

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

中藥柴胡桂枝湯對大鼠急性胃潰瘍之預防與治療的探討

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-002-382-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學獸醫學系暨研究所

計畫主持人：郭宗甫

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 22 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

NSC Project Reports

計畫編號：NSC 91-2313-B-002-382-

執行期限：91年8月1日至92年7月31日

主持人：郭宗甫 國立台灣大學獸醫學研究所

一、中文摘要

本研究藉由水浸潤拘束緊迫法誘導大鼠急性胃黏膜損傷，評估中藥柴胡桂枝湯預胃黏膜損傷與抗氧化之效果及對正常大鼠之影響。結果顯示此藥能預防 WIRS 誘導胃黏膜病灶的產生，促進胃黏膜及肝臟非蛋白質硫氫基化合物濃度的增加。在正常大鼠方面，此藥投藥四小時後，能促進胃黏膜與肝臟的非蛋白質硫氫基化合物濃度的增加，血漿脂質過氧化物濃度的降低。長期投藥三週能促進肝臟的非蛋白質硫氫基化合物濃度的顯著增加。故可知柴胡桂枝湯亦俱有促進體內抗氧化的效果。

關鍵詞：胃黏膜損傷、柴胡桂枝湯、活化氧自由基、水浸潤保定緊迫法、抗氧化

Abstract

The aim of this study was to investigate preventive and antioxidant effects of Chai-hu-gui-zhi-tang on the development of gastric mucosa lesions induced by water immersion restraint stress (WIRS). The result revealed that the medicine could prevent the development of gastric mucosal lesions and the decrease of gastric and liver nonprotein sulfhydryl groups (NPSH) induced by WIRS. In normal rats, short time administration of the medicine would promote the decrease of plasma lipid peroxidation and the increase of gastric and liver NPSH. Long time administration of the medicine would promote the increase of liver NPSH. Therefore, Chai-hu-gui-zhi-tang extract could also promote the antioxidation of the body.

Keywords: gastric mucosal lesions、Chai-hu-gui-zhi-tang、ROS、WIRS、antioxidant

二、緣由與目的

緊迫是臨床上胃潰瘍產生的因素之

一。於緊迫動物實驗，水浸潤拘束緊迫法 (Water immersion restraint stress; WIRS) 誘導大鼠胃黏膜損傷的實驗顯示：WIRS 誘導，會使胃黏膜活性氧自由基 (ROS) 生成增加，並造成脂質過氧化物濃度顯著上升 [21]。由 Nishida 等人的研究證實，局部貧血-再灌流 (Ischemia-reperfusion) 會引起能量代謝異常，黃嘌呤氧化酶 (Xanthine oxidase) 活化產生 ROS 於 WIRS 誘導過程中造成胃黏膜損傷。此外，局部貧血使細胞受損，會使血液循環中的嗜中性球吸附與活化。釋放大量 ROS，進一步傷害受損的細胞 [10]。

除了 ROS 外，WIRS 誘導時，胃黏膜及肝臟的 Glutathione (GSH) 亦有減少情形 [7, 12]。已知 GSH 等硫氫基抗氧化物 (NPSH) 對胃黏膜的完整性有其重要性 [17]。肝臟則是體內生成 GSH 的重要器官之一 [7]。藉由藥物抑制 GSH 生成，會使胃黏膜病灶產生。投予外源性 GSH 則可以減少經由 WIRS 誘導所產生的胃黏膜病變，並降低胃黏膜脂質过氧化物的濃度 [6, 7]。故 GSH 在 WIRS 誘導使脂質過氧化物產生增加的過程中所扮演的角色，需加以探討。

臨床上緊迫導致胃黏膜損傷的病例需予預防藥物預防出血的產生。然而預防投予抑制胃酸類藥物使胃黏膜 pH 值上升，會造成細菌感染，進而導致肺炎 [4]。故在胃潰瘍出血的預防上仍需尋找其他替代藥物。已知抗氧化亦是胃黏膜重要的防禦因子之一。傳統中藥複方，柴胡桂枝湯已知是一有效的抗氧化劑，於腦部具有抗氧化功能 [18]，傳統中醫已用於預防胃潰瘍的產生。然而在胃黏膜抗氧化方面，柴胡桂枝湯並無文獻報告加以研究探討。故本實驗將藉由 WIRS 動物模式，檢測胃黏膜 NPSH 濃度、胃黏膜過氧化物濃度的改變，評估柴胡桂枝湯對胃黏膜局部抗氧化物與活性氧自由基間平衡之影響。另外檢測肝臟

NPSH 與血漿過氧化物濃度的改變，以評估柴胡桂枝湯對大鼠系統性抗氧化生理的影響。此外，並檢測短期投藥(2h、4h)與長期投藥(3 weeks)對正常大鼠抗氧化之影響，評估柴胡桂枝湯作為臨床預防胃潰瘍出血的替代藥物。

三、材料與方法

實驗所用 Wistar 雄性大鼠是取自台灣大學醫學院實驗動物中心。柴胡桂枝湯是採用台灣港香蘭藥廠出品的濃縮中藥。

(1) 水浸潤拘束緊迫誘導急性胃黏膜損傷：WIRS 的操作是依據 Takagi 等人的作法，將已禁食 18 小時的大鼠拘束於拘束籠中，限制其移動，再將此拘束籠置入 23 °C 水中，深度直至大鼠胸骨劍突。藉由 WIRS 的進行，誘導胃黏膜病變產生[19]。

(2) 潰瘍指數的檢測：大鼠以 CO₂ 安樂死後，快速取出大鼠胃臟並置於冰上，延胃大彎切開胃臟，以 0.15 M NaCl 清洗胃黏膜表面。以解剖顯微鏡十倍下觀察，記錄胃黏膜出血病灶的直徑長度總和 (cm)。

(3) 非蛋白質硫氫化合物濃度之檢測：依據 Sedlak 等人的方法，利用 50 % Trichloroacetic acid 使蛋白質沈澱並分離後，藉由簡稱為 DTNB 的 Ellman reagent 與非蛋白質硫氫基化合物反應結合產生黃色產物，再藉由分光光度計，於波長為 412 nm 測量此黃色產物濃度予以定量[15]。

(4) 胃黏膜脂質過氧化物濃度之檢測：根據 Ohkawa 等人所建立之 TBARS (Thiobarbituric acid assay) 方法，加以改良後測量。原理是利用 Thiobarbituric acid 可與不飽和脂肪酸過氧化後所衍生穩定的次要產物，如 Malondialdehyde (MDA) 等，加熱反應產生粉紅色產物，使用分光光度計於光源波長為 532nm 予以檢測[11]。

(5) 血漿脂質過氧化物濃度之檢測：依據 Satoh 所建立的 TBARS 方法，利用 Thiobarbituric acid 可與不飽和脂肪酸過氧化後所衍生穩定的次要產物，如 MDA 等，加熱反應產生粉紅色產物，進而使用分光光度計於光源波長為 532nm 予以檢測[14]。

(6) 均質液蛋白質濃度之定量：依據

Bradford 建立的方法，利用 Coomassie Brilliant Blue G-250 與蛋白質反應結合為複合物後，顏色改變為深藍色，藉由分光光度計於波長為 595 nm 時，予以測量[2]。

(7) 統計分析：數據皆以 Mean ± SD 表示。分析方法上，多組數據，皆以變異分析 (ANOVA) 中的完全隨機設計 (Completely randomized design) 與鄧氏新多變域測驗法 (Duncan's new multiple range test) 予以分析。成對數據以 *t*-test 分析。*P* < 0.05 時，為顯著差異；*P* < 0.01 時，為極顯著差異。

四、結果與結論

本實驗結果顯示：預防投予柴胡桂枝湯能有效的抑制 WIRS 誘導 2h、4h 大鼠胃黏膜病變的產生。

於 WIRS 誘導前立即投予柴胡桂枝湯濃縮中藥，能預防 WIRS 誘導過程中，胃黏膜 NPSH 濃度的減少，同樣於無 WIRS 誘導的正常大鼠實驗結果也顯示，無氧化壓力的過程中，柴胡桂枝湯濃縮中藥於投藥兩小時後，能立即促進胃黏膜的 NPSH 增加，維持胃黏膜的完整性。已知大鼠胃黏膜的 NPSH 中，約 95 % 皆為 GSH[1]，而柴胡桂枝湯的成份中，並不含有 GSH[6]，故可能藉由 γ -glutamylcysteine synthetase、Glutathione synthetase 的作用使 GSH 產生增加。

相對於胃黏膜，實驗中我們證實，於柴胡桂枝湯濃縮中藥 250 mg/kg B.W.的劑量下，於 WIRS 誘導 2-4 小時過程中，能促進大鼠肝臟非蛋白質硫氫基化合物濃度的增加。相同劑量於投藥兩小時後，亦能使正常大鼠肝臟的非蛋白質硫氫基化合物濃度顯著增加。此外，已知大鼠肝臟的非蛋白質硫氫基化合物中，約 90 % 皆為 GSH[1]。GSH 是生物體內，細胞外最主要的抗氧化物，經由 GSHPx 催化，可將磷脂質過氧化物、H₂O₂ 與其他有機過氧化物分解還原為有機醇類、酚類或水[20]。而細胞外的 GSH 主要由肝臟產生，並分泌至血液與膽汁之中[18, 19]。藉由血液循環，肝臟產生的 GSH 可用於維持體內各臟器抗氧化與氧化間的平衡。故由以上可知，柴胡桂枝湯濃縮中藥除了能用於預防胃黏膜抗

氧化物的流失，也能用於增加體內的抗氧化能力。

由 Shian 等人藉由投予外源性的 GSH 抗氧化物，顯示能減少 WIRS 誘導過程中大鼠胃黏膜病灶的產生，並促進胃黏膜脂質過氧化物的減少[16]。於本研究的結果顯示：柴胡桂枝湯濃縮中藥於 WIRS 誘導過程中，雖然能促進胃黏膜 GSH 抗氧化物的增加，減少大鼠胃黏膜病灶的產生，但無法促進胃黏膜脂質過氧化物的降低，於投藥劑量 100 mg/kg B.W. 並會使胃黏膜脂質過氧化物顯著增加。於無 WIRS 誘導的正常大鼠實驗結果也顯示，柴胡桂枝湯濃縮中藥於投藥兩小時與四小時後，皆無法顯著的減少胃黏膜脂質過氧化物的濃度，同樣於投藥劑量 100 mg/kg B.W. 並會使胃黏膜過氧化物顯著增加。然而胃黏膜脂質過氧化物的濃度的增加，是否因由於柴胡桂枝湯濃縮中藥使胃黏膜局部的脂質過氧化增加，或是因體內脂質過氧化物的濃度增加？由本研究的結果得知：預先投予柴胡桂枝湯濃縮中藥於 WIRS 誘導四小時後，各劑量皆會使大鼠血漿脂質過氧化物顯著增加。於無 WIRS 誘導的正常大鼠實驗結果則顯示，柴胡桂枝湯濃縮中藥於投藥四小時後，血漿脂質過氧化物為顯著減少的情形。故由以上得知胃黏膜脂質過氧化物濃度並不隨血漿脂質過氧化物濃度的改變而改變，顯示兩者無直接的關係。

已知 WIRS 誘導過程中，抗氧化酵素如 SOD、Catalase 與 GSHPx 的活性並不會改變。因此胃黏膜脂質過氧化物濃度的顯著增加可能是因 ROS 的生成增加所致。由無 WIRS 誘導的正常大鼠實驗結果顯示，無局部貧血-再灌流黃嘌呤氧化酶的作用下，柴胡桂枝湯濃縮中藥於投藥兩小時後，投藥劑量 100 mg/kg B.W. 會使胃黏膜過氧化物顯著增加。故我們推測柴胡桂枝湯濃縮中藥可能會促進胃嗜中性球等炎症細胞的活化與吸附，進而使胃黏膜的脂質過氧化物濃度增加。

於 Hiramatsu 等人的實驗結果顯示：低劑量 1% 的柴胡桂枝湯具有自由基的性質，但於肝臟仍具有抗氧化的功能[6]。於 Hamada 等人使用黃芩成份之一，Baicalein，作為腦部自由基清除劑的研究報

告指出，Baicalein 於大腦不同部位分別顯示降低與增加脂質過氧化物濃度的不同結果[3]。已知柴胡桂枝湯是由柴胡、桂枝、黃芩、半夏、人參、芍藥、生薑、大棗與甘草共 9 味藥材組成。然而柴胡桂枝湯複方中確實的抗氧化藥物、成份與作用機制皆仍尚不明。柴胡桂枝湯中是否俱有自由基性質的成份而直接造成對胃黏膜的傷害，皆需更多研究加以釐清。

由此研究結果可知：投與柴胡桂枝湯濃縮中藥能預防胃黏膜病灶的產生，促進抗氧化物的增加，但於胃黏膜脂質過氧化物方面，則無顯著的降低。故可知柴胡桂枝湯濃縮中藥並非直接藉由減少胃黏膜脂質過氧化來達到預防胃潰瘍的效果。雖然於細胞與老鼠大腦的研究指出柴胡桂枝湯具有抗氧化之功能，能減少過氧化物的產生，促進維生素 E 氧化產物 Tocopheroxyl radical 的還原，並可用於清除 O_2^- 與 $\cdot OH$ [5, 6]。於小鼠內毒血症過程中，成份類似藥物的小柴胡湯亦能活化肝臟 SOD 與 GSHPx 等抗氧化酵素，並增加維他命 E 與非蛋白質硫氫基化合物等抗氧化物的濃度[13]。然而在嗜中性球浸潤等炎症反應因素的胃黏膜，柴胡桂枝湯似乎有不同的作用與效果。由以上可知，柴胡桂枝湯可能藉由活化其他胃黏膜防禦因子來達到預防潰瘍的效果。

相較於投藥 2 至 4 小時，柴胡桂枝湯濃縮中藥可能造成大鼠胃黏膜及血漿脂質過氧化物濃度的增加，於本研究的結果顯示：長期投藥三週對於正常十週齡與正常十月齡大鼠的胃黏膜及血漿脂質過氧化物濃度並不會有太大影響。於正常十週齡大鼠，柴胡桂枝湯濃縮中藥亦能促進肝臟的非蛋白質硫氫基化合物濃度的增加。因此柴胡桂枝湯濃縮中藥可利用於長期投予，預防大鼠胃黏膜潰瘍與出血的產生，並能維持大鼠體內活化氧自由基的生成與抗氧化機制間的平衡。

五、參考文獻

1. Boyd SC, Sasame HA, Boyd MR. High concentrations of glutathione in glandular stomach: Possible implication for carcinogenesis. *Science* 205: 1010-1012, 1979.
2. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the

- quantification of microgram quantities of -protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254, 1976.
3. Hamada H, Hiramatsu M, Edamatsu R, Mori A. Free radical scavenging action of baicalein. *Arch Biochem Biophys* 306: 261-266, 1993.
 4. Heyland DK, Mandell LA. Gastric colonization and nosocomial pneumonia: evidence for causation. *Chest* 101: 187-193, 1992.
 5. Hiramatsu M, Edamatsu R, Kohno M, Mori A. Scavenging of free radicals by Sho-saiko-to-go-keishi-ka-shakuyaku-to (TJ-960). In: Hosoya E, Yamamura TY, ed. *Recent advances in the pharmacology of KAMPO (Japanese Herbal) Medicines*. Excerpta Medica, Amsterdam, 127, 1988.
 6. Hiramatsu M, Velasco RD, Packer L. Vitamin E radical reaction with antioxidants in rat liver membranes. *Free Radic Biol Med* 9: 459-464, 1990.
 7. Hirota M, Inoue M, Ando Y, Hirayama K, Morino Y, Sakamoto K, Mori K, Akagi M. Inhibition of stress-induced gastric injury in the rat by glutathione. *Gastroenterol* 97: 853-859, 1989.
 8. Inoue M, Ando Y, Hirota M. Role of oxygen radicals in the pathogenesis of cellular injury caused by circulatory disturbance. In: Tsuchiya M, Asano M, Mishima Y, Oda M, eds. *Microcirculation-an update, Volume 1*. Elsevier, Amsterdam, 685-686, 1987.
 9. Inoue M, Nobukuni Y, Ando Y, Hirota M, Hirata E, Morino Y. Interorgan metabolism of glutathione as the defence mechanism against oxidative stress. In: Tanabe T, Hook JB, Endou H, ed. *Nephrotoxicity of antibiotics and immunosuppressants*. Elsevier, Amsterdam, 51-60, 1986.
 10. Nishida K, Ohta Y, Kobayashi T, Ishiguro I. Involvement of xanthine oxidase system and neutrophils in the development of acute gastric mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress. *Digestion* 58: 340-351, 1997.
 11. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbitric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358, 1979.
 12. Ohta Y, Kobayashi T, Nishida K, Nagata M, Ishiguro I. Therapeutic effect of Oren-gedoku-to extract on stress-induced acute gastric mucosal lesions in rats. *Phytother Res* 13: 588-592, 1999.
 13. Sakaguchi S, Tsutsumi E, Yokota K. Preventive effects of a traditional Chinese medicine (sho-saiko-to) against oxygen toxicity and membrane damage during endotoxemia. *Biol Pharm Bull* 16: 782-786, 1993.
 14. Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clinica Chimica Acta* 90: 37-43, 1978.
 15. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 25: 192-205, 1968.
 16. Shian WM, Sasaki I, Kamiyama Y, Naito H, Matsuno S, Miyazawa T. The role of lipid peroxidation on gastric mucosal lesions induced by water-immersion-restraint stress in rats. *Jpn Surg Today* 30: 49-53, 2000.
 17. Stein HJ, Hinder RA, Oosthuizen NMJ. Gastric mucosal injury caused by hemorrhagic shock and reperfusion: Protection role of the antioxidant glutathione. *Surgery* 108: 467-474, 1990.
 18. Sugaya E. Introduction. In: Hosoya E, Yamamura TY, ed. *Recent advances in the pharmacology of KAMPO (Japanese Herbal) medicines*, Excerpta Medica, Tokyo, 51-55, 1988.
 19. Takagi K, Okabe S. The effects of drugs on the stress ulcer in rats. *Jpn J Pharmacol* 18: 9-18, 1968.
 20. Urisini F, Maiorino M, Valente M, Gregolin C. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochem Biophys Acta* 710: 197-205, 1982.
 21. Yoshikawa T, Miyagawa H, Yoshida N, Sugino S, Kondo M. Increase in lipid peroxidation in rat gastric mucosal lesions induced by water immersion restraint stress. *J Clin Biochem Nutr* 1: 271-277, 1986.

