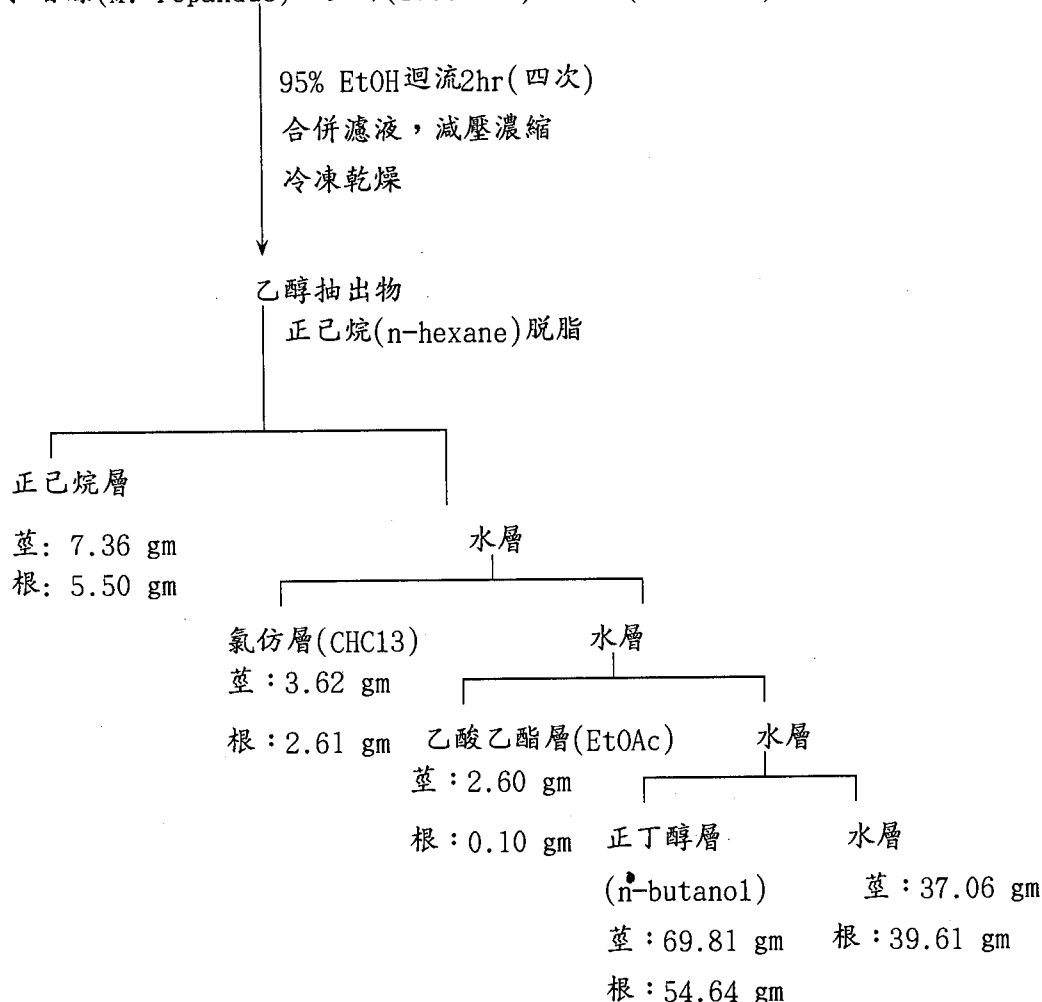
第二節 扛香藤M. repandus各分餾(fraction)成分之分離

取扛香藤(M. repandus)之莖(1700公克)，根(1320公克)，粉碎之後以10公升之乙醇在80-90°C迴流四次，每次2小時，合併濾液後，經減壓濃縮、冷凍乾燥，再加入500毫升之水，使成懸浮液。再連續以正己烷、

氯仿、乙酸乙酯、正丁醇等有機溶媒萃取。其產量分別爲莖部：正己烷層7.36公克、氯仿層3.62公克、乙酸乙酯層2.60公克、正丁醇層69.81公克、水層37.06公克；根部：正己烷層5.50公克、氯仿層2.61公克、乙酸乙酯層0.10公克、正丁醇層54.64公克、水層39.61公克。(實驗方法如流程圖)

流程圖 扛香藤莖部及根部之分畫

扛香藤(*M. repandus*)之莖部(1700公克)或根部(1320公克)



第三節 實驗材料與方法

一、材料之製備

取各分餾成分各100 mg (n-hexane及chloroform層除外)置入10 ml 0.1 M PBS (phosphate buffer saline)(pH = 7.8)中，於40°C下溶解備用，n-hexane層分餾成分則於 20 ml 1% Tween 80/PBS中溶解備用。Chloroform層分餾成分首先溶於 4 ml chloroform，然後加入 6 ml PBS (pH = 7.8)，將溶液充分攪拌後，取上清液備用。實驗中以純水來稀釋

各待試驗的分餾成分。二、實驗藥品、器材及方法如本篇第二章第二節所述，不再重覆。

第四節 結 果

一、Superoxide radical清除活性

Figure 1顯示DMPO-OOH spin adduct之ESR圖譜。在不同濃度之SOD (0~18.5 unit/ml)加入時，DMPO-OOH之訊號強度，隨著SOD濃度之提高而逐漸減弱(Figure 2及Table 1)。由superoxide radical訊號強度及內部對照信號 Mn^{2+} (in MnO)之比值(relative peak height)，可求得如Figure 3之檢量線。同樣的情況，亦在加入扛香藤*M. repandus*各分餾(fraction)成分時產生(Figure 4及5)。各分餾成分之superoxide radical ($O_2\cdot$)清除活性如Table 2所示。*M. repandus*之莖或根的各分餾成分，皆具清除superoxide radical之活性，其中以莖部之乙酸乙酯層(3.70×10^5 unit/g)，正丁醇層(1.58×10^5 unit/g)及根部之正丁醇層(1.74×10^5 unit/g)之活性最高。

二、Hydroxyl radical清除活性

Figure 6 顯示DMPO-OH spin adduct之ESR圖譜，當加入不同濃度之Ascorbic acid時，DMPO-OH之訊號強度隨著Ascorbic acid濃度之提高而逐漸減弱(Figure 7及Table 3)，由hydroxyl radical訊號強度及內部對照信號 Mn^{2+} (in MnO)之比值(relative peak height)，可得如Figure 8之檢量線。在加入扛香藤*M. repandus*各分餾成分時，亦產生同樣情形(Figure 9及10)，各分餾(fraction)成分hydroxyl radical ($\cdot OH$)清除活性如Table 4 所示。*M. repandus* 之莖或根的各分餾成分，皆具清除hydroxyl radical之活性，其中以莖部及根部之正己烷層顯示最強之抑制活性(180 unit/g)。

第五節 討 論

Superoxide radical ($O_2\cdot$)及hydroxyl radical ($\cdot OH$)對生物體造成各種傷害，並在許多臨床疾病上扮演重要角色。任何物質，無論是人工或合成物的，只要具有抗氧化活性，便能預防或改善因活性氧所造成之傷害⁽⁶⁻¹⁰⁾。

本研究證實了台灣產大戟科植物扛香藤(*M. repandus*)之各分餾成分，均具有清除superoxide及hydroxyl radical的活性，這不但可部份解明扛香藤的抗炎症及保肝活性³⁾，更意謂著*M. repandus*含有某種強力的抗氧化成份，能有效地清除 $O_2\div$ 及 $\cdot OH$ 。扛香藤清除superoxide radical ($O_2\div$)的活性，其 IC_{50} (相當於5.911 unit/ml SOD之活性，即抑制50%的DMPO-OOH相對信號強度所須之量)分別為*M. repandus*莖部：n-hexane層： 1.56×10^{-3} g/ml， $CHCl_3$ 層： 1.48×10^{-3} g/ml，EtOAc層： 1.60×10^{-5} g/ml，n-BuOH層： 3.74×10^{-5} g/ml，aqueous層： 7.55×10^{-5} g/ml，根部：n-hexane層： 1.12×10^{-3} g/ml， $CHCl_3$ 層： 1.85×10^{-3} g/ml，EtOAc層： 7.58×10^{-4} g/ml，n-BuOH層： 3.40×10^{-5} g/ml，aqueous層： 8.96×10^{-5} g/ml，其中以*M. repandus* 莖部之EtOAc及n-BuOH層，根部之n-BuOH層之清除superoxide radical活性最強，基本上，*M. repandus*莖部及根部各同一分餾成分之活性相當，這與先前所測定之*M. repandus*莖部或根部之水抽出物活性(SOD-like activity：莖部 2.69×10^5 unit，根部 2.77×10^5 unit/g)結果類似，顯示*M. repandus*根部與莖部之活性差異不大。而*M. repandus* 莖部EtOAc層(3.70×10^5 unit/g)與根部EtOAc層(7.80×10^3 unit/g)之活性差異大，究竟是所含成分不同或有效成份含量不同所致，仍待進一步探討。

扛香藤清除hydroxyl radical ($\cdot OH$)的活性，其 IC_{50} (相當於0.5 mM ascorbic acid之活性，即抑制50%的DMPO-OH相對信號強度所須之量)分別為*M. repandus* 莖部：n-hexane層： 2.80×10^{-3} g/ml， $CHCl_3$ 層： 1.09×10^{-2} g/ml，EtOAc層： 5.03×10^{-3} g/ml，n-BuOH層： 4.16×10^{-3} g/ml，aqueous層： 6.29×10^{-3} g/ml，根部：n-hexane層： 2.80×10^{-3} g/ml， $CHCl_3$ 層： 8.89×10^{-3} g/ml，EtOAc層：沒有活性，n-BuOH層： 4.34×10^{-3} g/ml，aqueous層： 1.52×10^{-3} g/ml，其中以*M. repandus*莖部及根部的n-hexane層之清除 hydroxyl radical活性最強(180 unit/g)。基本上莖部及根部各同一分餾成分之活性亦相差不多，這與先前所測定之*M. repandus*莖部或根部水抽出物活性(hydroxyl radical scavenger activity：莖部108 unit/g，根部114 unit/g)結果相類似，再次顯示根及莖部之活性差異不大。同樣地，莖部與根部之EtOAc層所得結果，差異仍相當大(莖部：100 unit/g，根部未測出任何

活性)。

本研究結果顯示，大戟科植物扛香藤(*M. repandus*)確實具有明顯的抗氧化能力，除了根部EtOAc fraction未測出hydroxyl radical清除活性外，其餘各fraction皆顯示顯著的活性氧清除能力。這些結果再次確證*M. repandus*對 carrageenan 誘發足蹠浮腫及CCl₄誘發急性肝毒性的保護及防治作用，應該是透過其抗氧化機轉(superoxide及hydroxyl radical清除活性)來達成的。

曾有報導指出植物所含成分中，若具有polyphenolic結構，例如含phenolic hydroxyl group的tannin⁽¹¹⁻¹⁶⁾，caffeic acid衍生物⁽¹¹⁾及flavonoid類，都具有活性氧清除活性。扛香藤*M. repandus*所具有之活性氧清除能力及抗炎、保肝活性，是由那種成分而來，則待進一步解明。

參考文獻

1. Chun-Ching Lin, Jer-Min Lin and Jenq-Jer Yang The Pharmacognostical Studies on Folk Medicine "Thang-kau-tin" from Taiwan. J. Chin. Med. 6(4), 265-274, 1995.
2. Kan, W.S. Manual of Vegetable Drugs in Taiwan. Part 2, p.22-23. Chinese medicine publishing Inc., Taipei, Taiwan, R.O.C. (Chinese), 1973.
3. Lin, C.C. and W.S. Kan. Medicinal plants used for the treatment of hepatitis in Taiwan. Am. J. Chin. Med. 18, 35-43, 1990.
4. Lin C.C., J.M. Lin and H.F. Chiu. Studies on Folk medicine "Thang-kau-tin" from Taiwan (I) The anti-inflammatory and liver-protective effect. Am. J. Chin. Med. 20, 37-50, 1992.
5. Lin, J.M. C.C. Lin, M.F. Chen and T. Ujje. Studies on folk medicine "Thang-Kau-tin" from Taiwn (II) Measurement of scavenging effect on active oxygen species using an ESR technique. J. Chin. Med. 5(4), 95-96, 1994.

6. Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet* 1396-1397, 1984.
7. Reddrop, C.J., K.H., Cheesman and T.F. Slater. Correlations between common tests for assesment of liver damage: indices of the hepatoprotective activity of promethazine in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Cellular and Biochemistry Function* 1, 55-63, 1983.
8. Yoshikawa, T., H. Tanaka and M. Kondo. Effect of vitamine E on adjuvant arthritis in rats. *Biochem. Med.* 29, 227-234, 1983.
9. Yoshikawa, T., H. Tanaka, N. Yoshida, O. Seto, N. Sugino and M. Kondo. Adjuvant artitis and lipid peroxide. Protection by superoxide dismutase. *Lipid Peroxide Research.* 7, 108-110, 1983.
10. Yuda, Y., J. Tanaka, F. Hirano K. Igarashi and T. Satch. Participation of lipid peroxidation in rat pertussis vaccine pleurisy. *Chem. Pharm. Bull.* 39(2), 505-506, 1991.
11. Kimura, Y., T. Okuda, K. Mori, T. Okuda and S. Arichi. Studies on the activities of tannins and related compounds of medicinal plants and drugsd. IV. *Chem. Phârm. Bull.* 32, 1866-1871, 1984.
12. Kimura, Y., T. Okuda, T. Hatano, I. Agata and S. Arichi. Effects of extracts of leaves of *Artemisia* species and caffeic acid and chlorogenic acid on lipid metabolic injury in rats fed peroxidized oil. *Chem. Pharm. Bull.* 33, 2028-2034, 1985.
13. Hatano, T., R. Edamatsu, M. Hiramatsu, A. Mori, Y. Fujita, T. Yasuhara, T. Yoshida and T. Okuda. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. *Chem. Pharm. Bull.* 37, 2016-2021, 1988.

14. Okuda, T., Y. Kimura, T. Yoshida, T. Hatano, T. Okuda and S. Arichi Studies on the activities of tannins and related compounds of medicinal plants and drugs. I. Chem. Pharm. Bull. 31, 1625- 1631, 1983.
15. Hatano, T., H. Kagawa, T. Yasuhara and T. Okuda. Two new flavonoids and other constituents in licorice root. Their relative astringency and radical scavenging effects. Chem. Pharm. Bull. 36, 2090-2097, 1988.
16. Yoshida, T., K. Mori, T. Hatano, T. Okumura, I. Uehara, K. Komagoe, Y. Fujita and T. Okuda. Studies on inhibition mechanism of autooxidation by tannins and flavonoids. V. Chem. Pharm. Bull. 37, 1919-1921, 1989.

Tavle 1. ESR signal activity of Mn^{2+} and superoxide radical in various concentrations of SOD

SOD (unit/ml)	ESR Signal Peak Height		Averaged Relative Peak Height
	Mn^{2+}	Radical	
0.000	84.8	203.0	2.394
1.850	85.8	165.6	1.930
4.625	79.4	112.4	1.416
9.250	81.8	74.4	0.910
13.875	86.8	57.6	0.655
18.500	82.0	47.4	0.547

Calibration curve: $Y=0.193756X-0.145256$ $R=0.998457$

Where $Y = \left(\frac{I_0}{I} - 1 \right)$, $X = \{ \text{SOD (unit)} \}$

I indicates the averaged relative peak height in various concentrations of SOD

Table 2. SOD-like (Superoxide radical scavenger) Activity Assay

Sample	Conc. g/ml	Signal	Peak Height	^a SOD-like Activity unit/g	IC ₅₀ (g/ml))
		Mn ²⁺	Radical		
M.R. (stem)					
n-hexane fr.	2.51×10 ⁻³	87.0	77.8	3.80×10 ³	1.56×10 ⁻³
CHCl ₃ fr.	2.82×10 ⁻³	97.8	77.6	4.00×10 ³	1.48×10 ⁻³
EtOAc fr.	2.87×10 ⁻⁵	89.2	75.8	3.70×10 ⁵	1.60×10 ⁻⁵
n-BuOH fr.	7.18×10 ⁻⁵	87.4	68.6	1.58×10 ⁵	3.74×10 ⁻⁵
aqueous fr.	1.42×10 ⁻⁴	91.0	72.4	7.83×10 ⁴	7.55×10 ⁻⁵
M.R. (root)					
n-hexane fr.	2.07×10 ⁻³	84.2	67.8	5.30×10 ³	1.12×10 ⁻³
CHCl ₃ fr.	2.89×10 ⁻³	83.2	75.4	3.20×10 ³	1.85×10 ⁻³
EtOAc fr.	1.33×10 ⁻³	83.0	69.0	7.80×10 ³	7.58×10 ⁻⁴
n-BuOH fr.	6.09×10 ⁻⁵	92.0	75.8	1.74×10 ⁵	3.40×10 ⁻⁵
aqueous fr.	1.72×10 ⁻⁴	95.8	78.2	6.60×10 ⁴	8.96×10 ⁻⁵

^aCalibration curve: $Y=0.193756X-0.145256$

Where $Y = \left\{ \frac{I_0}{I} - 1 \right\}$, $X = \{ \text{SOD (unit)} \}$

I_0 : 2.394 (from Table 1, without SOD or M.R.)

I : the averaged relative peak height in various concentrations of extracts.

Table 3. ESR signal activity of Mn^{2+} and hydroxyl radical in various concentration of Ascorbic acid.

Ascorbic acid (mM)	ESR Signal Peak Height		Averaged Relative Peak Height
	Mn^{2+}	Radical	
0.0	45.6	514.6	11.31
0.2	45.4	417.9	9.21
0.4	44.4	293.9	6.62
0.6	46.0	200.4	4.36
0.8	46.8	124.0	2.65

Calibration curve: $Y=0.05921X^3-0.36267X^2+0.79380X+0.01279$

where $Y=[AsA \text{ (mM)}]$, $X= \left[\frac{I_0}{I} - 1 \right]$

I indicates the averaged relative peak height in various concentration of Ascorbic acid (AsA)

Table 4. Hydroxyl radical scavenger activity assay

Sample	Conc. g/ml	Signal Peak Height		^a Hydroxyl radical scavenger activity (unit/g)	IC ₅₀ (g/ml)
		Mn ²⁺	Radical		
M.R. (stem)					
n-hexane fr.	3.01×10 ⁻³	44.2	228.8	180	2.80×10 ⁻³
CHCl ₃ fr.	1.35×10 ⁻²	45.0	175.2	46	1.09×10 ⁻²
EtOAc fr.	5.74×10 ⁻³	89.2	75.8	100	5.03×10 ⁻³
n-BuOH fr.	5.16×10 ⁻³	43.8	163.0	121	4.16×10 ⁻³
aqueous fr.	5.58×10 ⁻³	45.2	281.4	80	6.29×10 ⁻³
M.R. (root)					
n-hexane fr.	3.11×10 ⁻³	46.4	226.0	180	2.80×10 ⁻³
CHCl ₃ fr.	1.04×10 ⁻²	45.4	209.8	56	8.98×10 ⁻³
EtOAc fr.	5.33×10 ⁻³	44.4	409.2	N.D.	—
n-BuOH fr.	5.21×10 ⁻³	44.0	186.4	116	4.34×10 ⁻³
aqueous fr.	1.80×10 ⁻²	44.0	196.0	33	1.52×10 ⁻³

^aCalibration curve: $Y=0.05921X^3-0.36267X^2+0.79380X+0.01279$

Where $Y = [AsA (mM)]$, $X = \left\{ \frac{I_0}{I} - 1 \right\}$

I_0 : 11.31 (from table 3)

I : the averaged relative peak height in various concentration of extracts.

Reaction System: 1mM FeSO₄ 37.5 μ l, 5.5mM DETAPAC 37.5 μ l, 0.92M DMPO 20 μ l,
1 mM H₂O₂ 75 μ l and test solution 50 μ l

1 unit means the hydroxyl radical scavenger activity by 1mM ascorbic acid in this reaction system.

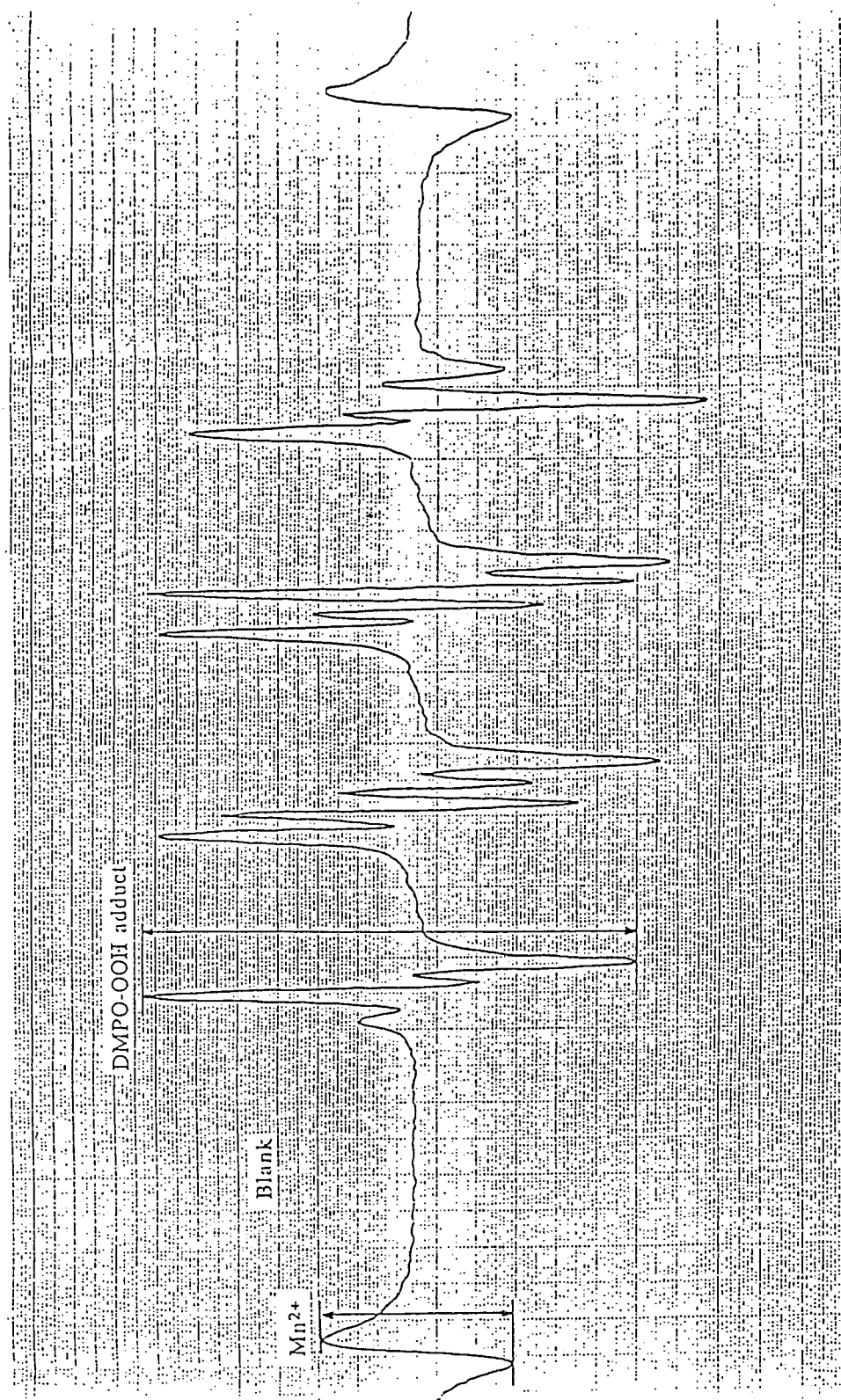


Fig. 1 The ESR spectrum from DMPO-OOH adduct

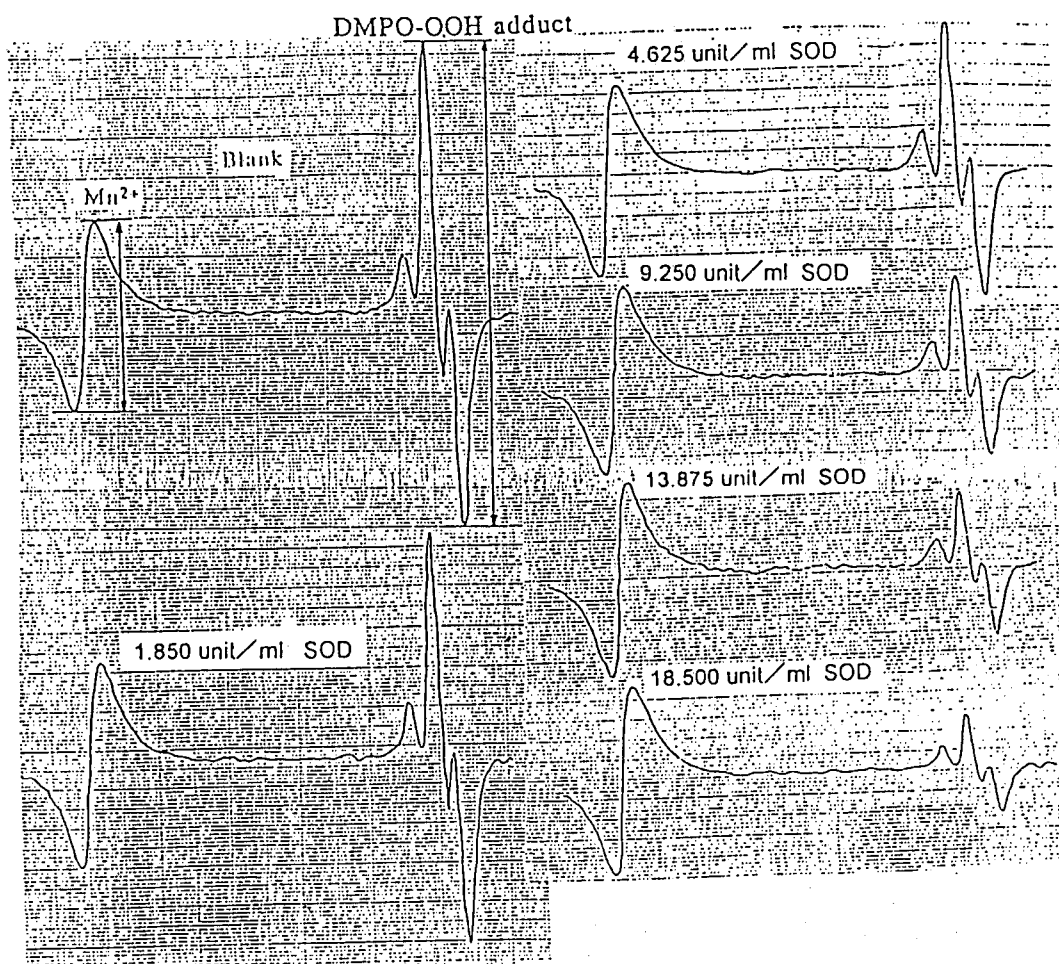


Fig. 2 The ESR spectra of DMPO-OOH and the inhibition effect of SOD on ESR signals of superoxide radical.

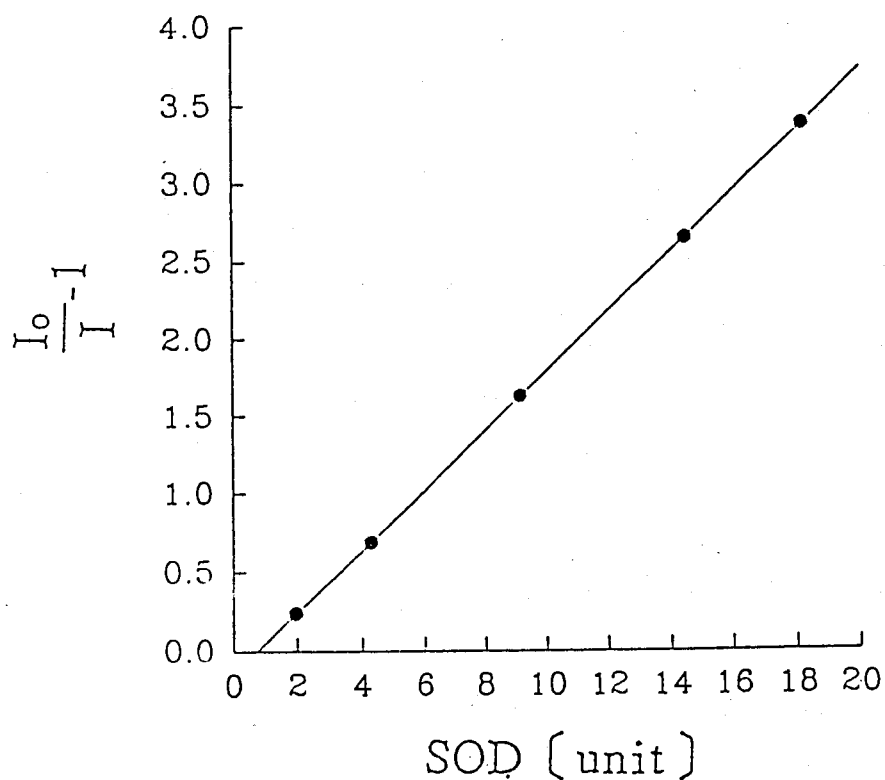


Fig. 3. The relationship between [SOD] and $\frac{I_0}{I} - 1$

Calibration curve : $Y=0.193756X-0.145256$ $R=0.998457$

I indicates the averaged relative peak height in various concentration of SOD.

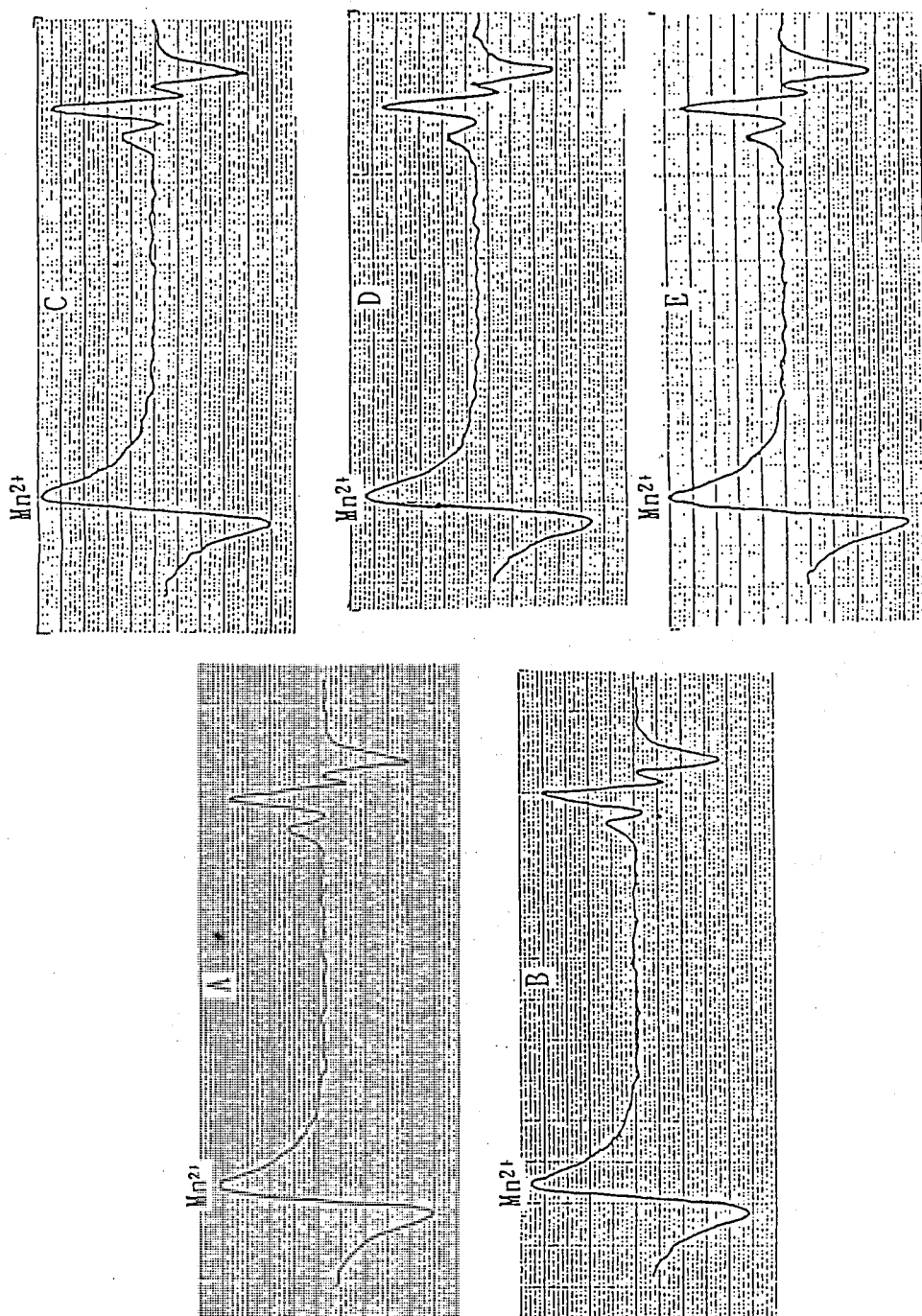


Fig. 4. Inhibitory effect of *M. repandus* (stem) on ESR signals of superoxide radical (DPP0-00II) peak. (A) n-hexane fr. (B) CCl_4 fr. (C) EtOAc fr.

(D) n-BuOH fr. (E) aqueous fr.

Mn^{2+} : manganese oxide signal as a standard

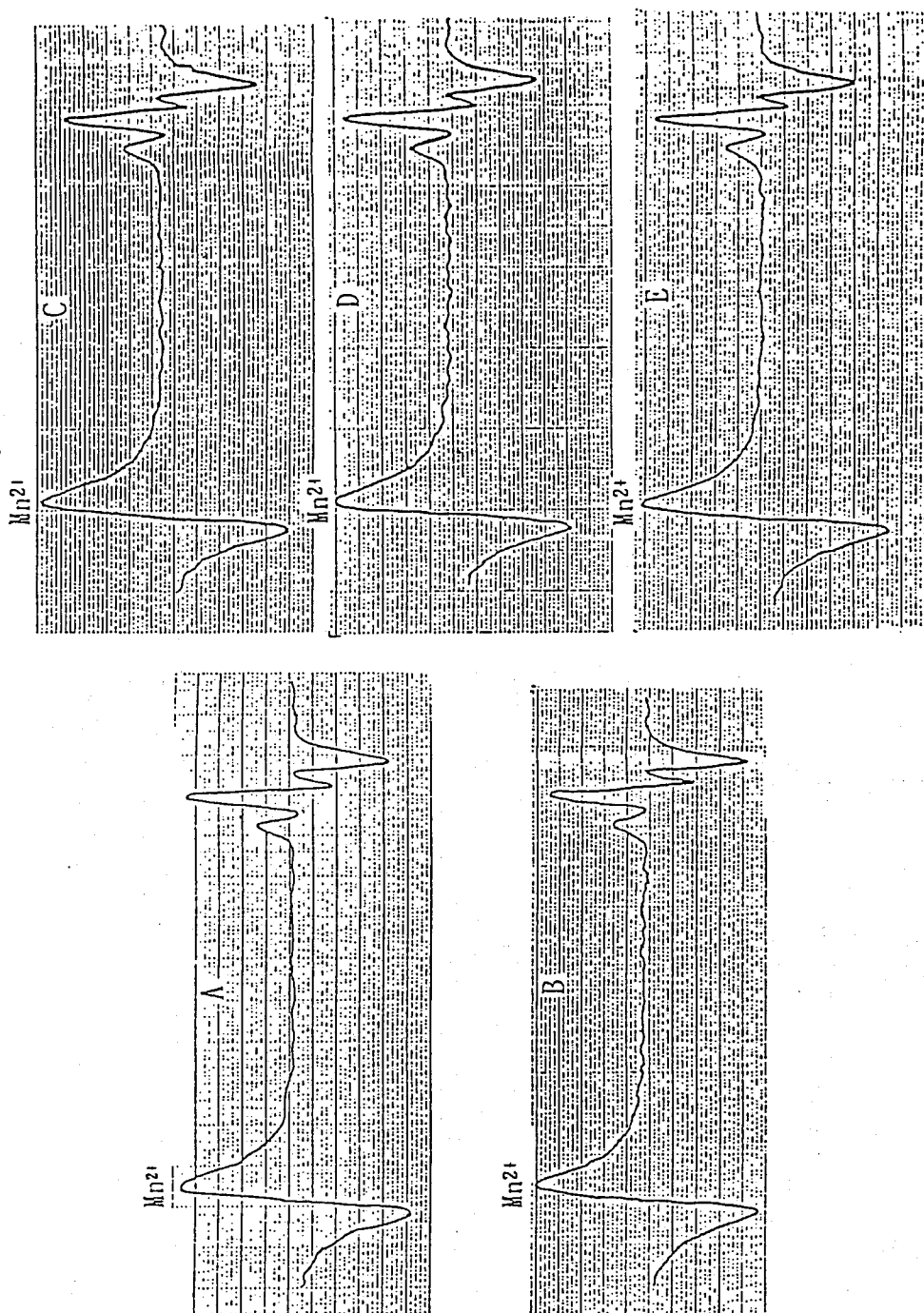


Fig. 5. Inhibitory effect of *M. repandus* (root) on ESR signals of superoxide radical (DMPO-OOH) peak. (A) n-hexane fr. (B) CHCl_3 fr. (C) EtOH fr. (D) n-BuOH fr. (E) aqueous fr. Mn^{2+} : manganese oxide signal as a standard

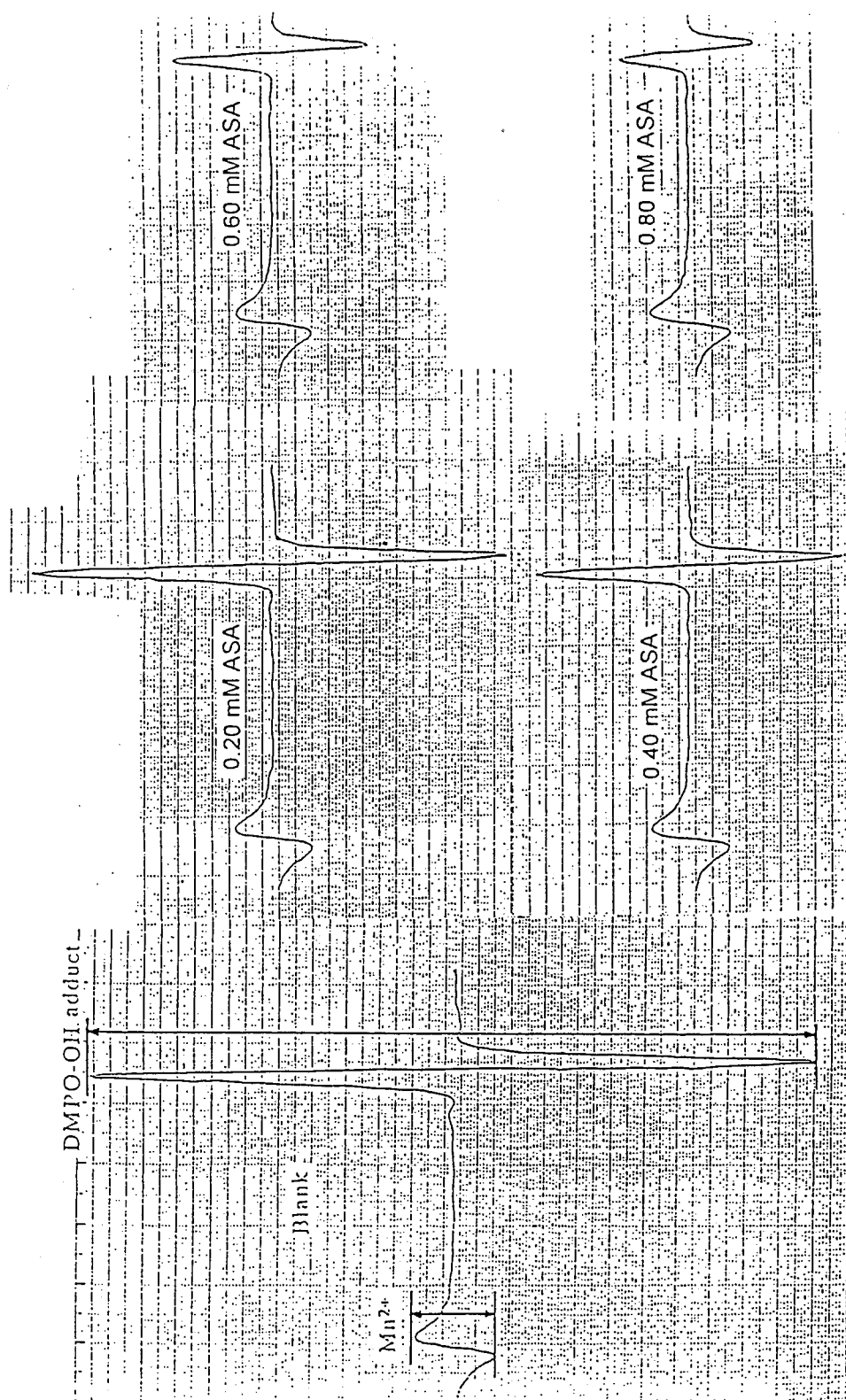


Fig. 7 The ESR spectra of DMPO-OH and the inhibition effect of ascorbic acid on ESR signals of hydroxyl radical.

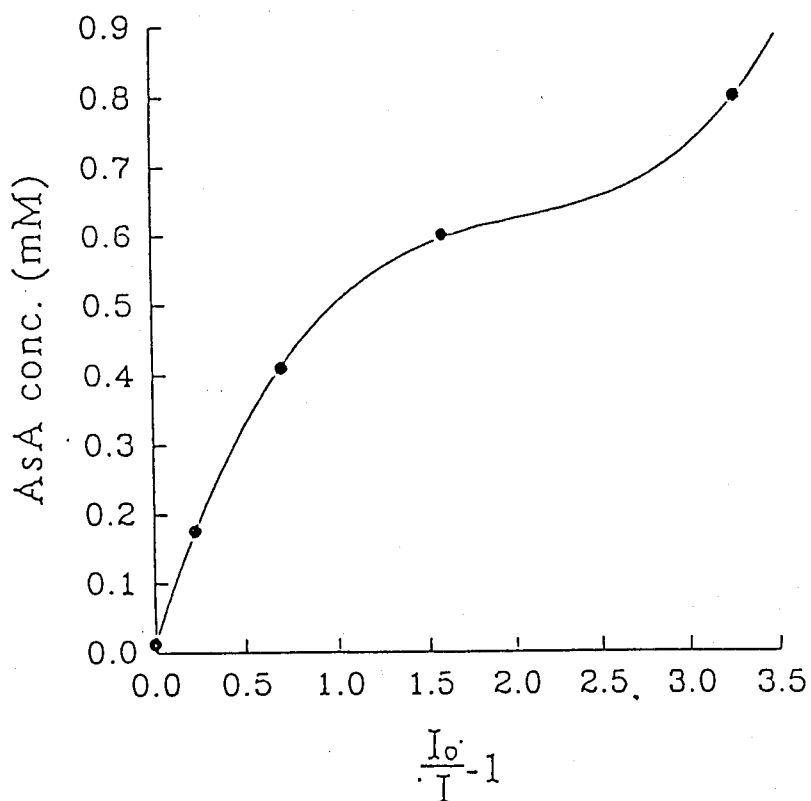


Fig. 8. The relationship between [AsA] and $\frac{I_0}{I} - 1$

$$Y = 0.05962X^3 - 0.36267X^2 + 0.79380X + 0.01279$$

I indicates the averaged relative peak height in various concentration of Ascorbic acid (AsA)

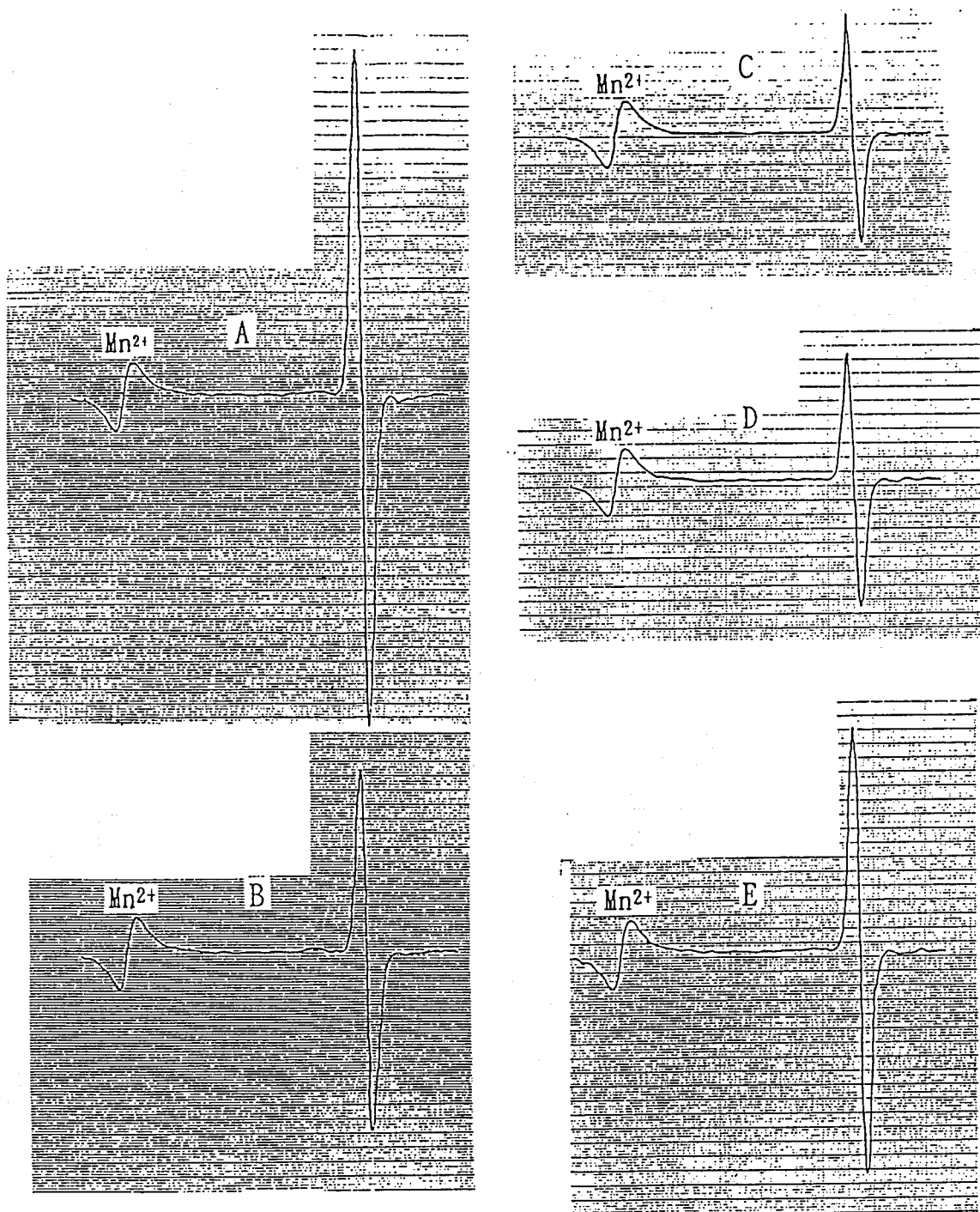


Fig. 9. Inhibitory effect of *M. repandus* (stem) on ESR signals of hydroxyl radical (DMPO-OH) peak. (A)n-hexane fr. (B) CHCl_3 fr. (C)EtoAc fr. (D)n-BuOH fr. (E)aqueous fr.
 Mn^{2+} : manganese oxide signal as a standard

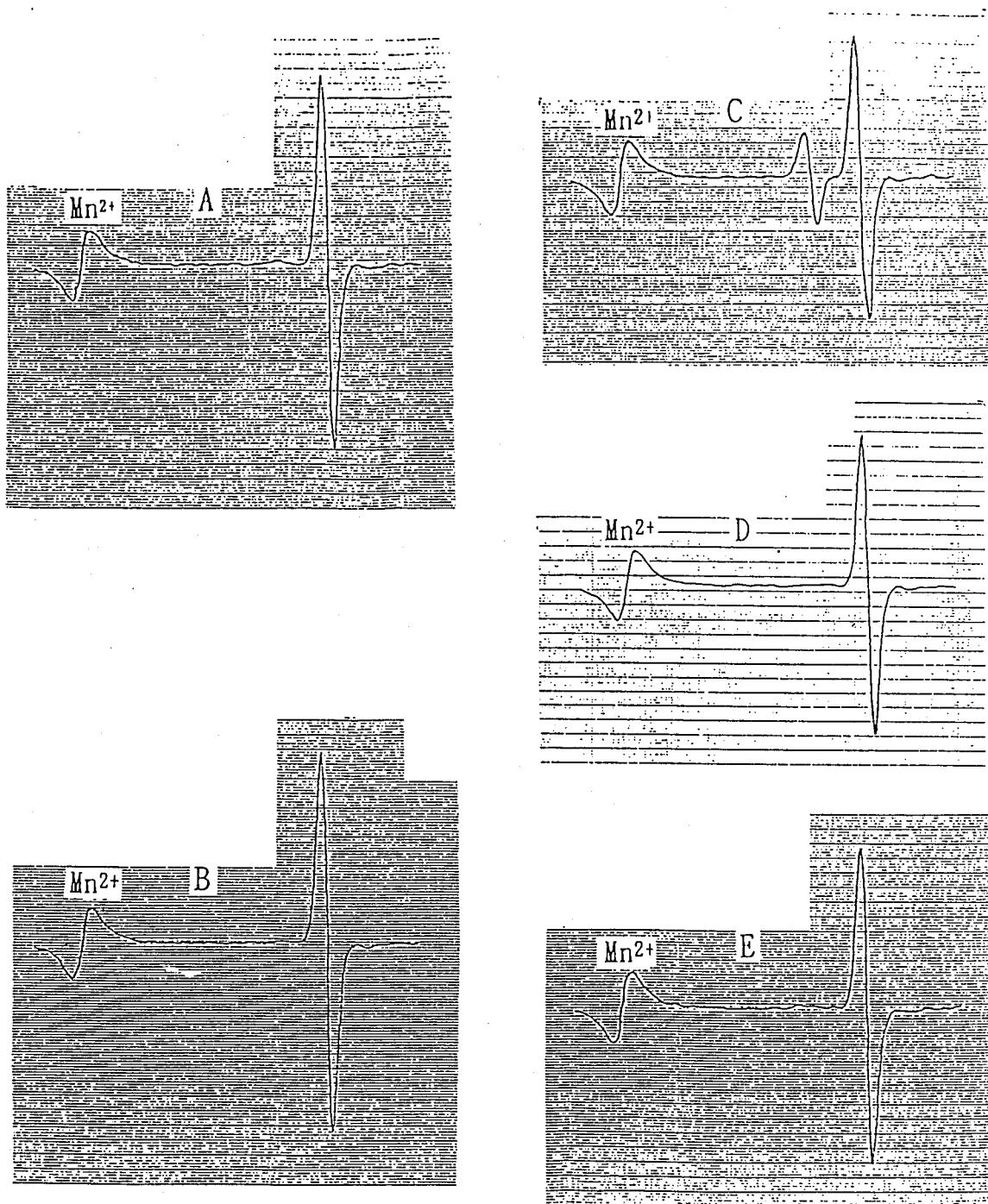


Fig. 10. Inhibitory effect of *M. repandus* (root) on ESR signals of hydroxyl radical (DMPO-OH) peak. (A)n-hexane fr. (B) CHCl_3 fr. (C)EtoAc fr. (D)n-BuOH fr. (E)aqueous fr.
 Mn^{2+} : manganese oxide signal as a standard

第二篇 台灣市售三種靈芝 *Ganoderma lucidum*、*G. neo-japonicum* 及 *G. formosanum* 之保肝及自由基清除作用評估

前言

靈芝為台灣民間常用之珍貴生藥，近來亦被陸續開發為保健飲料，而增加其使用頻率。根據文獻記載，靈芝被用來治療失眠、食慾不振、肝炎、精神衰弱、慢性支氣管炎及癌症。此外有報導指出，靈芝之藥理活性與其品種及栽培環境有關，為了確證及評估其藥效，作者擬將台灣常用市售三種靈芝 (*G. lucidum*, *G. neo-japonicum* Imazeki 及 *G. formosanum* Chang et Chen) 以四氯化碳 (CCl_4) 誘發急性肝毒性之動物實驗模式，來評估其保肝作用，接著以TBA法來測試生藥之抗脂質過氧化作用，以初步評估其抗氧化作用，然後再以電子自旋共振 (ESR) 及電子捕捉技術來瞭解上述生藥之抗氧化活性 (superoxide 及 hydroxyl radical 清除活性)，以提供作為國人用藥之參考。

第一章 台灣市售三種靈芝 *Ganoderma lucidum*、*G. neo-japonicum* 及 *G. formosanum* 之保肝及自由基清除作用評估

摘要

本研究主要探討台灣市場最常見到的三種靈芝 *Ganoderma lucidum*, *G. formosanum* 及 *G. neo-japonicum* 之保肝及自由基清除作用。給予 *G. lucidum*, *G. formosanum* 或 *G. neo-japonicum* 之水抽出物，能夠有效地抑制因為投予 CCl_4 所導致之 GOT、GPT 及 LDH 值上升現象。自由基清除活性則利用電子自旋共振技術 (Electron spin resonance, ESR) 及電子捕捉技術 (Spin-trapping) 來評估生藥水抽出物對 spin adduct (DMP-OOH 及 DMPO-OH) 之相對信號強度的抑制情形。結果顯示 *G. formosanum* 具最佳之保肝活性及自由基清除活性。

第一節 緒言

多孔菌科(Polyporaceae)靈芝屬*Ganoderma lucidum* (Leyss, exFr.) Karst.之子實體，稱作靈芝，自古以來即為我國民間常用之珍貴藥材，被用作鎮靜劑、強壯劑。一般被用來治療神經衰弱、食慾不振、失眠、高血壓、肝疾患、支氣管炎及癌症⁽¹⁻²⁾。曾有報導指出，靈芝的藥理作用及區分主要在於所使用之種類(strain)及栽培之環境⁽³⁾。

活性氧(Reactive oxygen species, ROS)，例如 superoxide radical ($O_2 \cdot$) 及 hydroxyl radical ($\cdot OH$) 在因投予 ethanol, carrageenan 或 carbon tetrachloride 所導致之炎症反應過程中，扮演相當重要的角色⁽⁴⁻⁷⁾。活性氧會攻擊細胞膜上之不飽和脂肪酸，產生過氧化脂質，這些都是許多臨床疾病的重要病理機轉⁽⁸⁻¹⁰⁾。

在先前之研究曾探討 *G. lucidum* 對於 CCl_4 所誘發之 GOT、GPT 值急速上升現象，具有意義的抑制作用⁽¹¹⁾。然而台灣市面有相當多種類的靈芝普遍地被使用，其中最常見的是 *G. lucidum*，*G. formosanum* 或 *G. neo-japonicum* 之子實體，本研究主要探討比較上述三種常用靈芝之保肝活性。此外，為了解明生藥保肝活性與抗氧化活性的關係，作者以 ESR (electron spin resonance) 及 spin-trapping 技術來評估上述三種靈芝的活性氧清除作用，並以 TBA 法來觀測三種靈芝的脂質過氧化抑制作用。

第二節 實驗材料及方法

一、三種靈芝水抽出物之製備

取 *G. lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst, *G. neo-japonicum* Imazeki 及 *G. formosanum* Chang et Chen 之子實體各 100 公克細切後，以 1 公升之沸水煎煮 1 小時，重覆三次，收集濾液後，濃縮、冷凍乾燥。產率分別為 4.41%，4.03% 及 4.55%。在進行動物實驗前，三種靈芝之水抽出物以 0.9% NaCl 溶液溶解。分成三種劑量 (10, 30, 100 mg/kg body weight)，腹腔給藥。

在 ESR 測試時，取三種靈芝之水抽出物各 10 mg，於 40°C 下溶於 10 ml 0.1 M PBS (phosphate buffer saline) (pH= 7.8) 備用，稀釋時，採用純水。

二、實驗方法

1. CCl_4 誘發肝毒性測試

(1) 化學試劑

全部採用由E. Merck (Darmstadt, F.R.G.), Sigma Chemical Co. (U.S.A.)及Kojima Chemical Co., LTD. (Japan)之分析級試藥

(2) 實驗動物

採用由成功大學動物中心所購得的Wistar系雄性大白鼠，所有的動物均飼養在具有空調的房間，溫度維持在 $22 \pm 3^\circ\text{C}$ ，相對濕度為 $60 \pm 10\%$ ，並且於半日照的環境下，餵以台糖公司所出品之小雞飼料，任其自由飲水和進食。將體重控制在 $180 \sim 230 \text{ gm}$ ，用來進行 CCl_4 所誘發的肝細胞毒性試驗。

(3) 實驗流程

將實驗動物分成控制組、溶媒組、四氯化碳組及各種藥物組。控制組給予生理食鹽水(以腹腔注射投予)；溶媒組僅給予橄欖油(背部皮下注射投予)；四氯化碳組給予四氯化碳／橄欖油 (1:1 3 ml/kg，背部皮下注射投予)。其餘藥物組則先給予生藥抽出液(1000 mg/kg，腹腔注射投予)，然後再於背部皮下注射四氯化碳／橄欖油，於第24小時，第48小時分別再各追加一次生藥抽出液。

(4) 血清生化學檢驗

於四氯化碳投予後的第72小時，將大白鼠用乙醚麻醉，從其頸動脈採血，再將這些血液以3000 r.p.m.，於 4°C 下離心10分鐘，最後取得血清，依Reitman和Frankel(12)所描述之方法，用Ciba-Corning 550型的Photometer，來測定這些血清轉胺酶的活性。

(5) 肝臟病理切片觀察研究

將上述取血完畢後的大白鼠，進行解剖，取出肝臟，再從每一葉取得一小塊肝，立刻以10%的中性福馬林固定，放置一段時間後，將這些肝組織脫水滲蠟再進行包埋切片。最後於顯微鏡下觀察形態上的變化，如氣球樣變性(ballooning degeneration)，脂肪變性(fatty change)，肝小葉中心壞死現象(centrilobular necrosis)，炎症細胞kupffer cells與lymphocytes增殖性發炎浸潤。

(6) 統計學的分析

本研究中，藥物組與控制組間之分析比較，採Student's或Dunnett's t-test；而比較各藥物組間藥理活性之差異，則採用One-way-analysis of variance (ANOVA)及Newman-Keuls test (N-K test)。

2. Superoxide及hydroxyl radical清除活性測試，抑制脂質過氧化作用方法如前所述，不再重覆。

第三節 結 果

一、CCl₄ 誘發肝毒性測試

大白鼠背部皮下注射CCl₄ (1:1, 3 ml/kg) 72小時後，與正常組比較，血清中GOT、GPT值顯著上升(GOT: 263.58 ± 8.11 , $P < 0.001$, GPT: 84.93 ± 2.29 , $P < 0.001$)，如Table 1所示，在注射CCl₄時，同時給予G. formosanum則能有意義地將GOT值上升情形抑制下來(10 mg/kg: 194.79 ± 22.09 , $P < 0.01$; 30 mg/kg: 193.32 ± 25.78 , $P < 0.01$, 100 mg/kg: 173.08 ± 25.95 , $P < 0.01$)。同樣情形亦發生在投予G. lucidum (30 mg/kg: 198.13 ± 19.32 , $P < 0.01$, 100 mg/kg: 169.52 ± 14.82 , $P < 0.01$)及G. neo-japonicum (100 mg/kg: 210.73 ± 38.51 , $P < 0.01$)。經統計分析比較(ANOVA及N-K test)，可得如下結果：

A組：效果最佳，G. lucidum (100 mg/kg)，G. formosanum (100 mg/kg)。

B組：G. formosanum (10, 30 mg/kg)，G. lucidum (30 mg/kg)，G. neo-japonicum (100 mg/kg)。

C組：G. neo-japonicum (10 mg/kg, 30 mg/kg)。

D組：效果最差，G. lucidum (10 mg/kg)

在降低因CCl₄引起之GPT值上升情形，只有G. lucidum (100 mg/kg: 52.68 ± 6.20 , $P < 0.05$)顯示有意義之差異。

在LDH之值方面，三種靈芝在統計分析上皆與CCl₄組有顯著意義地差異(除了G. lucidum 10 mg/kg之組)(Table 2)。值得注意的是G. formosanum 在降低LDH值方面，顯示了強力的保肝活性，並明顯優於G. lucidum 及G. neo-japonicum。

在肝臟病理切片檢驗上，可明顯看出CCl₄組之肝細胞在中央靜脈周圍

大量壞死(+++), 並且有顯著地炎症細胞浸潤, 氣球樣變性, 與正常組之肝細胞比較, 可看出細胞之正常架構已明顯流失。藥物組其肝細胞壞死情形有改善(+~++), 炎症細胞浸潤現象及氣球樣病變亦有改善(+~++), 與CCl₄組相比較, 其肝細胞維持正常架構的範圍較為廣泛。整體而言, *G. neo-japonicum* 之肝臟細胞保護效果不如 *G. lucidum* 及 *G. formosanum*。

二、抑制過氧化脂質作用評估

如Table 3所示, 對於FeCl₂導致老鼠肝臟均質液過氧化脂質上升的現象, 在投予*G. lucidum* (10 mg/ml), *G. neo-japonicum* (10 mg/ml)及*G. formosanum* (10 mg/ml)之後, 皆可達100%抑制效果, 顯現市售三種靈芝皆具抗氧化作用。

三、Superoxide及hydroxyl radical清除作用評估

圖1及圖2顯示出由HPX-XOD反應體系所產生之spin adduct DMPO-OOH及由ferrous sulfate-hydrogen peroxide反應體系所產生之spin adduct DMPO-OH。如Table 4及5所示, DMPO-OOH之信號強度及DMPO-OH之信號強度, 隨著SOD濃度(0~18.66 unit/ml)及ascorbic acid濃度(0~1 mM)之提高而逐漸降低(圖3及圖4)。同樣的情形亦發生在將*G. lucidum*, *G. neo-japonicum* 及*G. formosanum* 加入這兩種反應體系時(圖1及圖2), 由此可確認O與DMPO, 或者·OH與DMPO之捕捉反應能夠由於上述三種靈芝的加入而受抑制。爲了檢測生藥的superoxide radical清除活性(SOD-like activity)及hydroxyl radical清除活性, 將superoxide及hydroxyl radical的信號強度與內部對照信號(Mn²⁺ in MnO)相除, 便可獲得相對信號強度(relative peak height), 依此便可求得檢量線(Figure 5及Figure 6)。在求得加入各種不同靈芝後的superoxide或hydroxyl radical的信號強度後, 將其代入檢量線, 便可獲得各種不同靈芝的superoxide radical及hydroxyl radical清除活性(Table 6及7)。

G. lucidum, *G. neo-japonicum* 及*G. formosanum* 水抽出物之superoxide radical清除活性(SOD-like activity)分別爲 6.280×10^3 unit/g, 8.521×10^3 unit/g及 1.736×10^4 unit/g。其IC₅₀ (抑制相對信號強度至50%所須之量相當於4.129 unit/ml SOD之活性)爲0.66, 0.48及

24 mg/ml。由於 CCl_4 在體內被代謝成自由基而對細胞產生傷害⁽¹³⁻¹⁵⁾，而*G. formosanum*對 CCl_4 所導致之肝毒性有顯著地防治效果，因此*G. formosanum*所測得之superoxide radical清除活性高於*G. lucidum*及*G. neo-japonicum*的現象，可以推測*G. formosanum*所具備之強力抗氧化作用，能夠對 CCl_4 所造成之生化及病理上的變化提供正面的防治效果。至於hydroxyl radical清除活性，各種靈芝間沒有顯著差異，*G. lucidum*，*G. neo-japonicum*及*G. formosanum*之活性分別為42.90unit/g，46.90 unit/g及44.14 unit/g，其 IC_{50} （抑制相對信號強度達50%所須之量，相當於0.54 mM ascorbic acid之活性）分別為12.66 mg/ml，11.58 mg/ml及12.31 mg/ml。

第四節 討論

研究報告指出， CCl_4 所造成的肝損傷主要是 CCl_4 在肝臟中被cytochrome p 450代謝成自由基衍生物，然後攻擊肝細胞不飽和脂肪酸形成過氧化脂質所引起⁽¹⁶⁾。所以，對 CCl_4 所造成的肝傷害具有保護作用的藥物，是透過下列兩種途徑來改善 CCl_4 所造成之脂質過氧化現象。

(I) 抑制 CCl_4 自由基衍生物的產生⁽¹⁷⁻¹⁸⁾。

(II) 藥物本身具有抗氧化作用⁽¹⁹⁾。

在本研究中，使用台灣市售常用的三種靈芝*G. lucidum*，*G. neo-japonicum*及*G. formosanum*來評估是否對 CCl_4 所引起之肝毒性有改善作用。結果證實給予*G. formosanum* (10、30、100 mg/kg)，*G. lucidum* (30, 100 mg/kg)及*G. neo-japonicum* (100 mg/kg)的水抽出物能有效抑制 CCl_4 所引起之肝傷害，其保護百分率 (protective percentage)依序為48.06、49.22、63.40、45.85、65.89及37.02% (Table 1)。在檢驗LDH值時，可明確看到給予*G. formosanum* (10, 30, 100 mg/kg)的防治效果顯著優於*G. lucidum*及*G. neo-japonicum*。

這些現象可由Table 6,7中所獲得的superoxide及hydroxyl radical清除作用獲得確證。*G. formosanum*具最佳的保肝活性及最強的活性氧清除作用。由此可推測，生藥應該是透過superoxide及hydroxyl radical清除作用的藥理活性來達到預防及改善 CCl_4 所造成之肝損傷。雖然如此，這三種不同靈芝水抽出物的保肝成分或抗氧化成分是否不同，

仍待進一步之分離研究，如此一來，將來才能真正在臨床上使用。

參考文獻

1. Chiang Su New Medical College, Dictionary of Chinese Crude Drug, Shanghai Scientific Technological Publishers, Shanghai, pp. 16, 1979.
2. Hsu, H.Y. Oriental Materia Medica. Oriental healing arts institute, Long Beach, U.S.A., pp. 640-641, 1986.
3. Nishitob, T., H. Sato, S. Shirasu and S. Sakamura. Evidence on the strain-specific terpenoid pattern of *Ganoderma lucidum*. Agricultural and Biological Chemistry 50, 2151-2154, 1986.
4. Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. Lancet 1396-1397, 1984.
5. Yoshikawa, T., H. Tanaka and M. Kondo, Effect of vitamin E on adjuvant arthritis in rats. Biochem. Med. 29, 227-234, 1983.
6. Yoshikawa, T., H. Tanaka, N. Yoshida, O. Seto, N. Sugino and M. Kondo, Adjuvant arthritis and lipid peroxide protection by superoxide dismutase. Lipid peroxide Research 7, 108-110, 1983.
7. Yuda, Y., J. Tanaka, F. Hirano, K. Igarashi and T. Satch. Participation of lipid peroxidation in rat pretussis vaccine pleurisy. Chem. Pharm. Bull. 39(2), 505-506, 1991.
8. Cross, C.E., B. Halliwell, E.T., Borish, W.A. Pryor, B.N. Ames. R.L. Saul and J.M. McCord. Oxygen radicals and human disease. Ann. Int. Med. 107, 526-545, 1987.
9. Reilly, P.M., H.J. Schiller and G.B. Bulkley. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and

- other reactive oxygen metabolites. Am. J. Surg. 161, 448-502, 1991.
10. Singal, P.K., A. Petkau, J.M. Gerrard, S. Hrushovetz and J. Foerster. Free radicals in health and disease. Molecular and Cellular Biochemistry 84, 121-122, 1988.
 11. Jer-Min Lin, Chun-Ching Lin, Hui-Fen Chiu, Jengq-Jer Yang and Shing-Ginn Lee Evaluation of the Anti-inflammatory and Liver- protective Effects of Anoectochilus formosanus, Ganoderma lucidum and Gynostemma pentaphyllum in Rats. Am. J. Chin. Med., 21(1), 59-69, 1993.
 12. Reiman, S. and S. Frankel A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. Am. J. Clin. Path., 28: 56-63, 1957.
 13. Hruszkewycz, A.M., E.A. Glede and R.O. Recknagel. Destruction of microsomal cytochrome p-450 and glucose-6-phosphatase by lipids ectracted from peroxidized microsomes. Toxicol. App. Pharm. 46, 695-702, 1978.
 14. Noguchi, T., K.L. Fong, E.K. Lai, L. Olson and P.B. McCay. Selective eraly loss of ploypeptides in liver microsomes of CC14- treated rats. Biochem. Pharm. 31, 609-614, 1982.
 15. Recknagal, R.O. A new direction in the study of carbon tetrachloride hepatotoxicity. Life Sciences 33, 401-408, 1983.
 16. Recknagal, R.O., E.A. Glende, G., Ugazio, R.R. Koch and S. Serinivasan. New data in support of the lipid peroxidation theory of carbon tetrachloride liver injury. Israeli Journal of Medical Sciences 10, 301-307, 1974.
 17. Castro, J.A., G.C. de Ferreyra, C.R. de Castro, H. Sasame, O.M. de Fenos and J.R. Gillette. Prevention of carbon tetrachloride- induced necrosis by inhibitors of drug metabolism. Further studies on the metabolism of their

action Biochem Pharm. 23,295-302,1974.

18. Maling, H.M., F.M. Eichelbaum, W. Saul, I.G. Sipes, G.A.B. Brown and J.R. Gillette. Nature of the protection against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity produced by pretreatment with dibenamine N-chloroethyldipenzylamine. Biochem. Pharm. 23, 1479-1491, 1974.
19. Yasuda, H., N. Izugami, O. Shimadar, Y. Koba and M. Nakanishi. The protective effect of tinoridine against carbon tetrachloride hepatotoxicity. Toxicol. Appl. Pharm. 52, 407-413, 1980.

Table 1. The hepatic protective effects of crude drugs extracts on the CCl₄-induced GOT
、 GPT level increase.

Group	Dose (mg/kg)	GOT	GPT	% of protection
Normal	—	120.83 ± 4.02	44.18 ± 2.45	—
CCl ₄	—	263.58 ± 8.11*	84.93 ± 2.29*	—
C.L.	10	253.05 ± 16.26	77.07 ± 8.47	7.38
	30	198.13 ± 19.32 ^a	64.37 ± 5.32	45.85
	100	169.52 ± 14.82 ^a	52.86 ± 6.20 ^b	65.89
G.N.	10	228.73 ± 40.80	77.15 ± 20.47	24.41
	30	222.53 ± 18.63	69.07 ± 26.48	28.76
	100	210.73 ± 38.51 ^a	81.68 ± 19.47	37.02
G.F.	10	194.79 ± 22.09 ^a	74.08 ± 14.00	48.06
	30	193.32 ± 25.78 ^a	80.35 ± 15.62	49.22
	100	173.08 ± 25.95 ^a	64.68 ± 9.82	63.40

Significantly different from normal. * $p < 0.001$, Student's t -test.

Significantly different from CCl₄-control group.

^a $p < 0.01$, ^b $p < 0.05$, Dunnett's t -test.

C.L.: *Ganoderma lucidum*, G.N.: *G. neo-japonicum*, G.F.: *G. formosanum*

$$\% \text{ of protection: } P = \frac{(C-120.83) - (T-120.83)}{(C-120.83)} \times 100\%$$

C: The GOT value of CCl₄-controlled group

T: The GOT value of drug-treated group

Table 2. Serum total protein content (T.P.), albumin concentration (A.) and lactic dehydrogenase (LDH) activity in rats after treatment with crude drugs and CCl₄.

Group	Dose (mg/kg)	T.P.	A.	LDH
CCl ₄	—	5.37±0.05	3.30±0.00	552.83± 57.58
G.L.	10	5.27±0.08	3.32±0.04	484.67± 70.13
	30	5.58±0.12	3.42±0.04	464.33± 22.40 ^b
	100	5.45±0.05	3.30±0.11	310.17± 100.41 ^a
G.N.	10	5.65±0.05	3.52±0.08	298.50± 31.19 ^a
	30	5.60±0.13	3.38±0.13	297.17± 31.68 ^a
	100	5.62±0.13	3.33±0.05	207.50± 39.91 ^a
G.F.	10	5.63±0.15	3.45±0.05	178.00± 36.78 ^a
	30	5.57±0.12	3.30±0.12	170.17± 23.47 ^a
	100	5.42±0.04	3.33±0.08	153.67± 20.85 ^a

Significantly different from CCl₄-control group.

^a*p* < 0.01, ^b*p* < 0.05, Dunnett's *t*-test.

G.L.: *Ganoderma lucidum*, G.N.: *G. neo-japonicum*, G.F.: *G. formosanum*

Table 3. Inhibitory effect of *G. lucidum*, *G. neo-japonicum* and *G. formosanum* on FeCl₂-induced lipid peroxidation in a rat liver homogenate in vitro

Drug	Concentration (mg/ml)	% Inhibition
<i>G. lucidum</i>	1	36
	3	39
	10	102
<i>G. neo-japonicum</i>	1	42
	3	99
	10	106
<i>G. formosanum</i>	1	N.D.
	3	89
	10	106

The absorbance of reaction solution at 532 nm was measured and compared

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Tabs} - \text{Dabs}}{\text{Tabs} - \text{Babs}} \times 100\%$$

Tabs: FeCl₂-treated control 之吸光度

Babs: normal control 之吸光度

Dabs: drug-treated group 之吸光度

Table 4. ESR signal activity of Mn^{2+} and superoxide radical in various concentrations of SOD

SOD (unit/ml)	ESR Signal Peak Height		Averaged Relative Peak Height
	Mn^{2+}	Radical	
0.000	95.400	228.400	2.394
1.866	95.000	154.000	1.621
4.665	94.000	105.800	1.126
9.330	93.600	68.600	0.778
13.955	93.800	53.400	0.569
18.660	93.600	45.600	0.487

[Regression Coefficient] $\frac{I_0}{I} - 1 = 0.208123 \times [SOD] + 0.140562$

[Correlation Coefficient] 0.997632

I indicates the relative peak height when various concentration of SOD was added.

Calibration curve: $Y = 0.208123X + 0.140562$, where $Y = \frac{I_0}{I} - 1$, $X = [SOD]$

Table 5. ESR signal activity of Mn^{2+} and hydroxyl radical at various concentrations of Ascorbic acid.

Ascorbic acid (mM)	ESR Signal Peak Height		Averaged Relative Peak Height
	Mn^{2+}	Radical	
0.000	50.000	607.400	12.148
0.200	49.200	532.200	10.817
0.400	49.600	410.000	8.266
0.600	49.600	272.800	5.500
0.800	50.200	162.200	3.231
1.000	50.800	84.200	1.657

Table 6. SOD-like (Superoxide anion radical scavenger) Activity Assay

Sample	Conc. g/ml	Signal Peak Height		^a SOD Activity	SOD-like activity unit/g	IC ₅₀ mg/ml
		Mn ²⁺	Radical			
<i>G. lucidum</i>	1.344 × 10 ⁻³	95.600	79.000	8.440	6.280 × 10 ³	0.66
<i>G. neo-japonicum</i>	1.270 × 10 ⁻³	95.800	67.600	10.822	8.521 × 10 ³	0.48
<i>G. formosanum</i>	6.599 × 10 ⁻⁴	93.600	64.800	11.455	1.736 × 10 ⁴	0.24

^aCalibration curve: $Y = 0.208123X + 0.140562$,

where $Y = [-\frac{I_0}{I} - 1]$, $X = [\text{SOD}(\text{unit/ml})]$

I_0 : 2.394 (from Table 4, without SOD or crude drug)

I : the averaged relative peak height at various concentrations of extracts.

Table 7. Hydroxyl radical scavenger activity assay

Sample	Conc. g/ml	Signal Peak Height		Ascorbic acid conc. (mM)	^a Hydroxyl radical scavenger activity (unit/g)	IC ₅₀ mg/ml
		Mn ²⁺	Radical			
<i>G. lucidum</i>	1.57 × 10 ⁻²	49.80	217.20	0.67	42.90	12.66
<i>G. neo-japonicum</i>	1.57 × 10 ⁻²	50.00	186.00	0.74	46.90	11.58
<i>G. formosanum</i>	1.38 × 10 ⁻²	50.80	269.40	0.61	44.14	12.31

^aReaction System: 1mM FeSO₄ 37.5 μl, 5.5mM DETAPAC 37.5 μl, 0.092M

DMPO 20 μl, 1mM H₂O₂ 75 μl and test solution 50 μl

1 unit means the hydroxyl radical scavenger activity by 1 mM ascorbic acid in this reaction system.

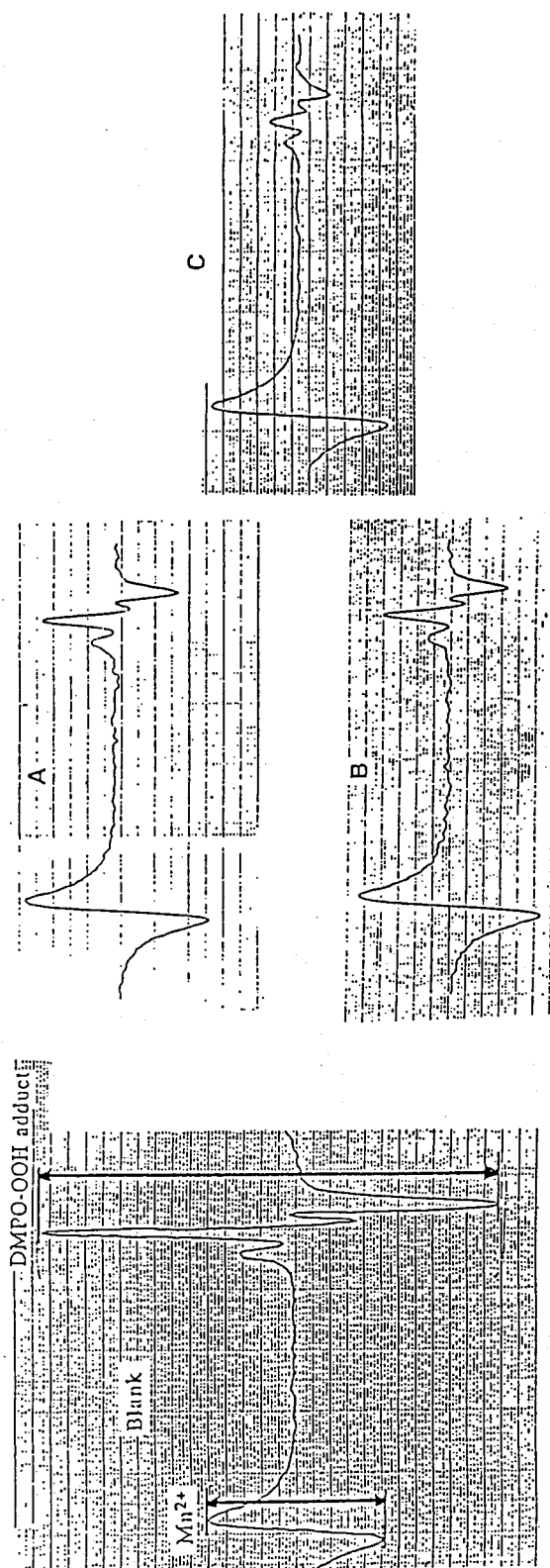


Fig.1. ESR signals of the standard manganese oxide (Mn^{2+}) and super oxide radical (DMPO-OOH) peak without SOD and inhibitory effect of crude drug on ESR signals of the superoxide radical. (A) *G. lucidum* (B) *G. neo-japonicum* (C) *G. formosanum*.

Mn^{2+} : manganese oxide signal as a standard.

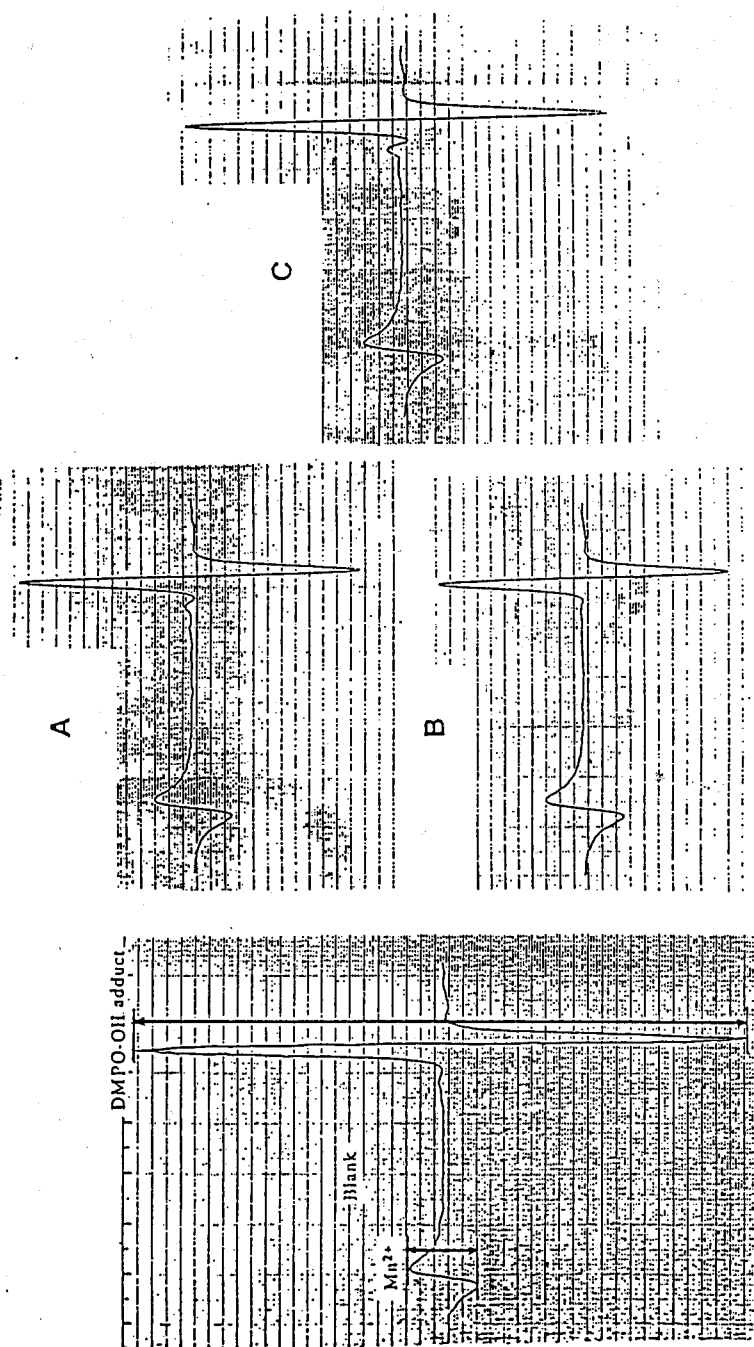


Fig.2. ESR signals of the standard manganese oxide (Mn^{2+} and hydroxyl radical (DMPO-OH) peak without ascorbic acid and inhibitory effect of crude drug on ESR signals of the hydroxyl radical. (A) *G. lucidum* (B) *G. neo-japonicum* (C) *G. formosanum*.

Mn^{2+} : manganese oxide signal as a standard.

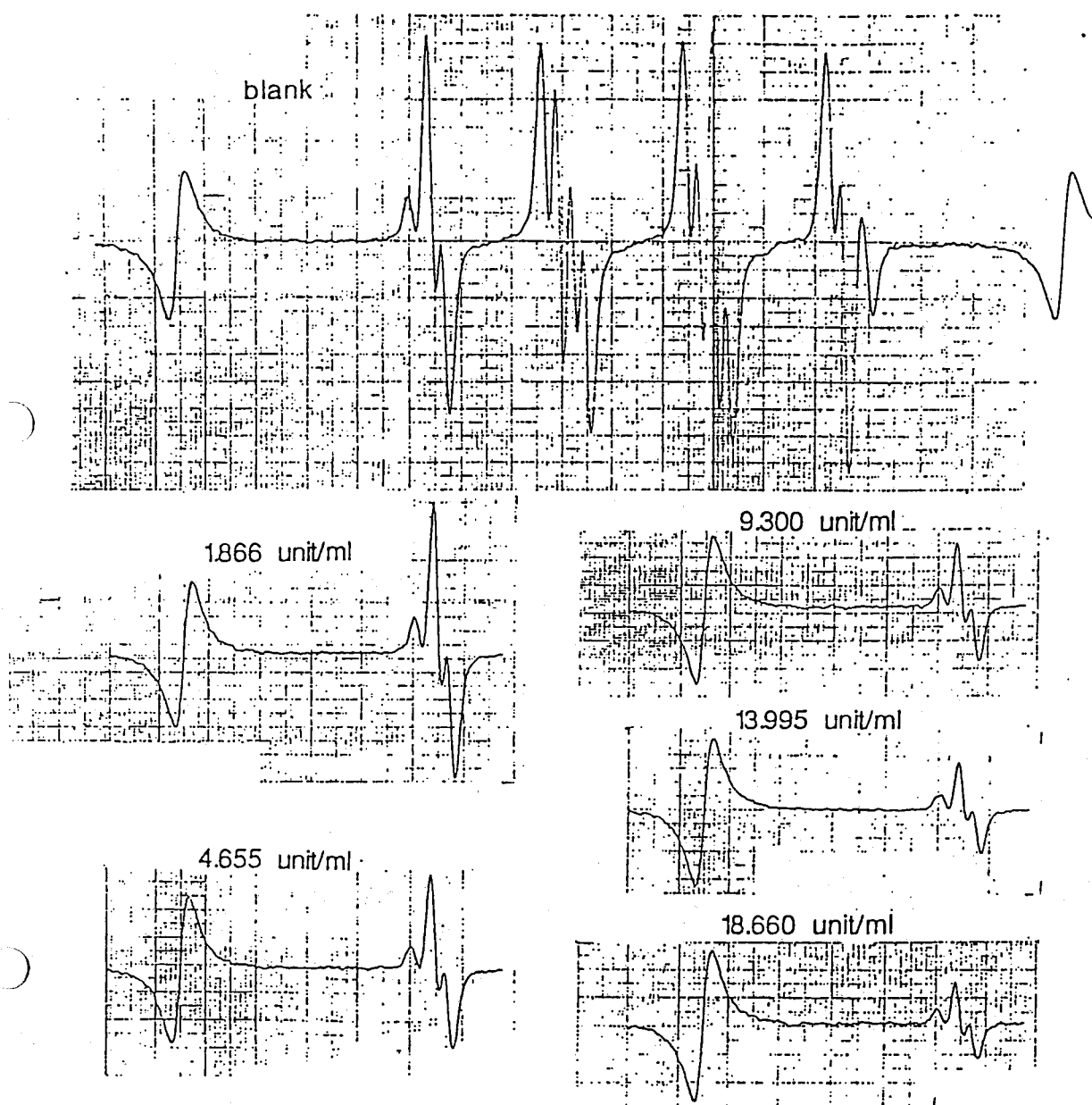


Fig. 3 The ESR spectra of DMPO-OOH and the inhibition effect of SOD on ESR signals of superoxide radicals.

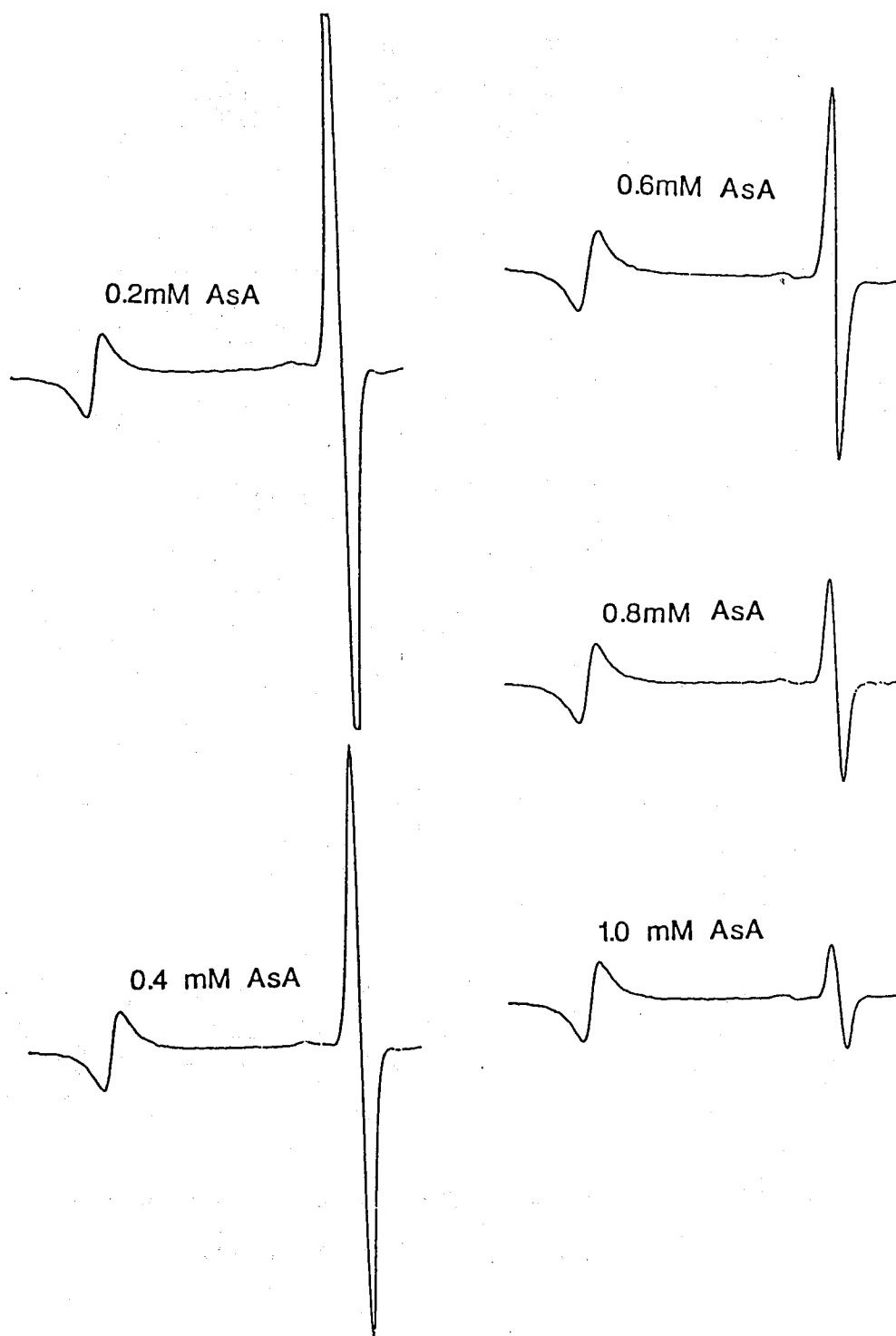


Fig 4 The ESR spectra of DMPO-OH and the inhibition effect of ascorbic acid on ESR signals of hydroxyl radical.

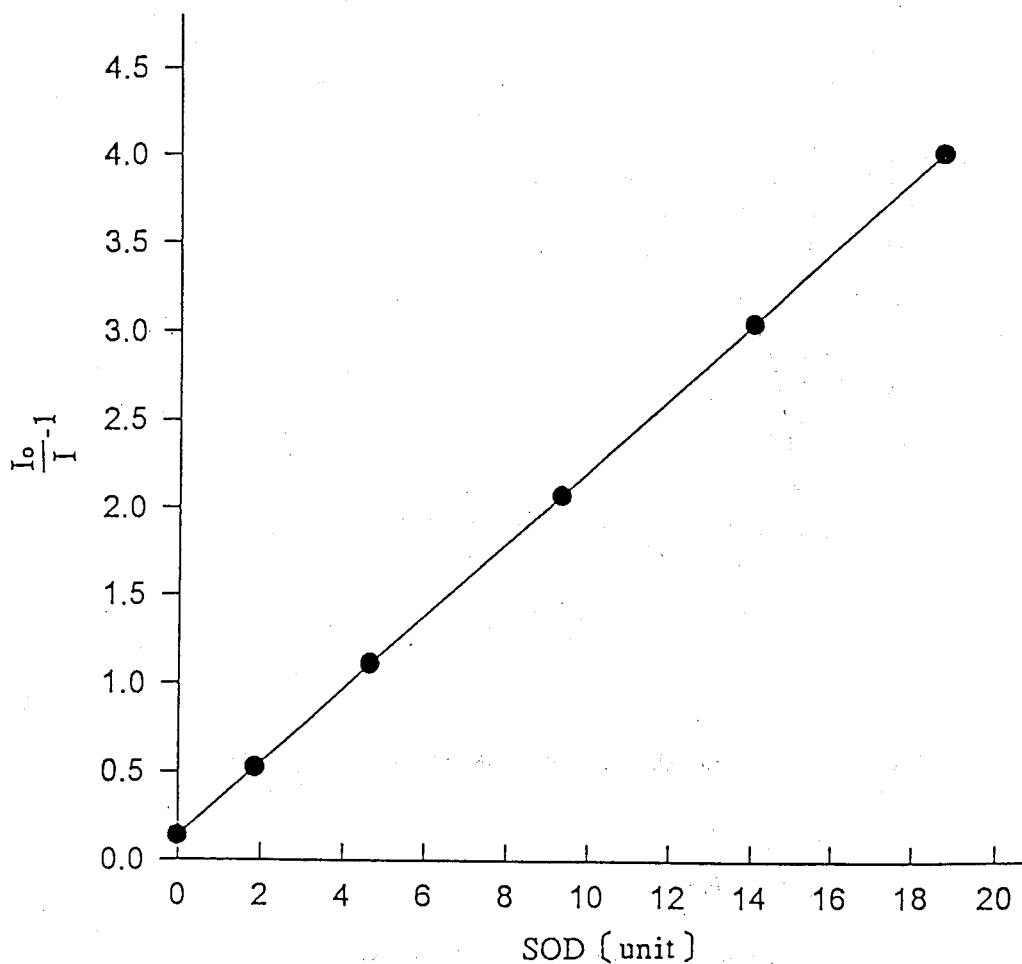


Fig. 5 The relationship between [SOD] and $\frac{I_0}{I} - 1$

Calibration curve: $Y = 0.208123X + 0.140526$

Where $Y = \frac{I_0}{I} - 1$, $X = [\text{SOD}]$

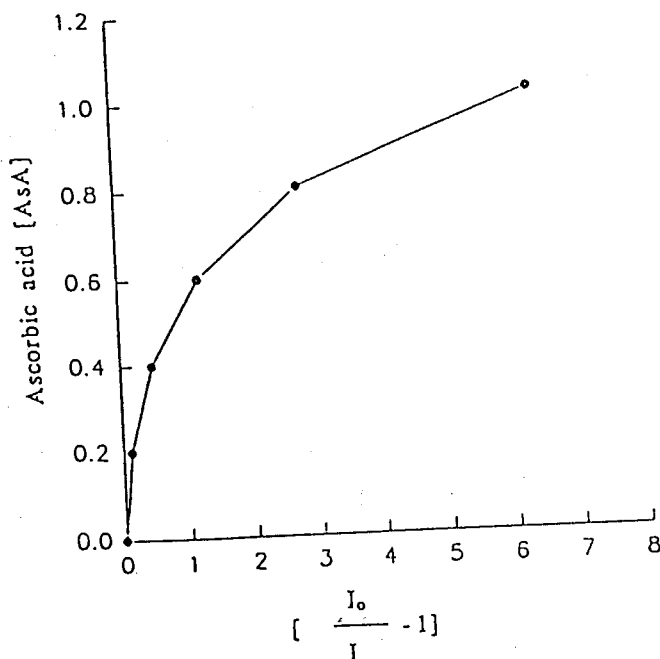


Fig. 6. The relationship between [AsA] and $[\frac{I_0}{I} - 1]$

Calibration

$$Y = AX + B \quad X = \frac{I_0}{I} - 1, \quad Y = [\text{AsA}]$$

When (1) $0 < X < 0.123$

$$A = 1.62601$$

$$B = 0.00000$$

(3) $0.47 < X < 1.20$

$$A = 0.27063$$

$$B = 0.27280$$

(5) $2.76 < X < 6.33$

$$A = 0.05600$$

$$B = 0.64542$$

(2) $0.123 < X < 0.4$

$$A = 0.57636$$

$$B = 0.12910$$

(4) $1.209 < X < 2.7$

$$A = 0.12894$$

$$B = 0.44410$$

I indicates the averaged relative peak height in various concentration of Ascorbic acid [AsA]

總 結 論

本研究計畫一系列探討評估台灣市售各種“桶鉤藤”之藥理活性(包括抑制脂質過氧化、活性氧清除作用)。據先前之生藥學研究，作者建議以大戟科植物扛香藤 *Mallotus repandus* (Willd.) Muell.-Arg. 的莖、根部作為“桶鉤藤”較為適切，接著再進一步探討其各分餾成分之藥理活性。此外，本研究計畫亦將台灣常用三種市售靈芝之保肝及抗氧化活性作比較，經一系列研究後，獲得下列各項結論：

(1)首度以抗氧化觀點來解析生藥之抗炎及保肝藥理作用機轉。經由TBA法評估市售各種“桶鉤藤”水抽出物對 FeCl_2 誘發大白鼠肝臟均質液(homogenate)脂質過氧化的抑制情形。結果顯示，在1, 3, 10mg/ml的濃度下，各種“桶鉤藤”皆顯著地抑制過氧化脂質之形成，初步證明各種“桶鉤藤”的抗氧化能力與其抗炎、保肝作用之關係。

(2)首次應用電子自旋共振(electron spin resonance, ESR)及電子捕捉(spin-trapping)技術，來評估市售各種“桶鉤藤”是否具直接捕捉清除活性氧(包括superoxide及hydroxyl radical)之能力。結果證實市售“桶鉤藤”對HPX-XOD反應體系產生之superoxide及Fenton反應體系所產生之hydroxyl radical確具顯著清除活性，證明市售各種“桶鉤藤”具有抗氧化能力，這點與其抗炎及保肝藥理活性互相獲得印證。

由結論1及2，可推論生藥所具有之抗氧化能力(抑制脂質過氧化及清除活性氧能力)應該在其抗炎及保肝作用機轉中扮演重要角色。本研究所建立之以ESR spin-trapping技術來評估生藥之抗氧化活性，其方法簡易、快速，實用，不但可直接測得對superoxide及hydroxyl radical之清除活性，使得結果更精確，可信度大大提高，而且再現活性亦高，在評估生藥之抗氧化性方面，有著極高之價值性。

(3)市售各種“桶鉤藤”中，*U. hirsuta*及*U. rhynchophylla*在傳統生藥中，是以“鉤藤”之生藥名被使用來作為鎮靜、鎮痙及治療心臟血管疾患的藥物。本研究證實*U. hirsuta*及*U. rhynchophylla*具有直接清除活性氧的抗氧化能力，這也是首次以抗氧化觀點來探討*U. hirsuta*及*U. rhynchophylla*對心臟血管的作用機轉。由於活性氧在心臟血管疾患病理機轉中佔重要角色，本研究成果正可為*U. hirsuta*及*U. rhynchophylla*在中國傳統醫療中被使用來治療心臟血管疾患的理由，提供了直接的科學證據。

(4)據先前之生藥學調查研究結果，建議應以大戟科植物扛香藤*M.*

repandus 作為“桶鉤藤”較為適切，為進一步解明扛香藤之主要活性成分，本研究以ESR spin-trapping技術測試扛香藤各有機溶媒分餾成分之抗氧化活性。結果顯示，除了M. repandus根部EtOAc fraction未測出hydroxyl radical清除活性外，其餘各 fraction皆具顯著的活性氧清除活性。而基本上，莖部與根部各分餾成分之活性差異不大，這點與M. repandus 莖及根部水粗抽出物之抗氧化活性差異不大的結果吻合。然而M. repandus 莖及根部之EtOAc fraction活性差異則相當明顯，這點值得進一步探討。

(5)首次評估台灣市售三種靈芝G. lucidum、G. formosanus及G. neo-japonicum 之保肝、抗脂質過氧化及自由基清除作用。結果顯示G. formosanus 保肝作用最佳，能有效降低因CCl₄所造成之GOT、GPT值急速上升。尤其在降低LDH值方面，G. formosanus 顯示了強力保肝活性，明顯優於G. lucidum 及G. neo-japonicum。在肝臟病理切片檢驗上，亦獲致相同結論，基本上G. neo-japonicum之肝臟細胞保護效果不如G. lucidum 及G. formosanus。

對於FeCl₂導致老鼠肝臟均質液過氧化脂質上升現象，給予上述三種靈芝(10 mg/ml)，皆可達100%抑制效果，初步顯示具抗氧化作用。

以ESR spin-trapping技術，比較市售三種靈芝之活性氧清除活性。結果G. formosanus之抗氧化活性最強，此結果與保肝作用結果一致，因此可推測靈芝之抗氧化能力，能夠對CCl₄所造成的生化及病理上的變化，提供正面的防治效果。

活性氧(ROS)包括superoxide及hydroxyl radical，能攻擊細胞膜上不飽和脂肪酸，產生過氧化脂質(lipid peroxide)，而導致許多疾病的產生。因此，生藥所具有之天然抗氧化活性，是否可改善或預防組織傷害，便成為最近研究的焦點。本研究，一系列地評估生藥之抗炎及保肝活性，並應用TBA法及ESR spin-trapping技術來評估生藥之抗氧化活性，結果證實了生藥抑制脂質過氧化及superoxide、hydroxyl radical清除活性與其抗炎、保肝及抑制肝癌細胞增生藥理作用的相關性。因此生藥所具有的抗氧化特性，在維持健康方面具有正面且積極的意義，值得進一步探討研究，並進行臨床評估，以開發藥物新資源。

以台灣產茄科中藥調控肝細胞腫瘤中 p53及Rb抑癌基因表現與調節修補DNA 變異之酵素活性及其在抗腫瘤機轉上 的研究

郭 國 華

高雄醫學院

中文摘要

世界各國致力於癌症機轉的研究已獲得顯著的成果，但對於癌症的治療除了藉助外科手術與化學藥物外，基因療法目前僅於臨床實驗性階段，同時僅限於致癌機轉較明白之部份特定癌症，因此尚未有廣泛與顯著的治療效果。由於空氣與環境污染或長久曝露於致癌物質下，癌症遂成為台灣第一大死亡原因，其發生率有逐年增加的驅勢。尤其肝細胞腫瘤（HCC）則是國人最主要之癌症，目前對於 HCC 尚無理想治療藥物，採用一般化學療法對 HCC 治療並無法降低其死亡率。對於如何啟動體內正常細胞形成腫瘤的機轉不明，但腫瘤的發生已知係導因於細胞基因的改變，因此僅利用化學藥物毒殺癌細胞同時對正常細胞亦造成傷害並不是理想的治療方式。p53 及 Rb 抑癌基因在調節細胞正常生長具有重要地位，因此具有抑制癌細胞生長的功能，但是 p53 及 Rb 抑癌基因若發生點變異（point mutation）或異對偶染色體失落（loss of heterozygosity），則轉變為具有致癌性。大部份的 HCC 或其他癌症均伴隨 p53 及 Rb 基因變異的現象，顯示 p53 及 Rb 抑癌基因變異與癌症形成有關。因此本計畫乃應用 RT-PCR 等分子生物學技術探討已被報告具有保肝及抗腫瘤作用之臺灣產茄科（Solanaceae）中藥—黃水茄（

Solanum incanum)、冬珊瑚(Solanum capsicastrum)、印度茄(Solanum indicum)、龍葵(Solanum nigrum) 及白英(Solanum lyratum) 等中藥成份對調控 p53 及 Rb 抑癌基因表現的影響，以及調控細胞內修補 DNA 酵素(例如 DNA glycosylase, polymerase 及 ligase) 之活性。期望能由抗腫瘤中藥中獲得具有上述細胞調節作用之中藥成份，則此中藥將不僅不會影響正常細胞的功能，同時藉著提高 DNA 修補能力以矯正癌細胞基因，對感染 B 型肝炎病毒之高危險群患者有預防癌化作用，亦對 HCC 將提供一新的治療方向。因此本計畫以 MacDNASIS 等軟體分析具最低自由能之 p53 與 Rb mRNA 結構，設計其特定 primers 後，進行 RT-PCR。所萃取的 RNA 為由經或未經中藥處理之人類肝癌細胞株 (Hep3B) 與正常皮膚纖維母細胞，結果發現上述茄科中藥對肝癌細胞及正常細胞之抑癌基因 (p53 及 Rb) 表現(expression)並無顯著差異，顯示茄科中藥之抗腫瘤機轉可能並非經由調控抑癌基因表現而達成。為進一步了解其真正抗腫瘤機轉，本計畫以 [³H]thymidine incorporation 探討其細胞之毒殺作用，結果顯示以茄科中藥之粗萃取液在 900 μg/ml/1 X 10⁷ cells 下，以白英具有顯著肝癌細胞毒殺效果，但對正常細胞並無毒殺作用，而民間常用於治療肝炎之黃水茄在此濃度下並無作用。經分別由白英及黃水茄分離其成份—Capsimine 與 Solamargine 並測定其細胞毒性結果，Capsimine 在 2 μg/ml/1 X 10⁷ cells 下即具有特異性毒殺癌細胞的作用，而在 15 μg/ml/1 X 10⁷ cells 可達到 60% 以上之癌細胞死亡之活性，但此濃度對正常細胞並不影響，此結果與利用白英粗萃取物所得實驗結果一致，顯示控制 Capsimine 濃度於 2-15 μg 可選擇性作用於肝癌細胞而不影響正常細胞之功能，因此進一步分析 Capsimine 對其它癌症如肺、乳癌等是否具有相同之藥理作用及其體內之藥效動力學後，Capsimine 可能具有臨床應用之潛力。另一方面，Solamargine 對肝癌細胞與正常細胞均具有很強的致死毒性 (IC₅₀=1.5 μg/ml)，同時對肝癌細胞與正常細胞之抑制曲線相重疊，顯示 Solamargine 對兩者細胞之作用機轉一致，為了解其機轉，肝癌與正常細胞受藥物作用後之細胞形狀與其 DNA 之改變情形分別以螢光顯微鏡及細胞分析儀 (Flowcytometry) 分析之，其 Sub-G1 細胞周期在 Solamargine 作用 3 小時後顯著增加，顯示 Solamargine 係經由 Apoptosis 機轉造成細胞死亡，同時細胞癌壞死因子受器 I (Tumor

necrosis factor receptor I) 之基因表現明顯的提高，因此 Solamargine 可能係藉由調控細胞中 TNFR I 的基因表現，進而引發細胞進行自殺性死亡 (Apoptosis) 的作用。以上結果正分別撰寫成論文。另外對於研究中藥在調節修補 DNA 酵素活性之偵測以應用於中藥抗腫瘤之研究上，目前正進行中，其結果將於成果發表會中提出。

關鍵詞：茄科中藥、抗癌機轉、抑癌基因調控、肝細胞腫瘤

ABSTRACT

Advancement has been made in the study of mechanism of tumorigenicity. To date, treatment of tumors in patients remains predominantly by surgery and chemotherapy. Although gene therapy has been shown an effective method in the treatment of cancers, it is not widely employed and restricted only in some particular tumors. Hepatocellular carcinoma (HCC) is a predominant malignancy in Taiwan. The clinical treatments for HCC by chemotherapy did not improve the mortality of HCC patients. Administration of medicines can inhibit the growth of HCC cell, but it also injures the normal cells. The mechanism for the tumor formation is not yet clear. However, it goes almost without saying that it is necessary to make changes in gene expression in order to convert a cell to the transformed phenotype. The tumor suppresser genes (p53 and Rb) were important in controlling cell-cycles and could prevent the development of tumors. They become oncogenic regulators when p53 and Rb were mutated or lost heterozygosity. The p53 and Rb mutations might be correlate with the tumorigenicity of HCC. The DNA reparative enzymes exhibit in cells for the automatic reconstruction of mutated sequences. Therefore, studies of the regulation of tumor suppresser genes expression and DNA reparative enzymes activities by Chinese herbs are essential.

It can prevent a tumorigenicity by increasing the DNA reparative enzymes activities and the expression of tumor suppresser genes without interfering the function of normal cells. The Solanaceae Chinese herbs in Taiwan such as *S. incanum*, *S. capsicastrum*, *S. indicum*, *S. nigrum* and *S. lyratum* have been reported as antihepatotoxic and antineoplastic agents. In this project, we studied the regulation of p53 and Rb gene expressions with Solanaceae herbs by RT-PCR. The mRNA secondary structures of p53 and Rb genes were predicted by MacDNASIS software. Primers designed according to the lowest free energy were synthesized. It showed that the gene expressions of p53 and Rb genes were not affected by the extracts of solanaceae herbs, suggesting another pathways for the anti-tumorigenicity of herbs. In order to realize the mechanism of cytotoxicity of solanaceae herb, the activity was determined by [³H]thymidine incorporation. The results indicated that *S. lyratum* possessed a potent cytotoxicity in Hep3B cells in the concentration of 900 μ g/ml/1 $\times 10^7$ cells. The *S. incanum* which has been widely used in the treatment of hepatitis exhibits no cytotoxicity to the cells. In order to further investigation of the activity of solanaceae herbs, capsimine and solamargine were then purified from *S. lyratum* and *S. incanum*, respectively. Capsimine selectively inhibited the growth of Hep3B cell in 2 μ g/ml/1 $\times 10^7$ cells, and 60% of Hep3B cells died in the concentration of 15 μ g/ml. However, the normal cell was not affected in the concentration (2-15 μ g) of capsimine. Thus, it suggests that manipulation of the dose of capsimine would selectively inhibit the Hep3B cells. Once the further investigation of the pharmacokinetics and effect of capsimine in another tumors was studied, capsimine might be potentially used in clinical trial. On the other hand, solamargine possessed a potent cytotoxicity to human hepatocyte

(Hep3B) and normal skin fibroblast. The inhibition curves of solamargine to the both cells were essentially overlapped, suggesting a parallel effect for the cell death. To define mechanism of cytotoxicity of solamargine, the changes of morphology and DNA content in cells were studied. A sub-G₁ cell stage was drastically increased after 3-h incubation with solamargine. The results evidence that solamargine arises cell death by apoptosis. In addition, the gene expression of TNFR I and II were up-regulated within 30 min of solamargine treatment. Since TNF Receptors have been involved in apoptosis, the overexpression of TNF receptors may be related with the mechanism of cytotoxicity of solamargine. In addition, regulation of the activity of DNA reparative enzymes by Chinese herbs is currently studied. This study illustrate the anti-tumor mechanism of Solanaceae herbs, and will provides a new direction in the treatment of HCC by Chinese herbs.

Key words: Solanaceae herbs、anti-tumorigenicity、regulation of tumor suppressor gene、hepatocellular carcinoma

前 言

肝細胞腫瘤 [Hepatocellular carcinoma (HCC)] 是台灣居民因惡性腫瘤死亡之最主要癌症，根據內政部今年公佈簡易生命表統計結果，癌症降低國人平均壽命程度有逐年擴大的現象。感染 B 型及 C 型肝炎病毒 (HBV 及 HCV) 或食物受到 aflatoxin B₁ (AFB₁) 污染，會提高罹患 HCC 之機率，但對於如何導致 HCC 機轉仍未明白[1]。

癌症的發生導因於細胞分裂失去控制，一般而言，細胞的生長與分化受到體內生長激素，例如 EGF、NGF、FGF、PDGF、erythropoietin、interleukins 及 interferon γ 的嚴格控制。當細胞受到特定病毒感染或因化學試藥、放射線、染色體變異或其他因素導至基因變異，則將產生錯誤的訊息傳遞蛋白質，而導至細胞無控制的生長並形成癌細胞。抑

癌基因 p53 及 Rb 分別位於第十七對及第十三對染色體上，在抑癌機轉具有重要角色，正常的 p53 蛋白質能抑制 cell cycle 的進行及細胞的分裂與變形，所以具有抑制癌細胞生長的功能[2-4]，但是 p53 或 Rb 基因所在的染色體發生 LOH (Loss of Heterozygosity) 或 point mutation 時，則變為具有致癌性 [5]。有關 p53 變異在 HCC 的重要性已有報告[6,7]，p53 codon 249 AGG 變異為 AGT 與 B 型肝炎病毒及 aflatoxin B1 的感染有關[8,9]，同時其變異程度會隨著癌細胞生長情況而有變化[10]。在許多癌細胞中，包括 肝癌、肺癌、膀胱癌、乳癌、胰臟癌及其他癌細胞中常可發現 p53 及 Rb 抑癌基因變異。因此 p53 及 Rb 基因的變異可能與癌症的形成過程有關。

正常細胞中有自動修補 DNA 變異系統，含有一些修補特定變異之 DNA glycosylase 酵素，這些酵素穿梭染色體中能認識變異位置而將該點或該段變異處移去，接著並由 DNA polymerase 及 DNA ligase 修補所移去的空缺。因此這些酵素組合在防止 DNA 變異上扮演非常重要的角色。既然癌症產生的主要原因係 DNA 變異產生錯誤的訊息傳遞蛋白質而導至細胞無法受到控制，但細胞中之 DNA 修補酵素為何無法認識變異位置？是否 DNA 修補酵素活性受到抑制？是值得探討的問題。因此如果能夠利用藥物增強 DNA 修補酵素活性，使能夠正確的除去變異處並使體內抑癌基因能正確發揮功能，才是治療癌症的正本之道。不僅不會影響正常細胞功能，同時對於癌症有預防及治療效果。比起傳統治療方法，僅以藥物毒殺癌細胞同時亦造成正常細胞之傷害，更具有意義。

目前西藥中尚無此種作用的藥物，而中藥在中國已沿用並累積幾千年之寶貴經驗，部份中藥雖尚缺科學證據證明，但其療效已確定，同時植物中含有多種成份，部份成份也已被證實具有生物活性，因此本計畫乃由中藥中已被報告具有保肝及抗腫瘤作用之茄科 (Solanaceae) 植物—黃水茄 (*Solanum incanum*)[11]、冬珊瑚 (*Solanum capsicastrum*)[12,13]、印度茄 (*Solanum indicum*)[13]、龍葵 (*Solanum nigrum*)[14] 及白英 (*Solanum lyratum*)[15] 研究其抗腫瘤機轉。以 RT-PCR (Reverse-transcriptase polymerase chain reaction) 探討上述中藥對 p53 及 Rb 抑癌基因 mRNA 表現(expression) 的影響，同時探討上述中藥在調節 DNA 修補酵素活性的角色。

本計畫完成後，將對茄科植物成份之抗癌機轉有更進一步的認識，

同時亦改變傳統治療觀念[13,17,18]，對中藥在癌症研究上提供一預防及治療的新方向。

材料與方法

實驗材料

本計畫所採用中藥之部位：黃水茄(新鮮果實)、冬珊瑚(根與莖)、印度茄(地上部份)、龍葵(地上部份)及白英(地上部份)，以上中藥經洗淨後切碎並於 40°C 乾燥 24 小時後，秤取 300 g 置於 1 l 之蒸餾水中，於 100°C 水浴蒸餾 60 分鐘，過濾後減壓濃縮，最後再經冷凍乾燥並秤取乾燥粉末 (10 mg/ml) 溶於滅菌水中。

細胞株 (Cell lines)

使用的細胞株為肝腫瘤細胞 Hep3B [HBV DNA Integration (+)]及 Human normal skin fibroblast 係由榮民總醫院細胞庫及高雄醫學院微生物學科獲得，兩者細胞均培養於 Dulbecco's Modified Eagle's medium 含 10% FBS 及 100 U Penicillin/Streptomycin 抗生素中。

細胞中 RNA 的萃取

Cellular RNA 的萃取係將細胞收集後，以 TE 或 TBS buffer 洗淨，並以 Lysis 溶液溶解細胞，以 Guanidinium Thiocyanate 方法萃取，並經 5.7 M CsCl/EDTA 以超高速離心 20 小時純化之。RNA 濃度的計算，以測其 260nm 之吸光度為基準，並計算其 260 nm /280 nm 的比值。

PCR 及 RT-PCR

PCR 操作步驟：總體積 100 μ l 中含有 100 ng DNA, 50 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10mM dNTP 及 200 ng primers。95°C Denatured 3 分鐘，添加 1 μ l Taq DNA polymerase, 接著於 94°C, 30 秒; annealing temperature 30 秒; 72°C, 30 秒共 40 Cycles, 最後於 72°C, 10 分鐘。RT-PCR 標準操作步驟：微量離心管中，總體積 100 μ l 中含有 RNA 250 ng, 10 mM dNTP, 25 mM MnCl₂,

200 ng Primers 及 2 μ l rTth 溶於 Reaction buffer，以 70°C，10 分鐘製備 cDNA，隨即置於冰中，等待下一步驟。以 Chelating buffer 除去 $MnCl_2$ ，添加 $MgCl_2$ 並於 94°C，30 秒；Annealing temperature，30 秒；72°C，1 分鐘，共 40 Cycles。所得 PCR 及 RT-PCR 產物分別以 Ethidium bromide 染色，並以 Agarose 電泳分離之。

引子 (Primer) 的設計與合成

抑癌基因之 Primer 設計，係根據 p53 及 Rb 基因之 mRNA 結構，計算其最低自由能後再分別設計偵測 p53 及 Rb 基因之三對 primers 以測定其基因表現。本計畫所使用之 Primers 擬委託 Primer 合成公司合成。

細胞毒性試驗

不同濃度之中藥成份加入細胞培養盤後於 37°C 培養 16 h. [3H] thymidine (2 mCi) 再加入 each well 中並繼續培養 37°C for 4 h. 放射性 Thymidine 結合反應以 diluting with 1ml of phosphate-buffered saline (PBS) containing cold thymidine (100 μ g/ml) 終止後。DNA 再以 cold 10% trichloroacetic acid (TCA) 沉澱，經 5% TCA 水洗後，以 95% ethanol 乾燥之。 [3H]DNA 以 0.5 ml 之 0.2 M sodium hydroxide solution 溶解後，轉至 vials 中內含 3 ml of Ecolume scintillation fluid (ICN Biomedicals)。 [3H]DNA 放射線強度以 Packard Model LS 6800 scintillation counter 測定之。

Flowcytometry Solamargine (5 μ g/ml) 加入細胞 (1×10^7 cell/ml) 後。在不同時間

以 PBS 終止其反應並水洗細胞。以 4% para-formaldehyde/PBS (pH 7.4) 於室溫下固定 30 min. 於 1,000 rpm 離心 10 min，再以 0.1% Triton X-100/0.1% sodium citrate at 4°C 增加細胞之通透性 2 min. Propidium iodide in PBS (10 μ g/ml) 用以染細胞並於 37°C 作用 30 min. 紅色螢光強度以 FACScan flowcytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) 測定之。每次測定至少含有 5,000 cells，所得結果再以 LYSIS II software 分析之。

Southern Hybridization

Southern blotting 係根據一般標準步驟進行，略述如下：DNA 片段以 Agarose 電泳分離，以 1.5 M NaCl-0.5 M NaOH denatured 後，轉漬至 Nylon membrane。經 pre-hybridization 及 hybridization 步驟後，探針以 random-priming 方式標上放射線，進行 hybridization 隔夜，以 SSC/SDS 洗去過剩的探針，風乾後，置於含 intensive screen 的卡夾內， -70°C autoradiography 後將底片沖洗並分析結果。

DNA Sequencing

據 Sanger et al. (1977)[19] dideoxy sequencing 方法，以 Sequenase 2.0 kit(USB)或 Cycle sequencing kit (Promega)分析其 DNA 序列。操作步驟依據產品所附之標準操作步驟。

結 果

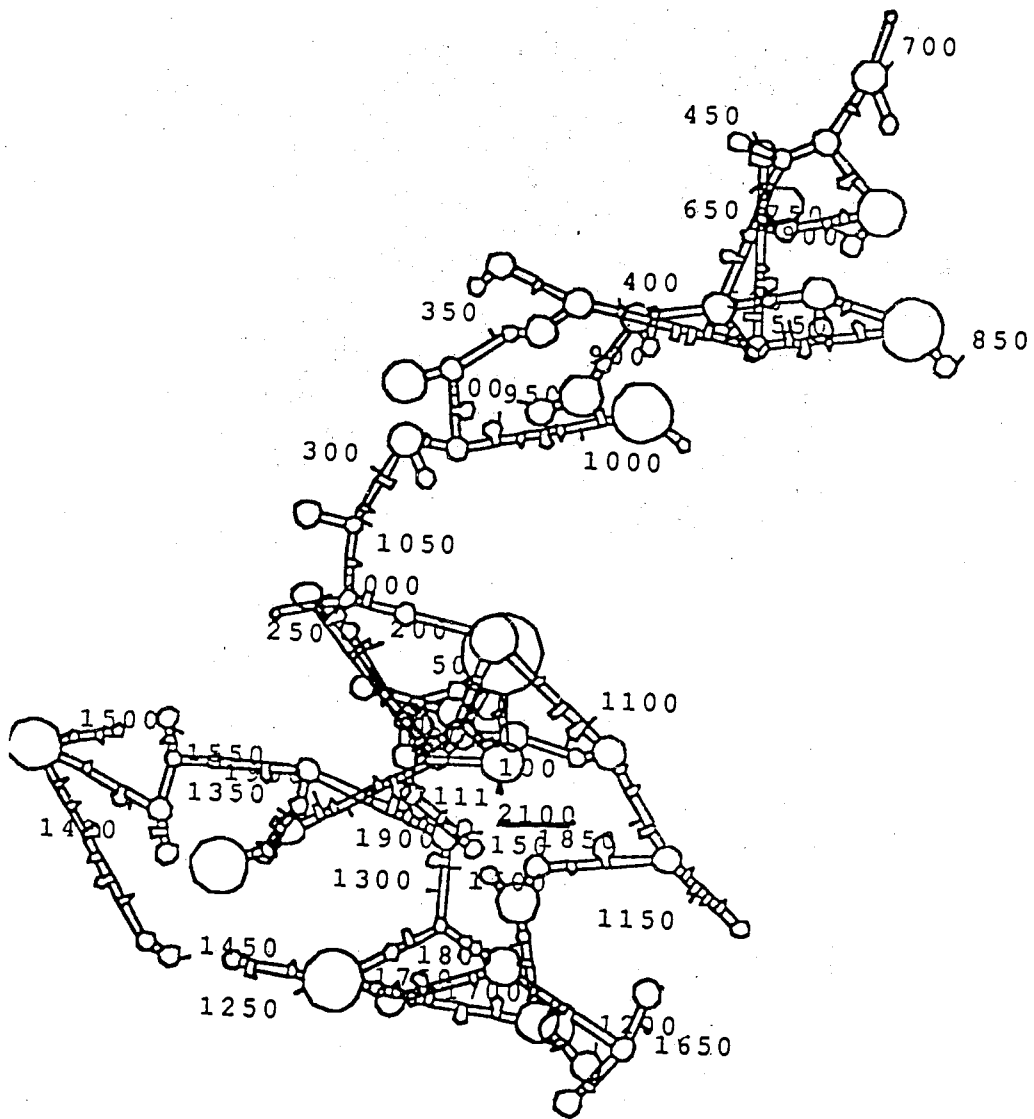
癌症長久以來一直是人類健康上的最大問題，而肝細胞腫瘤則是台灣居民因惡性腫瘤死亡之最主要癌症，其高發生率的原因可能與較多 B 型肝炎帶原者有關，因此對於肝炎病毒帶原者，其終生將受到癌症的威脅。抑癌基因 p53 及 Rb 是已知被研究較透澈的抑癌基因，在控制細胞癌化具有重要角色，在許多癌細胞中，包括 肝癌、肺癌、膀胱癌、乳癌、胰臟癌及其他癌細胞中常可發現 p53 及 Rb 抑癌基因變異。已有報告 mRNA 的二級結構會影響利用 RT-PCR 測定基因表現，本計畫為探討已被報告具有保肝及抗腫瘤作用的茄科植物成份對細胞之 p53 及 Rb 抑癌基因表現之調控情形，因此以 MacDNASIS 軟體分別以最低摺疊自由能預測 p53 及 Rb 之 mRNA 結構(如圖一及二)，經由其較低二級結構部位分別設計三對 Primers(如圖三及四)以進行 RT-PCR。肝癌細胞株(Hep3B)及人類皮膚纖維母細胞(Fibroblast)經中藥處理 12 小時後萃取其 Cellular RNA 並與未經中藥處理之細胞 Cellular RNA 比較，測定 A260 nm 及 A260/280 nm 吸光度以調整其濃度。等量 RNA 分別以 rTth 反轉錄酵素及上述設計之 Primers 進行 RT-PCR，其結果如圖五及六所示，細胞經中藥處理前後並未影響抑癌基因(p53 及 Rb) 之表現 (expression)，顯示茄科中藥雖具有抗腫瘤作用，但

可能並非藉由調控抑癌基因表現之途徑。

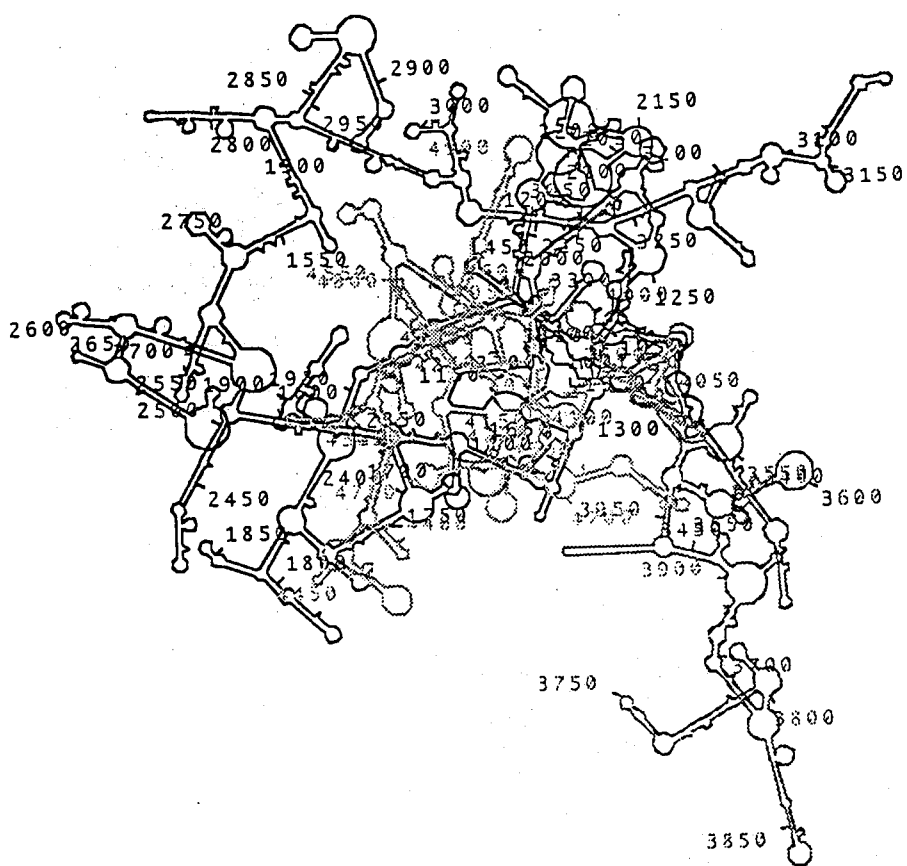
爲進一步研究茄科中藥之抗腫瘤機轉與細胞毒性，經水溶液萃取之中藥成份分別以 $[^3\text{H}]$ thymidine incorporation法測定其細胞毒性，其中由黃水茄與白英萃取出的 Solamargine及Capsimine對肝癌細胞株具有明顯的抑制作用(如圖七及八)，但是Solamargine對正常細胞株仍具有很強的毒性；而Capsimine在2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 即具有毒殺肝癌細胞株的作用，當達到15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 時，60% 的肝癌細胞死亡。但是在此濃度(2-15 $\mu\text{g}/\text{ml}$)下，對正常細胞株並未影響，此實驗經分別測定三次仍是相同之結果，因此顯示控制Capsimine在適當濃度下可能具有選擇性作用於肝癌細胞，待Capsimine之藥效動力學研究完成後，即可進行動物實驗以確定其是否具有臨床應用之潛力。

另外以茄科中藥之粗萃取物作用於肝癌細胞株及正常纖維母細胞(如圖九至十四)之結果，僅白英中藥對肝癌細胞具有明顯之毒性，甚至在900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之高濃度下對正常細胞仍不具有抑制作用(如圖九)，此結果與利用純化之Capsimine作用相一致，因此白英與Capsimine的作用機轉值得進一步探討。

另一方面，Solamargine對肝癌細胞與正常細胞均具有很強的致死毒性($\text{IC}_{50}=1.5 \mu\text{g}/\text{ml}$)，同時對肝癌細胞與正常細胞之抑制曲線相重疊(如圖七)，顯示Solamargine對兩者細胞之作用機轉一致，爲了解其機轉，肝癌與正常細胞受藥物作用後之細胞形狀與其 DNA 之改變情形分別以螢光顯微鏡(如圖十五)及細胞分析儀(Flowcytometry)分析之(如圖十六)，其 Sub-G1 細胞周期在Solamargine作用 3 小時後顯著增加(如圖十七)，顯示Solamargine係經由Apoptosis機轉造成細胞死亡，同時利用RT-PCR 及 Southern blotting 分析細胞癌壞死因子受器 I (Tumor necrosis factor receptor I) 之基因表現，hTNFR I 之基因表現明顯的提高(如圖十八)，因此顯示 Solamargine 可能係藉由調控細胞中TNFR I 的基因表現，進而引發細胞進行自殺性死亡 (Apoptosis) 的作用。



圖一、p53 抑癌基因之 mRNA 二級結構



圖二、Rb 抑癌基因之 mRNA 二級結構

Primers for the detection of human p53 gene

5'GTCTGTGACTTGCACGTACTCCCCT3'

5'AGGAGGGGCCAGACCATCGCTATC3'

5'AGATAGCGATGGTCTGGCCCCCTCCT3'

5'GTGGGTACAGTCAGAGCCAACCTCAGG3'

5'GAGATGTTCCGAGAGCTGAATGAGGC3'

5'TGTCAGTGGGGAACAAGAAGTGGAGA3'

圖三、利用 RT-PCR 偵測 p53 抑癌基因表現所用引子 (primer)
之 DNA 序列

Human Retinoblastoma gene:

5'TCTAATGGACTTCCAGAGGTTGAAAATC3'

5'TGGTGTCTCTGTGTTTCAAACTGTCT3'

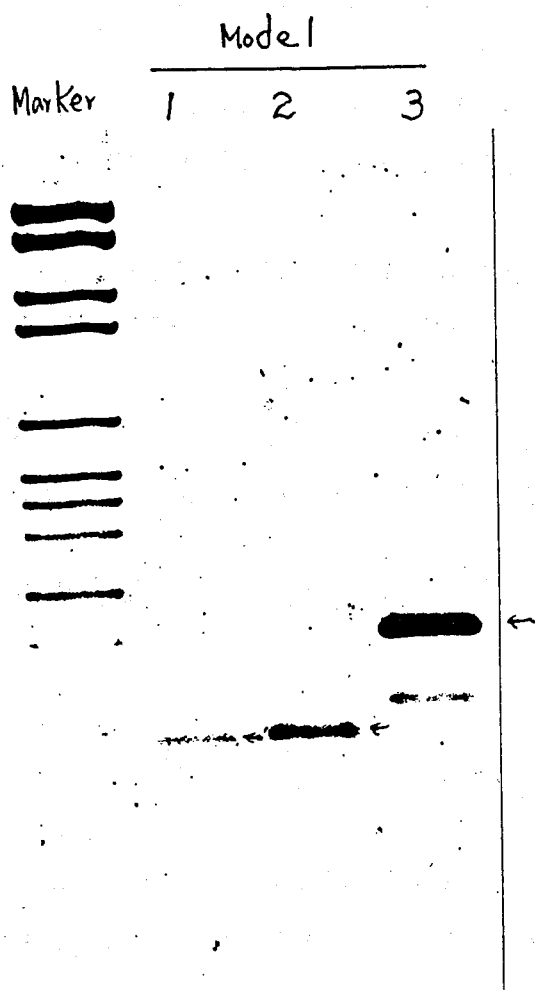
5'TTAAAGAGAAATTTGCTAAAGCTGTGGGA3'

5'TCTGCTATATGTGGCCATTACAACCTC3'

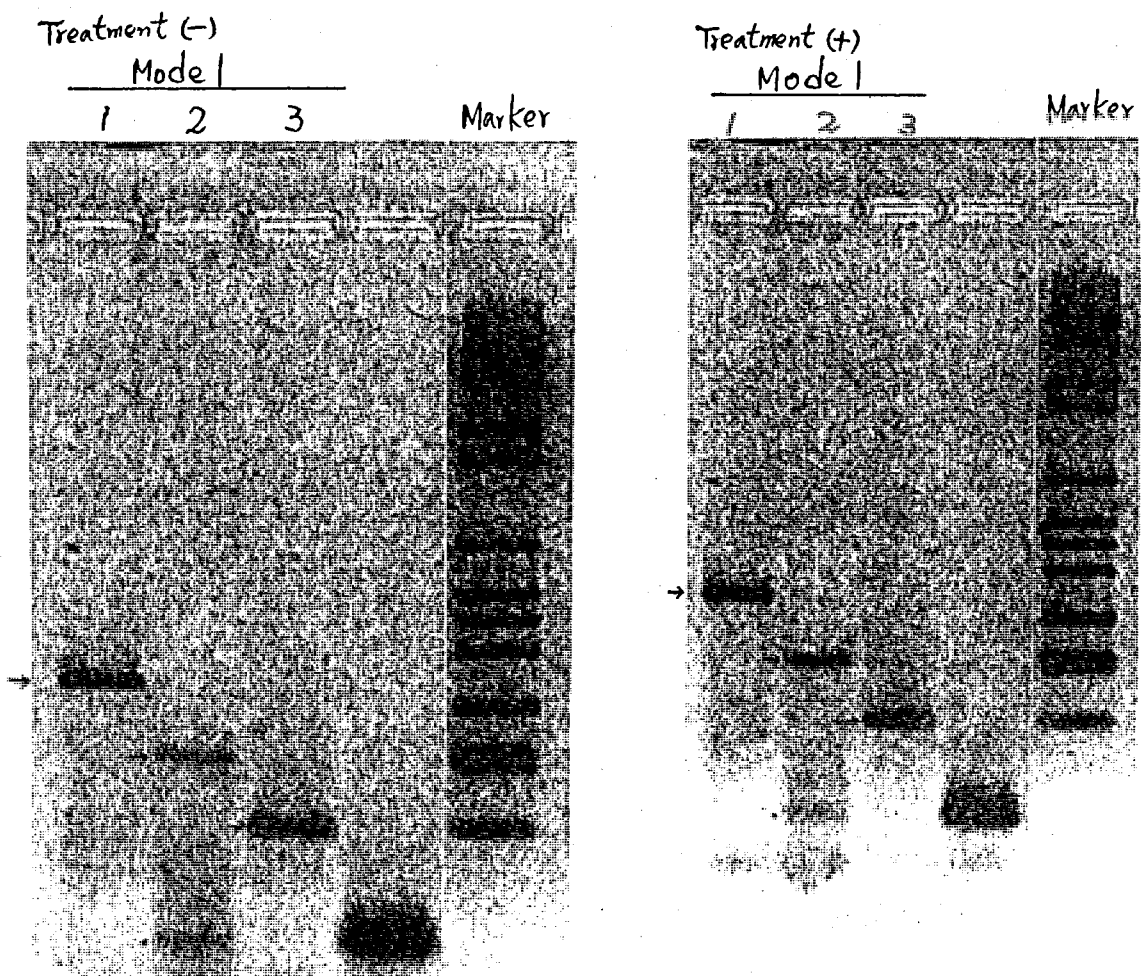
5'ATGAACTCATGAGAGACAGGCATTTGG3'

5'AGGAATCCGTAAGGGTGAAGTGGGAAA3'

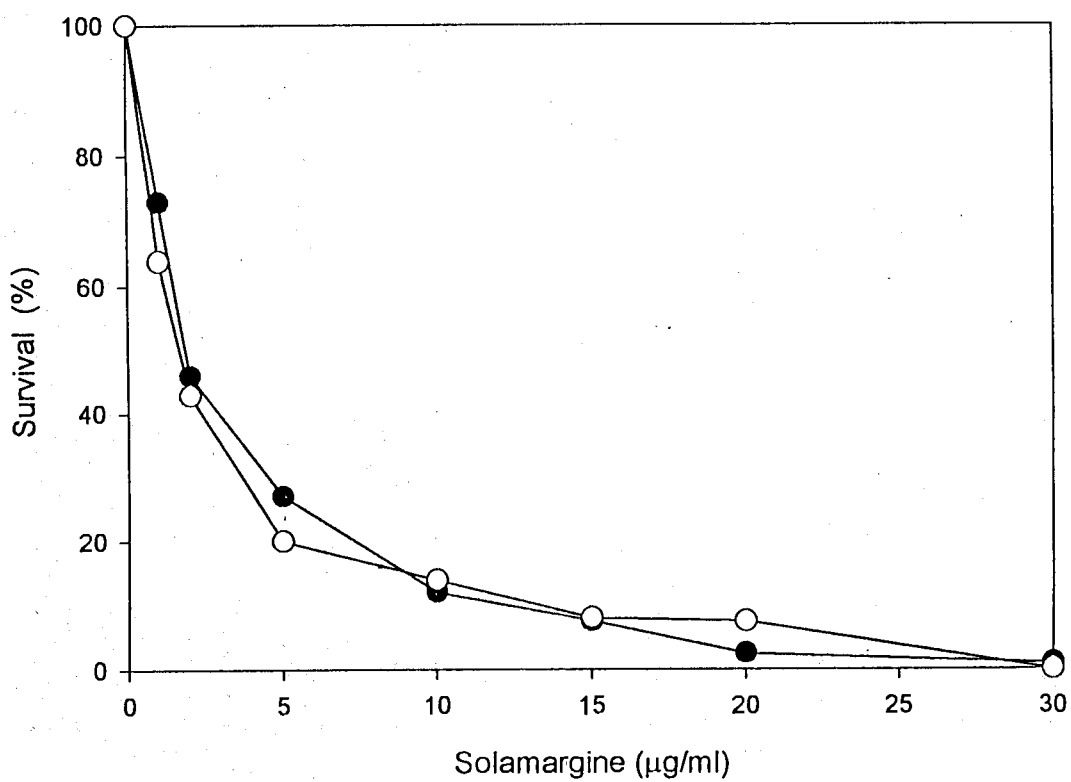
圖四、利用 RT-PCR 偵測 Rb 抑癌基因表現所用引子 (primer)
之 DNA 序列



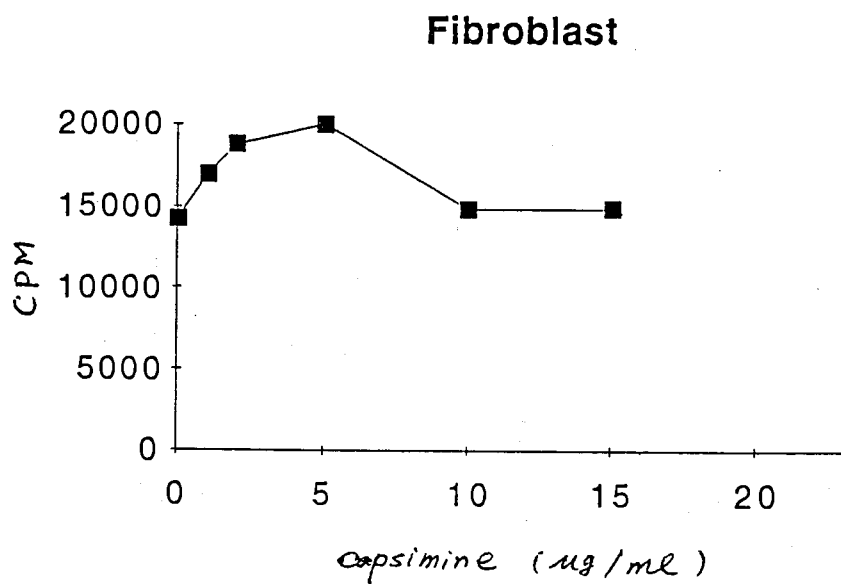
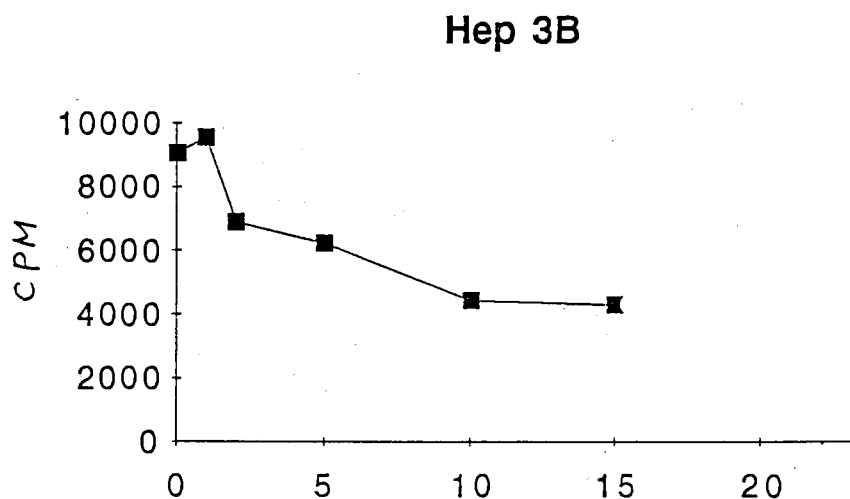
圖五、以 RT-PCR 偵測中藥處理前後之細胞中 p53 抑癌基因表現
(僅以白英中藥之處理為代表，其餘與此結果一致)



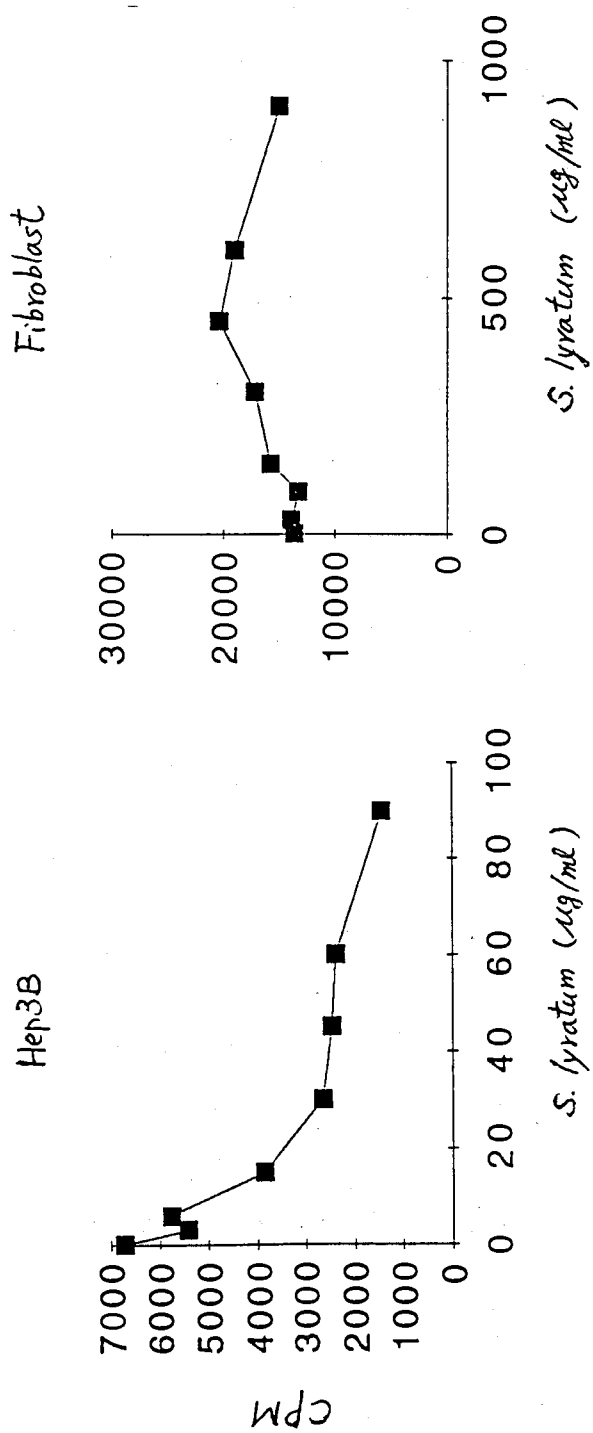
圖六、以 RT-PCR 偵測中藥處理前後之細胞中 Rb 抑癌基因表現
(僅以白英中藥之處理為代表，其餘與此結果一致)



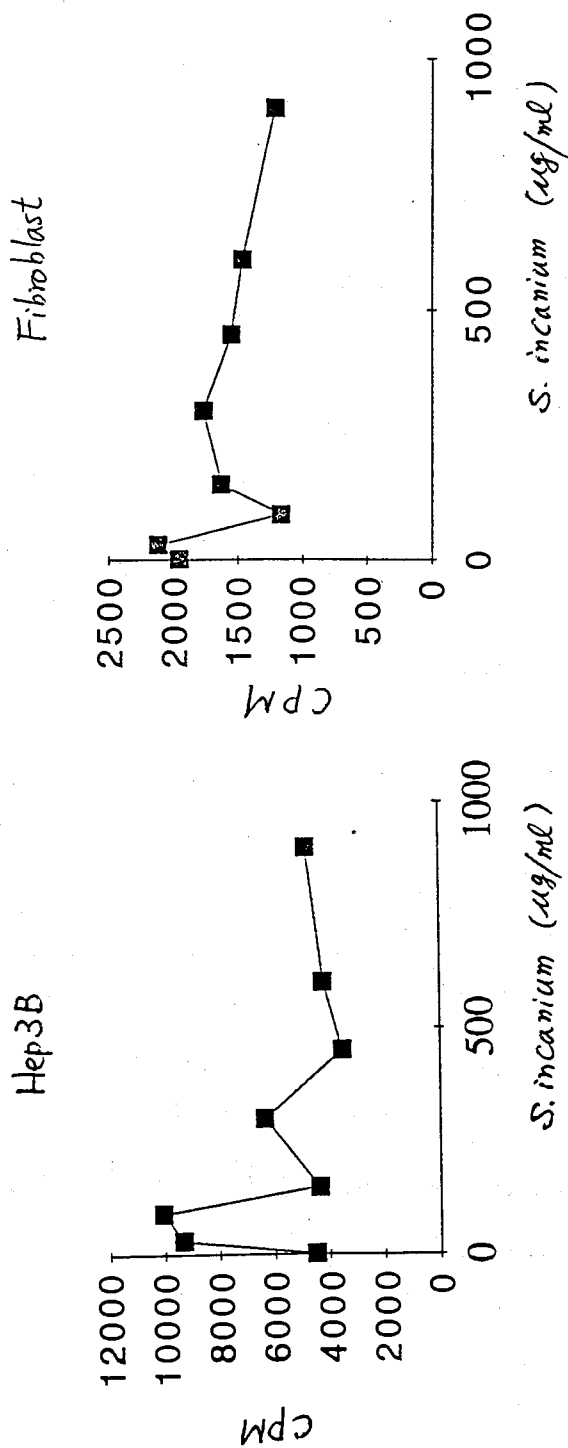
圖七、Solamargine 對肝癌細胞株 (Hep3B) 及正常皮膚纖維母細胞 (Fibroblast) 之細胞毒性



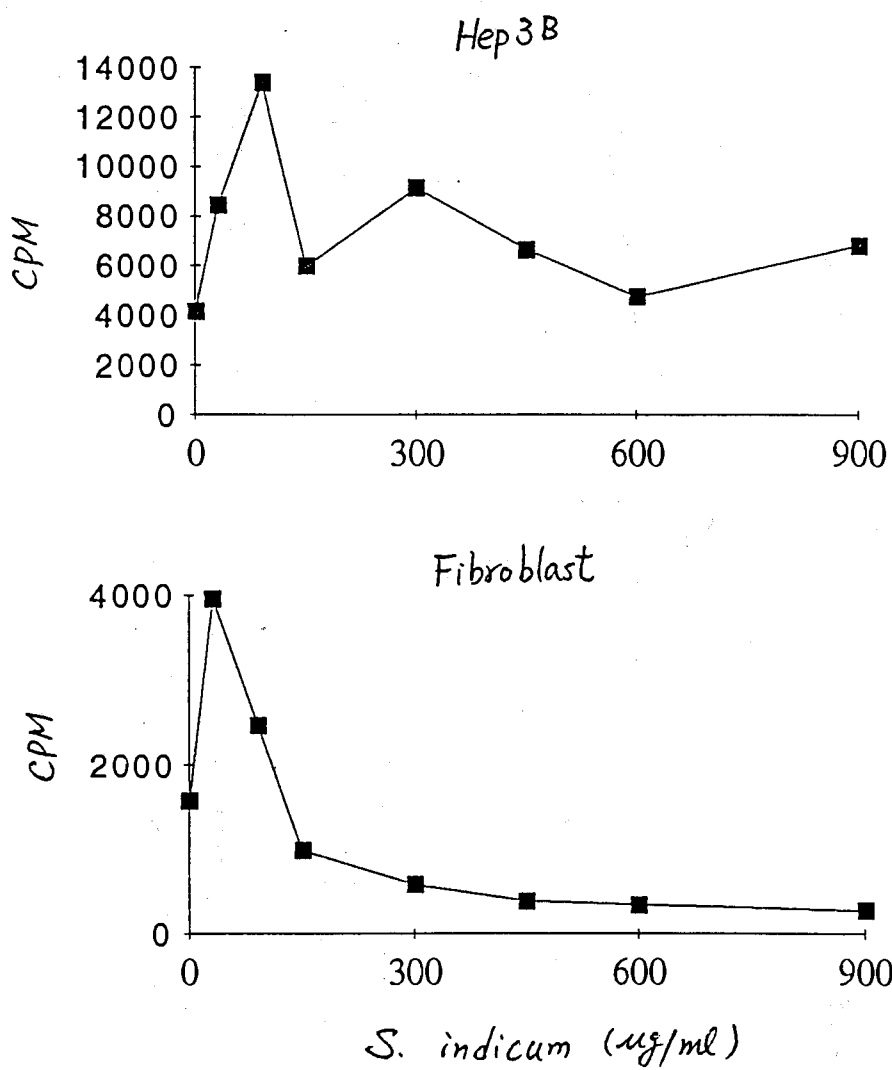
圖八、Capsimine 對肝癌細胞株 (Hep3B) 及正常皮膚纖維母細胞 (Fibroblast) 之細胞毒性



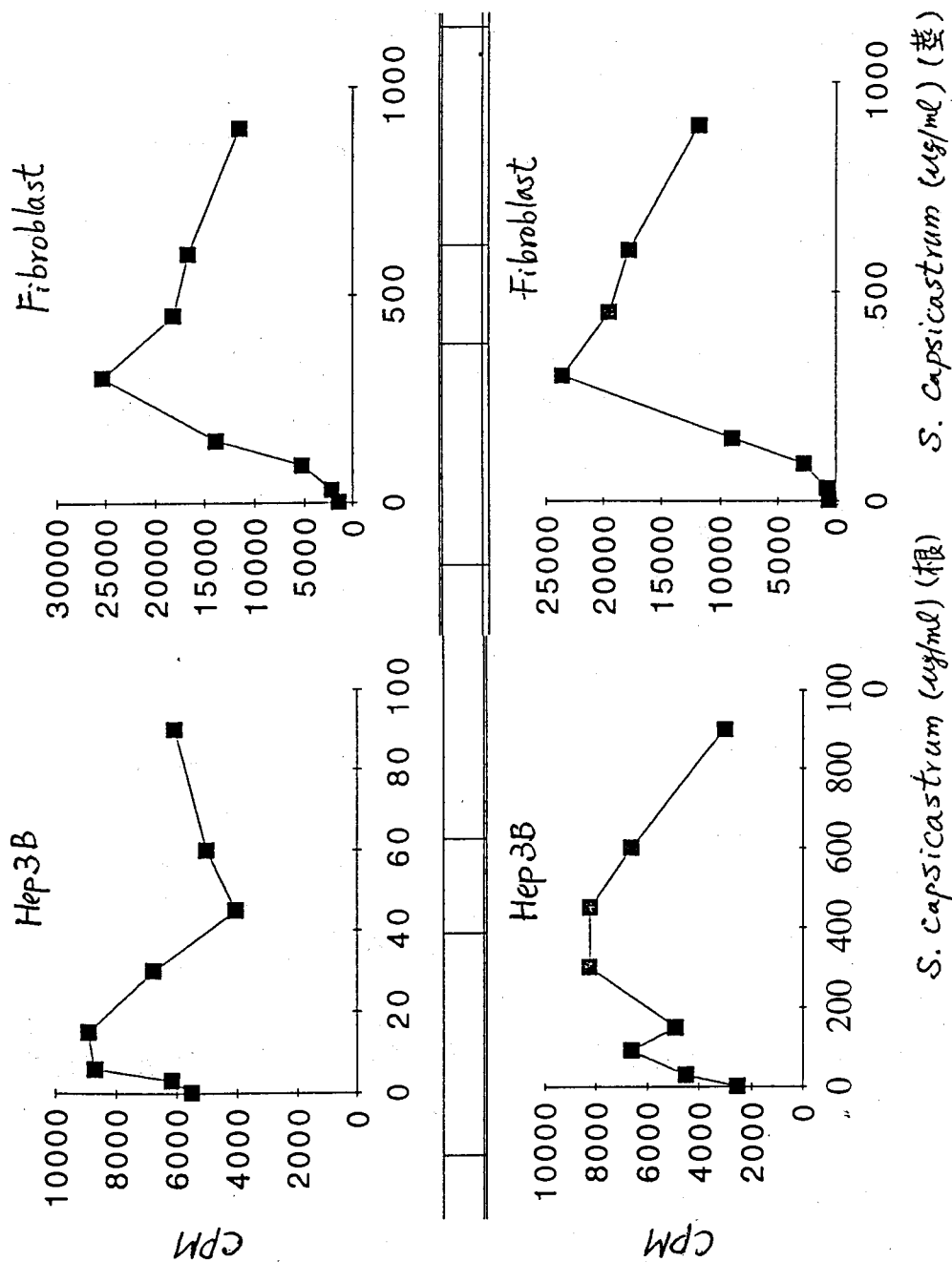
圖九、白英 (*S. lyratum*) 對肝癌細胞株 (Hep3B) 及正常皮膚纖維母細胞 (Fibroblast) 之細胞毒性



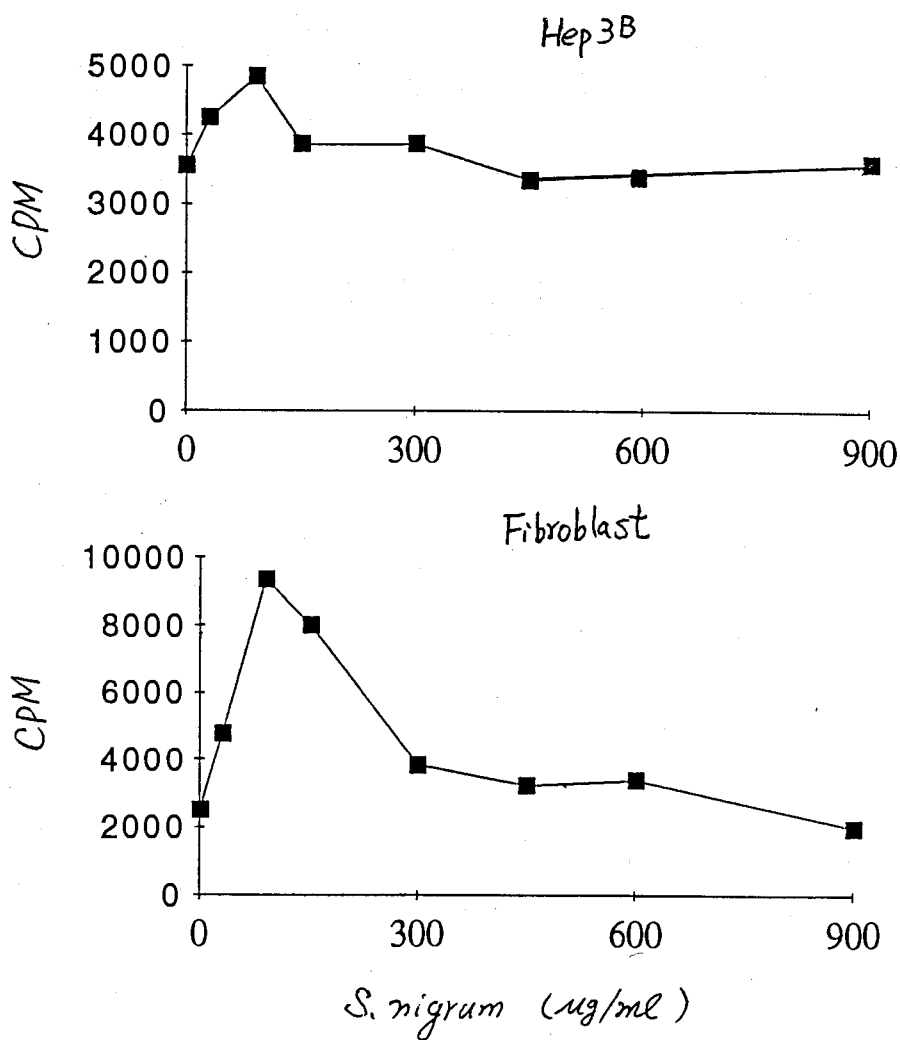
圖十、黃水茄 (*S. incanum*) 對肝癌細胞株 (Hep3B) 及正常皮膚纖維母細胞 (Fibroblast) 之細胞毒性



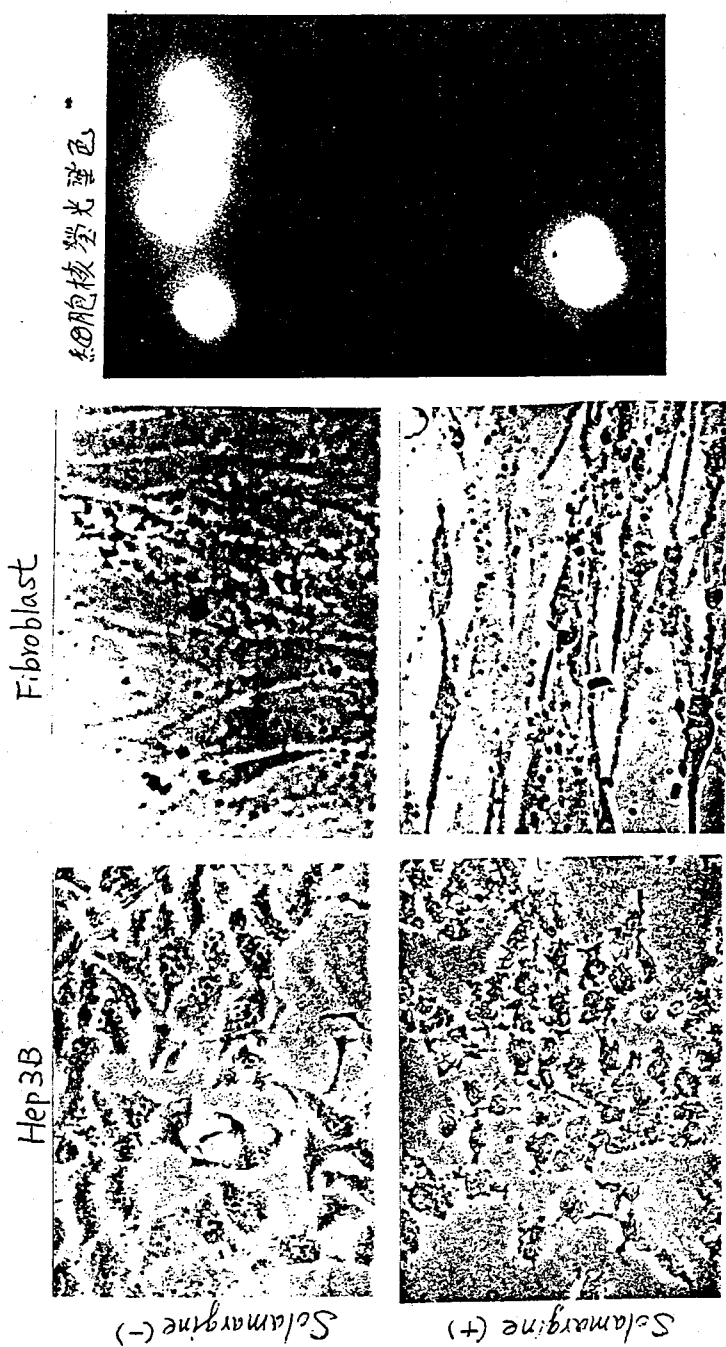
圖十一、印度茄 (*S. indicum*) 對肝癌細胞株 (Hep3B) 及正常皮膚纖維母細胞 (Fibroblast) 之細胞毒性



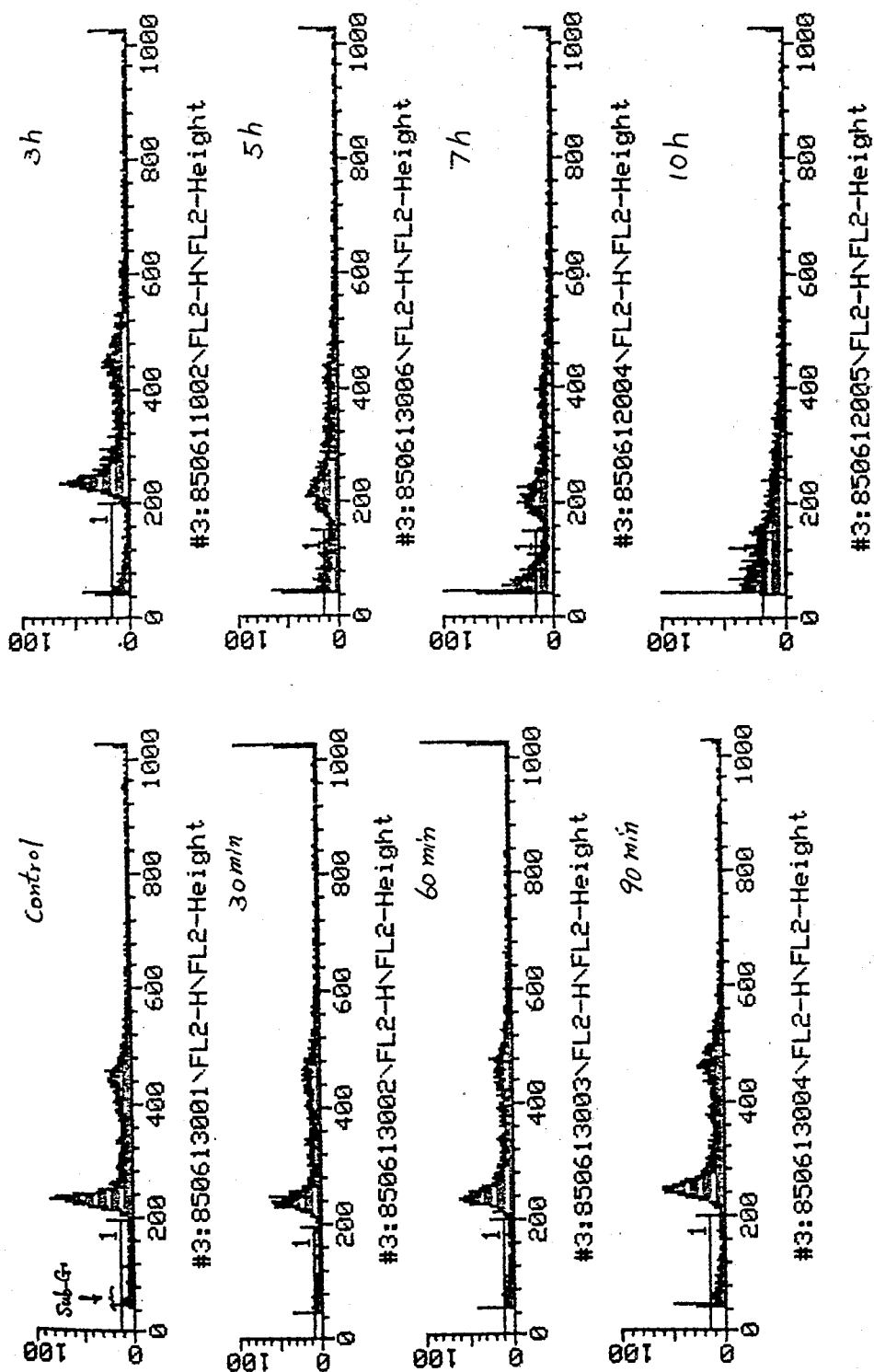
圖十三、冬珊瑚 (*S. capsicastrum*) 根與莖部對肝癌細胞株 (Hep3B) 及正常皮膚纖維母細胞 (Fibroblast) 之細胞毒性



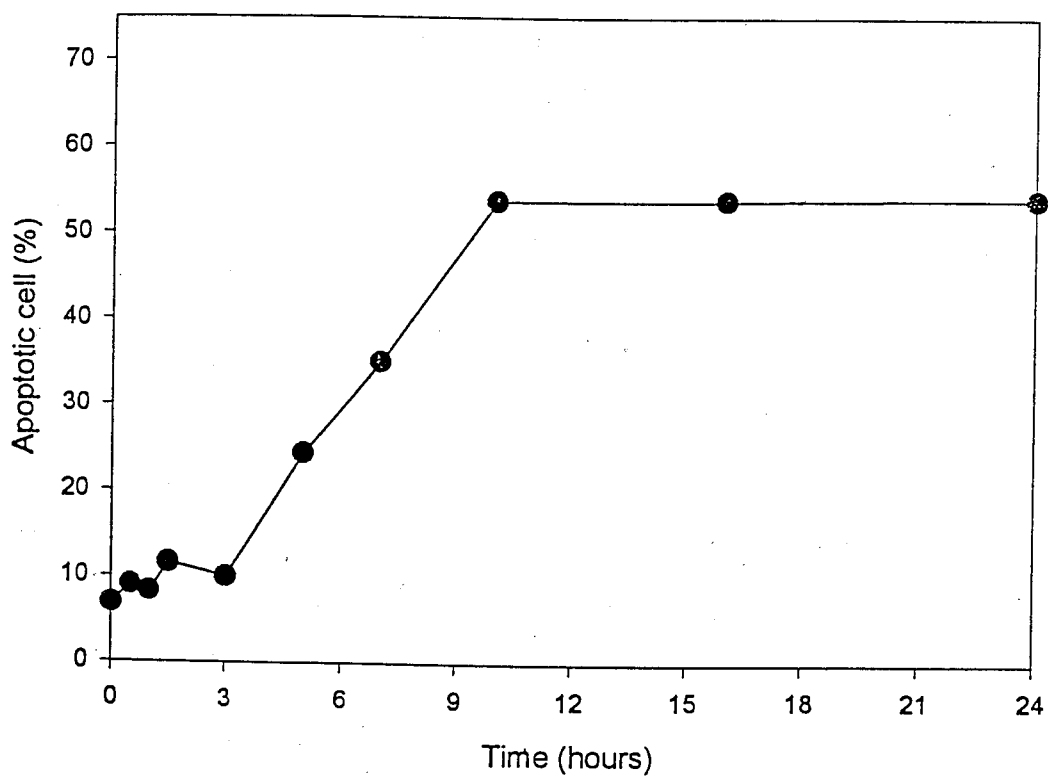
圖十四、龍葵 (*S. nigrum*) 對肝癌細胞株 (Hep3B) 及正常皮膚纖維母細胞 (Fibroblast) 之細胞毒性



圖十五、Solamargine 對肝癌細胞株 (Hep3B) 及正常皮膚纖維母細胞 (Fibroblast) 之細胞形狀與細胞核染色作用之影響



圖十六、以流體細胞分析儀 (Flowcytometry) 偵測 Solamargine 對
肝癌細胞株 (Hep3B) 及正常皮膚纖維母細胞 (Fibroblast)
之細胞死亡機轉



圖十七、Solamargine 導致細胞死亡時，其 Sub-G1 細胞周期對時間之變化情形

Solamargine 處理時間

○ 15min 30min 60min



圖十八、以 RT-PCR 及 Southern hybridization 偵測 Solamargine 對
細胞中人類癌壞死基因之受器型 I 之基因調節

討 論

癌症名列台灣第一大死亡原因，而肝細胞腫瘤則又是台灣最首要的癌症，目前對肝細胞腫瘤並無有效治療藥物，再加上並無理想之肝細胞腫瘤標誌可供早期診斷，因此被診斷出罹患肝細胞腫瘤患者，其生命僅有數月而已。傳統上研究治療癌症之藥物均著重於對細胞毒性(Cytotoxicity)的研究，但是能毒殺癌細胞的藥物通常對正常細胞亦會造成傷害，這是目前利用中及西藥治療癌症之最大困擾。同時癌組織雖經外科手術除去後常有再發生的現象，所以利用藥物抑制癌細胞生長的方法僅是治標而非治本的辦法。

隨著分子生物學的進展，對癌細胞的形成理論有進一步的瞭解。正常細胞要轉變成癌細胞必須細胞內之基因發生變化，產生錯誤的訊息傳遞蛋白質而造成細胞生長無法受到正常的調節，其中抑癌基因 p53 及 Rb 能控制細胞生長程序，因此在抑制癌細胞形成具有重要角色。但是細胞若因致癌因素造成 p53 及 Rb 基因變異，則細胞將轉變為癌細胞。許多癌症包括肝細胞腫瘤已證明與 p53 及 Rb 抑癌基因變異有關。本計畫之實驗證實細胞癌化成型後，其 DNA 變異位置已固定，欲藉由藥物矯正或調節其抑癌基因表現可能無法達成，因此經由中藥處理前後之肝癌細胞之抑癌基因表現並無明顯差異。唯有以藥物毒殺癌細胞並配合藥物控制該部位尚未癌化的細胞，使其不會癌化，如此才是癌症之治本辦法。

正常細胞中存有一套自動修補 DNA 變異之酵素組合（包括 DNA Glycosylase、DNA Polymerase 及 DNA Ligase）能定點或整段修補變異之 DNA Sequence。因此欲使正常細胞不會癌化，調節細胞本身之 DNA 修補功能是有有效的途徑。但是為何在癌細胞形成之前而細胞 DNA 變異時，這些修補酵素未發生功用？是否其活性受到抑制？這可能是研究中西藥治療癌症之學者急待解決的問題。因此如有藥物能增強抑癌基因表現(expression)或增加修補 DNA 之酵素活性，則該藥物將具有預防正常細胞癌化的功能，這對於台灣眾多的 B 型肝炎帶原者使其不致轉變成肝硬化或肝癌會有實質的意義。因此對癌細胞有治療的效果且不影響正常細胞功能。這是本計畫的主要目的及所要達成的目標。

台灣產茄科中藥，例如黃水茄、冬珊瑚、印度茄、龍葵及白英，已被應用於保肝及治療腫瘤之藥物，因此本計畫研究這些中藥之抗癌機轉

，以粗抽取液作實驗，我們發現僅白英具有明顯的細胞毒性，但白英在 900 $\mu\text{g/ml}$ 下對正常細胞並無造成傷害。同時由白英所純化出的 Capsimine 在 2-15 $\mu\text{g/ml}$ 濃度下具有選擇性作用於癌細胞上而不會影響正長細胞的生長，此結果與粗萃取物之結果一致，顯示白英成份中 Capsimine 可能具有臨床應用之潛力，相關應用之實驗目前正進行中。配合其藥效動力學的研究，不久將可提出體外應用 Capsimine 治療癌症之報告。另一方面，由黃水茄所分離的 Solamargine，本計畫已完成其細胞毒性機轉的研究，其致死機轉主要係經由調控人類癌壞死因子受器型 I 及 II (hTNFR I and II) 而造成細胞自殺性死亡 (Apoptosis)。另外研究茄科中藥在調節細胞中 DNA 修補酵素活性之情形，以期得到能增強抑癌基因表現及活化 DNA 修補酵素活性之中藥研究正進行中，其結果將於成果發表會中提出。

綜合以上之結果，有鑑於癌症的形成與細胞基因改變息息相關，因此本計畫乃應用分子生物學技術探討茄科中藥成份之抗癌機轉並研究利用中藥調控細胞抑癌基因表現及活化 DNA 修補酵素活性之效果，此計畫係應用中藥治療癌症上的新研究方向，同時在預防細胞癌化上更具有重要意義。

結論與建議

應用化學療法治療癌症已有很長的時間，目前已發現癌細胞對常使用之藥劑會產生抗藥性基因 (MDR, multiple drug resistant gene) 而使藥物失效，因此在治療癌症上尚未有理想而顯著的效果。所以經由調控細胞本身之基因而使癌細胞進行自殺性死亡作用 (Apoptosis)，可能是另一中藥抗癌研究的方向。本計畫所得結果中 Solamargine 之抗癌機轉已研究完成，其主要即是經由 Apoptosis 而有抗癌的作用，但是其對正常細胞亦有很強的毒性是其應用上的缺點。目前計畫主持人正與藥學系林忠男教授研究經由化學修飾作用解決此問題。另一方面，白英之粗萃取溶液與 Capsimine 對肝癌細胞具選擇性作用而不影響正常細胞生長，因此 Capsimine 是值得開發而具有臨床應用之潛力。相關研究正繼續完成中，待藥效動力學之研究完成後將可提出更完整之報告。植物含有多種成份能影響細胞的功能，利用化學療法治療癌症實際上併發許多嚴

重的副作用而未能突破，本計畫正進行中的調控 DNA 修補酵素活性，對癌症治療是一新研究方向，在應用中藥抗癌上具有重要而實質的意義。研究雖然堅苦，但找出一種中藥能選擇性作用於肝癌細胞而不影響正常細胞之生長，同時強化 DNA 修補酵素活性，則將直接造福億萬人類癌症患者。

參考文獻

- [1] Nishida, N., Fukuda, Y., Kokuryu, H., Sadamoto, T., Isowa, G., Honda, K., Yamaoka, Y., Ikenaga, M., Imura, H. and Ishizaki, K. (1992) *Int. J. Cancer* 51, 862-868.
- [2] Chen, P.L., Chen, Y., Bookstein, R. and Lee, W.H. (1990) *Science* 250, 1576-1580.
- [3] Finlay, C.A., Hinds, P.W. and Levine, A.J. (1989) *Cell* 57, 1083- 1093.
- [4] Baker, S.J., Markowitz, S., Fearon E.R., Willson, J.K.V. and Vogelstein, B. (1990) *Science* 249, 912-915.
- [5] Hinds, P., Finlay, C. and Levine, A.J. (1989) *J. Virol.* 63, 739- 746.
- [6] Hsu, H.C., Peng, S.Y., Lai, P.L., Sheu, J.C., Chen, D.S., Lin, L.I., Slagle, B.L. and Butel, J.S. (1994) *Cancer* 73, 42-47.
- [7] Hsu, H.C., Huang, A.M., Lai, P.L., Chien, W.M., Peng, S.Y. and Lin, S.W. (1994) *Hepatology* 19, 122-128.
- [8] Hsu, I.C., Metcalf, R.A., Sun, T., Welsh, J.A., Wang, N.J. and Harris, C.C. (1991) *Nature* 350, 427-428.
- [9] Bressac, B., Kew, M., Wands, J. and Oztruck, M. (1991) *Nature* 350, 429-431.
- [10] Teramoto, T., Satonaka, K., Kitazawa, S., Fujimori, T., Hayashi, K. and Maeda, S. (1994) *Cancer Res.* 54, 231-235.
- [11] Chiu, H.F., Lin, C.C., Yang, C.C. and Yang, F. (1989) *Amer. J. Chinese Med.* 17, 17-23.

- [12] Lin, C.N., and Gan, K.H. (1989) *Planta Medica* 55, 48-50.
- [13] Gan, K.H., Lin, C.N., and Won, S.J. (1993) *J. Natural Products* 56, 15-21.
- [14] Moundipa, P.F. and Domngang, F.M. (1991) *British J. Nutrition*, 65, 81-91.
- [15] "新編中藥大辭點", 新文豐出版社, 1978, p.595-596.
- [16] 張光雄、邱年永, 原色台灣藥用植物圖鑑 (I), 1983, p.189.
- [17] Chiang, H.C., Tseng, T.H., Wang, C.J., Che, C.F. and Kan, W.S. (1991) *Anticancer Research* 11, 1911-1917.
- [18] Lin, C.N., Lu, C.M., Cheng, M.K., Gan, K.H. and Won, S.J. (1990) *J. Natural Products* 53, 513-516.
- [19] Fujimoto, Y., Hampton, L.L., Wirth, P.J., Wang, N.J., Xie, J.P. and Thorgeirsson, S.S. (1994) *Cancer Res.* 54, 281-285.
- [20] Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. and Sekiya, T. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 2766-2770.
- [21] Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463-5467.

台灣產樟科及番荔枝科藥理活性成份之研究 (IV)

吳 永 昌

高雄醫學院

中文摘要

樟科及番荔枝科植物自古以來即被用為治療膿瘍、咳嗽、驅蟲、腹瀉、癩癧及腫瘤，以及做為防蟲、健胃、強心劑等民間用藥。由於科技之進步，以往未能了解其活性物質為『何物』之謎，於今已能運用特殊之科學方法篩選 (screening) 而加以追中蹤探討之。據文獻之報告及筆者近年來之研究，樟科、番荔枝科等中草藥具有細胞毒殺及抗心臟血管等疾病之藥理活性之作用。因此筆者計畫以「血小板功能測定」與「血管平滑肌收縮反應」等方法來探討此類中草藥在心臟血管疾病方面之藥效，以作為藥物開發之基礎。八十一年度完成白葉瓜馥木之活性物質的研究。八十三年度針對同科同屬植物之毛瓜馥木來加以研究其活性物質。八十四年度針對樟科植物之山胡椒來加以研究其活性物質。而於今年度 (八十五年度) 探討樟科植物無根草 (*Cassytha filiformis* L.) 具有抗血小板凝集作用之有效成分。

無根藤 (*Cassytha filiformis* L.) 屬於樟科 (Lauraceae)，以其全草為材料，探討其化學成分及生物活性為目的，分離得到八個 aporphine 型生物鹼：actinodaphnine (1)、cassythine (2)、N-methylactinodaphnine (3)、cathafiline (4)、cathaformine (5)、cas-

syformine (6)、isoboldine (7)、predicentrine (8)。其中 catha-filine (4), cathaformine (5) 及 cassyformine (6) 爲天然界首次分離得到；化合物8爲本科植物首次分離得到且化合物7、8爲本植物首次分離得到，所有化合物均經由光譜分析或化學反應證明其結構。

化合物1、3、8在抗血小板凝集活性方面，化合物 1 對於由 ADP、arachidonic acid、collagen 及 PAF 所誘發的血小板凝集效應，有完全的抑制作用；化合物 3 對於由 ADP、arachidonic acid及 collagen 所誘發的血小板凝集效應，有完全的抑制作用；化合物 8對於由 arachidonic acid 及 collagen 所誘發的血小板凝集效應，有選擇性的抑制作用。

化合物 3對於由高鉀 (80 mM) 和norepinephrine ($3\mu\text{M}$) 所引起的血管收縮有完全的抑制作用；化合物 1 對於由高鉀和 norepinephrine 所引起的血管收縮也有顯著的抑制作用。生物鹼中部份化合物之生物活性，目前仍在測試中。

關鍵詞：樟科、番荔枝科、無根草。

ABSTRACT

Lauraceous and Annonaceous plants are well known used for treatment of cough, diarrhea, tumor, stomachic and cardiotonic etc. in the folk medicines. Peoples always don't know "what" is the active substance of the folk medicines till now can follow by screening methology to obtain the pure and active compound. As part of our continuing search of bioactive compounds from natural products, we study the antiplatelet aggregation compounds from *Cassytha filiformis* L. in this year.

As a result of our continuing search for novel plant bioactive agents, the methanolic extract of the whole plant of

Cassytha filiformis L. was found to show significant antiplatelet aggregation activity against in vitro collagen factor. The investigation had led the isolation and characterization of eight aporphine alkaloids, actinodaphnine (1), cassythine (2), N-methylactinodaphnine (3), cathafiline (4), cathaformine (5), cassyformine (6), isoboldine (7) and predicentrine (8). Among them, 4, 5 and 6 are new compounds. The structural elucidation of the isolates was established by spectroscopic and chemical methods.

On antiplatelet aggregation bioassay, compound 1 showed inhibition of adenosine diphosphate (ADP)、arachidonic acid (AA)、collagen and platelet-activating factor (PAF)-induced antiplatelet aggregation. Compound 3 showed inhibition of adenosine diphosphate (ADP)、arachidonic acid (AA) and collagen-induced antiplatelet aggregation. Compound 8 showed inhibition of arachidonic acid (AA) and adenosine diphosphate (ADP)-induced antiplatelet aggregation.

Compound 3 exhibited strong inhibited aortic contraction induced by K^+ (80 mM) and norepinephrine ($3 \mu M$), compound 1 showed significant inhibited aortic contraction induced by K^+ (80 mM) and norepinephrine ($3 \mu M$).

The biological activities of some alkaloid compounds are currently under investigation.

Key Words: Lauraceae; Annonaceae; *Cassytha filiformis*.

1. 前言

「中藥」—我國幾千年來一直在使用，而且在人類「疾病與營養補

品」中扮演著相當份量的天然資源，不分國內、外，最近有更多研究人員著手於此方面之研究，可謂「全球草藥熱」，據載英國皇家地理學會已經在北亞馬遜河流域推動一項熱帶雨林研究計畫，目前已經發現兩百五十幾種有用的植物，其中包括一種樹內含有生物鹼，未來可能提煉出防止愛滋病的疫苗。熱帶雨林潛藏之藥用資源無限，一些大藥廠已經投入這個龐大的自然資源市場，準備開發草藥生劑。臺灣地處亞熱帶雨林區，同樣孕涵有豐富的藥用資源，包括司治何杰今氏病、心臟病，及避孕藥皆可從熱帶花卉種源之中提煉。而樟科番荔枝科植物自古以來即被用來治療膿瘍、咳嗽、驅蟲、腹瀉、癩癰、腫瘤、健胃、強心等民間之用藥。而且最近國科會的生命科學簡訊第四卷、第七期、第六頁的報導指出，樟科植物大香葉樹之一生物鹼成分"Dicentrine"具有抗心律不整與抗血小板凝集之作用。¹ 同時，國外之"Asia Pacific Journal of Pharmacology (1989), 233-248"² 報導天然物（分離自藥用植物者），具有Dopamine agonists及antagonists之治療上之發展，此類之天然物大多為isoquinoline之生物鹼。而樟科、番荔枝科中草藥所含之主要成份——生物鹼，亦大多屬於isoquinoline類之生物鹼。包括 aporphine, benzyloiso-quinoline, protoberberine, berberine.....等型。

基於上述，筆者擬以五年時間為全程計畫，逐年分項的篩選，分離活性之物質，研究其作用之機轉....以探討此類中草藥抗心臟血管疾病方面之藥效，而作為藥物開發之基礎。據甘偉松教授所著之「藥用植物學」記載，樟科植物主要分佈於熱帶，約45屬1500種，我國入藥者計7屬，約27種，番荔枝科主要產於熱帶約95屬、1200種，我國入藥者計5屬，約8種。³ 而根據臺灣植物誌所載，在臺灣生長的植物（包括本產與外來栽培者），樟科與番荔枝科分別有12屬66種與6屬14種。⁴

樟科植物無根草之藥理作用，根據甘偉松教授所著之藥用植物學記載，有淋病、腎臟病等功用。根據江蘇新醫學院所編之中藥大辭典，記載其清熱、利濕、涼血解毒、治肝熱消瘦、肺熱咳嗽、黃疸、痢疾、痛腫、流鼻血、血淋、疥瘡、燙傷.....等多重藥效。³⁵ 將無根草全草粗萃

取物做抗血小板凝集試驗之篩選，顯示具有明顯地抗血小板凝集作用，因此，我們計畫探討其作用的成分，以作為藥物開發之基礎。本計畫之主要目的，是擬於此五年之全程計畫內篩選並探究其主要作用（具有抗心臟血管疾病作用者）之成分並研究其作用的機轉，以期了解此類中草藥真正在心臟、血管疾病有關之藥理活性，解開其在「中藥」上使用未能了解其真正作用之謎，進行製備有活性成分的衍生物，探討其 Structure-Activity Relationship (S.A.R.)，以作為藥物開發之基源。

2. 材料與方法

植物分佈及型態

Cassytha filiformis L. 為一寄生纏繞性草本植物，借盤狀吸根攀附於寄主植物上，植物成長線型，綠色或綠褐色，雖為草本植物，但略具木質特性。新生幼嫩部份披上一層銹色短毛，隨後短毛漸漸脫落，最後變為稀疏或無毛。穗狀花序長2-5釐米，緊密的被一層銹色短毛所覆蓋；苞片和小苞片微小，呈寬卵圓形，長約1釐米，褐色，披緣毛。花形很小長不到2毫米，呈白色，無梗；花被共6片，排成兩圈，外圈3枚較小，呈圓形有緣毛，內圈3枚較大，成卵形，外面長有短毛，而內面幾乎無毛；共可包含9支雄蕊，第一圈雄蕊花藥近花瓣狀，其餘的為線狀，第一、二圈雄蕊花藥無腺體，第三圈雄蕊花藥基部有2個無柄的腺體，退化的雄蕊呈三角形，具柄；子房呈卵球形，幾乎無毛，花柱短小。果實小呈卵球形，包藏於花后增大的肉質果拖內，但彼此分離，頂端有宿存的花被片。花、果生長期大約5-12月。

產於中國南部，生於山坡或疏林中，分佈於貴州、廣西、廣東、湖南、江西、浙江、福建、及台灣等地區。熱帶亞洲、非洲和澳大利亞也有。

本植物對寄主有害，但全草可供藥用，民間用於化濕消腫，通淋利尿，治腎炎水腫，尿路結石，濕疹，又可作為造紙的糊料。⁵無根草成分

之萃取、分離及純化八十三年於墾丁採集樟科中草藥 - 無根草 [*Cassytha filiformis* L.] 之全草以 MeOH 萃取，取粗萃取物加以篩選其抗血小板凝集作用。隨後再以柱層層析法將其分為多個 fractions (由低極性至高極性)，取各 fraction 之 sample 再篩選之。緊接著將有活性之 fractions 加以分離、純化，最終找出具有活性之物質，且配合光譜學以決定其化學結構式。

儀器與材料

1. 融點 (Melting point)

以 Mel-Temp 融點器測定，未校正。

2. 旋光度 (Optical rotation)

以 Jasco DIP 370 Digital polarimeter 測定。

3. 紅外線光譜 (Infrared spectra IR)

以 Hitachi 260-30 Infrared spectrophotometer 測定。

4. 核磁共振光譜 (Nuclear Magnetic Resonance Spectra NMR)

以 Varian Germini 200 MHz FT-NMR 及 Varian Unity 400 MHz FT-NMR (高雄醫學院)。

5. 質譜 (Mass spectra, MS)

以 Jeol TMSD-100 Mass spectrometer (南部貴儀中心, 中山大學)

6. 層析材料:

a. Silica gel (Kieselgel 60, 70~230 mesh 及 230~400 mesh, Merck)

b. Sephadex LH-20 gel (Fine chemicals AB Uppsala, Pharmacia)

c. 薄層層析片 (TLC plate)

製備用 (preparative): Kieselgel 60, F254 (0.25nm, Merck 製)

分析用 (analytical): Kieselgel 60, F254

(0.20nm Merck 製)

7. TLC spots 之檢出:

UV (長波 365nm 短波 254nm)

Dragendorff's reagent 檢測生物鹼

50% 硫酸

生物活性試驗

第一部份 抗血小板凝集活性試驗^{6,7}

(A). 實驗材料:

Actinodaphnine(1)、N-methylactinodaphnine(3)及 predacentrine (8), 爲本實驗室由無根藤所分離得到之化合物。

1. 血小板懸浮液的製備:

根據 Teng 等人的方法, 用 100 mM EDTA 與兔子 (New Zealand white) 耳靜脈抽出血以 1:14 (v/v) 的比例混和後, 再於 $500 \times g$ 離心十分鐘。除去血漿後, 將下層血小板以含有 EDTA 及 BSA (3.5 mg/ml) 的 Tyrode 溶液懸浮之, 並於相同轉速離心十分鐘, 所得之血小板以不含 EDTA 的 Tyrode 溶液懸浮並離心後, 再以 Tyrode 溶液使其懸浮, 並以 Coulter Counter (Model ZM) 計算其血小板數目, 進而調整其數目爲 4.5×10^8 platelets/ml, 最後加入 1 mM Ca^{2+} , 靜置三十分鐘後, 則可開始進行實驗。

2. 血小板凝集的測定

血小板凝集反應乃根據 O'Brien 之混濁度測定法, 以 Lumi-aggregometer (Chrono-Log Co. U.S.A) 測定之。將製備好的血小板加入經 silicone 包衣的小玻璃管中, 並以小磁棒作每分鐘 1200 轉的攪拌。若未特別說明, 均在加入凝集因子前三分鐘添加抑制劑, 且所有過程需在 $37^\circ C$ 下操作。

3. 結果計算

凝集程度的計算, 係以 PS 的吸光度做爲 0% 的血小板凝集, 以不含血小板的血漿 (platelet poor plasma, PPP) 或 Tyrode 溶液的吸光度作爲 100% 的血小板凝集, 並以下列公式計算之:

$$\text{凝集 \%} = \frac{\text{加凝集因子前吸光度} - \text{加凝集因子後吸光度}}{\text{加凝集因子前吸光度} - \text{Tyrode 溶液之吸光度}} \times 100\%$$

第二部份 血管鬆弛試驗^{8,9}

一、實驗方法

A. 大白鼠胸主動脈環標本的製備

將Wistar大白鼠(250-300公克)敲昏，放血，迅速切開胸腔，取出胸主動脈(Thoracic aorta)放入 Krebs 溶液中，其組成如下 (mM)：NaCl (94.7)，KCl (4.7)，MgSO₄ (1.2)，KH₂PO₄ (1.2)，NaHCO₃ (25)，CaCl₂ (1.9)，glucose (11.1)。將主動脈上附著的結締組織小心去除乾淨後，剪成長約 5 mm 的小環，並由兩根 L型的白金絲穿過血管環，其中一根白金絲接於 transducer (Gould L770)，另一根則接於固定架上。再將其固定於含有 5 ml Krebs溶液的浴器 (organ chamber) 中，給予一公克的張力，並通以 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合氣。主動脈環標本至少平衡九十分鐘，其間並更換三次 Krebs 溶液才進行實驗。張力的變化以Gould polygraph (Model 2400) 記錄。

B. 高鉀引發的血管收縮反應

主動脈環在 Krebs 溶液中平衡九十分鐘後，將浴器內溶液換成無 Ca²⁺ 的 Krebs 溶液。標本在此溶液中平衡三十分鐘，並經三次更換溶液後，再換成高鉀 (80 mM) 無 Ca²⁺ 的 Krebs 溶液，再次平衡十五分鐘後，外加 Ca²⁺ (1.9 mM)使主動脈發生收縮反應，觀察三分鐘並做記錄。當收縮達到最高點後，再將浴器內溶液換成無 Ca²⁺ 的 Krebs 溶液，洗滌三次並平衡三十分鐘後，再將溶液換成無 Ca²⁺ 的高鉀溶液，並與各種測試的化合物溫浴後，再重覆 Ca²⁺ 所引發的收縮反應，以觀察各種測試的化合物是否可抑制此種的動脈收縮作用。

C. 新腎上腺素 (Norepinephrine, NE) 引發的血管收縮反應主動脈環標本在 Krebs 溶液中平衡九十分鐘後，給予各種濃度的測試化合物與主動脈溫浴之後，再加入 NE (3 μM)，引發兩相性收縮反應。較快產生者稱為瞬間收縮 (phasic contraction)，較慢產生者稱為持續性收縮 (tonic contraction)，可維持至少三十分鐘，觀察並記錄其反應。

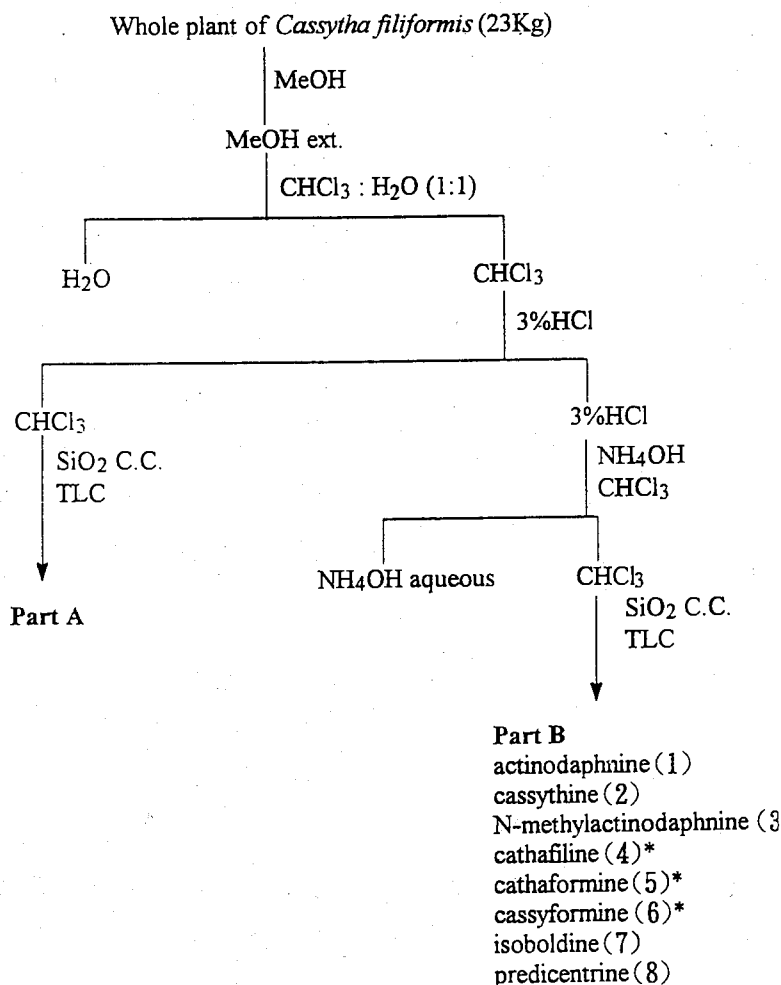
二、實驗材料

1. Norepinephrine 購自Sigma Chem. Co., U.S.A.

2. NaCl, KCl, MgSO₄, KH₂PO₄, NaHCO₃, CaCl₂, glucose 購自Wake Pure Chem. Ind., Japan

3. 結果

依圖一之流程，將新鮮全株植物 (23Kg)，以甲醇連續萃取五次，所得之抽出液經減壓濃縮後，用水及氯仿分配萃取，收集氯仿中性層(即 Part A)及酸性水層；酸層部分，則以氨水鹼性化後，再以氯仿萃取，收集氯仿層(即 Part B)。



圖一、無根草分離之流程

Part B: 利用管柱層析法 (Silica gel 70~230 mesh, 40×4 cm) 以氯仿爲初始沖提溶媒，接著以氯仿: 甲醇依序爲 100:1→50:1→20:1→10:1→8:1→5:1→4:1→1:1 之溶媒比例沖提，最後以甲醇沖洗，得到 28 個 fractions。

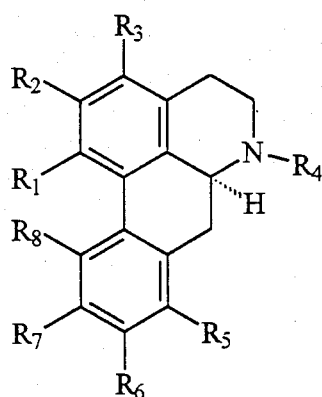
將 fr.16~19 合併，再利用管柱層析法 (Silica gel 230~ 400 mesh, 20×2 cm) 以氯仿爲初始沖提溶媒，接著以氯仿: 甲醇依序爲 50:1→20:1→10:1→8:1→5:1→4:1→1:1 之溶媒比例沖提，最後以甲醇沖洗，收集了 7 個 fractions；將 fr.6 反覆以管柱層析法進行純化，得到一棕色無晶形固體之 actinodaphnine (1) (0.15 g) [矽膠薄層色層分析以氯仿: 甲醇 (9:1) 展開，Rf 值爲 0.39]；fr.5 亦反覆以管柱層析法進行純化，得到一棕色無晶形固體之 cassythine (2) (1.52 g) [矽膠薄層色層分析以氯仿: 甲醇 (9:1) 展開，Rf 值爲 0.43]；fr.4 亦反覆以管柱層析法進行純化，得到一淡黃色無晶形粉末之 cassyformine (6) (7mg) [矽膠薄層色層分析以氯仿: 甲醇 (9:1) 展開，Rf 值爲 0.45]；fr.2 再利用管柱層析法以氯仿爲初始沖提溶媒，接著以氯仿: 甲醇依序爲 50:1→20:1→10:1→8:1→5:1→4:1→1:1 之溶媒比例沖提，最後以甲醇沖洗，收集了 5 個 fractions (2a~2e)，然後 fr. 2b 亦反覆以管柱層析法進行純化，得到一白色無晶形粉末之 isoboldine (7) (5mg) [矽膠薄層色層分析以氯仿: 甲醇 (10:1) 展開，Rf 值爲 0.60]；而 fr. 2d 亦反覆以管柱層析法進行純化，得到一棕色無晶形粉末之 predicentrine (8) (10mg) [矽膠薄層色層分析以氯仿: 甲醇 (10:1) 展開，Rf 值爲 0.62]。

將 fr.8~10 合併，再利用管柱層析法 (Silica gel 230~ 400 mesh, 20×2 cm) 以氯仿爲初始沖提溶媒，接著以氯仿: 甲醇依序爲 50:1→20:1→10:1→8:1→5:1→4:1→1:1 之溶媒比例沖提，最後以甲醇沖洗，收集了 6 個 fractions；將 fr.3 以薄層層析法 (pre-coated TLC plate) 進行純化，以氯仿: 甲醇 (50:1) 爲展開溶媒，得到一棕色無晶形固體之 cathafiline (4) (20 mg) [矽膠薄層色層分析以氯仿: 甲醇 (20:1) 展開，Rf 值爲 0.52]，及一棕色無晶形固體之 cathaformine (5) (

14 mg) [矽膠薄層色層分析以氯仿:甲醇(20:1)展開, Rf 值為 0.54]。

將 fr. 11~15 合併, 再利用管柱層析法 (Silica gel 230~400 mesh, 25×2 cm) 以氯仿為初始沖提溶媒, 接著以氯仿:甲醇依序為 50:1→20:1→10:1→8:1→5:1→4:1→1:1 之溶媒比例沖提, 最後以甲醇沖洗, 收集了 8 個 fractions (11a~11h), 然後 fr. 11 反覆以管柱層析法純化, 得到一棕色無晶形狀之 N-methylactinodaphnine (3) (15 mg) [矽膠薄層色層分析以氯仿:甲醇 (15:1) 展開, Rf 值為 0.54]。

以上共計分得八個化合物, 其中 cathafiline (4), cathaformine (5) 及 cassyformine (6) 為天然界首次分離得到; 化合物 8 為本科植物首次分離得到且化合物 7、8 為本植物首次分離得到, 所有化合物均經由光譜分析或化學反應證明其結構, 其結構如圖二。



	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
1	-OCH ₂ O-		H	H	H	OH	OCH ₃	H
1a	-OCH ₂ O-		H	Ac	H	OAc	OCH ₃	H
2	-OCH ₂ O-		OCH ₃	H	H	OH	OCH ₃	H
2a	-OCH ₂ O-		OCH ₃	Ac	H	OAc	OCH ₃	H
3	-OCH ₂ O-		H	CH ₃	H	OH	OCH ₃	H
* 4	-OCH ₂ O-		H	COOCH ₃	H	OH	OCH ₃	H
4a	-OCH ₂ O-		H	COOCH ₃	H	OAc	OCH ₃	H
* 5	-OCH ₂ O-		OCH ₃	COOCH ₃	H	OH	OCH ₃	H
5a	-OCH ₂ O-		OCH ₃	COOCH ₃	H	OAc	OCH ₃	H
* 6	-OCH ₂ O-		OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	OH
7	OH	OCH ₃	H	CH ₃	H	OH	OCH ₃	H
8	OCH ₃	OH	H	CH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H

* 係表示新化合物

圖二、從無根草分離得到之八個化合物結構

化合物1、3、8在抗血小板凝集活性方面，化合物 1 對於由 ADP、arachidonic acid、collagen 及 PAF 所誘發的血小板凝集效應，有完全的抑制作用；化合物 3 對於由 ADP、arachidonic acid及 collagen 所誘發的血小板凝集效應，有完全的抑制作用；化合物 8對於由 arachidonic acid 及 collagen 所誘發的血小板凝集效應，有選擇性的抑制作用，其結果見表一。

表一、化合物1, 3, 8 對家兔之 washed platelet 以Thr, ADP, AA, Col, PAF 等為誘導因子之抗血小板凝集作用 % Aggregation
[Mean \pm S. E. (n)]^a

Agent	Thr 0.1U/ml	ADP 20 μ M	AA 100 μ M	Col 10 μ g/ml	PAF 2nM
control	92.3 \pm 0.7(3)	79.8 \pm 1.8(4)	89.9 \pm 1.1(5)	89.0 \pm 0.4(5)	91.6 \pm 0.6(5)
actinodaphnine(1) 100 μ g/ml	_____	0.0 \pm 0.0(3) ^d	0.0 \pm 0.0(3) ^d	0.0 \pm 0.0(3) ^d	0.0 \pm 0.0(3) ^d
N-methylactinoda- phnine(3) 100 μ g/ml	_____	0.0 \pm 0.0(3) ^d	0.0 \pm 0.0(3) ^d	0.0 \pm 0.0(3) ^d	68.1 \pm 6.2(3) ^c
predicentrine(8) 100 μ g/ml	88.9 \pm 1.1(3)	_____	0.0 \pm 0.0(3) ^d	0.0 \pm 0.0(3) ^d	74.0 \pm 1.8(3) ^b
lysicamine(13) 100 μ g/ml	88.9 \pm 1.5(3)	_____	16.3 \pm 0.8(3) ^d	55.2 \pm 14.9(4)	83.7 \pm 0.6(3) ^b

^a Platelets were preincubated with each compound (100 μ g/ml) or 0.5 % DMSO (control) at 37°C for 3 min, then the inducer thrombin (0.1 U/ml), adenosine diphosphate (20 μ M), arachidonic acid (100 μ M), collagen (10 μ g/ml) and platelet activating factor (2nM) values are presented as means \pm S.E. (n=3-5).

b: p<0.05, c: p<0.01, d: p<0.001

$\alpha 1$ adrenoceptor agonist (如 norepinephrine) 能誘起血管平滑肌的收縮作用，而 $\alpha 1$ adrenoceptor antagonist 卻又會被 antagonist prazosin 所阻斷。高鉀離子誘起的血管平滑肌收縮作用就是 Ca^{2+} 經由 voltage-dependent Ca^{2+} -channels 流入增加的結果，而這個 channels 會被 dihydropyridines (如 nifedipine) 所阻斷。表二顯示在濃度為 $100 \mu\text{g/ml}$ 時，化合物 3 對於由高鉀 (80 mM) 和 norepinephrine ($3 \mu\text{M}$) 所引起的血管收縮有完全的抑制作用；化合物 1 對於由高鉀和 norepinephrine 所引起的血管收縮也有顯著的抑制作用。

表二、Effects of aporphines on high potassium and norepinephrine-induce phasic and tonic contractions of rat thoracic aorta ^a.

Compound	K^+ (80 mM)	NE ($3 \mu\text{M}$)-phasic	NE ($3 \mu\text{M}$)-tonic
actinodaphnine(1) $100 \mu\text{g/ml}$	41.9 ± 2.5^c	40.6 ± 1.5^c	15.5 ± 0.1^d
N-methylactinodaphnine (3) $100 \mu\text{g/ml}$	9.0 ± 7.3^d	0.0 ± 0.0^d	0.0 ± 0.0^d
Nifedipine ($1 \mu\text{M}$)	0.0 ± 0.0^d	—	—
Prazosin ($1 \mu\text{M}$)	—	0.0 ± 0.0^d	0.0 ± 0.0^d
Control	100 ± 16.7	100 ± 12.9	100 ± 11.1

^a Rat aortae were preincubated with various compounds, DMSO (0.1%, control), nifedipine or prazosin at 37°C for 15 min, then high potassium (K^+ , 80 mM) or norepinephrine (NE, $3 \mu\text{M}$) was added. Percentages of the control contraction were calculated and presented as means \pm S.E. ($n=3$).

b: $P < 0.05$; c : $P < 0.01$; d : $P < 0.001$ as compared with the respective control.

4. 討論

以上共計分得八個化合物，其中 cathafiline (4), cathaformine (5) 及 cassyformine (6) 爲自然界首次分離得到；化合物8爲本科植物首次分離得到且化合物7、8爲本植物首次分離得到，所有化合物均經由光譜分析或化學反應證明其結構，其結構如圖二。

化合物 1、3 及 8 抗血小板凝集活性之實驗結果，由化合物 1 對於由 ADP、arachidonic acid、collagen 及 PAF 所誘發的血小板凝集效應，有完全的抑制作用；化合物 3 對於由 ADP、arachidonic acid 及 collagen 所誘發的血小板凝集效應，有完全的抑制作用；化合物 8 對於由 arachidonic acid 及 collagen 所誘發的血小板凝集效應，有選擇性的抑制作用。

$\alpha 1$ adrenoceptor agonist (如 norepinephrine) 能誘起血管平滑肌的收縮作用，而 $\alpha 1$ adrenoceptor agonist 卻又會被 antagonist prazosin 所阻斷。高鉀離子誘起的血管平滑肌收縮作用就是 Ca^{2+} 經由 voltage-depedent Ca^{2+} -channels 流入增加的結果，而這個 channels 會被 dihydropyridines (如 nifedipine) 所阻斷。表二顯示在濃度爲 $100 \mu\text{g/ml}$ 時，化合物 3 對於由高鉀 (80 mM) 和 norepinephrine ($3 \mu\text{M}$) 所引起的血管收縮有完全的抑制作用；化合物 1 對於由高鉀和 norepinephrine 所引起的血管收縮也有顯著的抑制作用。

生物鹼中部份化合物之生物活性，目前仍在測試中。

5. 結論與建議

1. 由無根藤 (*Cassytha filiformis* L.) 分離得到八個化合物，包含八個 aporphine 型生物鹼：actinodaphnine (1)、cassythine (2)、N-methylactinodaphnine (3)、cathafiline (4)、cathaformine (5)、cassyformine (6)、isoboldine (7)、predicentrine (8)。其中 cathafiline (4), cathaformine (5), cassyformine (6) 三種爲新

化合物，為化學結構成分研究之新發現，其活性尚須進一步研究。若以一般來說，aporphine 生物鹼具有心血管疾病方面之活性，新化合物可以往這方面之活性篩選。化合物8為本科植物首次分離得到且化合物7及8為本植物首次分離得到，所有化合物均經由光譜分析或化學反應證明其結構。

2. 在抗血小板凝集活性方面，化合物 1 對於由 ADP、arachidonic acid、collagen 及 PAF 所誘發的血小板凝集效應，有完全的抑制作用；化合物 3 對於由ADP、arachidonic acid 及 collagen所誘發的血小板凝集效應，有完全的抑制作用；化合物 8 對於由arachidonic acid 及 collagen 所誘發的血小板凝集效應，有選擇性的抑制作用。
3. 化合物 3對於由高鉀(80 mM) 和norepinephrine ($3\mu\text{M}$) 所引起血管收縮有完全的抑制作用；化合物 1 對於由高鉀和 norepinephrine 所引起的血管收縮也有顯著的抑制作用。
4. 計畫核准至結束期間供研究之時限太短及匆促，經費亦過少，盼望改進。

6. 參考文獻

1. 「生命科學簡訊」，國科會發行，第四卷第七期 p. 6 (1990)。
2. N. Baidur and J. L. Neumeyer, Asia Pacific Journal of Pharmacology, 233-248 (1989)。
3. 甘偉松著，「藥用植物學」，國立中國醫藥研究所出版，p. 249 (1979)。
4. H. L. Li, T. S. Liu, T. C. Huang, T. Koyama, C. E. Devol, Flora of Taiwan VI, 現代關係出版社出版，p45(1979)。
5. "雲南植物誌" 中國科學院昆明植物研究所編著，第三卷，p211 (1983)。
6. C. M. Teng, W. Y. Chen, W. C. Ko and C. Ouyang, Antiplatelet effect of butylidenephthalide, Biochim. Biophys. Acta, 924,

375(1987).

7. J. R. O'Brien, Platelet aggregation II. Some results from a new method of study, J. Clin. Path., 15, 452(1962).
8. R. M. Aboud, M. Shafti and J. R. Docherty, Investigation of the subtypes of α 1-adrenoceptor mediating contractions of rat aorta vas deferens and spleen, Br. J. Pharmacol., 109, 80(1993).
9. D. Rampe, C. M. Su, F. Yousif and D. J. Triggle, Calcium channel antagonists : pharmacological considerations, Br. J. Clin. Pharm., 20, 247s(1985).

中藥及臺灣產天然物抗病毒抗癌及抗血栓之研究（四）

杜 昌 益

國立中山大學

中文摘要

癌症為全國十大死因排行榜，另由病毒引起之疾病亦有逐年增加之趨勢，化學療法在上述疾病之治療是非常重要的。過去由傳統中藥及天然物衍生而來之藥物，往往具有特殊之化學結構及作用機轉，是一般合成藥物無法比擬的。我國承襲中藥之精華，且臺島地處亞熱帶，天然資源甚豐，是開發新藥之庫。本畫以襖美國 NIH之抗癌及抗病毒篩選之方法來篩選傳統中藥。在抗癌活性方面，我們以多種人類癌細胞配合MTT分析方法，來篩選中藥及其成分。在抗病毒活性方面，我們以皰疹病毒型1 (Herpes simplex virus typel, HSV-1)F Strain、簡單型皰疹病毒型2 (HSV-2) G Strain、細胞巨大性病毒 (Cytomegalovirus) AD-169 及 Davis Strains 以及以上三種病毒低代臨分離株 (low passage clinical isolates)配合病斑減少法 (plaque reduction assay)及DNA-DNA雜交法，來篩選中藥及其成分。有活性之中藥繼續以活性為導向分離出活性成分，活性成分以化學、光譜及X-Ray繞射等方法來解析化學結構。今年之計畫中，我們從大葉樹蘭之葉部分離到五個具有 cytotoxicity 之成分。

關鍵詞：大葉樹蘭，抗癌活性。

ABSTRACT

Cancer is the leading death cause in Taiwan. Virus-related diseases also increased rapidly in recent years. Chemotherapy plays an important role in treating cancer and virus infected patients. Most clinically useful anticancer and antiviral agents from traditional herbs and natural sources usually possessed novel structures and mechanism of actions. In this project, we used multiple human tumor cell lines to screen traditional chinese herbs and their chemical constituents for anti-cancer activities and HSV-1, HSV-2, as well as CMV virus for antiviral activities. *Aglaia ellitipfolia* merr (Meliaceae) was selected for study when a chloroform extract of the stem bark was found to display significant cytotoxicity in A-549 (human lung adenocarcinoma), HT-29 (human colon adenocarcinoma), KB (human epidermoid carcinoma) and P-388 (mouse lymphocytic leukaemia) cell culture systems when assessed using standard protocols [1-2]. Bioactivity-guided chromatographic fractionation led to the isolation and characterization of five cytotoxic constituents.

英文關鍵詞： *Aglaia ellitipfolia*; Meliaceae; Cytotoxicity

前言

大葉樹蘭之葉部之氯仿萃取物具有顯著之癌細胞毒殺活性，以癌細胞毒殺活性為導向，我們從大葉樹蘭之葉部分離到五個具有 cytotoxicity 之成分分離出活性成分，活性成分以化學、光譜及 X-Ray 繞射等方法解析化學結構。

材料與方法

一般實驗方法

熔點：未校正。氫核磁共振譜 (200 MHz)：CDCl₃；質譜：70eV；紫外光譜：MeOH；紅外光譜：KBr。色層分析是以矽膠為固定相。分析級薄片層析板上之點用紫外光譜 (254 and 365 nm) 照射並再噴 60% 硫酸後加熱至 100°C 決定。

萃取和分離

空氣中自然乾燥，磨碎後之葉子 (2.5 Kg) 以甲醇重覆萃取。利用減壓濃縮除去甲醇之後，將溶於甲醇之萃取物用水和氯仿作液液相分配。乾燥後的氯仿層萃取物 (150 g) 被發現對 A-549 (人類肺癌細胞)，HT-29 (人類腸癌細胞)，KB (人類鼻咽癌細胞) 和 P-388 (老鼠血癌細胞) 有顯著之抑制作用 [1-2]，以矽膠為固定相，甲醇和氯仿為移動相，色層分析得到化合物 1 和 2 [氯仿為沖提液] 及化合物 3 和 4 [氯仿：甲醇 (19:1) 為沖提液]。

癌細胞毒殺活性測試方法

KB 和 P-388 細胞是由美國伊利諾大學 J. M. Pezzuto 教授提供，A-549 (human lung adenocarcinoma) 和 HT-29 (human colon carcinoma) 是買自 ATCC。

P-388 細胞是以 Fisher's medium 培養；KB 細胞是以 Basal Medium 培養；A-549 細胞是以 Eagle Minimum 培養；HT-29

細胞是以 Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 培養；所有的細胞皆培養在 5% CO₂ 培養箱中。

P-388, KB, A-549, and HT-29 四種癌細胞毒殺活性測試是以 MTT [3-(4, 5-dimethylthiazole-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] 比色法來進行，對於 P-388 及 KB 細胞之測試，是以 200 微升每孔 1500 個細胞加入九十六孔培養盤中，測試化合物再以八種濃度重複三次加入九十六孔培養盤中，經過七十二小時之培養，加入五十微升之 MTT 試劑；對於 A-549 及 HT-29 細胞之測試，是以 200 微升每孔 750 個細胞加入九十六孔培養盤中，測試化合物再以八種濃度重複三次加入九十六孔培養盤中，經過六天之培養，加入五十微升之 MTT 試劑；再置於培養箱中五個小時後，以 DMSO (Merck) 溶解結晶，再以 enzyme-linked immunosorbant assay reader (Titertek Mutiskan, Flow) 在 540 nm 波長之下讀起吸光值，百分之五十有效抑制濃度是以對照組細胞數之百分之五十來計算之。各化合物之癌細胞毒殺活性之百分之五十有效抑制濃度列於表一。

結果與討論

以生物活性為引導分離出五個具有癌細胞毒殺活性之化合物，分別為化合物 1-4；化合物 1 是無色之針晶，熔點 167-168 °C，分子式為：C₁₈H₂₂O₂N₂；以下之證據顯示官能基 cinnamoyl moiety 之存在：質譜 m/z 131 (PHCH=CHCO)，103 (PHCH=CH)；紅外光譜 (KBr) 1660, 1620, 1520, 1415, 990 cm⁻¹；¹H NMR spectrum (CDCl₃) δ 7.69 (1H, d, J = 15.4 Hz, H-3"), 6.94 (1H, d, J = 15.4 Hz, H-2"), and 7.20-7.50 (5H, m, aromatic protons). ¹H-¹H COSY 實驗得到以下之數據：δ 1.72 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-4), 1.82 (3H, d, J = 1.2 Hz, H-7), 1.70-1.98 (2H, m, H-4'), 1.90-2.25 (2H, m, H-3'), 3.20-3.56 (2H, m, H-5'), 6.08-6.18 (1H, m, H-2'), 6.48-6.60 (1H, m, H-3), 7.48 (1H, m, NHCO). ¹³C NMR 光譜 (CDCl₃) 顯示：δ 170.1 (s, C-1), 167.3 (s, C-1"), 143.8 (d, C-3"), 136.2 (s, C-2), 132.8 (d, C-3), 131.0 (d, C-7"), 130.1 (d, C-6", 8"), 129.4 (d, C-5", 9"), 119.5 (d, C-2"), 64.1 (d, C-2'), 46.8 (t, C-5'), 34.8 (t, C-3'), 21.9 (t, C-4'), 14.3 (q, C-7), 12.5 (q, C-4)。

化合物 1.：針晶；120 mg；m.p. 167-168°C； $[\alpha]_D^{18} +42.5^\circ$ (CHCl₃, c 0.01)；UV λ_{\max} nm (log ϵ)：282 (4.82)；IR ν_{\max} cm⁻¹：3270, 1660, 1620, 1520, 1415, 990 cm⁻¹；MS m/z (rel.int.)：298 [M⁺], 281 (0.4), 265 (0.2), 256 (0.3), 243 (0.1), 236 (0.2), 229 (0.6), 215 (15), 200 (4), 199 (21), 167 (35), 151 (6), 131 (100), 103 (59), 85 (52), 83 (44), 77 (28), 70 (15)。

化合物 2.：針晶；120 mg；m.p. 118-119°C； $[\alpha]_D^{20} -98^\circ$ (CHCl₃, c 0.1)；UV λ_{\max} nm (log ϵ)：215 (4.36), 234 (sh, 3.92), 274 (2.94)；MS m/z (rel.int.)：505 [M⁺], 487 (5), 443 (5), 390 (70), 300 (82), 285 (34), 205 (30), 176 (100), 135 (14)。

化合物 3.：針晶；20 mg；m.p. 128-129°C； $[\alpha]_D^{20} -48^\circ$ (CHCl₃, c 0.1)；UV λ_{\max} nm (log ϵ)：214 (4.26), 232 (sh, 3.92), 276 (2.84)；MS m/z (rel.int.)：492 [M⁺], 474 (5), 490 (5), 373 (70), 330 (82), 300 (100), 285 (34)。

化合物 4.：針晶；30 mg；m.p. 138-139°C； $[\alpha]_D^{20} -46^\circ$ (CHCl₃, c 0.1)；UV λ_{\max} nm (log ϵ)：214 (4.26), 238 (sh, 3.96), 284 (2.84)；MS m/z (rel.int.)：478 [M⁺], 487 (5), 459 (5), 390 (70), 300 (100), 285 (33)。

化合物 1-4 之 ¹³C 核磁共振譜之化學位移是以 ¹H-¹³C hetero-nuclea shift correlated 2D 實驗來確定。化合物 1-4 之癌細胞毒殺活性列於表一。

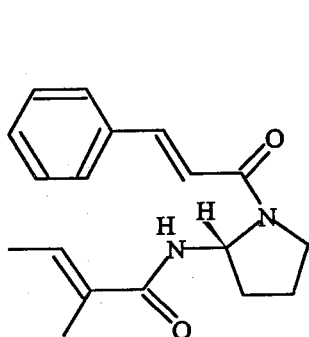
化合物一—四對拓璞異構酶一、拓璞異構酶二及 microtubule 沒有抑制作用。

引用文獻

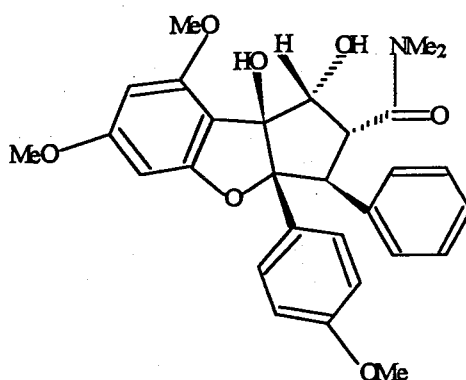
1. Geran, R. I., Greenberg, N. H., Macdonald, M. M., Schumacher, A. M., and Abbott, B. J. (1972) *Cancer Chemother. Rep.* **3**, 1.
2. Wang, S. -K., Duh, C. -Y., Wu, Y. -C., Wang, Y., Cheng, M. -C., Soong, K., and Fang, L. -S., (1992) *J. Nat. Prod.* **55**, 1430.

表一 化合物 1-4 之癌細胞毒殺活性 (ED₅₀, μ g/ml)

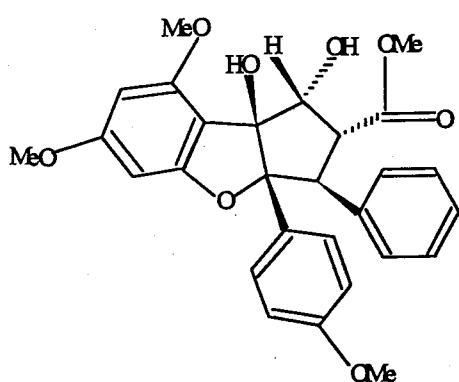
Compound	A-549	HT-29	KB	P-388
1	>50	>50	>50	2.86
2	0.0025	0.0130	0.0220	0.0084
3	0.0038	0.0045	0.0094	0.0037
4	0.0007	0.0008	0.0023	0.0012



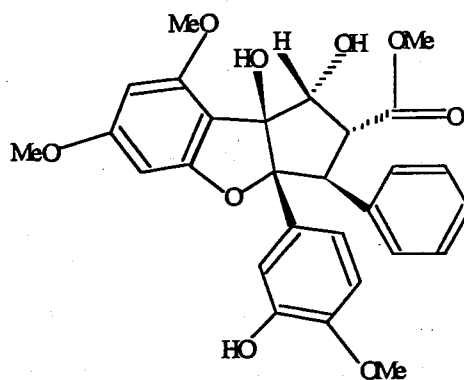
1



2

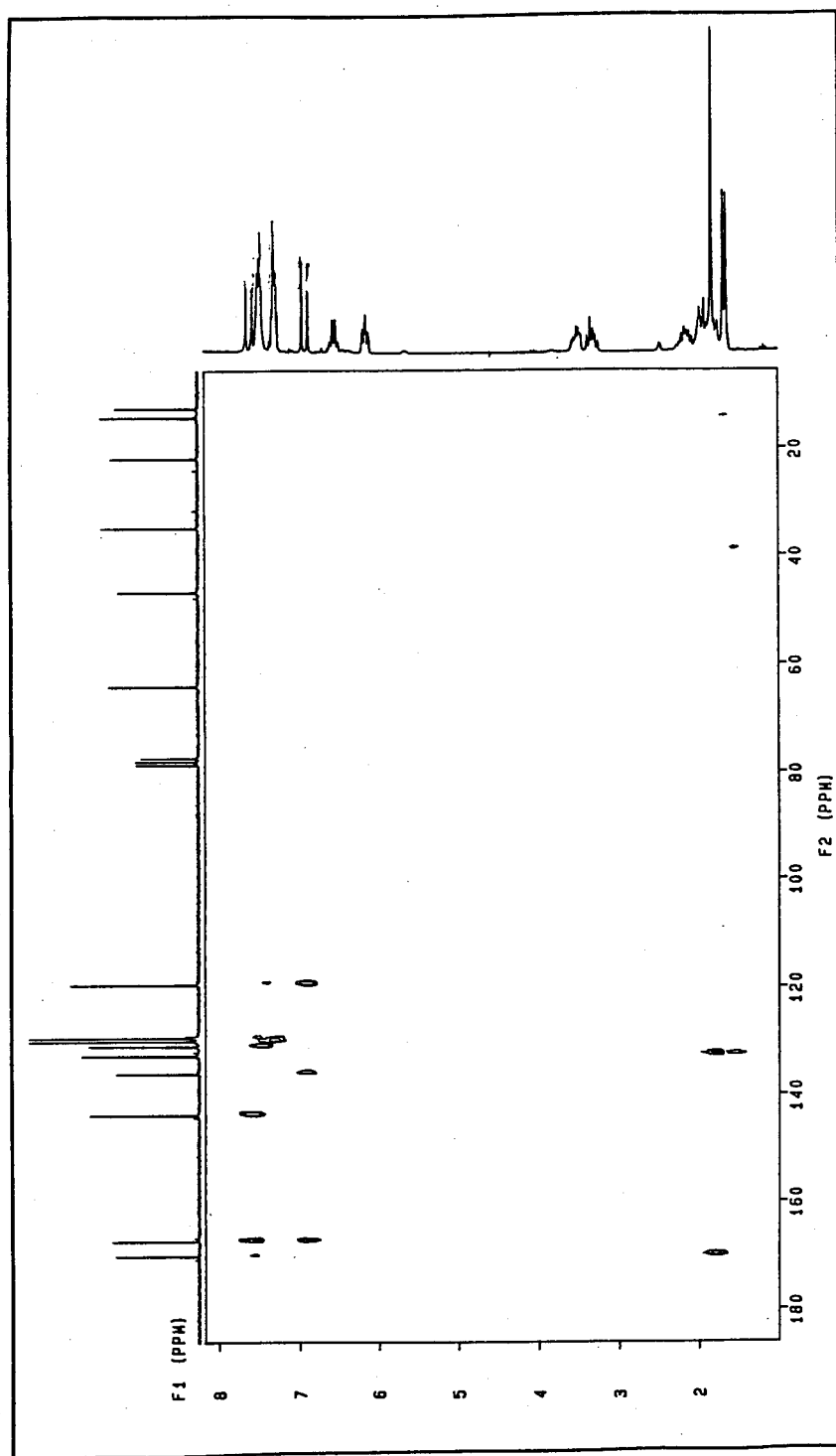


3

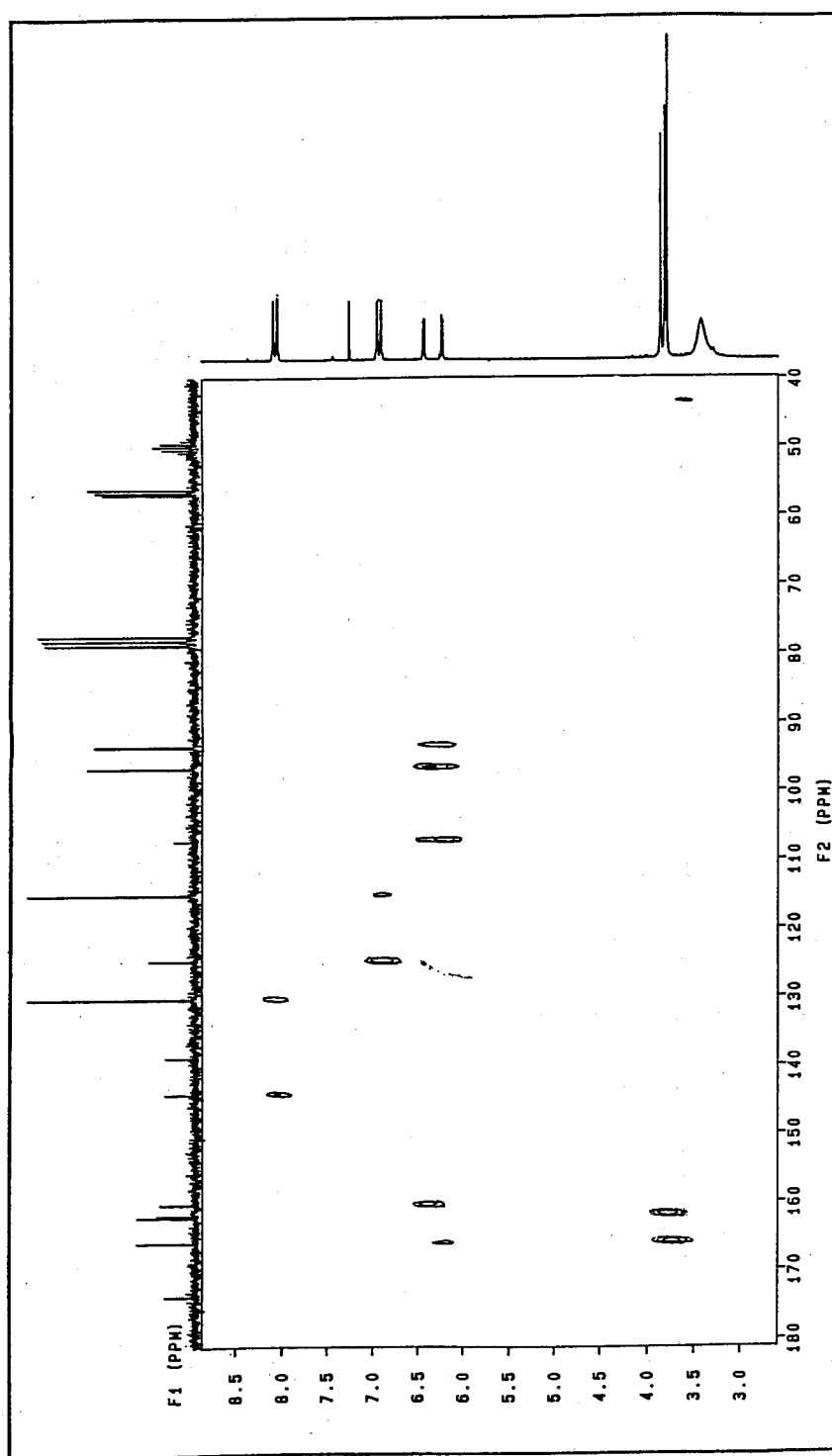


4

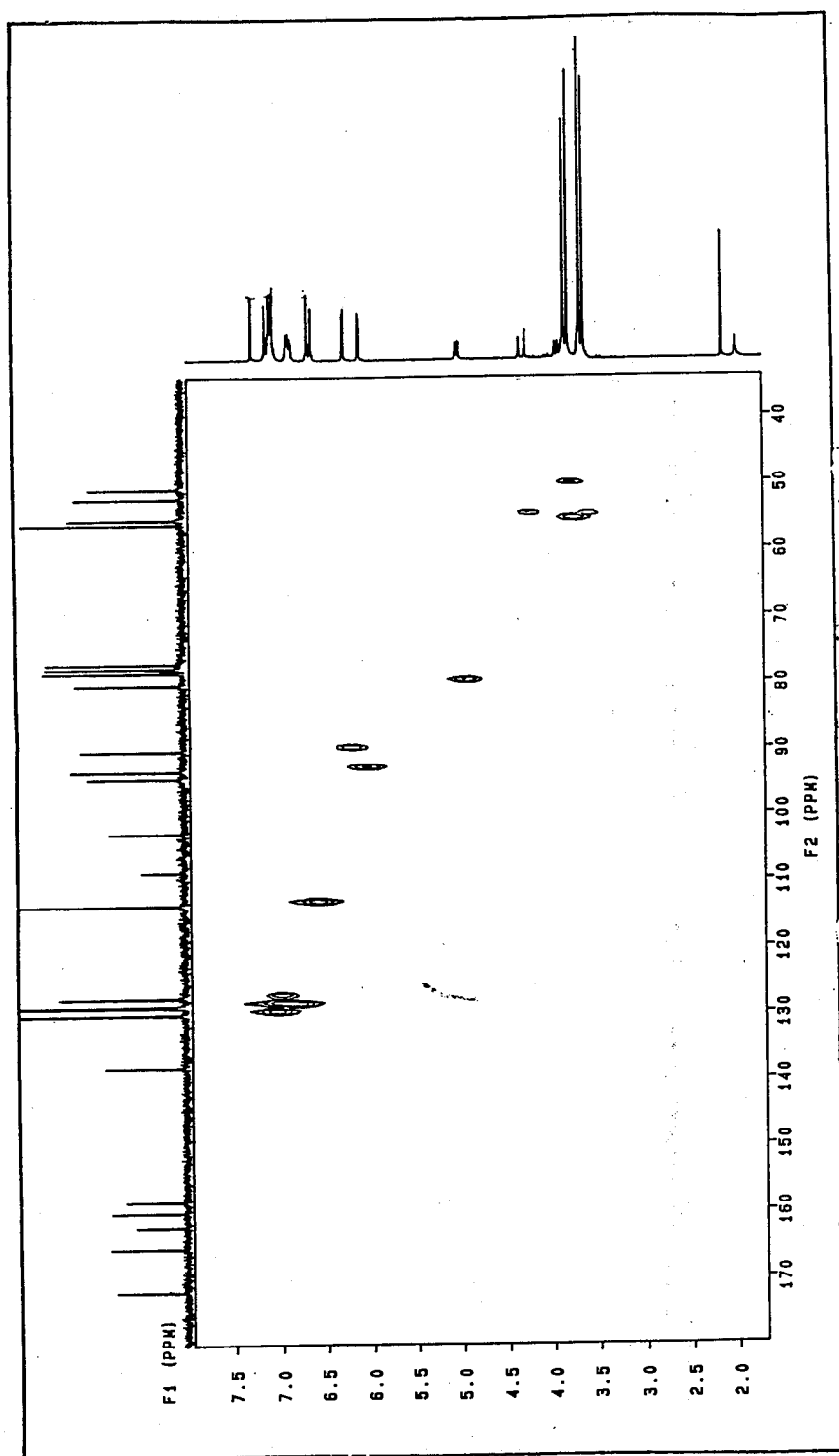
圖一 化合物 1-4 之化學結構



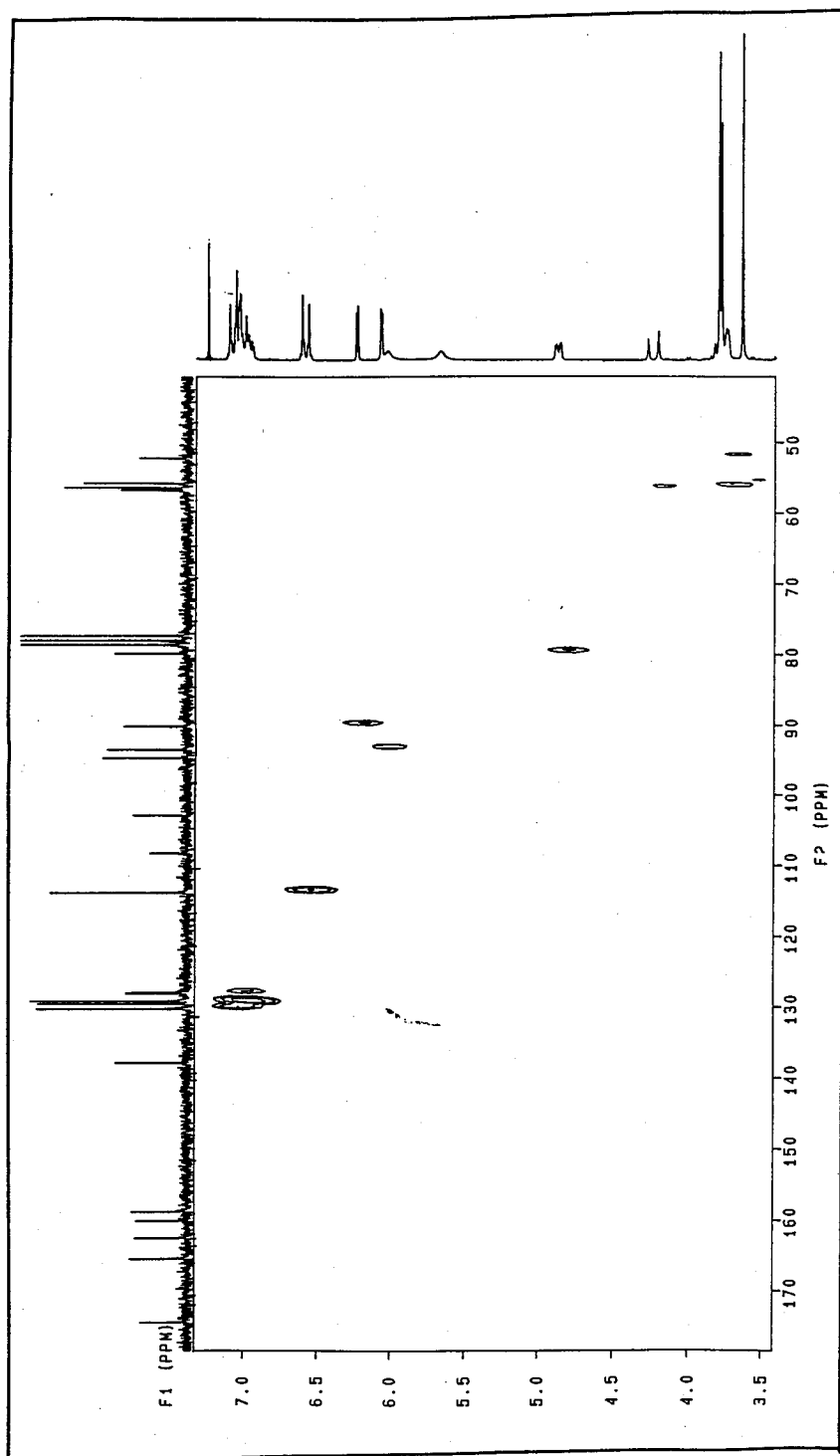
圖二 化合物 1 之HETCOR 圖譜



圖三 化合物 2 之HETCOR 圖譜



圖四 化合物 3 之HETCOR 圖譜



圖五 化合物 4 之HETCOR 圖譜

延胡索成份四氫巴馬汀對癲癇之影響

Effects of dl-tetrahydropalmatine on experimental epilepsy

林 茂 村

國立成功大學

中文摘要

本研究旨在於探討四氫巴馬汀 (THP) 對於實驗性癲癇之影響。癲癇發作之誘發採用皮下注射picrotoxin與杏仁核內電刺激等兩種模式。我們利用自行研發的紅外光矩陣式與超音波式行為量測系統來分析大白鼠癲癇發作時的量化程度。實驗結果顯示，不論是化學性或電氣性誘發癲癇發作時，大鼠之tremor, myoclonia, turning與 locomotion均有顯著增加；其動作增加之幅度均與癲癇發作之程度，兩者具有相關性。同時，我們發現給予THP確實可以抑低化學性或電氣性引致的癲癇發作。大鼠的動作增加現象也可被THP之服用所抑低。在全身麻醉下給予picrotoxin除了可誘發大鼠的癲癇發作（例如肌體抽搐不斷），同時提昇動脈壓以及杏仁核記錄到的妥巴氨釋放。THP服用後大大地抑制picrotoxin所引致的杏仁核妥巴氨釋放，動脈壓升高與肌體抽搐。由本實驗結果推論：延胡索成份四氫巴馬汀可經由抑制鼠腦杏仁核妥巴氨釋放而達其抑制癲癇發作之作用。由此可見THP可能具有抗癲癇作用。

中文關鍵詞：四氫巴馬汀

癲癇

妥巴胺

杏仁核

動脈壓

ABSTRACT

The purpose of the present study was to assess the possible therapeutic effects of dl-tetrahydropalmatine (THP) on experimental epilepsy. Experimental epilepsy was induced by subcutaneous injection of picrotoxin or direct electrical stimulation of the amygdala of the rat brain. The behavioral responses displayed by the animals to picrotoxin injection or intra-amygd

ala stimulation were measured by an ultrasonic motion-sensing system designed by ourselves. It was found that the experimental epilepsy or the behavioral responses to chemical or physical stimulation was significantly suppressed by premedication with THP administration. In addition, the pressor responses occurred during the experimental epilepsy were also attenuated by premedication with THP. Furthermore, the increased release of dopamine in the amygdala during experimental epilepsy was suppressed by THP treatment. The data indicate that THP may act through inhibition of amygdala dopamine release to protect the animal from epileptic attack.

Key word : Tetrahydroxy palmatine

Epilepsy

Dopamine

Amygdala

Arterial pressure

前 言

延胡索爲罂粟科植物之乾燥塊莖，最早著錄於開寶本草，性味辛苦、溫、歸肝、胃經。本草綱目記載：「活血、利氣、止痛」，自古用於淨血、鎮痛、鎮痙。（李時珍，1990）。

延胡索的成份已被分離出五種生物鹼：(1)(-)-tetrahydrocoptisine，(2)(+)-corydaline，(3)(+)-tetrahydropalmatine，(4)(-)-tetrahydrozatrarrhizine，(5)(+)-palmatine。其中dl-tetrahydropalmatine (THP)具有鎮靜、催眠、鎮痛(Liu et al. 1982)降壓(金國章等，1958)。抗心律不整(趙東科等，1958)及抗甲狀腺機能亢進症(謝明村、吳龍源等，1990)。劉國卿等人(Liu 1983; Liu et al. 1982)認爲THP經由作用於腦部單氨傳遞物質例如norepinephrine，dopamine或serotonin之代謝而達到鎮靜及催眠作用。最近彭文煌、謝明村、蔡輝彥、林茂村等人(1992)也證明THP可明顯抑制大鼠之自發運動量及增強鼠腦紋狀體多巴氨釋放。另一方面的證據亦指出癲癇之發作以及常用抗癲癇之藥物之藥效均與腦中單氨類神經傳遞物質之變化有關。因此THP是否具有強大的抗癲癇作用是個極有趣味的課題。

材料與方法

一、動物

雄性大白鼠(250-300克重)困於鼠籠並餵之以食物及飲水(隨時供應)。室溫維持在攝氏23°C左右，採12小時光明及12小時黑暗。

二、癲癇發作動物模式

第一種模式：採用Gean等人(1993)及Thomas (1990)方法(

Chemical Kindling) 化學激發癲癇：

每次實驗要使用剛準備好的picrotoxin (Sigma) 皮下注射3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 mg/kg，最少一小時內，觀察癲癇症狀。其症狀隨劑量大小而變，分成MYO (Myoclonic 肌肉抽搐) 和GTC (General tonic and clonic 全身僵直且抽搐)。MYO 指快速的全身顫動，GTC指喪失平衡，兩側前腳強力伸直且頭部前後移動，扮隨全身顫抖和間歇的抽筋。

第二種模式採用Wahnschaffe and Loscher (1991) 的方法。雙極電極埋在杏仁核，手術後兩週，用連續電流刺激，電量500微安培，1毫秒方形脈衝波，頻率每秒50次，刺激時間1秒，每天刺激1次，直到達到5階段癲癇，可能需數天到數週。

癲癇激發的五階段：

1. 不動閉眼鼻毛和臉部抽搐。
2. 點頭伴隨有更多的臉部抽搐。
3. 一隻前腳抽搐。
4. 站起常伴隨有二前腳抽搐。
5. 站起接著喪失平衡倒下並且有全身性的抽搐。

三、實驗藥材的製備

本實驗所使用之藥材經鑑定為罌粟科Papaveraceae植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang的塊莖。並由氯仿-B層以管柱層析法 (Column Chromatograph) 分離出protoberberine type alkaloids，經純化得dl-tetrahydropalmatine (THP) 供作本實驗。實驗材料以磷酸10% (V/V) 與蒸餾水 (1:9) 混合製備，以1N氫氧化鈉調至pH值4.5。

四、紅外光矩陣式動物行為量測系統

目前此套紅外光矩陣式動物行為量測系統如前人的描述 (Young, Li and Lin, 1993)。

第一部份是動物行為動作上的參數，包括：

- (1)水平小動作的時間 (Horizontal fine movement time, HFMT)，以秒為單位。被定義為大鼠身體在每一個電腦取樣為小距離的動作，即0到1.6 cm之間的水平小動作。
- (2)水平大動作的時間 (Horizontal gross movement time, HGMT)，以秒為單位。若大鼠身體移動的距離，超過前述小動作設定的判斷距離1.6 cm，稱為水平大動作的時間。
- (3)垂直方向動作的時間 (Vertical motion time, VMT)，以秒為單位。被定義為大鼠在實驗時從事站立所花費的時間。
- (4)休息時間 (Freezing time, FT)，以秒為單位。為大鼠在實驗時休息的時間的總和。
- (5)動物活動的總距離 (Total distance travelled, TDT)，以公分為單位。被定義為大鼠在某一時間內移動的總距離，而這裡所謂的移動是指前述水平大動作，即移動距離必須大於1.6 cm。
- (6)順時針轉向次數 (Clockwise turning, CT)，以次數為單位。被定義為大鼠在運動箱內移動軌跡呈圓弧順時針轉向行為。
- (7)逆時針轉向次數 (Anticlockwise turning, ACT)，以次數為單位。被定義為大鼠在運動箱內移動軌跡呈圓弧逆時針轉向行為。

五、活體清醒大鼠腦內單氨類電位化學變化

將單一碳纖維 (直徑12 μm , AVCO, Lowell, MA) 插入已拉成形的玻璃微滴管 (Pipette, 20-25 公釐長度) 之內。使用精細的剪刀切除 pipette 的頂口，纖維輕輕的接合玻璃頂口的內部，然後將炭纖維由 pipette 頂口拉出，內灌銀漿使纖維通電。pipette 的頂和鈍的尾端用 cyanoacrylate (超著膠) 黏著劑封口，整個表面均為厚約 12 μm ，長約 500 μm 的 pyrolytic 碳纖維表面。為了改良碳纖維對於單氨的敏感性及選擇性，電極須依 Gonon 及其研究同人發表的白皮書改良的方法作電極的前處理 (Gonon et al. 1984)。

經過上述前處理的碳纖維電極，把電極的頂端浸入 Nafion 溶液中 (5% 溶液, 10 μl , Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, Wis.

USA) 之內3分鐘。然後將覆蓋上一層Nafion 的碳纖維電極在攝氏60度乾燥20秒，重覆乾燥3次，再將黏附好Nafion之電極置於3 M氯化鈉溶液中，測其電容及電阻，只有電容值等於0.039 mF，而電阻值在200-400歐姆的電極才可供實驗使用 (Lin and Su 1992; Lin et al., 1992)。

將重250-300公克的雄性Sprague-Dawley大鼠以urethane (1.5g/kg 腹腔注射) 麻醉，將其頭部固定於立體定位儀上，依照 Paxinos和Watson座標，將塗上一層nafion 的碳纖維電極植入杏仁核 (A/P: bregma 往前0.2 mm, M/L: 中線左右旁開3.0 mm, D/V: 骨表面下5.5 mm) 及附加的參考電極 (Ag/AgCl) 置於皮質骨腔壁區域的硬膜 (dura) 表面上。差異脈衝電位圖 (voltammogram) 每 0.2秒自動地記錄，在每個實驗結束，拿出電極後，必須校準一次。若欲確認電極位置正確與否，可連續供應一5伏特直流電三秒鐘，執行電極損害。通過電極的電流大約0.4nA。再將腦解剖，冰凍並保持在零下20度，將組織切成20 mm冠狀的薄切片，作Nissl's染色。在碳纖維位置附近的損害面積大約直徑200 mm和長約500 mm。當碳纖維電極在活體實驗後被標化，植入另一電極於相同位置作電的破壞。THP將以腹腔內注入1-20 mg/ml/Kg之量投予動物體。

結 果

表一指出皮下注射picrotoxin (3-4 mg/kg) 可誘發大鼠之癲癇發作。紅外光矩陣式行為偵測系統顯示picrotoxin 注射後除了目視的癲癇發作之外並伴隨下列行為變化：水平動作增加、垂直動作增加、動物活動總距離增加、順時針與逆時針轉向次數增加。腹腔內注入四氫巴馬汀 (THP, 10-30 mg/kg) 則明顯抑制了由picrotoxin所引制的癲癇發作與多種行為參數變化。

圖一指出皮下注射picrotoxin 也增加大鼠的tremor, myoclonia與locomotion (以上參數係由超音波式行為偵測系統所得)。同樣地，四氫巴馬汀服用後可顯著地抑制由picrotoxin 所誘發的tremor myoclonia與locomotion 變化 (圖二)。四氫巴馬汀本身也可抑制大鼠自發性的

tremor, myoclonia 及 locomotion (請見圖三)。

圖四指出杏仁核內電刺激可誘發大鼠的癲癇發作。第一天電刺激時可誘發動物處於第一期與第二期之間。第二天電刺激時則大鼠癲癇發作進展至第三至第四期。第三天電刺激時則大鼠癲癇發作進展至第四至第五期之間。第四天或第五天的杏仁核內電刺激則進展至第五期。利用超音波式行爲偵測系統可以將大鼠癲癇發作之第一期至第五期加以量化(圖五)。

圖六指出以杏仁核內電刺激至第二天時大鼠發作已屆第三、第四期階段。若在第三天及第四天作電刺激之前給予一個劑量之腹腔內注射THP，則可以抑制電刺激所引致的癲癇發作至第一、第二期階段。圖七亦顯示當在第二天已提昇動物的動作量至第三、第四期時，如果在第三與第四天電刺激杏仁核之前注射THP一樣可以抑制超音波式系統所量化到的 tremor、myoclonia 與 locomotion 增加反應。

圖八顯示在全身麻醉的大鼠，當靜脈注射 picrotoxin 後，引發肌體抽搐、動脈壓升高與杏仁核的妥巴氨釋放量增加。如果事先以 Diazepam 來興奮 GABA 受體或以 6-OHDA 來破壞中樞神經系統的妥巴氨神經徑路，則可以阻斷 picrotoxin 所引致的肌體抽搐、動脈壓升高與杏仁核妥巴氨釋放增加等現象(請見圖九)。

討 論

過去許多研究文獻均已指出中樞神經系統中的多巴氨神經徑路與動物多種行爲的調控相關(Randrup and Munkvad, 1970)。許多研究成果也指出四氫巴馬汀可以抑低鼠腦妥巴氨等神經傳導物質，也具有拮抗妥巴氨D2受體的作用(Jin et al., 1985; Jin et al., 1985; Xu et al., 1985)。在本實驗，我們發現不管是化學性(picrotoxin注射)或電氣性(杏仁核內直接刺激)誘發動物癲癇發作時均伴隨有杏仁核妥巴氨釋放增加、動脈壓增加，與動物行爲亢進等現象。以上所誘發的癲癇發作等現象均可為四氫巴馬汀之服用而達到良好的治療效果。本實驗成果更

指出四氫巴馬汀可能經由抑制鼠腦杏仁核或其它神經的妥巴氨受體機制而達到其抑制大鼠癲癇發作之作用。因此，延胡索成份四氫巴馬汀具有淺在性的抗癲癇藥物之作用，提供臨床上之參考。

結論與建議

由本研究結果可知，中藥延胡索成份四氫巴馬汀對於癲癇的大鼠確實具有相當的療效。但是長久使用是否可以將該疾病則有待進一步觀察。

重要參考文獻

明，李時珍：本草綱目，卷13，山草類下，pp. 467-468，隆泉書局，台北，台灣，1990。

Liu G.Q., Alergi S. and Garattinin S.:DL-tetrahydropalmatine as monoamine depletor. Archives Internationales De Pharmacodynamiae Et De Therapie, 258(1): 39-50, 1982.

金國章，陳瑞庭，王蓮苑，胥彬：延胡索的藥理研究IV：延胡索素乙和丑對循環和呼吸的影響。藥學學報，6:26,1958

趙東科，趙更生，邱培倫：四氫巴馬汀對實驗性心率失常的作用。西安醫學院學報，6:322, 1985。

謝明村，吳龍源：延胡索有效成份對於大鼠甲狀腺機能之影響。中國醫藥學院中國藥學研究所碩士論文集，1990。

Liu G.Q.: Influence of paragyline on depletion of catecholamines in the rat brain caused by dl-tetrahydropalmatine. Yao Hsueh Hsueh Pao-Acta Pharmaceutica Sinica, 8(6): 472-474, 1983.

Peng WH, Hsieu MT, Tsai HY, Lin MT. Effects of dl-tetrahydropalmatine on the behavioral nad electrochemical changes in the rats. Ph.D. Dissertation. China Medical College, Taic-

hung, Taiwan, ROC, 1992.

Gean PW, Lin JH, Huang CC, Kuo JR. Anticonvulsant effects of Dizocipine against Picrotoxin-induced seizure activity in vivo and in vitro. J. Formosa. Med. Assoc. 92: 1-7, 1993.

Thomas J. The effect of Nimodopine on picrotoxin-induced seizures Brain Res. Bull. 24: 11-15, 1990.

Wahnschaffe U, Loscher W. Anticonvulsant effects of ipsilateral but not contralateral microinjection of the dopamine D2 agonist LY 171555 into the nucleus accumbens of amygdala-kindled rats. Brain Res. 553:181-187, 1991.

Young MS, Li YC, Lin MT. A modularized infrared light system with high resolution for measuring animal behaviorals. Physiol. Behav. 53: 545-551, 1993.

Gonon F, Buda F, Pujol JF. Treated carbon fiber electrodes for measuring catecholamines and ascorbic acid. In Marsden CA (ed), Measurement of Neurotransmitter Release in Vivo. John Wiley, Chichester, pp. 153-171, 1984.

Lin MT, Su CF. Spinal 5-HT pathways and the antinociception induced by intramedullary clonidine in rats. N.S. Arch Pharmacol. 346: 333-338, 1992.

Lin MT, Ho MT, Young MS. Stimulation of the nigrostriatal dopamine system inhibits both heat production and heat loss mechanisms in rats. N.S. Arch Pharmacol. 346: 504-510, 1992.

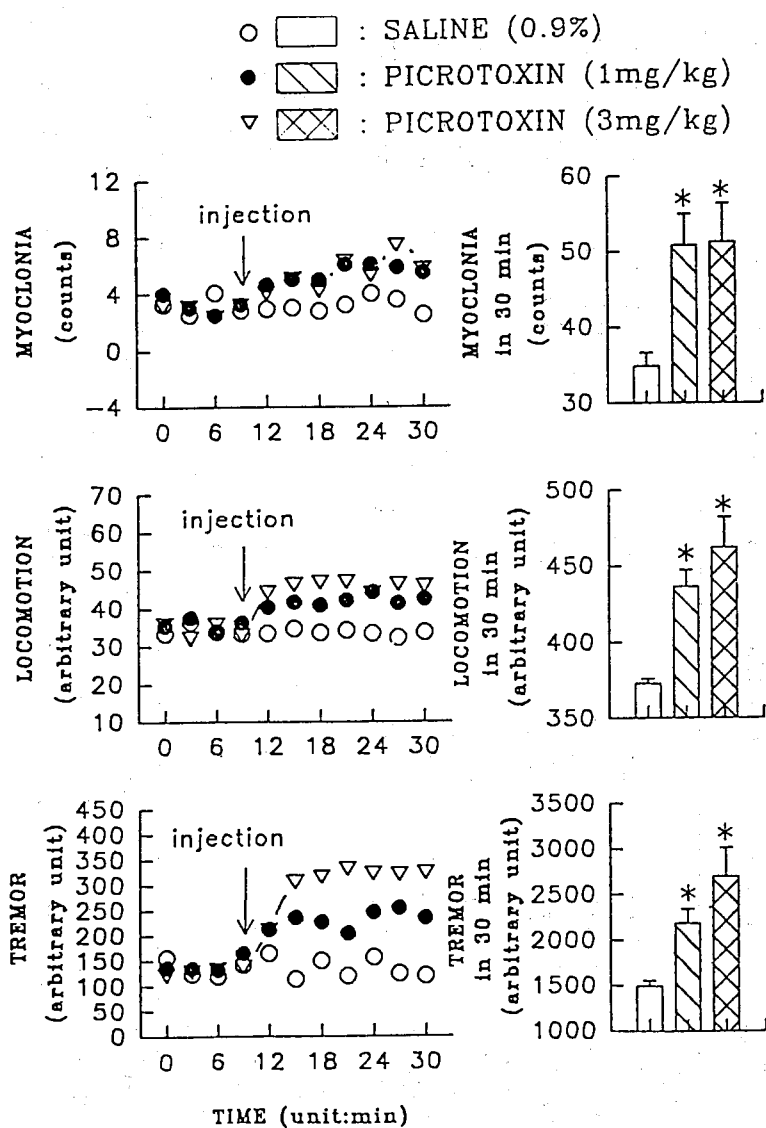
Table 1. Effects of picrotoxin on different locomotor activities of vehicle-treated rats and THP-treated rats during a period of 30 min following picrotoxin injection.

Treatment	HMT(s)	VMT(s)	CT(counts)	ACT(counts)	TDT(cm)	FT(s)
Rats treated with vehicle (ml/kg i.p.)						
Saline (0.9% s.c.)	6+1	9+3	2+1	2+1	16+2	8955+13
Picrotoxin (3 mg/kg s.c.)	37+8*	419+80*	7+1*	8+2*	402+55*	8386+51*
Picrotoxin (4 mg/kg s.c.)	58+7*	557+92*	14+2*	15+2*	486+63*	8042+48*
Rats treated with THP (10 mg/kg, i.p.)						
Saline (0.9% s.c.)	1+1#	1+1#	0	0	1+1#	8969+45
Picrotoxin (3 mg/kg s.c.)	12+3*#	73+12*#	2+1#	2+1#	286+60*#	8796+20*#
Picrotoxin (4 mg/kg s.c.)	22+4*#	85+15*#	3+2#	2+1#	301+45*#	8814+15*#
Rats treated with THP (30 mg/kg, i.p.)						
Saline (0.9% s.c.)	2+1#	1+1#	0	0	1+1#	8970+52
Picrotoxin (3 mg/kg s.c.)	2+1#	0#	0#	0#	3+2#	8968+20#
Picrotoxin (4 mg/kg s.c.)	1+1#	0#	0#	0#	3+2#	8971+21#

Values are means+SEM (n=8 for each group). HMT, horizontal motion time; VMT, vertical motion time; CT, clockwise turning; ACT, anticlockwise turning; TDT, total distanced travelled; FT, freezing time.

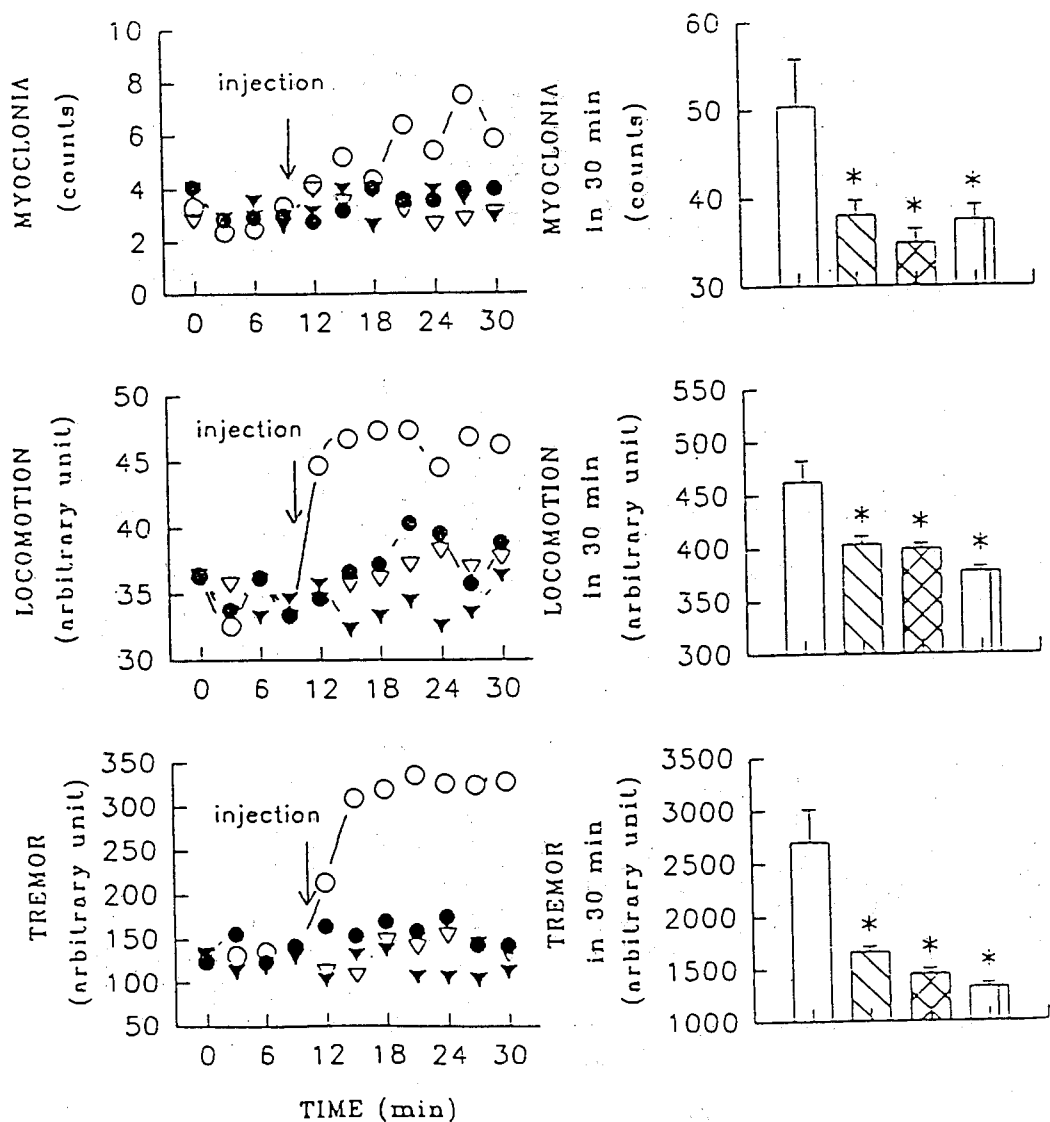
*Significance of difference from the corresponding control values(saline injection in vehicle-treated group or in THP-treated group): P<0.05 (ANOVA)

Significance of difference from the corresponding control values(vehicle-treated group): P<0.05 (ANOVA)



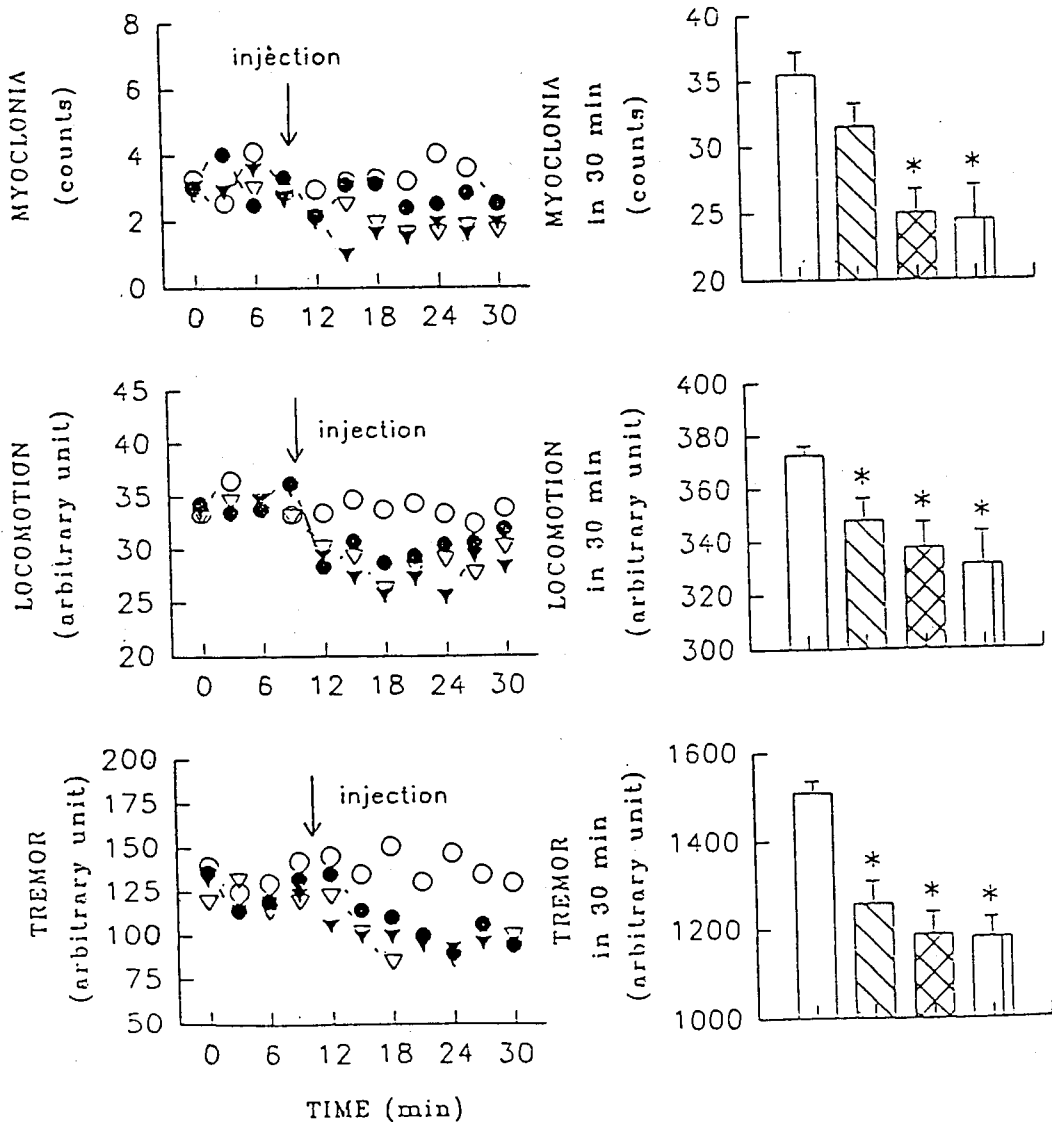
圖一、皮下注射 picrotoxin 誘發大鼠癲癇發作。

- □ : VEHICLE (1ml/kg) + PICROTOXIN (3mg/kg)
 ● ▨ : THP (5mg/kg) + PICROTOXIN (3mg/kg)
 ▽ ▩ : THP (10mg/kg) + PICROTOXIN (3mg/kg)
 ▼ □ : THP (15mg/kg) + PICROTOXIN (3mg/kg)



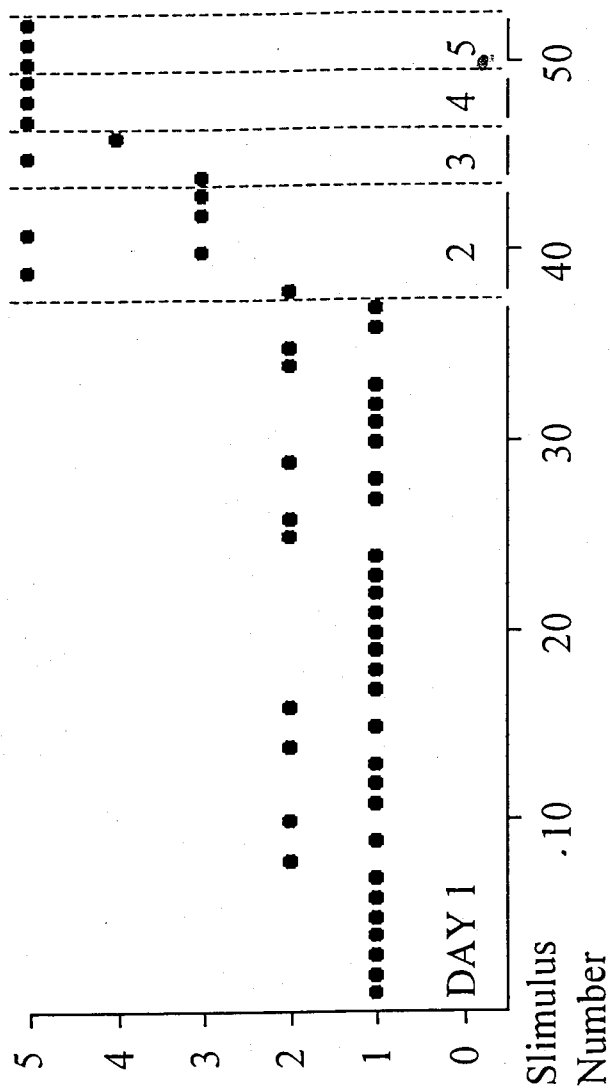
圖二、腹腔給予四氫巴馬汀 (THP) 可抑制 picrotoxin 所致癲癇發作。* $p < 0.05$

- □ : VEHICLE (1ml/kg)
 ● ▨ : THP (5mg/kg)
 ▽ ▩ : THP (10mg/kg)
 ▼ □ : THP (15mg/kg)

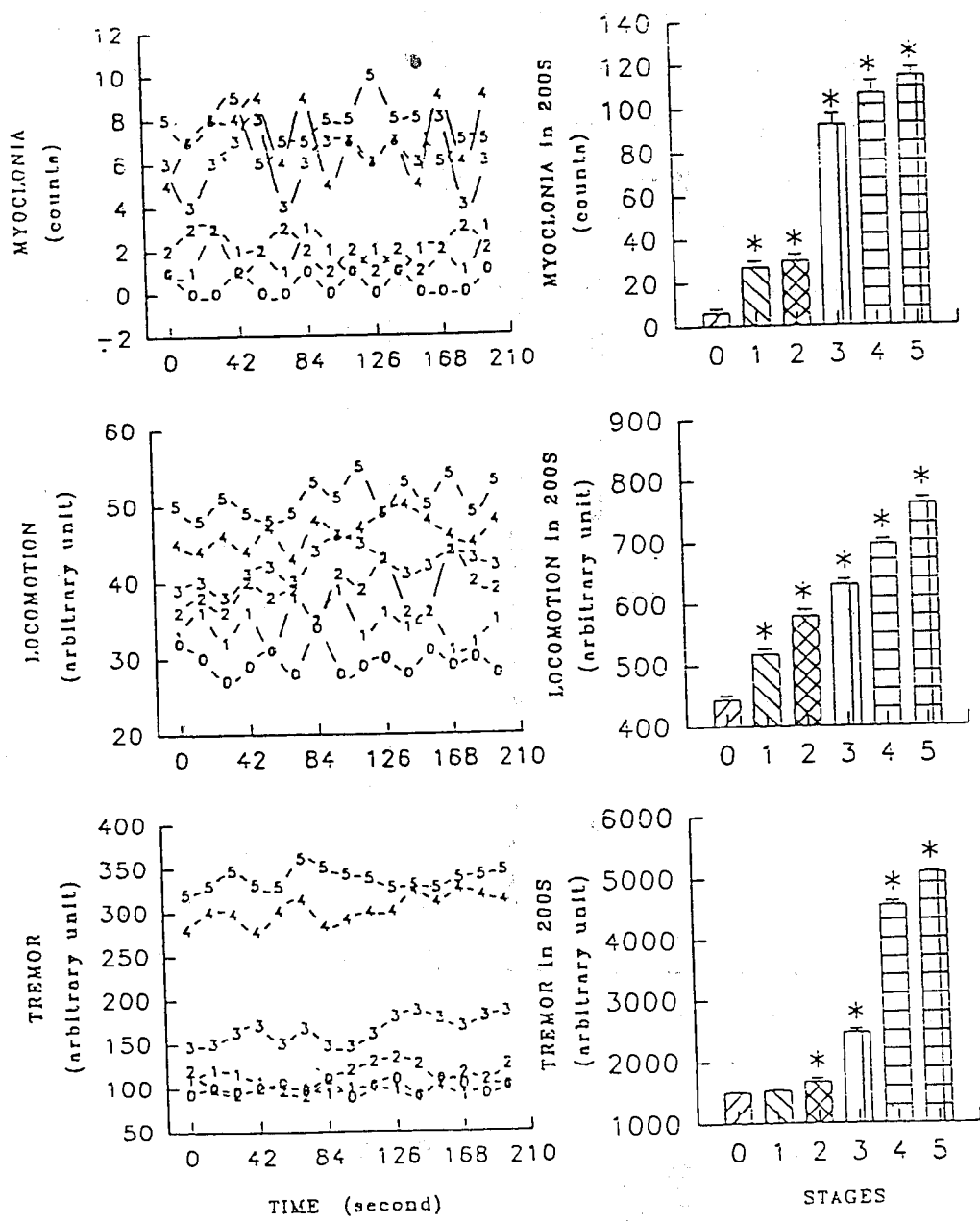


圖三、腹腔給予四氫巴馬汀可抑制大鼠之活動量。* $p < 0.05$

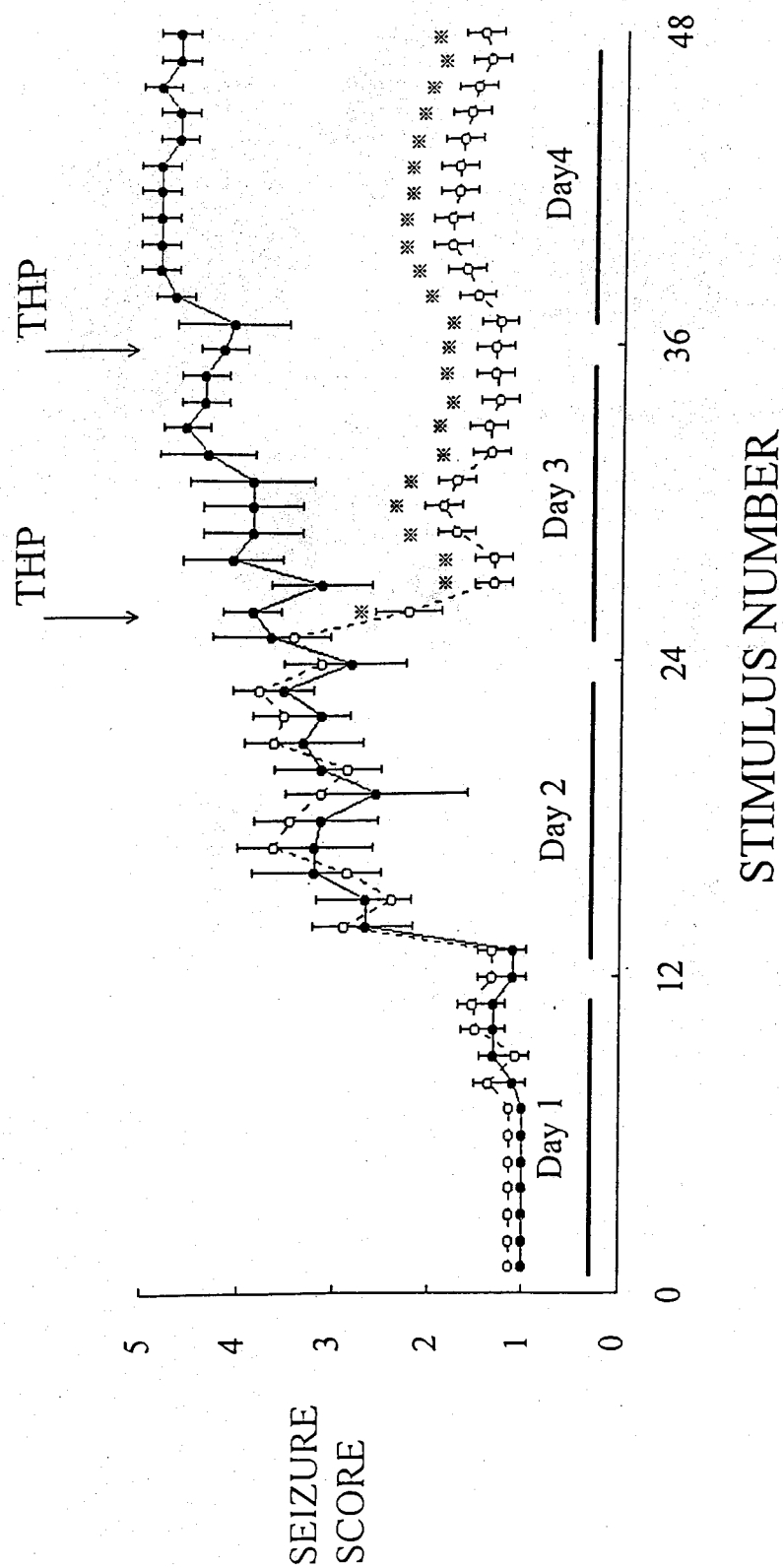
SEIZURE SCORE



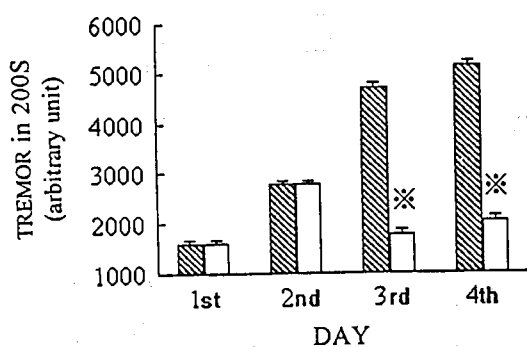
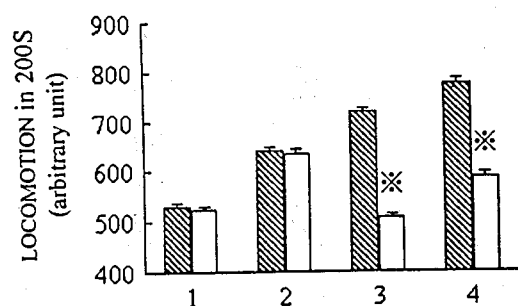
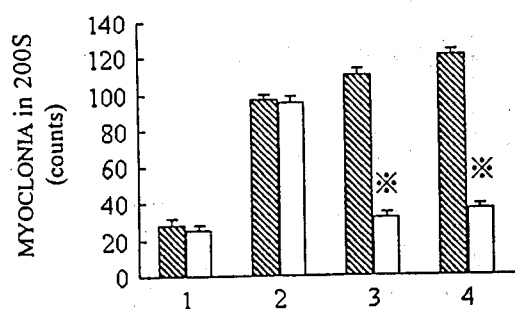
圖四.大鼠癲癇
指數之連續五
日記錄。



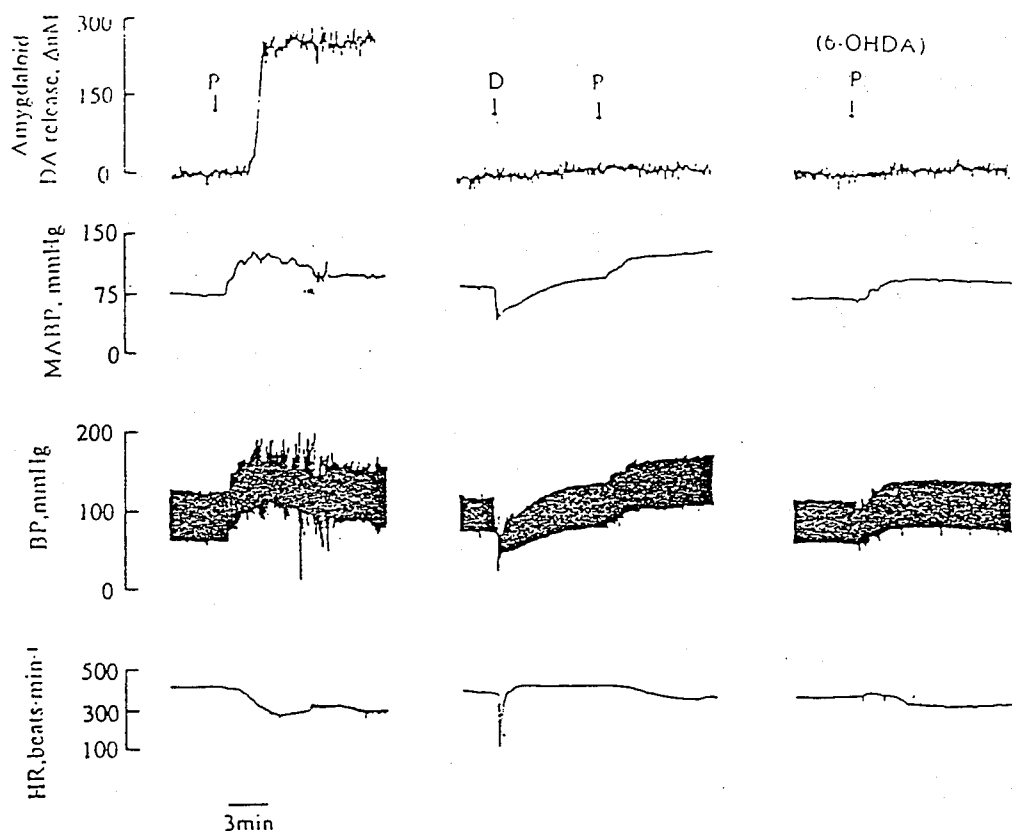
圖五、大鼠各癲癇期之活動量化情形。※ $p < 0.05$



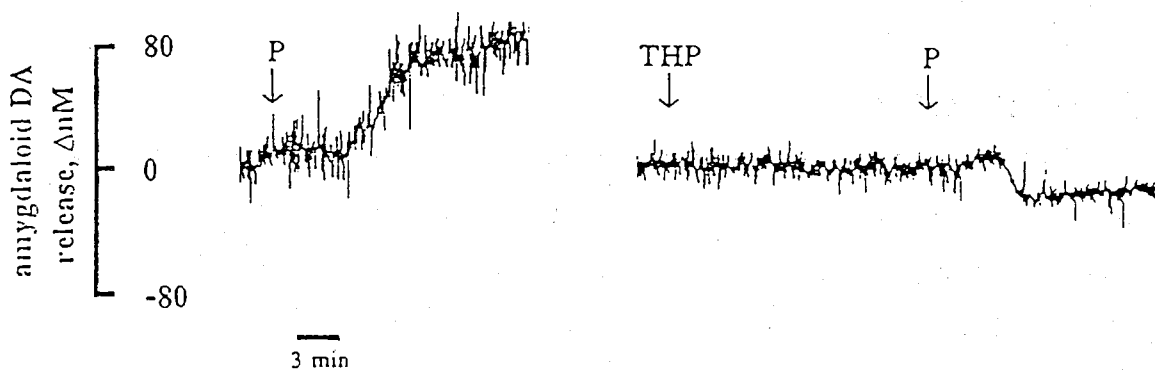
圖六. THP 治療對電刺激杏仁核所誘發癲癇指數之影響。
 ※ $P < 0.05$



圖七.電刺激杏仁核所誘發的癲癇發作
1~4天之 myoclonia, locomotion 與 tremor 之情形。斜線者為對照組而空白者為THP治療組。
※ $P < 0.05$



圖八、Picrotoxin (P)，Diazepam (D) 與 6-hydroxydopamine (6-OHDA) 麻醉大鼠杏仁核妥巴
 氨釋放、平均動脈壓 (MABP)，動脈壓 (BP)
 與心率 (HR) 之影響。



圖九、Picrotoxin 與 THP 給予對麻醉大鼠杏仁核妥巴氨釋
 放之影響。

厚朴的抗氧化成分對大白鼠心肌保護作用的研究

蔡 勝 國

台北榮民總醫院

中文摘要

一、研究緣起及目的

Honokiol 及 magnolol 是中藥厚朴的有效成分，它們皆有大白鼠心肌粒線體的抗脂質過氧化作用，同時它們在大白鼠冠狀動脈結紮有抗心律不整的作用，此種作用機轉至今尚未了解。然而 nitric oxide 及 prostaglandin 皆能產生心血管擴張及抑制血小板凝集作用，本實驗設計是藉 nitric oxide 及 prostaglandin 之拮抗劑與 honokiol 及 magnolol 相互作用來探討 honokiol 及 magnolol 在心肌缺氧時抗心律不整的機轉。

二、研究方法及過程

SD 大白鼠在 urethane 麻醉下，經由開胸術分離左冠狀動脈，在冠狀動脈結紮前 15 分鐘靜脈給予 10^{-7} g/Kg 的 honokiol 及 magnolol 作為控制組，然而在 honokiol 及 magnolol 治療前 15 分鐘分別給予 100 mg/Kg acetylsalicylic acid 或 1 mg/Kg 的 L-NAME 作為實驗組分別測定心律不整的現象。

三、研究結果及結論

使用honokiol 及 magnolol 10^{-7} g/Kg 的劑量治療下，如果先行給予aspirin 則在30分鐘的缺氧期及10分鐘的血流再灌注期，其心律不整(心室跳動過快及顫抖)皆有明顯的減少；但如果先行給予L-NAME則此種抗心律不整的作用則消失，因此實驗證明在大白鼠冠狀動脈結紮下honokiol 及 magnolol的抗心律不整作用也可能經由nitric oxide 系統而非prostaglandin系統，其兩者雖皆能產生心血管擴張及抗血小板凝集，但在生理上，前者是藉細胞內cGMP的作用而後者是經由細胞內cAMP的機轉。

關鍵字：Honokiol, Magnolol, 心律不整, 冠狀動脈缺血/再灌注, Prostaglandin, Nitric oxide

ABSTRACT

Honokiol and magnolol are active components of *Magnolia officinalis*. These were vasodilators and antiplatelet agents. these were found to reduce infarct size and suppress ventricular arrhythmias in rats subjected to coronary ligation. Nitric oxide and prostaglandin both derived from endothelium-derived relaxant factor(EDRF), are responsible for vasodilatation and inhibition of platelet aggregation. In this study, the mechanism of antiarrhythmic effects of honokiol and magnolol on underlying the differing pathway of EDRF in coronary ligated rats were investigated. Male rats were anesthetized with urethane. Acetylsalicylic acid(100 mg/kg) or No-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME, 1 mg/kg) was intravenously injected at 30 min before ligation of coronary artery. Honokiol or magnolol at dosages of 10^{-7} g/kg was intravenously administered 15 min before ligation of coronary artery as control. The incidence of

ventricular arrhythmias induced by coronary occlusion was totally suppressed with treatment of honokiol and magnolol. The durations of ventricular tachycardia and fibrillation were significantly reduced in the pretreatment with aspirin during honokiol and magnolol administered compared to control. These antiarrhythmic effect of honokiol and magnolol during ischemia/reperfusion period was abolished by L- NAME administered. We concluded that The antiarrhythmic effects of honokiol and magnolol may mediated through the different pathway of prostaglandin or EDRF/NO system.

Key words: Honokiol, Magnolol, Arrhythmia, Coronary arterial ischemia/reperfusion, Prostaglandin, Nitric oxide.

緒論：

Honokiol 和 magnolol 是從厚朴抽提出的成份，這兩個中藥的有效成份已經被發現對於冠狀動脈結紮的大白鼠，能夠減少梗塞區域以及心室心律不整，這個作用機轉至今尚未明瞭。Nitric oxide 和 prostaglandin是內皮放鬆因子的衍生物，其能夠放鬆血管以及抑制血小板的凝集，aspirin是cyclooxygenase的抑制劑，能夠影響 arachidonic acid 路徑中 prostaglandin 的形成，另一方面，L- NAME是nitric oxide 的抑制劑，能夠抑制內皮影響的血管放鬆作用。

此研究預先投與cyclooxygenase 或nitric oxide的抑制劑，在於冠狀動脈結紮大白鼠，經由不同的內皮放鬆因子的路徑，探討 Honokiol 和 magnolol抗心律不整的作用機轉。

材料與方法：

壹、動物的製備：

在本實驗中是選用體重介於 250~350 公克的雄性 Sprague-Dawley 大白鼠，以腹腔注射 urethane 的方式麻醉，urethane 的劑量為 1.25g/kg。首先，插上氣管，以接上人工呼吸器；插上靜脈管，此是爲了方便由靜脈投與藥物；再插上動脈管，用以監測血壓 (systemic blood pressure, BP)，血壓是以 statham P23XL transducer 監測。在大白鼠四肢末端接上銀電極，記錄心電圖 (electrocardiogram)，血壓和心電圖皆記錄在 Gould RS-3200 physiological Recorder。

以左胸廓切開術 (left thoracotomy)，打開胸腔，切口在第四和第五肋骨，接近胸骨左邊 2mm 的位置。馬上打開人工呼吸器，以室內空氣，給予 S.D. 大白鼠肺部正壓，呼吸器使用的潮氣體氣 (tidal volume) 為 15ml/kg (每公斤大白鼠體重予以 15ml 的空氣)，呼吸器的速率為 50 strokes/min (每分鐘五十次)。

貳、冠狀動脈閉合 (occlusion) 和再灌注 (reperfusion)

首先，將心包膜剪開，方便心臟在胸腔內能夠自由撥動，且可以使心臟上的血管清晰可見。用一條帶有六號絲線的 10mm micropoint reversecutting needle 縫在左主冠狀動脈下，將心臟恢復在胸腔的原位，讓 S.D. 大白鼠恢復 15min，在這恢復的 15min 中，若大白鼠的血壓低於 70mmHg，或是產生心律不整，則此隻大白鼠即予以捨棄。

將穿過心臟的絲線穿過一塑膠小導管 (Portex P-270 cannula)，將小導管向下壓擠，冠狀動脈被結紮線紮緊而閉合，記錄三十分鐘，而後放開小導管，使結紮冠狀動脈的絲線鬆開，使冠狀動脈再灌注，記錄十分鐘。若成功的將冠狀動脈閉合，則會觀察到一些心臟缺血的指標表現——動脈壓的減少或心電圖的改變 (R wave 變大，ST 段提昇)。而再灌注時，會產生動脈壓增加，心電圖改變 (R wave 減少，ST 段回復正常)，以及馬上產生心律不整。

參、藥物的投與

Magnolol或honokiol (Nacalai Tesque Co. Japan)先溶在含有 40% (v/v)propylene glycol 的生理溶液(normal saline)中，propylene glycol 在注射的 magnolol 或honokiol 溶液中的最終濃度為 4×10^{-3} % (v/v)。在這個濃度下，propylene glycol 對於缺血和再灌注所引起的心律不整沒有作用。在這個 magnolol 或 honokiol 對於心律不整的研究中，magnolol或 honokiol 所測試的劑量為 10^{-7} g/kg。在研究 magnolol或honokiol 對於梗塞區域的作用上，也是測試 10^{-7} g/kg 的劑量。冠狀動脈結紮前三十分鐘靜脈注射投與aspirin(Sigma Co. U.S.A.)或 L-NAME(Sigma Co. U.S.A.)，magnolol 或 honokiol 是在冠狀動脈結紮前十五分鐘靜脈注射投與，每次實驗投與 0.3 毫升的 magnolol 溶液。而對照組是投與 0.3毫升具有 4×10^{-3} %(v/v) propylene glycol的生理溶液，其也是在冠狀動脈結紮前十五分鐘靜脈注射投與的。動物被分配於治療組或對照組是採用隨機分配的方式。

肆、心律不整的計算

在實驗中，冠狀動脈首先結紮三十分鐘，然後再灌注十分鐘。在結紮、再灌注前以及結紮、再灌注期間，心跳、血壓和心電圖的改變皆要記錄下來。實驗的結果記錄在 AcqKnowledge (BIOPAC System, Inc) 軟體中，儲存在電腦裏。

計算心室異位的活性(ventricular ectopic activity)是根據 Lambeth Convention (Walker et al., 1988) 的診斷標準。計算的項目包括心室早期收縮 (ventricular premature beat, VPB)的次數以及心室性心搏過速 (ventricular tachycardia, VT)及心室性纖維顫動 (ventricular fibrillation, VF)的發生率和發生的時間長短，至於動物存活的情形以死亡率表示。

伍、封閉區域(occluded zone) 和梗塞區域(infarct zone) 的計算

大白鼠心臟封閉區域和梗塞區域是採用 Johnston 等人描述的方法鑑定的 (Johnston et al., 1983)，大白鼠先經由冠狀動脈結紮四個小時

然後犧牲掉，心臟先以 Langendorff 的技術灌注五分鐘，在此是使用 37℃ 的Kreb's溶液，在 100mmHg 的壓力下灌注心臟，用以除去血液。然後再以 2.0毫升的 cardiogreen dye (cardiogreen dye 的配製是每毫升的 Kreb's 溶液中含 1.0毫克的 indocyanine green) 灌注，用以區分灌注組織(為綠色的)和未灌注組織(為封閉區域)。稱量心室的重量，再剪下未灌注區域組織且稱重、計算未灌注組織重量相當於心室重量的百分比。然後，將心室組織剪成 1 毫米厚的切片，在 37℃ 的 tetrazolium dye 中培養三十至四十五分鐘。(tetrazolium dye 的配製是在每毫升七十毫莫耳濃度的鈉緩衝溶液中加入十毫克的 2, 3,5-triphenyltetrazolium chloride, 將其酸鹼值 (pH value)調在 8.5)。然後再將切下的小片段取出，放於含有10%的福馬林(formaldehyde) 的生理溶液(normal saline) 中二天。二天後將白色的組織(梗塞區域組織)剪下，稱重、計算梗塞組織重相當於心室重的百分比。

陸、統計

數據是以平均值±標準誤(Mean±S.E.M.)表達。心室早期收縮發生(VPB) 的數目、心室性心搏過速(VT) 及心室性纖維顫動(VF) 發生時間長短是以 student's t-test 分析對照組和藥物治療組之間的差異是否有意義。對照組和藥物治療組之間的血壓、心跳、R wave、ST 段的改變是比照 Bonferroni's test (Ludbrook J., 1994) 使用變異數分析(ANOVA)，分析其是否達有意義的改變。

對照組和治療組間心室性心搏過速(VT) 及心室性纖維顫動(VF) 發生率的百分比及死亡率的分析是以開檢定(chi-square test)分析其是否有意義。而梗塞區域(Infarct zone)的改善與否是否達有意義是以 student's t-test 分析，在此實驗中是以 P 小於 0.05 作為達有意義的結果。

結果：

壹、先投與asprin的作用

以劑量 10^{-7} g/kg 的Honokiol 和 magnolol治療，對於冠狀動脈結紮大白鼠所引起的心室心律不整的發生率皆有抑制作用，在於缺血的三十分鐘以及再灌注的十分鐘，以asprin先治療對於以 10^{-7} g/kg 的Honokiol 和以 10^{-7} g/kg 的 magnolol治療作用的影響，個別表示於表一和表二。在於以 100mg/kg asprin先治療對於以 10^{-7} g/kg 的Honokiol 和以 10^{-7} g/kg 的magnolol治療心室性心搏過速(ventricular tachycardia, VT)及心室性纖維顫動(ventricular fibrillation, VF)發生時間的長短，和對照組比較皆能有意義的減少。

貳、先投與L-NAME的作用

在於缺血和再灌注的實驗，以 10^{-7} g/kg 的Honokiol 和以 10^{-7} g/kg 的magnolol治療，皆能減少冠狀動脈結紮的大白鼠發生心室心律不整，但先投與1mg/kg 的L-NAME (NO的抑制劑)，對於這種在於缺血和再灌注期間，心律不整的保護作用，則會被消除。

討論：

心肌缺血以及再灌注會產生臨床上一個相當重要的結果就是會造成致死性的心室心律不整，先前我們針對傳統中草藥成分 Honokiol 和 magnolol的研究發現，此兩種成分皆可保護心肌，減少冠狀動脈結紮大白鼠心肌梗塞以及心室心律不整的發生。

然而，Honokiol 和 magnolol是從厚朴純化出的芳香氫氧化合物，其能夠對抗粒線體膜的脂質過氧化。

關於Honokiol 和 magnolol減少梗塞區域以及抑制心室心律不整的機轉尚不清楚，其效果可能是多重性的，有研究指出 prostaglandin 的衍生物以及NO的供給者，在於缺血的心臟，能夠保護缺血性傷害以及減少心室心律不整，在先前的研究我們發現Honokiol和magnolol的抗心律不整作用可被L-NAME所抑制，但是 aspirin沒有影響，由於NO的抑制劑

可以消除Honokiol 和 magnolol對心臟的療效，因此我們認為在於缺氧和再灌注的傷害上， Honokiol 和 magnolol的抗心律不整作用的機轉，NO的路徑可能比 prostaglandin的路徑扮演更重要的角色。藉著Honokiol和magnolol而增加NO的釋放，可能可以減少缺血和再灌注所產生的不良影響。

Honokiol 和 magnolol可能是藉由血管擴張、抗血小板凝集或抗氧化作用保護心肌對抗缺血傷害，血管擴張作用可以促進心肌的灌流、抗血小板凝集作用可以避免冠狀動脈的血栓、而抗氧化作用可以清除缺血以及再灌注所產生的自由基。

血管內皮釋放因子/NO和 prostaglandin，像 prostacyclin 和 prostaglandin E2 都有很多共同的作用，包括血管擴張作用和抑制血小板凝集，但是，血管內皮釋放因子/NO和 prostaglandin，是藉由不同的機轉達其生理作用，其中血管內皮釋放因子/NO可以藉由刺激可溶性 guanylate cyclase來增加cyclic GMP，而 prostaglandin是增加細胞內 messenger cyclic AMP的釋放，因此，我們認為 Honokiol 和 magnolol 是藉由通過 prostaglandin和血管內皮釋放因子/NO系統不同的作用機轉達到其抗心律不整的作用。

Reference

Chan, P., Tsai, S. K., Chiang, B. N., and Hong, C. Y. (1995) Trilinolein reduces infarct size and suppresses ventricular arrhythmias in rats subjected to coronary ligation. *Pharmacol* 51: 118-26.

Lo, Y. C., Teng, C. M., Chen, C. F., Chen, C. C., and Hong, C. Y. (1994) Magnolol and honokiol isolated from *Magnolia officinalis* protect rat heart mitochondria against lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 47: 549-53.

Teng, C. M., Chen, C. C., Ko, F. N., Lee, L. G., Huang, T.

F., Chen, Y. P., and Hsu, H. Y. (1988) Two antiplatelet agents from *Magnolia officinalis*. *Thromb Res* 50: 757-65.

Teng, C. M., Yu, S. M., Huang, Y. L., and Huang, T. F. (1990) EDRF-release and Ca^{++} -channel blockade by magnolol, an antiplatelet agent isolated from Chinese herb *Magnolia officinalis*, in rat thoracic aorta. *Life Sci* 47: 1153-61.

Walker, M. J. A., Curtis, M. J., Hearse, D. J., Campbell, R. W., Janse, M. J., Yellon, D. M., Cobbe, S. M., Coker, S. J., Harness, J. B., and Harron, D. W. (1988) The Lambeth conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischemia, infarction and reperfusion. *Cardiovasc Res* 22: 447-55.

Ludbrook, J. (1994) Repeated measurements and multiple comparisons in cardiovascular research. *Cardiovasc Res* 28: 303-11.

Mayes, P. A. (1983) Lipids; in Martin DW, Mayes PA, Rodwell VW (eds): *Harper's review of biochemistry*, ed 19. California, Lange, pp 188-220.

Kanayama, T., Kimura, Y., and Mizogami, S. (1993) A new prostacyclin analog, KP-10614, inhibits platelet polymorphonuclear leucocyte interaction and limits experimental infarct size in rat heart. *J Pharmacol Exp Ther* 266: 344-49.

Wainwright, C. L., Martorana, P. A., Pirsidomine, a novel nitric oxide donor, suppresses ischemic arrhythmia in anesthetized pigs. *J Cardiovasc Pharmacol* 22: S44-50.

Hong, C. Y., Lai, L. J., and Huang, Y. T. (1995) Endothelium-dependent vasorelaxant effect of trilinolein: mediated by nitric oxide and cyclic GMP. *Life Sciences* 57: 1309-15.

Lai, L. J., Shen, Y. C., and Hong, C. Y. (1994) Trilinolein

inhibits epinephrine- induced human platelet aggregation. Throm. Res. 76: 281-7.

Table 1. Effect of honokiol and magnolol which was pretreated aspirin on coronary ligation (30 min) induced arrhythmias in anesthetized rats.

Drug (10 ⁻⁷ g/Kg)	n	Ventricular Tachycardia		Ventricular Fibrillation		Mortality (%)
		Incidence(%)	Duration (s)	Incidence(%)	Duration(s)	
Control	14	100	39.8±7.2	64	261.1±101.7	29
Magnolol	7	71	14.2±9.5*	0	0.0±0.0	0
Honokiol	7	57	13.4±4.9*	14	1.2±1.1	0

* p<0.05 (compared with control)

Table 2. Effect of honokiol and magnolol which was pretreated aspirin on reperfusion (10 min) induced arrhythmias in anesthetized rats.

Drug (10 ⁻⁷ g/Kg)	n	Ventricular Tachycardia		Ventricular Fibrillation		Mortality (%)
		Incidence(%)	Duration (s)	Incidence(%)	Duration(s)	
Control	10	80	6.7±2.5	40	32.0±20.3	10
Magnolol	7	0	0.0±0.0*	0	0.0±0.0	0
Honokiol	7	0	0.0±0.0*	0	0.0±0.0	0

* p<0.05 (compared with control)

Table 3. Effect of honokiol and magnolol which was pretreated L-NAME on coronary ligation (30 min) induced arrhythmias in anesthetized rats.

Drug (10 ⁻⁷ g/Kg)	n	Ventricular Tachycardia		Ventricular Fibrillation		Mortality (%)
		Incidence(%)	Duration (s)	Incidence(%)	Duration(s)	
Control	11	91	124.6±57.3	64	57.5±25.0	36
Magnolol	7	86	126.2±67.2	57	54.9±21.4	0
Honokiol	7	86	80.1±52.7	29	32.1±26.7	0

* p<0.05 (compared with control)

Table 4. Effect of honokiol and magnolol which was pretreated L-NAME on reperfusion (10 min) induced arrhythmias in anesthetized rats.

Drug (10 ⁻⁷ g/Kg)	n	Ventricular Tachycardia		Ventricular Fibrillation		Mortality (%)
		Incidence(%)	Duration (s)	Incidence(%)	Duration(s)	
Control	7	71	17.1±7.8	14	0.7±0.7	0
Magnolol	7	14	0.8±0.8	0	0.0±0.0	0
Honokiol	7	14	0.2±0.2	0	0.0±0.0	0

* p<0.05 (compared with control)

探討 berberine, tetramethylpyrazine, baicalin, tetrandrine, 及 paeonol 等五種中藥抽出物對大白鼠心臟血管系統的作用 機轉

吳 勝 男

高雄榮民總醫院

中文摘要

利用 nystatin 穿透完整細胞電壓箝制技術，探討 tetrandrine (漢防己鹼) 對於血管平滑肌 A7r5 細胞離子電流的作用。Tetrandrine (1-100 μ M) 可逆性且劑量相關性抑制 L-type 鈣電流 ($I_{Ca,L}$)。Tetrandrine 抑制 $I_{Ca,L}$ 的 IC_{50} 值為 5 μ M，且 100 μ M tetrandrine 會完全抑制 $I_{Ca,L}$ 。Tetrandrine 的抑制作用具有張力性和使用依賴性的成分。Tetrandrine (10 μ M) 使 $I_{Ca,L}$ 之穩定去活化曲線往負偏移約 -15 mV。將電壓箝制在 -40mV 時，vasopressin (100 nM) 能夠在 A7r5 細胞上產生持續向內電流。該電流的逆轉電壓為 0 mV。當細胞外的陽離子改成鈣離子時，該向內電流仍能觀察。因此顯示該電流是鈣離通透性，非選擇性陽離子電流 (I_{NS})。Tetrandrine (30 μ M) 未能抑制 vasopressin 誘發之 I_{NS} 。在電壓箝制在 0 mV 時，tetrandrine 本身不會影響箝制電流，但抑制 vasopressin 誘發之鉀電流。Tetrandrine 在劑量超過 30 μ M 時也會抑制電壓依賴性鉀電流。以上結果顯示 tetrandrine 在血管

平滑肌抑制電壓依賴性 L-type 鈣電流的作用是主要引起血管擴張的原因。

關鍵詞：血管平滑肌細胞，漢防己鹼，鈣電流，鉀電流

ABSTRACT

The ionic mechanism of tetrandrine, an alkaloid extracted from the Chinese medicinal herb *Radix Stephania tetrandrae*, was investigated in A7r5 vascular smooth muscle cells. The nystatin-perforated whole cell voltage clamp technique was performed to examine the effects of tetrandrine on ionic currents. Tetrandrine ($1-100\ \mu\text{M}$) reversibly caused an inhibition of $I_{\text{Ca,L}}$ in a concentration-dependent manner. Tetrandrine did not cause any change in the overall shape of current-voltage relationship of $I_{\text{Ca,L}}$. The IC_{50} value of tetrandrine-induced inhibition of $I_{\text{Ca,L}}$ was $5\ \mu\text{M}$. In the presence of Bay K 8644 ($3\ \mu\text{M}$) or cyclopiazonic acid ($30\ \mu\text{M}$), tetrandrine still produced a significant inhibition of $I_{\text{Ca,L}}$. The inhibitory effects of tetrandrine on $I_{\text{Ca,L}}$ exhibited tonic and use-dependent characteristics. Tetrandrine ($3\ \mu\text{M}$) shifted the quasi-steady-state inactivation curve of $I_{\text{Ca,L}}$ to more negative membrane potentials by approximately $-15\ \text{mV}$. Tetrandrine at concentrations of more than $30\ \mu\text{M}$ also produced inhibitory effect on K^+ current in a voltage-dependent fashion. At a holding potential of $-40\ \text{mV}$, vasopressin ($100\ \text{nM}$) was able to activate a long-lasting inward current, i.e., non-selective cation current (INS). Tetrandrine ($30\ \mu\text{M}$) failed to inhibit vasopressin-induced INS significantly, while SK&F 96365 ($30\ \mu\text{M}$) completely abolished it. These results indicate

that tetrandrine directly inhibits the voltage-dependent L-type Ca^{2+} current in vascular smooth muscle cells, which may predominantly contribute to the vasodilatory actions of tetrandrine.

Key words: vascular smooth muscle cells, tetrandrine, Ca^{2+} current, K^{+} current

前 言

漢防己鹼 (tetrandrine) 是中藥漢防己 (*Stephania tetrandrae*) 所分離的一種生物鹼，具有多種藥理活性。報告指出漢防己鹼可抑制高鉀離子引起的血管平滑肌收縮 (Hu et al., 1983; Anselmi et al., 1994; Liu et al., 1995)，如同腎上腺素引起的作用一樣 (Su, 1993; Liu et al., 1995; Wang and Lemos, 1995)。漢防己鹼可能抑制不同組織的電壓依賴性鈣離子通道 (voltage-dependent Ca^{2+} channels)，其中包括血管平滑肌細胞 (King et al., 1988; Liu et al., 1992; Liu et al., 1995)。在血管平滑肌細胞，血管刺激劑 (如腎上腺素，血管加壓素或內皮激素) 可促使細胞內鈣離子釋出，流經肌纖維膜，使肌肉收縮 (Bolton, 1979; Somlyo and Himpens, 1989)。此路徑不只經由電壓依賴性鈣離子通道。報告顯示血管刺激劑亦引發其他通道，如 Ca^{2+} -permeable non-selective cation channel (Meisheri et al., 1981; Van Renterghem et al., 1988; Chen and Wagoner, 1991; Wang and Large, 1991; Nakajima et al., 1996)。漢防己鹼可抑制腎上腺素誘發細胞內鈣離子濃度增加的現象，被認為與其抑制 Ca^{2+} 流經電壓依賴性鈣離子通道有關 (Qian and Huang, 1992; Liu et al., 1995; Takemura et al., 1995)。其作用機制仍有待證實。

爲了進一步瞭解漢防己鹼的作用機制，以動脈平滑肌細胞 A7r5 爲模式，利用 nystatin-perforated whole cell voltage clamp

technique (Horn and Marty, 1988) 進行分析。分別比較漢防己鹼在電壓依賴性鈣離子通道，電壓依賴性鉀離子通道及 Ca^{2+} -permeable non-selective cation channel 的效應，結果顯示直接抑制電壓依賴性鈣離子通道是漢防己鹼誘發血管平滑肌擴張的主要因素。

材料與方法

細胞培養

取大鼠主動脈平滑肌細胞 (Clonal cell line A7r5, ATCC【CRL 1444】，Rockville, MD) 加入含有 10% fetal bovine serum, penicillin G (10,000 units/ml) 及 streptomycin (10 mg/ml) 的 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)，培養於 37°C 含有 5% CO_2 的培養箱中。每隔 2-3 天更換新鮮培養基，每週以含有 1% trypsin 的培養基做次培養，待細胞穩定後進行實驗。(Wu et al., 1995)

電生理測量及資料分析

利用 nystatin 穿透完整細胞電壓箝制技術 (Horn and Marty, 1988)，在電壓箝制的情形下，觀察細胞膜上離子電流的變化。玻璃電極選擇末端電阻在 3-5 MW，膜電位及離子電流在示波器 (model 1602, Gould, Valley View, OH, USA) 的監視下，儲存於數位記錄儀 (model 1204, Biologic, Claix, France)。所有的統計數字以平均值±標準差來表示，並且利用 paired Student's t test 或 Duncan's multiple range test 計算分析結果。當實驗組與對照組間的值小於 0.05 時，被認為具有統計學上的意義。

溶液及藥品

Normal Tyrode's 溶液包含 NaCl 136.5 mM, KCl 5.4 mM, CaCl_2 1.8 mM, MgCl_2 0.53 mM, glucose 5.5 mM, HEPES-KOH 5 mM (pH7.4)。玻

玻璃電極溶液包含 KCl 130 mM, EGTA 0.1 mM, $MgCl_2$ 2 mM, Na_2ATP 3 mM, guanosine-5'-triphosphate 0.1mM and HEPES-KOH 5 mM (pH7.2)。測量電壓依賴性鈣離子電流及 Ca^{2+} -permeable non-selective cation 電流時，玻璃電極溶液內的 KCL 改為等莫耳濃度的 CsCl，pH 值以 CsOH 滴定。其他藥品：(s,s)-(+) - Tetrandrine (6,6',7,12-tetramethoxy-2,2'-dimethylberbamam) (Aldrich, USA)，S(-)-Bay K 8644 和 1-【 β -【3-(4-methoxyphenyl)-pro-poxy】-4-methoxyphenethyl】-1-H-imidazole hydrochloride (SK&F96365) (Biomol, USA)，【Arg⁸】-vasopressin 和 guanosine-5'-triphosphate (Sigma, USA)，Cyclopiazonic acid 和 nystatin (Research Biochemicals, USA)。Nystatin 溶於 dimethyl sulfoxide (DMSO)，濃度 50 mg/ml；加入玻璃電極溶液內，終濃度 150 μ g/ml。漢防己鹼溶於 DMSO，稀釋後立即使用。

結 果

漢防己鹼在 voltage-dependent L-type Ca^{2+} 電流的作用在我們先前的研究顯示，血管平滑肌 A7r5 細胞的鈣離子電流主要是電壓依賴性，dihydropyridine 敏感性的 L-type Ca^{2+} 電流 (I_{CaL}) (Lo et al., 1995)。以鈣離子作為離子攜帶者來測定 I_{CaL} 的特性。利用 nystatin-perforated whole cell voltage clamp technique，發現 I_{CaL} 的穩定性在含有 1.8 μ M $CaCl_2$ 的 normal Tyrode's 溶液中超過 5 分鐘。靜止膜電位為 -40 ± 5 mV ($n=22$)。如圖 1 所示，外加漢防己鹼 (10 μ M) 導致 I_{CaL} 由 389 pA 降低為 161 pA，30 μ M 的漢防己鹼即可完全抑制 I_{CaL} ，其作用具有可逆性。

圖 2 比較 I_{CaL} 電流-電壓的關係。無論漢防己鹼存在與否，閾值電位 (-30 mV)、 I_{CaL} 最高點的電位 (+10 mV) 和可逆電位 (+40 mV) 是相同。也就是說 10 μ M 的漢防己鹼足以抑制 I_{CaL} 而不會改變其電壓依賴性和電流-電壓的關係。類似的結果也可從其他五種不同的細胞中觀察

到。

圖 3 顯示漢防己鹼的濃度和 $I_{Ca,L}$ 抑制百分比間的相關性。在 1-30 μM 的濃度下，呈現濃度依賴性。約 5 μM 下，為最大抑制的一半；30 μM 下，達最大抑制程度。此結果顯示漢防己鹼對 A7r5 細胞具有鈣拮抗作用。

同時測試漢防己鹼的效應是否受到 Bay K 8644 (一種特異性 L-type Ca^{2+} channel opener) 和 cyclopiazonic acid (sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 的抑制劑) 的影響。圖 4 比較此二種藥劑存在與否時，漢防己鹼對 $I_{Ca,L}$ 的抑制效果。Bay K 8644 (3 μM) 可增強 $I_{Ca,L}$ 約 1.6 倍，而 cyclopiazonic acid (30 μM) 則降低其約百分之十。即使 Bay K 8644 的作用下，漢防己鹼仍可降低 $I_{Ca,L}$ 約百分之六十。且在 cyclopiazonic acid 的存在下，漢防己鹼仍具有抑制 $I_{Ca,L}$ 的效用。此結果顯示漢防己鹼對 $I_{Ca,L}$ 的抑制是直接作用而與肌漿網 Ca^{2+} -ATPase 的功能無關。

漢防己鹼抑制鈣離子電流具有電壓及使用依賴性

更進一步測試漢防己鹼對 $I_{Ca,L}$ 的抑制效應，利用雙重電壓的方法，在 3 秒的控制電壓下，測試電壓由箝壓電壓 -80 mV 升至 +10 mV (間隔 150 毫秒)。

如圖 5 顯示， $I_{Ca,L}$ 的靜止穩定期不活化曲線 (f_{∞}) 與漢防己鹼作用間的關係符合 Boltzman 非線性回歸方程式 (Bowen and Jerman, 1995)：

$$f_{\infty}(V) = f_{\infty, \max} / \{1 + \exp[(V-a)/b]\}$$

$f_{\infty, \max}$ = 最大值的 f_{∞} ， V = 膜電位 (mV)， $a = 1/2 f_{\infty, \max}$ 時的膜電位， b = 不活化曲線的斜率因子。在控制組： $f_{\infty, \max} = 1$ ， $a = -31.8 \pm 1.2$ mV， $b = 10.4 \pm 0.8$ mV ($n = 5$)；在漢防己鹼 (3 μM) 存在時： $f_{\infty, \max} = 0.61 \pm 0.05$ ， $a = -46.7 \pm 0.9$ mV， $b = 10.9 \pm 0.6$ mV ($n = 4$)。因此，漢防己鹼不止抑制 $I_{Ca,L}$ 的最大傳導，同時使 f_{∞} 曲線移至高極化約 -15 mV，但是不影響曲線的斜率。此結果顯示在 A7r5 細

胞中，漢防己鹼抑制 $I_{Ca,L}$ 的作用具有電壓依賴性。

如圖 6 所示，刺激電壓從 -40 mV 到 $+10$ mV (間隔 150 毫秒)，當 $I_{Ca,L}$ 於 normal Tyrode 溶液中保持穩定時，停止去極化電壓但細胞繼續保持在不同濃度 (3 或 30 μ M) 的漢防己鹼。電壓中斷 2 分鐘後，給予重複的刺激。未加漢防己鹼前的 $I_{Ca,L}$ 值也顯示於圖 6。值得大家注意的，在 3 μ M 的漢防己鹼存在下，第一次電壓引起的 $I_{Ca,L}$ 值被抑制約 35% (如張力性抑制)。在重複電壓的刺激下， $I_{Ca,L}$ 值以指數方式降低至穩定值 (如使用依賴性抑制)。當漢防己鹼濃度增加到 30 μ M 時， $I_{Ca,L}$ 值幾乎完全被抑制。此結果顯示漢防己鹼抑制 $I_{Ca,L}$ 的作用具有刺激和使用依賴性。

漢防己鹼對電壓依賴性鉀電流的效應

將細胞箝壓在 -70 mV 下，給予不同的電壓，發現漢防己鹼 (30 μ M) 會導致鉀電流的降低。此電流 - 電壓的關係顯示在圖 7。當細胞箝壓在 -70 mV，電壓脈衝給予 $+90$ mV，漢防己鹼 (30 μ M) 明顯降低鉀電流至 149 ± 17 pA，控制組為 226 ± 14 pA ($n = 6$)。然而當電壓為 -30 mV 時，則無明顯作用 (8 ± 11 vs. 6 ± 10 pA [$n = 5$])。此作用為完全可逆性。值得注意的是當膜電位變得較正值時，漢防己鹼導致鉀電流明顯向下移的趨勢。此結果顯示漢防己鹼對鉀電流的抑制作用具有電壓依賴性。

漢防己鹼對 vasopressin-induced Ca^{2+} -permeable non-selective cation current (INS) 無抑制效應

在動脈和其他平滑肌細胞，鈣離子可經由其他通道進入如 Ca^{2+} -permeable non-selective cation channel，故我們更進一步研究漢防己鹼對此通道的作用。玻璃電極內加 CsCl 可抑制鉀電流，細胞箝壓於 -40 mV 下，外加 vasopressin (100 nM) 至 normal Tyrode's 溶液引起電流流入及增強背景干擾 (圖 8)。當溶液內含 140 mM 鈉離子，電流-電壓的關係保持在 -3 ± 2 mV ($n = 5$)，即使以 Cs-aspartate 替代 CsCl 或改變細胞外氯離子濃度也不會有所影響。此外，當細胞外鈉

離子完全被鈣離子 (110 mM) 所取代, vasopressin 仍可活化此電流。此結果指出 vasopressin 活化 I_{NS} 而非氯離子電流, 且鈣離子是 vasopressin-induced inward current 的離子攜帶者中的一員 (Nakajima et al., 1996)。

由圖 8 可看出漢防己鹼對 vasopressin 引起的 Ca^{2+} -permeable I_{NS} 的效應。當加入 vasopressin (100 nM) 於溶液中, 流入的電流將會增加。此結果顯示 vasopressin 活化 A7r5 細胞的 I_{NS} , 且不受 nifedipine (10 μ M) 的影響。圖 9 顯示 CdCl₂ (1 mM) 或 SK&F 96365 (10 μ M) 導致 vasopressin-induced I_{NS} 明顯降低約百分之八十五, 但漢防己鹼對其沒有明顯壓制作用。

討 論

由以上的研究我們得知漢防己鹼 (1-100 μ M) 直接抑制血管平滑肌 A7r5 細胞的 L-type Ca^{2+} current (I_{CaL}), 此作用具有劑量及電壓依賴性, 且與 sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 無關。低於 30 μ M 的漢防己鹼即可抑制電壓依賴性鉀電流, 但漢防己鹼對 vasopressin-induced Ca^{2+} -permeable non-selective cation current (I_{NS}) 無明顯抑制作用。這些結果顯示對 L-type Ca^{2+} current (I_{CaL}) 的抑制作用是漢防己鹼引起平滑肌細胞放鬆的主要機制之一。

已知高鉀離子促使膜電位去極化而引起平滑肌收縮, 且打開電壓依賴性鈣離子通道。故漢防己鹼可抑制高鉀離子引起的收縮指出漢防己鹼可能作為鈣離子通道的拮抗劑。我們的研究結果提供了一直接證據: 漢防己鹼抑制血管平滑肌的 I_{CaL} 。且此結果與漢防己鹼抑制高鉀離子引起的肌肉收縮 (Su 1993; Liu et al., 1995) 相符合。Liu et al. (1995) 報告指出在大鼠的尾動脈, 漢防己鹼抑制 KCl 誘發收縮的 IC_{50} 值為 6 μ M, 與我們由血管平滑肌 A7r5 細胞所得的 IC_{50} 值 (5 μ M) 相近。Weinsberg et al. (1994) 的報告也指出在牛嗜鉻性細胞中的 IC_{50} 值約 10 μ M。因此在不同細胞形式中的漢防己鹼敏感性可能並無明顯差異。

已知 dihydropyridine Ca^{2+} 拮抗劑（如 nifedipine）能夠產生穩定期不活化曲線不同的負移動。換言之，當箝壓電位去極化時，nifedipine 對通道的親和力愈大，電流的降低愈有效。如圖 5 所示，漢防己鹼不止降低 I_{CaL} 的最大收縮，也產生穩定期不活化曲線的負移動。漢防己鹼的效應為電壓依賴性且可為膜電位所改變。這些發現與先前的研究相符合（Anselmi et al., 1994; Liu et al., 1995）。單獨只有漢防己鹼不能影響靜止膜電位和胞內鈣離子濃度，但可抑制鉀離子引起的收縮。因此平滑肌對漢防己鹼的敏感性依賴先前的靜止膜電位，動作電位的激發速率或漢防己鹼的濃度。換言之，如果細胞膜去極化或動作電位頻率較高，可增強漢防己鹼對 I_{CaL} 的作用。

圖 6 顯示漢防己鹼對 I_{CaL} 的抑制作用亦具有使用依賴性。在長時間暫停後，去極化的開始可觀察到漢防己鹼對 I_{CaL} 的抑制作用，且在隨後的重複刺激中仍可見到此抑制作用。儘管平滑肌和心肌的次成分不同（Hullin et al., 1992），但漢防己鹼在血管平滑肌細胞的使用依賴性指出其在心臟有類似的作用（Liu et al., 1992; Rubio et al., 1993）。

我們的研究證實漢防己鹼對血管平滑肌的鉀電流有抑制作用（圖 7）。Wang and Lemos (1992) 的報告指出在大鼠垂體後葉神經末梢，漢防己鹼抑制鉀通道的 K_d 值為 $0.21 \mu\text{M}$ 。然而在 A7r5 細胞需要較高劑量的漢防己鹼（ $30 \mu\text{M}$ ）方能抑制 I_K 。如圖 3 和圖 6 所示， $10 \mu\text{M}$ 的漢防己鹼幾乎不影響鉀電流，但此濃度足以抑制約 60% 的 I_{CaL} 。此發現與單獨漢防己鹼存在不能影響靜止壓的結果（Su, 1993; Liu et al., 1995）一致。

在 A7r5 細胞中，已知 vasopressin 可活化 non-selective cation ion current (I_{NS})（Van Renterghem et al., 1988; Krautwurst et al., 1994; Nakajima et al., 1996）。在 Qian and Huang (1992) 和 Liu et al. (1995) 的報告指出漢防己鹼可活化 I_{NS} ，但在我們的報告中持反對意見（圖 8 和圖 9）。加入血管活化劑如 vasopressin 後，因 I_{NS} 的活化使細胞膜變得興奮及去極化，在此情形

下，漢防己鹼導致血管平滑肌電機制的分離。也就是說即使在細胞膜去極化下，漢防己鹼造成血管放鬆的作用仍然存在。因此漢防己鹼抑制 $I_{Ca,L}$ 的作用可以解釋為何漢防己鹼能夠還原由腎上腺素引起的血管收縮。其結果不可能為經由對 receptor-operated Ca^{2+} -permeable non-selective cation channels 的抑制來解釋。且漢防己鹼對的抑制亦可說明漢防己鹼在不同細胞形式對鈣流入的作用有所不同 (Takemura et al., 1995)。

曾有報告指出 (He et al., 1989) 漢防己鹼與細胞內的 cAMP 增加有關。但在我們先前的研究 (Lo et al., 1995) 發現在 A7r5 細胞中加入增加 cAMP 的藥劑如 calcitonin gene-related peptide 或 isoproterenol 對 $I_{Ca,L}$ 的影響甚小。因此漢防己鹼的抑制作用和 cAMP 的增加無關。且因為 isoproterenol 可活化血管平滑肌細胞的 Ca^{2+} -dependent K^+ current (Sadoshima et al., 1988; Akbarali et al., 1990)，所以漢防己鹼抑制鉀電流的作用不會改變 cAMP 的量。

Kwan and Wang (1993) 報告指出漢防己鹼可結合微血管的 $\alpha 2$ -adrenergic receptor。因為腎上腺素增加血管平滑肌的 $I_{Ca,L}$ ，所以漢防己鹼結合於 $\alpha 2$ -adrenergic receptor 與其抑制作用無關。同時此結合的作用可能很小，因為 $I_{Ca,L}$ 的直接抑制可抵消其效應。

多篇報告指出漢防己鹼亦可抑制 cyclopiazonic acid 或 thapsigargin 引起的鈣釋出 (Kwan et al., 1992; Liu et al., 1995)，並參與鈣離子隔絕的抑制 (Su, 1993; Liu et al., 1995)。雖然我們的研究不能偵測這些機制，但在 cyclopiazonic acid 的存在下，漢防己鹼對 $I_{Ca,L}$ 的抑制作用仍然有效 (圖 4)。這些結果顯示漢防己鹼的作用與肌漿網的 Ca^{2+} -ATPase 無關。且漢防己鹼對 cyclopiazonic acid 引發鈣釋出的抑制作用可能部分是由對 $I_{Ca,L}$ 的抑制所引起的。由以上的發現得知漢防己鹼是放鬆血管平滑肌的有效藥物。

結論與建議

- 一、綜合本計劃的實驗結果顯示漢防己鹼在開發用藥中是較有潛力的。它有顯著抑制鈣離子通道的作用，而且使用劑量和傳統鈣離子阻斷劑的劑量相近。
- 二、另外，本實驗主要是使用大鼠主動脈血管平滑肌細胞來測定電流的影響。是否其他部位的血管平滑肌細胞也有相同作用，則有待進一步的研究。不過，因為血管內皮細胞並無電壓依賴性鈣離子通道，漢防己鹼直接作用在內皮細胞的效果將很小。的確，在牛主動脈內皮細胞中，我們的結果顯示漢防己鹼對離子電流並無作用。
- 三、但是漢防己鹼的溶解性不好，不溶於水，只溶於有毒性的 DMSO 溶液，是主要的缺點。日後開發水溶性類似漢防己鹼的製藥，或許有更好的開發價值。
- 四、至於其他藥物，berberine 主要是作用在鉀電流，而 tetramethylpyrazine 作用在鈣電流的劑量需較高，因此開發價值有限。

誌 謝

感謝此研究計劃由行政院衛生署 (DOH-85-CM-041) 及國科會 (NSC-85-2331-B-075B-012) 所資助。並感謝黃聰龍先生技術上的協助，方能順利完成。

參考文獻

1. Hu WS, Pan XB, Wang T, Hu, CG, Lu FH: Mode of action of tetrandrine on vascular smooth muscle. J Tradit Clin Med 1983; 3: 7-12.
2. Anselmi E., Gomez-Lobo MD, Blzaquez MA, Zafra-Polo MC, D'oon MP: Influence of the absolute configuration on the vascular effects of tetrandrine and isotetrandrine in rat aorta. Pharmazie 1994; 49: 440-443.

3. Liu QY, Li B, Gang JM, Karpinski E, Pang PKT: Tetrandrine, a Ca^{2+} antagonist: effects and mechanisms of action in vascular smooth muscle cells. *J Pharm Exp Ther* 1995; 273: 32-39.
4. Su JY: Mechanisms of action of 7-o-ethyl tetrandrine in isolated vascular smooth muscle of rat aorta. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 1993; 347: 445-451.
5. Wang G, Lemos JR: Tetrandrine: a new ligand to block voltage-dependent Ca^{2+} and Ca^{2+} -activated K^+ channels. *Life Sci* 1995; 56: 295-306.
6. King VF, Garcoa ML, Himmel D, Reuben JP, Lam YKT, Pan JX, Han GQ, Kaczorowski GJ: Interaction of tetrandrine with slowly inactivating calcium channels. Characterization of calcium channel modulation by an alkaloid of Chinese medicinal herbal origin. *J Biol Chem* 1988; 263: 82238-82244.
7. Liu QY, Karpinski E, Pang PKT: Tetrandrine inhibits both T and L calcium channel currents in ventricular cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20: 513-519.
8. Bolton TB: Mechanisms of action of transmitter and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev* 1979; 59: 606-718.
9. Somlyo AP, Himpens B: Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB J* 1989; 3: 2266-2276.
10. Meisheri KD, Hwang O, Van Breeman C: Evidence for two separated Ca^{2+} pathways in smooth muscle plasmalemma. *J Membr Biol* 1981; 59: 19-25.
11. Van Renterghem C, Romey G, Lazdunski M: Vasopressin modulates the spontaneous electrical activity in aortic cells (line A7r5) by acting on three different types of ionic channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 9365-9369.
12. Chen C, Wagoner PK: Endothelin induces a nonselective cation

- current in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1991; 69: 447-454.
13. Wang Q, Large WA: Noradrenaline-evoked cation conductance recorded with the nystatin whole-cell method in rabbit portal vein cells. *J Physiol* 1991; 435: 21-39.
 14. Nakajima T, Hazama H, Hamada E., Wu SN, Igarashi K, Seyama Y, Omata Y, Kurachi Y: Endothelin-1 and vasopressin activate Ca^{2+} -permeable non-selective cation channels in aortic smooth muscle cells: mechanism of receptor-mediated Ca^{2+} influx. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 707-722.
 15. Kwan CY, Deng HW, Guan YY: Tetrandrine is not a selective calcium channel blocker in vascular smooth muscle. *Acta Pharmacol Sinica* 1992; 13: 385-390.
 16. Oriowo MA, Rufolo RRJr: Activation of a single α 1-adrenoceptor subtype in rat aorta mobilizes intracellular and extracellular pools of calcium. *Pharmacology* 1992; 44: 139-149.
 17. Qian YM, Huang YH: Inhibitory effects of tetrandrine on Bay K 8644-stimulated contraction of isolated rabbit aortic strips. *Acta Pharmacol Sinica* 1992; 13: 243- 245.
 18. Takemura H, Kwan CY, Ohshika H: Calcium antagonistic actions of tetrandrine depend on cell types. *Res Comm Mol Path Pharmacol* 1995; 90: 59-68.
 19. Horn R, Marty A: (1988) Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol* 1988; 92: 145-159.
 20. Wu SN, Yu HS, Seyama Y: Induction of Ca^{2+} oscillations by vasopressin in the presence of tetraethylammonium chloride in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biochem* 1995;

117: 142-148.

21. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ: Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfliigers Arch* 1981; 391: 85-100.
22. Wu SN, Lue SI, Yang SL, Hsu HK, Liu MS: Electrophysiologic properties of isolated adult cardiomyocytes from septic rats. *Circ Shock* 1993; 41: 239-247.
23. Lo YC, Wu SN, Wu JR, Chen IJ: Effect of capsaicin on membrane currents in cultured vascular smooth muscle cells of rat aorta. *Eur J Pharmacol* 1995; 292: 321-328.
24. Marks TN, Dubyak GR, Jones SW: Calcium currents in the A7r5 smooth muscle-derived cell line. *Pfliigers Arch* 1990; 417: 433-439.
25. Weinsberg F, Bickmeyer U, Wiegand H: Effects of tetrandrine on calcium channel currents of bovine chromaffin cells. *Neuropharmacology* 1994; 33: 885-890.
26. Spedding M, Kenny B, Chatelain P. New drug binding sites in Ca^{2+} channels. *Trends in Pharmacol Sci* 1995; 16: 139-142.
27. Rubio LS, Garrido G, Llanes L, Alvarez JL: Effects of tetrandrine on Ca^{2+} and Na^{+} currents of single bullfrog cardiomyocytes. *J Moll Cell Cardiol* 1993; 25: 801-813.
28. Hullin R, Singer-Lahat D, Freichel M, Biel M, Dascal N, Hofmann F, Flockerzi V: Calcium channel beta subunit heterogeneity. Functional expression of cloned DNA from heart, aorta and brain. *EMBO J* 1992; 11: 885-890.
29. Wang G, Lemos JR: Tetrandrine blocks a slow, large-conductance Ca^{2+} -activated potassium channel besides inhibiting a non-inactivating Ca^{2+} current in isolated nerve

- terminals of the rat neurohypophysis. *Pfliigers Arch* 1992; 421: 558-565.
30. Krautwurst D, Degtiar VE, Schultz G, Hescheler J: The isoquinoline derivative LOE 908 selectively blocks vasopressin-activated nonselective cation currents in A7r5 aortic smooth muscle cells. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 1994; 349: 301-307.
 31. He FC, Tang RY, Yao DF: Effects of tetrandrine on vascular permeability and neutrophil function in acute inflammation. *Acta Pharmacol Sinica* 1989; 10: 249- 251.
 32. Sadoshima J, Akaike N, Knaide H, Nakamura M: Cyclic AMP modulates Ca- activated K channels in cultured smooth muscle cells of rat aortas. *Am J Physiol* 1988; 255: H754-H759.
 33. Akbarali H, Nakajima T, Wyse DG, Giles W: Ca^{2+} -activated K^{+} currents in smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 1990; 68: 1489-1494.
 34. Kwan CY, Wang ZL: Tetrandrine: a vasodilator of medicinal herb origin with a novel contractile effect on dog saphenous vein. *Eur J Pharmacol* 1993; 238: 431- 434.
 35. Loirand G, Pacaud P, Mironneau C, Mironneau J: (1990) GTP-binding proteins mediate noradrenaline effects on calcium and chloride currents in rat portal vein. *J Physiol* 1990; 428: 517-529.
 36. Nelson MT, Standen NB, Brayden JE, Worley JF: Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. *Nature* 1988; 336: 382-385.
 37. Hughes AD, Parkinson NA, Wijetunge S: α 2-Adrenoceptor activation increases calcium channel currents in single vascular smooth muscle cells isolated from human omental resistance arteries. *J Vasc Res* 1996; 33: 25-31.

圖解

圖 1. 漢防己鹼對電壓依賴性 L-Type 鈣離子通道電流 (I_{CaL}) 的抑制作用。細胞箝壓於 -40 mV，刺激電壓增加至 $+10$ mV。玻璃電極內含 CsCl 溶液，外在溶液為 1.8 mM 含鈣溶液。a: 控制組；b: 10 μ M 漢防己鹼；c: 30 μ M 漢防己鹼；d: 洗去藥物後。圖左方的箭頭指出電流為零。

圖 2. 漢防己鹼存在與否時， I_{CaL} 電流 - 電壓之關係。細胞箝壓於 -50 mV，給予不同的刺激電壓（間隔 150 毫秒）。A 表細胞由箝壓電壓 (-50 mV) 增至不同電壓 (-40 , -30 , -10 , $+10$, $+30$ mV) 時去極化過程的原始路徑。A 左為控制組，右為加 10 μ M 漢防己鹼 1 分鐘後。其箭頭指出電流為零。B 表不加漢防己鹼（實心圓圈）或加入漢防己鹼（空心圓圈）時， I_{CaL} 電流-電壓之關係。

圖 3. 漢防己鹼抑制 I_{CaL} 具有濃度依賴性。圖顯示漢防己鹼的濃度與 I_{CaL} 抑制百分比間的關係。細胞箝壓於 -40 mV，刺激電壓增加至 $+10$ mV。加入不同濃度的漢防己鹼 (1 - 30 μ M)，比較其與控制組的 I_{CaL} 。括號內表細胞數。

圖 4. 在 Bay K 8644 或 cyclopiazonic acid 存在與否，漢防己鹼對 I_{CaL} 抑制的效應。細胞箝壓於 -40 mV，刺激電壓增加至 $+10$ mV（間隔 150 毫秒）。將控制組的 I_{CaL} 當作 1.0 ，加藥後 I_{CaL} 的與之對照。括號內表細胞數。

圖 5. 漢防己鹼存在與否和 I_{CaL} 的靜止穩定期不活化曲線。利用雙重電壓的方法，可獲得漢防己鹼不存在和存在 (3 μ M) 下之 I_{CaL} 的靜止穩定期不活化曲線 (f_{∞})。每隔 3 秒給予控制電壓，使細胞膜電位由箝壓電壓 (-80 mV) 升至 -70 mV 和 $+30$ mV 之間。在每次控制電壓的 10 秒後，測試電壓增加至 $+10$ mV（間隔 150 毫秒）以引起 I_{CaL} 。控制組和加漢防己鹼組之膜電位與 f_{∞} 的關係符合 Boltzman 方程式。插圖表雙重電壓的方法。實心圓圈：控制組；空心圓圈：加漢防己鹼 (3 μ M)。

圖 6. 漢防己鹼抑制 $I_{Ca,L}$ 的作用具有刺激和使用依賴性。細胞箝壓於 -40 mV，刺激電壓增加至 $+10$ mV（間隔 150 毫秒）。箭頭和帶狀指出加入漢防己鹼。圖表加入 $3\ \mu\text{M}$ 和 $30\ \mu\text{M}$ 的漢防己鹼，其 $I_{Ca,L}$ 相對的改變。控制組之 $I_{Ca,L}$ 當作 1 。停止電壓後，加入不同濃度的漢防己鹼（ $3\ \mu\text{M}$ 和 $30\ \mu\text{M}$ ）。電壓中斷 2 分鐘後，重複給予刺激電壓增加至 $+10$ mV。在漢防己鹼存在下，長時暫停後的第一次電壓即引起 $I_{Ca,L}$ 被抑制（如刺激抑制）；而在重複電壓的刺激下， $I_{Ca,L}$ 值呈現指數降低（如使用依賴性抑制）。

圖 7. 在血管平滑肌 A7r5 細胞中，漢防己鹼對電壓依賴性鉀電流（ I_K ）的效應。玻璃電極內含鉀溶液，外在溶液為含鈣的 normal Tyrode's 溶液。細胞由箝壓電位 -70 mV 增加至 $+90$ mV（間隔 500 毫秒），在每一刺激步驟終了，記錄 I_K 值，每一點以 5 至 6 個細胞的平均值 \pm 標準差來表示。 $30\ \mu\text{M}$ 的漢防己鹼對 I_K 的抑制作用具有電壓依賴性。實心圓圈：控制組；空心圓圈：加漢防己鹼（ $30\ \mu\text{M}$ ）。

圖 8. 漢防己鹼對 vasopressin-induced Ca^{2+} -permeable non-selective cation current (I_{NS}) 無抑制效應。玻璃電極內含 CsCl 溶液。細胞箝壓於 -40 mV 下，刺激電壓增加至 $+10$ mV。注意上圖和下圖的時間單位不相同。a：控制組；b：vasopressin ($100\ \text{nM}$)；c：vasopressin 加漢防己鹼（ $30\ \mu\text{M}$ ）。箭頭指出電流為零。

圖 9. 比較漢防己鹼、nifedipine、 CdCl_2 和 SK&F 96365 對 vasopressin-induced Ca^{2+} -permeable non-selective cation current (I_{NS}) 的效應。細胞箝壓於 -40 mV 下。由 vasopressin 引發的 Ca^{2+} -permeable non-selective cation current (I_{NS}) 當作 1 ，圖表示加不同藥物後的 I_{NS} 相對值。括號內表細胞數。

附 註

至於其它藥物的作用如下：

- 一、Berberine 對血管平滑肌細胞的主要作用是在 voltage-gated potassium channel 上。對 voltage-gated calcium channel 並沒有顯著的作用。Berberine 在 A7r5 細胞抑制 potassium channel 的 IC_{50} 約為 $10 \mu M$ 。因此我們認為，berberine 引起血管舒張的作用可能不是因為在細胞膜離子通道的作用。可能和 berberine 作用在抑制細胞內質網的鈣離子釋放有關。但是它對鉀離子通道的抑制作用是否和其抗癌作用有關是值得探討。
- 二、Tetramethylpyrazine 對血管平滑肌的 L 型鈣離子電流的確有明顯的抑制作用。tetramethylpyrazine 抑制高鉀引起的血管收縮作用，很有可能是由於直接抑制此離子電流所致。可是此作用的 IC_{50} 約為 $50 \mu M$ ，比傳統鈣離子阻斷劑的效果略差，而且它的作用在電流去活化曲線並無顯著偏移的情形，因此似乎並無顯著開發價值。不過它的化學結構與 tetrandrine 或其它傳統鈣離子阻斷劑皆不同，但仍有某種程度鈣離子通道阻斷的效果是值得日後進一步探討。
- 三、Baicalin 的作用不管哪一種實驗方式（包括血管收縮、血管細胞鈣離子或鉀離子通道的作用）都是不明顯，而且所使用的劑量要很高才有作用。因此我們認為開發使用的潛力不大。
- 四、Paeonol 二屬非特異性，做出來無明顯作用（電請吳勝男老師）

Figure 1.

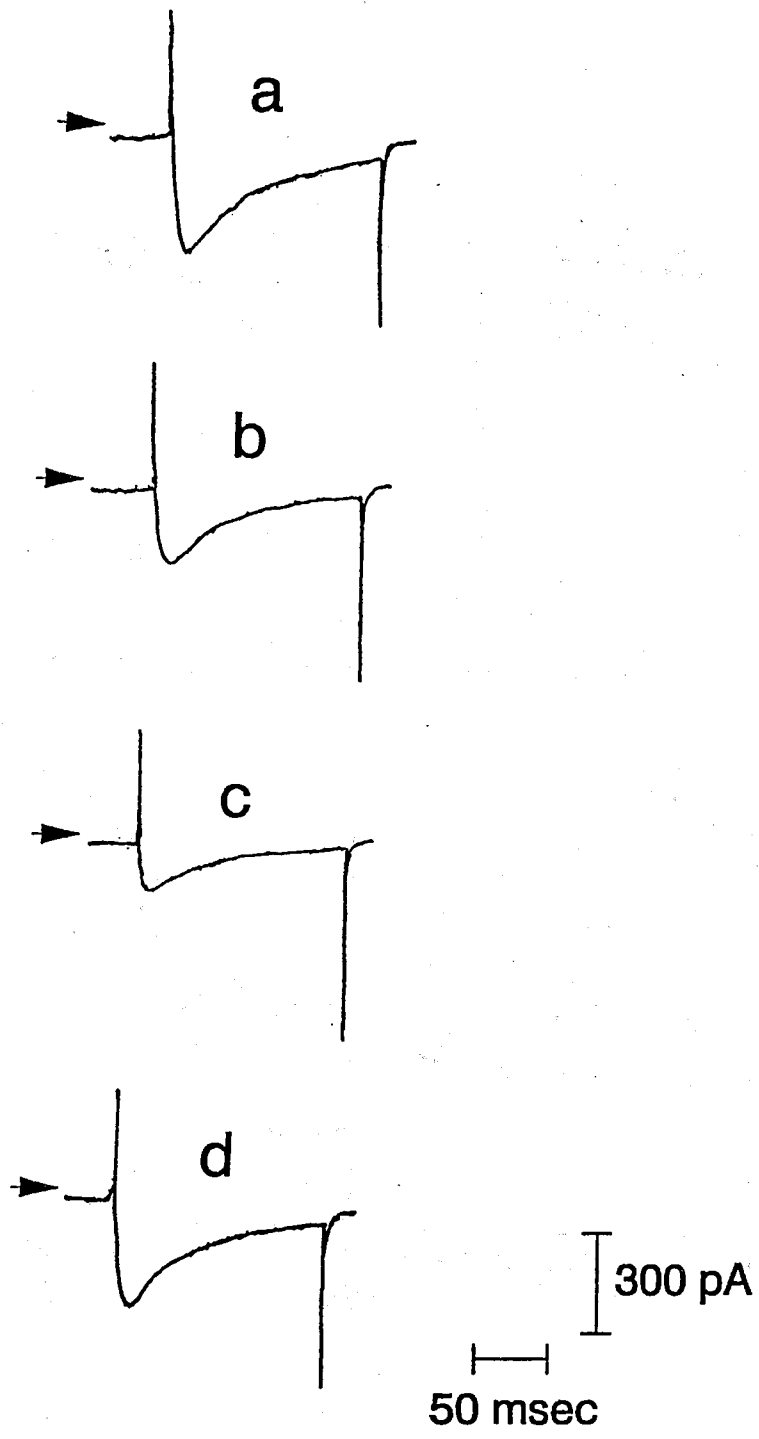
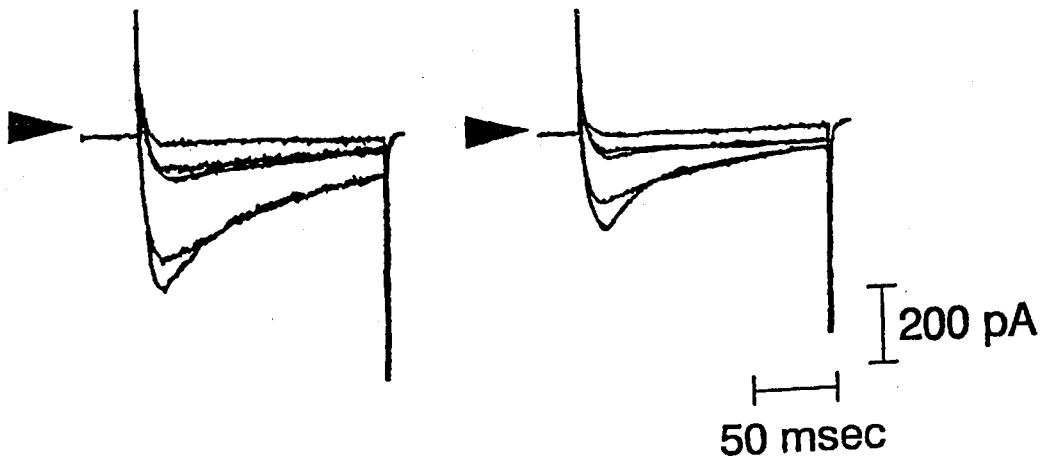


Figure 2.

A



B

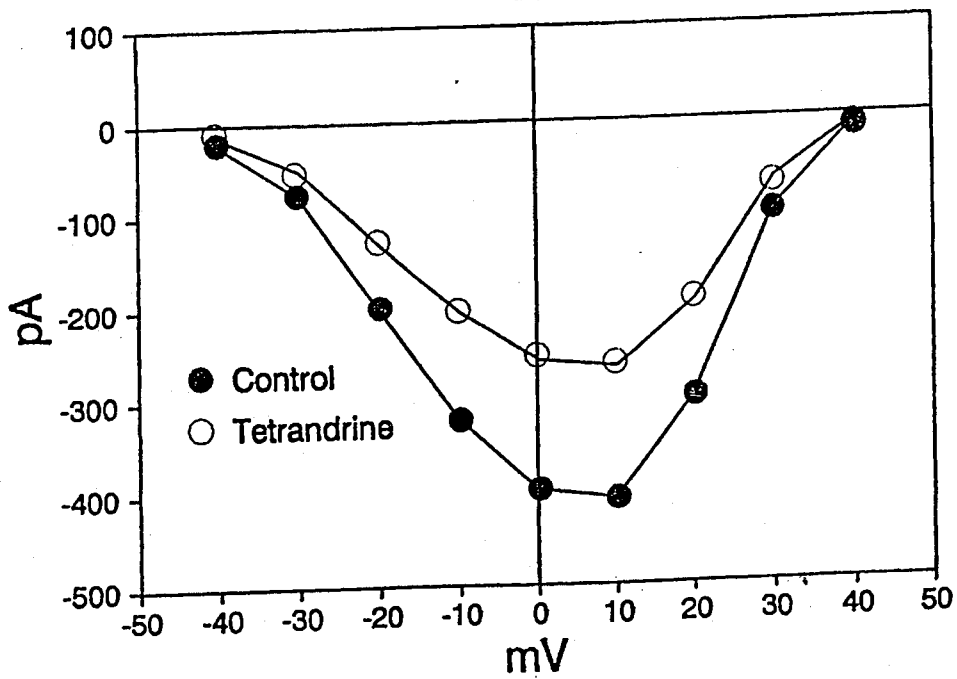


Figure 3.

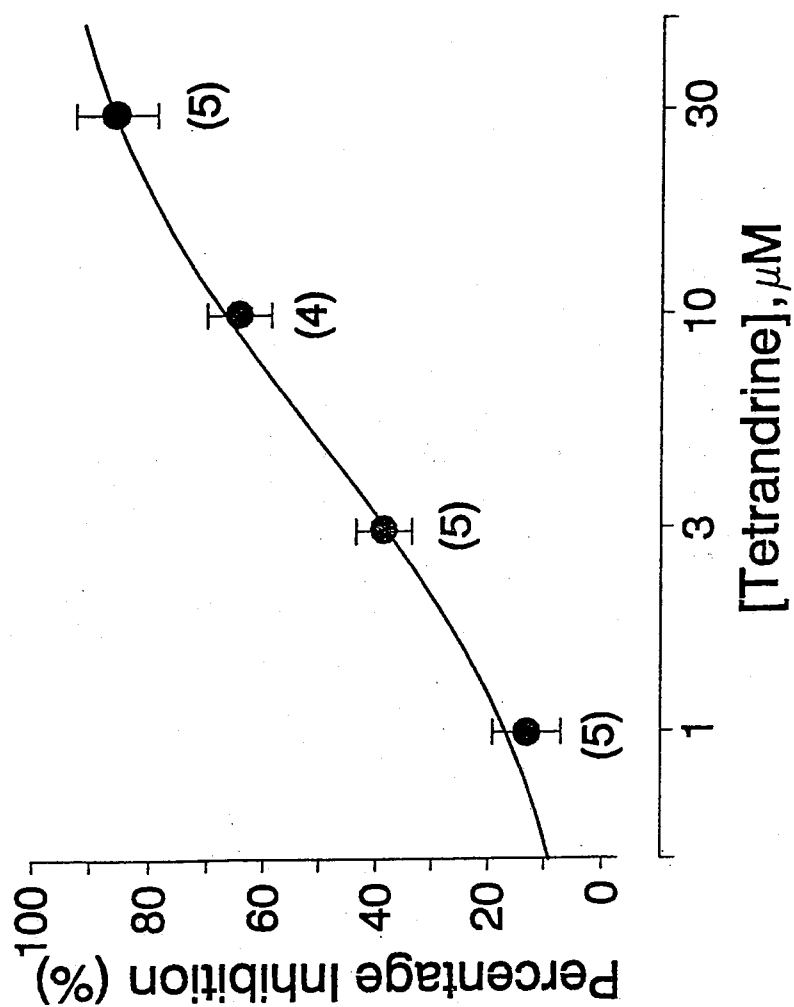


Figure 4.

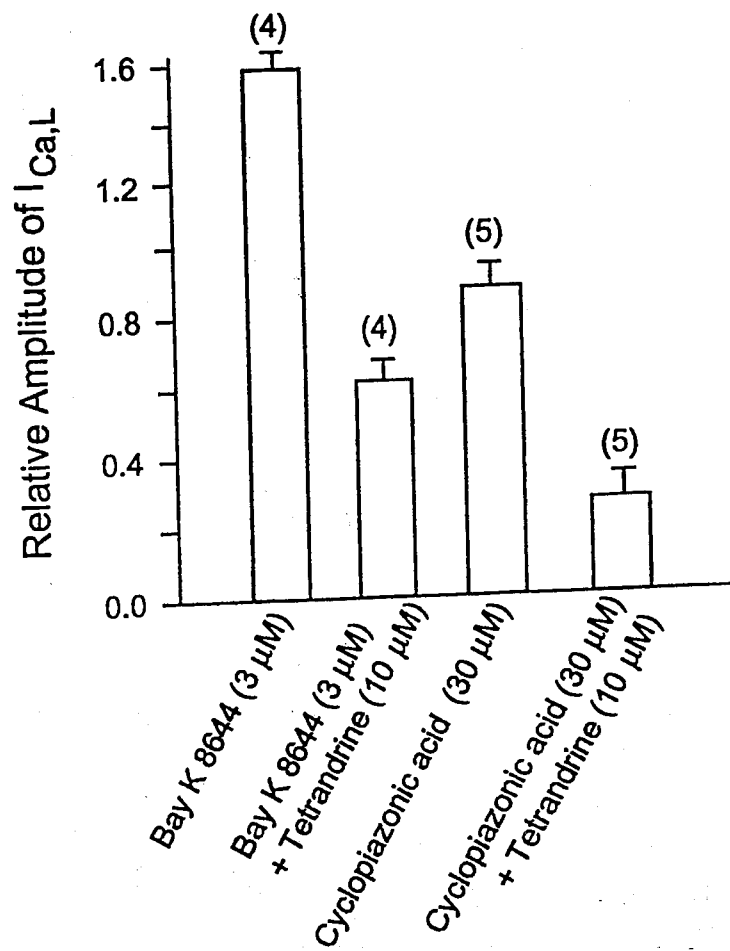


Figure 5.

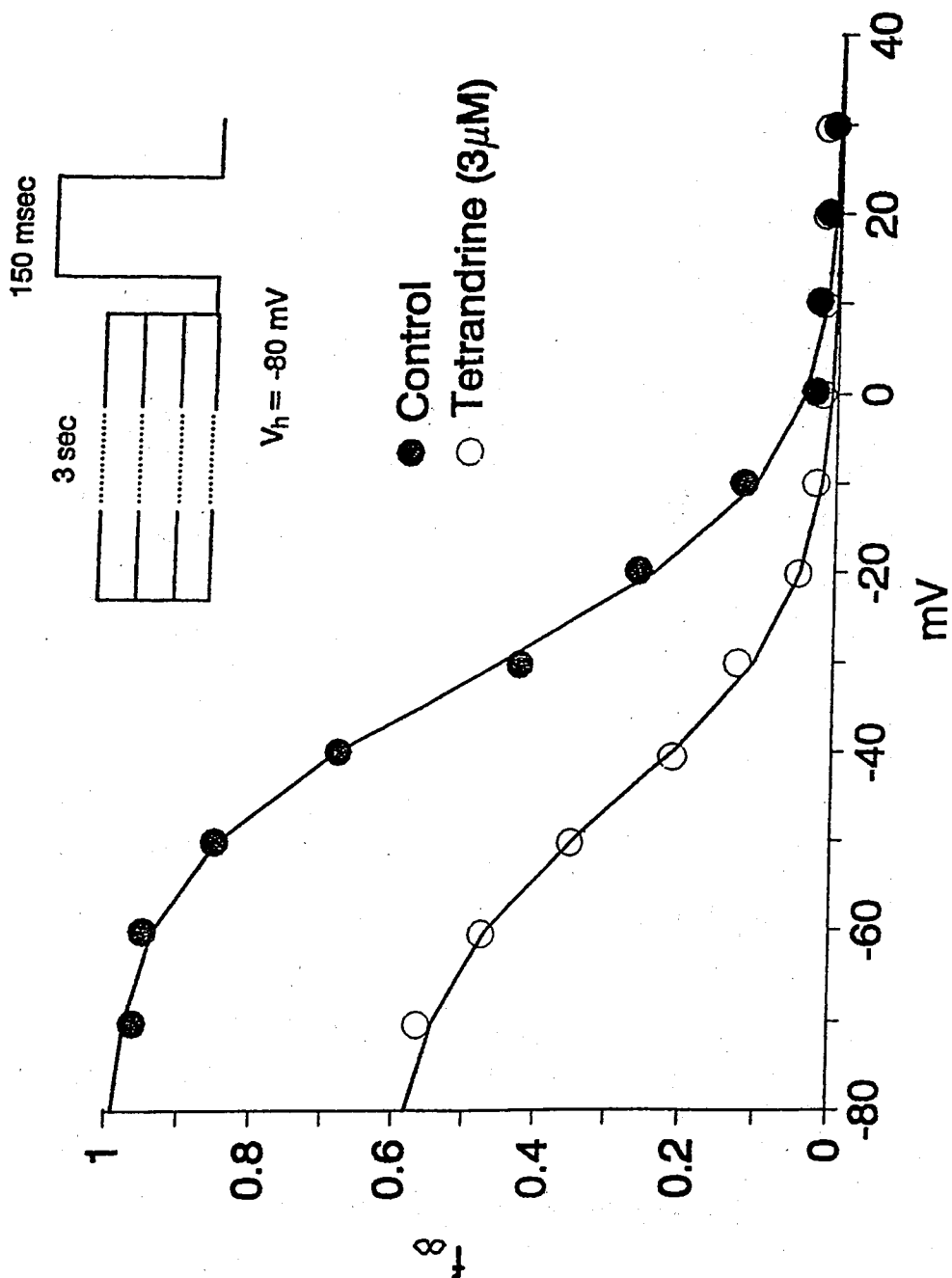


Figure 6.

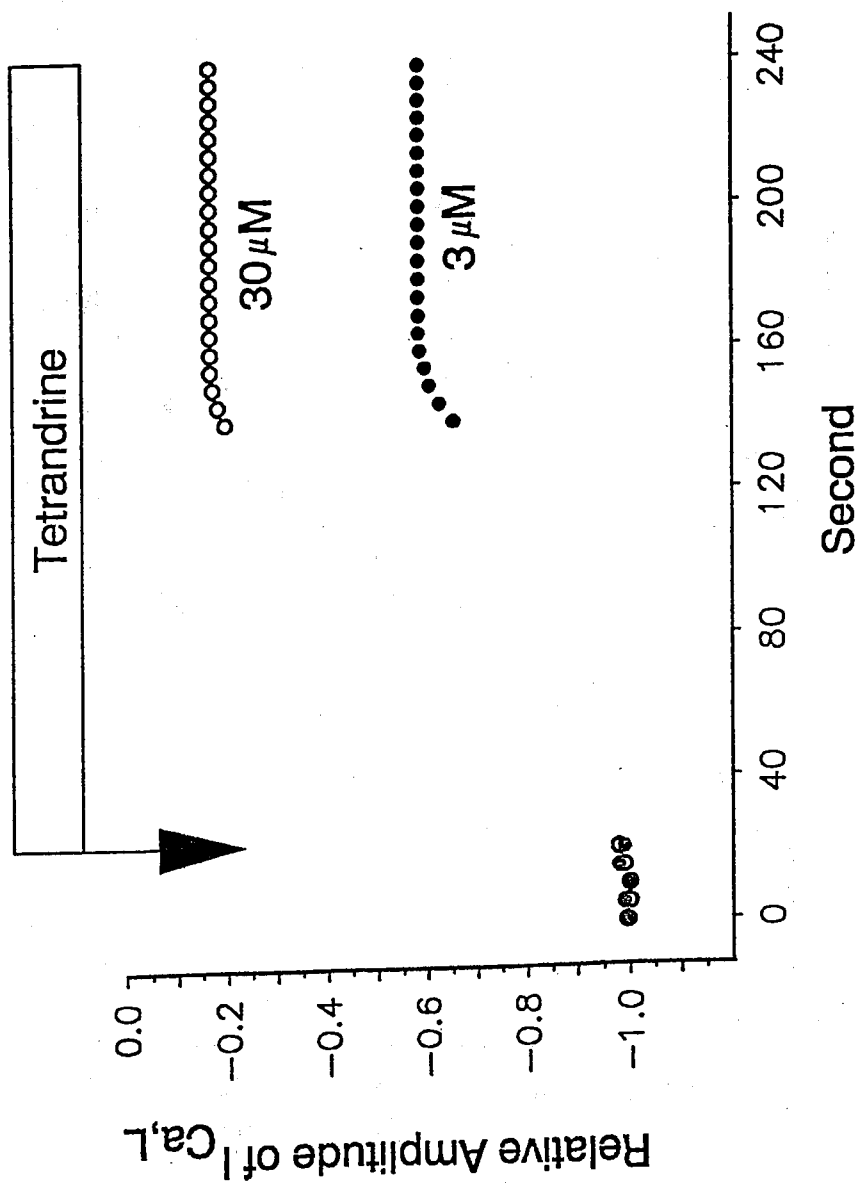


Figure 7.

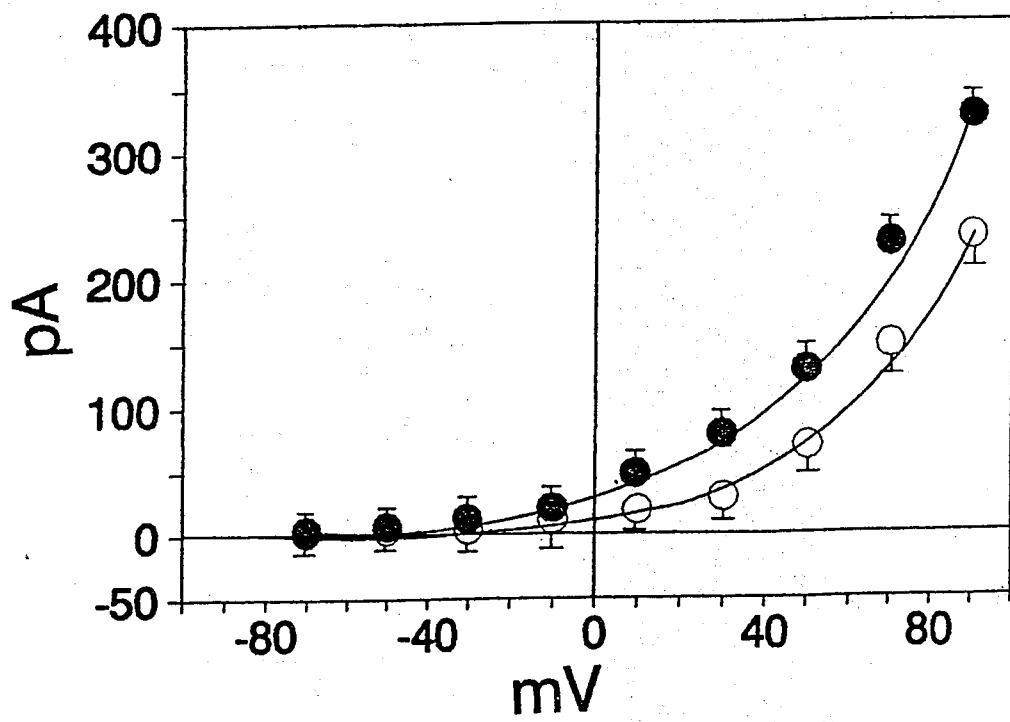


Figure 8.

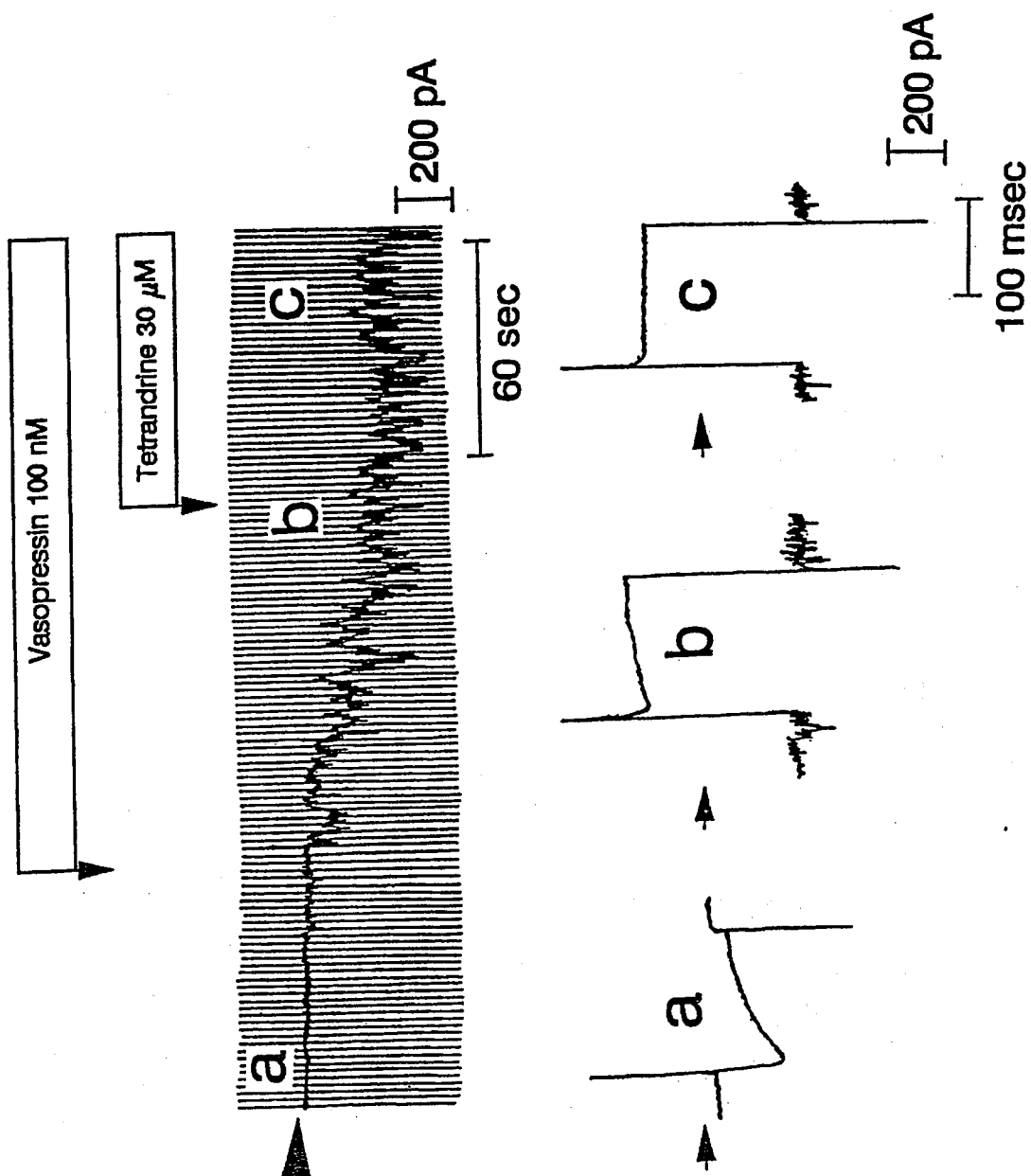
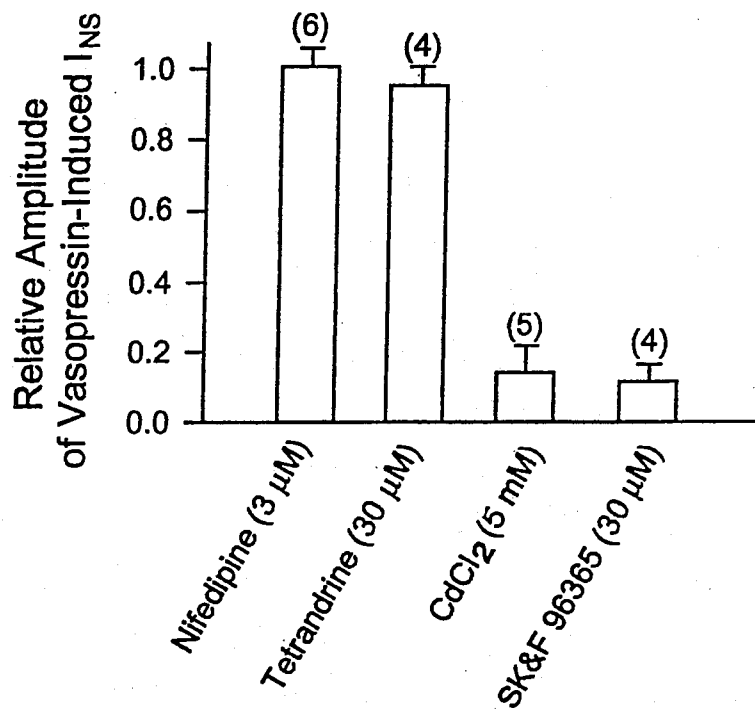


Figure 9.



象牙樹抗癌成分之研究

郭 曜 豪

國立中國醫藥研究所

中文摘要

象牙樹果實以酒精萃取後，其抽出物以抑制癌細胞生長為指標，分離出十種成分。經核磁共振、質譜、紅外線光譜等物理數據，分析鑑定係七種三帖類成分friedelin(1)、canophyllool(2)、friedelinol(3)、lupeol(4)、lupenone(5)、lup-20(29)-ene-3b,7b -diol(6)、betulin(7)，二種固醇類成分 β -sitosterol(8)、stigmasterol(9)及一種微量萜昆isodiospyrin(10)。其中isodiospyrin(10)對體外培養四種人類癌細胞包括肝癌(hepa-3B)、子宮頸癌(HeLa)、結腸癌(Colon-205)和鼻咽癌(KB)具有細胞毒殺(Cytotoxicity)作用，ED₅₀值分別為 ED₅₀(HEPA-3B)=0.25、ED₅₀(HELA)=0.27、ED₅₀(COLO-205)=0.13和 ED₅₀(KB)=1.81 μ g/ml。Isodiospyrin在30ng/ λ 濃度時，具有抑制DNA I型異構酶活性之作用。

關鍵字：象牙樹，抗癌，細胞毒殺作用，DNA I型異構酶

ABSTRACT

Seven triterpenes, friedelin(1), canophyllool(2), friedelinol(3), lupeol(4), lupenone(5), lup-20(29)-ene-3b,7b -diol(6) and

betulin(7), two sterols, β -sitosterol(8) and stigmasterol(9), and one naphthoquinone, isodiospyrin(10) were isolated from the ethanol extract of the fruits of *Diospyros ferrea*. The structural determination of these compounds were based on ^1H - and ^{13}C -NMR, MS, IR spectra, and the other physical data. All compounds were evaluated for in vitro cytotoxicity in 4 cancer cell lines. Compound 10 exhibited cytotoxicity against hepatoma (HEPA-3B), cervical carcinoma (HELA), colon carcinoma (COLO-205) and nasopharynx carcinoma (KB) [$\text{ED}_{50}(\text{HEPA-3B})=0.25$, $\text{ED}_{50}(\text{HELA})=0.27$, $\text{ED}_{50}(\text{COLO-205})=0.13$ and $\text{ED}_{50}(\text{KB})=1.81\text{mg/ml}$]. Isodiospyrin exhibited the inhibition of DNA type I topoisomerase activity ($\text{conc}=30\text{ng}/\lambda$).

Key Word: *Diospyrin ferrea*, anticancer, cytotoxicity, DNA Topoisomerase I

一、前言

癌症目前仍為國人十大死因之首位，雖目前對癌症之發生原因和其作用機制仍尚未清楚，但其治療方式仍以藥物殺死癌細胞、增強免疫系統、外科手術切除和放射線治療，甚至基因療法為主。而在發展新的抗癌藥物中，先以體外培養各種人體癌細胞 (In vitro) 對各種植物抽取物進行篩選試驗，經試驗有效者，再進行植物成分分離、純化、鑑定和化學修飾工作。接而進行動物體內試驗 (In vivo) 和其它藥理試驗，最後則以人體臨床試驗評估其核准上市之可行性。而天然物中，經這種系統性研究而獲得抗癌藥物的亦不少。

象牙樹 (*Diosyros ferrea*) 係屬柿科 (Ebenaceae) 灌木植物，一般主供觀賞用途。由於本實驗室從事臺灣抗癌植物成分之研究中，發現象牙樹果實，以酒精萃取後其抽出物對人體肝癌細胞和子宮頸癌細胞具

有抑制作用($ED_{50} < 4 \mu g/ml$)。目前為止，尚無有關象牙樹化學成分和相關藥理研究之報告。經本研究室一年之研究，以抑制癌細胞生長為指標，由象牙樹果實裏，分離出十種成分，經核磁共振、紅外線光譜等物理數據，分析鑑定係七種三帖類成分friedelin(1)、canophyllool(2)、friedelinol(3)、lupeol(4)、lupenone(5)、lup-20 (29)-ene-3b,7b -diol(6)、betulin(7)，二種固醇類成分 β -sitosterol(8)、stigmasterol(9)及一種微量萜酮isodiospyrin(10)。經以體外培養四種人類癌細胞肝癌(hepa-3B)、子宮頸癌(Hela)、結腸癌(Colon-205)和鼻咽癌(KB)的細胞毒殺(Cytotoxicity)試驗後，發現 isodiospyrin(10)對上述四種癌細胞均具抑制作用。此外，由於具 cytotoxicity抗癌成分在探討其抗癌機制時，第一型DNA拓樸異構酶(DNA Topoisomerase I)之活性抑制試驗，常被做為探討抗癌機制之模型⁽¹⁾。而此實驗之進行將和抗癌標準品 - 喜樹鹼(camptothecin)做一比較，以評估待測物之活性。這一方面之測試則由中央研究院黃昭蓮博士代為進行。

綜觀本計劃之主要目的如下：

- 一、利用色層分析法，自象牙樹果實分離、純化成分(包含抗癌成分)。
- 二、利用核磁共振光譜(NMR)和紅外線光譜等圖譜分析鑑定分離成分之化學結構式。
- 三、將這十種經分離的成分測試其抗癌活性實驗，包含由本實驗室以四種癌細胞，自行檢測其細胞毒殺作用(Cytotoxicity)實驗。
- 四、測試其抗癌機轉是否和第一型DNA拓樸異構酶(DNA Topoisomerase I)之活性抑制有關。

二、材料和方法

(一)儀器： 1H 和 ^{13}C 光譜分別在 300.13 和 75.46 MHz，以 Bruker 300AC 核磁共振光譜儀器計錄下來。HMBC 光譜利用偶合常數 8Hz，HRMS 和 EIMS 以 JEOL SX-102A 儀器完成。Sigel (Merck 70-230 mesh) 和 TLC板 (Merck 60-254)被用來做管柱層析和分析。HPLC則

以SPD-6AV 的液相層析，使用Semipreparative管柱 (Si gel column)來進行分離純化。熔點以Fisher-Johns apparatus測得。

(二)植物原料:象牙樹果實，1992年9月臺北市採集而得。植物標本存放在台北市國立中國醫藥研究所。

(三)萃取和分離:乾燥的象牙樹果實4.6公斤以乙醇萃取三次，粗萃取液以正己烷萃取五次。正己烷萃取物125g，應用Silica gel (1.7kg)，以 正己烷/乙酸乙酯 (5:1) 進行管柱層析，得六個分液 (fr.1-6)。而有活性的分液2 (fr.2) 更進一步以Si gel (600g) 應用正己烷/乙酸乙酯(20:1)、正己烷/乙酸乙酯(10:1)、正己烷/乙酸乙酯(5:1)、正己烷/乙酸乙酯(3:1)、正己烷/乙酸乙酯(1:1) 和以乙酸乙酯進行管柱層析，而得十個分液(fr.2-1~2-10)。化合物 1 (202 mg) 從分液2-2(fr.2-2) [1.1g，正己烷/乙酸乙酯 (5:1)]，化合物 3 (63 mg) 從分液2-3(fr.2-3) [0.2g，正己烷/乙酸乙酯 (3:1)]，以甲醇和乙酸乙酯沖洗而得。分液2-4 (fr.2-4)再以Si gel (400g) 正己烷/乙酸乙酯進行管柱層析，得十二個分液(fr.2-4-1~2-4-12)，每一部分500ml。化合物 2 (125 mg)從分液2-4-3(fr.2-4-3) [正己烷/乙酸乙酯 (7:1)]，化合物 5 (37 mg)從分液2-4-4(fr.2-4-4) [正己烷/乙酸乙酯 (5:1)]，化合物 7 (87 mg)從分液2-4-5(fr.2-4-5) [正己烷/乙酸乙酯 (4:1)] 獲致。分液2-5(fr.2-5)更進一步以 HPLC (Hibar Sigel, 250×10mm 正己烷/乙酸乙酯 3:1) 純化，得到化合物 10 (t_R =12 min, 10mg) 和化合物 6 (t_R =14 min, 69mg)。分液3 (fr.3)以矽膠(800g)，移動相使用正己烷/乙酸乙酯(7:1)，正己烷/乙酸乙酯 (5:1)，正己烷/乙酸乙酯 (4:1)，正己烷/乙酸乙酯(3:1)，二氯甲烷/乙酸乙酯(3:1)，乙酸乙酯和甲醇當沖提劑產生十一個分液，分液3-1到3-11(fr.3-1~fr.3-11)。化合物 4 (201mg) 由分液 3-3(fr.3-3) [正己烷/乙酸乙酯 5:1] 得到。化合物 8 (67mg) 和9 (32 mg) 分別由分液3-4(fr.3-4) [正己烷/乙酸乙酯 4:1] 和分液3-5 (fr.3-5) [正己烷/乙酸乙酯 3:1] 以處理化合物 1 相同的方式獲得。

(四) 化合物鑑定：friedelin(1)、canophyllol(2)、friedelinol(3)、lupeol(4)、lupenone(5)、lup-20 (29)-ene-3b,7b -diol(6)、betulin(7)、 β -sitosterol(8)、stigmasterol(9)及 isodiospyrin(10)，這些化合物對照文獻資料(mp, ^1H -and ^{13}C -NMR, MS, UV and IR)或標準品而加以鑑定。

(五) 抗癌之細胞毒殺試驗：體外細胞毒殺試驗，是根據對抗 KB、HEPA-3B、HELA和COLO-205等癌細胞的方法，主要是以Chen⁽²⁾所提出的方法為基礎。癌細胞來源除了從America type Culture collection購買KB外，皆由台北榮民總醫院所提供。

細胞毒殺實驗中，癌細胞以RPMI-1640培養基在培養充滿5%CO₂及37°C培養箱中。細胞毒殺作用藉由文獻^(3,4)中發表的步驟經修飾的方法—亞甲基藍染色法來進行。此分析根據在PH 8.5，染色液固定在monolayer 後洗滌monolayer，在低PH值時會釋出染料。簡而言之，準備0.1、1、10，和100 mg/ml 四種濃度的測試樣品和對照組的標準品，在九十六孔平板中種植2880cell/well培養3小時，再加入20ml測試樣品或對照組的標準品，在37°C中培養3天。從平板中移去培養基後，細胞以100 ml/well 10% normal saline 固定30分鐘，加入100 ml/well 0.01M borated-buffer的 1%(w/v) methylene blue染色30分鐘，染色後將九十六孔平板以borated-buffer洗滌四次以除去多餘染劑。加入100 ml/well ethanol-0.1M HCl(1/1:v/v)沖洗劑，震盪均勻，以Dynatech MR7000 測量在650 nm時每一microtiter的吸收值。ED₅₀定義是與未處理的細胞比較，測試樣品導致50%吸收值衰弱的濃度。

(六) DNA relaxation assay：首先將量之supercoil form的質體 YEPG與Bcocktail buffer充分混合，再加入不同濃度的受測藥物，最後，加入第一型拓模異構 每在37°C下，培養15分鐘，再將反應後的混合物，放到0.8%的agarose gel中電泳，90伏特，4小時，然後用EtBr染色、照相。

三、結果

象牙樹果實經由酒精萃取後，其粗抽取物再以正己烷和水層做分配相分離，由於正己烷經檢測具生物活性，因而繼續以矽膠色層分離之方法，以及利用高效能液相層析儀，反覆進行分離純化工作，最後獲得十種純化合物並確定其結構式係 friedelin(1)、canophyllo(2)、friedelinol(3)、lupeol(4)、lupenone(5)、lup-20(29)-ene-3 β ,7 β -diol(6)、betulin(7)、 β -sitosterol(8)、stigmasterol(9)和isodiospyrin(10)(See Figure-1, 2, 3)。

化合物1-10，經以體外培養鼻咽癌(KB)、肝癌(HEPA-3B)、結腸癌(COLO-205)和子宮頸癌(HELA)等四種癌細胞進行抑制活性實驗(Cytotoxicity)。結果(Table-1)顯示化合物10(isodiospyrin)的ED₅₀值分別為ED₅₀(KB)=1.81、ED₅₀(HEPA-3B)=0.25、ED₅₀(COLO-205)=0.13和ED₅₀(HELA)=0.27 μ g/ml。而其它化合物包括三帖類(1-7)和固醇類(8, 9)則因ED₅₀值大於4 μ g/ml而無抑制活性之效果。

至於DNA異構 每I之檢定，其結果顯示Isodiospyrin在濃度 30ng/ λ 時，可抑制DNA異構 每I之活性。

四、討論

化合物1和3由於¹³C-NMR光譜顯示在 δ_c 213的化學位移，紅外線譜1715 cm^{-1} 吸收訊號，證明化合物1和2均具酮基(Ketone)化合物1和3在¹H-NMR光譜圖上均發現一個二級甲基團(Secondary methyl group)，此外，七個單峰甲基基團(tertiary methyl group)出現在化合物1和3，六個甲基單峰出現在2上，顯示1、2和3均屬於三帖類 - friedelin 骨幹。檢測化合物1之質譜圖，其分子峰為m/z 440 (C₃₀H₅₀O) 和m/z 273 為friedelin-3-one的特性離子峰。再比對文獻^(5,6) 之碳譜、氫譜，證實化合物1為friedelin。

至於化合物2則多了 δ_H 3.62和 δ_c 68.1取代一甲基在C-17位置，化合

物3則在 ^1H 和 ^{13}C -NMR光譜上出現 δ_{H} 3.71和 δ_{C} 72.8，代替如1和2的酮基($\text{C}=\text{O}$) 在C-3上。進一步參考其質譜和比對文獻^(7,8)之碳、氫譜，證明化合物2和3分別為Canophyllool和friedelinol。

化合物4-7，由其在 ^1H -NMR光譜上的 δ_{H} 4.50 和 δ_{H} 4.66訊號峰，以及五個或六個單峰甲基團在高磁場位置，以及 ^{13}C - ^{13}C 光譜的三十個碳，推測其為lupene三帖類化合物。而且紅外線光譜在2950、1640、880 cm^{-1} 的吸收峰亦顯示具 $\text{C}=\text{CH}_2$ 的特徵。 ^1H 和 ^{13}C -NMR光譜上的 δ_{H} 3.71和 δ_{C} 78.9 ppm訊號峰，顯示化合物4、6和7在C-3上均具有-OH基，而化合物5的C-3位置則出現一酮基($\text{C}=\text{O}$)訊號(δ_{C} 218.1 ppm)。由此可知，化合物4-7係由lupene為骨架之三帖類，而化合物4和5則為lupeol和lupenone。

此外，化合物6上的NMR，圖譜發現 δ_{H} 3.92和 δ_{C} 70.5 ppm訊號，其代表具有-OH基。而其它三級甲基位置，在比較化合物4和6後，發現位於Me-23、25、26位置之氫譜均因附近含-OH基向改變化學位移，由此推測其OH應在C-6或C-7位置。進一步以HMBC和NOESY (2DNOE)之偶合關係而確定此OH以 β 立體方式位於C-7上位置。至於另一lupene三帖類，化合物7，則因 δ_{H} 3.31和 δ_{H} 3.77 ppm，以及 δ_{C} 60.51 ppm，係一個 CH_2OH 之特殊訊號，且少一個三級甲基，可推測最可能係Me-28被 CH_2OH 所取代。此外，由質譜斷裂離子峰 m/z 234得知其 CH_2OH 位於C-17位置，進而推論7是lup-20(29)-ene-3 β ,28-diol (betulin)。總之，上述化合物4、5、6和7其最後之判斷仍為將其質譜符合各個分子式，並比照文獻⁽⁹⁻¹⁴⁾之各種數據而得以確認。

化合物8和9主要係由 ^1H 和 ^{13}C -NMR紅外線光譜圖譜比照文獻資料^(15,16)和標準品而確定8是 β -sitosterol，而9為stigmasterol。化合物10光譜在1660、1640和1600 cm^{-1} 的吸收峰與 ^{13}C -NMR光譜在184.3、184.7、189.9、190.2的訊號顯示具有四個共軛酮基($\text{C}=\text{O}$)。且在低磁場上的 δ 6.67和6.87，(ABq)和化學位移相同的二個氫以singlet顯示，其代表係由四個Quinonoid的質子所組成。此外，具有芳香環特性的兩個氫(δ_{H} 7.24, 7.55 ppm)，和二個甲基及二個peri-oH，可推測此化合物由二個Quinone組成的dimer。進一步根據磁譜分子峰在 m/z 374並比照文獻資料⁽¹⁷⁻¹⁹⁾，因而

確定化合物10係isodiospyrin。

五、結論與建議

化合物1-10，經以體外培養鼻咽喉癌(KB)、肝癌(HEPA-3B)、結腸癌(COLO-205)和子宮頸癌(HELA)等四種癌細胞進行抑制活性實驗(Cytotoxicity)。結果顯示化合物10(isodiospyrin)對KB、HEPA-3B、COLO-205和HELA均具有不錯的抑制作用，而其它化合物包括三帖類和固醇類則無抑制活性之效果。當以 $ED_{50} < 4 \mu\text{g/ml}$ 的值，可判定具有抑制活性之意義，而isodiospyrin的 ED_{50} 值分別為 $ED_{50}(\text{KB})=1.81$ 、 $ED_{50}(\text{HEPA-3B})=0.25$ 、 $ED_{50}(\text{COLO-205})=0.13$ 和 $ED_{50}(\text{HELA})=0.27 \mu\text{g/ml}$ 其可謂具有相當強的抑制作用。由此推論，象牙樹果實之有效抗癌成分乃是isodiospyrin，而此結果符合文獻報導⁽²⁰⁻²²⁾其他柿科植物的抗癌成分主要為naphthoquinones相關成分。其它視抗癌成分的量而決定是否進行之實驗，則因抗癌成分 isodiospyrin 的量太少無法進行修飾衍生物之工作。至於象牙樹果實是否除了naphthoquinones外，尚有其他抗癌物質則有待將來進一步之研究。

另外在抗癌機制之探討上，以分離之Isodiospyrin和抗癌藥物標準品—喜樹鹼做一比較，發現兩者均可抑制DNA Topoisomerase I之活性，但Isodiospyrin比喜樹鹼之抑制活性更強（因前者之濃度為 $30\text{ng}/\lambda$ ，比後者之濃度 $100\text{ng}/\lambda$ 為低）。

總之，由其結論可知，雖由柿科之象牙樹果實可獲致抗癌成分—Isodiospyrin，但其含量實在太低（ $\text{yield}=0.00022\%$ ），因此此抗癌成分不適合做為象牙樹之指標成分。不過，可由本研究成果中，瞭解Isodiospyrin和喜樹鹼抗癌機制相似。因而對於由 Isodiospyrin的由其他柿科植物取得和其衍生物的製備，乃至於以更多種類癌細胞的測試，和毒理學實驗的進行，以資進一步評估開發抗癌藥物，實有相當裨益。

六、參考資料

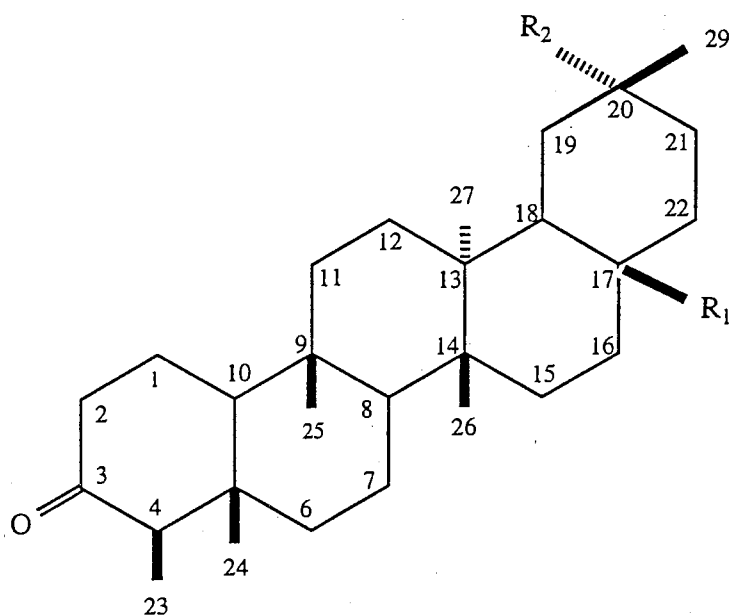
1. A.Y. Chen and L.F. Liu, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 34, 191 (1994).
2. C.F. Chen, J.M.H. Hwang, C.H. Wu, C.S. Chen, and K.Y. Chen, *Chin. Med. J. (Taipei)*, 46, 7 (1990).
3. W.M. Elliott, and N. Auersperg, *Biotechnic & Histochem.* 68, 29 (1993).
4. G.J. Finlay, B.C. Baguley, and W.R. Wilson, *Anal. Biochem.* 139, 272 (1984).
5. J. Klass, W.F. Tinto, S. McLean, and W.F. Reynold, *J. Nat. Prod.*, 55, 1626(1992).
6. H.E. Gottlieb, P.A. Ramaiah, and D. Lavie, *Magn. Reson. Chem.*, 23, 616(1985).
7. H. Nozaki, H. Suzuki, T. Hirayama, R. Kasai, R.Y. Wu, and K. H. Lee, *Phytochemistry*, 25, 479 (1986).
8. S.P. Gunasekera, and M.U.S. Sultanbawa, *J.C.S. Perkin I*, 418 (1977).
9. K. Yoshihira, M. Tezuka, and S. Natori, *Chem. Pharm. Bull.*, 19, 2314 (1971).
10. E. Wenkert, G.V. Baddeley, I.R. Burfitt, and L.N. Moreno, *Org. Mag. Res.*, 11, 337 (1978).
11. S. Anhut, H.D. Zinsmeister, R. Mues, W. Barz, K. Mackenbrock, J. Koster, and K.R. Markham, *Phytochemistry*, 23, 1073 (1984).
12. W.F. Tinto, L.C. Blair, A. Allli, W.F. Reynolds, and S. McLean, *J. Nat. Prod.*, 55, 395 (1992).
13. S.P. Wang, J.S. Lai, and K.F. Huang, *Chin. Pharm. J.*, 45, 329 (1993).
14. H. Budzikiewicz, J.M. Wilson, and C. Djerassi, *J. Am.Chem. Soc.*, 85, 3688 (1963).
15. B.B.Lin, and Y.S. Lin, *Chin. Pharm. J.*, 44, 281 (1992).

16. S.S. Lee, B.F. Lin, and K.C.S. Chen, Chin. Pharm. J., 47, 511 (1995).
17. M. Tezuka, C. Takhashi, M. Kuroyanagi, M. Statake, K. Yoshihira, and S. Natori, Phytochemistry, 12, 175 (1973).
18. A.V.B. Sankaram, R.V.V. Narayana, and M. Marthandamurthi, Phytochemistry, 25, 2687 (1986).
19. P.G. Waterman, and C.N. Mbi, Planta Med., 37, 241 (1979).
20. X.Z. Yan, Y.H. Kuo, T.J. Lee, T.S. Shih, C.H. Chen, D.R. MacPhail, A.T. MachPhail, and K.H.Lee, Phytochemistry, 28, 1541 (1989).
21. F. Gafner, J.C. Chapuis, J.D. Msonthi, and K. Hostettmann, Phytochemistry, 26, 2501 (1987).
22. B. Hazra, P.Sur, D.K.Roy, B. Sur, and A. Banerjee, Planta Med., 50, 295 (1984).

表一 Cytotoxicity of Compound 1-10 Against Tumor Cell Lines.

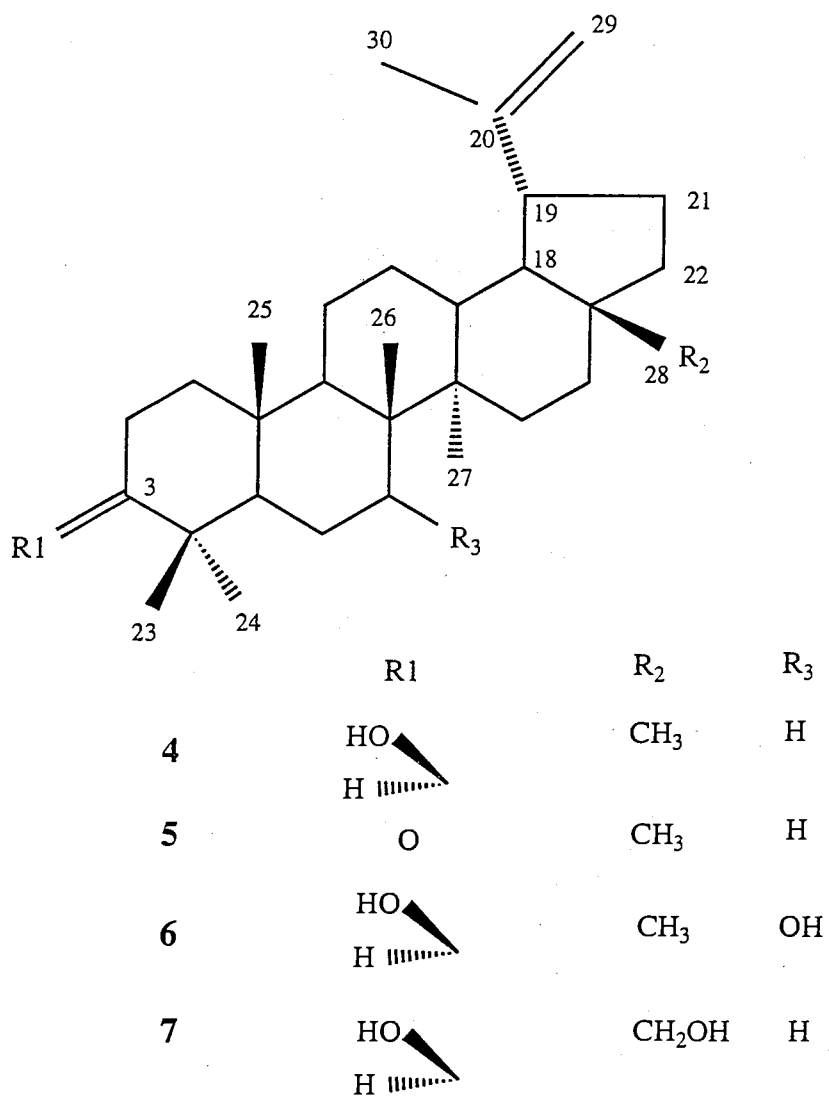
Compound	Cell lines (ED ₅₀ , µg/ml)			
	HEPA-3B	HELA	COLO-205	KB
1	I	I	I	I
2	I	I	I	I
3	I	I	I	I
4	I	I	I	I
5	I	I	I	I
6	I	I	I	I
7	I	I	I	I
8	I	I	I	I
9	I	I	I	I
10	0.25	0.27	0.13	1.81

I = Inactive, ED₅₀ > 4 µg/ml.

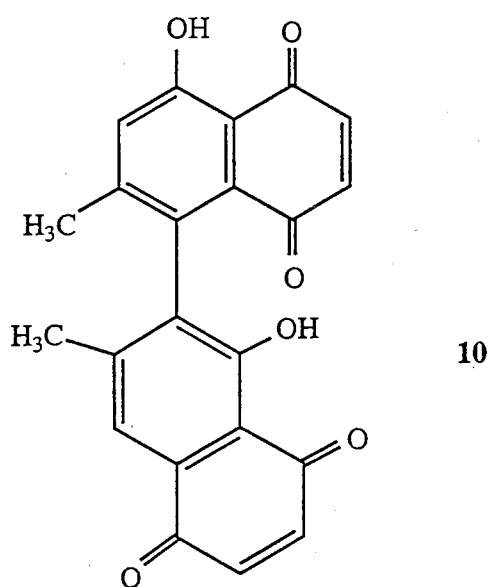
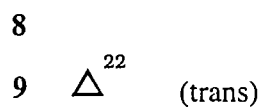
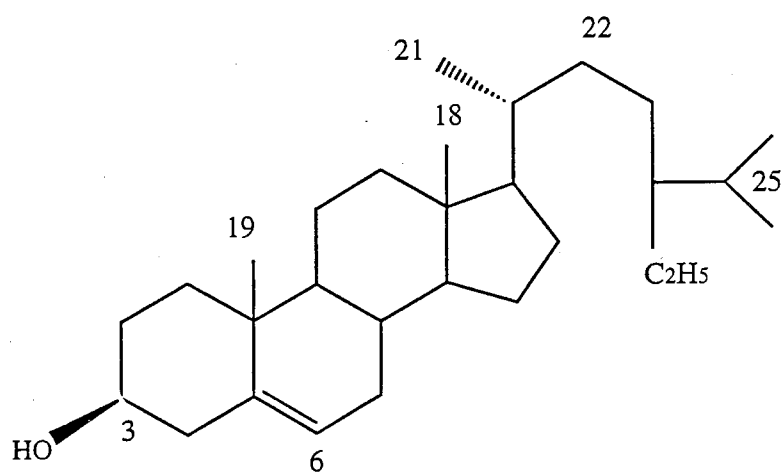


	R ₁	R ₂
1	CH ₃	CH ₃
2	CH ₃	COOH
3	CH ₂ OH	CH ₃

圖一. 化合物 1, 2, 3 化學結構式



圖二. 化合物 4, 5, 6, 7 化學結構式



圖三. 化合物 8, 9, 10 化學結構式

抗血管平滑肌細胞增生有效中藥成份之篩選及其作用機制之研究

余 淑 美

私立長庚醫學暨工程學院

中文摘要

我們從事植物成份藥理活性分析時發現來自獨活、白癬皮及龍膽科等植物有效成份具有抑制血管平滑肌細胞增生的作用。初步實驗結果發現獨活有效成份 osthole，白癬皮成份 fraxinellone 及龍膽成份 norwathriol 作用最強。執行本計畫主要是探討 osthole，fraxinellone 及 norwathriol 抗增生之作用機轉。若以胎牛血清 (fetal calf serum)，platelet-derived growth factor (PDGF, 20 ng/ml)，serotonin (10 μ M)，ionomycin (3 nM)，phorbol myristate acetate (PMA, 200 nM) 刺激培養的大鼠胸主動脈血管平滑肌細胞 DNA 合成時，將被 osthole 以 dose-dependent 方式抑制，且 IC_{50} 為 13.6 ± 1.8 ， 11.8 ± 1.3 ， 7.9 ± 0.9 ， 7.1 ± 0.2 ， 7.8 ± 0.2 及 8.6 ± 0.4 μ M。Fraxinellone 主要抑制 ionomycin 引起增加 DNA 合成之作用；norwathriol 抗增生之作用類似於 osthole。Osthole 及 norwathriol 本身即可增加 cAMP 及 cGMP，也可加強 forskolin 及 sodium nitroprusside 增加 cAMP 及 cGMP 之作用；而 fraxinellone 主要會抑制 mitogen 引起胞內 Ca^{2+} 濃度增加之作用。Osthole 及 norwathriol 主要會阻斷 cell cycle 中 G_0/G_1 進入 S phase 且抑制 Raf-1, MAPK 及

transcription factor NF- κ B 活化。Osthole 對內皮細胞 DNA 合成之抑制作用較小，比對血管平滑肌細胞小 12 倍。因此 osthole 是較有選擇性地抑制血管平滑肌細胞的增生，而此作用是來自增加 cAMP 及 cGMP 而來，透過 cAMP 及 cGMP 增加可進一步抑制 NF- κ B 活化，進而抑制 cell cycle-dependent gene 活化，而抑制 DNA 合成及細胞增生。

關鍵詞：獨活、白癬皮、龍膽、抗增生、血管平滑肌細

ABSTRACT

The antiproliferative effect of osthole, fraxinellone and norwathriol on rat vascular smooth muscle cells was examined in this study. A number of mitogenic agents, e.g., foetal-calf serum (10%, v/v) and platelet-derived growth factor (20 ng/ml), and pharmacological agents, e.g., serotonin (10 μ M), ionomycin (3 nM), phorbol 12,13- dibutyrate (20 nM) and phorbol myristate acetate (200 nM), were used to induce DNA synthesis in rat vascular smooth muscle cells; these effects were concentration dependently inhibited by osthole or norwathriol, and the half-maximal inhibition (IC_{50}) occurred at 13.6 ± 1.8 , 11.8 ± 1.3 , 7.9 ± 0.9 , 7.1 ± 0.2 , 7.8 ± 0.2 and 8.6 ± 0.4 μ M, respectively. Osthole and norwathriol itself increased the cyclic AMP and cyclic GMP formations in a concentration-dependent manner; it synergistically increased cyclic AMP and cyclic GMP levels induced by forskolin and sodium nitroprusside, respectively. After 48 h deprivation of serum, cells were re-stimulated with serum and the cell cycle was observed by flow cytometry; treatment of cells with osthole (100 μ M) or norwathriol (100 μ M) caused a block of serum-inducible cell cycle progression

at a point before the G_1 -S boundary. Both also block activation of transcription factor NF- κ B. The addition of osthole (100 μ M) at various times after serum addition to serum-deprived cells showed full inhibition of DNA synthesis even when added 6 h after serum. The cell cycle progression block was gradually lost as the delay from serum to osthole application was increased from 6 to 18 h. The effect of osthole on serum-stimulated [3 H]thymidine incorporation into endothelial cells was examined and the IC_{50} value (158.7 ± 2.7 μ M, $n=6$) was obtained; it exhibited greater potency (12-fold) for vascular smooth muscle cells as compared with endothelial cells as an antiproliferative agent. These results suggest that osthole is a selective antiproliferative agent in vascular smooth muscle cells. The antiproliferative effect occurs at the early G_1 phase of the cell cycle and is due to the increase in cyclic AMP and cyclic GMP contents. Furthermore, cAMP and cGMP both inhibit activation of NF- κ B, subsequent inhibit DNA synthesis and cell proliferation.

Keywords: DNA synthesis; Cell cycle; Smooth muscle cell, rat, vascular; Osthole; Fraxinellone; Norwathriol.

一、前言

背景

在我國十大死因中，心血管疾病分別佔第二（腦血管疾病）、四（心臟疾病）及八位（高血壓性疾病），其他死因（如糖尿病、腎病）亦間接與血管病變有關。而動脈硬化是造成心肌梗塞、腦中風等心血管疾病最主要的殺手（1），因此動脈硬化之治療及預防的藥物成為各大藥廠研究

的對象。目前大多數學者認為動脈硬化的產生與內皮細胞受損、血管過度收縮、血管平滑肌細胞不正常增生、血小板過度活化及脂質代謝異常有密切的關係 (2-4)。

血管平滑肌細胞過度增生是產生動脈硬化最早期且關鍵性的因素 (5)。此外血管平滑肌細胞不正常增生和某些血管性疾病如血管成形術後再阻塞，使用冠狀動脈氣球擴張術及血管排斥性等的高度相關性。因此抑制不正常的血管平滑肌細胞增生對動脈硬化及血管疾病的治療是相當重要的。正常情況血管內皮細胞可藉著釋放 prostacyclin (PGI_2) 及 endothelium-derived relaxing factor (EDRF) 來調控平滑肌細胞的張力 (6)。在病理狀況 (如缺氧、動脈硬化等)，內皮細胞受損，血小板被吸附至 subendothelium 後產生活化並釋放 ADP, thromboxane A_2 , platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF) 等，這些物質除了引起血管平滑肌收縮外 (6)，亦產生細胞增生。此外 macrophages 及 monocytes 也被吸附至內皮細胞並釋放一些物質如 cytokines (如 interleukin 1β), growth factors (如 fibroblast-derived growth factor) 及 expression adhesion protein (如 fibronectin, vitronectin 等) 並發生化學趨向性 (chemoattracted)，最終形成脂質過氧化 (oxidized lipids) 及自由基 (如 superoxide anion)。一方面使內皮細胞再度失去功能 (dysfunction)，另一方面 monocytes/macrophages 所釋放之物質會引起平滑肌細胞增生，最後形成動脈硬化斑 (atherosclerotic plaques)。目前有關 mitogens (如 growth factors, hormones 及 neurotransmitters) 引發平滑肌細胞增生之訊號傳遞過程大約可分為兩條路徑：一條是與 G-protein-coupled receptor 有關 (如 thrombin, vasopressin, angiotensin II, bombesin 等) (7)，另一條是 receptor protein tyrosine kinase pathway (如 PDGF, EGF, insulin) (7)。無論 G-protein-coupled pathway 或 tyrosine kinase receptor pathway 最後均引起 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 活化。MAPK 是一種 serine/threonine kinase，其上游 activator 是 MAPKKK 及 MAPKK。目前已知 tyrosine

kinase receptor 可經由 Ras 及 Raf protein 來活化 MAPKK，而 G-protein-coupled pathway 主要是直接活化 MAPKKK 再活化 MAPKK (8)。MAPK 藉著使其 substrate protein 磷酸化，進而將訊號傳至細胞核，使核膜上與細胞生長有關的 transcription factors expression，進而引響 cell cycle，並產生細胞增生 (8)。MAPK 主控制 cell cycle 中 G_0/G_1 進入 S phase。另外控制 cell cycle G2/M phase 中重要的 protein kinase 是 cyclin-dependent protein kinases (CDKs)。目前抗平滑肌增生之藥物十分貧乏，對 MAPKs 及 CDKs 是否有抑制作用仍未被發現。另外，cGMP/ PKG pathway 抑制增生之機轉至今仍不明。

由於天然物，特別是植物，在藥物的發展史上佔有相當重要的地位，而且一直是新藥開發的主要來源之一 (9)。因此由天然物著手找尋具有生物活性的物質，並開發成新藥是可以預期的。近 7-8 年來我們投入植物活性有效成分藥理作用的研究 (10-13)，並且透過藥化學家之協助合成許多比原成分活性更強的化合物執行一系列的藥理研究。其中有些成分或衍生物，不但在藥理作用上具有很好的選擇性，而且可能是有效的抗高血壓、抗血栓及強心劑。例如：大香葉樹分離得到的 dicentrine，大葉瓜馥木分離得到的 discretamine 是選擇性 α -腎上腺素性受體拮抗劑，具有降壓功能 (13,14)；YC-1 是 pyrazole 衍生物，是 soluble guanylate cyclase activator，具有抗血栓作用 (15)，此外亦抑制血管平滑肌細胞增生 (16)；由臺灣五掌楠分離出來的 thaliporphine 選擇性地抑制 inducible NOS，對敗血性休克有部分預防的作用 (17)。此外，在與國內多位植化家及合成專家共同努力下，我們由植物分離或由化學修飾得到數百種相關的衍生物，其中某些成分或化合物已證實在試管實驗中有相當好的生物活性，因此要由這數百種成分中找尋有效的血管平滑肌細胞增生的抑制劑是可以預期的。本計畫主要研究獨活成分 osthole、龍膽成分 norwathriol 及白癬皮成分 fraxinellone 抗增生之作用機轉。

二、材料與方法

1. 血管平滑肌細胞培養:

血管平滑肌細胞分離是取自大鼠胸主動脈，以無菌手術操作取下血管，利用 collagenase 及 elastase 作用分離出平滑肌細胞，分離步驟根據 Yu et al. (1990) (19) 的方法，並以 DMEM (含 10% 胎牛血清) 加入抗生素培養。人類臍靜脈內皮細胞及鼠類巨噬細胞購自 ATCC. 並分別以 EMEM 及 RPMI-1640 培養。

2. [^3H]Thymidine incorporation 之測定:

將 5×10^4 /well cells 種於 24 well plates, 以 DMEM 加 10% FCS 培養及加入 penicillin, streptomycin 等抗生素。24 小時之後，將 medium 換成 DMEM，並不加入 FCS，讓 cell cycle 停留在 Go phase (resting) 48 小時後，加入植物成分及 10% FCS 及 [^3H]thymidine，並分別於 6、12、18、24、48、72 小時後收集 cell，測定 DNA content。如此可知對 [^3H]thymidine incorporation 的影響，並決定藥物對 cell cycle 進行之調控作用。除了觀察這些植物成分對 10% FCS 引起細胞增生之影響外也探討對其它 mitogens (如 PDGF, angiotensin II, ADP, serotonin 及 TXA_2) 的影響，以了解這些植物成分抑制平滑肌細胞增生是否 serum-dependent。

3. 利用 flow cytometry 測定 nuclear DNA content:

Cells (5×10^4 /well) 於 DMEM，不加入 10% FCS 48 小時後，加入各種植物成分及 10% FCS，於 24 小時後以 trypsin/EDTA 終止反應，並用 Hanks' balance salt solution/5% BSA 洗掉 trypsin，最後懸浮於 PBS。加入 0.6% Nonidet P-40 及 0.1mg/ml propidium iodide, RNase 2 mg/ml。Flow cytometry 分析是利用 Becton Dickinson FACScan (exciting at 488 nm and sensing at 585 nm)。

4. 平滑肌細胞 cAMP, cGMP 的測定:

以 10^6 cells/ml 先用 IBMX ($10 \mu\text{M}$) 處理 5 分鐘後, 再加入植物成分反應 2 分鐘後終止反應。細胞置於 -86°C 冷凍, 欲測定 cAMP 或 cGMP 時細胞再離心, 取上清液用 EIA kits 測 cAMP 及 cGMP 含量, 而沉澱物則用於 protein 定量。

5. 細胞內鈣離子的測定:

將 5×10^4 cells/ml 種在 coverslip 上, 4 天後將長滿 cells 的 coverslip 加入 fura-2 ($5 \mu\text{M}$) 於 37°C 下置 30 分鐘 (18), 之後洗去殘存 fura-2/AM, 用 KHS buffer (組成 mM): NaCl 117.5, KCl 5.4, NaH_2PO_4 1.2, NaHCO_3 25.0, CaCl_2 2.5, MgSO_4 1.2, glucose 5.5, HEPES 25.0), 再將 coverslip 放入特製的 holder 及 cuvette, 實驗時加入各種植物成分 3 分鐘, 再加入上述各種血管增生引發劑引起細胞內 Ca^{2+} 濃度變化, 再觀察這些植物成分對 Ca^{2+} mobilization 影響, 再以 spectrophotometer (CAF110, Jasco, Japan) 測定 fluorescence (Ex 為 340 及 380 nm, Em 為 500 nm)。細胞內 Ca^{2+} 濃度之計算根據公式 (19)。

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \cdot \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \cdot \frac{F_{380\min}}{F_{380\max}}$$

6. 平滑肌細胞內 phosphoinositides breakdown 測定:

平滑肌細胞以 $[3\text{H}]\text{myo-inositol}$ 標示 24 小時, 再以上述各種血管增生引發劑活化 phospholipase C 引起 phosphoinositides breakdown, 經處理後以 anion exchanger AG-8X column 分離各種 inositol phosphates, 並加以定量, 觀察植物成分對上述各種血管增生引發劑所引起的 phosphoinositides breakdown 影響。

7. 平滑肌細胞 guanylate cyclase 活性分析:

Cells ($10^6/\text{ml}$) 懸浮於 KHS buffer, 於 4°C 下, 以 sonicator 震

破即可得 homogenates 再經離心 ($39000\times g$) 10 分鐘，取上清液為 soluble fraction；而其沈降部份 (particular fraction) 則懸浮於 Tris buffer。Guanylate cyclase 活性根據 Gerzer et al. (1983) (20) 方法，取 $80\ \mu\text{g}$ homogenate, $40\ \mu\text{g}$ soluble fraction, $40\ \mu\text{g}$ particular fraction 與 reaction buffer (15 mM creatine phosphate, 0.2 mg/ml creatine kinase, 5 mM MgCl_2 , 50 mM Tris-HCl, 0.2 mM GTP, 2.5 mM cGMP 與 $10^6\ \text{cpm}$ [^{32}P]-GTP) 反應。在 30°C 下反應 10 min，再加入 0.5 N HCl 終止反應並加熱再以 1 mM imidazole buffer 中和，最後以 neutral alumina 將 cGMP 與 GTP 分離，以求 cGMP 生成量。

8. Adenylate cyclase 活性分析:

根據 Insel et al. (1982) (21) 方法，將平滑肌細胞 particular fraction 與 reaction buffer (25 mM creatine phosphate, 1 mg/ml creatine kinase, 13 mM MgCl_2 , 50 mM Tris-HCl, 2.6 mM EDTA, 1 mM cAMP, 0.5 mM ATP, $10^6\ \text{cpm}$ [^{32}P]-ATP) 反應 20 分 30°C ，加入 0.5N HCl 終止反應，最後以 neutral alumina 將 cAMP 與 ATP 分離以求 cAMP 生成量。

9. 平滑肌細胞 phosphodiesterase 活性分析:

Phosphodiesterase 活性分析根據 Moore et al. (1985) 方法 (22)，將 cell homogenates (1 mg/ml) 與 0.1 ml cAMP 或 cGMP reaction buffer (10 μM cAMP 或 cGMP, 0.1 μCi [^3H] cAMP or [^3H] cGMP) 於 37°C 反應 30 分鐘再煮沸 1 分鐘終止反應，再冷卻，此時 cAMP (或 GMP) 會被 phospho-diesterase 分解為 5'-AMP 或 5'-GMP)。之後，加入具有 5'-nucleotidase 活性的蛇毒 (0.1 ml, 1 mg/ml, Ophiophagus hannah venom) 在 25°C 下反應 30 分鐘，此步驟可將 5'-AMP (or 5'-GMP) 轉為不帶磷酸根的 adenosine (or guanosine)。隨後加入 1 ml Dowex-1 column (anion-exchange)，將殘餘的 cAMP (or

cGMP) 結合，再用離心方式將其沈降下來，取 0.5 ml 上清液加入 atom light，以 counter 測 radioactivity。

三、研究結果：

Osthole, norwathriol 及 fraxinellone 化學結構見圖一 (Fig 1)

(一) Osthole, norwathriol 及 fraxinellone 對血清引發

[³H]thymidine incorporation 之影響在 serum-free medium 培養 48 小時後，再加入 10% serum，可增加 [³H]thymidine incorporation。Osthole 及 norwathriol 可明顯抑制此 serum 引發增加 DNA 合成之作用 (IC₅₀ 分別為 13.6±1.8 及 20.5±2.3 μM)，其它會增加 cGMP 或 cAMP 之藥物的 sodium nitroprusside、8-bromo-cGMP 及 8-bromo-cAMP 分別抑制 serum 引起增加 DNA 合成之 IC₅₀ 是 11.0±0.9, 33.1±1.4, 171.4±7.8 及 553.0±11.2 μM。另外 PDGF (20 ng/ml) 及 serotonin (10 μM) 也會刺激 DNA 合成，osthole 及 norwathriol 在 1~30 μM 範圍內將明顯抑制 (Fig 2)，然而 fraxinellone 對血清引起增加 DNA 合成作用沒有抑制。

(二) Osthole, norwathriol 及 fraxinellone 對 ionomycin、PDB 及 PMA 所刺激增生之影響

Osthole 及 norwathriol 對 Ca²⁺ ionophore (ionomycin)、protein kinase C activator (PDB 及 PMA) 所引起之增生有明顯抑制；其 IC₅₀ 為 7.1±0.2, 7.8±0.2 及 8.6±0.4 μM (Fig 3)。然而 fraxinellone 只抑制 ionomycin 所引起之作用。

(三) Osthole 及 norwathriol 對 cyclic nucleotide formation 及對 serum 引起 phosphoinositide 分解的影響

如 Table 1, osthole (10~100 μM) 引起明顯增加 cAMP 及 cGMP 濃度。Forskolin (3 μM) 及 sodium nitroprusside (1 μM) 分別增加 cAMP 及 cGMP。當合用 osthole (100 μM)、IBMX (100 μM)，是

phosphodiesterase inhibitor) 及 forskolin、sodium nitroprusside 則分別引起協同性增加 cAMP 及 cGMP。Norwathriol 對 cAMP 或 cGMP 影響相似於 osthole。Osthole, norwathriol 及 fraxinellone 並不影響血清所引起增加 phosphoinositide breakdown 之作用。Fraxinellone (100 μ M) 抑制 ionomycine 增加胞內 Ca^{2+} 之作用。

(四) Osthole 及 norwathriol 對細胞週期之影響

Quiescent cell 約有 85% 細胞停留在 G_0/G_1 phase; 加入 serum 後 12~18 h 會明顯增加 S phase 產生, Osthole (100 μ M) 會抑制細胞週期之 G_0/G_1 phase 進入 S phase (Fig 4)。Norwathriol (100 μ M) 也是抑制細胞週期之 G_0/G_1 phase 進入 S phase (圖未顯示)。Osthole (100 μ M) 完全抑制 DNA 合成主要是在再加入血清的前 6 小時, 若是血清存在 15 小時, 再加入則抗增生作用消失 (Fig 5)。

(五) Osthole 對 serum 刺激內皮細胞 DNA 合成之影響

Osthole 及 norwathriol 對 serum 引起增加內皮細胞 DNA 合成的作用所生之抑制作用較弱, IC_{50} 約分別為 $158.7 \pm 2.7 \mu\text{M}$ 及 $188 \pm 15 \mu\text{M}$ 。

(六) Osthole 及 norwathriol 對 Raf-1 及 MAPK 活性之影響

由於 Raf-1 及 MAPK 活化將貢獻細胞週期之 G_0/G_1 phase 進入 S phase, 因此檢查 osthole 及 norwathriol 是否影響血清引起增加 Raf-1 及 MAPK 活性之作用。由 Table 2 顯示血清刺激 6 倍 Raf-1 及 8 倍增加活性, 此增加將 osthole 及 norwathriol 抑制, 但不被 fraxinellone 影響。

(七) Osthole 及 norwathriol 對 nuclear transcription factor NF- κ B 活性之影響

由 Western blot analysis 顯示 osthole 及 norwathriol 將抑制 p65 NF κ B expression (Fig 6)。其它 cGMP 增加藥物也有相似之實驗結果。

四、討論：

本研究發現 osthole 及 norwathriol 對血清、PDGF、serotonin 及各種 PKC activator (PMA) 所刺激的增加血管平滑肌細胞 DNA 合成均有抑制作用，其抑制之 IC_{50} 值均相似，且濃度範圍內接近於 osthole 刺激 cAMP 及 cGMP 產生。其它的 cAMP or cGMP 增加劑如 forskolin 及 sodium nitroprusside 均會抑制 VSMC 增生。因此 osthole 及 norwathriol 是透過 cAMP 及 cGMP 來產生抗增生之作用。

cAMP 會活化 cAMP-dependent protein kinase (PKA)，而 PKA 可經由使 Raf-1 phosphorylation，進而使 Raf-1 活性消失 (23,24)，因此 MEK、MAPK 及 transcription factor 活性受抑制，進而抑制 DNA 合成。然而，至今仍不明瞭 cGMP 活化 cGMP-dependent protein kinase (PKG)，這 cGMP/ PKG 路徑是如何產生抗增生作用？我們發現 PKG 可直接使 Raf-1 serine 磷酸化，進而抑制 Raf-1 活性，使 MEK、MAPK 無法活化，另外 cGMP/ PKG 也抑制 NF- κ B 活化，而 NF- κ B 是引起增生很重要的 transcription factor (25)。因此我們的實驗說明了 osthole 及 norwathriol 經由增加 cAMP 及 cGMP pathway 產生抗增生之分子機制是抑制 Raf→Mek→MAPK，進而抑制 cell cycle dependent gene 活化，再抑制 DNA 合成。在本研究中也發現 fraxinellone 只抑制胞內鈣離子濃度是不足以抑制增生，這也說明了 $[Ca^{2+}]_i$ 對於細胞增生而言，不是非常重要的 second messenger。

Osthole 對 VSMC 有較明顯抑制，但對內皮細胞影響較小且弱，因此這對血管性疾病之治療是較有優勢的。

五、結論：

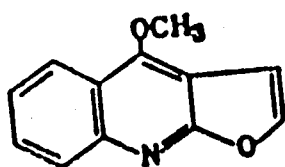
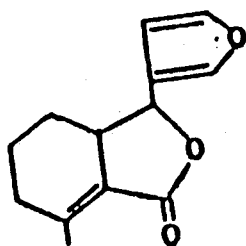
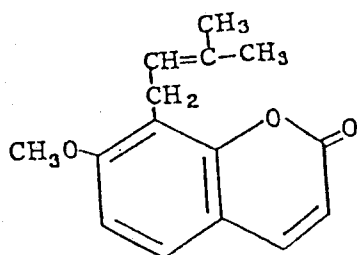
獨活成份 osthole 及龍膽 norwathriol 可較選擇性地抑制血管平滑肌細胞增生，可能可用於預防血管阻塞性疾病或動脈硬化之治療或預防，而白癬皮抗增生之作用較弱。未來研究將利用 balloon-catheter

injury 模式，進行大鼠頸動脈血管 injury 模式來評估獨活及龍膽在活體動物之抗增生作用。

References

1. Ross, R. (1986). *New Engl. J. Med.*, 314:488-500.
2. Epstein, F.H. (1965) *J. Chronic Dis.* 18:735-774.
3. Kannel, W.B. (1974) *Prog. Cardiovasc. Dis.* 17:5-24.
4. Rabkin, S.W., Mathewson, F.A.L. & Tate, R.B. (1978) *Ann. Intern. Med.* 88:342-345.
5. Kariya, K.I., Kawahara, Y., Araki, S.I., Fukuzaki, H. & Takai, Y. (1989) *Atherosclerosis* 80:143-147.
6. Weissberg, P.C., Grainger, D.J., Shanhan, C.M. & Metcalfe J. C. (1993) *Cardiovasc. Res.* 27:1191-1198.
7. Dumont, J.E., Jauniaux, J.C., & Roger, P.P. (1989). *Trends Pharmacol. Sci.*, 14:67-71.
8. Bennett, M.R., Evan, G.I. & Newby, A.C. (1994). *Circ. Res.* 74:525-536.
9. Heldin, N.E., Paulsson, Y., Forsberg, K., Heldin, C.H. & Westermark, B. (1989). *J. Cell. Physiol.*, 138:17-23.
10. Au, Y.P.T., Montgomery, K.F. & Clowes, A.W. (1992) *Circ. Res.* 70:1062-1069.
11. March, K.L., Wilensky, R.L., Roeske, R.W. & Hathaway, D.R. (1993). *Circ. Res.* 72:413-423.
12. Teng, C.M., Yu, S.M., Chen, C.C., Huang, Y.L., & Huang, T.F. (1990) *Thromb. Res.* 59:121-130.
13. Yu, S.M., Chen, C.C., Huang, Y.L., Tsai, C.W., Lin, C.H., Huang, T.F. & Teng, C.M. (1990) *Eur. J. Pharmacol.* 187:39-47.

14. Ko, F.N., Guh, J.H., Yu, S.M. Hou, Y.S., Wu, Y.C. & Teng, C. M. (1994) Br. J. Pharmacol. 112: 1174-1180.
15. Ko, F.N., Wu, C.C., Kuo, S.C., Lee, F.Y. & Teng, C.M. (1994) Blood (in press).
16. Yu, S.M. & Kuo, S.C. (1995) Biochem. J. 306:787-792.
17. Yu, S.M. (1994) Biochem. J. 303:289-294.
18. Negre-Salvayre, A. & Salvayre, R. (1992) Br. J. Pharmacol. 107:738-744.
19. Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y. (1985) J. Biol. Chem. 260:3440-3450.
20. Gerzer, R., Hamet, P., Ross, A.H., Lawson, J.A. & Hardman, J.G. (1983) J. Pharmacol. Exp. Ther. 226: 180-186.
21. Insel, P.A., Stengel, D., Ferry, N. & Hanoune, J. (1982) J. Biol. Chem. 257:7485-7490.
22. Moore, J.B., Fuller, B.L., Falotico, R. & Tolman, E.L. (1985) Thromb. Res. 40:401-411.
23. Graves, L.M., Bornfeldt, K.E., Raines, E.W., Potts, B.C., MacDonald, S.G., Ross, R. & Krebs, E.G. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10300-10304.
24. Cook, S.J. & McCormick, F. Science (1993) 262:1069-1072.



圖一 Osthole, Fraxinellone及Norwathriol之化學結構

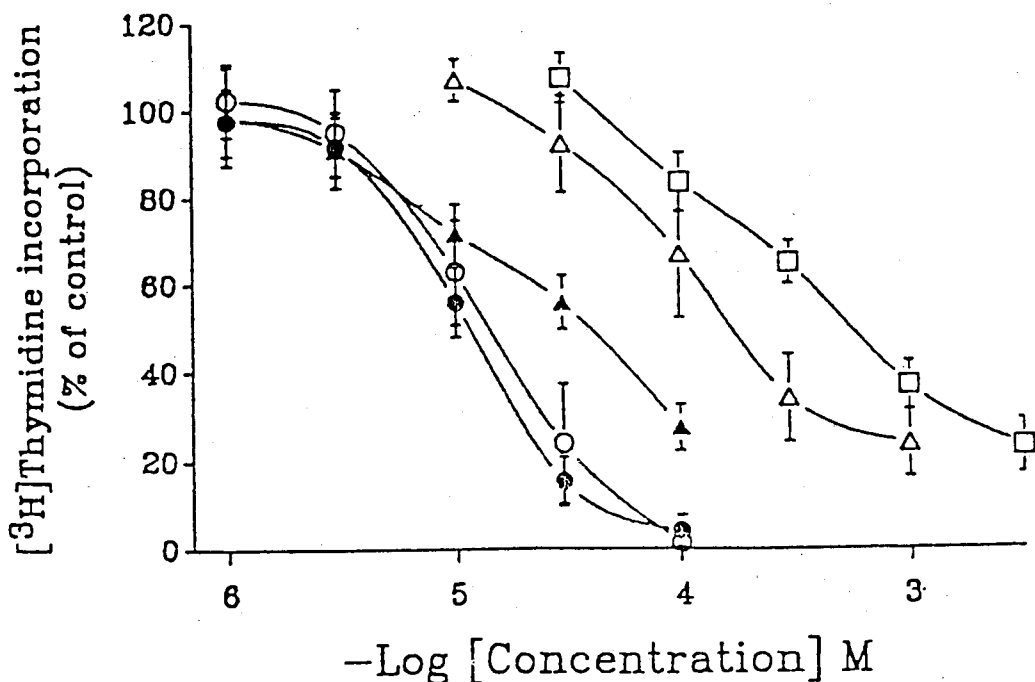


Fig. 2. Effects of osthole and antiproliferative agents on serum-stimulated DNA synthesis. Quiescent rat vascular smooth muscle cells were incubated in quadruplicate for 24 h with 10% (v/v) foetal-calf serum and the concentrations shown of osthole (○), sodium nitroprusside (●), forskolin (▲), 8-bromo-cyclic AMP (□) or 8-bromo-cyclic GMP (Δ) were added to inhibit foetal-calf serum-stimulated DNA synthesis. DNA synthesis assayed by [³H]thymidine incorporation as described in Materials and methods is expressed relative to that of control cells to which only serum was added. Values are means ± S.E.M. of six determinations.

圖二 獨活成分及其它抗增生藥物對血清引發增加DNA合成之影響。先將 quiescent 大鼠血管平滑肌細胞加入各種濃度 osthole(o), sodium nitroprusside(●), forskolin(▲), 8-bromo-cAMP(□) 或 8-bromo-cGMP(Δ) 之後再加入血清刺激，以 [³H] thymidine incorporation 來說明DNA合成。

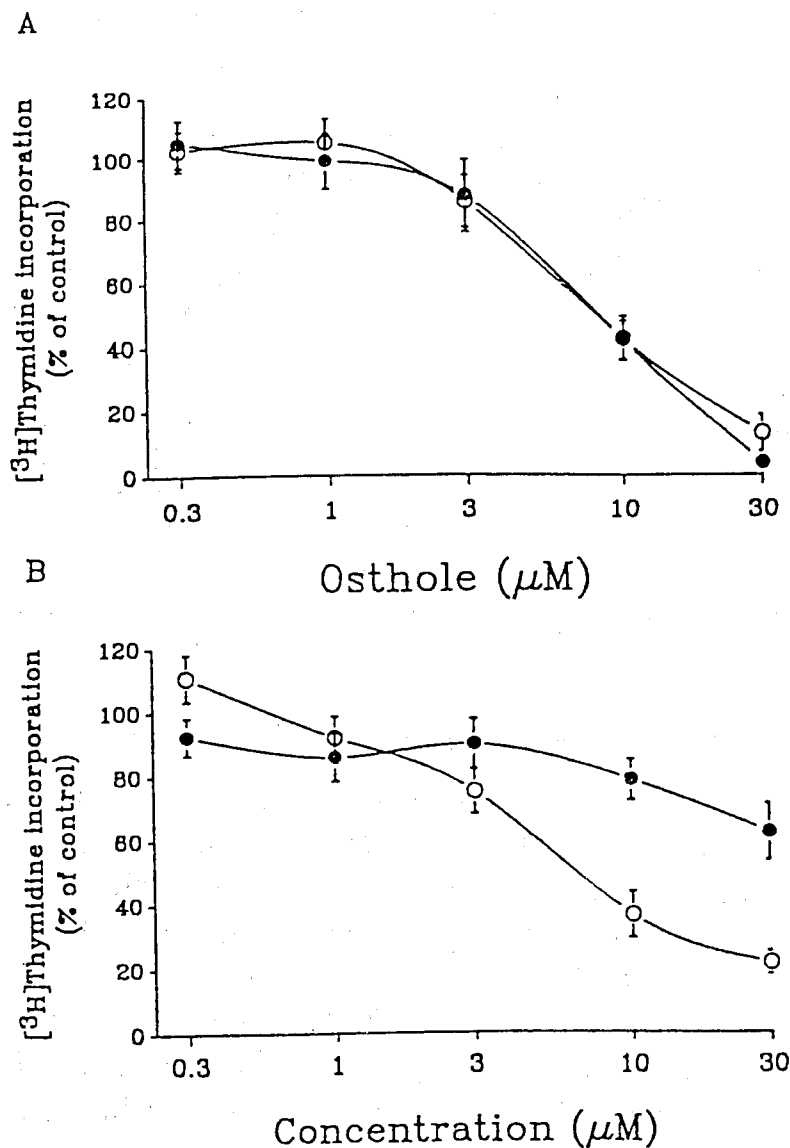
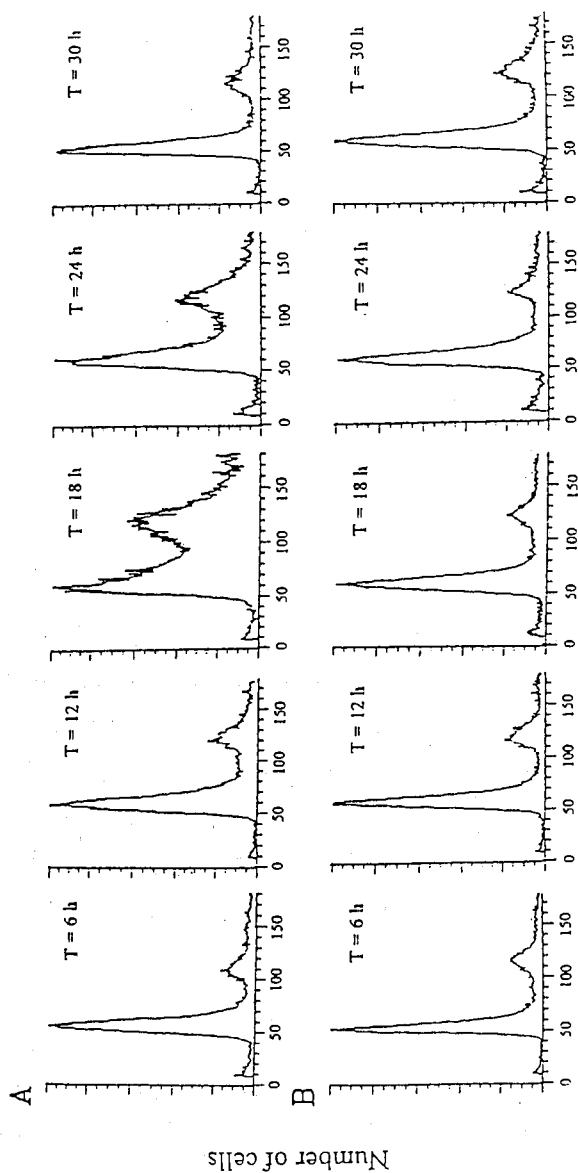


Fig. 3. Effects of osthole on (A) PDB- and PMA- or (B) ionomycin-stimulated DNA synthesis. Quiescent rat vascular smooth muscle cells were incubated in quadruplicate for 24 h with PDB (\circ , 20 nM), PMA (\bullet , 200 nM) or ionomycin (3 nM) and the concentrations shown of osthole (\circ and \bullet , for A and \circ , for B) or nifedipine (\bullet , for B) were added to inhibit DNA synthesis stimulated by these agents. DNA synthesis assayed by [^3H]thymidine incorporation as described in Materials and methods is expressed relative to that of control cells to which only agonists were added. Values are means \pm S.E.M. of six determinations.

圖三獨活成分對PDB及PMA(A)或ionomycin(B)引起DNA合成之影響。將 quiescent細胞加入PDB(20 nM, \circ), PMA(200 nM, \bullet)或ionomycin(3 nM),在有 osthole(\circ and \bullet , for A or \circ for B)或 nifedipine(\bullet , B)存在下評估 [^3H]thymidine incorporation看DNA合成。



Relative DNA content

Fig. 4. Time dependence of cell cycle progression as evaluated by flow cytometric determination of DNA content in quiescent rat vascular smooth muscle cells in the absence (A) or presence (B) of osthole ($100 \mu\text{M}$). Times given are those transpiring between 10% (v/v) foetal-calf serum depletion and harvesting as observed by flow cytometry. Individual nuclear DNA content as reflected by fluorescence intensity of incorporated propidium iodide plotted as a histogram depicting relative cell numbers at each intensity. Each histogram is derived from a data collection of 10000 events and representative of histograms obtained from a multiple of such experiments; the depicted histograms were those obtained within one experiment.

圖四 利用flow cytometry評估細胞週期進行之時間，在缺乏(A)或有獨活成分存在(B)對cell cycle影響。DNA content是利用propidium iodide結合至DNA之螢光強度表示，以收集10,000細胞為準。

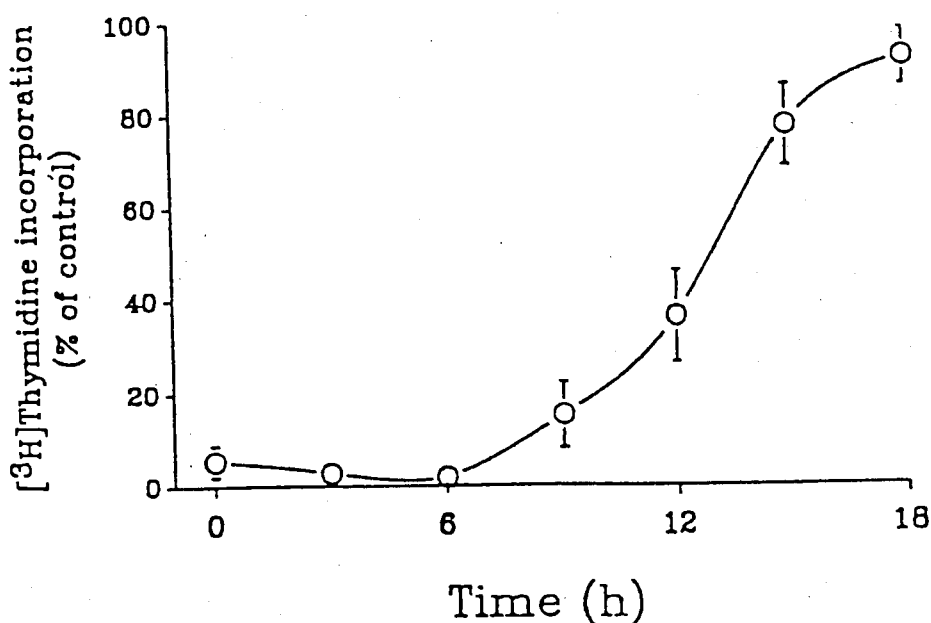


Fig. 5. Effect of delayed addition of osthole on DNA synthesis. Subcultured rat vascular smooth muscle cells were made quiescent by serum deprivation for 48 h. Cells were exposed to osthole (100 μ M) at the indicated times after the addition of 10% (v/v) foetal-calf serum. DNA synthesis was assayed by [³H]thymidine incorporation from 18 to 24 h. DNA synthesis is expressed relative to that of control cells to which no osthole was added. Values are means \pm S.E.M. of four determinations (each in quadruplicate).

圖五 獨活成分對DNA合成之delay作用。將血清-free 48小時之後細胞再加入 osthole(100 μ M),並在各指示時間點加入10%血清,再評估DNA合成之情形。

Table 1

Effects of osthole, forskolin, sodium nitroprusside and 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) on the cyclic AMP and cyclic GMP formations of rat vascular smooth muscle cells

表一 Osthole, forskolin, sodium nitroprusside 及 IBMX 對cAMP及cGMP形成之影響

Addition	Cyclic AMP (pmol/mg protein)	Cyclic GMP (pmol/mg protein)
Control	1.9 ± 0.6	3.7 ± 0.9
Forskolin 3 μM	30.2 ± 2.9 ^b	
Sodium nitroprusside 1 μM		7.8 ± 0.8 ^a
Osthole 10 μM	5.2 ± 0.8 ^a	6.2 ± 0.9
30 μM	8.3 ± 1.2 ^b	9.6 ± 1.0 ^a
100 μM	23.2 ± 2.1 ^b	14.8 ± 1.2 ^b
Osthole 100 μM + forskolin 3 μM	97.8 ± 3.2 ^b	
Osthole 100 μM + sodium nitroprusside 1 μM		39.7 ± 3.1 ^b
IBMX 100 μM	19.8 ± 2.7 ^b	15.7 ± 1.1 ^b
IBMX 100 μM + forskolin 3 μM	89.2 ± 1.7 ^b	
IBMX 100 μM + sodium nitroprusside 1 μM		41.2 ± 2.3 ^b
Osthole 100 μM + IBMX 100 μM	25.8 ± 2.0 ^b	19.4 ± 0.9 ^b

After preincubation of rat vascular smooth muscle cells in 1 ml DMEM for 5 min, dimethylsulphoxide (0.1%, control), osthole, forskolin, sodium nitroprusside or IBMX of the indicated concentrations was added for another 10 min and the reaction was stopped by the addition of ice-cold 10% (w/v) trichloroacetic acid/4 mM EDTA as described in Methods. Cyclic AMP and cyclic GMP contents were then measured. Values are means ± S.E.M. of three determinations. ^a $P < 0.01$ and ^b $P < 0.001$ as compared with the respective control.

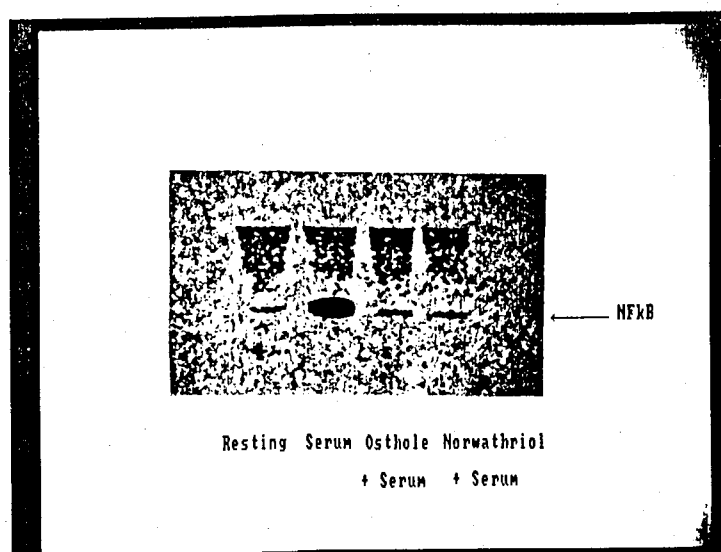
將大鼠平滑肌细胞和 dimethylsulphoxide, osthole, forskolin, sodium nitroprusside 或 IBMX 培養 10 分鐘之後，再加入 10% TCA/4mM EDTA。cAMP 或 cGMP 再利用 ELISA kit 測定。

Table 2 Effects of osthole and norwathriol on serum-activated
Raf-1 and MAPK in VSMC

獨活及龍膽成份對血清引發增加Raf-1及MAPK活性之影響

Treatment	Raf-1	MAPK (pmol/min/mg protein)
Resting	688±79	800±88
Serum(10%)	4128±318	6489±159
Osthole(100 μ M) +serum	1288±130	1374±124
Norwathriol(100 μ M) +serum	1356±120	1183±69
Fraxinellone(100 μ M) +serum	4000±280	5987±340

Raf-1活性測定是以Raf-1使MEK phosphorylation程度來判斷，MAPK使myelin basic protein(MBP)磷酸化來判斷。



圖六 Osthole及norwathriol對血清引起NF κ B表現之影響。將細胞分別和 osthole或norwathriol處理30分鐘，再加入血清60分鐘，之後用NF κ B 抗體進行免疫沉澱，再以Western blot分析。

天然海綿有效成份衍生物 BN-063 於 心肌缺血及再循環時期的保護作用

國防醫學院

顏 茂 雄

中文摘要

心室性心律不整 (ventricular arrhythmia) 常是缺血性心臟疾病如：心肌梗塞致死的重要因素。近年來研究報告顯示：adenosine 可改善心肌缺血所引發之心室性心律不整，而此抗心律不整作用被認為可能是經由活化 adenosine A₁ 受體所達成的。BN-063 (1-cyclopropyl-isoguanosine) 是一新合成之 doridosine 衍生物，doridosine 是天然海綿 (Tedania digitata) 之主成份，且已知是一種非選擇性 adenosine 受體致效劑。由本實驗室初步活體之藥理實驗及本學科陶寶綠教授實驗室之離體受體結合實驗結果已證實：BN-063 為一具選擇性之 adenosine A₁ 受體致效劑。因此本研究之實驗目 欲以大白鼠左冠狀動脈結紮及皮下注射 isoproterenol (7 mg/kg) 方式誘發心律不整，藉以探討 BN-063 之抗心律不整作用。結果顯示左冠狀動脈結紮前給予BN-063 可使心肌因缺血所導致之心律不整延後發生，亦可降低心律不整之發生率及嚴重程度，進而改善心肌梗塞的死亡率。左冠狀動脈結紮後，以BN-063 治療亦可改善缺血所導致之心律不整，降低死亡率。BN-063 可使因皮下注射isoproterenol 而導致之心室纖維顫動回復正常節律，增加存活率。由以上結果可知：Adenosine A₁ 受體致效劑—BN-063，具

顯著的抗心律不整作用，是一具開發潛力之抗心律不整新藥。

中英文關鍵字：心室性心律不整、缺血性心臟疾病、 adenosine、
doridosine

ABSTRACT

To assess the efficacy of the newly synthesized selective adenosine A₁ receptor agonist, BN-063 (1-cyclopropylisoguanosine), against myocardial reperfusion injury, 31 rats underwent 45 min of left coronary artery occlusion and 1 h of reperfusion. Animals were randomly assigned to four groups: control, I0.5-R0.5, in which BN-063 (0.5 mg/kg, i.v. bolus) was administered during both ischemia and reperfusion, R-0.5 and R-1.0, in which BN-063 was administered only during reperfusion at 0.5 and 1.0 mg/kg, respectively. The area at risk was determined by intravascular injection of blue dye during coronary artery occlusion, which was performed by retightening the ligature at the end of reperfusion, and infarct size was determined by incubation of heart slices in nitro blue tetrazolium chloride. A significant reduction in infarct size, as a percentage of the area at risk, was noted with all three BN-063 treatment groups (control: $63.5 \pm 4.0\%$, I0.5-R0.5: $39.6 \pm 3.7\%$, R-0.5: $37.5 \pm 3.5\%$, R-1.0: $38.1 \pm 5.2\%$). However, the I0.5-R0.5 group did not shown a more beneficial effect than the other two BN-063-treated groups. In addition, BN-063 exerted a protective effect on the number of ventricular premature contractions associated with reperfusion (control: 906 ± 52 , I0.5-R0.5: 325 ± 61 , R-0.5: 321 ± 95 , R-1.0: 340 ± 46).

The results of this study demonstrate that BN-063, through activation of adenosine A₁ receptors, exerts antiarrhythmic and anti-infarct effects during myocardial ischemia-reperfusion. Therefore, BN-063 would be useful clinically in the treatment and prevention of acute myocardial infarction.

前 言

根據臨床與動物實驗顯示：心臟缺血時，由於活化交感神經系統，導致缺血狀態下的心肌產生不良之影響。急性心肌梗塞發生時的疼痛與害怕，會活化中樞交感神經系統；同時缺血時血流動力學的改變，也會經由反射性作用活化心臟的交感神經，以上諸因素使得心臟組織中 norepinephrine 的含量明顯增加。心臟缺血期間致活交感神經，容易造成心臟二大方面的傷害：(i) 增加梗塞後心肌壞死面積 (ii) 導致缺血期間產生心律不整。心臟電生理研究顯示，急性心肌梗塞後，缺血心肌之靜止膜電位負值減少，因此心室細胞容易被去極化而產生異位性之節律點，造成心室性之心律不整(1,2)。於動物實驗中，急性心肌梗塞後，早期心律不整之出現約在五至二十分鐘到達高峰，二十至三十分鐘時漸漸消失，回復正常之竇性節律，直到一、二小時後再度出現晚期之心律不整。因此 Vegh 等人認為：缺血使心肌產生了未知的防禦機轉，因而中斷心律不整(3)。然而，早在1984年，即已提出"內生性心肌保護因子" (endogenous myocardial protective substances) 的假說，認為缺血狀態下之心肌會釋放一些保護性物質，以減少缺血造成之傷害，其中包括 adenosine(4)。心肌缺血時 adenosine 的釋放量會明顯增加，且當由體外給予 adenosine 時，譬如：靜脈或冠狀動脈內給予，均可明顯的抑制由缺血引起之心律不整(5,6)。截至目前 adenosine 之抗心律不整機轉仍不清楚，而 Culling 等人發現：adenosine 之受體拮抗劑 8-phenyltheophylline 具致心律不整作用(arrhythmogenic)(7)，因此初步認為 adenosine 可能是透過受體層面達到抗心律不整。1990年，

Downey 等人發現 preconditioning 可改善心肌因缺血造成之心室性心律不整(8)，因而也認為缺血的心肌可能釋放 "內生性心肌保護因子"，達到抗心律不整作用。目前研究認為 preconditioning 時所釋放之保護因子和 adenosine 有密切關係，可能是透過 adenosine A1 受體所達到之保護作用。

當心臟的氧供需比值 (oxygen supply/demand ratio) 下降時，譬如：處於缺血或低氧狀態時，會促使心肌細胞釋放 adenosine，擴張冠狀動脈，調整冠狀血流，增加心肌氧氣的供給(9)。若缺氧情形持續惡化，adenosine 的釋放量會增加，進而作用於房室結，延遲房室結的傳導速率，降低心跳速率，以減少心肌的耗氧量。心肌細胞內外均可進行生成 adenosine 的反應，透過細胞內或鍵結於細胞膜表面的 5'-核○酵素 (5'-nucleotidase) 將 AMP 去磷酸根後生成，的主要來源為細胞內之 ATP、ADT 及 cAMP，而 adenosine 的生成主要由細胞內的 5'-核○酵素進行。adenosine 生成後，透過核轉運系統 (nucleoside carrier system) 運送至細胞外，產生生理藥理作用(10)。Adenosine 的受體主要分為二類：(i) A1-受體：作用於此受體可抑制adenylyl cyclase 的活性，減少細胞內 cAMP 的含量。(ii) A2-受體：透過此受體則活化adenylyl cyclase，增加細胞內 cAMP 的含量。在心臟，A1-受體主要是位於心肌細胞，A2-受體主要位於內皮及血管平滑肌(11)。

根據文獻報告，adenosine 可能之抗心律不整機轉如下：(i) 增加冠狀血流，減輕缺血程度。(ii) 降低心跳速率，以減少心肌耗氧量。(iii) 活化向外的鉀離子流 (Ikado)：adenosine 可直接活化位於心室以上組織 (supraventricular tissue) 之鉀離子通道，產生向外的鉀離子流，因產生 hyperpolarization 而抑制心室以上組織之心律不整。(iv) 拮抗 catecholamines 的電生理作用：adenosine 藉著抑制被 catecholamines 致活的adenylyl cyclase，降低細胞內 cAMP 含量，進而抑制 Ica、及 If 的產生。目前研究也認為：增加細胞內 cAMP 含量和心室性心律不整的產生有密切關係。(v) 抑制交感神經節前纖維釋放 norepinephrine。以上各種作用均是透過 adenosine 受體所達成，

其中 (ii) 至 (v) 項均是作用於 A1-受體 (10)。然而 adenosine 在體內的半生期短，且作用廣泛，因此如果能開發出一選擇性高，半生期長的 A1-受體致效劑，或許將有助於未來抗心律不整藥物的發展。

BN-063，是一種萃取自海綿 (*Tedania digitata*) 的成份之一：doridosine (1-methylisoguanosine) 的衍生物，二者之結構如圖一。根據文獻報告，可產生類似 adenosine 之心血管作用：降低血壓與減慢心跳，且作用時間較 adenosine 長。進一步研究顯示：doridosine 可分別作用於 adenosine A1-受體產生心跳減慢現象及作用於 A2-受體造成血壓下降。本校藥學所陳基旺教授實驗室將 doridosine 結構加以修飾後合成一系列的衍生物，其中 BN-063 經藥理實驗結果發現：靜脈給藥後可立即而明顯的抑制心跳，但對血壓僅產生短暫之下降，約二分鐘後恢復正常，且抑制心跳作用可持續至少二小時以上 (圖二及圖三)。之心跳抑制作用可以明顯地被已知的 adenosine A1-受體拮抗劑：DPCPX (8-cyclopentyl-1,3- Dipropylxanthine) 所拮抗 (圖四)，故由活體實驗結果初步認為 BN-063 是作用於 adenosine A1-受體導致心跳減慢。此外，由本研究所陶寶綠教授實驗室做 BN-063 與 A1-受體之受體結合實驗結果更證實：BN-063 對 A1-受體結合的 K_i 值為 62 nM，對 A2-受體結合的 K_i 值為 23200 nM，A2/A1 比值為 374，可見 BN-063 是一種對 adenosine A1-受體具相當選擇性之 A1-受體致效劑。因此，本論文研究目的之一為探討 BN-063 之抗心律不整作用。

近年來研究結果顯示：透過活化 adenosine A1-受體可降低心肌缺血後再循環時造成之傷害 (myocardial reperfusion injury) (12)。因此本論文研究目的二為探討 BN-063 對再循環損傷之影響。臨床上，當病人發生急性心肌梗塞時，常以藥物或手術的方式，企圖打通梗塞的冠狀動脈，希望藉由恢復缺血區的血液灌流，儘快改善心肌的收縮功能。然而從動物實驗發現：當缺血後再灌流時，血液所帶來的氧氣、血球細胞及電解質，會對原本缺血的心肌產生更大的傷害，降低了以再循環治療的效果。因為再循環的結果常促使原本在缺血期仍存活的心肌及內皮細胞加速死亡，此種傷害稱之為再循環損傷 (reperfusion injury)。然

而再循環損傷是否真的存在？目前仍有許多爭議；但是有學者於再循環液中加入氧游離基抑制劑，發現可以明顯的減少心肌細胞的死亡。Forman 等人亦認為，人類心肌梗塞後，恢復缺血心肌血流供應後造成的再循環損傷，確實為阻礙心肌功能恢復的一重要因素 (13)。造成再循環損傷的機轉截至目前仍未確定，大致可歸類成以下數種：(i) 致活嗜中性白血球與微血管床的破壞：血液的再循環帶來大量的嗜中性白血球，被致活的白血球釋放蛋白及氧游離基，破壞內皮及心肌細胞，造成微血管阻塞，並破壞血管內皮釋放內皮依賴性舒張物質的能力，改變了內皮依賴性舒張物質與收縮物質間的平衡。(ii) 氧游離基的生成：再循環帶來大量的氧氣，使嗜中性白血球、內皮細胞及心肌細胞產生大量的氧游離基，破壞心肌組織。(iii) 細胞內鈣離子濃度過高：研究顯示，再循環時期細胞內鈣離子呈現過度負荷，導致細胞腫脹、粒腺體的破壞、活化細胞內蛋白、促使 xanthine oxidase 產生更多氧游離基等，加速細胞的破壞(14)。1987 年 Olafsson 等人發現：將 adenosine 加入再循環液中，可明顯減輕再循環造成的損傷，譬如：降低梗塞面積 (infarct size)、改善心肌收縮功能、減少微血管阻塞並且保護了內皮結構的完整 (15)。1990 年 Kitakaze 等人的實驗結果也顯示：adenosine 的受體拮抗劑 8- phenyltheophylline 可抑制 adenosine 之改善再循環損傷的能力(16)。1992 年 Norton 等人則報告：選擇性 A1 和 A2 受體致效劑均可明顯改善再循環損傷，但 A1 受體致效劑副作用較少，可能較 A2-受體致效劑更具臨床治療價值(17)。

最近研究亦顯示：preconditioning 時釋放之 adenosine 是作用於 A1-受體而達到降低梗塞壞死面積(18)。因此，本實驗亦想探討 BN-063 是否具對抗再循環損傷的作用。

本論文是利用大白鼠心臟左冠狀動脈結紮及皮下注射大劑量之 isoproterenol 兩種方法，建立心律不整的動物實驗模式，探討 BN-063 對此二實驗模式之抗心律不整作用，並利用心電圖及組織切片染色法兩種指標，觀察 BN-063 對於再循環時期之保護作用。

材料與方法

壹、本研究之實驗方法分成二部分：

抗心律不整實驗及抑制再循環損傷實驗

一、之心血管藥理實驗步驟：

- (一)取雄性 Sprague-Dawley 大白鼠，重約 250-300 公克，以 urethane (1.2 gm/kg)腹腔注射麻醉後，分別作股動靜脈插管。將股動脈插管連接於壓力轉能器 (Statham P23ID, Gould, Cleveland, OH, U.S.A.) 經由生理多項記錄儀 (RS 3400, Gould) 持續記錄動脈壓及心跳，並由股靜脈插管建立給藥途徑。
- (二)待動物之血壓心跳皆穩定後，將 BN-063 (0.05、0.1、0.5 mg/kg) 由靜脈注射入大白鼠體內，觀察BN-063 對血壓心跳之影響。
- (三)欲進一步探討BN-063 影響血壓心跳之可能藥理機轉，因此繼續做以下實驗：取另一組大白鼠，如上述之插管工作，待動物之血壓心跳皆穩定後，首先靜脈給予 BN-063 (0.5 mg/kg)，待其血壓與心跳恢復後，再由靜脈注射 DPCPX (8- cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthine; 0.5 mg/kg)，此藥為一種 adenosine A₁ 受體對抗劑，十五分鐘後，重覆注射同劑量之 BN-063 (0.5 mg/kg i.v.)，觀察此時 DPCPX 是否可影響 BN-063 引起之血壓心跳變化。

二、抗心律不整實驗步驟：

(一)左冠狀動脈結紮誘發心律不整實驗：

1. 動物準備：

取Sprague-Dawley 大白鼠，性別不拘，重量約 250-350 克，以 urethane (1.2 gm/kg)腹腔注射麻醉後，分別作股動靜脈及氣管插管。將股動脈插管連接於壓力轉能器，經由生理多項記錄儀記錄動脈壓及心跳，並經由股靜脈插管建立給藥途徑。以 lead II 肢導程連接上示波器 (DSO 420, Gould, Hainault, UK) 記錄心電圖變化。動物手術後，待血壓、心跳穩定約三十分鐘，將氣管接上呼吸器，調整適當呼吸速率 (45-55 次/分) 及潮氣容積(0.8

-1.0 毫升/一百公克體重)。

2. 開胸手術:

動物準備完成後，剪開大白鼠左胸毛皮，切開胸肌，自第五肋間之胸骨旁約二毫米處開胸，以開創器固定創口，小心撕開心包膜，掀開左心耳後，將左心耳與左心室連接處以及肺動脈之間之心肌，以六號帶鉤絲線 (6/0) 迅速勾起，並綁一鬆結，靜置二十分鐘，此二十分鐘內若血壓低於九十毫米汞柱或出現心律不整，此動物則予淘汰。待動物穩定後再將置於左冠狀動脈上之絲結結紮。

3. 實驗動物分組:

(1) 對照組:

左冠狀動脈結紮前不給藥物，注射與藥物等體積之生理食鹽水，觀察缺血三十分內心臟節律及心電圖之變化。

(2) 左冠狀動脈結紮前給藥組:

於結紮前十分鐘靜脈注射 BN-063 (0.25, 0.5, 1.0 mg/kg) 及 DPCPX (0.5 mg/kg)，分別觀察缺血三十分內 BN-063 及 DPCPX 對心臟節律及心電圖之影響。

(3) 左冠狀動脈結紮後給藥組:

左冠狀動脈結紮後，當出現心律不整時，立即由靜脈注射 BN-063 (0.25, 0.5, 1.0 mg/kg) 觀察藥物對心律不整之影響。

(二) 皮下注射 isoproterenol (ISO) 誘發心律不整實驗:

1. 動物準備:

取重約 380-440 克之 Sprague-Dawley 大白鼠，以 pentobarbital (50 mg/kg) 腹腔注射麻醉，分別做股動靜脈及氣管插管，記錄動脈壓、心跳，及建立給藥途徑，並以 lead II 肢導程記錄心電圖變化 (同上述)。

2. 動物穩定後，由皮下注射 (±)-isoproterenol (7 mg/kg)，待出現心室纖維顫動 (ventricular fibrillation; VF) 時，立刻由靜脈注射 BN-063 (0.5 mg/kg)，觀察 BN-063 對 ISO 引起之心

律不整及死亡率之影響。

三、對缺血後再循環損傷保護作用實驗：

(一)再循環模式之建立：

利用大白鼠左冠狀動脈結紮方式造成左心室嚴重缺血，於缺血四十五分鐘後，將絲結鬆綁，讓左心室恢復血液灌流達一小時。本實驗曾採用缺血三十分鐘後予再循環一小時，但無法測得心肌壞死的發生，所以延長缺血時間至四十五分鐘。

(二)實驗分成四組：

1. Control 組：整個實驗過程均不給藥，但注射相等體積之生理食鹽水作為對照組。
2. IO.5-R0.5 組：結紮前十分鐘及再循環前一分鐘均分別給予 BN-063 0.5 mg/kg。
3. R-0.5 組：於再循環前一分鐘時給予 BN-063 0.5 mg/kg。
4. R-1.0 組：於再循環前一分鐘時給予 BN-063 1.0 mg/kg。

(三)測量梗塞面積 (infarct size):

1. 再循環一小時結束時，將絲結再度結紮，由靜脈注射 methylene blue (3%) 約 0.4 毫升，使心臟之未缺血區域均染成藍色。三分鐘後取出心臟，將心臟置於充氧之 4°C Krebs 氏溶液中，以灌洗心臟內之血液，再將心室水平橫切，厚度約 3-4 毫米，將心臟切片上缺血與未缺血區域大小描繪於投影片上。
2. 此切片再與 0.1 % nitro blue tetrazolium 於 37°C 培養十五分鐘，此染劑可使缺血區內未壞死區域呈藍色，而壞死部分呈灰白色。亦將壞死區域大小描繪於投影片上。再以影像分析儀 (Magiscan 2, England) 計算缺血、未缺血及壞死面積。

3. 梗塞面積之計算：

梗塞面積 (infarct size ; %) = (壞死面積 / 缺血面積) × 100 %

貳、藥物之配製：

本研究所使用之藥物中僅 DPCPX 須以 dimethyl sulfoxide (DMSO)

溶解外，其餘各藥均可直接溶於水。

參、統計方法：

實驗所得數據，以平均值+標準誤 (Mean±S.E.M.)及百分率 (%)表示。以卡方檢定分析 saline 組與給藥組間心律不整發生率及死亡率之差異。以 Student's t test比較 saline 組與給藥組之心律不整發生時間之差異。其餘資料均以單向變異數分析 (one-way analysis of variance) 加以統計，再以 Newman-Keuls method 作事後比較。值小於0.05 才具統計差異。

結 果

一、對正常大白鼠血壓、心跳之影響：

(一)圖三和圖四結果顯示：靜脈給予 BN-063 三種不同劑量 0.05, 0.1, 0.5 mg/kg後可立即而明顯的抑制心跳，且呈現劑量相關性：劑量越大，抑制作用越明顯。此心跳抑制作用呈現兩個時期，先是心跳速率快速下降期，此期維持約十秒鐘，接著緩慢回升期，約在給藥後三至五分鐘達到穩定，此時心跳與給藥前相較仍下降約 120 次/分，此期維持的時間隨劑量大小而有所不同，BN-063 0.05 mg/kg的劑量下心跳抑制作用約只持續半小時，而 0.1 和 0.5 mg/kg 時則可持續二至三小時。對血壓影響僅在注射後短暫下降，此下降期間與心跳迅速下降期平行，隨後立即（約三至五分鐘）恢復至給藥前。

(二)圖五顯示：預先由靜脈給予大白鼠 DPCPX (0.5 mg/kg，一種具專一性之 A₁-受體對抗劑，十五分鐘後再給予 BN-063 0.5 mg/kg，結果發現DPCPX 可明顯對抗由 BN-063 引起之心跳抑制及血壓下降現象。

二、對左冠狀動脈結紮後引起心律不整之影響：

(一)左冠狀動脈結紮後血壓與心跳之變化：

- 1.圖六顯示：左冠狀動脈結紮前十分鐘分別給予三種不同劑量 (0.25、0.5、1.0 mg/kg) 之 BN-063 後對於收縮壓和舒張壓之影響不明顯；當左冠狀動脈結紮後會引起各組收縮壓明顯下降 ($P<0.05$)，但此降壓程度在各組間並無差異 (圖六 A)。而各組舒張壓在結紮前與結紮後相較則無差異。至於給藥組於結紮後各組間舒張壓變化如下：給予 0.25 及 0.5 mg/kg 兩組之舒張壓和 saline 組之舒張壓相比無統計差異，但給予 1.0 mg/kg 組結紮後之舒張壓於前二十分鐘內則明顯小於 saline 組 ($P<0.05$) (圖四B)。
2. 圖七結果顯示：左冠狀動脈結紮後會使各組平均動脈壓均下降。至於saline 組和預先給予 BN-063 0.25 及0.5 mg/kg 兩組之平均動脈壓於結紮後相較則無明顯差異，但給予 BN-063 1.0 mg/kg 組之平均動脈在結紮後二十分鐘內則明顯低於 saline 組。
- 3.圖八結果顯示：左冠狀動脈結紮前預先分別給予三種不同劑量之 BN-063 (0.25, 0.5, 1.0 mg/kg) 可使心跳立即而明顯下降，給藥十分鐘後之心跳次數仍明顯低於 saline 組 ($P<0.05$)；左冠狀動脈結紮後，組之心跳並未產生明顯變化，而給藥組之心跳次數則緩慢回升。BN-063 0.25 mg/kg 給藥組之心跳抑制作用可維持至結紮後十分鐘左右，0.5 mg/kg 組則可持續至二十分鐘，而 1.0 mg/kg 組之心跳抑制作用則可明顯維持至結紮後三十分鐘 ($P<0.05$)。
- 4.左冠狀結紮後缺血期間之收縮壓和心跳的乘積 ($SBP \times HR$) 可間接作為估量心肌耗氧量 (myocardial Oxygen consumption) 的指標。如圖九顯示：結紮前十分鐘給予 BN-063 三種不同劑量後，與HR之乘積均明顯下降。而結紮後缺血期內，給予BN-063 各組對於SBP 與 HR 乘積的影響與 saline 組相比均有統計上意義 ($P<0.05$)。

(二)BN-063 於冠狀動脈結紮前預先處理對結紮後心電圖之影響：

1. 表一結果顯示BN-063 對左冠狀動脈結紮後心律不整發生時間和發生率之影響：心肌缺血時產生的心律不整包括：ventricular premature contraction (VPC)，ventricular tachycardia (VT) 及 ventricular fibrillation (VF)。saline 組的十隻大白鼠於冠狀動脈結紮後三十分鐘內均出現心律不整，其 VPC 和VT 之發生率均為 100%，VF 之發生率則為 70%，而 VPC、VT、VF 之發生時間分別為 5.69 ± 0.22 ， 6.30 ± 0.32 及 9.47 ± 0.75 分。至於預先給予 BN-063 三種不同劑量之給藥組 (0.25，0.5，1.0 mg/kg)，其 VPC 發生率均為 100%，和 saline 組相同，而 VPC 之發生時間分別為 9.96 ± 0.9 ， 9.83 ± 1.71 ， 11.36 ± 0.7 分，此三組之 VPC 發生時間均較 saline 組之 VPC 發生時間明顯延後 ($P < 0.05$)。給予 BN-063 0.25，0.5，1.0 mg/kg 後 VT 之發生率分別為 70%、0% 及 50%，明顯低於 saline 組 ($P < 0.05$)。且 BN-063 0.25 及 1.0 mg/kg 組之 VT 發生時間各為： 12.84 ± 0.59 及 12.02 ± 1.0 分，二者均較 saline 組之 VT 發生時間明顯延後 ($P < 0.05$)。另外，BN-063 給藥組之 VF 發生率均為零，顯著低於 saline 組 ($P < 0.05$)。此外，給予 adenosine A1 受體對抗劑 DPCPX (0.5 mg/kg) 組，其 VPC，VT 之發生率均為 100%，其中 VF 發生率明顯大於 saline 組 ($P < 0.05$) 且三者之發生時間分別為 4.63 ± 0.24 ， 4.75 ± 0.4 及 8.19 ± 1.15 分，和 saline 組相較並無統計差異 ($P > 0.05$)。
2. 圖十A 與B 顯示：BN-063 對冠狀動脈結紮後三十分鐘內產生 VPC，次數之影響：VPC 發生總數在三種不同劑量之 BN-063 給藥組皆明顯低於 saline 組 ($P < 0.05$)，總數在 DPCPX 組則明顯的大於 saline 組 ($P < 0.05$)，約為 saline 組之三倍。而對於 VT 總數之影響，總數在三組給藥組均明顯低於 saline 組 ($P < 0.05$)，但 DPCPX 組之 VT 次數則明顯大於 saline 組 ($P < 0.05$)，且約為 saline 組之四倍。
3. BN-063 對於冠狀動脈結紮三十分鐘後存活率影響：如圖十一顯示：

saline 組於冠狀動脈結紮三十分鐘後之存活率為 60% ，至於預先給予三種不同劑量 BN- 063 組之存活率則高達 100% ，而 DPCPX 組之存活率為 40% ，明顯低於 saline 組 ($P<0.05$)。

(三)冠狀動脈結紮後，當出現心律不整時再給予 BN-063 之治療結果如下：

1.如圖十二A 所示：VT 的發生率在三種不同劑量之 BN-063 (0.25, 0.5, 1.0 mg/kg) 給藥組，分別為 67% , 55% , 67% , 均明顯低於 saline 組 ($P<0.05$)。如圖十二B 所示，VF 發生率在 saline 為 67% ，而三組給藥組之 VF 發生率則降為零，明顯低於 saline 組 ($P<0.05$)。

2.如圖十三所示：三種不同劑量給藥組之存活率均高達 100% ，明顯高於 saline 組之存活率 60% ($P<0.05$)。

(四)對於 isoproterenol 引發之心律不整之影響：

圖十四所示：大白鼠皮下注射 ISO (7 mg/kg) 後，心跳明顯地由 350 次/分上升至約 500 次/分，血壓亦立即明顯的下降，且心電圖出現 J 點下移的現象，此現象於五分鐘左右最為明顯。約五分鐘左右開始出現偶發之 VPC，隨時間的增加，出現之頻率亦漸增，到四十至五十分鐘左右突然出現 VF，而造成大白鼠之突然死亡。當 VF 出現時立即由靜脈注射 BN-063 (0.5 mg/kg)，約一分鐘後 VF 會消失，再經約二分鐘後可恢復正常之心臟節律，且動物存活。由表二可知：saline 組與給藥組兩組老鼠之體重相當，而出現 VF 的時間亦相近，但 saline 組老鼠之致死率高達 70% ，給予 BN-063 組之致死率為零，明顯低於 saline 組 ($P<0.05$)。

三、對左冠狀動脈結紮引起缺血後再循環之影響：

(一)BN-063 對血壓與心跳的影響：

1.圖十五A：再循環時三組給藥組 (I0.5-R.5, R-0.5, 1.0 mg/kg) 均可造成收縮壓短暫而明顯的下降，圖中可見一分鐘時之收縮壓均明顯低於同一時間之 saline 組 ($P<0.05$)。再循環約三分鐘左右，I0.5-R0.5 及 R-0.5 組之收縮壓已和 saline 組無明顯差異，

但 R-1.0 組之收縮壓於再循環十五分鐘後均明顯低於 saline ($P < 0.05$)。由 (圖十五B) 亦可發現類似之結果：再循環一分鐘時三組給藥組之舒張壓均明顯低於 saline 組，但其中只有 I0.5-R0.5 組之舒張壓持續低於 saline 組約達二十分鐘 ($P < 0.05$)。

2. 圖十六顯示：三組給藥組均可使再循環一分鐘時之平均血壓明顯低於 saline 組。平均血壓短暫降低後回升，R-0.5 組約在再循環三至五分鐘左右恢復，並和 saline 組相近，但 I 0.5-R0.5 及 R-1.0 組之平均血壓仍明顯低 saline 組 ($P < 0.05$)。

3. 圖十七結果顯示：再循環期間 BN-063 可產生明顯之心跳抑制作用。此心跳抑制現象亦呈二個階段：先是快速下降之後緩慢回升而達穩定。再循環時期內，三組給藥組的心跳均明顯低於 saline 組之心跳 ($P < 0.05$)，但各給藥組間並無顯著差異。

(二)BN-063 對於再循環期間心肌耗氧量之影響：

以再循環時期之收縮壓 (systolic blood pressure; SBP) 和心跳 (HR) 之乘積，可間接當作心肌耗氧量 (myocardial O₂ consumption) 之指標。如圖十六所示，三組給藥組：I0.5-R0.5，R-0.5 及 R-1.0 mg/kg 之 SBP-HR 乘積於再循環初期便明顯下降，顯著低於 saline 組，持續下降達整個再循環時期且明顯低於 saline 組 ($P < 0.05$)。但三組給藥組間 SBP-HR 之乘積並無統計上之差異。

(三)BN-063 對於再循環引發之 VPC 數目之影響：

再循環時期，可自本實驗之活體大白鼠心電圖觀察到 VPC 之出現。圖十七說明了給予 BN-063 後再循環期間發生 VPC 數目明顯低於 saline 組 ($P < 0.05$)。至於三組給藥組間並無統計上之差異。

(四)BN-063 對於再循環後梗塞面積 (infarct size) 之影響：

如圖十八所示：以缺血區 (area at risk) 和總截面積 (total) 之比值代表缺血區域大小，並以壞死區 (necrotic) 和缺血區面積之比值代表梗塞面積 (infarct size)。結果得知：saline 組和三組給藥組 (I0.5-R0.5, R-0.5 及 R-1.0) 之缺血區域大小相近，且組

間無明顯差異；而三組給藥組之梗塞面積均明顯小於saline 組($P<0.05$)，但三組給藥組間並無明顯差異。

討 論

心室性心律不整常是導致缺血性心臟疾病死亡的重要原因。根據文獻報告，急性心肌缺血發生後的數秒內，便可使心臟組織內 adenosine 及其代謝產物的含量明顯地增加其增加的結果被認為可使冠狀動脈擴張、抑制心跳、抑制交感神經釋放 noradrenaline 及抑制 catecholamines 活化 adenylyl cyclase 等作用以減少心肌耗氧量(10)。1984 年 Fagbemi 及 Parratt 等人發現靜脈灌注 adenosine 可改善心肌因缺血所造成之心律不整(4)。Adenosine 之抗心律不整作用，可能是透過作用於受體，尤其是A1 受體所達成。鑑於 adenosine 半衰期短，且選擇性低藥效廣泛。如果能合成一種對 adenosine A1 受體具選擇性，且半衰期長之致效劑，或許將有助於治療心臟因缺血所引起之心律不整。本實驗室以活體藥理實驗篩選出一種對adenosine A1 受體具選擇性之新藥—，欲探討其對抗不同原因引起之心律不整，及缺血後再循環時對心肌之保護作用。BN-063 是一種新合成的doridosine 的衍生物，當由靜脈注入正常大白鼠體內時，可產生立即而明顯的心跳抑制作用，此心跳抑制作用呈現兩種不同時程變化：快速下降期(約二分鐘)，及緩慢回升期(約可持續二至三小時)，然僅在快速下降期時，血壓相對明顯降低，但約二分鐘後即恢復正常，由此可知BN-063 所造成血壓暫時性的下降，是導因於心跳急速下降所致，而非作用於血管之 adenosine A2 受體。此外，預先處理 DPCPX (0.5 mg/kg i.v.) 十五分鐘後，可完全對抗BN-063 (0.5 mg/kg) 對於血壓及心跳的影響。由以上結果更加說明BN-063 引起之血壓下降是導因於注射初期之心跳急速下降所致，而且 BN-063 之心跳抑制作用可能是藉由活化 adenosine A1 受體所達成。此外，本學科陶寶綠教授實驗室以受體結合實驗證明 BN-063 對 A2 及 A1 受體 Kd 值之比值為 374，再次証明 BN-063 為一具選擇性之 adenosine A1受體致效

劑。

BN-063 之抗心律不整作用

因此，本研究將以新合成之 adenosine A₁-受體致效劑：BN-063 探討其抗心律不整的作用。由大白鼠左冠狀動脈結紮誘發心律不整實驗結果顯示（表一及圖十）：（1）結紮前預給 BN-063（0.25, 0.5, 1.0 mg/kg i.v.）均可明顯延後結紮後 VPC、VT、VF 的發生時間，並可明顯減少結紮後三十分鐘內 VPC、VT 的發生次數，及顯著降低 VT、VF 之發生率。由此可知預前給予 BN-063 確實可改善梗塞初期之心律不整。（2）預前處理 DPCPX 後，明顯增加了 VPC、VT 的發生次數及 VT、VF 的發生率，由此可知內生性之 adenosine 可扮演抗心律不整的角色，更加說明致活 adenosine A₁-受體可產生抗心律不整的作用。（3）結紮前給予 BN-063 0.25 mg/kg 已可產生明顯之抗心律不整作用，當劑量加大至 0.5 mg/kg 時產生之抗心律不整的作用更為明顯，但繼續加大劑量至 1.0 mg/kg 時，其抗心律不整作用反而不如 0.5 mg/kg 組。推測其可能原因為：BN-063 1.0 mg/kg 造成嚴重的心跳抑制及低血壓（圖七及圖八），進而減少冠狀血流的供應，加重了心肌缺血的程度。（4）當BN-063 最小劑量（0.25 mg/kg）組之 VT 發生率仍高達 70%時，卻已使 VF 之發生率降為零，其它兩組給藥組之 VF 發生率亦為零，故可知 BN-063 抑制 VF 效果特別好，藉此可預防急性心肌梗塞後病人猝死，此點亦為抗心律不整藥物應必備之條件。由圖十一結果顯示：BN-063 給藥組之存活率高達 100%，明顯高於 saline 組，而 DPCPX 組之存活率則明顯低於組，卻未降為零，由此可知：BN-063 確實可預防急性心肌梗塞初期病人之猝死，並可間接推論：心肌缺血時，除了內生性 adenosine 扮演抗心律不整角色外，可能另有他種內生性之抗心律不整機轉存在。

左冠狀動脈結紮後，當出現心律不整時再給予 BN-063（0.25, 0.5, 1.0 mg/kg i.v.）亦可產生抗心律不整效果：如圖十二，明顯降低了 VT 及 VF 的發生率，但此降低 VT 發生率的效果不如結紮前給藥組（表一）。根據文獻報告，大白鼠的心臟缺乏有效的冠狀動脈側枝循環，所以當冠狀動脈結紮後再給予BN-063，理論上藥物應無法到達缺血區。因

此，我們得到以下之推論：(1) BN-063 藉由作用於心臟之非缺血區而達到抗心律不整作用，此作用可能是透過抑制心跳，進而降低缺血期心肌耗氧量的結果（如圖九）。(2) BN-063 可直接作用於缺血區內之心肌細胞，抑制心室細胞產生異位性節律點，因而加強其抗心律不整作用。

因此 BN-063 可能之抗心律不整機轉可由下列二方面加以探討：(i) 抑制心跳及心肌耗氧量：根據文獻的報告：adenosine 經由致活A₁-受體可產生 (-)chronotropic、及 inotropic (18) 作用，造成心跳下降，並使心收縮力減弱，因此減少心臟的作功，進而降低心臟耗氧量。由圖九結果可知 BN-063 可明顯降低缺血心臟的耗氧量，藉此可改善缺血造成之氧供需失調，減少因缺血帶來的傷害，因此達到抗心律不整之作用。(ii) 直接對心室細胞產生抑制作用：急性心肌梗塞後，因為致活交感神經及心臟產生局部釋放 catecholamines 作用，使缺血的心臟組織內所含的 catecholamines 濃度大增，而 catecholamines 增加心肌細胞鈣離子內流 (I_{Ca})，以致容易誘發梗塞初期之心律不整。增加 I_{Ca} 易造成心律不整的可能原因如下：i) 增加 I_{Ca} 的結果造成細胞內鈣離子的過度負荷，此狀態下易引發transient inward current (I_{ti})，進而誘發 afterdepolarization，導致 triggered activity 的產生。ii) 心肌缺血時細胞膜電位呈較去極化的狀態，而 catecholamines造成 I_{Ca} 的增加，會使膜電位產生 slow responses，由此易引發 reentry，造成心律不整。iii) 增加 I_{Ca}，造成細胞內鈣離子濃度增加，使心臟之收縮力增強，易加重缺氧的程度(1,2)。離體的心肌細胞電生理實驗結果顯示：adenosine 可抑制 ISO 所造成之 I_{Ca} 增加，亦可明顯拮抗由 catecholamine 引發之 I_{ti}、triggered activity 及slow responses。活體動物及人體實驗亦顯示：adenosine 可能是藉由降低細胞內cAMP 的含量來對抗 catecholamines 的作用。而 Belardinelli 等人則證明 adenosine 是作用於 A₁-受體，透過活化 G_i 耦合蛋白而抑制 adenylyl cyclase 的活性，進而減少了細胞內 cAMP 的含量(19)。所以，亦可能是透過作用於 A₁-受體，抑制 adenylyl cyclase 活性，降低 cAMP 量而產生抗心律不整作用。為此，本研究續以 ISO 誘發心律不整之活體實

驗來探討 BN-063 可否透過抑制 adenylyl cyclase 活性，減少細胞內 cAMP 量，而達到抗心律不整作用。根據離體之心肌細胞實驗得知，作用於 β -adrenergic 受體，致活 adenylyl cyclase，使心肌細胞內 cAMP 量增加，造成 I_{Ca} 的增加，及誘發 I_{bi} ，如此易使細胞膜去極化，產生異位性節律。等人更推測，此異位性節律若發生於活體會產生 VT，若同時存在更多節律點時，則會誘發 VF。圖十四及表二顯示 ISO 於活體實驗之結果：由皮下注射 ISO 確實可誘發 VF 的產生，而 adenosine A₁-受體致效劑 BN-063 (0.5 mg/kg) 可使 VF 恢復正常節律，改善動物致死率。由以上結果得知：(1) BN-063 可抑制由 catecholamines 引發之心律不整。(2) BN-063 可能藉由抑制 adenylyl cyclase 活性，進而使心肌細胞內 cAMP 含量降低，而達抗心律不整作用。Adenosine 之抗心律不整作用已在三種動物之心肌缺血模式中證實，包括大白鼠，狗，豬，而其作用機轉推測可能是透過 adenosine A₁-受體所達成，關於此點至今仍無直接證據證實。而本研究直接以 adenosine A₁-受體致效劑 BN-063 探討其抗心律不整作用，所得到之結果證實，致活 adenosine A₁-受體確實具有抗心律不整作用。

綜合以上之實驗結果可知：adenosine A₁-受體致效劑 BN-063 可抑制心肌缺血早期之心律不整，而此作用可能是透過降低心肌耗氧量及抑制 catecholamines 之作用所達成。

BN-063 對再循環損傷之保護作用

當心肌缺血時間超過三十分鐘時，缺血區內之組織開始產生不可逆之損傷 (irreversible injury)，進而造成心肌壞死，亦即此時缺血區內同時存在可逆 (reversible injury) 與不可逆損傷之心肌細胞。缺血後再循環之結果，可能使處於可逆損傷狀態之組織加速壞死，而此種因再循環造成之壞死即為再循環損傷。由圖十九、圖二十結果顯示：三組 BN-063 給藥組均可明顯減少再循環期間所引發之 VPC 總數及梗塞面積，可知 BN-063 確實可改善因再循環造成之損傷。但是 I0.5-R0.5 組之結果卻不如預期中優於 R-0.5 及 R-1.0 組；造成此結果之原因可能是：(1) 缺血期太長 (四十五分鐘)，BN-063 之保護作用無法持續至結紮後四

十五分鐘所致。由圖九之結果亦可得到間接支持，結紮前給予 BN-063 0.5 mg/kg 之降低心肌耗氧量效果只維持至結紮後二十分鐘左右。因此，I0.5-R0.5 組於缺血四十五分鐘時之心肌狀況和未給藥之狀況已無太大差異，以致使再循環後之結果類似。(2) 再循環期間 I0.5-R0.5 組造成明顯之低血壓及心跳抑制（圖十五、圖十六），可能造成冠狀血液供應減少，而影響心肌細胞之復原，導致此組之結果無明顯優於 R-0.5 及 R-1.0 組。由圖十八顯示，三組給藥組之 SBP-HR 之乘積均明顯低於 saline 組，由此可知 BN-063 可減輕再循環期間之心肌作功，降低心肌耗氧量，此作用可能是抑制再循環損傷原因之一。

據文獻報告，造成缺血後再循環期間心律不整的可能原因如下：(1) 缺血時 ATP 耗盡，而再循環初期心肌細胞製造 ATP 的能力尚未恢復，故再循環期間 ATP 含量不足亦可能是導致心律不整的原因。(2) 缺血期間，細胞外堆積大量之鉀離子，與氫離子，而再循環將其瞬間帶走，如此之變化易導致再循環初期（約二分鐘內）之心律不整。(3) 再循環期間，細胞內 cAMP 量增加及鈣離子過度負荷亦可能誘發心律不整。(4) 血液恢復灌流造成大量氧游離基之產生，此亦是造成再循環心律不整之一因素。由此可推測 BN-063 於再循環期間之抗心律不整機轉可能為：(1) 降低再循環期間心肌作功，以減少 ATP 之耗損。(2) 可藉由抑制 adenylyl cyclase 活性，降低細胞內鈣離子含量，進而抑制 Ca^{2+} influx，改善細胞內鈣離子過度負荷之情形。(3) noradrenaline 經 autooxidation 反應後會產生氧游離基。據文獻報告，致活交感神經末梢之 adenosine A₁-受體可抑制神經末梢釋放 noradrenaline，故可減少氧游離基的產生。同時，可能透過抑制再循環期間之鈣離子過度負荷及氧游離基的生成，進而降低梗塞面積，達到保護心肌之作用。

結 論

(1) 新合成之 doridosine 衍生物，為一具選擇性之 adenosine A₁-受體致效劑。(2) BN-063 致活 adenosine A₁-受體可產生抗心律不整

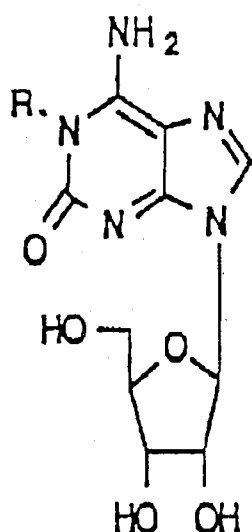
作用。(3) BN-063 可減輕心肌缺血後之再循環損傷。

參考文獻:

1. Martins JB: Sympathetic influences in myocardial ischemia: possible mechanisms of arrhythmogenesis. *Cardiol. Clin.* 1:51-61, 1983.
2. Rona G: Catecholamine cardiotoxicity. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 17:291-306, 1985.
3. Vegh A, Szekeres L and Parrat JR: preconditioning: an early protective response to myocardial ischemia. In: *Myocardial response to acute injury.*, Edit by Parrat JR, Macmillan Academic and professional Ltd., London, pp. 110-127.
4. Fagbeni, O. and Parratt, J.R. (1984). Antiarrhythmic actions of adenosine in the early stages of experimental myocardial ischaemia. *Eur. J. Pharmacol.*, 100, 243-244.
5. Hubert B and Jurgen S: Supply-to-demand ratio for oxygen determines formation of adenosine by heart. *Am. J. Physiol.* 250:H173-H180, 1986.
6. Parratt JR and Wainwright CL: The effects of adenosine on arrhythmias induced by myocardial ischemia and reperfusion in dogs. *Br. J. Pharmacol.* 85:228-236, 1985.
7. Culling W, Newby A and Sheridan DJ: Cellular electrophysiology of adenosine and 8-phenyltheophylline during myocardial ischaemia and reperfusion. *Clin. Sci.*, 67 (suppl 9), P30-31, 1984.
8. Downey JM, Liu GS and Thornton JD :Adenosine and the anti-infarct effects of preconditioning. *Cardiovasc. Res.*, 27, 3-8, 1993.

9. Berne RM: The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. *Circ. Res.* 47:807-813, 1980.
10. Boachie-Ansah G, Kane KA and Parratt JR (1993). Is adenosine an endogenous myocardial protective (antiarrhythmic) substance under conditions of ischaemia? *Cardiovasc. Res.*, 27, 77-83.
11. Lerman BB and Belardinelli L: Cardiac electrophysiology of adenosine. Basic and clinical concepts. *Circulation*, 83, 1499-1509, 1990.
12. Forman MB and Virmani R: Pathogenesis and modification of myocardial infarction. In: *Acute myocardial infarction*. Edited by Gersh BJ and Rahimtoola SH, Elsevier Science Publishing Co., New York, 1991, pp. 349-370.
13. Forman MB, Perry JM and Wilson BH: Demonstration of myocardial reperfusion injury in man: results of a pilot utilizing acute angioplasty with perfluorochemical in anterior myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 18:911-918, 1991.
14. Forman MB, Velasco CE and Jackson EK: adenosine attenuates reperfusion injury following regional myocardial ischaemia. *Cardiovasc. Res.* 27:9-17, 1993.
15. Olafsson B, Forman MB, Puett DW, et al.: Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intracoronary adenosine: Importance of the endothelium and the no-reflow phenomenon. *Circulation* 76:1136-1145, 1987.
16. Kitakaze M, Takashima S and Sato H: Stimulation of adenosine A1 and A2-receptors prevent myocardial stunning. *Circulation* 82 (suppl III):III-37, 1990.
17. Norton ED, Jackson EK, Turner MB, et al.: The effect of intravenous infusions of selective adenosine A1- and A2-

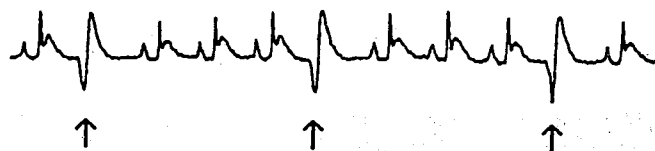
- receptors agonists on myocardial reperfusion injury. Am. Heart J. 123:332-342, 1992.
18. Miura T and Iimura O: Infarct size limitation by preconditioning: its phenomenological features and the key role of adenosine. Cardiovasc. Res. 27:36-42, 1993.
 19. Belardinelli L and Pelley A: Cardiac electrophysiology and pharmacology of adenosine. J. Cardiovasc. Electrophysiol. 1: 327-339, 1990.
 20. Egan TM, Noble SJ, Powell T, Twist VW and Yamoaka K: On the mechanism of isoprenaline- and forskolin-induced depolarization of single guinea-pig ventricular myocytes. J. Physiol. 400:299-320, 1988.



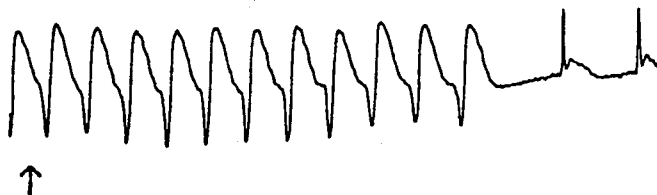
1. methyl (doridosine)
2. cyclopropyl (BN-063)

圖一、Doridosine 與 BN-063 之化學結構式。
R- 處若接上 methyl group 則為 doridosine ,
若接上 cyclopropyl group 則為 BN-063 。

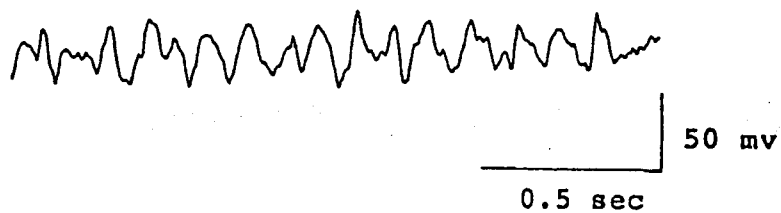
(A) Ventricular Premature Contraction (VPC)



(B) Ventricular Tachycardia (VT)

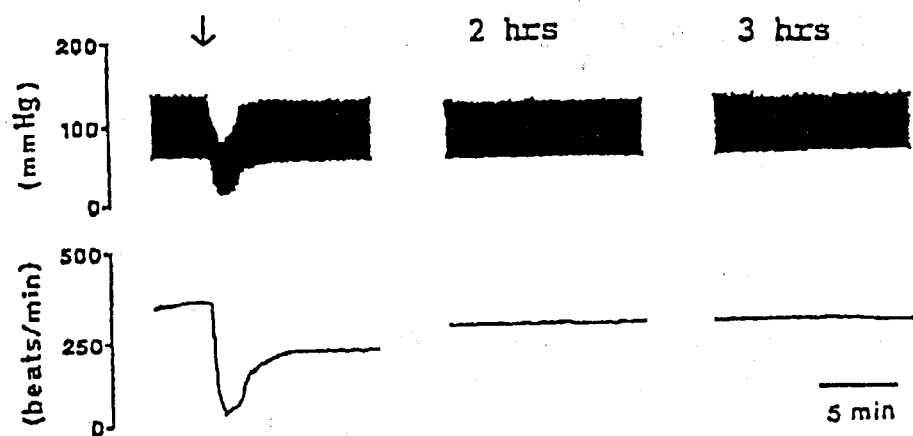


(C) Ventricular Fibrillation (VF)

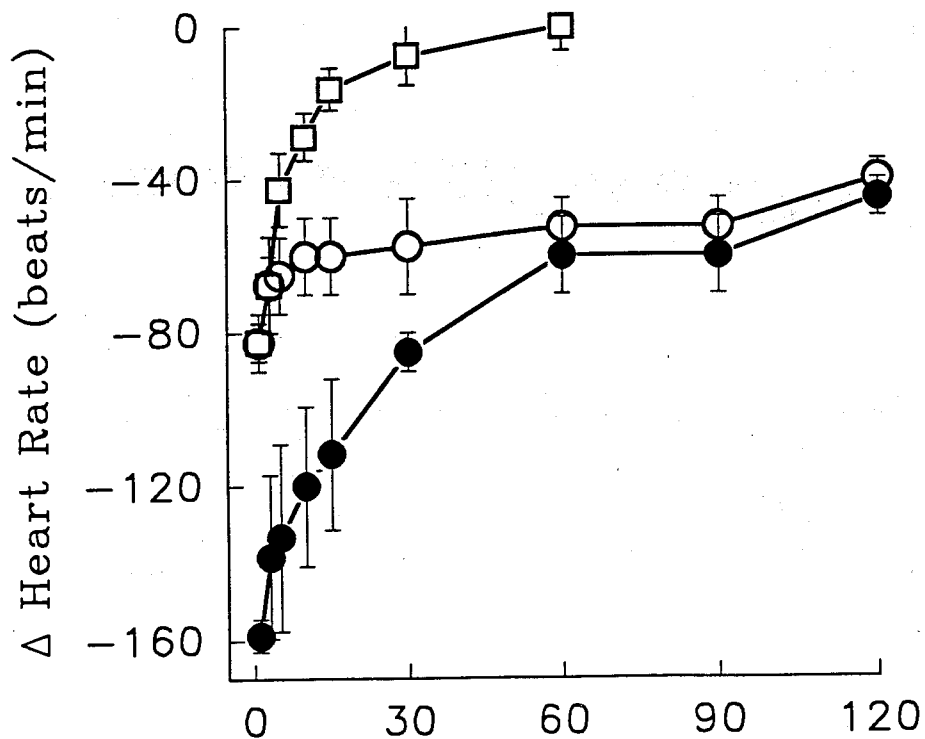


圖二、常見之大白鼠心室性心律不整之實例。

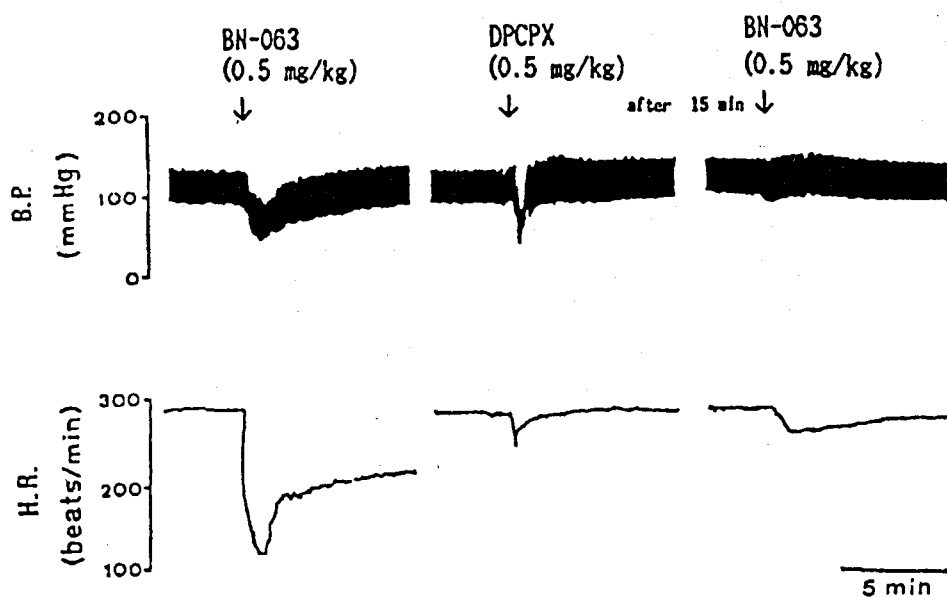
Rat BN-063 (0.5 mg/kg i.v.)



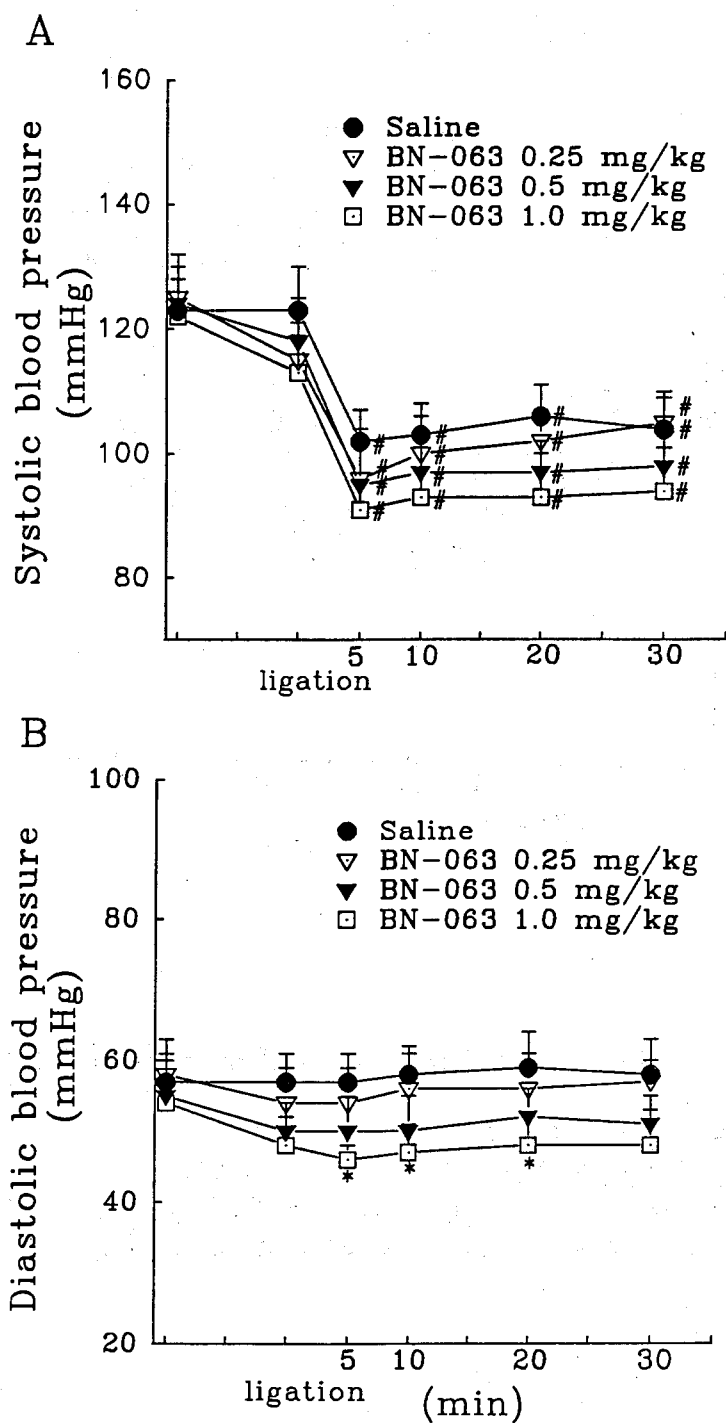
圖三、BN-063 影響正常大白鼠血壓與心跳之實例。



圖四、BN-063 對正常大白鼠心跳抑制作用之統計分析結果。
 縱軸代表心跳變化，以 beats/min 為單位，
 橫軸代表給藥後之時程，以 min 為單位。
 數據以平均值±標準誤 (Mean ± S.E.M.) 表示，
 n=6。



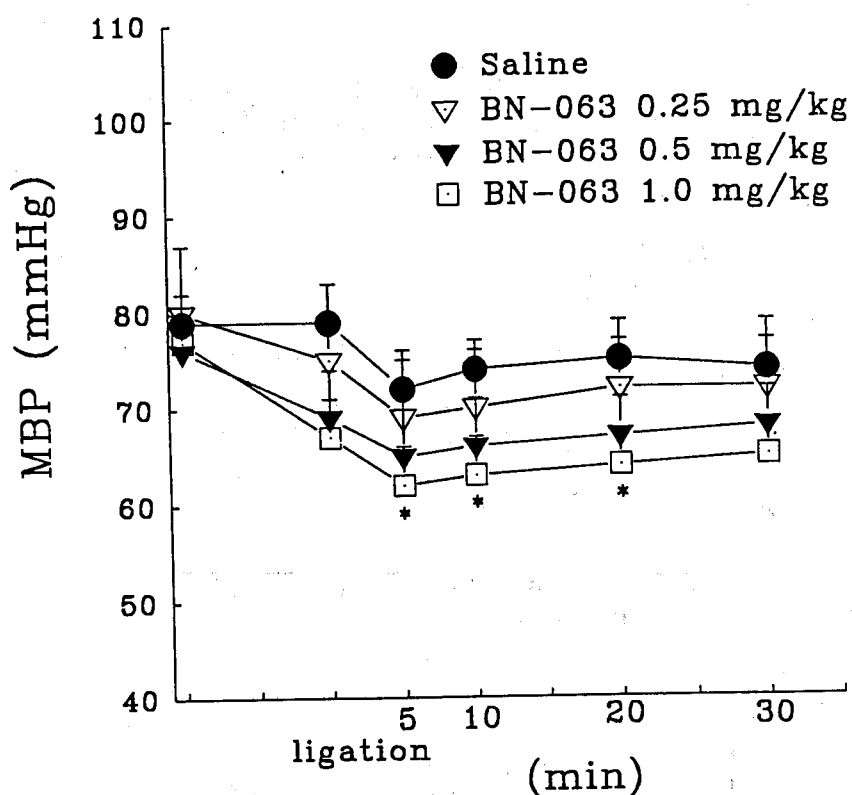
圖五、Adenosine A₁ 受體對抗劑—DPCPX，預處理後拮抗 BN-063 抑制心跳作用之實例。



圖六、BN-063 預處理對於左冠狀動脈結紮後收縮壓與舒張壓之影響。

* 代表 BN-063 給藥組和 saline 組比較具統計上之差異 ($P < 0.05$)。

代表各組結紮前與結紮後比較具統計上之差異 ($P < 0.05$)。



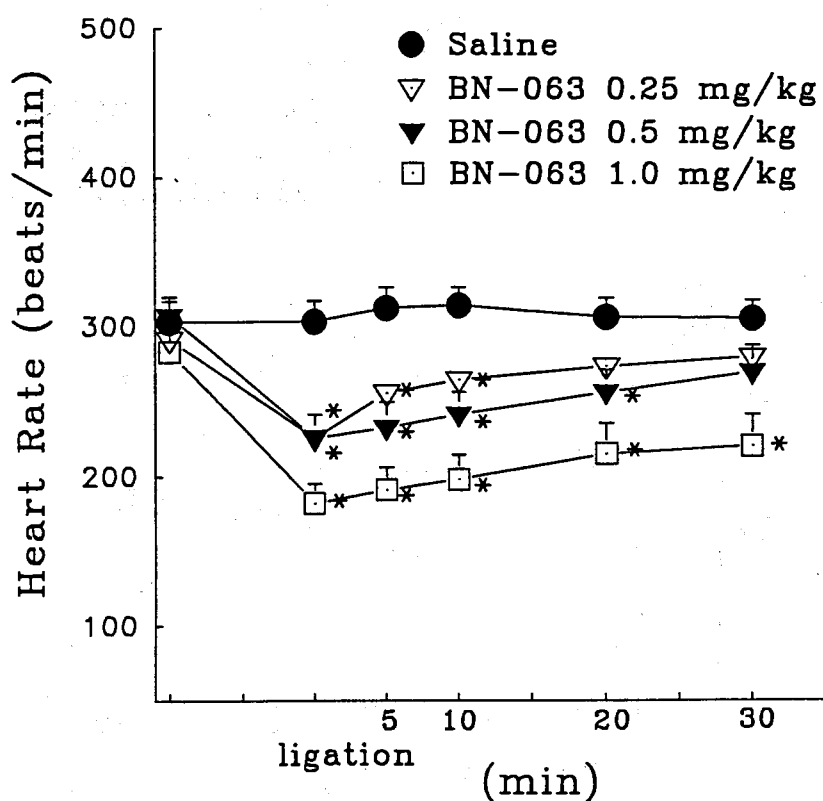
圖七、BN-063 預處理對左冠狀動脈結紮後平均動脈壓變化之影響。

縱軸代表平均動脈壓，單位是 mmHg。

橫軸代表結紮前與結紮後的時程，單位是 min。

數據以平均值±標準誤 (Mean ± S.E.M.) 表示，n=10。

* 代表 BN-063 組與 saline 組比較具統計上之差異。



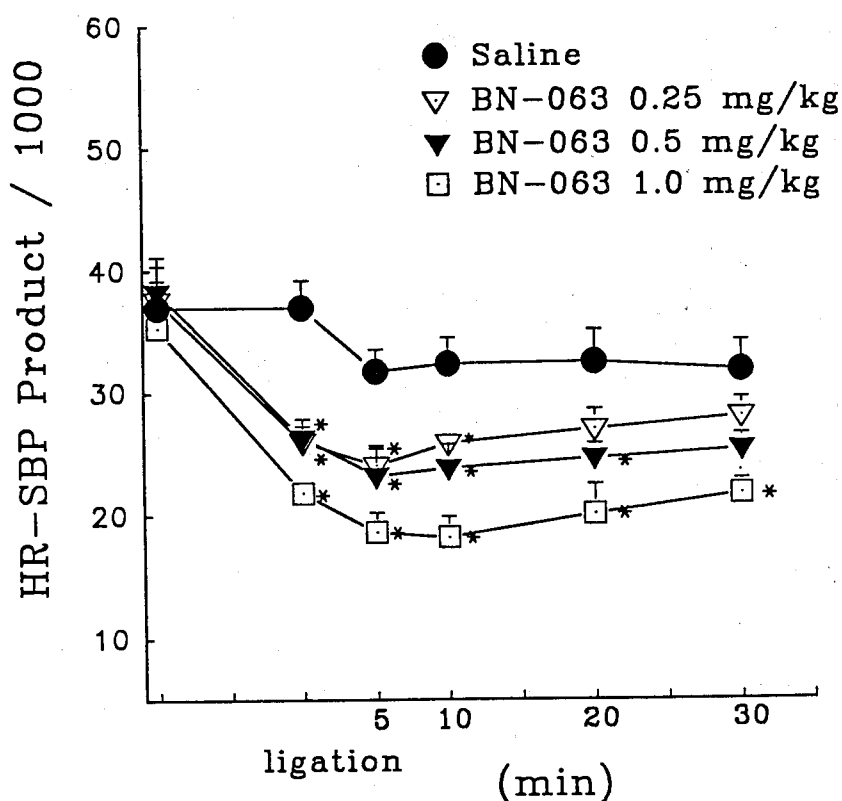
圖八、BN-063 預處理對左冠狀動脈結紮後心跳變化之影響。

縱軸代表心跳，以 beats/min 為單位。

橫軸代表結紮前與結紮後之時程，單位為 min。

數據以平均值±標準誤 (Mean ± S.E.M.) 表示，n=10。

* 代表 BN-063 給藥組和 saline 組比較具統計上之差異 (P<0.05)。



圖九、BN-063 預處理對左冠狀動脈結紮後之心跳與收縮壓乘積變化之影響。

縱軸代表心跳與收縮壓之乘積。

橫軸代表結紮前與結紮後之時程，單位為 min。

數據以平均值±標準誤 (Mean ± S.E.M.) 表示，n=10。

* 代表 BN-063 組和 saline 組比較具統計上之差異 (P<0.05)。

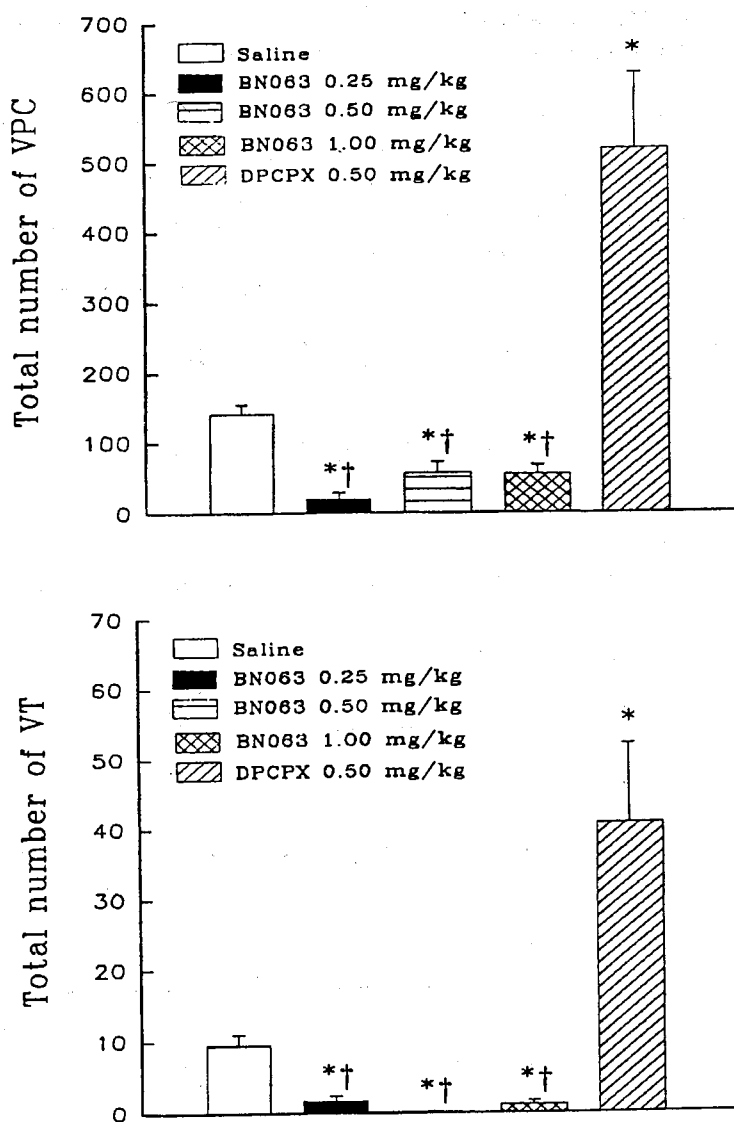
Table 1. Effects of pretreatment with BN-063 on the onset and incidence of arrhythmia following coronary artery occlusion in the rat.

group	N	VPC		VT		VF	
		onset (min)	incidence (%)	onset (min)	incidence (%)	onset (min)	incidence (%)
Saline	10	5.69±0.22	100	6.30±0.32	100	9.47±0.75	70
BN-063 (0.25 mg/kg)	10	9.96±0.90**	100	12.84±0.59**	70**	—	0**
BN-063 (0.5 mg/kg)	10	9.83±1.71**	100	—	0**	—	0**
BN-063 (1.0 mg/kg)	10	11.36±0.70**	100	12.02±1.00**	50**	—	0**
DPCPX (0.5 mg/kg)	10	4.63±0.24	100	4.75±0.40	100	8.19±1.15	100

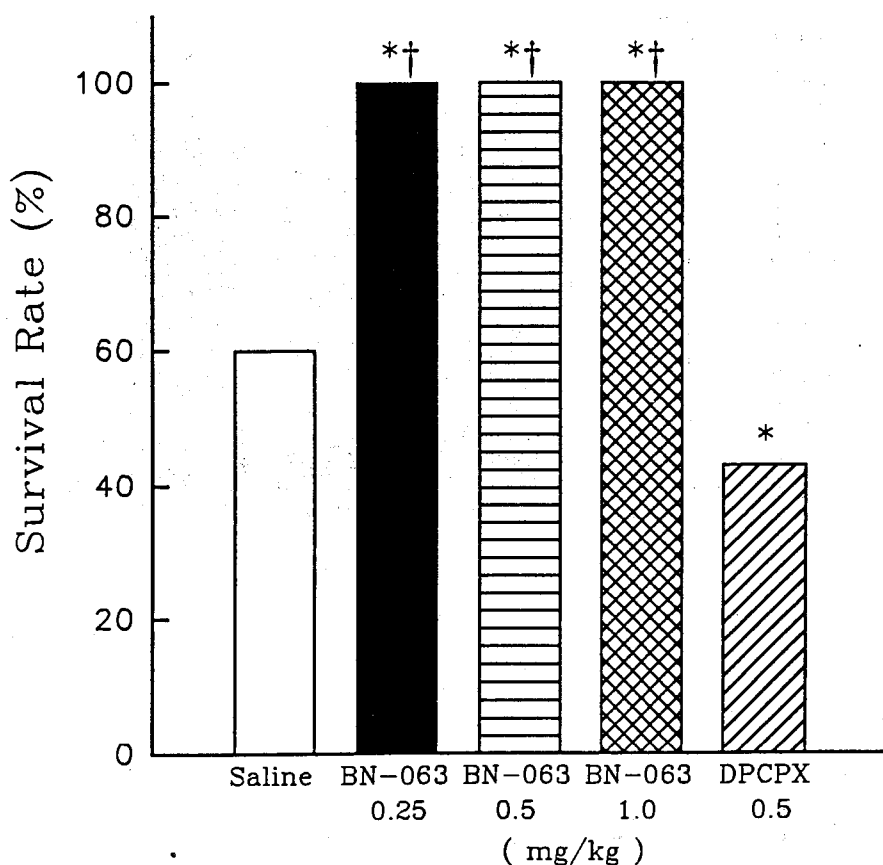
表一、BN-063 預處理對於左冠狀動脈結紮後心律不整的發生時間與發生率之影響。
數據以平均值±標準誤 (Mean ± S.E.M.) 及百分比 (%) 表示。

※ 代表 BN-063 組和 saline 組比較具統計上之差異 (P<0.05)。

+ 代表 BN-063 組和 DPCPX 組比較具統計上之差異 (P<0.05)。



圖十、BN-063 預處理對於結紮後三十分鐘內 VPC, VT 發生次數之影響。
 縱軸代表結紮後三十分鐘內發生 VPC 或 VT 之總數。
 橫軸代表組別。
 數據以平均值±標準誤 (Mean ± S.E.M.) 表示 n=10。
 * 代表 BN-063 組和 saline 組比較具統計上之差異 (P<0.05)。
 + 代表 BN-063 組和 DPCPX 組比較具統計上之差異 (P<0.05)。



圖十一、BN-063 預處理對於結紮三十分鐘後存活率之影響。

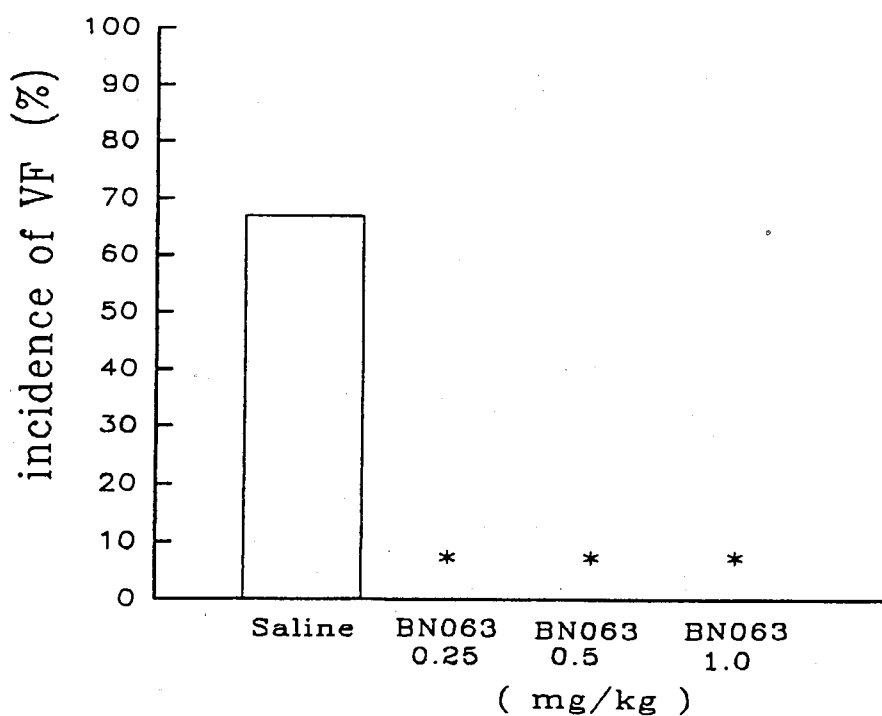
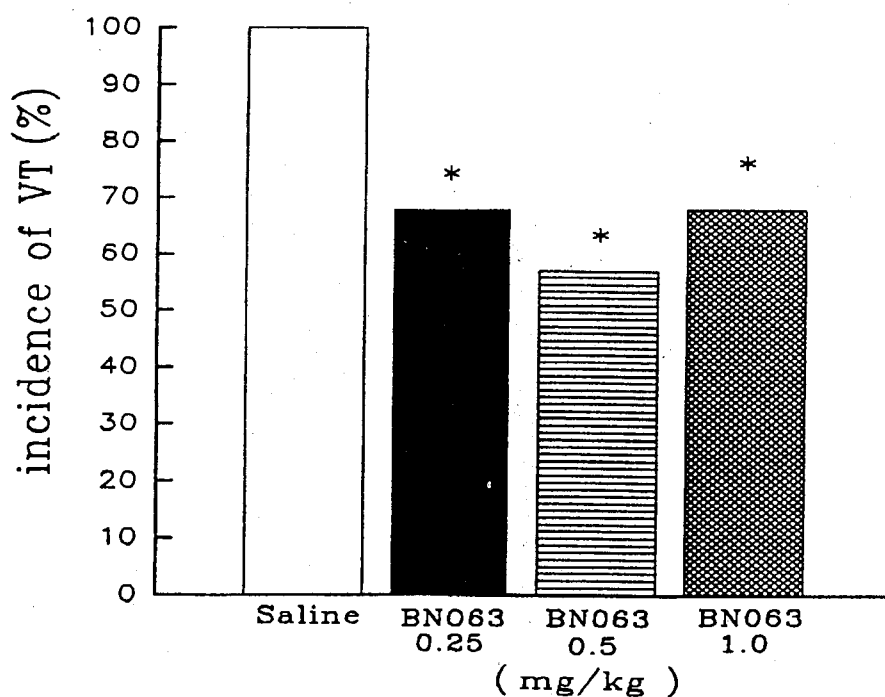
縱軸代表存活率，以 % 為單位。

橫軸代表組別。

數據以百分率 (%) 表示。

* 代表 BN-063 組和 saline 組比較具統計上之差異 ($P < 0.05$)。

+ 代表 BN-063 組和 DPCPX 組比較具統計上之差異 ($P < 0.05$)。



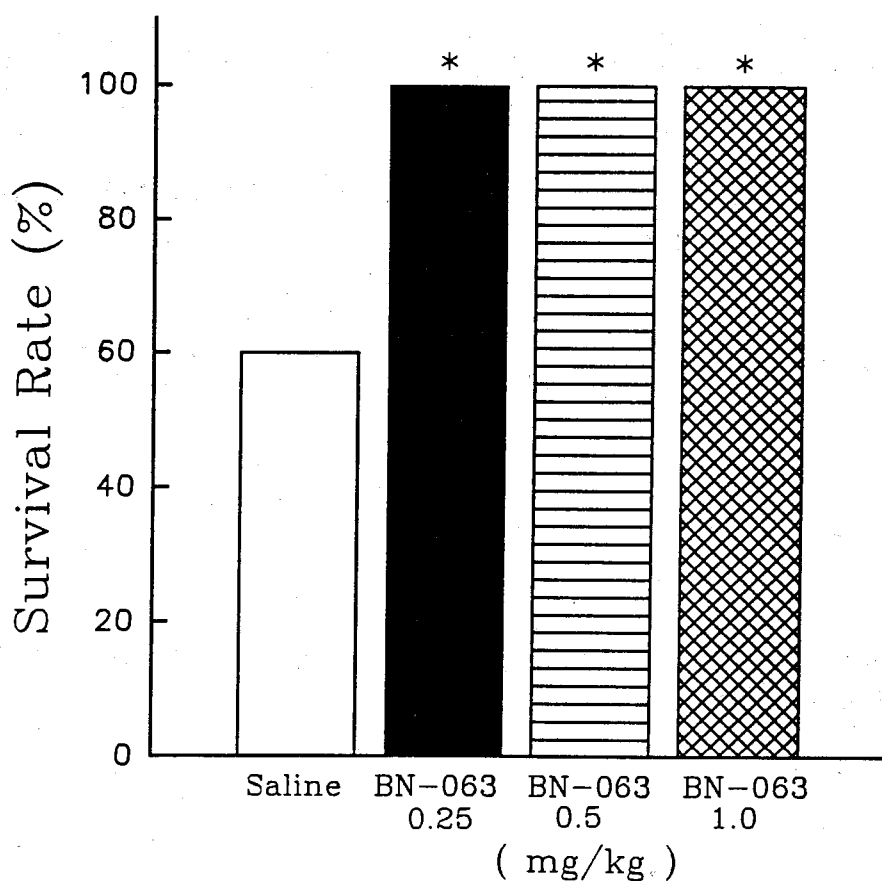
圖十二、冠狀動脈結紮後給予 BN-063 對於 VT、VF 發生率之影響。

縱軸代表 VT 或 VF 之發生率，以 % 為單位。

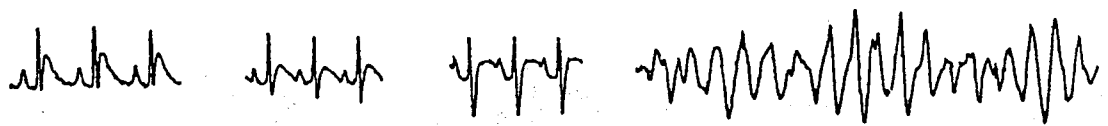
橫軸代表組別。

數據以百分率表示，n=7。

* 代表 BN-063 組和 saline 組比較具統計上之差異 (P<0.05)。



圖十三、冠狀動脈結紮後給予 BN-063 對於存活率之影響。
 縱軸代表存活率，以 % 為單位。
 橫軸代表組別。
 數據以百分率 (%) 表示， $n=7$ 。
 * 代表 BN-063 組和 saline 組比較具統計上之差異 ($P<0.05$)。



給藥前

↑
ISO

(7 mg/kg s.c.)

二分鐘

約四十分出現心室纖維顫動 (VF)

50
mv
0.5 sec



給予 BN-063 (0.5 mg/kg i.v.)
約一分鐘後 VF 消失

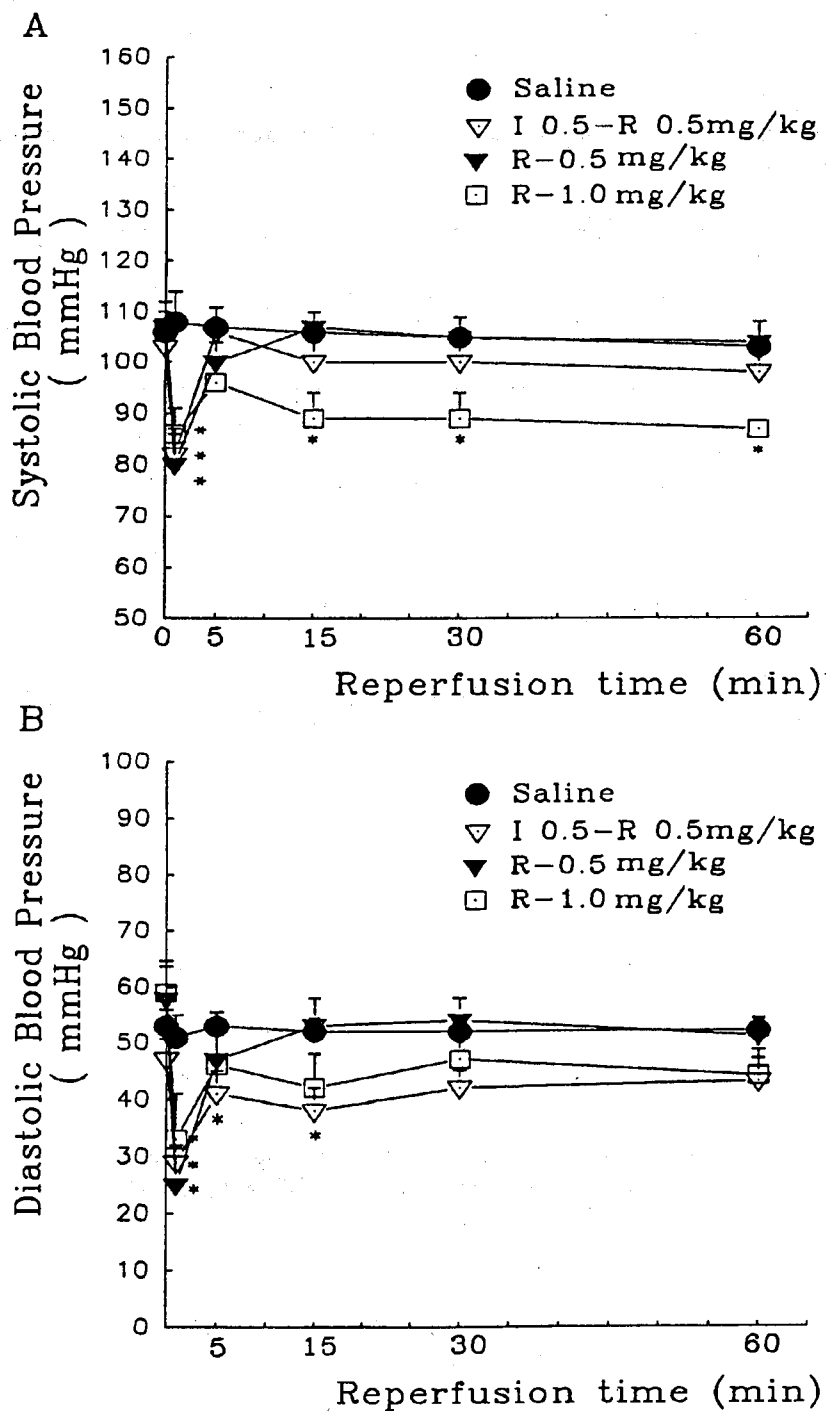
約二分鐘後心臟節律恢復正常

圖十四、靜脈注射 BN-063 (0.5 mg/kg) 影響 ISO 誘發
心室纖維顫動之實例。

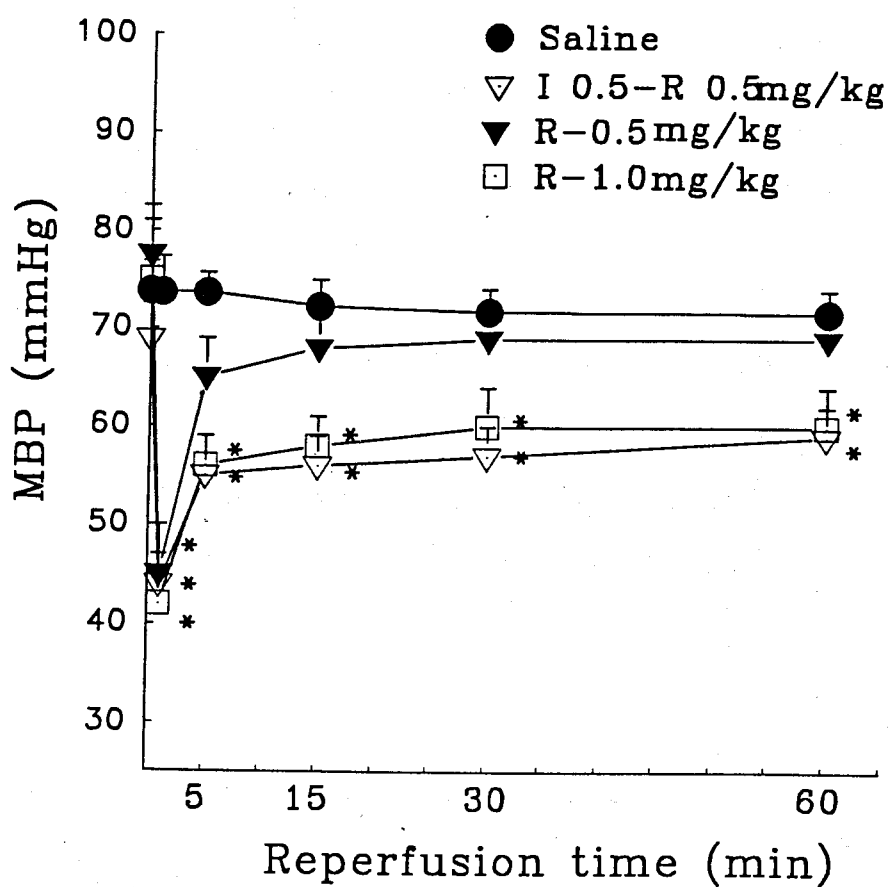
Table 2. The effect of BN-063 on the mortality caused by isoproterenol administered subcutaneously.

group	N	Body Weight (g)	onset of VF (min)	Survival (n)	Mortality (%)
saline	10	414 ± 16	49.56 ± 7.84	3	70
BN-063 (0.5 mg/kg)	10	408 ± 14	54.96 ± 11.68	10	0*

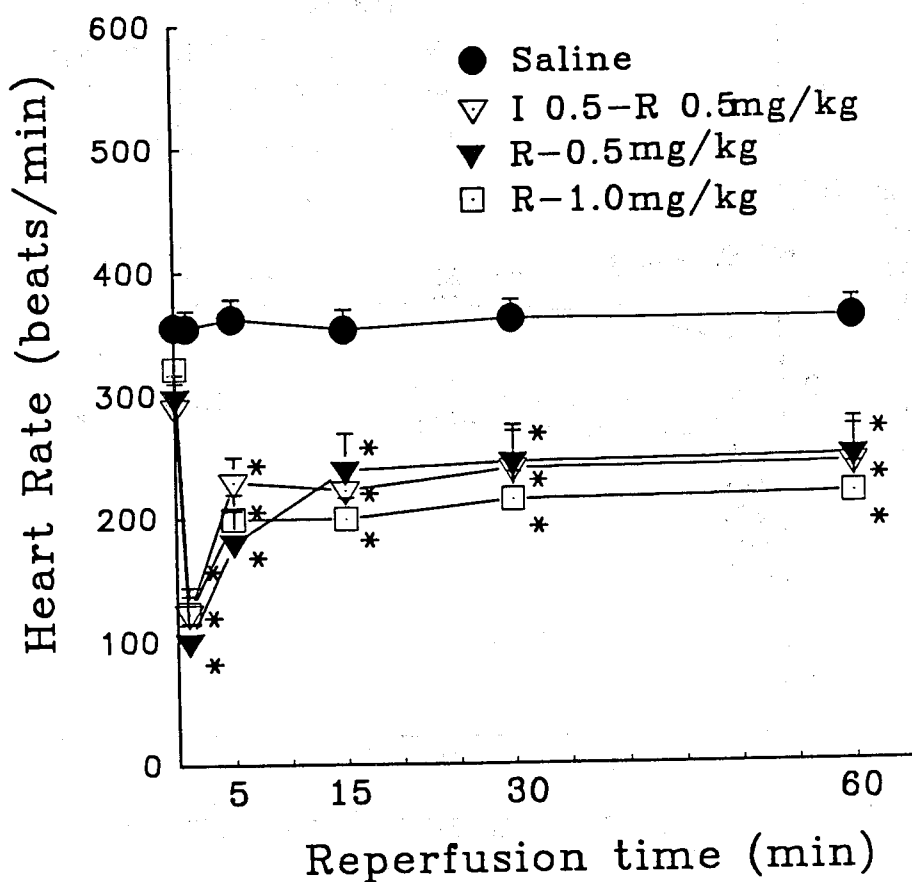
表二、BN-063 對於 ISO 誘發心室纖維顫動後致死率之影響。
 * 代表 BN-063 組和 saline 組比較具統計上之差異
 (P<0.05)。



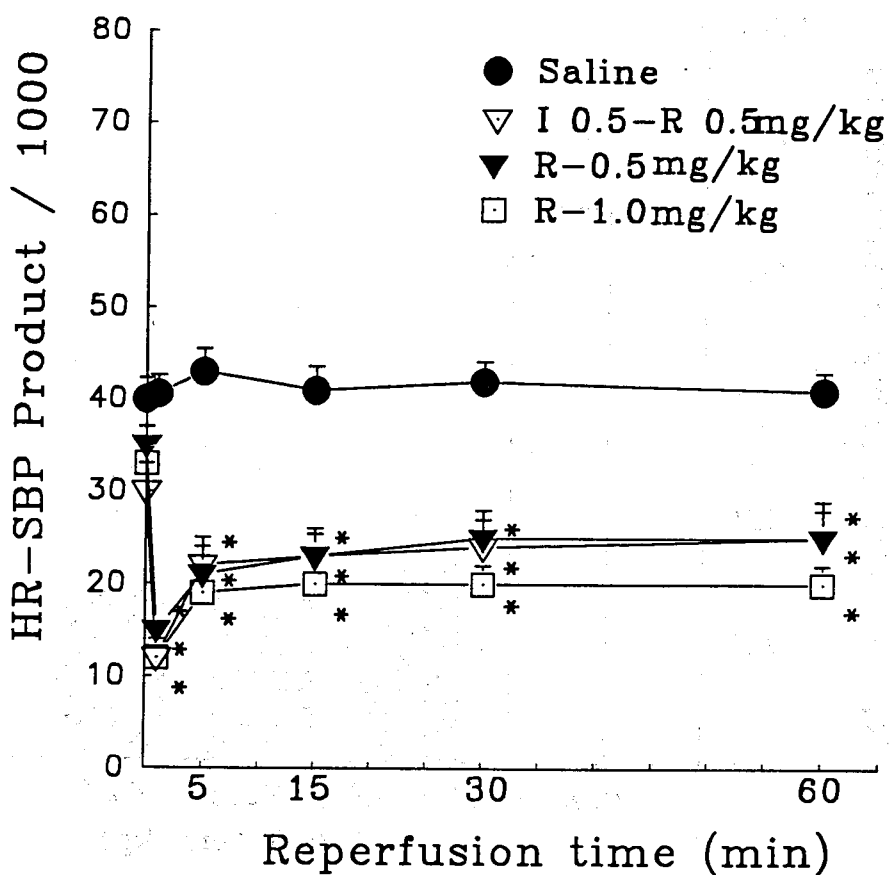
圖十五、BN-063 對再循環時期收縮壓與舒張壓之影響。
縱軸代表收縮壓或舒張壓，以 mmHg 為單位。
橫軸代表再循環之時程，以 min 單位。
數據以平均值±標準誤 (Mean ± S.E.M.) 表示，
n= 7。
* 代表 BN-063 組與 saline 組比較具統計上
之差異 (P<0.05)。



圖十六、BN-063 對再循環時期平均動脈壓之影響。
 縱軸代表平均動脈壓，以 mmHg 為單位。
 橫軸代表再循環之時程，單位是 min。
 數據以平均值±標準誤 (Mean ± S.E.M.) 表示，
 n= 7。
 * 代表 BN-063 組與 saline 組比較具統計上
 之差異 (P<0.05)。



圖十七、BN-063 對缺血後再循環時期心跳之影響。
 縱軸代表心跳，以 beats/min 為單位。
 橫軸代表再循環之時程，單位是 min。
 數據以平均值±標準誤 (Mean ± S.E.M.) 表示，
 n= 7。
 * 代表 BN-063 組與 saline 組比較具統計上
 之差異 (P<0.05)。



圖十八、BN-063 對再循環時期之 HR-SBP 乘積之影響。

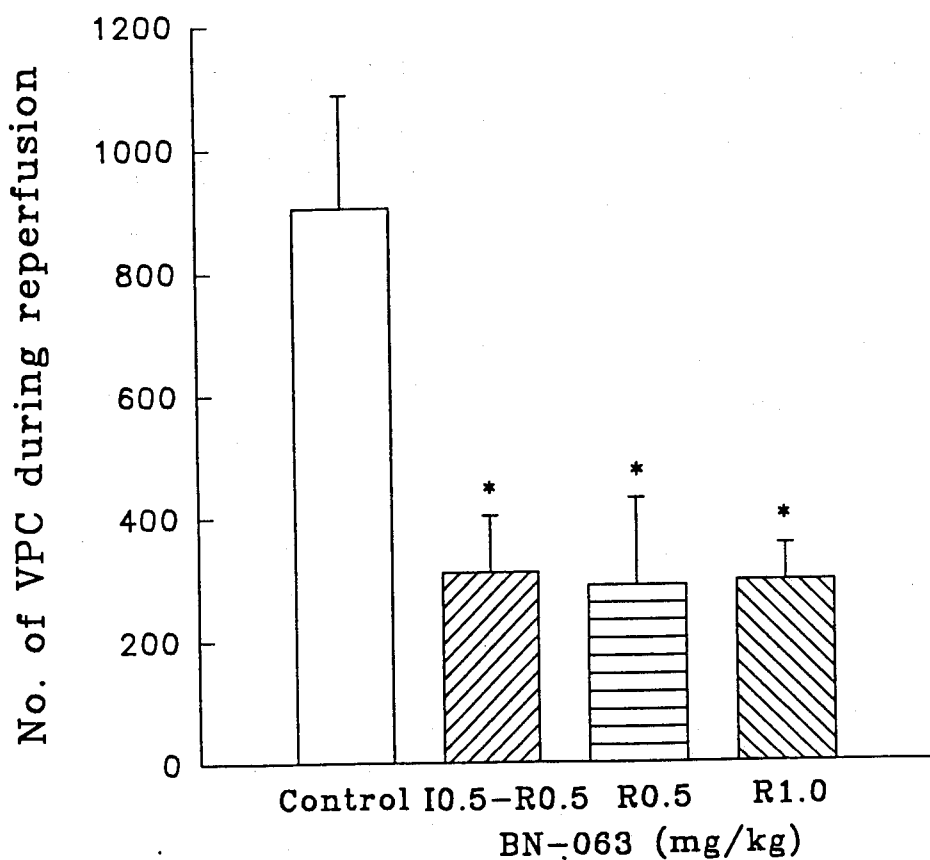
縱軸代表 HR-SBP 乘積。

橫軸代表再循環之時程，單位是 min。

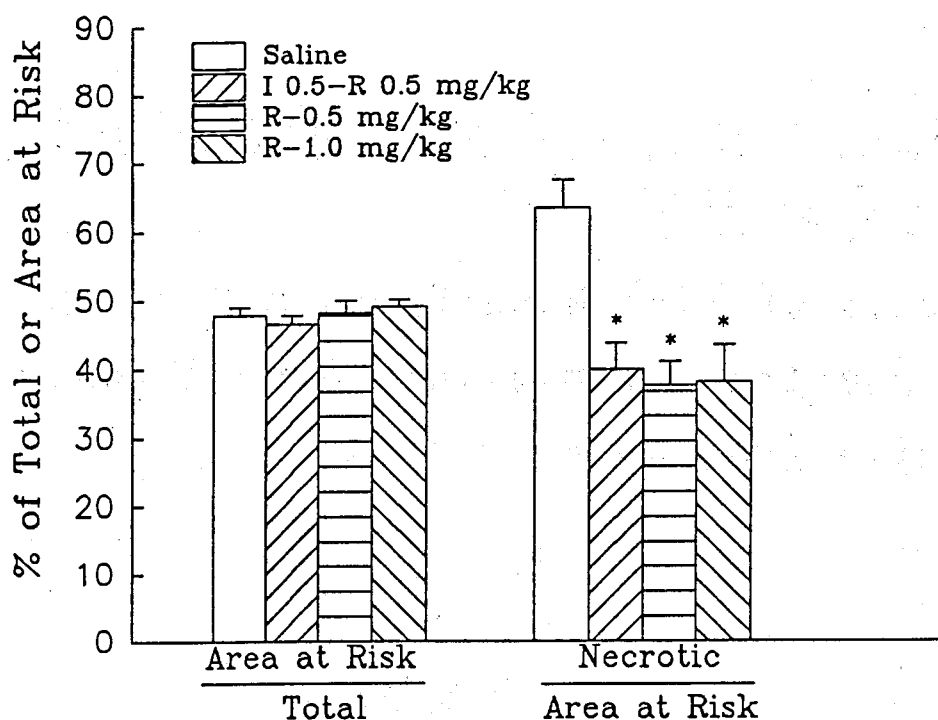
數據以平均值 ± 標準誤 (Mean ± S.E.M.)

表示，n=7。

* 代表 BN-063 組與 saline 組比較具統計上之差異 (P<0.05)。



圖十九、BN-063 對於再循環一小時內 VPC 總數之影響。
 縱軸代表再循環一小時內 VPC 之總數。
 橫軸代表組別。
 數據以平均值±標準誤 (Mean ± S.E.M.)
 表示, n= 7。
 * 代表 BN-063 組與 saline 組比較具統計
 上之差異 ($P<0.05$)。



圖二十、BN-063 對於再循環一小時後心肌壞死面積之影響。

縱軸代表缺血面積和總面積之比率或壞死面積和缺血面積之比率，以 % 為單位。

橫軸代表組別。

數據以平均值±標準誤 (Mean ± S.E.M.) 表示，n= 7。

* 代表 BN-063 組與 saline 組比較具統計上之差異 (P<0.05)。

天王補心丹對大白鼠單向被動迴避學習反應之影響

Effects of Tien-Wang-Pu-Hsin-Dang on the One-trial Inhibitory Step-through Passive Avoidance in Rats

謝 明 村

中國醫藥學院

中文摘要

天王補心丹主治「思慮過度，心血不足，怔忡健忘，心口多汗，大便或秘或溏，口舌生瘡等證」，方由人參、元參、丹參、茯苓、酸棗仁、遠志、柏子仁、天門冬、麥門冬、生地黃、桔梗、當歸及五味子等十三味藥所組成；方中以生地、玄參、麥冬及天冬滋陰制火爲君；人參及當歸補益氣血爲臣；棗仁、柏子仁、丹參、茯苓、遠志、五味子養血斂心、鎮心安神爲佐；桔梗載藥入心爲使。心者，君子之官也，神明出焉，思慮過度，耗其心血，則神明傷而成心勞，故怔忡健忘。因此本研究將天王補心湯分爲君藥組（生地、玄參、麥冬及天冬）、臣藥組（人參及當歸）、佐藥組（棗仁、柏子仁、丹參、茯苓、遠志、五味子）、使藥組（桔梗）及全方組等五組，擬以單向被動迴避反應（one-trial passive avoidance）及自發運動量來探討天王補心丹對scopolamine及cycloheximide所誘發之學習記憶障礙之作用及天王補心丹方劑組成與主

治間之關連性。

一次給藥之天王補心丹各組，對scopolamine誘發之學習獲得障礙及cycloheximide誘發之記憶鞏固障礙，僅天王補心丹全方組之水粗抽組及95%酒精粗抽組具改善作用，且以水粗抽組較佳；至於對大鼠自發運動量，天王補心丹全方組之水粗抽組及95%酒精粗抽組具降低大鼠自發運動量之作用，但對電痛閾值則各組均不影響。一週連續給藥之天王補心丹各組在大劑量時，對scopolamine誘發之學習獲得障礙及cycloheximide誘發之記憶鞏固障礙均具改善作用，其中以天王補心丹全方組之水粗抽組較為明顯；其次在自發運動量的試驗，水粗抽組具增加大鼠自發運動量之作用，但對電痛閾值則不影響。最後，全方組之水粗抽組改善cycloheximide誘發記憶鞏固障礙之作用，可被scopolamine及8-OHDPAT所拮抗，為ritanserine所增強。

綜合研究結果，顯示天王補心丹全方組之水粗抽組及95%酒精粗抽組，在一次給藥後，具改善學習記憶作用，且以水粗抽者較佳，而其改善學習記憶部份因鎮靜之作用所致；一週連續給藥後，各組在大劑量下對於學習獲得及記憶鞏固障礙均有明顯之改善作用。而其改善學習記憶障礙之作用機轉可能與增強中樞 cholinergic system之活性及protein synthesis、降低serotonergic system之活性有關。

關鍵詞：天王補心丹，學習記憶，scopolamine，cycloheximide

ABSTRACT

In this study, we divided the Tien-Wang-Pu-Hsin-Dang (abbr. as TWP) into five groups: (1) Chun was consisted of Rehmanniae Radix, Schrophulariae Radix, Ophiopogonis Tuber and Asparagi Radix. (2) Chen was consisted of Ginseng Radix and Angelicae Sinensis Radix. (3) Tso was consisted of Zizyphi Semen, Thujae Orientalis Semen, Salivae Miltiorrhizae Radix, Hoelen,

Polygalae Radix and Schizandrae Fructus. (4) Shih was consisted of Platycodi Radix. (5) TWP was consisted of the above four groups. We attempted to investigate the effect of five groups on scopolamine-induced and cycloheximide-induced amnesia in passive avoidance task and locomotor activity in rats.

After acute treatment, only TWP extracted with water or 95 % ethanol could improved the scopolamine-induced acquisition impairment and cycloheximide- induced consolidation deficit, and the former was better than the latter. After one-week consecutive treatment, five groups could improved the scopolamine-induced acquisition impairment and cycloheximide-induced consolidation deficit, and TWP extracted with water was better than the others. Whereas, TWP extracted with water decreased the locomotor activity after acute treatment and increased the locomotor activity after one-week consecutive treatment in rats. But five groups did not change the threshold of vocalization with electric foot-shock in rats. Furthermore, the memory improvement of TWP on the cycloheximide-induced storage impairment was antagonized by scopolamine and 8-OHDPAT, and was potentiated by ritanserin.

These results are shown that TWP produce memory improvement in acute treatment, partially due to possess sedative effect. The learning and memory improvement effect of TWP after one-week consecutive treatment may be due to the increase in cholinergic activity and protein synthesis, and the decrease in serotonergic activity.

Key word: Tien-Wang-Pu-Hsin-Dang; Learning and memory; scopolamine; cycloheximide

前言

現今之社會已由農業社會逐漸轉型為工業社會，國民平均所得逐年提高，使我國邁入已開發國家之林，國民注重環境衛生及醫療保健，生活品質改善，平均壽命顯著提高，因而導致社會年齡層老化，自1900年代以來，人類的壽命一直在戲劇性的增加中，今天，已有更多的人可以活過80歲，此種社會結構漸趨老化的現象，已使得老年疾病的防治與研究日漸重要，如老年痴呆症、糖尿病等，老年痴呆症則為其中最重要的一環。

老年痴呆症是一種廣泛性腦機能障礙，對人的記憶、人格、行為和情緒均有影響，有報告指出，65歲以上，每20人中有1人；80歲以上，每5人中有1人會被老年痴呆症所困擾，因此探討老年痴呆症之防治，實為當今醫藥界刻不容緩之工作。

學習記憶與腦內神經傳遞物質之關係，於1970年至1994年之藥理、生理、生化等之研究，綜合其研究結果指出記憶之形成，大致可分成三個階段，即學習獲取(acquisition)、記憶鞏固(consolidation)及記憶再現(retrieval)；而按記憶之形成時間及持續時間，又可將其分為短期記憶(short-term memory)、中期記憶(intermediate-term memory)及長期記憶(long-term memory)三個時期⁽¹⁾。經幾十年來在生化及電生理之研究指出，於學習獲取及短期記憶形成時，中樞hippocampus及amygdala之地位頗為重要，且以hippocampus CA1區之LTP(long-term potentiation)更為重要⁽²⁾。

自1971年Deutsh J.A.之研究報告指出，於學習後，cholinergic突觸後之細胞膜對acetylcholine之敏感性增加，因而導致記憶形成；但當敏感性降低或受阻礙時，便發生健忘之現象⁽³⁾；由此確立了cholinergic system在學習記憶形成過程中，確實扮演著重要的角色。於近幾年來更進一步研究cholinergic system之致效劑及抑制劑對學習記憶之影響，發現其致效劑arecoline及前驅物choline、lecithin均可增強學習記憶，而其抑制劑scopolamine則有阻礙學習記憶之作用⁽⁴⁾；在學習記憶形成

階段及記憶時期之影響，於近幾年之研究顯示，其影響主要在學習獲取階段^{(5)、(6)}。至於長期記憶方面，其致效劑具增強長期記憶之作用⁽⁷⁾。

其次，中樞cholinergic system之分佈區域甚廣，但對學習記憶之主要影響區域係basal forbrain cholinergic system，而該系統又分成三條支配路徑：由medial septal(MS)及vertical nucleus of diagonal band支配之hippocampus、由horizontal nucleus of diagonal band支配之visual cortex及entorhinal cortex、由nucleus basalis magnocellularis(NBM)支配之frontal cortex及basolateral amygdala，以ibotenic acid損害basal forbrain cholinergic system各區與學習記憶實驗如passive avoidance、active avoidance、Y-maze、Morris water maze、radial maze之研究中，指出當MS或NBM區受到損害時，對各類學習記憶均會造成阻礙⁽⁸⁻¹⁰⁾。由以上之結果可知，中樞MS-hippocampus cholinergic system及NBM-basolateral amygdala cholinergic system，在學習記憶形成過程中均扮演極重要之角色。

痴呆症患者知覺正常，但由於不明原因引起腦部損傷，造成進行性的記憶力減退，其主要特徵是常忘記最近發生的事情，日常生活之活動量下降。目前臨床上對於老年痴呆症之治療，大多採對症療法，主要以修復受損傷之腦組織及提高腦代謝活性為目的。然這些腦代謝賦活劑(如calcium hopantenate, amantadine)使用高劑量或長期服用時，會有失眠現象及不安及譫語惡化等不良副作用產生⁽¹¹⁾，因此尋找對學習記憶有所助益且副作用少之理想藥物，以改善老年痴呆症患者記憶力的減退，實為目前刻不容緩的工作。

中醫方劑為我國古聖先賢臨床經驗的累積，陶弘景之傷寒論最早有方劑之記載，至明李時珍之本草綱目總共收載萬餘方，為我國豐富的醫療資源寶庫。中醫對於老年痴呆症之臨床用藥上多以補氣寧神為主，主以促進腦部血液流通，防止或減少腦動脈硬化及腦血栓形成，然對於其藥理機轉則大多未見有探討。著者因此進行本研究，擬從我國豐富的方劑寶庫中找出具有促進學習記憶之中藥方劑。

著者從中醫補養方劑中選用主治「思慮過度，心血不足，怔忡健忘

，心口多汗，大便或秘或溏，口舌生瘡等證」之天王補心丹進行研究，心（中醫所言之心即現今所說之腦）也者，君子之官也，神明出焉，思慮過度，耗其心血，則神明傷而成心勞，故怔忡健忘也。本方因終南宣律師課誦勞心，夢天王授以此方故名，主以滋心陰、養心血、補心氣及安心神爲主，方由人參、元參、丹參、茯苓、酸棗仁、遠志、柏子仁、天門冬、麥門冬、生地黃、桔梗、當歸及五味子等十三味藥所組成⁽¹²⁾，硃砂爲衣；方中以生地、玄參、麥冬及天冬滋陰制火爲君：人參及當歸補益氣血爲臣：棗仁、柏子仁、丹參、茯苓、遠志、五味子及硃砂養血斂心、鎮心安神爲佐：桔梗載藥入心爲使，因此本研究將天王補心湯分爲君藥（生地、玄參、麥冬及天冬）組：臣藥（人參及當歸）組：佐藥（棗仁、柏子仁、丹參、茯苓、遠志、五味子及硃砂）組：使藥（桔梗）組及全方組等五組，擬以自發運動量及單嚐試被動迴避反應（one-trial inhibitory step-through passive avoidance）來探討天王補心丹對scopolamine及cycloheximide所誘發之學習記憶障礙之作用及天王補心丹方劑組成與主治間之關連性。

材料與方法

一、實驗藥材之製備

本實驗所用之天王補心湯藥材，經邱年永技術員鑑定，確定其基原如下：

1. 人參：五加科植物人參 *Panax ginseng* C.A. MEYER 的乾燥根。
2. 生地：玄參科植物地黃 *Rehmannia glutinosa* (GAERTN.) LIBOSCH. 的乾燥塊根。
3. 玄參：玄參科植物玄參 *Schrophularia ningpoensis* HEMS. 的乾燥根。
4. 麥門冬：百合科植物沿階草 *Ophiopogon japonicus* (THUNB.) Ker-Gaw. 的乾燥塊根。
5. 天門冬：百合科植物天門冬 *Astragalus cochinchinensis* (LOUR.)

MERR.的乾燥塊根。

- 6.當 歸：傘形科植物當歸*Angelica sinensis* (OLIV.) DIELS.的乾燥塊根。
- 7.酸棗仁：鼠李科植物酸棗*Zizyphus spinosis* Hu的乾燥成熟種子。
- 8.柏子仁：柏科植物側柏*Biota orientalis* ENDL.的乾燥成熟種子。
- 9.丹 參：唇形科植物丹參*Salvia miltiorrhiza* Bge.的乾燥塊根。
- 10.茯 苓：多孔菌科植物茯苓菌*Poria cocos* (SCHW.) WOLF.的乾燥菌核。
- 11.遠 志：遠志科植物細葉遠志*Polygala tenuifolia* WILLD.的乾燥根。
- 12.五味子：木蘭科植物北五味子*Schizandra chinensis* BAILL.的乾燥成熟果實。
- 13.桔 梗：桔梗科植物桔梗*Platycodon grandiflorum* (JACQ.) A. DC.的乾燥根。

本研究依中醫方劑組成原理將上述藥材分爲以下五組：

- 1.君藥組：生地、玄參、麥冬及天冬，比例依序爲8：1：2：2。
- 2.臣藥組：人參及當歸，比例依序爲1：2。
- 3.佐藥組：棗仁、柏子仁、丹參、茯苓、遠志、五味子，比例依序爲2：2：1：1：1：2。
- 4.使藥組：桔梗，比例爲1。
- 5.全方組：生地、玄參、麥冬、天冬、人參、當歸、棗仁、柏子仁、丹參、茯苓、遠志、五味子及桔梗，比例依序爲8：1：2：2：1：2：2：2：1：1：1：2：1。

將上述各組實驗藥材以水或95%乙醇浸潤之，後在50℃下迴流抽取四～五次，每次約四小時，合併抽取液，經減壓濃縮乾燥後，即得各組藥材粗萃取物。

二、實驗動物

本研究所使用之動物爲：Sprague-Dawley 系雄性大鼠，體重 180～

240公克 (自發運動量實驗用)及 300~400 公克 (避暗學習反應實驗用)。

三、實驗方法

1. 對大鼠自發運動量之影響：

運動量之測定是使用「動物運動量測定裝置」(1-Opto-Varimex-3 Animal Activity Meter, USA)，記錄大鼠經口服給予不同劑量之天王補心湯五組藥才粗萃取物後之各種活動行為的變化 (包括垂直、水平走動，站立，及移動總距離等)。使用雄性大鼠，每組6隻。實驗分一次給藥組及一週長期給藥組，一次給藥組，於口服給藥55分鐘後放入此裝置內適應5分鐘，再開始記錄，觀察並連續記錄2小時。連續給藥組，於連續給藥一週之最後一次口服給藥後55分鐘，放入此裝置內適應5分鐘，再觀察並連續記錄2小時⁽¹³⁾。對照組均給予 vehicle。

2. 對大鼠電痛閾值之影響：

將大鼠置於「條件反應測定裝置」之儀器中，依序以列之電流 (0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mA)進行2秒鐘電刺激，並以15秒鐘依序提昇電流強度⁽¹⁴⁾，實驗分一次給藥組及一週長期給藥組，經口服給予雄性小鼠不同劑量之各組抽組後60分鐘，將大鼠置於儀器中，記錄大鼠跳躍或叫聲時之電流強度。每組8隻。對照組給予 vehicle。

3. 對大鼠避暗學習反應之影響：

本實驗是使用「條件反應測定裝置」(Muromachi Kikai Co. Ltd. Japan)，此裝置分成兩部份：實驗箱(Shuttle Box)係為一經中間閘門分隔為相同大小二室(48×20×30cm)的箱子及其控制器 (MCU-101 Controller, Muromachi Kikai Co. Ltd. Japan)；在實驗裝置處置上，於相同大小二室之其中一室上方置一20W之電燈泡，將相同大小二室區分為明暗二室，中以門閘控制；而於實驗步驟上，先將大鼠置入明室，同時開啓閘門，以大鼠在90秒內進入暗室者，供做本實驗。

訓練期：將篩選過之大鼠，置入明室，同時開啓閘門，待大鼠進入暗室後，關閉閘門，同時於底板通以電流(1mA, 2sec)，待電刺激後5秒，自暗室取出大鼠，歸回飼養籠。

測定期：於訓練後24小時，再將大鼠置入明室，同時並開啓閘門，記錄大鼠在明室之滯留時間(step-through latency, STL)。當於明室之滯留時間大於10分鐘(600秒)時，則稱大鼠之學習記憶能力正常⁽¹⁵⁾。

4. 對scopolamine誘發避暗學習反應障礙物質之影響：

實驗分一次給藥組及一週長期給藥組。一次給藥之各組萃取物，分別於訓練前60分鐘以不同劑量口服給予，再與誘發學習障礙物質Scopolamine HBr(1mg/kg, i.p.)於訓練前90分鐘給藥⁽¹⁶⁾併用，依前法，將大鼠放入明室，於進行訓練後，歸回飼養籠；待24小時後，再將大鼠置入明室，進行測定，記錄大鼠於明室之滯留時間。一週長期給藥之各組萃取物，則於最後一次口服給藥60分鐘進行訓練，且與下述之誘發學習障礙物質併用，依前法，將大鼠放入明室，於進行訓練後，歸回飼養籠；待24小時後，將大鼠再次置入明室，進行測定，記錄大鼠於明室之滯留時間。病理對照組給予下述之誘發學習記憶障礙物質。而空白對照組則給予 vehicle。

5. 對cycloheximide誘發避暗學習反應障礙物質之影響：

實驗分一次給藥組及一週長期給藥組。一次給藥之各組萃取物，分別於訓練前60分鐘以不同劑量口服給予，再與誘發學習障礙物質Cycloheximide (1.5mg/kg, i.p.)於訓練後立刻給藥⁽¹⁷⁾併用，依前法，將大鼠放入明室，於進行訓練後，歸回飼養籠；待24小時後，再將大鼠置入明室，進行測定，記錄大鼠於明室之滯留時間。一週長期給藥之各組萃取物，則於最後一次口服給藥60分鐘進行訓練，且與下述之誘發學習障礙物質併用，依前法，將大鼠放入明室，於進行訓練後，歸回飼養籠；待24小時後，將大鼠再次置入明室，進行測定，記錄大鼠於明室之滯留時間。病理對照組給予下述之誘發學習記憶障礙物質。而空白對照組則給予 vehicle。

本實驗所使用於探討大鼠學習記憶物質之劑量及時間爲：
scopolamine(0.3 mg/kg, i.p.)於訓練後立刻給藥⁽¹⁸⁾；8-OH-DPAT
(0.025 mg/kg, s.c.)於訓練後立刻給藥⁽¹⁸⁾；ritanserin(0.25 mg/kg
, i.p.)於訓練後立刻給藥⁽¹⁸⁾。

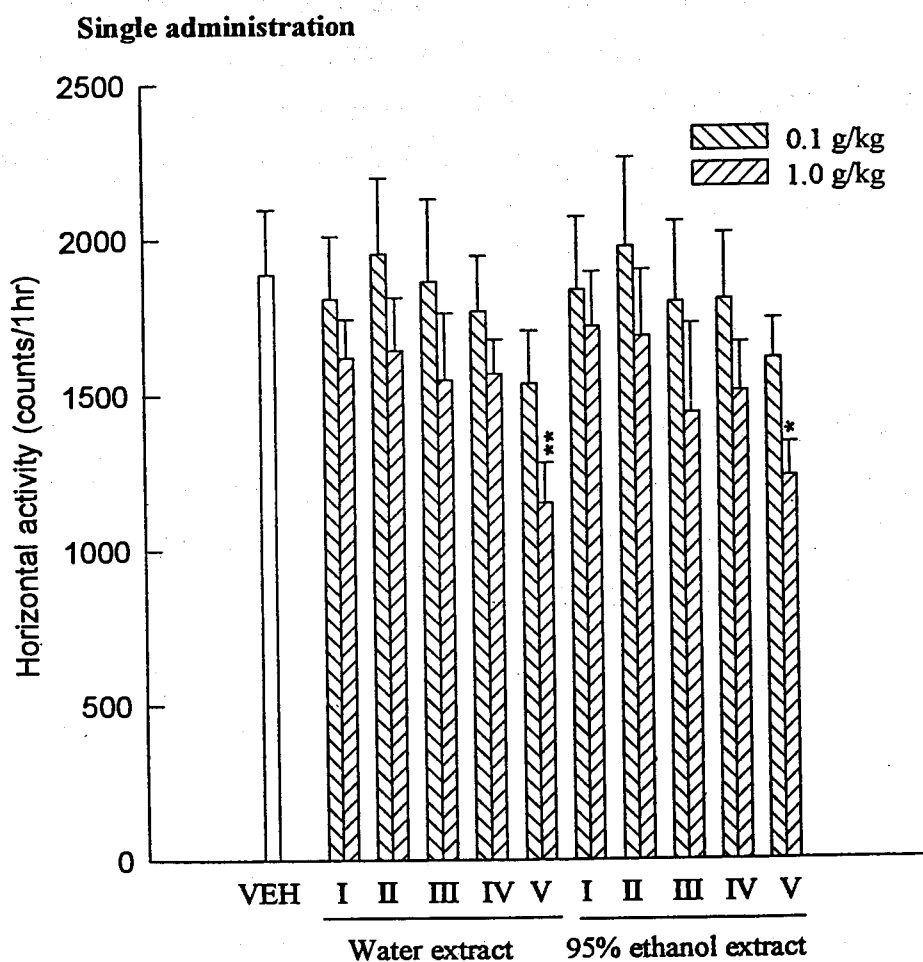
6. 統計學分析：

本實驗所得之數據，自發運動量實驗，均以one-way ANOVA分析其變異數，再以Duncan's multiple range test檢定，統計並分析其間差異之顯著性，凡 P值小於0.05以下時，則認爲有統計意義。而於單嚐試被動迴避反應實驗，則以non-parameter統計，並以Kruskal-Wallis單因子變異數分析檢定其間差異之顯著性，凡 P值小於0.05以下時，則認爲有統計意義。

結 果

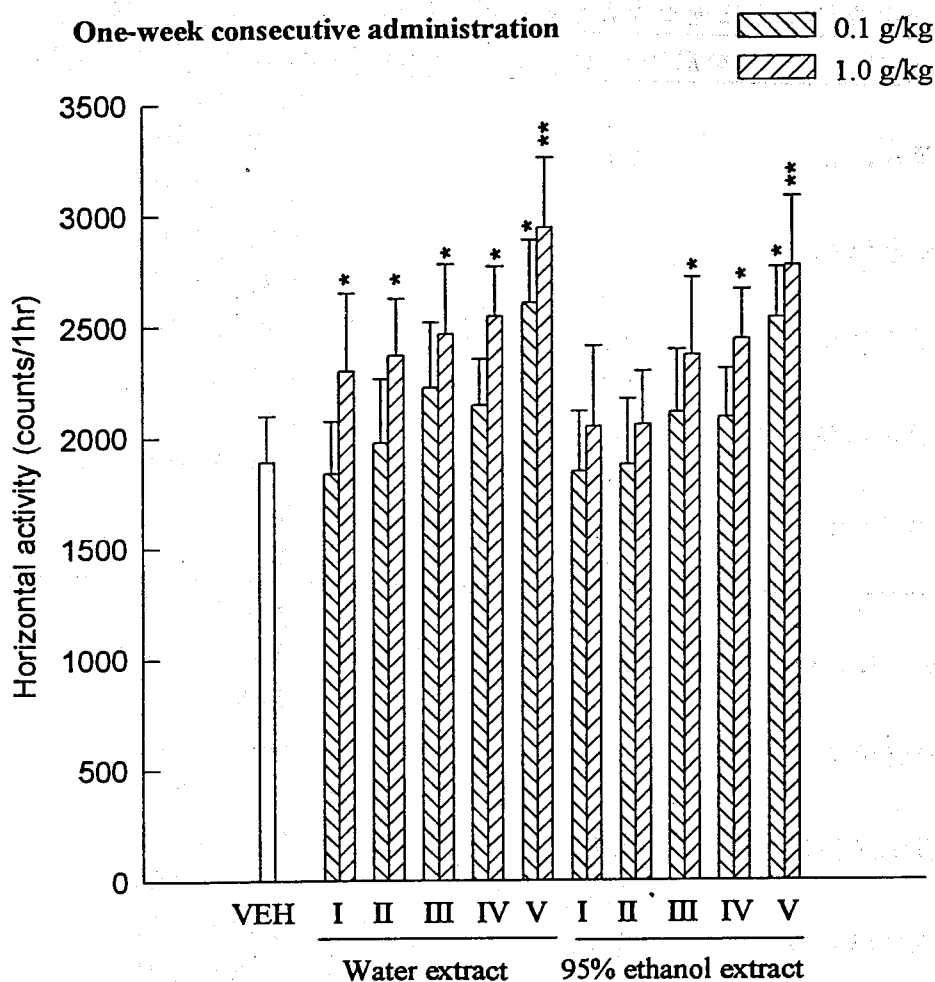
一、對大鼠自發運動量之影響

如圖一所示，天王補心湯各水抽組及酒精抽組於一次給藥後，僅天王補心湯全方之水抽組及酒精抽組，於1.0 g/kg之劑量下，可降低大鼠之自發運動量，且以全方水抽組之作用最佳。



圖一、一次給藥之天王補心湯各水抽組及酒精抽組對大鼠自發運動量之影響。I：君藥組、II：臣藥組、III：佐藥組、IV：使藥組、V：全方組。Data are represented as mean \pm S.E.M of six rats. ANOVA for repeated measures followed by Duncan's multiple range test. ** $p < 0.01$, as compared with the VEH group.

如圖二所示，天王補心湯各水抽組及酒精抽組於一週長期給藥後，於 1.0 g/kg 之劑量下，均可增加大鼠之自發運動量，其中以全方水抽組之作用最佳。



圖二、一週長期給藥之天王補心湯各水抽組及酒精抽組對大鼠自發運動量之影響
 I：君藥組、II：臣藥組、III：佐藥組、IV：使藥組、V：全方組。Data are represented as mean \pm S.E.M of six rats. ANOVA for repeated measures followed by Duncan's multiple range test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, as compared with the VEH group.

二、對大鼠電痛閾值之影響：

如表一所示，控制組之電痛閾值為 0.88 ± 0.01 ，天王補心湯各水抽組及酒精抽組於一次給藥後，並不影響之電痛閾值。

表一、一次給藥之天王補心湯各水抽組及酒精抽組對電痛閾值之影響

組別	口服劑量 (g/kg)	Jump / Vocalization Threshold (mA)
Control		0.88 ± 0.01
君藥水抽組	0.1	0.87 ± 0.01
	1.0	0.89 ± 0.01
臣藥水抽組	0.1	0.88 ± 0.01
	1.0	0.86 ± 0.01
佐藥水抽組	0.1	0.86 ± 0.01
	1.0	0.88 ± 0.01
使藥水抽組	0.1	0.89 ± 0.02
	1.0	0.88 ± 0.01
全方水抽組	0.1	0.87 ± 0.01
	1.0	0.88 ± 0.02
Control		0.88 ± 0.01
君藥酒精抽組	0.1	0.88 ± 0.02
	1.0	0.86 ± 0.02
臣藥酒精抽組	0.1	0.87 ± 0.02
	1.0	0.86 ± 0.01
佐藥酒精抽組	0.1	0.89 ± 0.03
	1.0	0.86 ± 0.02
使藥酒精抽組	0.1	0.87 ± 0.02
	1.0	0.88 ± 0.01
全方酒精抽組	0.1	0.89 ± 0.04
	1.0	0.86 ± 0.02

All data are described as mean \pm S.E.. N=8

如表二所示，控制組之電痛閾值為 0.88 ± 0.01 ，天王補心湯各水抽組及酒精抽組於一週長期給藥後，並不影響之電痛閾值。

表二、一週長期給藥之天王補心湯各水抽組及酒精抽組對電痛閾值之影響

組別	口服劑量 (g/kg)	Jump / Vocalization Threshold (mA)
Control		0.88 ± 0.01
君藥水抽組	0.1	0.87 ± 0.01
	1.0	0.89 ± 0.01
臣藥水抽組	0.1	0.88 ± 0.01
	1.0	0.86 ± 0.01
佐藥水抽組	0.1	0.86 ± 0.01
	1.0	0.88 ± 0.01
使藥水抽組	0.1	0.89 ± 0.02
	1.0	0.88 ± 0.01
全方水抽組	0.1	0.87 ± 0.01
	1.0	0.88 ± 0.02
Control		0.88 ± 0.01
君藥酒精抽組	0.1	0.86 ± 0.02
	1.0	0.88 ± 0.02
臣藥酒精抽組	0.1	0.86 ± 0.01
	1.0	0.86 ± 0.01
佐藥酒精抽組	0.1	0.86 ± 0.01
	1.0	0.88 ± 0.01
使藥酒精抽組	0.1	0.89 ± 0.02
	1.0	0.88 ± 0.01
全方酒精抽組	0.1	0.87 ± 0.01
	1.0	0.88 ± 0.02

All data are described as mean \pm S.E.. N=8

三、對scopolamine誘發避暗學習反應障礙物質之影響：

如表三所示，scopolamine (1 mg/kg, i.p.) 於訓練前30分鐘給藥，可縮短大鼠在明室之滯留時間，造成大鼠避暗學習反應障礙；當天王補心湯各水抽組及酒精抽組於一次給藥後，僅天王補心湯全方之水抽組及酒精抽組，可延長scopolamine所誘發大鼠在明室之滯留時間，且以全方水抽組之作用最佳。

表三、一次給藥之天王補心湯各水抽組及酒精抽組對scopolamine誘發大鼠單向抑制性被動避暗學習反應障礙之影響

組別	口服劑量 (g/kg)	明室滯留時間 (sec)
Control		>300
Scopolamine		10.8±2.5
君藥水抽組	0.1	12.4±1.5
	1.0	19.4±2.6
臣藥水抽組	0.1	16.3±2.0
	1.0	21.5±1.8
佐藥水抽組	0.1	12.8±2.6
	1.0	16.5±2.3
使藥水抽組	0.1	9.8±2.0
	1.0	12.7±2.5
全方水抽組	0.1	25.7±2.3
	1.0	46.4±4.2**
Control		>300
Scopolamine		10.8±2.5
君藥酒精抽組	0.1	11.8±2.3
	1.0	16.7±3.5
臣藥酒精抽組	0.1	14.6±2.7
	1.0	18.8±2.1
佐藥酒精抽組	0.1	10.9±3.1
	1.0	15.4±2.8
使藥酒精抽組	0.1	8.5±2.4
	1.0	11.4±3.4
全方酒精抽組	0.1	19.7±4.2
	1.0	32.7±5.6*

Values are expressed as mean±SEM for 12 rats.

*p < 0.05, compared with scopolamine group (Mann-Whitney U-test).

如表四所示，scopolamine (1 mg/kg, i.p.) 於訓練前30分鐘給藥，可縮短大鼠在明室之滯留時間，造成大鼠避暗學習反應障礙；當天王補心湯各水抽組及酒精抽組於每天一次連續一週長期給藥後，各組均可延長scopolamine所誘發大鼠在明室之滯留時間，且以天王補心湯全方之水抽組及酒精抽組較佳，其中又以全方水抽組之作用最佳。

表四、一週長期給藥之天王補心湯各水抽組及酒精抽組對scopolamine誘發大鼠單向抑制性被動避暗學習反應障礙之影響

組別	口服劑量 (g/kg)	明室滯留時間 (sec)
Control		>300
Scopolamine		15.4±3.3
君藥水抽組	0.1	48.3±5.4*
	1.0	67.6±9.1**
臣藥水抽組	0.1	57.2±8.5**
	1.0	87.4±12.7**
佐藥水抽組	0.1	43.7±7.8*
	1.0	73.8±8.4**
使藥水抽組	0.1	19.8±4.3
	1.0	27.3±6.4
全方水抽組	0.1	78.6±5.1**
	1.0	184.7±17.8***
Control		>300
Scopolamine		15.4±3.3
君藥酒精抽組	0.1	37.6±4.8*
	1.0	50.7±7.3**
臣藥酒精抽組	0.1	46.2±9.2*
	1.0	76.4±14.3**
佐藥酒精抽組	0.1	32.7±6.5*
	1.0	68.5±7.5**
使藥酒精抽組	0.1	15.3±5.7
	1.0	20.9±8.9
全方酒精抽組	0.1	67.2±6.8**
	1.0	147.6±15.4***

Values are expressed as mean±SEM for 12 rats.

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, compared with scopolamine group (Mann-Whitney U-test).

四、對cycloheximide誘發避暗學習反應障礙物質之影響：

如表五所示，cycloheximide (1.5 mg/kg, i.p.) 於訓練前30分鐘給藥，可縮短大鼠在明室之滯留時間，造成大鼠避暗學習反應障礙；當天王補心湯各水抽組及酒精抽組於一次給藥後，僅天王補心湯全方之水抽組及酒精抽組，可延長cycloheximide所誘發大鼠在明室之滯留時間，且以全方水抽組之作用最佳。

表五、一次給藥之天王補心湯各水抽組及酒精抽組對cycloheximide誘發大鼠單向抑制性被動避暗學習反應障礙之影響

組別	口服劑量 (g/kg)	明室滯留時間 (sec)
Control		>300
Cycloheximide		12.9±3.2
君藥水抽組	0.1	14.1±4.1
	1.0	19.6±4.5
臣藥水抽組	0.1	18.4±3.8
	1.0	23.4±5.2
佐藥水抽組	0.1	15.3±3.6
	1.0	20.8±6.3
使藥水抽組	0.1	11.7±2.6
	1.0	14.7±4.5
全方水抽組	0.1	29.7±6.4
	1.0	50.8±8.7**
Control		>300
Cycloheximide		12.9±3.2
君藥酒精抽組	0.1	13.4±3.7
	1.0	17.2±3.8
臣藥酒精抽組	0.1	16.8±4.5
	1.0	21.9±5.7
佐藥酒精抽組	0.1	12.5±2.7
	1.0	18.4±5.6
使藥酒精抽組	0.1	11.3±3.4
	1.0	15.6±4.1
全方酒精抽組	0.1	25.7±5.8
	1.0	42.9±7.4*

Values are expressed as mean±SEM for 12 rats.

*p < 0.05, **p < 0.01, compared with cycloheximide group (Mann-Whitney U-test).

如表六所示，cycloheximide (1.5 mg/kg, i.p.) 於訓練前30分鐘給藥，可縮短大鼠在明室之滯留時間，造成大鼠避暗學習反應障礙；當天王補心湯各水抽組及酒精抽組於每天一次連續一週長期給藥後，各組均可延長cycloheximide所誘發大鼠在明室之滯留時間，且以天王補心湯全方之水抽組及酒精抽組較佳，其中又以全方水抽組之作用最佳。

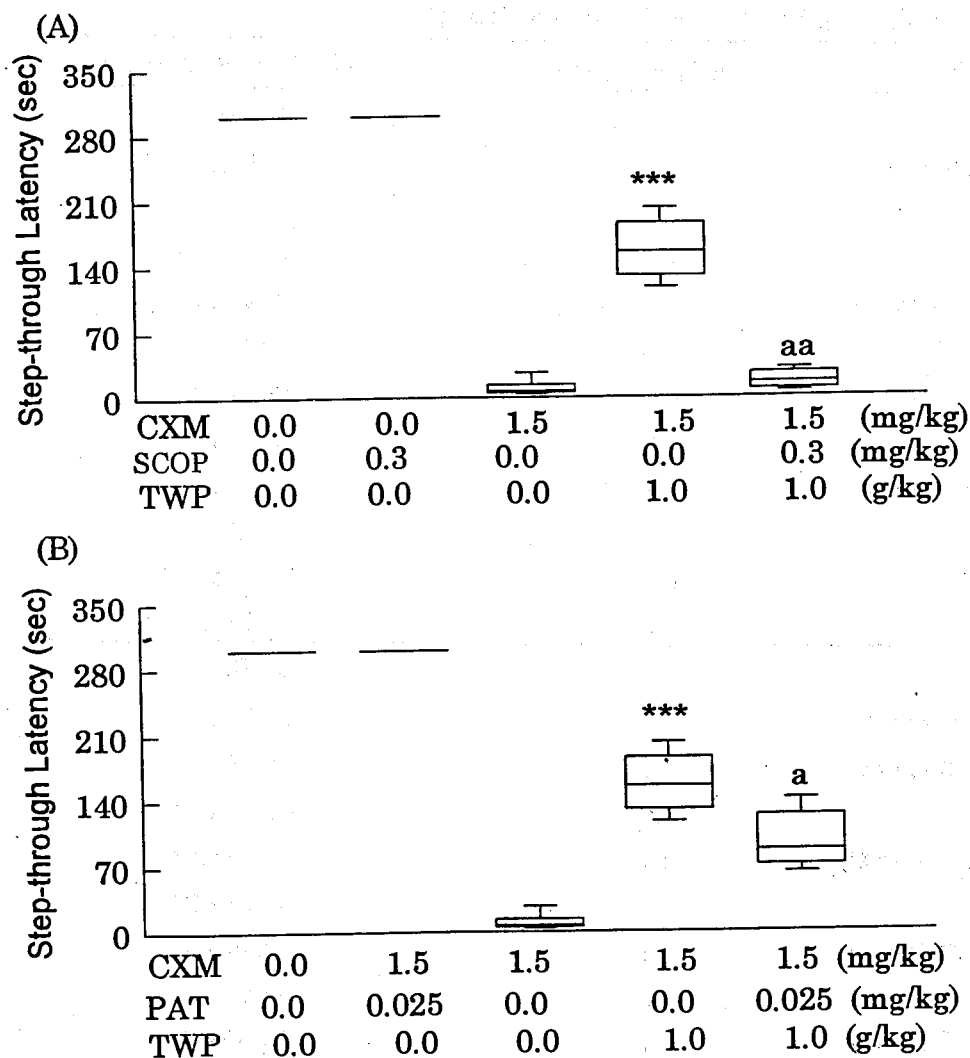
表六、一週長期給藥之天王補心湯各水抽組及酒精抽組對cycloheximide誘發大鼠單向抑制性被動避暗學習反應障礙之影響

組別	口服劑量 (g/kg)	明室滯留時間 (sec)
Control		>300
Cycloheximide		12.8±2.6
君藥水抽組	0.1	35.7±4.2*
	1.0	52.4±5.2**
臣藥水抽組	0.1	48.9±6.8*
	1.0	72.4±9.7**
佐藥水抽組	0.1	38.2±5.1*
	1.0	66.6±8.1**
使藥水抽組	0.1	11.7±2.6
	1.0	14.7±4.5
全方水抽組	0.1	75.8±5.7**
	1.0	162.7±15.9***
Control		>300
Cycloheximide		12.8±2.6
君藥酒精抽組	0.1	28.9±6.6
	1.0	47.6±4.5*
臣藥酒精抽組	0.1	36.7±5.8*
	1.0	60.8±7.9**
佐藥酒精抽組	0.1	27.4±6.3
	1.0	54.9±7.2**
使藥酒精抽組	0.1	14.6±3.8
	1.0	19.8±5.7
全方酒精抽組	0.1	57.4±6.7**
	1.0	127.8±14.9***

Values are expressed as mean±SEM for 12 rats.

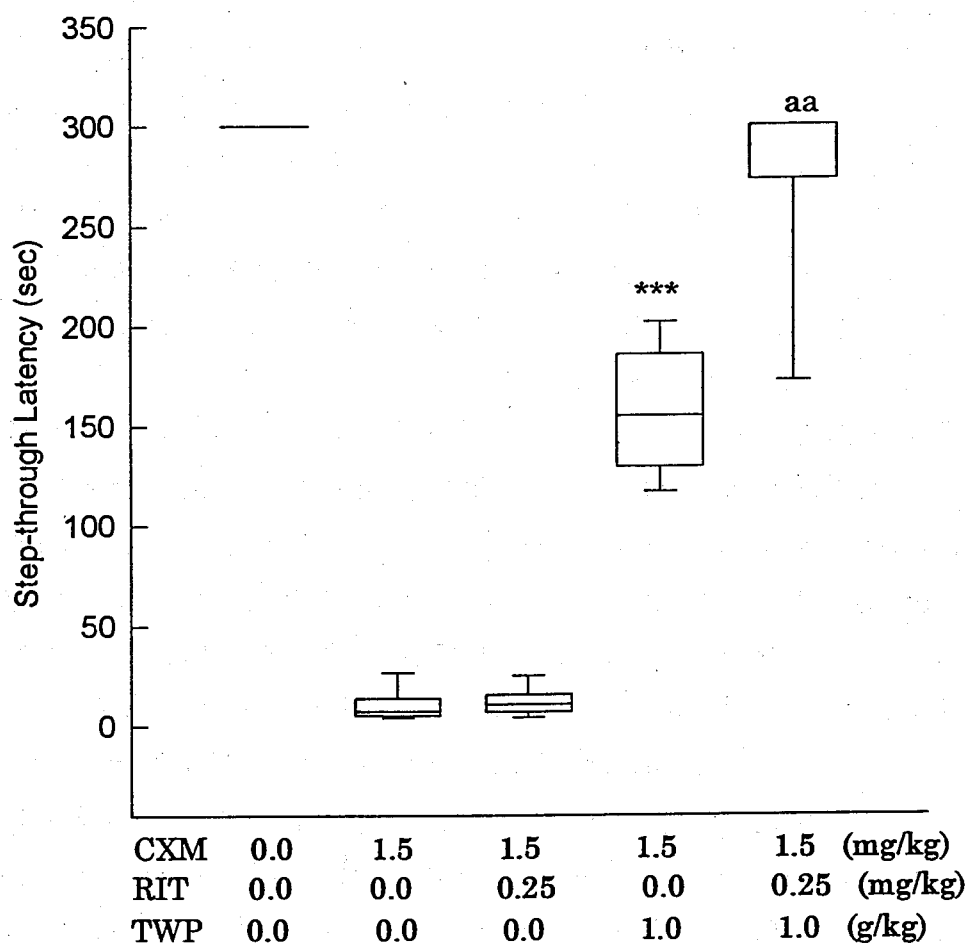
*p < 0.05, **p < 0.01, ***p<0.001, compared with cycloheximide group (Mann-Whitney U-test).

如圖三所示，cycloheximide (1.5 mg/kg, s.c.) 於訓練後立刻給藥，可縮短大鼠在明室之滯留時間，造成大鼠避暗學習反應障礙；天王補心湯全方水抽組於1.0 g/kg，可延長cycloheximide所誘發大鼠在明室之滯留時間，此作用可被scopolamine (0.3 mg/kg, i.p.) 及8-OH-DPAT (0.025mg/kg, i.p.) 訓練後立刻給藥所拮抗。



圖三、Scopolamine (SCOP) 及 8-OH-DPAT (PAT) 對一週長期給藥後天王補心湯全方水抽組 (TWP) 改善 cycloheximide (CXM) 誘發大鼠單向抑制性被動避暗學習反應障礙作用之影響。Each column and figures are the medians and range of 12-18 rats. *** $p < 0.001$ compared with cycloheximide group. aa $p < 0.01$ compared with CXM in combination with TWP group.

如圖四所示，cycloheximide (1.5 mg/kg, s.c.) 於訓練後立刻給藥，可縮短大鼠在明室之滯留時間，造成大鼠避暗學習反應障礙；天王補心湯全方水抽組於1.0 g/kg，可延長cycloheximide所誘發大鼠在明室之滯留時間，此作用可被ritanserine (0.25mg/kg, i.p.) 訓練後立刻給藥所增強。



圖四、Ritanserine (RIN) 對一週長期給藥後天王補心湯全方水抽組 (TWP) 改善 cycloheximide (CXM) 誘發大鼠單向抑制性被動避暗學習反應障礙作用之影響。Each column and figures are the medians and range of 12-18 rats. *** $p < 0.001$ compared with cycloheximide group. aa $p < 0.01$ compared with CXM in combination with TWP group.

討 論

就中醫所言『心』也者，君子之官也，神明出焉，思慮過度，耗其心血，則神明傷而成心勞，故怔忡健忘也；相較於現今，即西醫所說之腦。天王補心丹屬中醫之補養方劑，本方因終南宣律師課誦勞心，夢天王授以此方故名，主以滋心陰、養心血、補心氣及安心神為主，主治「思慮過度，心血不足，怔忡健忘，心口多汗，大便或秘或溏，口舌生瘡等證」，方由人參、元參、丹參、茯苓、酸棗仁、遠志、柏子仁、天門冬、麥門冬、生地黃、桔梗、當歸及五味子等十三味藥所組成⁽¹²⁾；方中以生地、玄參、麥冬及天冬滋陰制火為君，人參及當歸補益氣血為臣，棗仁、柏子仁、丹參、茯苓、遠志、五味子及硃砂養血斂心、鎮心安神為佐；桔梗載藥入心為使。因此，本研究將天王補心湯分為君藥(生地、玄參、麥冬及天冬)組，臣藥(人參及當歸)組，佐藥(棗仁、柏子仁、丹參、茯苓、遠志、五味子及硃砂)組，使藥(桔梗)組及全方組等五組，來探討天王補心丹方劑組成與主治間之關連性。

學習記憶與腦內神經傳遞物質之關係，於1970年至1994年之藥理、生理、生化等之研究，綜合其研究結果指出記憶之形成，大致可分成三個階段，即學習獲取(acquisition)、記憶鞏固(consolidation)及記憶再現(retrieval)⁽¹⁾。自1971年 Deutsh J.A.之研究報告指出，於學習後，cholinergic突觸後之細胞膜對acetylcholine之敏感性增加，因而導致記憶形成；但當敏感性降低或受阻礙時，便發生健忘之現象⁽³⁾；由此確立了cholinergic system在學習記憶形成過程中，確實扮演著重要的角色。於近幾年來更進一步研究cholinergic system之致效劑及抑制劑對學習記憶之影響，發現其致效劑arecoline及前驅物choline、lecithin均可增強學習記憶，而其抑制劑scopolamine則有阻礙學習記憶之作用⁽⁴⁾；在學習記憶形成階段及記憶時期之影響，於近幾年之研究顯示，其影響主要在學習獲取階段^{(5)、(6)}。一次給藥之天王補心丹各組，對scopolamine誘發之學習獲得障礙，僅天王補心丹全方組之水粗抽組及95%酒精粗抽組具改善作用，且以水粗抽組較佳；一週連續給藥之天王補

心丹各組在大劑量時，對scopolamine誘發之學習獲得障礙均具改善作用，其中以天王補心丹全方組之水粗抽組較為明顯。

其次，在記憶之鞏固及長期記憶之形成上，蛋白質合成為一必需之因素，因此蛋白質合成抑制劑如cycloheximide、anisomycin、puromycin等均能造成記憶鞏固損害現象，故使用蛋白質合成抑制劑cycloheximide誘發記憶鞏固障礙⁽¹⁷⁾。一次給藥之天王補心丹各組，對cycloheximide誘發之記憶鞏固障礙，僅天王補心丹全方組之水粗抽組及95%酒精粗抽組具改善作用，且以水粗抽組較佳；一週連續給藥之天王補心丹各組在大劑量時，對cycloheximide誘發之記憶鞏固障礙均具改善作用，其中以全方之水粗抽組較為明顯。據研究報告指出，cycloheximide對記憶鞏固之阻礙作用，可能為cholinergic neurons與5-HT₂ receptor之聯結作用⁽¹⁸⁾；另5-HT_{1A} receptor之致效劑8-OH-DPAT可誘發學習記憶障礙，因此繼續探討天王補心丹全方之水粗抽組改善cycloheximide誘發記憶鞏固障礙之作用機轉。發現全方之水粗抽組改善cycloheximide誘發記憶鞏固障礙之作用，可被scopolamine及8-OHDA所拮抗，為ritanserin所增強。由以上之結果顯示，其作用機轉可能因直接增強中樞cholinergic system及降低中樞serotonergic system活性。

最後，因在單向被動迴避學習反應中，大鼠之行爲如運動量、痛覺等均會影響大鼠之操作及實驗結果之評估，故繼續進行大鼠自發運動量及電痛閾值之實驗。在大鼠自發運動量上，一次給藥後天王補心丹全方之水粗抽組及95%酒精粗抽組具降低大鼠自發運動量之作用，顯示天王補心丹全方之水粗抽組及95%酒精粗抽組改善學習記憶障礙之作用，部份可能因天王補心丹全方之鎮靜作用所致；至於一週連續給藥後天王補心丹全方之水粗抽組及95%酒精粗抽組具增加大鼠自發運動量之作用。至於在電痛閾值實驗上，天王補心丹全方之水粗抽組及95%酒精粗抽組一次給藥或一週連續給藥對電痛閾值均不影響。

綜合研究結果，顯示天王補心丹全方組之水粗抽組及95%酒精粗抽組，在一次給藥後，具改善學習記憶作用，且以水粗抽者較佳，而其改善學習記憶部份因鎮靜之作用所致；一週連續給藥後，各組在大劑量下

對於學習獲得及記憶鞏固障礙均有明顯之改善作用。而其改善學習記憶障礙之作用機轉可能與增強中樞 cholinergic system之活性及protein synthesis、降低serotonergic system之活性有關。其次，在衛生署經費補助下，從事一系列方劑對於學習記憶之影響：歸脾湯針對記憶鞏固之作用較佳，適用於各種原因之癡呆症，特別是血循環不良而致之記憶鞏固不佳者⁽¹⁹⁾。而補中益氣湯針對學習獲得之作用較佳，適用於阿耳滋海默氏症，特別是胃腸吸收不良而致之虛弱、注意力差、學習能力不佳者⁽²⁰⁾。天王補心丹則對學習獲得障礙及記憶鞏固均佳。而上述之結果仍有待將來臨床評估，以便印證與運用。

結論與建議

- 一、天王補心丹以生地、玄參、麥冬及天冬為君，人參及當歸為臣，棗仁、柏子仁、丹參、茯苓、遠志、五味子為佐：桔梗為使。本研究發現在改善scopolamine及cycloheximide誘發學習記憶障礙之作用上，均以全方組之效果較佳，顯示天王補心丹確有其組方之意義存在。
- 二、天王補心丹全方改善scopolamine及cycloheximide誘發學習記憶障礙之作用，均以水抽取之效果較佳。
- 三、天王補心丹改善scopolamine及cycloheximide誘發學習記憶障礙之作用，一週連續給藥之效果較一次給藥為佳。
- 四、天王補心丹全方，在一次給藥，具改善學習記憶作用，而此部份與鎮靜作用有關。
- 五、天王補心丹全方，一週連續給藥，明顯改善學習獲得及記憶鞏固障礙。而其改善學習記憶障礙之作用機轉可能與增強中樞cholinergic system之活性及protein synthesis、降低serotonergic system之活性有關。
- 六、天王補心丹組方確有其實質之意義存在，全方以水抽取效果較佳；口服後，一次給藥具鎮靜作用；一週連續給藥明顯改善學習獲得及

記憶鞏固障礙，顯示可用於失眠及防治學習記憶障礙、老年癡呆症。其作用機轉可能與增強中樞cholinergic system之活性及protein synthesis、降低serotonergic system之活性有關。

七、在衛生署經費補助下，從事一系列方劑對於學習記憶之影響歸脾湯針對記憶鞏固之作用較佳，適用於各種原因之癡呆症，特別是血循環不良而致之記憶鞏固不佳者。而補中益氣湯針對學習獲得之作用較佳，適用於阿耳滋海默氏症，特別是胃腸吸收不良而致之虛弱、注意力差、學習能力不佳者。天王補心丹則對學習獲得障礙及記憶鞏固均佳。

參考文獻

1. Rosenzweig M, Bennett EL: Modulation of memory: Basic processes and modulatory influences in the stages of memory formation. In: Lynch G, McGaugh JL, Weinberger NM, eds. Neurobiology of learning and memory, New York, Guilford publishing, 1984: 263-89.
2. Graham RB: Memory: The physiological basis of long-term memory. In: Physiological psychology. California, Wadworth publishing Co., 1990: 614-31.
3. Deutsh JA: The cholinergic synapse and the site of memory. Science 1971; 174: 788-94.
4. Elrod K, Buccafusco JJ: An evaluation of the mechanism of scopolamine-induced impairment in two passive avoidance protocols. Pharmacol Biochem Behav 1988; 29: 15-21.
5. Drachman DA, Leavitt J: Human memory and the cholinergic system. Arch Neurol 1974; 30: 113-21.
6. Sprits AM: Mechanisms of memory disturbance during stages of memory acquisition and fixation. Neurosci Behav Physiol

1989

7. Flood JF, Landry DW, Jarvik ME: Cholinergic receptor interactions and their effects on long-term memory processing. *Brain Res* 1981; 215: 177-85.
8. Tomlison BE, Irving D, Blessed G: Cell loss in the locus coeruleus in senile dementia of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1981; 49: 419-28.
9. Kesner RP: Reevaluation of the contribution of basal forebrain cholinergic system to memory. *Neurobiol Aging* 1988; 9: 609-16.
10. Robinson SE: Effect of specific serotonergic lesions on cholinergic neurons in the hippocampus, cortex and striatum. *Life Sci* 1983; 32: 345-353.
11. Preston J, Johnson J: *Clinical Psychopharmacology made Radiculously Simple*. Miami, MedMaster, Inc., 1992; 128-41.
12. 清·汪昂：醫方集解，台中，昭人出版社，1988，13-4。
13. Itoh T, Murai S, Yoshida Y, Asito H, Ching HC: Effects of methamphetamine and morphine on the vertical and horizontal motor activities in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1987; 27: 139-97.
14. Ichihara K, Nabeshima T, Kameyama T: Opposite effects induced by low and high doses of apomorphine on single-trial passive avoidance learning in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1988; 30: 107-13.
15. Worms P, Gueudet C, P'erio A, Soubri'e P: Systemic injection of pirenzepine induces a deficit in passive avoidance learning in rats. *Psychopharmacology* 1989; 98: 286-8.
16. Decker MW, Tran T, McGaugh JL: A comparison of the effects of scopolamine and diazepam on acquisition and retention of

- inhibitory avoidance in mice. *Psychopharmacology* 1990; 100: 515-21.
17. Davis HP, Squire LR: Protein synthesis and memory: A review. *Psychol Bull* 1984; 96: 518-59.
 18. Nabeshima T, Itoh K, Kawashima K, Kameyama T: Effects of 5-HT₂ receptor antagonist on cycloheximide-induced amnesia in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1989; 32: 787-90.
 19. Hsieh MT, Wu CR, Tsai HY, Peng WH, Hsieh CC: Effects of Gui-Pi-Tang on passive avoidance learning in rats. *Chin Med Coll J* 1994; 3(1): 15-24.
 20. 謝明村、孫樂珊、彭文煌：補中益氣湯對單向抑制性被動避暗學習反應之影響。八十四年度行政院衛生署科技發展研究報告。

臺灣市售防己、牛膝類藥材及其製劑之研究

Studies on Fan-Chi and Niu-Chi Radix and Their Preparations

中國醫藥學院

張 永 勳

中文摘要

近年來政府積極推行中藥GMP政策，以提高中藥及中藥製劑水準。然而有些中藥材之基原頗為複雜，商品名稱及來源亦很混亂，且常有代用品或膺偽品充斥其間，因此有必要對基原較複雜之藥材加以釐清。本研究就臺灣市售防己、牛膝類藥材及其製劑進行調查研究。各類藥材作本草考察，收集臺灣市場品及臺灣同屬植物標本，進行形態學及顯微鑑別，並就臺灣市售含防己、牛膝濃縮成方中所用防己及牛膝種類加以鑑別，進一步評估各種防己、牛膝市場品之藥理活性，以作為品質鑑別之依據。

實驗結果顯示，廣防己、木防己、粉防己及青藤可由其顯微特徵加以區別；台灣市售含防己類成方濃縮中藥所用的大部分為廣防己，僅兩家改用粉防己。鎮痛試驗中，以廣防己之鎮痛效果最好；在大鼠足蹠試驗中，以粉防己的抗浮腫效果最好；在利尿試驗方面，各種防己對正常大鼠並無明顯的利尿效果。臨床上可參考此結果，分別選用。

臺灣市售之牛膝類藥材根據生藥組織鑑定得知，懷牛膝的基原為莧

科 (Amaranthaceae)植物牛膝(*Achyranthes bidentata* Blume)之乾燥根；川牛膝的基原應為莧科植物川牛膝(*Cyathula officinalis* Kuan)之乾燥根，然而臺灣中藥店使用量最大，市售稱川牛膝的藥材，經由生藥組織鑑定證明，並非大陸藥典所記載之川牛膝，而是爵床科(*Acanthaceae*)腺毛馬藍(*Strobilanthes forrestii* Diels)之乾燥根及根莖，又稱為味牛膝，大陸上鮮少使用；而臺灣市面上極少使用，市售稱杜牛膝者，基原才是川牛膝(*Cyathula officinalis* Kuan)之乾燥根。在一般中藥房所買到的牛膝大部分為味牛膝，市售濃縮成方製劑中所用的牛膝種類以化學鑑別的結果顯示，絕大部分也用味牛膝，應加以改正。

本研究以比較生藥學之方法，綜合利用形態鑑別法、顯微鑑別、化學鑑別及藥理活性評估，對市售防己及牛膝類藥材做合理評估。

ABSTRACT

In recent years, the Chinese Government implemented GMP policies to elevate the quality standard of the Chinese crude drug preparations. However, the names and origins of some crude drugs are confusing. Substitution and adulteration are very common. Therefore, it is essential to clarify the origins of those confused drugs. This study investigated Fang-Chi and Niu-Chi Radix and the preparations containing those two herbs. Pentsaological survey of the two herbs, collection of commercially available samples and native species of Fang-Chi and Niu-Chi, microscopic examination of the specimen, identification of specific species used in extracted preparations, and pharmacological activities of those species were performed.

Four species of Fan-Chi, namely, Kwang-Fan-Chi, Mu-Fan-Chi, Fen-Fan-Chi and Ching-Teng can be distinguished microscopically. The Fang-Chi used in most extracted preparations was Kwang-Fan-

Chi. Two companies had switched to Fen-fan- Chi recently. Kwang -Fan-Chi showed significant analgesic effect whilst fen-fan-Chi showed antiinflammatory effect. Neither species of Fang-Chi showed diuretic effect. Huai-Niu-Chi was identifies as *Achyranthes bidentata*, Chuan-Niu-Chi was identified as *Cyathula officinalis*. Both were from *Amaranthaceae* family. However, the Chuan-Niu-Chi sold in Taiwan was not *Cyathula* species. It was identified as *Strobilanthes forrestii* of *Acanthaceae* family. This species was not used in Mainland China. The Niu-Chi used in extracted preparations was found to be *Stobilanthes* species also. Misuse of Chuan-Niu-Chi should be corrected to assure the clinical efficacy.

This study utilize comparative pharmacognosy method which combine morphological identification, microscopical method, chemical method and pharmacological methods to evaluate the quality of Fan-Chi and Niu-Chi.

Key words: Fan-Chi, Niu-Chi, Commercial species, Microscopic examination, Chemical identification, Unification of the species used in prescription.

前 言

爲提昇國內中藥及中藥製劑之品質，確保全民健康，政府數年來積極推動中藥GMP計畫。也由於政府對中醫藥之重視，於民國七十二年七月起試辦中醫勞保，七十七年三月起試辦中醫公保，中醫農保也隨後進行。由於中醫公、勞、農保醫療院所之大量需求與開放，使得中藥，特別是濃縮中藥市場之需求，急劇增加，對這類中藥製劑之品管要求也日益迫切。

迫切。

我國即將邁入高齡化社會之際，又伴隨全民健康保險的實施，醫療資源的開發與利用已到了刻不容緩的程度，爲了能符合社會福利國家的標準，使幼有所養、壯有所用、老有所終，就近從我國傳承數千年，汗牛充棟的傳統醫藥資源中，去開發，去利用，則不失爲一條捷徑。

有些中藥材之基原頗爲複雜，商品名稱及來源亦很混亂，且常有代用品或膺僞品充斥其間，因而造成中毒或誤用的情形發生，因此有必要對基原較複雜之藥材加以釐清。

目前市售各種中藥製劑大都依中醫古籍之固有成方爲依據，然而所依據之醫書不同，同一方名處方組成及主治往往有很大差異，衛生署有鑑於此，於最近擬出中藥標準方198個；但是標準處方中之組成藥材，常因市場品之不同，而影響該方之療效主治，因此也有必要加以統一。本年度計畫中的防己及牛膝類藥材即爲其中的例子。

1993年2月13日比利時Jean-Louis Vanherweghem教授曾在The Lancet發表一篇關於因食用減肥藥而造成多位婦人發生腎衰竭的病例。根據調查，此種減肥藥中含有中藥"防己"，且其爲致病的原因，但防己的基原根據文獻記載有防己科 (Menispermaceae)植物粉防己 (*Stephania tetrandra* S. Moore)、木防己 (*Cocculus trilobus* D.C.)、防己 (*Sinomenium acutum* Rehd.)之根或根莖，及馬兜鈴科 (Aristolochiaceae)植物廣防己 (*Aristolochia fangchi* Wu)、漢中防己 (*Aristolochia heterophylla* Hemsl.)之根部，而此減肥藥中所含之防己究竟爲何種防己？目前尚未確定，但有鑑於此事件，且爲了全民之用藥安全，故本計畫就臺灣市售防己類藥材及其製劑進行調查研究，並作市售各種防己類藥材活性比較，同時對含防己之方劑處方該選用何種防己加以建議，以符合衛生署建立標準方之用意。

臺灣市售牛膝類藥材種類眾多，常見的商品名稱有懷牛膝、川牛膝、杜牛膝、土牛膝等，但是根據文獻調查，牛膝的基原應爲莧科 (Amaranthaceae)植物牛膝 (*Achyranthes bidentata* Bl.)之乾燥根，川牛膝的基原應爲莧科 (Amaranthaceae)植物川牛膝 (*Cyathula officinalis*

Kuan.)之乾燥根；然而臺灣市售所稱之川牛膝並非大陸藥典記載川牛膝(*Cyathula officinalis* Kuan.)的正品，而是另有其物，因而本計畫就臺灣市售牛膝類藥材、臺灣本產牛膝類植物加以探討比較，並對含牛膝類藥材之固有成方中所用牛膝之種類加以建議，以求統一。

實驗結果顯示，廣防己、木防己、粉防己及青藤可由其顯微特徵加以區別；台灣市售含防己類成方濃縮中藥所用的大部分為廣防己，僅兩家改用粉防己。鎮痛試驗中，以廣防己之鎮痛效果最好；在大鼠足蹠試驗中，以粉防己的抗浮腫效果最好；在利尿試驗方面，各種防己對正常大鼠並無明顯的利尿效果。臨床上可參考此結果，分別選用。

臺灣市售之牛膝類藥材根據生藥組織鑑定得知，懷牛膝的基原為莧科(*Amaranthaceae*)植物牛膝(*Achyranthes bidentata* BLUME)之乾燥根；川牛膝的基原應為莧科植物川牛膝(*Cyathula officinalis* Kuan)之乾燥根，然而臺灣中藥店使用量最大，市售稱川牛膝的藥材，經由生藥組織鑑定證明，並非大陸藥典所記載之川牛膝，而是爵床科(*Acanthaceae*)腺毛馬藍(*Strobilanthes forrestii* Diels)之乾燥根及根莖，又稱為味牛膝，大陸上鮮少使用；而臺灣市面上極少使用，市售稱杜牛膝者，基原才是川牛膝(*Cyathula officinalis* Kuan)之乾燥根。在一般中藥房所買到的牛膝大部分為味牛膝，市售濃縮成方製劑中所用的牛膝種類以化學鑑別的結果顯示，絕大部分也用味牛膝，應加以改正。

本研究以比較生藥學之方法，綜合利用形態鑑別法、顯微鑑別、化學鑑別及藥理活性評估，對市售防己及牛膝類藥材做合理評估

第一部分 防 己

第一章 緒 言

防己(*Fangchi Radix*)，始載於神農本草經，列為中品⁽¹⁾，自唐、甄權藥性論即分為漢防己、木防己兩種⁽²⁾，具有利水消腫、祛風止痛的功效，主治水腫風腫、淋病、小便不利、風濕痹痛、腳氣濕腫、手足攣痛等

症⁽³⁾⁽⁴⁾。

漢防己，在我國除了使用馬兜鈴科(Aristolochiaceae)植物漢中防己(異葉馬兜鈴)*Aristolochia heterophylla* Hemsl.之根部外，尚使用防己科(Menispermaceae)植物粉防己*Stephania tetrandra* S. Moore，青藤*Sinomenium acutum* Rehd. et Wils.之根或根莖。木防己則曾使用馬兜鈴科植物廣防己*Aristolochia fangchi* Wu.及防己科植物木防己*Cocculus trilobus* DC.之根部，其他尚有許多替代品或膺偽品充斥其間，極為混亂⁽⁵⁾。

我國歷代醫家所使用的方劑，如防己茯苓湯(金匱要略)、防己黃耆湯(金匱要略)、防己飲(朱丹溪)等，雖有防己之名卻未具體指出使用何種防己⁽⁶⁾，令人存疑而無所適從；而防己的名稱及來源頗為混淆，其成分、藥效也不相同，故確定方劑中防己所應使用的藥材，才能確保中藥療效，保障用藥品質。

西元1993年2月13日，根據比利時Jean-Louis Vanherneghem教授在The Lancet發表的文章，指出一種含有防己成分的減肥藥處方，曾造成多位婦人腎衰竭的病例⁽⁷⁾。經研究指出，此防己為致病原因，但究竟此防己為馬兜鈴科或防己科，抑或是其他膺偽品，則尚無定論。而在台灣是否有民眾因為服用防己而造成慢性腎衰竭呢？仍舊是未知之數，故釐清有毒的防己類藥材以保護全民健康，實在是刻不容緩的事，值得我們去探究。

有鑑於此，本研究乃先進行本草學考察，以闡明防己藥材的歷史演變，考證歷代諸醫家所使用的藥材，並參閱近代藥用植物及生藥學文獻，將蒐集藥材及原植物樣品，以埋蠟切片法製成切片，利用顯微鏡觀察組織形態之差異，以確定其基原，進而以薄層層析法鑑定市售濃縮中藥方劑，並以藥理學觀點確立以防己配伍的方劑中所應使用的防己藥材，以提供醫藥業者及進一步研究之參考。

第二章 總 論

第一節 防己類藥材之本草學考察

防己始載於神農本草經，列爲中品，記有：“味辛平，主風寒溫瘧，熱氣諸癰，除邪，利大小便，一名解離，生川谷”⁽¹⁾，爾後別錄⁽⁸⁾、陶注⁽⁹⁾、新修⁽⁹⁾、嘉祐⁽¹⁰⁾、證類⁽¹¹⁾、綱目⁽¹²⁾、圖考⁽¹²⁾等古來之本草文獻均有著錄，其本草系統如 圖2-1：⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾

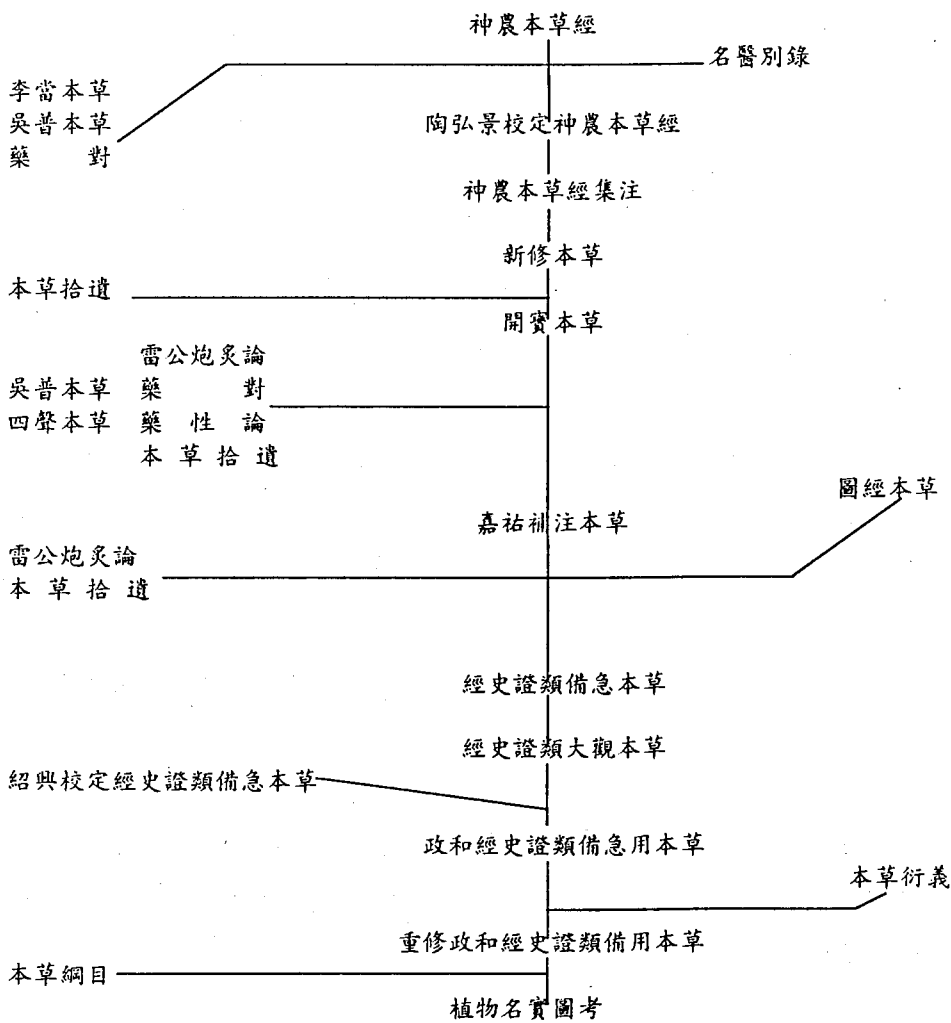


圖 2-1 防己之本草系統圖

一、藥名之考訂：

神農本草經：「防己，一名解離。」⁽⁹⁾吳普本草：「防己，一名解燕。」⁽¹⁰⁾御覽引本草經「一名石解。」⁽¹⁾綱目：「一名石解。」防己之異名除了石解、解離、解燕，尚有房苑、房慈、載君行(新本草綱目)等名稱⁽⁶⁾。

防己原名防已，後誤作防己⁽¹³⁾，歷代本草對“防己”名稱的寫法不一，神農本草經由於版本不同，有作防己者，也有作防已者或防巳者，本草經集注敦煌石室藏六朝寫本存序錄及其影印本，其中多處寫法均作“防巳”。唐、甄權藥性論作“防巳”，孫思邈千金翼方處方中藥名作“防巳”，證類本草作“防巳”，元湯液本草作防巳，本草綱目金陵本藥圖之名作“防巳”，本草原始作“防巳”，清本草備要、本經逢原、本草求真和植物名實圖考均作防己⁽¹³⁾。

故可知本經原名防已，而後唐宋諸家本草仍以防已爲名，但自綱目後，誤寫爲防己，承誤日久，習以爲常，就延用至今了。本草綱目李時珍曰：『按東垣李杲云「防己如險健之人，幸災樂禍，能首爲亂階，若善用之，亦可禦敵。」其名或取此義，解離因其紋解也。』且根據說文對“巳”字解釋道：“巳爲蛇，象形”。己無可防，巳乃我國十二生肖的蛇，且本科植物多爲蛇藥，如石蟾蜍(*Stephania tetrandra*)、蒼白秤鉤風(*Diploclisia chinensis*)等能治毒蛇咬傷，故應將防己改爲防巳，方爲合理⁽¹⁴⁾。

神農本草經曰：「防己，一名解離，生川谷。」⁽¹⁾魏、名醫別錄曰：「文如車輻理解者良，生漢中川谷，二月八月採根，陰乾。」⁽⁸⁾范子計然云：「防己，出漢中，旬陽。」⁽¹⁾吳普曰：「木防己，一名解離，一名解燕。如芍莖蔓延，如白根外黃，似桔梗內黑，又如車輻解。二月、八月、十月採根。」李當曰：「其莖如葛蔓延，其根外白內黃，如桔梗，內有黑紋，如車輻解者，良。」⁽²⁾根據以上的文獻，可知我國最早使用的防己，一名解離，又名木防己，產於漢中川谷，藥用部位爲根，且具有外白內黃如桔梗，內有黑紋如車輻解的特徵。故可以推斷此種防己係指馬兜鈴科(*Aristolochiaceae*)植物的漢中防己(*Aristolochia*

heterophylla), 亦即異葉馬兜鈴。而宋、蘇頌圖經本草更補充其形態曰：「防己生漢中川谷，今黔中亦有之。但漢中出者，破之文作車輻解，黃實而香，莖梗甚嫩，苗葉小類牽牛，折其莖，一頭吹之，氣從中貫，如木通類。它處者青白虛軟，又有腥氣，皮皴上有丁足子，名木防己……今雖不入藥，而古方通用之……。」⁽²⁾更可確定我國最早使用的防己爲異葉馬兜鈴，由此可知漢、張仲景傷寒論的加減木防己湯、防己地黃湯、五物防己湯，金匱要略的木防己湯以及孫思邈治遺尿小便澀的三物木防己湯，其所用的防己及木防己應爲漢中防己⁽⁸⁾。

陶注云：「今出宜都(湖北省宜都縣)、建平(四川省巫山縣)，大而青白色虛軟者好，黯黑木強者不佳。」⁽⁹⁾新修本草蘇敬曰：「謹按防己本出漢中者，作車輻解，黃實而香，其青白虛軟者名木防己，都不任用，陶謂之佳者，蓋未見漢中者。」⁽⁹⁾陳藏器曰：「如陶所說漢木防己即是根苗爲名。」⁽²⁾

陶弘景認爲防己亦有產於宜都、建平者，且以大而青白色虛軟者爲上品；新修本草蘇敬反駁陶氏的看法，認爲生長他處，青白虛軟者名爲木防己，不堪使用，而陶氏一定是未見過漢中防己，才會說青白虛軟者好。這裏很明顯的提出有一種防己不是產於漢中，且其形態爲青白色虛軟或黯黑木強，沒有提到馬兜鈴科“內有黑紋如車輻解的特徵”，故我們可以認定它爲防己科的植物，圖經也補充說明：「……，他處者，青白虛軟，又有腥氣，皮皴上有丁足子，名木防己。」⁽²⁾由附圖黔州防己之特徵考之：蘇頌本草圖經謂防己“今黔中亦有之”，證類本草附有“黔州防己”一圖，從果序看來，肯定是防己科植物，但所繪葉形，好像是複葉，肯定有誤。總的輪廓與Cocculus不無有類似之處。李時珍本草綱目(金陵本)之附圖防己爲蔓生草本，葉三淺裂，大抵與植物分類學中所述之木防己Cocculus trilobus (L.) DC.相似⁽¹³⁾。

如前所敘，吳普所稱之木防己，實爲“漢中防己”以根入藥。唐、陳藏器則認爲“木、漢二防己即是苗根爲名”，亦即以根爲漢防己，以藤莖爲木防己。明、陳嘉謨本草蒙筌則從陳藏器之說，謂“防己”多生漢中府，屬陝西，……與木通近似，氣吹亦貫兩頭，……因根苗各治，

各分漢木兩呼，是根，破之文作車輻解，黃實馨香；是苗，皮皺，上有丁足子，……宗此辨認，庶不差訛，並刮淨粗皮才咀成薄皮，漢者主水氣，名載君行，木者理風氣”。汪昂本草備要謂：“出漢中，根大而虛通，空心有花紋，色黃，名漢防己。黑點，黃腥木強者爲木防己，不佳”（15）。

如上述得知，以藥用部分而言，漢代防己全部用根，唐代、明代謂木防己用藤莖，漢防己用根；清代以後防己仍然用根。

以品種而論，吳普認爲木防己就是漢中防己的根，二者是同物異名關係。唐、陳藏器與明、陳嘉謨認爲木防己和漢防己是同一植物的不同部位，木防己用藤莖，漢防己用根，而且兩者功效有別。清、汪昂則認爲漢防己和木防己均用根，但原植物不同。清道光元年，廣東的陽春縣志物產部藥之屬載有另一種木防己，顯然這裏記載的木防己肯定是指馬兜鈴科的廣防己 *Aristolochia fangchi* Wu. 而言的。至此，歷史上的木防己已經明確的品種至少有三種：1. 漢中防己 *Aristolochia heterophylla* 2. 木防己 *Cocclus trilobus* 3. 廣防己 *Aristolochia fangchi* 漢防己在不同歷史時期使用的品種變化如前所述，名醫別錄曰：“生漢中川谷”這裏只是說了“生漢中”，並未提及“漢防己”之名。直接以“漢防己”“木防己”爲名的始於唐、甄權藥性論（627~649年），該書云：“漢防己，君，味苦，有小毒，能治濕風，口面喎斜，手足疼，散留痰，主肺氣嗽喘”“木防己，使，畏女苑、鹵鹹，味苦辛，能治男子股節中風，毒風不語，主散結氣，癰腫溫瘡，風水腫，去膀胱熱。”⁽²⁾可惜對漢防己與木防己未有形態方面的描述，不知二者究屬何指。至陳藏器本草拾遺才說木、漢二防己即是根苗爲名，是指同一植物的兩個不同藥用部分。本草原始在漢防己條下附有瓜防己圖，無疑瓜防己即當時之漢防己，否則不會直附其下，而此瓜防己正如前所說是防己科青藤或石蟾蜍，或白藥子根的縱切飲片圖。

目前商品的漢防己約有三種植物的根作漢防己使用，即漢中防己、青藤、粉防己；漢中防己僅陝西少數地區生產，全國大部地區並不使用，青藤產量也很少，使用地區以韓國、日本爲主，而粉防己就逐漸以漢

防己之名行銷全國，故市面上的漢防己主要以粉防己爲主⁽¹³⁾。

廣防己藥用歷史的考察，廣防己之名不見於歷代本草，它是近百年來在廣東地區應用的“防己”，銷至外省稱之爲“廣防己”，清代陽春縣志稱此爲木防己，清代恩平縣志和陳仁山藥物出產辨關於廣東的清遠、平崗、羅定、連灘等地有產防己的記載，實際就是指廣防己而言⁽¹³⁾。

二、形態

名醫別錄曰：「文如車輻理解者良，生漢中川谷，二月八日採根，陰乾。」⁽⁸⁾魏、李當之李當之本草曰：「其莖如葛蔓延，其根外白內黃，如桔梗，內有黑紋，如車輻解者，良。」⁽²⁾吳普曰：「木防己，一名解離，一名解燕。如芍莖蔓延，如白根外黃，似桔梗內黑，又如車輻解。二月、八月、十月採根。」⁽¹⁾本草圖經：「防己生漢中川谷，今黔中亦有之。但漢中出者，破之文作車輻解，黃實而香，莖梗甚嫩，苗葉小類牽牛，折其莖，一頭吹之，氣從中貫，如木通類。它處者青白虛軟，又有腥氣，皮皺上有丁足子，名木防己。」⁽²⁾如前所敘，此種防己乃爲異葉馬兜鈴，爲我國最早使用的防己，產於漢中(即陝西省南鄭縣)。

陶弘景曰：「今出宜都、建平，大而青白虛軟者好，黯黑木強者不佳。」⁽⁹⁾唐、蘇敬新修本草曰：「防己本出漢中者，作車輻解，黃實而香，其青白虛軟名木防己，都不任用，陶謂之佳者，蓋未見漢中者。」宋、蘇頌本草圖經曰：「防己生漢中川谷，今黔中亦有之。但漢中者，破之文作車輻解，黃實而香，莖梗甚嫩，苗葉小類牽牛，折其莖，一頭吹之，氣從中貫，如木通類然。他處者青白虛軟，又有腥氣，皮皺上有丁足子，名木防己。」⁽¹¹⁾而證類本草亦附有黔州防己之圖，經過推測可能爲木防己屬的(*Cocculus* sp.)植物。

在證類本草有黔州防己及興元府防己二圖，據文獻所載黔州防己可能是木防己屬(*Cocculus* sp.)植物，興元府防己是馬兜鈴科植物異葉馬兜鈴 *Aristolochia heterophylla*，大觀本草中黔州防己與政和本草之圖相異，而興元府防己也與政和圖左右相反，政和本草將興元府防己稱興化軍防己；但亦有認爲黔州防己爲興化軍防己，具掌狀中裂之葉。著者認爲黔州防己依圖可知爲木防己屬植物，而興元府(或興化軍)防己應較

近似於*Sinomenium acutum*⁽⁶⁾。

植物名實圖考中有「防己」、「滇防己」之別，圖考云：「防己，本經中品，李當之云莖如葛根，外白內黃，如桔梗。」「滇防己，綠蔓細鬚，一葉五歧，黑根硬，切之作車輻紋。」⁽¹²⁾植物名實圖考之滇防己植物圖近似*Sinomenium acutum*，而高橋真太郎從植物分布上推定，認為宋以前所謂漢防己應為青藤 *Sinomenium acutum*，而宋以後所謂防己應為粉防己 *Stephania tetrandra*⁽⁶⁾。

三、性味及藥能

神農本草經曰：「防己味辛平，主風寒溫瘧，熱氣諸癰，除邪，利大小便。」⁽¹⁾魏、吳普吳普本草曰：「神農辛，黃帝岐伯桐君苦無毒，李當之大寒。」⁽²⁾魏、名醫別錄曰：「苦溫無毒，療水腫風腫，去膀胱熱，傷寒寒熱邪氣，中風手腳攣急，止洩，散癰腫惡結，諸癰疥癬瘡、通湊理，利九竅。」⁽⁸⁾陶弘景曰：「大而青白色虛軟者好，黯黑木強者不佳，服食亦須之，是療風水氣要藥爾。」⁽⁹⁾

北齊、徐之才雷公藥對曰：「殷孽為之使，殺雄黃毒，惡細辛，畏女苑鹵鹹，伏消石。」⁽²⁾

唐、陳藏器本草拾遺曰：「治風用木防己，治水用漢防己。」⁽²⁾

唐、甄權藥性論曰：「苦有小毒。」又曰：「治漢防己，治風口面斜，手足拘攣，散留痰肺氣喘嗽。」又「木防己，主治男子肢節中風，毒風不語，散結氣癰腫，溫瘧風水腫，去膀胱熱。」⁽²⁾

金、張元素潔古珍珠囊曰：「大苦辛寒，陰也泄也。」又曰：「治中下濕熱腫，洩腳氣，行十二經。」又曰：「去下焦濕腫及痛，並治膀胱火邪，必用漢防己，草龍膽為君，黃蘗、知母、甘草佐之。防己乃太陽本經藥也。……」⁽²⁾

金、李杲用藥法象曰：「夫防己大苦寒，能洩血中溼熱，通其滯塞，亦能洩大便，補陰洩陽，助秋冬洩春夏之藥也。」⁽²⁾

綜合上述，知防己性寒，味苦辛，入膀胱、肺兩經。能祛風止痛和利水消腫，用於風濕熱壅滯於經絡引起的發熱、關節紅腫熱痛、面色黃滯等症，亦用於水濕停留所致的水腫、濕腳氣症。漢防己利水消腫作用

較強，木防己祛風止痛之力較佳。故陶弘景曰：「防己，療風水氣要藥爾。」⁽⁶⁾

四、修治和方用

甲 修治⁽¹⁶⁾

1. 淨製 去皮用(元、湯液)。凡使，勿用木條，色黃、腥、皮皺、上有丁足子，不堪用，惟要心有花文黃色者(明、綱目)。刮淨粗皮(明、蒙荃)。
2. 切製 剉碎(宋、寶產)。刮淨粗皮，才咀成薄片(明、蒙荃)。
3. 炮製 (1)蒸製 又剉車前草根，相對同蒸半日後出(晒)，去車前草根，細剉用之(宋、證類—雷公)。(2)酒製 酒洗(唐、新修)。酒拌(宋、婦人)。酒浸(明、奇效)。酒洗，微焙(明、醫學)。酒浸(明、正宗)。酒潤(清、全生集)。

炮製作用：如去下焦濕腫及痛，並膀胱有火邪必須酒洗防己(元、湯液)。下焦有瘡須用防己酒洗(金、珍珠囊)。酒洗去皮，治肺生用(明、回春)。

乙 方用⁽⁶⁾

1. 防己茯苓湯(金匱要略)：配黃耆、桂枝、茯苓、甘草，治皮水跗重，水氣在皮膚中，四肢聶聶動者。
2. 防己黃耆湯(金匱要略)：配黃耆、白朮、甘草、生薑、棗，治風水惡風，汗出身重，脈浮。風濕相搏關節沉痛微腫，惡風。
3. 木防己湯(金匱要略)：配石膏、桂枝、人參，治膈間支飲，其人喘滿，心下痞堅，面色黧黑，其脈沉緊，得之數十日，醫吐下之，不愈。另以防己、人參等分，爲末，桑白湯服二錢，主治傷寒喘急。
4. 己椒藶黃湯(金匱要略)：配椒目、葶藶子、大黃，治腹滿、口舌乾燥，此腸間有水氣。
5. 三物木防己湯(千金方)：木防己、防風、葵子，主治小便淋瀝。
6. 以漢防己末二錢，漿水一盞，煎七分，細呷，治肺熱喘嗽(儒門事親)。
7. 漢防己(防己)、葶藶，等分爲末，糯米飲，每服一錢，治肺痿咯血。

多痰（初虞世古今錄驗方）。

8. 生防己末，新汲水服二錢，仍以少許出許之，治鼻衄不止（宋太宗太平聖惠方）。

9. 防己、白芷等分，爲末，新汲水服二錢，治霍亂吐利（聖惠方）。

10. 防己酒浸三次，爲末，每一服二錢，溫酒下，治目睛暴痛（摘玄方）。

11. 防己煎汁服之，主解雄黃毒，另外將實焙乾爲末，如茶法煎服，俗用治脫肛（肘後方）。

12. 防己汁解服雄黃中毒（肘後方）。

13. 防己飲（朱丹溪）：配防己、蒼朮、木通、檳榔、黃蘗、生地、犀角、川芎、甘草。主治清泄濕熱。

第二節 大陸產防己類藥材之藥用植物學考察

一、防己之基原植物

防己一名，據中外藥用植物文獻考察結果，均指出有兩科植物作爲防己使用，一爲防己科植物，另爲馬兜鈴科植物。而使用地區較廣的有兩種：防己科植物粉防己，藥材又名漢防己；馬兜鈴科植物廣防己，藥材又名木防己、水防己。防己科植物木防己及馬兜鈴科植物漢中防己則在少數地區使用⁽⁵⁾。

此外個別地區，尚使用防己科植物青藤、毛防己、華防己、蝙蝠葛以及馬兜鈴科植物穆坪馬兜鈴，大葉馬兜鈴等。各地用爲防己藥材之防己科植物及馬兜鈴科植物，如表2-1，表2-2所示：⁽⁵⁾

表 2-1：曾被使用為防己藥材之防己科 (Menispermaceae) 植物

學名	藥材名	產地	使用地區	藥用部位
粉防己 <i>Stephania tetrandra</i>	漢防己	浙江 安徽 江西 湖北	使用地區廣泛 包括臺灣	根
木防己 <i>Cocculus trilobus</i>	木防己	河南 江西 陝西	遼寧 北京 河南 陝西 青海 江蘇	根
青藤 <i>Sinomenium acutum</i>	河南稱地上莖莖為 木防己，粗根為漢防 己；四川稱木防己， 日本為漢防己	河南 四川	河南 四川	莖及根
毛青藤 <i>Sinomenium acutum</i> var <i>cineracens</i>		河南	河南	根
華防己 <i>Diploclisia chinensis</i> Merr.	湖南稱過山龍、穿山 藤，1958 年後大量 收購稱湘防己	湖南	湖南	藤莖
蝙蝠葛 <i>Menispermum dauricum</i> DC.	四川稱漢防己、土防 己	甘肅 四川	甘肅 四川	根

表 2-2：曾被使用為防己藥材之馬兜鈴科 (Aristolochiaceae) 植物

學名	藥材名	產地	使用地區	藥用部位
廣防己 <i>Aristolochia fangchi</i>	木防己	廣東 廣西	使用地區廣泛 包括臺灣	根
漢中防己 <i>Aristolochia heterophylla</i>	湖南過去以本品作 青木香用，現已糾 正。 貴州民間稱青藤 香、百解藥	陝西 甘肅 四川 貴州	遼寧 北京 河 南 陝西 甘肅 安徽 青海 江 蘇 四川 貴州	根
穆坪馬兜鈴 <i>Aristolochia moupinensis</i>	藥材名理防己	雲南	雲南	根
大葉馬兜鈴 <i>Aristolochia kaempferi</i>	防己	甘肅	甘肅	藤莖

二、防己科植物之共同特徵⁽¹⁷⁾

分佈：全世界共有65屬200多種，主要分布熱帶至亞熱帶地區。大陸有20屬60種，臺灣有5屬14種。

莖：多木質藤本，稀灌木或喬木。

葉：單一互生，脈掌狀，托葉無。

花：花單性，雌雄異株，通常為總狀花序或叢生，有時為圓錐花序或單生。花整齊或少數不整齊，苞片3枚；花小，花萼通常為6枚，成兩輪排列，外輪較小，花瓣6枚，通常比花萼小，有時無；雄蕊3枚或6枚，有時更多，花藥2室；雌蕊具退化的心皮小或無，離生心皮3枚為主，稀為1枚或6枚或更多，子房上位，1室，邊緣胎座，橫生胚珠1枚。

果：核果或核果狀。

三、大陸產防己植物之形態

茲就大陸產防己植物較重要者，分述如下：

1. 粉防己 (*Stephania tetrandra* S. Moore): ⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾ 多年生纏繞性落葉藤本；小枝圓柱形，有縱條紋。葉幼時紙質，老時膜質，互生，寬三角狀卵形，長3.5~6.5 cm，寬5~7 cm，頂端鈍，具小突尖，基部截形或心形，全緣，下面灰綠色或粉白色，兩面有短柔毛，掌狀脈5條；葉柄盾狀著生，長4~7.5 cm。花單性，雌雄異株；雄花序由許多頭狀聚繖花序組成，再成總狀花序式排列；總花梗4~10 cm；雄花萼片3~5枚；花瓣4枚；雄蕊4枚；雌花萼片和花瓣與雄花同數；子房上位，花柱3。核果球形，成熟時紅色，直徑5~6 mm。
2. 木防己 (*Cocculus trilobus* DC.): ⁽⁵⁾⁽¹³⁾⁽¹⁹⁾ 纏繞性落葉藤本，根圓柱形，莖木質化，長達3 m左右，小枝密被灰白色細柔毛。葉互生；葉柄長1~3 cm；葉片廣卵形，有時3淺裂，長3~14 cm，寬2~9 cm，先端銳尖至鈍圓，有短尖頭，全緣或微波狀，基部微心形至近截形；兩面有灰褐色柔毛。花小，黃白色，雌雄異株，聚繖狀圓錐花序腋生；雄花萼片6枚，2輪，卵形至廣卵形；花瓣6枚，卵狀披針形，先2裂，基部兩側呈耳狀；雄蕊6枚，藥短近珠形；雌蕊的萼片、花瓣與雄花相近，

有退化雄蕊6枚，心皮6枚，分離。核果近球形，直徑5~8 mm，熟時藍黑色，被白粉，內有1枚馬蹄狀種子。花期7~8月。果期9~10月。

3. 青藤(*Sinomenium acutum* Rehd. et Wils.): ⁽³⁾⁽¹⁹⁾⁽²¹⁾落葉纏繞藤本，莖帶木質，枝綠色，光滑，有縱直條紋。葉互生，葉柄長5~10 cm；葉片近圓形或卵圓形，長6~12 cm，寬4~12 cm，基部稍心形或近截形，全緣或5~7淺裂，上面光滑，綠色，下面蒼白色。花小，單性，雌雄異株；圓錐花序，長1~18 cm，多少被毛；雄花具花萼6枚，黃色，長1.8~2.5 cm，外側被毛；花瓣6枚，淡綠色；雄蕊9~12枚，長約1.6 mm；雌花的花被與雄花同；具9枚退化雄蕊；心皮3枚，花柱反曲，柱頭淺裂。核果，黑色，長5~7 mm，直徑4~5 mm，內果皮扁平。種子半月形。花期6~7月。

4. 廣防己(*Aristolochia fangchi* Wu.): (3)(13)(19)(20)多年生攀緣藤本，長達3~4 m。根部粗大，圓柱形，栓皮發達。莖細長少分枝，灰褐色或棕黑色，密生褐色絨毛。葉互生；葉柄長1~4 cm，密生褐色絨毛；葉片長圓形或卵狀長圓形，長3~17 cm，寬2~6 cm，先端漸尖或鈍，基部心形或圓形，全緣，幼時兩面均被灰白色絨毛，後漸脫落，老時質稍厚，主脈3條，基出。花單生於葉脈，花梗長約1~2 cm，被棕色短毛，花被筒狀，長約5 cm，紫色，上有黃色小斑點，脰部不分裂，平展，中部收縮成管狀，略彎曲，外面被毛；雄蕊6枚，附於柱頭裂片的外面，組成合蕊柱，花絲幾無或甚短；柱頭3裂。蒴果，種子多數。花期5~6月。果期7~8月。

5. 漢中防己(*Aristolochia heterophylla* Hemsl.): ⁽¹³⁾⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾攀援半灌木；幼枝密生淡褐色短茸毛，老枝疏生短柔毛，有淺縱溝。葉心狀卵形或狹卵形，長5.5~12 cm，寬5~8 cm，頂端鈍、圓或有時微尖，上面疏生短柔毛，下面毛較密葉柄長2.5~5.5 cm，有平伏的短柔毛。單花腋生；花梗長2~5 cm，中部以下有一近圓形的苞片；花被長約4 cm厘米，密生短柔毛，筒部呈U字形彎曲，頂端3裂，裂片圓三角形，上帶紫色。蒴果長橢圓形，長3~6.5 cm，6瓣裂開。

第三節 臺灣產防己科植物之藥用植物學考察

臺灣產防己科植物，據文獻之記載(18)，計有五屬十四種植物，分述如下：

(一)木防己屬 *Cocculus* DC.

樟葉木防己 *Cocculus laurifolius* DC.

鐵牛入石 *Cocculus sarmentosus* Diels

木防己 *Cocculus trilobus* DC.

(二)土防己屬 *Paracyclea* Kudo & Yamamoto

土防己 *Paracyclea gracillima* Yamamoto

蘭嶼土防己 *Paracyclea insularis* Kudo & Yamamoto

臺灣土防己 *Paracyclea ochiaiana* Kudo & Yamamoto

(三)蓬萊藤屬 *Pericampylus* Miers

蓬萊藤 *Pericampylus formosanus* Diels

三肋蓬萊藤 *Pericampylus trinervatus* Yamamoto

(四)千金藤屬 *Stephania* Lour.

白藥子 *Stephania cephalantha* Hayata

毛千金藤 *Stephania hispidula* Yamamoto

千金藤 *Stephania janponica* Mier

蘭嶼千金藤 *Stephania merrilli* Diers

石蟾蜍 *Stephania tetrandra* S. Moore

(五)青牛膽屬 *Tinospora* Miers

恒春青牛膽 *Tinospora dentata* Miers

一、臺灣產防己科植物屬之檢索表：⁽¹⁷⁾

1. 葉非盾狀；心皮3~6枚；胚乳豐富

2. 葉爲矢狀或心臟形，全淺裂..... 青牛膽屬(*Tinospora*)

2. 葉卵形或稍心臟形，全緣或深裂緣

3. 葉柄短於2公分；花瓣雙裂..... 木防己屬(*Cocculus*)

3. 葉柄較3公分長；花瓣全緣..... 蓬萊藤屬(*Pericampylus*)

1. 葉多爲盾狀；心皮單一；胚乳貧乏

5.雄花萼片4枚；雌花具萼片1枚及花瓣1枚

.....土防己屬(*Paracyclea*)

5.雄花萼片6~8枚；雌花萼片3~6枚及花瓣2~4枚

.....金藤屬(*Stephania*)

二、臺灣產防己科植物各屬之種檢索表⁽²²⁾

(一)木防己屬(*Cocculus*)

1.葉卵~長橢圓形、披針形，長比寬約三倍或更長

.....葉木防己 *C. laurifolius*

1.葉卵形~寬廣的卵形，長比寬少於兩倍

2.葉卵形~寬廣的卵形，有時為戟形或三淺裂

.....木防己 *C. trilobus*

2.葉倒卵形、披針形，鈍頭鈍腳..華南木防己 *C. sarmentosus*

(二)土防己屬(*Paracyclea*)

1.葉基部心形，全緣

2.莖纖細，被細毛，葉很小，長2~4公分，寬1.5~3公分

.....土防己 *P. gracillima*

2.莖粗厚，被厚毛，葉很大，長2~9公分，寬2~8.5公分

.....蘭嶼土防己 *P. insularis*

1.葉基部截形，全緣或波形，常另一邊有牙形

.....臺灣土防己 *P. ochiaiana*

(三)蓬萊藤屬(*Pericampylus*)

1.葉五脈，有時三脈.....蓬萊藤 *P. formosanus*

1.葉全為三脈.....三肋蓬萊藤 *P. trinervatus*

(四)千金藤屬(*Stephania*)

1.花序腋生，假的繖形花序，繖形花序單一或複式，葉盾形

2.光滑花序

3.葉長6~7公分，寬5~6公分，果實大小5×6公厘

.....千金藤 *S. japonica*

3.葉長9~12公分，寬8~9公分，果實大小為12×10公厘

- 蘭嶼千金藤 *S. merrilli*
2. 著短毛花序..... 毛千金藤 *S. hispidula*
1. 花序雄性腋生，假的總狀花序，在很密的球形或圓筒頭中，葉盾或無
2. 葉盾狀，光滑膜狀，基底圓形，萼片3~6，花瓣4~6，根捲曲狀..... 白藥子 *S. cephalantha*
2. 葉非盾狀，著短毛，基底略心形，萼片4，花瓣4，根圓筒狀..... 粉防己 *S. tetrandra*

三、臺灣產防己植物之形態與分布：

(一) 木防己屬(*Cocculus*)

1. 樟葉木防己 *C. laurifolius* DC. ⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾⁽²³⁾

【形態】常綠灌木，高約3 m。莖直立；有時枝條下垂攀緣於其他樹上；枝有條紋。葉薄革質，橢圓狀矩圓狀披針形，長4~10 cm，寬2~4 cm，先端漸尖，基部漸狹，乾時邊緣呈微波狀，亮綠色，基出脈3條；葉柄長5~10 mm。花單性，雌雄異株；聚繖狀圓錐花序生葉腋，少單生；雄花萼片6枚，外輪3片，長約1 mm，內輪3片，長約1.3 mm；花瓣6枚，寬倒三角形，頂端2深裂，有時裂片再2淺裂；雄蕊6枚，長約1 mm，長於花瓣；雌花萼片和花瓣與雄花的相似；退化雄蕊6枚，微小；心皮3枚。核果扁球形，長約5 mm。

【分布】分佈北部叢林、高雄萬金庄等地，生於林中蔭處。

2. 鐵牛入石 *C. sarmentosus* Diels ⁽²³⁾

【形態】全株有毛。葉互生，紙質，披針形或卵狀橢圓形，鈍頭，鈍腳，罕心形，葉長3~9 mm。雄聚繖花序，有梗，3至多數花，罕腋生，概總狀，小苞2；萼片6枚，外輪3，異形，內輪3，卵狀橢圓；花瓣6枚，先端2裂；雌聚繖花序小形，心皮6枚。核果深黑色。

【分布】全省，平野至低海拔山區。

3. 木防己 *C. trilobus* DC. ⁽³⁾⁽⁵⁾⁽¹⁹⁾⁽²⁴⁾

【形態】纏繞性落葉木質藤本，長可達3米。根為不整齊的圓柱形，外皮黃褐色，斷面黃白色，有放射狀紋理。小枝纖細而韌，有縱線

紋和柔毛。葉互生，有短柄；葉片寬卵狀長圓形，長4~9 cm，寬2.5~6 cm，先端形多變化，基部圓形、楔形或略呈心形，全緣或3淺裂，中央裂片較長，兩面被短柔毛。夏季開淡黃色小花，圓錐聚花序腋生，花單性，雌雄異株；花萼6片，二輪；花瓣6片，二輪，較花萼小，先端2裂；雄花中有雄蕊6個，對瓣著生；雌花中有退化雄蕊6個，心皮6個。核果近球形，藍黑色，有白粉。

【分布】陽明山、士林、觀音山、獅頭山。生於丘陵、山坡低地、路旁草地及低灌木叢中。

(二)土防己屬(*Paracyclea*)

1. 土防己 *P. gracillima* Yamamoto⁽²³⁾

【形態】葉具長柄，盾狀心形，鈍頭，心腳，長8~23 cm，兩面有毛。雌雄二家，圓錐花序；苞小，卵狀菱形，柄短，小苞細小，線狀鑿形或倒披針形；花細小，綠色，雄花者：萼鐘形，萼片4~5枚，卵形，鈍頭；花瓣4~5枚；花藥4~5枚，無柄；雌花者：萼片2枚，橢圓形；瓣1；子房廣卵形，無毛，花柱短。果實多數，球形，淡紅色；滑澤。

【分布】高雄、台東山野。

2. 蘭嶼土防己 *P. insularis* Kudo & Yamamoto⁽²²⁾

【形態】攀援狀藤本，枝圓柱狀，具縱形條紋，幼枝密生茸毛。葉具長柄，葉近心形、心形到圓形，腋生，長2~9 cm，寬2~8.5 cm，基部心形，七條葉脈，全緣，表面很少茸毛，葉底密生茸毛，葉柄2~5 cm長，花細小，具圓錐花序，通常為孤立軸生，2~5 cm長，核果圓形扁狀，直徑約5 mm，2.5 mm厚，少茸毛。

【分布】蘭嶼，灌木叢中。

3. 台灣土防己 *P. ochiaiana* Kudo & Yamamoto⁽²³⁾⁽²⁵⁾

【形態】常綠藤本，全株部分有毛。葉具長柄，紙質，歪卵形或三角狀卵形，先端漸尖銳，基部略為盾狀，全緣或邊緣為1~2粗齒裂，長4~9 cm，寬2.5 cm，脈掌5~7條，裏面有毛。圓錐花序腋生，單立或雙出，有毛；花小形，雄花有萼片4枚，2寬2狹，長約1 mm，

花瓣4片，卵形，較萼片爲小；又雌花有雄蕊4枚，合生而成管筒，藥在頂端作盾形伸展；雌花花柱粗短，柱頭作深3裂。核果球形，徑約4 mm。

【分布】高雄(來社)、阿里山(奮起湖)、烏來(阿玉山)及陽明山等地。

(三)蓬萊藤屬(*Pericampylus*)

1. 蓬萊藤 *P. formosanus* Diels⁽¹⁹⁾⁽²³⁾⁽²⁵⁾

【形態】常綠藤本；全株幼嫩部份有毛。葉具長柄，闊卵形或心形，先端銳，基部爲圓形或淺心形，長5~7 cm，寬3.5~6 cm，主脈5條，基部有毛。雌雄異株；聚繖花序成圓錐形排列，叢生葉脈；花形小，苞6片，披針形，長0.4 mm；萼片6枚，2輪，倒披針形，長約0.9 mm；花瓣6枚，各與萼片對生，倒卵形，長寬各爲0.8~1 mm；雌花具退化雄蕊6枚，各與瓣片對生；子房球形，徑約0.7 mm；花柱作3深裂，裂片復爲淺2裂。核果倒卵形或近於球形，周緣有肋紋。

【分布】中部蓮華池及恒春200~600 m。

2. 三肋蓬萊藤 *P. trinervatus* Yamamoto⁽²⁶⁾

【形態】多分枝，新生者有淡黃色密毛，老者稀，或光滑。葉殆圓形，腳圓，頭尖，葉基具三脈，葉大者長6 cm，寬4 cm，小者長4 cm，寬2.5 cm，革質或紙質，先端尖或凸，腳圓。繖房花序，雌花腋生，單獨或雙生，有淡黃色毛；苞線形；萼片6枚，不同；瓣6枚，倒卵形，與萼等長；假雄蕊6枚，與瓣片對生；子房球形。核果倒卵形，三分裂。

【分布】自生於魚池海拔高650 m上下之常綠蔓莖灌木，喜生裸地。

(四)千金藤屬(*Stephania*)

1. 白藥子 *S. cephalantha* Hayata⁽²⁶⁾

【形態】多年生纏繞性落葉藤本，全株平滑無毛，具橢圓形塊根。老莖下部木質化，小枝纖弱，具縱直扭旋的細溝紋。葉互生，紙質，三角狀近圓形，長5~9 cm，寬與長相等或較寬，先端鈍圓，具小

突尖，全緣或微呈波狀，基部近截切或微向內凹，上面深綠色，下面粉白色，掌狀脈5~9條；葉柄盾狀著生，長5~11 cm。花單性，雌雄異株；花序腋生；雄花序爲頭狀聚傘花序，扁圓形，有花18~20朵；花淡綠色，基部具苞片1枚；雄花具花萼4~6枚，匙形，花瓣3~5枚，近圓形，直徑約0.5 mm，有時具短爪；雄蕊6枚，花絲癒合成柱狀體，花藥合生成圓盤狀；雌花花萼3~5裂。核果球形，成熟後紫紅色。花期6~7月。果期8~9月。藥用其塊根。

【分布】基隆、台北。生於陰濕山坡、路旁或溪邊、林邊。

2. 千金藤 *S. japonica* Miers⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾⁽²⁶⁾

【形態】木質藤本，長4~5 m，全無體毛。塊莖粗壯。小枝有細縱條紋。葉草質或近紙質，互生，寬卵形或卵形，長4~8 cm，寬3~7.5 cm，先端鈍，基部圓形、近截形或微心形，全緣，下面通常粉白色，掌狀脈7~9條；葉柄盾狀著生，長5~8 cm。花單性，雌雄異株；花序傘狀至聚傘狀，腋生；總花梗長2.5~4 cm，分枝4~8；花小，淡綠色，有梗；雄花萼片6~8枚，卵形或倒卵形；花瓣3~5枚；雄蕊花絲癒合成柱狀體；雌花萼片3~5枚；花瓣與萼片同數；無退化雄蕊；花柱3~6枚裂，外彎。核果近球形，徑約6毫米，紅色。藥用其根、莖葉。

【分布】全省。生於山坡、溪旁或路旁。

3. 毛千金藤 *S. hispidula* Yamamoto⁽¹⁹⁾

【形態】纏繞性藤本，草質。具大形塊根。莖纖細，具棱。單葉互生，卵形、扁圓形或三角狀卵圓形，基部圓形，全緣或淺波狀，上面深綠，下面灰綠色；葉柄盾狀著生，長8~14 cm。花單性，雌雄異株；複繖形花序腋生；總狀花梗長7~9 cm；花小，黃綠色；小花梗不等長；雄花萼片6，兩幹；花瓣3，闊扁卵形，肉質；雄蕊6枚，聯合成柱體，頂端呈盤狀；雌花的萼片及花瓣通常3或4枚，與雄花同形；雌蕊1枚，柱頭5裂，盤狀，子房上位，1室。核果倒卵形至球形。花期6~7月。

【分布】臺北、阿里山。生於山谷、溝邊、路旁、陡坡的樹林邊。

4. 蘭嶼千金藤 *S. merrilli* Diers⁽²³⁾

【形態】枝徑1cm，具10條溝，皮褐色，小枝下垂，光滑，淡綠色。葉柄長7~9 cm，葉紙質或革質，光滑，廣卵形，長9~10 cm，寬8.5~9 cm，上半有短突尖或廣三角形或圓形，全緣或微卷，成盾狀，具12幅射脈。雄花序腋生，有梗，梗長8~12 cm，光滑，先端有繖形花，8花作放射狀。果叢生，核果狀，倒卵形，長1.2 cm，寬1 cm，頂圓，腳截形。

【分布】自生蘭嶼及綠島山野，臺東各試驗場栽培之常綠蔓莖灌木。

第四節 防己類藥材之化學成分考察

1. 粉防己 (*Stephania tetrandra*)⁽¹⁹⁾⁽²¹⁾⁽²⁷⁾

粉防己根含生物鹼約1.2%，其中有漢防己鹼(Tetrandrine)、防己醇靈鹼(Fangchinoline)、一種酚性生物鹼(C₃₂H₄₂O₆N₂)、門尼新鹼(Menisine)、門尼錠(Menisidine)，以及輪環藤酚鹼(Cyclanoline)等。

粉防己的生物鹼，曾有種種異名，漢防己鹼曾名漢防己甲素(Hanfangchin A, Fanchinin)，防己醇靈鹼即去甲漢防己鹼(Demethyltetrandrine)，亦曾名漢防己乙素(Hanfangchin B)，酚性生物鹼即漢防己丙素。門尼新鹼原稱木防己素甲，門尼錠原稱木防己素乙，分別為漢防己鹼和去甲漢防己鹼的異構物。粉防己根尚含黃酮類、酚類、有機酸、揮發油等。

2. 木防己 (*Cocculus trilobus*)⁽³⁾⁽¹⁹⁾⁽²¹⁾

木防己根含木防己鹼(Trilobine)、異木防己鹼(Isotrilobine, Homotrilobine)、木蘭花鹼(Magnoflorine)、木防己胺(Trilobamine)、木防己賓鹼(Coclobine)、甲門尼薩任鹹(Menisarine)去甲門尼薩任鹼(Normenisarine)等多種生物鹼。

3. 青藤 (*Sinomenium acutum*)⁽⁵⁾⁽¹⁹⁾⁽²¹⁾

青藤的莖和根含青藤鹼(Sinomenine)、雙青藤鹼(Disinomenine)、木蘭花鹼(Magnoflorine)、尖防己鹼(Acutumine)、四氫表小蘗鹼(

Sinactine)、異青藤鹼(sinomenine)、土杜拉寧(Tuduranine)、清風藤鹼(Sinoacutine)、dl-丁香樹脂酚(dl-Syringaresinol)、十六烷酸甲酯、N-去甲基尖防己鹼(Acutumidine)、白蘭花鹼(Michelalbine)、光千金藤鹼(Stepharine)。又含 β -穀脂醇、豆脂醇。青藤的莖含清風藤鹼甲(Sabianine A)等多種生物鹼。

4. 廣防己(Aristolochia westlandi)⁽³⁾⁽²⁰⁾⁽²⁷⁾

廣防己含馬兜鈴酸(Aristolochic acid)、馬兜鈴酸B、C，馬兜鈴內醯胺(Aristololacton)、木蘭鹼(Magnoflorine)、尿囊素(allantoin)及 β -sitosterol。

第五節 防己類藥材之藥理文獻考察

1. 粉防己(Stephania tetrandra)⁽³⁾⁽¹⁹⁾⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾

漢防己鹼、粉防己鹼、去甲基粉防己鹼、粉防己流浸膏及煎劑均有鎮痛作用。粉防己鹼少量能使離體蟾蜍心臟收縮力增強、振幅加大，並能擴張周圍血管，使血壓降低，同時能使局部血液及淋巴液循環通暢，使炎性病變容易恢復而具有消炎作用。小劑量對於腎臟有刺激作用，使尿量增加，大量則抑制，使尿量減少。其他尚有鬆弛骨骼肌之作用，解熱作用，抗過敏性休克作用，抗阿米巴原蟲作用，抗菌作用，抗腫瘤作用等。

2. 木防己(Cocculus trilobus)⁽³⁾⁽¹⁹⁾

木防己鹼(三葉素，Trilobine)對發熱家兔有降溫作用，能使兔血壓下降，血管收縮，麻痺蛙的心肌及骨骼肌。小量增強小腸、子宮的收縮，大量則麻痺之。對家兔氮代謝無明顯影響，可增進犬的淋巴形成；能麻痺草履蟲。對破傷風、白喉、肉毒桿菌的外毒素以及河豚毒素對小鼠的致死作用有某些保護作用。對家兔的最小致死量，靜脈注射為0.05克/公斤，皮下注射為0.15克/公斤。對蛙、小鼠皮下注射的最小致死量為0.5~1.0克/公斤，可引起動物運動麻痺及偶而驚厥，死於呼吸衰竭。

非生物鹼成分木防己甲素(Mutangchin A)50毫克/公斤或乙素200毫

克／公斤，對大鼠無退熱作用(大腸桿菌肉湯注射引起之發熱)。用小鼠熱板法，證明甲素、乙素並無鎮痛作用。甲素靜脈注射對小鼠的半數致死量為76毫克／公斤，乙素毒性很低。Trilobamine(Daphnoline)對中樞神經系統有抑制作用。

3. 青藤(Sinomenium acutum)⁽³⁾⁽¹⁹⁾⁽²⁹⁾⁽³⁰⁾

小鼠腹腔注射青藤鹼50毫克／公斤能顯著提高對熱刺激的痛閾，其作用強度與嗎啡比較約為1：2.5。對大白鼠甲醛性或蛋清性“關節炎”有顯著的消腫作用。大白鼠腹腔注射青藤鹼60毫克／公斤的效果要比水楊酸鈉200毫克／公斤為好。貓腹腔注射青藤鹼5毫克／公斤，可使陽性防禦性條件反射潛伏期明顯延長，條件反射部分消失。青藤鹼的抗炎作用與腎上腺皮質有密切關係對切除垂體的大白鼠，青藤鹼不出現抗炎作用。因此對腎上腺皮質的功用顯然是通過垂體分泌ACTH間接作用於腎上腺皮質所致。青藤所含的總生物鹼給動物灌胃或靜脈注射均有快速降壓作用，但很快產生耐受現象。

4. 廣防己(Aristolochia fangchi)⁽²⁹⁾

馬兜鈴酸(硝基酚類有機物)具有抗癌，抗感染等作用。有報導指出能提高抗菌素及化療藥物的治療效果。又據報導，1981年德國衛生部取消了所有馬兜鈴酸鹽製劑，原因是這類藥物經啮齒類動物長期毒性試驗，發現幾個器官中與劑量有關的致癌作用。此外馬兜鈴能增強吞噬細胞活性的作用，中毒劑量的1%還有增強吞噬作用。而尿素囊(allantoin)為嘌呤氧化分解產物，外用能促使潰瘍癒合及肉芽生長。 β -sitosterol有鎮咳祛痰而無平喘作用，尚有降膽固醇作用。馬兜鈴酸對肝、腎有毒性，尤其是對腎臟，治療劑量為中毒劑量的千分之一。

第三章 材料與方法

第一節 實驗材料

一、臺灣產防己科植物之採集

1. 民國82年7月10日臺中市大坑，採得千金藤*S. japonica*、木防己*C.*

trilobus

2. 民國82年8月7日臺中縣太平鄉，採得千金藤*S. japonica*、蓬萊藤*P. ramosanus*、華南木防己*C. sarmentosus*
3. 民國82年11月9日南投縣溪頭鳳凰山採得臺灣土防己*P. ochiaiana*
4. 民國83年2月1日台北縣金山 採得千金藤*S. japonica*、粉防己*S. tetrandra*
5. 民國83年2月3日著臺北市木柵，採得千金藤*S. japonica*、木防己*C. trilobus*
6. 民國83年2月10日北橫東眼山，採得蓬萊藤*Pericampylus formosanus*
7. 民國83年3月16日新竹縣竹東鎮五指山採得千金藤*S. japonica*、木防己*C. trilobus*
8. 民國83年5月10日著臺中市大坑，採得三肋蓬萊藤*P. trinervatus*、木防己*C. trilobus*
9. 民國83年7月10日高雄萬金庄，採得樟葉木防己*C. laurifolius*
10. 民國83.年9月6日苗栗縣後龍採得木防己*C. trilobus*、華南防己*C. sarmentosus*
11. 民國84年2月1日南投縣埔里，採得金線吊烏龜*S. cephalantha*
12. 民國84年2月8日屏東縣關山，採得土防己*P. gracillima*、千金藤*S. japonica*
13. 民國84年2月9日南橫屏東~臺東，太麻里採得千金藤*S. japonica*、蓬萊藤 *P. formosanus*
14. 民國84年2月9日南橫屏東~臺東，大武採得粉防己*S. tetrandra*、華南木防己*C. sarmentosus*、金線釣烏龜*S. cephalantha*
15. 民國84年2月10日臺東農業改良場採得木防己*C. trilobus*、金線釣烏龜*S. cephalantha*

二、臺灣市售防己類藥材之蒐集

本研究共蒐集全省各地二十五家中藥房所販售之防己類藥材，以供鑑定。

三、含防己濃縮中藥方劑市場品之採樣：

本研究共採購八家藥廠市售之五種含防己濃縮中藥方劑，以供鑑定。

表 3-1 臺灣市售含防己之濃縮中藥方劑

	防己黃耆湯	疏經活血湯	小續命湯	通用痛風丸	木防己湯
A藥廠	△	△	△	△	
B藥廠	△	△	△	△	△
C藥廠	△	△	△	△	△
D藥廠	△	△	△	△	
E藥廠	△	△	△	△	
F藥廠	△	△	△	△	
G藥廠	△	△	△	△	
H藥廠	△	△	△	△	

△：表示有購得此濃縮中藥方劑

防己黃耆湯

處方依據：金匱要略方

處方內容：防己、黃耆、白朮、甘草、生薑、大棗

疏經活血湯

處方依據：萬病回春方

處方內容：當歸、地黃、蒼朮、川芎、桃仁、茯苓、芍藥、牛膝、威靈仙、防己、羌活、防風、龍膽、生薑、陳皮、白芷、甘草

小續命湯

處方依據：千金要方

處方內容：防風、桂枝、麻黃、杏仁、川芎、白芍、防己、甘草、芍藥、人參、附子、生薑、大棗、黃芩

上中下通用痛風丸

處方依據：醫方集解

處方內容：蒼朮、黃柏、南星、神麴、川芎、桃仁、龍膽、防己、白芷、羌活、威靈仙、桂枝、紅花

木防己湯

處方依據：金匱要略方

處方內容：木防己、石膏、桂枝、人參

四、實驗動物

本研究所使用之動物有：

1. ICR系雄性小鼠，體重18~25克(國科會提供及本院動物中心)
2. Sprague-Dawley 系雄性大鼠，體重200~250克(國科會提供及本院動物中心)

五、藥理實驗藥材之抽取

將市售三種防己藥材廣防己、粉防己、木防己(經組織切片鑑別)以甲醇將藥材冷浸，抽出液過濾、合併、減壓濃縮得其粗抽物；廣防己甲醇抽出率為23.37%，粉防己甲醇抽出率為19.43%，木防己甲醇抽出率為26.58%。臨用前配成提取物的生理食鹽水混懸溶液(0.2g/ml)

六、實驗試劑

甲醇，乙酸乙酯，無水酒精，二甲苯，氫氟酸，冰醋酸等購自皓峰公司；氫氧化氫購自聯工化學廠；福馬林購自島久要藥品株式會社；發色液用硫酸(1%)，Vanillin sulfuric acid spray reagent，Anisaldehyde sulfuric acid spray reagent。

七、實驗儀器

1. 紫外線燈：CAMAG Universal UV lamp，波長 254 nm及 366 nm。
2. 蒸餾水製造器：Branson 5200
3. 減壓濃縮機：Eyela Rotary Vacuum Evaporator
4. UV照相器：CAMAG REPROSTAR II
5. 照相機：PENTAX SF1
6. 轉輪式石臘切片機：農試所
7. 顯微鏡：Nikon potograph T-2
8. 排水量測定器：7150 plethysmometer
9. 烘箱：DRYING OVEN CHANNEL
10. 薄層色層分析法(Thin Layer Chromatography)：

定性分析採用 Kieselgel 60 F254 silica gel precoated aluminium plate，厚度 0.2 mm (E.Merck)。

第二節 實驗方法

一、石蠟切片法⁽³¹⁾

將組織埋於蠟塊內，連同蠟塊一起切片後除去石蠟，再經染色和封片而成，整個製片過程概述如下：

1. 軟化：切成適當大小($0.5 \times 0.5 \times 4.0$ cm³)，用水煮沸60分鐘以排氣，冷卻後置於5%NaOH 24小時，流水沖水4小時，再置於15%HF 8小時，流水沖水24小時

2. 固定：以F A A固定24小時

3. 脫水：將材料逐步置換於下列溶液中

	t-butanol	95%ethanol	H2O
第一步	10	40	50
第二步	20	50	30
第三步	35	50	15
第四步	55	45	0
第五步	75	25(無水酒精)	0
第六步	100	0	0

4. 滲蠟：在60~65°C溫箱內操作，將固體的小蠟塊分三到五次逐漸加入固定瓶內，每次以不超過瓶內液體的三分之一為原則。

5. 埋蠟：將固定瓶內的材料和液體蠟倒入模型內，置於冷水中使之快速冷卻凝固，而成固體蠟塊。

6. 切片：先將多餘蠟塊剔除，再固定在小木塊上，以轉動式切片機切片。

7. 張貼切片：將載玻片塗上少許黏附劑(Mayer's adhesive)，滴上適量的稀福馬林(3~4%)，再將蠟帶置於載玻片上，輕拉蠟片伸展，吸乾福馬林，烘乾約一至數天(40°C~45°C)。

8. 染色：先把蠟帶用二甲苯溶解後，才由高濃度的酒精逐漸移至所採用的染料溶液中進行染色。

9. 封片：滴上巴爾森，蓋上玻片。

二、薄層層析法

(一)各種防己藥材的薄層層析⁽³²⁾

(1)標準溶液之配製：

分別稱取 Aristolochic acid, Tetrandrine, Sinomenine 各10mg, 分別置於樣品瓶中, 加10ml Methanol 溶解, 以供作標準溶液。

(2)檢液之調製：

取六種防己粉末各2.0g置於三角錐瓶中, 加入10ml Methanol, 超音波震盪30分鐘, 過濾, 取濾液濃縮至乾, 殘渣加1ml MeOH 溶解, 此溶液為檢品溶液。

(3)薄層層析條件：

薄層層析板：Silica gel 60 F254

展開溶媒：乙酸乙酯：甲醇：氨水(10：1：0.2)

點注量：各5ml

展開距離：5.5 cm

檢出方法：UV 254 nm

(二)市售含防己濃縮中藥方劑之薄層層析⁽³³⁾

(1)標準溶液之配製：

稱取Aristolochic acid, Tetrandrine 各10 mg分別置於樣品瓶中, 加10 ml Methanol 溶解以, 供作標準溶液。

(2)對照藥材溶液之配製：

稱取廣防己(Aristolochia fangchi)、粉防己(Stephania tetrandra)藥材粉末各 2.0g置於三角錐瓶中, 加入10ml Methanol, 超音波震盪30分鐘, 過濾, 取濾液濃縮至乾, 殘渣加1ml Methanol 溶解, 此溶液為對照藥材溶液。

(3)檢品溶液之配製：

稱取本品粉末6.0g於三角錐瓶中, 加50 ml Methanol, 超音波震盪30分鐘, 過濾, 取濾液濃縮至乾, 殘渣加5ml Methanol 溶解, 此溶液為檢品溶液。

(4)空白溶液之配製：

稱取與檢液相同處方量，除去防己於三角錐瓶中，加50ml Methanol 超音波震盪30分鐘，過濾，取濾液濃縮至乾，殘渣加5ml Methanol 溶解，以供作空白溶液。

(5)薄層層析條件：

薄層層析板：Silica gel 60 F254

展開溶媒：乙酸乙酯：甲醇：氨水(10：2：0.2)

點注量：各5ml

展開距離：5.5 cm

檢出方法：UV 254 nm

(三)在比利時造成腎衰竭減肥藥的薄層層析⁽³³⁾

(1)標準溶液之配製：

稱取Aristolochic acid, Tetrandrine 各10 mg分別置於樣品瓶中，加10 ml Methanol溶解以，供作標準溶液。

(2)檢品溶液之配製：

稱取本品粉末2.0g於三角錐瓶中，加20 ml Methanol，超音波震盪30分鐘，過濾，取濾液濃縮至乾，殘渣加2 ml Methanol 溶解，此溶液為檢品溶液。

(3)薄層層析條件：

薄層層析板：Silica gel 60 F254

展開溶媒：乙酸乙酯：甲醇：氨水(10：2：0.2)

點注量：各5ml

展開距離：5.5 cm

檢出方法：UV 254 nm

三、藥理實驗方法：

(一)急性毒性實驗：

將防己甲醇粗提取物經由口服給予小鼠，連續觀察72小時，記錄中毒死亡情形，依 Litchfield and Wilcoxon氏方法(34)，求得使實驗動物一半死亡的劑量及其95%可信限。

(二)鎮痛實驗(Analgesic test)：

1. 熱板法(Hot Plate Method)⁽³⁵⁾

將小鼠，分成每組10隻，編號稱重，並分別置於熱板(55±0.5℃)測定各小鼠的正常痛覺反應(舔後足、踢後腿或跳躍)時間，共測2次，每次間隔 5min，兩次痛反應時間差在五秒內者，供為本實驗用。

小鼠分別口服給藥，生理食鹽水為空白對照組，給予各防己粗粉提取液 (2.5g/kg)，15、30、45、60、75、90min測定痛反應時間2次，求平均值。如小鼠在熱板上60秒仍無痛反應，以60秒計算。將測得的痛反應時間，按下列公式算出用藥後各不同時間的痛閾提高百分率。以痛閾提高百分率做為縱座標，給藥後時間做為橫座標，繪出各藥的鎮痛作用時間曲線，加以比較。

$$\text{痛閾提高百分率} = \frac{\text{給藥後平均反應時間} - \text{給藥前平均反應時間}}{\text{給藥前平均反應時間}} \times 100\%$$

2. 醋酸扭體反應實驗(Writhing response)⁽³⁶⁾

以防己甲醇粗提取物不同劑量(2.5g/kg, 1.0g/kg, 0.5g/kg, 0.1g/kg)口服給予小鼠，一小時後，由腹腔注射1% Acetic acid(給藥量 0.1ml/10g)，觀察並記錄小鼠注射5分鐘後之重覆肌肉收縮及所伴隨之後肢伸張次數(writhing response)，連續記錄10分鐘。對照組給 vehicle。

(三) 抗炎實驗(Anti-inflammatory test)：

1. 大鼠足蹠浮腫實驗(Hindpaw edema test)(37)

依Winter法，大鼠每組6隻，以poethysmometer測其右後腳掌體積(誘發前腳掌體積：Ec)，分別口服給予不同劑量(2.5g/kg、1.0g/kg、0.5g/kg、0.1g/kg)之各種防己藥材粗粉提取液，另以0.5% saline口服為控制組。1小時後，以1% carrageenin於大鼠右後腳掌皮下注射以誘發浮腫，再經1小時後，測其右後腳掌體積(誘發後腳掌體積：Et)，以後每隔1小時測1次，連續測四次。比較給藥組浮腫率(St)，控制組浮腫率(Sc)計算方法如下：

$$S(\text{浮腫率}) = \frac{Et - Ec}{Ec} \times 100\%$$

2.st cell與Neutrophil的釋放反應⁽³⁸⁻⁴⁵⁾

A. 肥大細胞的釋放反應

大鼠經頸部放血後，將含肝素之Tyrodes溶液注入大鼠腹腔內，按摩並取出腹腔溶液，經38%牛血清蛋白溶液離心，沉澱細胞經清洗後，懸浮成 $1-1.5 \times 10^6$ 細胞每毫升⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾，並測定細胞存活率⁽⁴⁰⁾。將此肥大細胞懸浮液與compound 48/80作用，離心後將上清液取出，測其中所含組織氨。利用o-phthaldehyde聚合後以螢光分光光度來測量⁽⁴¹⁾，和利用phph-glucuronide作為受質，經由分光光度計測量 β -glucuronidase⁽⁴²⁾

B. 中性白血球釋放反應

大鼠麻醉後，由背動脈抽血，經dextran混和靜置，以Ficoll-hypaque離心，低張溶液除去紅血球⁽⁴³⁾⁽⁴⁴⁾，將細胞清洗並懸浮成 1×10^7 細胞每毫升。將此細胞懸浮液與FMLP作用後，離心取上清液，並測其中所含的 β -glucuronidase量，利用分光光度計測之及利用 Micrococcuslysodeik——ticus細胞作為受質，利用分光光度計在450nm波長下測lysozyme⁽⁴⁵⁾。

(四) 大鼠代謝籠利尿實驗⁽⁴⁶⁾

將大鼠分成數組，實驗前禁食18小時，以減少糞便的干擾，實驗開始時輕壓下腹，排盡餘尿，實驗時口服生理食鹽水5ml/100g，放入代謝籠內分別收集各鼠5小時尿量，求出排尿百分率(尿量/口服水量 $\times 100\%$)。當正常尿的排尿百分率穩定後($13 \pm 10\%$)，隨機分組，包括對照組，待試藥組，已知藥組，每組6隻。在給藥前1小時左右給予水負荷(1.5ml/100g)，試藥組以灌胃法給大鼠口服生理鹽水配成的藥液5.0ml/100g；對照組給等量的生理食鹽水。陽性對照組給予以0.2 mg/kg chlorohydrothiazide配成的等量生理食鹽水藥液，收集5小時的尿液，尿量以ml/100g表示。計算各組5小時尿量平均值及其標準差。

(五) 抗腫瘤試驗^{(47)*}

利用 MTT分析法，於 96孔培養皿中加入測試之抽取物 $20 \mu l$ (每孔中最終濃度為 50, 5, $0.5 \mu g/ml$ 三種，各種濃度重覆三次)，再於每孔

中加入 $180 \mu\text{l}$ 細胞 (約 100-25000個細胞)，將此培養二至十天後，將細胞以 PBS洗二次，再於每孔中加入 MTT $25 \mu\text{l}$ (2 mg/ml)，將此培養皿置於 37°C ， $5\% \text{ CO}_2$ 培養箱中靜置四小時後，再於每孔中加入 DMSO溶解藍色沉澱。利用 Multiscan reader 讀取波長 540nm 之吸光度，並計算其 ED_{50} 。

根據美國 NCI之準則，粗抽物之 $\text{ED}_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$ ，純物質之 $\text{ED}_{50} \leq 4 \mu\text{g/ml}$ ，則視為具有抗腫瘤之活性。

本實驗所使用之癌細胞如下：

(a)KB-16：人類喉癌細胞

以DMEM (GIBCO)為培養基，外加10 %胎牛血清。

(b)P-388：老鼠血癌細胞

以Fisger's medium培養，外加10 %胎牛血清。

(c)A-549：人類肺癌細胞

以 RPMI 1640(GIBCO) 為培養基，外加10 %胎牛血清， 2mM glutamine， 1mM sodium pyruvate 及 50mM mercaptoethanol。

(d)HT-29：人類腸癌細胞

以 α MEM(GIBCO)為培養基，外加10 %胎牛血清。

第四章 結 果

第一節 市售防己類藥材之生藥學研究

一、市售防己類藥材

臺灣市售防己類藥材，經生藥學鑑定，有粉防己、木防己、廣防己三種，青藤則在日本當漢防己使用，經整理結果如下：

表 4-1 性狀構造檢索表

1. 根短圓形，多彎曲，有深橫溝而成結節狀，易折斷，粉性大.....粉防己
(*Stephania tetrandra*)
1. 根或根莖長圓柱形，難折斷
 2. 根橫切面中心無髓，表面灰褐色或黑褐色.....木防己
(*Cocculus trilobus*)
 2. 橫切面具有髓
 3. 根橫切面中央可見一小環紋（異型維管束）.....廣防己
(*Aristolochia fangchi*)
 3. 根橫切面中央為圓形的髓.....青藤
(*Sinomenium acutum*)

表 4-2 組織構造檢索表

1. 皮層組織具有簇晶，具髓部，石細胞成環.....防己
(*Aristolochia fangchi*)
1. 皮層組織不具簇晶
 2. 髓中央為薄壁細胞，有結晶（針晶）.....青藤
(*Sinomenium acutum*)
 2. 根無髓
 3. 皮層石細胞成環帶，方晶多而大.....木防己
(*Cocculus trilobus*)
 3. 皮層石細胞單個散在或成群，方晶少而小.....粉防己
(*Stephania tetrandra*)

市售防己類藥材其生藥詳細描述如下：

1. 粉防己 (*Stephania tetrandra*)

材 料：林郁進自大陸南京農業大學帶回之標本及中國藥科大學徐國鈞教授所提供之標本及李威著自勝昌藥廠取得之標本

性 狀：塊根呈不規則短圓柱形、半圓形或呈塊片狀，多彎曲，長5~15cm，直徑1~5cm。未刮去栓皮者表面灰棕色，粗糙而多細皺，根痕明顯，可見橫長突起的皮孔；刮去栓皮者表面灰白色，較平滑，可見深色的橫溝；皮部刮去者露出不規則彎曲的條紋(導管與纖維束)，縱剖者可見彎曲的刺片。質重而堅脆，易折斷。

構 造：以擴大鏡檢視其橫斷面，斷面淺黃白色或類白色，粉性，皮部薄，形成層環紋明顯，棕黑色的導管與黃白色的射線形成放射狀花紋。

鏡 檢：以顯微鏡檢視其橫斷面，木栓層5~8層，厚82~260mm，木栓細胞排列整齊緊密，類長方形或方形，黃棕色，呈切線性延展，切向20~82mm，徑向14~27mm。皮層狹窄，一次皮層和二次皮層劃分不明顯；石細胞單個散在或成群，分布較稀疏，方形、類圓形或長橢圓形，長徑26~108mm，短徑20~41mm，壁厚3~7mm，層紋和孔溝較明顯；韌皮部薄壁細胞中含有許多草酸鈣結晶，除單晶之外尚有柱晶及砂晶，長3~7mm，並含有澱粉粒，層紋不明顯，多為單粒亦有複粒，篩管類多角形，其間夾有類三角形伴細胞；韌皮部外圍有癒合韌皮組織，形成層明顯。木質部放射狀排列，導管單個或2~3個成群，類圓形，多為具緣紋孔導管，也有網紋導管，直徑34~204mm，木纖維成束，方形或多角形，直徑9~17mm，壁厚2~7mm。射線寬廣，由10~50列徑向延長的細胞組成。中央無髓。

2. 木防己 (*Cocculus trilobus*)

材 料：民國八十三年中國藥科大學徐國鈞教授所提供之標本及李威著自勝昌藥廠取得之標本

性 狀：根圓柱形或近扁圓柱形彎曲，長約15cm，直徑1~2.5cm。表面

灰褐色或黑褐色，有深陷而扭曲的溝紋，可見橫長的皮孔及支根痕。質較堅硬不易折斷。

構造：以擴大鏡檢視其橫斷面，斷面黃白色，粉性差，皮部極薄，木部寬廣，有放射狀紋，中心無髓。

鏡檢：以顯微鏡檢視其橫斷面，木栓層厚68mm，木栓細胞長方形。皮層狹窄，細胞內含草酸鈣結晶，多為砂晶與小板狀晶，石細胞多，排列成環帶，深入到韌皮射線，石細胞類圓形、方形、長方形、長梭形、類三角形或不規則形，壁稍厚，層紋和孔溝明顯，胞腔內含結晶及澱粉粒。維管束鞘為薄膜性石細胞環繞韌皮部外圍，韌皮部類廢篩管群與韌皮薄壁細胞成層交互排列。形成層不明顯。木質部寬廣，導管類圓形、圓多角形或橢圓形，單個散在或2~3個成群，木質部薄壁細胞類長方形。射線寬窄不一，細胞長方形或方形，徑向排列整齊，壁微木化。本品薄壁細胞充滿澱粉粒；有的有草酸鈣方晶，長約至14mm。

3. 青藤(*Sinomenium acutum*)

材料：民國八十三年日本西館德次郎先生提供及四川省中藥研究所王一濤教授所提供之標本

性狀：青藤的乾燥藤莖細長圓柱形，長5~20cm，外表灰褐色或棕褐色，有縱皺及橫向皮孔，節處膨大。體輕，質堅硬而脆，易折斷，斷面灰黃色或淡灰棕色，不平坦。

構造：以擴大鏡檢視其橫斷面，韌皮部很窄，木質部導管與射線呈放射狀排列，導管較大，中央為圓形的髓。

鏡檢：以顯微鏡檢視其橫斷面表皮細胞一列，被厚角質層，栓皮層數層(4~5層)呈切線性方向延伸。皮層散有纖維及石細胞，薄壁細胞含有針晶；維管束外側具有中柱鞘纖維，呈新月形；纖維內側具石細胞2~5列，並切向延展與射線中的石細胞連接成環，韌皮部細胞大多類廢，篩管下為韌皮部薄壁細胞，有束間形成層；木質部導管單個散在或數個切向連接，呈

階梯狀排列，導管徑約40~150mm，具填充物，木質部尚有薄壁細胞及纖維；髓線向外漸寬，可見錐形或分枝狀石細胞。具髓，中央細胞較周圍細胞為大，中央為薄壁細胞，具草酸鈣簇晶，外圍為厚壁細胞，紋孔明顯。

4. 廣防己 (*Aristolochia fangchi*)

材 料：南京中國藥科學大學徐國鈞教授所提供之標本及本院附設醫院提供之市場品

性 狀：根圓柱形或半圓柱形，略彎曲，有深橫溝，長8~15cm，直徑2~6cm。未刮去栓皮者，表面灰棕色，栓皮較厚，粗糙，多縱皺紋；刮去部分栓皮者，露出灰黃色的皮部，刮除全部栓皮者，表面灰黃色，較光滑。商品大多縱剖切開面灰白色或淺棕黃色，略粉性，可見縱向、橫向或彎曲排列的導管束，順著導管束方向，易呈刺片狀剝下。質堅硬，不易折斷。

構 造：以擴大鏡檢視其橫斷面，斷面木部占大部分，略有粉性，可見細而較密的放射狀紋，導管束向外呈2歧或多歧分叉，中央可見一小環紋異型維管束。

鏡 檢：以顯微鏡檢視其橫斷面，栓皮特別明顯發達，為數十層（20~40層）木栓細胞組成，厚204~340 μm，木栓細胞類方形，整齊或不整齊；栓內層為薄壁細胞，內含草酸鈣簇晶及澱粉粒。皮層窄，石細胞群斷續排列成環，圓形、類方形、長方形、長橢圓形和多角形，孔溝清楚，層紋明顯或不明顯，胞腔明顯。韌皮部較寬；韌皮射線寬廣，有十至數十列徑向排列細胞，向外漸擴大成喇叭狀，缺乏韌皮纖維；石細胞群散在。形成層明顯。木質部導管束向外呈2歧或多歧分叉，導管類圓形，單個或2~3個成群，主為具緣紋孔和網紋導管；木纖維成束，多角形；木射線寬廣，偶見簇晶和石細胞。髓部薄壁細胞恢復分生能力產額外形形成層，向內產生韌皮部，向外產生木質部，形成異型複合維管束。本品薄壁細胞充滿澱粉粒，有的含草酸鈣簇晶。

5. 異葉馬兜鈴(*Aristolochia heterophylla*)

材 料：民國八十三年四川省中藥研究所王一濤教授提供之標本。

性 狀：根圓柱形而彎曲，長8~20cm，直徑2~3cm。栓皮常除去而顯淺棕黃色，殘留的栓皮灰褐色，較平坦。質堅實，不易折斷，

構 造：以擴大鏡檢視其橫斷面，斷面黃白色，粉性；皮部較厚，木部可見放射狀的導管束，向外作2歧或多歧分叉。

鏡 檢：以顯微鏡檢視其橫斷面，栓皮層厚136~408mm，木栓細胞扁平或類方形。皮層石細胞群斷續排列成環，石細胞方形、長方形、類圓形、梭形或不規則形，層紋、孔溝清楚；石細胞群間有纖維束，纖維三角形或多角形，壁厚，層紋明顯。韌皮部外側可見數條與薄壁細胞相間隔的頽廢篩管群。形成層明顯。木質部寬廣，導管束自中央向外作2歧或多歧分叉，導管類圓形或圓多角形，大多單個散在或2~3個成群，常切向排列；木纖維多角形或三角形，壁薄。初生射線寬廣，次生射線較窄，細胞徑向延長。中央有少數薄壁細胞。本品薄壁細胞充滿澱粉粒；有的含草酸鈣簇晶，直徑 9~43mm。

二、臺灣產防己科植物

1. 金線吊烏龜(*Stephania cephalantha*)

鏡檢：以顯微鏡檢視其橫斷面，栓皮層厚68~204mm，由10~20層薄壁細胞所組成，細胞呈長方形。皮層石細胞常3~5個成群，也有單個散在，長梭形、類方形、長方形或多角形，層紋和孔溝明顯，缺韌皮纖維；二次皮層充滿澱粉粒，偶見草酸鈣方晶、棒晶；中柱異常構造，維管束較稀疏，略排成2~4個同心環，最外列維管束較小，有時僅1至數個導管，形成層幾連接成環；向內維管束較大，木質部由導管、木纖維及木薄壁細胞組成；中央次生構造呈蝶狀，被次生射線分隔成複二叉狀。本品薄壁細胞含澱粉粒。

2. 華南木防己(*Cocculus sarmentosus*):

鏡檢：以顯微鏡檢視其橫斷面，表皮具有角質保護，木栓皮層呈切線

性延長，細胞壁較厚，並有次生組織，由8~16層細胞所構成。皮層狹窄，石細胞聚集連接成環，圓形、長橢圓形、多角形、孔溝清楚。維管束呈放射狀，韌皮纖維圍繞在維管束的最外層，略呈弦月形，韌皮組織較寬且癒合，形成層並不明顯；木質部亦寬廣，大型導管單個或2~3個成群，類圓形，圓多角形，150~350 μ m，小型導管約60 μ m，髓線狹窄，5~8層細胞徑向排列整齊，細胞長方型。髓為厚壁細胞所組成，愈往中心細胞愈大，內有長方型結晶。

3. 樟葉木防己(*Cocculus laurifolius*):

鏡檢：以顯微鏡檢視其橫斷面，木栓細胞長方形，木栓化並微有木化，由12~20層淡褐色細胞所組成，木栓形成層及栓內層均不明顯，皮層狹窄，石細胞群3~4列斷續排列成環，圓形、長橢圓，孔溝明顯；石細胞內側緊臨癒合韌皮組織，缺乏韌皮纖維，形成層不明顯。木質部寬廣呈放射狀，由內而外呈喇叭狀漸寬，木部細胞大部分木化成厚膜細胞，中間散在少數口徑稍大之導管及木部纖維。無髓，木部髓線大小不一，呈三角形，髓線細胞呈放射狀整齊排列，中央為木部匯合成圓形。

4. 千金藤(*Stephania japonica*)

鏡檢：以顯微鏡檢視其橫斷面，木栓細胞2~3層，顏色暗褐色。栓內層含短小棒晶，長4~8 μ m，中柱鞘部位有厚壁石細胞3~10個成群散在，多數呈橢圓形，木化，少數類圓形，韌皮部外側為半圓形之纖維束圍成韌皮纖維，且常與厚壁石細胞群連接成環。維管束少厚壁細胞，木質部呈放射狀排列，導管大小可至120 μ m。澱粉粒多為複粒，由2~3分粒組成，單粒類圓形，直徑2~16 μ m。

5. 土防己(*Paracyclea gracillima*):

鏡檢：以顯微鏡檢視其橫斷面，木栓細胞6~10列。中柱鞘部位有1~3列石細胞斷續排列成環，石細胞類圓形或長橢圓形，長52~87 μ m，直徑24~45 μ m。孔溝不明顯；皮層內側，亦即與韌皮部交界處較寬廣，韌皮部不癒合，形成層不明顯且不成環。導管

斷續排列成放射狀，周圍有木纖維圍繞，間有木薄壁細胞，韌皮薄壁細胞，木射線細胞，皮層柔細胞，含有多數小方晶及棒狀結晶，無髓。

6. 台灣土防己(*Paracyclea ochiaiana*)

鏡檢：以顯微鏡檢視其橫斷面，木栓層為4~8列木栓細胞，長方形呈切線性排列。皮層狹窄，石細胞多，排列成環帶，深入到韌皮射線，石細胞類圓形、橢圓形、類三角形或不規則形，壁厚，孔溝明顯。韌皮部寬窄不一，隨放射性維管束大小而有極大差異，具癒合韌皮部，形成層連接成環。木質部寬窄亦有不同，甚至向外分成兩歧，導管圓形、橢圓形、多角形單個散在。無髓，木質部向外會合成大圓形。

7. 三肋蓬萊藤(*Paracyclea trinervatus*)

鏡檢：以顯微鏡檢視其橫斷面，木栓細胞長方形，呈切線方向排列整齊，由6~10列細胞所組成，有時剝落，壁薄，木栓化並微有木化，皮層極為狹窄，僅5~10層柔細胞，皮層內側，亦即緊臨韌皮部之處，石細胞群斷續排列成環，圓形、橢圓形、類方形、長橢圓形，孔溝明顯，層紋明顯或不明顯，胞腔明顯，韌皮部癒合，髓線自內而外呈喇叭狀擴張使放射形維管束較為狹窄，形成層不明顯，木質部大型導管排列成放射狀，導管類圓形、圓多角形或橢圓形，單個散在。髓線較寬，細胞方形或多角形，徑向排列整齊，壁微木化。無髓。

8. 五肋蓬萊藤(*Pericampylus formosanus*)

鏡檢：以顯微鏡檢視其橫斷面，表皮具角質，厚可達60 μm ；表皮下為木栓層，細胞3~5列，皮層極為狹窄，由類圓形薄壁細胞組成。細胞內含澱粉粒及少數草酸鈣小針晶，皮層內側石細胞140~220個聚集成新月形排列於每一維管束的外側，且每一新月形石細胞群互相連接成環，又與射線中的石細胞群相連接。維管束為外韌開放型且向外寬廣，韌皮組織大多癒合，形成層不明顯，木質部寬廣的放射，大型導管單個散在，圓型、橢圓形或多

角形。射線細胞10~17列，細胞壁薄，徑向延伸，故極為狹長，內含細小球形澱粉粒與少量草酸鈣，無髓。

第二節 市售防己類藥材及含防己濃縮中藥方劑之薄層色譜鑑別

一、市售防己類藥材

臺灣防己市場品經抽查北中南二十五家中藥房，其販售名稱極為混亂，有漢防己、木防己、廣防己等名稱，經鑑定確認二十三家使用廣防己(*Aristolochia fangchi*)，二家使用粉防己(*Stephania tetrandra*)而民間草藥鐵牛入石則為木防己(*Cocculus trilobus*)及華南木防己(*Cocculus sarmentosus*)混用。二、含防己濃縮中藥方劑

本研究收集臺灣市售含有防己的濃縮中藥方劑，共八家藥廠五種方劑，作問卷調查，並以TLC法鑑別方劑中所使用的防己為何種基原，以了解其使用情形，其結果如下：

A. 問卷調查

調查八家藥廠：

- (1)五家藥廠自稱所用防己為“漢防己”
- (2)一家藥廠自稱所用防己為“廣防己”
- (3)一家藥廠自稱八十二年十月十二日以前使用廣防己，之後五種方劑所使用防己，全面改成漢(粉)防己。
- (4)一家藥廠自稱多年來臺灣地區進口防己普遍為廣防己，但其公司自行由華中地區進口漢防己，亦嘗購用本省產“倒地瓊”，而在青黃不接時則使用廣防己。

B. 薄層色譜鑑別

鑑別八家藥廠：

- (1)六家藥廠所使用的防己為廣防己(*Aristolochia fangchi*)
- (2)二家藥廠所使用的防己，除防己黃耆湯使用廣防己(*Aristolochia fangchi*)之外，其餘均使用粉防己(*Stephania tetrandra*)

表4-4 市售含防己濃縮中藥方劑之薄層色譜鑑別

	防己黃耆湯	疏經活血湯	小續命湯	通用痛風丸	木防己湯
A藥廠	△	◎	◎	◎	
B藥廠	△	△	△	△	△
C藥廠	△	△	△	△	△
D藥廠	△	◎	◎	◎	
E藥廠	△	△	△	△	
F藥廠	△	△	△	△	
G藥廠	△	△	△	△	
H藥廠	△	△	△	△	

△：廣防己 (*Aristolochia fangchi*) ◎：粉防己 (*Stephania tetrandra*)

由以上可知：各家藥廠對其所使用的防己基原並不了解，名稱使用也混淆不清，並沒有遵循“治風用木防己，治水用漢防己”的使用原則以配合在方劑中使用；而自1993年二月比利時事件發表之後，兩家藥廠警覺到廣防己可能會造成腎衰竭的情況，紛紛將廣防己改為漢（粉）防己使用，其他藥廠則仍然繼續使用廣防己，而臺灣是否也有服用防己而造成腎衰竭的病例，值得我們注意。

三、在比利時造成腎衰竭減肥藥的薄層層析

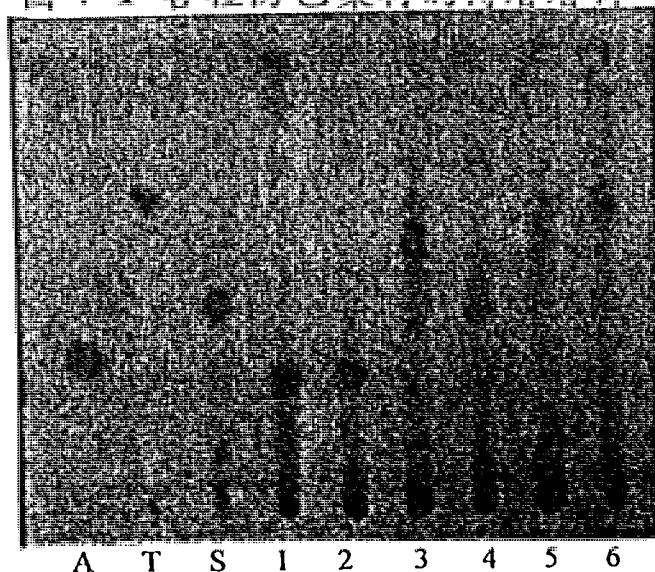
由比利時教授 Jean-Louis Vanhermeghem 提供的四種批號減肥藥，經薄層層析鑑別，結果如表 4-5 所示：

表 4-5：比利時四種批號減肥藥的薄層層析

	Batch 91L 18/4	Batch 91c 13/1	Batch 92D 23/5	Batch 92D 03/6
馬兜鈴酸	△		△	△
粉防己鹼				

△：表示含有此種標準品

圖 4-1 各種防己藥材的薄層層析



- A--Aristolochic acid
- T--Tetrandrine
- S--Sinomenine
- 1--*Aristolochia fangchi*
- 2--*Aristolochia heterophylla*
- 3--*Stephania tetrandra*
- 4--*Sinomenium acutum*
- 5--*Cocculus trilobus*
- 6--*Paracyclea ochiaiana*

圖 4-2 八家藥廠市售之防己黃耆湯

薄層層析條件：

薄層層析板：Silica gel 60 F254

展開溶媒：乙酸乙酯:甲醇:氨水(10:2:0.2)

點注量：各 5 μ l

展開距離：5.5 cm

檢出方法：U V 254 nm

1~8-八家藥廠

A--Aristolochic acid

T--Tetrandrine

F--*Aristolochia fangchi*

S--*Stephania tetrandra*

B--Blank

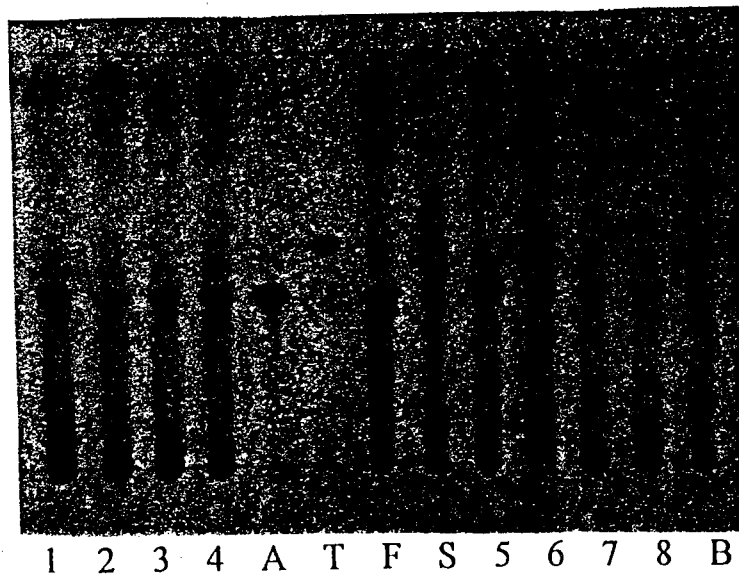
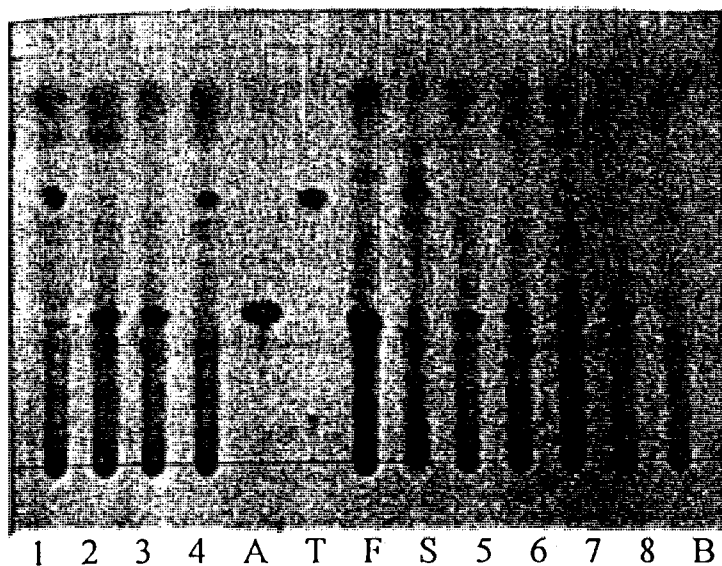


圖 4-3 八家藥廠市售之疏經活血湯



薄層層析條件：

薄層層析板：Silica gel 60 F254

展開溶媒：乙酸乙酯:甲醇:氨水(10:2:0.2)

點注量：各 5 μ l

展開距離：5.5 cm

檢出方法：U V 254 nm

1-8-八家藥廠

A-Aristolochic acid

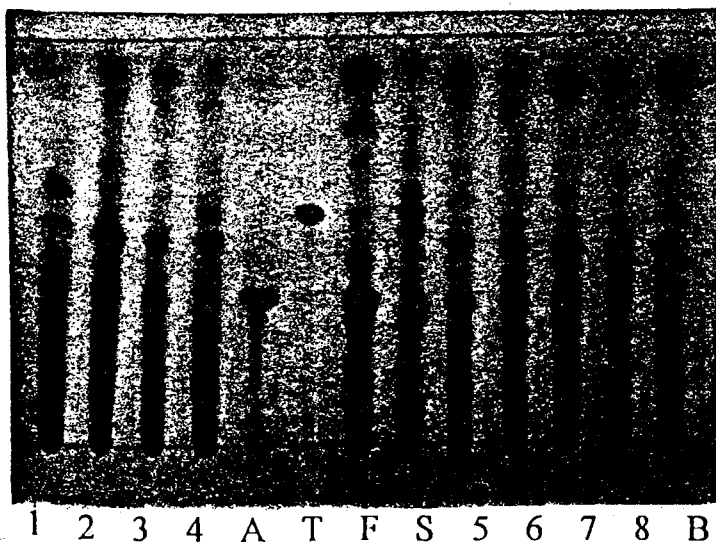
T-Tetrandrine

F-Aristolochia fangchi

S-Stephania tetrandra

B-Blank

圖 4-4 八家藥廠市售之小續命湯



薄層層析條件：

薄層層析板：Silica gel 60 F254

展開溶媒：乙酸乙酯:甲醇:氨水(10:2:0.2)

點注量：各 5 μ l

展開距離：5.5 cm

檢出方法：U V 254 nm

1-8-八家藥廠

A-Aristolochic acid

T-Tetrandrine

F-Aristolochia fangchi

S-Stephania tetrandra

B-Blank

圖 4-5 八家藥廠市售之通用痛風丸

薄層層析條件：

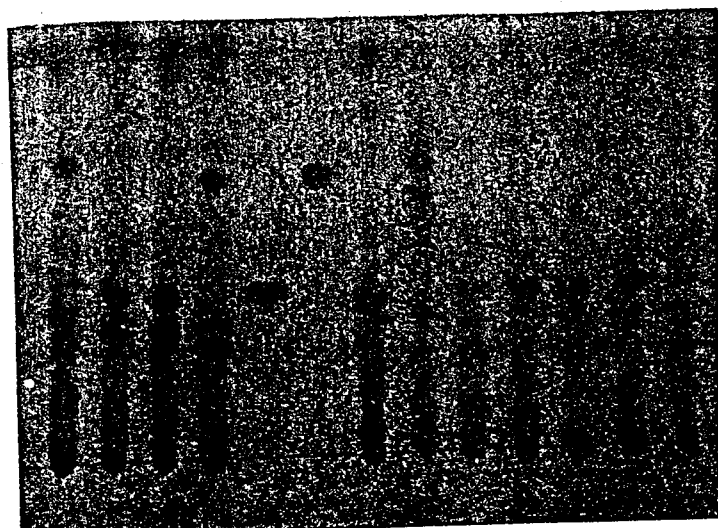
薄層層析板：Silica gel 60 F254

展開溶媒：乙酸乙酯:甲醇:氨水(10:2:0.2)

點注量：各 5 μ l

展開距離：5.5 cm

檢出方法：U V 254 nm



1 2 3 4 A T F S 5 6 7 8 B

1~8-八家藥廠

A-Aristolochic acid

T-Tetrandrine

F-Aristolochia fangchi

S-Stephania tetrandra

B-Blank

圖 4-6 八家藥廠市售之木防己湯

薄層層析條件：

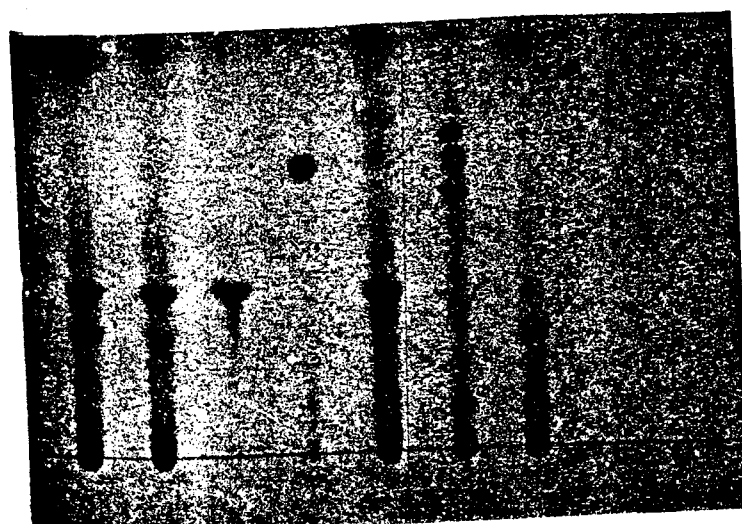
薄層層析板：Silica gel 60 F254

展開溶媒：乙酸乙酯:甲醇:氨水(10:2:0.2)

點注量：各 5 μ l

展開距離：5.5 cm

檢出方法：U V 254 nm



1 2 A T F S B

1~2-八家藥廠

A-Aristolochic acid

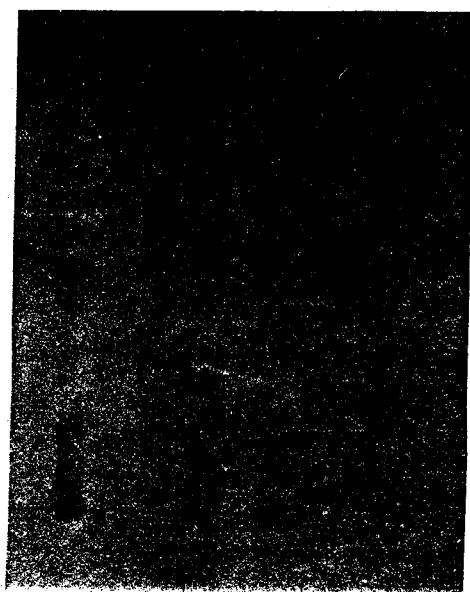
T-Tetrandrine

F-Aristolochia fangchi

S-Stephania tetrandra

B-Blank

圖 4-7 比利時四種批號的減肥藥



1 2 3 4 A T

薄層層析條件：

薄層層析板：Silica gel 60 F254

展開溶媒：乙酸乙酯:甲醇:氨水(10:2:0.2)

點注量：各 5 μ l

展開距離：5.5 cm

檢出方法：U V 254 nm

1~4—四種批號減肥藥

A—Aristolochic acid

T—Tetrauridine

第三節 市售防己類藥材之藥理學研究

防己性寒，味苦辛，入膀胱、肺兩經，具有祛風止痛、利水消腫的功能⁽⁶⁾。唐、陳藏器本草拾遺曰：「治風用木防己，治水用漢防己」⁽⁹⁾即謂木防己祛風止痛較強，漢防己利水消腫較佳，然而究竟何者為木防己？何者為漢防己？卻沒有具體的描述，且防己的名稱和來源頗為混淆，使得實際應用沒有一個明確依據。而且在1993年2月比利時有多位婦人因服用含有防己的減肥藥而造成腎衰竭的病例，故本研究針對防己的鎮痛、抗發炎、利尿、毒性等特性，進行多項藥理實驗，以探討各種防己的藥理作用，進行防己藥材的品質評價，提高中藥療效。

一、急性毒性試驗

給予小鼠口服廣防己、粉防己、木防己之甲醇抽出物，其LD₅₀及95%可信限如下：

表4-6 防己之急性毒性試驗

藥材	LD ₅₀ 劑量 (g/kg)	95 % 可信限 (g/kg)
粉防己 (<i>Stephania tetrandra</i>)	0.97 g/kg	0.756 ~ 1.250 g/kg
廣防己 (<i>Aristolochia fangchi</i>)	3.96 g/kg	3.00 ~ 5.23 g/kg
木防己 (<i>Cocculus trilobus</i>)	4.26 g/kg	3.47 ~ 5.24 g/kg

甲醇抽出物經折算為原藥材可知：粉防己LD₅₀為18.85g/kg最毒，廣防己LD₅₀為92.58g/kg次之，木防己LD₅₀為113.23 g/kg毒性最小。

中毒症狀：

粉防己：活動性降低，共濟運動失調，震顫驚厥，呼吸困難，嚴重腹瀉等，最後因呼吸衰竭而死。

木防己：瞳孔縮小，活動性降低，偶而驚厥，呼吸麻痺而死。

廣防己：通常口服1~2日後死亡。

二、鎮痛試驗

(一)小鼠熱板法

結果顯示，各種防己都有提高痛閾的作用，但顯著性有所差異；其中以廣防己作用最強，痛閾提高百分率在給藥後30min高達 $121.53 \pm 3.87\%$ ；粉防己痛閾提高百分率次之，木防己僅在給藥後15min痛閾提高百分率達 $70.38 \pm 2.66\%$ ，其後痛閾提高百分率僅約有30%。折算為原藥材比例後以廣防己鎮痛效果好，粉防己次之，木防己最弱。如Fig 4-8，Table 4-7所示：

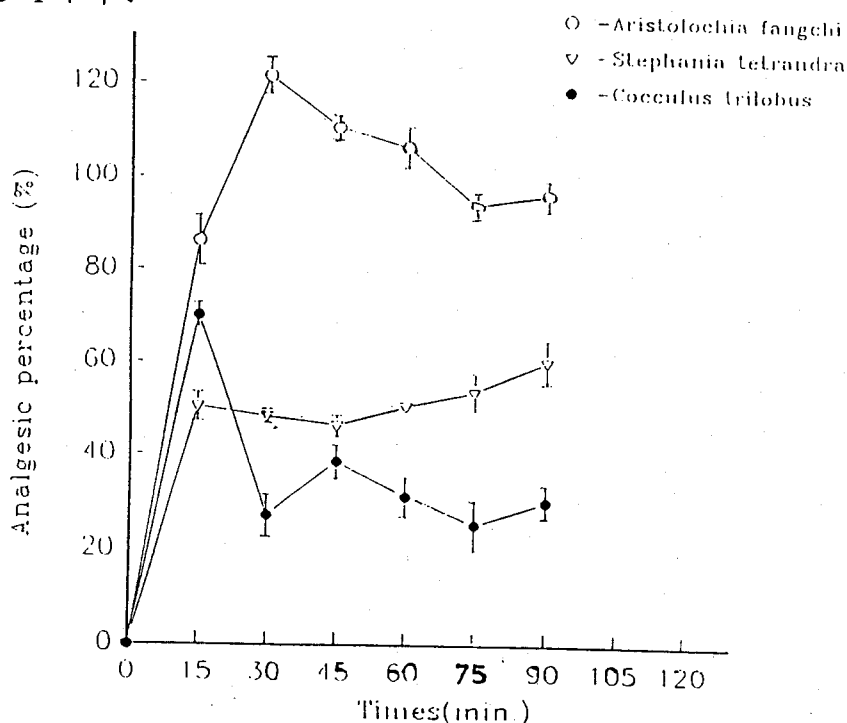


Fig 4-8 The analgesic effects of different fangchi extract on hot plate in mice

Dose P.O (2500mg/kg)

Data: Mean \pm S.E. (n = 10)

Significant: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

(二)醋酸鎮痛法

結果顯示，各種防己對於由腹腔注射1% Acetic acid (給藥量 0.1 ml/10g) 引起之重覆肌肉收縮及所伴隨之後肢伸張次數 (writhing response)，均有抑制作用，但不顯著；以口服粉防己2500mg/kg，其%protection 44.51%為最好，口服廣防己2500mg/kg，其%protection 19.19%次之。

如 Fig 4-9，Table 4-8所示：

Table 4-7 Analgesic Effects of Fangchi in Mice (Hot Plate Method)

Drug	Dose P.O (2500mg/kg)	痛閾提高百分率 (%)				
		15min	30min	45min	60min	75min 90min
<i>Aristolochia fangchi</i>		86.25 ± 5.32**	121.53 ± 3.87**	110.56 ± 2.60**	106.38 ± 4.28**	93.85 ± 2.53** 96.21 ± 3.29**
<i>Cocculus trilobus</i>		70.38 ± 2.66**	27.26 ± 4.42	38.55 ± 3.53	31.29 ± 4.18	25.32 ± 5.21 30.26 ± 3.42
<i>Stephania tetrandra</i>		50.29 ± 3.22*	48.26 ± 1.53*	46.32 ± 2.21*	50.39 ± 1.02*	53.63 ± 3.98* 60.29 ± 6.77**

Data represented as Mean ± SEM.

★ P < 0.05 ★★ P < 0.01 as compare with control

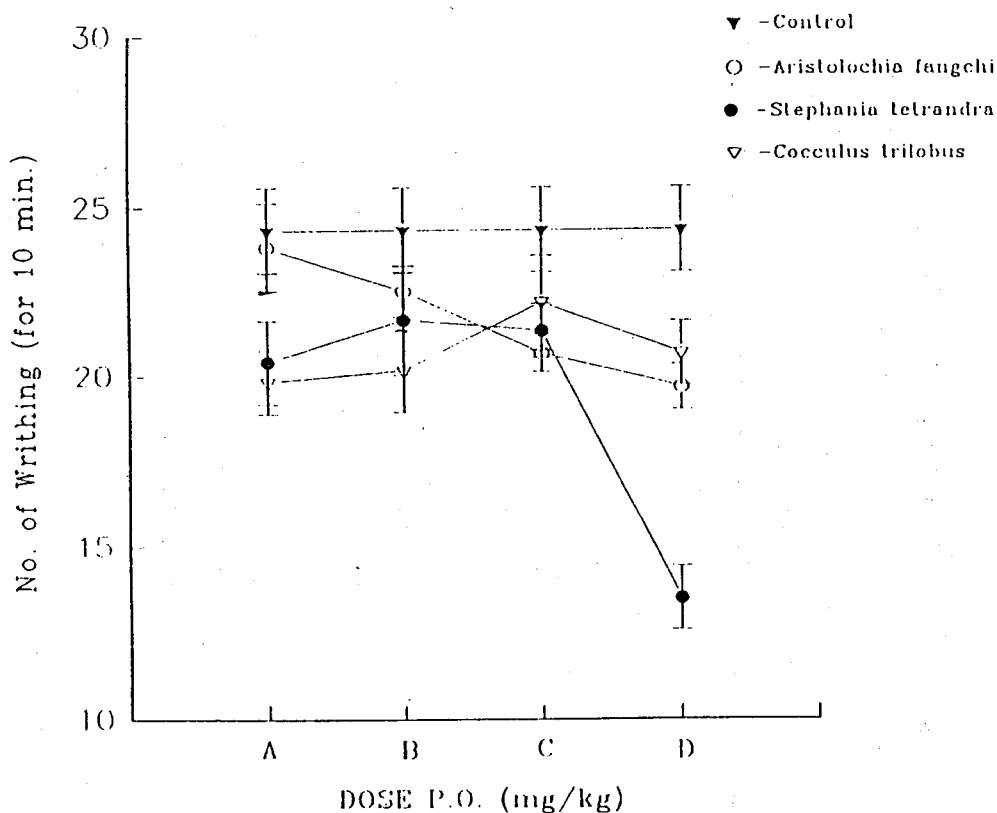


Fig 4-9 The effects of different fangchi extract on acetic acid—induce writhing response in mice
 A(100mg/kg) B(500mg/kg) C(1000mg/kg) D(2500mg/kg)
 Data : Mean \pm S.E. (n=8)
 Significant : * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

三、抗發炎實驗

(一) 大鼠足蹠實驗

結果顯示，各種防己對於皮下注射1% λ -carrageenin於大鼠右後腳掌所誘發的浮腫，均有抑制效果，但其顯著性有所差異；4小時後控制組浮腫率為 $118.51 \pm 3.22\%$ ，粉防己（口服2500mg/kg）能將其浮腫率降低至 $5.47 \pm 0.66\%$ ，可見其抗浮腫效果最好，廣防己、木防己亦有抗浮腫效果。如Fig 4-10，Table 4-9所示：

Table 4-8 Analgesic Effects of Fangchi on no. of Writhing in mice

Drug	Dose P.O (mg/kg)	No. of Writhing (for 10 min)	% protection
Control		24.33 \pm 1.26	
<i>Aristolochia fangchi</i>	2500	19.66 \pm 0.66*	19.19
	1000	20.66 \pm 0.55	15.08
	500	22.50 \pm 0.76	7.52
	100	23.83 \pm 1.30	3.9
<i>Cocculus trilobus</i>	2500	20.66 \pm 0.95	15.08
	1000	22.16 \pm 1.42	8.91
	500	20.16 \pm 1.22	17.13
	100	19.83 \pm 0.94	18.49
<i>Stephania tetrandra</i>	2500	13.50 \pm 0.92**	44.51
	1000	21.33 \pm 0.83	12.33
	500	21.66 \pm 1.64	10.97
	100	20.42 \pm 1.23	16.07

Data represented as Mean \pm SEM.

★ P < 0.05 ★★ P < 0.01 as compare with control

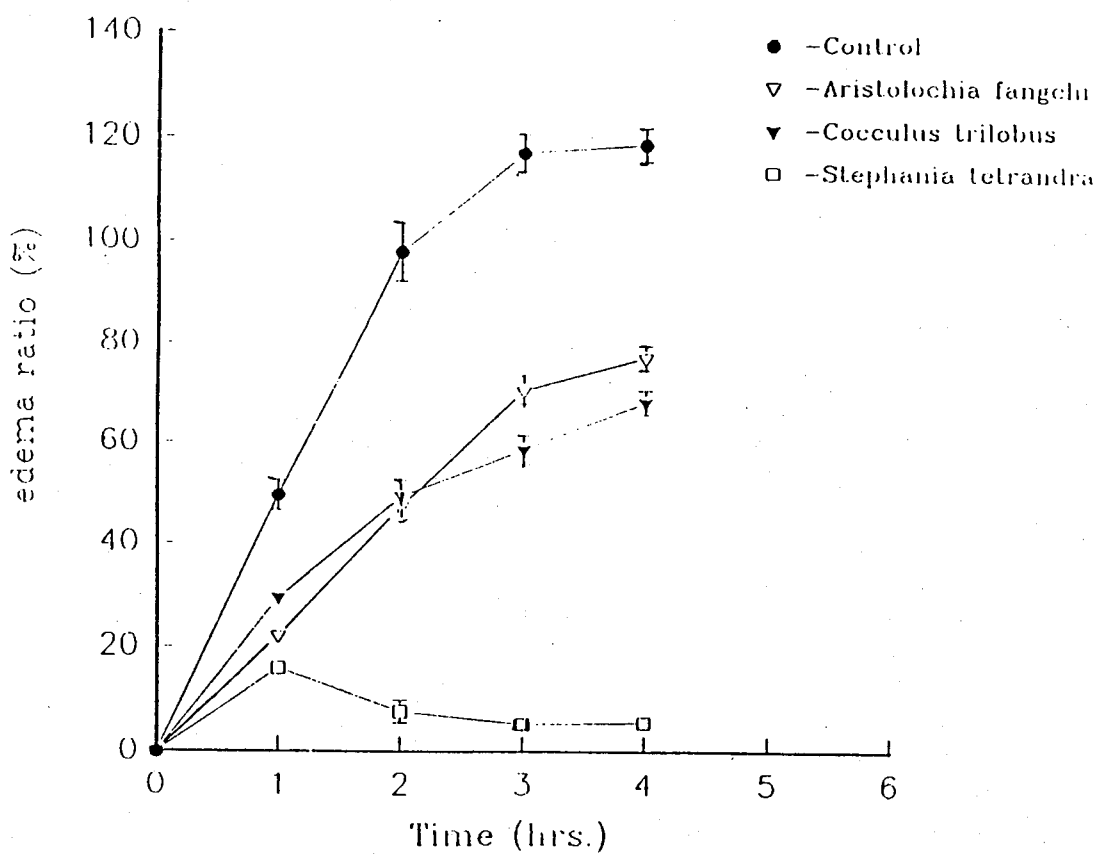


Fig 4-10 The effects of different fangchi extract on rat's hind paw edema induced by λ -carrageenin
Dose P.O (2500mg/kg)
Data : Mean \pm S.E. (n = 6)
Significant : * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

Table 4-9 Effects of Fangchi on Swelling of Rat Hind Paw Induced by λ -Carrageenin

Drug	Dose P.O (mg/kg)	swelling			Ratio
		1hr	2hr	3hr	
Control		49.55 \pm 3.06	97.98 \pm 5.66	116.96 \pm 3.57	118.51 \pm 3.22**
<i>Aristolochia fangchi</i>	2500	22.03 \pm 1.42**	47.34 \pm 2.62**	70.84 \pm 3.26**	77.14 \pm 2.48**
	1000	32.22 \pm 1.92**	54.02 \pm 2.46**	87.52 \pm 2.65**	82.69 \pm 3.22**
	500	37.39 \pm 2.06**	76.50 \pm 4.12**	91.55 \pm 2.69**	91.03 \pm 2.97
	100	45.24 \pm 3.36	83.33 \pm 3.41	101.43 \pm 2.66*	105.19 \pm 2.89
<i>Cocculus trilobus</i>	2500	29.38 \pm 1.53*	49.43 \pm 3.21**	58.64 \pm 2.88**	68.16 \pm 2.42**
	1000	33.28 \pm 1.82**	51.22 \pm 2.91**	66.37 \pm 2.42**	76.69 \pm 1.78**
	500	39.49 \pm 1.39*	64.13 \pm 2.21**	79.19 \pm 1.49**	88.87 \pm 1.88**
	100	37.25 \pm 3.24	87.17 \pm 4.09	95.93 \pm 3.93**	101.22 \pm 3.07**
<i>Stephania tetrandra</i>	2500	16.06 \pm 1.41**	7.85 \pm 2.18**	5.39 \pm 0.99**	5.47 \pm 0.63**
	1000	9.91 \pm 2.06**	13.39 \pm 1.15**	21.07 \pm 0.92**	35.71 \pm 2.48**
	500	15.12 \pm 1.79**	21.14 \pm 2.61**	26.39 \pm 2.06**	38.75 \pm 2.76**
	100	21.43 \pm 1.24**	22.26 \pm 1.28**	34.27 \pm 1.69**	52.52 \pm 3.15**

Data represented as Mean \pm SEM.

★ P < 0.05 ★★ P < 0.01 as compare with control

(二)醋酸鎮痛法

結果顯示，各種防己對於由腹腔注射1% Acetic acid(給藥量 0.1 ml/10g)引起之重覆肌肉收縮及所伴隨之後肢伸張次數(writhing response)，均有抑制作用，但不顯著；以口服粉防己2500mg/kg，其% protection 44.51%為最好，口服廣防己2500mg/kg，其% protection 19.19%次之。

如 Fig 4-9, Table 4-8所示

Table 4-10 Effect of the Fangchi on the mast cell degranulation (in vitro) induced by compound 48/80 (10 μ g/ml)
Animal : Rat

Drugs	(μ g/ml)	Percent Release		
		β -glucuronidase (% inh)	histamine	(% inh)
Control		—	27.6 \pm 4.3	—
Aristolochia fangchi	100	15.4 \pm 2.7	31.8 \pm 3.1	18.0 \pm 8.0
	30	17.5 \pm 3.2	29.4 \pm 3.8	7.7 \pm 3.6
Cocculus trilobus	100	15.8 \pm 2.8	28.1 \pm 3.3	3.3 \pm 6.3
	30	16.1 \pm 3.5	30.6 \pm 3.0	13.3 \pm 7.6
Stephania tetrandra	100	18.7 \pm 3.8	27.0 \pm 2.9	0.4 \pm 6.1
	30	13.4 \pm 2.4	24.1 \pm 5.1	14.5 \pm 7.8
		13.2 \pm 3.2		

N=3-5 ★ P < 0.05 ★★ P < 0.01 — : affect the assay system

Table 4-11 Effect of the Fangchi on the Neutrophil degranulation (in vitro) induced by FMLP (10^{-6} M)
Animal : Rat

Drugs	($\mu\text{g/ml}$)	Percent	Release	
		β -glucuronidase (% inh)	lysozyme	(% inh)
Control		23.9 \pm 1.2	—	—
Aristolochia fangchi	100	6.7 \pm 2.6**	70.0 \pm 13.6	36.0 \pm 3.0
	30	10.0 \pm 1.9**	58.5 \pm 7.0	13.3 \pm 5.4*
	10	11.6 \pm 0.8*	48.2 \pm 3.7	23.4 \pm 7.0
Cocculus trilobus	100	16.9 \pm 1.7	28.4 \pm 8.2	25.4 \pm 1.4
	30	23.1 \pm 2.1	11.3 \pm 8.3	29.1 \pm 1.9
Stephania tetrandra	100	13.9 \pm 1.5	43.7 \pm 1.7	41.6 \pm 2.2
	30	16.5 \pm 1.9	31.5 \pm 4.4	— 16.1 \pm 10.0
				17.9 \pm 8.0
				7.4 \pm 4.9

N=3-5 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ — : affect the assay system

四、利尿試驗

結果顯示，各種防己對正常大鼠並無明顯的利尿效果(粉防己小劑量微增，大劑量反有抑制)，如Fig 4-11，Table 4-12所示：

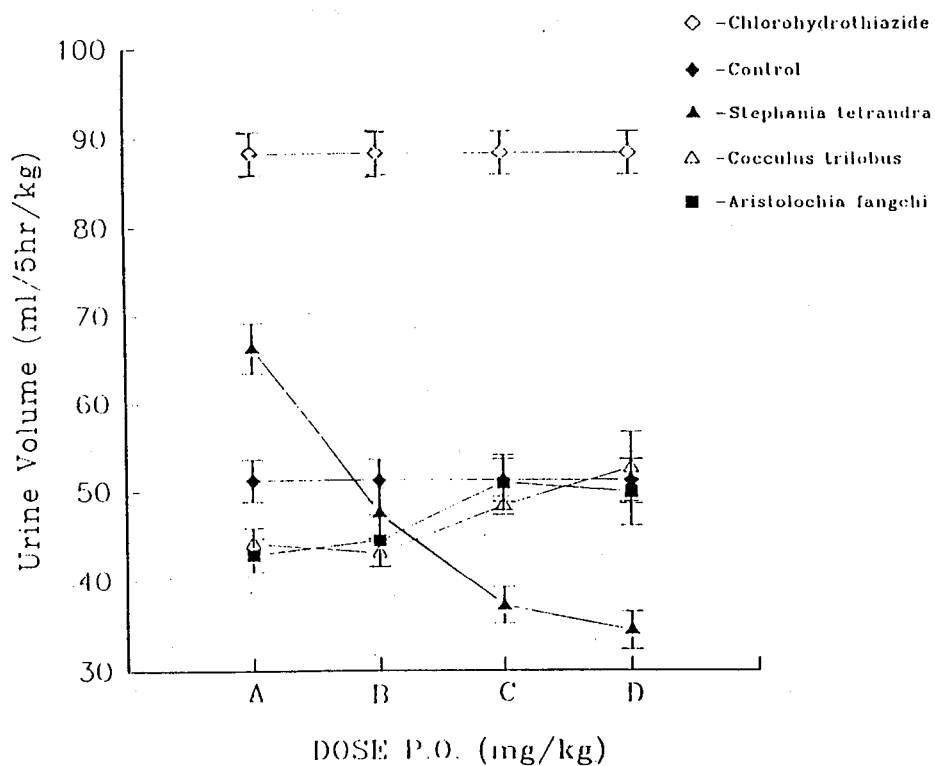


Fig 4-11 The effects of different fangchi extract on the Urine Volume in rat
 A(100mg/kg) B(500mg/kg) C(1000mg/kg) D(2500mg/kg)
 Data : Mean \pm S.E. (n = 6)
 Significant : * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

Table 4-12 Effects of Fangi on the Urine excretion Volume in Rat

Drug	Dose P.O (mg/kg)	Urine Volume (ml/5hr/kg)
Control		51.23±2.38
Chlorohydrothiazide	20	88.23±2.44
<i>Aristolochia fangchi</i>	2500	49.95±3.74
	1000	50.93±3.12
	500	44.51±2.90
	100	42.91±1.89
<i>Cocculus trilobus</i>	2500	52.64±4.01
	1000	48.37±1.03
	500	43.07±1.58
	100	44.20±1.73
<i>Stephania tetrandra</i>	2500	34.47±2.09
	1000	37.20±1.99
	500	47.54±2.74
	100	66.33±2.87★

Data represented as Mean \pm SEM.

★ P < 0.05 ★★ P < 0.01 as compare with control

五、抗腫瘤試驗

結果顯示：廣防己對於人類腸癌細胞具有顯著抑制效果；木防己則對人類腸癌細胞、人類喉癌細胞、人類肺癌細胞及老鼠血癌細胞均有顯著抑制效果；粉防己則均無效果。如表4-13所示：

表 4-13 防己之甲醇粗抽物抗腫瘤實驗之ED₅₀值 (μg/ml)

	P388	KB16	A549	HT29
廣防己	26.852	>50	>50	6.832
木防己	3.5	5.399	5.476	5.657
粉防己	>50	>50	>50	>50

1. data are shown as mean

2. If ED₅₀ 值 ≤ 20 μg/ml (Crude extract) , it has antitumor effect

第五章 討 論

防己爲常用中藥。在台灣除了使用防己科(Menispermaceae)植物粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore，木防己 *Cocculus trilobus* DC. 之根或根莖外，尚使用馬兜鈴科(Aristolochiaceae)植物廣防己 *Aristolochia fangchi* Wu.之根部，具有利水消腫，祛風止痛的功效。

唐、陳藏器本草拾遺：「治風用木防己，治水用漢防己」，即謂漢防己利水消腫作用較強，木防己祛風止痛之力較佳，然究竟何者爲漢防己，何者爲木防己卻沒有具體的描述，致使後人在應用上無所適從，實際上防己商品來源極爲複雜，市場品的名稱也混淆不清，若要墨守於「治風用木防己，治水用漢防己」的成規，藥效品質必定大打折扣，所以我們可以不採用前人「治風用木防己，治水用漢防己」的說法，將防己市場品作藥理上的評估，以正確的使用防己藥材。

防己在中醫臨床上用以治療風濕性關節炎、類風濕性關節炎⁽²⁹⁾、風濕性心臟病、急性腎炎、尿路感染、膀胱炎等，外用治療毒蛇咬傷、癰疔腫毒等⁽⁴⁸⁾，故本研究利用誘發動物疼痛、發炎及利尿等反應以探究廣防己、粉防己、木防己之間的療效差異。

本實驗之熱板鎮痛試驗結果顯示，各種防己均有提高痛閾的作用，但以廣防己之鎮痛效果最好；而在大鼠足蹠試驗中，各種防己均有明顯的抗浮腫作用，其中以粉防己的抗浮腫效果最好。由此可知防己藥材使用在風濕性關節炎、類風濕性關節炎均有鎮痛、抗發炎的效果，我們則可以根據病況的差異，加以分別應用；若是病人疼痛甚劇，可先用廣防己鎮痛以舒緩症狀；若病人疼痛尚可忍受，可以使用粉防己消炎，因爲大部份疼痛是因爲炎症所引起的。

在利尿試驗方面，各種防己對正常大鼠並無明顯的利尿效果(粉防己小劑量微增，大劑量反有抑制)，這與防己能利水消腫的觀念不合，然而排尿問題牽涉到膀胱、尿道、骨盆腔肌肉等部位的功能協調；膀胱正常收縮、尿道通暢、骨盆腔肌肉適時放鬆是正常排尿的三大要素⁽⁴⁹⁾；發炎反應不僅使膀胱收縮力變差，收縮動作不協調，並可能導致尿道狹窄，因

此大部分的排尿問題都是發炎反應所造成，而防己能清利下焦濕熱以治水腫，即防己可能是經由抗發炎的作用以利水消腫，故對正常大鼠並無利尿作用，但若是一個人因為膀胱發炎、泌尿道感染等原因而造成的排尿不順，則可藉由防己而加以改善。

即防己有清利下焦溼熱的作用以治水腫，故常與其他利尿消腫之藥配伍應用，若屬虛症水腫，則宜配黃耆、白朮、甘草、桂枝等⁽⁴⁹⁾。由此可知，在治療急性腎炎、尿路感染、膀胱炎等引起之水腫，我們可以應用抗炎效果較強的粉防己，以迅速改善症狀。

西元1993年2月，比利時教授Jean-Louis Vanherneghem 在 The Lancet 雜誌上發表了一篇文章，指出在比利時首都布魯塞爾附近有許多位婦人由於服用了含防己的減肥藥而造成了腎衰竭的病例，現在將其所發表的兩篇論文分述如下：

一、Lancet 1993；341：387-91

在比利時首都布魯塞爾附近，由於1992年後腎衰竭的人數劇增，促使他們進行此地區的流行病學調查，發現這些腎衰竭的病患除了服用腎毒性的藥（如 analgesics，diuretics，non-steroidal antiinflammatory drugs）及idiopathic的病人外，幾乎所有的病患在腎病確定之前都有服用一種減肥藥的處方；許多人服用本處方多年均沒有健康上的問題，但自從1990年處方改變，加入防己、厚朴藥材後就陸續有腎衰竭的病例產生。

根據文獻的記載，厚朴的毒性很低沒有造成腎毒性的報告，而粉防己的成份 tetrandrine也只有在大量注射時才會產生，且以薄層層析法鑑定此處方，並沒有 tetrandrine被測得，經過一連串的調查，認為引起腎衰竭的原因可能有三種：1. fungal 2. Ochratoxin A 3. Aristolochic acid 很值得注意的是防己的使用在中國地區極為混亂，其中就有含馬兜鈴酸的廣防己作為防己使用，但由於處方很複雜，鑑定需經過幾個純化步驟，容易將成分破壞而無法測得，故致病原因仍待探討。

二、Lancet 1994；343：173

由於強烈的懷疑造成腎衰竭的原因可能為使用馬兜鈴科的廣防己，且無法以薄層層析法鑑定出Aristolochia acid 的存在，於是他們就收集比利時首都布魯塞爾附近的12家市場品，發現其中有10家使用含Aristolochic acid的廣防己，1家使用含 tetrandrine 的粉防己，另1家兩者混用，可見由中國大陸輸入比利時的防己以廣防己為主，所以造成腎衰竭的原因極可能是使用了馬兜鈴科的廣防己。

由於Jean-Louis Vanherneghem 教授仍無法確定減肥藥處方中所使用的防己為馬兜鈴科的廣防己，故本研究向Jean-Louis教授索取造成腎衰竭的減肥藥，以確定其防己是否為馬兜鈴科的廣防己，結果證實四個不同批號的減肥藥中有三種為含有Aristolochic acid的廣防己，另一種不含有Aristolochic acid及tetrandrine，這正也證實了在比利時也有人長期服用此種減肥藥而沒有腎臟病變(可能是在此減肥藥中不含有防己或使用其它防己類藥材)。

西元1993年 2月，比利時事件發表後，臺灣兩家藥廠警覺到廣防己可能會造成腎衰竭的情況，紛紛將廣防己改為漢(粉)防己使用，其他藥廠則仍然繼續使用廣防己；其實在使用藥物上，首先就應確立一個觀念，那就是“用之得當方為藥，用之不當即是毒”；“藥即是毒”但我們不可以因為有毒而不去使用它，在比利時事件中，他們是因為不認識中藥的特性，把含有防己的製劑當作健康食品減肥藥，大量而長期的服用，所以造成許多腎衰竭的病例，而我們則必需把防己當作是一種毒，謹慎小心，方能靈活運用以治療疾病。

第六章 結 論

防己為常用中藥。在台灣除了使用防己科(Menispermaceae)植物粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore，木防己 *Cocculus trilobus* DC. 之根或根莖外，尚使用馬兜鈴科(Aristolochiaceae)植物廣防己 *Aristolochia fangchi* Wu之根部，具有利水消腫，祛風止痛的功效。

實際上，商品防己藥材來源複雜，品種混亂，其功效亦有差異，

1993年於比利時曾有因服用含防己處方而造成多起腎衰竭的病例報告。

爲了提高藥材品質，保證用藥安全有效，本研究蒐集各種市售防己，鑑定其基原；並以TLC法確認含防己濃縮中藥方劑中所使用的防己種類；再以藥理學觀點比較廣防己、粉防己、木防己的鎮痛、抗炎、利尿、慢性毒性等藥效，獲得以下幾點結論：

- 一、防己原名防已，後誤作防己，我國最早使用的防己爲異葉馬兜鈴，由此可知漢、張仲景傷寒論的加減木防己湯、防己地黃湯、五物防己湯，金匱要略的木防己湯以及孫思邈治遺尿小便澀的三物木防己湯，其所用的防己及木防己應爲漢中防己。⁽⁸⁾
- 二、台灣防己藥材市場品經組織切片及薄層色譜鑑別，以馬兜鈴科 (Aristolochiaceae)植物廣防己(*Aristolochia fangchi*)爲主，防己科 (Menispermaceae)植物粉防己(*Stephania tetrandra*)佔小部分。而民間草藥 (鐵牛入石)則爲木防己*Cocculus trilobus*及華南木防己*Cocculus sarmentosus*混用。
- 三、青藤(*Sinomenium acutum*)使用於日本，稱爲漢防己使用。
- 四、粉防己LD50爲18.85g/kg最毒，廣防己LD50爲92.58g/kg次之，木防己LD50爲113.23 g/kg毒性最小。
- 五、防己之鎮痛效果以熱板鎮痛法及醋酸鎮痛法分析，發現各種防己都有一定提高痛閾的作用，熱板鎮痛法中以廣防己最好，醋酸鎮痛法則以粉防己最好。
- 六、防己之抗炎效果以足蹠浮腫法及Mast cell與Neutrophil的釋放反應來分析，發現對於carrageenin引發之足蹠腫脹有顯著的抑制作用，但以粉防己效果最好；而Mast cell與Neutrophil的釋放反應則以廣防己在30 μ g/ml，100 μ g/ml下對 β -glucuronidase的釋放則有明顯的抑制作用，
- 七、防己的利尿效果以太鼠代謝籠法來分析，結果顯示，各種防己對正常大鼠並無明顯的利尿效果(粉防己小劑量微增，大劑量反有抑制)
- 八、比利時腎衰竭事件中所使用的流膠藥，經薄層層析鑑定確定爲廣防己。

九、抗腫瘤試驗結果顯示：廣防己對於人類腸癌細胞具有顯著抑制效果；木防己則對人類腸癌細胞、人類喉癌細胞、人類肺癌細胞及老鼠血癌細胞均有顯著抑制效果；粉防己則均無效果。

參考文獻

1. 蕭天石：神農本草經，自由出版社，臺北 1988；卷二：160-1。
2. 明 李時珍：本草綱目，國立中國醫藥研究所，臺北 1976；卷十八：716。
3. 全國中草藥匯編編寫組：全國中草藥匯編(上)，人民衛生出版社，北京 1992；23、173、657-8。
4. 許鴻源：中藥成分最近研究，國立中國醫藥研究所，臺北 1968；55。
5. 中國藥品生物製品檢定所，中國科學院植物研究所編：中藥鑑別手冊(一)，科學出版社，北京 1993；230-4、286。
6. 許信義、張憲昌、許鴻源：市售防己類藥材之生藥學研究，中國醫藥研究所叢刊社，臺北 1986；12，33-45。
7. Jean-Louis Vanherweghem : Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women : association with slimming regimen including Chinese herbs。 Lancet 1993；341，387-391。
8. 梁 陶弘景：名醫別錄，尚志鈞輯校，人民衛生出版社，北京 1986；244-5。
9. 岡西爲人：重輯新修本草，國立中國醫藥研究所，臺北 1964；219。
10. 宋 掌禹錫等奉勅撰：重輯嘉祐補註本草，那琦、謝文全、李一宏重輯，中國醫藥學院中國藥學研究所，臺中 1989；92。
11. 宋 唐慎微：大觀經史證類本草，岡西爲人、難波恒雄、李煥榮編；國立中國醫藥研究所，臺北 1971；252。 宋 唐慎微：重修政和經史證類備用本草，南天書局，臺北 1972；卷九：233。

12. 清 吳其濬：植物名實圖考，世界書局；1960；卷二十三：577
13. 謝宗萬：中藥材品種論述(上)，上海科學技術出版社，上海 1990；242-5。
14. 鄧明魯、高士賢：防己應作防已，哈爾濱中醫雜誌，哈爾濱 1965；7-39。
15. 汪昂：本草備要，志遠書局，臺北 1990；122-4。
16. 王孝濤：歷代中藥炮制法匯典，江西科學技術出版社，江西 1986；82。
17. 黃增泉：植物分類學，國立編譯館，臺北 1993；156-173。
18. 甘偉松：中國高等植物圖志，宏業書局，臺北 1980；546、775-8、783。
19. 張蘭昌：中藥大辭典，昭人出版社，臺北 1981；398、783、1582、1622-6、1901-2、3861。
20. 任仁安：中藥鑑定學，上海科學技術出版社，上海 1983；49、89。
21. 劉接寶：彩色中藥大典(一)，立得出版社，臺北 1984；252-255。
22. 臺灣植物誌編輯委員會：Flora of Taiwan (II)，現代關係出版社，臺北 1976；529-40。
23. 甘偉松：臺灣藥用植物志，國立中國醫藥研究所，臺北 1970；2，155-9。
24. 戴新民發行：中國藥材學(上)，啓業書局，臺北 1974；545。
25. 劉堂瑞：臺灣木本植物圖誌，國立臺灣大學農學院叢書，臺北 1960；卷上，156-62。
26. 戴新民發行：彩色生草藥圖譜(一)，啓業書局，臺北 1981，268-272。
27. 沙世炎、徐禮榮：中草藥有效成分分析法，人民衛生出版社，北京 1981；58、271。
28. 鄭年永、張光雄：原色臺灣藥用植物圖鑑(三)，南天書局，臺北 1986；3、74。
29. 李廣勛：中藥藥理毒理與臨床，天津科技出版公司，天津 1992；160

-70°

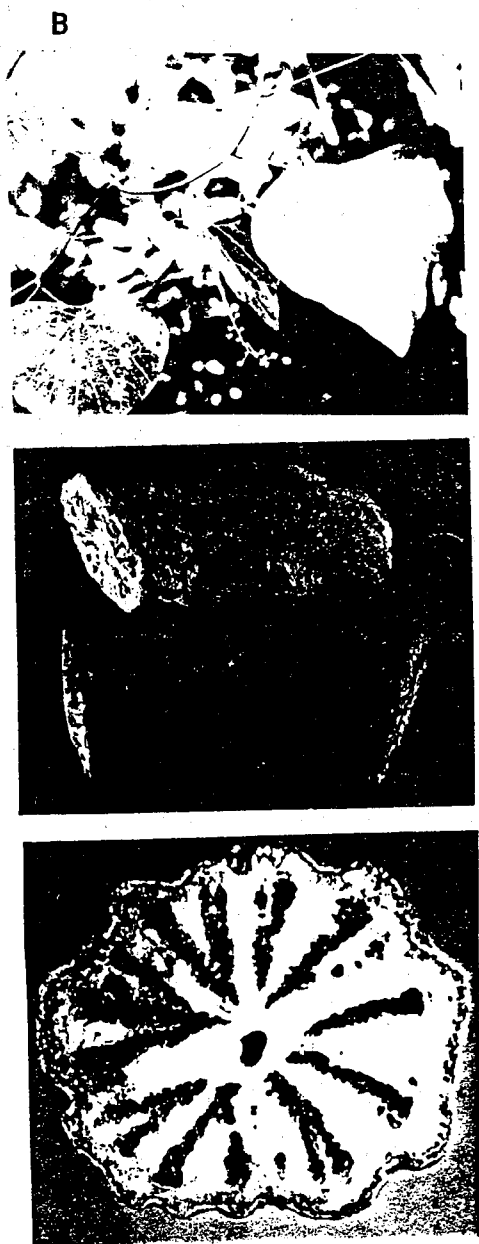
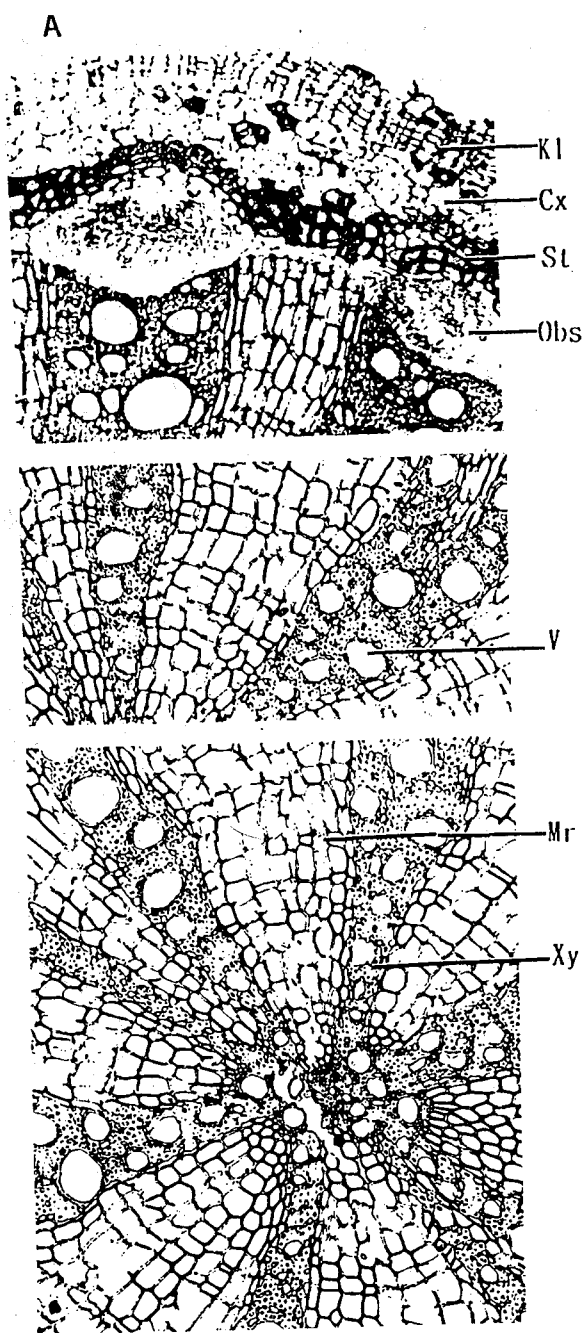
30. 中國醫學科學院藥物研究所等編：中藥志(五)，人民衛生出版社，北京 1993；645-7。
31. 蔡淑華：植物組織切片技術綱要，茂昌圖書有限公司，臺北 1992；30-44。
32. 劉訓紅、王玉璽、房克慧、李泉：中藥材薄層色譜鑑別，天津科學技術出版社，天津 1989；9-10、60-3。
33. 張光雄：中藥方劑之定性與定量，明通醫藥雜誌社，臺中 1994；76-85。
34. Litchfield JT, Wilcoxon F: A simplified method of elevating dose effect expriment, J Pharmacol Exp Ther 1949; 96: 99-113。
35. 高木敬次郎，小澤光：中樞神經的藥理，藥物學實驗，南山堂株式會社 1978；54-5。
36. Taber RI, Greenhouse DD, Rendell Jk and Irwin S : Agonist and antagonist interactions of opioids on acetic acid - induced abdominal stretching in mice. J pharmacol exp Ther 1969; 169: 29~37.
37. Winter CA, Risley EA and Nuss GW: Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. Antiinflammatory Assay 1962; 544-7.
38. McClain DE, Donlon MA, Chock S, Catravas GN : Biochem. BioPhys. Acta 1983; 763: 419.
39. Hanahae THP: Agents Action 1984; 14: 468.
40. Johnson AR, Erdos EG: Proc Soc Exp Biol Med 1973; 142: 1252.
41. Hakanson R, Ronnberg AL: Antlyt Biochem 1972; 60: 560.
42. Barrett AJ: a Laboratory Handbook(Dingle J T ed)1972; 118。
43. Markert M, Andrews PC, Barbior BM: Methods Enzymol 1984; 105: 358.

44. Newby AC : Biochem J 1980 ; 186 : 907.
45. Absolom DR : Methods Enzymol 1986 ; 132 : 95。
46. 李儀奎：中藥藥理實驗方法學，上海科學技術出版社，上海 1989；482-4。
47. Dhar ML，Dhar MN，Dhawan BN，Mehrotra BN，Srima RC：Screening of indian plants for biological activity part IV. Indian J Exp Biol 1973；11：43.
48. 李奎儀、姜名瑛：中藥藥理學，中國中醫藥出版社，北京 1992；98。
49. 張振隆：實用生理學(上)，台光出版社，臺中 1991；14-5。

略字解

- K1：栓皮層(cork layer)
- Cx：皮層(cortex)
- Xy：木質部(xylem)
- V：導管(vessel)
- Pa：柔細胞(parenchyma)
- M：髓(medulla)
- Mr：髓線(medulla ray)
- Wf：木纖維(wood fiber)
- St：石細胞(stone cell)
- Ph：韌皮部(phloem)
- Obs：癒合韌皮組織(obliterated sieve)

Plate 1 *Stephania tetrandra*(粉防己)



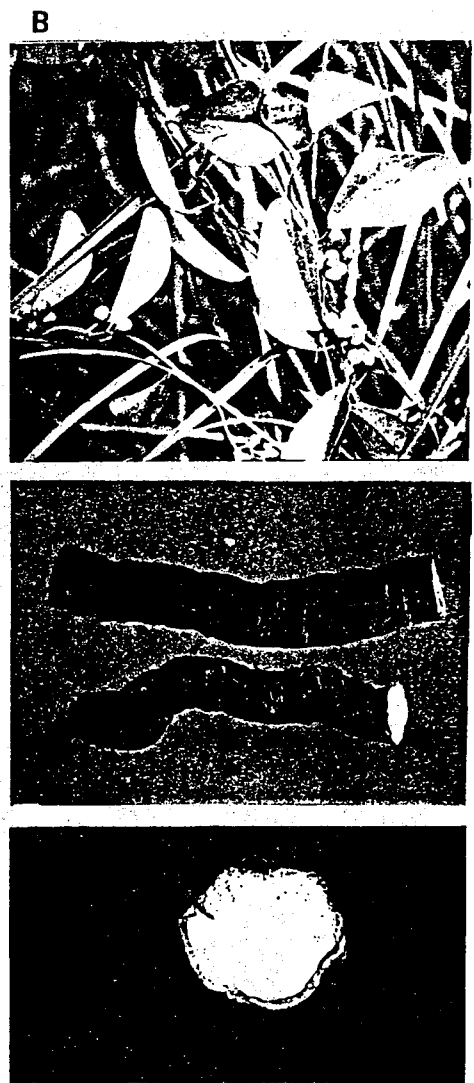
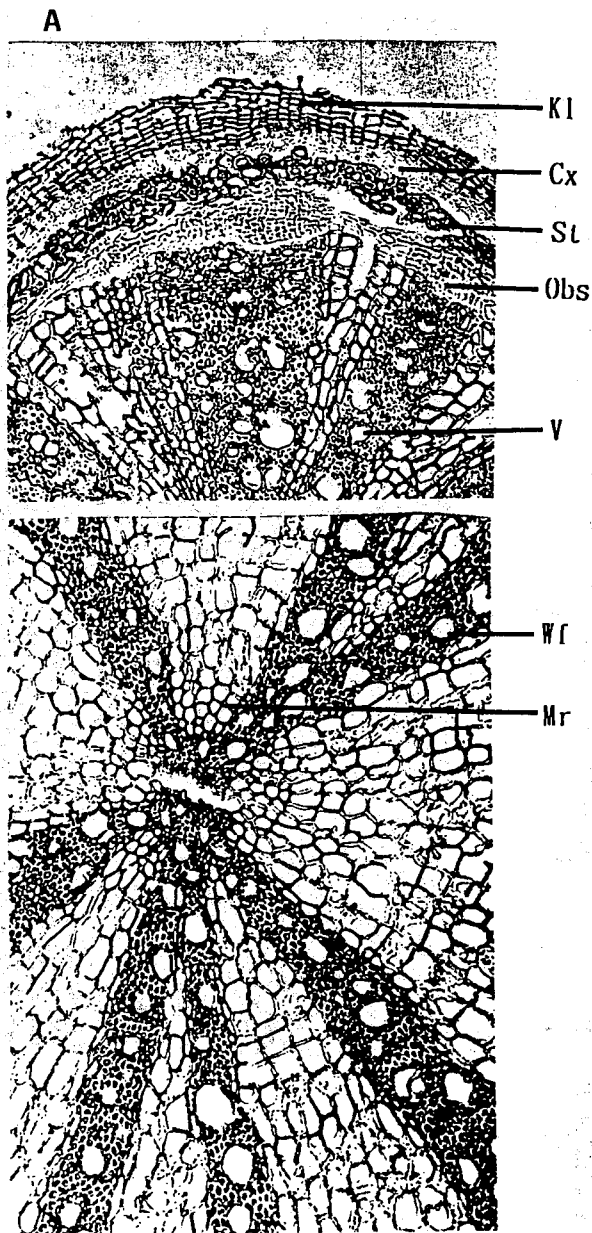
A. 横切面解剖圖×20

B. 原植物形態

藥材圖

藥材橫切面

Plate 2 *Cocculus trilobus* (木防己)



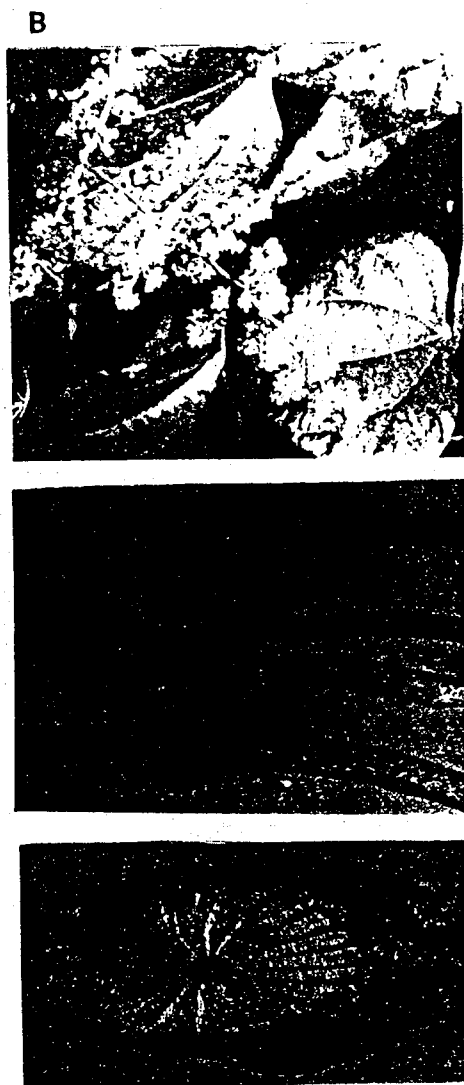
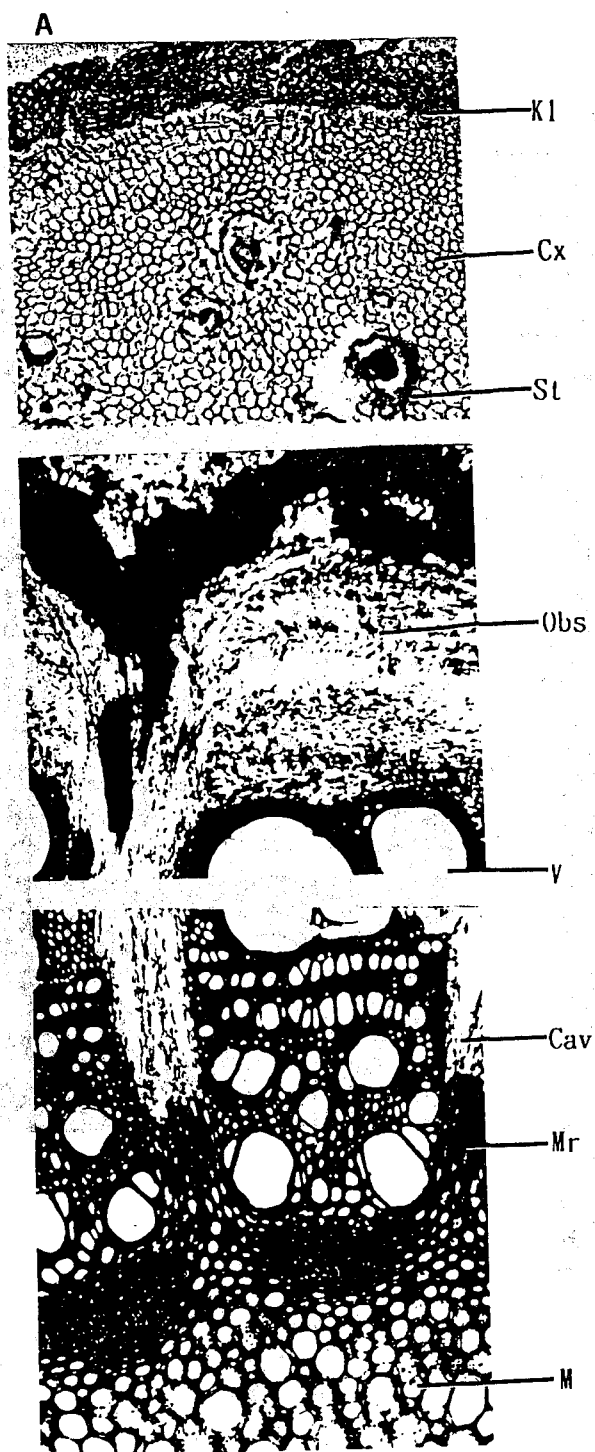
A. 横切面解剖圖×20

B. 原植物形態

藥材圖

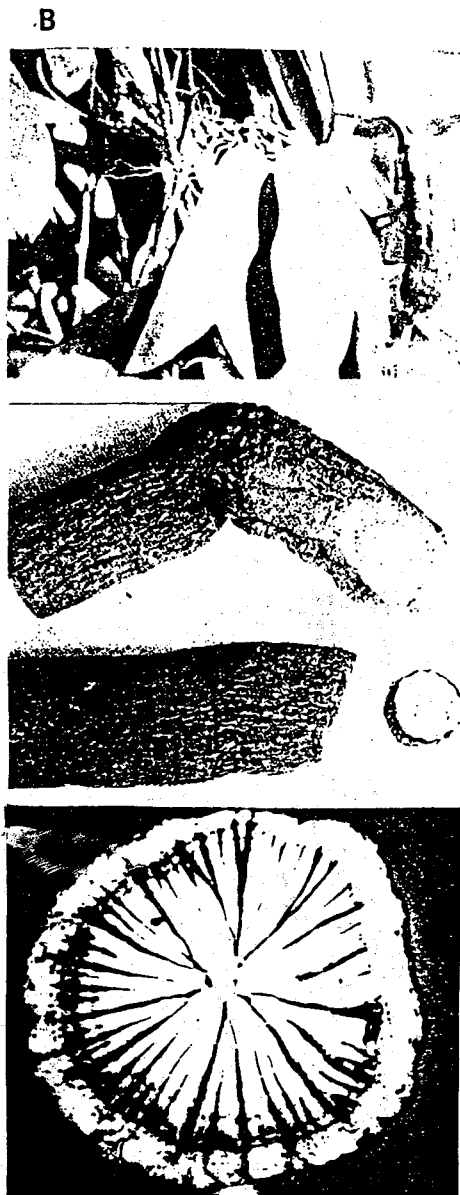
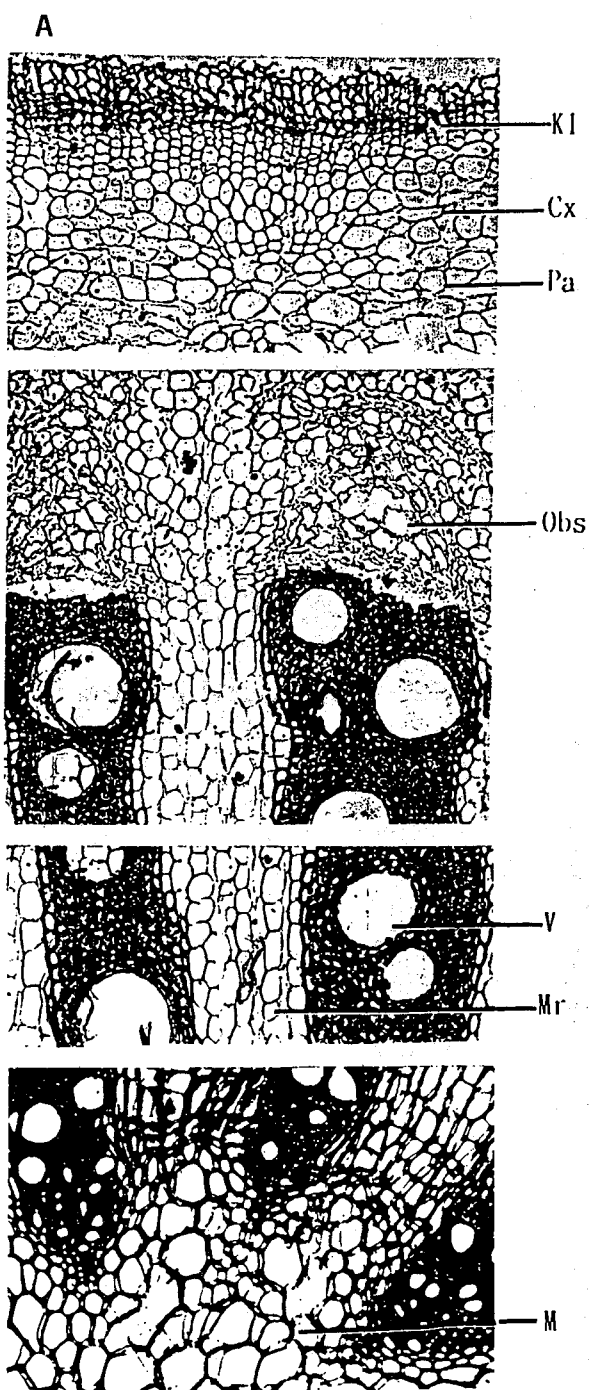
藥材橫切面

Plate 3 *Sinomenium acutum*(青藤)



A. 橫切面解剖圖×20
 B. 原植物形態
 藥材圖
 藥材橫切面

Plate 4 廣防己 *Aristolochia fangchi* (廣防己)



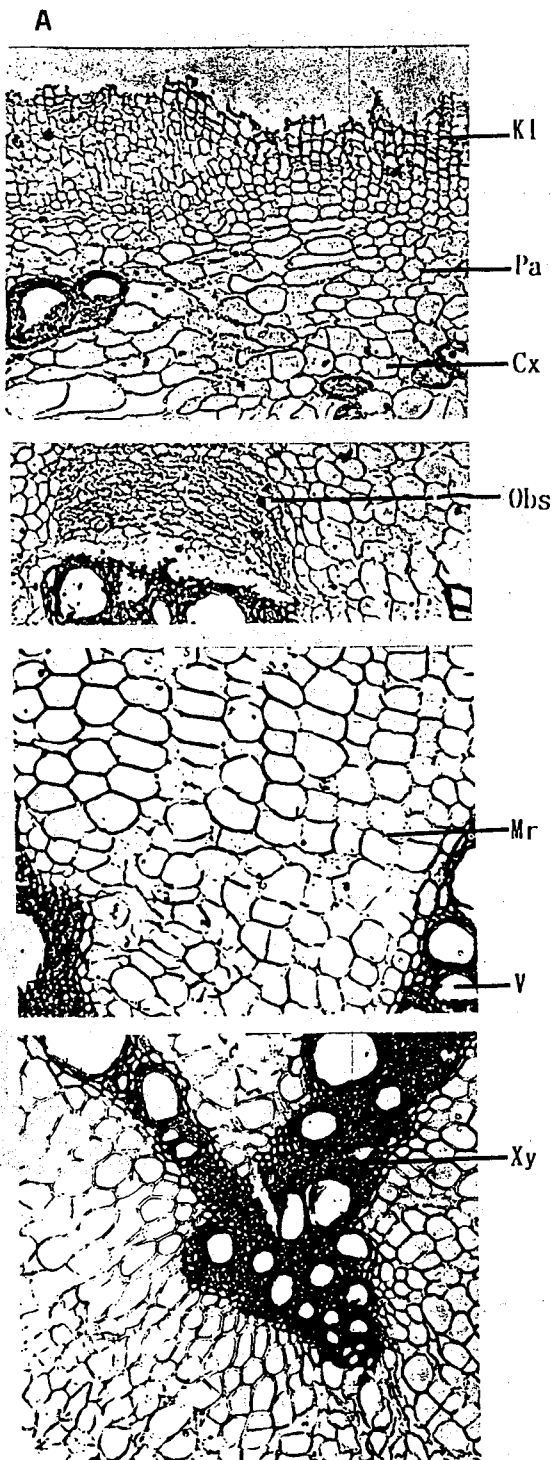
A. 橫切面解剖圖×20

B. 原植物形態

藥材圖

藥材橫切面

Plate 5 *Aristolochia heterophylla*(漢中防己)



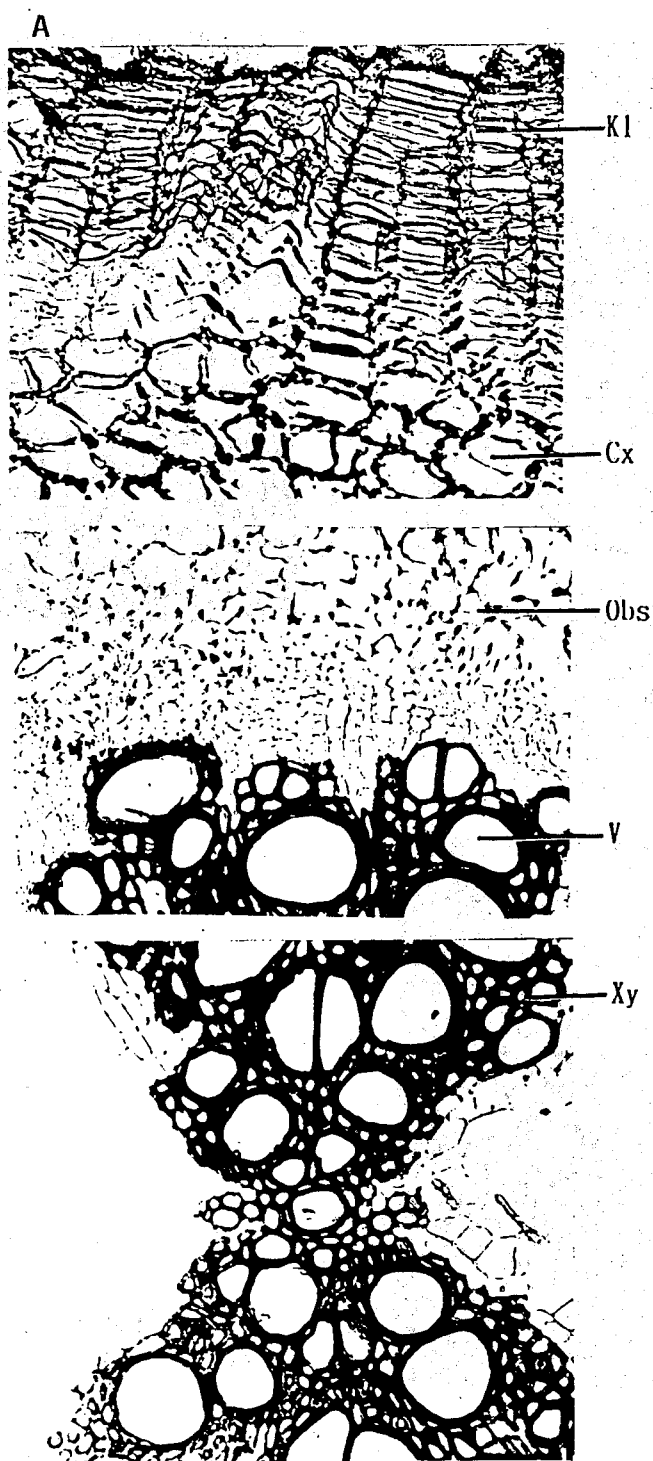
A. 橫切面解剖圖×20

B. 原植物形態

藥材圖

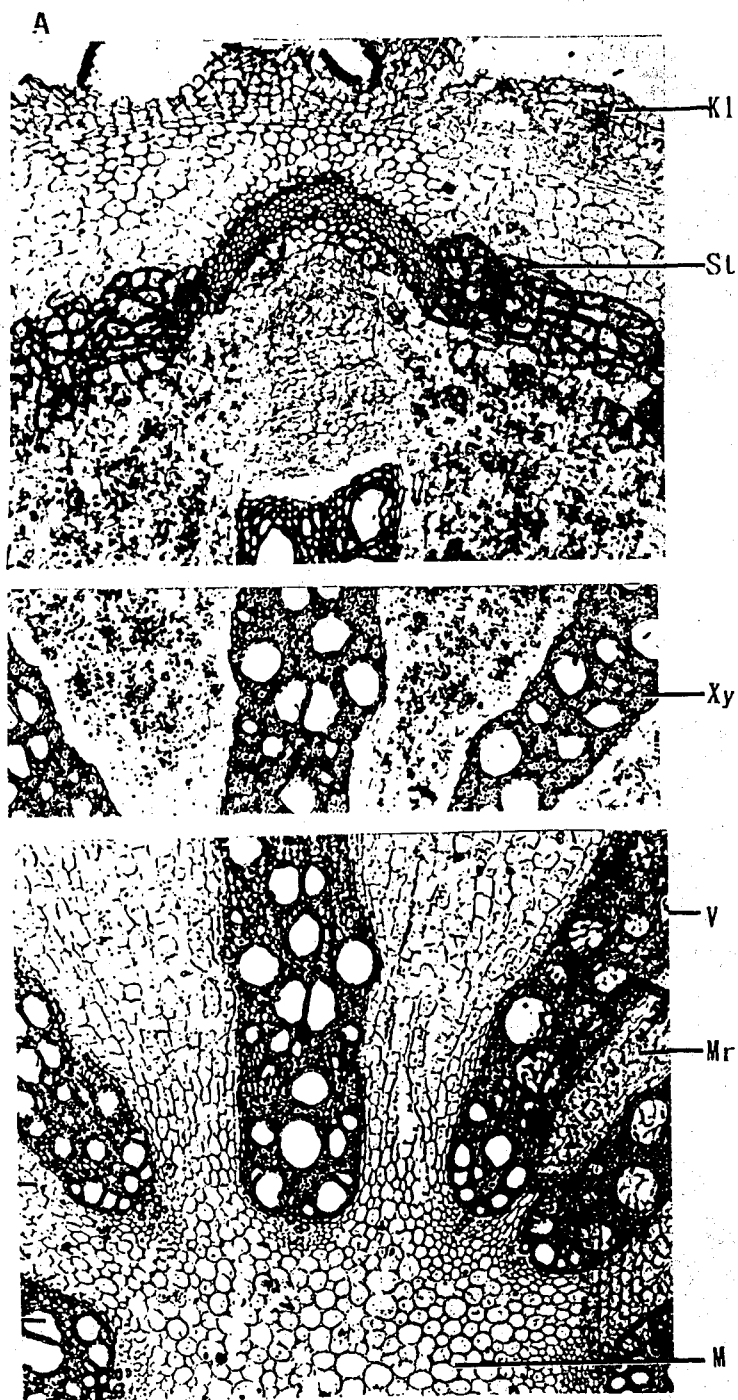
藥材橫切面

Plate 6 *Stephania cephalantha*(白藥子)



A. 横切面解剖圖×50
B. 原植物形態

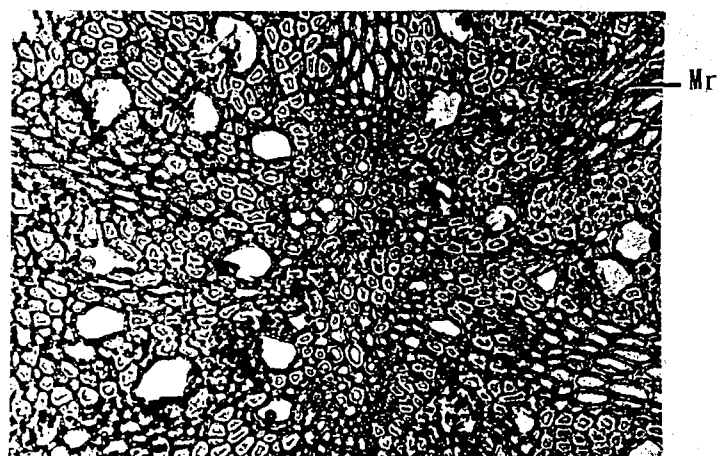
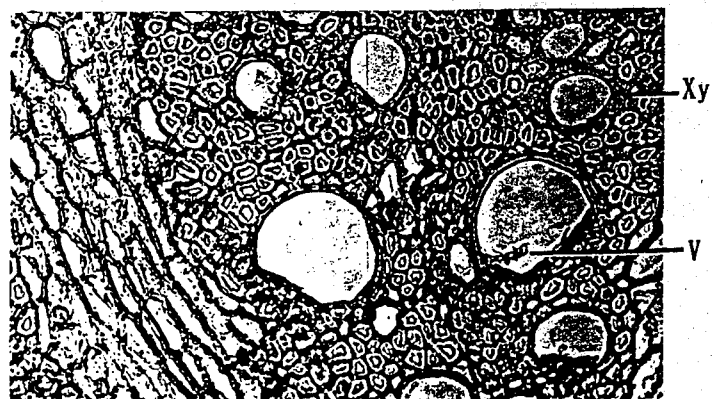
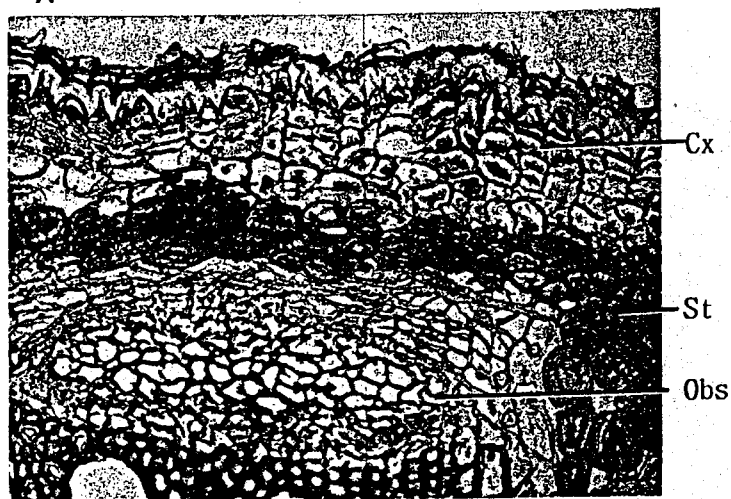
Plate 7 *Stephania japonica*(千金藤)



A. 横切面解剖圖×20
B. 原植物形態

Plate 8 *Pericampylus formosanus*(蓬萊藤)

A



B

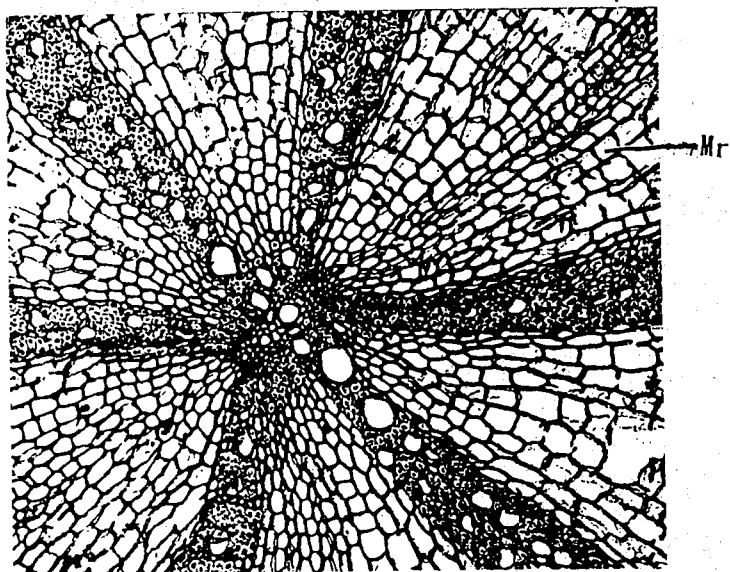
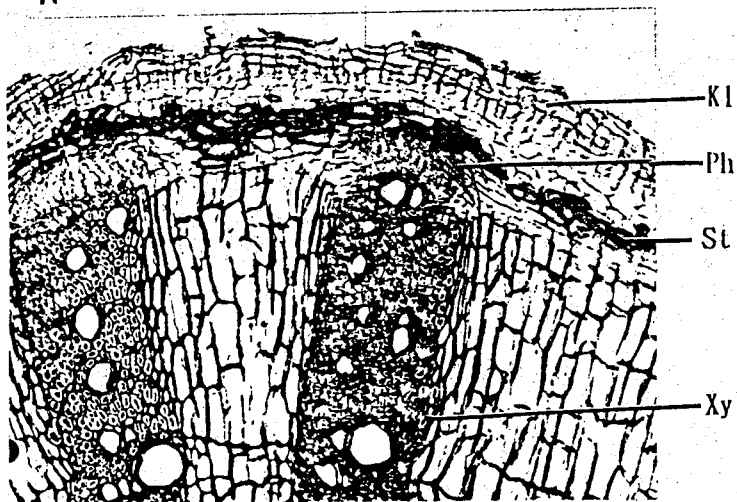


A. 横切面解剖圖×50

B. 原植物形態

Plate 9 *Pericampylus trinervatus*(三肋蓬萊藤)

A



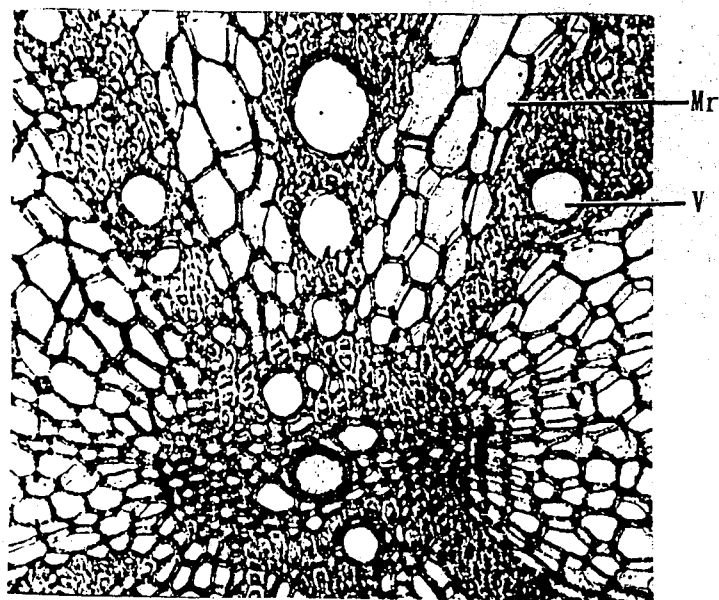
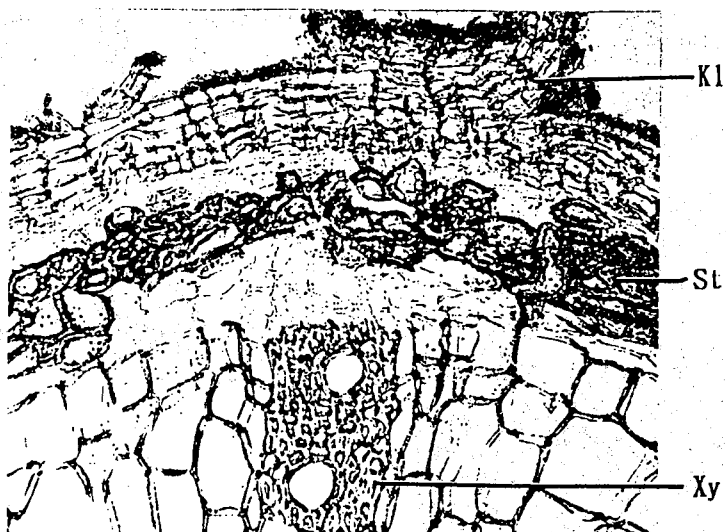
B



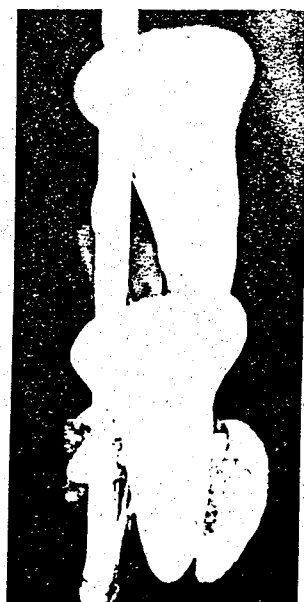
A. 横切面解剖圖×20
B. 原植物形態

Plate 10 *Cocculus sarmentosus* (華南木防己)

A



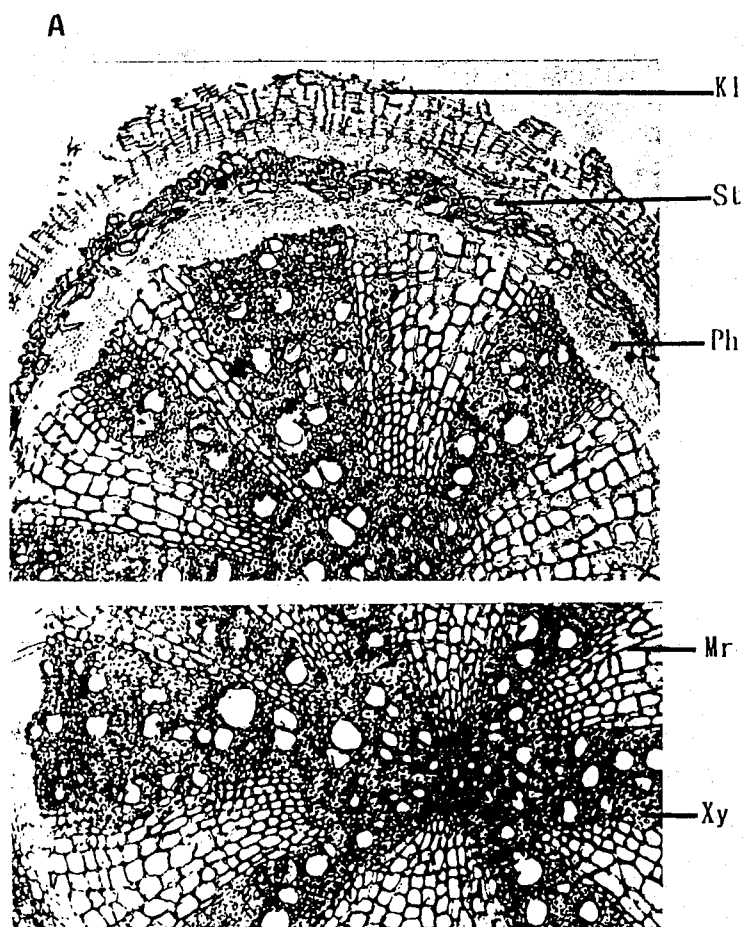
B



A. 橫切面解剖圖×50

B. 原植物形態

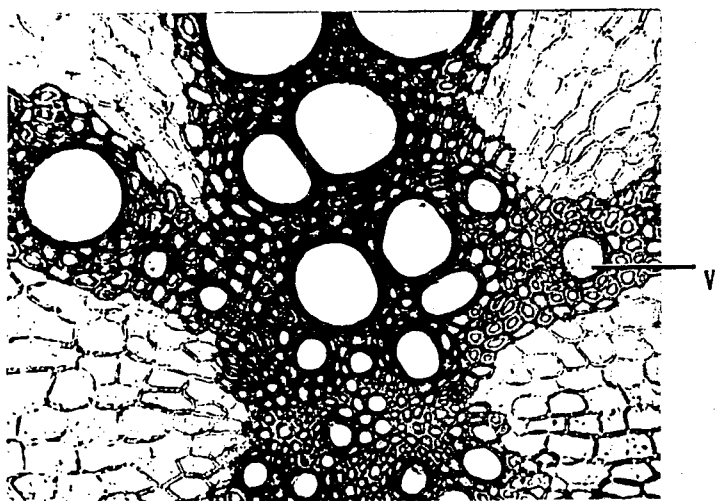
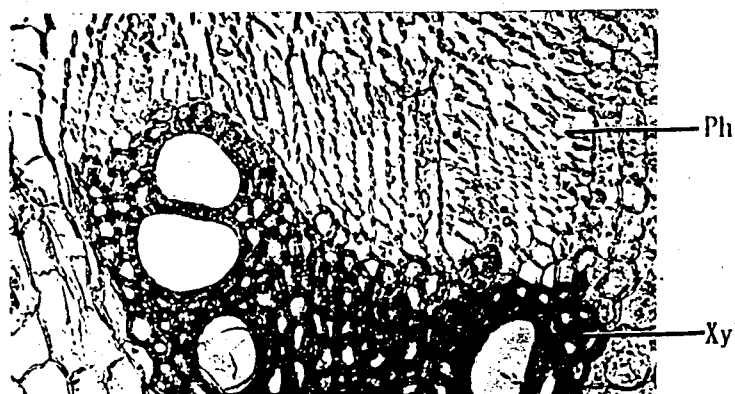
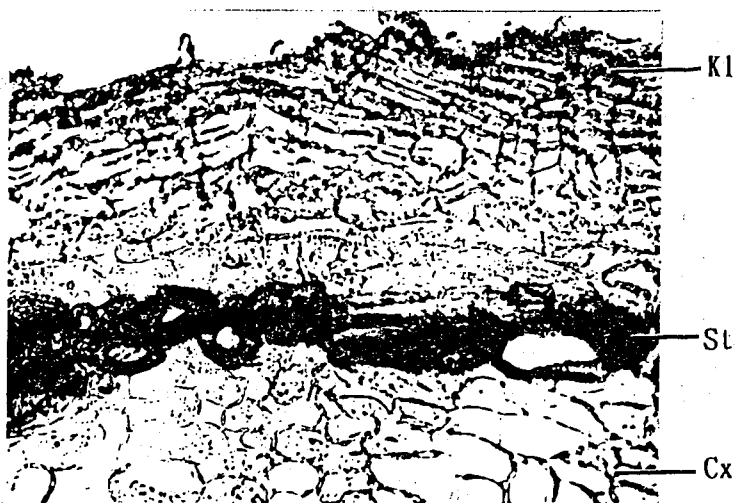
Plate 11 *Cocculus laurifolius*(樟葉木防己)



A. 横切面解剖圖×20
B. 原植物形態

Plate 12 *Paracyclea gracillima*(土防己)

A



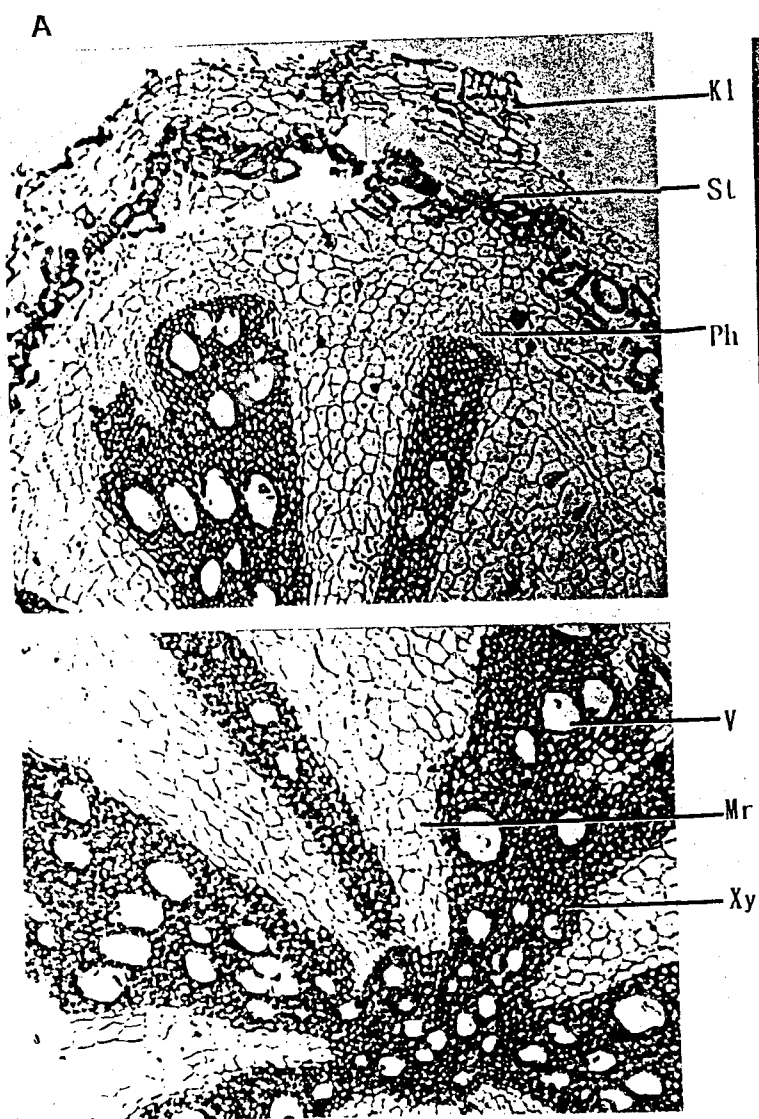
B



A. 横切面解剖圖×50

B. 原植物形態

Plate 13 *Paracyclea ochiaiana* (臺灣土防己)



A. 橫切面解剖圖×20
B. 原植物形態

第二部分 牛 膝

第一章 緒 言

爲提昇國內中藥及中藥製劑之品質，確保全民健康，政府數年來積極推動中藥GMP計畫。也由於政府對中醫藥之重視，於民國七十二年七月起試辦中醫勞保，七十七年三月起試辦中醫公保，中醫農保也隨後進行。由於中醫公、勞、農保醫療院所之大量需求與開放，使得中藥，特別是濃縮中藥市場之需求，急劇增加，對這類中藥製劑之品管要求也日益迫切。

我國即將邁入高齡化社會之際，又伴隨全民健康保險的實施，醫療資源的開發與利用已到了刻不容緩的程度，爲了能符合社會福利國家的標準，使幼有所養、壯有所用、老有所終，就近從我國傳承數千年，汗牛充棟的傳統醫藥資源中，去開發，去利用，則不失爲一條捷徑。

有些中藥材之基原頗爲複雜，商品名稱及來源亦很混亂，且常有代用品或膺僞品充斥其間，因而造成中毒或誤用的情形發生，因此有必要對基原較複雜之藥材加以釐清。

目前市售各種中藥製劑大都依中醫古籍之固有成方爲依據，然而所依據之醫書不同，同一方名之組成及主治往往有很大差異，衛生署有鑑於此，於最近擬出中藥標準方198個；但是標準處方中之組成藥材，常因市場品之不同，而影響該方之療效主治，因此對其基原也有必要加以統一。如臺灣市售牛膝類藥材，其來源就頗爲複雜，經實地去調查，發現主要有牛膝(市售稱懷牛膝)、川牛膝(市售稱杜牛膝)、味牛膝(市售誤稱川牛膝)三種。

牛膝，爲莧科植物 *Achyranthes bidentata* BLUME 的乾燥根，神農本草經列爲草部上品，以降歷代諸家本草均有記載。自古用根，具有補肝腎，強筋骨，逐瘀通經，引血下行之功能。用於腰膝酸痛，筋骨無力，經閉癥瘕，肝陽眩暈等症⁽¹⁾。

從歷代諸家文獻當中，牛膝可用於散瘀血、消癰腫，治淋病，血尿

，經閉，癥瘕，難產，胞衣不下，產後瘀血腹痛，喉痺，癰腫，跌打損傷。補肝腎，強筋骨，治腰膝骨痛，四肢拘攣，痿痺，故有相當多的中藥方劑中使用了牛膝，包括獨活寄生湯、疏經活血湯、濟生腎氣丸、玉女煎、柏子仁丸、血府逐瘀湯、八仙湯、還少丹、牛膝散等。在中國醫藥學院附設醫院近幾年的使用頻率中，獨活寄生湯、疏經活血湯更是使用最頻繁的前十大方劑⁽²⁾，尤其是在治療風濕筋骨酸痛與婦女經產方面，屢有著效；在單味藥及飲片方面，川牛膝及懷牛膝用量之排行亦在百名內；而在近代的研究文獻中，已經證實了牛膝對子宮有收縮的作用，而對離體小鼠的腸管則有抑制蠕動的作用，對犬則有降壓作用，另外還具有鎮痛、抗炎、輕微的利尿作用等⁽³⁾。

然而臺灣市售牛膝類藥材主要產於中國大陸，由香港進口，少部份為本地產者，來源相當複雜，且有代用品或膺偽品充斥其間，因此有對其作系統分析之必要，以供國人用藥之參考。

目前臺灣市售牛膝藥材以牛膝(*Achyranthes bidentata* BLUME，市售稱懷牛膝)、川牛膝(*Cyathula officinalis* KUAN，市售稱杜牛膝)及味牛膝(*Strobilanthes forrestii* DIELS，市售誤稱川牛膝)為主；然而臺灣市售所稱之川牛膝並非大陸藥典所記載之川牛膝⁽¹⁾，而是爵床科(*Acanthaceae*)植物，腺毛馬藍(*Strobilanthes forrestii* DIELS)的乾燥根及根莖；臺灣市面上極少被使用，市售稱杜牛膝者，才是川牛膝(*Cyathula officinalis* KUAN)之乾燥根。因而本研究將就臺灣市售牛膝類藥材、臺灣產牛膝類植物，以生藥組織鑑別、植物化學及藥理學等方法，加以研究比較，並對含牛膝類藥材之固有成分中所用牛膝之種類加以探討，以求明確使用，達到有效的處方運用。

第二章 總 論

第一節 牛膝之本草學考察⁽³⁻¹⁵⁾

一、藥名之考訂⁽³⁻¹¹⁾

1. 歷代諸家本草所記載之名稱

廣雅疏證曰：「牛莖，牛膝也。」

神農本草經曰：「牛膝，....一名百倍。」

名醫別錄曰：「陶隱居云：其莖有節似牛膝，故以爲名。」

圖經本草曰：「有節如鶴膝，又如牛膝狀，以此名之。」

救荒本草曰：「山莧菜，本名牛膝，俗名腳斯蹬，又名對節菜。」

滇南本草曰：「白牛膝強筋之功甚於川牛膝。」

李時珍本草綱目曰：「本經又名百倍，隱語也，言其滋補之功，如牛之多力也。其葉似莧，其節對生，故俗有山莧、對節之稱。....牛膝處處有之，謂之土牛膝。」

廣西通志曰：「接骨草即土牛膝，又名四季花。」

2. 名稱之考訂

綜合上述，牛膝以其形態“莖有節似牛膝”爲其源之正名，又名牛莖、百倍、山莧菜、對節菜、土牛膝等。至於川牛膝之名，乃始於明初的滇南本草，又清張壽頤本草正義載：「川牛膝之名，不見古書，....但今時藥肆所謂川牛膝，則其形甚大。」根據調察考證，與今用者相符，並可見川牛膝乃近代使用之牛膝商品。

二、形態、種類及產地之考訂^(3-5,12-14)

名醫別錄曰：「牛膝生河內川谷及臨朐，二月、八月、十月採根，陰乾。陶隱居云：今出近道蔡州者，最長大柔潤。其莖有節，莖紫節爲大者爲雄，青細者爲雌，以雄爲勝。」

吳普本草曰：「葉如夏藍，莖本赤。」

日華子諸家本草曰：「懷州者長白，近道蘇州者色紫。」

圖經本草曰：「牛膝生河內川谷及臨朐，今江、淮、閩、粵、關中亦有之，然不及淮州者爲真。春生苗，莖高二、三尺，青紫色，有節如鶴膝，又如牛膝狀，以此名之。葉尖圓如匙，兩兩相對於節上，生花作穗，秋結實，甚細。此有二種：莖紫節爲大者爲雄，青細者爲雌。二月、八月、十月採根，陰乾。根極長大，而柔潤者佳。」

寇宗奭本草衍義曰：「牛膝，今西京作畦種，有長二尺者最佳。」

救荒本草曰：「苗高二尺已來，莖方，青紫色，其莖有節如鶴膝，又如牛膝狀，以此名之。葉似莧菜葉而長，頗尖鞘，葉皆對生，開花作穗。」

李時珍本草綱目曰：「牛膝處處有之，謂之土牛膝，不堪服食。惟北土及川中人家栽蒔者爲良，秋間收子，至春種之，其苗方莖暴節，葉皆對生，頗似莧菜而長且尖鞘。秋月開花作穗，結子狀如小鼠負蟲，有濇毛，皆貼莖倒生。」

陳人山藥物出產辨曰：「淮牛膝，產於河南懷慶府、武、陟、溫三縣，十一、十二月收成。杜牛膝產四川龍安府，味甘，冬季出新。川牛膝味苦、鮮，產湖北宜昌縣、宜都縣、興山縣、資邱鎮等處，陝西興安府、漢中府、四川巫山縣等處，均有出產。」

植物名實圖考曰：「牛膝，本經上品，處處有之，以產懷慶四川者入湯劑，餘者皆謂之杜牛膝。」

綜合上述，考歷代諸家本草藥圖對照及歷代文獻均指出，牛膝爲莧科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* BLUME 的乾燥根。其產地於"河內"，即今河南省沁陽縣境，後置懷慶府，懷慶乃今黃河以北的河南沁陽、武陟、孟縣、輝縣、博愛一帶；臨朐在今山東省，蔡州爲河南汝南縣，近道指江蘇一帶，由此可見牛膝最早記載產於河南、山東、江蘇等地，且又以河南懷慶府產的，即今稱之爲"懷牛膝"的爲主，這與目前用藥的"懷牛膝"完全吻合。

其植物形態爲莖有節，葉似莧、對生，穗狀花序，結子狀如小鼠負蟲，有濇毛，皆貼莖倒生。

三、藥味、性能之考訂^(3-6,10,15)

神農本草經曰：「牛膝味苦、酸。主寒濕痿痺，四肢拘攣，膝痛不可屈伸，逐血氣，傷熱火爛，墮胎。久服輕身，耐老。」

名醫別錄曰：「爲君，平，無毒。療傷中少氣，男子陰消，老人失溺，補中續絕，填骨髓，除腦中痛及腰脊痛，婦人月水不通，血結，益氣，利陰氣，止髮白。」

吳普本草曰：「牛膝，.....無毒。」

李當之本草曰：「溫。」

徐之才雷公藥論曰：「惡螢火、龜甲、陸英、畏白前、忌牛肉。」

甄權藥性論曰：「治陰痿，補腎填精，逐惡血流結，助十二經脈。」

日華子諸家本草曰：「治腰膝軟怯冷弱，破癥結，排膿止痛，產後心腹痛並血運，落死胎，壯陽。」

嘉祐補注神農本草曰：「牛膝臣忌牛肉，能治陰痿，補腎填精，逐惡血流結，助十二經脈。病人虛羸，加而用之。」

寇宗奭本草衍義曰：「牛膝，....與茯苓酒浸服，益腎。竹木刺入肉，嚼爛罨之，即出。」

張元素曰：「強筋。」

朱震亨本草衍義補遺曰：「牛膝，能引諸藥下行，筋骨痛風在下者，宜加用之。」

王好古湯液本草曰：「強筋，補肝腎風虛。」

李時珍本草綱目曰：「治久瘡寒熱，五淋尿血，莖中痛，下痢，喉痺，口瘡，齒痛，癰腫，惡瘡，傷折。」

本草備要曰：「酒蒸則益肝腎，強筋骨，治腰膝骨痛，足痿筋攣，陰痿失溺，久瘡，下痢，傷中少氣；生用則散惡血，破癥結，治心腹諸痛，淋痛尿血，經閉難產，喉痺齒痛，癰疽惡瘡。」

綜合上述，牛膝味苦、酸，性溫、平，無毒，惡螢火、龜甲、陸英、畏白前、忌牛肉，具有益肝腎、強筋骨、引藥下行、逐瘀通經、消癰腫等作用。

四、修治與方用之考訂^(3-5,10)

名醫別錄曰：「二月、八月、十月採根，陰乾。」

蘇敬新修本草曰：「諸藥八月以前採者，皆日乾、火乾；十月以後至正月，乃可陰乾。」

雷公炮炙論曰：「凡使去頭蘆，以黃精自然汁浸一宿，漉出，細剉，焙乾用之。」

甄權藥性論曰：「病人虛羸，加而用之。」

圖經本草曰：「二月、八月、十月採根，陰乾。」又曰：「土牛膝根洗切，焙搗爲末，酒煎溫服極效。今福州人單用之。」

寇宗奭本草衍義曰：「與從蓉酒浸服，益腎。」

朱震亨本草衍義補遺曰：「筋骨痛風在下者，宜加用之。凡用土牛膝，春夏用葉，秋冬用根。」

李時珍本草綱目曰：「九月末取根，水中浸兩宿，掇去皮，裏絮暴乾。雖白直可貴，而掇去白汁入藥，不如留皮者力大也。」又曰：「今惟以酒浸入藥，欲下行則生用，滋補則焙用，或酒拌蒸過用。」又曰：「牛膝乃足厥陰少陰之藥，所主之病，大抵得酒則能補肝腎，生用則能去惡血，二者而已。……土牛膝亦可，或入麝香、乳香尤良。」

綜合上述，牛膝於秋後採收，多生用或酒製等。

千金方牛膝湯：配當歸、瞿麥、木通、滑石、冬葵子，治胞衣不下，肚腹脹滿。

千金方獨活寄生湯：配獨活、桑寄生、秦艽、防風、細辛、當歸、芍藥、川芎、熟地、杜仲、人參、茯苓、甘草、桂心，治肝腎虛熱，風濕內攻，腰膝作痛，冷痺無力，屈伸不便。

婦人良方牡丹皮散：配丹皮、桂心、歸尾、延胡索、赤芍、莪朮、三棱，治血瘕。

五、歷代本草系統圖⁽⁴⁾

牛膝之本草系統圖如圖2-1。

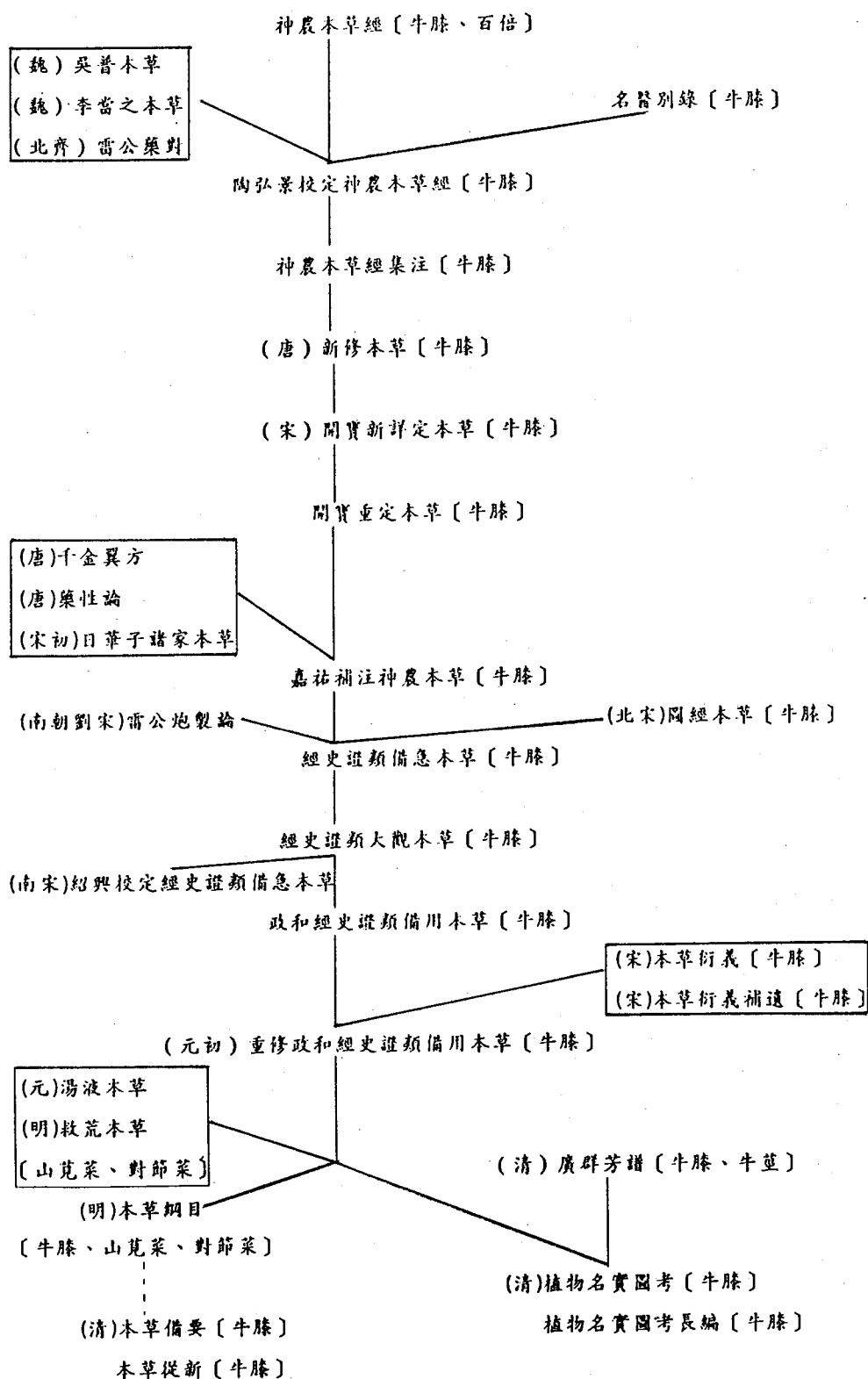


圖2-1 牛膝之本草系統圖

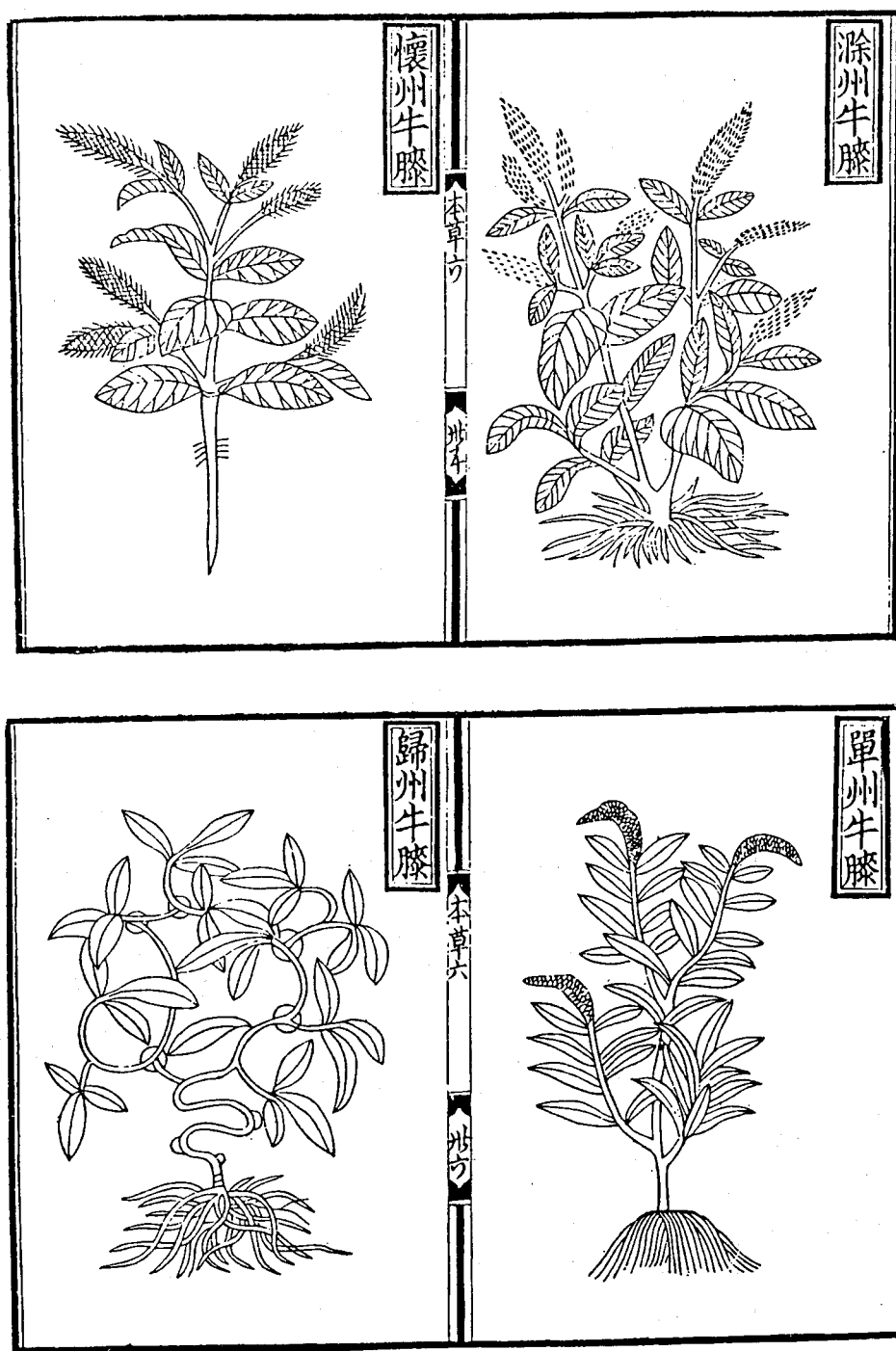


圖 2-2 經史證類大觀本草牛膝圖⁽¹⁶⁾

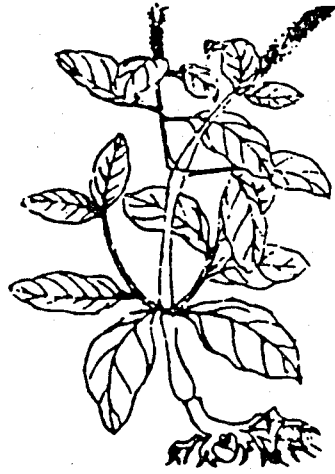


圖 2-3 本草綱目牛膝圖⁽¹⁰⁾



圖 2-4 植物名實圖考牛膝圖⁽¹³⁾

第二節 大陸產牛膝類藥材之藥用植物學考察

一、牛膝類藥材原植物之共同特徵與分布^(3,4,17-26)

大陸產牛膝類藥材主要有莧科(Amaranthaceae)牛膝屬(Achyranthes)及川牛膝屬(Cyathula)植物、石竹科(Caryophyllaceae)狗筋蔓屬(Cucubalus)植物及爵床科(Acanthaceae)馬藍屬(Strobilanthes)植物，茲分述於下：

1. 莧科(Amaranthaceae)

莧科植物全世界約90屬900種⁽¹⁷⁾，廣布於全世界熱帶、亞熱帶及溫帶。我國入藥者，計有7屬，約22種。

(1) 牛膝屬(Achyranthes)植物之共同特徵

牛膝屬(Achyranthes)之植物，不下於10種，分布於亞洲、非洲和波里尼西亞等熱帶、亞熱帶等地區。本屬植物的特徵，為多年生草本，莖直立或向上延生，基部略為木質化，莖分枝，節部膨大。葉有柄，對生，全緣。花兩性，頂生或腋生，長穗狀花序；花苞宿存，膜質，針狀；小苞2枚，每枚均具有2片葉耳，直立，針狀；花被4或5片，草質性革質，上有一脈或多脈，鑿狀披針形，刺尖頭；雄蕊5枚，花絲基部合生，花藥2室，退化雄蕊呈廣截狀、齒狀或長絲裂狀；子房長橢圓形，近扁平；胚珠1枚，花柱單1呈絲狀，柱頭頭狀。胞果膜質，不開裂，呈長橢圓形或卵圓形；種子長橢圓形，倒向單生，外種皮革質化。

a. 牛膝(Achyranthes bidentata BLUME)

多年生草本，高30~100 cm。根細長，直徑0.6~1 cm，外皮土黃色。莖直立，四稜形，具條紋，疏被柔毛，節略膨大，節上對生分歧。葉吋生，葉柄長約5~20 mm；葉片橢圓形或橢圓狀披針形，長2~10 cm，寬1~5cm，先端長尖，基部楔形或廣楔形，全緣，兩面被柔毛。穗狀花序腋生兼頂生，初時花序短，花緊密，其後伸長，連下部總梗在內長約5~20cm；花皆下折貼近花梗；苞片1，膜質，寬卵形，上部突尖成粗刺狀，另有2枚小苞片針狀，先端略向外曲，基部兩側各具1卵狀膜質小裂片；花被綠色，5片、直立，披

針形，有光澤，長3~5 mm、具1脈，邊緣膜質；雄蕊5，花絲細，基部合生，花藥卵形，2室，退化雄蕊頂端平或呈波狀缺刻；子房長圓形，花柱線狀，柱頭頭狀。胞果長圓形，光滑。種子1枚，黃褐色。花期7~9月。果期9~10月。栽培品稱懷牛膝，野生品稱土牛膝。(圖2-5A及圖2-5B)

b. 柳葉牛膝(*Achyranthes longifolia* MAKINO)

多年生草本植物。莖高約90 cm，直立，有四稜，節膨大。葉對生，有柄，葉片披針形或線狀披針形，長4~15 cm，寬0.5~3.5 cm，兩端均漸尖形，全緣。長穗狀花序，著生多數綠色小花；萼片5；雄蕊5，花絲基部連合或杯狀；雄蕊1枚；子房倒卵狀球形，花柱1枚。胞果橢圓形，內藏種子1枚。

c. 土牛膝(*Achyranthes aspera* var. *indica* L.)

一年或二年生草本植物，高20~100 cm，莖有稜，具毛茸。葉對生，有柄，葉片倒卵形或近圓形，長3~10 cm，寬1~4 cm，基部狹尖或楔形，先端漸尖，全緣。長穗狀花序，上生無數小花，萼具5強韌鱗片；無花瓣；蜜腺較花萼為長；雄蕊5枚；花柱與雄蕊等長，柱頭粗糙，兩裂。果實具1種子，被以包膜。

(2) 川牛膝屬(*Cyathula*)植物之共同特徵

多數為多年生草本，少數為矮灌木；莖直立或平臥。葉對生；花群生成近似穗狀的總狀花序；1至3個完全花成一束，上附叢生鉤狀芒；花被5片，乾膜質，單脈，漸尖；雄蕊5枚，與微凹或二裂之退化雄蕊合生，花藥2室；子房倒卵圓形，花絲柱狀，柱頭頭狀。胞果小，卵圓形，不開裂，倒生；種子長橢圓形，具革質外種皮。

a. 川牛膝(*Cyathula officinalis* KUAN)

多年生草本，高40~100 cm。主根圓柱形，直徑0.8~1.5 cm，外皮棕色。莖下部近圓柱形，中部近四稜形，疏被糙毛，節處略膨大。葉叢生，葉片橢圓形至狹橢圓形，長3~13 cm，寬1.5~5 cm，先端漸尖，基部楔形或寬楔形，全緣，上面密生倒伏糙毛，下面密生柔毛；葉柄長約0.3~1.5 cm。花綠白色，頭狀花序數個於枝端

排成穗狀；苞片卵形，長3~5 mm，乾膜質，先端具鉤狀芒刺；苞腋有花數朵，能育花居中，不育花居兩側；不育花的花被退化爲2~5枚鉤狀芒刺，能育花的花被5，2長3短；雄蕊5；花絲基部密被長柔毛；退化雄蕊 5，長方形，狹細，長約0.3~0.4 cm，寬0.1~0.2 cm，先端齒狀淺裂；雄蕊基部外側圍繞子房叢生的長柔毛較退化雄蕊爲長；雌蕊子房上位，1室、花柱細。胞果長橢圓狀倒卵形，長2~5 mm。種子卵形。花期6~7月。果期8~9月。(圖2-6)

b. 頭花杯莧(*Cyathula Capitata* (WALL.) MOQ.)

主要特徵爲葉呈倒卵形至寬卵狀矩圓形；頭狀花序單生或簇生，排成1~4 cm的穗狀花序式，腋生或頂生；退化雄蕊長約1 mm，頂端撕裂成流蘇狀，花乾時褐紫色。

2. 石竹科(*Caryophyllaceae*)

(1) 狗筋蔓屬(*Cucubalus*)植物之共同特徵

狗筋蔓屬植物僅有狗筋蔓(*C. baccifer* L.) 1種。分佈於北溫帶，我國見於西南、臺灣和東北。披散草本；葉卵狀披針形；花1~3朵聚生或單生於分枝的叉上；萼闊鐘形，5齒裂，10脈；花瓣5，頂端2裂，基部有鱗片2；雄蕊10；花盤延生而成一短柄；子房1室，基部有隔膜3；胚珠多數；花柱3；果球形，肉質，最後不規則的開裂。

a. 狗筋蔓(*Cucubalus baccifer* L.)

多年生草本，莖鋪散而漸向上，長1~2 m，多分枝，疏生短柔毛，節處明顯膨大。葉對生，卵形、卵狀長橢圓形至卵狀披針形，長2~4 cm，寬1~2 cm，近基部的葉長3~5 cm，寬2~2.5 cm，頂端急尖，基部楔形，全緣，兩面有斑點，僅中脈上有毛；葉柄短，長3~5 mm，無托葉。聚散花序頂生，呈圓錐狀，少數花腋生小枝上，每枝有1~3花；花萼寬鐘狀，5裂，花瓣5，白色，2深裂，喉部有2鱗片；雄蕊10；花柱3，絲狀，子房1室，基部有假隔膜分爲3室，每室有多數胚珠。果實球形，漿果狀，直徑約1 cm，黑色，有光澤。種子多數。

3. 爵床科(Acanthaceae)

(1) 馬藍屬(*Strobilanthes*)植物之共同特徵

草本至亞灌木。葉對生，鋸齒緣。穗狀花序或為近頭狀花序及小聚繖花序；花萼5裂，裂片線形或線狀披針形；花冠淡紫色，稀白色，先端五裂；雄蕊2強，花絲基部有膜相連；蒴果，種子4粒。

a. 腺毛馬藍(*Strobilanthes forrestii* DIELS)

為爵床科(Acanthaceae)植物。多年生草本，高達100 cm，全株遍生柔毛和棕黃色腺毛，後漸脫落。根莖粗大，橫向或斜向生長，呈不規則連結的疙瘩狀，直徑1~2 cm，下邊鬚根成叢，根圓柱狀，長達40 cm，灰棕色或棕黑色。莖上部四稜形，節部稍膨大。葉對生，草質，卵形至卵狀矩圓形，長2~12 cm，寬1.5~7.5 cm，頂端漸尖至尾尖，基部楔形，常不對稱，邊緣有粗鋸齒，兩面均疏生白色短伏毛和短棒狀鐘乳體；葉柄長1~5 mm，莖上部葉有短柄至無柄。穗狀花序頂生或腋生，長5~15 cm，或基部有分枝，每節有2朵對生花；苞片葉狀，卵狀橢圓形，長1~2 mm；小苞片條形，和萼裂片等長或較短，萼裂片5，條形，長8~12 mm，等長或其中兩片略長；花冠紫色或白色，長約3.5 cm，筒形，基部細窄，上部擴大並彎曲，外面和背面疏生微毛，內面有2行柔毛，裂片5，幾相等，長約3 mm；雄蕊二強，著生花筒壁上部，基部有薄膜相連；花柱細長，子房上位，2室，每室有2胚珠。蒴果橢圓形，長10~15 mm，黃棕色，背裂，果瓣外彎；種子扁圓形，長4 mm，黑色，貼生黃色粗毛。藥材名稱為味牛膝或窩牛膝。(圖2-7)



1.花枝 2.根 3.花

圖 2-12 牛膝(*Achyranthes bidentata* Blume)⁽²²⁾



1.花枝 2.根 3.雄蕊

圖 2-6 川牛膝(*Cyathula officinalis* KUAN)⁽²⁶⁾

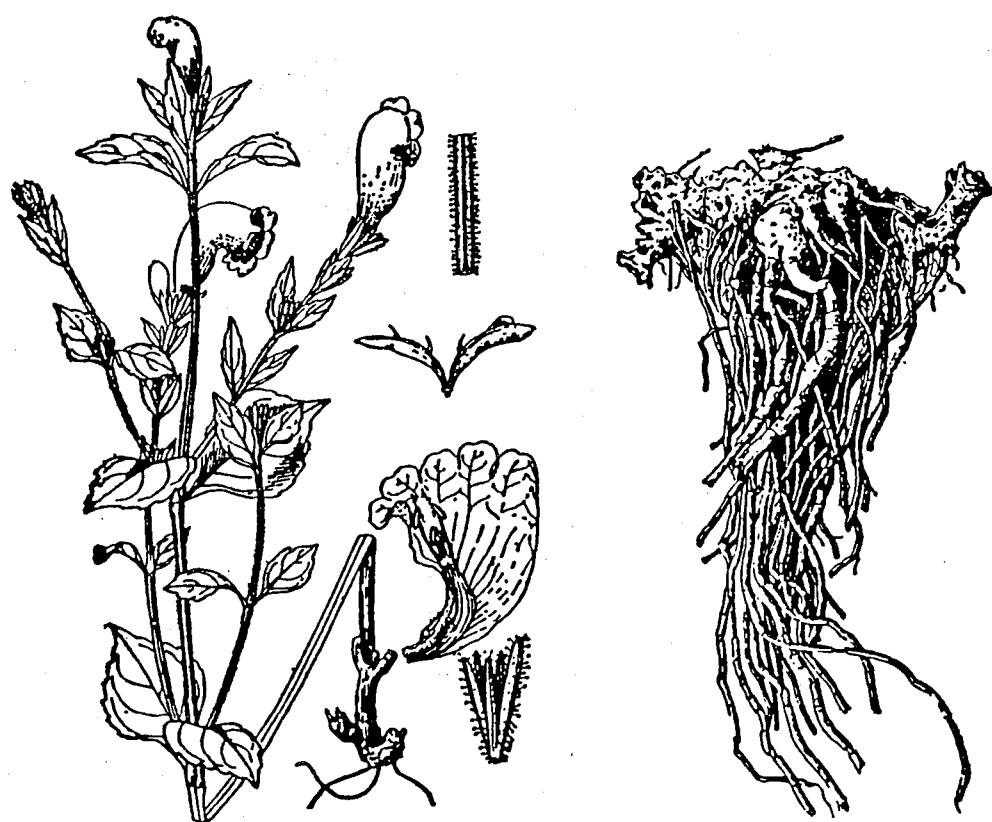


圖 2-7 腺毛馬藍(*Strobilanthes forrestii* DIELS)⁽²⁴⁾

表2-1 中國大陸牛膝類藥材之基原植物⁽²¹⁻²⁷⁾

原 植 物		藥 材 名 產 地		使用地區	藥用部分	備 注
科 名	學 名	藥 材	名 產			
苋 (Amaranthaceae)	牛 膝 <i>Achyranthes bidentata</i> BLUME	懷牛膝(栽培品) 土牛膝(野生品)	遼寧、河北、河南、陝西、 山東、安徽、湖南、廣西、 四川、雲南、貴州	全國各地	根	
	柳葉牛膝 <i>Achyranthes longifolia</i> MAKINO	紅牛膝	陝西、浙江、江西、湖南、 四川、雲南、貴州	同左	根	
	土牛膝 <i>Achyranthes aspera</i> L.	土牛膝 小牛膝	廣東、廣西、四川、雲南、 貴州	同左	根	廣東尚用其 全草，稱"倒 扣草"
	川牛膝 <i>Cyathula officinalis</i> KUAN	川牛膝	甘肅、山東、湖南、四川、 雲南、貴州	全國各地	根	
	頭花杯苋 <i>Cyathula capitata</i> (WALL) MOQ.	麻牛膝	四川、雲南、貴州	部分地區	根	
石 竹 科 (Caryophyllaceae)	狗筋蔓 <i>Cucubalus baccifer</i> L.	白牛膝	雲南	同左	根	
爵 床 科 (Acanthaceae)	腺毛馬藍 <i>Strobilanthes forrestii</i> DIELS	味牛膝 窩牛膝	湖北、四川、雲南	黑龍江	根莖及根	

第三節 臺灣產牛膝屬(*Achyranthes*)及川牛膝屬(*Cyathula*)之藥用植物學考察根據臺灣植物誌⁽¹⁹⁾記載，臺灣產牛膝屬(*Achyranthes*)植物共有6種，川牛膝屬(*Cyathula*)有1種。

一、臺灣產牛膝屬(*Achyranthes*)植物之檢索表(19)

1. 退化雄蕊上緣絲裂狀

2. 葉倒卵形或近圓形，葉端鈍形——*A. aspera* var. *indica*(土牛膝)

2. 葉長橢圓形，葉端尖銳形——

A. aspera var. *rubro-fusca*(紫莖牛膝)

1. 退化雄蕊截斷狀，上緣略帶齒狀

2. 莖直立或近乎直立；葉通長為長橢圓形或線狀披針形，長於6公分

3. 植物體稍具柔毛或近乎平滑無毛

4. 葉線狀披針形——*A. longifolia*(柳葉牛膝)

4. 葉長橢圓形——*A. japonica*(日本牛膝)

3. 植物體被白色短絨毛——*A. bidentata*(牛膝)

2. 莖稍伏援，節處長根；葉披針形，一般長小於6公分

——*A. ogatai*(南天牛膝)

二、臺灣產牛膝屬(*Achyranthes*)植物之形態(3, 19-23)

1. *Achyranthes aspera* var. *indica* L. 印度牛膝(土牛膝)

一年或二年生草本植物，高20~100 cm，莖有稜，具毛茸。葉對生，有柄，葉片倒卵形或近圓形，長3~10 cm，寬1~4 cm，基部狹尖或楔形，先端漸尖，全緣。長穗狀花序，上生無數小花，萼具5強韌鱗片；無花瓣；蜜腺較花萼為長；雄蕊5枚；花柱與雄蕊等長，柱頭粗糙，兩裂。果實具1種子，被以包膜。(圖2-8)

2. *Achyranthes aspera* var. *rubro-fusca* HOOK. f. 臺灣牛膝(紫莖牛膝)多年生草本植物，高100~150 cm，全株被毛，莖方形，節膨大，枝條赤褐色，乾則成褐色。葉對生，有柄，葉片長橢圓形，長2~10 cm，寬1.5~4 cm，基部近楔形，先端尖，全緣。長穗狀花序，花

無瓣，具針狀小苞；萼片5，披針形，先端頗尖銳而硬；雄蕊5枚；花柱1枚。無藥雄蕊先端有毛，小包基腳無小齒。瘦果小，卵形，為宿存苞及萼所包著。(圖2-9)

3. *Achyranthes bidentata* BLUME 牛膝

多年生草本植物，高70~120 cm；根圓柱形，莖有稜角，幾無毛，節部膝狀膨大，有分枝。葉對生，有柄，葉片卵形至橢圓形或橢圓狀披針形，長4.5~12 cm，寬1~5 cm，基部楔形，先端長尖，全緣，兩面有柔毛；葉柄長0.5~3 cm。穗狀花序頂生或腋生，花後總花梗伸長，花向下折而貼近總花梗；苞片寬卵形，頂端漸尖，小苞片貼生於萼片基部，刺狀，基部有卵形小裂片；花被5，綠色；雄蕊5，基部合生，退化雄蕊頂端平圓，波狀。胞果矩圓形，長2~2.5 cm。(圖2-10)

4. *Achyranthes japonica* (MIQ.) NAKAI 日本牛膝

多年生草本植物，株高50~100 cm。根稍粗厚，地中分株。莖四角形，向上披伏短毛，節上膨大；葉腋對生短枝，莖枝均呈紅色，節上尤深紅。葉對生，具短柄，葉片長橢圓形，長4~10 cm，寬2.5~6 cm，基部鈍形，先端尖，鋸齒緣，兩面披伏毛。穗狀花序頂生或腋生，小花密生序上，由下而上順序開放，花後向下反貼花軸上。花苞3枚，針狀；花被片5枚，線狀披針形；雄蕊5枚，雌蕊1枚。子房橢圓形；胞果長橢圓形。種子1粒。花果期夏秋間。(圖2-11)

5. *Achyranthes longifolia* MAKINO 柳葉牛膝

多年生草本植物。莖高約90 cm，直立，有四稜，節膨大。葉對生，有柄，葉片披針形或線狀披針形，長4~15 cm，寬0.5~3.5 cm，兩端均漸尖形，全緣。長穗狀花序，著生多數綠色小花；萼片5；雄蕊5，花絲基部連合或杯狀；雄蕊1枚；子房倒卵狀球形，花柱1枚。胞果橢圓形，內藏種子1枚。(圖2-12)

6. *Achyranthes ogatai* YAMAMOTO 南天牛膝

多年生草本植物，高約50 cm，莖細長，莖部伏臥地面，結節生根，上部蔓性，茸毛散生。葉對生，有柄，披針形，長3~7 cm，寬1~3

cm，基部鈍形或尖形，先端漸尖形，全緣。穗狀花序，苞乾皮質，線狀披針形；花被革質，5裂，裂片披針形，銳尖頭，有爪。果實長橢圓形，有苞及小苞，苞線狀披針形，乾皮質；小苞二、二齒裂，齒片圓形，有芒。(圖2-13)

三、臺灣產川牛膝屬(*Cyathula*)植物之形態^(3,19)

1. *Cyathula prostrata* (L.) BLUME 假川牛膝

多年生草本植物，高可達50 cm。莖常有四稜，被柔毛，基部常匍匐。葉對生，橢圓形或倒卵狀菱形，長2~5 cm，先端鈍或急尖，基部楔形，兩面被伏貼柔毛。總狀花序頂生或腋生；花束疏生，總苞1枚，著生於花束基部，卵形；花小，無花梗；小苞2枚，闊卵形；萼片5，長卵形，長2~2.5 mm，具脈紋條，外面密被長柔毛；雄蕊5枚，基部合生；不育雄蕊短舌狀，先端鈍或兩淺裂；不育花的花萼及苞片變態為鉤狀芒刺。胞果不開裂。花期9~11月。(圖2-14)



圖2-5B *Achyranthes bidentata* Blume 牛膝(懷牛膝)

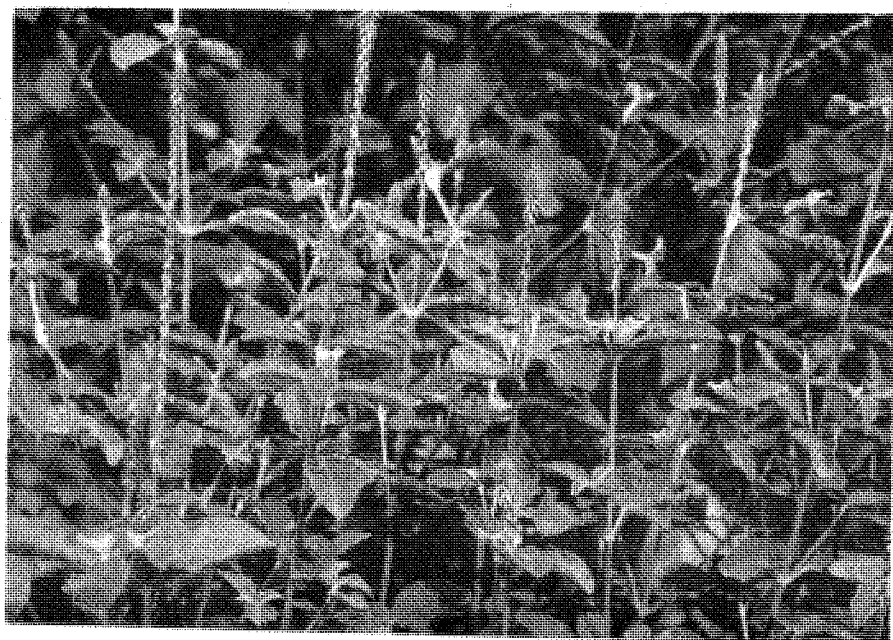


圖2-8 *Achyranthes aspera* var. *indica* L. 印度牛膝(土牛膝)



圖2-9 *Achyranthes aspera* var. *rubro-fusca* HOOK. f. 臺灣牛膝(紫莖牛膝)

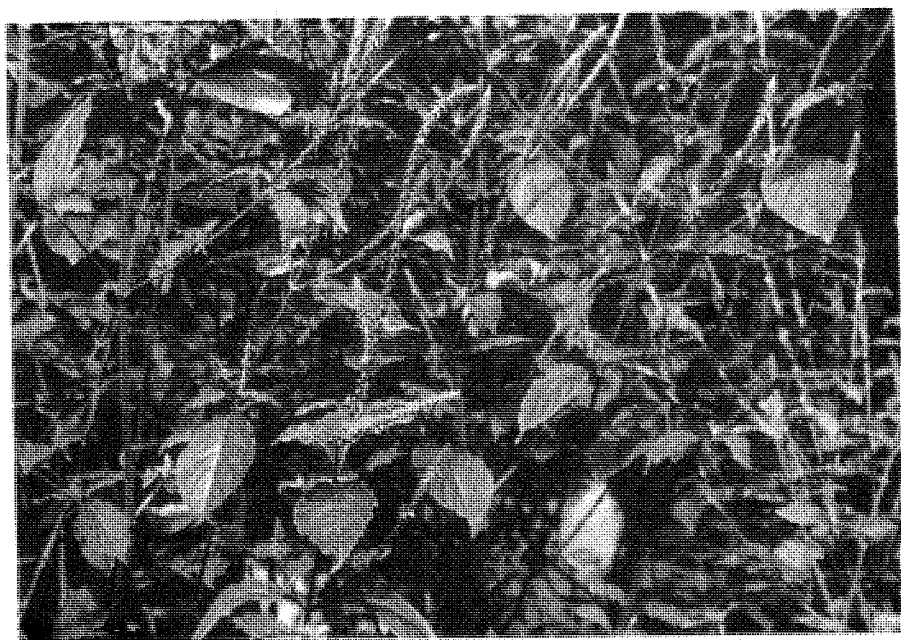


圖2-10 *Achyranthes bidentata* BLUME 牛膝



圖2-11 *Achyranthes japonica* (M_{IQ}.) NAKAI 日本牛膝

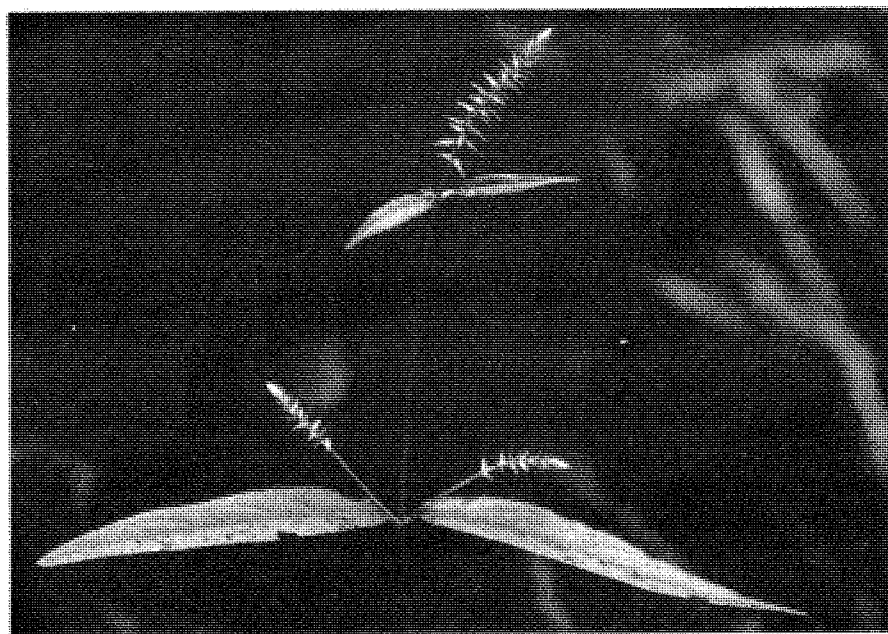


圖2-12 *Achyranthes longifolia* M_{AKINO} 柳葉牛膝



圖2-13 *Achyranthes ogatai* Y_{AMAMOTO} 南天牛膝



圖2-14 *Cyathula prostrata* (L.) B_{LUME} 假川牛膝

第四節 牛膝已知成分之文獻考察^(3,24,26-38)

牛膝屬(Achyranthes)及川牛膝屬(Cyathula)植物，其成分根據美國伊利諾大學 Narpralert 資料庫在1994年7月份之前所做的統計，牛膝屬已有8種植物發表過成分，川牛膝屬已有3種植物發表過成分，茲分述於下：

一、牛膝屬(Achyranthes)植物

1. Triterpene⁽³⁹⁻⁴⁵⁾：

Achyranthes saponin C, Achyranthes saponin D, Oleanolic acid (C₃₀H₄₈O₃), 3- β -D-gl-olean-12-en-28-oic acid, Oleanolic acid glucuronide, Ursolic acid, Oleanolic acid α -l-rhamnopyranosyl- β -D-galactopyranoside.

2. Steroid⁽⁴⁶⁻⁶¹⁾：

b-Ecdysone, b-sitosterol, Stigmasterol, Inokosterone (C₂₇H₄₄O₇), Daucosterol, Inokosterone A, Inokosterone B, Rubrosterone, Stigmasterol-3-O- β -D-glucoside.

3. Protein⁽⁶¹⁻⁶⁵⁾：

Phenylalanine, Arginine, Betaine, Histidine, Leucine, Iso-leucine, Lysine, Methionine, Indole-acetic acid oxidase, Polyphenol oxidase, Peroxidase, Protein, Tryptophan, Valine, Aspartic acid, Glutamic acid, Glycine, Proline, Serine, Threonine, Tyrosine, Alanine, γ -amino-butyric acid.

4. Lipid⁽⁶¹⁻⁶³⁾：

Arachidic acid, Behenic acid, Lauric acid, Linoleic acid, Myristic acid, Oleic acid, Palmitic acid, Stearic acid.

5. Alkane⁽⁶⁶⁻⁶⁹⁾：

36,37-Dihydroxy-henpentacontan-4-one, Hentriacontane, 16-Hydroxy-26-methyl-heptacosan-2-one, Pentatriacontan-17-ol, Tritriacontan-1-ol.

6. Carbohydrate^(64,70,71)：

Carbohydrate, Achyranthes bidentata polysaccharides, Achyranthes polysaccharides ABAB, Polysaccharides, Glucuronic acid.

7. Alkaloid ^(62,72):

Achyranthine, Cystine.

8. Inorganic ^(40,73):

K, KCl, N, Na, P, Zn, Mn, Ca, Mg.

9. Others ^(51,61,68,74,75):

27-Cyclo-heptacosan-2-one, 3,4-hydroxy benzoic acid, Emodyne, Physcion, Succinic acid.

二、川牛膝屬(Cyathula)植物

1. Steroid ^(51,76-86):

Amarasterone A, Amarasterone B, Capitasterone($C_{29}H_{44}O_7$), 24-Ethyl-cholest-5-en-3- β -ol, Cyasterone($C_{27}H_{44}O_7$), 24-Ethyl-5- α -cholest-7-en-3- β -ol, (24-S)-24-Ethyl-cholesta-5-22-dien-3- β -ol, Poststerone, Sengosterone ($C_{29}H_{44}O_9$), β -Ecdysone, Epicyasterone, Isocyasterone, Precyasterone, Rubrosterone, (24-Z)-5- α -stigmasta-7-24(28)-dien-3- β -ol.

2. Inorganic ⁽⁸⁷⁾:

Fluoride.

第五節 牛膝之藥理作用及臨床應用文獻考察

一、藥理作用

1. 牛膝之藥理作用 ^(3,28-30)

(1) 對子宮的作用 ⁽⁸⁸⁻⁹⁰⁾:

牛膝對子宮平滑肌的作用因動物種類不同及是否懷孕而異。如牛膝流浸膏或煎劑對離體家兔子宮不論已孕或未孕均能發生收縮；對於收縮無力的小鼠離體子宮則使收縮加強；對貓的未孕子宮呈弛緩作用，而對已孕子宮發生強有力的收縮；對已孕或未孕豚鼠

子宮多呈弛緩作用；對動情期大鼠離體子宮，牛膝表現是振幅增大，頻率加快，並且是規則的節律性收縮。

(2)對腸管的作用⁽³⁾：

本品煎劑對小白鼠離體腸管呈抑制；對豚鼠腸管有加強收縮作用。

(3)對心血管系統的作用⁽⁸⁹⁾：

對犬有短暫降壓作用；對蟾蜍心臟的搏動有減弱的作用。

(4)鎮痛作用^(90,91)

(5)抗炎作用⁽⁹⁰⁾

(6)促進蛋白質合成與更新⁽⁹⁰⁾

(7)輕微利尿作用⁽³⁾

(8)抗癌作用⁽⁹²⁾

(9)抗早孕作用(Abortifacient effect)⁽⁹³⁾

(10)抗菌作用⁽⁹⁴⁾

2. 川牛膝之藥理作用

(1)對子宮的作用^(28,90)：

川牛膝對子宮肌肉的作用因動物種類不同及是否懷孕而異。如，川牛膝流浸膏對豚鼠的子宮肌緊張性不論已孕或未孕多呈弛緩作用；川牛膝流浸膏對已孕和未孕的家兔子宮都能發生收縮；川牛膝流浸膏對貓的未孕子宮呈弛緩作用，而對已孕子宮發生強有力的收縮；對狗的子宮則作用不定，或先呈收縮繼之弛緩；對動情期大鼠離體子宮，川牛膝的作用為抑制性，不但使子宮平滑肌原有的收縮振幅減弱，甚至可部分對抗催產素所引起的子宮平滑肌強烈收縮。

(2)對小白鼠有抗生育和抗著床作用⁽⁹⁵⁾

(3)抗炎作用⁽⁹⁰⁾

(4)鎮痛作用⁽⁹⁰⁾

二、臨床應用

根據文獻記載，懷牛膝善於補肝腎、強筋骨，活血通絡，多用於肝

腎不足的閉經、痛經、腰膝酸痛；川牛膝偏於活血祛瘀，多用於實證之血瘀^(97,98,102)。

1. 牛膝之臨床應用^(3,29,30,96-104)

【功用主治】

生用散瘀血，消癰腫，治淋病，血尿，經閉，癥瘕，難產，胞衣不下，產後瘀血腹痛，喉痺，癰腫，跌打損傷。熟用補肝腎，強筋骨。治腰膝骨痛，四肢拘攣，痿痺。

(1)祛瘀通經療傷：用於血滯、經痛、產後瘀滯婦痛及跌打損傷等。如牛膝散。

(2)補肝腎、強筋骨：用於肝腎不足的腰腿酸痛，軟弱無力及風濕痺証，下肢關節疼痛。如獨活寄生湯、三妙丸。

(3)引血下行：用於陰虛火旺所致的牙齦腫痛、口舌生瘡等上火熱証及吐血、衄血。如玉女煎。

(4)利水通淋：小便不利，尿道澀痛，腎虛水腫。如濟生腎氣丸。

2. 川牛膝之臨床應用^(3,101)

【功用主治】

祛風，利濕，通經，活血。治風濕腰膝疼痛，腳痿筋攣，血淋，尿血，婦女經閉，癥瘕。

(1)風濕腰膝疼痛：川牛膝煎(<三因極病症論>)

(2)經閉、難產、胞衣不下：常與當歸、桃仁、赤芍、紅花同用。

(3)尿路結石：化瘀排石湯。

第六節 臺灣市售含牛膝方劑之文獻考察(105-110)

一、獨活寄生湯

【原出典】《備急千金要方》

【組成】獨活 桑寄生 秦艽 防風 細辛 川芎 當歸 茯苓 桂心 杜仲 牛膝 乾地黃 芍藥 人參 甘草

【功用】祛風濕，止痺痛，益肝腎，補氣血。

【主治】痺痛日久，肝腎兩虧、氣血不足。腰膝疼痛，肢節屈伸不利

，或麻木不仁，畏寒喜溫，心悸氣短，舌淡苔白，脈象細弱。

二、疏經活血湯

【原出典】《萬病回春》

【組成】白芍 當歸 生地黃 蒼朮 桃仁 牛膝 威靈仙 陳皮
龍膽草 茯苓 川芎 漢防己 羌活 防風 白芷 生薑
甘草

【功用】疏經活血，祛風除濕。

【主治】遍身走痛如刺，左足痛尤甚，左屬血，多因酒色損傷，筋脈虛空，被風寒濕熱，感於內，熱包於寒，則痛傷筋絡，是以晝輕夜重，宜以疏經、活血、行濕，此非白虎，歷節風也。令治婦人血風勞。

三、濟生腎氣丸

【原出典】《濟生方》

【組成】山藥 山茱萸 茯苓 牡丹皮 澤瀉 車前子 附子 熟地黃 牛膝 肉桂

【功用】溫補腎陽，利水消腫。

【主治】腎陽不足；腰痛腳軟，下半身常有冷感，少腹拘急，小便不利，或小便反多，舌淡而胖，苔薄白不燥，尺脈沉細。以及腳氣、痰飲、消渴、轉胞等証。

四、玉女煎

【原出典】《景岳全書》

【組成】石膏 熟地黃 麥門冬 知母 牛膝

【功用】清胃滋陰。

【主治】陰虛胃熱而致煩熱口渴，頭痛，牙痛，或吐血，衄血，咯血，舌紅，苔白或黃而乾，脈洪或滑，按之有虛象。

五、柏子仁丸

【原出典】《婦人良方》

【組成】續斷 澤蘭 熟地黃 柏子仁 牛膝 卷柏

【功用】益心血，通結滯。

【主治】婦女月經不調或瘀積不通，血虛有火，月經耗損，漸至不通，羸瘦而生潮熱，及室女思慮過度，經閉成勞。

六、血府逐瘀湯

【原出典】《醫林改錯》

【組成】桃仁 紅花 當歸 生地黃 牛膝 赤芍 枳殼 川芎 桔梗 柴胡 甘草

【功用】活血祛瘀，行氣止痛，開胸散結。

【主治】胸中血瘀，血行不暢。胸痛、頭痛日久不愈、痛如針刺而有定處，或呃逆日久不止，或飲水即噎，乾嘔、或內熱瞋悶，或心悸怔忡，或夜不能睡，或夜寐不安，或急燥善怒，或入暮潮熱，或舌質黯紅、舌邊有瘀斑，或舌面有瘀點，唇暗或兩目暗黑、脈澀或弦緊。

七、八仙湯

【原出典】《萬病回春》

【組成】白朮 茯苓 當歸 白芍 陳皮 川芎 熟地黃 半夏 秦艽 人參 牛膝 防風 羌活 柴胡 炙甘草 桂枝 大棗 生薑

【功用】益肝腎，補氣血，祛風濕，止痺痛。

【主治】氣虛、濕痰、死血引起之肢節麻木，筋骨疼痛，尤對手、足麻木卓效。

八、還少丹

【原出典】《楊氏家藏方》

【組成】山藥 牛膝 五味子 茴香 遠志 山茱萸 茯苓 杜仲 巴戟天 肉蓯蓉 楮實子 大棗 熟地黃 枸杞 石菖蒲

【功用】滋陰養血、補氣益腎。

【主治】脾腎虛寒，血氣羸乏，不思飲食，發熱盜汗，遺精白濁，肢體瘦弱，牙齒浮痛。

九、三痺湯

【原出典】《婦人良方》

【組成】人參 黃耆 茯苓 甘草 當歸 白芍 杜仲 桂心 細辛
秦艽 大棗 牛膝 防風 續斷 獨活 川芎 生地黄
生薑

【功用】益氣養血，祛風勝濕。

【主治】血氣凝滯，手足拘攣，風痺等疾。

十、折衝飲

【原出典】《產論》

【組成】桃仁 當歸 牡丹皮 川芎 芍藥 桂枝 延胡索 牛膝
紅花

【功用】祛瘀活血、化積散滯。

【主治】婦人經病，目眩頭痛，腰酸腹痛，血瘀瘀結，或閉塞不通，
月水不調。

表 2-2 臺灣市售含牛膝之市售濃縮中藥方劑

	方劑	類別	出典	出典所用牛膝
1	獨活寄生湯	風濕筋骨劑	千金方	牛膝
2	疏經活血湯	風濕筋骨劑	萬病回春	牛膝
3	濟生腎氣丸	婦女經產劑	濟生方	牛膝
4	玉女煎	清涼瀉火劑	張景岳方	牛膝
5	柏子仁丸	婦女經產劑	婦人大全良方	牛膝
6	血府逐瘀湯	理血劑	醫林改錯	牛膝
7	八仙湯	風濕筋骨劑	萬病回春	牛膝
8	還少丹	補養強壯劑	楊氏方	牛膝
9	三痺湯	風濕筋骨劑	張氏醫通方	牛膝
10	折衝飲	風濕筋骨劑	萬病回春	牛膝

第三章 材料與方法

第一節 實驗材料

一、臺灣產牛膝屬(*Achyranthes*)及川牛膝屬(*Cyathula*)植物之採集

1. 臺灣產牛膝屬(*Achyranthes*)植物

(1) *Achyranthes aspera* var. *indica* L. 印度牛膝(土牛膝)

來源：民國八十三年五月於清水大甲溪岸採得之鮮品。

性狀：根細長圓柱形，呈馬尾狀歧，上端較粗，下部漸細，主根長約5~30公分，直徑約0.1~0.5公分，表面呈土黃色或淡黃色，鮮品斷面呈黃色，乾燥品質硬，具稀疏側根痕，斷面呈黃白色。微香，味略甘。

(2) *Achyranthes aspera* var. *rubro-fusca* HOOK. f. 臺灣牛膝(紫莖牛膝)

來源：民國八十三年五月於新竹五指山區採得之鮮品。

性狀：根細長圓柱形，上端較粗，下部漸細，主根長約10~50公分，直徑約0.3~0.6公分，表面灰褐色至灰黃褐色，鮮品斷面呈紫色或黃色，乾燥品質硬，表面呈黃色或棕色，具稀疏側根痕，滿佈縱皺紋，略有彈性，斷面呈黃棕色。微香，味略甘。

(3) *Achyranthes bidentata* BLUME 牛膝

來源：民國八十三年五月於新竹寶山鄉區採得之鮮品。

性狀：根細長圓柱形，上端較粗，下端較細，主根長約10~40公分，直徑約0.2~0.6公分，鮮品表面呈土黃色或淡棕色。乾燥品質硬而脆，具有細縱皺紋及稀疏的側根痕，斷面黃白色。微香，略具甘味。

(4) *Achyranthes japonica* (MIQ.) NAKAI 日本牛膝

來源：民國八十三年六月於墾丁採得之鮮品。

性狀：根呈馬尾狀歧，上端較粗，下部漸細，主根長約5~20公分，直徑約0.1~0.4公分，表面呈紫色或棕色，滿佈縱皺紋，

鮮品斷面呈紫色或黃色，乾燥品質硬，斷面呈黃棕色。微香，味略甘。

(5) *Achyranthes longifolia* MAKINO 柳葉牛膝

來源：民國八十三年十月於烏來採得之鮮品。

性狀：根呈馬尾狀歧，上端較粗，下部漸細，主根長約10~25公分，直徑約0.3~0.5公分，表面呈灰黃色或棕色，滿佈縱皺紋，鮮品斷面呈紫色或黃色，乾燥品質硬，斷面呈黃色。微香，味略甘。

(6) *Achyranthes ogatai* YAMAMOTO 南天牛膝

來源：民國八十三年十月於烏來採得之鮮品。

性狀：根由節處歧生，呈細長圓柱形，長約5~20公分，直徑約0.1~0.3公分，表面呈黃色，鮮品斷面呈黃色，乾燥品質硬，表面呈棕色，滿佈縱皺紋，斷面呈黃棕色。微香，味略甘。

2. 臺灣產川牛膝屬(*Cyathula*)植物

(1) *Cyathula prostrata* (L.) BLUME 假川牛膝

來源：民國八十三年六月於墾丁採得之鮮品。

性狀：根呈細長，長約10~20公分，直徑約0.05~0.2公分，表面呈黃色，鮮品斷面呈黃色，乾燥品質硬，表面呈棕色，斷面呈黃棕色。

註：以上臺灣產牛膝屬及川牛膝屬植物經由中國醫藥學院中藥研究所邱年永技正鑑定。

二、臺灣市售牛膝類藥材之蒐集

民國八十三年二月至六月間到全省各地二十家中藥房或中藥批發商抽購各種牛膝類藥材，並經中國醫藥學院附設醫院中藥局張永勳主任、北京中國中醫研究院中藥研究所謝教授宗萬及南京中國藥科大學徐教授國鈞鑑定，市售稱懷牛膝之藥材為牛膝(*Achyranthes bidentata* BLUME)的乾燥根，市售稱杜牛膝之藥材為川牛膝(*Cyathula officinalis* KUAN)的乾燥根，而市售稱川牛膝之藥材則為腺毛馬藍(*Strobilanthes*

forrestii DIELS)的乾燥根及根莖。

三、臺灣市售含牛膝濃縮成方製劑之蒐集(105)

民國八十三年二月至六月間蒐購甲、乙、丙、丁、戊、己、庚、辛等八家濃縮GMP中藥廠含牛膝之成方製劑：獨活寄生湯、疏經活血湯、濟生腎氣丸、玉女煎、柏子仁丸、血府逐瘀湯、八仙湯、還少丹、三痺湯、折衝飲等十種濃縮成方製劑，並請八家中藥廠提供其所用牛膝之藥材，以供參考。

表3-1 臺灣市售含牛膝成方製劑

	甲	乙	丙	丁	戊	己	庚	辛
獨活寄生湯	V	V	V	V	V	V	V	V
疏經活血湯	V	V	V	V	V	V	V	V
濟生腎氣丸	V	V	V		V	V	V	V
玉女煎		V	V	V		V	V	V
柏子仁丸	V	V	V		V	V	V	V
血府逐瘀湯			V		V	V	V	V
八仙湯		V		V			V	
還少丹	V	V	V	V	V	V	V	V
三痺湯	V	V	V				V	
折衝飲	V		V	V				V

V：能購得之製劑

四、蠟葉標本

牛膝 (*Achyranthes bidentata* BLUME)、川牛膝 (*Cyathula officinalis* KUAN)、腺毛馬藍 (*Strobilanthes forrestii* DIELS) 蠟葉標本由北京中國中醫研究院中藥研究所謝教授宗萬及南京中國藥科大學徐教授國鈞提供。

五、實驗試藥

甲醇、乙酸乙酯、正己烷、正丁醇、氯仿等購自皓峰公司。

冰醋酸、乙醚等購自聯工化學廠。

硫酸、鹽酸爲試藥級，購自Dong Shing Industrial Co, Ltd.。

SIGMA：香夾蘭醛(Vanillin)、茴香醛(P-Anisaldehyde)，Urethane，Heparin，Formalin， λ -carrageenan，Indomethacin購自誠心堂化學股份有限公司。發色液之配製⁽¹¹⁾

1. 香夾蘭醛/硫酸發色液(Vanillin/ H₂SO₄ spray reagent)：取 Vanillin 0.5 g加入濃硫酸及乙醇以4：1混合之混合液100 ml中。
2. 茴香蘭醛/硫酸發色液(P-Anisaldehyde/H₂SO₄ spray reagent)：取P-Anisaldehyde 0.5 ml加入冰醋酸0.1 ml及濃硫酸0.5 ml，加乙醇9 ml，用前配製。

六、儀器

1. 電子天平：OHAUS GALAXY™ 160。
2. 超音波振盪器：SONOREX SUPER RK 1028 BH。
3. 蒸餾水製造器：Branson 5200。
4. 紫外燈：CAMAG Universal UV lamp，波長254 nm及366 nm。
5. 減壓濃縮裝置：Eyela Rotary Vacuum Evaporator。
6. 玻璃展開槽：120mm×150mm。
7. 照相機：PENTAX SF1。
8. 毛細管：CAMAG Disposable Micropipettes。
9. 薄層板：Silica gel 60 F₂₅₄ Art No.5554，E. Merck公司。
10. 顯微鏡：Nikon potograph T-2。

第二節 實驗方法

一、生藥組織鑑別

將採集之臺灣本產牛膝屬(*Achyranthes*)、川牛膝屬(*Cyathula*)植物的根部及市售牛膝類藥材：牛膝、川牛膝、味牛膝為材料，利用徒手切片法進行橫切、放射性縱切、切線性縱切等，並置檢體於載玻片上，先以chloral hydrate solution清除細胞內含物後，再滴加各種不同化學染色劑如phloroglucinol- alcohol與conc. HCl進行木化反應，或滴加Sudan III進行木栓化反應等，最後以glycerin: water (1:1)混合溶液將檢品封鎖，蓋上蓋玻片，然後置於顯微鏡下，先用低倍鏡頭檢查檢品輪廓，再以高倍鏡頭觀察內部組織之特徵，並利用顯微攝影拍攝各個組織。

二、臺灣市售含牛膝成方製劑之檢驗^(111,112)

1. 對照藥材溶液之調製：

取對照藥材牛膝、川牛膝、味牛膝各5 g，分別加入甲醇，於超音波振盪約30分鐘，過濾，定容至10 ml，供作對照藥材溶液。

2. 對照空白溶液之調製：

取與檢液相同之處方量，以牛膝為1 g，其餘藥材量按其比例，除去牛膝，加入甲醇至液面蓋過藥材，於超音波振盪約30分鐘，過濾，定容至10 ml，供作空白溶液。

3. 檢液之調製：

取市售八家藥廠含牛膝的濃縮成方製劑粉末(獨活寄生湯、疏經活血湯…等)各5 g，分別加入甲醇，於超音波振盪約30分鐘，過濾，定容至10 ml，供作檢液。

4. 薄層層析之條件：

方法一：

a. 層析板：Silica gel 60 F254

b. 展開溶媒：n-Hexane : Ethyl acetate (4 : 1)

c. 點注量：各20 μ l

d. 展開距離：5cm

e.檢 出 方 法：噴P-Anisaldehyde/H₂SO₄ spray reagent，
105°C加熱五分鐘

方法二：

- a.層 析 板：Silica gel 60 F254
- b.展 開 溶 媒：n-Butanol : H₂O : Acetic acid (7 : 2 : 1)
- c.點 注 量：各20 μ l
- d.展 開 距 離：5cm
- e.檢 出 方 法：UV 254 nm

第四章 實驗結果

第一節 牛膝類藥材之生藥學研究

一、臺灣產牛膝屬(*Achyranthes*)及川牛膝屬(*Cyathula*)植物

1. 臺灣產牛膝屬(*Achyranthes*)植物

(1) *Achyranthes aspera* var. *indica* L. 印度牛膝(土牛膝)

構造：根之橫切面，最外層為木栓層，由4~8列扁長型細胞組成，
。皮層由5~9列類長方形柔細胞組成，內有少數簇晶散佈，
多分佈於皮層組織。維管束開放並立型，排列成同心圓狀
，中央原生木部呈十字型。導管以孔紋及網紋為主。(圖4-
1)

(2) *Achyranthes aspera* var. *rubro-fusca* H_{OOK.} f. 臺灣牛膝(紫莖牛膝)

構造：根之橫切面，最外層為木栓層，由4~7列扁長形細胞組成，
易剝落。皮層由6~13列類橢圓形柔細胞組成。維管束呈環
狀排列，開放並立型，外層常連結成環狀。髓線明顯；中
央原生木部呈二扇型。導管以孔紋及網紋為主。(圖4-2)

(3) *Achyranthes bidentata* B_{LUME} 牛膝

構造：根之橫切面，最外層為木栓層，由4~9列扁長形細胞組成。
皮層由8~12列柔細胞組成，細胞呈扁長方形、多角形或不

規則形。次生維管束呈環狀斷續排列，外層連結成環狀，維管束外韌形。導管較初生維管束導管數量少且較小，呈木化或弱木化。根部中央初生木質部呈二扇型。導管以網紋及孔紋為主。(圖4-3)

(4) *Achyranthes japonica* (M_{IQ.}) N_{AKAI} 日本牛膝

構造：根之橫切面，最外層為木栓層，由3~5列細胞組成，易剝落，具厚角組織。皮層由6~9列類橢圓形柔細胞組成。維管束開放並立型，外層連結成環狀，內層單個散生。中央髓線細胞大，外側小。中央由2個維管束組成，呈二扇型。導管屬孔紋、網紋導管。(圖 4-4)

(5) *Achyranthes longifolia* M_{AKINO} 柳葉牛膝

構造：根之橫切面，最外層為木栓層，由5~9列扁長細胞組成。皮層由 10~13列長方形、不規則形柔細胞組成。維管束單個散生，開放並立型，呈同心圓放射狀，導管單個獨立大小不一，髓線特別發達，由中央直達皮層。中心之初生木質部呈二扇形，中央柔細胞呈不規則多角形。形成層不明顯，放射組織發達；簇晶量少，集中於維管束同心環中央部位的環間薄壁組織，少數則散佈在皮層組織。導管屬孔紋、網紋及階紋導管。(圖4-5)

(6) *Achyranthes ogatai* Y_{AMAMOTO} 南天牛膝

構造：根之橫切面，最外層為木栓層，由4~7列類方形細胞組成。皮層由6~9列類方形、不規則形柔細胞組成。維管束呈環狀排列，開放並立型，多層，導管單個獨立大小不一。髓線與維管束交叉排列，由中央直達皮層，2~5列，中央髓線細胞大，外側小。中央由2個維管束組成，呈二扇型排列。導管以網紋及孔紋為主。(圖 4-6)

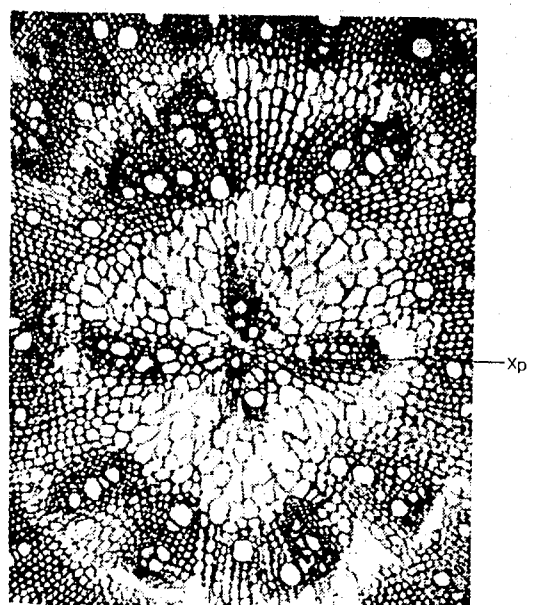
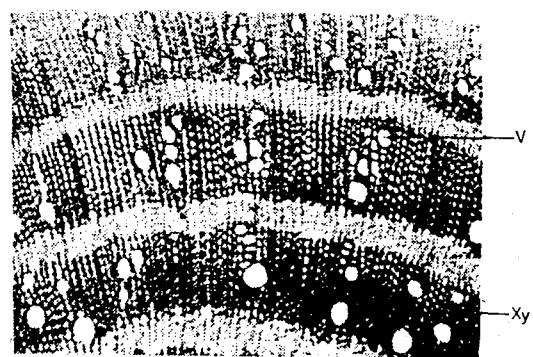
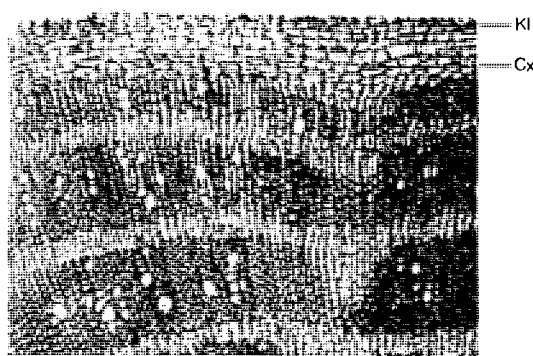


圖4-1 *A. aspera* var. *indica* 土牛膝之橫切面(×20)

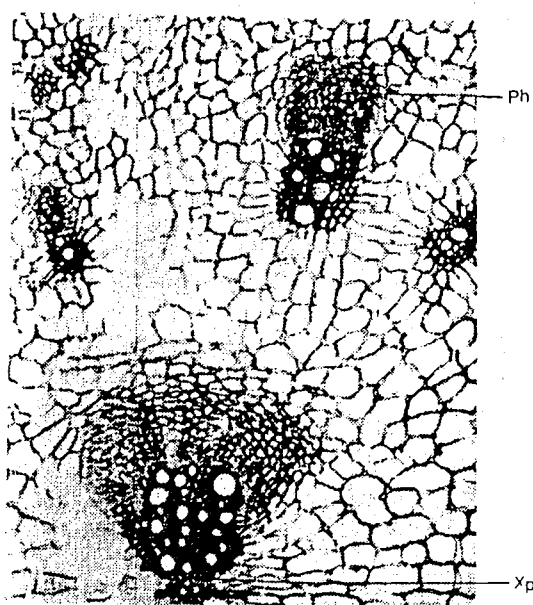
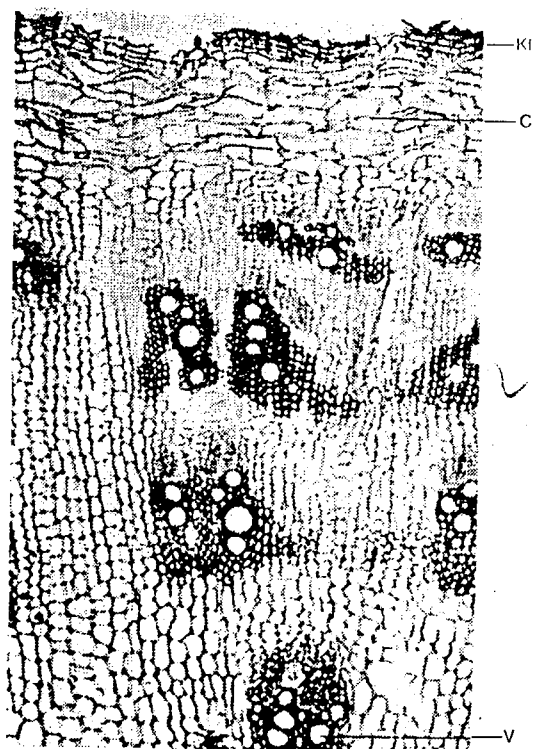


圖4-2 *A. aspera* var. *rubro-fusca* 紫莖牛膝之橫切面(×20)

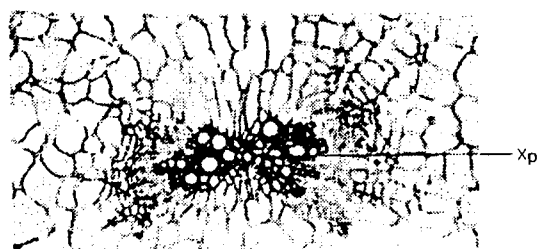
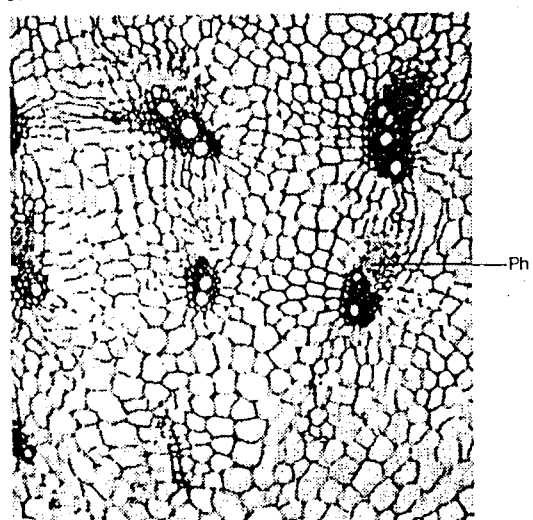
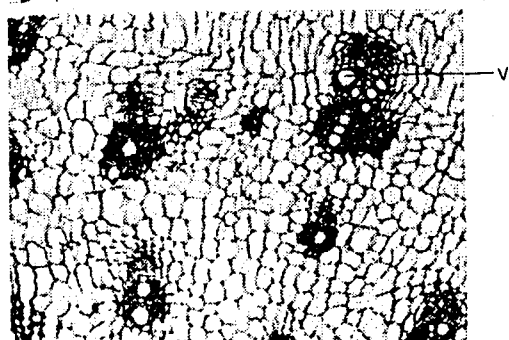
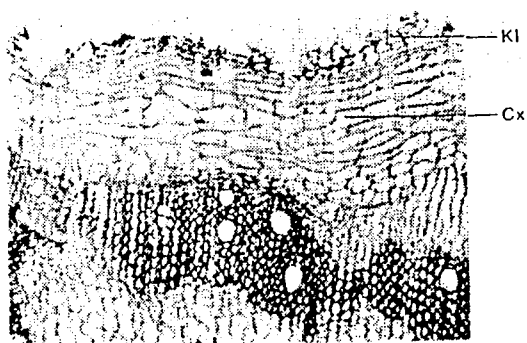


圖4-3 *A. bidentata* 牛膝之橫切面(×20)

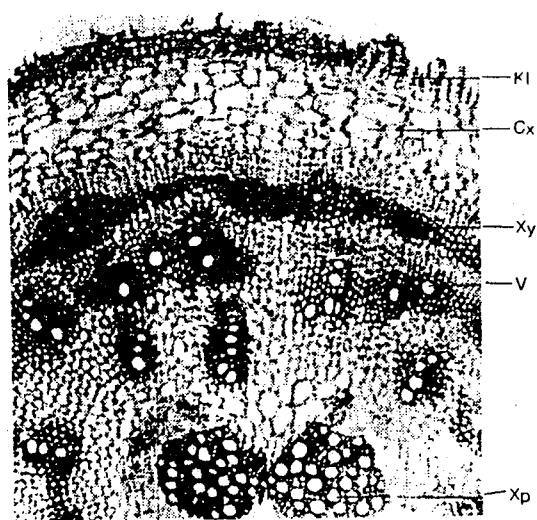


圖4-4 *A. japonica* 日本牛膝之橫切面(×20)

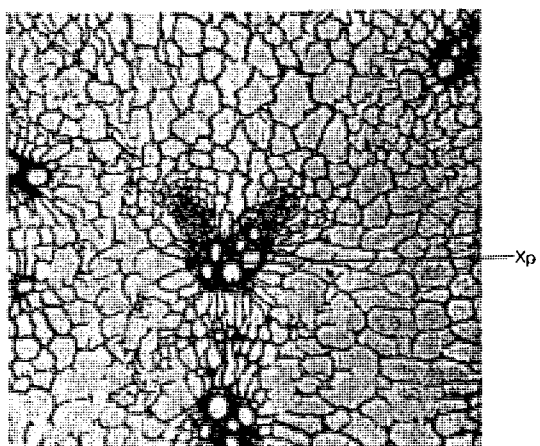
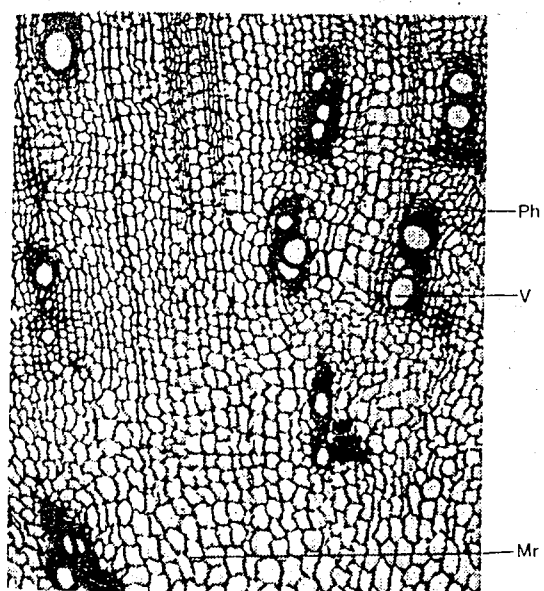


圖4-5 *A. longifolia* 柳葉牛膝之橫切面(×20)

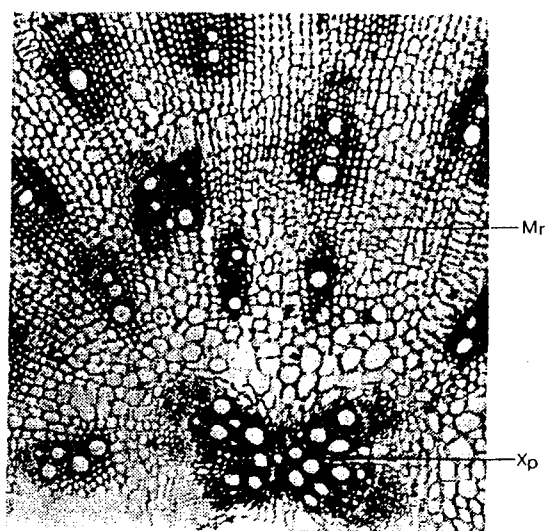
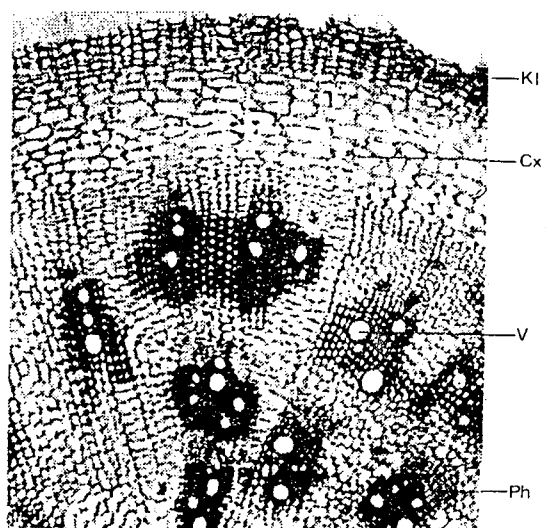


圖4-6 *A. ogatai* 南天牛膝之橫切面(×20)

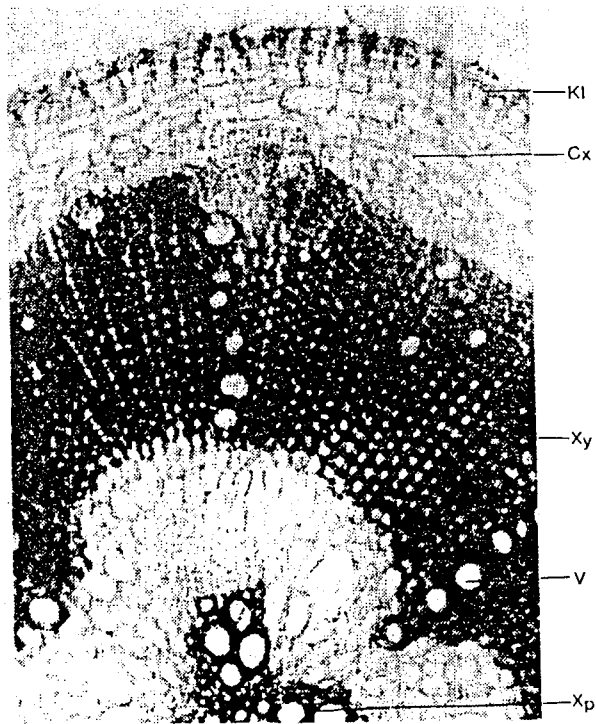


圖4-7. *Cyathula prostrata* 假川牛膝之橫切面(×50)

表 4-2 臺灣產牛膝屬(*Achyranthes*)及川牛膝屬(*Cyathula*)植物根之內部構造比較

	印度牛膝(土牛膝) <i>A. aspera</i> var. <i>indica</i>	臺灣牛膝(紫莖牛膝) <i>A. aspera</i> var. <i>rubro-</i> <i>fusca</i>	牛膝 <i>A. bidentata</i>	日本牛膝 <i>A. japonica</i>	柳葉牛膝 <i>A. longifolia</i>	南天牛膝 <i>A. ogatai</i>	假川牛膝 <i>C. prostrata</i>
栓皮層	4~8 列 扁長形	4~7 列 扁長形 易剝落	4~9 列 扁長形	3~4 列 常剝落，有厚角 組織	6~8 列 扁長形	4~7 列 類方形	3~7 列 類方形
皮 層	5~9 列 類長方形	6~13 列 類橢圓形	8~12 列 扁長形、多角 形、不規則形	6~9 列 類橢圓形	10~12 列	6~9 列 類方形	3~6 列 類長方形
維管束	成同心圓，連結成 環狀排列	最外 2~3 層常連結成 環狀，內層單個散生	最外層常連結成 環狀，內層 單個散生	外層連結成環 狀，內層單個散 生	單個散生 放射狀	多層維管束環 狀排列	連結成環狀
導 管	孔紋、網紋	孔紋、網紋	孔紋、網紋	孔紋、網紋	孔紋、網紋、階 紋	孔紋、網紋	孔紋、網紋
髓 線	不明顯	明顯	明顯	不明顯	特別發達，由中 央直達皮層	明顯，與維管束 交叉排列	不明顯
中 央	2 個維管束組成	2 個維管束組成	2 個維管束組 成	2 個維管束組成	2 個維管束組成	2 個維管束組成	3 個維管束組成

二、臺灣市售牛膝類藥材

1. 牛膝 (*Achyranthes bidentata* B._{LUME}, 市售稱懷牛膝)

性狀：本品呈細長圓柱形，上端較粗，下端較細，常直，較少彎曲，長約 30~100公分，直徑約0.4~1公分，市售品常以紅綿繩將15~20條捆成一束。表面呈土黃色或淡棕色，有略扭曲的細縱皺紋，具稀疏的側根痕，皮孔明顯。質硬而脆，略有彈性，易折斷，斷面平坦，黃白色，微角質狀，木心明顯。微香，略具甘味及粘液性。以長條而肥壯者為佳。

構造：根之橫切面，最外層為木栓層，由4~9列呈切線性延長的木栓細胞組成，壁薄，呈扁長形或扁不規則形。皮層由數十列柔細胞組成，略成左右橫向排列，細胞呈扁長方形、多角形或不規則形。次生維管束呈環狀斷續排列，維管束外韌形，束間形成層不明顯，木質部有導管、管胞、木部纖維、次生維管束，導管較初生維管束導管數量少且較小，呈木化或弱木化。根部中央為初生木質部，導管以網紋及孔紋為主。少數薄壁細胞含草酸鈣砂晶，量少，多呈長方形、正方形或不規則形。（圖4-8）

2. 川牛膝 (*Cyathula officinalis* K._{UAN}, 市售稱杜牛膝)

性狀：本品呈長圓柱形而扭曲，上端較粗，下部漸細，長約30~50公分，直徑約0.5~1.2公分，頂端有除去莖的斷痕，表面呈灰黃色或棕黑色，有扭曲的縱皺紋及側根痕。質滋潤柔韌，不易折斷，斷面棕黃色，有黃色小點，排成數圈，嚼之富油性，呈黏膠狀。味甘而黏，後微回苦。

構造：根之橫切面，最外層為木栓層，由5~10層呈類長方形、類方形、多角形細胞組成。皮層由8~10層呈類方形、不規則形柔細胞組成。韌皮部窄，形成層由2~3層細胞組成，中柱中，由多數的維管束組成，外圍的維管束較小，愈近中心，維管束愈大。導管呈類圓形、橢圓形。均壁厚，強木化，一些薄壁細胞含大量草酸鈣砂晶，成三角形、菱形，草酸鈣方晶呈長

方形、方形。導管爲有緣孔紋、網紋。(圖4-9)

3. 味牛膝(*Strobilanthes forrestii* D_{IELS}, 市售誤稱川牛膝)

性狀：根莖粗大，多分支，盤曲結節，有多數莖基殘留。鬚根叢生，細長圓柱形。長可達50公分，直徑1-6毫米，有時可達8毫米。表面暗灰色，平滑無皺紋，常有環形的斷節裂縫，有時剝落而露出木心。木心質堅韌，不易折斷。無臭、味淡。

構造：栓皮層由4~7層呈扁長細胞組成。皮層由8~14層呈類方形、橢圓形柔細胞組成，在皮層薄壁細胞可見鐘乳體。維管束呈放射狀，與髓線平行排列，木質部木化程度強。中心部位爲髓組織。導管爲有緣孔紋、網紋、階紋。(圖4-10)

由全省各地二十家中藥房或中藥批發商抽購各種牛膝類藥材結果得知：臺灣市售牛膝類藥材以味牛膝(市售又稱川牛膝，牛七)爲主，二十家均有售；牛膝(市售又稱懷牛膝，淮七)共十九家有售；而川牛膝(市售稱杜牛膝)較少使用，僅二家有售，而其中又以味牛膝之用量最多，但送請北京中國中醫研究院中藥研究所謝教授宗萬及南京中國藥科大學徐教授國鈞鑑定，又經由五官鑑別及藥材組織切片與蠟葉標本與文獻⁽¹¹³⁻¹²⁴⁾比對鑑別後，發現懷牛膝的基原爲莧科(*Amaranthaceae*)植物牛膝(*Achyranthes bidentata* BLUME)之乾燥根；臺灣中藥房使用量最大，市售稱川牛膝之藥材，並非大陸藥典所記載之川牛膝，而是爵床科(*Acanthaceae*)腺毛馬藍(*Strobilanthes forrestii* D_{IELS})之乾燥根及根莖，又稱爲味牛膝；而臺灣市面上極少使用，市售稱爲杜牛膝者，其基原才是川牛膝(*Cyathula officinalis* K_{UAN})之乾燥根(表4-3)。

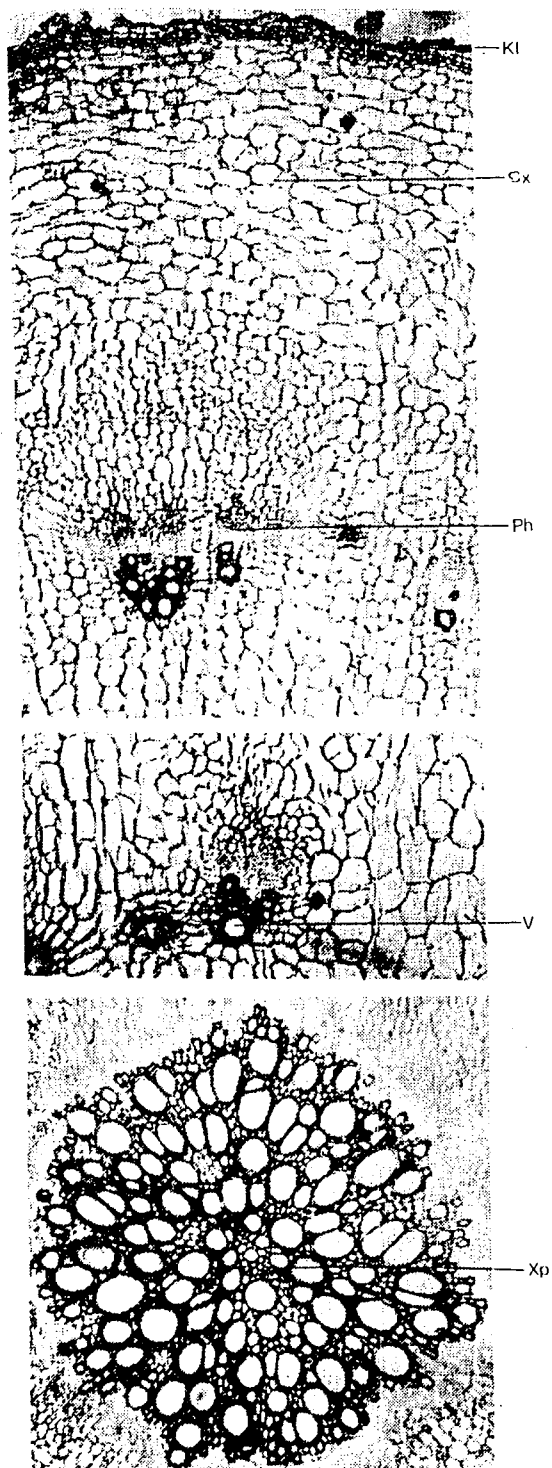


圖4-8 牛膝藥材之橫切面(×20)

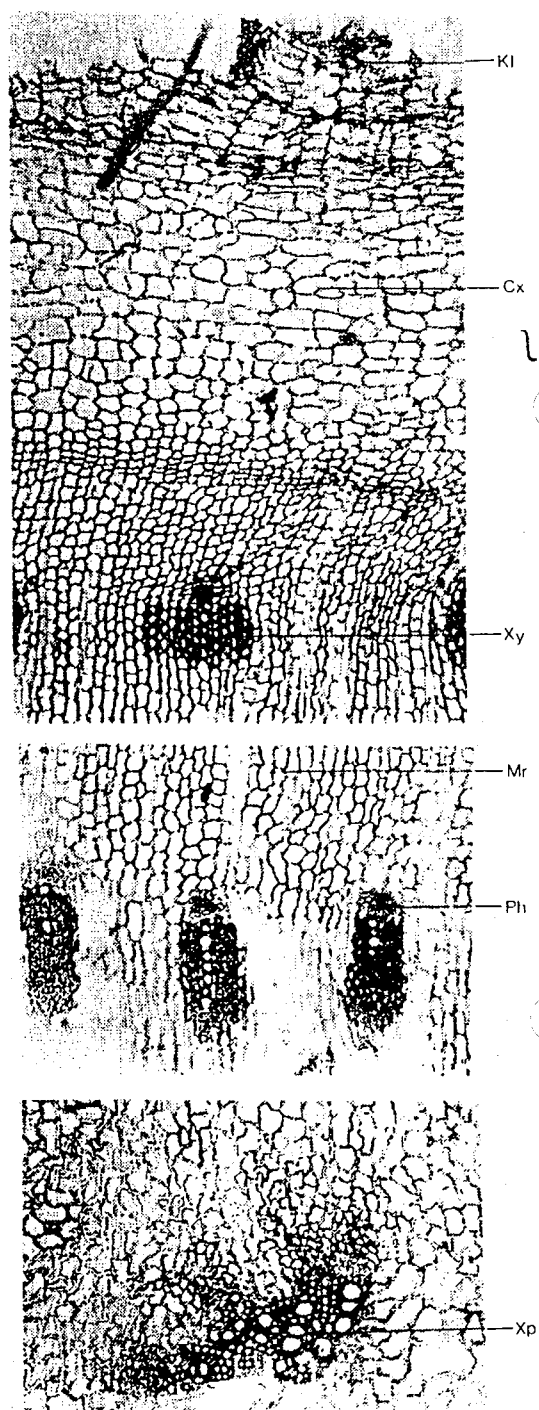


圖4-9 川牛膝藥材之橫切面(×20)

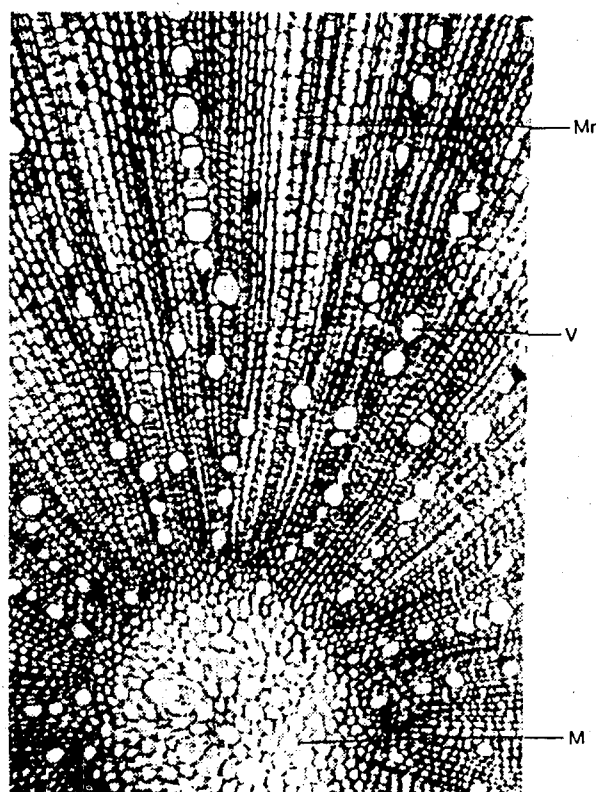


圖4-10 味牛膝藥材之橫切面(×20)

表 4-3 市售藥材性狀及特徵

學名	藥材	性狀	顯微特徵	大陸藥名	臺灣藥名
牛膝 <i>Achyranthes bidentata</i> BLUME	本品呈細長圓柱形，上端較粗，下端較細，常直，較少彎曲，長約 30-100 cm，直徑約 0.4-1 cm。表面呈土黃色或淡棕色，有略扭曲的細縱皺紋，具稀疏的側根痕，皮孔明顯。質硬而脆，略有彈性，易折斷，斷面平坦，黃白色，微角質狀，木心明顯。臭特殊，稍帶酸氣，味甘而澀。以長條而肥壯者為佳。	木栓層為數列細胞。皮層較窄，異型維管束斷續排列，維管束外韌型。束間形成層外輪明顯。木質部由導管、木纖維及木薄壁細胞組成。中央為正常維管束，初生木質部二原型。少數薄壁細胞含草酸鈣砂晶。	懷牛膝	懷牛膝	
川牛膝 <i>Cyathula officinalis</i> KUAN	乾燥的藥材，根條肥壯，大幅度扭曲如拐枝或牛尾狀，故又有稱之為拐牛膝，或拐膝者，商品以"特拐"為頭等，"賽拐"為二等，"拐膝"為三等。頭粗尾細，長 30-50 cm，直徑 0.5-2.5 cm，頂端有除去莖的斷痕，體表灰褐色或棕黃色，有扭曲的縱皺紋及側根痕。質滋潤柔韌，不易折斷，斷面棕黃色，有黃色小點，排成數圈，嚼之富油性，呈黏膠狀。味甘而黏，後微回苦。	木栓層細胞數列。栓內層細胞數列。異型維管束排列成 3-8 輪同心環；維管束外韌型，無束間形成層。中央有正常維管束，初生木質部二原型。薄壁細胞含大量砂晶。	川牛膝	杜牛膝	
陳毛馬藍 <i>Strobilanthes forrestii</i> DIELS	根莖粗大，多分支，盤曲結節，有多數莖基殘留。鬚根叢生，細長圓柱形。長可達 50 cm，直徑 1-6 mm，有時可達 8 mm。表面暗灰色，平滑無皺紋，常有環形的斷節裂縫，有時剝落而露出木心。木心質堅韌，不易折斷。無臭、味淡。	栓皮層細胞數列。皮層由數列，在皮層薄壁細胞可見鐘乳體。維管束呈放射狀，與髓線平行排列，木質部木化程度強。中心部位為髓組織。	味牛膝 窩牛膝	川牛膝	

第二節 臺灣市售含牛膝之成方製劑檢測結果

利用薄層層析法(Thin layer chromatography)分析甲、乙、丙、丁、戊、己、庚、辛等八家中藥廠含牛膝之濃縮成方製劑：獨活寄生湯、疏經活血湯、濟生腎氣丸、玉女煎、柏子仁丸、血府逐瘀湯、八仙湯、還少丹、三痺湯、折衝飲等十種濃縮成方製劑，其結果可知大部分製劑皆用味牛膝(市售誤稱川牛膝)，僅有辛藥廠之玉女煎、柏子仁丸、血府逐瘀湯及戊藥廠之血府逐瘀湯等製劑使用懷牛膝，至於川牛膝(市售稱杜牛膝)則未見使用，結果如圖4-11~圖4-20及表4-4。而從八家中藥廠所提供之牛膝藥材亦可知：八家中藥廠皆有懷牛膝及味牛膝，但卻無一家使用川牛膝。

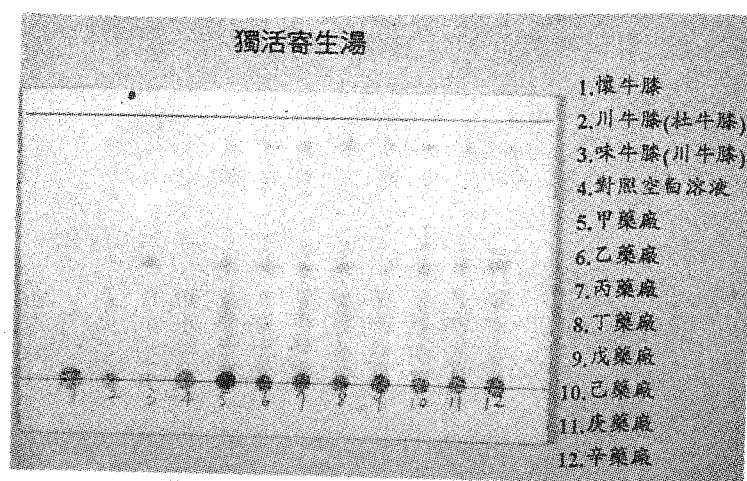


圖 4-11 市售濃縮獨活寄生湯檢品薄層層析圖

薄層層析之條件：方法一

結果：甲、乙、丙、丁、戊、己、庚、辛藥廠於 R_f 值 0.44 處，與 3. 味牛膝(川牛膝)有相同紫色點。

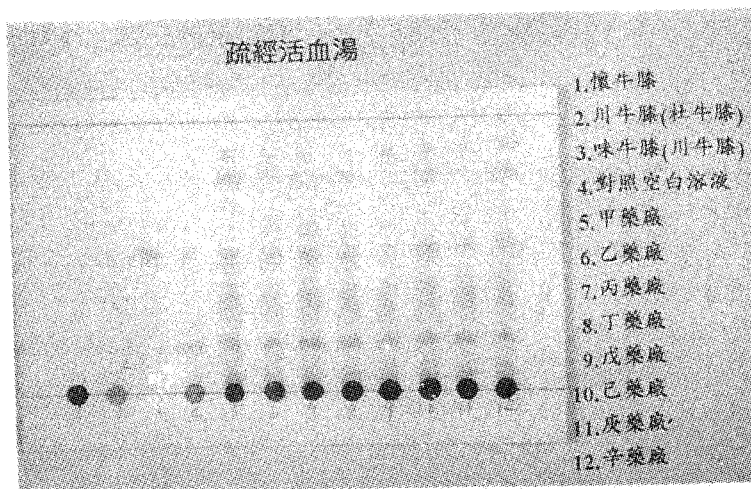


圖 4-12 市售濃縮疏經活血湯檢品薄層層析圖

薄層層析之條件：方法一

結果：甲、乙、丙、丁、戊、己、庚、辛藥廠於 Rf 值 0.51 處，與 3.味牛膝(川牛膝)有相同紫色點。

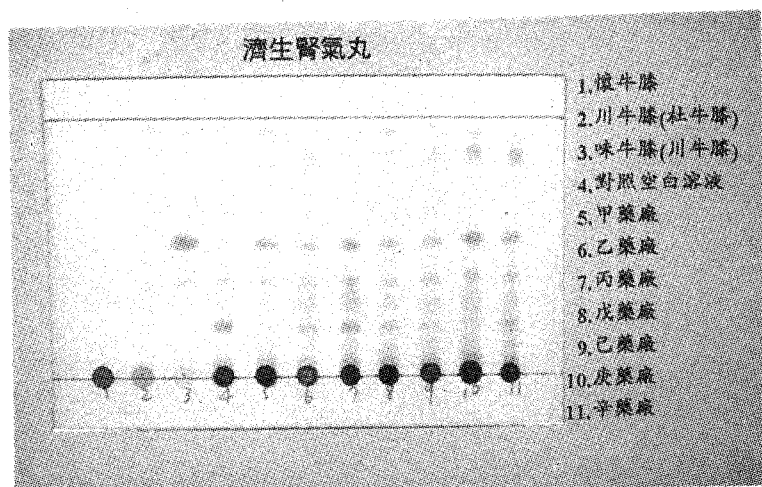


圖 4-13 市售濃縮濟生腎氣丸檢品薄層層析圖

薄層層析之條件：方法一

結果：甲、乙、丙、戊、己、庚、辛藥廠於 Rf 值 0.51 處，與 3.味牛膝(川牛膝)有相同紫色點。

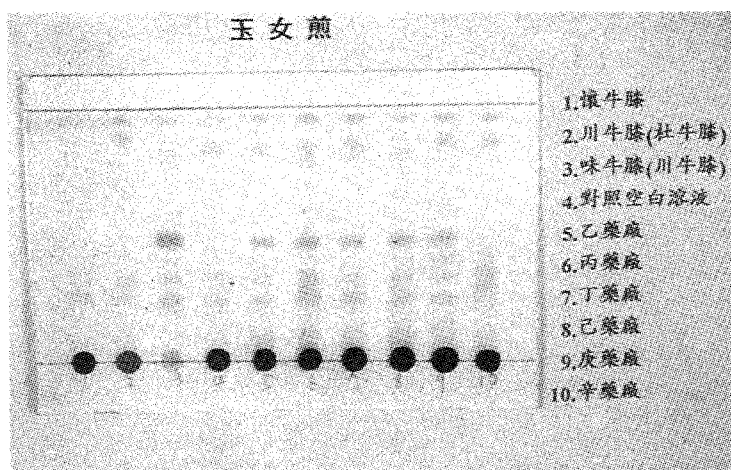


圖 4-14 市售濃縮玉女煎檢品薄層層析圖

上圖薄層層析之條件：方法一

上圖結果：乙、丙、丁、己、庚藥廠於 R_f 值 0.49 處，與 3. 味牛膝(川牛膝) 有相同紫色點。

下圖薄層層析之條件：方法二

下圖結果：辛藥廠於 R_f 值 0.73 處，與 1. 懷牛膝有相同綠色點。

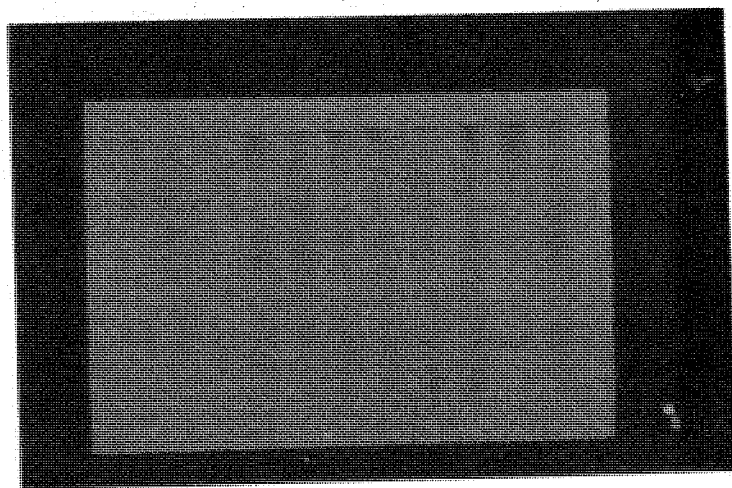
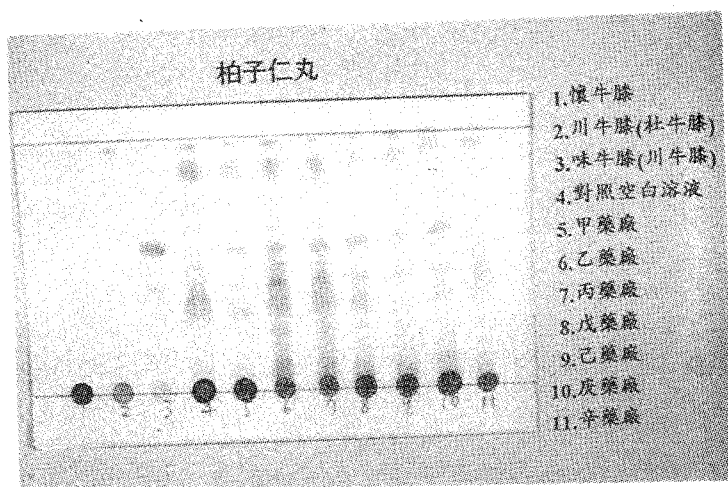


圖 4-15 市售濃縮柏子仁丸檢品薄層層析圖

上圖薄層層析之條件：方法一

上圖結果：甲、乙、丙、戊、己、庚藥廠於 Rf 值 0.56 處，與 3. 味牛膝(川牛膝)有相同紫色點。

下圖薄層層析之條件：方法二

下圖結果：辛藥廠於 Rf 值 0.74 處，與 1. 懷牛膝有相同綠色點。

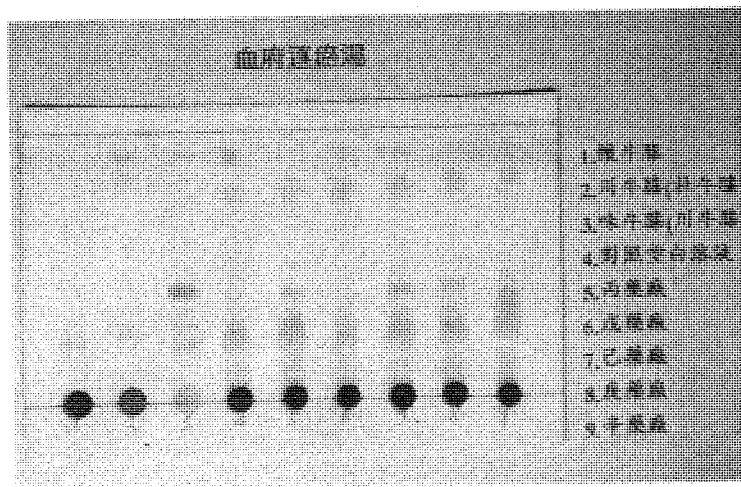


圖 4-16 市售濃縮血府逐瘀湯檢品薄層層析圖

上圖薄層層析之條件：方法一

上圖結果：丙、己、庚藥廠於 Rf 值 0.41 處，與 3. 味牛膝(川牛膝)有相同紫色點。

下圖薄層層析之條件：方法二

下圖結果：戊、辛藥廠於 Rf 值 0.74 處，與 1. 懷牛膝有相同綠色點。

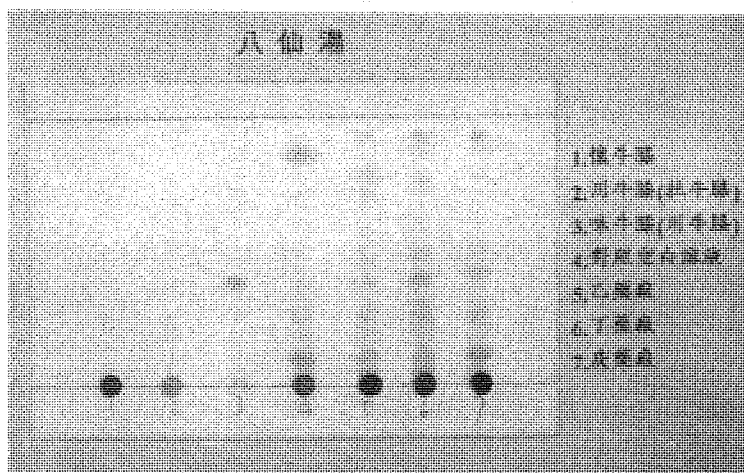


圖 4-17 市售濃縮八仙湯檢品薄層層析圖

薄層層析之條件：方法一

結果：乙、丁、庚藥廠於 Rf 值 0.36 處，與 3.味牛膝(川牛膝)有相同紫色點。

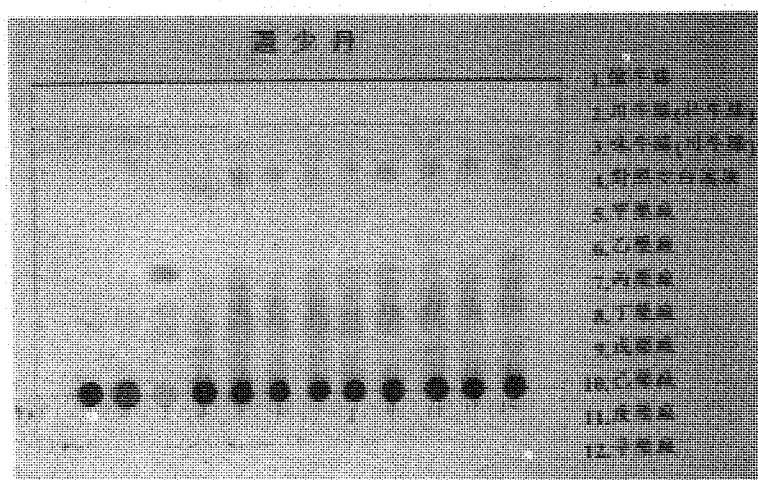


圖 4-18 市售濃縮還少丹檢品薄層層析圖

薄層層析之條件：方法一

結果：甲、乙、丙、丁、戊、己、庚、辛藥廠於 Rf 值 0.46 處，與 3.味牛膝(川牛膝)有相同紫色點。

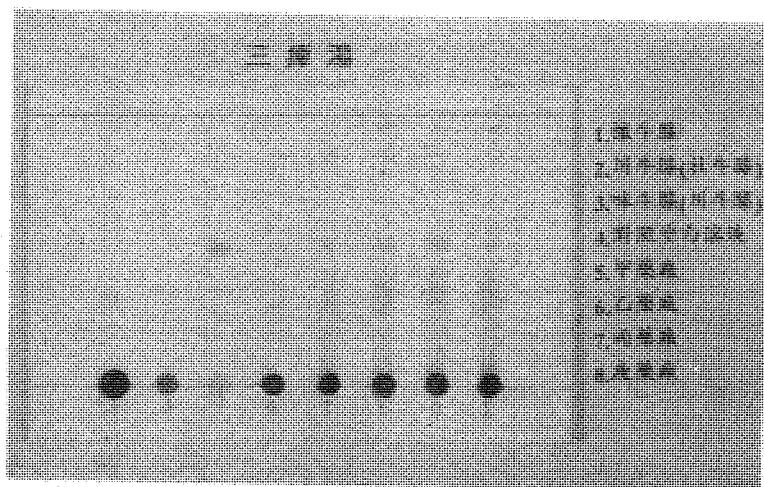


圖 4-19 市售濃縮三痺湯檢品薄層層析圖

薄層層析之條件：方法一

結果：甲、乙、丙、庚藥廠於 Rf 值 0.51 處，與 3. 味牛膝(川牛膝)有相同紫色點。

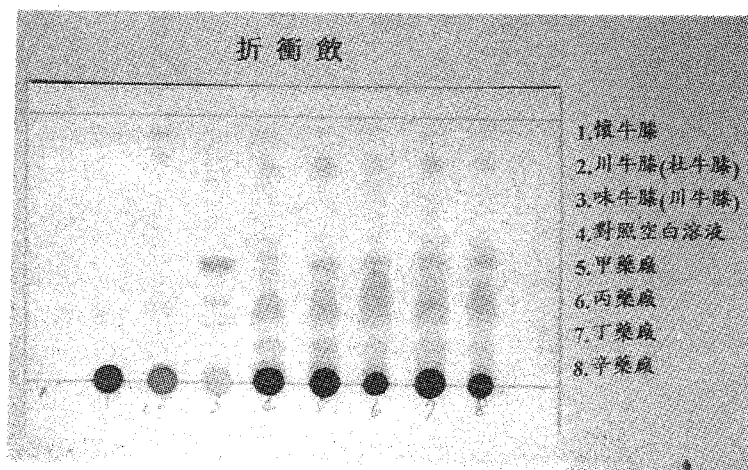


圖 4-20 市售濃縮折衝飲檢品薄層層析圖

薄層層析之條件：方法一

結果：甲、丙、丁、辛藥廠於 Rf 值 0.45 處，與 3. 味牛膝(川牛膝)有相同紫色點。

表4-4 臺灣市售含牛膝成方製劑檢驗結果

	甲	乙	丙	丁	戊	己	庚	辛
獨活寄生湯	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
疏經活血湯	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
濟生腎氣丸	◎	◎	◎		◎	◎	◎	◎
玉女煎		◎	◎	◎		◎	◎	★
柏子仁丸	◎	◎	◎		◎	◎	◎	★
血府逐瘀湯			★		◎	◎	◎	★
八仙湯		◎		◎			◎	
還少丹	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
三痺湯	◎	◎	◎				◎	
折衝飲	◎		◎	◎				◎

★：懷牛膝

◎：味牛膝

□：川牛膝

第五章 討 論

牛膝始載於神農本草經，以河南懷慶府所產的爲主，故又稱爲懷牛膝。川牛膝之名，始於明初的滇南本草，但當時並未對其形態加以描述，至清本草正義才有形態描述⁽¹¹⁾；根據調查考證，與今用者相符，並可見川牛膝乃近代使用之牛膝商品。

臺灣市售之牛膝類藥材主要有牛膝(市售稱懷牛膝)、川牛膝(市售稱杜牛膝)、味牛膝(市售誤稱川牛膝)三種。根據生藥組織鑑定得知，牛膝的組織構造與徐國鈞教授及謝宗萬教授所提供之牛膝(*Achyranthes bidentata* B_{LUME})蠟葉標本的組織構造相同，確定其爲歷代本草中所記載的莧科(*Amaranthaceae*)植物，牛膝 (*Achyranthes bidentata* B_{LUME})之乾燥根。川牛膝的基原應爲莧科植物，川牛膝 (*Cyathula officinalis* K_{UAN})之乾燥根；然而臺灣中藥店使用量最大，市售稱川牛膝的藥材，經由生藥鑑定，證明其並非大陸藥典所記載之川牛膝，而與爵床科 (*Acanthaceae*)植物，腺毛馬藍(*Strobilanthes forrestii* D_{IELS})蠟葉標本之乾燥根及根莖比對，確定其爲腺毛馬藍之乾燥根及根莖，又稱爲味牛膝，大陸鮮少使用。而臺灣市面上極少被使用，市售稱杜牛膝者，其組織構造與川牛膝(*Cyathula officinalis* K_{UAN})的蠟葉標本比對，確定其基原爲大陸藥典所載莧科植物，川牛膝之乾燥根。

臺灣產的牛膝(*Achyranthes bidentata* B_{LUME})基原與大陸牛膝基原相同，但由生藥切片比對，前者維束較多，且外層常連結成環狀，而後者維管束少且皆單個散生，二者組織並不相同，其是否爲同名異物？則有待進一步探討。

而在一般中藥房所買到的牛膝藥材大部分爲味牛膝，市售濃縮成方製劑中所用的牛膝種類以化學鑑別的結果顯示(如表4-4)，絕大部分也用味牛膝，僅有辛藥廠之玉女煎、柏子仁丸、血府逐瘀湯及戊藥廠之血府逐瘀湯等製劑使用懷牛膝，而以味牛膝當牛膝使用是否適當？值得進一步探討。

第六章 結 論

牛膝爲常用中藥之一，自古用根，具有補肝腎，強筋骨，逐瘀通經，引血下行之功能；用於腰膝酸痛，筋骨無力，經閉癥瘕，肝陽眩暈等。而臺灣市售之牛膝類藥材主要有牛膝(市售稱懷牛膝)、川牛膝(市售稱杜牛膝)、味牛膝(市售誤稱川牛膝)三種。根據生藥組織鑑定得知，牛膝的基原爲莧科(Amaranthaceae)植物，牛膝(*Achyranthes bidentata* BLUME)之乾燥根；臺灣用量最大，市售稱爲川牛膝的藥材則爲爵床科(Acanthaceae)植物，腺毛馬藍(*Strobilanthes forrestii* DIELS)之乾燥根及根莖，又稱爲味牛膝；臺灣市面上極少被使用，市售稱杜牛膝者，才是莧科植物川牛膝(*Cyathula officinalis* KUAN)之乾燥根。

而臺灣產的牛膝(*Achyranthes bidentata* BLUME)基原與大陸牛膝基原相同，但由生藥切片比對，二者組織並不相同，其是否爲同名異物？則有待進一步探討。

在臺灣市售濃縮成方製劑中，所用的牛膝種類以化學鑑別的結果顯示，絕大部分使用味牛膝，僅少數製劑用懷牛膝，至於川牛膝則未見使用。但臺灣充當川牛膝使用之味牛膝之使用是否適當，則有待進一步探討。

參考文獻

1. 中華人民共和國衛生部藥典委員會：中華人民共和國藥典1990年版一部，人民衛生出版社，北京 1990；58-9、25-6。
2. 中國醫藥學院附設醫院中藥局未發表資料，臺中 1994。
3. 江蘇新醫學院：中藥大辭典，上海科學技術出版社，上海 1988；417-20。
4. 許鴻源，張憲昌，林明暄：市售牛膝類藥材之比較生藥學研究。中國醫藥研究叢刊 1981；11：94-144。
5. 清·吳其濬：植物名實圖考長編，世界書局，臺北 1962；431-3。

6. 清·黃奭：神農本草經，中醫古籍出版社，北京 1987；38-9。
7. 梁·陶弘景：名醫別錄，人民衛生出版社，北京 1986；34。
8. 梁·陶弘景：本經集注，南大阪印刷株式會社，大阪 1986；45。
9. 明·蘭茂：滇南本草，雲南人民出版社，昆明 1977；57。
10. 明·李時珍：圖解本草綱目(上冊)，文光圖書公司，臺北 1970；599-601。
11. 江蘇省植物研究所、中國醫學科學院藥物研究所、中國科學院昆明研究所：新華本草綱要第二冊，上海科學技術出版社，上海 1991；54-6、60-1。
12. 陳仁山：藥物出產辨，新醫藥出版社，臺北 1977；30。
13. 清·吳其濬：植物名實圖考(上冊)，世界書局，臺北 1974；262-3。
14. 中華人民共和國藥典(1990年版一部)注釋編委會：中華人民共和國藥典(1990年版一部)注釋選編，廣東科技出版社，廣州 1993；40-2。
15. 張賢哲：本草備要解析，中國醫藥學院出版組，臺中 1988；28-30。
16. 宋·唐慎微：經史證類大觀本草，正言出版社，臺南 1977；146-7。
17. 黃增泉：植物分類學，國立編譯館，臺北 1993；147。
18. 謝成科：藥用植物學，人民衛生出版社，北京 1991；215-7。
19. 臺灣植物誌編輯委員會主編：FLORA OF TAIWAN II，現代關係出版社，臺北 1976；364-70、379-80。
20. 侯寬昭：中國種子植物科屬科屬詞典，南天書局，臺北 1991；5、137、469。
21. 甘偉松：臺灣藥用植物誌第一卷，國立中國醫藥研究所，臺北 1970；118-9。
22. 甘偉松：藥用植物學，國立中國醫藥研究所，臺北 1986；214-6。
23. 甘偉松：中國高等植物圖誌，宏業書局，臺北 1980；608-9。

24. 衛生部藥品生物製品檢驗所、中國科學院植物研究所：中藥鑒別手冊第二冊，科學出版社，北京 1981；105-14。
25. 謝宗萬：中藥材品種論述中冊，上海科學技術出版社，上海 1984；1-21。
26. 中國醫學科學院藥物研究所等主編：中藥志第一冊，人民衛生出版社，北京 1997；121-7。
27. 毛文山等：中藥真偽鑒別，陝西科學技術出版社，西安 1987；147-53。
28. 全國中草藥匯編編寫組：全國中草藥匯編，人民衛生出版社，北京 1992；38-40、131-3、205-6。
29. 四川中藥志協作編寫組：中藥志第一卷，四川人民出版社，成都 1979；10-2，17-20。
30. 福建中醫研究所：福建藥物志，福建科學技術出版社，福州 1980；83-4。
31. Hsu HY：The chemical constituents of oriental herbs，Oriental Healing Arts Institute, Los Angeles, 1982；1043-6、1026-8。
32. 三橋博，田中治，野副重男，永井正博等：天然物化學，江南堂株式會社，東京 1989；176-7、388-9。
33. 國家醫藥管理局中草藥情報中心站：植物藥有效成分手冊，人民衛生出版社，北京 1986；285-6、367-8、608-9、786-7。
34. 中國醫學科學院藥物研究所：中草藥有效成分的研究，人民衛生出版社，北京 1972；398-9。
35. 徐禮榮，沙士炎：中草藥有效成分分析法，人民衛生出版社，北京 1985；85-7。
36. 劉舞霞，史葉龍：牛膝栽培品種的質量考察，I. 生藥鑒定及有機成分測定。中草藥 1988；19(12)：26-9。
37. 劉舞霞等：牛膝栽培品的質量考察，II. 微量元素測定。中藥材 1990；13(9)：31-2。

38. 劉舞霞等：牛膝栽培品的質量考察，III.栽培措施和產地加工方法。
。中藥材 1990；13(10)：8-9。
39. Seshadri V, Batta AK, Rangaswami S: Structure of two new saponins from *Achyranthes aspera*. Indian J Chem Ser B 1981; 20 : 773-5.
40. Ratra PS, Misra KC: Seasonal variation in chemical composition of *Achyranthes aspera* and *A. bidentata*. Indian For 1970; 96: 372.
41. Hari NK, Sen GP: Oleanolic acid from *Achyranthus aspera*. J Indian Chem Soc 1958; 35: 529.
42. Nikolov S, Phan TH, Asenov L: A triterpene saponin from *Achyranthes bidentata* Bl. Farmatsiya 1991; 41(2): 14-8.
43. Tian GY, Tang TB et al.: Extraction of antitumor polysaccharide from roots of *Achyranthes bidentata*. Patent-faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu- 1,037,714 1989: 6pp-.
44. Hahn DR, Lee MW: Studies on the constituents of *Achyranthis Radix*. I. Oleanolic acid bisdesmoside from the root. Yakhak Hoe Chi 1991; 35 (6): 457- 60.
45. Wu NJ, Zhang GQ: Study on chemical constituents of *Tu Niu Xi* (*Achyranthes longifolia* Makino). Chung Ts'ao Yao 1982; 13(10): 437-8.
46. Kapoor VK, Singh H: Isolation of betaine from *Achyranthes aspera*. Indian J Chem 1966; 4: 461.
47. Kong YC, Hu SY, Lau FK, Che CT, Yeung HW, Cheung S, Hwang JCC: Potential anti-fertility plants from Chinese medicine. Am J Chin Med 1976; 4 : 105-28.
48. Ikan R, Ravid U, Trosset D, Shulman E: Ecdysterone an insect molting hormone from *Achyranthes aspera*. Experientia

1971; 27: 504.

49. Banerji A, Chadha MS: Insect molting hormone from *Achyranthes aspera*. *Phytochemistry* 1970; 9: 1671.
50. Banerji A, Chintalwar GJ, Joshi NK, Chadha MS: Isolation of ecdysterone from Indian plants. *Phytochemistry* 1971; 10: 2225.
51. Takemoto T, Ogawa S, Nishimoto N, Hirayama H, Taniguchi S: Constituents of *Achyranthis Radix*. VII. The insect-molting substances in *Achyranthes* and *Cyathula* genera. *Yakugaku Zasshi*. Suppl 1968; 88: 1293-7.
52. Hikino H, Jin H, Takemoto T: Occurrence of insect-molting substances ecdysterone and inokosterone in callus tissues of *Achyranthes*. *Chem Pharm Bull* 1971; 19: 438.
53. Takemoto T, Ogawa S, Nishimoto N: Studies on the constituents of *Achyranthis Radix*. II. Isolation of the insect-molting hormones. *Yakugaku Zasshi* 1967; 87: 1469.
54. Jin H, Hikino H, Takemoto T: Seasonal dynamics of the accumulation of phytoecdysones in *Achyranthes fauriei*. *Yakugaku Zasshi* 1975; 95: 596.
55. Jones CG, FirnRD: The role of phytoecdysteroids in Bracken Fern, *Pteridium aquilinum* as a defense against phytophagous insect attack. *J Chem Ecol* 1978; 4: 117-38.
56. Hikino H, Hikino Y, Takemoto T: Rubrosterone, a metabolite of insect metamorphosing substance from *Achyranthes rubrofusca*: Synthesis. *Tetrahedron Lett* 1969; 3389.
57. Takemoto T, Hikino Y, Hikino H, Ogawa S, Nishimoto N: Structure of rubrosterone, a novel C19 metabolite of insect-molting substances from *Achyranthes rubrofusca*. *Tetrahedron Lett* 1968; 3053.

58. Takemoto T, Hikino Y, Hikino H, Ogawa S, Nishimoto N: Rubrosterone, a metabolite of insect metamorphosing substance from *Achyranthes rubrofusca*: structure and absolute configuration. *Tetrahedron Lett* 1969; 1241.
59. Anon: Ecdysone from *Pfaffia paniculata*. Patent-Japan Kokai Tokkyo Koho-59 10, 600 1984; 5pp.
60. Ogawa S, Yoshida A, Kato R: Analytical studies on the active constituents in crude drugs. III. High-speed liquid chromatographic determination of ecdysterone and inokosterone in *Achyranthis Radix*. *Chem Pharm Bull* 1977; 25: 904.
61. Takemoto T, Ogawa S, Nishimoto N: Studies on the constituents of *Achyranthis Radix*. *Yakugaku Zasshi* 1967; 87: 1463.
62. Satyanarayana MS, Sushella BA, Rao NAM, Vijayaraghavan PK: Proximate composition and essential amino acid content of Aghada (*Achyranthes aspera*) seeds. *J Food Sci Technol* 1964; 1: 26.
63. Daulatabad CD, Ankalgi RF: Minor seed oils. II. Fatty acid composition of some seed oils. *Fette Seifen Anstrichm* 1985; 87(5): 196-7.
64. Shekhawat NS, Ramawat KG, Arya HC: Carbohydrate, protein, phenols and enzymes (PPO, PRO and IAA oxidase) in gall and normal tissues of *Achyranthes aspera* L. *Curr Sci* 1978; 47: 780-1.
65. Bisht G, Sandhu H, Bisht LS: Chemical constituents and antimicrobial activity of *Achyranthes bidentata*. *J Indian Chem Soc* 1990; 67(12): 1002-3.
66. Misra TN, Singh RS, Pandey HS, Prasad C: An aliphatic dihydroxyketone from *Achyranthes aspera*. *Phytochemistry* 1991; 30(6): 2076-8.

67. Gopalachari R, Dhar ML: Chemical examination of the seeds of *Achyranthes aspera*. J Sci Ind Res-B 1952; 11: 209.
68. Misra TN, Singh RS, Pandey HS, Prasad C, Singh BP: Two long chain compounds from *Achyranthes aspera*. Phytochemistry 1993; 33(1): 221-3.
69. Misra TN, Singh RS, Pandey HS, Prasad C, Singh BP: Anti-fungal essential oil and a long chain alcohol from *Achyranthes aspera*. Phytochemistry 1992; 31(5): 1811-2.
70. Tian G, Tang T, Et AL: Extraction of antitumor polysaccharide from roots of *Achyranthes bidentata*. Patent-Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu Cn-1,037,714 1989; 6pp -.
71. Fang JN, Zhang ZH, Liu BN: Chemical studies on polysaccharide of *Achyranthes bidentata*. Yao Hsueh Hsueh Pao 1990; 25 (7): 526-9.
72. Patra PS: Alkaloids in two species of *Achyranthes* at different stages of their growth. Curr Trends Life Sci 1979; 4: 81-5.
73. Basu NK, Singh HK, Aggarwal OP: Chemical investigation of *Achyranthes aspera*. J Proc Inst Chem 1957; 29(1): 33-58.
74. Bishit G, Sandhu H, Verma S: Constituents of *Achyranthes bidentata*. Fitoterapia 1993; 64(1): 85.
75. Yun-Choi HS, Kim JH, Kim SO, Lee JR: Platelet anti-aggregating plant materials. Korean J Pharmacog 1986; 17(2): 161-7.
76. Takemoto T, Nomoto K, Hikino H: Structures of amarasterone A and B, novel C29 insect-molting substances from *Cyathula capitata*. Tetrahedron Lett 1968; 4953-6.
77. Takemoto T, Nomoto K, Hinino Y, Hikino H: Structure of

- capitasterone, a novel C29 insect-molting substance from *Cyathula capitata*. *Tetrahedron Lett* 1968; 4929.
78. Hikino H, Nomoto K, Takemoto T: Sengosterone, an insect metamorphosing substance from *Cyathula capitata*: Structure. *Tetrahedron Lett* 1970; 887.
 79. Boid R, Rees HH, Goodwin TW: Insect-molting hormone biosynthesis. Biosynthesis of cyasterone in the plant *Cyathula capitata*. *Biochem Physiol Pflanz* 1957; 168: 27.
 80. Hikino H, Nomoto K; Takemoto T: Cyasterone, an insect-metamorphosing substance from *Cyathula capitata*: Absolute configuration. *Tetrahedron* 1971; 27: 315-21.
 81. Hikino H, Hikino Y, Nomoto K, Takemoto T: Cyasterone, an insect metamorphosing substance from *Cyathula capitata*: Structure. *Tetrahedron Lett* 1968; 4895.
 82. Hikino H, Nomoto K, Takemoto T :Structure of isocyasterone and epicyasterone, novel C-29 insect-moulting substances from *Cyathula capitata*. *Chem Pharm Bull* 1971; 19: 433-5.
 83. Hikino H, Nomoto K, Takemoto T: Steroids. Part XII. Isocyasterone, an insect metamorphosing substance from *Cyathula capitata*. *Phytochemistry* 1971; 10: 3173-8.
 84. Hikino H, Nomoto K, Ino R, Takemoto T: Structure of precyasterone, a novel C29 insect-molting substance from *Cyathula capitata*. *Chem Pharm Bull* 1970; 18: 1078.
 85. Hikino H, Nomoto K, Takemoto T: Steroids. Part XI. Poststerone. A metabolite of insect metamorphosing substances from *Cyathula capitata*. *Steroids* 1970; 16: 393-400.
 86. Hikino H, Nomoto K, Takemoto T: Structure of sengosterone, a novel C-29 insect-molting substance from *Cyathula capitata*. *Tetrahedron Lett* 1969; 1417.

87. Sakai T, Kobashi K, Tsunozuka M, Hattori M, Namba T: Studies on dental caries prevention by traditional Chinese medicines (Part VI). On the fluoride contents in crude drugs. Shoyakugaku Zasshi 1985; 39(2): 165-9.
88. 朱和, 車錫平: 牛膝總皂 對動物子宮平滑肌的作用。中草藥 1987; 18(4): 17-20。
89. 劉壽山: 中藥研究文獻摘要(1920-1961), 科學出版社, 北京, 1975; 108-9。
90. 徐國鈞, 徐珞珊: 常用中藥材品種整理和質量研究, 南方協作組第一冊, 福建科學技術出版社, 福州 1994; 241-63。
91. 戴傳禮, 李根池: 小鼠甲醛致痛模型篩選中藥牛膝的鎮痛作用。中成藥 1989; 11(10): 29-30。
92. Kosuge T, Yokota M, Sugiyama K, Tamamoto T, Ni MY, Yan SC: Studies on antitumor activities and antitumor principles of Chinese herbs. I. Antitumor activities of Chinese herbs. Yakugaku Zasshi 1985; 105(8): 791-5.
93. 陳梓璋, 胡堯碧, 肖銘玉: 莪朮複方和單味莪朮的抗早孕作用及毒性的比較。中草藥 1982; 13(5): 32-3。
94. Bisht G, Sandhu H, Bisht LS: Chemical constituents and antimicrobial activity of *Achyranthes bidentata*. J Indian Chem Soc 1990; 67(12): 1002-3.
95. 李乾五, 葛玲, 李生正, 丁東寧: 川牛膝提取物抗生育作用的實驗研究。西安醫科大學學報 1990; 11(1): 27-9。
96. 高學敏: 中藥學, 中國醫藥科技出版社, 北京 1990; 236-7。
97. 凌一揆, 雷載權, 劉繼林: 中藥學, 四川科學技術出版社, 成都 1985; 361-3。
98. 葉顯純: 中藥學(上冊), 上海中醫學院出版社, 上海 1989; 403-4、419-20。
99. 呂廣振: 中藥學, 山東科學技術出版社, 濟南 1993; 153-4。

100. 龐俊忠：臨床中藥學，中國醫藥科技出版社，北京 1989；70-1。
101. 胡世林：中國道地藥材，黑龍江科學技術出版社，哈爾濱 1989；157-9、283-6。
102. 李學杲：中藥性用類比辨異，學苑出版社，北京 1991；78。
103. 李國奇：淺談牛膝的臨床應用。四川中醫 1992；9：25。
104. 陰健，郭力弓：中藥現代研究與臨床應用I，學苑出版社，北京 1994；168-71。
105. 李世滄：臨床常用中藥方劑手冊，弘祥出版社，臺中 1991；101、69、10、143、182、74、86、21、88、200、332-5。
106. 李慶業：方劑學，中國醫藥科技出版社，北京 1989；284、158、98、216。
107. 連建傳：歷代名方精編，浙江科學技術出版社，浙江 1990；503、283、186、426、506。
108. 陳傳，路一平：方劑學，上海中醫學院出版社，常熟 1990；407、232、133、325、408。
109. 楊倓：楊氏家藏方，人民衛生出版社，北京 1988；173-4。
110. 陳自明：婦人大全良方，人民衛生出版社，北京 1985；23、96。
111. 謝王昭昭等：中藥檢驗方法專輯(五)，製劑薄層層析法，行政院衛生署藥物食品檢驗局，臺北 1992；VIII、60。
112. 劉訓紅，王玉璽，房克慧，李泉：中藥材薄層色譜鑑別，天津科學技術出版社，南京 1990；26-31。
113. 王盛民，張英：實用中藥材鑒別檢索手冊，學苑出版社，北京 1992；70-7。
114. 孫火玉：中藥鑒定學，江蘇科學技術出版社，揚中 1992；37-40。
115. 崔同寅：全國重名易混中藥鑒別手冊，中國醫藥科技出版社，北京 1992；42-4、103-4。
116. 任仁安：中藥鑒定學，上海科學技術出版社，上海 1992；55-8。
117. 徐國鈞：中藥材粉末顯微鑒定，人民衛生出版社，北京 1989；22-5、40-1。

118. 范崔生：中藥材採集收購鑒別手冊，江西科學技術出版社，南昌 1989；25-9。
119. 難波恒雄：原色和漢藥圖鑑(上)，保育社株式會社，大阪 1980；28-30。
120. 王玉璽：中藥組織鑒別彩色圖譜，人民軍醫出版社，北京 1989；27-9。
121. 趙達文：常用中藥材組織粉末圖解，人民衛生出版社，北京 1991；64。
122. 徐國鈞：中藥彩色圖譜，福建科學技術出版社，福州 1989；38-9。
123. 鄭肖巖：中藥真假識別法，泰華堂出版社，臺北 1984；38-9。
124. 中華人民共和國衛生部藥典委員會：中華人民共和國藥典中藥彩色圖集，廣東科技出版社，廣州 1991；35、74。

謝 辭

本研究承行政院衛生署研究計劃DOH85-CM-046經費補助。在藥理實驗方面，感謝中山大學海洋資源學系杜昌益教授代測抗癌活性、台中榮民總醫院王繼平博士代測肥大細胞及中性白血球之釋放反應；在藥材鑑定方面，則感謝北京中國中醫研究院中藥研究所謝教授宗萬及南京中國藥科大學徐教授國鈞之協助，比利時Jean-Louis Vanherneghem教授提供引起急性腎衰竭之減肥藥檢品，謹此一併致誠摯之謝意。

中藥材之鑑定研究

陳 忠 川

中國醫藥學院

一、計劃摘要

本研究之目的在於辨明中藥之真偽與來源植物，利用顯微鏡以解剖藥材，觀察其內部構造，粉末特徵，照相製圖，敘述各藥材之內部，粉末組織之內容，並就市售中藥之來源植物，進行實際調察採集，綜合各方面之鑑定，以作為標準品提供中藥GMP之檢驗標準。

二、計劃緣起

目前臺灣各種藥商總計二萬餘家（包括中醫師、中藥廠、中藥商），其所需中藥材數量甚大，而我國所使用之中國藥材種類繁多而複雜，其藥材之真偽與品質之優劣，關係到病人健康甚鉅，偽劣藥常遭致不良效果，為了藥材來源或真偽之鑑定，建立中藥品質評價資料。

臺灣市售中藥，經生藥學家調查研究，其結論簡述如下：(1)藥材來源單純，供應量充裕，售價便宜。(2)藥材之來源複雜，不同科屬之若干種植物，市場上均以同一種名稱出現。(3)本省所產與進口藥材均用代用品與偽藥。本研究依行政院衛生署編定中華民國中藥典範所載168種中藥材之鑑定研究，85年度共完成50種，以期樹立未來中藥材GMP之檢驗及標準依據，確定藥材使用時之真偽並確保療效。

三、研究計劃報告

1. 厚朴之組織描述及組織圖、粉末構造
2. 羌活之組織描述及組織圖、粉末構造
3. 楮實子之組織描述及組織圖、粉末構造
4. 蒺藜子之組織描述及組織圖、粉末構造
5. 紅大戟之組織描述及組織圖、粉末構造
6. 桑寄生之組織描述及組織圖、粉末構造
7. 使君子之組織描述及組織圖、粉末構造
8. 魚腥草之組織描述及組織圖、粉末構造
9. 白朮之組織描述及組織圖、粉末構造
10. 沉香之組織描述及組織圖、粉末構造
11. 續斷之組織描述及組織圖、粉末構造
12. 花椒之組織描述及組織圖、粉末構造
13. 女貞子之組織描述及組織圖、粉末構造
14. 牛蒡子之組織描述及組織圖、粉末構造
15. 小飛揚草之組織描述及組織圖、粉末構造
16. 酸棗仁之組織描述及組織圖、粉末構造
17. 覆盆子之組織描述及組織圖、粉末構造
18. 枳殼之組織描述及組織圖、粉末構造
19. 火炭母草之組織描述及組織圖、粉末構造
20. 蒼朮之組織描述及組織圖、粉末構造
21. 木瓜之組織描述及組織圖、粉末構造
22. 紅花之組織描述及組織圖、粉末構造
23. 決明子之組織描述及組織圖、粉末構造
24. 海藻之組織描述及組織圖、粉末構造
25. 火麻仁之組織描述及組織圖、粉末構造
26. 木蝴蝶之組織描述及組織圖、粉末構造
27. 柏子仁之組織描述及組織圖、粉末構造
28. 玉米鬚之組織描述及組織圖、粉末構造

- 29.墨旱蓮之組織描述及組織圖、粉末構造
- 30.金線蓮之組織描述及組織圖、粉末構造
- 31.萊菔子之組織描述及組織圖、粉末構造
- 32.吳茱萸之組織描述及組織圖、粉末構造
- 33.辛夷之組織描述及組織圖、粉末構造
- 34.胡桃之組織描述及組織圖、粉末構造
- 35.咸豐草之組織描述及組織圖、粉末構造
- 36.王不留行之組織描述及組織圖、粉末構造
- 37.枸杞之組織描述及組織圖、粉末構造
- 38.麥芽之組織描述及組織圖、粉末構造
- 39.穀芽之組織描述及組織圖、粉末構造
- 40.大葉千斤拔之組織描述及組織圖、粉末構造
- 41.水丁香之組織描述及組織圖、粉末構造
- 42.刺莧之組織描述及組織圖、粉末構造
- 43.虎杖之組織描述及組織圖、粉末構造
- 44.白薇之組織描述及組織圖、粉末構造
- 45.臺灣山豆根之組織描述及組織圖、粉末構造
- 46.愛玉藤之組織描述及組織圖、粉末構造
- 47.兔兒菜之組織描述及組織圖、粉末構造
- 48.大飛揚草之組織描述及組織圖、粉末構造
- 49.了哥王之組織描述及組織圖、粉末構造
- 50.狐狸尾之組織描述及組織圖、粉末構造

厚 朴

Magnoliae Cortex

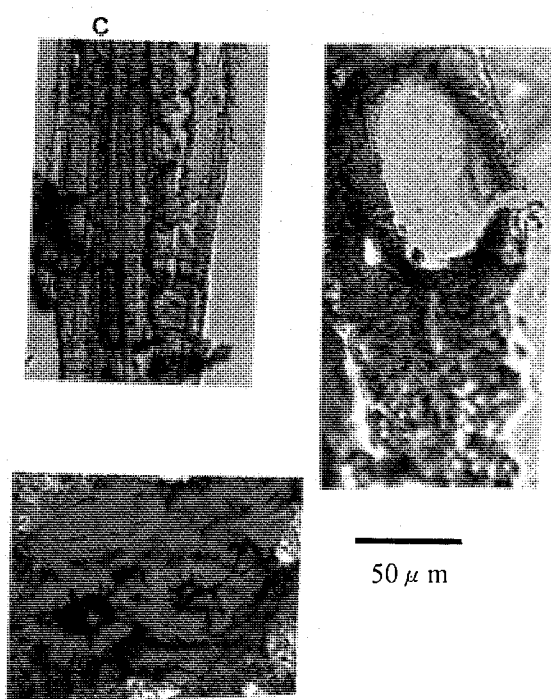
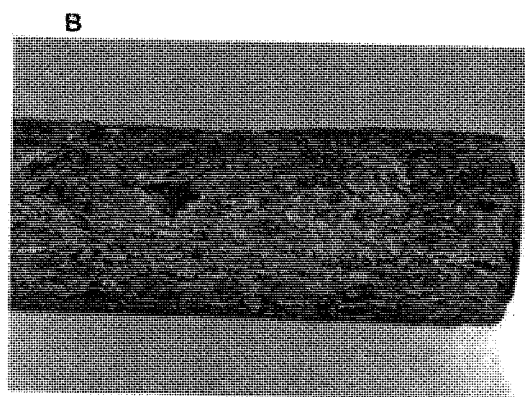
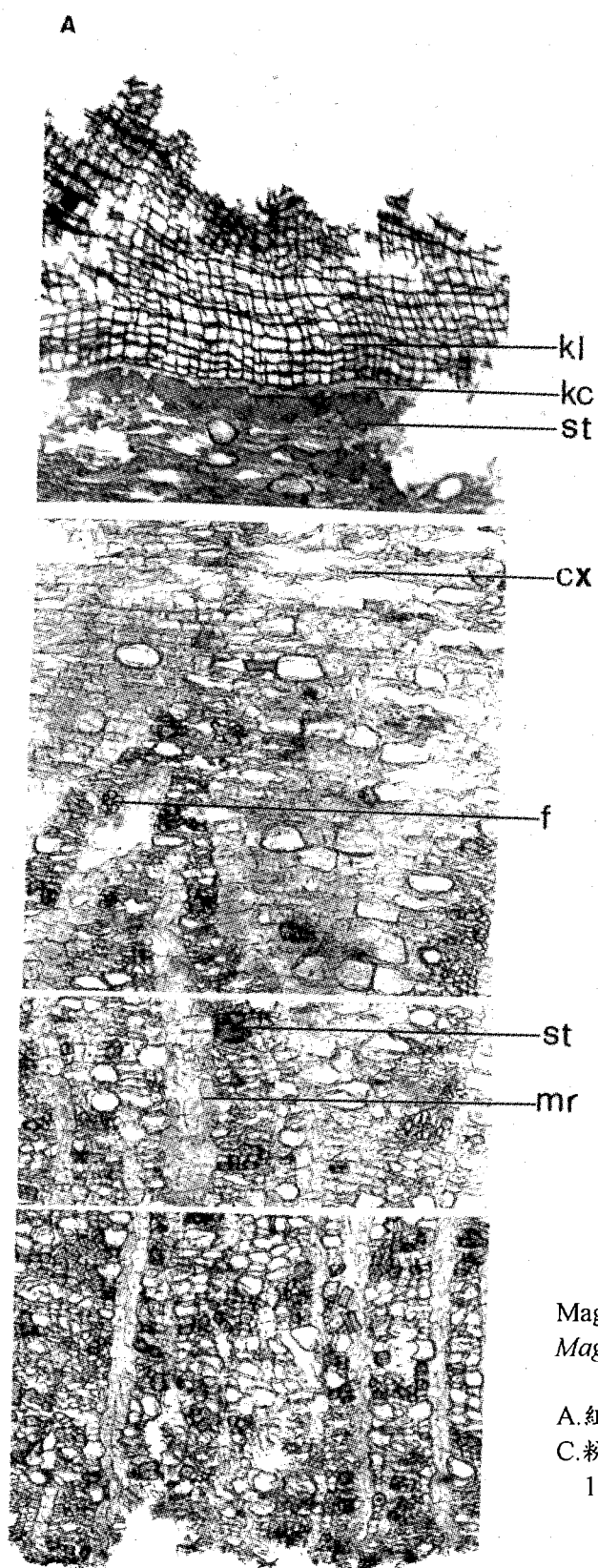
Magnolia officinalis REHD. et WILS. (Magnoliaceae)

[組織鑑別]：

木栓層數十層，細胞壁薄，方形，微木化；木栓形成層細胞 1 - 3 層，扁平而排列緊密，細胞壁薄；栓內層為一石細胞環帶，由 2 - 3 層不規則形之石細胞組成；皮層中亦分佈石細胞單個散在或數個成群，形狀不規則，徑 15 - 50 μm 。油細胞多數，散在皮層中，內含棕黃色樹脂狀物質，細胞壁略厚，圓形或橢圓形，徑 60 - 100 μm 。偶可見纖維束。薄壁細胞呈長方形，切線狀排列。韌皮部髓線細胞由 1 - 3 層薄壁組織排列而成，細胞呈長方形。韌皮纖維分佈極為密集，纖維多成群，與篩管薄壁細胞相間排列生長，纖維胞腔極小，細胞壁厚且木化。篩管細胞成群，壁略厚；油細胞散生，於韌皮部外側較為密集。薄壁細胞內存有草酸鈣方晶。

[粉末鑑別]：

棕色粉末，略有香氣。木栓細胞，扁長方形，微木化。石細胞多成群存在，圓形、橢圓形或類多角形，壁極厚，徑 10 - 35 μm 。纖維多成束長條狀存在，長 20 - 30 μm ，徑 15 - 25 μm ，壁厚且木化，胞腔極小。可見篩管細胞，篩板明顯。油細胞，多數，圓形或橢圓形，徑 60 - 100 μm ，內含棕黃色樹脂狀物質。薄壁細胞與髓線細胞中偶可見草酸鈣方晶。



厚 朴

Magnoliae Cortex
Magnolia officinalis REHD. et WILS. (Magnoliaceae)

A. 組織圖 B. 藥材圖

C. 粉末及解離要素

1. 纖維 2. 石細胞 3. 油細胞

羌 活

Notopterygii Rhizoma

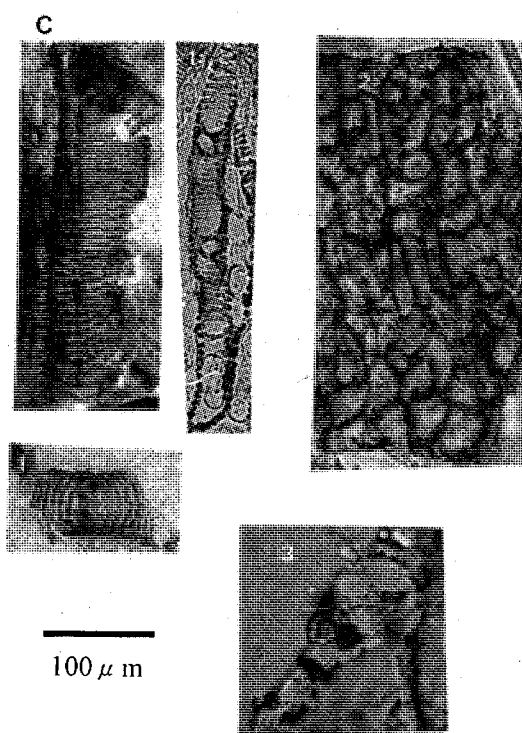
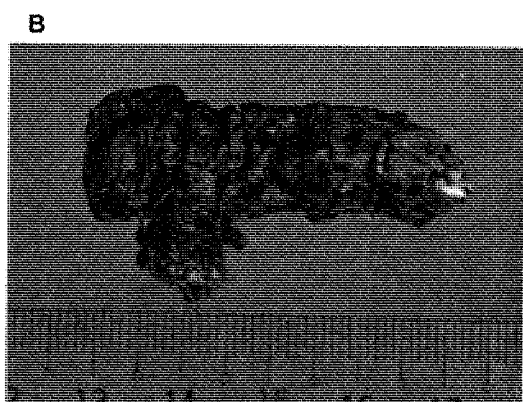
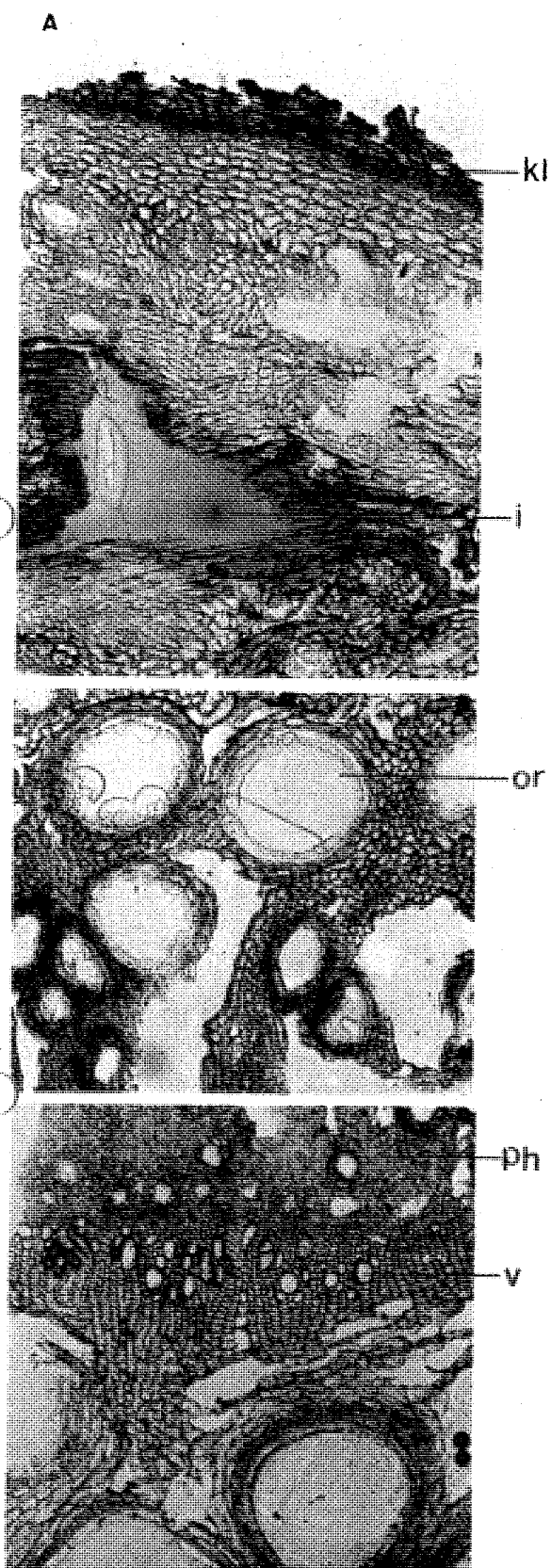
Notopterygium forbesii Boiss. (Umbelliferae)

[組織鑑別]:

木栓層細胞壁薄、方形、十數層，內有黃棕色內含物，木栓層外側細胞常因擠壓而脫落，細胞多皺摺而形狀不規則；皮層極薄，細胞不規則形；篩部長條狀，細胞裂隙極多；形成層為環狀分佈，木質部導管多為單個散生，徑 15 - 45 μm ，導管常成束，其中並含有成片狀分佈之木纖維群。髓部極為寬闊，壁薄。韌皮部、髓線、髓部均分佈有許多大型油室，徑 180 - 400 μm 。

[粉末鑑別]:

棕黃色粉末。木栓層細胞淡棕色，方形、壁薄，多成片存在，內有黃棕色內含物，長 10 μm 。薄壁細胞多細長，長 20 - 40 μm 。破碎之油細胞多見，其內常殘存有淡黃色之分泌物；導管主要以網紋導管為主，網紋似梭形而較稀疏，徑 15 - 45 μm ，亦可見螺紋導管，徑 8 - 30 μm ；澱粉粒類圓形或橢圓形，層紋與臍點均不明顯，徑 2 - 8 μm 。



羌 活

Notopterygii Rhizoma
Notopterygium forbesii Boiss. (Umbelliferae)

A.組織圖 B.藥材圖

C.粉末及解離要素

1.導管 2.分泌管碎片 3.分泌物團塊

楮 實 子

Broussonetiae Fructus

Broussonetia papyrifera (L.) (Moraceae)

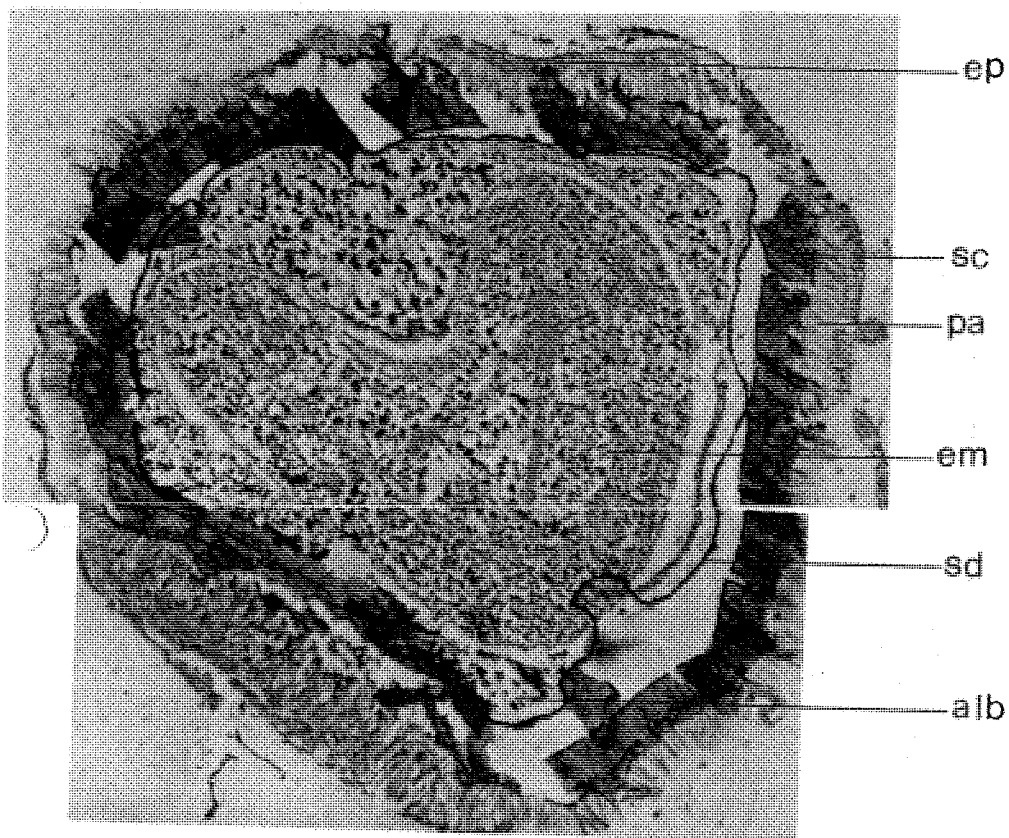
[組織鑑別]:

果皮表皮細胞一層，細胞壁薄，類長方形。下為一層柵狀組織，細胞壁增厚，長 $40 - 130 \mu\text{m}$ 、寬 $10 - 20 \mu\text{m}$ 。柵狀細胞為一層含晶細胞層，細胞壁極厚，細胞壁間細胞界限不明，內含草酸鈣簇晶。種皮細胞一層，類方形，胞壁增厚。胚乳與子葉均為薄壁細胞，內含許多澱粉粒與脂肪油滴。

[粉末鑑別]:

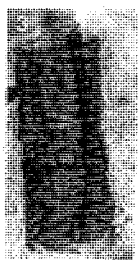
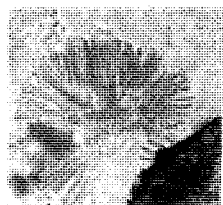
紅棕色粉末。果皮柵狀細胞黏液化，白色如細毛狀，長 $40 - 130 \mu\text{m}$ 、寬 $10 - 20 \mu\text{m}$ 。含草酸鈣簇晶細胞層常成片存在，棕色，表面觀之呈多角形，斷面則為類長方形，細胞壁極厚，草酸鈣簇晶多圓形，徑 $8 - 20 \mu\text{m}$ 。內果皮厚壁細胞扁平，多重層疊、界限不明。種皮細胞表面觀呈多角形，內含棕色物質，徑 $12 - 18 \mu\text{m}$ 。小型厚壁細胞類圓形，徑 $8 - 15 \mu\text{m}$ 。

A



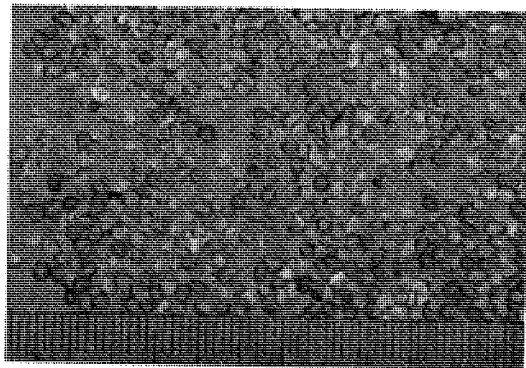
250 μ m

C



100 μ m

B



楮 實 子

Broussonetiae Fructus

Broussonetia papyrifera (L.) (Moraceae)

A.組織圖 B.藥材圖

C.粉末及解離要素

1.草酸鈣簇晶 2.果皮柵狀細胞

3.內果皮厚壁細胞 4.種皮表面細胞

蒺 藜 子

Tribuli Fructus

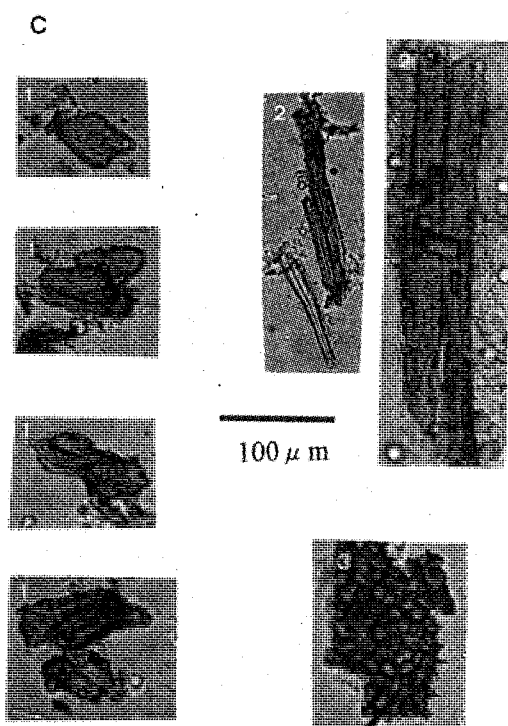
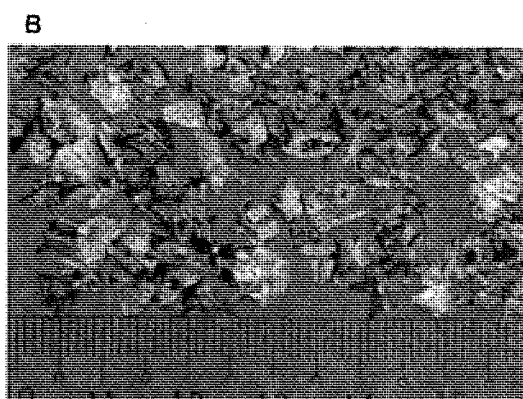
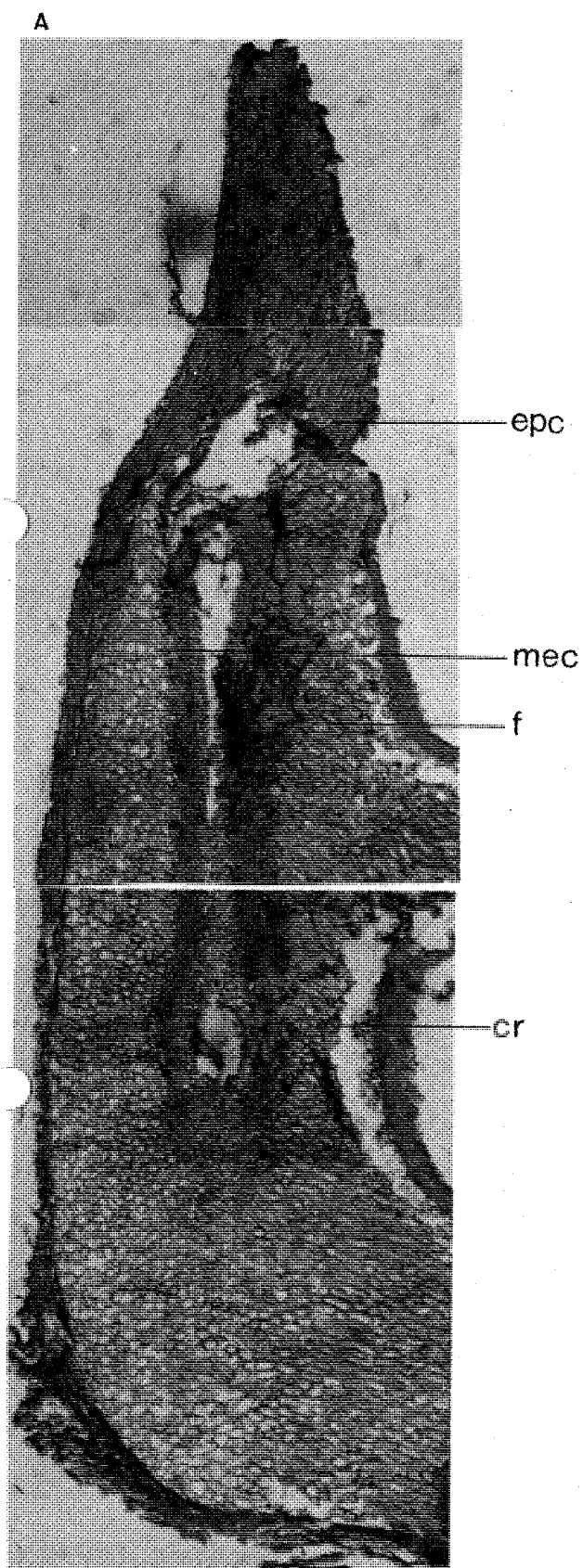
Tribulus terrestris L. (Zygophyllaceae)

[組織鑑別]:

外果皮細胞一層，有單細胞之非腺毛。中果皮細胞為薄壁組織，近外果皮處有草酸鈣簇晶分佈，中果皮內側近內果皮處，分佈許多草酸鈣方晶，形成一結晶層。維管束小型，分佈走向不規則。內果皮層為纖維層，排列錯雜。種皮細胞一層，排列整齊細密，細胞壁增厚。種子之子葉細胞，細胞壁薄，內含油滴。

[粉末鑑別]:

黃白至黃綠色粉末。纖維細長條狀，網狀上下交錯排列或成束狀，長 35 - 95 μm 。內果皮石細胞單個或成群散在，卵圓形至不規則形，胞壁極厚，孔紋少見。導管多為螺紋導管，亦可見網紋導管，徑 7 - 15 μm 。草酸鈣方晶眾多，徑 10 - 40 μm 。種皮細胞淡棕色，常呈片狀，表面觀呈多角形，徑 10 - 20 μm 。



蒺藜子

Tribuli Fructus

Tribulus terrestris L. (Zygophyllaceae)

A.組織圖 B.藥材圖

C.粉末及解離要素

1.石細胞 2.纖維 3.種皮細胞

紅 大 戟

Knoxiae Radix

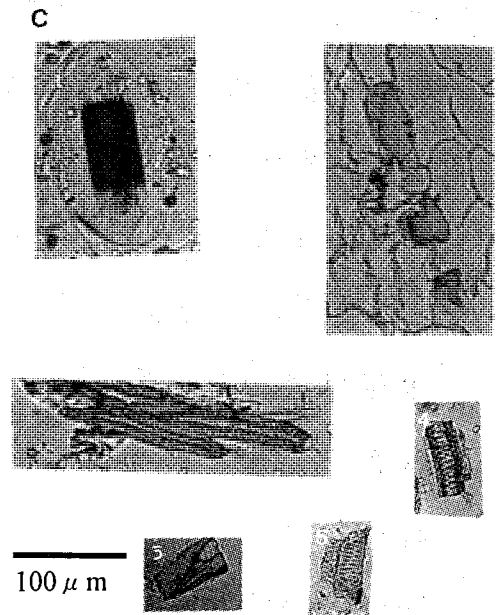
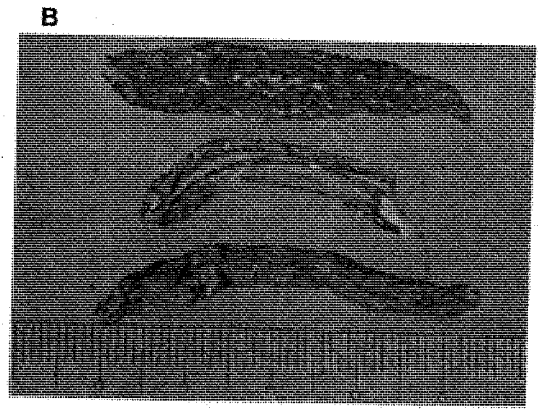
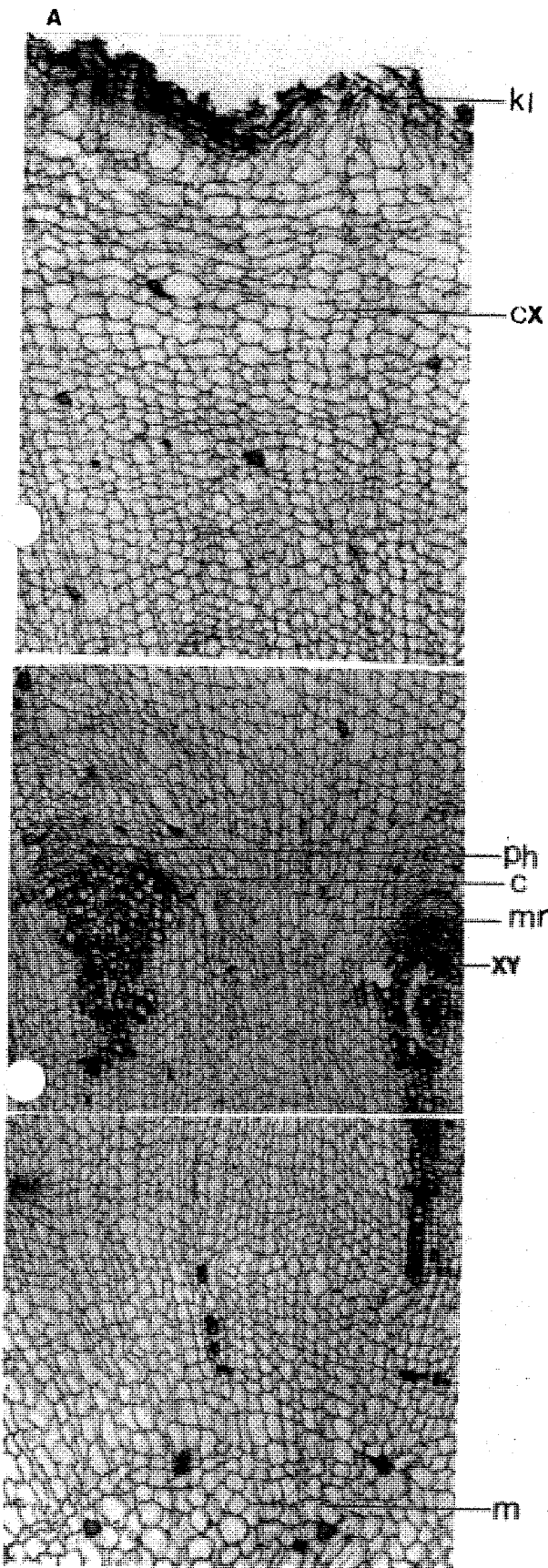
Knoxia valerianoides THOREL et PITARD (Rubiaceae)

[組織鑑別]：

以顯微鏡檢視其根之橫斷面，最外緣為外被角質層之表皮細胞，一層，多破裂狀，細胞呈類長方形、類方形。栓皮層，6-9層，細胞呈長方形、類長方形、類方形，偶見有紅棕色塊狀物。皮層，細胞呈長方形、扁長方形：散見有分泌細胞及草酸鈣針晶束分佈：分泌細胞，細胞呈類圓形或類長圓形，內含黃棕色或紅棕色塊狀物：草酸鈣針晶，散在或成束存在於粘液細胞中，針晶，長33-111 μm ，直徑約2 μm 。韌皮部，與皮層分界不甚明顯，由充滿澱粉粒之薄壁細胞所組成，細胞呈長方形、類長方形、類方形、類多邊形、類圓形，具有明顯的細胞間隙，偶見有內含黃棕色或紅棕色塊狀物；愈近形成層細胞愈小，可見細小之篩細胞。形成層，成環，略明顯，3-5層，細胞呈長方形、扁長方形。木質部，略廣，約佔1/2，由導管、木部柔細胞、木部纖維所組成：導管，略大，單個散生或數個連生，斷續呈放射狀排列，近形成層處有較多導管群，導管旁伴有成束木纖維，徑14-76 μm ，主為有緣孔紋、孔紋或網紋導管，細胞呈類圓形、類多邊形、類卵圓形、類方形：髓線，略廣，延生至韌皮部，由薄壁柔細胞組成，細胞呈類長方形、類方形、類多邊形、類圓形，散見有分泌細胞及草酸鈣針晶束分佈。中央為初生木質部，由多數小導管及木纖維組成，形成類圓形。

[粉末鑑別]：

紅棕色粉末，氣微，味微辛。以顯微鏡檢視其粉末，表面觀之木栓細胞，呈紅棕色，壁略厚，微木化，細胞呈類長方形、類方形、扁長方形或類多角形，可見有內含紅棕色塊狀物之細胞。韌部柔細胞，具有明顯的細胞間隙，細胞呈類長方形、類方形、長方形，可見有分泌細胞及草酸鈣針晶束分佈：草酸鈣針晶，極多，隨處散在或成束存在於長圓形之粘液細胞中，針晶束兩端整齊或參差不齊，針晶長37-153 μm ，粗約2 μm 。木纖維，多成束，細長，微木化，直徑10-24 μm ，壁厚，具有緣孔紋，細胞呈長條形或長披針形。導管，略大，徑14-76 μm ，主為有緣孔紋、孔紋或網紋導管，伴有木部纖維。色素塊散在，為紅棕色、棕黃色或淡黃色，呈橢圓形、長條形或不規則形，大小53-85 μm 。



紅 大 戟

Knoxiae Radix

Knoxia valerianoides THOREL et PITARD (Rubiaceae)

A. 組織圖

B. 藥材圖

C. 粉末及解離要素

1. 針晶束
2. 色素團塊
3. 纖維
4. 網狀導管
5. 孔紋導管

桑 寄 生

Loranthi Ramus

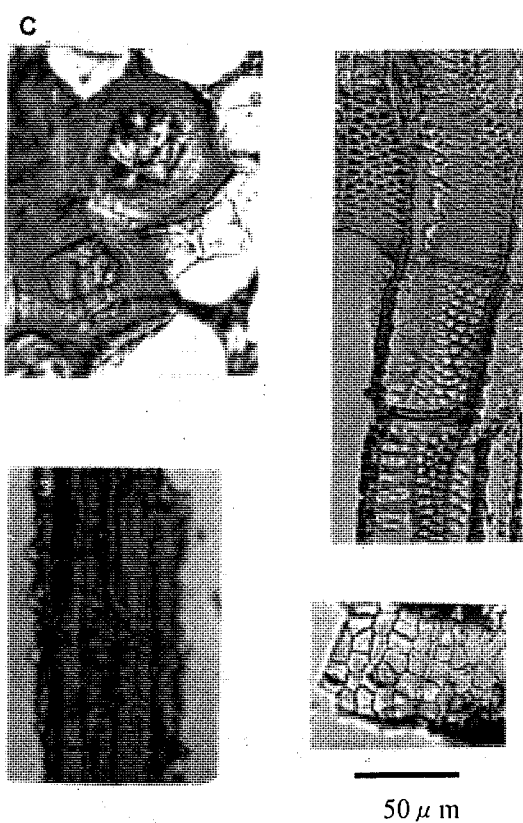
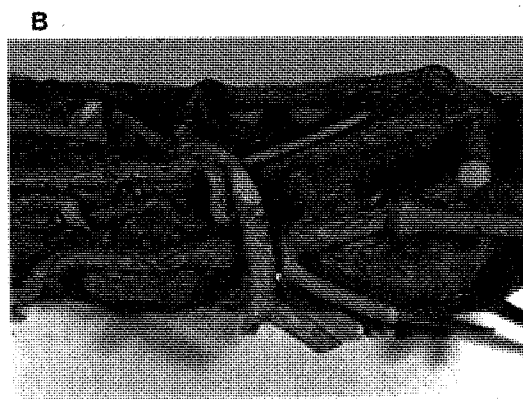
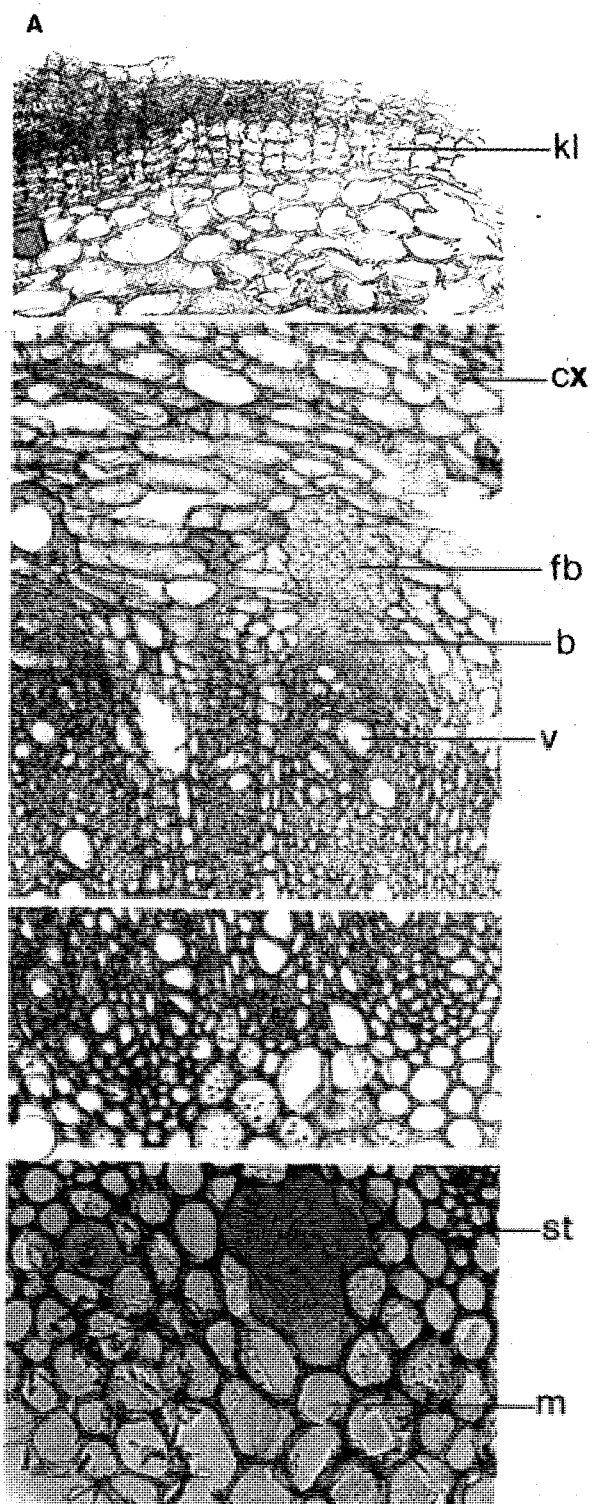
Scurrula liguidambaricolus (HAY.) DANSER (Loranthaceae)

[組織鑑別]：

木栓層細胞十餘層，胞壁略木化，排列緊密，細胞呈類方形、長方形，外層細胞中含棕色物質。皮層狹窄，約佔整個的1/9，約 10 層細胞組成，細胞壁略厚，長橢圓形，內含紅棕色物質與澱粉粒。石細胞眾多與中柱鞘纖維幾乎排列呈環狀。韌皮部狹窄，散生有石細胞或石細胞群。維管束內形成層明顯。木質部髓線由 1-4 層細胞組成，導管單個散生或 2-3 個並生，周圍伴生木部纖維及木部薄壁組織，徑 20 -50 μm ，。髓部有石細胞群，石細胞內含有草酸鈣方晶。髓部薄壁細胞中含澱粉粒與含紅棕色物質。

[粉末鑑別]：

淡黃棕色粉末。石細胞單個或數個成群，類方形、類圓形或類三角形，細胞壁多三面厚一面薄，故胞腔多側生於一邊，壁厚5-47 μm ，石細胞大小不等，徑 15-76 μm ，差異大。石細胞胞腔內常含有草酸鈣方晶或紅棕色團塊物質；草酸鈣結晶，呈長方形或短柱形多面體，長25-40 μm 。木部纖維成束較長，與木部薄壁細胞常連成片。導管多為有紋孔緣導管，徑 20 -50 μm ，亦可見網紋、階紋與螺旋導管。澱粉粒單粒類圓形，層紋與臍點均不明顯，徑 5-10 μm ，複粒少見。



桑 寄 生

Taxilli Ramus

Scurrula liquidambaricolus (HAYATA.) DANSER (Loranthaceae)

A. 組織圖

B. 藥材圖

C. 粉末及解離要素

1. 草酸鈣方晶
2. 有緣孔紋導管
3. 纖維
4. 薄壁組織

使 君 子

Quisqualis Fructus

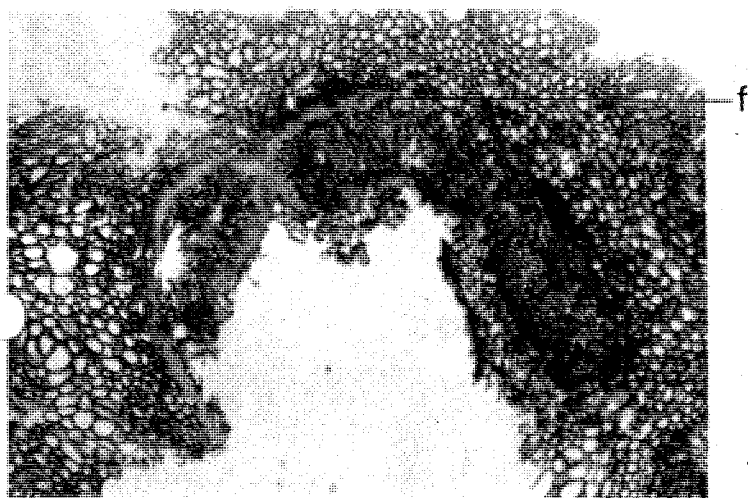
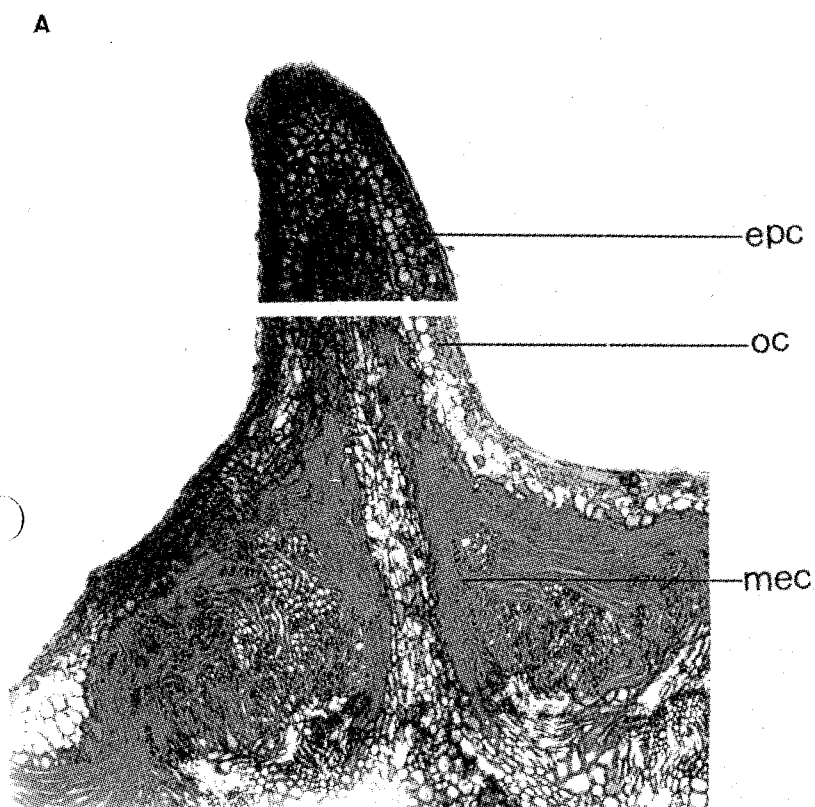
Quisqualis indica L. (Combretaceae)

[組織鑑別]:

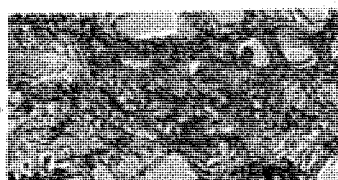
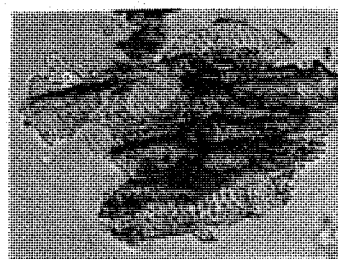
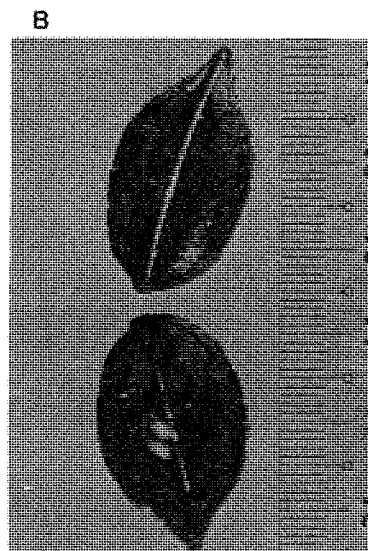
果皮表皮細胞一層，形狀不規則，細胞壁略厚、外被有角質層，胞腔內充滿黃棕色樹脂狀物。中果皮部分為成片、木化之網狀纖維群，其間散生薄壁細胞，細胞內有棕色分泌物。種皮表皮細胞壁薄，呈類長方形，內含紅棕色團塊物；表皮下為網狀細胞層，細胞切向延長，有網狀紋理，其中常散生維管束。子葉細胞中含脂肪油滴與草酸鈣簇晶。

[粉末鑑別]:

棕色粉末。果皮表皮細胞，形狀不規則，表面觀之呈多角形，細胞壁略厚，徑 12 -30 μm ，胞腔內充滿黃棕色樹脂狀物。纖維多成束，亦有上下層縱橫交錯排列生長，木化，徑 10 -20 μm 。種皮細胞壁薄，呈類長方形，含紅棕色團塊物，長 8 -50 μm ；表皮網狀細胞呈類圓形或橢圓形，非木化，徑 15 -40 μm 。草酸鈣簇晶存在於子葉細胞中，徑 3 -10 μm 。澱粉粒少見，類圓形、臍點明顯。



250 μ m



50 μ m

使君子

Quisqualis Fructus

Quisqualis indica L. (Combretaceae)

A. 組織圖

B. 藥材圖

C. 粉末及解離要素

1. 果皮表皮細胞 2. 果皮網紋細胞 3. 草酸鈣簇晶

魚 腥 草

Houttuyniae Herba

Houttuynia cordata THUNB.(Saururaceae)

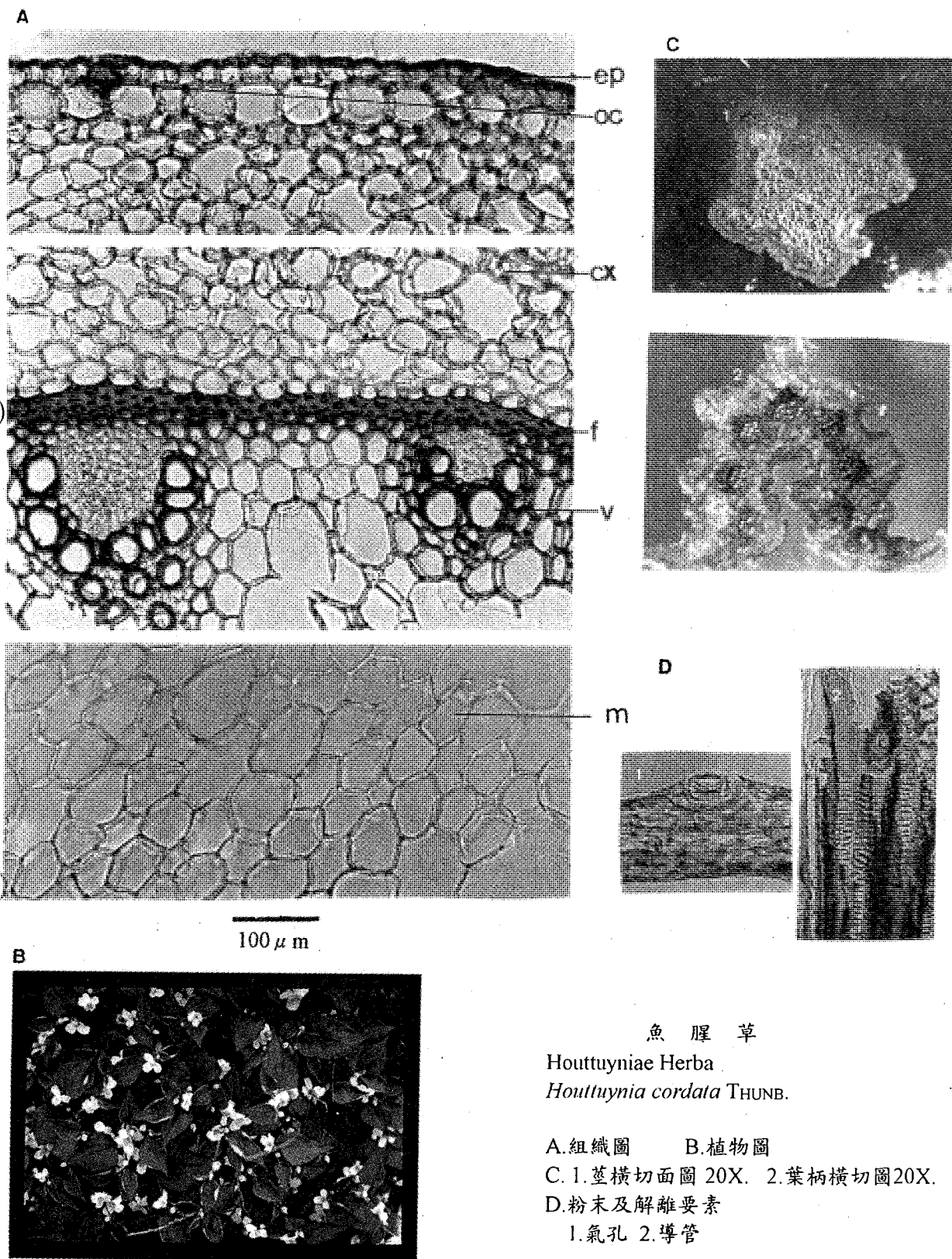
[組織鑑別]:

莖橫切面:

表皮細胞一層、方形，外側細胞壁略為增厚；皮層外側有一層排列整齊之大型薄壁細胞，其中間有油細胞散生，大型薄壁細胞之下為一層排列緊密之類圓形、小型薄壁細胞，而在更下之皮層細胞，胞壁亦薄，但形狀不規則，細胞排列疏鬆、細胞間隙亦多。中柱鞘纖維一至二層，排列呈環狀，木化，纖維之胞壁極厚、胞腔極小。維管束排列呈環狀存在；篩部明顯；多見螺紋與網紋導管，徑 20 - 50 μm 。髓部寬廣，有油細胞與草酸鈣簇晶散生。

葉橫切面:

上表皮細胞切線方向延長，有油細胞散生其間；油細胞類圓形，徑 70 - 80 μm 。表皮下方為一層類方形薄壁細胞，細胞較大、徑 40 - 70 μm 。其下有排列整齊之柵狀細胞一層，和排列不規則之海棉狀細胞數層，其中分佈許多草酸鈣簇晶。下表皮內亦有一層類方形大薄壁細胞，在葉脈之下方有厚壁細胞數層。下表皮細胞一層，有非腺毛及氣孔。



魚 腥 草

Houttuyniae Herba

Houttuynia cordata THUNB.

A. 組織圖 B. 植物圖

C. 1. 莖橫切面圖 20X. 2. 葉柄橫切面圖 20X.

D. 粉末及解離要素

1. 氣孔 2. 導管

白 朮

Atractylodes Rhizoma

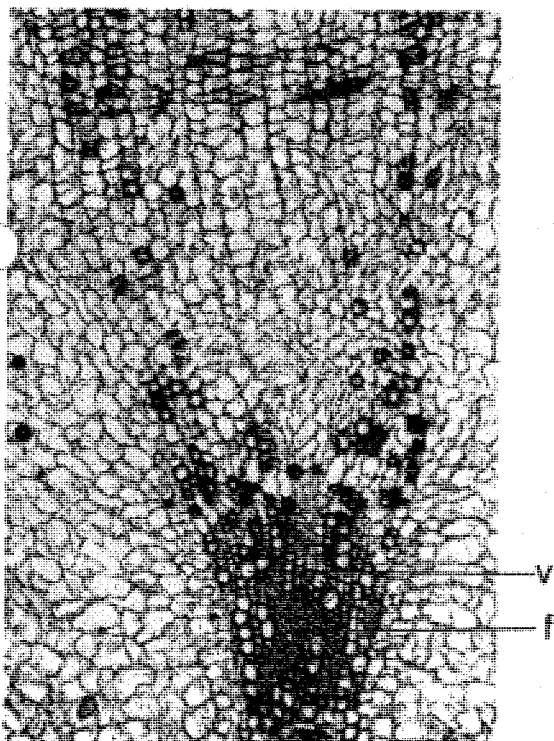
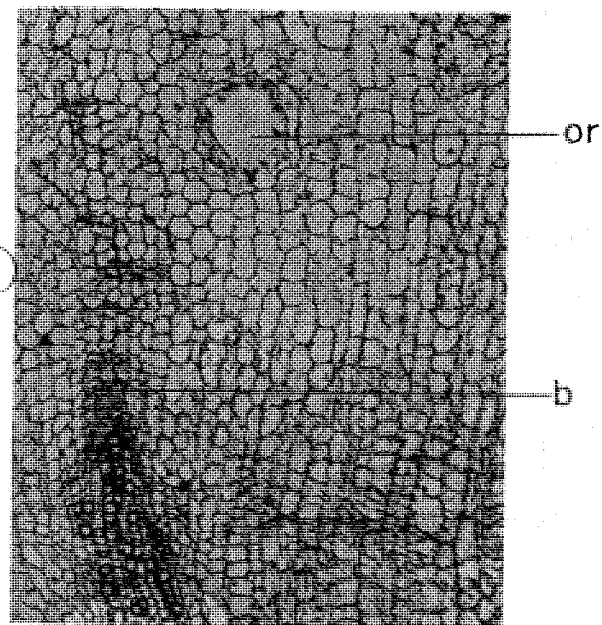
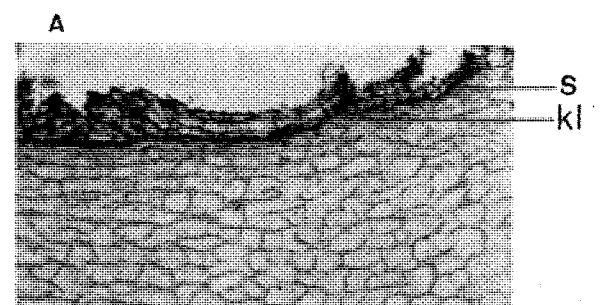
Atractylodes macrocephala Komz. (Compositae)

[組織鑑別]:

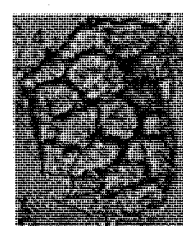
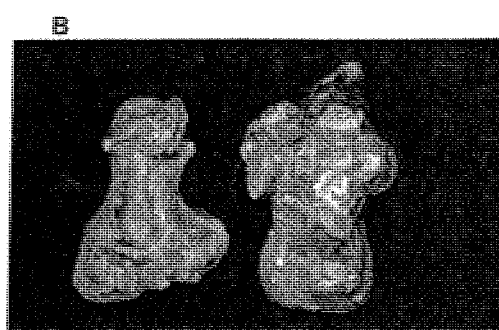
木栓層為 1 - 5 層木栓細胞組成，木栓細胞扁長方形，中間常夾有斷續之石細胞帶，石細胞方形，胞腔明顯。皮層、韌皮部與木質部髓線中油室散生，油室多呈類圓形至長橢圓形，徑 140 - 350 μm ，內含棕色油滴。形成層環明顯，木質部外側導管呈放射狀排列，1 - 3 層排列生長，外圍為薄壁細胞，內部導管間則常伴生木纖維束，導管徑 14 - 60 μm 。薄壁細胞中含草酸鈣針晶與菊糖。

[粉末鑑別]:

淡黃棕色粉末。木栓細胞表面觀之為多角形，微木化，內含淡黃色物質，常連結石細胞。石細胞方形，胞腔明顯，徑 40 - 60 μm 。纖維多成束，長梭形，細胞壁厚，木化，徑 10 μm 。導管多為網紋與有緣孔紋，徑 14 - 60 μm ，導管細胞短。草酸鈣針晶細小，不規則地分佈於薄壁細胞中。



250 μ m



100 μ m

白 朮

Atractylodes Rhizoma
Atractylodes macrocephala Koidz. (Compositae)

A. 組織圖 B. 藥材圖

C. 粉末及解離要素

1. 纖維 2. 石細胞 3. 導管 4. 木栓細胞

沉香

Aquilariae Lignum

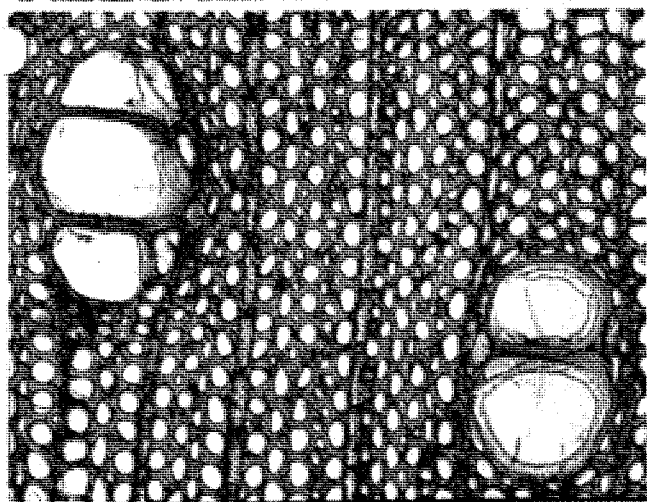
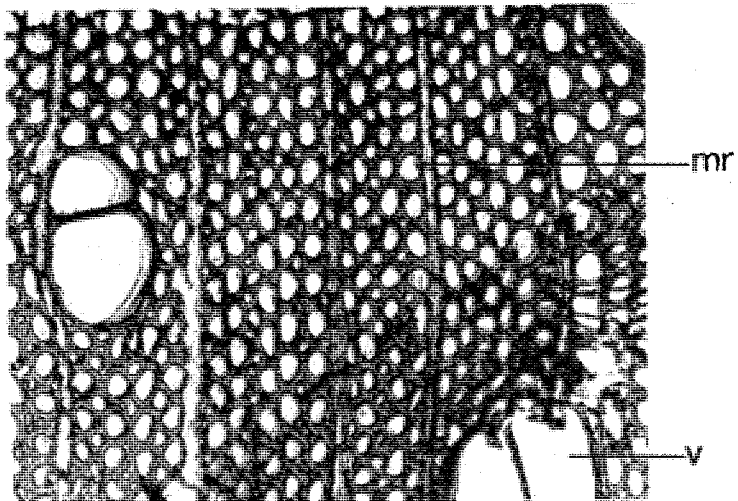
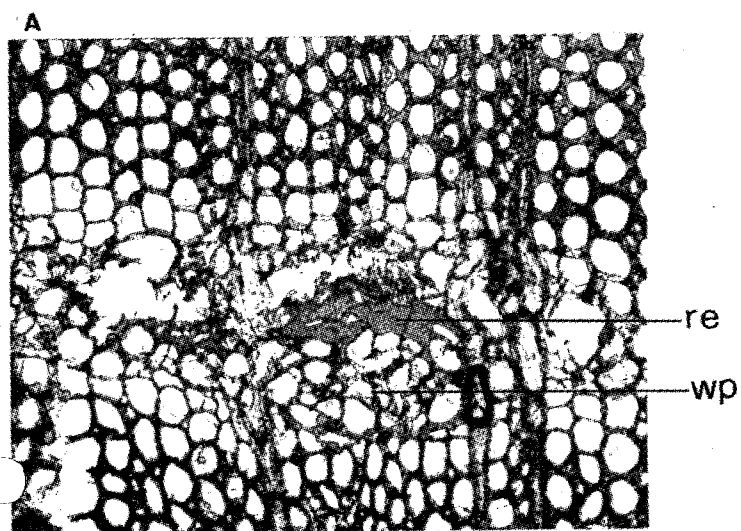
Aquilaria agallocha ROXB. (Thymelaeaceae)

[組織鑑別]：

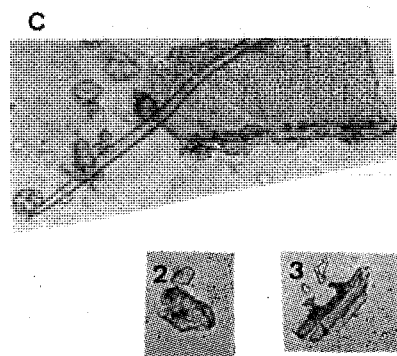
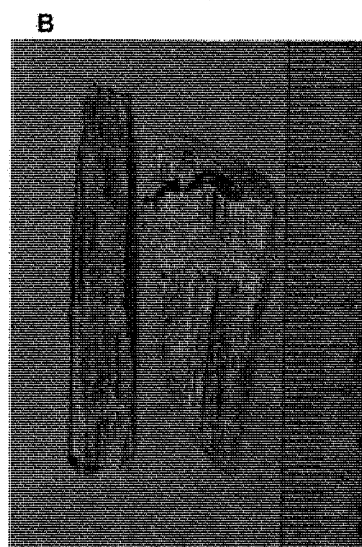
導管分散於木質部中，單一或 2-4 成群存在，類橢圓形，多呈徑向排列，細胞壁木化，徑 40 - 140 μm 。髓線細胞在橫切面上規則地呈放射狀排列，常充滿紅棕色之樹脂狀團塊，髓線細胞周圍之木部薄壁組織，常因樹脂團塊存在而破壞，形成形狀不規則之樹脂帶。木纖維壁薄，木化；薄壁細胞中偶可見草酸鈣結晶。

[粉末鑑別]：

暗棕色粉末。木部髓線細胞細胞壁薄，木化；有緣孔紋導管，孔紋排列緊密，徑 40 - 140 μm 。樹脂團塊淡黃色或黃棕色，成圓塊狀或不規則狀，大小不一。草酸鈣方晶極少見。



100 μ m



沉香

Aquilariæ Lignum

Aquilaria agallocha Roxb. (Thymelaeaceae)

A. 組織圖

B. 藥材圖

C. 粉末及解離要素

1. 有緣孔紋導管 2. 樹脂團塊 3. 纖維

續 斷

Dipsaci Radix

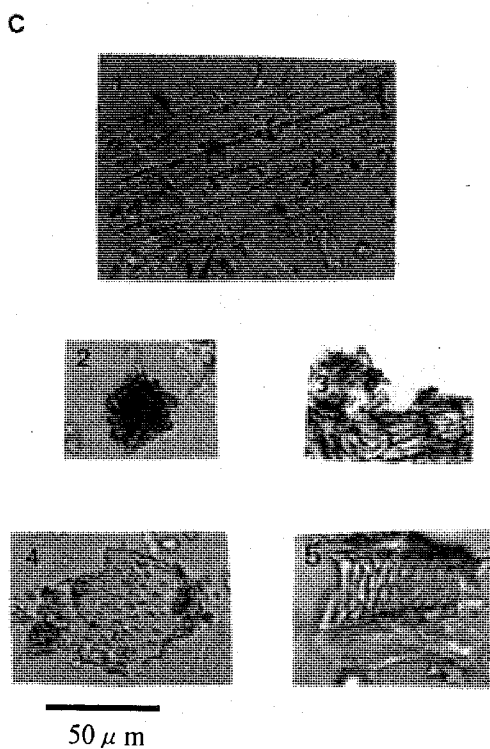
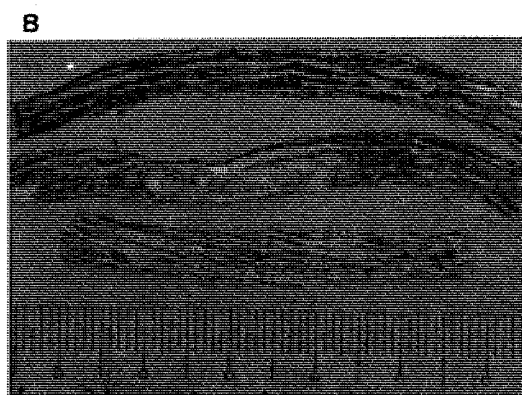
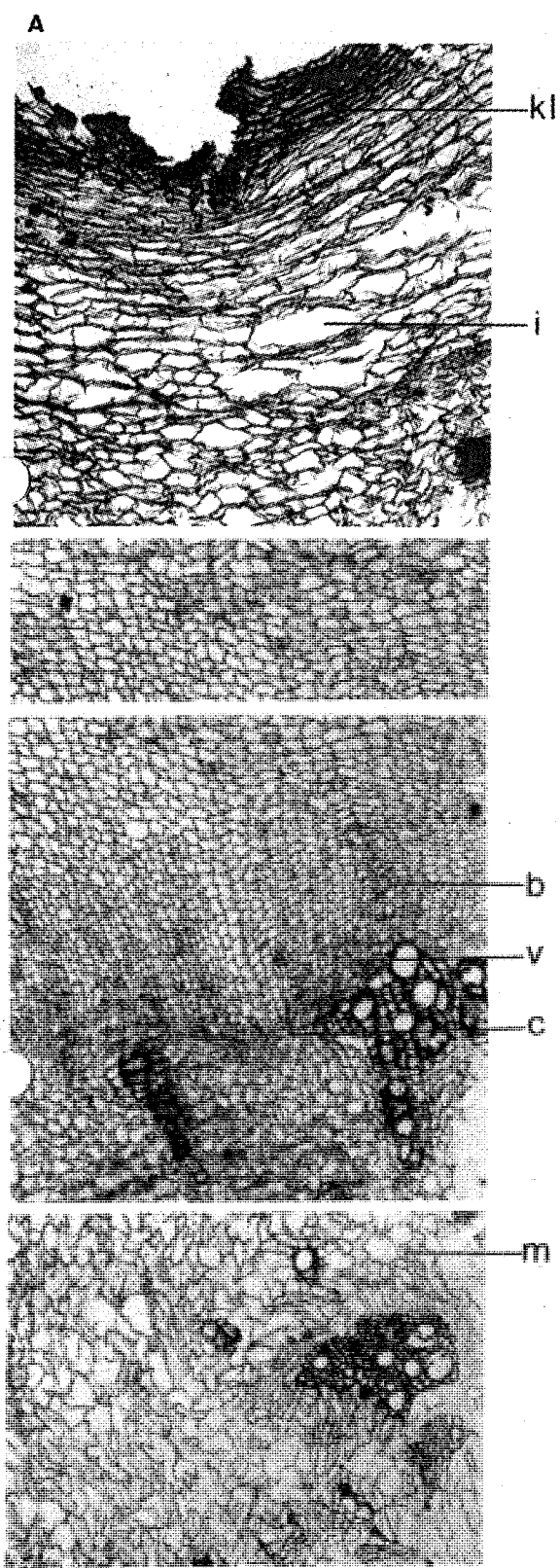
Dipsacus asper WALL. (Dipsacaceae)

[組織鑑別]：

木栓層數層，扁長方形或因擠壓而呈不規則狀；皮層細胞不規則狀，細胞裂隙多且大小不一。韌皮部篩管稀疏散生，近外側處並有許多細胞間隙。形成層呈環狀；木質部髓線寬闊，近形成層處導管分佈較密集，愈向內愈稀少，常單個散在或 2 - 3 個成群存在，徑 24 - 40 μm 。髓部較小，薄壁細胞中含草酸鈣簇晶。

[粉末鑑別]：

黃棕色粉末。木栓細胞棕黃色，表面觀之呈長方形。薄壁細胞呈紡錘狀，細胞壁有斜向交錯之紋理，木質纖維細胞壁厚，有斜孔紋。導管為有緣孔紋導管與網紋導管，徑 24 - 40 μm 。草酸鈣簇晶多存於皺縮不規則之薄壁細胞中，量甚多，徑約 15 - 30 μm 。



續 斷

Dipsaci Radix
Dipsacus asper WALL. (Dipsacaceae)

- A. 組織圖 B. 藥材圖
 C. 粉末及解離要素
 1. 皮層薄壁細胞 2. 草酸鈣簇晶 3. 栓皮細胞
 4. 有緣孔紋導管 5. 網紋導管

花 椒

Zanthoxyli Pericarpium

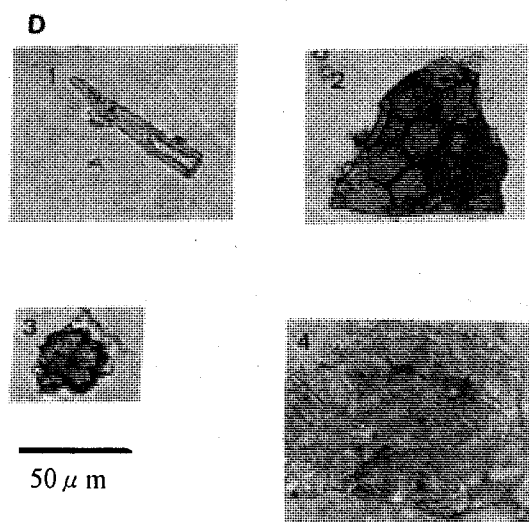
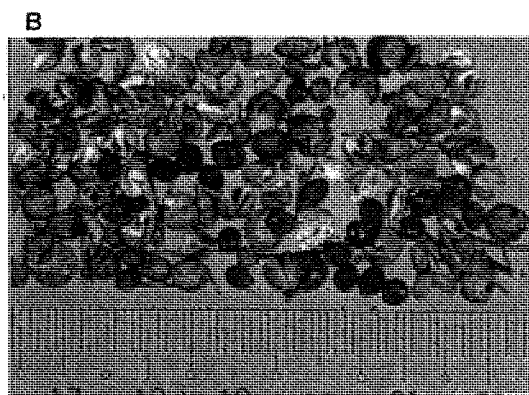
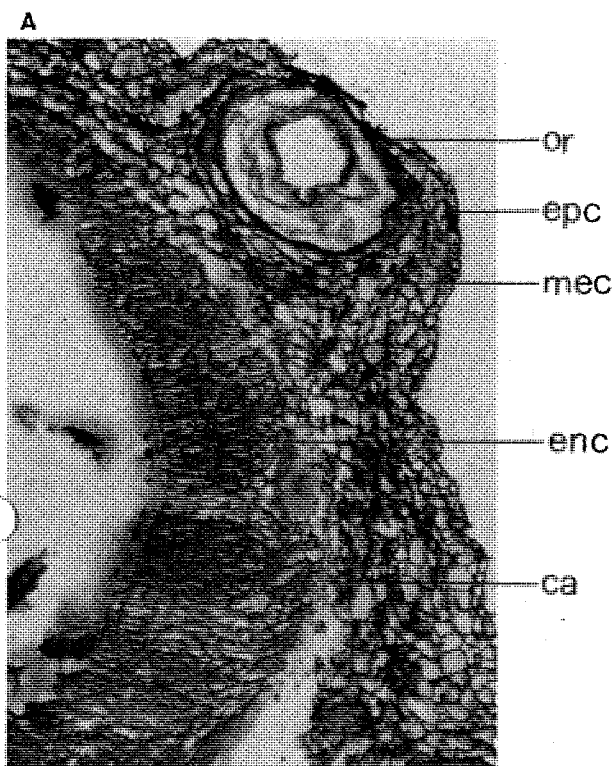
Zanthoxylum bungeanum MAXIM. (Rutaceae)

[組織鑑別]:

外果皮橫切面為一層表皮細胞，細胞外壁被角質層，細胞內含棕色物質，表面觀偶可見氣孔，氣孔直徑 32 - 42 μm 。中果皮分布維管束及大形油室，油室橢圓形，長徑 500 - 900 μm ，短徑 300 - 700 μm ，內含淡黃色油狀物，薄壁細胞內含許多草酸鈣簇晶，靠近內果皮處更多，直徑 15 - 45 μm 。內果皮由數層木化的纖維細胞組成，長短不等，交錯排列，接近中果皮處的細胞呈條形，餘呈長圓形、類圓形或多角形，直徑 12 - 22 μm 。

[粉末鑑別]:

暗棕色粉末。外果皮細胞外壁被角質層，細胞壁薄，內含棕色物質，表面觀偶可見氣孔，氣孔徑 32 - 42 μm 。油室大型、橢圓形，長徑 500 - 900 μm ，短徑 300 - 700 μm ，內含淡黃色油狀物。中果皮薄壁細胞內含許多草酸鈣簇晶，近內果皮處更多，徑 15 - 45 μm 。內果皮由數層木化的纖維細胞組成，長短不等，交錯排列，呈條形、長圓形、類圓形或多角形，徑 12 - 22 μm 。偶可見螺紋導管，徑約 10 μm 。



花 椒

Zanthoxyli Pericarpium

Zanthoxylum bungeanum MAXIM. (Rutaceae)

A. 組織圖

B. 藥材圖

C. 薄壁細胞中之簇晶

D. 粉末及解離要素

1. 纖維 2. 種皮表皮細胞 3. 草酸鈣簇晶

4. 果皮表皮細胞

女 貞 子

Ligustri Fructus

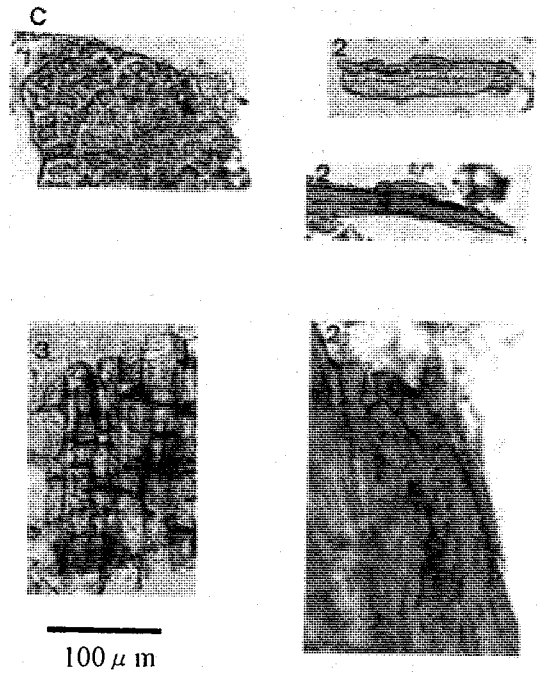
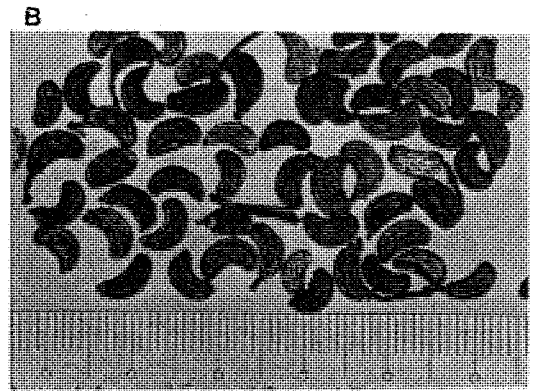
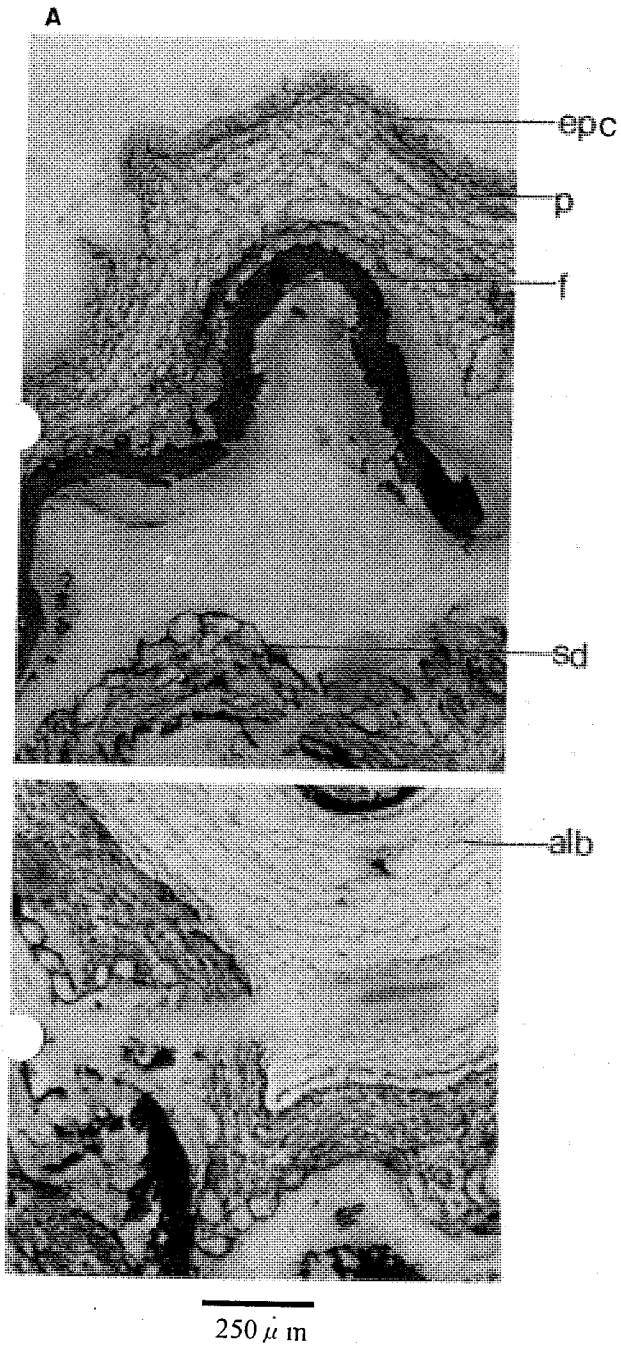
Ligustrum lucidum AIT. (Oleaceae)

[組織鑑別]：

外果皮為一層細胞，扁圓形，細胞外壁及側壁呈圓拱形加厚，其內常有棕色油滴狀物。中果皮為多層之薄壁細胞，形狀不規則，細胞界限不明顯，有時可見散生之導管與結晶。內果皮纖維上下交錯縱橫排列，呈類圓形。種皮最外為一層切向延長的表皮細胞，細胞扁長，其間雜有圓形或長圓形之分泌細胞，單個或 2-4 個聚生，徑50-80 μ m，胚乳細胞類多角形，細胞壁較厚，內含澱粉粒與油滴，偶可見草酸鈣簇晶。

[粉末鑑別]：

暗棕色粉末。外果皮細胞，扁圓形，細胞壁成圓拱門狀加厚，其內常有棕色油滴狀物。中果皮細胞薄壁，形狀不規則，細胞界限不明顯。內果皮纖維上下交錯縱橫排列，長條狀、切面呈類圓形，長短不一，徑10-350 μ m。種皮表皮細胞扁長，其間雜有圓形或長圓形之分泌細胞，單個或 2-4 個聚生，徑50-80 μ m。胚乳細胞類多角形，細胞壁較厚，內含澱粉粒與油滴。偶可見螺紋或環紋導管，徑 8-18 μ m。草酸鈣簇晶少見，多存於中果皮或胚乳細胞中。



女貞子
 Ligustri Fructus
Ligustrum lucidum Ait. (Oleaceae)

A.組織圖 B.藥材圖
 C.粉末及解離要素
 1.胚乳細胞 2.內果皮纖維
 3.中果皮薄壁組織

牛 蒡 子

Arctii Fructus

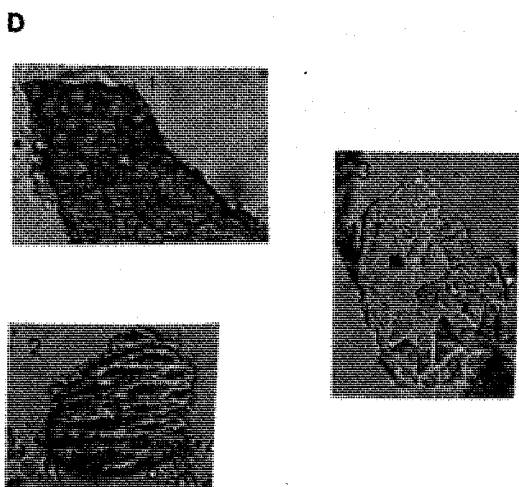
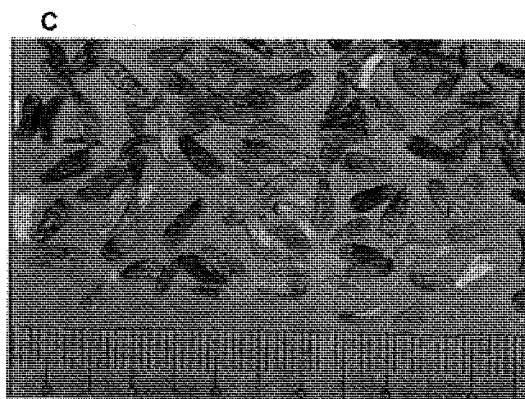
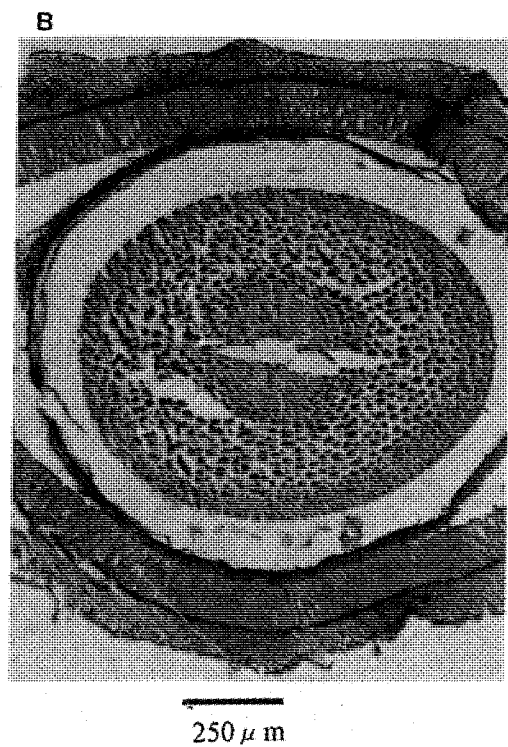
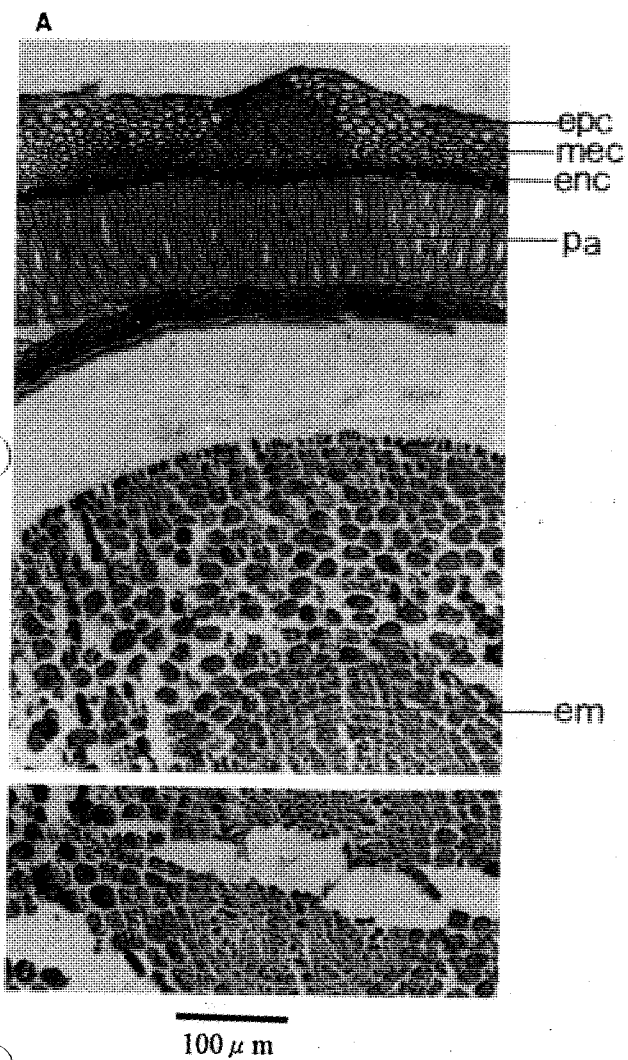
Arctium lappa L. (Compositae)

[組織鑑別]:

外果皮橫切面為一層大小不等的類方形薄壁細胞，胞壁彎曲，多破裂，外被角質層。中果皮厚薄不勻，細胞壁稍厚，棕黃色或暗棕色，微木化；於果實稜脊處常有小形維管束。內果皮狹窄，為棕黃色的頹廢細胞層，細胞界限不清，充滿草酸鈣方晶。種皮表皮細胞一層，細胞界限不明，其下為為 2 - 3 層紡錘狀細胞組成之組織，排列緊密，但不規則，長 50 - 110 μm 、寬 10 - 30 μm ，壁甚厚。胚乳細胞數層，內含脂肪油滴；子葉細胞內充滿澱粉粒及脂肪油滴，並含有細小的草酸鈣簇晶，偶可見方晶。

[粉末鑑別]:

灰綠色粉末。外果皮細胞斷面為類方形薄壁細胞，外被角質層。中果皮厚薄不勻，細胞壁稍厚，具細密錯雜之紋理，棕黃色或暗棕色，微木化。內果皮石細胞成片狀存在，側面觀之略呈長條狀，寬 20 - 90 μm 。種皮表皮細胞胞壁略厚。紡錘狀細胞組織，壁甚厚，排列緊密，成片存在，長 50 - 110 μm ，寬 10 - 30 μm 。胚乳細胞壁略厚，表面觀呈多角形。子葉細胞內充滿澱粉粒及脂肪油滴。可見草酸鈣簇晶與方晶。



牛 蒡 子

Arctii Fructus

Arctium lappa L. (Compositae)

A.組織圖 B.橫切面圖 C.藥材圖

D.粉末及解離要素

1.中果皮細胞 2.種皮柵狀細胞 3.子葉細胞

小 飛 揚 草

Euphorbiae Herba

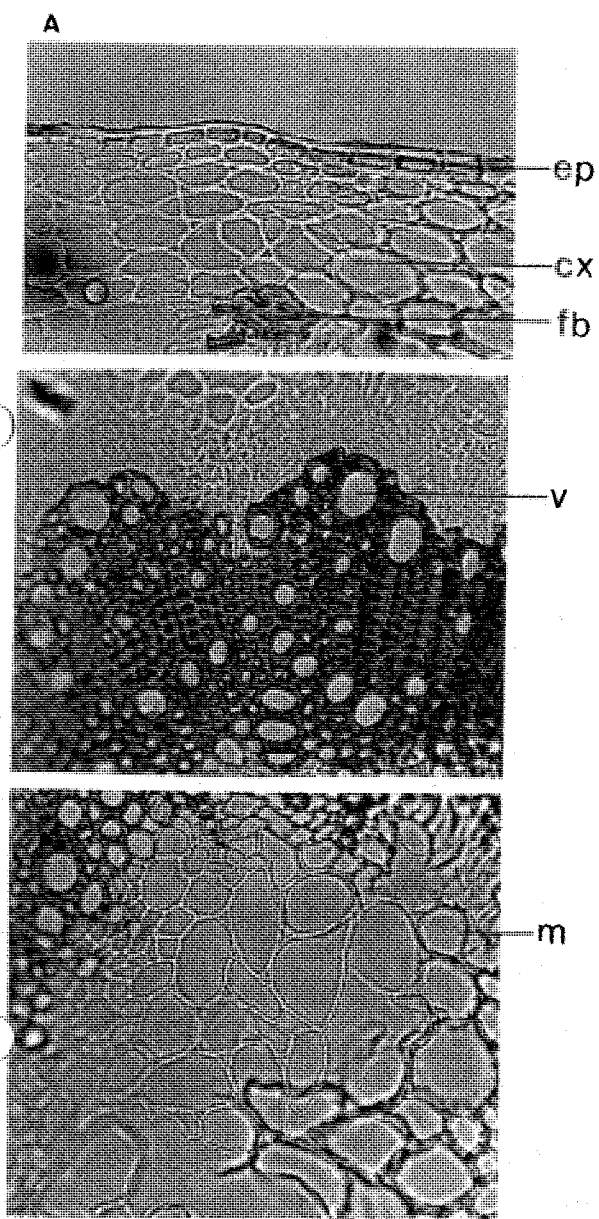
Euphorbia thymifolia LINN. (Euphorbiaceae)

[組織鑑別]：

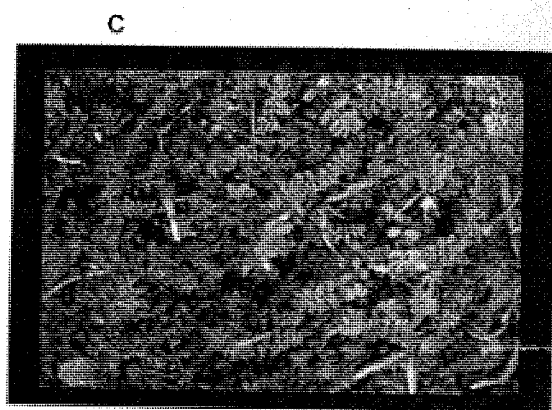
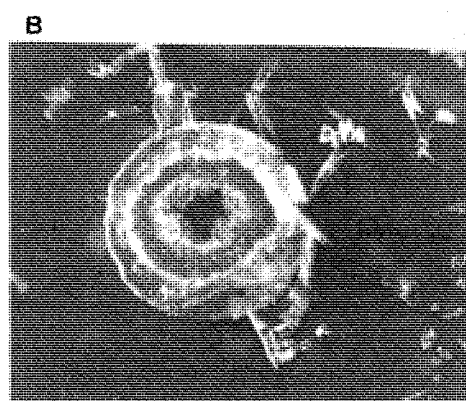
表皮細胞一層，長方形、排列緊密，細胞外壁增厚。皮層細胞壁薄，細胞形狀不規則，細胞間隙多；中柱鞘纖維成束狀存在，並斷續地呈環狀排列。韌皮部不明顯，形成層環亦不明顯，木質部較寬廣，導管呈環狀排列，多單個散生，徑 6-15 μm ，木質部纖維與木部柔細胞均整齊排列於導管四周。髓部細胞大形，細胞壁薄，形狀不規則。髓部中心通常有大型之空隙。

[粉末鑑別]：

灰綠色粉末。表皮細胞排列緊密，長方形，外壁增厚，長 10-12 μm ，寬 4-6 μm 。皮層細胞壁薄，細胞形狀不規則，徑 14-40 μm ；導管多單個散生，徑 6-15 μm ，木質部纖維徑 8 μm 。髓細胞，細胞壁薄，形狀不規則，徑 30-50 μm 。



50 μ m



小 飛 揚 草

Euphorbiae Herba

Euphorbia thymifolia LINN. (Euphorbiaceae)

A.組織圖 B.橫切面略圖 (10X)

C.植物圖

酸 棗 仁

Zizyphi Semen

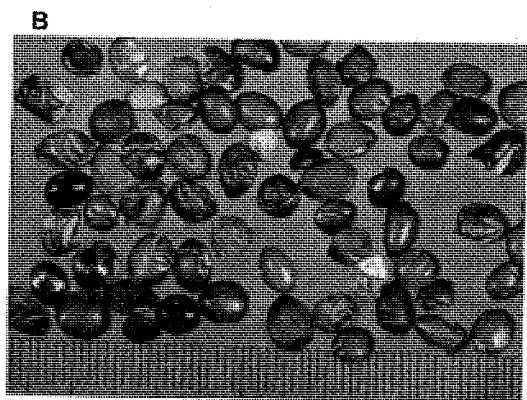
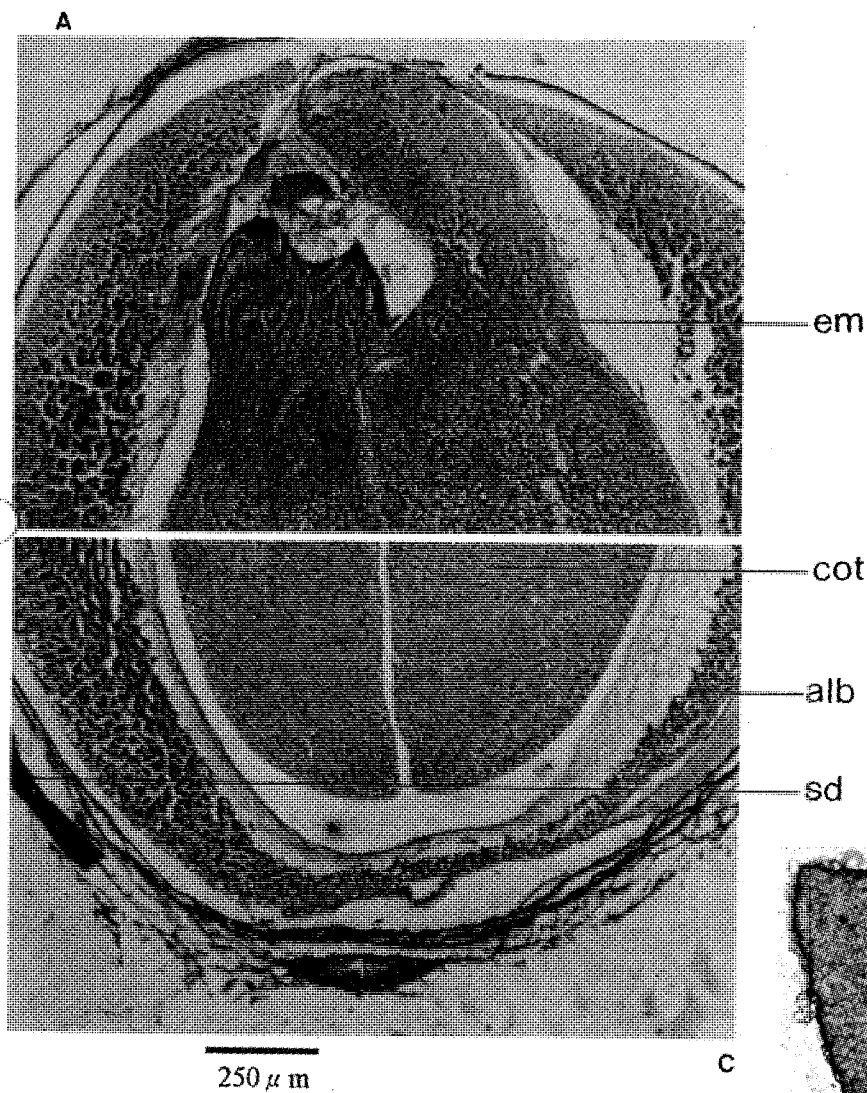
Zizyphus jujuba MILL. (Rhamnaceae)

[組織鑑別]：

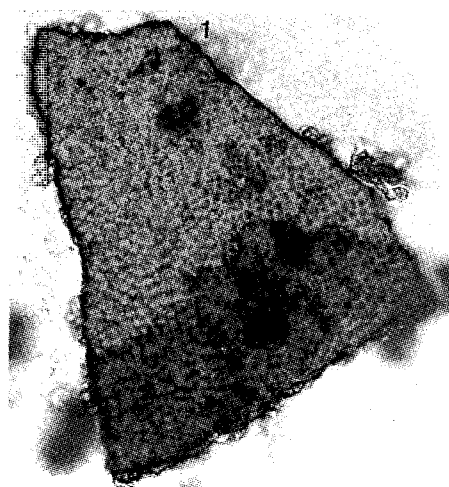
種皮外被厚約 5 μm 的角質層，角質層常破裂。其下為一層柵狀細胞，黃色或棕黃色，壁厚，木化，長 70 - 130 μm 。內種皮表皮細胞扁長方形胞壁略為增厚，長 40 - 45 μm 、寬 7 - 13 μm 。在種子之一端有較大的種脊維管束。胚乳細胞類多角形，含大量糊粉粒及脂肪油。黏液層厚 20 - 30 μm 。子葉表皮細胞及附近的薄壁細胞含有小型的草酸鈣簇晶，直徑 3-5 μm 。薄壁細胞均充滿澱粉粒及脂肪油滴。

[粉末鑑別]：

黃白至紅棕色粉末。種皮柵狀細胞成片，黃棕色或淡紅棕色。表面觀呈類多角形，排列緊密，徑 10 - 15 μm ，壁厚，胞腔線形細小；橫斷面觀呈長方形。長 70 - 130 μm ，寬長 10 - 18 μm ，外被較薄的角質層，內常含紅棕色或黃棕色顆粒狀物。種皮內表皮細胞成片。表面觀呈多角形、類方形或長方形，長 40 - 45 μm 、寬 7 - 13 μm 。細胞壁呈密集的連珠狀增厚，非木化，胞腔充滿棕色物質；營養頹廢細胞棕色，壁薄，細胞界限多不清楚，含淡棕色或黃棕色物及少數草酸鈣方晶，方晶長 23 μm ，直徑 2 - 16 μm 。內胚乳及子葉細胞均含澱粉粒，且含脂肪油滴。草酸鈣簇晶存在於類多角形的子葉表皮細胞中。



100 μ m



酸 棗 仁

Zizyphi Semen

Zizyphus jujuba MILL. (Rhamnaceae)

A. 組織圖 B. 藥材圖

C. 粉末及解離要素

1. 胚乳細胞 2. 內種皮細胞

3. 種皮柵狀細胞

覆 盆 子

Rubi Fructus

Rubus chingii HU. (Rosaceae)

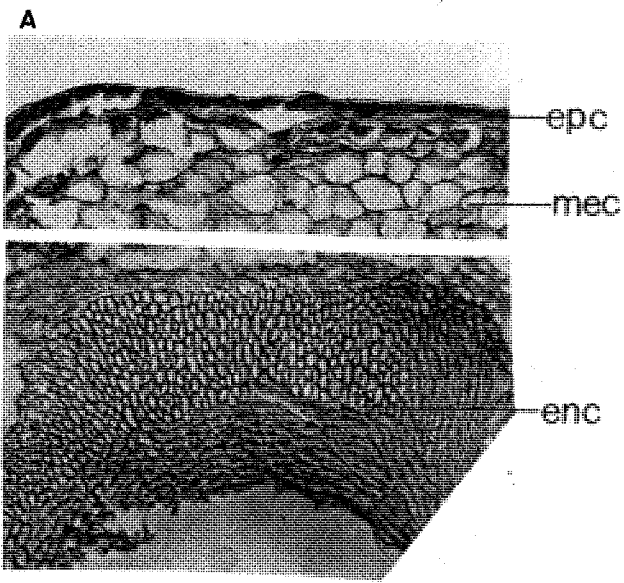
[組織鑑別]：

聚合果橫切面：花托圓形，周圍排列許多小核果。

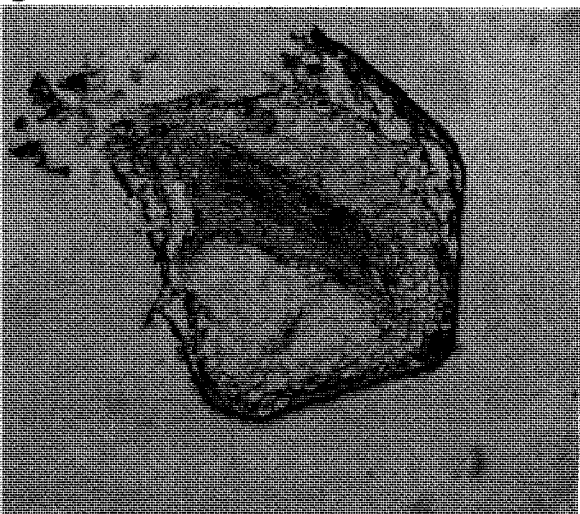
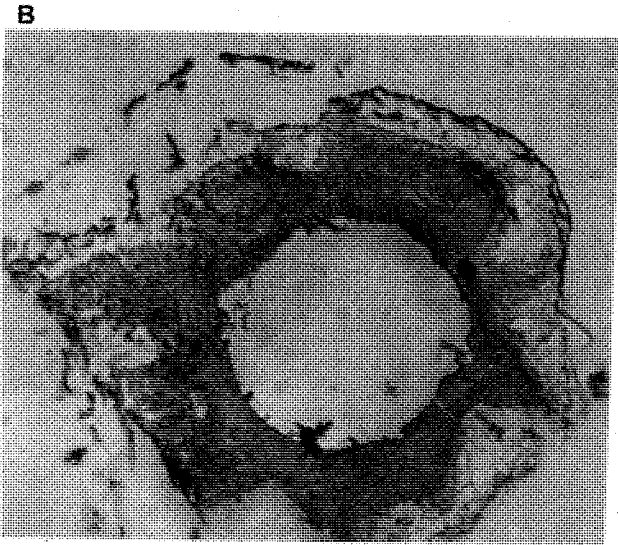
小核果橫切面：外果皮為一層排列整齊，切向延長的薄壁細胞，頂端部分的細胞常分化成單細胞非腺毛，毛茸脫落處遺留毛基殘痕。中果皮為 3-5 層長圓形的薄壁細胞，有的含草酸鈣簇晶。內果皮較厚，作脊狀突起，外側為多層增厚的細胞，細胞壁木化，最外一層細胞較小，排列整齊，內側為多層纖維，呈橫臥或斜向排列。種皮最外為一層切向延長的薄壁細胞，胞腔內充滿棕色色素，其下方 1-2 層被擠壓的薄壁細胞。胚乳及子葉細胞，壁薄、含糊粉粒和脂肪油。

[粉末鑑別]：

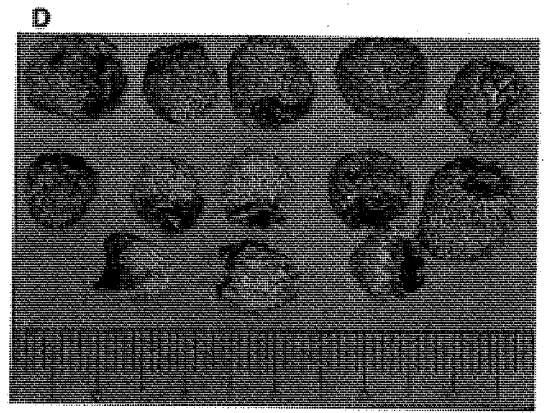
淡棕黃色粉末。非腺毛常為單細胞，細胞壁甚厚，木化，胞腔不明顯，胞壁常有螺紋，形似石細胞，長 80-400 μm ，徑 10-20 μm 。果皮表皮細胞成片存在，表面觀之呈多角形，其中夾有單個散生之石細胞，石細胞類圓形，徑 10-25 μm 。果皮纖維成群存在，成縱向或斜向交錯排列，長 180-250 μm ，徑 10-15 μm 。草酸鈣簇晶常見，徑 20-50 μm 。



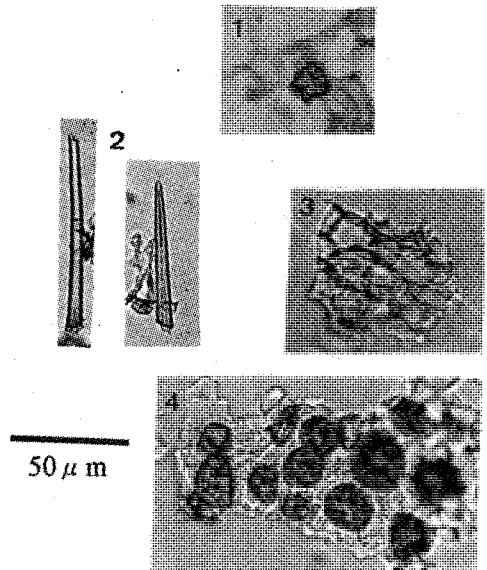
100 μ m



250 μ m



E



覆盆子

Rubi Fructus

Rubus chingii Hu. (Rosaceae)

A.組織圖 B.橫切面圖 C.縱切面圖

D.藥材圖

E.粉末及解離要素

1.草酸鈣簇晶 2.非腺毛

3.薄壁組織 4.表皮細胞

枳 殼

Ponciri Fructus

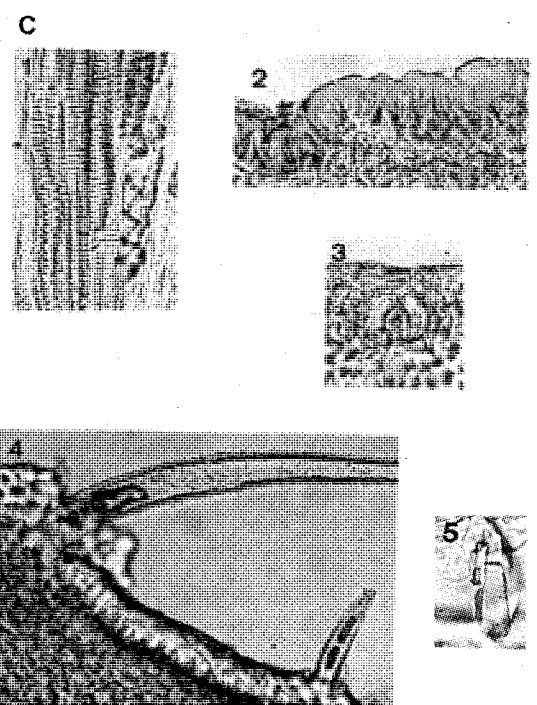
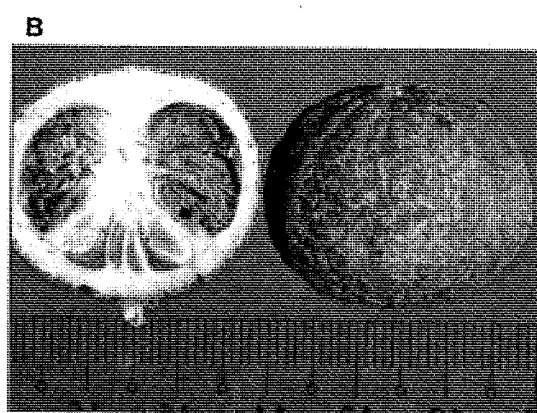
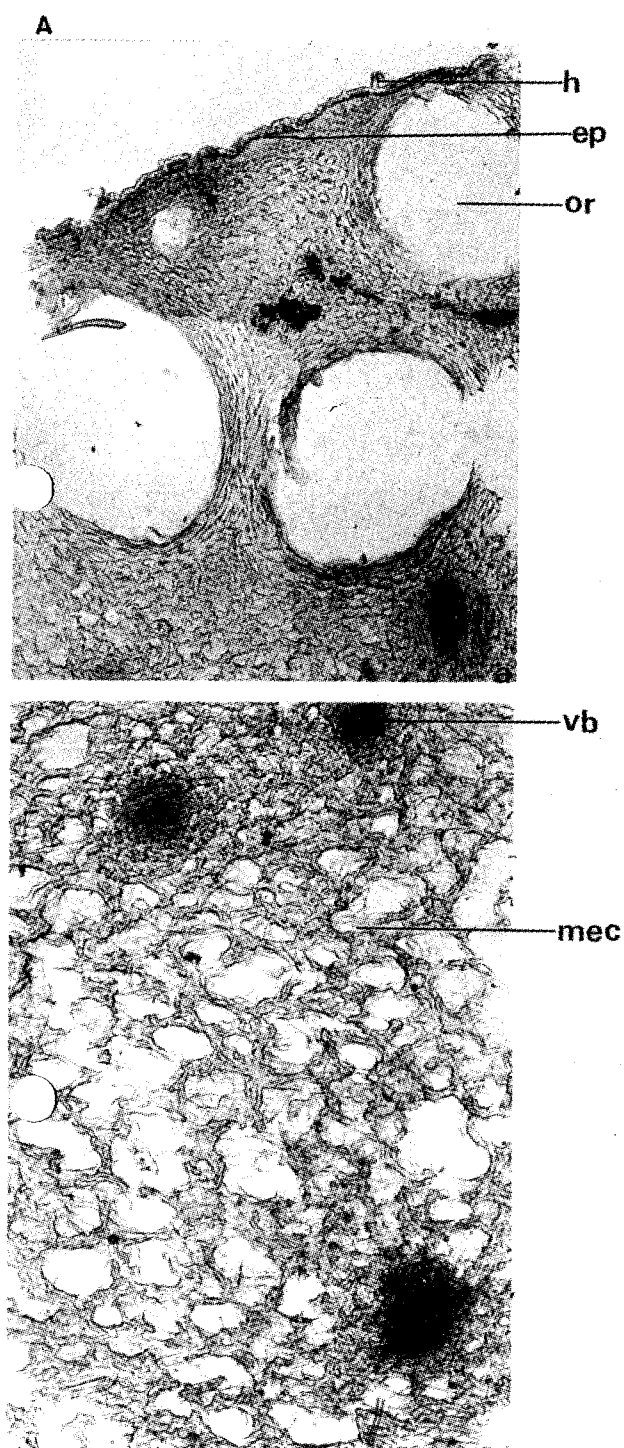
Poncirus trifoliata L. (Rutaceae)

[組織鑑別]:

呈半邊球狀，直徑 2.5 - 3 cm，外果皮組織為表皮細胞一層，外壁被角質層，有氣孔；非腺毛多分隔，先端鈍尖，長 30 - 150 μm 、徑 15 - 35 μm 。表皮以下為中果皮，細胞壁薄、形狀不規則，細胞間隙較大。油室大型、散生於中果皮外側，圓形或卵圓形、徑 300 - 500 μm 。有維管束、分佈走向不規則。

[粉末鑑別]:

淡黃棕色粉末。外果皮組織，表面觀呈多角形或類方形，外壁被角質層，壁厚、凹凸不平；氣孔圓形或類圓形，徑 25 - 35 μm 。非腺毛多分隔，先端鈍尖，長 30 - 150 μm 、徑 15 - 35 μm 。中果皮、細胞壁薄、形狀不規則，細胞間隙大。草酸鈣方晶長 10 - 20 μm 。可見螺紋與網紋導管，徑 12 - 18 μm 。



50 μ m

枳 殼

Ponciri Fructus

Poncirus trifoliata L. (Rutaceae)

A. 組織圖 B. 藥材圖

C. 粉末及解離要素

1. 螺紋導管 2. 角質層 3. 氣孔

4. 非腺毛 5. 草酸鈣方晶

火 炭 母 草

Polygoni Herba

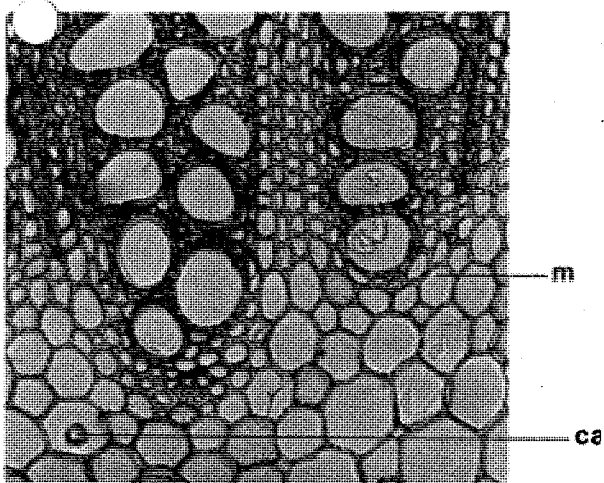
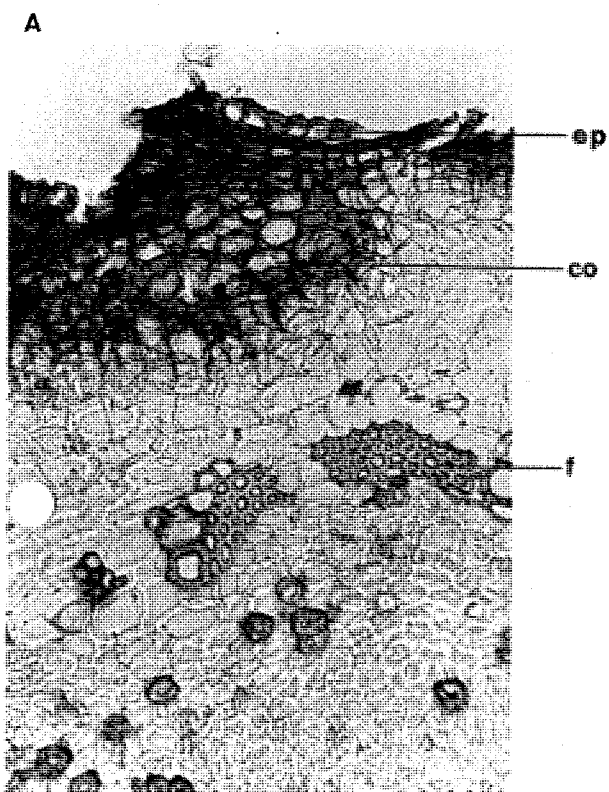
Polygonum chinensis L. (Polygonaceae)

[組織鑑別]：

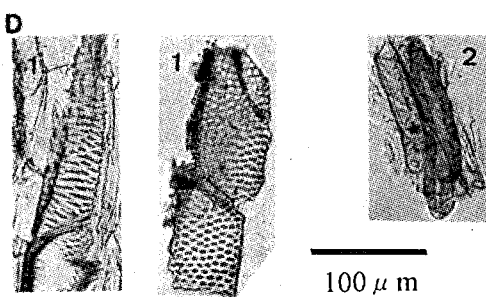
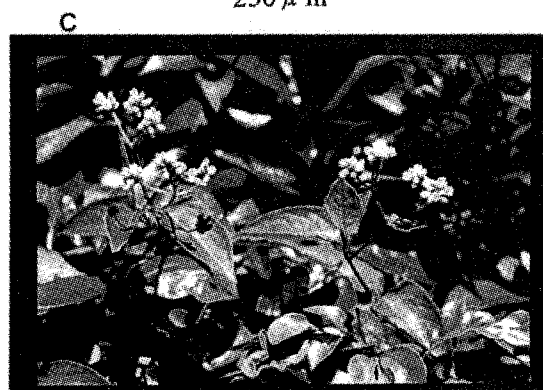
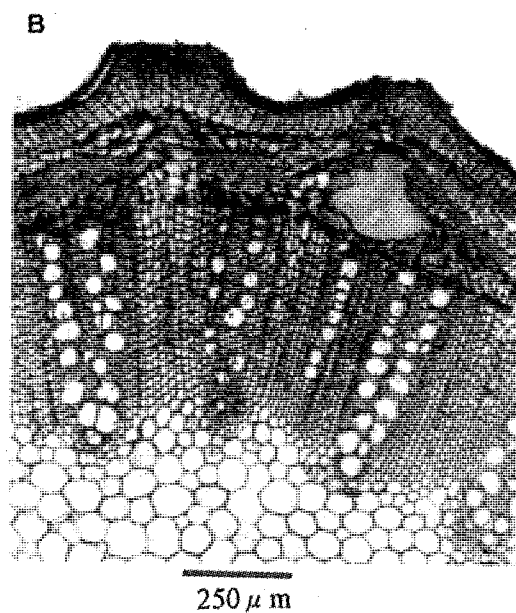
莖橫切面：表皮細胞一層，類方形，外壁被角質層，內有紅棕色物質。皮層外側有 3-5 層厚角細胞，韌皮纖維 4-5 層成群而生，斷續排列成環狀，成群之韌皮纖維旁常伴生 1-2 個石細胞；篩部細胞薄壁，多因擠壓而呈不規則狀，有紅棕色內含物，木質部導管多單個存在，偶見兩個並生，排列整齊；髓線明顯，髓部寬廣。

[粉末鑑別]：

黃棕色粉末，葉之上表皮細胞呈多角形，被角質層，層紋明顯；多細胞腺毛，散見、長 40 - 50 μm 。網紋導管，徑 35 - 50 μm 。可見草酸鈣簇晶。



100 μ m



火 炭 母

Polygoni Herba

Polygonum chinensis L. (Polygonaceae)

A.組織圖 B.橫切面略圖

C植物圖

D.粉末及解離要素

1.導管 2.纖維

蒼 朮

Atractylodes Rhizoma

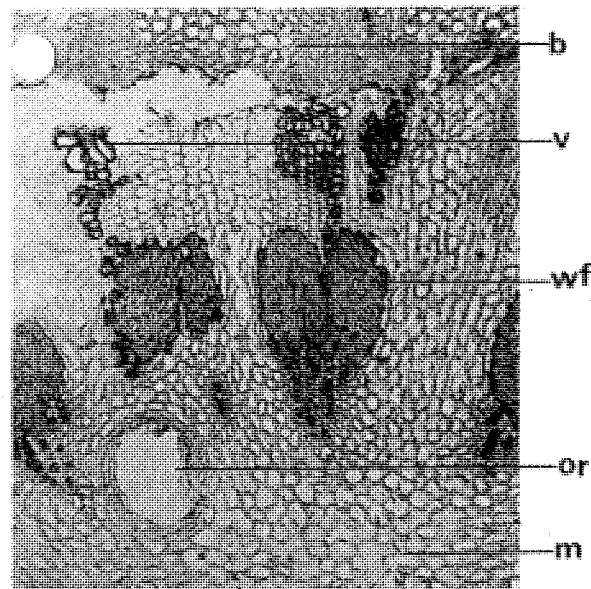
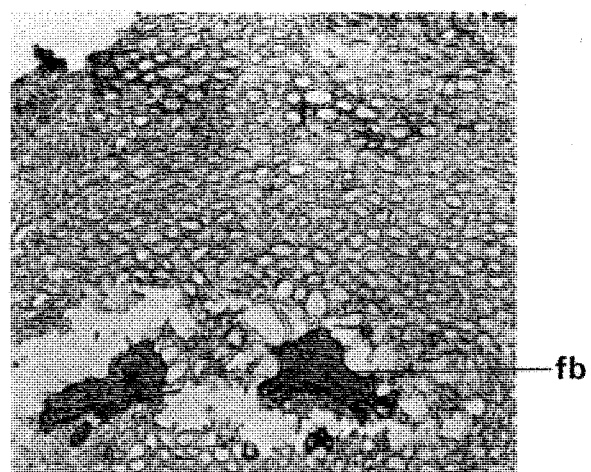
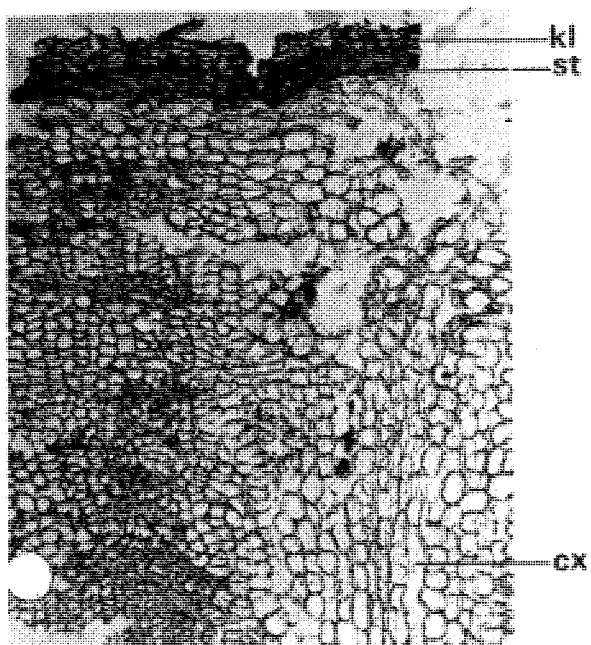
Atractylodes chinensis (DC.) Koidz. (Compositae)

[組織鑑別]:

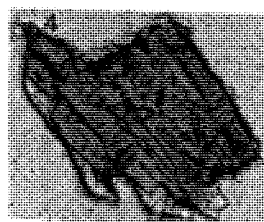
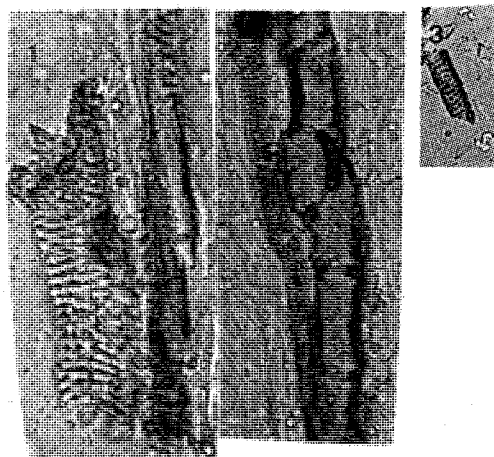
木栓層多層，多受擠壓形狀不規則，內含棕黃色物質；木栓層下有石細胞層二至三層，類方形；皮層薄壁細胞中，裂隙極多，纖維成束狀存在，亦有纖維束位於韌皮部外方。韌皮部狹小，形成層呈環狀，木質部有大型之木纖維束與導管相間排列。皮層、韌皮部、髓線及髓部均有大型油細胞散生，徑 140 - 350 μm 。

[粉末鑑別]:

棕色粉末，木栓細胞表面呈多角形或類長方形，常受擠壓形狀不規則，木栓石細胞常連接木栓細胞，類方形或略狹長，邊緣不平整。韌皮纖維與木質纖維均成束狀存在狹長如梭狀，胞腔狹細不明顯，徑 5 - 40 μm ，長 80 - 700 μm 。常見草酸鈣針晶，長 5 - 20 μm 。網紋導管、有緣孔紋導管與螺紋導管均可見，徑 10 - 55 μm 。



250 μ m



100 μ m

蒼

朮

Atractylodes Rhizoma
Atractylodes chinensis (DC.) Koidz. (Compositae)

A.組織圖 B.藥材圖

C.粉末及解離要素

1.有緣孔紋導管 2.網紋導管 3.螺旋導管
4.纖維束 5.澱粉粒

木 瓜

Chaenomeles Fructus

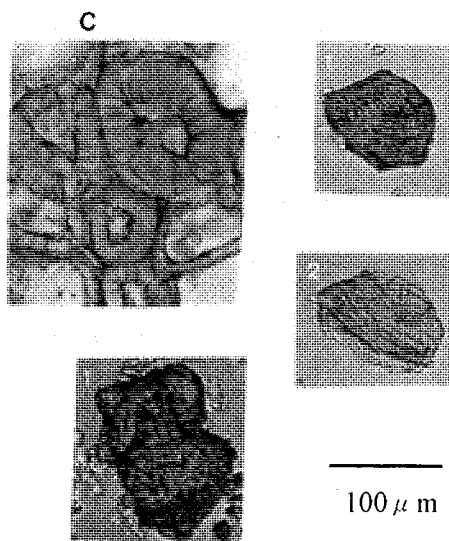
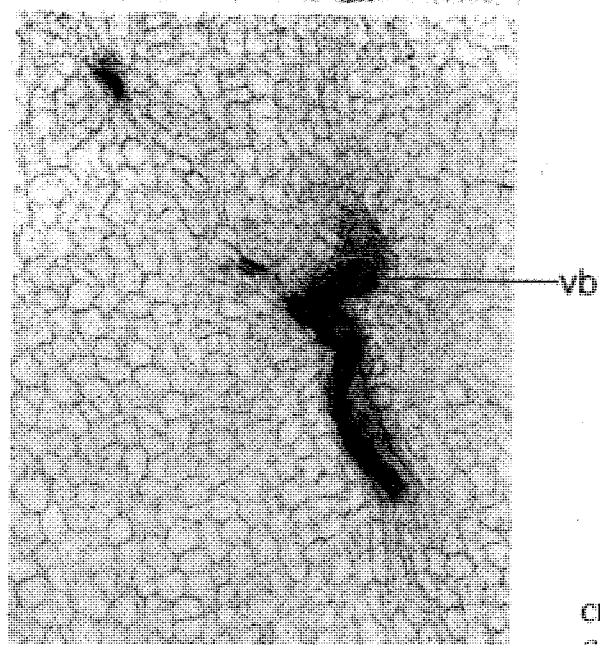
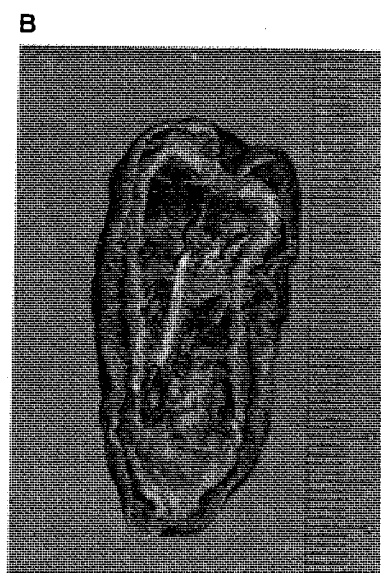
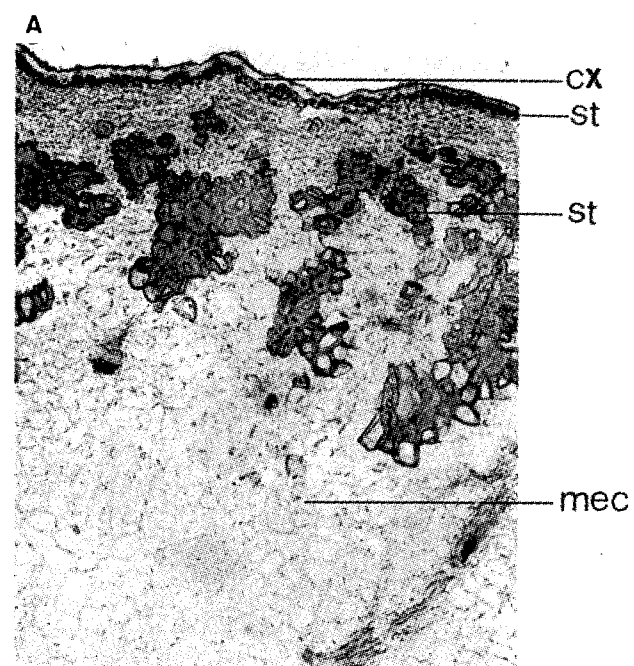
Chaenomeles speciosa (S.) NAKAI (Rosaceae)

[組織鑑別]：

果肉之最外層被一厚角質層，內有一層類圓形、排列緊密之石細胞，皮層外層 7- 10 層細胞之下有許多石細胞，排列成環狀。外果皮為一石細胞層，由十餘層排列整齊、緊密之石細胞組成。中果皮為薄壁組織，有維管束散生其中。內果皮為多層緊密排列之薄壁細胞。

[粉末鑑別]：

粉末紅棕色。石細胞極多，成群或單個散在，形狀不定、呈圓形、橢圓形、長方形、三角形等，大小亦不等，徑 10 -80 μm ，壁厚 10 - 20 μm 。層紋明顯、孔溝細且分叉。果肉薄壁細胞，細胞皺縮，界限不明。中果皮細胞偶可見小型草酸鈣方晶，長 10-15 μm ，寬 7 - 10 μm 。網紋導管較多見，徑 8 - 10 μm ，階紋導管少見。



木瓜

Chaenomeles Fructus

Chaenomeles speciosa (S.) NAKAI (Rosaceae)

A. 組織圖 B. 藥材圖

C. 粉末及解離要素

1. 石細胞 2. 果肉薄壁細胞

250 μm

紅 花

Carthami Flos

Carthamus tinctorius LINN. (Compositae)

[性狀鑑別]：

花皺縮彎曲散亂成團或散在，紅色或橘紅色。單一花朵長約 1 cm，基部線形，上端花冠成管狀，先端五裂、裂片線形，雄蕊五枚，花藥聚合成管狀，黃色至棕黃色。柱頭圓柱狀、黃色，頂端微分叉，有特殊氣味。

[粉末鑑別]：

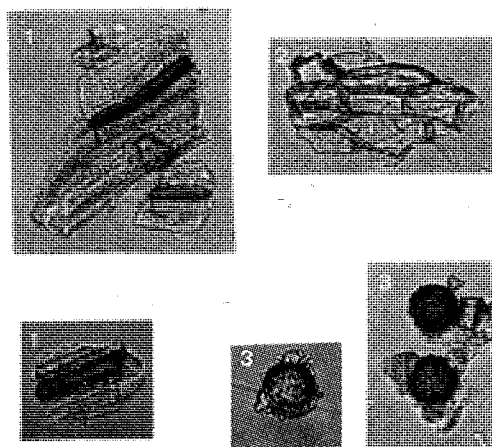
分泌細胞單層縱向排列成分泌管，寬 15 - 30 μm ，內含棕黃色至紅棕色分泌團塊，分泌管旁常伴生螺旋導管。花瓣細胞類長方形，細胞壁薄。花粉粒圓形至類圓形，具3個萌發孔，花粉粒外壁呈小圓粒狀突起，徑 30 - 70 μm 。偶可見草酸鈣方晶。

A



250 μ m

C



100 μ m

紅 花

Carthami Flos

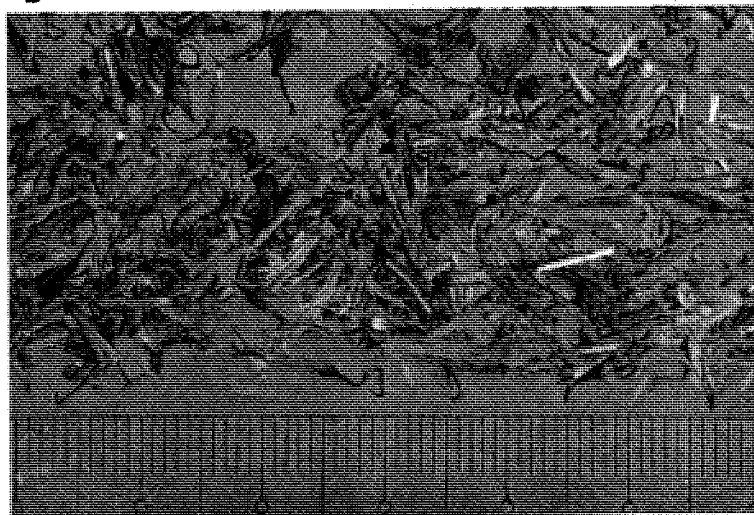
Carthamus tinctorius LINN. (Compositae)

A. 組織圖 B. 藥材圖

C. 粉末及解離要素

1. 導管、分泌管 2. 花瓣細胞 3. 花粉粒

B



決 明 子

Cassiae Semen

Cassia tora L. (Leguminosae)

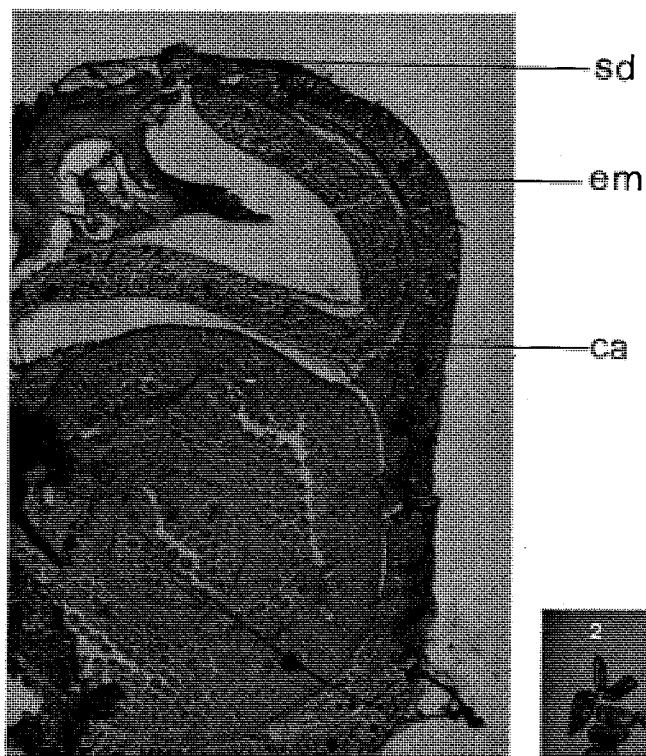
[性狀鑑別]：

成四稜之短圓柱狀，兩端均傾斜，一端平整，另一端則有突起之尖頭，種子長3-5mm、寬2-3mm；表面棕色至棕綠色，平滑有光澤，背面與腹面各有一條稜線。稜線兩側各有一寬廣之淺棕黃色的色帶，種皮質地堅硬。

[組織鑑別]：

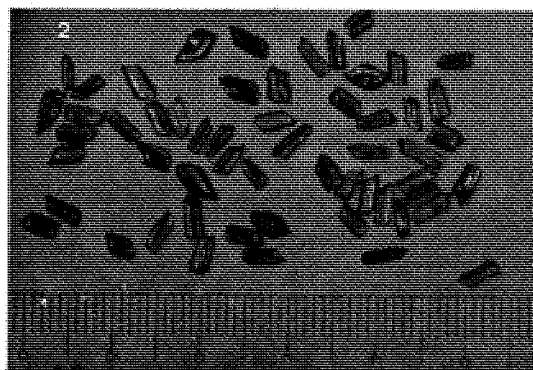
表皮細胞外披一極厚之角質層，透明。表皮一層柵狀組織，細胞壁厚。其下為一層啞鈴狀細胞，胞壁極厚，細胞間隙亦大。再內為 5-6 層之薄壁細胞，含有大量之草酸鈣簇晶，徑 2-8 μm 。內種皮細胞一層，長方形、排列整齊，其中亦含草酸鈣結晶。胚乳細胞不規則形，含澱粉、色素、草酸鈣簇晶及油滴。草酸鈣簇晶較大，3-10 μm 。

A

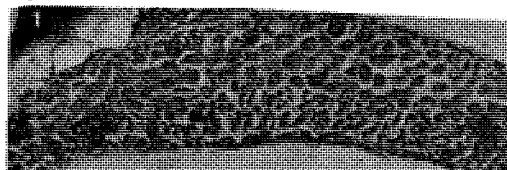


250 μ m

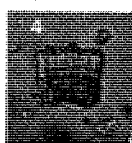
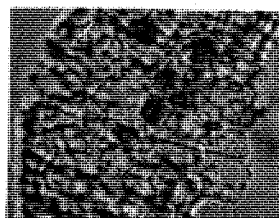
B



C



100 μ m



決 明 子

Cassiae Semen

Cassia tora L. (Leguminosae)

A. 組織圖

B. 1. 藥材表面觀(10 X) 2. 藥材圖

C. 粉末及解離要素

1. 草酸鈣簇晶 2. 內胚乳細胞

3. 種皮支持細胞 4. 種皮柵狀細胞

海 藻

Sargassi Thallus

Sargassum palidum (TURN) C. Ag. (Sargassaceae)

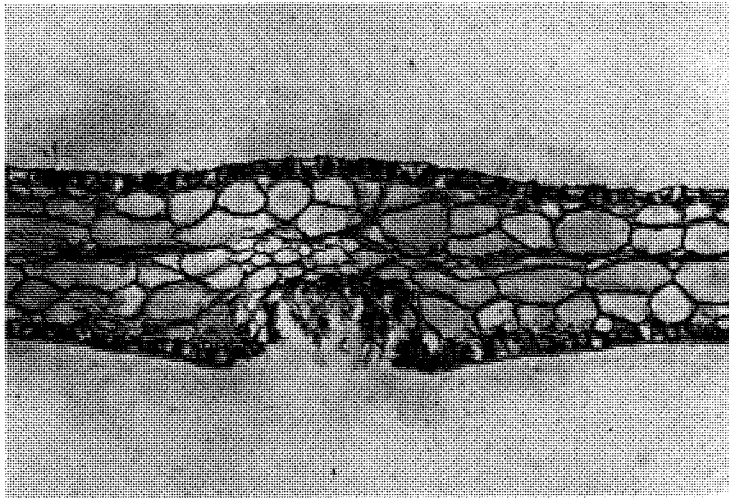
[性狀鑑別]：

黑色或棕色，主幹有稜，質地鬆脆，常捲曲縮成團狀。浸水泡軟後，呈樹枝狀，暗棕色，枝條柔韌、黏滑。葉互生、長卵圓形至披針形、先端尖、邊緣為疏鋸齒狀、具中肋。氣囊褐色圓球形，生於葉腋。

[組織鑑別]：

葉之橫切面，扁平帶狀，表皮上下各一層，細胞類圓形，胞壁較厚，排列整齊且緊密。中有皮層細胞多層，細胞較大、壁薄。中央髓部細胞呈扁圓形，排列緊密，較無細胞間隙。

A



100 μ m

C



B



海 藻

Sargassi Thallus

Sargassum palidum (TURN) C. Ag. (Sargassaceae)

A. 組織圖

B. 藥材圖

C. 植物圖

火 麻 仁

Cannabis Fructus

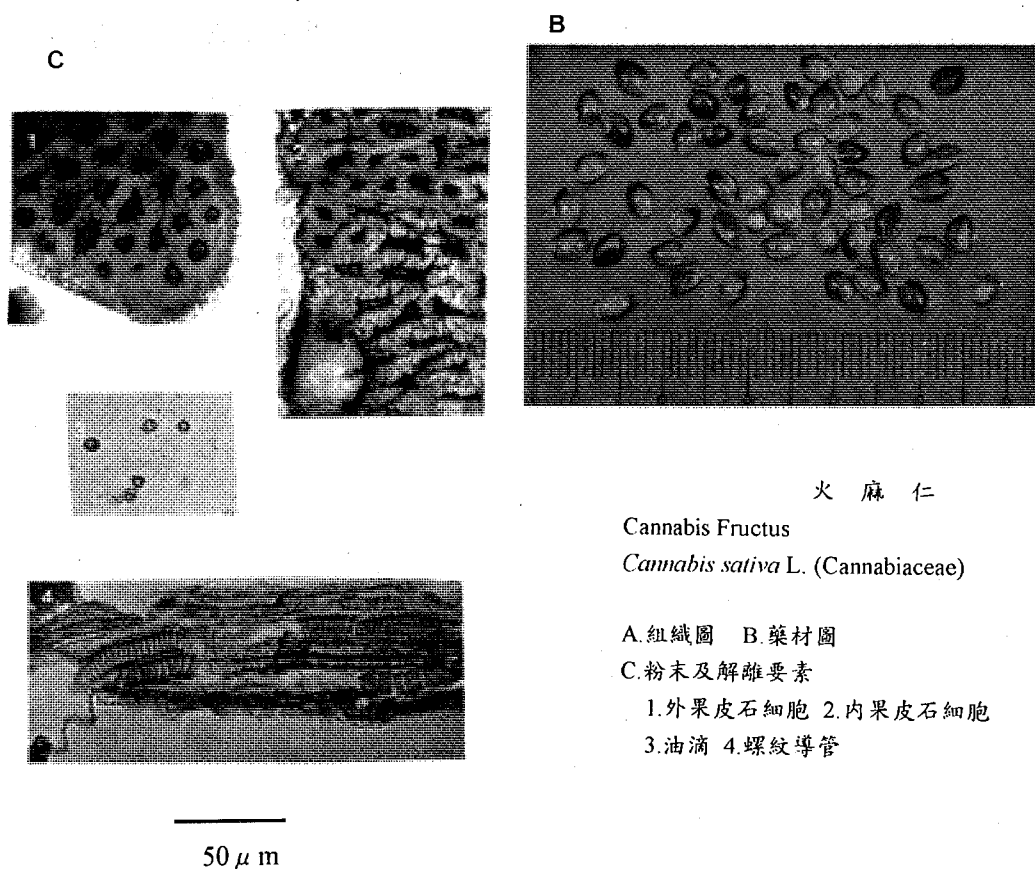
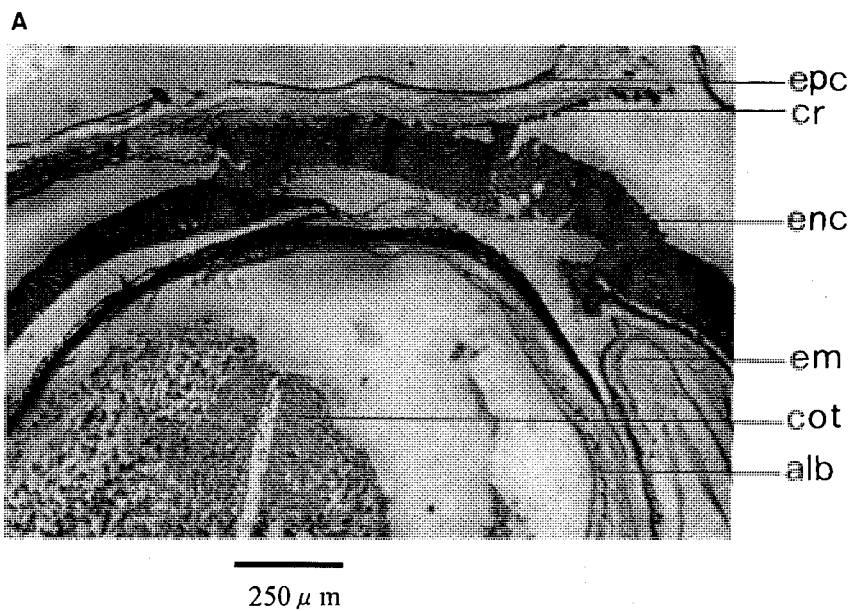
Cannabis sativa L. (Cannabiaceae)

[組織鑑別]：

外果皮一層，為圓形至橢圓形之石細胞，層紋明顯。中果皮 2-4 層，細胞壁薄，內含色素，近內果皮之一層細胞含草酸結晶。內果皮由一層石細胞組成，細胞大小、形狀差異極大，呈長方形、多角形、三角形，胞腔狹窄，層紋、孔溝明顯。種皮表皮細胞壁薄，細胞界限不明，多黏附於內果皮上，不易分離。胚乳灰白色，圍繞於胚之四周。子葉細胞無色至淡黃色，含脂肪油滴。

[粉末鑑別]：

外果皮細胞呈片狀，淡黃色至無色，表面觀之呈不規則多角形，細胞大小不一，徑 10-50 μm 、長 60-90 μm 、厚壁。內果皮細胞成片，黃棕色。橫斷面觀之呈柵狀，長 70-220 μm 、寬 30-50 μm ，細胞間排列緊密，層紋、孔溝細密且明顯。草酸鈣結晶多見於中果皮薄壁細胞中，方晶、簇晶多見，偶亦可見砂晶。



火 麻 仁

Cannabis Fructus

Cannabis sativa L. (Cannabiaceae)

A. 組織圖 B. 藥材圖

C. 粉末及解離要素

1. 外果皮石細胞 2. 內果皮石細胞
3. 油滴 4. 螺旋導管

木 胡 蝶

Oroxyli Semen

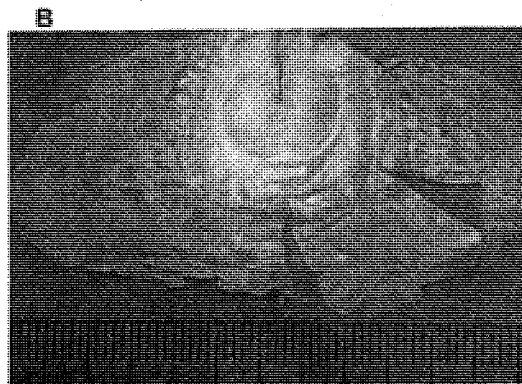
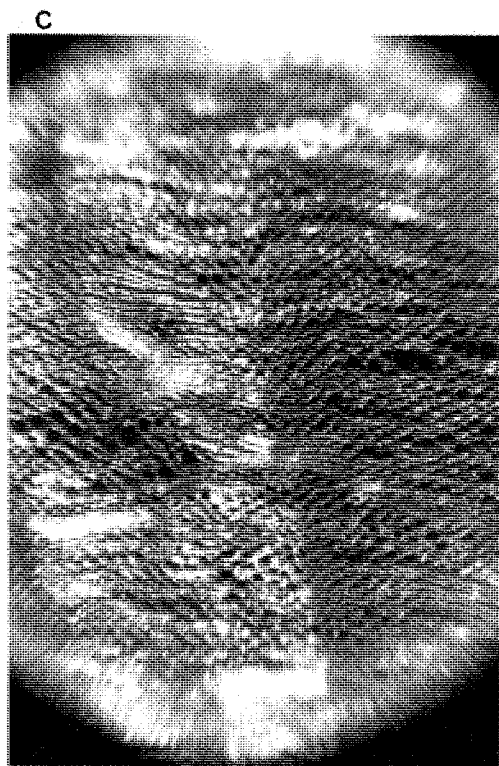
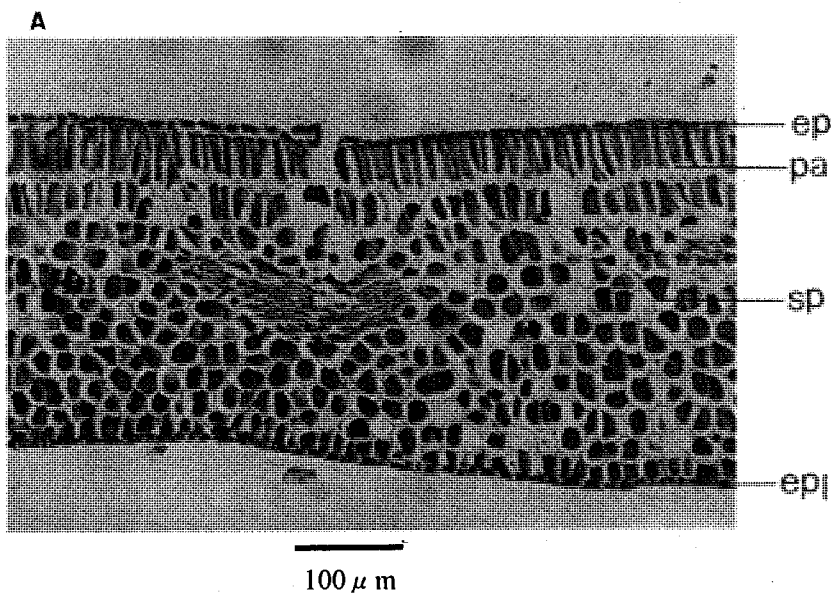
Oroxylum indicum (L.) VENT. (Bignoniaceae)

[性狀鑑別]：

藥材呈蝶形片狀，種皮三面延伸寬大薄膜狀之膜狀種翅，長 5-9 cm、寬 3-5 cm，淡乳白色、半透明、有光澤，邊緣多破裂。

[組織鑑別]：

薄膜狀之種皮細胞，細長條形或圓形、多層。胚乳細胞多角形，5-15 層。子葉之上表皮細胞長方形，排列緊密。表皮細胞下方一層柵狀組織內含油滴。柵狀細胞之下為海棉組織，細胞卵圓形至不規則狀，含油滴與澱粉粒，其中偶分佈小型維管束。下表皮近方形，比上表皮略小，排列亦緊密。



木 蝴蝶

Oroxyli Semen

Oroxylum indicum (L.) VENT. (Bignoniaceae)

A. 組織圖

B. 藥材圖

C. 種翅表面觀(10X)

柏 子 仁

Platycladi Semen

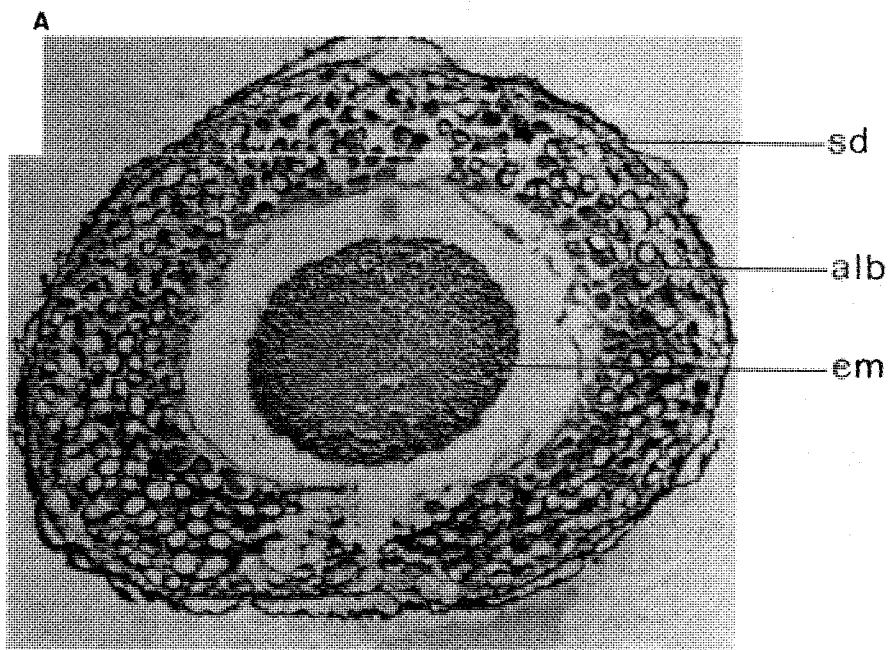
Platycladus orientalis (L.) FRANCO (Cupressaceae)

[組織鑑別]：

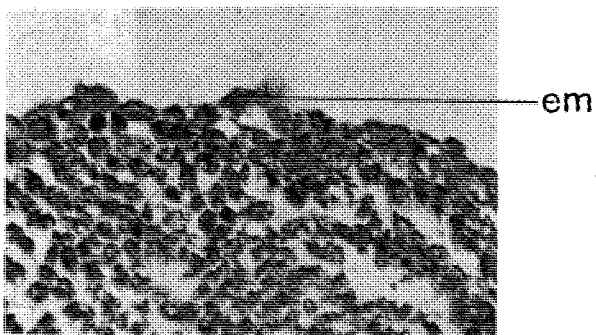
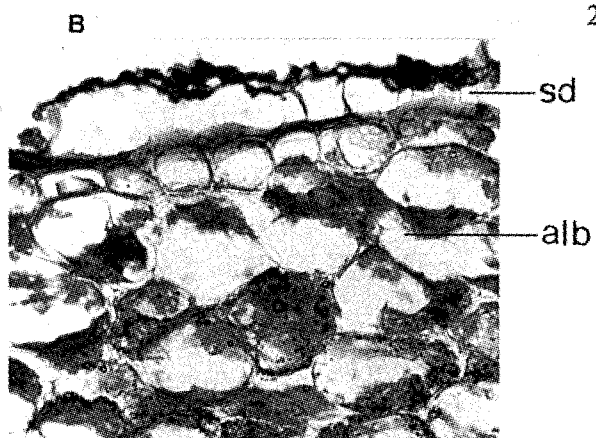
種皮表皮細胞為一層扁長方形細胞，內含淡棕色物，其下有厚壁細胞 1-2 層，細胞內含色素，再下有薄壁細胞多層。胚乳發達，呈多角形或類圓形，淡黃色至黃綠色，胞腔中充滿較大之澱粉粒與油滴，子葉細胞無色至淡黃綠色，呈長方形，排列整齊，胞腔中澱粉粒與油滴較小。

[粉末鑑別]：

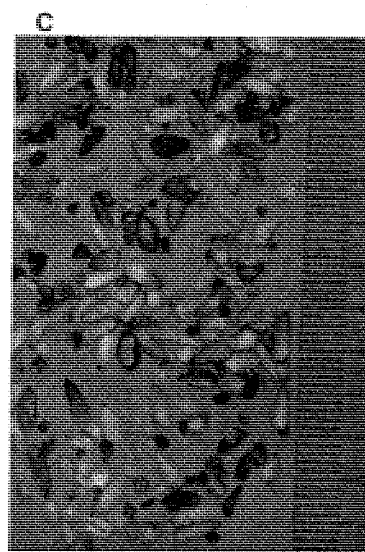
黃棕色粉末，多結成小塊狀，種皮細胞多呈長方形，常與其下之厚壁色素細胞連結，色素細胞之細胞界限不明顯。子葉細胞，呈長方形，排列整齊，長 10- 45 μm 。澱粉粒類圓形或橢圓形，徑 3-9 μm 。澱粉粒常伴生脂肪油滴。偶見種皮石細胞，淡黃色、多角形。



250 μ m



50 μ m



柏子仁

Platycladi Semen

Platycladus orientalis (L.) FRANCO (Cupressaceae)

A. 横切面圖

B. 組織圖

C. 藥材圖

玉 米 鬚

Maydis Stigma

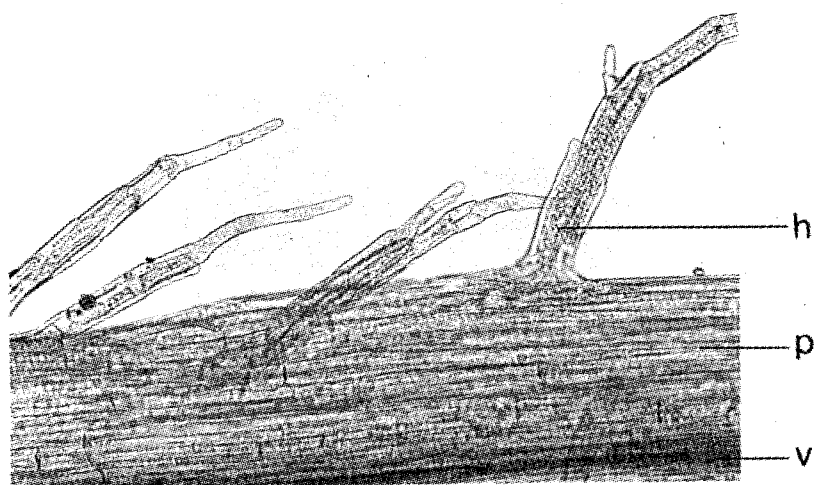
Zea mays L. (Gramineae)

[性狀鑑定]:

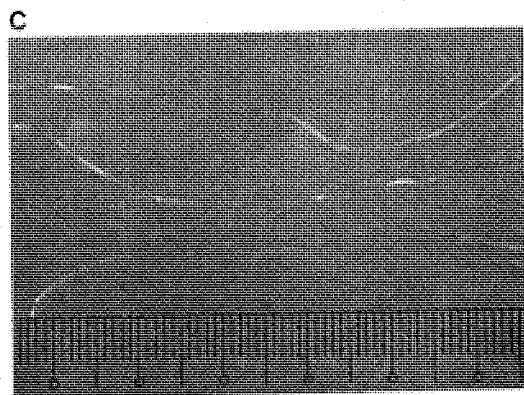
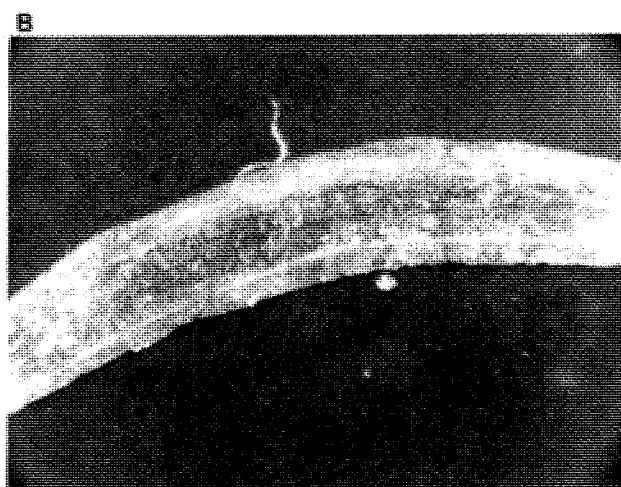
玉米鬚經常集結成膨鬆團塊狀，花柱呈細線或長鬚狀，長 10-25 cm。新鮮時呈淡綠色、黃綠色至黃褐色，有光澤、略為透明。乾燥後呈淡黃色或淺棕色。

[粉末鑑定]:

白色粉末。細胞長方形，壁略厚。表面有多細胞之非腺毛。導管以螺紋與環紋導管居多，徑 7-10 μm ，導管旁常伴生纖維。



100 μ m



玉米鬚

Maydis Stigma

Zea mays L. (Gramineae)

A. 組織圖

B. 外形圖

C. 藥材圖

墨 旱 蓮

Ecliptae Herba

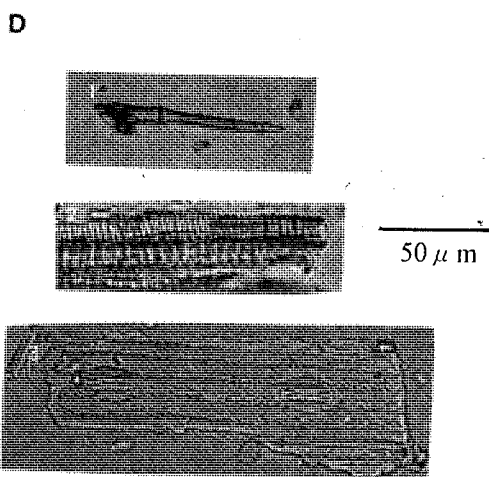
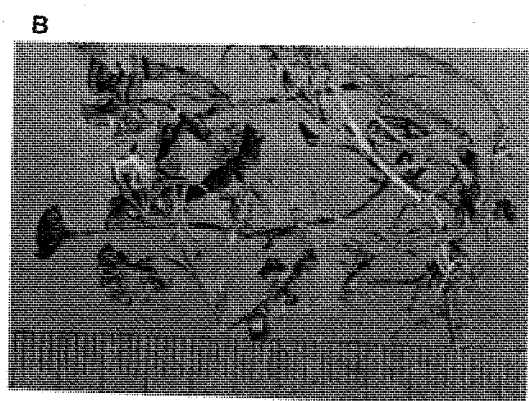
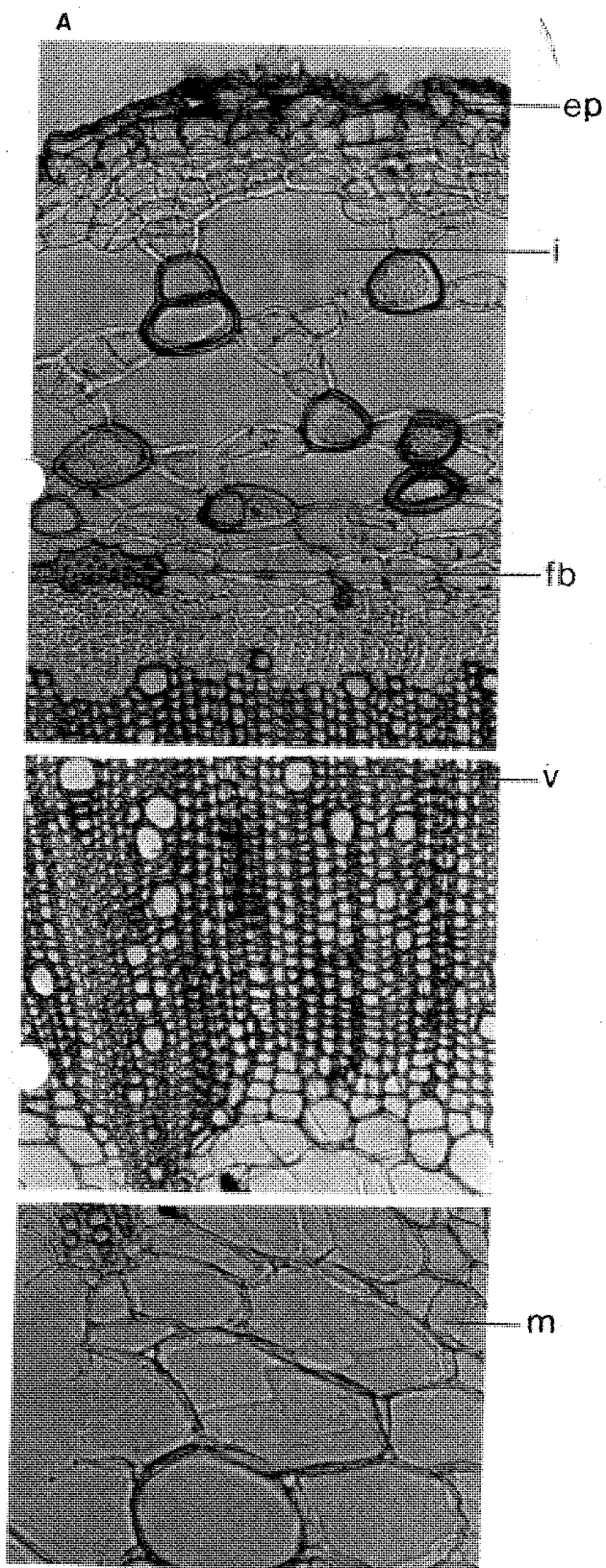
Eclipta prostrata L. (Compositae)

[組織鑑別]：

表皮具非腺毛；表皮細胞一層，其下有薄壁細胞細胞 3 - 6 層，類橢圓形，排列緊密。皮層由類橢圓形至類長方形組成，細胞多間隙，呈海棉組織狀，其中夾有單個存在，細胞壁木化之大形纖維細胞，類三角形。中柱鞘纖維散生。韌皮部、形成層不明顯；木質部較為寬大，導管多角形或圓形，大小不等，徑 15 -25 μm 。纖維木化，髓線為 2 - 6 層放射狀生長之薄壁細胞組成。中央髓部為類圓形之大型薄壁細胞組成。

[粉末鑑別]：

灰綠色粉末。非腺毛多由 3 個細胞組成，長 70 -350 μm 。；表皮細胞類橢圓形，排列緊密，細胞壁薄。皮層由類橢圓形至類長方形組成，細胞多間隙，呈海棉組織狀，其中夾有單個存在，細胞壁木化之大形纖維細胞，類三角形，徑 75 - 100 μm 。多見螺紋導管，徑 15 -25 μm 。髓部之類圓形大型薄壁細胞徑 300 - 350 μm 。



墨旱蓮

Eclipta Herba

Eclipta prostrata L. (Compositae)

A. 組織圖 B. 藥材圖 C. 植物圖

D. 粉末及解離要素

1. 非腺毛 2. 螺旋導管 3. 氣孔

金 線 蓮

Anoetochili Herba

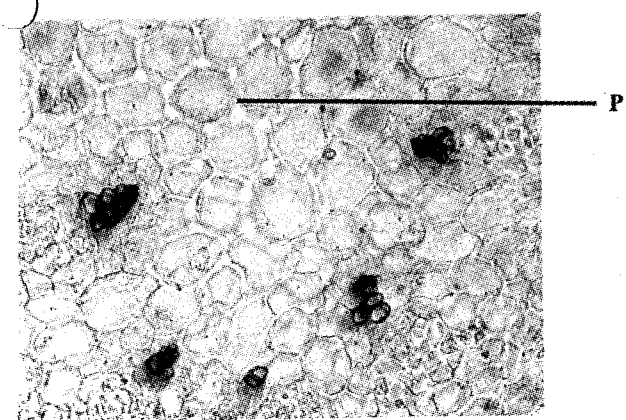
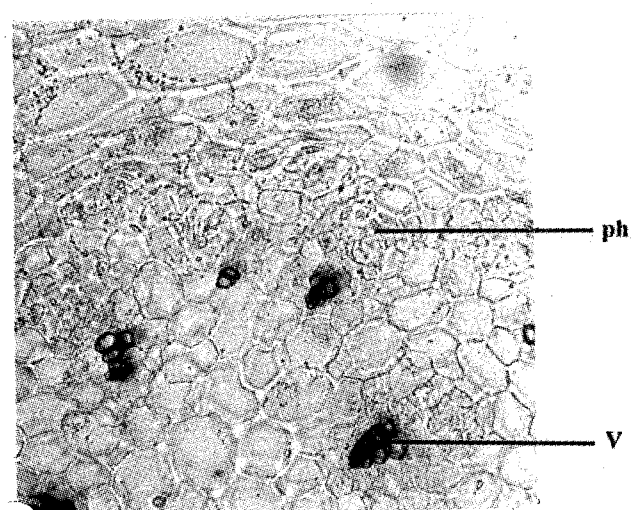
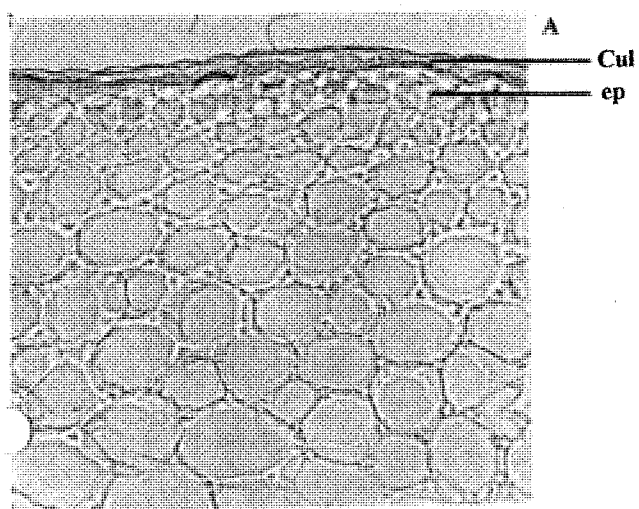
Anoetochilus formosanus HAY.(Orchidaceae)

[組織鑑別]：

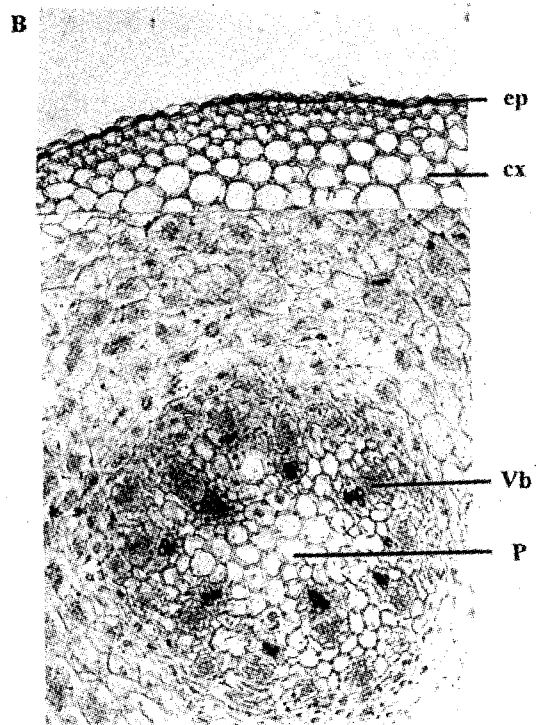
以顯微鏡檢視其橫斷面，最外部為表皮細胞，約 2-3 層，呈類圓形，約 16-24 μm ，外被角質層；內接皮層組織由類圓形或多角形細胞，約 22-50 μm ，其間有細胞間隙，細胞內含許多棕色物質。維管束呈放射狀排列，中間為髓部，其細胞呈圓形。

[粉末鑑別]：

本品粉末為紅棕色，表皮外有角質層保護，皮層的薄壁細胞內含許多棕色物質，導管類圓形，以環紋為主，直徑約 197-224 μm 。



50μm



金線蓮

Anoectochili Herba

Anoectochilus formosanus HAY. (Orchidaceae)

A.組織圖 B.橫切面略圖

C.植物圖

萊 菔 子

Raphani Semen

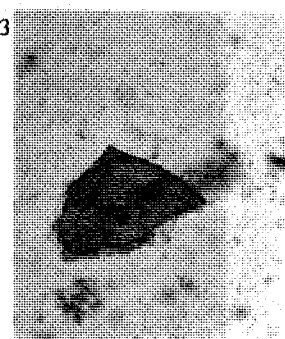
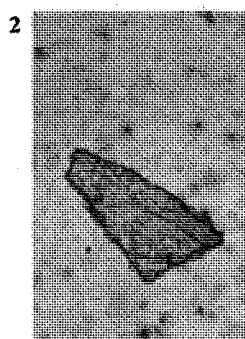
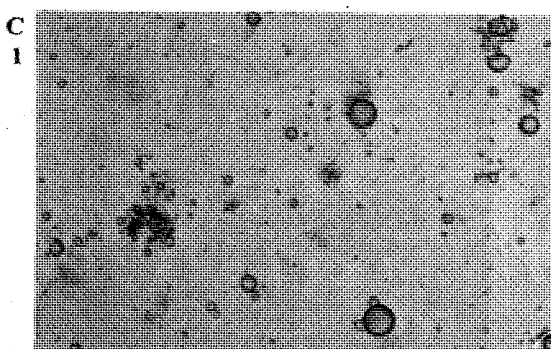
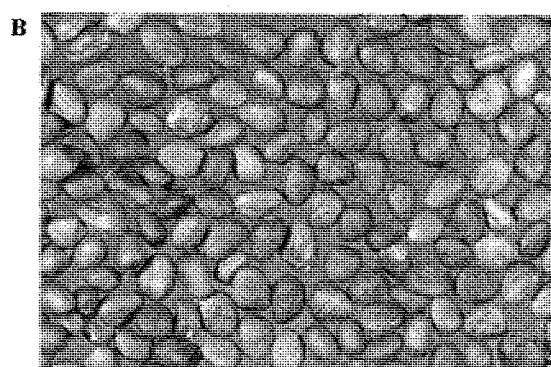
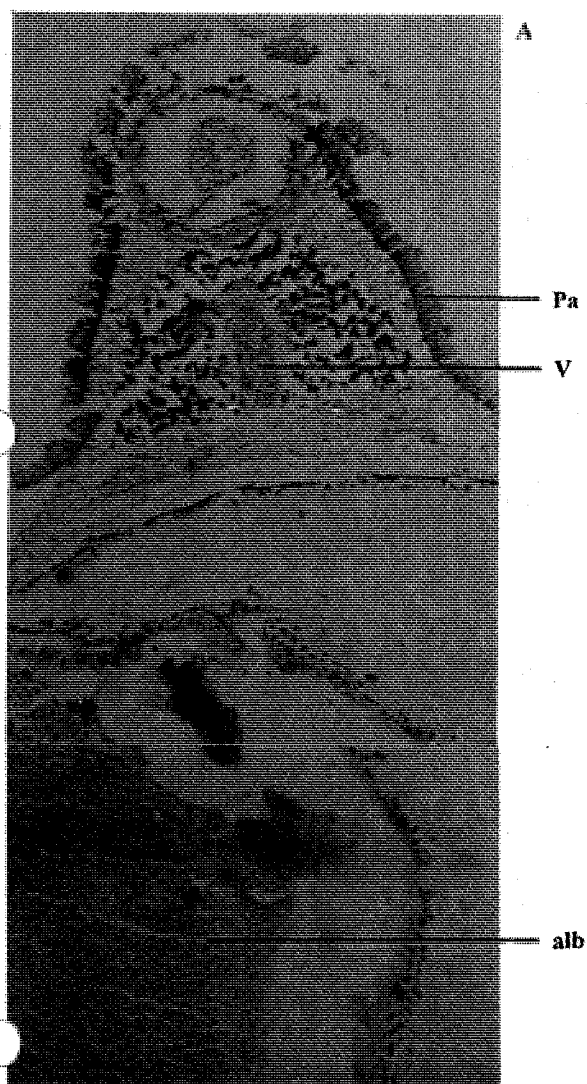
Raphanus sativus L.(Cruciferae)

[組織鑑別]：

萊菔子呈類圓形，長3-6 mm，寬2.5-3 mm，有黃棕色、紅棕色或灰棕色，一端有深棕色的臍點。從其橫斷面觀察，其最外一層為表皮細胞，接下為一層柵狀細胞層，木化，呈紅棕色，高約為10-21 μ m，柵狀細胞層下有色素層，內含紅棕色物質。內胚乳為扁平、類圓形的薄壁細胞，在胚根細胞中有糊粉粒及脂肪油的存在。

[粉末鑑別]：

本品粉末為黃棕色，表面觀察呈類多角形，種皮柵狀細胞成片，紅棕色。內胚乳細胞呈扁平形，表面觀察成多角形，內含糊粉粒及脂肪油滴。



50μm

100μm

菜 菔 子

Raphani Semen

Raphanus sativus L.(Cruciferae)

A.組織圖

B.藥材圖

C.植物圖 1.脂肪油滴 2.子葉細胞 3.柵狀種皮細胞之表面

吳 茱 萸

Evodiae Fructus

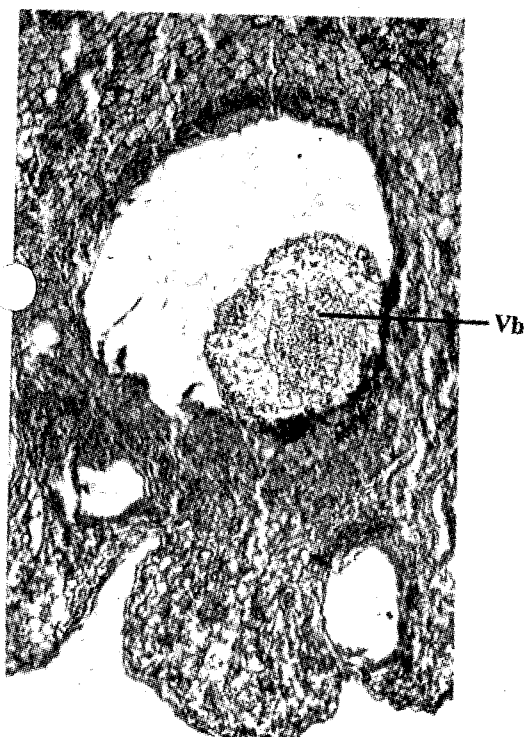
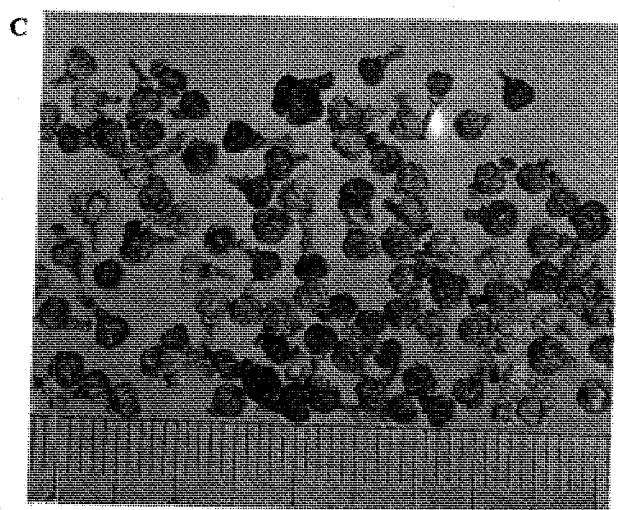
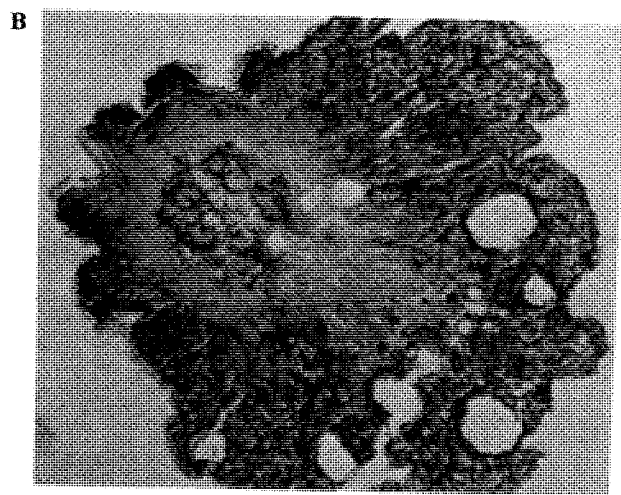
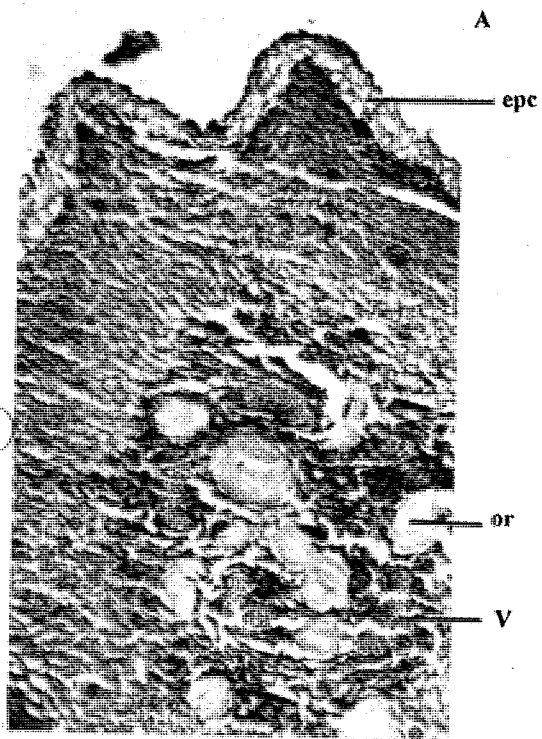
Evodia rutaecarpa BENTH.(Rutaceae)

[性狀鑑別]：

吳茱萸呈類球形或五角扁球形，直徑 2 - 5mm，高約 1-3 mm，表面暗棕色頂端下凹，呈五瓣瓣裂隙，基部有花萼及短小果柄。質硬而脆，具有濃郁的香氣。

[組織鑑別]：

果實呈圓形，內部分裂為五室，外果皮為 1-2 層類圓形的薄壁細胞所組成，中果皮較厚，全為薄壁細胞，有油室散於其間，油室直徑約為 26 - 32 μ m，細胞中含有許多草酸鈣簇晶，近內果皮更密，簇晶大小約 30 - 34 μ m。



50μm

吳 茱 萸

Evodiae Fructus

Evodia rutaecarpa BENTH. (Rutaceae)

A.組織圖 B.橫切面略圖

C.植物圖

辛 夷

Magnoliae Liliflorae Flos

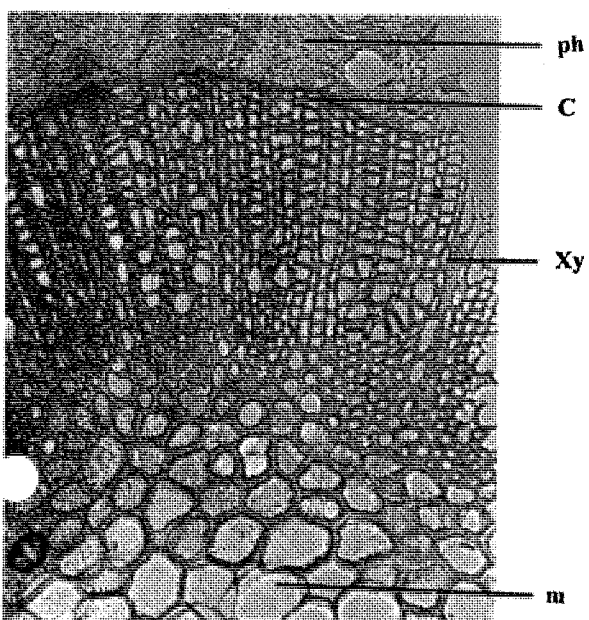
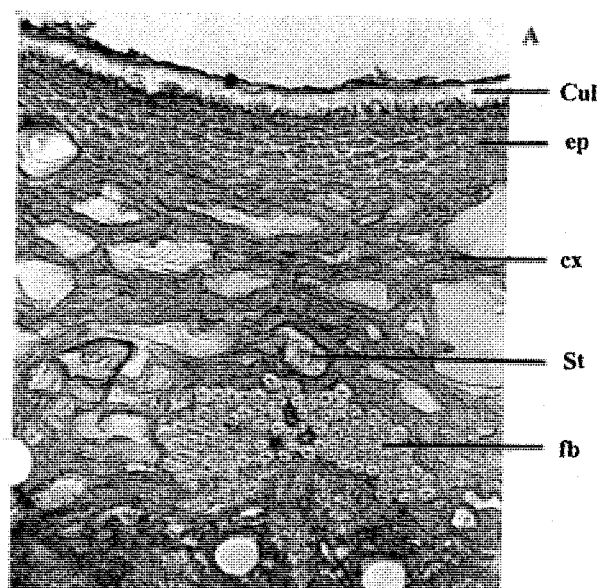
Magnolia liliflor DESR.(Magnoliaceae)

[性狀鑑別]：

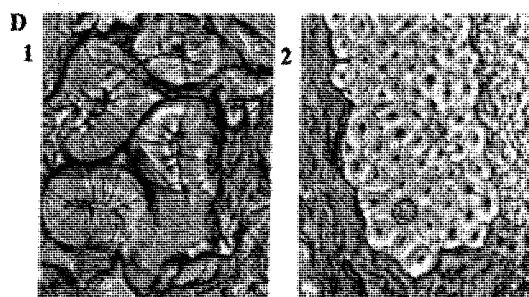
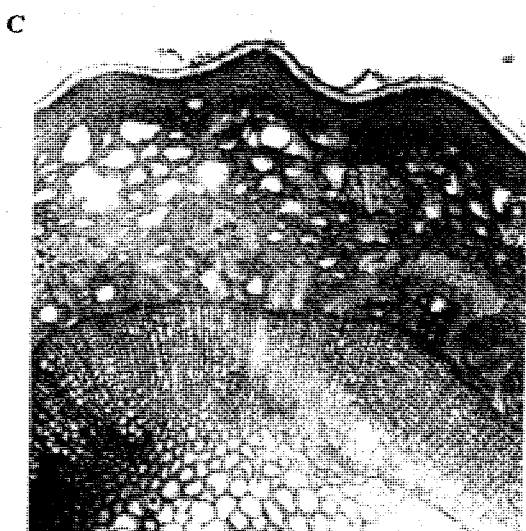
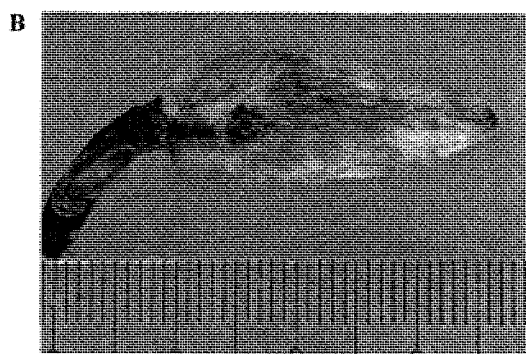
辛夷呈長卵形，似毛筆頭，長約 1.5 - 4 cm。基部長具短梗，苞片 2-3 層，苞片外表密被灰白色或灰綠色的茸毛，內表面暗棕色，無毛。

[組織鑑別]：

具有角質層，寬度約為 13 - 14 μ m，在角質層與皮層之間有乳狀形突起，外皮層約 6-8 層呈長方形，細胞壁較厚，纖維群及石細胞散於其間，石細胞的大小，徑約 115-117 μ m，並可見草酸鈣簇晶，約 15-16 μ m，屬於外韌形維管束，有髓。



50μm



100μm

辛 夷

Magnoliae Liliflorae Flos

Magnolia Liliflora DESR.(Magnoliaceae)

A.組織圖 B.植物圖 C.橫切面略圖

D.粉末及解離要素 1.石細胞 2.纖維及結晶

胡 桃

Juglandis Semen

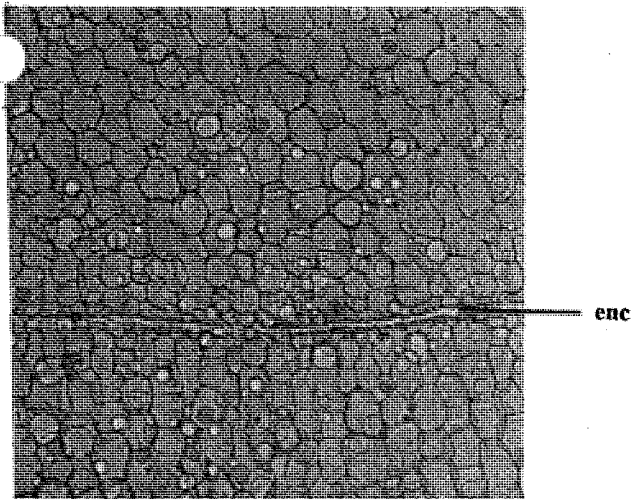
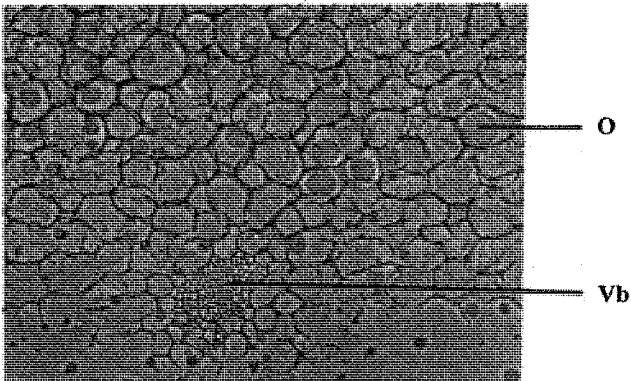
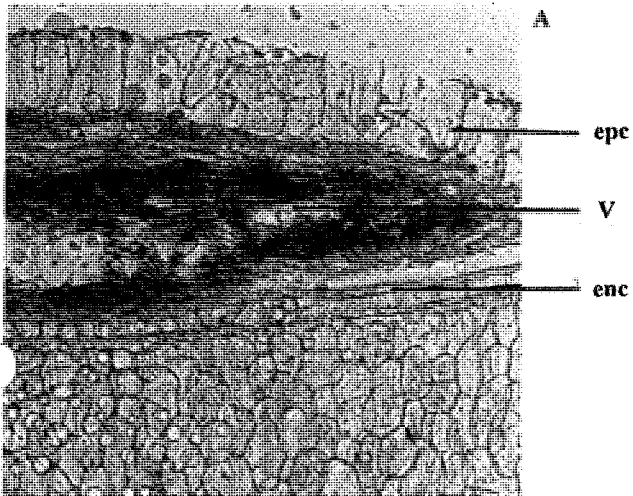
Juglans regia L. (Juglandaceae)

[性狀鑑別]：

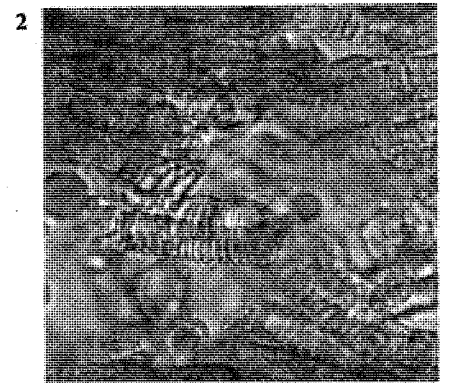
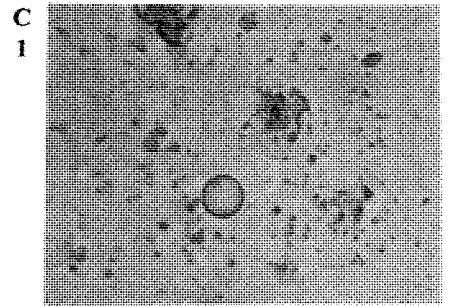
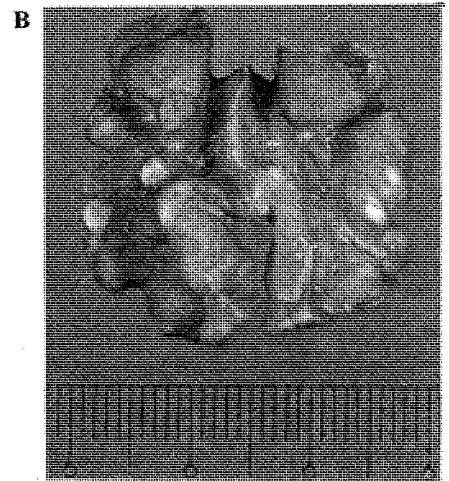
胡桃仁是胡桃的種子，種子由 2 片呈腦狀的子葉所構成，子葉大小約為 2.5-3 cm，其表面淡棕色，有深色脈紋，破碎後可見其內部成黃白色或乳白色，富油質。

[組織鑑別]：

種皮表皮細胞呈類方形，表皮下有一種脊維管束，內的導管以螺旋紋為主，有一圈內胚乳將其分隔出內外皮層，內皮層為多層類圓形的薄壁細胞，時有小型的維管束散在其間。本品粉末呈黃褐色，脂肪油滴隨處可見。



50μm



胡桃
Juglandis Semen
Juglans regia L. (Juglandaceae)

A. 組織圖 B. 植物圖
C. 粉末及解離要素 1. 油滴 2. 導管

咸 豐 草

Bidens Herba

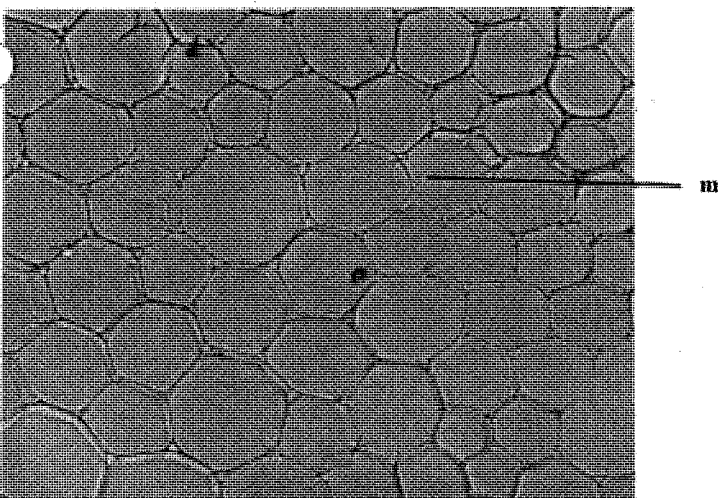
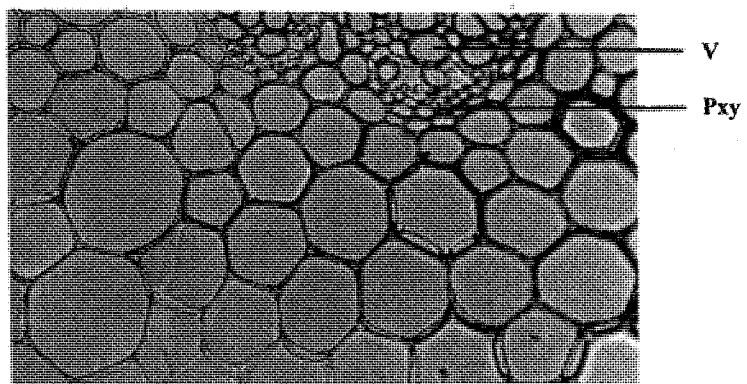
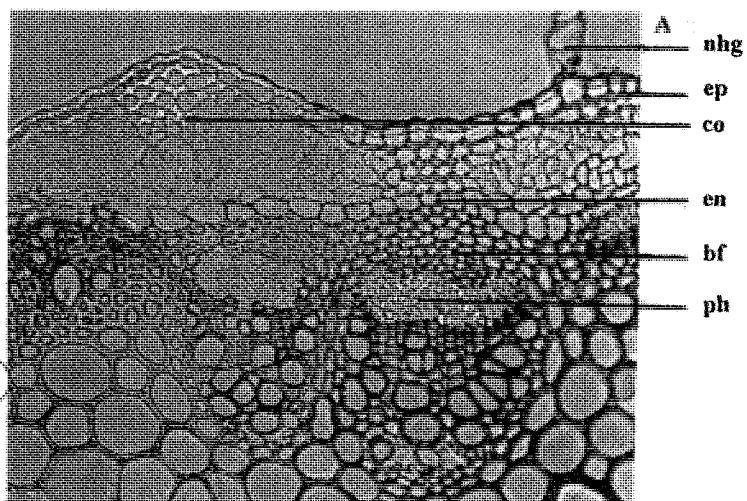
Bidens pilosa L. var *minor* (BL) SCHEFF(Compositae)

[組織鑑別]：

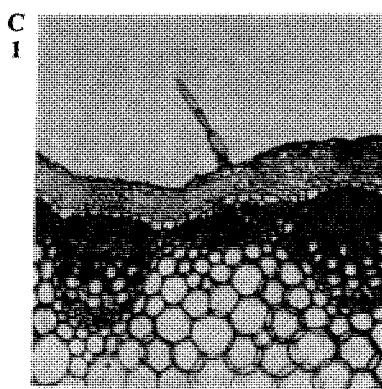
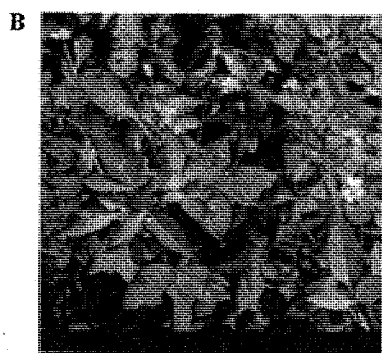
表皮為一層長圓形細胞所組成，徑 $7-18\ \mu\text{m}$ ，外有角質層覆蓋，皮層由 7-8 層薄壁細胞所組成，且其四個稜角處有厚角細胞，內皮層的細胞較大，約 $15-22\ \mu\text{m}$ ，呈長橢圓形。韌皮纖維群位於韌皮部外側，斷續呈環狀，纖維壁厚，微木化。韌皮部較為狹小，木質部的導管成圓形，單個或雙個並層且徑向排列。髓部寬廣，占整個組織的大部分。

[粉末鑑別]：

本品粉末呈灰綠色，表皮細胞外有多細胞腺毛存在，其長約 $26-50\ \mu\text{m}$ ，靠近表皮處的皮層有厚角細胞及纖維群的出現。髓細胞，約 $27-56\ \mu\text{m}$ ，呈多角形，細胞間隙小。



100μm



咸 豐 草

Bidens Herba

Bidens pilosa L.var.minor (Compositae)

A.組織圖 B. 植物圖

C. 粉末及解離要素 1.多細胞腺毛

王 不 留 行

Vaccariae Semen

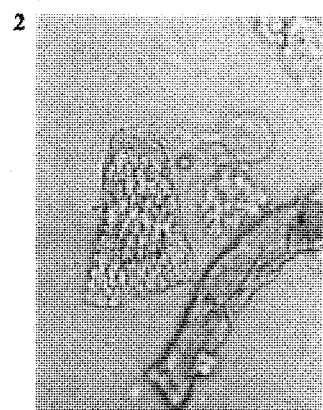
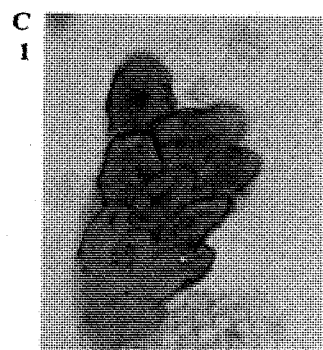
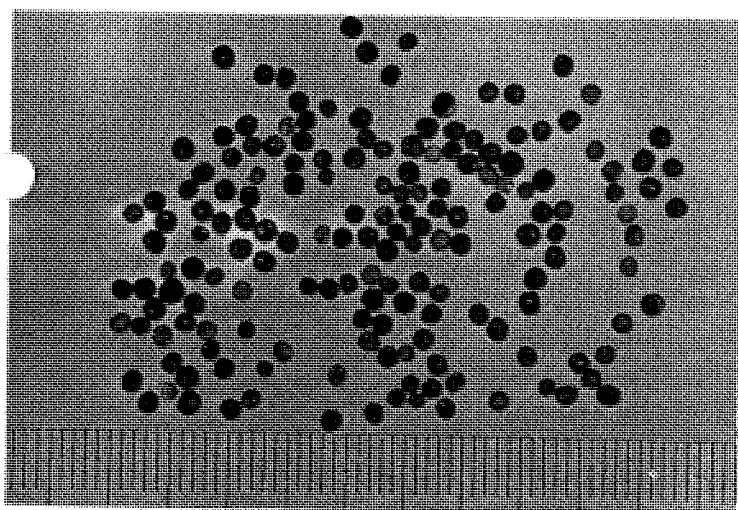
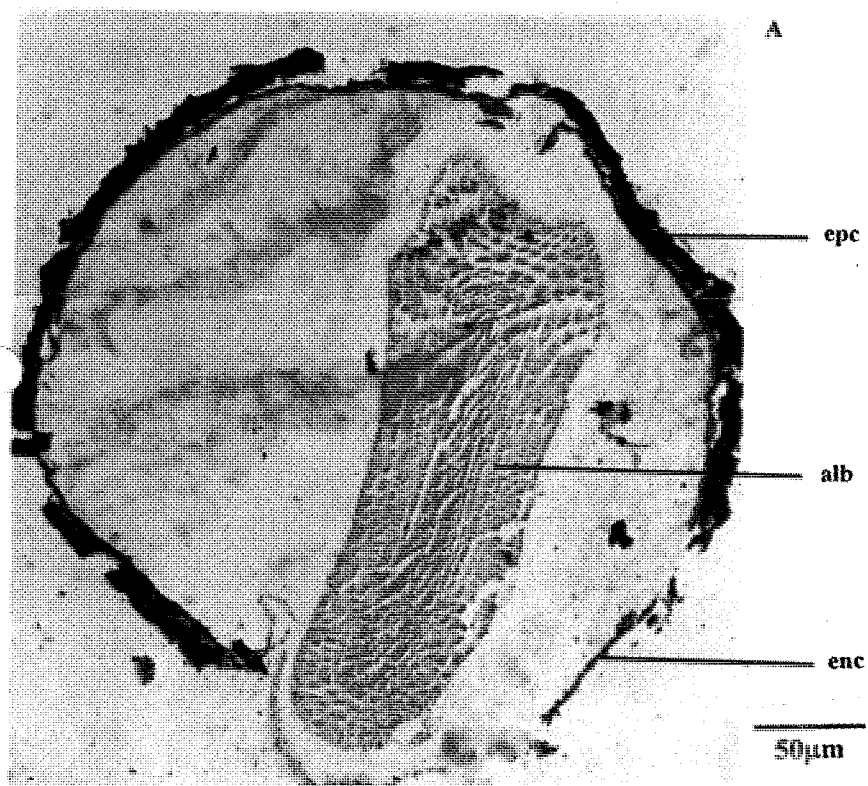
Vaccaria pyramidata MEDIC (Caryophyllaceae)

[組織鑑別]：

王不留行呈球形，徑 1-1.5mm，表面黑色，略有光澤，質硬。從種子的縱切面觀察，可見胚彎曲，胚乳佔極大部分。種皮表皮細胞棕黑色，波狀性彎曲。種皮內表皮細胞紅棕色。胚乳細胞呈多角形、或類橢圓形，胞腔內充滿澱粉粒。

[粉末鑑別]：

本品粉末呈灰褐色，種皮碎片呈紅棕色，胞腔明顯，呈類橢圓形，可見層紋。胚乳細胞較大，呈多角形或類橢圓形，胞壁較薄，內含澱粉粒及糊粉粒。



100µm

王不留行

Vaccariae Semen

Vaccaria pyramidata MEDIC

(Caryophyllaceae)

A.組織圖 B.藥材圖

C.粉末及解離要素 1.表皮細胞

2.胚乳細胞

枸 杞

Lycii Fructus

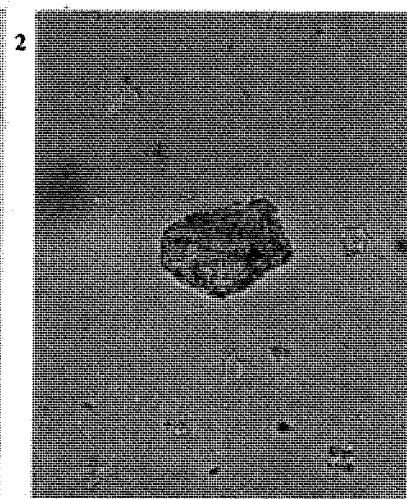
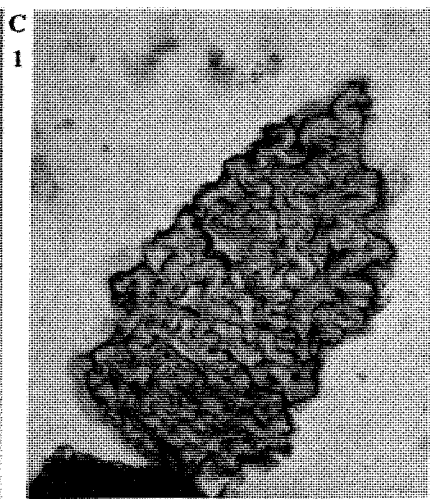
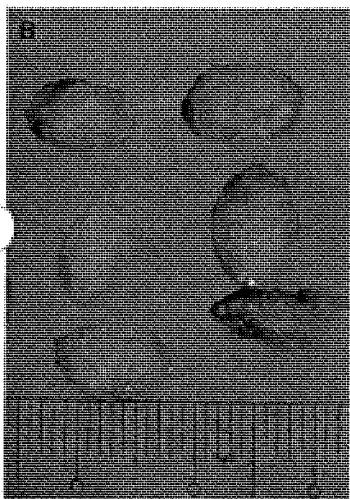
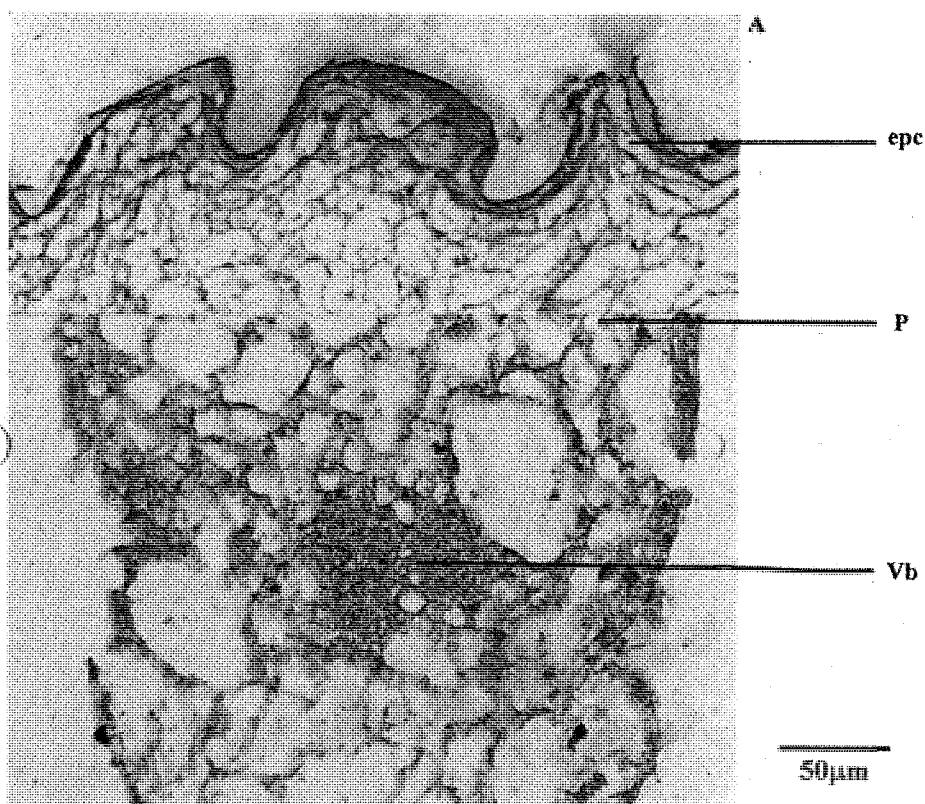
Lycium chiaense MILLER. (Solanaceae)

[性狀鑑別]：

枸杞果實呈長卵圓形或紡錘形，色澤為紅色或橘紅色，其外果皮具不規則皺摺，長約 8-10 mm。內含許多黃色種子。

[組織鑑別]：

其橫斷面呈類圓形，外果皮柔韌，是由一層較厚細胞壁的扁平細胞所組成。中果皮是由多層的薄壁細胞所組成，其中愈靠近外層一-二層的薄壁細胞較小，而愈靠近中央者則細胞愈大。薄壁細胞內含有草酸鈣砂晶，其內部具有多數個的雙韌形維管束，散生於皮層間。



枸 杞

Lycii Fructus

Lycium chinense MILLER. (Solanaceae)

A. 組織圖 B. 藥材圖

C. 粉末及解離要素 1. 種皮石細胞 2. 果皮表皮細胞

麥 芽

Hordei Germinati Fructus

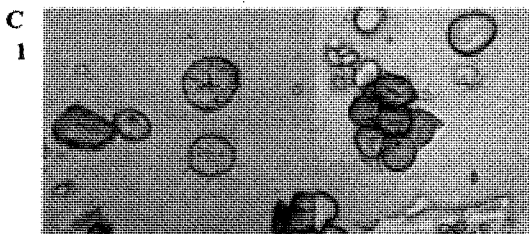
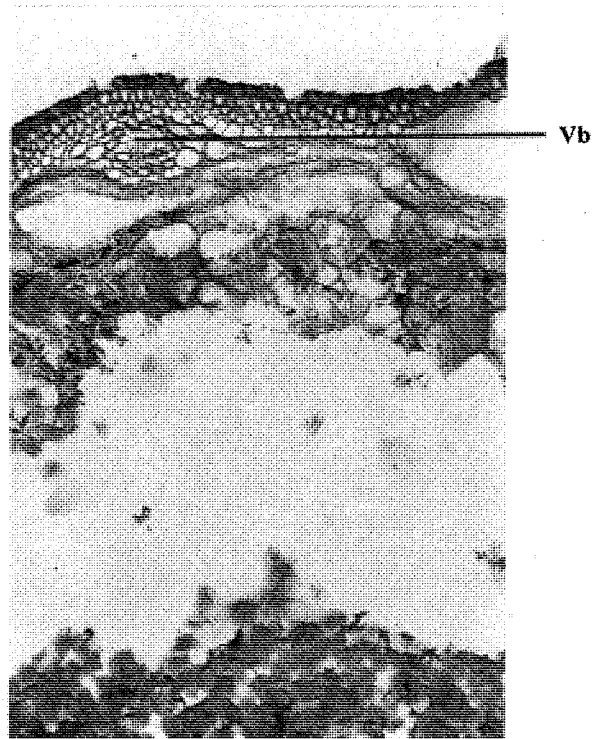
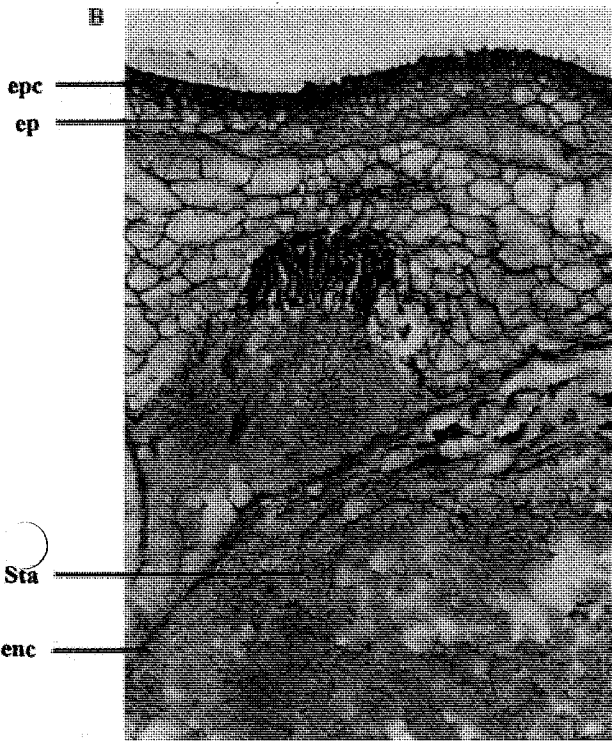
Hordeum vulgare L. (Gramineae)

[性狀鑑別]：

麥芽呈梭形，兩端狹尖，長約 10 - 15 mm，基部鈍圓，頂端微凸，背部胚處長出胚芽或鬚根，質硬。橫斷面呈粉性，白色。

[組織鑑別]：

表皮細胞呈細小念珠狀增厚，有維管束的分布，內果皮內含有許多澱粉粒，其呈扁平的圓形、橢圓形或卵圓形直徑約 8 - 28 μ m，可見其條狀臍點；層紋不明顯。



50μm

麥 芽
Hordei Germinati Fructus
Hordeum vulgare L. (Gramineae)

A.藥材圖 B.組織圖
C.粉末及解離要素 1.澱粉粒

250μm

穀 芽

Oryzae Germinati Fructus

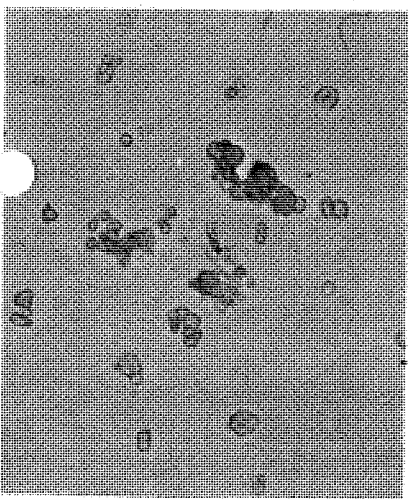
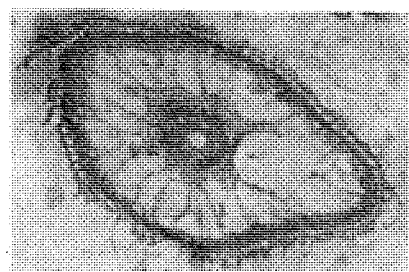
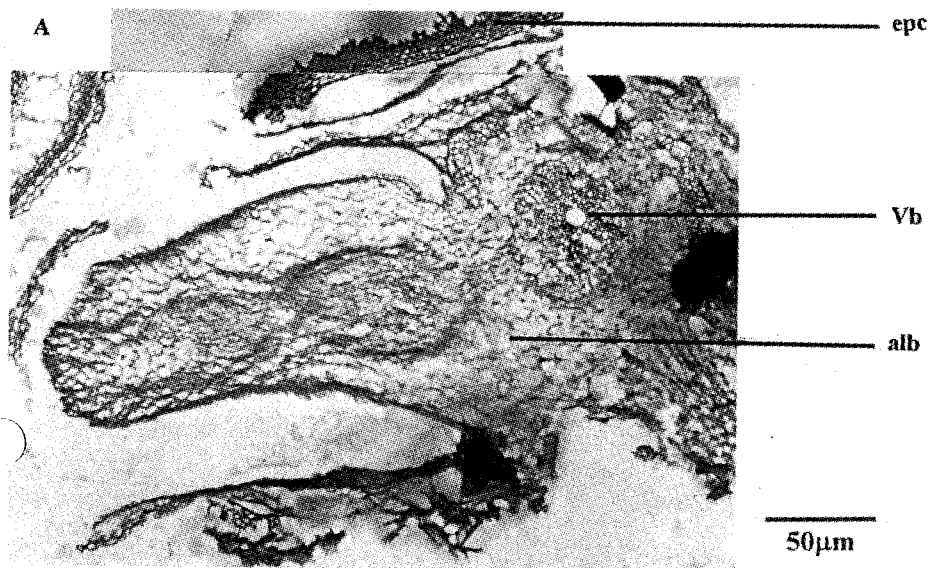
Oriza sativa L. (Gramineae)

[性狀鑑別]：

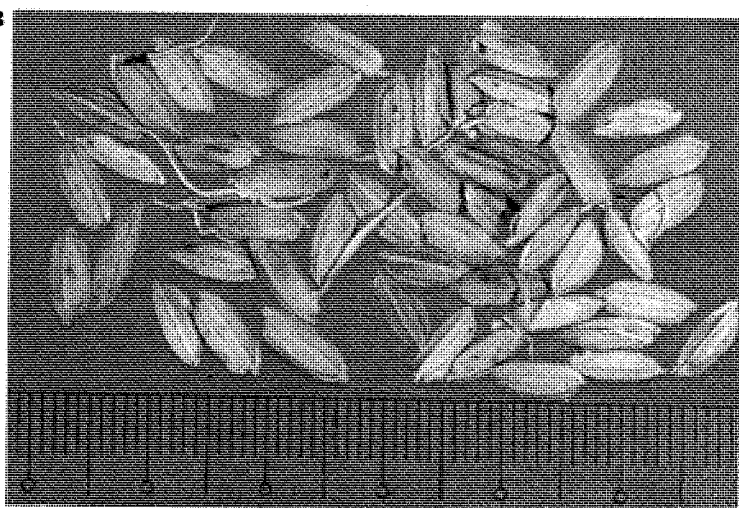
穀芽呈橢圓形，兩端狹尖，長約 8 - 10 mm，基部鈍圓，頂端微凸，開裂處易長鬚根，質硬。橫斷面呈粉性，白色。

[組織鑑別]：

果實內部含有許多澱粉粒，呈單粒呈不規則多面形，邊緣尖銳約 6 - 13 μ m，可見其臍點，但層紋不明顯。全形多數呈卵圓形或圓形。



250μm



穀 芽
Oryzae Germinati Fructus
Oryza sativa L. (Gramineae)

A. 組織圖 B. 藥材圖
 C. 粉末及解離要素 1. 維管束 2. 澱粉粒

大 葉 千 斤 拔

Moghaniae Radix

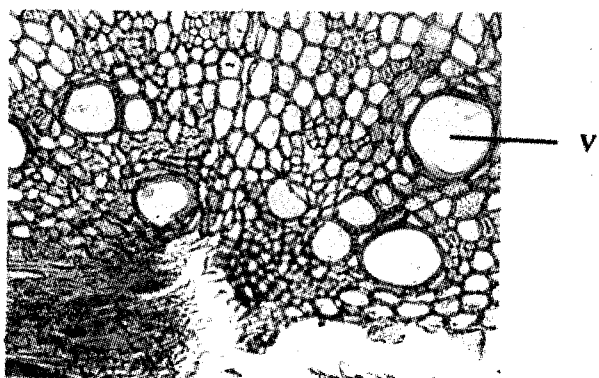
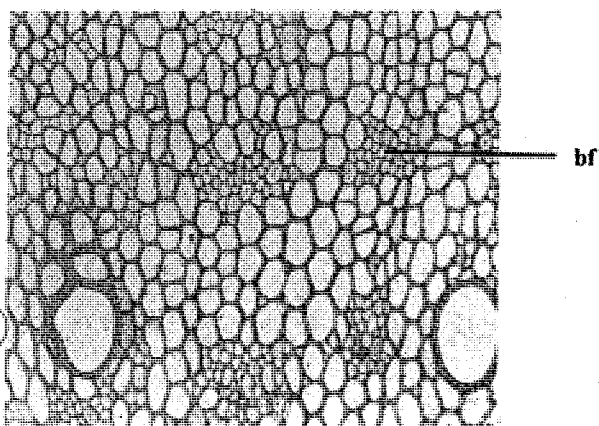
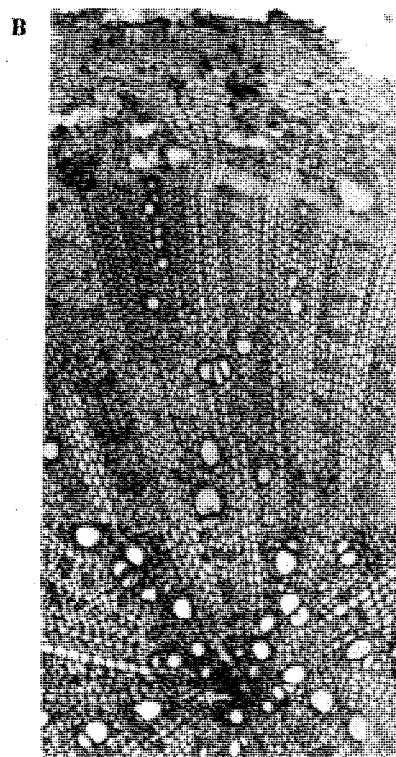
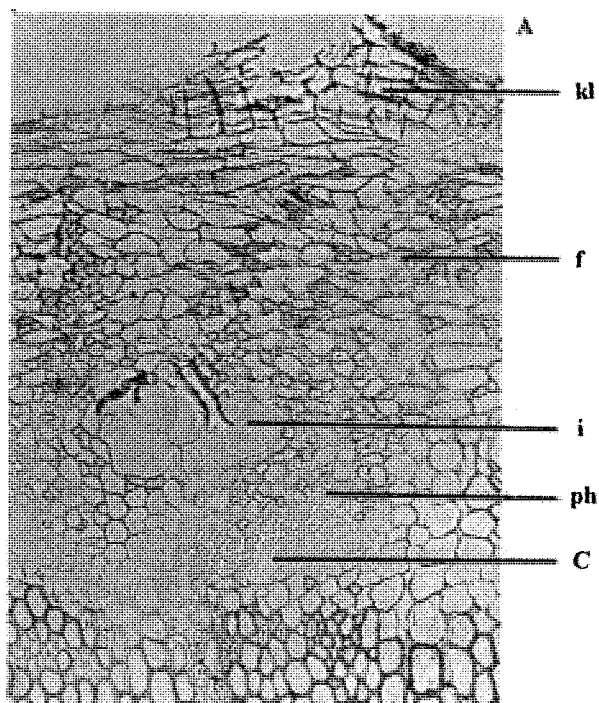
Moghania macrophylla (Leguminosae)

[組織鑑別]：

以顯微鏡觀察其橫斷面，最外層為木栓層，約有 8-15 層栓皮細胞所組成，細胞呈扁長方形排列，部分木栓層外緣多破裂；皮層多層，細胞呈長橢圓形、類長方形或類圓形，纖維散居其間；放射組織細胞呈長方形，2-5 層，外端與篩部彎曲，直達皮層；篩部與木部之間有 2-4 層形成層，為開放型維管束。木部由導管、木部的薄壁細胞及木部纖維所組成，導管單個或數個成群，大小不一，呈類圓形，是不規則放射狀排列，導管是以網紋為主及有緣孔紋，無髓。

[粉末鑑別]：

本品粉末呈灰綠褐色，木栓皮細胞呈扁長方形排列，長 16-18 μm ，寬 6-8 μm 。部分木栓層外緣多破裂；導管單個或數個成群，大小不一，呈類圓形，是不規則放射狀排列，導管是以網紋為主，徑約 37-40 μm ，澱粉粒多存於皮層，臍點明顯，單粒或複粒，徑 25-27 μm 。



50μm

大葉千斤拔

Moghaniae Radix

Moghania macrophylla (Leguminosae)

A.組織圖 B.橫切面略圖

C.植物圖

水 丁 香

Ludwigiae Herba

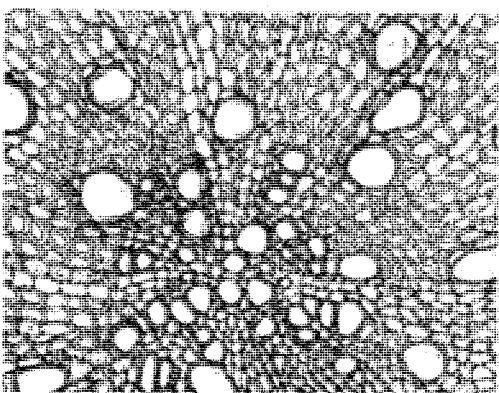
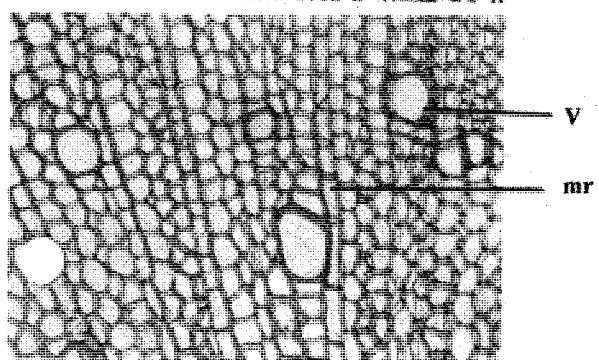
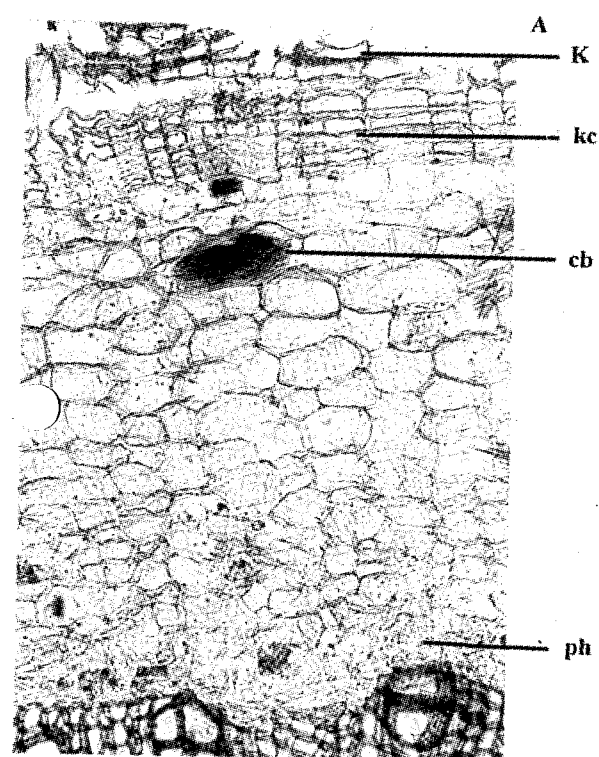
Ludwigia octovalvis Jacq.(Onagraceaea)

[組織鑑別]：

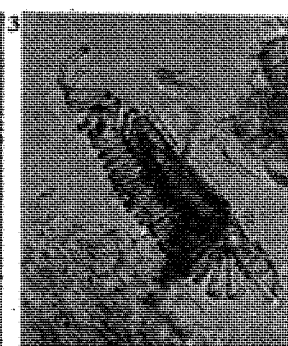
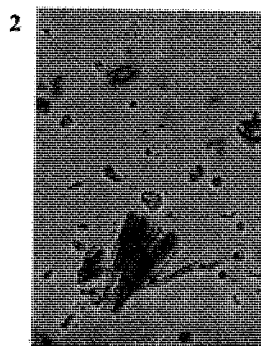
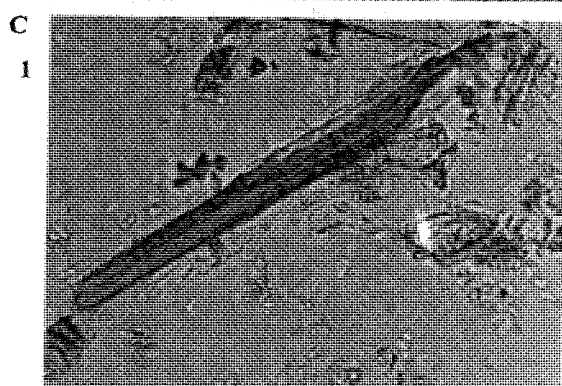
以顯微鏡觀察其橫斷面，最外層為木栓層，約有 7-10 層栓皮細胞所組成，細胞呈扁長方形排列，大小約 18-39 μm ，部分木栓層外緣多破裂；皮層多層，細胞呈長橢圓形、類長方形或類圓形，草酸鈣針晶存在此處；放射組織細胞呈類方形，2-5 層；篩部與木部之間有 1-2 層形成層，為開放並立型維管束。木部由導管、木部的薄壁細胞及木部纖維所組成，導管單個或數個成群，大小不一，呈類圓形，是不規則放射狀排列，導管是以螺旋紋為主，無髓。

[粉末鑑別]：

本品粉末呈灰綠褐色，木栓皮細胞呈扁長方形排列，長 18-39 μm ，寬 5-8 μm 。部分木栓層外緣多破裂；皮層內有針晶束及石細胞存在，針晶束大小約 18-50 μm ，石細胞長扁型，大小約長 197-210 μm ，寬 18-20 μm ；導管單個或數個成群，大小不一，呈類圓形，是不規則放射狀排列，導管是以螺旋紋為主。



50μm



100μm

水 丁 香

Ludwigiae Herba

Ludwigia octovalvis Jacq. (Onagraceae)

A. 組織圖 B. 植物圖

C. 粉末及解離要素 1. 石細胞 2. 針晶束

3. 螺旋紋導管

刺 莧

Amaranthi Herba

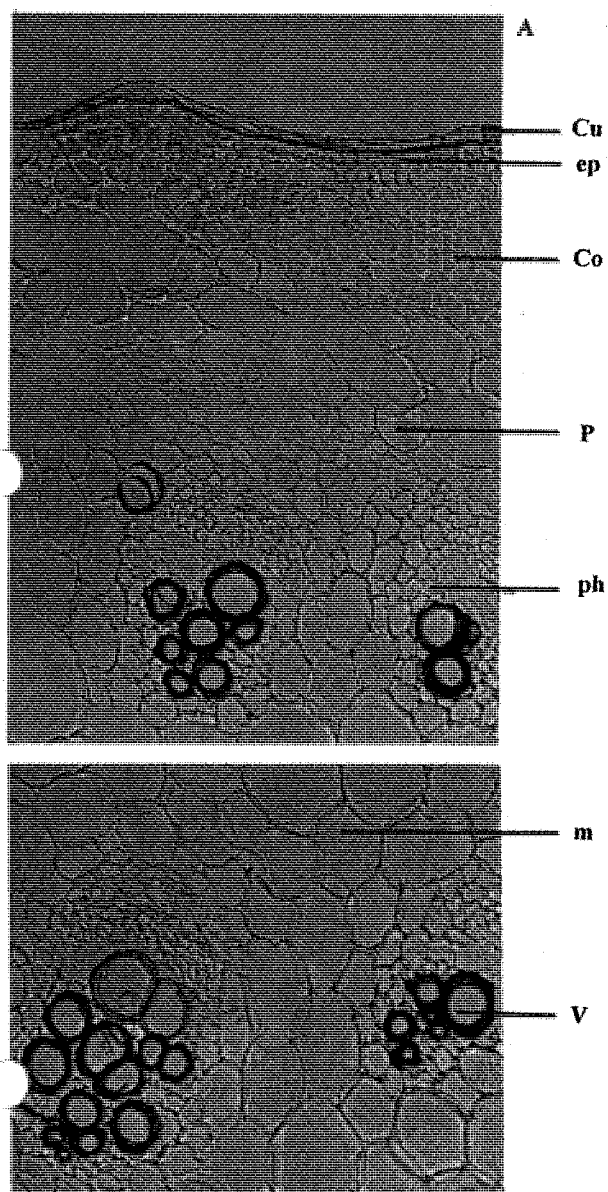
Amaranthus spinosus L.(Amaranthaceae)

[性狀鑑別]：

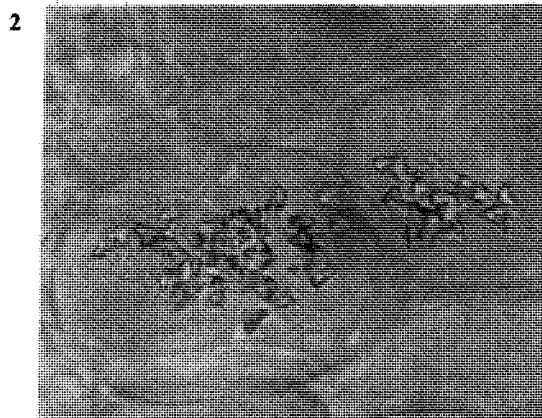
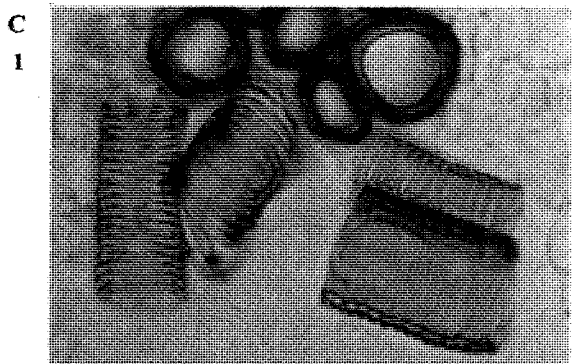
以顯微鏡觀察其橫斷面，表皮層呈類長方形，外被為角質層，表皮層下的皮層細胞，皮層多層，細胞由小至大，類圓形、長橢圓形或類長方形，愈靠近表皮的皮層細胞成厚角化，草酸鈣簇晶存在此處；篩部與木部相互並立，並立型維管束。導管單個或數個成群，大小不一，呈類圓形，導管是以環紋為主，有髓。

[粉末鑑別]：

本品粉末呈灰綠褐色，有角質層覆於表皮層外。皮層較為寬廣，愈靠近表皮，細胞壁厚化成厚角細胞，草酸鈣簇晶存於此處，約 $39-42\ \mu\text{m}$ ；導管單個或數個成群，大小不一，約 $78-106\ \mu\text{m}$ ，呈類圓形，導管是以環紋為主。



50μm



250μm

刺 莧

Amaranthi Herba

Amaranthus spinosus L.(Amaranthaceae)

A.組織圖 B. 植物圖

C.粉末及解離要素 1.導管 2.草酸鈣結晶

虎 杖

Polygoni Rhizoma

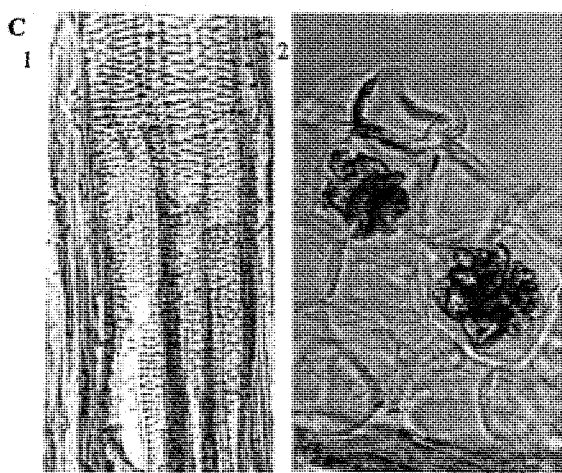
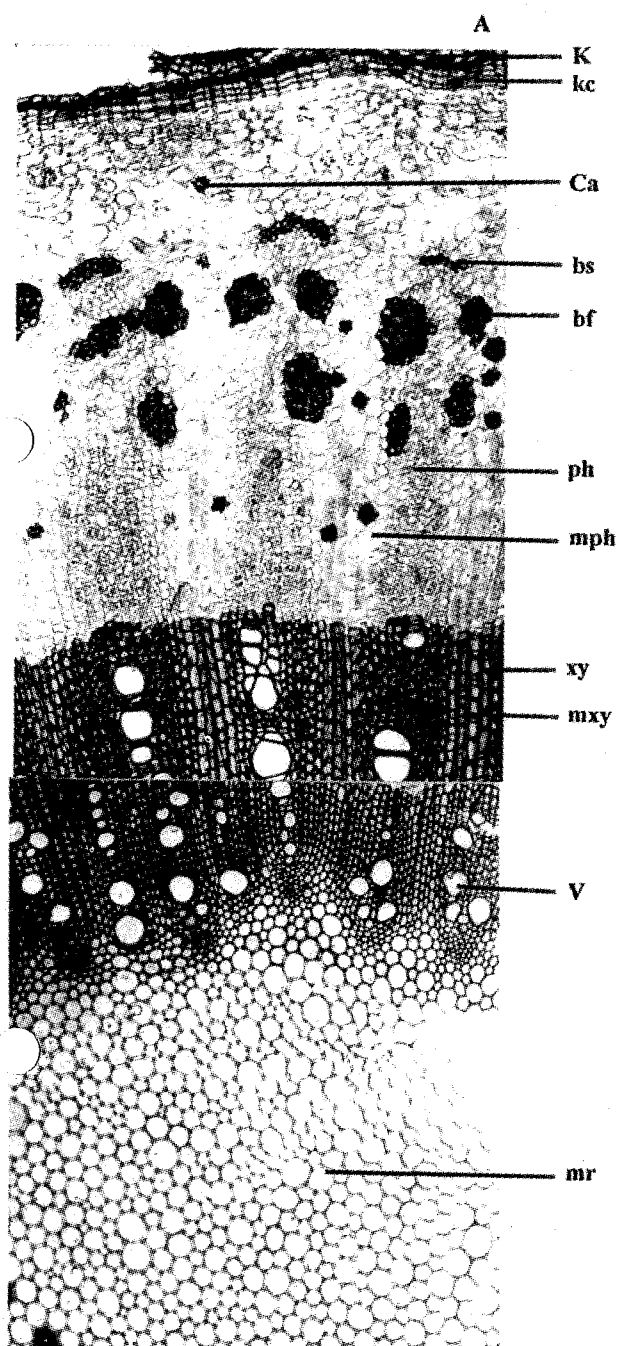
Polygonum cuspidatum S. et. Z. (Polygonaceae)

[組織鑑別]：

呈圓柱形或不規則塊片，外皮棕褐色，根莖有節，質堅韌，不易折斷。從其橫斷面觀察，最外層為木栓層，是由十多層的扁平細胞所組成。皮層及韌皮部有纖維束存在，形成層成環，外韌形維管束，木質部細胞均木化，具有木纖維。有髓，但髓細胞易破裂，薄壁細胞內含澱粉粒及草酸鈣簇晶。

[粉末鑑別]：

本品粉末呈黃棕色，在粉末鏡檢中，有許多草酸鈣簇晶，直徑 30-58 μ m，其導管為有緣孔紋，以環紋及網紋為主，徑 32-34 μ m。木部髓線細胞類長方形，細胞壁成念珠狀增厚，木化。



虎 杖

Polygoni Rhizoma

Polygonum cuspidatum S. et. Z.(Polygonaceae)

A.組織圖 B. 植物圖

C.粉末及解離要素 1.導管 2.草酸鈣簇晶

白 薇

Cynanchi Atrati Radix

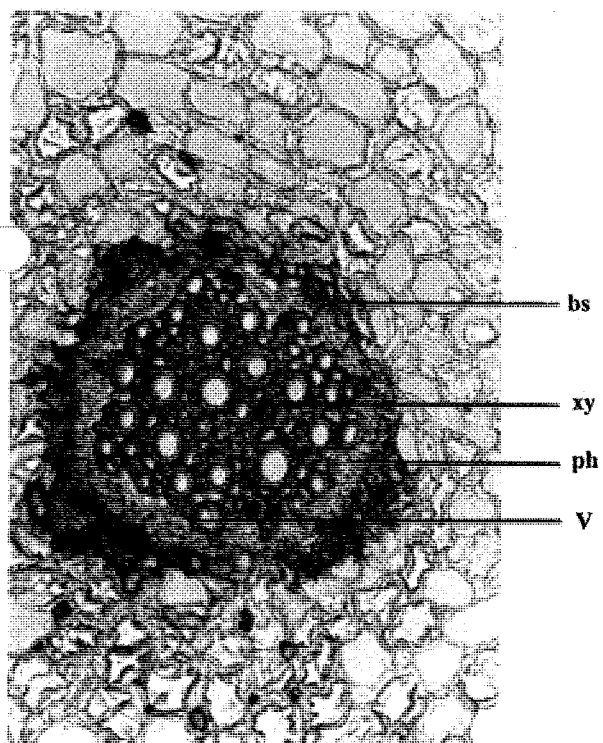
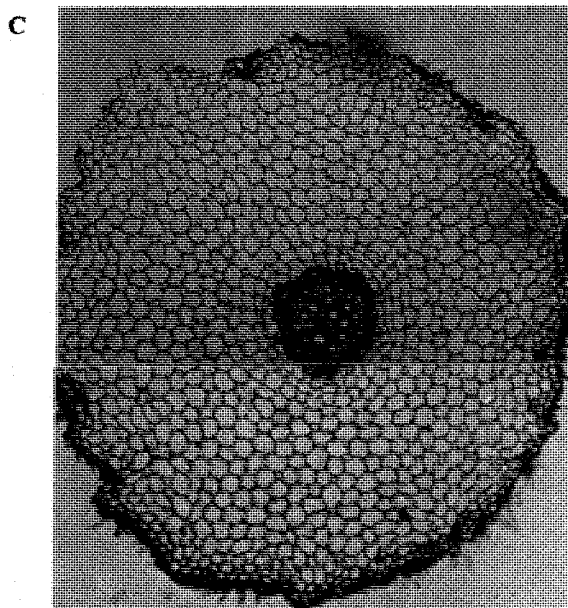
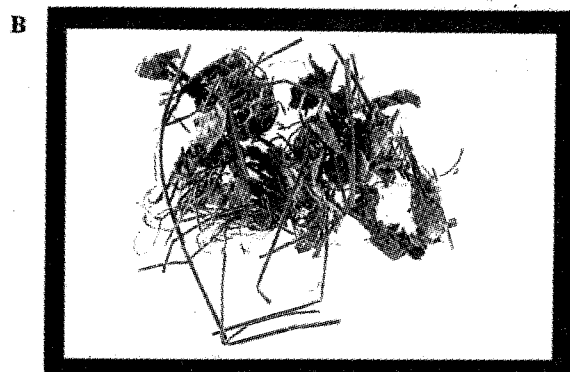
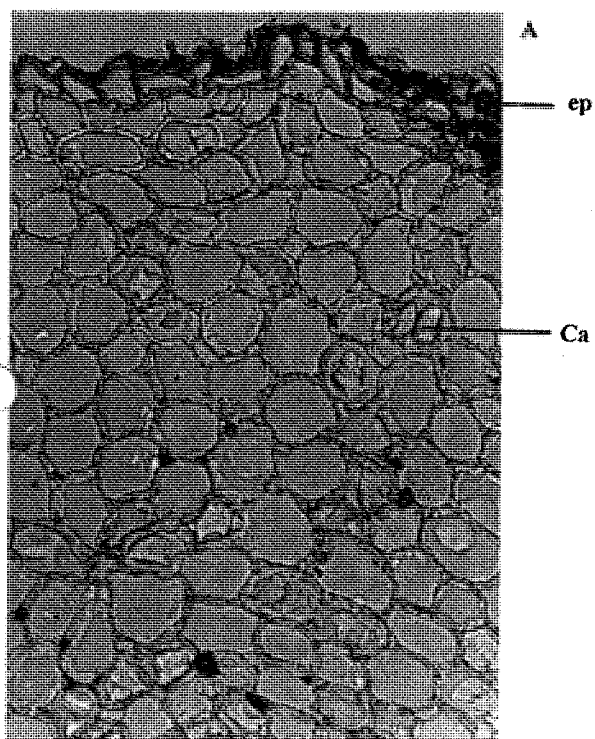
Cynanchum atratum BUNGE(Asclepiadaceae)

[組織鑑別]：

從本品橫斷面觀察，最外層為表皮層，是由一層多角形的細胞所構成，皮層寬廣，澱粉粒及草酸鈣簇晶存於其間，內皮層細胞明顯，中柱鞘為1-2層薄壁細胞所組成，韌皮部狹小，形成層成環，木部由導管、木部的薄壁細胞及木部纖維所組成，均以木化，導管單個或數個成群，大小不一，呈類圓形，導管是以有緣紋孔，網紋及螺旋紋為主。

[粉末鑑別]：

本品粉末呈黃褐色，表皮細胞呈多角形細胞單層排列，長 $24-26.3\ \mu\text{m}$ ，寬 $11-17.6\ \mu\text{m}$ 。皮層內有澱粉粒及草酸鈣方晶存於其間；導管單個或數個成群，大小不一，徑約 $42-42.5\ \mu\text{m}$ 呈類圓形，導管是以有緣紋孔，網紋及螺旋紋為主。



100μm

白 薇

Cynanchi Atrati Radix

Cynanchum atratum BUNGE(Asclepiadaceae)

A.組織圖 B.植物圖

C.橫切面略圖

臺 灣 山 豆 根

Sophorae Formosanae Radix

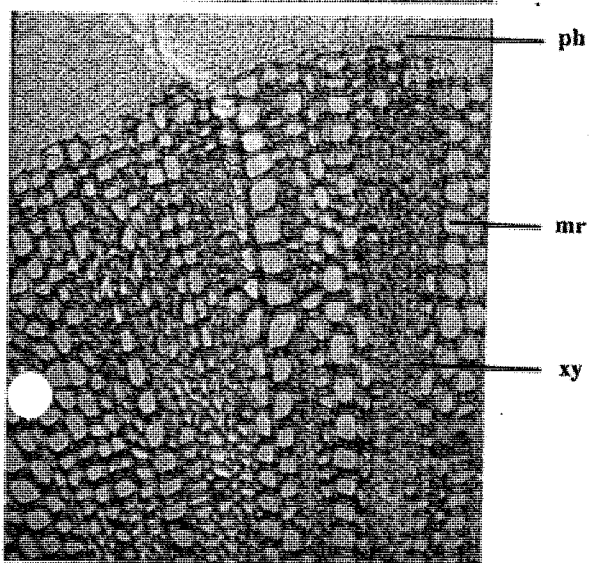
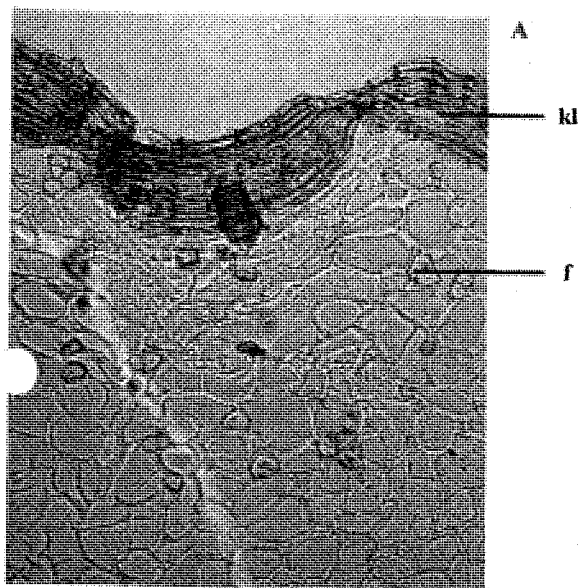
Euchresta formosana OHWI (Leguminosae)

[性狀鑑別]：

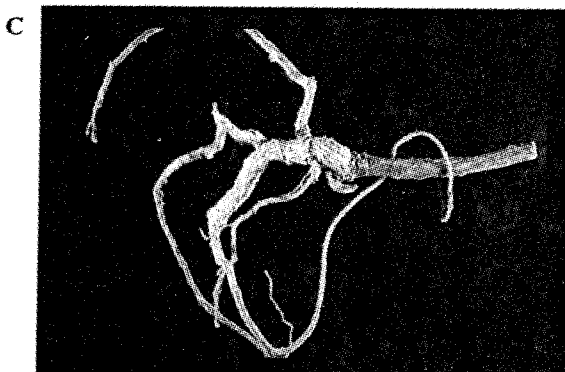
根呈長圓柱形，皮為棕色，表面有皺紋，直徑 5-20 mm，質硬而脆，略有韌性。微焦香，味略苦。莖長約 20 cm，直徑約 3 mm，表面棕色，具縱紋。斷面呈灰色，有髓。

[組織鑑別]：

根之橫切面，最外層為木栓層，由 8-14 層長方形細胞組成，栓皮細胞具木化及木栓化反應，且易向內捲曲。皮層廣闊，約由 16-20 層類長橢圓形、橢圓形及不規則形柔細胞組成，在類廢篩部中散生著厚膜之韌皮纖維，篩部不甚發達，其內部與形成層連接，皮部內有結晶散布，其大小約 $31.5 \mu m$ 。形成層不明顯，髓線明顯，1-4 層。木部係由導管、木纖維、木細胞與放射組織構成。中央為放射狀的薄壁組織，常有油滴。具有石細胞及澱粉粒，澱粉單粒或複粒，直徑約 $15 \mu m$ ，臍點不甚明顯。導管為網紋、孔紋及螺旋紋，直徑約 $60 \mu m$ 。



50µm



臺灣山豆根

Sophorae Formosanae Radix

Euchresta formosana Oiw (Leguminosae)

A.組織圖 B.植物圖

C.藥材圖

愛 玉 藤

Fici Ramulus

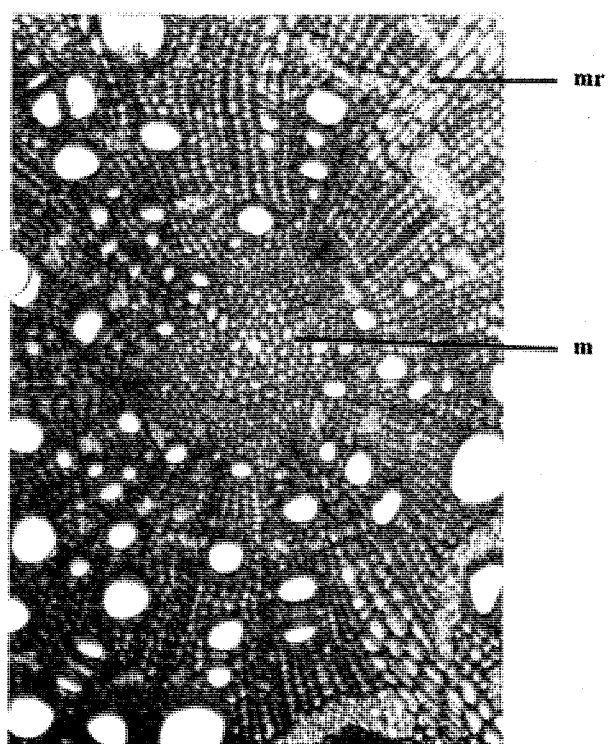
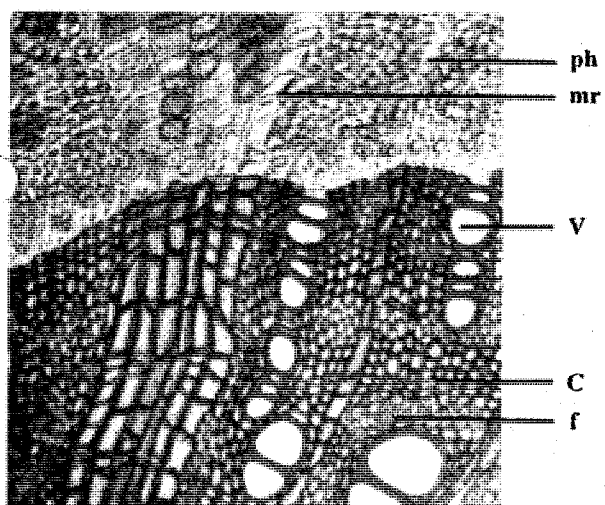
Ficus awkeotsang MAK.(Moraceae)

[組織鑑別]：

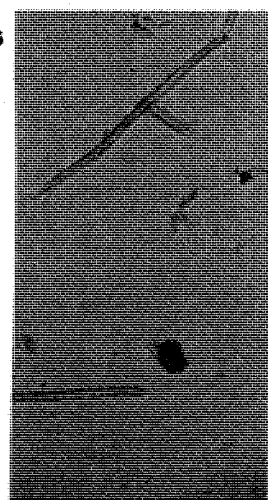
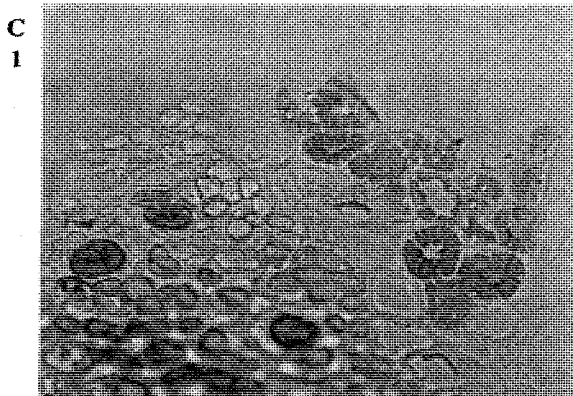
木栓層是由 5-8 層木栓細胞所組成，呈類方形，黃棕色，規則排列，木栓層外緣多破裂，在皮層中散生單個或成群的石細胞及纖維。皮層與韌皮部界限較不明顯。形成層 1-2 層，成環。木質部約佔橫切面的 2/3，由導管、髓線、木部纖維、木部薄壁細胞所組成，細胞呈類圓形、類長方形或類方形。內有髓線 2-5 層，有髓但已木化。

[粉末鑑別]：

本品粉末呈綠褐色，木栓細胞呈類方形細胞 5-8 層規則排列。皮層內有石細胞及纖維群存於其間，石細胞，類扁圓形，胞腔明顯，徑約 10 - 40 μ m；導管單個或數個成群，大小不一，呈類圓形，導管是以有緣紋孔，網紋及螺旋紋為主。



50μm



愛玉藤

Ficus awkeotsang

Moraceae

A.組織圖 B.植物圖

C.粉末及解離要素 1.石細胞 2.導管 3.纖維

兔 兒 菜

Lactucaae Herba

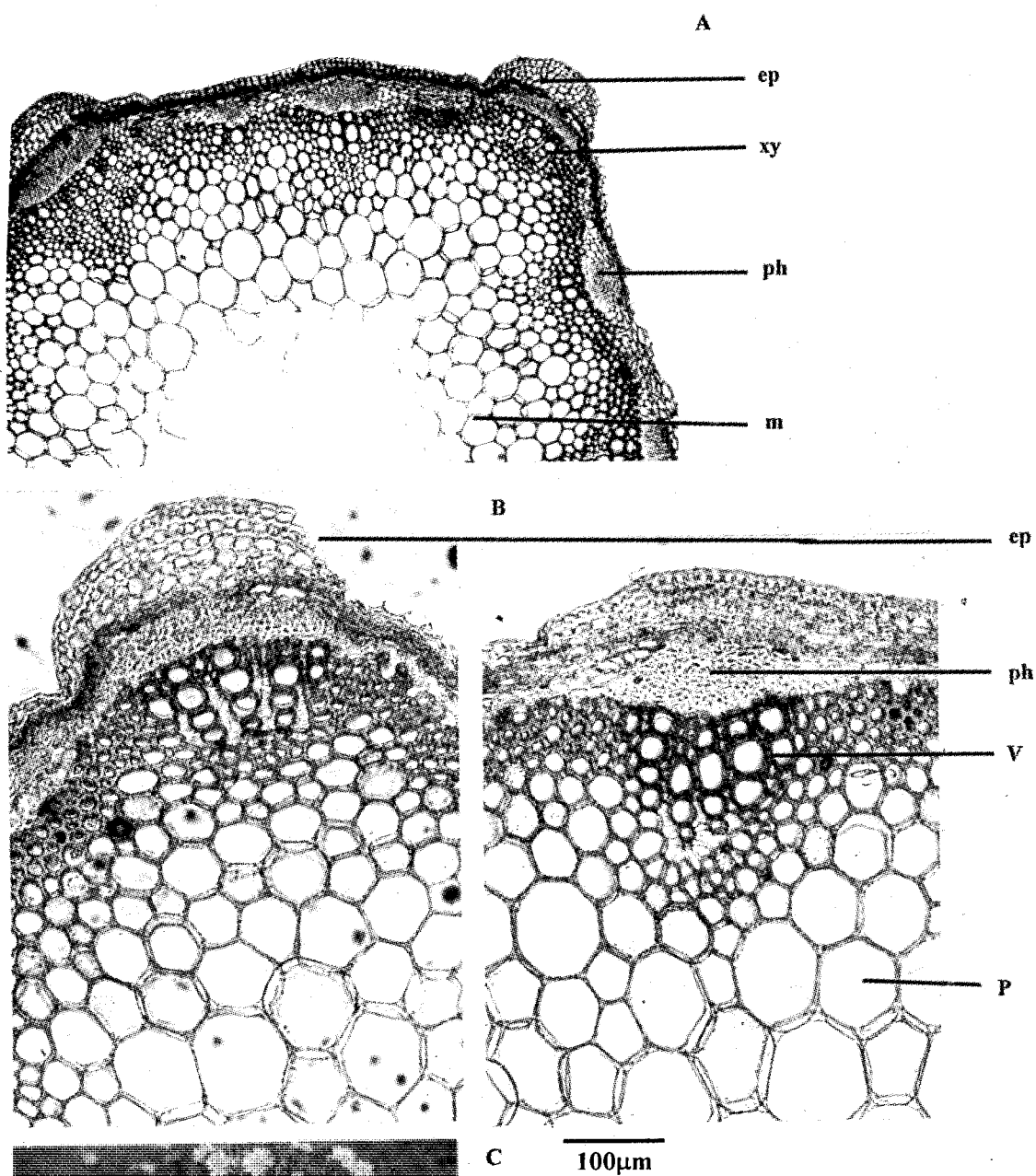
Lactuca chinensis MAK.(Compositae)

[性狀鑑別]：

表皮為 2-3 層類圓形細胞所組成，外有角質層覆蓋，皮層狹窄，且其四個稜角處的皮層較其它外緣多出 2-5 層細胞，韌皮纖維群位於韌皮部外側，斷續呈環狀，纖維壁厚，微木化。韌皮部較為狹小，木質部的導管成圓形，單個或雙個並層且徑向排列。導管是以螺旋紋為主，髓部寬廣，占整個組織的大部分。

[粉末鑑別]：

本品粉末呈棕綠色，表皮細胞外有氣孔，皮層狹窄，有纖維群的出現，但有棕色物質存在。導管是以螺旋紋為主，髓部寬廣，約 27 - 52.3 μ m，呈多角形，細胞間隙小。



兔 兒 菜

Lactucae Herba

Lactuca chinensis MAK.(Compositae)

A.横切面略圖 B.組織圖

C.植物圖

大 飛 陽 草

Euphorbiae Herba

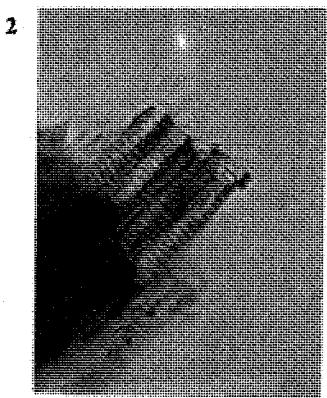
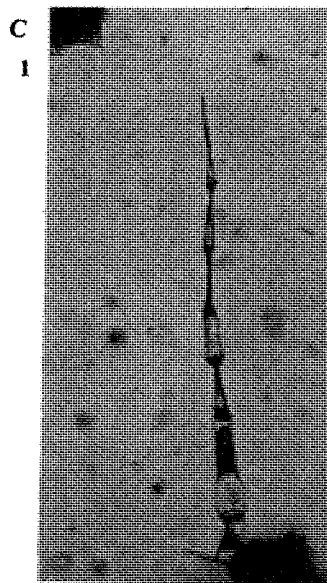
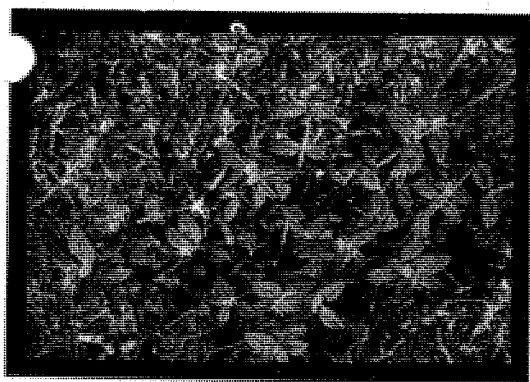
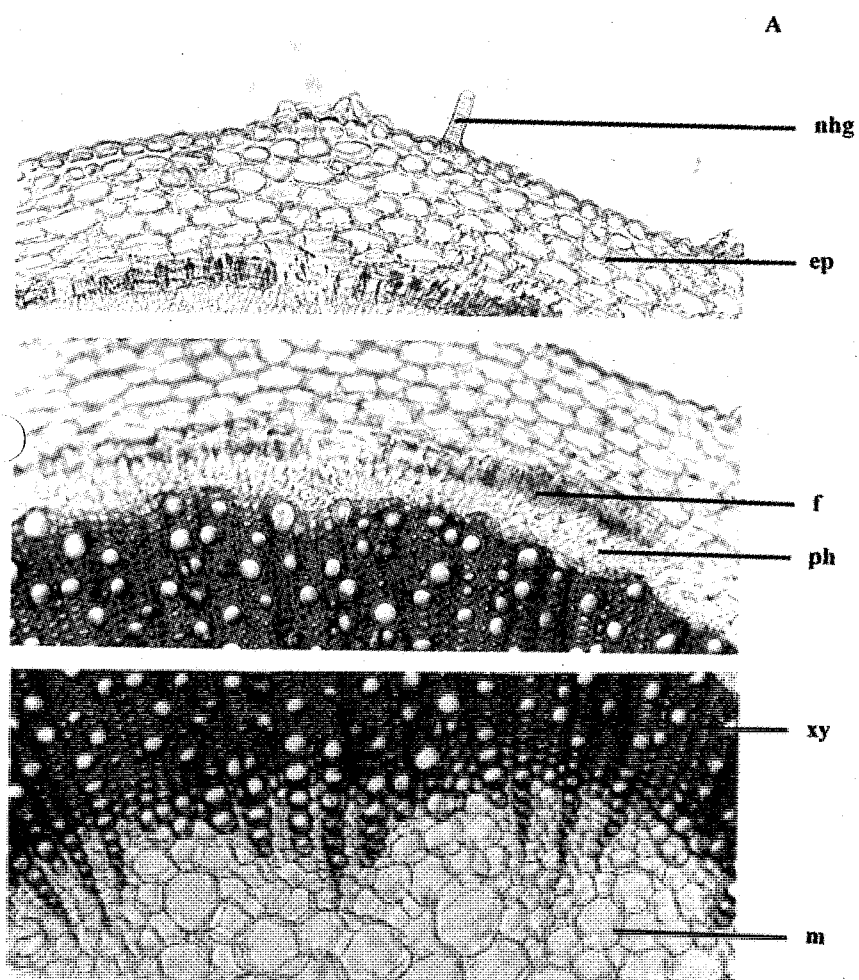
Euphorbia hirta L. (Euphorbiaceae)

[組織鑑別]：

以顯微鏡檢視其橫斷面，最外部為表皮細胞一層，呈類圓形，外被角質層，且具多細胞腺毛；內接皮層組織由類圓形薄壁細胞所組成，有纖維群斷續初出現於韌皮部交接處，韌皮部狹窄，木質部的導管成類圓形，徑向排列。導管是以螺旋紋為主，髓部寬廣，占整個組織的大部分，細胞呈類圓形。

[粉末鑑別]：

本品粉末為綠棕色，表皮外有角質層保護，表皮外可見氣孔及多細胞腺毛，長約 421-473 μ m，皮層中有纖維群出現，細胞內含許多黃棕色物質，導管類圓形，以螺旋紋為主。



大飛陽草

Euphorbiae Herba

Euphorbia hirta L. (Euphorbiaceae)

A. 組織圖 B. 植物圖

C. 粉末及解離要素 1. 多細胞腺毛 2. 導管

了哥王

Wikstroemia Ramulus

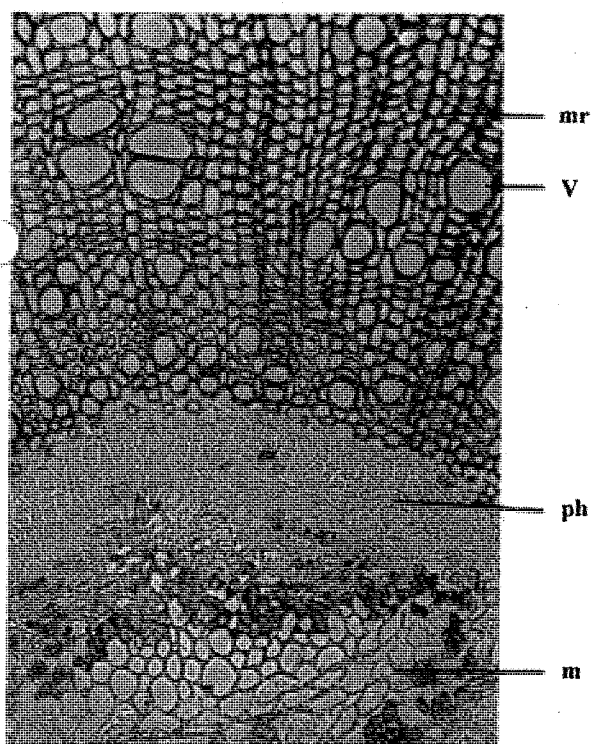
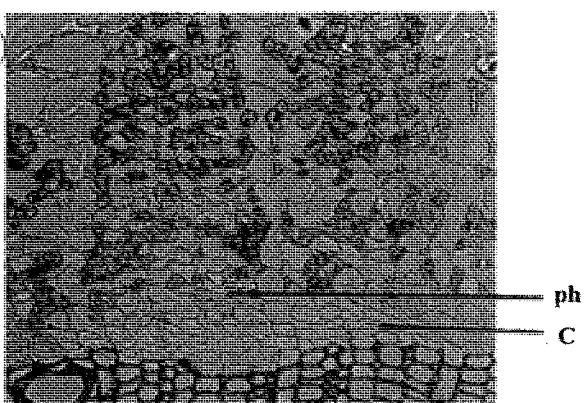
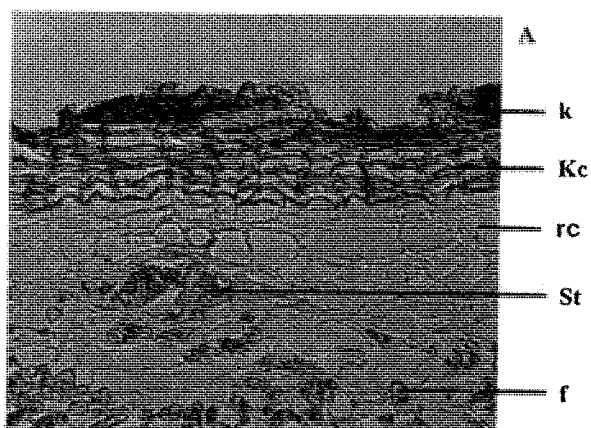
Wikstroemia indica C.A.MEY.(Thymelaeaceae)

[組織鑑別]：

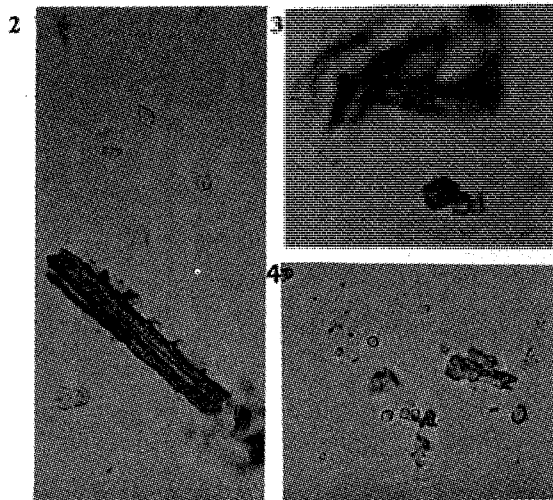
木栓層是由 5-8 層木栓細胞所組成，呈類長方形，黃棕色，規則排列，木栓層外緣多破裂，栓皮層下有網紋細胞出現，皮層內散生成群的纖維及石細胞。皮層與韌皮部界限較不明顯。形成層 3-6 層，成環。木質部，由導管、髓線、木部纖維、木部薄壁細胞所組成，細胞呈類圓形。內有髓線 1-2 層，呈類長方形，木質部將韌皮部一分為二，形成兩立型維管束。有髓，細胞類圓形。

[粉末鑑別]：

本品粉末呈灰綠褐色，木栓細胞呈類方形細胞 5-8 層排列，呈紅棕色。皮層內有網紋細胞、石細胞及纖維群存於其間；導管單個或數個成群，大小不一，呈類圓形，導管是以有緣紋孔，螺旋紋為主。



50μm



100μm

了哥王

Wikstroemiae Ramulus

Wikstroemia indica C.A.MEY.(Thymelaeaceae)

A. 組織圖

B. 植物圖

C. 粉末及解離要素 1. 栓皮層 2. 石細胞

3. 結晶 4. 澱粉及油滴

狐 狸 尾

Urariae Herba

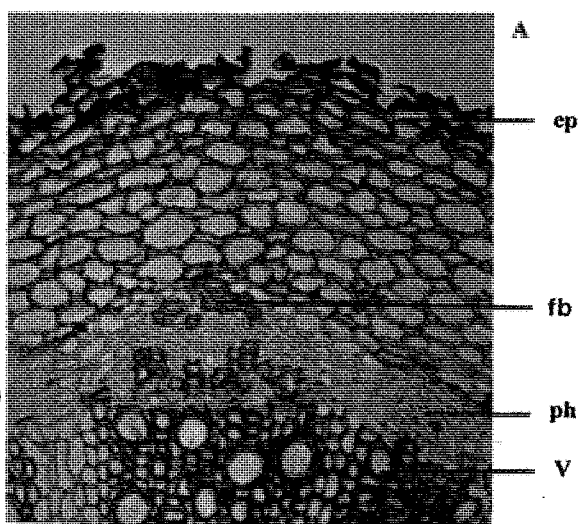
Uraria macrostachya WALL. (Leguminosae)

[組織鑑別]：

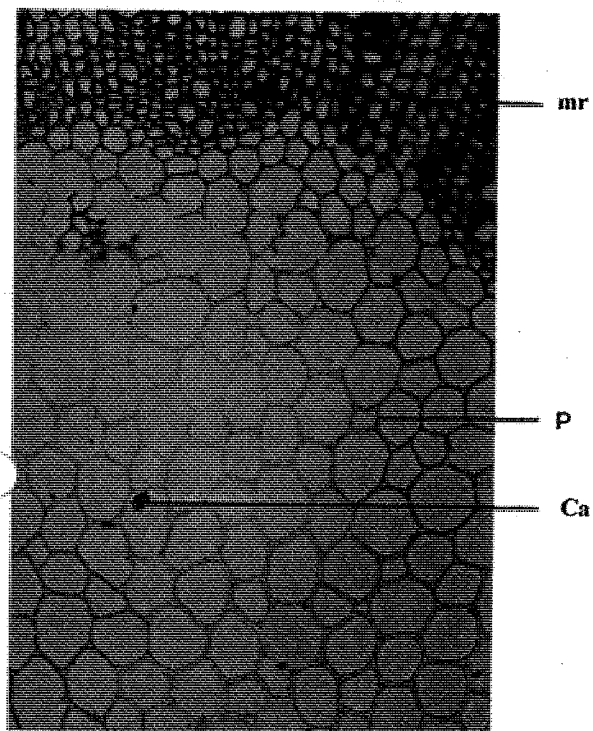
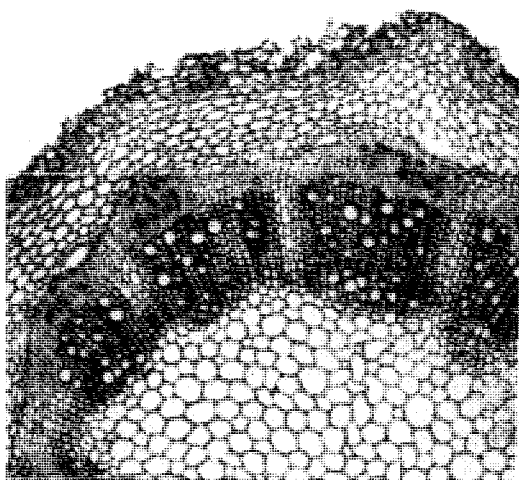
木栓層是由 3-5 層木栓細胞所組成，呈類長方形，紅棕色，木栓層外緣多破裂，栓皮層下有一層細胞呈黃色，將栓皮細胞與皮層細胞隔開，皮層細胞呈類橢圓形或多角形，約 18-26.3 μ m。皮層與韌皮部界限明顯。韌皮部內有纖維裙群存在，形成層不明顯。木質部，由導管、髓線、木部纖維、木部薄壁細胞所組成，細胞呈類圓形。內有髓線 2-4 層，呈類長方形，木質部內有棕色物質存於其間，形成並立型維管束。有髓，細胞類圓形，徑約 18-27 μ m，細胞間隙較小。

[粉末鑑別]：

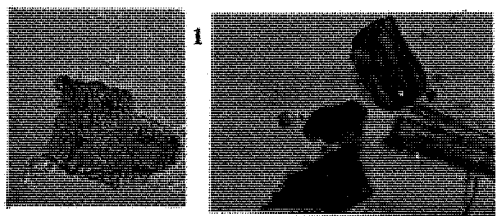
本品粉末呈灰綠褐色，木栓細胞呈類方形細胞 3-5 層排列，呈紅棕色。皮層細胞的細胞壁有增厚現象；導管單個或數個成群，大小不一，呈類圓形，導管是以網紋為主。



B



C



D
2

50μm

狐 狸 尾

Urariae Herba

Uraria macrostachya WALL. (Leguminosae)

A.組織圖 B.橫切面略圖 C.植物圖

D.粉末及解離要素 1.導管 2.纖維及結晶

生藥學術語之英文略字表

略號	術語	中文名
ag	aleurion grain	澱粉粒
alb	albumen	胚乳
b	bast	韌皮部
bf	bast fiber	韌皮纖維
bp	bast parenchyma	篩部柔組織
br	bract	苞葉
bs	vascular bundle sheath	維管束鞘
c	cambium	形成層
ca	clustered crystal	集晶，簇晶
cb	crystal bundle	束晶，針晶束
cd	crystal sand	沙晶
cf	crystal fiber	結晶纖維
clx	calyx	萼
cm	cell membrane	細胞膜
cn	needle crystal raphid	針晶
co	collenchyma(tous)(cell)	厚角組織(細胞)
cot	cotyledon	子葉
cr	crystal	結晶
cs	single crystal	單晶
cu	cuticle	角皮
cul	cuticular layer	角質層
cx	cortex	皮，皮部，皮層
cy	cystolith	鐘乳體
em	embryo	胚
en	endodermis	內皮
enc	endocarp	內果皮
eo	essential oil	精油
ep	epidermis	表皮
epc	epicarp	外果皮
epl	lower epidermis	下面表皮
f	fiber	纖維

略號	術語	中文名
fb	fiber bundle	纖維束
gs	glandular scale	腺鱗
gst	gelatinized starch	糊化澱粉
h	hair	毛
ha	hadrome	木部
hg	glandular hair	腺毛
hi	helum	臍點
i	intercellular space	細胞間隙
id	idioblast	異形細胞
in	inulin	菊糖
k	cork , (cork cell)	栓皮(栓皮細胞)
kc	cork cambium(phellogen)	栓皮形成層
kl	cork layer	栓皮層
le	leptome	篩部
lt	latex tube	乳管
lv	lactiferous vesssel	聯合乳管
m	mark , pith , medulla	髓
md	madrib , main nerve	主脈
mes	mesophyll	葉肉
mph	phloem medullary ray	篩部髓線
mrr	medullary ray	髓線
muc	mucilage cell	黏液細胞
mxy	xylem medullary ray	木部髓線
o	oil drop	油細胞
obs	obliterated sieve (portion)	退廢細胞
oc	oil cell	油細胞
or	oil (secreting) reservoir	油室
p	parenchyma(cell)	柔組織(柔細胞)
pa	palisade parenchyma(tissue)	柵狀細胞組織
pd	phelloderm(=cork cortex)	栓皮層
pg	phellogen (=cork cambium)	栓皮形成層
ph	phloem (=leptome)	篩部
pib	bordered pit	有緣膜孔

略號	術語	中文名
pph	phloem parenchyma	篩部柔組織
pr	pericycle	內鞘
pxy	xylem parenchyma	木部柔組織
rc	resin canal	樹脂道
s	sieve tube	篩管
sc	sclerenchyma(cell)	厚膜組織(細胞)
sd	seed coat, spermoderm	種皮
sec	secretory cell	分泌細胞
sp	spongy tissue parenchyma)	海綿狀組織
st	stone cell	石細胞
sta	starch grain	澱粉粒
ste	stele (=central cylinder)	中心柱
sto	stoma , stomata	氣孔
str	striation	層紋
v	trachea , vessel	導管
vb	vascular bundle	維管束
vbb	bicollateral v.b	兩立維管束
vbc	concentric v.b	包圍維管束
vbcx	cortical v.b	內層內維管束
vbh	hadrocentric v.b	外篩維管束
vbl	leptocentric v.b	內篩包圍維管束
vbn	open v.b	開放維管束
vbo	collateral v.b	並立維管束
vbr	radial v.b	放射維管束
vbs	closed v.b	閉鎖維管束
vc	scalariform vessel	階紋維管束
vd	bordered pit vessel	重緣孔導管
ve	vein	脈(葉)
vg	ring vessel	環紋導管
vp	pitted vessel	孔紋導管
vr	reticulate vessel	網紋導管
vs	spiral vessel	螺旋紋導管

略號	術語	中文名
wf	wood fiber	木纖維
wp	wood parenchyma	木部柔細胞
x,xy	xylem	木部
xm	metaxylem	後生木部
xp	protoxylem	原生木部

八十五年度中藥材組織鑑定之生藥

衛生署計畫 編號：DOH85-CM-047

1. 本研究主要以中藥典範所收載之藥材為主，合約書所選出50種藥材名只供參考，本年度已完成80種藥材如下：
1. 厚朴 *Magnolia officinalis* R_{EHD} et W_{LS}. (Magnoliaceae) (中藥典範)
2. 羌活 *Notopterygium forbesii* Boiss. (Umbelliferae) (中藥典範)
3. 楮實子 *Broussonetia papyrifera* (L.) (Moraceae) (中藥典範)
4. 蒺藜子 *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae) (中藥典範)
5. 紅大戟 *Knoxia valerianoides* T_{HOREL} et P_{ITARD} (Rubiaceae) (中藥典範)
6. 桑寄生 *Scurrula liquidambaricolus* (H_{AYATA}.) D_{ANSER} (Loranthaceae) (中藥典範)
7. 使君子 *Quisqualis indica* L. (Combretaceae) (中藥典範)
8. 魚腥草 *Houttuynia cordata* T_{HUNB.} (Saururaceae) (台灣植物藥材誌)
9. 白朮 *Atractylodes macrocephala* K_{OIDZ.} (Compositae) (中藥典範)
10. 沉香 *Aquilaria agallocha* R_{OXB.} (Thymelaeaceae) (中藥典範)
11. 續斷 *Dipsacus asper* W_{ALL.} (Dipsacaceae) (中藥典範)
12. 花椒 *Zanthoxylum bungeanum* M_{AXIM.} (Rulaceae) (台灣植物藥材誌)
13. 女貞子 *Ligustrum lucidum* A_{IT.} (Oleaceae) (中藥典範)

14. 牛蒡子 *Arctium lappa* L. (Compositae) (中藥典範)
15. 小飛揚草 *Euphorbia thymifolia* L_{INN}. (Euphorbiaceae) (台灣植物藥材誌)
16. 酸棗仁 *Zizyphus jujuba* M_{ILL}. (Rhamnaceae) (中藥典範)
17. 覆盆子 *Rubus chingii* H_U. (Rosaceae) (中藥典範)
18. 枳殼 *Poncirus trifoliata* L. (Rutaceae) (中藥典範)
19. 火炭母草 *Polygonum chinensis* L. (Polygonaceae) (台灣植物藥材誌)
20. 蒼朮 *Atractylodes chinensis* (DC.) K_{OIDZ}. (Compositae) (中藥典範)
21. 木瓜 *Chaenomeles speciosa* (S.) N_{AKAI} (Rosaceae) (中藥典範)
22. 紅花 *Carthamus tinctorius* L_{INN}. (Compositae) (中藥典範)
23. 決明子 *Cassia tora* L. (Leguminosae) (中藥典範)
24. 海藻 *Sargassum palidum* (T_{URN}) C. Ag. (Sargassaceae) (中藥典範)
25. 大麻仁 *Cannabis sativa* L. (Cannabiaceae) (中藥典範)
26. 木蝴蝶 *Oroxylum indicum* (L.) V_{ENT}. (Bignoniaceae) (台灣植物藥材誌)
27. 柏子仁 *Platycladus orientalis* (L.) F_{RANCO} (Cupressaceae) (中藥典範)
28. 玉米鬚 *Zea mays* L. (Gramineae) (台灣植物藥材誌)
29. 墨旱蓮 *Eclipta prostrata* L. (Compositae) (中藥典範)
30. 金線蓮 *Anoectochilus formosanus* H_{AY}. (Orchidaceae) (台灣植物藥材誌)
31. 萊菔子 *Raphanus sativus* L. (Cruciferae) (中藥典範)
32. 吳茱萸 *Evodia rutaecarpa* B_{ENTH}. (Rutaceae) (中藥典範)
33. 辛夷 *Magnolia liliflora* D_{ESR}. (Magnoliaceae) (中藥典範)
34. 胡桃 *Juglans regia* L. (Juglandaceae) (中藥典範)
35. 咸豐草 *Bidens pilosa* L. var. *minor*. (BL.) S_{CHERFF} (Compositae) (台灣植物藥材誌)

36. 王不留行 *Vaccaria pyramidata* M_{EDIC} (Caryophyllaceae) (中藥典範)
 37. 枸杞 *Lycium chinense* M_{ILLER} (Solanaceae) (中藥典範)
 38. 麥芽 *Hordeum vulgare* L. (Gramineae) (中藥典範)
 39. 穀芽 *Oriza sativa* L. (Gramineae) (中藥典範)
 40. 大葉千斤拔 *Moghania macrophylla* (Leguminosae) (台灣植物藥材誌)
 41. 水丁香 *Ludwigia octovalvis* Jacq. (Onagraceae) (台灣植物藥材誌)
 42. 刺莧 *Amaranthus spinosus* L. (Amaranthaceae) (台灣植物藥材誌)
 43. 虎杖 *Polygonum cuspidatum* S. et. Z. (Polygonaceae) (台灣植物藥材誌)
 44. 白薇 *Cynanchum atratum* B_{UNGE} (Asclepiadaceae) (中藥典範)
 45. 臺灣山豆根 *Euchresta formosana* O_{HWI} (Leguminosae) (台灣植物藥材誌)
 46. 愛玉藤 *Ficus awkeotsang* M_{AK} (Moraceae) (台灣植物藥材誌)
 47. 兔兒菜 *Lactuca chinensis* M_{AK} (Compositae) (台灣植物藥材誌)
 48. 大飛揚草 *Euphorbia hirta* L. (Euphorbiaceae) (台灣植物藥材誌)
 49. 了哥王 *Wikstroemia indica* C.A.M_{EY} (Thymelaeaceae) (台灣植物藥材誌)
 50. 狐狸尾 *Uraria macrostachya* W_{ALL} (Leguminosae) (台灣植物藥材誌)
2. 本年度(85)之藥材以中藥典範爲主，輔以甘偉松著台灣植物藥材誌，但今年所選50種藥材，偏重於民間藥有所不妥，故改選中藥典範所收藏之其他藥材。
 3. 合約書中所列參考藥材，部分爲少用之稀有植物，除採集不易外，又無旅運費津貼，故改選其他藥材。

花蓮縣藥用植物資源之調查報告

Investigation and Study on the Medicinal Plants in Hualien Country

謝文全 謝明村 張永勳 邱年永 楊來發

中國醫藥學院中國藥學研究所

中文摘要

花蓮縣為台灣省最大的縣，東臨太平洋，西屏中央山脈，山谷交錯，地形複雜，開發較晚，受到人為及自然保護，區內植物種類繁多，包括寒溫暖熱、沿海等氣候帶植物群落，其中稀有或特殊珍貴藥材及具經濟價值者，宜詳加調查採集以利資源開發。茲為瞭解花蓮縣各山岳，鄉鎮市藥用植物分布及目前本縣野生及栽培品種，同時進行民間藥及健康保健食品之拓展，對於民間藥或正統道地藥材誤用、混用情形，應予以釐清並糾正之，俾便使用良藥，以確保國民健康。優良品種俾便研究大量繁殖供應市場之需，或降低市價，因而提出本調查研究計劃。茲統計歸納各項研究成果如下：

1. 花蓮縣位於台灣本島東部，輪廓似臥蠶，東臨太平洋，西有中央山脈，沿海復有海岸山脈縱走，而南連台東縣，西南鄰高雄縣及南投縣，西北鄰台中縣及宜蘭縣；全部面積4628.5713平方公里，平原、河川各佔百分之七及六，餘皆山岳達百分之八十七。形成西高東低之層疊地形之勢，地形分別為山岳、台地、段丘、平原、河川、海岸，配合本縣之氣候、土壤等因素，使其間植物林相之分佈豐富，致使海濱、平

原性、丘陵性及高山藥用植物資源十分充沛。

2. 花蓮縣產藥用植物，經調查、採集計有木耳等961種，分別隸屬於6門、184科、645屬，依照Engler & Prantl System自然分類法排列，簡述每種植物之中名、學名、本草出典、別名、藥用部位、性味、毒性、功用及用量，以明示該植物之來源及效能。
3. 花蓮縣產藥用植物收載於歷代諸家本草者，經考察統計有中國藥材木耳等305項，分別隸屬於387種藥用植物。
4. 花蓮縣產藥用植物垂直分布，經調查統計：甲．自生種：一、海拔1500m以上計松蘿等78種。二、海拔500~1500m之間土馬棕219種。三、海拔500m以下計靈芝等407種；乙．栽培種：一、山地計巢蕨等10種。二、平地計木耳等 142種，由植物分布情形，可瞭解其生長環境和習性。
5. 花蓮縣產有毒藥用植物，經調查較明顯毒性者計鳳尾蕉等50種，瞭解有毒植物的毒性，可預防中毒事件的發生。
6. 花蓮縣民間驗方及用藥經調查蒐集，感謝王可德先生等人提供之民間驗方及用藥，較有效者收錄於本論文者計14則，以資參考。
7. 花蓮縣植物藥材名稱、價格及銷售量經調查整理，計鐵牛入石等109種，以資參考。
8. 花蓮縣海邊藥用植物，經調查較常用者計林投等12種。
9. 花蓮縣稀有藥用植物經調查有赤箭等9種，宜保護或組織培養大量繁殖，以利育種。
10. 花蓮縣藥用植物中，其臨床應用療效優越者、值得開發者，經調查整理計石上柏等7種。就其基原、別名、分布、產地、形態、採集加工、效用等予以敘述。

關鍵詞：花蓮縣 藥用植物 資源

ABSTRACT

Hualien County is the largest county in Taiwan. With Pacific Ocean to its east, and Central Mountain Zones to its west, mixed with mountains and valleys, the topography is complex. The area was not well developed. Due to the natural resources protection policies, the area is full of plant species including flora from tropical to the frigid zones. The rare and precious species and those with economic potentials deserves further investigation. The major findings of our investigation are listed below:

1. Hualien County is located in the eastern part of Taiwan. The total area is 4628.5713 km². Plain and river occupy seven and six percent of the land separately. The rest 87% are all mountainous area. the geological zones include mountains, hills, slope lands, plains, rivers and seashores. The area is full of natural resources.
2. According to the plant taxonomy of Engler & Prantl System, there are 961 species of medicinal plants belong to 6 phylums, 184 families and 636 genera growing in Hualien County. Each medicinal plants was briefly described with Chinese names, scientific names, origin of Pents'ao, distribution, vernacular name, medicinal part used, properties and taste, toxicity, function and medicinal application and dosage.
3. Among the medicinal plants surveyed in Hualien County, there are 305 crude drugs originated from 387 plant species recorded in ancient Pents'ao.
4. Distribution of the medicinal plants of Hualien County are listed at full length according to altitude range. For indigenous species, 78 species were found above 1500m

altitude, 219 species were found in 500m - 1500m range and 407 species below 500m altitude. For cultivated species, 10 species in mountainous area and 142 species in plain area.

5. Fifty poisonous medicinal plants were found in Hualien County. Awareness of the potential toxicity of those poisonous plants will avoid the accidents by misusing them.
6. Special folk medicinal formulas were also collected during our investigation. Fourteen more effective formulas were reported.
7. One hundred and nine crude drugs were found in herbal stores. The name, price and quantities sold were listed.
8. There are twelve seashore medicinal plants found in Hualien Country.
9. In Hualien County, nine species were categorized as rare plants species which deserved protection or propagation with tissue culture technique.
10. We found seven species with clinical efficacy and potential for development. Each of them were described with description, origin, property and taste, chemical components, pharmacological effects and clinical applications.

Key Word: Hualien Country, Pharmaceutical Botany, Investigation.

第一章 緒 言

花蓮縣為台灣省最大的縣，縣內有太魯閣國家公園，境內太魯閣峽谷風景崎麗，中外馳名，區內尚有本省山岳第三高峰，諸如南湖大山、中央尖山、奇萊、能高諸峰、秀姑巒山、八通關古道，仍青年學生登山覽勝，探討冰谷遺跡，鍛鍊體魄，尋找樂趣，為本省山岳最具原始自然

風光所在。

由於山谷交錯，地形複雜，高度變化大，加上冰谷溪流沖積河階和沖積扇，不但面積小，土地貧脊，及石灰岩地形之特殊景觀，且河床與台地間落差過大，導致水源利用不易，更加上溪流折曲，河岸峻峭，導致台地間交通不便，從生態學觀點來看，較不適宜群居生活。由於開發較晚，受到人爲及自然保護，並未遭受破壞，區內植物種類繁多，包括寒、溫、暖、熱、沿海等氣候帶植物群落，其中稀有或特殊珍貴藥材及具經濟價值者，據初步調查植物共計壹仟貳佰餘種⁽¹⁾，其中供藥用者經採集、調查、統計含前述達961種，藥材資源豐富，宜詳加調查與採集，以利資源開發，研究和利用。

茲爲瞭解花蓮縣各山岳、鄉鎮市藥用植物之分佈，及目前花蓮縣野生及栽培之藥用植物，同時進行民間藥及健康保健食品之採訪工作，對於民間藥或正統道地藥材間，誤用，混用情形，應予以釐清並糾正之，俾便使用良藥，以確保國民健康，至於值得研究開發之中藥材，俾便研究大量繁殖以供市場之需或降低市價，因而提出本調查研究計劃。

有關花蓮縣藥用植物之調查，因調查區域面積遼闊，加上高山險阻無法全部到達，而計劃執行時間僅一年，故沿海、平原、台地、河川週邊土地利用及藥用植物分佈，走訪較爲詳盡；高山山脈先後曾赴南湖大山、合歡山、清水山、秀姑巒山、中央尖山、西寶山、和平山、太魯閣大山、桃源山、鯉魚山、鳳林山等地，由本所同仁率研究生分赴各林道山區，並驅車調查採集藥用植物及經濟作物經營現況。因時間短促，採得標本及蒐集文獻資料雖多，然過於零亂，本報告僅就已知本縣常用藥用植物之生態，分項統計梗概如下，繆誤不周之處在所難免，爲祈各界不吝指正。

第二章 花蓮縣地理氣候概論

第一節 花蓮縣縣名及建置沿革

洪荒時期，花蓮古稱奇萊，首稱花蓮者，始見沈葆楨奏疏，前所無

聞焉。故老云：花蓮溪東注，其水與海濤激盪，紆迴澎湃，因之以形容，故曰洄瀾，後人諧音爲花蓮，至今沿襲之。⁽²⁾

花蓮居台灣東部，昔爲荒徼之地，交通阻塞，蕃漢界嚴，同治十三年，清廷依沈葆楨議，開築後山道路（指彰化南投八通關至玉里璞石閣）。光緒元年，解除界禁，化蕃漢畛域，置卑南廳，二年設招撫局，十二年設撫墾局（秀姑巒今瑞穗）花蓮港，各設分局。十二年台灣建省，改卑南廳爲台東直隸州，花蓮港設州判，分治水尾迤北之地。民國前十七年日人據台，翌年六月，更張制度，依台東直隸轄境，置台南縣台東支廳，同年八月，改爲台南民政支部，台東出張所。民國前十五年廢出張所，置台東廳，下設卑南、水尾、奇萊三辦務署。翌年卑南辦務署改稱卑南出張所，而合併水尾、奇萊兩署爲花蓮港出張所。民前十一年廢之，置花蓮港、璞石閣、成廣澳、巴塹衛四支廳。洎乎民前三年十月，劃分台東廳之半，建立花蓮港廳，下置璞石閣支廳與台東廳抗衡而治。民國九年改制，花蓮港廳下置花蓮、研海、鳳林、玉里四支廳。民國二十六年廢支廳，改爲花蓮、鳳林、玉里三郡，民國三十四年十月二十五日，台灣光復，同年十一月十一日成立花蓮港接管委員會。三十五年一月十一日花蓮縣政府成立，改郡爲區，下置市、鄉、鎮。民國三十七年，花蓮、鳳林、玉里三區悉撤，縣政府直轄市鄉鎮。目前（民國72年後）花蓮縣行政區，轄一市（花蓮市）、二鎮（鳳林鎮、玉里鎮）、十鄉（新城鄉、吉安鄉、壽豐鄉、光復鄉、瑞穗鄉、富里鄉、豐濱鄉、秀林鄉、萬榮鄉、卓溪鄉），合計六十九里，九十七村。⁽²⁾

第二節 地理位置及面積

花蓮縣疆界緯度，乃東臨太平洋，南連台東縣，西南鄰高雄縣，西鄰南投縣，西北鄰台中縣，北接宜蘭縣。極東爲大濁水溪口，位於東經 $120^{\circ}46'16''$ ，極西爲雲峰山東側，位於東經 $120^{\circ}58'46''$ ，極南爲網網口，位於北緯 $23^{\circ}22'23''$ ，北回歸線橫過縣境中南部，歷豐濱、玉里、瑞穗、卓溪四鄉鎮，仍最適宜植物生長繁殖推廣之地帶。⁽²⁾⁽³⁾

花蓮縣東西幅寬28-44公里，縱長南北長達140餘公里，面積達4628.

5713平方公里，平原約佔百分之七，計323.9999平方公里，河川約佔百分之六，計 277.7143平方公里，餘皆山岳約佔百分之八十七，計4026.857平方公里。由平地到高山，皆有不同植物之分佈地帶。

第三節 地形及地勢

花蓮縣位於台灣本島東部，輪廓似臥蠶，東臨太平洋，西有中央山脈中段東側之地，佔海岸山脈與台東縱谷平原三分之二強，形成西高東低之層壘地形地勢，山岳多，平原及河川較少，地形分別為山岳、台地、段丘、平原、河川、海岸。

西部有高山峻嶺，沿海復有海岸山脈縱隔，中間有肥沃平原與台東縱谷平原連綿，河流由山谷發源，因受地勢影響，河床斜度較高，流程甚急，災害因而隨颱風洪水而發生，水利設施提供發電應用，對農田灌溉而言，並不十分普及，物產種類雖多，尚能自己自足，人口密度不高，均集中於部份平原市鎮，且皆為外來移居者佔大多數。

平地主要分佈在台東縱谷及沿海地區，北起新城，花蓮、吉安，中部有壽豐、鳳林、光復，中南部有瑞穗、玉里、富里，中部海岸東側濱海地帶之豐濱等幅員不太大之平原、河床外，餘皆山岳，可說是起伏頗大，配合本縣之氣候，土壤等因素，使其間植物林相之分布豐富，有海濱植物、平原性植物、丘陵性植物及高山植物等。⁽⁴⁾

第四節 山岳山脈地質

花蓮縣境內山岳，西為中央山脈，東為海岸山脈，所佔地區，達全縣面積百分之八十七。兩山脈，岡巒蟠曲，峰嶺迢遞，河流錯綜，斷崖險巖，雖廣狹低昂有差，而峻峭嶒嶒略同。顧疊巘幽邃，萬壑千巖，考證所及，僅能略誌梗概，其間諸峰，尚多已測標高未曾命名者，姑依附近新舊地名或何源指事以稱，俾易蹤跡，其無可據者，暫稱無名山，統異日正名焉。⁽³⁾

本縣之山系可分兩大系：一為中央山脈，如中央山脈脊嶺，南湖大山支脈，奇萊連峰支脈，知亞干山支脈，白石山支脈，關門山支脈，丹

大山支脈，塔比拉支脈，三叉山支脈；二爲海岸山脈，如月眉山稜，新社山稜，貓公山稜，成廣澳山稜，新港山稜，麓溪山稜等（詳附圖），簡述如下：⁽³⁾

(一)中央山脈：北起宜蘭縣烏岩角，自北北東向南南向延伸，至恆春半島南折逐降，止於鵝鑾鼻，長達250餘公里，花蓮縣近居中段，佔山脈全長之半，其間支脈紛披，骨由脊嶺山東側稜線組成。⁽³⁾

(1)中央山脈脊嶺～岩層爲粘板岩類，亦介有火成岩，土層屬原始土類石質壤，皆草山地及針葉林相。著名諸山跨花蓮縣境者，自北而南爲南湖大山3740m、中央尖山3703m、無名山3449m、鈴鳴山3271m、碧綠山3370m、介壽山北峰3422m、介壽山東峰3116m、奇萊北峰3605m、奇萊主山3559m、奇萊南峰3357m、能高山3261m、能高南峰3349m、知亞干山3059m、白石山3108m、安東軍山3067m、關門山3052m、大石公山3055m、丹大山3371m、塔比拉山3577m、馬博拉斯山3807m、秀姑巒山 3833m、大水窟山3724m、尖山3222m、轆轤山3577m、雲峰3562m、南雙頭山3288m、三叉山3498m等，標高皆在三千公尺以上，逶迤綿連，突凹紆鬱。兩側坡度多東緩西陡，斜面幅員亦東廣西促，山峰形狀，降中央尖山、奇萊主山尖山爲峭嶺外，餘悉圓平頂。⁽³⁾

(2)南湖大山支脈～由中央山脈脊嶺南湖大山東稜線，東南稜綜合中央尖山無名山東南稜線、碧綠山東稜線組成，介和平溪立霧溪間，脈端連太平洋岸，跨花宜二縣。岩層爲粘板岩類、石墨片岩、綠泥片岩、結晶石灰岩、介有火成岩、片麻岩等，土層屬原始土類粘壤土或粗骨土類粘壤土，山之林相爲針葉樹、闊葉樹混合林。著名諸山有馬比彬山3209m、西基南山2692m、陶賽山2334m、比林山3380m、朝墩山2248m、北二子山2564m、北雙頭山2644m、卡那岡山2268m、基寧堡山1549m、和平山1402m、蘇華沙魯山1598m、鍛鍊山1792m、海鼠山1715m、三錐山2606m、錐麓山1666m、清水山2407m、石矸山1623m、崇德山1273m、羅蘭浮山2918m、雞鳴山1534m、哇赫魯山1547m、西拉克山2271m、西寶山1794m、羊頭山3033m、魯翁山2252m、可巴

洋山1715m、西奇良山1277m、饅頭山1128m、黑岩山3022m、卡拉寶山2395m等，山脈中有大南溪斷層橫貫支脈上段，三錐山斷層橫貫支脈中段，清水山斷層縱貫支脈中部。⁽³⁾

(3)奇萊連峰支脈～此山脈由中央山脈脊嶺奇萊北峰北稜線、東南稜線及奇萊主山東南稜線、奇萊南峰東南稜線組成，介立霧溪、木瓜溪間，當秀林鄉中部，稜端迄立霧溪三角洲平原與花蓮海岸平原。岩層為粘板岩類、結晶石灰岩、石墨片岩、綠泥片岩、介有火成岩，土層屬原始火類石質壤土或粗骨土類粘壤土，山之林相為針葉樹林，針葉樹闊葉樹混合林，盛產檜木，為太魯閣林場作業地，脊嶺草生地，山麓多成耕地。著名諸山有屏風山3248m、托寶閣山2102m、磐石山3105m、太魯閣大山3282m，得其黎主山3068m、江口山2495m、塔山2448m、凱金山2580m、巴都蘭山2919m、佐久間山2812m、富田山2014m、巴托魯山3100m、啓源山2376m、龍翠山2383m、夫婦山2051m、嵐山2031m、加禮宛山1470m、科蘭山2440m、三巴拉岡山1915m、崙外山1119m、天長山2412m、托莫灣山1785m、新城山1440m、慈雲山2311m、吉安山1321m、龍閣山1689m、柴田山2477m等。⁽³⁾

(4)知亞千山脈～由中央山脈脊嶺能高山東北稜線、能高山南峰東稜線與知亞千山東稜線組成，介木瓜溪、壽豐溪之間，當秀林鄉南部，脈端迄台東縱谷平原。大南溪斷層橫貫支脈上段，奇萊山斷層橫貫中段，銅門斷層橫貫其下段。岩層為粘板岩類，介有火成岩、結晶石灰岩、石墨片岩、綠泥片岩等，土層屬原始土類粘壤土或粗骨土類粘壤土，山之林相為針葉樹林或闊葉樹林，為木瓜林區作業地。著名諸山有東能高山2774m、巴沙灣山3028m、武陵山2522m、赤壁山1820m、桃源山1728m、烏帽山980m、陰山1052m、牡丹山2963m、東崖山2905m、哈崙山2475m、大檜山2730m、可樂派西山2269m、木瓜山2426m、大景山1540m、銅門山1484m、霸嶺2285m、清昌山1986m、原荖腦山1082m、壽峰山501m、鯉魚山601m等。⁽³⁾

(5)白石山支脈～由中央山脈脊嶺白石山東稜線與東南稜線組成，介壽豐溪萬里溪之間，當萬里鄉北部，脈端止於台東縱谷平原。岩層為

結晶石灰岩，石墨片岩、綠泥片岩，土層屬原始土類粘壤土或粗骨類粘壤土，山之林相有針葉樹林，或針葉闊葉混合樹林，及闊葉樹林，山麓多成耕地。著名諸山有南崖山2809m、針山 2303m、馬里山2498m、安來山2794m、大安山2827m、平林山2044m、林田山2067m、南二子山2531m、初見山1826m、鳳林山821m、萬里山1237m等。大南溪山、奇萊山、銅門等斷層橫貫其上中下三段中。⁽³⁾

(6)關門山支脈～由無名山東稜線、東北稜線與銅門山東北稜線組成，介萬里溪馬鞍溪間，當萬榮鄉中部，脈端迄台東縱谷平原，為諸支脈中規模最小者，河流疏，斷崖少，故複褶峭拔之勢亦遜。前述三斷層亦橫貫其上中下三段中。岩層為結晶石灰岩、石墨片岩、綠泥片岩、絹雲母石墨片岩，土層屬原始土類粘壤土或粗骨土類粘壤土，山之林相為針葉闊葉樹混合林或闊葉樹林，稜端緩坡或山麓成耕地。著名諸山有高嶺2517m、清水嶺2049m、王武塔山2013m、森板山1482m、長港山838m、樂嘉山1986m、大觀山1825m等為林田山林場作業地。⁽³⁾

(7)丹大山支脈～由丹大山東北稜線無名山東稜線及無名山東南稜線組成，介馬鞍溪太平溪間，跨萬榮鄉南部與卓溪鄉北部，脈端迫對海岸山腳，縱谷平原為之仄。岩層為結晶石灰岩、石墨片岩、綠泥片岩、土層屬原始土類或粗骨土類粘壤土，山之林相為針葉樹林及針葉闊葉樹混合林，稜腳多成耕地。著名諸山有阿巴拉山2985m、崙大門山2948m、興魯郡山2090m、拔子山1742m、狼頭山845m、馬猴宛山2810m、那實答山1358m、馬錫山1192m、加籠籠山922m、阿魁那來山3009m、沙武巒山2810m、巒丹山2282m、興實骨丹山2394m、食祿間山2691m、撫魯山1756m、沙甲山972m、虎頭山1745m、打馬燕山1107m、紅葉山654m、馬遠山686m、座主板山1459m、加星山1348m、迪佳山1244m、崙布山1043m、舞鶴山643m、三民山308m、內嶺爾山3204m、烈克泥山2610m等。⁽³⁾

(8)塔比拉山支脈～由塔比拉山、秀姑巒山、大水窟山之東南稜線及轆轤山、南雙頭山之東稜線組成，介太平洋樂樂溪間，當卓溪鄉中部

，脈端迄台東縱谷平原。大南澳及銅門斷層橫貫其上下段，河流錯綜，崖谷雜此還，山貌多險峻。岩層爲結晶石灰岩、石墨片岩、綠泥片岩及絹雲母石墨片岩，或介有火成岩，土層屬灰棕壤類及粗骨土類粘壤土，山之林相爲闊葉樹林，山麓多成耕地。著名諸多有馬西山3429m、卡西巴南山3167m、玉里山2155m、卓溪山1128m、阿波蘭山2922m、巴里香山1780m、大魯木山2565m、馬富蘭山1437m、中興山857m、針墾山872m、太魯那斯山3230m、那那德克山2334m、伊波克山2178m、美亞珊山2643m、埃西拉山2445m、打訓山2252m、賽珂山2982m等。⁽³⁾

(9)三叉山支脈～由三叉山東稜線與東南稜線組成，介樂樂溪新武路溪間，跨花蓮台東兩縣境，脈端迄台東縱谷平原。大南溪及銅門斷層橫貫其上下段，斷崖錯綜，形勢嶮峻。岩層爲岩板岩類、結晶石灰岩、石墨片岩、綠泥片岩、絹雲母石墨片岩，介有火成岩，土層屬灰棕壤類或原始土類粘壤土，山之林相爲針葉闊葉樹混合林、針葉樹林或闊葉樹林，山麓多成耕地。著名諸山有連理山3138m、新原山3335m、珂珂爾寶山3950m、大里仙山2050m、那母岸山1223m、巴蘭沙克山 2680m、魯崙山2304m、斑甲山2658m、綠山2423m、無樂散山2036m、沙沙美山2543m、網網山2394m、崙天山2110m、丹那山1317m、包沙克山2034m、石壁山1677m、苓苓園山1621m、古鳳山1157m、楓山291m、伊蘇剛山646m、秀巒山1115m、卓清山 916m、馬里旺山1023m、里行山896m、龜鑑山545m、學田山422m等。⁽³⁾

(二)海岸山脈—位於台灣東部海岸，北起花蓮溪河口，南迄卑南大溪河口，與台東縱谷平原併行，東臨太平洋，西隔縱谷平原與中央山脈相對。自東北逶迤向南西走，延長150公里，跨花東兩縣，最寬處16.5公里，形成七山稜。⁽³⁾

(1)月眉山稜～居海岸山脈北段北部，北東、南西走向，北起花蓮溪口，南迄蕃寮溪左岸溪，山與溪右岸，兩溪分水嶺成鞍部，與新社山稜接連。岩層爲中新統頁岩、砂岩、鮮新統頁岩、安山岩質碎屑岩，土層屬黃壤類砂壤土、粘壤土，山之林相爲闊葉樹林。著名諸山

有美崙山108m、鹽寮坑山440m、北月眉山479m、米棧山614m、東月眉山545m、水璉山530m、山興山588m等。⁽³⁾

(2)新社山稜～居海岸山脈北段中部，北東、南西走向，北起蕃寮溪右岸，南迄豐濱溪右岸。岩層為中新統頁岩砂岩、安山岩質碎屑岩、砂岩、介有石灰岩、土層屬黃壤類粘壤土、砂壤土、山之林相為闊葉樹林。著名諸山有蕃薯寮坑山505M、磯崎山549M、加路蘭山732M、新社山744M、加禮洞山252M、馬亞須山741M、馬拉羅翁山438M、萬壽山169M、馬里洲山325M、砂荖山600M、秀望山644M、臨潢山612M、滁山304M、丁子漏山330M、八里灣山496M、富興山297M、塔拉阿蘭山503M、烏漏山等402M等。⁽³⁾

(3)貓公山稜～跨海岸山脈北段南段各一部，北東、南西走向，北起豐濱溪河口左岸，南迄下勞灣溪河口右岸。岩層為安山岩碎屑岩、鮮新統頁岩、砂岩、粘土、土壤屬黃壤類粘壤土、灰化紅壤類壤粘土及砂壤土，山之林相為闊葉樹林。著名諸山有姑律山394m、貓公山922m、新瑞山704m、烏雅立山603m、打落馬山462m、猴子山220m、大磯山815m、奈美山483m、蔓山508m、赤土山248m、崩山631m、德武山905m、苓子濟山247m、小竹山516m、三富山1156m、茅平山300m、馬太林山 775m、織羅山1121m、松浦山425m、禮汝蘭山1289m、猛子蘭山1280m、馬久答山 832m、觀音山221m、太古嶺950m、高寮山389m、石公山831m、樂合山357m等。⁽³⁾

(4)成廣澳山稜～居海岸山脈南段北部，跨花蓮台東兩縣，北東、南西走向，北水母丁溪右岸，南迄麓溪右岸。岩層為中新統頁岩、砂岩、介有少量安山岩質碎屑岩，土層黃壤類粘壤土及灰化紅壤粘土。山之林相為闊葉樹林，緩坡皆為耕地。著名諸山有馬稼海山1322M、北花東山1232m、下勞灣山556m、石門山1023m、員江山419m、大里山376m、方寧山447m、竹田山1023m、九岸山1407m、頭人埔山790m、成廣澳山1579m、羅山957m、分水崙山1449m、安土堀山909m、紅座山630m、安通山994m、大庄山1010m、六十石山1015m、阿眉山676m、馬加祿山885m、螺子山 1214m、石牌山695m、永豐山589m等

。(3)

(5)新港山稜～居海岸山脈南段中部，跨花東兩縣，南北走向，北三仙溪右岸，南迄馬武窟溪河口左岸。岩層爲中新統頁岩、砂岩，土層屬黃壤類粘壤土，山之林相爲闊葉樹林。著名諸山有白守蓮山1620m、新港山1682m、富里山1175m、麒麟山等。⁽³⁾

(6)麓溪山稜～居海岸山脈南段中部，略呈南北走向，北起麓溪左岸，南迄馬武窟南溪源頭，由麓溪山989m及台東之錦園山、山墜山、噯嘮吧灣山、電光山組成。岩層爲鮮新統頁岩、砂岩，土層屬黃壤類粘壤土，山之林相爲闊葉樹林。⁽³⁾

第五節 台地、段丘及平原

台地、段丘，或稱丘陵、階地，均爲更新統（洪積層）與現世統（沖積原）之沖積或堆積礫砂、粘土層，經地盤隆起，拔出平原面及河岸、海岸。丘面向多方傾斜者稱台地，向一方梯降者稱丘。高位段丘多發育於中央山脈東側各流域上游；低位段丘，多發育於下游及海岸山脈各溪流域。依分佈區域，分別爲中央山脈東側各流域河岸段丘（包括台地）及海岸山脈東西側河岸及海岸段丘，茲簡述如下：⁽³⁾

(1)中央山脈東側各流域河岸段丘：包括姑姑子段丘、基寧堡丘、豐德段丘、富世段丘、落支煙段丘、好好士段丘、沙卡丹段丘、阿唷段丘、普樂灣段丘、巴大岡段丘、合流段丘、荖西段丘、陀各段丘、道拉斯段丘、凱金段丘、天祥段丘、文山段丘、托布拉段丘、西寶段丘、小保段丘、西拉克段丘、梅園段丘、蘇華沙魯盆地、山里段丘、關賽段丘、西奇良段丘、苦莫赫魯段丘、魯博克段丘、洛韶段丘、三棧段丘、佳民段丘、美崙台地、花崗山台地、銅門段丘、榕樹段丘、文蘭段丘、池南段丘、荖溪段丘、平林段丘、馬太鞍台地、舞鶴台地、三民段丘、烈克泥段丘、卓溪段丘、打訓段丘等45段丘。⁽³⁾

(2)海岸山脈西側河岸段丘：包括月眉段丘、米棧段丘、草鼻段丘、山興段丘、烏漏段丘、鶴岡段丘、猴子段丘、奇美段丘、謝德武段丘、馬久答段丘、竹田台地、富里台地、三台段丘等13段丘。⁽³⁾

(3)海岸山脈東側河岸段丘：包括水漣段丘、丁子漏段丘、豐濱段丘、八里灣段丘、奇美港口間段丘等5段丘。⁽³⁾

(4)海岸山脈東側海岸段丘：包括鹽寮段丘、磯碕段丘、新社段丘、姑律段丘、石梯段丘、港港段丘、靜浦段丘等7段丘。⁽³⁾

花蓮縣境內平原，包括河川下游河床共480餘平方公里，佔總面積十分之一強。或由海岸堆積，或由河川沖積，或由洪涵地堆積，益以地盤隆起與河流改道襲奪而成。其間介有台地段丘，為洪積層及沖積層早期隆起者，而平原兩側諸溪，建瓚直瀉，一出口即成網狀流路，河床拓寬，遂成沖積扇。依地理形勢，分別為和平溪三角洲平原，立霧溪三角洲平原、花蓮海岸平原、台東縱谷平原，茲簡述如下：⁽³⁾

(1)和平溪三角洲平原：位於和平溪河口一帶，地面高度在海拔30公尺以下，平坦緩斜，向海岸逐低，幅員約12平方公里，輪廓喇叭形。和平村東方有砂丘高約 20公尺，平原土壤屬沖積土類砂質壤土，略混礫塊並產沙金。

(2)立霧溪三角洲平原：位於立霧溪河口一帶，地面高度在海拔50公尺以下，幅員15平方公里餘，中介段丘，遂呈梯狀，輪廓似雕了。河口網狀流路，成小型沖積扇，平原被截斷，南翼面積較大，富世、秀林、新城、順安諸村建於此，北翼狹小，當有崇德村。平原土壤屬沖積土類砂質壤土，略混礫塊，明末哆囉滿砂金著稱。⁽³⁾

(3)花蓮海岸平原：北起三棧溪河口，南迄木瓜溪河口，北接立霧溪三角洲平原，南連台東縱谷平原，東沿太平洋岸，西鄰加禮宛山吉安山東麓，幅員90平方公里餘，輪廓弧形。地面平坦，向海岸緩斜，高度不一。平原北段之兩有佳民段丘，東緣原樂村海岸有大小砂丘五座，美崙山居平原中段偏東，其東麓為美崙台地，迤北有模開詔，花崗山台地居平原中段東緣，南濱海岸有砂丘一座，平原範圍內有山有丘有台地，故地勢略呈起伏。平原大體雖由海岸堆積層與地盤隆起而成，但其間有為沖積扇及洪涵地之堆積物覆蓋而改變原狀者，故又別為加禮宛平原，土壤屬沖積土類褐色砂質壤土；美崙洪涵地，土壤為水稻土類粉砂壤土；美崙溪沖積扇，除河床為礫砂層外，土壤屬棕紅壤類土

與水稻土類粉砂壤土；木瓜溪沖積扇，土壤屬棕紅壤類；惟南華村以南則為洲積土類砂壤土等區域。⁽³⁾

- (4)台東縱谷平原：北起木瓜溪下游，南迄台東縣卑南大溪下游，跨花東兩縣，居中央山脈東側，海岸山脈面側之間，與兩山脈競走，縱長150公里，面積500餘平方公里，為狹長平原，依三大河流劃分區域，花蓮溪為北段，秀姑巒溪為中段、卑南大溪為南段，地面大致平坦緩斜，平原屬花蓮者，縱長96公里，面積370餘平方公里。平原中沖積扇所佔面積與耕地相等，在平原西緣者，自北而南有木瓜溪沖積扇、壽豐溪沖積扇、萬里溪沖積扇、馬鞍溪沖積扇、興復溪沖積扇、加籠溪沖積扇、紅葉溪沖積扇、太平溪沖積扇、卓溪沖積扇、樂樂溪沖積扇、太埔溪沖積扇、萬朝溪沖積扇、新武路沖積扇、坎頂溪沖積扇、加奈典溪沖積扇、鹿寮溪沖積扇、北絲龜溪沖積扇等。在平原東者，自北而南有大農溪沖積扇、苓子濟溪沖積扇、馬太林溪沖積扇、高寮溪沖積扇、九岸溪沖積扇等。由於河錯綜，丘陵羅列，遂使地面略呈起伏，而幅員狹長，土質不一，其間土壤，包括棕紅壤類、準紅壤類、黃壤類、水稻土類、沖積土類、分佈區域十分複雜。⁽³⁾

第六節 河川水系、湖沼和海岸

花蓮縣境內河川有兩大主流，在北為花蓮溪，在南為秀姑巒溪，潺湲迴薄，貫穿平原，灘磧遼闊，斷續相承。各河川或發源中央山脈，或發源海岸山脈，巨細盤紆，交織匯合，各周地形所居，分注主流。其他源出兩山脈之和平、立霧、三棧、水璉、豐濱等溪，則皆汨汨下趨，直注于海，惟中央山脈各溪，發源崇山峻嶺間，挾高奔騰，每遇豪雨，激湍洶流，岩石礫砂俱下，河床雍高，宣洩不暢，常因洪水泛濫，此景象以木瓜、壽豐、萬里、馬鞍、紅葉、富源、太平、樂樂、清水等溪為最，而寬闊之溪，漲落無常，流急灘險、殊鮮舟楫之利。主別為花蓮溪流域各河川、秀姑巒溪流域各河川，茲簡述如下：⁽⁴⁾

- 一、花蓮溪流域各河川：包括花蓮溪、光復溪、馬鞍溪、崙大門溪、萬里溪、高嶺溪、清水溪、大觀溪、鳳林溪、壽豐溪、安來溪、大安

溪、西林溪、清昌溪、清水溪、荖溪、白鯢溪、頭墮溪、木瓜溪、巴都蘭溪、巴托魯溪、清流溪、大農溪、砂荖溪、太巴塢溪、阿德橫溪、加禮洞溪、山興溪、草鼻溪、米棧溪、南月眉溪、月眉溪等32條河流。⁽⁴⁾

二、秀姑巒溪流域各河川：包括秀姑巒溪、馬里量溪、大埔溪、樂樂清小溪、馬博拉斯溪、美亞洲溪、打訓溪、連理溪、馬卡諾溪、大魯木溪、伊侯侯爾溪、篤篤壑溪、巴沙克溪、巴蘭沙克溪、珂珂爾寶溪、卓溪、太平溪、內嶺爾溪、卡西巴南溪、針壑溪、三民溪、紅葉溪、富源溪、鼈溪、永斗溪、螺子溪、九岸溪、馬加祿溪、阿眉溪、大庄溪、員全溪、安通溪、下勞灣溪、石坑溪、石公溪、高寮溪、尋腰溪、阿美溪、呂範溪、巷子濟溪、富興溪、太多蘭溪、鶴岡一溪、鶴岡二溪、奇美溪、大磯溪等46條河流。⁽⁴⁾

三、直流於海各河川：花蓮直注於海各河川，源出中央山脈者為和仁溪、和平溪、立霧溪、三棧溪、美崙溪、吉安溪等6條河流，均在花蓮溪流域以北，流程較長。源出海岸山脈者為鹽寮溪、水璉溪、蕃寮溪、加蘭溪、親不知溪、新社溪、斗濱溪、北頭溪、三富溪、大興溪等10條河流，皆在東側，除小璉、斗濱兩溪外，大率流程短促。⁽⁴⁾

唯一湖沼，鯉魚潭，位於銅門山，鯉魚山之間，南北長約1500公尺，東西寬800公尺，面積1平方公里餘，為南闊北狹之橢圓形湖沼，潭身向東傾斜，潭水逐深，深達八公尺，東畔通臨鯉魚山崖，依勢凹曲。潭為昔日之荖溪河床，經襲奪改道阻斷積滯而成，花縣略具規模之湖沼，風景擅勝。

花蓮東圍臨海，北起和平溪河口，南迄靜浦村迤南之大尖石，延袤110公里餘。立霧溪以北，當中央山脈東麓，山腳直插於海，南至花蓮溪河口，當立霧三角洲平與花蓮海岸平原之東緣，花蓮溪河口以南海岸山脈，導海逶迤走。沿岸全線，大致平直，僅美崙鼻及石梯坪東突，局部彎曲而已。

第七節 氣候

花蓮縣中央山脈蜿蜒崛律於西，太平洋沖融行漫於東，平地狹甚，故海陸風之流動特顯。晝，海風含水氣登陸，旋觸山脈，激升而蒸發、凝結、瀰漫於數百里間，璀璨晶晶，蔚爲雲海，天氣恆半陰半晴，晡後尤甚，日射爲之而減色。夜，陸風度林丘漸海，煙雲皆畫，常月朗星輝，浩渺無際，凡此關係海空航行至切。

所處緯度低，北迴歸線通過域內，及太平洋爲暖流沖激，平均水溫達 27°C ，氣溫殊高，大抵自北而南，愈南愈增，且逐月遞升，七月後漸降，殊富規律。年溫差亦小，全年似夏冬二季。雨量年中分配頗勻，秋冬稍多。雨量年平均達1927公厘以上，山區更增。風四序咸多，每暴風、颶、颶挾豪雨時至，縱橫挑蕩，掩冉卉木，洗滌灌園，殊爲偉觀，然往往致興，民物大損，益以地震頻繁，誠可念矣。顧以高溫多雨故，農作物與群植之生長，既易且豐，此又天惡飲特也。⁽³⁾

花蓮設有航標、測候所、燈台，此外又有糖廠、山林管理所、農林改良場、水利局、電力公司等，亦皆有測候設施，規模雖小，然紀錄提供訊息，有利航空，氣候及農林漁牧作業。⁽⁵⁾

花蓮氣溫頗高，無霜雪，紫翠終年不歇，嘉禾再熟，諸穀相屬，蔬果遍地，四季中，夏長而冬短，若以每候平均 22°C 以上者爲夏，不是 10°C 者爲冬，則平地夏長達210日以上，真正冬季則無之。然有西南季風，及其所挾雨量之調節、溫度爲低於西南諸縣約爲 22.5°C 。全年以1~2月爲最冷，7月最熱，然最冷時，氣溫不低於 4.4°C ，最熱才 36.5°C 。⁽³⁾

高溫、多風，兼之豪雨，最爲域內氣候特徵。東北季風始於十月下旬，終於次年三月下旬，爲期約六月。平均最大風速10.7，絕對最大風速達16.8。西南季風始於五月上旬，終於九月下旬，風力不大，上層雲霧易生雷雨，中央山脈間幾雷雨所作，若海上無颱風，即無強力風浪。⁽³⁾

花蓮縣山脈競走，標高伏，降雨數量，因地形而有差異，大抵北迴歸線以北年平均雨量約1700-2000公厘，以南地區2000公厘左右，大濁水右岸迄南山岳地區，爲2300-2400公厘，內太魯閣及八通關附近，雨量最少，年平均爲1300公厘，能高、奇萊一帶、雨量最多，年平均爲5800公厘。本縣全年降雨次數，則平均春季63天、夏季45天、秋季45天、冬季

54天，合計207天，日數之多可見一般。⁽³⁾

濕度因縣內北部以漲海，故亦略高於南，年平均絕對濕度為16.8公厘，平均相對濕度為81，雲量則次於宜蘭縣在十分之7.9~6.7間，惟雲量大，日照以弱，蒸冗以小。

颱風因本縣迴出東隴，於菲既適，故被襲之患，獨多且大，常發生於5月至 11月，7~9月尤登，各月發生率為5月4%，6月5%，7月27%，8月31%，9月22%，10月9%，11月2%。⁽³⁾

第三章 調查研究的方法與實施

第一節 研究方法：

一、文獻之蒐集、考察、整理：

由於花蓮縣誌缺土地資源植物篇，所以本論文植物方面初稿主要蒐集自(1)太魯閣國家公園植物調查報告⁽¹⁾，(2)Flora of Taiwan (台灣植物誌) Vol.1-6⁽⁶⁾，(3)台灣省通誌⁽⁵⁾，(4)最新台灣植物總目錄⁽⁷⁾，(5)台灣植物名彙⁽⁸⁾，(6)台灣木本植物圖鑑⁽¹¹⁾，(7)台灣外來觀賞植物名錄⁽⁹⁾，(8)台灣自生有用重要園藝植物圖說⁽¹⁰⁾，(9)台灣耕地之雜草⁽¹⁴⁾，(10)台灣海濱植物1-3冊，(11)台灣蘭科植物 1-3冊，(12)台灣高山植物彩色圖鑑，(13)台灣草本植物彩色圖鑑，(14)台灣木本植物彩色圖鑑Vol.1，(15)台灣木本植物誌，(16)台灣重要樹木彩色圖鑑，(17)台灣熱帶植物彩色圖鑑1-3 冊，(18)台灣常見植物圖鑑，(19)台灣的稀有植物，(20)台灣蕨類植物，(21)台灣海濱常見植物，(22)常見觀賞植物，(23)台灣野生木本植物，(24)蕨類植物，(25)海邊原生林植物之分佈與生態調查等有關植物及研讀本所已發表之論文著作或其他相關中藥文獻所記載之花蓮縣藥用植物，以供資料之整理。

將以上資料配合實地採集調查資料，依植物學分類次序，予以整理歸類，而藥用部位及主治、用法除依調查所得記載外，主要參考書目尚有：(1)藥用植物分類學，(2)高等植物分類學原理，(3)藥用植物學，(4)台灣藥用植物誌1-3卷，(5)台灣植物藥材誌1-2冊，(6)台灣有毒植物誌，(7)綱要台灣民間藥用植物誌，(8)台灣藥用植物手冊，(9)台灣民間藥1-2冊

，(10)世界民間藥，(11)彩色生草藥圖譜，(12)中草藥，(13)台灣地區出產中藥藥材圖鑑，(14)常用中藥之研究，(15)少用中藥之研究，(16)原色和漢藥圖譜上下冊，(17)原色常用中藥圖鑑，(18)原色中藥飲片圖鑑，(19)常用中藥之藥理 1-6 冊，(20)原色台灣藥用植物圖鑑 1-5 冊，(21)藥用植物之栽培，(22)中藥炮製學，(23)台灣藥草，(24)中藥大辭典，(25)東北之藥材，(26)中國藥用植物誌……等。並於本所指導教授等之推薦與指導下，分赴花蓮縣各地區及花蓮縣政府、農會、太魯閣國家公園管理局、中醫藥公會、藥用植物學會、林業工作區等處收集相關資料。

二、實地採藥、調查：

- (1)赴花蓮縣境內各鎮鄉市，作重點式實地採集調查，包括野生與栽培種藥用植物之生長與分佈情形，將其名稱、產地、用途、用部、調查時間，分別予以記錄，對特殊經濟作物做詳細栽培方式、植物生態等敘述，較具療效稀有之藥用植物及藥材拍攝幻燈片，並製成臘葉標本，以資保存。有疑問之藥用植物，則帶回研究、核對、查索或請教本所相關教授及專家學者，以鑑定其學名。
- (2)由本所所長或教授陪同或由中醫藥前輩或同學等單獨前往，拜訪花蓮縣境內較具規模之青草藥業者、採藥業者、中藥店、山產行、國術館、中醫診所及縣內對栽培、採藥、青草藥有興趣之人士等有關單位，並且由當地熱心人士陪同調查民間療法、產地、價格等情形。並抽樣分赴各地市場了解青草藥販賣及保健、飲料療法之現況。

第二節 實施要點

自幼隨父移居生長於花蓮縣玉里鎮，鄉村文物及農牧生活，早已深植心靈之中，爾後就讀本學院藥學系時，對藥用植物中醫藥更形樂衷，於今開展台灣植物保健事業，更是學以致用，為求精進於 83 年秋參加本所學分班之再進修，決定將家鄉藥用植物之調查予以完成，經選定研究之論文題目後，著手入階相關事宜並開始蒐集相關資料、文獻；爾後漸次實地走訪花蓮縣境內重點區域，進行調查採集研究工作，其實施分述如下：

1. 民國 83 年 10 月初，承業師謝教授文全，邱技正年永之指導，先行研讀本學組畢業校友之論文著作，了解本學組論文研究之方向及方法，並作成筆記，記錄要點，探討其成果及創見，並比較其良莠得失，以爲從事本論文研究之參考。
2. 民國 83 年 10 月底，筆者有感於本所研究生藥學組之台灣產生藥學研究論文分赴各地採集及分類之基礎十分豐富，因而進行蒐集，以助進行調查採集藥用植物研究工作之順利進行。
3. 民國 83 年 10 月 25、26 日兩天，筆者偕妻羅紋珍，犬子筑君、筑凱藉回娘家之際，由岳父羅永金先生陪同拜會縣政府相關人員，答允提供花蓮縣志及相關農林資料。
4. 民國 84 年元月 1 ~ 3 日三天，藉國定假日與妻小返鄉玉里老家探望母親，並由高中同學王則雄、薛順興等之陪同前往太麻林業工作站調查、採集並拜會蒐集資料。得藥材 24 種，藥用植物 150 種。
5. 民國 84 年 2 月 1 ~ 6 日六天，藉農曆春節回娘家並返鄉拜年之際，前往新城、北埔、佳民及源城、客城等地採集調查。得藥材 40 種，藥用植物 206 種。
6. 民國 84 年 3 月 29-31 日三天，與同學黃昭郎由中橫驅車經山線於光復、富田、大富調查採集並拍攝幻燈片，得藥用植物 186 種，後驅台東訪查，繞道南橫返台中。
7. 民國 84 年 4 月 22-24 日三天，由邱老師年永、黃昭郎同學陪同，前往鯉魚潭、池南等地採集調查，並拜會花蓮農場，得藥用植物 256 種。
8. 民國 84 年 8 月 15-18 日三天，由邱老師年永、黃昭郎同學陪同，租車經埔里合歡山，抵花蓮縣秀林鄉大禹嶺、天祥、花蓮市美崙山、瑞穗鄉、玉里鎮、卓溪鄉、富里鄉抵台東再經南橫返台中，沿途調查登記拍攝藥用植物幻燈片等達 326 種。調查高山植物及一般藥用植物。
9. 民國 84 年 9 月 19-22 日四天，由邱年永老師指導，黃昭郎同學陪同，租車經南迴公路台東成功長濱，抵靜浦、長虹橋、石門、豐濱、丁子漏

、光復經瑞穗、玉里過夜宮下，經新社、高山、牛山、檜木樹腳、鹽寮、嶺頂仁和、東昌、花蓮市、七星潭、古井頭、天祥、西寶農場後返台中，沿途採集調查拍攝幻燈片等達 289 種。調查海邊及一般植物。

10. 民國84年10月23-26日四天，由謝文全、葉豐次、張賢哲老師指導，黃昭郎同學陪同，租車經中橫公路沿途採集拍攝幻燈片，後前往秀林鄉煙冠山、和平、中和、仁和及清水山、大仁等地涉水登山採藥，後沿原道返台中，得高山植物 185 種。
11. 民國84年12月15-18日四天，由謝所長明村、謝文全老師、曾啓宗董事長、同學黃昭郎等陪同，租車經中橫公路，沿途採集，並拜訪西寶農場、天祥、花蓮市美崙山，後沿濱海、壽豐、豐濱、光復、瑞穗、玉里、卓溪、富里於台東東河農場與蘇主委貫中等會合，再拜訪台東農改場，因大雨改經南迴返台中，此次收穫最豐，獲得杜仲、大葉桑寄生及大量文獻資料，也登錄近 600 種藥用植物，有山地、平原、高山及海邊植物。
12. 民國85年3月23日親自返玉里後，專程赴太麻里林區工作站山區訪視毒蛇咬傷要藥台灣山豆根之產區原植物。
13. 民國85年3月30日至4月3日五天，由張永勳、邱年永老師指導，同學黃昭郎陪同，租車由南迴公路經台東到玉里鎮與花蓮海岸內側縱谷線之卓溪、樂合、石光、坪頂、高寮、春日、瑞穗及鹿鳴、山風瀑布經花蓮中橫返台中，獲取玉里高山藥用植物分佈與海岸縱谷山脈藥用植物分佈，得藥用植物326種，及稀有植物如赤箭等。
14. 民國85年4月29-30日二天，由謝文全教授陪同前往嘉里、七星潭及吉安、福興並鯉魚潭週邊，採集調查並拍攝幻燈片及觀察植物生長及分佈栽培情形，獲得藥材 15 種，藥用植物 168 種。
15. 民國85年6月7-9日二天，由謝文全教授陪同前往，租車經中橫公路到花蓮市、秀林鄉、龍澗、龍溪、奇萊、木瓜溪、新城鄉古井頭、廣安宮與天祥太魯閣山區，並調查花蓮市地區青草藥店，回生堂青草藥舖謝昌臨、黃曉德，並由中醫師公會楊朝堂總幹事陪同訪視，獲得藥材

達 6-7 百種，據言最高販售達貳仟多種，藥用植物達 375 種。

第三節 協助調查、訪問、採集及提供資料者

茲列舉協助調查、採集及提供資料者之商號住址等如下：

1. 太魯閣國家公園保育課 鄒月娥技士：花蓮縣秀林鄉富世村富世291號。
2. 花蓮林區管理處玉里工作站 薛順興先生：花蓮縣玉里鎮中華路414號。
3. 花蓮縣中醫師公會總幹事 楊朝堂先生。
4. 岐安堂藥房張維熙先生：花蓮市南京街33號。
5. 廣修堂藥房黃星玉先生：花蓮縣玉里鎮中正路74號。
6. 回春藥行張建才先生：花蓮市中華路97號。
7. 日春青草藥店吳上明先生：花蓮市福集路16號。
8. 裕仁堂藥房張宏煙先生：花蓮縣富里鄉車站街22號。
9. 天生藥房邱耀璋先生：花蓮市中山路85號。
10. 祥順青草行陳文呈先生：花蓮縣吉安鄉自立路21號。
11. 六和堂國藥行張又中先生：花蓮縣吉安鄉中山路1段34號。
12. 少林青草行龐寶霖先生：花蓮縣新城鄉北埔路98號。
13. 八百春堂藥房彭子森先生：花蓮縣壽豐鄉壽豐路1段135號。
14. 延壽藥房張金生先生：花蓮縣鳳林鎮中正路2段171號。
15. 保壽堂藥房馮堯泉先生：花蓮縣瑞穗鄉中華路15號。
16. 杏林藥房楊寶喜女士：花蓮縣玉里鎮大禹里220號。
17. 太和藥房范鈞理先生：花蓮縣東里村131號。
18. 保生堂藥房林榮昌先生：花蓮縣富里鄉中山路101號。

編號：DOH85-CM-049

藥用植物之引種觀察及標本製作

Introduction, Observation, and Specimen Preparation of Medicinal Plants

台灣省農業試驗所

劉 新 裕

中文摘要

爲配合行政院衛生署中醫藥委員會發展本土性藥用植物，及設立藥園之政策，於本所農場建立一低海拔藥園，並經由各種公、私管道引進國內外藥用與保健植物之種原，利用種子播種或莖枝扦插等技術進行繁殖，並試種於本所溫室、農場或藥園中，同時進行初步觀察試驗及標本製作。針對常用藥用植物並進行一系列性狀調查、生產力評估或品質比較。

本年度自歐洲地區與日本引進多種藥用、保健及調味植物種原，其中纈草、康復力、薊、茴香、薰花草、西洋蒲公英、洋薄荷、迷迭香、麝香草及芎藭等十種植物，本爲歐洲地區與日本最重要藥用及調味植物種類之一，引種後在本省繁殖情形良好，且初期之生長不錯，應具將來發展潛力。上述之材料由於繁殖與生產已無問題，應值得國內有關醫藥研究單位加以繼續開發及利用。

關鍵詞：藥用植物、引種、觀察、標本製作、生產

ABSTRACT

As a program of the Department of Health, Executive Yuan, Republic of China, Taiwan Agricultural Research Institute(TARI) has established a low-land Medicinal Plant Park (altitude 85 m) due to its plentiful herb germplasm preservation and active research activities on medicinal plants. A total of 600 medicinal species have been introduced, propagated, and observed at TARI during the past years. The introduced included *Bupleurum* and *Dioscorea* spp., *Valeriana officinalis*, *Symphytum officinale*, *Cnicus benedictus*, *Foeniculum vulgare*, *Lavandula angustifolia*, *Taraxacum officinale*, *Mentha piperita*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Cnidium officinale*, and *Echinacea angustifolia* etc. Materials from 10 important medicinal plants introduced from Germany and Japan have been cultivated at TARI to evaluate their production ability.

key words: Medicinal plants, Introduction, Observation, Specimen preparation, production.

前 言

我國地大物博，自然條件十分優越，生藥資源極為豐富，先民在用藥經驗中已累積了相當輝煌之成果。最早遠在三皇五帝時代即有利用民間藥之記載，漢代之「神農本草經」為全世界第一部藥學專著。其後至今，更有一系列之本草及醫藥典籍問世。這些典籍主要以闡述藥用及保健植物為主，記載有關之性味、歸經、功能及應用療效，足以起人沈疴、益人神智、弱可令強、鬱可使寬。我國歷史之淵源流長實與固有醫藥之發揚息息相關。

藥用植物依其用途可分為下列五類：1. 藥典原料植物—為根據藥典

而收集之藥用植物，藥之效能最爲確實。此類植物及藥品之性狀、功能及品質，在有些國家已有明文規定，此等植物約有150種左右。2.國藥原料植物—係依據本草綱目所記載者，分佈於我國、韓國及日本等地，較重要者約有300種左右。3.新藥原料植物—係藥典記載以外之新藥用植物，爲製藥公司製造特殊藥劑之原料植物。4.民間藥用植物—爲民間一般常用之草藥及藥劑，或祕方藥之植物。5.工業原料植物—除醫藥用途以外，兼用於工業原料之藥用植物。

近來由於發現大部分的合成藥劑都有副作用，而且現代醫學對於幾種慢性疾病如肝炎、高血壓及糖尿病等，仍不能提出根治之道。因此，天然藥用植物的利用研究正日受重視，我國傳統醫藥的價值與重要性也再度引起世人的普遍注意與重視。

本省雖偏處一隅，但是自然條件十分優越，境內高山平原處處，氣候更兼具溫、副熱及熱帶三帶，植物資源相當豐富，因而素有天然大植物園之美譽。據資料指出，台灣自生維管束植物多達4,477種，加上外來的2,500餘種，總數超過 7,000 種，其中不乏可資利用之珍貴生藥資源，可供藥用及保健利用，有的且療效不錯。惟國人至今所需藥材多依靠進口，其價格與品質因爲無法確保穩定，徒增病患不少負擔，及影響醫療效果甚大。

在本省關於藥用植物較具體的研究利用，最早可考的栽培地點爲日據時代在花蓮富里，曾闢有一處占地200多公頃的藥園，當時共栽植一百多種藥用植物，且生長情形甚佳。光復後由於乏人管理，並受採藥人士濫採結果，已所剩不多。目前，本省民間有不少地區種植藥用植物，其中部份曾得到政府經費補助及技術輔導，如省農林廳曾與中國醫藥學院合作，輔導雲林縣虎尾等鄉鎮，種植薄荷、澤瀉、枸杞、荊芥及澤蘭等植物，所生產的藥材直接供應當地藥商利用。行政院衛生署中醫藥委員會亦曾自民國65年(1976)起，委託中國醫藥學院及林業試驗所，進行引種、育苗及試種工作，民國72年起又洽請國軍退除役官兵輔導委員會所屬的花蓮、臺東、清境及嘉義四個農場，進行試種黃柏、土肉桂、杜仲、槐花及山藥等五種重要藥用植物，在各場細心照料下，生長情形甚佳

本所藥用植物之研究起自年，曾自國內外引進多種藥用植物的種子及種苗，分別在不同海拔試種栽培，並進行多項試驗，其中較為重要且正進行深入研究的藥用植物，在民間藥材方面計有金線連、七葉膽、曇花、仙草及白鶴靈芝等，在常用的傳統藥材方面則有三島柴胡、高氏柴胡、日本黃連、馬援薏苡、長葉枸杞、台灣木通、台灣黃蘗、黃梔子、金銀花、麥門冬、地黃、芡實、黃耆、當歸、半夏、漏蘆(山防風)、山藥及桔梗等。就本省之藥用植物資源進行開發利用，將對我國傳統醫藥之發揚、國民之保健及疾病之治療有重大助益。

由國貿局海關資料指出，每年進口生藥之種類、數量及金額相當龐大，以民國七十三年(1984)為例，進口生藥之金額達新台幣億萬元以上的有高麗紅參、黃耆、西洋參、黃連及當歸等五種；金額達千萬以上的有三七、杜仲、枸杞子、地黃、麥門冬、柴胡及沉香等28種。若能針對需要量較多且價格較高之藥用植物種原由國內外引進，並進行試種、生產、品種改良及多元化利用等深入研究，將具有特殊意義。

同功異構酵素是指不同形式之同一種酵素，它們可能具有不同的分子量、電荷、立體結構或其他性質，但可進行相同的催化反應，因此可藉電泳和染色方法顯示不同的條帶，而呈現多形性現象(polymorphism)，因此是一種有用的生化標誌(biochemical marker)，可用於基因型的鑑定。同功酵素之電泳分析具有多種優點，如具有共顯性現象(codominance)，可直接顯示生物的基因型；靈敏度高；分析時只需少量樣品，因而對供試材料之傷害極微；且沒有上位基因之交互感應現象(epistatic interaction)等。因此，同功異構酵素在農業上的應用日漸廣泛。有關藥用植物的同功異構酵素電泳研究，至今尚缺乏充分的文獻資料，亟待補充。

本試驗將針對本省現有或引進之藥用植物，作系統徵集、鑑定及觀察，以開發本省現有重要之藥用植物，對年需要量很多且價格昂貴的未有藥用植物，將由國外引進並進行初步適應性試驗與其他相關深入研究。

材料與方法

一、建立低海拔藥園：

以本所目前收集之藥用與保健植物種原，及陸續引入之種類，建立低海拔(本所海拔)藥園一處，藥園內之植物將區分為下列種類：

1. 草部本草植物：主以本草備要常用草本藥用植物為主。
2. 木部本草植物：主以本草備要常用木本藥用植物為主。
3. 民間藥用植物：主以民間藥用植物為主。
4. 水生藥用植物：主以水生藥用植物為主。
5. 抗癌植物：主以薏苡等抗癌藥用植物為主。
6. 引種、繁殖與育苗：建立引種育苗專區，供新引進藥用植物之適應、繁殖與觀察用。
7. 試驗推廣植物：本區將供已經證明特具藥效、且值得推廣利用之藥用植物，作栽培示範及觀摩比較用。

二、藥用植物之引種觀察及標本製作：

1. 藥用植物之引種與觀察：將利用各種公、私管道，引進國內外重要藥用植物之種子或植株，進行初步觀察比較試驗。
2. 永久標本製作法：利用飽和 $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ，加水(1:3)，將藥用植物植株在 $75^\circ\text{C} \sim ^\circ\text{C}$ 下煮50分鐘，然後水洗40分，取出植株並用草酸和亞硫酸鈉溶液 (各3.15g/1) 浸2~3天，之後浸在2%福馬林液中4~8小時，並置入含相同溶液之標本瓶中，供永久保存。

三、大量繁殖試驗：每年將完成約20種重要藥用植物之大量繁殖研究。 大量繁殖方法如下：

1. 種子繁殖法：利用不同梯溫生長箱，探討常用藥用植物種子發芽之最適當溫度，俾利大量繁殖工作之進行。
2. 扦插繁殖法：利用不同濃度IBA(Indole-3-butyric acid) 處理常用藥用植物之剪枝，調查扦插成活率及發芽與發根情形，以探討大量

繁殖之可行性。 IBA濃度分爲0、500、1,000、1,500及2,000ppm五種，取長約100cm具二節之枝條40支，扦插於混合介質之穴植管內，混合介質爲泥炭土：蛭石：珍珠石=5：1：1，重複三次，利用隧道式覆蓋透明塑膠布觀察其生長情形。

3. 組織培養繁殖法：利用MS培養基，並添加BA(Benzyladenine)、NAA(α -Na-phthalene-acetic acid)、sucrose及Difco-agar，培養重要藥用植物之頂芽或腋芽，以探討利用組織培養技術進行大量繁殖之可行性，BA濃度爲1、2及3 mg/l，濃度爲0.1、0.2及0.4 mg/l，濃度爲1、2及5%，Difco-agar爲0.9%，每處理各支，三重複。

四、重要藥用植物之生產力評估：於田間試種後，調查其性狀與收量，供為藥

用植物生產力之評估依據。

五、藥用植物之電泳分析：

A. 架設膠片架：

1. 先將玻璃以酒精擦拭乾淨，放在乾淨的面紙上，以大玻璃、小玻璃之順序疊好。

大小玻璃均以較無缺口者爲下端，以防溶液漏出。2. 將疊好之玻璃片插入膠片夾，務必使兩片玻璃之下端平整，spacers緊靠二邊，不可高低不平，否則注入gel solution時易漏。對齊後，分別將四個螺栓栓緊。

3. 膠片夾置入膠片架上，卡緊，注意：下部有紅色、灰白色長條形軟墊各一塊，墊於膠片夾之下，使其與玻璃片能緊密結合，避免產生空隙。

B. 配置膠體：

1. 先配置running gel (配方AA)，攪拌後，以吸管吸取，緩慢注入，待高度至膠片夾兩端邊線凹處下緣。
2. 以dist. H₂O注入其上，使膠片(running gel)保持水平線。

RA 2.5 ml 1.25 ml 0.625 ml

配方AB(Stacking gel) :

1.SA(pH 6.7) : 内含 1N HCl 48.0 ml
 0.5M Tris 5.98 g
 Temed 0.46 ml
 add dist. H₂O to 100 ml(Total)

2.SB : 内含 acrylamide 10.0 g(過濾)
 Bis 2.5 g
 add dist. H₂O to 100 ml(Total)

3.SC : 内含 Riboflavin 4 mg
 add dist. H₂O to 100 ml(Total)

4. stacking gel 3.1% : 内含 4片量 2片量 1片量
 dist. H₂O 4 ml 2 ml 1 ml
 SB 2 ml 1 ml 0.5 ml
 SC 1 ml 0.5 ml 0.25 ml
 SA 1 ml 0.5 ml 0.25 ml

配方AC(Tank buffer, pH 8.3) : 内含

 Tris 6.0 g
 Glycine 28.8 g
 add dist.H₂O to 1000 ml(Total)

C. 取樣：

1. 預定採取量，先準備適量封口袋，寫上品系名稱、並備好冰桶。
2. 至田間選取成熟完好的葉片(避免太嫩或已老化、黃化之葉片)。
採下後裝入封口袋內，馬上放入冰桶中，以保持酵素活性。
3. 回到實驗室，以剪刀剪取適量葉片，約取0.3g，並加入萃取液1ml。若是離心管萃取，則取葉片.17g(萃取液：.5ml)，注意避免取到中肋或葉緣。(4)稱好後若不馬上研磨萃取，必須先放入原封口袋，置於冰桶保持低溫狀態。

註2：配方B(PAGE extration buffer)：一般常用之萃取液有下列四種，將取用適當者。

配方BA(extration buffer I)：內含

①Tris-HCl	0.1M	pH7.5	1.21 g/100 ml
② β -mercapto ethanol	0.002%		0.002 ml =2 μ l
③glycerol	25%		25 ml
④PVP-40	6%		6.0 g
⑤Triton-100	0.05%		0.05 ml
⑥EDTA	0.3 mM		11.16 mg
[②+③+④+⑤+⑥]+①至100 ml			

配方BB(extration buffer II)：內含

①Tris-HCl	0.1M	pH7.5	1.21 g/100 ml
②Na ₂ -EDTA	3mM		0.11166 g
③glycerol	50%(v/v)		50 ml
④pvp-40	6%		6.0 g
⑤Triton-100	0.05%		0.05 ml
⑥glutathione	1%(w/v)		1 g
[②+③+④+⑤+⑥]+①至100 ml			

配方(extraction buffer III)：內含

①Tris-HCl	0.1M	pH7.5	1.21 g/100 ml
② β ethanol	0.003%		0.003ml=3 μ l
③glycerol	50%		50ml
④Na ₂ -EDTA	1mM		372mg=0.372g
⑤KCl	10mM		0.075g
⑥MgCl ₂	10mM		0.095g
[②+③+④+⑤+⑥]+①至100 ml			

配方BD(extraction buffer IV)：內含

①Tris-HCl	0.1M	pH7.2	1.21 g/100 ml
②Na ₂ -EDTA	1mM		0.372g
③glycerol	50%(v/v)		50ml
④pvp-40	6%		6.0g
⑤glutathione	1%		1.0g
⑥KCl	5mM		0.038g
⑦MgCl ₂	10.5mM		0.1g
[②+③+④+⑤+⑥+⑦]+①至100 ml			

D. 萃取：

1. 準備適量有蓋小離心管，寫上品系名稱(二套)。取一盆冰，萃取液(配方B)放在冰上，將sample倒入研鉢中，置於冰上，放入少許pvp 粉末。研鉢上也需標試品系名，以便識別。
2. 欲研磨之sample放在桌上(不可在冰上，否則會結冰無法磨)，加入適量液態氮以杵先壓碎葉片，待液態氮完全蒸發前，快速磨碎葉片，若葉片不夠細碎，可再加液態氮再磨一次。
3. 加入1ml萃取液，將研鉢放在冰上磨細葉片(須看不到片狀或塊狀)，汁液倒入有蓋離心試管，管口擦拭乾淨、蓋緊，置於冰上。
4. 以1,000 rpm、4°C，離心15分鐘(離心機應於使用前約1 小時開機，設定好溫度；離心前，須先將試管擦拭乾淨，避免污染離心機；

放入離心機時，注意左右平衡)。離心後取上清液至新的有蓋離心管中，置於冰上或冷凍庫中備用。

E. sample loading及跑電泳：

1. 取sample 20 μ l，loading至ge凹槽處，注意：避免污染鄰槽。
 2. loadin完，吸取少許buffer (配方AC)，緩慢注滿凹槽至玻璃上緣。
 3. 拆下膠片夾，置於電極架上(電極架置於桌面上擺平，膠片夾水平置入。注意要卡緊)。放入電泳槽，內槽加入tank buffer，高度高於小片玻璃約0.5cm至 0.8cm，外槽加入tank buffer至約電泳槽/3高度，在內槽加入追蹤染劑2~3滴Bromophenol，使tank buffer呈深藍色。
 4. 蓋上電泳槽蓋，注意與電極架上之正負電極相符，接上 power supply。設定volts至1000V，curr.至16.0mA (8.0mA \times 2)，設定至適當顯示位置後，開始跑電泳。電泳槽須置於冰箱中。
 5. 注意volts之初始值。前1小時，每30分鐘檢測一次數值變化程度，並注意追蹤線的位置。
 6. 當追蹤劑至底部三橫線的第三條線時，即可關掉電源，進行酵素染色。
 7. 在跑電泳時，即須將所需染劑配好，以便跑完電泳可立即染色。
- 電泳跑完時，小心取出電極架，內槽之tank buffer棄之，外槽tank buffer可回收。小心取出膠片夾，再取出玻璃片，輕動spacers 則可將2片玻璃分開，分開後依gel之位置，做上記號，以便視別順序，通常在大玻璃上之gel可在其左下角刮去一塊，小玻璃之gel則在右下刮去一角。

F. 染色：依不同酵素、不同染劑及染色時間，進行下列九種酵素之染色及分析 (依據Vallejos, 1983 及Gmitter, 1985 之方法)。

- (1) Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) (E.C. 2.6.1.1)
- (2) Shikimate dehydrogenase (SKDH) (E.C. 1.1.1.25)
- (3) Peroxidase (PRX) (E.C. 1.11.1.7)

- (4) Isocitric dehydrogenase (IDH) (E.C. 1.1.1.42)
- (5) Esterase (EST) (E.C. 3.1.1.2)
- (6) Acid phosphatase (ACP- α or APS)
- (7) Phosphoglucoisomerase (PGI) (E.C. 5.3.1.9)
- (8) Phosphoglucomutase (PGM) (E.C. 2.7.5.1)
- (9) Malate dehydrogenase (MDH) (E.C. 1.1.1.37)

結果與討論

爲配合行政院衛生署中醫藥委員會發展本土性藥用植物之政策，及設立藥園，於本所農場建立一低海拔藥園，並進行重要藥用植物之引種、繁殖、及觀察等試驗及標本製作。針對常用藥用植物並進行一系列性狀、生產力及品質比較。藉此，將可開發各種具潛力且質量俱優之重要藥用植物，以期早日達到本土性生藥材料自給自足之目的。

一、低海拔藥園之建立與管理：

已於本所內建立低海拔(本所海拔85m)藥園一處，並定時進行除草、肥培管理及美化等工作。藥園內藥用植物分成下列種類：

1. 草部本草植物類：主以本草備要常用藥用植物爲主，例如柴胡、當歸、麥門冬、天門冬、山藥、莪朮、車前、桔梗、射干、半夏、天南星、防風、夏枯草、大小薊、牛蒡、何首烏、薄荷、金銀花、葛根、益母草、艾葉、薑黃、商陸、木通、仙茅、使君子、山奈、蒲公英、土茯苓、白茅、吳茱萸及其他重要本草植物等。
2. 木部本草植物類：主以黃梔子、枸杞、紫蘇、檉柳、宜梧、白鶴靈芝、桑樹、大青及肉桂等藥用植物爲主。
3. 民間藥用植物類：主以魚腥草、肝炎草、明日葉、山防風、三白草、左手香、岡梅及蘆薈等藥用植物爲主。
4. 水生藥用植物類：主以芡、蓴菜、荷花、睡蓮及澤瀉等藥用植物爲主。

5. 抗癌植物類：主以薏苡、南瓜、山防風及金銀花等藥用植物為主。
6. 引種、繁殖與育苗區：建立引種育苗區，供新引進藥用植物之適應、繁殖及比較用。
7. 試驗推廣植物區：本區將供已經實驗證明特具藥效，且值得推廣利用之藥用植物，作栽培示範及觀摩比較用。例如柴胡專區、山藥專區、薄荷專區、麥門冬專區、何首烏專區、薑黃專區、黃梔子專區及白鶴靈芝專區等。

二、藥用植物之引種及標本製作：

本年度計引種種藥用植物，有關其植物名稱與分類及標本製作目錄表列如下。

表 1.1996 引種藥用植物之名稱、分類及標本製作目錄表

種 類	科 名	學 名
1. 大茴香	繖形科	Pimpinella anisum
2. 朝鮮薊	菊 科	Cynara scolymus
3. 纈草	敗醬科	Valeriana officinalis
4. 康復力	紫草科	Symphytum officinale
5. 茴香	繖形科	Foeniculum vulgare
6. 雛菊	菊 科	Bellis perennis
7. 金絲桃	福木科	Hypericum perforatum
8. 金蓮花	金蓮花科	Tropaeolum majus
9. 大南瓜	葫蘆科	Cucurbita maxima
10. 薰衣草	唇形科	Lavandula angustifolia
11. 亞麻	亞麻科	Linum usitatissimum
12. 西洋蒲公英	菊 科	Taraxacum officinale
13. 水芹	繖形科	Petroselinum crispum
14. 洋薄荷	唇形科	Mentha piperita
15. 迷迭香	唇形科	Rosmarinus officinalis
16. 紫蘇	唇形科	Salvia officinalis
17. 太陽帽	菊 科	Echinacea angustifolia
18. 麝香草	唇形科	Thymus vulgaris
19. 苦艾	菊 科	Artemisia absinthium
20. 北柴胡	繖形科	Bupleurum chinense

表 1.1996 引種藥用植物之名稱、分類及標本製作目錄表(續)

種 類	科 名	學 名
21.小本山葡萄	葡萄科	Vitis thunbergii
22.白木香	瑞香科	Aquilaria sinensis
23.巴戟天	茜草科	Morinda officinalis
24.淫羊藿	小蘗科	Epimedium macranthum
25.淡竹葉	禾本科	Lophatherum gracile
26.紫菀	菊 科	Aster tataricus
27.食茱萸	芸香科	Fagara ailanthoides
28.粉光參	五加科	Panax quinquefolium
29.長野山藥	薯蕷科	Dioscorea spp.
30.大黃	蓼 科	Rheum palmatum
31.芎藭	繖形科	Cnidium officinale
32.長葉枸杞	茄 科	Lycium halimifolium
33.草石蠟	茄 科	Stachys sieboldi
34.蒟蒻	天南星科	Amorphophallus konjac
35.薄荷	唇形科	Mentha spp.
36.紅花	菊 科	Carthamus tinctorius
37.杜仲	杜仲科	Eucommia ulmoides
38.青脆枝	茶茱萸科	Nothapodytes foetida
39.曇花	仙人掌科	Epiphyllum oxypetalum
40.地黃	玄參科	Rehmannia glutinosa
41.紫草	紫草科	Lithospermum erythrorhizon
42.牌錢樹	豆 科	Phyllodum pulchellum
43.茴香菖蒲	天南星科	Acorus macrospadiceus

表 1.1996 引種藥用植物之名稱、分類及標本製作目錄表(續)

種 類	科 名	學 名
44. 龍吐珠	馬鞭草科	<i>Clerodendrum thomsonae</i>
45. 天門冬	百合科	<i>Asparagus cochinchinensis</i>
46. 朱蕉	百合科	<i>Cordyline terminalis</i>
47. 山菅蘭	百合科	<i>Dianella ensifolia</i>
48. 四葉蓮	金粟蘭科	<i>Chloranthus oldhami</i>
49. 酸棗	鼠李科	<i>Zizyphus jujuba</i>
50. 日日春	夾竹桃科	<i>Catharanthus roseus</i>
51. 龍舌蘭	石蒜科	<i>Agave americana</i>
52. 魚腥草	三白草科	<i>Houttuynia cordata</i>
53. 過山香	芸香科	<i>Clausena excavata</i>
54. 金橘	芸香科	<i>Fortunella japonica</i>
55. 鳳仙花	鳳仙花科	<i>Impatiens balsamina</i>
56. 仙人球	仙人掌科	<i>Echinopsis multiplex</i>
57. 藍桉	桃金娘科	<i>Eucalyptus globulus</i>
58. 龍膽草	龍膽科	<i>Gentiana scabra</i>
59. 狗尾草(狐狸尾)	豆 科	<i>Uraria macrostachya</i>
60. 魚針草	唇形科	<i>Anisomeles indica</i>
61. 山煙草	茄 科	<i>Solanum verbascifolium</i>
62. 釘地蜈蚣	玄參科	<i>Torenia formosana</i>
63. 一枝黃花	菊 科	<i>Solidago leiocarpa</i>

三、主要繁殖方式：完成下列種藥用植物之主要繁殖方法研究。

表 2. 40種重要藥用植物之繁殖方法

種 類	學 名	主要之繁殖法
1. 大茴香	Pimpinella anisum	種子繁殖
2. 朝鮮薊	Cynara scolymus	種子繁殖
3. 纈草	Valeriana officinalis	種子繁殖
4. 康復力	Symphytum officinale	種子繁殖
5. 茴香	Foeniculum vulgare	種子繁殖
6. 雛菊	Bellis perennis	種子繁殖
7. 金絲桃	Hypericum perforatum	種子繁殖
8. 金蓮花	Tropaeolum majus	種子繁殖
9. 大南瓜	Cucurbita maxima	種子繁殖
10. 薰衣草	Lavandula angustifolia	種子繁殖
11. 亞麻	Linum usitatissimum	種子繁殖
12. 西洋蒲公英	Taraxacum officinale	種子繁殖
13. 水芹	Petroselinum crispum	種子繁殖
14. 洋薄荷	Mentha piperita	種子繁殖
15. 迷迭香	Rosmarinus officinalis	種子繁殖
16. 紫蘇	Salvia officinalis	種子繁殖
17. 太陽帽	Echinacea angustifolia	種子繁殖
18. 麝香草	Thymus vulgaris	種子繁殖
19. 苦艾	Artemisia absinthium	種子繁殖
20. 柴胡	Bupleurum chinense	種子繁殖

表 2. 40種重要藥用植物之繁殖方法(續)

種 類	學 名	主要之繁殖法
21.小本山葡萄	Vitis thunbergii	種子繁殖或莖節扦插繁殖
22.白木香	Aquilaria sinensis	種子繁殖或莖節扦插繁殖
23.巴戟天	Morinda officinalis	種子繁殖或莖節扦插繁殖
24.淫羊藿	Epimedium macranthum	種子繁殖或莖節扦插繁殖
25.淡竹葉	Lophatherum gracile	扦插繁殖
26.紫菀	Aster tataricus	種子繁殖
27.食茱萸	Fagara ailanthoides	種子繁殖
28.粉光參	Panax quinquefolium	種子繁殖
29.長野山藥	Dioscorea spp.	種子繁殖
30.大黃	Rheum palmatum	種子繁殖
31.芎藭	Cnidium officinale	塊根繁殖
32.長葉枸杞	Lycium halimifolium	種子繁殖或莖節扦插繁殖
33.草石蠟	Stachys sieboldi	塊根繁殖
34.蒟蒻	Amorphophallus konjac	塊根繁殖
35.薄荷	Mentha spp.	莖節扦插繁殖
36.紅花	Carthamus tinctorius	種子繁殖
37.杜仲	Eucommia ulmoides	莖節扦插繁殖
38.紫草	Lithospermum erythrorhizon	種子繁殖
39.牌錢樹	Phyllodum pulchellum	種子繁殖
40.茴香菖蒲	Acorus macrospadiceus	分株繁殖

四、重要藥用植物之觀察與發展評估：

本年度針對種重要藥用植物，進行觀察與發展評估，以供日後生產質量俱優之藥材、及早達到生藥自給自足之目標預作準備。在下列植物中，第 A 至第 I 種引至歐洲之德國地區，第 J 種引至日本。

A. 纈草(*Valeriana officinalis*)，屬於敗醬科Valerianaceae草本植物，為歐洲地區最重要藥用及調味植物種類之一。

1. 繁殖方式：種子繁殖。

2. 形態特徵：多年生植物，株高可達1.8m。

莖直立。

葉對生，近根部之葉片較大，莖上葉較小。

花繖形，小花多數，花冠3—6mm長，淡紅至白

色，花期每年5—9月。

3. 分佈：歐洲全境。

4. 成分：根部含Valepotriate、酸、生物鹼及揮發油。

5. 利用：根部為鎮靜及鎮痙要藥，無副作用，供治神經興奮、失眠及胃與腸痛。

6. 飲用法：家居失眠時，可取2茶匙根粉，先以250cc冷開水浸泡，10—12小時後飲用，每日2—3次，每次一茶杯量。

B. 康復力(*Symphytum officinale*)，屬於紫草科Botarginaceae 草本植物，為歐洲地區最重要藥用及調味植物種類之一。

1. 繁殖方式：種子繁殖。

2. 形態特徵：多年生草本，株高1.5m，全株密披細毛。

莖角狀有翼膜，不分枝或只上端分枝。

葉披針形，長達25cm。

花期每年5—7月。

3. 分佈：全部歐洲及亞洲均有分佈。

4. 成分：Allantoin、單寧酸、粘液質、Pyrrolizidin類生物鹼、揮發油。

5. 利用：根及葉可消炎、止血、癒傷，治骨折、關節痛、扭傷、脫

白。

6. 飲用法：取2茶匙康復力根，先以250ml沸水浸泡15分鐘，過濾後濾液內服，每日2—3茶杯量，不可常服。

C. 薊(*Cnicus benedictus*)，屬於菊科Asteraceae 草本植物，為歐洲地區最重要藥用及調味植物種類之一。

1. 繁殖方式：種子繁殖。

2. 形態特徵：株高40—100cm，全株披毛。

莖五角狀，多分枝，下半部多刺。

葉長方形至披針形，下半部葉長達30cm，有柄，上半部葉環生於莖部。

頭狀花位於莖頂，約4cm長，2cm寬，花期每年 6—7月。

果實有冠毛。

3. 分佈：地中海區域、小亞細亞、高加索地區。

4. 成分：單寧酸、揮發油及苦味物質。

5. 利用：葉及花可治肝、膽疾患、胃痛、食慾不振。

6. 飲用法：取葉及花約1湯匙量，加水250ml，煮沸後靜置數分鐘，於主餐後服用一杯，每日兩杯量。

D. 茴香(*Foeniculum vulgare*)，屬於繖形科Apiaceae 草本植物，為歐洲地區最重要藥用及調味植物種類之一。

1. 繁殖方式：種子繁殖。

2. 形態特徵：多年生草本，環境不良時只一年生，株高2m。

莖直立，多分枝。

葉線形。

繖形花，花期每年7—10月。

果實長卵形，長4—10mm，寬2—3mm。

3. 分佈：地中海沿岸。

4. 成分：揮發油、脂肪酸。

5. 利用：種子常用為鎮咳及鎮定劑，可改善脹氣及消化不良等症。

6. 飲用法：取1茶匙壓碎種子，以250ml開水浸泡10分鐘，過濾後服

用，咳嗽時加糖，日服2—5次，每次1茶杯量，治胃腸脹氣時不加糖，皆無副作用。

E. 薰衣草(*Lavandula angustifolia*)，屬於唇形科Lamiaceae草本植物，為歐洲地區最重要藥用及調味植物種類之一。

1. 繁殖方式：種子繁殖。

2. 形態特徵：多年生半灌木植物，株高60cm。

葉長而細，葉緣內捲，下面葉具銀灰色絨毛，上面葉灰綠色。

花藍紫色，有很強香味，花期7—9月。

3. 分佈：地中海一帶。

4. 成分：富含揮發油、單寧酸及苦味物質，另含樹脂及少許皂甙。

5. 利用：花為中樞神經鎮定劑及止瀉劑。

6. 用法：

茶飲法：取2茶匙花，以250ml開水浸泡5—10分鐘，之後過濾飲用，鎮定神經興奮時加糖慢飲，止瀉或治胃及腸痛時不加糖。

沐浴法：取花50—60g，加1l水浸泡，加熱至沸約10分鐘後過濾，再加入滿水浴缸內使用。

以上二法皆無副作用。

F. 西洋蒲公英(*Taraxacum officinale*)，屬於菊科Asteraceae草本植物，為歐洲地區最重要藥用及調味植物種類之一。

1. 繁殖方式：種子繁殖。

2. 形態特徵：多年生草本，株高40cm，全株含乳白色汁。根粗大，長可達30cm。葉基生，有不整齊缺刻。花單生於長柄上，舌狀花，花期4—5月。

3. 分佈：全歐、西亞。

4. 成分：苦味物質、單寧酸、Cholin、菊糖、維生素C及礦物元素。

5. 利用：嫩葉供生菜(salat)用，根或全草治肝、膽及腎疾病，促進膽汁分泌，另治風濕病。

6. 飲用法：取1—2茶匙乾根，以250ml冷水浸泡後煮沸1分鐘，10分鐘後過濾飲用。

G. 洋薄荷(*Mentha piperita*)，屬於唇形科Lamiaceae 草本植物，為歐洲地區最重要藥用及調味植物種類之一。

1. 繁殖方式：種子繁殖。

2. 形態特徵：多年生草本，株高80cm。

莖四角形，於上半部分枝。

葉對生，有柄，長卵形，鋸齒緣，間雜紅色。

花輪生於上位葉腋，淡紫色，花期7—9月。

3. 分佈：歐洲及北美。

4. 成分：揮發油、單寧酸、芳香物質。

5. 利用：全草治胃、腸、肝及膽疾病。

6. 飲用法：取1湯匙葉量，以250ml開水浸泡10分鐘，過濾後不加糖飲用，日服量三次，每次1茶杯量。

H. 迷迭香(*Rosmarinus officinalis*)，屬於唇形科Lamiaceae 草本植物，為歐洲地區最重要藥用及調味植物種類之一。

1. 繁殖方式：種子繁殖。

2. 形態特徵：常綠木質半灌木，株高1m，多分枝。

葉對生，針狀，緣向下捲，上表皮深綠色，下表皮灰色，披絨毛。

花色淺藍至淡紫，花期3—6月。

3. 分佈：地中海至中歐一帶。

4. 成分：揮發油、單寧酸、苦味物質、芳香物質、迷迭香酸。

5. 利用：供風濕及低血壓症按摩用或沐浴用，可致神經平衡作用。

6. 飲用法：取1茶匙量葉片，以250ml冷水浸泡後慢火至沸，即行過濾後，於清晨及中午飲用1茶杯量。

迷迭香酒：取10—20g葉，以750ml白酒浸泡5天，過濾後飲用，每日2次，一小杯量。正常劑量下無副作用，過量時易致胃、腸及腎之刺激。

1. 麝香草(*Thymus vulgaris*)，屬於唇形科Lamiaceae 草本植物，為歐洲地區最重要藥用及調味植物種類之一。

1. 繁殖方式：種子繁殖。

2. 形態特徵：多年生半灌木，株高30cm。

莖四角形，下半部木質化。

葉對生，長橢圓形，緣向下捲曲，下表皮密披毛。

穗狀花淡紅色，具短柄，花期5—9月。

3. 分佈：原產於地中海地區。

4. 成分：揮發油(Thymol及Carvacrol)、苦味物質、單寧酸及樹脂。

5. 利用：全草可去痰及止癢，治咳嗽、百日咳、急慢性支氣管炎、胃及腸病。

6. 用法：取1茶匙全草，以250ml水浸泡後煮沸，過濾後溫服，日飲3茶杯量，治咳嗽時加蜜服用。沐浴時可加100g全草於11開水中浸15—20分鐘，過濾後加入滿水浴缸中使用。

J. 芎藭(*Cnidium officinale*)，屬於唇形科Lamiaceae草本重要藥用植物。

1. 繁殖方式：塊根繁殖。

2. 形態特徵：多年生草本。

莖直立，圓柱形中空。

葉互生，羽狀複葉，羽狀全裂或深裂緣。

複繖形花序，花小白色。

3. 分佈：日本。

4. 成分：川芎內脂。

5. 利用：根莖為鎮靜、頭痛及強壯藥。

五、藥用植物之電泳分析：

1. 不同山藥之電泳分析：

利用聚丙烯醯胺膠體系統所分析之酵素包括SkDH、PGI、PGM、GOT、PRX及ACP等六種，染色效果均佳；其他三種之染色效果不佳。所取

用山藥材料之學名等資料如下：山藥台農1號(*Dioscorea alata*)、山藥台農2號(代號70W04, *Dioscorea alata*)、血薯山藥(代號70R16, *Dioscorea purpurea*)、二刺山藥(代號70W47, *Dioscorea alata*)、茨城山藥(代號 70W44, *Dioscorea japonica*)。

在SkDH之染色條帶方面，山藥台農號之成熟葉只具一條帶，且活力甚弱，其Rf值為0.36。70W04(台農2號)、70W44、70R16及70W47則具有相同之二條帶，Rf值分別為0.45及0.48。Rf值為0.45之SkDH在70W47及70 R16之活力表現甚強。

就PGI而言，山藥台農1號之成熟葉具有六條帶，其Rf值分別為 0.10、0.12、0.13、0.23、0.30及0.37，只後者之活力表現最強。70W04、70W44、70R16及70W47各具有二條帶，此二條帶在70R16之Rf值為0.37及0.45，以0.37之活力表現較強；在其他三品系之Rf值同為0.35及0.42，Rf值為0.35之活力在70W04之表現甚強。

在PGM之染色條帶方面，山藥台農1號之成熟葉具有二條帶，其Rf值分別為0.44及0.50，二者之活力皆甚強。70W04、70R16及70W44各具有相同之二條帶，此二條帶之Rf值分別為0.41及0.49，以0.49之活力表現較強。

在GOT之染色條帶方面，山藥台農1號之成熟葉無條帶呈現。70W04、70W47及70R16具有相同之二條帶，此二條帶之Rf值分別為0.47及0.67，以在70R16之活力表現最強。70W44品系只具Rf值為0.47之條帶，其活力表現甚弱。

在PRX之染色條帶方面，山藥台農1號之成熟葉呈現三條帶，分別出現在距負極0.8、1.2及1.7cm處，此三條帶之活力表現均弱。70W04之成熟葉呈現四條帶，分別出現在距負極1.4、1.6、2.0及2.2cm處，與山藥台農 1號差異頗大，此四條帶之活力表現亦弱。其餘三品系具有相同之二條帶，此二條帶分別出現在距負極1.4及2.0cm處，活力表現均弱。

在ACP之染色條帶方面，山藥台農1號、70W04及70W44之成熟葉呈現相同之三條帶，Rf值分別為0.53、0.57及0.60，以台農1號之活力表

現最弱。70W47及70R16則只具有相同之一條帶，此條帶之Rf值為0.61，惟活力表現均甚強。

表 3. 不同山藥同功異構酵素圖譜條帶Rf 值之比較

Yam genotype	SkDH	PGI	PGM	GOT	PRX	ACP
Tainung 1	0.36	0.10	0.44	-Y	0.8	0.53
		0.12	0.50		1.2	0.57
		0.13			1.7	0.60
		0.23				
		0.30				
		0.37				
70W04	0.45 0.48	0.35 0.42	0.41 0.49	- 0.47 0.67	1.4	0.53
					1.6	0.57
					2.0	0.60
					2.2	
70R16	0.45 0.48	0.37 0.45	0.41 0.49	0.47 0.67	1.4	0.61
					2.0	
70W47	0.45 0.48	0.35 0.42	0.49	0.47 0.67	1.4	0.61
					2.0	
70W44	0.45 0.48	0.35 0.42	0.41 0.49	0.47	1.4	0.53
					2.0	0.57
						0.60

-Y : not detected.

2. 柴胡葉片之電泳分析：

兩種柴胡葉片利用聚丙烯醯胺膠體電泳系統之圖譜如表4所示。就APS而言，高氏柴胡之老葉及嫩葉則各只具Rf=0.23一條帶。台農1號之老葉與嫩葉各有相同之二條帶，其Rf值分別為0.23及0.33。柴胡品種間似可利用 APS予以區別。

對而言，高氏柴胡之老葉及嫩葉各具三條帶，除了Rf=0.24條帶相

同外，其老葉另具 $R_f=0.84$ 及 0.89 二條帶，其嫩葉另具 $R_f=0.81$ 及 0.88 二條帶。台農1號之老葉只具 $R_f=0.24$ 一條帶，其嫩葉具三條帶，除 $R_f=0.24$ 條帶外，另具 $R_f=0.77$ 及 0.85 二條帶。利用PRX酵素似可鑑別此二柴胡品種。

就SkDH而言，高氏柴胡之老葉及嫩葉雖各具一條帶，但 R_f 位置不同，其老葉為 0.36 ，嫩葉為 0.38 。台農1號之老葉不含SKDH，惟嫩葉具有四條帶，以 $R_f=0.36$ 及 0.41 之活力較強， $R_f=0.33$ 及 0.48 之活力較弱。利用SKDH酵素似可鑑別此二柴胡品種。

表 4. 不同柴胡品種同功異構酵素圖譜 R_f 值之比較

Genotype	Leaf	APS	PRX	SkDH
B. kaoi	Old	0.23	0.24 0.84 0.89	0.36
B. kaoi	Young	0.23	0.24 0.81 0.88	0.38
Tainung No. 1	Old	0.23 0.33	0.24	-
Tainung No. 1	Young	0.23 0.33	0.24 0.77 0.85	0.33 0.36 0.41 0.48

-: not detected.

結論與建議

本研究進行至今，已完成600多種藥用及保健植物之引種與觀察，及近500種永久標本之製作。在前期之研究中，經由田間之試種與觀察，並參酌各種本草文獻知，下列20種應屬於本省較為重要且值得開發利用的

藥用及保健材料，此即高氏柴胡、三島柴胡、金銀花、車前草、當歸、白鶴靈芝、明日葉、通天草、仙草、何首烏、山防風、甜菊、荷蘭千日、黃梔子、芡實、蘆薈、麥門冬、長形山藥、白肉山藥及紅肉山藥；由初步成分分析之結果可知，其中之白鶴靈芝、何首烏、當歸、柴胡、山藥、芡實、通天草、明日葉、荷蘭千日、黃梔子、金銀花、甜菊及仙草等種，更富含大量與微量礦物元素、各種維他命、及蛋白質等一般成分；由重要藥用植物生產力之觀察結果可知，麥門冬、芡實、山防風、黃梔子、金線連、柴胡、明日葉、通天草、太陽帽、山藥皆具高產能力。本研究另指出，纈草、康復力、薊、茴香、薰花草、西洋蒲公英、洋薄荷、迷迭香、麝香草及芎藭等十種植物，本為歐洲地區與日本最重要藥用及調味植物種類之一，引種後在本省繁殖情形良好，且初期之生長不錯，亦具將來發展潛力。上述之材料由於繁殖與生產已無問題，應值得國內有關醫藥研究單位加以繼續開發及利用。

藥植之種類繁多，而且許多為一年及二年生植物，以現地藥園保存為可行之方式之一。藥園之建立旨在現地妥善保存重要藥用植物之種原，經逐年擴充及細心管理，使成漸具完整規模之藥植種原中心。據此，除了可開發較具潛力且品質與產量俱優之藥植種類，以達到省產材料自給自足之目標外，另可供各界進行研究及教育利用，意義甚大。

我國農業現在正處於一轉型期之關鍵階段，為了順應潮流及申請加入世界貿易組織，在經濟與貿易自由化的日益開放之下，國內栽培的作物將受到外界相當大的影響，其結果將造成農業經營上很大的困難。我們國內整個農業結構必須調整，必須向多元化及精緻化的方向發展，藥用與保健植物之開發與利用，極符合此種研究趨勢，今後之發展方向除了多元化及精緻化之外，尚須符合科學化、本土化、大眾化及生活化之要求。為了降低進口產品太大的衝擊，省政府正推動臺灣省農業建設方案，即各地區依特殊之地理環境條件，生產深具特色且質優之產品。在此一政策之推動下，藥用與保健植物可預期地將扮演相當重要的角色。

我國傳統醫藥之科學化與本土化為政府之一貫政策，在衛生署與中央與地方農政機關之輔導下，目前國內研究天然植物之風氣極為盛行，

藥用植物研究之科學化已具基礎，本土化方面則須加強努力，因為國內所需之藥材，大半係仰賴進口，根據統計數字顯示，每年進口中藥材至少約需新台幣兩百億元，外匯壓力不小。本省現有之藥用植物資源雖近2,000種，但被開發利用的仍不多，因此台灣地區現有藥用植物資源之開發與利用，乃益形重要。而大陸地區則有12,807種之多，可供引種、開發與利用。積極開發有用之種原，及早選定重點發展之藥用植物，利用科學方法進行品種及栽培技術改良，並適時、適地加以栽培，同時進行有效成分之確定以提昇品質，更進一步進行藥理及臨床等研究，為其療效與價值提供科學性依據，以及擴大產品之利用途徑等，為今後應努力之處，以期早日達到省產藥材自給自足的目標。

參考文獻

1. 中國醫藥學院研究年報1-13卷。私立中國醫藥學院。臺中。
2. 甘偉松。1980。台灣藥用植物誌第一卷。國立中國醫藥研究所。台北。
3. 甘偉松。1986。台灣抗癌植物與長壽藥草。勝昌醫藥全冊。台北。
4. 甘偉松。1981。藥用植物學。國立中國醫藥研究所全冊。台北。
5. 好兄弟編輯部。1987。常見中草藥第1-5輯。好兄弟出版社。台北。
6. 朱振華、鄭鼎鐘。1976。甜菊栽培種初步報告。台灣糖業研究所研究彙報74:1-13。
7. 林俊清。1990。生藥柴胡與柴胡劑全冊。高雄。
8. 吳進錫。1979。天然彩色台灣藥草第一輯。南村書局。台北。
9. 吳進錫。1980。天然彩色台灣藥草第二輯。南村書局。台北。
10. 吳進錫。1983。天然彩色台灣藥草第三輯。南村書局。台北。
11. 邱年永、張光雄。1983。原色台灣藥用植物圖鑑(I)。南天書局。台北。
12. 邱年永、張光雄。1986。原色台灣藥用植物圖鑑(II)。南天書局。台北。

13. 邱年永。1973。藥用植物栽培法。大學圖書公司。台北。
14. 徐氏基金會。1980。最新藥用植物栽培法。徐氏基金會。台北。
15. 高木村。1981。臺灣藥用植物手冊。南天書局。台北。
16. 高木村。1985。台灣民間藥(1)。南天書局。台北。
17. 高木村。1988。台灣民間藥(2)。南天書局。台北。
18. 高木村。1981。台灣藥用植物手冊。南天書局。台北。
19. 張拙夫。1987。中國本草學第三版。國立中國醫藥研究所。台北。
20. 張鴻銘(鑑訂)。1980。白鶴靈芝。中藥大辭典第二冊:1256-1257。昭人出版社。台中。
21. 張鴻銘(鑑訂)。1980。柴胡。中藥大辭典第三冊:2816-2825。昭人出版社。台中。
22. 張鴻銘(鑑訂)。1980。車前子。中藥大辭典第二冊:1962-1866。昭人出版社。台中。
23. 張鴻銘(鑑訂)。1980。金銀花。中藥大辭典第二冊:2124-2129。昭人出版社。台中。
24. 張鴻銘(鑑訂)。1980。山藥。中藥大辭典第二冊:298-304。昭人出版社。台中。
25. 許鴻源。1985。簡明藥材學。新醫藥出版社。台北。
26. 許鴻源。1975。藥用植物分類學。新醫藥出版社。台北。
27. 陳貴、張榮如、陳水田。1978。甜菊品系分類與成分之研究。甜菊品系調查。國立台灣大學農學院研究報告18:36-46。
28. 陳貴、張榮如、陳水田。甜菊之栽培與Stevioside 季節變化之研究。中國園藝24:34-42。
29. 黃三元。1985。中國醫藥學新編。八德教育文化出版社。台北。
30. 黃啓敏。1978。天然甘味料甜菊的栽培法。農友:38-39。
31. 楊再義。1982。台灣植物名彙。天然書社。台北。
32. 潘杏初。1985。標準藥性大字典。將門文物出版社。台北。
33. 劉國柱、周正仁、歐潤芝。1978。台灣野生可食植物(一)。國立中國醫藥研究所。台北。

34. 劉國柱、周正仁、歐潤芝。1981。台灣野生可食植物(二)。國立中國醫藥研究所。台北。
35. 劉國柱、歐潤芝、黃瑞齡。1984。台灣藥用植物之探研(III)。國立中國醫藥研究所。台北。
36. 戴新民(發行)。1984。中藥栽培法。啓業書局。台北。
37. 賴榮祥。1976。原色生藥學。創譯出版社。台北。
38. 豐年社附設出版部。1988。經濟植物集。豐年社。台北。
39. 豐年社附設出版部。1987。青草集。豐年社。台北。
40. Association of Official Agricultural Chemists. 1970. Methods of Analysis A.O.A.C. 11th ed. Pub. by Association of Official Agricultural Chemists Washington, D. C.
41. Van Niekerk, P. J. 1982. Determination of Vitamins. In "HPLC in Food Analysis" ed. by R. Macrae, Chapter 8. pp:187-225. Acad. Press, London, New York.

湖北貝母組織培養之研究

Studies on the Tissue Culture of *Fritillaria hupehensis* Hsiao et K. C. Hsia

台灣省農業試驗所

蔡 新 聲

中文摘要

將葉片、莖段基部、鱗片及PLB(芽球相似體)四種培植體，培養於含有不同濃度BA之培養基中，結果發現再生鱗片之誘導率以鱗片52.92%最高，莖段基部 41.43%次之，28.24%又次之，而以葉片4.02%最%差；而培養60天後之褐化死亡率則相反，以葉片94.78%最高，莖段基部34.04%次之，鱗片及PLB之褐化死亡率較少，分別為16.88%及13.73%。每個成活培植體形成新鱗片數目則以莖段基部平均5.01個最佳，其於依次為鱗片3.74個，葉片3.2個及PLB 2.58個；而擬胚化癒合組織之誘導則以PLB及莖段基部 31.37%及28.72%較佳，其次為鱗片19.48%，而以葉片1.20%最差。衡諸新鱗片誘導率、形成新鱗片數目及擬胚化癒合組織形成率，則以含0.5-2 mg/1 BA之培養基較為適當。此外，添加不同濃度之NAA可提高新鱗片誘導率(莖段基部由41.43%提高為65.22%；鱗片由52.92%提高為68.10%)，卻不利於形成新鱗片之數目(莖段基部由5.01個下降為3.01個；鱗片由3.74個下降為3.33個)；NAA且有誘導培植體發根之作用，在0-4 mg/1 NAA之範圍內，隨濃度升高而發根漸多，因此較適合

湖北貝母培植體培養，誘導新鱗片形成之培養基爲0.5-2 mg/1 BA配合0.5 mg/1 NAA之MS基本鹽類培養基；四種培植體之再生能力順序爲：鱗片 > 莖基部 > PLB > 葉片。0.5-1 mg/1 NAA配合0.5mg/1 BA之培養基，對PLB及鱗片之增重效果最佳，經60天培養後之PLB及鱗片，可增加重量約15倍。減少或升高NAA濃度，均使PLB及鱗片之增重效果降低。0.5-4mg/1 2,4-D對誘導鱗片形成新鱗片之能力和NAA相仿，但8mg/1 2,4-D則顯現濃度過高之害；對擬胚化癒合組織之誘導則NAA優於 2,4-D；而對鱗片形成根之能力則0.5-8 mg/1 2,4-D均顯現抑制現象；照光與否對新鱗片之形成影響不大。

關鍵詞：湖北貝母，芽球相似體，組織培養。

ABSTRACT

Be-Mu (*Fritillaria hupehensis*) was first recorded in Shen-Nung-Pen -Ts'ao-Ching under the middle herb category and was recorded in successive Pen-ts'aos of the descending dynasties. It has been used as antitussive and expectorant for the care of coughing and the prevention of phlegm formation. The component peiminine in the bulb of Be-Mu has been suggested as the major active ingredient. As the amount of bulb collected from naturally-grown and traditionally-cultured plants is far from enough for medicinal demand, the tissue culture method of mass propagation was therefore studied. Cytological and phytochemical study were also conducted for chromosome counting and active ingredient determination. The results are summarized as follows.

1. For the comparison on the efficiency of new bulbscale production among various explants cultured on solid medium

containing MS basic salts and different BA concentration for 60 days, bulbscale explant showed the highest percentage (52.92%) followed by stem base (41.43%) , protocorm-like-body (PLB) (28.24 %) , and leaf blade (4.02%). On the contrary, the order of browning percentage during the culturing period was reversed for the four explants. The stem base explant could produce the highest number of bulbscale (5.01 per culture) , followed by bulbscale explant (3.74) ,leaf blade (3.20) , and PLB (2.58). The induction percentages of embryogenic callus were higher for PLB and stem base (31.37% and 28.72%, respectively) and lower for bulbscale and leaf blade (19.48% and 1.20%, respectively).

2. The addition of NAA to the medium resulted in increased efficiency of bulbscale formation, e.g., from 41.43% to 65.22 % for stem base explant and 52.92% to 66.10% for bulbscale explant, and concurrently decreased number of new bulbscale produced per culture, e.g., from 5.01 to 3.01 for stem base and 3.74 to 3.33 for bulbscale explant. NAA in the concentration range of 0-4 mg/l could also promote the rooting ability of the explants.

3. Experimental results indicated that medium containing MS basic salts with 0.5-2.0 mg/l BA and 0.5 mg/l NAA was suitable for bulbscale production in vitro. The regeneration ability of explants was highest for bulbscale, followed by stem base, PLB, and leaf blade.

4. A 15-fold increase in fresh weight was recorded on PLB and bulbscale cultured on medium containing MS basic salts supplemented with 0.5-1 mg/l NAA and 0.5 mg/l BA for 60 days. Change of NAA concentration could result in adverse effect on fresh weight gain.

5. Addition of 0.5-4 mg/l 2,4-D to medium showed similar effect on bulbscale production from cultured bulbscale explant as compared to effect of NAA. Phytotoxicity was observed when concentration of 2,4-D was increased to 8 mg/l. The rooting ability of bulbscale was also inhibited by 0.5-8 mg/l 2,4-D. NAA was superior to 2,4-D in the induction of embryogenic callus. Lighting was not necessary for the production of new bulbscale during the culture process.

Key words: *Fritillaria hapehensis* Hsiao et K.C.Hsia, Protocorm like body, Tissue culture

前 言

貝母首載于神農本草經，列入草部中品，陶弘景曰：「形如聚貝子，故名貝母」，歷代諸家本草，如本草綱目及綱目拾遺等均有著錄。

貝母按藥用習慣分爲浙貝母和川貝母兩大類，二者均爲止咳、化痰藥，但浙貝苦寒，多用於外感咳嗽，川貝苦甘微寒，多用於虛勞咳嗽，臨床上分別應用，在湖北西部和四川東部發展一種湖北貝母(*Fritillaria hapehensis* Hsiao et K.C.Hsia)又名板貝，應數川貝之一種，其爲百合科多年生之草本植物，以地下鱗莖入藥，乃常用中藥，歷年來均採用鱗莖繁殖，但繁殖係數與產量皆低，而用種子播種又需 4-5 年之生育期，故常造成藥源短缺，不足醫療所需，部份地區乃以土貝母、麗山江慈菇、葫蘆科假貝母之鱗莖等充當之，這些偽品不但不具療效，且常延誤病情，甚者更引起中毒，戕害身心至巨，爲求改善此一問題，本研究乃積極進行湖北貝母之組織培養，期能大量繁殖種苗，縮短生育週期，以供國人藥用之需。

材料與方法

一、材料：

本研究使用之材料，係由四川中醫學院提供之湖北貝母，其鱗片經培養後，形成無菌帶小鱗片之芽球相似體(protocorm like body，以下簡稱PLB)。切取含2-3個小鱗片之PLB團塊，經培養在含0.5 mg/1 BA及1 mg/1 NAA之MS固體培養基中，待長出帶莖葉之小鱗莖時，供試驗之用。

二、方法：

1. 不同部位培植體之採取：

分別切下葉片、小鱗莖及PLB，培養在如上述相同組成份之液體培養基中，經三週後，莖葉、小鱗莖及PLB生長迅速，此時切取葉片(5mm×7mm)、莖段基部(5mm×5mm)、小鱗片(5mm×5mm)及PLB(5mm×5mm)為供試材料。

2. 培養基組成份及配製：

本試驗所用之培養基，以MS(1962)基本鹽類為主要成份，並添加BA與NAA等植物生長調節劑，其使用濃度如表1-7所示。此外添加0.9% Difco agar及3% 蔗糖，培養基在加入Difco agar前，先用NaOH或HCl，將pH值調至5.7，然後經121°C、1.05kg/cm²之高溫高壓殺菌15分鐘後，擺成斜面放冷備用。

3. 培養環境：

接種之材料置於25°C之恆溫及光照強度2,000 lux下進行培養。

結 果

一、湖北貝母不同來源培植體產生褐化現象之比較：

將葉片、莖段基部、小鱗片及PLB等不同來源培植體，分別培養在不同濃度 BA(0、0.25、0.5、1、2、4mg/1)，之MS培養基中，結果發現，94.78%的葉片產生褐化現象；莖段基部褐化率(34.04%)顯著下降；再次為鱗片，褐化率為16.88%，褐化率最少者為PLB，僅13.73%(表1-4)。另將葉片、莖段基部、小鱗片及PLB等培植體，培養在含0.5mg/1 BA配

合不同濃度NAA(0.1、0.25、0.5、1、2、4mg/1)之 MS培養基中，結果發現，莖段基部褐化率為 30.43%，鱗片與 PLB培植體則僅有 12.54%及 13.03%產生褐化現象(表5-7)。

二、湖北貝母不同來源培植體形成幼嫩鱗片之能力：

將上述不同來源之培植體，培養在不同濃度BA(0、0.25、0.5、1、2、4mg/1)之MS培養基中，由表1之結果發現，葉片形成幼嫩鱗片之比率僅 4.02%，平均獲得3.2個幼嫩鱗片，而較佳之植物生長調節劑條件為0.25、0.5及1 mg/1 BA，形成幼嫩鱗片比率分別為4.76%、8.89%、4.55%，而獲得鱗片個數分別為3、2及5.5個。表2則顯示莖段基部培養在不同濃度BA(0、0.25、0.5、1、2、4mg/1)之MS培養基中，因褐化率顯著下降，故幼嫩鱗片形成率亦提升不少，平均有41.43%，平均獲得之幼嫩鱗片數為5.01個，而較佳之植物生長調節劑條件為0.5及1 mg/1 BA，形成幼嫩鱗片比率分別為50%及46.67%，而獲得幼嫩鱗片數分別為5.8及5.71個。莖段基部培養在含0.5mg/1 BA配合不同濃度NAA(0.1、0.25、0.5、1、2、4mg/1)之 MS培養基中(表5)，結果發現，莖段基部之幼嫩鱗片形成率可提升為65.22%，但平均獲得幼嫩鱗片數，卻下降為3.01個，但此幼嫩鱗片較為粗壯。綜合表2及表5之結果，對莖段基部而言，較佳之植物生長調節劑條件為0.5mg/1 BA配合1 mg/1 NAA，其幼嫩鱗片形成率為72.22%，獲得幼嫩鱗片數為3.46個。

表3顯示鱗片培養在不同濃度BA(0、0.25、0.5、1、2、4mg/1)之MS培養基中，幼嫩鱗片形成率有52.92%，較莖段基部者(41.43%)為高，而平均獲得之幼嫩鱗片數為3.74個，則比莖段基部平均獲得之幼嫩鱗片數5.01個少，而較佳之植物生長調節劑條件為0.5mg/1 BA，形成幼嫩鱗片比率與獲得幼嫩鱗片數分別為56.82%及 3.84個。鱗片培養在含0.5mg/1 BA配合不同濃度NAA(0.1、0.25、0.5、1、2、4mg/1)之MS培養基中(表6)，結果發現，鱗片之幼嫩鱗片形成率可提升為66.10%，但平均獲得幼嫩鱗片數，卻下降為3.33個，但此幼嫩鱗片也較為粗壯，此一情形與莖段基部所獲得之結果相似。綜合表3及表6之結果，對鱗片而言，較佳

之植物生長調節劑條件為0.5mg/1 BA配合NAA 0.5mg/1，其幼嫩鱗片形成率為78.43%，獲得幼嫩鱗片數為3.71個。

表4顯示PLB培養在不同濃度BA(0、0.25、0.5、1、2、4mg/1)之MS培養基中，幼嫩鱗片形成率有28.24%，較莖段基部(41.43%)及鱗片(52.92%)為低，而平均獲得之幼嫩鱗片數為2.53個，也比莖段基部及鱗片平均獲得之幼嫩鱗片數5.01個及 3.74個少，而較佳之植物生長調節劑條件為0.5mg/1 BA，形成幼嫩鱗片比率與獲得幼嫩鱗片數分別為36.58%及3.20個。而當培養在含0.5mg/1 BA配合不同濃度 NAA(0.1、0.25、0.5、1、2、4mg/1)之MS培養基中(表7)，結果發現，鱗片之幼嫩鱗片形成率為28.99%，平均獲得幼嫩鱗片數為2.33個，此結果亦與僅含BA者相差不多，但此幼嫩鱗片也較為粗壯，此一情形與莖段基部與鱗片者所獲得之結果相似。綜合表4及表7之結果，對PLB而言，較佳之植物生長調節劑條件為0.5mg/1 BA配合NAA 0.5mg/1，其幼嫩鱗片形成率為36.84%，獲得幼嫩鱗片數為2.86個。

根據上述結果(表1-7)，鱗片為較佳之培植體，而BA與NAA之組合可增加幼嫩鱗片形成率，雖然平均獲得幼嫩鱗片數比不加NAA者少(表3、表6)，但生成之幼嫩鱗片較粗壯，較易生成正常植株，最佳之植物生長調節劑條件為0.5mg/1 BA配合NAA 0.5mg/1，其幼嫩鱗片形成率為78.43%，獲得幼嫩鱗片數為3.71個(表6)。

三、湖北貝母不同來源培植體形成embryogenic callus之能力：

將上述不同來源之培植體(葉片、莖段基部、小鱗片及PLB)培養在不同濃度 BA(0、0.25、0.5、1、2、4mg/1)之MS培養基中(表1-4)，結果發現embryogenic callus形成率分別為1.20%、28.72%、19.42%與31.37%；而莖段基部、鱗片及PLB培植體，培養在含0.5mg/1 BA配合不同濃度NAA(0.1、0.25、0.5、1、2、4mg/1)之MS培養基時(表5-7)，結果發現，embryogenic callus形成率分別為 22.17%、31.35%及32.77%，故NAA加入與否，對莖段基部及PLB培植體形成embryogenic callus之比率，影響不大，但對鱗片培植體則稍有影響。

四、湖北貝母不同來源培植體形成根之能力：

將莖段基部、鱗片及PLB等培植體，培養在含0.5 mg/1 BA配合不同濃度 NAA(0.1、0.25、0.5、1、2、4mg/1)之MS培養基中(表8~表10)，結果發現，平均根形成率分別為28.26%、25.07%、22.69%，而平均形成根數分別為2.95、2.82、3.15；而莖段基部及鱗片培植體，培養在含0.5mg/1 BA配合4mg/1 NAA時，根形成率分別為57.14%及41.82%，而形成根數分別為2.87及2.48條，乃較佳之發根條件。而PLB培植體則以0.5mg/1 BA配合2mg/1 NAA時，有較佳之根形成率(35.14%)。

五、NAA對湖北貝母PLB及鱗片培養重量增加之影響

將PLB與鱗片培植體，培養在含0.5mg/1 BA配合不同濃度NAA(0.1、0.25、0.5、1、2、4 mg/1)之MS培養基中(表11，表12)開始培養時測其鮮重，之後每10天均測其鮮重，60天後可測出其生長曲線。將PLB培養在BA 0.5mg/1配合NAA 0.5mg/1及 BA 0.5mg/1配合NAA 1 mg/1之MS基中，培養60天後，鮮重分別增加15.4倍及14.5倍；而鱗片培植體則增加13.7倍及15.4倍(表11、表12)。

六、光線對湖北貝母鱗片培養產生褐化現象、形成幼嫩鱗片、embryogenic callus及形成根之影響

暗培養與16小時光週期之光照培養者之平均褐化率分別為32.44%及19.95%，顯示照光可顯著降低褐化現象；暗培養者，幼嫩鱗片平均形成率(51.47%)與光照培養者(48.96%)相仿，但平均獲得幼嫩片數，暗培養者(3.84個)較光照培養者(2.96個)高；光照培養者embryogenic callus平均形成率為20.19%而暗培養者僅有15.28%。暗培養者，平均根形成率(21.45%)與光照培養者(21.58%)相仿，但平均形成根數，則以暗培養者(3.63個)較光照培養者(2.59個)高。

七、植物生長調節劑對湖北貝母鱗片暗培養與光照培養幼嫩鱗片形成能力之影響

各以1 mg/1、2 mg/1 2, 4-D及4 mg/1 NAA配合0.5 mg/1 kinetin進行暗培養，幼嫩鱗片形成率分別為67.86%、47.83%、57.14%，而獲得之鱗片數分別為4.47個，5.27個及5.75個，乃較佳之條件。若以8 mg/1 2, 4-D配合0.5 mg/1 kinetin時，幼嫩鱗片形成率及獲得之鱗片數分別為21.88%及1.57個，已顯示濃度過高之毒害(表 13)。如以1 mg/1、2 mg/1 2, 4-D及4 mg/1 NAA配合0.5 mg/1 kinetin等三種組合之培養基進行16小時光週期之光照培養時，幼嫩鱗片形成率分別為46.43%、44.19%、61.54%，而獲得之鱗片數分別為2.21個、2.79個及2.50個，乃較佳之條件，但所得結果較暗培養者差。然而8 mg/1 2, 4-D配合0.5 mg/1 kinetin時，幼嫩鱗片形成率及獲得之鱗片數分別為51.35%及2.42個，較暗培養者高出很多，此可能係光線會對 2, 4-D有所影響。而光線對NAA誘導形成幼嫩鱗片之能力，則在NAA 8 mg/1時稍有影響，16小時光週期光照培養者，幼嫩鱗片形成率(41.67%)較暗培養者(56.41%)少(表15)。

八、植物生長調節劑對湖北貝母鱗片暗培養與光照培養embryogenic callus形成能力之影響

不管暗培養或光照培養，形成embryogenic callus之能力，NAA較2, 4-D為佳。在2, 4-D高達4-8 mg/1時，暗培養者形成embryogenic callus之能力較差，而NAA濃度變化(2-8 mg/1)，似乎對embryogenic callus之誘導率影響不明顯。一般而言，暗培養之embryogenic callus形成率15.28%較光照培養者20.19%少(表13、表15)。

九、植物生長調節劑對湖北貝母鱗片暗培養與光照培養根形成之能力

在暗培養下NAA較2, 4-D有較佳之根形成率及根數。而當NAA濃度為4 mg/1及8 mg/1時，根形成率為54.29%及46.15%，而形成根數分別為3.16及4.72(表14)。光照培養者亦有類似之結果，NAA比2, 4-D有較佳之根形成率及根數。而當4 mg/1及8 mg/1時，根形成率為56.41%及50.00%，而形成根數分別為2.18及2.22，根形成率略為增加，但根數卻下降(

表16)。總體而言，根之誘導率有隨著NAA濃度增加而上昇之趨勢，而平均形成根數，則在0.5-8 mg/l NAA濃度變化時，並無太大區別(表14，表16)。

討 論

一、湖北貝母不同來源培植體產生褐化現象之比較

由表1-7顯示，褐化率最高者為葉片培植體，次為莖段基部，而鱗片與PLB則有較低之褐化率。Kukulczanka et al. (1977)指出，*Peperomia scandens*近葉柄端之葉片為培植體時，分化芽體之能力較強，且以葉片近葉柄連接處最先誘導出芽體，顯示此區較具分生能力，可能是內生性生長素含於此處⁽⁹⁾。而本研究顯示，葉片枯死率平均高達94.78%，但仍然有一些葉片培植體可長出幼嫩鱗片，根據觀察，這些長出幼嫩鱗片之葉片培植體乃含有少許葉柄部分，而此靠近葉片之葉柄部位具有分生能力，可發育形成幼嫩鱗片而不致褐化，但大部分之葉片培植體並不含有葉柄部位，故產生褐化現象。

二、湖北貝母不同來源培植體形成幼嫩鱗片之能力

同一品種不同部位培植體之反應不盡相同，此乃因不同部位之培植體各具有不同之分化能力所致。本研究顯示(表1-7)以鱗片誘導幼嫩鱗片之能力最強，而莖段基部次之，PLB則較差，葉片最差。而加入NAA者(表3、表6)可增加幼嫩鱗片形成率，但平均獲得幼嫩鱗片數則下降，但卻較粗壯、體積較大且鮮重較重，較易形成正常植株，最佳之植物生長調節劑條件為0.5mg/l BA配合0.5mg/l NAA其幼嫩鱗片形成率為78.43%，而獲得幼嫩鱗片數為3.71個(表6)。衷等(1982)在中草藥中指出，太白貝母組織培養時加入NAA者，不僅每一鱗片培植體平均分生幼嫩鱗片數多，而且其體積較大⁽³⁾。Niimi(1984)亦指出，NAA是增加*Lilium rubellum* Baker鱗莖鮮重之最主要因素⁽¹¹⁾。故NAA之存在應可使鱗莖更為茁壯。上述之試驗結果符合此論點。

三、湖北貝母不同來源培植體形成embryogenic callus之能力

由表2-4顯示培植體在無激素之培養基中，亦可誘導出幼嫩鱗片及embryogenic callus，此一現象可能與鱗莖植物之特性，以及培植體中之內生性激素含量有關。加入適合比例之激素可增加幼嫩鱗片之誘導率、幼嫩鱗片數及平均鮮重。伊貝母鱗片切段在培養12-15天時，一部分切段基部產生肉眼可見之透明突起，繼而發白且逐漸長大成小鱗莖，同時切段亦可產生少量之癒合組織⁽¹⁾。太白貝母鱗片橫切為厚1-2mm之薄片，置於試管中培養，能直接再生小鱗莖，少數切片先形成癒合組織，再從癒合組織表面分化出小鱗莖⁽³⁾。川貝母鱗片接種半個月後，材料切面長出小癒合組織，進而癒合組織向四週伸展，生長加快呈白色或淡黃色，以後由此長出黃豆大之突出物進而形成小鱗莖，亦有材料可不經癒合組織階段，直接在材料切面上長出小鱗莖⁽¹⁾。本試驗之湖北貝母亦類此，接種約3週後，培植體有一些直接長出幼嫩鱗片，少數形成embryogenic callus，亦或二者皆存在。有一些embryogenic callus會形成綠苗而長出幼嫩鱗片，此幼嫩鱗片有的可正常發育成正常植株，但大部分則匍匐於embryogenic callus之表面難於直立。孫等(1977)指出，浙貝癒合組織表面會有很多綠色的芽狀突起出現，這就是幼葉原基，它們可以繼續生長成為一片松針狀之葉子，但大多數之葉原基之極性不太正常，形成之葉片難於直立，多匍匐於癒合組織之表面⁽⁵⁾。此結果與本試驗結果極為類似。

四、湖北貝母不同來源培植體形成根之能力

依據NAA對不同來源培植體發根之研究顯示(表8-表10)，根形成率有隨著NAA濃度增加而增加之趨勢，形成根數最佳條件為0.5-4mg/l。

五、NAA對湖北貝母PLB及鱗片培養重量增加之影響

衷等(1982)在中草藥中指出，太白貝母組織培養時，加入NAA者不僅每一鱗片培植體平均分生幼嫩鱗片數多，而且其體積較大。伊貝母以黃化莖段當培植體，以MS培養基配合0.5 mg/l NAA及0.2mg/l BA誘導鱗片

再生率竟高達100%，且生長快速，培養80天後之鱗莖可達自然條件下2-3年大小⁽¹⁾。Niimi(1984)亦指出，NAA是增加*Lilium rubellum* Baker鱗莖鮮重之最主要因素⁽¹¹⁾。Shoyama et al.也指出浙貝母以鱗莖當培植體大量繁殖時，在0.5 mg/1 NAA配合1 mg/1 BA之MS液體培養基中，以60 rpm、25°C下照光培養九週後，其鱗莖鮮重增殖率達20倍，可得26個小鱗莖⁽¹²⁾。喬等(1986)指出川貝母亦培養在含1 mg/1 2,4-D及1 mg/1 NAA之MS培養基中，培養半年後普遍能達到自然界栽培3-5年之鱗莖大小⁽⁷⁾。孫等(1977)亦指出將浙貝母培養在含0.5-1 ng/1 NAA之MS培養基中，4個月後小鱗莖可達由種子得到2-3年的鱗莖大小⁽⁵⁾。王及秦(1986)指出，伊貝母培養時NAA濃度必須大於cytokinin之濃度，鱗莖生長才好⁽¹⁾。本研究結果顯示(表11、表12)，王的論點應該亦可適用於湖北貝母，因NAA/BA=1及2時，鮮重增加最多。

六、光線對湖北貝母鱗片培養產生褐化現象、形成幼嫩鱗片、embryogenic callus，及形成根之影響

由表13與表15顯示照光可顯著降低褐化現象；暗培養者，幼嫩鱗片平均形成率與光照培養者相仿，但平均獲得幼嫩鱗片數，暗培養者較光照培養者高；光照培養者embryogenic callus形成率平均則較暗培養者高；由表14與16顯示暗培養者，根形成率與光照培養者相仿，但形成根數則以暗培養者較光照培養者高。故光線對湖北貝母鱗片培養產生褐化現象、形成幼嫩鱗片、embryogenic callus及根形成之能力均會有所影響。

七、植物生長調節劑對湖北貝母鱗片暗培養與光照培養幼嫩鱗片形成能力之影響

衷等(1982)指出，添加2,4-D可以促進太白貝母形成小鱗片，但當2,4-D濃度提高至4 mg/1時，誘導率反而降低，如配合少量之kinetin(1mg/1)可較大幅度提高幼嫩鱗片之形成能力(3)。故本試驗乃添加0.5 mg/1之濃度，以期提高幼嫩鱗片形成率。表13顯示，暗培養時分別以1mg/1、

2mg/1 2,4-D及4mg/1 NAA配合0.5mg/1 kinetin時，幼嫩鱗片形成率分別為67.86%、47.83%、57.14%，而獲得之鱗片數分別為 4.47個、5.27個及5.75個，乃較佳之條件。8 mg/1 2,4-D時幼嫩鱗片形成率及獲得之鱗片數分別為21.88% 及1.57個，已顯示濃度過高之毒害，符合上述之論點。

寒蘭(*Cymbidium kanran*)則在黑暗中，其根莖之生長情形較照光者為佳，並且將根莖以暗培養方式培養，則芽形成之情形較好⁽¹⁰⁾。Stimart & Ascher(1978)在百合鱗片培養時，連續暗培養可增加球莖數目及大小，維持8小時黑暗及小時光照之光週期卻產生抑制作用⁽¹³⁾。Hasegawa and Goi(1987)在*Cymbidium*試驗中指出，暗處理比照光16小時者可形成約2.5倍之根莖⁽⁸⁾。

表15結果顯示將鱗片於16小時光週期之光照環境下，以1mg/1、2mg/1 2,4-D及 4mg/1 NAA配合0.5mg/1 kinetin培養時，幼嫩鱗片形成率分別為46.34%、44.19%、 61.54%，而獲得之鱗片數分別為2.21個、2.79個及2.50個，所得結果較暗培養者差。亦符合上述之論點。但衷等(1982)在中草藥中指出，將太白貝母鱗片暗培養與小時光週期之光照培養形成幼嫩鱗片之能力並無明顯差異⁽³⁾。

8 mg/1 2,4-D配合0.5mg/1 kinetin時，幼嫩鱗片形成率及獲得之鱗片數分別為 51.35%及2.42個，較暗培養者高出很多，此可能係光線會對2,4-D有所影響所致。而光線對NAA誘導形成幼嫩鱗片之能力，則在NAA 8 mg/1時稍有影響，16小時光

週期光照培養者，幼嫩鱗片形成率(41.67%)較暗培養者(56.41%)少(表15)，故可能光線對NAA亦有所影響。

八、植物生長調節劑對湖北貝母鱗片暗培養與光照培養callus形成能力之影響

大體而言，暗培養或光照培養embryogenic callus之形成能力，NAA均較2,4-D為佳(表13、表15)。陳(1991)指出，1-4 mg/1 2,4-D之MS培養基，對輪葉沙參葉片誘導癒合組織之能力比NAA強，且癒合組織之鮮重

亦較重，但對於誘導莖段形成癒合組織之情形，則以NAA效果較好，鮮重較重⁽⁶⁾。高(1984)指出，2,4-D對半夏珠芽及根尖誘導癒合組織之能力比NAA強，而誘導半夏種子形成癒合組織，則以NAA較佳⁽⁴⁾。2,4-D與NAA對同一株植物不同部位組織誘導癒合組織之機制不盡相同；而不同植物對2,4-D與NAA感受性亦迥異，此種差異性可能與培植體內自身性 auxin之含量，或培植體對植物生長調節劑之感應性不同。表13及表15結果顯示，暗培養所得之embryogenic callus平均形成率較16小時光週期光照培養者少。周(1976)也指出百合癒合組織形成率亦有類似之結果⁽²⁾。而太白貝母則有相反之結果，暗培養之embryogenic callus形成率較16小時光週期光照培養者高⁽³⁾。此種差異可能與培植體自身性auxin含量有關。

九、植物生長調節劑對湖北貝母鱗片暗培養與光照培養根形成之能力

由表14及表16之結果顯示，根之誘導率有隨著NAA濃度(0.5-4 mg/1)增加而上昇之趨勢，而光照培養之根形成率略為增加。Shoyama et al. (1986)亦指出NAA 2 mg/1 對浙貝母發根效果最佳⁽¹²⁾。王及秦(1986)在中草藥中亦指出，NAA與kinetin配合，對不定根形成具促進作用⁽¹⁾。Niimi(1984)亦指出NAA乃促進Lilium rubellum Baker發根之最主要因素，照光培養更可促進發根(11)。Udea及Torikata(1970)指出，光對Cymbidium goeringii發根之影響為光可促進植物行光合作用及氮素之同化作用而幫助根部形成；以上論點可驗證本試驗之結果。

結論與建議

本研究結果顯示利用湖北貝母之鱗片、莖基部及PLB在 0.5-2.0 mg/1 BA配合 0.5 mg/1 NAA 的MS 基本鹽類培養基的誘導下，可使之形成多數芽體而達到大量繁殖湖北貝母的目地。

參考文獻

1. 王小菁、秦振棟。1986。伊貝母黃化莖段小鱗莖再生的研究。中草藥 17(10)。
2. 周哲彥。1976。百合之組織培養(二)。中國園藝 22(4):161-168。
3. 袁維綱、劉素珍、楊觀梅。1982。太白貝母鱗莖切片的組織培養。中草藥 13(9)。
4. 高宗桂。1986。半夏組織培養之研究。中國醫藥學院中國藥學研究所論文。
5. 孫敬三、朱至清、王敬駒。1977。浙貝母癒合組織的培養和器官再生。植物學報 19(2)。
6. 陳素昭。1991。輪葉沙參組織培養之研究。中國醫藥學院中國藥學研究所論文。
7. 喬惠琳、麻秀芳、李靈玉。1986。川貝母鱗莖室內生產研究初報。中藥通報, 11(3)。
8. Hasegawa, A. and M. Goi. 1987. Rhizome formation in *Cymbidium goeringii* reichen bachfil and *Cymbidium Kanran* Makino in shoot-tip culture. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 56(1):70-78.
9. Kukulczanka, K., K. Klimaszewska and H. pluta. 1977. Regeneration of entire plant of *Peperomia scandens* Ruiz from different parts of leaves in vitro Acta Hort. 78:365- 369,
10. Lee, J. S., K. K. Shim. and M. S. Yoo. 1986. Studies on Rhizome Growth and Organogenesis of *Cymbidium Kanran* Cultured in vitro. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 27(2):174-180.
11. Niimi Y. 1984. Effects of α -naphthaleneacetic acid and 6-benzylaminopurine on the development of excised-bulbs (*Lilium rubellum* Baker) cultured in vitro both in diffused light and in continuous darkness, and the leaf emergence from the bulbs in vivo. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 53(1):59-65.

12. Shoyama. Y. N. Hasegawa and I. Nishioka. 1986. Studies on propagation of *Fritillaria verticillata* tissue (1) . The Japanese Journal of Pharmacognosy. 40(2) :198-202.
13. Stimart, D. P. and P. D. Ascher. 1978 Tissue culture of bulb scale sections for asexual propagation of *Lilium oniflorum* Thumb. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 103:182-184.

表1. BA對湖北貝母葉片培養形成幼嫩鱗片與胚狀化癒合組織之影響

Table 1. Effects of BA on the formation of bulb scales and embryogenic callus from leaf segment of *Fritillaria hupehensis**

MS medium with BA mg/l	No. of explant cultured	Explant turned to brown		Explant producing bulb scales		No. of bulb scales produced		Explant forming embryogenic callus	
		No.	%	No.	%	Total	Average**	No.	%
0	38	38	100.00	0	0.00	0	0.0	0	0.00
0.25	42	40	95.24	2	4.76	6	3.0	0	0.00
0.5	45	41	91.11	4	8.89	8	2.0	1	2.20
1	44	42	95.45	2	4.55	11	5.5	1	2.27
2	40	36	90.70	1	2.50	4	4.0	1	2.60
4	40	39	97.50	1	2.50	3	3.0	0	0.00
Total & Average	249	236	94.78	10	4.02	32	3.2	3	1.20

*Data obtained from leaf segments were cultured for 60 days.

**Average = Total no. of bulb scales produced / No. of explant producing bulb scales.

表2. BA對湖北貝母莖段基部培養形成幼嫩鱗片與胚狀化癒合組織之影響

Table 2. Effects of BA on the formation of bulb scales and embryogenic callus from stem base segment of *Fritillaria hupehensis**

MS medium with BA mg/l	No. of explant cultured	Explant turned to brown		Explant producing bulb scales		No. of bulb scales produced		Explant forming embryogenic callus	
		No.	%	No.	%	Total	Average**	No.	%
0	49	21	42.80	18	36.74	82	4.56	7	14.29
0.25	42	20	47.62	13	31.00	68	5.23	12	28.57
0.5	40	12	30.00	20	50.00	116	5.80	12	30.00
1	45	8	17.78	21	46.67	120	5.71	15	33.33
2	60	20	33.33	27	45.00	122	4.52	21	35.00
4	46	15	32.61	17	36.96	73	4.29	14	30.40
Total & Average	282	96	34.04	116	41.43	581	5.01	81	28.72

*Data obtained from stem base segments were cultured for 60 days.

**Average = Total no. of bulb scales produced / No. of explant producing bulb scales.

表3. BA對湖北貝母鱗片培養形成幼嫩鱗片與胚狀化癒合組織之影響

Table 3. Effects of BA on the formation of bulbscales and embryogenic callus from bulb segment of *Fritillaria hupehensis**

MS medium with BA mg/l	No. of explant cultured	Explant turned to brown		Explant producing bulbscales		No. of bulbscales produced		Explant forming embryogenic callus	
		No.	%	No.	%	Total	Average**	No.	%
0	54	12	22.22	26	48.15	106	4.08	14	25.93
0.25	52	14	26.92	28	53.85	98	3.50	12	23.08
0.5	44	10	22.72	25	56.82	96	3.84	8	18.18
1	60	14	23.33	32	53.33	108	3.38	15	25.00
2	58	10	17.24	29	50.00	117	4.03	5	8.62
4	40	6	15.00	23	57.50	82	3.56	6	7.32
Total & Average	308	52	16.88	163	52.92	607	3.74	60	19.48

*Data obtained from bulb segments were cultured for 60 days.

**Average = Total no. of bulbscales produced / No. of explant producing bulbscales.

表4. BA對湖北貝母PLB培養形成幼嫩鱗片與胚狀化癒合組織之影響

Table 4. Effects of BA on the formation of bulbscales and embryogenic callus from PLB segment of *Fritillaria hupehensis**

MS medium with BA mg/l	No. of explant cultured	Explant turned to brown		Explant producing bulbscales		No. of bulbscales produced		Explant forming embryogenic callus	
		No.	%	No.	%	Total	Average**	No.	%
0	40	6	15.00	7	17.50	22	3.13	9	22.50
0.25	41	7	17.07	9	21.95	26	2.89	12	29.27
0.5	41	4	9.76	15	36.58	48	3.20	18	44.00
1	40	4	10.00	16	40.00	40	2.50	14	35.00
2	43	4	9.30	16	37.21	33	2.06	19	44.10
4	50	10	20.00	9	18.00	13	1.44	8	16.00
Total & Average	255	35	13.73	72	28.24	182	2.53	80	31.37

*Data obtained from PLB segments were cultured for 60 days.

**Average = Total no. of bulbscales produced / No. of explant producing bulbscales.

表5. NAA對湖北貝母莖段基部培養形成幼嫩鱗片與胚狀化癒合組織之影響

Table 5. Effects of NAA on the formation of bulbscales and embryogenic callus from stem base segment of *Fritillaria hupehensis**

MS medium with BA	NAA mg/l	No. of explant cultured	Explant turned to brown		Explant producing bulbscales		No. of bulbscales produced		Explant forming embryogenic callus	
			No.	%	No.	%	Total	Average**	No.	%
0.5	0.10	42	17	40.48	18	42.86	45	2.50	8	19.05
0.5	0.25	46	16	34.78	32	69.57	77	2.40	8	17.39
0.5	0.50	38	11	28.95	26	68.42	95	3.65	9	23.68
0.5	1.00	36	10	27.78	26	72.22	90	3.46	12	33.33
0.5	2.00	40	10	25.00	28	70.00	82	2.93	10	25.00
0.5	4.00	28	6	21.43	20	71.43	62	3.10	4	50.00
Total & Average		230	70	30.43	150	65.22	451	3.01	51	22.17

*Data obtained from stem base segments were cultured for 60 days.

**Average = Total no. of bulbscales produced / No. of explant producing bulbscales.

表6. NAA對湖北貝母鱗片培養形成幼嫩鱗片與胚狀化癒合組織之影響

Table 6. Effects of NAA on the formation of bulbscales and embryogenic callus from bulb segment of *Fritillaria hupehensis**

MS medium with BA	NAA mg/l	No. of explant cultured	Explant turned to brown		Explant producing bulbscales		No. of bulbscales produced		Explant forming embryogenic callus	
			No.	%	No.	%	Total	Average**	No.	%
0.5	0.00	57	10	17.54	31	54.39	109	3.52	16	28.07
0.5	0.10	42	6	14.29	29	69.05	94	3.24	13	30.95
0.5	0.25	63	6	9.52	45	71.43	174	3.87	18	28.57
0.5	0.50	51	7	13.73	38	78.43	141	3.71	16	31.37
0.5	1.00	40	5	12.50	28	70.00	73	2.61	13	32.50
0.5	2.00	43	6	13.95	27	62.79	76	2.81	15	34.83
0.5	4.00	55	4	7.27	34	61.82	106	3.12	18	32.73
Total & Average		351	44	12.54	232	66.10	773	3.33	109	31.35

*Data obtained from bulb segments were cultured for 60 days.

**Average = Total no. of bulbscales produced / No. of explant producing bulbscales.

表7. NAA對湖北貝母PLB培養形成幼嫩鱗片與胚狀化癒合組織之影響

Table 7. Effects of NAA on the formation of bulbscales and embryogenic callus from PLB segment of *Fritillaria hupehensis**

MS medium with		No. of explant cultured	Explant turned to brown		Explant producing bulbscales		No. of bulbscales produced		Explant forming embryogenic callus	
BA	NAA		No.	%	No.	%	Total	Average**	No.	%
	mg/l									
0.5	0.10	36	7	19.44	8	22.22	22	2.75	12	33.33
0.5	0.25	40	6	15.00	10	25.00	26	2.60	16	25.00
0.5	0.50	38	4	10.53	14	36.84	40	2.86	14	36.84
0.5	1.00	42	5	11.90	16	38.10	38	2.38	13	30.95
0.5	2.00	37	4	10.81	13	35.14	23	1.77	10	27.03
0.5	4.00	45	5	11.11	8	17.78	12	1.50	13	28.89
Total & Average		238	31	13.03	69	28.99	161	2.33	78	32.77

*Data obtained from PLB segments were cultured for 60 days.

**Average = Total no. of bulbscales produced / No. of explant producing bulbscales.

表8. NAA對湖北貝母莖段基部培養形成根之影響

Table 8. Effects of NAA on root formation from stem base segment of *Fritillaria hupehensis**

MS medium with		No. of explant cultured	Explant producing root		No. of root produced	
BA	NAA		No.	%	Total	Average**
	mg/l					
0.5	0.10	42	8	19.05	8	1.00
0.5	0.25	46	12	26.09	28	2.33
0.5	0.50	38	8	21.05	30	3.75
0.5	1.00	36	8	22.22	25	3.13
0.5	2.00	40	13	32.50	48	3.69
0.5	4.00	28	16	57.14	53	3.31
Total & Average		230	65	28.26	192	2.95

*Data obtained from stem base segments were cultured for 60 days.

**Average = Total no. of root produced / No. of explant producing root.

表9. NAA對湖北貝母鱗片培養形成根之影響

Table 9. Effects of NAA on root formation from bulb segment of *Fritillaria hupehensis**

MS medium with		No. of explant cultured	Explant producing root		No. of root produced	
BA	NAA		No.	%	No.	%
mg/l						
0.5	0.00	57	8	14.04	6	0.75
0.5	0.10	42	7	16.67	8	1.14
0.5	0.25	63	14	22.22	35	2.50
0.5	0.50	51	12	23.53	38	3.17
0.5	1.00	40	9	22.50	40	3.33
0.5	2.00	43	15	34.88	51	3.40
0.5	4.00	55	23	41.82	70	3.04
Total & Average		351	88	25.07	248	2.82

*Data obtained from bulb segments were cultured for 60 days.

**Average = Total no. of root produced / No. of explant producing root.

表10. NAA對湖北貝母PLB培養形成根之影響

Table 10. Effects of NAA on root formation from PLB segment of *Fritillaria hupehensis**

MS medium with BA NAA		No. of explant cultured	Explant producing root		No. of root produced	
mg/l			No.	%	No.	%
0.5	0.10	36	5	13.89	11	2.20
0.5	0.25	40	6	15.00	14	2.33
0.5	0.50	38	8	21.05	38	4.75
0.5	1.00	42	8	19.05	33	4.13
0.5	2.00	37	13	35.14	36	2.77
0.5	4.00	45	14	31.11	38	2.71
Total & Average		238	54	22.69	170	3.15

*Data obtained from PLB segments were cultured for 60 days.

**Average = Total no. of root produced / No. of explant producing root.

表 11. NAA對湖北貝母PLB培養重量增加率之影響

Table 11. Effects of NAA on weight increased from PLB segment of *Fritillaria hupehensis* *

MS medium		Average weight of						
with		explant in 1st day	explant after 20 days	explant after 40 days	explant after 60			
BA	NAA	of culture	in cultured	in cultured	days in cultured			
mg/l		g	g	FI***	g	FI	g	FI
0.5	0.10	0.13 ^{ab}	0.36 ^{cd**}	2.8159	0.79 ^c	6.180	1.02 ^d	8.048
0.5	0.25	0.14 ^{ab}	0.42 ^c	3.0582	1.28 ^b	9.457	1.67 ^b	12.294
0.5	0.50	0.1379 ^{ab}	0.54 ^a	3.9297	1.59 ^a	11.538	2.12 ^a	15.404
0.5	1.00	0.15 ^a	0.49 ^b	3.1351	1.64 ^a	10.610	2.25 ^a	14.529
0.5	2.00	0.14 ^{ab}	0.33 ^d	2.2762	1.28 ^b	8.985	1.51 ^{bc}	10.585
0.5	4.00	0.12 ^b	0.36 ^{cd}	2.9427	1.16 ^b	9.338	1.38 ^c	11.149

*Culture duration was 60 days.

**Means with the same letter of a column are not significantly different at 5 % level by Duncan's multiple range test.

***FI : fold increased

表 12. NAA對湖北貝母鱗片培養重量增加率之影響

Table 12. Effects of NAA on weight increased from bulb segment of *Fritillaria hupehensis* *

MS medium		Average weight of						
with		explant in 1st	explant after 20 days	explant after 40 days	explant after 60			
BA	NAA	day of culture	in cultured	in cultured	days in cultured			
mg/l		g	g	FI***	g	FI	g	FI
0.5	0.00	0.08 ^b	0.20 ^{b**}	2.5246	0.37 ^d	4.6431	0.64 ^d	8.1274
0.5	0.10	0.07 ^b	0.23 ^b	3.1105	0.39 ^d	5.2900	0.64 ^d	8.7954
0.5	0.25	0.07 ^b	0.22 ^b	3.1542	0.48 ^c	6.7327	0.69 ^d	9.7694
0.5	0.50	0.08 ^b	0.24 ^b	2.9860	0.51 ^c	6.4536	1.08 ^b	13.7150
0.5	1.00	0.08 ^b	0.32 ^a	3.7476	0.75 ^{ab}	8.8172	1.31 ^a	15.3950
0.5	2.00	0.11 ^a	0.24 ^b	2.1676	0.79 ^a	7.4821	0.89 ^c	8.0947
0.5	4.00	0.11 ^a	0.29 ^a	2.7612	0.79 ^b	6.7781	0.88 ^c	8.2846

*Culture duration was 60 days.

**Means with the same letter of a column are not significantly different at 5 % level by Duncan's multiple range test.

***FI: fold increased

表13. Auxins類植物荷爾蒙對湖北貝母鱗片暗培養形成幼嫩鱗片與胚狀化癒合組織之影響
Table 13. Effects of auxins on the formation of bulbscales and embryogenic callus from bulb segment of *Fritillaria hupehensis* under dark condition*

MS medium with 2,4-D NAA kinetin		No. of explant cultured	Explant turned to brown		Explant producing bulbscales		No. of bulbscales produced		Explant forming embryogenic	
mg/l			No.	%	No.	%	Total	Average**	No.	callus %
0	0.5	31	10	32.26	13	41.94	45	2.37	5	16.13
0.5	0.5	28	11	39.29	18	64.29	61	3.38	3	10.71
1	0.5	28	13	46.43	19	67.86	85	4.47	5	17.86
2	0.5	46	15	33.33	22	47.83	116	5.27	4	8.70
4	0.5	42	16	38.10	22	52.38	81	3.68	1	2.38
8	0.5	32	13	40.63	7	21.88	11	1.57	2	6.25
	0.5	33	19	33.33	17	51.51	57	3.35	4	12.12
	1	30	9	30.00	16	53.33	37	2.3	9	30.00
	2	29	7	24.14	16	55.17	71	4.44	7	24.14
	4	35	10	28.57	20	57.14	115	5.75	8	22.86
	8	39	8	20.51	22	56.41	59	2.68	9	23.08
Total & Average		373	121	32.44	192	51.47	738	3.84	57	15.28

*Data obtained from stem segments were cultured for 60 days under dark conditions.

**Average = Total no. of bulbscales produced / No. of explant producing bulbscales.

表14. Auxins類植物生長調節劑對湖北貝母鱗片暗培養形成根之影響
Table 14. Effects of auxins on root formation from bulb segment of *Fritillaria hupehensis* under dark condition*

MS medium with 2,4-D NAA kinetin			No. of explant cultured	Explant producing root		No. of root produced	
mg/l				No.	%	Total	Average**
0		0.5	31	2	6.45	4	2
0.5		0.5	28	3	10.71	3	1
1		0.5	28	1	3.57	2	2
2		0.5	46	3	6.52	4	1.33
4		0.5	42	4	9.52	6	1.5
8		0.5	32	3	9.38	5	1.67
	0.5	0.5	33	5	15.15	15	3
	1	0.5	30	11	36.67	24	2.18
	2	0.5	29	11	37.93	53	4.82
	4	0.5	35	19	54.29	60	3.16
	8	0.5	39	18	46.15	85	4.72
Total & Average			373	80	21.45	261	3.63

*Data obtained from bulb segments were cultured for 60 days under dark conditions.

**Average = Total no. of root produced / No. of explant producing root.

表 15. Auxins類植物生長調節劑對湖北貝母鱗片光照培養形成幼嫩鱗片與胚狀化癒合組織之影響
Table 15. Effects of auxins on the formation of bulbscales and embryogenic callus from bulb segment of *Fritillaria hupehensis* under light condition*

MS medium with 2,4-D NAA kinetin		No. of explant cultured	Explant turned to brown		Explant producing bulbscales		No. of bulbscales produced		Explant forming embryogenic callus	
mg/l			No.	%	No.	%	Total	Average**	No.	%
0	0.5	40	9	22.50	17	42.50	51	3.00	5	12.50
0.5	0.5	38	8	21.05	16	42.11	46	2.88	4	10.53
1	0.5	41	8	19.51	19	46.34	42	2.21	6	14.63
2	0.5	43	9	20.93	19	44.19	53	2.79	8	18.60
4	0.5	39	9	23.08	18	46.15	48	2.67	7	17.95
8	0.5	37	8	21.62	19	51.35	46	2.42	5	13.51
	0.5	35	7	20.00	18	51.43	53	2.94	9	25.71
1	0.5	42	7	16.67	23	54.76	62	2.70	11	26.19
2	0.5	41	8	19.51	23	56.10	64	2.78	12	29.27
4	0.5	39	7	17.95	24	61.54	60	2.50	11	28.21
8	0.5	36	6	16.67	15	41.67	42	2.80	9	25.00
Total & Average		431	86	19.95	211	48.96	567	2.69	87	20.19

*Data obtained from stem segments were cultured for 60 days under dark conditions.

**Average = Total no. of bulbscales produced / No. of explant producing bulbscales.

表 16. Auxins類植物生長調節劑對湖北貝母鱗片光照培養形成根之影響

Table 16. Effects of auxins on root formation from bulb segment of *Fritillaria hupehensis* under light condition*

MS medium with 2,4-D NAA kinetin			No. of explant cultured	Explant producing root		No. of root produced	
mg/l				No.	%	Total	Average**
0		0.5	40	3	7.50	7	2.33
0.5		0.5	38	3	7.90	10	3.33
1		0.5	41	4	9.76	13	3.25
2		0.5	43	5	11.63	14	2.80
4		0.5	39	3	7.69	7	2.33
8		0.5	37	4	10.81	4	1.00
	0.5	0.5	35	7	20.00	20	2.86
	1	0.5	42	12	28.57	38	3.17
	2	0.5	41	12	29.27	40	3.33
	4	0.5	39	22	56.41	48	2.18
	8	0.5	36	16	50.00	40	2.22
Total & Average			431	91	21.58	241	2.59

*Data obtained from bulb segments were cultured for 60 days under dark conditions.

**Average = Total no. of root produced / No. of explant producing root.

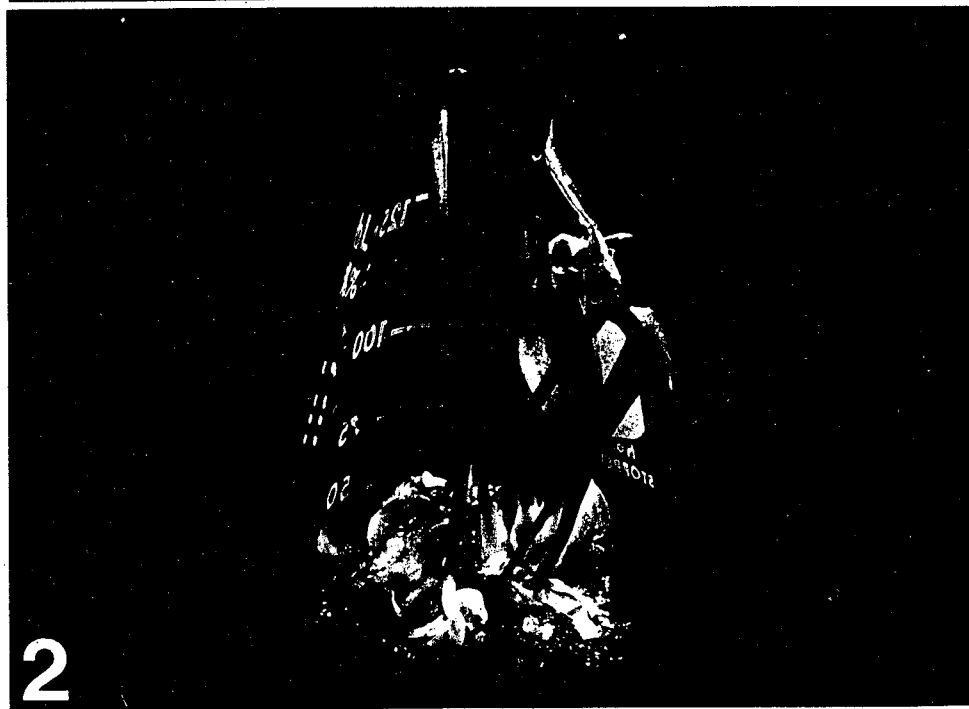
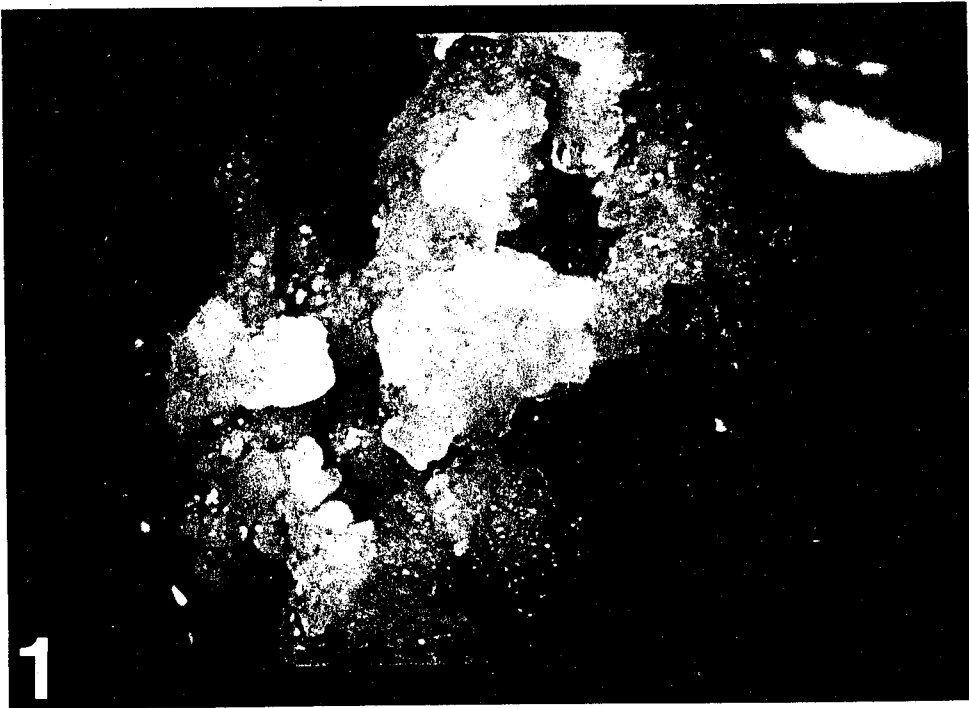


圖 1. 湖北貝母鱗片培養於含 0.5 mg/l BA 及 0.5 mg/l NAA 之 MS 培養基中，
60 天後形成之擬胚化癒合組織。

圖 2. 湖北貝母鱗片培養於含 0.5 mg/l BA 及 0.5 mg/l NAA 之 MS 培養基中，
80 天後形成之植物體。

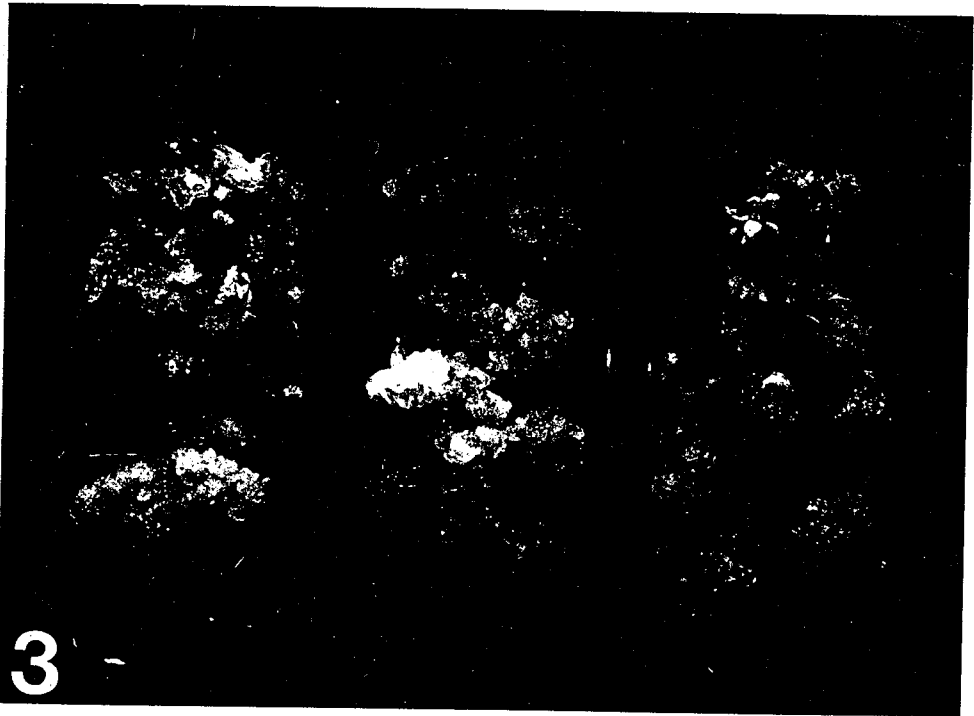


圖 3. 胚化癒合組織經照光繼代培養 16 mg/l NAA 之 MS 培養基中，120 天後形成之芽體。

圖 4. 胚化癒合組織經照光繼代培養於含 0.5 mg/l BA 及 0.5 mg/l NAA 之 MS 培養基中，90 天後可自癒合組織表面形成眾多綠苗。

中醫藥年報

第十五期第二冊

編者：行政院衛生署中醫藥委員會

發行人：蘇貫中

發行所：行政院衛生署中醫藥委員會

地址：台北市羅斯福路一段七號十樓

電話：(02)3967765

傳真：(02)3914900

印刷：啓展彩色製版印刷有限公司

地址：板橋市中山路二段465巷81號2F

電話：(02)9577563

中華民國八十六年五月出版

勘 誤 表

計畫編號	標題	頁數	行數	原稿	修正
DOH85-CM-037	中文摘要	289	倒數第4行	無根藤	無根草
	討論	303	倒數第14，15行	agnost	agonist
	結論與建議	303	倒數第5行	無根藤	無根草
	結論與建議	304	第2行	生物鹼具有心血管疾病方面之活性	生物鹼具有抗心血管疾病方面之活性
DOH85-CM-039	材料與方法 第五項	320	倒數第10行	12um	12 μ m
	"	"	倒數第5，6行	12um，500um	12 μ m，500 μ m
	"	"	倒數第1行	10u1	10 μ 1
DOH85-CM-040	討論	341	倒數第12行	藉由通過 prostaglandin 和血管內皮釋放 因子/NO 系統不 同的作用機轉達 到其抗心律不整 的作用	藉由血管內皮釋 放因子/NO 系統 的作用機轉達到 其抗心律不整的 作用
DOH85-CM-045	前言	454	倒數第7行	陶弘景之傷寒論	張仲景傷寒論

統一編號

016204860022



健康是您的權利 保健是您的責任

ISBN 957-00-9298-X (第二冊：平裝)