

中國醫藥學院醫學研究所

碩士論文

具止瀉與瀉下功能中草藥對於大白鼠腸道上皮
細胞離子運送的影響

**Effects of selected anti-diarrheal and laxative chinese herbal
medicine on ion transport of the rat intestinal epithelia**



研究生: 蔡淑理
指導老師: 張文正老師
共同指導老師: 蔡忠昌老師

中華民國九十一年五月二十日

中國醫藥學院醫學研究所
碩士候選人學位考試

論文題目

中文: 具止瀉與瀉下功能中草藥對於大白鼠小腸上皮細胞
離子運送的影響

英文: Effects of selected anti-diarrheal and laxative Chinese herbal
medicine on ion transport of the rat intestinal epithelia

本論文係 蔡淑理 於中國醫藥學院醫學研究所完成
之碩士論文，經考試委員及口試及格，特此證明。
考試委員

所長: _____

中華民國九十一年五月二十日

致謝

承蒙恩師張文正老師與蔡忠昌老師兩年來悉心指導，於研究方向、治學態度與待人處世上多方啟發，使得本論文得以順利完成，特此致上十二萬分謝忱。並感謝生理科王慧如老師、陳卓昇老師、盧敏吉老師、閔明源老師，藥理科吳介信老師，惠予寶貴意見與匡正，使本論文更臻至完美，學生銘感於心。

另外感謝在我研究所學習期間，同窗好友毓娟與學弟景煥、永昇的互相砥礪與幫助下，才能度過辛苦又單調的歲月。

最後，謹將此論文獻給我最摯愛，養育我、栽培我的爸爸永順、媽媽錦色、及我的家人大姐淑惠、弟弟銘俊、妹妹淑敏、以及我的先生松琳，由於你們的支持與鼓勵，使我順利完成學業與論文，希望你們可以永遠健康與快樂，謝謝你們。

中文摘要

中草藥如秦皮、黃連、苦參、黃柏等具有止瀉的功效，大黃、巴豆、牽牛子、火麻仁等具有瀉下的功效。由於腹瀉與止瀉的生理機制與腸道上皮間之離子通透及水分進出有關，本研究即探討上述具止瀉及瀉下功能的中藥酒精及水抽出物對於腸道上皮細胞離子運送的影響，實驗方法主要利用 Ussing Chamber 連結 voltage/current clamp 的技術測量大白鼠腸道上皮組織因離子移動產生的電流變化。第一部份實驗探討這些中草藥酒精及水抽出物對電流的影響，結果顯示，在於 serosal 端加入 5 μ M forskolin 引發氯離子分泌，使電流上升之後，再於 serosal 端加入中藥材酒精抽出物，秦皮、苦參、黃連、黃柏、鴉膽子等止瀉中草藥酒精抽出物能夠降低 forskolin 引發之上升電流，而具有瀉下功效之大黃、巴豆、牽牛子、火麻仁等中藥酒精抽出物則使 forskolin 引發之上升電流再增加。這些藥材水抽出物對電流的影響則較酒精抽出物為低。第二部分實驗係利用與鈉離子主動運輸有關的 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 抑制劑 Ouabain，及與氯離子主動運輸有關的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter 抑制劑 Bumetanide，探究這些藥材酒精抽出物與鈉離子及氯離子移動的關係，結果發現大黃、巴豆、秦皮、火麻仁等中草藥酒精抽出物可能是藉由影響氯離子的運送而使離子電流產生變化，而苦參可能是藉由影響鈉離子的運送而使離子電流產生變化。本研究結果初步證實所探討之中草藥可能是藉由影響腸道上皮細胞離子運送的改變因而具有止瀉或瀉下功能。

目錄

	頁數
致謝-----	1
中文摘要-----	2
目錄-----	3
表目錄-----	4
圖目錄-----	5
壹、前言-----	7
貳、材料與方法-----	17
參、結果-----	22
肆、討論-----	27
伍、參考文獻-----	33
英文摘要-----	58
作者簡歷-----	60
著作權聲明-----	61

表目錄

	頁數
表一、中藥酒精萃取物冷凍乾燥後所得的重量及實驗刺激的濃度-----	39
表二、中藥水萃取物冷凍乾燥後所得的重量及實驗刺激的濃度-----	40
表三、中藥離子成分的分析-----	41
表四、不同藥材酒精抽出物對於 Forskol in 刺激大白鼠腸道上皮組織間離子電流的影響-----	42
表五、不同藥材水抽出物對於 Forskol in 刺激大白鼠腸道上皮組織間離子電流的影響-----	43

圖目錄

頁數

圖一. forskolin 對於大白鼠腸道短路電流的影響-----	44
圖二. 黃柏酒精抽出物對於接受 forskolin 刺激大白鼠腸 道上皮短路電流的影響-----	45
圖三. 秦皮酒精抽出物對於接受 forskolin 刺激大白鼠腸 道上皮短路電流的影響-----	46
圖四. 巴豆酒精抽出物對於接受 forskolin 刺激大白鼠腸 道上皮短路電流的影響-----	47
圖五. 大黃酒精抽出物對於接受 forskolin 刺激大白鼠腸 道上皮短路電流的影響-----	48
圖六. 不同藥材酒精抽出物對於 forskolin 刺激大白鼠腸 道上皮離子電流的影響-----	49
圖七. 鈉離子與氯離子移動與秦皮酒精抽出物影響腸道 上皮短路電流之關係-----	50
圖八. 鈉離子與氯離子移動與黃連酒精抽出物影響腸道 上皮短路電流之關係-----	51
圖九. 鈉離子與氯離子移動與苦參酒精抽出物影響腸道 上皮短路電流之關係-----	52
圖十. 鈉離子與氯離子移動與大黃酒精抽出物影響腸道 上皮短路電流之關係-----	53
圖十一. 鈉離子與氯離子移動與巴豆酒精抽出物影響腸 道上皮短路電流之關係-----	54
圖十二. 鈉離子與氯離子移動與火麻仁酒精抽出物影響 腸道上皮短路電流之關係-----	55

圖十三. 苦參酒精抽出物對鈉離子移動的影響-----56

圖十四. 秦皮酒精抽出物對氯離子移動的影響-----57

壹、前言

研究緣由與目的

中醫典籍中常可見利用一些中草藥材，用以治療病人的腹瀉或便秘症狀，即所謂的止瀉藥或瀉下藥。在典籍上記載具有止瀉的功效藥方，包括葛根、黃連、苦參、白朮、半夏、秦皮、黃柏等。而瀉下藥方則有大黃、巴豆、牽牛子、火麻仁等藥材(雷載權 1998; 施仁潮 1999 ; Kase, *et al.* 1996, 1998)。

根據文獻記載，這些藥方的功效如下：黃連功能為主治瀉痢、腹痛，其他作用則為入心瀉火，鎮乾涼血，益肝膽，厚腸胃等。黃柏主治熱痢泄瀉，能清熱燥濕，解毒。秦皮具消炎止瀉、補肝膽功能。苦參抗菌消炎，能治久痢，治溫病血痢，腸風逆亦。鴉膽子功能清熱解毒，用於止痢。火麻仁治腸燥便秘，具瀉下作用。巴豆具瀉痢功效，去臟腑沉寒，治牙痛。牽牛子功能：瀉下利便，殺蟲墮胎，利大小便，逐水消痰。大黃功能：蕩滌腸胃，具良好的瀉下作用、其他作用為治黃膽水腫、損傷積血、腹痛裏急(張賢哲 1998 ; 林景彬 1999)。

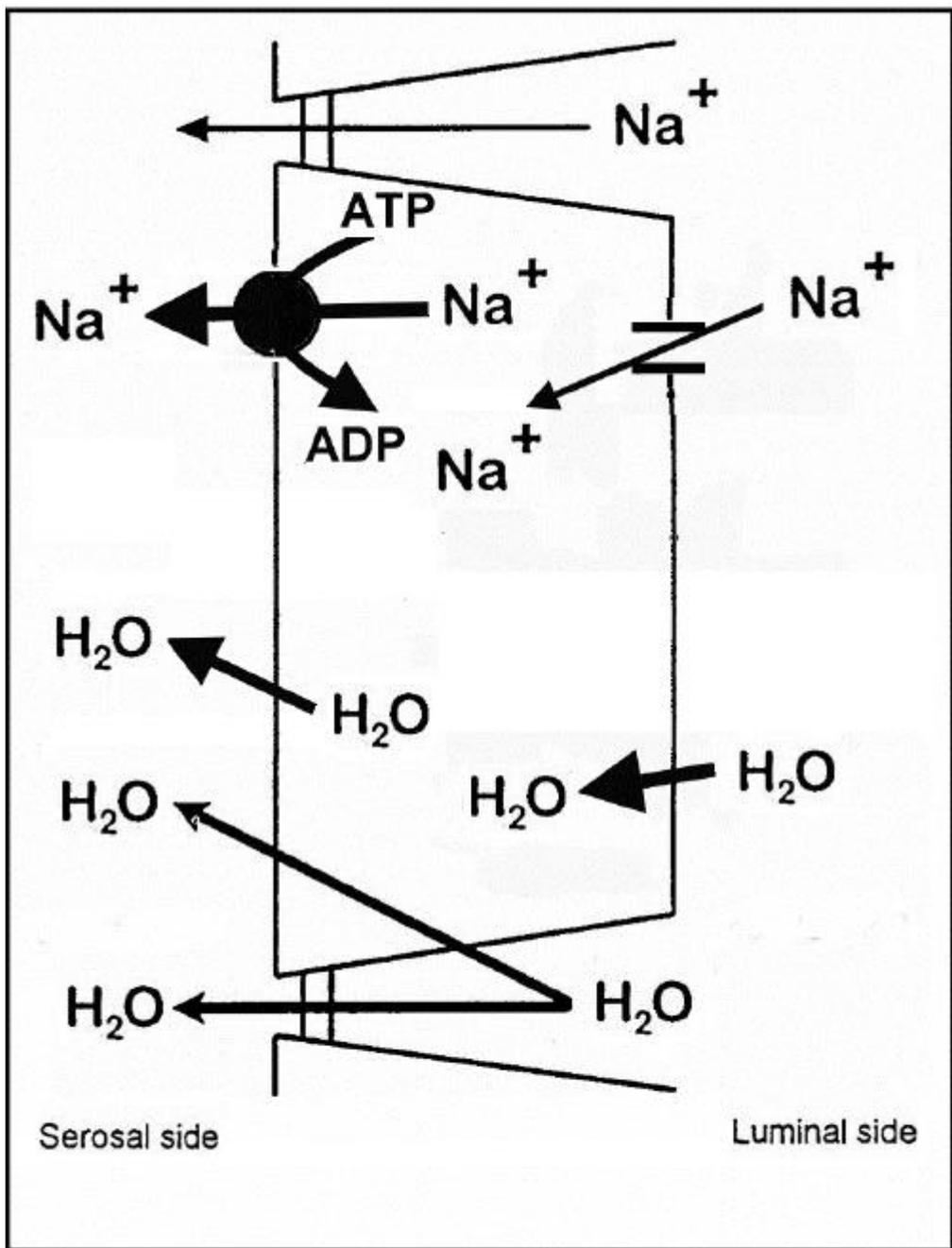
雖然中醫書上紀錄著這些藥物的作用，但是它們的藥理機制以及細胞生理機轉，卻所知及其有限。從腸道上皮細胞生理學的研究得知，腹瀉的原因是因為腸道上皮組織離子運送改變而影響水分分泌作用。當輪狀病毒 (Rotavirus) 感染老鼠的腸道，會使得老鼠發生腹瀉的現象，鈉離子和氯離子的運送會因此增加 (Starkey, *et al.* 1990)。因此，上述具止瀉及瀉下功能中草藥與腸道上皮離子運送的關係相當值得探討。本研究目的即在探討上述中草藥抽出物質對於大白鼠腸道上皮離子移動的影響。

腸道上皮組織離子運送機制與水分移動

離子運送在腸道上皮細胞扮演重要的角色，它帶動腸道上皮細胞對於水分的吸收或是消化液的分泌。在腸道上皮細胞中，鈉離子的主動運輸所造成的滲透壓差可以帶動大量水分子跟著被吸收，而氯離子的主動分泌造成的滲透壓差則同樣地帶動大量水分子跟著被排出。消化過程當中，水分便經由不同離子的吸收、排出進出道上皮之間幫助營養分子的消化與吸收(Powell, 1995)。

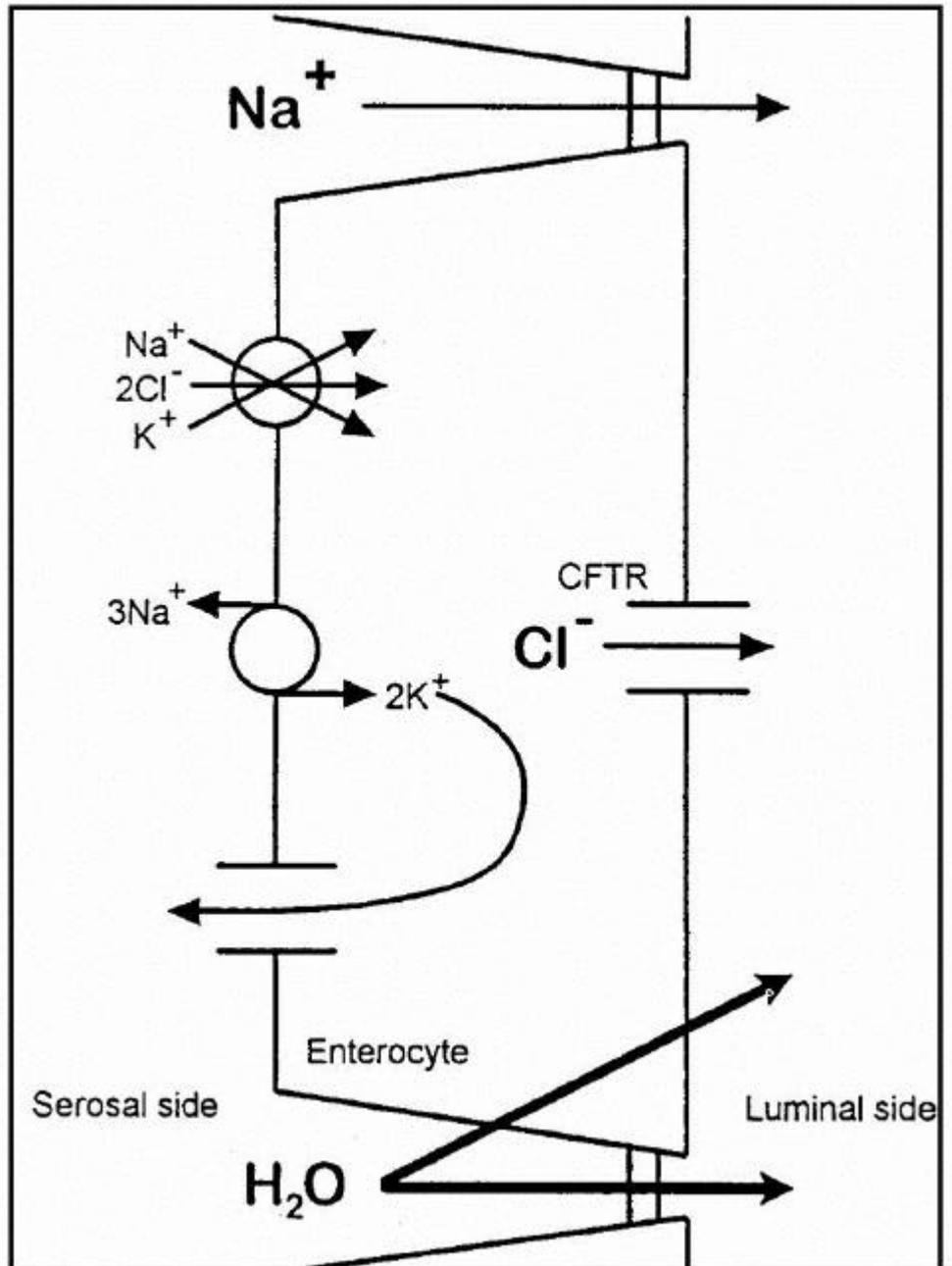
以腸腔鈉離子的吸收而言，小腸細胞在底側端的膜上有鈉鉀幫浦分子($\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump 即 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase)，以耗能方式主動運輸將細胞內的鈉離子往細胞與血液送，使細胞內鈉離子濃度降低，而在細胞頂端膜上則有鈉離子通道(Na channel)，當它打開時，外頭的鈉離子則可因為細胞內鈉離子濃度低的原因進入細胞。腸腔端的細胞膜容許鈉離子進入細胞，底側血液端的細胞膜則將細胞內鈉離子往組織血管送，如此，鈉離子便源源不絕的被細胞所吸收(附圖所示，第 9 頁)。

另外，氯離子往腸腔的分泌則是引起消化液中水分分泌的動力，過度的氯離子分泌則往往使水分移出至腸腔太多而引起腹瀉。有關小腸上皮氯離子分泌的機制是細胞在底側端的膜上有 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter，以耗能主動運輸的方式將組織間的氯離子往細胞內送，使細胞內氯離子濃度升高，而在細胞頂端膜上則有氯離子通道(Cl channel)，當它打開時，細胞內的氯離子則可因為細胞外氯離子濃度低的原因離開細胞，如此引起氯離子分泌(附圖所示，第 10 頁)。腸道上皮細胞在受到毒素、藥物、或發炎物質的刺激之後，細胞會增加氯離子的分泌，因此在腸道上皮細胞增加氯離子分泌，水分跟著往腸腔移動，過多的水分於是留在腸道，並且隨著糞便排出，因而造成腹瀉。



腸道細胞中鈉離子的吸收與水分移動

鈉由內腔進入表皮細胞是經由位於腔內膜上的鈉離子通道的擴散。鈉的擴散進入細胞是因為細胞內的鈉濃度低，這是由於 Na^+ , K^+ -ATPase 幫浦將鈉主動運送出另一側的底側膜之故。因為鈉濃度的改變就伴隨著兩側的水濃度產生變化，使得水由表皮細胞低鈉側往高鈉側經滲透而移動。



腸道細胞中氯離子的分泌

腸道在底側端的膜上有 Na^+ - K^+ - 2Cl^- cotransporter，以耗能主動運輸的方式將組織間的氯離子往細胞內送，使細胞內氯離子濃度升高，而在細胞頂端膜上則有氯離子通道(Cl^- channel)，當它打開時，細胞內的氯離子則可因為細胞外氯離子濃度低的原因離開細胞，如此引起氯離子分泌。

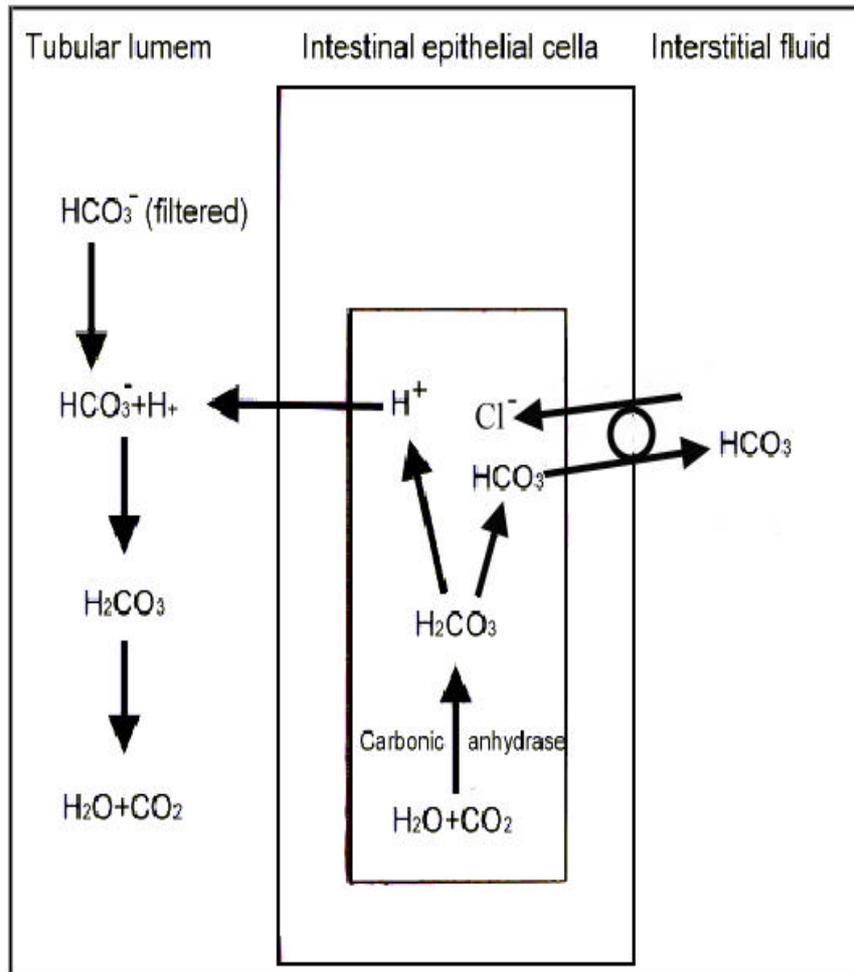
腸道上皮細胞中除了主要的鈉離子和氯離子移動之外，其他離子的移動也常受到研究者注意。例如鉀離子的移動機制為：鉀離子在腸道主要是靠被動吸收，腸道上皮吸收物質，因此造成兩側濃度的改變，伴隨著兩側的水濃度產生變化，使得水由表皮細胞低濃度側往高濃度側經滲透而移動被吸收，鉀離子會因水的吸收而經擴散作用被吸收。當細胞內的鉀離子濃度過高時，會造成細胞內的鉀離子有向細胞外被動擴散的驅力，如此使得鉀離子分泌。

重碳酸鹽 (HCO_3^-) 離子的移動機制則是：首先在腸細胞內碳酸酐酶將二氧化碳與水分子結合產生碳酸 (H_2CO_3)，碳酸馬上會解離成氫離子和重碳酸鹽，重碳酸鹽會經 HCO_3^- , Cl^- exchangers 穿過底側細胞膜到組織間液，然後進入血中，完成重碳酸鹽 (HCO_3^-) 的吸收。同時氫離子經細胞頂端膜上的 H^+ , K^+ -ATPase 或是 Na^+/H^+ exchangers 被分泌至管腔中。腸腔腔室側並沒有直接主動運輸 HCO_3^- 的 pump， HCO_3^- 的再吸收完全依賴腸道對氫離子的分泌(附圖所示，第 12 頁)。

腸道上皮組織離子運送研究方法

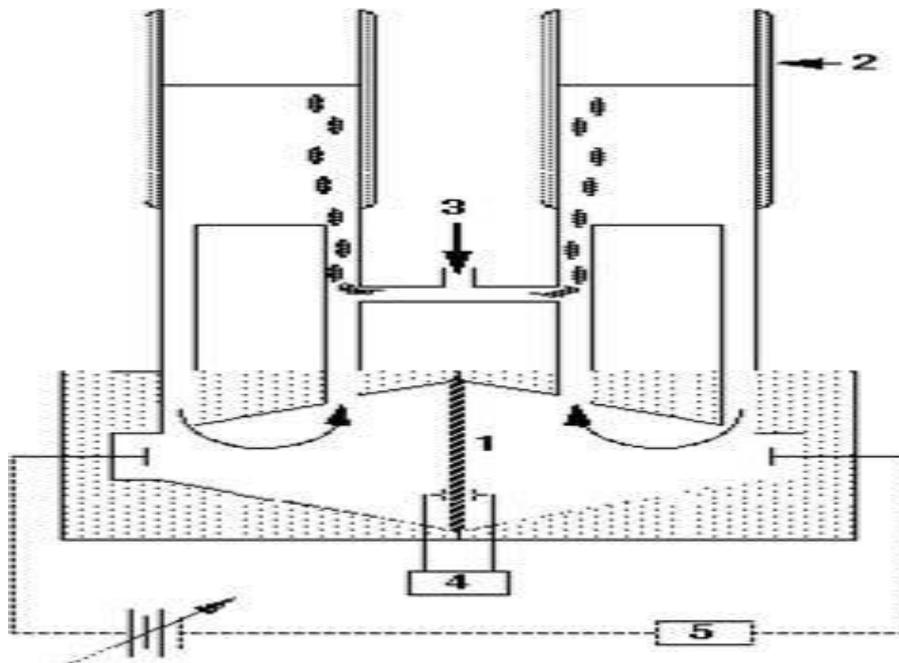
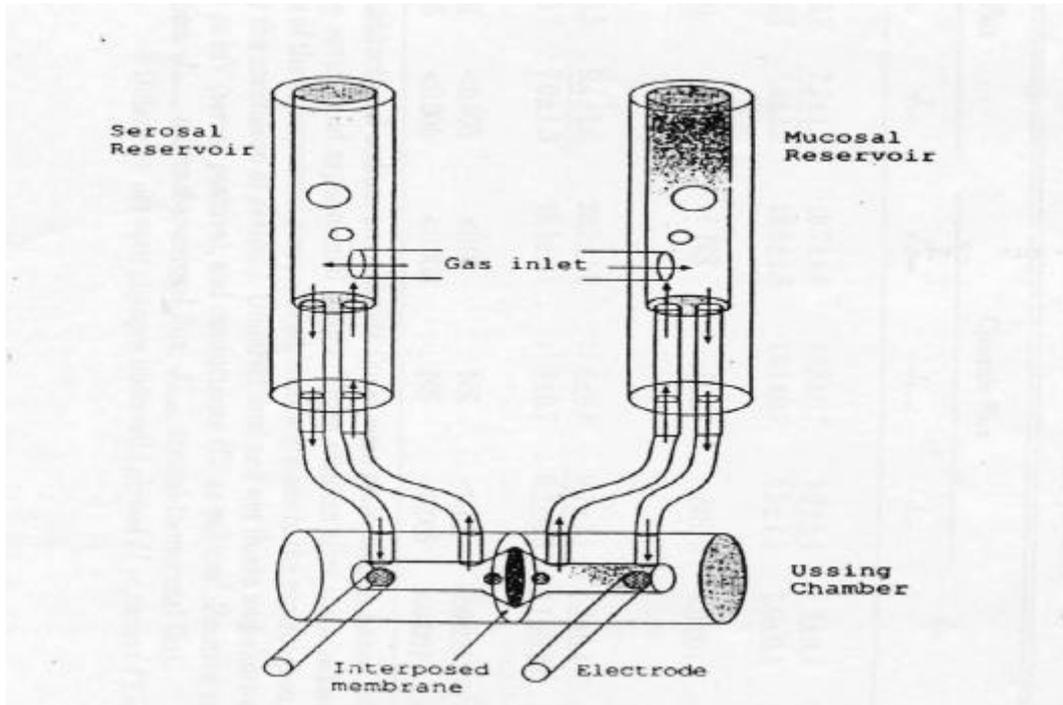
通透腸道黏膜的物質，小的如 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} 等離子，經過胃腸消化後的單糖、氨基酸、脂肪酸，膽固醇等小分子，甚至是一些特定的大分子也會經由腸道上皮細胞的吸收進入體內循環而為各器官所利用(Kimm, *et al.* 1994; Gall, 1998; Kiliaan, *et al.* 1998)。研究者們便利用這些物質的特性而發展出許多研究腸道上皮物質通透的方法。例如，上皮組織內外離子通透活動產生的離子流會改變細胞兩端的電位差異，這些數據可以利用電壓/電流測量儀及紀錄器測量得知。利用 Ussing chamber 技術(附圖所示，第 13 頁)，在研究腸道上

皮組織的離子通透中，Ussing chamber 是常被利用的實驗技術 (Kurkchubasche, *et al.* 1998; Gabriel, *et al.* 1999)。



重碳酸鹽的移動

(1) 主動分泌氫離子到腸腔 (2) 重碳酸根離子與氫離子結合行成碳酸後，分解成二氧化碳，被再吸收。



Ussing chamber

- 1 上皮組織 2. 漿膜端 加 buffer & 黏膜端加 buffer
 3. 95% O₂ 5% CO₂ 4. 測電壓的電極 5. 測電流的電極

Ussing chamber 的設計是將上皮組織夾於兩空槽之間，上皮組織的黏膜端與漿膜端因此可分別浸置於不同溶液中，兩邊的溶液中也分別插入電極以測量上皮組織的電流(short-circuit current) 或者是兩邊的電位差(potential difference)。上皮細胞兩端離子通透的變化會造成 Short-circuit current 或者是 potential difference 的改變。藉以測量上皮細胞兩端電位及電流的差異，並根據歐姆定律計算出該上皮組織的電阻，是研究腸道上皮組織的離子通透常用且信賴度高的方法之一。

以腸道上皮細胞鈉離子的主動而言，因為有正負離子，所以兩邊會產生電位的差異，要如何知道在腸腔中有多少的離子在流動，利用 Ussing chamber system 就可以外加一個和腸腔裡面反方向的電流，將裡面離子流動所產生的電流嵌制住，所外加的這個電流就叫做短路電流(short circuit current)，而將電流所嵌制住的動作叫做 Voltage clamp，因此所測得的短路電流(short circuit current)就等於腸腔裡面離子移動所產生的電流，所以利用 Ussing chamber system 所測得的電流就代表腸道上皮細胞兩端離子通透的變化。

另一種常用的方法則是利用同位素標定分子，將這些分子加入上皮組織的一端，然後在另一端收集組織液測定其內同位素含量，便可推算特定分子在上皮細胞間的流動速率，並藉此比較不同處理下腸道上皮通透性的差異(Auchere, 1998)。然而，測定同位素所需之閃爍計數儀較為昂貴，同時後續的廢棄物處理更是費時費工，因此利用 Ussing chamber system 是近來較為廣泛採用的方法，這個方法可以取代過去同位素標定方法來研究上皮細胞離子運送的研究。

相關研究簡介

有關草藥或是植物成分影響腸道上皮組織的研究並不多，日本研究者曾抽取半夏瀉心湯有效成分，命名 TJ-14 研究它治療腹瀉的機制。TJ-14 對於上消化系統以及胃部疾病的治療均有效。TJ-14 曾經用於胃炎的模式來研究它的作用機轉 (Harasawa, *et al.* 1993; Kobayashi, *et al.* 1994)。TJ-14 對於下消化系統、慢性腹瀉及炎症所引起的腹瀉也有效 (Kawagoe, *et al.* 1994)。Kase,*et al.* 在 1996,1997 對 TJ-14 作了詳細的研究，證實 TJ-14 可以抑制細菌感染 (霍亂毒素) 所導致的腸道上皮細胞離子與水分的分泌。

半夏瀉心湯,出至傷寒論，成分包含有：半夏、黃芩、甘草、大棗、人參、乾薑、黃連，時常被用於治療急性和慢性的腸胃炎及腹瀉 (Kase, *et al.*1996)。實驗研究結果發現 TJ-14 可以抑制 castor oil 所引起的腹瀉，顯然 TJ-14 可以治療 inflammatory diarrhea(Kawagoe, *et al.*1994)。serotonin(5-HT)以及 PGE₂ 在霍亂毒素所引起的腸道水分分泌增加中扮演重要角色(Beubler, *et al.*1989,1990)。研究顯示 TJ-14 可以抑制腸道中 prostaglandin E₂ 的量，以及增加水分的吸收，因此 TJ-14 對於細菌感染所引發的腹瀉是有效的(Kase, *et al.*1998)。霍亂毒素所導致的腹瀉是經由增加腸道中 cAMP 所造成的，cAMP 會刺激腸道中氯離子及水分的分泌，引起腹瀉(Beubler, *et al.*1989, 1990)。TJ-14 可以抑制霍亂毒素所導致的腹瀉，但無法抑制因為 serotonin(5-HT)所引起的腸道蠕動增加而導致的腹瀉，顯示 TJ-14 的止瀉機制是去抑制腸道上皮細胞離子與水分的分泌，然而對於因為腸道蠕動增加所引起的腹瀉則無效(Kase, *et al.*1996)。

另一種在南美常使用的止瀉物質 SP-303，是從植物 *Croton lechleri* 中所萃取出的一種乳汁成分(Ubillas, *et al.* 1994)。研究者利用 Cholera toxin 處理腸道上皮細胞，引發氯離子及水分的分泌，再給予 SP-303，發現 SP-303 可以抑制霍亂毒素所導致的氯離子及水分的分泌，且 SP-303 具有 dose dependent 的效能。若是先給予 SP-303，再給予 forskolin(此藥劑引發細胞內 cAMP 增加並導致 Cl⁻分泌)，發現 forskolin 所引起的 Cl⁻分泌會減少，因此研究證實 SP-303 可以抑制 forskolin 所引起的 Cl⁻分泌。給予 forskolin 引起 Cl⁻分泌，再給予 SP-303 (100 μM, 300 μM)，發現當 SP-303 給予到 300 μM 時，可以完全抑制 forskolin 所引起的 Cl⁻分泌。SP-303 在動物的實驗中證實具有抑制 Cholera toxin 所引起的腹瀉，同時也可以抑制因 cAMP 所引起的氯離子及水分的分泌，因此 SP-303 可以證實是有用的治療腹瀉的藥 (Gabriel, *et al.* 1999)。

由這些研究得知，離子運送與水分移動的改變是導致腹瀉主要的原因，因此在研究腹瀉藥物或是止瀉藥物的藥理機制中，研究它們對於腸道上皮離子移動的影響應是首先要探討的項目。

本篇論文的研究主要內容包括

- 1.利用 Ussing chamber system 測量具止瀉功能中草藥鴉膽子、黃連、苦參、秦皮、黃柏及具有瀉下功能中草藥大黃、巴豆、牽牛子、火麻仁等藥材酒精及水抽出物對於大白鼠小腸上皮組織離子運送的影響。
- 2.探討這些藥材抽出物與鈉離子與氯離子移動的關係。

貳、材料與方法

一、實驗動物

實驗動物為體重介於 250~300g 之 Sprague-Dawley(SD)雄性大白鼠，均購自國家科學實驗動物中心，並以實驗鼠專用飼料餵食。在飼養室適應期間，一籠飼養動物數目以 4-5 隻為限，除了實驗前 24 小時限制食物外，其他時間均不限制飲水和食物，環境維持在 22 ± 1 。

二、實驗材料

止瀉藥材: 黃連、鴉膽子、秦皮、苦參、黃柏。

瀉下藥材: 牽牛子、火麻仁、大黃、巴豆。

上述藥材購自中國醫藥學院附近的中西醫聯合藥局。

三、電極的製作

取 KCl 5.592g，Agarose 0.5g 加水 25ml，加熱至粉末消失，液體呈透明狀，稍微冷卻，利用滴管將液態 Agarose (*VEGONIA*) 裝入塑膠空管中，凝固後將長的塑膠空管接紅色電極棒(Ag/AgCl)，短的塑膠空管接藍色電極棒(接上之前先滴 1~2 滴 3M KCl)。

四、短路電流之量測紀錄：

電壓箝制與短路電流的紀錄係利用兩組銀/氯化銀(Ag/AgCl)電極，每一電極一端經銀導線接於電壓電流箝位儀 (Voltage/current clamp EVC 2000, WPI, U.S.A.)，另一端氯化銀則裹上可增加導電的 3M KCl Agarose 置於上皮組織一邊溶液之內。兩組電極中，一組電極作為箝制電壓用，另一組電極則作為紀錄短路電流的變化。實驗步驟是將腸道組織剪開成一平面，夾於 Ussing chamber 中，黏膜端槽中注

入細胞培養液(Krebs-Henseleit solution) , 漿膜端槽中注入細胞培養液但含欲測定中藥酒精及水的抽出物, 黏膜端及漿膜端通入氣體後, 藉由測量離子電流與電位差的不同變化, 推測離子的通透活動。

五、實驗方法

樣品處理：中藥藥材各取 20g, 置 200 ml 乙醇, 及水, 將中藥藥材分別加入乙醇或水中, 加熱溶解煮沸 30 分鐘後, 取上清液利用利用減壓濃縮機(EYELA, VACUUM EVAPORATOR N-N SERIAS, JAPAN)加熱濃縮至約 5 ml。將濃縮好的中藥利用冷凍乾燥機乾燥, 48 小時後收取樣品(表一, 表二)。為了確定實驗中所加入的藥材不會因為本身所含的 Na^+ 離子濃度過高而影響電流, 因此將實驗所使用藥材送至中研院作離子成分分析, 結果如表三。

六、實驗步驟

大白鼠禁食 24 小時後以過量乙醚麻醉犧牲, 並固定於解剖台上, 將皮層縱切約 3 公分, 以顛子將皮層向兩側拉開, 剖開腹腔取出靠近盲腸之迴腸, 將之剪成每段約 2 cm 的長度, 於解剖顯微鏡下以細鑷移除漿膜及部分肌肉層, 將腸管剪開成一平面後, 用 saline 清洗, 固定於 Ussing chamber 中, 上皮組織兩側槽中分別注入 Krebs-Henseleit solution, 並通入混和氣體 (95% O_2 + 5% CO_2) at 37 測量離子電流。Krebs-Henseleit solution 的成分(in mM) : NaCl 118, KCl : 4.7, CaCl_2 : 2.5, MgSO_4 : 1.2, KH_2PO_4 : 1.2, NaHCO_3 : 25.0, glucose : 11.1 (Mercks, U.S.A.)。

實驗一：比較止瀉及瀉下中藥酒精抽出物和水抽出物對 Cl⁻分泌所引發之上升短路電流的影響。

1. 氯離子分泌之引發：

腸道上皮離子電流穩定約 30min 後，於漿膜端加入 5 μl forskolin (final concentration=5 μM) (Sigma, U.S.A.)，此藥劑引發細胞內 cAMP 增加並導致 Cl⁻分泌，Isc(短路電流)上升變化 (氯離子的主動分泌促使水分子被動進入腸腔，引發腹瀉)。

2. 具止瀉與瀉下功能中草藥對於腸表皮氯離子運輸之影響：

forskolin 導致 Cl⁻分泌，Isc(短路電流)上升變化穩定約 20min 後，在漿膜端加入中藥酒精抽出物或水抽出物濃縮液 25 μl，觀察比較其止瀉及瀉下中藥酒精抽出物和水抽出物對 Cl⁻分泌所引發上升之短路電流的影響。

實驗二：探討具止瀉及瀉下功能中藥酒精抽出物是否經由影響腸道上皮離子 Na⁺或是 Cl⁻的 transport 而影響短路電流。

1. 氯離子分泌之引發：

腸道上皮離子電流穩定約 30min 後，於漿膜端加入 5 μM forskolin，此藥劑引發細胞內 cAMP 增加並導致 Cl⁻分泌，Isc(短路電流)上升變化 (氯離子的主動分泌促使水分子被動進入腸腔，引發腹瀉)。

2. 藥材酒精抽出物對鈉離子與氯離子移動的影響：

小腸上皮組織在以 forskolin 刺激氯離子分泌後，於漿膜端再分別加入與鈉離子主動運輸有關的 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 抑制劑 Ouabain (100 μM) (Gabriel, *et al.* 1999) (Sigma, U.S.A.), 或與氯離子主動運輸有關的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter 抑制劑 Bumetanide (100 μM) (Sigma, U.S.A.), 觀察在抑制了鈉離子與氯離子的主動運輸之後，各項藥材酒精抽出物對短路電流的影響，以了解它們與鈉離子和氯離子運送的關係。

實驗三：探討苦參酒精抽出物是否確定經由影響腸道上皮 Na^+ 離子的 transport 而影響短路電流及秦皮酒精抽出物是否確定經由影響腸道上皮 Cl^- 離子的 transport 而影響短路電流。

1. 氯離子分泌之引發：

腸道上皮離子電流穩定約 30min 後，於漿膜端加入 5 μM forskolin，此藥劑引發細胞內 cAMP 增加並導致 Cl^- 分泌， I_{sc} (短路電流) 上升變化 (氯離子的主動分泌促使水分子被動進入腸腔，引發腹瀉)。

2. 苦參酒精抽出物對鈉離子移動的影響：

小腸上皮組織在以 forskolin 刺激氯離子分泌後，在漿膜端加入苦參酒精抽出物濃縮液 25 μl ，再加入與鈉離子主動運輸有關的 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 抑制劑 Ouabain (100 μM)，觀察苦參酒精抽出物在抑制了短路電流之後，給予 Ouabain 是否還可以抑制電流。

3. 秦皮酒精抽出物對氯離子移動的影響：

小腸上皮組織在以 forskolin 刺激氯離子分泌後，在漿膜端加入秦皮酒精抽出物濃縮液 25 μ l，再加入與氯離子主動運輸有關的 Na^+ - K^+ - 2Cl^- cotransporter 抑制劑 Bumetanide (100 μ M)，觀察秦皮酒精抽出物在抑制了短路電流之後，給予 Bumetanide 是否還可以抑制電流。

七、統計分析

實驗結果各種參數，以 mean \pm SEM 表示，並採『one way ANOVA repeated measure』檢定各種處理間的差異，再以『Paired t-test』做組間比較。機率小於 0.05 者($P < 0.05$)及視為有統計上之顯著差異。

參、結果

大白鼠腸道上皮在架上 Ussing chamber 後，箝制上皮兩端電壓同時，可測得上皮間一短路電流，此電流約在 $40\mu\text{A}$ 左右，為上皮細胞進行正常離子主動運輸所造成。在漿膜端加入 $5\mu\text{M}$ forskolin，引發細胞內 cAMP 增加並導致氯離子分泌增加，而使短路電流驟升至 $70\mu\text{A}$ 上下，此上升之短路電流通常可持續一兩個小時，如圖一所示。

實驗一：具止瀉與瀉下功能中草藥酒精及水抽出物對於經 forskolin 刺激腸道上皮短路電流的影響：

酒精抽出物

具止瀉功能之中草藥黃連、鴉膽子、秦皮、苦參、黃柏酒精抽出濃縮物質均則可使接受 forskolin 刺激之大白鼠腸道上皮短路電流下降。以下為各藥材對於腸道上皮短路電流的影響：

黃柏：接受 forskolin 刺激大白鼠腸道上皮，在加入黃柏酒精抽出物後，短路電流明顯下降(圖二)，來自六隻大白鼠腸道上皮組織之平均下降值為 $7.0 \pm 2.4 \mu\text{A}$ ，經 Paired t-test 與對照組數值有顯著差異(表四)。

黃連：接受 forskolin 刺激大白鼠腸道上皮，在加入黃連酒精抽出物後，短路電流明顯下降，平均下降值為 $13.5 \pm 8.4 \mu\text{A}$ 。

鴉膽子：接受 forskolin 刺激大白鼠腸道上皮，在加入鴉膽子酒精抽出物後，電流下降，平均下降值為 $8 \pm 3.03\mu\text{A}$ 。

秦皮：接受 forskolin 刺激大白鼠腸道上皮，在加入秦皮酒精抽出物後，短路電流下降(圖三)，平均值下降值為 $9.0 \pm 2.0\mu\text{A}$ 。

苦參：接受 forskolin 刺激大白鼠腸道上皮，在加入苦參酒精抽出物後，電流下降，平均下降值為 $5.6 \pm 1.7\mu\text{A}$ 。

在五種止瀉功能之中草藥中，黃連酒精抽出物對短路電流影響較黃柏、苦參、鴉膽子、秦皮四種藥材酒精抽出物為高（圖六）。

具瀉下功能之中草藥酒精抽出濃縮物質則可使接受 forskolin 刺激之大白鼠腸道上皮短路電流上升。以下為各藥材對於腸道上皮短路電流的影響：

巴豆：接受 forskolin 刺激大白鼠腸道上皮，在加入巴豆酒精抽出物後，短路電流明顯上升（圖四），來自六隻大白鼠腸道上皮組織之平均上升值為 $14.6 \pm 3.0 \mu\text{A}$ ，經 Paired t-test 與對照組數值有顯著差異（表四）。

牽牛子：接受 forskolin 刺激大白鼠腸道上皮，在加入牽牛子酒精抽出物後，短路電流明顯上升，平均上升值為 $18.33 \pm 4.08\mu\text{A}$ 。

火麻仁：火麻仁酒精抽出物可使接受 forskolin 刺激大白鼠腸道上皮之短路電流再上升，平均上升值為 $13.33 \pm 2.87\mu\text{A}$ 。

大黃：接受 forskolin 刺激之大白鼠腸道上皮短路電流再加入大黃酒精抽出物，可使電流再度上升（圖五），平均上升值為 $14.33 \pm 3.07\mu\text{A}$ 。

在四種具瀉下功能之中草藥中，牽牛子酒精抽出物對短路電流的影響較火麻仁、大黃、巴豆酒精抽出物為高（圖六）。

水抽出物

具止瀉功能之中草藥水抽出濃縮物質可使接受 forskolin 刺激

之大白鼠腸道上皮短路電流下降。接受 forskolin 刺激大白鼠腸道上皮之短路電流，在加入黃柏水抽出物後，短路電流明顯下降，來自三隻大白鼠腸道上皮組織之平均下降值為 $3.3 \pm 1.15\mu\text{A}$ 。黃連、鴉膽子、秦皮、苦參之作用類似黃柏（表五）。

具瀉下功能之牽牛子、火麻仁、大黃、巴豆水抽出濃縮物則可加強接受 forskolin 刺激大白鼠腸道上皮之短路電流。接受 forskolin 刺激大白鼠腸道上皮之短路電流，在加入巴豆水抽出物後，電流明顯上升，來自三隻大白鼠腸道上皮組織之平均上升值為 $6.67 \pm 2.1\mu\text{A}$ ，經 Paired t-test 與對照組數值有顯著差異。牽牛子、火麻仁、大黃之結果類似巴豆（表五）。

比較藥材酒精抽出濃縮物質和水抽出濃縮物質可看出藥材酒精抽出物質明顯的比水抽出濃縮物質對於接受 forskolin 刺激大白鼠腸道上皮之短路電流更具有影響性。

實驗二：鈉離子與氯離子移動與實驗藥材酒精抽出物影響腸道上皮短路電流之關係

接受 forskolin 刺激大白鼠腸道上皮之短路電流之後分別給予 Ouabain 及 Bumetanide 處理，再加入藥材酒精抽出物，腸道上皮短路電流變化值如下

秦皮：以 Ouabain 處理，再加秦皮酒精抽出物，短路電流變化值為 $7.16 \pm 2.78\mu\text{A}$ ，與對照組（ $9.0 \pm 2.0\mu\text{A}$ ）差異不甚明顯。以 Bumetanide 處理，再加秦皮酒精抽出物，短路電流變化值則為 $3.0 \pm 2.60\mu\text{A}$ ，與對照組則有明顯差異（ $p=0.001$ ）（圖七）。

黃連：以 Ouabain 處理，再加黃連酒精抽出物，短路電流變化值

為 $8.5 \pm 2.16\mu\text{A}$ ，與對照組 ($13.5 \pm 8.38\mu\text{A}$) 差異不甚明顯 ($p=0.187$)。以 Bumetanide 處理，再加黃連酒精抽出物，短路電流變化值則為 ($7.0 \pm 1.54\mu\text{A}$) 與對照組 ($p=0.09$) 差異不明顯(圖八)。

苦參：以 Ouabain 處理，再加苦參酒精抽出物，短路電流變化值為 $3.16 \pm 1.72\mu\text{A}$ ，與對照組($5.6 \pm 1.75\mu\text{A}$)有明顯差異($p=0.031$)。以 Bumetanide 處理，再加苦參酒精抽出物，短路電流變化值則為 $5.0 \pm 2.09\mu\text{A}$ ，與對照組差異不甚明顯 ($p=0.56$) (圖九)。

大黃：以 Ouabain 處理，再加大黃酒精抽出物，短路電流變化值為 $7.66 \pm 1.96\mu\text{A}$ ，與對照組($14.33 \pm 3.07\mu\text{A}$)差異明顯($p=0.001$)。以 Bumetanide 處理，再加大黃酒精抽出物，短路電流變化值則為 $2.66 \pm 1.86\mu\text{A}$ ，與對照組也有明顯差異 ($p=0.00001$) (圖十)。

巴豆：以 Ouabain 處理，再加巴豆酒精抽出物，短路電流變化值為 $7.83 \pm 2.48\mu\text{A}$ ，與對照組 ($14.66 \pm 3.01\mu\text{A}$) 差異明顯 ($p=0.0015$)。以 Bumetanide 處理，再加巴豆酒精抽出物，短路電流變化值則為 $4.5 \pm 2.34\mu\text{A}$ ，與對照組也有明顯差異 ($p=0.00006$) (圖十一)。

火麻仁：以 Ouabain 處理，再加火麻仁酒精抽出物，短路電流變化值為 $8.16 \pm 1.72\mu\text{A}$ ，與對照組($13.33 \pm 2.87\mu\text{A}$)差異明顯 ($p=0.003$)。以 Bumetanide 處理，再加火麻仁酒精抽出物，短路電流變化值則為 $5.66 \pm 2.16\mu\text{A}$ ，與對照組也有明顯差異 ($p=0.003$) (圖十二)。

實驗三：苦參酒精抽出物對鈉離子移動影響及秦皮酒精抽出物對氯離子移動影響的實驗：

接受 forskolin 刺激大白鼠腸道上皮，給予苦參酒精抽出物，短路電流平均下降值為 $7.75 \pm 1.71 \mu\text{A}$ ，再以 Ouabain 處理，短路電流變化值再度下降，平均下降值為 $25 \pm 3.31 \mu\text{A}$ 與對照組(接受 forskolin 刺激之後給予 Ouabain) 電流平均值下降值 ($41 \pm 12.41 \mu\text{A}$) 差異明顯(圖十三)。

接受 forskolin 刺激大白鼠腸道上皮，給予秦皮酒精抽出物，短路電流平均下降值為 $10.5 \pm 6.05 \mu\text{A}$ ，再以 bumetanide 處理之後，短路電流變化值再度下降，平均下降值為 $20.25 \pm 9.17 \mu\text{A}$ 與對照組(接受 forskolin 刺激之後給予 bumetanide) 電流平均下降值($36.33 \pm 10.63 \mu\text{A}$)差異明顯(圖十四)。

肆、討論

本研究主要以 Ussing Chamber 連結電壓 (voltage clamp) 紀錄儀技術，研究中草藥中具止瀉及瀉下功能藥材對於大白鼠腸道上皮組織離子運送的影響，研究結果相信可以提供中藥治病更多的支持證據，並能夠應用於研究各類物質對於腸道上皮離子運送與腸道上皮細胞間分子通透性的影響。

具止瀉與瀉下功能中草藥酒精及水抽出物對於經 forskolin 刺激腸道上皮短路電流的影響

具止瀉功能中草藥黃柏、黃連、秦皮、苦參、鴉膽子酒精及水抽出物可抑制接受 forskolin 刺激之大白鼠腸道上皮短路電流，具瀉下功能中草藥火麻仁、巴豆、牽牛子、大黃酒精及水抽出物，則可增加接受 forskolin 刺激大白鼠腸道上皮之短路電流。由於 forskolin 的作用是增加細胞內 cAMP 以加速氯離子的排出，因此這些藥材很可能與氯離子的移動有關，因此能夠影響腸道上皮間的短路電流。

另一方面，止瀉或是瀉下藥材的酒精抽出濃縮物對於接受 forskolin 刺激大白鼠腸道上皮短路電流的影響較水抽出物質為高，包括有黃柏、黃連、鴉膽子、秦皮、火麻仁、巴豆、牽牛子、大黃酒精抽出濃縮物，這可能是所使用藥材的有效成分較容易由酒精抽出。

鈉離子以及氯離子移動與實驗藥材酒精抽出物影響腸道上皮短路電流之關係

在第二部分的實驗中，利用 ouabain 及 bumetanide 探討止瀉藥秦

皮、黃連、苦參，瀉下藥大黃、巴豆、火麻仁等六種藥材酒精抽出物與鈉離子氯離子移動的關係，以下為各藥材實驗之結果分析。

秦皮：接受 forskolin 刺激之大白鼠腸道上皮，以 ouabain 抑制了鈉離子主動運送之後，秦皮酒精抽出物仍然能夠使短路電流下降，而以 bumetanide 抑制了氯離子主動運送之後，秦皮酒精抽出物則無法再抑制短路電流（圖七）。相反的，若是先加秦皮酒精抽出物，再加 bumetanide（圖十四），結果顯示加入 bumetanide 後秦皮酒精抽出物所能抑制的短路電流減少了。由此可推論，秦皮應該能夠抑制氯離子分泌，所以使得後來所加的 bumetanide 抑制氯離子的移動減少。因此，秦皮應是藉由抑制氯離子的分泌而抑制腸道上皮之間的短路電流。

黃連：接受 forskolin 刺激之大白鼠腸道上皮，給予 Ouabain 抑制了鈉離子主動運送之後，黃連酒精抽出物仍然能夠抑制短路電流，而以 bumetanide 抑制了氯離子主動運送之後，黃連酒精抽出物依舊也可以抑制短路電流，使腸道上皮細胞短路電流下降（圖八）。因此，黃連酒精抽出物的作用應該和氯離子或鈉離子的運輸較無直接關聯，黃連有可能是影響其他的離子，如 HCO_3^- 或是鉀離子等的移動，或是其他因素，如神經性或免疫性的因子（敘述於後）而使短路電流下降。

苦參：接受 forskolin 刺激之大白鼠腸道上皮，並以 ouabain 抑制了鈉離子主動運送之後，苦參酒精抽出物便無法使短路電流下降，而以 bumetanide 抑制了氯離子主動運送之後，苦參酒精抽出物則可再抑制短路電流（圖九）。在另一組實驗中，當先加苦參酒精抽出物再加 ouabain，發現 ouabain 所能夠抑制的電流減少了（圖十三）。根據這兩項結果，可以推測苦參酒精抽出物可能是藉由影響鈉離子的運輸而

影響腸道上皮之間的短路電流。

大黃：接受 forskolin 刺激之大白鼠腸道上皮，分別再以 ouabain 或 bumetanide 處理的實驗結果顯示，大黃酒精抽出物使短路電流上升似乎和與氯離子及鈉離子的運送均有關係，因為以 bumetanide 抑制了氯離子主動運送之後，大黃酒精抽出物刺激短路電流上升的程度明顯降低（圖十）。以 ouabain 抑制了鈉離子主動運送之後，大黃酒精抽出物刺激短路電流上升的程度也減少，但是較 bumetanide 的作用為低（圖十）。由此結果推測，大黃酒精抽出物主要是刺激氯離子的分泌，因而使短路電流上升。至於為什麼 ouabain 也能降低大黃酒精抽出物刺激短路電流上升的程度，也許是因為氯離子的分泌雖是與底側細胞膜的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter 有關，但是此一氯離子分泌作用同時需要 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 主動將鈉離子由細胞內打到細胞外，以使細胞外有較多的鈉離子，如此 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter 才能將細胞外的 Cl^- 打到細胞內，氯離子再經由細胞頂端膜上的氯離子通道(Cl^- channel) 分泌，因而使短路電流上升，因此 ouabain 的處理也能部分地影響大黃酒精抽出物刺激氯離子分泌作用。

巴豆與火麻仁酒精抽出物結果與大黃類似，推測巴豆酒精抽出物主要影響氯離子的分泌而使短路電流上升，因為以 bumetanide 抑制了氯離子主動運送之後，巴豆酒精抽出物刺激短路電流上升的程度明顯降低（圖十一），以 ouabain 抑制了鈉離子主動運送之後，巴豆酒精抽出物刺激短路電流上升的程度也減少，但是較 bumetanide 的作用為低（圖十一）。火麻仁酒精抽出物主要也是刺激氯離子的分泌，因而使短路電流上升，因為以 bumetanide 抑制了氯離子主動運送之後，火麻仁酒精抽出物刺激短路電流上升的程度明顯降低（圖十二），以

ouabain 抑制了鈉離子主動運送之後，火麻仁酒精抽出物刺激短路電流上升的程度也減少，但是較 bumetanide 的作用為低（圖十二）。

總之，瀉下藥大黃、巴豆、火麻仁、牽牛子酒精抽出物可使接受 forskolin 刺激之大白鼠腸道上皮短路電流上升，其中大黃、巴豆、火麻仁主要是藉由刺激氯離子的排出而使短路電流上升。止瀉藥黃連、黃柏、苦參、鴉膽子、秦皮酒精抽出物可使接受 forskolin 刺激之大白鼠腸道上皮短路電流下降，其中苦參可能是藉由抑制鈉離子的運送而使短路電流下降，秦皮則可能是藉由影響氯離子的運送而使短路電流產生變化。

本實驗結果與其他相關研究結果的比較

本論文所研究止瀉藥的實驗結果與 SP303(Gabriel, *et al.* 1999) , TJ14(Kase, *et al.*1998)結果類似，藥材都是藉由影響腸道上皮細胞離子運送而影響水分的吸收及分泌，因此結果符合先前預期，具止瀉或瀉下功能中草藥是藉由影響腸道上皮細胞離子運送的改變因而具有止瀉或瀉下功能。

然而，在影響離子運送的機制上，則有所差異。SP303 , TJ-14 的研究報告指出它們是經由抑制氯離子的排出而具有止瀉功能。本研究實驗結果顯示，秦皮酒精抽出物很可能也是藉由影響氯離子的運送而具有止瀉功能。苦參酒精抽出物則可能是影響鈉離子的運輸而具有止瀉功能，黃連則和鈉離子以及氯離子運送較無關，因此苦參、黃連和 SP303 , TJ-14 影響腸道離子運送的機制並不相同。

瀉下藥大黃、巴豆、火麻仁等酒精抽出物則可能都是經由刺激氯

離子的排出而具有瀉下功能。

其它可能影響腸道上皮離子通透的因子與本研究的關係

影響腸道上皮吸收和分泌功能的外在因素很多，許多細菌所引起之腸道下痢(diarrhea)便是由於致病分子改變了細胞對於離子通透所引起，例如霍亂弧菌毒素(cholera toxin)可以刺激腸道上皮細胞膜上之 G 蛋白質，而引發一連串細胞內訊息傳遞而導致氯離子往黏膜端的分泌增加(Fondacaro, *et al.* 1986)。另外如大腸桿菌(*E. coli*)，沙門氏菌(*Salmonella typhimurium*)，變形菌(*Proteus mirabilis*)等細菌也會改變腸道細胞的結構而改變腸道上皮組織對於物質的通透性(Kurkchubasche . *et al.*1998)。

另外，內在因素包括免疫及神經的影響，免疫反應所引發之訊息分子神經傳導物質會影響離子及水份的運送 例如革蘭氏陰性菌內毒素(endotoxin)，即其細胞壁成分 lipopolysaccharide(LPS)可以增加腸道上皮細胞的通透性(Osman, *et al.* 1998; Mishima,*et al.*1999)，而 LPS 可能是透過引發腸道組織中的訊息分子如一氧化氮(nitric oxide, NO)及前列線素(prostaglandin)來影響腸道上皮對於離子或分子的通透性(Konturek, *et al.* 1998)。其他的報告也指出，利用 NO synthase 抑制劑 N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)的實驗證實了 NO 可以促進腸道的吸收 (Izzo, *et al.*1998; Schirgi-Degen and Beubler 1998 ; Mishima, *et al.*1999) 。 cytokines 具有免疫調節的功能，在腸胃道中扮演調節水分和離子運輸的角色,anti-inflammatory cytokines，例如 interleukin(IL)-10 和 IL-4 可以提高腸道 Na⁺和 Cl⁻的吸收,以及抑制 Cl⁻的分泌 (Madsen, *et al.* 1996,1997;Zund, *et al.* 1996)，然而

pro-inflammatory cytokines , 像 IL-1 和 IL-3 卻是刺激 Cl⁻的分泌 (Chiossone, *et al.* 1990; Theodorou, *et al.* 1994)。其他的報告也指出 IL-11 可以直接的作用於 neuro-epithelial , 調節腸道電解質和水分的運輸 (James, *et al.* 2000)。雖然本實驗研究中並未去探討中草藥與免疫系統之間的關係 , 不過黃連經我們的研究得知 , 不會影響氯離子或鈉離子的移動 , 因此我們推測或許黃連是跟免疫系統有關係而影響腸道上皮的通透。

由上述的研究得知 , 除了我們所研究的中草藥可以改變腸道上皮的通透之外 , 致病性分子對於腸道功能的影響也相當受到注意。所以 , 不論是有關細菌致病機制的探討 , 或者是在中草藥功能的評估 , 均不能忽略它們對於影響腸道上皮離子通透與分子吸收基礎機制的探討。

未來可繼續研究的方向

- 將所使用的中草藥作有效成份的抽出 , 比較各個成分與離子的運輸的關係 , 藉此可以更深入地了解這些中藥材的藥理機制。
- 以霍亂毒素或其他容易引起腹瀉症狀的細菌性或病毒性因子替代 foskolin 來引起氯離子分泌 , 研究具止瀉功能的中草藥是否也可以抑制霍亂毒素所引起的氯離子分泌 , 若是可以的話 , 相信實驗結果所具有的價值意義會更大。
- 本實驗中 , 黃連與鈉離子以及氯離子的移動關係並不明顯 , 針對這點 , 可以往其他方向研究黃連對於腸道上皮細胞的影響。

伍、參考文獻

- 林景彬 (1999) 中藥藥理與應用 ,p171-193. 中國醫藥學院
- 施仁潮 (1999) 胃腸病中醫保健 ,p339-345. 人民衛生出版社
- 張賢哲 (1998) 本草備要解析 ,p162-173. 中國醫藥學院
- 雷載權、張廷模 (1998) 中華臨床中藥學 ,p 434-544. 人民衛生出版社
- Auchere, D., Tardivel, S., Gounelle, J.-C., Druke, T. and Lacour, B. Role of transcellular pathway in ileal Ca^{2+} absorption: stimulation by low- Ca^{2+} diet. *Am J Physiol* 275 : G951-956, 1998.
- Barrett KE. Positive and negative regulation of chloride secretion in T84 cells. *Am J Physiol* 265: C859-C868, 1993.
- Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 23: 403-11, 1979.
- Binder HJ, Sandle GI. Electrolyte transport in the mammalian colon. In *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. LR Johnson (ed). New York, Raven Press. 1994, pp 2133-2172.
- Chiossone DC, Simon PL, and Smith PL. Interleukin-1: Effect on rabbit ileal mucosal ion transport in vitro. *Eur J Pharmacol*.180: 217-228, 1990.
- Christensen O, Bindslev N. Fluctuation analysis of short-circuit current in a warm-blooded sodium-retaining epithelium: site current, density, and interaction with triamterene. *J Membr Biol* 65: 19-30,

1982.

Class W, Durr JE, Guth D, Skadhauge E. Effects of adrenal steroids on Na transport in the lower intestine (coprodeum) of the hen. *J Membr Biol* 96: 141-52, 1987.

Field M, Fromm D, Al-Awqati Q, Greenough WB. Effect of cholera enterotoxin on ion transport across isolated ileal mucosa. *J Clin Invest* 51: 796-804, 1972.

Field M. Intestinal secretion. *Gastroenterology* 66: 1063-1084, 1974.

Fondacaro, J.D. Intestinal ion transport and diarrheal disease. *Am J Physiol* 250 : G1-8, 1986.

Gabriel, S. E., S. E. Davenport, R. J. Steagall, V. Vimal, T. Carlson, and E. J. Rozhon. A novel plant-derived inhibitor of cAMP-mediated fluid and chloride secretion. *Am J Physiol* 276 (*Gastrointest. Liver Physiol.* 39): G58-G63, 1999.

Gall, D.G. Gastrointestinal uptake of macromolecule. *Acta Paed Sin* 39: 9-11, 1998.

Hansen MB, Bindslev N. Serotonin-induced chloride secretion in hen colon. Possible second messengers. *Comp Biochem Physiol* 94A: 315-21, 1989.

Hansen MB, Skadhauge E. New aspects of pathophysiology and treatment of secretory diarrhea. *Physio Res* 44: 61-78, 1995.

Hansen MB, Thorboll JE, Christensen P, Bindslev N, Skadhauge E. Serotonin-induced short-circuit current in pig jejunum. *J Vet Med* A41: 110-20, 1994.

Holtug K, Shipley A, Dantzer V, Sten Knudsen O, Skadhauge E. Localization of sodium absorption and chloride secretion in an intestinal epithelium. *J Membr Biol* 122: 215-29, 1991.

Holtug K, Skadhauge E. Ion transport across isolated pig jejunum. *Am J Physiol* 260: G220-31, 1991.

Izzo, A.A., Mascolo, N. and Capasso, F. Nitric oxide as a modulator of intestinal water and electrolyte transport. *Digest Dis and Sci* 43: 1605-1620, 1998.

Jodal M, Holmgren S, Lundgren O, Sjoqvist A. Involvement of the myenteric plexus in the cholera toxin induced net fluid secretion in the rat small intestine. *Gastroenterology* 105: 1286-1293, 1993.

Kase, Y., Hayakawa, T, Takeda, S, Ishige, A., Aburada, M. and Okada, M Pharmacological studies on antidiarrheal effects of Hange-shashin-to. *Biol & Pharmaceut Bull* 19: 1367-70, 1996.

Kase, Y., Hayakawa, T, Takeda, S, Ishige, A., Aburada, M. and Okada, M Effects of Keishi-ka-shakuyaku-to (Gui-Zhi-Jia-Shao-Yao-Tang) on diarrhea and small intestinal movement. *Biol & Pharmaceut Bull* 22: 87-9, 1998.

Kiliaan, A.J., Saunders, P.R., Bijisma, P.B., Berin, M.C., Taminiu, J.A., Groot, J.A. and Perdue, M.H. Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. *Am J Physiol* 275: G1037-1044, 1998.

Kimberg DV, Field M, Johnson J, Henderson A, Gershon E. Stimulation of intestinal mucosal adenylyl cyclase by cholera enterotoxin and prostaglandins. *J Clin Invest* 50: 1218-1230, 1971.

Kimm, M.H., Curtis, G.H., Hardin, J.A. and Gall, D.G. Transport of bovine serum albumin across rat jejunum: role of the enteric nervous system. *Am J Physiol* 266: G186-G193, 1994.

Konturek, P.H. *et al.* Involvement of nitric oxide and prostaglandin in gastroprotection induced by bacterial lipopolysaccharide. *Scand J Gastroenterol* 33: 691-700, 1998.

Kurkchubasche A.G., Cardona, M., Watkins, S.C., Smith S.D., Albanese, C.T., Simmons, R.L., Rowe, M.I. and Ford, H.R. Transmucosal passage of bacteria across rat intestinal epithelium in the Ussing Chamber: effect of nutritional factors and bacterial virulence. *Shock* 9: 121-127, 1998.

Madsen KL, Lewis SA, Tavernini MM, Hibbard J, and Fedorak RN. Interleukin 10 prevents cytokine-induced disruption of T84 monolayer barrier integrity and limits chloride secretion. *Gastroenterology* 113: 151-159, 1997.

Madsen KL, Tavernini MM, Mosmann TR, and Fedorak RN. Interleukin 10 modulates ion transport in rats small intestine. *Gastroenterology* 111: 936-944, 1996.

McEwan GT, Schousboe B, Skadhauge E. Effect of antisecretory factor on *Escherichia coli* STs enterotoxin-induced alkalisation of pig. *Pflugers Arch* 417: 174-9, 1990.

Nolan JP, Hare DK, McDevitt JJ, Ali MV. In vitro studies of intestinal endotoxin absorption. I. Kinetics of absorption in the isolated everted gut sac. *Gastroenterology* 72: 434-9, 1977.

Osborne MP, Haddon SJ, Spencer AJ, et al. An electron microscopic investigation of time related changes in the intestine of neonatal mice infected with murine rotavirus. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 7: 236-48, 1988.

Osman, N.E., Westrom, B. and Karlsson, B. Serosal but not mucosal endotoxin exposure increases intestinal permeability in vitro in the rat. *Scand J Gastroenterol* 33: 1170-1174, 1998.

Petritsch W, Eherer AJ, Holzer-Petsche U, Hinterleitner TA, Beubler E, Krejs GJ. Effect of cholera toxin on the human jejunum. *Gut* 33: 1174-1178, 1992.

Powell DW, Binder HJ, Curran PF. Electrolyte secretion by the

guinea pig ileum in vitro. *Am J Physiol* 223: 531-537, 1972.

Powell, D.W. (1995) Approach to the patient with diarrhea. in *Textbook of Gastroenterology*. ed. by T. Yamada *et al.* 2nd ed. J.B. Lippincott Company. pp813-863.

Pugin J, Schurer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 2744-8, 1993.

Rask-Madsen J, Bukhave K, Beubler E. Influence on intestinal secretion of eicosanoids. *J Intern Med Suppl* 732: 137-44, 1990.

Rask-Madsen J, Hjelt K. Effect of amiloride on electrical activity and electrolyte transport in human colon. *Scand J Gastroenterol* 12: 1-6, 1977.

Schirgi-Degen A. and Beubler E. Proabsorptive properties of nitric oxide. *Digestion*. 59: 400-403, 1998.

Sheldon RJ, Malachick ME, Fox DA, Burks TF, Porreca F. Pharmacological characterization of neural mechanisms regulating mucosal ion transport in mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 249: 572-582, 1989.

Starkey WG, Candy DCA, Thornber D, et al. An in vivo model to study aspects of the pathophysiology of murine rotavirus-induced diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 10: 361-70, 1990.

Starkey WG, Candy DCA, Thornber D, et al. An in vitro model to study aspects of the pathophysiology of murine rotavirus-induced diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 10: 361-70, 1990.

Tabcharani, J. A., W. Low, D. Elie, and J. W. Hanrahan. Low-conductance chloride channel activated by cAMP in the

epithelial cell line T84. *FEBS Lett.* 270: 157-163, 1990.

Theodorou V, Eutamene H, Fioramonti J, Junien JL, and Bueno L. Interleukin-1 induces a neurally mediated colonic secretion in rats: Involvement of mast cells and prostaglandins. *Gastroenterology* 106: 1493-944, 1994.

Trezise, A. E. O., and M. Buchwald. In vivo cell-specific expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* 353: 434-437, 1991.

Ubillas, R., S. D. Jolad, R. C. Bruening, M. R. Kernan, S. R. King, D. F. Sesin, M. Barrett, C. A. Stoddart, T. Flaster, J. Kuo, F. Ayala, E. Meza, M. Castanel, D. McMeekin, E. Rozhon, M. S. Tempesta, D. Barnard, J. Huffman, D. Smee, R. Sidwell, K. Soike, A. Brazier, S. Safrin, R. Orlando, P. T. Kenny, N. Berova, and K. Nakanishi. SP-303, an antiviral oligomeric proanthocyanidin from the latex of *Croton lechleri* (*Sangre de Drago*). *Phytomedicine* 1: 77-106, 1994.

表一、中藥酒精萃取物冷凍乾燥後所得的重量及實驗刺激的濃度

	酒精萃取物				
	乾燥前體積(ml)	乾燥後重量(g)	濃縮液(ul)	刺激量(mg)	實驗刺激的濃度(mg/ml)
黃柏	5	0.0598	25	0.299	0.0299
黃連	5	0.0711	25	0.3555	0.03555
鴉膽子	5	0.1601	25	0.8005	0.08005
苦參	5	0.0082	25	0.041	0.0041
秦皮	5	0.0342	25	0.171	0.0171
大黃	5	0.0470	25	0.235	0.0235
巴豆	5	0.0174	25	0.087	0.0087
牽牛子	5	0.0638	25	0.319	0.0319
火麻仁	5	0.0256	25	0.128	0.0128

表二、中藥水萃取物冷凍乾燥後所得的重量及實驗刺激的濃度

	水萃取物				
	乾燥前體積(ml)	乾燥後重量(g)	濃縮液(ul)	刺激量(mg)	實驗刺激的濃度(mg/ml)
黃柏	5	0.0311	25	0.1555	0.01555
黃連	5	0.0269	25	0.1345	0.01345
鴉膽子	5	0.0202	25	0.0101	0.00101
苦參	5	0.0290	25	0.145	0.0145
秦皮	5	0.0334	25	0.167	0.0167
大黃	5	0.0184	25	0.092	0.0092
巴豆	5	0.0214	25	0.107	0.0107
牽牛子	5	0.0646	25	0.323	0.0323
火麻仁	5	0.0040	25	0.02	0.002

表三、離子成分分析

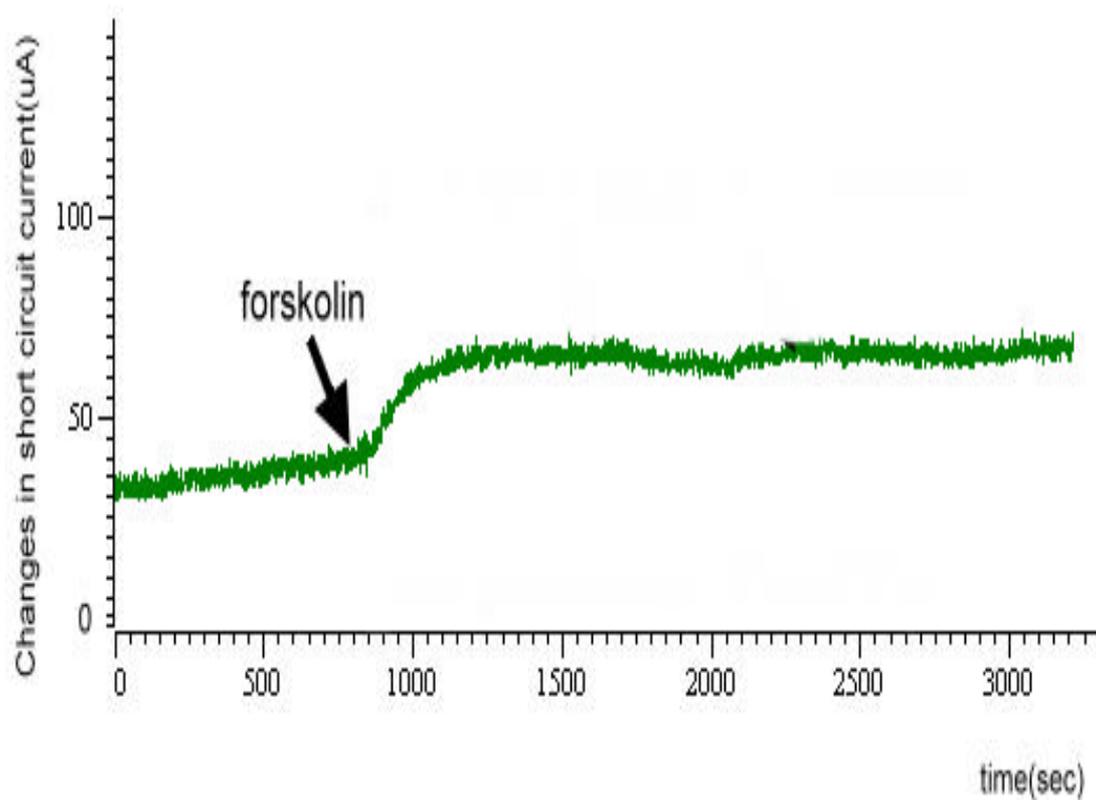
	離子成分			
	Mg(mM)	K(mM)	Na(mM)	Ca(mM)
黃柏	0.49	2.09	0.21	0.0525
黃連	0.84	2.82	0.34	0.085
鴉膽子	7.57	0.74	undetectable	undetectable
苦參	4.23	1.91	0.61	0.1525
秦皮	5.42	1.66	0.04	0.01
大黃	5.57	0.15	undetectable	undetectable
巴豆	2.35	1.87	0.09	0.0225
牽牛子	1.93	1.76	1.26	0.315
火麻仁	2.6	5.7	2.79	0.6975

表四、不同藥材酒精抽出物對於 Forskolin 刺激大白鼠腸道上皮組織間離子電流的影響，數值單位為 μA ，括弧內為標準差。

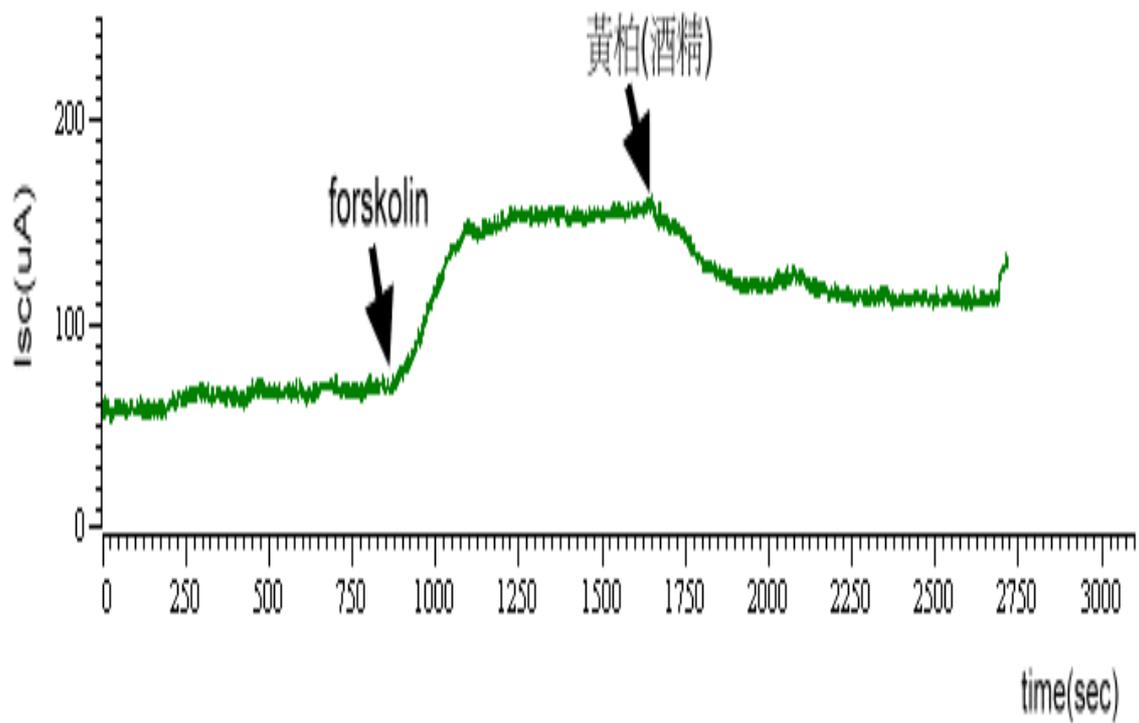
藥材	樣本數	起始值	加 Forskolin	加抽出物	電流變化值
對照組	3	57.3	105.7	105.0	-0.7(1.5)
黃連	6	58.8	109.2	95.7	-13.5(8.4)
黃柏	6	47.3	103.2	96.2	-7.0(2.4)
鴉膽子	6	50.0	94.0	86.0	-8.0(3.0)
苦參	6	52.3	79.3	73.7	-5.6(1.7)
秦皮	6	35.3	88.5	80.0	-8.5(2.0)
大黃	6	45.2	95.5	109.8	+14.3(3.1)
巴豆	6	42.0	98.7	113.3	+14.6(3.0)
牽牛子	6	40.8	95.3	113.7	+18.4(4.1)
火麻仁	6	47.0	99.7	112.8	+13.1(2.9)

表五、不同藥材水抽出物對於 Forskolin 刺激大白鼠腸道上皮組織間離子電流的影響，數值單位為 μA ，括弧內為標準差。

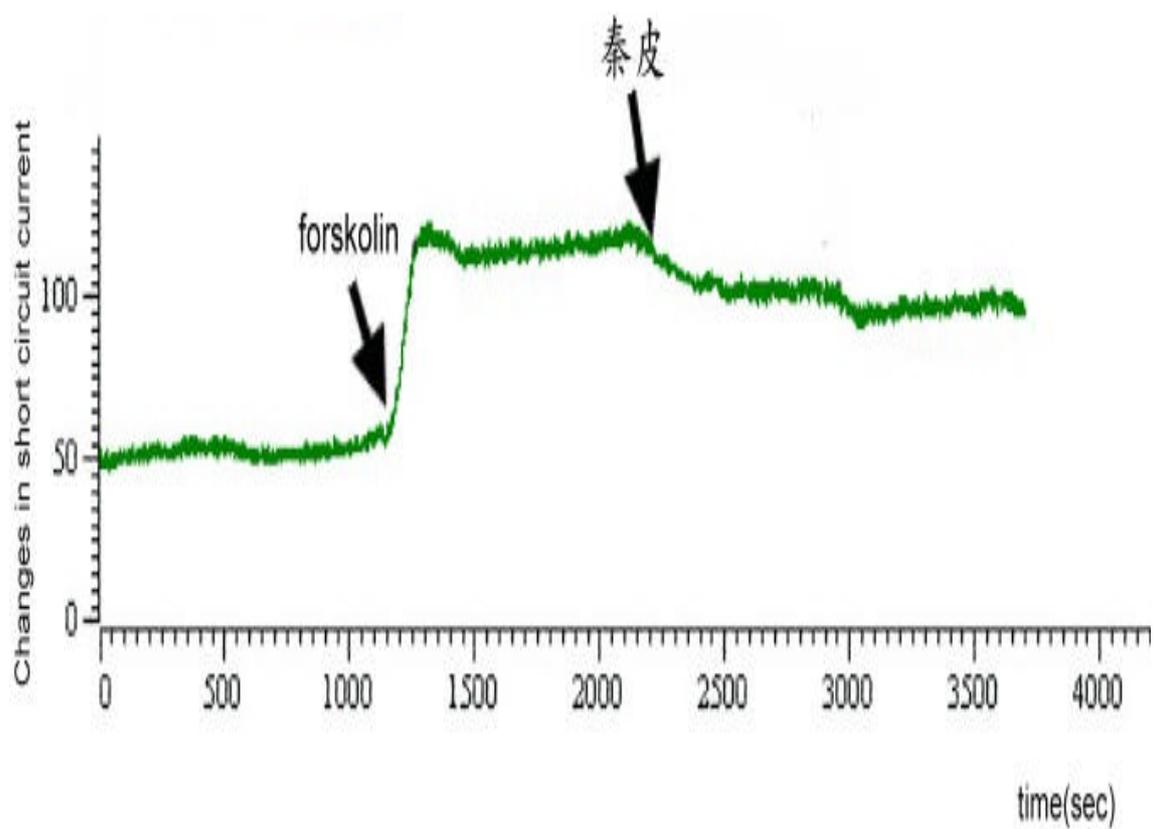
藥材	樣本數	起始值	加 Forskolin	加抽出物	電流變化值
對照組	3	57.3	105.7	105.0	-0.7(1.5)
黃連	3	62.4	109.2	107.2	-2(3.46)
黃柏	3	45.2	110.6	107.2	-3.4(1.15)
鴉膽子	3	53.8	121.4	119.0	-2.4(1.15)
苦參	3	56.8	110.3	105.9	-4.4(1.53)
秦皮	3	43.3	91.2	90.2	-1(1.0)
大黃	3	43.9	98.7	100.4	+1.7(0.57)
巴豆	3	54.3	113.6	120.3	+6.7(2.08)
牽牛子	3	48.4	110.4	113.0	+2.6(1.52)
火麻仁	3	54.1	109.5	112.2	+1.7(1.15)



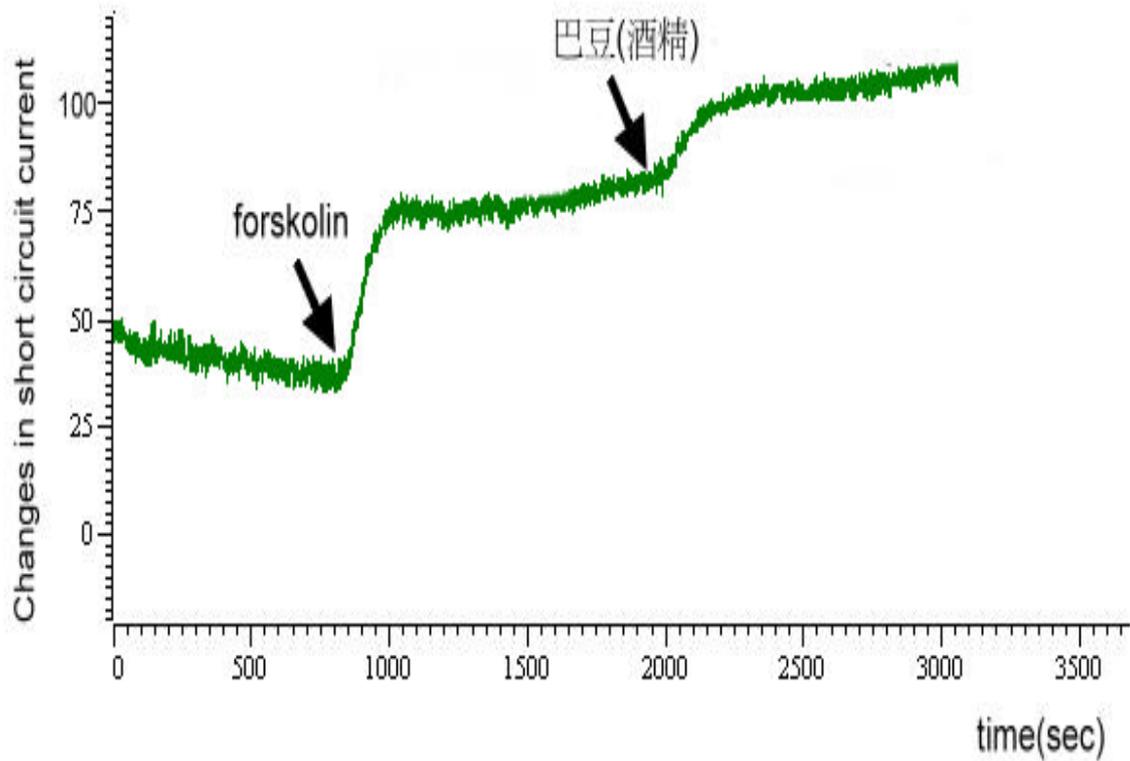
圖一、forskolin 對於大白鼠腸道短路電流的影響。大白鼠腸道上皮在架上 Ussing chamber 後，箝制上皮兩端電壓同時，可測得上皮間一短路電流，此電流約在 $40\mu\text{A}$ 左右，為上皮細胞進行正常離子主動運輸所造成，在漿膜端加入 $5\mu\text{M}$ forskolin，引發細胞內 cAMP 增加並導致氯離子分泌增加，而使短路電流驟升至 $70\mu\text{A}$ 上下，此上升之短路電流通常可持續一兩個小時。



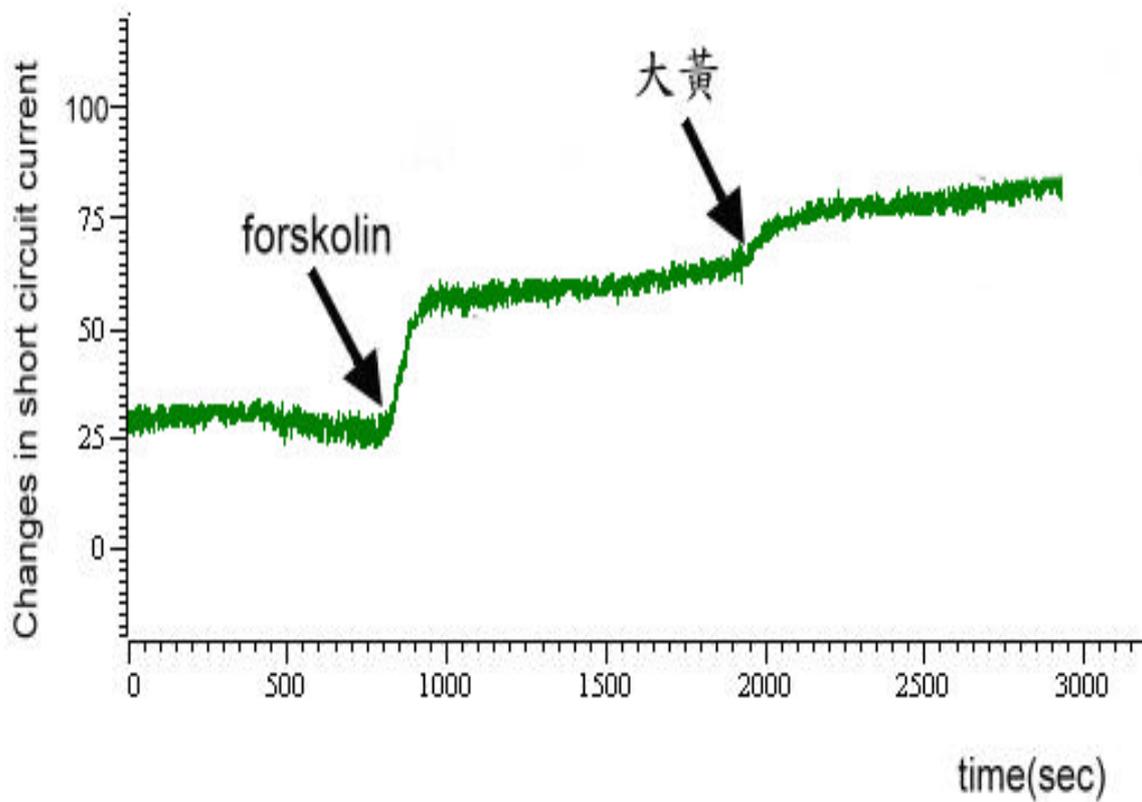
圖二、黃柏酒精抽出物對於接受 forskolin 刺激大白腸道上皮短路電流的影響。接受 forskolin 刺激大白鼠腸道上皮，在加入黃柏酒精抽出物後，短路電流明顯下降。



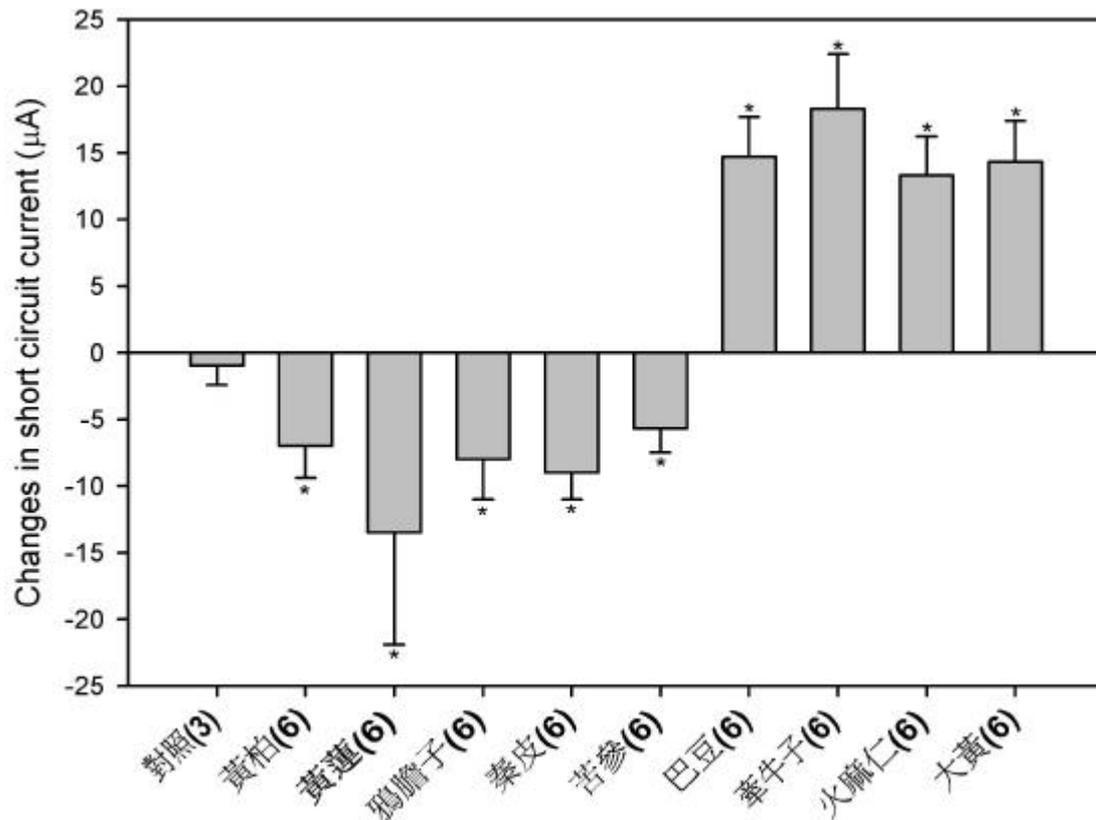
圖三 秦皮酒精抽出物對於接受 forskolin 刺激大白腸道上皮短路電流的影響。接受 forskolin 刺激大白鼠腸道上皮，在加入秦皮酒精抽出物後，短路電流明顯下降。



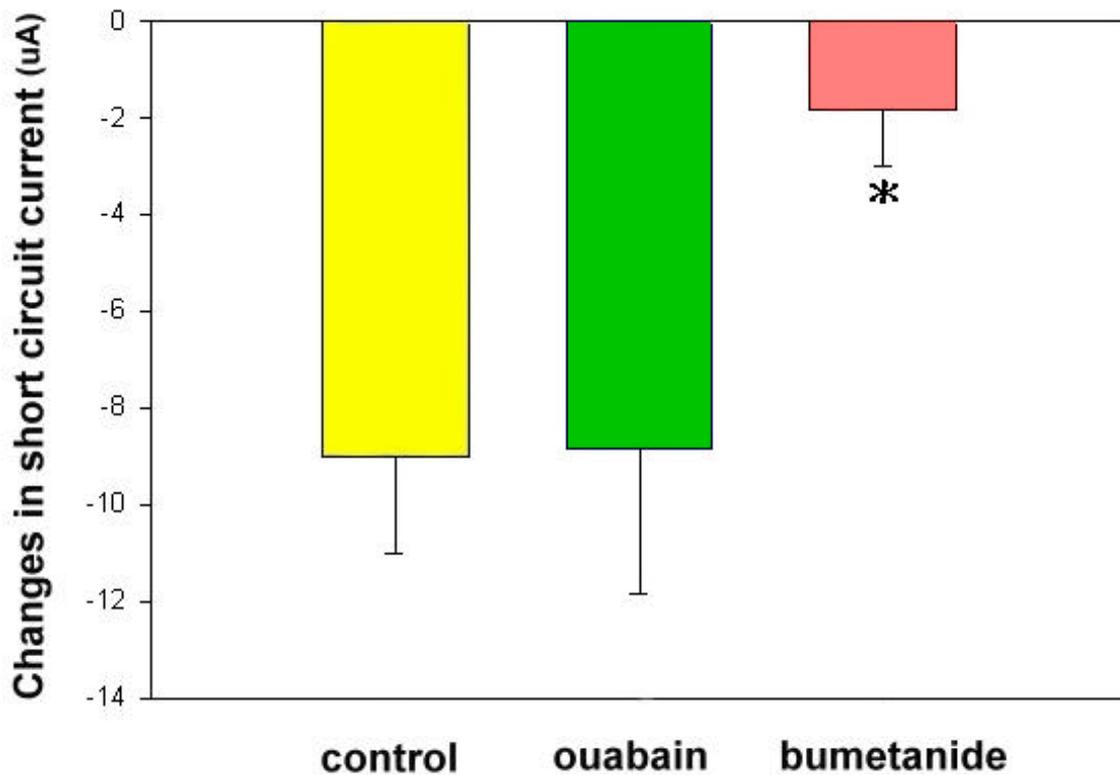
圖四 巴豆酒精抽出物對於接受 forskolin 刺激大白腸道上皮短路電流的影響。接受 forskolin 刺激大白鼠腸道上皮，在加入巴豆酒精抽出物後，短路電流明顯上升。



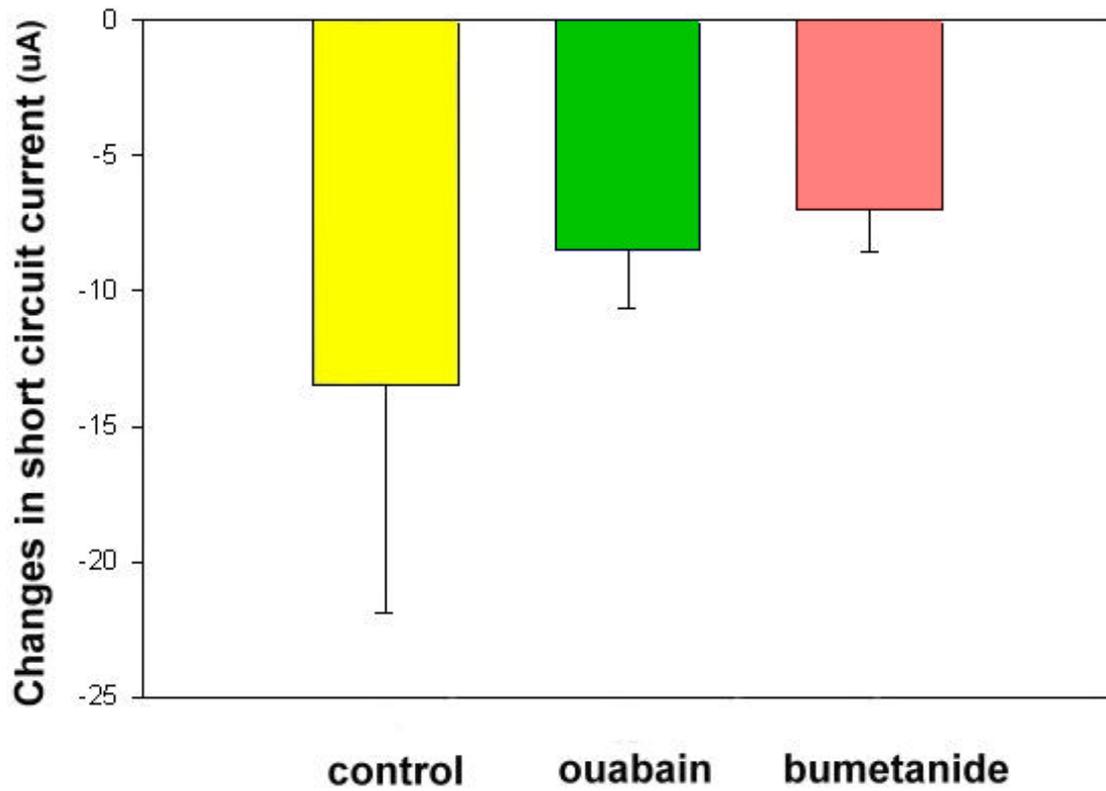
圖五 大黃酒精抽出物對於接受 forskolin 刺激大白腸道上皮短路電流的影響。接受 forskolin 刺激大白鼠腸道上皮，在加入大黃酒精抽出物後，短路電流明顯上升。



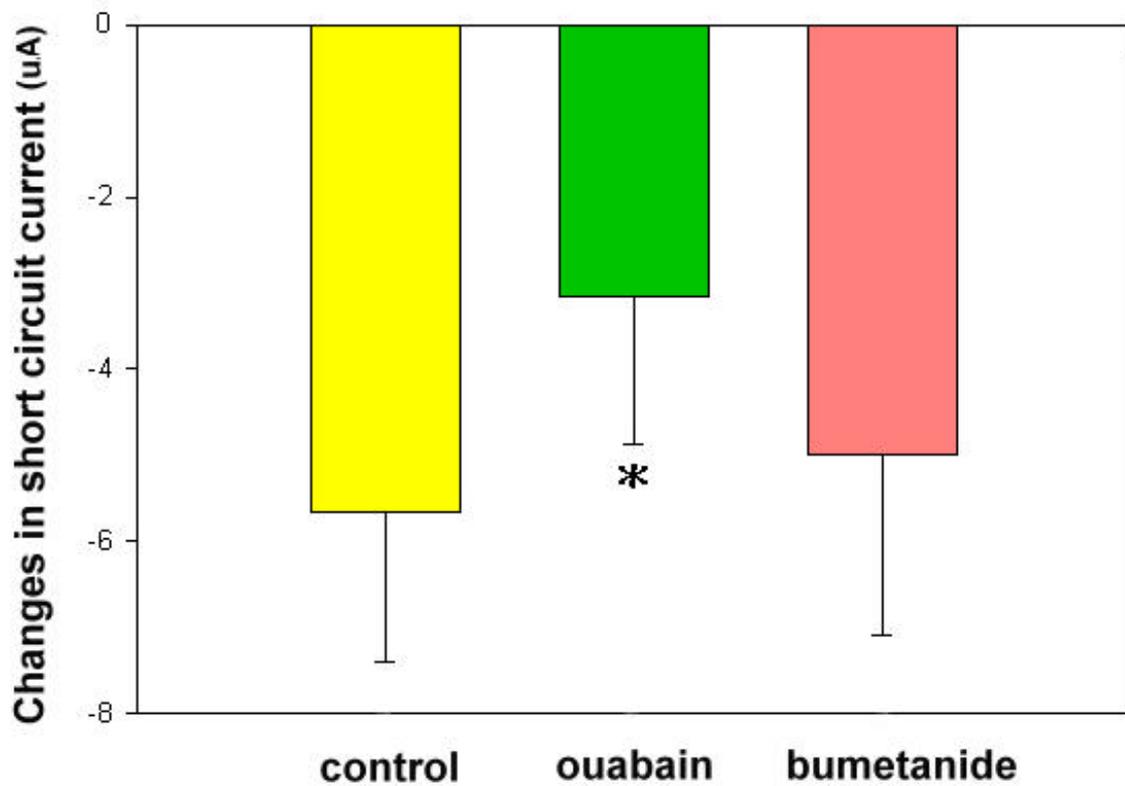
圖六、不同藥材酒精抽出物對於 forskolin 刺激大白鼠腸道上皮離子電流的影響，括弧內為樣本數。具止瀉功能之中草藥黃連、鴉膽子、秦皮、苦參、黃柏酒精抽出濃縮物質均則可使接受 forskolin 刺激之大白鼠腸道上皮短路電流下降。具瀉下功能之中草藥酒精抽出濃縮物質則可使接受 forskolin 刺激之大白鼠腸道上皮短路電流上升。



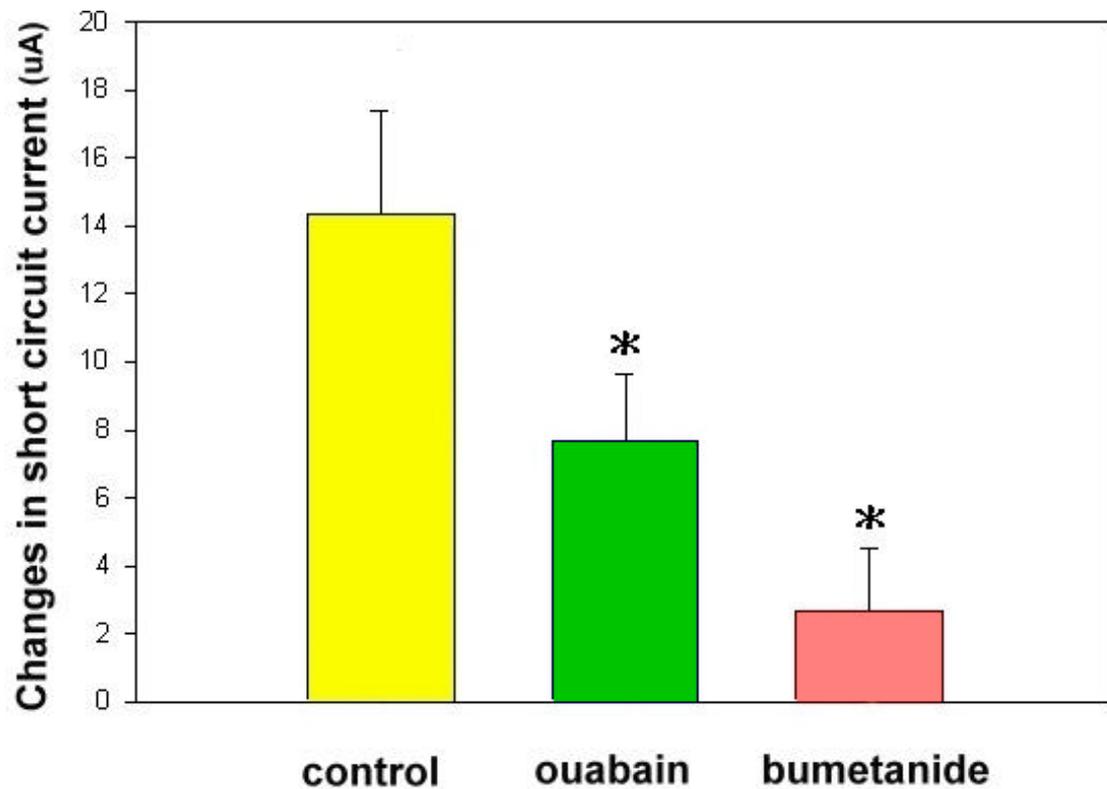
圖七、鈉離子與氯離子移動與秦皮酒精抽出物影響腸道上皮短路電流之關係。接受 forskolin 刺激大白鼠腸道上皮之短路電流之後分別給予 ouabain 及 bumetanide 處理，再加入秦皮酒精抽出物，腸道上皮短路電流變化值。以 ouabain 處理，再加秦皮酒精抽出物，短路電流變化值與對照組差異不甚明顯，以 bumetanide 處理，再加秦皮酒精抽出物，短路電流變化值對照組則有明顯差異。(n=6), *p < 0.05 v.s control。



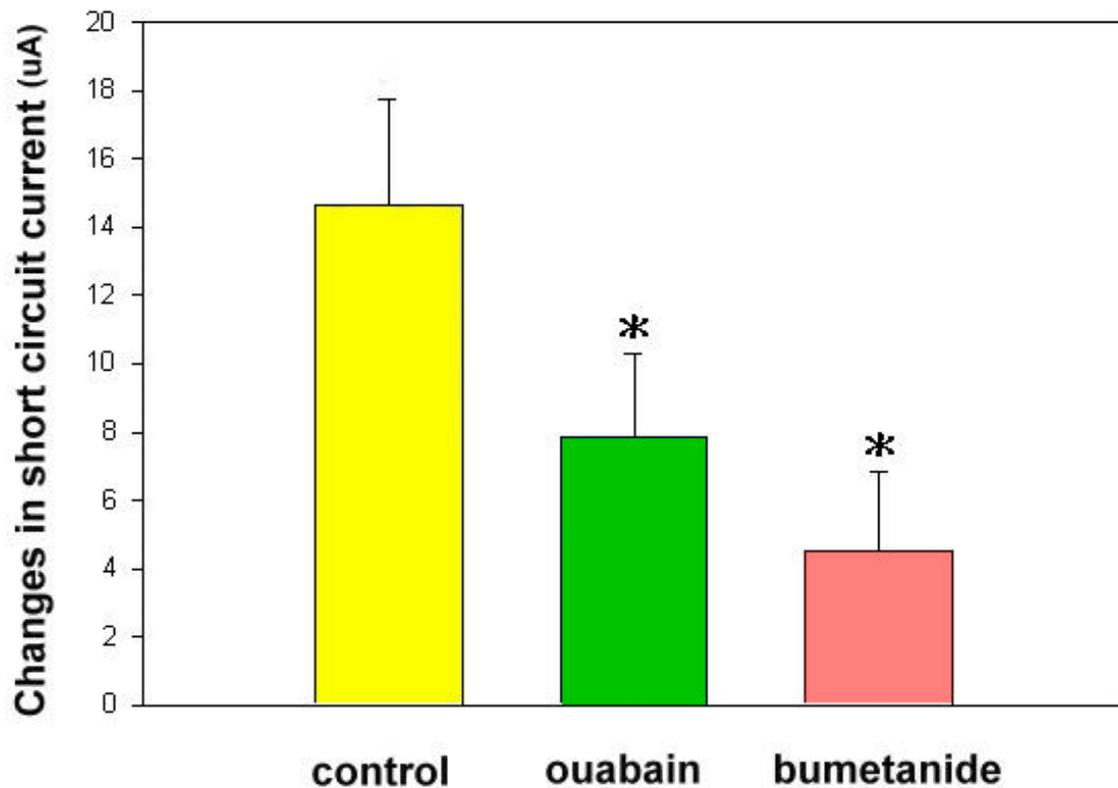
圖八、鈉離子與氯離子移動與黃連酒精抽出物影響腸道上皮短路電流之關係。以 ouabain 處理，再加黃連酒精抽出物，短路電流變化值為與對照組差異不甚明顯 ($p=0.187$) ($n=6$)。以 bumetanide 處理，再加黃連酒精抽出物，短路電流變化值也與對照組 ($p=0.09$) 差異不明顯。 ($n=6$)。



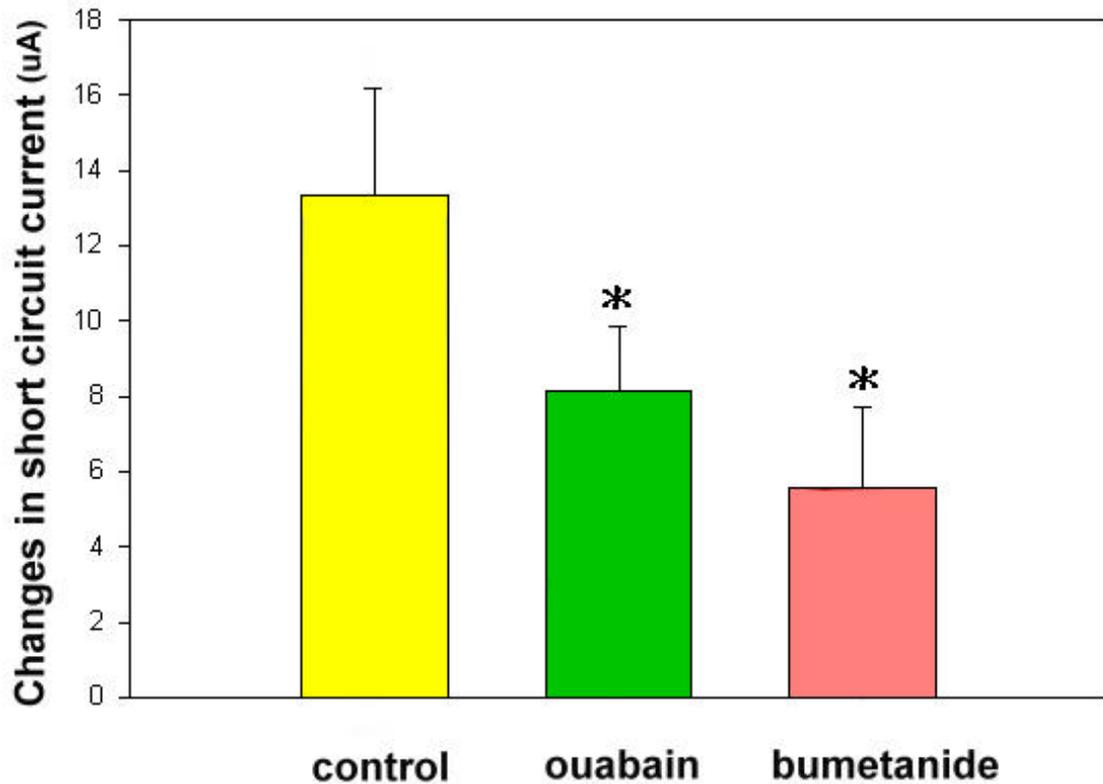
圖九、鈉離子與氯離子移動與苦參酒精抽出物影響腸道上皮短路電流之關係。以 ouabain 處理，再加苦參酒精抽出物，短路電流變化值對照組有明顯差異。以 bumetanide 處理，再加苦參酒精抽出物，短路電流變化值與對照組差異不甚明顯 (n=6)。*p < 0.05 v.s control。



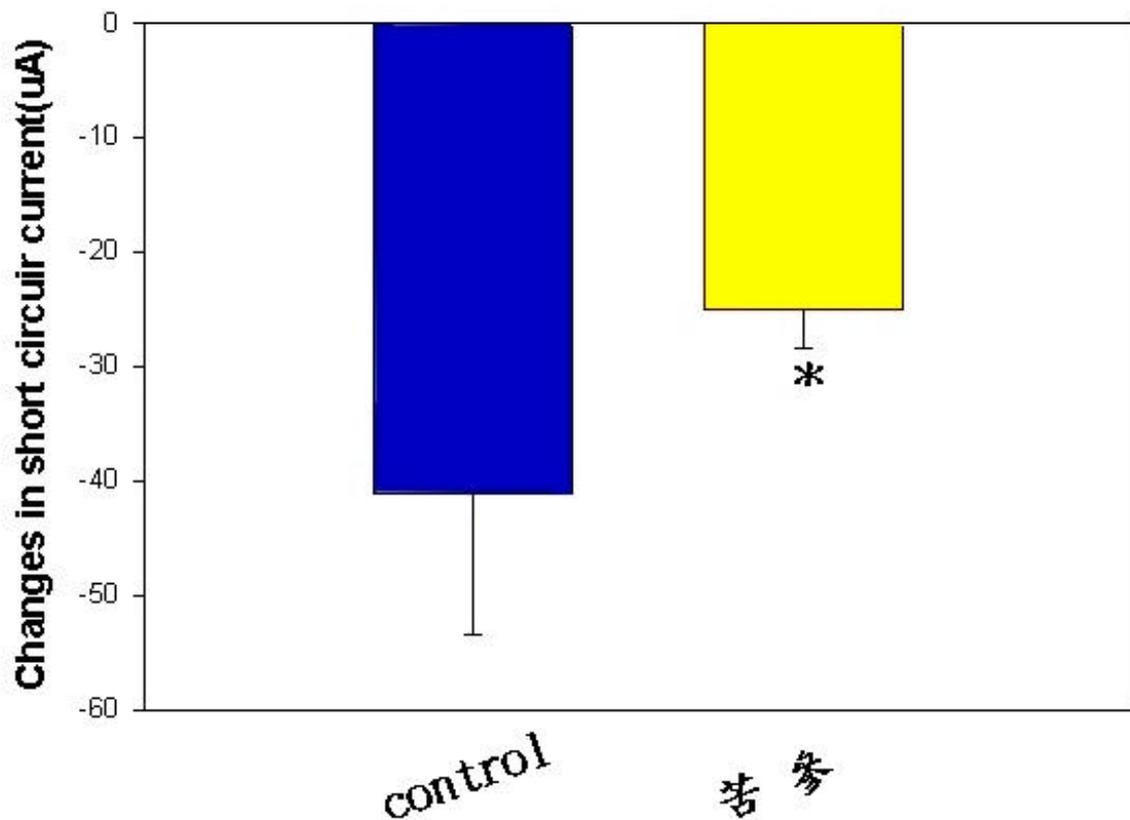
圖十、鈉離子與氯離子移動與大黃酒精抽出物影響腸道上皮短路電流之關係。以 ouabain 處理，再加大黃酒精抽出物，短路電流變化值與對照組 ($14.33 \pm 3.07\mu\text{A}$) 差異明顯。以 bumetanide 處理，再加大黃酒精抽出物，短路電流變化值與對照組也有明顯差異。($n=6$), * $p < 0.05$ v.s control。



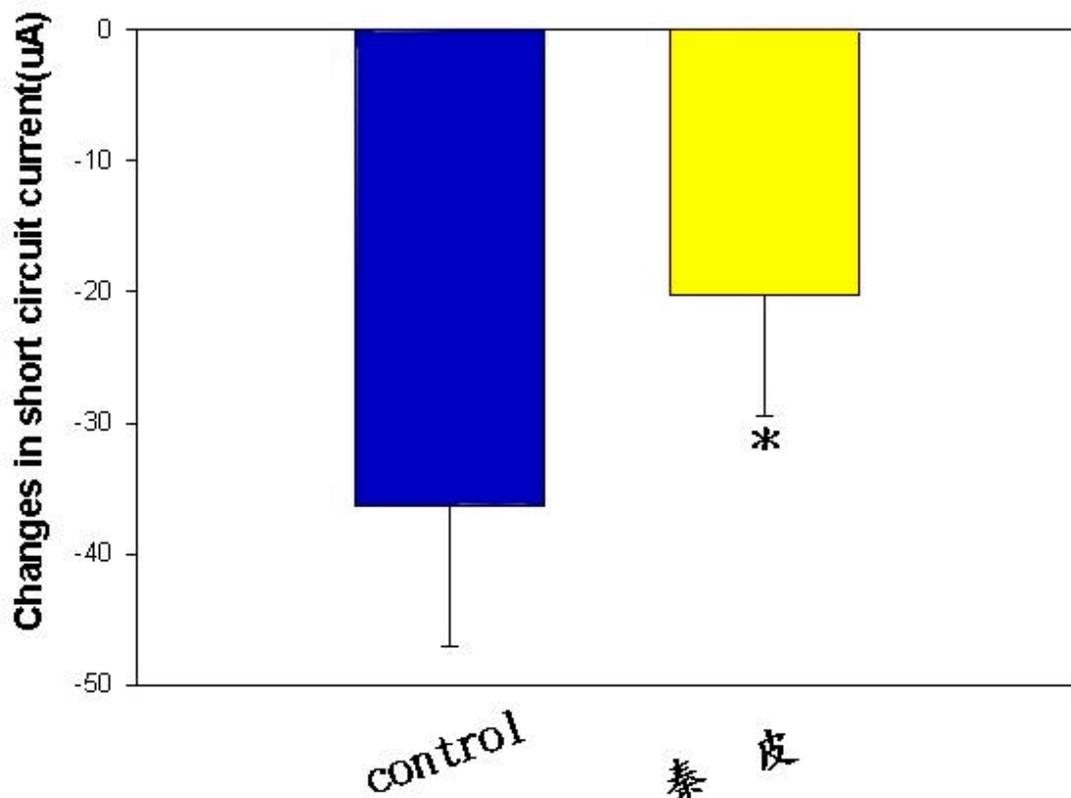
圖十一、鈉離子與氯離子移動與巴豆酒精抽出物影響腸道上皮短路電流之關係。以 ouabain 處理，再加巴豆酒精抽出物，短路電流變化值與對照組差異明顯。以 bumetanide 處理，再加巴豆酒精抽出物，短路電流變化值與對照組也有明顯差異。(n=6), *p < 0.05 v.s control。



圖十二、鈉離子與氯離子移動與火麻仁酒精抽出物影響腸道上皮短路電流之關係。以 ouabain 處理，再加火麻仁酒精抽出物，短路電流變化值與對照組)差異明顯 ($p=0.003$)。以 bumetanide 處理，再加火麻仁酒精抽出物，短路電流變化值，與對照組也有明顯差異。(n=6), * $p < 0.05$ v.s control。



圖十三、苦參酒精抽出物對鈉離子移動的影響。接受 forskolin 刺激大白鼠腸道上皮，給予苦參酒精抽出物，結果顯示在加入苦參之後，短路電流明顯下降，再以 ouabain 處理，短路電流變化值再度下降，平均下降值與對照組(接受 forskolin 刺激之後給予 ouabain) 電流平均值下降值差異明顯。(n=4)，*p < 0.05 v.s control。

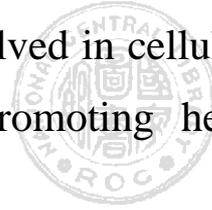


圖十四、秦皮酒精抽出物對氯離子移動的影響。接受 forskolin 刺激大白鼠腸道上皮，給予秦皮酒精抽出物，結果顯示在加入秦皮之後，短路電流明顯下降，再以 bumetanide 處理之後，短路電流變化值再度下降，與對照組(接受 forskolin 刺激之後給予 bumetanide) 電流平均下降值差異明顯。(n=4)，*p < 0.05 v.s control。

英文摘要

According to the Chinese medical literature, *C. teeta* Wallich, *Fraxini cortex*, *Goldenseal*, *Sophora flavescens* Aiton, and *Phellodendron amurense* Rupr are known for the anti-diarrheal characteristics, whereas *Rheum palmatum* L., *Croton tiglium* L., *Cannabis sativa* L. and *Pharbitis hederacea* Choisy are known for the ability to promote diarrhea. This study was aimed to discern effects of these herbs' extracts on ion transport of the rat intestinal epithelia. The epithelia were mounted in the Ussing chamber and were attached to voltage/current clamp for measuring changes of the short circuit current. After serosal addition of 5 μ M forskolin to raise the current, ethanol-extracts and water-extracts of the herbs with anti-diarrheal characteristics did reduce the current. On the contrary, ethanol-extracts and water-extracts of the herbs with diarrhea-promoting characteristics augmented the current further. Moreover, ethanol-extracts of these herbs showed more effect on changing the current. In following experiments, ouabain and bumetanide, which inhibit Na^+ - K^+ -ATPase and Na^+ - K^+ -2 Cl^- cotransporter respectively, were added prior to ethanol-extracts of these herbs for revealing the herb's effect on Na^+ and Cl^- movement. The results suggest *Fraxini cortex*, *Rheum palmatum* L. and *Croton tiglium* L., *Cannabis sativa* L. would affect Cl^- transport, whereas *Sophora flavescens* Aiton would

affect Na^+ transport. This study provide evidences to confirm that changes of Cl^- or Na^+ transport may be involved in cellular activities of the anti-diarrheal and diarrhea-promoting herb medicines on the rat intestinal epithelia.



作者簡歷

姓名:蔡淑理

民國 65 年 7 月 15 日生

出生地:高雄

學歷: 80.9-85.6 私立輔英技術學院

86.9-88.6 私立輔仁大學

89.9-91.6 私立中國醫藥學院醫學研究所基礎組