

中國醫藥大學

基礎醫學研究所

碩士學位論文

羅布麻葉萃取物對大鼠胸主動脈血管

張力效應之研究

Vascular effects of *Apocynum venetum* leaf extract

in rat thoracic aorta

指導教授：關超然 教授

共同指導教授：謝文聰 副教授

研究生：顧澤承

中華民國一百年 元月

中文摘要

Apocynum venetum 羅布麻在中國用來當作單方的抗高血壓茶。

在先前大鼠離體主動脈血管研究，顯示羅布麻葉萃取物 (AVLE) 會引起大鼠主動脈血管內皮依存性舒張的作用。但本研究室發現高劑量之 AVLE 反而會引起之血管收縮作用。所以本研究希望探索 AVLE 對離體大鼠主動脈之血管舒張與收縮截然不同張力的機理，希望釐清羅布麻用來抗高血壓茶的作用評估。投與低劑量 AVLE 10 $\mu\text{g/ml}$ 能引起作用時間長的內皮依存性之血管舒張作用，其血管舒張作用，能被 L-NAME (一氧化氮合成酶抑制劑) 所逆轉。而高劑量 30 $\mu\text{g/ml}$ 以上之 AVLE，能逆轉低劑量 AVLE 產生的長時間血管舒張作用，此現象能被併用之超氧化物歧化酶 (SOD) 和過氧化氫歧化酶 (catalase) 所抑制。綜合本研究結果推測：在離體大鼠主動脈血管中，低劑量 AVLE 之血管舒張作用與血管內皮依存性 NO 產生有關。高劑量 AVLE 使血管逆轉其舒張作用，可能與產生超氧陰離子 (superoxide anions) 有關。

Key words: 羅布麻，AVLE, 抗高血壓茶，主動脈，血管內皮依存性舒張，血管收縮， L-NAME, SOD, catalase, NO, 超氧陰離子。

Abstract

Apocynum venetum, also known as luobuma, has been used as the sole ingredient in antihypertensive tea in China. In our preliminary study, we found *Apocynum venetum* leaf extract (AVLE) could elicit vasorelaxation but at high dosage of AVLE could reverse the AVLE-evoked vasorelaxation. In this study, we investigate the vascular tension effect of this herb extract in isolated rat thoracic aorta. AVLE 10 $\mu\text{g/ml}$ and carbachol (CCh) could elicit endothelium- dependent vasorelaxation. AVLE has shown the long-lasting vasodilatation which that effect could inhibit the phenylephrine (α_1 -adrenergic receptor agonist; PE)-evoked vasoconstriction but could not inhibit potassium chloride-evoked vasoconstriction. The AVLE-evoked long-lasting vasodilatation could be reversed by L-NAME (nitric oxide synthase inhibitor). The concentration above AVLE 30 $\mu\text{g/ml}$ (high dosage) could reverse AVLE evoked long-lasting vasorelaxation. Combined SOD and catalase could inhibit the reverse AVLE evoked vasorelaxation, but less inhibits effect by catalase only. In summary, our results indicate the mechanism of relaxative effect on vascular muscle might be related to endothelium-dependent NO mediated and the high dosage of AVLE evoked vasoconstriction might be mediated by superoxide anions in isolated rat aorta.

Key words: luobuma, AVLE, antihypertensive tea, aorta, EDRF, vasoconstriction, L-NAME, SOD, catalase, NO, superoxide anions.

序言與誌謝辭

首先要感謝家人平時對我的支持與鼓勵，沒有你們的栽培，就沒有今日的我。也要感謝關教授和謝老師，平時耐心的教導與督促，讓我能夠順利完成碩士學業與學位；在這些日子和過程當中，無論是生活上、學業上、人際關係的經驗，我都學到很多…。最後，感謝實驗室的成員：梁老師、家佳、昌鑫、peter 和其他人的關心；有你們陪伴，使我生活更精采不少！

感恩，謝謝你們！



目錄

	頁數
第一章 前言	
第一節 研究背景	
一、 高血壓之流行病學	1
二、 高血壓之治療	1
三、 近年來降壓中草藥作用在血管上的機制研究	1
四、 中草藥羅布麻對高血壓之應用現況	2
(1) 基源與分布	2
(2) 中醫記載用法	2
(3) 羅布麻葉的成分	3
(4) 現代科學研究	3
五、 AVLE的血管舒張因子	4
六、 血管內皮在血管張力調控之角色	4
七、 血管平滑肌在血管張力調控之角色	7
第二節 研究目的	9
第二章 研究方法	9
第一節 研究材料	9
一、 實驗試劑	9
二、 實驗儀器	11
三、 實驗動物	14
第二節 研究設計	16
一、 實驗控制組流程	16
二、 大鼠血管內皮與去內皮實驗設計	17
三、 AVLE低劑量舒張血管實驗	17

	頁數
四、 AVLE高劑量逆轉舒張血管實驗	17
五、 AVLE高劑量逆轉舒張之機轉	17
六、 AVLE長時間培育時對內皮及平滑肌作用完整之影響	18
第三節 統計方法	18
第三章 研究結果	19
一、低濃度AVLE對內皮依存性及對於大鼠主動脈血管環舒張之影響。	19
二、去內皮與完整內皮之狀態下；AVLE濃度累加至高劑量逆轉舒張之作用。	22
三、AVLE與血管培育時間對血管收縮及舒張之影響	28
四、高劑量AVLE對內皮和血管平滑肌作用後，完好程度之統計	32
五、AVLE 高劑量收縮之機轉	32
第四章 討論	35
第一節、低濃度AVLE於大鼠主動脈血管環產生內皮依存性舒張之探討。	35
第二節、AVLE雙效反應之探討	36
第三節、AVLE 高劑量影響超氧陰離子恢復收縮之機轉	37
第四節、AVLE 之「時間依存性」和「劑量依存性」	38
第五節、AVLE 在靜置張力之影響	39
第六節、其他相關性討論	39
第七節、研究限制	41
第五章 結論與建議	42
第一節、結論	42

第二節、對未來研究方向的建議	42
參考文獻	43



圖目錄		頁數
圖一	血管平滑肌舒張機轉圖	6
圖二	血管平滑肌收縮機轉圖	8
圖三	離體動物血管等長張力儀圖	11
圖四	tranducer 圖	12
圖五	器官槽圖	12
圖六	紀錄器圖	12
圖七	amplifier 圖	13
圖八	離體大白鼠主動脈組織圖	14
圖九	紀錄器按鍵圖	15
圖十	物理方法去內皮圖	17
圖十一	化學方法去內皮圖	17
圖十二	AVLE 導致大白鼠主動脈血管環舒張結果圖	20
圖十三	高劑量 AVLE 影響大白鼠主動脈血管環恢復收縮結果圖	23
圖十四	高劑量 AVLE 在前置低劑量收縮劑 PE 狀態下響影大白鼠 主動脈血管環恢復收縮結果圖	25
圖十五	高劑量 AVLE 在大白鼠主動脈血管環靜置張力狀態下之 「刺動反應」結果圖	27
圖十六	高劑量 AVLE 對大白鼠主動脈血管環之損傷作用結果圖	29
圖十七	SOD 取消高劑量 AVLE 在大白鼠主動脈血管環恢復收縮 作用之結果圖	33

Abbreviation

[Ca ⁺²] i	Cytosolic free Ca ⁺² concentration
Ang II	Angiotensin II
AVLE	Apocynum Venetum leaf extract
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
CaM	Calcium binding protein calmodulin
CCh	Carbacol
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
cNOS	Constitutive nitric oxide synthase
EDCF	Endothelium-derived contractive factor
EDHF	Endothelium-derived hyperpolarizing factor
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
ER	Endoplasmic Reticulum
ET-1	Endothelin-1
GC	Guanylate cyclase
GTP	Guanosine triphosphate
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
IP ₃	Inositol 1,4,5-triphosphate
IP ₃ .R	Inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor
KCl	Potassium chloride
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginine methyl ester
MLCK	Myosin light chain kinase
nNOS	Neuronal nitric oxide synthase
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
O ₂ ⁻	Superoxide anion
OH ⁻	Hydroxyl radical

ONOO ⁻	Peroxynitrite
PE	Phenylephrine
PGI ₂	Prostacyclin I ₂
ROS	Reactive oxygen species
SOD	Superoxide dismutase
SR	Sarcoplasmic reticulum
TXA ₂	Thromboxane A ₂



第一章 前言

第一節 研究背景

一、高血壓之流行病學

正常人之血壓值，收縮壓小於 120 mmHg，舒張壓小於 80 mmHg。一旦血壓值收縮壓大於 140 mmHg，舒張壓大於 90 mmHg 之範圍，即稱為高血壓。根據 JNC 7 報告，美國有五千萬之人口，患有高血壓。全球有十億人口患有高血壓。而台灣在 1993-1996 年之健康調查，患有高血壓的人口比率，成年人男性為 26%，女性 19 為%。

二、高血壓之治療

高血壓藥理上之治療，包括了：利尿劑、 α -阻斷劑、血管張力素酶抑制劑、血管張力素受體阻斷劑和鈣離子抑制劑(Lee & Oh, 2010)。

其中造成高血壓之因素為「血管硬化」，如減少了動脈順應性，便會增加心臟之後負荷，引起快速的血壓上升。「內皮失能」，為造成「血管硬化」之重要因素，同時為「血管老化」之表徵。因此，治療高血壓可從改善「血管內皮功能」著手；因減少了「動脈血管硬化」，增加動脈血管彈性，進而達到增加「血管動脈順應性」，而達到治療高血壓之效果(Correia & Haynes, 2007; Lee, Karam, Hussain & Winer, 2008; Takumi et al., 2010)。

三、近年來降壓中草藥作用在血管上的機制研究

中草藥藉由促進血液循環，引起血管舒張；以達到去血化瘀和治療高血壓之功效。例如：粉防己 (*Tetrandra stephania*)，含有成份 tetrandrine，藉由抑制在平滑肌細胞上之電壓活化鈣離子通道，達到血管平滑肌舒張的效果。(Kwan, 1994; Wang, Lemos & Iadecola, 2004) 川芎 (*Ligustrium wallichii*)，含有成份 tetramethylpyzazine(Kwan, 1994)，

可經由抑制 α -腎上腺受體、活化 ATP-敏感性鉀離子通道和活化鈣離子依存性鉀離子通道(Tsai, Lai, Huang, Liu & Cheng, 2002)。

鉤藤 (*Uncaria rhychophylla*), 可藉由抑制 L-型鈣離子通道, 達到降血壓的效果(Zhang, Chen, Sim & Kwan, 2004)。

其它像：人參 (*Panax ginseng*)、杜仲 (*Eucommia ulmoides*)、刺五加 (*Eleutherococcus senticosus*), 則可藉由內皮依存性舒張因子產生一氧化氮 (NO), 和活化鉀離子通道之方法, 來達到降血壓之效果。(Chen, 1996; Kwan, Chen, Deyama & Nishibe, 2003; Kwan, Zhang, Deyama & Nishibe, 2004; Kwan, Zhang, Nishibe & Seo, 2005; Kwan, Zhang, Sim, Deyama & Nishibe, 2004)

四、中草藥羅布麻對高血壓之應用現況

(1) 基源：

羅布麻 *Apocynum venetum* L., 一種廣泛生長在中國中部至西北部區域的野生植物, 屬夾竹桃科 (*Apocynaceae*)。在中國泛稱為羅布麻 (*Loubuma*) (Kamata, Seo & Nakajima, 2008), 在日本則稱為 *Rafuma* (Kim, Yokozawa, Hattori, Kadota & Namba, 2000a); 在中國和日本當地, 羅布麻的葉子通常用來泡茶飲用, 具有健康養生的作用。

(2) 中醫記載用法：

遠從中國古代, 羅布麻葉泡茶飲即是傳統用藥。動物研究顯示有顯著的利尿作用(Qian et al., 1988); 羅布麻葉對於心悸失眠、肝陽暈眩、治療高血壓(Kim et al., 2000a; Kwan et al., 2005; Ma & Chen, 1989; Tagawa, Kagawa, Nakazawa, Onizuka, Nishibe & Kawasaki, 2004)、腎腫發炎和神經衰弱...等疾病症狀有良好的治療功效。

(3) 羅布麻葉的成份：

目前，從羅布麻葉分離出的 16 種成分有：adhyperforin, hyperforin, amentoflavone, biapigenin, quercetin, avicularin, acetylated isoquercetin, acetylated hyperoside, astragaloside, trifolin, isoquercetin, hyperoside, quercitrone, rutin, chlorogenic acid and quercetin-3-O- β -d-glucosyl- β -d-glucopyranoside (Zhang, Liu, Zhang, Wang, Wu & Li, 2010)

(4) 現代科學研究：

科學家研究發現，從羅布麻葉中萃取出來的萃取物，具有利尿 (Qian et al., 1988)、抗脂質過氧化(Yokozawa, Dong & Kashiwagi, 1997)、保護肝臟(Xiong et al., 2000)以及抗氧化的功能(Kim, Yokozawa, Hattori, Kadota & Namba, 2000b; Ma et al., 1989; Takako Yokozawa, 2004; Yokozawa, Kashiwada, Hattori & Chung, 2002)。而氧化壓力常與神經退化性疾病相關(Shirai, Kawai, Yamanishi & Terao, 2005)。

科學研究也在十字迷宮測驗中發現，老鼠在口服 AVLE 30、125 mg/kg 明顯地增加出現在開放區域的時間比例，增強了抗焦慮的功能(Grundmann, Nakajima, Seo & Butterweck, 2007)。而在強迫式游泳測驗中 (註：Porsolt 在 1978 年所提出的方法：將大鼠或小鼠丟在有水的透明壓克力圓柱桶裡，老鼠會在水裡掙扎試圖逃脫，努力無效之後會放棄掙扎而漂浮在水面上呈現靜止不動的姿勢。此方法可用來作為篩選抗憂鬱藥劑之藥理學測驗)，大鼠在口服羅布葉萃取物 30 ~ 125 mg/kg 明顯地縮短在測驗中游泳不動的時間，顯示了抗憂鬱的功能。(Butterweck, Nishibe, Sasaki & Uchida, 2001; Grundmann, Nakajima, Kamata, Seo & Butterweck, 2009; Grundmann et al., 2007)

五、AVLE的血管舒張因子

羅布麻葉純萃提取物 Venetron 的主要兩種成份：Hyperoside 和 Isoquercitrin，主要有抗焦慮、抗氧化和降血壓等作用(Butterweck et al., 2001; Tagawa et al., 2004)。

Hyperoside 之化學式：quercetin 3-O- β -D-galactose

Isoquercetin 之化學式：quercetin 3-O- β -D-glucoside (Kamata et al., 2008)

六、血管內皮在血管張力調控之角色

動脈血管的生理構造組成基本上可分為三層：

(1)內皮層 intima layer, 主要為單層的 endothelial cells

(2)平滑肌層 medial layer, 主要為 smooth muscle cells

(3)動脈外膜 adventitial layer, 主要為由膠原纖維 (collagen)所組成，此膠原纖維層俱有固定和穩定血管與附近之器官之作用。

內皮是由一層許多單一個內皮細胞所組成。在血管組織系統中，內皮對於血管張力之調節使血管及分泌內分泌素，對平滑肌產生收縮或舒張佔有很重要功能與地位。動脈血管內皮失去功能，是導致動脈硬化主要原因之一。因此，血管收縮抑制劑，血管舒張作用劑，可恢復動脈「順應性」，減少動脈硬化導致的高血壓。(Glasser, 2000; Lee et al., 2008)。內皮會分泌以下因子：「內皮依存性舒張因子」(EDRF) (Furchgott RF, 1980)：一氧化氮 (NO)、前列素 I₂ (PGI₂)以及「內皮依存性過極化因子」(Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor ; EDHF) (Feletou & Vanhoutte, 2009)。當小血管動脈有EDRF (一氧化氮，NO) 產生時，「EDHF 也會功能性的增加更多活性。然而，在KCl 15—20 mM的低濃度下，KCl會引起較小的或沒有的收縮反應現象。然

而，在此低濃度下 (KCl) 卻能夠抑制小動脈血管的EDHF的現象 (Adeagbo & Triggle, 1993; Luksha, Agewall & Kublickiene, 2009; Shimokawa et al., 1996)。

根據文獻內皮不只產生舒張因子，另一方面也會產生收縮因子，例如「內皮依存性收縮因子」(EDCF): 內皮素 (ET-1)、血栓素 (TXA₂)、血管張力素 (Ang II)、O₂⁻ (superoxide anion)..... 等 (Edgaras Stankevičius, 2003)。

細胞血管舒張因子：一氧化氮 NO (nitric oxide)

1980年，Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro和Ferid Murad 發現血管內皮依存性舒張因子之物質：一氧化氮，因而獲得諾貝爾獎 (Furchgott & Zawadzki, 1980)。

一氧化氮可作為生物體內的訊息傳遞者(Nathan & Xie, 1994)，在生物體內適量產生時，有保護組織器官之作用，例如高血壓之病人，血管舒張之效應。然而持續性產生時，反而會產生細胞組織毒害之作用(Gross & Wolin, 1995)，例如：敗血症。

一氧化氮合成酶 nitric oxide synthase (簡寫為：NOS) 共存在三種形態：分成誘導型 (iNOS)、體質內皮型 (eNOS) 和體質神經型 (nNOS) (Forstermann, Nakane, Tracey & Pollock, 1993)。cNOS (constitutive NOS 包括了 eNOS and nNOS，稱為體質型)。在體質型細胞內，當 Ca⁺² 濃度上升，和 calmodulin，形成 Ca⁺²-calmodulin 複合體，接著活化一氧化氮合成酶 (NOS)，再將精胺酸 (arginine) 和 O₂，裂解為 citrulline 和 NO。NO 在平滑肌細胞中再活化 GC (Guanylate cyclase)，GC 將 GTP 催化成 cGMP，cGMP 造成平滑肌細胞舒張的現象。

方程式：

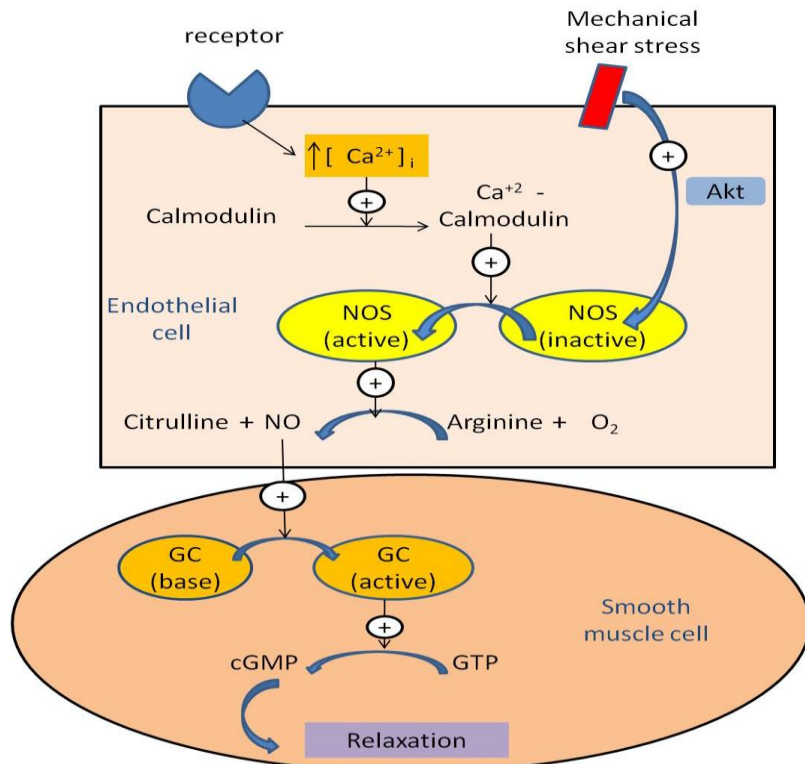
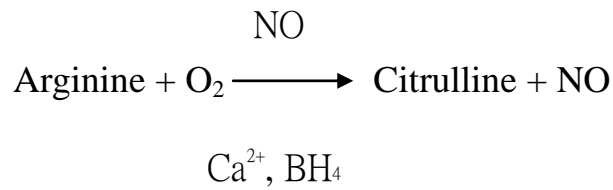


圖 1. 血管平滑肌舒張機轉

精胺酸 (arginine)和氧氣經 NOS 活化產生 NO (nitric oxide)，NO 從內皮擴散至平滑肌細胞並活化 GC。活化 GC 後，累積產生 cGMP。而後 cGMP 使平滑肌舒張。

而 NO 影響血管的功能：可分為直接作用血管產生舒張，或靠著抑制收縮物質 (如：血管張力素和交感神經之作用)影響，間接作用血管產生舒張。此外，NO 還有抗血栓凝集、抗發炎以及抗血管平滑肌增殖肥大的作用。(Forstermann, 2008; Forstermann & Munzel, 2006;

Forstermann et al., 1993)

在離體大鼠主動脈血管環內皮完整狀態之下，施予 L-NAME 3×10^{-4} 或者「血管去內皮」的狀態下，會完全抑制 AVLE 10 $\mu\text{g/ml}$ 之舒張效果；判定此作用在血管的物質為 EDRF 之物質：一氧化氮 (nitric oxide, NO) (Kwan et al., 2005)。

七、血管平滑肌在血管張力調控之角色

血管平滑肌的收縮，為反應血壓變化而維持血管肌肉長時間之等長張力之作用。

血管平滑肌的肌肉收縮，會被平滑肌細胞質內的「內鈣濃度」上升所引起。當平滑肌細胞「內鈣濃度」上升時，和攜鈣素 (CaM) 形成 Ca^{+2} -CaM 複合體，此複合體會活化肌原蛋白輕鏈磷酸酶 (MLCK)，並使肌原蛋白磷酸化，使平滑肌產生收縮。而平滑肌「內鈣濃度」之上升之原因有：被「L-型鈣離子通道」和「配位子陽離子通道」所引起之細胞質「外鈣」流入，以及受到位於 ER 上的 IP_3 -R 結合 IP_3 之活化釋放「內鈣」所影響 (Rembold, 1992; Webb, 2003)。

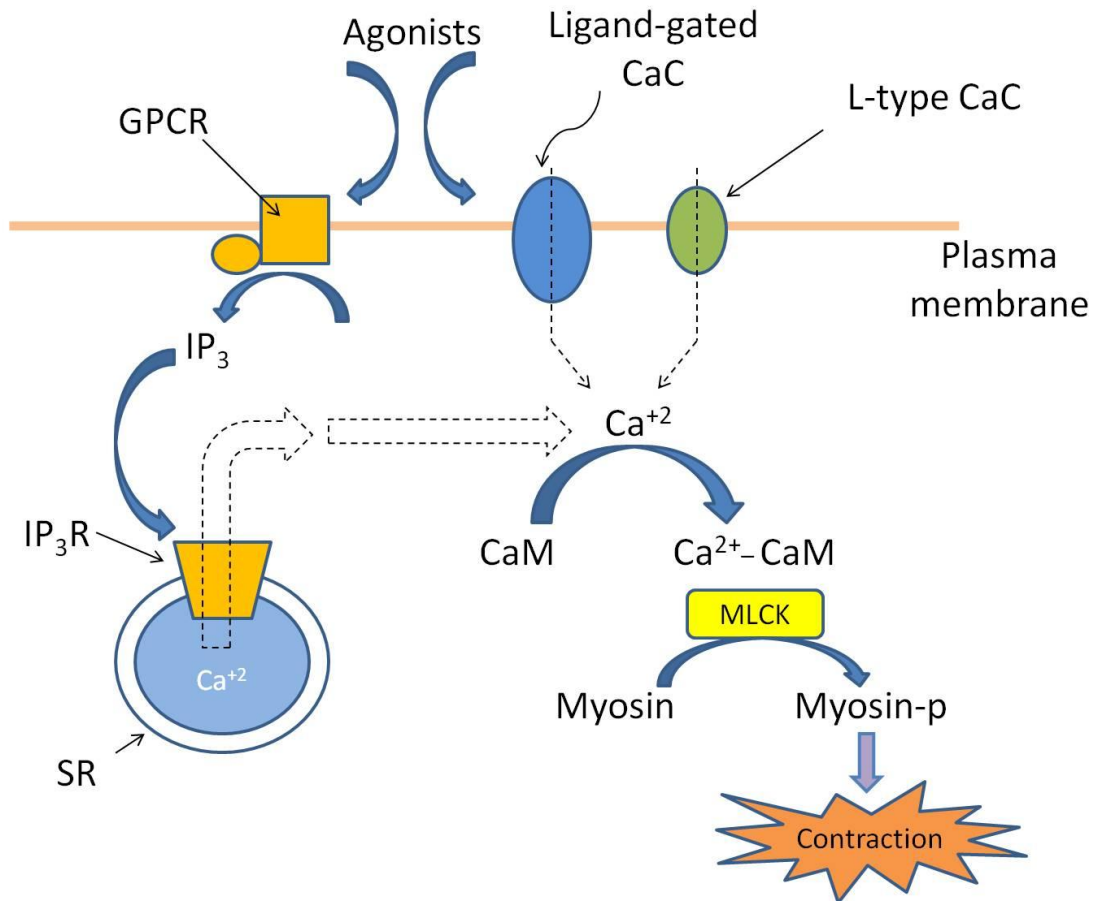


圖 2.血管平滑肌收縮機轉

IP₃ 之活化使 SR 中的內鈣大量釋放。配位子鈣離子通道以及 L 型鈣離子通道的開啟，使外鈣流入細胞質內。細胞內「內鈣濃度」的上升，與 CaM 形成 Ca²⁺-CaM 複合體，活化 MLCK，磷酸化肌原蛋白，使平滑肌產生收縮。

PE 為 α-腎上腺受體致效劑，與受體結合後經由 PLC 活化 IP₃ 和 DAG，而後 IP₃ 作用在肌漿網受體，活化肌漿網釋放內鈣流。DAG 則是活化 PKC，接著磷酸化肌凝蛋白輕鏈，產生平滑肌之收縮。(Rembold, 1992; Webb, 2003)

KCl 則是藉由平滑肌細胞產生興奮去極化之作用，活化電壓調控鈣離子通道之開啟，進而使外鈣離子進入細胞中，直接致使收縮 (Rembold, 1992; Webb, 2003)。

L-NAME (N^G -nitro-L-arginine methyl ester)為一氧化氮合成酶抑制劑。在本實驗中用來檢視逆轉 NO 之收縮作用。

SOD (superoxide dismutase)：超氧化物歧化酶；能將超氧陰離子催化為氧 (O_2)和過氧化氫 (H_2O_2)。可分為作用於細胞質中的 SOD_1 (Cu-Zn-SOD)，作用於粒腺體中的 SOD_2 (Mn-SOD)，和作用於細胞外的 SOD_3 (Cu-Zn-SOD) (Forstermann, 2010)。

第二節 研究目的

根據前學者之研究(Kwan et al., 2005)，AVLE 10 $\mu\text{g/ml}$ 對離體大鼠主動脈環，有血管舒張之效應。而在後續 AVLE 離體大鼠實驗中，發現 AVLE 累積至 30 $\mu\text{g/ml}$ 高劑量時，有逆轉舒張之現象。

因此，本研究目的在於：

探討高劑量 AVLE 對離體大鼠主動脈血管引起逆轉舒張 (restored- contraction) 之現象及機轉。

第二章 研究方法

第一節 研究材料

一、實驗試劑

1. 以下藥物皆以二次蒸餾水 (double distilled water) 配製：

◆ phenylephrine (PE)：配製 2.03 mg / ml = 10^{-2} M 之後，再稀釋十倍為 10^{-3} M，再稀釋 10 倍為 10^{-4} M，然後取 50 μl 加入器官槽 (organ bath) 當中，其容量 5 ml；所以最終濃度為 10^{-6} M (當 50 μl 之藥物投入 5 ml 之器官槽中，藥物濃度會被稀釋 100 倍)。

◆ carbachol (CCh)：配製 5.49 mg/ml = 3×10^{-2} M，然後稀釋十倍為 3×10^{-3} M，再稀釋十倍為 3×10^{-4} M，取 50 μl 加入器官槽 (organ bath)

5 ml 中，所以最終濃度為 3×10^{-6} M。

◆ potassium chloride (KCl) 80 mM：

分子量：74.55

取 22.4g KCl 溶入 0.1 L 之二次蒸餾水中，配成濃度為 3 M 之 KCl 之溶液。

而後，取 130 μ l 加入 5 ml 之器官槽中，所以最終濃度為 80 mM。

◆ N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)：

分子量：269.7

配製 2.69 mg/ml = 10^{-2} M，然後取 150 μ l 加入器官槽 5ml 中，所以最終濃度為 3×10^{-4} M。

註：以上藥物購買自 Sigma chemical 公司 (St. Louis, Mo USA)。

◆ *Apocynum venetum* leaf extract (AVLE)：取 1 mg 的 AVLE 溶於，1 ml 之二次水中，濃度為 1 mg / ml。然後取 50 μ l 加入器官槽 5 ml 中，最終稀釋 100 倍，濃度為 10 μ g/ml。藥品來源：Tokiwa 製藥廠。

◆ Krebs's solution 所含成分之濃度 (mM)：

NaCl 119 mM，NaHCO₃ 25 mM，D-glucose 11 mM，KH₂PO₄ 1.2 mM，KCl 4.7 mM，MgSO₄ · 7H₂O 1.2 mM，CaCl · 2H₂O 2.4 mM。

Krebs's solution 溫度保持 36.5° C 在充氣 (carboxigen) 之狀況下維持，酸鹼值 p H 7.4。

2. 藥物配製注意事項：

(1) 秤藥用具：使用藥秤，單位至 mg 小數點後一位。

一支鐵製藥杓，一支小「細調節輪」藥杓。

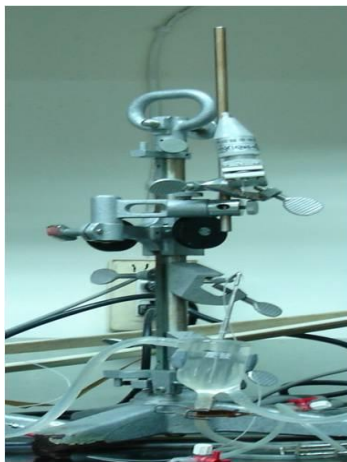
秤藥之小塑膠盤。數張擦手紙；秤完藥後用擦手紙清理器具。

(2) 將裝有 2 公升之一次水的大量筒，放至電磁攪拌加熱爐上，放入磁棒。電磁攪拌強度調整至 6~8 之強度，使磁棒攪拌轉速至最大，加速溶解藥物。

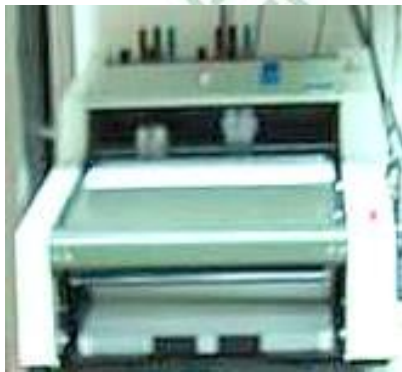
二、實驗儀器：

1. 使用儀器項目

Gross isometric displacement transducer FT03



Gould 2600s 紀錄



Gould transducer amplifier



圖 3. 離體動物血管等長張力儀，紀錄血管收縮和舒張之情形。

2. 準備與校正儀器：

(1). 準備肥皂水和小刷子，刷洗器官槽（organ bath）。刷洗後，用一次水沖洗器官槽。



圖 4.，transducer 一座，加上
器官槽。

圖 5.，器官槽（organ bath）。

(2). 調整血管張力紀錄器，按電源按鈕啟動；開關扳鈕「measure」
「zero」；在「measure」時，調整轉鈕「position」將墨水筆頭
各調至基準線。若先調 position 無用；後調 balance。

圖 6.如下：



三、 實驗動物

(1)、Male Sprague-Dawley rat, 體重：350±80 克 (gm) 用具準備：
報紙、大骨剪 (剪皮骨)、小剪 (剪組織器官)、攝子...等。

(2)、使用 CO₂ 犧牲老鼠，取下老鼠主動脈 (如下圖)後，先用攝子夾住主動脈末端，在裝有 Kreb's solution 之圓底盤中浸洗、迅速



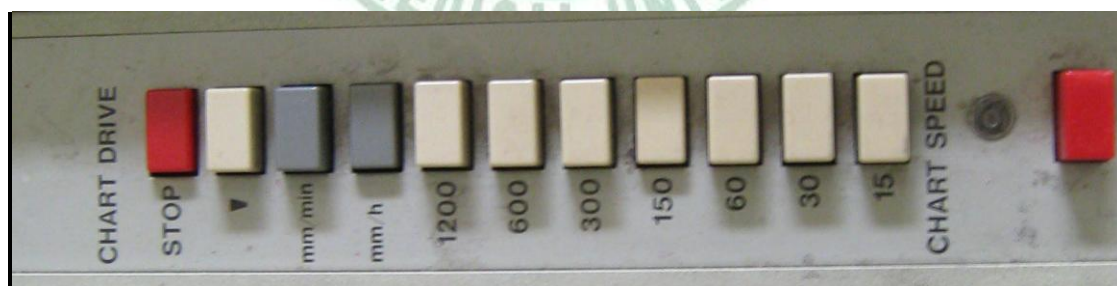
圖 8.：白色組織為清理完結締組織之離體大鼠主動脈，與紅色組織 (剛取出之離體大鼠主動脈) 圖。容器中盛裝之克氏生理溶液 (Kreb's solution)，每十分鐘換一次新溶液以保持溶液溫度，以及組織所需之養分；溶液中氧氣氣泡管需全程供應。

搖洗，將表面血液大致洗浸過後，放至第二盤 Kreb's solution (放入氧氣管)。用大頭釘和塑膠底盤固定主動脈兩端之 connective tissue (結締組織)，用兩支攝子並用夾剪之方法，清除主動脈表面結締組織之和殘餘血塊。(注意在解剖主動脈，和清理結締組織時儘量不要拉扯到主動脈血管，避免破壞血管內皮之作用活性)。清理結締組織時，需要每十分鐘換一次 Kreb's solution，

以保持溫度及養分，必免血管組織失去活性。

- (3)、將主動脈末端夾子夾過的地方和大頭釘釘過的地方，用刀鋒銳利之小剪，一刀到底剪下，接下來以二分之一等分法，將主動脈血管分配等分剪成為 2.5 ~ 3.0 mm 的主動脈血管環 (aortic rings)。
- (4)、將主動脈血管環小心仔細穿過綁線鐵鈎和塑膠棒鐵鈎；架設張力傳導器。必需注意：鐵鈎刺傷內皮；架設時用手指捏住線和塑膠棒上端作固定 (避免血管環組織的拉扯，以及鐵鈎和塑膠棒鐵鈎互相卡住，也會傷害內皮)，再將線圈掛在張力傳導儀的掛鈎上。
- (5)、將張力傳導器之「粗調節輪」往上拉 2 克張力，兩手並用將後面的「鎖轉」轉緊。
- (6)、啟動機器「150」、「mm/h」、「▼」，等參數按鈕讓「張力紀錄器」裡的紀錄紙開始啟動紀錄。

圖 9.如下：



註：動物實驗參考指引(Sammut et al., 1998)

第二節 研究設計

一、實驗控制組流程：

- (1) 張力靜置期 equilibration：開始 90 分鐘之靜置期 equilibration；每十五鐘 wash 一次。共 6 次。
- (2) 張力建立期 stabilization：靜置期 equilibration 之後，加 KCl (80 mM 共 3 次)建立標準張力。一次 KCl，作用收縮期間約 30~40 分鐘。30~40 分鐘後，每五分鐘 wash 一次；共 wash 五次，約 20 分鐘。「兩個 KCl 之間要相隔 20~30 分的恢復期 (recovering)」
- (3) 實驗藥物作用期 experimentation：KCl 加完後，先加 phenylephrine (PE) 10^{-6} M 約 20 分後，後加 carbachol (CCh) 3×10^{-6} M，測試內皮活性之良好程度，實驗採用內皮活性良好的血管環，使 PE 收縮張力曲線下降 60~80%，最高完整張力曲線下降 100% 至水平基線。carbachol (CCh) 作用完後，每隔 5 分鐘換洗 Kreb's solution，5 次。之後開始實驗藥物藥程。
- (4) 標準化期 standardization：最後，實驗藥程結束後，加最後一次 KCl；比較實驗前後 KCl 之活性差異 (註：KCl 實驗前後張力大小正常不超過 10%)。

二、大鼠血管內皮與去內皮實驗設計

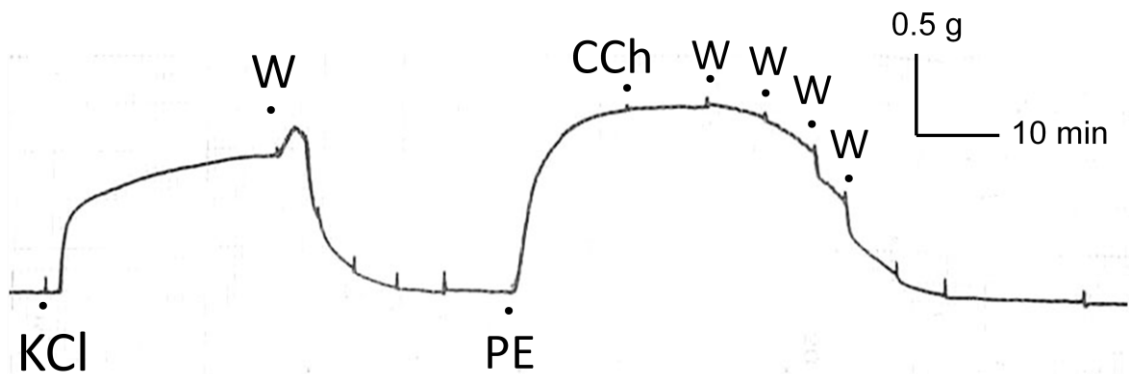


圖 10. 物理去內皮方法：使用棉花細棒摩擦去內皮。

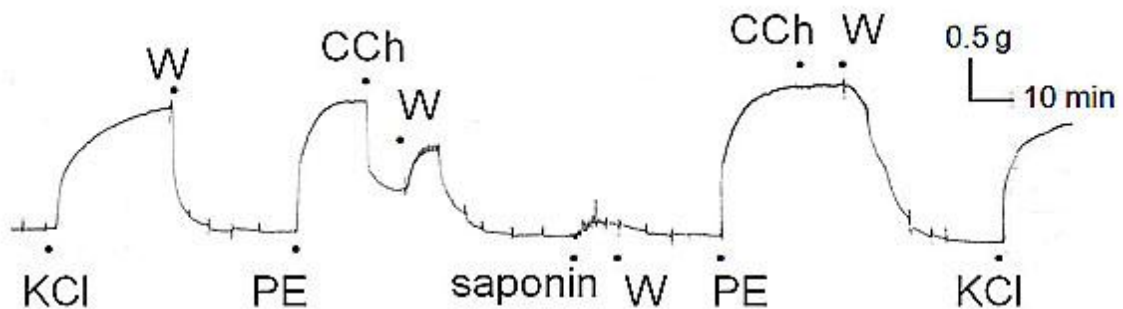


圖 11. 化學去內皮方法：皂素 (saponin 100~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 除去大鼠血管環內皮(Kwan et al., 2003)。

內皮好壞取捨決定於：CCh 舒張程度和 PE 張力收縮程度之比例，到達 60 % 以上者為內皮活性良好者；低於 20 % 者可自動作為去內皮之實驗設計。

三、AVLE 低劑量舒張血管實驗：

實驗中，AVLE 低劑量累加為 1、3、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

四、AVLE 高劑量逆轉舒張血管實驗：

實驗中，AVLE 高劑量累加為 30、90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

五、AVLE 高劑量逆轉舒張之機轉：

ROS 阻斷劑，測定內皮和血管平滑肌，測定逆轉舒張之詳細機轉。

六、AVLE 長時間培育時對內皮及平滑肌作用完整之影響：

羅布麻高劑量使用過後，CCh、KCl 張力統計比較一般正常 CCh、KCl 之張力值。

◆ 其它注意事項：

- (1)、藥物配製完成後，器具、藥品需收拾乾淨。
- (2)、將泡好之 Kreb's solution 先倒入大燒瓶中。
- (3)、將裝有 Kreb's solution 之水瓶放入水循環保溫機中，（注意若水面太低，請先加一次水）並啟動循環保溫器電源，讓水循環保溫。
- (4)、在 organ bath 和兩平底圓盤中，加入 Kreb's solution。都加入 Kreb's solution 後，再開氧氣瓶。（實驗中，需注意每個 organ bath 裡的輸氣管之氧氣有無阻塞、中斷）。
「註：原因是若有其中一氣泡管，沒有浸入液體曝露在空氣中，會使此氣泡管加速流出好幾倍（壓力差）的氣體流量；所以若有氣泡管曝露空氣中，必須關掉它的此氣管之閥門。」
- (5)、注意氧氣筒上的指針標示，若指針標示低至 30~20 刻度之間，必需準備更換氧氣筒。

第三節 實驗統計

實驗結果統計使用 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 表示平均值及誤差，以 Student's t test 或 ANOVA test 等統計方法分析其差異顯著性，當 P 值小於 0.05，其值認為具有統計上的意義。

第三章 研究結果

一、低濃度 AVLE 對內皮 (endothelium) 依存性及對於大鼠主動脈血管環舒張 (relaxation) 之影響。

在內皮完整狀態下 (使用 CCh 3×10^{-6} M 測定內皮作用活性) 的離體大鼠主動脈血管環中，給予前置收縮劑 PE 10^{-6} M，後給 AVLE 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，離體大鼠主動脈血管環能行使舒張的效應。如結果圖 12 B。

在去內皮的狀態下，(使用皂素 saponin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ；將離體大鼠主動脈血管環去內皮)，會使 AVLE 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的舒張效應消失，如圖 12 D。與在 PE 10^{-6} M 之前使用一氧化氮合成酶抑制劑 L-NAME 3×10^{-4} M，則會取消低劑量 AVLE 舒張之效應。如圖 12 C。

統計如 (圖 12 E.)



Fig. 12

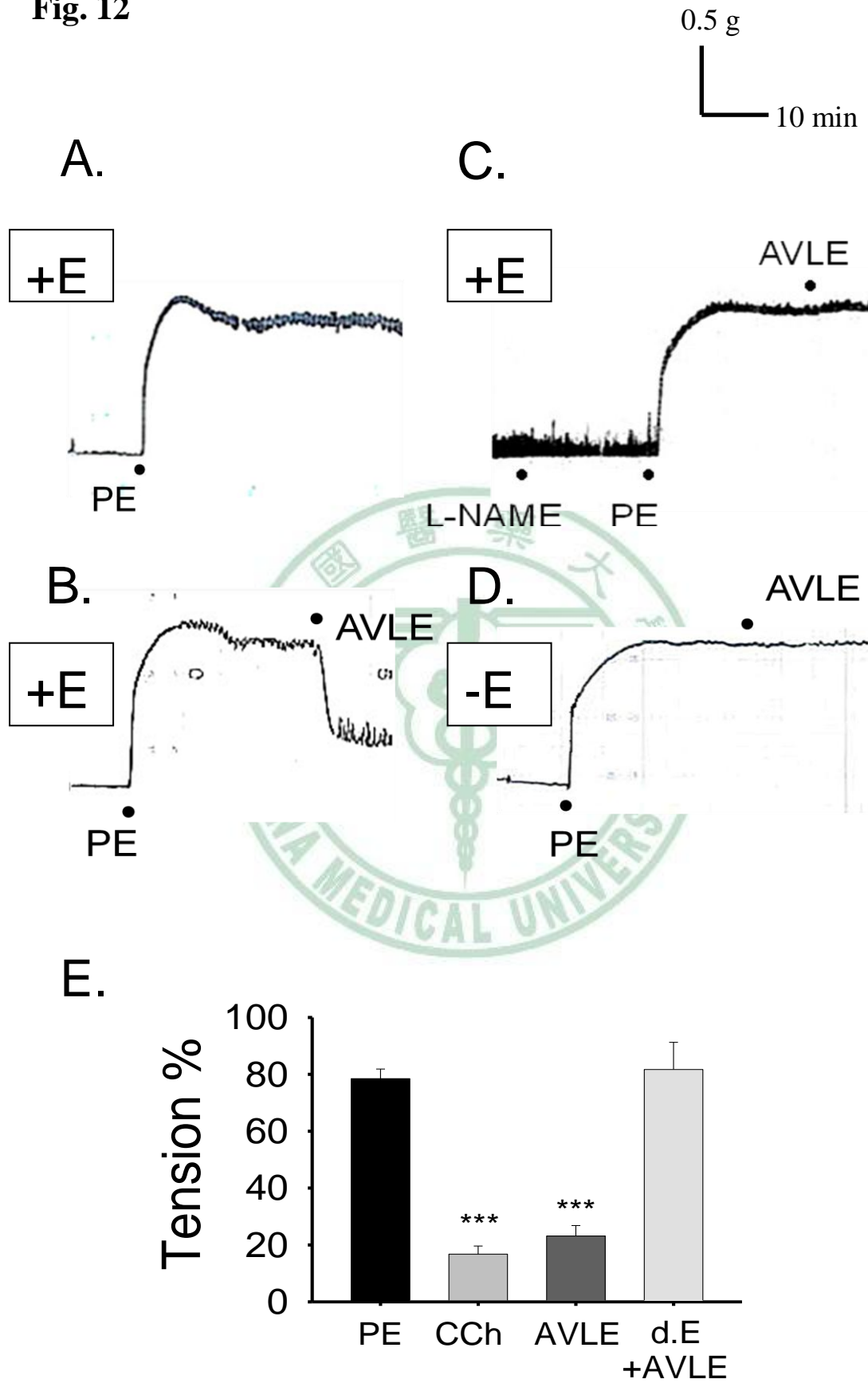


Fig. 12 AVLE- induced vaso-relaxation in rat aortic rings. A. PE control. Tracing of phenylephrine (PE) 10^{-6} M. B. The tracing showing the effect of AVLE 10 μ g/ml on contractile responses of rat aortic rings with intact endothelium in response to phenylephrine 10^{-6} M (PE; n= 11, from 3 rats). The CCh 3×10^{-6} M, the endothelium functional test of the control in experiment in response to pretreated PE 10^{-6} M. C. Tracings showing that L-NAME prevented the relaxant effect of AVLE 10 μ g/ml on PE 10^{-6} M contracted rat aortic rings. D. Tracing of endothelium denuded aortic contraction with compared to that endothelium intact when they were contracted with PE 10^{-6} M followed by addition of AVLE 10 μ g/ml. E. Data summary of the relaxant effect of AVLE 10 μ g/ml on the contractile responses of rat aortic rings with intact endothelium in response to phenylephrine 10^{-6} M (PE; n = 11). And with denuded endothelium (abbreviated as d.E) of rat aortic rings abolished the AVLE 10 μ g/ml relaxation effect on phenylephrine 10^{-6} M contractile response. The result were compared to the relaxant effect of CCh 3×10^{-6} M under the same experimental condition. *** Statistically significant (P < 0.001) compared to PE control.

二、去內皮與完整內皮之靜置張力下；AVLE 濃度累加至高劑量恢復收縮之作用。

低劑量 AVLE 10 $\mu\text{g/ml}$ 時能產生最大的內皮調節產生 NO 血管舒張作用效應。(NO-mediated and Endothelium-depend manner)。而當實驗繼續累積至高劑量 30 $\mu\text{g/ml}$ 、90 $\mu\text{g/ml}$ 以上時，血管舒張的效應減弱了，反而出現逆轉舒張；逆轉舒張之現象(圖 13 B., C.)。當累積劑量至 90 $\mu\text{g/ml}$ ，甚至超過 90 $\mu\text{g/ml}$ 時，AVLE 會減少離體大鼠血管環舒張之效應，使張力水平恢復至前置血管收縮劑 PE 10^{-6} M 之收縮高度。

在離體大鼠主動脈血管環去內皮的狀態下(圖 13 D.)，則看不出此逆轉舒張之現象。因為低劑量舒張的作用被取消了，因此看不出逆轉舒張之反應高度。

因此，實驗中以去內皮與否之離體大鼠主動脈血管環；前置低劑量血管收縮劑 PE 3×10^{-8} M，後累加 AVLE 至高劑量，作為觀察逆轉舒張；逆轉舒張反應的張力程度之實驗設計(圖 14 A., B.)。以及前置使用 L-NAME 3×10^{-4} M 作為觀察 AVLE 高劑量之逆轉舒轉；逆轉舒張反應之張力現象(圖 14 C.)。統計圖如圖 14.E。

在實驗中，在靜置水平張力下之離體大鼠血管環，給予 AVLE 以劑量累加之方法至高劑量。結果顯示十個離體大鼠動脈血管環中占有四成比例之血管環數量，具有「spike activity」跳動活性之現象，而且具有重複性。(如圖 15.)。

Fig. 13

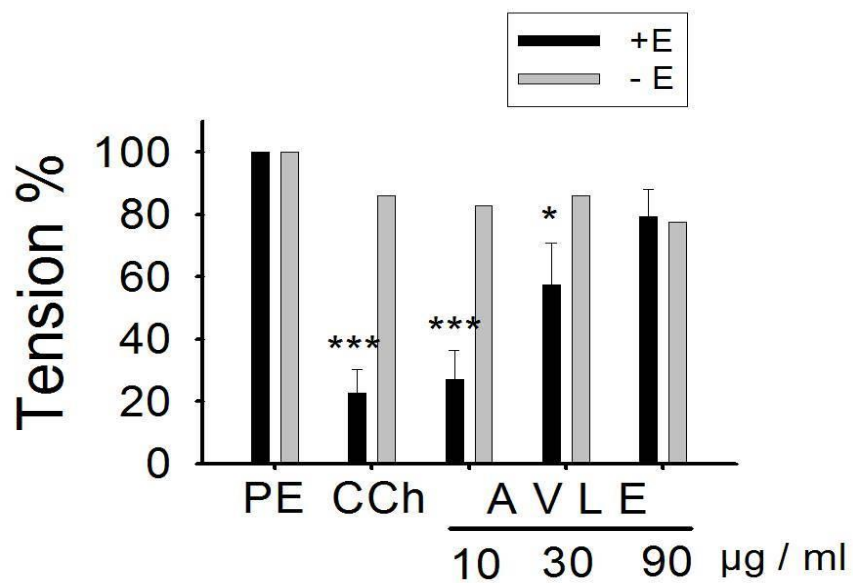
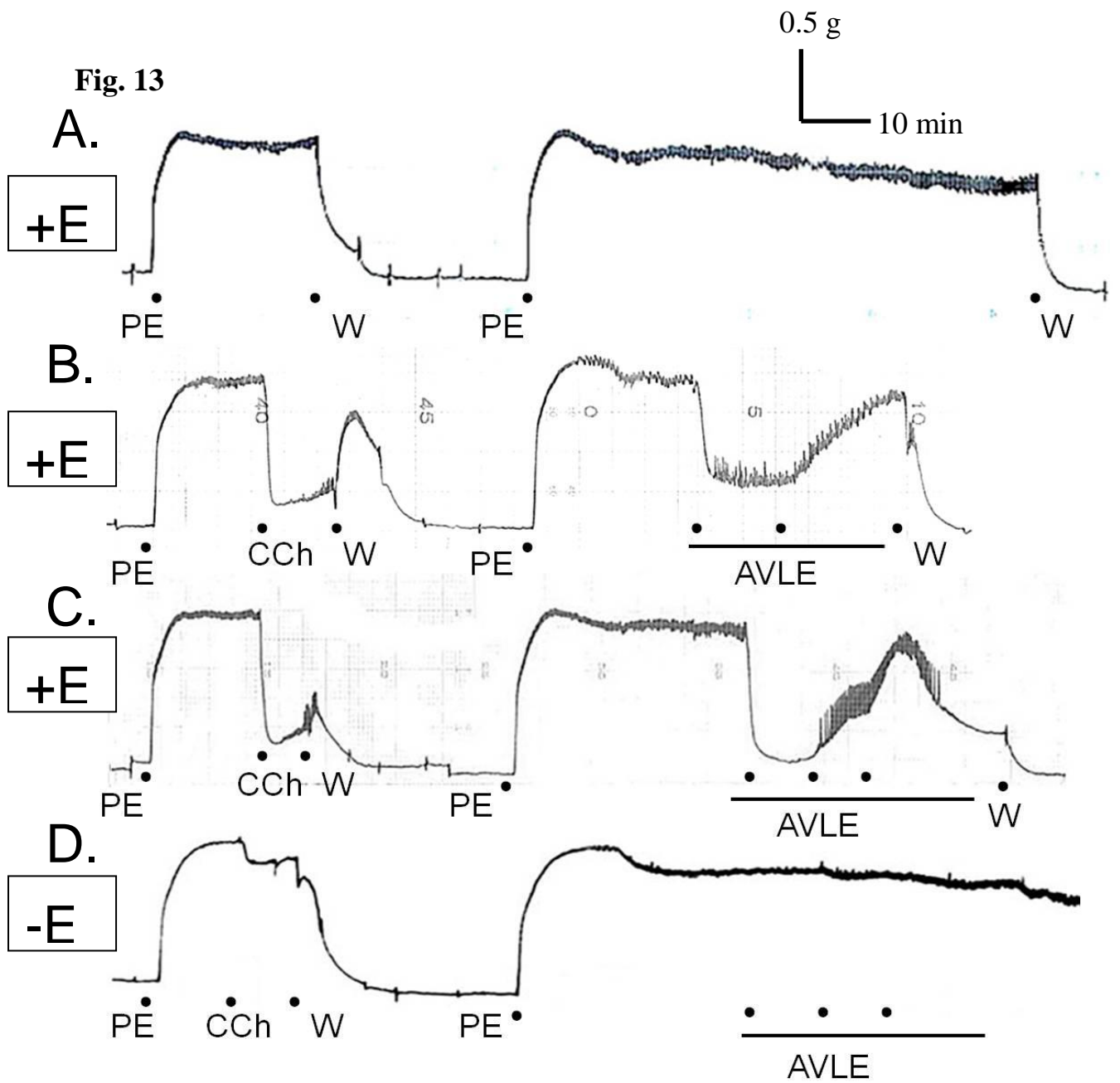


Fig. 13 High dose AVLE restored- contraction effect in rat aortic rings. A. PE control. Tracing of PE 10^{-6} M. B. Typical tracing of concentration-dependence of AVLE 10, 30 $\mu\text{g/ml}$ on PE contractions compared with control. C. Typical tracing of concentration-dependence of AVLE 10, 30, 90 $\mu\text{g/ml}$ on PE contractions compared with control. D. tracing of concentration-dependence of AVLE 10, 30, 90 $\mu\text{g/ml}$ on PE contractions with endothelium-denuded aortic rings. Typical tracing of concentration-dependence of AVLE on PE 10^{-6} M contracted aortic rings (-E, endothelium-denuded; +E, endothelium intact). Removal of endothelium was achieved by incubating the aortic ring with Saponin 200 $\mu\text{g/ml}$ for 5 minutes and assessed as the diminishment of relaxation induced by CCh 3×10^{-6} M. E. Summary of data obtained under conditions as described in the legend of B. (statistically significant * , $P < 0.05$; ***, $P < 0.01$)(n = 5, from 3 rats)

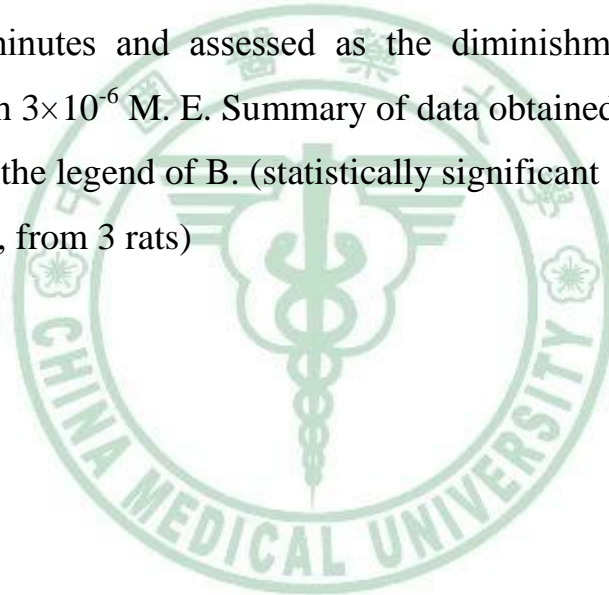


Fig. 14

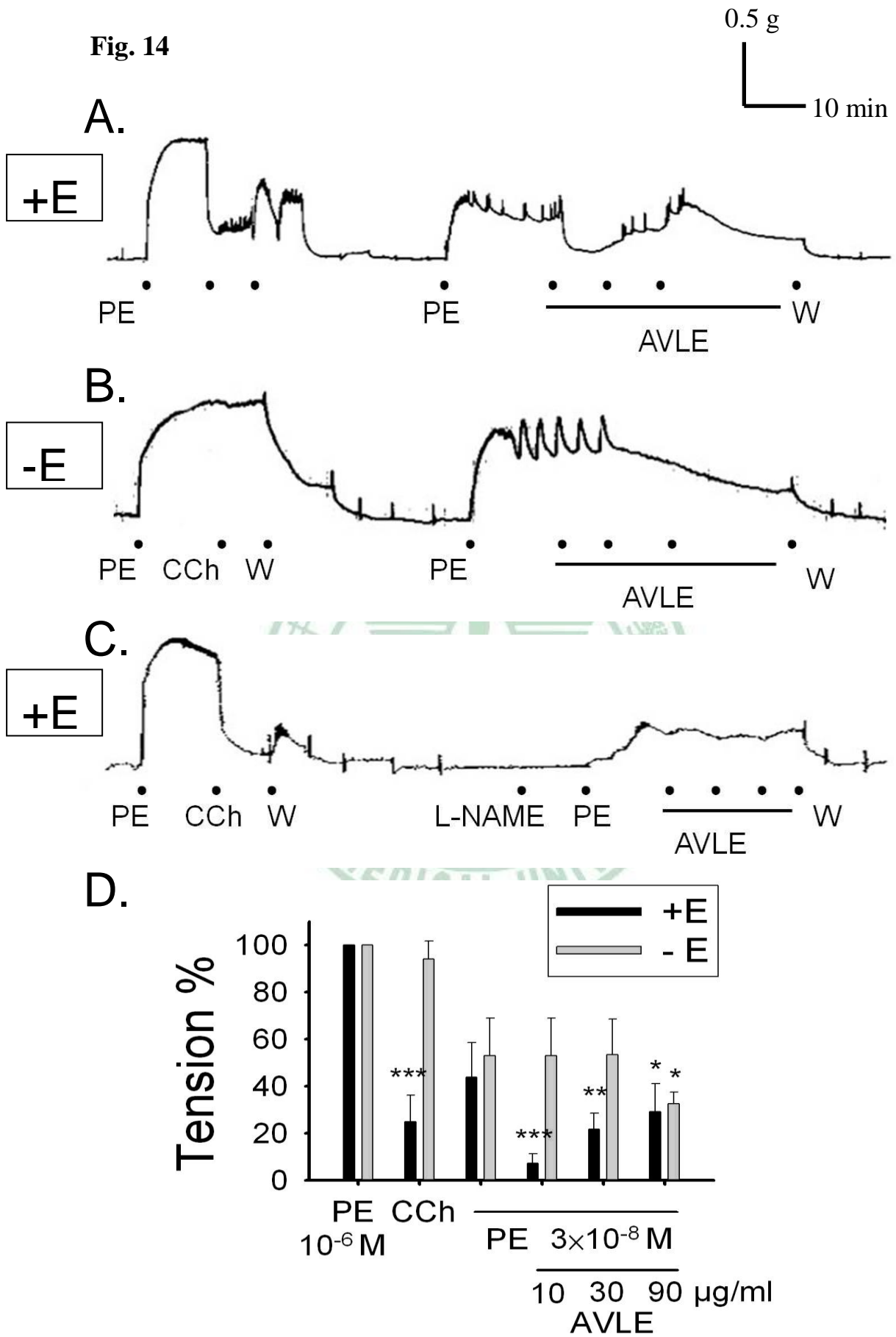


Fig. 14 High dose AVLE restored- contraction effect on pretreated low dose PE in rat aortic rings A. Typical tracing of concentration-dependent of AVLE 10, 30, 90 $\mu\text{g/ml}$ on PE-induced contraction in rat aorta with endothelium (+E) . B. compared with that in denuded endothelium (-E) at low dose PE 3×10^{-8} M. The restoration of PE-contraction remains below the plateau PE response after introduction of AVLE 90 $\mu\text{g/ml}$. C. Experiment condition remains the same as in the about protocol except that L-NAME 3×10^{-4} M was used to inhibit the NO formation. D. Data summary of experiment as described in legend of Fig 14 A, B. (** P < 0.01, *** P < 0.001) (+E, n=6, from 3 rats) (-E, n=6, from 2 rats)



Fig. 15

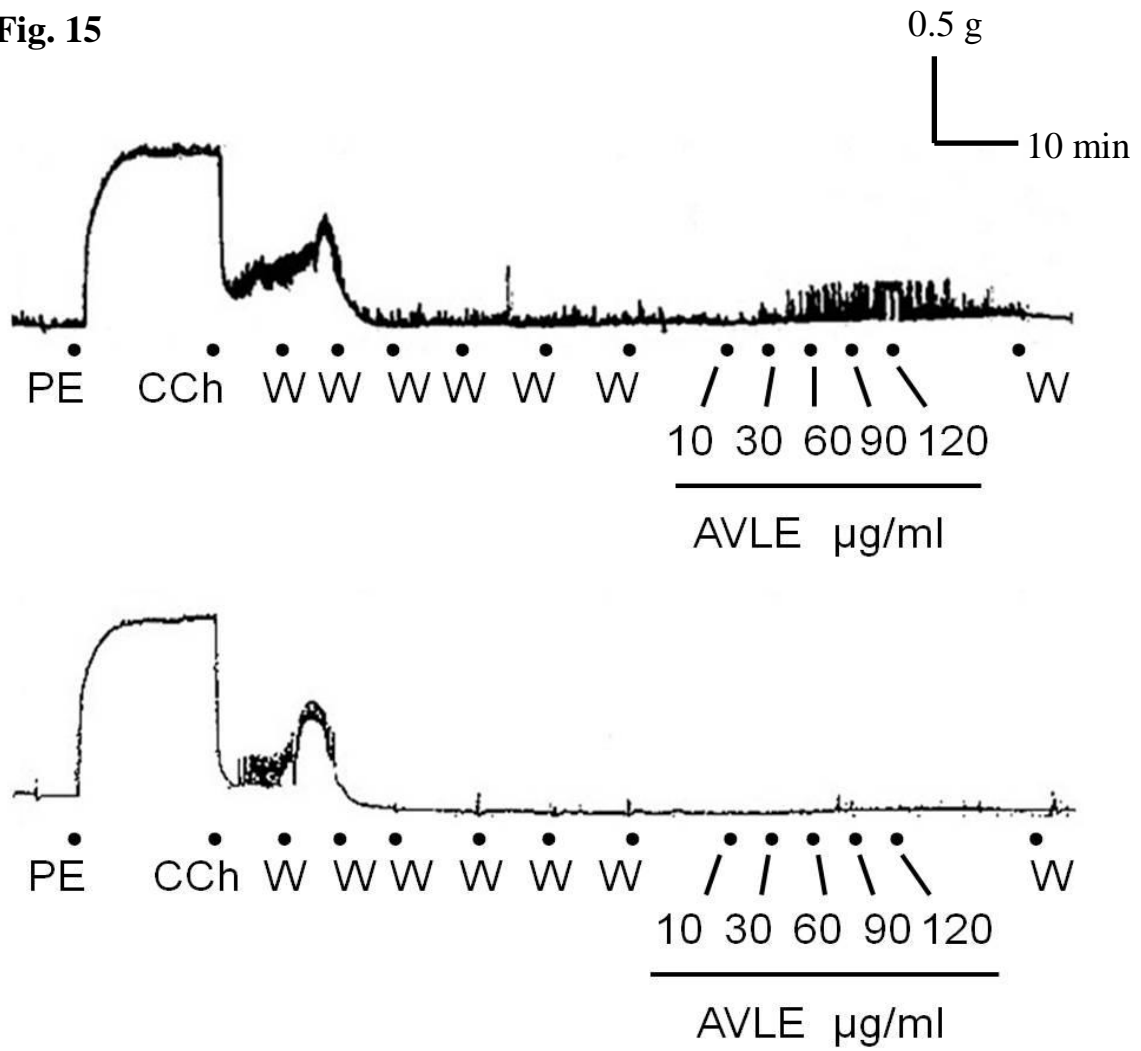


Fig. 15 「 Spike activity 」 of high dose AVLE effect on resting tension in rat aortic rings 「 Spike activity 」 of high dose AVLE 30, 90 µg/ml on resting tension level of rat aortic rings. Upon Two tracings are control and high dose of AVLE stored contractile effect.

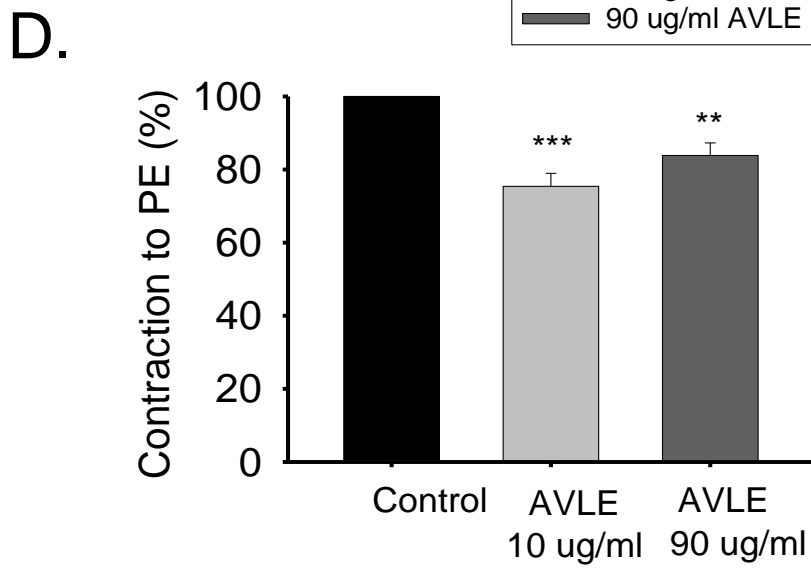
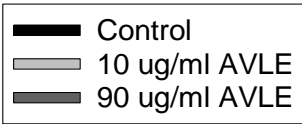
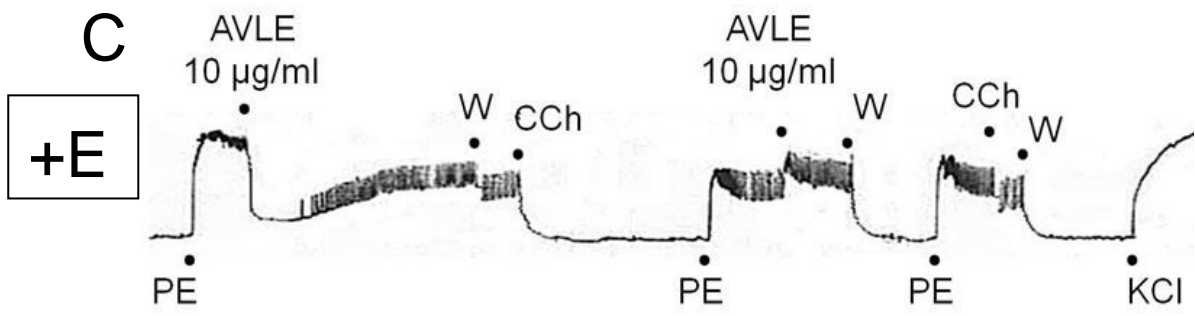
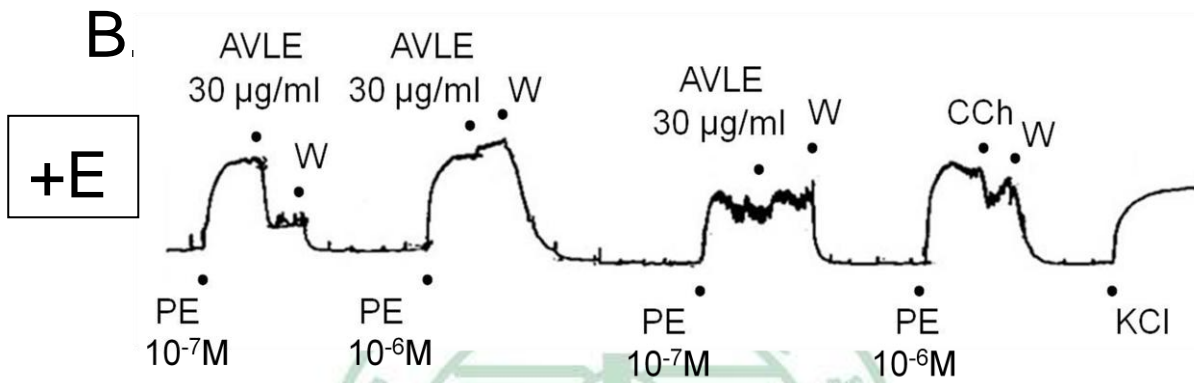
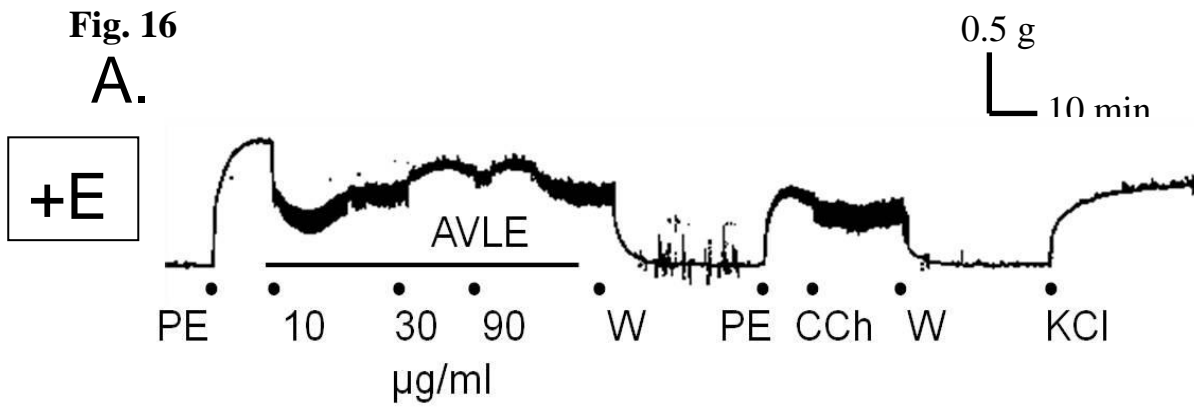
三、AVLE與血管培育時間對血管收縮及舒張之影響

單劑量 AVLE 10 $\mu\text{g/ml}$ 和單劑量 30 $\mu\text{g/ml}$ 有著舒張血管之效應 (圖 16 A., 16 B.), 而單劑 AVLE 10 $\mu\text{g/ml}$ 可以重複數次而不影響血管內皮活性。單劑 30 $\mu\text{g/ml}$ 卻不能重複第二次 (圖 16 B.) (第二次作用下, 便無舒張血管之效應), 經 CCh 3×10^{-6} M 作用內皮顯示, 當 AVLE 30 $\mu\text{g/ml}$ 重複時 (固定浸浴在器官槽 10 分鐘), 內皮活性也會逐次減少 20%。

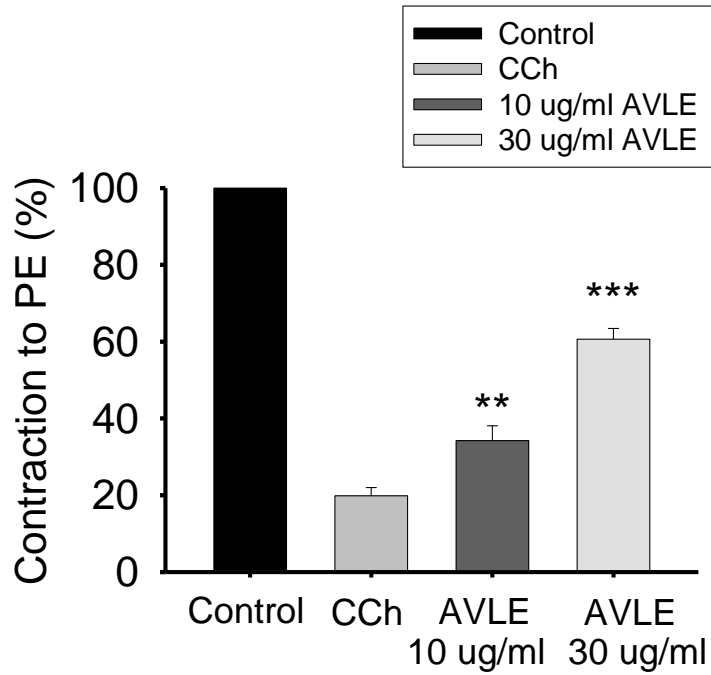
在低劑量 AVLE 10 $\mu\text{g/ml}$ 「長時間」浸浴在器官槽中 (約 40 mins), 則無法再重覆單劑低劑量 10 $\mu\text{g/ml}$ 之舒張作用 (圖 16 C.), 而且 CCh 內皮作用活性測定中, 與後加的 PE, 測定活性作用皆會有減少 20% 之現象。如圖 16 E. 與 圖 16 F. 顯示出 AVLE 在離體器官槽中, 「低」劑量「長」時間, 與「高」劑量「短」時間, 皆會對離體大鼠主動脈產生損害之作用。

結果顯示 AVLE 之功能活性有「劑量依存性」和「時間依存性」之特徵。

Fig. 16



E.



F.

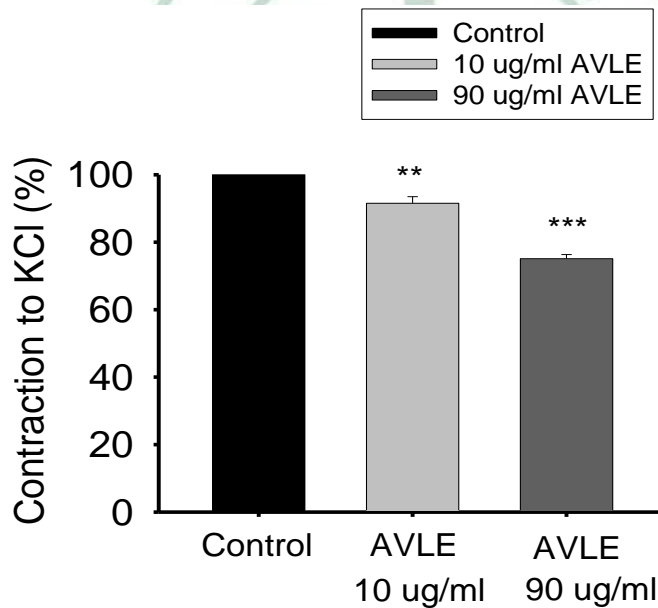


Fig. 16 Damaged effect of high dose and low dose long time incubation of AVLE in rat aortic rings. A. Tracing of the effect high AVLE (90 μ g/ml) on the subsequent contraction to PE 10^{-6} M, CCh-induced relaxation and contraction to KCl 80 mM. B. Tracing of CCh after AVLE 30 μ g/ml three times repeat on PE 10^{-6} M and 10^{-7} M. C. Tracing of low AVLE (10 μ g/ml) in time control manner (incubation for

40 mins), and repeat CCh test. D. Statistics of pretreated high dose and low dose long time incubation of AVLE effect on PE. Black bar: Control contractions to PE 10^{-6} M. (n=5, from 3 rats) Gray bar: Contraction to PE 10^{-6} M after incubation with low AVLE 10 μ g/ml for 40 minutes on rat aortic rings. (n= 7 rings, from 2 rats) Black gray bar : Contraction to PE 10^{-6} M after incubation with AVLE 30 μ g/ml for 10 minutes on rat aortic rings. (n= 6 rings, from 3 rats) E. Statistics of pretreated high dose and low dose long time incubation of AVLE effect on CCh. Black bar: Control contractions to PE 10^{-6} M. (n=7, from 3 rats) Gray bar: The statistics of normal CCh control. (n=5 , from 3 rats) Black gray bar: The statistics of low AVLE 10 μ g/ml incubation in organ bath for 40 minutes compared with control of CCh. (n= 7 rings, from 2 rats) White gray bar: Statistics of CCh after high AVLE 30 μ g/ml (each incubation for 10 mins repeat two or three times) compared with control with CCh. (n= 5 rings, from 3 rats) F. Statistics of pretreated high dose and low dose long time incubation of AVLE effect on KCl. Black bar: KCl control response. (n=5, from 3 rats) Gray bar: Control of KCl and low dose AVLE 10 μ g/ml incubation in organ bath for 30~ 40 mins on rat aortic rings. (n=7, from 3 rats) Black gray bar: Control of KCl and KCl after high AVLE 30~ 90 μ g/ml through the (once high dose AVLE incubation in organ bath more than 30 minutes) experiment. (n=6, from 3 rats) (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

四、高劑量 AVLE 對內皮和血管平滑肌作用後，完好程度之統計

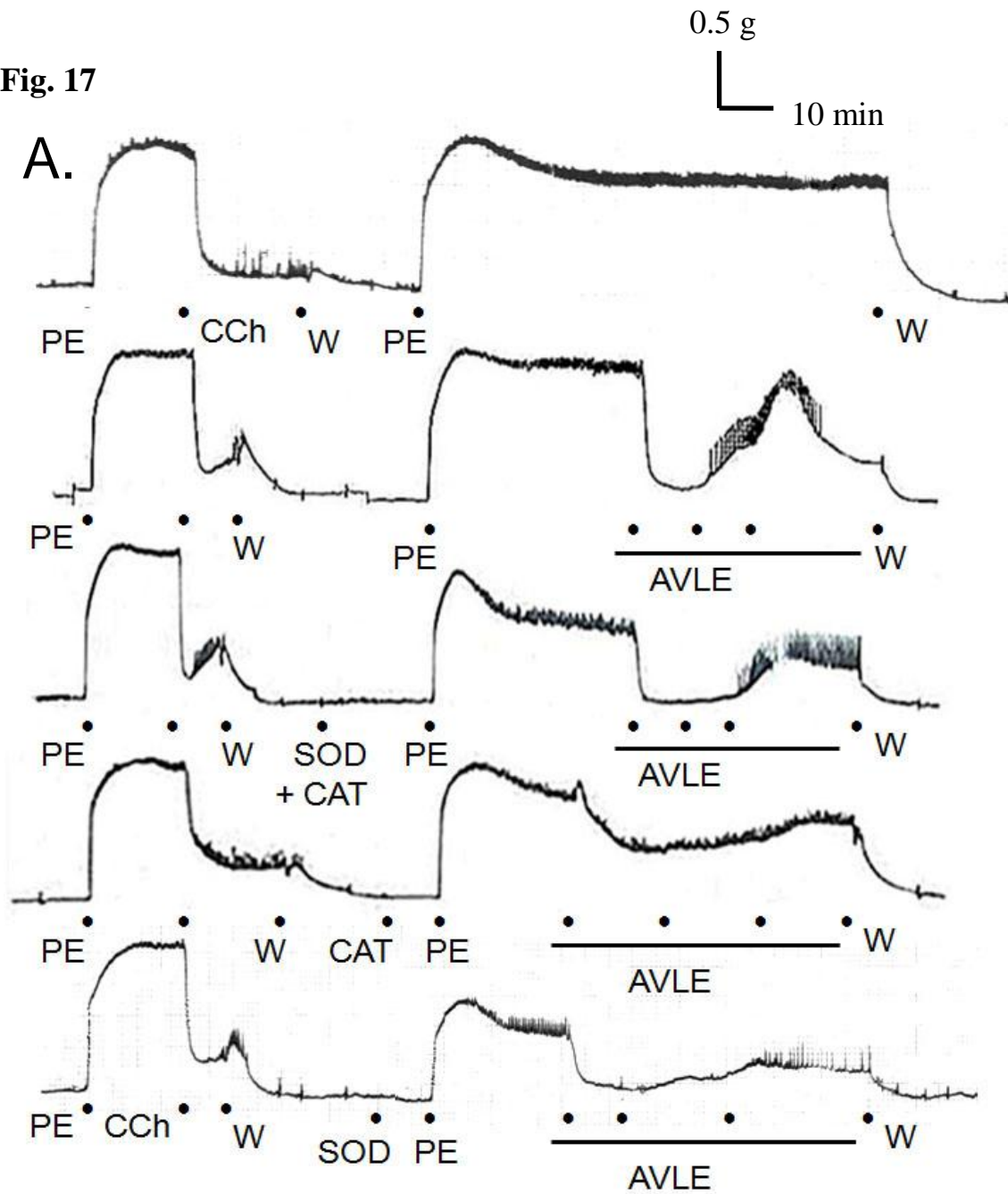
圖 16 A.：正常控制組，比較圖 16 B.：高劑量 AVLE 短時間浸浴在器官槽中和圖 16 C.：低劑量 AVLE 長時間浸浴在器官槽中；使用 CCh 檢測內皮活性作用。其中，高劑量短時間浸浴在器官槽和低劑量長時間浸浴在器官槽，內皮功能活性與 PE 活性與正常控制組比較，皆減少 20 %。而高劑量長時間則對 KCl 有 30 % 損害影響之現象 (圖 16 F.：Black gray bar)。

五、AVLE 高劑量收縮之機轉

高劑量 AVLE 逆轉舒張之作用會被超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 200 U 結合過氧化氫歧化酶 (catalase) 200U，取消了 AVLE 累加 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 逆轉舒張；逆轉舒張之作用。

單劑量之 SOD (200 U)，也可單獨取消高劑量 AVLE 逆轉舒張 (restored- contraction) 之反應。如圖 17. A 與統計圖 17. B。

Fig. 17



B.

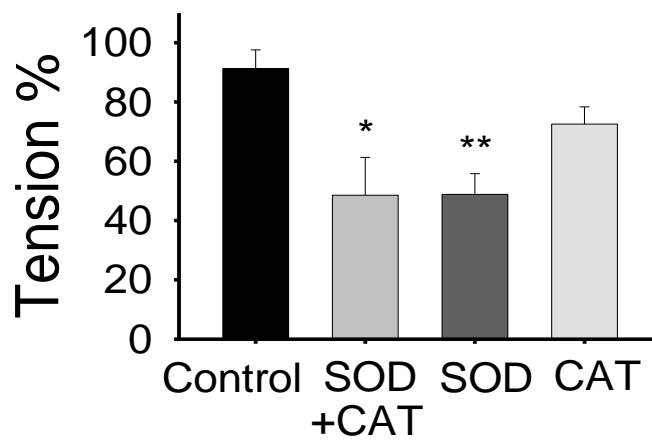


Fig. 17 SOD and catalase each 200 units abolished the restored contractile response of 10, 30 and 90 $\mu\text{g/ml}$ of AVLE . A. The third and fourth tracing is normal control and AVLE dose control. The lowest tracing is SOD combined catalase each 200 units abolished the restored contractile response of 10, 30 and 90 $\mu\text{g/ml}$ AVLE . B. Data summary of AVLE 90 $\mu\text{g/ml}$ compared with plateau of PE. Single dose of SOD 200 units, single dose of catalase 200 units and SOD combined catalase abolished the restored contractile response of high dose AVLE . (* P < 0.05 , ** P < 0.01) (n= 5, from 3 rats)



第四章 討論

第一節、低濃度AVLE於大鼠主動脈血管環產生內皮依存性舒張之探討。

羅布麻葉在中國及日本等地，通常用來泡茶飲用。而在中國古代，羅布麻葉泡茶飲即是傳統用藥。羅布麻葉對於心悸失眠、肝陽暈眩、治療高血壓、腎腫發炎和神經衰弱...等疾病症狀有良好之功效(China, 2000)。羅布麻有降血壓、保肝以及抗焦慮、保護神經...等功能(Butterweck et al., 2001; Grundmann et al., 2009; Grundmann et al., 2007; Kim et al., 2000a; Kwan et al., 2005; Ma et al., 1989; Tagawa et al., 2004; Xiong et al., 2000)。

本研究發現高劑量 AVLE 有逆轉舒張，恢復收縮之現象。因此本研究方法及目的在於，離體大鼠主動脈血管環之實驗模式，使用前置收縮劑 PE 和 KCl 為不同之收縮機轉之藥物，探討低劑量與高劑量 AVLE 對老鼠主動脈之影響與研究。

PE 為 α -腎上腺受體致效劑，與受體結合後經由 PLC 活化 IP_3 和 DAG，而後 IP_3 作用在肌漿網受體，活化肌漿網釋放內鈣流。DAG 則是活化 PKC，接著磷酸化肌凝蛋白輕鏈，產生平滑肌之收縮。(Rembold, 1992; Webb, 2003)

KCl 則是藉由平滑肌細胞產生興奮去極化之作用，活化電壓調控鈣離子通道之開啟，進而使外鈣離子進入細胞中，直接致使平滑肌細胞收縮(Rembold, 1992; Webb, 2003)。

AVLE 對於離體大鼠之主動脈與腸繫膜動脈舒張作用(Kwan et al., 2005)，在離體大鼠主動脈實驗中，AVLE 10 $\mu\text{g/ml}$ 對於 PE 和 U46619 誘發的血管收縮，有著舒張作用(Kwan et al., 2005)。

大鼠主動脈血管環去內皮之狀態下，會抑制 AVLE 10 $\mu\text{g/ml}$ 之

舒張作用 (圖 12 D.)；使用一氧化氮合成酶抑制劑：L-NAME，可完全抑制 AVLE 10 $\mu\text{g/ml}$ 之舒張作用 (圖 12 B.比較圖 12 C.)。在離體大鼠腸繫膜動脈實驗中，經由鉀離子通道阻斷劑能阻斷 AVLE 產生腸繫膜動脈舒張作用。所以 AVLE 10 $\mu\text{g/ml}$ 對於大鼠血管之舒張作用，不僅為內皮依存性 NO 調節 (EDRF)之作用，且為內皮依存性過極化之因子 (EDHF)之作用(Kwan et al., 2005; Luksha et al., 2009)

第二節、AVLE雙效反應之探討

在本實驗中，AVLE 之雙效反應：高劑量 AVLE 之逆轉舒張之作用，本實驗 AVLE 之高劑量為 30 至 90 $\mu\text{g/ml}$ 與低劑量 AVLE 10 $\mu\text{g/ml}$ 為區別；低劑量 AVLE 10 $\mu\text{g/ml}$ 為內皮依存性之舒張效應(Kwan et al., 2005)，然而累加劑量到達 30 $\mu\text{g/ml}$ 、90 $\mu\text{g/ml}$ 以上時，會顯示出逆轉舒張，恢復前置收縮劑 PE 之血管張力水平高度之現象 (見圖 13 B.,13 C.)。

在離體大鼠主動脈血管環去內皮的狀態下，則看不出此逆轉舒張之現象。因為低劑量舒張的作用被取消了，因此看不出逆轉舒張之反應高度。因此，實驗中以去內皮與否之離體大鼠主動脈血管環，使用前置低劑量之血管收縮劑 PE 3×10^{-8} M，後累加 AVLE 至高劑量 (90 $\mu\text{g/ml}$) 之實驗方法，作為觀察逆轉舒張；恢復收縮反應的張力實驗設計。

實驗結果顯示，完整內皮狀態下，離體大鼠血管環之前置低劑量血管收縮劑 PE 3×10^{-8} M，後累加 AVLE 由低劑量至高劑量 (10 $\mu\text{g/ml}$ 、30 $\mu\text{g/ml}$ 、90 $\mu\text{g/ml}$) (見圖 14 A.)。低劑量 AVLE 10 $\mu\text{g/ml}$ ，對於離體大鼠主動脈血管環，行使血管舒張效應；而高劑量 30 $\mu\text{g/ml}$ 、90 $\mu\text{g/ml}$ 一樣產生逆轉舒張，恢復收縮之現象，張力水平高度恢復至

前置低劑量血管收縮劑 PE 3×10^{-8} M 之張力高度。在去內皮的狀態下，同樣實驗方法，測試高劑量 AVLE 逆轉舒張之張力程度。結果圖 14 A. 顯示，無論去內皮與否，逆轉舒張之作用均不超過前置收縮劑的張力水平高度；但去內皮的狀態下，低劑量 AVLE 行使的舒張作用，皆會被取消掉，圖 14 B.。

第三節、AVLE 高劑量影響超氧陰離子恢復收縮之機轉

在前學者測試過，鈣離子通道阻斷劑和蕁毒類膽鹼受體阻斷劑之後（結果顯示，AVLE 不受鈣離子通道調控和蕁毒類膽鹼受體之影響(Kwan et al., 2005)，但缺乏高劑量 AVLE 對於大鼠主動脈逆轉舒張，恢復前置收縮劑 PE 10^{-6} M 之收縮水平高度之機轉調查，排除了鈣離子通道因素和蕁毒類膽鹼受體之原因外，但缺乏了對於超氧陰離子 (superoxide anions) 和過氧化氫 (hydrogen peroxide) 之 ROS 阻斷劑等影響血管收縮之研究。

本實驗中，超氧化物歧化酶 (SOD, superoxide dismutase)、過氧化氫歧化酶 (Catalase) 之單劑 ROS 阻斷劑之使用，與 SOD 與 Catalase 結合之使用；作為探討逆轉舒張，恢復收縮之機轉測試。

結果顯示，單劑使用 SOD 200 units，對於高劑量 AVLE 逆轉舒張反應有較大的抑制作用，結合 SOD 與 catalase 各 200 units，則和單劑使用 Catalase 200 units 一樣有較小的抑制作用。詳見結果圖 17. A。由此推測知，高劑量 AVLE 對離體大鼠主動脈逆轉舒張之機轉的主要作用物質為超氧陰離子 (superoxide anions)，而不是過氧化氫 (hydrogen peroxide)。

離體大鼠動脈環組織在器官槽中，長時間浸泡在 Kreb's solution (克氏生理溶液)，經實驗證實也會經由 NADPH oxidase 自然產生超氧

陰離子(Romero et al., 2009; Zalba et al., 2000)。此超氧陰離子並非由 AVLE 之本身作用，可能是由前置收縮劑 PE 作用 α -AR 受體(Ming-Ho Tsai, 2010)，經由 NADPH oxidase 產生。

根據其他科學研究報告，在老鼠尾動脈組織中，經由螢光顯示測定。使用 PE 10^{-5} M 刺激超氧陰子生成(Ming-Ho Tsai, 2010)，以及使用 α_1 腎上腺受體拮抗劑 Prazosin 10^{-6} M 會取消，由 PE 刺激產生的超氧陰子和收縮反應；由此指出 PE 在老鼠尾動脈中，刺激超氧陰離子之產生，是具有結合 α_1 腎上腺受體專一性的(Ming-Ho Tsai, 2010)。

第四節、AVLE 之「時間依存性」和「劑量依存性」

在離體大鼠主動脈血管環實驗中，AVLE 對其影響，可歸納出：「時間依存性」和「劑量依存性」之特徵。

給予 AVLE 依劑量，1、3、10、30 和 90 $\mu\text{g/ml}$ 。其中 1、3、10 $\mu\text{g/ml}$ 對離體大鼠主動脈血管環，行使舒張的作用。以 10 $\mu\text{g/ml}$ 有最大之舒張效應；但隨著組織和藥物 (PE) 浸泡在器官槽的時間以 10 分鐘的間隔倍增，組織會經由 NADPH oxidase 導致超氧陰離子之產生(Ming-Ho Tsai, 2010)；和劑量累加至高劑量 (30, 90 $\mu\text{g/ml}$ ；通常時間已累加 30 至 40 分，產生逆轉舒張，恢復收縮之現象。

推測此逆轉舒張，逆轉舒張的現象，為組織中隨著時間增加，產生之超氧陰離子，與 AVLE 行使一氧化氮的作用互相競爭之結果，而超氧陰離子減損了一氧化氮之血管舒張效應(Katusic, 1996)。

此時，再加以 CCh 3×10^{-6} M 測定「內皮」活性和 KCl 80 mM 之「平滑肌」活性測試，由結果圖.16 E, F 可得知，在 AVLE「長時間」低劑量和「高劑量」狀態下，「內皮」活性和血管「平滑肌」活性，

皆有減損 10 至 20 %之現象。

以上歸納「時間」和「劑量」之因素會影響 AVLE，對離體大鼠主動脈血管環之效用。

第五節、AVLE 在靜置張力之影響- 在靜置張力狀態下之研究：

離體大鼠主動脈血管環，在靜置張力狀態下，給予累加 AVLE 低劑量至高劑量，見結果圖 15. 顯示。AVLE 對靜置張力沒有顯著之影響，但會有「spike activity」之現象。

AVLE 雙重效應之應用：根據之前和現在之研究，低劑量 AVLE 能行使內皮依存性產生 NO 之效應，與先前學者之研究，AVLE 也是具有清除超氧陰離子能力的抗氧化物(Kim et al., 2000a; Kwan et al., 2005; Tagawa et al., 2004)。

第六節、其他相關性討論

承接 AVLE 能像其他中草藥一樣，在大鼠主動脈血管能以 NO 調節 EDRF 之方法，行使血管舒張之作用。在大鼠腸繫膜動脈，AVLE 也能部分行使 EDRF 和 EDHF 之血管舒張因子。且低劑量 AVLE 萃取物，具有清除超氧陰離子的抗氧化效應(Kim et al., 2000a; Kwan et al., 2005; Tagawa et al., 2004)。

其它有關超氧陰離子之產生，相關討論：

科學研究顯示長久的氧化壓力會使eNOS失能，而產生的物質不再是NO，而是 O_2^- (Forstermann, 2008; Forstermann et al., 2006)。

此ROS物質，能使eNOS失能處於「偶合不完全」之狀態，進而產生

超氧陰離子 (O_2^-) 之氧化壓力(Forstermann, 2010)。

血管細胞中的NADPH oxidase和未完全偶合之eNOS；是血管組織中，超氧陰離子主要之來源。通常在正常細胞內之自由基清除酶，保持在0.1-1.0 nM 之濃度，可使超氧陰離子失去活性(Pryor, 1994)。

一旦，細胞中自由基清除酶和 NO 之含量和超氧陰離子之失去平衡後(Katusic, 1996)，超氧陰離子會在細胞中繼續衍生 $ONOO^-$ 、 $OH\cdot$ 等(Beckman, Beckman, Chen, Marshall & Freeman, 1990)，會損傷細胞的氧化自由基離子。而這些自由基造成的氧化傷害，導致以下心血管疾病：粥狀動脈硬化、高血壓、血管痙攣、糖尿病和缺血後灌流傷害(Frei, 1994)。

這些超氧陰離子 (superoxide anions , O_2^-)，除了由 NADPH oxidase 和 uncoupled eNOS 產生外； α_1 -adrenoreceptor 作用劑 PE 本身也會刺激血管組織生成超氧陰離子(Ming-Ho Tsai, 2010)。

本實驗中，AVLE「高劑量」所造成大鼠主動脈血管環，逆轉舒張，恢復收縮之機轉；也是內皮中 NO 和超氧陰離子失衡的關係(Katusic, 1996)。

除了血管前置收縮劑 PE 10^{-6} M，刺激血管平滑肌組織產生超氧陰離子外，隨著時間增加 NADPH oxidase 和 uncoupled eNOS 產生的超氧陰離子，進而削減了 AVLE 內皮依存性之 NO 舒張之作用。

至於結果圖 13-C 中，AVLE 高劑量恢復收縮至前置收縮劑 PE 10^{-6} M 之張力高度，此「恢復收縮」作用為一「短暫收縮」(transient contraction) 之現象。此「短暫收縮」之現象：根據推測有可能是，存在於主動脈血管平滑肌中的肌漿質網的 NADPH oxidase 產生「超氧陰離子」，經由調控 ryanodine receptor 之活性，釋放了肌漿質網中的

鈣離子，造成了「短暫收縮」之現象(Yi et al., 2006)。

第七節、研究限制

此研究為離體大鼠主動脈血環之方法，單一觀察血管平滑肌等長張力收縮與藥物作用機轉；但不能像整體動物實驗一樣，觀察整體動物之神經系統、內分泌系統和心血管系統之整體互相作用。



第五章 結論與建議

第一節、結論

低劑量 AVLE 10 µg/ml 有長效性舒張血管和抗氧化、清除超氧陰離子之效應；但高劑量 AVLE 30、90 µg/ml 反而會降低此功效。本實驗結果推測，此逆轉舒張，恢復收縮之作用為組織中超氧陰離子之產生與 NO 競爭之失衡，導致血管平滑肌恢復前置收縮劑之收縮狀態。因此本實驗結論中，建議使用 AVLE，當「適量」即可，「過量」反而降低良好之功效，並且會有血管組織損傷之現象。

第二節、對未來研究方向的建議

- 1、AVLE 之長效效應 (Long-lastng effect)，缺乏對於整體性動物之研究，建議未來整體性之動物研究中可作長效之作用。AVLE 之長效效應俱有臨床效應，表示長效效應對未臨床藥物之使用，只需少量、適量極可達到效應，不需高劑量之使用。
- 2、高劑量之 AVLE，缺乏整體性動物之血管組織損傷研究，建議未來可作整體性動物和細胞損傷之研究。探討整體性動物之損傷研究是否與離體動物實驗吻合。
- 3、有效成分：本實驗使用之 AVLE 萃取物為，Venetron：含有金絲桃苷 (hyperoside) 和異槲皮苷 (isoquercitin)，經前學者之研究，兩項植物化合物互相結合，在生物體內會有最佳之代謝吸收時間。但單項之藥物研究仍究缺乏，建議未來可作單項藥物之整體性動物與細胞之研究。單項成份之研究，具有藥理上和經濟上之價值。

參考文獻

References

- Adeagbo, A. S., & Triggle, C. R. (1993). Varying extracellular [K⁺]: a functional approach to separating EDHF- and EDNO-related mechanisms in perfused rat mesenteric arterial bed. *J Cardiovasc Pharmacol*, 21(3), 423-429.
- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., & Freeman, B. A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(4), 1620-1624.
- Butterweck, V., Nishibe, S., Sasaki, T., & Uchida, M. (2001). Antidepressant effects of apocynum venetum leaves in a forced swimming test. *Biol Pharm Bull*, 24(7), 848-851.
- Chen, X. (1996). Cardiovascular protection by ginsenosides and their nitric oxide releasing action. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 23(8), 728-732.
- China, T. P. C. o. t. H. M. o. t. P. s. R. o. (2000). Pharmacopeia of People's Republic of China, part 1. *Chemical Technologic Publisher, Beijing*.
- Correia, M. L., & Haynes, W. G. (2007). Arterial compliance and endothelial function. *Curr Diab Rep*, 7(4), 269-275.
- Edgaras Stankevičius, E. K., Enrikas Vainorius², Ulf Simonsen¹ (2003). Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. *MEDICINA (2003) Vol. 39, No.4*.
- Feletou, M., & Vanhoutte, P. M. (2009). EDHF: an update. *Clin Sci (Lond)*, 117(4), 139-155.
- Forstermann, U. (2008). Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 5(6), 338-349.
- Forstermann, U. (2010). Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch*, 459(6), 923-939.
- Forstermann, U., & Munzel, T. (2006). Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*, 113(13), 1708-1714.
- Forstermann, U., Nakane, M., Tracey, W. R., & Pollock, J. S. (1993). Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. *Eur Heart J*, 14 Suppl I, 10-15.
- Frei, B. (1994). Natural antioxidants in human health and disease.
- Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial

- cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), 373-376.
- Glasser, S. P. (2000). On arterial physiology, pathophysiology of vascular compliance, and cardiovascular disease. *Heart Dis*, 2(5), 375-379.
- Gross, S. S., & Wolin, M. S. (1995). Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol*, 57, 737-769.
- Grundmann, O., Nakajima, J., Kamata, K., Seo, S., & Butterweck, V. (2009). Kaempferol from the leaves of *Apocynum venetum* possesses anxiolytic activities in the elevated plus maze test in mice. *Phytomedicine*, 16(4), 295-302.
- Grundmann, O., Nakajima, J., Seo, S., & Butterweck, V. (2007). Anti-anxiety effects of *Apocynum venetum* L. in the elevated plus maze test. *J Ethnopharmacol*, 110(3), 406-411.
- Kamata, K., Seo, S., & Nakajima, J. (2008). Constituents from leaves of *Apocynum venetum* L. *J Nat Med*, 62(2), 160-163.
- Katusic, Z. S. (1996). superoxide anion and endothelium regulation of arterial tone. *Free Radical Biology & Medicin*, 20, 443-448.
- Kim, D., Yokozawa, T., Hattori, M., Kadota, S., & Namba, T. (2000a). Effects of aqueous extracts of *Apocynum venetum* leaves on spontaneously hypertensive, renal hypertensive and NaCl-fed-hypertensive rats. *J Ethnopharmacol*, 72(1-2), 53-59.
- Kim, D. W., Yokozawa, T., Hattori, M., Kadota, S., & Namba, T. (2000b). Inhibitory effects of an aqueous extract of *Apocynum venetum* leaves and its constituents on Cu(2+)-induced oxidative modification of low density lipoprotein. *Phytother Res*, 14(7), 501-504.
- Kwan, C. Y. (1994). Plant-derived drugs acting on cellular Ca²⁺ mobilization in vascular smooth muscle: tetramethylpyrazine and tetrandrine. *Stem Cells*, 12(1), 64-67.
- Kwan, C. Y., Chen, C. X., Deyama, T., & Nishibe, S. (2003). Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the aqueous extracts of the *Eucommia ulmoides* Oliv. leaf and bark: implications on their antihypertensive action. *Vascul Pharmacol*, 40(5), 229-235.
- Kwan, C. Y., Zhang, W. B., Deyama, T., & Nishibe, S. (2004). Endothelium-dependent vascular relaxation induced by *Eucommia ulmoides* Oliv. bark extract is mediated by NO and EDHF in small vessels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 369(2), 206-211.
- Kwan, C. Y., Zhang, W. B., Nishibe, S., & Seo, S. (2005). A novel in vitro endothelium-dependent vascular relaxant effect of *Apocynum venetum*

- leaf extract. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 32(9), 789-795.
- Kwan, C. Y., Zhang, W. B., Sim, S. M., Deyama, T., & Nishibe, S. (2004). Vascular effects of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*): endothelium-dependent NO- and EDHF-mediated relaxation depending on vessel size. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 369(5), 473-480.
- Lee, H. W., Karam, J., Hussain, B., & Winer, N. (2008). Vascular compliance in hypertension: therapeutic implications. *Curr Diab Rep*, 8(3), 208-213.
- Lee, H. Y., & Oh, B. H. (2010). Aging and arterial stiffness. *Circ J*, 74(11), 2257-2262.
- Luksha, L., Agewall, S., & Kublickiene, K. (2009). Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 202(2), 330-344.
- Ma, Y. X., & Chen, S. Y. (1989). [Observations on the anti-aging, antihypertensive and antihyperlipemic effect of *Apocynum venetum* leaf extract]. *Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 9(6), 335-337, 323.
- Ming-Ho Tsai, M. J. J. (2010). Reactive oxygen species are involved in regulating $\alpha 1$ -adrenoceptor-activated vascular smooth muscle contraction. *Journal of Biomedical Science*, 17, 67.
- Nathan, C., & Xie, Q. W. (1994). Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*, 269(19), 13725-13728.
- Pryor, W. A. (1994). Free radicals and lipid peroxidation: What they are and how they got that way. *Natural antioxidants in human health and disease.*, 1-24.
- Qian, Z. N., Song, L. H., Gu, Z. L., Chen, B. Q., Zhang, K. P., Li, H. Z., & Peng, Y. K. (1988). [An experimental observation on the diuretic effect of an extract of *luobuma* (*Apocynum venetum*) leaves]. *Zhong Yao Tong Bao*, 13(10), 44-46, 64.
- Rembold, C. M. (1992). Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. *Hypertension*, 20(2), 129-137.
- Romero, M., Jimenez, R., Sanchez, M., Lopez-Sepulveda, R., Zarzuelo, M. J., O'Valle, F., Zarzuelo, A., Perez-Vizcaino, F., & Duarte, J. (2009). Quercetin inhibits vascular superoxide production induced by endothelin-1: Role of NADPH oxidase, uncoupled eNOS and PKC. *Atherosclerosis*, 202(1), 58-67.
- Sammut, I. A., Foresti, R., Clark, J. E., Exon, D. J., Vesely, M. J., Sarathchandra, P., Green, C. J., & Motterlini, R. (1998). Carbon monoxide is a major contributor to the regulation of vascular tone in aortas expressing high levels of haeme oxygenase-1. *Br J Pharmacol*, 125(7), 1437-1444.

- Shimokawa, H., Yasutake, H., Fujii, K., Owada, M. K., Nakaike, R., Fukumoto, Y., Takayanagi, T., Nagao, T., Egashira, K., Fujishima, M., & Takeshita, A. (1996). The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J Cardiovasc Pharmacol*, 28(5), 703-711.
- Shirai, M., Kawai, Y., Yamanishi, R., & Terao, J. (2005). Approach to novel functional foods for stress control 5. Antioxidant activity profiles of antidepressant herbs and their active components. *J Med Invest*, 52 Suppl, 249-251.
- Tagawa, C., Kagawa, T., Nakazawa, Y., Onizuka, S., Nishibe, S., & Kawasaki, H. (2004). [Studies on antihypertensive effect of Luobuma (*Apocynum venetum* L.) leaf extract (3)]. *Yakugaku Zasshi*, 124(11), 851-856.
- Takako Yokozawa, T. N. (2004). Inhibitory effects of Luobuma tea and its components against glucose-mediated protein damage. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 975-981.
- Takumi, T., Yang, E. H., Mathew, V., Rihal, C. S., Gulati, R., Lerman, L. O., & Lerman, A. (2010). Coronary endothelial dysfunction is associated with a reduction in coronary artery compliance and an increase in wall shear stress. *Heart*, 96(10), 773-778.
- Tsai, C. C., Lai, T. Y., Huang, W. C., Liu, I. M., & Cheng, J. T. (2002). Inhibitory effects of potassium channel blockers on tetramethylpyrazine-induced relaxation of rat aortic strip in vitro. *Life Sci*, 71(11), 1321-1330.
- Wang, G., Lemos, J. R., & Iadecola, C. (2004). Herbal alkaloid tetrandrine: from an ion channel blocker to inhibitor of tumor proliferation. *Trends Pharmacol Sci*, 25(3), 120-123.
- Webb, R. C. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ*, 27(1-4), 201-206.
- Xiong, Q., Fan, W., Tezuka, Y., Adnyana, I. K., Stampoulis, P., Hattori, M., Namba, T., & Kadota, S. (2000). Hepatoprotective effect of *Apocynum venetum* and its active constituents. *Planta Med*, 66(2), 127-133.
- Yi, X. Y., Li, V. X., Zhang, F., Yi, F., Matson, D. R., Jiang, M. T., & Li, P. L. (2006). Characteristics and actions of NAD(P)H oxidase on the sarcoplasmic reticulum of coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290(3), H1136-1144.
- Yokozawa, T., Dong, E., & Kashiwagi, H. (1997). In vitro and in vivo studies on anti-lipid peroxidation effect of extract from Luobuma leaves. *Nat. Med.*, 51, 325-330.

- Yokozawa, T., Kashiwada, Y., Hattori, M., & Chung, H. Y. (2002). Study on the components of luobuma with peroxynitrite-scavenging activity. *Biol Pharm Bull*, 25(6), 748-752.
- Zalba, G., Beaumont, F. J., San Jose, G., Fortuno, A., Fortuno, M. A., Etayo, J. C., & Diez, J. (2000). Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 35(5), 1055-1061.
- Zhang, W. B., Chen, C. X., Sim, S. M., & Kwan, C. Y. (2004). In vitro vasodilator mechanisms of the indole alkaloids rhynchophylline and isorhynchophylline, isolated from the hook of *Uncaria rhynchophylla* (Miquel). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 369(2), 232-238.
- Zhang, Y., Liu, C., Zhang, Z., Wang, J., Wu, G., & Li, S. (2010). Comprehensive separation and identification of chemical constituents from *Apocynum venetum* leaves by high-performance counter-current chromatography and high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 878(30), 3149-3155.

