

中藥采坤茶的抗氧化力以及 雌激素活性研究

蘇珊玉 李誌雄 賴呈委 王櫻諭 賴銘淙 游明謙 許清祥

中國醫藥大學附設醫院 中醫內科 小兒部 中西合作醫療中心

中國醫藥大學病理科

台中

景岳生物科技股份有限公司

台南

年 月 日受理， 年 月 日收校訂稿， 年 月 日接受刊載

補充女性荷爾蒙是更年期婦女為了緩解停經症候群諸多不適所採用的常規療法，但是近年來許多研究顯示傳統的荷爾蒙替代療法有很多副作用，因此從中草藥中找尋具有雌激素作用的藥物，以取代傳統荷爾蒙替代療法，具有重要的臨床價值，也是本研究的目的。本研究針對由紅棗、黑大豆、黑木耳所組成的采坤茶粗萃取物，偵測其抗氧化作用及雌激素活性。在抗氧化實驗方面，采坤茶清除（ ）自由基的能力，與保護微脂粒不被三氯化鐵氧化的能力隨采坤茶濃度的上升而增加，在濃度為 μ 時，清除的能力可達到與 μ 的 相近，且采坤茶的清除能力比紅棗、黑大豆或黑木耳其中任一種藥物單獨使用時都高。在濃度為 時，微脂粒的保護作用與 相似。雌激素活性以雌鼠子宮增生試驗測定，將采坤茶餵食斷奶且未成熟的 母鼠，測量子宮濕重及母鼠體重，並將母鼠子宮進行病理切片，發現高濃度達十倍的采坤茶可以明顯增加子宮濕重與體重比，且可以增加子宮上皮的厚度及有絲分裂細胞數，而一倍采坤茶則無此作用。由本研究結果顯示，由紅棗、黑大豆、黑木耳所組成的采坤茶粗萃取物，不但具有清除自由基的抗氧化作用，在動物實驗中更可以證明具有明顯的雌激素活性。

關鍵詞：采坤茶，抗氧化，植物性雌激素。

前 言

以中藥來預防老化已有數千年的歷史，在中醫的理論中，腎虛與血瘀是老化的基礎，亦為老化的生理

聯絡人：許清祥，中國醫藥大學附設醫院，小兒部過敏免疫風濕科，電話： 轉 ，傳真：

特點。早在《素問 上古天真論》中就有記載：「女子七歲腎氣盛，齒更髮長；二七而天癸至，任脈通，太沖脈盛，月事以時下；三七腎氣平均，故真牙生而長極；五七陽明脈衰，面始焦，髮始墮，六七三陽脈衰於上，面皆焦，髮始白，七七任脈虛，太衝脈衰少，天癸竭，地道不通，故形壞而無子也。」說明人體的生長發育是靠著腎氣的旺盛，而老化則與腎氣的衰敗有密切的關係。

女性進入更年期後，超過一半以上的停經婦女會因為體內雌激素驟然下降，產生許多心臟、血管、新陳代謝及精神上的疾病及各種不適症狀。於是近年來，荷爾蒙替代療法廣泛地被使用在停經後婦女，以預防因為停經後雌激素不足所產生的症狀。但在 年美國的一項研究表示，長期服用雌激素和黃體素會使乳癌罹患率增加，中風率增加，心臟病罹患率增加，肺血栓率會增加。有鑑於此，服用具雌激素活性的天然物成為更年期婦女用來預防更年期症候群的另一種選擇。其實，某些天然物具有雌激素活性的事實很早就被注意到，許多文獻指出黃豆及一些蔬菜中含有一種植物性雌激素，它是一種天然化合物，其構造及作用與女性荷爾蒙的化合物 β 類似，但其效價僅為此女性荷爾蒙的千分之一左右。許多關於植物性雌激素的研究指出，植物性雌激素可以減輕更年期婦女潮熱症狀、改善自覺的陰道乾燥感，降低血中總膽固醇、低密度膽固醇和三酸甘油酯等，還能增加高密度膽固醇的濃度，及預防骨質的流失，並可降低乳癌的發生率。中草藥中具有雌激素活性的藥物也陸續被發現，依據中藥分類可分成三大類：補益藥類有人參、甘草、淫羊藿、肉蓯蓉、女貞子；活血化瘀藥類有丹參和川牛膝；以上這兩類藥物為數最多，其它種類如小茴香、五味子、蛇床子、蒺藜、葛根也具有雌激素活性。

近年來的研究顯示，老化與自由基有密不可分的關係，無論是生物體內產生的或是外界環境存在的高活性致氧化物，均會對細胞的脂質、核酸、蛋白質造成破壞，推測這種過氧化的破壞尤其是對粒線體核酸的破壞與細胞的老化死亡有關。自然界中存在有許多抗氧化機制提供生物體對抗自由基的傷害，其中包括生物體內的酵素系統、非酵素系統以及維生素、維生素和維生素。研究中藥與自由基的交互關係，發現補腎活血藥也有抑制自由基反應、提高抗氧化活性的作用。

根據上述研究和中醫理論，本研究試圖在本草中找尋具有雌激素活性的中草藥，因此選擇了三種有活血補血與補腎填精效果的藥物，分別為黑木耳(*Auricularia auricula*)、黑大豆(*Glycine max*)與紅棗(*Fructus Ziziphi Jujubae*)，依中國八卦理論中“坤”代表大地，有象徵女性的意義，因而將這三者合用命名為采坤茶。本研究利用抗氧化活性的測試，來研究補腎活血藥物采坤茶在抗老化的功能上可能扮演的角色，並偵測采坤茶的雌激素活性，進而評估采坤茶是否有潛力成為停經後婦女除了使用荷爾蒙替代療法的另一種選擇。

材料與方法

一、實驗動物

以剛斷奶且未成熟之 母鼠（約 天）為實驗動物，均飼養於光照、黑暗各 小時，室溫維持在 $\pm$ °，濕度維持在 $\pm$ ，水分與飼料充分供給之獨立空調的動物房內。

二、化學藥品

本實驗所使用的主要化學藥品和試劑：

α 。

三、試劑配製

微脂粒溶液：將 與 在 () 中混合 秒後，再進行超音波震動 分鐘。

雌激素溶液：秤取 的 α 溶於 酒精中，此為原液。加入適量水稀釋，使最終濃度為 μ 。

采坤茶及藥物粗萃取液：本實驗分別取 青仁黑豆、 黑木耳、 紅棗或上述重量之黑豆、黑木耳及紅棗攪碎混合，各加水至 以 °。萃取 分鐘，此為粗萃取液。

采坤茶乾燥粉末：采坤茶凍乾粉末的製造是將采坤茶湯劑以冷凍乾燥法取得。將溫度與壓力控制到三相點以下，三相點即水的固相、液相及氣相共存時的溫度及壓力條件，在此溫度及壓力條件之下，加熱可使水分直接昇華而得到乾燥粉末。采坤茶凍乾粉末由每包湯劑 之粗萃液冷凍乾燥後有 克粉末。

四、采坤茶之抗氧化活性試驗

實驗參考 所述之清除 自由基之能力來測定抗氧化活性。分別取 μ 之連續 倍稀釋之黑豆、黑木耳、紅棗、采坤茶的粗萃取液或 ，加入新鮮配置的 μ 之 甲醇溶液。震盪混合均勻於室溫下靜置 分鐘後，以 偵測其吸光值 (自由基被清除的越多，則吸光值下降越多)。清除率 () 【 (樣品吸光值 未添加樣品之控制組吸光值)】 $\times$ 。

五、微脂粒氧化抑制作用

先依序將 的采坤茶或 、 水溶液 加入 μ 微脂粒溶液中，置 ° 下反應 小時，再將 水溶液 μ 及 μ 溶液加入上述反應後之溶液 中，加熱至 ° 分鐘，冷卻後加入 ，最後以 波長測量 () 吸光值。

六、植物性雌激素活性試驗

一 雌鼠子宮增生試驗

采坤茶凍乾粉末，每包 有 克粉末。成人每天服用 包，依體表面積換算為成人劑量，小鼠劑

量約為成人劑量乘 倍，換算成老鼠 倍劑量，約為每天每隻小鼠需口服 ； 倍劑量則為每天需 。以剛斷奶且未成熟之 母鼠（約 天）為實驗動物，共有四組，每組 隻小鼠，進行連續 天的口服餵食試驗。 為控制組，即不餵食任何藥物； 組為雌激素組，每日口服雌激素 μ ，即 μ ，餵食 ； 組為低劑量組，即餵食 倍采坤茶，劑量為 ，每天餵食兩次，每次 ； 組為高劑量組，即餵食 倍采坤茶，劑量為 ，每日餵食 次，每次 （餵食量為體重）。在餵食後第 天早上將小鼠犧牲，取其子宮（去除脂肪組織）秤重，並以子宮濕重量 總體重的百分比來表示雌激素活性。利用 ，並以 作為事後檢定法，並以 p 做為顯著差異的依據。

二 病理切片

詎進行脂肪病理切「`d啻洵病間並主\$ 0 | [

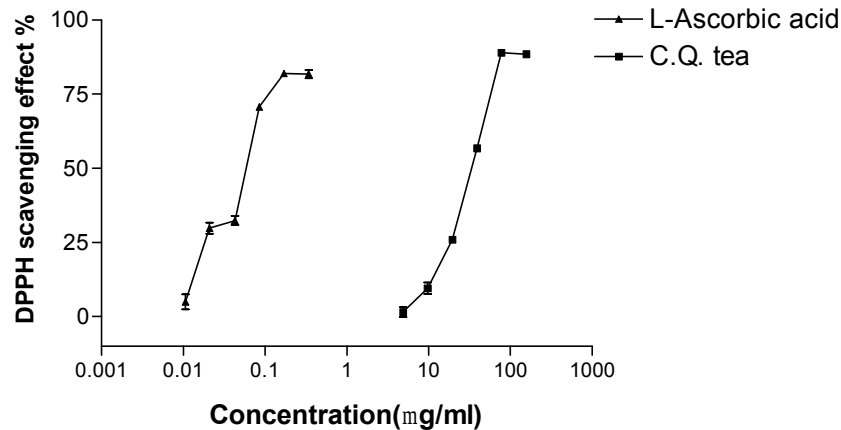


圖 1: 采坤茶在各種濃度下清除 DPPH 自由基之能力。▲ : vitamin C 組 ■ : 采坤茶組 (N = 3, 數據以 mean ± SD 表示)

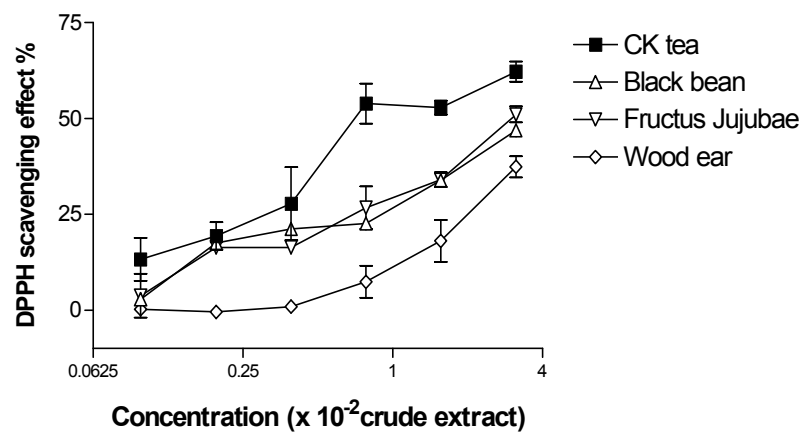


圖 2 : 各種濃度下黑豆、紅棗、黑木耳及采坤茶清除 DPPH 自由基之能力。■ : 采坤茶 ▴ : 黑大豆 ▾ : 紅棗 ▾ : 黑木耳 (N = 3, 數據以 mean ± SD 表示)

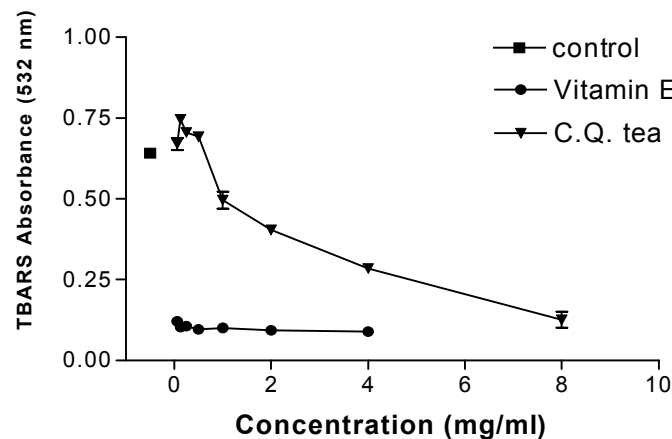


圖 3 : 不同濃度之 α -tocopherol (Vitamin E) 與采坤茶在微脂粒氧化作用之抑制效果。■ : 控制組 ● : vitamin E 組 ▼ : 采坤茶組 (N = 3, 數據以 mean ± SD 表示)

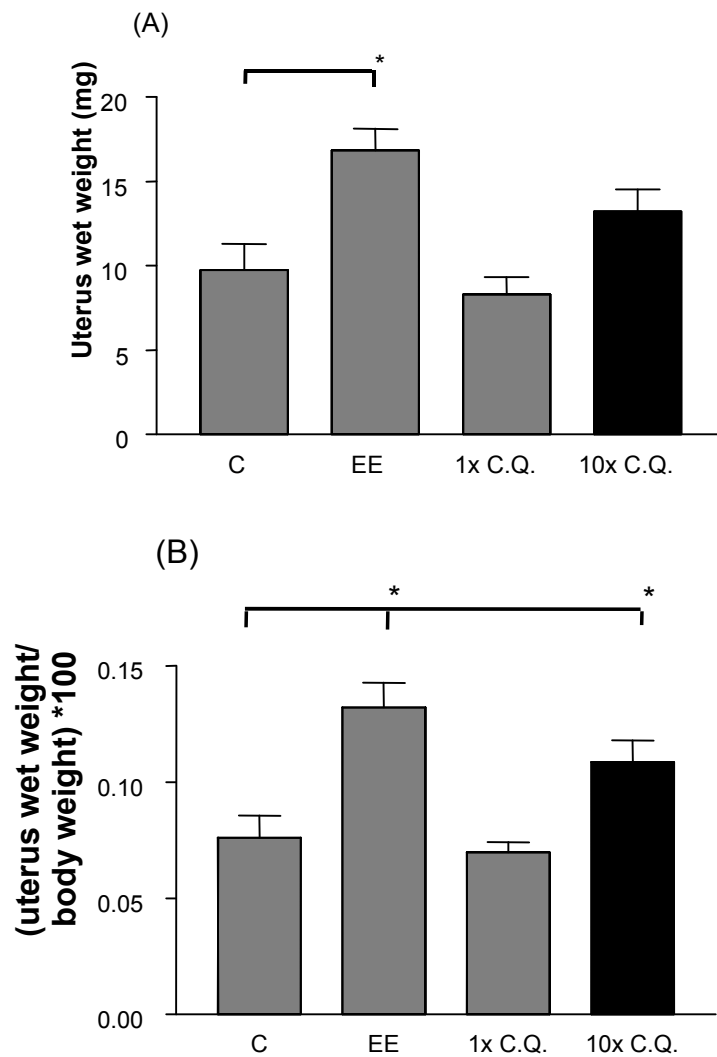


圖 4：餵食采坤茶對未成熟 ICR 母鼠之子宮重量或子宮重量與體重百分比之影響。表示與控制組比較具顯著差異 ($p < 0.1$)。C 組：沒有餵食任何藥物；EE 組：餵食雌激素；1 × C.Q.組：餵食低劑量的采坤茶；10 × C.Q.組：餵食高劑量的采坤茶。(N = 5，數據以 mean ± SD 表示)

坤茶之植物性雌激素活性時，發現餵食高劑量采坤茶能明顯增加子宮濕重與體重的百分比(圖 4, $p < 0.1$)，顯示高濃度采坤茶具有植物性雌激素活性，然而餵食低劑量采坤茶其子宮濕重或子宮濕重與體重的百分比與控制組無顯著差異。

將上述之母鼠子宮病理切片以 H&E 染色，由放大 100 倍顯微鏡頭觀察病理組織切片，顯示控制組的小鼠子宮上皮多由單層上皮細胞所組成；雌激素組的小鼠子宮上皮細胞則明顯增生，由 1 至 3 層上皮細胞所組成，且上皮厚度明顯增加；低劑量采坤茶組的小鼠子宮上皮亦由單層上皮細胞所組成，與控制組無明顯差異；高劑量采坤茶組的小鼠子宮上皮細胞層數亦明顯較控制組增加，且上皮細胞厚度亦較控制組增加(圖 5)。以放大 400 倍的顯微鏡頭下觀察上皮細胞的有絲分裂，顯示控制組與低劑量采坤茶組在一個 400 倍鏡頭下並未發現正在進行有絲分裂的細胞，雌激素組可見 1 至 2 個有絲分裂細胞，高劑量采坤茶組的子宮切片在 400 倍鏡頭下可見 1 至數個進行有絲分裂的上皮細胞(圖 6)。

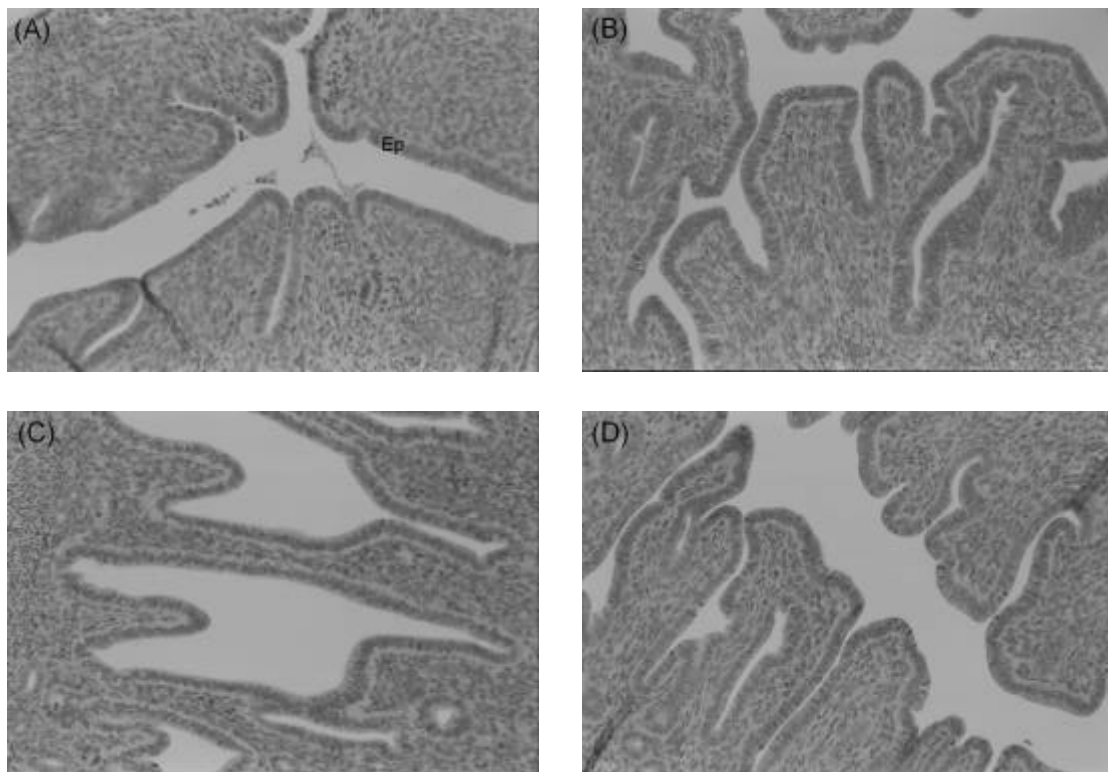


圖 5：采坤茶對子宮內膜上皮細胞增生的影響（H & E stain，200 倍）。A 正常控制組 B 雌激素餵食組 C 1 倍采坤茶餵食組 D 10 倍采坤茶餵食組。（Ep：上皮）

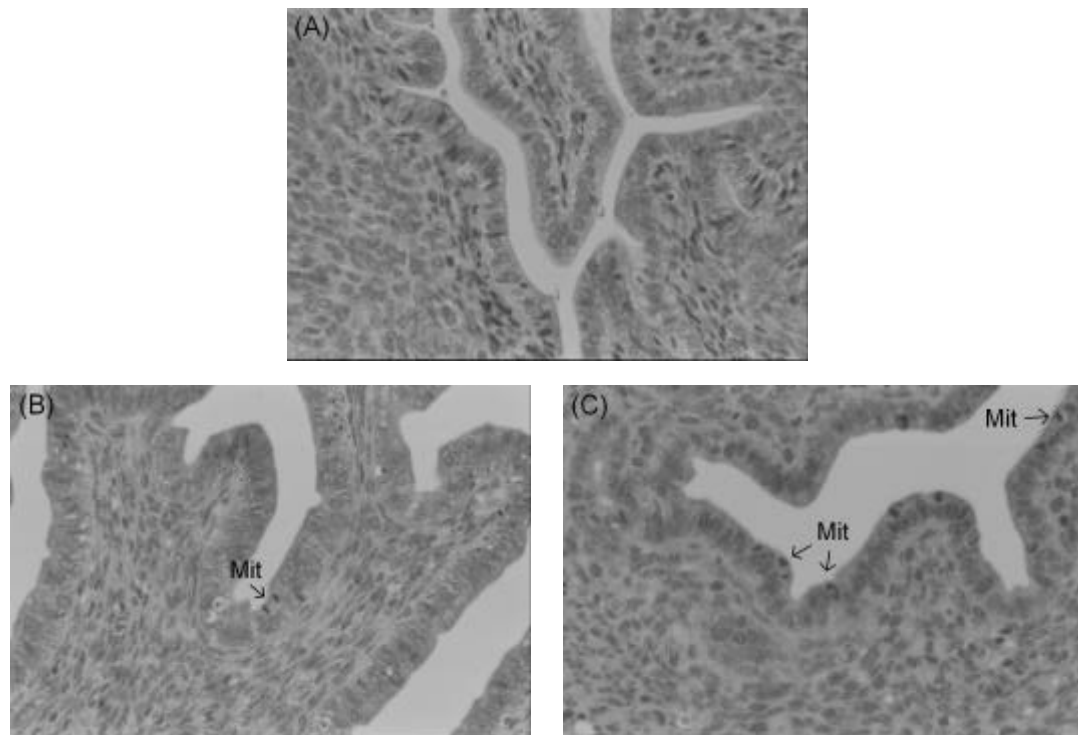


圖 6：采坤茶對子宮內膜上皮細胞有絲分裂的影響（H & E stain，400 倍）。A 正常控制組 B 雌激素餵食組 C 高劑量采坤茶餵食組。（Mit：有絲分裂）

討 論

紅棗、黑大豆、黑木耳為日常飲食中常使用的食材，也是隨手可得的健康食品，從古醫典的記載中，黑豆有「久服好顏色，變白不老」的功能；大棗有「養脾氣，平胃氣，和百藥，久服輕身延年」之功；木耳則可「益氣不飢，輕身強志」。在中醫的理論中，黑色食物具有補腎活血的作用，可以補養虛弱、延緩衰老；現代對黑色食物的研究發現，黑色食物中除了含有大量的纖維質、不飽和脂肪酸、蛋白質、胺基酸、維生素、礦物質、活性多醣等營養成分之外，還含有黃酮或類黃酮類的色素，這類元素具有廣泛的生物活性，能夠抗病毒、抗發炎、抗過敏，以及促進血管擴張；另外，大陸與台灣的研究結果均顯示，黑色食品包括黑豆、黑木耳等，還具有抗氧化、減少低密度脂蛋白的氧化，降血脂、抗動脈粥狀硬化的作用，中藥的其他補腎活血藥如何首烏、丹參、淫羊藿等也有相似的作用。

我們根據中醫方劑的原理，將紅棗、黑大豆、黑木耳以適當比例組合成一新方劑，並命名為成采坤茶。為了探討采坤茶的抗氧化活性，本實驗使用清除 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 之能力來分析抗氧化能力， $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 自由基為一種極穩定的自由基，其氧化態在甲醇溶液中有 0.7 的吸光值而在還原態此吸光值即消失，在抗氧化研究上常用 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 的此特性來檢測抗氧化物提供氫原子的能力。結果顯示，采坤茶具有明顯清除 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 的能力，且其清除能力與采坤茶的劑量有關，隨著采坤茶濃度的增加， $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 的清除能力逐漸上升，當采坤茶濃度為 $100 \mu\text{g/mL}$ 時，其清除自由基的效果最好，可達 95% ，與 $100 \mu\text{g/mL}$ 濃度為 $100 \mu\text{g/mL}$ 時清除能力為 95% 近似。分別分析紅棗、黑大豆、黑木耳對 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 的清除能力發現黑大豆與紅棗的清除力相當，均高於黑木耳，當紅棗、黑木耳與黑大豆共同使用時，抗氧化效果比任一種藥物單獨使用都來得大，這說明中醫方劑的特點，當藥物組合成方劑時，其治療果比其中任一單味藥物還好。在采坤茶的微脂粒氧化抑制作用的研究結果顯示，事先在微脂粒溶液中加入采坤茶，可減少三價鐵離子對微脂粒所造成的氧化作用，證明采坤茶可以保護微脂粒，減少外加氧化劑對微脂粒的氧化傷害。近年來對老化的研究指出，老化與自由基對生物體傷害有密切的關係，上述研究證明采坤茶的確具有抗氧化、抑制自由基傷害的作用，我們由此推測采坤茶可能具有抗老化的能力。

在過去幾十年來，許多報告指出從植物來的化合物具有結合到雌激素受器的能力，即具有雌激素活性，有許多體外試驗系統可以偵測定量天然或合成化合物的雌激素活性，但是即使結合多種不同的體外測試系統，但還是不能去預測一個物質在有機體內的作用，因此，體內系統仍然是偵測雌激素活性的最佳選擇。體內系統中，最常用來分析這些植物性化合物是否具有雌激素活性大多使用嚙齒類的子宮來分析，並以化合物是否能刺激子宮的生長為決定因子。這種子宮分析方法包括了使用未成熟母鼠、垂體切除過或卵巢摘除的大鼠或小鼠為實驗動物，有報導指出以未成熟母鼠來評估雌激素活性較為敏感。文獻指出以子宮分析實驗來篩選雌激素活性仍有些限制，例如雖然不會刺激子宮生長但卻在乳腺或骨頭具雌激素活性。因此結合形態學、組織學、生化分子層次上的分析可加強研究雌激素活性的功效，其中最常用來做為組織上評估依據為子宮上皮細胞的高度。本研究給予未成熟小鼠口服采坤茶來評估其雌激素活性，發現低劑量采坤茶並無法增加子宮濕重及子宮濕重與體重的百分比，高劑量采坤茶雖然能增加子宮濕重但與控制組無顯著差異，但是卻可以明顯增加子宮濕重與體重百分比。觀察經采坤茶餵食後之小鼠子宮上皮

細胞增生情形，發現經低劑量采坤茶餵食後的小鼠，其子宮上皮的層數及高度與控制組無明顯差異，而高劑量采坤茶餵食後的小鼠子宮上皮細胞的層數及上皮高度較控制組增加，且上皮細胞的有絲分裂細胞數亦較控制組及雌激素組為多。顯示高濃度的采坤茶可刺激小鼠子宮上皮細胞增生，的確具有雌激素活性，而低濃度采坤茶卻無明顯的雌激素活性效果。

采坤茶中的紅棗、黑豆和黑木耳本是民間常用的養生食品，經本研究証實將這三者組成起來具有明顯的抗氧化的能力以及雌激素活性，它是否能被引用為停經婦女的荷爾蒙補充療法，尚須要進一步的研究和更多的臨床試驗來評估。

參考文獻

趙益業，腎虛是衰老的基礎，中國中醫基礎醫學雜誌：，。

莊宏達編，節號本黃帝內經，上古天真論，宏祥出版社，台中，，。

賀紅莉、金煥、王繼峰、牛建昭，雌激素受體調節劑及其相關中藥的研究進展，中國中藥雜誌：

，。

鞠寶兆，補腎活血法抗腦老化的機理探討，遼寧中醫雜誌：，。

李時珍，本草綱目，人民衛生出版社，北京，
，
。

刁曼蓬，黑色神祕食物，健康雜誌：
，
。

范亞明、王朋、張穎、方虹、潘曉冬、王綠姬，黑木耳抗脂質過氧化的初步探討，心肺血管病雜誌：
，
。

楊棋明、楊智旭、趙璧玉，市售黑豆與黃豆抗氧化力之灰預測比較，中華民國營養學會雜誌：
，
。

張瑋、王淑珍、王京花、楊永濱、張麗敏、谷長任、倪江、於祥志、杜德兵、劉國勇，黑豆果油降血脂作用的實驗研究，哈爾濱醫科大學學報：
，
。

ANTIOXIDATIVE EFFECTS AND ESTROGENIC ACTIVITY OF CHINESE HERBS CHARMING-QUEEN TEA

¹*Department of Chinese Medicine*

⁵*Institute for integration of Traditional Chinese and Western Medicine*

³*Department of Pediatric, China Medical University Hospital, Taichung, Taiwan*

⁴*Department of Pathology, China Medical University*

Taichung, Taiwan

²*GenMont Biotechnology Incorporation*

Tainan, Taiwan

(Received 10 June 2003, revised Ms received 28 July 2003, accepted 14 August 2003)

μ

μ

Key words