

編號：CCMP92-CT-07

保育類藥材—穿山甲替代藥品對實驗動物 泌乳能力、免疫調節與抗腫瘤活性之研究

謝長奇

中國醫藥大學中西醫結合研究所

摘 要

台灣穿山甲係屬第二類保育類野生動物，因應保育野生動物的世界潮流，中醫藥委員會希望輔導業者使用替代品，開發其他具有相類似之中藥臨床藥效，創造保育與醫療雙贏，本研究以穿山甲替代藥材在實驗動物泌乳能力、免疫調節與抗腫瘤活性之功能比較。實驗動物泌乳能力研究中利用 promazine 為西藥對照組，就單次泌乳量而言，王不留行對於單次泌乳能力比穿山甲明顯；每日泌乳量而言，穿山甲與王不留行低、高劑量組於分娩後第五日有效的改善缺乳；分娩後七日，母鼠犧牲後分析全血 prolactin，穿山甲、王不留行低、高劑量組與西藥對照組均能提高 prolactin 的分泌；乳腺組織在 NaF 造型後，乳腺細胞明顯發育不完整，經餵食穿山甲、王不留行低、高劑量組與西藥對照組後，乳腺細胞有明顯的成長。在免疫調節作用中，王不留行對於 T、B 淋巴球與未成熟之早期 NK 細胞(NK+/CD3+)的增殖有明顯的調節作用，脾細胞分泌 TNF- α 能力，各組之間無差異顯著性。抗腫瘤活性中，使用 Chang liver、Hep3B、HepG2 等肝癌細胞，結果顯示，王不留行較有明顯的細胞毒殺作用，所使用的相對劑量亦較低。綜合以上數據我們得知，雖然穿山甲藥材對於缺乳動物之泌乳能力於餵食較長時間後仍具有改善泌乳之能力，對免疫細胞增殖有促進作用，對肝癌細胞株亦有毒殺作用，但王不留行為植物性藥材，對於前述生理調節作用均等同或高於穿山甲的反應，站在保育野生動物的立場，對於王不留行在穿山甲藥材的取代上應具備重要的意義。

關鍵詞：保育類野生動物、穿山甲、泌乳能力、免疫調節、抗腫瘤活性

Number : CCMP92-CT-07

The lactation performance, immunomodulation and antitumor effects in the replacement drugs of Squama Manitis

Hsieh, Chang-Chi

China Medical University

ABSTRACT

Manidae is the type II conservation animal in Taiwan. Committee on Chinese Medicine and Pharmacy, Department of Health want to guidance and assistance the employment to use the replacement drug in traditional medication and reduce the animal drug usage. In this study, we want to use semen vaccariae (WBLX) to be the replacement drug of Squama Manitis (PS) in lactation performance, immunomodulation and antitumor effects. In incensement lactation performance, WBLX can significantly increase the NaF reduced lactated effect in rat in one-time, one-day lactation performance, and prolactin secretion and modulated lactated mammary gland like condensed interlobular connection tissue. WBLX and PS administration also increased splenic T and B cell proliferation in ConA or LPS stimulation. In the splenocytes differentiated by surface marker, immature pre-NK cell (NK+/CD3+) were increase in the WBLX and PS administration. Finally in hepatoma cell lines cytotoxic assay indicated WBLX were more powerful in induced cell apoptosis. Talking all these data together, WBLX might be an idea replacement pharmaceutical medicine to replace the Squama Manitis in enhances lactation performance, immunomodulation and antitumor effects in hepatoma cell lines.

Keywords: Wild animal conservation, Pangolin, Lactation performance,
Immunomodulation, Antitumor

壹、前言

台灣陸棲哺乳類野生動物據調查約有 8 目 20 科 70 餘種。其中 44 種為台灣特有種及特有亞種，例如台灣獼猴、穿山甲、山羌、白鼻心等都是其中具有代表性的特有種或特有亞種。近年來，由於人口快速成長和土地持續開發，已使野生動物的棲息環境遭受劇烈改變，嚴重威脅牠們的生存，且大部分哺乳類因長久以來民間相信具有療補功效，其皮毛、器官及體肉都成為國人食用的對象，造成強大的獵捕壓力，使族群數量日漸減少⁽¹⁾。

農委會指出，穿山甲科動物係屬野生動物保育法指定公告之第二類保育類野生動物；亦即雖非瀕臨絕種動物，但仍屬珍貴稀有野生動物。野生動物保育法第三十五條規定，保育類野生動物、瀕臨絕種及珍貴稀有野生動物產製品，非經主管機關同意，不得買賣或在公共場所陳列、展示。未經公告項目，則需依照野保法第十六條規定，保育類野生動物產製品除另有規定外，不得買賣、輸入、輸出或加工。其產製品目前尚未核准穿山甲產製品供商業利用之進出口案。至於國內買賣部分，依現行規定穿山甲產製品不得買賣⁽²⁾。

衛生署中醫藥委員會提出穿山甲並非瀕臨絕種的保育動物，穿山甲依規定可以向農委會申請同意後公告為可買賣項目，但截至目前都沒有業者向農委會提出申請。亦即依野生動物保育法必須遵守第十六條的規定，一律不得買賣。國內穿山甲來源地以南非為主，只要業者出示產地證明，領有農委會的許可，衛生署沒有理由禁止業者用穿山甲入藥，但因應世界潮流，衛生署中醫藥委員會希望輔導業者使用替代品，並類舉可替代穿山甲於祛瘀通經、通下乳汁、消腫排膿的功能；與提高白血球之藥理作用之替代品，中醫藥界認為部分救命的藥方因此不能處方、調劑，在保護保育類野生動物的前題下，開發其他具有相同或相類似之中藥基源與臨床藥效，以創造保育與醫療雙贏的局面。

穿山甲為鯢鯉科動物鯢鯉的鱗片，處方有炮山甲、醋山甲、炮甲珠或炒甲片等。其味鹹，性微寒，入肝、胃二經。李時珍云：「穿山甲入厥陰、陽明經。古方鮮用，近世風瘡、瘡科、通經、下乳，用為要藥。蓋此物穴山而居，寓水而食，出陰入陽，能竄經絡，達於病所故也。」並在本草綱目中記載穿山甲「除痰瘧寒熱，風痺強直疼痛，通經絡，下乳汁，消癰腫，排膿血，通竅殺蟲。」中醫常以其走竄之性無所不至，用於宣通臟腑，疏暢經絡，透達關竅，開血凝，散血聚，消腫排膿，活血下乳⁽³⁾。通經下乳有產後乳汁不下、乳房脹痛發硬而乳汁不下者與婦女閉經時可調劑使用。祛瘀散結經臨床驗證，凡屬跌打損傷，關節腫脹，脅肋疼痛，半身不遂以及各種淋巴結腫大、腫瘤包塊及各種癌癥均

可以使用穿山甲調劑進行治療，有消積散結之功⁽⁴⁾。張錫純著醫學衷中參西錄云：「穿山甲味淡性平，氣腥而竄，其走竄之性，無微不至，故能宣通臟腑，貫徹經絡，透達關竅，血凝血聚為病，皆能開之，以治療癰，放膽用之，立見功效。」故對於消癰排膿，治乳癰初起療效較佳。對風寒濕痺而致的手足麻木，四肢疼痛，拘攣等癥，可用穿山甲通經絡，活氣血，其效良好⁽⁵⁾。於現代藥理學研究中，穿山甲可改善實驗性家兔微循環障礙，並具有抗凝血作用，增加動脈血流量與降低血管阻力。對化療後致白血球減少症有明顯改善，並提高小鼠之機體免疫力⁽⁶⁾。

李時珍著本草綱目云：「王不留行能走血分，乃陽明衝任之藥，俗有『穿山甲、王不留，婦人服了乳長流』之語，可見其性行不住也。」王不留行(WBLX)，本品為石竹科(Caryophyllaceae)植物麥藍菜的乾燥成熟種子。生於平原或山地，以麥田中生長最多。分布於黑龍江、吉林、遼寧、河北、河南、山西、山東、江蘇、安徽、浙江、江西、陝西、甘肅、新疆、雲南、四川等省區。味苦，性平。有活血通經，下乳消腫的功能。用於乳汁不下，經閉，痛經，乳癰腫痛。；成份研究顯示種子含多種皂，主要為王不留行皂(vacsego side)，經水解得王不留行次皂甘(vaccaroside)及D-葡萄糖，王不留行次皂水解得絲石竹皂元(gypsogenin)及β-D-葡萄糖醛酸；尚含王不留行黃酮(vaccarin)、生物鹼和香豆素類化合物。本品水煎劑和乙醇浸劑對大鼠離體子宮均有收縮作用，後者較前者作用強。本研究室之研究中證實，王不留行對大鼠之子宮角重量增加，子宮壁增厚等現象，結果與Itokawa H⁽⁷⁾等人之研究相近，我們的研究進一步發現，王不留行煎劑，可明顯抑制肝癌細胞株(HepG2, Hep3B)與乳癌細胞株(MCF-7)之生長。對此數據顯示，王不留行不論其早期出典資料與本研究室之相關研究，均證實其具有雌激素樣之作用，並能有效抑制癌細胞生長，於Fujimoto Y., Nikaido T.與Itokawa H.等研究中亦分離出許多三類之化合物⁽⁸⁻¹²⁾，而三類的研究中對非特異免疫反應具有調節作用，基於上列原因與保育野生動物的原則，本研究積極研究以王不留行取代穿山甲鱗片藥材。

一般而言在西醫臨床上並沒有針對缺乳治療的藥物，如必要時僅使用Phenothiazine類抗精神病藥物，與Chlorpromazine相同，對交感神經，副交感神經及肌肉，有遮斷作用。對內分泌造成影響，而產生的泌乳作用，如使用於男性，會有男性女乳症之副作用產生，故本研究使用promazine為西藥正對照組。

貳、材料與方法

一、藥材基源

- (一) 穿山甲：Manis pentadactyla LINNAEUS 之鱗甲(為海關查獲之鱗甲藥材，為農委會委託國立自然科學博物館代管之庫存品，經農委會同意提供並使用於本研究，農委會正式行文如附件一)。
- (二) 王不留行：Vaccaria segetalis (NECK.) GARCKE 的乾燥成熟種子。圖一所示。

二、12S rDNA 基因定序鑑別

穿山甲粉末 0.1 g 加入 500 μ l DNA extraction buffer，經 60°C 加熱萃取 10 分鐘後，離心收取上清液，以醋酸鉀增加其鹽濃度，並以等體積之異丙醇沉澱，經 TE 緩衝液溶解沉澱後，再經 phenol/chloroform 變性蛋白質並離心收集 DNA 水層，以兩倍體積之絕對酒精沉澱 DNA，經 TE 緩衝液溶解後定量於 15 μ g/ml，抽取之 DNA 以 H1478 與 L1373 引子 PCR 放大後定序之，並於 Genbank 中比對⁽¹⁴⁾。

三、藥品製備

穿山甲依膨化法炮製之，將藥材適量裝入膨化機，直火加熱並不斷轉動，約 3-5 分鐘，待壓力達 116.50-121.56 kPa，溫度到達 110-120°C 時立即將甲片放出膨化，稱取 500 g，加入 2.5 L 蒸餾水，浸泡隔夜後，煎煮 60 分鐘，收集第一次水煎液，再加入 2.5 L 蒸餾水，煎煮 60 分鐘，收集兩次水煎液，經 50°C 減壓濃縮乾燥後，稱重並記錄產率及生藥與水煎劑乾重比，乾燥煎劑以蒸餾水(500 ml) 還原為每毫升含一克生藥之濃縮液，冷凍於-20°C 保存⁽⁶⁾。

王不留行稱取 500 g 以文火炒至爆成白花，出鍋待涼後，加入 2.5 L 蒸餾水，浸泡一小時後，煎煮 40 分鐘，收集第一次水煎液，再加入 2.5 L 蒸餾水，煎煮 30 分鐘，收集兩次水煎液，經 50°C 減壓濃縮乾燥後，稱重並記錄產率及生藥與水煎劑乾重比，乾燥煎劑以蒸餾水(500 ml) 還原為每毫升含一克生藥之濃縮液，冷凍於-20°C 保存。

四、實驗性缺乳大鼠之造型與實驗分組

Sprague-Dawley 懷孕大鼠於分娩前一週購置，每組 10 隻，並任飼與飲水，

待分娩當日向母鼠腹腔注射氟化鈉 (15 mg/kg)，連續 7 天 (正常對照組除外)。給藥組:分別灌胃穿山甲 15 g/kg (Group C)，王不留行 5、15 g/kg (Group D, E)。正常對照組 (Group A)、模型對照組 (Group B) 灌服生理鹽水 20 ml/kg，西藥對照組以 ip 注射 promazine (10 mg/kg, Group F)。每天上午 9:30 全窩仔鼠稱重，分離母仔鼠 5 小時後，仔鼠全窩稱重後，送回母鼠身邊授乳 40 min 後再稱全窩仔鼠重。測試指標：

- (一) 以全窩仔鼠比吮乳前增加的體重定為單次泌乳量。
- (二) 以每天上午仔鼠重量差定為一日泌乳量。
- (三) 每隻母鼠分娩七天後，採血，置 25°C 水浴 30 分鐘後，離心 1500 rpm，10 min，分離血清以 ELISA 測定 prolactin。
- (四) 剝離皮膚，取出乳腺，甲醛溶液固定，石臘包埋作病理切片⁽¹³⁾。

試驗分組簡表

Group A: Naive, 正常對照組。

Group B: NaF, 氟化鈉 (15 mg/kg) 造型組，不餵藥。

Group C: NaF-PS, 氟化鈉 (15 mg/kg) 造型，灌胃穿山甲 15 g/kg。

Group D: NaF-WBL, 氟化鈉 (15 mg/kg) 造型，灌胃王不留行 5 g/kg。

Group E: NaF-WBH, 氟化鈉 (15 mg/kg) 造型，灌胃王不留行 15 g/kg。

Group F: NaF-PMZ, 氟化鈉 (15 mg/kg) 造型，腹腔注射 promazine 10 mg/kg。

五、大鼠催乳素之測定

使用 Rat prolactin enzyme immunoassay kit (CI-A05101, IDS Ltd., England) 測定催乳素含量，其測定方法以競爭性酵素免疫分析法測定之，將待測樣品與試劑組中之泌乳素表準液競爭鍵結抗體後，以酵素標定之二次抗體與一次抗體結合，待受質呈色後以 450 nm 吸光值扣除 570 nm 背景吸光值後與標準曲線對照，並乘上稀釋倍數後其求出泌乳素之值。

六、非特異性免疫反應

- (一) BALB/c 小鼠分組：

六至八週 BALB/c 公鼠，每組 10 隻，並任飼與飲水，連續 7 天給藥:分別灌胃穿山甲 15 g/kg (Group B)，王不留行 5、15 g/kg (Group C, D)。正常對照

組 (Group A)。

(二) 脾臟細胞增殖反應：

脾細胞單一懸浮後，定量於 1×10^7 /ml，於 96 孔盤中培養 2×10^5 /well，分別以 ConA (5 μ g/ml)、LPS (10 μ g/ml) 的裂殖原刺激 T 細胞與 B 細胞的生長，經培養 48 小時之後，加入 MTS (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) 經四小時培養呈色後，以 490nm 吸光值扣除 670nm 景吸光值，將所得吸光值除以僅用培養液培養之對照組得刺激指數 (Stimulation Index, SI)，比較刺激指數評估藥物對於淋巴細胞增生之作用。

(三) 分離脾臟細胞及表面標記分析：

利用頸椎脫白法分別犧牲老鼠，將脾臟取出並製備成單一細胞懸浮液，更進一步利用低張溶液將紅血球懸浮漲破，而白血球則利用 HBSS 溶液清洗三次後再進行下一步的實驗。將單一白血球分離出後，利用 Fluorescein isothiocyanate (FITC) 及 Phycoerythrin (PE) 染色的單株抗體來計算不同表面標記的比例及數目。這些細胞表面標記的測定將利用於 Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) 分析法。本次實驗主要分析 T (CD3+/CD4+, CD3+/CD8+)、B (CD19+)、NK (NK 1.1) 細胞比率，與活化態 T 細胞 (CD25+, CD69+) 之比率。

(四) 細胞激素分泌實驗：

將分離出的淋巴球以 1×10^6 /ml 的濃度置於 24-well 的 Plate 中，利用已經定量過的 Con A 或 LPS 來刺激這些淋巴球。經過 16 小時的培養後，收集將上層細胞培養液，測定 TNF- α 製造的量。在取得足夠檢體以前，可將其它檢體先保存在 -80°C ，等到檢體足夠時再一起測試。TNF- α 的測定是利用 sandwich-ELISA 法。先利用第一個 TNF- α 的抗體先覆蓋在 ELISA plate 上，在 4°C 靜置一晚。在進行實驗前以 1% PBS-BSA 處理後清洗之。再將要處理的檢體加到 plate 上，置於室溫 2 小時後加入 biotin 聯結的第二個 TNF- α 抗體。兩小時的室溫靜置後，加入 avidin 聯結過氧化酵素 (avidin-linked peroxidase)，再靜置二個小時後加入受質以呈色。

七、抗腫瘤活性與細胞凋亡之研究

(一) 細胞培養：

人類肝炎細胞 Hep3B、HepG2 與肝細胞 Chang Liver 細胞 (CCL-13)，購自食品工業發展研究所，生物資源中心細胞株庫，經培養於培養液 DMEM

(supplemented with 10% fetal bovine serum, 2mM L-glutamine, a 1% nonessential amino acid mixture)，並於 37°C 含 5 % 之二氧化碳培養箱中孵育。

(二) 細胞毒殺試驗：

細胞以 1×10^4 /well 培養於 96 孔培養盤中，分別以不同濃度之穿山甲與王不留行萃取液進行細胞毒殺試驗，經培養 24、48 與 72 小時之後，將細胞培養液換除，並以 PBS 清洗過後加入 MTS，待進一步於 37°C 孵育兩個小時後，以 490nm 吸光值扣除 670 nm 背景吸光值，將所得吸光值除以僅用培養液培養之對照組得相對細胞毒殺百分比，經統計比較其細胞毒殺之作用。

(三) 凋亡細胞斷裂核酸電泳膠梯狀核酸態分析：

細胞於六公分培養皿中以 5×10^5 /plate 的細胞濃度培養，經加入不同濃度之穿山甲與王不留行萃取液進行細胞凋亡試驗，經培養 24 小時之後，細胞以膜穿孔溶液 (lysing buffer: 20 mM Tris, 10 mM EDTA, 0.2% Triton X-100, pH 8.0)，於冰上孵育 15 分鐘，將細胞以 15,000 rpm 離心沉澱，收集上清液中之凋亡細胞核酸片段，以酚與氯仿變性蛋白質並離心去除之後，將萃取之核酸溶液以兩倍體基之酒精沉澱，經 2 % 電泳凝膠分析後於紫外光燈下呈像，並使用拍立得相機紀錄之。

(四) 流式細胞儀對凋亡核酸次波峰分析：

細胞於六公分培養皿中以 5×10^5 /plate 的細胞濃度培養，經加入不同濃度之穿山甲與王不留行萃取液進行細胞凋亡試驗，經培養 24 小時之後，凋亡細胞以 70 % 酒精固定後，於 -20°C 致少培養 24 小時，之後以 0.3 ml PI staining solution (50 μ g/ml propidium iodide in DPBS)，再加入 RNase A Solution 0.3 ml (v/v) (200 unit in PBS)，經 37°C 培養 30 分鐘後，以 50 μ m 濾膜過濾大顆粒的黏著細胞後，於流式細胞儀分析，並使用 ModFit 軟體分析前凋亡核酸次波峰的比率。

參、結果

一、12S rDNA 基因定序鑑別：

```
GenBank-- AAAACAGAACACAAACGAATACCCTAATGA  
AAAACAGAACACAAACGAATACCCTAATGA  
  
AAACGAGGGTTAAAGGAGGATTTAGTAGTA  
AAATGAGGGTTAAAGGAGGATTTAGTAGTA  
  
AGCTAAGAATAGAAAGCTTAGCTGAACTCG  
AGATAAGAATAGAGAGCTTAGCTGAACTCG  
  
GCTCTAAAGCACGCACACACCGCCCGTCAC  
GCTCTAAAGCACGCACACACCGCCCGTCAC
```

與 GenBank 比對後僅三個鹼基不同，推論應屬於 *Manis pentadactyla* LINNAEUS。

二、穿山甲及王不留行對實驗性缺乳大鼠泌乳調節作用：

(一) 單次泌乳量之變化 (圖二)：

第一天：西藥對照組 (PMZ, 10 mg/kg) 對 NaF 造型組、穿山甲 (15g/kg) 及王不留行低劑量 (5g/kg) 組具有差異顯著性。

第二天：王不留行高劑量 (15g/kg) 組與西藥對照組 (PMZ, 10 mg/kg) 對 NaF 造型組有差異顯著性。

第三天：正常對照組、王不留行高劑量組 (15g/kg) 與西藥對照組 (PMZ, 10 mg/kg) 對 NaF 造型組有差異顯著性。

第四天：正常對照組與西藥對照組 (PMZ, 10 mg/kg) 對 NaF 造型組有差異顯著性。

第五天：正常對照組、穿山甲 (15g/kg)、王不留行低 (5g/kg)、高劑量組 (15g/kg) 與西藥對照組 (PMZ, 10 mg/kg) 對 NaF 造型組有差異顯著性。

第六天：正常對照組、王不留行低 (5g/kg)、高劑量組 (15g/kg) 與西藥對照組 (PMZ, 10 mg/kg) 對 NaF 造型組有差異顯著性。

第七天：正常對照組、穿山甲 (15g/kg)、王不留行低 (5g/kg)、高劑量組 (15g/kg) 與西藥對照組 (PMZ, 10 mg/kg) 對 NaF 造型組有差異顯著性。

(二) 一日泌乳量的變化 (圖三)。

第二天：正常對照組對 NaF 造型組有差異顯著性。

第三天：正常對照組、王不留行高劑量組 (15g/kg) 與西藥對照組 (PMZ, 10 mg/kg) 對 NaF 造型組有差異顯著性。

第四天：正常對照組對 NaF 造型組有差異顯著性。

第五天：正常對照組、穿山甲 (15g/kg)、王不留行低 (5g/kg)、高劑量組 (15g/kg) 與西藥對照組 (PMZ, 10 mg/kg) 對 NaF 造型組有差異顯著性。

第六天：正常對照組與西藥對照組 (PMZ, 10 mg/kg) 對 NaF 造型組有差異顯著性。

第七天：正常對照組、王不留行高劑量組 (15g/kg) 與西藥對照組 (PMZ, 10 mg/kg) 對 NaF 造型組有差異顯著性。

(三) prolactin 分泌的變化 (圖四)。

試驗前各組間無顯著差異，分娩後七天，正常對照組、王不留行高劑量組 (15g/kg) 與西藥對照組 (PMZ, 10 mg/kg) 對 NaF 造型組有差異顯著性。

(四) 乳腺病理切片 (圖五，表一)。

乳腺組織病理切片以三方向分析並給予 1-5 的分數，評分標準以 (1) 乳腺囊泡表皮細胞型態 (shape of luminal epithelial cell, from "1", cuboids to "5", squamous)。(2) 小葉間結締組織面積 (area of interlobular connected tissue, from "1", large to "5", small)。(3) 乳腺囊泡中所含的乳汁含量 (Milk content, from "1", less to "5", full)。結果經 Mann-Whitney Test 分析後如下：

(1) 乳腺囊泡表皮細胞型態比較：

NaF 造型組與 Naive 組比較，有顯著差異 ($P < 0.05$)，顯示造型成功。NaF 造型組與穿山甲組 (15g/kg) 比較，無差異顯著性。

NaF 造型組與王不留行低劑量組 (5 g/kg) 比較，有顯著差異 ($P < 0.05$)，顯示對乳腺增生有明顯改善。

NaF 造型組與王不留行高劑量組 (15 g/kg) 比較，無差異顯著性。

NaF 造型組與 promazine 組 (10 mg/kg) 比較，有顯著差異 ($P < 0.05$)，顯示對乳腺增生有明顯改善。

(2) 小葉間結締組織面積比較：

NaF 造型組與 Naive 組比較，有極顯著差異 ($P < 0.01$)，顯示造型成功。

NaF 造型組與穿山甲組 (15 g/kg) 比較，無差異顯著性。

NaF 造型組與王不留行低劑量組 (5 g/kg) 比較，有極顯著差異 ($P < 0.01$)，顯示對乳腺增生有明顯改善。

NaF 造型組與王不留行高劑量組 (15 g/kg) 比較，無差異顯著性。

NaF 造型組與 promazine 組 (10 mg/kg) 比較，有極顯著差異 ($P < 0.01$)，顯示對乳腺增生有明顯改善。

(3) 乳腺囊泡中所含的乳汁含量比較：

NaF 造型組與 Naive 組比較，有顯著差異 ($P < 0.05$)，顯示造型成功。

NaF 造型組與穿山甲組 (15 g/kg) 比較，無差異顯著性。

NaF 造型組與王不留行低劑量組 (5 g/kg) 比較，有顯著差異 ($P < 0.05$)，顯示對乳汁分泌有明顯改善。

NaF 造型組與王不留行高劑量組 (15 g/kg) 比較，有顯著差異 ($P < 0.05$)，顯示對乳汁分泌有明顯改善。

NaF 造型組與 promazine 組 (10 mg/kg) 比較，有顯著差異 ($P < 0.05$)，顯示對乳汁分泌有明顯改善。

三、非特異性免疫反應：

(一) 脾臟細胞增殖反應 (圖六)：

脾臟 T 淋巴細胞增殖反應部份，王不留行高劑量組 (15g/kg) 與正常對照組有差異顯著性，王不留行高劑量組 (15g/kg) 與穿山甲組 (15g/kg) 有差異顯著性。脾臟 B 淋巴細胞增殖反應部份，王不留行低 (5g/kg)、高劑量組 (15g/kg) 與正常對照組有差異顯著性，王不留行低 (5g/kg)、高劑量組 (15g/kg) 與穿山甲組有差異顯著性。

(二) 脾臟細胞及表面標記分析 (圖七、八)：

脾臟淋巴細胞表面標記分析部份在，在 T 毒殺型細胞、T 輔助型細胞、T 淋巴球、B 淋巴球與已分化 NK 細胞各組間均無顯得差異，但未成熟之早期 NK 細胞 (NK+/CD3+) 在王不留行高劑量組 (15g/kg) 與穿山甲組 (15g/kg) 對正常對照組有顯著性提高。

在 T 輔助細胞與 T 毒殺細胞活化態 (CD25+, CD69+) 細胞之間的變化，各組之間無差異顯著性。

(三) 細胞激素分泌實驗 (圖九):

脾細胞以 ConA (5 $\mu\text{g/ml}$)，刺激 T 淋巴球分泌 TNF- α 細胞激素方面，各組之間無差異顯著性，以 LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) 刺激 B 淋巴球分泌 TNF- α 細胞激素方面，各組之間無差異顯著性。

四、抗腫瘤活性與細胞凋亡之研究：

(一) 細胞毒殺試驗 (圖十、圖十一)

細胞毒殺試驗結果顯示，穿山甲藥材對 CCL-13、HepG2、Hep3B 細胞的毒殺試驗中，其 IC50 的濃度在 HepG2 為 $587.9 \pm 43.6 \mu\text{g/ml}$ 、Hep3B 的 IC50 濃度為 $894.9 \pm 92.2 \mu\text{g/ml}$ ，CCL-13 的 IC50 濃度高於 3.2 mg/ml。王不留行藥材對 CCL-13、HepG2、Hep3B 細胞的毒殺試驗中，其 IC50 的濃度在 HepG2 為 $115.3 \pm 23.7 \mu\text{g/ml}$ 、Hep3B 的 IC50 濃度為 $289.2 \pm 37.1 \mu\text{g/ml}$ ，CCL-13 的 IC50 濃度為 $1217.9 \pm 65.3 \mu\text{g/ml}$ 。

(二) 凋亡細胞斷裂核酸電泳膠梯狀核酸態分析 (圖十二)

凋亡核酸片段分析中顯示，CCL-13 在穿山甲藥材粗萃取液的作用之下並無顯著的凋亡核酸片段，穿山甲、王不留行藥材粗萃取液的作用之下高劑量有凋亡片段產生。Hep3B 在王不留行藥材中於 250 $\mu\text{g/ml}$ 培養兩天，可觀察到明顯的凋亡片段，穿山甲藥材中於 1500 $\mu\text{g/ml}$ 培養兩天，可觀察到明顯的凋亡片段。HepG2 在王不留行藥材中於 250 $\mu\text{g/ml}$ 培養兩天，可觀察到明顯的凋亡片段，穿山甲藥材中於 1500 $\mu\text{g/ml}$ 培養兩天，可觀察到明顯的凋亡片段。

(四) 流式細胞儀對凋亡核酸次波峰分析 (表二、三)

CCL-13、HepG2、Hep3B 細胞經由穿山甲不同劑量處理培養 24 小時後，以酒精固定後，加入 PI 染色以流式細胞儀分析，結果顯示，穿山甲在高劑量 1000 $\mu\text{g/ml}$ 對 CCL-13 有明顯之凋亡細胞產生，對 HepG2 細胞在高於 500 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度時才有明顯的凋亡細胞表現，在 Hep3B 細胞方面，高於 1000 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度時才有明顯的凋亡細胞表現。CCL-13、HepG2、Hep3B 細胞經由王不留行不同劑量處理培養 24 小時後，以酒精固定後，加入 PI 染色以流式細胞儀分析，結果顯示，穿山甲在高劑量 500 $\mu\text{g/ml}$ 對 CCL-13 有明顯之凋亡細胞產生，對 HepG2 細胞在高於 125 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度時才有明顯的凋亡細胞表現，在 Hep3B 細胞方面，高於 250 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度時才有明顯的凋亡細胞表現。

肆、討論

一、泌乳能力之影響

中藥穿山甲單用的情況下對於缺乳大鼠並沒有較顯著的差異，其原因有可能是穿山甲的使用常合併其他藥材組成方劑，借由各單味藥之間的協同作用，而達到改善泌乳之效果¹⁵⁻¹⁷，況且中醫施治須行辨證論治，證候不同所用方藥之加減亦不同，中醫學認為，乳汁由氣血津液所化，資于衝任，若氣血虧虛，津液不足，則致乳汁減少或不足；或七情所傷，肝氣鬱結，可致乳脈不通而缺乳¹⁸。宋·陳自明著婦人大全良方·產後乳少或止方論：「婦母乳汁，乃氣血所化，若元氣虛弱，則乳汁短少，初產乳房頰脹，此乳未通…若累產無乳，此內亡津液，蓋乳汁資于沖任，若婦人疾在沖任，乳少而色黃者，生子則怯弱多疾。」明確指出了缺乳的病機，同時還指出了乳汁的質和量能直接影響嬰兒體質的強弱。泌乳機制十分複雜，它與嬰兒吮奶的刺激、產婦的營養狀況、血清中催乳素及催乳素抑制因素多巴胺（Dopamine）的含量有密切相關¹⁹。一般而言在西醫臨床上並沒有針對缺乳治療的藥物，如必要時僅使用 Phentiazine 類抗精神病藥物，與 Chlorpromazine 相同，對交感神經，副交感神經及肌肉，有遮斷作用。對內分泌造成影響，而產生的泌乳作用，如使用於男性，會有男性女乳症之副作用產生，故本研究即利用多巴胺的致效劑 promazine 為西藥對照組，觀察相關的泌乳情況，就單次泌乳量而言，穿山甲藥材需到五日後才對泌乳量有較明顯的改善，而王不留行藥材低劑量在第三天，高劑量在第二天均有明顯的改善作用，相較之下，王不留行單味藥對於缺乳大鼠的單次泌乳能力似乎比穿山甲藥材來的明顯。就每日泌乳量的數據中顯示，穿山甲藥材與王不留行低、高劑量組於分娩後第五日均有效的改善缺乳的情況，比較單次泌乳與單日泌乳上的差異，其原因有可能是中藥投藥的時間點，在比較西藥對照組的結合又可知，西藥作用較為快速，對於單次泌乳的改善能有效反應，由單日泌乳量結果中顯示相對中藥的作用雖然較為緩慢，但總結果（每日泌乳量）可知，小鼠日增重明顯高於西藥對照組，進一步由分娩後七日，母鼠犧牲後採取的全血進行分析，穿山甲、王不留行低、高劑量組與西藥對照組均能提高 prolactin 的分泌，但王不留行高劑量組與西藥對照組對 NaF 造型組有顯著的差異；分析乳腺之組織切片更能明顯的看出，乳腺組織在 NaF 造型後，乳腺細胞明顯發育不完整，Interlobular dense connection tissue 與 Interlobular loose connection tissue 的組織間隙明顯，乳腺細胞較小，而經過餵食穿山甲、王不留行低、高劑量組與西藥對照組後，乳腺細胞有明顯的成長，其中以王不留行低、高劑量組與西藥對照組較為明顯，glandular alveoli 較為飽滿。綜合以上數據我們得知，雖然

穿山甲藥材對於缺乳動物之泌乳能力於餵食較長時間後仍具有改善泌乳之能力，但王不留行為植物性藥材，對於缺乳動物模型之泌乳能力有改善作用，明顯高於穿山甲藥材，雖然本研究中並無使用其他高劑量的穿山甲投於缺乳動物，但站在保育野生動物的立場，對於王不留行在泌乳能力的取代上應具備重要的意義，況且古籍中之記載：「穿山甲、王不留，婦人吃了乳常流。」即可知道，王不留行在增進泌乳的作用上是與穿山甲具有同養的評價，更何況科學數據更證明，王不留行之效用更高於穿山甲。

二、免疫調節的作用

在免疫調節作用中，脾臟 T 淋巴細胞增殖反應部份，王不留行高劑量組與正常對照組有差異顯著性，王不留行高劑量組與穿山甲組有差異顯著性。脾臟 B 淋巴細胞增殖反應部份，王不留行低、高劑量組與正常對照組有差異顯著性，王不留行低、高劑量組與穿山甲組有差異顯著性，王不留行對於 T、B 淋巴球的增殖有明顯的調節作用，在細胞的表面抗原部份，脾臟淋巴細胞表面標記分析部份在，在 T 毒殺型細胞、T 輔助型細胞、T 淋巴球、B 淋巴球與已分化 NK 細胞各組間均無顯得差異，但未成熟之早期 NK 細胞 (NK+/CD3+) 在王不留行高劑量組與穿山甲組對正常對照組有顯著性提高，在 T 輔助細胞與 T 毒殺細胞活化態 (CD25+, CD69+) 細胞之間的變化，各組之間無差異顯著性。脾細胞以 ConA (5 µg/ml)，刺激 T 淋巴球分泌 TNF-α 細胞激素方面，各組之間無差異顯著性，以 LPS (10 µg/ml) 刺激 B 淋巴球分泌 TNF-α 細胞激素方面，各組之間無差異顯著性，此結果或許顯示，在非特異性的免疫調節中，穿山甲與王不留行均能提高 T、B 細胞的增殖，對於未成熟之早期 NK 細胞 (NK+/CD3+) 亦具有調節的作用，在大陸學者鄭敏的研究中亦顯示，穿山甲對於白血球缺少有提昇的作用²⁰⁻²¹，在本研究中王不留行對於穿山甲的白血球分裂增殖亦有相同功效，但對於 TNF-α 細胞激素的分泌並無明顯的變化，然而對於其他影響非特異性免疫的細胞激素分泌的調節須要更進一步的試驗。

三、抗腫瘤活性

在中國大陸所發表的期刊中指出，穿山甲藥材具有腫瘤抑制的作用，並在許多方臨床試驗的方劑組成中加入穿山甲作為軟堅散結的方藥²²⁻²⁴，本試驗使用王不留行的原因在於，中國大陸與日本對於王不留行成份的研究中均指出，王不留行亦具有抗腫瘤活性^{10-12, 25-26}，而中國大陸的報告中指出，肝癌的臨床治療方劑中經常使用穿山甲與王不留行²⁴⁻²⁶，本試驗於是使用 Chang liver (CCL-13)、Hep3B、HepG2 等肝癌細胞作一體外試驗，觀察穿山甲與王不留

行對於體外肝癌細胞的毒殺作用，結果顯示，王不留行較有明顯的細胞毒殺作用，所使用的相對劑量亦較低，本試驗所使用的劑量標準是以相對於原生藥之重量的作用，故相對劑量較大，在穿山甲的粗萃液中一克生藥的體外試驗相對重量僅有 115 mg，王不留行的粗萃液中一克生藥的體外試驗相對重量僅有 162 mg，觀察王不留行所造成的細胞毒殺試驗中顯示，王不留行即是透過細胞凋亡的模式來進行，其牽涉到的機轉在日本學者所作的試驗中提到，或許與其類雌激素的作用有關⁷⁻¹²，其相關機轉須待更進一步的試驗來證實。

伍、結論與建議

- 一、王不留行藥材在泌乳、免疫調節與抗腫瘤的藥理作用中或許可作為取代穿山甲藥材的參考，尚須更多試驗數據，如方劑的綜合應用等。
- 二、由於中醫治病均以方劑行之，應參考中藥方劑對於產後缺乳的方劑中積極尋找非使用穿山甲藥材的方劑，或使用王不留行為取代藥材的試驗，以進一步證實全面取代穿山甲之入藥。
- 三、由於台灣民間常使用野牡丹的根部藥材來作為王不留行藥材，本試驗原希望能進行相關試驗，看看是否野牡丹的根部藥材與原基源麥藍菜種子具有同等之功效，但有於經費預算不足以進行此一試驗，但希望在未來有機會能進行此一試驗，為尋得另一穿山甲藥材的取代性藥材。

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 CCMP92-CT-07 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. <http://www.tesri.gov.tw/content4/mammal.htm>
2. 野生動物保育法，中華民國七十八年六月二十三日，總統華總（一）義字第三二六六號令制定公布全文四十五條，中華民國八十三年十月二十九日，總統華總（一）義字第六五二五號令修正公布。
3. 李時珍，本草綱目，國立中國醫藥研究所，臺北縣。
4. 蔡永敏，最新中藥藥理與臨床應用，華夏出版社，北京。
5. 張錫純，醫學衷中參西錄選評，啟業出版社，台北市。
6. 鄭虎占、董澤宏、余靖，中藥現代研究與應用，學苑出版社，北京。
7. Yun YS. Morita H. Takeya K. Itokawa H. Cyclic peptides from higher plants. 34. Segetalins G and H, structures and estrogen-like activity of cyclic pentapeptides from *Vaccaria segetalis*. *Journal of Natural Products*. 1997; 60: 216-218.
8. Sang SM. Lao AN. Chen ZL. Uzawa J. Fujimoto Y. Three new triterpenoid saponins from the seeds of *Vaccaria segetalis*. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2000; 2: 187-193.
9. Sang S. Lao A. Wang H. Chen Z. Uzawa J. Fujimoto Y. Triterpenoid saponins from *Vaccaria segetalis*. *Journal of Asian Natural Products Research*. 1999; 1: 199-205.
10. Jia Z. Koike K. Kudo M. Li H. Nikaido T. Triterpenoid saponins and sapogenins from *Vaccaria segetalis*. *Phytochemistry*. 1998; 48: 529-536.
11. Koike K. Jia Z. Nikaido T. Triterpenoid saponins from *Vaccaria segetalis*. *Phytochemistry*. 1998; 47: 1343-1349.
12. Yun YS. Shimizu K. Morita H. Takeya K. Itokawa H. Shirota O. Triterpenoid saponin from *Vaccaria segetalis*. *Phytochemistry*. 1998; 47: 143-144,.
13. 侯士良等，比較豬蹄甲、穿山甲泌乳作用實驗研究，中國中藥雜誌，2000; 25: 44-46.
14. 蔡貴花、簡一治、謝長奇、張賢哲，保育類龜板應用 DNA 定序之鑑定，第十七屆天然藥物研討會暨中草藥生物科技研討會壁報論文。
15. 馬麗，穿山甲的藥理及臨床研究，中醫藥研究，2002; 18: 46-47.

16. 董西林，乳癰解毒湯配合抗生素治療急性乳腺炎症 56 例，陝西中醫，1997; 18: 58-59
17. 李世杰，乳痺湯的應用，內蒙古中醫藥，1987; 6: 147-148。
18. 姜海斌、蔣俊和，中藥治療產後缺乳的概況，湖南中醫藥導報，2003; 9: 66-67.
19. Turkington RW. Prolactin secretion in patients treated with various drugs: phenothiazines, tricyclic antidepressants, reserpine, and methyl dopa. Arch Intern Med. 1972; 130: 349-354.
20. 鄭敏，穿山甲治療白細胞減少症，中國民間療法，2001; 9: 42-43.
21. 李鐘瑞，長安生白沖劑治療腫瘤化療白細胞減少症，陝西中醫，1994; 15: 51-52.
22. 楊立權、遲程、遲萍，穿山甲的研究概況與展望，雲南中醫學院學報，1994; 17: 46-50.
23. 雍履平，葉天士應用穿山甲配伍經驗探析，安徽中醫臨床雜誌，1994; 6: 45-46.
24. 趙振平，中西醫結合治療中晚期肝癌，臨床醫學，1987; 3:182-183.
25. 王嵐，馬傳軍，李遵孟運用王不留行的臨床經驗，安徽中醫臨床雜誌，1998; 10: 301.
26. 楊洪芝，黃酒沖服炮山甲、王不留行末為主治療乳房疾病，山東中醫雜誌，1995; 14: 254-255.

[\(5-03 圖\)--CCMP92-CT-07.doc](#)