

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計 畫 *
* : 苦藤水草物的腎臟保護效應研究 *
* 名 稱 *
* ***** *

執行計畫學生： 沈君柔
學生計畫編號： MOST 105-2815-C-041-008-B
研 究 期 間： 105 年 07 月 01 日至 106 年 02 月 28 日止，計 8 個月
指 導 教 授： 蕭慧美

處理方式： 本計畫可公開查詢

執 行 單 位： 嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學保健營養系
(含碩士班)

中華民國 106 年 02 月 20 日

題目：苦藤萃出物的護腎功效

(一) 摘要

苦藤(*Caulis Tinosporae*)的乾燥莖切片為民間常用以泡開水服用以護肝，本實驗試著探討苦藤萃取物對小鼠肝腎的抗氧化效果。方法：乾燥苦藤莖分別以熱水和冷水並以不同時間進行萃取，測定萃出率及萃出物的總酚類和類黃酮含量。小鼠適應一週後再依體重隨機分五組：空白組(C組)、誘導氧化組(CIP組)、苦藤萃出物高劑量組 500mg/kg (CIP+TH組)、苦藤萃出物中劑量 250mg/kg (CIP+TM組)、苦藤萃出物低劑量 100mg/kg (CIP+TL組)。餵食一週後再進行 CIP 注射，三天後進行動物犧牲。結果：苦藤使用熱水萃取 10 分鐘的萃出率及總多酚類、類黃酮的指標最佳，因此以熱水萃出物進行動物實驗。苦藤高劑量組肝臟相對組織重量顯著高於空白組；血漿 Creatinine 以及腎臟的氧化效果於組間沒有顯著差異；苦藤高劑量組的肝臟 GSH 含量顯著最高。因此認為苦藤可能對肝臟有較佳的抗氧化作用。

(二) 研究動機與研究問題

動機：苦藤為民間用藥，目前許多研究指出苦藤具有抗氧化、抗發炎、治療糖尿病與保護肝臟等功效。我們實驗室曾經以高尿酸動物實驗發現苦藤水萃出物可以降低血清尿酸的作用。網路也流傳苦藤具有抗衰老效果，所以推測苦藤應該具有抗氧化作用然後透過抗氧化來保護腎的效果。

研究問題：本實驗目的為探討苦藤是否具有保護腎臟的作用。根據一般植物資訊指出該植栽全年可採，砍取地上植物莖部分，除去嫩枝及葉，切段，曬乾。**苦藤的功能**(根據網路資料)：【性味】苦、澀，涼。【功能與主治】清熱潤肺，調合病理所致紊亂。用於肝熱，五臟熱，肺病，風濕關節炎，衰老病。

Panchabhai 等人(2008)的文獻回顧中討論了 *Tinospora cordifolia* 的各種藥性與治療宣稱，包含了糖尿病、肝臟損傷、自由基引發損傷、感染，壓力與癌症、免疫調節、利尿、抗發炎、抗膽鹼酯解酶、腸胃保護效應等。可見此藥物之發展潛能極為寬廣。

(三) 文獻回顧與探討

苦藤 *CAULIS TINOSPORAE*，包括防己科植物心葉寬筋藤 *Tinospora cordifolia*(wulld)Miers 與寬筋藤 *T. sinensis*(Lour.)Merr. 的乾燥莖。Panchabhai 等人(2008)的文獻回顧中討論了 *Tinospora cordifolia* 的各種藥性與治療宣稱，談到了糖尿病、肝臟損傷、自由基引發損傷、感染，壓力與癌症。免疫調節、利尿、抗發炎、analgesic、抗膽鹼酯解酶、腸

胃保護效應等等作用。在 Manjrekar 等人 (2000) 的文獻中也提到 *Tinospora cordifolia* 和 *Tinospora sinensis* 莖部的水萃物與酒精萃出物皆具有免疫調節作用。*Tinospora cordifolia* 水萃物 (200mg/kg) 可以降低 STZ-誘發糖尿病小鼠的血糖並減緩多尿現象 (Grover 等人 2001)。*Tinospora cordifolia* 可以改善 STZ 加上高果糖誘導糖尿病大鼠的血糖、胰島素分泌，也會降低各種氧化壓力指標、(Sangeetha et al. 2011)。Gupta and Sharma (2011) 是發現到 *Tinospora cordifolia* 的根部萃取液能保護腎臟免於受到黃麴毒素-B1 的毒性傷害。我們實驗中的發現苦藤具有降尿酸作用，但是苦藤的飲用到底對腎臟是否具有保護效果還是可能造成傷害則沒有人加以探討。

Cisplatin 是一種化療藥物，但是它同時具有腎毒性，也有許多文獻皆在著手尋找可減緩 CIP-腎毒性的物質。由於 CIP 之腎毒性與氧化傷害有關，所以探討抗氧化物質減緩 CIP-腎毒性的研究很多，例如具抗氧化能力的維生素 C 和維生素 E 之投予，可提升注射 CIP 的小鼠腎臟抗氧化酵素活性與 GSH 含量並降低血清尿素氮 (Ajith et al. 2009)，透過電子顯微鏡的觀察研究，維生素 C 具有保護大鼠腎臟免於 CIP 之傷害 (Tarlacalisir et al. 2008)。

既然苦藤具有降尿酸作用，民間也流傳苦藤具有抗衰老、抗發炎等效果，所以我們推測苦藤應該具有抗氧化作用然後透過抗氧化來達到保護腎臟的效果。

(四) 研究方法及步驟

1. 苦藤水萃物製備：將苦藤莖洗淨後陰乾後以冷凍乾燥機-40°C 乾燥 48 小時，接著磨成粉（避免日曬）。每 10 克苦藤粉以 1L 冷水或熱水泡製苦藤茶，分別以 Whatman No.1 濾紙與 nitrocellulose membrane 過濾兩次後，置於減壓濃縮機使用 55°C 水浴以蒸發水分直到水萃液呈現半固體狀態。將上述半固體萃出物冷凍過夜，繼續以冷凍乾燥機進行乾燥至粉末狀，秤重後置於室溫防潮箱中備用 (Sehgupta et al. 2011)。
2. 總酚類和類黃酮的測量：總酚類分析：取 400 μ L 適當濃度之 gallic acid 溶液作為標準品，加入 400 μ L Folin Ciocalteu's phenol reagent 振盪混合後，於室溫下靜置三分鐘，再加入 40 μ L 的 10% Na₂CO₃ 溶液，每隔 10 分鐘 振盪 一次，一小時後以分光光度計 (Spectrophotometer, U-2800A, Hitachi, Tokyo, Japan) 檢測 725 nm 之吸光值。樣品中總多酚含量以樣品液 400 μ L 取代 400 μ L 適當濃度之 gallic acid 溶液，其餘步驟與上述相同，樣品之總多酚含量 (mg/g) 由標準檢量線求得。類黃酮含量分析乃參考 Christel (2000) 等人之方法。取適當濃度之 quercetin 溶液作為標準品，加入等體積 2% 之 AlCl₃ · 6H₂O 振盪

混合室溫下靜置 10 分鐘後，以分光光度計檢測 430 nm 之吸光值。測試樣品之類黃酮含量($\mu\text{g/mL}$)由標準檢量線求得。

3. 動物飼養：使用小鼠，經適應七天後依體重分組：基礎飼料空白組(C組)、誘導腎損傷空白組(CIP組)、苦藤萃出物高劑量 500mg/kg(CIP+TH組)、苦藤萃出物中劑量 250mg/kg(CIP+TM組)、苦藤萃出物低劑量 100mg/kg(CIP+TL組)。經管餵生理食鹽水或苦藤萃出物七天後，注射 CIP，注射後三天，即進行動物犧牲。犧牲當天以 CO_2 窒息，下腔靜脈採血並分離血清、取下肝腎臟並秤重。所有小鼠皆飼養於溫度及日照時間控制的環境中，任其自由攝食及飲水。

4. 動物樣品分析項目與方法：

(1)血漿尿素氮、肌酸酐：血液以低速離心將血漿分離，分裝後貯存於 -20°C 。分析當天解凍後以市售試劑套組測定尿素氮和肌酸酐。

(2)肝臟與腎臟

①(Thiobarbituric acid-reactive substance)TBARS：肝、腎臟經秤重後，於冰上剪下定量的組織並記錄重量後，以均質緩衝液(potassium-phosphate buffer 0.01 M, pH 7.4) 進行均質，並定量體積使成為 25% (W/V) 組織均質液。取適量的均質液加入 3g/L SDS 0.5mL、0.1mol/L HCl 2mL、10g/L phosphotungstic acid 0.3mL 以及 0.7g/L thiobarbituric acid，激烈震盪後於沸水 50°C 中水浴 1 小時，冷卻後以 1-butanol 震盪萃取，離心後取得上層液測定 532nm 之吸光值。另以 1,1,3,3-tetraethoxypropane 作為標準品，經過 0.02N HCL 系列稀釋作出標準曲線以供濃度換算。

②(Glutathione)GSH：肝、腎臟經秤重後，於冰上定量組織並記錄重量後，以均質緩衝液(potassium-phosphate buffer 0.01 M, pH 7.4) 進行均質，並定量體積使成為 25% (W/V) 組織均質液。取適量的均質液加入 0.4M Tris buffer(含 0.02M EDTA)、0.01M DTNB 靜置 5 分鐘後測定 428nm 之吸光值。另以 1mM GSH 作為標準品，經過 D.W 系列稀釋做出標準曲線以供濃度換算。

(3)統計方法：實驗結果皆以平均值 $\pm$ 標準偏差來表示。所有結果以 one-way ANOVA 進行統計，並以 Duncan's 檢定組別差異， $p < 0.05$ 為顯著差異。

(五)結果與討論

苦藤經冷水或熱水於不同時間進行萃取後，結果如表一，熱水萃取率皆高於冷水。萃取時間越久，萃出率亦隨之增加。熱水萃取物的總酚類皆

高於冷水法，而類黃酮含量則以熱水 10 分鐘為最高。綜合上述萃出率、總多酚類、類黃酮的指標來看，熱水 10 分鐘為最佳萃取條件。因此以熱水 10 分鐘萃出物進行動物實驗。

苦藤對於腎臟的影響以血清 BUN 及肌酸酐做為參考指標，結果如表二，各組間並無顯著差異。BUN 以 CIP 組低於苦藤高劑量組。此結果與預期不符合。經探討有兩大原因：其一是 CIP 組的藥劑注射未能誘導腎臟損傷，造成 BUN 沒有顯著提升。其二是採血過程不當造成血液溶血嚴重所致，每組皆有 3-4 隻有溶血反應。劉氏(2007)指出溶血現象會影響 BUN 與肌酸酐的分析準確性。

腎臟的脂質過氧化情形如表三，中劑量苦藤的 TBARS 濃度顯著高於 C 組與 CIP 組，但是 GSH 濃度，於五組間都沒有顯著差異；由於 CIP 注射會消耗大量的 GSH 造成氧化損傷，本實驗結果未能看到 CIP 組的誘導現象。肝臟的脂質過氧化情形如表四，苦藤高劑量組的肝臟 GSH 含量顯著最高。因此若以抗氧化作用來看，苦藤似乎對肝臟有較佳的保護效應。

(六)參考文獻

- Ajith TA, Abhishek G, Roshnv D, Sudheesh NP (2009) Co-supplementation of single and multi doses of vitamins C and E ameliorates cisplatin-induced acute renal failure in mice. *Exp Toxicol Pathol*, on line.
- Tarladacalisir YT, Kanter M, Uygun M (2008) Protective effects of vitamin C on cisplatin-induced renal damage: a light and electron microscopic study. *Renal Failure* 30:1-8.
- Grover JK, Vats V, Rathi SS, Dawar R (2001) Traditional Indian anti-diabetic plants attenuate progression of renal damage in streptozocin induced diabetic mice. *J Ethnopharmacol* 76, 233-238.
- Gupta R & Sharma V (2011) Ameliorative effects of *Tinospora Cordifolia* extract on histopathological and biochemical changes induced by Aflatoxin-B1 in mice kidney. *Toxicol Int* 18:94-98.
- Manjrekar PN, Jolly CI, Narayanan S (2000) Comparative studies of the immunomodulatory activity of *Tinospora cordifolia* and *Tinospora sinensis*. *Fitoterapia* 71, 254-257.
- Sangeetha MK, Raghavendran HRB, Gayathri V, Vasanthi HR (2011) *Tinospora cordifolia* attenuates oxidative stress and distorted carbohydrate metabolism in experimentally induced type 2 diabetes in rats. *J Nat Med*, 65:544-550.
- Sehgupta M, Sharma GD, Chakraborty B (2011) Effect of aqueous extract of *Tinospora cordifolia* on functions of peritoneal macrophages isolated from CCl4 intoxicated male albino mice. *BMC Complementary and Alternative*

Medicine, 11:102-111.

劉佚。溶血對部分血液生化指標的影響。中華醫學研究雜誌，2007 年第 7 卷第 12 期。

(七) 附表

表一、苦藤不同萃出條件之萃出率、類黃酮及總多酚類含量

	萃出率 %	Flavonoid mg/g 萃出物	Total phenol mg/g 萃出物
冷水			
10min	15.94	7.74±0.35	98.88±0.60
0.5h	18.87	8.20 ±0.90	91.77±0.88
1h	18.44	6.69 ±0.80	93.61±1.38
熱水			
10min	17.73	13.01±0.18	159.71±0.94
0.5h	22.90	6.68±0.37	125.11±0.73
1h	26.12	5.71±0.32	122.02±1.33

表二、苦藤水萃物對於血清尿素氮及肌酸酐之影響

Group	Dose (mg/kg)	n	BUN (mg/ml)	Creatinine (μmol/L)
C	-	7	25.08±2.93 ^{ab}	36.64±10.92 ^a
CIP	-	7	23.13±2.31 ^b	52.07±56.17 ^a
CIP+TL	100	7	24.92±3.43 ^{ab}	32.31±10.82 ^a
CIP+TM	250	6	24.94±1.20 ^{ab}	27.56±7.52 ^a
CIP+TH	500	7	26.55±1.56 ^a	29.89±6.59 ^a

表三、苦藤水萃物對於腎臟 GSH、TBARS 濃度之影響

Group	Dose (mg/kg)	n	TBARS	GSH
C	-	7	(nmol/g)	(umol/g)
CIP	-	7	41.29±6.94 ^b	2.27±0.55 ^a
CIP+TL	100	7	42.71±6.12 ^b	2.06±0.53 ^a
CIP+TM	250	6	53.00±11.68 ^a	1.91±0.36 ^a
CIP+TH	500	7	46.50±9.19 ^{ab}	2.19±0.37 ^a

表四、苦藤水草物對於肝臟 GSH、TBARS 濃度之影響

Group	Dose (mg/kg)	n	TBARS (nmol/g)	GSH (umol/g)
C	-	7	23.83±2.72 ^a	3.87±0.47 ^b
CIP	-	7	24.10±2.73 ^a	3.95±0.71 ^b
CIP+TL	100	7	23.94±2.79 ^a	4.36±0.41 ^b
CIP+TM	250	6	23.33±2.88 ^a	3.98±0.73 ^b
CIP+TH	500	7	23.87±2.93 ^a	5.01±0.63 ^a