

國立臺灣師範大學理學院

生技醫藥產業碩士學位學程碩士論文

Graduate Program of Biotechnology and Pharmaceutical Industries

College of Science

National Taiwan Normal University

Master's Thesis

養肝丸(神立清)之抗氧化及肝臟保護藥效評估

**Efficacy Assessment of Yang-Gan-Wan(Shen-Li-Qing)  
in Anti-oxidation and Liver Protection**

葉佳文

Yeh, Chia-Wen

指導教授：吳忠信 博士

Advisor : Wu, Chung-Hsin, Ph.D.

中華民國 110 年 2 月

February 2021

## 謝 誌

首先最要感謝我的恩師—指導教授 吳忠信老師，您的提攜是佳文完成生技醫藥碩士學程及論文的最大動力。感謝老師您這段時間不厭其煩的給與鼓勵、指導，帶領學生認識很多醫藥產業並學習實務技能，讓學生在最短的時間內學習最多收穫最大。在學習過程中與老師您相處十分愉快，老師和藹可親亦師亦友，佳文老人家很幸運、很有福氣才有機會成為您的學生，佳文非常珍惜這樣的緣分，永遠感念老師永懷師恩。

感謝學校提供完善的學習環境，感謝本校生命科學院系上每位指導佳文學習的老師們，感恩您們大愛無私、諄諄教誨，辛苦了。

非常感恩 鄭劍廷院長在學習過程中願意用心指導，給予嚴厲督促要求，讓非本科學系背景の佳文超速學習，瞬間貼進科學領域の距離，佳文才能有機會進步，並完成實驗室各項研究的學習。特別敬佩您對學術嚴謹的態度，給予學生學習の最佳典範，永遠感恩您。

特別感謝 呂國棟老師，您犧牲珍貴休息時間，特別費心指導論文修改!! 您提出針對性問題、指點哪裡有錯誤問題、建議修正改善方法、給予重要寶貴意見!! 學生佳文衷心感懷老師大德。非常感恩您!!

非常感謝 陳冬生老師，老師除了在生技醫藥領域上不吝教授豐富多元的實務經驗；老師還特別犧牲寶貴時間指導佳文這個老學生如何研讀、怎樣作報告等，老師細心、耐心地解惑教導，讓學生受益良多、永難忘懷。非常感恩您!!

感謝實驗室的所有學長、同學們，在佳文學習及實驗檢測上大力協助，多方包容、不分彼此相互的幫忙，讓佳文倍感溫暖。

感謝雪娥學姊，臨床經驗豐富的學姊，在醫院工作繁忙之餘，還要從桃園中壢趕來實驗室幫忙指導協助作實驗，並分享獨家的臨床經驗、提供特殊的技能，讓佳文非常感動。感恩您!!

感謝珍奴學姊，萬能學姊小老師提供豐富完整的實作經驗及實務理論，總是縝密細心的教導，設計完整的實驗流程，動作靈巧有序、不僅指導協助佳文完成實驗報告，並不畏辛苦耐心協助幫忙完成論文修改。非常窩心的小老師，以後在開發生技醫藥產業的實驗研究上，仍請您繼續協助指導。感恩您!!

感謝睿芝學姊，您從佳文入學到現在，學習過程一路來不厭其煩提供各方面的協助，在生活上也總是不斷分享您照顧家長的經驗、提供解決處理問題的方法，才能讓佳文在學業與家庭照護上兼顧。一切感同身受，祈禱並祝福快樂與您同在。感恩您!!

感謝婉溱學姊，是我學習實驗最棒的指導小老師，提供全方位、純熟的實驗技術方法，您總是不厭煩、十分有耐心地重複解說、並帶領教我操作實驗的每個步驟。感恩您!!

感謝非常優秀的詩云同學，在我學習過程中，非常有耐心、用心的一步一步、重複又重複的教我老人家做報告及實驗，課業學習上才能順利通過。感恩您!!

佳文還有很多地方需要學習，往後的人生旅程，仍請師長們多多指教，學生將帶著感恩的心、及在生技醫藥課程學習的心得向前行。期許未來能結合中醫藥學應用於臨床，並繼續研究開發更多實用且有利益眾生的產品，祈能造福社會、迴向感謝此生所有的有緣人。

祝福大家 平安健康快樂!!

## 中文摘要

在臺灣，民眾罹患肝病盛行率居高不下，而肝病造成之死亡率，多年來亦高居十大死因之前幾位，因此開發有效保護肝臟功能的藥物，一直是生技醫藥產業積極投注資金及研發的重點項目。過去西方醫學對於肝病的治療多採取支持性的保守療法，對於具體促進肝功能的西藥開發進程更是緩慢。從中醫學古籍中草藥相關之記載中，對於保護肝臟的中藥方已有相當清楚的認識，惟肝病中醫藥雖然源遠流長數千年，但由於西方科學盛起之故，未經科學研究證實功效的中醫藥反而屢受質疑。為此，本論文主要研發具保護肝臟功能的傳統中藥，以科學實驗的研究證實相關藥物功效。本研究選用順天堂中藥養肝丸(神立清)顆粒劑探討其抗氧化及肝臟保護的藥效。利用清除 DPPH 自由基能力測定實驗，本實驗研究結果發現養肝丸(神立清)顆粒劑具備顯著的清除 DPPH 自由基能力；利用活體外細胞實驗，結果發現養肝丸(神立清)顆粒劑可以緩解因革蘭陰性菌外膜成分脂多糖(LPS)誘發肝臟細胞的損傷。此外，利用動物餵食實驗，結果發現養肝丸(神立清)顆粒劑可以保護小鼠對乙醯胺酚 (APAP) 誘發的肝毒性。綜觀順天堂中藥養肝丸(神立清)顆粒劑，效能確實並具有抗氧化的功效，再者目前經由科學學理實驗研究證實養肝丸(神立清)顆粒劑確實具有保護肝臟機能功效，因此應該可以作為保肝的中藥。

關鍵詞：中藥、養肝丸、抗氧化自由基、肝臟保護

## Abstract

In Taiwan, the prevalence rate of liver disease among the people remains high, and the death rate caused by liver disease has been the highest among the top ten causes of death for many years. Therefore, the development of drugs that effectively protect liver function has always been an active investment and key projects for R&D of the biotechnology and pharmaceutical industry. In the past, Western medicine used supportive conservative treatments for liver disease, and the development of western medicines that specifically promote liver function was slow. From ancient records of Chinese herbal medicines, there is a clear understanding of traditional chinese medicines (TCM) for protecting the liver functions. However, although TCM for liver disease has a long history of thousands of years, due to the rise of Western science, TCM that have not been proven by scientific research, thus TCM have been challenged. In this study, a scientific Chinese medicine of Sun Ten Pharmaceutical Co., Ltd. " Yang Gan Wan (Shen Li Qing) " (YGW) granules were used to study its anti-oxidation and liver protection effects. By using the DPPH free radical scavenging ability measurement experiment, our results found that YGW granules have significant DPPH free radical scavenging ability. By using cell experiments in vitro, our results found that YGW granules could relieve lipopolysaccharide (LPS) -induced damage in liver cells. In addition, by using animal feeding experiments, our results found that YGW granules can protect mice from liver toxicity induced by Acetaminophen (APAP) .To summary the function of YGW granules that have anti-oxidant effects and can indeed protect liver function. We suggested that YGW granules could be an ideal TCM for liver protection.

Keywords : Traditional Chinese Medicine, Yang Gan Wan, Anti-oxidant free radicals, Liver protection

## 目錄

### 目錄

謝誌	I
中文摘要	III
Abstract	IV
論文目錄	V
圖表次	VII
第一章 緒論	1
第一節 研究背景與動機	1
第二節 文明疾病引發氧化壓力	3
第三節 氧化壓力誘發肝臟損傷	5
第四節 中醫藥學理論與肝臟的生理病理聯繫	9
第五節 中醫藥學理論與肝臟保護有關的中藥	12
第二章 研究目的與設計	18
第一節 研究目的	18
第二節 實驗設計	18
第三章 材料與方法	19
第一節 順天堂中藥養肝丸(神立清)顆粒劑成份分析	19
第二節 清除1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)氧化自由基能力測定	19

---

第三節 脂多醣(LPS)誘發肝臟巨噬細胞發炎模式	20
第四節 乙醯胺酚(APAP)誘發肝損傷動物模式	23
第五節 血清生化值分析	24
第六節 肝臟組織染色	24
第七節 統計與資料分析	26
第四章 研究結果	27
第一節 養肝丸(神立清)顆粒劑的中藥指紋圖譜	27
第二節 養肝丸(神立清)顆粒劑抗氧化、清除自由基的能力	27
第三節 養肝丸(神立清)顆粒劑對肝臟巨噬細胞損傷的保護作用	28
第四節 養肝丸(神立清)顆粒劑對小鼠肝損傷的保護作用	29
第五章 討論與結論	32
第一節 養肝丸(神立清)顆粒劑的抗氧化作用	32
第二節 養肝丸(神立清)顆粒劑對肝細胞損傷的保護作用	32
第三節 養肝丸(神立清)顆粒劑對動物誘發肝損傷的保護作用	34
第四節 結論	37
參考文獻	38
中文引用	38
英文引用	39
附錄圖表	45

---

---

## 圖表次

表 1：實驗使用抗體及試劑	45
表 2：實驗流程圖表	47
圖 1：養肝丸(神立清)的高效液相層析 3D-HPLC 圖譜	48
圖 2：養肝丸(神立清)具有清除自由基的功能	50
圖 3：養肝丸(神立清)有效緩解脂多醣誘發肝臟巨噬細胞的損傷作用	52
圖 4：養肝丸(神立清)可以有效緩解脂多醣誘發肝臟巨噬細胞的發炎作用	54
圖 5：養肝丸(神立清)有效緩解乙醯胺酚誘導肝損傷小鼠的肝細胞死亡	56
圖 6：養肝丸(神立清)有效緩解乙醯胺酚誘導肝損傷小鼠的肝臟纖維化	58
圖 7：養肝丸(神立清)有效降低乙醯胺酚誘導肝損傷小鼠的肝臟損傷指標	60
圖 8：養肝丸(神立清)有效提升乙醯胺酚誘導肝臟損傷小鼠的免疫球蛋白	62
圖 9：養肝丸(神立清)保護肝臟損傷的統整示意圖	64

---

# 第一章 緒論

## 第一節 研究背景與動機

### 一、研究背景

(一)本論文係因為個人感受到現代醫藥科技發達，但醫院病患卻相對增加，罹患各種疾病率更是負面的成長；尤其是肝病的治療用藥缺乏，而造成肝病死亡率逐年上升。根據衛福部統計，臺灣每年約有 32,000 人死於慢性肝病、肝硬化及肝癌，而且肝癌為全國十大癌症死因的第 2 位，其中因肝癌病逝者約有 50%為 B 型肝炎帶原者、40%為慢性 C 型肝炎帶原者(Ho 等人，2014；Su 等人，2019)。因此認為研發有效保護肝臟功能的藥物產品是當務之急。

(二)在臺灣是以西醫學為主流的醫療體系，西醫師的治療用藥模式皆複製歐美醫學觀念為依歸，但過去西方醫學對於肝病的治療多採取支持性的保守療法，對於具體促進肝功能的西藥開發進程更是緩慢。從中醫學古籍中草藥相關之記載中，對於保護肝臟的中藥方已有相當清楚的認識，惟肝病中醫藥雖然源遠流長數千年，但由於西方科學盛起之故，未經科學研究證實功效的中醫藥反而屢受質疑。因此研發有效保護肝臟功能的相關中藥，一直是生技醫藥產業積極投注資金的重點項目。

### 二、研究動機

(一)在研習中醫學多年來，了解中藥對肝病的臨床治療藥效顯著，並

且中醫學《內經》闡述非常重要的『治未病』養生保健觀念。所以要降低減緩肝病的罹患率，以科學實證研發具保護肝臟功能的中藥相關產品，應該是現代保健醫學的目標，也是生技醫藥產業最重要的努力方向。故本論文選擇順天堂中藥養肝丸(神立清)顆粒劑研究，探討該配方對於清除自由基抗氧化的能力及保護肝臟的功效。

(二)保肝相關的中藥處方非常多，選擇順天堂養肝丸(神立清)中藥方作為研究主題與實驗材料樣品的主要因素如下：

1. 在台灣的現行法規中「處方用藥」與「成藥」之生產、核准與使用有別，「處方用藥」是必須經醫師診療後開立的治療性用藥；而「成藥」是可在一般藥局方便民眾購買的保養用藥。
2. 經查台灣現有「養肝丸」證照有 148 張證照，其中 137 張為成藥。順天堂生產之「養肝丸」是核准的「處方用藥」，且其養肝丸的組成配方中是選用楮實子，而其他廠製傳統的養肝丸是用枳實。「楮實子」歸肝、腎經；主要功效為補腎清肝，明目，利尿。故順天堂生產之「養肝丸」方中整體組合對於肝臟相關疾病等應用更為具體。
3. 順天堂是國內外核可的 GMP 製藥大廠之一，其生產、品管、研究、市場銷售、品牌等有嚴格管理與要求。
4. 順天堂藥廠業已將處方用藥「養肝丸」科學中藥製成 OTC 非處方藥「神立清」顆粒劑，故本研究主題選用養肝丸(神立清)顆粒劑作為研究材料。

## 第二節 文明疾病引發氧化壓力

### 一、文明疾病的認識

現代文明疾病從生理和遺傳的角度來看，人類的體質與過去數百萬年間並沒有多大改變，然而社會習慣與環境的快速變遷，讓人類無所適從，導致氧化壓力叢生潛伏在身體中，長期積累造成身心失調而形成慢性發炎的疾病。慢性發炎會慢慢地損傷人體的心腦血管系統、肝腎免疫系統、肺呼吸系統、內分泌系統、脾胃消化系統等器官功能，誘發全身性代謝性病變造成現代文明疾病。

從公共衛生的調查中，發現這些現代文明疾病在開發中國家的罹患率遠低於已開發國家，除了環境衛生的因素外，心理現象、工作壓力等才是影響人類健康的重要因素。例如，在 20 世紀 50 年代前，心臟病(心肌梗塞)、腦血管阻塞(中風)、糖尿病、癌症、過敏症、阿茲海默氏症(老化疾病)等，都屬於罕見疾病。50 年代後，這些疾病已躍升為重大死因，成為現今先進國家危害健康最常見的文明疾病(翟建富，2008)。

### 二、氧化壓力對人體的影響

#### (一)氧化壓力

氧化壓力(Oxidative stress)是機體活性氧成分與抗氧化系統之間平衡失調引起的一系列適應性的反應。當細胞失去正常的氧化還原狀態，會製造產生過氧化物與自由基攻擊細胞的蛋白質、脂類以及 DNA 鏈斷裂等毒性作用，導致細胞氧化損傷並造成人體許多發炎反應、退化、衰老與基因突變等，衍生為氧化壓力。

自由基是帶有不成對電子的化學中間產物，相當不穩定，會攻擊細胞膜與 DNA

造成細胞的傷害與基因的突變。體內自由基的產生主要來自以下五種原因：(1)紫外線、X光、 $\gamma$ 射線等放射線的照射。(2)抽菸。(3)發炎反應時由嗜中性白血球與巨噬細胞釋放出來。(4)空氣中的污染物。(5)粒線體在能量代謝的過程中釋放出來。氧化自由基對人體造成極大的威脅與壓力，抗氧化物主要功能即是協助人體清除過多的過氧化物、自由基等，正常人體內會製造抗氧化物質，以避免氧化自由基對身體細胞造成傷害(Houten 等人，2018)。

## (二)氧化壓力對身體的傷害

根據醫學研究報告，當氧化壓力越高，對細胞造成傷害越大，現代人體的疾病有 85%與氧自由基和過氧化脂質有關。氧自由基是人體在氧化代謝過程及自然防禦系統中，所產生的活性物質。過量的氧自由基，會破壞體內抗氧化防禦系統恆定性，並攻擊體內細胞膜不飽和脂肪酸，形成過氧化脂質，也會攻擊體內蛋白質及DNA，造成細胞破壞、死亡，導致微循環障礙及氧化壓力危機，產生各種疾病、老化現象及癌症等(Krystona 等人，2011)。

## (三)與氧化壓力相關的疾病

過往研究用於評估氧化壓力的指標，主要為丙二醛、神經營養因子、超氧化物歧化酶、活性氧物種、自由基、肌酸激酶等。若體內超氧化物歧化酶-2 (Superoxide dismutase 2, SOD2)水平缺乏或不足，則易導致提早死亡或增加癌症發病率(Muller 等人，2007)。過往研究應用於評估發炎的指標，主要有紅血球沉澱速率(Erythrocyte sedimentation rate, ESR)、C-反應蛋白(C-Reactive Protein, CRP)、腫瘤壞死因子 $\alpha$  (Tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )、白血球、類風濕性因子、核因子活化B細胞 $\kappa$ 輕鏈增強子(Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- $\kappa$ B)等。

長期大量的氧化壓力則會引發心血管疾病(例如：動脈硬化、高血壓、心肌梗大)，腦部功能障礙(例如：阿茲海默症、腦中風)，癌症(例如：肝癌、肺癌)及其他(例如：輻射、紫外線、白內障、糖尿病..等等)多種疾病(Sterba 等人，2013)。粒線體是氧化磷酸化的主要地點，產生大量不穩定和高反應性的氧氣，因而氧化大量分子以形成活性氧物種。而活性氧物種會透過細胞膜脂質過氧化、蛋白質氧化修飾和破壞去氧核糖核酸(DNA)三種途徑引起細胞損傷。過往研究化療損害癌細胞有絲分裂及代謝過程，但也同時造成其他訊號傳遞異常和正常細胞損傷，並伴隨氧化壓力水平升高、提高藥物耐受性和耐藥性(Zhang 等人，2018)。化療雖然可以治療多種癌症，但對造血系統有不利影響，而嗜中性白血球低下症為其中一種衍生疾病。(Akif 等人，2016)研究指出，接受化療引發嗜中性白血球(低於 500/mm<sup>3</sup>)低下症的患者，同時體內丙二醛水平升高，對氧磷酶(PON)、芳基硫酸酯酶(ARSA)和高密度脂蛋白(HDL)含量降低。(Angsutararux 等人，2015)研究指出蔥環類藥物包括阿黴素(AC)為目前癌症治療的方法之一，但會使體內產生大量活性氧物種，並引起心臟毒性等嚴重副作用，而若在癌症化療期間同時服用攝食抗氧化劑，例如穀胱甘肽(Glutathione)、維生素 E 和 N-乙醯半胱氨酸(N-acetyl cystein)，可以降緩產生活性氧物種的趨勢。

### 第三節 氧化壓力誘發肝臟損傷

#### 一、肝臟基本生理功能

肝臟是人體最大的腺體，重約 1.5 公斤，位於橫膈之下，腹腔的右上側，是人體中最大臟器。肝臟主要生理功能包括：(1)膽汁的生成及分泌，(2)血液的排毒作用，(3)醣類、脂質、蛋白質的代謝反應及酮體的分泌，(4)製造抗凝血劑及血漿蛋白，(5)儲存維生素、礦物質，(6)造血、儲血和調節循環血量，(7)維生素 D 的活

化，(8)免疫防禦功能。肝臟因負責全身眾多任務，如肝臟損傷機能異常了，不僅是肝功能受到影響，也會造成全身性病變。所以保護肝臟健康、降低肝損傷的關鍵，應從幫助肝臟抗氧化能力開始，這也是許多醫學專家紛紛投入護肝與抗氧化物質研究的因素。

## 二、肝臟損傷引發機體障礙

### (一) 肝臟損傷

在人體損傷定義為正常的細胞和組織可以對機體內外環境變化等刺激時，做出不同的形態、功能和代謝的反應調整；而當機體內外環境刺激超過組織和細胞的適應能力時，可引起受損細胞和細胞間質的物質代謝、組織化學、超微結構乃至顯微鏡下甚至肉眼可見的異常變化，稱為損傷。

### (二) 損傷機制

損傷機制主要有幾種方式包括：(1)細胞膜的破壞：細胞膜的破壞常見於細胞損傷引發，特別是細胞早期不可逆損傷的關鍵環節；細菌毒素、缺氧及機械性的直接損傷等可破壞細胞膜的完整性和通透性，從而影響其正常功能。(2)活性氧類物的產生：活性氧類物質(ASO)細胞正常的代謝也可產生，是一種強氧化性物質，是細胞損傷的基本環節；當受到刺激時，增生不足又無法及時清除，不能與周圍分子發生反應，釋放能量，從而損傷細胞引發病變。(3)細胞質內高游離鈣的損傷：正常細胞質內游離鈣較低，而許多酶的啟動依賴於細胞質內的游離鈣；細胞中毒、缺氧等使細胞質游離鈣升高，啟動蛋白酶、磷脂酶、核酸酶等使組織溶解，是多因素損傷細胞的最終環節。(4)遺傳變異：化學損傷、病毒、放射性物質直接損傷遺傳物質，使其不能合成相應的蛋白質(Cobb 等人，1996)。(5)缺血、缺氧的損傷：缺血缺氧使細胞能量、營養不足，破壞組織結構及功能喪失。(6)化學性損傷：可直接細胞毒化作用、損傷遺傳物質、誘導過敏免疫損傷等(Kang 等人，2020)。

### 三、評估肝細胞損傷指標

#### (一) 肝臟檢查

肝臟具有多種多樣的物質代謝功能，肝功能檢查對於診斷肝臟是否異常有著重要的意義，目的是要了解檢測肝病患者的肝臟是否有損傷，及損傷程度。肝臟生化檢查，包括肝臟酶學檢查、膽紅素代謝檢查、肝臟合成功能檢查及肝纖維化血清學指標等，能較全面地反映肝臟功能狀態，為肝功能異常的診斷提供重要依據，並能動態監測病情，是臨床應用最廣泛的實驗室檢測方法。

#### (二) 肝功能血液生化檢查項目

麩胺酸苯醋酸轉氨基酶(Glutamic Oxaloacetate Transaminase, GOT)，又稱天門冬胺酸轉氨酶(Aspartate aminotransferase, AST)。麩胺酸丙酮酸轉氨基酶(Glutamic Pyruvic Transaminase, GPT)，又稱丙胺酸轉氨酶(Alanine aminotransferase, ALT)。GOT 與 GPT 是體內肝細胞的酵素，與人體胺基酸、蛋白質的代謝有關，當肝細胞內的濃度升高、受損時就會流進血液中，代表肝臟發炎、損傷的訊息。因此 GOT 與 GPT，常被視為「肝功能」的血清生化值分析主要檢驗項目。

#### (三) 肝功能血液生化檢查項目分析

在臨床診斷上，GPT 與 GOT 常搭配檢測，用來評估肝細胞發炎或壞死程度以及區分急慢性肝炎，也是肝病治療的指標。在大部份的肝病，GOT、GPT 會同時上升，GOT 的數值通常比 GPT 低；在早期的肝臟細胞損害，GPT 上升幅度大都高於 GOT，作為定期檢查追蹤肝炎進行變化的主要項目；而當 GOT 高過 GPT 時，疑可能是有慢性肝炎逐漸演變成肝硬化或肝癌之傾向(Huang 等人，2006)。

血液生化檢查肝功能的主要項目 GOT (AST)與 GPT (ALT)分析如下:

1. GOT (AST)主要存在於肝細胞線粒體中、心臟和肌肉組織也有，是組織細胞內一種代謝胺基酸(轉移氨基)的酵素。當細胞受到各種破壞時，GOT 會被釋出到血中，故是評估肝細胞發炎或損傷的基本又重要肝機能酵素。
2. GPT (ALT)絕大部份存在於肝細胞漿中(腎臟次之)，是一種與胺基酸代謝有關之細胞酵素。GPT 是早期的肝臟細胞損傷、肝功能異常時最敏感的檢測指標。當肝細胞受損特別嚴重時，會釋出大量的 GPT 到血液中，即為急性肝炎(猛爆性肝炎)(Prati 等人，2002; Woreta 等人，2014)。
3. GOT/GPT (AST/ALT)之正常比值為 0.80~1.50，損傷會影響不同肝指數比值。
  - (1) 早期肝受損，因為肝細胞線粒體完整，一般 GOT<GPT。
  - (2) 中期肝受損，部分肝細胞線粒體損壞，GOT 會部分升高，會追趕 GPT。
  - (3) 重型肝受損，肝細胞線粒體大幅度損壞，GOT 升高明顯，GOT/GPT>1.5，甚至>2。

#### 四、肝臟損傷對機體的影響

肝臟是身體最大的器官，它的功能是代謝醣類、蛋白質、脂肪等養分，以及儲存養分、解毒等功能。當有毒化學物質、病毒、藥物、酒精或添加物，可以直接或間接引起毒性造成肝損傷與代謝異常等現象(Dai 等人，2006；Jerry. R. Mitchell. 等人，1974)。

(一)乙醯氨基酚 (Acetaminophen, APAP)，又稱乙醯氨酚(APAP)是全世界最常用的鎮痛藥和解熱藥之一。由於個體差異，在使用治療劑量下是安全的，若是服用

過量乙醯氨基酚(APAP) 24-48 小時內會造成肝臟的損害，導致急性肝衰竭和甚至死亡(L. P. James 等人，2003；J. A. Hinson 等人，2003；Bernal W 等人，2010 與 Singh 等人，2016)。過量的乙醯氨基酚(APAP)透過葡萄糖醛酸化或細胞色素 P450 2E1(CYP2E1)的硫酸化反應後，導致形成的代謝產物 N-乙酰基-對苯醌亞胺(NAPQI) 積累無法正常代謝(Cohen SD 等人，1997)，引起肝臟的先天性免疫細胞，例如：肝臟的巨噬細胞稱之庫弗氏細胞(kupffer cell, KC)以及伴隨發炎因子的活化。肝細胞壞死會減少抗氧化酶，例如過氧化氫酶 ( $H_2O_2$ )、超氧化物歧化酶(SOD)或穀胱甘肽過氧化物酶(GPx)的生成(B. L. Woolbright 等人，2017)。此外，過量的 APAP 增加了脂質過氧化作用和活性氧(ROS)的生成，最終導致肝細胞凋亡 (D. Eugenio-Perez 等人，2016)。因此，我們應從日常生活即要注意避免肝功能損傷，同時也要增強身體免疫力，這是保護肝臟健康很重要的觀念。

(二)研究顯示，過度的氧化反應、炎症的介質與乙醯氨基酚(APAP)誘導肝損傷的毒性有關，乙醯氨基酚(APAP)引起肝損害的機制仍有許多進展。肝損傷會引起庫弗氏細胞(kupffer cell, KC) (肝臟的巨噬細胞)的活化，進而刺激過度的氧化反應，並影響其他炎性細胞(嗜中性顆粒細胞和浸潤性巨噬細胞)伴隨釋放炎症細胞激素，例如腫瘤壞死因子 alpha (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ，TNF- $\alpha$ )、細胞介白素 1-beta (Interleukin-1 $\beta$ ，IL-1 $\beta$ )和細胞介白素 6 (Interleukin-6，IL-6)的含量增加 (D. Eugenio-Perez 等人，2016)。因此保護肝臟健康的關鍵，應從提高肝臟的抗氧化能力開始。

## 第四節 中醫藥學理論與肝臟的生理病理聯繫

### 一、中醫學理論肝臟的機能

#### (一) 肝臟的氣機

肝的主要生理機能：肝主疏泄，肝主藏血。

1. 肝主疏泄：是指肝氣具有疏通、暢達全身氣機的作用(孫廣仁，2007)。  
主要生理功能：(1)調暢氣機，(2)調節情緒精神，(3)促進脾胃運化和膽汁分泌排泄，(4)維持氣血運行，(5)調節水液代謝，(6)調節性與生殖。肝的疏泄功能正常，則氣機調暢，氣血和調，經絡通利，臟腑器官的活動也就正常，故常說肝掌管一身的氣機。而肝是排毒器官本身即容易受傷，又常受情緒的影響，所以如肝氣不順，可牽一髮而動全身，整個人體的氣機都會受影響。
2. 肝主藏血：是指肝臟具有貯藏血液和調節血量的功能(孫廣仁，2007)。肝的貯藏血液功能既可以濡養自身維持肝的陰陽平衡、氣血和調，又可以防止出血。其調節血量功能是維持人體各部分的血液量相對正常恆定，此即古代醫家王冰解說“人動則血運于諸經，人靜則血歸於肝臟”。

## (二) 肝臟的病機

1. 肝的病機特點：肝氣、肝陽常有餘；肝陰、肝血常不足(朱文鋒，2007)肝為剛臟，肝氣主升主動，性喜條達而惡抑鬱；肝開竅於目，與膽相表裡；肝以血為體，以氣為用，體陰而用陽，集陰陽氣血於一身，成為陰陽統一之體。故其病理變化複雜多端，因此，肝氣、肝陽常有餘，肝血、肝陰常不足就成為肝的重要病機特點。
2. 肝的病理變化：常見證型如肝氣鬱結、肝陰不足、肝血不足、肝火上炎、肝陽上亢、肝風內動等(朱文鋒，2007)。肝藏血與氣機的調節關係至為密切。如病機演變過程中，若肝陽上亢、升動無制，致肝風內動，則易發生中風等病變；肝陰虛證，肝血不足，則濡潤失職、筋脈失養、虛熱內生等。主要臨床表現如眼睛乾澀、兩目昏花、畏光、頭痛、眩暈、失眠多夢、心煩易怒、煩熱、盜汗等症狀。

## 二、肝臟與其他臟腑器官的病理聯繫

### (一) 臟腑五行相生的關係

五臟六腑以中醫五行(木、火、土、金、水)作為代表，藉由五行相生觀念來瞭解臟腑疾病關係(孫廣仁，2007)。如木生火，即肝藏血能幫助心臟血管循環的功能。水生木，即腎水滋肝木，腎精可滋養肝血，以助肝功能的正常發揮。

### (二) 肝病與其他臟腑的關係

肝臟體陰用陽，易肝陽過剩克侮他臟(朱文鋒，2007；周仲瑛，2009)，故肝病往往不限於本臟問題，常能影響其他臟腑造成病變。常見木旺克土，即肝有病變易影響脾胃功能，如肝炎、肝硬化、肝癌等導致脾胃功能障礙，出現嚴重腹水、腹脹、食慾減弱等症。

### (三) 肝臟與其他臟腑的病理影響

- 1.心與肝：心為血液循環的動力，肝是貯藏血液的臟器，所以心血旺盛，肝血貯藏也充盈，既可營養筋脈，又能促進心血運行活動。
- 2.肝與脾：如脾虛影響血的生成，導致肝血不足，出現頭暈、視物不清等。若肝氣鬱結，橫逆犯脾，易飲食難下、食慾減退、消化不良等。
- 3.肝與肺：肝氣升發，肺氣肅降，關係到人體氣機的升降運行。若肝氣上逆，肺失肅降，可見胸悶喘促、呼吸困難等。
- 4.肝與腎：腎藏精，肝藏血，精血相依。如腎精不足，肝血虧虛、肝陰不足，易導致眩暈、耳鳴、震顫、抽搐、肢體麻木等。
- 5.肺與肝：肝火旺盛時可以灼肺，如肝氣上逆影響肺氣失降，可見胸腔脹滿、咳嗽等症狀。

## 三、臟腑整體聯繫意義

中醫診斷學的辨證理論是整體觀(朱文鋒, 2007), 從臟腑功能和病變的認識, 在生理狀態下它們之間既分工又合作, 構成複雜的生理活動。在病理狀態下, 也是相互影響的。因此它們之間的關係, 可從生理和病理變化上反映出來, 故掌握這些臟腑關係的理論, 對臨床辨證施治, 有一定的指導意義。

由上述臟腑的聯繫關係, 我們更能瞭解為何五臟六腑的病變會造成肝臟損傷, 而肝損傷也會影響全身而產生病變等問題。故百病由肝治的論述, 即是反映全身病理性的調治概念; 故調養保護肝臟機能即有助於改善全身各類症狀疾病。這也是本案為何選擇研究具有肝臟保護之中藥的主要原因。

## 第五節 中醫藥學理論與肝臟保護有關的中藥

### 一、中醫藥學保護肝臟的文獻

肝炎為臺灣常見的疾病, 當肝臟細胞受到病毒、藥品、酒精、環境中毒性或氧化物質侵害就會引起發炎反應。在臨床上中醫常以「清利濕熱」及「益氣養陰」為治療原則。研究中醫藥保護肝臟的相關文獻探討: 例如

(一)現在生技醫藥研究方向主要針對直接阻斷纖維化形成的連鎖反應, 以及抑制和逆轉(reversing)纖維化, 在研究抗纖維化治療策略尚可歸納以下數點: (1) 抗氧化的功效, (2) 抗炎症反應, (3) 細胞激素(cytokine)的阻斷, (4) 抑制膠原纖維的合成, (5) 促使肝臟星狀細胞加速凋亡(Bissell 等人, 2001; Rojkind 及 Greenwel, 2001)。雖然目前有一些藥物對於治療肝纖維化有抑制及部分逆轉作用(Friedman 等人, 2000; Gebhardt, 2000; Iredale 等人, 2001; Schuppan and Porov, 2002), 有動物實驗結果及肝硬化病人臨床用藥及外科治療效果的證實(Shiratori 等人, 2000; Hammel 等人, 2001), 對於西藥治療肝纖維化之研究進展方面, 包括干擾素(Interferon- $\alpha$ )、抗轉型生長因子(Anti-transforming factor $\beta$ 1; Anti-TGF- $\beta$ 1)之抗體、

肝細胞生長因子(Hepatocyte growth factor ; HGF)等(Dieperink 等人, 2004 ; Nakamura 等人, 2000 ; Matsuda 等人, 1997), 但是到目前為止市面上卻尚無一種適合有效的西藥可治療肝纖維化。

(二)開發天然化合物或其衍生物所開發的藥物產品已超過一半用於治療不同類型的疾病, 例如癌症、肝臟損傷或炎性病徵(Clark, A.M., 1996)。在世界各地, 約有 65% 的患者使用抗肝病的草藥, 由於它們的廣泛可用性, 毒性及副作用低, 與合成藥物相比具有強的藥理活性和化學多樣性(Xiao, J.等人, 2013 ; Zhang, A. 等人, 2013 ; Gordaliza, M.等人, 2007)。

(三)薑黃素是薑黃根莖的主要成分。由於其抗氧化能力高, 具有抑制炎性反應被廣泛使用(Bahramsoltani, R.等人, 2017 ; Maheshwari, R.K.等人, 2017)。薑黃素具有多種生物活性, 包括: 抑制腫瘤生長(Kuttan, R.等人, 1985), 傷口癒合能力(Sidhu, G.S.等人, 1998), 抑制炎性反應(Satoskar R. 等人, 1998 ; Srimal, R.等人, 1998)和活性高的抗氧化劑(Sharma, O.等人, 2018)。

已知研究治肝方面的天然物, 發現給予薑黃素處理可以緩解肝炎。薑黃素含有有效活性物質且具有明顯的抗氧化作用可清除自由基。經由各種細胞和分子機制試驗與肝臟相關疾病之研究顯示, 薑黃素具有抑制脂質過氧化產物、發炎細胞因子和肝臟星狀細胞的活化。相關研究結果顯示: 薑黃素治療前後可以使乙醯胺酚(APAP)治療組的血清 GPT(ALT)顯著降低, 薑黃素治療組降低實驗小鼠肝組織壞死的發生率。同時可以增加乙醯胺酚(APAP)治療組的抗氧化超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase 2, SOD2)活性。此外, 添加薑黃素可有效抑制乙醯胺酚(APAP)所產生的 Bcl-2 / Bax 細胞凋亡蛋白的含量(Mohammad Hosein Farzaei 等人, 2018)。

(四)近年來掀起中草藥開發的研究風氣，由於它們的廣泛可用性，毒性及副作用低的優點，過往研究如小柴胡湯(Sho-saiko-to)與丹參(*Salvia miltiorrhiza*)等(Sakaida 等人，1998；Shimizu 等人，1999；Huang 等人，2001；Wasser 等人，1998)，其相關科學佐證不多，無法證實真正的確效機制，雖然傳統中醫藥在對肝病之臨床治療上已有悠久之歷史，但對於中醫藥成份療效之探討缺乏科學化數據佐證，加上作用機轉不明使得藥物使用安全性受到顧慮，因此在應用上無法受到國際醫學或科學界之認同(Schuppan 等人，2002)。但中醫之臨床用藥經驗確實具有療效，所以近年來對於中醫藥療效評估及作用機轉研究，無論在國內外皆日趨獲得重視。

(五)根據明朝<景岳全書>中記載柴胡疏肝散之成份為「柴胡、陳皮各二錢、川芎(*Ligusticum striatum*)、香附、枳殼、芍藥各一錢半、炙甘草一錢」，具有疏肝行氣、和血止痛之功效。柴胡疏肝散各單方之作用如下：柴胡能肝解鬱，對免疫系統有增強作用，其中柴胡皂甘(Saikosaponin)為主要成份，具鎮靜、鎮痛、解熱及鎮咳之作用，具有保肝利膽之功效；柴胡與香附具明顯之鎮痛解熱作用；柴胡、香附、甘草、枳殼與陳皮均可抑制炎症反應；枳殼、陳皮、白芍及甘草具解痙作用；川芎可抑制血栓素 A2 (Thromboxane A2)之血栓形成作用，白芍(*Paeonia sterniana*)也具有抗血栓及降血壓之功效；枳殼成分中之檸檬烯(d-Limonene)可促使膽管收縮以利膽汁分泌(陳奇，1993；林宗旦 等人，1996)。柴胡疏肝散為中醫常用之肝病治療方劑，根據臨床病例指出，柴胡疏肝散對病毒性肝炎與酒精性脂肪肝具有療效(楊曉冰，1997；俞君平 等人，1997；潘志堅 等人，2001)可顯著降低肝硬化患者 GPT (ALT)及 GGT 丙醯基轉胺酶(Gamma-glutamyl transferase， $\gamma$ -GT)以促使肝功能恢復及抑制肝纖維化(朱肖鴻 等人，2003)。

## 二、養肝丸(神立清)顆粒劑組成成份相關研究

(一)本研究之養肝丸(神立清)顆粒劑複方組成中藥包括：當歸(*Angelica sinensis*)、熟地黃(*Rehmannia*)、車前子(*Plantago asiatica*)、川芎(*Ligusticum striatum*)、白芍(*Paeonia sterniana*)、楮實子(*Fructus Broussonetiae*)、防風(*Saposhnikovia divaricate*)、蕤仁(*Prinsepia uniflora Batal*)。

(二)過往單味中藥的相關研究，如當歸(*Angelica sinensis*)水提取物小鼠肝臟的肝脂肪變性減少。以高脂飲食(BALF / c)餵養的當歸水提取物中老鼠的活性成份，評估了血清和肝臟的生化參數顯示。GOT (AST) 明顯減輕了血清過氧化物酶體增殖物活化受體  $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR $\gamma$ ) 表達上調和激活導致肝脂質異常和脂肪肝脂聯素 SIRT1-AMPK 信號轉導。此外，當歸(*Angelica sinensis*)水提取物顯著緩解了嚴重的氧化壓力，減輕非酒精性脂肪肝疾病機制(Wang 等人，2016)。

(三)如熟地黃(*Rehmannia*)富含多醣也被認為具有免疫調節活性。此研究調查了水提取熟地黃對四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )誘導的大鼠肝損傷的影響。病理組織學檢查顯示熟地黃治療均減少了壞死性肝細胞，炎性細胞的化學吸引和肝纖維化。與四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )治療相比，熟地黃治療均降低了血漿 GPT (ALT)和 GOT (AST)的活性，並降低了肝臟促炎細胞因子-腫瘤壞死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )的水平(Wu 等人，2011)。

## 三、養肝丸(神立清)顆粒劑的功效應用

### (一) 養肝丸(神立清)顆粒劑成份

本論文所研究的養肝丸(神立清)顆粒劑是古代養肝丸配方，原為《嚴氏濟生方》[眼門眼論治]的方劑，再係摘錄《重訂嚴氏濟生方》《雜病源流犀燭》卷二十五方名養肝丸的藥物組成為來源。故本研究養肝丸(神立清)顆粒劑成份為當歸、熟地黃、

車前子、川芎、白芍、楮實子、防風、蕤仁等八種中藥所組成。其主要效能為養肝明目，適應症有肝血不足、眼目昏花、或生眵淚、久視無力，還有現代研究具保護肝臟的功效(李冀，2014；高學敏，2008)。

## (二) 養肝丸(神立清)顆粒劑組成及功效分析:

1.有補血、調血、養肝的功效。

當歸:補血活血潤燥柔肝

熟地:補血滋陰

川芎:活血行氣

白芍:斂陰平肝止痛

以上四味藥即為四物湯的組成，四物補血儲藏於肝，故可補血調血養肝。

2.有調肝明目功效。

楮實子:平肝明目

車前子:清肝明目

蕤仁:養肝明目

以上三味藥雖然都有明目功效，實則各自有不同的路徑方向，皆能調肝明目，又能共奏加乘療效。

3.有緩解肝氣的功效。

防風:疏肝解癥

防風能避風寒、防止外來病菌入侵、疏通肝經，維護肝氣促使血液神經傳導順暢。

4.全方有補有瀉、有攻有守、表本兼顧，對肝臟具有滋養及護衛調理功效。

## (三)、養肝丸(神立清)顆粒劑的臨床應用研究

1.養肝丸在臺灣功效已獲得證實，並受到國際矚目，據國際研究發表資料所載，美國南加州大學(USC)進行養肝丸的研究，獲得研究證實有預防

肝纖維化等功效。

- 2.藥理、毒理、細胞生物聯合動物試驗：養肝丸可保護肝臟。根據 2012 發表於肝臟病學期刊的結論指出：養肝丸進行動物試驗的結果可以保護因烯丙醇(AIOH)、四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)及乙醯胺酚(APAP)等化學物質對動物肝臟造成的傷害，此研究成果被刊登在美州中國醫學雜誌(The American Journal of Chinese Medicine)及美國著名的肝臟病學期刊(Hepatology)。
- 3.我們透過衛福部中醫藥司的公開資訊檢視與養肝丸相關的適應症發現，其適應症大多是「肝血不足、眼目昏花、或生眵淚、久視無力」，可見得養肝不僅是保護肝臟，同時可有明目功效，可改善眼睛視物不清等問題。



## 第二章 研究目的與設計

### 第一節 研究目的

本論文主要研究目的為探討養肝丸(神立清)顆粒劑清除自由基以及抗氧化能力，為藥物作用機轉之研究。研發具保護肝臟功能的科學中藥，將傳統保肝中藥方，以科學實驗的研究證實相關藥物功效。故本研究選用順天堂中藥養肝丸(神立清)顆粒劑探討其抗氧化及肝臟保護的藥效評估。



### 第二節 實驗設計

利用清除 DPPH 自由基能力測定實驗，檢測養肝丸(神立清)顆粒劑清除 DPPH 自由基的能力；利用活體外細胞實驗，檢測養肝丸(神立清)顆粒劑緩解因革蘭陰性菌外膜成份脂多糖(LPS)誘發肝臟細胞損傷的能力。此外，利用動物餵食實驗，檢測養肝丸(神立清)顆粒劑保護小鼠對乙醯胺酚 Acetaminophen (APAP)誘發肝毒性的的能力。藉由上述實驗評估順天堂中藥養肝丸(神立清)顆粒劑之抗氧化及肝臟保護藥效。

## 第三章 材料與方法

### 第一節 順天堂中藥養肝丸(神立清)顆粒劑成份分析

(一)高效能液相層析法(High-Performance Liquid Chromatography, HPLC)是所有分析分離技術中最被廣泛使用，並具有高靈敏度的檢測。主要是基於傳統中藥的藥材來源、藥物鑑定與品質管制的需求。其原理是藉由移動相在沖提過程中帶動樣品流過管柱，並以固定相對樣品各組成份的吸附力之不同，使其分離而加以分析。再透過 HPLC 的偵檢器(Detector)是一種訊號接收和訊號轉換裝置，將管柱流出物中樣品的組成和含量變化轉換為可提供檢測的訊號，以進行定性及定量之分析。

(二)設定標準品最佳吸收波長利用 HPLC 的全波長掃描功能，顯示化學指標活性成份之含量。養肝丸(神立清)顆粒劑購自順天堂藥廠股份有限公司(Sun Ten Pharmaceutical Co., Ltd)。養肝丸(神立清)複合物中各個中藥的化學指標活性成份分析，包括：Albiflorin、Paeoniflorin (白芍)、Prim-O-glucosylcimifugin、5-O-Methylvisammioside (防風)、Ferulic acid、Ligustilide (當歸、川芎)、Acteoside (車前子)。本試驗委託禾百安檢驗公司以高效能液相層析法(3D-HPLC)分析法利用標準藥材之標準品的最佳吸收波長進行養肝丸(神立清)複合物中各個中藥的化學指標活性成份分析圖譜。

### 第二節 清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 氧化自由基能力測定

(一)1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除能力測試目的是在測試一個成份是否具有抗氧化性的一種簡單的篩檢試驗。DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)是一種穩定的自由基，當其溶於甲醇或乙醇中會呈現藍紫色，當加入的成份樣品可以和 DPPH 自由基直接反應，則會阻斷 DPPH 自由基的連鎖反應，當呈現藍紫色的 DPPH 溶液顏色會轉成澄清的黃色，表示加入的成份樣品具有捕捉 DPPH 自由基的能力，而呈現的顏色愈淡，則表示捕捉 DPPH 自由基的能力愈強，也就表示該成份樣品的抗氧化能力越好。

(二)試驗方法及步驟是首先配置 1.5 mM/mL 的 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) (D9132, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)，加入 9mL 甲醇(Methanol) (322415, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)混和溶液中，再取 100 $\mu$ L 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)以及 0.1, 1, 10mg/ml 之養肝丸(神立清)顆粒劑試驗樣品各 100 $\mu$ L，震盪混合均勻後於室溫下避光靜置 30 分鐘，以紫外光/可見光光譜儀 (Microplate Spectrophotometer, uQuant, Biotek Instruments, Inc., Vermont, USA)測其 517nm 之吸光值。利用對照組之吸光值的減少百分比，可判斷各試驗樣品清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基能力之強弱。之後取清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基能力最強之試驗樣品，配置成 3 種不同濃度進行並與標準品 L-抗壞血酸(L-Ascorbic acid, L-AA) (A5960, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)進行比較。本試驗為三重複。DPPH 自由基清除率(%)= (1 - 《實驗組吸收值 / 對照組吸收值》)  $\times$  100 (Gyamfi 等人, 1999)。

### 第三節 脂多醣(LPS)誘發肝臟巨噬細胞發炎模式

#### 一、肝臟庫佛氏細胞(Kupffer cell, KC) 培養

肝臟庫佛氏細胞(Kupffer cell, KC), (SCC119, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)。使用混和培養基(Culture Medium, CM)進行培養, 包括 PriGrow II 培養基(TM002; Abm<sup>®</sup> inc., Vancouver, CND) 及 RPMI-1640 培養基(Gibco,BRL,Grand Island,NY,USA), 比例為 1:3 同時補充有 10%胎牛血清(Fetal Bovin Serum,FBS) (HyClone,Logan,UT,USA), 1.5g/L 碳酸氫鈉, 0.11g/L 丙酮酸鈉, 4mM L-谷氨酰胺, 100U/mL 青黴素和 100µg/mL 鏈黴素(Gibco BRL,Grand Island,NY)。將這些細胞在培養基(CM)中培養, 並在 5%CO<sub>2</sub> 濕潤氣氛中保持在 37°C 培養箱。用 0.25%胰蛋白酶(Trypsin) (Gibco BRL,Grand Island,NY)消化庫佛氏細胞(Kupffer cell, KC) 1 分鐘, 直至大部分細胞脫落。對於每個 8 孔腔室載玻片(Lab-Tek, Nunc, Naperville, IL, USA), 將所有細胞密度調節至每孔 2×10<sup>4</sup> 個細胞。24 小時後, 添加含有及不含有大腸桿菌(O26: B6)的脂多醣(LPS) (L-2654, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 及養肝丸(神立清)顆粒劑於細胞中。

## 二、實驗組別

組別為四組, 分別是(1)控制組、(2) 養肝丸(神立清)增補組、(3)脂多醣(LPS)誘發肝臟損傷組、(4) 養肝丸(神立清)+脂多醣誘發肝臟損傷組。反應 72 小時後用磷酸鹽緩衝生理鹽水(Phosphate buffered saline, PBS)洗滌後以 2%多聚甲醛溶液(2% paraformaldehyde) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)固定細胞, 室溫靜置 15 分鐘後, 用磷酸鹽緩衝生理鹽水(Phosphate buffered saline, PBS)洗滌。以倒立光學顯微照相系統(Leica DM-IRB; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)拍攝細胞型態。

## 三、細胞活性測試 (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

**diphenyltetrazolium bromide ; MTT assay)**

MTT 是一種偵測活細胞粒線體的染色法，其主要是以細胞粒線體中的琥珀酸脫氫酶(Succinate dehydrogenase, SDH)作用將 MTT 之四唑(Tetrazolium)環打斷，產生氧化還原反應形成(Formazan)藍紫色結晶，再藉由二甲基亞風(Dimethyl sulfoxide; DMSO)有機溶劑將紫色結晶溶解形成紫色液體，利用生成顏色的深淺代表細胞數目的多寡，以測定肝臟庫佛氏細胞(Kupffer cell, KC)之細胞粒線體增生能力。將  $1 \times 10^5$  cells/mL 之肝臟庫佛氏細胞(KC)，再加入上述實驗組別共同培養 72 小時後，直接加入 0.5mg/mL 之 MTT solution (M5655, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)，培養 3 小時後去除上清液後，再加入 100 $\mu$ L/well 二甲基亞風(Dimethyl sulfoxide; DMSO)有機溶劑，震盪 10 分鐘後測量 570 nm 之吸光值。

#### 四、酵素結合免疫吸附分析法(Enzyme-linked immunosorbent assay ;

##### ELISA) 檢測炎性細胞激素(Inflammatory cytokines)之含量

炎性細胞激素含量之分析 採用酵素結合免疫吸附分析法(ELISA)，於96孔盤 microwell plate (Thermo Scientific Nunc®, Nunc AS, Copenhagen, Denmark)加入含有適量之細胞激素純化單株抗體：32ng/mL purified rat anti-mouse TNF $\alpha$  (88-7324 ; Invitrogen, Carlsbad, CA)及32ng/mL purified rat anti-mouse IL-1 $\beta$ (88-7013 ; Invitrogen, Carlsbad, CA)的碳酸鹽緩衝液(Carbonate buffer)加入每孔100  $\mu$ L/well，靜置於4 $^{\circ}$ C；隔夜以0.05%磷酸鹽緩衝液(PBST buffer)清洗3次沖去未結合之單株抗體，加入阻斷液(Blocking solution)每孔200 $\mu$ L/well以減少非特異性的結合，室溫反應60分鐘；以磷酸鹽緩衝液(PBST buffer)洗3次後加入細胞上清液樣品及抗體標準品8-1000pg/mL Recombinant mouse TNF- $\alpha$ 及 IL-1 $\beta$ 每孔100  $\mu$ L/well，室溫反應2小時；以磷酸鹽緩衝液(PBST buffer)清洗4次，再加入連結生物素的抗細胞激素二級抗體

Biotin-conjugated anti mouse TNF- $\alpha$ 及IL-1 $\beta$ antibody加入每孔100  $\mu$ L/well(250x)，室溫反應1小時；以磷酸鹽緩衝液(PBST buffer)清洗5次後，加入Avidin 連結之過氧化酶(Avidin-horseradish peroxidase conjugated)加入每孔100  $\mu$ L/well，室溫反應30分鐘；以磷酸鹽緩衝液(PBST buffer)清洗6次，再與加入每孔100  $\mu$ L/well 受質(Tetramethylbenzidine; TMB)反應，待室溫避光反應20-30分鐘的作用呈色，以2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 終止反應，測定450-570 nm之吸光值。

#### 第四節 乙醯胺酚(APAP)誘發肝損傷動物模式

(一)本研究對象為 60 隻十週大的 ICR 品系遠交雄性小鼠，購自樂斯科生物科技股份有限公司，實驗期間全程飼養於國立臺灣師範大學公館校區生命科學院動物房，飼養環境控制室溫為 23-27°C，濕度為 50-60%，飼料及飲用水皆為自取式不限量供應。

(二)將 60 隻小鼠以體重平均分配為六組，每組 10 隻，分別是(1)空白處理(控制)組、(2)乙醯胺酚(APAP)誘發肝臟損傷組、(3) 100mg/kg 養肝丸(神立清)前處理+乙醯胺酚(APAP)誘發肝臟損傷組、(4) 100mg/kg 養肝丸(神立清)後處理+乙醯胺酚(APAP)誘發肝臟損傷組、(5) 100mg/kg 養肝丸(神立清)全(前、後)處理+乙醯胺酚(APAP)誘發肝臟損傷組、(6) 600mg/kg N 乙醯半胱氨酸(NAC)緩解肝毒性組。實驗期總共四週，包含第一週適應環境；第二到三週管餵增補養肝丸(神立清)、600mg/kg N 乙醯半胱氨酸(NAC)緩解肝毒性組每週五次，共計二週；及腹腔注射 400mg/kg 乙醯胺酚(APAP)每週二次，共計一週；於第四週結束後灌流犧牲並收集血液、肝臟組織等。實驗流程於附錄圖表說明(表 2)。

(三)N 乙醯半胱氨酸(Nacetylcysteine, NAC)為肝臟解毒劑可以有效預防肝毒性的發生，常被用來作為乙醯胺酚(APAP)中毒和腎臟的有效解毒劑，其效果僅限於急性早期發炎或損害時期(K. Du 等人，2016)。

## 第五節 血清生化值分析

肝臟是人體內含酶最豐富的器官，而檢驗肝功能指數最多的兩種酶包括：天門冬氨酸轉氨酶 GOT (AST)及丙氨酸轉氨酶 GPT (ALT)的數值最為普遍。當肝臟產生發炎壞死癥狀時，這 2 種轉氨酶就會由肝細胞內釋放至血液中，是評估肝臟是否處於發炎的指標。實驗動物結束後犧牲小鼠。將血液樣品收集到 2mL 離心管中靜置 1~2 小時，待血清與血漿分離後以 3,000 g，控溫 4°C 下離心 15 分鐘。收集上層血清，保存在 -80°C 直至分析。使用分析試劑盒分析血清樣品的 GOT 與 GPT，依據乾式全自動生化分析儀 Spotchem EZ SP 4430(ARKRAY, Kyoto, 日本)的使用說明流程來測量血清 GOT 和 GPT 的含量。

## 第六節 肝臟組織染色

### 一、蘇木精-伊紅染色(Hematoxylin-eosin staining; HE)

蘇木精-伊紅染色(HE)實驗步驟如下：首先，犧牲小鼠後取其肝臟組織放置於包埋盒中，並浸泡在 10%福馬林(Formalin) (Sigma-Aldrich St. Louis, MU, United States) 24 小時後進行固定。固定完成後，以石蠟(Paraffin)包埋，並利用旋轉式精密切片機(Leica RM2135, Wetzlar, Germany)切製成 5  $\mu\text{m}$  之肝組織切片，接著將組

織切片貼片保存。在攝氏 60 度加熱進行脫蠟；接著進行一系列酒精洗滌和脫水的過程。洗滌和脫水是為了讓組織中水分可以被石蠟所取代，達到硬化支持的作用。第一缸先浸泡 85%酒精 60 分鐘，接著浸泡皆為 95%酒精的第二、三缸各 70 分鐘，再浸泡於皆為 100%酒精的第四、五、六缸各 90 分鐘。酒精浸泡完成後脫水。脫水完成後，浸泡第一蠟缸 30 分鐘，再轉為浸泡第二蠟缸放置隔夜，經數次甲醇、95%酒精、二次水以洗淨石蠟後，以生理食鹽水沖洗 10 分鐘，加入蘇木精(Hematoxylin)和伊紅(Eosin)進行蘇木精-伊紅染色(Hematoxylin-eosin staining; HE) (Polymer detection system) (RE7140-K/RE7150-K, Leica Biosystems Newcastle Ltd.) 各反應 8 分鐘進行對比染色，並以清水小心沖洗玻片背面 10 分鐘，即完成染色程序。

## 二、肝臟組織纖維化染色(Masson trichrome, MT)

肝臟組織纖維化染色，主要是利用馬森三色染色法(Masson trichrome, MT) (AR-173, Artisan Masson's trichrome staining kit, Agilent, Santa Clara, CA) 染色肝臟組織是否表現纖維化的情形。MT 染色標的為膠原纖維，常被用於肝臟纖維化的判定依據。肝組織切片的步驟同上述方法以 10%福馬林(Formalin)進行脫蠟、固定、石蠟(Paraffin)包埋，切製成 5  $\mu\text{m}$  之肝組織切片，加入 Iron-hematoxylin 染色 10 分鐘後再沖水 10 分鐘呈現水藍色後再加入 Biebl's sacle (or Pancean organe) 染色 10 分鐘再沖水，加入 Phosphotungstic 的酸性溶液染色 10 分鐘後，接著再加入 Aniline blue (or light green) 染色 7 分鐘，進行一系列脫水過程後封片進行判讀。判讀的結果為膠原纖維呈現藍色；肌肉呈現紅色；細胞核呈現黑色。最後進行脫水及封片，並使用金相顯微光學顯微鏡(Olympus BH2 system light microscope; Canon DS126271) (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) 在可見光下以 40 倍至 100 倍間拍攝。

## 第七節 統計與資料分析

每組實驗各組最少重複三次，所有的實驗數值都是用平均值±平均值標準誤差來表示。而統計方法則是用單因子變異數分析(One-way ANOVA)，再用 Tukey 事後檢定比較做分析，*P*-values 設定<0.05 表示組間具有顯著差異。



## 第四章 研究結果

### 第一節 養肝丸(神立清)顆粒劑的中藥指紋圖譜

本論文圖 1 研究選用順天堂中藥養肝丸(神立清)顆粒劑探討其抗氧化及肝臟保護的藥效評估。養肝丸(神立清)顆粒劑是順天堂藥廠以養肝丸散劑製成的藥方，經過溶離試驗，確保療效有效性。主治肝血不足、養肝明目、改善慢性疲勞、活化機能。養肝丸(神立清)顆粒劑複方組成中藥包括：當歸(*Angelica sinensis*)、熟地黃(*Rehmannia*)、車前子(*Plantago asiatica*)、川芎(*Ligusticum striatum*)、白芍(*Paeonia sterniana*)、楮實子(*Fructus Broussonetiae*)、防風(*Saposhnikovia divaricate*)、蕤仁(*Prinsepia uniflora Batal*)。圖 1 利用高效液相層析 3D-HPLC 分析養肝丸(神立清)的中藥指紋圖譜。圖譜中被檢測出來的化學指標活性成份以及對應的中藥名稱分別為 Albiflorin (白芍)、Paeoniflorin (白芍)、Prim-O-glucosylcimifugin (防風)、Ferulic acid (當歸、川芎)、Acteoside (車前子)、5-O-Methylvisammioside (防風)、Ligustilide (當歸、川芎)。

### 第二節 養肝丸(神立清)顆粒劑抗氧化、清除自由基的能力

本論文圖 2 研究利用清除 DPPH 自由基能力測定實驗，檢測養肝丸(神立清)顆粒劑清除 DPPH 自由基的能力。圖 2A 以 DPPH 方法對順天堂中藥養肝丸(神立清)顆粒劑之抗氧化能力測定，圖 2B 統計了 DPPH 方法測試不同濃度養肝丸(神立清)下的自由基清除率變化情形，實驗結果顯示 0.1mg/mL 養肝丸(神立清)具有 47.6%

清除自由基的效率，1.0mg/mL 養肝丸(神立清)具有 62.1%清除自由基的效率，10mg/mL 養肝丸(神立清)具有 70.3%清除自由基的效率，這結果顯示養肝丸(神立清)具有清除自由基的功效。這統計結果顯示養肝丸(神立清)隨著測試濃度增加，清除自由基的抗氧化效率顯著增加。

### 第三節 養肝丸(神立清)顆粒劑對肝臟巨噬細胞損傷的保護作用

(一)本論文研究利用活體外細胞實驗，檢測養肝丸(神立清)顆粒劑緩解因革蘭陰性菌外膜成分脂多糖(LPS)誘發肝臟巨噬細胞損傷的能力。圖 3 結果顯示養肝丸(神立清)可以有效緩解脂多醣誘發肝臟巨噬細胞的損傷作用。圖 3A 利用 1 $\mu$ g/mL 脂多醣(LPS)誘發肝臟巨噬細胞的損傷作用(箭頭指示)，可觀察到細胞數目變少且外觀型態拉長形成梭狀。然後添加 15mg/mL 養肝丸(神立清)處理損傷的肝臟巨噬細胞，經過 24 小時以及 72 小時觀察肝臟巨噬細胞外觀型態，可以發現肝臟巨噬細胞變得與空白處理組的正常肝臟巨噬細胞相類似，這結果顯示養肝丸(神立清)具有保護肝臟巨噬細胞損傷的功效。圖 3 B 利用 MTT 方法測試不同濃度養肝丸(神立清)下的細胞存活率變化情形，統計結果顯示：正常肝臟巨噬細胞(-LPS)的細胞存活率會隨著養肝丸(神立清)測試濃度增加而顯著增加；而添加脂多醣(+LPS)誘發肝臟巨噬細胞損傷的情形下，細胞存活率均較相同濃度養肝丸(神立清)的細胞存活率明顯減少，惟脂多醣(+LPS)誘發損傷的肝臟巨噬細胞，也會隨著養肝丸(神立清)測試濃度增加而顯著增加。這結果說明養肝丸(神立清)確實具有保護肝臟巨噬細胞損傷的功效。

(二)圖 4 結果說明養肝丸(神立清)可以有效緩解脂多醣誘發肝臟巨噬細胞的發炎作用。圖 4A 利用 1 $\mu$ g/mL 脂多醣(LPS)誘發肝臟巨噬細胞損傷，可觀察到細胞的 TNF- $\alpha$ 發炎指數較空白處理組顯著增加( $p<0.01$ )，當添加 15mg/mL 養肝

丸(神立清)，於肝臟巨噬細胞 72 小時後，可以發現肝臟巨噬細胞 TNF- $\alpha$  發炎指數顯著降低( $p<0.01$ )。圖 4B 利用 1 $\mu$ g/mL 脂多醣(LPS)誘發肝臟巨噬細胞損傷，可觀察到細胞的 IL-1  $\beta$  發炎指數較空白處理組顯著增加( $p<0.01$ )，當添加 15mg/mL 養肝丸(神立清)，於 72 小時檢測肝臟巨噬細胞，可以發現肝臟巨噬細胞 IL-1  $\beta$  發炎指數顯著降低( $p<0.01$ )。這結果顯示養肝丸(神立清)確實具有緩解肝臟巨噬細胞發炎的功效。

#### 第四節 養肝丸(神立清)顆粒劑對小鼠肝損傷的保護作用

(一)本論文研究利用動物餵食實驗，檢測養肝丸(神立清)顆粒劑保護小鼠對乙醯胺酚(APAP)誘發肝毒性的能力。藉由上述實驗評估順天堂中藥養肝丸(神立清)顆粒劑之抗氧化及肝臟保護藥效。圖 5 結果說明養肝丸(神立清)有效緩解乙醯胺酚(APAP)誘導肝損傷小鼠的肝細胞死亡。圖 5A 利用蘇木精-伊紅染色(Hematoxylin-eosin staining; HE)處理空白對照組小鼠肝臟組織切片的結果顯示肝臟組織相當正常且肝細胞核也相當完整；當利用腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚(APAP)可以誘導小鼠產生肝損傷，此時肝臟組織受損嚴重且肝細胞核也多受損死亡；如果事先添加肝臟解毒劑 600 mg/kg N 乙醯半胱氨酸(NAC)，則可以有效減緩乙醯胺酚(APAP)誘發的肝損傷，而損傷區域也大大降低。圖 5B 為小鼠事先增補 100 mg/kg 養肝丸(神立清)兩週後，再腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚(APAP)，可觀察到有效減緩乙醯胺酚(APAP)的肝損傷，而損傷的區域也大大降低(箭頭指示)；當小鼠腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚(APAP)後再增補 100 mg/kg 養肝丸(神立清)兩週後，也可觀察到有效修補乙醯胺酚(APAP)肝毒性引起的肝損傷，而損傷的區域也大大降低；而小鼠事先以及事後均增補 100 mg/kg 養肝丸(神立清)各兩週，中間腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚(APAP)，可觀察到有效減緩乙醯胺酚(APAP)的肝損傷，而損傷的區域也

大大降低。

(二)圖 6 結果說明養肝丸(神立清)有效緩解乙醯胺酚(APAP)誘導肝損傷小鼠的肝臟纖維化。圖 6A 利用 Masson trichrome (MT) 染色處理空白組小鼠肝臟組織切片的結果顯示肝臟組織相當正常且肝臟細胞也沒有纖維化的情形。MT 染色標的為膠原纖維，故常被用於肝臟的纖維化判定依據。利用腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚(APAP)可以誘導小鼠產生肝損傷，此時肝臟組織受損嚴重且呈現大區域的纖維化(箭頭指示藍色區域)；事後小鼠添加肝臟解毒劑 600 mg/kg N 乙醯半胱氨酸(NAC)則可以有效減緩乙醯胺酚(APAP)誘發的肝損傷，而纖維化的區域也大大降低。圖 6 B 顯示小鼠利用事先增補 100 mg/kg 養肝丸(神立清)兩週後，再腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚(APAP)，可觀察到有效減緩乙醯胺酚(APAP)的肝損傷，纖維化的區域雖有減緩惟纖維化情形仍然明顯；當小鼠腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚(APAP)後再增補 100 mg/kg 養肝丸(神立清)兩週後，可觀察到有效修補乙醯胺酚(APAP)肝毒性引起的肝損傷，而纖維化的區域也明顯降低；當小鼠事先以及事後均增補 100 mg/kg 養肝丸(神立清)各兩週，中間腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚(APAP)，可觀察到有效減緩乙醯胺酚(APAP)的肝損傷，而纖維化的區域也明顯降低。

(三)圖 7 結果說明養肝丸(神立清)有效降低乙醯胺酚(APAP)誘導肝損傷小鼠的肝臟損傷指標。圖 7A 利用抽血檢視肝細胞壞死指數 GPT (ALT)，結果顯示小鼠利用腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚(APAP)誘導產生肝損傷的血液中 GPT 顯著增加 ( $p < 0.01$ )。當事先添加肝臟解毒劑 600 mg/kg N 乙醯半胱氨酸(NAC)、或是事先、事後、以及前後均增補 100 mg/kg 養肝丸(神立清)兩週、再腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚(APAP)，可以觀察到 N 乙醯半胱氨酸(NAC)與養肝丸(神立清)均可以有效降低小鼠血液中的 GPT ( $p < 0.01$ )。惟 GPT 緩解的效果與空白對照組小鼠血液中的 GPT 比較，仍有顯著的差異 ( $p < 0.01$ )；圖 7B 利用抽血檢視肝細胞壞死指數 GOT (AST)，結果顯示利用腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚(APAP)誘導產生肝損傷的小鼠血液中

的 GOT 顯著增加( $p<0.01$ )。當事先添加肝臟解毒劑 600 mg/kg N 乙醯半胱氨酸(NAC)、或是事先、事後、以及前後均增補 100 mg/kg 養肝丸(神立清)兩週、再腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚(APAP)，可以觀察到 N 乙醯半胱氨酸(NAC)與養肝丸(神立清)均可以有效降低小鼠血液中的 GOT( $p<0.01$ )。惟 GOT 緩解的效果與空白對照組小鼠血液中的 GOT 比較，仍有顯著的差異( $p<0.01$ )。這結果顯示肝臟解毒劑 N 乙醯半胱氨酸(NAC)與養肝丸(神立清)對於肝臟損傷指標雖有緩解的效果，但是仍無法回復到一般正常的肝臟損傷指標。

(四)圖 8 結果說明養肝丸(神立清)有效提升乙醯胺酚(APAP)誘導肝臟損傷小鼠的免疫球蛋白。利用抽血檢視免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G ; IgG)，IgG 是血清和細胞外液中含量最高的一類免疫球蛋白。圖 8 結果顯示利用腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚(APAP)誘導產生肝損傷的小鼠血液中的 IgG 顯著降低( $p<0.05$ )。當事先添加肝臟解毒劑 600 mg/kg N 乙醯半胱氨酸(NAC)、或是事先、事後、以及前後均增補 100 mg/kg 養肝丸(神立清)兩週、再腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚，可以觀察到 N 乙醯半胱氨酸(NAC)與養肝丸(神立清)均可以有效提高小鼠血液中的 IgG ( $p<0.05$ )。

(五)圖 9 為養肝丸(神立清)保護小鼠肝臟損傷的統整示意圖。綜合本論文研究結果可以說明養肝丸(神立清)對於乙醯胺酚(APAP)誘導產生肝損傷的小鼠具有肝臟損傷保護和修復的功能。當小鼠腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚(APAP)會造成肝臟細胞損傷以及纖維化的情形；當肝臟發炎或壞死時，肝細胞會讓 GOT、GPT 釋入血液中，造成肝指數升高，進而引發肝臟發炎。當事先、事後、以及前後均增補 100 mg/kg 養肝丸(神立清)兩週，則可以有效緩解肝臟損傷。

## 第五章 討論與結論

### 第一節 養肝丸(神立清)顆粒劑的抗氧化作用

現代生活的現實環境中還是有著不可避免的污染物或化學物質。所有這些都會在體內累積大量必須處理的物質，而肝臟負責過濾所攝取的一切物質，進行巨大工程任務。所以，身體的廢物過濾系統永遠不能真正休息。養肝丸的配方主要出自《重訂嚴氏濟生方》，由當歸、白芍、熟地黃、川芎、防風、車前子、蕤仁、楮實子組成，主要功效為養血明目，適應症有肝血不足，眼目昏花，或生眵淚，久視無力。本論文研究圖 2 以 DPPH 方法對中草藥複合物之抗氧化能力測定，實驗結果顯示保肝功能候選中藥具有清除自由基的功效。除了維護肝功能外，養肝丸(神立清)中的許多成份還具有抗氧化活性，有助於保護肝臟細胞免受破壞性的氧化壓力。

### 第二節 養肝丸(神立清)顆粒劑對肝細胞損傷的保護作用

(一)肝臟巨噬細胞又稱為庫佛氏細胞(Kupffer cell、Browicz-Kupffer cell、stellate macrophages)，簡稱庫佛氏細胞(Kupffer cell)，是為了紀念發現的科學家而命名為庫佛氏細胞(Kupffer cell)，具有支持肝臟細胞功能的效果。

肝臟除了負責過濾有毒物質，其實還負責人體很多的免疫功能。除了主要的肝臟細胞外，肝臟還包含了許多免疫相關細胞，例如巨噬細胞(Kupffer cell 庫佛氏細胞)負責肝臟內的吞噬作用。巨噬細胞也同時身兼抗原呈現細胞的一員(Antigen

present cell)，能將外來病原體的碎片用來活化 T 細胞，扮演著先天性與後天性免疫的溝通橋樑，並同樣參與在許多的疾病中，包含肝臟炎症反應、心肌梗塞、癌症、氣喘、糖尿病、肥胖等，因此巨噬細胞近年來成為許多面向的熱門研究，大多為中藥常用的養肝、保肝成方。主要在改善肝臟功能、提高身體代謝作用及抵抗疾病能力。

(二)本論文研究利用活體外細胞實驗，檢測養肝丸(神立清)顆粒劑緩解因革蘭陰性菌外膜成分脂多糖(LPS)誘發肝臟巨噬細胞損傷的能力。本論文研究圖 3A 結果顯示養肝丸(神立清)可以有效緩解脂多醣(LPS)誘發肝臟巨噬細胞的損傷作用利用脂多醣(LPS)誘發肝臟巨噬細胞的損傷作用，可觀察到細胞數目變少且外觀型態拉長。當添加 15mg/mL 養肝丸(神立清)處理損傷的肝臟巨噬細胞，可以發現肝臟巨噬細胞變得與空白處理組的正常肝臟巨噬細胞相類似，這結果顯示養肝丸(神立清)具有保護肝臟巨噬細胞損傷的功效。此外，本論文研究圖 3B 利用 MTT 方法測試不同濃度養肝丸(神立清)下的細胞存活率變化情形，結果顯示正常肝臟巨噬細胞(-LPS)的細胞存活率會隨著養肝丸(神立清)測試濃度增加而顯著增加；而添加脂多醣(+LPS)誘發肝臟巨噬細胞損傷的情形下，細胞存活率均較相同濃度養肝丸(神立清)的細胞存活率明顯減少，惟脂多醣(+LPS)誘發損傷的肝臟巨噬細胞，也會隨著養肝丸(神立清)測試濃度增加而顯著增加。這結果說明養肝丸(神立清)確實具有保護肝臟巨噬細胞損傷的功效。

(三)肝臟巨噬細胞(Kupffer cell 庫佛氏細胞)是位於肝臟中的特殊巨噬細胞，為單核吞噬細胞系統(mononuclear phagocyte system)的一部分。庫佛氏細胞的 TLR4 受體與 CD14 受體被活化，促進許多造成發炎的細胞因子轉譯(如腫瘤壞死因子  $\alpha$ ，TNF- $\alpha$ )及超氧化物( $O_2^-$ )的製造。腫瘤壞死因子  $\alpha$  可造成肝臟星狀細胞大量合成膠原蛋白，造成肝臟的纖維化，肝的纖維化最終造成肝硬化並失去功能。本論文研究圖 4 結果說明養肝丸(神立清)可以有效緩解脂多醣(LPS)誘發肝臟巨噬細胞的發炎

作用。利用脂多醣(LPS)誘發肝臟巨噬細胞損傷，可觀察到細胞的 TNF- $\alpha$  發炎指數較空白處理組顯著增加，當添加養肝丸(神立清)於檢測肝臟巨噬細胞，可以發現肝臟巨噬細胞 TNF- $\alpha$  發炎指數顯著降低。此外，利用脂多醣(LPS)誘發肝臟巨噬細胞損傷，可觀察到細胞的 IL-1 $\beta$  發炎指數較空白處理組顯著增加，當添加 15mg/mL 養肝丸(神立清)，於 72 小時檢測肝臟巨噬細胞，可以發現肝臟巨噬細胞 IL-1 $\beta$  發炎指數顯著降低。這結果顯示養肝丸(神立清)確實具有緩解肝臟巨噬細胞發炎的功効。

### 第三節 養肝丸(神立清)顆粒劑對動物誘發肝損傷的保護作用

(一)藥物引起的肝臟發炎症狀與病毒性肝炎差不多，但多是以急性肝炎為主，慢性肝炎較少見，除非患者持續吃那一種會引起肝損傷的藥物，才可能演變成慢性肝炎，甚至出現肝纖維化、脂肪肝、肝硬化、膽汁滯留等症狀。至於可能引起藥物性肝損傷的藥品，常見的包括非類固醇消炎止痛藥乙醯胺酚(APAP)、抗生素、抗腫瘤藥、激素類藥(包括口服避孕藥)、心腦血管治療藥物(Captopril)、麻醉藥、抗癲癇藥(Anti-convulsants)、免疫抑制劑、鎮靜和神經精神藥物等，其中乙醯胺酚(APAP)是歐美國家認為會引起急性肝衰竭的最主要原因。乙醯胺酚又稱為 paracetamol 或 N-acetyl-para-aminophenol，簡稱 APAP，是市面上使用最普遍的解熱鎮痛劑，經常有許多民眾因乙醯胺酚(APAP)使用不當而中毒或用於自殺的案例發生。APAP 引起的肝臟損傷是造成重症及死亡的最主要因素。本論文研究利用動物餵食實驗，檢測養肝丸(神立清)顆粒劑保護小鼠對乙醯胺酚(APAP)誘發肝毒性的能力。已有許多的臨床經驗證明 APAP 的肝毒性是可以預防的，早期的診斷和即時的給予解毒劑 N 乙醯半胱氨酸 (NAC)可以有效預防肝毒性的發生(Smilstein 等人，1988)。對於有肝臟疾病、酗酒的病人都是屬於會引起嚴重肝毒性的高危險群。以酒精為例，酒

精主要是由肝臟的 CYP2E1 代謝，當肝臟有較多的 CYP2E1 來代謝 APAP，使得 APAP 的毒性代謝產物明顯增加，造成肝細胞損傷(Lee, 2003)。

(二)本論文研究圖 5 結果說明養肝丸(神立清)有效緩解乙醯胺酚(APAP)誘導肝損傷小鼠的肝細胞死亡。空白對照組小鼠肝臟組織相當正常且肝細胞核也相當完整，利用腹腔注射乙醯胺酚(APAP)，結果肝臟組織受損嚴重且肝細胞核也多受損死亡；如果事先添加肝臟解毒劑 N 乙醯半胱氨酸(NAC)，則乙醯胺酚(APAP)誘導肝臟組織損傷區域也大大降低。當事前給予養肝丸(神立清)增補兩週，或事後給予養肝丸(神立清)增補兩週，以及前後各給予養肝丸(神立清)增補兩週，則乙醯胺酚(APAP)誘導肝臟組織損傷區域也大大降低。

(三)由於組織病理檢查對肝衰竭的診斷、分類及預後判定具有重要的意義。急性肝衰竭的肝細胞呈一次性壞死，壞死面積 $\geq$ 肝實質的 2/3、大面積壞死存活的肝細胞有嚴重變性；慢性肝衰竭主要為瀰漫性肝臟纖維化，及異常結節形成，伴有分佈不均的肝細胞壞死。本論文研究圖 6 結果說明養肝丸(神立清)有效緩解乙醯胺酚(APAP)誘導肝損傷小鼠的肝臟纖維化。利用 Masson trichrome (MT)染色膠原纖維，作為肝臟的纖維化判定依據。正常小鼠肝臟組織切片顯示肝臟組織相當正常且肝臟細胞也沒有纖維化的情形。利用乙醯胺酚(APAP)誘導小鼠產生肝損傷，此時肝臟組織受損嚴重且呈現大區域的纖維化；事後小鼠添加肝臟解毒劑 N 乙醯半胱氨酸(NAC)，則可以有效減緩乙醯胺酚(APAP)誘發的肝損傷，而纖維化的區域也大大降低。事前給予養肝丸(神立清)增補兩週，或事後給予養肝丸(神立清)增補兩週，以及前後各給予養肝丸(神立清)增補兩週，則乙醯胺酚(APAP)誘導肝臟組織纖維化的區域也大大降低。

(四)乙醯胺酚(APAP)是普拿疼和斯斯的主要成分，可直接作用在腦部阻斷疼痛傳導，達到止痛退燒的效果。由於乙醯胺酚(APAP)主要經由肝臟代謝，在過量使用

時，可能會對肝臟造成傷害。肝臟有許多功能，沒有任何一項檢查可單獨代表所有肝臟之功能。最常見之肝臟疾病為肝炎及脂肪肝，所以體檢常選用 GOT、GPT 作為篩檢的指標。GOT、GPT 是肝細胞內的酵素之一，當肝細胞因發炎或化學藥物而受損或壞死時，血中酵素的濃度會上升，因此臨床醫療上常以 GPT、GOT 升高的程度作為肝臟發炎或受損程度之評估方式。**本論文研究圖 7 結果**說明養肝丸(神立清)可以有效降低乙醯胺酚(APAP)誘導肝損傷小鼠的肝臟損傷指標。利用抽血檢視腹腔注射乙醯胺酚(APAP)誘導產生肝損傷小鼠的 GPT、GOT，結果均較正常小鼠高出許多；當事先添加肝臟解毒劑 N 乙醯半胱氨酸(NAC)、或是事先、事後、以及前後均增補 100 mg/kg 養肝丸(神立清)兩週、再腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚(APAP)，可以觀察到 N 乙醯半胱氨酸(NAC)與神立清均可以有效降低小鼠血液中的 GPT 與 GOT。惟 GPT 與 GOT 緩解的效果與空白對照組小鼠血液中的 GOT 比較，仍有顯著的差異。這結果顯示肝臟解毒劑 N 乙醯半胱氨酸(NAC)與養肝丸(神立清)對於肝臟損傷指標雖有緩解的效果，但是仍無法回復到一般正常的肝臟損傷指標。

(五)肝臟免疫是因肝臟從體循環和腸道所接受血液富含微生物產物、環境毒素和外部抗原。肝臟富含先天免疫細胞，在先天免疫防禦對抗病原體中發揮關鍵作用，因此又稱免疫器官。**本論文研究圖 8 結果**說明養肝丸(神立清)有效提升乙醯胺酚(APAP)誘導肝臟損傷小鼠的免疫球蛋白。免疫球蛋白 G (IgG)是血清和細胞外液中含量最高的一類免疫球蛋白。當事先添加肝臟解毒劑 N 乙醯半胱氨酸(NAC)、或是事先、事後、以及前後均增補養肝丸(神立清)兩週，可以有效緩解小鼠因為腹腔注射乙醯胺酚(APAP)引起的免疫球蛋白 IgG 減少。

(六)綜合**本論文圖 9 研究結果**可以說明養肝丸(神立清)對於乙醯胺酚(APAP)誘導產生肝損傷的小鼠具有肝臟損傷保護和修復的功能。當小鼠腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚(APAP)會造成肝臟細胞損傷以及纖維化的情形；當肝臟發炎或壞死時，

肝細胞酵素 GOT、GPT 會進入血液中，造成肝指數升高，進而引發肝臟發炎。當事先、事後、以及前後均增補養肝丸(神立清)兩週，則可以有效緩解肝臟損傷。

## 第四節 結論

(一)近年衛生署積極推動以藥理研究為基礎的健康食品認證制度，「保肝、養肝、強肝」為近年保健市場上炒作的議題，號稱取自天然植物成份之產品琳瑯滿目，功效經證實者卻是寥寥無幾。雖然中藥對肝臟保護藥理研究尚待加強，與中藥典籍記載「益氣」、「強陰」等傳統功效仍無法結合，且相關臨床研究也不多。然而本研究養肝丸(神立清)顆粒劑以科學實驗結果顯著，證實具有抗氧化及肝臟保護的藥效，應可提供科學研發保護肝臟功能的科學中藥相關產品之參考。

(二)本研究尚有很多未盡事宜，但綜觀傳統中藥方養肝丸，可養血明目、補養肝血功用，再者目前也經由科學學理實驗研究證實有維護肝臟機能的功效，是可作為養肝明目的藥品。此一傳統中藥方養肝丸已經由順天堂藥廠開發成非處方藥(OTC)-神立清，相信本研究所得之結果，將有助於中藥方養肝丸之全球化應用參考，使得中醫藥得以發揚光大於世界。也希望未來能將中醫藥臨床心得，廣泛應用於生技醫藥產業，開發更多可改善各種常見疾病的產品，造福更多病患。

(三)因研究本論文，對養肝丸(神立清)顆粒劑的臨床應用有更深入的了解，認為其具有抗氧化及肝臟保護的功效。臨床應用建議可添加單味藥“丹參”成份，丹參酮類化合物對小鼠肝損傷具有一定的保護作用，丹參的抗氧化活性作用機制可加強養肝丸(神立清)顆粒劑效能。中醫古籍常記載一味丹參功同四物，具有養血、活血、化瘀，可增強抗氧化力，還有保護肝臟機能的功效，故建議日後研究可做另一個主題的延伸進行探討。

## 參考文獻

### 中文引用

- 朱肖鴻、符淑艷、葉蕾(2003)柴胡疏肝散抗肝纖維化治療的療效觀察。中醫藥學報，31:28-29。
- 朱文鋒(2007)中醫診斷學。中國中醫藥出版社，北京。
- 李冀(2014)方劑學。中國中醫藥出版社，北京。
- 林宗旦、林宗平、林景彬(1996)中藥藥理學。華香園出版社，台北市。
- 周仲瑛(2009)中醫內科學。中國中醫藥出版社，北京。
- 俞君平、朱蔚崗、宋鴻范(1997)柴胡疏肝散加減治療病毒性肝炎合併膽道感染 65 例。實用中西醫結合雜誌，10:865-866。
- 孫廣仁(2007)中醫基礎理論。中國中醫藥出版社，北京。
- 高學敏(2008)中藥學。中國中醫藥出版社，北京。
- 陳奇(1993)中藥名方藥理與應用。南天書局，台北市。
- 楊曉冰(1997)柴胡疏肝散加味治療慢性乙型肝炎 58 例療效觀察。交通醫學，11:9。
- 翟建富(2008)現代文明疾病的因應。科學發展雜誌，422:12-17。
- 潘志堅、鐘澤鑫(2001)柴胡疏肝散治療酒精性之脂肪肝 60 例。實用中醫藥雜誌，17:22-23。

## 英文引用

- Akif D, Ali G, Bilal U, Selcuk I, & Emin TE (2016) Oxidative stress and antioxidant parameters in neutropenic patients secondary to chemotherapy. *Pakistan J Medical Sciences*, 32(2), 309-313.
- Angsutararux P, Luanpitpong S, & Lssaragrisil S (2015) Chemotherapy-induced cardiotoxicity: overview of the roles of oxidative stress. *OxiMed & Cellular Longevity*, 1-13. online publication. Doi:10.1155/2015/795602
- Bahramsoltani R, Rahimi R, Farzaei MH (2017) Pharmacokinetic interactions of curcuminoids with conventional drugs: A review. *J. Ethnopharm*, 209, 1–12.
- Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, Wendon J (2010) Acute liver failure. *The Lancet*, 376, 190-201.
- Bissell DM. (2001) Chronic liver injury, TGF-beta, and cancer. *Exp Mol Med*, 33(4), 179-190.
- Clark, AM (1996) Natural products as a resource for new drugs. *Pharm. Res*, 13(8), 1133–1141.
- Cobb JP, Hotchkiss RS, Karl IE, Buchman TG (1996) Mechanisms of cell injury and death. *Br J Anaesth*, 77, 3–10.
- Cohen SD, Khairallah EA (1997) Selective protein arylation and acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug metab reviews*, 29(1&2), 59-77.
- Dai G, He L, Chou N, and Y.-J. Y. Wan YJY (2006) Acetaminophen metabolism does not contribute to gender difference in its hepatotoxicity in mouse. *Toxicol Sciences*, 92(1) 33–41.
- Dianelena EP, He AMOS and Jose PC (2016) Role of food-derived antioxidant agents against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Pharm Biology*, 54(10), 2340–

2352.

- Dieperink E, Ho SB, Tetrick L, Thuras P, Dua K, Willenbring ML (2004) Suicidal ideation during interferon-alpha2b and ribavirin treatment of patients with chronic hepatitis C. *Gen Hosp Psychiatry*, 26, 237-240.
- Du K, Ramachandran A and Jaeschke H (2016) Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: sources, pathophysiological role and therapeutic potential. *Redox Biol*, 10, 148–156.
- Friedman SL (2000) Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*, 275(4), 2247-2250.
- Gebhardt R. (2000) Oxidative stress, plant-derived antioxidants and liver fibrosis. *Planta Med*, 68(4), 289-296.
- Gordaliza, M. (2007) Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin Transl Oncol*, 9, 767–776.
- Gyamfi MA, Yonamine M, Aniya Y. (1999) Free radical scavenging activity of medicinal herb of Ghana: *Thonningia sanguinea* on experimentally induced liver injuries. *General Pharmacol*, 32, 661-67.
- Hammel P, Couvelard A, O'Toole D, Ratouis A, Sauvanet A, Flejou JF, Degott C, Belghiti J, Bernades P, Valla D, Ruszniewski P, Levy P. (2001) Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *N Engl J Med*, 344(6), 418-423.
- Hinson JA, Roberts DW, and James LP (2010) Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb Exp Pharmacol*, 196, 369–405.
- Houten BV, Gloria A. Santa-Gonzalez, and Mauricio Camargo M (2018) DNA repair after oxidative stress: current challenges. Published in final edited form as: *Curr Opin Toxicol*, 7, 9–16.
- Ho CM, Lee CH, Wang JY, Lee PH, Lai HS and Hu PH (2014) Nationwide

- Longitudinal Analysis of Acute Liver Failure in Taiwan. *Medicine*. 93(4), 1-9.
- Huang YT, Lee TY, Lin HC, Chou TY, Yang YY, Hong C-Y (2001) Hemodynamic effects of *Salvia miltiorrhiza* on cirrhotic rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 79(7), 566-572.
- Huang XJ, Yang KC, Im YK, Yarimaga HS, Yoon O, E. and Kim HS (2006) Aspartate Aminotransferase (AST/GOT) and Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) Detection Techniques. Review. *Sensors*, 6(7), 756-782.
- Iredale JP (2001) Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis*, 21(3), 427-436.
- James LP, Mayeux PR and J. A. Hinson JA (2003) “Acetaminophen- induced hepatotoxicity,” *Drug Metabolism and Disposition. The Biological Fate of Chemicals*, 31(12), 1499– 1506.
- Mitchell JR, Thorgeirsson SS, Potter WZ, Jollow DJ, and Keiser H (1974) Acetaminophen-induced hepatic injury: protective role of glutathione in man and rationale for therapy. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 16(4), 676–684.
- Krystona TB, Georgieva AB, Pissis P, Alexandros G, Georgakilas AG (2011) Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research* 711(1-2), 193–201.
- Kuttan R, Bhanumathy P, Nirmala K, George M. (1985) Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*). *Cancer Lett*, 29(2), 197–202.
- Lee WM (2003) Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med*, 349, 474-485.
- Li C, Luo J, Li L, Cheng M, Huang N, Liu J, Waalkes MP (2003) The collagenolytic effects of the traditional Chinese medicine preparation, Han-Dan-Gan-Le, contribute to reversal of chemical-induced liver fibrosis in rats. *Life Sci*, 72, 1563-1571.
- Maheshwari RK, Singh A.K, Gaddipati J, Srimal RC (2006) Multiple biological

activities of curcumin: A short review. *Life Sci*, 78(18), 2081–2087.

- Matsuda Y, Matsumoto K, Yamada A, Ichida T, Asakura H, Komoiya Y, Nishiyama E, Nakamura T. (1997) Preventive and Therapeutic effects in rat of Hepatocyte growth factor infusion on liver fibrosis/cirrhosis. *Hepatology*, 26(1) 81-89.
- Mohammad HF, Zobeiri M, Parvizi F, Fardous F. El-Senduny, Ilias Marmouzi, Coy-Barrera E, Rozita Naseri R, Nabavi SM, Rahimi R and Abdollahi M (2018) Curcumin in Liver Diseases: A Systematic Review of the Cellular Mechanisms of Oxidative Stress and Clinical Perspective. *Nutrients*, 10(7), 1-28.
- Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, & Van Remmen H (2007) Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology & Medicine*, 43(4), 477-503.
- Nakamura T, Sakata R, Ueno T, Sata M, Ueno H. (2000) Inhibition of transforming growth factor  $\beta$  prevents progression of liver fibrosis and enhance hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology*, 32, 247-255.
- Prati D, Taioli E, Zanella A, Della Torre E, Butelli S, Del Vecchio E, Vianello L, Zanuso F, Mozzi F, Milani S, Conte D, Colombo M, Sirchia G (2002) Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels. *Ann Intern Med*, 137(1), 1-10.
- Rojkind M, Greenwel P. Pathophysiology of liver fibrosis. In: Arias IM, Boyer JL, Chisari FV, Fausto N, Schachter D, and Shafritz DA (2001) *The Liver: Biology and Pathobiology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 721-738.
- Sakaida I, Matsumura Y, Akiyama S, Hayashi K, Ishige A, Okita K (1998) Herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) prevents liver fibrosis and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-deficient diet. *J Hepatol*, 28(2), 298-306.
- Satoskar R, Shah S, Shenoy S (1986) Evaluation of anti-inflammatory property of curcumin (diferuloyl methane) in patients with postoperative inflammation. *Int. J.*

Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol, 24(12), 651–654.

Schuppan D, Porov Y. (2002) Hepatic fibrosis: from bench to bedside. *J Gastroenterol Hepatol*, 17, S300-S305.

Shimizu I, Ma YR, Mizobuchi Y, Liu F, Miura T, Nakai Y, Yasuda M, Shiba M, Horie T, Amagaya S, Kawada N, Hori H, Ito S. (1999) Effects of Sho-saiko-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats. *Hepatology*, 29(1) 49-160.

Shiratori Y, Imazeki F, Moriyama M, Yano M, Arakawa Y, Yokosuka O, Kuroki T, Nishiguchi S, Sata M, Yamada G, Fujiyama S, Yoshida H, Omata M (2000) Histologic improvement of fibrosis in patients with hepatitis C who have sustained response to interferon therapy. *Ann Intern Med*, 132(7), 517-524.

Sharma O (1976) Antioxidant activity of curcumin and related compounds. *Biochem. Pharmacol*, 25(15), 1811–1812.

Sidhu GS, Singh AK, Thaloor D, Banaudha KK, Patnaik GK, Srimal RC, Maheshwari RK (1998) Enhancement of wound healing by curcumin in animals. *Wound Repair Regen*, 6(2) 167–177.

Singh D, Cho, WC and Upadhyay G (2016) Drug-induced liver toxicity and prevention by herbal antioxidants: an overview. *Front physiol*, 6, 1-18.

Smilkstein MJ, Knapp GL, Kulig KW (1988) Efficacy of oral N-acetylcysteine in the treatment of acetaminophen overdose. *N Engl J Med*, 319(24), 1557-1562.

Sterba M, Popelova O, Vavrova A, Jirkovsky E, Kovarikova P, Gersl V, & Simunek T (2013) Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. *Antioxid Redox Signal*, 18(8), 899-929.

Stickel F, Brinkhaus B, Krahmer N, Seitz HK, Hahn EG, Schuppan D. (2002) Antifibrotic properties of botanicals in chronic liver disease. *Hepatology*, 49, 1102-1108.

Srimal R, Dhawan B (1973) Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-

steroidal anti-inflammatory agent. *J Pharm Pharmacol*, 25(6), 447-52.

Su SY and Lee WC (2019) Mortality trends of liver diseases from 1981 to 2016 and the projection to 2035 in Taiwan: An age-period-cohort analysis. *Liver International*, 39(4), 770–776.

Wang k, Peng CP, Wang H, Tang Z, Wang N, Wang J. & Zhang Y (2016) Chronic administration of *Angelica sinensis* polysaccharide effectively improves fatty liver and glucose homeostasis in high-fat diet-fed mice. *Scientific Reports*, 6, 26229, 1-11.

Wasser S, Ho JMS, Ang HK, Tan CEL (1998) *Salvia miltiorrhiza* reduced experimentally induced hepatic fibrosis in rats. *J Hepatol*, 29(5), 760-771.

Woreta TA, Alqahtani, SA (2014) Evaluation of Abnormal Liver Tests. *Med Clin N Am*, 98(1), 1–16.

Kang W, Robitaille MC, Merrill M, Kim T, C.W. & Raphael MP (2020) Mechanisms of cell damage due to mechanical impact: an in vitro investigation. *Scientific Reports*, 10, 12009, 1-12.

Woolbright BL and Jaeschke H (2017) Role of the inflammasome in acetaminophen-induced liver injury and acute liver failure. *J Hepatology*, 66(4), 836–848.

Wu PS, Wu SJ, Tsai YH, Lin YH, Chao JCJ (2011) Hot water extracted *Lycium barbarum* and *Rehmannia glutinosa* inhibit liver inflammation and fibrosis in rats. *Am J Chin Med*. 39(6), 1173-91.

Xiao J, So KF, Liong EC, Tipoe GL (2013) Recent advances in the herbal treatment of non-alcoholic Fatty liver disease. *J. Tradit. Complement. Med*, 3(2), 88–94.

Zhang A, Sun, H, Wang X (2013) Recent advances in natural products from plants for treatment of liver diseases. *Eur J Med Chem*, 63, 570–577.

Zhang J, Lei W, Chen X, Wang S & Qian W (2018) Oxidative stress response induced by chemotherapy in leukemia treatment (review). *Molecular and Clinical Oncology*, 8(3) 391-399.

## 附錄圖表

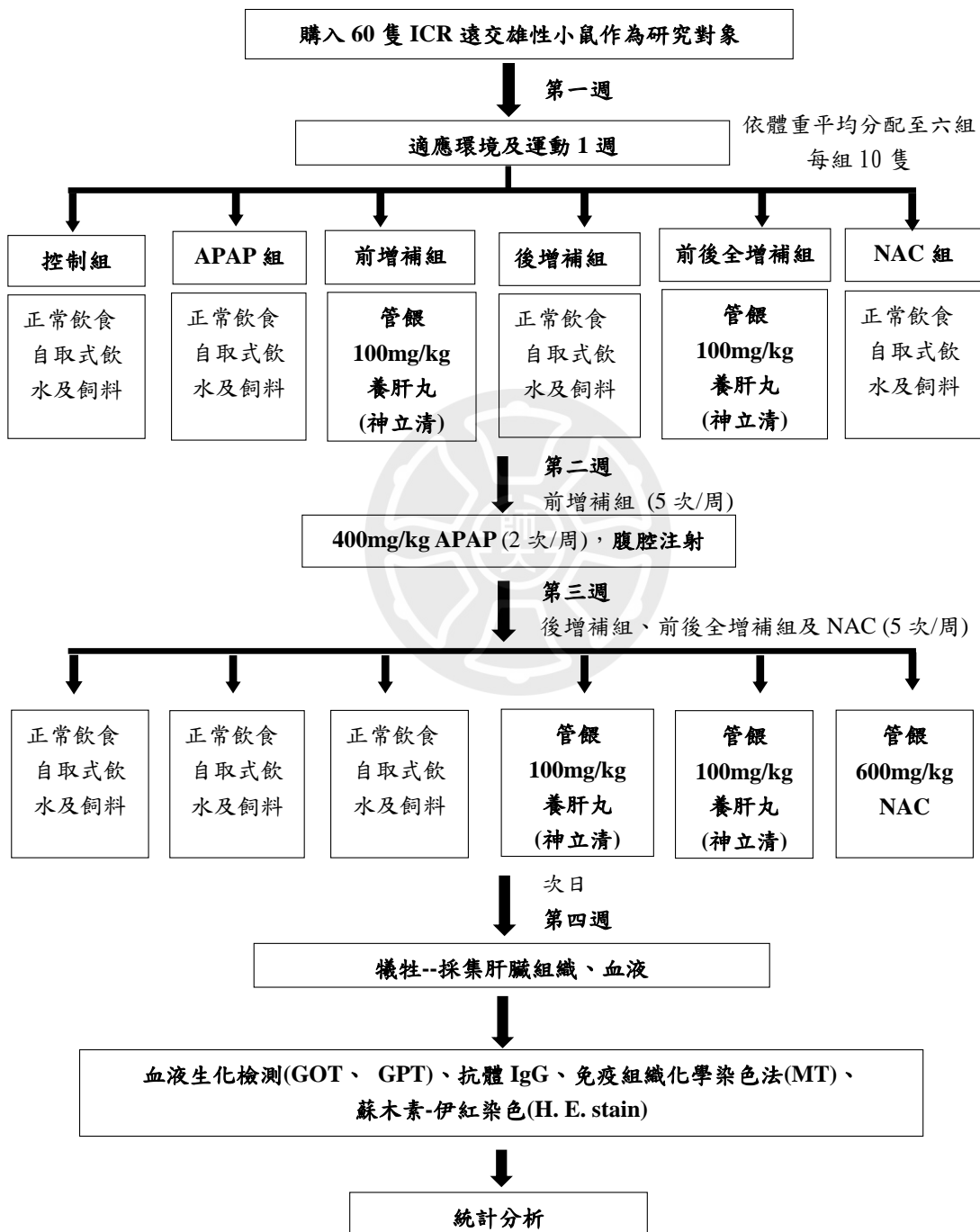
表 1 實驗使用抗體及試劑

抗體及試劑名稱	濃度或 稀釋倍數	抗體來源 產品批號	供應廠商
1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)	1.5 mM/mL	D9132	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
甲醇 (Methanol)	100%	322415	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
L-抗壞血酸 (L-Ascorbic acid, L-AA)	10~200 $\mu$ g/mL	A5960	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
肝臟庫佛氏細胞 (Kupffer cell, KC)	20000cell/well	SCC119	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
胎牛血清 (Fetal Bovin Serum, FBS)	10%	SH30071	HyClone, Logan, UT, USA
RPMI-1640 培養基	750ml/L	31800022	Gibco, BRL, Grand Island, NY, USA
PriGrow II 培養基	250ml/L	TM002	Abm <sup>®</sup> inc., Vancouver, CND

表 1 (續)

抗體及試劑名稱	濃度或 稀釋倍數	抗體來源 產品批號	供應廠商
脂多醣 (LPS)	1 $\mu$ g/mL	L-2654	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT solution)	0.5mg/mL	M5655	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
腫瘤壞死因子 $\alpha$ 酵素結合免疫吸附分析套 組 (TNF- $\alpha$ ELISA kit)	32ng/mL purified rat anti- mouse TNF $\alpha$	88-7324	Invitrogen, Carlsbad, CA
細胞介白素 1-beta 酵素結合免疫吸附分析套 組 (IL-1 $\beta$ ELISA kit)	32ng/mL purified rat anti- mouse IL-1 $\beta$	88-7013	Invitrogen, Carlsbad, CA
乙醯胺酚 (Acetaminophen, APAP)	400 mg/kg	A7085	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
N 乙醯半胱氨酸 (NAC)	600mg/kg	616-91-1	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
蘇木精-伊紅染色 (hematoxylin-eosin staining; HE) (polymer detection system)	1mL	RE7140- K/RE7150-K.	Leica Biosystems Newcastle Ltd.
馬森三色染色試劑套組 (Masson's trichrome staining kit)	1mL	AR173	Artisan Masson's trichrome staining kit, Agilent, Santa Clara, CA

表 2：實驗流程圖表



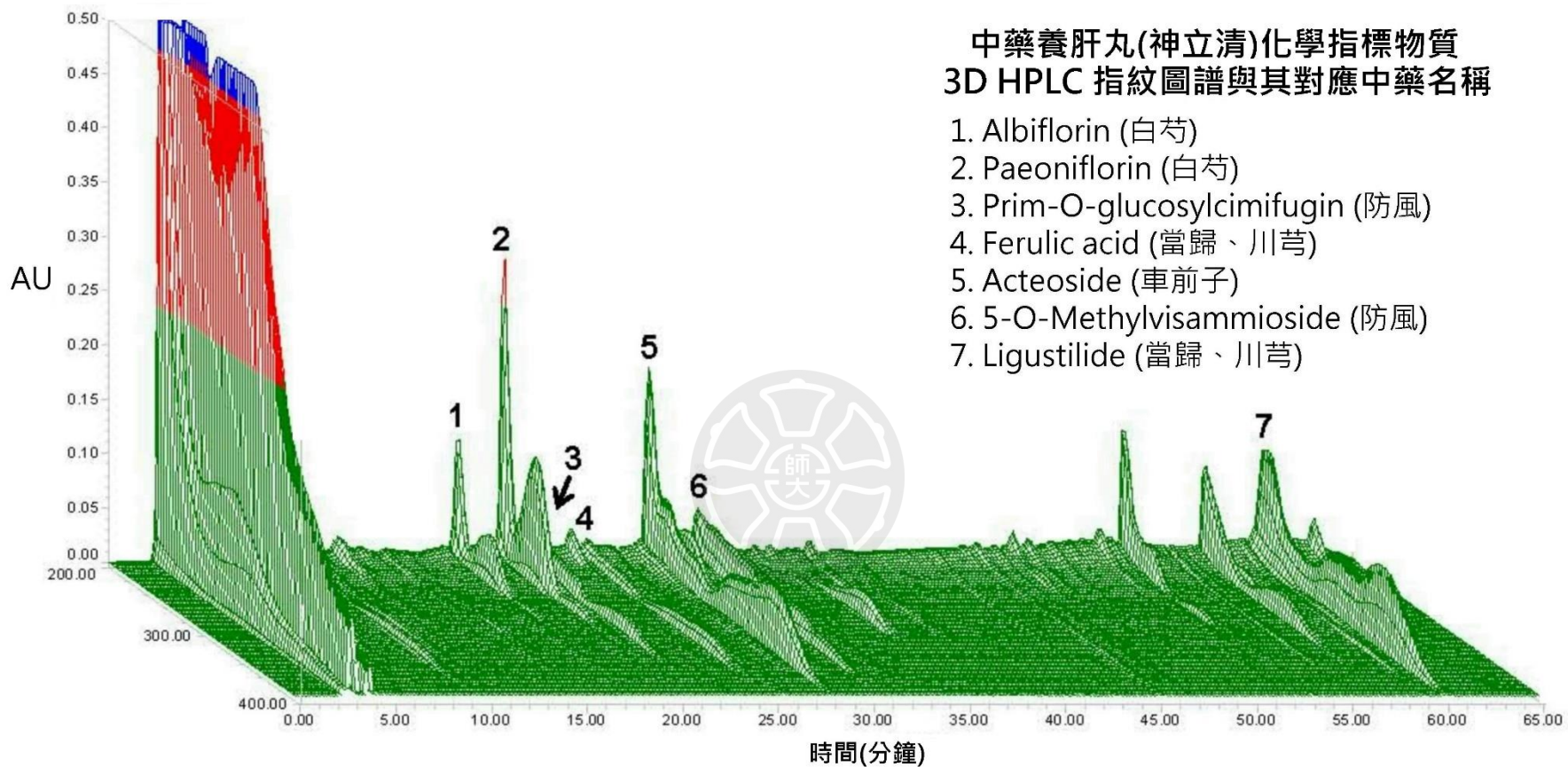


圖 1：養肝丸(神立清)顆粒劑的高效液相層析 3D-HPLC 圖譜

### 圖 1：養肝丸(神立清)顆粒劑的高效液相層析 3D-HPLC 圖譜

利用高效液相層析 3D-HPLC 分析養肝丸(神立清)的中藥指紋圖譜。圖譜中的化學指標活性成份以及對應的中藥名稱分別為 1. Albiflorin (白芍)、2. Paeoniflorin (白芍)、3. Prim-O-glucosylcimifugin (防風)、4. Ferulic acid (當歸、川芎)、5. Acteoside (車前子)、6. 5-O-Methylvisammioside (防風)、7. Ligustilide (當歸、川芎)。



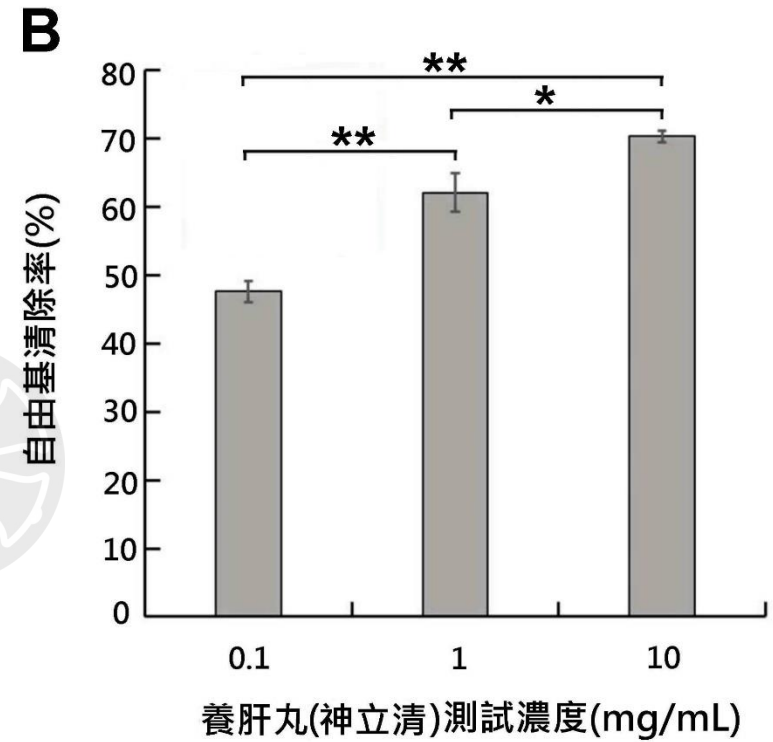
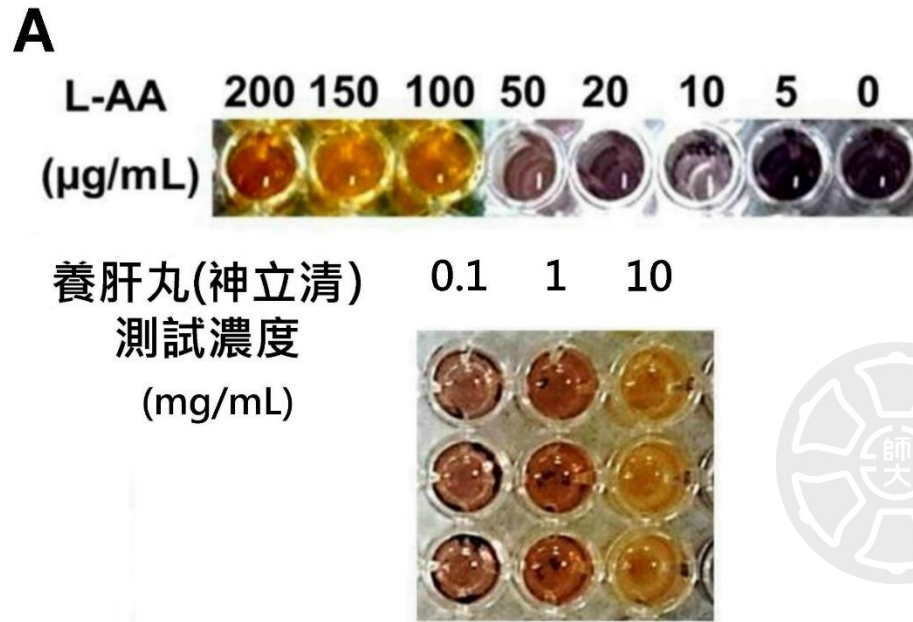


圖 2：養肝丸(神立清) 顆粒劑具有清除自由基的功能

## 圖 2：養肝丸(神立清)顆粒劑具有清除自由基的功能

(圖 A) 利用 DPPH 方法對順天堂養肝丸(神立清)顆粒劑之抗氧化能力測定，實驗結果顯示 0.1mg/mL 養肝丸(神立清)具有 47.6% 清除自由基的效率，1.0 mg/mL 養肝丸(神立清)具有 62.1% 清除自由基的效率，10 mg/mL 養肝丸(神立清)具有 70.3% 清除自由基的效率，這結果顯示養肝丸(神立清)具有清除自由基的抗氧化功效。(圖 B) 利用 DPPH 方法測試不同濃度養肝丸(神立清)下的自由基清除率變化情形，統計結果顯示養肝丸(神立清)隨著測試濃度增加，清除自由基的抗氧化效率顯著增加。各組檢測出來的數值均由平均值±平均值標準誤差 (Standard error of the mean, SEM) 來表示，且用單因子變異數分析 (One-way analysis of variance, ANOVA) 以及 S-N-K 多重差距檢定 (Student-Newman-Keuls multiple range test) 來分析是否有顯著誤差，若有顯著誤差則用\*\* $p < 0.01$  以及\* $p < 0.05$  表示。



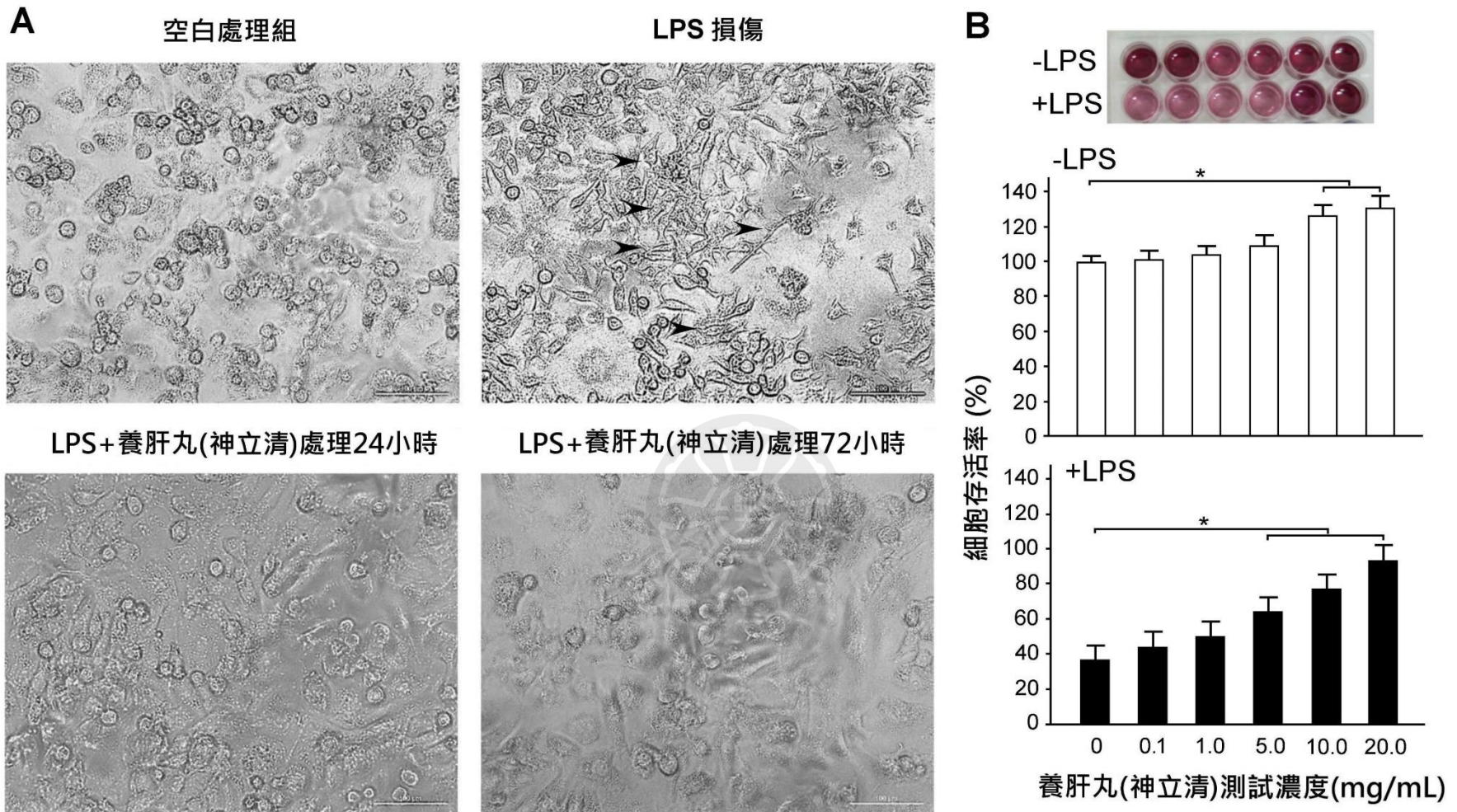


圖 3：養肝丸(神立清)顆粒劑有效緩解脂多醣(LPS)誘發肝臟巨噬細胞的損傷作用

### 圖 3：養肝丸(神立清)有效緩解脂多醣(LPS)誘發肝臟巨噬細胞的損傷作用

(圖 A) 利用  $1\mu\text{g/mL}$  脂多醣(LPS)誘發肝臟巨噬細胞的損傷作用(箭頭指示),可觀察到細胞數目變少且外觀型態拉長;此時添加  $15\text{mg/mL}$  養肝丸(神立清),於 24 小時以及 72 小時觀察肝臟巨噬細胞,可以發現肝臟巨噬細胞外觀型態變得與空白處理組的正常肝臟巨噬細胞相類似,這結果顯示養肝丸(神立清)具有保護肝臟巨噬細胞損傷的功效。圖中刻度線長度 =  $30\mu\text{m}$ 。(圖 B) 利用 MTT 方法測試不同濃度養肝丸(神立清)下的細胞存活率變化情形,統計結果顯示:正常肝臟巨噬細胞(-LPS)的細胞存活率會隨著養肝丸(神立清)測試濃度增加而顯著增加;而添加脂多醣(+LPS)誘發肝臟巨噬細胞損傷的情形下,細胞存活率均較相同濃度養肝丸(神立清)的細胞存活率明顯減少,惟脂多醣(+LPS)誘發損傷的肝臟巨噬細胞,也會隨著養肝丸(神立清)測試濃度增加而顯著增加。這結果說明養肝丸(神立清)確實具有保護肝臟巨噬細胞損傷的功效。各組檢測出來的數值均由平均值 $\pm$ 平均值標準誤差 (standard error of the mean, SEM) 來表示,且用單因子變異數分析 (One-way analysis of variance, ANOVA) 以及 S-N-K 多重差距檢定 (Student-Newman-Keuls multiple range test) 來分析是否有顯著誤差,若有顯著誤差則用  $**p<0.01$  以及  $*p<0.05$  表示。

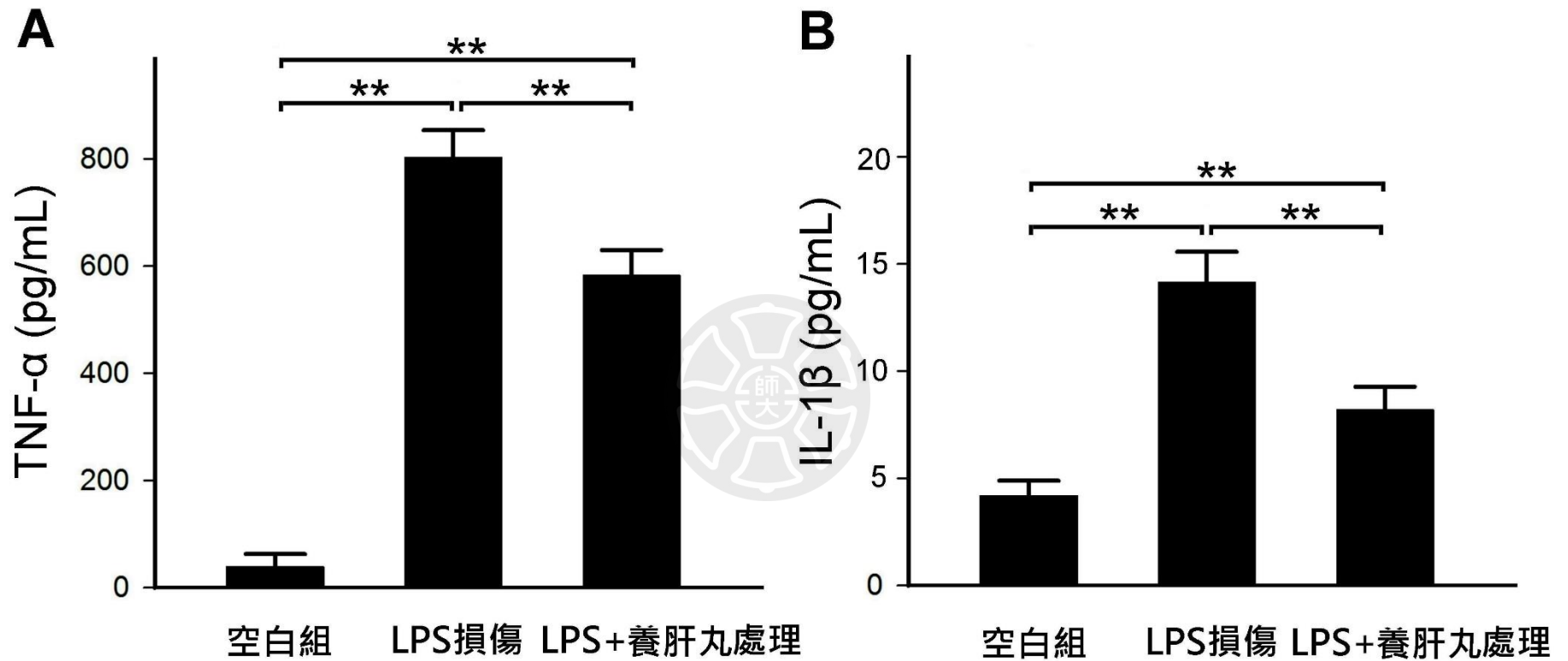


圖 4：養肝丸(神立清)顆粒劑可以有效緩解脂多醣(LPS)誘發肝臟巨噬細胞的發炎作用

#### 圖 4：養肝丸(神立清)顆粒劑可以有效緩解脂多醣(LPS)誘發肝臟巨噬細胞的發炎作用

(圖 A) 利用 1 $\mu$ g/mL 脂多醣(LPS)誘發肝臟巨噬細胞損傷，可觀察到細胞的 TNF- $\alpha$  發炎指數較空白處理組顯著增加( $p<0.01$ )，當添加 15mg/mL 養肝丸(神立清)於 72 小時檢測肝臟巨噬細胞，可以發現肝臟巨噬細胞 TNF- $\alpha$  發炎指數顯著降低( $p<0.01$ )。(圖 B) 利用 1 $\mu$ g/mL 脂多醣(LPS)誘發肝臟巨噬細胞損傷，可觀察到細胞的 IL-1 $\beta$  發炎指數較空白處理組顯著增加( $p<0.01$ )，當添加 15mg/mL 養肝丸(神立清)於 72 小時檢測肝臟巨噬細胞，可以發現肝臟巨噬細胞 IL-1 $\beta$  發炎指數顯著降低( $p<0.01$ )。這結果顯示養肝丸(神立清)確實具有緩解肝臟巨噬細胞發炎的功效。

各組檢測出來的數值均由平均值 $\pm$ 平均值標準誤差 (standard error of the mean, SEM) 來表示，且用單因子變異數分析 (One-way analysis of variance, ANOVA) 以及 S-N-K 多重差距檢定 (Student-Newman-Keuls multiple range test) 來分析是否有顯著誤差，若有顯著誤差則用\*\* $p<0.01$  表示。

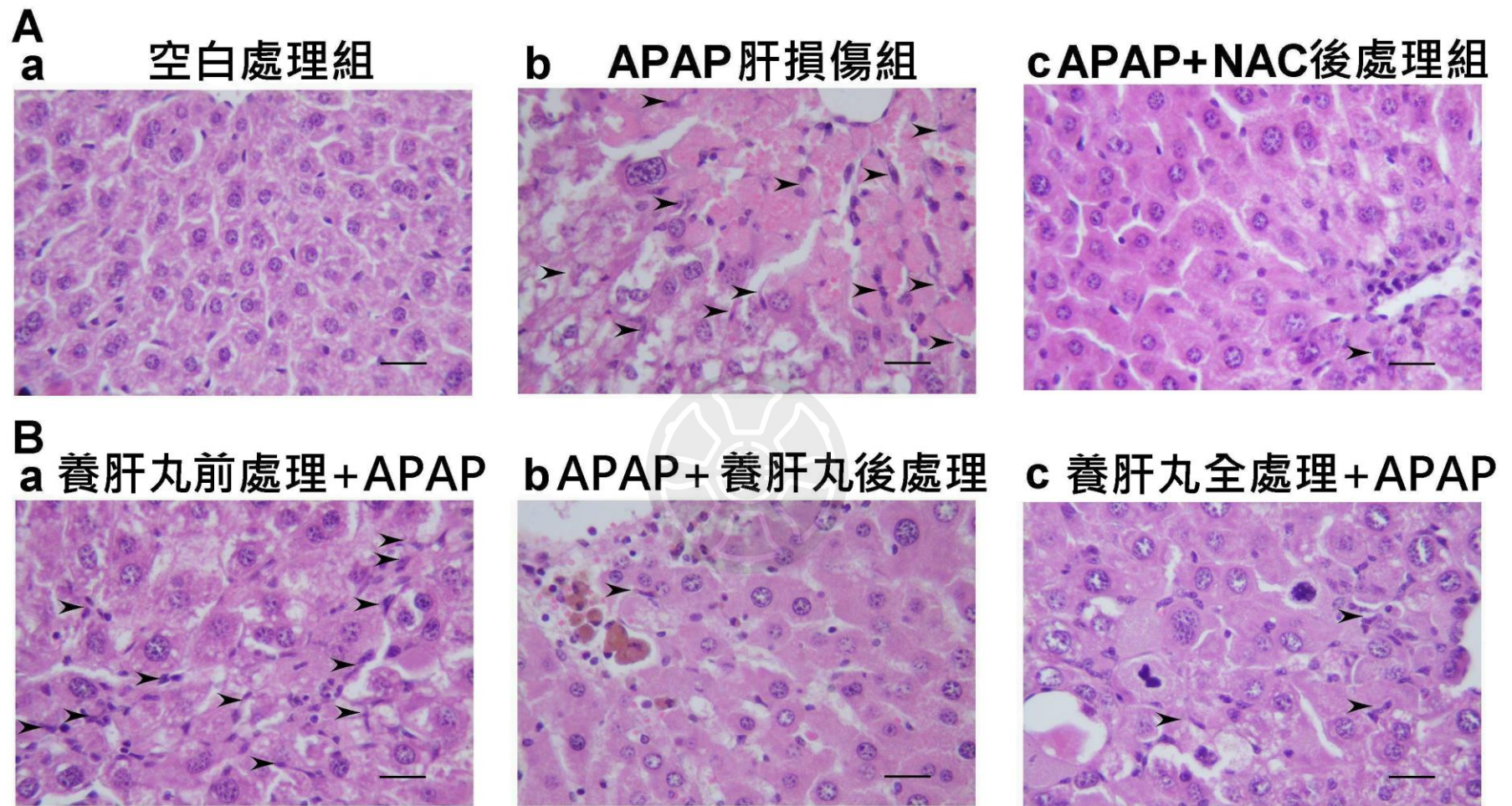


圖 5：養肝丸(神立清)顆粒劑有效緩解乙醯胺酚(APAP)誘導肝損傷小鼠的肝細胞死亡

### 圖 5：養肝丸(神立清)顆粒劑有效緩解乙醯胺酚(APAP)誘導肝損傷小鼠的肝細胞死亡

(圖 A) a.利用蘇木精-伊紅染色(hematoxylin-eosin staining；HE)處理空白對照組小鼠肝臟組織切片的結果顯示肝臟組織相當正常且肝細胞核也相當完整；b.利用腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚(Acetaminophen，APAP)可以誘導小鼠產生肝損傷，此時肝臟組織受損嚴重且肝細胞核也多受損死亡(箭頭指示)；c.如果事先添加肝臟解毒劑 600 mg/kg N-acetylcysteine 簡稱 N 乙醯半胱氨酸(NAC)，則可以有效減緩乙醯胺酚誘發的肝損傷，而損傷區域也大大降低(箭頭指示)。(圖 B) a.事先增補 100 mg/kg 養肝丸(神立清)兩週後，再腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚，可觀察到有效減緩乙醯胺酚的肝損傷，而損傷的區域也大大降低(箭頭指示)；b.腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚後再增補 100 mg/kg 養肝丸(神立清)兩週後，可觀察到有效修補乙醯胺酚肝毒性引起的肝損傷，而損傷的區域也大大降低(箭頭指示)；c.事先以及事後均增補 100 mg/kg 養肝丸(神立清)各兩週，中間腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚，可觀察到有效減緩乙醯胺酚的肝損傷，而損傷的區域也大大降低(箭頭指示)。

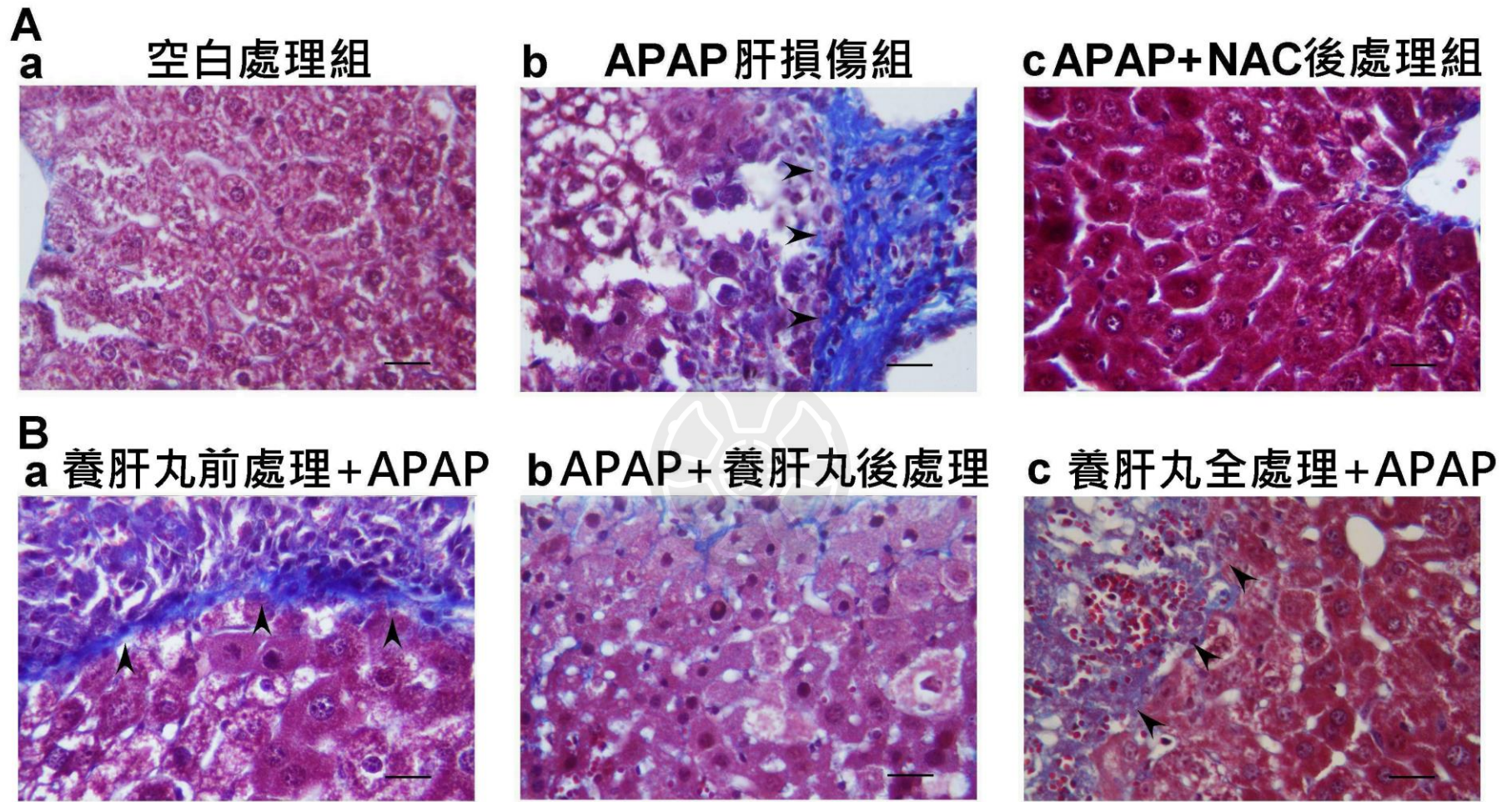


圖 6：養肝丸(神立清)顆粒劑有效緩解乙醯胺酚(APAP)誘導肝損傷小鼠的肝臟纖維化

## 圖 6：養肝丸(神立清)顆粒劑有效緩解乙醯胺酚(APAP)誘導肝損傷小鼠的肝臟纖維化

(圖 A) a.利用 Masson trichrome (MT)染色處理空白組小鼠肝臟組織切片的結果顯示肝臟組織相當正常且肝臟細胞也沒有纖維化的情形。MT 染色標的為膠原纖維，故常被用於肝臟的纖維化判定依據。b.利用腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚(Acetaminophen, APAP)可以誘導小鼠產生肝損傷，此時肝臟組織受損嚴重且呈現大區域的纖維化(箭頭指示藍色區域)；c.事先添加肝臟解毒劑 600 mg/kg N 乙醯半胱氨酸(NAC)，則可以有效減緩乙醯胺酚誘發的肝損傷，而纖維化的區域也大大降低。(圖 B) a.事先增補 100 mg/kg 養肝丸(神立清)兩週後，再腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚，可觀察到有效減緩乙醯胺酚的肝損傷，纖維化的區域雖有減緩惟纖維化情形仍然明顯(箭頭指示)；b.腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚後再增補 100 mg/kg 養肝丸(神立清)兩週後，可觀察到有效修補乙醯胺酚肝毒性引起的肝損傷，而纖維化的區域也明顯降低；c.事先以及事後均增補 100 mg/kg 養肝丸(神立清)各兩週，中間腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚，可觀察到有效減緩乙醯胺酚的肝損傷，而纖維化的區域也明顯降低(箭頭指示)。

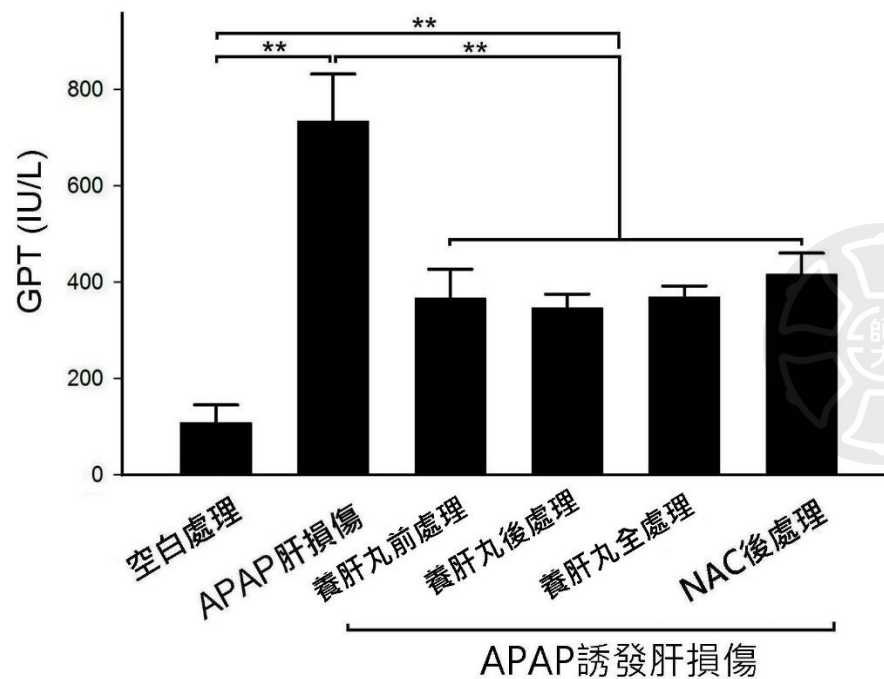
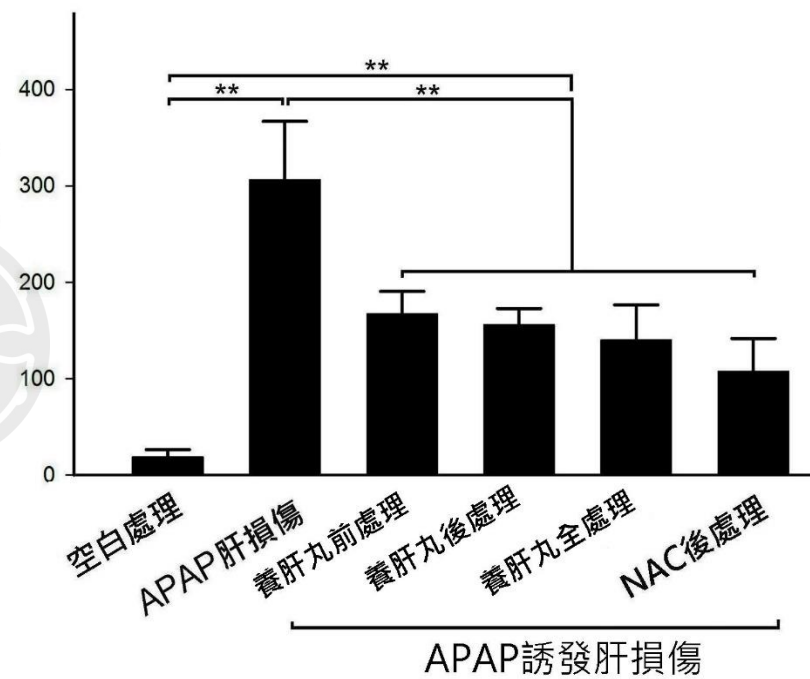
**A****B**

圖 7：養肝丸(神立清)顆粒劑有效降低乙醯胺酚(APAP)誘導肝損傷小鼠的肝臟損傷指標

### 圖 7：養肝丸(神立清)顆粒劑有效降低乙醯胺酚(APAP)誘導肝損傷小鼠的肝臟損傷指標

(圖 A)利用抽血檢視肝細胞壞死指數 GPT (glutamic-pyruvic transaminase)，結果顯示利用腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚(Acetaminophen，APAP)誘導產生肝損傷的小鼠血液中的 GPT 顯著增加( $p<0.01$ )。當事先添加肝臟解毒劑 600 mg/kg N 乙醯半胱氨酸(NAC)、或是事先、事後、以及前後均增補 100 mg/kg 養肝丸(神立清)兩週、再腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚，可以觀察到 N 乙醯半胱氨酸(NAC)與養肝丸(神立清)均可以有效降低小鼠血液中的 GPT( $p<0.01$ )。惟 GPT 緩解的效果與空白對照組小鼠血液中的 GPT 比較，仍有顯著的差異( $p<0.01$ )；(圖 B)利用抽血檢視肝細胞壞死指數 GOT (glutamic-oaa transaminase)，結果顯示利用腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚誘導產生肝損傷的小鼠血液中的 GOT 顯著增加( $p<0.01$ )。當事先添加肝臟解毒劑 600 mg/kg N 乙醯半胱氨酸(NAC)、或是事先、事後、以及前後均增補 100 mg/kg 養肝丸(神立清)兩週、再腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚，可以觀察到 N 乙醯半胱氨酸(NAC)與養肝丸(神立清)均可以有效降低小鼠血液中的 GOT( $p<0.01$ )。惟 GOT 緩解的效果與空白對照組小鼠血液中的 GOT 比較，仍有顯著的差異( $p<0.01$ )。這結果顯示肝臟解毒劑 N 乙醯半胱氨酸(NAC)與養肝丸(神立清)對於肝臟損傷指標雖有緩解的效果，但是仍無法回復到一般正常的肝臟損傷指標。

各組檢測出來的數值均由平均值±平均值標準誤差 (standard error of the mean, SEM) 來表示，且用單因子變異數分析 (One-way analysis of variance, ANOVA) 以及 S-N-K 多重差距檢定 (Student-Newman-Keuls multiple range test) 來分析是否有顯著誤差，若有顯著誤差則用\*\* $p<0.01$  表示。

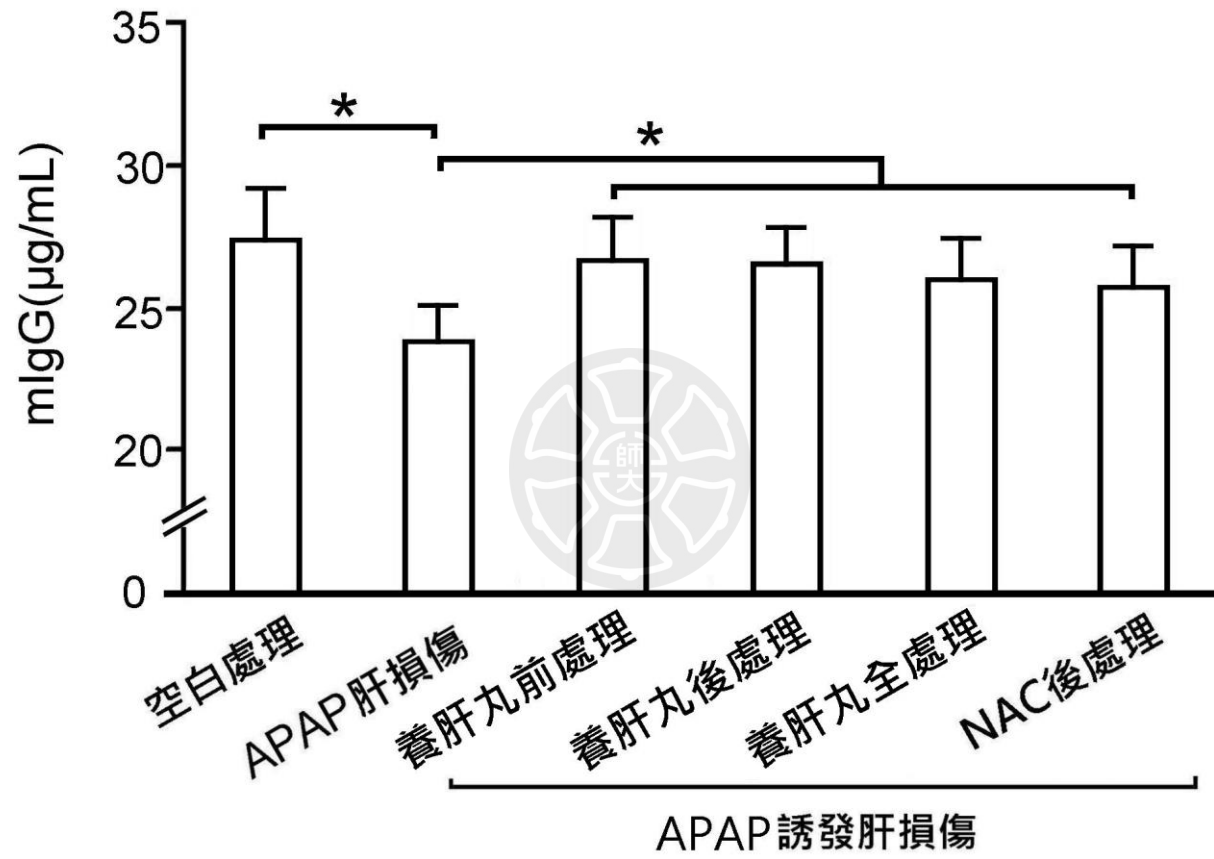
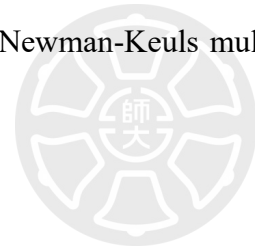


圖 8：養肝丸(神立清)顆粒劑有效提升乙醯胺酚(APAP)誘導肝臟損傷小鼠的免疫球蛋白 IgG

**圖 8：養肝丸(神立清)顆粒劑有效提升乙醯胺酚(APAP)誘導肝臟損傷小鼠的免疫球蛋白 IgG**

利用抽血檢視免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G ; IgG)，IgG 是血清和細胞外液中含量最高的一類免疫球蛋白。結果顯示利用腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚(Acetaminophen，APAP)誘導產生肝損傷的小鼠血液中的 IgG 顯著降低( $p < 0.05$ )。當事先添加肝臟解毒劑 600 mg/kg N 乙醯半胱氨酸(NAC)、或是事先、事後、以及前後均增補 100 mg/kg 養肝丸(神立清)兩週、再腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚，可以觀察到 N 乙醯半胱氨酸(NAC)與養肝丸(神立清)均可以有效提高小鼠血液中的 IgG ( $p < 0.05$ )。

各組檢測出來的數值均由平均值±平均值標準誤差 (standard error of the mean, SEM) 來表示，且用單因子變異數分析 (One-way analysis of variance, ANOVA) 以及 S-N-K 多重差距檢定 (Student-Newman-Keuls multiple range test) 來分析是否有顯著誤差，若有顯著誤差則用  $*p < 0.05$  表示。



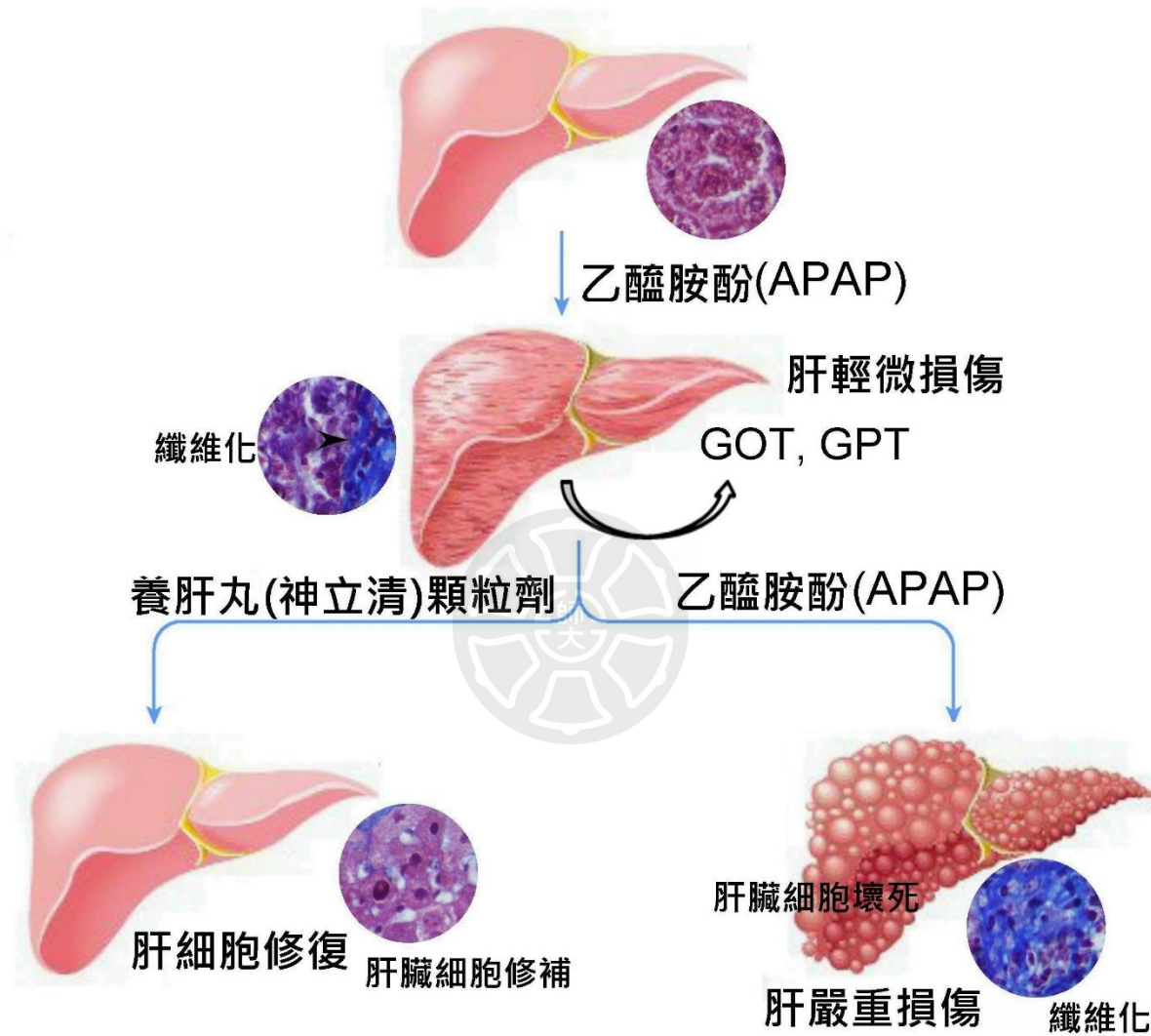


圖 9：養肝丸(神立清)顆粒劑保護肝臟損傷的統整示意圖

### 圖 9：養肝丸(神立清)顆粒劑保護肝臟損傷的統整示意圖

綜合本論文研究結果可以說明養肝丸(神立清)對於乙醯胺酚(Acetaminophen, APAP)誘導產生肝損傷的小鼠具有肝臟損傷保護和修復的功能。當小鼠腹腔注射 400 mg/kg 乙醯胺酚會造成肝臟細胞損傷以及纖維化的情形；當肝臟發炎或壞死時，肝細胞酵素 GOT、GPT 會進入血液中，造成肝指數升高，進而引發肝臟發炎。當事先、事後、以及前後均增補 100 mg/kg 養肝丸(神立清)兩週，則可以有效緩解肝臟損傷。

