

中藥減緩老化程序機轉及效應評估(2-2)

The mechanisms and effect of Chinese medicines in attenuation of ageing processes(2-2)

高雄市立中醫醫院

楊 淑 齡

摘 要

本研究計畫重點在於篩選抗衰老的中藥，評估其效應，以確立中藥在預防機體老化上扮演的重要角色，並在研究過程中以分子生物學角度，評估探討中藥參與抗衰老過程之可能機轉，是否為中藥誘發 HSP 分子，以減弱自由基，並增加細胞修復能力，而減緩細胞或生物機體的老化過程。

本計畫進行二年實驗，以完成藥物篩選及體外培養人體纖維母細胞與動物體內實驗之效應評估。第一年篩選五種方劑，進行活體外培養細胞實驗；第二年篩選第一年五種方劑中之二種方劑進行動物實驗，偵測活體內、外細胞之細胞內、外所含 NO 量，及細胞中 HSP 之合成，以評估中藥應用於動物體內抗衰老之效應及可能機轉。

實驗顯示篩選之中藥可在動物體內，外細胞誘發 HS 蛋白，而實驗組也表現 NO 量有統計意義的差異存在。中藥產生減緩老化效應的機轉很可能是藥物誘發細胞內合成 HS 蛋白，而影響 NO 的產生及促進 NO 排出，而減少 NO 對細胞的傷害。希望藉由對中藥參與抗老化之機制能更加了解，使臨床醫療人員在面對老化或與老化有關之慢性疾病之治療或處置時能有幫助，對傳統中藥之

功效主治或新藥之開發有更深一層的認知與提昇。

關鍵詞：老化，HSP 分子，自由基

Kaohsiung Municipal Chinese Medical Hospital

Yang Shu Ling

Abstract

This study was designed to screen the anti-ageing effects of Chinese medicine compounds. The role in resisting ageing was assessed in vitro and in vivo. A point of molecular biological view in studying the mechanism of antiageing was established to confirm if Chinese medicines induce the synthesis of HS proteins which mitigate free radicals and enhance cellular repair and that attenuate the ageing processes.

Whole study was divided two parts. Five types of herbal extract compounds were used to study whether these traditional medicines could provide some effects for antiageing. First year, cultured human fibroblasts were treated with herbal extract compounds to access the effect of these compounds on HS proteins synthesis and nitrate existence in vitro. The second year, Wistar rats were treated with herbal extract compounds to access the effect of these compounds on HS proteins, nitrate existence in vivo.

The highly suspected mechanism of traditional Chinese medicines in attenuation of ageing processes were drug-induced HSPs decreased NO production and increased NO secretion. The improvements in our understanding of the regulation of traditional Chinese medicine/Nitric Oxide pathway on the molecular level may lead to the development of new drugs or managements in ageing or associated chronic disease.

Keywords : Ageing, HS protein, free radical

壹、前言

老化是生物體機能減退之狀態，生物體即使不患任何一種致死性疾病，最後也仍需面對逐漸衰老而死亡的命運，因此要延長或維持生命體的生命品質及壽命，則必需要解開帶領生命體驅向死亡之謎，並藉以進而尋求有效預防或治療的處置方法。

衰老的發生機轉有許多假說，例如：自由基學說(Harman D., 1992)，體細胞突變學說(Failla G.,1990; Szilard L.,1959)，交聯學說(Bjorksten J.,1990)等，其中以自由基學說為研究最多、成果最受肯定，為與機體老化最有關係者(Cestaro B., 1997)，老化主要為自由基對組織或器官的細胞及細胞膜造成損傷而造成(Casado JA.,1996; Cestaro B., 1997)，自由基中的 NO(nitric oxide)是一種在哺乳類動物機體即會自然產生的代謝物，並在許多生理及病理變化過程中扮演重要角色，有研究顯示 NO 可對機體產生傷害(Smirin BV. 2000)，本計畫中以 NO 之偵測作為評估細胞損傷與機體老化的自由基指標之一。

HSP 分子被公認為一種保護性蛋白，大部份的研究顯示 HSP 分子可以保護細胞免於受傷害(Renkawek K.,1993)，在細胞中 HSP 分子主要是扮演伴隨者(chaperone)的角色(Georgopoulos C.,1993)，主導細胞修復及細胞週期之演化進行(Milarski KL., 1989; Samali A., 1996; Wang JH., 1995)，並參與蛋白質結構改變，而影響蛋白質的生理活性，幫助功能性蛋白的形成；並使蛋白分子在膜穿越時改變結構而更易快速通過膜(Manev H.,1994；Parnham MJ.,1992；Wiech H.,1990；Wienhues U.,1992)。HSP 分子也積極參與了死亡細胞的分解及蛋白質碎片的加速移除(Cox G.,1994；；Mailhos C.,1993；Mehlen P.,1996；Parsell DA.,1993)。在老化的細胞及機體上都發現 HSP 分子之合成或含量較低(Borghetli AF.,1991; Campanini C.,1992; Congy F.,1995; Garcia-Arumi E., 1998)，而持續給與 HSP 分子之誘發刺激，也可減緩老化之過程(Rattan SI.,1998)，而在主持人長期對 HSP 分子研究的過程中也發現長期施與 HSP 誘發處置之動物，其衰老死亡過程皆比較遲緩。在哺乳類可被誘發合成之 HSP 分子中以 HSP72 及 HSP89 為最主要的兩種(Craig EA.,1993，Lindquist S.,1986；Liu AY.,1989)其

中尤其以 HSP72 已被證實可加速生理運作，發揮特殊保護與修復功能，避免細胞甚至生物體死亡(Ashburner M.,1979；Tissiers A.,1974；Yang SL.,1995；Yang RC.,1996)。許多研究顯示機體細胞可受誘發而產生 HSP 分子之合成，以發揮保護細胞之功效（Yang SL.,1995；Chen HW.,1995; Locke M.,1996；Maiello M.,1998；Rao DV.,1999），其中內皮細胞(endo- thelial cells)可因受 heat shock 處置，誘發 HSP72 合成，並避免氧化之傷害(Jornot L.,1991；Wang JH.,1995；Xu Q.,1996；Portig I.,1996; Graven KK.,1997；Wang JH.,1997；Gill RR.,1998；Wagner M.,1999；Ikeda T.,2000)，富含內皮細胞的主動脈(aorta) 受 heat shock 處置後，可使其 NO 合成酵素受抑制,使 NO 量減少,而保護細胞與器官(Hector R.,1997；Scarim AL.,1998；Toporsian M., 2000)。

中國自古即有學者提出抗老延年的方藥，如黃帝內經中已提到“七七”“八八”腎氣漸衰，神農本草等也收錄許多益壽延年的藥物，近代李時珍之本草綱目更收載益壽藥物 253 種，集延年藥物之大成。本計畫在第一年選擇五種常用安全性高之補養劑，進行實驗以探討這些方劑產生之效應，並以已廣為應用於老化研究且穩定性高之培養人體纖維母細胞進行實驗(BorghettiAF.,1991;Campanini C.,1992; Rattan SI.,1998)，本年度則以篩選之兩種中藥補養劑進行動物實驗，期望獲得更進一步之結果，以探討中藥用於抗衰老的效應及可能機轉。

補養類中藥可在活體外培養的人體纖維母細胞誘發保護性蛋白 HSP72 合成，並可能藉其對細胞產生之作用—減弱 NO 合成酵素，而降低 NO 之產生量，並加速 NO 之排除，使得 NO 對細胞傷害減弱，進而使生物機體的老化作用減緩。

貳、材料與方法

一、藥材購買：

選取二種補養類方劑：補中益氣湯、六味地黃丸，依組成購買單味藥。補中益氣湯及六味地黃丸方劑組成，出自清汪詡庵醫方集解，六味地黃丸組成比

例為地黃：山茱：山藥：茯苓：牡丹皮：澤瀉 = 8：4：4：4：4：3；補中益氣湯組成比例為黃耆：人蔘：甘草：白朮：陳皮：當歸：升麻：柴胡 = 7.5：5：5：2.5：2.5：2.5：1：1。

二、生藥組成方劑成份抽提萃取：

購買藥材依組成調劑為方劑後，進行藥物煎煮與成份抽提。

三、動物購買及飼養：

由中央研究院動物中心購買雄性、250 公克重 Wistar 大白鼠，並委託私立高雄醫學大學動物中心飼養。

四、藥物投與：

分別以劑量濃度 830 mg/Kg 藥物投與動物，對照組投與等量水液，每日投與二次，連續投與十四日。

五、NO 測定：

給藥之十四日內，分別於第三天、第七天及第十四天抽血，以 NO assay kit 偵測血漿中 Nitrite 量。

六、HSP 分子偵測：

(一)細胞蛋白液萃取：

1.淋巴球中蛋白萃取：

抽血 2 ml、並分離出淋巴球，以超音波擊碎細胞取得萃取液。

2.器官組織蛋白萃取：

將動物犧牲，灌流後取主動脈、肝、心、腎、腓腸肌組織，將組織切碎研磨後，以超音波擊碎細胞取得萃取液。

(二)膠凝電泳法分析蛋白質組成：

將萃取完成之膠泳蛋白液進行 SDS-PAGE 膠凝電泳。

(三)免疫化學染色法：

SDS-PAGE 膠體以蛋白質點轉印器，將蛋白質帶轉印至硝化木纖維紙上，再以 HSP72 之單株抗體進行免疫染色。

七、統計分析：

測定之 NO 量以 ONE WAY ANOVA 進行統計分析。

參、結果

六味地黃丸組血漿中，NO 的含量變化，在給藥第三天及第七天顯示統計上有意義的降低，第十四天顯示統計上有意義升高(圖四)。補中益氣湯組呈現相似的表現，血漿中 NO 的含量變化在給藥第三天及第七天顯示統計上有意義的降低，第十四天顯示統計上有意義升高(圖四)。

若分別比較兩種方劑間之 NO 含量變化，分別在第三天，第七天及第十四天皆呈現無統計上差異存在(圖一、圖二、圖三)。

在 HS 蛋白偵測上，六味地黃丸組之心肌細胞無論是對照組或實驗組皆可偵測到 HS 蛋白，但是在第三天及第七天兩組之差異較顯著，而在第十四天呈現較少量(圖五)；肝臟細胞無論是對照組或實驗組皆可偵測到 HS 蛋白，第三天及第七天兩組之差異較顯著，而在第十四天呈現較少量(圖五)；在腓腸肌細胞無論是對照組或實驗組皆可偵測到 HS 蛋白，但是在第三天及第七天兩組之差異較顯著，而在第十四天呈現較少量(圖五)；腎組織細胞無論是對照組或實驗組皆可偵測到 HS 蛋白，但兩組之差異不顯著(圖六)；主動脈細胞無論是對照組或實驗組皆可偵測到 HS 蛋白，但兩組之差異不顯著(圖六)；淋巴球細胞無論在對照組或實驗組皆無法偵測到 HS 蛋白(圖六)。補中益氣湯組之心肌細胞無論是對照組或實驗組皆可偵測到 HS 蛋白，但是在第三天組之差異較顯著，而在第七天及在第十四天呈現遞減量(圖五)；肝臟細胞無論是對照組或實驗組皆可偵測到 HS 蛋白，第三天及第七天兩組之差異較顯著，而且在第七天最顯著，而在第十四天呈現較少量(圖五)；在腓腸肌細胞無論是對照組或實驗組皆可偵測到 HS 蛋白，但是在第三天及第七天兩組之差異較顯著，而在第十四天呈現較少量(圖五)；腎組織細胞無論是對照組或實驗組皆可偵測到 HS 蛋白，但兩組之差異不顯著(圖六)；主動脈細胞無論是對照組或實驗組皆可偵測到 HS 蛋白，但兩組之差異不顯著(圖六)；淋巴球細胞無論在對照組或實驗組皆無法偵測到 HS 蛋白(圖六)。

肆、討論

本研究計畫重點在於篩選抗衰老的中藥，評估中藥在預防機體老化上扮演的重要角色，並在研究過程中，以分子生物學角度探討中藥參與抗衰老過程之可能機轉，是否為中藥誘發細胞產生 HSP 分子，以減弱自由基，並增加細胞修復能力，而減緩細胞或生物機體的老化過程。

本計畫提出一項較大膽假設，為參與衰老過程的另一條生物分子途徑(HSP 假說)，跳脫熱門的自由基理論，並期望藉由本計畫評估中藥在體內(in vivo)細胞之作用差異，及其參與細胞或機體衰老或死亡之可能假設。

計畫設計之初，原設計之 NO 偵測以 Griess solution 進行 nitrite 計量再估算 NO 之量，但在文獻回顧(Nims RW.et al.,1996)時發現，NO 在水溶液的狀態下，很快會轉換為 Nitrate 及 Nitrite，而非只轉換為 Nitrite，因此只單純估算 Nitrite 之量，無法代表檢測樣本中 Nitric Oxide 之量，必需再以還原酵素(NADH-dependent enzyme nitrate reductase)將 Nitrate 完全還原為 Nitrite，因此，將 NO 之偵測修改為以 Nitric Oxide Assay Kit(Calbiochem CO.)進行。除了前述因素加上考量經費之運用，因此選擇單一濃度 0.05 mg/ml 進行 NO 組實驗，而生長曲線之觀察仍維持五種濃度進行測試。進行 Nitric Oxide 之實驗需注意取樣環境是否會干擾實驗的準確度，如本實驗為體外培養細胞之情形，必需避免使用含 nitrate 之 RPMI 1640 等為培養基。估算加藥前後細胞生長情形，皆可在一週內生長至所需細胞成長數，但是高劑量組(5 mg/ml)之細胞生長在不同之藥物組皆有抑制現象(圖一至圖五)，其中六味地黃丸組、人參養榮湯組及補中益氣湯組甚至有細胞快速凋亡之現象(圖一至圖三)；因此這也指示出補養類中藥方劑仍需考量作用安全適應濃度，尤其在一般民眾對中草藥之認知有偏差時，常發生自行濫用藥物之情形，這是非常危險的。在給藥各三、六、九天後，細胞內及細胞外控制組(未加藥組)與實驗組(加藥組) NO 含量之比較，以 T 檢定分析後，顯示細胞內 NO 含量則在加藥三天後即明顯比未加藥組減少，而給藥六及九天後細胞外 NO 含量和未加藥組相比呈有統計意義的增加，但是，可能因實驗樣本數因考量試劑比較昂貴，而只有三個樣本數，在統計時樣本數太小

影響統計結果，若不考量統計之意義，大部份數據仍顯示相似結果(表一、圖六至圖十)。

有研究顯示 HSP 會抑制 I κ B 磷酸化(phosphorylation)，因而影響和其連結在一起的 NF- κ B 無法解離，以致無法定位於核中，並因此使 iNOS 的基因表現(gene expression)受阻，導致 NO 無法產生(Taylor BS.et al.,1997；Moncada S.1993；Moncada S.et al.,1989)，若比較 HSP72 之合成在第三天量增多，是否本實驗誘發之 HSP72 參與這路徑，使得第三天時細胞內 NO 之產生減少，而且有研究也顯示 HSP 可幫助物質快速通過膜(Manev H.et al.,1994；Pamham MJ. et al.,1992；Wiech H. et al.,1990；Wienhues U. et al.,1992)，本實驗在加藥六及九天後細胞外 NO 含量和未加藥組相比呈有統計意義的增加之結果是否也是第三天誘發產生的 HSP 參與之結果是需要再深入探究而非常有意義的。

本實驗發現，以中藥誘發 HS 蛋白之能力，因不同器官組織細胞而表現不同，但大約都是在第三天至第七天即大量合成再慢慢衰減，而細胞外血漿中 NO 量則是在第三及第七天遞減，然後在第十四天遞增，或許是 HSP 合成後在第三至第七天參與抑制 NO 之合成，在第七至十四天又促進 NO 之排除造成。

本實驗結果發現所篩選之方劑在投與動物後可增加細胞分泌(排出)nitric oxide 之量，以減弱細胞內 nitric oxide 之量，並使細胞內產生的 nitric oxide 也減少(圖七)，而可能藉以更相對減弱了 nitric oxide 對細胞之傷害，並增加細胞生長及修復能力而減緩細胞的老化過程。而這結果在生物機體之體內及體外培養細胞皆有相似表現，而減緩生物機體整體之老化過程機轉與 HSP 之關係則尚待進一步探究。

伍、結論與建議

補養類藥物之投與可增加細胞外 nitric oxide 之量，並使細胞內產生的 nitric oxide 也減少。本實驗所篩選之方劑在投與動物體內或體外之培養細胞時，皆可增加細胞分泌排出)nitric oxide 之量，以減弱細胞內 nitric oxide 之量，加上細胞內之產量也減少，而可能藉以相對減弱 nitric oxide 對細胞之傷害，並

增加細胞生長及修復能力而減緩細胞的老化過程。

結果顯示中藥減緩老化的可能機轉，非常可能是中藥誘發 HS 蛋白合成，因而減少 NO 的產生並增加 NO 的排除。

陸、參考文獻

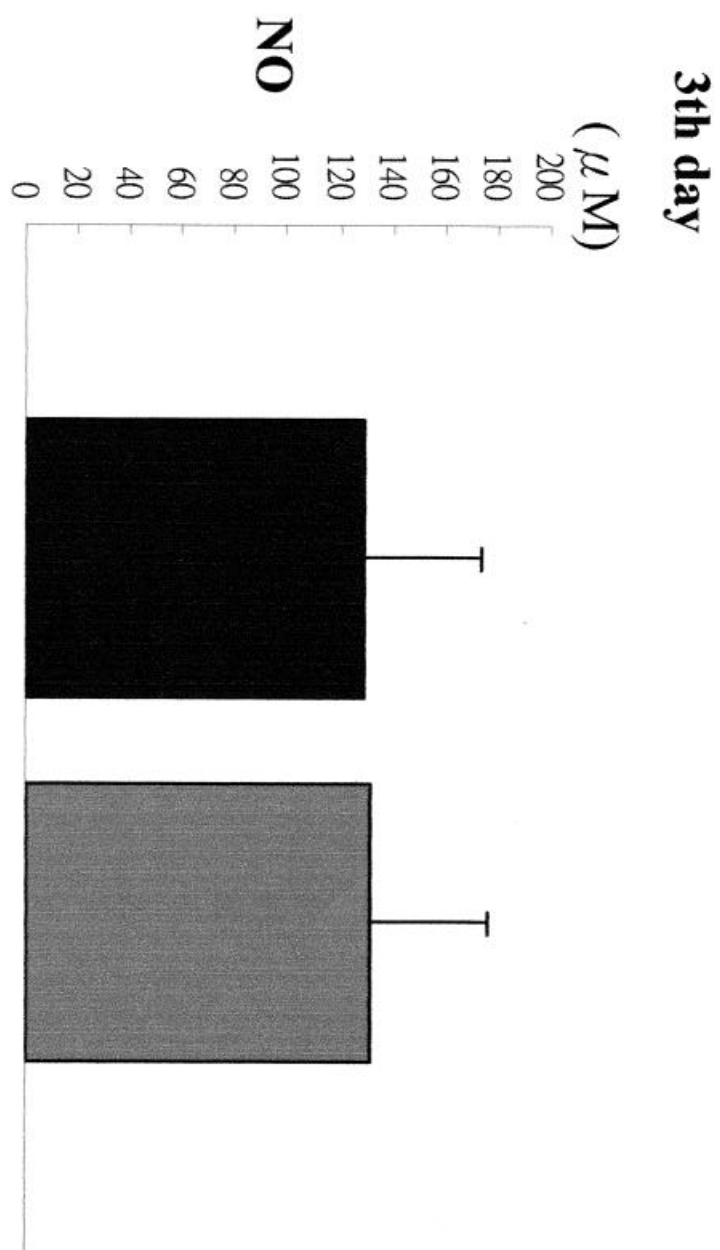
1. Ashburner M. Bonner J. 1979: The induction of gene activity in drosophila by heat shock., *Cell.*, 17:241-54.
2. Bjorksten J. Tenhu H.1990: The crosslinking theory of ageing.*Exp. Gerontol*, 25:91.
3. Borghelti AF. Campanini C. Alfieri R. Petronini PG., 1991: Attenuated Induction of heat shock proteins in human fibroblasts during ageing in vitro. *Acta Biomed Ateneo Parmense.*, 62(3-4): 117-24.
4. Campanini C / Petronini PG. Alfieri R. Borghetti AF.,1992: Decreased expression of heat shock protein 70 mRNA and Protein in WI - 38 human fibroblasts aging in vitro., *Ann NY Acad Sci.*, Nov 21,663 :442-3.
5. Casado JA. Merino J. Cid J. Subira ML. Sanchez-Ibarrola A.,1996: Oxidizing agents and free radicals in biomedicine., *Rev Med Univ Navarra.*, 40(3):31-40.
6. Cestaro B., Giuliani A., Fabris F., Scarafioti C. 1997:Free radicals, atherosclerosis, ageing and related dysmetabolic pathologies: biochemical and molecular aspects. *Eur J Cancer Prev*, 6(1):s25-30.
7. Chen HW. Yang SL. Jin-HH. Tsai YF.Tsai LY.Chen SS. Yang RC. 1995: Synthesis of HSP72 induced by exercise in high Temperature, *Chinese J Phy.*, 38(4):241-6.
- 8 Cox G. Oberley LW. Hunninghake GW., 1994: Manganese super – oxide dismutase and heat shock protein 70 are not necessary for suppression of apoptosis in human peripheral blood neutrophils., *Amer. J Res. Cell Mol. Bio.*,10(5):493-8.
9. Craig EA. Gambill BD. Nelson RJ. 1993: Heat shock proteins molecular

- chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.*,57(2): 402-14.
10. Congy F., Bonnefont-Rousselot D., Dever S., Delattre J., Emerit J. 1995: Study of oxidative stress in the elderly. *Presse Med*, Jul 1-8; 24(24):1115-8.
 11. Failla G. 1990: The ageing process and somatic Mutations. *The Biology of Ageing*. Am Inst Biol Sci Washington DC.
 12. Garcia-Arumi E., Andreu AL., Lopez-Hellin J., Schwartz S. 1998: Effect of oxidative stress on lymphocytes from elderly subjects. *Clin Sci*, 94(4):447-52.
 13. Georgopoulos C. Welch WJ.,1993: Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones.,*Annu. Rev. Cell Biol.*, 9:601-34.
 14. Gill RR., Gbur CJ Jr., Fisher BJ., Hess ML., Fowler AA 3rd., Kukreja RC., Sholley MM. 1998: Heat shock provides delayed on against oxidative injury in cultured human umbilical vein endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol*, Dec;30 (12):2739-49.
 15. Graven KK., Farber HW. 1997: Endothelial hypoxic stress protein. *Kidney Int*, Feb;51(2):426-37.
 16. Harman D.1992: Free radical theory of ageing. *Mutat Res Dnaging genet Instab Ageing.*,275:257.
 17. Hector RW., Marnie R., Jonathan RW. 1997: The heat shock response inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression by blocking I κ -B degradation and NF- κ B nuclear translocation. *Biochem Biophys Res Commun*, 231:257-263.
 18. Ikeda T., Ikenoue T., Xia XY., Xia YX. 2000: Important role of 72-kd heat shock protein expression in the endothelial cell in acquisition of hypoxic-ischemic tolerance in the immature rat. *Am J Obstet Gynecol*, Feb;182(2):380-6.
 19. Jornot L., Mirault ME., Junod AF. 1991: Differential expression of hsp70 stress proteins in human endothelial cells exposed to heat shock and hydrogen peroxide. *Am J Respir Cell Mol Biol*, Sep;5(3):265-75.
 20. Lindquist S.1986: The heat shock response. *Annu. Rev Biochem.*, 55:1151-91.

21. Liu AY. Bae-Lee MS. Choi US. Li BS.,1989: Heat shock induction of HSP89 is regulated in cellular ageing. *Biochem biophys Res Commun.*, 162(3):1302-10.
22. Locke M., Tanguay RM. 1996: Diminished heat shock response in the aged myocardium. *Cell Stress Chaperones*, Dec;1(4):251-60.
23. Maiello M., Boeri D., Sampietro L., Pronzato MA., Odetti P., Marinari UM. 1998: Basal synthesis of heat shock protein70 increases with age in rat kidneys. *Gerontology*,44(1):15-20.
24. Mailhos C. Howard MK. Latchman DS.,1993: Heat shock protects Lieuronal cells form programmed cell death by apoptosis., *Neurosci.*, 55(3): 621-7.
25. Manev H. K.harlamov A. Armstrong DM.,1994: Photochemical brain injury in rats triggers DNA fragmentation, P53 andHSP72. *Neuroreport*, 5(18):2661-4
26. Mehlen P. Schulze-Osthoff K. Arrigo AP',1996: Smallsress protens as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1 and stauro-sporine-induced cell death. *J Bio. Chem.*, 271(28): 16510-4.
27. Milarski KL. Welch WJ. Morimoto IU.,1989: Cell cycle-dependent association of HSP70 with specific cellular proteins.,*J Cell Biol.*, 108:413-23.
28. Moncada S. et al.,1989: Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *Biochem. Pharma.*,11(38):1709-15.
29. Moncada S.: The L-arginine-Nitric Oxide pathway. *J. England Med.*,2002-11.1993.
30. Nims RW. et al.,1996: *Method in Enzymology*, 268,93.
31. Parnham MJ. Feige U.,1992: Structure and functional properties of heat shock proteins in inflammatiom and immunity., *Agents actions*, 35(1-2):34-6.
32. Parsell DA. Lindquist S., 1993: The function of heat shock proteins in stress tolerance: Degradation and reactivation of damaged proteins., *Annu. Rev. Genet.*,27:437-96.
33. Portig I, Pankuweit S., Lottspeich F., Maisch B. 1996: Identification of stress proteins in endothelial cells. *Electrophoresis*, Apr;17(4): 803-8.

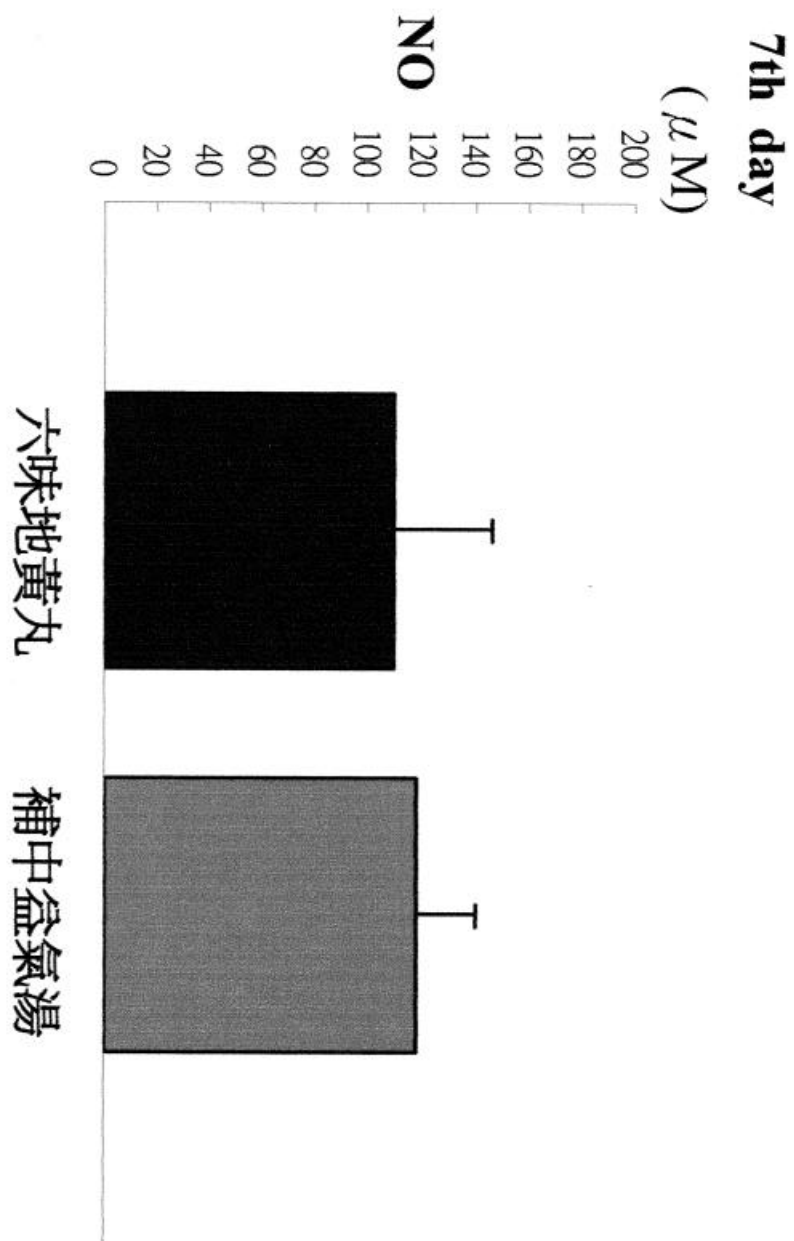
34. Rao DV., Watson K., Jones GL. 1999: Age-related attenuation in the expression of the major heat shock proteins in human peripheral lymphocytes. *Mech Ageing Dev*, Feb 1;107(1):105-18.
35. Rattan SI. 1998: Repeated mild heat shock delays ageing in cultured human skin fibroblasts. *Biochem Mol Biol Int*,45(4):753-9.
36. Renkawek K. bosman GJ. Gaestel M. 1993: Increased expression of heat shock protein 27 in Alzheimer disease: a preliminary study. *Neuroreport.*, 5(1):14-6.36.
37. Samali A. Cotter TG., 1996: Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp. Cell Res.*, 223(1): 163-70.
38. Scarim AL., Heitmeier MR., Corbett JA. 1998: Heat shock inhibits cytokine-induced nitric oxide synthase expression by rat and human islets. *Endocrinology*, Dec;139(12):5050-7.
39. Smirin BV., Pokidyshev DA., Malyshev Iiu., Vanin AF., Manukhina EB. 2000: Nitrogen oxide storage as a factor of adaptive defence. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*, Apr;86(4): 447-54.
40. Szilard L. 1959: On the nature of the ageing process. *Proc Natl Acad USA.*, 45:30.
41. Taylor BS. et al.: Inducible nitric oxide synthase in the liver: Regulation and function. Review article.
42. Tissieres A., Mitchell HK., Tracy U. 1974: Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol*, 84:389-98.
43. Toporsian M., Govindaraju K., Nagi M., Eidelman D., Thibault G., Ward ME. 2000: Downregulation of endothelial nitric oxide synthase in rat aorta after prolonged hypoxia in vivo. *Circ Res*, 86(6):671-5.
44. Wagner M., Hermanns I., Bittinger F., Kirkpatrick CJ. 1999: Induction of stress proteins in human endothelial cells by heavy metal ions and heat shock. *Am J Physiol*, 277(5 Pt 1):L1026-33.
45. Wang JH., Redmond HP., Watson RW., Condrón C., Bouchier-Hayes D. 1995:

- Induction of heat shock protein72 prevents neutrophil-mediated human endothelial cell necrosis. *Arch Surg*, 130(12): 1260-5.
46. Wang JH., Redmond HP., Watson RW., Bouchier-Hayes D. 1997: Induction of human endothelial cell apoptosis requires both heat shock and oxidative stress responses. *Am J Physiol*, 272 (5 Pt 1):C1543-51.
47. Wiech H. Stuart R. Zimmermann R.,1990: Role of cytosolic factors in the transport of proteins across membranes. *Seminars in cell Biology*, 1(1):55-63.
48. Wienhues U. Neupert W., 1992: Protein translocation across mitochondrial membranes., *Bioessays*, 14(1):17-23.
49. Xu Q., Wick G. 1996: The role of heat shock proteins in protection and pathophysiology of the arterial wall. *Mol Med Today*, 2(9):372-9.
50. Yang RC., Yang SL., Chen SW., Lai SL., Chen SS., Chiang CS. 1996: The previous heat shock treatment attenuates bicuculline-induced convulsion in rats. *Exp Brain Res*, 108:18 -22.
51. Yang SL. 1995: The inductional synthesis of heat shock protein72 in mammalian cells and the biological effects of the heat shock response in CNS. Kaohsiung Medical College, 1-196.
52. 醫宗金鑑 (文化圖書公司,台北,1976)
53. 中醫藥理學 (弘祥出版社,台北,1985)
54. 中醫內科學 (啟業書局,台北,1984)
55. 中醫方劑研究與應用大成 (中國科學技術出版社,北京,1995)

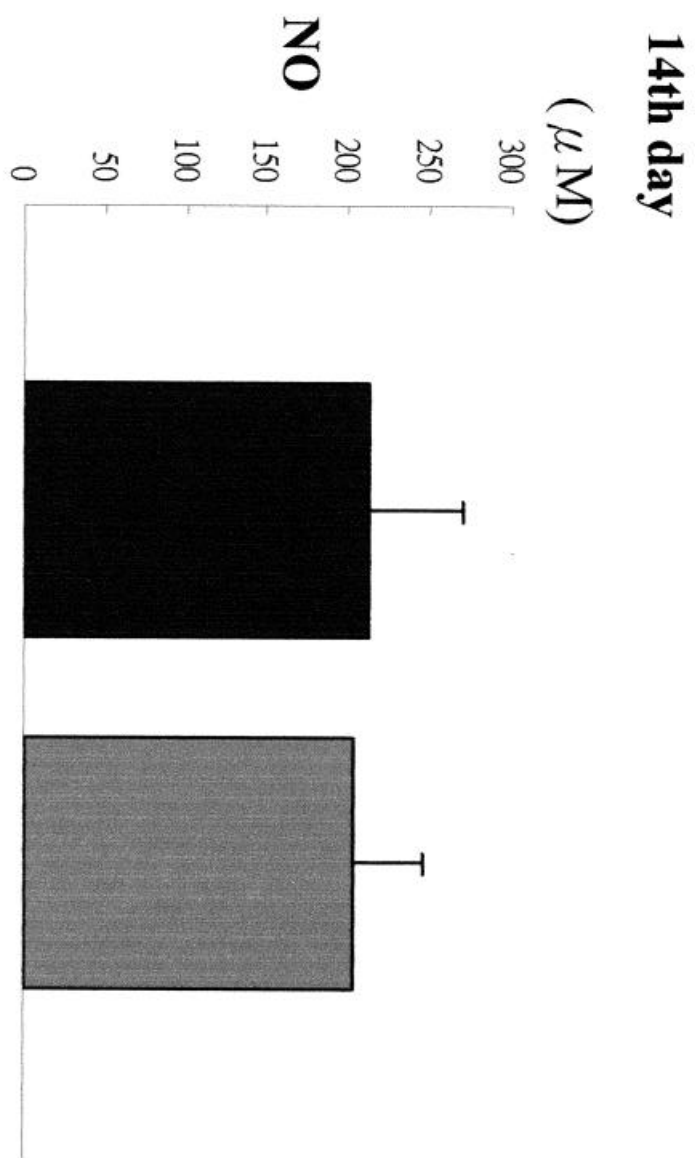


圖一．給藥三天後，六味地黃丸組與補中益氣湯組血漿中 NO 含量比較 (*, $p < 0.05$)

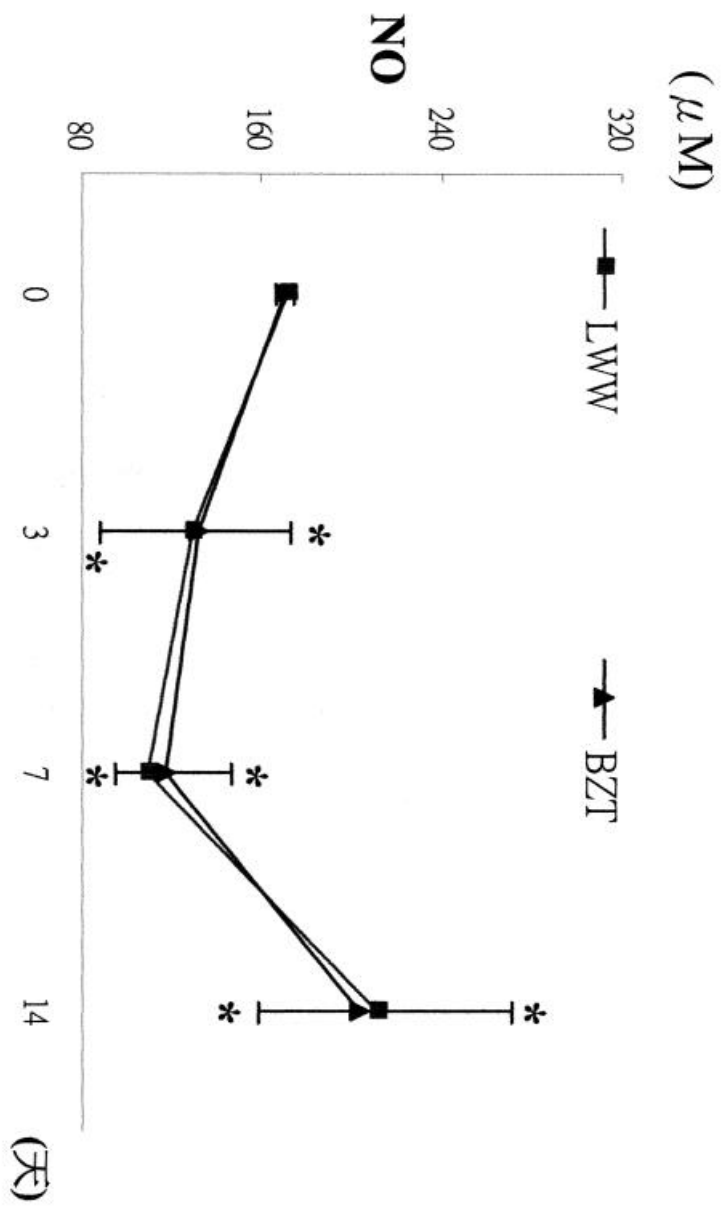
柴、附圖、表



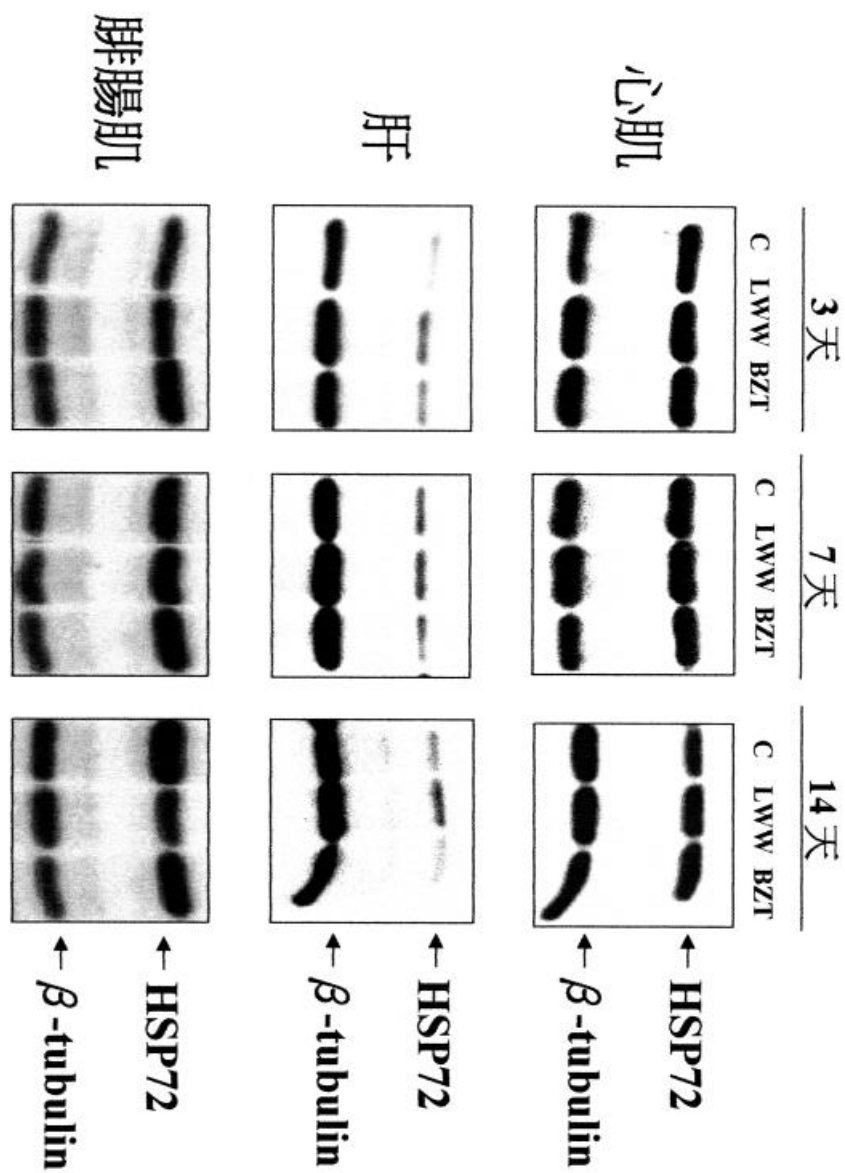
圖二．給藥七天後，六味地黃丸組與補中益氣湯組
血漿中 NO 含量比較 (*, $p < 0.05$)



圖三．給藥十四天後，六味地黃丸組與補中益氣湯組血漿中 NO 含量比較 (*, $p < 0.05$)

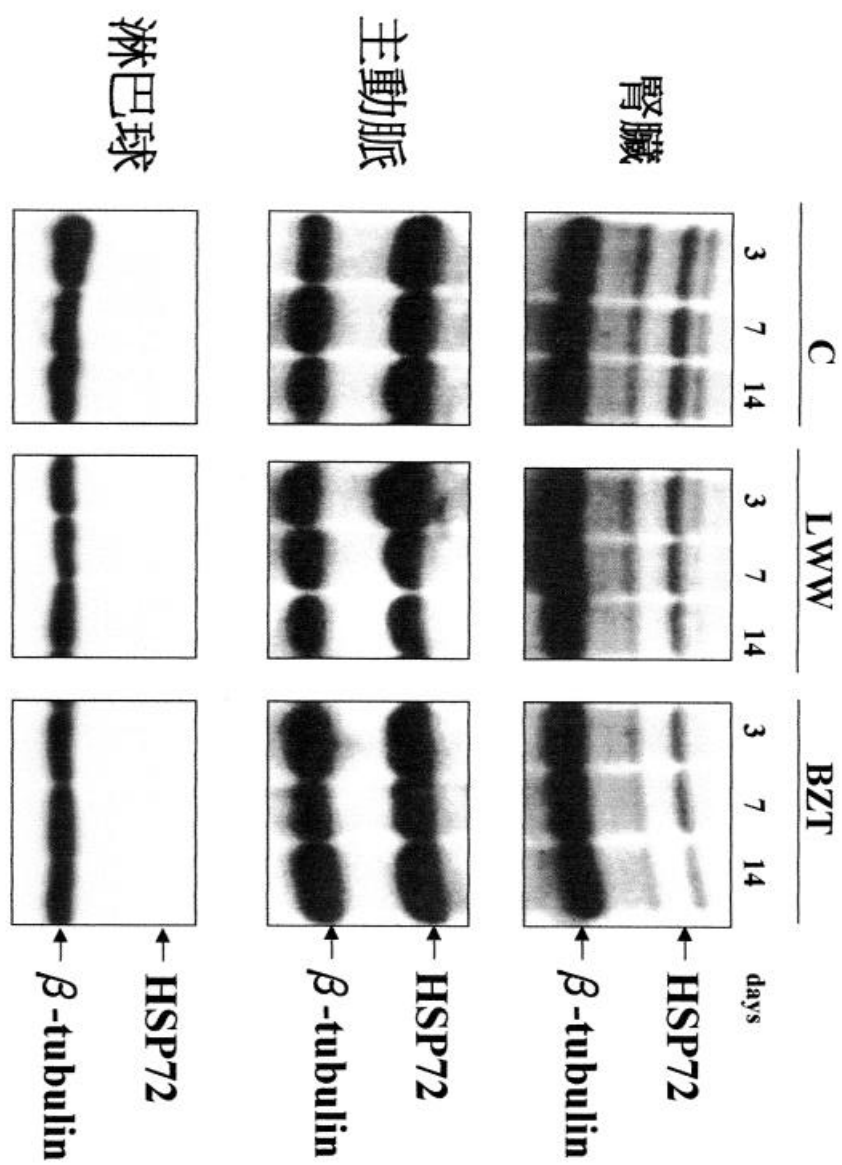


圖四. 六味地黃丸組(LW)與補中益氣湯組(BZT):
未給藥、第三天、第七天及第十四天血漿中
NO 含量比較 (*, $p < 0.05$)



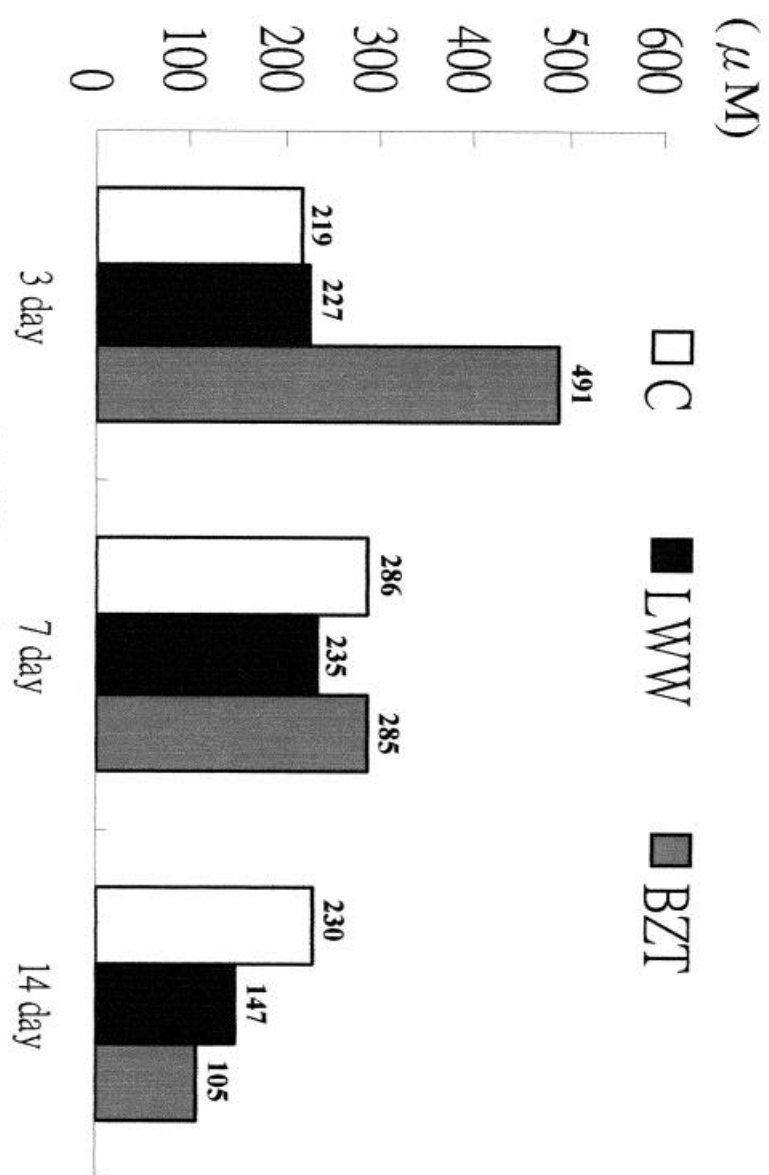
圖五. 六味地黃丸組(LWW)與補中益氣湯組(BZT)：

第三天、第七天、第十四天於組織細胞中HSP72偵測



圖六. 六味地黃丸組(LWW)與補中益氣湯組(BZT)：

第三天、第七天、第十四天於組織細胞中HSP72偵測



圖七. 肝臟組織細胞內 NO 含量

C: 未給藥組 LWW: 六味地黃丸組

BZT: 補中益氣湯組