

第四章 歸脾湯活體外抗氧化作用的研究

前言

體內自由基的產生與清除是保持平衡的，一旦由於某種原因造成體內自由基的堆積，便會損傷細胞，導致各種病理變化，已證實許多疾病的產生與自由基有關，因此抗氧化療法受到重視 (Rice-Evans and Diplock, 1993; Delanty and Dichter, 2000)。

中藥方劑的應用，已在中國流傳了數千年，近年來越來越多的研究證明，許多的中藥具有抗氧化損傷的作用，這可能是它們防治疾病的原理之一。前章實驗證實歸脾湯對大鼠去卵巢所誘發的氧化應力有減輕作用，由附錄的資料，歸脾湯對大鼠去卵巢的子宮、腦下垂體等臟器重量的變化與雌激素不同，顯然歸脾湯並不具有雌激素樣作用。亦即歸脾湯對缺雌激素氧化傷害的保護作用應來自其本身的清除自由基作用。

本章實驗的目的，主要探討活體外實驗歸脾湯清除自由基的作用。

材料與方法

一、藥材製備

與第三章藥材製備同。

二、酚類化合物定量

歸脾湯水粗萃取物所含酚類化合物的定量依照 Barnes 等人的方法 (1963)。各種不同濃度的歸脾湯水粗萃取物加入 0.1 ml Folin-Ciocalteu reagent 和 0.2 ml 10 % Na_2CO_3 ，此混合物置放於 99°C 的熱水浴中 1 分鐘，而後冷卻之，以分光光度計(Hitachi, U-2100; Japan)測定 700 nm 的吸光度，以 catechin 為標準品。

三、清除自由基能力

1 清除 α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPHH) 自由基能力之測定

取 2 ml 不同濃度歸脾湯水粗萃取液，加入 0.5ml 新鮮配製的 1.0 mM DPPH 乙醇溶液，震盪混合均勻，於室溫下靜置 30 分鐘後，使用分光光度計檢測 517 nm 之吸光值。

2. 清除氫氧自由基能力之測定

依據 Gutteridge (1984) 的方法。每隻試管最終體積為 1 ml，內含 20 mM KH_2PO_4 -KOH buffer (pH 7.4)、2.8 mM deoxyribose、100 μM FeCl_3 、 10^4 μM EDTA、300 μM H_2O_2 、100 μM ascorbic acid 及各種不同濃度的歸脾湯水粗萃取液。反應混合物於 37 放置 1 小時，而後加入 1 ml thiobarbituric acid (1 % w/v ; 溶於 0.05 M NaOH) 及 1ml

trichloroacetic acid (2.8 % w/v)。離心除去沉澱物，上清液於 100⁰ C 加熱 15 分鐘，冷卻後於 532 nm 測吸光值。清除氫氧自由基的反應速率，由歸脾湯水粗萃取液的濃度及吸光值倒數所得直線的斜率依照 Halliwell et al.(1987)等人的方法算出。

3. 清除超氧陰離子能力之測定

每隻試管最終體積為 1 ml，內含 Phosphate buffer(0.125M,pH =7.8,Xanthine 125 μ M)，Xanthine oxidase(1.4U/ml)，Nitro blue tertrazolium(NBT; 6mM)及各種不同濃度的歸脾湯水粗萃取液。混合均勻後置於分光光度計 25 中記錄在 560 nm 的起始吸光值及 10 分鐘後的吸光值，記算出超氧陰離子產生率。

上述實驗，可能包含歸脾湯萃取物對 xanthine oxidase 的抑制作用。因此，另進行歸脾湯水粗萃取物對 xanthine oxidase 抑制作用的實驗，即測定 uric acid 的產生。每隻試管最終體積為 1 ml，內含 Phosphate buffer(0.125M,pH =7.8,Xanthine 125 μ M)，Xanthine oxidase(1.4U/ml) 及各種不同濃度的歸脾湯水粗萃取液。混合均勻後置於分光光度計 25 中記錄在 295 nm 的起始吸光值及 10 分鐘後的吸光值，記算出 uric acid 產生率。

4. 清除過氧化氫能力之測定

不同濃度歸脾湯水粗萃取液 1 ml 加入 4 mM H₂O₂ ml，混合均勻，室溫下靜置 20 分鐘，添加 0.6 ml Horseadish peroxidase-phenol red (HRPase 0.5 mg/ml; phenol red 7.5 mM)，混勻靜置 10 分鐘，水浴 10 分鐘後，

測定 610 nm 之吸光值 (Boveris et al., 1972)。

5. 螯合鐵能力之測定

取 1 ml 不同濃度的歸脾湯水粗萃取液，加入 3.7 ml 的 methanol，先加入 2 mM 的 FeCl_2 0.1 ml，30 秒後再加入 5 mM 的 ferrozine 0.2 ml，反應 10 分鐘後，檢測 562 nm 的吸光值。

四、. 大鼠腦均質液脂質過氧化作用

依據 Braugher et al (1987)的方法，測定歸脾湯水粗萃取液對大鼠腦均質液在 FeCl_2 -ascorbic acid 引發的脂質過氧化，及對自發性脂質過氧化，是否有抑制作用。

以 tris-HCl (pH 7.4)製備 10 % (w/v) 腦組織均質液。取腦組織均質液 0.5 ml、4 mM FeCl_2 0.05 ml 及 0.05 ml 各種不同濃度的歸脾湯水粗萃取液於 37 放置 30 分鐘反應。反應終了，加 0.2 ml 8.1 % sodium dodecyl sulfate、1.5 ml 20 % acetic acid，及 1.5 ml 0.8 % thiobarbituric acid 溶液，加水使最後體積為 4 ml，在 100 水浴中加熱 1 小時。於自來水中冷卻後，加入 1 ml 去離子水、5 ml n-butanol / pyridine 混合液 (15 : 1, v/v)，混勻後，離心 (4000 rpm, 10 min)，取有機層於 532 nm 測吸光值。脂質過氧化程度以 nmol malondialdehyde (MDA)/ mg protein 表示。蛋白質含量依 Lowery et al. (1951)的方法測定。

自發性脂質過氧化實驗步驟與上述同，唯 0.05 ml 4 mM FeCl_2 以去離子水代替。

五、試藥

Folin-Ciocalteu reagent、 Na_2CO_3 、catechin、 α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPHH)、 H_2PO_4 、KOH、deoxyribose、 FeCl_3 、EDTA、ascorbic acid、thiobarbituric acid、NaOH、trichloroacetic acid、Xanthine、Xanthine oxidase、NBT(Nitro blue tetrazolium)、 H_2O_2 、Horseadish peroxidase、phenol red、methanol、 FeCl_2 、ferrozine 0.2 ml、sodium dodecyl sulfate、n-butanol、pyridine

結 果

1. 酚類化合物定量

每 mg 歸脾湯水粗萃取物約含 29.7 μg catechin 樣物質。

2. 清除 DPPH 自由基能力之測定

如表 4-1 所示 DPPH 使用的濃度為 1.0 mM, 歸脾湯水粗萃取物 5 mg/ml 達最高抑制作用, 約 37 %。

Table 4-1. Free radical scavenging activities of GPT as evaluated by the activity with DPPH.

Concentration (mg/ml)	Inhibition (%)
0.01	0
0.1	5.62
1	25.68
2	31.24
3	31.72
4	33.02
5	37.75

Data represent the means of triplicate determination from 3 experiments.

3. 清除氫氧自由基能力之測定

如圖 4-1 所示，歸脾湯水粗萃取物能抑制氫氧自由基對 deoxyribose 的分解作用，由藥物濃度及吸光值倒數(1/A)所得直線的斜率計算出其反應速率為 $1.10 \times 10^{-10} / M / sec$ 。對照藥物 mannitol 的反應速率為 $1.61 \times 10^{-9} / M / sec$ 。

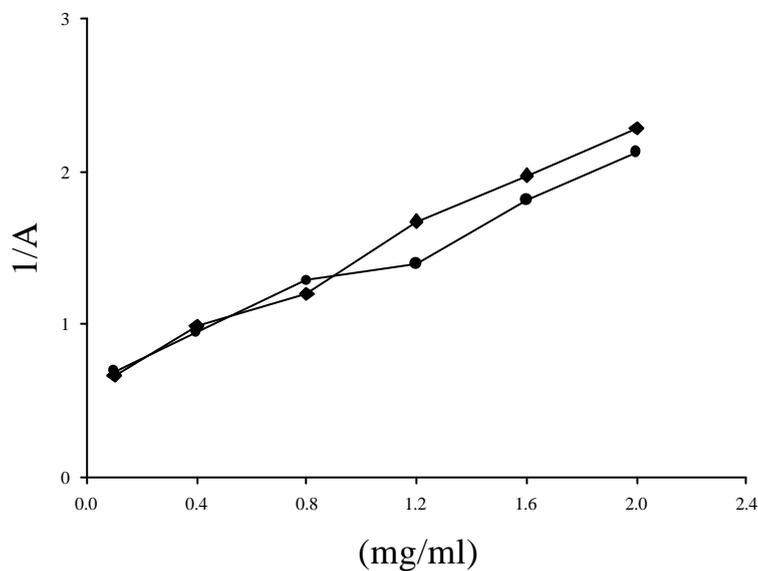


Fig. 4-1. Inhibition of deoxyribose degradation by GPT or mannitol. ● : GPT ; ◆ : mannitol. The absorbance obtained at the end of the experiment. Data represent the means of triplicate determination from 3 experiments that differed by no more than 10%.

3. 清除超氧陰離子能力之測定

歸脾湯水粗萃取物 2 mg / ml 對超氧陰離子清除作用達最高接近 62 %。歸脾湯水粗萃取物 1、2 mg / ml 對 xanthine oxidase 的抑制作用分別為 33.1%和 59.6 %。

Table 42. Scavenging of superoxide anion generated xanthine-xanthine oxidase system

Concentration (mg/ml)	NBT reduction % inhibition	Uric acid % inhibition
0.1	19.9	9.1
0.2	25.8	15.1
0.5	34.8	27.9
1	42.3	33.1
2	62.7	59.6

Data represent the means of triplicate determination from 3 experiments.

Table 43. Inhibition of the formation of H₂O₂-HRPase-Pheno red by GPT.

Concentration (mg/ml)	Inhibition %
0.1	3.03
0.5	10.76
1	13.01
1.5	22.31
2	26.13
3	37.47
4	48.63
5	56.56

Data represent the means of triplicate determination from 3 experiments.

5. 清除過氧化氫能力之測定

H₂O₂使用的濃度為 4 mM，歸脾湯水粗萃取物 (5 mg/ml) 對 H₂O₂-HRPase -Pheno red 的呈色約可抑制 56 %，IC₅₀ 約 4 mg/ml。(表 4-3)

6. 螯合鐵能力之測定

Fe⁺² 使用的濃度為 2 mM，歸脾湯水粗萃取物 5 mg/ml 對 Fe⁺² 與 ferrozine 呈色可達最高抑制，約 75 %，IC₅₀ 約 0.5 mg/ml。

Table 4-4. Inhibition of the formation of Fe⁺²-ferrozine by GPT.

Concentration (mg,	Inhibition
0.1	32.65
0.5	53.41
1	59.09
1.5	61.67
2	64.77
3	69.01
4	74.17
5	75.83

Data represent the means of triplicate determination from 3 experiments.

7. 大鼠腦均質液脂質過氧化作用

腦均質液不加鐵自發性脂質過氧化 MDA 的量為 6.46 nmol / mg protein，加鐵誘發產生 MDA 的量為 16.06 nmo / mg protein。歸脾湯水

粗萃取物 2.0 mg / ml 對自發性脂質過氧化達最高抑制，約 99 %， IC_{50} 約 0.1 mg / ml。對加鐵誘發產生的脂質過氧化最高濃度 4 mg/ml 約可抑制 47 %。

Table 45. The inhibitory effect of GPT on the lipid peroxidation in a rat brain homogenate *in vitro*.

Concentration.	Fe-independent	Fe-dependent
0	0	0
0.1	45.0	10.6
0.5	89.3	16.9
1	98.6	23.3
1.5	98.8	30.4
2	99.1	31.4
3	---	43.6
4	---	47.2
5	---	43.5

Data represent the means of triplicate determination from 3 experiments.

討 論

生物體過多的自由基會衍生許多疾病如動脈粥狀硬化、癌症、老化及一些退化性疾病 (Wiseman, 1995)。因此科學家正積極尋求一些天然抗氧化劑以防止自由基所產生的連鎖反應對人體造成的傷害。現今使用評估抗氧化劑的抗氧化性之方法，種類眾多，機轉複雜且至今尚無一套公認的抗氧化評估方式。因此欲評估樣品之抗氧化活性應盡量採用多種方法來評估以增加實驗數據的可信度。

已有文獻指出其清除自由基的能力與其酚類化合物的含量有一正向關係 (Sharma et al., 1995)。因此測出定歸脾湯水粗萃取物含有酚類化合物的量，可以與其他天然物比較抗氧化能力。本實驗顯示，歸脾湯水粗萃取物含有一定量酚類化合物。

通常用 DPPH 來評估抗氧化物的供氫能力。由於 DPPH 有個單電子在 517 nm 處有一個強吸收，其乙醇水溶液呈深紫色，如果抗氧化物質提供一個電子使此單電子配對，其吸收將會消失 (Blois, 1958)。歸脾湯水粗萃取物具有消除 DPPH 自由基的作用。

清除氫氧自由基的能力是使用 deoxyribose 的簡便試管試驗方法 (Gutteridge, 1984; Halliwell et al., 1987)，deoxyribose 受到氫氧自由基的攻擊會產生 MDA 類似的物質，MDA 可與 thiobarbituric acid 反應產生粉紅色物質，抗氧化物質若能清除氫氧自由基則可使粉紅色物質的產生減少。Mannitol 為已知能清除氫氧自由基的清除劑，因此用來與歸脾湯作為對照。實驗結果顯示歸脾湯水粗萃取物亦具有清除氫氧自由基的能力，其清除能力較對照藥物 mannitol 好。

測定歸脾湯水粗萃取物清除超氧陰離子是利用 xanthine 與 xanthine oxidase 作用放出超氧陰離子，NBT 可被超氧陰離子還原而呈藍紫色物質。

在 SOD 存在的條件下，超氧陰離子因發生歧化反應而減少。對 NBT 的還原作用減弱。因此用比色法測定 NBT 還原產物可以間接反應抗氧化劑類似 SOD 的活力。歸脾湯水粗萃取物對此呈色有不錯的抑制作用。但對此呈色的抑制作用也有可能來自對 xanthine oxidase 的抑制所致，因此在測定歸脾湯水粗萃取物清除超氧陰離子實驗之外亦另外進行了 xanthine oxidase inhibition 的實驗，顯示歸脾湯水粗萃取物能抑制 xanthine oxidase 的活性。歸脾湯水粗萃取物清除超氧陰離子的能力多數來自對 xanthine oxidase 的抑制作用，即歸脾湯不具很好的超氧陰離子清除能力。

過氧化氫清除能力的測定是使用 HRPase 與 H_2O_2 作用使酚紅(phenol red)氧化後呈含 電子的生色團，此氧化物在 610nm 有最大吸收波峰，故可藉由測定 610nm 處吸光值的變化得知 H_2O_2 的消耗量。若是樣品能使吸光值減少，表示其具有清除過氧化氫的能力。歸脾湯水粗萃取物在高濃度才能明顯的清除過氧化氫。

加鐵誘發脂質過氧化反應，是經由 Fenton reaction ($Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + OH\cdot + OH^-$) 產生氫氧自由基。 Fe^{+2} 經常是最具影響力的助氧化劑，其會促進脂質過氧化的進行。若藥物能螯合鐵離子也會減少氫氧自由基的產生，利用 Fe^{+2} 與 ferrozine 產生的複合物在 562 nm 之呈色反應來檢測歸脾湯水粗萃取物螯合鐵離子的能力。結果顯示歸脾湯水粗萃取物於低濃度下就有明顯螯合鐵離子的作用，此作用應與其抑制加鐵誘發腦組織脂質過氧化有關。

本實驗使用大鼠腦均質液來測定歸脾湯水粗萃取物抑制脂質過氧化的能力。已知腦組織清除自油基的能力較低，又含有一些會產生活性氧的

酵素如 monoamine oxidase 等，因此腦組織會有自發性的脂質過氧化產生 (Evans, 1993)。測定與 thiobarbituric acid 反應物質的方法，是所有用於檢測脂質過氧化的方法中最為簡單的一種。已知以鐵誘發的脂質過氧化在腦部組織的傷害中佔重要角色 (Braugher et al., 1987)。腦均質液加鐵誘發的脂質過氧化作用明顯高於不加鐵，歸脾湯水粗萃取物對加鐵與不加鐵誘發的脂質過氧化，均具有抑制作用，以對不加鐵誘發的抑制作用較強。

由以上活體外實驗結果顯示，歸脾湯中具有清除自由基的作用，能減輕含氧自由基對生物體的損傷。前章活體內實驗也證實歸脾湯具有抗氧話保護作用。歸脾湯抗氧化作用在臨床上的應用尚待進一步研究。