RG88B0-0016
RRPG88B00016(47.P)

計畫編號：DOH88-CM-044

行政院衛生署八十八年度委託研究計畫

常用治療中風方劑抗氧化活性研究—血腑逐瘀湯、烏藥順氣散、補陽還五湯、小續命湯、柴胡加龍骨牡蠣湯

委託研究成果報告

執 行 機 構：高雄醫學院
計 畫 主 持 人：林俊清
研 究 人 員：顏峰霖、許芬芳
執 行 期 限：87年1月1日至88年6月30日

＊＊本研究報告僅供參考用，不代表本署意見＊＊

編號 ：CCMP88-RD-044

常用治療中風方劑抗氧化活性之研究--血腑逐瘀湯、烏藥順氣散、補陽還五湯、小續命湯、柴胡加龍骨牡蠣湯

計畫主持人 ：林 俊 清
執 行 單 位 :高 雄 醫 學 院

摘 要

中風是國人的十大死亡原因之一，而中風主要有四種類型：腦栓塞、腦血栓、腦出血、蜘蛛膜下出血，其中以血塊引起的腦栓塞、腦血栓為最常見。腦栓塞通常是在已被動脈硬化症所損壞的動脈中形成，動脈硬化症的部分成因是因高血脂中的脂肪、膽固醇和形成血塊的必要物質沉積在動脈所造成。根據醫學研究顯示，當人在面臨氧化壓力時，一旦抗氧化系統失去平衡，活性氧(自由基)便會去攻擊破壞膽固醇中的低密度脂蛋白(LDL)，使得氧化的脂質沉積在血管壁上，因而造成動脈粥狀硬化，嚴重時有變成心臟病、高血壓、中風等疾病之危險，而抗氧化物的使用，能有效改善及預防動脈硬化。為了開發中風防治生藥資源，而著手對我國傳統醫學常用方劑：血腑逐瘀湯、烏藥順氣散、補陽還五湯、小續命湯及柴胡加龍骨牡蠣湯等，進行研究其抗氧化活性之研究，以期改善及預防動脈硬化，進而對中風之治療有所助益。實驗是以 Cytochrome C 還原比色法測定各方劑清除 $\cdot O_2^-$ 自由基之效果，結果發現此五種方劑均具有清除 $\cdot O_2^-$ 自由基的活性，其中以柴胡加龍骨牡蠣湯最具效果。另以

Hypoxanthine-xanthine oxidase 和 Fenton 反應體系分別產生超氧陰離子自由基 Superoxide radical 和 Hydroxyl radical，以 5,5-Dimethylprrroline-N-oxide 作為 spin adduct 捕捉劑，並以電子自旋共振（Electron spin resonace, ESR）技術直接觀察生藥對氧自由基的清除作用，結果發現此五種方劑均具有清除 $\cdot O_2^-$ 及 ·OH 自由基的活性，其中以柴胡加龍骨牡蠣湯清除 $\cdot O_2^-$ 最具效果，清除 ·OH 自由基方面則以補陽還五湯最具效果，因此更進一步證實此五種方劑具有清除自由基的能力。此外，五種方劑在氯化亞鐵-抗壞血酸-誘發脂質過氧化實驗均具有降低 LDL 及 Cholesterol 與抗脂質過氧化的能力活性，其中以血腑逐瘀湯較佳此外，五種方劑在氯化亞鐵-抗壞血酸-誘發脂質過氧化實驗均具有降低 LDL 及 Cholesterol 與抗脂質過氧化的能力活性，其中以血腑逐瘀湯較佳。綜合以上的研究結果，血腑逐瘀湯、烏藥順氣湯、補陽還五湯、小續命湯及柴胡加龍骨牡蠣湯等五方劑均具有良好之清除自由基之能力。

關鍵詞：中風、血腑逐瘀湯、烏藥順氣湯、補陽還五湯、小續命湯、柴胡加龍骨牡蠣湯、自由基、超氧陰離子自由基、Electron spin resonace、Cytochrome C 、氯化亞鐵-抗壞血酸、抗脂質過氧化、xanthine oxidase。

CCMP88-RD-044

The anti-lipidperoxidation and radical scavenger effects of Chinese crude drug prescriptions on stroke

Chun-Ching Lin

Kaohsiung Medical Collage, Kaohsiung, Taiwan, R. O. C.

Abstract

The anti-oxidant effect of five Chinese medicinal prescriptions:SHIEE-FUU-JWU-IU-TANG、UYAKUJUNKISAN、BUU-YANG-HWAN-WU U-TANG、SHIOZOKUMYOTOO、SAOKOKARYUKOTSUBOREITO -O were investigated in free radical scavenger activity.

The free radical scavenger activity of these prescriptions crude drugs extract was examined by means of cytochrome *C* system and an electron spin resonance (ESR) spectrometra. The result of a preliminary test suggest that these five prescriptions may be effective in the prevention and therapy of cerebrovascular stroke. SHIEE-FUU-JWU-IU-TANG (SFJIT)、UYAKUJUNKISAN (UYJKS)、BUU-YANG-HWAN-WUU-TANG (BYHWT)、SHIOZOKUMYOTOO (SZMT)、SAOKOKARYUKOTSUBOREITOO (SKKRKBRT) are prescriptions of folk Chinese Medicine. In present study, these prescriptions have free radicals scavenging effects and decreases LDL , Cholesterol and antilipidperoxidation. In order to further clarify the pharmacological effect, we evaluate these prescriptions on antioxidant effect and active oxygen scavenging activity. Active oxygen scavenging activity by electron spin resonance (ESR) spectrometry using 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) as a spin trap.

Keywords: stroke、SHIEE-FUU-JWU-IU-TANG、UYAKUJUNKISAN、BUU-YANG-HWAN-WUU-TANG、SHIOZOKUMYOTO-O、SAOKOKARYUKOTSUBOREITOO、free radical、superoxide radical、Cytochrome *C*、$FeCl_2$-Ascorbic acid、antilipidperoxidation、xanthine oxidase.

目　錄

頁

中文摘要---------- 1
英文摘要---------- 3
目　　錄---------- 5

實驗內容
第一章　抗脂質過氧化作用之研究

壹、 前言 ---------- 7
貳、 材料與方法 ---------- 8
參、 結果與討論 ---------- 11

第二章　自由基清除作用之研究
壹、前言 ---------- 13
貳、材料與方法 ---------- 13
參、結果與討論 ---------- 17

第三章　自由基生成抑制作用之研究
壹、前言 ---------- 19
貳、材料與方法 ---------- 20
參、結果與討論 ---------- 23

第四章　電子自旋共振法
壹、前言 ---------- 25
貳、材料與方法 ---------- 26
參、結果與討論 ---------- 28

第五章　降血脂作用之研究
壹、前言 ---------- 30

貳、 材料與方法 ---------- 30
參、結果與討論---------- 31

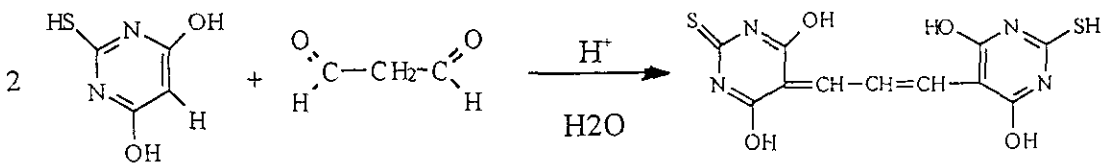
總結論 ---------- 33
參考文獻 ---------- 35
表格 ---------- 41
附圖 ---------- 43

第一章　抗脂質過氧化作用之研究

壹、　前言

其原理係用脂質過氧化作用產物之一的丙二醛（malondialdehyde；MDA）與硫代巴比妥酸（thiobarbituric acid；TBA）反應生成在波長 532nm 處有最大吸收之 MDA-TBA 紅色複合物，由於 MDA 的量與吸收度呈比例關係，故可依此定量之 [3]、[4]、[40]。

本實驗以氯化亞鐵-抗壞血酸（$FeCl_2$-ascorbic acid）誘發脂質過氧化模式來測定各化合物抗脂質過氧化的能力。實驗步驟乃依 Yoden [4]及 Kimuya [5]等人之方法作部份修正而成，分為含藥控制組、非藥控制組、Cholesterol 組、及藥物組。並且以 trolox (水溶性維生素 E）作對照組 [6]。其反應機轉如下:



TBA　　MDA　　MDA-TBA (TBARS)

貳、　材料與方法

（一）實驗藥品及器材

1. Thiobarbituric acid （TBA）: Sigma Chemical Co.
2. L (+) - Ascorbic acid （AA）: Sigma Chemical Co.
3. Tris-HCl: Sigma Chemical Co.

4. Sodium dodecyl sulphate （SDS）: Sigma Chemical Co.
5. Ferrous chloride ($FeCl_2$) :Wako pure chemical Industries Ltd.
6. n-Butanol: Merck Chemical Co.
7. 1,1,3,3-Tetraethoxypropane （TEP）: Sigma Chemical Co.
8. Trolox: Aldrich Chemical Co.
9. *DC* Protein assay instruction manual: BioRad life science group
10. Spectrophotometer: HITACHI U-2000

（二）實驗動物

取購自國立成功大學動物中心四週大（約 100 公克重）之雄性大白鼠（Wistar Albino Rats），飼養四週後，斷頭取肝。稱取約 2 公克重之老鼠肝臟，以 150 mM Tris-HCl （pH 7.2）緩衝液，製成 20 %（w/v）之腦及肝均質液（homogenate），然後於離心力 500×g 下離心 10 分鐘，吸取上清液，並依據 Lowry 等人之方法作蛋白質定量 [40]。

(三)藥品配製

1. Tris-HCl （150mM）溶液

稱取 Tris-HCl 粉末 4.728 克，加水至總體積 200 毫升，並且以 1N 之 NaOH 溶液調至 pH 7.2 即成。

2. Ascorbic acid （0.1mM）溶液

稱取 ascorbic acid 粉末 17.61 毫克，加水至總體積 10 毫升，然後稀釋 100 倍即成。

3. TBA （0.6%，w/v）溶液

稱取 TBA 粉末 0.6 克，加水 50 毫升，以超音波震盪器加熱震盪 30 分鐘至完全溶解，冷卻後加水至總體積 100 毫升即成。

4. SDS （9.8%，w/v）溶液

稱取 SDS 粉末 9.8 克，加水 50 毫升，緩慢搖勻後靜置至粉末完全溶解，然後加水至總體積 100 毫升即成。

5. $FeCl_2$ （4 mM）溶液

稱取 $FeCl_2$ 粉末 50 毫克，加水 10 毫升，然後稀釋 10 倍即成。

6. TEP 標準溶液

量取 25μl 之 TEP，以乙醇（ethanol）稀釋至 25 毫升（A液），4 ℃下保存一個月。量取 500 μl 之 A 液，以乙醇稀釋至 100 毫升（B液），4℃下可保存 14 天。量取定量 B 液，以水稀釋成 10、15、20、25、30 μM 之標準溶液，並製作檢量線。

(四) 實驗方法

Solution	控制組 (非藥)	控制組 (含藥)	藥物組	空白組 (藥物)	空白組 (水)
Homogenate(2g/10ml)	250μl	250μl	250μl	-	-
Test solution(1-5mg/ml)	-	-	50μl	50μl	-
Tris-HCl(pH7.2)	250μl	150μl	150μl	450μl	500μl
$FeCl_2$(4mM)	-	50μl	50μl	-	-
Ascorbic acid(0.1mM)	-	50μl	50μl	-	-

↓以混合器（vortex）混合均勻。

↓於 37℃下水浴培養 1 小時。

↓將各組試管加入 500 μl 0.1N HCl，混合均勻。

↓加入 200 μl 9.8 % SDS，混合均勻。

↓加入 900 μl 超純水，混合均勻。

↓各加入 2 ml 的 0.6 % TBA，混合均勻。

↓於 95℃水浴 1 小時，冰浴，待冷卻至室溫。

↓加入正丁醇（n-butanol） 5 ml，充份混合（40 sec/tube）。

↓於 25℃，1000×g 下，離心 25 分鐘。

↓取正丁醇層於 532 nm 下測吸光度。

↓計算藥物抑制脂質過氧化之抑制率及 IC_{50} 值。

二．抑制率

脂質過氧化抑制率之計算如下：

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

Tabs: 含藥控制組（扣除空白組）之吸光度

Babs: 非藥控制組（扣除空白組）之吸光度

Dabs: 藥物組（扣除藥物空白組）之吸光度

參、 結果及討論

血腑逐瘀湯、烏藥順氣湯、補陽還五湯、小續命湯及柴胡加龍骨牡蠣湯等五種方劑對氯化亞鐵（ $FeCl_2$ ）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。

過氧化脂質（ lipid peroxide ）的上升，一般都被視為活性氧上升而與脂質產生連鎖反應的結果，而相關研究亦指出，自由基、活性氧及過氧化脂質在炎症反應及老化過程中扮演著重要角色[8]，[9]。同時亦有研究報導在風濕性關節炎（rheumatoid arthritis）患者之關節腔液中，其過氧化脂質明顯地增加 [10]，而且過氧化脂質與分解微粒酵素（lysosomal enzyme）有高度地關連性。

因此，脂質過氧化作用的機轉經歷三個過程，即 (1) 主要的起始反應（ initiation ），是由 $\cdot O_2^-$ 、 $\cdot OH$ 、 $\cdot CCl_3$ 等所引發，(2) 鏈鎖式和鏈鎖式支鏈反應的傳撥擴增作用（ propagation ）和 (3) 自由基相互反應終止（termination）。

脂質（ LH ）比蛋白質及核酸更易與活性氧（ reactive oxygen-species，ROS ）反應[14]。此反應由 LH → L・開始，接著增幅反應，直至 2L・ → L-L ； L・ + LOO・ → LOOL ； 2LOO・ → LOOL + 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自由基或活性氧像 $\cdot O_2^-$ 、 $\cdot OH$ 、 $\cdot CCl_3$ 等所引發。在酸性下加熱過氧化脂質（ 如 malondialdehyde，MDA，CHO-CH_2-CHO ），便可與 TBA 反應，並藉此來定量 MDA 之量。此一複合物在 532 nm 波長處有最大吸收峰。顏色越深，表示 MDA 量越多，脂質過氧化作用越嚴重。

Trolox 為水溶性維生素 E 類似物（analog），在先前的研究中，

證明具有抗脂質過氧化之作用活性。由於一般的維生素 E 為脂溶性，無法在高極性反應系統下進行測定，因此在本實驗中採用水溶性之 trolox 作為對照標準品。

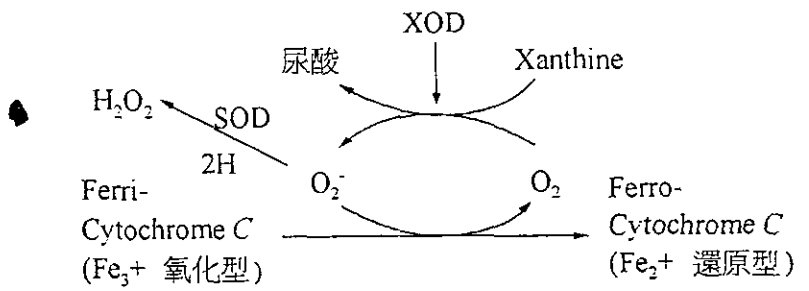
本研究以 TBA 法來評估常用中風方劑一一證實此五種方劑具有清除自由基的能力。此外，五種方劑在氯化亞鐵-種抗壞對脂質過氧化的抑制情形。結果顯示，五種方劑中除了小續命湯較無活性外，其餘四種方劑都確實均有抑制脂質過氧化的作用活性，而又以柴胡加龍骨牡蠣湯為最有作用活性。

第二章　自由基清除作用之研究

壹、 前言

當黃嘌呤氧化酵素（xanthine oxidase）催化黃嘌呤（xanthine）轉變為尿酸（uric acid）時，同時產生超氧陰離子自由基（superoxide anion radical；$\cdot O_2^-$），若以細胞色素 C（cytochrome C）作檢測劑，利用細胞色素 C 和 $\cdot O_2^-$ 之間的氧化還原作用，會使還原態細胞色素 C 增加，由於還原態細胞色素 C 在 550 nm 波長有特異吸收，因此可利用分光光度比色法（spectrophotometric method）來測定細胞色素 C 的吸光值變化速率作為測定藥物清除 $\cdot O_2^-$ 的活性及抑制[13]。

反應機轉如下:



Cytochrome C 測定 $\cdot O_2^-$ 含量（McCord & Fridovich 法）

貳、 材料與方法

(一) 實驗材料與藥品

1. KH_2PO_4: Ferak Chemical Co.

2. Dimethyl sulfoxide （DMSO）: Sigma Chemical Co.

3. Ethylenediamine tetraacetic acid（EDTA）: Sigma Chemical Co.

4. Cytochrome *C*: Sigma Chemical Co.

5. Xanthine: Sigma Chemical Co.

6. Xanthine oxidase: Sigma Chemical Co.

7. Spectrophotometer: HITACHI U-2000

（二）. 藥品配製

1. KH_2PO_4 （50mM）溶液

稱取 KH_2PO_4 粉末 0.68 克，加水至總體積 100 毫升，並且以 1N 之 KOH 溶液調至 pH 7.8 即成。

2. EDTA （0.1mM）溶液

稱取 EDTA 粉末 372.2 毫克，加水至總體積 100 毫升，然後稀釋 10 倍即成。

3. Cytochrome *C* （0.1mM）溶液

臨用配置，稱取 cytochrome *C* 粉末 12.3 毫克，加水至總體積 10 毫升即成。

4. Xanthine （0.1mM）溶液

稱取 xanthine 粉末 7.6 毫克，加水至 5 毫升，並且以 10 滴 0.1N 之 NaOH 溶液助溶。以超音波震盪器震盪至完全溶解，加水至總體積 10 毫升，然後稀釋 50 倍即成。

5. Xanthine oxidase （1U/ml）溶液

吸取 xanthine oxidase 原液，依其標籤上所標示之濃度（mg protein/ml ×unit/mg protein = unit/ml）加水稀釋即成，實驗中須以冰塊冷卻維持其活性。

6. 測試檢品溶液

將五種方劑冷凍乾燥成粉末精稱，以純水配置成 10 mM 溶液，冷藏保存，待用時再以 KH_2PO_4 溶液稀釋至各所須濃度 0.5%，0.3%，0.1%，0.05%，0.01%。檢品以臨用配置，單次使用為最佳。

(二)實驗方法

一．反應試液（experiment solution；E 液）之配製

50 mM	KH_2PO_4	2 ml
0.1 mM	EDTA	2 ml
0.1 mM	cytochrome *c*	2 ml （臨用配製）
0.1 mM	xanthine	40 ml （臨用配製）

二．測定流程

↓空氣校正。

石英管	DMSO	E 液	H_2O	xanthine oxidase
tube A	50μl	400μl	530μl	-(H_2O)
tube B	50μl	400μl	530μl	-(H_2O)

歸零，前面石英管倒掉，後面保留。

↓控制組(空白組)

石英管	DMSO	E 液	H_2O	xanthine oxidase
tube A	50μl	400μl	530μl	-(H_2O)
tube C	50μl	400μl	530μl	20μl

實驗組(藥物組)

石英管	Sample	E 液	H_2O	xanthine oxidase
tube A	-(DMSO)	400μl	530μl	-(H_2O)
tube D	50μl	400μl	530μl	20μl

迅速攪拌，次數固定，分別測 OD_{550nm} 值，共記錄 70 秒。

↓比較控制組和藥物組最終吸光度，即可求得各藥物對清除 $\cdot O_2^-$ 之抑制百分比，並計算出 IC_{50} 值。

三．抑制率

抑制率之計算如下：

$$\text{抑制率}\ (\ I\%\ ) = \frac{Tabs - Dabs}{Tabs} \times 100\ \%$$

Tabs：控制組之吸光度

Dabs：藥物組之吸光度

參、 結果及討論

一般而言，由生體體外脂質過氧化測試所測得之 TBARS (thiobarbituric acid reactive substance) 值，包含了 MDA 以及其他反應物質，而且測得的是活性氧與脂質反應後的最終產物，並無法直接測得其清除活性氧的能力，因此筆者乃進一步以細胞色素 C (cytochrome C) 還原比色法及黃嘌呤氧化酵素活性抑制測試，來評估五種方劑之抗氧化作用是否對活性氧 (包括 $\cdot O_2^-$) 具直接捕捉之抗氧化能力。

Cytochrome C 還原比色法測試清除 $\cdot O_2^-$ 自由基為參考 McCord 與 Fridovich 之方法[14] ，經由加入 xanthine oxidase (X.O.) 催化 xanthine 變成 uric acid 的同時產生 superoxide radicals ($\cdot O_2^-$) ，再利用檢測劑 cytochrome C 與 $\cdot O_2^-$ 之間的氧化還原作用，並使氧化型 cytochrome C (Fe^{3+}) 變成還原型 cytochrome C (Fe^{2+}) ，並於 550 nm 下特異吸收。以比色法檢測實驗 550 nm 下吸光度增減，即可定量還原型 cytochrome C 含量。由此法只能藉由 cytochrome C 與 $\cdot O_2^-$ 之間的氧化還原間接求出 $\cdot O_2^-$ 含量。結果證實理論上 cytochrome C 此法可運用樣品中 SOD-like 活性的測定，但實際應用上常出現一些問題:比如氧化型細胞色素 cytochrome C 不純: 因此種方法所要求的酵素需高純度，但市售含有 SOD 或低分子量的干擾物質。另外，在實驗中所含黃嘌呤氧化酵素抑制劑 (xanthine oxidase inhibitor) 加入該反應體系，將降低 $\cdot O_2^-$ 之生成。這情形可能會影響到測試之準確性，因為可能測得具類似 SOD 活性之物質其實不能直接清除 $\cdot O_2^-$ 而是具抑制黃嘌呤氧化酵素活性之特性，使其產生類 SOD 般清除 $\cdot O_2^-$ 之假象。而若試料中具有能將 Fe^{3-} 還原成 Fe^{2-} 的成分存在，也可能得到相同的結果，導致細胞色素 C 還原比色法之結果受到爭議。此外由於此法是比色定量法，並不適於測定有色之

檢品（如含有類黃鹼素），使其應用範圍大大受限。

因此，本實驗細胞色素 C（cytochrome C）和黃嘌呤氧化酵（xanthine oxidase）作用的最大不同處，在於前者必需通過 $\cdot O_2^-$ 的產生才能具有抑制黃嘌呤氧化酵素活性之特性，使其產生類 SOD 般清除 $\cdot O_2^-$ 之作用。而後者可以直接使細胞色素 C（cytochrome C）還原。此誤差即可能是因其具抑制黃嘌呤氧化酵素之活性所致。因此擬再進行黃嘌呤氧化酵素活性抑制測試，除了校正細胞色素 C 還原比色測試的結果外，並評估藥物抑制自由基產生之能力。

實驗結果顯示，在原生藥方劑抽取物之 0.3%濃度皆具有 50.0%的有效抑制率，其中以小續命湯及柴胡加龍骨牡蠣湯最具效果（參看圖一）。

第三章　自由基生成抑制作用之研究

壹、　前言

黃嘌呤氧化酵素（ xanthine oxidase ）會催化黃嘌呤轉變為尿酸並產生具有毒性之 $\cdot O_2^-$，此種酵素可藉由一個電子的還原，把氧 O_2 還原成 O_2^-（ oxygen radical ）或藉由二個電子之還原產生過氧化氫（H_2O_2）。由於此種實驗會伴隨著超氧化自由基及過氧化氫生成。原因是當組織缺血時氧氣供應不足，當組織中缺血時氧氣供應不足，ATP 在無氧狀態下，分解成 ADP 但無法再磷酸化為 ATP，因此 ADP 會繼續分解成 AMP、IMP，造成黃嘌呤（ xanthine ）和次黃嘌呤（ hypoxanthine ）大量蓄積。同時細胞內黃嘌呤脫氫酵素（ xanthine dehydrogenase ）也因蛋白質水解性轉變成黃嘌呤氧化酵素(xanthine oxidase)，而其大量增加。所以當組織缺血時，黃嘌呤氧化酵素則與蓄積的黃嘌呤和次黃嘌呤作用產生大量的超氧化物自由基。當適當的螯合鐵（chelated iron）存在下，生成超氧化物自由基進行 Fenton 反應，生成更毒氫氧自由基（$\cdot OH^-$），而這些氫氧自由基（$\cdot OH^-$）和體內蛋白質、核酸、及脂肪反應形成一連串自由基連鎖效應，而併發中風、心臟病、動脈性栓塞、高血脂症等其它臨床上疾病 [14]、[15]。

由於尿酸在波長 295nm 有最大吸收，若藥物對黃嘌呤氧化酵素活性的抑制作用越強，則尿酸的吸光值變化速率越低，因此可利用分光光度分析法（ spectro-photometric method ）來測定尿酸的吸光值變化速率作為測定黃嘌呤氧化酵素活性的指標 [16]、[17]。

反應機轉如下:

$$Xanthine + H_2O + 2O_2 \xrightarrow{\text{xanthine oxidase}} \text{Uric acid} + H_2O_2 + \cdot O_2^-$$

貳、 材料與方法

1. KH_2PO_4: Ferak Chemical Co.
2. Dimethyl sulfoxide （DMSO）: Sigma Chemical Co.
3. Xanthine : Sigma Chemical Co.
4. Xanthine oxidase : Sigma Chemical Co.
5. Allopurinol : Sigma Chemical Co.
6. Spectrophotometer : HITACHI U-2000.

（一）. 藥品配製

1. KH_2PO_4 （50 mM）溶液

稱取 KH_2PO_4 粉末 0.68 克，加水至總體積 100 毫升，並且以 1N 之 KOH 溶液調至 pH 7.8 即成。

2. Xanthine （0.1 mM）溶液

稱取 xanthine 粉末 7.6 毫克，加水至 5 毫升，並且以 10 滴 0.1N 之 NaOH 溶液助溶。以超音波震盪器震盪至完全溶解，加水至總體積 10 毫升，然後稀釋 50 倍即成。

3. Xanthine oxidase (1 U / ml) 溶液

吸取 xanthine oxidase 原液，依其標籤上所標示之濃度（mg protein/ml × unit/mg protein = unit/ml）加水稀釋即成，實驗中須以冰塊冷卻維持其活性。

4. 測試檢品溶液

將將五種方劑冷凍乾燥成粉末精稱，以純水配置成 10 mM 溶液，冷藏保存，待用時再以 KH_2PO_4 溶液稀釋至各所須濃度 10，8，5，3 mg/ml。檢品以臨用配置，單次使用為最佳。

(二). 反應試液 (experiment solution；E 液) 之配製

0.1mM xanthine/ KH_2PO_4 (pH7.8)

(三). 測定流程

↓空氣校正。

歸零，前面石英管倒掉，後面保留。

↓控制組 (空白組)

石英管	DMSO	E 液	H_2O	xanthine oxidase
tube A	50 μl	400 μl	530 μl	-(H_2O 20 μl)
tube C	50 μl	400 μl	530 μl	20 μl

歸零，前面石英管倒掉，後面保留。

↓控制組 (空白組)

石英管	DMSO	E 液	H_2O	xanthine oxidase
tube A	50 μl	400 μl	530 μl	-(H_2O 20 μl)
tube C	50 μl	400 μl	530 μl	20 μl

實驗組（ 藥物組 ）

石英管	Sample	E 液	H_2O	xanthine oxidase
tube A	-(DMSO)	400 μl	530 μl	-(H_2O 20 μl)
tube D	50μl	400 μl	530 μl	20 μl

迅速攪拌，次數固定，分別測 OD_{295nm} 值，共記錄二分鐘。

比較控制組和藥物組每分鐘吸光度的變化速率，即可求得各藥物抑制黃嘌呤氧化酵素之抑制百分比，並計算 IC_{50} 值。

三．抑制率

抑制率之計算如下：

$$\text{抑制率（ I\% ）} = \frac{\text{Tabs - Dabs}}{\text{Tabs}} \times 100\ \%$$

Tabs：控制組之吸光度變化速率

Dabs：藥物組之吸光度變化速率

參、 結果及討論

在細胞色素 C 還原比色法中，此實驗乃針對藥物清除已產生之 $\cdot O_2^-$ 自由基之作用來研究其抗氧化活性，但基於前面章節描述缺點，因此採用更積極的方式則是直接抑制 $\cdot O_2^-$ 自由基之產生以避免更進一步的傷害。因此作更進一步探討五種方劑抑制自由基生成的效果。

黃嘌呤氧化酵素（ xanthine oxidase ）為黃色素蛋白（ flavo-protein ）之一種 [18]，在各種動植物及細菌中均有發現 [19]、[20]。在大鼠，黃嘌呤氧化酵素分佈在大部份組織中，而在人類則主要存在於肝、小腸及心臟，以及不正常的風濕性關節炎（ rheumatoid arthritis)患者之關節腔液中，至於其他組織則幾乎無活性 [21]、[22]。

黃嘌呤氧化酵素在生體內主要的生理作用為將次黃嘌呤（ hypoxanthine ）氧化為黃嘌呤（ xanthine ），再將黃嘌呤氧化成尿酸(uric acid)而隨尿液排除。在黃嘌呤氧化的過程中，同時伴隨產生 $\cdot O_2^-$ 自由基及 H_2O_2，而此二者則依 Fenton 反應之反應機轉（ $H_2O_2 + \cdot O_2^- \rightarrow O_2 + \cdot OH + OH^-$ ）而產生更毒的氫氧自由基（ hydroxyl radical；$\cdot OH$ ），$\cdot OH$ 自由基則可能與蛋白質、核酸或脂肪酸反應，形成一連串的自由基氧化性傷害，如組織缺血後再灌流傷害 [23、24]、肝炎[25] 、動脈硬化 [26、27]、關節炎、癌症 [28、29]、[30] 、老化 [31、32] 及自體死亡（ apoptosis ）[33] 等。另外，產生的過量尿酸則會引發痛風等疾病。因此，具有抑制黃嘌呤氧化酵素作用之藥物除可考慮用來治療痛風外，同時亦具有抗自由基形成之生理功能。

目前臨床上使用之黃嘌呤氧化酵素抑制劑僅有 allopurinol 一種，主要是用來治療痛風。但根據筆者研究發現，其雖具有良好的抑制

黃嘌呤氧化酵素活性之效果，卻無清除 $\cdot O_2^-$ 自由基之作用，因此確定其藥理機轉純粹在於抑制黃嘌呤氧化酵素之活性。但在五種常用治療中風方劑之抗氧化活性研究中，雖然發現其在細胞色素 C 法中具有良好的抗氧化活性，卻仍須以此法來加以證實。結果發現，以尿酸量在 290 nm 下評估五種常用治療中風方劑對 superoxide radical 之清除活性。

實驗結果證實，五種常用治療中風方劑在 0.8%濃度下皆有 50.0% 的有效抑制率；其中以小續命湯及柴胡加龍骨牡蠣湯最具效果(參看圖二)。

血腑逐瘀湯、烏藥順氣湯、補陽還五湯、小續命湯及柴胡加龍骨牡蠣湯等五方劑，確實均具有抑制黃嘌呤氧化酵素 (抑制 $\cdot O_2^-$ 自由基生成) 的作用活性，並且和較 allopurinol 相互比較。由細胞色素 C 還原比色法及黃嘌呤氧化酵素抑制實驗 (xanthine oxidase inhibitor test) 的結果互相對照後推測。

第四章　電子自旋共振法

壹、 前言

以細胞色素 *C* 還原比色法檢測波長 550nm 下之吸光度增減，只能藉由細胞色素 *C* 與 $\cdot O_2^-$ 之間的氧化還原作用來間接求出 $\cdot O_2^-$ 含量，雖然實驗結果初步證實五種常用治療中風方劑都具有呈現抑制 $\cdot O_2^-$ 作用，但具有黃嘌呤氧化酵素抑制作用（ xanthine oxidase inhibition ）活性之藥物，可能造成抑制 $\cdot O_2^-$ 作用而影響此實驗結果之判定。因此藥物清除 $\cdot O_2^-$ 能力需進一步以能直接測定自由基之電子自旋共振法（ electron spin resonance，ESR ）及電子捕捉技術（ spin-trapping ）來評估自由基（ 如 $\cdot O_2^-$ ）之變化情形。此法主要利用次黃嘌呤-黃嘌呤氧化酵素（ hypoxanthine-xanthine oxidase system, HPX-XOD)產生超氧陰離子自由基（ superoxide anion radical ），用 DMPO (5,5-dimethyl-pyrroline-N-oxide) 作為 spin adduct 捕捉劑，再用電子自旋共振儀測其活性。

ESR 法係藉著檢出化合物或原子中的不對稱電子所具有之磁氣特性，以及從其能源變化，以了解電子舉動或狀態之方法 [34-38]。其與分光法最大不同點是試料置於磁場中之凹槽（ cavity ），以及入射波採微波，波長比分光法長。因 ESR 法採用微波，具有在測定時比較不受試料形狀色調影響之特徵，且能不破壞試料即進行自由基之定性、定量。

測試時，將試料設定在此位於電磁石中的凹槽，當從外部增加磁場且變化其強度時，自由基所有之不對稱電子在凹槽內吸收微波，以檢出元件（ diode ）檢波並予放大記錄於記錄器（ recorder ）即可得到光譜。

電子捕捉技術（ spin-trapping method ）是 1971 年由 Janzen EG [39] 所發表，係把不安定之自由基（R・）與自由基捕捉劑（TRAP）反應，變換為比較安定之自旋加成物（ spin adduct；RT・）以便於測定之方法。一般稱為電子自旋共振捕捉技術（ ESR spin-trapping method ）。本研究則以 Lin [40] 之電子自旋共振捕捉技術來評估藥物清除 $\cdot O_2^-$ 之活性。

貳、 材料與方法

(一). Electron spin resonance (ESR) 儀器裝置條件：

Field: 335.4±5.0mT

Modulation frequency: 100KHz

Modulation amplitude: 0.79×0.1mT

Microwave power: 8.0 mW （9.416 GHz）

Receiver gain: 2×100

Response time: 0.1 秒

Sweep time: 2 分鐘

Temp: 室溫

(二). 試藥的配製

A. 2.0mM hypoxanthine/PBS	50 μl
B. 5.5 mM DETAPAC /PBS	35 μl
C. drug sample or SOD or PBS	50 μl
D. 9.2 M DMPO	15 μl
E. 0.4 units/ml xanthine oxidase/PBS	50 μl

(三). 實驗方法

依序先將上述藥物配置備用，其中 E 液必需放置在冰浴中，防止酵素失去活性。

→ 首先先取 50 μl 2mM hypoxanthine (HPX)

→ 加入 35μl 5.5mM diethylenetriamine pentaacetic acid (DEPATAC)

→ 再加入 50 μl 各種不同濃度之 SOD 或加各種純化合物

→ 再加入 15 μl DMPO 置於試管中並混和均勻。

→ 再加 50 μl xanthine oxidase 加以攪拌混合。

→ 將混合液移至 ESR 測定石英 cell (160μl)

→ 將 cell 放在 ESR spectrometer 中的凹槽(cavity)後

→ 加入 XOD 約 40 秒，開始測定，2 分鐘完成。

(四). 光譜判讀

ESR 所測得之 DMPO-OOH 光譜中，第一信號之高度，即為 $\cdot O_2^-$加成物 DMPO-OOH 的量。首先由未添加 SOD 的光譜裡，取得 DMPO-OOH 與 Mn^{2+}信號的高度比 [DMPO-OOH (SOD=0) / Mn^{2+}]，再由添加了 SOD 的光譜中，求出 [DMPO-OOH (SOD=x) / Mn^{2+}]之值，即可得下列之計算公式：

$$Y=\frac{\text{DMPO-OOH (SOD=0) / } Mn^{2+}}{\text{DMPO-OOH (SOD=x) / } Mn^{2+}} - 1 \quad \text{或} \quad Y=\frac{I_0}{I} - 1$$

得到直線變換型檢量線。

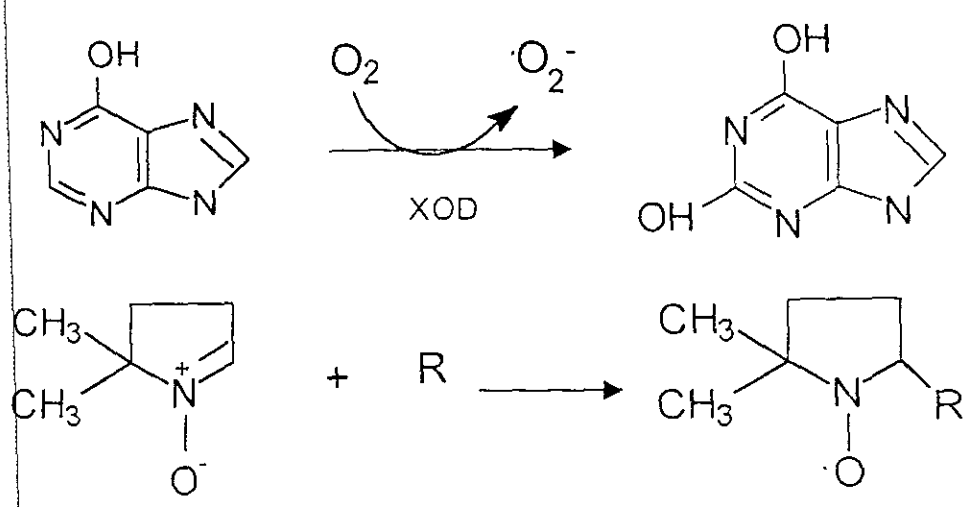
(五) 活性分析

由自旋加成物之光譜強度求出・O_2^-產生量。利用 SOD 和 DMPO 競爭與・O_2^-反應，首先求出由次黃嘌呤與黃嘌呤氧化酵素反應所產生之・O_2^-量，然後添加不同濃度之 SOD，對 SOD 消除・O_2^-之強度作成檢量線，再將偵測物質放入同一反應體系，觀測其對・O_2^-之消除活性（superoxide scavenging activity），再與檢量線相對照，便可求出各種藥物之・O_2^-消除活性，或稱為類 SOD 活性（SOD -like activity）。

參、 結果與討論

具有黃嘌呤氧化酵素抑制作用（xanthine oxidase inhibition）活性之藥物，可能造成抑制・O_2^-作用而影響此實驗結果之判定。因此採用次黃嘌呤-黃嘌呤氧化酵素（hypoxanthine-xanthine oxidase）反應體系產生・O_2^-，然後由 DMPO 捕捉，自旋加成物 DMPO-OOH 再以電子自旋共振光譜儀（ESR spectrometer）分析。

・O_2^-之 generated from HPX-XOD system



DMPO　　DMPO-adduct

Spin adduct （DMPO-OOH）was analyzed by ESR

為了防止・O_2^- 被歧化後所產生之 H_2O_2 與存在於反應系之微量金屬反應形成・OH 而干擾結果，必須加入金屬螯合劑 DETAPAC (diethylenetriamine pentaaceticacid) ，而為了使生成之・O_2^-變為更安定的基團 (radical)，則使用了電子捕捉劑 DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide)。反應起始在於 XOD 或 hydrogen peroxide 加入各反應體系，在 ESR 裝置中具備自由基感應器 (radical biosensor) ，為調整觀察信號位置及裝置之檢出感度，以 Mn^{2+} (MnO)作為內部信號對照標準 (ESR marker) 。

本研究所採用之電子自旋共振技術 (electron spinresonance，ESR)，具有以下特點：

(1) 能夠選定只測定自由基 (定量及定性) 。

(2) 可非破壞性、高靈敏度性測出濃度 10^{-11}M (試料量 0.13 毫升) 的有機自由基。

(3) 採用不影響試料的狀態及形態(液體、固體、氣體等) 的微波分光法 (能量來源採用微波，相當於分光光度計中的光源) ，擁有一般分光法所沒有的優點。

以電子自旋共振 (electron spin resonance，ESR) 及電子捕捉 (spin-trapping) 技術，證實血腑逐瘀湯、烏藥順氣湯、補陽還五湯、小續命湯及柴胡加龍骨牡蠣湯等五方劑其 SOD-like activity 分別為 5.2×10^3 unit/g、4.2×10^4 unit/g、6.3×10^3 unit/g、3.6×10^4 unit/g、5.1×10^4 unit/g，都具有呈現抑制・O_2^-作用 (參看表二) 。

第五章　降血脂作用之研究

壹、 前言

中風是國人的十大死亡原因之一，而中風主要有四種類型：腦栓塞、腦血栓、腦出血、蜘蛛膜下出血，其中以血塊引起的腦栓塞、腦血栓為最常見。腦栓塞通常是在已被動脈硬化症所損壞的動脈中形成，動脈硬化症的部分成因是因高血脂中的脂肪、膽固醇和形成血塊的必要物質沉積在動脈所造成。根據醫學研究指出，當人在面臨氧化壓力時，一旦抗氧化系統失去平衡，活性氧(自由基)便會去攻擊破壞膽固醇（LDL），使得氧化的脂質沉積在血管壁上，因而造成動脈粥狀硬化，嚴重時有變成心臟病、高血壓、中風等疾病之危險，而抗氧化物的使用，能有效改善及預防動脈硬化。為了開發中風防治生藥資源，而著手對我國傳統醫學常用方劑：血腑逐瘀湯、烏藥順氣散、補陽還五湯、小續命湯及柴胡加龍骨牡蠣湯等，進行研究其抗氧化活性之研究，以期改善及預防動脈硬化，進而對中風之治療有所助益。

貳、 材料與方法

(一) 生藥成分抽取

血腑逐瘀湯方劑組成為當歸 3g，生地黃 3g，桃仁 4g，紅花 3g，枳殼 2g，赤芍 2g，柴胡 1g，甘草 1.5g，桔梗 1.5g，川芎 1.5g，牛膝 3g。烏藥順氣散方劑組成為烏藥、陳皮、白殭蠶、麻黃、川芎、桔梗各 2.5g，乾姜、枳殼各 2g，白芷、甘草各 1.5g。補陽還五湯方劑組成為當歸 2g，黃耆 40g，赤芍 1.5g，紅花、桃仁、地龍各 1g。小續命湯方劑組成為防風 3g，附子、大棗各 1g，桂枝、麻黃、杏仁、川芎、白芍、人參、甘草、黃芩、防己、生薑各 2g。柴胡加龍骨牡蠣湯方劑組成為柴胡 5g，半夏 4g，茯苓、桂枝各 3g，黃芩、大棗、生薑、人參、龍骨、牡蠣各 2.5g，大黃 1g。將各種方劑（200 g），分別用一公升的沸水煮沸達二小時，然後過濾，如此重覆三次，合併三次濾液，先經減壓濃縮後，分別得到血腑逐瘀湯浸膏重 64.5g，

產率 23.54 %；烏藥順氣散浸膏重 47g，產率 15.49 %；補陽還五湯浸膏重 55.5g，產率 19.9 %；小續命湯浸膏重 42.0g，產率 12.96 %；柴胡加龍骨牡蠣湯浸膏重 41.0g，產率 14.36 % 作成浸膏以備每次實驗所需之用。

（二）實驗方法

將取購自國立成功大學動物中心 四週大（約100公克重）之雄性大白鼠（Wistar Albino Rats）分為正常的大白鼠，餵食飼料中含有2 % cholesterol ，1% cholic acid 及 5% 豬油，連續餵食此含高膽固醇之飼料四週；另外以口服方式分別一天一次餵食 0.5 g/kg，1.0 g/kg 的血腑逐瘀湯、烏藥順氣散、補陽還五湯、小續命湯及柴胡加龍骨牡蠣湯抽取物連續四週等十二組。取血實驗前，大白鼠禁食12小時，以斷頭方式取血測定總膽固醇，低密度脂蛋白，三酸甘油酯，比較是否有效 [48、49、51]。

參、 結果及討論

血腑逐瘀湯、烏藥順氣散、補陽還五湯、小續命湯及柴胡加龍骨牡蠣湯等五種常用治療中風方劑在古代中醫方劑中主要作用為活血化瘀，通經活絡，補氣。因此用於治療中風的補氣活血，此外因中醫所述之臨床效果是一種經驗累積，故在本實驗針對五種常用治療中風方劑先研究其對血中血脂的影響，進而對心血管疾病造成藥理作用。

本實驗用於降血脂的血腑逐瘀湯其藥理作用為降低血脂作用擴張血管，增加血流改善微循環，提高網狀內皮系統之活性，阻斷及清除促凝因子，清除血中被活化之凝血物質進而改善中風病症。而烏藥順氣散其藥理作用為擴張血管，改善血液循環作用。補陽還五湯其藥理作用為擴張腦血管作用而改善腦血管循環障礙，降低微血管通透性，減少炎症性滲血作用，抑制血小板凝集作用及促進血栓溶解作用都有益於改善中風病症。小續命湯有循環改善作用及緩和作用而柴胡加龍骨牡蠣湯具有降低血脂，改善血液循環進而防止動脈硬化以改善中風病症。

實驗結果顯示，五種常用治療中風方劑對於 cholesterol 及

LDL 都有明顯的降低作用，其中以血腑逐瘀湯、烏藥順氣散兩種方劑的效果最為顯著，而劑量的提高也有助於降低血脂作用(參看表三及表四) 。因此，對於冠狀動脈病疾患含有比正常人較高 cholesterol 及LDL，服用五種常用治療中風方劑可以預防中風及腦血管病變。

總結論

近年來醫學研究顯示 [50]，血管內皮受傷害，免疫系統帶引單核球進入循環系統，而在血管壁成為巨噬細胞釋放氧自由基（$\cdot O_2^-$），進一步成為 H_2O_2 及 $\cdot OH$，再度傷害附近細胞，而刺激平滑細胞再生 LDL 被氧自由基氧化，成為趨化物質因子，促使更多單核球靠近受損的血管 LDL 被氧化後，不能與巨噬細胞的 LDL 受體結合，使膽固醇迅速在巨噬細胞內累積而成為泡沫狀細胞氧化型 LDL 會使動脈平滑肌細胞死亡，亦會破壞血液流動力的平衡在自由基存在下，細胞間鈣離子會增加，並逐漸累積在沉積物塊上，使塊狀變大血管變狹窄。此結果會引發冠狀動脈粥狀硬化，其主要原因為動脈血管壁上的結締組織有膽固醇及LDL大量堆積，使血管壁彈性降低管徑變小，血液循環受阻，而易發生血栓，血壓上升而導致腦中風或心臟病。而在中風發病時，腦部血流減少，血中含氧量及 ATP 都會降低，而使神經細胞膜去極化，此時神經細胞釋放大量 glutamate 。而 Glutamate 是腦部主要的興奮性神經傳導物質，在執行任務時，其受體為N-methyl-D-asparate（ NMDA ），NMDA 則是神經系統中控制鈣離子及鈉離子的孔道，當細胞外的 glutamate 大量升高，將活化 NMDA 受體，結果導致細胞外鈣離子及鈉離子沖入細胞內，細胞就會腫脹死亡。而鈣離子進入 NMDA 受體，會活化Nitric oxide synthase（ NOS ），產生Nitric oxide（ NO ）及 $\cdot O_2^-$，結果產生反應性及毒性最高的 $\cdot OH$，造成腦神經細胞之壞死。

此外，缺血再灌流血（ischemia-reperfusion ）造成氧自由基增高，導致神經細胞死亡。當缺血（氧）時，組織內 ATP 減少，次黃嘌呤（ Hypoxanthine ） 增加。當缺血再灌流時， Hypoxanthine 藉著Xanthine oxidase 之活化而被氧化，並使再灌流的氧分子形成 $\cdot O_2^-$ 及 H_2O_2 ，引起更大傷害如半身不遂或癱瘓。

實驗結果顯示，血腑逐瘀湯、烏藥順氣散、補陽還五湯、小續命湯及柴胡加龍骨牡蠣湯等五種常用治療中風方劑，都具有清除自由基（ $\cdot O_2^-$ 及 $\cdot OH$ ）與降低膽固醇及低密度脂蛋白(LDL ）。因此對於患有冠狀動脈粥狀硬化及心臟病、高血壓病患，使用五種常用治療中風方劑來當抗氧化物，將可預防及減輕因神經損傷導致之中風後遺症，並可避免缺血再灌流時所引起之腦神經細胞大量壞死所造成半身不遂或癱瘓。此外，文獻指出使用羥基自由基清除劑，

可有效減少蜘蛛膜下腔出血病人，發生血管攣縮之後所引發之缺血性神經病變。

本實驗對於抗脂質過氧化作用，自由基清除作用及降血脂作用都有初步的作用。因此証明常用中風方劑及活血化瘀之生藥，由於其抗氧化活性及自由基清除能力，應對於中風防治及後遺症復健具有某種程度之助益。

參考文獻

1. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 1979,95: 351-358.
2. Grace SC,Salgo MG,Pryor WA.Scavenging of peroxynitrite by a phenolic peroxidase system prevents oxidative damage to DNA. *FEBS Letters.*1998,426(1):24-28.
3. Draper, H.H., Hadley, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods. Enzymol.* 1990,186: 421-431.
4. Yoden K,Iio T and Tabata T .Measurement of thiobarbituric acid value in tissue homogenate solubilized with sodium dedecylsulphate. *Yakugaku Zasshi.*1980,100:553-559.
5. Kimuya K,Kubo M,Tani T,Arich S and Okuda H.Studies on Scutellariae Radix.IV.Effects on lipid peroxidation in rat liver.*Chem.Pharm.Bull.*1981,29:2609-2617.
6. Wu TW,Hashimoto N and Au JX.Trolox protects rat hepatocytes againest oxyradical damage and the ischemic rat liver from reperfution injury.*Hepatology.*1991,13:575-580.
7. Halliwell B and Gutteridge JMC.The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biology system.*Tibs.*1990,15:129-135.
8. Halliwell B and Gutteridge JMC. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet.* 1984,23: 1396-1397.
9. Yoshikawa T,Yokoe N,Takemura S,Hosokawa K,Kondo M.Studies on the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Lipid peroxide and lysosmal enzymes in rheumatoid joints. *Jpn.J.Med.*1979,18:199-204.
10. Yoshikawa T,Tanaka H,Yoshida N,Seto O,Sugino N,and Kondo M.Adjuvant arthritis and lipid peroxide.Protection by superoxide

dismutase. *Lipid peroxide Res.*1983,7:101-110.

11. Slater, T.F. Free- radical mechanisms in tissue injury. *J. Biochem.* 1984,222: 1-15.
12. Pryor WA,Stanley Tpand Blair E.Antioxdation of polyunsaturated fatty acid (Ⅱ).*Lipids.*1976,11:370-379.
13. McCord JM,Fridovich I.Superoxide dismutase .Anenzymic function for erythro cuprein (hemo cuprein).*J.B.C.*1969,244(22):6049-6055.
14. Salaris SC,Babbs CF, and Voorhees Ⅲ WD.Methylene blue as an inhibitors of superoxide generation by xanthine oxidase .*Biochem. Pharmacol.*1991,42:449-506.
15. Nishino T.The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury. *J.Biochem.*1994,116:1-6.
16. Chang WS,Chang YH,Lu FJ and Chiang HC.Inhibitory effects of phenolics on xanthine oxidase.*Anticancer Res.*1994,14:501-506.
17. Badyla SF,Simmons A,Turek Jand Babbs CF.Protection from rfperfution injury in the isolated rat heart by poatischemic deferoxamine and oxypurinol administration.*Cardiovas.Res.*1987,21: 500-506.
18. Ball EG. Xanthine oxidase : Purification and properities.*J.Biol.Chem.* 1939,128:51-67.
19. Parks Da and Granger DN. Xanthine oxidase : Biochemistry,distribu -tion and physiology.*Acta.physiol.Scand.Suppl.*1986,548:87-99.
20. Al-Khalidi UAS and Chaglassian TH.The specise distribution of xanthine oxidase.*J.Biochem.*1965,97:318-320.
21. Krenitsky TA,Tuttle JV,Cattau Eland Wang P.A comparsion of the distribution and electron acceptor specificities of xanthine oxidase and aldehyde.*Comp.Biochem.Physiol.*1974,49B:686-703.
22. Allen RE,Outhwaite Jmand Blake DR.Xanthine oxidoreductase is

present in human synovium.*Ann.Rheum.Dis.*1987,46:843-845.

23. Zimmerman BJ and Granger DN. Mechenisms of reperfusion injury.*Am.J.Med.Sci.*1994,307:284-292.
24. Schoenberg MH,Beger HG.Oxygen radicals in intestinal ischemia and reperfusion.Chem.Biol.Interaction.1990,76:141-161.
25. 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.
26. Esterbauer H,Gebicki J and Pahl H.The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free.Radic.Biol.Med.* 1922,13:341-390.
27. Regnstrom J,Nilsson J and Torn vall P.Susceptibility to low density lipoprotein oxidation and coronaryn atherosclerosis.*Lancet*.1992, 339:1183-1186.
28. Marnett LJ. Peroxyl free radicals:potential mediators of tumor initiation and promotion.*Carcinogenesis*.1987,8:1365-1373.
29. Imlay J and Linn S.Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*.1988,240: 640-642.
30. Hochstein P, Atallah AS. The nature of oxidants and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer. *Mutation Res.* 1988 ,202: 363-375.
31. Ames BN,Shigenaga MK,and Hagen TM.Oxidants antioxidants and degenerative disease of aging.*Proc.Natl.Accd.Sci.USA*.1993,90:7915-7922.
32. Richter C.Oxidative damage to mitochomdrial DNA and its relationship to aging.*Int.J.Biochem.Cell.Biol.*1995,:27:647-653.
33. Buttke TM,and Sandatrom PA.Oxidative stress as a mediator of apoptosis.*Immunol.Today*.1994,15:7-10.

34. Kohno M.Analysis of superoxide by ESR method. *Lab.Clin.Pract.*19--89,7:65-71.

35. Mitsuta K,Mizuta Y,Kohno M,Hiramatsu M and Mori A.The application of ESR spin-trapping technique to the evaluation of SOD-like activity of biological substances.*Bull.Chem.Soc.Jpn.*1990,63:187-191.

36. Tanigawa T.The determination of hydroxyl radical scavenging activity by electron spin resonance.*J.Kyoto.Pref.Univ.Med.*1990,99: 133-143.

37. Kohno M,Yamada M,Mitsuta K,Mizuta Y and Yoshikawa T.Spin-trapping studies on the reaction of Iron complex with peroxides and the effect of water-soluble antioxidants.*Bulll.Chem.Soc.Jpn.*1991,64: 1447-1453.

38. Finkelstein E,Rosen GM,Rauckman EJ.Spin-trapping kinectics of the reaction of supoeroxide and hydroxyl radicals with nitrones.*J.Am.Chem.Soc.*1980,102:4994-4999.

39. Janzen EG.Spin trapping.*Acc.Chem.Res.*1971,4:31-40.

40. Lin JM,Lin CC,Chen MF,Ujiie T and Takata A.Scavenging effects of Mollotus repandus on active oxygen species.*J.Ethnopharmacology.*1995,46:175-181.

41. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 1971,44: 276.

42. Fridovich, I. Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity. In Free Radicals Biology. (ed. Pryor, W.A.), *Academic Press, New York.*1976,1:239-271.

43. Halliwell B, Gutteridge J.M.C. Free radicals in biology and medicine, 1989,2nd Edn. *Oxford University Press, Oxford.*

44. Lowry OH,Rosebrough NJ,Farr AL,Randall RJ. Protein measurement

with the folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951,193: 265-275.

45. Shigeki A,Kazunobu M, Shigeyuki I,Tetsu S, Yukihito A,Naomi F,Takayoshi T. Biological and clinical significance of superoxide production in Kupffer cell. *Free Radicals in Clinical Medicine.* 1988,3:107-114.
46. Vuillaume M. Reduced oxygen species, mutation, induction and cancer initiation. *Mutation Res.* 1987, 186: 43-72.
47. Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach CN, Sunderman FW. Lipoperoxide in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin. Chem.* 1987,33(2): 214-220.
48. Chang HL,Wu CH,Chung JG,Lin WC,Chen GW,Lin JG.Antiather -ogenic effect of Pou Yan Fan Wu Tan in hypercholesterolemic rat. *J.Chin.Med.* 1998,9(1):53-60.
49. Kim DW,Yokozawa T,Hattori M,Kadota S,Namba T.Luobuma leaf inhibits oxidation of low-density lipoprotein in cholesterol-fed rats. *J.Trad.Med.*1998,15,40-44.
50. Turpeinen O.Effect of cholesterol lowering diet on mortality from coronary heart disease and other caueses. *Circulation.* 1979,59:1-7.
51. Raj kumar S,Pillai KK,Balani DK,Hussain SZ. Antiatherosclirotic effect of Lipotab Forte in cholesterol-fed rabbits.*J.Ethno.*1998,59: 125-130.
52. Kim DW,Yokozawa T,Hattori M,Kadota S,Namba T,Dong E. In vitro and in vivo studies on anti-lipid peroxidation effect of extract from Luobuma leaves. *Nat.Med.*1997,51(4):325-330.
53. Yokozawa T, Dong E,Liu ZW,Oura H.Antiperoxidation activity of traditional chinese prescription and their main crude drugs in vitro. *Nat.Med.*1997,51(2):92-97.

54. Yamazaki T,Miura K,Kako M,Ishihara E,Usami M,Tanigawa K,Kato A.Effect of methanol extract of Phellodendri cortex on lipid metabolism in normal and hyperlipidemic mice. *Nat.Med.*1997,50(6): 417-419.

55. Shepherd J,Packard CJ,Grundy SM,Yeshurun D,Gotto AM and Taunton OD.Effects of saturated and polyunsaturated fat diets on chemical composition and metabolism of low density lipoproteins in man.*J.Lipid.Res.* 1980,21:91-99.

56. Larsen L,and Illingworth DR. Drug treatment of dyslipoproteinemia -*Med.Clin.North Am.*1994,78:225-245.

表一、五種常用治療中風方劑在 $FeCl_2$-ascorbic acid 誘導脂質過氧化作用的抑制作用(in vitro)

組別	濃　度 (mg/ml)	MDA (nmole/mg protein)	抑制率 (%)
正常組	-	1.58±0.08	-
FeCl2-AA + saline	-	3.72±0.04*	-
FeCl2-AA + 血腑逐瘀湯	1	3.31±0.10†	16.44
	3	2.84±0.11†	39.94
	5	2.36±0.12†	63.18
FeCl2-AA + 烏藥順氣散	1	3.23±0.06†	24.80
	3	2.99±0.02†	39.42
	5	2.49±0.04†	61.68
FeCl2-AA + 補陽還五湯	1	3.15±0.06†	26.67
	3	2.75±0.03†	48.04
	5	2.33±0.12†	68.14
FeCl2-AA + 小續命湯	1	4.08±0.04	-
	3	3.27±0.12†	23.24
	5	3.12±0.16†	36.01
FeCl2-AA + 柴胡加龍骨牡蠣湯	1	3.26±0.04†	23.34
	3	2.39±0.05†	66.49
	5	1.73±0.03†	97.13

* 利用 Steudent's t-test 來比較正常組、藥物組之差異，P<0.001

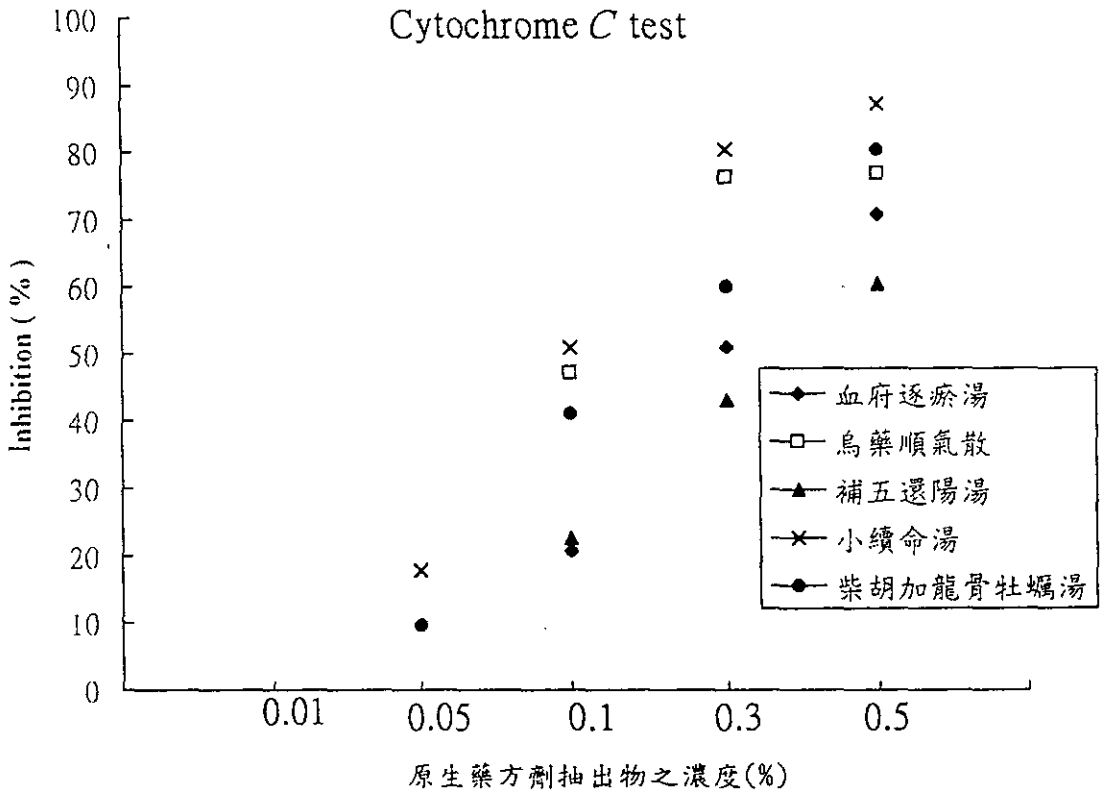
† 利用 Steudent's t-test 來比較藥物組及 FeCl2-AA 組之差異，P<0.01

表二、五種常用治療中風方劑 SOD like activity 活性分析

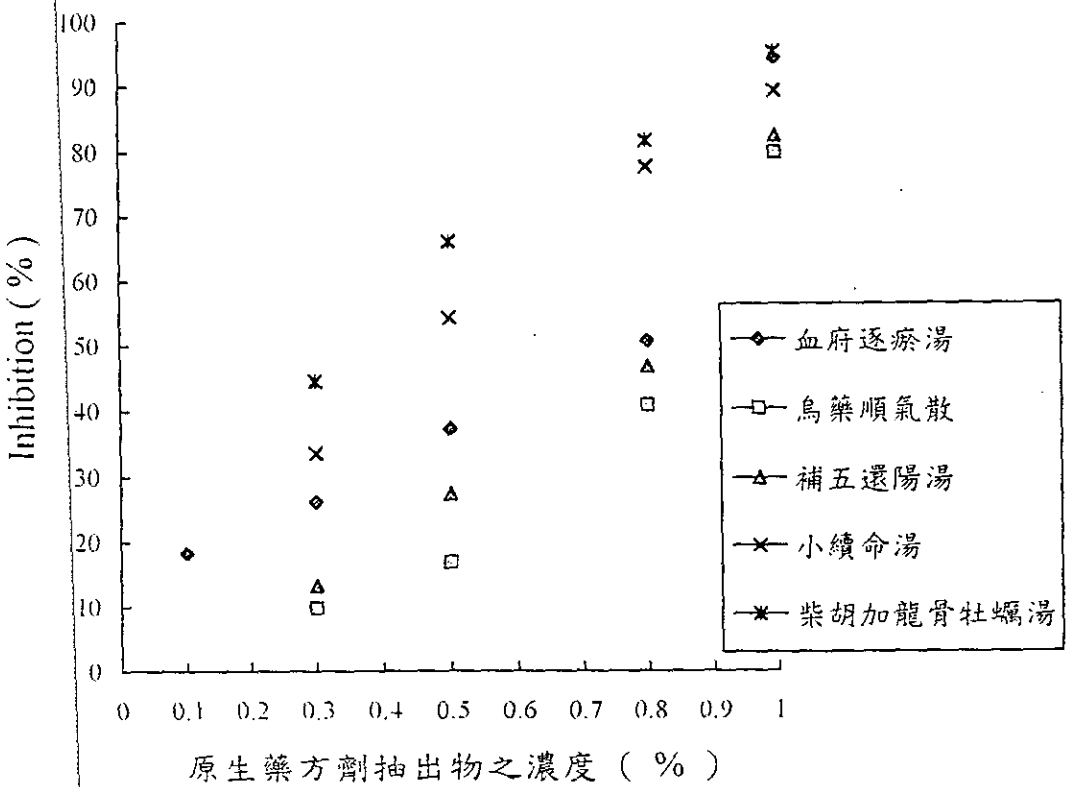
生藥浸膏	SOD like activity 清除 • O_2^- 活性 (unit / g)	• OH 清除活性 (unit / g) [a)]
血府逐瘀湯	5.2×10^3	41
烏藥順氣散	4.2×10^4	51
補陽還五湯	6.3×10^3	56
小續命湯	3.6×10^4	50
柴胡加龍骨牡蠣湯	5.1×10^4	37

a) 每 unit 代表 1mM Ascorbic acid 清除 • OH 之能力

註：每公克生藥浸膏約等於4.25-7.72公克之原生藥方劑



圖一. 五種常用治療中風方劑以細胞色素 C 還原比色法測試清除超氧陰離子（Superoxide anion・O_2^-）之抑制作用



圖二. 五種常用治療中風方劑於黃嘌呤氧化酵素測試中，抑制超氧陰離子自由基（Superoxide anion・O_2^-）之抑制作用

表三. 五種常用治療中風方劑（0.5g）對於大白鼠血清中之總膽固醇及低密度脂蛋白含量之影響

組 別	總膽固醇 (mg/dl)	低密度脂蛋白 (mg/dl)
Normal	79.62±10.45	54.90± 7.69
Cholesterol - fed rats	156.06±3.99*	131.12±21.62*
SFJIT	118.68±11.74*	97.72±10.46
UYJKS	117.04±6.49*	88.56±6.79***
BYHWT	116.18± 4.73*	98.72±3.67***
SZMT	134.44±16.34*	110.50±15.27
SKKRKBRT	115.80± 9.97*	100.16±12.91

* 利用 Steudent's t-test 來比較 Normal、藥物組及 Cholesterol 組之差異，P<0.001

** 利用 Steudent's t-test 來比較 Normal、藥物組及 Cholesterol 組之差異，P<0.001

*** 利用 Steudent's t-test 來比較 Normal、藥物組及 Cholesterol 組之差異，P<0.05

表四. 口服五種常用治療中風方劑（1.0g）對於大白鼠血清中之總膽固醇及低密度脂蛋白含量之影響

組 別	總膽固醇 (mg/dl)	低密度脂蛋白 (mg/dl)
Normal rats	79.62±10.45	54.90±7.69
Cholesterol - fed rats	156.06±3.99*	131.12±21.62**
SFJIT	87.20± 5.37**	70.32± 6.23**
UYJKS	95.26±10.27***	98.52± 5.12***
BYHWT	104.02±13.84***	87.46±10.76***
SZMT	113.08± 3.77*	95.36±1.73***
SKKRKBRT	102.68± 8.16**	90.34±8.60**

* 利用 Steudent's t-test 來比較 Normal、藥物組及 Cholesterol 組之差異，P<0.001

** 利用 Steudent's t-test 來比較 Normal、藥物組及 Cholesterol 組之差異，P<0.01

*** 利用 Steudent's t-test 來比較 Normal、藥物組及 Cholesterol 組之差異，P<0.05