

中國醫藥大學中國藥學研究所博士班

博士論文

編號：ICPS-D052

指導教授：吳金濱 副教授

共同指導教授：謝明村 教授

共同指導教授：彭文煌 副教授

中草藥抗發炎作用之篩選暨

半枝蓮與 *Scutellarein* 抗發炎研究

**Studies on the Anti-inflammatory Activity in
Selected Traditional Chinese Herbs, *Scutellaria
rivularis* Wallich and *Scutellarein***

研究生：廖容君

Jung-Chun Liao

中 華 民 國 九 十 五 年 七 月

目 錄

內文目錄	I
圖目錄	VI
表目錄	VIII
略字表	IX
中文摘要	X
英文摘要	X II

內文目錄

第一章 緒言	1
第一節 研究動機背景	1
第二節 研究目的	3
第二章 總論	5
第一節 發炎反應	5
第二節 中草藥在抗發炎藥物中的發展	7
第三節 角叉菜膠(λ -carrageenan)誘導發炎模式之簡介	9
一、 λ -carrageenan 誘發小鼠足蹠浮腫實驗	12
二、浮腫率(edema rate)及抑制率(inhibition rate)之計算	12
三、 λ -carrageenan 引起的發炎與自由基的關係	13
第四節 一氧化氮與發炎性疾病的關係	14
一、一氧化氮之生理作用	16
二、與一氧化氮有關的疾病	17
三、巨噬細胞 RAW264.7 測定 NO 模式	18
第五節 疼痛反應	19
一、疼痛的分子生物學研究	20
二、鎮痛實驗動物模式	20

(一) 扭體反應試驗·····	22
(二) 福馬林試驗·····	23
第六節 半枝蓮植物考察·····	25
一、 半枝蓮之藥用植物學研究彙整·····	26
二、 半枝蓮之成分研究彙整·····	32
三、 半枝蓮之藥理作用·····	33
四、 半枝蓮成分漢黃芩素(wogonin)之理化性質與 藥理作用·····	34
五、 半枝蓮成分黃芩素(baicalein)之理化性質與藥 理作用·····	35
六、 半枝蓮成分高山黃芩素(scutellarein)之理化性 質與藥理作用·····	37
第三章 實驗之部·····	38
第一節 八十七種中草藥及半枝蓮成分漢黃芩素 (wogonin)、黃芩素(baicalein)、高山黃芩素 (scutellarein)對 LPS 與 INF- γ 誘發巨噬細胞 264.7 產生 NO 之抑制活性試驗·····	38
一、 實驗材料·····	38
(一) 實驗材料之收集·····	38
(二) 實驗材料之抽提·····	38
(三) 檢品之製備·····	39
(四) 細胞培養·····	39
(五) 實驗試藥·····	39
(六) 實驗儀器·····	40

二、實驗方法	41
(一) 一氧化氮測定	41
(二) 細胞存活率測定(MTT assay)	41
第二節 半枝蓮及其成分 scutellarein 鎮痛作用之研究	43
一、實驗材料	43
(一) 實驗材料之製備	43
(二) 實驗動物	43
(三) 實驗試藥	44
二、實驗方法	44
(一) 扭體反應試驗	44
(二) 福馬林試驗	44
第三節 半枝蓮及其成分 scutellarein 對 λ -carrageenan 誘發 足蹠發炎之抗發炎機轉研究	46
一、實驗材料	46
(一) 實驗材料之製備	46
(二) 實驗動物	46
(三) 實驗試藥	46
(四) 實驗儀器	46
二、實驗方法	47
(一) 角叉菜膠誘導小鼠足蹠腫脹之影響	47
(二) 角叉菜膠誘導小鼠足蹠腫脹作用機轉之探討	48
(三) 肝組織抗氧化酵素活性測定	48
1. SOD 之測定	48
2. GSH-Rd 之測定	49
3. GSH-Px 之測定	50

(四) 腳組織一氧化氮(NO)及丙二醛(Malondialdehyde ;	
MDA)含量測定·····	51
1. NO 之測定·····	51
2.MDA 之測定·····	53
第四節 統計學分析·····	56
第四章 實驗結果·····	57
第一節 八十七種中草藥及半枝蓮成分漢黃芩素(wogonin)、	
黃芩素(baicalein)、高山黃芩素(scutellarein)對	
LPS 與 INF- γ 誘發巨噬細胞 264.7 產生 NO 之抑制	
活性試驗·····	57
一、八十七種中草藥對 LPS 與 INF- γ 誘發巨噬細胞	
264.7 產生 NO 之抑制活性試驗·····	57
二、Wogonin、baicalein、scutellarein 對 LPS 與	
INF- γ 誘發巨噬細胞 264.7 產生 NO 之抑制活性	
試驗·····	66
第二節 半枝蓮及其成分 scutellarein 鎮痛作用之研究·····	68
一、半枝蓮鎮痛作用·····	68
(一)醋酸扭體反應試驗結果·····	68
(二)福馬林前期舔足試驗·····	69
(三)福馬林後期舔足試驗·····	70
二、Scutellarein 鎮痛作用·····	71
(一)醋酸扭體反應試驗結果·····	71
(二)福馬林前期舔足試驗·····	72
(三)福馬林後期舔足試驗·····	73

第三節 半枝蓮及其成分 scutellarein 對 λ -carrageenan 誘發	
足蹠發炎之抗發炎機轉研究.....	74
一、半枝蓮對 λ -carrageenan 誘導足蹠腫脹的影響.....	74
二、Scutellarein 對 λ -carrageenan 誘導足蹠腫脹的	
影響及抗發炎機轉研究.....	75
(一) Scutellarein 對 λ -carrageenan 誘導足蹠浮腫的	
影響.....	75
(二) Scutellarein 抗氧化與抗發炎關係探討.....	76
1. Effect of scutellarein on NO level.....	76
2. Effect of scutellarein on MDA level.....	77
3-1. Effect of scutellarein on liver SOD activity induced	
by λ - carrageenan	78
3-2. Effect of scutellarein on liver GSH-Rd activity	
induced by λ - carrageenan.....	79
3-3. Effect of scutellarein on liver GSH-Px activity	
induced by λ - carrageenan.....	80
第五章 討論.....	81
第六章 結論.....	89
謝 辭.....	93
參考文獻.....	95

圖目錄

圖一、 λ -carrageenan 誘發小鼠足蹠浮腫發炎之作用機轉.....	11
圖二、半枝蓮植物照片.....	25
圖三、半枝蓮植物寫生圖.....	27
Figure 4. Analgesic effects of indomethacin and SR _{EtOH} on acetic acid (0.1 ml/10g) induced writhing response in mice.....	68
Figure 5. Analgesic effects of indomethacin and SR _{EtOH} on the early phase in the formalin test in mice.....	69
Figure 6. Analgesic effects of indomethacin and SR _{EtOH} on the late phase in the formalin test in mice.....	70
Figure 7. The effects of indomethacin and scutellarein on acetic acid-induced writhing response.....	71
Figure 8. Analgesic effects of indomethacin and scutellarein on the early phase in the formalin test in mice.....	72
Figure 9. Analgesic effect of indomethacin and scutellarein on the late phase in the formalin test in mice.....	73
Figure 10. The effects of indomethacin and SR _{EtOH} extract on mice hind paw edema induced by λ -carrageenan.....	74

Figure 11. The effects of indomethacin and scutellarein on mice hind paw edema induced by λ - carrageenan.....	75
Figure 12. The effects of indomethacin and scutellarein on NO level induced by λ - carrageenan.....	76
Figure 13. The effects of indomethacin and scutellarein on MDA level induced by λ - carrageenan.....	77
Figure 14. Effect of scutellarein on liver SOD activity induced by λ - carrageenan.....	78
Figure 15. Effect of scutellarein on liver GSH-Rd activities induced by λ - carrageenan.....	79
Figure 16. Effect of scutellarein on liver GSH-Px activities induced by λ - carrageenan.....	80

表目錄

表一	NO 標準曲線溶液配製方式	52
表二	MDA 標準溶液配製方式	54
表三	MDA 標準曲線製作方式	55

Table 4. Inhibitory activity of 87 species of traditional Chinese

herbs on NO production by a murine macrophage-like

cell line, RAW264.7, activated with lipopolysaccharide

and interferon- γ and the viability of macrophage by

the MTT assay

59

Table 5. Inhibitory activity of wogonin, scutellarein, and baicalein

on NO production by a murine macrophage-like cell line,

RAW264.7, activated with lipopolysaccharide and

interferon- γ and the viability of macrophage by

the MTT assay

67

略字表

eNOS : endothelial NOS

GSH : glutathione

GSH-Px : glutathione peroxidase

GSH-Rd : glutathione reductase

H₂O₂ : hydrogen peroxide

IFN- γ : interferon- γ

IL-1 β : interleukin-1 β

iNOS : inducible NOS

LPS : lipopolysaccharide

MDA : malondialdehyde

NF- κ B : nuclear factor kappa B

nNOS : neuronal NOS

NO : nitric oxide

NOS : nitrite oxide synthase

NSAIDs : non-steroidal anti-inflammatory drugs

O₂^{-•} : superoxide anion radical

OH• : hydroxyl radical

ONOO⁻ : peroxynitrite

PAF : platelet activating factor

ROS : reactive oxygen species

SOD : superoxide dismutase

TNF- α : tumor necrosis factor- α

TXA₂ : thromboxane A₂

摘要

本研究首先從八十七種用於治療抗發炎、解熱及鎮痛之中草藥篩選對 LPS 與 interferon- γ 誘導巨噬細胞(RAW264.7)產生 NO 活性抑制之影響，結果顯示有 15 種中草藥對 LPS 與 Interferon- γ 誘導巨噬細胞(RAW264.7)產生之 NO 含量有顯著的抑制作用，其抑制率都在 80% 以上。並就其中活性佳且台灣民間常用的抗癌藥物半枝蓮(*Scutellaria rivularis* Wallich)進一步以醋酸扭體法、福馬林舔足試驗及 λ -carrageenan 足蹠腫脹法，探討半枝蓮及其成分 scutellarein 之鎮痛及抗發炎藥理作用，最後測定 λ -carrageenan 誘導足蹠腫脹小鼠之腫脹腳掌的 MDA 及 NO 含量、肝組織中抗氧化酵素(SOD、GSH-Rd、GSH-Px)活性，以探討 scutellarein 之抗發炎機轉。

醋酸扭體法實驗結果發現，口服給予半枝蓮粗抽物與腹腔注射給予 scutellarein 均可明顯減少小鼠因醋酸所引起疼痛之扭體次數，顯示有鎮痛作用。福馬林舔足試驗實驗結果發現，半枝蓮粗抽物與 scutellarein 可明顯減少小鼠福馬林誘發後期之舔足反應時間，顯示其具有週邊鎮痛作用。

λ -carrageenan 足蹠腫脹法實驗結果發現，口服給予半枝蓮粗抽物與腹腔注射給予 scutellarein 可明顯降低 λ -carrageenan 誘導的急性足蹠浮腫，顯示半枝蓮粗抽物具有抗發炎作用。

最後測定 λ -carrageenan 誘導足蹠腫脹小鼠之腫脹腳掌的 MDA 及 NO 含量、肝組織中抗氧化酵素(SOD、GSH-Rd、GSH-Px)活性發現，scutellarein 能明顯降低 λ -carrageenan 所引起之腫脹腳組織 NO、MDA 濃度及明顯提升肝臟中 SOD、GSH-Rd 抗氧化酵素的濃度，顯示 scutellarein 之抗發炎作用與增強自由基的酵素活性，因而減少 MDA 與 NO 含量有關。

綜合上述結果，經由本研究設立的 NO assay 篩選平台所篩選出來對 NO 具有抑制活性的半枝蓮與其成分 scutellarein，經藥理與生化指數證實確實具有鎮痛與抗發炎作用，期待此簡便的篩選平台能夠提供研究同道們選取抗發炎實驗題材之參考依據。

關鍵詞：半枝蓮，一氧化氮，中草藥，鎮痛，抗發炎，抗氧化酵素。

Abstract

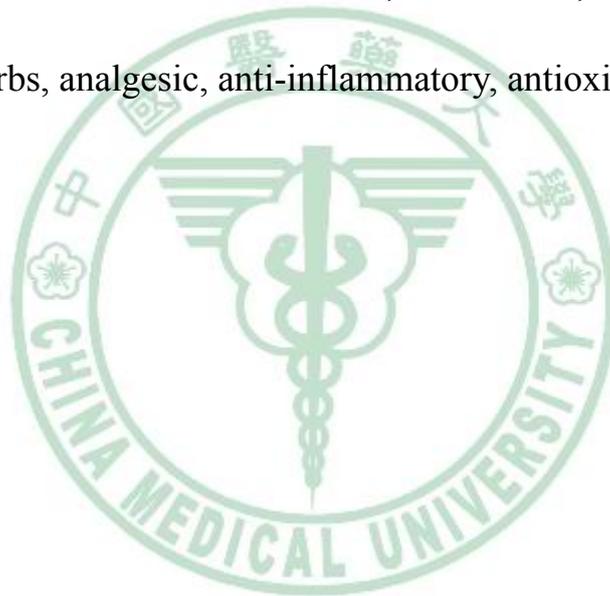
In the present study, the effect of eighty-seven species of traditional Chinese herbs on nitric oxide (NO) production by a lipopolysaccharide (LPS) and interferon- γ (IFN- γ) activated murine macrophage-like cell line, RAW 264.7 was investigated. The inhibitory rate of the fifteen species is more than eighty percent. *Scutellaria rivularis* Wallich, used as anti-cancer drug in Taiwan, showed strong inhibitory effect. Therefore, I investigated the analgesic and anti-inflammatory effects of *S. rivularis* and its constituent-scutellarein.

First, we investigated the analgesic effect of *S. rivularis* and scutellarein by acetic acid-induced writhing response test and formalin test. The anti-inflammatory activity of *S. rivularis* and scutellarein were determined by the λ -carrageenan induced mice paw edema. The writhing response and carrageenan-induced paw edema showed significantly reduced by treatment with *S. rivularis* and scutellarein. These results suggested that *S. rivularis* and scutellarein exerts analgesic and anti-inflammatory activity.

Scutellarein treatment also caused a significant reduction of the NO and MDA levels in the edema paw, while increasing SOD and GSH-Rx activities in the liver tissue.

In conclusion, the anti-inflammatory mechanism of scutellarein may be related to an inhibition of the NO and MDA production and the increase in the activities of antioxidant enzymes (SOD, and GSH-Rd). We suggest that scutellarein may be used as a pharmacological agent in preventing and treating disease in which free radical formation is a pathogenic factor.

Keywords : *Scutellaria rivularis* Wallich, nitric oxide, traditional Chinese herbs, analgesic, anti-inflammatory, antioxidant enzymes.



第一章 緒言

第一節 研究動機背景

進入二十一世紀的今天，仍然有許多疾病（例如感染性疾病、癌症、糖尿病等）常伴隨著全身或局部性的發炎作用，這些病症無法從西方醫學中獲得全面性的治療或預防，反觀我民族使用歷史悠久的中醫藥因而逐漸引起研究者的注目與高度的興趣。

2002年，著名的美國前三軍聯席醫院院長 Koop 博士曾經指出，「因應未來醫藥之希望與需要，學界、藥廠與食品藥物管理局(FDA)，應加強天然藥物之研究發展與合作」⁽¹⁾。2003年5月28日第五十六屆世界衛生大會(WHA56.31)，會中公開支持傳統醫學，並注意到世界衛生組織傳統醫學戰略，包括制定政策，提高安全性、有效性和品質，確保獲取，以及促進合理使用等四項主要目標，傳統醫學於是更加受到國際間研究者的注意。

我國民間常用之中草藥即屬傳統醫學的一部份，中草藥典籍中關於具有抗發炎、解熱、鎮痛等功效之中草藥的記載非常多^(2、3)，再加上民間習用的秘方或驗方，大量記載了這些藥物的臨床療效。但往往中草藥的品質良窳不齊，影響了藥物的使用效果，加上中草藥成分複雜、不明確，並且缺乏符合現代醫學要求的實驗平台驗證，以至於目

前市面上販售的中草藥不是效果不明就是過分誇大療效，往往使得使用者無所適從，亦無法廣受西方醫學所肯定。

炎症反應是一種極其常見而又十分複雜的基本病理過程，是許多疾病的發病基礎。所謂的炎症是指具有血管系統的活體組織對損傷因子所發生的免疫防禦反應，而在局部表現為紅、腫、熱、痛及機能障礙五大主癥⁽⁴⁾。其發炎反應係與肥大細胞、巨噬細胞、嗜伊紅性白血球及嗜中性白血球活化，產生大量 $O_2^- \cdot$ (superoxide anion radical) 有關，而其機轉據學者研究指出與高反應性含氧分子(reactive oxygen species, ROS)：如一氧化氮 (nitric oxide; NO)、自由基生成釋出等在發炎過程中扮演重要的角色⁽⁵⁾。

又自由基中的 NO 在發炎過程中扮演促進發炎物質 (如 IL-1, TNF...) 生成的角色，間接或直接地參與巨噬細胞所調控的發炎反應⁽⁶⁾。NO 在發炎反應過程中主要是經由活花一氧化氮合成酵素(nitric oxide synthase, NOS)而將細胞內之 L-arginine 轉變成為 L-citrulline 及 NO 的釋放⁽⁷⁾。因此從抑制過多的 NO 生成的角度來探索新的抗發炎藥，應是一種新的指標。

第二節 研究目的

本研究為了探討中草藥之抗發炎作用，首先藉由篩選具有抗發炎作用之中草藥對於 LPS 與 INF- γ 誘導小鼠巨噬細胞(RAW264.7)產生 NO 活性抑制之作用為指標，希望在本研究室設立一簡便且實驗結果再現性高的篩選平台，方便往後進行藥理體內試驗評估之依據。

根據此平台進行了 87 種中草藥的篩選工作，發現其中 15 種能夠明顯的抑制 NO 生成⁽⁸⁾，在這 15 種中草藥中，選擇台灣常用的抗癌藥物—半枝蓮為接下來的研究主題。半枝蓮基原為唇形科 *Scutellaria rivularis* Wallich 的全草，具有治療吐血、衄血、黃疸、咽喉腫痛、疔瘡、癰癤及腫瘤之功效⁽⁹⁻¹²⁾。現代藥理研究亦發現其具有抗癌作用^(13、14)、免疫調節作用⁽¹⁵⁾、抑菌作用⁽¹⁶⁾與解痙祛痰等作用⁽¹⁷⁾。另外據學者研究指出，半枝蓮的乙醇抽出物經分劃後的氣仿層含有 baicalin、baicalein、wogonin 等成分，具有明顯的抗炎作用及保肝活性^(18、19)，而半枝蓮的活性成分中 baicalin 有很好的抗炎作用，wogonin 具有保肝活性⁽²⁰⁾。並有研究指出黃酮類成分 oroxylin A 主要是藉由抑制細胞內轉錄因子 NF- κ B 的活化，進而導致細胞內誘導型 NOS 之表現受到抑制所致⁽²¹⁾；baicalin、baicalein、wogonin 具有抑制 LPS 誘導之 PGE₂ (LPS-induced prostaglandin E₂) 產生的能力⁽²²⁾。然而半枝蓮成分中與 oroxylin A、baicalin、baicalein、wogonin 結構相近的另一個成分

scutellarein，其鎮痛及抗發炎作用與機轉仍未見探討。

因此本研究再應用醋酸扭體試驗及福馬林試驗於探討半枝蓮粗抽物及其成分 scutellarein 之鎮痛作用，應用 λ -carrageenan 試驗及測定浮腫腳掌之丙二醛(MDA)及 NO 濃度、肝組織之抗氧化酵素(SOD、GSH-Rd、GSH-Px)之活性，以探討半枝蓮粗抽物及其成分 scutellarein 之抗發炎作用機轉，俾開發能抑制 NO 且具鎮痛抗炎作用的藥物。



第二章 總論

第一節 發炎反應

炎症（inflammation），係指具有血管系統的活體組織對損傷因子所發生的防禦反應，也是一種極其常見又十分複雜的基本病理過程，同時炎症也是許多疾病的重要組成部分。內外源性損傷因子均可引起機體細胞和組織各種各樣的損傷性變化，與此同時機體的局部和全身也發生一系列複雜的反應，以侷限和消滅損傷因子，清除及吸收壞死組織和細胞，並同時進行細胞的再生修復損傷，這種機體的損傷和對損傷的複雜反應構成炎症現象⁽²³⁾。

在公元前的古希臘羅馬時代，Celsus 就提出了炎症的四大特徵，即為紅、腫、熱、痛。後來在 19 世紀德國病理學家 Virchow 又提出局部機能障礙的第五大主癥⁽⁴⁾。受傷害的組織細胞，會釋出組織胺，刺激附近的血管，導致局部血管擴張及微血管通透性增大。症狀包括局部血管擴張，使該部血流增加，呈現紅、熱症狀；微血管通透性之增大，致使血漿滲出較多，造成腫脹，進而壓迫神經而感覺疼痛。

在炎症反應的各個階段都有炎症介質的釋放和參與，這些炎症介質大致可分成三類：（1）高反應性含氧分子（ROS）：如一氧化氮（NO）。（2）脂質衍生物：包括血小板活化因子及環氧化酶（cyclooxygenase）和脂氧化酶（lipoxygenase）代謝花生四烯酸

(arachidonic acid) 所生成之發炎分子包括白三烯酸 (leukotrienes)、前列腺素 (prostaglandins) 及血栓凝集素 (thrombin)。 (3) 蛋白質：通常是 interleukin、TNF- α 、TNF- γ 。這些炎症介質的作用扮演著促進發炎、抗發炎或者雙重角色，在一定階段時。某種介質可能引起主要作用，引起某種反應，並可刺激其他介質的生成和釋放，引起連鎖反應，促進炎症反應。但在另一個階段，它又可能抑制其他介質的生成或抑制其作用，甚至通過負回饋調節自身生成，而抑制炎症發展。



第二節 中草藥在抗發炎藥物中的發展

自從世界衛生大會公開宣示支持傳統醫學，傳統醫學於是更受到國際間的注意。事實上近年來，國際社會對於中草藥的需求與日劇增，各種中草藥產品充斥於坊間，例如以健康食品、膳食補充品或中藥處方藥物等形式大量販售。

許多疾病(例如感染性疾病、癌症、糖尿病、阿茲海默症等)常伴隨著全身或局部性的發炎作用，例如慢性腸炎會增加大腸癌發生的機率⁽²⁴⁾，此時為降低發炎反應，通常可使用一些抗發炎藥物，如具有清熱解毒方面功效的藥物。

由於保健食品、健康食品或膳食補充品的蓬勃發展，現代藥理關於中草藥具有抗發炎作用的研究非常多，例如陳皮的成分 nobiletin 對 LPS 與 INF- γ 誘導巨噬細胞(RAW264.7)生成 NO 及 PGE₂ 有抑制作用⁽²⁵⁾；杜仲、甘草、當歸之乙醇粗抽物對 LPS 誘導小鼠巨噬細胞(RAW264.7)生成的 NO 及 PGE₂ 具有抑制作用⁽²⁶⁾；當歸成分 ferulic acid、馬鞭草粗抽物對 λ -carrageenan 誘導小鼠足蹠浮腫均具有明顯的抑制作用^(27, 28)；甘草主成分 glycyrrhizin 具有抗發炎、抗潰瘍、抗過敏、抑制免疫效果等功能⁽²⁹⁾；山葡萄為民間常用在利尿、消炎、止血、治療慢性肝炎等作用，據 Hsieh(1998)研究指出其甲醇粗抽物對福馬

林誘發舔足試驗具抑制效果，對 λ -carrageenan 誘導小鼠足蹠浮腫具有明顯的抑制作用⁽³⁰⁾。



第三節 角叉菜膠 (λ -carrageenan) 誘導發炎模式之簡介

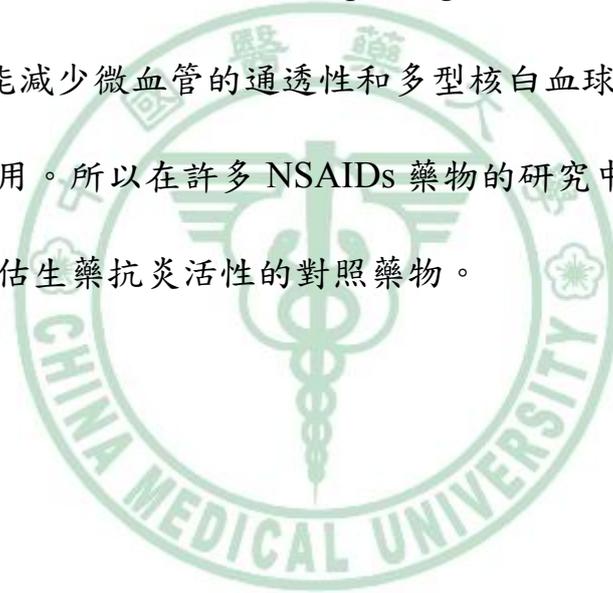
誘發小鼠組織急性浮腫發炎的介質包括 λ -carrageenan、histamine、5-HT、dextrose、bradykinin、prostaglandin 等，其中以 λ -carrageenan 誘發小鼠足蹠浮腫發炎之作用機轉 (如圖一) 最明確，因此廣泛使用於評估抗發炎藥物的效果。

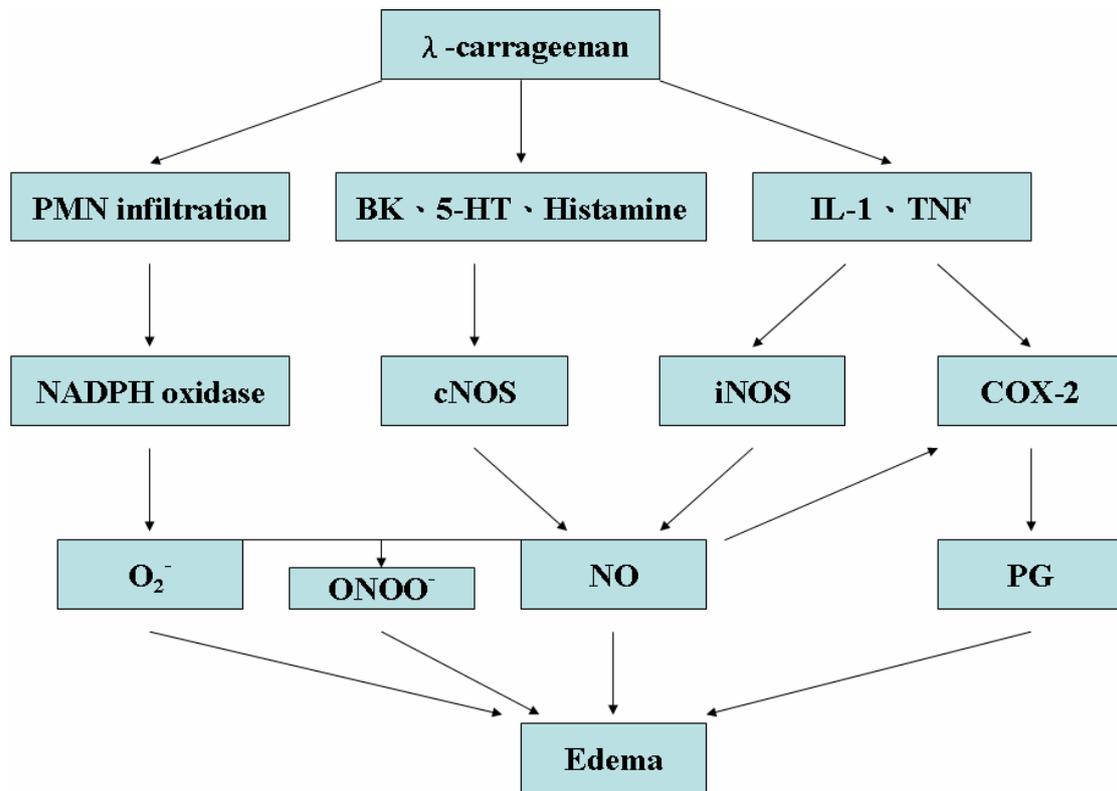
λ -carrageenan 是一種植物多醣體，為非刺激性的致炎物質，最初是由藻類角叉菜 (愛蘭苔 Irich seamoss，學名 *Chondrus crispus*) 抽提而得，其誘發小鼠足蹠浮腫之機轉，被認為具有雙相 (biphasic) 之機轉⁽³¹⁾，原因在於注射 λ -carrageenan 後，在不同時間釋放出不同的物質而引起發炎，即 0-1.5 小時或 20 分至 1 小時內 (first phase)，此時 histamine、serotonin、PAF (platelet activating factor) 會游離出來；而 1.5-2.5 小時 (second phase)，kinin 類物質會釋放；2.5 小時之後 (third phase)，prostaglandin 及 leukotrienes、NO 和自由基⁽³²⁾ 會被釋放出來。

急性發炎反應，是指受到傷害之組織立即產生的變化，包括大量的化學媒介物 (如 histamine、serotonin、prostaglandins、leukotrienes、bradykinin、interleukin-1 等) 被製造及釋放。雖然受傷部位不同，但引發致炎之媒介皆相同，因此急性發炎的基本形態是一樣的。而 carrageenan 所誘發的炎症反應，與臨床之急性炎症非常類似，其過程包括 arachidonic acid (花生四烯酸) 代謝產物 prostaglandin 和

leukotrienes 之增加；釋放 histamine、serotonin 及 bradykinin 等物質，造成血管通透性增加；嗜中性球（neutrophil）及單核球（monocyte）之吞噬反應等。所以實驗上常以 λ -carrageenan 引發炎症反應來評估藥物之抗急性炎症效果。

實驗並選用正對照藥物 indomethacin，indomethacin 為非類固醇抗炎藥（NSAIDs），其抗炎機轉主要在抑制 cyclooxygenase 之活性，使 arachidonic acid 無法變成前列腺素（prostaglandin）、 TXA_2 、prostacyclin 等致炎物，並能減少微血管的通透性和多型核白血球的（PMN）轉移，以達抗炎的作用。所以在許多 NSAIDs 藥物的研究中，indomethacin 也就常成為評估生藥抗炎活性的對照藥物。





圖一、λ-carrageenan 誘發小鼠足蹠浮腫發炎之作用機轉⁽³²⁾

一、 λ -carrageenan 誘發小鼠足蹠浮腫實驗

用記號筆在小鼠右後肢踝關節周圍做一標記，將小鼠右後肢浸入浮腫測定儀器，測量正常足蹠容積後，分別在小鼠右後肢足蹠皮下注射1% λ -角叉菜混懸液（0.1 ml/隻）致炎⁽³³⁾。誘導2.5小時後，將小鼠分別以不同劑量之檢品腹腔給予，正對照組於誘導後1.5小時，皮下注射indomethacin（10 mg/kg），給藥量皆為0.1 ml/10g。給藥後每隔1小時皆按上法，各測一次足蹠容積，連續測7小時，記錄結果，並分別計算誘導後每小時足蹠體積與誘導前個別足蹠之體積差（ ΔV ）。

二、浮腫率（edema rate）及抑制率（inhibition rate）之計算

$$\text{浮腫率 (E) \%} = [(V_t - V_0) / V_0] \times 100$$

$$\text{抑制率 (I) \%} = [(E_c - E_t) / E_c] \times 100$$

V_0 = carrageenan 注射前之足蹠體積（mL）

V_t = carrageenan 注射後 t 小時之足蹠體積（mL）

E_c = 控制組的浮腫率

E_t = 藥物組的浮腫率

三、 λ -carrageenan 引起的發炎與自由基的關係

研究指出角叉菜膠所誘導的發炎反應與自由基有關⁽³⁴⁾。以 λ -carrageenan 誘導大鼠足蹠發炎反應， 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 ($O_2^{\cdot-}$)。而 $O_2^{\cdot-}$ 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。 λ -carrageenan 也會經由活化 iNOS 生成 NO，NO 會和 $O_2^{\cdot-}$ 作用，形成 $ONOO^-$ 。 $OH\cdot$ 和 $ONOO^-$ 攻擊細胞膜脂質，導致細胞損傷而發炎^(5, 35)。活性氧自由基，例如 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 $OH\cdot$ 、 $ONOO^-$ ，是急性發炎反應中重要介質⁽³⁵⁾，發炎組織中的活性氧自由基，於發炎反應後 1-6 小時即可被表現出來。且有文獻指出注射 λ -carrageenan 三小時後，最大的水腫反應和藥物的抗炎作用均會在這時期發生⁽³⁶⁾。因此，發生炎症時如能有效地減少 ROS 含量，可以得到良好的抗發炎效果⁽³⁷⁾。

第四節 一氧化氮 (NO) 與發炎性疾病的關係

NO 是哺乳動物中最小、最輕並具有廣泛生物學功能的信息分子與效應分子⁽⁷⁾，無色、無味氣體，可溶於水和脂肪。它不帶電荷且有一個未配對電子，在體內以自由基的形式存在，由於不帶電荷使它可以自由的穿越細胞膜。廣泛存在於神經系統、心血管系統、免疫系統、消化系統、生殖系統與呼吸系統的細胞內⁽³⁸⁾。它的半衰期很短，約 5-10 秒，會迅速被氧化成硝酸鹽和亞硝酸鹽。NO 在體內是由一氧化氮合成酶 (NOS) 催化 L-arginine 轉成 L-citrulline 的過程中生成的⁽⁷⁾。

一氧化氮合成酶 (NOS) 主要分為三種形式，分別是 eNOS、nNOS、iNOS，分佈在不同組織中，在體內調節不同生理功能。eNOS 是於血管內皮細胞中發現，由其生成的 NO，可促進血管舒張達到降血壓之作用⁽³⁹⁾；第二種是主要存在於腦細胞或神經細胞中 nNOS，由 nNOS 生成的 NO 則與神經傳導之調節、腦部記憶和學習有密切關係。其中 eNOS 與 nNOS 屬於結構性的合成酶，不需誘導即自然存在於體內，機體內正常濃度一般約在 nmole 之譜⁽⁴⁰⁾。而第三種 iNOS 則屬於誘發型，主要存在於巨噬細胞中，必須被誘導才會呈現活化，如細菌內毒素 (LPS) 或細胞激素 (cytokines) 包括 TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 等皆可誘導 iNOS 之產生。但 IL-4 與 IL-10 等具有抗發炎作用的細胞激素，可藉由抑制促發炎的細胞激素 (TNF- α 、IL-1、IL-6) 的生成，

進而抑制 iNOS 的表現，並且減少 NO 之生成。Weisz (1994)⁽⁴¹⁾ 等學者研究指出，iNOS 主要調節於轉錄階段，LPS 和 IFN- α 可以藉由活化巨噬細胞中 iNOS transcription factor：NF- κ B，增加其與 iNOS 之 DNA binding 而促進 iNOS mRNA 轉錄作用，進而增加 NO 之生成。Ohshima 與 Bartsch (1994)⁽⁴²⁾ 進一步指出，iNOS 誘導生成之 NO 具殺菌作用並參與宿主防禦機能，由此路徑誘導生成之 NO，濃度約為 eNOS 或 nNOS 路徑生成之 1000 倍，且其本身為一自由基 (free radical)，故若長期暴露於此過量 NO 環境下，可能會與 $O_2^{\cdot-}$ 作用，生成一強氧化劑 $ONOO^-$ ，進而對組織細胞產生毒害作用，引起發炎反應並增加致癌機率。



一、一氧化氮之生理作用

NO 有兩大重要功能：(1)NO 是細胞和細胞間信息傳遞的重要調節因子，作為第二信息和神經傳導物質而有各種不同的作用，如調節血管張力，調節血壓、傳遞神經信息和抑制血小板凝集等。(2)NO 在細胞免疫和炎症毒性扮演重要的角色。NO 在炎症反應的許多環節中發揮複雜的調節作用，炎症反應時，致炎物質或炎症介質可誘導或增加局部 NO 的合成與釋放⁽⁶⁾。大致上，組織中誘導型 NO (iNOS) 在炎症反應中被誘導產生，生成大量 NO，促進炎症反應，例如血管擴張反應、細胞毒性、水腫及細胞因子依賴過程的間接作用等。相反地，由內皮細胞中原生型 NO 合成酶 (eNOS) 所產生的 NO，則透過活化微血管中的中性粒細胞，阻止細胞黏附以及氧化物的釋放而發揮其保護作用及抑制炎症反應的作用。NO 在炎症機制中發揮著雙重作用，一方面，NO 促進炎症反應的作用包括使血管舒張、形成水腫和局部紅斑、增加炎症滲出、促進敗血症的發展、活化前列腺素合成酶以及參與類風濕的發展等；另一方面，NO 又可與前列腺素相互作用，調節一系列生理的和炎症的過程，體內存在著一套精確地調控 NO 合成的機制⁽⁴³⁾。

二、與一氧化氮有關的疾病

如上一節所述，適量的 NO，可作為神經傳導物質、並會引起血管平滑肌鬆弛及抑制血小板凝集。然而，高濃度的 NO 會造成病理上的血管擴張、組織傷害。以下彙整一些因高濃度 NO 引起相關疾病的文獻。

1. 造成菌血症(sepsis)患者血壓大量下降、對神經元傷害造成神經退化疾病⁽⁴⁴⁾。因此 NO 與格蘭氏陰性菌引發之敗血性休克及 circulatory failure 有關⁽⁴⁵⁾。
2. 在發炎或感染的組織中，巨噬細胞產生的 NO 明顯增加。包括關節炎(arthritis)^(46、47、48)、癌症、動脈粥樣硬化、中風^(38、44)及敗血性休克(septic shock)⁽⁴⁹⁾
3. B 型肝炎、肝腫瘤或結腸癌的發生可能和慢性發炎有密切關係⁽⁴²⁾，且這些疾病的發生可能和 NO 有密切的關係^(40、50)
4. 阿茲海默氏症患者腦部大量沉積 senile plaque，主要由 beta-amyloid 引起。有證據指出因 beta-amyloid 活化了 microglial cell，促使其產生 NO 而傷害了神經細胞⁽⁵¹⁾。在老鼠的 glial cell 中， β -amyloid 會刺激 iNOS 表現增強，並產生高濃度 NO，而此高濃度 NO 可能即是造成阿茲海默氏症的病因之一⁽⁵²⁾。
5. Type I 糖尿病患者血清中一氧化氮增高。目前認為一氧化氮能損

傷胰島β細胞，使胰島素合成下降，導致血糖升高⁽⁵³⁾。

三、巨噬細胞 RAW264.7 測定 NO 模式

巨噬細胞在發炎及宿主對抗細菌或病毒上均扮演重要角色，在活化的巨噬細胞所釋放的各種媒介物質當中，一氧化氮為巨噬細胞在抗腫瘤及抗菌作用上能發揮調節或細胞毒素作用的有效分子之一，負責巨噬細胞合成一氧化氮的酵素是 iNOS，然而平常 iNOS 是不存在的，但在細菌內毒素 (LPS) 和炎症的細胞分裂素作用下能強力引發 iNOS 產生，INF- γ 對 LPS 作用下的巨噬細胞具有協同作用能引發更大量 iNOS 產生，然而 INF- γ 單獨並不能引發巨噬細胞產生 iNOS。然而，在急性或慢性發炎中發現過多的一氧化氮可能導致宿主細胞及組織嚴重的損壞，在種種發炎疾病中，例如風濕性關節炎患者體內就發現其巨噬細胞產生過多的一氧化氮。因此，抑制過多的一氧化氮成為目前找尋抗發炎藥物的一個重要指標。

第五節 疼痛反應

1979 年國際疼痛研究協會(International Association for the Study of Pain , IASP)將人類疼痛定義為：「不愉快的感覺及情緒的變化伴隨著實際上或潛在的組織傷害」，1996 年美國疼痛醫學會發表「疼痛」為呼吸、血壓、心跳、脈搏以外的第五大生命徵象。疼痛為人類共有的一種複雜生理、心理反應，且個體差異很大的一種不愉快的主觀感覺；它是一種主觀的、複雜的感覺傳導，並提供軀體受到威脅的警報信號，是生命裏不可缺少的一種特殊保護功能。目前關於止痛劑的發展雖然不斷的推陳出新，然而大多限制在西藥的發展為主，不可諱言的，西藥的治療又多帶有一些副作用，例如癌症引起的劇烈疼痛多需使用成癮性麻醉鎮痛藥，例如 morphine 類製劑，雖有很好的止痛效果但也往往造成許多身體與精神方面的障礙。而非成癮性麻醉鎮痛藥(NSAID)，雖然無成癮的隱憂，但亦多有些副作用或毒性，例如廣泛使用的水楊酸類製劑(salicylic acid)對消化道的刺激性，及 acetaminophen 對肝臟的毒性等。因此如果能從傳統中草藥中發掘出對於鎮痛方面具有療效，而毒副作用又小的藥物，對於深受疼痛之苦的人來說，將是一個新的選擇。

一、疼痛的分子生物學研究

愈來愈多的證據顯示，長期的傷害性刺激會導致中樞神經特殊的改變，使得中樞神經敏感化(sensitization)，對於輕微而短暫的刺激產生強烈而持續的反應^(54, 55)。疼痛刺激從初級傳入神經去極化開始，透過突觸間傳遞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，必須經過三級制訊號傳遞系統⁽⁵⁶⁾。這些經由傷害性神經刺激所造成的中樞神經可塑性變化(neuroplasticity)，主要經由興奮性胺基酸受器(excitatory amino acid receptor)以及受器活化後引發的一連串胞內訊息傳遞物質的影響⁽⁵⁷⁾。這些物質包括了興奮性胺基酸，神經細胞內鈣離子，一氧化氮、前列腺素、PKC 以及 C-Jun、C-Fos 等蛋白的調節。因此當細胞受到疼痛刺激後，經由興奮性胺基酸、受器，以及一連串胞內的訊息傳遞物質會導致神經細胞特殊變化的分子生物學機轉。

二、鎮痛實驗動物模式

一般引起疼痛反應的刺激種類，可分為機械刺激法、熱刺激法、電刺激法及化學刺激法等四大類傷害性刺激。

研究疼痛的實驗動物模式包括：簡單反射測量模式，如 tail-flick test、limb-withdrawal reflex、jaw-open reflex；持續疼痛模式，如 formalin

test、adjuvant poly arthritis、carrageenan induced inflammation；未學習行為反應模式，如 hot-plate test、writhing response；學習行為反應模式，如 shock titration、reaction time conflict task 等⁽⁵⁸⁾。

由於常用的幾個疼痛模式中，各有其限制及缺點。例如 tai-flick test 雖然是一簡單且量化性高的實驗，但也僅能代表動物對痛覺的反射行為 (reflex behavior)，而沒有高級中樞痛覺整合的參與，且須注意實驗過程中不能影響到動物的運動神經及肌肉的功能，否則會改變反射的延遲時間而造成誤判，另外 baseline 的變異不小，亦是 tail-flick test 的困擾，因此必須選擇合適的紅外線功率及 cut-off 時間。在近幾年的研究中，有學者提出實驗環境溫度及鼠尾溫度會干擾 baseline latency⁽⁵⁹⁾，因此，必須控制固定且合適的室溫(22-24°C)並記錄實驗前後的鼠尾溫度變化，若有改變要再用公式來校正。

化學刺激中，用醋酸腹腔注射造成急性腹膜炎所引起的臟腑痛 (visceral pain)，可見到扭體反應(writhing response)，其中要注意實驗動物的年齡及體重造成的誤差，而扭體反應也僅能代表位於周邊的疼痛作用。相反的許多機械性刺激(tail pressure test，tail pinch test)、熱刺激(hot plate)及電刺激(electric foot shock)亦僅能代表中樞的鎮痛作用。唯有化學性刺激中的福馬林試驗較特別，它可同時測得中樞以及周邊所引起的痛覺反應，這是此試驗的優點⁽⁶⁰⁾。因此本研究採用扭體

反應試驗及福馬林試驗方式評估半枝蓮乙醇粗抽物與 scutellarein 鎮痛之作用。

(一) 扭體反應試驗

一般引起疼痛反應的刺激種類，可分為機械、溫熱、電氣及化學的刺激等。如以化學物質刺激實驗動物，常用的化學物質有 acetic acid、bradykinin、K⁺ 等，以腹腔注射刺激腹膜或接觸皮膚，會引起刺激化學敏感型接受體引發疼痛反應，實驗動物表現出腹部收縮內陷、後肢伸展、身體扭曲或蠕行等扭體表現⁽⁶¹⁾。本研究採用醋酸扭體實驗乃是 Siegmand 等人所提出⁽⁶²⁾，以化學物質刺激實驗動物的化學敏感型接受體，使動物疼痛而產生腹肌收縮、扭體等反應的實驗^(63、64)。然而包括鴉片類與內生肽類等神經鎮痛物質及固醇類和非固醇類週邊性鎮痛抗炎物質皆可抑制此扭體反應⁽⁶⁵⁾，因此可廣泛使用於篩選大部分鎮痛物質^(66、67)

一般認為醋酸扭體之作用機轉乃經由醋酸對腹部之直接刺激所引發之疼痛反應，造成其腹部內縮、後腿伸直、身體拉長扭曲之現象⁽⁶²⁾；其所媒介之機轉以周邊作用較強，但亦有中樞之作用（中樞許多神經傳遞物質參與鎮痛系統的作用，例如 β -endorphin 等鴉片樣物質）⁽⁶⁵⁾，因而無法確認其作用機轉是經由中樞或周邊而來，所以必須進一步以福馬

林試驗進行研究，以確認其真正的鎮痛作用機轉。

(二) 福馬林試驗

福馬林舔足實驗最早由 Dubuisson 和 Dennis 於 1977 年提出，對許多鎮痛藥物的篩選為一可靠有效的方法⁽⁶⁸⁾，皮下注射稀釋過的福馬林於大鼠、小鼠、貓或靈長類動物可觀察到兩相痛反應，在小鼠右後足掌注入福馬林，因刺激引起疼痛而有舔足或頓足的行為反應，此一動物模式經由 Shibata(1989)等研究發現，其所產生之舔蹠反應呈雙相(biphasic response)的作用，亦即其舔足時間具有兩個高峰期，在福馬林注入 0-5 分鐘會造成起痛 (initial pain)反應而引起小鼠舔足，稱之為前期 (early phase)，前期主要因直接刺激痛覺接受體造成 substance P 或 bradykinin 等致痛物質釋放；而在 20-30 分鐘所表現舔足時間稱之為後期 (late phase)，後期主要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、prostaglandin 及 kinin 等有關物質由受損組織細胞中釋出所引起⁽⁶⁹⁾。本實驗所選用之正對照藥物--非類固醇消炎藥 indomethacin 只能降低福馬林刺激的第二階段疼痛行為⁽⁷⁰⁾。

Hunskaar (1987)⁽⁷¹⁾等人研究報告指出福馬林試驗對發炎性和非發炎性疼痛之鎮痛藥物評估為一有效之模式，亦即前期為非發炎性疼痛，後期為發炎性疼痛。另外，以福馬林誘導產生的疼痛反應中，福馬林的

濃度也佔了很重要的因素，當福馬林濃度僅 0.02-0.2%時僅能誘導出前期舔腳反應，如以光學顯微鏡下觀察組織，發現其對組織的改變相當小；而使用 1%或更高之福馬林濃度時即可誘導出前期及後期舔腳反應，如注入 5%福馬林，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，顆粒性白血球破壞及腫脹均清楚可見⁽⁷⁰⁾。

近代亦有文獻⁽⁷²⁾指出，脊髓中樞的變化是造成福馬林刺激第二階段疼痛很重要的原因。在福馬林皮下注射後，紀錄脊髓背角單一神經元，發現在一階段之前注射局部麻醉劑，能夠預防第二階段疼痛行為的發生。由於第二階段的疼痛反應必須倚賴第一階段的疼痛刺激。因此，福馬林測試，在研究各種阻斷劑的對於過敏性疼痛的止痛效用時，便提供了我們很好的一個疼痛行為評估模式。

第六節 半枝蓮植物考察



圖二、半枝蓮植物照片(陳忠川老師提供)

半枝蓮 (*Scutellaria rivularis* Wallich) (如圖二) 為台灣民間常用藥，自生於台灣全境平野濕潤地。多年生草本植物，於開花期間採全草，鮮用或乾燥後使用。有清熱、解毒、散瘀、止血、鎮痛等功效。用於抗發炎、肝硬化、抗癌與利尿作用等^(9、12、73、74)。

一、半枝蓮之藥用植物學研究彙整

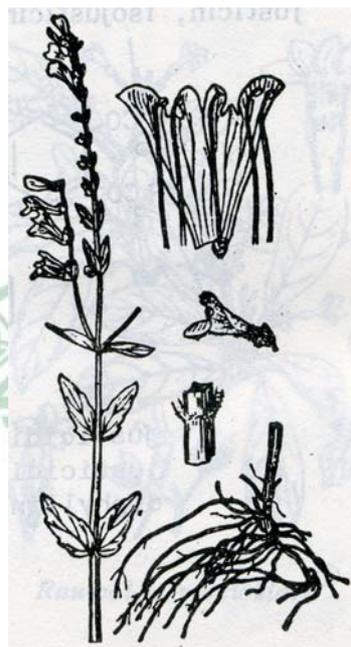
(一)來源：為唇形科植物半枝蓮的全草。

(二)分布：分佈於華東、華南、西南及河北、陝西南部、河南、湖北、湖南⁽⁷³⁾。台灣全境平野濕潤地、田畔、溝旁自生⁽¹²⁾。

(三)特徵：半枝蓮 *Scutellaria rivularis* Wallich (*Scutellaria barbata*

D.Don)係多年生草本植物，高 15-50 cm。莖四棱形，無毛或在花序軸上部疏被緊貼小毛，不分枝或具或多或少的分枝。葉對生；葉柄長 1-3 mm；葉片卵形、三角狀卵形或披針形，長 1-3 cm，寬 0.4-1.5 cm，先端急尖或稍鈍，基部寬楔形或近截形，邊緣具疏淺鈍齒，上面橄欖綠色，下面帶紫色，兩面沿脈疏生貼伏短毛或近無毛，側脈 2-3 對，與中脈在下面隆起。花對生，偏向一側，排列成 4-10 cm 的頂生或腋生的總狀花序；下部苞葉葉狀，較小，上部的逐漸變得更小，全緣；花梗長 1-2 mm，有微柔毛，中部有 1 對長約 0.5 mm 的針狀小苞片；花萼長 2-2.5 mm，果時達 4 mm，外面沿脈有微柔毛，裂片具短緣毛，盾片高約 1 mm，果時高約 2 mm；花冠藍紫色，長 1-1.4 cm，外被短柔毛，花冠筒基部囊狀增大，寬 1.5 mm，向上漸寬，至喉部寬 3.5 mm，上唇盔狀，長約 2 mm，下唇較寬，中裂片梯形，長約 3 mm，側裂片三角狀卵形；子房 4 裂，花柱細長；雄蕊 4，前

對較長，具能育半藥，退化半藥不明顯，後對較短，具全藥，花絲下部疏生短柔毛；花盤盤狀，前方隆起，後方延伸成短子房柄。小堅果褐色，扁球形，徑約1mm，具小疣狀突起。花期5-10月，果期6-11月⁽⁷³⁾。(如圖三)



圖三、半枝蓮植物寫生圖⁽⁷⁵⁾

(四)炮製：取原藥材，揀去雜質，用水洗淨。瀝去水，切段，乾燥⁽⁷³⁾。

(五)異名⁽⁷³⁾：

1. 廣州植物誌：狹葉韓信草
2. 南京民間藥草：通經草、紫連草、並頭草
3. 江蘇省植物藥材誌：牙刷草

4. 廣西藥用植物圖誌：水韓信
5. 江西民間草藥驗方：溪邊黃芩、金挖耳
6. 浙江民間常用草藥：野夏枯草、方草兒、半向花、偏頭草、四方草
7. 廣西中草藥：耳挖草
8. 福建中草藥：小號向天盞
9. 福建新醫療法資料選編：狹葉向天盞

(六)品種考證：半枝蓮之名最早見於外科正宗，用治毒蛇傷人。蔣儀藥鏡拾遺賦云："半枝蓮解蛇傷之仙草。"但均無形態描述，故難於確定為何種植物。綱目拾遺在"鼠牙半支"條內收載。百草鏡收載半枝蓮飲，所用半枝蓮為鼠牙半支，並描述其形態云："鼠牙半枝二月發苗，莖白，其葉三瓣，層積蔓生，花後即枯，四月開花黃色，如瓦松。"據所述特徵考訂，應為景天科景天屬 (*Sedum*)植物。此外，江蘇、浙江、雲南等地有些地區稱唇形科植物韓信草 *Scutellaria indica* L.為半枝蓮，均非本品⁽⁷³⁾。

(七)藥材鑑別⁽⁷³⁾：

1. 性狀鑒別 全草長 15-30cm。根纖細。莖四棱形，直徑 2-5mm，表面黃綠色至暗紫色。葉對生，皺縮或卷摺，展平後呈卵狀披針形，長 1.5-3cm，寬 0.5-1cm，被疏柔毛，上面深綠色，下面灰綠色；葉柄短或近無柄。枝頂有偏於一側的總狀花序，具殘存的宿萼，有時內藏四個小堅果。莖質軟，易折斷。氣微，味苦澀。以色綠、味苦者為佳。
2. 顯微鑒別 葉表面觀：表皮細胞長多角形，垂周壁波狀彎曲，上表皮細胞較大，有的細胞含橙皮苷結晶，以氣孔周圍為多見；氣孔直軸式。非腺毛 1-4 細胞，壁具厭狀突起，基部細胞有放射狀紋理。腺鱗較多，頭部類圓形，4-10 餘細胞，直徑 25-47 μm ，形大者類圓形或橢圓形，有的邊緣凹凸，由數十個細胞組成，直徑 140-266 μm 。另有小腺毛，頭部類圓形，1-2 細胞，直徑約 28 μm ，柄短，單細胞。
3. 理化鑒別 (1)取本品粉末 10g，加 80%乙醇 50ml，置水浴迴流 0.5h，趁熱濾過。取濾液 1ml，加鎂粉少許及濃鹽酸數滴，漸顯緋紅色。(檢查黃酮類)；(2)取(1)項濾液 1ml，加 1%三氯化鐵試液 1-2 滴，溶液顯墨綠色。(檢查酚類)；(3)取(1)項濾液 4ml，置水浴上蒸乾，殘渣加 5%鹽酸 5ml,攪拌溶解，

濾過。濾液分置 3 支試管內分別加碘化鉍鉀試液、碘化汞鉀試液、矽鎢酸試液各 1-2 滴，各試管均產生沉澱。(檢查生物鹼)

(八) 性味⁽⁷³⁾ 味辛、苦，性寒。歸肺、肝、腎經。

1. 廣西藥用植物圖志：「味辛微腥，性平，無毒。」
2. 南寧市藥物誌：「甘，平，無毒。」
3. 江西草藥：「性寒，味苦。」
4. 廣州部隊常用中草藥手冊：「微苦，涼。」

(九) 功能與主治⁽⁷³⁾ 清熱解毒，散瘀止血，利尿消腫。主治熱毒癰腫，咽喉疼痛，肺癰，腸癰，累癰，毒蛇咬傷，跌打損傷，吐血，衄血，血淋，水腫，腹水及癌症。

1. 南京民間藥草：「破血通經。」
2. 廣西藥用植物圖誌：「消炎，散瘀，止血。治跌打傷，血痢。」
3. 南寧市藥物誌：「消腫，止痛。治跌打，刀傷，瘡瘍。」
4. 江西草藥：「清熱解毒，消腫止痛。」
5. 全國中草藥彙編：「治腫瘤，闌尾炎，肝炎，肝硬化腹水，肺膿瘍。」

6. 福建藥物誌：「主治痢疾，吐血，血淋，肝炎，肺結核，淋巴腺炎，癌腫，胃痛，風濕關節痛，小兒高燒，白帶，乳腺炎，蛇頭疔，頸淋巴結核，角膜炎，瘡瘍腫毒，跌打損傷，狂犬及毒蛇咬傷。」

7. 浙江藥用植物誌：「治咽喉腫痛。」

(十) 採收加工⁽⁷³⁾ 種子繁殖的，從第2年起，每年的5月、7月、9月都可收穫一次。分株繁殖的，在當年9月收穫第1次，以後每年可收穫3次。用刀齊地割取全株，揀除雜草，捆成小把，曬乾或陰乾。



二、半枝蓮之成分研究彙整

全草主要含黃酮類、多醣、植物固醇、有機酸及其他類成分。黃酮類包括紅花素(carthamidin)，異紅花素(isocarthamidin)，高山黃芩素(scutellarein)，高山黃芩苷(scutellarin)；多醣有半枝蓮多醣；此外還含有硬脂酸(stearic acid)、 β -谷固醇(β -sitosterol)等⁽⁷⁶⁾。

半枝蓮的乙醇抽出物經分劃後的氯仿層含有 baicalin、baicalein、wogonin 等成分⁽¹⁸⁾。其揮發油含有 menthol、hexahydrofarnesylacetone、eugenol、globulol 等 41 種成分⁽¹⁶⁾。

另據報導，從地上部分分離得到一個新的 diterpenoid (scuterivulactone D)⁽⁷⁷⁾、rivularin⁽⁷⁸⁾、E-1-(4'-hydroxyphenyl)-but-1-en-3-one⁽⁷⁹⁾、抗菌活性成分 apiginin 及 luteolin⁽⁸⁰⁾，與抗肝癌的成分 pheophorbide a⁽⁸¹⁾。

三、半枝蓮之藥理作用

(一) 抗癌作用 半枝蓮萃取物經體內試驗發現，對 S-180 mouse sarcoma、U14 cervical carcinoma、solid hepatoma、W256 rat sarcoma 以及 Ehrlich's sarcoma 等癌症均具有抑制癌細胞生長的作用⁽¹³⁾；對人類肺癌細胞 cell line A549 有抑制細胞生長的作用⁽¹⁴⁾。

(二) 免疫調節作用 半枝蓮多醣在體外可促進刀豆球蛋白 A(Con A) 誘導的小鼠脾細胞淋巴細胞轉化。皮下注射給藥 1 星期後可明顯提高小鼠外周血淋巴細胞中酯酶陽性細胞的百分率，促進二硝基氯苯 (DNFB) 誘導的遲發型變態反應，但大劑量注射 (200 mg/kg) 可抑制小鼠胸腺指數，對脾指數無影響⁽¹⁵⁾。

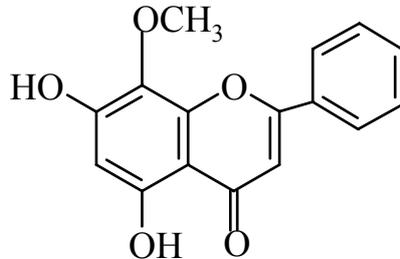
(三) 抑菌作用 半枝蓮揮發油經體外試驗發現，對大腸桿菌等 20 種細菌具有抗菌作用⁽¹⁶⁾；從半枝蓮分離到二個抗菌活性成分 apiginin 及 luteolin 不管對 methicilin 具抗藥性的(methicilin-resistant)或對 methicilin 有效的(methicilin-sensitive) *Staphylococcus aureus* 株細菌均具有相當的抑制作用⁽⁸⁰⁾。

(四) 解痙祛痰作用 紅花素有較強的對抗由組織胺引起的平滑肌收縮作用，並有很好的祛痰作用⁽¹⁷⁾。

四、半枝蓮成分漢黃芩素(wogonin)之理化性質與藥理作用⁽⁸²⁾

[異名]漢黃芩黃素、沃貢寧、次黃芩素

[結構式]



[分子式及分子量] $C_{16}H_{12}O_5$ ，284.27

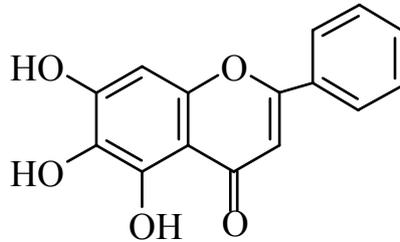
[來源] 唇形科植物黃芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi) 根，顛黃芩 (*S. amoena* C.H. Wright) 根，半枝蓮 (*S. rivularis* Wallich) 根；夾竹桃科小錦蘭 (*Anodendron affine* (Hook. & Arn.) Druce) 莖。

[活性] 小鼠離體的小腸實驗表明有罌粟鹼樣的解痙作用，但作用較弱，約為罌粟鹼的 1/5。本品大鼠口服可降低乙醇所致的甘油三酯水準。還具有抗癌作用和利尿作用。

五、半枝蓮成分黃芩素(baicalein)之理化性質與藥理作用⁽⁸³⁾

[異名]黃芩苷元、黃芩黃素

[結構式]



[分子式及分子量] $C_{15}H_{10}O_5$ ，270.25

[來源]唇形科植物並頭草 (*Scutellaria scordifolia* Fisch. ex Schrank)

根、葉，黃芩 (*S. baicalensis* Georgi) 根和葉中常以其 7-葡萄糖苷酸形式存在，*S. galericulata* Linnaeus 中則以其 7-鼠李糖苷形式存在，半枝蓮 (*S. rivularis* Wallich) 根。紫葳科木蝴蝶 (*Oroxylum indicum* (L.) Vent.) 種子、莖皮，及葉子中則以其 6-葡萄糖苷和 6-葡萄糖苷酸形式存在。車前科大車前 (*Plantago major* Linnaeus) 葉。

[活性]具有抗炎作用，對豚鼠離體氣管過敏性收縮及整體運動過敏性

氣喘有緩解作用，還能抑制過敏性水腫及炎症和降低小鼠耳毛細血管的通透性；急性利尿試驗表明，利尿作用強于漢黃芩素和黃芩苷；並能降低實驗大鼠肝的總膽固醇、游離膽固

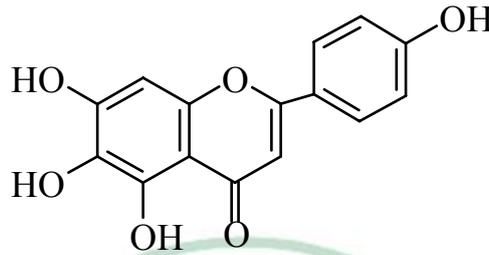
醇與三酸甘油酯含量。據實驗證明，baicalin 與 baicalein 均具有抗焦慮作用⁽⁸⁴⁾。



六、半枝蓮成分高山黃芩素(scutellarein)之理化性質與藥理作用⁽⁸⁵⁾

[異名]黃芩配質、黃芩次苷配質、野黃芩黃素、印黃芩素、6-烴基芹菜素(6-hydroxyapigenin)

[結構式]



[分子式及分子量] $C_{15}H_{10}O_6$ ，286.25

[來源] 唇形科植物韓信草 (*Scutellaria indica* Linnaeus) 全草，半枝蓮 (*S. rivularis* Wallich) 全草；紫葳科木蝴蝶 (*Oroxylum indicum* (L.) Vent.) 葉、莖、皮，姊妹樹 (*Miuingtonia hortensis*) 葉；另外，薔薇科珍珠梅 (*Sorbaria arborea* Schneid) 葉、花中含其 7-鼠李糖苷；菊科宿根矢車菊 *Centaurea depressa* Bieb. 花中含其 5-葡萄糖酸。同時其配糖基存在於百合科日光蘭屬 (*Asphodelus*)；玄參科 *Digitalis orientalis* Lam. 葉；和唇形科黃芩屬 (*Scutellaria*) 植物根部。

[活性] 具有抑制引朵-3-乙酸氧化酶和 ATP 生成和抑制穀實夜蛾 (*Heliothis zea*) 幼蟲生長的作用。

第三章 實驗之部

第一節 八十七種中草藥及半枝蓮成分漢黃芩素(wogonin)、黃芩素(baicalein)、高山黃芩素(scutellarein)對 LPS 與 INF- γ 誘發巨噬細胞 264.7 產生 NO 之抑制活性試驗

一、實驗材料

(一) 實驗材料之收集

本實驗材料部分收集自市面上或採集自本省各地，部分蒙瀋陽藥科大學姚新生教授提供蒐集自大陸各地，共有 87 種具有抗發炎、解熱及鎮痛作用中草藥。台灣蒐集之藥材經本校中國藥學研究所邱年永技正鑑定及比對藥用植物形態學或以生藥學書籍比對藥材之外部形態確立其基原，藥材樣本並存本校中國藥學研究所。姚新生教授提供之藥材經瀋陽藥科大學孫啟時、吳維春教授鑑定之。

本實驗所採用之藥品漢黃芩素 (wogonin)、黃芩苷 (baicalin) 購自日本松浦藥業株式會社；高山黃芩素 (scutellarein) 購自法國 Extrasynthese 公司。

(二) 實驗材料之抽提

將中草藥實驗材料洗淨、切片後陰乾成飲片，以 50%乙醇室溫浸泡 72 小時後，用紗布過濾，收集濾液，如此反覆三次，合併濾液，

在 40°C 下減壓濃縮至乾，即得實驗材料 50% 乙醇粗提取物。

(三) 檢品之製備⁽⁸⁶⁾

精確秤取實驗材料乙醇粗提取物一至二毫克，精秤之材料以每毫克溶於二十微升 DMSO 製成檢品溶液。

(四) 細胞培養⁽⁷¹⁾

RAW264.7 細胞為大鼠巨噬細胞樣細胞，以 Abelson leukemia virus 轉化，得自於 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)。培養於 Nutrient Mixture F-12 Ham (Ham's F12) (Sigma, N4888, 500mL) 培養基 [培養基添加 10% 非動化胎牛血清 (heat-inactivated fetal bovine serum) (Gibco, Cat. No. 16000-036, 100mL), 1% 穀胺醯酸 (L-glutamine) (Sigma, G7513, 20mL), 及 6% kanamycin sulfate (Wako, 117-00341, 1g)], 並置於 37°C 二氧化碳培養箱中 (5% 二氧化碳, 95% 潮濕的空氣)。以塑膠培養皿 (Falcon, No.1001; Becton Dickinson) 培養細胞，每週繼代二次。

(五) 實驗試藥

Ham's F-12 細胞培養基、穀胺醯酸購自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA)，胎牛血清購自 Gibco BRL 公司 (Grand Island, NY, USA)，

RAW264.7 購自於 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA), IFN- γ 購自 Genzyme 公司 (Cambridge, MA, USA), LPS (Escherichia coli, O55: B5) 購自 Difco 公司 (Detroit, MI, USA), kanamycin sulfate、sulfanilamide、N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride、phosphoric acid、3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 購自 Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan), 本實驗應用之化學藥品及試劑均為最純的商品。

(六) 實驗儀器

倒立顯微鏡：NIKON (TMS Type 104)

CO₂ 培養箱：SANYO CO₂ Incubator (5% CO₂)

冷凍離心機：HITACHI (himac CF 7D2)

Microplate reader(UV)：BIO-RAD Model 3550 Microplate reader

均質機：TAITEC (Microincubator M-36)

抽液幫浦：日本理化學器材株式會社 (NRK, UP2 型)

-30°C 凍箱：SANYO (Medicool, MPR-411F)

Pipet-Aid XP (用來吸放細胞)

Eppendorf (Micropipet, 微量取樣器) 0.1~2.5, 50~200, 200~1000 μ L

多次分樣器（吸一次量為 2.5mL，每按一次可設定 50~250 μ L 的量）

二、實驗方法

(一) 一氧化氮測定 (NO Assay)⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾

每 200 μ L（調整細胞濃度 1.2×10^6 個/mL）細胞分注至 96 孔盤（Sumitomo Bakelite, #8096R, Tokyo）中，37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳培養箱中培養一小時，加刺激物 LPS (*Escherichia coli*) (100ng/mL, Sigma)、IFN- γ (0.33ng/mL, Genzyme)，並加入樣本 DMSO 溶液 0.4 μ L，將 96 孔盤置於 37 $^{\circ}$ C 二氧化碳培養箱培養 16 小時，取出上清液 100 μ L（剩餘細胞留待 MTT assay 檢測細胞毒性），加入 Griess reagent [0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride 溶液 (1mg/mL, Wako)、1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄ 溶液] 各 50 μ L，呈色，十分鐘後以 Microplate Reader (BIO-RAD, Model 3550) 570nm 測吸光度，將亞硝酸根離子(Nitrite)定量。

(二) 細胞存活率測定 (MTT Assay)⁽⁸⁹⁾

MTT 法是一種檢測哺乳類細胞存活和生長的方法。MTT 是一種能接受氫原子的黃色染料，化學名為 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide，商品

名是噻唑藍。哺乳類動物活細胞粒腺體中的琥珀酸脫氫酶能使外源性的 MTT 還原為難溶性的藍紫色結晶物 (formazan) 並沈積在細胞中，而死細胞則無此功能。DMSO 能溶解細胞中的紫色結晶物，用 ELISA 在 570nm 波長處測定其光吸收值，在一定細胞數量範圍內，MTT 結晶物形成的量與活細胞數量成正比，因此由吸光值可間接反應其活細胞數量，故可用於檢驗 NO 活性抑制藥物給藥後巨噬細胞存活率。

當取完上清液 100 μ L 後，剩餘細胞溶液再加入 25 μ L MTT 溶液(2 mg/mL)，置於 37 $^{\circ}$ C 二氧化碳培養箱培養 4 小時，將上清液倒掉，加入 150 μ L DMSO 將深藍色結晶物 (formazan) 混和均勻，等待數分鐘讓結晶物完全溶解，即可以 Microplate Reader (BIO-RAD, Model 3550) 570nm 測吸光度。

第二節 半枝蓮及其成分 scutellarein 鎮痛作用之研究

一、實驗材料

(一) 實驗材料之製備

本實驗材料半枝蓮購自台中市漢強中藥行，經本校中國藥學研究所邱年永技正鑑定及比對藥用植物形態學或以生藥學書籍比對藥材之外部形態確立其基原。

將半枝蓮以 50%乙醇室溫浸泡 72 小時後，用紗布過濾，收集濾液，如此反覆三次，合併濾液，在 40°C 下減壓濃縮至乾，即得半枝蓮 50%乙醇粗提取物(簡稱為 SR_{EtOH})。

本實驗所採用之藥品高山黃芩素 (scutellarein) 購自法國 Extrasynthese 公司，實驗當天以 tween 80 助溶，並用二次水新鮮配置。

(二) 實驗動物

本實驗採用之動物為國家實驗動物中心、及樂思科生物科技公司所提供之 ICR 系雄性小鼠，體重 18~25 公克。

飼養於溫度控制在 23 ± 1°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。

(三) 實驗試藥

1. 醋酸 (acetic acid) 購自 Merck。
2. 福馬林 (formalin) 購自日本試藥株式會社。
3. Indomethacin 購自 Sigma。
4. Ethyl Ether 購自日本島九藥品株式會社。

二、 實驗方法

(一) 扭體反應試驗 (writhing response test) :

將不同劑量之 SR_{EtOH} (0.5、1.0 g/kg) 口服給予及半枝蓮成分高山黃芩素 scutellarein (10、20 mg/kg) 腹腔注射給予，30分鐘後由腹腔注射1% 醋酸溶液，小鼠每10g體重給予0.1 ml，用以誘發扭體反應，將小鼠置於觀察箱中，5分鐘後開始觀察，並以計數器記錄注射醋酸後5-15分鐘內，小鼠腹部因醋酸溶液引起的肌肉收縮，其所伴隨之扭體次數⁽⁶²⁾，並以 indomethacin (10 mg/kg) 為正對照組，於注射醋酸前20分鐘腹腔注射給藥。

(二) 福馬林試驗 (formalin test) :

福馬林誘發舔蹠反應試驗，採用經 Dubuisson 及 Dennis⁽⁶⁸⁾ 修飾後的方法，將不同劑量之 SR_{EtOH} (0.5、1.0 g/kg) 口服給予及 scutellarein

(10、20 mg/kg) 腹腔注射給予後 30 分鐘，用微量注射器以 27 號針頭，在小鼠右後足背，皮下注射 20 μ l 的 5% 福馬林溶液，立即將小鼠置入觀察箱中，觀察並每隔 5 分鐘記錄小鼠舔其足蹠（右後腳背注射福馬林的部位）之累積秒數，共記錄 30 分鐘⁽⁹⁰⁾。將 0-5 分鐘之累積舔蹠秒數稱為早期或第一相（early phase; first phase）之痛覺反應時間，而 20-30 分鐘之累積舔蹠秒數稱為晚期或第二相（late phase; second phase）之痛覺反應時間。並以 indomethacin（10 mg/kg）為正對照組，於注射福馬林前 20 分鐘腹腔注射給藥。



第三節 半枝蓮及其成分 scutellarein 對 λ -carrageenan 誘發足蹠發炎 之抗發炎機轉研究

一、實驗材料

(一) 實驗材料之製備

同上一節鎮痛作用之實驗材料。

(二) 實驗動物

同上一節鎮痛作用之實驗動物。

(三) 實驗試藥

1. 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP)、thiobarbituric acid (TBA)、butylated hydroxytoluene (BHT)、 λ -carrageenan、indomethacin：購自 Sigma 公司。
2. Ethyl Ether購自日本島九藥品株式會社。
3. GSH-Px kits：Art. J68131，購自 Randox。
4. SOD kits：Art. ORD04，購自 Randox。
5. GSH-Rd kits：Art. 21023 購自 Oxis Research。
6. NO kits：購自 Cayman。

(四) 實驗儀器

- 1、浮腫測定儀器 NK-101 CMP PLETHYSMOMETER (Muromachi)。

2、酵素免疫分析儀：Powerwave X 340 Microplate。

Spectrophotometer (Bio-Tek instruments INC.)

3、高速冷凍離心機：HERMLE Z233MK-2 (組織檢品離心用)。

4、高速冷凍離心機：Backman GS-6R (血清檢品離心用)。

5、全自動生化分析儀：Roche 公司 COBAS MIRA plus。

6、均質機 POLYTRON PT 1200：造鑫企業有限公司。

二、實驗方法

(一) 角叉菜膠致大鼠足蹠腫脹之影響

用記號筆在小鼠右後肢踝關節周圍做一標記，將小鼠右後肢浸入浮腫測定儀器，測量正常足蹠容積後，分別在小鼠右後肢足蹠皮下注射1% λ -carrageenan混懸液 (0.1 ml/隻) 致炎⁽³³⁾。誘導2.5小時後，將小鼠分別以不同劑量之SR_{EtOH} (0.5、1.0 g/kg) 口服給予及scutellarein (10、20 mg/kg) 腹腔給予，正對照組於誘導後1.5小時，皮下注射indomethacin (10 mg/kg)，給藥量皆為 0.1 ml/10g。給藥後隨後每隔1小時皆按上法，各測一次足蹠容積，連續測7小時，記錄結果，並分別計算誘導後每小時足蹠體積與誘導前個別足蹠之體積差 (ΔV)。

(二) 角叉菜膠誘導小鼠足蹠腫脹作用機轉之探討

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 2 小時後，將小鼠分別以不同劑量之 SR_{EtOH} (0.5、1.0 g/kg) 口服給予及其成分 scutellarein (10、20 mg/kg) 腹腔注射。正對照組於誘導後 1.5 小時腹腔注射 indomethacin (10 mg/kg)，給藥量皆為 0.1 ml/10g。給藥後 1 小時，將動物犧牲，並取其肝大葉及腳組織，用於探討 SR_{EtOH} 及其成分 scutellarein 對肝及腳組織氧化傷害有無保護作用，並探討肝臟抗氧化酵素活性與腳組織 NO 及 MDA 含量變化。

(三) 肝組織抗氧化酵素活性測定：

1. SOD 之測定 (super oxide dismutase assay)

本實驗方法依據 1984 年，Kakkar 和 Viswanathan⁽⁹¹⁾ 提出之方法，取肝組織 0.5 g，加入 0.5 ml 0.9% 的 Normal Saline，以均質機均質，取 300 μ l 均質液於試管中，加入 1.8 ml 冷的二次去離子水，4°C、冷藏 15 分鐘，混合均勻。取 20 μ l 的混合液加入 120 μ l 0.1M Phosphate buffer (CAPS 40 mmol/L、EDTA 0.94 mmol/L，PH7.0) 均勻混合，最終，取 5 μ l 混合液加入 340 μ l Mixed Substrate1 (xanthine 0.05 mmol/L、I.N.T 0.025 mmol/L)，再加入 xanthine oxidase 呈色，混合均勻後於波長 505 nm，反應溫度 37°C 下測量吸光值，每隔 30 秒測量一

次，總共測量 3 分鐘，計算每分鐘吸光值變化速率，以多重校正曲線計算濃度⁽⁹²⁾。SOD 活性以單位時間內抑制 I.N.T 自動氧化速率為一單位 (U)，肝組織內 SOD 比活性以 U/mg protein 表示。

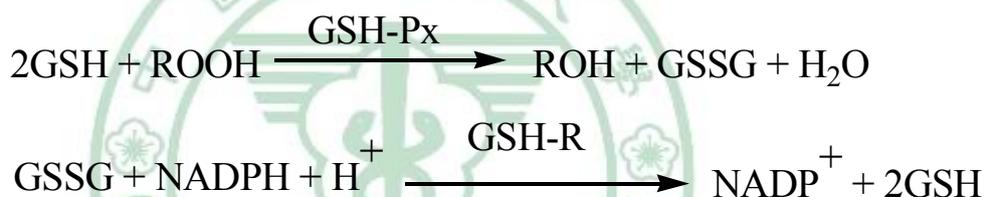
2. GSH-Rd 之測定 (glutathione reductase assay)

本實驗方法依據 1966 年，Guntherberg 與 Rost 提出之方法⁽⁹³⁾，主要利用 NADPH 來測量 GSH-Rd 的活性，NADPH 在波長 340nm 下具有吸光值，而 NADPH 經由 GSH-Rd 作用下代謝變成 NADP，吸光值會下降，所以 GSH-Rd 活性與吸光值呈反比。

取肝組織 0.5 g，加入 0.5 ml 0.9% 的 normal saline 均質，取 10 μ l 的均質液，加入 190 μ l 的 precipitation reagent (trichloroacetic acid in water) 混合均勻，離心 3000g, 4°C、10 分鐘。取上清液 50 μ l 於 Cuvette 中，依序加入等量 50 μ l 的 Buffer (potassium phosphate、diethylenetriamine pentaacetic acid、Lubrol、PH 7.8)，Reducing agent (tris(2-carboxyethyl) phosphine in HCl)，Chromogen (1-methyl-4-chloro-7-trifluoromethyl-quinolinium methylsulfate in HCl)，Color developer (NaOH in water) 混合均勻，於波長 340 nm 下測量吸光值⁽⁹⁴⁾，肝組織內 glutathione reductase 活性以 U/mg protein 表示。

3. GSH-Px 之測定(glutathione peroxidase assay)

本法根據 Paglia 及 Valentine (1967)所提出之方法為基礎，利用 glutathione 及 cumene hydroperoxide 與 GSH-Px 作用，再以 NADPH 與 glutathione reductase 將氧化態的 GSSG (oxidised glutathione)迅速轉成還原態，伴隨著 NADPH 氧化成 NADP^+ ，以吸光值之減少速率來定義 GSH-Px 之活性⁽⁹⁵⁾。



取肝組織 0.5 g，加入 0.5 ml 0.9% 的 normal saline 均質，取均質液 50 μl ，加入 1 ml 的 diluting agent 稀釋，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⁽⁹⁶⁾，計算吸光值變化速率(U/L)，肝組織內 glutathione peroxidase 活性以 U/mg protein 表示。

(四) 腳組織一氧化氮 (NO) 及丙二醛 (MDA) 含量測定

取小鼠右後腳組織，以冷的 0.9 % normal saline 沖洗，迅速加入四倍的 0.9 % normal saline 均質，並以 4°C、12000 rpm 離心 5 分鐘。取上層液，使用 10 KD 濾膜過濾，濾液以 12000 rpm 離心 30 分鐘後，取下層液貯於-20°C 冰箱備用。

1. NO 之測定

目前測定組織中 NO 含量的方法，利用 NO_2^- 可與 sulfanilamide 發生重氮化，再與 naphthylethylenediamine 偶聯，生成紫紅色產物，在波長 540nm 下具有吸光值，利用此原理可測定分析 NO 含量。

(1) NO 標準曲線製作

將 Assay Buffer 用二次水稀釋到 100 ml。(於 4°C 下，可儲存 2 個月)。

取 1.0 ml assay buffer，加入 Nitrate standard vial 瓶中。

取 1.2 ml assay buffer，加入 Enzyme Cofactors vial 瓶中。

取 1.2 ml assay buffer，加入 Nitrate Reductase vial 瓶中。

依下表一；依序加入下列藥品

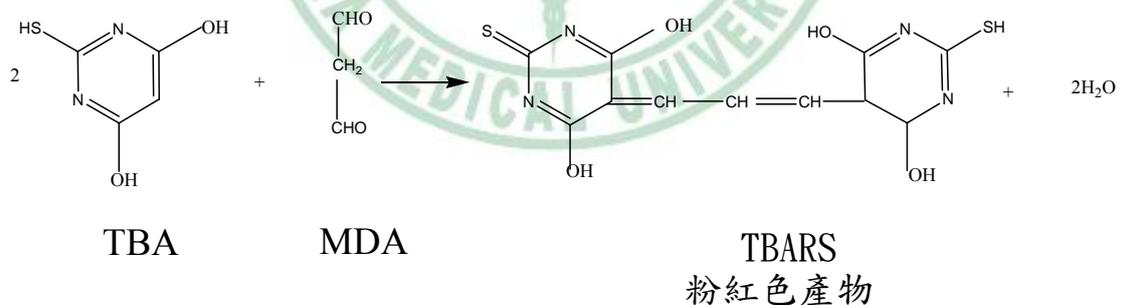
表一 NO 標準曲線溶液配製方式

well	Nitrate conc. (μ M)	Nitrate std. (μ L)	Assay buffer (μ L)
A1	0	0	80
B1	5	5	75
C1	10	10	70
D1	15	15	65
E1	20	20	60
F1	25	25	55
G1	30	30	50
H1	35	35	45

加入 10 μ l 的 Enzyme Cofactors 及 Nitrate Reductase，置於室溫下三小時。再加入 50 μ l 的 griess reagent 1 及 griess reagent 2，室溫下等待 10 min。於 540 nm 下測吸光值。

2. MDA 之測定

參考 Tatum 與 Changchic 1990 之方法⁽⁹⁷⁾，採用 TBA 法(硫代巴比妥酸法)測定，TBA 法為測量脂肪酸、細胞膜和生物組織脂質過氧化的最古老也是應用最多的方法，本法利用硫代巴比妥酸 (TBA) 可以和脂質過氧化的最終產物丙二醛 (MDA) 反應，在 pH3.0 左右加熱生成紅色複合物(TBARS)，在 532nm 處有一特徵吸收。採集樣品，在酸性條件下與 TBA 共同加熱就可以形成 TBARS 粉紅色產物，用有機溶劑抽提，再以分光光度計就可測量該樣品中脂質過氧化物的含量。TBA 與丙二醛反應如下所示：



(1)MDA 標準溶液配置

TEP(1'1'3'3'-tetraethoxy propane) , 50 μ l 加 40 %乙醇至 25 ml , 取上述配製液體 250 μ l , 加 40 %乙醇至 50 ml , 即完成 TEP 試液配製(於 4°C 下避光 , 可儲存兩週) 。以 0.01N 的 HCl , 將 TEP intermediate standard solution , 依下表二稀釋成 MDA 標準溶液備用。(於 4°C 下 , 可儲存 1 週) 。

表二 MDA 標準溶液配製方式

MDA conc. (μ M)	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
0.01N HCl (mL)	9.85	9.7	9.4	8.8	7.6	5.2

(2)MDA 標準曲線製作

0.2 g TBA 加入 50 ml、0.2 N HCl，以磁石攪拌器攪拌溶解。(於 4°C 下，可儲存 1 週)。0.1g BHT，加入 50ml，95 %乙醇溶解。(避光，於 4°C 下，可儲存 1 週)。取 7 管 enpendoff(包鋁箔)，依下表三；依序加入下列藥品

表三 MDA 標準曲線製作方式

試藥	BHT 試液	MDA 標準品	TBA 試液
濃度			
Blank	45 μ L	100 μ L, 0.01N HCl	300 μ L
0.625 μ M	45 μ L	取 0.625 μ M MDA 標準品 100 μ L	300 μ L
1.25 μ M	45 μ L	取 1.25 μ M MDA 標準品 100 μ L	300 μ L
2.5 μ M	45 μ L	取 2.5 μ M MDA 標準品 100 μ L	300 μ L
5 μ M	45 μ L	取 5 μ M MDA 標準品 100 μ L	300 μ L
10 μ M	45 μ L	取 10 μ M MDA 標準品 100 μ L	300 μ L
20 μ M	45 μ L	取 20 μ M MDA 標準品 100 μ L	300 μ L

將其以震盪器混合均勻，置於 90°C 水浴鍋中加熱 45 分鐘。取出

置於室溫冷卻 10 分鐘，加入(495 μ l)正丁醇，混合搖盪 1 分鐘。4°C、12000 rpm，離心 5 分鐘。取上層液(粉紅色)，於 532 nm 下測吸光值。

第四節 統計學分析

本研究所得之數據，均以 Oneway ANOVA analysis 分析變異數，再以 Scheffe's multiple range test 檢定其間差異之顯著性，凡 p 值小於 0.05 以下時，則認為有統計意義。



第四章 實驗結果

第一節 八十七種中草藥及半枝蓮成分漢黃芩素(wogonin)、黃芩素(baicalein)、高山黃芩素(scutellarein)對 LPS 與 INF- γ 誘發巨噬細胞 264.7 產生 NO 之抑制活性試驗

一、八十七種中草藥對 LPS 與 INF- γ 誘發巨噬細胞 264.7 產生 NO 之抑制活性試驗

八十七種中草藥 50%乙醇粗抽物對 LPS 與 IFN- γ 誘導巨噬細胞 (RAW264.7) 產生一氧化氮 (NO) 之抑制率及細胞毒性作用如表四所示，發現其中共有 15 種具有很好的 NO 抑制活性，其抑制率都在 80% 以上，包括

艾納香 *Blumea balsamifera* (L.) DC. (IC₅₀: 30.03 μ g/mL);

鵝不食草 *Centipeda minima* (L.) A. Br. & Ascher. (IC₅₀: 7.34 μ g/mL);

馬藍 *Kalimeris indica* (L.) Sch. Bip. (IC₅₀: 32.37 μ g/mL);

葉下珠 *Securinega suffruticosa* (Pall.) Rehd. (IC₅₀: 26.12 μ g/mL);

廣東紫花地丁 *Gentiana loureirii* (G. Don) Griseb. (IC₅₀: 13.5 μ g/mL);

半枝蓮 *Scutellaria rivularis* Wall. (IC₅₀: 38.28 μ g/mL);

益母草 *Leonurus artemisia* (Lour.) S. Y. Hu (IC₅₀: 37.46 μ g/mL);

廣東香思子 *Abrus cantoniensis* Hance (IC₅₀: 68.31 µg/mL);
龍鬚藤 *Bauhinia championii* (Benth.) Benth. (IC₅₀: 40.47 µg/mL);
丁葵草 *Zornia gibbosa* Spanoghe (IC₅₀: 40.12 µg/mL);
剛毛尖子木 *Oxyspora vagans* (Roxb.) Wall. (IC₅₀: 19.79 µg/mL);
地瓜榕 *Ficus tikoua* Bur. (IC₅₀: 17.51 µg/mL);
仙鶴草 *Agrimonia pilosa* Ledeb. (IC₅₀: 27.44 µg/mL);
細葉水團花 *Adina rubella* Hance (IC₅₀: 3 µg/mL) 及
深綠卷柏 *Selaginella doederleinii* Hieron. (IC₅₀: 47.11 µg/mL) 等。

另外，

漢中防己 *Aristolochia kaempferi* Willd. f. *heterophylla* (Hemsl.) S.

M. Hwang、

漢防己 *Stephania tetrandra* S. Moore、

紫金牛 *Ardisia japonica* (Hornsted) Blume 及

山芝麻 *Helicteres angustifolia* L. 等四種植物之乙醇粗抽物 NO 抑

制率都在 80% 以上，但經由 MTT 細胞毒性試驗發現具有細胞毒。

Table 4. Inhibition activity of 87 species of traditional Chinese herbs on NO production by a murine macrophage-like cell line, RAW264.7, activated with lipopolysaccharide and interferon- γ and the viability of macrophage by the MTT assay.

	Plant	Family	Plant Part	NO ^a (%)	IC ₅₀ (μ g/mL)	MTT ^b (%)
1	<i>Gendarussa ventricosa</i> (Wall.) Nees 黑葉接骨草	Acanthaceae	whole plant	22.02 \pm 1.61	—	107.53
2	<i>Peristrophe baphica</i> (Spreng.) Bremek. 野靛青	Acanthaceae	whole plant	48.53 \pm 2.88	—	97.21
3	<i>Actinidia chinensis</i> Planch. var. <i>setosa</i> Li 台灣羊桃	Actinidiaceae	stem	12.60 \pm 3.33	—	101.60
4	<i>Actinidia collosa</i> Lindl. 硬齒獼猴桃	Actinidiaceae	stem	20.33 \pm 3.15	—	100.28
5	<i>Actinidia latifolia</i> (Gardn. & Champ.) Merr. 闊葉獼猴桃	Actinidiaceae	stem	14.43 \pm 2.15	—	109.03
6	<i>Actinidia rubricaulis</i> Dunn 紅莖獼猴桃	Actinidiaceae	stem	20.33 \pm 3.17	—	92.74
7	<i>Achyranthes aspera</i> L. 土牛膝	Amaranthaceae	root	72.41 \pm 2.32	—	97.39
8	<i>Aristolochia fangchi</i> Y.C.Wu & L.D.Chow & S.M.Hwang 廣防己	Aristolochiaceae	root	48.46 \pm 3.9	—	110.76
9	<i>Aristolochia kaempferi</i> Willd. f. <i>heterophylla</i> (Hemsl.) S. M. Hwang 漢中防己	Aristolochiaceae	root	103.37\pm4.35	—	38.47
10	<i>Aristolochia moupinensis</i> Franch. 川防己	Aristolochiaceae	stem	67.89 \pm 4.14	—	114.6
11	<i>Mahonia bealei</i> (Fort.) Carr. 闊葉十大功勞	Berberidaceae	stem	62.45 \pm 0.76	—	106.56

	Plant	Family	Plant Part	NO ^a (%)	IC ₅₀ (µg/mL)	MTT ^b (%)
12	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr. 鳳梨	Bromeliaceae	peel	36.72±2.06	—	99.36
13	<i>Lobelia chinensis</i> Lour. [<i>L. radicans</i> Thunb.] 半邊蓮	Campanulaceae	whole plant	24.59±0.75	—	110.51
14	<i>Lonicera hypoglauca</i> Miq. 菰腺忍冬	Caprifoliaceae	dry flower bud	66.18±1.53	—	91.27
15	<i>Drymaria cordata</i> (L.) Willd. ex Roem. & Schult. 荷蓮豆	Caryophyllaceae	whole plant	28.42±1.02	—	96.3
16	<i>Euonymus fortunei</i> (Turcz.) Hand. Mazz. 扶芳藤	Celastraceae	trig with leaf	36.72±2.16	—	107.1
17	<i>Laggera alata</i> (D. Don) Sch. Bip. ex Oliv. 六稜菊	Compositae	whole plant	30.75±1.13	—	113.29
18	<i>Blumea balsamifera</i> (L.) DC. 艾納香	Compositae	whole plant	105.81±1.04	30.03	80.52
19	<i>Centipeda minima</i> (L.) A. Br. & Ascher. 鵝不食草	Compositae	whole plant	104.56±2.04	7.34	78.65
20	<i>Elephantopus scaber</i> L. 地膽草	Compositae	whole plant	34.02±1.42	—	111.39
21	<i>Kalimeris indica</i> (L.) Sch. Bip. 馬藍	Compositae	whole plant	91.91±1.81	32.37	93.34
22	<i>Senecio scandens</i> Buch. Ham. 千里光	Compositae	whole plant	58.09±2.83	—	101.92
23	<i>Taraxacum mongolicum</i> Hand. Mazz. 蒲公英	Compositae	whole plant	76.14±1.74	—	106.36
24	<i>Xanthium sibiricum</i> Patr.. 蒼耳	Compositae	fruit	46.06±2.29	—	108.83
25	<i>Erycibe subspicata</i> Wall. ex G. Don 錐序丁公藤	Convolvulaceae	stem	35.12±1.42	—	94.92

	Plant	Family	Plant Part	NO ^a (%)	IC ₅₀ (µg/mL)	MTT ^b (%)
26	<i>Porana racemosa</i> Roxb.var. <i>tomen tella</i> Wu 毛葉飛娥藤	Convolvulaceae	whole plant	70.04±1.22	—	86.67
27	<i>Gynostemma pentaphyllum</i> (Thunb.) Makino 絞股蘭	Cucurbitaceae	whole plant	34.55±1.44	—	113.65
28	<i>Cibotium barometz</i> (L.) J. Smith [<i>Polypodium barometz</i> L.] 狗脊	Dicksoniaceae	rhizome	36.84±3.4	—	102.6
29	<i>Antidesma montanum</i> Bl. 山地五月茶	Euphorbiaceae	leaf	53.97±1.45	—	106.91
30	<i>Glochidion eriocarpum</i> Champ. ex Benth.毛果算盤子	Euphorbiaceae	leaf	57.88±2.8	—	97.93
31	<i>Mallotus apelta</i> (Lour.) Muell. Arg. 白背葉	Euphorbiaceae	leaf	77.59±1.89	—	111.64
32	<i>Securinega suffruticosa</i> (Pall.) Rehd. 葉下珠	Euphorbiaceae	twig with leaf	90.67±2.07	26.12	103.79
33	<i>Gentiana loureirii</i> (G. Don) Griseb. 廣東紫花地丁	Gentianaceae	whole plant	98.81±2.53	13.5	97.03
34	<i>Imperata cylindrica</i> (L.) Beauv. var. <i>major</i> (Nees) C. E. Hubb. 白茅根	Gramineae	rhizome	23.98±1.28	—	99.17
35	<i>Hypericum japonicum</i> Thunb. 地耳草	Guttiferae	whole plant	77.18±2.52	—	111.34
36	<i>Salacia polysperma</i> Hu 多籽五層龍	Hippocrateaceae	root	52.38±1.11	—	109.06
37	<i>Scutellaria rivularis</i> Wall. [<i>S. barbata</i> D. Don] 半枝蓮	Labiatae	whole plant	92.86±1.65	38.28	95.59
38	<i>Clerodendranthus spicatus</i> (Thunb.) C.Y. Wu ex H.W. Li 貓鬚草	Labiatae	whole plant	52.28±2.45	—	109.71

	Plant	Family	Plant Part	NO ^a (%)	IC ₅₀ (µg/mL)	MTT ^b (%)
39	<i>Leonurus artemisia</i> (Lour.) S. Y. Hu 益母草	Labiatae	whole plant	81.12±0.93	37.46	109.57
40	<i>Rabdosia nervosa</i> (Hemsl.) C.Y. Wu & H.W. Li 顯脈香茶菜	Labiatae	whole plant	74.27±2.07	—	111.98
41	<i>Rabdosia ternifolia</i> (D. Don) Hara 牛尾草	Labiatae	whole plant	33.53±3.44	—	111.18
42	<i>Sargentodoxa cuneata</i> (Oliv.) Rehd. & Wils. [<i>Holboellia</i> <i>cuneata</i> Oliv.] 大血藤	Lardizabalaceae	stem	17.68±1.48	—	108.09
43	<i>Abrus cantoniensis</i> Hance 廣東相思子	Leguminosae	whole plant	95.64±1.62	68.31	111.59
44	<i>Bauhinia championii</i> (Benth.) Benth. 龍鬚藤	Leguminosae	root or stem	85.68±2.2	40.47	104.19
45	<i>Bauhinia variegata</i> L. 粉花羊蹄甲	Leguminosae	root	30.56±2.14	—	111.37
46	<i>Derris robusta</i> (DC.) Benth. 大魚藤樹	Leguminosae	stem with root	46.83±2.49	—	103.12
47	<i>Lespedeza cuneata</i> (Dum. Cours.) G. Don 截葉鐵掃帚	Leguminosae	whole plant	39.42±2.21	—	103.45
48	<i>Sophora tonkinensis</i> Gagnep. 山豆根	Leguminosae	root	-161.84±1.79	—	102.92
49	<i>Zornia gibbosa</i> Spanoghe [<i>Zornia diphylla</i> (L.) Pers.] 丁葵草	Leguminosae	whole plant	89.21±1.79	40.12	109.81
50	<i>Strychnos wallichiana</i> Steud. ex DC. 方莖馬錢	Loganiaceae	seed	27.58±2.77	—	107.05
51	<i>Oxyspora vagans</i> (Roxb.) Wall. 剛毛尖子木	Melastomataceae	trig with leaf	96.03±1.47	19.79	101.10

	Plant	Family	Plant Part	NO ^a (%)	IC ₅₀ (μg/mL)	MTT ^b (%)
52	<i>Stephania tetrandra</i> S. Moore 漢防己	Menispermaceae	root tuber	102.98±3.11	—	22.97
53	<i>Tinospora sinensis</i> (Lour.) Merr.. 寬筋藤	Menispermaceae	stem	25.61±1.5	—	99.23
54	<i>Ficus pumila</i> L. 薜荔	Moraceae	stem with leaf	74.07±0.88	—	99.56
55	<i>Ficus tikoua</i> Bur. 地瓜榕	Moraceae	sycon ium 隱花果	100±3.29	17.51	79.98
56	<i>Psidium guajava</i> L. 番石榴	Myrtaceae	leaf	17.28±3.46	—	112.82
57	<i>Ardisia japonica</i> (Hornsted) Blume 紫金牛	Myrsinaceae	whole plant	103.53±1.93	—	44.82
58	<i>Ardisia solanacea</i> Roxb. 酸苔菜	Myrsinaceae	whole plant	53.97±2.88	—	108.2
59	<i>Embelia laeta</i> (L.) Mez 酸藤子	Myrsinaceae	whole plant	53.94±1.31	—	103.4
60	<i>Nervilia aragoana</i> Gaud. 綠背一點癩	Orchidaceae	whole plant	33.74±1.89	—	97.36
61	<i>Nervilia purpurea</i> (Hayata) Schltr. 紫背一點癩	Orchidaceae	whole plant	18.29±2.49	—	99.34
62	<i>Polygala fallax</i> Hemsl. 黃花倒水蓮	Polygalaceae	whole plant	55.39±2.17	—	105.97
63	<i>Polygala glomerata</i> Lour. var. <i>villosa</i> C.Y. Wu 長毛華南遠志	Polygalaceae	whole plant	25.52±0.72	—	104.54
64	<i>Drynaria fortunei</i> (Kunze) J. Smith 骨碎補	Polypodiaceae	rhizo me	34.96±1.98	—	112.66

	Plant	Family	Plant Part	NO ^a (%)	IC ₅₀ (µg/mL)	MTT ^b (%)
65	<i>Phellinus linteus</i> (Berk. & Curt.) Teng 桑黃	Polyporaceae	spore	33.54±1.59	—	95.65
66	<i>Clematis argenteilucida</i> (Levl. & Vant.) W.T. Wang 威靈仙	Ranunculaceae	stem	37.4±1.28	—	110.13
67	<i>Agrimonia pilosa</i> Ledeb. 仙鶴草	Rosaceae	whole plant	98.81±1.91	27.44	88.82
68	<i>Rosa laevigata</i> Michx. 金櫻子	Rosaceae	fruit	17.37±2.05	—	97.13
69	<i>Adina rubella</i> Hance 細葉水團花	Rubiaceae	whole plant	103.53±2.15	3	79.64
70	<i>Damnacanthus indicus</i> (L.) Gaertn. f. 虎刺	Rubiaceae	whole plant	33.40±1.66	—	98.18
71	<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis 黃梔子	Rubiaceae	fruit	46.03±2.98	—	105.32
72	<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis var. <i>grandiflora</i> Nakai 大花梔子	Rubiaceae	fruit	45.02±1.9	—	109.42
73	<i>Hedyotis diffusa</i> Willd. [<i>Oldenlandia diffusa</i> (Willd.) Roxb.] 白花蛇舌草	Rubiaceae	whole plant	25.61±1.5	—	109.63
74	<i>Mussaenda pubescens</i> Ait.f. 玉葉金花	Rubiaceae	stem with leaf	51.24±2.1	—	97.34
75	<i>Neonauclea griffithi</i> (Hook. f.) Merr. 新烏檀	Rubiaceae	trig	43.85±1.64	—	109.45
76	<i>Psychotria yunnanensis</i> Hutch. 雲南九節	Rubiaceae	whole plant	53.57±1.02	—	97.12
77	<i>Schizomussaenda dehiscens</i> (Craib) Li 裂果金花	Rubiaceae	stem with root	62.70±2.45	—	101.20

	Plant	Family	Plant Part	NO ^a (%)	IC ₅₀ (µg/mL)	MTT ^b (%)
78	<i>Selaginella doederleinii</i> Hieron. 深綠卷柏	Selaginellaceae	whole plant	83.61±3.48	47.11	98.87
79	<i>Picrasma quassioides</i> (D. Don) Benn. 苦木	Simarubaceae	bark	28.63±2.07	—	87.43
80	<i>Helicteres angustifolia</i> L. 山芝麻	Sterculiaceae	root	102.07±2.59	—	54.88
81	<i>Hydrocotyle sibthoroides</i> Lam. 天胡荽	Umbelliferae	whole plant	43.36±2.69	—	99.06
82	<i>Verbena officinalis</i> L. 馬鞭草	Verbenaceae	whole plant	38.17±0.72	—	94.67
83	<i>Viola philippica</i> Cav. (<i>Viola yedoensis</i> Makino) 紫花地丁	Violaceae	whole plant	49.39±2.01	—	116.73
84	<i>Ampelopsis japonica</i> (Thunb.) Makino [<i>Paullinia japonica</i> Thunb.] 白藜	Vitaceae	root tuber	48.42±4.3	—	128.5
85	<i>Cissus hastata</i> (Miq.) Planch. 戟葉白粉藤	Vitaceae	whole plant	34.23±0.6	—	96.75
86	<i>Tetrastigma crucistum</i> Craib & Gag. 十字崖爬藤	Vitaceae	whole plant	52.78±1.52	—	113.76
87	<i>Tetrastigma membranaceum</i> Wu & Wang 膜葉崖爬藤	Vitaceae	whole plant	75.20±3.03	—	104.84

^a: NO Production inhibitory activity, Inhibition (%) by (0.1 mg/mL)

^b: Viability (%) = the absorbance of Sample / the absorbance of Control ×

100%

二、Wogonin、baicalein、scutellarein 對 LPS 與 INF- γ 誘發巨噬細胞

264.7 產生 NO 之抑制活性試驗

wogonin、baicalein、scutellarein 對 LPS 與 INF- γ 誘發巨噬細胞 264.7

產生 NO 之抑制活性試驗結果如表五所示，均具有很好的 NO 抑制活

性，其中以 scutellarein 活性最佳，其 IC₅₀ 為 12.7±3.11 μ g/mL。



Table 5. Inhibition activity of wogonin, scutellarin, and baicalein on NO production by a murine macrophage-like cell line, RAW264.7, activated with lipopolysaccharide and interferon- γ and the viability of macrophage by the MTT assay.

Drugs	($\mu\text{g/mL}$)	NO ^a (%)	MTT ^b (%)
wogonin	100	85.83	78.52
	50	68.74	82.89
	25	43.78	98.95
	10	28.04	114.42
IC ₅₀		31.23 \pm 3.11	
scutellarein	100	100.2	85.52
	50	79.50	92.35
	25	56.83	95.23
	10	45.3	104.04
IC ₅₀		12.7 \pm 3.11	
baicalein	100	86.83	87.11
	50	50.55	96.69
	25	33.67	101.54
	10	20.76	115.63
IC ₅₀		48.72 \pm 3.11	

^a: NO Production inhibitory activity, Inhibition (%) by (0.1 mg/mL)

^b: Viability (%) = the absorbance of Sample / the absorbance of Control \times 100%

第二節 半枝蓮及其成分 scutellarein 鎮痛作用之研究

一、半枝蓮鎮痛作用

(一) 醋酸扭體反應試驗結果

如圖四結果顯示，腹腔注射 indomethacin (10 mg/kg) 與 SR_{EtOH} (0.5, 1.0 g/kg) 均可減少由醋酸所引起疼痛之扭體次數。

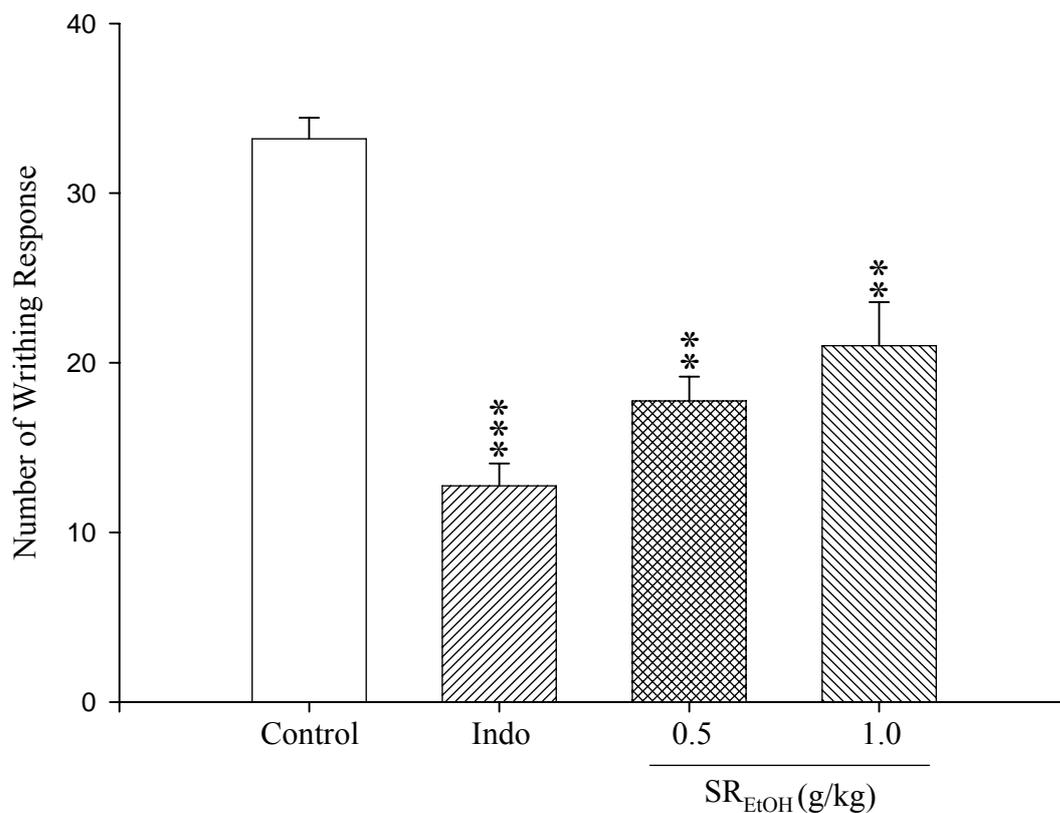


Figure 4. Analgesic effects of indomethacin and SR_{EtOH} on acetic acid (0.1 ml/10g) induced writhing response in mice. Each value represented as Mean \pm S.E.M (n=10). **P < 0.01, ***P < 0.001 as compared with the control group. (Oneway ANOVA followed by Scheffe's multiple range tests) Indo: indomethacin group.

(二)福馬林前期舔足試驗

如圖五結果顯示，腹腔注射 indomethacin (10 mg/kg) 與 SR_{EtOH} (0.5, 1.0 g/kg) 對減少小鼠福馬林誘發前期之舔足反應時間沒有明顯影響。

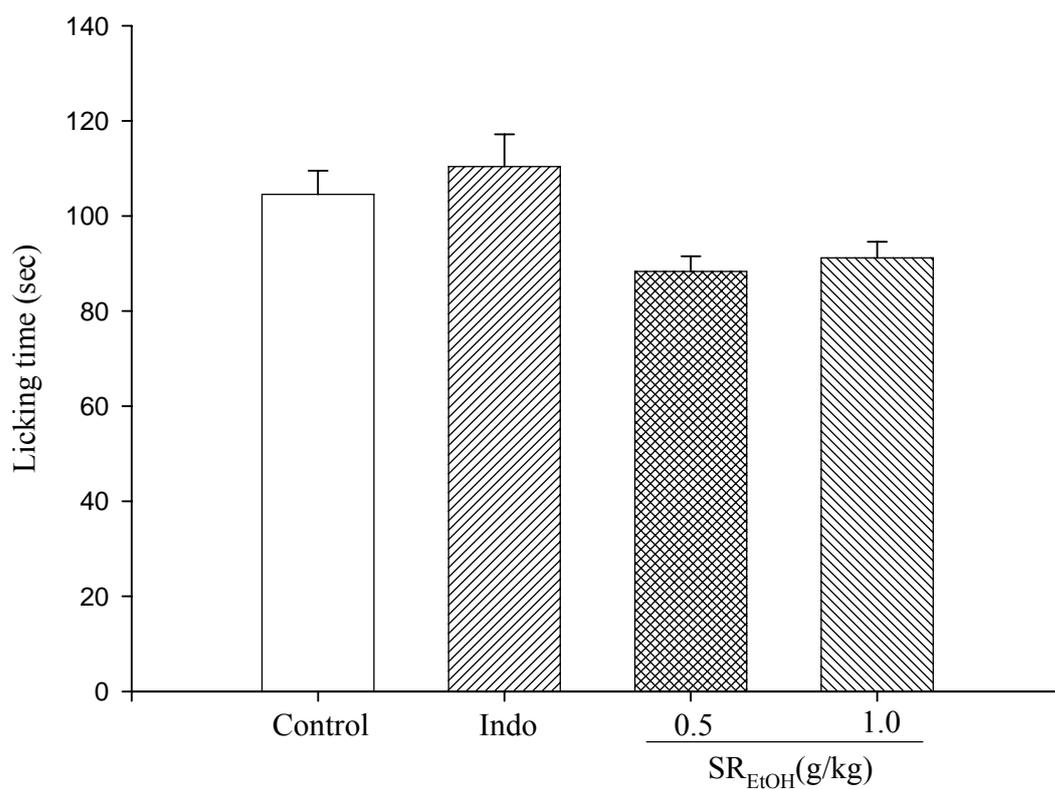


Figure 5. Analgesic effects of indomethacin and SR_{EtOH} on the early phase in the formalin test in mice. Indo: indomethacin group.

(三)福馬林後期舔足試驗

如圖六結果顯示，腹腔注射 indomethacin (10 mg/kg) 與 SR_{EtOH} (1.0 g/kg) 可明顯減少小鼠福馬林誘發後期之舔足反應時間

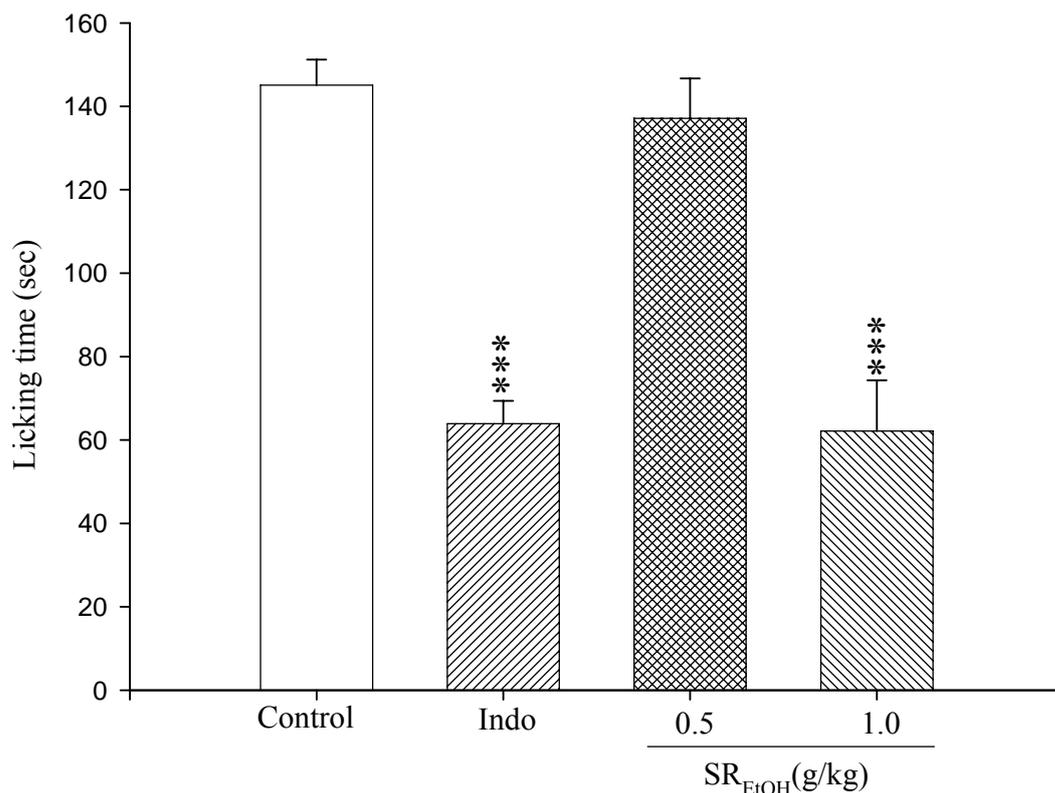


Figure 6. Analgesic effects of indomethacin and SR_{EtOH} on the late phase in the formalin test in mice. Indo: indomethacin group. *** $P < 0.001$ as compared with the control group. (Oneway ANOVA followed by Scheffe's multiple range test).

二、Scutellarein 鎮痛作用

(一) 醋酸扭體反應試驗結果

如圖七結果顯示，腹腔注射 indomethacin (10 mg/kg) 與 scutellarein (10, 20 mg/kg) 均可減少由醋酸所引起疼痛之扭體次數。

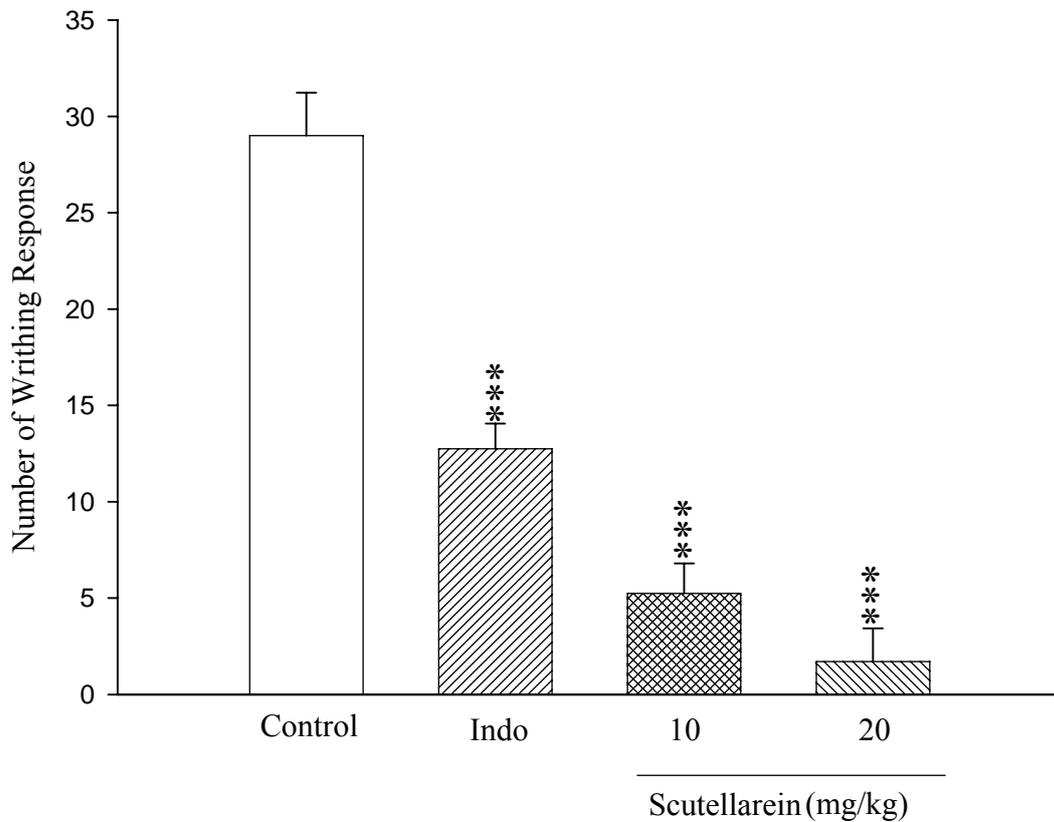


Figure 7. The effects of indomethacin and scutellarein on acetic acid-induced writhing response. Indo: indomethacin group. Each value represented as Mean \pm S.E.M (n=10). ***P < 0.001 as compared with the control group. (Oneway ANOVA followed by Scheffe's multiple range tests)

(二)福馬林前期舔足試驗

如圖八結果顯示，腹腔注射 indomethacin (10 mg/kg) 與 scutellarein (10, 20 mg/kg) 不能明顯減少小鼠福馬林誘發前期之舔足反應時間。

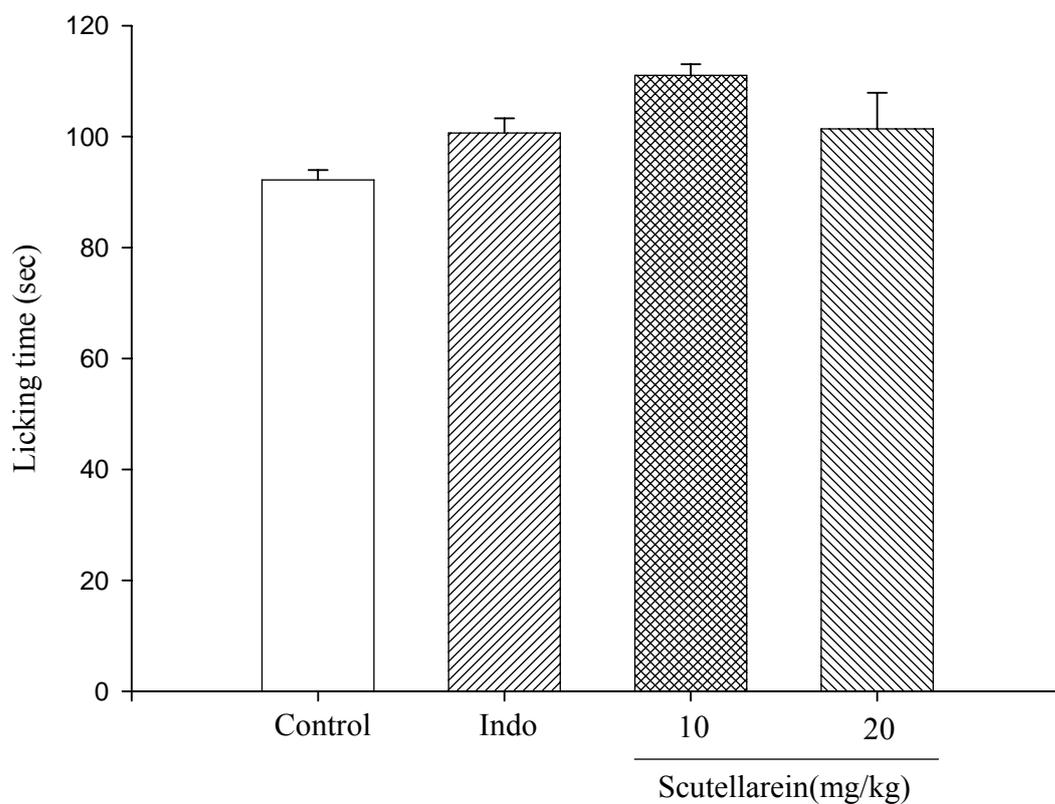


Figure 8. Analgesic effects of indomethacin and scutellarein on the early phase in the formalin test in mice. Indo: indomethacin group.

(三)福馬林後期舔足試驗

如圖九結果顯示，皮下給予 indomethacin (10 mg/kg) 與 scutellarein (10, 20 mg/kg) 可明顯減少小鼠福馬林誘發後期之舔足反應時間。

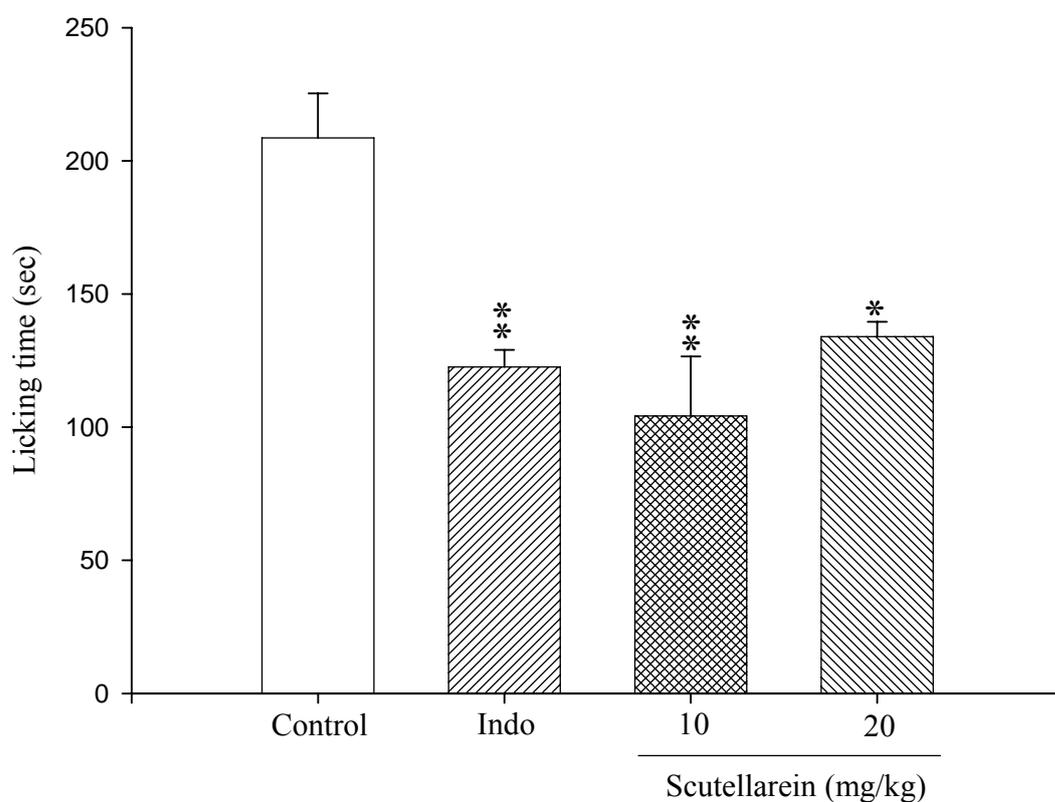


Figure 9. Analgesic effects of indomethacin and scutellarein on the late phase in the formalin test in mice. Indo: indomethacin group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ as compared with the control group. (Oneway ANOVA followed by Scheffe's multiple range test).

第三節 半枝蓮及其成分 scutellarein 對 λ -carrageenan 誘發足蹠發炎
之抗發炎機轉研究

一、半枝蓮對 λ -carrageenan 誘導足蹠腫脹的影響

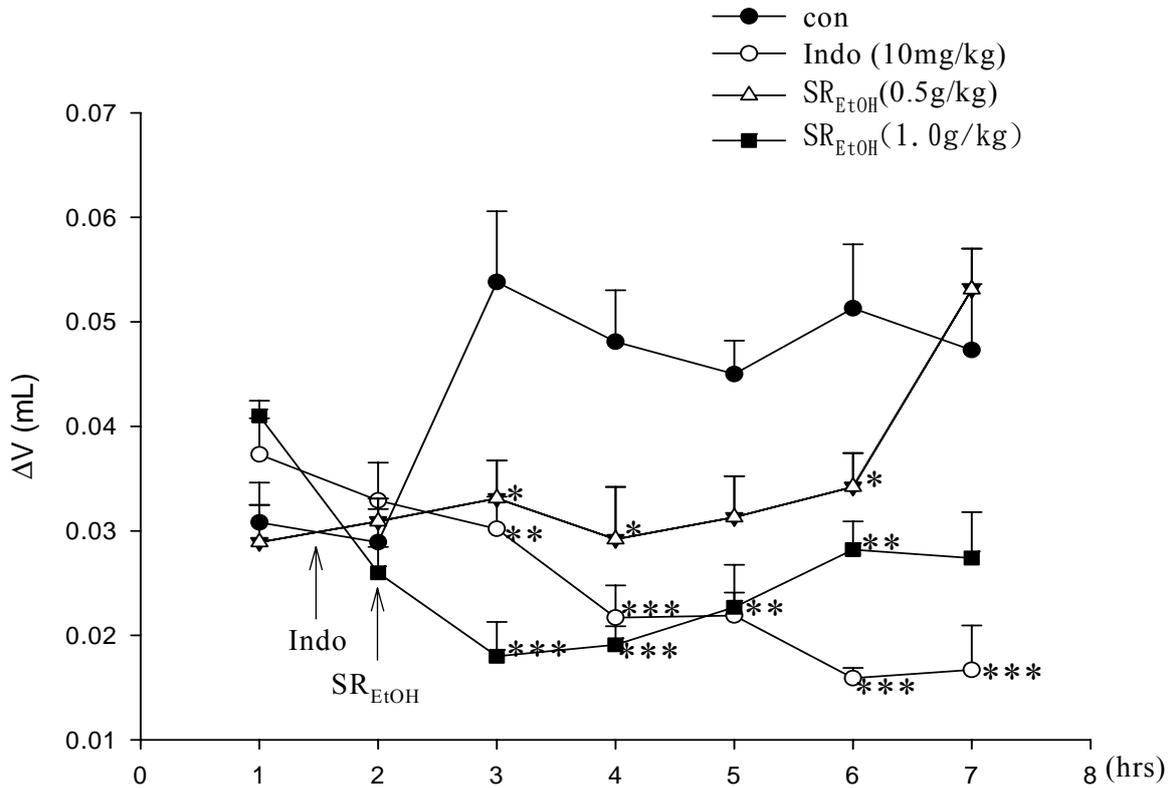


Figure 10. The effects of indomethacin and SR_{EtOH} extract on mice hind paw edema induced by λ -carrageenan. Each value repeated as mean \pm S.E.M (n=10). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 as compared with the λ -carrageenan group. (Oneway ANOVA followed by Scheffe's multiple range test).

二、Scutellarein 對 λ -carrageenan 誘導足蹠腫脹的影響及抗發炎機轉研究

(一) Scutellarein 對 λ -carrageenin 誘導足蹠浮腫的影響

如圖十一結果顯示，腹腔注射 indomethacin (10 mg/kg) 與 scutellarein (10, 20 mg/kg) 可明顯抑制 λ -carrageenin 誘導的急性足蹠浮腫。

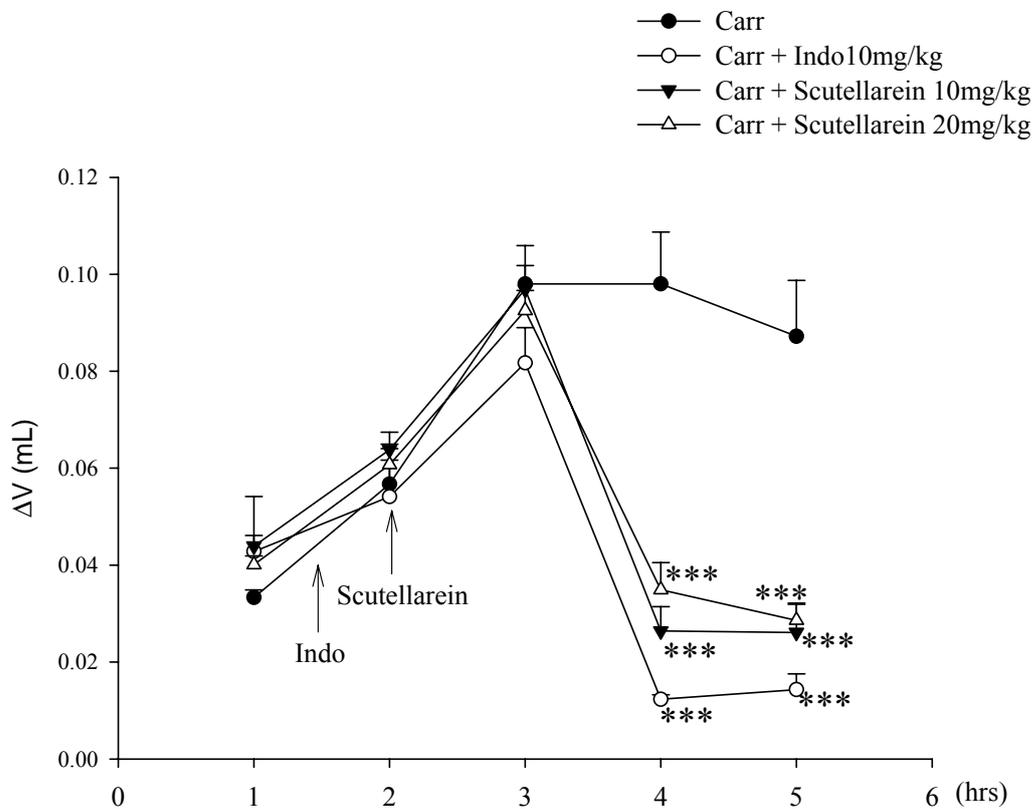


Figure 11. The effects of indomethacin and scutellarein on mice hind paw edema induced by λ -carrageenan. Each value represented as Mean \pm S.E.M (n=10). ***P < 0.001 as compared with the λ -carrageenan group. (Oneway ANOVA followed by Scheffé's multiple range tests)

(二) Scutellarein 抗氧化與抗發炎關係探討

1. Effect of scutellarein on NO level

如圖十二結果顯示 indomethacin(10 mg/kg)與 scutellarein(10 , 20 mg/kg) 皆能明顯降低 NO 的濃度。

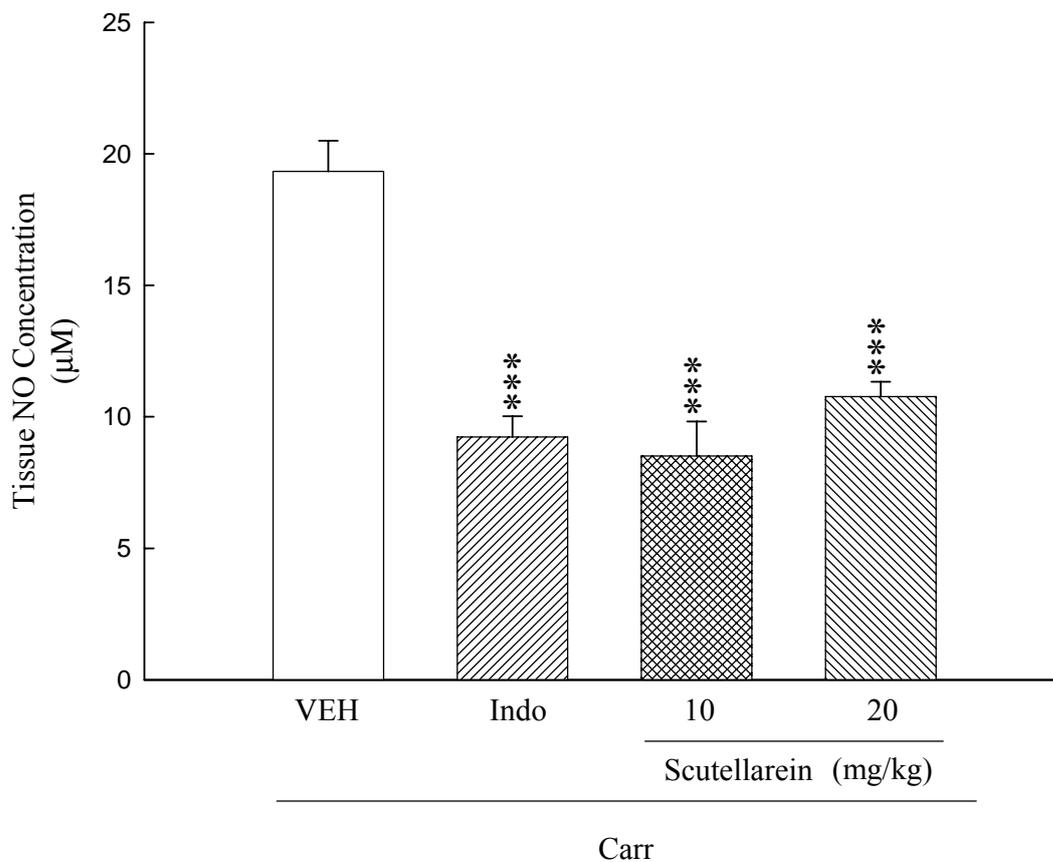


Figure 12. The effects of indomethacin and scutellarein on NO level induced by λ - carrageenan. Each value represented as Mean \pm S.E.M (n=10). ***P < 0.001 as compared with the VEH/Carr group. (Oneway ANOVA followed by Scheffe's multiple range tests) VEH: the vehicle control.

2. Effect of scutellarein on MDA level

如圖十三結果顯示 indomethacin(10 mg/kg)和 scutellarein(10 , 20 mg/kg) 皆能明顯降低 MDA 的濃度。

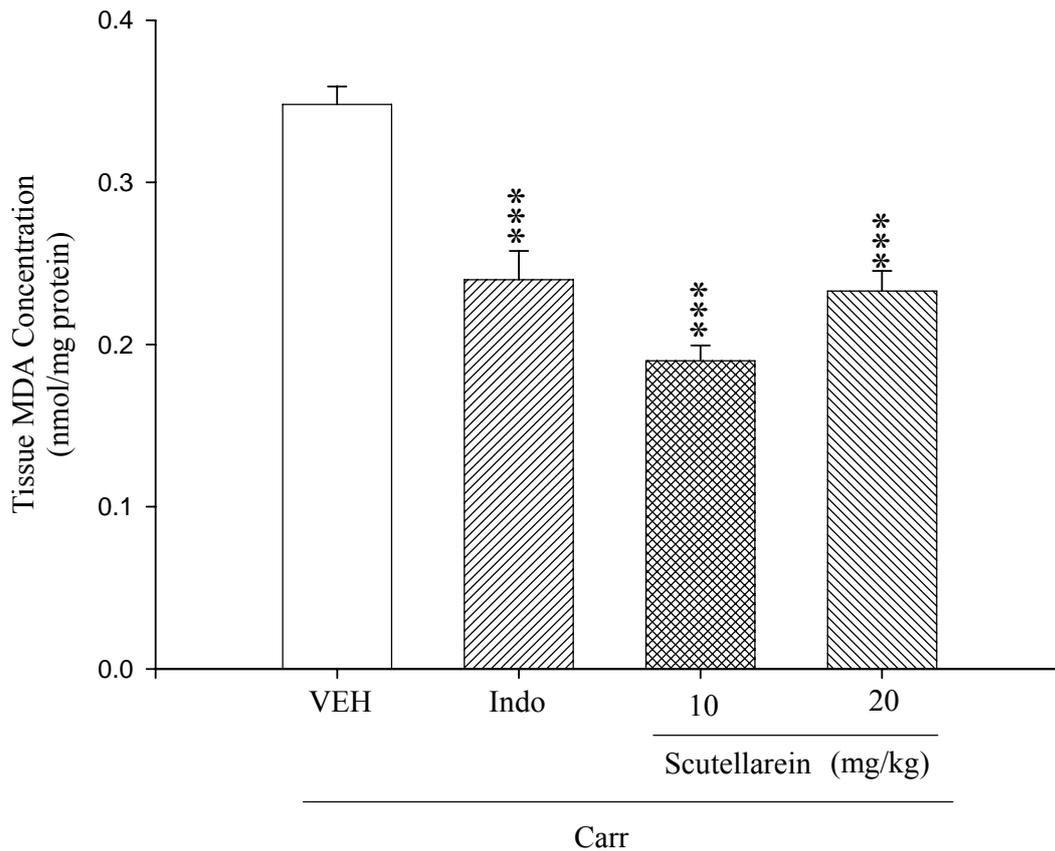


Figure 13. The effects of indomethacin and scutellarein on MDA level induced by λ - carrageenan. Each value represented as Mean \pm S.E.M (n=10). ***P < 0.001 as compared with the VEH/Carr group. (Oneway ANOVA followed by Scheffe's multiple range tests) VEH: the vehicle control.

3-1. Effect of scutellarein on liver SOD activity induced by λ -carrageenan

如圖十四結果顯示 scutellarein 能明顯提升 SOD 抗氧化酵素的濃度。

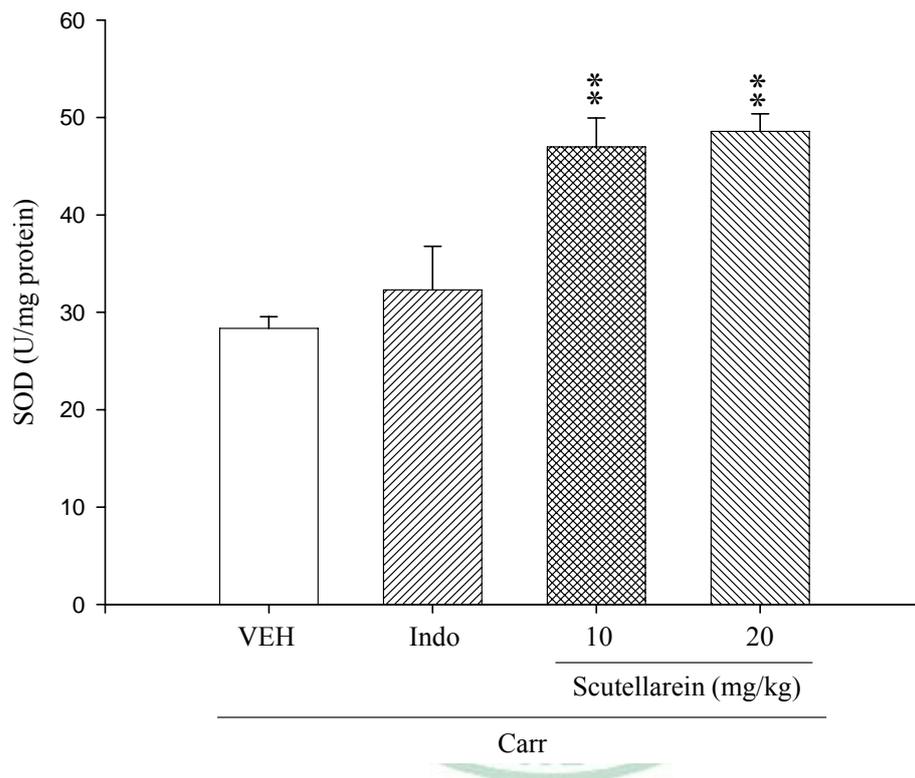


Figure 14. Effect of scutellarein on liver SOD activity induced by λ -carrageenan (Carr). Each value represented as mean \pm S.E.M (n=10). **P<0.01 as compared with the VEH/Carr group. VEH: the vehicle control.

3-2. Effect of scutellarein on liver GSH-Rd activity induced by λ -carrageenan

如圖十五結果顯示 scutellarein 能明顯提升 GSH-Rd 抗氧化酵素的濃度。

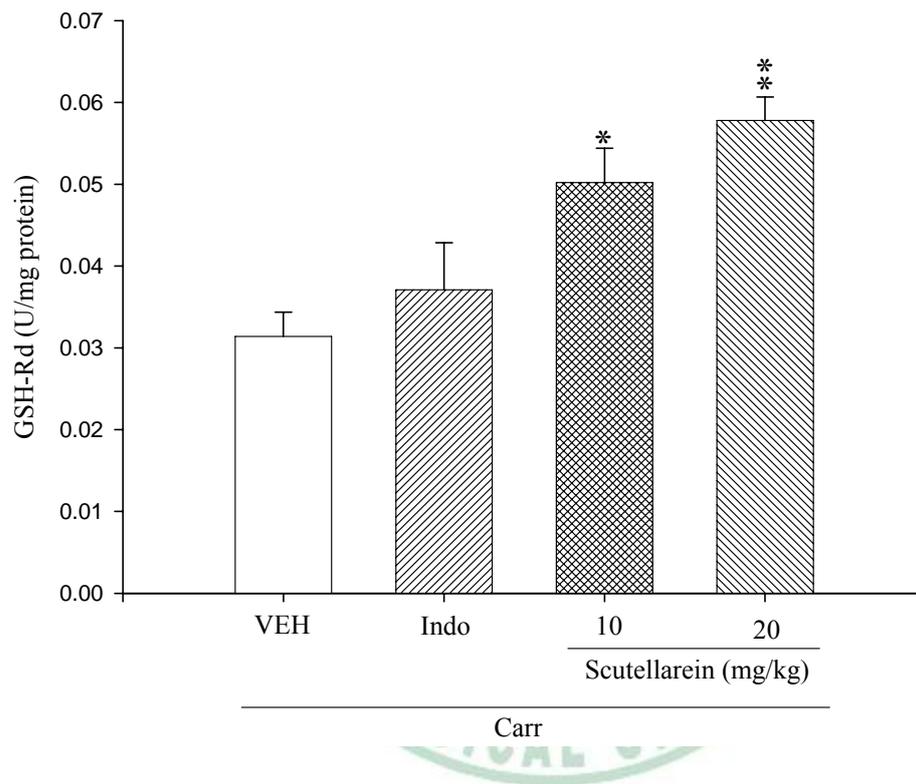


Figure 15. Effect of scutellarein on liver GSH-Rd activities induced by λ -carrageenan (Carr). Each value represented as mean \pm S.E.M (n=10).

*P<0.05, **P<0.01 as compared with the VEH/Carr group. VEH: the vehicle control.

3-3. Effect of scutellarein on liver GSH-Px activity induced by λ -carrageenan

如圖十六結果顯示 scutellarein 對 GSH-Px 抗氧化酵素的濃度無明顯影響。

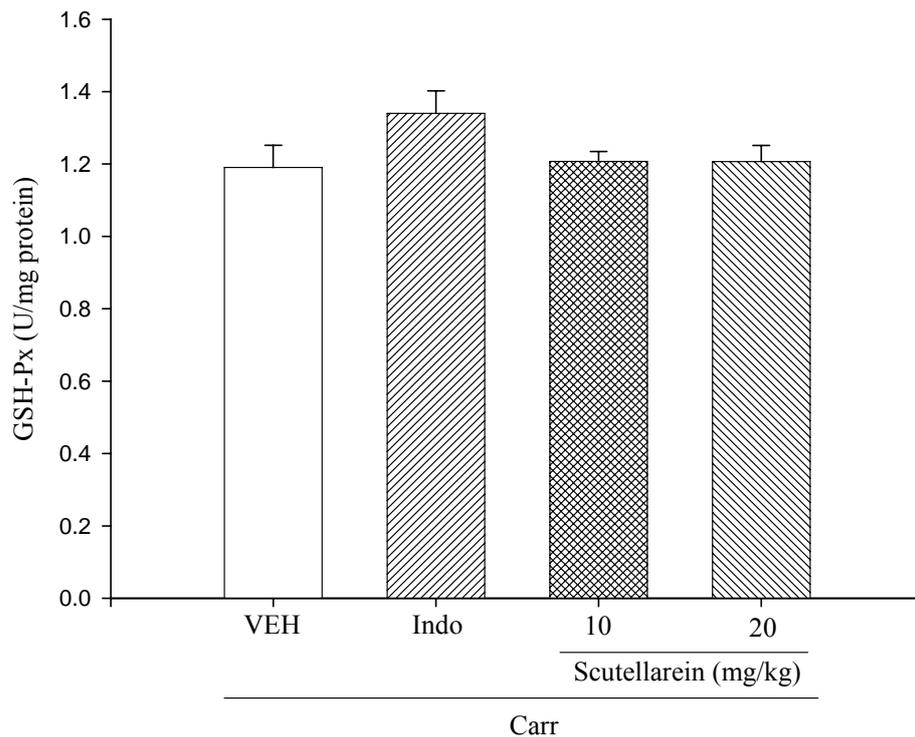


Figure 16. Effect of scutellarein on liver GSH-Px activities induced by λ -carrageenan (Carr). Each value represented as mean \pm S.E.M (n=10).

第五章 討論

由於巨噬細胞在發炎及宿主對抗細菌或病毒上均扮演重要角色⁽⁹⁸⁾，在活化的巨噬細胞所釋放的各種媒介物質當中，一氧化氮為巨噬細胞在抗腫瘤及抗菌作用上能發揮調節或細胞毒素作用的有效分子之一⁽⁹⁹⁻¹⁰²⁾，負責巨噬細胞合成一氧化氮的酵素是 iNOS，然而平常 iNOS 是不存在的，但在細菌內毒素 (LPS)^(103、104) 和炎症的細胞分裂素作用下能強力引發 iNOS 產生，INF- γ 對 LPS 作用下的巨噬細胞具有協同作用，能引發更大量 iNOS 產生，然而 INF- γ 單獨並不能引發巨噬細胞產生 iNOS⁽⁴¹⁾，因此本研究採用 LPS 與 iINF- γ 共同使用於誘導巨噬細胞(RAW264.7)產生 NO。在急性或慢性發炎中發現過多的 NO 也可能導致宿主細胞及組織嚴重的損壞⁽¹⁰⁵⁾，在種種發炎疾病中，例如風濕性關節炎患者體內就發現其巨噬細胞產生過多的一氧化氮⁽¹⁰⁶⁾。據此，假設能抑制巨噬細胞產生一氧化氮的藥物將可能成為一有效的抗發炎藥物。

因此，本研究篩選八十七種常見的中草藥對 LPS 與 IFN- γ 誘導巨噬細胞 (RAW264.7) 產生 NO 之抑制率做比較，並以 MTT 試驗檢測樣本對細胞毒性作用，發現其中 15 種具有很好的 NO 抑制活性。而在這 15 種植物中，本研究先選擇在台灣民間習用的抗癌植物半枝蓮為研究目標；並探討半枝蓮的成分 scutellarein、wogonin 和 baicalein

對 LPS 與 IFN- γ 誘導巨噬細胞 (RAW264.7) 產生 NO 之抑制率的影響,發現 scutellarein 對 NO 活性抑制的效果最好,其 IC₅₀ 為 12.7 \pm 3.11。接著,本研究進一步探討半枝蓮 50%乙醇粗抽物及其成分 scutellarein 之鎮痛及抗發炎之藥理作用機轉。

首先,疼痛反應之評估可分為化學(醋酸扭體及福馬林舔足)及機械刺激反應⁽¹⁰⁷⁾。本研究所使用之疼痛模式為化學刺激之醋酸扭體及福馬林舔足反應試驗。醋酸扭體反應試驗由 1957 年由 Siegmund⁽⁶²⁾ 使用於測試疼痛反應,其方法是經由醋酸對動物之腹部直接刺激所引發之疼痛反應,造成其腹部內縮、後腿伸直、身體拉長扭曲之現象。鴉片類與內生肽類等神經鎮痛物質及固醇類和非固醇類周邊性鎮痛抗炎物質皆可抑制此扭體反應⁽⁶⁵⁾,可廣泛用於篩選大部分鎮痛物質^(62、66-68),由本實驗結果得知半枝蓮粗抽物及 scutellarein 均可減少由醋酸所引起疼痛之扭體次數,顯示有鎮痛作用。但由於醋酸扭體模式其所媒介之機轉以周邊作用較強,但亦有中樞作用,因而無法確認其作用機轉是經由中樞或周邊而來,所必須進一步以福馬林試驗進行研究,以確認其真正的鎮痛作用機轉。

福馬林舔足試驗最早由 Dubuisson 和 Dennis 於 1977⁽⁶⁸⁾ 年提出,此實驗方法利用福馬林造成組織損傷的急性、中性及連續性 (tonic) 疼痛來篩選鎮痛藥物的一個有效方法。此一實驗模式經由 Shibata

(1989)⁽⁶⁹⁾等研究，其所產生之舔蹠反應呈雙向(biphasic response)作用，亦即舔足時間具有兩個高峰期，在福馬林注入 0~5 分鐘會造成痛 (initial pain) 反應而引起小鼠舔足，稱之為前期(early phase)，主要因直接刺激痛覺接受體造成 substance P 或 bradykinin 等致痛物質釋放；而在 20~30 分鐘所表現舔足時間稱之為後期 (late phase)，主要是因為福馬林容易引起發炎反應造成化學傳遞物質，如 histamine, serotonin, prostaglandin 及 kinin 等有關物質由受損組織細胞中釋出所引起及脊髓背腳功能性改變^(60、69)。Hunskaar (1987)⁽⁷¹⁾等人研究報告指出福馬林試驗對發炎性和非發炎性疼痛之鎮痛藥物評估為一有效模式。前期為非發炎性疼痛，後期為發炎性疼痛，使用 0.5-10%福馬林皆可誘導出前期及後期舔足反應，而 5%福馬林濃度可誘導最大前期和後期舔足反應⁽¹⁰⁸⁾。故本研究以 5%福馬林誘導疼痛反應。本實驗結果發現半枝蓮粗抽物及 scutellarein 對減少小鼠福馬林誘發前期之舔足反應時間沒有明顯影響。但可明顯減少小鼠福馬林誘發後期之舔足反應時間。顯示其對發炎性疼痛有明顯鎮痛作用，而對非發炎性疼痛無明顯作用。根據 1989 年 Shibata 等人研究報告指出，麻醉性鎮痛劑如 morphine 對前期及後期都有抑制作用，但 NSAID 只對後期有抑制作用^(69、109)。半枝蓮粗抽物及 scutellarein 之鎮痛作用可能與周邊作用有關，但其確實之鎮痛機轉與何種發炎介質釋放有關，則有待進一

步探討。

其次，用於評估抗炎藥之許多篩選方法中，常以注射致炎劑後能產生抑制浮腫之能力為先決條件，最常使用之致炎物包括 λ -角叉菜膠 (λ -carrageenan)、histamine、右旋醣苷 (dextrose)、白蛋白 (albumin)、酵母 (yeast) 等，其中又以 λ -carrageenan 最常用，1962 年由 Winter 等人⁽⁶⁷⁾ 使用 0.05 ml, 1% λ -carrageenan 注射大鼠足蹠，結果引發足蹠腫脹，並於注射後連續測量 3 小時後浮腫體積；1963 年以此分析 indomethacin 之抗炎作用，遂成為一種普遍研究抗炎活性之實驗；之後，1964 年 Niemegeers 等人支持實驗模式，用其作臨床抗風濕活性藥物之事先篩選；與其它誘發水腫之致炎劑相較，其優點是在發炎過程中為局部刺激引起和抗原反應無關，且在毒性劑量下反應性佳，無全身性作用，再現性高⁽¹¹⁰⁾。研究結果發現，腹腔給予半枝蓮粗抽物及 scutellarein 可明顯降低 λ -carrageenan 誘導的急性足蹠浮腫，顯示半枝蓮粗抽物和 scutellarein 具有抗炎作用。

事實上， λ -carrageenan 注入足蹠所引起的浮腫是雙向性反應⁽³¹⁾，注射 λ -carrageenan 後會在不同時間釋放出不同物質而引起發炎。第一階段，即 0-1.5 小時或 20 分至 1 小時內游離出 histamine、serotonin、PAF 等物質⁽¹¹¹⁾；第二階段從 1.5-2.5 小時，kinin 類物質會釋放出來；2.5 小時之後為第三階段，prostaglandin 及 leukotriens、NO 和自由基⁽¹¹²⁾

會被釋放出來。又有研究指出角叉菜膠所誘導的發炎反應與自由基有關⁽³⁴⁾。以 carrageenan 誘發小鼠足蹠浮腫發炎實驗中， 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($O_2^{\cdot-}$)，而 $O_2^{\cdot-}$ 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。 λ -carrageenan 也會經由活化 iNOS 生成一氧化氮 (NO)，NO 會和 $O_2^{\cdot-}$ 作用，形成 $ONOO^-$ 。 $OH\cdot$ 和 $ONOO^-$ 攻擊細胞膜脂質，導致細胞損傷而發炎^(5,35)。活性氧自由基，例如 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 $OH\cdot$ 、 $ONOO^-$ ，是急性發炎反應中重要介質⁽³⁵⁾，發炎組織中的活性氧自由基，於發炎反應後 1-6 小時即可被表現出來。且有文獻指出注射 λ -carrageenan 三小時後，最大的水腫反應和藥物的抗炎作用均會在這時期發生⁽³⁶⁾。因此，發生炎症時如能有效地減少 ROS 含量，可以得到良好的抗發炎效果⁽³⁷⁾。而肝組織中含有許多抗氧化酵素，以抵抗自由基的作用。故本實驗於注射 λ -carrageenan 4 小時 (如圖 9) 之後將老鼠犧牲，並取其肝組織，測定肝臟中抗氧化酵素的活性。結果顯示，腹腔給予 scutellarein 對肝臟中 SOD、GSH-Rd 活性均具增強作用。因此，scutellarein 可能藉由提升肝臟中抗氧化酵素的活性，而強化清除自由基的能力，進而達到抗發炎的作用。

以 λ -carrageenan 誘發老鼠足蹠浮腫發炎實驗中，MDA 扮演重要

的角色。而相關研究指出， λ -carrageenan 注射之後 1~6 小時，會產生 $\text{OH}\cdot$ 及 ONOO^- ⁽¹¹²⁾。而 $\text{OH}\cdot$ 和 ONOO^- 攻擊細胞膜脂質，而引發脂質過氧化生成 MDA。MDA 為脂質過氧化物最終產物之一，可作為體內脂質過氧化作用指標，因此 MDA 含量愈高，表示脂質過氧化程度愈高；反之丙二醛含量降低，表示脂質過氧化程度減少⁽¹¹³⁾。故本實驗於注射 λ -carrageenan 4 小時之後將小鼠犧牲，並取其腳組織，測定發炎腳組織中 MDA 的含量。實驗結果顯示，腹腔注射 indomethacin (10 mg/kg) 會減少小鼠足蹠 MDA 的濃度，此與 Kirkova 等人⁽¹¹⁴⁾ 的研究結果相同。根據文獻指出，indomethacin 具有清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\text{OH}\cdot$ 、 ONOO^- 和 NO 的能力⁽¹¹⁵⁾，因此推測 indomethacin 能減少 MDA 生成，可能是藉由清除過多的活性氧自由基有關。腹腔給予 scutellarein (10, 20 mg/kg)，亦均會減少小鼠足蹠 MDA 的含量，而 scutellarein 同時也會增加肝臟及血液中抗氧化酵素的含量，因此推論 scutellarein 減少小鼠足蹠 MDA 的含量，可能是藉由提升肝臟及血液中抗氧化酵素的含量有關。

以 λ -carrageenan 誘發小鼠足蹠浮腫發炎實驗中 (如圖一所示)，NO 扮演一重要角色，NO 不但能刺激 COX 活性增加而產生過度的 pro-inflammatory prostaglandin⁽¹¹⁶⁾，NO 在發炎過程中扮演重要的角色，其所誘導的發炎反應有兩期，NO 會在後期 1~6 小時產生，當

$O_2^{\cdot-}$ 和 NO 作用，形成 $ONOO^-$ ， $ONOO^-$ 攻擊細胞膜脂質，而引發脂質過氧化。實驗結果顯示，腹腔注射 indomethacin 會減少大鼠足蹠中 NO 的含量。而腹腔給予 scutellarein，也會減少大鼠足蹠 NO 的含量，因此 scutellarein 會抑制發炎反應可能與抑制發炎組織中 NO 的生成有關。

Indomethacin 為最普遍使用的一種鎮痛抗炎藥物，據文獻顯示，indomethacin 不僅能抑制 PG 的生成⁽¹¹⁷⁾，也同時具有清除 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 、 $ONOO^-$ 和 NO 等自由基的能力⁽¹¹⁵⁾，相較於成癮性的鎮痛麻醉藥物，NSAID 類的藥物在安全性上及使用性能上均相當優秀，然不可諱言的，在使用 indomethacin 的同時也具有一定的風險，包括引起急性精神病學上的不安(Acute psychiatric disturbance)⁽¹¹⁸⁾與支氣管氣喘(Bronchial asthma)⁽¹¹⁹⁾等副作用，經由本研究發現存在於半枝蓮等植物中的成分 scutellarein，其鎮痛抗炎作用與 indomethacin 相當。

關於半枝蓮成分 wogonin、baicalein 及 scutellarein 抗炎機轉之探討，據文獻記載天然黃酮類化合物 oroxylin A 主要是藉由抑制細胞內轉錄因子 NF- κ B 的活化，進而導致細胞內誘導型 NOS 之表現受到抑制所致⁽²¹⁾，又 baicalin、baicalein、wogonin 具有抑制 LPS 誘導之 PGE_2 (LPS-induced prostaglandin E_2) 產生的能力⁽²²⁾。在結構與活性關連部分，據文獻指出，結構相似的 flavone 亦會抑制 LPS 誘導之 NO 表現，

且 flavone 化合物結構上之氫氧基數目愈多者其抗氧化能力愈強，並且降低 LPS 誘導之 NO 的能力也愈強⁽¹²⁰⁾。Scutellarein 亦屬 flavone 類成分，其結構與 baicalein 與 wogonin 相比，在第一個碳上連接苯環的第三個碳位上多了一個氫氧基 (3'-OH)，所以 scutellarein 對 LPS 與 Interferon- γ 誘導巨噬細胞(RAW264.7) 產生之 NO 含量的抑制率明顯比 baicalein 與 wogonin 高。

綜合以上結果顯示，本省的民間抗癌植物半枝蓮及其成分 scutellarein 對 LPS 併用 IFN- γ 誘導巨噬細胞 (RAW264.7) 產生一氧化氮之抑制率最佳。半枝蓮粗抽物和 scutellarein 於醋酸所引起疼痛之扭體次數及福馬林所誘發的疼痛試驗，有明顯鎮痛作用。於抗發炎實驗中半枝蓮粗抽物和 scutellarein 具有抗炎作用，而其抗發炎之作用機轉可能與提升肝臟中抗氧化酵素之活性而減少大鼠足蹠 MDA 的含量有關，而半枝蓮成分 scutellarein 更能抑制發炎組織中 NO 的含量，而達抗發炎作用。

第六章 結論

本研究藉由篩選具有解熱、鎮痛、抗發炎作用之中草藥對於 LPS 與 Interferon- γ 誘導小鼠巨噬細胞(RAW264.7)產生 NO 抑制之作用為指標，設立一實驗篩選平台。

首先從八十七種用於治療抗發炎、解熱及鎮痛之中草藥篩選對 LPS 與 Interferon- γ 誘導巨噬細胞(RAW264.7)產生 NO 抑制之影響。其中半枝蓮不僅活性佳，且為台灣民間常用的抗癌藥物，又半枝蓮幾個主要化學成分也與中藥黃芩類似，因此本研究進一步以醋酸扭體法、福馬林舔足試驗及 λ -carrageenan 足蹠腫脹法，探討半枝蓮及其成分 scutellarein 之鎮痛及抗發炎藥理作用，最後測定 λ -carrageenan 誘導足蹠腫脹小鼠之腫脹腳掌的 MDA 及 NO 含量、肝組織中抗氧化酵素(SOD、GSH-Rd、GSH-Px)活性，以探討 scutellarein 之抗發炎機轉。獲得結果簡述如下：

- 一、八十七種中草藥對 LPS 與 INF- γ 誘導巨噬細胞(RAW264.7)產生 NO 活性抑制之實驗中包括艾納香 *Blumea balsamifera* (L.) DC. (IC₅₀: 30.03 μ g/mL); 鵝不食草 *Centipeda minima* (L.) A. Br. & Ascher. (IC₅₀: 7.34 μ g/mL); 馬藍 *Kalimeris indica* (L.) Sch. Bip. (IC₅₀: 32.37 μ g/mL); 葉下珠 *Securinega suffruticosa* (Pall.) Rehd. (IC₅₀: 26.12 μ g/mL); 廣東紫花地丁 *Gentiana loureirii* (G. Don)

Griseb. (IC₅₀: 13.5 µg/mL); 半枝蓮 *Scutellaria rivularis* Wall. (IC₅₀: 38.28 µg/mL); 益母草 *Leonurus artemisia* (Lour.) S. Y. Hu (IC₅₀: 37.46 µg/mL); 廣東香思子 *Abrus cantoniensis* Hance (IC₅₀: 68.31 µg/mL); 龍鬚藤 *Bauhinia championii* (Benth.) Benth. (IC₅₀: 40.47 µg/mL); 丁葵草 *Zornia gibbosa* Spanoghe (IC₅₀: 40.12 µg/mL); 剛毛尖子木 *Oxyspora vagans* (Roxb.) Wall. (IC₅₀: 19.79 µg/mL); 地瓜榕 *Ficus tikoua* Bur. (IC₅₀: 17.51 µg/mL); 仙鶴草 *Agrimonia pilosa* Ledeb. (IC₅₀: 27.44 µg/mL); 細葉水團花 *Adina rubella* Hance (IC₅₀: 3 µg/mL) 及深綠卷柏 *Selaginella doederleinii* Hieron. (IC₅₀: 47.11 µg/mL) 等，共有 15 種中草藥對 LPS 與 INF-γ 誘導巨噬細胞(RAW264.7)產生之 NO 含量有顯著的抑制作用，其抑制率都在 80% 以上。半枝蓮成分 wogonin、baicalein、scutellarein 對抑制 NO 產生實驗中又以 scutellarein 效果最好，其 IC₅₀ 為 12.7±3.11 µg/mL。

二、口服給予半枝蓮粗抽物 (0.5, 1.0 mg/kg) 均可減少由醋酸所引起疼痛之扭體次數，顯示有鎮痛作用。腹腔注射 scutellarein 明顯減少由醋酸所引起疼痛之扭體次數，且以 scutellarein (20 mg/kg) 效果最佳，顯示有鎮痛作用。

三、口服給予半枝蓮粗抽物對減少小鼠福馬林誘發前期之舔足反應時間沒有明顯影響，但可明顯減少小鼠福馬林誘發後期之舔足反應時間，顯示其具有週邊鎮痛作用，且以半枝蓮 (1.0g/kg)效果較佳。腹腔注射 scutellarein 對減少小鼠福馬林誘發前期之舔足反應時間沒有明顯影響，但可明顯減少小鼠福馬林誘發後期之舔足反應時間，顯示其具有週邊鎮痛作用。

四、口服給予半枝蓮粗抽物可明顯降低 λ -carrageenan 誘導的急性足蹠浮腫，顯示半枝蓮粗抽物具有抗發炎作用。腹腔給予 scutellarein 可明顯降低 λ -carrageenan 誘導的急性足蹠浮腫，顯示 scutellarein 具有抗發炎作用，其中以 scutellarein (10 mg/kg)效果最佳。且 scutellarein 能明顯降低 NO、MDA 含量，及明顯提升 SOD、GSH-Rd 抗氧化酵素的濃度，顯示 scutellarein 之抗發炎作用與提升肝臟中抗氧化酵素之活性，因而減少 MDA 與 NO 含量有關。

五、Scutellarein 對 LPS 與 INF- γ 誘導巨噬細胞(RAW264.7)產生之 NO 含量的抑制率明顯高於 baicalein 與 wogonin，顯示其活性與 flavone 結構上氫氧基數量有關。

綜合上述結果顯示，利用 LPS 與 INF- γ 誘導小鼠巨噬細胞 (RAW264.7) 產生 NO 含量之抑制作用為指標，可篩選出具有抗發炎作用之中草藥。半枝蓮及其成分 scutellarein 具有鎮痛與抗發炎作用，而 scutellarein 之抗發炎作用機轉，與提高肝臟中抗氧化酵素 (SOD 與 GSH-Rd) 之活性，並減少足蹠組織中之 MDA 與 NO 含量有關。



謝 辭

衷心感謝恩師吳金濱博士、謝明村博士及彭文煌博士不辭辛勞的盡心指導，本論文方得順利完成，在此致上最誠摯的謝意。受業期間，承蒙吳老師協助申請至日本大學進修，日本交流協會與國科會提供經費，那段赴日進修的時光永生難忘；感謝謝校長如父執般的殷殷提攜；彭老師如兄長般的殷切指導與關懷，受益恩情永銘於心。由衷感謝陳教授介甫博士、吳教授午龍博士、陳主任忠川博士、張所長永勳博士於論文審查時所賜寶貴建議，使本論文更臻完善。更感謝張所長的提拔，推廣教育中心九年的行政經驗讓我成長許多，鼓勵並提供我良好的進修環境；日本大學生藥學研究室北中進教授提供一氧化氮研究方法與優良的研究環境，王立岩博士、王珏博士在實驗上的指導；瀋陽藥科大學姚新生教授提供部分藥材樣本，孫啟時教授、吳維春教授協助鑑定藥材；謝教授文全博士、邱年永老師協助採集與鑑定植物，葉副教授豐次博士、黃副教授順爵博士、郭副教授昭麟博士、黃副教授太鴻博士給予的提攜與教導。

感謝臻里生物科技股份有限公司協助抽取半枝蓮。感謝動物中心王技士文信先生、中藥所藥理實驗室立偉、泛修、皓元、宗俊、宜璇、信維、冠麟、芸禎、熒駿、承瑋、藥化所植化實驗室惠雅、致群、雯

茹、釗偉、勝紘、柏雄等學弟妹們的協助，能與大家一起做實驗，是我最愉快的時光。博士班同學賴副教授妙英博士、柯助理教授裕仁博士、謝助理教授長奇博士、高國清博士、碩士班同學黃助理教授雯雯博士、大學同學張助理教授文德博士、余副教授建志博士，以及慧敏、惠貞、宜文、淑華、淑瓊、夙真、玲珊等諸多好友，謝謝你們給我的關懷與鼓勵。

七年的時光雖然有些波折，但我心中充滿感恩，感恩這一路上所有陪我走過來的朋友們。感恩我的先生、我無話不談的好朋友林昆宏醫師，多年來以實際行動支持我在職進修，總在我想要放棄的時候拉我一把，鼓勵我不論有多艱苦也要完成學業；感恩我三個乖巧貼心的小孩汝穎、汝潔、伯勳，媽媽終於畢業了；感恩公公林資湖先生、婆婆洪素鶯女士對我如女兒般的照拂，讓我時時感受到溫暖。

最後謹以本論文獻給四十年來始終疼愛我的父親廖福麟先生、母親鍾秀琴女士及愛護我的大哥廖芳俊、二哥廖廷尉，由於您們多年來的關懷與支持，讓我終於完成此人生重要的階段。

參考文獻

1. Koop CE. The future of medicine. *Science* 2002; 295: 233.
2. 謝明村。中藥學概論，國立中國醫藥研究所，台北，1996：pp99-124。
3. 許鴻源。簡明藥材學，新醫藥出版社，台北，1985：pp78-203。
4. 魏文漢。病理生理學(第一版)，上海科學技術出版社，上海，1984：p388.
5. Costa D, Gomes A, Reis S. Hydrogen peroxide scavenging activity by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Life Sci* 2005; 76: 2841-8.
6. Yoshida Y, Wang MQ, Liu JN. Immunomodulating activity of Chinese medicinal herbs and *oldenlandia diffusa* in particular. *Int J Immunol* 1997; 19: 359.
7. 劉銀良，高佛良。NO 一種新的信息分子與效應分子，*免疫學雜誌* 1996；12：1-4。
8. Liao JC, Lin KH, Ho HY, Peng WH, Yao XH, Kitanaka S, Wu JB. Inhibitory effects of 87 species of traditional Chinese herbs on nitric oxide production in RAW264.7 macrophages, activated with lipopolysaccharide and interferon- γ . *Pharmaceutical Biology* 2005; 43: 158-63.
9. 中藥大辭典，上海科學技術出版社，上海，1978：p738。

10. Hsu HY. Illustrations of Chinese herb medicine of Taiwan. Chinese Herb Medicine Committee National Health Administration. Taipei, R.O.C., 1972: p133.
11. Kan WS. Pharmaceutical Botany. National Research Institute of Chinese Medicine. Taipei, R.O.C., 1975: p487.
12. Chiu NY and Chang KH. The Illustrated medicinal plants of Taiwan Vol. (1) Southern Materials Center Inc., Taipei, R.O.C. 1999; p188.
13. Qian B. Clinical effect of anticancer Chinese medicine. Shanghai Translation Publishing House; Shanghai, 1987: pp6-7.
14. Yin X, Zhou J, Jie C. Anticancer activity and mechanism of *Scutellaria barbata* extract on human lung cancer cell line A549. *Life Science* 2004; 75: 2233-44.
15. 路平成、許益民。半枝蓮多糖對細胞免疫的調節作用，南京中醫學院學報，1989；2：32-33。
16. Yu J, Lei J, Yu H, Cai X, Zou G. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Scutellaria barbata*, *Phytochemistry* 2004; 65: 881-4.
17. 向仁德、鄭永芳。半枝蓮化學成分的研究，中草藥，1982；13：9-12。

18. Chiu FH, Lin CC, Yen MH, Wu PS, Yang CY. The pharmacological and pathological studies on several hepatic protective crude drugs from Taiwan (V): The effects of *Bombax malabrica* and *Scutellaria rivularis*. *American Journal of Chinese Medicine* 1992; 4: 257-64.
19. Lin SC, Lin CC, Lin YH, Chen CH. Protective and therapeutic effects of Ban-zhi-lian on hepatotoxin-induced liver injuries. *American Journal of Chinese Medicine* 1994; 22: 29-42.
20. Lin CC, Shieh DE. The anti-inflammatory activity of *Scutellaria rivularis* extracts and its active components, baicalin, baicalein and wogonin. *American Journal of Chinese Medicine* 1996; 24: 31-6
21. Chen YC, Yang LL, Lee TJF. Oroxylin A inhibition of LPS-induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of NF- κ B activation. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 1445-57.
22. Chen YC, Shen SC, Chen LG, Lee TJ, Yang LL. Wogonin, baicalin, and baicalein inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions induced by nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide. *Biochemical Pharmacology* 2001; 61: 1417-27.
23. 楊光華。病理學第五版，人民衛生出版社，北京，2002：p572。

24. Shacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Huntington)* 2002; 16: pp217-26, 229, discussion 230-2.
25. Murakami A, Nakamura Y, Torikai K, Tanaka T, Koshiha T, Koshimizu K, Kuwahara S, Takahashi Y, Ogawa K, Yano M, Tokuda H, Nishino H, Mimaki Y, Sashida Y, Kitanaka S, Ohigashi H. Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice. *Cancer Res* 2000; 60: 5059-66.
26. 曾頌惠：台北醫學大學生藥學研究所論文，非類固醇抗炎藥與天然物合併治療對抗發炎反應之協調作用，2002，pp28-9.
27. Ozaki Y. Antiinflammatory effect of tetramethylpyrazine and ferulic acid. *Chem Pharm Bull* 1992; 40: 954-6.
28. Deepak M, Handa SS. Antiinflammatory activity and chemical composition of extracts of *Verbena officinalis*. *Phytother Res* 2000; 14: 463-5.
29. 許鴻源。簡明藥材學，新醫藥出版社，台北，1985，pp410-1.
30. Hsieh WT, Tan TW, Chen CF, Tsai HY. Studies of anti-inflammatory and analgesic effect of *Ampelopsis brevipedunculata*. *Chin Med Coll J* 1998; 7: 81-7.

31. Vinegar R, Schreiber W. R. Biphasic development of carrageenan edema in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1969; 1: 96-166.
32. Holsapple MP, Yim GKW. Therapeutic reduction of ongoing carrageenin induced inflammation by lipo-oxygenase, but not cyclo-oxygenase inhibitors. *Inflammation* 1984; 8: 233.
33. Gepdiremen A, Mshvildadze V, Suleyman H, et al. Acute and chronic antiinflammatory effects of *Hedera colchica* in rats. *J Ethnopharmacol* 2004; 94: 191-5.
34. Bilici D, Akpınar E, Kiziltunc A. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced acute local inflammation. *Pharmacol Res* 2002; 46: 133-9.
35. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Hake P, et al. Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 450-9.
36. 鄭皓元：去羥梔子苷鎮痛、抗炎及保肝作用之研究。中國醫藥學院中國藥學研究所碩士論文，台中，2002，pp36-9。
37. 丁克祥，邱仲峰，呂鋒洲。SOD 生物與醫學淺論，藝軒圖書出版社，台北，1996：p218。

38. Culotta E, Koshland DE Jr. NO news is good news, *Science* 1992; 258: 1862-5.
39. Drummond GR, Harrison DG. eNOS-overexpressing mice: too much NO makes the blood pressure low. *Journal of Clinical Investigation* 1998; 102: 2033-4.
40. Tamir S, Tannenbaum SR. The role of nitric oxide (NO.) in the carcinogenic process. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996; 1288: F31-6.
41. Weisz A, Oguchi S, Cicatiello L, Esumi H. Dual mechanism for the control of inducible-type NO synthase gene expression in macrophages during activation by interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. Transcriptional and post-transcriptional regulation. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269: 8324-33.
42. Ohshima H, Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutation Research* 1994; 305: 253-64.
43. Shan BE, Yoshida Y, Sugiura T. Stimulating activity of Chinese medicinal herbs on human lymphocytes in vitro. *International Journal of Immunopharmacology* 1999; 21: 149
44. Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annual Review of Physiology* 1995; 57: 737-69.

- 45.Kengatharan M, De Kimpe SJ, Thiemermann C. Analysis of the signal transduction in the induction of nitric oxide synthase by lipoteichoic acid in macrophages. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 1163-70.
- 46.Clancy RM, Abramson SB. Nitric oxide: a novel mediator of inflammation. *Experimental Biology & Medicine* 1995; 210: 93-101.
- 47.Laskin DL, Pendino KJ. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology* 1995; 35: 655-77.
- 48.Cochran FR, Selph J, Sherman P. Insights into the role of nitric oxide in inflammatory arthritis. *Medicinal Research Reviews* 1996; 16: 547-63.
- 49.Wolkow PP. Involvement and dual effects of nitric oxide in septic shock. *Inflammation Research* 1998; 47: 152-66.
- 50.Connor JR, Manning PT, Settle SL, Moore WM, Jerome GM, Webber RK, Tjoeng FS, Currie MG. Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharm* 1995; 273: 15-24.
- 51.Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L Jr, Baron P, Villalba M, Ferrari D, Rossi F. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* 1995; 374: 647-50.

52. Vodovotz Y, Lucia MS, Flanders KC, Chesler L, Xie QW, Smith TW, Weidner J, Mumford R, Webber R, Nathan C, Roberts AB, Lippa CF, Sporn MB. Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *Journal of Experimental Medicine* 1996; 184: 1425-33.
53. Mullet D, Fertel RH, Kniss D, Cox GW. An increase in intracellular cyclic AMP modulates nitric oxide production in IFN-gamma-treated macrophages. *Journal of Immunology* 1997; 158: 897-904.
54. Woolf CJ, Thompson SWN. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation: Implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain* 1991; 44: 293-9.
55. Dubner R, Ruda MA. Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. *Trends Neurosci* 1992; 15: 96-101.
56. 曹永昌：中國醫藥大學中國醫學研究所博士論文，電針刺激與一氧化氮合成酵素抑制劑結合的鎮痛研究，2003，pp14-24.
57. 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 1994：4：75-88.

58. Dubner R. Methods of assessing pain in animals. Textbook of pain Vol. I Second Ed. (Wall PD and Melzack R), Churchill Livingstone, Edinburgh London Melbourne and New York 1989: pp247-50.
59. Eide PK, Rosland JH. The role of tail skin temperature in the facilitation of the tail-flick reflex after spinal transection or interference with descending serotonergic neurotransmission. *Acta Physiol Scand* 1988; 135: 427-33.
60. Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992; 51: 5-17.
61. 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.
62. Siegmund E, Cadmus R, Lu G. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. *Proc Soc Exp Biol Med* 1957; 95: 729-31.
63. Collier HOJ, 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.

64. 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.
65. Gilani AU, Janbaz KH. Studies on protective effect of *Cyperus scariosus* extract on acetaminophen and CCl₄-induced hepatotoxicity. *Gen Pharmacol* 1995; 26: 627-31.
66. Otani A, Hugli TE. Leukocyte chemotaxis : a new *in vivo* testing technique. *Inflammation* 1977; 2: 67-82.
67. Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hindpaw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Biol NY* 1962; 111: 544-7.
68. 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: 161-74.
69. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 1989; 38: 347-52.
70. Rosland JH, Tjolsen A, Maehle B, Hole K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain* 1990; 42: 235-42.

71. Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory drug. *FASEB J* 1987; 89-96.
72. 曹永昌：中國醫藥大學中國醫學研究所博士論文，電針刺激與一氧化氮合成酵素抑制劑結合的鎮痛研究，2003：p30。
73. 中華本草編委會。中華本草（七），上海科學技術出版社，1999；pp210-2。
74. Wang ZQ, Xu FM, Yan XZ, Zhu Y. Scutebarbatine A, a new neoclerodane-type diterpenoid alkaloid from *Scutellaria rivularis*. *Chin Chem Lett* 1996; 7: 333-4.
75. 許鴻源。簡明藥材學，新醫藥出版社，台北，1985：p174。
76. 鄭虎占，董澤宏，余靖。中藥現代研究與應用(第二卷)，學苑出版社，北京 1997：pp1684-6。
77. Kizu H, Imoto Y, Tomimori T, Tsubono K, Kadota S, Kikuchi T. Structure of scuterivulactone D determined by two-dimensional NMR spectroscopy. A new diterpenoid from a Chinese crude drug "ban zhi lian" (*Scutellaria rivularis* Wall.). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 1987; 35: 1656-9.
78. Chou CJ. Rivularin, a new flavone from *Scutellaria rivularis*. *J Taiwan Pharm Assoc* 1978; 30: 36-43.

79. Ducki S, Hadfield JA, Lawrence NJ, Liu CY, McGown AT, Zhang X. Isolation of E-1-(4'-Hydroxyphenyl)-but-1-en-3-one from *Scutellaria barbata*. *Planta Medica* 1996; 62: 185-6.
80. Sato Y, Suzuki S, Nishikawa T, Kihara M, Shibata H, Higuti T. Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology* 2000; 72:483-8.
81. Chan JY, Tang PM, Hon PM, Au SW, Tsui SK, Waye MM, Kong SK, Mak TC, Fung KP. Pheophorbide a, a major antitumor component purified from *Scutellaria barbata*, induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Planta Medica* 2006; 72: 28-33.
82. 孫文基，繩金房。天然活性成分簡明手冊，中國醫藥科技出版社，北京，1998；p601。
83. 孫文基，繩金房。天然活性成分簡明手冊，中國醫藥科技出版社，北京，1998；p64。
84. Liao JF, Hung WY, Chen CF. Anxiolytic-like effects of baicalein and baicalin in the Vogel conflict test in mice. *European Journal of Pharmacology* 2003; 464: 141-6.
85. 孫文基，繩金房。天然活性成分簡明手冊，中國醫藥科技出版社，北京，1998；pp508-9。

86. Ishii R, Horie M, Saito K, Arisawa M, Kitanaka S. Inhibitory effects of phloroglucinol derivatives from *Mallotus japonicus* on nitric oxide production by a murine macrophage-like cell line, RAW264.7, activated by lipopolysaccharide and interferon- γ . *Biochimica et Biophysica Acta* 2001; 1568: 74-82.
87. Kitanaka S, Ishii R, Saito K. Screening of natural products which activate macrophages and studies on active components. *Research Papers of the SUZUKEN Memorial Foundation* 1998; 17: 158-64.
88. Daikonya A, Katsuki S, Wu JB, and Kitanaka S. Anti-allergic agents from natural sources (4): Anti-allergic activity of new phloroglucinol derivatives from *Mallotus philippensis* (Euphorbiaceae). *Chem Pharm Bull* 2002; 50: 1566-9.
89. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
90. Herencia F, Ubeda A, Ferrandiz ML, Terencio MC, Alcaraz MJ, Garcia-Carrascosa M, Capaccioni R, Paya M. Anti-inflammatory activity in mice of extracts from Mediterranean marine invertebrates. *Life Sci* 1998; 62: PL115-20.
91. Kakkar P, Das B, Viswanathan PN. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 1984; 21: 130-2.

92. Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Research in Veterinary. *Science* 1983; 34: 253-6.
93. Guntherberg H, Rost J. The true oxidized glutathione content of red blood cells obtained by new enzymic and paper chromatographic methods. *Analy Biochem* 1966; 15: 205-10.
94. Anderson M. Glutathione in Free Radicals. A Practical Approach, eds. PUNCHARD NA, and Kelly FJ, Oxford University Press, New York 1996; p213.
95. Kraus RJ, Ganther HE. Reaction of cyanide with glutathione peroxidase. *Biochem Biophysical Res Comm* 1980; 96: 1116-22.
96. Prohaska JR, Oh SH, Hoekstra WG, Ganther HE. Glutathione peroxidase: inhibition by cyanide and release of selenium. *Biochem Biophysical Res Comm* 1977; 74: 64-71.
97. Tatum VL, Changchit C, Chow CK. Measurement of malondialdehyde by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Lipids* 1990; 25: 226-9.
98. Adams DO, Hamilton TA. The cell biology of macrophage activation. *Annu Rev Immunol* 1984; 2: 283-318.
99. Bonta IL, Ben-Efraim. Involvement of inflammatory mediators in macrophage antitumor activity. *J Leukocyte Biol* 1993; 54: 613-26.

100. Farias-Eisner R, Sherman MP, Aeberhard E, Chaudhuri G. Nitric oxide is an important mediator for tumoricidal activity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9407-11.
101. Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 375: 408-11.
102. MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, Stevens K, Xie QW, Sokol K, Hutchinson N, Chen H, Mudgett JS. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 1995; 81: 641-50.
103. Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 7738-42.
104. Stuehr DJ, Marletta MA. Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. *Cancer Res* 1987; 47: 5590-4.
105. Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3030-4.

106. Sakurai H, Kohsaka H, Liu MF, Higashiyama H, Hirata Y, Kanno K, Saito I, Miyasaka N. Nitric Oxide Production and Inducible Nitric oxide Synthase Expression in Inflammatory Arthritides. *J Clin Invest* 1995; 96: 2357-63.
107. Dongmo AB, Nguelefack T, Lacaille-Dubois MA. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Acacia pennata* Wild (Mimosaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 98: 201-6.
108. Okuda K, Sakurada C, Takahashi M, Yamada T, Sakurada T. Characterization of nociceptive responses and spinal releases of nitric oxide metabolites and glutamate evoked by different concentrations of formalin in rats. *Pain* 2001; 92: 107-15.
109. Shannon HE, Lutz EA. Comparison of the peripheral and central effects of the opioid agonists loperamide and morphine in the formalin test in rats. *Neuropharmacology* 2002; 42: 253-61.
110. Massino R. Biological properties of carrageenan. *J Pharm Pharmacol*. 1972; 224: 89-102.
111. Di Rosa M, Giroud JP, Willoughby DA. Studies of mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Physiol* 1971; 104: 15-29.

112. Dudhgaonkar SP, Tandan SK, Bhat AS, et al. Synergistic anti-inflammatory interaction between meloxicam and aminoguanidine hydrochloride in carrageenan-induced acute inflammation in rats. *Life Sci* 2006; 78: 1044-8
113. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 515-40.
114. Kirkova M, Kassabova T, Russanov E. In vivo effects of indomethacin-I. Activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation. *Gen Pharmacol* 1992; 23: 503-7.
115. Fernandes E, Costa D, Toste SA, et al. In vitro scavenging activity for reactive oxygen and nitrogen Species by nonsteroidal anti-inflammatory indole, pyrrole, and oxazole derivative drugs. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1895-905.
116. Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U SA* 1993; 90: 7240-4.
117. Woods KW, McCroskey RW, Michaelides MR, Wada CK, Hulkower KI, Bell RL. Thiazole analogues of the NSAID indomethacin as selective COX-2 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2001; 11:1325-8.

- 118.Lear J, Moore RS. Acute psychiatric disturbance--a side effect of indomethacin therapy. *Journal of Accident & Emergency Medicine* 1994; 11: 210.
- 119.Koger EL, Klaassen CH. Bronchial asthma, a side effect of indomethacin which can be avoided. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde* 1973; 117: 854-5.
- 120.Ko CH, Shen SC, Lin HY, Hou WC, Lee WR, Yang LL, Chen YC. Flavanones structure-related inhibition on TPA-induced tumor promotion through suppression of extracellular signal-regulated protein kinases: involvement of prostaglandin E₂ in anti-promotive process. *Journal of Cellular Physiology* 2002; 193: 93-102.

