

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

台灣產筋骨草藥材基原鑑定、活性評估及組織培養大量繁殖之研究 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 98-2320-B-039-024-
執行期間：98年08月01日至99年07月31日
執行單位：中國醫藥大學中國藥學暨中藥資源學系

計畫主持人：郭昭麟
共同主持人：陳昱璋、闕甫仁、謝長奇
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：李佩珊
碩士班研究生-兼任助理人員：張婷翔
大專生-兼任助理人員：林佳欣

公開資訊：本計畫可公開查詢

中華民國 99 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

台灣產筋骨草藥材基原鑑定、活性評估及組織培養大量繁殖之研究

Study on the pharmacognostical identification, activity evaluation and
micropropagation of Ajugae Herba in Taiwan

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 98-2320-B-039-024

執行期間：98年08月01日至99年07月31日

執行機構及系所：中國醫藥大學 中藥資源學系

計畫主持人：郭昭麟

共同主持人：謝長奇、闕甫仁、陳昱璋

計畫參與人員：李佩珊、張婷翔、林佳欣

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

中 華 民 國 99 年 10 月 31 日

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文：已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利：已獲得 申請中 無

技轉：已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

本計畫申請三年計畫，但只核准一年，因此計畫僅進行三種種原的採集、調查及基原與分子生物鑑定，同時進行二種種原的初步組織培養的大量繁殖及一種種原的粗抽成分之抗氧化能力及保肝的活性評估，並有初步成果，已達成預期目標。可由本計畫之結果應用於台灣產筋骨草藥材外部形態、內部組織的鑑別及分子鑑定，釐清其基原，建立科學化的鑑別機制，利用組織培養進行健康苗的大量繁殖及開發其為保肝的保健產品，未來具有開發為本土藥用植物資源，作為中草藥的藥材之潛力。

本計畫之抗氧化能力及保肝的活性評估，計進行降低硫代乙醯胺誘導小鼠肝纖維化之肝臟重量變化、降低硫代乙醯胺誘導小鼠肝纖維化之肝臟 hydroxyproline 變化、降低硫代乙醯胺誘導小鼠肝纖維化之血清 ALT 變化、降低硫代乙醯胺誘導小鼠肝損傷與肝纖維化之組織切片、降低硫代乙醯胺誘導小鼠肝細胞死亡分析、降低脂多糖胺誘導小鼠發炎細胞炎症反應分析等動物試驗，其成果將可進行學術期刊論文發表。

中文摘要

筋骨草又名金瘡小草、白馬蜈蚣草、散血草、有苞筋骨草、百症草等，為台灣民間常用中藥之一，全草具有清熱解毒，止咳化痰，養筋活血之功效。筋骨草藥材來源應為唇形科(Labiatae)植物日本筋骨草(*Ajuga nipponensis* MAKINO)及台灣筋骨草(*A. taiwanensis* NAKAI ex MURATA)等二品種。近年來藥理實驗證明筋骨草藥材具有保肝的作用及活血化淤等療效。民間因此大量使用及栽種本類藥材，在大量需求下，於是使用其不同品種，如網果筋骨草(*A. dictyocarpa* HAYATA)、匍伏筋骨草(*A. decumbens* THUNB ex MURRAY)及矮筋骨草(*A. pygmaea* A. GRAY)等為代用品，甚至有同名異物，如石松科(Lycopodiaceae)筋骨草(*Lycopodium cernuum* LINN.)，造成筋骨藥材的混用。因此本計畫針對台灣產筋骨草藥材進行品種及來源調查，利用傳統五官鑑定法、顯微鏡檢鑑定法及分子生物鑑定法等，進行基原鑑定之研究，釐清其基原，建立科學化的鑑別機制，並有實質成果，可供未來鑑別之依據，能更快速及準確的比對正確之基原，提供筋骨草藥材基原鑑定之完整可行的參考資料，而種源的收集將可提供日後比對及研究的依據，將可避免市售中草藥混誤用對民眾用藥安全造成之危害。同時進行日本筋骨草、台灣筋骨草的活性評估，其結果將有助於筋骨草藥材之保健產品的研發，而組織培養大量繁殖的成果，可提供大量繁殖所得的材料，將可作為未來開發為本土藥用植物資源藥材之潛力。

中文關鍵詞：日本筋骨草、台灣筋骨草、基原鑑定、活性評估、大量繁殖

Abstract

The plant is commonly used in indigenous system of medicine as antibacterial and anti-malarial. Its plant source belongs to Labiatae the plant of *Ajuga nipponensis* and *A. taiwanensis*. The pharmacology experiment proves that this kind of crude drugs has curative effect, such as function which protect the liver and invigorating blood circulation silt, etc. in recent years, use and plant this kind of crude drugs in a large amount among the people, under the generous demand, then use its different varieties, *A. dictyocarpa*, *A. decumbens*, *A. pygmaea* etc. to be the substitute, even there is foreign matter of the same name, example Lycopodiaceae, *Lycopodium cernuum*, cause using with the plant of medical herbs of *Ajugae Herba*. To identification the true and false plant resources by using traditional facial identification method, microscope and molecular type to dissect the medical plants, to observe the inside structure, to draw the picture of powdery character, to describe the contents of inside and powdery tissue. Understand that misapplies and uses the difference with the normal product with, offer the intact and feasible reference material that bases appraised originally of Chinese herbal medicine, and the collection of one kind of sources can be offered in the future than correctly and basis studied. Can prevent city from and sell at the Chinese herbal medicine and mix and misapply to the danger caused safely that the people use medicine. At the same time into *A. nipponensis* and *A. taiwanensis*, activity evaluation of *Ajugae Herba*, the results will contribute to *Ajugae Herba* of health products development. And tissue culture mass propagation of results, can provide great propagation resulting material, will serve as a future development for native medicinal plant resources of potential medicinal materials.

key words: *Ajuga nipponensis* and *A. taiwanensis*, identification, activity evaluation, mass propagation

壹、前言

筋骨草藥材又名金瘡小草、白馬蜈蚣草、散血草、有苞筋骨草及百症草等，為台灣常用中藥之一，具有清熱解毒，止咳化痰，養筋活血之功效；民間則常用於保肝處方。筋骨草藥材來源為唇形科(Labiatae)植物日本筋骨草(*Ajuga nipponensis*)及台灣筋骨草(*A. taiwanensis*)⁽¹⁻²⁾。近年來藥理實驗證明本類藥材具有保肝的作用及活血化淤等療效，民間因此大量使用及栽種本類藥材，在大量需求下，於是使用其不同品種，如匍伏筋骨草 (*A. decumbens*)、網果筋骨草 (*A. dictyocarpa*) 及矮筋骨草 (*A. pygmaea*)⁽³⁻⁶⁾ 等為代用品，甚至有同名異物，如石松科(Lycopodiaceae) 筋骨草 (*Lycopodium cernuum* LINN.)，造成筋骨藥材的混用。因此本計畫針對台灣所產的筋骨草屬植物利用顯微鑑定法及分子生物鑑定法進行其基原鑑定之研究，釐清其基原，建立科學化的鑑別機制，以供未來鑑別之依據，能更快速及準確的比對正確之基原。瞭解誤用混用與正品之差異性，提供中草藥基原鑑定之完整可行的參考資料，而種源的收集將可提供日後比對及研究的依據。將可避免市售中草藥混誤用對民眾用藥安全造成之危害，並開發為本土藥用植物資源，作為中草藥的藥材。

本計畫調查結果，台灣藥農栽培的種原為日本筋骨草 (*Ajuga nipponensis*)，分佈最普遍且為民間習用的為台灣筋骨草 (*A. taiwanensis*) 其它為稀有種不列入討論，故本研究以日本筋骨草 (*A. nipponensis*) 為主要研究主題，並使用內核酸轉錄區 (internal transcribed spacer, ITS) 間進行分子種別鑑定，同時探討日本筋骨草 (*A. nipponensis*) 與台灣筋骨草 (*A. taiwanensis*) 之抗氧化能力，及保肝的活性，其結果將有助於筋骨草藥材之保健產品的研發。

本計畫同時進行筋骨草種苗大量繁殖之研究，以筋骨草之種子無菌播種繁殖或以莖節等為培植體建立組織培養大量繁殖系統，已初步建立其快速的大量繁殖途徑。上述結果可作為開發本土藥用資源的開發及產業的推廣，達到國產筋骨草藥材自給自足之目的。

貳、材料與方法

一、材料

- 1.日本筋骨草 (*Ajuga nipponensis* MAKINO) 之植株及藥材；
- 2.台灣筋骨草 (*A. taiwanensis* NAKAI ex MURATA) 之植株及藥材；
- 3.日本筋骨草 (*A. juga nipponensis*) 之熱水萃取 (AJW) 與60%酒精萃 (AJE) 之抽提物

二、試藥

(一)基原及分子生物鑑定

- 1.sundan III solution; 2.chloral hydrate solution; 3.hydrochloric acid;4.phloroglucinol solution;
- 5.glycerin : alcohol : water (1:1:1); 6.glycerin : water (1:1); 7.potassium hydroxide(50%)
- 8.ferric chloride reagent; 9. iodine test solution; 10. fast green FCF; 11.potassium chlorate;
- 12.safranin; 13.acetomethyl green; 14. methyl green; 15.acidic fuchsin;
- 16.Taq DNA polymerase; 17.agarose; 18.dNTP; 19.primer; 20. TBE buffer

(二)組織培養

- 1.MS Medium(Murashige and Skoog, 1962); 2.WPM Medium(Lloyd and McCown, 1980);
- 3.B5 Medium (Gamborg, 1968); 4.1N NaOH_(aq); 5.1N HCl_(aq); 6.Sucrose; 7. Agar; 8.Gelrite;
- 9.95%Ethanol; 10. Tween 20; 11.5% NaOCl_(aq); 12. kinetin; 13. zeatine; 14. BA; 15. NAA;
- 16.2,4-D; 17. ABA; 18.GA₃;19.IAA; 20.TDZ

(三)保肝之活性評估

- 1.BNL cells; 2.RAW 264.7 cells; 3.RPMI medium, FBS, NEAA, Gentamycin;
- 4.DMEM medium, FBS, penicillin, streptomycin; 5.DEPC; 6.DPPH; 7.Greiss reagent;
- 8.agarose; 9.TBE buffer; 10.MOPS buffer; 11.GITC lysis buffer; 12.primer;
- 13.Taq DNA polymerase; 14.dNTP;15.iNOS antibody; 16.NF-kB antibody (以上購自Sigma)
- 17.IL-1, IL-6, TNF-alpha ELISA試劑組購自eBioscience
18. 細胞株：BNL cells (BALB/c normal liver cell)、RAW 264.7購自食品工業發展研究所

三、儀器與設備

(一)基原及分子生物鑑定

- 1.照相機 (Nikon FM2)；2.顯微鏡 (Olympus CH2)；3.顯微鏡 (Nikon photograph T-2)
- 4.立體顯微鏡 (Nikon SMZ-2T)；5.顯微測微計 (Erma 0.01mm Micromete)
- 6.電子天平 (OHAUS GALAXYTM 160)；7.蒸餾水製造器 (Branson 520)
- 8.描繪器 (Olympus BH2-DA drawing attachmen)；9.衛星定位 (GP)
- 10.超音波振盪器 (SONOREX SUPER RK 1028 B)；
- 11.分子生物鑑定所需儀器：(1)PCR；(2)Agarose gel electrophoresis system；
(3)Gel photography system；(4)Micropipette；(5)Power supply

(二)組織培養

- 1.電子天平 (OHAUS GALAXYTM 160)；2.無菌操作台 (Laminar Flow Horizontal Typ)
- 3.加熱攪拌器 (Ceramic Hot Plate/Stirrer)；4.冷凍乾燥機 (Freeze Drying Syste)
- 5.高壓滅菌器 (Autoclave)；6.超音波震盪器 (Ultrasoni)；7.立體顯微鏡 (Nikon SMZ-2)
- 8.蒸餾水製造器 (Branson 520)；9.pH meter；10.植物生長箱 (Growth Chamber)

(三)保肝之活性評估

- 1.二氧化碳培養箱 CO₂ incubator (Revoco,USA)；2.離心機Centrifuge(5910,Kubota, Japan.)
- 3.無菌操做台，Laminar flow (造鑫公司，台灣)
- 4.流式細胞儀，Flow cytometer (FACScan, BD Bioscience, CA, USA)
- 5.酵素免疫分析儀，ELISA reader (Multiskan, Termal Labssystem, CA, USA)

四、方法

(一)基原及分子生物鑑定

1.五官鑑別

首先對採集之筋骨草藥材及市售品藥材進行傳統外部形態之五官鑑別，如直觀分析法，傳統生藥學之「性狀經驗鑑別」，通過眼看、手摸、鼻嗅、口嚐、耳聽、水試、火試等進行鑑定，並將其鑑別依據及要點一一說明，並建立數位影像鑑別圖檔資料庫，作為未來鑑定之依據。

2.生藥組織鑑別

將採集之筋骨草藥材及市售品藥材，利用徒手切片法進行橫切、放射性縱切、切線性縱切等，並置檢體於載玻片上，先以 chloral hydrate solution 清除細胞內容物後，再滴加各種不同化學染劑，例如 5% phloroglucinol-alcohol 與 12N HCl_(aq) 進行木化反應，或滴加 sundan III 進行木栓化反應等，最後以 glycerin : water (1:1) 混合溶液將檢品封鎖，蓋上蓋玻片，然後置於顯微鏡下觀察，先用低倍鏡頭檢查檢品之弱擴大圖，再用高倍鏡觀察內部組織之特徵，並利用顯微鏡之攝影成數位影像或描繪器描繪各組織，作為未來鑑定之依據。

3.分子生物鑑定

(1)筋骨草藥材 DNA 抽取

(2)藥材基原鑑定-PCR⁽⁷⁾

藥材基源之鑑別乃是利用核糖體基因之Internal transcribed spaces (ITS), ITS1與ITS2作為基原鑑定之依據，所使用之引子係參考Fu RZ et al.,所發表之論文並適當之修飾，5'端引子：(18D)：5'-CAC ACC GCC CGT CGC TCC TAC CGA-3'，3'端引子：(28CC)：5'-ACT CGC CGT TAC TAG GTG AA-3'，PCR放大之反應條件為：25 μl反應中包含15 ng 模板DNA，10 mM Tris-HCl (pH 8.3)，50 mM KCl，1.0 μM each primer，0.2 mM dNTP，2.0 mM MgCl₂，1.0 U Klen *Taq* DNA polymerase；反應循環為：one cycle of 94°C for 5 min, 50°C for 1 min and 72°C for 2 min; 40 cycles of 94°C for 1 min, 60°C for 1 min and 72°C for 1.5 min with a final extension of 72°C for

10 min。經PCR擴增ITS1/ITS2 序列後以 1% 瓊脂電泳進行長度判別，經分離約 800 bp 之片段以 spin column進行純化動作，再交由合作廠商進行以 Sanger 法之定序工作。經重覆至少三次不同採集地點之同種藥材，經序列比對無誤後，並於本校藥學院標本館寄存標本樣品後，於 GenBank 登錄序列。

(二)組織培養

1. 培植體之消毒

取日本筋骨草及台灣筋骨草的莖節為培植體，以清水沖洗乾淨後，以0.5%次氯酸鈉溶液 (NaOCl_(aq)) (每100 ml含Tween20兩滴) 於超音波震盪器進行表面消毒10~15分鐘，移至無菌操作臺經無菌水洗滌3次後，置於無菌培養皿上取出莖節，去除消毒受損的組織，放置於培養基中待長出植物體，再進行各項試驗，以達植株大量繁殖之目的。

2. 培養基的配製⁽⁸⁻¹³⁾

培養基之配製，以MS無機鹽類及有機成分為基本配方，添加3 % 蔗糖及0.9 % Difco agar，配合NAA、IAA、2,4-D、BA、TDZ、kinetin、zeatin及GA₃等各類植物生長調節劑，培養基加入agar前先用 1N NaOH_(aq)及HCl_(aq)將pH值調至5.70±0.01，然後以121°C、15 lb/in² (1.05 kg/cm²) 進行高壓滅菌15分鐘後，擺成斜面冷卻備用。

3. 培養環境

接種後，將材料置於 25±1 °C之恆溫、黑暗或照光 (光量100 μE/m²s，光波長350~800 nm) 下培養。

4. 接種方式

以試管為培養容器，內含10 mL培養基，每支試管接種二個培植體。接種後培養於25.0±0.5°C、黑暗或光強100 μE/m²s，每日照光14小時，相對濕度為75%的培養室。

5. 植株之誘導及大量繁殖體系

由無菌的培植體所獲得的癒合組織或不定芽，接種於含有植物生長調節劑之MS固體培養基，經30天後調查植株的誘導率，所獲得的植株再進行大量繁殖體系的探討。

(三)保肝之活性評估

1. 細胞培養與樣本處理⁽¹⁴⁾

BALB/c normal liver cell (BNL)以3×10³的數目接種於96孔盤中，以RPMI medium (10% FBS, penicillin (100 units/ml), and streptomycin sulfate (100 mg/ml))培養於5%CO₂培養箱中，並以不同濃度之AJE及AJW處理細胞24小時後，再以thioacetamide (150 μg/ml) 進行肝細胞傷害，測定其毒殺之保護作用，細胞經 MTS 呈色以 ELISA reader 測定細胞存活率，並使用流式細胞儀分析其凋亡之保護作用。

RAW 264.7 murine macrophage cells以5×10⁴的數目接種於96孔盤中，以RPMI medium (10% FBS, penicillin (100 units/ml), and streptomycin sulfate (100 mg/ml))培養於5%CO₂培養箱中，並以不同濃度之AJE及AJW處理細胞24小時，以LPS (1.0 μg/ml) 刺激其發炎反應之產生，並收集細胞上清液測定發炎介質的含量，評估其抗發炎能力。

2. 一氧化氮分析(Nitric oxide Assay)⁽¹⁴⁾

經由發炎刺激之RAW細胞培養上清液，以等體積與Griess reagent混合於室溫反應十五分鐘後於550 nm測定其吸光值，以NaNO₂作成之檢量線迴歸計算其NO含量。

3. 動物模式⁽¹⁵⁾

BALB/c 小鼠由國家實驗動物中心購得，飼養於獨立空調隔離籠架中，飲水、飼料與墊料均經滅菌處理，待小鼠成長至20-25克後隨機分組，每組小鼠十隻，以硫代乙醯胺(thioacetamide, 200 mg/kg, 每兩天投藥一次，每週三次，共投藥十週)誘導肝炎與肝纖維化產生，AJW(250 mg/kg, 1000 mg/kg)及AJE(250 mg/kg, 1000 mg/kg)以口服管餵方式投與，對照組餵食滅菌蒸餾水(10 ml/kg)，第十週犧牲小鼠，收集全血，分離

肝臟、脾臟等並稱重之，約三克肝臟以100°C烘乾後，以過氧化氫氧化後，以p-dimethylamino- benzoaldehyde反應呈色，於540 nm吸光質測定hydroxyproline的含量，評估纖維化之膠原蛋白沉積。

(1)肝功能評估⁽¹⁵⁾

將50 µl血液與150 µl 5% sodium citrate溶液經抗凝並以離心機離心(1700×g 4°C, 10 min)分離血漿後，以血清生化儀測定ALT, AST含量。

(2)細胞激素分泌分析(Splenocyte culture and assay for cytokines)

細胞培養上清液與血清，使用ELISA三重複測量IL-1, IL-6, TNF-alpha (eBioscience)等細胞激素。⁽¹⁶⁻¹⁷⁾

(3)肝組織包埋與染色⁽¹⁵⁾

小鼠麻醉後犧牲，收集全血後，肝臟使用10% 福馬林固定做H&E 染色(Merck) 染色。確定組織型態，並進一步使用picro-sirius red stain，鑑定纖維化組織。

(4)統計分析

數值資料以單因子變異數分析(One-way ANOVA)，經Duncant事後檢定後，分析組間差異，差異顯著性以* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 表示之。

參、結果

一、基原及分子生物鑑定

1. 植株形態

(1)日本筋骨草 (*Ajuga nipponensis*) 為一或二年生草本。莖通常直立，稀平臥，常從基部分枝而無基生葉，高10~20cm或更高，全株被疏柔毛。莖生葉具柄；葉片寬橢圓形或倒卵狀橢圓形，長1.8~4.6cm，寬1.4~2.6cm，兩面被疏糙伏毛。聚繖花序下部者遠隔，向上漸密集成頂生假穗狀花序；苞片小，卵形至寬披針形；花冠白色至淡淺藍色，稀白綠色，具深色條紋，近基部具毛環。雄蕊4，二強。(如Fig. 1.)

(2)台灣筋骨草 (*A. taiwanensis*) 多年生草本，矮小，具匍匐莖，從基部分枝，枝長10~30cm，易傾倒成匍伏，具花的莖直立，高8-12cm，被灰白色長柔毛或綿狀長柔毛。具基生葉，有柄，柄長0.8~1.6cm，莖生葉無柄或近無柄；葉片紙質，基生葉匙形或倒披針形，長2~4cm，寬0.7~1.2cm，莖生葉倒卵形或圓形，長1~1.5cm，寬0.6~1cm，先端鈍或幾圓形，基部楔形，邊緣具不顯著或不整齊波狀圓齒，具緣毛，兩面被疏柔毛或糙伏毛。聚繖花序，生於莖中部以上葉腋內，向上漸密聚成穗狀，下部者疏離；苞葉下部者葉狀，均密被綿狀之柔毛，邊緣具缺刻及緣毛；苞片及小苞片匙形，長2~8mm，寬12.5mm，疏被柔毛，近全緣；花梗短，長約1mm，被柔毛。花冠紫色或淡紫色，有深紫色斑點，外面被微柔毛及淡色腺點。雄蕊4，二強。(如Fig. 2.)

2. 組織鑑別

(1)日本筋骨草 (*Ajuga nipponensis*) 以顯微鏡檢視其莖之橫切面，莖表皮層，一列，呈類長方形表皮細胞組成，外被角質層，散見腺毛及非腺毛。莖呈類四角形，皮層佔1/3~1/4，由10~16列柔細胞組成，呈類圓形、類方形或類多角形，徑32~192µm，稜角處6~8列呈厚角組織；與韌皮部交結處有2~6列韌皮纖維束，排列呈環狀；韌皮部由6~8列，柔細胞細小，細胞呈類方形、類圓形；形成層1~3列，不明顯；木質部，木化~強木化排列呈環狀，由6-10列木部細胞、纖維及導管組成；導管以網紋、有緣孔紋、螺紋為主，徑22~54µm。髓部佔2/3~3/4，由呈類方形、類圓形柔細胞組成，徑52~178µm，中央處呈裂隙狀。(如Fig. 9)

(2)台灣筋骨草 (*A. taiwanensis*) 組織圖與日本筋骨草相似，但其韌皮纖維束只有2~4列，皮層約佔1/3，髓部約佔2/3。

3. 分子生物鑑定

(1)日本筋骨草 (*Ajuga nipponensis*) voucher CMU-9901 18S ribosomal RNA gene, partial

sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
CGAGGCGACGTGGGCGGTTTCGCCGCTCGCGACGTCTGAGAGAAGTCCACTGAACTTATCATTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCC
GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCAAACTGCAAGGACAGCCGCAACACGTGTTAATCACATCGGGTCGGCGGCTTCGGCTGTG
CCCCGACCCCGTCGGTATGGGTGCTTGGCTTGTGCGGCTCGGGCTAACAACTCGGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAAATAAAAGGATCGT
CTGCCCCCGTCGCCCGTTCGCGGATTGTGTGCGGGGATGGACGCTGTGTAATACCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCG
CATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCGAATCCCGTGAACCATCGAGCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCC
GTCAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTACACATCGCGTTCGCCCTCCAGTGTTCGGAGCTCGTGTGGGGGGCGGAGAATGGCCTC
CCGTGCGCTCGGCGTGGCTGGTCCAAATGTGTTCCCGCGCGTACGTGCGGACAGTGGTGGTTGATCATCAACTCGCGTGTGTTG
CGACTAGAGGCGTTGTCGGTGGGGAACAAACATGACCCAAAGGGTGCATTTCATTGCATTGCGCTCCGACCGCGACCCAGGTGAGCG
GGACTACCCGCTGAGTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTTAC
```

(2)台灣筋骨草 (*A. taiwanensis*) voucher CMU-9902 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
CGAGGCGACGTGGGCGGTTTCGCCGCTCGCGACGTCTGAGAGAAGTCCACTGAACTTATCATTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCC
GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCAAACTGCAAGGACAGCCGCAACACGTGTTAATCACATCGGGTCGGCGGCTTCGGCTGTG
CCCCGACCCCGTCGGTATGGGTGCTTGGCTTGTGCGGCTCGGGCTAACAACTCGGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAAATAAAAGGAT
CGTCTGCCCCGTCGCCCGTTCGCGGATTGTGTGCGGGGATGGACGCTGTGTAATACCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTC
TCCCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCGAATCCCGTGAACCATCGAGCTTTGAACGCAAGTTGCGCCG
AAGCGTCTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTACACATCGCGTTCGCCCTCCAGTGTTCGGAGCTCGCAGTGTGGGGGGCGGAGA
ATGGCTCCCGTGGCGCTCGGCTGGTCCAAATGTGTTCCCGCGCGTACGTGCGGACAGTGGTGGTTGATCATCAACTCGCGT
GCTGTGCGACTAGAGGCGTTGTCGGTGGGGAACAAACATGACCCAAAGGGTGCATTTCATTGCATTGCGCTCCGACCGCGACCCAGGT
CAGGCGGACTACCCGCTGAGTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTTAC
```

二、組織培養

野生日本筋骨草、台灣筋骨草之種子以 75% 乙醇中浸泡 30 秒，再以 1% 次氯酸鈉（每 100 mL 滴加 Tween 20 一滴）溶液消毒 10 分鐘，進行表面消毒過後之種子接種於不添加任何生長調節劑之 1/2MS 固體培養基中，培養於 25±1°C 之恆溫，光照（光量 100 μE/m²s，光波長 350-800 nm）環境下培養，經 14~28 天後，種子發芽得無菌苗，再將無菌苗繼代至 1/2MS 固體培養基之蘭花瓶中培養 60 天，再取其葉及葉柄，培養於含 2 mg/L BA MS 培養基中，可誘導出良好之癒合組織。癒合組織分別培養於含 1ppm 不同植物生長調節劑之 MS 培養基中，於黑暗或光照的環境下培養 30 天觀察其結果：添加 1ppm NAA 並培養於黑暗環境下會誘導癒合組織發根；添加 1ppm 2,4-D 並培養於黑暗環境下利於癒合組織生長；添加 1ppm BA 培養於光照環境下較利於癒合組織再生芽體（如 Fig. 3,4,5）。將再生的芽體培養於不含植物生長調節劑之 1/2MS 固體培養基中可使其生長成根系健全之植株，（如 Fig. 6,7）達到了大量繁殖的目的。

三、日本筋骨草的保肝之活性評估

1. 筋骨草對降低TAA誘導小鼠肝纖維化之肝臟重量變化，實驗結果證實高劑量之AJW與低劑量之AJE可顯著降低肝臟重量，對肝臟炎症反應或纖維化可能具備緩解之作用(Fig. 10)。

2. 筋骨草對降低TAA誘導小鼠肝纖維化之肝臟hydroxyproline變化，實驗結果證實AJW與AJE可顯著降低肝臟hydroxyproline含量，對肝臟纖維化有緩解之作用(Fig. 11)。

3. 筋骨草對降低TAA誘導小鼠肝纖維化之血清AST變化，實驗結果證實AJW與AJE可顯著降低血清AST含量，對肝臟損傷有緩解之作用(Fig. 12)。

4. 筋骨草對降低TAA誘導小鼠肝纖維化之血清ALT變化，實驗結果證實AJW與AJE可顯著降低血清ALT含量，對肝臟損傷有緩解之作用(Fig. 13)。

5. 筋骨草對降低TAA誘導小鼠肝損傷與肝纖維化之組織切片，實驗結果證實經餵食不同劑量之AJW及AJE對肝臟損傷有緩解之作用同時對肝臟纖維化有緩解之作用(Fig. 14, 15)。

6. 筋骨草對降低TAA誘導小鼠肝細胞死亡分析，實驗結果證實有顯著性降低TAA誘導之BNL細胞毒殺作用，同時可顯著性降低TAA誘導之BNL細胞凋亡 (Fig. 16, 17)。

7. 筋骨草對降低脂多醣胺誘導小鼠發炎細胞炎症反應分析，實驗結果證實可顯著性降低

LPS所誘導產生之NO。同時經由ELISA試劑組測定TNF- α 與IL-6，證實可顯著性降低LPS所誘導產生之TNF- α 與IL-6 (Table 1)。

肆、討論與結論

筋骨草藥材又名金瘡小草、白馬蜈蚣草、散血草、有苞筋骨草及百症草等，為台灣常用中藥之一，具有清熱解毒，止咳化痰，養筋活血之功效；民間則常用於保肝處方。筋骨草藥材來源應為唇形科(Labiatae)植物日本筋骨草(*Ajuga nipponensis*) (雲林及南投有大量栽培，如圖8.)及台灣筋骨草(*A. taiwanensis*)。近年來藥理實驗證明本類藥材具有保肝的作用及活血化淤等療效，民間因此大量使用及栽種本類藥材，在大量需求下，於是使用其不同品種，如匍伏筋骨草(*A. decumbens*)、網果筋骨草(*A. dictyocarpa*)及矮筋骨草(*A. pygmaea*)等為代用品，甚至有同名異物，如石松科筋骨草(*Lycopodium cernuum*)，造成筋骨藥材的混用。因此本計畫針對台灣所產的筋骨草屬植物利用顯微鑑定法、化學成分鑑定法及分子生物鑑定法進行其基原鑑定之研究，釐清其基原，建立科學化的鑑別機制同時建置數位鑑別圖譜，另經定序鑑定結果後顯示之序列與*Ajuga reptans*有96%相似度，顯示為同屬近緣植物，我們將序列發表於GenBank中，以做為分子鑑定一依據。

動物試驗結果顯示，筋骨草水萃液可有效降低肝臟損傷(Fig. 12, 13, 14)，並降低纖維化(Fig. 11, 15)之趨勢，結果呈劑量相關性，其相關機轉與保護肝細胞免於凋亡(Fig. 16, 17)，並降低TAA所誘導之腸胃道菌叢死亡後，所產生之LPS所誘導之巨噬細胞活化，並產品發炎性介質(NO, TNF- α 與IL-6, Table 1)，未來我們將繼續相關研究，將筋骨草水萃液中之功效成份分離，並進行包括纖維化機轉的探討。另一方面，筋骨草酒萃液在低劑量雖然有降低肝纖維化之發生，但肝細胞損傷方面只有低劑量有效果，高劑量似乎有增加肝細胞損傷之潛在問題，當然對於活性成分的分離或許可釐清這些問題。

由於筋骨草未明列衛生署公告之可供食品使用原料一覽表之品項，未來如果要開發其為保健產品，或許對於其毒性問題之釐清，並去除不利於肝腎毒性之因素後，開發為保肝藥材仍然具有其潛力。未來分子鑑別之應用，能更快速及準確的比對正確之基原。瞭解誤用混用與正品之差異性，提供中草藥基原鑑定之完整可行的參考資料，而種源的收集將可提供日後比對及研究的依據。將可避免市售中草藥混誤用對民眾用藥安全造成之危害。並開發為本土藥用植物資源，作為中草藥的藥材。

Table 1. AJW reduced LPS stimulated inflammatory mediators expression

Treatment	NO ₂ ⁻ , μ M	TNF- α , pg/ml	IL-6, pg/ml
Medium only	10.6 \pm 2.4	17.2 \pm 5.1	68.6 \pm 27.6
LPS, 1.0 μ g/ml			
Control	339.2 \pm 15.7 ^{###}	327.1 \pm 54.4 ^{###}	435.6 \pm 78.4 ^{###}
AJW, 12.5 μ g/ml	302.4 \pm 7.5	321.6 \pm 89.5	384.9 \pm 74.9
AJW, 25.0 μ g/ml	211.1 \pm 5.3*	277.0 \pm 87.7	316.0 \pm 101.4
AJW, 50.0 μ g/ml	152.3 \pm 7.9**	150.3 \pm 55.8*	291.3 \pm 53.6*
AJW, 100.0 μ g/ml	129.8 \pm 3.1**	146.9 \pm 58.4*	194.3 \pm 74.1*

Data present as mean \pm SD, ^{###}P<0.001 indicated LPS significant stimulate inflammatory mediators expression. **P<0.01, *P<0.05 indicate AJW reduced LPS significant stimulate inflammatory mediators expression.



Fig. 1 日本筋骨草(*A. nipponensis*)植株外形圖



Fig. 2 台灣筋骨草(*A. taiwanensis*)植株外形圖

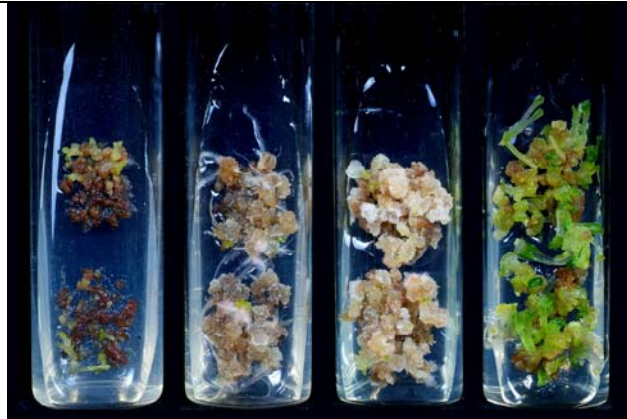


Fig. 3 日本筋骨草培養於不同生長調節劑暗培養生長情形

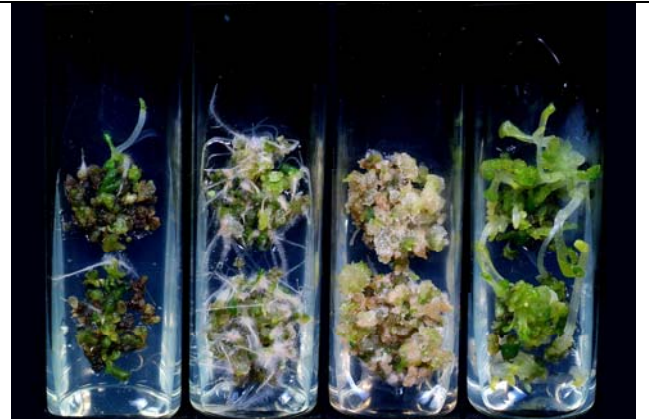


Fig. 4 台灣筋骨草培養於不同生長調節劑暗培養生長情形

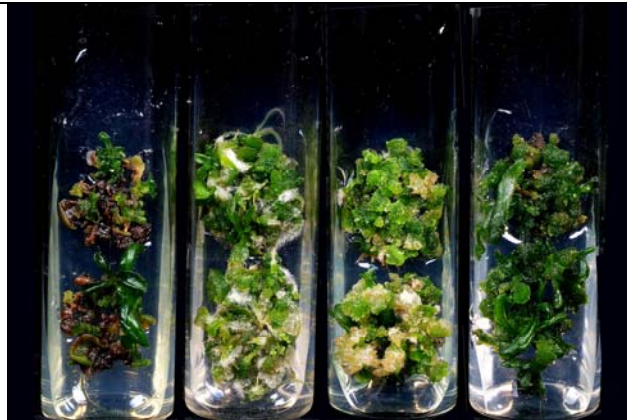


Fig. 5 日本筋骨草培養於不同生長調節劑光培養生長情形



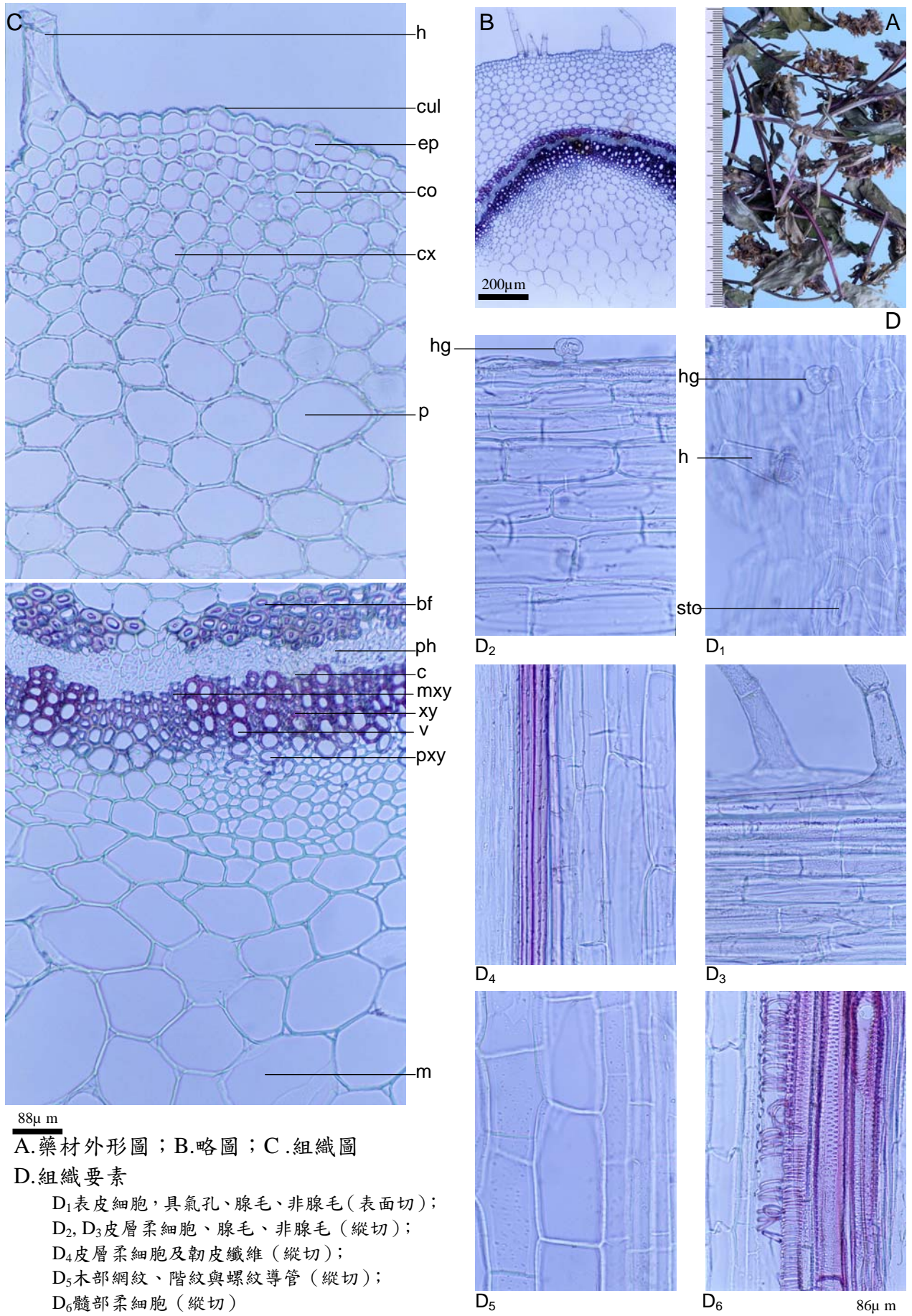
Fig. 6 台灣筋骨草培養於1/2MS培養基中生長成健全之植株



Fig. 7 日本筋骨草培養於1/2MS培養基具健全根系之植株



Fig. 8 藥農大量栽培之日本筋骨草



A. 藥材外形圖；B. 略圖；C. 組織圖

D. 組織要素

- D₁ 表皮細胞，具氣孔、腺毛、非腺毛（表面切）；
- D₂, D₃ 皮層柔細胞、腺毛、非腺毛（縱切）；
- D₄ 皮層柔細胞及韌皮纖維（縱切）；
- D₅ 木部網紋、階紋與螺旋紋導管（縱切）；
- D₆ 髓部柔細胞（縱切）

Fig. 9 日本筋骨草 (*Ajuga nipponensis* MAKINO) 莖之組織圖

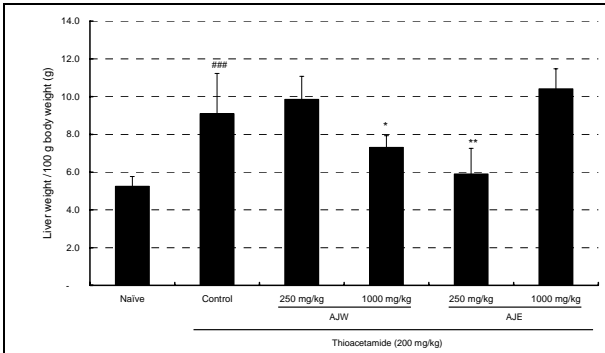


Fig. 10 BALC/c mice peritoneal injection with TAA (200 mg/kg) can significant increase liver weight (###P<0.001). AJW (1000 mg/kg, *P<0.05) and AJE (250 mg/kg, **P<0.01) can significant reduce the liver weight of TAA induced hepatic fibrosis.

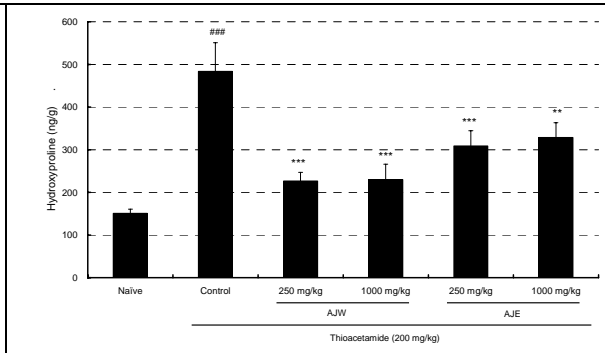


Fig. 11 BALC/c mice peritoneal injection with TAA (200 mg/kg) can significant increase hydroxyproline (###P<0.001). AJW (250 and 1000 mg/kg ***P<0.001), and AJE (250 mg/kg, ***P<0.001; 1000 mg/kg, **P<0.01) can significant reduce the hydroxyproline content of TAA induced hepatic fibrosis.

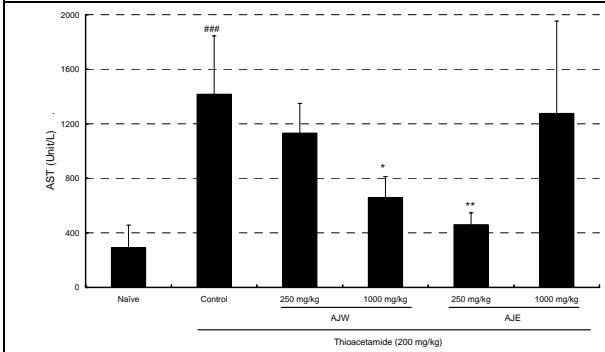


Fig. 12 BALC/c mice peritoneal injection with TAA (200 mg/kg) can significant increase AST (###P<0.001). AJW (1000 mg/kg *P<0.05), and AJE (250 mg/kg, **P<0.01) can significant reduce the serum AST content of TAA induced hepatic fibrosis.

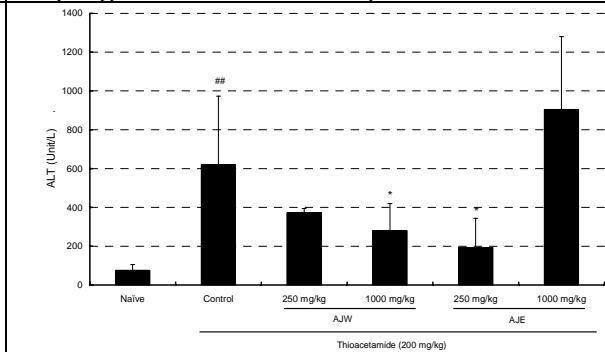


Fig. 13 BALC/c mice peritoneal injection with TAA (200 mg/kg) can significant increase ALT (##P<0.01). AJW (1000 mg/kg *P<0.05), and AJE (250 mg/kg, *P<0.05) can significant reduce the serum ALT content of TAA induced hepatic fibrosis.

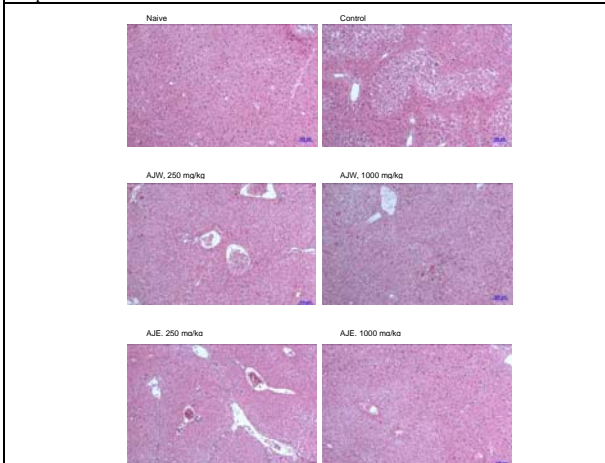


Fig. 14 H&E stain indicate TAA induce liver injure (control), and AJW, AJE can significant reduce liver injure.

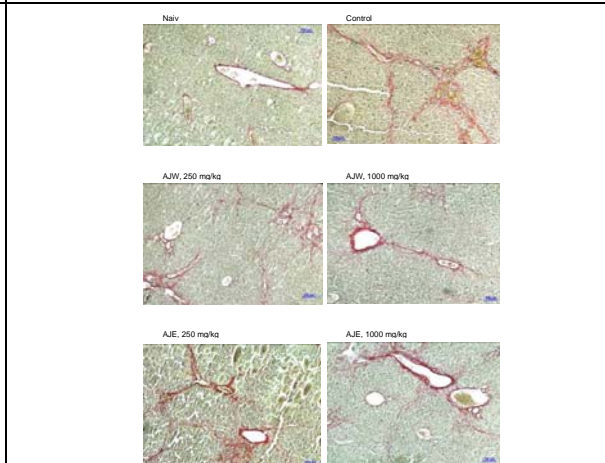


Fig. 15 Pico-sirius red stain indicate TAA induce hepatic collagen acumination (control), and AJW, AJE can significant reduce liver fibrosis.

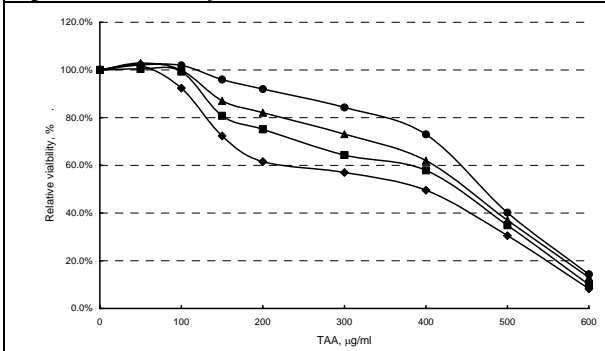


Fig. 16 Relative viability of TAA cytotoxic effect. AJW in 0 (◆), 12.5 µg/ml (■), 25 µg/ml (▲) and 50 µg/ml (●) can reduce the cytotoxic effect.

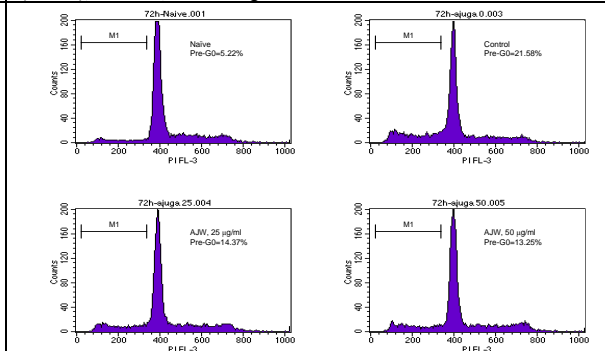


Fig. 17 Various doses of AJW (1, 25, 50 µg/ml) reduced TAA (250 µg/ml) induced BNL cell. M1 is the pre-G0 phase indicated apoptosis population. Reduced G2/M population also recover by AJW treatment.

略字解

bf bast fiber 韌皮纖維；c cambium 形成層；co collenchyma 厚角組織（細胞）
cul cuticular layer 角質層；cx cortex 皮（皮部）（皮層）；ep epidermis 表皮
h hair 毛；hg glandular hair 腺毛；m mark (pith) (medulla) 髓；
mxy xylem medullary ray 木部髓線；p parenchyma 柔細胞（柔組織）
ph phloem (leptome) 篩部；sto stoma 氣孔；v vessel (trachea) 導管；
x (xy) xylem 木部；xp protoxylem 原生木部

參考文獻

- 1.甘偉松：藥用植物學，國立中國醫藥研究所，台北，1970: pp.475-476。
- 2.張永勳、陳益昇等：台灣藥用植物資源名錄，行政院衛生署中醫藥委員會，台北，2003: pp.319-392
- 3.Huang, T. C. (ed.) Flora of Taiwan, 2nd, Vol. 4. Editorial Committee of the Flora of Taiwan, Taiwan. 1998: pp.432-504。
- 4.楊遠波等：台灣維管束植物簡誌 第四卷6 行政院農業委員會，台北，199: pp.133-134, 339。
- 5.褚小藍、王漢章、陳有根：筋骨草的本草考證。中藥材 1997;11(11): 586-7。
- 6.國家中醫藥管理局編委會：中華本草第七冊：上海科學技術出版社，1996; pp.5-11。
- 7.Lin TC, Hsieh CC, Agrasal DC, Kuo CL, Chueh FS, Tsay HS. ITS sequence based phylogenetic relationship of dangshen radix. J. Food Drug Analysis. 2007. 15:1-5.
- 8.Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497; 1962.
- 9.Satish M.N., Abhay P.S., Lee C.Y., Kao C.L., and Tsay H.S. 2003 Studies on tissue culture Studies on tissue culture of Chinese medicinal plant resources in Taiwan and their sustainable utilization. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 44:79-98.
- 10.Camloh M, Gogala N .1992 *In vitro* culture of *Platycerium bifurcatum* gametophyte. *Sci Hortic.* 51: 343-346.
- 11.Asaka, I., I. Ii, M. Hirotani, Y. Asada, T. Yoshikawa, and T. Furuya. 1994. Mass production of ginseng (*Panax ginseng*) embryoids on media containing high concentrations of sugar. *Planta Med.* 60: 146-148.
12. Bajaj, Y. P. S. 1995. Cryopreservation of germplasm of medicinal and aromatic plants. In: Bajaj, Y. P. S. (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 32, Cryopreservation of plant germplasm I, Springer-Verlag, Berlin, pp. 419-434.
13. Choi, Y. E., J. W. Kim, and E. S. Yoon. 1999. High frequency of plant production via somatic embryogenesis from callus or cell suspension cultures in *Eleutherococcus senticosus*. *Ann. Bot.* 83: 309-314.
- 14.Wu JB, Lin WL, Hsieh CC, Ho HY, Tsay HS, Lin WC. The hepatoprotective activity of kinsenoside from *Anoectochilus formosanus*. *Phytother Res.* 2007 21:58-61.
- 15.Hsieh CC, Fang HL, Lina WC. Inhibitory effect of *Solanum nigrum* on thioacetamide-induced liver fibrosis in mice. *J Ethnopharmacol.* 2008. 119:117-21.
- 16.You WC, Lin WC, Huang JT, Hsieh CC. Indigowood root extract protects hematopoietic cells, reduces tissue damage and modulates inflammatory cytokines after total-body irradiation: does Indirubin play a role in radioprotection? *Phytomedicine.* 2009 16:1105-11.
- 17.Hsieh CC, Hsiao HB, Lin WC. A standardized aqueous extract of *Anoectochilus formosanus* modulated airway hyperresponsiveness in an OVA-inhaled murine model. *Phytomedicine.* 2010. 17:557-62.

無衍生研發成果推廣資料

98 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：郭昭麟		計畫編號：98-2320-B-039-024-					
計畫名稱：台灣產筋骨草藥材基原鑑定、活性評估及組織培養大量繁殖之研究							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	將彙整本計畫之執行成果於99.12.112010「台灣藥學會年會暨學術研討會」以研討會論文發表。
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	1	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	0	100%			
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	0	100%			

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>無</p>
--	----------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

本計畫申請三年計畫，但只核准一年，因此計畫僅進行三種種原的採集、調查及基原與分子生物鑑定，同時進行二種種原的初步組織培養的大量繁殖及一種種原的粗抽成分之抗氧化能力及保肝的活性評估，並有初步成果，已達成預期目標。可由本計畫之結果應用於台灣產筋骨草藥材外部形態、內部組織的鑑別及分子鑑定，釐清其基原，建立科學化的鑑別機制，利用組織培養進行健康苗的大量繁殖及開發其為保肝的保健產品，未來具有開發為本土藥用植物資源，作為中草藥的藥材之潛力。

本計畫之抗氧化能力及保肝的活性評估，計進行降低硫代乙醯胺誘導小鼠肝纖維化之肝臟重量變化、降低硫代乙醯胺誘導小鼠肝纖維化之肝臟 hydroxyproline 變化、降低硫代乙醯胺誘導小鼠肝纖維化之血清 ALT 變化、降低硫代乙醯胺誘導小鼠肝損傷與肝纖維化之組織切片、降低硫代乙醯胺誘導小鼠肝細胞死亡分析、降低脂多醣胺誘導小鼠發炎細胞炎症反應分析等動物試驗，其成果將可進行學術期刊論文發表。