



行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 87-2314-B039-027

執行期限：86年8月1日至87年7月31日

主持人：蔡輝彥

中國醫藥學院藥理學科

微
縮
送
小
組

一、中文摘要

藜蘆鹼及芍藥 對扭體試驗及福馬林試驗中之早期，皆有劑量依存性的抑制作用；而芍藥 對於福馬林試驗中的晚期，也產生劑量依存性之鎮痛作用。藜蘆鹼之鎮痛作用，並不會被 L-arginine, L-NAME, β -FNA, ICI-174864, nor-BNI, pindobind-5-HT_{1A}, ketanserin, TTX 及 verapamil 所改變；芍藥 之鎮痛作用並不被 L-arginine, β -FNA, ICI-174864 和 ryanodine 所改變。

Naloxone (1 mg/kg, i.p.) 能夠逆轉芍藥 及藜蘆鹼在福馬林試驗中早期之鎮痛作用。LY-278584 可增加藜蘆鹼在福馬林試驗早期之鎮痛作用。芍藥 在福馬林試驗中之早期鎮痛作用可被 nor-BNI 所逆轉，晚期之鎮痛則可被 L-NAME 所逆轉。

芍藥 對離體鼩鼠輸精管並無作用。藜蘆鹼($1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-3}$ g/ml)，可引起離體大鼠及鼩鼠輸精管收縮。藜蘆鹼(1×10^{-5} g/ml) 所引起輸精管近副睪端及近前列腺端之收縮作用，可完全被 Ca^{++} -free 溶液及 verapamil 所抑制。而 naloxone 並不影響藜蘆鹼(1×10^{-5} g/ml) 所引起之收縮作用。芍藥 (4.8×10^{-5} g/ml) 則可以抑制藜蘆鹼對近副睪端及近前列腺端所引起之收縮作用，芍藥 可加強 norepinephrine (1×10^{-5} M) 對近副睪端所引起之快速性收縮作用，但減低對近前列腺端所引起之快速性收縮作用。芍藥 可增加 KCl (56 mM) 對近副睪端所引起的快速性收縮，但減低 KCl 對近副睪端及近前列腺端所引起之強直性收縮。Ryanodine (1×10^{-5} M) 可抑制藜蘆鹼在近副睪端及近前列腺端所引起之收縮，當併用芍藥 及 ryanodine 時，並不能加強芍藥 抑制藜蘆鹼在近副睪端及近前列腺端所引起之收縮作用。

關鍵詞：芍藥 ； 藜蘆鹼

Abstract

Veratrine and paeoniflorin showed dose-related antinociceptive effects on the writhing response test and the early phase of formalin test in mice. Paeoniflorin antinociception was also on the late phases of formalin test. The antinociceptive effects of veratrine were not altered by L-arginine, L-NAME, β -FNA, ICI-174864, nor-BNI (1 μ g, i.c.v.), pindobind-5-HT_{1A} (4 μ g, i.c.v.), ketanserin, TTX and verapamil on both the early and late phases of formalin test. The antinociception of paeoniflorin were not antagonized by L-arginine, β -FNA, ICI-174864 and ryanodine on both the early and late phases of formalin test. Naloxone (1 mg/kg, i.p.) could reverse the effects of veratrine and paeoniflorin on the early phase of formalin test. LY-278584 could potentiate the veratrine-induced antinociception on the early phase of formalin test. The early phase of paeoniflorin on formalin test could be reversed by nor-BNI and the late phase by L-NAME.

Paeoniflorin had no effect on the isolated mouse vas deferens. Veratrine ($1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-3}$ g/ml) could directly induce contraction of rat and mouse vas deferens. The contraction induced by veratrine (1×10^{-5} g/ml) was completely inhibited by the Ca^{2+} -free solution and verapamil both on the epididymal and prostatic portions. Naloxone (1×10^{-5} M) could not altered the contraction induced by veratrine both on the epididymal and prostatic portions. Paeoniflorin (4.8×10^{-5} g/ml) could inhibit the contraction induced by veratrine on both the epididymal and prostatic portions. Paeoniflorin could potentiate the norepinephrine (1×10^{-5} M)-induced phasic contraction on the epididymal portion but decrease on the prostatic portion. Paeoniflorin (4.8×10^{-5} g/ml) could increase

the KCl (56mM) -induced phasic contraction on the epididymal portion but decrease the tonic contraction on either the epididymal or the prostatic portion. Veratrine (1×10^{-5} g/ml)-induced contraction could be decreased by the pretreatment with ryanodine (1×10^{-5} M) both on the epididymal and prostatic portions. Pretreatment with the combination of paeoniflorin and ryanodine (1×10^{-5} M) could not potentiate the inhibition of paeoniflorin on the veratrine-induced contraction on both the epididymal and prostatic portions.

Keywords: Paeoniflorin Veratrine

二、計畫緣由與目的

中醫藥界對於中藥之配伍，一向遵循本草所述七情、十八反、十九畏之戒。十八反歌以儒門事親或珍珠囊補遺·藥性賦所載者為代表：「本草明言十八反，半萋貝斂芫攻烏，藻戟遂芫俱戰草，諸參辛芍叛藜蘆。」芍藥 (Paeoniflorin) 為芍藥的主成分。芍藥為毛茛科多年生草本植物 *Paeonia lactiflora* P_{ALL.} 的乾燥根。傳統中醫在臨床方劑中，常作為活血化瘀、解痙及止痛之作用。藉由現代藥理學的研究，發現芍藥具有輕度的鎮靜作用⁽¹⁾，對豚鼠、家兔之離體腸管呈現抑制作用⁽²⁾，對大鼠結腸組織能抑制其 ^{45}Ca 之內流⁽³⁾；顯示對不同部位平滑肌有選擇性的解痙作用。芍藥之鎮痛、解痙及抗腹瀉的作用，可能與其主成分 Paeoniflorin 之抗膽鹼激素作用 (anti-cholinergic action) 有關⁽⁴⁾。

藜蘆鹼 (Veratrine) 是藜蘆的主成分，其藥理作用很廣，常用來作為研究藥物藥理作用之工具。其對於 excitable membrane，包括 peripheral nerve、skeletal muscle 及 cardiac muscle 都有作用，這些作用與其活化 sodium channels，使細胞內鈉離子增加，而經由 Na^+ - Ca^{2+} exchange，導致細胞內鈣離子增加之機轉有關⁽⁵⁻⁷⁾。在中樞方面，Veratrine 會造成一些神經傳遞物質，如 GABA、ACh、NE、dopamine、CCK、glutamate 及 aspartate 之釋放⁽⁸⁻¹⁰⁾，且可誘發腦中 NO 之合成、增加 c-GMP 之含量及刺激 phospho-inositide

breakdown；甚至可以活化迷走傳入神經而引起鎮痛作用；並可改變腦組織切片中 opioid 及 muscarinic 之結合部位⁽¹²⁾。

芍藥與藜蘆在十八反中被列為“相反”的藥，在方劑使用上是不能相互配伍，其配合禁忌經由現代藥理學的探討，在中樞神經系統方面顯示，臺灣藜蘆與芍藥併用時，臺灣藜蘆能拮抗芍藥之鎮靜、鎮痛、抗痙攣的作用，且芍藥能加強臺灣藜蘆對鼯鼠之毒性，增加作嘔次數，並影響鼯鼠之自發運動量與改變腦內之單胺及其代謝物的濃度⁽¹³⁾，顯示臺灣藜蘆與芍藥併用時，對於中樞神經系統確實具有相互作用。在心肌方面，進一步以其主要成分作探討，發現芍藥之主成分 Paeoniflorin 能拮抗藜蘆之主成分 Veratrine 對於離體大鼠心房所引起之收縮增強及心律不整的作用，其機轉與 Paeoniflorin 阻斷 Ca^{2+} -channel 有關⁽¹⁴⁾。在我們利用 writhing response test 預試的鎮痛實驗，亦發現 Paeoniflorin 能拮抗 Veratrine 在扭體反應中的鎮痛作用。由此認為本草將藜蘆與芍藥列於十八反之內，是具有藥理學之意義。進而利用 *in vivo*、*in vitro* 的方法，探討 Paeoniflorin 與 Veratrine 在鎮痛之相互作用及其機轉。

三、結果與討論

本研究所使用之鎮痛模式為醋酸扭體反應及福馬林試驗，兩者皆屬於化學刺激之鎮痛模式。醋酸扭體反應⁽¹⁵⁾一般認為其所媒藉之機轉以周邊之作用較強，但亦有中樞之作用，因而無法確認其作用機轉是經由中樞或周邊而來，所以須進一步以福馬林試驗進行研究。福馬林試驗是由 Dubuisson 和 Dennis⁽¹⁶⁾於 1977 年提出，利用於動物之足蹠注射福馬林溶液引起疼痛，使動物產生舔蹠及頓足之行為表現。此一動物模式經由 Takahashi(1984)⁽¹⁷⁾等研究發現，其所產生之舔蹠反應呈現 biphasic 的作用。Veratrine 能夠劑量依存性的抑制鼯鼠因 1% 醋酸所引起之扭體反應次數，顯示 Veratrine 對於醋酸所致鼯鼠的扭體反應具鎮痛作用。Veratrine 對於福馬林試驗的早期舔蹠時間具有劑量依存性的抑制作用，而對於

晚期的舔蹠時間則無影響，顯示 Veratrine 的鎮痛作用機轉可能是經由其中樞的作用而來 Paeoniflorin 在扭體反應試驗中，亦呈劑量依存性的抑制作用，顯示 Paeoniflorin 對於扭體反應具有鎮痛作用。Paeoniflorin 對於福馬林試驗的早期及晚期舔蹠時間，均呈劑量依存性的抑制作用，顯示 Paeoniflorin 的鎮痛作用可能是經由其中樞及周邊作用機轉而來。NO 的前驅物質 L-arginine 及 NO 合成的抑制劑 L-NAME，對於 Veratrine 在福馬林試驗中的早期及晚期舔蹠時間並無影響，顯示 NO 這條 pathway 並非 Veratrine 鎮痛所媒介之機轉。L-arginine 並無加強 Paeoniflorin 在福馬林試驗中的早期及晚期的鎮痛作用，而 L-NAME 雖無法抑制 Paeoniflorin 在福馬林試驗中的早期作用，卻能逆轉 Paeoniflorin 在晚期的作用，可能是因 L-NAME 周邊腹腔給予所造成的周邊作用影響，而非 NO 這條 pathway 的直接作用。所以使用細胞內鈣離子阻斷劑 ryanodine，探討 Paeoniflorin 的鎮痛作用機轉，發現 ryanodine 並不影響 Paeoniflorin 在福馬林試驗中的早期及晚期的鎮痛作用，因此認為 Paeoniflorin 的鎮痛作用應與細胞內鈣離子的增加與否無關。

選擇性的 μ -antagonist, β -FNA, δ -antagonist, ICI-174864, 及 κ -antagonist, nor-BNI, 對於 Veratrine 在福馬林試驗中所致的鎮痛作用，無論早期或晚期均無逆轉的作用，顯示 Veratrine 的鎮痛作用似乎與鴉片樣接受體無關。然而非選擇性的 antagonist, naloxone, 卻可抑制 Veratrine 在福馬林試驗中的早期鎮痛作用，因此 Veratrine 的中樞鎮痛作用可能是經由 non-opioid receptors 的機轉而來。Paeoniflorin 對福馬林試驗的早期鎮痛作用可被非選擇性的阻斷劑 naloxone 及選擇性的 κ 阻斷劑 nor-BNI 所拮抗，而 μ 的阻斷劑 β -FNA 及 δ 的阻斷劑 ICI-174864, 則對 Paeoniflorin 的鎮痛作用無影響，顯示 Paeoniflorin 的中樞鎮痛作用機轉可能與其活化 κ 接受器的作用有關。但細胞內鈣離子阻斷劑 ryanodine 並不能拮抗 Paeoniflorin 在福馬

林試驗中的鎮痛作用，因此 Paeoniflorin 的鎮痛作用與細胞內鈣離子的增加無關。

在鎮痛系統中，除中樞 opioid 系統外，腦中之單胺物質亦扮演相當重要的角色。選擇性的 5-HT₁ 的阻斷劑(pindobind-5-HT_{1A})及 5-HT₂ 的阻斷劑(ketanserin)，對於 Veratrine 福馬林試驗中的早期及晚期的作用皆無抑制現象，而 5-HT₃ 的阻斷劑(LY-278584)，則可加強 Veratrine 在福馬林試驗中的早期鎮痛作用，顯示 Veratrine 對於福馬林試驗的早期鎮痛作用可能媒介由抑制 5-HT₃ 的活性所產生。

關於 Veratrine 的作用機轉，已知是經由活化鈉離子管道(sodium channels)，而使得細胞內鈉離子的濃度增加，在經由鈉-鈣的交換(Na^+ - Ca^{2+} exchange)的作用，而使細胞內鈣離子的濃度增加，產生其藥理活性的作用⁽¹⁸⁾。但是在我們的實驗結果中，使用鈉離子阻斷劑(TTX)及鈣離子阻斷劑(verapamil)，對於 veratrine 在福馬林試驗中的鎮痛作用並無影響，顯示 veratrine 的鎮痛作用與其活化鈉離子或鈣離子管道的作用較不密切。

Veratrine 對於離體大鼠及鼯鼠輸精管的副睪端及近前列腺端，可直接引起收縮作用，且其所引起的快速性收縮(phasic contraction)強度呈現濃度依存性的增加作用。當給予 L-type 鈣離子阻斷劑(verapamil)或 Ca^{2+} -free 的 Krebs 溶液時，皆能完全阻斷 Veratrine 在離體鼯鼠輸精管的副睪端及近前列腺端的收縮作用，顯示細胞外鈣離子對 Veratrine 在輸精管的收縮扮演重要的角色。已知 Veratrine 的作用機轉與其活化鈉離子及鈣離子管道有關⁽⁶⁻⁷⁾，由實驗結果證實，Veratrine 對於離體輸精管的收縮作用與活化鈣離子管道有關。為研究 Veratrine 與 opioid receptors 間的關係，利用鼯鼠離體輸精管上的 μ -、 δ -及 κ -opioid receptors 來探討⁽¹⁹⁻²⁰⁾，但當使用非選擇性的 opioid receptor 的拮抗劑(naloxone)並不會影響 Veratrine 在離體鼯鼠輸精管上的收縮作用，顯示 Veratrine 收縮與 opioid receptors 無關。

Paeoniflorin 能夠增強 norepinephrine

及 KCl 在輸精管副睪端所引起的快速性收縮，但卻減低 norepinephrine 在近前列腺端的快速性收縮。而 KCl 在輸精管的副睪端及近前列腺端所引起的強直性收縮，可被 Paeoniflorin 所抑制。由此推論，Paeoniflorin 對於輸精管的作用可能與其影響鈣離子的流動有關。

細胞內鈣離子阻斷劑(ryanodine)能夠減低 Veratrine 在鼯鼠離體輸精管的副睪端及近前列腺端的收縮，顯示細胞內鈣離子與 Veratrine 在輸精管所引起的收縮有關。當 Paeoniflorin 與 ryanodine 併用時，其在輸精管的副睪端及近前列腺端，對 Veratrine 所產生的抑制作用並沒有比 Paeoniflorin 單獨使用時強，所以當阻斷細胞內鈣離子時，並不會加強 Paeoniflorin 對 Veratrine 的抑制作用，顯示細胞內鈣離子的阻斷，與 Paeoniflorin 拮抗 Veratrine 在輸精管的作用並無直接的相關性。在先前的研究中，Paeoniflorin 能拮抗 Veratrine 在離體心房所引起的收縮及心律不整的作用，與 Paeoniflorin 阻斷鈣離子管道有關⁽¹⁴⁾。所以 Paeoniflorin 與 Veratrine 在輸精管的拮抗作用可能與其阻斷鈣離子管道的作用有關，而使得細胞外的鈣離子無法進入細胞內，因而減低 Veratrine 在輸精管的收縮。

四、參考文獻

1. 張雪琴等:白芍總 對老年性疾病的治療作用，中國藥理學通報，4(5): 314, 1988.
2. 崔豐年:芍藥甘草湯的藥理研究和臨床應用，中成藥，13(7): 36-37, 1991.
3. 郭世鋒、康毅、吳咸中:芍藥、甘草及芍藥甘草湯對離體大鼠結腸平滑肌 45Ca 內流的實驗研究，中成藥，3(7):45, 1991.
4. Kobayashi M., Ueda C., Aoki S., Tajima K., Tanaka N. and Yamahara J. Anticholinergic action of paeony root and its active constituents. Yakugaku Zasshi, 110(12): 964-968, 1990.
5. Brill D.M. and Wasserstrom J.A. Intracellular sodium and positive inotropic effect of veratridine and cardiac glycoside in sheep purkinje fibers. Circulation Research, 58: 109-119, 1986.
6. Nanasi P.P., Varro A., Bryant S.H. and Lathrop D.A. Effects of veratrine on ion currents in single rabbit cardiomyocytes. General Pharmacology, 25(8): 1667-72, 1994.
7. Lin Y.T., Chen Y.F., Tsai H.Y., Hsieh M.T. and Chen C.F. Effects of veratrine on isolated atria. Chinese Pharmaceutical Journal, 48(6): 427-439, 1996.
8. Kirkpatrick K.A., Richardson P.J. Adenosine receptor-mediated modulation of acetylcholine release from rat striatal synaptosomes. British Journal of Pharmacology, 110: 949-954, 1993.
9. Huang H.Y. ω -Conotoxin GVIA inhibits release of noradrenaline from rat hippocampal slices in the absence of extracellular calcium. Neuropharmacology, 32(2): 133-137, 1993.
10. Patterson T.A., Lim E.K., Meldrum M.J. and Dawson R.Jr. Glutamate efflux from rat brain rat slices and cultures: a comparison of the depolarizing agents potassium, 4-aminopyridine, and veratrine. Neurochemical Research, 20(2): 225-232, 1995.
11. Tiger G., Lundin D. and Fowler C.J. Veratrine-stimulated phosphoinositide breakdown as an assay for local anesthetic actions at Na^+ channels [see comments]. Anesthesia & Analgesia, 81(3): 480-485, 1995.
12. Van Huizen F., Wilkinson M., Cynader M. and Shaw C. Sodium channel toxins veratrine and veratridine modify opioid and muscarinic but not beta-adrenergic binding sites in brain slices. Brain Research Bulletin, 21(1): 129-132, 1988.
13. Chen Y.F., Tsai H.Y. and Chen H.C. The effects of veratri formosani rhizoma on some central actions of

paeoniae radix. Chinese Pharmaceutical Journal, 40(2): 11-16, 1988.

14. Tsai H.Y., Lin Y.T., Chen Y.F. and Chen C.F. The interactions of paeoniflorin and veratrine on isolated rat atria. *Journal of Ethnopharmacology*, 57: 169-176, 1997.
15. Collier H.O.J., Denneen L.C., Johnson C.A. and Schneider C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapeutics*, 32: 295-310, 1968.
16. Dubuisson D. and Dennis S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 4: 161-174, 1977.
17. Takahashi M., Tokuyama S. and Kaneto H. Implication of endogenous opioid mechanism in the production of antinociceptive effect induced by psychological stress in mice. *Japanese Journal of Pharmacology*, 44: 283-291, 1984.
18. Erecinska M., Nelson D., Silver I.A. Interactions of benztropine, atropine and ketamine with veratridine-activated sodium channels: effects on membrane depolarization, K⁺-efflux and neurotransmitter amino acid release. *British Journal of Pharmacology*, 94: 871-881, 1988.
19. Miller L., Shaw J.S. and Whiting E.M. The contribution of intrinsic activity to the action of opioids in vitro. *Journal of Pharmacology*, 87: 595-601, 1986.
20. Leslie F.M. Methods used for the study of opioid receptors. *Pharmacological Review*, 39(3): 197-239, 1987.