

中藥黃芩、槐花與薑黃抗發炎效果 之比較

Comparisons of the Anti-inflammatory Effect between *Scutellaria baicalensis*、*Sophora japonica* and *Curcuma longa*

謝明學 ^{*1}Ming-Shueh Shieh 周瑞玲 ²Jui-Ling Chou
元培科技大學環境工程衛生系 元培科技大學生物技術系

1 Department of Environmental Engineer and Health, Yuanpei University

2 Department of Biotechnology, Yuanpei University

(Received, April 2, 2009; April 20, Revised, May 5, 2009; Accepted, May 12, 2009)

摘要：活化巨噬細胞大量生成一氧化氮 (NO) 的現象在發炎反應的許多病理進展過程中，扮演一個重要的指標。本研究以對 lipopolysaccharide (LPS) 刺激活化之 RAW 264.7 細胞的 NO 生成抑制試驗法，探討黃芩、槐花與薑黃 50% 乙醇粗抽物抗發炎作用。結果顯示，黃芩、槐花與薑黃 50% 乙醇粗抽物都具有抗發炎效果，其抑制 NO 生成的 IC₅₀ 各為 0.20 mg/mL、2.35 mg/mL 及 0.64 mg/mL。同時，在添加相同濃度(0.4 mg/mL)下，以未添加待測藥物 NO 生成量為 100% 時，其生成 NO 量各自為 18 ± 1.1% (黃芩)、87 ± 1.6% (槐花)和 71.6 ± 2.9% (薑黃)。經比較結果，三種中藥 50% 乙醇粗抽物中，黃芩抗發炎的能力最強，而薑黃略優於槐花。

關鍵詞：抗發炎、巨噬細胞、黃芩、槐花、薑黃、一氧化氮

* Corresponding author



Abstract: Overproduction of nitric oxide (NO) by activated macrophage play a central role in many pathological processes during inflammation. In this study, the anti- inflammatory effect of the Chinese herb *Scutellaria baicalensis*, *Sophora japonica* and *Curcuma longa* were assessed by measuring the decreased amounts of NO production by lipopolysaccharide (LPS) activated murin macrophage-like RAW 264.7 cells compared with that of drug-untreated control sample. The results showed that the 50% ethanol crude extracts of *Scutellaria baicalensis*, *Sophora japonica* and *Curcuma longa* suppressed NO production with the values of 50% inhibitory concentration (IC₅₀) about 0.20, 2.35 and 0.64 mg/mL, respectively. Meanwhile, by addition of same concentration (0.4 mg/mL) of these tested crude herb extracts, *Scutellaria baicalensis*, *Sophora japonica* and *Curcuma longa* produced 18 ± 1.1%, 87 ± 1.6% and 71.6 ± 2.9% of NO production, when the NO produced by drug-untreated control samples was treated as 100%. The results indicated that anti- inflammatory effect of these three 50% ethanol crude extracts, *Scutellaria baicalensis* exerted the strongest potent, and *Curcuma longa* was better than *Sophora japonica*.

Key words: Anti-inflammation, Macrophage, *Scutellaria baicalensis*, *Sophora japonica*, *Curcuma longa*, Nitric oxide

壹、前 言

具有悠久歷史的中國傳統醫學，對於一些在西方醫學感到相當棘手的疾病，確有顯著而神奇的療效。因此，近年來醫藥界努力地從傳統中草藥中篩選出具有醫療潛力之有效成份，並進一步對其作用機制提出科學論證，希望能使我國中草藥未來可以廣為西方醫學所接受。中藥黃芩、槐花與薑黃都是常用的中藥藥材。黃芩(*Scutellaria baicalensis* Geprgi)為唇形科植物，其乾燥根具有鎮熱、解痛、止血安胎等功效；臨床上用於上呼吸道感染、急慢性扁桃腺炎、急性咽喉炎、肺炎、痢疾和抗腫瘤等疾病¹。槐花(*Sophora japonica* L.)為豆科植物，其乾燥花蕾之萃取物含黃酮類成分，具有抗氧化及抗發炎反應的效果^{2,3}。薑黃(*Curcuma longa* L.)屬於薑科植物，其乾燥根狀莖的主要活性成份為薑黃素 (Curcumin)，許多以動物研究模式結果顯示，薑黃素能夠抑制脂肪形成⁴，預防皮膚癌、胃癌、大腸癌、肝癌和乳癌的生成⁵⁻¹⁰，亦具有抗氧化及抗發炎反應的效果^{11,12}。

一氧化氮 (NO) 在發炎反應過程中扮演相當重要的角色，其生成是經由活化細胞內的一氧化氮合成酶，利用酵素作用，將細胞內之 L-arginine 轉變成為 L-citrulline 及 NO 自由基的釋放¹³。細胞內生性的一氧化氮是維持體內正常運作之重要訊息傳遞因子，它促使 GDP 轉變為 cGMP 進而誘發一連串之生理反應，包括血管擴張、子宮平滑肌鬆弛及抑制血小板凝集等作用，但當過量被生成則會造成細胞的傷害與血管過度的舒張，最後造成嚴重的發炎反應以及併發症¹⁴。在葛蘭氏陰性與陽性菌感染的過程中，其細胞壁成份中之 lipopolysaccharide (LPS) 與 Lipoteic acid (LTA) 均會誘導大量 NO、前列腺素與細胞激素的產生，而進而引起發炎反應^{15,16}。



雖已知黃芩、槐花與薑黃都具有抗發炎藥效，但目前並沒有直接並行比較三者抗發炎能力之實驗結果發表，因此本研究選用 RAW 264.7 細胞株為實驗對象，主要是利用它在 LPS 的刺激下，會大量生成 NO 的特性做研究，以黃芩、槐花與薑黃 50% 乙醇萃取液為試劑，試驗是否能抑制被刺激過之 RAW 264.7 細胞的一氧化氮生成，並比較此三種常用中藥抗發炎成效。

貳、研究方法

一、黃芩、槐花與薑黃成分萃取

取單方科學中藥製劑黃芩、槐花與薑黃濃縮粉末（購自順天堂藥廠出產之商品）各 5 克，用 50% 乙醇 10mL 分別加熱萃取兩小時，冷卻後定容至 10 mL，經過濾後，儲備萃取液。

二、小鼠巨噬細胞 (RAW 264.7 cells) 之培養：

實驗細胞購自食品工業發展研究所。其為 BALB/c 小鼠以 Abelson murine leukemia virus 引發而來之小鼠巨噬細胞株。細胞的生長是培養於含 10% 胎牛血清的 DMEM 培養液中，放置於恆溫細胞培養箱 (37°C、5%CO₂)，當細胞長到八至九分滿即進行繼代培養。

三、細胞生成一氧化氮 (NO) 之測量¹⁷：

細胞內生成的一氧化氮，會很快氧化成 nitrite (NO²⁻) 和 nitrate (NO³⁻)，因此透過 nitrite 的方式，可間接測定 NO 的生成量。本實驗使用的 Griess 試液可與 nitrite 反應生成紅色溶液，在 546 nm 波長下有最大的吸光值，因待測細胞培養液中 nitrite 累積量的不同而造成濃度不同，其呈現深淺的吸光值不同，而做定量分析¹⁸。方法步驟如下：將細胞濃度調整為 1x10⁶ cells/mL，種入 96 孔組織培養盤。置於恆溫細胞培養箱 (37°C、5% CO₂) 培養 24 小時。加入不同濃度的待測藥物反應 30 分鐘後，再加入 LPS (0.1 μg/mL) 培養 16 小時。取培養液 80 μL/well，加入等量事先已混合的 Griess 試劑 [由 Griess A 試劑 (0.1% N-(1-Naphthyl) ethylenediamine) 與 Griess B 試劑 (1% Sulfanilamide / 5% H₃PO₄ 以 1:1 比例混合)，用酵素免疫分析儀，測量波長 550 nm 的吸光值 (O.D.)。以已知濃度的 Sodium nitrite (NaNO₂) 溶液為標準，將樣本 OD 值以內插法換算成樣品中 nitrite 濃度。

四、細胞存活率分析¹⁹：(MTT assay法)

Method of transcriptional and translational (MTT) assay 是一種常用於測定細胞存活率或增殖作用的方法；MTT 試劑在水溶液中呈黃色，可被活細胞內粒線體中的琥珀酸脫氫酶還原成紫色結晶。因此，當在細胞樣品中添加 MTT 試劑，樣品中活的細胞數越多，相對呈現出來之脫氫酶活性會越強，而使 MTT 試劑被還原成紫色結晶堆積於細胞中量越高；紫色結晶可用 dimethyl sulfoxide (DMSO) 溶劑溶解出來，再依其呈現紫色深淺的吸光值，來評估細胞樣品的存活率。方法步驟如下：將實驗處理過的細胞樣品，分別加入 MTT 試劑 (1



mg/mL, pH 7.4) 50 μ L/well。置恆溫細胞培養箱 (37 $^{\circ}$ C、5% CO₂) 培養 2 小時。移除上清液，再加入 100 μ L/well 的 DMSO，以 150 rpm 震盪，將細胞內的紫色結晶溶出。最後以酵素免疫分析儀，測量波長 540 nm 下的吸光值。

五、統計分析：

以未添加待測藥物之 LPS 刺激活化之 RAW 264.7 細胞的存活率及 NO 生成量為 100% 為控制組。實驗結果及作圖，所表示的數據，均以平均值 \pm 標準差 (means \pm S. D.) 顯示。以 Student's t-test 對不同的實驗組與控制組間結果做統計分析，若統計結果所得之 *P* 值 \leq 0.05，則視為統計上具有顯著的差異。

參、實驗結果

一、黃芩 50% 乙醇粗抽物不同濃度下，RAW 264.7 細胞 (LPS刺激活化)生成 NO 量之變化

在光學顯微鏡下，觀察添加的黃芩 50% 乙醇粗抽物對 RAW 264.7 細胞形態的影響及變化，結果如圖 1A 顯示，細胞形態在 0.4 mg/mL 的濃度下不會產生顯著變化，並且根據 MTT 試驗數據顯示細胞存活率亦無顯著的差異。實驗以未添加待測藥物之 LPS 刺激活化之 RAW 264.7 細胞的 NO 生成量為 100%，平行配合實驗，添加不同濃度之黃芩 50% 乙醇粗抽物 (0, 0.05, 0.1, 0.2 和 0.4 mg/mL)，置於恆溫細胞培養箱 (37 $^{\circ}$ C、5% CO₂)，培養 16 小時後，測量 RAW 264.7 細胞 (LPS刺激活化) 產生 NO 量之變化。結果如圖 1B 顯示：黃芩 50% 乙醇粗抽物具抑制細胞生成或釋放 NO 的能力，且藥物劑量與 NO 生成量百分率間，具有線性關係(負)。經計算評估，黃芩 50% 乙醇粗抽物之 IC₅₀ 值為 0.2 mg/mL，表明黃芩 50% 乙醇粗抽物具有抗發炎有的效果。

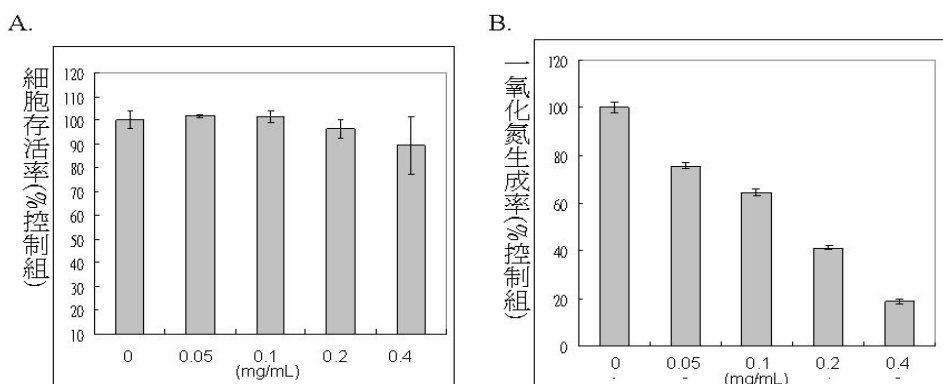


圖 1 黃芩 50% 乙醇粗抽物的抗發炎效果。(A)不同黃芩 50%乙醇粗抽物濃度對 RAW 264.7 細胞存活率的影響。(B)不同黃芩 50% 乙醇粗抽物濃度對 LPS 刺激 RAW 264.7 細胞



生成 NO 量之抑制效果。控制組以未添加待測藥物之 LPS 刺激活化之 RAW 264.7 細胞的存活率及 NO 生成量為 100%。

二、槐花 50% 乙醇粗抽物不同濃度下，RAW 264.7 細胞 (LPS刺激活化) 生成 NO 量之變化

結果如圖 2A 顯示：槐花 50% 乙醇粗抽物在 3 mg/mL 的濃度下，RAW 264.7 細胞之存活率並不受影響。因而在此藥物濃度範圍內，以未添加待測藥物之 RAW 264.7 細胞(LPS 刺激活化) NO 生成量為 100%，實驗分別添加不同濃度之槐花 50% 乙醇粗抽物 (0, 0.1, 0.5, 1, 2 和 3 mg/mL)，置於恆溫細胞培養箱 (37°C、5% CO₂)，培養 16 小時後，測量 NO 生成量之變化。結果如圖2B顯示，槐花 50% 乙醇粗抽物濃度要在 0.5 mg/mL以上才能明顯降低細胞NO生成或釋放量，且藥物劑量與 NO 生成量百分率間，亦具有線性關係(負)。經計算評估，槐花 50% 乙醇粗抽物作用之 IC₅₀ 值為 2.35 mg/mL。

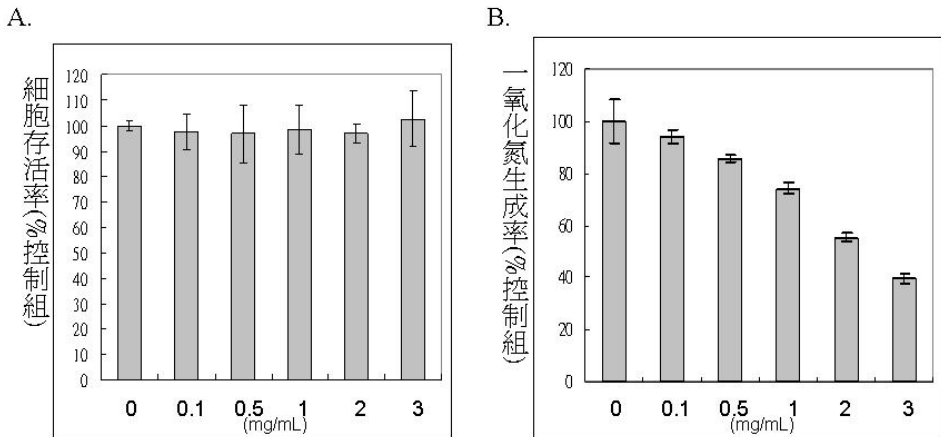


圖 2 槐花 50% 乙醇粗抽物的抗發炎效果。(A)不同槐花 50% 乙醇粗抽物濃度對 RAW 264.7 細胞存活率的影響。(B)不同槐花 50% 乙醇粗抽物濃度對 LPS 刺激 RAW 264.7 細胞生成 NO 量之抑制效果。控制組以未添加待測藥物之 LPS 刺激活化之 RAW 264.7 細胞的存活率及 NO 生成量為 100%。

三、薑黃 50% 乙醇粗抽物不同濃度下，RAW 264.7 細胞 (LPS刺激活化) 生成NO 量之變化

結果如圖 3A 顯示，薑黃 50% 乙醇粗抽物在 1 mg/mL 的濃度下，不影響 RAW 264.7 細胞之形態與存活率。在此藥物濃度範圍內，以未添加待測藥物之 RAW 264.7 細胞 (LPS 刺激活化) NO 生成量為 100% 時，實驗分別添加不同濃度之薑黃 50% 乙醇粗抽物 (0, 0.2, 0.4, 0.6 和 1 mg/mL)，置於恆溫細胞培養箱(37°C、5% CO₂)，培養 16 小時後，測



量 NO 生成量之變化。結果如圖 3B 顯示，都能有效地降低細胞 NO 生成或釋放量，且藥物劑量與 NO 生成量百分率間，具有線性關係(負)。經計算評估，薑黃 50% 乙醇粗抽物作用之 IC₅₀ 值為 0.64 mg/mL。

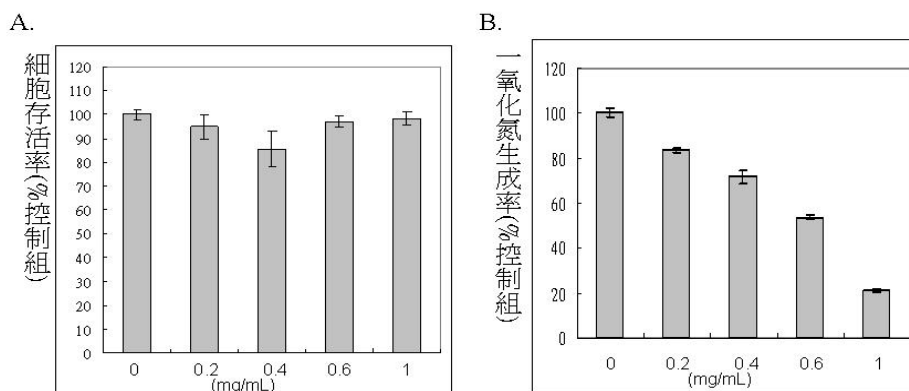


圖 3 薑黃 50%乙醇粗抽物的抗發炎效果。(A)不同薑黃 50% 乙醇粗抽物濃度對 RAW 264.7 細胞存活率的影響。(B)不同薑黃 50%乙醇粗抽物濃度對 LPS 刺激 RAW264.7 細胞生成 NO 量之抑制效果。控制組以未添加待測藥物之 LPS 刺激活化之 RAW 264.7 細胞的存活率及 NO 生成量為 100%。

四、黃芩、薑黃和槐花 50% 乙醇粗抽物對 RAW 264.7 細胞(LPS 刺激活化)生成 NO 量之抑制效果不同

根據前面實驗結果顯示，黃芩、薑黃和槐花 50% 乙醇粗抽物都具有降低 RAW 264.7 細胞生成 NO 量的效果，代表三種單味藥粉 50% 乙醇粗抽物都具有抗發炎的能力。為能更清楚的比對三者抗發炎能力的差異程度，在添加相同濃度 (0.4 mg/mL)下，測量 NO 生成量之變化。結果如圖 4 顯示：黃芩 50% 乙醇粗抽物濃度抑制 LPS 刺激活化之 RAW264.7 細胞生成 NO 量為未添加待測藥物 NO 生成量的 $18 \pm 1.1\%$ ，而薑黃和槐花 50% 乙醇粗抽物各自為 $71.6 \pm 2.9\%$ 和 $87 \pm 1.6\%$ 。此結果指出降低 RAW 264.7 細胞生成 NO 量的效能，黃芩 50% 乙醇粗抽物遠優於薑黃和槐花，而薑黃 50% 乙醇粗抽物略強於槐花。



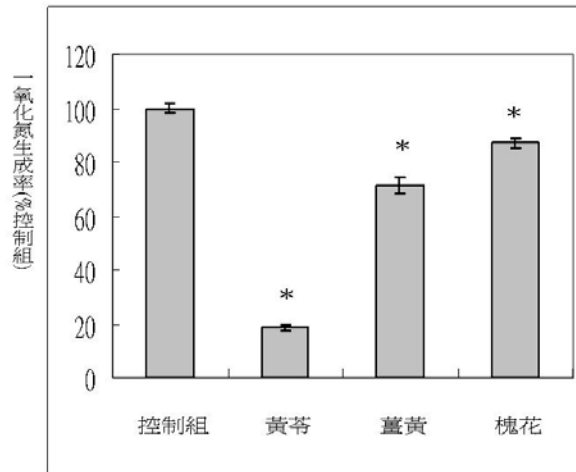


圖 4 黃芩、槐花和薑黃 50% 乙醇粗抽物抗發炎效果之比較。在添加相同濃度 (0.4 mg/mL) 下，測量黃芩、槐花 和薑黃 50% 乙醇粗抽物對 LPS 刺激 RAW 264.7 細胞生成 NO 量之抑制效果。控制組以未添加待測藥物之 LPS 刺激活化之 RAW 264.7 細胞的 NO 生成量為 100% (*表示 $P \leq 0.05$)。

肆、討 論

人體的發炎反應與許多慢性疾病的病程發展有關，如何藉由中藥或調整飲食來抑制發炎反應，以減緩疾病機轉的進行，漸為許多研究者感興趣的課題。本研究結果顯示，黃芩、槐花與薑黃 50% 乙醇粗抽物都具有抗發炎作用，但強度不同。就降低 NO 生成量效果而言，黃芩比槐花與薑黃有效。但由於此三種中藥之 50% 乙醇粗抽物為多種活性成份的混合物，故若無進一步對其進行系統性的純化和比較分析，難以確認何使黃芩具最強抗發炎能力的原因。然而，目前已從黃芩萃取物中分離出其有效成分黃酮類化合物為黃芩苷(baicalin)、黃芩素(baicalein)、漢黃芩素(wogonin)等²⁰，此三種化合物都具有具抗發炎藥效。黃芩除了能抗發炎外，傳統中藥上亦使用其解熱和保肝等生物活性，且近年來研究更深入其抗氧化、抗腫瘤和抗病毒的藥理作用和機轉。因此，中藥黃芩及其活性成分在未來除可開發為鎮痛及抗發炎藥物外，另外在作為抗血栓、降血壓、治療冠心病和糖尿病以及防治腫瘤和愛滋病藥物的研究發展上，都具有相當良好的開發潛力。



參考文獻

1. 張喜平、李宗芳、劉效恭，黃芩素的藥理學研究概況，中國藥理學通報，第 17 卷，民國 90 年，711-13 頁。
2. Kim, B. H., Chung, E. Y., Ryu, J. C., Jung, S. H., Min, K. R. and Kim, Y., "Anti-inflammatory Mode of Isoflavone Glycoside Sophoricoside by Inhibition of Interleukin-6 and Cyclooxygenase-2 in Inflammatory Response," *Arch Pharm Res.*, Vol. 26, 2003, pp. 306-311.
3. Tang, Y. P., Li, Y. F., Hu, J., Lou, F. C., "Isolation and Identification of Antioxidants from *Sophora Japonica*," *J Asian Nat Prod Res.*, Vol. 4, 2002, pp.123-128.
4. Ejaz, A., Wu, D., Kwan, P. and Meydani, M., "Curcumin Inhibits Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes and Angiogenesis and Obesity in C57/BL Mice," *Journal of Nutrition*, Vol. 139, 2009, pp. 1042-1048.
5. Conney AH, Lysz T, Ferraro T, et al. "Inhibitory effect of curcumin and some related dietary compounds on tumor promotion and arachidonic acid metabolism in mouse skin", *Adv. Enzyme Regul*, Vol. 31,1991, pp. 385-396.
6. Sharma, R. A., Gescher, A. J.and Steward, W. P., "Curcumin: the Story so Far", *Eur J Cancer*, Vol. 41, 2005, pp. 1955-1968.
7. Singh, S. V., Hu, X. and Srivastava, S. K., et. al. "Mechanism of Inhibition of benzo[a]pyrene-induced Forestomach Cancer in Mice by Dietary Curcumin," *Carcinogenesis*, Vol. 19, 1998, pp. 1357-1360.
8. Kim, J., Araki, S.and Kim, D., et. al, "Chemopreventive Effects of Carotenoids and Curcumins on Mouse Colon Carcinogenesis after 1,2-demethylhydrazine Initiation," *Carcinogenesis*, Vol. 19, 1998, pp. 81-85.
9. Inano H, Onoda M, and Inafuku N, et. al., "Potent Preventive Action of Curcumin on Radiation-induced Initiation of Mammary Tumorigenesis in Rats," *Carcinogenesis*, Vol. 21, 2000, pp. 1835-1841.
10. Chuang, S. E., Kuo, M. L. and Hsu, C. H., et. al., "Curcumin-containing Diet Inhibits Diethylnitrosamine-induced Murine Hepatocarcinogenesis," *Carcinogenesis*, Vol. 21, 2000, pp. 331-335.
11. Jagetia, G. C. and Aggarwal, B. B., ""Spicing up" of the Immune System by Curcumin," *J Clin Immunol*, Vol. 27, 2007, pp. 19-35.
12. Young-Il Jeong, Sang Woo Kim, In Duk Jung, Jun Sik Lee, Jeong Hyun Chang , Chang-Min Lee, Sung Hak Chun, Man-Soo Yoon, Geun Tae Kim, Seok Woo Ryu, Jong-Suk Kim, Yong Kyoo Shin, Won Suk Lee, Hwa Kyoung Shin, Jae-Dong Lee, and Yeong-Min Park, "Curcumin Suppresses the Induction of Indoleamine 2,3-Dioxygenase by Blocking the Janus-activated Kinase-Protein Kinase C{delta}-STAT1 Signaling Pathway in



- Interferon- γ -stimulated Murine Dendritic Cells,” *J. Biol. Chem.*, Vol. 284, 2009, pp. 3700-3708.
13. Chen, Y. C., Lin-Shiau S. Y., Lin, J. K., “Involvement of Reactive Oxygen Species and Caspase 3 Activation in Arsenite Induce Apoptosis,” *J. Cell Physiol*, Vol. 177, 1998, pp. 324-333.
 14. De Groot C. J., Ruuls S. R., Theeuwes J. W., Dijkstra C. D., Van der Val P., “Immunocytochemical Characterization of the Expression of Inducible and Constitutive Isoforms of Nitric Oxide Synthase in Demyelinating Multiple Sclerosis Lesions,” *J. Neuropathol Exp Neurol*, Vol. 56, 1997, pp. 10-20.
 15. Salkowski, C. A., Detore, G., McNally, R., van Rooijen, N., Vogel, S. N., “Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase Messenger RNA Expression and Nitric Oxide Production by Lipopolysaccharide in Vivo: the Roles of Macrophages, Endogenous IFN- γ and TNF Receptor-1-mediated Signaling,” *J. Immunol*, Vol. 158, 1997, pp. 905-912.
 16. Mello, S. B., Novaes, G. S., Laurindo, I. M., Muscara, M. N., Maciel, F. M., Cossermelli, W., “Nitric Oxide Synthase Inhibitor Influences Prostaglandin and Interleukin-1 Production in Experimental Arthritic Joints,” *Inflammation Res.*, Vol. 46, 1997, pp. 72-77.
 17. Cho, J. Y., Baik, K. U., Jung, J. H., Park, M. H., “In vitro Anti-inflammatory Effects of Cynaropicrin Lactone, A Sesquiterpene Lactone, from *Saussurea lappa*,” *Eur. J. Pharmacol*, Vol. 398, 2000, pp. 399-407.
 18. Schmidt, HHHW, Warner, T. D., Murad, F., “Double-edged Role of Endogenous Nitric Oxide,” *The Lancet*, Vol. 339, 1992, p. 986.
 19. Cho, J. Y., Park, J. S., Baik, K. U., Lee, J. G., Kim, H. P. and Yoo, E. S. et. al., “Differential Effect of Phosphodiesterase IV Inhibitor RP73401 on Various Inflammatory and Immune Responses Relevant to Rheumatoid Arthritis,” *Pharmacol Res.*, Vol. 49, 2004, pp. 423-431.
 20. Zhang, Y. Y., Don, H. Y., Guo, Y. Z., Ageta, H., Harigaya, Y. and Onda, M., et. al., “Comparative Study of *Scutellaria Planipes* and *Scutellaria Baicalensis*,” *Biomed Chromatogr*, Vol. 12, 1998, pp.31-33.

