

第三章 實驗部分

第一節 實驗材料

一、藥材：

1、 鵝石斛 *Dendrobium crumenatum*

93 年 12 月，商請何富順先生至綠島採集，鵝石斛新鮮全草 1.2 kg，經陳教授忠川博士確定該植物基原。

2、 木斛 *Ephemerantha lonchophylla*

94 年 3 月，購自彰化縣秀水鄉「施文彬藥局」，368 g。經陳教授忠川博士確定該植物基原。

3、 石斛 *Dendrobium moniliforme*

94 年 4 月，商請何富順先生至南投杉林溪採集，得鮮石斛新鮮全草 4 kg，經陳教授忠川博士確定該植物基原。

二、實驗動物：

本研究使用之動物為國家實驗動物繁殖及研究中心提供之 ICR 系雄性小鼠，體重 28 ± 2 g。

三、實驗試藥：

- 1、藥用酒精：台糖公司新營副產加工廠製造，規格符合中華藥典，酒精度為 95 度。
- 2、福馬林 (formalin)：購自日本試藥株式會社。
- 3、-carrageenan、indomethacin：購自 Sigma 公司。
- 4、醋酸 (acetic acid)：購自 Merck。
- 5、Mayer's reagent (氯化汞 - 碘化鉀試劑)：實驗室配製。
- 6、hydrochloric acid：購自聯工化學。
- 7、ammonia solution：購自 Merck 公司。
- 8、diethyl ether：購自 Alps Chem Co., Ltd.
- 9、chloroform：購自 Tedia Company Inc.

四、實驗儀器：

- 1、浮腫測定儀器 NK-101 CMP PLETHYSMOMETER (Muromachi)。
- 2、冷凍乾燥機 LABCONCO。
- 3、高速冷凍離心機 HERMLE Z233MK-2。
- 4、全自動生化分析儀 - Roche 公司 COBAS MIRA plus。

第二節 實驗方法

一、實驗藥材之製備

取鵠石斛 *Dendrobium crumenatum* 1200 g 及石斛 *Dendrobium moniliforme* 3000 g 原植物去根，洗淨去雜質，然後陰乾，得到鵠石斛莖 168.3 g、石斛莖 622.5 g，市售木斛 *Ephemerantha lonchophylla* 乾品 368 g。

按中國藥典 2005 版在石斛項下的用法與用量：「入複方宜先煎，單用可久煎」⁽⁶⁾，以 70% 乙醇當溶媒，以 70 迴流萃取三次，每次 8 小時，期間每 30 分鐘加以振搖一次⁽⁴⁷⁾，萃取液合併，以 50 減壓濃縮⁽⁴⁸⁾，再以冷凍乾燥法乾燥後備用。其抽取率如 Table 1 所示。

二、總生物鹼含量測定：

取鵠石斛、石斛、木斛乙醇粗抽物各 0.1g，以 5% HCl solution 溶解，取濾液，反覆數次至殘渣加 Mayer's reagent 呈陰性反應為止，合併各次酸性濾液。酸性濾液再以乙醚萃取，萃取液以氨水鹼化後，再以氯仿萃取，合併各次萃取液，減壓濃縮去除氯仿，精確稱量⁽⁴⁹⁾。總生物鹼含量如 Table 2 所示。

三、鎮痛實驗模式

1、醋酸扭體反應試驗 (Writhing Response Test) :

將不同劑量 (0.1、 0.5、 1.0 g/kg) 之鴿石斛、石斛、木斛乙醇粗抽物口服投予⁽⁵⁰⁾ , 60 分鐘後由腹腔注射 1% 醋酸溶液(每 10 g 體重投予 0.1 mL) , 用以誘發扭體反應 , 將小鼠置於觀察箱中 , 5 分鐘後開始觀察 , 並以計數器記錄注射醋酸後 5-15 分鐘內 , 小鼠腹部因醋酸溶液引起的腹部收縮 , 其所伴隨之扭體次數⁽⁵¹⁾ , 並以 indomethacin 20mg/kg 為正對照組 , 於注射醋酸前 90 分鐘口服投藥。

2、福馬林誘發舔蹠反應試驗(Formalin-induced licking time Test) :

採用經 Dubuisson 及 Dennis⁽⁵²⁾修飾後的方法 , 將不同劑量之鴿石斛、石斛、木斛乙醇粗抽物 0.1、 0.5、 1.0 g/kg 口服投予 , 60 分鐘後用微量注射器以 27 號針頭 , 在小鼠右後足背 , 皮下注射 20 μ L 的 5% 福馬林溶液⁽⁵³⁾ , 立即將小鼠置入觀察箱中 , 觀察並每隔 5 分鐘記錄小鼠舔其足蹠 (右後腳背注射福馬林的部位) 之累積秒數 , 共記錄 30 分鐘⁽⁵⁴⁾。將 0-5 分鐘之累積舔蹠秒數稱為前期或第一相 (early phase; first phase) 之痛覺反應時間 , 而 20-30 分鐘之累積舔蹠秒數稱為後期或第二相 (late phase; second phase) 之痛覺反應時間。並以 indomethacin 20mg/kg 為正對照

組，於注射福馬林前 90 分鐘口服投予。

四、抗發炎實驗模式

1、對角叉菜致小鼠足蹠腫脹的影響：

用記號筆在小鼠右後肢踝關節周圍做一標記，將小鼠右後肢浸入浮腫測定儀器，測量正常足蹠容積後，分別在小鼠右後肢足蹠皮下注射 1% λ -角叉菜混懸液（50 μ L/隻）致炎⁽⁵⁵⁾。誘導 2 小時後，將小鼠分別將不同劑量之鴿石斛、石斛、木斛乙醇粗抽物 0.1、0.5、1.0 g/kg 口服投予，正對照組於誘導後 1.5 小時，口服投予 indomethacin（20 mg/kg），給藥量皆為 0.1 mL/100g。給藥後隨後每隔 1 小時皆按上法，各測一次足蹠容積，連續測 7 小時，記錄結果，並分別計算誘導後每小時足蹠體積與誘導前個別足蹠之體積差（paw volume difference）。

五、抗氧化實驗模式：

1、抗氧化酵素活性測定：

（1）SOD Assay

取肝組織 1 g，加入 1 mL 0.9% 的 normal saline，以均質機均質，取 150 μ L 均質液於試管中，加入 900 μ L 冷的二次去離子水，4℃、冷藏 15 分鐘，混合均勻。取 20 μ L 的混合液加

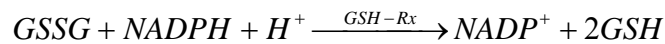
入 260 μL 0.1M phosphate buffer(CAPS 40 mmol/L、 EDTA 0.94 mmol/L , pH 7.0)均勻混合,最終,取 5 μL 混合液加入 340 μL mixed substrate1 (xanthine 0.05 mmol/L、 I.N.T 0.025 mmol/L), 再加入 xanthine oxidase 呈色,混合均勻後於波長 505 nm , 反應溫度 37 $^{\circ}\text{C}$ 下測量吸光值,每隔 30 秒測量一次,總共測量 3 分鐘,計算每分鐘吸光值變化速率,以多重校正曲線計算濃度⁽⁵⁶⁾。SOD 活性以單位時間內抑制 I.N.T 自動氧化速率為一單位 (U), 肝組織內 SOD 比活性以 U/mg protein 表示。

(2) Glutathione Assay

本實驗方法依據 1966 年, Guntherberg H 與 Rost J 提出之方法,取肝組織 1 g , 加入 1 mL 0.9 % 的 normal saline 均質,取 100 μL 的均質液,加入 100 μL 的冰二次水, 2 ~8 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏 10 分鐘。離心 12000 rpm , 5 分鐘。取上清液 25 μL , 加入 475 μL 之 0.9 % 的 normal saline , 混合均勻。取混合液 50 μL 於 Cuvette 中,依序加入等量的 glutathione reductase buffer (250mmol/L , pH7.3 kupferphosphate 與 EDTA 0.5mmol/L) 與 substrat (GSSG 2.2mmol/L) 與 NADPH (0.17mmol/L) 混合均勻,於波長 340 nm 下測量吸光值,肝組織內 glutathione reductase 活性以 $\mu\text{mol/g tissue}$ 表示。

(3) Glutathione Peroxidase Assay

本法根據 Paglia 及 Valentine (1967)所提出之方法為基礎，利用 glutathione 及 cumene hydroperoxide 與 GSH-Px 作用，再以 NADPH 與 glutathione reductase 將氧化態的 GSSG(oxidised glutathione)迅速轉成還原態，伴隨著 NADPH 氧化成 $NADP^+$ ，以吸光值之減少速率來定義 GSH-Px 之活性。



取肝組織 1 g，加入 1 mL 0.9% 的 normal saline 均質，取均質液 25 μ L，加入 500 μ L 的 diluting agent 稀釋。取上清液 500 μ L，隨即加入 Reagent 1(glutathione 4 mmol/L、 glutathione reductase 0.5 U/L、 NADPH 0.28 mmol/L)混合均勻，再加入 Reagent 2(cumene hydroperoxide 0.18 mmol/L)作用，於溫度 37、波長 340 nm 下測量吸光值，計算吸光值變化速率(U/L)，肝組織內 glutathione peroxidase 活性以 U/mg protein 表示。

(4) Total Protein Assay

取肝組織 0.5 g, 加入 0.5 mL 0.9% 的 normal saline 均質, 取肝均漿 50 μ L, 加入 350 μ L 的 normal saline 混和均勻, 加入 Biuret reagent (sodium hydroxide 100mmol/L、 Na-K-tartrate 16mmol/L、 potassium iodide 15mmol/L、 cupric sulphate 6mmol/L) 使反應變化呈增色反應, 波長 550 nm 條件下測量吸光值, 每隔 25 秒測量一次吸光值變化, 於反應第 15 分鐘達反應終點, 以人血清為 protein standard, 濃度 (6.0 g/dL) 產生吸光值變化扣除 blank reagent (Sodium hydroxide 100mmol/L、 Na-K-tartrate 16mmol/L) 之吸光度差, 換算出轉換係數(F), 進而換算出肝組織 total protein 之濃度, 肝組織 total protein 以 mg/g tissue 表示。

六、統計學分析：

本實驗所得之數據, 以 One-Way ANOVA 分析其變異數, 再以 Scheffe's multiple range test 檢定, 統計並分析其間差異之顯著性, 凡 p 值小於 0.05 以下時, 則認為有統計意義。