

編號：CCMP97-RD-019

# 人參及人參皂苷於純系小鼠之馬兜鈴酸 腎炎模型的藥效評估

陳世銘、許光陽  
台北醫學大學

## 摘 要

### 研究目的：

馬兜鈴酸(aristolochic acid, AA)在中草藥引起的腎病變中扮演重要的角色。本研究的目的為藉由投予 AA 引起馬兜鈴酸腎病變(aristolochic acid nephropathy, AAN)，以評估人參(ginseng extrat, GE)及其成份 ginsenoside Rb<sub>1</sub>、Rd 及 Rg<sub>1</sub> 對 AAN 的改善效果。

### 研究方法：

給予純系小鼠 C3H/He (6 week-old male) 3.0  $\mu$ g/mL AA 當飲用水，連續 56 天，之後治療組分別經口投予 GE (125、250、500 mg/kg)或純成份 ginsenoside (Rb<sub>1</sub>、Rd、Rg<sub>1</sub>) 5 mg/kg 連續 14 天，對照組給予等量蒸餾水，Normal 組則全程給予蒸餾水。藉由測定尿蛋白，尿中 N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG)與血中 blood urea nitrogen (BUN)及 creatinine，以評估小鼠腎功能；腎組織使用 PAS 染色觀察病理組織改變，並進行免疫螢光染色 (TGF- $\beta$ ，MMP-9，HGF)，以辨識損傷部位之特異性抗原。

### 結果與討論：

實驗結果顯示，投予 GE 250 mg/kg，ginsenoside Rb<sub>1</sub>，Rg<sub>1</sub> 之治療組的尿蛋白、NAG、BUN、SCr 及血糖值都有降低；組織學及免疫螢光染色觀察發現腎組織損傷的情形皆有緩解。根據以上結果發現，人參濃縮劑部分，GE 250 的療效最好，其次依序為 GE 500 及 GE 125。人參皂苷部分，有效程度依序為 Rg<sub>1</sub>、Rb<sub>1</sub>、Rd。

關鍵詞：馬兜鈴酸腎病變、人參、人參皂苷 ginsenoside Rb<sub>1</sub>、Rd，Rg<sub>1</sub>、乙型轉型生長因子、基質金屬蛋白分解酶、肝細胞生長因子

# Effects of Ginseng and Ginsenosides on Aristolochic Acid-induced Nephropathy in Inbred Mice

Shih-Ming Chen, Kuang-Yang Hsu  
Taipei Medical University

## ABSTRACT

### Aim:

Aristolochic acid (AA) has been demonstrated to play a crucial role in Chinese herbs nephropathy. The purpose of this study was to evaluate the therapeutic effect of ginseng extract (GE) and its active component, ginsenoside (GS), on AA-induced nephropathy.

### Method:

AA was dissolved in distilled water (3 $\mu$ g/ml) as drinking water to C3H/He mice (6 week-old male) for 56 days. The treatment groups were administered orally with GE (125, 250, 500 mg/kg) or ginsenosides (Rb1, Rd, Rg1 5 mg/kg) once daily for 14 days. The control group was administered with distilled water. The normal group was only administered with distilled water throughout the experiment.

Urine protein (UP), urine N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG), blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine were determined to evaluate renal function. Renal tissues were served to histological examination (PAS stain and immunofluorescence). The antibodies, including TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ), MMP-9 (matrix metalloproteinase-9), HGF (hepatocyte growth factor), were chosen to recognize the specific antigens in injury sites.

### Results & Discussion:

Compared with the control group, urine protein, NAG, BUN, serum creatinine and blood glucose were decreased in the GE 250 mg/kg, ginsenoside Rb1 and Rg1 treatment groups. In histological examination, we observed the alleviation in all treatment groups. According to the study, the effect of GE 250 is superior to the other GE-treated groups and ginsenoside Rg1 has the best effect among all the GS-treated groups.

Keywords: Aristolochic acid nephropathy (AAN), ginseng, ginsenoside Rb1, Rd, Rg1, TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ), MMP-9 (matrix metalloproteinase-9), HGF (Hepatocyte Growth Factor)

## 壹、前言

根據衛生署資料顯示，台灣迄今約有四萬名尿毒症病患需長期接受洗腎治療，且每年以 10% 比例成長。雖然腎衰竭致病因素複雜，甚至於現今有許多原因仍不明，前年中藥減肥藥引起腎衰竭的報導非常的頻繁，民眾受輿論影響誤解中藥與腎衰竭習習相關。殊不知其中原因是因誤用含馬兜鈴酸的植物造成腎病變。為此本研究利用馬兜鈴酸引起之腎病變，建立與人類相似的馬兜鈴酸腎炎(aristolochic acid nephropathy, AAN)，再藉由 AAN 模型評估人參及其成分-人參皂苷 Rb<sub>1</sub>，Rd 及 Rg<sub>1</sub> 等是否含有腎毒性。以此腎炎模型進行中藥腎功能評估，才能有效建立用藥安全。

### 馬兜鈴酸腎病變 (Aristolochic acid nephropathy, AAN)

1993 年，Vanherweghem 等人發現在比利時首都布魯塞爾附近，有許多不到 50 歲的婦人服用了同一家診所於 1990 年起改變組成的減肥藥後，發生快速進行性間質性腎炎，推測與減肥藥中新增的兩種生藥厚朴 (*Magnolia officinalis*) 和粉防己 (*Stephania tetrandra*) 有關，故稱此疾病為中草藥腎病變 (Chinese herb nephropathy, CHN)<sup>1</sup>。由於在病患的處方中沒有發現 tetrandrine (粉防己鹼) 的成分，故推測處方中的粉防己可能不小心被名稱相似含馬兜鈴酸 (Aristolochic acid, AA) 成分的廣防己 (*Aristolochia fangchi*) 取代，進一步分析同時期一起輸入比利時的粉防己，發現 12 個產品中有 10 個含有 AA<sup>2</sup>，且病人體內有 AA 和 DNA 烷化的加成物 (AA-DNA) 的存在，顯示 AA 是造成此腎病的罪魁禍首，初期用 CHN 稱呼此生藥引起的腎功能損害似乎不是很適當，故有學者建議將原本的 CHN 更名為馬兜鈴酸腎病變 (Aristolochic acid nephropathy, AAN)<sup>3</sup>。

### 臨床表徵

主要的臨床表徵包括早期嚴重的貧血，推測可能和產生紅血球生成素 (Erythropoietin, EPO) 的腎小管上皮細胞或間質細胞被破壞有關，尿液檢查有輕微腎小管性蛋白尿 (低分子量蛋白尿，low molecular weight proteinuria，尿中低分子量蛋白：α<sub>1</sub>-microglobulin, β<sub>2</sub>-microglobulin, clara cell protein, retinol-binding protein 都會上升)、正常無菌性膿尿，40% 的案例有腎性糖尿但血糖維持在正常範圍內<sup>4-6</sup>。

病人腎功能惡化的速度很快，即使停藥後，仍然持續惡化，在 2 年內快速進展至末期腎臟疾病，腎臟惡化的速度與用藥時間長短<sup>6</sup>、體內的累積劑量皆成正比<sup>14</sup>，與停藥到發病診斷的時間間隔成反比<sup>6</sup>。

### 病理特徵

腎臟體積對稱性縮小，病人腎臟切片的病理特徵是廣泛的腎間質纖維化，合併腎小管萎縮及腎小管消失，間質有細胞浸潤的情形，病變以皮質

表層最為明顯，越往皮質深層病變越輕，葉間小動脈內膜有纖維化及增厚的傾向，與腎小管相比，腎絲球相對未受影響<sup>3,8</sup>。

### 實驗模型

1960 年代開始陸續有 AA 引起急性腎臟衰竭和腎小管受損的報告，單次靜脈注射給予兔子 1 mg/kg 的 AA 後，發生急性腎小管受損；靜脈注射 1 mg/kg/day 的 AA 3 天或更多天後在人類身上也有急性腎小管損傷的情形<sup>9</sup>；Mengs<sup>10</sup> (1987) 給予大鼠或小鼠單一大劑量(10-300mg/kg)的 AA，所有動物產生嚴重的腎小管壞死並且在 15 天內死亡。

Mengs et al.<sup>11</sup> (1993) 以 10, 50 和 100 mg/kg 的 AA 單一劑量餵食大鼠，發現第 3 天時只有大劑量組的血清中尿素氮(blood serum nitrogen, BUN)、肌胺酸酐 (serum creatinine, Scr)、尿中蛋白質、尿中酵素：N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase (NAG)、 $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT) 和 malate dehydrogenase (MDH) 明顯增加，而尿中葡萄糖含量在 3 組中都有明顯上升，觀察腎臟組織切片，發現 100 mg/kg 這組在近曲小管有大範圍的壞死，50 mg/kg 這組只有少量細胞壞死，而 10 mg/kg 這組雖然沒有壞死的現象，但腎臟表皮細胞有絲分裂指標有增加的趨勢，證明腎小管細胞已有部分受損。Sato et al.<sup>12</sup> (2004) 為了找出最適合模擬人類 AAN 的實驗模型，腹腔注射或口服給予三系小鼠(BALB/c, C3H/He, C57BL/6) 2 週 2.5mg/kg 的 AA，在投藥 14 天後及停藥後 14 天發現腎臟受損傷的嚴重程度為：BALB/c > C3H/He > C57BL/6，三系小鼠都有腎小管受損、單核球浸潤的病理特徵，但有間質性纖維化特徵只有 C3H/He，與臨床上 AAN 病人的病徵最相似。

### 慢性腎毒性

關於 AA 引起急性腎毒性和致癌性的報導有很多，最近也陸續有報告證實 AA 會引起慢性腎臟病變，Nouweb et al.<sup>13</sup> (1995) 連續 3 個月給予老鼠 10, 20 和 30 mg/kg/day 的 AA，發現老鼠有近曲小管萎縮伴隨上皮細胞壞死的情形。Cosyns et al.<sup>14</sup> (2001) 利用腹腔注射給予 New Zealand White (NZW) 成兔 17 至 21 個月 0.1 mg/kg/day 的 AA，發現兔子除了產生泌尿道上皮不典型分化和泌尿道移行型上皮細胞癌外，腎臟也有和 AAN 病人相似的特徵：廣泛的腎間質纖維化，腎皮質細胞減少；受損的部位依序為腎原表面近曲小管直行端(S3)，近曲小管迴旋端(S1, S2)，腎原深層，主要特徵是少量單核球浸潤及間質性纖維化，但因實驗耗時過長，喪失其實用價值。Zheng et al.<sup>15</sup> (2001) 連續 4 個月腹腔注射給予大鼠 5mg/kg/day 的 AA，4 到 6 個月後發現實驗動物的腎臟功能不良伴隨有少量單核球浸潤型的間質性硬化。Debelle et al.<sup>16</sup> (2002) 連續 35 天皮下注射給予脫水大鼠 10mg/kg/day 的 AA，發現 Scr 值上升，腎臟有明顯淋巴球浸潤、間質性纖維化之外，亦發現有泌尿道上皮不典型分化和泌尿道移行型上皮細胞癌的情形。隨著物種、

品系的不同，對於馬兜鈴酸的毒性反應也有差異，目前關於這方面的結果雖然很多，但目前仍然沒有定論。

## 人參

人參(*Panax ginseng* C.A. Meyer)為五加科(*Araliaceae*)人參屬的多年生草本植物，藥用部位為乾燥根。*Panax* 命名源自希臘語，Pan 表示「全體的、總的」，acos 表示「醫藥」，意為「萬能之藥」<sup>17-30</sup>。東方國家以人參作為滋補的藥物已經有很長的時間，其藥效最早在「神農本草經」中有記載，如：「補五臟、安精神、止驚悸、除邪氣、明目、開心益智、久服輕身延年」。

人參種類繁多，依據其基源的不同，大致可分為韓國及大陸東北生產的 *P. ginseng* C.A. Meyer；美國與加拿大所產的 *P. quinquefolius* L 兩大類。兩者外觀與成份皆不盡相同，一般俗稱的人參指 *P. ginseng* C.A. Meyer，台灣市場上的吉林人參，韓國人參皆屬之<sup>17</sup>。尚有其他同為人參屬但不同種的人參，如：竹節人參/日本人參(*P. japonicus* C. A. Meyer)；三七/田七[*P. notoginseng* (Burkill) F. H.]；越南人參(*P. vietnamensis* Ha & Grushv)等。

若依照人參的生長方式來分，可分為栽培參、野生參及移山參。栽培參又稱園參，是人工栽培而成。移山參則是幼小野生參移植於參園，或將幼小的園參移植於山野而長成。若依照加工過程來區分，可分為白參(*Ginseng Radix Alba*)及紅參(*Ginseng Radix Rubra*)。兩者的差異在於紅參有經過蒸製處理，最後乾燥而得<sup>31, 32, 33</sup>。

人參的效用除了和種類有關，也與其生長年齡有關<sup>34</sup>，一般而言，六年生的人參，皂苷成份的種類量多、成份均衡、分佈平均，功效較佳。除此之外，溫度，土壤，日照，水源等環境因素也會影響人參的含量<sup>35</sup>。

人參的主要活性成份為人參皂苷(ginsenoside)，目前發現約有 30 餘種人參皂苷，依人參不同的種類、部位，所含的皂苷種類及含量各有不同<sup>35, 36</sup>；人參的組成除了皂苷外，尚包含醣類、含氮化合物、胺基酸、植物固醇、精油、有機酸、維他命及礦物質等<sup>37</sup>。

## 人參的藥效研究

人參的藥理作用有調節中樞神經系統，改善精神狀態及認知功能，調節免疫系統，促使血管擴張，抗氧化，降血糖，改善脂質代謝，抑制血小板凝集，抗腫瘤等<sup>38-41</sup>。

在動物實驗方面，Hattori et al.<sup>42</sup> (1989)經口投予大鼠人參 200 mg/kg 連續 12 天，發現人參能降低抗腎絲球基底膜腎炎(anti-GBM nephritis)引起的腎絲球細胞增殖性變化(hypercellularity)。Ham et al.<sup>43</sup> (1996)腹腔注射人參萃取液(*Ginseng extract, GE*) 200 mg/kg 於大鼠，發現可誘使其腎臟產生 NO，進而增加腎血流，避免缺血造成的傷害，對腎臟具有保護作用。Hiai et al.<sup>44</sup> (1979)以人參腹腔注射於大鼠，分別於 30、60、90 分鐘後觀察，發現血漿

中的 ACTH 及 corticosterone 皆明顯上升，推測人參會對內分泌造成影響。

在臨床研究方面，Zuin et al.<sup>45</sup> (1987) 針對因酒精及藥物引起的慢性肝臟疾病的病人，發現給予人參萃取物能改善 gamma-glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GT)，具有保護肝臟的作用。Sotaniemi et al.<sup>46</sup> (1995) 給予 36 位新診斷的非胰島素依賴型糖尿病病人每天 200 mg 人參，連續給予 8 週，發現其糖化血色素及空腹血糖值都獲得改善。Kim et al.<sup>47</sup> (2003) 給予健康受試者每天 6 g 的人參萃取物，連續給予 8 週，結果發現 total cholesterol、LDL、triglyceride (TG) 皆下降，HDL 則上升，顯示人參有降血脂的作用，且同時觀察到 superoxide dismutase (SOD) 及 catalase 的活性皆降低，推測可能與其抗氧化力有關。

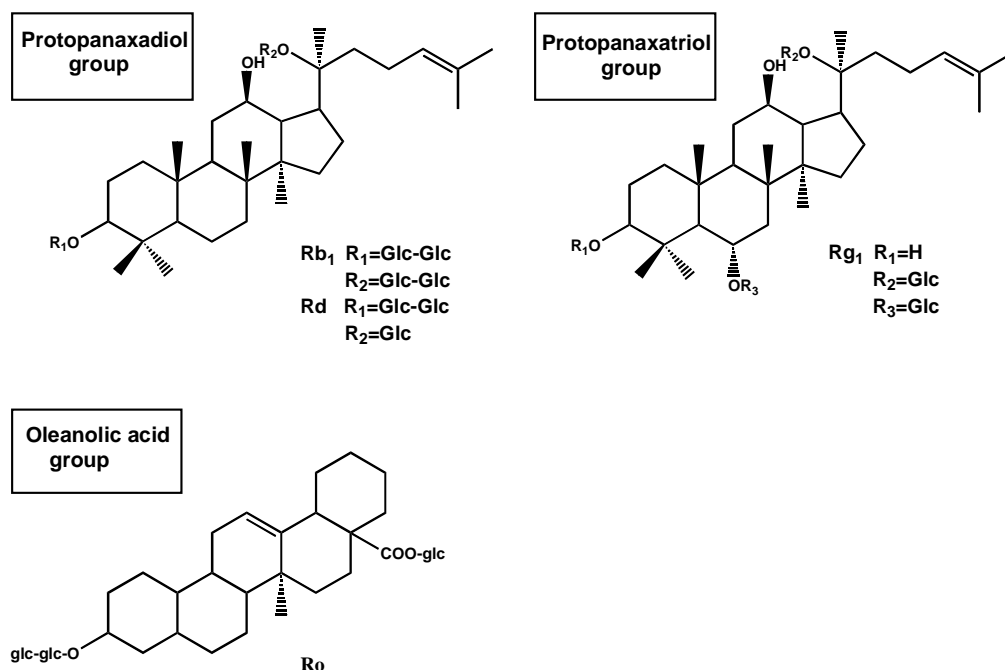
無論在歐美或是亞洲國家，使用人參作為營養補充品的情形相當普遍，人參具有多種用途及生理功效，但對於其機轉仍有許多不明之處，所以近年來許多研究皆針對人參的成份做更進一步的探討，期望找出各成份具有的功效及其可能的機轉。

## 人參皂苷 (Ginsenoside Rb1, Rd, Rg1)

### 人參皂苷之結構特性

人參的主要生物活性來自於皂苷，人參皂苷約占人參的 3-6%<sup>48</sup>，屬於三萜配糖體 (triterpene glycoside)，由糖基及非糖基 (sapogenin) 所組成。依據其非糖基的結構可將人參皂苷分為三大類：Protopanaxadiols (PPDs)、Protopanaxatriols (PPTs) 及 Oleanolic acid<sup>33, 49-51</sup>。目前發現的人參皂苷主要屬於 PPDs 及 PPTs，依據其側鏈連接之不同糖分子，而具有不同之命名及藥理作用。

### 人參皂苷之結構分類



### 人參皂苷 Rb<sub>1</sub> 的藥效學研究

Rb<sub>1</sub> 有保護神經<sup>52-54</sup>，改善學習及記憶功能<sup>55</sup>，抗氧化<sup>56</sup>，保護肝臟<sup>57</sup>，抗癌等<sup>58,59</sup>作用。

Park et al.<sup>60</sup> (2002) 以腹腔注射投予大鼠 Rb<sub>1</sub> 10 mg/kg，一天一次，連續投予三天，發現肝臟 cAMP 的量明顯增加，TG 及 cholesterol 則明顯降低，推測 Rb<sub>1</sub> 可能會藉由調節肝臟 cAMP 的量，進而影響脂質的代謝。

Smolinski et al.<sup>61</sup> (2003) 單次口服給予小鼠 Rb<sub>1</sub> 25 mg/kg，發現對 lipopolysaccharide (LPS) 引起的前發炎物質 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 有抑制的趨勢，推測 Rb<sub>1</sub> 具有抗發炎的特性。Joo et al.<sup>62</sup> (2005) 在大鼠的小神經膠質細胞(microglia)研究中指出，Rb<sub>1</sub> 不但能夠抑制 TNF- $\alpha$  的產生，對其他前發炎物質如：interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 和 interleukin-6 (IL-6) 的產生也有抑制作用。

Park et al.<sup>50</sup> (2005) 的研究也指出 Rb<sub>1</sub> 具有抗發炎的作用，當口服投予 Rb<sub>1</sub> 於大鼠，可在尿液中發現經腸內菌代謝之產物 compound K，在 LPS 引起的發炎細胞中，其代謝物能夠抑制 NO 及 prostaglandin E<sub>2</sub> 的產生，推測可能是藉由抑制 NF- $\kappa$ B 的活化而達到抗發炎的作用。

### 人參皂苷 Rd 的藥效學研究

相較於 Rb<sub>1</sub> 及 Rg<sub>1</sub>，目前 Rd 方面的藥效研究不多，主要以探討對腎臟的保護作用為主<sup>63</sup>，其他也有抗氧化<sup>64</sup>，神經保護等方面的研究<sup>65,66</sup>。

Yokozawa et al.<sup>63</sup> (1994) 為了進一步評估人參成份的藥效研究，以細胞培養方式發現 Rd 與萃取之總人參皂苷皆可抑制 mesangial cell 的增生，推測在總人參皂苷中可能的有效成份即為 Rd。

Yokozawa et al.<sup>67</sup> (1998) 在大鼠的實驗模型中，以缺血後組織再灌流 (ischemia-reperfusion) 的方式造成腎臟傷害，當預防性的給予口服 Rd 連續 30 天，與對照組相比，其抗氧化酵素：superoxide dismutase (SOD)、catalase 及 glutathione peroxidase 都會上升，blood urea nitrogen (BUN) 及 serum creatinine 皆下降，發現 Rd 具有保護腎臟的作用。

Yokozawa et al.<sup>68</sup> (1999)<sup>69</sup> (2000) 分別設計出以 cephalexin、cisplatin 引起的腎衰竭動物實驗模型，先經口投予大鼠 Rd 5 mg/kg 連續 30 天，接著靜脈注射 cephalexin、cisplatin 引起腎臟損傷，予以犧牲後觀察其腎功能及腎臟的氧化壓力。實驗結果發現，治療組的抗氧化酵素：SOD、catalase 明顯上升，尿糖、尿蛋白及尿中鈉、鉀都有下降的趨勢，血中 BUN 及 creatinine 也明顯獲得改善，顯示 Rd 可減少 cephalexin、cisplatin 造成的腎臟傷害。

### 人參皂苷 Rg<sub>1</sub> 的藥效學研究

目前有關 Rg<sub>1</sub> 的研究主要為認知記憶及神經方面的保護作用<sup>53,55,70,71</sup>，

其他作用如：抗發炎<sup>72</sup>，預防骨質疏鬆<sup>73</sup>，抑制血小板凝集<sup>74</sup>等，也有相關的文獻報告。

Hattori et al.<sup>75</sup> (1991)在抗腎絲球基底膜腎炎的動物模型中，連續腹腔注射 12 天 Rg<sub>1</sub> 1 mg/kg 於大鼠，發現在第一天時即可明顯降低尿蛋白，實驗結束後發現腎組織也有明顯改善，腎血流上升，另外還觀察到血中膽固醇有降低的現象。

Leung et al.<sup>76</sup> (2006)在細胞研究中發現，Rg<sub>1</sub> 可以和 glucocorticoid receptor 結合，進而活化 PI3K/Akt pathway，導致內皮細胞 NO 合成酶(eNOS)磷酸化，而產生 NO。NO 除了會促使血管舒張，對心血管方面具保護作用外，還有抗發炎、抗氧化等作用。

此研究證實了 Rg<sub>1</sub> 為 glucocorticoid receptor 的致效劑。Wu et al.<sup>72</sup> (2007)在小神經膠質細胞(microglial cell)的研究中指出，對 LPS 引起的 TNF- $\alpha$  上升情形，Rg<sub>1</sub> 具有抑制的作用，除此之外，NF- $\kappa$ B 也有下降的情形，推測可能是因為 Rg<sub>1</sub> 藉由抑制 NF- $\kappa$ B 而達到抗發炎的效果。



## 貳、材料與方法

### 實驗動物

實驗動物 C3H/He 六週齡雄性小鼠購自財團法人國家實驗動物中心，實驗動物進駐於台北醫學大學實驗動物中心代養，以一般小鼠飼料(福壽牌，台灣) 飼養，供其自由攝食及充足的飲水，代養在室溫約 21°C、相對溼度約 70~80% 的環境，動物房內維持 12 小時明暗自動光照。

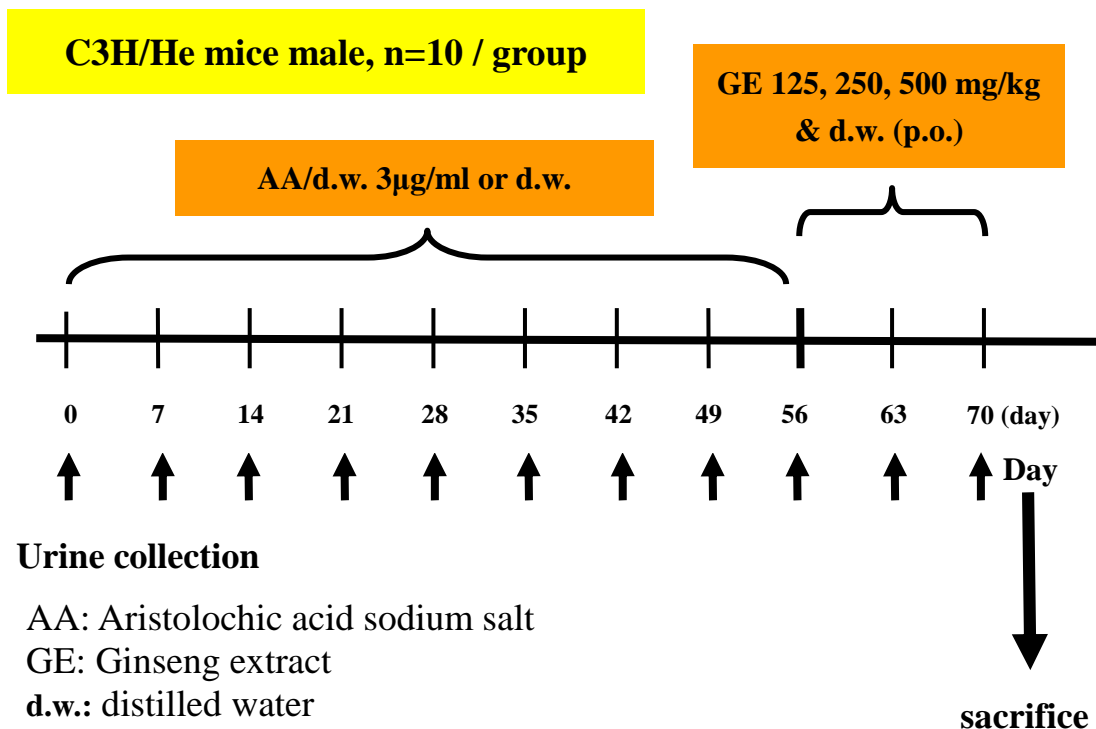
### 藥物

紅參(購於長生中藥行，韓國產) 300 公克，切成薄片狀。置於圓底燒瓶中，加入 1:1 之水醇溶液(1:10, wt/vol)，置放於水浴槽加熱迴流六小時，反覆操作三次，收集三次濾液合併後過濾，以減壓濃縮機濃縮後，冷凍乾燥之，即為人參濃縮劑<sup>77</sup>。

### 實驗設計

將 AAs 溶於 d.w.當作飲用水給予小鼠，溶於蒸餾水(distilled water, d.w.)當作小鼠之飲用水，劑量為 3.0 µg/mL (0.5 mg/kg/day)，連續投予 56 天後恢復正常飲水，並分別經口投予 0.1 ml 人參濃縮劑(ginseng extract, 以下簡稱 GE) 125、250、500 mg/kg，持續投藥 14 天，對照組投予等量蒸餾水，Normal 組則全程給予蒸餾水。為了觀察人參濃縮劑對 AAN 的治療效果，給予治療藥物後 14 天犧牲各組的動物，實驗組、對照組及 normal 組每組動物各 10 隻，共 50 隻。

### 實驗設計流程



## 尿液收集

採尿時小鼠皆禁食，只提供飲用水。在小鼠餵食 AAs 前 1 天及餵食 AAs 之後每週，皆使用特製的新陳代謝器(常盤化學株式會社，日本)收集小鼠 12 小時的尿液，測定尿蛋白、NAG 含量，來評估其腎臟功能。

## 動物犧牲法、血液及組織切片製作

實驗第 70 天，先在小鼠尾靜脈採血，經乙醚麻醉再從其心臟採全血，血液在室溫下靜置 2 小時後，以 4°C、3000 rpm，離心 15 分鐘取得血清，進一步作 Scr 及 BUN 之腎功能血清生化學的分析。

小鼠犧牲後採其腎臟，用 0.9 % NS 潤濕以保持腎臟的新鮮。取下腎臟被膜後，其左腎經 10% 中性福馬林液(buffered neutral formalin solution) (Sigma, USA) 固定，以石蠟包埋(paraffin-embedded)製作切片(section)，使用 periodic acid Schiff's (PAS) 染色觀察腎臟病理組織學型態。而右腎橫切(cross section)後以乾冰 CO<sub>2</sub>(s) 冷凍法製作冷凍切片(frozen section)，利用 CO<sub>2</sub>(s) 急速冷凍的低溫(-78°C) 將 blocks 凝固成硬塊，以便薄切。使用迴轉式冷凍切片機(Bright cryostat™) 將組織薄切成 4-5μm，以便進行免疫螢光染色分析。

## 尿蛋白、NAG 含量測定

根據 Bradford method，使用 Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Inc., USA) 以 bovine serum albumin (BSA) 作檢量線，選用 FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech Inc., Germany) 以 O.D. 595 (optical density) 測其吸光度，以偵測尿蛋白含量。

利用 methylumbelliferyl N-acetyl-β-D-glucosaminide (簡稱 4-MU-NAG) 作為 NAG 的 substrate，使尿液中 NAG 酵素與其作用而產生 methylumbelliferone (4-MU)，因為 4-MU 會發出螢光，所以藉由 4-MU 所產生的螢光作為判斷的標準。以 4-MU 作檢量線，選用 FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech Inc., Germany) 以螢光(excitation= 370, emission= 460) 偵測，定量 NAG 濃度。

## 血清中 BUN 的含量測定

血清中 BUN 選擇 Dimension clinical chemistry system (Dade Behring Inc., USA) 測定：BUN 是利用 urease-glutamate dehydrogenase (GLDH) 反應成 NADH，以 UV 340nm 測其吸光度，儀器使用 Dimension Clinical Biochemistry System RXL (Dade Behring Inc., USA)。

## 血液中血糖值的含量測定

血液中血糖值選擇 SureStep™ Test Strips (Lifescan Inc., USA) 測定：先利用 glucose oxidase 將血液中的糖份反應為 gluconic acid 和 hydrogen peroxide，在利用 peroxidase 使 hydrogen peroxide 和染劑呈色，以 SureStep™

Plus (Lifescan Inc., USA) 偵測血糖值。採尿時小鼠皆禁食，只提供飲用水。在小鼠餵食 AAs 前 1 天及餵食 AAs 之後每週，皆使用特製的新陳代謝器(常盤化學株式會社，日本)收集小鼠 12 小時的尿液，測定尿蛋白、NAG 含量，來評估其腎臟功能

### Periodic Acid Schiff's stain (PAS)組織染色

將製作好的左腎石蠟包埋切片(6 $\mu$ m)先行脫蠟，水洗 10~20 秒，浸泡於 0.5% 過碘酸溶液(periodic acid, HIO<sub>4</sub>)約 5 至 10 分鐘。經蒸餾水水洗 3 次後，以 Schiff 氏試液染色 10 至 15 分鐘，之後直接移至新鮮配製的亞硫酸氫鈉溶液(sodium bisulfite, NaHSO<sub>3</sub>)，transfer 三次，每次 3 分鐘，流水漂洗 3 至 5 分鐘。對比染色選用蘇木紫液(hematoxylin stain solution) (武藤化學株式會社，Japan)進行組織核染色，流水漂洗至標本呈藍色，依序以 70% 乙醇(ethanol)、95% 乙醇(Sigma Inc., USA)、99.5% 乙醇(absolute) (Sigma Inc., USA)、二甲苯(Xylene) (Sigma Inc., USA)等逐一脫水，最後以 Entellan (Merck Inc., Germany)封入劑(mounting medium)封蓋，以供鏡檢觀察。

### 組織損傷程度的量化

腎組織利用鏡檢組織照相法，使用光學顯微鏡(OPTIMA G-330) 200 倍(目鏡 × 物鏡：10X × 20X)與數位相機(Nikon Coolpix 4500)隨機找 20 個不重複的部位觀察腎小管與間質的傷害，包括腎小管上皮細胞萎縮(tubular atrophy)、間質細胞浸潤(cell infiltration)、間質纖維化(interstitial fibrosis)，經由組織量化的方式評估，以 0-3 點分 3 階段計分，總和為腎小管間質部分之 Tubulointerstitial histological score (TIHS)，然後算出每一組的平均值<sup>78</sup>。

### 免疫螢光染色 (Immunofluorescence)

將新鮮的冷凍切片回溫(室溫 25°C)，以 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)濕潤後，以 10% normal rabbit serum 處理，將選定之特異性一次抗體 TGF- $\beta$ ，MMP-9，HGF (Santa Cruz, USA)以 PBS 適當稀釋後，分別加在各組織上，同切片之另一組織僅加入 PBS 當作陰性對照(negative control)，反應後再以 PBS 連續清洗 3 次。於避光環境下分別加入二次抗體 Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate (TRITC)-labeled rabbit anti-goat IgG (Santa Cruz, USA)，之後用 PBS 連續清洗 3 次，風乾，最後再以 90 % glycerol 封蓋。使用共軛焦雷射掃描式顯微鏡 Olympus FV500 (Tokyo, Japan)，以氬氦綠雷射為光源，設定激發光 543 nm、發射光 585nm，觀察組織中 TGF- $\beta$ 、MMP-9 及 HGF 的沉積情形，所得影像以 Matlab version 6.5 軟體分析。

### 統計方法

數據以 mean $\pm$ SD 表示，實驗之尿蛋白、NAG 含量與血清中 BUN、Scr、血糖值、組織經 PAS 染色及免疫螢光染色量化後之結果均採用 Mann-Whitney U test 方法統計。

## 第二節 Ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rd, Rg<sub>1</sub> 在 AAN 之藥效評估

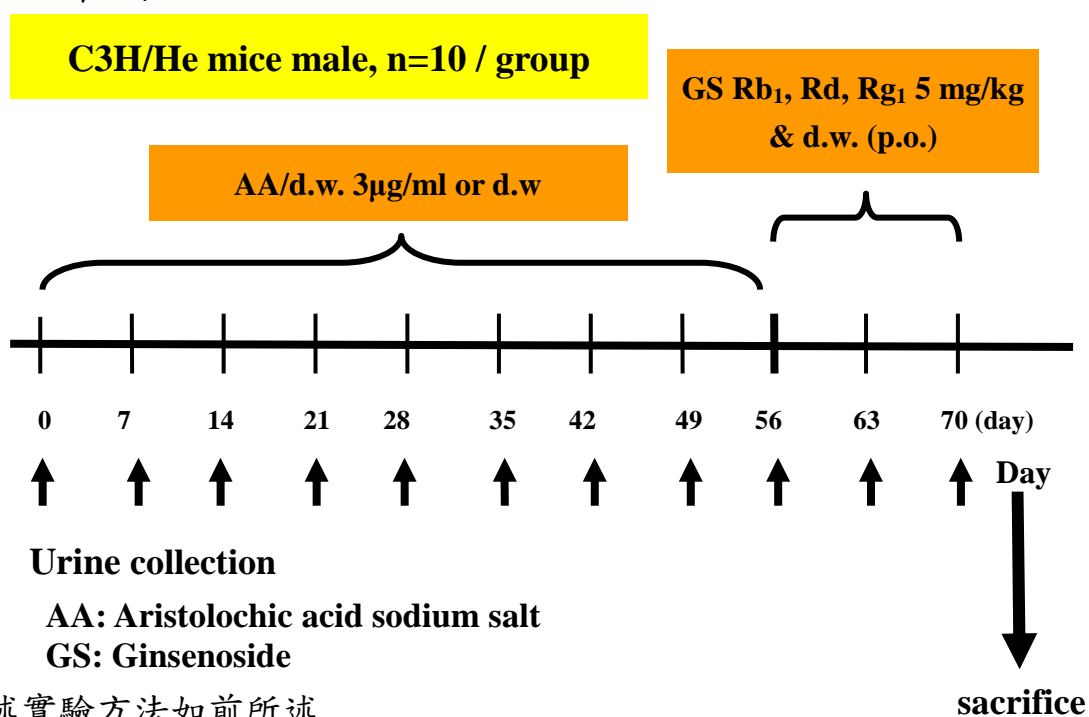
### 實驗藥物

Ginsenoside Rb<sub>1</sub> (Genay, France), Rd (Genay, France), Rg<sub>1</sub> (Nacalai Tesque, Japan)。

### 實驗設計

將 AA 溶於 d.w. 當作小鼠之飲用水，劑量為 3.0 µg/mL (0.5mg/kg/day)，連續投予 56 天後，恢復正常飲水，並分別經口投予 0.1ml ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rg<sub>1</sub>, Rd (以下簡稱 GS) 5 mg/kg，持續投藥 14 天，對照組投予等量蒸餾水，Normal 組則全程給予蒸餾水。為了觀察治療藥物對 AAN 之效果，給予治療藥物後 14 天犧牲各組的動物，實驗組及對照組及 normal 組動物每組各 10 隻，共 50 隻。

### 實驗設計流程



上述實驗方法如前所述

測定方法：

尿液收集

動物犧牲法、血液及組織切片製作

尿蛋白、NAG 含量測定

血清中 BUN

血液中血糖值的含量測定

PAS 組織染色

組織損傷程度的量化

免疫螢光染色

統計方法

### 第三節 人參濃縮劑之 ginsenoside Rg1、Rb1 與 Rd 含量 HPLC 分析

#### 實驗試藥

人參濃縮劑的製備如前述；人參成分中之 ginsenoside Rg1 購自 Nacalai Tesque (Nacalai Tesque, Japan)，ginsenoside Rb1 與 Rd 購自 Genay (Genay, France)。

#### 儀器裝置

1. 高壓幫浦 L-7110 Pump (Hitachi, Japan)
2. 自動注入器 L-7200 Autosampler (Hitachi, Japan)
3. 紫外光偵測器 L-4000H UV Detector (Hitachi, Japan)
4. 層析管柱選用 Inertsil ODS-2: 4.6x150 mm I.D, particle size 5  $\mu$ m (GL Sciences Inc., Japan)
5. 積分紀錄儀 D-2000 Chromato-Integrator (Hitachi, Japan)

#### HPLC 條件

1. 測定波長：203 nm
2. 溫度：RT
3. 注射量：30  $\mu$ l
4. 移動相：
  - (1) Ginsenoside Rg1：Acetonitrile:H<sub>2</sub>O=20:80
  - (2) Ginsenoside Rb1 與 Rd：Acetonitrile:H<sub>2</sub>O=30:70
5. 流速：1 ml/min

#### 標準品配製與檢量線製作

標準品 ginsenoside Rg1 與 Rb1 分別溶於純水製備成儲備溶液(1 mg/ml, w/v)，將檢量線濃度定為 0.2, 0.4, 0.5, 0.8, 1 mg/ml；ginsenoside Rd 溶於移動相製備成儲備溶液(1 mg/ml, w/v)，將檢量線濃度定為 0.1, 0.2, 0.25, 0.4, 0.5 mg/ml。三者皆取標準品之儲備溶液分別配製成上述五種濃度。每回定量檢品時，均須建立該次檢量線<sup>79</sup>。

#### 檢品配製

檢品人參濃縮劑溶於純水(100 mg/ml, w/v)，經濾膜 Millipore syringe filter 0.45  $\mu$ l (Merck Inc., Germany)過濾後再行注入。

#### 分析方法之精密度(precision)與準確度(accuracy)試驗

依照上述標準品配置方法製備檢量線，進行同日內(intraday)與異日間(interday)重複六次試驗之確效(validation)。將個別六次的結果計算其平均值(mean)、標準偏差(standard deviation, SD)、變異係數(coefficient of variation, CV)以及誤差(error)，來測定分析方法的精確性與準確性。

## 參、結果

### 第一節 人參濃縮劑對慢性 AAN 的藥效評估

#### 1.1 尿蛋白、NAG 含量分析

在尿蛋白的分析中，投予治療藥物 GE 7 天，實驗組中 125 mg/kg ( $2.52 \pm 0.20^*$  mg/day)，250 mg/kg ( $2.12 \pm 0.27^*$  mg/day)，500 mg/kg 組 ( $2.34 \pm 0.03^*$  mg/day) 之 24 小時尿蛋白含量減少，相較於 AAN 對照組 ( $2.88 \pm 0.04$  mg/day) 皆有統計學上顯著的意義。而在給予治療藥物 14 天後，125 mg/kg 組 ( $2.12 \pm 0.15^*$  mg/day)，250 mg/kg 組 ( $1.94 \pm 0.21^*$  mg/day)，500 mg/kg 組 ( $2.00 \pm 0.21^*$  mg/day) 之尿蛋白含量持續降低，與對照組 ( $3.02 \pm 0.09$  mg/day) 相較有統計學上顯著的意義 ( $*P < 0.05$ )。(圖一)

在 NAG 的含量分析中，投予 GE 7 天後，實驗組中 125 mg/kg ( $2.88 \pm 0.22^*$   $\mu\text{M}/\text{min}/\text{L}$ )，250 mg/kg ( $2.82 \pm 0.22^*$   $\mu\text{M}/\text{min}/\text{L}$ )，500 mg/kg 組 ( $2.91 \pm 0.09^*$   $\mu\text{M}/\text{min}/\text{L}$ ) 之尿中 NAG 含量與對照組 ( $3.29 \pm 0.01$   $\mu\text{M}/\text{min}/\text{L}$ ) 相較有降低的趨勢。而在治療 14 天後，125 mg/kg ( $2.66 \pm 0.07^*$   $\mu\text{M}/\text{min}/\text{L}$ )，250 mg/kg ( $2.36 \pm 0.08^{**}$   $\mu\text{M}/\text{min}/\text{L}$ ) 與 500 mg/kg 組 ( $2.46 \pm 0.05^{**}$   $\mu\text{M}/\text{min}/\text{L}$ ) 皆可降低尿中 NAG 含量，與對照組 ( $3.39 \pm 0.15$   $\mu\text{M}/\text{min}/\text{L}$ ) 相較有統計學上顯著的意義 ( $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ )。(圖三)

#### 1.2 血清中 BUN 分析

連續投予 14 天 GE 250 mg/kg ( $20.00 \pm 1.22^*$  mg/dL) 會降低血清中 BUN 值，相較於 AAN 對照組 ( $23.75 \pm 2.06$  mg/dL) 有統計學上的意義 ( $*P < 0.05$ )。但投予 125 mg/kg ( $21.25 \pm 0.96$  mg/dL)，500 mg/kg ( $23.33 \pm 1.15$  mg/dL) 的組別則沒有明顯的改善。(表一)

#### 1.3 血清中 Creatinine 分析

在給予治療藥物 14 天後，250 mg/kg 組 ( $0.33 \pm 0.04^*$  mg/dL) 可降低血清 creatinine 值，與對照組 ( $0.40 \pm 0.01$  mg/dL) 相較有統計學上的意義 ( $*P < 0.05$ )。但投予 125 mg/kg ( $0.38 \pm 0.04$  mg/dL)，500 mg/kg ( $0.36 \pm 0.05$  mg/dL) 的組別則沒有明顯的改變。(表一)

#### 1.4 血液中血糖分析

在 AAN 小鼠投予 14 天 GE 治療之實驗組中，發現 125 mg/kg ( $122.00 \pm 2.65^*$  mg/dL)，250 mg/kg ( $122.00 \pm 6.24^*$  mg/dL)，500 mg/kg 組 ( $130.00 \pm 4.36^*$  mg/dL) 的血糖值和對照組 ( $141.70 \pm 5.81$  mg/dL) 相較皆有降低的趨勢，且有統計上顯著的差異 ( $*P < 0.05$ )。(表三)

## 1.5 組織病理 PAS 染色

在光學顯微鏡 200 倍下，觀察投予治療藥物 GE 之小鼠腎組織病理變化(圖五)，分別可見 Normal (A)，對照組(B)及連續投予 14 天 GE (125 mg/kg，250 mg/kg，500 mg/kg)之治療組(C,D,E)的病理組織圖。相較於對照組，三組治療組都可發現腎小管萎縮及間質細胞浸潤和纖維化的情形明顯減緩，腎小管的損傷也較輕微。

## 1.6 組織損傷量化分析

經 PAS 染色之組織在顯微鏡下觀察，依病理組織損傷程度量化表予以計分。經量化結果發現，以 GE 125 mg/kg ( $3.38 \pm 0.74^{**}$ )，250 mg/kg ( $2.33 \pm 0.87^{**}$ )，500 mg/kg ( $3.29 \pm 0.49^{**}$ )治療之組別，其組織損傷程度皆有減輕的趨勢，與對照組( $7.14 \pm 1.21$ )相較有統計學上的意義 (\*\* $P < 0.01$ )。(圖七)

## 1.7 免疫螢光染色及量化分析

### 1.7-1 TGF- $\beta$

組織以免疫螢光染色，利用共軛焦雷射掃描式顯微鏡觀察腎組織化學激素 TGF- $\beta$  沉積情形。相較於對照組( $95.75 \pm 8.62$ )之腎組織，GE 125 ( $32.00 \pm 4.90^{**}$ )的抗體接著點降低了 67 %、GE 250 ( $29.00 \pm 1.55^{**}$ ) 的抗體接著點降低 70 %、GE 500 ( $32.20 \pm 1.33^{**}$ )的抗體接著點降低 66 %。三組皆可發現腎小管和腎間質部位之紅色呈色減少，顯示給予 GE 125，250，500 mg/kg 皆可減少 TGF- $\beta$  蓄積。(圖九、十)

### 1.7-2 MMP-9

觀察腎組織以 MMP-9 免疫螢光染色後的沉積，相較於對照組( $1.25 \pm 0.50$ )，GE 125 ( $11.50 \pm 4.20^*$ )的亮點增加了 8.2 倍、GE 250 ( $20.67 \pm 4.99^*$ )的亮點增加了 15.5 倍、GE 500 ( $13.00 \pm 2.94^*$ )的亮點增加了 9.4 倍，三組在腎小管和腎間質部位的紅色呈色均有增加的情形，表示給予 GE 125，250，500 mg/kg 可增加 MMP-9 的沉積。(圖九、十)

### 1.7-3 HGF

組織以免疫螢光染色，利用共軛焦雷射掃描式顯微鏡觀察腎組織 HGF 沉積情形。相較於對照組( $8.00 \pm 0.82$ )之腎組織，GE 125 ( $21.00 \pm 2.83^*$ )的亮點增加了 1.6 倍、GE 250 ( $67.00 \pm 8.55^{**}$ )的亮點增加了 7.4 倍、GE 500 ( $52.50 \pm 7.61^{**}$ )的亮點增加了 5.6 倍。三組皆可發現腎小管和腎間質部位之紅色呈色增加，顯示給予 GE 125，250，500 mg/kg 可增加 HGF 沉積。(圖九、十)。

## 第二節 Ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rd, Rg<sub>1</sub> 對慢性 AAN 的藥效評估

### 2.1 尿蛋白、NAG 含量分析

在尿蛋白的分析中，投予治療藥物 GS 5 mg/kg 7 天，實驗組中 Rb<sub>1</sub> (1.91±0.09\* mg/day)，Rd (2.05±0.14\* mg/day)，Rg<sub>1</sub> 組(2.03±0.03\* mg/day)之 24 小時尿蛋白含量減少，相較於 AAN 對照組(2.98±0.05 mg/day)皆有統計學上顯著的意義。而在給予治療藥物 14 天後，Rb<sub>1</sub> 組(1.87±0.11\*\* mg/day)，Rd 組(2.06±0.01\* mg/day)，Rg<sub>1</sub> 組(1.83±0.17\*\* mg/day)尿蛋白含量持續降低，與對照組(3.06±0.08 mg/day)相較有統計學上顯著的意義(\**P* < 0.05，\*\**P* < 0.01)。(圖二)

在 NAG 的含量分析中，投予 GS 5 mg/kg 7 天後，實驗組中 Rb<sub>1</sub> (2.82±0.09\* μM/min/L)，Rd (2.98±0.13\* μM/min/L)，Rg<sub>1</sub> 組(2.86±0.17\* μM/min/L)之尿中 NAG 含量與對照組(3.65±0.05 μM/min/L)相較有降低的趨勢。而在治療 14 天後，Rb<sub>1</sub> 組(2.85±0.08\* μM/min/L)，Rd 組(3.01±0.08\* μM/min/L)與 Rg<sub>1</sub> 組(2.89±0.04\* μM/min/L)組皆可降低尿中 NAG 含量，與對照組(3.85±0.14 μM/min/L)相較皆有統計學上顯著的意義(\**P* < 0.05)。(圖四)

### 2.2 血清中 BUN 分析

連續投予 14 天 GS Rb<sub>1</sub> 5 mg/kg (19.50±1.29\* mg /dL)，Rd 5 mg/kg (17.40±1.52\*\* mg /dL)，Rg<sub>1</sub> 5 mg/kg (20.50±0.58\* mg /dL)皆會降低血清中 BUN 值，相較於 AAN 對照組(22.55±1.08 mg/dL)有統計學上的意義(\**P* < 0.05，\*\**P* < 0.01)。(表二)

### 2.3 血清中 Creatinine 分析

在給予治療藥物 GS 5 mg/kg 14 天後，Rb<sub>1</sub> 組(0.30±0.01\* mg/dL)，Rg<sub>1</sub> 組(0.30±0.01\* mg /dL)可降低血清 creatinine 值，與對照組(0.38±0.04 mg/dL)相較有統計學上的意義(\**P* < 0.05)。但投予 Rd (0.33±0.05 mg/dL)的組別則沒有明顯的降低。(表二)

### 2.4 血液中血糖分析

在 AAN 小鼠投予 14 天 GS 治療之實驗組中，發現 Rb<sub>1</sub> 組(132.00±3.46\* mg/dL)，Rg<sub>1</sub> 組 (131.75±2.36\* mg/dL)的血糖值和對照組(142.20±1.92 mg/dL)相較皆有降低的趨勢，且有統計上顯著的差異(\**P* < 0.05)。但 Rd 組 (137.75±9.74 mg/dL) 則沒有明顯的降低。(表四)

### 2.5 組織病理 PAS 染色

在光學顯微鏡 200 倍下，觀察投予治療藥物 GS 之小鼠腎組織病理變化(圖六)，分別可見 Normal 組 (A)，對照組 (B) 與連續投予 14 天 5mg/kg GS Rb<sub>1</sub>, Rd, Rg<sub>1</sub> 之治療組 (C,D,E) 的病理組織圖。相較於對照組，三組治療



組都可發現腎小管及間質細胞浸潤和纖維化的情形明顯減緩，腎小管的損傷也較輕微。

## 2.6 組織損傷量化分析

經 PAS 染色之組織在光學顯微鏡下觀察，依病理組織損傷程度量化表予以計分。經量化結果發現，以 GS Rb<sub>1</sub> (2.50±0.55\*\*), Rd (3.84±0.83\*\*), Rg<sub>1</sub> (2.33±0.65\*\*) 治療之組別，組織損傷程度皆有減輕的趨勢，相較於對照組 (7.14±1.21) 有統計學上的意義 (\*\**P* < 0.01)。(圖八)

## 2.7 免疫螢光染色

### 2.7-1 TGF-β

組織以免疫螢光染色，利用共軛焦雷射掃描式顯微鏡觀察腎組織化學激素 TGF-β 沉積情形。對照組之腎組織與 GS Rb<sub>1</sub>、Rd、Rg<sub>1</sub> 治療組的 TGF-β 沉積程度不同。相較於對照組(95.75±8.62)之腎組織，GS Rb<sub>1</sub> (32.50±7.18\*\*) 的抗體接著點降低了 66 %、Rd (29.00±3.79\*\*) 的抗體接著點降低了 70 %、Rg<sub>1</sub> (22.67±6.62\*\*) 的抗體接著點降低了 76 %。三組皆可發現腎小管和腎間質部位之紅色呈色減少，顯示 TGF-β 蓄積減少。(圖十一、十二)

### 2.7-2 MMP-9

觀察腎組織以 MMP-9 免疫螢光染色後的沉積，相較於對照組 (1.25±0.50)，GS Rb<sub>1</sub> (35.67±5.38\*\*) 的亮點增加了 27.5 倍、Rd (26.86±5.98\*\*) 的亮點增加了 20.5 倍、Rg<sub>1</sub> (28.50±3.94\*\*) 的亮點增加了 21.8 倍。三組治療組在腎小管和腎間質部位的紅色呈色皆有增加的情形，即表示給予 GS Rb<sub>1</sub>，Rd，Rg<sub>1</sub> 可增加 MMP-9 的沉積。(圖十一、十二)

### 2.7-3 HGF

組織以免疫螢光染色，利用共軛焦雷射掃描式顯微鏡觀察腎組織 HGF 沉積情形。相較於對照組(8.00±0.82) 之腎組織，GS Rb<sub>1</sub> (22.67±3.36\*) 的亮點增加了 1.8 倍，Rd (17.00±2.94\*) 的亮點增加了 0.6 倍，Rg<sub>1</sub> (23.50±3.50\*) 的亮點增加了 1.9 倍。三組皆可發現腎小管和腎間質部位之紅色呈色增加，此顯示給予 GS Rb<sub>1</sub>，Rd，Rg<sub>1</sub> 可增加 HGF 的沉積(圖十一、十二)。

### 第三節人參濃縮劑之 ginsenoside Rg1、Rb1 與 Rd 含量 HPLC 分析

#### 人參濃縮劑之 ginsenoside Rg1、Rb1 與 Rd 含量之 HPLC 圖譜

分析人參濃縮劑之 ginsenoside Rg1、Rb1 與 Rd 含量的層析圖譜(圖十三)。圖示為(A)標準品 ginsenoside Rg1 (1 mg/ml), (B)標準品 ginsenoside Rb1 (1 mg/ml), (C)標準品 ginsenoside Rd (0.5 mg/ml), (D)檢品人參濃縮劑(50 mg/ml)及(E)檢品人參濃縮劑(100 mg/ml)。標準品 ginsenoside Rg1、Rb1 與 Rd 的滯留時間分別約為 22, 14, 39 分鐘。

#### 線性(linearity)

標準品 ginsenoside Rg1 五種濃度為 0.2, 0.4, 0.5, 0.8, 1 mg/ml 重複六次試驗之檢量線線性關係圖(圖十四)。其線性迴歸方程式分別為  $Y=290446X-57395$ , 相關係數為  $R^2=0.9948$ , 此檢量線為良好之線性關係。標準品 ginsenoside Rb1 五種濃度為 0.2, 0.4, 0.5, 0.8, 1 mg/ml 重複六次試驗之檢量線線性關係圖(圖十五)。其線性迴歸方程式分別為  $Y=178152X-121519$ , 相關係數為  $R^2=0.9985$ , 此檢量線為良好之線性關係。標準品 ginsenoside Rd 五種濃度為 0.1, 0.2, 0.25, 0.4, 0.5 mg/ml 重複六次試驗之檢量線線性關係圖(圖十六)。其線性迴歸方程式分別為  $Y=191823X-31391$ , 相關係數為  $R^2=0.9959$ , 此檢量線為良好之線性關係。

#### 分析方法之精密度與準確度

為證明此 HPLC 的分析方法具有良好之再現性(reproducibility), 進行同日內與異日間之精密度與準確度試驗。Ginsenoside Rg1 同日內分析之變異係數為 1.48~6.88%, 誤差程度為-4.49~5.66%(表五); 異日間分析之變異係數為 1.21~6.57%, 誤差程度為-1.25~5.70%(表六)。Ginsenoside Rb1 同日內分析之變異係數為 1.09~4.49%, 誤差程度為-2.46~3.71%(表七); 異日間分析之變異係數為 2.04~5.22%, 誤差程度為-3.09~3.58%(表八)。Ginsenoside Rd 同日內分析之變異係數為 0.01~8.84%, 誤差程度為-3.21~5.92%(表九); 異日間分析之變異係數為 1.43~4.33%, 誤差程度為-3.44~4.08%(表十)。各濃度之變異係數百分比皆小於 10%, 且其誤差程度百分比皆在 10% 以下, 由此可確定本實驗分析方法具有良好的再現性, 且精密度與準確性佳, 對於人參之 ginsenoside Rg1、Rb1 與 Rd 含量測定方法具確效特性。

#### 人參濃縮劑之 ginsenoside Rg1、Rb1 與 Rd 含量分析

利用此 HPLC 分析方法得知, 人參濃縮劑 100 mg/ml 中所含 ginsenoside Rg1 之百分比為  $0.3510 \pm 0.0248\%$ , 相當於 3.5108 mg 之 ginsenoside Rg1; 人參濃縮劑 100 mg/ml 中所含 ginsenoside Rb1 之百分比為  $0.7810 \pm 0.0875\%$ , 相當於 7.8106 mg 之 ginsenoside Rb1; 人參濃縮劑 100 mg/ml 中所含 ginsenoside Rd 之百分比為  $0.2635 \pm 0.0211\%$ , 相當於 2.6350 mg 之 ginsenoside Rd(表十一)。

## 肆、討論

本實驗在動物品系的選擇是參考 Sato et al.<sup>80</sup> (2004)的結果，分別針對 BALB/c, C3H/He, C57BL/6 三種品系小鼠腹腔注射或口服給予 AA，發現 C3H/He 有明顯的腎間質纖維化及細胞浸潤，與臨床上 AAN 病人的病徵最相似，故本實驗選擇以 C3H/He 小鼠為實驗動物。在劑量方面，參考 Mengs<sup>81</sup> (1987)針對雄性小鼠經口投予 AA 的 LD<sub>50</sub> 55.9 mg/kg 的百分之一劑量(0.5 mg/kg)，作為本實驗的投予劑量，並配合小鼠的飲水習慣，固定濃度讓小鼠長期飲用。

Yokozawa et al.<sup>82</sup> (1994)發現人參濃縮劑能夠降低 5/6 腎臟切除(5/6 nephrectomized)之大鼠的高尿蛋白，與本實驗發現 GE 可降低 AAN 小鼠尿蛋白含量的結果相同。純成份的部分，Yokozawa et al.<sup>68</sup> (1999)的研究指出，Rd 能夠降低 cephaloridine 引起的尿蛋白；Hattori et al.<sup>75</sup> (1991)在抗腎絲球基底膜腎炎的研究顯示，Rg<sub>1</sub> 能夠有效降低尿蛋白；本實驗也有相同的結果，除了 Rd 及 Rg<sub>1</sub> 外，本實驗還發現 Rb<sub>1</sub> 也具有相同的效果，推測可能由於人參及其純成份能使腎血流量上升，進而改善腎功能。

Kabanda et al.<sup>83</sup> (1995)在腎小管受損嚴重 AAN 病人身上發現尿液中 NAG 含量明顯增加；本實驗中我們發現連續投予 14 天人參濃縮劑及人參皂苷 Rb<sub>1</sub>, Rd, Rg<sub>1</sub> 都會降低尿中 NAG 含量，顯示 GE 及 GS 能夠減緩 AA 造成的腎小管損傷。

BUN、serum creatinine 方面，本實驗發現人參濃縮劑 250 mg/kg 可以明顯降低血清中 BUN 及 creatinine 值，與 Yokozawa et al.<sup>82</sup> (1994)發現 GE 能夠降低 BUN 的結果相似；純成份部分，本實驗發現 Rb<sub>1</sub> 及 Rg<sub>1</sub> 會明顯降低 BUN 及 creatinine，而 Rd 雖然會使 BUN 降低但對 creatinine 則無顯著改善，此與 Yokozawa et al.<sup>67</sup> (1998) <sup>68</sup> (1999) <sup>69</sup> (2000)在缺血後組織再灌流、cephaloridine、cisplatin 引起的動物腎衰竭模型中，發現 Rd 能夠降低 BUN 及 creatinine 的結果不同，推測可能因為累積劑量不同所導致。Yokozawa 等人的研究是使用 5 mg/kg 連續口服給予 30 天，但在本實驗為連續給予 14 天，可能因為給予的時間不夠長，加上 ceratinine 不像 BUN 會受身體整體狀況影響<sup>79</sup>，所以改善的幅度無法像 BUN 的幅度那麼大，造成我們只觀察到 ceratinine 有下降的趨勢，但未達到統計的差異。

在血糖值方面，給予人參濃縮劑 125、250、500 mg/kg 三組皆有下降的趨勢，與 Jung et al.<sup>84</sup> (2005)在 streptozotocin 引起的糖尿病大鼠實驗中，發現 GE 能夠降低血糖的結果相同；純成份的部分，Rb<sub>1</sub>、Rg<sub>1</sub> 組也觀察到血糖值有下降的現象，推測可能因為人參能夠減少葡萄糖在小腸的吸收<sup>85</sup> 及促進 insulin 分泌有關<sup>37, 86</sup>。

腎組織鏡檢觀察發現投予 GE 及 GS Rb<sub>1</sub>、Rd、Rg<sub>1</sub> 皆可減低腎小管損傷、間質細胞浸潤和纖維化，此與 Yokozawa et al.<sup>82</sup> (1994) 發現人參皂苷混合物能改善腎小管萎縮、浸潤、纖維化的結果相同。

本實驗進一步選用 TGF- $\beta$ 1、MMP-9 及 HGF 為一次抗體，利用免疫螢光染色法探討此腎炎模型的免疫病理機轉。

Yang et al.<sup>87</sup> (2003) 在 AAN 病人腎臟組織切片上發現 TGF- $\beta$ 1 大量表現；Li et al.<sup>88</sup> (2004) 發現給予 AAI 後，人類近端腎小管上皮細胞(proximal tubular epithelial cell, PTEC)的 TGF- $\beta$ 1 會大量釋放。Okada et al.<sup>89</sup> (2003) 在研究 AA 的慢性腎臟纖維化實驗中，比較 wild type 及 hepatocyte growth factor (HGF) 基因鼠腎臟的損傷情形，發現 HGF 基因鼠可明顯增加 MMP-9 的表現，減輕纖維化的情形。本實驗中，在共軛焦顯微鏡觀察下發現，GE 及 GS 的 TGF- $\beta$  沉積的情形降低，MMP-9 及 HGF 沉積的情形增加，顯示 AA 引起的纖維化情況獲得改善。

Hattori et al.<sup>90</sup> (1996) 在研究溫脾湯與腎臟纖維化的實驗中發現，溫脾湯中的成份-人參，能夠抑制 TGF- $\beta$  的活化；在本實驗中也觀察到給予 GE 及 GS 後，TGF- $\beta$  的沉積明顯降低。目前沒有直接關於人參、人參皂苷與 MMPs、HGF 的研究報告，在本實驗中投予 GE 及 GS 後，MMP-9 及 HGF 沉積增加的現象，推測可能與人參的抗發炎作用有關。

依據 Klahr et al.<sup>91</sup> (2000) 的研究結果，NF- $\kappa$ B 會引起 TNF- $\alpha$  的產生，引起發炎反應外，也會促使腎小管細胞產生纖維化前期的 cytokines 並活化纖維母細胞，造成過多的細胞外基質生成，最後導致纖維化。Cho et al.<sup>92</sup> (2001)、Park et al.<sup>50</sup> (2005) 發現 Rb<sub>1</sub> 能夠抑制 NF- $\kappa$ B 及 TNF- $\alpha$  的活化；Wu et al.<sup>72</sup> (2005) 的研究指出 Rg<sub>1</sub> 能夠抑制 NF- $\kappa$ B 及 TNF- $\alpha$  的產生。推測人參及其純成份可能藉由抑制 NF- $\kappa$ B，而抑制 TGF- $\beta$  的活化，進而促進 MMP-9 及 HGF 的表現，使腎功能獲得改善。

在人參濃縮劑方面，綜合各方面測量指標的結果，GE 250 的效果最好，推估人參濃縮劑藥效可能在 250 mg/kg 已達飽和，所以給予 500 mg/kg 時沒有觀察到腎功能有更進一步的改善。

根據本實驗 HPLC 分析結果，人參濃縮劑之 ginsenoside Rg<sub>1</sub>、Rb<sub>1</sub> 與 Rd 含量多寡依序為 Rb<sub>1</sub>>Rg<sub>1</sub>>Rd，此結果與 Soldati et al.(1980) 相符<sup>79</sup>。且分析結果證實本實驗所使用之人參濃縮劑確實含有 ginsenosides，因此可以推論人參濃縮劑對於馬兜鈴酸所造成的腎臟損傷有相當程度之療效。

綜合上述討論，推測 GE 及 GS 在本實驗中治療有效的可能的機轉為：人參具有抗發炎及抗氧化的作用，且人參結構類似類固醇也許能增加體內 corticosterone 含量，而能夠有效治療 AA 引起之腎損傷，抑制腎臟損傷持續進展。

## 伍、結論與建議

經口投予人參濃縮劑可降低小鼠尿蛋白，NAG，BUN，SCr，腎組織鏡檢觀察亦有顯著改善，免疫螢光染色發現 TGF- $\beta$  表現減少，MMP-9 及 HGF 表現增加。顯示人參濃縮劑能減輕 AAN 小鼠腎臟受損情形，其中以人參濃縮劑 250 mg/kg 的效果最好。

在人參皂苷的部分，經口投予人參皂苷可降低小鼠尿蛋白、NAG、BUN 及 SCr，腎組織鏡檢觀察亦有顯著改善。免疫螢光染色發現 TGF- $\beta$  表現減少，MMP-9 及 HGF 表現增加。顯示人參皂苷能減輕 AAN 小鼠腎臟受損情形，綜合以上各方面測量指標的結果，評估治療藥物在本實驗腎炎模型的療效依序為 Rg1、Rb1、Rd。

由於治療藥物的治療時間短及樣本數不足的關係，在本實驗中僅能觀察到人參短期的治療效果，未來可以延長藥物治療的時間，以利更進一步探討其療效之間的差異及可能的有效機轉。

## 誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會計畫編號CCMP97-RD-019 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. Vanherweghem, J. L. et al. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet* 341, 387-391 (1993).
2. Vanhaelen, M., Vanhaelen-Fastre, R., But, P. & Vanherweghem, J. L. Identification of aristolochic acid in Chinese herbs. *Lancet* 343, 174 (1994).
3. Cosyns, J. P. When is "aristolochic acid nephropathy" more accurate than "Chinese herbs nephropathy"? *Kidney International* 61, 1178 (2002).
4. Kabanda, A., Jadoul, M., Lauwerys, R., Bernard, A. & van Ypersele de Strihou, C. Low molecular weight proteinuria in Chinese herbs nephropathy. *Kidney International* 48, 1571-1576 (1995).
5. Nortier, J. L. et al. Proximal tubular injury in Chinese herbs nephropathy: monitoring by neutral endopeptidase enzymuria. *Kidney International* 51, 288-293 (1997).
6. Reginster, F., Jadoul, M. & van Ypersele de Strihou, C. Chinese herbs nephropathy presentation, natural history and fate after transplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation* 12, 81-86 (1997).
7. Martinez, M. C., Nortier, J., Vereerstraeten, P. & Vanherweghem, J. L. Progression rate of Chinese herb nephropathy: impact of *Aristolochia fangchi* ingested dose. *Nephrology Dialysis Transplantation* 17, 408-412 (2002).
8. Depierreux, M., Van Damme, B., Vanden Houde, K. & Vanherweghem, J. L. Pathologic aspects of a newly described nephropathy related to the prolonged use of Chinese herbs. *American Journal of Kidney Diseases* 24, 172-180 (1994).
9. Jackson, L., Kofman, S., Weiss, A. & Brodovsky, H. ARISTOLOCHIC ACID (NSC-50413): PHASE I CLINICAL STUDY. *Cancer Chemotherapy Reports - Part 1* 42, 35-37 (1964).
10. Mengs, U. Acute toxicity of aristolochic acid in rodents. *Archives of Toxicology* 59, 328-331 (1987).
11. Mengs, U. & Stotzem, C. D. Renal toxicity of aristolochic acid in rats as an example of nephrotoxicity testing in routine toxicology. *Archives of Toxicology* 67, 307-311 (1993).
12. Sato, N. et al. Acute nephrotoxicity of aristolochic acids in mice. *Journal of Pharmacy & Pharmacology* 56, 221-229 (2004).

13. Nouwen, E. J., Zhu, M. Q. & Savin, M. in ASN Annual Meeting P1002 (1995).
14. Cosyns, J. P. et al. Chronic aristolochic acid toxicity in rabbits: a model of Chinese herbs nephropathy. *Kidney International* 59, 2164-2173 (2001).
15. Zheng, F., Zhang, X. & Huang, Q. Establishment of model of aristolochic acid-induced chronic renal interstitial fibrosis in rats. *Chung-Hua i Hsueh Tsa Chih* 81, 1095-1100 (2001).
16. DeBelle, F. D. et al. Aristolochic acids induce chronic renal failure with interstitial fibrosis in salt-depleted rats. *Journal of the American Society of Nephrology* 13, 431-436 (2002).
17. 賴榮祥. 原色生藥學 (創譯出版社, 1976) pp.81-85
18. 台灣原住民藥用植物彙編
19. 臺灣藥用植物資源名錄
20. 中華中藥典
21. 臺灣常用藥用植物圖鑑一至三冊
22. 台灣中草藥臨床試驗環境與試驗法規
23. 中醫藥年報第 1-23 期
24. 中醫藥研究計畫成果報告中英文摘要彙編 85-93 年度
25. 臺灣中醫藥願景-行政院衛生署中醫藥委員會簡介
26. 中醫藥管理法規彙編 (2005)
27. 行政院衛生署中醫藥委員會學術暨臨床應用研討會成果會彙編 (2004) (第一-五冊) -中醫學術暨臨床應用研討會成果彙編
28. 臺灣中醫藥發展策略與成果: 行政院衛生署中醫藥委員會成立 10 週年紀念特輯建構臺灣中醫臨床教學訓練環境暨病例教學實務
29. 行政院衛生署中醫藥委員會科技研發策略暨委辦計畫 (1996-2005 年) 研究成果, 傳統醫學與現代醫學對話論壇專輯 (一) 傳統醫學與現代醫學對話的啟動與機制
30. 中醫藥基因體研究及其核心技術訓練 DVD 光碟書 (一)
31. Yun TK. Panax ginseng--a non-organ-specific cancer preventive? *Lancet Oncology* 2001; 2(1):49-55.
32. Baek SH, Piao XL, Lee UJ, et al. Reduction of Cisplatin-induced nephrotoxicity by ginsenosides isolated from processed ginseng in cultured renal tubular cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2006; 29(10):2051-5.
33. Chang YS, Seo EK, Gyllenhaal C, et al. Panax ginseng: a role in cancer therapy? *Integrative Cancer Therapies* 2003; 2(1):13-33.

34. Chan TW, But PP, Cheng SW, et al. Differentiation and authentication of *Panax ginseng*, *Panax quinquefolius*, and ginseng products by using HPLC/MS.[erratum appears in *Anal Chem* 2000 May 15;72(10):2329]. *Analytical Chemistry* 2000; 72(6):1281-7.
35. Nam MH, Kim SI, Liu JR, et al. Proteomic analysis of Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences* 2005; 815(1-2):147-55.
36. Gillis CN, Gillis CN. *Panax ginseng* pharmacology: a nitric oxide link? *Biochemical Pharmacology* 1997; 54(1):1-8.
37. Xie JT, McHendale S, Yuan CS, et al. Ginseng and diabetes. *American Journal of Chinese Medicine* 2005; 33(3):397-404.
38. Kiefer D, Pantuso T, Kiefer D, et al. *Panax ginseng*. *American Family Physician* 2003; 68(8):1539-42.
39. Glenn MB, Lexell J, Glenn MB, et al. Ginseng. *Journal of Head Trauma Rehabilitation* 2003; 18(2):196-200.
40. Kitts D, Hu C, Kitts D, et al. Efficacy and safety of ginseng. *Public Health Nutrition* 2000; 3(4A):473-85.
41. Yu JY, Jin YR, Lee JJ, et al. Antiplatelet and antithrombotic activities of Korean Red Ginseng. *Archives of Pharmacal Research* 2006; 29(10): 898-903.
42. Hattori T, Nagamatsu T, Ito M, et al. Studies on antinephritic effect of TJ-8014, a new Japanese herbal medicine, and its mechanisms (1): Effects on original-type anti-GBM nephritis in rats and platelet aggregation. *Japanese Journal of Pharmacology* 1989; 50(4):477-85.
43. Han SW, Kim H. Ginsenosides stimulate endogenous production of nitric oxide in rat kidney. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1996; 28(5):573-80.
44. Hiai S, Yokoyama H, Oura H, et al. Stimulation of pituitary- adrenocortical system by ginseng saponin. *Endocrinologia Japonica* 1979; 26(6):661-5.
45. Zuin M, Battezzati PM, Camisasca M, et al. Effects of a preparation containing a standardized ginseng extract combined with trace elements and multivitamins against hepatotoxin-induced chronic liver disease in the elderly. *Journal of International Medical Research* 1987; 15(5): 276-81.
46. Sotaniemi EA, Haapakoski E, Rautio A, et al. Ginseng therapy in non-insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes Care* 1995; 18(10):1373-5.
47. Kim SH, Park KS. Effects of *Panax ginseng* extract on lipid metabolism in



- humans. *Pharmacological Research* 2003; 48(5): 511-3.
48. Huang KC. *The Pharmacology of Chinese Herbs*. 1999.
49. Ong YC, Yong EL. Panax (ginseng)--panacea or placebo? Molecular and cellular basis of its pharmacological activity. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 2000; 29(1):42-6.
50. Park EK, Shin YW, Lee HU, et al. Inhibitory effect of ginsenoside Rb1 and compound K on NO and prostaglandin E2 biosyntheses of RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2005; 28(4):652-6.
51. Zhang HS, Wang SQ, Zhang H-S, et al. Ginsenoside Rg1 inhibits tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced human arterial smooth muscle cells (HASMCs) proliferation. *Journal of Cellular Biochemistry* 2006; 98(6):1471-81.
52. Park JK, Namgung U, Lee CJ, et al. Calcium-independent CaMKII activity is involved in ginsenoside Rb1-mediated neuronal recovery after hypoxic damage. *Life Sciences* 2005; 76(9):1013-25.
53. Radad K, Gille G, Moldzio R, et al. Ginsenosides Rb1 and Rg1 effects on mesencephalic dopaminergic cells stressed with glutamate. *Brain Research* 2004; 1021(1):41-53.
54. Radad K, Gille G, Moldzio R, et al. Ginsenosides Rb1 and Rg1 effects on survival and neurite growth of MPP+-affected mesencephalic dopaminergic cells. *Journal of Neural Transmission* 2004; 111(1):37-45.
55. Mook-Jung I, Hong HS, Boo JH, et al. Ginsenoside Rb1 and Rg1 improve spatial learning and increase hippocampal synaptophysin level in mice. *Journal of Neuroscience Research* 2001; 63(6):509-15.
56. Ohashi R, Yan S, Mu H, et al. Effects of homocysteine and ginsenoside Rb1 on endothelial proliferation and superoxide anion production. *Journal of Surgical Research* 2006; 133(2):89-94.
57. Lee HU, Bae EA, Han MJ, et al. Hepatoprotective effect of ginsenoside Rb1 and compound K on tert-butyl hydroperoxide-induced liver injury. *Liver International* 2005; 25(5):1069-73.
58. Hasegawa H, Uchiyama M, Hasegawa H, et al. Antimetastatic efficacy of orally administered ginsenoside Rb1 in dependence on intestinal bacterial hydrolyzing potential and significance of treatment with an active bacterial metabolite. *Planta Medica* 1998; 64(8):696-700.
59. Cheng Y, Shen LH, Zhang JT, et al. Anti-amnestic and anti-aging effects of

- ginsenoside Rg1 and Rb1 and its mechanism of action. *Acta Pharmacologica Sinica* 2005; 26(2):143-9.
60. Park KH, Shin HJ, Song YB, et al. Possible role of ginsenoside Rb1 on regulation of rat liver triglycerides. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2002; 25(4):457-60.
61. Smolinski AT, Pestka JJ, Smolinski AT, et al. Modulation of lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine production in vitro and in vivo by the herbal constituents apigenin (chamomile), ginsenoside Rb(1) (ginseng) and parthenolide (feverfew). *Food & Chemical Toxicology* 2003; 41(10):1381-90.
62. Joo SS, Won TJ, Lee DI, et al. Reciprocal activity of ginsenosides in the production of proinflammatory repertoire, and their potential roles in neuroprotection in vivo. *Planta Medica* 2005; 71(5): 476-81.
63. Yokozawa T, Iwano M, Dohi K, et al. Inhibitory effects of ginseng on proliferation of cultured mouse mesangial cells. *Nippon Jinzo Gakkai Shi Japanese Journal of Nephrology* 1994; 36(1):13-8.
64. Choi SS, Lee JK, Han EJ, et al. Effect of ginsenoside Rd on nitric oxide system induced by lipopolysaccharide plus TNF-alpha in C6 rat glioma cells. *Archives of Pharmacal Research* 2003; 26(5):375-82.
65. Lee JK, Choi SS, Lee HK, et al. Effects of ginsenoside Rd and decursinol on the neurotoxic responses induced by kainic acid in mice. *Planta Medica* 2003; 69(3):230-4.
66. Shi Q, Hao Q, Bouissac J, et al. Ginsenoside-Rd from *Panax notoginseng* enhances astrocyte differentiation from neural stem cells. *Life Sciences* 2005; 76(9):983-95.
67. Yokozawa T, Liu ZW, Dong E, et al. A study of ginsenoside-Rd in a renal ischemia-reperfusion model. *Nephron* 1998; 78(2):201-6.
68. Yokozawa T, Owada S. Effect of ginsenoside- Rd in cephaloridine-induced renal disorder. *Nephron* 1999; 81(2):200-7.
69. Yokozawa T, Liu ZW. The role of ginsenoside-Rd in cisplatin-induced acute renal failure. *Renal Failure* 2000; 22(2): 115-27.
70. Leung KW, Yung KK, Mak NK, et al. Neuroprotective effects of ginsenoside-Rg1 in primary nigral neurons against rotenone toxicity. *Neuropharmacology* 2007; 52(3):827-35.
71. Chen XC, Zhou YC, Chen Y, et al. Ginsenoside Rg1 reduces MPTP-induced substantia nigra neuron loss by suppressing oxidative stress. *Acta*

- Pharmacologica Sinica 2005; 26(1):56-62.
72. Wu CF, Bi XL, Yang JY, et al. Differential effects of ginsenosides on NO and TNF-alpha production by LPS-activated N9 microglia. *International Immunopharmacology* 2007; 7(3):313-20.
  73. Gong YS, Chen J, Zhang QZ, et al. Effect of 17beta-oestradiol and ginsenoside on osteoporosis in ovariectomised rats. *Journal of Asian Natural Products Research* 2006; 8(7):649-56.
  74. Kimura Y, Okuda H, Arichi S. Effects of various ginseng saponins on 5-hydroxytryptamine release and aggregation in human platelets. *Journal of Pharmacy & Pharmacology* 1988; 40(12):838-43.
  75. Hattori T, Suzuki Y, Ito M, et al. [Studies on antinephritic effects of plant components in rats (2): Effects of ginsenosides on original-type anti-GBM nephritis in rats and its mechanisms]. *Nippon Yakurigaku Zasshi - Folia Pharmacologica Japonica* 1991; 97(2):127-34.
  76. Leung KW, Cheng YK, Mak NK, et al. Signaling pathway of ginsenoside-Rg1 leading to nitric oxide production in endothelial cells. *FEBS Letters* 2006; 580(13):3211-6.
  77. Krumbiegel G, Hallensleben J, Mennicke WH, et al. Studies on the metabolism of aristolochic acids I and II. *Xenobiotica* 1987; 17(8):981-91.
  78. Vanherweghem JL, Abramowicz D, Tielemans C, et al. Effects of steroids on the progression of renal failure in chronic interstitial renal fibrosis: a pilot study in Chinese herbs nephropathy. *American Journal of Kidney Diseases* 1996; 27(2):209-15.
  79. F. Soldati and O. Sticher. HPLC Separation and Quantitative Determination of Ginsenosides from *Panax ginseng*, *Panax quinquefolium* and from Ginseng Drug Preparations. *Journal of Medicinal Plant Research* 1980; 38: 348-357.
  80. Sato N, Takahashi D, Chen SM. Acute nephrotoxicity of aristolochic acids in mice. *Journal of Pharmacy & Pharmacology* 2004; 56(2):221-9.
  81. Mengs U. Acute toxicity of aristolochic acid in rodents. *Archives of Toxicology* 1987; 59(5):328-31.
  82. Yokozawa T, Zhou JJ, Hattori M, et al. Effects of ginseng in nephrectomized rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 1994; 17(11):1485-9.
  83. Kabanda A, Jadoul M, Lauwerys R, et al. Low molecular weight proteinuria in Chinese herbs nephropathy. *Kidney International* 1995; 48(5):1571-6.
  84. Jung CH, Seog HM, Choi IW, et al. Effects of wild ginseng (*Panax ginseng*

- C.A. Meyer) leaves on lipid peroxidation levels and antioxidant enzyme activities in streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 98(3):245-50.
85. Chung SH, Choi CG, Park SH. Comparisons between white ginseng radix and rootlet for antidiabetic activity and mechanism in KKAY mice. *Archives of Pharmacal Research* 2001; 24(3):214-8.
86. Kimura M, Waki I, Chujo T, et al. Effects of hypoglycemic components in ginseng radix on blood insulin level in alloxan diabetic mice and on insulin release from perfused rat pancreas. *Journal of Pharmacobio- Dynamics* 1981; 4(6):410-7.
87. Yang L, Li XM, Wang HY. A comparative study of manchurian Dutchmanspipe and antibiotics induced acute tubular necrosis in renal cellular biological features. *Chinese journal of integrated traditional and Western medicine* 2003; 23(5):329-34.
88. Li B, Li XM, Zhang CY, et al. Cellular mechanism of renal proximal tubular epithelial cell injury induced by aristolochic acid I and aristololactam I. *Journal of Peking University Health sciences* 2004; 36(1):36-40.
89. Okada H, Watanabe Y, Inoue T, et al. Transgene-derived hepatocyte growth factor attenuates reactive renal fibrosis in aristolochic acid nephrotoxicity. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2003; 18(12): 2515-23.
90. Hattori T, Fujitsuka N, Kurogi A, et al. [Effect of Onpi-to (TJ-8117) on TGF-beta 1 in rats with 5/6 nephrectomized chronic renal failure.]. *Nippon Jinzo Gakkai Shi Japanese Journal of Nephrology* 1996; 38(11): 475-83.
91. Klahr S, Morrissey JJ. The role of vasoactive compounds, growth factors and cytokines in the progression of renal disease. *Kidney International - Supplement* 2000; 75:S7-14.
92. Cho JY, Yoo ES, Baik KU, et al. In vitro inhibitory effect of protopanaxadiol ginsenosides on tumor necrosis factor (TNF)-alpha production and its modulation by known TNF-alpha antagonists. *Planta Medica* 2001; 67(3):213-8.

柒、圖、表

圖一、人參濃縮劑在此腎炎模型之尿蛋白含量分析。

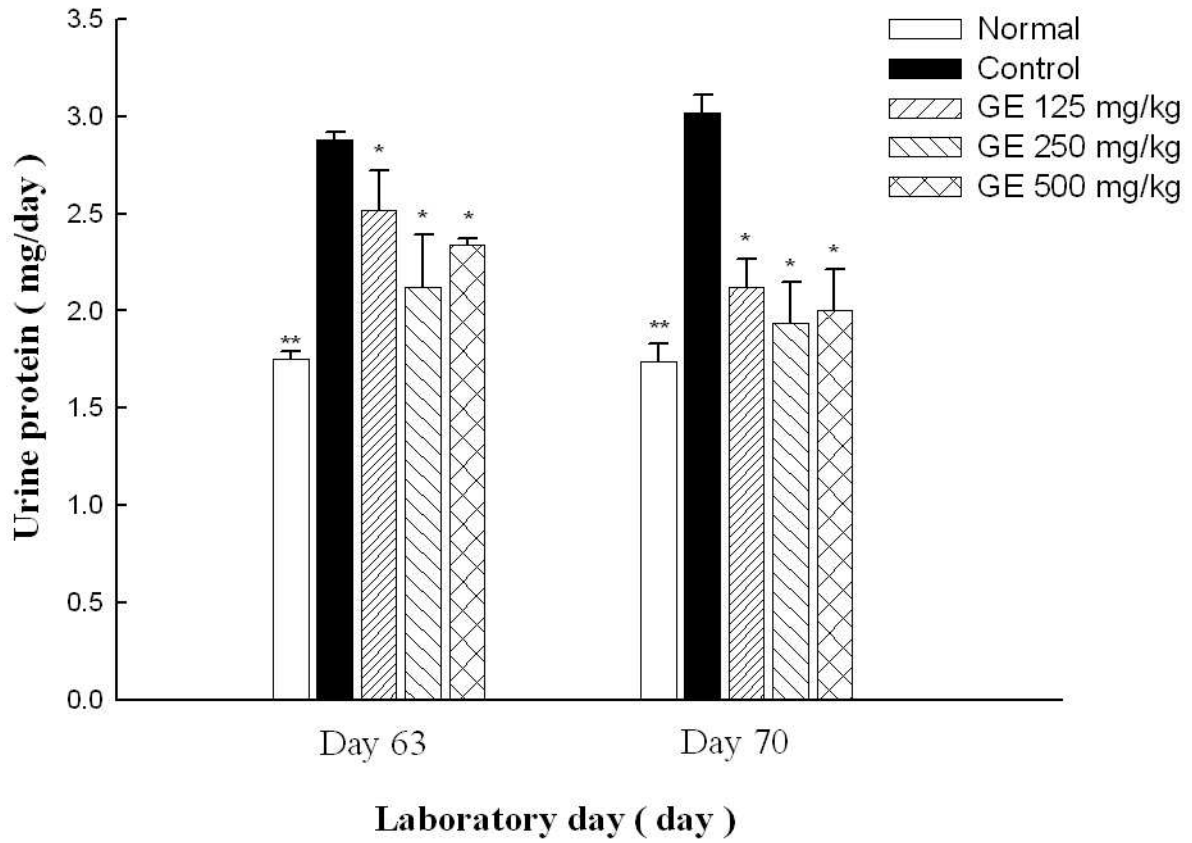


Fig 1 Effect of ginseng extract (GE) on urine protein excretion in AAN mice. Treated with 125, 250 and 500 mg/kg of GE significantly decreased the excretion of urine protein on day 63 and day 70.

\* $P < 0.05$  vs. the control group by Mann-Whitney U test.

\*\* $P < 0.01$  vs. the control group by Mann-Whitney U test.

圖二、Ginsenosides 在此腎炎模型之尿蛋白含量分析。

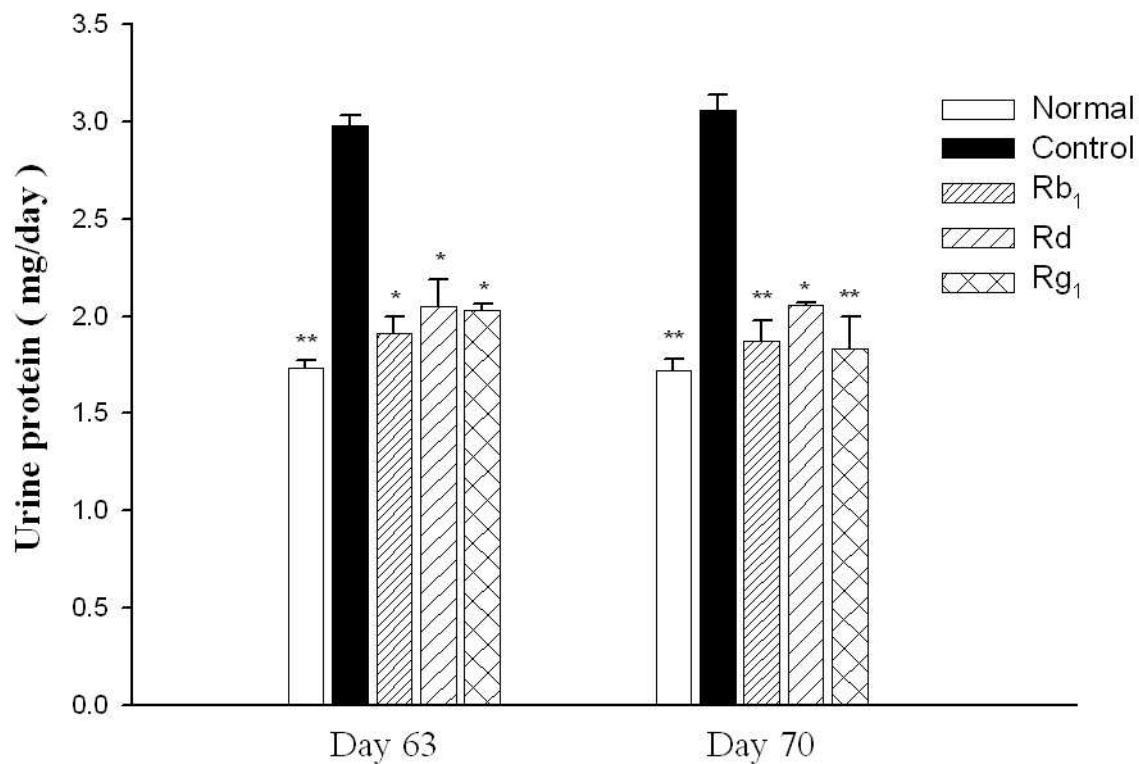


Fig 2 Effect of ginsenosides (GS) on urine protein excretion in AAN mice. Treated with Rb<sub>1</sub>, Rd and Rg<sub>1</sub> 5 mg/kg of GS significantly decreased the excretion of urine protein on day 63 and day 70.

\* $P < 0.05$  vs. the control group by Mann-Whitney U test.

\*\* $P < 0.01$  vs. the control group by Mann-Whitney U test

圖三、人參濃縮劑在此腎炎模型之 NAG 含量分析。

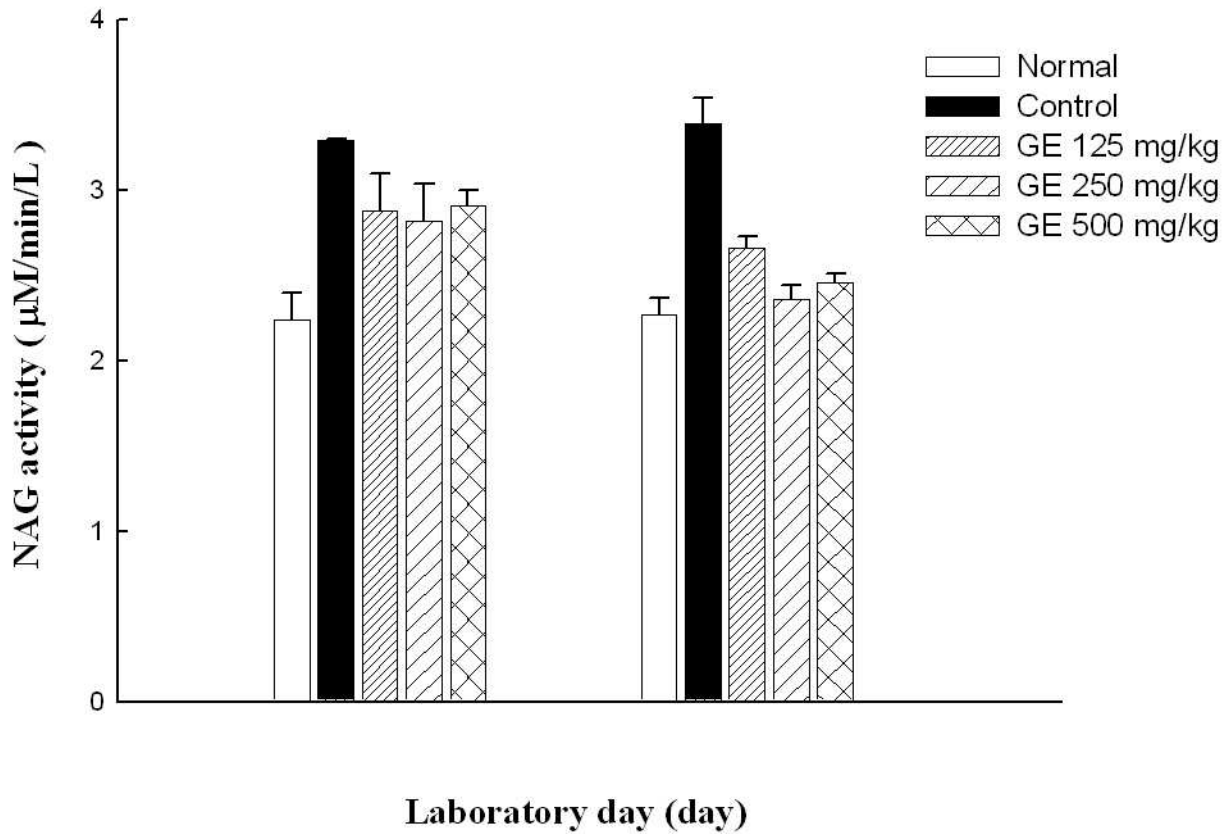


Fig 3 Effect of ginseng extract (GE) on urine NAG excretion in AAN mice. Treated with 125, 250, 500 mg/kg of GE significantly decreased the excretion of NAG on day 63 and day 70.

\* $P < 0.05$  vs. the control group by Mann-Whitney U test.

\*\* $P < 0.01$  vs. the control group by Mann-Whitney U test.

圖四、Ginsenosides 在此腎炎模型之 NAG 含量分析。

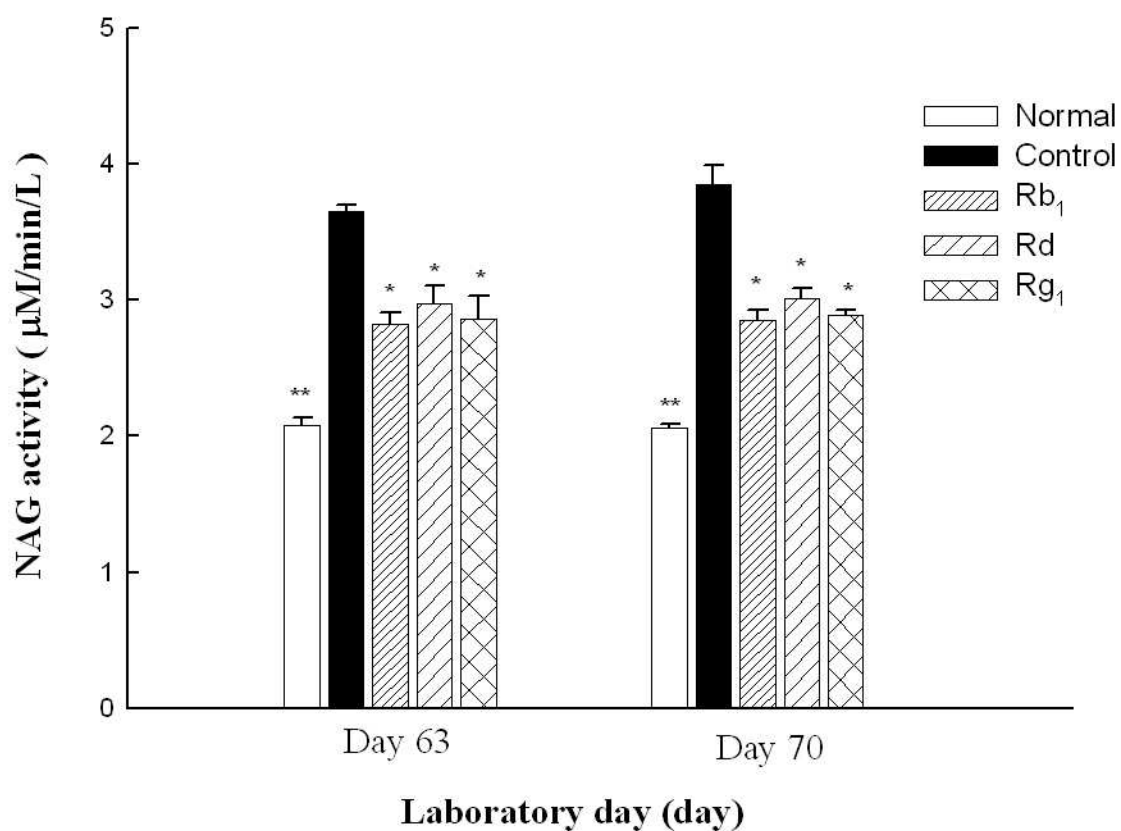


Fig 4 Effect of ginsenosides (GS) on urine NAG excretion in AAN mice. Treated with Rb<sub>1</sub>, Rd and Rg<sub>1</sub> 5 mg/kg of GS significantly decreased the excretion of NAG on day 63 and day 70.

\* $P < 0.05$  vs. the control group by Mann-Whitney U test.

\*\* $P < 0.01$  vs. the control group by Mann-Whitney U test



圖五、人參濃縮劑在此腎炎模型之腎組織病理變化情形。

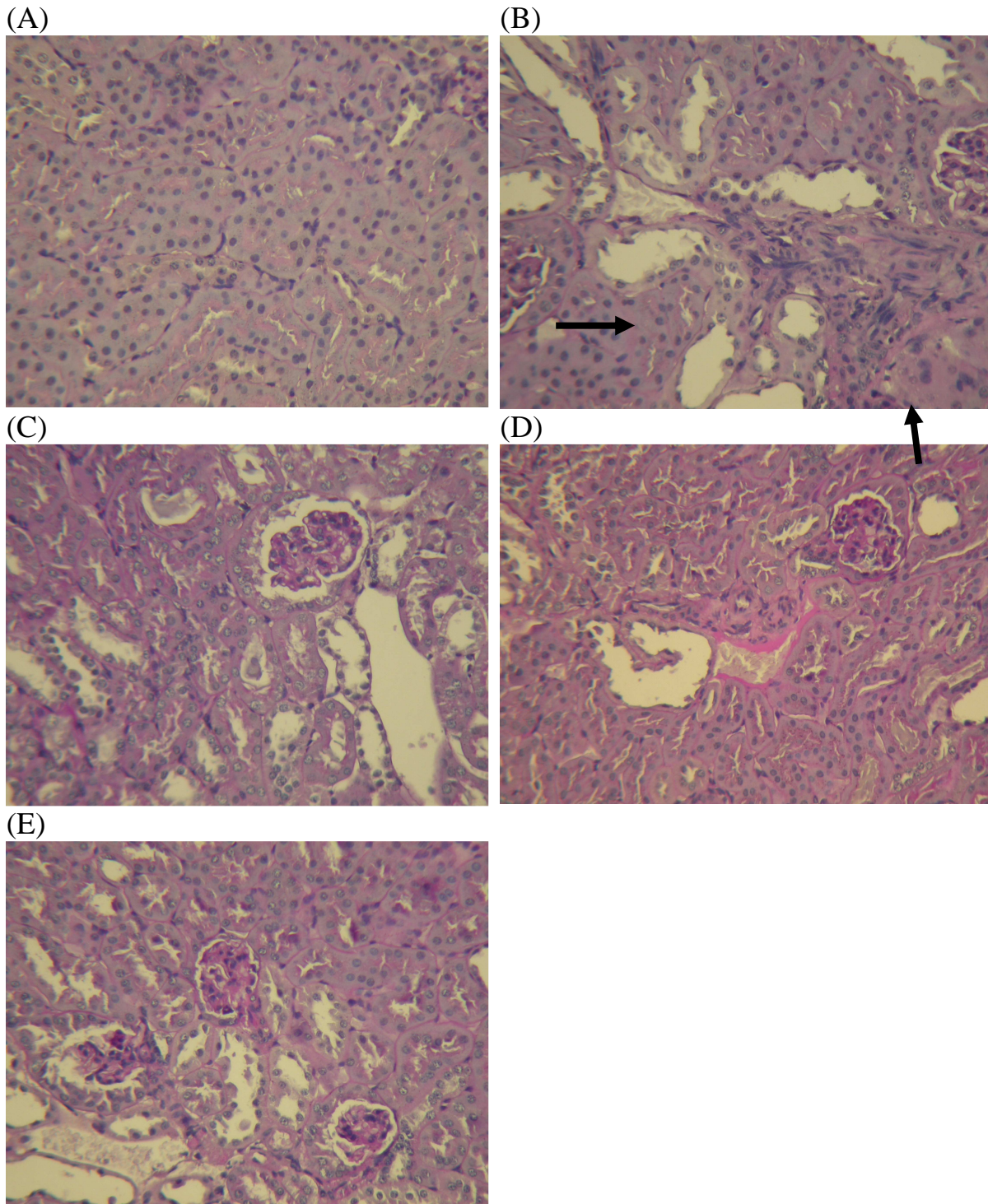


Fig 5 Light microscopy findings of renal tissue of normal group (A), control group (B) and treatment group (125 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg/kg) (C, D, E ), respectively. The GE treated groups demonstrated the amelioration of tubulointerstitial damage, such as tubular cell atrophy, cell infiltration into interstitium and interstitial fibrosis. Arrows indicate the tubulointerstitial damage of renal tissue. (PAS stain, x 200)

圖六、Ginsenosides 在此腎炎模型之腎組織病理變化情形。

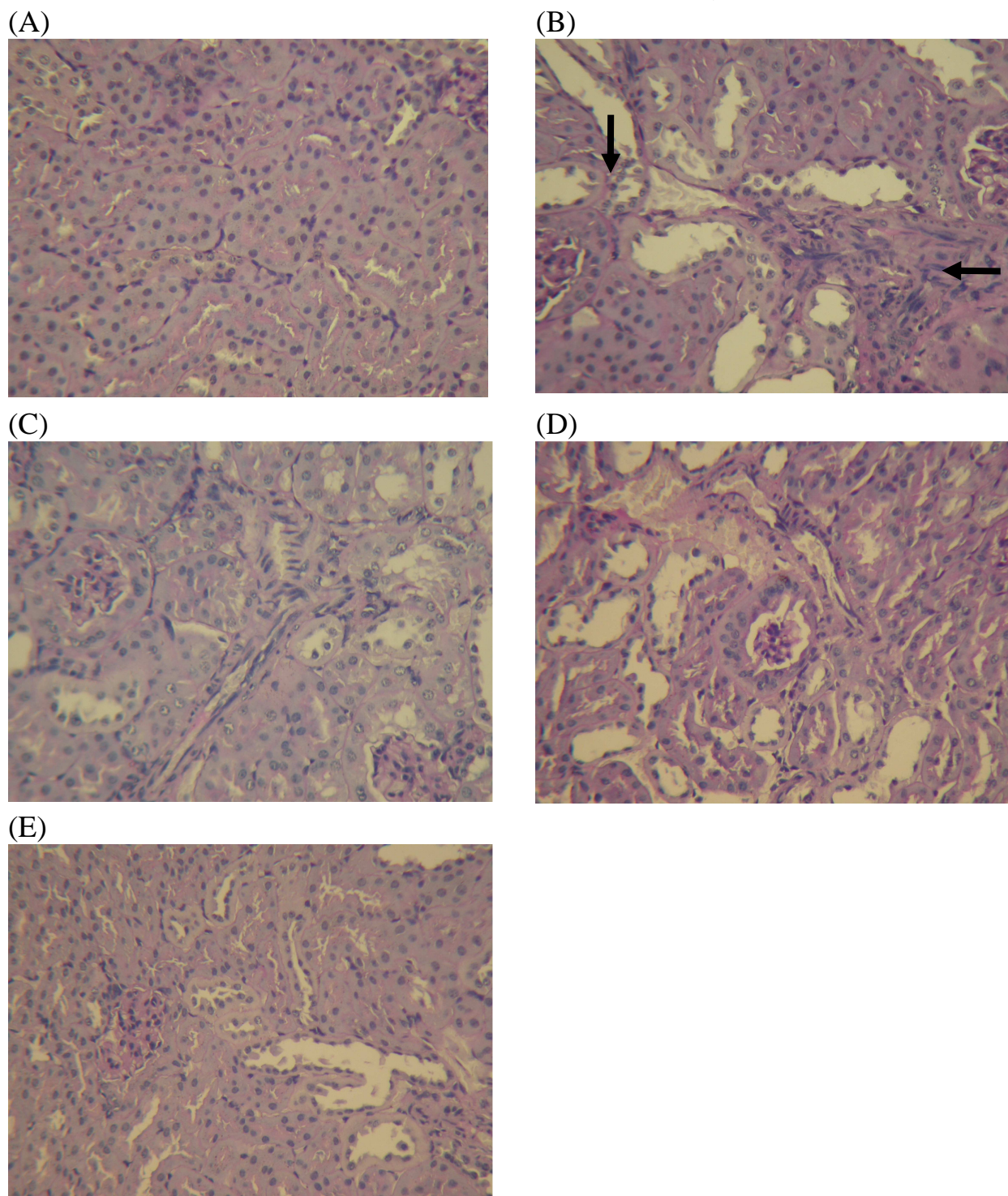


Fig 6 Light microscopy findings of renal tissue of normal group (A), control group (B) and treatment group (5mg/kg of ginsenoside Rb1, Rd, Rg1) (C, D,E), respectively. The GS treated groups demonstrated the amelioration of tubulointerstitial damage, such as cell infiltration into interstitium, tubular cell atrophy and interstitial fibrosis. Arrows indicate the tubulointerstitial damage of renal tissue. (PAS stain, x 200)

圖七、人參濃縮劑在此腎炎模型之組織損傷量化分析。

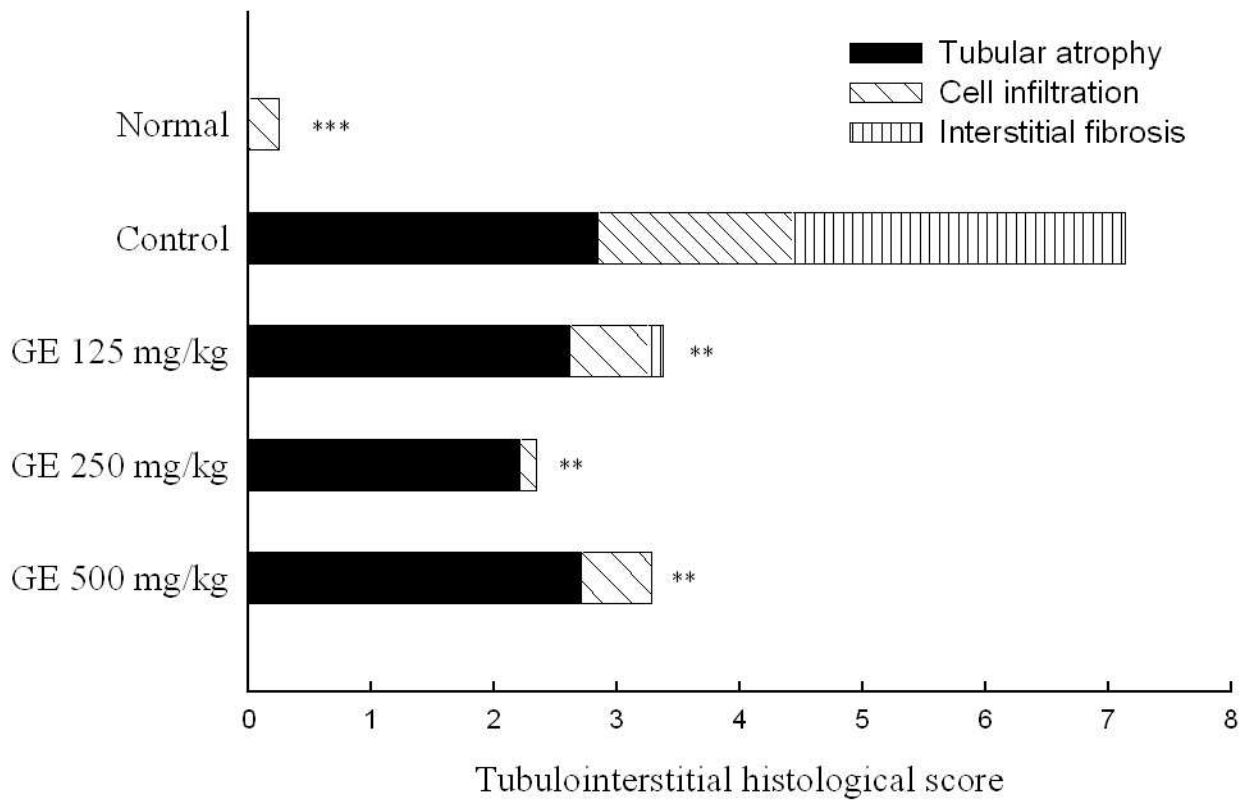


Fig 7 Tubulointerstitial histological score (TIHS) of GE treated groups. Treated with 125, 250, 500 mg/kg of GE significantly decreased tissue damage on day 70.

\*\* $P < 0.01$  vs. the control group by Mann-Whitney U test.

\*\*\*  $P < 0.001$  vs. the control group by Mann-Whitney U test.

圖八、Ginsenosides 在此腎炎模型之組織損傷量化分析。

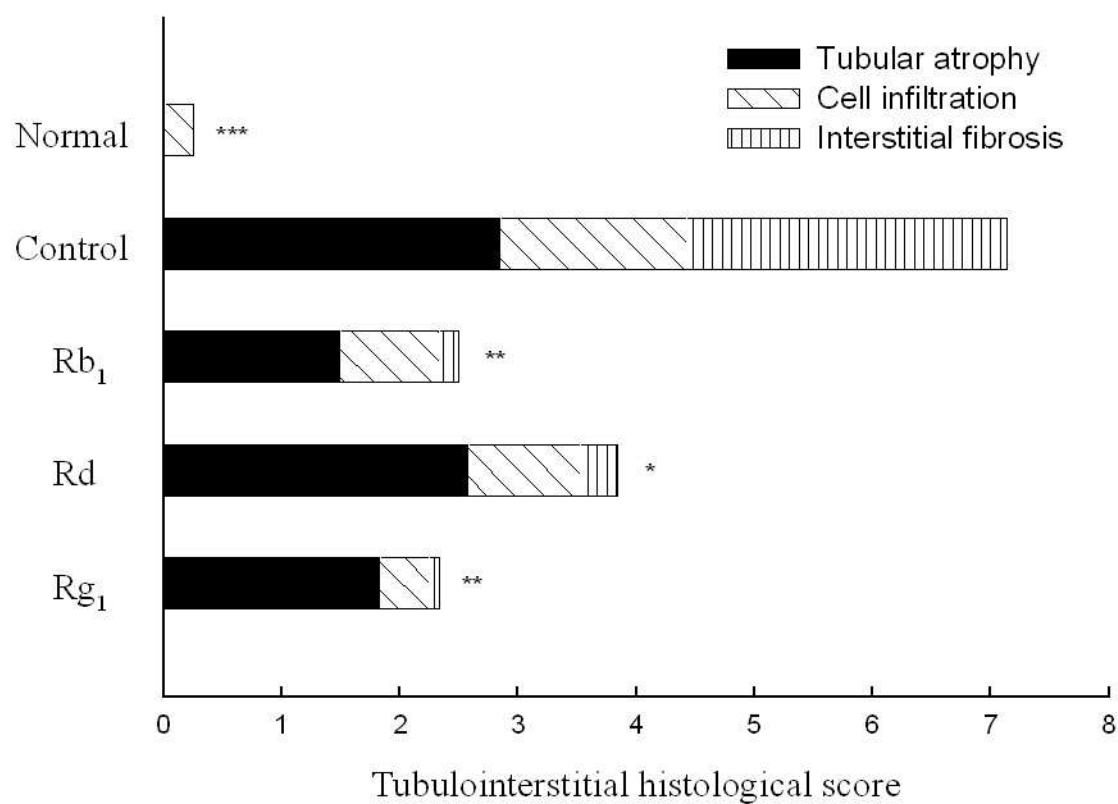


Fig 8 Tubulointerstitial histological score (TIHS) of ginsenosides (GS) treated groups. Treated with 5 mg/kg of GS Rb1, Rd, Rg1 significantly decreased tissue damage on day 70.

\* $P < 0.05$  vs. the control group by Mann-Whitney U test.

\*\* $P < 0.01$  vs. the control group by Mann-Whitney U test.

\*\*\*  $P < 0.001$  vs. the control group by Mann-Whitney U test.

圖九、人參在此腎炎模型之免疫螢光染色變化情形。

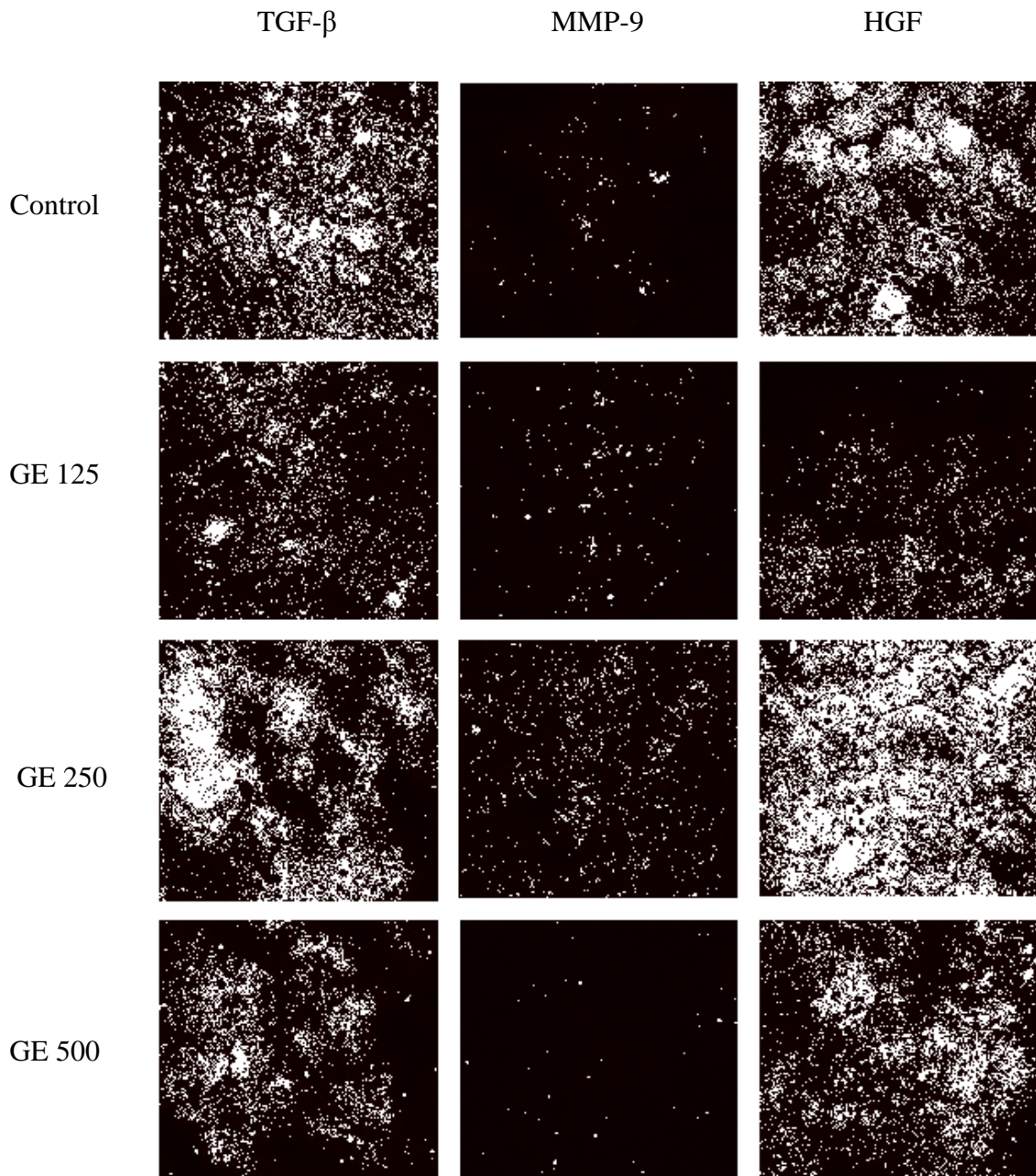


Fig 9 Confocal images of immunofluorescence stain of tubular interstitium of control group and others treated with 125 mg/kg, 250 mg/kg, and 500 mg/kg of GE, respectively. The red color demonstrated the presence of TGF- $\beta$ , MMP-9 and HGF in the injury site.

圖十、人參在此腎炎模型之免疫螢光染色定量分析。

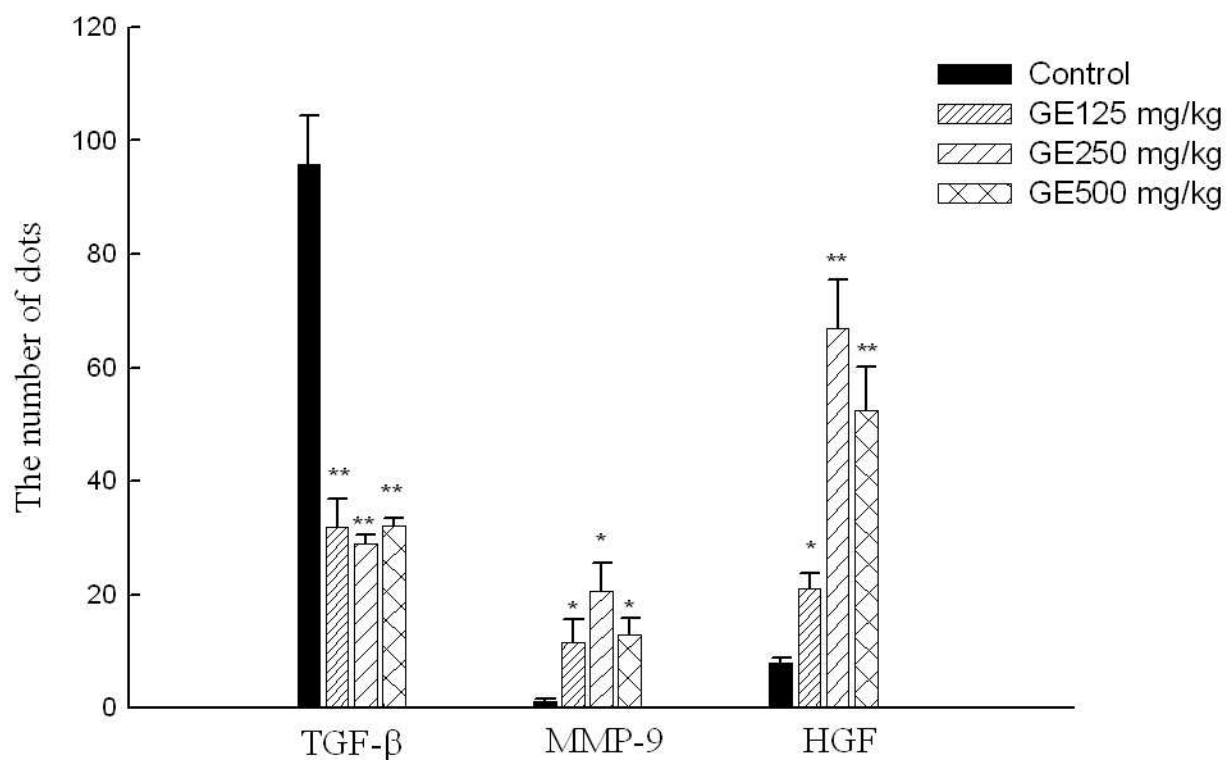


Fig 10 Quantification of TGF-β, MMP-9, HGF of experimental and control groups. The fluorescence dots of TGF-β were significantly decreased and MMP-9, HGF were significantly increased in experimental group on day 70.

\* $P < 0.05$  vs. the control group by Mann-Whitney U test.

\*\* $P < 0.01$  vs. the control group by Mann-Whitney U test.

圖十一、Ginsenosides 在此腎炎模型之免疫螢光染色變化情形。

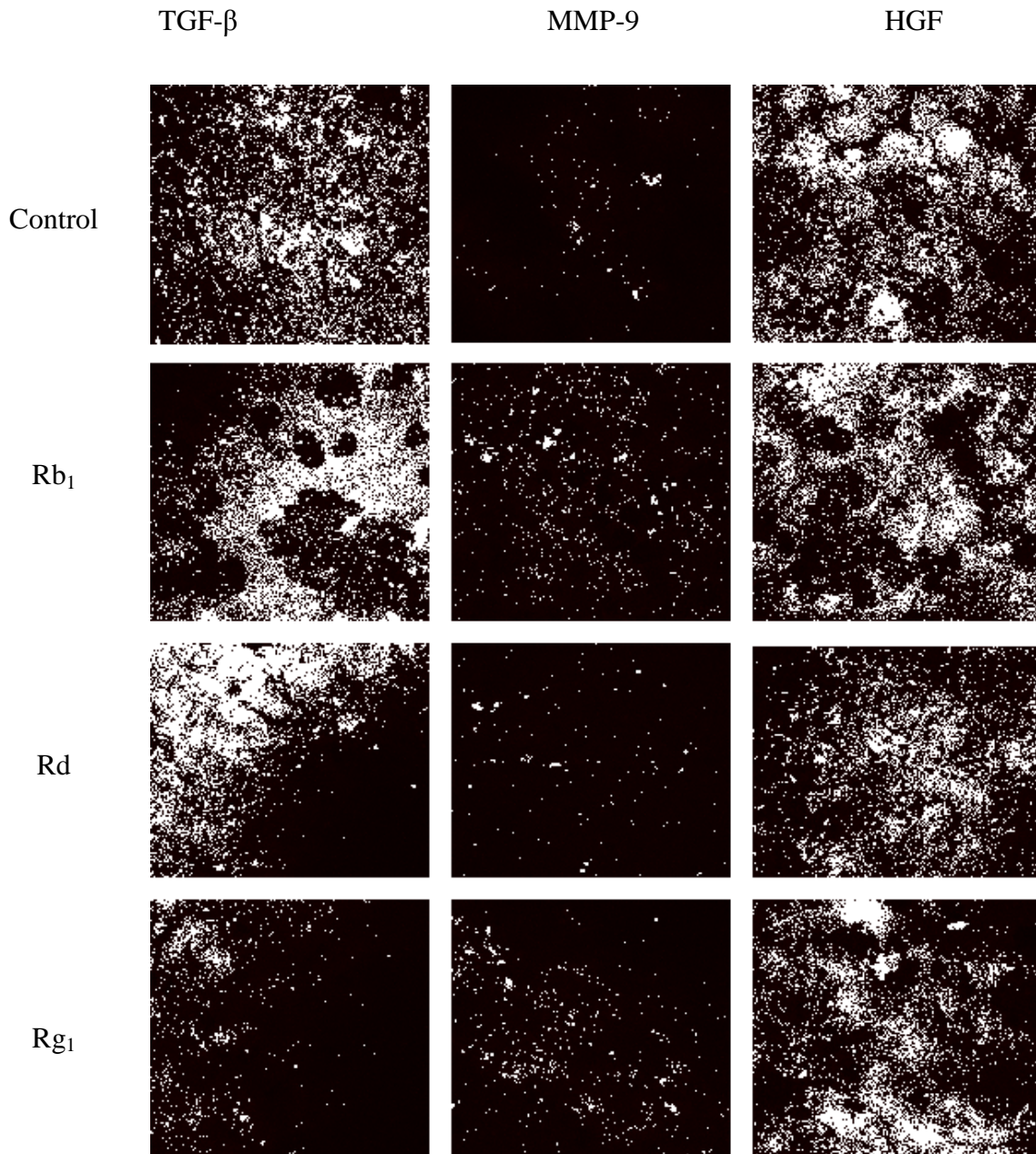


Fig 11 Confocal images of immunofluorescence stain of tubular interstitium of control group and others treated with 5 mg/kg of GS Rb<sub>1</sub>, Rd, Rg<sub>1</sub>, respectively. The red color demonstrated the presence of TGF- $\beta$ , MMP-9 and HGF in the injury site

圖十二、Ginsenosides 在此腎炎模型之免疫螢光染色定量分析。

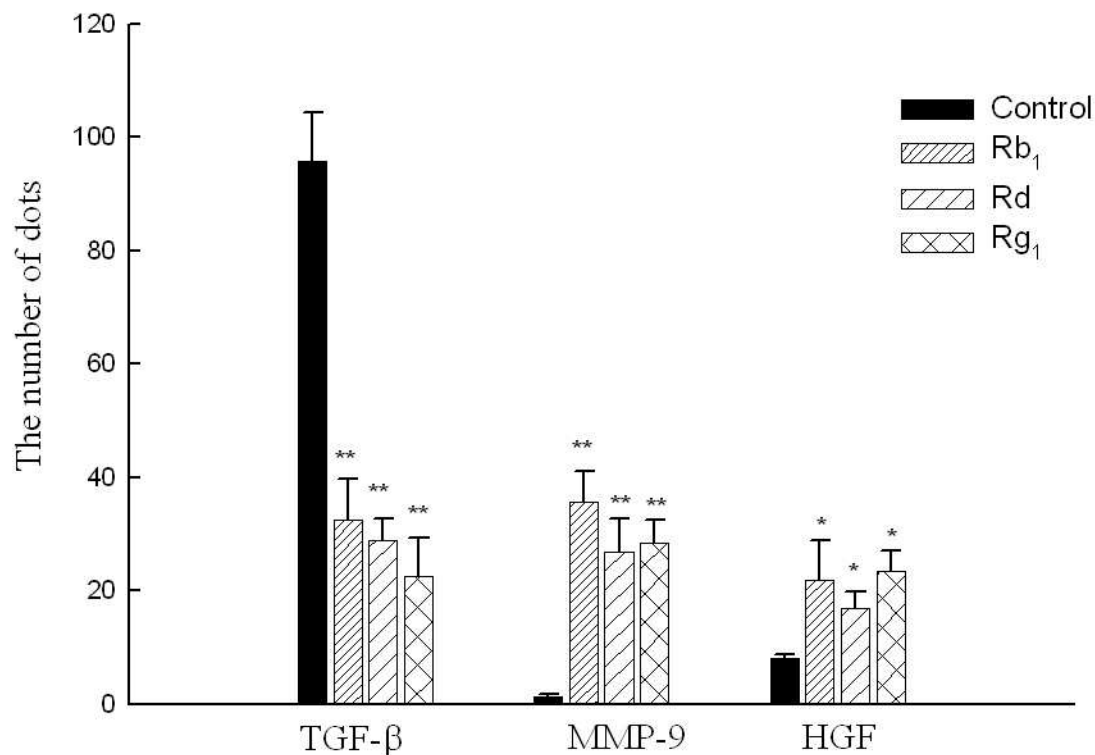


Fig 12 Quantification of TGF-β, MMP-9, HGF of experimental and control groups. The fluorescence dots of TGF-β were significantly decreased and MMP-9, HGF were significantly increased in experimental group on day 70.

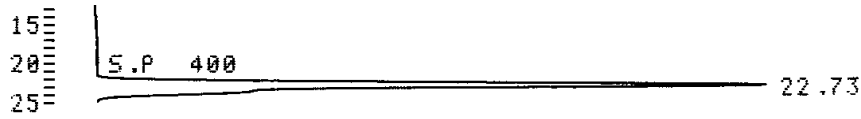
\* $P < 0.05$  vs. the control group by Mann-Whitney U test.

\*\* $P < 0.01$  vs. the control group by Mann-Whitney U test.

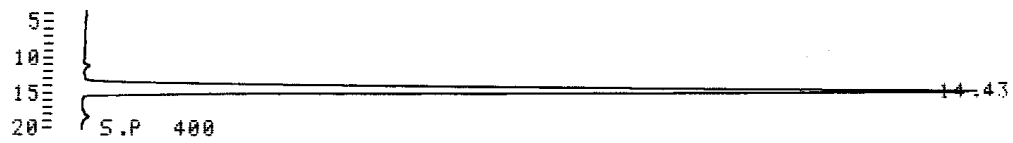


圖十三、Ginsenosides(Rg1, Rb1, Rd)及人參濃縮劑(Ginseng extract, GE)之 HPLC 圖譜。

(A) Ginsenoside Rg1 (1mg/ml)



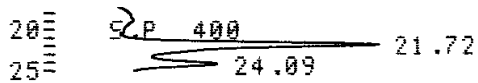
(B) Ginsenoside Rb1 (1mg/ml)



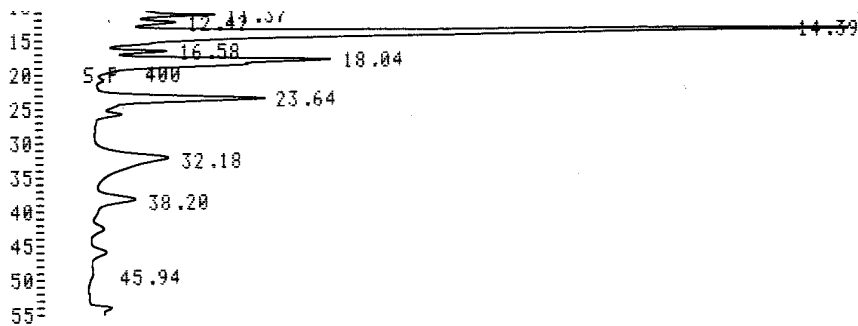
(C) Ginsenoside Rd (0.5mg/ml)



(D) GE (100mg/ml), 移動相條件為 Acetonitrile:H<sub>2</sub>O=20:80



(E) GE (100mg/ml), 移動相條件為 Acetonitrile:H<sub>2</sub>O=30:70



圖十四、Ginsenoside Rg1 之檢量線線性關係圖。

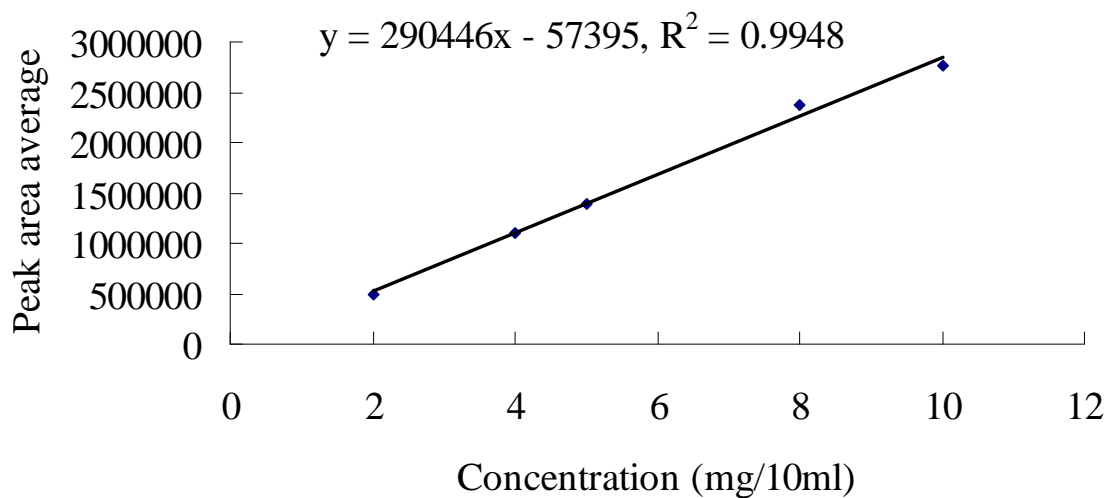


Fig 14 Calibration curve of ginsenoside Rg1 (n=6)

圖十五、Ginsenoside Rb1 之檢量線線性關係圖。

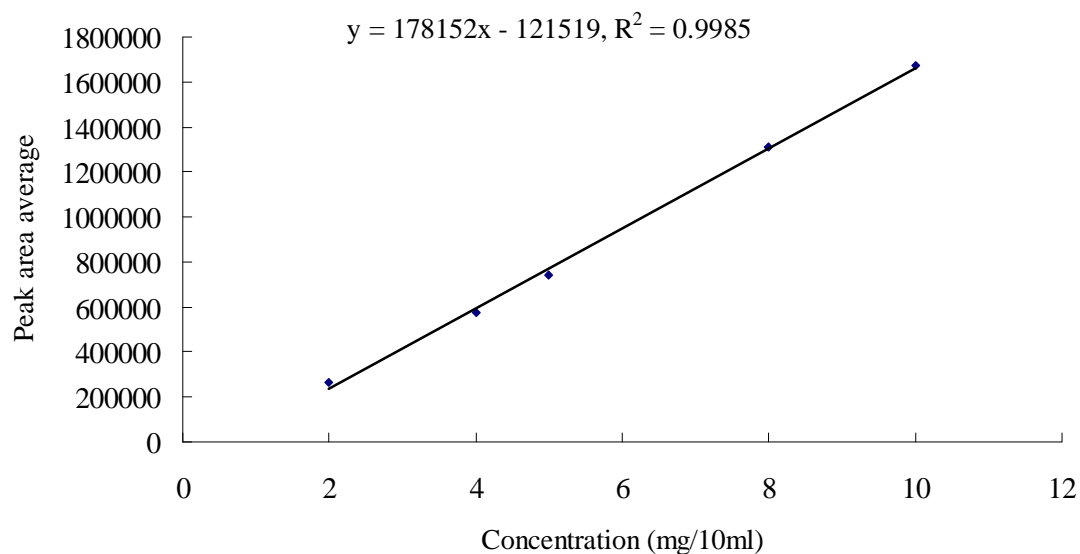


Fig 15 Calibration curve of ginsenoside Rb1 (n=6)

圖十六、Ginsenoside Rd 之檢量線線性關係圖。

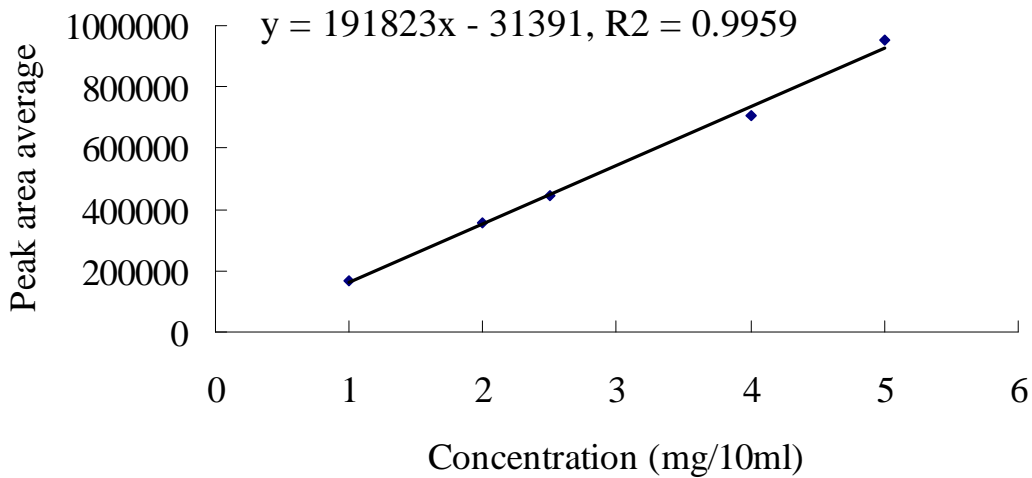


Fig 16 Calibration curve of ginsenoside Rd (n=6)

表一、人參濃縮劑在此腎炎模型之血清 BUN 及 Creatinine 值。

Treatment (n=10/ group)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
Normal	18.33±1.97**	0.25±0.05**
Control	23.75±2.06	0.40±0.01
GE 125 mg/kg	21.25±0.96	0.38±0.04
GE 250 mg/kg	20.00±1.22*	0.33±0.04*
GE 500 mg/kg	23.33±1.15	0.36±0.05

\*P < 0.05 vs. the control group by Mann-Whitney U test.

\*\*P < 0.01 vs. the control group by Mann-Whitney U test.

表二、Ginsenosides 在此腎炎模型之血清 BUN 及 Creatinine 值。

Treatment (n=10/ group)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
Normal	17.69±0.51**	0.27±0.05 **
Control	22.55±1.08	0.38±0.04
Rb <sub>1</sub> 5 mg/kg	19.50±1.29*	0.30±0.01*
Rd 5 mg/kg	17.40±1.52**	0.33±0.05
Rg <sub>1</sub> 5 mg/kg	20.50±0.58*	0.30±0.01*

\*P < 0.05 vs. the control group by Mann-Whitney U test.

\*\*P < 0.01 vs. the control group by Mann-Whitney U test.

表三、人參濃縮劑在此腎炎模型之血糖值。

Treatment (n=10/ group)	Blood glucose (mg/dL)
Normal	128.00±4.24*
Control	141.70±5.81
GE 125 mg/kg	122.00±2.65*
GE 250 mg/kg	122.00±6.24*
GE 500 mg/kg	130.00±4.36*

\*P < 0.05 vs. the control group by Mann-Whitney U test.

表四、Ginsenosides 在此腎炎模型之血糖值。

Treatment (n=10/ group)	Blood glucose (mg/dL)
Normal	127.75±4.27*
Control	142.20±1.92
Rb <sub>1</sub> 5 mg/kg	132.00±3.46*
Rd 5 mg/kg	137.75±9.74
Rg <sub>1</sub> 5 mg/kg	131.75±2.36*

\*P < 0.05 vs. the control group by Mann-Whitney U test.

\*\*P < 0.01 vs. the control group by Mann-Whitney U test.

表五、Ginsenoside Rg1 同日內分析之精密度與準確度

Spike concentration (mg/ml)	Calculated concentration (mg/ml)	CV (%)	error (%)
0.2	0.211±0.015	6.88	5.66
0.4	0.401±0.017	4.27	0.28
0.5	0.478±0.017	3.56	-4.49
0.8	0.798±0.028	3.47	-0.20
1.0	1.008±0.015	1.48	0.78

CV : Coefficient of variation

表六、Ginsenoside Rg1 異日內分析之精密度與準確度

Spike concentration (mg/ml)	Calculated concentration (mg/ml)	CV (%)	error (%)
0.2	0.211±0.014	6.52	5.70
0.4	0.396±0.013	3.28	-1.07
0.5	0.495±0.033	6.57	-0.90
0.8	0.790±0.031	3.92	-1.25
1.0	1.010±0.012	1.21	1.03

CV : Coefficient of variation

表七、Ginsenoside Rb1 同日內分析之精密度與準確度

Spike concentration (mg/ml)	Calculated concentration (mg/ml)	CV (%)	error (%)
0.2	0.195±0.003	1.74	-2.41
0.4	0.415±0.012	2.93	3.71
0.5	0.488±0.005	1.09	-2.46
0.8	0.783±0.035	4.49	-2.08
1.0	1.023±0.034	3.37	2.31

CV : Coefficient of variation

表八、Ginsenoside Rb1 異日內分析之精密度與準確度

Spike concentration (mg/ml)	Calculated concentration (mg/ml)	CV (%)	error (%)
0.2	0.207±0.011	5.22	3.58
0.4	0.396±0.012	2.99	-1.10
0.5	0.485±0.020	4.19	-3.09
0.8	0.807±0.034	4.27	0.88
1.0	0.999±0.020	2.04	-0.08

CV : Coefficient of variation

表九、Ginsenoside Rd 同日內分析之精密度與準確度

Spike concentration (mg/ml)	Calculated concentration (mg/ml)	CV (%)	error (%)
0.10	0.1059±0.0094	8.84	5.92
0.20	0.2011±0.0061	3.04	0.57
0.25	0.2420±0.0081	3.35	-3.21
0.40	0.3895±0.0074	1.90	-2.64
0.50	0.5120±0.0001	0.01	2.40

CV : Coefficient of variation

表十、Ginsenoside Rd 異日內分析之精密度與準確度

Spike concentration (mg/ml)	Calculated concentration (mg/ml)	CV (%)	error (%)
0.1	0.1041±0.0039	3.73	4.08
0.2	0.2008±0.0087	4.33	0.39
0.25	0.2480±0.0083	3.36	-0.78
0.4	0.3862±0.0111	2.89	-3.44
0.5	0.5109±0.0073	1.43	2.17

CV : Coefficient of variation

表十一、人參濃縮劑之 ginsenosides (Rg1 , Rb1 , Rd)含量分析

Test drug	ginsenosides (Rg1 , Rb1 , Rd)/ ginseng extract (%)
Ginseng extract (100mg/ml)	0.3510±0.0248 (Rg1)
	0.7810±0.0875 (Rb1)
	0.2635±0.0211 (Rd)