

編號：CCMP95-RD-102

關節炎治療之研究： 中藥萃取物(威靈仙等)之運用

計畫主持人：謝銘勳
執行單位：台北醫學大學

摘要

利用破壞兔子之十字韌帶，建立『關節炎之動物模式』，最為篩選中草藥具治療關節炎之開發平台，並藉檢測祛風濕藥中的威靈仙之功效。將 6 公斤威靈仙利用丙酮萃取濃縮至浸膏。將威靈仙萃取浸膏混入兔子的飼料中，製作成含有 9mg/g 的威靈仙之飼料，每日餵服已引發關節炎之大白兔 100 公克，分別於 21 及 29 天後抽血檢查生化值，並於 29 天進行病理評估。目前實驗尚未完全結束，但根據現有資料顯示威靈仙萃取物確實具有預防關節炎之功效。

關鍵詞【至少三項】：威靈仙，關節炎之動物模式，十字韌帶

編號：CCMP95-RD-102

Research of Study on the molecular mechanism of anti-arthritis by Chinese Herbal (Triptolide and Clematidis Radix)

Ming-Shium Hsieh
School of Medicine, Taipei Medical University

ABSTRACT

To investigate the joint protective effect of Clematidis Radix on anterior cruciate ligament ligated rabbit, and to set up the OA animal model for future studies. Six kilograms of Clematidis Radix were extracted with acetone. The extracts were made by mixing the extracts with normal rabbit fodder to become the 9 mg/g food pellet and feed the OA animal model-induced rabbits daily with 100 mg of such food pellet. Rabbits were Serum lab data were obtained on day 21 and day 29. At day 29, the jobecomeint were also sent for pathological study. The experiment is not completed yet. But from the present observation, Clematidis Radix do exert joint protective effect of ACL ligated rabbit.

Keywords 【至少三項】：Clematidis Radix , OA animal model, Anterior cruciate

壹、前言

傳統中醫藥之「祛風濕藥」可應用於治療關節炎之中藥萃取物，包括威靈仙、雷公藤、秦艽、獨活、五加皮、木瓜、羌活、細辛、吳茱萸、小茴香、丁香、高良薑、川芎、丹參、莪朮、紅花、桑寄生、蛇床子、附子、烏頭、肉桂等種類。本實驗是探討威靈仙萃取物對關節炎之保護作用，且於九十四年度已得知其對人類軟骨細胞具有保護作用，本年度則是破壞兔子膝關節之十字韌帶，建立『關節炎之動物模式』，再藉此評估威靈仙萃取物之功效。

「威靈仙」是一種常用安全的中藥，其學名為 *Clematis chinese* Osbeck。味辛、鹹、性溫，屬於肝、腎二經，使用部位為乾燥根及根莖，含有三萜類皂苷(triterpenoid saponins)。在中醫藥典籍中，其具有風濕痺痛、關節屈伸不利、腰膝關節酸痛以及諸骨梗喉等症。目前它也是治療類風濕關節炎及其他慢性關節炎常選用之藥物。然而威靈仙的藥理作用機轉至今仍不十分清楚明確，只略知其具有鎮痛、抗菌、抗組織胺...等藥理作用，因此我們想藉著相關的基礎來深入研究威靈仙對於骨關節炎所扮演的角色，及其藥理作用，以俾利於臨床的使用。

骨關節炎又稱為退化性關節炎，是一種常見的關節病變，通常發生於常動關節及承重關節，可能是關節長期載重和撕裂所引起，與發炎反應沒有直接關係。骨關節炎是軟骨本質改變所引起的一種疾病，軟骨是包覆在關節面末端的一種平滑纖維組織，隨著軟骨的退化，關節處的骨骼兩端組織會增生，使關節失去作用，關節處會僵直、疼痛，而軟骨的損壞也可能引起關節發炎。過度使用關節的運動家、從事工作需要大量活動關節、關節處骨骼接合不良、先天關節畸形或體重過重的人都是罹患骨關節炎的高危險群，但也有些骨關節炎可能有家族遺傳性。骨關節炎與軟骨的斷裂有關，如年齡漸長，軟骨會出現某種程度的退化。軟骨細胞(chondrocyte)是構成關節的唯一一種細胞，藉由合成軟骨間質及分泌間質分解酵素來調控關節間質的恆定狀態。軟骨細胞可合成關節間質成分，如第二型膠原蛋白(type II collagen)、proteoglycan 以及其他間質蛋白。軟骨大部分是由水和膠原蛋白(collagen)所組成，軟骨內沒有血管，無法自行補給養分，但其吸收力極大，可吸收關節內關節液的養分而維持。骨關節炎患者的軟骨會變得較正常平滑的軟骨鬆軟、晦暗且失去彈性，表面會因摩擦而變薄，骨頭與骨頭相互摩擦，使得骨頭上出現小洞及裂縫。因此本實驗之動物模式，即利用外力之物理作用破壞十字韌帶，加速關節磨

損，而誘導兔子之關節炎。

貳、材料與方法

一、威靈仙大量萃取

以丙酮回流萃取萃取 6 公斤威靈仙，萃取液經減壓濃縮後，真空乾燥得萃取物 20 克，置於 -20°C 下備用。

二、破壞十字韌帶誘導兔子關節炎之動物模式

1. 自飼養場購買雄性紐西蘭大白兔約 2-3 公斤。
2. 於大白兔之右後肢注射麻醉藥，使之昏迷。
3. 使用滅菌消毒之無菌巾覆蓋大白兔右後肢，露出欲手術之部位。
4. 剔除該部位之毛髮，以滅菌後之手術器材，切開表皮層(圖一-A)。
5. 固定表皮層，以手術刀進一步切開肌肉層，依麻醉情況適時補充麻醉劑(圖一-B)。
6. 稍為移動兔子之右後肢，使其關節裸露出，如有出血情況則以無菌紗布擦拭(圖一-C)。
7. 繼續調整右後肢，十字韌帶已可見(圖一-D)
8. 清除關節周圍之異物，可發現縱向之十字韌帶(圖一-E)。
9. 以手術用之剪刀使之十字韌帶斷裂(圖一-F)
10. 清除傷口附近異物，縫合其傷口(圖一-G)。
11. 以紗布包覆傷口，避免感染(圖一-H)。
12. 每日觀察其傷口變化。

三、大白兔之威靈仙飼料製備流程

1. 將購買之大白兔飼料利用粉粹機粉碎成粉末狀
2. 已濃縮好之威靈仙浸膏加入 5.5 公升 10% 的酒精攪拌均勻
3. 兔飼料粉末 5000 g 加上 500 g 玉米澱粉，使其均勻分佈後再加入 5.5 公升之威靈仙溶液，混合均勻後塑型成小顆粒狀
4. 將威靈仙飼料放入 37 度烘箱烘乾，即可得含威靈仙萃取物 9 mg/g 之飼料。

四、大白兔之餵服威靈仙飼料之方法

1. 預試驗觀察一隻兔子平均一天進食飼料之重量，結果得知約為 100 克/天。
2. 對照組與實驗組之兔子各為 3 隻，手術後，對照組餵服為含

有樣品之兔子飼料，實驗組則餵服含威靈仙萃取物之飼料，每日每隻提供新鮮飼料 100 克，正常供水，翌日則量所剩之飼料，推算其進服之量。

3. 持續餵服 21 天。

五、加速關節惡化之方法

第 22 天起每隻兔子於兔子跑步機，每日持續跑步 15 分鐘，加速關節惡化。

六、藥效評估之方法

1. 第 21 天，及 29 天由兔耳抽血，取血清分析 PGE₂ 之量。
2. 每日觀察其進食的狀況。
3. 每日觀察其步形的狀況。
4. 第 29 日以 X 光觀察關節之狀況，並解剖進行病理切片。

參、結果與討論

目前結果顯示：每隻兔子每日約食 26.8mg/kg 之威靈仙萃取物，且其手術後行動恢復狀況良好，三隻兔子皆存活，但對照組於第 21 天則死亡了兩隻，其在手術後進食狀況不佳（圖二），懷疑是手術引起疼痛，導致食慾不佳而餓死。目前實驗正在進行中，病理切片等尚未有結果，且因兔子死亡，以再進行第三次試驗。

肆、結論與建議

本實驗手術試驗困難，因而實驗進度較緩，但根據目前結果顯示威靈仙萃取物具有預防關節炎之功效。

伍、參考文獻

1. 王萌 中西醫結合治療關節病型銀屑病 1 例，西省寶雞市人民醫院皮膚科，陝西寶雞 721000
2. 寇秋愛，房定亞 類風濕沖劑治療急性期類風濕性關節炎 34 例臨床療效觀察，中醫雜誌，1995; 35(9): 537.
3. 黃迪君 類風擦劑治療 RA 臨床觀察，成都中醫藥大學學報，1995; 18(3): 20.

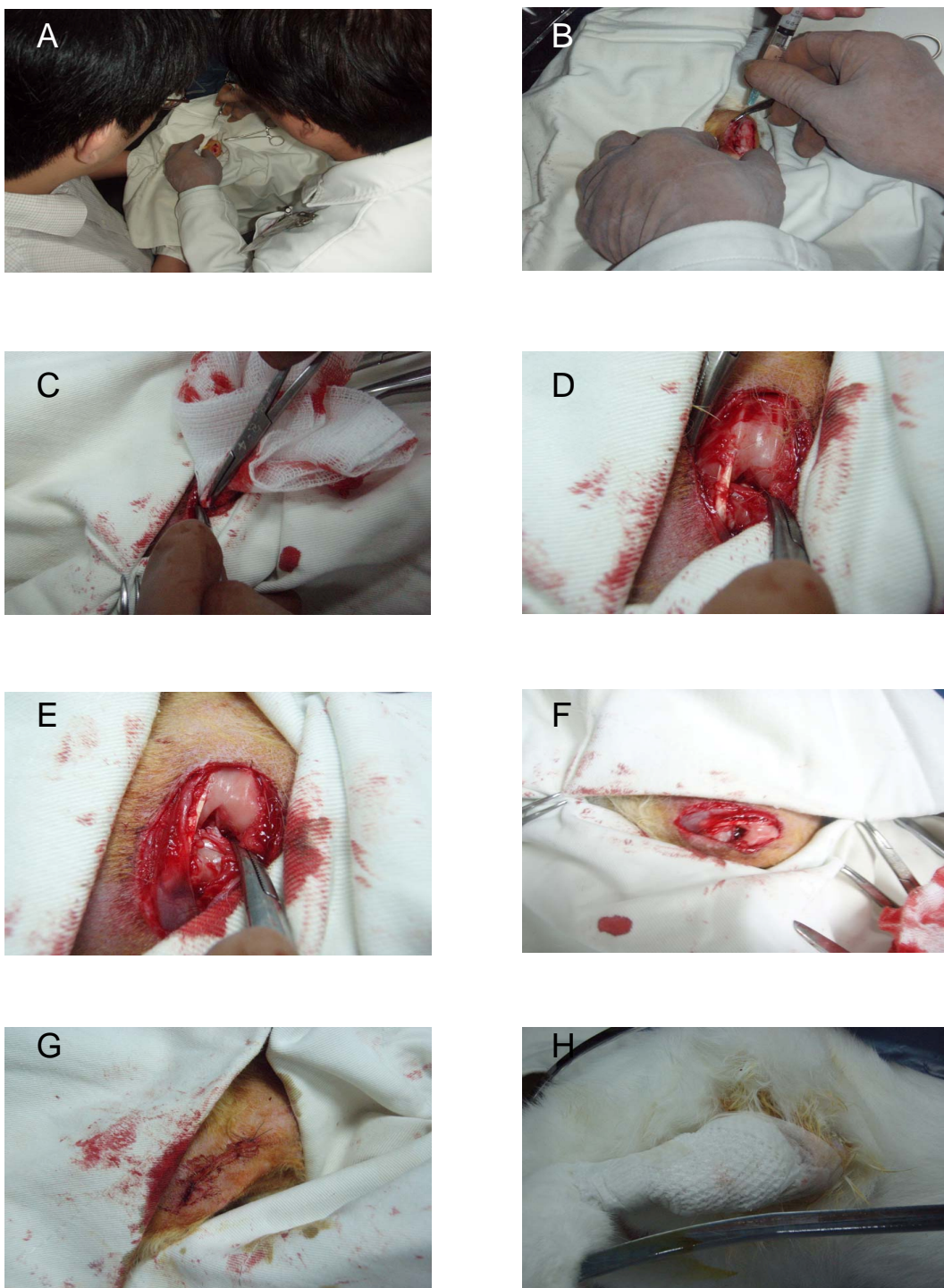
4. 許得盛, 沈自尹, 盧葦...等 類風關合劑治療類風濕性關節炎的臨床與實驗研究[J], 中國中西醫結合雜誌, 1996; (1): 14.
5. 趙南, 李建強, 陳燕河 中藥免疫調節治療類風濕性關節炎 36 例[J], 中國中醫藥資訊雜誌, 1996; (4): 31.
6. Chen, B.J. (2000) Triptolide, A Novel Immunosuppressive and Anti-Inflammatory Agent Purified from A Chinese Herb *Tripterygium Wilfordii* Hook F, *Leukemia and Lymphopna*, 42(3), 253-265.
7. Tao, X., Lipsky, P.E. (2000) The Chinese anti-inflammatory and immunosuppressive herbal remedy *Tripterygium wilfordii* Hook F. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 26, 29-50. viii.
8. Mao, Y.P., Tao, X.L., Lipsky, P.E. (2000) Analysis of the stability and degradation products of triptolide, *J. Pharm. Pharmacol*, 52, 3-12.
9. Qiu, D., Zhao, G., Aoki, Y., Shi, L., Uyei, A., Nazarian, S., Ng, J.C., Kao, P.N. (1999) Immunosuppressant PG490 (triptolide) inhibits T-cell interleukin-2 expression at the level of purine-box/nuclear factor of activated T-cells and NF-kappaB transcriptional activation, *J. Biol. Chem*, 274, 13443-13450.
10. Chang, W.T., Kang, J.J., Lee, K.Y., Wei, K., Anderson, E., Gotmare, S., Ross, J.A., Rosen, G.D. (2000) Triptolide and chemotherapy cooperate in tumor cell apoptosis: a role for the p53 pathway, *J. Biol. Chem.*
11. Wang, J., Xu, R., Jin, R., Chen, Z., Fidler, J.M. (2000) Immunosuppressive activity of the Chinese medicinal plant *Tripterygium Wilfordii*, I. Prolongation of rat cardiac and renal allograft survival by the PG27 extract and immunosuppressive synergy in combination therapy with cyclosporine, *Transplantation*, 70, 477-455.
12. Ho, L.J., Chang, D.M., Chang, M.L., Kuo, SY., Lai, J.H. (1999) Mechanism of immunosuppression of the antirheumatic herb TWHf in human T cells, *J. Rheumatol*, 26, 14-24.
13. Cavaillon, J-M, Duff, G. (1999) Cytokines and the cellular mechanism of inflammation, In *The Cytokine Network and Immune Response*, edited by J. Theze, 251-261 New York Oxford University Press.
14. Maekawa, K., Yoshikawa, N., Du, J., Nishida, S., Kitasato, H., Okamoto, K., Tanaka, H., Mizushima, Y., Kawai, S. (1999) The molecular mechanism of inhibition of interleukin-1 beta-induced cyclooxygenase-2 expression in human synovial cells by *Tripterygium wilfordii* Hook F

- extract. *Inflamm. Res.* 48, 575-581.
15. Chang, D.M., Kuo, S.Y., Lai, J.H., Chang, M.L. (1999) Effects of anti-rheumatic herbal medicines on cellular adhesion molecules, *Ann. Rheum. Dis.*, 58, 366-371.
 16. Lee, K.Y., Chang, W., Qiu, D., Kao, P.N., Rosen, G.D. (1999) PG490 (triptolide) cooperates with tumor cells. *J. Biol. Chem.*, 274, 13451-13455.
 17. Tengehaisri, T., Chawengkirtikul, R., Rachaphaew, N., Reutrakul, V., Sangsuwan, R., Sirisinha, S. (1998) Antitumor activity of triptolide against cholangiocarcinoma growth in vitro and in hamsters, *Cancer Lett.*, 133, 169-175.
 18. Lang, Y., Liu, Z., Tolosa, E., Yang, J., Li, Li (1998) Triptolide induces apoptotic death of T lymphocyte, *Immunopharmacology* 40, 139-149.
 19. Gu, W.Z., Brandwein, S.R. (1998) Inhibition of type II collagen-induced arthritis in rats by triptolide. *Int. J. Immunopharmacol.*, 20, 389-400.
 20. Ushiro, S., Ono, M., Nakayama, J., Fujiwara, T., Komatsu, Y., Sugimachi, K., Kuwano, M. (1997) New nortriterpenoid isolated from anti-rheumatoid arthritic plant, *Tripterygium wilfordii*, modulates tumor growth and neovascularization. *Int. J. Cancer* 72, 657-663.
 21. Lipsky, P.E., Tao, X.L. (1997) A potential new treatment for rheumatoid arthritis: thunder god vine. *AR.* 26, 713-723.
 22. Alain I. (2000) The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF- κ B. *Trend in Cell biology* 10: 129-133. Review
 23. Baggiolini, M., Dewald, B., and Moser, B. (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines- CXC and CC chemokines. *Adv Immunol.* 55: 97-179. Review
 24. Baggiolini, M., Dewald, B., and Moser, B. (1997) Human chemokines: an update. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 675-705. Review
 25. Baud, V., Liu Z-G., Bennett B., Suzuki N., Xia Y. and Karin M. (1999) *Genes Dev.* 13: 1297-1308.
 26. Davis, R.J. (1994) MAPKs: New JNK expands the group. *Trends Biochem. Sci.* 19: 470-473.
 27. Ensien, H., Raingeaud, J. and Davis, R.J. (1998) Selective Activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J. Biol. Chem.* 273: 1741-1748.

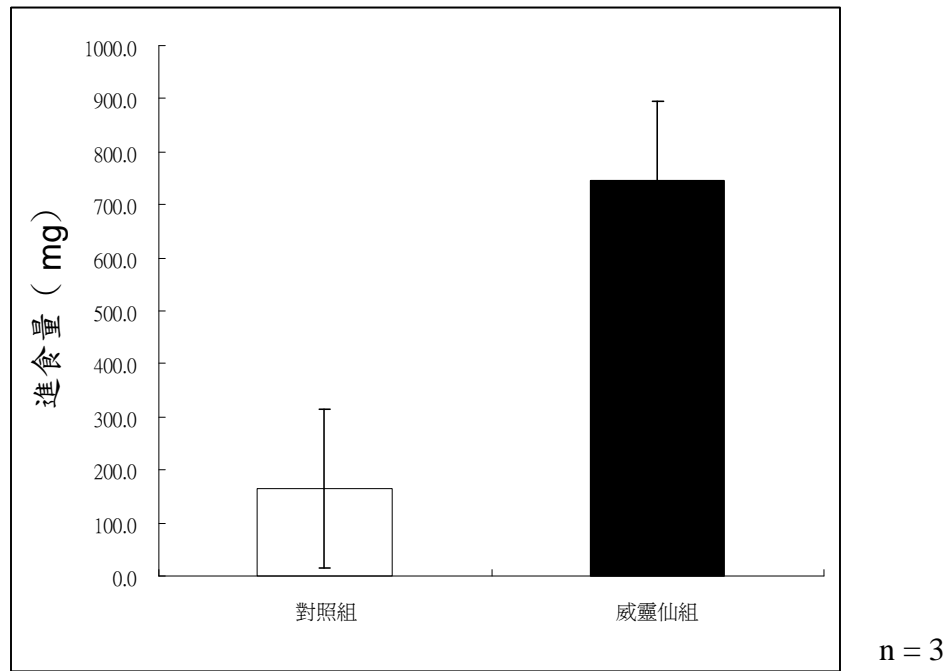
28. Gita, T.K., Susan, S., Tetsuya, A., Tan, J., Sha, Q.J., Andrew, G., Per, S.S., Lars, K.P., and Rafeul, A. (2000) Eotaxin induces degranulation and chemotaxis of eosinophils through the activation of ERK2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *Blood* **95**: 1911-1917.
29. Hambleton, J., Weinstein, S.L., Lem, L. and Defranco, A.L. (1996) Activation of c-jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc. Natl. Sci. Acad.* **93**: 2774-2778 Hideaki, N., J. Frederick Woessner, Jr. (1999) Matrix metalloproteinases *J. Bio. Chem.* **274**: 21491-21494. Review
30. Linda L, J., Richard, D., and Donald J, H. (1999) Matrix metalloproteinases *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**: 466-471. Review
31. Mary, B.G. (2000) The role of chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **43**: 1916-1926. Review
32. Michael, K. (1999) How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene.* (18) 6867-6874. Review.
33. Michael, K., and Mireille D. (2000) The I κ B kinase (IKK) and NF- κ B: key elements of proinflammatory signaling. *Seminar in immunol.* **12**: 85-98. Review
34. Naito K., Takahashi M., Kushida K. et al., (1999) Measurement of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in patients with knee osteoarthritis: comparison with generalized osteoarthritis. *Rheumatology* **38**: 510-5.
35. Pelletier JP, Caron JP, Evans C, Robbins PD, Georgescu HI, Jovanovic D, Fernandes JC, Martel-Pelletier J. (1997) In vivo suppression of early experimental osteoarthritis by interleukin-1 receptor antagonist using gene therapy. *Arthritis Rheum* **40**(6): 1012-9
36. Rossi, D., and Zlotnik, A. (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **18**: 217-42. Review.
37. Schall, T.J., and Bacon, K.B. (1994) Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* **6**: 865-73.
38. Wang, J., Xu, R., Jin, R., Chen, Z., Fidler, J.M. (2000) Immunosuppressive activity of the Chinese medicinal plant *Tripterygium wilfordii*, II Prolongation of hamster-to-rat cardiac xenograft survival by combination therapy with the PG27 extract and cyclosporine, *Transplantation*, **70**, 456-464.

39. Ramgolam, V., Ang, S.G., Lai, Y.H., Loh, C.S., Yap, H.K. (2000) Traditional Chinese medicines as immunosuppressive agents, *nn, Acad, Med. Singapore*, 27, 11-16.
40. Lu, H., Hachida, M., Enosawa, S., Li, X.K., Suzuki, S., Koyanagi, H. (1999) Immunosuppressive effect of triptolide in vitro., *Transplant., Proc.*, 31, 2056-2057.

陸、圖、表



圖一、破壞十字韌帶誘導兔子關節炎之動物模式之手術步驟圖



圖二、兔子平均每日進食量

