

生肌散及其成份的抗氧化作用研究

許堯欽¹ 陳明豐² 陳榮洲^{3,4}

¹ 奇美醫院 中醫部

台南市

² 秀傳紀念醫院 腫瘤中心

³ 秀傳紀念醫院 中醫部

彰化市

⁴ 中國醫藥學院 中醫學系

台中市

(2001年5月31日受理, 2001年7月31日收校訂稿, 2002年1月18日接受刊載)

壓瘡的形成與缺血及缺血後再灌流所產生的自由基有密切的關係。我們在先前的臨床研究中發現生肌散對於壓瘡確有促進癒合的效果, 為求進一步了解其可能的有效作用機轉, 吾等著手探討生肌散清除相關自由基的作用。結果顯示: 生肌散對於 Xanthine / Xanthine oxidase 所產生之超氧陰離子有明顯的清除作用, 對於 FeCl₂ 所誘發的脂質過氧化作用也有明顯的抑制效果。兒茶對於人體白血球產生超氧陰離子、過氧化氫與次氯酸有明顯的抑制作用。生肌散與其組成藥物兒茶有助於減少缺血後再灌流所產生的自由基對組織的損傷。理論上生肌散應該有利於壓瘡傷口的癒合。但是生肌散對於激發態的白血球所產生的過氧化氫、次氯酸與超氧陰離子卻不具抑制作用, 其原因則值得進一步探討。

關鍵詞: 生肌散, 壓瘡, 缺血後再灌流, 自由基。

前 言

壓瘡 (pressure ulcer) 俗稱「褥瘡」, 中醫典籍記載為「席瘡」, 好發於長期臥床與行動不便的患者群, 是臨床最難處理的皮膚傷口之一。瘍醫大全席瘡門曰:「席瘡乃久病著床之人, 挨擦磨破而成, 上而背脊, 下而尾間。病人但見床瘡, 死之徵也。¹」顯示在古代已了解到壓瘡的治療不易。即使到了醫學發達的近代, 由於皮膚傷口的癒合困難, 再加上細菌感染的威脅, 本病患者的死亡率仍比一般住院患者高出四倍以上。據估計, 每年平均有六萬人死於壓瘡與其併發症²。

壓瘡比一般皮膚潰瘍不易處理，其原因除了局部組織因受壓迫，以致於缺乏正常血流供應，延緩傷口癒合之外；當壓力解除後，在血流再灌注 (reperfusion) 過程中所產生的大量氧自由基，不但會造成組織損傷³，而且還會進一步誘發脂質過氧化作用⁴，加重組織的壞死，阻礙了壓瘡傷口的癒合。Salcido 等的研究指出缺血與缺血後再灌流所產生的氧自由基是導致壓瘡的重要病理因素⁵。Rees 等經由動物皮瓣 (Skin flap) 的實驗研究驗證 Xanthine oxidase 的活性所產生的自由基是導致缺血狀態之下的皮膚損傷壞死的根源⁶。Punch 等經由大鼠實驗證實 Xanthine oxidase 所產生的氧自由基與組織缺血後再灌流所造成的損傷有密切的相關性⁷。在各界紛紛尋找加速壓瘡癒合的藥物之際，自由基清除劑提供了新的思考方向。

作者在先前的臨床研究中發現生肌散能有效的促進住院病患的壓瘡癒合⁸，為求進一步了解其是否能有效的清除由缺血與缺血後再灌流損傷及 Xanthine oxidase 所產生的氧自由基與脂質過氧化物，我們乃設計了本抗氧化實驗研究，希望了解生肌散是否也具備相關的抗氧化作用。

材料與方法

一、中藥的製作

1. 由於生肌散在臨床使用時並未經熱水萃取，乃直接以原生藥磨粉，混合均勻塗敷傷口，因此，本實驗乃模擬臨床實際狀況，以原生藥磨成粉末，再加以 RO 水溶解，直接測定其抗氧化活性。
2. 生肌散之製作：
以原生藥乳香、沒藥、血竭、冰片、三七、兒茶與真珠各 10 gm，研磨成細粉後，充分混合，再以 RO 水溶解，經離心沉澱，將上清液以 0.45 um 孔徑的 filter 過濾後，供實驗使用。
3. 單味中藥的製作：
以原生藥乳香、沒藥、血竭、冰片、三七、兒茶及真珠各 10 gm，分別研磨成細粉後，再分別以 RO 水溶解，並分別經離心沉澱，將上清液以 0.45 um 孔徑的 filter 過濾後，供實驗使用。

二、中藥的抗氧化作用研究

(一)生肌散及其組成中藥之清除 Xanthine / xanthine oxidase 所產生之超氧陰離子 (superoxide anion O_2^-) 的作用：

1.原理：

以 hypoxanthine 與 xanthine oxidase 混合後，hypoxanthine 會被 xanthine oxidase 轉變成 uric acid，同時供給水溶液中的 O_2 分子一個電子產生 superoxide (O_2^-)。 O_2^- 進而與氧化型 cytochrome C (Fe^{+3}) 反應，形成還原型 cytochrome C (Fe^{+2})。後者於可見光 550nm 下可測得吸收值。由吸收值的變化即可推測 O_2^- 的濃度，此法稱為 cytochrome C 法⁹。在實驗過程中，若加入不同濃度之中藥水溶液，觀察其抑制吸收值的程度，即可推測中藥水溶液的清除 O_2^- 之能力，進一步測定其 IC50 的濃度。

表 1 中藥在試管內消除由 Xanthine / Xanthine oxidase 所產生的超氧陰離子的能力的實驗步驟

試劑	終濃度	添加液濃度	添加量
1. 磷酸鉀緩衝液 (PH:7.8, 含 EDTA-2Na)	50 mM 0.1 mM	300 mM 0.6 mM	0.5 ml 0.5 ml
2. Cytochrome C	1×10^{-5} M	6×10^{-5} M	0.5 ml
3. Xanthine (Hypoxanthine)	0.05 mM	0.3 mM	0.5 ml
4. 加水稀釋			1.0 ml
5. 檢體或標準 SOD 溶液	$\times 1$	$\times 10$	0.3 ml
6. XOD	$0.5-1 \times 10^{-8}$ M	$7.5-15 \times 10^{-8}$ M	0.2 ml

註：在 550 nm, 25°C 下，連續記錄一分鐘

Hitachi U-2000 UV spectrophotometer 機器的 X 軸 H : 0.05, Y 軸 L : 0.001

2. 實驗步驟：

首先配製 E 溶液，E 溶液乃由 50 mM 磷酸鉀緩衝液 (PH7.8)、0.1 mM EDTA、 1×10^{-5} M Cytochrome C 及 0.05 mM Xanthine 所組成。取 50 μ l 之中藥萃取物或蒸餾水 (control) 與 400 μ l 之 E 溶液及 530 μ l 之蒸餾水充分混合後，在 UV spectrophotometer (Hitachi U-2000 日本) 500 nm 波長下測定其吸光度 (A1)，再加入 20 μ l 1.5×10^{-7} M Xanthine oxidase 充分混合一分鐘後再測定其吸光度 (A2)。A2-A1 代表該檢體吸光度的變化，此數據與 O_2^- 產生的量成正比，詳細步驟如表 1。

(二) 生肌散及其組成中藥抑制過氧化脂質形成的作用：

1. 原理：

不飽和脂肪酸 linoleic acid 或 linolenic acid 可被 $FeCl_2$ 氧化而產生氧化脂質 (lipid peroxide)。lipid peroxide 於加熱狀態下可被分解產生 malondialdehyde (MDA) 過氧化脂質代謝產物。MDA 在高溫下可與 thiobarbituric acid (TBA) 試劑反應，形成紅色化合物。此化學化合物可在 532 nm 可見光下測定吸光度，此吸光度的強度與過氧化脂質的量成正比，此稱 TBA 法¹⁰。實驗過程中加入中藥水溶液，由吸光度的減少程度，即可知中藥抑制脂質過氧化的作用。本實驗法可用 Tetramethoxypropane (TEP) 當標準品，作成標準曲線。

2. 實驗步驟：

肝細胞 homogenate 製作：將 Wistar 大白鼠以乙醚麻醉後，取出肝臟以 Tris-buffer 洗淨。稱重後置於 tube 中加入 9 倍的 Tris-buffer (W / V)。而後以超音波臟器研磨器將肝臟研碎。於 500 gm 下，10 分鐘離心，取上清液之 homogenate 供實驗用。

MDA 之測定：將實驗分為兩階段，第一階段是全面篩選，初步擇出清除過氧化脂質效用較強的中藥 第二階段是針對初選的藥物進行不同濃度的效應評估 第一階段實驗共分為 ABCDEFGHIJK 十一組，每組三支試驗管。分別是 A：空白對照組、B： $FeCl_2$ 對照組、C：中藥生肌散、D：乳香、E：沒藥、F：血竭、G：冰片、H：三七、I：兒茶、J：真珠，以上中藥均為 1 mg/ml 及 K:Vit.E 10 mM 水溶液各 1 mg/ml。每組的試管均加入 0.1 ml 的肝細胞 homogenate。除 A 組加入 0.1 ml 的蒸餾水 (dsH_2O) 外，B 至 J 組各加入 0.1 ml 300 nM 的 $FeCl_2$ ，C 至 H 組則另加入 0.1 ml 1 mg/ml 的中藥水

溶液。再以 Tris-buffer 將各 tube 調整為 1 cc。各組皆加入 0.2 ml 的 SDS 充分混合後，再各加入 1.5 ml 之 TBA solution 及 1.5 ml 之 acetic acid。經混合後於 95°C 的水浴下放置，一小時後將各試驗管冷卻，各加入 n-butanol 5 ml，混合 30 秒以後，於 25°C 下，以 3000 rpm 離心 15 分鐘。

取 butanol 層 solution 於可見光 532 nm 下測其吸光度。由吸收值被抑制程度，即可知道中藥抑制脂質過氧化的作用。第二階段則以在 1 mg/ml 濃度下抑制過化脂質效應較強的中藥為對象，進行不同濃度的實驗分析，實驗步驟同第一階段。

(三) 生肌散及其組成中藥清除白血球產生 H_2O_2 與 OCl^- 的作用：

1. 原理：

白血球之 myeloperoxidase 於自然狀態下可將 H_2O_2 與 Cl^- 反應產生強氧化劑 hypochloride ($HOCl$)，而於 zymosan 刺激下，其產量可增加至 10-100 倍。 H_2O_2 與 hypochloride 可將化學發光物質 luminol 氧化，氧化型 luminol 於還原過程中會釋出能量及 HV，可被微量化學發光儀（日本東下電子）偵測。在實驗過程中加入中藥水溶液，觀察其抑制發光值的程度即可知道中藥抑制白血球產生 H_2O_2 與 hypochloride 的能力¹¹⁻¹⁴。

2. 方法：

抽取正常人之靜脈血 10 cc 置於鋁箔紙遮光之含 heparin 的試管內，置於冰塊上。取 100 ul 全血與 PBS 充份混合後於化學發光儀下測定發光值 200 秒，以此為基礎值 再加入 1 ml 之 10 M luminol，繼續偵測發光值 400 秒，此為未刺激狀態之化學發光值。而後再加入 200 ul 之 8 mg/ml zymosan，繼續偵測 400 秒之化學發光值，此為刺激狀態下之化學發光值。於實驗過程中加入各種不同濃度之中藥水溶液並觀察其化學發光值被抑制的程度，即可知道中藥清除白血球產生 H_2O_2 與 hypochloride 的作用。

(四) 生肌散及其組成中藥對白血球產生之超氧陰離子 (O_2^-) 的清除作用：

1. 原理：

血液中的白血球 NADPH oxidase 於自然狀態下可產生少量的 O_2^- ，而 zymosan 刺激時其產量可增加至 10-100 倍左右。依 Tono 等人的方法¹⁵⁻¹⁷，全血中加入化學發光物質 lucigenin， O_2^- 會將 lucigenin 氧化，氧化型的 lucigenin 於還原過程中會放出能量且產生 HV，可被微量化學發光儀（日本東下電子）偵測到。若於偵測之同時，於全血中加入中藥溶液，觀察發光值被抑制的程度，即可知道中藥清除白血球產生 O_2^- 之能力¹⁸⁻²⁰。本實驗方法的優點乃敏感度高，而且不必分離白血球即可操作，更接近白血球之自然生理狀態。

2. 實驗方法：

實驗方法同上，只要將化學發光物質及 luminol 改為 lucigenin 即可。

三、統計分析

實驗所得數據將以 MEAN \pm SD 表示，而藥物實驗組與對照組之間的差異，將先以 ANOVA 分析，再進一步以 Student's t- test 分析比較各組的差異。

結 果

一、生肌散與其組成中藥清除 Xanthine/Xanthine oxidase 產生之超氧陰離子的作用

如表 2 所示,生肌散、沒藥與兒茶皆對於 Xanthine / Xanthine oxidase 所產生之 O_2^- 有明顯的清除作用,其 IC_{50} 的濃度分別為 2.75 mg/ml、10 mg/ml 與 0.47 mg/ml。生肌散與兒茶在濃度達 10 mg/ml 時其清除作用均比 10 mM 的 VitE 更強。另外 VitE 的 IC_{50} 則為 3.8 mM。

二、生肌散與其組成中藥對於 $FeCl_2$ 所誘發的脂質過氧化的抑制作用

如表 3 所示,第一階段發現生肌散與兒茶對於 $FeCl_2$ 所誘發的脂質過氧有明顯的抑制作用。如表 4 所示,第二階段發現生肌散在 10 mg/ml 與 1 mg/ml 濃度時對於 $FeCl_2$ 所誘發的脂質過氧化有明顯的抑制作用。兒茶則在時 10 mg/ml、1 mg/ml 與 0.1 mg/ml 濃度時均有明顯的抑制作用。VitE 在 10 mM 時亦有明顯的抑制作用。

三、生肌散及其組成中藥對清除白血球產生 H_2O_2 與 OCI^- 的作用：

如表 5 所示,兒茶在 1 mg/ml 濃度時對於白血球產生的 H_2O_2 與 OCI^- 有明顯的抑制作用。

表 2 生肌散與組成中藥清除 Xanthine/Xanthine oxidase 產生之超氧陰離子的作用

藥物名稱	藥物濃度	吸光值 (550 nm)	抑制率
空白對照組	0 mg/ml	0.034 ± 0.002	0.0 %
生肌散	1 mg/ml	0.030 ± 0.002	11.8 %
	5 mg/ml	0.008 ± 0.001	76.5 %
	10 mg/ml	0.000 ± 0.001	100.0 %
珍珠	1 mg/ml	0.035 ± 0.002	0.0 %
	10 mg/ml	0.034 ± 0.002	0.0 %
兒茶	0.1 mg/ml	0.029 ± 0.002	14.7 %
	1 mg/ml	0.006 ± 0.001	82.4 %
	10 mg/ml	0.004 ± 0.001	88.2 %
乳香	1 mg/ml	0.035 ± 0.002	0.0 %
	10 mg/ml	0.029 ± 0.002	14.7 %
沒藥	1 mg/ml	0.030 ± 0.002	11.8 %
	10 mg/ml	0.018 ± 0.002	47.1 %
川七	1 mg/ml	0.030 ± 0.002	11.8 %
	10 mg/ml	0.029 ± 0.002	14.7 %
血竭	1 mg/ml	0.034 ± 0.002	0.0 %
	10 mg/ml	0.032 ± 0.002	5.9 %
冰片	1 mg/ml	0.034 ± 0.002	0.0 %
	10 mg/ml	0.033 ± 0.002	3.0 %
VitE	1 mM	0.022 ± 0.002	35.3 %
	10 mM	0.006 ± 0.001	82.4 %

表 3 生肌散與其組成中藥對於 FeCl₂ 所誘發的脂質過氧化的抑制作用

藥 物	MDA 濃度(uM)
空白對照組	-0.007 ± 0.003
陽性控制組	0.120 ± 0.008
生肌散 1 mg/ml	0.032 ± 0.009*
珍 珠 1 mg/ml	0.132 ± 0.019
兒 茶 1 mg/ml	0.034 ± 0.007*
乳 香 1 mg/ml	0.123 ± 0.010
沒 藥 1 mg/ml	0.110 ± 0.006
川 七 1 mg/ml	0.119 ± 0.010
血 竭 1 mg/ml	0.119 ± 0.015
冰 片 1 mg/ml	0.134 ± 0.002

* : $P < 0.05$ vs 陽性控制組 by Student's t-test表 4 生肌散與兒茶對於 FeCl₂ 所誘發的脂質過氧化的抑制作用

藥 物	MDA 濃度(uM)
空白對照組	0.021 ± 0.009
陽性控制組	0.088 ± 0.007
生肌散	
0.01 mg/ml	0.096 ± 0.005
0.1 mg/ml	0.094 ± 0.003
1 mg/ml	0.015 ± 0.001*
10 mg/ml	0.014 ± 0.004*
兒 茶	
0.01 mg/ml	0.083 ± 0.007
0.1 mg/ml	0.023 ± 0.002*
1 mg/ml	0.021 ± 0.004*
10 mg/ml	0.020 ± 0.002*
VitE	10 mM
10 mM	0.011 ± 0.001

* : $P < 0.05$ vs 陽性控制組 by Student's t-test表 5 生肌散及其組成中藥對白血球產生 H₂O₂ 與 OCl⁻ 的清除作用 # ##

藥物種類	處置前	處置後	P 值
生肌散 1 mg/ml (n = 6)	11511.74 ± 7976.43	13112.36 ± 8169.99	0.550
珍 珠 1 mg/ml (n = 6)	141704.80 ± 204539.80	46567.50 ± 29288.20	0.299
兒 茶 1 mg/ml (n = 12)	67812.20 ± 64556.70	38605.80 ± 27259.30	0.01*
乳 香 1 mg/ml (n = 6)	19061.63 ± 9439.64	29512.23 ± 6413.96	0.025**
沒 藥 1 mg/ml (n = 6)	31264.58 ± 20527.09	46919.10 ± 25862.87	0.150
川 七 1 mg/ml (n = 6)	43239.02 ± 23466.91	47981.38 ± 20370.44	0.440
血 竭 1 mg/ml (n = 6)	32932.58 ± 20613.10	33321.28 ± 14141.63	0.920
冰 片 1 mg/ml (n = 6)	47388.70 ± 24684.57	50486.42 ± 15467.40	0.785

: 試劑為 Luminol

: 單位為 counts / 10 sec

* : $P < 0.05$ vs 處置前 by paired t-test

** : 處置後不降反升

表 6 生肌散及其組成中藥對白血球產生之超氧陰離子 (O_2^-) 的清除作用 # ##

藥物種類	處置前	處置後	P 值
生肌散 1 mg/ml (n = 6)	42705.62 ± 35342.45	47415.63 ± 26424.47	0.365
珍珠 1 mg/ml (n = 6)	24231.63 ± 13816.23	26811.80 ± 13737.48	0.618
兒茶 1 mg/ml (n = 12)	58432.73 ± 26933.70	7557.33 ± 3762.68	0.0034*
乳香 1 mg/ml (n = 6)	35000.30 ± 20624.79	37968.08 ± 16979.51	0.499
沒藥 1 mg/ml (n = 6)	10711.63 ± 4915.29	11715.53 ± 5067.48	0.717
川七 1 mg/ml (n = 6)	11400.35 ± 9214.93	13011.03 ± 10380.03	0.314
血竭 1 mg/ml (n = 6)	27401.75 ± 15276.03	26629.85 ± 12038.54	0.700
冰片 1 mg/ml (n = 6)	20995.87 ± 12256.01	22220.57 ± 12803.35	0.657

: 試劑為 Lucigenin

: 單位為 counts/ 10 sec

* : $P < 0.05$ vs 處置前 by paired t-test

四、生肌散及其組成中藥清除白血球產生超氧陰離子(O_2^-)的作用：

如表 6 所示，兒茶在 1 mg/ml 濃度時對於白血球產生之超氧陰離 (O_2^-) 有明顯的抑制作用作用。

討 論

事先運用抗氧化劑清除氧自由基可以預防並減少缺血後再灌流所造成的損傷。Punch 等指出在實驗前預先運用 Allopurinol (XO 抑制劑) 超氧化物歧化酶 (SOD) 過氧化氫酶 (Catalase) 與 Dimethyl sulfoxide 等自由基清除劑可改善大鼠缺血後再灌流造成的損傷²¹。Amiram 等以 S-D 白鼠的皮瓣移植進行缺血後再灌流損傷的觀察。結果發現事前以超氧化物歧化酶治療能明顯提高實驗動物皮瓣移植的存活率，缺血 10 小時後兩組存活率分別是 26 %與 74 %，25 %與 86 %， $P < 0.0025$ 與 $P < 0.0005$ ²²。Li 氏則直接將超氧化物歧化 (SOD) 注入皮瓣，發現它能有效的降低移植後的皮瓣因缺血後再灌流所造成的損傷，從而使其存活率由 63.7 %明顯提高到 93.6 %²³。維他命 E 是重要的抗氧化劑之一，Taren 等以大鼠作研究，發現接受放射治療之後的大鼠皮膚傷口，其抗力 (breaking strength, g/5 mm wound) 明顯降低。而隨著事前使用維他命 E 劑量的增加，皮膚傷口的抗力相對提高 ($P < 0.01$)²⁴。

本研究結果顯示生肌散與其組成藥物兒茶對於 Xanthine / Xanthine oxidase 所產生之超氧陰離子 O_2^- 有明顯的清除作用 (見表 2)，若能在壓瘡發生的初期及早使用生肌散治療，理論上應該有助於減少缺血後再灌流所造成的損傷。

在呼吸爆發的情況之下，人體內的巨噬細胞氧氣消耗量大增，在 NADPH 氧化酶的催化之下，氧分子 O_2 從 NADPH 獲得電子，產生超氧陰離子 O_2^- 。MPO 系統是人體內最強的殺菌系統，它催化鹵素離子與過氧化氫 H_2O_2 反應產生次氯酸 (HOCl)。HOCl 是具強烈生物活性的化合物，對細菌和真核細胞有明顯的細胞毒性作用。以上二者均屬人體防禦系統，一方面扮演殺菌的角色，一方面也可增強放大炎症反應，造成組織的損傷²⁵。Brestel 的研究指出 Taurine 等藥物能有效的清除次氯酸與脂質過氧化物，此項功能可作為研發新消炎藥物的指標²⁶。

理論上，若某藥物能清除全血中受激發態白血球所產生的 H_2O_2 、 $HOCl$ 與 O_2^- ，表示它可能可以保護組織免受過強的炎症反應所造成的二度傷害。本研究發現生肌散與其組成藥物兒茶對於 $FeCl_2$ 所誘發的脂質過氧化均有明顯的抑制作用（見表 3）。此外，兒茶對於激發態的白血球所產生的過氧化氫、次氯酸與超氧陰離子都有良好的抑制作用。顯示生肌散與兒茶的相關抗氧化作用，有可能與它促進壓瘡傷口的作用機轉有部分的相關性。

兒茶素是中藥兒茶的多酚成分²⁷，Lotito 等的研究指出兒茶素在人體血漿中是有效的抗氧化劑，它能有效的抑制脂肪過氧化並延緩內源性脂質抗氧化劑的消耗²⁸。此與本研究的部分成果有相關之處，也說明了兒茶素可能是生肌散的主要抗氧化活性成分之一。

左壯在回顧性的綜合報導中提到珍珠提取物與三七均具有抗氧化作用²⁹。羅傳一報導三七皂苷和人參總皂苷均有抗自由基作用，連續給藥三月後，有使老年白鼠心肌和腦組織的脂褐質與血清中的 LPO 含量均顯著下降的效果³⁰。珍珠與三七均是生肌散的組成藥物，然而在本研究中並未能有效地清除 Xanthine / Xanthine oxidase 所產生之超氧陰離子 O_2^- 與氯化亞鐵 $FeCl_2$ 所誘發的過氧化脂質。

臨床上，皮膚的傷口癒合包括炎症期、組織形成期與組織重組期三個階段。傷口癒合是一套精密的修復過程，需要許多可溶性介質、血球、胞外母質與實質細胞的參與。各類生長因子（移行上皮生長因子 TGF、血小板生長因子 PDGF、血管內皮生長因子 VEGF、角質細胞生長因子 KGF 等）許多蛋白酶（Collagenase、Gelatinase、Stromelysin、Plasminogen activator）等，都可能影響到傷口癒合的任一步驟³¹。傷口局部的氧氣含量、細菌感染與出血量的多寡、局部組織生長因子的分泌量；整體性因子，例如患者本身的營養與體能狀態等均會影響傷口的癒合³²。Arisawa 等的研究指出 Hydroxyl 自由基會造成傷口膠原蛋白（Collagen）的變性（Denaturation），進而阻礙癒合後期的重組（Remodeling）³³。Foschi 等觀察發現使用玻尿酸藥膏外敷傷口，能有效的清除氧自由基，從而提高實驗白鼠的皮膚傷口癒合率³⁴。Yu 等的研究指出各種生長因子可能是藉由與發炎細胞與纖維母細胞的交互作用，進而影響皮膚傷口的癒合³⁵。

我們從先前的臨床研究發現生肌散有利於壓瘡皮膚傷口的癒合⁸，在本研究中又發現生肌散能有效的清除 Xanthine / Xanthine oxidase 產生之超氧陰離子 O_2^- ，與氯化亞鐵所誘發的過氧化脂質，理論上生肌散應該有助於減少缺血後再灌流所造成的組織損傷，有利於壓瘡傷口的癒合。但是生肌散對於激發態的白血球所產生的過氧化氫、次氯酸與超氧陰離子卻不具抑制作用，其原因則值得進一步探討。

生肌散為什麼能促進皮膚的傷口癒合？其相關的作用機轉是值得進一步探討的。包括：生肌散對於皮膚組織的各類生長因子有無調控作用？對於纖維母細胞與血管內皮細胞的增生有無促進作用？

結 論

生肌散與其組成藥物兒茶對於 Xanthine / Xanthine oxidase 所產生之超氧陰離子有明顯的清除作用，對於氯化亞鐵所誘發的脂質過氧化也有明顯的抑制作用。兒茶對於激發態的白血球所產生的過氧化氫、次氯酸與超氧陰離子都有良好的抑制作用。生肌散有助於減少缺血後再灌流所產生的自由基對機體的損傷。

誌 謝

本研究承蒙臺南市立醫院檢驗科李淑芳小姐在實驗技術上的指導，秀傳醫院陳宇輝醫師、洪業晃醫師提供寶貴參考意見，在此一併致謝。

參考資料

1. 清 顧世澄：瘍醫大全，旋風出版社，臺北，p. 35, 1973。
2. Perez ED: Pressure ulcers. Updated guidelines for treatment and prevention, *Geriatrics*, 48: 39, 1993.
3. 陳援、周玫：自由基醫學，人民軍醫出版社，北京，p. 149, 1991。
4. 鄭榮梁：自由基生物學，高等教育出版社，河北，p.131, 1992。
5. Salcido R, Donofrio JC, Fisher SB, LeGrand EK, Dicky K, Carney JM, Schosser. Liang. R: Histopathology of pressure ulcers as a result of sequential computer- ontrolled pressure session in a fuzzy rat model. *Adv Wound Care*, 7: 5, 23-24, 26, 28 passim, 1994.
6. Rees R, Smith D, Li TD, Cashmer B, Garner W, Punch J and Smith DJ: The role of Xanthine oxidase and Xanthine dehydrogenase in skin ischemia. *J Surg Res*, 56: 162-167, 1994.
7. Punch J, Rees R, Cashmer B, Wilkins E, Smith DJ and Till GO: Xanthine oxidase: its role in the no-reflow phenomenon. *Surgery*, 111: 169-176, 1992.
8. Yao-Chin Hsu, Heng-Hon Chang, Ming-Feng Chen and Jung-Chou Chen: Therapeutic effect of SHENG-JI-SAN on pressure ulcers. *Am J Chin Med*, 28: 391-399, 2000.
9. McCord JM, Fridovich I: Superoxide dismutase, An enzymic function for erythrocyte (hemo cuprein), *J B C*, 244: 6049-6055, 1969.
10. 八木國夫、大石誠子、大川博：測定法，過氧化脂質與疾患。（八木國夫，王島雄一郎編集），醫學書院，東京，pp. 20-32，1981。
11. Nishida A, Kimura H, Sugioka K, Nakano M: The ability of granulocytes to generate superoxide anions and hypochlorite during phagocytosis: comparison of neonatal granulocytes with adult granulocytes. *Biol Neonate*, 58: 145-151, 1990.
12. Rost M, Karge E, Klinger W: What do we measure with luminol, lucigenin, and penicillin-amplified chemilucence? (1) Investigations with hydrogen peroxide and sodium hypochlorite. *J Biolumin Chemilumin*, 13:355-363, 1998.
13. Mueller S, Arohold J: Fast and sensitive chemiluminescence determination of H₂O₂ concentration in stimulated human neutrophils. *J Biolumin Chemilumin*, 10: 229-237, 1995.
14. Arnhold J, Hammerschmidt S, Arnold K: Role of functional groups of human plasma and luminol in scavenging of NaOCl and neutrophile-derived hypochlorous acid. *Biochim Biophys Acta*, 1097: 145-151, 1991.
15. Theron AJ, Steenkamp KJ, Anderson R: NADPH-oxidase activity of stimulated neutrophils is markedly increased by serum. *Inflammation*, 18: 459-467, 1994.
16. Lu FJ, Lin JT, Wang HP, Huang WC: A simple sensitive, non-stimulated photon counting system for detection of superoxide anion in whole blood. *Experientia*, 52: 141-144, 1995.

17. Chen MF, Chang CL, Liou SY: Increase in resting levels of superoxide anion in the whole blood of uremic patients on chronic hemolysis. *Blood Purif*, 16: 290-300, 1998.
18. Himmelfarb J, Lazarus M, Hakim R: Reactive oxygen species production by monocytes and polymorphonuclear leukocytes during dialysis. *Am J Kidney Dis*, 17: 271-276, 1991.
19. Nguyen AT, Lethias C, Zingfaff J, Herbelin A, Naret C, Descamps-latcha B: Hemodialysis membrane-induced activation of phagocyte oxidative metabolism detected in vivo and in vitro within micro-amounts of whole blood. *Kidney Int*, 28: 158-167, 1985.
20. Bonomin M, Stuard S, Carreno MP, Settefrati N, Santarelli P, Haeffner-Cavaillon N, Albertazzi A: Neutrophil reactive oxygen species production during hemodialysis: Role of activated platelet adhesion to neutrophils through P-selection. *Nephron*, 75: 402-411, 1997.
21. Punch J, Rees R, Cashmer B, Wilkins E, Smith DJ and Till GO: Xanthine oxidase: its role in the no-reflow phenomenon. *Surgery*, 111: 169-176, 1992.
22. Amiram S, Michael F, David L and Berish S: Improved survival of island flaps after prolonged ischemia by perfusion with superoxide dismutase. *Plast and Reconstr Surg*, pp. 639-642, 1986.
23. Li SR: Effect of scavenger of superoxide radicals in reducing ischemic injury of skin flaps. *Chung Hua Cheng Hsing Shao Shang Wai Ko Tsa Chih*, 54: 281-283, 1989.
24. Taren DL, Chvapil M and Weber CW: Increasing the breaking strength of wound exposed to preoperative irradiation using vitamin E Supplementation. *Int J Vitam Nutr Res*, 57: 133-137, 1987.
25. 陳援、周玫：自由基醫學，人民軍醫出版社，北京，pp.115-119，1991。
26. Brestel EP: Co-oxidation of luminol by hypochlorite and hydrogen peroxide implications for neutrophil chemiluminescence. *Biochem Biophys Res Commun*, 126: 482-488, 1985.
27. Bensky D. and A. Gamble, Chinese herbal medicine (Materia Medica). Eastland Press Inc., Washington, pp. 650-651, 1986.
28. Lotito SB, CG. Fraga: (+)- Catechin prevents human plasma oxidation, *Free Radic Biol Med*, 24: 435-441, 1998.
29. 左壯、李順成，自由基及其中西醫結合研究進展，北京中醫雜誌，1：58-59，1991。
30. 羅傳，中醫藥與自由基的研究近況，中醫藥學報，3：38-41，1992。
31. Singer AJ, Clark and Richard AF: Cutaneous wound healing. *N Eng J Med*, 341: 738-746, 1999.
32. Waldorf H and Fewkes J: Wound healing. *Adv.Dermatol*, 10: 77-90, 1995.
33. Arisawa S, Arisawa T, Ohashi M, Nitta Y, Iketa T and Asai: Effect of hydroxyl radicals on fibroblast-mediated collagen remodelling in vitro. *J Clin Exp Pharmacol Physiol*, 23: 222-228, 1996.
34. Foschi D, Castoldi L, Radaelli E, Abelli P, Carderini G, Rastrelli A, Mariscotti C, Marazzi M and trabucchi E: Hyaluronic acid prevents oxygen free-radical damage to granulation tissue, a study in rats. *Int J.Tissue React*, 12: 333-339, 1990.
35. Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ: Expression of growth factors in early wound healing in rat skin. *Laser Surg Med*, 15: 281-289, 1994.

J Chin Med 13(3): 119-129, 2002

STUDIES OF SHENG-JI-SAN AND IT'S COMPONENT ON ANTI-OXIDATIVE EFFECTS

Yao-Chin Hsu¹, Ming-Fong Chen² and Jung-Chou Chen^{3,4}

¹*Chi-Mei Foundational Hospital, Chinese Medical Department
Tainan, Taiwan*

²*Show Chwan Memorial Hospital, Cancer Center*

³*Show Chwan Memorial Hospital, Chinese Medical Department
Changhua, Taiwan*

⁴*China Medical College, School of Chinese Medicine
Taichung, Taiwan*

(Received 31th May 2001, revised Ms received 31th July 2001, accepted 18th January 2002)

SHENG-JI-SAN promotes the healing of pressure ulcers successfully in our clinical research. According to the correlation between ischemia, post-ischemic reperfusion injury and the pressure ulcers, we tried to investigate the anti-oxidative effect of SJS. The result showed that SJS effectively scavenge the superoxide anion produced by Xanthine/ Xanthine oxidase and also inhibit the lipid peroxidation induced by ferrous chloride. Acacia catechu inhibit hydroperoxide, hypochloride and superoxide produced by stimulated human white cells. It's contributory to understanding the mechanism of SJS to accelerate the healing of pressure ulcers.

Key words : SHENG-JI-SAN (SJS), Pressure ulcers, Post ischemic reperfusion injury, Lipid peroxidation.