

第四節 藥理試驗方法與材料

(一) 抗心律不整活性試驗方法：

1. 心肌收縮力與自發性收縮頻率之測量：

成年大白鼠(WKY strain)重約 250-300 克,先腹腔注射 heparin (16mg/kg) 並以 pentobarbital sodium (50 mg/kg)麻醉; 而成年天竺鼠(Hartly strain)重約 200-300 克,先注射 heparin (16mg/kg), 兩種動物皆以頸椎分離(cervical dislocation)方式犧牲,迅速取出心臟於低溫含 1.8mM 鈣,置於通混合氣(95 % O₂ + 5 % CO₂)之 Tyrode 溶液中,將左、右心房及右心室分離,心室肌則修剪成約 4 mm × 6 mm 之長方形條塊。各組織一端以細絲線固定於電極底部,置入內含 10 ml Tyrode 溶液充以混合氣的組織浴器(organ bath)中,溫度維持 36±0.2 ,另一端則連接張力轉能器(force transducer, Type BG 25, Cleveland, Ohio, U.S.A)並經由記錄器(Gould Recorder RS 3400)記錄等長收縮張力。

標本給予適當靜止張力約 0.5- 1.0 克,待平衡後始進行實驗。左心房及右心室肌標本以波寬 1 ms,兩倍閾值 (threshold)方形波的電刺激強度,頻率 2 Hz 來引起收縮反應。右心房組織因內含竇房結節律組織,可記錄其自律性收縮頻率及收縮力。各離體心肌標本至少平衡 30 分鐘後始進行實驗。

2. 實驗用溶液組成:

(1)Tyrode 溶液(mM):

< A > NaCl 137, KCl 5.4, MgCl₂ 1.1, CaCl₂ 1.8, NaHCO₃ 11.9, NaH₂PO₄ 0.33, dextrose 11, 95 % O₂ + 5 % CO₂。

< B > NaCl 137, KCl 5.4, MgCl₂ 1.1, CaCl₂ 1.8, HEPES 10, 100 % O₂, 以 NaOH 滴定至 pH 7.4。

(2)酵素溶液:

無鈣 HEPES-buffered Tyrode 溶液含 collagenase (Sigma type I) 1 mg/ml 及 protease (Sigma type XIV) mg/ml。

(3)KB 溶液(mM):

KCl 86.1, NaCl 50, MgSO₄ 5, KH₂PO₄ 301.1, EGTA 0.5, dextrose 20, pyruvic acid 5, succinic acid 5, creatine 5, taurine 20 polyvinylpyrrolidone (PVP 40) 1.25, NaATP 5, 以 KOH 調至 pH 7.4。

(4)電極溶液(internal solution):

< A > 正常電極溶液(mM):

NaCl 10, KCl 120, MgATP 5, K₂EGTA 5, cAMP 0.3, HEPES 10, dextrose 5.5, 以 KOH 滴定至 pH 7.4。

< B >含 Cs⁺電極溶液(mM) :

CsCl 130, TEACl 15, K₂EGTA 5, CAMP 0.03, HEPES 10, dextrose 5, 以 CsOH 滴定至 pH 7.4。

(5)低鈉 Tyrode 溶液(mM) :

NaCl 1, HEPES 10, MgCl₂ 1.1, CaCl₂ 2, dextrose 11, choline chloride 122, 以 NaOH 滴定至 pH 7.4。

3.實驗用試劑:

Quinidine, Propranolol, 4-aminopyridine (4-AP), (±) Verapamil, Lidocaine, Prazosin, Pyrilamine, Tetrodotoxin 皆購自 Sigma Chem. Co. U.S.A. 除 4-AP, Prazosin, Pyrilamine 及 TTX 以去離子水為溶劑外, 其餘藥品皆以 dimethyl sulfoxide (DMSO)為溶劑作 stock solution。在對照組實驗 DMSO 不超過 0.1% 對實驗結果無明顯作用。

4.實驗數據的統計:

實驗數據以平均值± 標準誤差 (Mean± S.E)表示。而實驗組與對組間之差異, 以 Student's-test 加以評估。

(二)抗血小板凝集活性試驗方法:

1.血小板凝集引發劑之製備

(1) Thrombin :購自 Park Davis Co. USA; 溶解於 50% (v/v) glycerol, 製備成 100 NIH units/ml 之 stock solution。

(2) Arachidonic acid (AA): 購自 Sigma Chem. Co. USA; 以去離子水溶解, 使濃度成為 100 mM。

(3) Collagen (Type I bovine Achilles tendon): 購自 Sigma Chem. Co. USA; 溶於 25 mM 醋酸水溶液中, 於 4 °C 研磨成均勻的懸浮液, 以 1 mM/ml 的濃度分裝, 於 -70 °C 中貯存, 使用前再解凍研磨均勻, 使濃度成為 10 mg/ml。

(4) Platelet-activating factor (PAF): 購自 Sigma Chem. Co. USA; 溶於 chloroform 中, 使用前以 0.9 % NaCl 稀釋, 使濃度成為 2ng/ml。

2.血小板懸浮液之製備

從兔子耳靜脈抽出血液, 與 100mM EDTA 以 1:14 (VN)的比例混合, 使 EDTA 之最終濃度為 6mM, 在室溫下立即以 90g 離心 10 分鐘, 取出上層富含血小板之血漿(platelet-rich plasma), 再將其以 500g 離心 10 分鐘, 除去血漿後, 將下層血小板(platelet pellets)以含有 EDTA(2 mM)及 Bovin serum albumin(3.5 mg/ml)的 Tyrode's solution (calcium free)清洗之, 在相同轉速(500

g)下離心 10 分鐘，所得之血小板以不含有 EDTA 之 Tyrode's solution 清洗之，再於相同之條件下離心後，取血小板層，將其懸浮於 Tyrode's solution，其組成如下(mM)：NaCl (136.8), KCl (2.8), NaHCO₃(11.9), MgCl₂(1.1), NaH₂PO₄(0.33), CaCl₂ (1.0) and glucose (11.2)；並以 Coulter counter (Model ZM)計數，調整血小板數約為 4.5×10^8 platelets/ml，最後加 1 mM 鈣離子(Ca²⁺) 放置 30 分鐘進行實驗。

3.血小板凝集之試驗

利用混濁度法(turbidimetric method)之原理來測定凝集程度⁸⁰，並以 dual-Channel Lumiaggregometer (Model 1020, PayLon, Canada)測定之。將血小板懸浮液 0.4 毫升加入經 Silicone 包衣的小玻璃管中，並以小磁棒做每分鐘 900 轉(900 rpm)的攪拌，若未特別說明，均在加入測試之化合物三分鐘後，再加入凝集引發劑，經六分鐘後觀察結果。為了排除溶媒(DMSO)影響，在血小板溶液的濃度為 0.5%。全部反應過程皆在 37 °C 下進行，凝集程度的表示方法如下⁸¹。

$$\text{凝集 \%} = [(A_1 - A_2) / (A_1 - A_b)] \times 100 \%$$

A₁: 加入凝集引發劑前的吸光度

A₂: 加入凝集引發劑後的吸光度

A_b: Tyrode's solution 的吸光度

(三)抗發炎活性試驗方法:

1.嗜中性白血球懸浮液之製備

大白鼠(Sprague Dawley, 300-350 g)以 pentobarbital (60 mg/kg) 腹腔注射麻醉後，從腹腔大動脈抽取血液(以 100 mM EDTA 當抗凝劑)，與 dextran 混合後在試管中靜置使紅血球沈澱。取上清液離心(400g) 10 分鐘，丟棄大部份上清液，將沈澱細胞懸浮液輕輕加至含有 Ficoll-Hypage 的試管中，離心(500g) 30 分鐘⁸²。將沈澱細胞懸浮在 Hanks', balanced salt solution (HBSS) (含有 10 mM N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES), pH 7.4, 4 mM NaHCO₃)，離心(700 g) 10 分鐘，並以低張 NaCl solution (0.05%) 使沈澱細胞中剩餘的紅血球破裂，以去除紅血球^{83,84}；再用含有 0.25% bovine serum albumin(BSA)之高張 NaCl solution (1.75%)清洗並調整至等張，使細胞懸浮於 HESS 中(1×10^7 cells/ml)，即可製備純度及存活力均大於 95% 的嗜中性白血球懸浮液。

2.實驗方法

(A) Neutrophil degranulation method

(1) β -glucuronidase 釋放反應之測定⁸⁵

將嗜中性白血球細胞懸浮液分別與 DMSO 或檢品溶液於 37 °C 培養三分鐘後，個別加入 fMLP (1 μ M)與之作用，經 45 分鐘後，加入冰浴過之 Tyrode's solution 中止反應，混合液經離心(1000g) 10 分鐘後取出上清液，利用上清液中之 β -glucuronidase 與 phenolphthalein- β -D-glucuronide 反應後，經由分光光度計在 550nm 測量其中所含的 β -glucuronidase。

(2) Lysozyme 釋放反應之測定⁸⁶。

同 β -glucuronidase 釋放反應之處理後，將所得含 lysozyme 之上清液，利用 Micrococcus lysodeikticus 細胞作為受質，在分光光度計 450 nm 下測量。

β -glucuronidase 及 lysozyme 的釋放表示如下：

$$\text{release \%} = \frac{(\text{release elicited by secretagogue} - \text{spontaneous release})}{\text{total content}} \times 100$$

(total content 是將細胞懸浮於 Triton X-100 後所測量之值)

(B) Superoxide formation method

(1) Superoxide anion 釋放反應之測定

將含嗜中性白血球之細胞懸浮液(2×10^6 cells/ml)以及 ferricytochrome *c* (0.5mg/ml)的比色槽，置於 37 °C 恆溫的雙光束分光光譜儀中預熱 3 分鐘，再將 fMLP (0.3 μ M)加入此檢品溶液中 30 分鐘，對照組比色槽另含有 6.6 μ g/ml 的 superoxide dismutase (SOD)。加入測試之化合物後，在 550 nm 下測定 SOD 可抑制的 ferricytochrome *c* 吸光值之變化⁸⁷。在 dihydroxyfumaric acid (DHF)自發氧化反應之測量，比色槽中含 0.891 mM DHF 及 0.274mM nitroblue tetrazolium(NBT)，對照組比色槽另外含有 6.6 μ g/ml 的 SOD。加入測試之化合物後，在 560 nm 下測定 SOD 可抑制的 NBT 吸光值之變化⁸⁸。

(四)抗過敏活性試驗方法

1.肥大細胞懸浮液之製備

大鼠經頸部放血後(exsanguinated rats; Sprague-Dawley, 250~300 g)，10ml 含肝素之 Tyrode's 溶液(Tyrode's sol'n A)注入鼠腹腔內，按摩 1-2 分鐘並取出腹腔溶液，經 38 % 牛血清蛋白溶液離心，沉澱細胞經清洗後，以 Tyrode's sol'n B 懸浮成每毫升 $1-1.5 \times 10^6$ 個細胞^{89,90}，並測定細胞存活率⁹¹。

2.實驗方法

(A) Mast cell degranulation method

(1)組織胺(Histamine)釋放反應之測定⁹²

將此肥大細胞懸浮液分別與 DMSO 或檢品溶液於 37 °C 培養 3 分鐘，個別加入 compound 48/80 (10 mg/ml)與之作用，經 15 分鐘後，加入冰浴過之 Tyrode's solution 中止反應，混合液經離心(1000g)十分鐘後取出上清液，利用上清液中所含之組織胺與 o-phthaldehyde 聚合後以螢光分光光度計在 350/450nm 處測量組織胺含量。

*Compound 48/80 : a polymer of *N*-(*p*-methoxyphenylethyl)methylamine with formaldehyde

(2) β-glucuronidase 釋放反應之測定

同 histamine 釋放反應，將所得含 β-glucuronidase 之上清液，利用 phenolphthalein-β-D-glucuronide 作為受質，以分光光度計在 550nm 下測量所含之 β-glucuronidase

Histamine 及 β-glucuronidase 的釋放表示如下：

Release % =(releases elicited by secretagogue – spontaneous release)
/total content]×100

(total content 是將細胞懸浮於 Triton X-100 後所測量之值)

(五) NO (nitric oxide) 及 TNF-α 實驗方法:

1.材料

- (1) Iscove's Modified Dulbecco's Medium 與牛胚胎血清 (fetal bovine serum, FBS) : 購自 Gibco BRL (Gaithersburg)
- (2) TNF-α 酵素免疫分析(enzyme immunoassay, EIA) kit : 購自 Genzyme Co.(MA)
- (3) 老鼠干擾素-γ(mouse interferon-γ, IFN-γ) : 購自 R&D Systems(MN)
- (4) RAW 264.7 mouse macrophage-like cell line : 購自 American Type Culture Collection, MD.
- (5) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)與犢牛胚胎血清(fetal calf serum): 購自 Gibco BRL (Gaithersburg)
- (6) 其餘試藥皆購自 Sigma(St. Louis, MO.)

2.細胞培養與前處理⁹³

Murine microglial cell lines N9 係以含有 2 % FBS 與抗生素之 Iscove's Modified Dulbecco's Medium 培養; 在前處理的部分, 首先將細胞與代測藥物於 37°C 混合一小時, 之後再以 100 ng/ml 的 LPS(*Escherichia coli*, serotype

0111:B4)加 100 U/ml IFN- γ 刺激 24 小時，最後保存於-70°C 下，需要時才取出。

RAW 264.7 mouse macrophage-like cell line 則以含有 5% fetal calf serum、100 units/ml penicillin 與 100 μ g/ml streptomycin 之 DMEM 培養在前處理的部分，首先將細胞與代測藥物於 37°C 混合一小時，之後再以 100 ng/ml 的 LPS(*Escherichia coli*, serotype 0111:B4)刺激 24 小時，最後保存於-70°C 下，需要時才取出。

3. NO 之測定⁹⁴

依序將 40 μ l 5 mM 的 sulfanilamide、10 μ l 2M HCl 及 20 μ l 40mM naphthylethylenediamine 加入 150 μ l 培養基中，於室溫下混合 10 分鐘後，以 microplate 計數器在 550nm 下測其吸光度。一氧化氮標準曲線則以 NaNO₂ 於相同條件下所求得。

4. TNF- α 之測定

培養基中的 TNF- α 測定係使用 TNF- α enzyme immunoassay (EIA) kit，依照廠商提供之操作步驟進行測定。