

編號：CCMP95-TP-015

馬兜鈴酸腎症在純系小鼠的確立與柴胡在此腎炎模型的藥效評估

許光陽
台灣藥學會

摘要

研究目的：

近年來中藥減肥藥引起腎衰竭的報導非常的頻繁，其中原因之一是誤用含馬兜鈴酸的植物造成馬兜鈴酸腎病變(aristolochic acid nephropathy, AAN)。其受損部位侷限於近曲小管，除了明顯的間質纖維化，腎小管萎縮，還有輕微細胞浸潤的情形。本研究藉由長期投予純系小鼠低劑量 aristolochic acid (AA)成功誘發與人類 AAN 相似的腎炎，並評估柴胡(Bupleuri Radix)及 prednisolone 等對 AAN 的改善效果。

研究方法：

純系小鼠 C3H/He (6weeks, males)連續 28 天飲水給予 3.0 μ g/mL AAs 後停藥，恢復正常飲用水觀察 14 天，對照組在實驗期間投予正常飲用水。藥效評估實驗依前述方法給予 28 天 AAs 後，連續 14 天經口投予柴胡濃縮劑 (BR) 150, 300, 450 mg/kg，柴胡成分 saikosaponin A, C, D, prednisolone (P), 柴胡濃縮劑 300 mg/kg 併用 P，對照組則給予蒸餾水。

測定尿蛋白，N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG)與血中尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)，來評估小鼠腎功能；腎組織使用 PAS 染色觀察病理組織改變，及進行免疫螢光染色(巨噬細胞，TGF- β ，MMPs)以辨識損傷部位之特異性抗原。

結果與討論：

實驗結果顯示，藉由飲用水連續給予 28 天 AA 會造成尿蛋白、NAG 及 BUN、血糖值輕微上昇；腎組織鏡檢發現腎小管萎縮、間質有細胞浸潤和輕微纖維化的情形，免疫螢光染色發現腎小管間質巨噬細胞、TGF- β 表現明顯增加，MMP-9 也有些許表現，此外，腎臟受損的情形在停止投予 AA 後不但沒有恢復，反而有

惡化的情形。在投予柴胡濃縮劑 300mg/kg, saikosaponin A, D, P, 柴胡濃縮劑併用 P 等五組之尿蛋白, NAG, BUN, 血糖值都有降低; 組織學觀察發現腎小管萎縮、間質細胞浸潤和纖維化的情形皆有緩解, 根據以上結果發現本研究中的療效依序是柴胡濃縮劑併用 P, P, 柴胡濃縮劑 300mg/kg, saikosaponin D 與 saikosaponin A。因此利用生藥製劑與化學藥品的合併療法可以提供未來臨床上治療的新方向。

關鍵詞：馬兜鈴酸腎病變、柴胡、巨噬細胞、乙型轉型生長因子、基質金屬蛋白分解酶

Number: CCMP95-TP-015

Establishment of the Aristolochic Acid Nephropathy in Inbred Mice and Effect of Bupleuri Radix on the Nephritis

Kuang-Yang Hsu

The Pharmaceutical Society of Taiwan

ABSTRACT

Aim:

Nephrotoxicity induced by weight-control Chinese medicine was reported frequently in recent years. One of the factors is mistaken the herb that contains aristolochic acid (AA). Aristolochic acid nephropathy (AAN) is a unique type of nephropathy, which was characterized by an extensive interstitial fibrosis with rare cell infiltration and tubular atrophy. We tried to establish a chronic interstitial fibrosis model of AAN in inbred mice and investigated the impact of Bupleuri Radix, prednisolone on AAN.

Method:

Aristolochic acid (AA) dissolved in distilled water (3 μ g/ml) were administered orally to C3H/He mice (6 weeks, male) as drinking water ad libitum for 4 weeks, control group were treated with distilled water. In the second experiment, they were administered orally with Bupleuri Radix extract (BR) (150, 300, 450 mg/kg), saikosaponin A, C, D, prednisolone (P), BR 300 mg/kg combine with P once a day for 14 days. The control group was treated with distilled water.

Urinary protein, urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG), blood urea nitrogen (BUN), blood glucose were determined. Renal tissues were served to histological examination (PAS stain and immunofluorescence staining). The antibodies, including murine F4/80 macrophage, TGF- β (transforming growth factor- β), MMP-9 (matrix metalloproteinase-9) was chosen to recognize the specific antigens, which deposited in injury sites.

Results & Discussion:

All animals given AA developed elevation of urinary protein, NAG, BUN, blood glucose. The histological examination was observed the typical AAN: tubular atrophy, interstitial infiltration and fibrosis. In the immunofluorescence stain assay, macrophage, TGF- β , MMP-9 were localized in the renal tissue. After discontinuation of AA, renal function was not improved.

The amount of urinary protein, NAG, BUN, blood sugar were decreased in the BR 300 mg/kg, saikosaponin A, D, P, BR combine with P-treated groups compared with the control group. The histological examination was observed the alleviation in all treatment groups. The staining areas of macrophage, MMP-9 in the interstitium were significantly increased, and TGF- β was decreased among all groups. Our result demonstrate the therapeutics effect of the treatment as following: BR combine with P have more prior effect than P, BR 300 mg/kg, saikosaponin D, saikosaponin A. This present study offers a new therapeutic trend of utilizing the crude drug preparation with medicine.

Keywords: Aristolochic acid nephropathy (AAN), Bupleuri Radix, macrophage, TGF- β (transforming growth factor- β), MMP-9 (matrix metalloproteinase-9)

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 模型評估柴胡 (Bupleuri Radix)及其成分 saikosaponin A, C, D、延胡索及葛根湯等是否含有腎毒性。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)¹。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 AA²，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)³。

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 1- microglobulin, β 2- 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⁴⁻⁶。

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⁶、體內的累積劑量皆成正比¹⁴，與停藥到發病診斷的時間間隔成反比⁶。

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^{3,8}。

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⁹；Mengs¹⁰ (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.¹¹ (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- β -glucosaminidase (NAG), γ -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.¹² (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.¹³ (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.¹⁴ (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.¹⁵ (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.¹⁶ (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。

柴胡 (Bupleuri Radix)

柴胡(Bupleuri Radix)屬繖形科(Umbelliferae)，為多年生草本植物的乾燥根，目前台灣市場品主要分為：(1)北柴胡(*Bupleurum chinense* De Candolle)；(2)南柴胡(*Bupleurum scorzoneraefolium* WILLd)；(3)竹葉柴胡(Bupleuri Herba)，又名春柴胡，基原與北柴胡相同，本實驗使用的是南柴胡，又名軟柴胡、香柴胡、軟苗柴胡。柴胡自古即常被用來作為解熱、消炎藥，收載於神農本草經的上品，其記載為：「味苦，平，主治心腹，去腸胃中結氣，飲食積聚，寒熱邪氣，推陳致新，久服輕身名目益精。」在日本著名臨床家吉益東洞所著的藥徵中提到柴胡的藥能為「主治胸脇苦滿，往來寒熱，腹中痛，兼治黃疸。」¹⁷⁻³⁰

柴胡的成分有 saponin (約 3%) : saikosaponin A, B₁, B₂, C, D, E, F (如圖五)，其中 B₁, B₂ 是 A, D 加水分解得到的二次生成物；脂肪酸(fatty acid) : stearic acid, oleic acid, linolic acid, linolenic acid；其他：碳水化合物，flavonoids, α -spinasterol, stigmaserol 等³¹。

柴胡的藥效研究

目前研究柴胡的藥理作用有抑制中樞神經、抗發炎、抗潰瘍、改善肝機能障礙、改善脂質代謝、抑制腎炎、調節免疫機能、抗腫瘤及類 steroid 等作用¹⁷⁻³¹。

柴胡及其成份 saikosaponin 對於 CCl₄^{32,33}, β -D-galactosamine (D-GalN), acetaminophen, ethanol³⁴, ANIT (α -naphthylisothiocyanate), ADCC (antibody dependant cell-mediated cytotoxicity)及活性化 macrophage 引起的肝損害及慢性肝炎均有改善及修復作用。Abe et al.³⁵ (1982)發現事先給予 saikosaponin D 能改善 CCl₄ 誘發之大鼠肝臟損傷，為了進一步了解 saikosaponin D 的療效，Abe et al.³² (1985)使用 pentobarbital 增強 CCl₄ 誘發之大鼠肝機能障礙，發現 saikosaponin D 能降低肝小胞體系酵素(NADPH-cytochrome C reductase)活性，抑制大鼠的肝障害。Chiang et al.³⁵ (2003)利用由人類肝癌細胞 (hepatocellular carcinoma cell) Hep G2 cell 衍生出的 2.2.25 cell line，研究 saikosaponin 細胞毒殺及抗 B 肝病毒的功效，結果發現 saikosaponin C 能抗 B 肝病毒，而 saikosaponin D 雖然不能抑制 B 肝病毒的活性卻能毒殺肝癌細胞。Yen et al.³⁵ (2005)以 dimethylnitrosamine 誘發大鼠肝臟機能障礙的研究指出，柴胡能降低肝臟發炎、纖維化的情形，並增加肝細胞的再生能力。

臨床上，含柴胡之小柴胡湯常與五苓散併用 (又稱柴苓湯) 來治療各種腎炎及腎病症候群，柴胡及所含之 saikosaponin 對腎臟有類 steroid 樣免疫

改善及 steroid 增強作用，也能直接作用於腎絲球基底膜而減少尿蛋白。Abe et al.³⁷ (1986) 以 puromycin aminonucleoside (PA) 誘發大鼠腎炎的研究指出，saikosaponin D 能降低尿蛋白、減少腎絲球上皮足細胞的死亡或融和；Hattori et al.³⁸ (1989) 發現柴胡能降低抗腎絲球基底膜腎炎引起的腎絲球細胞增殖性變化 (hypercellularity)，增加體內 corticosterone 含量³⁹；Hattori et al.⁴⁰ (1991) 發現 saikosaponin A, D 能降低抗腎絲球基底膜腎炎引起的蛋白尿和腎臟損傷；Li et al.⁴¹ (1997) 發現柴胡和 saikosaponin D 能降低 1-22-3 單株抗體(monoclonal antibody) 腎炎所引起的蛋白尿、並且能抑制 mesangial cell 增生與 mesangial matrix 擴展。臨床上也發現使用類固醇劑治療腎症候群的病人，併用 saikosaponin 時，能防止種種之副作用及增強抗炎症效果，且預後良好。

據 Kumazawa et al.⁴² (1989) 證實腹腔給予小鼠 saikosaponin A, D 會活化腹腔巨噬細胞進行吞噬作用(phagocytosis)、促進細胞溶酶體酵素的釋放等，而 saikosaponin C 則不會活化巨噬細胞。Ushio et al.⁴³ (1991) 肌肉注射給予小鼠 saikosaponin D 後，收集其巨噬細胞做成細培養基，觀察其對真菌的吞噬作用，發現給予 saikosaponin D 會明顯增加巨噬細胞的吞噬作用。Ushio et al.⁴⁸ (1991) 的另一個研究發現，saikosaponin D 藉由促進巨噬細胞分泌 interleukin-1 (IL-1)，酸性磷酸酶(acid phosphatase)來活化 T 細胞的淋巴組織增生反應、抑制 B 細胞的淋巴組織增生反應。

據 Hiai et al.⁴⁵ (1981) 證實，腹腔給予大鼠 saikosaponin A, D 使體內 adrenocorticotrophic hormone (ACTH) 和 corticosterone 的含量明顯上升。Nose et al.⁴⁶ (1989) 發現腹腔及口服給予小鼠 saikosaponin A, D 及其代謝物會促使體內 corticosterone 的值上升，而腹腔給藥的效果又比口服投予來的強；由於柴胡的純成分 saikosaponin A, D 會促使體內 corticosterone 上升，因此 Ushio et al.⁴⁴ (1991) 推測其柴胡的抗發炎作用可能和其類 steroid 作用有關。

Yamamoto et al.⁴⁷ (1975) 發現 saikosaponin A, D 雖然會增加脂質及膽固醇之生合成，但是也會加速及排除，因此對於高膽固醇血症之大鼠有降膽固醇及三酸甘油脂的作用。Cheng et al.⁴⁸ (2004) 以高膽固醇飼料餵食大鼠，發現以柴胡為主的處方能改善大鼠高血脂的情形。

In vitro 實驗發現，saikosaponin A 會誘導 p53 引起 p21 的轉錄 (transcription)，抑制 CDK-mediated phosphorylation，使細胞週期中止於 G0/G1 期，此外，Saikosaponin A 也會降低 Bax, Bcl-2, c-myc 蛋白的表現、增加 Bax/Bcl-2 的比例，而引起細胞凋亡⁴⁹。Saikosaponin D 除了會增加 p53 和 p21 的表現，使細胞週期停止在 G1 期，也會藉著增加 glucocorticoid receptor (GR)⁵⁰，c-myc, p53 mRNA，降低 Bcl-2 mRNA 的含量引起細胞凋亡⁵¹。

Saikosaponin C 的構造為 glucose-glucose-rhamnose 三糖，與 saikosaponin A, D 的 glucose-fructose 雙糖結構不同，可能是結構的差異，saikosaponin C 沒有抑制癌症細胞生長的作用⁵²，但 Shyu et al.⁵³ (2004) 發現 saikosaponin C 能藉由活化第二型基質金屬蛋白分解酶(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、血管內皮細胞生長因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 促進血管新生 (angiogenesis)。

延胡索 (*Corydalis Tuber*)

最早記載在唐代『本草拾遺』其基原為罌粟科 (Papaveraceae) 的 *Corydalis turtschaninovii* Besser forma *yanhusuo* Y.H.Chou et C.C. Hsu 之塊莖，主要產地為中國、朝鮮、日本。主要成分為生物鹼類 l-corydaline, dehydrocorydaline, protopine, dl-tetrahydropalmatisine, bulbocapnine, coptisine 等成分。用於鎮痛、鎮痙、活血藥¹⁸⁻³⁰。

延胡索的藥效研究

延胡索小鼠經口投予 dl-Tetrahydropalmatine (THP) 及 d-corydaline 有鎮痛效果。其 l-THP 可使小鼠有鎮靜效果可延長睡眠⁵⁴，將 Bulbocapnine 皮下注射在天竺鼠亦有鎮靜安眠作用⁵⁵⁻⁵⁶。在老鼠的試驗使用 DHC 發現有強力抑制胃酸分泌作用，具有抗胃潰瘍作用⁵⁷⁻⁶⁰。Protopine, d-corydaline, l-tetrahydrocolumbamine, glaucine 具有血液凝固抑制作用⁶¹⁻⁶²、延胡索乙醇抽出物有具備抗炎症、抗過敏反應作用⁶³⁻⁶⁴。

葛根湯 (Gee Gen Tong)

出典為傷寒論，組成藥物為葛根、麻黃、桂枝、芍藥、甘草、大棗、生薑。主治太陽病、項背几几、無汗惡風、亦治太陽陽明合病下痢。應用於感冒、蓄膿症、神經痛。此為外感無汗惡寒項背強急時之發汗劑，作感冒藥使用之機會最多，且有著效。並可治結腸炎與赤痢初起，發熱有惡寒者¹⁸⁻³⁰。

葛根湯的藥效研究

其水抽出液對於老鼠的發熱，抗炎症有效對於 PGE₂ 的遊離抑制效果類似 aspirin 的效果⁶⁵⁻⁶⁶。對於流行性感感冒病毒及 HSV 有阻斷不活化的效果抑制，同時可抑制 Interleukin- α ⁶⁷⁻⁷¹。同時具免疫抗過敏可活化 macrophage 作用影響細胞性免疫⁷²，中樞作用方面可回復 phenobabital 引起的睡眠作用⁷³。

貳、材料與方法

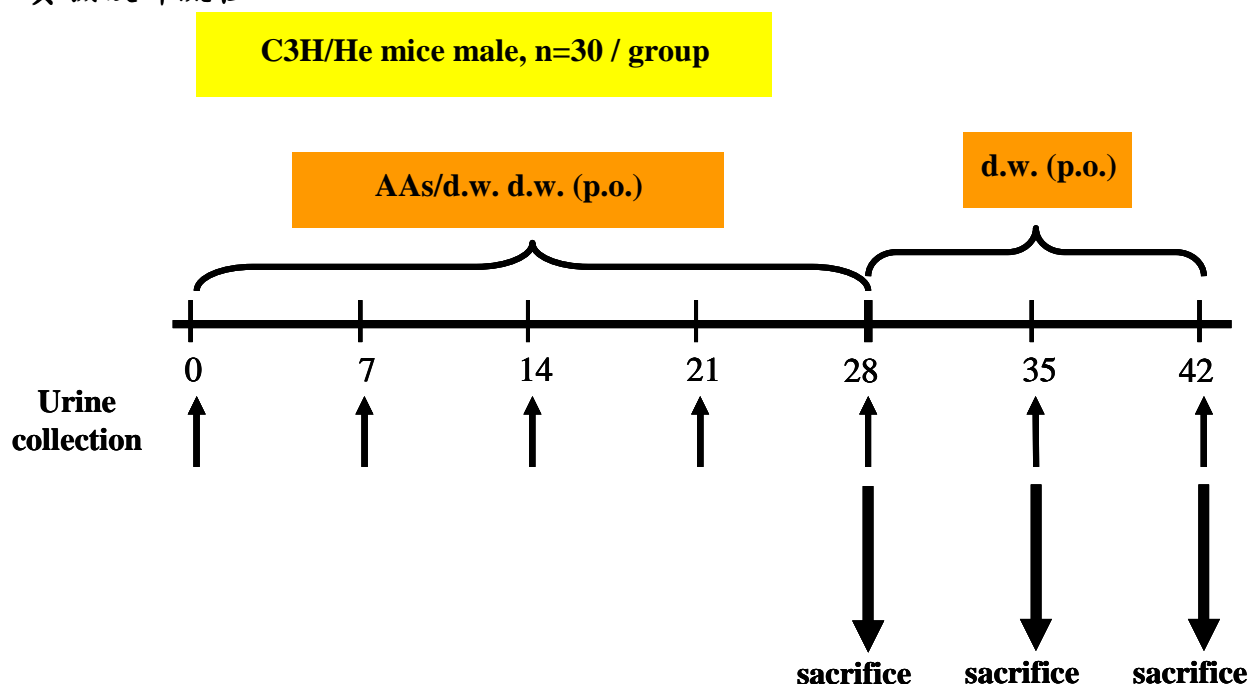
實驗動物

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。

實驗設計

實驗開始前，每隻鼠的每日平均飲水量約為 3.5ml。將 Aristolochic acid sodium salt (AAs; AAI: AAI = 63:31) (Sigma Inc., USA) 5mg/kg 溶於蒸餾水 (distilled water, d.w.) 當作飲用水給予小鼠，連續投予 28 天後恢復正常飲用水觀察兩週，對照組在實驗期間給予正常飲用水。為了瞭解 AAN 和正常小鼠的病生理狀態，實驗第 28 天、35 天、42 天，每週犧牲各組 10 隻動物，實驗組及對照組動物每組各 30 隻，共 60 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 28、35、42 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，經 15 分鐘離心取得血清，進一步作 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 Inc., 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 CO₂(s)冷凍法製作冷凍切片 (frozen section)，利用 CO₂(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(6μm)先行脫蠟，水洗 10~20 秒，浸泡於 0.5% 過碘酸溶液(periodic acid, HIO₄)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, NaHSO₃)，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 0-4 點分 4 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分數。

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 F4/80 (Serotec Inc., USA), TGF-β, MMP-9 (Santa Cruz Inc., California)以 PBS 適當稀釋分別加在各組織上，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 goat anti-rat IgG, rabbit anti-goat IgG, rabbit anti-goat IgG (Santa Cruz Inc., California)，染色後用 PBS 連續清洗 3 次，風乾，最後以 90 % glycerol 封蓋，使用共軛焦雷射掃描式顯微鏡 (FV500, Olympus, Tokyo, Japan)，以氬氬綠雷射為光源，設定激發光 543 nm、發射光 585nm，觀察組織中 Macrophage, TGF-β, MMP-9 的沉積情形，所得影像以 FluoView 軟體分析 (version 4.0, Olympus, Tokyo, Japan)。

統計方法

數據以 mean±SD 表示，實驗之尿蛋白、NAG 含量與血清中 BUN、血糖值的結果採用 Mann-Whitney U test 方法統計。

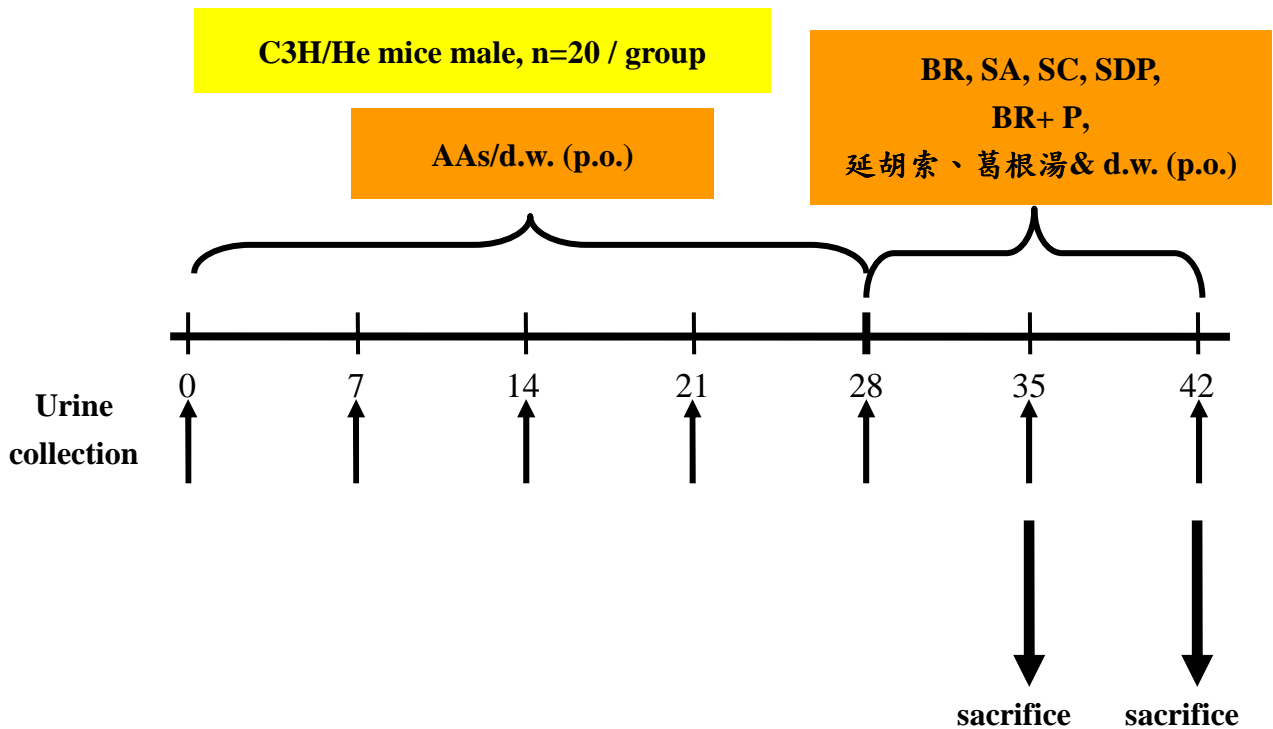
第二年度實驗計畫

實驗藥物

南柴胡(中國湖北產)延胡索及葛根湯，粗粉置於圓底燒瓶中，加入蒸餾水，置放於水浴槽加熱迴流 1 小時，反覆操作三次，收集三次濾液合併後離心，以減壓濃縮機濃縮後，以冷凍乾燥，即為柴胡濃縮劑柴胡皂苷 Saikosaponin A, C, D 購自和光純藥株式會社 (Wako Pure Chemical Inc., Japan)。

實驗設計

將 AAs 溶於 d.w. 當作飲用水給予小鼠，連續投予 4 週後恢復正常飲水，並經口投予 0.1ml 柴胡濃縮劑(Extract of Bupleuri Radix, 以下簡稱 Br) 150, 300, 450 mg/kg，柴胡皂苷 Saikosaponin A, C, D (10 mg/kg), Prednisolone (2 mg/kg)，柴胡濃縮劑(300 mg/kg)與 Prednisolone (2 mg/kg)，延胡索 50 mg/kg，葛根湯 270 mg/kg 混合溶液，持續投藥 14 天，對照組投予 d.w.。為了觀察藥物對 AAN 的治療效果，給予治療藥物後 7、14 天犧牲各組一半的動物，實驗組及對照組動物每組各 20 隻，共 140 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

參、結果

一、慢性 AAN 在純系小鼠的確立

(一)尿蛋白、NAG 含量分析

實驗開始前，實驗組和投予 d.w.之對照組的小鼠 24 小時尿蛋白含量為 2.97 ± 0.22 mg/day 和 2.70 ± 0.17 mg/day，兩組間在統計學上沒有差異。連續投予 28 天 AAs 的小鼠在給藥後 7, 14, 21, 28 天之尿蛋白含量都有增加的趨勢，這種尿蛋白上升的情形在停藥後仍然持續，實驗第 35、42 天 ($4.42 \pm 0.16^{**}$ mg/day ; $4.56 \pm 0.19^{**}$ mg/day) 之尿蛋白與對照組相比 (3.06 ± 0.21 mg/day; 3.08 ± 0.21 mg/day)，在統計學上皆有顯著的意義 (**P < 0.01) (如圖一)。

投予 AAs 後小鼠尿液中的 NAG 含量緩慢上升，在第 28 天和對照組達到統計學上的差異 ($1.96 \pm 0.28^*$ U/L vs 1.45 ± 0.16 U/L)，實驗第 35、42 天實驗組的 NAG 仍然持續上升 ($2.19 \pm 0.28^{**}$ U/L ; $2.42 \pm 0.37^{**}$ U/L) 與對照組相比 (1.476 ± 0.26 U/L; 1.50 ± 0.20 U/L)，在統計學上皆有顯著的意義 (**P < 0.01) (如圖二)。

(二)血清中 BUN 分析

小鼠連續投予 28 天 AAs 犧牲所取得血清之 BUN 值 ($32.58 \pm 3.63^{**}$ mg/dL) 相較於對照組 (21.23 ± 1.35 mg/dL) 有顯著統計學上的意義；實驗組在實驗第 35 天 ($33.07 \pm 2.69^{**}$ mg/dL)、42 天 ($33.83 \pm 2.68^{**}$ mg/dL) 之 BUN 值相較於對照組 (21.83 ± 0.89 mg/dL; 22.46 ± 2.37 mg/dL) 皆有顯著統計學上的意義 (**P < 0.01) (如表一)。

(三)血液中血糖分析

投予 28 天 AAs 犧牲所取得血糖值 ($123.00 \pm 4.16^{**}$ mg/dL) 相較於對照組 (114.40 ± 2.76 mg/dL) 有顯著統計學上的意義；實驗組在實驗第 35 天 ($131.40 \pm 3.72^{**}$ mg/dL)、42 天 ($137.90 \pm 5.65^{**}$ mg/dL) 之血糖值相較於對照組 (114.70 ± 3.71 mg/dL; 118.30 ± 3.43 mg/dL) 皆有顯著統計學上的意義 (**P < 0.01) (如表二)。

(四)組織病理 PAS 染色

組織以 PAS 染色在光學顯微鏡 200 倍下觀察腎組織病理的變化 (如圖三)。投予 28 天 AAs 的腎臟組織切片，可以發現腎絲球正常，腎小管間質有顯著的細胞浸潤、萎縮 (atrophy) 及間質性纖維化 (interstitial fibrosis)，這些腎小管間質損傷的情形在停止給藥後，不但不能恢復，反而有加重的情形。

(五)組織損傷量化分析

顯微鏡下觀察 PAS 染色之組織，依病理組織損傷程度量化表予以計分。經量化後發現，實驗組之組織損傷程度在實驗第 28 天 ($3.11 \pm 0.67^{**}$)，35 天 ($3.59 \pm 0.72^{**}$)、42 天 ($4.44 \pm 0.56^{**}$) 相對正常小鼠 (0.10 ± 0.06) 有顯著意義 (** $P < 0.01$) (如圖四)。

(六)免疫螢光染色

1. 巨噬細胞

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巨噬細胞沉積情形。正常腎組織並無沉積，連續給予 28 天 AAs，可發現腎間質和腎小管受損部位有明顯紅色呈色，此顯示巨噬細胞蓄積於損傷部位。巨噬細胞蓄積的情形在停止給予 AAs 後不但沒有減緩，反而增加(如圖五、六)。

2. TGF- β

組織以免疫螢光染色觀察腎組織 TGF- β 沉積情形。正常腎組織並無沉積，在給予 28 天 AAs 的組別，可發現腎間質和腎小管部位有明顯紅色呈色，顯示 TGF- β 蓄積於此損傷部位。停止給予 AAs 後 14 天，蓄積的情形不但沒有減緩，反而有更多的 TGF- β 蓄積於腎間質和腎小管 (如圖五、六)。

3. MMP-9

觀察腎組織中 MMP-9 沉積情形，發現正常腎組織並無呈色，而隨著實驗時間點的不同，沉積的程度略有不同。在給予 28 天 AAs 的組別中，發現腎間質有些許紅色呈色，表示 MMP-9 蓄積於此損傷部位。停止給予 AAs 後 14 天，沉積的情形有輕微增加的趨勢 (如圖五、六)。

二、柴胡濃縮劑對慢性 AAN 的藥效評估

(一)尿蛋白、NAG 含量分析

投予柴胡濃縮劑 7 天，實驗組中 150 mg/kg 組 ($3.69 \pm 0.39^{*}$ mg/day)，300 mg/kg 組 ($3.06 \pm 0.48^{**}$ mg/day)，450 mg/kg 組 ($2.79 \pm 0.33^{**}$ mg/day) 之 24 小時尿蛋白含量減少，相較於 AAN 對照組 (4.42 ± 0.40 mg/day) 有統計學上的顯著意義。而在給予治療藥物 14 天後，150 mg/kg ($3.01 \pm 0.36^{**}$ mg/day)、300 mg/kg ($2.53 \pm 0.27^{**}$ mg/day) 與 450 mg/kg ($3.20 \pm 0.50^{**}$ mg/day) 組皆可降低尿蛋白含量，與對照組 (4.56 ± 0.44 mg/day) 比較有顯著差異 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。由此發現，給予三種劑量的柴胡濃縮劑對於降低 AAN 的尿蛋白含量和對照組相比皆有統計上的差異，其中又以柴胡 300 mg/kg 降尿蛋白的效果最好(如圖七)。

投予柴胡 150 mg/kg (2.17+0.30 U/L)、300 mg/kg (1.92+0.35 U/L)、450 mg/kg (2.08+0.23** U/L) 7 天後尿中 NAG 含量和對照組 (2.19+0.28 U/L) 相比有降低的趨勢。而在治療 14 天後，150 mg/kg (2.30+0.30 U/L)、300 mg/kg (2.04+0.26* U/L) 與 450 mg/kg (2.30+0.35 U/L) 組皆可降低尿中 NAG 含量，只有 300 mg/kg 組與對照組 (2.42+0.37* U/L) 比較有顯著差異 (*P < 0.05) (如圖八)。

(二) 血清中 BUN 分析

連續投予 7 天柴胡濃縮劑 150 mg/kg (30.30±1.64* mg/dL)、300 mg/kg (28.70±2.62* mg/dL) 會降低血清中 BUN 值，相較於 AAN 對照組 (33.07±2.69 mg/dL) 有統計學上的意義。連續投予 14 天柴胡濃縮劑，不論是在 150 mg/kg (26.53+0.8** mg/dL)、300 mg/kg (23.16+0.84** mg/dL)、450 mg/kg (26.17+1.45** mg/dL) 的組別，和對照組相比 (33.83+2.68 mg/dL) 皆有顯著統計學上的意義 (*P < 0.05, **P < 0.01) (如表三)。

(三) 血液中血糖分析

在 AAN 小鼠投予 7 天柴胡濃縮劑治療之實驗組中，發現 150 mg/kg (142.70+6.22** mg/dL) 與 450 mg/kg (139.60+7.53 mg/dL) 組的血糖值和對照組 (131.40+3.72 mg/dL) 相較有惡化的情形，而 300 mg/kg (127.30+4.79 mg/dL) 的血糖則有改善的情形。連續給藥 14 天，發現 300 mg/kg (120.00+6.07** mg/dL)、450 mg/kg (130.30+1.70** mg/dL) 的組別都有降血糖的效果，和對照組 (137.90+5.65 mg/dL) 相比有統計上顯著的差異 (**P < 0.01)，而 150 mg/kg (138.30+2.98 mg/dL) 組的血糖值則有惡化的情形 (如表四)。

(四) 組織病理 PAS 染色

光學顯微鏡 200 倍下觀察投予柴胡濃縮劑小鼠腎組織病理的變化 (如圖九)，在對照組 (A) 與連續 14 天投予柴胡濃縮劑 (150 mg/kg, 300 mg/kg, 450 mg/kg) 的病理組織圖 (B, C, D)。在柴胡濃縮劑 300 mg/kg 組中，可明顯發現腎小管和間質細胞浸潤和纖維化的情形減緩，腎小管的傷害也相對減弱。

(五) 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，組織損傷程度在柴胡濃縮劑 150 mg/kg (3.19+0.93*)、300 mg/kg (2.48+0.89**)、450 mg/kg (2.89+0.93**) 都有減輕的趨勢，相較於對照組 (4.30+0.56) 有統計學上的意義 (*P < 0.05, **P < 0.01) (如圖十)。

(六)免疫螢光染色

1. 巨噬細胞

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巨噬細胞沉積情形。AAN 對照組之腎組織(A)與不同劑量柴胡濃縮劑(150 mg/kg, 300 mg/kg, 450 mg/kg)在 14 天後沉積有程度上的差異(B,C,D)。相較於對照組，在給予柴胡治療的組別可以發現腎小管和腎間質受損部位之紅色呈色增加，其中以柴胡濃縮劑 300 mg/kg 組的呈色範圍最廣、亮度也最強，此顯示給予柴胡 300 mg/kg 可促進巨噬細胞活化(如圖十一、十二)。

2. 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。AAN 對照組之腎組織(A)與不同劑量柴胡濃縮劑(150 mg/kg, 300 mg/kg, 450 mg/kg)在 14 天 TGF-β 的沉積程度不同(B,C,D)。相較於對照組，在 300 mg/kg 的組別可發現腎小管和腎間質部位之紅色呈色減少，此顯示給予柴胡 300 mg/kg 可減少 TGF-β 蓄積(如圖十一、十二)。

3. MMP-9

觀察腎組織以免疫螢光染色在 MMP-9 的沉積，隨著柴胡的投予劑量不同，其在組織沉積程度略有不同。相較於對照組，300 mg/kg 的組別在腎小管和腎間質部位的紅色呈色有增加的情形，即表示給予柴胡 300 mg/kg 可增加 MMP-9 的沉積(如圖十一、十二)。

三、各種治療藥物在 AAN 之藥效評估

(一)尿蛋白、NAG 含量分析

AAN 小鼠投予各種治療藥物之實驗組中，BR 300 mg/kg (BR) ($3.06 \pm 0.48^{**}$ mg/day), SA ($3.93 \pm 0.30^*$ mg/day), SD ($3.46 \pm 0.43^{**}$ mg/day), P ($2.98 \pm 0.39^{**}$ mg/day), BR+P ($2.40 \pm 0.37^{**}$ mg/day)組在治療 7 天後 24 小時尿蛋白含量減少，相較於 AAN 對照組(4.42 ± 0.40 mg/day)有統計學上的顯著意義。連續投予 14 天治療藥物後，BR 300 mg/kg ($2.53 \pm 0.27^{**}$ mg/day), SA ($3.20 \pm 0.36^{**}$ mg/day), SD ($2.91 \pm 0.26^{**}$ mg/day), P ($2.15 \pm 0.33^{**}$ mg/day), BR+P ($2.47 \pm 0.25^{**}$ mg/day)組的 24 小時尿蛋白含量減少，相較於對照組(4.56 ± 0.44 mg/day)有統計學上的顯著意義(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。由此發現，給予 SA, SD, P, BR, BR+P 都可以降低 AAN 的尿蛋白含量，其中以 P 降低尿蛋白的效果最好(如圖十三)。

投予治療藥物之實驗組中，BR (1.92 ± 0.35 U/L), SA (2.07 ± 0.29

U/L), SD (1.95 ± 0.10 U/L), P (1.80 ± 0.24 U/L), BR+P ($1.71 \pm 0.19^*$ U/L) 組在 7 天後尿中 NAG 含量和對照組(2.19 ± 0.28 U/L)相比有降低的趨勢。而在治療 14 天後, BR ($1.92 \pm 0.35^*$ U/L), SA (2.16 ± 0.13 U/L), SD (2.14 ± 0.18 U/L), P ($1.92 \pm 0.15^{**}$ U/L), BR+P ($1.82 \pm 0.24^{**}$ U/L) 組皆可降低尿中 NAG 含量, 其中只有 BR, P 與 BR+P 組和對照組。(2.42 ± 0.37 mg/day)比較起來有統計學上的顯著意義(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) (如圖十四)。

(二)血清中 BUN 分析

AAN 小鼠投予治療藥物 7 天候的 BUN 值在 BR ($28.70 \pm 2.62^*$ mg/dL), SA ($27.00 \pm 2.71^{**}$ mg/dL), P ($25.67 \pm 0.58^{**}$ mg/dL), BR+P 組 ($29.00 \pm 2.21^*$ mg /dL)都有降低的情形, 相較於對照組(33.07 ± 2.69 mg/dL) 有統計學上的意義。連續投予 14 天治療藥物後, 除了 SC 組(32.67 ± 2.66 mg/dL)之 BUN 值沒有改善以外, BR ($23.16 \pm 0.84^{**}$ mg/dL), SA ($31.00 \pm 0.67^*$ mg/dL), SD ($29.00 \pm 1.49^*$ mg/dL), P ($27.72 \pm 2.36^{**}$ mg/dL), BR+P 組($26.22 \pm 1.93^{**}$ mg/dL)之 BUN 值都有下降的趨勢, 相較於對照組(33.83 ± 2.68 mg/dL)皆有統計學上的意義(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) (如表五)。

(三)血液中血糖分析

AAN 小鼠投予各種治療藥物之實驗組中, SA 組($95.00 \pm 2.40^{**}$ mg/dL), SC 組($97.50 \pm 0.53^{**}$ mg/dL), SD 組($92.60 \pm 4.09^{**}$ mg/dL), P 組($114.40 \pm 9.63^{**}$ mg/dL), BR+P 組($94.10 \pm 5.97^{**}$ mg/dL)在給藥 7 天後, 血糖值有降低的情形, 相較於對照組(131.40 ± 3.72 mg/dL)有統計學上的意義。投予 14 天後, BR 組($120.00 \pm 6.07^{**}$ mg/dL), SA 組($93.00 \pm 2.91^{**}$ mg/dL), SC 組($108.00 \pm 3.93^{**}$ mg/dL), SD 組 ($114.60 \pm 7.73^{**}$ mg/dL), P 組 ($92.70 \pm 5.74^{**}$ mg/dL), BR+P 組 ($98.50 \pm 5.87^{**}$ mg/dL)的血糖值都有降低的情形, 相較於對照組 (137.90 ± 5.65 mg/dL)有統計學上的意義(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) (如表六)。

(四)組織病理 PAS 染色

光學顯微鏡 200 倍下觀察到小鼠之腎組織病理的變化(圖十五、十六), AAN 對照組(Fig.15A, Fig.16A), 連續投予 14 天 SA, SC, SD (Fig.15B, C, D), BR, P, BR+P (Fig.16B, C, D)的病理組織圖。在 SA, SD (Fig.15B, D) 的組織圖中, 腎小管和間質細胞浸潤和纖維化的情形減緩, 腎小管上皮細胞的傷害也相對減弱。BR、P 及 BR+P 組(Fig.16B, C, D)可明顯發現腎小管只有輕微的萎縮, 而間質細胞浸潤和纖維化的傷害明顯改善。

(五)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，組織損傷程度在 BR 組 ($2.48 \pm 0.89^{**}$)，SA 組 ($2.70 \pm 0.88^{**}$)，SC 組 (3.58 ± 0.88)，SD 組 ($2.62 \pm 0.85^{**}$)，P 組 ($2.11 \pm 0.71^{**}$) 及 BR+P 組 ($2.00 \pm 0.62^{**}$) 都有減輕的趨勢，除了 SC 組之外，其他組與對照組 (4.30 ± 0.56) 相比皆有統計學上的意義 ($**P < 0.01$) (如圖十七)。

(六)免疫螢光染色

1. 巨噬細胞

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巨噬細胞沉積情形。AAN 對照組之腎組織與治療藥物在巨噬細胞的沉積有程度上的差異。在 BR, SA, SD, P, BR+P 組中，可以發現腎小管和腎間質受損部位之螢光強度增加，此顯示給予 BR, SA, SD, P, BR+P 可增加巨噬細胞活化(如圖十八、十九、二十、二十一)。

2. TGF- β

觀察腎組織以免疫螢光染色在 TGF- β 沉積情形。對照組與不同治療藥物在腎組織之 TGF- β 沉積有程度上的差異。相較於對照組，在 BR, SA, SD, P, BR+P 的組別中，可發現腎小管和腎間質部位之紅色呈色減少，此顯示給予 BR, SA, SD, P, BR+P 可減少 TGF- β 蓄積 (如圖十八、十九、二十、二十一)。

3. MMP-9

腎組織中 MMP-9 的沉積，隨著投予藥物的不同，其沉積程度也略有不同。相較於對照組，BR, SA, SD, P, BR+P 的組別在腎小管和腎間質部位的紅色呈色有增加的情形，即表示給予 BR, SA, SD, P, BR+P 可增加 MMP-9 的沉積 (如圖十八、十九、二十、二十一)。

肆、討論

一、慢性 AAN 在純系小鼠的確立

本研究藉由連續 4 週給予 C3H/He 小鼠 AAs/d.w. 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 成功確立純系小鼠在馬兜鈴酸腎症的模型，連續給予 4 週 AAs 會造成小鼠尿蛋白、NAG、BUN、血糖值上升，PAS 染色腎組織鏡檢可發現腎小管上皮細胞有明顯變化，間質有嚴重細胞浸潤和輕微纖維化的情形，即使停藥後，腎臟功能受損的情形不但沒有恢復，反而惡化；上述觀察皆與人類 AAN 的組織病態相似。

Sato et al.²⁴ (2004) 發現，腹腔注射或口服給予 C3H/He 小鼠 2.5 mg/kg AA 後的腎臟損傷情形與 AAN 患者的病理特徵最相似，故本實驗選用 C3H/He 小鼠作為實驗動物。為了模擬臨床上 AAN 病人長期服用 AAs 造成的慢性腎損傷，參考 Mengs¹⁰ (1987) 雄性小鼠經口投予 AAs 的 LD_{50} 55.9 mg/kg 的百分之一劑量 0.5 mg/kg 當做本實驗的投予劑量，並配合小鼠的飲水習慣，調成適當濃度讓小鼠長期飲用。

實驗期間，飲用 AAs 的小鼠和正常小鼠相比體重有偏輕的情形，Cosyns et al.¹⁴ (2001) 也發現長期給予 AAs 會造成動物厭食而引起體重上升情形緩慢，這些現象與人類誤服 AAs 後體重下降的情形相似。

Cosyns et al.¹⁴ (2001) 在投予 AAs 3 個月後才發現 NZW 成兔尿蛋白含量上升，而在我們的實驗中，在投藥後 1 週即發現小鼠尿蛋白含量隨著投予時間增加有上升的趨勢，推測是因為我們使用的劑量比較大，所以在早期就可以觀察到動物的尿蛋白含量變化。

NAG 是由腎臟近曲小管產生的酵素，當腎小管細胞受損時會大量釋放，尿中的 NAG 含量會明顯上升，可以作為近曲小管細胞受損的特異性指標。Kabanda et al.²⁹ (1995) 在腎小管受損嚴重的病人(AAN 1c, 2) 身上發現尿液中 NAG 含量明顯增加；Nortier et al.⁵ (1997) 除了發現病人尿中 NAG 含量上升，也發現 neutral endopeptidase (NEP, MW 94kD，腎小管刷狀邊緣分泌的外酵素) 明顯下降，這些結果和本實驗中實驗組隨著體內 AA 累積的劑量增加，NAG 含量慢慢上升的趨勢相同，此外，本實驗在投予 AA 期間並沒有發現老鼠尿液中之 creatinine 值變化。

BUN、Scr 是臨床上用來評估腎功能受損常用的指標，在我們的實驗動物只能發現 BUN 上升，並沒有觀察到 Scr 的變動，推測可能是因為實驗時間不夠長，導致小鼠腎臟受損情形並不像臨床上 AAN 病人沒有那麼嚴重所造成的。

Mengs et al.¹¹ (1993) 和 Cui et al.⁷⁴ (2005) 的研究發現，短時間給予大劑量的 AAs 會造成腎小管急性受損，導致腎小管糖份的再吸收產生問題，產

生高尿糖的現象，但在我們的實驗動物身上並沒有尿糖異常的情形，且老鼠的血糖值也在正常範圍內，和 Cosyns et al.¹⁴ (2001) 的實驗結果與 AAN 病人高尿糖，血糖值正常的情形稍有不同，推測可能是實驗時間不夠長或劑量不大的關係，若延長實驗時間或增加劑量可能會有不同的結果。

本實驗利用免疫螢光染色法進一步探討此腎炎模型的免疫病理機轉，選用小鼠組織巨噬細胞、TGF- β 1、MMP-9 為一次抗體。經共軛焦雷射掃描式顯微鏡觀察，腎間質和腎小管受損部位有大量巨噬細胞浸潤與部分 TGF- β 沉積，而 MMP-9 多沉積在腎小管邊緣和纖維化的部位。此與 DeBelle et al.¹⁶ (2004) 連續 5 週給予大鼠 AAs 發現腎間質有大量單核球/巨噬細胞浸潤的結果相同，這些單核細胞 (mononuclear cells) 是促進基質蛋白產生和腎臟纖維化的重要因子^{86, 92-95}。

Basile⁷⁶ (1999) 在發現很多以腎臟纖維化為特徵的實驗中，腎臟的 TGF- β mRNA 和 peptide 有明顯增加的趨勢，這種現象也可以在一些人類的腎臟疾病中發現，如: cyclosporine nephropathy 等。Yang et al.⁷⁷ (2003) 在關木通引起的 AAN 病人腎臟組織切片上發現 TGF- β 1、 α -SMA、結締組織生長因子(connective tissue growth factor, CTGF)大量表現。Li et al.⁷⁸ (2004) 以人類近曲小管上皮細胞 (proximal tubular epithelial cell, PTEC) HK-2 觀察 AAI 造成 PTEC 受損的細胞機轉，發現給予 AAI 後，TGF- β 1 會大量釋放，進一步刺激 fibronectin 分泌、細胞 apoptosis。在我們的實驗中也可以發現到相同的結果，連續投予 4 週 AAs，腎間質和腎小管受損部位有部分 TGF- β 1 沉積，停藥後，沉積的情形不但沒有減緩反而增加，推測是因為 AAs 造成腎臟不可逆的損傷，造成巨噬細胞持續活化，促使 TGF- β 1 大量釋放所造成的。

MMPs 能分解各種細胞外基質的蛋白成分，在許多腎絲球疾病中發現會被活化表現，如：快速進行性腎絲球腎炎、IgA 腎症、膜性腎絲球腎炎、糖尿病腎病變、狼瘡腎炎、馬杉腎炎等，其中最常探討 MMP-2、MMP-9 與腎臟疾病的關係。Okada et al.⁹⁶ (2003) 在成功誘發 AAN 的 hepatocyte growth factor (HGF) 基因鼠腎臟中，發現促纖維化的 TIMP-1 表現明顯下降，而使抑制纖維化的 MMP-9 表現比正常老鼠強烈。本實驗亦在連續投予 AAs 4 週後觀察到腎小管邊緣和間質纖維化的部位有 MMP-9 的沉積，即使在停藥後，MMP-9 沉積的情形仍然持續，證實 MMP-9 在 AAN 病程進展中扮演重要的角色。

根據本實驗的結果推測 AAN 造成腎臟損傷的機制是：AAs 直接造成組織受損，導致腎小管間質有大量單核球/巨噬細胞浸潤、活化，促進 TGF- β 釋放，使 fibroblast 進一步活化成 myofibroblast 並且釋放出 TGF- β ，這些釋放出的 TGF- β 進一步促進 type I & III 膠原蛋白和 TIMP 釋放，降低 MMPs

含量，造成腎小管損害和間質性纖維化。

二、柴胡濃縮劑對慢性 AAN 的藥效評估

本實驗投予柴胡濃縮劑作為治療藥物，劑量範圍的選定是參考 Fujitsuka et al.⁷⁹ (2004) 投予大鼠柴苓湯之有效劑量，換算出柴胡含量後取約略值。本實驗發現，經口投予柴胡濃縮劑 150, 300, 450 mg/kg 可明顯降低 AAN 小鼠尿蛋白含量，以 300 mg/kg 組降低尿蛋白的效果最好，與 Li et al.⁴¹ (1997) 發現柴胡可以降低尿蛋白的結果相同，其可能機轉與柴胡對基底膜荷電狀態之調整、抑制 globulin 而減少尿蛋白有關³⁷。此外，我們發現連續投予 14 天柴胡濃縮劑 300 mg/kg 可以明顯降低尿中 NAG 含量。

經口投予柴胡濃縮劑 150, 300, 450 mg/kg 可以降低血清中 BUN 值，隨著藥物投予的時間增加，BUN 值有改善的情形。在血糖值方面，柴胡濃縮劑 150, 450 mg/kg 組的血糖在第 7 天有增惡的情形，只有 300 mg/kg 組的血糖有改善；第 14 天時，在 300, 450 mg/kg 組都有降血糖的效果，只有 150 mg/kg 組對血糖沒有影響，推測可能因為劑量不足的關係。目前關於柴胡對糖類代謝的研究不多，無法引證本實驗中柴胡對於血糖值的影響，此部分可以留待以後的研究探討。

腎組織鏡檢觀察發現投予柴胡濃縮劑可減低腎小管損傷、間質細胞浸潤和纖維化，推測與柴胡能降低基質擴展(matrix expansion)⁴¹、抑制細胞增殖^{38, 41}有關。免疫螢光染色發現巨噬細胞浸潤情形增加，TGF- β 接著的情形降低，MMP-9 接著的情形增加，與 Kumazawa et al.⁴² (1989), Ushio et al.^{43, 44, 80, 81} (1991) 發現柴胡能活化巨噬細胞，促進巨噬細胞的吞噬作用結果相同，推測柴胡能改善腎功能可能與抑制 TGF- β 、活化巨噬細胞及促進 MMP-9 作用有關。

本實驗發現，經口投予柴胡濃縮劑可以降低 AAN 小鼠尿蛋白、NAG、BUN、血糖值，腎組織鏡檢發現腎小管和腎間質受損情形亦有改善。免疫螢光組織染色中，亦可發現巨噬細胞浸潤情形增加，TGF- β 接著的情形降低，MMP-9 接著的情形增加。從本實驗的結果發現柴胡濃縮劑 300 mg/kg 對此 AAN 小鼠模型的改善效果最好。

三、各種治療藥物在 AAN 之藥效評估

本研究中 saikosaponin A, C, D 劑量是根據生藥學柴胡篇³⁵中其成分含有 3% saponin 所換算出來，prednisolone 劑量是參考臨床上用來治療腎病症後群 (nephrotic syndrome) 常用的劑量 2 mg/kg⁸² 換算成實驗小鼠的劑量。本實驗發現，經口投予柴胡濃縮劑 300 mg/kg, saikosaponin A, saikosaponin D, prednisolone、柴胡濃縮劑 300 mg/kg 併用 prednisolone 可明顯降低 AAN 小鼠尿蛋白，其中以柴胡濃縮劑 300 mg/kg 併用 prednisolone 組降低尿蛋白的效果最好。Prednisolone 降低尿蛋白的結果除了在 Tipping et al.⁸³ (1985) 兔

子的腎絲球腎炎、Hattori et al.⁸⁴ (1996) 以單株抗體 anti-Thy 1 引發的大鼠腎絲球腎炎、Nakai et al.⁸⁵ (1998) 以自體免疫產生狼瘡腎炎 MRL/lpr 小鼠的研究中有發現之外，臨床上也發現 prednisolone 能降低腎病症候群、狼瘡腎炎的病人的尿蛋白含量⁸²。在純成分方面，本實驗發現 saikosaponin A, D 能降低 AAN 小鼠的尿蛋白含量，與 Hattori et al.⁴⁰ (1991) 發現 saikosaponin A 能降低抗腎絲球基底膜腎炎引起的高尿蛋白，Abe et al.³⁷ (1986), Hattori et al.⁴⁰ (1991), Li et al.⁴¹ (1997) 的研究顯示，saikosaponin D 能降低 puromycin aminonucleoside 誘發的腎炎、抗腎絲球基底膜腎炎、單株抗體引起的腎絲球腎炎的尿蛋白的結果相同，其原因可能為 saikosaponin D 促使細胞膜安定化，及其結構與類固醇相似，而有似類固醇作用。由上述的研究得知，柴胡濃縮劑併用 prednisolone 之所以效果最佳的原因可能是柴胡中的 saikosaponin A, D 合併 prednisolone 所產生的效果。

在 NAG 含量方面，投予柴胡濃縮劑 300 mg/kg 併用 prednisolone 組在第 7 天就有明顯降低 NAG 含量的效果，連續投藥 14 天，在柴胡濃縮劑 300 mg/kg，prednisolone、柴胡濃縮劑 300 mg/kg 併用 prednisolone 組都可以發現 NAG 含量明顯下降。

經口投予柴胡濃縮劑 300 mg/kg, saikosaponin A, saikosaponin D, prednisolone、柴胡濃縮劑 300 mg/kg 併用 prednisolone 皆可降低 BUN，隨著藥物投予的時間延長，BUN 值有好轉的情形。但在純成分方面我們發現一個有趣的現象，saikosaponin A 組在第 7 天治療效果不錯，但在第 14 天時效果變差，其原因仍然不明，推測可能是體內產生了耐受性或樣本數太小所造成的；saikosaponin D 組在第 7 天有輕微療效，在第 14 天效果更好，與 Abe et al.³⁷ (1986), Hattori et al.⁴⁰ (1991), Li et al.⁴¹ (1997) 發現 saikosaponin D 在腎臟方面有療效的結果不謀而合。

經口投予柴胡濃縮劑 300 mg/kg, saikosaponin A, saikosaponin C, saikosaponin D, prednisolone、柴胡濃縮劑 300 mg/kg 併用 prednisolone 對血糖值都有改善，由於給予藥物治療的時間只有 2 週，並沒有像 Vanherweghem et al.⁸⁶ (1996) 發現 prednisolone 造成血糖值異常的情形；目前關於 saikosaponin 對糖類代謝的研究不多，無法引證本實驗中 saikosaponin 對於血糖值的影響，此部分可以留待以後的研究探討。

腎組織鏡檢觀察發現除了在投予 saikosaponin C 的組別沒有明顯改善外，其他治療藥物都能減低腎小管受損、間質細胞浸潤和纖維化，免疫螢光染色亦發現巨噬細胞浸潤情形增加，TGF- β 接著情形降低，MMP-9 接著情形增加。雖然 Tipping et al.⁸³ (1985), Ono et al.⁸⁷ (2005) 在腎臟受損的兔子上發現 prednisolone 會降低發炎部位巨噬細胞的含量，但是本實驗在 prednisolone 組發現巨噬細胞活化的情形，與 Lombardi et al.⁹¹ (1978), Liu et

al.⁹⁰ (1999), Piemonti et al.⁸⁹ (1999) 發現 prednisolone 能增加巨噬細胞的吞噬作用，清除外來的抗原、毒素、微生物和受損細胞以終止發炎反應的結果相同。而 saikosaponin A, D 會活化巨噬細胞的結果則與 Kumazawa et al.⁴² (1989), Ushio et al.^{43,44,80,81} (1991) 的發現相同。推測腎功能改善可能與活化巨噬細胞、抑制 TGF- β 、活化 MMP、降低基質擴張、增加體內 corticosterone 含量³⁸ 有關。

本實驗發現，saikosaponin A, D 對於 AAN 小鼠的腎功能改善效果不錯，而 saikosaponin C 對於 AAN 小鼠則沒有什麼幫助，但是單獨給予柴胡的純成分 saikosaponin 對於腎臟的改善效果都沒有比使用柴胡濃縮劑 300 mg/kg 組來的好，推測柴胡濃縮劑的療效比使用單一 saikosaponin 好的原因可能是柴胡成分的複和效果所造成的，或許在治療腎臟疾病時，柴胡濃縮劑會比使用單一成分效果來的好。

在柴胡濃縮劑 300 mg/kg, prednisolone、柴胡濃縮劑 300 mg/kg 併用 prednisolone 三組中，柴胡濃縮劑 300 mg/kg 和 prednisolone 的效果差不多，且之間沒有顯著差異，而給予柴胡濃縮劑 300 mg/kg 併用 prednisolone 在本實驗中的治療效果最好，推測可能與柴胡能促進腦下垂體分泌 ACTH⁴⁵ 增加體內 cortisosterone 含量^{45, 88} 有關，柴胡濃縮劑與 prednisolone 併用能增加 prednisolone 的作用。

綜合上述討論，我們可以知道柴胡濃縮劑 300 mg/kg、saikosaponin A, D, prednisolone、柴胡濃縮劑 300 mg/kg 併用 prednisolone 皆能改善 AAN 小鼠的腎臟功能，特別值得一提的是本實驗在開發新療效部分發現併用柴胡濃縮劑 300 mg/kg 和 prednisolone 的治療效果最好，未來可以考慮 prednisolone 併用與類固醇結構相似，含植物性賀爾蒙的柴胡來降低 prednisolone 的使用量並改善其副作用，以維持 AAN 病人的腎臟功能。

伍、結論與建議

本實驗發現連續 28 天飲用水給予 C3H/He 小鼠 AAs/d.w. 3 $\mu\text{g/ml}$ ，會造成小鼠尿蛋白、NAG、BUN、血糖值上升，腎組織鏡檢發現腎小管萎縮、腎小管間質有嚴重細胞浸潤和輕微纖維化的情形；免疫螢光染色發現腎小管間質有大量 Macrophage, TGF- β 表現，MMP-9 也有些許表現，腎臟受損的情形在停止投予 AA 後不但沒有恢復，反而惡化，可說明 AAN 是一種進行性腎臟疾病。

經口投予柴胡濃縮劑可降低小鼠尿蛋白、NAG、BUN 值，腎組織鏡檢觀察亦有顯著改善，免疫螢光染色發現 Macrophage 表現增加，TGF- β 表現減少，MMP-9 表現增加。由實驗發現，柴胡濃縮劑能減輕 AAN 小鼠腎臟受損情形，其中以柴胡濃縮劑 300 mg/kg 的效果最好。

經口投予柴胡濃縮劑 300 mg/kg (BR), saikosaponin A, D, prednisolone (P), 柴胡濃縮劑 300 mg/kg 併用 prednisolone (BR+P), 可降低小鼠尿中 NAG (saikosaponin A, D 除外)、尿蛋白、BUN、血糖值，腎組織鏡檢觀察亦有顯著改善，免疫螢光染色可發現 Macrophage 表現增加，TGF- β 表現減少，MMP-9 表現增加，評估治療藥物在本實驗腎炎模型的效依序是 BR+P, P, BR, saikosaponin D 與 saikosaponin A；將來可以考慮併用柴胡與 prednisolone，降低 prednisolone 的使用量並改善其副作用，以維持 AAN 病人的腎臟功能。

由於實驗限制的關係，本實驗 Macrophage 來源仍舊不明，未來可以更進一步探討增加 Macrophage 表現之來源，以了解治療藥物調控 Macrophage 表現與此疾病的關係。

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 CCMP95-TP-015 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. 北川勳、三川潮、庄司順三、滝戸道夫、友田正司、西岡五夫. 生藥學 (廣川書店, 2001) pp.162-164
32. Abe, H., Orita, M., Konishi, H., Arichi, S. & Odashima, S. Effects of saikosaponin-d on enhanced CCl₄-hepatotoxicity by phenobarbitone. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 37, 555-559 (1985).
33. Abe, H., Sakaguchi, M., Odashima, S. & Arichi, S. Protective effect of saikosaponin-d isolated from *Bupleurum falcatum* L. on CCl₄-induced liver injury in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 320,

- 266-271 (1982).
34. Lin, S. C., Lin, C. C., Lin, Y. H., Supriyatna, S. & Pan, S. L. The protective effect of *Alstonia scholaris* R. Br. on hepatotoxin-induced acute liver damage. *American Journal of Chinese Medicine* 24, 153-164 (1996).
 35. Chiang, L. C., Ng, L. T., Liu, L. T., Shieh, D. E. & Lin, C. C. Cytotoxicity and anti-hepatitis B virus activities of saikosaponins from *Bupleurum* species. *Planta Medica* 69, 705-709 (2003).
 36. Yen, M. H., Weng, T. C., Liu, S. Y., Chai, C. Y. & Lin, C. C. The hepatoprotective effect of *Bupleurum kaoi*, an endemic plant to Taiwan, against dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28, 442-448 (2005).
 37. Abe, H., Orita, M., Konishi, H., Arichi, S. & Odashima, S. Effects of saikosaponin-d on aminonucleoside nephrosis in rats. *European Journal of Pharmacology* 120, 171-178 (1986).
 38. Hattori, T., Nagamatsu, T., Ito, M. & Suzuki, Y. 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* 50, 477-485 (1989).
 39. Hattori, T., Nagamatsu, T., Ito, M. & Suzuki, Y. Studies on antinephritic effect of TJ-8014, a new Japanese herbal medicine, and its mechanisms (2): Effect on the release of corticosterone from adrenal glands. *Japanese Journal of Pharmacology* 51, 117-124 (1989).
 40. Hattori, T., Ito, M. & Suzuki, Y. Studies on antinephritic effects of plant components in rats (1). Effects of saikosaponins original-type anti-GBM nephritis in rats and its mechanisms. *Folia Pharmacologica Japonica* 97, 13-21 (1991).
 41. Li, P. et al. Suppressive effects of sairei-to on monoclonal antibody 1-22-3-induced glomerulonephritis: analysis of effective components. *Pathology International* 47, 430-435 (1997).
 42. Kumazawa, Y., Takimoto, H., Nishimura, C., Kawakita, T. & Nomoto, K. Activation of murine peritoneal macrophages by saikosaponin a, saikosaponin d and saikogenin d. *International Journal of Immunopharmacology* 11, 21-28 (1989).
 43. Ushio, Y. & Abe, H. The effects of saikosaponin-d on yeast phagocytosis and degradation in peritoneal macrophages: related increase in Fc receptor expression and altered cytoplasmic organization. *Japanese Journal of*

- Pharmacology 56, 167-175 (1991).
44. Ushio, Y., Oda, Y. & Abe, H. Effect of saikosaponin on the immune responses in mice. *International Journal of Immunopharmacology* 13, 501-508 (1991).
 45. Hiai, S., Yokoyama, H., Nagasawa, T. & Oura, H. Stimulation of the pituitary-adrenocortical axis by saikosaponin of *Bupleuri radix*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 29, 495-499 (1981).
 46. Nose, M., Amagaya, S. & Ogihara, Y. Corticosterone secretion-inducing activity of saikosaponin metabolites formed in the alimentary tract. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 37, 2736-2740 (1989).
 46. Yamamoto, M., Kumagai, A. & Yamamura, Y. Structure and action of saikosaponins isolated from *Bupleurum falcatum* L. II. Metabolic actions of saikosaponins, especially a plasma cholesterol-lowering action. *Arzneimittel-Forschung* 25, 1240-1243 (1975).
 47. Cheng, B. J. et al. Preventive effect of traditional herbal formulae against experimental hypercholesterolemia in rats with special reference to blood lipoprotein cholesterol levels. *Journal of Ethnopharmacology* 94, 275-278 (2004).
 48. Chen, J. C., Chang, N. W., Chung, J. G. & Chen, K. C. Saikosaponin-A induces apoptotic mechanism in human breast MDA-MB-231 and MCF-7 cancer cells. *American Journal of Chinese Medicine* 31, 363-377 (2003).
 49. Bu, S., Xu, J. & Sun, J. Effect of Saikosaponin-d on up-regulating GR mRNA expression and inhibiting cell growth in human leukemia cells. *Chinese Journal of Integrated Traditional & Western Medicine* 20, 350-352 (2000).
 50. Hsu, M. J., Cheng, J. S. & Huang, H. C. Effect of saikosaponin, a triterpene saponin, on apoptosis in lymphocytes: association with c-myc, p53, and bcl-2 mRNA. *British Journal of Pharmacology* 131, 1285-1293 (2000).
 51. Okita, K., Li, Q., Murakami, T. & Takahashi, M. Anti-growth effects with components of Sho-saiko-to (TJ-9) on cultured human hepatoma cells. *European Journal of Cancer Prevention* 2, 169-175 (1993).
 52. Shyu, K. G., Tsai, S. C., Wang, B. W., Liu, Y. C. & Lee, C. C. Saikosaponin C induces endothelial cells growth, migration and capillary tube formation. *Life Sciences* 76, 813-826 (2004).
 53. Hsu, B. et al : *Arch Int Pharmacodyn Therap*, 139 : 318, 1962
 54. 北鼻芳子等 : *藥誌*, 84 : 73-7, 1964.

55. 高木敬次郎等編：和漢藥物學. 南山堂, 東京, 153, 1982.
56. 莊司行伸等：日藥理誌, 70：425-437, 1974.
57. 莊司行伸等：日藥理誌, 65：196-209, 1969
58. 倉喬和義等：現代的臨床, 4：197-204, 1970
59. 山原條二等：生藥誌, 40：123, 1986.
60. Matsuda R, et al：Planta Med, 54：27, 498, 1988.
61. Matsuda R, et al：Chem Pharm Bull, 38：2320, 1990.
62. Kubo M, et al：Biol Pharm Bull, 17：262-265, 1994.
63. Kubo M, et al：Biol Pharm Bull, 17：458-459, 1994.
64. 中鈿則道等：漢方醫學, 17：200-207, 1993.
65. 中鈿則道等：Pharma Medica, 13(2)：205-209, 1995.
66. 黒川昌彦等：和漢醫藥學雜誌, 12：390-391, 1995；ibid, 13：442-443, 1996.
67. 長坂和彦等：和漢醫藥學雜誌, 11：392-393, 1994.
68. Nagasaka K, et al：J Medical Virology, 46：28-34, 1995.
69. 白木公康等：Molecular Medicine, 32：1092-1099, 1995.
70. Kurokawa M, et al：J Trad Med, 13：201-209, 1996.
71. 久保道德等：和漢醫藥學會誌, 2：200-201, 1985.
72. 渡邊裕司等：和漢醫藥學會誌, 7(2)：99-107, 1990.
73. Cui, M., Liu, Z. H., Qiu, Q., Li, H. & Li, L. S. Tumour induction in rats following exposure to short-term high dose aristolochic acid I. *Mutagenesis* 20, 45-49 (2005).
74. DeBelle, F. D. et al. The renin-angiotensin system blockade does not prevent renal interstitial fibrosis induced by aristolochic acids. *Kidney International* 66, 1815-1825 (2004).
75. Basile, D. P. The transforming growth factor beta system in kidney disease and repair: recent progress and future directions. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 8, 21-30 (1999).
76. Yang, L., Li, X. M. & Wang, H. Y. 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* 23, 329-334 (2003).
77. Li, B., Li, X. M., Zhang, C. Y., Wang, X. & Cai, S. Q. Cellular mechanism of renal proximal tubular epithelial cell injury induced by aristolochic acid I and aristololactam I. *Journal of Peking University. Health sciences.* 36, 36-40 (2004).
78. Fujitsuka, N., Goto, K., Takeda, S. & Aburada, M. The diuretic effect of

- Sairei-to is mediated by nitric oxide production in pentobarbital-anesthetized rats. *Journal of Pharmacological Sciences* 94, 185-191 (2004).
79. Ushio, Y. & Abe, H. Effects of saikosaponin-d on the functions and morphology of macrophages. *International Journal of Immunopharmacology* 13, 493-499 (1991).
80. Ushio, Y. & Abe, H. The effects of saikosaponin on macrophage functions and lymphocyte proliferation. *Planta Medica* 57, 511-514 (1991).
81. DRUGDEX®; System: Klasco RK (Ed): DRUGDEX®; System. Thomson MICROMEDEX, G. V., Colorado (Vol. 124 expires 6/2005).
82. Tipping, P. G. & Holdsworth, S. R. The mechanism of action of corticosteroids on glomerular injury in acute serum sickness in rabbits. *Clinical & Experimental Immunology* 59, 555-563 (1985).
83. Hattori, T., Fujitsuka, N. & Shindo, S. Effect of acteoside on mesangial proliferation in rat anti-Thy 1 nephritis. *Japanese Journal of Nephrology* 38, 202-212 (1996).
84. Nakai, S., Kawakita, T., Himeno, K. & Nomoto, K. Combined treatments with Ninjin-youei-to (Ren-shen-yang-rong-tang) plus a suboptimal dose of prednisolone on autoimmune nephritis in MRL/lpr mice. *International Journal of Immunopharmacology* 20, 275-284 (1998).
85. Vanherweghem, J. L., Abramowicz, D., Tielemans, C. & Depierreux, M. 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* 27, 209-215 (1996).
86. Ono, T. et al. Suppressive Mechanisms of Sairei-to on Mesangial Matrix Expansion in Rat Mesangioproliferative Glomerulonephritis. *Nephron. Experimental Nephrology* 100, e132-e142 (2005).
87. Yokoyama, H., Hiai, S. & Oura, H. Effect of saikosaponins on dexamethasone suppression of the pituitary-adrenocortical system. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 32, 1224-1227 (1984).
88. Piemonti, L. et al. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *Journal of Immunology* 162, 6473-6481 (1999).
89. Liu, Y. et al. Glucocorticoids promote nonphlogistic phagocytosis of apoptotic leukocytes. *Journal of Immunology* 162, 3639-3646 (1999).
90. Lombardi, L., Forte, N. & Paradisi, F. Effect of pretreatment with prednisolone on the phagocytic activity of mouse peritoneal macrophages in vitro. *Experientia* 34, 1503-1504 (1978).

91. Muller, G. A., Schettler, V., Muller, C. A. & Strutz, F. Prevention of progression of renal fibrosis: how far are we? *Kidney International - Supplement* 54, S75-82 (1996).
92. Nathan, C. F. Secretory products of macrophages. *Journal of Clinical Investigation* 79, 319-326 (1987).
93. Nikolic-Paterson, D. J., Lan, H. Y., Hill, P. A. & Atkins, R. C. Macrophages in renal injury. *Kidney International - Supplement* 45, S79-82 (1994).
94. Rodriguez-Iturbe, B., Pons, H., Herrera-Acosta, J. & Johnson, R. J. Role of immunocompetent cells in nonimmune renal diseases. *Kidney International* 59, 1626-1640 (2001).
95. Okada, H. et al. Transgene-derived hepatocyte growth factor attenuates reactive renal fibrosis in aristolochic acid nephrotoxicity. *Nephrology Dialysis Transplantation* 18, 2515-2523 (2003).

柒、圖、表

圖一、實驗期間之尿蛋白含量分析

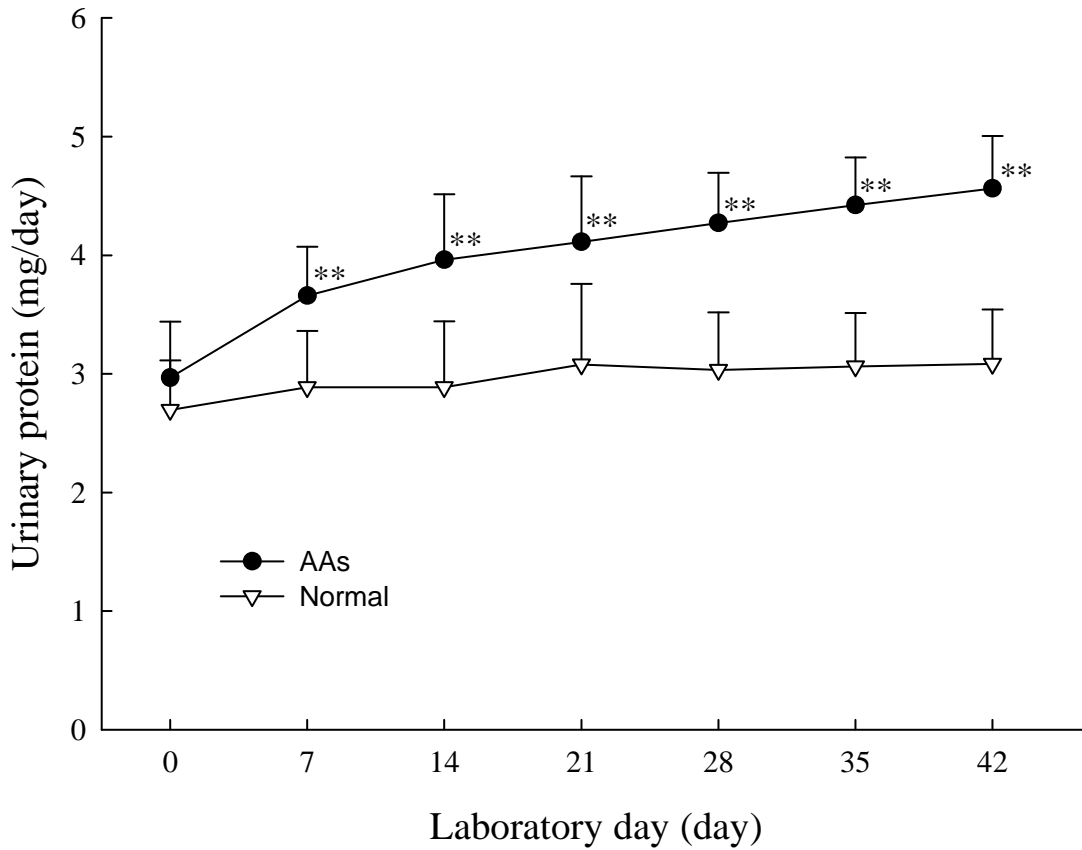


Fig.1 Urinary protein excretion of experimental (●) and normal (▽) group.

Treatment of AAs (●) significantly increased the excretion of urinary protein at 7, 14, 21, 28, 35, 42 days.

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

圖二、實驗期間之 NAG 含量分析

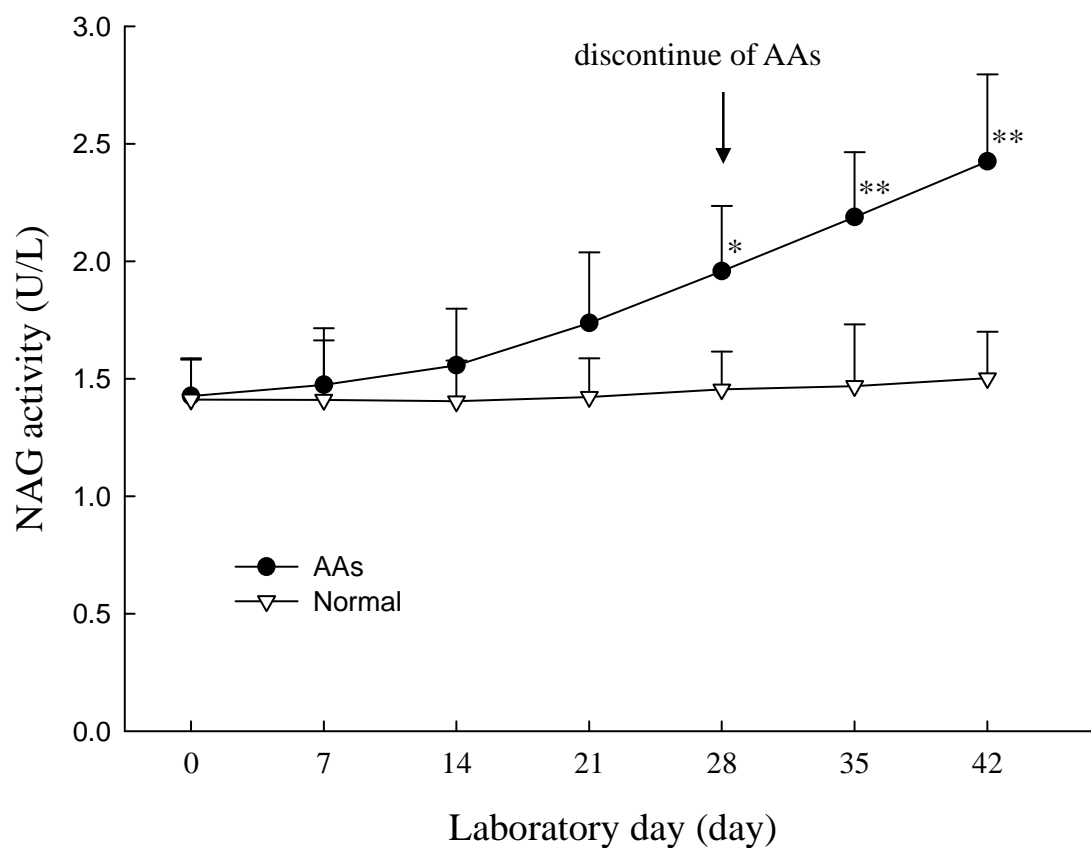


Fig.2 Urinary NAG activity of experimental (●) and normal (▽) group. Treatment of AAs (●) significantly increased the excretion of urinary NAG at 28, 35, 42 days. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. the normal group by Mann-Whitney U test.

表一、實驗第 28, 35, 42 天之 BUN 值

Treatment (n= 10/ group)	Day 28 ^a	Day 35 ^b	Day 42 ^c
AAs 3μg/ml	32.58±3.63**	33.07±2.69**	33.83±2.68**
Normal	21.23±1.35	21.83±0.89	22.46±2.37

^a Day 28: treated with 3μg /ml AAs for 28 days

^b Day 35: treated with 3μg /ml AAs for 28 days and discontinue for 7 days

^c Day 42: treated with 3μg /ml AAs for 28 days and discontinue for 14 days

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

表二、實驗第 28, 35, 42 天之血糖值

Treatment (n= 10/ group)	Day 28 ^a	Day 35 ^b	Day 42 ^c
AAs 3μg/ml	123.00±4.16**	131.40±3.72**	137.90±5.65**
Normal	114.40±2.76	114.70±3.71	118.30±3.43

^a Day 28: treated with 3μg /ml AAs for 28 days

^b Day 35: treated with 3μg /ml AAs for 28 days and discontinue for 7 days

^c Day 42: treated with 3μg /ml AAs for 28 days and discontinue for 14 days

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

圖三、實驗期間之腎組織病理變化情形

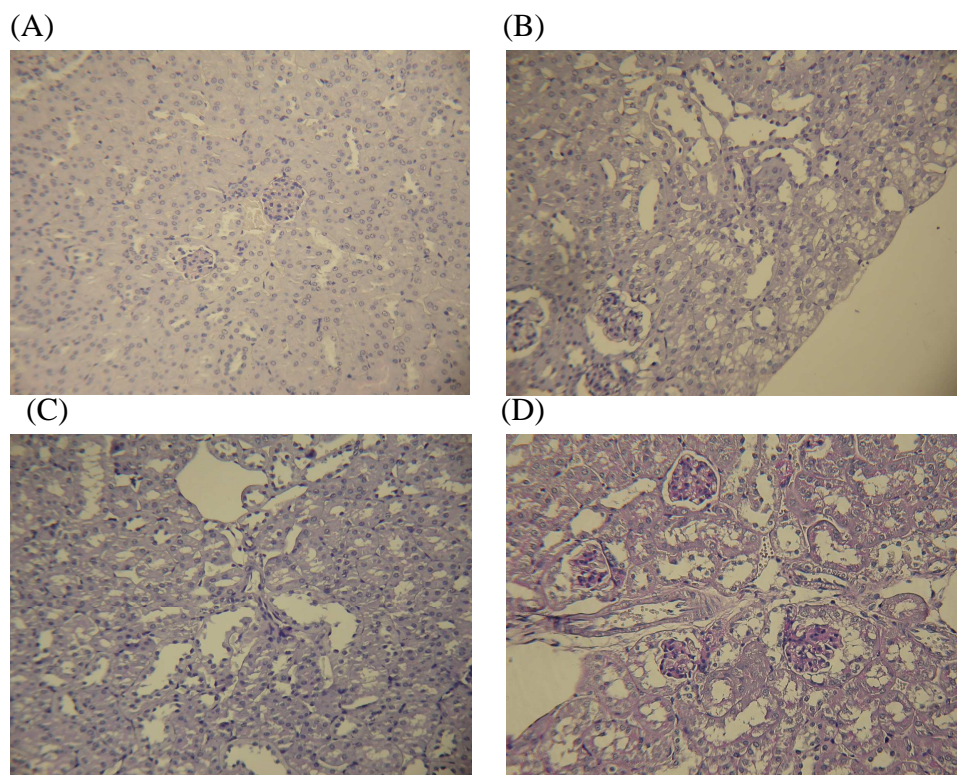


Fig.3 Light microscopy findings of renal tissue of normal mice (A), treated with 3μg /ml AAs for 28 days (B), discontinue AAs for 7 days (C), 14 days (D). The mice treated with 3μg/ml AAs groups show moderate tubulointerstitial damage, such as cell infiltration into interstitium, tubular cell atrophy and interstitial fibrosis. (PAS stain, x 200)

圖四、實驗期間之組織損傷量化分析

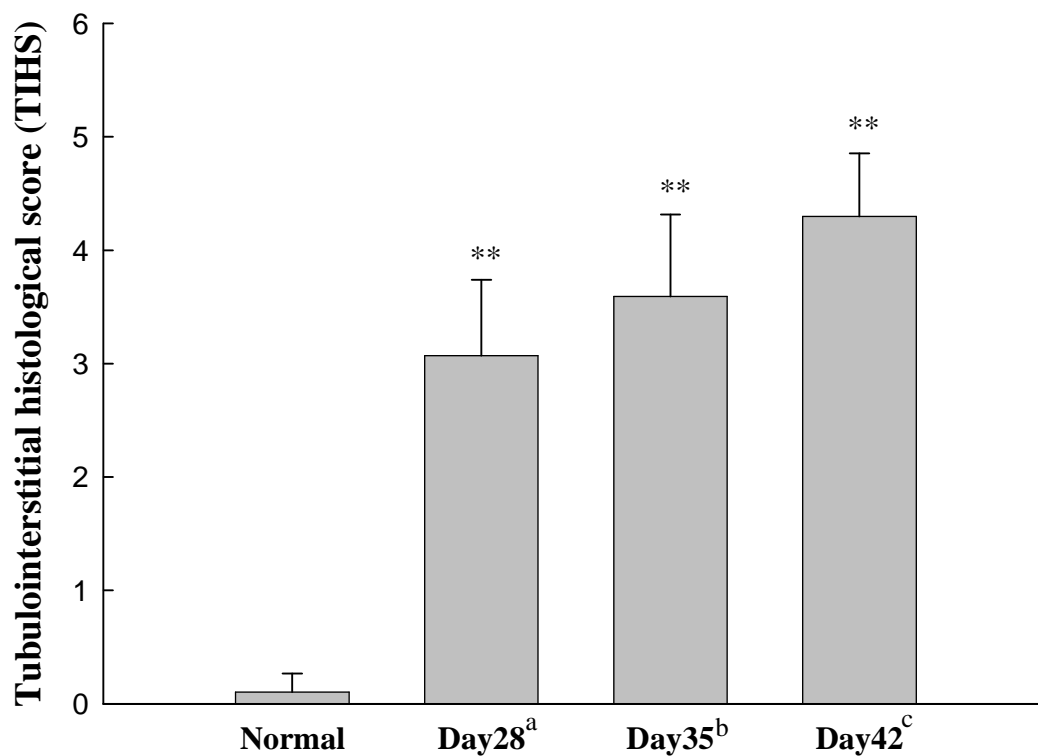


Fig.4 Tubulointerstitial histological score (TIHS) of experimental and normal group. Treatment of AAs significantly increased the TIHS at 28, 35, 42 days.

^a Day 28: treated with 3 μ g /ml AAs for 28 days

^b Day 35: treated with 3 μ g /ml AAs for 28 days and discontinue for 7 days

^c Day 42: treated with 3 μ g /ml AAs for 28 days and discontinue for 14 days

**P < 0.01 significantly different from the normal group by Mann-Whitney U test.

圖五、實驗期間腎組織之免疫螢光染色變化情形

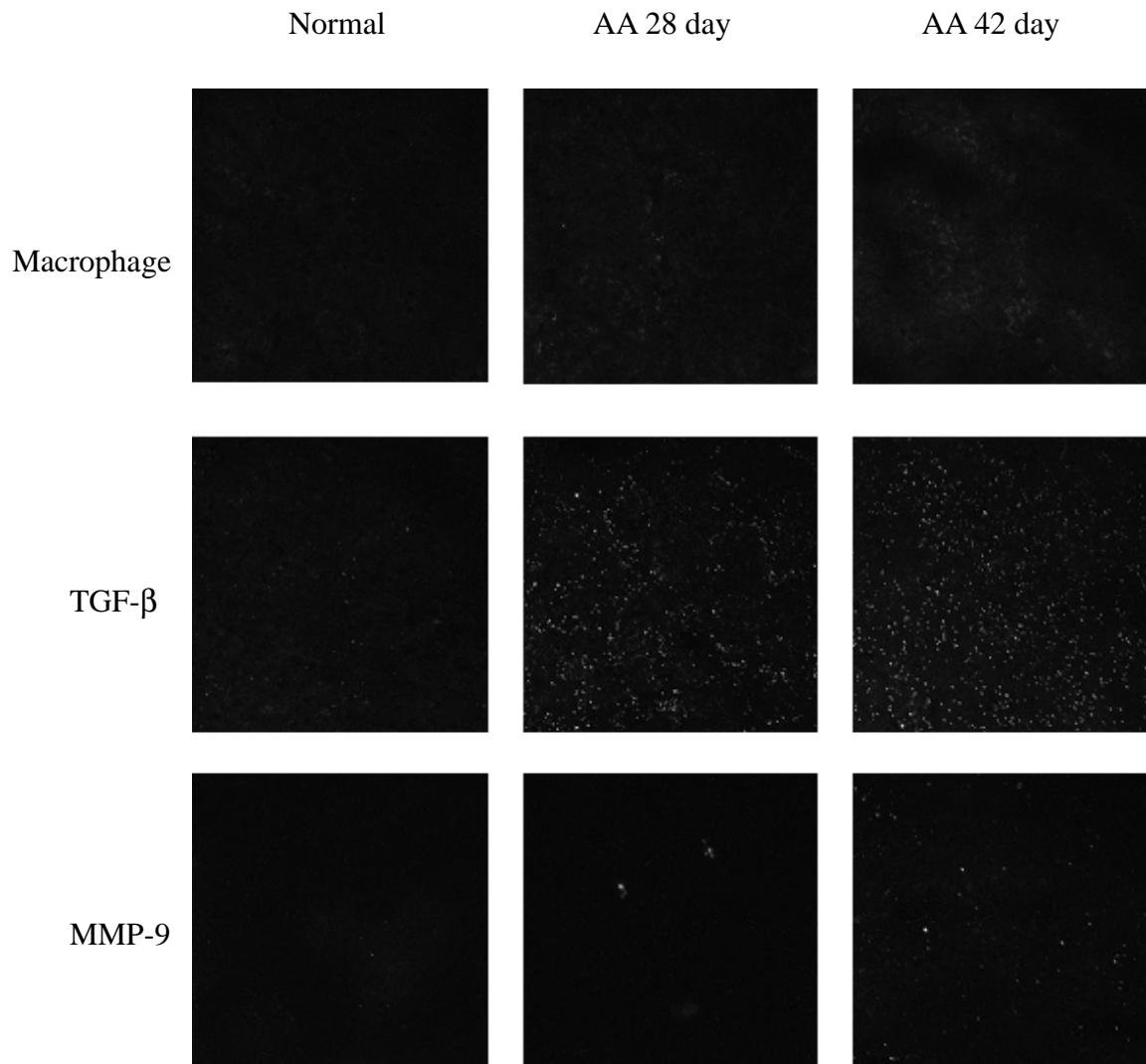


Fig.5 Confocal images of immunofluorescence staining of tubular interstitium of normal mice, treated with 3 μ g/ml AAs for 28 days (AA day 28), discontinue AAs for 14 days (AA day 42). The red color demonstrating the presence of macrophage, TGF- β and MMP-9 in the injury site.

圖六、實驗期間腎組織之免疫螢光染色半定量分析

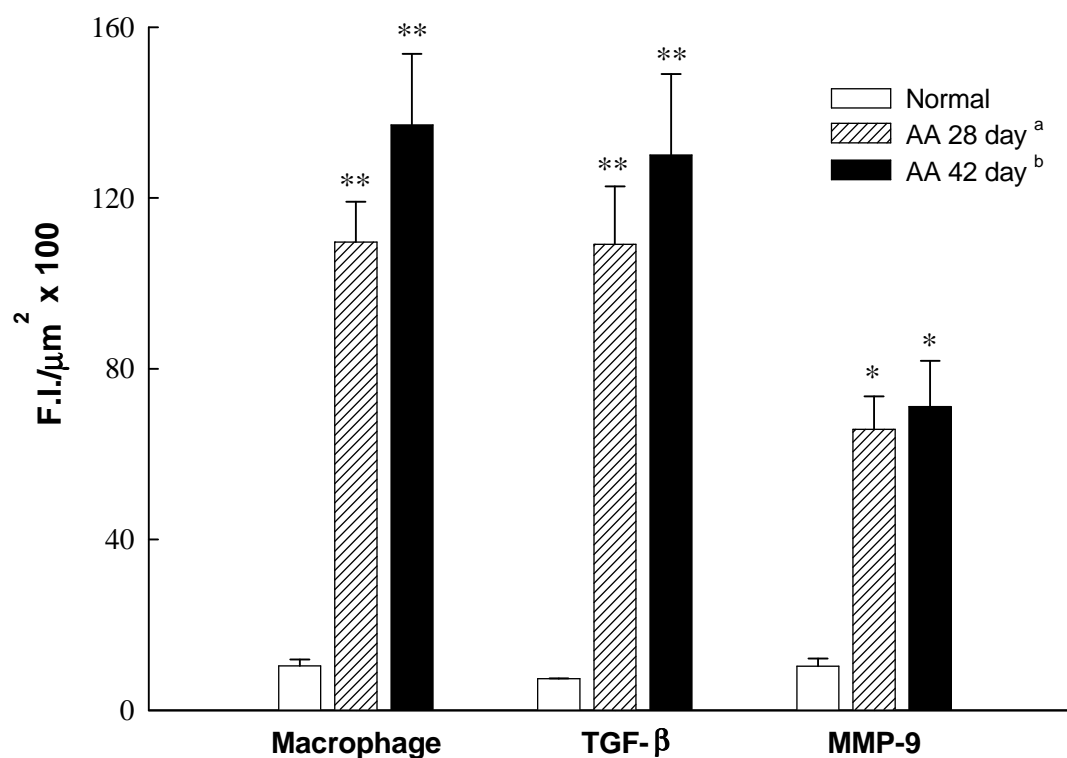


Fig.6 Semi-quantification of macrophage, TGF-β, MMP-9 of experimental and normal group. The fluorescence intensity (F.I.) of macrophage, TGF-β, MMP-9 was significantly increased in experimental group at 28, 42 days.

^a AA 28 day: treated with 3μg /ml AAs for 28 days

^b AA 42 day: treated with 3μg /ml AAs for 28 days and discontinue for 14 days

*P < 0.05, **P < 0.01 significantly different from the normal group by Mann-Whitney U test.

圖七、柴胡濃縮劑在此腎炎模型之尿蛋白含量分析

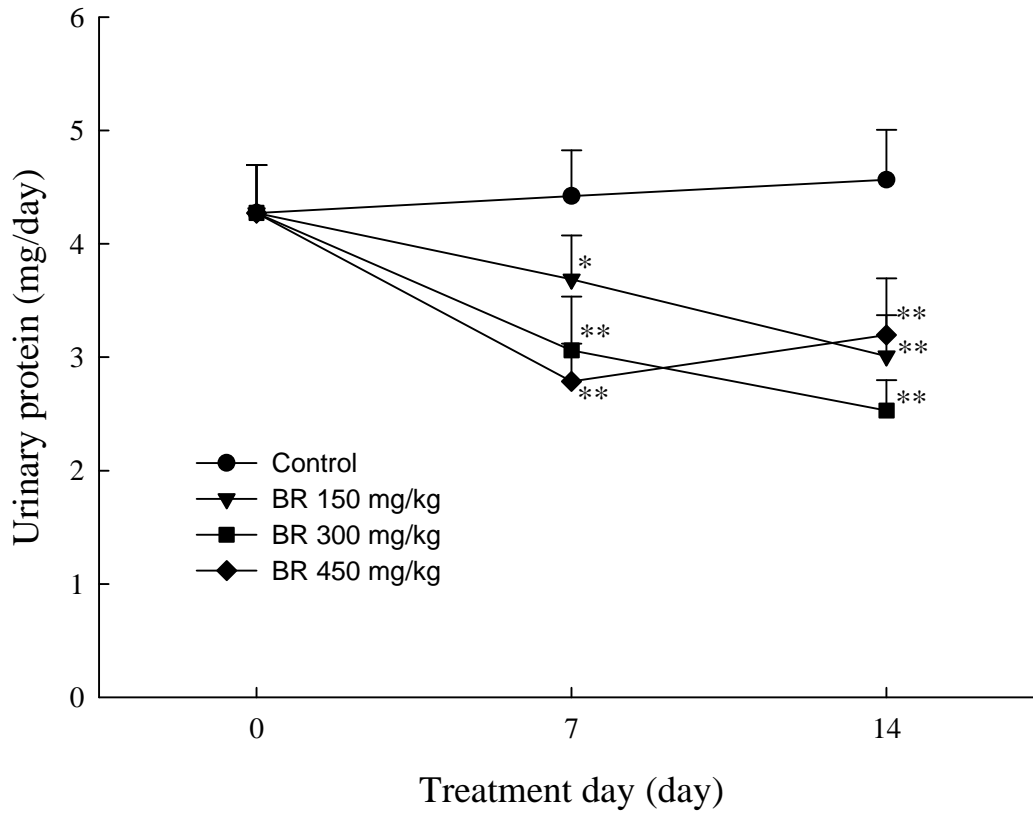


Fig.7 Urinary protein excretion for Bupleuri Radix (BR) treatment groups. Treatment with 150 mg/kg (▼), 300 mg/kg (■) and 600mg/kg (◆) of BR significantly decreased the excretion of urinary protein at 7, 14 days.

*P < 0.05, **P < 0.01 vs. the control group by Mann-Whitney U test.

圖八、柴胡濃縮劑在此腎炎模型之 NAG 含量分析

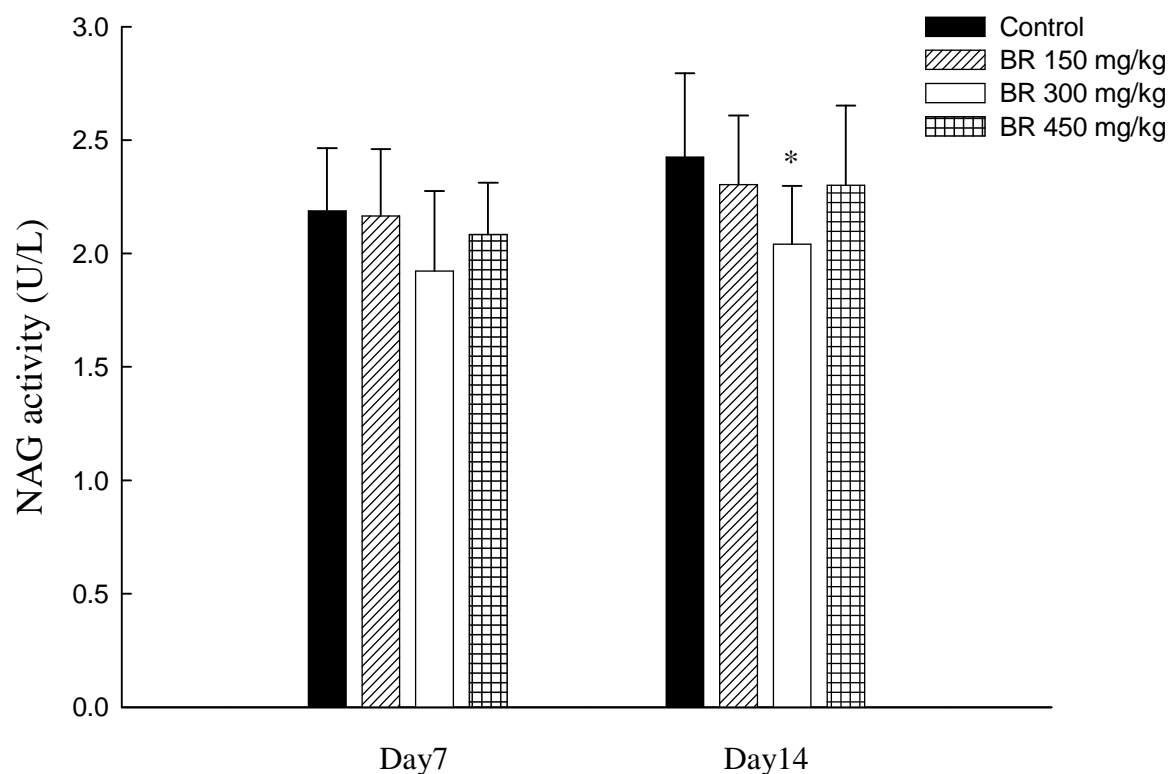


Fig.8 Urinary NAG excretion of Bupleuri Radix (BR) treatment groups in day 7 and 14. Treatment with 300 mg/kg of BR significantly decreased the excretion of NAG at 14 days. *P < 0.05 vs. the control group by Mann-Whitney U test.

表三、柴胡濃縮劑在此腎炎模型之 BUN 值

Treatment (n= 10/ group)	Day 7	Day 14
Control	33.07±2.69	33.83±2.68
BR 150 mg/kg	30.30±1.64*	26.53±0.8**
BR 300 mg/kg	28.70±2.62*	23.16±0.84**
BR 450 mg/kg	30.85±1.92	26.17±1.45**

*P < 0.05, **P < 0.01 vs. the control group by Mann-Whitney U test.

表四、柴胡濃縮劑在此腎炎模型之血糖值

Treatment (n= 10/ group)	Day 7	Day 14
Control	131.40±3.72	137.90±5.65
BR 150 mg/kg	141.10±5.24**	138.30±2.98
BR 300 mg/kg	127.30±4.79	120.00±6.07**
BR 450 mg/kg	139.60±7.53**	130.30±1.70**

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

圖九、柴胡濃縮劑在此腎炎模型之腎組織病理變化情形

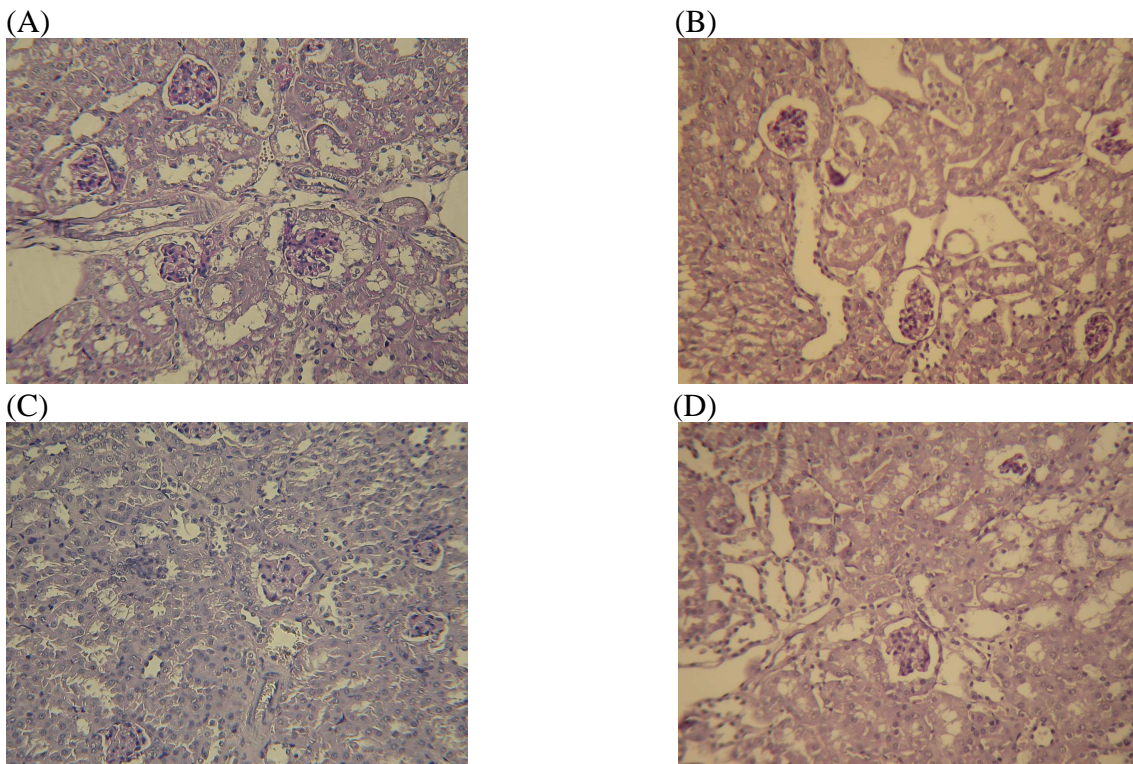


Fig.9 Light microscopy findings of renal tissue of control group (A) and others treated with 150 mg/kg, 300 mg/kg, and 450 mg/kg of Bupleuri Radix (B, C, D), respectively. The 300 mg/kg of Bupleuri Radix group demonstrated the amelioration of tubulointerstitial damage, such as cell infiltration into interstitium, tubular cell atrophy and interstitial fibrosis. (PAS stain, x 200)

圖十、柴胡濃縮劑之組織損傷量化分析

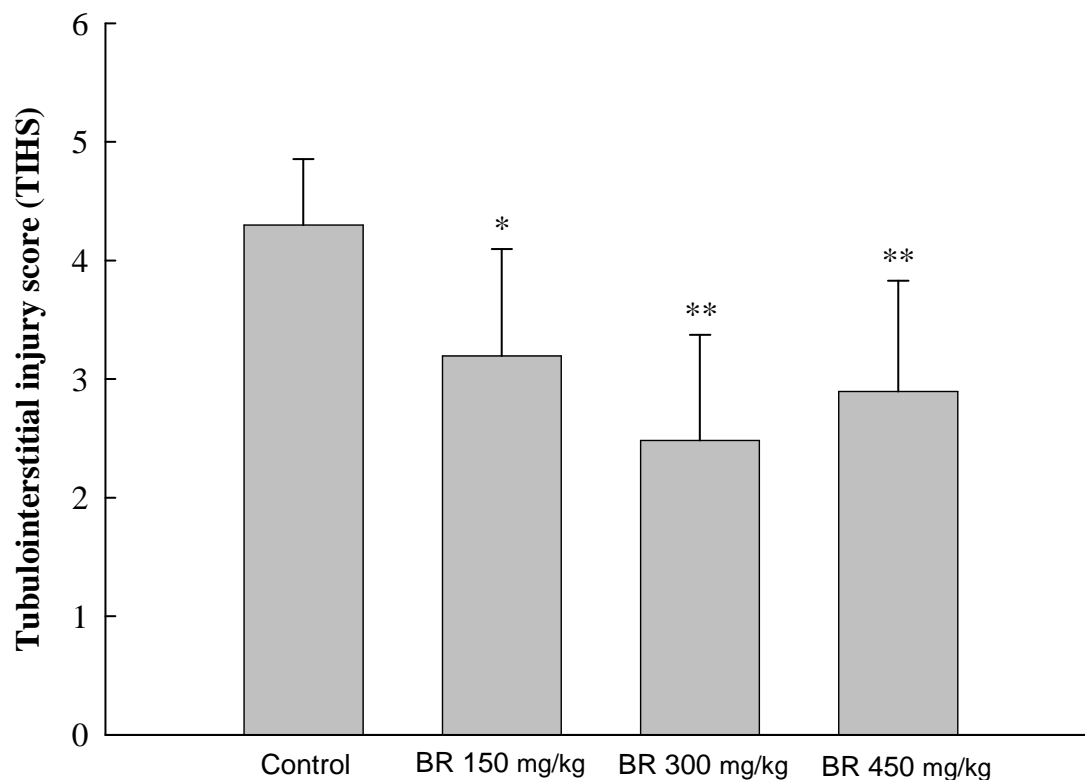


Fig.10 Tubulointerstitial histological score (TIHS) for Bupleuri Radix (BR) treatment groups. Treatment of 150 mg/kg, 300 mg/kg and 450 mg/kg of BR significantly decreased the TIHS at 14 days.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ significantly different from the control group by Mann-Whitney U test.

圖十一、柴胡濃縮劑在此腎炎模型之免疫螢光染色變化情形

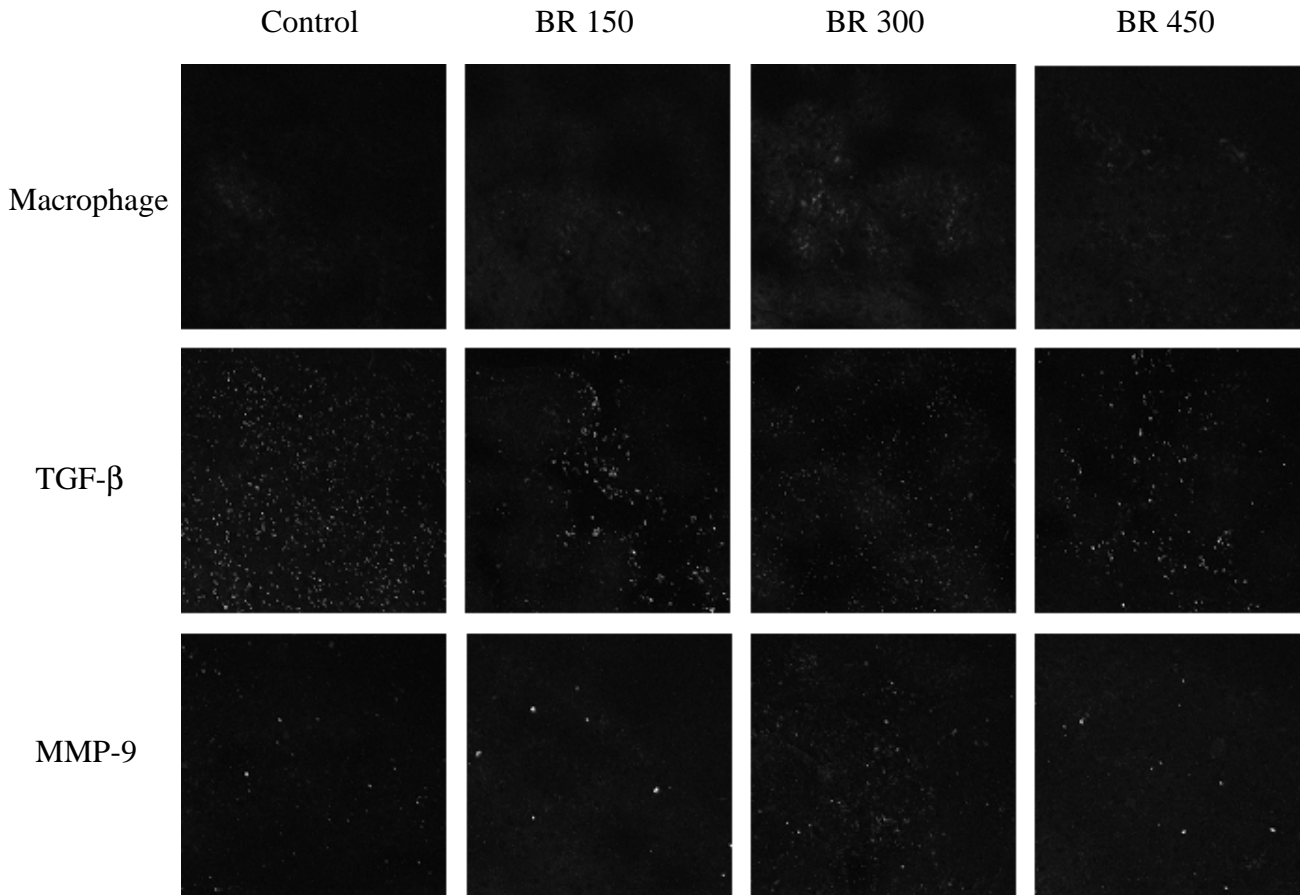


Fig.11 Confocal images of immunofluorescence staining of tubular interstitium of control group and others treated with 150 mg/kg, 300 mg/kg, and 450 mg/kg of Bupleuri Radix (BR), respectively. The red color demonstrating the presence of macrophage, TGF- β and MMP-9 in the injury site.

圖十二、柴胡濃縮劑在此腎炎模型之免疫螢光染色半定量分析

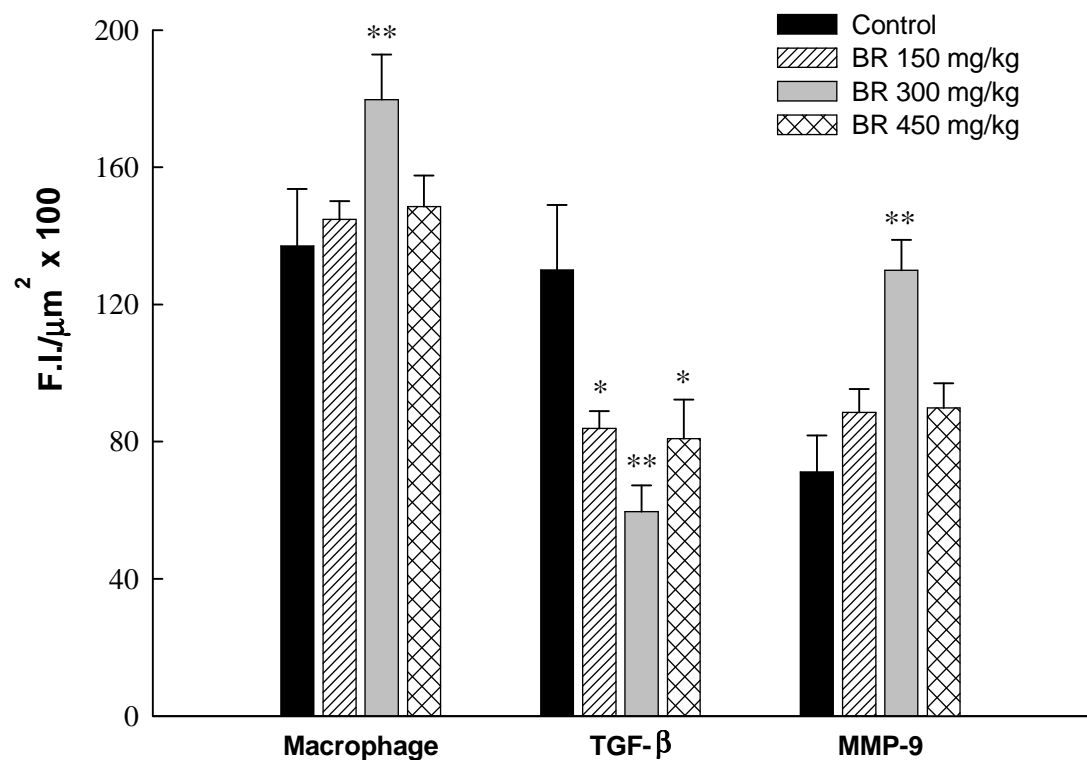


Fig.12 Semi-quantification of macrophage, TGF- β , MMP-9 of control and Bupleuri Radix (BR) treatment groups. The fluorescence intensity (F.I.) of macrophage, MMP-9 was significantly increased in the BR 300 mg/kg-treated group compared with the control group. The fluorescence intensity of TGF- β in the interstitium was significantly decreased in all treatment groups.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ significantly different from the control group by Mann-Whitney U test.

圖十三、各種治療藥物在此腎炎模型之尿蛋白含量分析

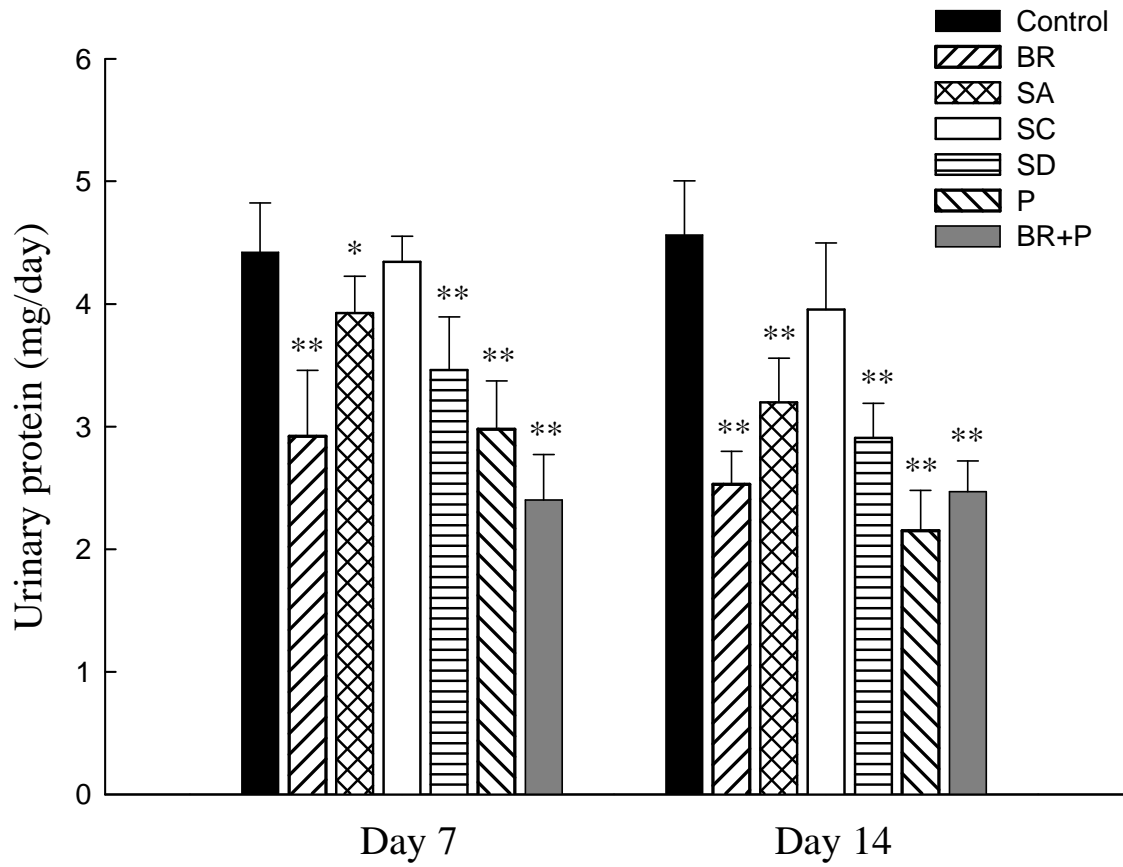


Fig.13 Urinary protein excretion of therapeutic groups. Treatment of 300 mg/kg of Bupleuri Radix (BR), Saikosaponin A (SA), Saikosaponin D (SD), Prednisolone (P), BR+P significantly decreased the excretion of urinary protein at 7, 14 days.

*P < 0.05, **P < 0.01 vs. the control group by Mann-Whitney U test.

圖十四、各種治療藥物在此腎炎模型之 NAG 含量分析

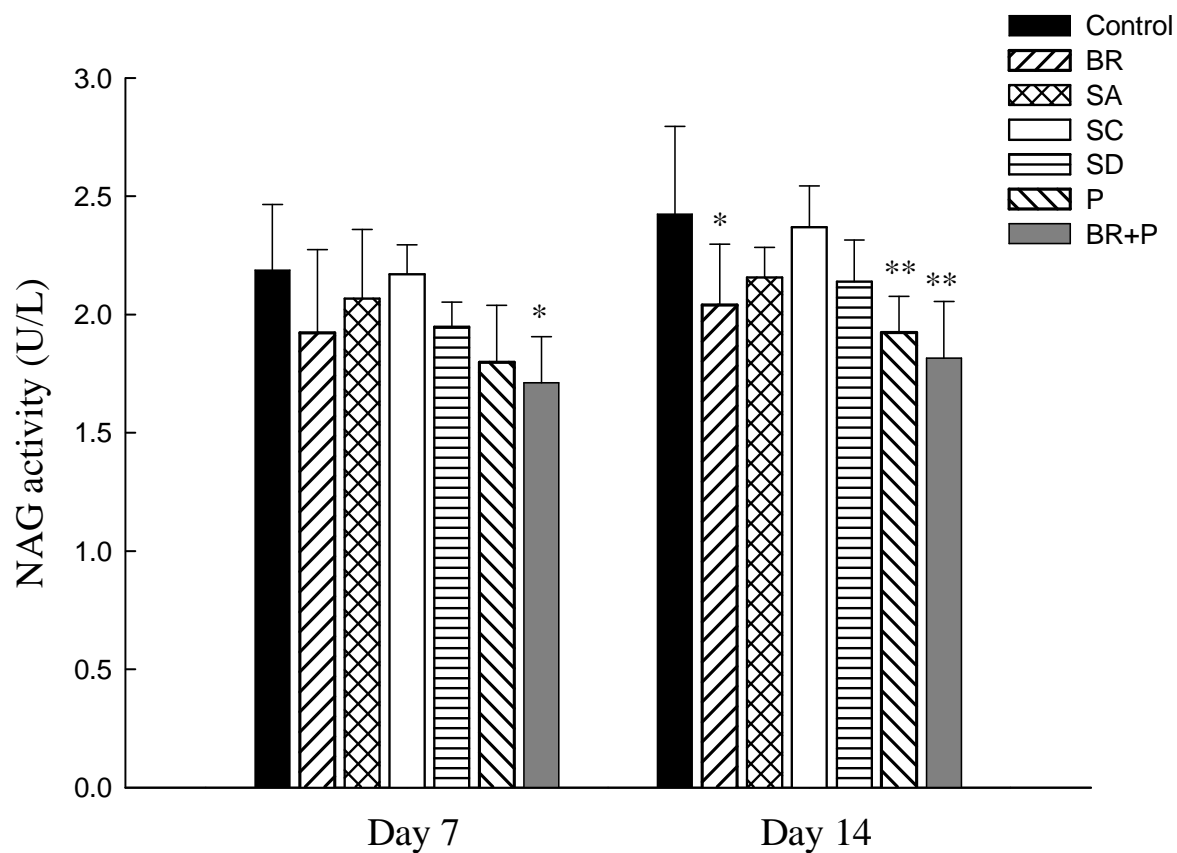
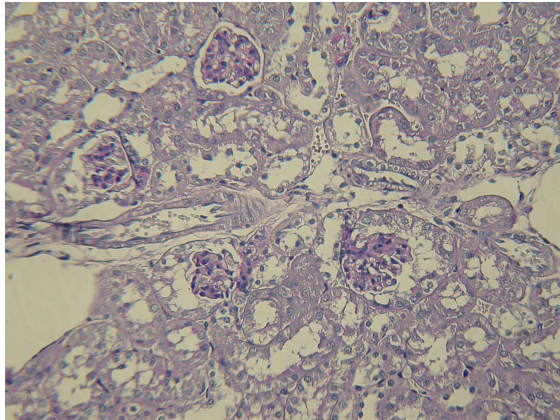


Fig.14 Urinary NAG excretion of therapeutic groups. Treatment of 300 mg/kg of Bupleuri Radix (BR), Prednisolone (P), BR+P significantly decreased the excretion of urinary NAG at 14 days.

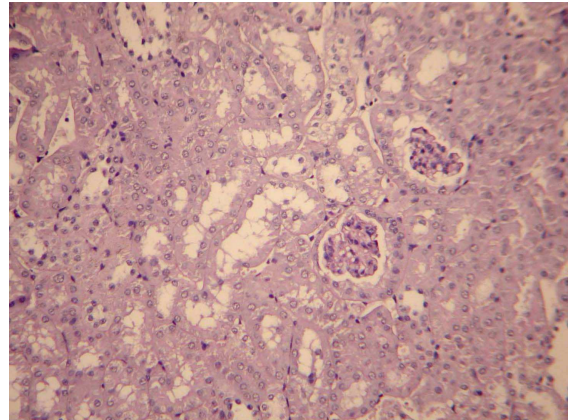
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. the control group by Mann-Whitney U test.

圖十五、Saikosaponin 在此腎炎模型之腎組織病理變化情形

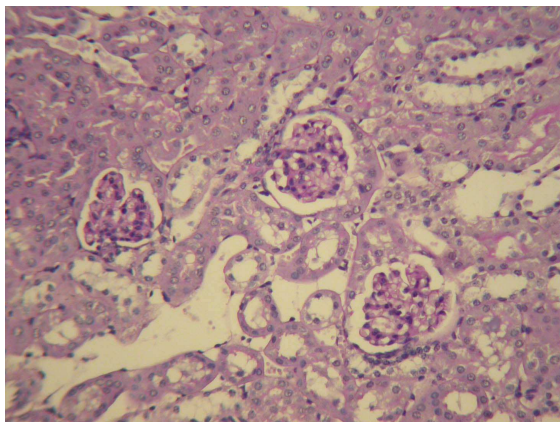
(A)



(B)



(C)



(D)

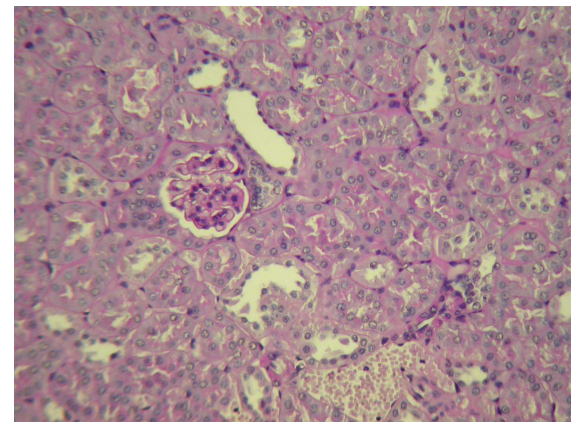
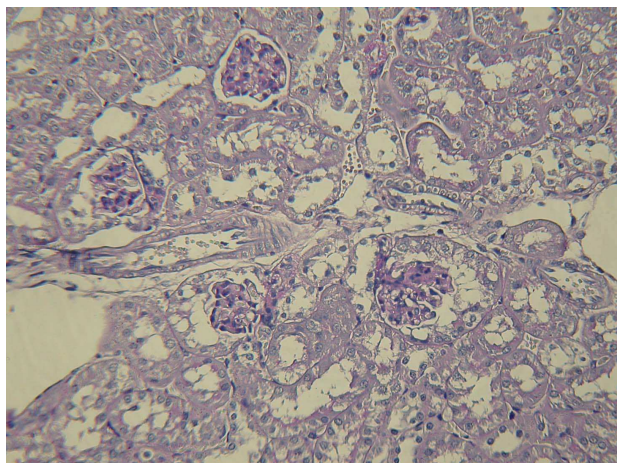


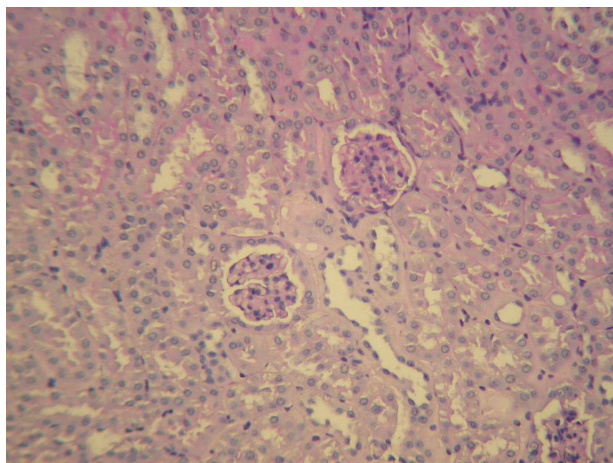
Fig.15 Light microscopy findings of renal tissue of control mice (A) and others treated with saikosaponin A, C, D (B, C, D). The saikosaponin A, D (B, D) significantly decreased cell infiltration into interstitium, tubular cell atrophy and interstitial fibrosis. (PAS stain, x 200)

圖十六、各種治療藥物在此腎炎模型之腎組織病理變化情形

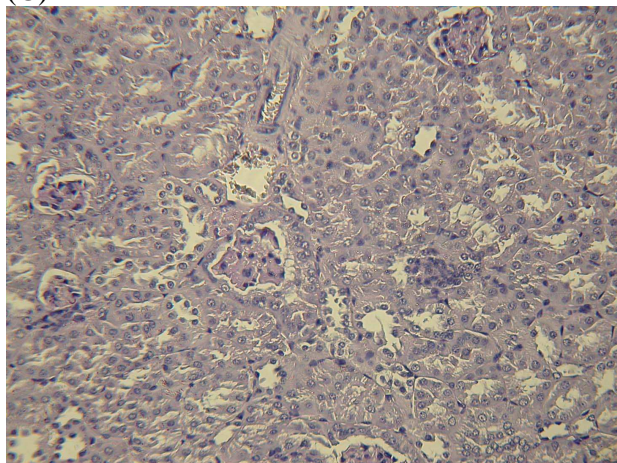
(A)



(B)



(C)



(D)

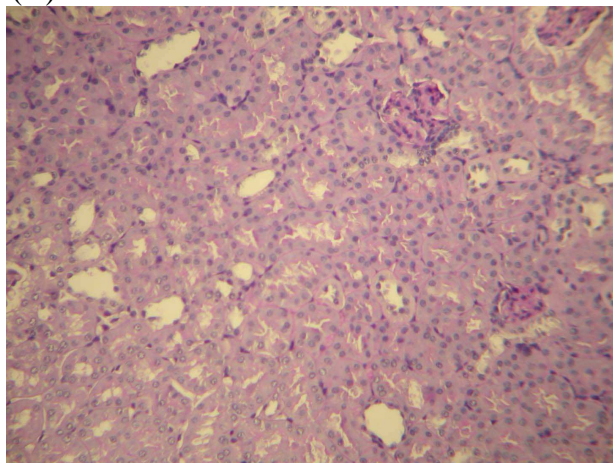


Fig.16 Light microscopy findings of renal tissue in control mice (A) and others treated with Bupleuri Radix (B), prednisolone (C) and Bupleuri Radix combine with prednisolone (D). The Bupleuri Radix (B), prednisolone (C) and Bupleuri Radix combine with prednisolone (D) significantly decreased cell infiltration into interstitium, tubular cell atrophy and interstitial fibrosis. (PAS stain, x 200)

表五、各種治療藥物在此腎炎模型之 BUN 值

Treatment (n= 10/ group)	Day 7	Day 14
Control	33.07±2.69	33.83±2.68
Bupleuri Radix 300 mg/kg	28.70±2.62*	23.16±0.84**
Saikosaponin A 10 mg/kg	27.00±2.71**	31.00±0.67*
Saikosaponin C 10 mg/kg	33.50±2.92	32.67±2.66
Saikosaponin D 10 mg/kg	31.30±2.63	29.00±1.49*
Prednisolone 2 mg/kg	25.67±0.58**	27.72±2.36**
BR+P	29.00±2.21*	26.22±1.93**

*P < 0.05, **P < 0.01 vs. the control group by Mann-Whitney U test.

表六、各種治療藥物在此腎炎模型之血糖值

Treatment (n= 10/ group)	Day 7	Day 14
Control	131.40±3.72	137.90±5.65
Bupleuri Radix 300 mg/kg	127.30±4.79	120.00±6.07**
Saikosaponin A 10 mg/kg	95.00±2.40**	93.00±2.91**
Saikosaponin C 10 mg/kg	97.50±0.53**	108.00±3.93**
Saikosaponin D 10 mg/kg	92.60±4.09**	114.60±7.73**
Prednisolone 2 mg/kg	114.40±9.63**	92.70±5.74**
BR+P	94.10±5.97**	98.50±5.87**

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

圖十七、各種治療藥物在此腎炎模型之組織損傷量化分析

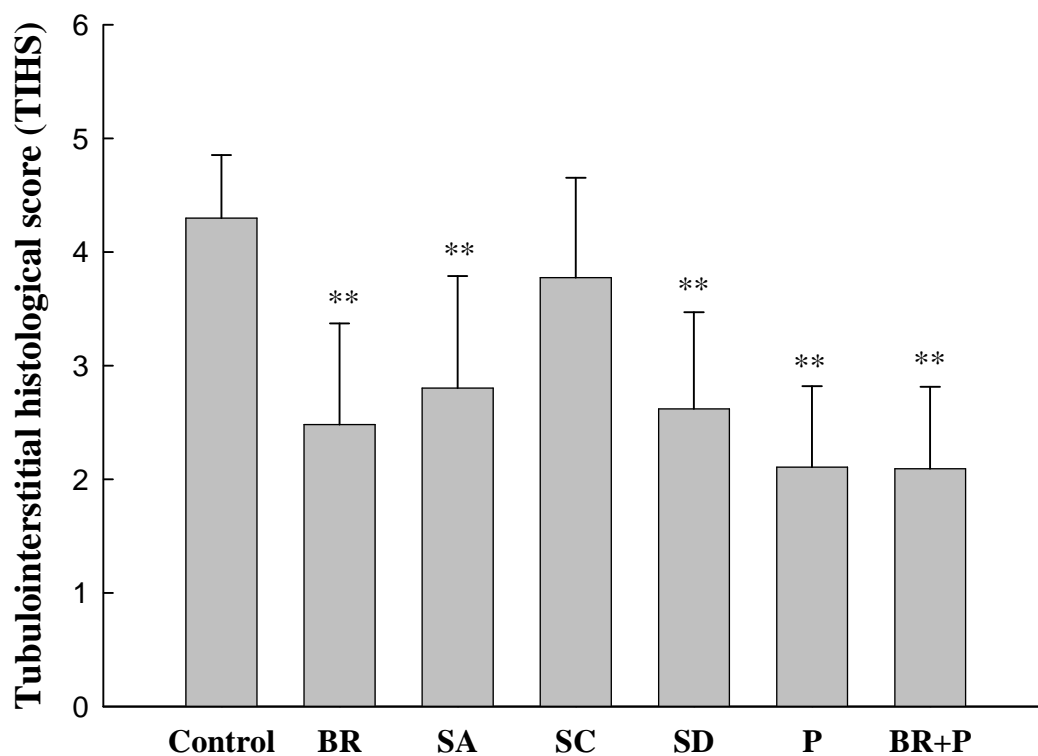


Fig.17 Tubulointerstitial histological score (TIHS) of therapeutic groups. Treatment of Bupleuri Radix 300 mg/kg (BR), Saikosaponin A, D, Prednisolone (P), BR+P significantly decreased the TIHS.

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

圖十八、Saikosaponin 在此腎炎模型之免疫螢光染色變化情形

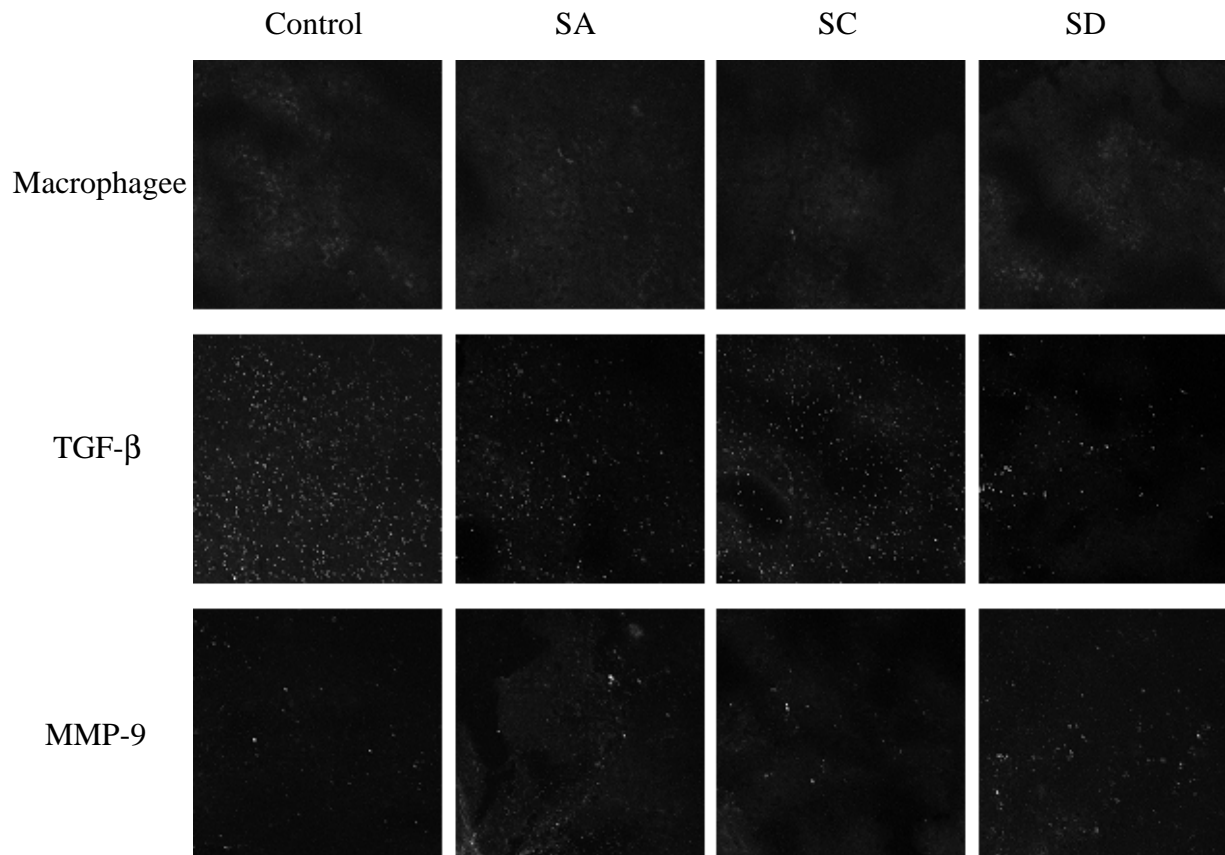


Fig.18 Confocal images of immunofluorescence staining of tubular interstitium of control group and others treated with saikosaponin A, C, D, respectively. The red color demonstrating the presence of macrophage, TGF-β and MMP-9 in the injury site.

圖十九、Saikosaponin 在此腎炎模型之免疫螢光染色半定量分析

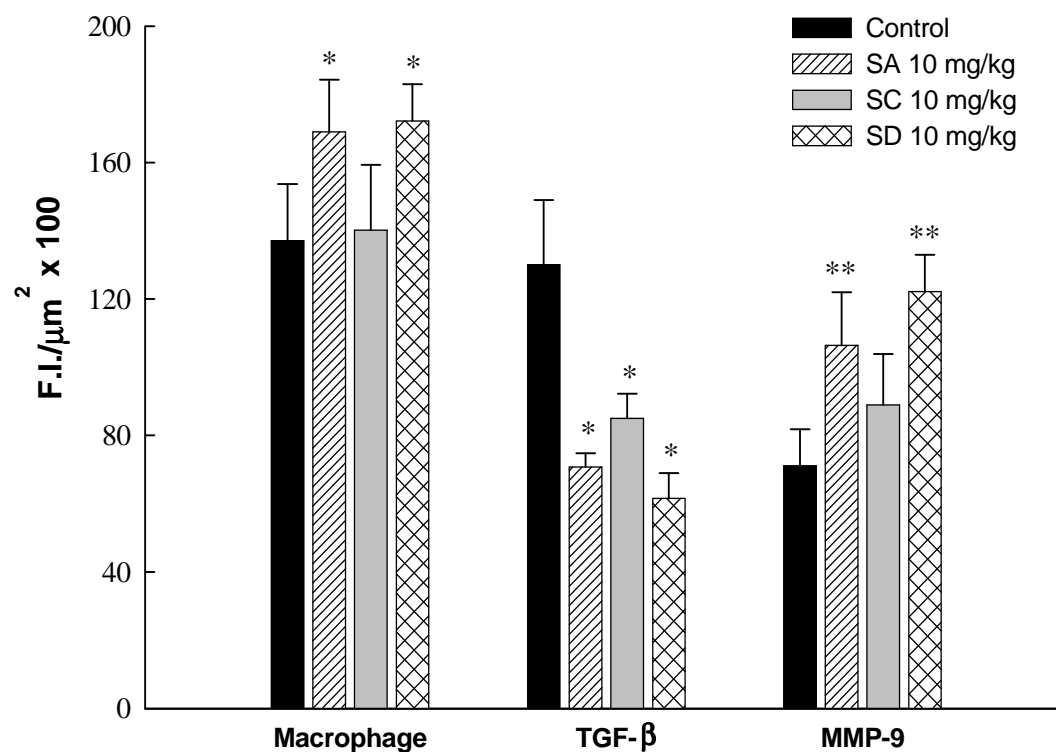


Fig.19 Semi-quantification of macrophage, TGF- β , MMP-9 of control and treatment groups. The fluorescence intensity (F.I.) of macrophage, MMP-9 was significantly increased in the saikosaponin A, D-treated group compared with the control group. The fluorescence intensity of TGF- β in the interstitium was significantly decreased in all treatment groups. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. the control group by Mann-Whitney U test.

圖二十、各種治療藥物在此腎炎模型之免疫螢光染色變化情形

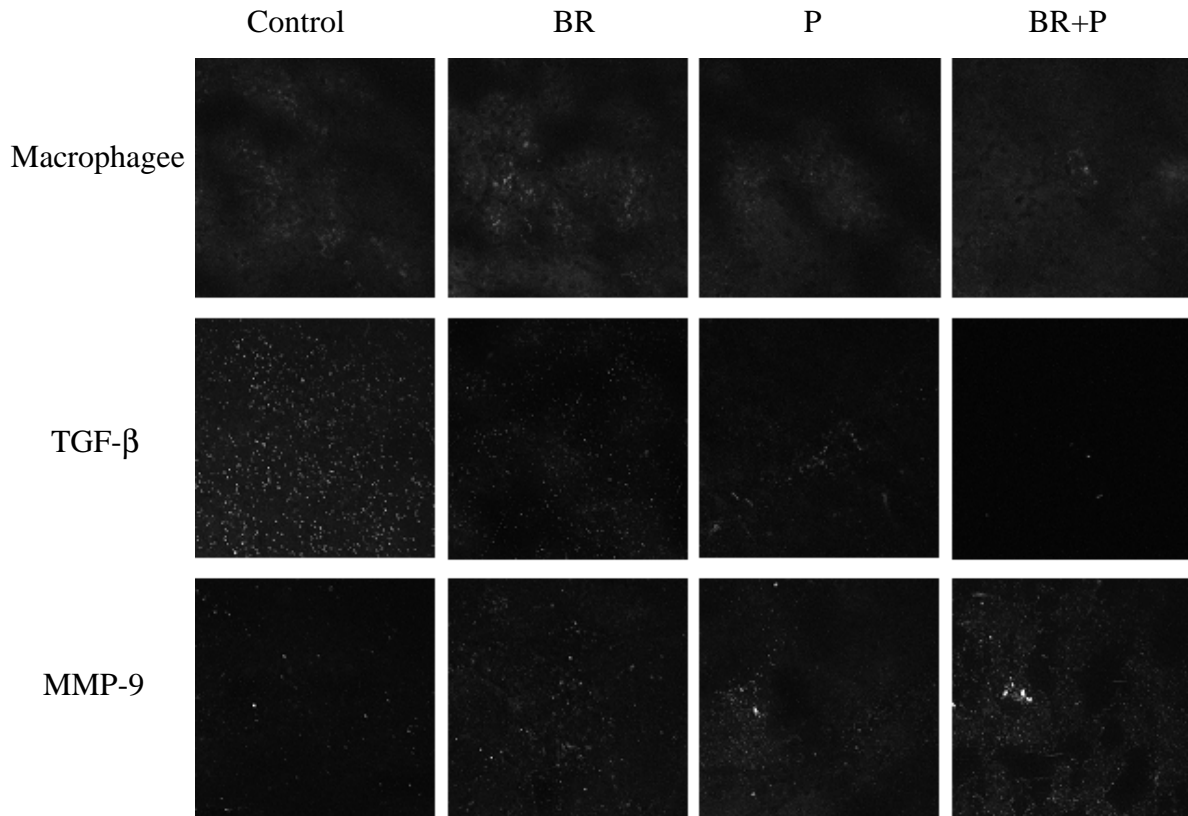


Fig.20 Confocal images of immunofluorescence staining of tubular interstitium of control group and others treated with BR, prednisolone (P), BR+P, respectively. The red color demonstrating the presence of macrophage, TGF-β and MMP-9 in the injury site.

圖二十一、各種治療藥物在此腎炎模型之免疫螢光染色半定量分析

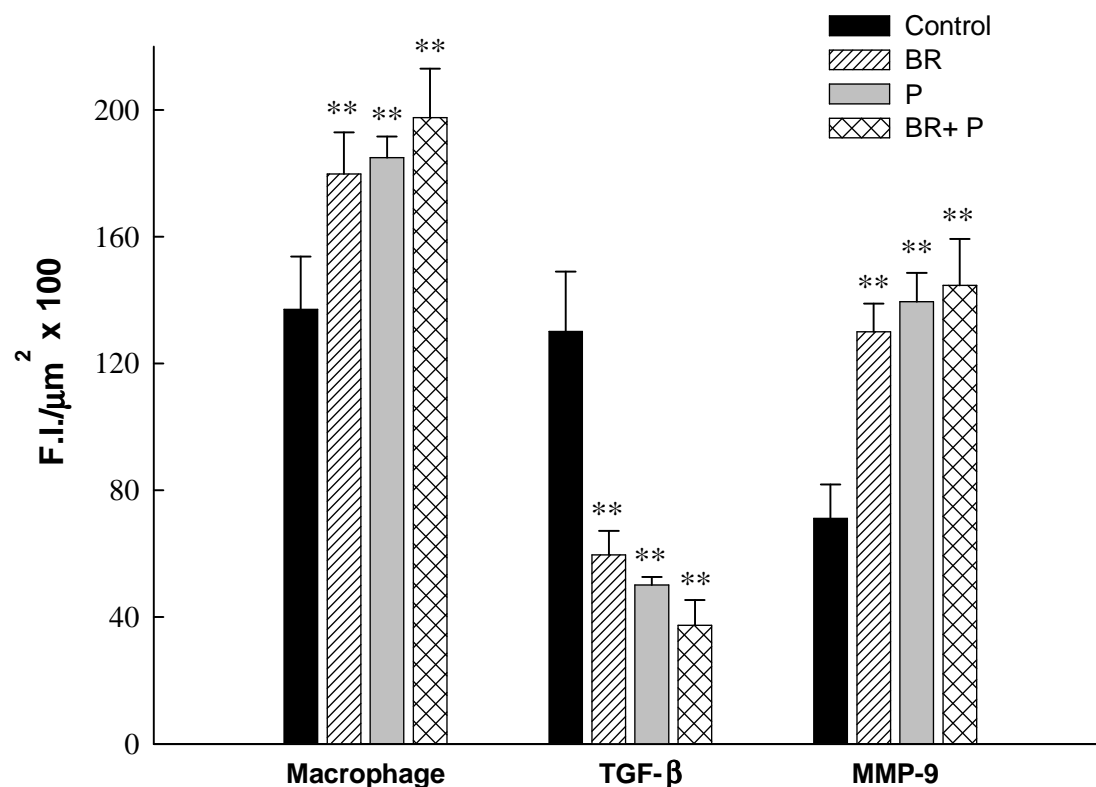


Fig.21 Semi-quantification of macrophage, TGF-β, MMP-9 of control and treatment groups. The fluorescence intensity (F.I.) of macrophage, MMP-9 was significantly increased in all treatment groups The fluorescence intensity of TGF-β in the interstitium was significantly decreased in all treatment groups.

***P < 0.01 significantly different from the control group by Mann-Whitney U test.