



計畫編號：CCMP89-RD-112

行政院衛生署八十九年度科技研究發展計畫

以去活化蛋白激酵素及抗氧化酵素系統篩選模式
評估龍膽瀉肝湯及當歸龍薈丸之療效

委 託 研 究 報 告

計畫委託機關：台北醫學大學

計畫主持人：許秀蘊

研究人員：李明亭

執行期間：89年5月1日至89年10月31日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見

目錄

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
前言.....	3
材料與方法.....	4-10
結果.....	11
討論.....	12
結論與建議.....	13
圖、表.....	14-18
參考文獻.....	19-20
自我評估表.....	21

表次

表.1 各方劑水草物對黃嘌呤氧化酵素之抑制效果	14
表.2 各方劑對黃嘌呤氧化酵素之抑制型態及抑制常數	14
表.3 龍膽瀉肝湯對肝癌細胞之細胞毒性	14
表.4 當歸龍薈丸(不含麝香)對肝癌細胞之細胞毒性	15
表.5 當歸龍薈丸(不含麝香)對肝癌細胞之細胞毒性	15
表.6 各方劑之水草物對 MMPs 之有效抑制濃度	15

圖次

圖.1 龍膽瀉肝湯之 Lineweaver-Burk 圖	16
圖.2 當歸龍薈丸(不含麝香)之 Lineweaver-Burk 圖	17
圖.3 當歸龍薈丸之 Lineweaver-Burk 圖	18

編號：CCMP89-RD-112

以去活化蛋白激酵素及抗氧化酵素系統 篩選模式評估龍膽瀉肝湯及當歸龍薈丸 之療效

許秀蘊

台北醫學大學

摘要

以三種傳統方劑龍膽瀉肝湯、當歸龍薈丸(不含麝香)及當歸龍薈丸，用各種不同極性之溶媒系統下之萃取物，於黃嘌呤/黃嘌呤氧化酵素系統、肝病變細胞株之細胞毒、DNA 斷裂之分析、總蛋白激酵素活性、細胞間質蛋白質裂解酵素之檢測等，並評估出一簡易之篩選模式。龍膽瀉肝湯、當歸龍薈丸(不含麝香)及當歸龍薈丸之水萃物對黃嘌呤/黃嘌呤氧化酵素系統由其 IC_{50} (2.05~2.79 mg) 及 K_i 值 (1.87~2.76 mg) 表現其顯著之黃嘌呤氧化酵素抑制作用。

於肝病變細胞株中，此三種方劑在相當於生藥 1mg/mL 之濃度下，對 Hep G2 及 Hep3B 具 44.87~54.66% 之抑制生長率。各方劑之水萃物對細胞間質蛋白質裂解酵素(MMPs)之有效抑制濃度，對 MMP-2 及 MMP-9 其 IC_{50} (ug/mL) 介於 62.8~86.3。而在 DNA 斷裂之分析、總蛋白激酵素活性測定方面則並未顯現明確之差異。

由以上之篩選模式可看出對此三個方劑而言，黃嘌呤/黃嘌呤氧化酵素系統、肝病變細胞株之細胞毒、細胞間質蛋白質裂解酵素之檢測等，可視為一簡易之篩選模式。

關鍵詞：龍膽瀉肝湯， 當歸龍薈丸， 黃嘌呤氧化酵素，細胞間質蛋白質裂解酵素。

Evaluate the potential effects of the Decoction of Gentianae and Bolus of Angelicae Sinensis and Gentianae by using the screening model on the inactivated protein kinase and anti-oxidative enzyme

**Shiow-Yunn Sheu
Taipei Medical University
ABSTRACT**

There are three kinds of traditional Chinese herb composition , Decoction of Gentianae , Bolus of Angelicae Sinensis and Gentianae, and one without musk, under different solvent system extraction, then try to built an convenient screening model to evaluate the potential effects on the xanthine/xanthine oxidase system, cytotoxicity, DNA fragmentation, total kinase activity, and matrix metalloproteinase inhibitory effect.

Water extract of these three herb composition showed the potential inhibitory effects on xanthine oxidase (IC_{50} 2.05~2.79mg; K_i 1.87~2.76mg).

Under 1mg/mL (crude drug) concentration, it was found the 44.87 to 54.66% growth inhibition on Hep G2 and Hep 3B cell lines. The inhibition of metastasis on the Hep G2 and Hep 3B were investigated the IC_{50} 62.8~86.3 ug/mL, but there were no significantly difference on DNA fragmentation or total protein kinase analysis.

The screening model of xanthine oxidase inhibitory system, cytotoxicity test and matrix matalloproteinase inhibition analysis could be contributing to evaluate the potential effects of Chinese herb medicine.

Key words: Decoction of Gentianae , Bolus of Angelicae Sinensis and Gentianae, xanthine oxidase, matrix matalloproteinase.

壹、前言

中醫藥古籍中不乏具清熱瀉肝之方劑，而今醫學文獻上之記載，於病毒性肝炎病人血清中，發現其黃嘌呤氧化酵素之含量比正常人高出許多(由 0~0.5 mIU/L 增加至數百 mIU/L)[1,2]。而黃嘌呤氧化酵素除了與痛風有關外，於組織缺血再灌流時所產生之氧衍生自由基(oxygen-derived free radical)，其在人體內之作用方式[3,4]，除了引起脂肪過氧化反應、蛋白質氧化外，也會導致核酸氧化。其中脫氧核糖核酸股裂開，則 DNA 需要修復，可能助長突變形成；另則鹽基性物質的改變，如 8-hydroxyguanine、5-hydroxymethyl uracil, thymine glycol 的產生，引起突變形成，甚至導致癌生長。因此自由基除了與心血管疾病、缺血後再灌流之組織傷害、老化[5~7]....等有關外，也與肝炎、癌症以及程式死亡[8~10]有相當之關連性。

因此，擬從龍膽瀉肝湯及當歸龍薈丸之萃取物中，測定對於肝病變細胞株之細胞毒性、DNA fragmentation 之分析、總蛋白激酵素之活性、細胞間質蛋白質裂解酵素之檢測及對黃嘌呤氧化酵素活性之抑制作用。

貳、 材料與方法

貳.一、 藥材基源及萃取

龍膽瀉肝湯 [龍膽 4g, *Gentiana manshurica* Kitagawa; 黃芩 2g, *Scutellaria baicalensis* Georgi; 山梔子 2g, *Gardenia jasminoides* Ellis; 澤瀉 4g, *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep.; 木通 2g, *Clematis argentilucida* W. T. Wang; 車前子 2g, *Platago asiatica* L.; 當歸 2g, *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels; 生地黃 2g, *Rehmannia glutinosa* Libosch.; 柴胡 4g, *Bupleurum chinense* DC.; 甘草 2g, *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.] 及當歸龍薈丸 [當歸 3g, *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels; 龍膽 3g, *Gentiana manshurica* Kitagawa; 蘆薈 1.5g, *Aloe ferox* Miller; 山梔子 3g, *Gardenia jasminoides* Ellis; 黃連 3g, *Coptis chinensis* Franch; 黃芩 3g, *Scutellaria baicalensis* Georgi; 黃柏 3g, *Phellodendron chinese* Schneid; 大黃 1.5g, *Rheum officinale* Baill; 木香 0.75g, *Aucklandia lappa* decne; 青黛 1.5g, *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek; 麝香 0.1g, Musk].

方劑均依傳統方法製備並經水萃後濃縮，而當歸龍薈丸(含麝香)則由市售購得濃縮散，再經各種不同極性之溶媒萃取後製成適量當樣品溶液。

貳.二 黃嘌呤/黃嘌呤氧化酵素模式之評估

黃嘌呤氧化酵素會催化黃嘌呤轉變為尿酸，在 UV 295 nm 有最大吸收，因此可用比色定量法，以測定尿酸吸光值變化速率，作為測定黃嘌呤氧化酵素活性之指標，以及測試物對於此酵素之抑制活性，而避免自由基之產生而致使細胞之病變。故測試物如能抑制此酵素之活性，則具保護細胞之功能。

黃嘌呤氧化酵素活性抑制百分比(percent inhibition)測定[11]：

1 控制組測定：

(1).空白組：DMSO 10 μ l + PBS 390 μ l

控制組：DMSO 10 μ l + 0.04 units xanthine oxidase / PBS 40 μ l + PBS 350 μ l

(2).以上兩組各加入 xanthine / PBS 600 μ l，搖均勻後放入 UV cell 中。

(3).以波長 295 nm 測定吸光值，每十秒記錄一次吸光質變化速率，共記錄一分鐘。

(4).以上步驟，重複做三次。

2 實驗組測定：

(1).空白組：sample 10 μ l + PBS 390 μ l

實驗組：sample 10 μ l + 0.04 units xanthine oxidase / PBS 40 μ l + PBS 350 μ l

(2).其他步驟如上述控制組測定，重複做三次，並記錄之。

3 較控制組吸光值變化速率 ($\Delta A_{\text{control}}$) 和實驗組吸光值變化速率 (ΔA_{test})，可得測試成份對 xanthine oxidase 活性抑制百分比 (percent inhibition)，公式如下：

$$\text{percent inhibition} = (1 - \Delta A_{\text{test}} / \Delta A_{\text{control}}) \times 100\%$$

$\Delta A_{\text{control}}$ ：控制組每分鐘的吸光值變化速率 (absorbance change / minute)

ΔA_{test} ：實驗組吸光值變化速率 (absorbance change / minute)

4. IC_{50} 之測定[11~13]:

若測試成份在 $100 \mu\text{M}$ 濃度時對於 xanthine oxidase 具有明顯抑制作用時，將測試成份稀釋成各種不同的濃度，測其抑制程度，以求出 IC_{50} 。

將不同濃度之抑制百分比代入 Titer Soft 之 Grafit 可求得以求出 IC_{50} 值。公式如下：

$$y = a / \{ 1 + [x / IC_{50}]^s \} + \text{background}$$

x：測試成份之濃度 (concentration)

y：測試成份之 percent response (即 $\Delta A_{\text{test}} / \Delta A_{\text{control}}$)

a：maximum y range

s：slope factor

5. 抑制型態 (inhibition mode) 之探討[13-14]:

將所配製的 $100 \mu\text{M}$ xanthine / PBS 緩衝溶液稀釋成 75、50、25、10、 $5 \mu\text{M}$ 等濃度，依 2.2.2.1 步驟操作並記錄其結果。再根據 Lineweaver-Burk plot 的求法，從控制組和實驗組的雙倒數迴歸線圖交點，判斷出抑制劑和酵素之作用型態，並求得抑制常數 (k_i)。

貳.三、細胞毒性之測定

本實驗以 Hep3B 及 HepG2 細胞株之培養，用 MTT 之分析方法及錐藍染液分析法，測定龍膽瀉肝湯及當歸龍薈丸以各種不同極性溶媒之萃取物的細胞毒性。

貳.四、細胞間質蛋白質裂解酵素之檢測

1. 細胞培養：肝病變細胞 (Hep G2, Hep 3B, Hep G2-2, Hep G2-5) 培養於含 10% FCS-RPMI-1640 的 75 cm² 培養瓶中，將培養瓶置於 37°C，溼度 9.8%，含 5% 二氧化碳的培養箱中。細胞長滿後，將培養基抽乾，先以 PBS 清洗細胞表層兩次後，加入 1ml 0.05% Trypsin-0.02% EDTA，把細胞打下再加入 10 ml RPMI-1640，將細胞均勻沖散，留約五分之一的細胞在原培養瓶，繼續培養。若是要做 MMP 活性的分析，則將含血清的培養基，換成不含血清的培養基，培養 24 小時。
2. 細胞內蛋白磷酸化反應：種 5×10^5 /well 的細胞於 6-wells 培養皿上，待細胞長滿後，換以 0.5% FCS-RPMI-1640 進行 serum starvation 24 小時，再將培養基抽乾，以 PBS 清洗細胞兩次，加入 0.5ml 不含磷酸根離子的 RPMI-1640 (phosphate free medium) 再加 200uCi/ml ³²Pi 至每一 well，37°C 下培養 3 小時，在終止反應前一小時加入類黃鹼素。反應完後，將培養皿放置冰上，小心抽出含有 ³²Pi 的培養基，以 washing buffer 清洗三次。最後再以 Washing buffer 沖洗兩次，隨後加入 100ul 的 lysis buffer 至每一 well，將細胞溶破後吸出，置入 microfuge tube 中，以 12,000× g，4°C 離心 10 分鐘，將樣品取出放置冰上，儘快抽

出上清液。取 5ul 上清液加入 Pierce BCA Protein assay kit，在 60°C 下，反應 30 分鐘，於室溫冷卻後測 562nm 吸光值，換算蛋白質濃度。

3. 細胞內蛋白質的萃取：已處理過藥物的細胞，抽掉 medium，用冰 PBS wash 二次（以下步驟均在冰上或 4°C 中操作）。刮下細胞後，立即加入 0.3ml/10 cm dish 的 Gold lysis buffer，並以 pipetman 抽吸作充分的混合使細胞完全的溶解，將此 cell lysate 吸到 1.5ml 的 eppendroff tube 中，再振盪 1.5min，然後離心 10min (12000rpm)，取上清液，並用 BCA Protein assay kit 來測量蛋白質的濃度，萃取液保存在 -70°C 冰箱，直到下次取用前。

4. SDS-聚丙稀醯膠胺凝膠電泳分析：取 10ml 30% acrylamide/0.8% bis; 7.5ml 4x Tris-Cl/SDS pH 8.8; 12.5ml ddH₂O; 100ul 10%APS 及 30ul TEMED 混合均勻後，迅速倒入電泳片中，直到液面距離 well 約 2 公分處為止，加入水飽和的正丁醇，直到正丁醇蓋住整個液面。待膠凝固後，將正丁醇倒掉，並以去離子水清洗表面數次，才開始製備 stacking gel。若是分析 MMP 的活性則在膠體中加入 0.2mg/ml 的 gelatin。待 stacking gel 凝固後，拔掉齒梳，用二次去離子水沖洗數次，準備注入樣本。取 50ug 的蛋白樣本，或是適量的已培養過細胞的細胞培養基，再加入等體積的 2x SDS/protein Loading buffer。用毛細管 tips 將蛋白樣本加至每個 well 中。開始時以 15 mA 的固定電流跑 Stacking gel，直到色帶

跑至 stacking gel 與 separating gel 的交界處，調整電流為 30mA。當色帶跑至底線時，才停止電泳。

5. SDS-聚丙烯醯胺凝膠膠片染色: SDS 聚丙烯醯胺凝膠膠片以固定液 (50% methanol, 12% acetic acid) 室溫下固定 30 分鐘後，置於染色液 (40% methanol, 7% acetic acid、0.025% Coomassie brilliant blue R-250) 染色 15-20 分鐘，再以褪染液 (40% methanol, 7% acetic acid) 褪色數次，以清水置換褪染液後，膠片固定於雙層玻璃紙中間，晾乾後保存。

6. 西方墨點法 (Western blot) 分析: 電泳分析後，利用 Bio-Rad 公司的蛋白質轉印器將蛋白質自 SDS 聚丙烯醯胺膠體轉移至硝化纖維濾紙，以 PBS 洗滌硝化纖維濾紙三次，然後置於含有 3% skim milk 的 PBS 溶液中進行 blocking 反應 2 小時，再利用 PBS 洗滌三次。接著加入 10 ml 一級抗體溶液 (1:1000 比例稀釋多元抗體血清於 PBS 溶液中)，在 4°C 反應 10 小時 (或室溫反應 2 小時)，以 PBS 溶液洗三次，再加入接合過氧化氫 (peroxidase) 的二級抗體溶液在室溫反應 2 小時，經 PBS 洗滌三次後，隨即進行增強化學螢光顯影 (enhance chemilluminent detection)。

貳. 五、

1. DNA 片段的萃取 (DNA fragment extraction)

將以處理過藥物的細胞刮下，用冰過的 PBS 清洗三次，加入 100 μ l 的 lysis buffer (10mM Tris-HCl pH7.6; 1mM EDTA)，將細胞溶解後，在加入等量的 phenol/chloroform，搖勻，再適溫下 14500rpm 離心，15 分鐘。用去頭的 tip，取出上清液，在加入 1 μ g 的 RNase A，在 37°C 下，放置至少 2 小時。

2. 洋菜膠電泳分析 (agarose gel electrophoresis): 取適量洋菜膠 (agarose), 以 TBE 緩衝液 (50mM Tris-HCl pH 8.0、50mM Boric acid、1 mM EDTA) 混合, 使最終濃度為 1.6%, 再經微波爐加熱溶解, 冷卻至 60°C, 加入 ethidium bromide (最終濃度為 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 並將洋菜膠倒至膠盤上。待其凝膠後, 將之移至電泳槽中, 以 TBE 緩衝液注入電泳槽, 直到覆滿膠盤之上為止。載入欲分析之 DNA 樣本 (已加入 gel loading buffer: 最終濃度為 0.05% bromophenol blue、0.05% xylene cyanol 及 5% glycerol), 以電壓 100 伏特進行電泳, 並以紫外光偵測 DNA 訊號並照相留存。

貳. 六蛋白酪胺酸激酶活性分析

將作過蛋白質定量後的細胞質或細胞膜萃取液以 incubation buffer (50mM Tris-Cl pH 7.5, 20mM MgCl_2 , 5mM NaF, 0.2mM EDTA, 0.8mM EGTA) 調整濃度為 0.8mg/ml。將 10 μl 檢體與 40 μl PGT (poly Glu: Tyr, 4:1, 購自 Sigma) substrate (以 incubation buffer 配成 2mg/ml) 混合後加入 10 μl [γ - ^{32}P] ATP 溶液。為了活化不同種的受體型式的 PTK, 則在 incubation buffer 中, 加入生長因子 (growth factors)。[γ - ^{32}P] ATP 放射量濃度為 10 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, 溶液配方為: 45mM MgOAc , 150 μM ATP。磷酸化反應是在 22°C 進行 20 分鐘。最後加入 10 μl , 0.5M 的 EDTA 以終止反應。再將反應液滴在 phosphocellulose (p81) paper 上使蛋白質附著在紙上, 接者以 5% TCA (trichloro-acetic acid) 洗 3 次, 陰乾後將 p81 paper 放到 4ml 閃爍計數液 (cocktail solution) 以 β -counter 測定放射含量。

參、 結果

龍膽瀉肝湯、當歸龍薈丸(不含麝香)及當歸龍薈丸於黃嘌呤/黃嘌呤氧化酵素系統下，發現此三種方劑以正己烷及二氯甲烷之萃取物並未顯示出有意義之抑制作用；而水萃物對於黃嘌呤氧化酵素之抑制作用，其 IC_{50} 分別為 2.79 ± 0.88 ; 2.05 ± 0.15 ; 2.23 ± 0.80 mg; K_i 值為 1.87; 2.76; 2.23 mg. (表 1,2)。但就其抑制型態而言，龍膽瀉肝湯及當歸龍薈丸(不含麝香)均為明顯的無競爭型(uncompetitive type)之抑制作用，而當歸龍薈丸則表現出混合型之抑制作用(圖 1~3)。

於肝病變細胞株中，龍膽瀉肝湯、當歸龍薈丸(不含麝香)及當歸龍薈丸等三種方劑在相當於生藥 1mg/mL 之濃度下，對 Hep G2 分別表現出 49.58、54.66、50.23% 之抑制生長率；對 Hep 3B 分別為 44.87、53.43、48.56% 之抑制生長率(表 3~5)。

各方劑之水萃物對細胞間質蛋白質裂解酵素(MMPs)之有效抑制濃度，對 MMP-2 其 IC_{50} (ug/mL) 為 62.9；71.3；66.0，對 MMP-9 則為 86.3；62.8；78.2(表 6)，而對去活化蛋白激酵素活性之測定並未顯現明確之差異。

肆、討論

龍膽瀉肝湯、當歸龍薈丸(不含麝香)及當歸龍薈丸之水萃物都顯示出對於黃嘌呤氧化酵素強力之抑制效果(IC_{50} 分別為 2.79 ± 0.88 ; 2.05 ± 0.15 ; 2.23 ± 0.80 mg; K_i 值為 1.87; 2.76; 2.23 mg)。故其不僅能當為黃嘌呤氧化酵素之抑制劑，更對於自由基的生成具抑制作用，可驅除自由基，並可避免自由基之傷害。而由於黃嘌呤氧化酵素在早期病毒性肝炎患者之血清中其濃度為正常人(0~0.5 mIU/L) 之數百倍[1,2]，腦瘤病人組織(2.34 mU/mg PT)也有顯著增加(正常為 1.06 mU/mg PT)[15]。亦即黃嘌呤氧化酵素抑制劑對於這些疾病之治療或預防上應具有其重要角色。

因黃嘌呤氧化酵素而生成之氧衍生物自由基，尤其在缺血後再灌流引起之組織傷害，當然包括肝細胞傷害[16]，可因對黃嘌呤氧化酵素之抑制作用而降低。於肝病變細胞株中，此三種方劑在相當於生藥 1mg/mL 之濃度下，對 Hep G2 及 Hep 3B 均具 50% 之抑制生長率，顯示出其細胞毒性，並於其細胞形態上有明顯之變化。

癌細胞之轉移大部分為具入侵性，而高度的入侵性又與一群蛋白質裂解酵素有關[17~20]。其中的 collagenase type IV、MMP-2 和 MMP-9 等尤其高度出現於乳癌及各種的癌細胞中[17,21]。因此對於蛋白質裂解酵素之抑制劑，與抑制癌症之轉移應有其相關性。

由上述之分析結果顯示，各種不同極性溶媒之萃取物中，仍以水萃物具最好之效果，本計劃顯示與傳統之以水煎煮方式互相印證。而且當歸龍薈丸(不含麝香)及當歸龍薈於上述之分析法中並無明顯之差異性，值得在基於保育動物上當一參考。

伍、結論與建議

1. 三個方劑之水萃物效果較佳。
2. 當歸龍薈丸(不含麝香)及當歸龍薈於上述之分析法中並無明顯之差異性。
3. 黃嘌呤氧化酵素之抗氧化系統及蛋白質裂解酵素之抑制，對於癌症之預防及治療上應具重要之角色。故此篩選模式可當參考及應用。

陸、圖、表

表、1 各方劑水萃物對黃嘌呤氧化酵素之抑制效果

方劑	抑制百分比(%)									
	相對生藥重量(mg)									
	0.3	0.75	1.5	2.0	2.25	3.0	5.0	10.0	20.0	IC50(mg)
龍膽瀉肝湯				39.10			68.86	84.43	90.66	2.79
				± 3.30			± 5.25	± 5.27	± 4.38	± 0.88
當歸龍薈丸(不含麝香)	10.96	13.84	46.37		53.11	81.91				2.05
	± 4.61	± 1.73	± 2.55		± 0.87	± 1.74				± 0.15
當歸龍薈丸				58.82			84.08	88.93		2.23
				± 2.07			± 2.43	± 7.41		± 0.80

表、2 各方劑對黃嘌呤氧化酵素之抑制型態及抑制常數

方劑	抑制型態	抑制常數(mg)
龍膽瀉肝湯	無競爭型	1.87
當歸龍薈丸(不含麝香)	無競爭型	2.76
當歸龍薈丸	混合型	2.23

表、3 龍膽瀉肝湯對肝癌細胞之細胞毒性

細胞株	抑制百分比(%)		
	相對生藥量(mg/mL)		
	0.25	0.5	1.0
Hep G2	7.43± 2.75	29.21±1.51	49.58±1.18
Hep 3B	20.84±1.98	30.88±2.58	44.87±1.45

表、4 當歸龍薈丸(不含麝香)對肝癌細胞之細胞毒性

細胞株	抑制百分比(%)		
	相對生藥量(mg/mL)		
	0.25	0.5	1.0
Hep G2	33.59± 4.33	32.19± 4.41	54.66± 2.80
Hep 3B	14.68± 1.40	30.63± 1.89	53.43± 2.35

表、5 當歸龍薈丸對肝癌細胞之細胞毒性

細胞株	抑制百分比(%)		
	相對生藥量(mg/mL)		
	0.25	0.5	1.0
Hep G2	30.09± 3.55	29.25± 2.79	50.23± 4.48
Hep 3B	18.44± 1.63	31.45± 1.51	48.56± 3.22

表、6 各方劑之水萃物對MMPs之有效抑制濃度

	IC ₅₀ [相對生藥量(ug/mL)]		
	龍膽瀉肝湯	當歸龍薈丸(不含麝香)	當歸龍薈丸
MMP-2	62.9± 5.2	71.3±7.5	66.0±2.2
MMP-9	86.3±4.7	62.8±4.9	78.2±3.2

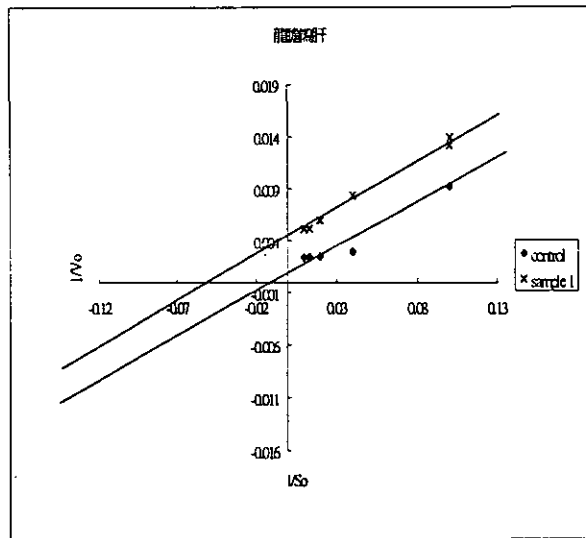


圖 1. 龍膽瀉肝湯之 Lineweaver-Burk 圖

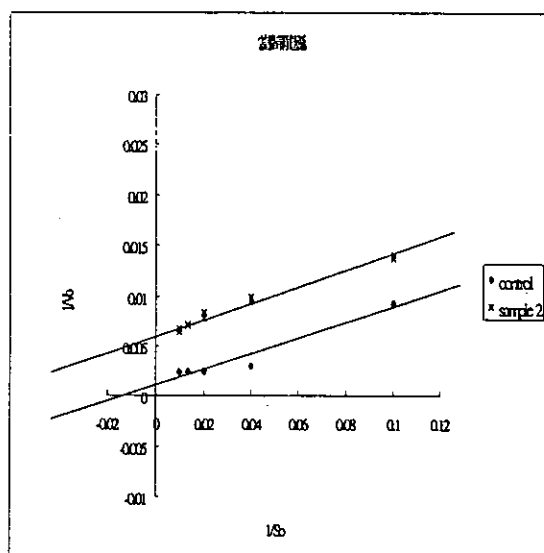


圖 2. 當歸龍薈丸(不含麝香)之 Lineweaver-Burk 圖

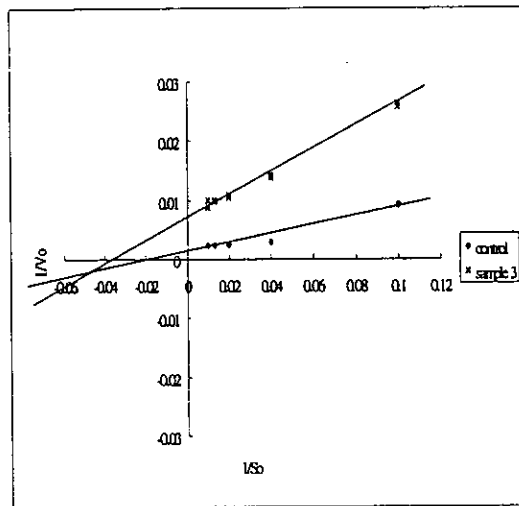


圖 3. 當歸龍薈丸之 Lineweaver-Burk 圖

柒、參考文獻

1. Shamma MH, Nasrallah S, Chaglassian T, Kachadurian AK and Al-Khalidi UAS. Serum xanthine oxidase : a sensitive test of acute liver injury. *Gastroenterology* 1985; 48:226-230.
2. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Eng J Med* 1985; 312:159-163.
3. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol.* 1993; 23:21-48.
4. Floyd RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia, *FASEB J.*1990; 4:2587-2597.
5. Prasad K, Kalra J and Bharaddwaj L. Cardiac depressant effects of oxygen free radicals. *J. Vasc. Dis.* 1993; 44:257-269.
6. Zimmerman BJ and Granger DN. Mechanisms of reperfusion injury. *Am. J. Med. Sci.* 1994; 307:284-292.
7. Richter C. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to aging. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1995; 27:647-653.
8. Adkison D, Hollwarth ME, Benoit JN, Parks DA, McCord JM and Granger DN. Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver. *Acta Physiol. Scand Suppl.* 1986; 548:101-107.
9. Clemens MR. Free radicals in chemical carcinogenesis. *Klin Wochenschr* 1991; 69:1123-1134.
10. Buttke TM and Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today* 1994; 15:7-10.
11. Sandl r M, and John SH. Design of Enzyme inhibitors as drugs. pp. 770-779. Oxford University Press, 1989.
12. 施益民，呂鋒洲. 自由基與各種疾病，當代醫學 1989 16(5):399-407.
13. Cervantes G. DNA interaction and antitumor activity of a pt(III) derivative of 2-mercaptopyridine. *J Inorg Biochem* 1999 77(3-4): 197-203.
14. Abeles RH, Jencks WP, Lipmann F, Spektor LB. *Enzymetic Reaction Mechanisms* pp.432-443. WH Freeman and Company 1979.
15. Kokogu K, Belce A, Ozyurt E, Tepeler Z. Xanthine oxidase levels in human brain tumors. *Cancer Lett* 1990; 50:179-181.

16. Adkison D, Hollwarth ME, Benoit JN, Parks DA, Mccord JM, Granger DN. Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986; 101-107.
17. Neal DE, Marsh C, Bennett MK, Abel PD, Hall RR, Sainsbury JR, Harris AL. Epidermal-growth factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumors. *Lancet* 1985; 336-368.
18. Paolo M, Daniel B, Rifkin. *Biology and Biochemistry of Proteins in Tumor Invasion. Physiological Reviews.* 1993; 73(1): 161-195.
19. Kelloff GJ, Fay JR, Steele VE, Lubet RA, Boone CW, Crowell JA, Sigma CC. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as potential cancer chemopreventives. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5:657-666.
20. Sharoni Y, Teuerstein I, Levy J. Phosphoinositide phosphorylation precedes growth in rat mammary. 1986; 142-148.
21. Tani Y, Katsuki Y, Kosoto H, Arichi S, Kubo M, Tatsuda H, Kimura Y, Kitagawa I, Yoshikawa M. Studies on the medical history, chemical constituents and pharmacological effects moutan cortex. *Proc Symp Wakan-Yaku* 1981; 14:86-92.