

中國醫藥大學 藥學院 中國藥學研究所 藥學博士論文

組別：藥理學組 編號：ICPS-D70

指導教授：彭文煌 博士

共同指導教授：吳啟瑞 博士

廣藿香甲醇萃取物鎮痛及抗發炎分子機轉之研究

**Molecular Mechanisms of Analgesic and
Anti-Inflammatory Effects of the Methanol Extract from**

Pogostemon cablin

研究生：呂宗俊

Tsung-Chun Lu

中華民國九十九年一月

誌 謝

五年了！自從離開靜宜大學，毅然決然的往研究領域繼續進修，拜讀在彭文煌老師名下，期間除了經歷實驗、研究、投稿，也完成了戀愛、結婚、生子，最後終於孕育出這本論文。這本論文雖然只是我這些年來在這領域的一部分，卻是我就讀博士期間，所有學習經歷的寫照，它的完成，代表著我人生志願的一個終點，也代表我另一個人生的起點。

這本著作的完成，最感謝的當然是彭文煌老師，從大學一年下開始，跟著彭老師學實驗，當完兵後攻讀碩士，亦是彭老師辛勤的指導。畢業後到靜宜擔任助教，有感於所學不足，又繼續回到彭老師門下進修博士。感謝彭老師十多年來，不論是做人處世、待人接物或是在學術上對我的諄諄教誨。謝明村前校長是一位有智慧且慈祥的長者，雖然退休了，仍然很熱心的到學校為學生指導，不論在課業上或是研究上甚至是生活感情方面，我都蒙受其利。當初若不是有謝校長的鼓勵與支持，相信我不會娶到君茹這麼棒的老婆，也不會找到靜宜助教的工作，更不可能會繼續進修博士。王文信大哥是我心目中如親兄弟般的大哥，因為有他的幫忙，才能讓動物實驗順利執行。打從大學打工當工讀生，到碩士班一起當同學，王大哥一直默默的幫忙；吳啟瑞老

師(吳大)對我照顧有加，雖然我把他的助理搶走了，可是他卻很大方的祝福我們，更在實驗、投稿以及論文寫作上指導我；感謝張文德老師在這幾年讓我當他的兼任助理，一方面學新的實驗，另一方面獲得養家育兒的生活費；張永勳老師是我心中最忙也最海派的老師了，跟老師借過太多數不清的儀器及書籍，老師總是二話不說”自己去翻”；黃冠中老師雖來才來兩三年，可是他的拼勁是有目共睹的。受到他的感染，我都想與他一起努力到晚上 11 點，可惜我家有一隻阿牛嗷嗷待哺，無法與老師一起奮鬥。感謝黃老師在細胞實驗方面給予我的幫忙與指導；謝謝立偉、皓元、穎志及家佑學長在實驗室及羽球場上與我一起努力打拼。汎修、國任、尚志、仁傑、皓元、世勳學長等好友的互相扶持，勇嘉、熒駿、趙嶸、紀方、繼仁、芸貞、佳臻、香秀及亭邑等學弟妹的幫忙、還有謝怡倩學妹畢業後還依舊常回來幫忙，另外要感謝成功大學賴俊熹(泡泡)學弟協助我打GC-MS，還有中興大學廖俊旺老師幫忙動物組織切片判讀，再來要感謝國祥、馨瑜夫婦及懷之、季真夫婦對我遠在竹南的老婆多加照顧，最後要感謝我的爸媽、兄弟、岳父母以及一直默默陪伴我的君茹及調皮鬼阿牛(呂以謙)，有了你們的鼓勵與支持，才有今天的我。感謝你們！

目錄

| | |
|-------------------------------|------|
| 目錄..... | I |
| 略字表..... | V |
| 圖目錄..... | VIII |
| 表目錄..... | XI |
| 摘要..... | XII |
| Abstract..... | XIV |
| 第一章 緒論..... | 1 |
| 第二章 總論..... | 4 |
| 第一節 廣藿香文獻考察..... | 4 |
| 一、廣藿香之本草考察..... | 4 |
| 二、廣藿香生藥學相關記載..... | 7 |
| 三、廣藿香成分..... | 11 |
| 四、廣藿香現代藥理相關研究..... | 11 |
| 第二節 疼痛反應相關文獻..... | 13 |
| 一、疼痛分子學..... | 13 |
| 二、疼痛的實驗模式..... | 13 |
| 三、發炎反應的生理機制..... | 15 |
| 四、發炎反應的分子機制..... | 15 |
| 五、發炎的實驗模式..... | 16 |
| 第三節 巨噬細胞 (RAW 264.7)實驗介紹..... | 19 |
| 一、巨噬細胞之活化與細胞激素..... | 19 |

| | |
|--------------------------------------|----|
| 二、 內毒素 (LPS)..... | 19 |
| 第四節 抗氧化相關文獻 | 21 |
| 一、 自由基..... | 21 |
| 二、 自由基的種類..... | 21 |
| 三、 自由基與疾病..... | 23 |
| 四、 生物體內的抗氧化防禦系統..... | 24 |
| 五、 抗氧化酵素..... | 25 |
| 第三章 材料與方法..... | 29 |
| 第一節 實驗架構與流程 | 29 |
| 第二節 材料萃取 | 30 |
| 第三節 實驗動物 | 31 |
| 第四節 廣藿香成分分析 | 32 |
| 第五節 廣藿香甲醇萃取物急性毒性試驗..... | 34 |
| 第六節 廣藿香及廣藿香油抗氧化實驗..... | 35 |
| 一、 試劑..... | 35 |
| 二、 儀器..... | 35 |
| 三、 實驗方法..... | 36 |
| 第七節 廣藿香對LPS誘發RAW 264.7 巨噬細胞發炎實驗..... | 38 |
| 一、 細胞培養使用之試劑..... | 38 |
| 二、 儀器..... | 39 |
| 三、 細胞培養..... | 40 |
| 四、 實驗流程..... | 40 |
| 五、 細胞總蛋白質含量測定..... | 40 |

| | | |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 六、 | PC _{MeOH} 對RAW細胞之毒性評估：MTT | 41 |
| 七、 | 一氧化氮試驗 | 42 |
| 八、 | 十二基硫酸鈉電泳法 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE) | 43 |
| 九、 | 西方點墨法 | 44 |
| 十、 | 細胞激素TNF- α 、IL-1 β 之分析 | 45 |
| 第八節 | 廣藿香及廣藿香油鎮痛及抗發炎之動物實驗 | 46 |
| 一、 | 試劑 | 46 |
| 二、 | 儀器 | 46 |
| 三、 | 實驗方法 | 47 |
| 第九節 | 統計分析 | 60 |
| 第四章 | 結果 | 61 |
| 第一節 | 廣藿香GC-MS成分分析圖 | 61 |
| 第二節 | 廣藿香甲醇萃取物急性毒性試驗 | 64 |
| 第三節 | 廣藿香及廣藿香油之DPPH自由基清除能力及抗氧化成分含量 | 64 |
| 一、 | 清除自由基DPPH | 64 |
| 二、 | 總多酚 (polyphenols)及總黃酮 (flavonoids)成分含量測定 | 66 |
| 第四節 | 廣藿香對LPS誘發RAW 264.7 巨噬細胞發炎實驗之影響 | 67 |
| 一、 | PC _{MeOH} 對RAW細胞之毒性評估 | 67 |
| 二、 | PC _{MeOH} 對LPS誘導RAW 264.7 細胞中細胞激素TNF- α 生成之影響 | 71 |
| 三、 | PC _{MeOH} 對LPS誘導RAW 264.7 細胞中細胞激素IL-1 β 生成之影響 | 73 |
| 四、 | PC _{MeOH} 對LPS誘導RAW 264.7 細胞中COX-2 與iNOS生成之影響 | 74 |
| 第五節 | 廣藿香及廣藿香油鎮痛及抗發炎動物實驗之影響 | 75 |

| | |
|---------------------------------|-----|
| 一、 鎮痛實驗..... | 75 |
| 二、 λ -角叉菜膠誘導足蹠腫脹影響..... | 81 |
| 三、 抗氧化酵素及生化值變化..... | 83 |
| 第五章 討論..... | 110 |
| 第六章 結論..... | 116 |
| 第七章 參考文獻..... | 119 |



略字表

| | |
|-------------------------------|--------------------------------------|
| AA | Arachidonic acid |
| BHT | Butylated hydroxytoluene |
| Carr | λ -Carrageenan |
| cNOS | Constitutive nitric oxide synthases |
| COX-2 | Cyclooxygenase 2 |
| DMEM | Dulbecco's minimal essential medium |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide |
| DPPH | 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl |
| eNOS | Endothelial nitric oxide synthases |
| FBS | Fetal bovine serum |
| GC-MS | Gas chromatography-mass spectrometry |
| GSH | Glutathione |
| GSH-Px | Glutathione peroxidase |
| GSH-Rd | Glutathione reductase |
| H ₂ O ₂ | Hydrogen peroxide |
| H&E | Hematoxylin and eosin stain |
| IC ₅₀ | Concentration with 50% inhibition |
| IHC | Immunohistochemical stain |
| IL-1 β | Interleukin-1 β |
| IL-6 | Interleukin-6 |

| | |
|----------------|-----------------------------------------------------------------|
| Indo | Indomethacin |
| iNOS | Inducible nitric oxide synthases |
| I.N.T | 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| MDA | Malondialdehyde |
| NADPH | Nicotinamide adenine diphosphate |
| NF- κ B | Nuclearfactor –kappa B |
| nNOS | Neuronal nitric oxide synthases |
| NO | Nitric oxide |
| O_2^- | Superoxide anion radical |
| OH \cdot | Hydroxyl radical |
| ONOO $^-$ | Peroxynitrite |
| PAF | Platelet activating factor |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PGs | Prostaglandins |
| RNS | Reactive nitrogen species |
| ROS | Reactive oxygen species |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate |
| SOD | Superoxide dismutase |
| TBA | Thiobarbituric acid |
| TCA | Trichloroacetic acid |



TEP 1,1,3,3-Tetraethoxypropane

TNF- α Tumor necrosis factor- α



圖目錄

| | |
|--------------------------------------------------|----|
| 圖 1. 重修改和經史證類備用本草對廣藿香的記載及附圖..... | 5 |
| 圖 2. 經史證類備急本草記載之廣藿香..... | 5 |
| 圖 3. 本草綱目對廣藿香的記載..... | 6 |
| 圖 4. 本草備要對廣藿香之記載..... | 6 |
| 圖 5. 廣藿香植物圖及生藥圖..... | 7 |
| 圖 6. 廣藿香莖縱切面..... | 9 |
| 圖 7. 廣藿香之粉末特徵圖..... | 10 |
| 圖 8. λ -角叉菜膠誘導的小鼠足蹠發炎反應機轉..... | 17 |
| 圖 9. LPS誘導RAW 264.7 細胞發炎反應機轉..... | 20 |
| 圖 10. MDA生成機轉圖..... | 22 |
| 圖 11. 體內自由基與抗氧化酵素機轉..... | 28 |
| 圖 12. 實驗架構與流程..... | 29 |
| 圖 13. MTT的還原過程..... | 42 |
| 圖 14. 肝臟抗氧化酵素作用機轉..... | 50 |
| 圖 15. QCM偵測COX-2 濃度圖..... | 53 |
| 圖 16. 廣藿香層析圖..... | 61 |
| 圖 17. 成分A質譜圖..... | 62 |
| 圖 18. 成分B質譜圖..... | 62 |
| 圖 19. 成分C質譜圖..... | 63 |
| 圖 20. 成分pogostone質譜圖 ⁽¹³⁶⁾ | 63 |
| 圖 21. PC _{MeOH} 清除DPPH自由基之TLC板染色試驗..... | 65 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 圖 22. RAW 264.7 細胞存活率試驗 | 68 |
| 圖 23 PC _{MeOH} 對RAW 264.7 細胞進行 24 小時反應後之形態觀察 | 69 |
| 圖 24. PC _{MeOH} 對RAW 264.7 細胞生成NO的影響 | 70 |
| 圖 25. 細胞以LPS誘導及不同濃度PC _{MeOH} 培養 24 小時後，對TNF- α 生成的影響 | 72 |
| 圖 26. 細胞於不同濃度PC _{MeOH} 培養 24 小時後，對LPS誘導後IL-1 β 生成的影響 | 73 |
| 圖 27. PC _{MeOH} 對LPS誘導RAW 264.7 生成COX-2 與iNOS的蛋白質表現量之影響 | 74 |
| 圖 28. PC _{MeOH} 及Indo對醋酸誘導小鼠扭體反應之鎮痛試驗 | 75 |
| 圖 29. PCO及Indo對醋酸誘導小鼠扭體反應之鎮痛試驗 | 76 |
| 圖 30. PC _{MeOH} 及Indo對福馬林誘導小鼠前期舔足反應之鎮痛試驗 | 77 |
| 圖 31. PCO及Indo對福馬林誘導小鼠前期舔足反應之鎮痛試驗 | 78 |
| 圖 32. PC _{MeOH} 及Indo對福馬林誘導小鼠後期舔足反應之鎮痛試驗 | 79 |
| 圖 33. PCO及Indo對福馬林誘導小鼠後期舔足反應之鎮痛試驗 | 80 |
| 圖 34. PC _{MeOH} 及Indo對 λ -角又菜膠誘導小鼠足蹠腫脹之抗發炎試驗 | 81 |
| 圖 35. PCO及Indo對 λ -角又菜膠誘導小鼠足蹠腫脹之抗發炎試驗 | 82 |
| 圖 36. PC _{MeOH} 及 Indo對小鼠肝臟抗氧化酵素SOD活性的影響 | 83 |
| 圖 37. PCO 及 Indo對小鼠肝臟抗氧化酵素SOD活性的影響 | 84 |
| 圖 38. PC _{MeOH} 及 Indo對小鼠肝臟抗氧化酵素GSH-Px活性的影響 | 85 |
| 圖 39. PCO及Indo對小鼠肝臟抗氧化酵素GSH-Px活性的影響 | 86 |
| 圖 40. PC _{MeOH} 及Indo對小鼠肝臟抗氧化酵素GSH-Rd活性的影響 | 87 |
| 圖 41. PCO及Indo對小鼠肝臟抗氧化酵素GSH-Rd活性的影響 | 88 |
| 圖 42. PC _{MeOH} 及Indo對Carr誘導小鼠足蹠發炎，足蹠中COX-2 含量抑制率的影響 | 89 |
| 圖 43. PCO及Indo對Carr誘導小鼠足蹠發炎，足蹠中COX-2 含量抑制率的影響 | 90 |
| 圖 44. PC _{MeOH} 及Indo對 λ -角又菜膠誘導小鼠足蹠發炎，足蹠中MDA含量的影響 | 91 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------|-----|
| 圖 45. PCO及Indo對λ-角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎，足蹠中MDA含量的影響 | 92 |
| 圖 46. PC _{MeOH} 及Indo對λ-角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎，足蹠中IL-6 濃度的影響..... | 93 |
| 圖 47. PCO及Indo對λ-角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎，足蹠中IL-6 濃度的影響 | 94 |
| 圖 48. PC _{MeOH} 及Indo對λ-角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎，足蹠中TNF-α濃度的影響 | 95 |
| 圖 49. PCO及Indo對λ-角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎，足蹠中TNF-α濃度之影響..... | 96 |
| 圖 50. λ-carrageenan 誘導小鼠足蹠發炎的H&E切片染色圖 | 99 |
| 圖 51. PC _{MeOH} 及Indo對λ-角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎後，足蹠之H&E染色..... | 100 |
| 圖 52. PC _{MeOH} 及Indo對λ-角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎後，COX-2 免疫組織化學染色 | 102 |
| 圖 53. PC _{MeOH} 及Indo對λ-角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎後，iNOS免疫組織化學染色 | 103 |
| 圖 54. PC _{MeOH} 及Indo對λ-角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎後，足蹠中COX-2 含量的影響 | 105 |
| 圖 55. PCO及Indo對λ-角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎後，足蹠中COX-2 含量的影響..... | 106 |
| 圖 56. PC _{MeOH} 及Indo對λ-角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎後，足蹠中iNOS含量的影響 | 108 |
| 圖 57. PCO及Indo對λ-角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎後，足蹠中iNOS含量的影響 | 109 |
| 圖 58. 廣藿香甲醇萃取物抗發炎之機轉圖 | 116 |

表目錄

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 表 1. GC/MS分析條件 | 33 |
| 表 2. IL-6 標準品濃度之配製表..... | 54 |
| 表 3. IL-6 實驗步驟流程表..... | 54 |
| 表 4. TNF- α 標準品濃度之配製表 | 56 |
| 表 5. TNF- α 實驗步驟流程表 | 56 |
| 表 6. MDA標準品濃度配製表..... | 57 |
| 表 7. 加入MDA試劑流程表..... | 57 |
| 表 8. 蛋白質定量配製表 | 60 |
| 表 9. PC _{MeOH} 以GC-MS分析的成分..... | 63 |
| 表 10. PC _{MeOH} 與PCO對DPPH自由基清除作用之IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 66 |
| 表 11. 病理評估標準 | 98 |
| 表 12. 小鼠足部病理評估..... | 98 |

廣藿香甲醇萃取物鎮痛及抗發炎分子機轉之研究

研究生 呂宗俊

中國醫藥大學 藥學院 中國藥學研究所

摘要

廣藿香 (*Pogostemon cablin*) 是臨床上常用的芳香化濕藥，中醫常用來治療中暑嘔瀉、頭痛寒熱；外用敷治瘡疔腫痛、刀傷、燙傷等症狀。研究指出廣藿香甲醇萃取物具有良好的抗氧化效果，並且具有止吐、鎮痛及抑制子宮收縮作用，因此本研究採用廣藿香為研究材料。以醋酸扭體及福馬林舔足試驗，探討廣藿香甲醇萃取物之鎮痛作用，另外體外實驗以 LPS 誘導 RAW 264.7 細胞株發炎試驗，以及體內實驗以 λ -角叉菜膠誘發小鼠足蹠浮腫試驗，研究抗發炎之效果；檢測其肝臟抗氧化酵素 SOD、GSH-Rd、GSH-Px 等活性及測定腳組織 MDA、IL-1 β 、IL-6 與 TNF- α 等 cytokines 含量，並以 quartz crystal microbalance(QCM)、西方點墨法與組織染色切片等不同的實驗方法驗證 COX-2 與 iNOS 的變化，藉以探討其鎮痛及抗發炎之分子機轉。

結果顯示，廣藿香甲醇萃取物 (1.0 g/kg) 及廣藿香油 (10, 20 mg/kg) 對於醋酸誘導的扭體反應有明顯的抑制效果，對於福馬林誘導的舔足反應，廣藿香甲醇

萃取物 (0.5, 1.0 g/kg)及廣藿香油 (10, 20 mg/kg)可明顯的減少小鼠後期舔足時間，另外抗發炎方面，體外實驗，廣藿香甲醇萃取物 (500, 1000 μ g/kg)可明顯抑制LPS誘導RAW 264.7生成NO與發炎介質 (iNOS、COX-2)以及cytokines (IL-1 β 與TNF- α)；廣藿香甲醇萃取物 (0.5, 1.0 g/kg)及廣藿香油 (10, 20 mg/kg)可明顯抑制 λ -角叉菜膠誘導小鼠的足蹠腫脹反應，並且增加肝臟抗氧化酵素 (SOD、GSH-Rd、GSH-Px)的活性以及抑制腳組織發炎介質 (COX-2、iNOS)與cytokines (IL-6、TNF- α)的含量。

上述結果顯示，廣藿香甲醇萃取物及其主成分廣藿香油均具有鎮痛及抗發炎作用。而其機轉研究顯示，鎮痛方面由於其可抑制醋酸誘導扭體反應及抑制福馬林所誘導的後期發炎性疼痛，因此我們推論其鎮痛效果與抑制發炎反應有關；而在抗發炎方面，檢測可增強肝臟抗氧化酵素活性以及抑制足蹠發炎介質的濃度，其作用之機轉可能與提升肝臟中抗氧化酵素，以清除自由基，減少發炎足蹠組織中脂質過氧化的傷害；減少cytokines (IL-1 β 、IL-6、TNF- α)的濃度，以抑制COX-2的產生；及減少cytokines含量及抑制iNOS的濃度，進而減少NO的生成，而達到抗發炎作用。

Molecular Mechanisms of Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of the Methanol Extract from *Pogostemon cablin*

Tsung-Chun Lu

Graduate Institute of Chinese Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, China

Medical University

Abstract

Pogostemon cablin (PC) is used as aromatic eliminating dampness herb by traditional Chinese physicians. In traditional Chinese medicine, it is often used for treating summer vomiting and diarrhea, headache fever and chills, furuncle, cut and scald. The methanol extract of PC (PC_{MeOH}) has significantly efficient anti-oxidative activity in some studies. Moreover, the antiemetic, analgesic and constriction effects were also demonstrated by treatment with PC. Therefore, this study investigated the analgesic effect of the PC_{MeOH} and Pogostemon cablin Oil (PCO) by acetic acid-induced writhing response and formalin test. The anti-inflammatory effect of the PC_{MeOH} was examined by LPS induced RAW 264.7 cells. In the vivo, PC_{MeOH} and PCO were examined by λ -carrageenan-induced paw edema in mice. To investigate the possible anti-inflammatory mechanisms of the PC_{MeOH} and PCO, we further measured the activities of SOD, GSH-Rd and GSH-Px in the liver tissue, the levels of MDA and cytokines such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the edema paw of mice, the

expressions of COX-2 and iNOS by Western blot, and immunohistochemical stain.

The results showed that the PC_{MeOH} (1.0 g/kg) and PCO (10, 20 mg/kg) significantly inhibited the acetic acid-induced writhing response. The PC_{MeOH} (0.5, 1.0 g/kg) and PCO (10, 20 mg/kg) significantly inhibited formalin (0.5%, 0.1 ml/ 10 g) induced the licking time in the late phase. Moreover, PC_{MeOH} (500, 1000 µg/kg) significantly inhibited the levels of NO, iNOS, COX-2 and cytokines such as IL-1β and TNF-α induced by LPS in RAW 264.7 cells. *In vivo*, PC_{MeOH} (0.5, 1.0 g/kg) and PCO (10, 20 mg/kg) also significantly inhibited λ-carrageenan-induced paw edema, and increased the activities of SOD, GSH-Rd and GSH-Px in the liver tissue.

The results show that the PC_{MeOH} and PCO possessed significant analgesic and anti-inflammatory effects. There are three possible anti-inflammatory mechanisms of the PC_{MeOH} and PCO. One is associated with enhancing anti-oxidative enzymes in liver for cleaning the free radicals and diminishing the damage of lipid peroxidation in inflammatory paw tissue. Another is associated with decreasing the levels of cytokines (IL-1β, IL-6 and TNF-α) that resulted in inhibition of COX-2 activity. The other is associated with inhibiting iNOS activity which resulted in decreasing NO production.

第一章 緒論

發炎是許多疾病的源頭，文獻指出炎症參與了許多疾病的致病機制，包括癌症⁽¹⁾，動脈粥狀硬化⁽²⁾，心血管疾病⁽³⁾，關節炎⁽⁴⁾，神經變性疾病⁽⁵⁾，糖尿病⁽⁶⁾，肥胖⁽⁷⁾。然而，目前仍有許多發炎性疾病或是慢性炎症尚未得到有效的控制與治療，這也使得越來越多的國家，希望從植物中尋找可以治療發炎疾病的天然產物。例如類風濕關節炎或骨關節炎的治療已改用補充和替代醫學，包括中草藥產品⁽⁸⁾。因此，找尋有效的消炎藥非常重要的。

炎症的特徵往往是紅、腫、痛、熱。這是宿主對入侵病菌一種很重要的防禦機制。發炎期間，前發炎因子如腫瘤壞死因子- α (TNF- α) 在細胞內受到刺激，會大量產生許多發炎介質，這些發炎介質包括誘導型環氧合酶 2 (COX-2)、前列腺素 (PGs)、誘導型一氧化氮合酶 (iNOS)、一氧化氮 (NO)⁽⁹⁾。誘導型環氧合酶 2 (COX-2) 會促進前列腺素的生合成⁽¹⁰⁾。而誘導型一氧化氮合酶 (iNOS) 則會大量產生一氧化氮 (NO)⁽¹¹⁾。許多的研究報告指出，一氧化氮和前列腺素參與炎症並造成更嚴重的傷害^(12, 13)。因此通過抑制 iNOS 和 COX-2 的含量，在抑制 NO 及前列腺素的生成，對治療炎症性疾病來說是很重要的^(14, 15)。

另外有文獻指出，自由基的攻擊亦會造成發炎反應的更加嚴重及持續，因此體內的抗氧化酵素如 superoxide dismutase (SOD)、glutathione (GSH)、glutathione peroxidase (GSH-P_x) 即扮演著非常重要的角色，它能夠減低體內 hydrogen peroxide (H₂O₂)、O₂⁻ 等自由基的增生，進而減少細胞間氧化壓力及損

傷，亦間接減少體內發炎反應的進行^(16, 17)。因此，減少體內自由基的增生對減低發炎反應極為重要。

廣藿香來源於唇形科植物廣藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth 的乾燥地上部分⁽¹⁸⁾。原產於菲律賓、馬來西亞、印度等國家，後來傳入我國，主要以栽培為主。目前在大陸、海南島、台灣均有栽培。廣藿香是中醫常用的芳香化濕藥，其味辛，性微溫；歸脾、胃、肺經，具有芳香化濁，開胃止嘔，發表解暑的功能。臨床上主要用於濕濁中阻，暑濕倦怠，胸悶不舒，寒濕閉暑，腹痛腹瀉，鼻淵頭痛等症⁽¹⁹⁾。中醫以其具有清熱止嘔、行氣化溼、健胃和脾之功效，用來治療中暑嘔瀉、胸積苦悶、頭痛寒熱；外用敷治瘡疔腫痛、刀傷、燙傷等症狀。藥理作用方面主要表現在調節胃腸功能、抗病原微生物兩個方面，在調節胃腸功能方面，廣藿香水抽提物、揮發油以及去油後其他部分均能不同程度地刺激胃腸分泌，提高胃蛋白酶活性，解除胃腸痙攣，對小鼠的胃排空功能、小鼠腸推進運動、大鼠胃分泌功能（胃酸總酸度、總酸排出量、胃蛋白酶活力）及小鼠足蹠組織澱粉酶活力均有促進作用；並對乙醯膽鹼、氯化鉍所致離體兔腸痙攣和番瀉葉引起的腹瀉次數和抑制冰醋酸引起的內臟絞痛均有解除和減輕功效^(20, 21)。廣藿香的抗病原微生物相關實驗結果證實，廣藿香具有抗真菌、細菌、病毒等作用^(22, 23)。在體外試驗方面，廣藿香甲醇萃取物抗氧化能力亦有不錯的表現⁽²⁴⁾。有鑑於此，我們合理推測廣藿香可能具有鎮痛抗發炎的功效，並且又能和胃健脾，或許可發展成具抗發炎活性又不傷腸胃的藥物。因此本研究將廣藿香乾燥後以甲醇萃取，得到廣藿香甲醇粗萃取物，並以 gas

chromatography-mass spectrometry (GC-MS)測定分析其主要成分；其次以體外抗氧化試驗評估其抗氧化能力，以 LPS 誘發巨噬細胞 (RAW 264.7)發炎試驗評估其體外抗發炎效果。動物實驗方面，則以醋酸扭體反應及福馬林試驗評估其鎮痛活性，另以 λ -角叉菜膠誘導足蹠浮腫試驗評估其抗發炎活性，並藉由測量小鼠肝臟 SOD、glutathione reductase (GSH-Rd)、GSH-Px 等抗氧化酵素活性生化數值以及足蹠的 malondialdehyde (MDA)、COX-2、iNOS、TNF- α 、interleukin-6 (IL-6) 等 cytokines 探討其機轉。再以 hematoxylin and eosin stain (H&E)染色方法，觀察其組織切片之發炎情形，並以 immunohistochemical stain (IHC)染色方法觀察其發炎部位之 COX-2 及 iNOS 的變化來佐證其抗發炎機轉。



第二章 總論

第一節 廣藿香文獻考察 (補藿香)

一、廣藿香之本草考察

藿香最早相關記載於東漢楊孚異物誌:「藿香交趾有之」。神農本草經尚未見其記載，嘉祐本草引隋代南州異物志謂:「藿香出海邊國，形如都梁，葉似水蘇，可著衣服中」。之後諸多本草如重修政和經史證類備用本草 (圖 1)⁽²⁵⁾、經史證類備急本草 (圖 2)⁽²⁶⁾、本草綱目 (圖 3)⁽²⁷⁾等均引嘉祐本草之記載。圖經曰:「藿香，舊附五香條，不著所出州土，今嶺南郡多有之，人家亦多種植」。本草備要曰:「藿香方莖有節，葉微似茄葉，古惟用葉，今枝莖亦用之，因葉多偽也」(圖 4)⁽²⁸⁾。

廣藿香之名最早出現西元 1957 年中藥通報刊出了李東生⁽²⁹⁾與陳潤初⁽³⁰⁾的論文，現代中醫藥典籍及藥典均正名為廣藿香，而現今之藿香一名則為土藿香。考察藿香之本草描述以及對照其附圖發現，皆與廣藿香較為符合。因此可知，現今臨床用之廣藿香即為本草所述之藿香。

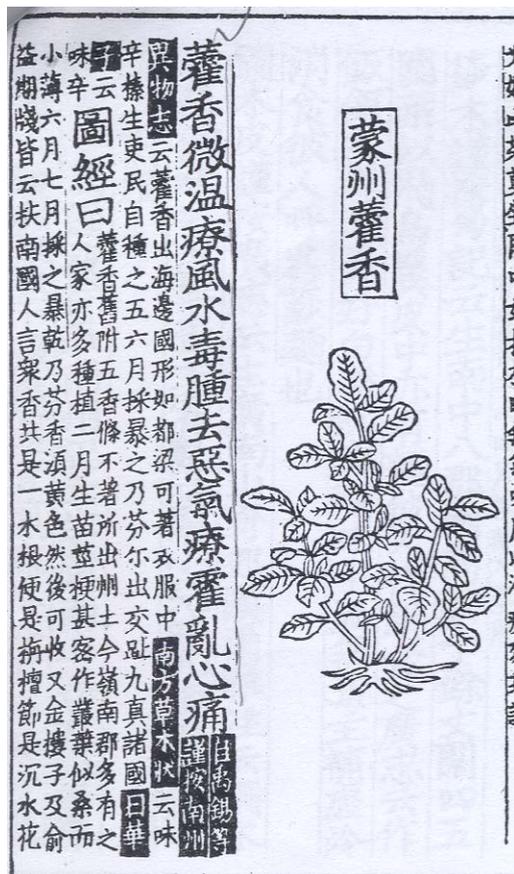


圖 1. 重修政和經史證類備用本草對廣藿香的記載及附圖⁽²⁵⁾

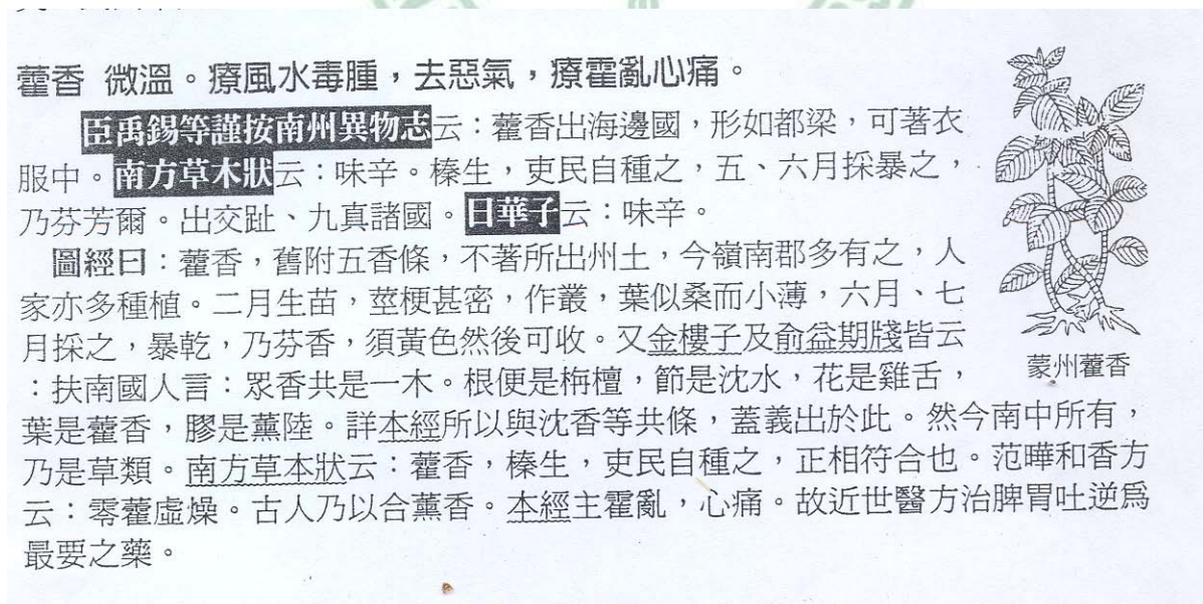


圖 2. 經史證類備急本草記載之廣藿香⁽²⁶⁾

二、廣藿香生藥學相關記載

廣藿香收載於中華中藥典為唇形科植物 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 的乾燥地上部份⁽¹⁸⁾，圖 5 為其植物圖及生藥圖⁽³¹⁾。



圖 5. 廣藿香植物圖及生藥圖⁽³¹⁾

(一) 廣藿香與藿香的比較^(18, 32)

1. 性狀鑑定：

廣藿香其莖略呈方柱型，多分枝，枝條稍曲折，長 30-60 公分，直徑 0.2-0.7 公分，表面被柔毛，質脆易折，斷面有髓，葉對生，邊緣具不規則鋸齒，氣香特異。藿香莖呈方柱形，直徑可達 5 mm，外表暗棕色，表面有縱紋，節顯明，節間長 3-10 cm。

2. 組織鑑別：

廣藿香以顯微鏡鏡檢其橫切面（圖 6），最外層為扁平長方形表皮細胞組成，具非腺毛及腺毛，表皮下有 3-5 層木栓化細胞，皮層由數列細胞組成，外為 4-10 層厚角細胞，內為薄壁細胞，細胞間隙大，內有間隙腺毛，腺毛頂部 1-2 個細胞，長橢圓形，內含黃色~黃綠色揮發油，腺毛柄由 1-3 個細胞組成，皮層細胞中含草酸鈣結晶，中柱鞘纖維成束，斷續排列成環狀，維管束為外韌維管束，莖的四角處較為發達，韌皮部狹窄，細胞呈不規則形，木質部由導管、木部薄細胞及木部纖維組成，導管呈類圓形或不等徑性多角形，木化，20-60 μm ，髓部細胞類圓形，微木化，有細胞間隙，且含草酸鈣結晶，並含少數澱粉粒⁽³³⁾。藿香莖橫切面：表皮由單層長方形細胞構成，其內為皮層，皮層細胞為薄壁組織，韌皮部則圍繞皮層之內，篩管細胞 2~3 層，木質部由排列整齊之導管細胞組成，中心部為髓部。

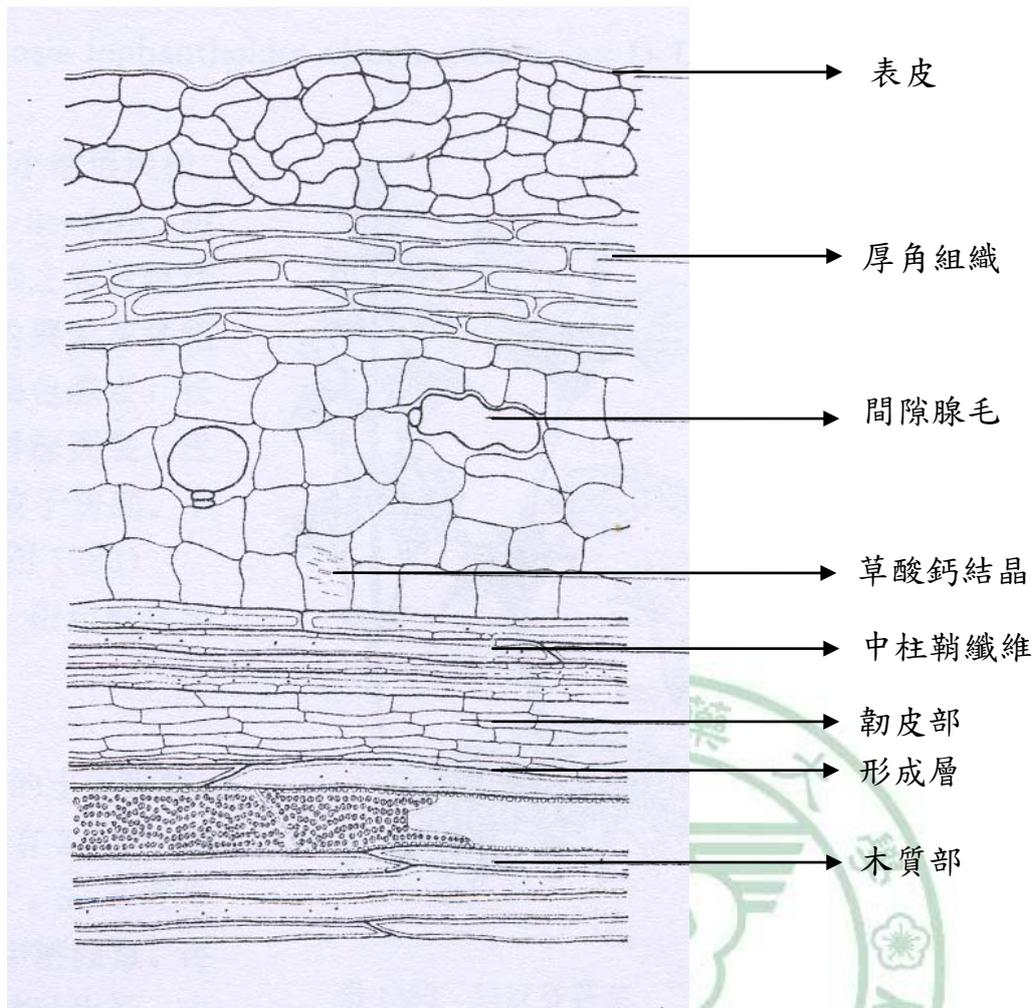


圖 6. 廣藿香莖縱切面⁽³³⁾

3. 粉末鑑定：

廣藿香粉末呈淡棕色，壁具刺狀突起，有的胞腔含黃棕色物，有的基部含小針晶，間隙腺毛存在於葉肉或莖薄壁組織的細胞間隙中，頭部單細胞呈不規則囊狀，含有金黃色油狀物，有特異香氣(圖 7)⁽³⁴⁾。藿香粉末呈棕黃色，非腺毛細胞，稍向一側偏彎，表面有疣狀突起，鱗腺頭部 4-8 細胞，內含淡黃色物，腺毛頂部 1~2 個細胞，腺毛柄由單細胞組成，草酸鈣針晶極細小，散在葉肉及莖表皮細胞中。

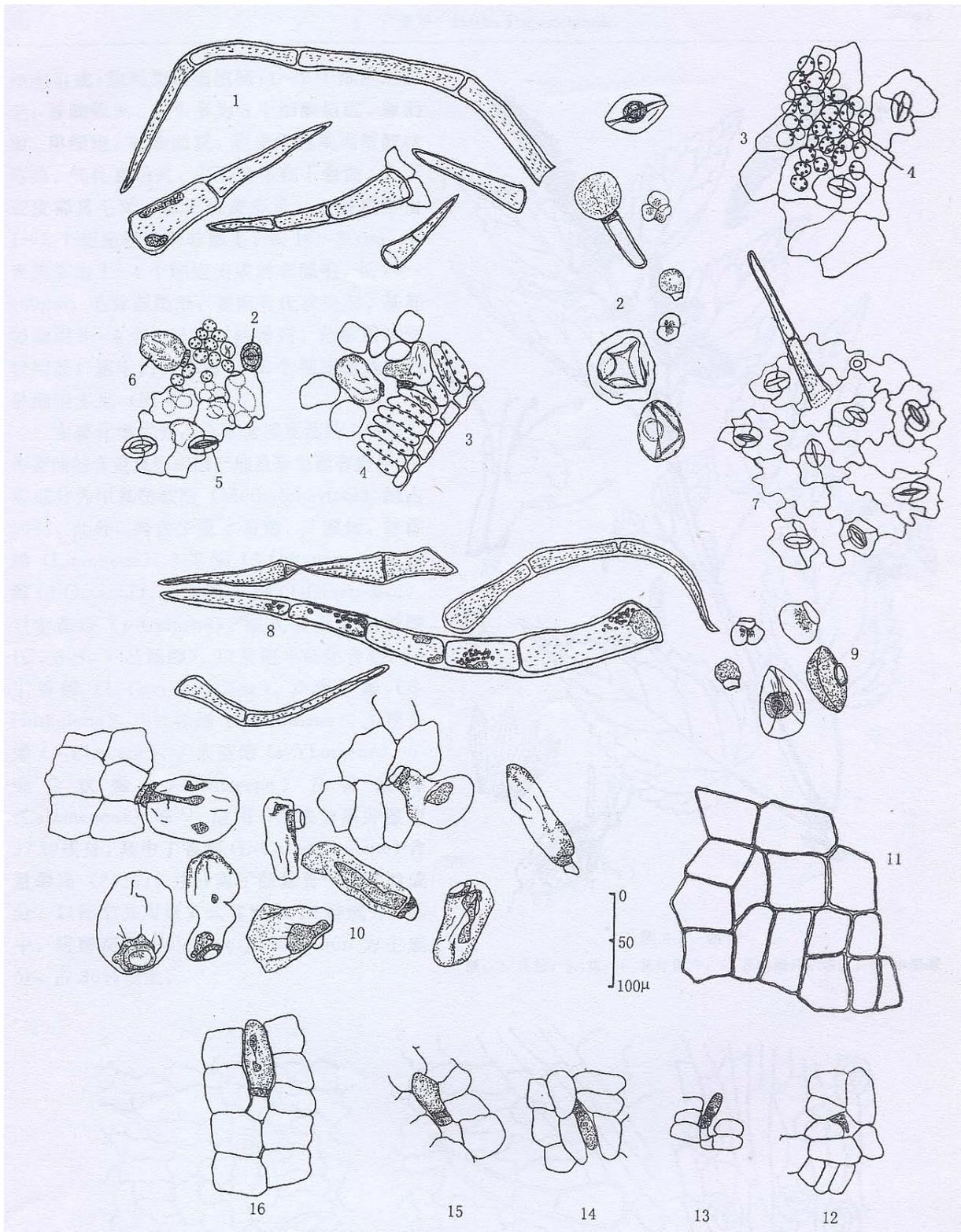


圖 7. 廣藿香之粉末特徵圖⁽³⁴⁾

圖中 1~7 葉粉末特徵；8~10 莖粉末特徵；1,8 非腺毛；2,9 腺毛；3.葉的上表皮；4. 柵欄組織；5.氣孔；6,10 間隙腺毛；7.葉的下表皮；11.木栓組織；12~16 莖皮層中間隙腺毛的發育過程。

三、廣藿香成分

廣藿香的主要藥用成分為揮發油，稱為廣藿香油 (patchouli oil)，內含倍半萜類成分：廣藿香醇 (patchuli alcohol)，佔約 44%，其他如 α -、 β -、 γ -廣藿香烯 (α -、 β -、 γ -patchoulene)⁽³⁵⁾、甘菊環 (azulene)、 α -、 β -、 δ -愈創木烯 (α -、 β -、 δ -guaiene)、廣藿香酮 (pogostone)、 α -布藜烯 (α -bulnesene)、雅檻藍油烯 (eremophilene)⁽³⁶⁾、環賽車烯 (cycloseychellene)、藿香醇 (patchoulol)、廣藿香奧醇 (pogostol)、賽車烯 (seychellene)、衣蘭烯 (ylangene)⁽³⁷⁾。還有黃酮類成分：5-羥基-3',7,4'-三甲氧基二氫黃酮 (5-hydroxy-3',7,4'-trimethoxyflavone)、3,5-二羥基-,7,4'-二甲氧基黃酮 (3,5-dihydroxy-7,4'-dimethoxyflavone)、3,5,7,3',4'-五羥基黃酮 (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone)⁽³⁸⁾、甘草查爾酮 A (licochalcone A)、商陸黃素 (ombuin)⁽³⁹⁾、巴拿馬黃檀異黃酮 (retusin)⁽⁴⁰⁾、藿香黃酮醇 (pachypodol)、熊竹素 (kumatakenin)⁽⁴¹⁾。

四、廣藿香現代藥理相關研究

(一) 廣藿香抽取物具有止咳平喘化痰的功效

劉堯⁽⁴²⁾以劑量 0.012、0.024 以及 0.036 mg /20 g 餵食小鼠廣藿香油，一個小時後，以氨水氣霧誘導小鼠咳嗽試驗，測試廣藿香油的止咳效果，結果顯示 0.024 mg 及 0.036 mg/20 g 的劑量下，有明顯的止咳效果。而化痰試驗是口服廣藿香油後以 0.5% 酚紅腹腔注射，30 分鐘後犧牲，取其氣管測試酚紅含量，分析其化痰能力，結果顯示低劑量至高劑量皆有明顯的化痰能力。

(二) 調節胃腸道功能

廣藿香的水萃取物、去油水萃取物和揮發油等三種萃取物對離體培養的兔子腸自發性收縮以及由乙醯膽鹼或氯化鋇引起的痙攣性收縮均有抑制作用，其中揮發油對乙醯膽鹼或氯化鋇引起的收縮抑制作用最強。此外，水萃取物、去油水萃取物和揮發油均可抑制冰醋酸引起的扭體反應⁽²⁰⁾。

(三) 抗菌作用

文獻指出以中國、印度和印度尼西亞爪哇不同產地的廣藿香油進行抗菌試驗發現，不同產地的廣藿香油均對皮膚癬菌和常見致病菌具有很好的特異選擇性抑制作用。其中以中國廣藿香油對皮膚癬菌作用最具有效果，能完全抑制淺部真菌紅色癬菌、狗小孢菌和絮狀表皮癬的生長繁殖⁽⁴³⁾。另外，亦有研究顯示廣藿香酮為抗菌主要成分之一，而 α -愈創木烯的抗菌活性較差⁽⁴⁴⁾。莫小路在培養基試驗中發現，廣藿香油在濃度為 0.03%~0.27% 時對受試的 13 種常見植物病原菌均有不同程度的抑制作用；當作用濃度為 0.1% 時，對檀香多毛孢、番茄早疫病菌和核盤菌可達到抑制⁽⁴⁵⁾。

第二節 疼痛反應相關文獻

一、疼痛分子學

疼痛初期由細胞接受刺激傳入神經去極化開始，經由突觸間傳遞以及自由擴散的方式將訊號送入中樞神經系統之神經細胞核內，藉由興奮性胺基酸受體及受體活化後所引發的一連串胞內訊息傳遞物質如 PKC、c-Jun、c-Fos、興奮性胺基酸、神經細胞內鈣離子、一氧化氮及前列腺素的釋放⁽⁴⁶⁾。因此，疼痛反應乃是細胞受刺激後產生一連串胞內的訊息傳遞物質釋放的生物學機制⁽⁴⁷⁾。

二、疼痛的實驗模式

疼痛刺激的原理包括熱刺激法、機械刺激法、電刺激法以及化學刺激法等四大類傷害性刺激⁽⁴⁸⁾，而研究疼痛的實驗動物模式包括：(1)簡單反射測量模式，如閃尾試驗、縮肢反射、張口反射等；(2)自然反應模式，如熱板試驗、扭體反應；(3)發炎性疼痛模式，如福馬林試驗、輔助性多關節炎、 λ -角叉菜膠誘導發炎等；(4)學習後反應模式，如休克滴定法、衝突事件反應時間等⁽⁴⁹⁾。

本論文所使用之疼痛刺激實驗模式為醋酸扭體反應及福馬林試驗。其中，醋酸扭體反應試驗能夠判斷是否具有抑制週邊性疼痛作用^(50, 51)，而福馬林試驗則可同時判斷中樞以及週邊所引起的痛覺反應⁽⁵²⁾。

(一) 醋酸扭體試驗

常用來刺激疼痛的化學物質有醋酸、致痛素 (bradykinin)、福馬林等，本研究採用 Siegmund 等人所提出的醋酸誘導扭體實驗⁽⁵³⁾，以醋酸作為誘發疼痛的誘

導劑，腹腔注射醋酸後，會刺激引發疼痛反應。實驗動物表徵為”腹部收縮內陷、後肢伸展、身體扭曲或蠕動”等扭體表現⁽⁵⁴⁾。另外分子機轉可發現，醋酸誘導疼痛反應中巨噬細胞及肥大細胞會釋出細胞激素，如 TNF- α 、interleukin-1 β (IL-1 β) 及 IL-6⁽⁵⁵⁾。當組織損傷時，交感神經系統中生物胺類會釋放 histamine、serotonin、bradykinin、cyclooxygenase、PGs，這些物質會誘導 adenosine 與 triphosphate 釋放，產生痛覺⁽⁵⁶⁾。

(二) 福馬林試驗

福馬林試驗是一個經常被使用來研究鎮痛抗發炎的動物模式，早在 1977 年 Dubuisson 和 Dennis 就已經提出⁽⁵⁷⁾，藉由觀察動物行為上的變化來評估化學性傷害刺激所造成的疼痛。經過不斷的研究觀察與改良，發現了福馬林的劑量與時間，對傷害及疼痛的誘導皆有很大的不同，Rosland 建議使用 1% 或更高濃度的福馬林溶液，誘導 30 分鐘之後，在光學顯微鏡下觀察組織，可發現組織呈現急性發炎反應⁽⁵²⁾。1989 年 Shibata 和 Takahashi 等人提出，在老鼠腳掌注射福馬林溶液後會造成雙相(biphasic response)的痛覺反應⁽⁵⁸⁾；即福馬林誘導的疼痛有兩個高峰期，其舔足時間亦有兩個高峰期，前期(early phase)屬於中樞性疼痛反應，在福馬林注入後 0~5 分鐘，主要是 substance P 和 bradykinin 等神經傳導物質的釋放，直接刺激了痛覺接受體(nociceptor)，再經由 A δ 及 C-神經纖維，將痛覺傳入中樞⁽⁵⁹⁾；後期(late phase)屬於發炎性疼痛反應，在誘導後的 20~30 分鐘所表現的舔足時間，主要是因為福馬林溶液引起發炎反應造成化學傳遞物質，例如：histamine、serotonin、PGs 及 kinin 等相關物質由受損組織細胞釋出

所引起⁽⁶⁰⁾。由此可知，福馬林試驗可有效評估藥物對發炎性和非發炎性疼痛之鎮痛作用⁽⁶¹⁾，藉以釐清鎮痛藥物之作用機轉。

三、發炎反應的生理機制

發炎反應係指生物體對損傷因子所誘發的一種防禦反應，這是一種常見卻又複雜的病理過程，同時與許多疾病的發生有密切關聯。損傷因子導致生物體各種的損傷，會促使生物體局部或全身發生一系列複雜的反應，藉以抑制或消滅損傷因子，清除壞死組織和細胞，並同時進行細胞的再生修復，這種複雜的現象構成了發炎反應⁽⁶²⁾。

發炎初期，嗜中性球、單核球及淋巴細胞會往感染部位移動，對於周邊發炎的組織細胞，會釋出組織胺刺激鄰近的血管，導致局部血管擴張及微血管通透性增加，而所呈現的紅、腫、熱、痛症狀⁽⁶³⁾。

四、發炎反應的分子機制

1970年McCord及Fridovich提出在發炎部位會有活性氧 ($O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 $OH^{\cdot-}$ 及 NO^{\cdot})等自由基的產生⁽⁶⁴⁾，並導致組織損傷包括增加微血管通透性、脂質過氧化、內皮細胞損傷。發炎反應的各個階段都有發炎介質的參與及釋放，引起各種反應，並刺激其他介質的生成與釋放，進而促進更嚴重的發炎反應⁽⁶⁵⁾，這些發炎介質大致可分成三類：(1)蛋白質類：細胞激素interleukin (如IL-1 β 、IL-6與IL-8等)、TNF- α 、IFN- γ 等，其中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 在急性發炎反應中扮演重

要角色，是發炎反應之主要調節者⁽⁶⁶⁾；(2)脂質衍生物：包括血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF)、cyclooxygenase 2 (COX-2)、白三烯素 (leukotrienes, LTA₄、LTC₄)、前列腺素 (prostaglandins, PGE₂)及血栓凝集素 (thromboxan, TXA₂)⁽⁶⁷⁾；(3)活性氧 (ROS)：如NO、O₂⁻、OONO⁻、H₂O₂等⁽⁶⁸⁾。這些發炎介質如NO的生成會刺激活化的巨噬細胞分泌IL-1β的能力；而IL-1β與TNF-α則會促進IL-6的分泌，進而使COX-2活化而增加PGE₂的生成與釋放⁽⁶⁹⁾。適當的發炎反應可避免感染的擴大；但是，過量或長期的發炎反應可能造成嚴重的心血管疾病以及癌症的發生⁽⁷⁰⁾。

五、發炎的實驗模式

評估發炎的模式可分為三方面：(1)肉芽組織增生模式；(2)檢測白血球細胞活化模式 (如胸膜炎模式)；(3)增加血管通透性模式 (如測定血漿蛋白滲出量與腫脹程度等)⁽⁷¹⁾。其中以λ-角叉菜膠 (λ-carrageenan, Carr)誘導足蹠腫脹程度模式是目前最常使用且作用機轉被研究的最透徹的一種致炎劑。λ-角叉菜膠具有 (1)引起局部刺激；(2)與抗原反應無關；(3)在毒性劑量下反應性佳；(4)無全身性作用；(5)再現性高等優勢，利用此法評估藥物之抗發炎效果，還可以探討藥物抗發炎機轉與自由基路徑之間的相互關係⁽⁷²⁾。

(一) λ-carrageenan誘導的足蹠發炎

λ-carrageenan 最初是由藻類角叉菜(愛蘭苔 *Irich seamoss*，學名 *Chondrus crispus*)抽提而得，為一種植物多醣體，經常被使用在刺激動物的蹠部，誘導發

炎反應的致炎物質。

(二) λ -carrageenan 誘導發炎的機轉

1962 年 Winter 等人利用 1% λ -carrageenan (50 μ L/隻) 注射小鼠足蹠，誘發足蹠腫脹⁽⁷³⁾。亦有文獻指出使用 λ -carrageenan 誘導三小時後，會引起最大的浮腫反應⁽⁷⁴⁾。 λ -carrageenan 所誘導的浮腫反應是雙向性的⁽⁷⁵⁾，發炎初期 (first phase) 或後期會釋放不同物質。在誘導發炎後 0~1 小時稱之為發炎初期，由於 histamine、bradykinin、serotonin 和 PAF⁽⁷²⁾ 的釋放與刺激而引起浮腫現象；而誘導發炎反應後 1~6 小時則是指發炎後期 (second phase)，此時則有超氧陰離子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 及 cytokines (IL-1 β 與 TNF- α) 的產生，cytokines 刺激 iNOS、COX-2 活性增加，造成 NO、PGs 生成，進而引起發炎性疼痛(圖 8)。

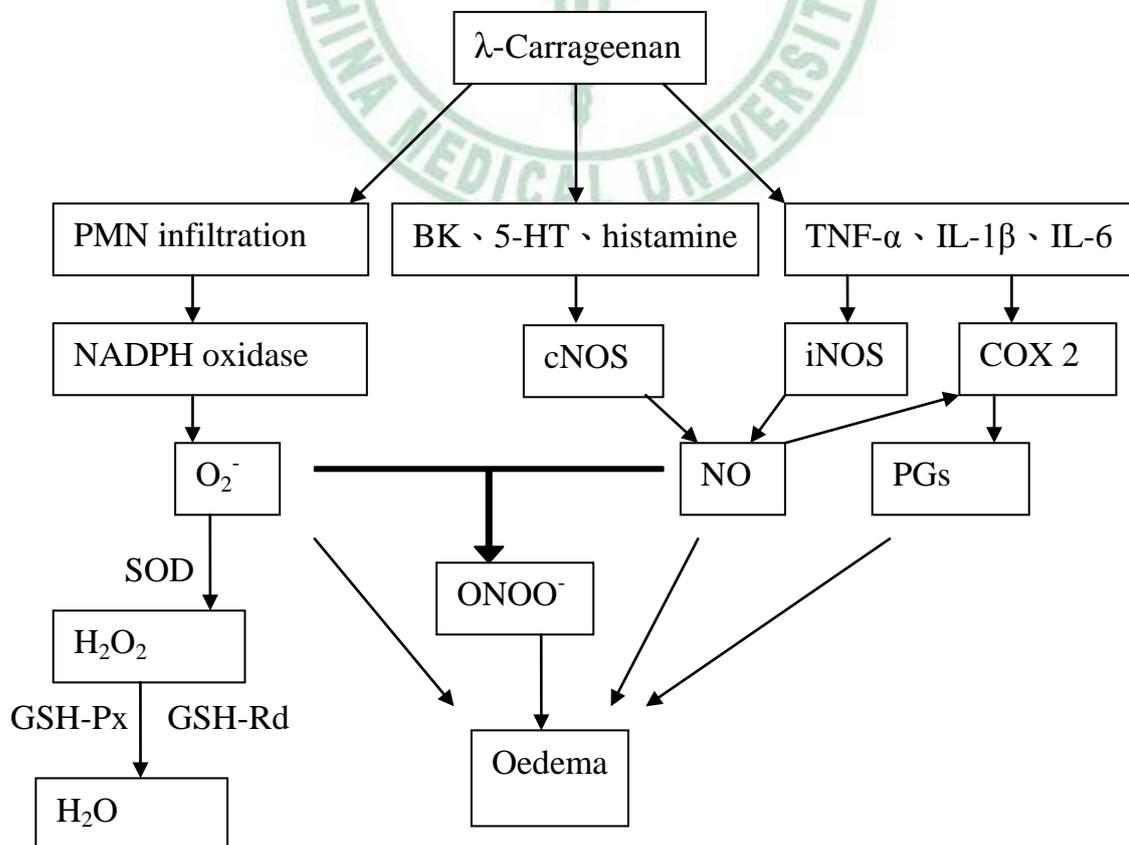


圖 8. λ -角叉菜膠誘導的小鼠足蹠發炎反應機轉⁽⁶⁷⁾

另外亦有研究指出 λ -角叉菜膠所誘導的發炎反應與自由基有關， O_2^- 、hydrogen peroxide (H_2O_2)、hydroxyl radicals (OH^\bullet)與 $ONOO^-$ ，是急性發炎反應的重要介質，這些介質在發炎反應後 1-6 小時即可被表現出來⁽⁶⁰⁾。 λ -carrageenan 會活化巨噬細胞，受活化的巨噬細胞會釋放出大量的超氧陰離子自由基 ($O_2^{\bullet-}$)。而 $O_2^{\bullet-}$ 會經由超氧歧化酵素(SOD)作用產生 H_2O_2 ， H_2O_2 會經由 catalase 和 GSH-Px，轉換成無害的氧和水；或是在亞鐵離子的作用下再轉變成 OH^\bullet ；或是在 NO 存在的情況下，與 NO 形成 $ONOO^-$ ，不論是 OH^\bullet 或是 $ONOO^-$ 都會攻擊脂質，造成更嚴重的發炎反應⁽⁷⁶⁾。



第三節 巨噬細胞(RAW 264.7)實驗介紹

一、巨噬細胞之活化與細胞激素

巨噬細胞為一種抗原呈現細胞，當生物體受到感染時，能夠調節發炎及免疫反應，因此經常被用來探討體外發炎反應，在小鼠的免疫系統中佔有舉足輕重的位子。巨噬細胞由造血幹細胞 (hematopoietic stem cell)經刺激因子 (cloning 8 - stimulating factors)及細胞激素 (interleukin)的刺激分化而來⁽⁷⁷⁾。當動物受到感染或傷害時，會促使巨噬細胞活化，釋放出大量的細胞激素 (cytokines)⁽⁷⁸⁾。發炎前期誘導產生細胞激素 (pro-inflammatory cytokines)如：IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等；趨化激素如：interleukin-8 (IL-8)、macrophage inflammatory protein-1 α/β (MIP-1 α/β)；或是抑制發炎的細胞激素 (anti-inflammatory cytokines)如 transforming growth factor- β (TGF- β)等⁽⁷⁹⁾。另外亦有研究指出在嚴重細菌感染的情況下，巨噬細胞會產生大量的NO⁽⁸⁰⁾而導致敗血性休克、低血壓、器官衰竭，甚至有可能致命^(81, 82)。

二、內毒素 (LPS)

內毒素 (endotoxin 或稱 lipopolysaccharide；簡稱 LPS)是革蘭氏陰性細菌細胞膜的主要成分，屬於醣脂類 (glycolipid)，其分子 Lipid A 部分是造成內毒素之生物毒性主要部分⁽⁸³⁾。經常作為活化巨噬細胞的誘導藥物，模擬生物體受到細菌感染時，體內巨噬細胞的反應。內毒素與細胞膜上之受體 CD14 結合後，會促使 I κ B 受磷酸化而分解，使原本呈現不活化態的核轉錄因子 nuclear factor - κ B

B (NF- κ B)活化，而影響許多細胞激素如：IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、COX-2 與 iNOS 等因子的產生⁽⁸⁴⁻⁸⁶⁾ (圖 9)。

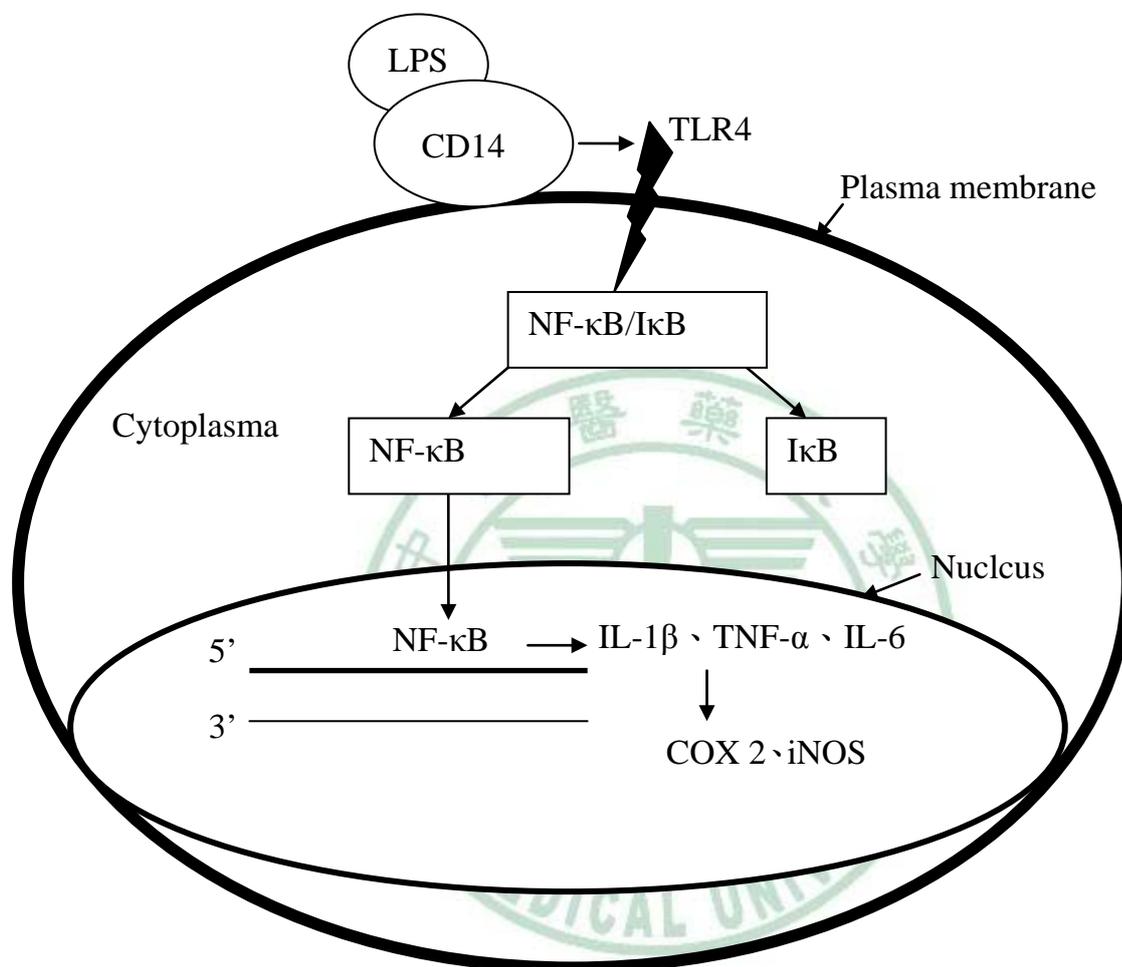


圖 9. LPS 誘導 RAW 264.7 細胞發炎反應機轉⁽⁸⁴⁻⁸⁶⁾

第四節 抗氧化相關文獻

一、自由基

自由基 (free radical) 是泛指具有一個或多個不成對電子的原子、分子或離子。因為其半衰期非常短，化學性質極不穩定，反應性較其他分子高，因此很容易攻擊週遭的分子，搶奪其鄰近分子的電子而形成電子對。藉由這種反應，使其本身達到穩定的狀態，而被搶奪電子的分子則變得不穩定，極易與其他分子碰撞，造成連鎖反應 (chain reaction)，產生更多的自由基⁽⁸⁷⁾。

二、自由基的種類

(一) 活性氧屬 (Reactive oxygen species, ROS)

活性氧為氧的某些特定代謝產物和一些反應的含氧產物，其活性較一般基態氧強。

1. 超氧陰離子($O_2^{\cdot -}$)

由體內粒線體及吞噬細胞釋放出的，是體內最先產生的自由基，為電子傳遞鏈因氧氣的還原反應不完整而產生。亦可能經由葡萄糖與蛋白質作用產生，半衰期短，無法穿過細胞膜，因此對生物體較少直接性的傷害。超氧陰離子在體內會轉變為過氧化氫 (H_2O_2)、氫氧自由基 ($OH\cdot$) 或 peroxynitrite 等，對生物體造成嚴重的傷害⁽⁸⁸⁾。

2. 過氧化氫 (H₂O₂)

屬於非自由基型的活性氧，其來源主要為 O₂⁻ 經 SOD 轉換而成，或是吞噬細胞進行吞噬作用及其他氧化還原作用皆會產生。當 H₂O₂ 穿過細胞膜時會與體內的鐵離子產生 Fenton reaction (H₂O₂ + Fe²⁺ → Fe³⁺ + OH⁻ + OH·)，產生對細胞傷害較大的氫氧自由基 (OH·) 及次氯酸，進而產生脂質過氧化造成傷害⁽⁸⁹⁾。

3. 氫氧自由基 (OH·)

為一個化學活性非常不穩定之 ROS，在體內由過氧化氫參與 Fenton reaction 而來。具有高反應性且半衰期短，是內生性氧化壓力的主要來源，造成體內脂質過氧化而破壞細胞，對生物體傷害性極大⁽⁹⁰⁾。

4. 脂質過氧化自由基 (lipid peroxy radical, LOO·)

脂質過氧化自由基為脂質不飽和脂肪酸的特殊化學結構，受自由基的攻擊而生成碳中心自由基，再與基態氧分子結合形成過氧化自由基與脂質過氧化物，經過一連串連鎖反應，造成更多的脂質被破壞，最終生成毒性極大的醛，如丙二醛 (MDA)(圖 10)，導致細胞壞死或變性失去功能⁽⁹¹⁻⁹³⁾。

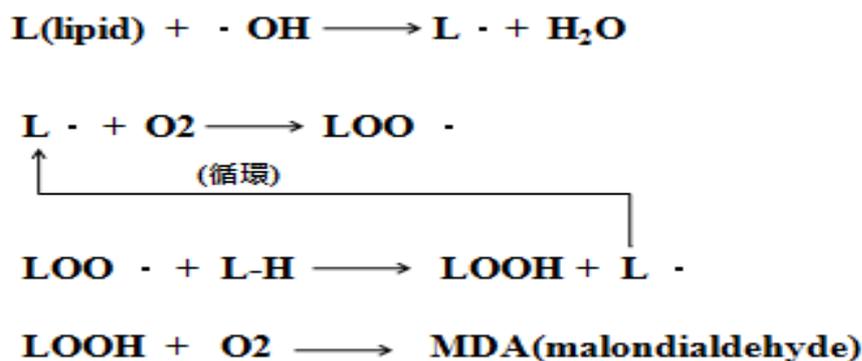


圖 10. MDA 生成機轉圖⁽⁹¹⁾

5. 單線態氧 (singlet oxygen, $^1\text{O}_2$)

為一強氧化劑，屬於非自由基型之活性氧物質。體內穩定態氧 ($^3\text{O}_2$) 經由紫外線照射後轉為激發態 (excited state) 的氧分子，其能階提高 22 kcal/ml，因此活性高亦非常不穩定，易與氫與脂質反應，產生自由基或是脂質過氧化⁽⁹⁴⁾。

(二) 活性氮屬 (Reactive nitrogen species, RNS)

活性氮屬 (RNS) 是攜帶電荷的含氮自由基或是不帶電的含氮化合物如：一氧化氮 (NO)、硝酸根自由基 (nitrate, NO_3^-)、二氧化氮 (nitrogen dioxide, NO_2) 等。生物體內的 RNS 大多是由 NO 的代謝反應而來的。NO 最早於 1988 年由 Palmer 及 Schmidt 所發現，為無色、無味之化合物，不帶電荷且具有一個未配對電子，以自由基形式存在於生物體內，可穿越細胞膜。NO 在體內是經由一氧化氮合成酵素 (nitric oxide synthases, NOS) 將 L-arginine 轉變成 L-citrulline 所生成的⁽⁹⁵⁾。一氧化氮合成酵素 (nitric oxide synthases, NOS) 又可分為 endothelial nitric oxide synthases (eNOS)、neuronal nitric oxide synthases (nNOS) 及 iNOS，其中 iNOS 存在於巨噬細胞中，受到發炎細胞素如細胞間質素-1 (IL-1) 及腫瘤壞死因子- α (TNF- α) 所調控⁽⁹⁶⁾。

三、自由基與疾病

自由基是生物體代謝過程中形成的產物，在體內自由基的生成與代謝不斷的循環。當體內的自由基生成遠超過代謝時，將會使身體的氧化還原平衡失調，而形成氧化壓力 (oxidative stress)^(97, 98)，過量的氧化壓力會破壞細胞，造成身體

嚴重的損害；許多研究顯示，細胞損傷、疾病的發生及基因突變等，皆與自由基有密切關係⁽⁹⁹⁾。與自由基有關的疾病如：心肌梗塞、動脈粥狀硬化、老年痴呆症、腦血管病變、肝炎、胰臟炎、消化性潰瘍、高血壓、糖尿病、自體免疫疾病（關節炎、紅斑性狼瘡）等^(100, 101)。

四、生物體內的抗氧化防禦系統

自由基造成氧化性損傷及疾病，日益受到重視。在生理狀態下，自由基的濃度是極低的，不會損傷生物體，且適量的自由基還具有調節細胞訊息、殺菌、預防及抵禦疾病的作用。然而因病理、環境因素、內源性、外源性因素間接或直接誘導產生的自由基得不到及時清除，就會造成對生物體的損傷，因此為了避免受到自由基的傷害，體內便衍生出一套防衛自由基的系統，可分為酵素型和非酵素型二大類：(1)酵素型：包括超氧化歧化酶 (SOD)、觸酶 (catalase)、麩胱甘肽過氧化酶 (GSH-Px)、glutathione transferase、GSH-Rd 等，體內可自行合成，但隨著年齡增長，合成能力亦會逐漸減低。(2)非酵素型：包括抗氧化維生素，如維生素 E、維生素 C、 β -carotene 及其它具有抗氧化能力的物質，如 glutathione (GSH)、尿酸 (uric acid)、白蛋白 (albumin)、膽紅素 (bilirubin) 等；另外，飲食補充的類黃酮 (flavonoids) 以及許多存有抗氧化成分的天然植物，如穀類、茶類、蔬果等，皆有助於清除體內自由基的堆積。

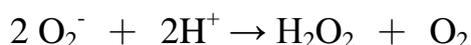
五、抗氧化酵素

哺乳動物細胞中的抗氧化酵素常見有 SOD、GSH-Px、catalase 等 (圖 11)。

(一) 超氧化歧化酶 (SOD)

SOD 是一種需要結合金屬離子為反應中心的酵素，根據其活性位置結合的金屬輔因子 (cofactor) 的不同，可區分成三類⁽¹⁰²⁾：(a)銅鋅型 (copper-zinc SOD, Cu/Zn/SOD)；(b)錳型 (manganese SOD, Mn-SOD)；(c)鐵型 (non-heme Fe³⁺ SOD, Fe-SOD)。在人體細胞的粒腺體中含有以錳為還原中心的 SOD 即 Mn-SOD，大多為由兩個次蛋白單元 (subunit) 組成的二聚體 (dimer)，但亦有發現四聚體或三聚體的存在，每個次蛋白單元含有一個錳離子。在紅血球及細胞質中的 SOD 則以銅和鋅為反應中心 Cu/Zn/SOD，大多數 Cu/Zn/SOD 為二聚體，每個次單元之間以疏水鍵相互作用結合而成，每個次單元都具有一個活性中心，含有一個銅離子與鋅離子。鐵型超氧化歧化酶 (Fe-SOD) 則分佈於原核細菌細胞質，藻類、某些高等植物及其葉綠體中，但在動物組織則從未發現過⁽¹⁰³⁾。

在正常情形下，細胞常因非偶合性電子傳遞系統 (uncoupled electron transport) 而產生超氧陰離子，而 SOD 的作用在於將超氧陰離子還原為 H₂O₂ 以避免在細胞內累積。SOD 清除超氧陰離子的反應可稱為歧化反應 (dismutation reaction)，其反應式如下：



經 SOD 作用形成的 H₂O₂，可進一步的經由觸酶 (catalase) 及麩胱甘肽過氧化酶 (GSH-Px) 將之代謝成不具毒性 H₂O。

(二) 麩胱甘肽過氧化酶 (GSH-Px)

麩胱甘肽過氧化酶 (GSH-Px)有兩型⁽¹⁰⁴⁾：第一型是 Se-GSH-Px，其酵素活性是需要依賴硒 (Se)的 GSH-Px；第二型是 Non-Se-GSH-Px，其酵素活性是不需要依賴硒 (Se)，稱為麩胱甘肽硫轉移酶 (glutathione S-transferase, GST)。這兩型不同處在於 Se-GSH-Px 可以還原 H_2O_2 及氫過氧化物，而 GST 只可還原氫過氧化物。麩胱甘肽過氧化酶 (GSH-Px)的受質 GSH，主要是由 glycine、glutamate 及 cysteine 三種胺基酸所構成的水溶性抗氧化分子，即 γ -Glu-Cys-Gly，因其結構所含 cysteine 含有硫氫基，故屬於硫醇化合物 (thiol compound)，在人體內 GSH 主要在肝臟合成⁽¹⁰⁵⁾。GSH 有還原態及氧化態二種，還原態只含一個硫氫基，簡寫為 GSH，氧化態則含有雙硫鍵，即 GSSG。還原態的 GSH 可作為 GSH-Px 的受質，協助 GSH-Px 將 H_2O_2 還原成 H_2O 及將脂質氫過氧化物 (LOOH)還原成醇類 (LOH)，以減少體內自由基的功用。而由上述亦可知，GST 亦具有將脂質氫過氧化物還原成醇類的能力，以避免脂質的過氧化擴大，整個酵素系統主要在清除體內過多的 H_2O_2 或 LOOH。然而，在這些反應過程中，GSH 會被氧化成 GSSG，此時 GSH-Rd 則可以 nicotinamide adenine diphosphate (NADPH)為還原力來源將氧化態的 GSSG 回復成 GSH⁽¹⁰⁶⁾；而葡萄糖-6-磷酸去氫酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH)則主要在提供 NADPH使 GSSG 還原為 GSH⁽¹⁰⁷⁾。Wang 也曾指出，紅血球所含的 GSH-Px 可保護血紅素免受 H_2O_2 的攻擊，而阻止鐵離子的釋出，進而抑制 $OH\cdot$ 形成，而 G6PDH 則在製造 NADPH

上扮演著重要的角色，因此若缺乏 G6PDH，會使得整個 GSH-Px 系統功能降低，這可能是造成 G6PDH 缺乏之病人溶血的原因⁽¹⁰⁸⁾。

(三) 觸酶 (catalase)

觸酶是由四個次蛋白單元組成，各含有血紅素 (heme) 和 NADPH 基團，此酵素分佈在生物體內各細胞組織，其中以紅血球與肝臟含量最多，在細胞中 catalase 主要是分佈於過氧化體 (peroxisomes) 內。在體內觸酶的作用類似 GSH-Px，具有將 H₂O₂ 代謝成不具毒性的 H₂O 之能力⁽¹⁰⁹⁾，其反應式如下：



在此種反應中，觸酶需要以 Fe²⁺ 為輔因子，才能發揮其酵素活性。H₂O₂ 會促使血紅素的 heme 基團釋出亞鐵離子 (Fe²⁺)，亦產生 Fenton reaction 的連鎖反應，而產生更多自由基。由於 catalase 及 GSH-Px 在體內分佈情形不同，例如在腦部 catalase 的含量較少，但 GSH-Px 含量較多，因此這兩種酵素會相互合作以行使分解 H₂O₂ 的工作，加速自由基的清除，以排除 H₂O₂ 所帶來的氧化壓力⁽¹¹⁰⁾。

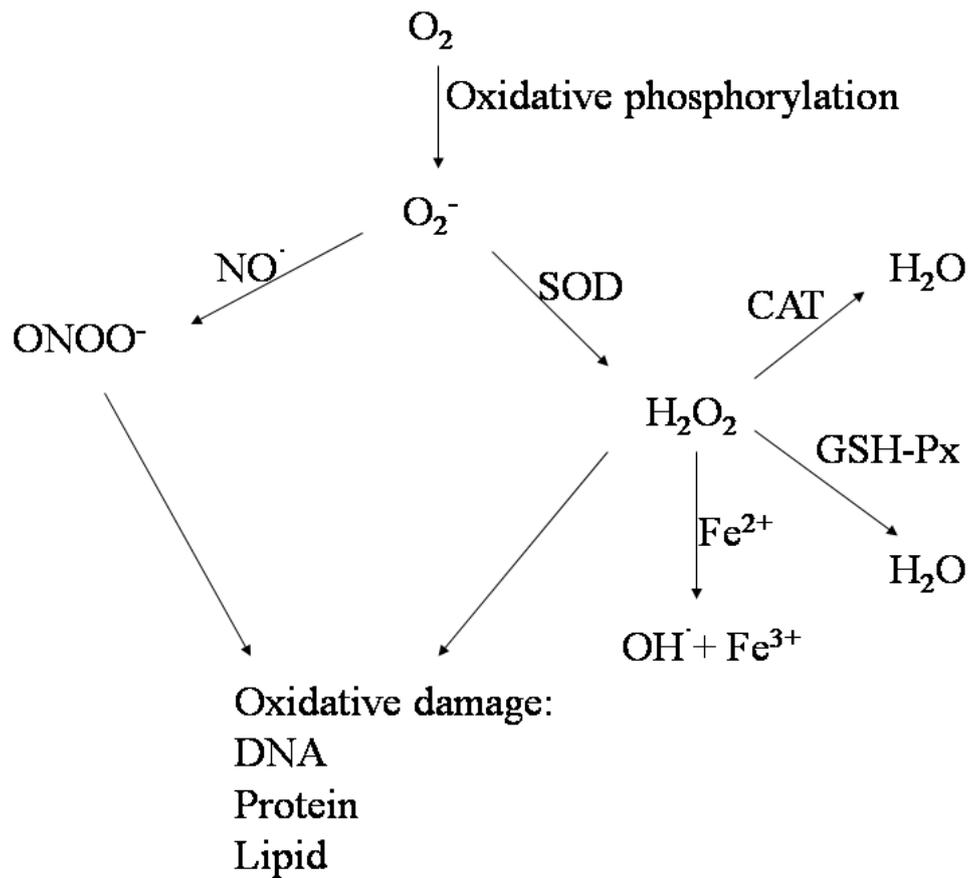


圖 11. 體內自由基與抗氧化酵素機轉⁽⁷⁶⁾.

在體內，超氧陰離子會與 NO 形成 $ONOO^-$ ，或是轉變成 Hydroxyl radical (OH^\cdot) 攻擊細胞膜造成氧化壓力，體內的抗氧化酵素 SOD、CAT 與 GSH-Px 則有助於自由基轉變成無害的 H_2O 。

第三章 材料與方法

第一節 實驗架構與流程

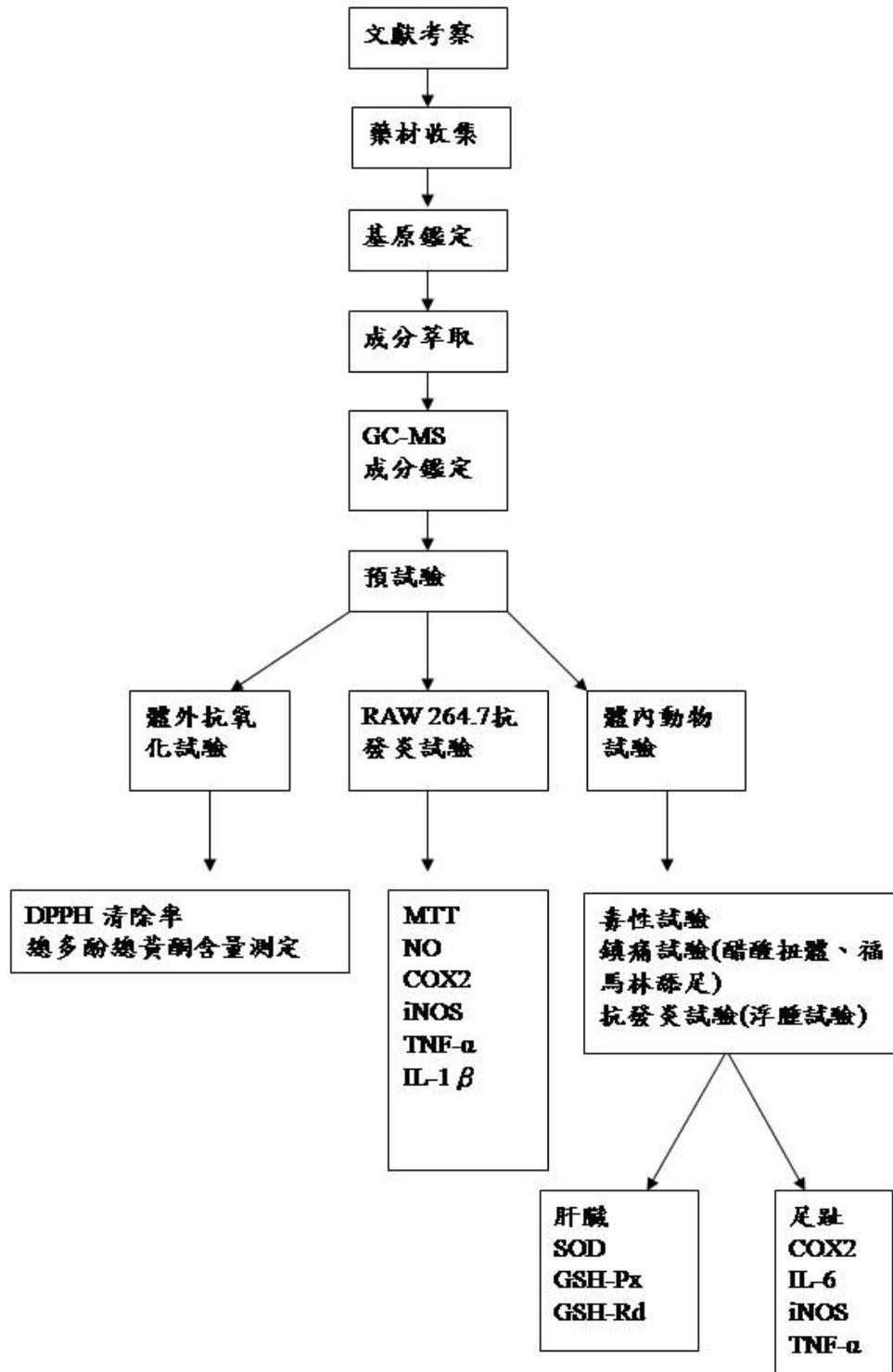


圖 12. 實驗架構與流程

第二節 藥材萃取

廣藿香自欣隆中藥行(台中市)購買，經過中國醫藥大學中藥資源學系系主任郭昭麟副教授鑑定後，將乾燥藥材秤重 (1800 g)經甲醇回流萃取四次，收集濾液後經過減壓濃縮機濃縮，並經過冷凍乾燥後得到廣藿香甲醇萃取物 53.1 g(以下簡稱PC_{MeOH})，萃取率為 2.95%。萃取物放置冰箱冷藏，實驗時，加入一至兩滴 Tween 80 以及慢慢加入二次水以瑪瑙研鉢研磨均勻，調配至適當濃度。

廣藿香揮發油則係購自中國藥品生物製品檢定所之國家藥品標準物質，以 GC-MS 分析其成分，確認其含有廣藿香醇等成分。廣藿香油之配製須先加入一至兩滴 Tween 80，以瑪瑙研鉢研磨均勻後再慢慢加入二次水，調配至適當濃度，再進行之後各項實驗。

萃取率 (%)=【萃取物乾重 (g)/ 植物材料乾重 (g)】× 100

第三節 實驗動物

本實驗採用之動物購自樂斯科生技股份有限公司，是ICR雄性小鼠，體重約21-25公克。飼養時溫度控制在 $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的空調飼養室，採12小時亮12小時暗(08:00 燈亮，20:00 燈暗)的燈光控制系統，食物與飲水之供應不予限制。實驗動物均依中華民國實驗動物學會出版之實驗動物飼養與管理指南之規定管理與照顧。



第四節 廣藿香成分分析

本實驗對於廣藿香甲醇萃取物分析方法是使用氣相層析質譜儀 (GC/MS 6890N/5973, Agilent Technologies)。直接將廣藿香甲醇萃取物以甲醇溶解後，以 $0.45\ \mu\text{m}$ 的過濾器過濾，之後以濃度 10ppm 開始施打溶劑注入至氣相層析質譜儀 (GC/MS) 進行分析，廣藿香甲醇萃取物波峰訊號於 GC 層析圖中大約出現於 19 及 45 分鐘。有關 GC/MS 之操作條件如表 1 所示，圖 16 至圖 24 為廣藿香甲醇萃取物之標準層析圖及質譜圖。



表 1. GC/MS 分析條件

| | |
|---------------|----------------------------------------------------|
| Columns | 30 m×0.25 mm×0.25 μm(film) HP DB-5 MS capillary |
| Injector temp | 250°C |
| MS temp | 280°C |
| Carrier Gas | He gas (99.9999%) |
| Gas pressure | 5 psi |
| Gas Flow | 1 mL/min |
| Initial | 80°C Hold 5 min |
| Ramp1 | 10 °C/min to 110 °C Hold 5 min |
| Ramp2 | 3 °C/min to 120 °C Hold 10 min |
| Ramp3 | 2 °C/min to 134 °C |
| Ramp4 | 1 °C/min to 143 °C Hold 5 min |
| Ramp5 | 5 °C/min to 240 °C |
| | 20 °C/min to 280 °C Hold 5 min |
| Run time | 60 min |

第五節 廣藿香甲醇萃取物急性毒性試驗

廣藿香甲醇萃取物以 10 g/kg 劑量口服灌食 ICR 公鼠，並給予充足的食物與水源，將其置於 23 °C 等適當環境下，觀察 7 天，並監測其行為與水量以及食物攝取量，實驗分組為兩組，分別為正常組及給藥組，每組十隻。



第六節 廣藿香及廣藿香油抗氧化實驗

一、試劑

1. (+)-Catechin
2. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)
3. 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulphonic acid (ABTS)
4. Aluminum chloride hexahydrate ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
5. Butylate hydroxyltoluene (BHT)
6. Ferric chloride (FeCl_3)
7. Glutathione reduced (GSH)
8. p-Dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA)
9. Potassium ferricyanide ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)
10. Potassium peroxodisulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)
11. Rutin
12. Sodium bicarbonate (Na_2CO_3)
13. Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4)
14. Sodium phosphate monobasic (NaH_2PO_4)
15. Trichloroacetic acid (TCA)
16. Tris (hydroxymethyl) aminomethane 以上試劑皆購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
17. Folin-Ciocalteu solution
18. 95% Ethanol 以上試劑皆購自 Merck Co. (Santa Ana, CA, USA)

二、儀器

1. 減壓濃縮機 (Rotavapor R200 Series, Buchi)
2. 冷凍乾燥機 (FreeZone 6, Labconco)

3. 離心機 (HermLe Z300)
4. 酵素免疫分析儀 (VERSAmax microplate reader, Molecular Devices)
5. 微量天平 (TB-214, Denver instrument)
6. 去離子水製造機 (Milli-Q, Millipore)
7. 酸鹼值測定計 (Microcomputer pH/mV/TEMP meter 6171)
8. 恆溫水浴槽 (Zeta ZC-4000, KS)
9. 震盪混合器 (Vortex-genie 2, Scientific industries)
10. Pipetment (Tipor-V, Orange scientific)
11. 96槽ELISA微量盤 (Greiner bio-one)
12. Pipet tips (Extra gene)

三、實驗方法

(一) DPPH 自由基清除染色法&清除效應

1. 清除效應

在 96 槽的微量平盤中加入 20 μL 不同濃度的試驗樣品之溶液與正對照組 (Vit C 和 BHT)，之後再加入 80 μL 的 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)，隨即迅速加入 100 μL DPPH 乙醇溶液 (500 μM)，使最後體積成為 200 μL 。均勻混合後於室溫下避光靜置 20 分鐘，之後以分光光度計，在波長 517 nm 下，測其吸光值。當 DPPH 自由基被清除越多時，其吸光值會下降的愈多，利用相對於空白對照組的吸光值下降百分比，可判斷各試驗樣品清除 DPPH 自由基能力之強弱，亦即表示試驗樣品供氫能力之強弱⁽¹¹⁾。清除力計算公式如下：

【 $1 - (\text{ABS}_{\text{sample}} / \text{ABS}_{\text{control}})$ 】 $\times 100$

2. 染色法

將不同濃度的樣品及正對照組 (Vit C 和 BHT) 依序以 3 μL 的量附載在 20 公分 \times 20 公分的 thin layer chromatography (TLC) 板子 (silica gel 60 F₂₅₄, Merck) 上，靜置使其陰乾約 3 分鐘，待乾後，將 TLC 板子向上浸泡在盛有 0.4 mM DPPH 溶液的槽中約 10 秒，將 TLC 板子拿出陰乾，多餘的 DPPH 溶液用薄紙輕輕擦拭，這時底色為紫色的 TLC 板子上若有呈現白點，代表樣品有清除自由基的活性，出現白點的密度大小正比於 DPPH 的自由基清除能力⁽¹¹²⁾。

(二) 總多酚及總黃酮成分含量測定

1. 總多酚類 (polyphenols) 含量測定

以 (+)-catechin 為標準品，做成減量線。取 20 μL 樣品溶液，加入 200 μL 之蒸餾水，混合均勻，加入 40 μL 的 Folin-Ciocalteu 試劑，靜置 5 分鐘，再加入 40 μL 之 20% 碳酸鈉 (sodium carbonate) 溶液，再以 680 nm 測其吸光值並計算總多酚類含量⁽¹¹³⁾。總多酚類含量以 mg (+)-catechin equivalent/g dry weight 表示。

2. 總類黃酮 (flavonoids) 含量測定

以 rutin 為標準品，做成減量線。取 100 μL 樣品溶液，加入 100 μL 2% 之 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 甲醇溶液，混合均勻，靜置 10 分鐘，再以 430 nm 測其吸光值並計算總類黃酮含量⁽¹¹⁴⁾。總類黃酮含量以 mg rutin equivalent/g dry weight 表示。

第七節 廣藿香對 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞發炎實驗

一、細胞培養使用之試劑

1. Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)
2. Fetal bovine serum (FBS)
3. Trypan blue
4. 40% (w/v) Acrylamide : bisacrylamide 以上試劑皆購自 GIBCO BRL.(Grand Island, NY)
5. Bovine serum albumin (BSA)
6. Diallyl disulfide (DADS)
7. Diallyl sulfide (DAS)
8. Diallyl methylsulfide (AMS)
9. Dimethyl sulfoxide(DMSO)
10. Lipopolysaccharide (LPS) from Escherichia coli 0111:B4
11. β -Mercaptoethanol
12. N-(1-naphthyl) ethylene diamine (NED)
13. Phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF)
14. Potassium chloride (KCl)
15. Potassium phosphate(KH_2PO_4)
16. Sodium bicarbonate (NaHCO_3)
17. Sodium chloride (NaCl)
18. Sodium nitrite
19. Sodium phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
20. Sulfanilamide
21. Tris base
22. Triton X-100
23. Tween 20 以上試劑皆購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)

24. Ammonium persulfate (APS)
25. Glycerol
26. Glycine
27. Sodium dodecyl sulfate (SDS) 以上試劑皆購自 USB 公司(Cleveland, OH)
28. ECL western blotting detection reagent 購自 Amersham LifeScience 公司(Cleveland, OH)
29. Absolute ethanol 購自 Merck 公司(Darmstadt, Germany)
30. Methanol 購自 ALPS 公司(Taiwan)
31. Mouse affinity-purified monoclonal antimouse COX-2 抗體購自 Abcam plc(UK)
32. Rabbit affinity-purified polyclonal antimouse iNOS 抗體購自 Abcam plc(UK)
33. Nitrocellulose membrane 購自 Schleicher & Schuell 公司(USA)
34. Ponceau S solution 購自 ACROS 公司(New Jersey, USA)
35. Protein molecular weight standards 購自 BioLabs 公司(New England)

二、儀器

1. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) reader(Labsystems Multiskan RC, Finland)
2. 分光光度計(Double beam UV-vis spectrophotometer model)U-2000, HITACHI)
3. 垂直及水平電泳裝置(Hoefer electrophoresis system, CA)
4. pH meter(JENWAY, model 3020)
5. CO₂ 培養箱(NAPCO, model 5410 incubator)
6. 冷光照相系統(Fuji, LAS-3000)

三、細胞培養

本研究選用小鼠巨噬細胞 (mouse macrophage cell line, RAW 264.7)，來源為 American Type Culture Collection (ATCC, No.TIB-71)購自食品工業發展研究所，菌種中心編號 CCRC60001，細胞培養於含有 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 的培養基中，並於 37°C，5% CO₂ incubator 環境下培養，當細胞長滿約 80%時，則以 phosphate buffered saline(PBS)，清洗細胞後再以 DMEM pipetting 的方式重新打散細胞，進行繼代培養。

四、實驗流程

細胞分別培養於直徑 10 公分的培養皿中，當生長至 7 至 8 分滿時添加溶於 PBS 中的 100 ng/mL LPS 以誘導 NO 的生成，並同時加入溶於 DMSO 之廣藿香甲醇萃取物，DMSO 於培養基之最終濃度不超過 0.1%，分別以其之溶劑為控制組，進行以下之分析。首先以 MTT assay 分析樣品對細胞存活率的影響，而後分析同時加入 LPS 與不同濃度之 PC 培養 24 小時後，分析其對 NO 生成之影響，並觀察是否有劑量效應。另一方面也收集 medium 利用 ELISA kit 分析不同劑量之 PC_{MeOH} 於 LPS 有無存在對細胞激素(TNF- α 與 IL-1 β)之影響，並收集細胞總蛋白質利用 Western blot 觀察細胞中 iNOS 與 COX-2 的蛋白質表現。

五、細胞總蛋白質含量測定

測量細胞中總蛋白質含量乃使用Bio-Rad 蛋白質分析試劑，目的在於定量由

細胞中萃取的總蛋白質含量，以進一步計算出於十二基硫酸鈉電泳法 (SDS-PAGE) 中每一蛋白質 sample 之需要量。定量方法乃是以牛血清蛋白 (BSA) 作為標準蛋白質。先泡製 stock 濃度為 10 mg/mL BSA 溶液，再以連續稀釋法配製 1~9 mg/mL 等不同濃度之蛋白質標準溶液。分別取 3 μ l 加入 1 ml 已稀釋 5 倍之 Coomassie® Brilliant Blue G-250 染料 (Bio-Rad dye)，混和均勻後於分光光度計波長 595 nm 下測量吸光值，並畫出標準曲線 (standard curve)，當相關係數 (correlation coefficient) 大於 0.99 時接受此標準曲線。

先將定量之細胞培養於 10 cm 培養皿 24 小時後，於細胞中添加不同濃度之 PC_{MeOH} 培養 24 小時，利用 100 μ l lysis solution (150 mM NaCl / 1% Triton X-100 / 10 mM Tris, pH 7.4 / 5 mM EDTA / 1 mM phenyl methyl sulfony fluoride, PMSF)，以 12000 g 離心 10 分鐘，收集上清液 (細胞蛋白質萃取液)。而後取 3 μ l 細胞蛋白質萃取液加入 1 ml 已稀釋 5 倍之 Bio-Rad dye 染料，混和均勻後於分光光度計波長 595 nm 下測量吸光值，並利用上述之標準曲線計算出正確蛋白質含量。每一樣本進行重複兩次 (duplicate) 之分析。

六、PC_{MeOH} 對 RAW 264.7 細胞之毒性評估：MTT

此項實驗以 PC_{MeOH} 對 RAW 264.7 細胞之存活率試驗進行，一般認為實驗樣品所選的濃度範圍，其細胞存活率宜大於 90%，方具有繼續進行實驗的意義，故以不同濃度的 PC_{MeOH} 進行細胞之存活率試驗。將 RAW 264.7 細胞培養於 96 wells 培養盤中，每 well 的細胞數以 2×10^4 cells 置入，體積為 100 μ L，培養液為

含 10% FBS 之 DMEM，培養於 5% CO₂、37 °C 之高濕度恆溫培養箱中。培養 24 小時，待細胞貼附好後，加入含 LPS（最終濃度為 100 ng/mL），以及不同濃度之 PC_{MeOH}（最終濃度為 1000、500、250、125 及 62.5 μg/mL），再培養 24 小時後，始進行 MTT 試驗⁽¹¹⁵⁻¹¹⁷⁾。MTT assay 主要是依賴活細胞內粒線體中琥珀酸去氫酶的作用將 MTT【黃色水溶性固體】的 tetrazolium 轉變為藍紫色產物 MTT formazan（不溶性）⁽¹¹⁸⁾，如圖 13 所示。這種轉變僅發生於活細胞，而 MTT formazan 會堆積於細胞內，且 formazan 形成量會與活的細胞數目成正比。

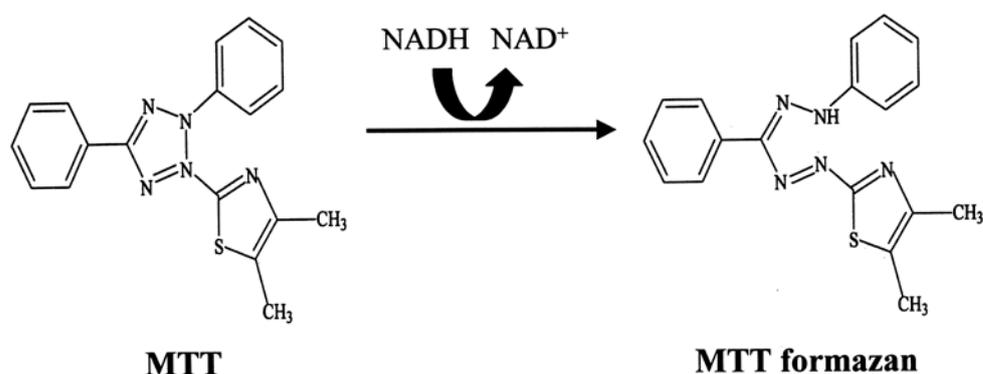


圖 13. MTT 的還原過程⁽¹¹⁸⁾

實驗首先抽去每 well 中的培養液，用 DPBS 清洗 1 次，加入 90 μL 培養液及 10 μL MTT 溶液 (1 μg/mL)，再放入培養箱中 4 小時，接著用 isopropanol (100 μL/well) 溶出細胞中之藍紫色顆粒，最後以 570 nm 波長測定其吸光值，並以控制組（不添加 PC_{MeOH}，僅有 LPS）之吸光值當 100 % 表示。

七、一氧化氮試驗

取 138 mg 之 sodium nitrite 溶於 20 ml 去離子水配置成 100 mM stock

solution，在依序稀釋為0~500 μM 不同濃度之nitrite 標準液，並加入Griess reagent 於波長540 nm分析nitrite含量，相關係數大於0.99時接受標準曲線，利用上述之標準曲線對應計算出正確nitrite含量，結果以 μM 表示之，每一樣本進行重複兩次 (duplicate)之分析。

NO在自然界只短暫存在數秒鐘，體液或溶液中主要以其穩定之產物nitrite 與nitrate存在，所以本實驗主要利用將0.1% naphthylenediamine dihydrochloride 與1% sulfanilamide/5% H_3PO_4 所組成之Griess reagent 與nitrite結合，呈現紅棕色產物，在吸光值540 nm 偵測之，以溶液中nitrite 之含量代表NO之生成量⁽¹¹⁹⁾。

以 5×10^5 細胞/well 培養於24 well培養皿24小時後，加入LPS 誘導NO 之生成，同時加入不同濃度之 PC_{MeOH} 繼續培養24小時後，取培養液到96 well microtiter plate 中，加入等量之Griess reagent，利用microplate reader於波長540 nm下測量培養液中nitrite含量，以反應細胞中NO生成之情形。每一濃度樣本數為4 (n=4)，並以sodium nitrite 取得的standard curve 以計算nitrite 含量之平均值 (mean)及標準偏差 (standard deviation, SD)。

八、十二基硫酸鈉電泳法 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

利用分子量大小的不同而分離出不同之蛋白質。其中之SDS試劑是一種清潔劑，主要可使蛋白質變性並帶負電荷，因而蛋白質於進行電泳時可由負極往正極移動，並依分子量大小而使不同的蛋白質分離至不同之位置，分子量大的蛋

白質會因移動較慢，停留於電泳膠片之上方，分子量較小的蛋白質，則因其移動較快而停留於電泳膠片之下方，以便分離不同之蛋白質分子。本實驗欲觀察之蛋白質為iNOS與COX-2，其分子量分別為130 kDa 與72 kDa，故選用10% SDS-PAGE 進行分析。主要是利用SDS-polyacrylamide gel system (GIBCO)製作之電泳膠片 (4% stacking gel, 10% resolving gel)，並於電泳裝置 (Hoefer electrophoresis system)中進行電泳步驟。取含有40 μ g 總蛋白質之細胞蛋白質樣本萃取液或4 μ l protein marker (BioLabs 公司, New England)，加入等體積之treatment buffer (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8 / 4% SDS, 20% glycerol / 10% β -mercaptoethanol)，並再加入適量之lysis solution 使所有蛋白質樣本達相同之總體積，混合均勻後於100 $^{\circ}$ C 環境中加熱5分鐘使蛋白質變性，隨即將樣本分別注入已製作完成之膠片內的well中，於電泳槽內外注入Tank buffer (25 mM Tris, pH 8.3 / 192 mM glycine / 0.1% SDS)，室溫下以100 mA進行2小時之電泳分離⁽¹²⁰⁾。

九、西方點墨法

將SDS-PAGE 所得之電泳膠片，利用半乾式轉移設備 (semi-dry unit)，使用 Towbin transfer buffer (20 mM Tris/ 192 mM glycine/ 1.3 mM SDS/ 10% Methanol) 為轉移緩衝溶液，於300 mA 環境下轉移2小時，而後將含蛋白質之PVDF膜，利用Ponceau S solution (0.2% Ponceau S / 3% trichloroacetic acid)染色確定膠片上蛋白質已轉印至膜上，並利用針頭標定protein marker 分子量位置，最後以蒸餾水清洗去除膜上之紅色染劑再進行免疫分析。將含轉移蛋白質之PVDF膜浸於

blocking solution 【5% non-fat milk/PBS-T(PBS in 0.2% Tween 20)】，於室溫下作用1小時，以減少膜上非特異性之鍵結，並以PBS-T清洗PVDF膜5分鐘，連續三次，接著加入1:1000倍之一級抗體 (iNOS或COX-2)於4 °C下作用16小時，再以PBS-T 重複清洗PVDF膜5分鐘四次，加入1:5000倍之二級抗體，於室溫下作用1小時，同樣以PBS-T 重複清洗PVDF膜5分鐘5次。最後加入顯影劑 chemiluminescent HRP substrate，以冷光照相系統 (Fuji LAS-3000)拍攝，觀察蛋白質之表現。

十、細胞激素TNF- α 、IL-1 β 之分析

ELISA 試劑組能快速且準確地偵測體內或體外之細胞激素，故本研究為確定PC_{MeOH}是否會影響LPS誘導細胞激素生成，使用TNF- α 與IL-1 β 細胞激素試劑組進行分析。

將定量之細胞培養於24 well培養皿中，24小時後加入LPS誘導NO之生成，同時加入不同濃度之PC培養24小時後，分別收集培養基，並利用市售之cytokine試劑組以ELISA分析培養基中不同之細胞激素TNF- α 與IL-1 β 的生成。

第八節 廣藿香及廣藿香油動物實驗

一、試劑

1. 醋酸 (acetic acid)：購自 Merck 公司。
2. 福馬林 (formalin)：購自日本試藥株式會社。
3. 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (TEP)
4. Thiobarbituric acid (TBA)
5. Butylated hydroxytoluene (BHT)

6. λ -Carrageenan
7. Indomethacin (Indo)
8. Protein kits

以上試劑皆購自 Sigma 公司

9. SOD kits
10. GSH-Px kits
11. GSH-Rd kits

以上試劑皆購自 RANDOX 公司

12. TNF- α kits：購自 PeproTech 公司。
13. IL-1 β ：購自 PeproTech 公司。
14. IL-6：購自 PeproTech 公司。

以上試劑購自 PeproTech 公司

二、儀器

1. 全自動生化分析儀-Roche 公司 COBAS MIRA

2. 浮腫測定儀 (UGO Baslile Plethysmometer 7140)
3. ELISA 免疫螢光分析儀 (VersaMax; Massachusetts, USA)
4. 高速冷凍離心機 (Backman GS-6R)
5. 壓電晶體生物感測器 (Piezoelectric quartz crystal biosensor; Asia New Technology)

三、實驗方法

(一) 醋酸扭體反應

將不同劑量之廣藿香甲醇萃取物 (0.1, 0.5, 1.0 g/kg)及廣藿香油 (2, 10, 20 mg/kg)以口服方式投予，在給藥後 55 分鐘由腹腔注射 1%醋酸溶液 (每 10 g 體重給予 0.1 mL)，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紀錄注射醋酸後第 5 到 15 分鐘，共 10 分鐘內，小鼠的扭體次數，並以 indomethacin (10 mg/kg, i.p.)作為正對照組，於注射醋酸前 25 分鐘給藥⁽¹²¹⁾。

(二) 福馬林舔足試驗

採用 Dubuisson 及 Dennis⁽⁵⁷⁾修飾後的方法，將不同劑量之廣藿香甲醇萃取物 (0.1, 0.5, 1.0 g/kg)及廣藿香油 (2, 10, 20 mg/kg)以口服方式投予，在給藥後 60 分鐘，用微量注射器以 27 號針頭，在小鼠右後足蹠，皮下注射 20 μ L 的 5%福馬林溶液⁽¹²²⁾，立即將小鼠置入觀察箱中觀察，記錄早期及晚期反應時間，共紀錄 30 分鐘⁽⁵⁹⁾。其中，第 0 到 5 分鐘之累積舔蹠秒數稱為早期 (early phase)之痛覺反應時間；第 20 到 30 分鐘之累積舔蹠秒數稱為晚期 (late phase)之痛覺反應

時間。並以 Indo(10 mg/kg, i.p.)作為正對照組，於注射福馬林前 30 分鐘給藥。

(三) λ -角叉菜膠誘導足蹠腫脹試驗

此項實驗採 λ -角叉菜膠誘導小鼠足蹠腫脹模式進行，用記號筆在小鼠右後肢踝關節周圍做一標記，將小鼠右後足蹠浸入浮腫測定儀器，測量正常足蹠容積後分別在小鼠右後足蹠皮下注射 1% λ -角叉菜膠混懸液 (50 μ L/隻)致炎⁽¹²³⁾。誘導 2 小時後，將小鼠分別以不同劑量之廣藿香甲醇萃取物 (0.1, 0.5, 1.0 g/kg) 以及廣藿香油 (2, 10, 20 mg/kg)口服方式投予，誘導後 2.5 小時腹腔注射正對照組 Indo(10 mg/kg)，給藥量皆為 0.1 mL/10 g。給 λ -角叉菜膠混懸液 (50 μ L/隻)致炎後，每隔 1 小時，各測一次足蹠容積，連續測 4 小時，紀錄結果，並分別計算誘導後每小時足蹠體積與誘導前個別足蹠體積差 (ΔV)。

(四) 肝臟抗氧化酵素

分別在小鼠右後肢足蹠皮下注射 1% λ -角叉菜膠混懸液 (50 μ L/隻)致炎。誘導 1 小時後，分別將不同劑量之廣藿香甲醇萃取物 (0.1, 0.5, 1.0 g/kg)及廣藿香油 (2, 10, 20 mg/kg)以口服方式投予；於誘導後 2.5 小時腹腔注射正對照組 Indo(10 mg/kg)。誘導後第 4 小時，將動物犧牲，採集肝臟，分別將大葉置於福馬林以待日後切片；其餘肝組織部分以夾鏈袋收集，冷凍於-80 $^{\circ}$ C，並剪取小鼠右後肢足蹠，冷凍於-80 $^{\circ}$ C。

1. 肝組織抗氧化酵素活性測定

以肝重 (g)與 0.9%的 normal saline (含 protease inhibitor)比例一比一方式在冰浴中用均質機均質，將均質液倒入 eppendorf 於 4 $^{\circ}$ C，離心 12000 g，取其上

清液放入新的 eppendorf 中，置入 -80 °C 冷凍儲存備用。

A. 總蛋白質濃度測定

取肝均質液 50 μL ，加入 350 μL 的 0.9% 之 normal saline 混和均勻，加入 Biuret reagent (Sodium hydroxide 100 mmol/L, Na-K-tartrate 16 mmol/L, potassium iodide 15 mmol/L, cupric sulphate 6 mmol/L) 使產生呈增色反應，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 min 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 100 mmol/L, Na-K-tartrate 16 mmol/L) 之吸光度差，換算出轉換係數 (F)，進而換算出肝組織總蛋白質之濃度，肝組織總蛋白質之表示方式為 g/dL。

B. SOD activity assay

取 150 μL 均質液置於 eppendorf 中，加入 900 μL 的冰二次去離子水，4 °C，冷藏 15 分鐘，混合均勻。取 20 μL 的混合液加入 260 μL 0.1M phosphate buffer (3-cyclohexylamino-1-propanesulfonic acid; 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 substrate (xanthine 0.05 mmol/L, I.N.T 0.025 mmol/L)，再加入 xanthine oxidase 呈色，混合均勻後於溫度 37 °C、波長 505 nm 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⁽¹²⁴⁾。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 活性以 U/mg protein 表示。

C. Glutathione Reductase activity assay

使用 Guntherberg 及 Rost⁽¹²⁵⁾ 在 1996 年所提出之方法。取 100 μL 的均質液，倒入 100 μL 的冰二次水，2-8 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏 10 分鐘。離心 12000 g，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 (250 mmol/L, pH7.3 kupfer phosphate 與 EDTA 0.5 mmol/L) 與 substrate (GSSG 2.2 mmol/L) 與 NADPH (0.17 mmol/L) 混合均勻，於波長 340 nm 下測量吸光值⁽¹²⁶⁾，肝組織內之 GSH-Rd 活性表是方式為 U/mg protein。

D. Glutathione Peroxidase activity assay

本方法依 Paglia 及 Valentine 在 1967 所提出之方法為基礎⁽¹²⁷⁾，使用 glutathione 及 cumene hydroperoxide 與 GSH-Px 反應，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表示 GSH-Px 之活性(圖 14)⁽¹²⁸⁾。

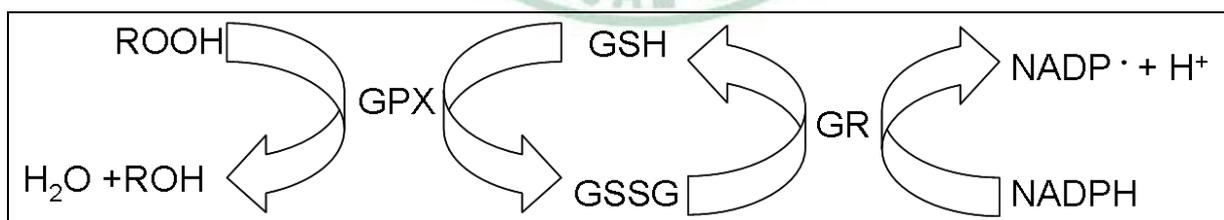


圖 14. 肝臟抗氧化酵素作用機轉

取均質液 25 μL ，加入 500 μL 的 diluting agent 稀釋。取上清液 500 μL ，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°C、波長 340 nm 下測量吸光值⁽¹²⁹⁾，計算吸光值變化速率 (U/L)，肝組織內 glutathione peroxidase 活性表示方法為 U/mg protein。

(五) 足蹠組織生化值測定

1. COX-2 濃度測定

A. 檢品的製備

取腳組織以均質機於低溫下均質，均質前須加入四倍量含蛋白質酶抑制劑之緩衝溶液，以 12000 g 離心 5 分鐘，取上清液備用。

B. 定量蛋白質含量

取腳均質液 10 μ L，加入 700 μ L 的 0.9% 之 normal saline 混和均勻，加入 Biuret reagent (Sodium hydroxide 100 mmol/L, Na-K-tartrate 16 mmol/L, potassium iodide 15 mmol/L, cupric sulphate 6 mmol/L) 使產生呈增色反應，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，以胎牛血清為 protein standard，濃度 (6.0 g/dL) 產生吸光值變化扣除 blank reagent (Sodium hydroxide 100 mmol/L, Na-K-tartrate 16 mmol/L) 之吸光度差，換算出轉換係數 (F)，進而換算出腳組織總蛋白質之濃度，腳組織總蛋白質之表示方式為 g/dL。

C. QCM 測量腳組織 COX-2 含量

實驗原理

壓電晶體生物感測器採用 QCM 的原理，在固定壓力下，晶片表面的感測器會表現出特定頻率，當晶片表面質量改變時，會引起共振頻率衰減，藉由訊號

放大器的放大，在輸出後可以圖示清楚表示其前後頻率變化，利用衰減量算出質量的變化，其有效的精確度可以達到 10^{-12} g。利用公式 $\Delta F=K*\Delta m/A$ 可求得濃度與頻率衰減的對應關係，以此作為定量的標準（圖 15）。

實驗步驟

首先以舊晶片上機，清除管路間氣泡，再換上新的晶片置入 flow cell 內測頻率，待頻率穩定後 (5 Hz/500 sec)，便可開始實驗。實驗步驟依序注入戊二醛 (2.5% glutaldehyde, GA)400 μ l 作為 coupling reagent，以活化晶片表面的功能性集團。繼續注入 100 μ g/ml COX-2 antibody 400 μ l，使其一端黏附在晶體表面，而另一端則負責與樣品中的抗原結合，注入 blocking reagent(1M glycine)400 μ l，填補晶片表面空隙，防止非代測物與晶片薄膜結合，造成誤差，之後注入樣品 400 μ l，以測定各組 COX-2 之含變化⁽¹³⁰⁾。

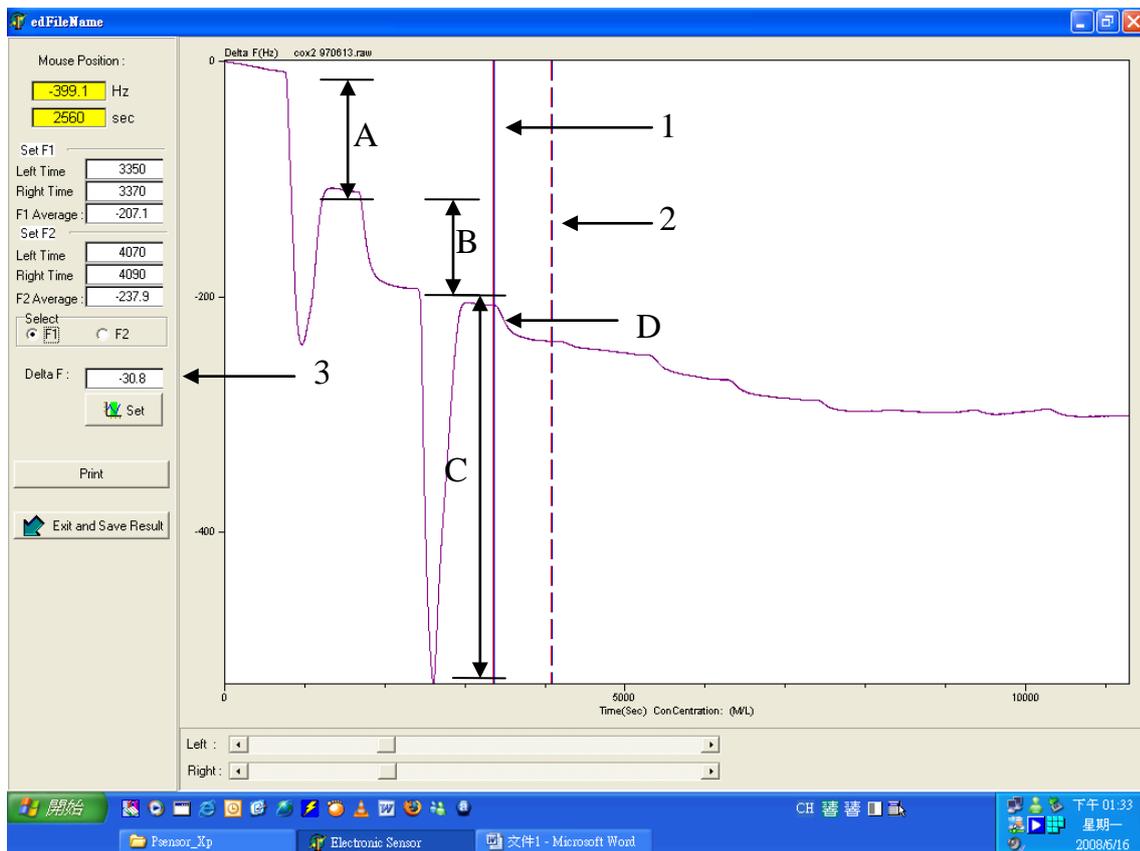


圖 15. QCM 偵測 COX-2 濃度圖

圖中:A:注入 2.5% GA 活化晶片表面功能集團 B:注入單株抗體 C:注入 blocking reagent D:注入檢品後的變化 1:注入檢品前，晶片的振動頻率 (Hz)；2: 注入檢品後，晶片的振動頻率 (Hz)；3:為兩者相減後得到的振幅

2. IL-6 濃度測定

本分析是採用定量的三明治酵素免疫分析法 (quantitative sandwich enzyme immunoassay technique)來測定 mouse IL-6 的濃度。一種對 IL-6 有特異性的 monoclonal antibody 已經先被結合在 microplate 上，當標準品和樣品被加入 wells 後，加入對 IL-6 有特異性的 enzyme-linked polyclonal antibody，最後加入 substrate reagent 等顏色呈現後便終止反應，在波長 450 nm 的吸光值下得到樣本中 IL-6 的濃度。所呈現的顏色深度和 IL-6 的濃度成正比⁽¹³¹⁾。

首先以連續稀釋法方式配置標準溶液，濃度分別為 1000、250、62.5 與 15.6

pg/mL 四組，配置流程如表 2，另外將 IL-6 抗體(50 μ L)加入 96 孔盤，再將標準品及檢品加 50 μ L 到指定 wells (除 Blank 外)，室溫下，振搖 2 小時，之後以 400 μ L wash buffer 沖洗 3 次，再加入 100 μ L streptavidin-HRP conjugat 後，室溫下振搖 2 小時，用 400 μ L wash buffer 沖洗 3 次，加入 100 μ L TMB substrate 後，避光振搖 30 分鐘，最後加入 100 μ L stop solution，然後以 ELISA 在波長 405 nm 下測定其吸光值。流程如表 3 之說明

表 2. IL-6 標準品濃度之配製表

| Test tube | Standard diluent | Standard 4,000 (pg/mL) | IL-6 Concentration |
|-----------|------------------|------------------------|--------------------|
| Stock | 300 μ L | 100 μ L | 1,000 (pg/mL) |
| Std 1 | 300 μ L | 從 Stock 取 100 μ L | 250 (pg/mL) |
| Std 2 | 300 μ L | 從 Std 1 取 100 μ L | 62.5 (pg/mL) |
| Std 3 | 300 μ L | 從 Std 2 取 100 μ L | 15.6 (pg/mL) |

表 3. IL-6 實驗步驟流程表

| Well | Blank | Standard | Sample |
|----------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| IL-6 antibody | 50 μ L | 50 μ L | 50 μ L |
| Standard diluent | 50 μ L | — | — |
| Standard & sample | — | 50 μ L | 50 μ L |
| Tap plate gently to mix | →→→ | →→→ | →→→ |
| Room temperature 2 hr, sealed | →→→ | →→→ | →→→ |
| Wash 3 次 \times 400 μ L | →→→ | →→→ | →→→ |
| Streptavidin-HRP conjugate | 100 μ L | 100 μ L | 100 μ L |
| Room temperature 2 hr, sealed | →→→ | →→→ | →→→ |
| Wash 3 次 \times 400 μ L | →→→ | →→→ | →→→ |
| TMB substrate | 100 μ L | 100 μ L | 100 μ L |
| Room temperature 30 min, in dark | →→→ | →→→ | →→→ |
| Stop solution | 100 μ L | 100 μ L | 100 μ L |

(—：表示該步驟不加任何試劑。→→→：表示等候時間)

3. TNF- α 濃度測定

本分析是採用定量的三明治酵素免疫分析法 (quantitative sandwich enzyme immunoassay technique)來測定 mouse TNF- α 的濃度。一種對 TNF- α 有特異性的 monoclonal antibody 已經先被結合在 microplate 上，當標準品和樣品被加入 wells 後，加入對 TNF- α 有特異性的 enzyme-linked polyclonal antibody，加入 substrate solution，incubation 一段時間後，加入 substrate reagent 使顏色呈現出來，終止反應後，在波長 490 nm 下測得該樣品所含 TNF- α 濃度⁽¹³²⁾。

首先製備 TNF- α 標準曲線，以連續稀釋法製備八個濃度的標準溶液 (2000~15.625 pg/kg)。配製流程如表 4。另外將 TNF- α 抗體(50 μ L)加入 96 孔盤，再將標準品及檢品加 50 μ L 到指定 wells (除 Blank 外)，室溫下，振搖 2 小時，之後以 400 μ L wash buffer 沖洗 3 次，再加入 100 μ L streptavidin-HRP conjugat 後，室溫下振搖 2 小時，用 400 μ L wash buffer 沖洗 3 次，加入 100 μ L TMB substrate 後，避光振搖 30 分鐘，最後加入 100 μ L stop solution，然後以 ELISA 在波長 405 nm 下測定其吸光值。流程如表 5 之說明。

表 4. TNF- α 標準品濃度之配製表

| Test tube | Assay buffer | TNF standard 20,000 (pg/mL) | TNF Concentration |
|-----------|--------------|--------------------------------|----------------------|
| Stock | 450 μ L | 50 μ L | 2,000 (pg/mL) |
| Std 1 | 250 μ L | 從 Stock 取 250 μ L | 1,000 (pg/mL) |
| Std 2 | 250 μ L | 從 Std 1 取 250 μ L | 500 (pg/mL) |
| Std 3 | 250 μ L | 從 Std 2 取 250 μ L | 250 (pg/mL) |
| Std 4 | 250 μ L | 從 Std 3 取 250 μ L | 125 (pg/mL) |
| Std 5 | 250 μ L | 從 Std 4 取 250 μ L | 62.5 (pg/mL) |
| Std 6 | 250 μ L | 從 Std 5 取 250 μ L | 31.25 (pg/mL) |
| Std 7 | 250 μ L | 從 Std 6 取 250 μ L | 15.625 (pg/mL) |

表 5. TNF- α 實驗步驟流程表

| Well | Blank | Standard | Sample |
|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Standard diluent | 50 μ L | — | — |
| Standard & sample | — | 50 μ L | 50 μ L |
| Tap plate gently to mix | →→→ | →→→ | →→→ |
| Room temperature 2 hr, sealed | →→→ | →→→ | →→→ |
| Wash 3 次 \times 400 μ L | →→→ | →→→ | →→→ |
| TNF antibody | 50 μ L | 50 μ L | 50 μ L |
| Room temperature 2 hr, sealed | →→→ | →→→ | →→→ |
| Wash 3 次 \times 400 μ L | →→→ | →→→ | →→→ |
| Streptavidin-HRP conjugate | 100 μ L | 100 μ L | 100 μ L |
| Room temperature 30 min, sealed | →→→ | →→→ | →→→ |
| Wash 3 次 \times 400 μ L | →→→ | →→→ | →→→ |
| TMB substrate | 100 μ L | 100 μ L | 100 μ L |
| Room temperature 30 min, sealed | →→→ | →→→ | →→→ |
| Stop solution | 100 μ L | 100 μ L | 100 μ L |

(—：表示該步驟不加試劑。→→→：表示等候時間)

4. MDA 濃度測定

參考 Nakhai 等人於 2007 年的方法⁽¹³³⁾，即 MDA 與 thiobarbituric acid (TBA) 在酸性高溫下會形成紅色複合物 TBARS。此複合物在波長 532 nm 下，具有吸光值，利用此原理可測定樣品所含 MDA 濃度。

首先將 TEP 以 0.01 N 的 HCl 依表 6 稀釋配置成 20~0.625 μM 六個濃度，作為 MDA 標準溶液 (表 6)。取 100 μL 樣品及標準品置入 eppendorf (包鋁箔) 中，依序加入 BHT 及 TBA (300 μL) (表 7)，再以震盪器混合均勻後，置於 90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴鍋中加熱 45 分鐘。之後取出，置於室溫冷卻 10 分鐘，加入 445 μL 正丁醇，混合搖盪 1 分鐘。然後離心 (3,000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 5 分鐘)，吸取上層液 (粉紅色)，以 ELISA 於 532 nm 波長下測吸光值。

表 6. MDA 標準品濃度配製表

| MDA 濃度 (μM) | 0.625 | 1.25 | 2.5 | 5 | 10 | 20 |
|-----------------------------------------|-------|------|-----|-----|-----|-----|
| TEP intermediate standard solution (mL) | 0.15 | 0.3 | 0.6 | 1.2 | 2.4 | 4.8 |
| 0.01 N HCl (mL) | 9.85 | 9.7 | 9.4 | 8.8 | 7.6 | 5.2 |

表 7. 加入 MDA 試劑流程表

| | 標準品或樣品(μL) | BHT 試液(μL) | TBA 試液(μL) |
|--------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Blank | 100 (0.01N HCl) | 45 | 300 |
| MDA standard | 100 | 45 | 300 |
| Sample | 100 | 45 | 300 |

(六) 組織切片染色實驗方法

1. 蘇木紫－伊紅染色 (H.E. stain)

剪取實驗鼠之右後肢足蹠，於 10% 的中性福馬林固定一段時間（約一週）後，再將此足蹠組織以脫水浸蠟機先進行脫水，再進行石臘包埋。包埋後以旋轉式切片機切成約 4~5 μm 之足蹠組織切片。進行蘇木紫－伊紅染色 (Hematoxylin & Eosin stain)，於光學顯微鏡下觀察各組足蹠組織之特異情況及組織病理變化，比較並拍照評估足蹠發炎程度⁽¹³⁴⁾。

2. 免疫組織化學染色 (immunohistochemical stain, IHC stain)

剪取實驗鼠之右後肢足蹠，於 10% 的中性福馬林固定一段時間（約一週）後，再將此足蹠組織以脫水浸蠟機先進行脫水，再進行石臘包埋。包埋後以旋轉式切片機切成約 4~5 μm 之足蹠組織切片。分別針對 COX-2 及 iNOS 進行免疫組織化學染色，於光學顯微鏡下觀察各組足蹠組織之 COX-2 及 iNOS 之表現程度，以褐色表示陽性反應，亦即染色片上褐色區域越多，表示 COX-2 及 iNOS 的含量越多⁽¹³⁵⁾。

(七) 西方點墨法-腳組織 COX-2 與 iNOS 含量測定

首先以胎牛血清 BSA 製備標準曲線如 (表 8) 以便定量樣品之蛋白質含量，之後製作電泳法所需之聚丙烯醯胺凝膠，製作完畢後，置入樣品 (40ug 蛋白質/wel)，進行跑膠及轉漬，再依照 β -actin (43 kDa)、COX-2 (72 kDa) 及 iNOS (125 kDa) 的蛋白分子量切割 PVDF 膜，加入抗體二，並以 TBST 在震盪器上清洗 5 次後，加入 1ml 顯影劑 (A:B=1:1) 於 PVDF 膜上，置入螢光冷光影像分析 (Fuji

LAS-3000)，拍攝。

1. 製膠

首先製備下膠(兩片膠)，依序加入 (DDW：11.373 mL，40% Acyl-Bis：5.275 mL，Solution B：5.625 mL，10% APS：180 μ L，TEMED：45 μ L)，然後以甲醇壓平，再將甲醇倒出，待凝固 (約 10 min)；製備上膠(2 片膠)，依序加入(DDW：6.5625 mL，40% Acyl-Bis：937.5 μ L，Solution C：2.5 mL，10% APS：80 μ L，TEMED：20 μ L)並插入 comb，待凝固 (約 5 分鐘)，製膠完成後，開始跑膠。

2. 跑膠

先將 sample (sample：dye = 4：1)，以 100 $^{\circ}$ C 加熱震盪 5 分鐘後離心；架起電泳槽，並在內槽加滿 running buffer，將 comb 取出後 load maker 及 sample，外槽加 running buffer，先跑上膠(70 V，30 分鐘)，再跑下膠(100 V，90 分鐘)，

3. 轉漬

架設 transfer 的裝置：由黑至白分別為海綿、濾紙、膠、PVDF 膜、濾紙、海綿。目的是將膠上的 band 轉至 PVDF 膜上。由於 PVDF 膜不親水，需先泡在甲醇裡才可使用。將 transfer 的裝置放入槽中，整個槽嵌入冰桶內，加入 transfer buffer，設定 105 V，2 hr，跑完後，染膜 (Donceau's solution)，並以 DDW 洗掉多餘染劑，再用原子筆標示出 marker 的位置與分子量，用刀片割下所需的 band，在震盪器上 blocking 1 hr (2% CCS/ 1X TBS)，再使用 PBS Wash (250 μ L Tween 20/ 500 ml PBS)在震盪器上洗三次，分別加入抗體 (iNOS、COX-2、 β -Actin)，在冷房 (4 $^{\circ}$ C)裡振搖，overnight。隔天加入抗體二在震盪器上分鐘 1 小時，以 TBST

在震盪器上清洗 5 次，加 1ml 顯影劑 (A:B=1:1)於 PVDF 膜上，置入螢光冷光影像分析 (Fuji LAS-3000)，拍攝。

表 8. 蛋白質定量配製表

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| BSA | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| Dye | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| ddH ₂ O | 160 | 158 | 156 | 154 | 152 | 150 |



第九節 統計分析

本論文所有實驗結果之數據，皆以 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 或 $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ 表示，並以單因子變異數分析 (one-way ANOVA) 進行分析，再以 Scheffe's multiple range test 檢定其間差異之顯著性，凡 p 值小於 0.05 時，則認為具有統計上意義。

第四章 結果

第一節 廣藿香 GC-MS 成分分析圖

使用 GC-MS 在本實驗條件下分離結果如圖 16，由層析圖可清楚呈現有三個較多的成分，各層析質譜圖比對資料庫 (Agilent Technologies) 及文獻得知各層析峰之成分為表 9 所列。

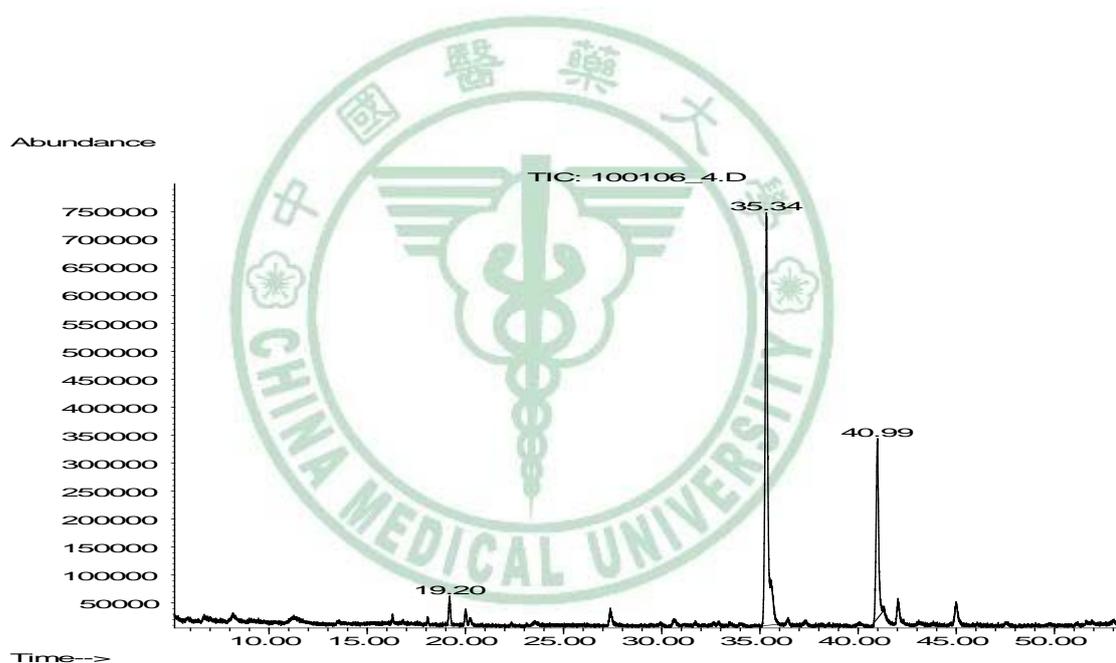


圖 16. 廣藿香層析圖

圖中 A~C 為不同滯留時間點分離出的成分

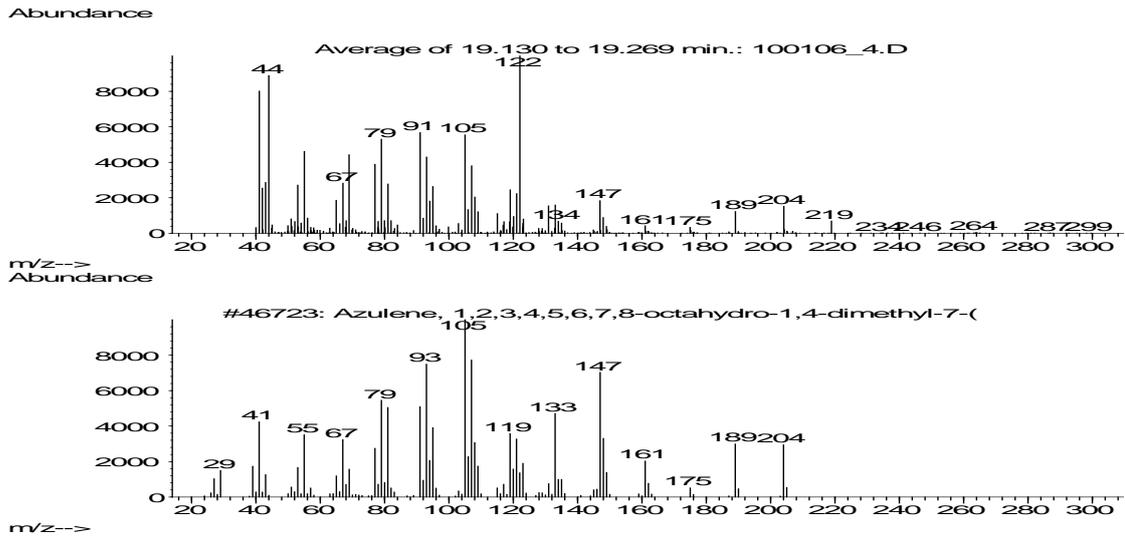


圖 17. 成分 A 質譜圖

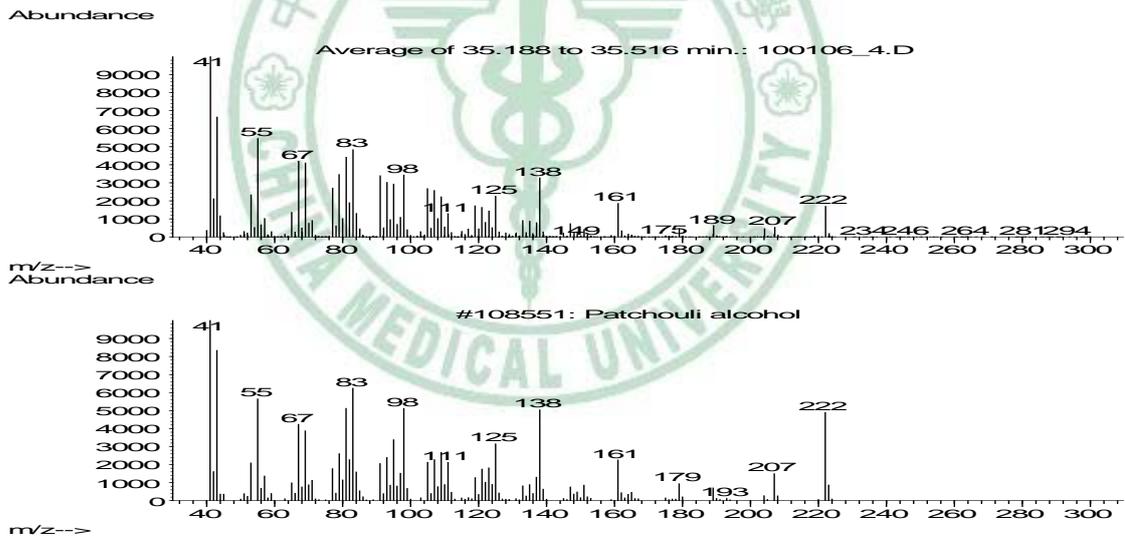


圖 18. 成分 B 質譜圖

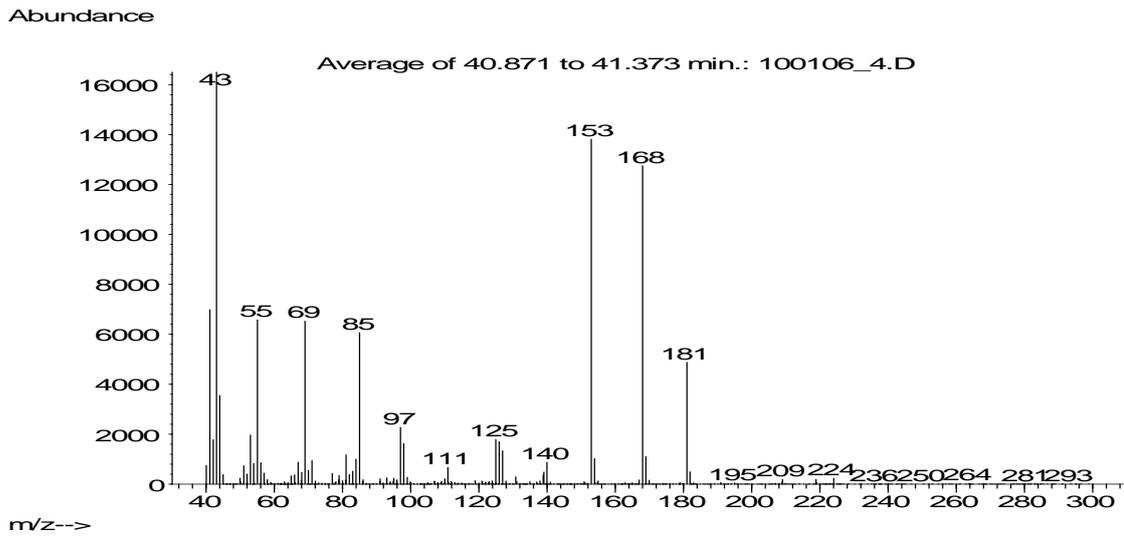


圖 19. 成分 C 質譜圖

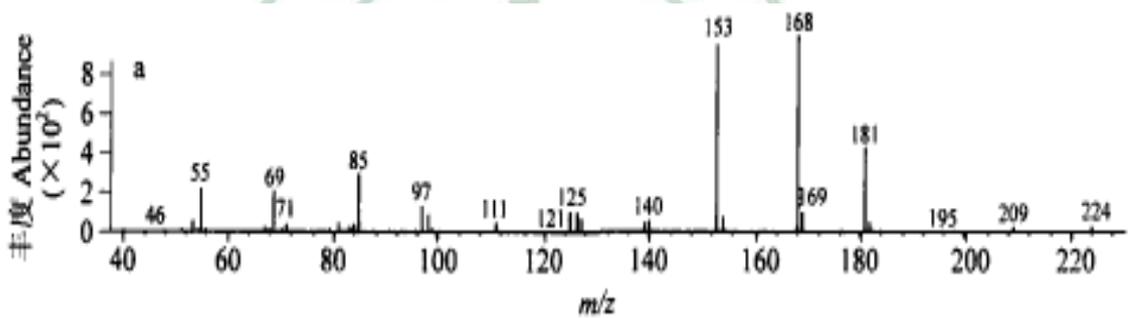


圖 20. 成分 pogostone 質譜圖⁽¹³⁶⁾

表 9. PC_{MeOH} 以 GC-MS 分析的成分

| 成分序號 | 化合物 | 成分 | 分子量 | 相似度 | 滯留時間 (mins) |
|------|------|------------------|-----|-----|-------------|
| A | 甘菊環 | azulene | 204 | 84% | 19.35 |
| B | 廣藿香醇 | patchuli alcohol | 222 | 98% | 35.35 |
| C | 廣藿香酮 | pogostone | 224 | | 41.37 |

第二節 廣藿香甲醇萃取物急性毒性試驗

經過實驗確認，廣藿香甲醇萃取物餵食(10 g/kg)，觀察七天後，小鼠並無特殊反應及影響，實驗樣品數十隻小鼠皆存活。

第三節 廣藿香及廣藿香油抗氧化實驗

一、清除自由基DPPH

(一) TLC

本實驗原理乃利用 DPPH 自由基原有的紫藍色，與抗氧化劑反應時，其顏色會消失，因此，可作為樣品對 DPPH 自由基清除能力評估的預試驗。藉由實驗結果，篩選適合的實驗濃度。當 TLC 板點上不同濃度、固定量的樣品，再浸泡於 DPPH 溶液中，均勻沾染後靜待 TLC 板顏色變化。樣品對 DPPH 自由基的清除能力與白點的密度大小成正比⁽¹¹²⁾。

實驗結果顯示，PC_{MeOH} 濃度越高白點密度越明顯。在濃度 (1000 µg/ml) 仍可見濃密度白點，而白點密度相當於濃度 250 µg/mL 的 BHT (圖 21)。

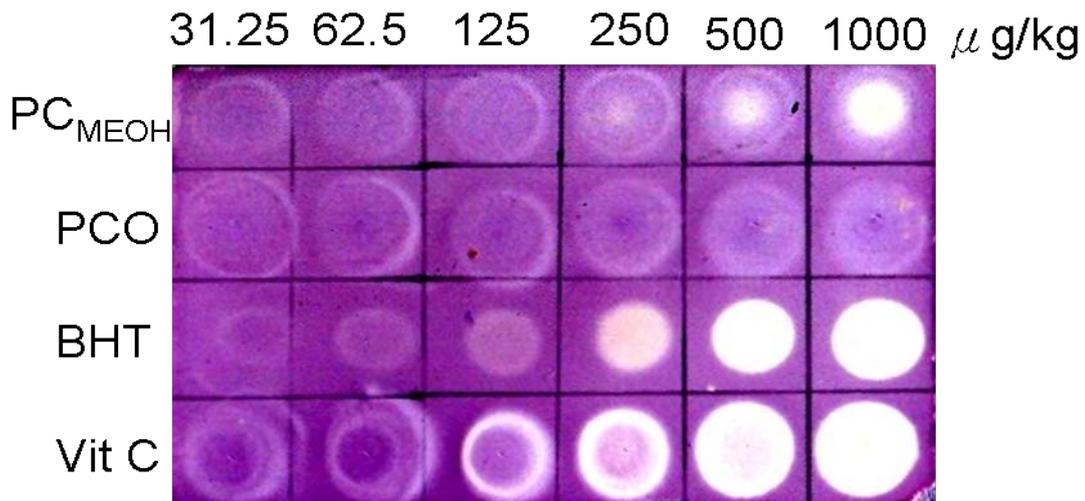


圖 21. PC_{MeOH} 清除 DPPH 自由基之 TLC 板染色試驗
 圖中 PC_{MeOH} 表示廣藿香甲醇萃取物、PCO 為廣藿香油、Vit C 與 BHT 為對照組。

(二) DPPH 自由基清除效應：

DPPH 為一種相當穩定的自由基，其為紫藍色，在 517 nm 波長下有強的吸收光，當 DPPH 與具有供氫能力之抗氧化劑反應時，其顏色會消失，因此，在 517 nm 的吸光值就會降低，而吸光值降的越低，表示抗氧化劑 (AH) 的供氫能力越強，也就是指該抗氧化劑清除自由基的能力越強。樣品對 DPPH 自由基清除率達 50% 時的樣品濃度 (即所謂的 IC₅₀ 值)，IC₅₀ 值越小表示樣品抗氧化能力越強。其反應式如下：



實驗結果顯示 PC_{MeOH} 及 PCO 對 DPPH 具有良好的清除能力，IC₅₀ 分別為 162.22 $\mu\text{g/mL}$ 以及 171.45 $\mu\text{g/mL}$ ，抗氧化能力依序為 Vit C > BHT > PC > PCO (表 10)。

表 10. PC_{MeOH} 與 PCO 對 DPPH 自由基清除作用之 IC₅₀ (µg/mL)

| Species and positive controls | IC ₅₀ (µg/mL) |
|-------------------------------|--------------------------|
| Vit C | 45.64 ± 0.12 |
| BHT | 50.23 ± 0.24 |
| PC _{MeOH} | 162.22 ± 1.54 |
| PCO | 171.45 ± 2.01 |

^a Values represented as mean ± S.D. of three parallel measurements.

二、總多酚 (polyphenols)及總黃酮 (flavonoids)成分含量測定

總多酚類含量以 mg (+)-catechin equivalent/g dry weight (µg CE/mg)表示，PC 的總多酚含量為 37.23 ± 1.65 (µg CE/mg)。總類黃酮含量以 mg rutin equivalent/g dry weight (µg RE/mg)表示，PC 的總多酚含量為 6.65 ± 0.23 (µg RE/mg)。

第四節 廣藿香甲醇萃取物巨噬細胞實驗

一、PC_{MeOH}對RAW 264.7 細胞之毒性評估

(一)PC_{MeOH}對RAW 264.7 細胞之存活率試驗：

為了確認在本實驗中，PC_{MeOH}對組織細胞是否具毒性，我們將不同濃度的 PC_{MeOH} 對 RAW 264.7 細胞進行 24 小時的反應處理，其存活率試驗結果如圖 22。由圖可知 PC_{MeOH} 在 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 到 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的濃度範圍下，對 RAW 264.7 細胞並不具有細胞毒性。因此，我們將 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PC_{MeOH} 當成細胞實驗濃度。另外動物實驗濃度一般為細胞實驗濃度的 1,000 倍，故本實驗後續動物餵藥部分，PC_{MeOH} 的口服最高濃度取 1,000 mg/kg。

另外以 LPS (100 ng/ml)誘導 RAW 細胞產生發炎反應現象，由圖 23 顯示，不論是 LPS 誘導組或是治療組，還是單獨給予 PC_{MeOH} 組別，其細胞之形態及存活數目，以 100 倍顯微鏡觀察，亦無發現明顯差異。

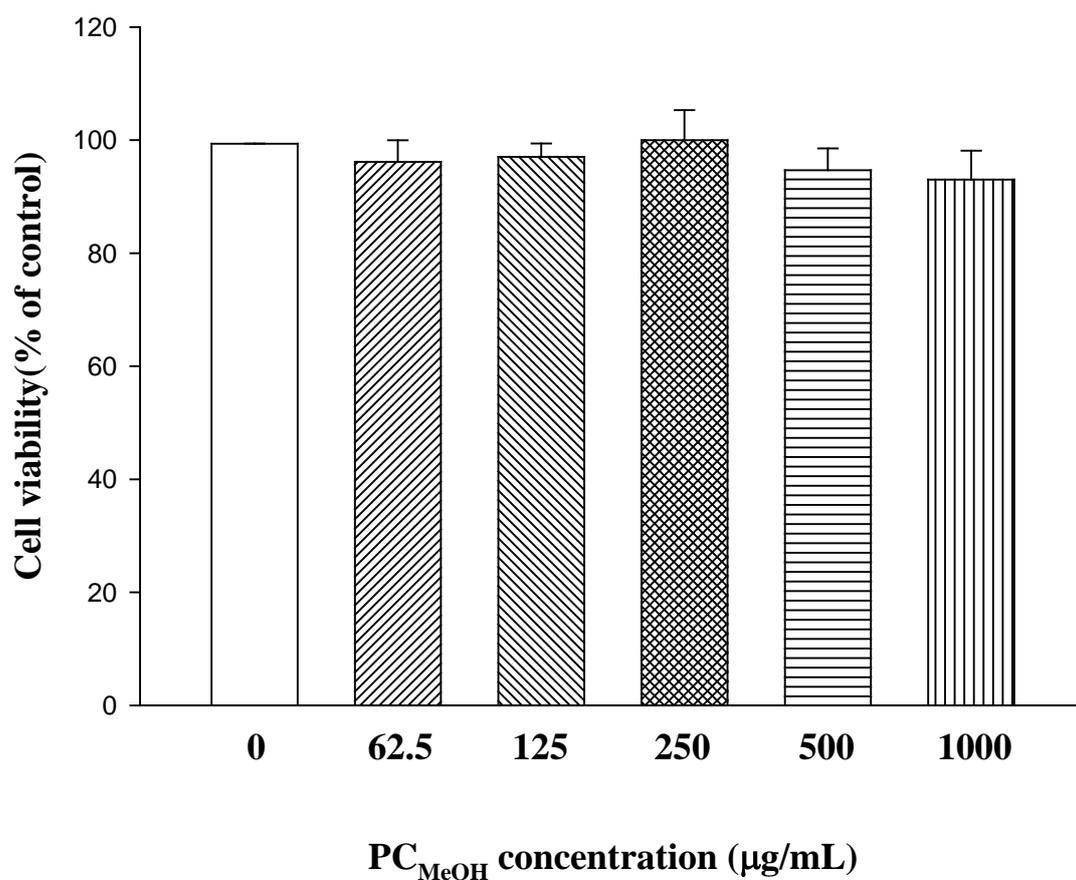
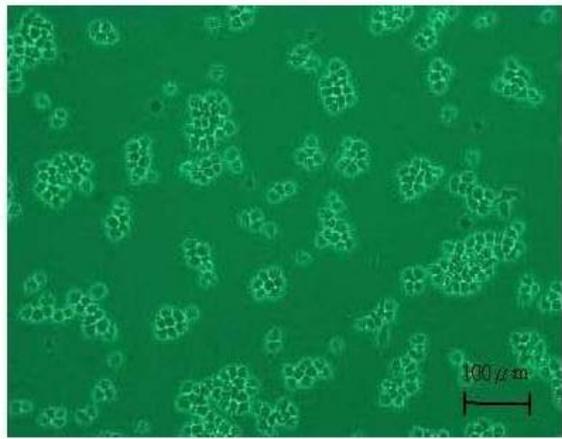
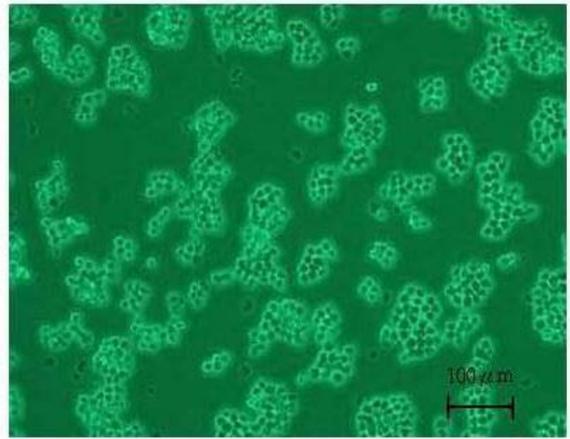


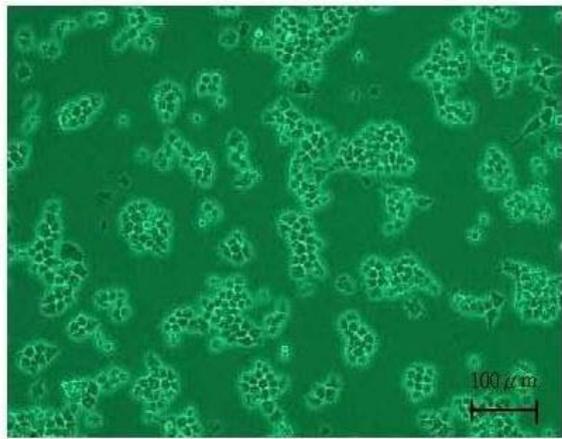
圖 22. RAW 264.7 細胞存活率試驗
 PC_{MeOH} 對 RAW 264.7 細胞進行 24 小時反應之存活率試驗，圖中每個數值以 mean ± S.D. 表示，n=3，其 *p* 值大於 0.05。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。



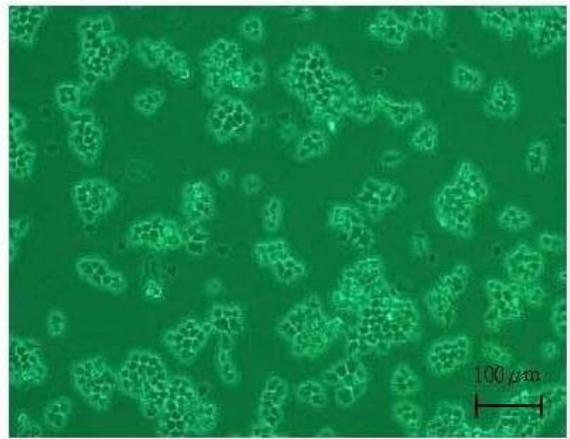
Control



LPS 100 ng/mL



LPS 100 ng/mL + PC_{MeOH} 1000 μg/mL



PC_{MeOH} 1000 μg/mL

圖 23 PC_{MeOH} 對 RAW 264.7 細胞進行 24 小時反應後之形態觀察

上述各圖皆以 100 倍觀察，給藥後 24 小時可觀察到各組間細胞形態並無明顯差異。

(一) PC_{MeOH} 對 LPS 誘導 RAW 264.7 細胞生成 NO 的影響

預試驗指出 LPS 刺激 24 小時比 16 小時有穩定之 nitrite 誘導，因此以 24 小時培養進行實驗。將定量細胞培養於 24 well 培養盤中 24 小時後，添加 LPS (100 ng/mL)，並分別加入不同濃度 PC_{MeOH} 繼續培養 24 小時後，取細胞培養液以 Greiss reagent 分析 nitrite 的含量。圖 24 為細胞於不同濃度 PC_{MeOH} 培養 24 小時後，觀察在 LPS 誘導下對 RAW 264.7 細胞 NO 生成的影響。結果顯示，添加 PC_{MeOH} 於劑量 500 與 1000 $\mu\text{g/ml}$ 下與控制組比較可明顯誘導細胞中 NO 生成。

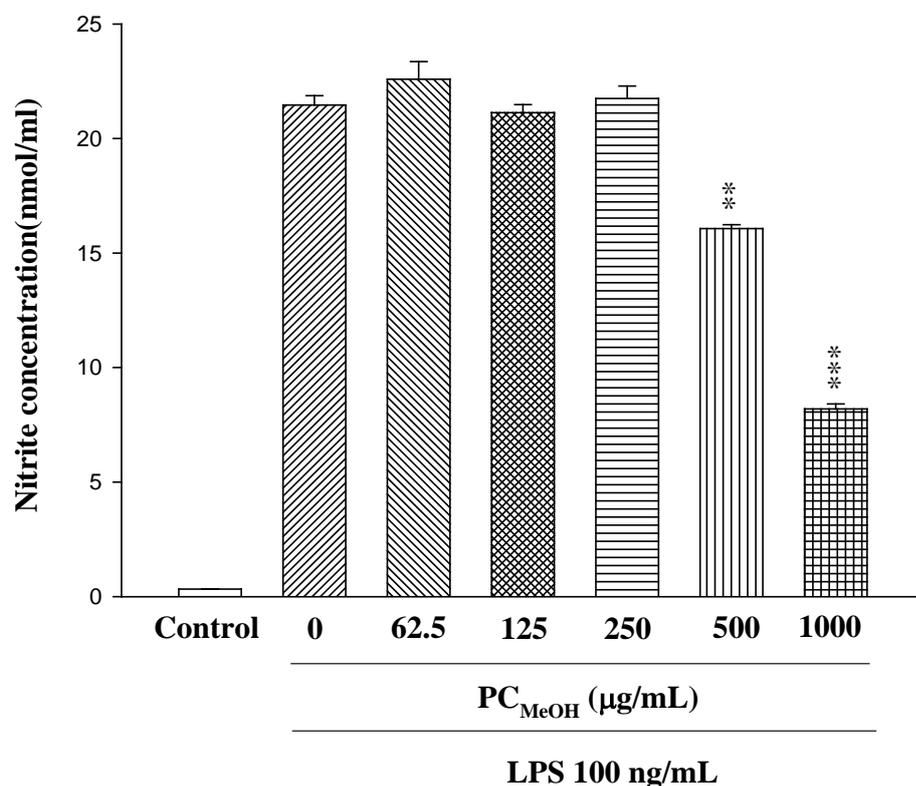


圖 24. PC_{MeOH} 對 RAW 264.7 細胞生成 NO 的影響

PC_{MeOH} 對 LPS 誘導 RAW 264.7 生成 NO 的影響，同時給予 LPS 及 PC_{MeOH} 進行 24 小時反應後，以 Greiss reagent 分析 NO 的含量，圖中每個數值以 mean \pm S.D. 表示， $n=3$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ，皆與 LPS (PC_{MeOH} 0 $\mu\text{g/mL}$) 組比較。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。

二、PC_{MeOH}對LPS誘導RAW 264.7 細胞中細胞激素TNF- α 生成之影響

當巨噬細胞受到外來刺激會活化釋放出一些細胞激素，其中，促發炎性細胞激素如：TNF- α 、IL-1 β 會促進 iNOS 基因的表現而增加 NO 的生成。由於 PC_{MeOH} 可抑制由 LPS 所誘導之 NO 的生成，因此本實驗進一步觀察 PC_{MeOH} 對不同細胞激素生成之影響。

如圖 25 同時給予不同濃度 PC_{MeOH} 與 LPS 100 ng/mL 培養 24 小時後，對 RAW 264.7 生成 TNF- α 的影響。結果顯示，PC_{MeOH} 與 LPS 同時給予時，PC_{MeOH} 可抑制 LPS 所誘導之 TNF- α 生成，並於 1000 μ g/mL 抑制作用最為明顯。



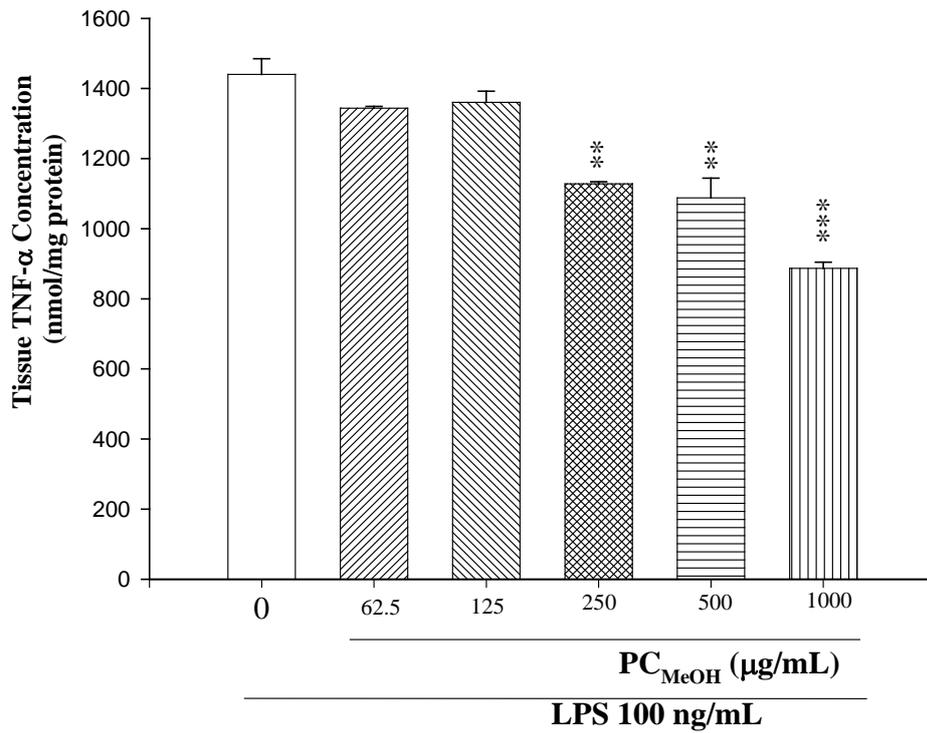


圖 25. 細胞以 LPS 誘導及不同濃度 PC_{MeOH} 培養 24 小時後，對 TNF- α 生成的影響 PC_{MeOH} 對 LPS 誘導 RAW 264.7 生成 TNF- α 的影響，同時給予 LPS 及 PC_{MeOH} 進行 24 小時反應後，分析其上清液 TNF- α 的含量，圖中每個數值以 mean \pm S.D. 表示，n=3，** p < 0.01，*** p < 0.001，皆與 LPS (PC_{MeOH} 0 μ g/mL) 組比較。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。

三、PC_{MeOH}對LPS誘導RAW 264.7 細胞中細胞激素IL-1 β 生成之影響

如圖 26 同時給予不同濃度 PC_{MeOH} 與 LPS 100 ng/mL 培養 24 小時後，對 RAW 264.7 生成 IL-1 β 的影響。結果顯示，PC_{MeOH} 與 LPS 同時給予時，PC_{MeOH} 可抑制 LPS 所誘導之 IL-1 β 生成，並於 1000 μ g/mL 抑制作用最為明顯 (抑制率約 80%)

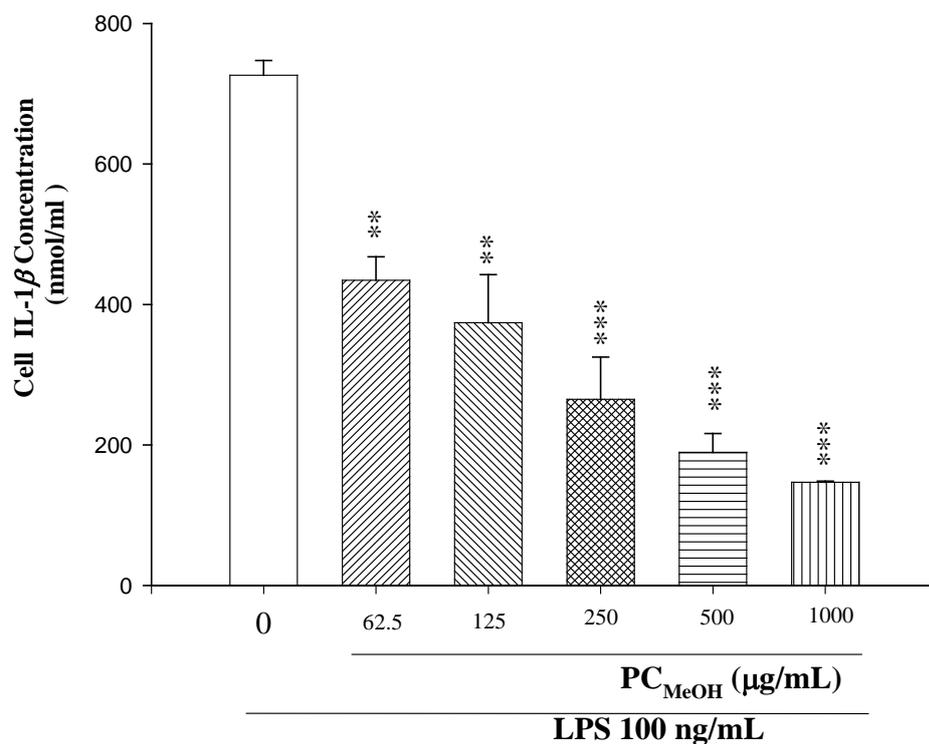


圖 26. 細胞於不同濃度 PC_{MeOH} 培養 24 小時後，對 LPS 誘導後 IL-1 β 生成的影響
PC_{MeOH} 對 LPS 誘導 RAW 264.7 生成 IL-1 β 的影響，同時給予 LPS 及 PC_{MeOH} 進行 24 小時反應後，分析其上清液 IL-1 β 的含量，圖中每個數值以 mean \pm S.D. 表示，n=3，** p < 0.01，*** p < 0.001，皆與 LPS (PC_{MeOH} 0 μ g/mL) 組比較。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。

四、PC_{MeOH}對LPS誘導RAW 264.7 細胞COX-2 與iNOS生成之影響

PC_{MeOH}可抑制因LPS誘導之NO、TNF- α 、IL-1 β 之生成，因此本實驗進一步探討PC_{MeOH}對於iNOS與COX-2蛋白質的影響。由SDS-PAGE電泳分離蛋白質，且經免疫分析結果顯示，圖27顯示PC_{MeOH}(500, 1000 μ g/mL)可明顯抑制LPS誘導RAW 264.7細胞生成iNOS與COX-2的蛋白質表現。

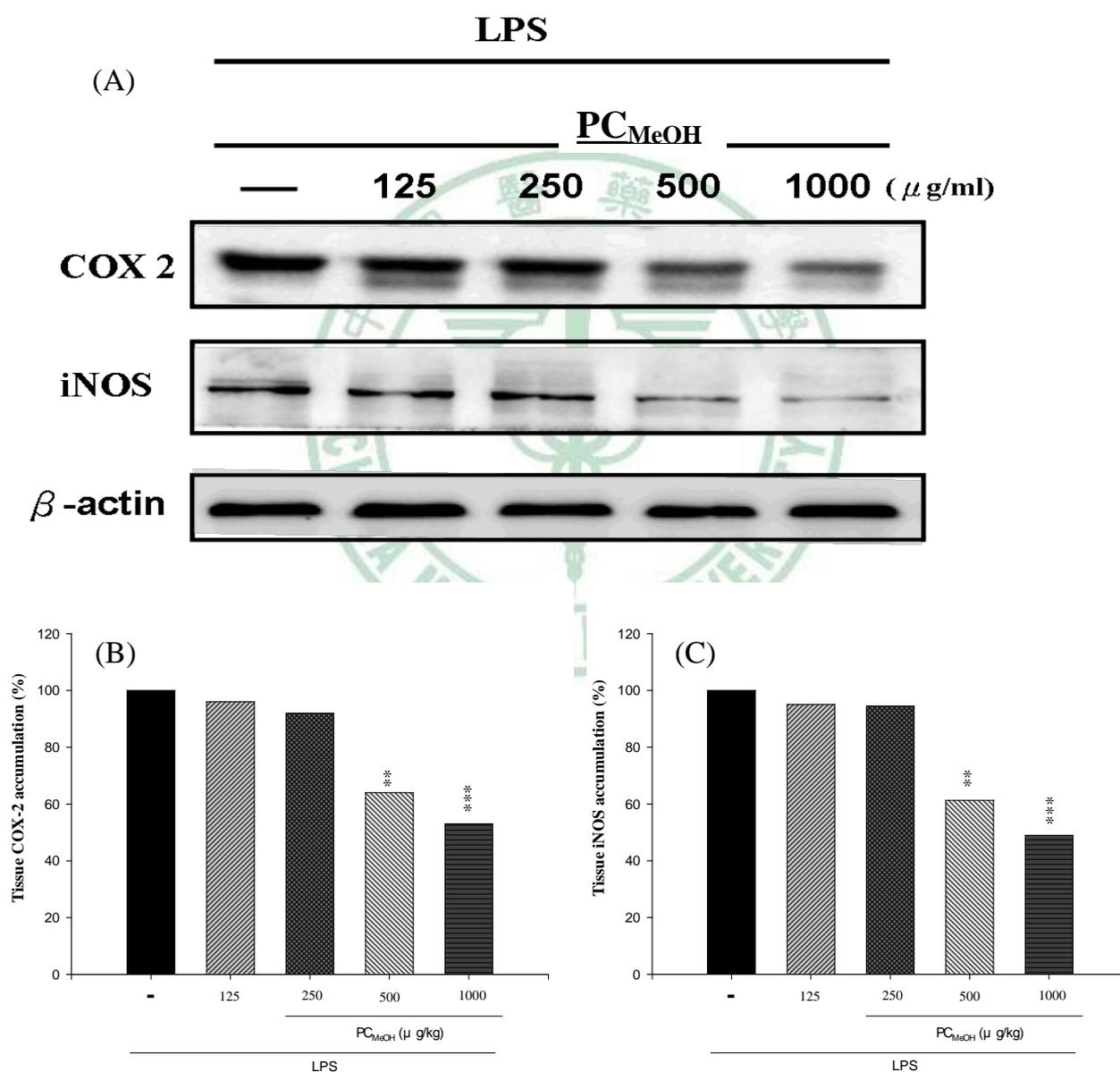


圖 27. PC_{MeOH}對LPS誘導RAW 264.7 生成COX-2與iNOS的蛋白質表現量之影響 (A) PC_{MeOH}對LPS誘導RAW 264.7生成COX-2與iNOS的蛋白質表現量之影響，LPS劑量為100 ng/ml，每個樣品取40 μ g/protein。 (B) COX-2蛋白質表現量化圖 (C) iNOS蛋白質表現量化。 ** p < 0.01, *** p < 0.001。

第五節 廣藿香及廣藿香油動物實驗

一、鎮痛實驗

(一) 醋酸扭體反應試驗

口服給予 PC_{MeOH} (1.0 g/kg)、PCO (10, 20 mg/kg)與 Indo (10 mg/kg)均可明顯減少由醋酸所引起疼痛之扭體次數，結果如圖 28, 29 所示。口服給予 PC_{MeOH} (0.1, 0.5, 1.0 g/kg)治療，在中低濃度時 (0.1, 0.5 g/kg)，無法減少疼痛之扭體次數，高濃度 (1.0 g/kg)才能減少扭體次數，PCO 於 10, 20 mg/kg 即有明顯鎮痛效果。正對照組 Indo 具有明顯之鎮痛效果。

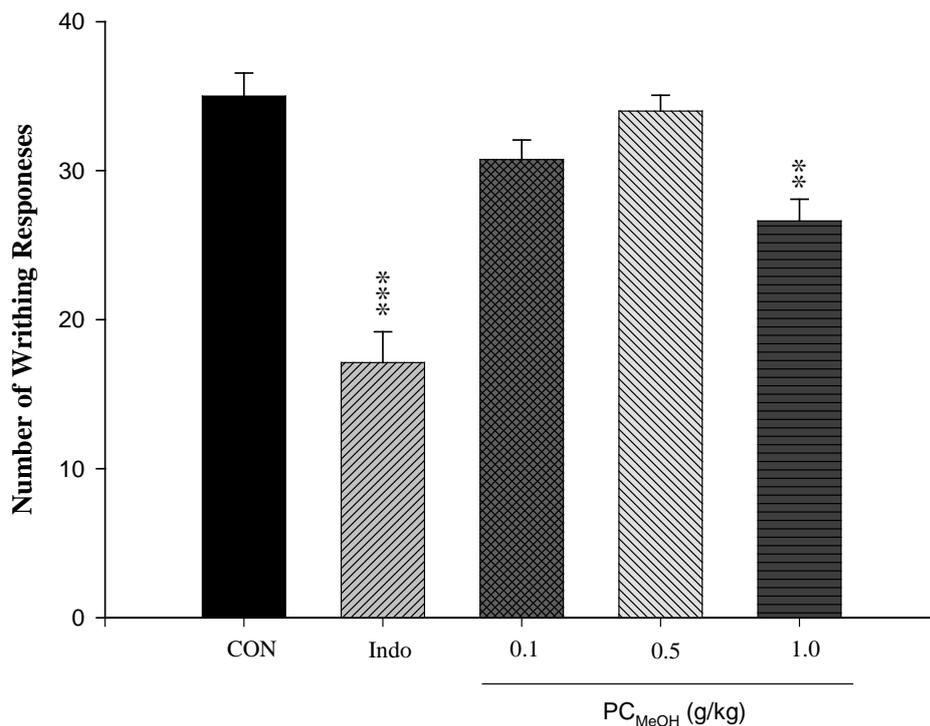


圖 28. PC_{MeOH} 及 Indo 對醋酸誘導小鼠扭體反應之鎮痛試驗

PC_{MeOH} 及 indomethacin (Indo)對醋酸誘導小鼠扭體反應之鎮痛試驗，每個數值以 mean ± S.E.M.表示，n=6，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ，皆與 control (CON)組比較。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。

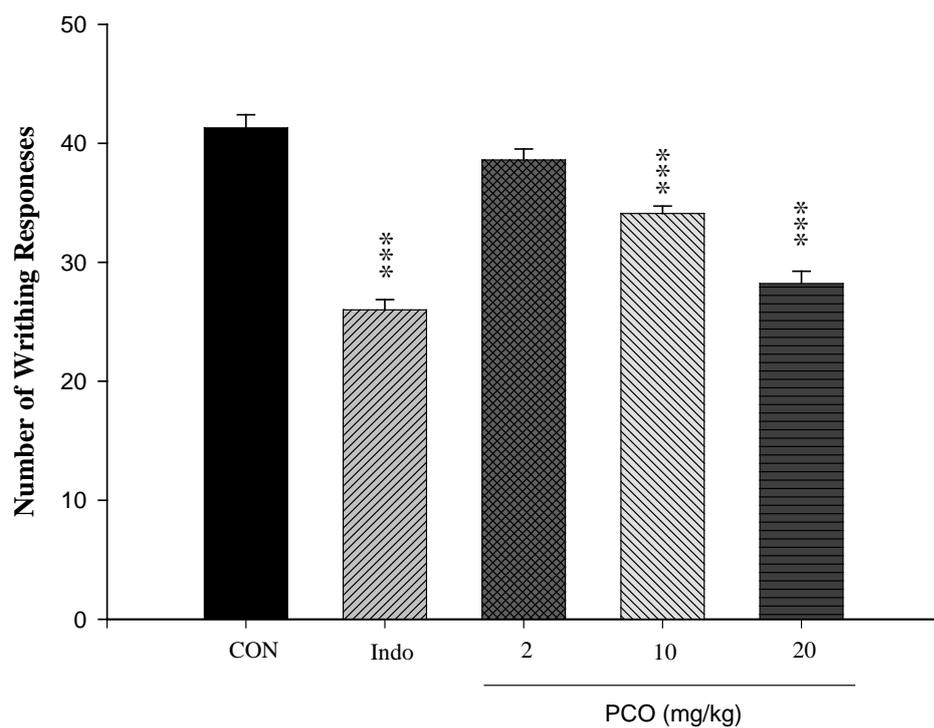


圖 29. PCO 及 Indo 對醋酸誘導小鼠扭體反應之鎮痛試驗
 PCO 及 indomethacin (Indo) 對醋酸誘導小鼠扭體反應之鎮痛試驗，每個數值以 mean ± S.E.M. 表示，n=6，*** $p < 0.001$ ，皆與 control (CON) 組比較。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。

(二) 福馬林舔足實驗

口服給予 PC_{MeOH} (0.1, 0.5, 1.0 g/kg)與 PCO (2, 10, 20 mg/kg)或腹腔注射 Indo (10 mg/kg)，均無法影響小鼠福馬林誘導前期之舔足反應時間，結果如圖 30, 31 所示。口服給予 PC_{MeOH} (0.5, 1.0 g/kg)、PCO (10 mg/kg)或腹腔注射 Indo (10 mg/kg)，均可明顯減少小鼠福馬林誘導後期之舔足反應時間，結果如圖 32, 33 所示。

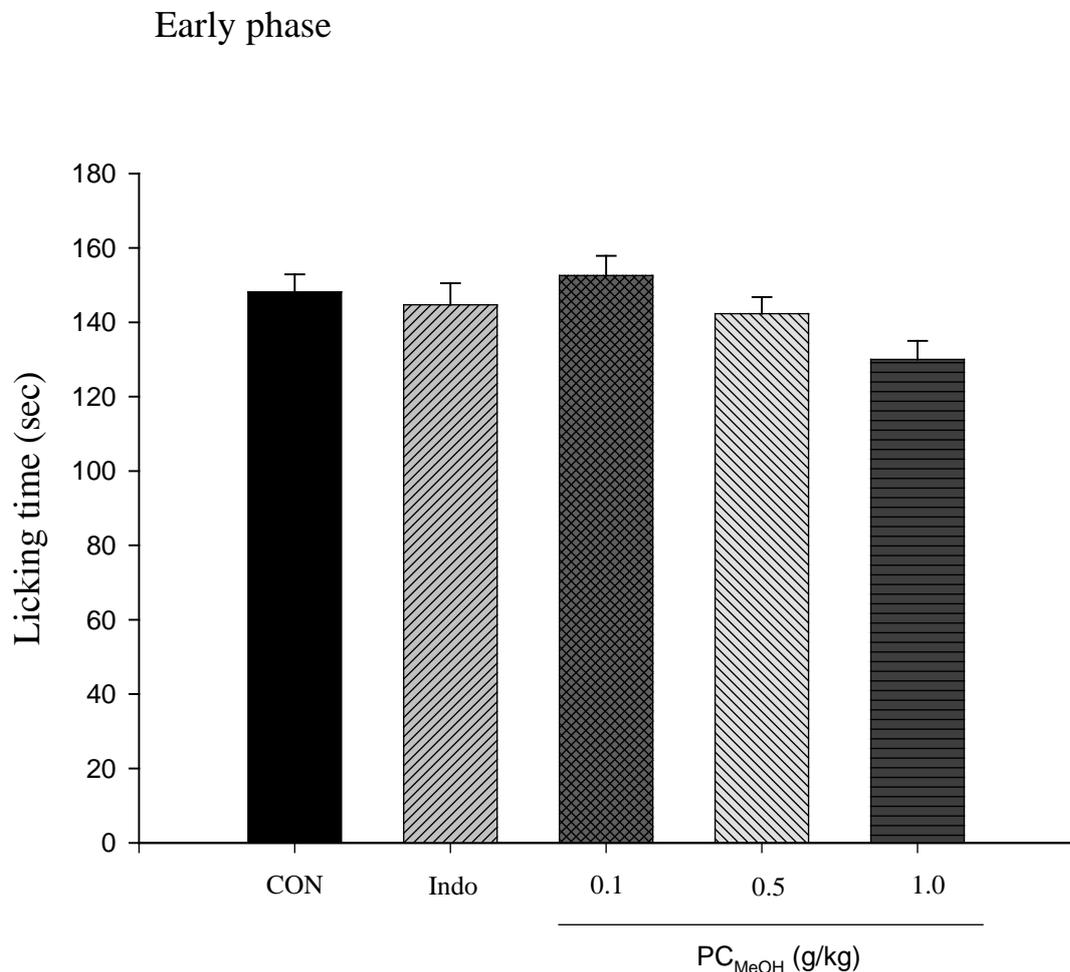


圖 30. PC_{MeOH} 及 Indo 對福馬林誘導小鼠前期舔足反應之鎮痛試驗

PC_{MeOH} 及 indomethacin (Indo) 對福馬林誘導小鼠前期舔足反應之鎮痛試驗，每個數值以 $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ 表示， $n=6$ ，其 p 值大於 0.05，皆與 control (CON) 組比較。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。

Early phase

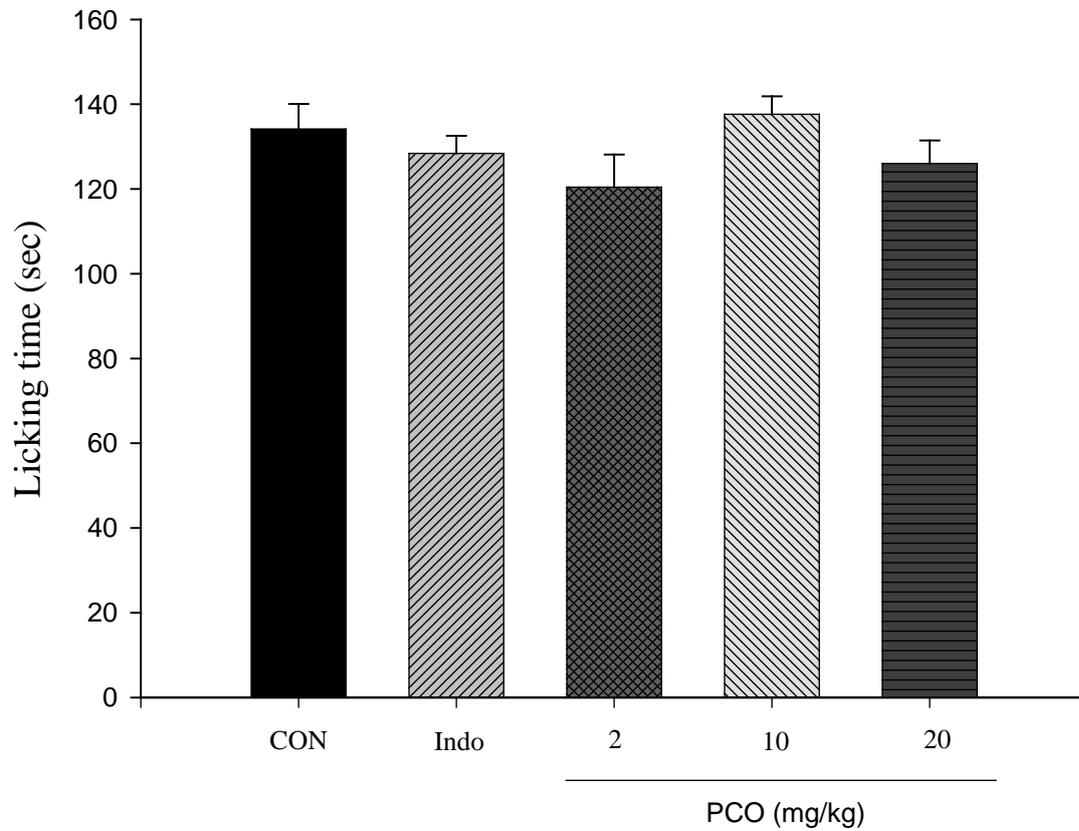


圖 31. PCO 及 Indo 對福馬林誘導小鼠前期舔足反應之鎮痛試驗

PCO 及 indomethacin (Indo) 對福馬林誘導小鼠前期舔足反應之鎮痛試驗，每個數值以 $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ 表示， $n=6$ ，其 p 值大於 0.05，皆與 control (CON) 組比較。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。

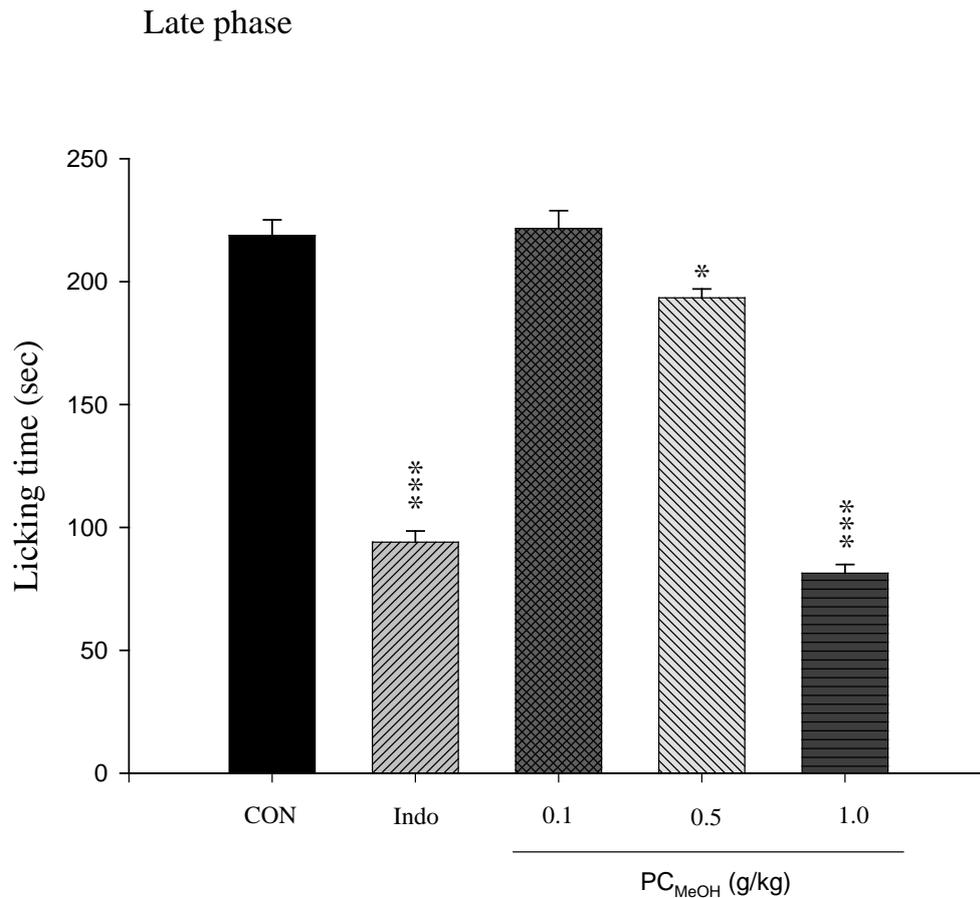


圖 32. PC_{MeOH} 及 Indo 對福馬林誘導小鼠後期舔足反應之鎮痛試驗

PC_{MeOH} 及 indomethacin (Indo) 對福馬林誘導小鼠後期舔足反應之鎮痛試驗，每個數值以 mean ± S.E.M. 表示，n=6，* $p < 0.05$ ，*** $p < 0.001$ ，皆與 control (CON) 組比較。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。

Late phase

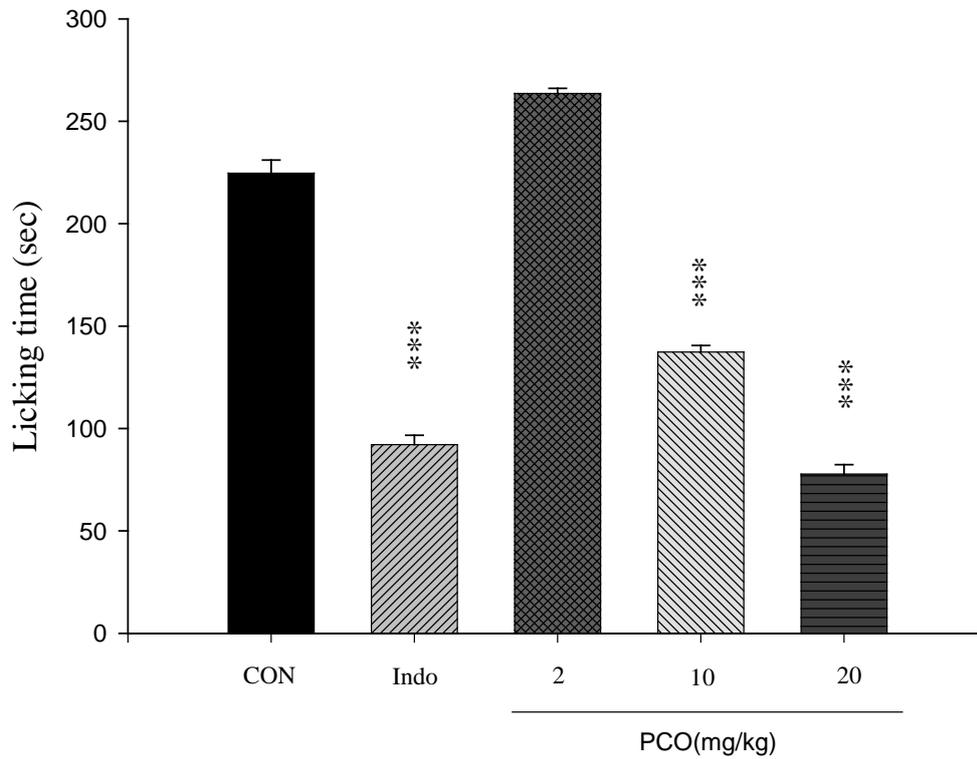


圖 33. PCO 及 Indo 對福馬林誘導小鼠後期舔足反應之鎮痛試驗

PCO 及 indomethacin (Indo) 對福馬林誘導小鼠後期舔足反應之鎮痛試驗，每個數值以 $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ 表示， $n=6$ ，*** $p < 0.001$ ，皆與 control (CON) 組比較。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。

二、 λ -角叉菜膠誘導足蹠腫脹實驗

本試驗乃利用 λ -角叉菜膠誘導小鼠足蹠腫脹的發炎模式。如圖 34 所示，口服給予 PC_{MeOH} (0.1, 0.5, 1.0 g/kg) 或腹腔注射 Indo (10 mg/kg)，均可明顯抑制 λ -角叉菜膠誘導小鼠急性足蹠腫脹。口服 (P.O.) 給予 PCO (10, 20 mg/kg) 或腹腔注射 (i.p.) Indo (10 mg/kg) (圖 35)，也都能明顯抑制 λ -角叉菜膠誘導小鼠急性足蹠腫脹。在第 3 小時， PC_{MeOH} (0.1, 0.5 g/kg)、PCO (10, 20 mg/kg) 以及 Indo (10 mg/kg)，已有明顯抑制浮腫作用。

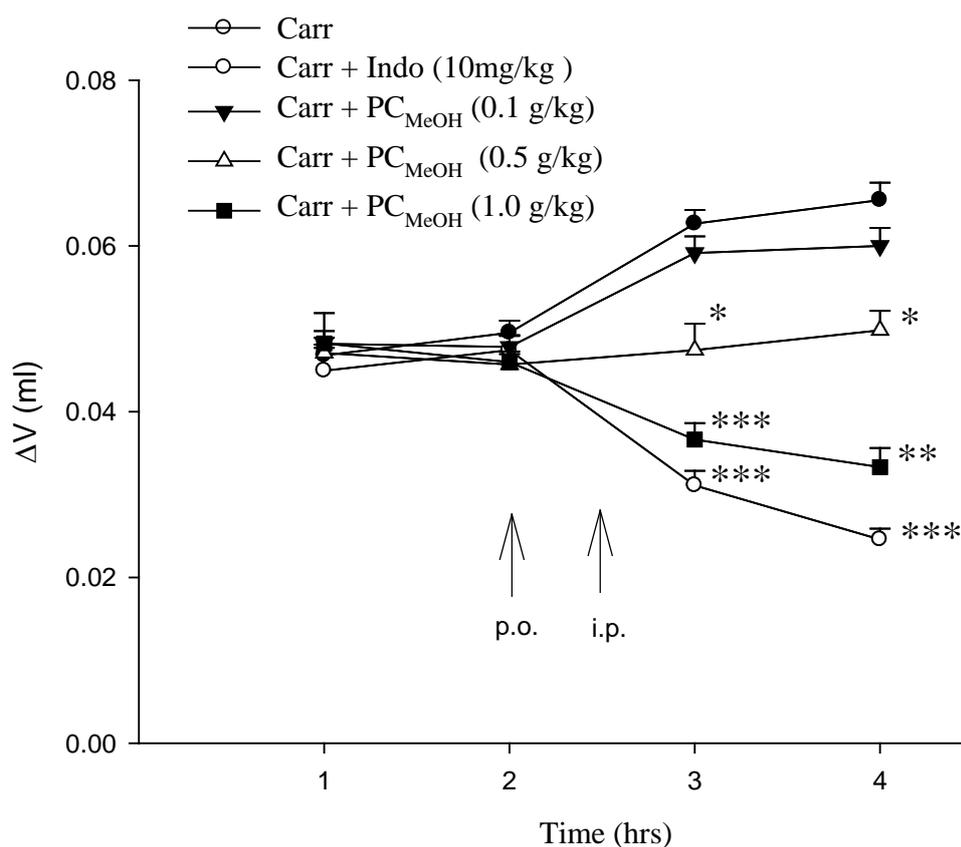


圖 34. PC_{MeOH} 及 Indo 對 λ -角叉菜膠誘導小鼠足蹠腫脹之抗發炎試驗

PC_{MeOH} 及 indomethacin (Indo) 對 λ -角叉菜膠誘導小鼠足蹠腫脹之抗發炎試驗，每個數值以 mean \pm S.E.M. 表示， $n=6$ ，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ，皆與 λ -carrageenan (Carr) 組比較。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。

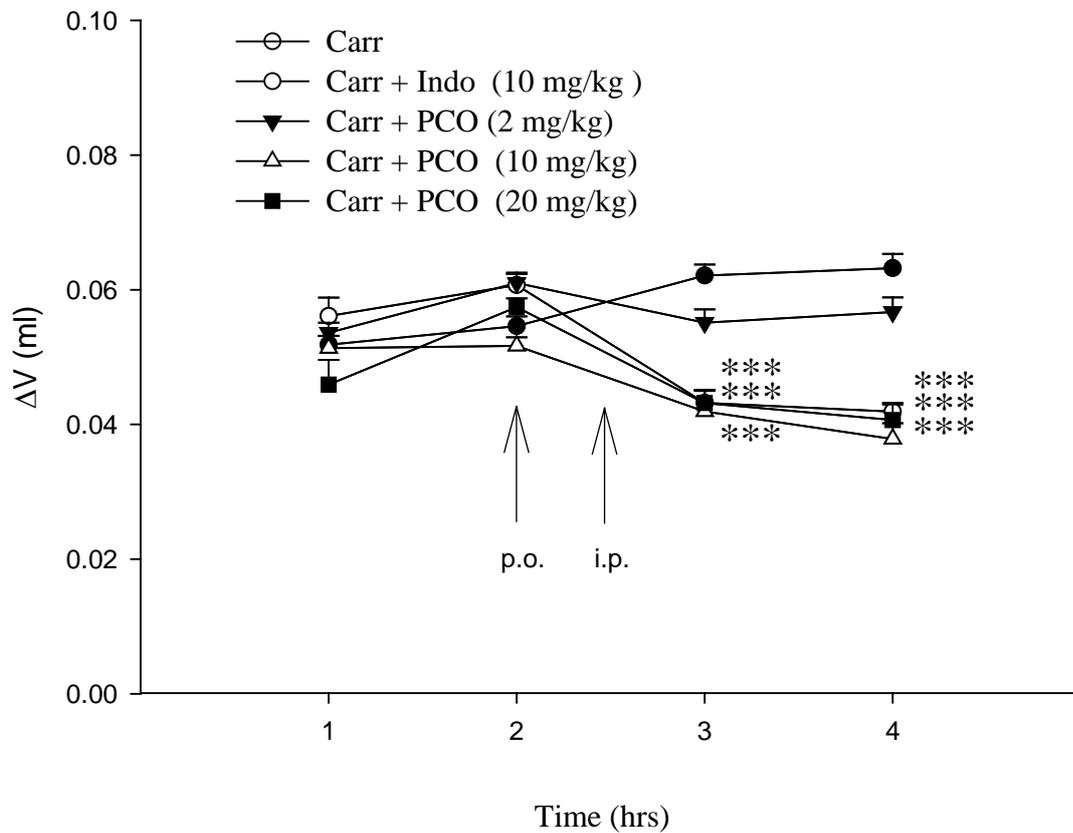


圖 35. PCO 及 Indo 對 λ -角叉菜膠誘導小鼠足蹠腫脹之抗發炎試驗
 PCO 及 indomethacin (Indo) 對 λ -角叉菜膠誘導小鼠足蹠腫脹之抗發炎試驗，每個數值以 $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ 表示， $n=6$ ， $***p < 0.001$ ，皆與 λ -carrageenan (Carr) 組比較。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。

三、抗氧化酵素及生化值測定實驗

(一) PC_{MeOH}對小鼠肝臟抗氧化酵素活性測定

1. SOD活性測定

如圖 36 顯示，腹腔注射 indomethacin (10 mg/kg)與口服 PC_{MeOH} (1.0 g/kg)，會增加肝臟中 SOD 的活性。圖 37 顯示口服 PCO (20 mg/kg)，會增加肝臟中 SOD 的活性。

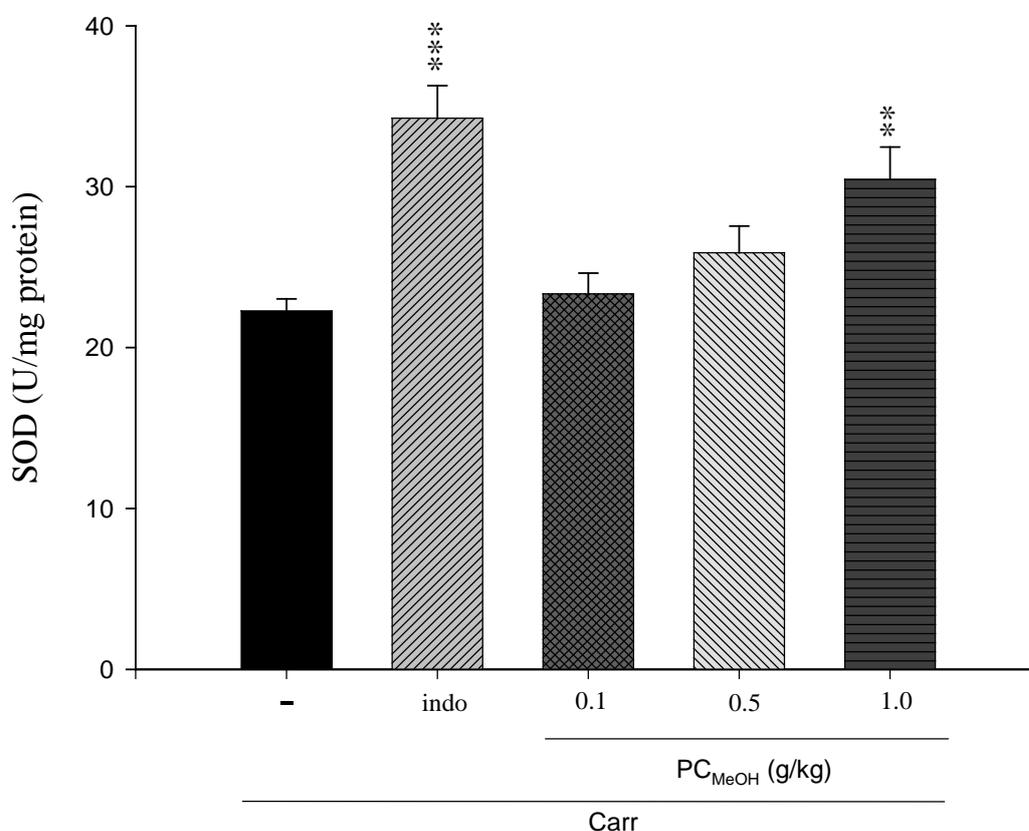


圖 36. PC_{MeOH} 及 Indo 對小鼠肝臟抗氧化酵素 SOD 活性的影響

PC_{MeOH} 及 indomethacin (Indo)對於 λ -角叉菜膠誘導小鼠足趾腫脹第四小時後，肝臟中抗氧化酵素 SOD 活性的影響。圖中每個數值以 mean \pm S.E.M.表示，n=6，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ，皆與 λ -carrageenan (Carr)組比較。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。

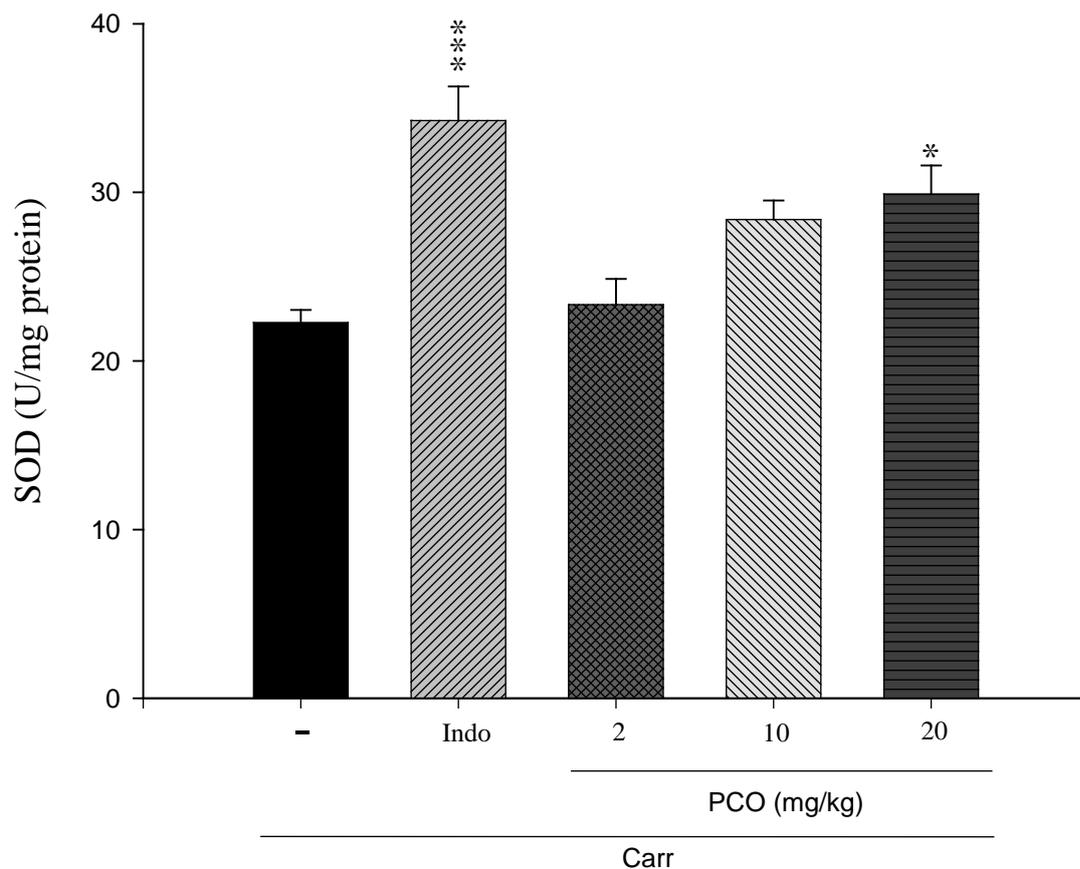


圖 37. PCO 及 Indo 對小鼠肝臟抗氧化酵素 SOD 活性的影響
 PCO 及 indomethacin (Indo) 對於 λ -角叉菜膠誘導小鼠足趾腫脹第四小時後，肝臟中抗氧化酵素 SOD 活性的影響。圖中每個數值以 $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ 表示， $n=6$ ， $*p < 0.05$ ， $***p < 0.001$ ，皆與 λ -carrageenan (Carr) 組比較。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。

2. GSH-Px活性測定

如圖 38 顯示，口服 PC_{MeOH} (0.5, 1.0 g/kg)及腹腔注射 indomethacin (10 mg/kg)會增加肝臟中 GSH-Px 的活性。圖 39 顯示口服 PCO (2, 10, 20 mg/kg)會增加肝臟中 GSH-Px 的活性。

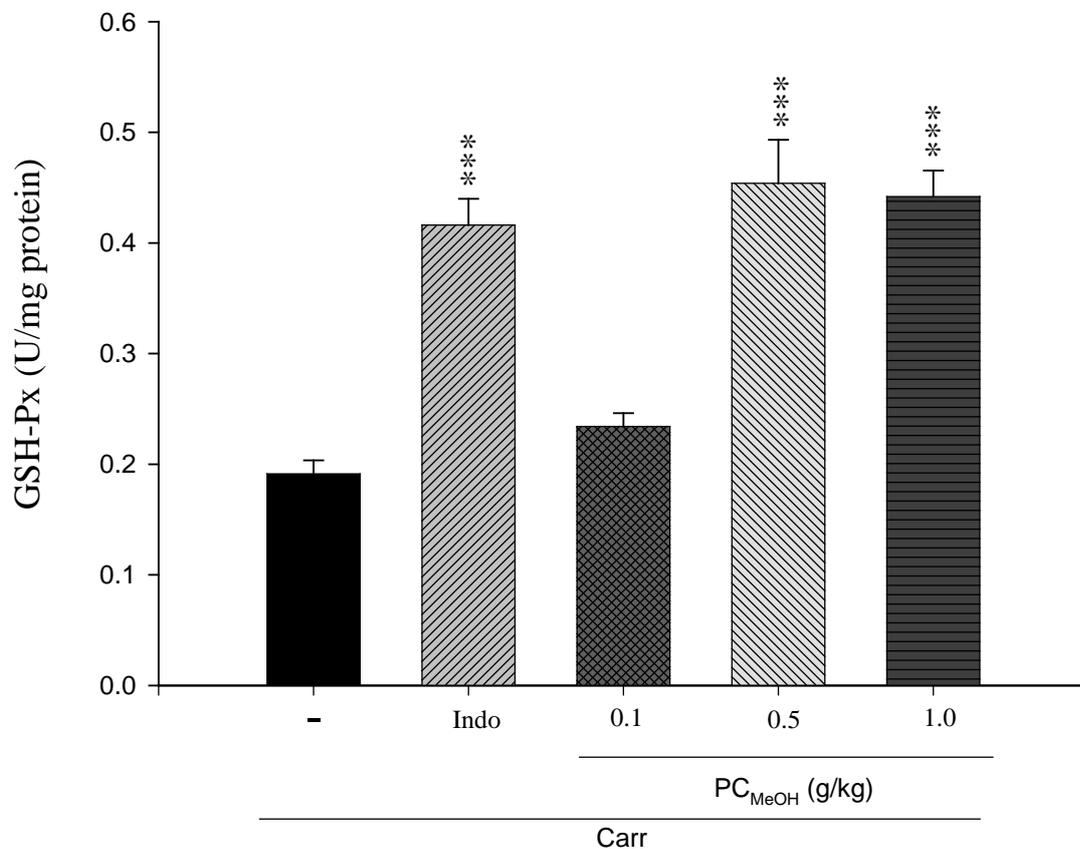


圖 38. PC_{MeOH} 及 Indo 對小鼠肝臟抗氧化酵素 GSH-Px 活性的影響

PC_{MeOH} 及 indomethacin (Indo)對於 λ -角叉菜膠誘導小鼠足趾腫脹第四小時後，肝臟中抗氧化酵素 GSH-Px 活性的影響。圖中每個數值以 mean \pm S.E.M.表示，n=6，*** $p < 0.001$ ，皆與 λ -carrageenan (Carr)組比較。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。

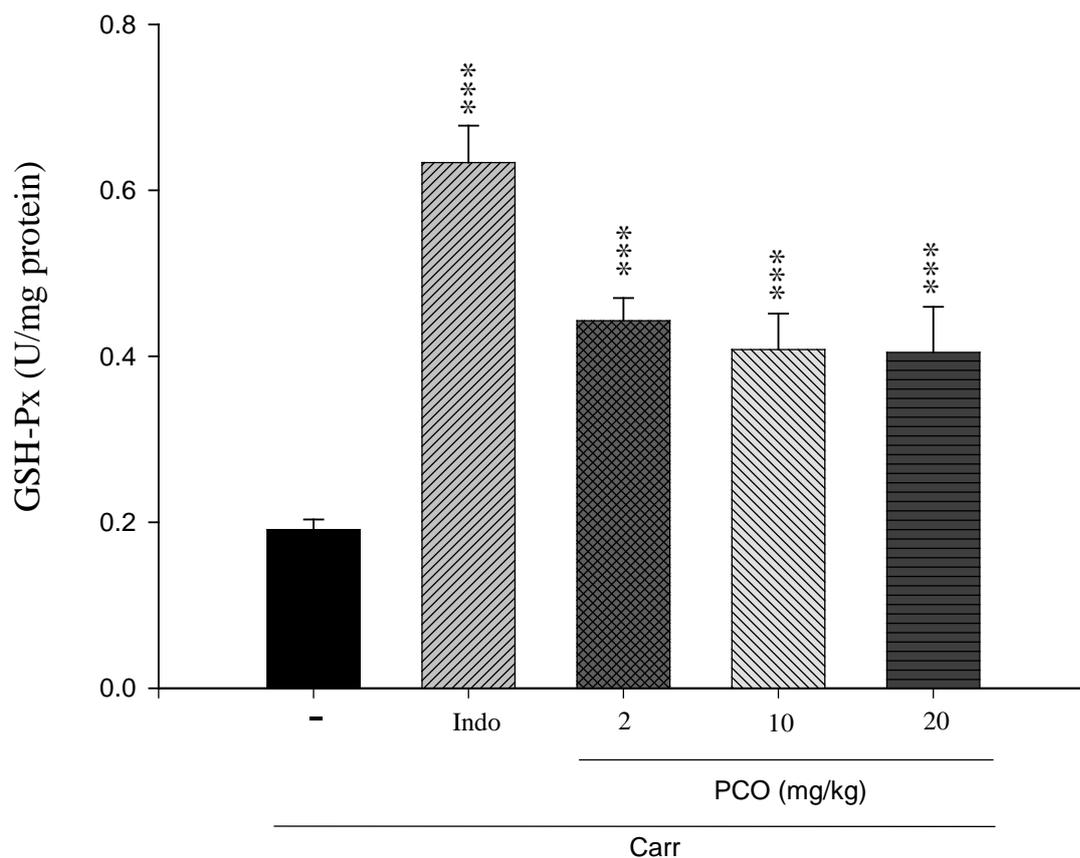


圖 39. PCO 及 Indo 對小鼠肝臟抗氧化酵素 GSH-Px 活性的影響
 PCO 及 indomethacin (Indo) 對於 λ -角叉菜膠誘導小鼠足趾腫脹第四小時後，肝臟中抗氧化酵素 GSH-Px 活性的影響。圖中每個數值以 $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ 表示， $n=6$ ，*** $p < 0.001$ ，皆與 λ -carrageenan (Carr) 組比較。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。

3. GSH-Rd活性測定

如圖 40 結果顯示，口服給予 PC_{MeOH} (0.5, 1.0 g/kg)與腹腔注射 indomethacin (10 mg/kg)，會增加肝臟中 GSH-Rd 的活性。圖 41 顯示 PCO (20 mg/kg)會增加肝臟中 GSH-Rd 的活性。

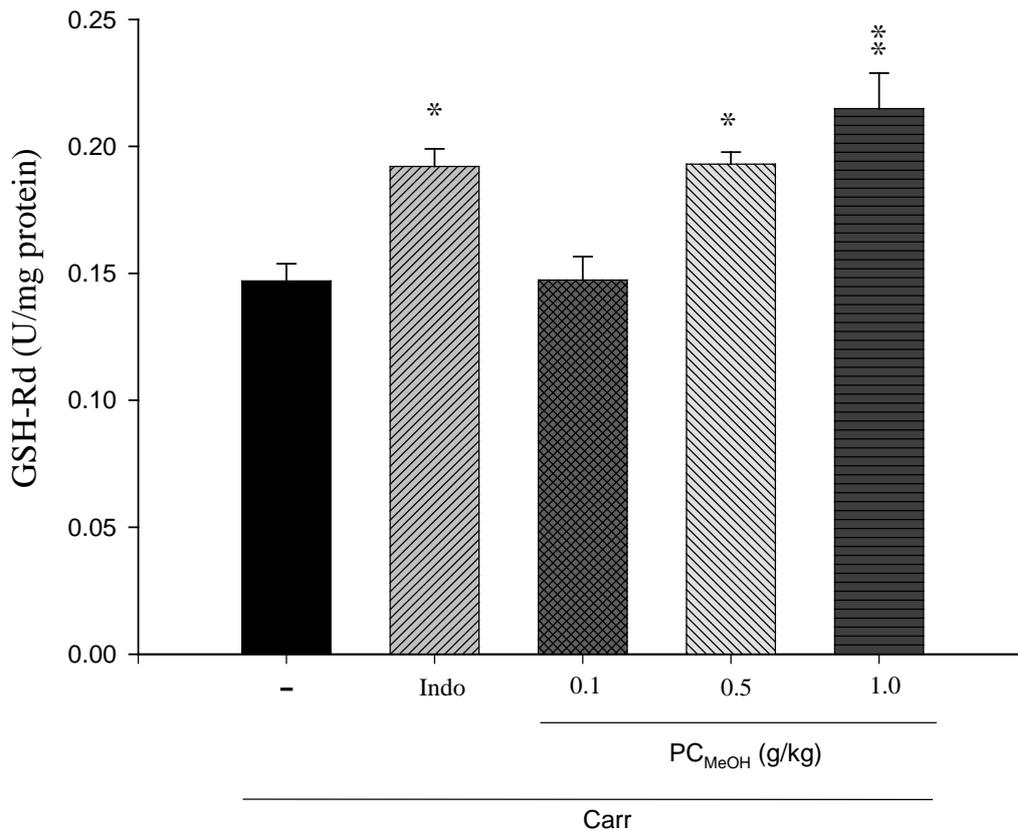


圖 40. PC_{MeOH} 及 Indo 對小鼠肝臟抗氧化酵素 GSH-Rd 活性的影響

PC_{MeOH} 及 indomethacin (Indo)對於λ-角叉菜膠誘導小鼠足趾腫脹第四小時後，肝臟中抗氧化酵素 GSH-Rd 活性的影響。圖中每個數值以 mean ± S.E.M.表示，n=6，* $p < 0.05$ ，*** $p < 0.001$ ，皆與λ-carrageenan (Carr)組比較。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。

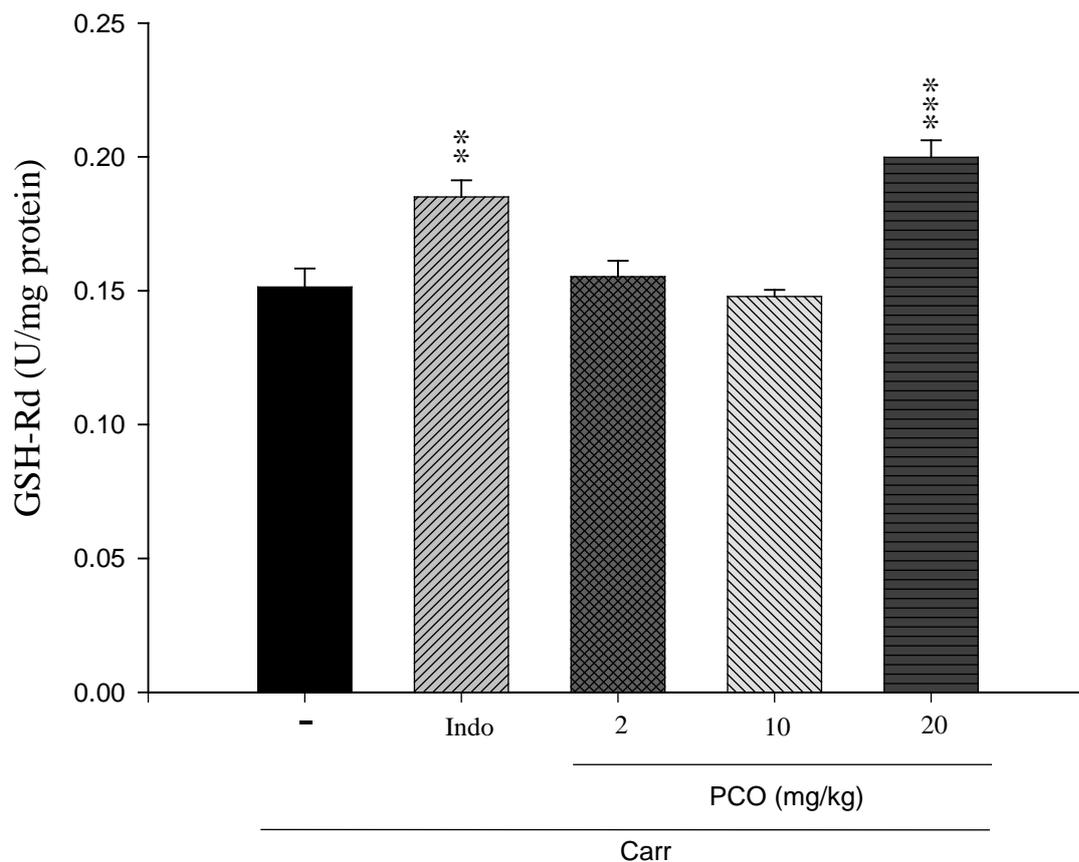


圖 41. PCO 及 Indo 對小鼠肝臟抗氧化酵素 GSH-Rd 活性的影響
 PCO 及 indomethacin (Indo)對於λ-角叉菜膠誘導小鼠足趾腫脹第四小時後，肝臟中抗氧化酵素 GSH-Rd 活性的影響。圖中每個數值以 mean ± S.E.M.表示，n=6，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ，皆與 λ-carrageenan (Carr)組比較。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。

(二)足蹠組織中發炎介質含量測定

1. 足蹠組織中COX-2 含量測定

如圖 42 結果顯示，口服給予 PC_{MeOH} (0.5, 1.0 g/kg)或腹腔注射 indomethacin (Indo 10 mg/kg)，會抑制足蹠組織中 COX-2 的含量。圖 43 顯示 PCO (10, 20 mg/kg) 會抑制足蹠組織中 COX-2 的含量。

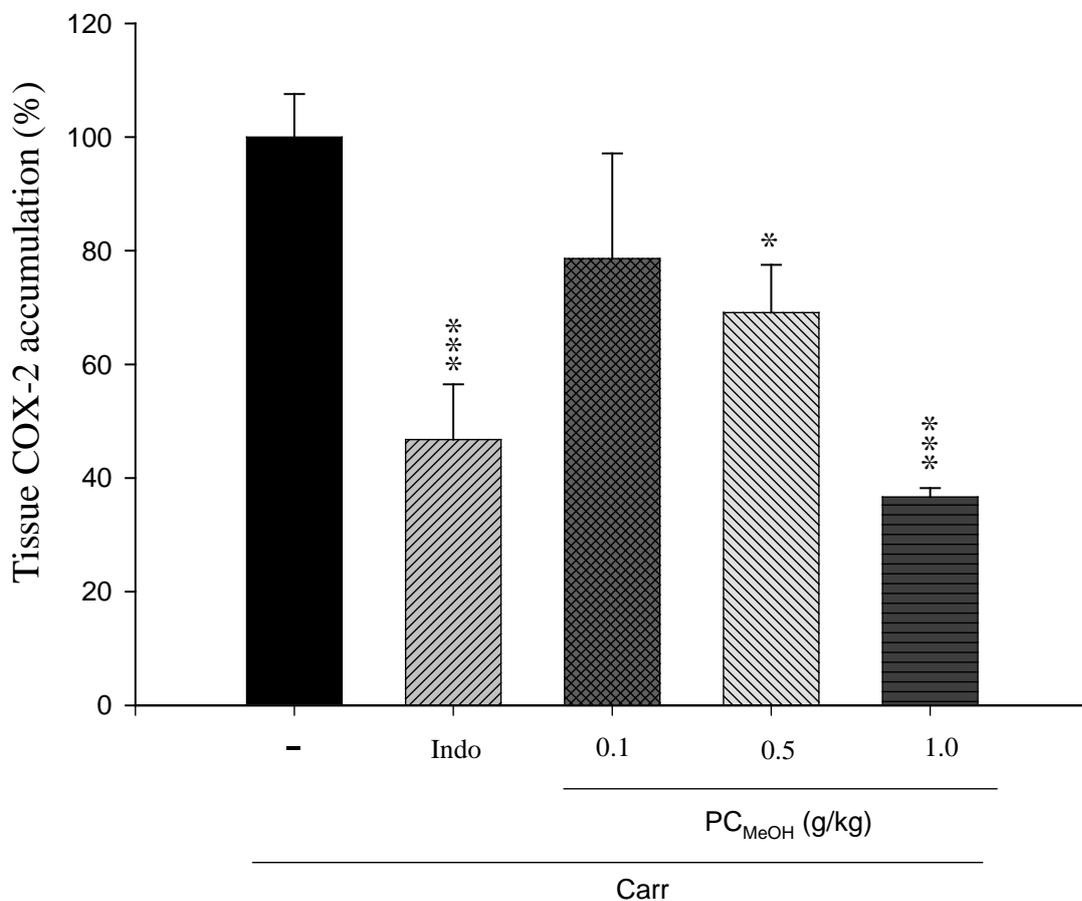


圖 42. PC_{MeOH} 及 Indo 對 Carr 誘導小鼠足蹠發炎，足蹠中 COX-2 含量抑制率的影響
PC_{MeOH} 及 indomethacin (Indo)對於λ-角叉菜膠誘導小鼠足趾腫脹第四小時後，足蹠中發炎介質 COX-2 含量抑制率的影響。圖中每個數值以 mean ± S.E.M.表示，n=6，* $p < 0.05$ ，*** $p < 0.001$ ，皆與λ-carrageenan (Carr)組比較。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。

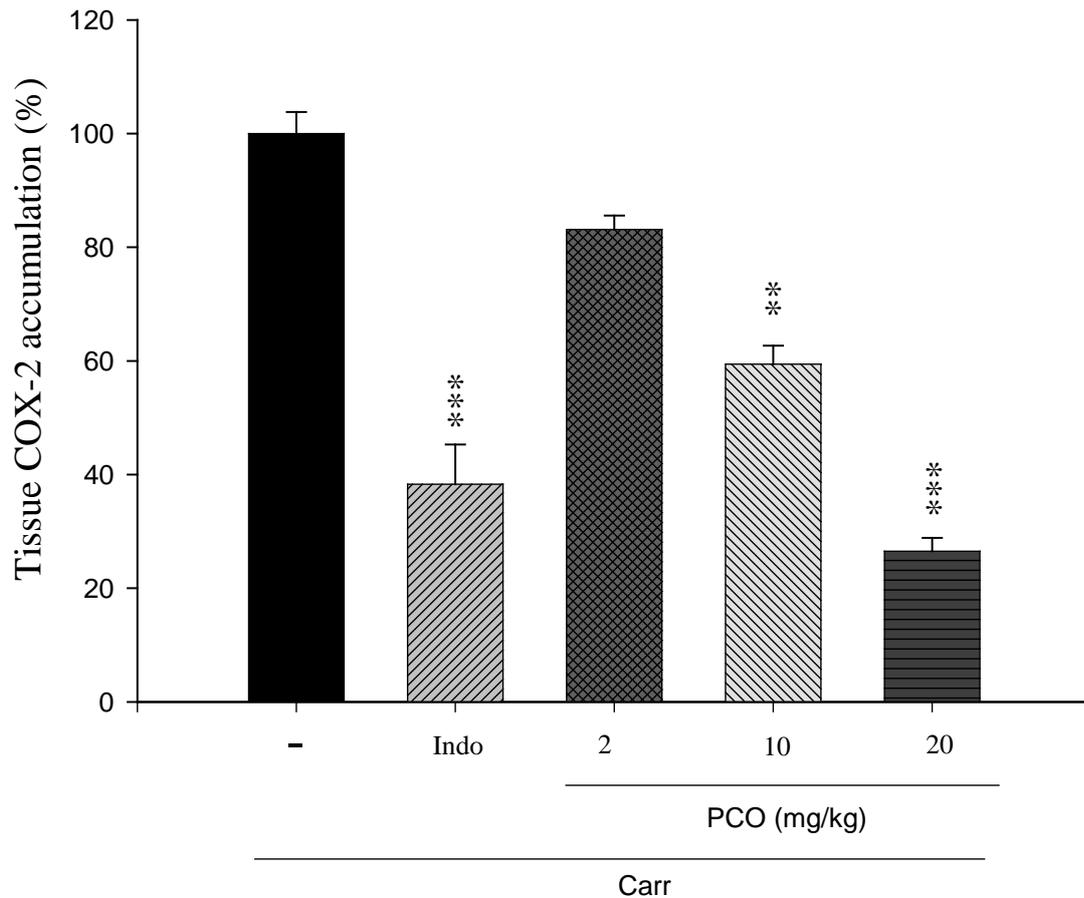


圖 43. PCO 及 Indo 對 Carr 誘導小鼠足蹠發炎，足蹠中 COX-2 含量抑制率的影響
 PCO 及 indomethacin (Indo) 對於 λ -角叉菜膠誘導小鼠足趾腫脹第四小時後，足蹠中發炎介質 COX-2 含量抑制率的影響。圖中每個數值以 mean \pm S.E.M. 表示，n=6，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ，皆與 λ -carrageenan (Carr) 組比較。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。

2. 足蹠組織中脂質過氧化物MDA濃度測定

λ -角叉菜膠組之足蹠中 MDA 濃度明顯上升，而口服給予高濃度 PC_{MeOH} (0.1, 0.5 g/kg)或腹腔注射 Indo (10 mg/kg)皆能明顯抑制足蹠中脂質過氧化物 MDA 上升之現象，口服給予 PCO (10, 20 mg/kg)，結果如圖 44, 45 所示。

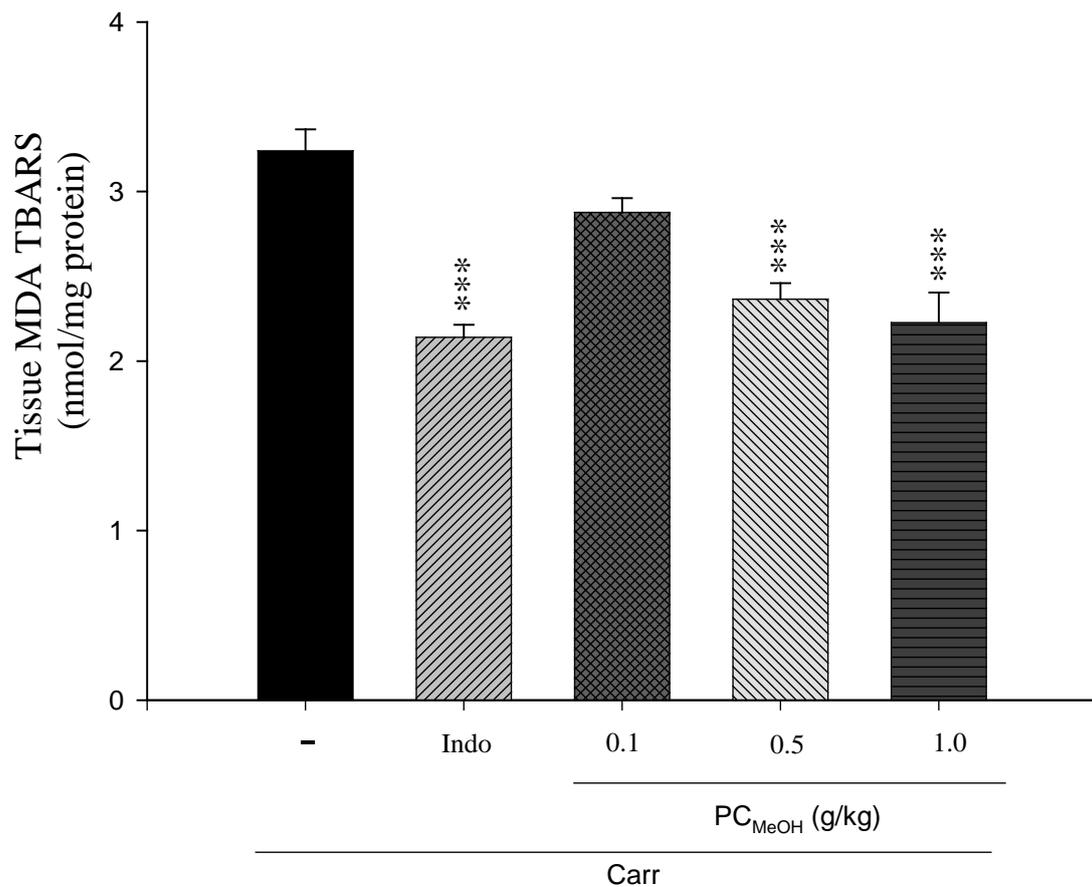


圖 44. PC_{MeOH} 及 Indo 對 λ -角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎，足蹠中 MDA 含量的影響
 PC_{MeOH} 及 indomethacin (Indo) 對於 λ -角叉菜膠誘導小鼠足趾腫脹第四小時後，足蹠中脂質過氧化物 MDA 含量的影響。圖中每個數值以 mean \pm S.E.M. 表示， $n=6$ ，*** $p < 0.001$ ，皆與 λ -carrageenan (Carr) 組比較。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。

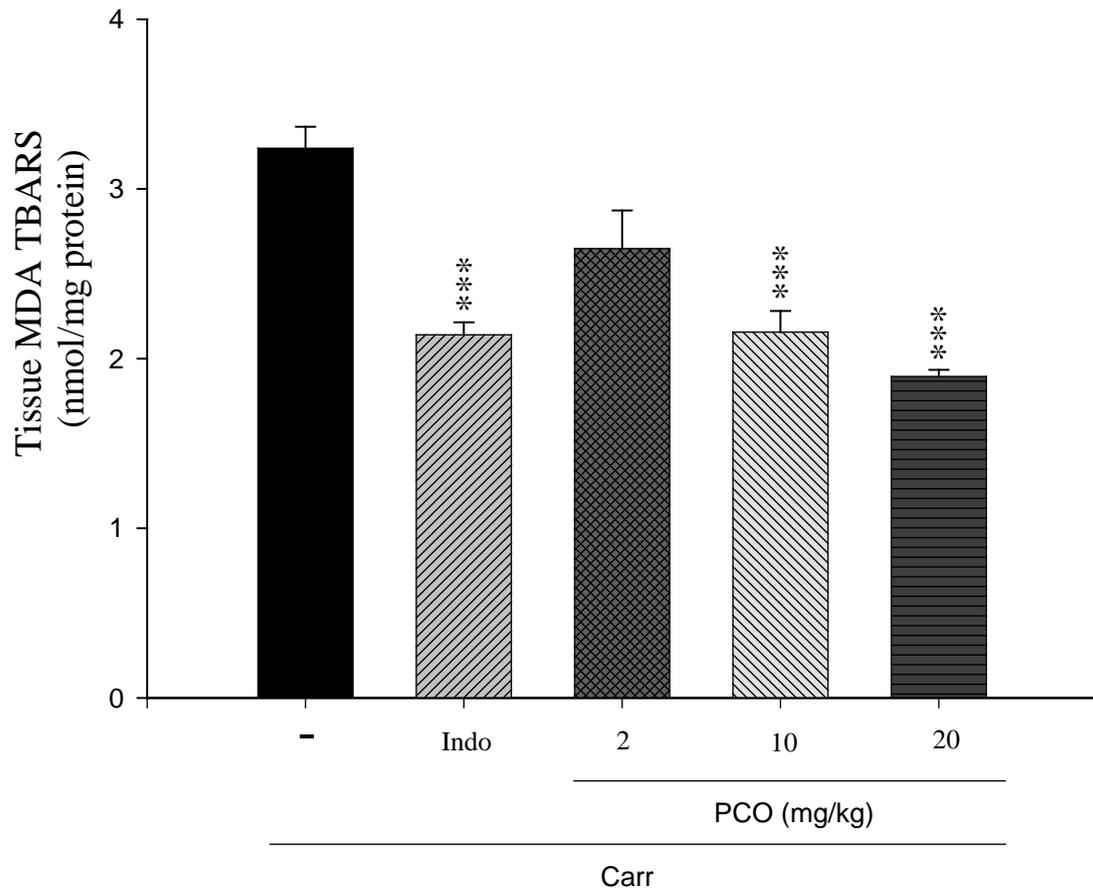


圖 45. PCO 及 Indo 對 λ -角叉菜膠誘導小鼠足趾發炎，足趾中 MDA 含量的影響
 PCO 及 indomethacin (Indo) 對於 λ -角叉菜膠誘導小鼠足趾腫脹第四小時後，足趾中脂質過氧化物 MDA 含量的影響。圖中每個數值以 $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ 表示， $n=6$ ，*** $p < 0.001$ ，皆與 λ -carrageenan (Carr) 組比較。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。

3. 足蹠組織中IL-6 濃度測定

λ -角叉菜膠組之足蹠組織中 IL-6 濃度明顯上升，而口服給予 PC_{MeOH} (0.5, 1.0 g/kg)、PCO (10, 20 mg/kg)或腹腔注射 Indo (10 mg/kg)，皆能明顯抑制 λ -角叉菜膠所誘導小鼠足蹠組織中 IL-6 濃度之上升，結果如圖 46, 47 所示。

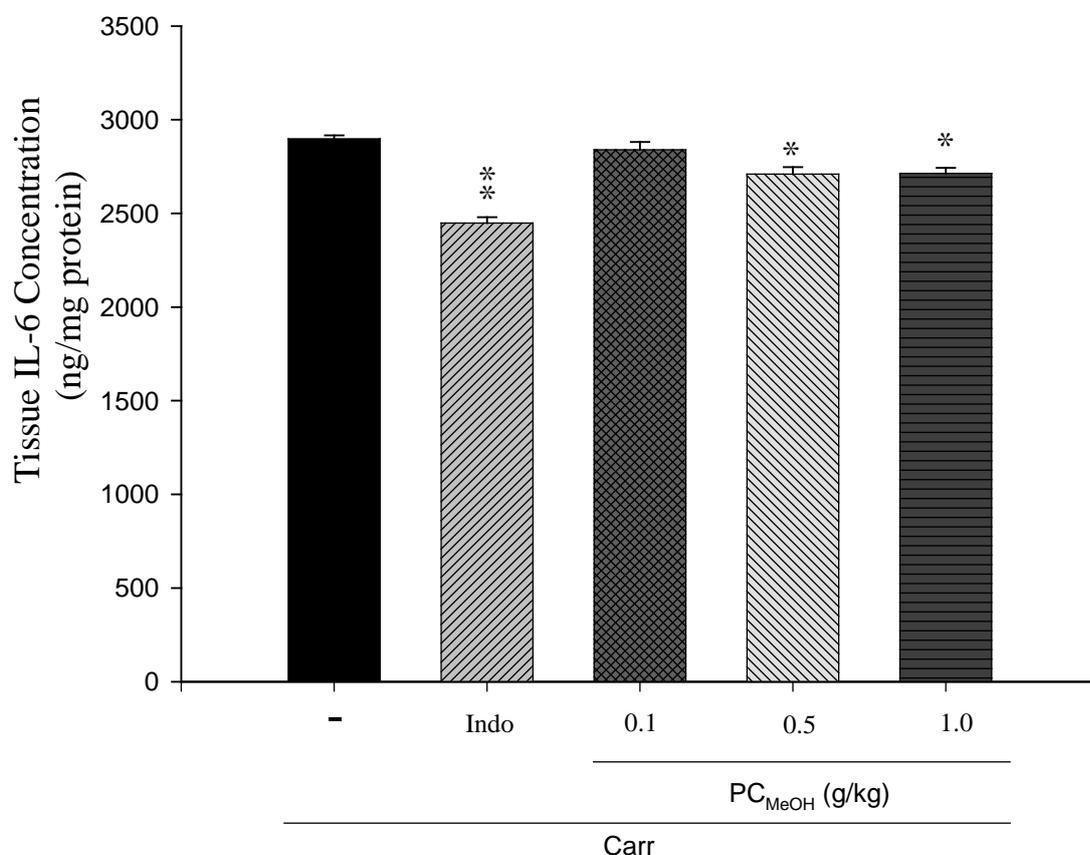


圖 46. PC_{MeOH} 及 Indo 對 λ -角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎，足蹠中 IL-6 濃度的影響
PC_{MeOH} 及 indomethacin (Indo) 對於 λ -角叉菜膠誘導小鼠足蹠腫脹第四小時後，足蹠中 IL-6 濃度的影響。圖中每個數值以 mean \pm S.E.M. 表示，n=6，* p <0.05，** p <0.01，皆與 λ -carrageenan (Carr) 組比較。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。

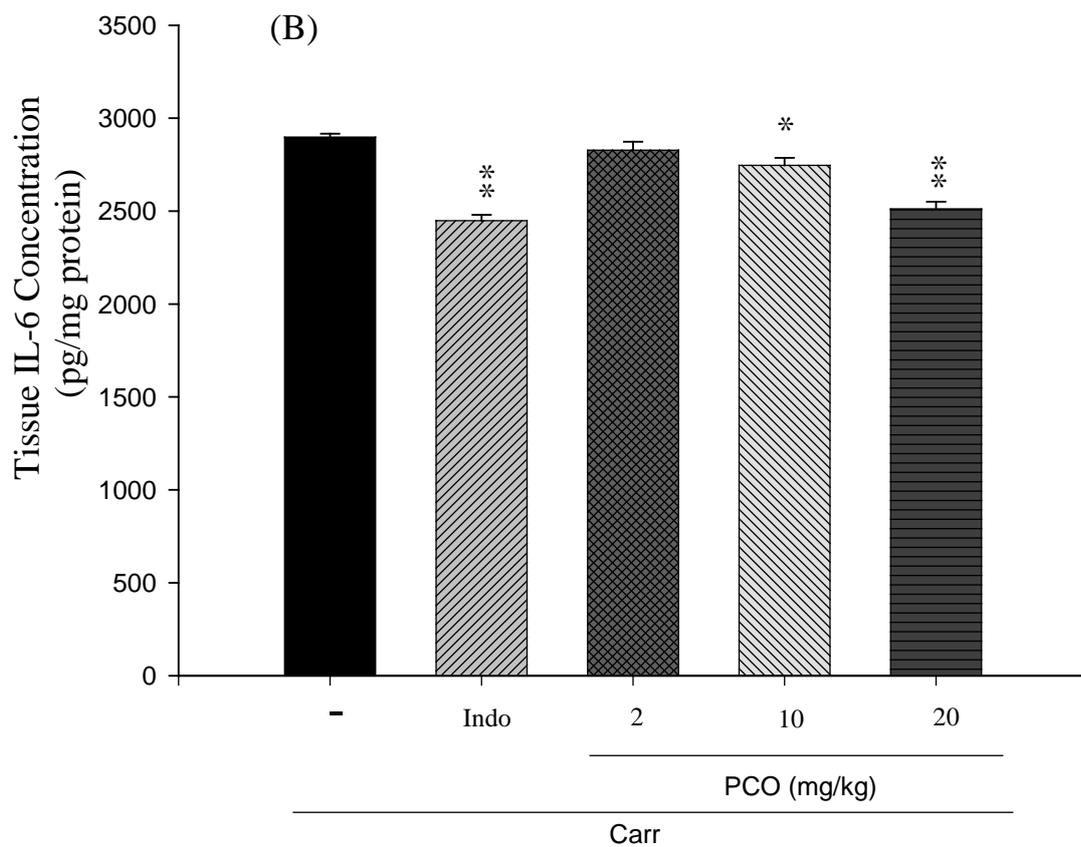


圖 47. PCO 及 Indo 對 λ -角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎，足蹠中 IL-6 濃度的影響
 PCO 及 indomethacin (Indo) 對於 λ -角叉菜膠誘導小鼠足趾腫脹第四小時後，足蹠中 IL-6 濃度的影響。圖中每個數值以 mean \pm S.E.M. 表示，n=6，* p < 0.05, ** p < 0.01，皆與 λ -carrageenan (Carr) 組比較。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。

4. 足蹠組織中TNF- α 濃度測定

λ -角叉菜膠組之足蹠組織中 TNF- α 濃度明顯上升，而口服 PC_{MeOH} (0.5, 1.0 g/kg)、PCO (10, 20 mg/kg)或腹腔注射 Indo (10 mg/kg)能抑制足蹠組織中 TNF- α 濃度上升之現象，低濃度 PC_{MeOH} (0.1 g/kg)則無效，結果如圖 48, 49 所示。

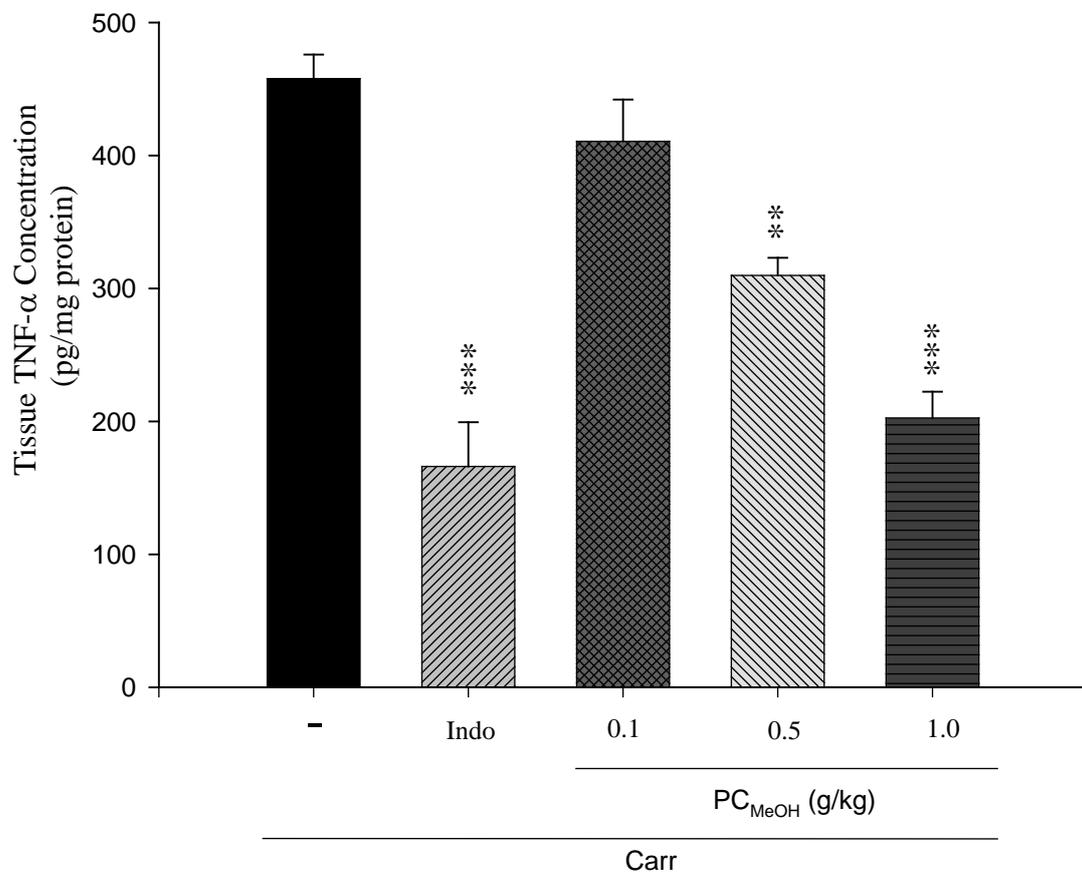


圖 48. PC_{MeOH} 及 Indo 對 λ -角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎，足蹠中 TNF- α 濃度的影響
PC_{MeOH} 及 indomethacin (Indo)對於 λ -角叉菜膠誘導小鼠足趾腫脹第四小時後，足蹠中 TNF- α 濃度的影響。圖中每個數值以 mean \pm S.E.M.表示，n=6，*** p <0.01，** p <0.01，皆與 λ -carrageenan (Carr)組比較。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。

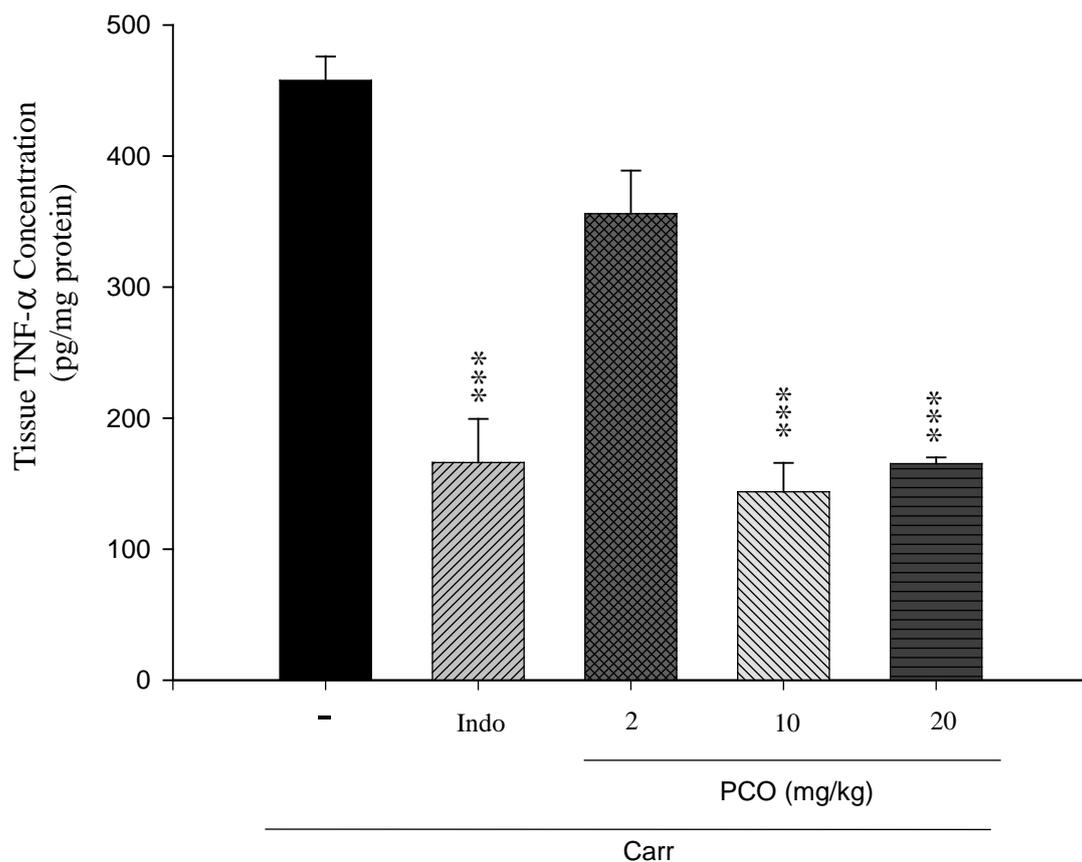


圖 49. PCO 及 Indo 對 λ -角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎，足蹠中 TNF- α 濃度之影響
 PCO 及 indomethacin (Indo) 對於 λ -角叉菜膠誘導小鼠足趾腫脹第四小時後，足蹠中 TNF- α 濃度的影響。圖中每個數值以 mean \pm S.E.M. 表示，n=6，*** p < 0.001，皆與 λ -carrageenan (Carr) 組比較。(One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range test)。

(三)蘇木紫－伊紅染色

蘇木紫－伊紅染色之染色與判讀，委請中興大學獸醫系廖俊旺老師製作與判讀，實驗共分成五組，控制組、對照組、以及治療組 (0.1, 0.5, 1.0 g/kg)三組。表 11 為評估標準，實驗結果於表 12 及圖 51 呈現，結果顯示口服給予PC_{MeOH}濃度 (0.5, 1.0 g/kg)或腹腔注射Indo (10 mg/kg)皆能顯著改善λ-角叉菜膠組所呈現之組織腫脹現象。

發炎現象的評估重點在於嗜中性球於發炎組織中的多寡 (圖 50)。在實驗各組小鼠足蹠之 H.E.染色觀察中 (表 12)，λ-角叉菜膠組誘導組的嗜中性球數量明顯多於各組，而口服給予 PC_{MeOH} 各個劑量或腹腔注射 Indo 皆能顯著改善λ-角叉菜膠組所呈現之發炎現象。



表 11. 病理評估標準

Observation fate:

Gross finding:

No abnormalities (NA)

Left (L); Right (R)

Bilateral (B)

Slight, +

Mild, ++

Moderate, +++

Severe, ++++

Histopathological nomenclatures:

No significant lesions (NSL)

Modification: Degeneration, Necrosis, ...

Distribution: Focal, Multifocal, Local Extensive and Diffuse

Degree: Minimal, Slight, Moderate, Moderate/Severe and Severe/High

Duration: Acute, Subacute, and Chronic

Exudate: Serous, Fibrinous, and Purulent

Degree of lesions was graded from one to five depending on severity: 1 = minimal (< 1%); 2 = slight (1-25%); 3 = moderate (26-50%); 4 = moderate/severe (51-75%); 5 = severe/high (76-100%).

Severity of lesions was graded according to the methods described by Shackelford et al. (2002)(*Toxicologic Pathology* 30: 93-96, 2002).

表 12. 小鼠足部病理評估

| Organ | Lesions | Group | | | | |
|-------|--------------------------------------------------------------------|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Paw | | | | | | |
| | Edema, subcutaneous, focal, slight to moderate/severe ¹ | 5/5 ² | 8/8 | 8/8 | 5/5 | 6/6 |
| | Histoscore of edema ³ | 3.4 ±0.5 | 2.6 ±0.7 | 3.3 ±0.7 | 3.0 ±0.0 | 2.3 ±0.5 |
| | Infiltration, neutrophil, focal | 5/5 ² | 8/8 | 8/8 | 5/5 | 6/6 |
| | Histoscore of inflammation | 3.0 ±0.0 | 2.3 ±0.4 | 2.4 ±0.5 | 1.6 ±0.5 | 1.3 ±0.5 |

¹Degree of lesions was graded from one to five depending on severity: 1 = minimal (< 1%); 2 = slight (1-25%); 3 = moderate (26-50%); 4 = moderate/severe (51-75%); 5 = severe/high (76-100%).

²Incidence: Affected mice/ Total examined mice.

³Score of dermatitis = Mean score of dermatitis /Examined mice

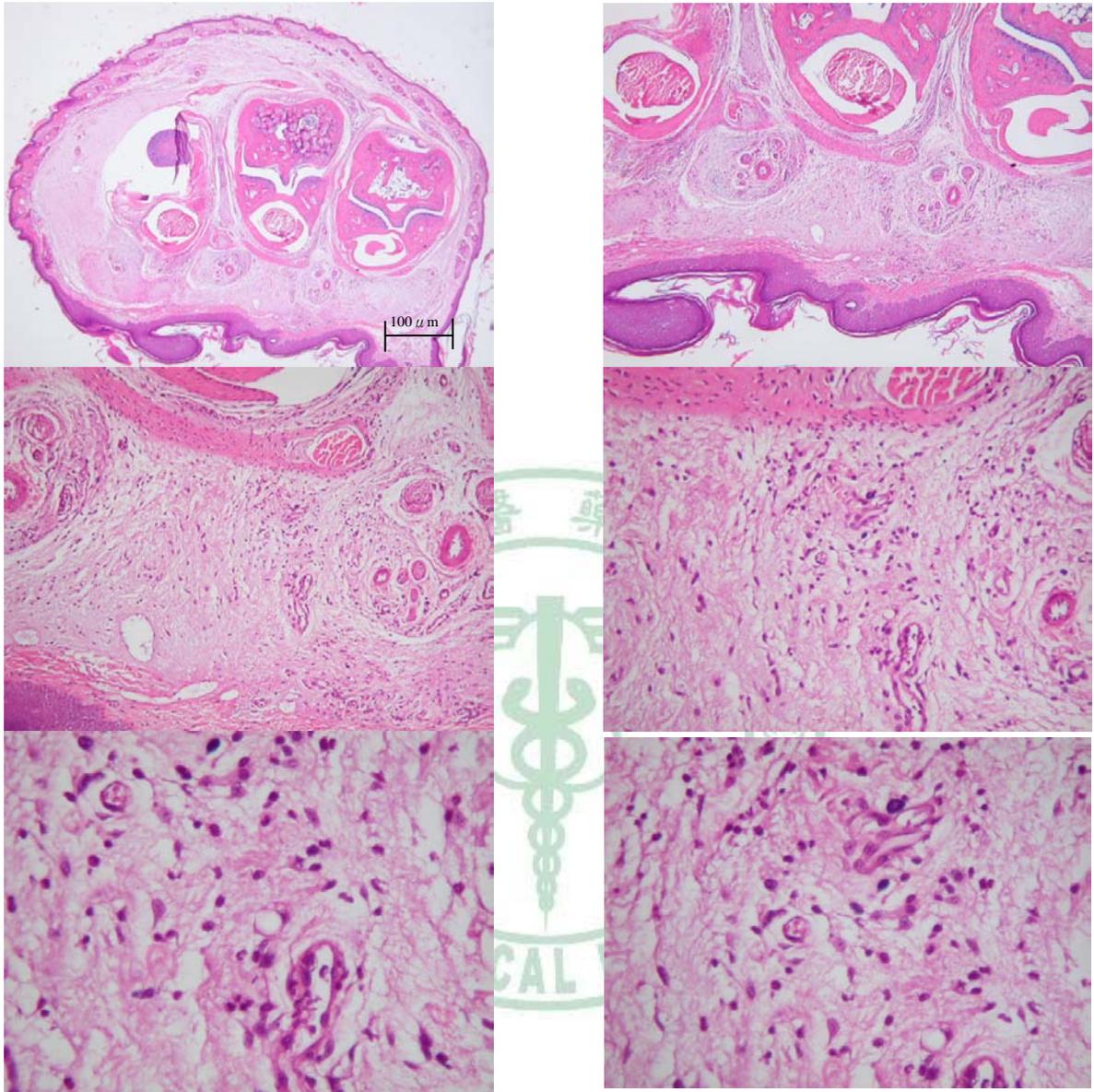
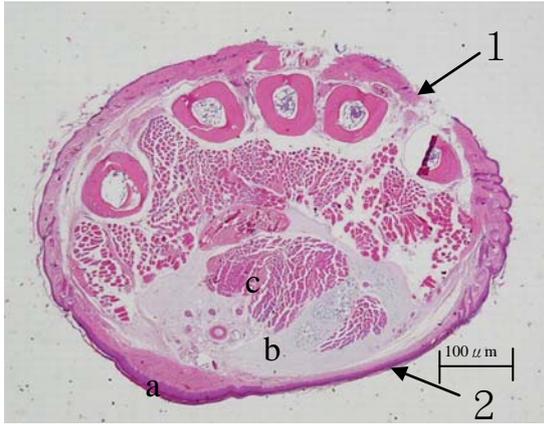


圖 50. λ -carrageenan 誘導小鼠足蹠發炎的 H&E 切片染色圖

λ -carrageenan 誘導小鼠足蹠發炎的 H&E 切片染色圖。圖中 (A. 20x, B. 40x, C. 100x, D. 200x, E. and F. 400x, animal code: 1-5)，藍紫色部分為嗜中性球，嗜中性球密度越高代表發炎反應越嚴重。



- 1 為腳背
- 2 為腳底
- a 為表皮組織
- b 為結締組織
- c 為肌肉組織

20x



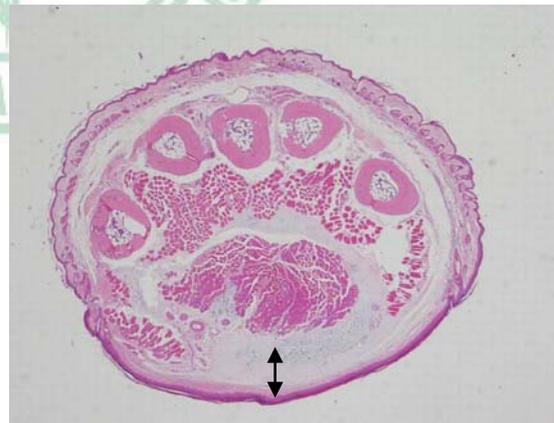
Control



1% Carr



Indo (10 mg/kg)+ 1% Carr



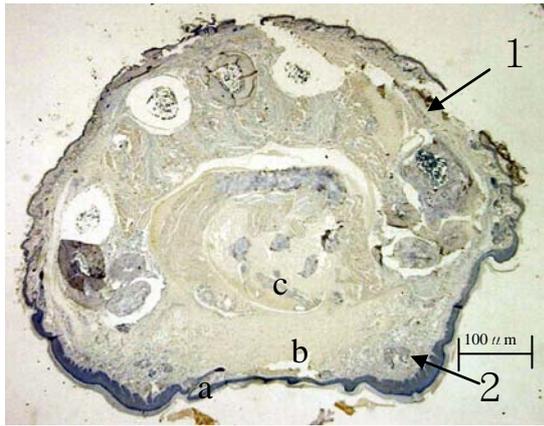
PC_{MeOH} (1.0 g/kg)+ 1% Carr

圖 51. PC_{MeOH} 及 Indo 對 λ-角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎後，足蹠之 H&E 染色
 PC_{MeOH} 及 indomethacin (Indo) 對 λ-角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎後，足蹠之 H&E 染色。
 圖中 a 為表皮層、b 為肌肉層、c 為結締組織、1 為小鼠足蹠腳背、2 為腳底，上述各
 圖皆以 20 倍觀察。結締組織間隙大小為評估標準，間隙越大代表腫脹程度越大。

(四) 足蹠之免疫組織化學染色

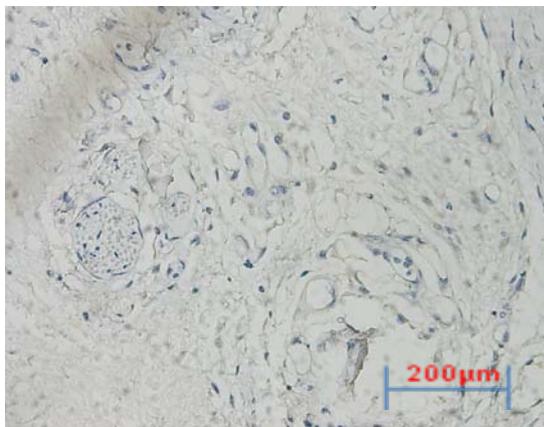
利用 IHC 染色法可以凸顯實驗各組小鼠足蹠之變化情形，其中圖 52 為 COX-2 之免疫組織化學染色，而圖 53 為 iNOS 之免疫組織化學染色，統計切片上棕色反應的數量，褐色反應越多，代表 COX-2 或 iNOS 之含量越多。由圖中觀察可知， λ -角叉菜膠誘導組之 COX-2 及 iNOS 明顯增加，口服給予高濃度 PC_{MeOH} (1.0 g/kg) 或腹腔注射 Indo (10 mg/kg) 皆能顯著降低發炎足蹠組織 COX-2 及 iNOS 之表現量。



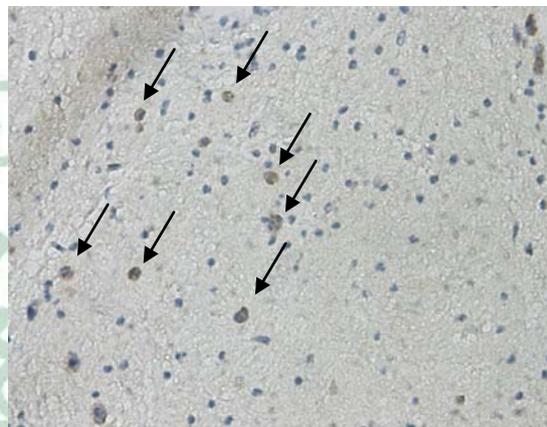


20x

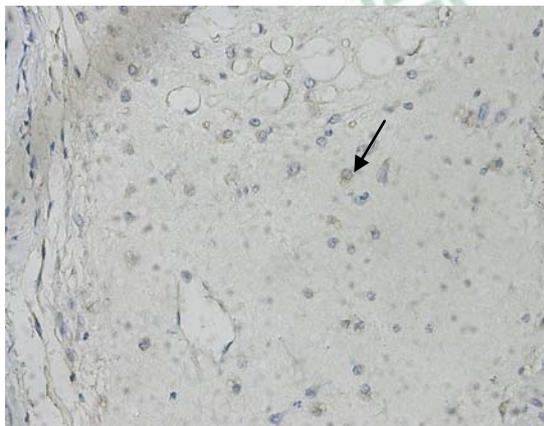
- 1 為腳背
- 2 為腳底
- a 為表皮組織
- b 為結締組織 (200x)
- c 為肌肉組織



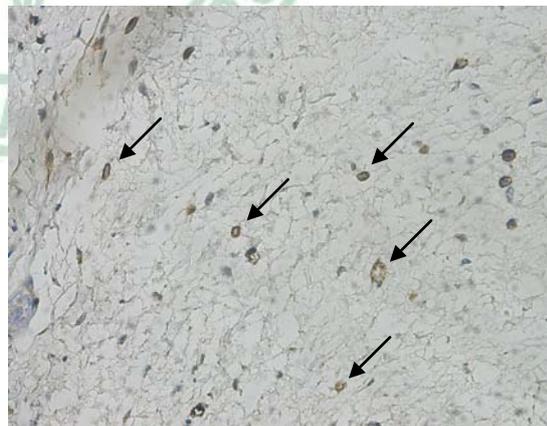
Control



1% Carr

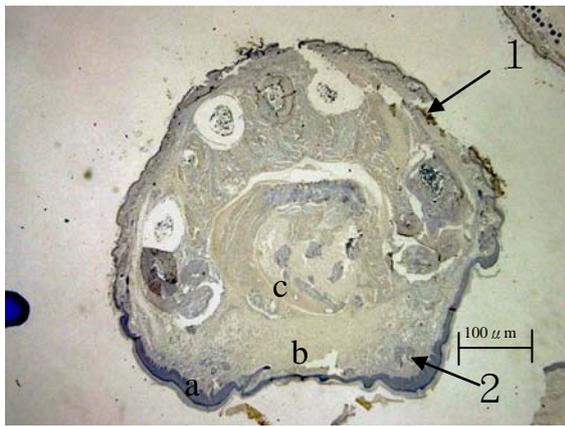


Indo (10 mg/kg)+ 1% Carr



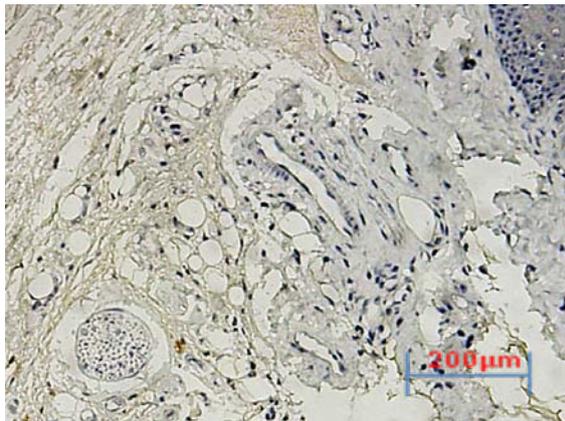
PC_{MeOH} (1.0 g/kg)+ 1% Carr

圖 52. PC_{MeOH} 及 Indo 對 λ-角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎後，COX-2 免疫組織化學染色
 PC_{MeOH} 及 indomethacin (Indo) 對 λ-角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎第四小時後，足蹠之
 COX-2 免疫組織化學染色，上述各圖皆以 200 倍觀察，圖中箭頭所指褐色為陽性反應，
 即表示有 COX-2 表現，陽性反應越多表示 COX-2 的表現越強。

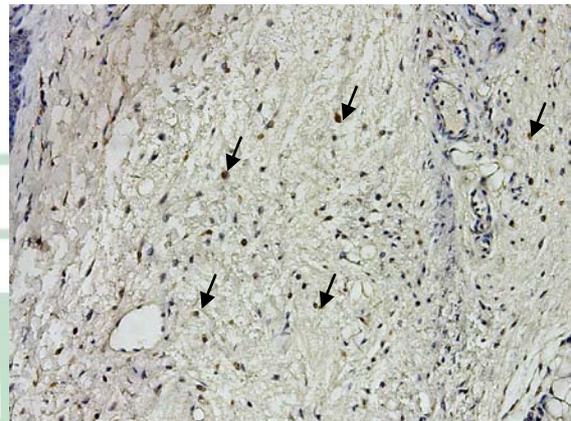


20 X

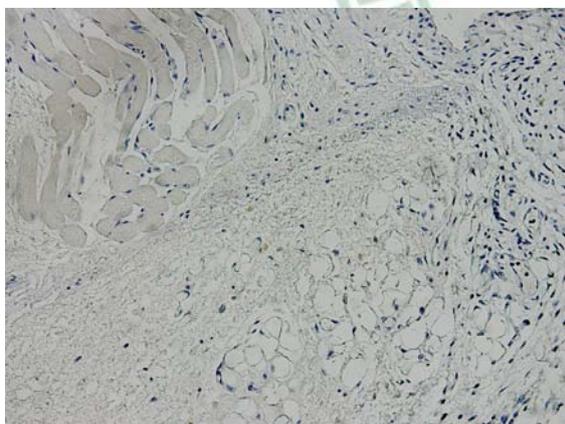
- 1 為腳背
- 2 為腳掌
- a 為表皮組織
- b 為結締組織(放大 200 X)
- c 為肌肉組織



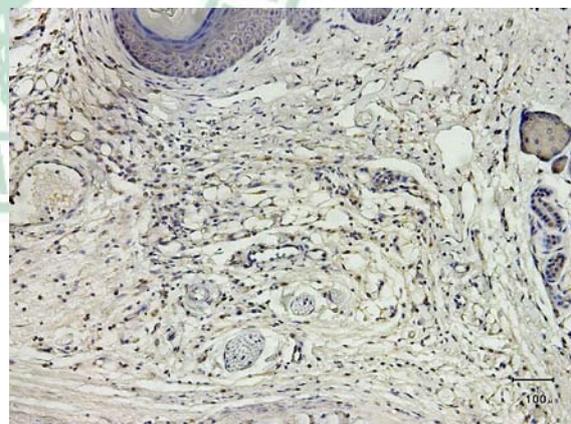
Control



1% Carr



Indo (10 mg/kg)+ 1% Carr



PC_{MeOH} (1.0 g/kg)+ 1% Carr

圖 53. PC_{MeOH} 及 Indo 對 λ -角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎後，iNOS 免疫組織化學染色
 PC_{MeOH} 及 indomethacin (Indo) 對 λ -角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎第四小時後，足蹠之
 iNOS 免疫組織化學染色，上述各圖皆以 200 倍觀察，圖中箭頭所指褐色為陽性反應，
 即表示有 iNOS 表現，陽性反應越多表示 iNOS 的表現越強。

(五) 西方點墨法

以西方點墨法方式對於小鼠發炎組織的 COX-2 含量進一步確認，一方面可以藉由不同方式呈現實驗結果，另一方面可更加確認實驗的準確性，由圖 54 顯示，Carr 誘導的小鼠足蹠組織 COX-2 含量相當高，而 PC_{MeOH} 以及 Indo 治療組的 COX-2 濃度明顯降低了，圖 55 顯示 PCO 亦能夠抑制小鼠發炎組織中 COX-2 的含量。這結果與我們使用 QCM 測量的結果相符，也與 IHC 染色的結果雷同。



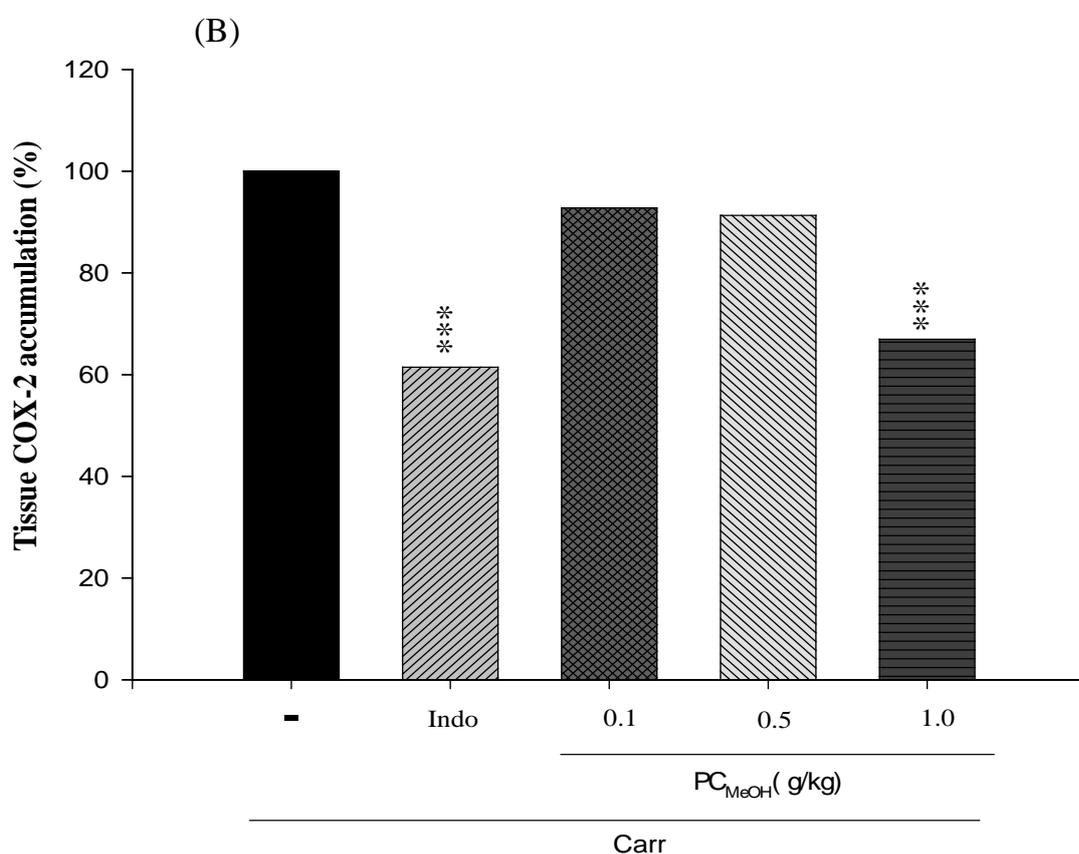
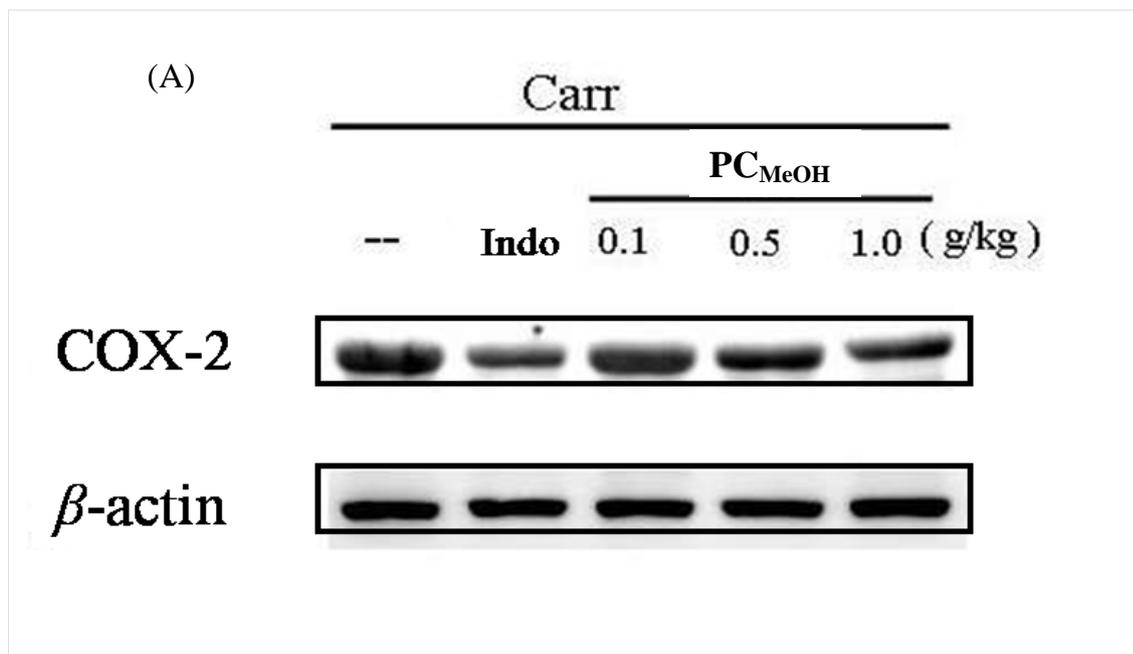


圖 54. PC_{MeOH} 及 Indo 對 λ -角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎後，足蹠中 COX-2 含量的影響
 (A) PC_{MeOH} 及 indomethacin (Indo) 對 λ -角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎，足蹠中發炎介質 COX-2 之蛋白質表現量，每個樣品取 40 μ g/protein。(B) 組織 COX-2 蛋白質表現量圖 *** $p < 0.001$ 。

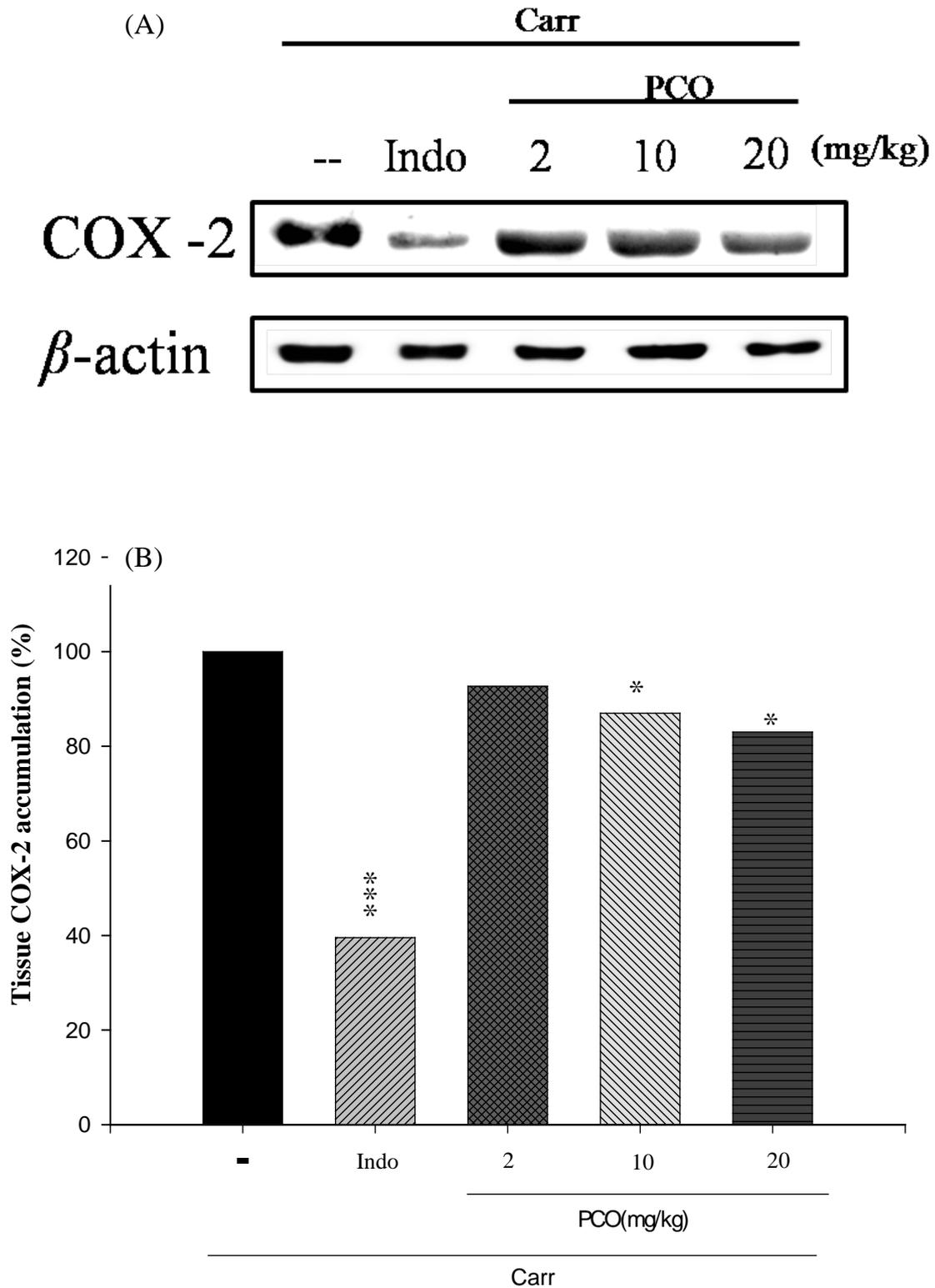


圖 55. PCO 及 Indo 對 λ -角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎後，足蹠中 COX-2 含量的影響
 (A)PCO 及 indomethacin (Indo)對 λ -角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎，足蹠中發炎介質 COX-2 之蛋白質表現量，每個樣品取 40 μ g/protein。(B)組織 COX-2 蛋白質表現量化圖。 * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ 。

iNOS 為發炎介質中相當重要的一個指標，本研究以西方點墨法以及免疫組織化學染色法兩種方式分析，結果顯示 PC_{MeOH} (1.0 g/kg)與 Indo (10 mg/kg)可明顯抑制 Carr 誘導小鼠足蹠中 iNOS 的含量 (圖 56)，PCO (10, 20 mg/kg)亦可抑制 Carr 誘導小鼠足蹠中 iNOS 的含量 (圖 57)，此結果與組織染色結果相符。



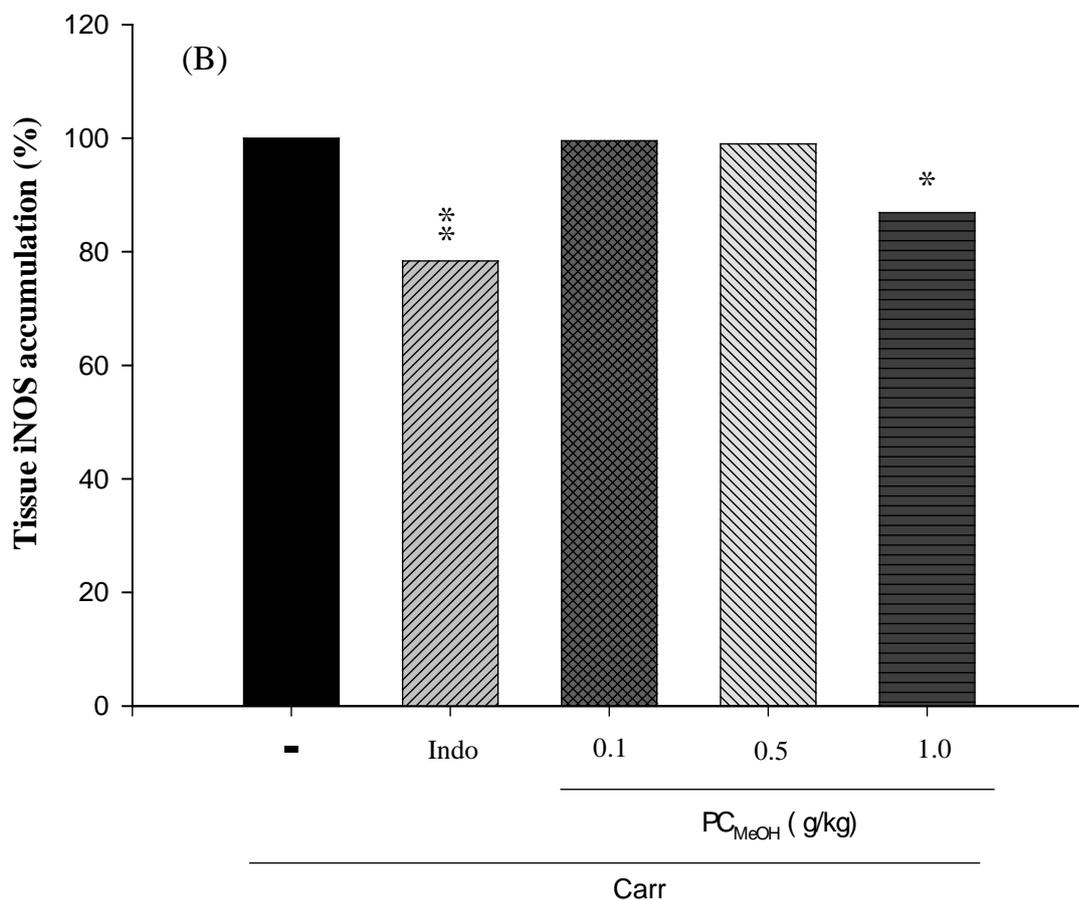
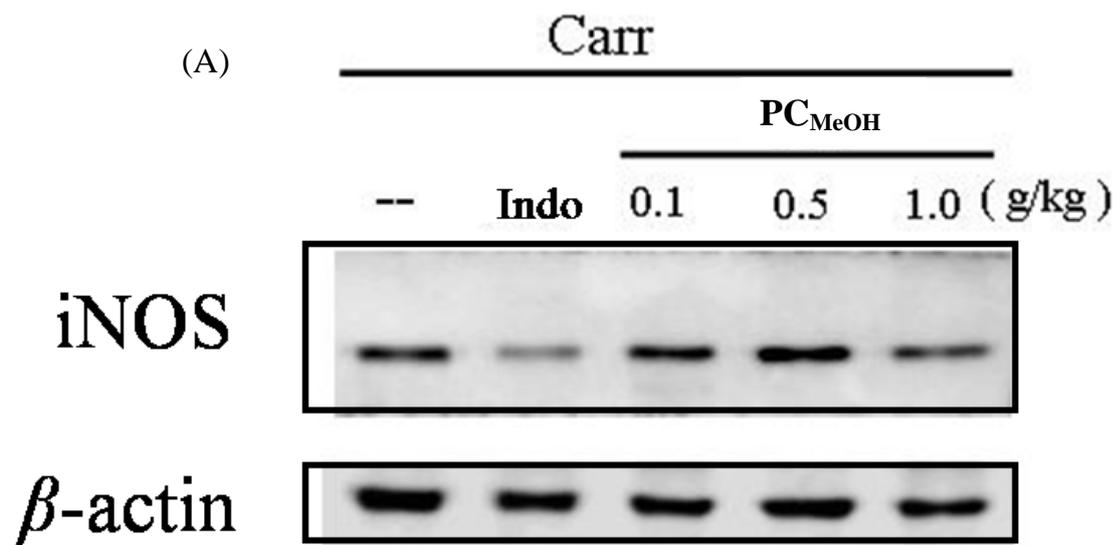


圖 56. PC_{MeOH} 及 Indo 對 λ -角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎後，足蹠中 iNOS 含量的影響
 (A)PC_{MeOH} 及 indomethacin (Indo)對 λ -角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎，足蹠中發炎介質 COX-2 之蛋白質表現量，每個樣品取 40 μ g/protein。(B)組織 iNOS 蛋白質表現量化圖。
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

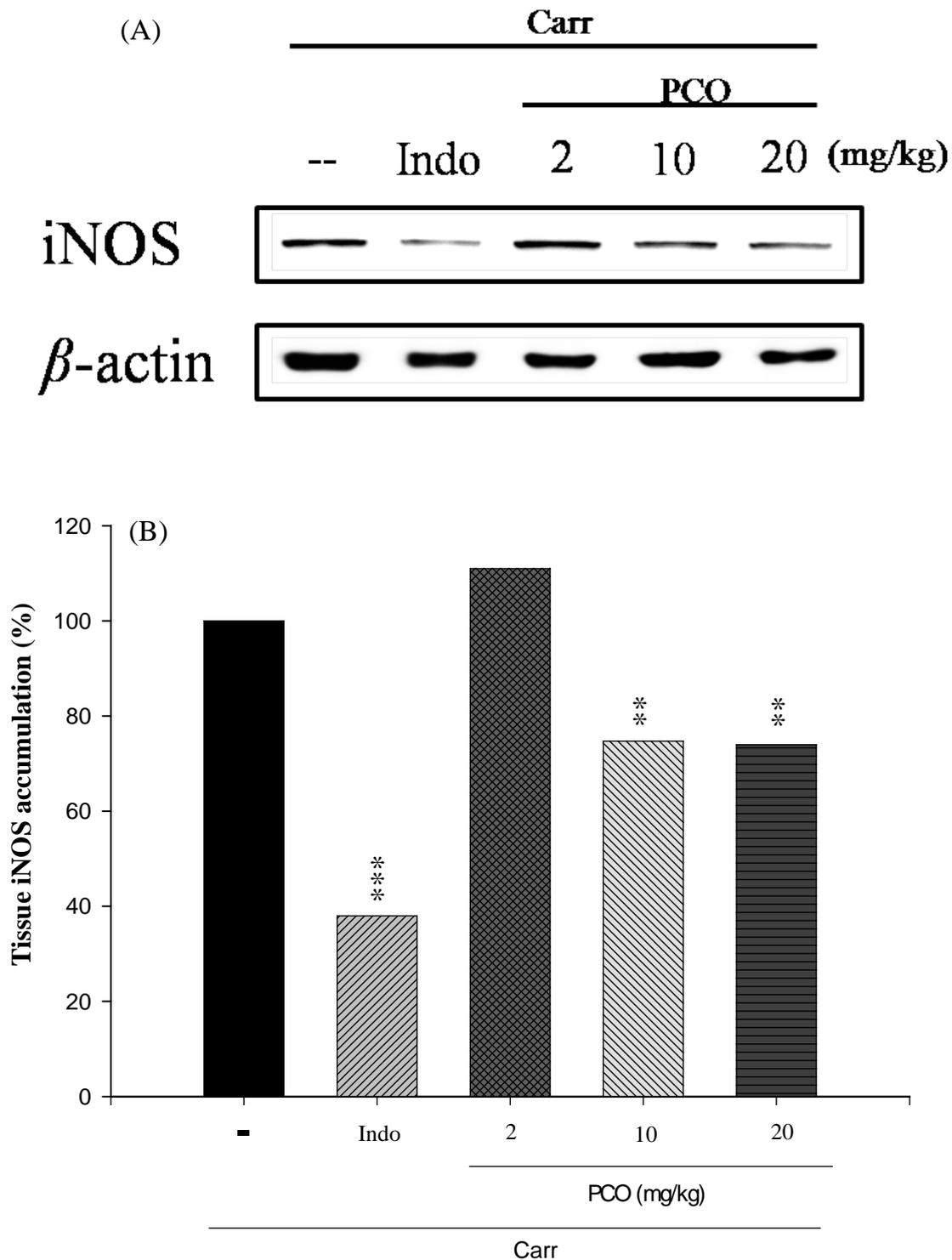


圖 57. PCO 及 Indo 對 λ -角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎後，足蹠中 iNOS 含量的影響
 (A)PCO 及 indomethacin (Indo)對 λ -角叉菜膠誘導小鼠足蹠發炎，足蹠中發炎介質 iNOS 之蛋白質表現量，每個樣品取 40 μ g/protein。(B) 組織 iNOS 蛋白質表現量化圖。 ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

第五章 討論

中草藥一直都是人類發展關注的焦點之一，科技日新月異，人類壽命不斷增長，藥學發展功不可沒。近年來傳統醫學倍受重視，本草傳承下來的知識，更是受到重視。一些古老的藥方及中藥，改以科學的方式，探討其成分、藥理作用及作用機轉。本實驗所選用之材料廣藿香 [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.]，本草記載具有清暑解表、化濕健胃、涼血解毒等功效，用於蚊蟲叮咬之消腫止癢、感冒及扁桃腺發炎等。為了更深入了解其鎮痛及抗發炎功效及用藥安全，因此本研究進行成分分析、急性毒性試驗、體外抗氧化反應試驗、體外細胞抗發炎試驗、體內鎮痛試驗及抗發炎試驗，並探討其作用機轉。

廣藿香甲醇萃取物以 GC-MS 分析發現其中成分 A、B、C 中，B 成分含量最高，C 成分次之，A 成分較少。比對其質譜圖，判斷其可能成分為 A (azulene)、B (patchuli alcohol) 及 C (pogostone)。體外抗氧化實驗方面，廣藿香甲醇萃取物及廣藿香油具有很好的抗氧化能力，因此推測其具有清除體內自由基的功效。

鎮痛實驗方面，透過醋酸扭體反應及福馬林舔足試驗，評估藥物對中樞性或週邊性疼痛的效果。利用醋酸腹腔注射造成急性腹膜炎所引起的臟器痛 (visceral pain)，可見如小鼠腹部內縮、後腿伸直與身體拉長扭曲之扭體反應 (writhing response) 現象。其機轉是因為醋酸損傷細胞膜脂質，產生花生四烯酸 (arachidonic acid) 經過 COX-2 催化作用，促進前列腺素的生合成 (prostaglandin biosynthesis; PGs)⁽⁵⁶⁾。本研究結果顯示，腹腔給予 indomethacin (10 mg/kg)、口

服廣藿香油 (10, 20 mg/kg)或廣藿香甲醇萃取物 (0.5, 1.0 g/kg)均可減少由醋酸所引起疼痛之扭體次數，顯示 indomethacin、廣藿香油和廣藿香甲醇萃取物具有鎮痛作用。其可能的作用機轉與抑制花生四烯酸有關。為了更進一步確認其鎮痛作用，是否經由中樞、周邊或兩者皆抑制所造成，因此進行福馬林舔足試驗。

福馬林舔足試驗於 1977 年由 Dubuisson 及 Dennis 首先提出之方法⁽⁵⁷⁾，藉由實驗動物舔足時間之長短來評估福馬林傷害造成持續性的疼痛。而 Hunskaar 等人於 1987 年研究提出福馬林試驗可分辨鎮痛作用是否屬於抗發炎性的鎮痛⁽⁶¹⁾。福馬林注射入實驗動物之腳掌會造成雙相(biphasic response)的痛覺反應，即有兩個舔足時間的高峰期，前期 (early phase)的舔足反應為在福馬林注入的 0~5 分鐘所造成的疼痛 (initial pain)，主要經由 substance P 及 bradykinin 等神經傳遞物質釋放，直接刺激痛覺接受體，再通過 A δ fiber、C fiber 將痛覺傳入中樞，此階段屬於中樞神經性所引起的痛覺反應⁽⁵⁹⁾；在 20~30 分鐘之舔足反應稱為後期 (late phase)，主要為福馬林溶液引起發炎反應使 histamine、serotonin、prostaglandin 及 kinin 等發炎介質由組織細胞中釋出所造成⁽⁶⁰⁾，此階段屬於炎症所造成的痛覺反應即發炎性疼痛，故本研究使用 5% 的福馬林溶液來誘導小鼠舔足試驗。實驗結果顯示廣藿香油、廣藿香甲醇萃取物及 indomethacin 皆對福馬林誘導舔足之前期皆無抑制效果，這結果推測廣藿香油、廣藿香甲醇萃取物之鎮痛機轉應該與中樞抑制無關；口服廣藿香甲醇萃取物 (0.5, 1.0 g/kg)及腹腔注射 indomethacin (10 mg/kg)和廣藿香油 (10, 20 mg/kg)均可減少福馬林所誘導後期舔足的時間，由結果推測廣藿香油、廣藿香甲醇萃取物之鎮痛機轉可能與抑制發炎作用有關。

為了更進一步確認其機轉，本研究以體內外實驗來探討，首先進行體外細胞實驗，以 LPS 誘導 RAW 264.7 細胞產生發炎反應現象，RAW 264.7 是小鼠的巨噬細胞，當給予 LPS 誘導時會產生發炎反應，促進 NO 增生，以及 cytokine (IL-1 β , TNF- α)及發炎介質 (COX-2, iNOS)的產生。結果顯示，當給予廣藿香甲醇萃取物後，NO 與 cytokine (IL-1 β , TNF- α)以及發炎介質 (COX-2, iNOS)的產生明顯受到抑制，表示廣藿香甲醇萃取物具有體外抗發炎作用；體內動物實驗方面，本研究選用 λ -carrageenan 為致炎劑，作誘導小鼠足蹠發炎試驗。 λ -角叉菜膠所誘導的發炎實驗模式是成熟且廣被使用的動物模型之一，且為局部致發炎劑與免疫反應無關，在誘導劑量下反應性佳，無全身性作用，再現性高⁽¹³⁷⁾。可用來評估藥物的抗發炎效果及探討發炎反應和自由基之間相互關係⁽⁷³⁾。實驗結果顯示，口服廣藿香甲醇萃取物 (0.5, 1.0 g/kg)及腹腔注射 indomethacin (10 mg/kg)和廣藿香油 (10, 20 mg/kg)均可減少 λ -arrageenan 所誘導的足蹠腫脹程度。由此可知，廣藿香油和廣藿香甲醇萃取物均可抑制發炎反應。

根據研究顯示， λ -carrageenan 注入足蹠引起的浮腫是雙相性反應⁽¹³⁸⁾，且其機轉相當複雜，在不同時間有不同物質釋放而引起發炎，大致可分為三條路徑。路徑一：誘導後 0~1 小時稱之為發炎初期，藉由 histamine、bradykinin 和 serotonin、platelet activating factor 的釋出，使結構型一氧化氮合成酶 (cNOS)活化，一氧化氮增加造成脂質過氧化，進而引起浮腫反應⁽⁷²⁾；路徑二： λ -carrageenan 注入足蹠後，受損組織血管通透性增加，血液中的多型核白血球會聚集造成浸潤現象，進而增加自由基的生成，引起脂質過氧化而浮腫。路徑三：活化體內

受損組織如白細胞介素與腫瘤壞死因子，刺激誘導型一氧化氮合成酶 (iNOS) 產生一氧化氮引起脂質過氧化而造成浮腫，亦活化環氧化酶2 (COX-2) 產生前列腺素等引起疼痛浮腫。其中路徑一為 λ -carrageenan 所誘導的發炎實驗模式之雙相性反應的前期 (early phase)；路徑二及路徑三為後期 (late phase)⁽¹³⁹⁾。

又有研究指出，在注射 λ -carrageenan 後的第三~四個小時會達到最大的浮腫反應⁽⁷⁴⁾，若體內抗氧化酵素提升或是活性增加，可減少發炎造成的浮腫現象⁽¹⁴⁰⁾。故本研究在注射 λ -carrageenan 後第四個小時將小鼠犧牲，取其肝臟及足蹠，測定其肝臟中抗氧化酵素活性包括:SOD、GSH-Px 及 GSH-Rd；以及發炎足蹠組織中 MDA、COX-2、iNOS、IL-6 及 TNF- α 之含量變化。

人體中環氧化酶 (簡稱 COX) 可分 2 型，COX 1 在正常生理下，存在於多數細胞中進行常態的表現，與發炎反應無關；COX-2 會被促發炎劑所誘發，當發炎反應形成時，COX-2 會被大量誘導出來⁽¹⁴¹⁾；IL-6 與 TNF- α 主要由單核球或巨噬細胞在生理或病理因子刺激下產生，為發炎反應的重要指標之一⁽¹⁴²⁾， λ -carrageenan 藉由活化 cytokine (IL-1 β 、IL-6、TNF- α)，而活化 COX-2，促進 PGE₂ 生成的能力以及活化誘導型一氧化氮合成酶 (iNOS) 促進一氧化氮 (NO) 生成，NO 與 O₂⁻ 作用形成 ONOO⁻ 攻擊細胞膜，造成脂質過氧化使組織細胞受損發炎^(143, 144)。脂質過氧化可分成三個階段，即(1)起始反應(initiation)；(2)擴增反應(propagation)；(3)終止反應(termination)生成穩定的非自由基產物，而終止反應。在此過程中，MDA 為其代謝產物之一，可作為脂質過氧化作用指標⁽¹⁴⁵⁾。

實驗結果顯示口服廣藿香甲醇萃取物 (0.5, 1.0 g/kg) 及腹腔注射

indomethacin (10 mg/kg)和廣藿香油 (10, 20 mg/kg)，均可降低發炎腳組織中COX-2及TNF- α 之含量。在西方點墨法實驗中可發現腹腔注射indomethacin (10 mg/kg)與口服廣藿香甲醇萃取物，可抑制受損腳組織之COX-2及iNOS的蛋白質表現。在組織H.E染色病理評分中，可以發現廣藿香甲醇萃取物與廣藿香油均可以減少腫脹及發炎程度；也可由組織切片圖中發現廣藿香甲醇萃取物與廣藿香油可減少組織浸潤現象的產生。而足蹠之免疫組織化學染色 (IHC)中，廣藿香甲醇萃取物明顯降低了發炎足蹠組織之COX-2及iNOS表現量。因此，推測廣藿香甲醇萃取物及廣藿香油可能經由抑制cytokine (IL-6, TNF- α)，而減少iNOS的產生，進而抑制NO的生成，達到抗發炎的效果。另外cytokine也是活化COX-2的重要因素，因此抑制IL-6與TNF- α 也可以抑制COX-2的產生，而達到抗發炎的目的。

另外， λ -carrageenan 誘導足蹠發炎腫脹與自由基亦息息相關^(64, 146)。

λ -carrageenan 會活化巨噬細胞，釋放大量的超氧陰離子自由基(O₂^{•-})，而超氧陰離子自由基(O₂^{•-})會攻擊細胞膜，造成脂質過氧化物 MDA 堆積，另外它也會與NO結合，產生毒性更強的 ONOO⁻，使的發炎反應更加嚴重；因此在抗發炎機轉中，體內的抗氧化酵素系統便扮演重要的角色，超氧陰離子自由基(O₂^{•-})可經由超氧歧化酵素 (SOD)作用產生 H₂O₂，H₂O₂藉由 catalase、GSH-Px 及 GSH-Rd 轉換為無害的氧和水。

實驗結果顯示，口服廣藿香甲醇萃取物 (0.5, 1.0 g/kg)及indomethacin (10 mg/kg)和廣藿香油 (10, 20 mg/kg)均可提升肝臟中SOD、GSH-Rd以及GSH-Px之活性及降低發炎腳組織中MDA的含量。因此口服廣藿香甲醇萃取物與廣藿香油

亦可能經由增加肝臟中抗氧化酵素活性，以減少自由基的傷害來達到抗發炎的效果。

綜合上述結果顯示，廣藿香甲醇萃取物及廣藿香油具鎮痛、抗發炎之作用。其鎮痛機轉為減少發炎反應而達到；其抗發炎的機制可能由以下四種機轉：(1)減少多型核白血球造成的浸潤現象；(2)增加肝臟抗氧化酵素活性以減少自由基的傷害；(3)抑制cytokines(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)的含量，減少iNOS濃度，進而抑制NO的生成，減少自由基的傷害；(4)抑制cytokines的濃度，減少COX-2的含量，而達到抗發炎的作用(圖58)。



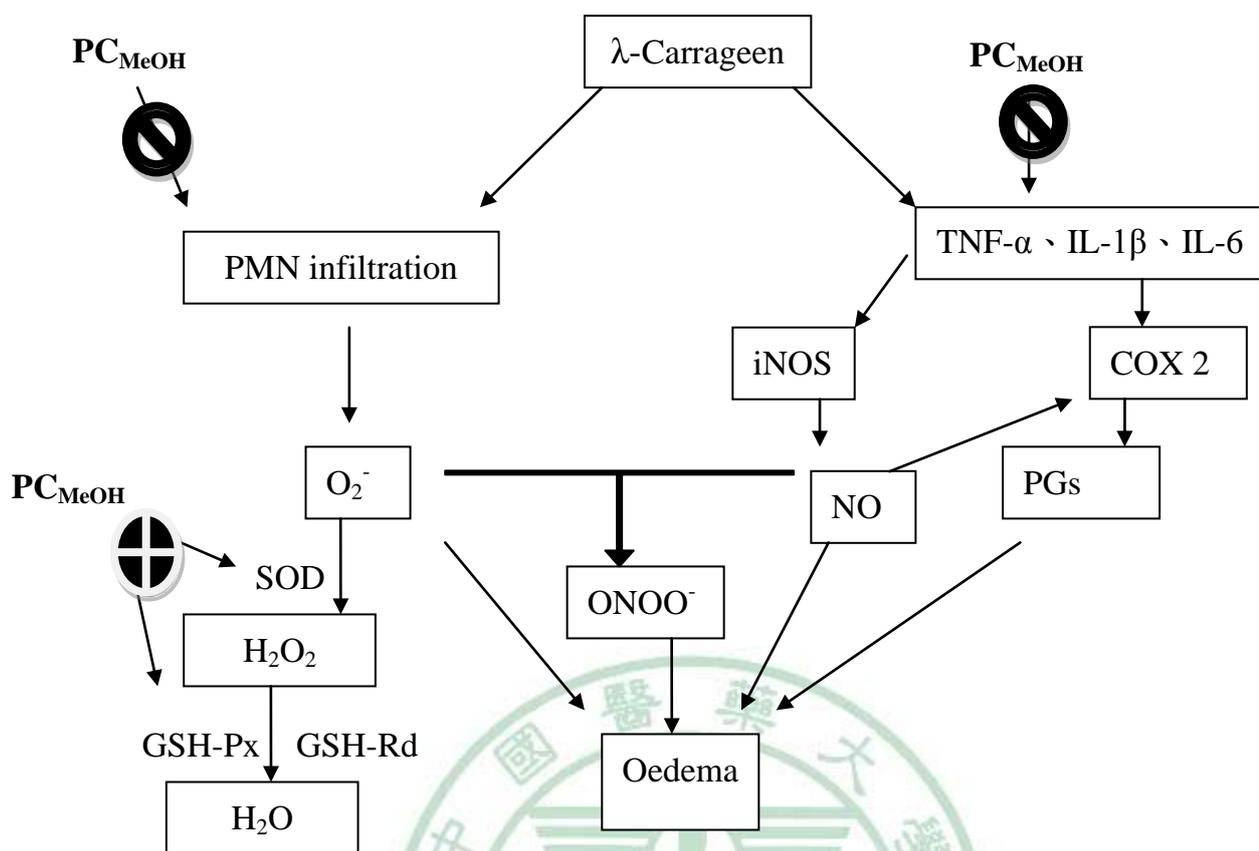


圖 58. 廣藿香甲醇萃取物抗發炎之機轉圖

第六章 結論

本論文以體外試驗、細胞試驗及動物實驗探討廣藿香甲醇萃取物及廣藿香油之自由基清除能力、鎮痛及抗發炎作用之分子機轉，獲得結果如下：

一、抗氧化實驗

廣藿香甲醇萃取物具有清除DPPH自由基能力，顯示其具有良好的抗氧化能力。

二、體外細胞實驗實驗

廣藿香甲醇萃取物於500及1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 可抑制LPS (100 ng/mL)誘導RAW 264.7產生NO、IL-1 β 及TNF- α ，亦可明顯抑制iNOS及COX-2蛋白質的表現量。顯示廣藿香甲醇萃取物(500, 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$)可經由抑制IL-1 β 及TNF- α 的含量而減少iNOS與COX-2的產生，進而抑制NO的生成，由此路徑抑制LPS誘導RAW 264.7細胞發炎反應。

三、鎮痛抗發炎實驗

廣藿香甲醇萃取物(1.0 g/kg)及廣藿香油(10, 20 mg/kg)可明顯抑制醋酸所誘導的小鼠扭體反應，以及福馬林所誘導的後期舔足反應，顯示其鎮痛作用可能與抗發炎作用有關。

在抗發炎方面，廣藿香甲醇萃取物(0.5, 1.0 g/kg)及廣藿香油(10, 20 mg/kg)可明顯抑制由 λ -carrageenan所誘導的小鼠足蹠發炎腫脹、抑制細胞浸潤現象以及

嗜中性球的增加，其足蹠組織中cytokines (IL-6、TNF- α)以及iNOS與COX-2蛋白質表現量明顯受到抑制，廣藿香甲醇萃取物(0.5, 1.0 g/kg)及廣藿香油(10, 20 mg/kg)可明顯提升肝臟中抗氧化酵素 (SOD、GSH-Px、GSH-Rx)的活性。

綜合上述結果顯示，廣藿香甲醇萃取物(0.5, 1.0 g/kg)及廣藿香油(10, 20 mg/kg)具鎮痛、抗發炎之作用。其鎮痛機轉為減少發炎反應而達到；其抗發炎的機制可能由以下四種方式而達到：(1)減少多型核白血球造成的浸潤現象；(2)增加肝臟抗氧化酵素活性以減少自由基的傷害；(3)抑制cytokines(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)的含量，減少iNOS濃度，進而抑制NO的生成，減少自由基的傷害；(4)抑制cytokines的濃度，減少COX-2的含量 (圖58)。



第七章 參考文獻

1. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860-867.
2. Paoletti R, Gotto AM, Jr., Hajjar DP. Inflammation in atherosclerosis and implications for therapy. *Circulation* 2004; 109: 20-26.
3. Rus H, Niculescu FI. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1997; 337: 423; author reply 423-424.
4. Firestein GS. Inhibiting inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2006; 354: 80-82.
5. Klegeris A, McGeer EG, McGeer PL. Therapeutic approaches to inflammation in neurodegenerative disease. *Curr Opin Neurol* 2007; 20: 351-357.
6. Liu T, Li G. Inflammation: another potential mechanism between diabetes mellitus and atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 2008; 101: 1681-1682.
7. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30: 400-418.
8. Kaboli PJ, Doebbeling BN, Saag KG, Rosenthal GE. Use of complementary and alternative medicine by older patients with arthritis: a population-based study. *Arthritis Rheum* 2001; 45: 398-403.
9. Cirino G. Multiple controls in inflammation. Extracellular and intracellular phospholipase A2, inducible and constitutive cyclooxygenase, and inducible nitric oxide synthase. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 105-111.
10. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 387-437.
11. Vodovotz Y, Kim PK, Bagci EZ, Ermentrout GB, Chow CC, Bahar I, Billiar TR. Inflammatory modulation of hepatocyte apoptosis by nitric oxide: in vivo, in vitro, and in silico studies. *Curr Mol Med* 2004; 4: 753-762.
12. Ferreira SH, Moncada S, Vane JR. Prostaglandins and the mechanism of analgesia produced by aspirin-like drugs. *Br J Pharmacol* 1973; 49: 86-97.
13. Holthusen H, Arndt JO. Nitric oxide evokes pain in humans on intracutaneous injection. *Neurosci Lett* 1994; 165: 71-74.
14. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2001; 2: 907-916.
15. Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 147-156.
16. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Calapai G, Nava F, Caputi AP. Zymosan-activated plasma induces paw oedema by nitric oxide and prostaglandin production. *Life Sci* 1997; 60: 215-220.
17. Maxwell SRJ. Prospects for the Use of Antioxidant Therapies. *Drugs* 1995; 49: 345-361.
18. 行政院衛生署中華中藥集編修小組編纂. 中華中藥典 第一版. 台北: 行政院衛生署 2004; 1: p.178.

19. 國家藥典委員會編. 中華人民共和國藥典 一部. 北京: 化學工業出版社 2005: pp.30-31.
20. 陳小夏, 何冰, 李顯奇, 利紅宇, 羅集鵬. 廣藿香三種提取物對腸道功能作用的比較. *中藥藥理與臨床* 1998: 32-34.
21. 何冰, 陳小夏, 羅集鵬. 廣藿香去油部分的 5 種不同極性提取物對胃腸道的影響. *中藥材* 2001; 24: 422-423.
22. 范瑞強, 魯長明. 中藥香蓮復方抗真菌作用的研究. *實用醫學雜誌* 1995: 67-68.
23. 陳蕙芳. 植物活性成分辭典 第二冊: 北京: 中國醫藥科技出版社 2001: pp.16.
24. 黃宗賢. 廣藿香莖葉之成分及其抗血小板凝集抗發炎活性研究. 台中: 中國醫藥學院/藥物化學研究所/84/碩士 1995: pp.75-77.
25. 唐慎微(宋). 重修政和經史證類備用本草. 台北市: 南天書局有限公司 1994: p.309.
26. 唐慎微(宋). 經史證類備急本草. 台北市: 南天書局有限公司 1994: p.409.
27. 李時珍(明). 本草綱目. 台北市: 國立中國醫藥研究所 1994: pp.524-525.
28. 汪訥庵(清). 本草備要. 台北: 文光圖書有限公司 1988: pp.86-87.
29. 李東生. 廣州附近廣藿香的栽培法. *中藥通報* 1957; 3: 204.
30. 陳潤初. 海南島廣藿香的栽培方法. *中藥通報* 1957; 3: 210.
31. 趙中振, 蕭培根. 當代藥用植物典. 香港: 香港賽馬會中央研究院有限公司 2007; 4: pp.395-397.
32. 行政院衛生署中華中藥集編修小組編纂. 中華中藥典 第一版. 台北: 行政院衛生署 2004; 1: pp.195-196.
33. 徐國鈞, 何宏賢, 徐珞珊, 金蓉鸞. 中國藥材學. 北京: 中國醫藥科技出版社 1996; 2: pp.1543-1546.
34. 陳忠川. 中藥品質管制-組織形態學鑑定. 台北: 行政院衛生署中醫藥委員會 1999: pp.239-240.
35. 關玲, 權麗輝, 叢浦珠. 廣藿香揮發油化學成分的研究. *天然產物研究與開發* 1992; 4: 34-37.
36. 張強, 李章萬, 朱江粵. 廣藿香揮發油成分的分析. *華西藥學雜誌* 1996; 11: 249-250.
37. Deguerry F, Pastore L, Wu S, Clark A, Chappell J, Schalk M. The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases. *Arch Biochem Biophys* 2006; 454: 123-136.
38. 張廣文, 馬祥全, 蘇鏡娛, 曾隴梅, 王發松, 楊得坡. 廣藿香中的黃酮類化合物. *中草藥* 2001; 32: 123-136.
39. Park EJ, Park HR, Lee JS, Kim J. Licochalcone A: an inducer of cell differentiation and cytotoxic agent from *Pogostemon cablin*. *Planta Med* 1998; 64: 464-466.
40. Yang Y, Kinoshita K, Koyama K, Takahashi K, Tai T, Nunoura Y, Watanabe K. Anti-emetic principles of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. *Phytomedicine* 1999; 6: 89-93.

41. Miyazawa M, Okuno Y, Nakamura S, Kosaka H. Antimutagenic activity of flavonoids from *Pogostemon cablin*. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 642-647.
42. 劉堯, 毛羽. 廣藿香揮發油止咳化痰藥理實驗的研究. *時珍國醫國藥* 2007; 18: 1920-1921.
43. 楊得坡. 藿香和廣藿香揮發油對皮膚癬菌和條件致病真菌的抑制作用. *中國藥學雜誌* 2000: 9-11.
44. 張廣文, 藍文鍵, 蘇鏡娛, 曾隴梅, 楊得坡, 王發松. 廣藿香精油化學成分分析及其抗菌活性(II). *中草藥* 2002; 03: 20-22.
45. 莫小路, 嚴振, 王玉生, 汪小根. 廣藿香精油對植物病原真菌的抑菌活性研究. *中藥材* 2004; 11: 805-807.
46. 孫維仁, 侯文詠, 謝正勇, 劉健強, 林瑞明. C-fos 細胞致癌基因在疼痛訊號傳遞過程中所扮演的角色. *疼痛醫學雜誌* 1994: 75-88.
47. Lundberg JM. Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol Rev* 1996; 48: 113-178.
48. 徐淑云. 藥理實驗方法學. 北京: 人民衛生出版社 1991: pp.693-701.
49. Dubner R. Methods of assessing pain in animals. Edinburgh London Melbourne and New York: Churchill Livingstone 1989; Textbook of pain Vol. I Second Ed. (Wall PD and Melzack R): pp.247-250.
50. Collier HO, Dinneen LC, Johnson CA, Schneider C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br J Pharmacol Chemother* 1968; 32: 295-310.
51. Berkenkopf JW, Weichman BM. Production of prostacyclin in mice following intraperitoneal injection of acetic acid, phenylbenzoquinone and zymosan: its role in the writhing response. *Prostaglandins* 1988; 36: 693-709.
52. Rosland JH, Tjolsen A, Maehle B, Hole K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain* 1990; 42: 235-242.
53. Siegmund E, Cadmus R, Lu G. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. *Proc Soc Exp Biol Med* 1957; 95: 729-731.
54. Taber RI, Greenhouse DD, Rendell JK, Irwin S. Agonist and antagonist interactions of opioids on acetic acid-induced abdominal stretching in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1969; 169: 29-38.
55. Ribeiro RA, Vale ML, Thomazzi SM, Paschoalato AB, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharmacol* 2000; 387: 111-118.
56. Andrade SF, Cardoso LG, Carvalho JC, Bastos JK. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populonic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. *J Ethnopharmacol* 2007; 109: 464-471.
57. Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977; 4: 161-174.
58. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 1989; 38: 347-352.

59. Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992; 51: 5-17.
60. Vaccarino AL, Marek P, Liebeskind JC. Stress-induced analgesia prevents the development of the tonic, late phase of pain produced by subcutaneous formalin. *Brain Res* 1992; 572: 250-252.
61. Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 1987; 30: 103-114.
62. 楊光華. 病理學 北京: 人民衛生出版社 2002; 第五版: p.572.
63. Ohshima H, Tazawa H, Sylla BS, Sawa T. Prevention of human cancer by modulation of chronic inflammatory processes. *Mutat Res* 2005; 591: 110-122.
64. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-6055.
65. Sawatzky DA, Megson IL, Rossi AG. Sildenafil offers protection against NSAID-induced gastric injury. *Br J Pharmacol* 2005; 146: 477-478.
66. Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 625-655.
67. Spector WG, Willoughby DA. The inflammatory response. *Bacteriol Rev* 1963; 27: 117-154.
68. Dawson J, Sedgwick AD, Edwards JC, Lees P. A comparative study of the cellular, exudative and histological responses to carrageenan, dextran and zymosan in the mouse. *Int J Tissue React* 1991; 13: 171-185.
69. Lu TC, Ko YZ, Huang HW, Hung YC, Lin YC, Peng WH. Analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous extract from Glycine tomentella root in mice. *J Ethnopharmacol* 2007; 113: 142-148.
70. Tousoulis D, Davies G, Stefanadis C, Toutouzas P, Ambrose JA. Inflammatory and thrombotic mechanisms in coronary atherosclerosis. *Heart* 2003; 89: 993-997.
71. 陳奇. 中藥藥理研究方法學. 北京: 人民衛生出版社 1993: pp.356-361.
72. Di Rosa M, Giroud JP, Willoughby DA. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol* 1971; 104: 15-29.
73. Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962; 111: 544-547.
74. Kirkova M, Kassabova T, Russanov E. In vivo effects of indomethacin on the activity of metal-containing enzymes. *Gen Pharmacol* 1992; 23: 811-814.
75. Di Rosa M, Willoughby DA. Screens for anti-inflammatory drugs. *J Pharm Pharmacol* 1971; 23: 297-298.
76. Mamelak M. Alzheimer's disease, oxidative stress and gamma-hydroxybutyrate. *Neurobiol Aging* 2007; 28: 1340-1360.
77. Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T, Arai K. Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 295-331.
78. McClain CJ, Hill DB, Song Z, Deaciuc I, Barve S. Monocyte activation in alcoholic liver disease. *Alcohol* 2002; 27: 53-61.

79. Stout RD, Suttles J. T cell signaling of macrophage function in inflammatory disease. *Front Biosci* 1997; 2: d197-206.
80. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 323-350.
81. Morrison DC, Ryan JL. Endotoxins and disease mechanisms. *Annu Rev Med* 1987; 38: 417-432.
82. Rietschel ET, Brade H, Holst O, Brade L, Muller-Loennies S, Mamat U, Zahringer U, Beckmann F, Seydel U, Brandenburg K, Ulmer AJ, Mattern T, Heine H, Schletter J, Loppnow H, Schonbeck U, Flad HD, Hauschildt S, Schade UF, Di Padova F, Kusumoto S, Schumann RR. Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 216: 39-81.
83. Fenton MJ, Golenbock DT. LPS-binding proteins and receptors. *J Leukoc Biol* 1998; 64: 25-32.
84. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 2001; 13: 85-94.
85. Diks SH, van Deventer SJ, Peppelenbosch MP. Lipopolysaccharide recognition, internalisation, signalling and other cellular effects. *J Endotoxin Res* 2001; 7: 335-348.
86. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* 2001; 7: 167-202.
87. Kanter M. Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. *Proc Nutr Soc* 1998; 57: 9-13.
88. Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radic Res* 1996; 25: 57-74.
89. Zima T, Kalousova M. Oxidative stress and signal transduction pathways in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 110S-115S.
90. Petersen RB, Nunomura A, Lee HG, Casadesus G, Perry G, Smith MA, Zhu X. Signal transduction cascades associated with oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2007; 11: 143-152.
91. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986; 246: 501-514.
92. Bosch-Morell F, Sanz A, Diaz-Llopis M, Romero FJ. Lipid peroxidation products in human subretinal fluid. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 899-903.
93. Ostalowska A, Birkner E, Wiecha M, Kasperczyk S, Kasperczyk A, Kapolka D, Zon-Giebel A. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in synovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14: 139-145.
94. Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 2003; 189: 147-163.
95. Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo H, Freeman BA, Darley-Usmar VM. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411: 385-400.
96. Rao KM. Molecular mechanisms regulating iNOS expression in various cell types. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2000; 3: 27-58.

97. Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1987; 1: 441-445.
98. Figueroa-Romero C, Sadidi M, Feldman EL. Mechanisms of disease: the oxidative stress theory of diabetic neuropathy. *Rev Endocr Metab Disord* 2008; 9: 301-314.
99. Schoneich C. Reactive oxygen species and biological aging: a mechanistic approach. *Exp Gerontol* 1999; 34: 19-34.
100. Hernandez-Saavedra D, McCord JM. Evolution and free radicals. Importance of oxidative stress in human pathology. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2007; 45: 477-484.
101. Moskovitz J, Yim MB, Chock PB. Free radicals and disease. *Arch Biochem Biophys* 2002; 397: 354-359.
102. Bannister WH, Bannister JV. Factor analysis of the activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in normal tissues and neoplastic cell lines. *Free Radic Res Commun* 1987; 4: 1-13.
103. Kato M, Minakami H, Kuroiwa M, Kobayashi Y, Oshima S, Kozawa K, Morikawa A, Kimura H. Superoxide radical generation and Mn- and Cu-Zn superoxide dismutases activities in human leukemic cells. *Hematol Oncol* 2003; 21: 11-16.
104. Power JH, Blumbergs PC. Cellular glutathione peroxidase in human brain: cellular distribution, and its potential role in the degradation of Lewy bodies in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol* 2009; 117: 63-73.
105. Smith JE. Animal model of human disease: inherited erythrocyte glutathione deficiency. *Am J Pathol* 1976; 82: 233-236.
106. Skrzydlewska E, Farbiszewski R. Glutathione consumption and inactivation of glutathione-related enzymes in liver, erythrocytes and serum of rats after methanol intoxication. *Arch Toxicol* 1997; 71: 741-745.
107. Rosemeyer MA. The biochemistry of glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glutathione reductase. *Cell Biochem Funct* 1987; 5: 79-95.
108. Wang X, Ma Y, Huang C, Wan Q, Li N, Bi Y. Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a central role in modulating reduced glutathione levels in reed callus under salt stress. *Planta* 2008; 227: 611-623.
109. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605.
110. Heffner JE, Repine JE. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 531-554.
111. Lai LS, Chou ST, Chao WW. Studies on the antioxidative activities of Hsian-tiao (*Mesona procumbens* Hemsl) leaf gum. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 963-968.
112. 黃世勳. 臺灣產天胡荽屬植物之藥理研究. 臺中: 中國醫藥大學中國藥學研究所博士論文 2008: pp.104-105.
113. Ragazzi E, Veronese G. Quantitative analysis of phenolic compounds after thin-layer chromatographic separation. *J Chromatogr* 1973; 77: 369-375.
114. Asgary S, Naderi G, Sarrafzadegan N, Ghassemi N, Boshtam M, Rafie M, Arefian A. Anti-oxidant effect of flavonoids on hemoglobin glycosylation. *Pharm Acta Helv* 1999; 73:

223-226.

115. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 1989; 119: 203-210.
116. Hryniuk WM, Bertino JR. Growth rate and cell kill. *Ann N Y Acad Sci* 1971; 186: 330-342.
117. Rockabrand D, Austin T, Kaiser R, Blum P. Bacterial growth state distinguished by single-cell protein profiling: does chlorination kill coliforms in municipal effluent? *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4181-4188.
118. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
119. Verdon CP, Burton BA, Prior RL. Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by NADP⁺ when the Griess reaction is used to assay for nitrite. *Anal Biochem* 1995; 224: 502-508.
120. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
121. Tsuang YH, Lam SL, Wu LC, Chiang CJ, Chen LT, Chen PY, Sun JS, Wang CC. Isokinetic eccentric exercise can induce skeletal muscle injury within the physiologic excursion of muscle-tendon unit: a rabbit model. *J Orthop Surg* 2007; 2: 13.
122. Hunskar S, Fasmer OB, Hole K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J Neurosci Methods* 1985; 14: 69-76.
123. Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, Sautebin L, Cirino G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol* 2004; 142: 331-338.
124. Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. *Res Vet Sci* 1983; 34: 253-256.
125. Guntherberg H, Rost J. The true oxidized glutathione content of red blood cells obtained by new enzymic and paper chromatographic methods. *Anal Biochem* 1966; 15: 205-210.
126. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 1985; 113: 484-490.
127. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
128. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247: 3170-3175.
129. Prohaska JR, Mowafy M, Ganther HE. Interactions between cadmium, selenium and glutathione peroxidase in rat testis. *Chem Biol Interact* 1977; 18: 253-265.
130. Gunnarsson K. Affinity-based biosensors for biomolecular interaction analysis. *Curr Protoc Immunol* 2001; Chapter 18: Unit 18 16.
131. Gepdiremen A, Mshvildadze V, Suleyman H, Elias R. Acute and chronic antiinflammatory effects of *Hedera colchica* in rats. *J Ethnopharmacol* 2004; 94: 191-195.
132. Chun SC, Jee SY, Lee SG, Park SJ, Lee JR, Kim SC. Anti-Inflammatory Activity of the Methanol Extract of Moutan Cortex in LPS-Activated Raw264.7 Cells. *Evid Based Complement*

Alternat Med 2007; 4: 327-333.

133. Nakhai LA, Mohammadirad A, Yasa N, Minaie B, Nikfar S, Ghazanfari G, Zamani MJ, Dehghan G, Jamshidi H, Boushehri VS, Khorasani R, Abdollahi M. Benefits of *Zataria multiflora* Boiss in Experimental Model of Mouse Inflammatory Bowel Disease. *Evid Based Complement Alternat Med* 2007; 4: 43-50.

134. 高明都, 黃義祿. 病理組織切片技術. 臺北市: 南山堂出版社 1988: pp.31-35.

135. 高明都, 黃義祿. 病理組織切片技術. 臺北市: 南山堂出版社 1988: pp.171-174.

136. 曾志, 譚麗賢, 蒙紹金, 張菡. 廣藿香化學成分和指紋圖譜研究. *分析化學研究報告* 2006; 9: 1249-1254.

137. Di Rosa M. Biological properties of carrageenan. *J Pharm Pharmacol* 1972; 24: 89-102.

138. Vinegar R, Schreiber W, Hugo R. Biphasic development of carrageenin edema in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1969; 166: 96-103.

139. Dudhgaonkar SP, Tandan SK, Bhat AS, Jadhav SH, Kumar D. Synergistic anti-inflammatory interaction between meloxicam and aminoguanidine hydrochloride in carrageenan-induced acute inflammation in rats. *Life Sci* 2006; 78: 1044-1048.

140. Cuzzocrea S, Costantino G, Zingarelli B, Mazzon E, Micali A, Caputi AP. The protective role of endogenous glutathione in carrageenan-induced pleurisy in the rat. *Eur J Pharmacol* 1999; 372: 187-197.

141. Viji V, Helen A. Inhibition of lipoxygenases and cyclooxygenase-2 enzymes by extracts isolated from *Bacopa monniera* (L.) Wettst. *J Ethnopharmacol* 2008; 118: 305-311.

142. Mohan K, Cordeiro E, Vaci M, McMaster C, Issekutz TB. CXCR3 is required for migration to dermal inflammation by normal and in vivo activated T cells: differential requirements by CD4 and CD8 memory subsets. *Eur J Immunol* 2005; 35: 1702-1711.

143. Gilad E, Wong HR, Zingarelli B, Virag L, O'Connor M, Salzman AL, Szabo C. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFkappaB activation. *FASEB J* 1998; 12: 685-693.

144. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Caputi AP. Role of constitutive nitric oxide synthase and peroxynitrite production in a rat model of splanchnic artery occlusion shock. *Life Sci* 1998; 63: 789-799.

145. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 515-540.

146. Bilici D, Akpınar E, Kiziltunc A. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced acute local inflammation. *Pharmacol Res* 2002; 46: 133-139.

第八章 謝詞

五年了！自從離開靜宜大學，毅然決然的往研究領域繼續進修，拜讀在彭文煌老師名下，期間除了經歷實驗、研究、投稿，也完成了戀愛、結婚、生子，最後終於孕育出這本論文。這本論文雖然只是我這些年來在這領域的一部分，卻是我就讀博士期間，所有學習經歷的寫照，它的完成，代表著我人生志願的一個終點，也代表我另一個人生的起點。

這本著作的完成，最感謝的當然是彭文煌老師，從大學一年下開始，跟著彭老師學實驗，當完兵後攻讀碩士，亦是彭老師辛勤的指導。畢業後到靜宜擔任助教，有感於所學不足，又繼續回到彭老師門下進修博士。感謝彭老師十多年來，不論是做人處世、待人接物或是在學術上對我的諄諄教誨。謝明村前校長是一位有智慧且慈祥的長者，雖然退休了，仍然很熱心的到學校為學生指導，不論在課業上或是研究上甚至是生活感情方面，我都蒙受其利。當初若不是有謝校長的鼓勵與支持，相信我不會娶到君茹這麼棒的老婆，也不會找到靜宜助教的工作，更不可能會繼續進修博士。王文信大哥是我心目中如親兄弟般的大哥，因為有他的幫忙，才能讓動物實驗順利執行。打從大學打工當工讀生，到碩士班一起當同學，王大哥一直默默的幫忙；吳啟瑞老師(吳大)對我照顧有加，雖然我把他的助理搶走了，可是他卻很大方的祝福我們，更在實驗、投稿以及論文寫作上指導我；感謝張文德老師在這幾年讓我當他的兼任助理，一方面學新的實驗，另一方面獲得養家育兒的生活費；張永勳老師是我心中最忙也最海

派的老師了，跟老師借過大多數不清的儀器及書籍，老師總是二話不說”自己去翻”；黃冠中老師雖來才來兩三年，可是他的拼勁是有目共睹的。受到他的感染，我都想與他一起努力到晚上 11 點，可惜我家有一隻阿牛嗷嗷待哺，無法與老師一起奮鬥。感謝黃老師在細胞實驗方面給予我的幫忙與指導；謝謝立偉、皓元、穎志及家佑學長在實驗室及羽球場上與我一起努力打拼。汎修、國任、尚志、仁傑、皓元、世勳學長等好友的互相扶持，勇嘉、熒駿、趙嶸、紀方、繼仁、芸貞、佳臻、香秀及亭邑等學弟妹的幫忙、還有謝怡倩學妹畢業後還依舊常回來幫忙，另外要感謝成功大學賴俊熹(泡泡)學弟協助我打GC-MS，還有中興大學廖俊旺老師幫忙動物組織切片判讀，再來要感謝國祥、馨瑜夫婦及懷之、季真夫婦對我遠在竹南的老婆多加照顧，最後要感謝我的爸媽、兄弟、岳父母以及一直默默陪伴我的君茹及調皮鬼阿牛(呂以謙)，有了你們的鼓勵與支持，才有今天的我。感謝你們！