

計畫編號：DOH88-CM-040

PG88B0-0012



RRPG88B00012(33.P)



行政院衛生署八十八年度委託研究計畫

四磨飲、桂枝茯苓丸、瀉青丸和四逆散對實驗性老
鼠急性肝損傷之影響

委託研究成果報告

執行機構：私立中國醫藥學院

計畫主持人：林國瑞

研究人員：賴俊雄、蔡金川、羅明江

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

計畫編號：CCMP88-RD-040

各機關研究計畫基本資料庫之計畫編號：PG88BO-0012

行政院衛生署八十八年度科技研究發展計畫

**四磨飲、桂枝茯苓丸、瀉青丸和四
逆散對實驗性老鼠急性肝損傷之影**

委託研究報告

計畫委託機關私立中國醫藥學院

計畫主持人：林國瑞

研究人員：賴俊雄 蔡金川 羅明江

執行期間：87年7月1日至88年6月30日

目 錄

目錄.....	1
中文摘要.....	2
英文摘要.....	3
本文.....	4
壹、前言.....	4
貳、材料與方法.....	6
參、結果.....	14
肆、討論.....	18
伍、結論與建議.....	23
陸、參考文獻.....	24
柒、圖表.....	26
自我評估表.....	32

編號：CCMP88-RD-040

四磨飲、桂枝茯苓丸、瀉青丸和四逆散 對實驗性老鼠急性肝損傷之影響(3-1)

計畫主持人：林國瑞

執行單位：中國醫藥學院

摘 要

肝病是中國人常見的疾病，其相關病變久為台灣地區十大死亡原因之一。現代醫藥對其並無令人滿意之對策，有待改進。而中醫對此疾病之治療有悠久的歷史與豐富臨床經驗，並且有其獨特多元化的學理思路及相當的療效，給肝病患者提供了很大的希望。

為究明中醫藥之療效與作用機轉，並探討中醫學理之實質，而進行本實驗。本計畫擬以四種中醫方劑：桂枝茯苓丸（理血）、四磨飲（理氣）、瀉青丸（瀉火）和四逆散（和解）之水抽出物進行各種保肝模型之試驗。包括：四氯化碳（重複暴露）、乙醇（Alcohol）和醋氨酚（Acetaminophen）等肝毒性物質誘發各種不同急性肝損傷，以期對中醫藥做深入之探討，開發肝病醫療新資源。

實驗結果顯示，四中方劑皆有保肝、護腎等作用。由於重複暴露致病毒物等分項研究，方劑各成不同程度之功效，如是將可作為臨床選方用藥之參考方針。另外由抑制脂質過氧化及相關抗氧化酵素之研究，證實其確具抗自由基損傷作用與作用機轉，可茲作為中醫藥療肝上提供科學證據。

關鍵詞：肝病，中醫，中醫方劑，急性肝損傷。

CCMP88-RD-040

**Effect of Chinese Materia : Guizhi-Fuling-Wan,
Syh-Mo-Yiin, Shieh-Qing- Wan and Syh-Nih-Sann
on Experimental Acute Liver Damage in Rodents.**

Author : Lin Kuo-Juei

Organization : China Medical College

ABSTRACT

As an endemic area of liver diseases in China, the hazard became one of the Ten Leading Causes of Death in Taiwan Area of years. Until recently, it has been accepted that pharmacological treatment of liver disease was difficult. Treatment of patients with liver diseases still remains to be improved. However traditional Chinese Medicine (TCM), with diverse and unique thinking-process, developed through clinical practices and proved to be useful for centuries in the remedy of liver trouble. Interest in TCM on hepatic medications has increased widely in recent years.

Acute liver damages induced by alcohol, acetaminophen and repeated CCl_4 insult in rats were conducted to elucidate the hepatoprotective effects of TCM and study the essence of it. Water extracts of four prescriptions of Chinese Materia Medical: Syn-Mo-Yiin (SMY), Guizhi-Fuling-Wan(GFW), Shieh-Qing-Wan(SQW), and Syh-Nih-Sann(SNS), used in this study, were medicinal herbs and prepared according to different factions of TCM. Their active principles were worth to investigate and exploring as up-date hepatic medication.

The results showed that the four recipes mentioned above did possess hepato renoprotective activity and they also exhibited antioxidant effect in lipid peroxidation inhibitory activity and antagonized with CCl_4 -insult in the disturbances of antioxidant enzymes. It suggested that the activity of free radical scavenging and antioxidant of them could play one part in their hepatoprotective effects.

Keywords : Disease of the Liver, Traditional Chinese Medicine, Chinese Material, chronic Liver Damage

壹、前言

肝病是危害人類健康的常見病、多發病。其病變大體上可概括為：急性肝炎、慢性肝炎（肝硬化），以及膽道淤阻等三病變。在國外，特別是北美和西歐是以酒精引起的肝臟病變為主；而在我國是以病毒性肝炎發病率高，特別是乙型病毒肝炎⁽¹⁾。

肝臟是人體最大的腺體，是毒物和藥物代謝的重要器官；肝臟有豐富的酵素能促進毒物與藥物之代謝，並能合成特殊蛋白以供進行正常生理所需，而且分泌膽汁以完成消化及排謝功能。有些毒物與藥物在代謝過程中可轉變為自由基(free radical)而作用於肝內細胞器和細胞內大分子，特別是內質網膜、粒線體膜、溶酶體膜等，引起脂質氧化反應，導致細胞功能喪失與破壞、最後細胞死亡或癌變。當酗酒時大量Alcohol的攝取將造成肝臟Glutathione(GSH)之消耗，而且乙醇在肝臟細胞中microsome、cytosol內會被代謝成oxyzen-related自由基，是為酒精性肝損傷之禍源。

近來，由於生活型態的改變，國人對酒類之銷耗激增，加上原住民之酗酒習性，使得肝病，及其續發病變（慢性肝病及肝硬化）久居國內十大死亡原因之中⁽²⁾。最近由於環境的污染、藥物之濫用（甚致以酒精-alcohol、普拿疼-acetaminophen進行自殺），對國人的健康尤其是肝臟的威脅更是嚴重，。保肝、療肝之醫藥資源的發展開創實刻不容緩。

中醫藥治療肝臟疾病有著悠久的歷史、獨到的理論體系和豐富的臨床經驗，並形成了不同的學術思路和流派^(1,3)。為深入探討中醫、中藥之保肝療效，並解明學派理論之實質以及開發肝病醫療新資源，而進行本研究。

本計畫擬以四種不同中醫治療原理且在臨床顯效之常用方劑：理氣劑—四磨飲、理血劑—桂枝茯苓丸、瀉火劑—瀉青丸、合解劑—四逆散^(4,5,6)等之水抽出物進行一系列之保肝評估。

方劑挑選是以藥味單純化為原則，並且不同藥方中儘量避免有相同藥物。四磨飲乃宋朝陳無擇三因方之理氣方藥，能行氣降逆、寬胸散結，主治胸膈滿悶，上氣喘急，不思飲食，對肝氣橫逆郁結有一定療效^(6,7)。桂枝茯苓丸是漢代張仲景金匱要略的方劑，主要用於婦女經病，盆腔炎、附件炎，亦有用於心血管疾病，慢性肝炎…等。曾有報導，能使淤血型、癥瘕型肝炎好轉，sGPT恢復正常⁽⁸⁾。瀉青丸是宋朝錢乙小兒藥證直訣中的方劑，有清肝瀉火之功，治療目赤腫痛，煩躁易怒，尿赤便秘，對肝火實證有一定療效^(6,7)。四逆散乃漢朝張仲景傷寒論之藥方，能疏肝理脾，和解去滯，是小柴胡湯之加減方，常用於肝病^(6,8)。

首先，以四氯化碳 (CCl₄) 多重暴露致毒之療效評估，包括：生化檢測^(9,10,11,12,13)、組織病理觀察。另外對老鼠肝臟均質漿作脂質過氧化之藥理學研究，並且對組織內主要抗氧化酵素 (SOD、Catalase、GSH-Px) 進行機轉探討。其次，進行肝損傷模型之療效探討包括：(1) 酒精 (Alcohol) (2) 普拿疼 (acetaminophen) 等肝毒性物質誘發不同肝損傷，以期對治療肝病之中醫藥作深入之探討

貳、材料與方法

I. 方劑藥材之準備

委託中國醫藥學院附設醫院中藥局主任張永勳博士收集並鑑定其
基源

1. 四磨飲 << 宋•陳無擇•濟生方 >>

人蔘 — *Panax ginseng* C.A. Meyer 之乾燥根

檳榔 — *Areca catechu* L. 之成熟種子

沉香 — *Aquilaria agallocha* Roxb. 之含有黑色樹脂木材

烏藥 — *Lindera strychnifolia* Villar 之根

各等分

桂枝茯苓丸 << 漢•張仲景•金匱要略 >>

丹皮 — *Paeonia suffruticosa* Andr. 之根皮

芍藥 — *Paeonia lactiflora* Pall. 之根

桂枝 — *Cinnamomum cassia* Presl. 之嫩枝

茯苓 — *Poria cocos* Wolf 之菌核

桃仁 — *Prunus persica* Batsch. 之乾燥成熟種子

各等分

3. 瀉青丸 << 宋•錢乙•小兒藥證直訣 >>

當歸 — *Angelica sinensis* Diels. 之乾燥根

龍膽草 — *Gentiana scabra* Bunge. 之根及根莖

山梔 — *Gardenia jasminoides* Ellis 之成熟果實

大黃 — *Rheum palmatum* L. 之乾燥根及根莖

川芎 — *Ligusticum chuanxiong* Hort. 之乾燥根莖

羌活 — *Notopterygium incisum* Ting. 之根及根莖

防風 — *Saposhnikovia divaricata* Schischk. 之根

各等分

4. 四逆散 << 漢•張仲景•傷寒論 >>

柴胡 — *Bupleurum chinense* DC. 之根

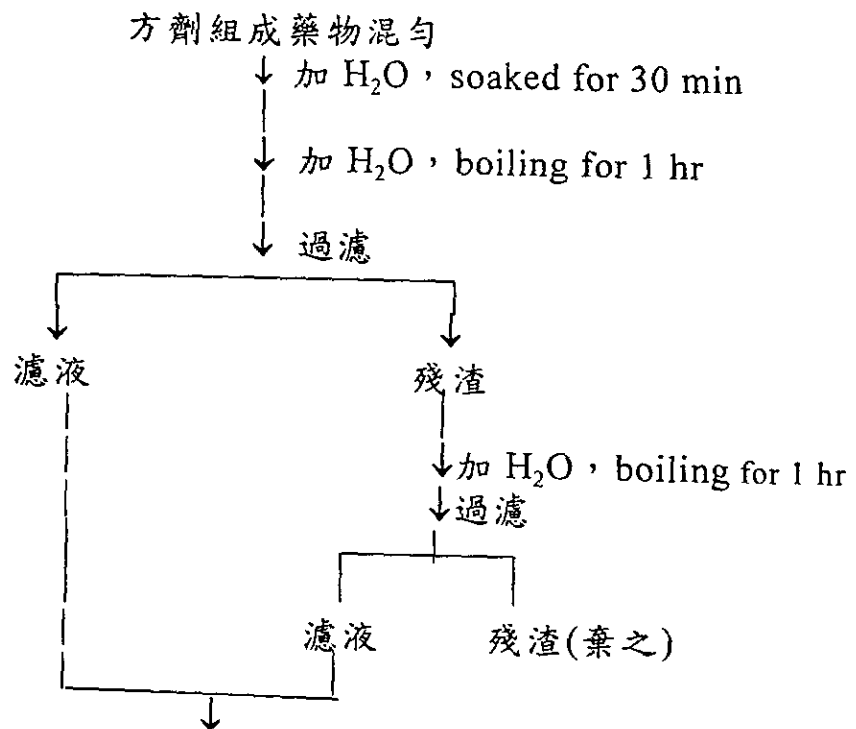
芍藥 — *Paeonia lactiflora* Pall. 之根

枳實 — *Citrus aurantium* L. 之未成熟果實

炙甘草 — *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 之乾燥根及根莖密炙

各等分

II. 方劑水抽出物之製備



濾液合併，減壓濃縮，冷凍乾燥，得乾燥粉末以備實驗使用(記錄產率)。

方劑水抽出物英文簡稱如下：

四磨飲—SMY ext.；桂枝茯苓丸—GFW ext.；

瀉青丸—SQW ext.；四逆散—SNS ext.

III. 實驗動物

動物品種：

Wistar品系雄性大白鼠 (Wistar Albino Rats)。

動物來源：

國家實驗動物繁殖及研究中心。

動物週齡：

4~6週

飼養環境：空調房間，溫度維持 $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ ，相對濕度 $55\pm 5\%$ ，半日照環境，自由飲水及餵食標準飼料。體重控制在180~220克。

IV. 實驗方法與步驟

(A) 四氯化碳(CCl_4) 多重誘發肝損傷之療效評估

實驗參考 Subrata De⁽³⁰⁾等人所描述之方法(稍加修飾)，隨機將大白鼠分成控制組；毒藥組；中藥治療組；對照藥物組。分別投與中藥 SMY ext.、GFW ext.、SQW ext.、SNS ext.，及投與 silymarin(25mg/kg, p.o.)與 saline，連續投與 10 天。在第 3、第 6、第 9 天誘毒投與 CCl_4 (3.5ml/kg in 1:4 v/v olive oil, i.p.)；控制組則在此三天投與 olive oil(3.5ml/kg, i.p.)。在第 10 天藥物投與後 6 小時，以乙醚輕度麻醉，由頸動脈採血分離血清，檢測生化。並解剖取肝，進行脂質過氧化 (LPO)、體內抗活性氧酵素 (SOD、Catalase、GSH-Px) 之分析，並做組織切片進行病理學檢查。

(B) 乙醇(Ethanol) 誘發損傷之保肝研究⁽¹⁴⁻²²⁾

實驗參考 Alfonso Valenzuela⁽¹⁵⁾等人所描述之方法，隨機將大白鼠分成理氣組、理血組、瀉火組、和解組、毒藥組(Ethanol)、對照藥物組(Silymarine)及控制組，每組十隻。各分別投與中藥 SMY ext.、GFW ext.、SQW ext.、SNS ext.，而對照藥物組投與 Silymarine (25mg/kg, s.c.)，毒藥組及對照藥物組投與 saline (10 ml/kg, p.o.)，動物禁食。16 小時後，給予酒精(5g/kg, i.p.)，24 小時後由頸動脈採血分離血清，檢測生化；並解剖取肝。

(C) 醋氨酚(Acetaminophen) 誘發損傷之保肝研究⁽¹⁴⁻²²⁾

實驗參考 Pablo Murie⁽²³⁾ 等人及 Jie Liu⁽²⁴⁾ 所描述之方法(稍加修飾)，隨機將大白鼠分成理氣組、理血組、瀉火組、和解組、毒藥組、對照藥物組、及控制組，每組十隻。分別投與中藥 SMY ext.、GFW ext.、SQW ext.、SNS ext.，對照藥物組投與 N-acetylcysteine(1 g/kg)，毒藥組及對照藥物組投與 saline (10ml/kg, i.p.)，動物禁食。16 小時後給予 Acetaminophen (1.2g/kg, i.p.)，24 小時後，由頸動脈採血分離血清，檢測生化。並解剖取肝。

註：四種中醫方劑：桂枝茯苓丸（理血）、四磨飲（理氣）、瀉青丸（瀉火）和四逆散（和解）分別給以 0.5g/kg、1g/kg、2g/kg 三種劑量。

(D)肝組織脂質過氧化(LPO)、SOD、Catalase、GSH-Px 之評估方法如下：

§ 脂質過氧化(LPO)之分析§

實驗參照 Ohkawa(1979)^(25,26)等人所描述之方法進行，將肝組織用冰食鹽水(ice-cold saline)洗淨，在漏斗上滴乾鹽水，加入適量冷 KCl(1.15%)溶液，打碎使成 10%之均質漿(homogenate)。取 0.1 毫升之 homogenate 順序加入 0.2 毫升 SDS(8.1%)。1.5 毫升 acetic acid (20%)，並以 NaOH 調整酸鹼度(pH=3.5)。加入 1.5 毫升 TBA(0.8%)，再以蒸餾水調整容積(V=4ml)。將樣本置於 95°C 熱水中加熱一小時。取出、以自來水冷卻。加入 1 毫升蒸餾水、5 毫升 n-Butanol/pyrimidine(15:1, v/v)。劇烈搖盪混均，在每分鐘 4000 轉離心機內離心十分鐘。靜置、取有機層 1.5 毫升(上層)，上機(BECKMAN-DU[®]650 spectrophotometer)於 532nm 測量光學活性(Optical Density)。分析過程中以 TMP(1,1,3,3,-tetramethoxypropane)為標準品(external standard)，先作檢量線，再進行分析。肝組織蛋白質含量以牛血漿蛋白為標準品，依照 Lowry(1951)等所述之法檢測。肝組織脂質過氧化之水平，以每單位蛋白質所含 MDA 的量表示(nanomoles of MDA per milligram of protein)。

§ 超氧化物歧化酵素(SOD)之測定§

實驗參照 Marklund (1974)⁽²⁷⁾ 等人所描述之方法進行，將肝組織用冰食鹽水(ice-cold saline)洗淨，在漏斗上滴乾鹽水，加入適量緩衝液(0.32 mol/L sucrose, 1 m mol/L EDTA, 10 n mol/L Tris-HCl, pH=7.4)，打碎使成 10% 之均質漿(homogenate)。高速離心 30 分鐘(13600xg)，取上清液 50 μ L，再加上 Triscacodylic acid buffer (pH=8.20, 50mM)100 μ L。溶液再加上二次蒸餾水，使體積成為 980 μ L，再加上 Pyrogallol 20 μ L(0.2mM)，劇烈搖盪混均，上機(BECKMAN-DU[®])於 420NM 測量吸光值(A)，每隔 20 秒測量一次，總共測量 5 分鐘，計算 $\Delta A/\Delta T$ 。分析過程中以 Sigma 公司所出品 SOD 標準品，作出標準線(standard curve)，再進行分析。單位時間內抑制鄰苯三酚自動氧化速率達 50%時酵素量定為一單位(U)，肝組織酵素活性，以每單位蛋白質所含 SOD 單位量表示(U per milligram of protein)。

§ 過氧化氫酵素(CAI)之分析§

實驗參照 Aebi (1984)⁽²⁸⁾ 所描述之方法進行，將肝組織用冰食鹽水 (ice-cold saline) 洗淨，在漏斗上滴乾鹽水，加入適量磷酸鹽緩衝溶液，打碎使成 10% 之均質漿 (homogenate)。離心 (700xg) 10 分鐘，取上層液 9 份加入 1 份 Triton X-100 (1%) 成為 stock homogenate (S.H.)。取 S.H. 加入適量之磷酸緩衝溶液進行稀釋，調整酸鹼度至 pH=7 成為 dilute homogenate (D.H.)。取 D.H. 2ml 加入 1ml H₂O₂ (0.03M)，劇烈搖盪混均，上機 (BECKMAN-DU® 650 spectrophotometer) 於溫控 25°C、波長 240nm 之條件下測量吸光值 (A)，每隔 15 秒測量一次，總共測量 2 次，計算求得反應速率常數 K。

$$K = \frac{2.3}{\Delta T} \log A_1/A_2$$

Δt ：時間間隔 (15 秒鐘)

A_1 ： T_1 時段，檢品之吸光值—空白吸光值 (空白校正)。

A_2 ： T_2 時段，檢品之吸光值—空白吸光值 (空白校正)。

肝組織酵素活性，以每單位蛋白質所含反應速率 K 表示之 (K per milligram of protein)。

§ 谷胱甘汰過氧化酵素(GSH-Px)之測定§

實驗參照 Hafeman (1974)⁽²⁹⁾ 等人所描述之方法進行，將肝組織用冰食鹽水(ice-cold saline)洗淨，在漏斗上滴乾鹽水，加入適量緩衝液(0.32 mol/L sucrose, 1 m mol/L EDTA, 10 n mol/L Tris-HCl, pH=7.4)，打碎使成 10% 之均質漿(homogenate)。高速離心 30 分鐘(13600xg)，取上清液 0.4mL，再加上 Glutathione 0.4mL，置於 37°C 水浴加熱 5 分鐘。然後再加入 H₂O₂ 0.2mL，置於 37°C 水浴加熱 5 分鐘。然後迅速置於冰水中冷浴且加入偏磷酸溶液(metaphosphate)4mL，再離心 10 分鐘(3000rpm)。取上清液 2mL，加入 Na₂HPO₄ 溶液 2mL(0.4M)與 DTNB 溶液 1mL，混和均勻後上機(BECKMAN-DU[®]650 spectrophotometer)於 412nm 測量吸光值。為消除非酵素系統對 GSH 之影響，同時另設非酵素反應管。根據 GSH 標準曲線計算 GSH 消耗量。單位時間內檢品消耗之 GSH 濃度取對數值 (log [GSH]^E)，扣除非酵素系統對 GSH 之影響(log [GSH]^{NE})，所得值之千分之一為 GSH-Px 活性單位(U)：

$$U = \frac{\log [GSH]^E - \log [GSH]^{NE}}{1000 \times \Delta t}$$

肝組織酵素活性，以每單位蛋白質所含 GSH-Px 活性單位(U)表示之(U per milligram of protein)。

參、結果

(A) 氯化碳(CCl_4) 多重誘發肝損傷之療效評估

第一部分：保肝作用之探討

由表一所示，將大白鼠在十天實驗過程中腹腔投與四氯化碳 (20% in olive oil, 3.5ml/kg) 三次 (第三、六、九天)，其血清酵素均顯著竄升 (sGOT : 1973、sGPT : 1788、ALP : 842)，與控制組 (sGOT : 93、sGPT : 29.5、ALP : 392) 有很大的差別，其值 $P < 0.01$ 。十天投與中醫方劑與對照藥物 (silymarin) 均對 CCl_4 所誘發肝炎血清酵素之竄升，皆有顯著的保護作用。在抑制 sGOT 值上升方面，以瀉青丸較佳 ($P < 0.01$)；在抑制 sGPT 值上升方面，也是以瀉青丸較佳，而且優於對照藥物組。然而藥物在 sGPT 值之改善，在統計上均只達 $P < 0.05$ 。

在肝臟病理切片觀察發現，投與四氯化碳之動物顯示肝組織有嚴重受損，諸如：中央靜脈旁大量細胞壞死與邊界消失 (necrosis and loss of cellular boundary) 甚至中央靜脈區之間塊狀變性有橋連現象 (confluent necrosis: central-to-central bridging)、加上嚴重脂肪變性 (fatty change)、炎症細胞浸潤 (broad infiltration of lymphocytes and Kupffer cell)、幾乎喪失細胞原本之正常架構。投與中藥後，都具有不等程度的改善，肝組織維持正常小葉架構與小程度的壞死、浸潤與脂肪變性 (圖一)。肝組織維持正常小葉架構之面積比僅投與四氯化碳之大白鼠還廣泛。此結果與血清生化檢測大致吻合。

第二部分：作用機轉探討

由肝組織脂質過氧化作用 (LPO) 之分析，進行抗自由基之機轉探討，結果歸納於表二。多重暴露四氯化碳後，造成實驗老鼠肝組織脂質過氧化，所含 MDA 顯著高於控制組 (8.11 n mole/mg protein 對 1.37 n mole/mg protein)。四中藥方劑投與顯著擁有保護作用。經由統計分析比較後，以桂枝茯苓丸最佳，但藥物組之間並無明顯意義之差別。

肝組織抗氧化酵素之檢量，結果歸納於表二。多重暴露四氯化碳後，肝組織的超氧化物歧化酵素 (SOD) 顯著升高 (8.61→10.87 U/ mg protein)，中藥方劑除桂枝茯苓丸外其餘皆能有效地消滅其升高。在過氧化氫酵素 (CAT) 之檢測中，暴露四氯化碳後，CAT 大大地消滅 (11.81→3.67 U/ mg protein)。中藥方劑投與後皆能有效回升，其中以四磨飲效果最好。在谷胱甘肽過氧化酵素 (GSH-Px) 之測定中，四氯化碳投與後肝組織 GSH-Px 活性，僅僅稍為下降，而未達統計差異。投與四逆散後 GSH-Px 活性提升，與毒藥組有顯著差別 ($P<0.05$)；其餘方劑與 silymarin 則幾乎沒有作用。

(B)乙醇(Ethanol) 誘發損傷之保肝研究⁽¹⁴⁻²²⁾

乙醇 (EtOH) 投與後生化指標皆有顯著竄升 (sGOT:140→413、sGPT:29→177、r-GT:1.9→3.4)，保證實驗模型誘發成功。四種方劑與對照藥物 (Silymarine, 25mg/kg) 之療效規納於表三，大致上提高劑量療效增加。其中桂枝茯苓丸 (GFW) 呈現突出之療效，且有劑量依賴趨勢，並且加重劑量為 2 g/kg 有最好的療效。四磨飲 (SMY) 在 sGOT、sGPT 改善以 1 g/kg 劑量療效最佳，2 g/kg 劑量療效次之，0.5 g/kg 劑量療效再次；r-GT 之改善卻以 0.5 g/kg 劑量效果最好。瀉青丸 (SQW) 亦顯出同樣作用趨勢：0.5 g/kg 劑量效果比較差，而 1 g/kg 劑量、2 g/kg 劑量效果一致提高。四逆散 (SNS) 在 sGOT、sGPT 改善以 1 g/kg 劑量療效最佳，2 g/kg 劑量療效次之，0.5 g/kg 劑量療效再次；r-GT 之改善亦以 1 g/kg 劑量效果最好。

(C) 醋氨酚(Acetaminophen) 誘發損傷之保肝研究⁽¹⁴⁻²²⁾

醋氨酚(Acetaminophen)投與後肝、腎功能生化指標皆有顯著的惡化 (sGOT : 92→1640、sGPT : 31→689 ; BUN : 15→87、Creatinine : 0.49→1.30) , 顯示實驗模型誘發成功。四種方劑與對照藥物 (N-acetylcysteine, 1g/kg) 之療效規納於表四, 大致上提高劑量療效增加。其中四磨飲 (SMY) 呈現突出之療效, 在 sGOT、sGPT 改善以 1 g/kg 劑量療效最佳, 2 g/kg 劑量療效次之, 0.5 g/kg 劑量療效再次; BUN 與 Creatinine 也相同。桂枝茯苓丸 (GFW), 保肝方面有劑量依賴趨勢, 護腎則以 1 g/kg 有最好的療效。瀉青丸 (SQW) 保肝護腎亦顯出同樣作用趨勢: 0.5 g/kg 劑量效果比較差, 而 1 g/kg 劑量效果最高。四逆散 (SNS) 在 sGOT、sGPT、BUN、Creatinine 三種劑量療效一致, 相差不多。

肆、討論

動物多次注射四氯化碳後，血清酵素活性大量竄升。此實驗酵素 sGOT 值由 93 IU/L 竄高至 1973 IU/L、sGPT 值由 29.5 IU/L 竄高至 1788 IU/L。表示細胞大量損傷。甚至 ALP 值（鹼性磷酸酶），在此實驗中由 392 IU/L 升高至 842 IU/L ($P < 0.01$)，顯示除肝細胞傷害外還對其它細胞（包括膽管上皮）造成損傷；此印證在臨床上，重度肝臟炎症常伴有一定程度膽汁鬱積⁽⁶¹⁾。由肝組織切片發現肝三區（Zone 3）之肝細胞嚴重變性與壞死並有水樣滲出浸潤，細胞失去界限而融合甚至中央靜脈之間有壞死之橋聯壞死（confluent necrosis: central-to-central bridging）。

在此模型情況下，瀉火性質的傳統醫療方劑瀉青丸，突顯其清熱瀉火作用，發揮主治肝火鬱熱之功效。由實驗模型從毒性誘導中，依生化指標變化及肝臟切片病理圖樣之觀察，但實驗中動物並無死亡，顧此模型應是重度肝炎、急性肝壞死。方劑瀉青丸經由：清腸逐毒、護肝利膽、調整血液動力學，改善微循環…等瀉火作用。方中「大黃」能保護肝細胞超顯微結構，增加肝細胞內糖原和核糖核酸含量，減輕肝細胞腫脹變性壞死、疏通膽小管改善膽汁鬱積。此外，還通過抑制腸性毒素吸收、中合毒素，消炎抑制病毒⁽⁵²⁾…等應是本方療效所在。理氣方劑四磨飲之效果沒有突顯（sGOT、sGPT 改善統計值 $P < 0.05$ ，ALP 有所改善但未達統計意義）。

在脂質過氧化 (LPO) 評估中，證實此四種傳統醫藥具有保護作用。但在效果方面對照下，發現生化值最突顯優勢之瀉青丸卻沒在 LPO 評估中獨佔鰲頭，應是由於外物 (毒) 重複侵犯當中，除毒物本身之傷害性外，誘發機體免疫應激反應產生之生物效應將會扮演重要角色⁽⁵⁵⁾。本此複雜微妙之結果，當可作為往後研究者之參考。

在抗氧化酵素探討中，毒藥組肝中 SOD 含量反而增加？生物體合成 SOD 之量常受 O_2^- 濃度的影響，例如經常處在 O_2 分壓較高的環境中，其體內 O_2^- 濃度高於正常者，在 O_2^- 的誘導下，SOD 的生物合成能力增高。本實驗之結果，應是實驗動物對氧化壓力 (oxidative stress) 的一種代償反應。Baskar 等人⁽⁷¹⁾，曾以 sodium glycolate 誘發老鼠腎臟結石，並評估老鼠腎臟之 LPO、SOD、CAT...，結果其中毒藥組之 LPO 程度上升，SOD 活性升高、CAT 活性降低等，與吾人研究結果吻合，提示本推論是正確，實驗進行無誤。

另一抗氧化酵素 GSH-Px 在實驗後，檢測結果控制組、毒藥組與治療組之間並無顯著差別，此與 Ohta 等人⁽⁷²⁾1995 年發表於《美洲中醫雜誌》：「探討大柴胡湯在四氯化碳誘發肝損傷中對其活性氧的保護」，中毒藥組 LPO 升高的情況下，GSH-Px 也一樣無顯著意變動。與吾人實驗結果類同。

由此了解到此四種方劑之防治肝炎功能，確切經由於抗氧化路徑而達成，並且證實方劑之保肝功效牽涉到機體體內抗氧化酵素之作用機制。

酒精為一種間接肝毒素，其毒性與量之大小有關，而影響肝臟各方面的代謝作用，造成細胞內三酸甘油酯的累積。其次酒精氧化產生的乙醛對肝細胞有毒性作用，抑制細胞粒腺體的功能等。當酗酒時大量 Alcohol 的攝取將造成肝臟 Glutathione(GSH)之消耗，而且乙醇在肝臟細胞中 microsome、cytosol 內會被代謝成 oxygen-related 自由基 (hydroxyethyl radicals)，是為酒精性肝損傷之禍源。

Acetaminophen(APAP)是 Phenacetin 的代謝物，被廣泛使用於鎮痛解熱方面。在一般治療劑量下安全性高，且副作用少。但在過量投與時，會變成肝臟之一致病劑，甚至造成人與實驗動物的猛暴性肝損傷及腎小管壞死而亡。如果服藥後 4、12 小時後血中濃度分別為 $200 \mu\text{g/ml}$ 和 $50 \mu\text{g/ml}$ 時，就會有肝壞死的現象。因此，Acetaminophen 之代謝途徑與毒性受到相當之重視。

APAP 投與吸收後在體內產生多種代謝物，部份代謝物與體內組織之大分子共價鍵結合，其他的代謝物形成自由基及超氧化物。這些具活性的代謝物是造成肝損傷的主要來源。

APAP 的代謝主要經由肝臟 cytochrome p-450 之酵素系統，N-acetyl-p-benzoquinone imine(NAPQI)為其具自由基性質之中間代謝物。少量 NAPQI 可以與 glutathione 結合形成 Mercapturic acid 而排出體外。NAPQI 活性相當強，當其與 glutathione 飽和結合時，多餘的 NAPQI 迅速的與組織大分子共價鍵結，引起細胞脂質過氧化反應。

酒精 (EtOH) 之損傷實驗中，理血方劑 (GFW: 2g/kg) 表現強眼，在保肝作用優於其它方劑，桂枝茯苓丸效果最好。此理血化瘀方藥可能經由下列作用：(1) 顯著對抗急慢性肝損傷 (包括肝硬化)，減少肝細胞變性、壞死，保護超顯微結構。(2) 改善肝臟微循環。(3) 抑制肝臟間質炎症、降低血漿球蛋白，抑制過敏反應性肝損傷。(4) 改善肝細胞代謝，增加糖原貯存，促進對脂質處理，抗脂肪變性。(5) 提高肝細胞 DNA 合成率，促進肝細胞再生，抑制肝臟膠原纖維增生，顯著減輕肝硬化病變。而體現中醫『活血化瘀』之防治優勢。

Acetaminophen 誘發肝、腎損傷之實驗中以四磨飲(SMY)效果最好，顯示理氣作用可有效防止 APAP 之損傷，也就是傳統醫學的正氣內存，邪不可干。另外，在臟器損傷後，理氣藥物加重劑量則會耗氣，反使療效降低，此符合溫病學說：益氣健脾，用藥宜少(邪傷時)。理血方劑桂枝茯苓丸(GFW)隨劑量的升高，sGOT、sGPT 呈現穩定改善，此符合在濕熱損傷後造成瘀證時，活血化瘀療法有其優勢，符合溫病學說：活血化瘀用藥宜早且持續。瀉青丸(SQW)對 Creatinine 升高的緩解表現最佳，也就是護腎功能最好，此所代表的意義是『瀉火』，對濕熱延及下焦，呈現積極的治療作用。

由此四方劑對以上實驗所呈現不同程度的療效表明符合溫病處理濕熱病證原則：1.降泄濕濁為主。2.活血化瘀用藥宜早。3.益氣健脾用藥宜少。(但若平常預防使用則可將損害減至最低，也就是正氣內存，邪不可干。)

伍、結論與建議

肝炎及其相關病變（慢性肝炎、肝硬化）位居十大死因的第六位；而在十大死因之首的癌症中，肝癌在男性中高居榜首。近年來，隨著疾病譜的改變和診斷方法之提高，肝疾患有逐年增多的趨勢，加上環境汙染嚴重、生活習性之改變…如是對於人體肝臟危害日益嚴重。因而如何進一步提高肝膽疾患的臨床療效，預防肝病的發生與傳播，保障人類的身體健康，是醫學界面臨之重要課題。傳統醫藥源遠流長，曾對我民族之健康與繁衍作出供獻。在今日科技突飛猛進之時代中，仍具醫療保健顯效，綻放光芒。從事肝疾患之中醫藥研究，以輔現代醫療之不足，並以發揚傳統醫學寶藏，確實迫切。

本研究的目的，對各個損傷模型評估其防治效果外，並探討其作用機轉，釐清其抗氧化活性。而獲得以下成果結論：

- （一）切確證實此四種傳統方藥對於各個損傷模式之防治效果，並提供科學學理證據。
- （二）在機轉研究中，發現傳統方劑確有對抗『自由基—脂質過氧化作用』之傷害功能，對於中醫藥基本理論和治則實質，得有學術和實用價值之確立。
- （三）實驗中之相關細節與發現，可作為臨床用藥之參考。
- （四）對於中國醫學中之『理、法、方、藥』經由實驗之實踐中有所體會，往後證型之探討，可在本實驗的基礎上循序歸納與建立。

陸、參考文獻

1. 陳桂廷，楊思澍，實用中西醫結合診斷治療學，中國醫藥科技出版社，北京，p. 476~486,1991
2. 公務統計，中華民國台灣地區衛生統計，行政院衛生署，正中書局，台北，p.84~86,1993,Sep
3. 馬光亞，台北臨床三十年，世界書局，台北，p.57~74,1988
4. 江克明，包明蕙，簡明方劑辭典，上海科學技術出版社，上海，p.293,296,682,868,1991
5. 謝觀，中國醫學大辭典，商務印書館，台北，p.736, 742, 2087, 4351, 1988
6. 劉接寶，中西結合肝病治療研究，立得出版社，台北，p.106~152,171~182,1984
7. 陳偉，路一平，方劑學，上海中醫學院出版社，上海，p.125,312,1989
8. 陳奇，中藥名方藥理與應用，南天書局，台北，p.107,455,1993
9. Reitman S. and Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol* 1975; 28:56-63.
10. Glossman M. and Neville D.M. (Glutanyl transferase in kidney brush border membrane. *FEBS Lett* 1972; 19:340-344.
11. Wootton I.D.P. Plasma proteins in micro-analysis in medical biochemistry. 4th edn J. and A. Churchill Ltd, London. 1964; 138-140
12. Bergmeyer H.V., Grabl M. and Walter H.E. Enzyme. In methods of enzymatic analysis, ed. By Bergmeyer H.V. and Gral M. Verlag-Chemie, Weinheim 1983; 267-270,
13. Quick A.J., Stanley B.M. and Bancroft F.W. A study of the coagulation defect in hemophilia and in jaundice. *Am. J. Med. Sci* 1935; 190: 501-511.
14. 楊春茂，楊聖信，林君穎，許桂森，張國志，人體藥理學(上冊)，藝軒圖書出版社，1994;435-444
15. Valenzuela A., Lagos C., Schmidt K. and Luis A.V Silymarin protection against hepatic lipid peroxidation induced by acute ethanol intoxication in rat. *Biochemical Pharmacology*.1984; 34(12): 2209-2212.

16. Lee Y.J., Pantuck C.B. and Pantuck E.J. Effect of Ginseng on plasma levels of ethanol in rat. *Planta Med.* 1993; 59:17-19.
17. Vagra M., Buris L. and Fodor M. Ethanol elimination in man under influence of hepatoprotective Silibinin. *BLUTALKOHOL* 1991;28: 405-408.
18. Lamb R.G., Koch J.C., Snyder J.W., Huband S.M. and Bush S.R. An in vitro model of ethanol-dependent liver cell injury. *Hepatology* 1994; 19:174-182.
19. Chao Y.C., Liou S.R., Chung Y.Y., Tang H.S., Hsu C.T., Li T.K. and Yin S.J. Polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenase genes and alcoholic cirrhosis in Chinese patients. *Hepatology* 1994; 19:306-366.
20. Padova C., Roine R., Frezza M., Gentry R.T., Baraona E. and Lieber C.S. Effects of ranitidine 1992
21. Risto J.K., Padova C.D. and Lieber C.S. Fister pass metabolism of ethanol - A gastrointestinal barrier against the systemic toxicity of ethanol. *Life Science* 1985; 37: 567-573.
22. Shaffar M. and Stroupe S.D. A general method for routine clinical chemistry on the Abbott TDx analyzer. *Clin. Chem.* 1983; 29(6):1251.
23. Pablo M., Tania G., Vitor P.A., and Marisabel M. Silymarin protects against paracetamol-induced lipid peroxidation and liver damage. *Journal of Applied Toxicology* 1992; 12(6): 439-442.
24. Liu J., Liu Y., madhu C. and Klaassen C.D. Protective effects of oleanolic acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1993; 266(3):1607-1613.
25. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem* 1979;95:351-358.
26. Lowry OH, Rosbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 1951;193;265-275.
27. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the oxidation of paragallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 1974; 47:469-474.
28. Aebi H. Catalase in vitro. *Mechods in Enzymol.* 1984; 105:121-126.
29. Hafeman DG, Sunde RA, Hoekstra WG. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxides in the rats. *J. Nut.* 1974; 104:580-587,.
30. Subrata D, Ravishankar B, Bhavsar GC. An investigation on the hepatoprotective activity of *Gymnosporia montana*. *Planta Med.* 60:301-304, 1994.

柒、圖表

表一、中醫方劑：四磨飲 (SMY)、桂枝茯苓丸 (GFW)、瀉青丸 (SQW)、四逆散 (SNS) 與參考要物—水飛薊 (silymarin) 對四氯化碳 (CCl₄) 多重誘發肝損傷之療效評估。

Groups	Dose (mg/kg)	sGOT (IU/L)	sGPT (IU/L)	ALP (IU/L)
Control	---	93 ± 2	30 ± 1	392 ± 15
CCl ₄	3.5 ml/kg	1973 ± 360 ^{##}	1788 ± 479 ^{##}	842 ± 27 ^{##}
SMY + CCl ₄	500	830 ± 196*	616 ± 179*	804 ± 42
GFW + CCl ₄	500	676 ± 133**	451 ± 109*	705 ± 32**
SQW + CCl ₄	500	625 ± 83**	324 ± 46*	675 ± 28**
SNS + CCl ₄	500	741 ± 82**	402 ± 65*	661 ± 10**
silymarin+ CCl ₄	25	666 ± 107**	387 ± 61*	633 ± 36**

Each value represents mean ± S.E.M. (n=6)

Student's *t*-test was performed.

^{##}*P*<0.01 significantly different from normal control group.

P*<0.05, *P*<0.01 significantly different from CCl₄-intoxicated group.

表二、中醫方劑：四磨飲 (SMY)、桂枝茯苓丸 (GFW)、瀉青丸 (SQW)、四逆散 (SNS) 與參考要物—水飛薊 (silymarin) 對四氯化碳 (CCl₄) 誘發肝臟組織脂質過氧化 (LPO) 損傷及三抗氧化酵素 (SOD、Catalase、GSH-Px) 變化之療效評估。

Groups	Dose (mg/kg)	LPO ^a	SOD ^b	Catalase ^c	GSH-Px ^d
Control	---	1.37 ± 0.14	8.61 ± 0.24	11.81 ± 0.82	844 ± 10
CCl ₄	3.5 ml/kg	8.81 ± 1.21 ^{##}	10.87 ± 0.41 ^{##}	3.67 ± 0.58 ^{##}	775 ± 31
SMY + CCl ₄	500	3.41 ± 0.40 ^{**}	8.43 ± 0.21 ^{**}	8.65 ± 0.60 ^{**}	846 ± 29
GFW + CCl ₄	500	3.30 ± 0.52 ^{**}	10.86 ± 0.27	7.70 ± 0.62 ^{**}	836 ± 24
SQW + CCl ₄	500	4.49 ± 0.51 ^{**}	8.97 ± 0.22 ^{**}	7.91 ± 0.25 ^{**}	845 ± 28
SNS + CCl ₄	500	4.28 ± 0.60 ^{**}	8.88 ± 0.22 ^{**}	7.69 ± 0.38 ^{**}	911 ± 32*
Silymarin + CCl ₄	25	2.36 ± 0.43 ^{**}	8.61 ± 0.20 ^{**}	5.92 ± 0.25 ^{**}	823 ± 19

Each value represents mean ± S.E.M. (n=6)

Student's *t*-test was performed.

^{##}*P*<0.01 significantly different from normal control group.

P*<0.05, *P*<0.01 significantly different from CCl₄-intoxicated group.

^aLPO: n moles of MDA formed per milligram protein.

^bCatalase: unit-K per milligram protein (U/mg protein).

^cSOD: unit per milligram protein (U/mg protein).

^dGSH-Px: unit per milligram protein (U/mg protein).

表三、中醫方劑：四磨飲 (SMY)、桂枝茯苓丸 (GFW)、瀉青丸 (SQW)、四逆散 (SNS) 與參考要物—Silymarine 對酒精(EtOH)誘發肝損傷之療效評估。

Groups	Dose (g/kg)	sGOT (IU/L)	sGPT (IU/L)	γ -GT (IU/L)
Control	----	140±12	29±1	1.9±0.1
EtOH	5g/kg (20%)	413±63 ^{##}	177±8 ^{##}	3.4±0.4 ^{##}
SMY + EtOH	0.5	230±14*	84±5**	2.1±0.1*
	1.0	160±9**	65±5**	2.6±0.3
	2.0	186±24*	91±15**	2.4±0.7
GFW + EtOH	0.5	230±12*	103±7**	1.8±0.3*
	1.0	140±15**	81±22**	1.7±0.2*
	2.0	115±13**	49±9**	1.7±0.1**
SQW + EtOH	0.5	239±9*	88±6**	2.3±0.1*
	1.0	132±10**	45±4**	1.8±0.2**
	2.0	135±8**	47±3**	2.3±0.2
SNS + EtOH	0.5	230±25*	81±9**	2.0±0.1*
	1.0	146±14**	72±11**	1.9±0.3*
	2.0	175±12**	85±5**	2.3±0.2*
Silymarine + EtOH	25mg	149±21**	69±21**	2.2 ±0.1*

Each value represents mean ± S.E.M. (n=5~6)

Student's *t*-test was performed.

^{##}*P*<0.01 significantly different from normal control group.

P*<0.05, *P*<0.01 significantly different from CCl₄-intoxicated group.

表四、中醫方劑：四磨飲 (SMY)、桂枝茯苓丸 (GFW)、瀉青丸 (SQW)、
四逆散 (SNS) 與參考要物—N-acetyl-N-cystein(NACS) 對
Acetaminophen(APAP)誘發肝、腎損傷之療效評估。

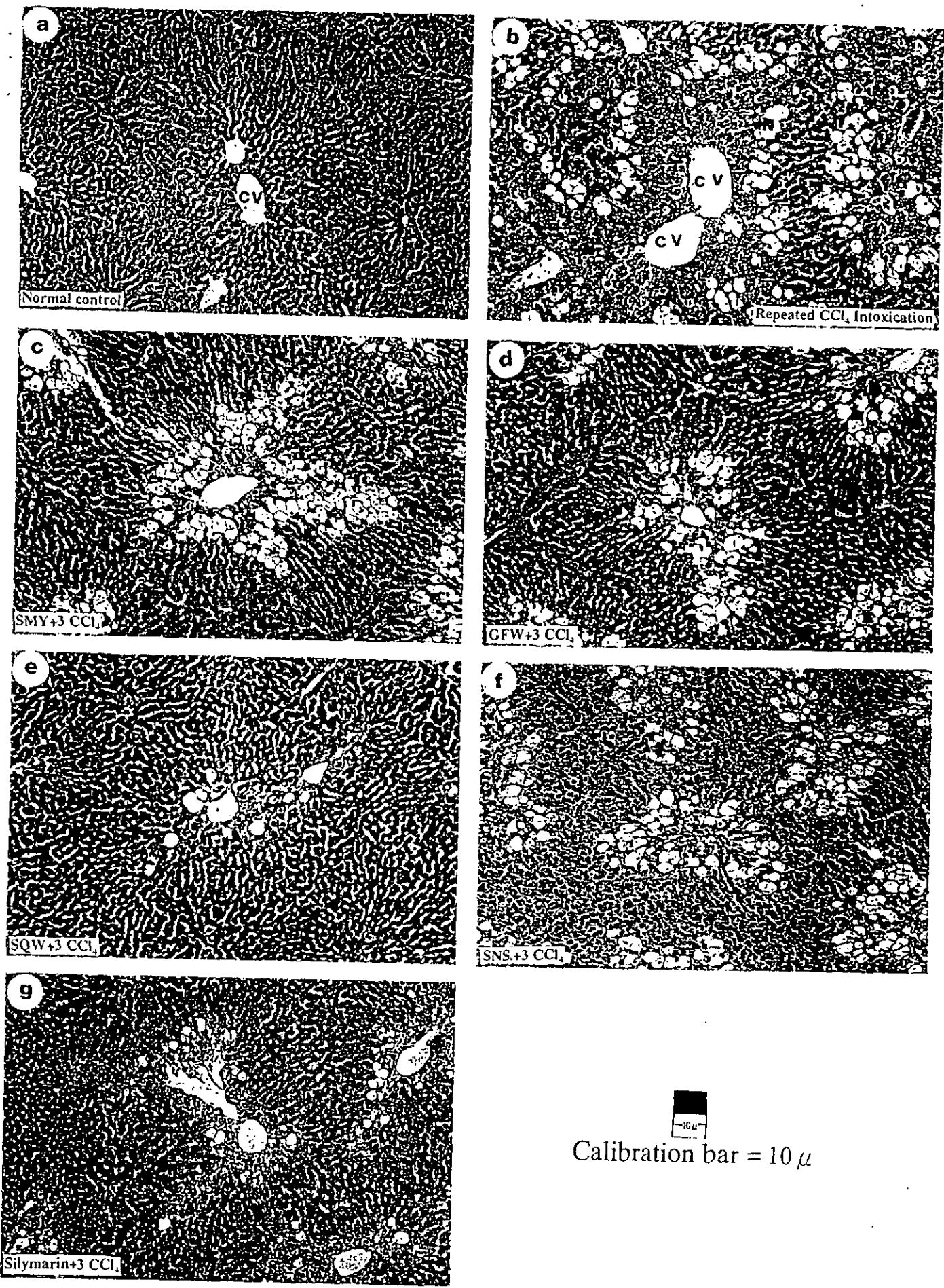
Groups	Dose (g/kg)	sGOT (IU/L)	sGPT (IU/L)	BUN(mg/dl)	Creatinine(mg/dl)
Control	----	92±2	31±2	15±1	0.49±0.01
APAP	1.2 g / kg	1640±180 ^{##}	689±137 ^{##}	87±24 [#]	1.30±0.29 [#]
SMY + APAP	0.5	324±34 ^{**}	75±5 ^{**}	20±4 [*]	0.63±0.05 [*]
	1.0	281±18 ^{**}	59±4 ^{**}	20±1 [*]	0.59±0.00 [*]
	2.0	321±35 ^{**}	68±6 ^{**}	24±3 [*]	0.59±0.01 [*]
GFW + APAP	0.5	406±16 ^{**}	82±3 ^{**}	37±13	0.95±0.24
	1.0	352±25 ^{**}	77±8 ^{**}	23±3 [*]	0.74±0.04
	2.0	328±40 ^{**}	70±11 ^{**}	32±7 [*]	0.84±0.08
SQW + APAP	0.5	430±24 ^{**}	83±6 ^{**}	23±7 [*]	0.70±0.09
	1.0	327±29 ^{**}	74±4 ^{**}	21±1 [*]	0.68±0.02 [*]
	2.0	370±31 ^{**}	82±7 ^{**}	27±2 [*]	0.58±0.01 [*]
SNS + APAP	0.5	433±33 ^{**}	89±6 ^{**}	22±4 [*]	0.65±0.07 [*]
	1.0	431±42 ^{**}	88±9 ^{**}	22±1 [*]	0.76±0.04
	2.0	400±53 ^{**}	79±9 ^{**}	21±2 [*]	0.71±0.02
NACS+ APAP	1 g	377±10 ^{**}	82±7 ^{**}	36±2	0.55±0.02 [*]

Each value represents mean ± S.E.M. (n=5~6)

Student's *t*-test was performed.

^{##}*P*<0.01 significantly different from normal control group.

^{*}*P*<0.05, ^{**}*P*<0.01 significantly different from CCl₄-intoxicated group.



圖一

圖一、說明：

中醫四方劑對『多重』四氯化碳誘發肝損傷之病理療效評估：

(a) 控制組，(b) 毒藥組（四氯化碳），(c) 四磨飲＋四氯化碳，

(d) 桂枝茯苓丸＋四氯化碳，(e) 瀉青丸＋四氯化碳，

(f) 四逆散＋四氯化碳，(g) 參考藥物（Silymarine）＋四氯化碳。

Note：CV：central vein（中心靜脈），P：portal area（門脈區），

N：necrosis（壞死），F：fatty change（脂肪變性）。