

大 葉 大 學

藥用植物與保健學系碩士班

碩士論文

台灣產筋骨草屬植物降血糖功能及其活性
成分之研究

The Hypoglycemic Activity and Active
Components of *Ajuga* Species in Taiwan

研 究 生：劉育伶

指 導 教 授：謝昌衛

中 華 民 國 1 0 3 年 6 月

中文摘要

筋骨草屬植物對降血糖功能之研究尚未完善，為建立筋骨草相關品種對降血糖效果之研究，本研究選用五種台灣常見之筋骨草：匍匐筋骨草、日本筋骨草、矮筋骨草、臺灣筋骨草和網果筋骨草。第一階段，筋骨草以超音波輔助萃取法與超臨界流體萃取法，將萃取物進行篩選試驗。實驗結果顯示經超音波輔助萃取之日本筋骨草萃取物的總黃酮和蛇皮甾酮含量最高，分別為 7.86 ± 0.18 mg/g 和 0.785 ± 0.031 mg/g， α -glucosidase 活性抑制率與 HepG2 細胞對葡萄糖的攝取促進率結果，分別為 28.62 ± 1.56 % 與 54.15 ± 2.56 %。第二階段，本研究於超音波萃取前，先以纖維水解酵素於不同溫度下水解日本筋骨草。結果顯示 40°C 水解後與未經水解步驟之日本筋骨草萃取物相比，其總黃酮含量提升 20.23%，蛇皮甾酮含量提升 23.95%， α -glucosidase 活性抑制率提升 7.24 %，而 HepG2 細胞對葡萄糖的攝取促進率則提升了 13.40%，顯示纖維水解酵素的添加可有效提升萃取物的成分含量和功能性。第三階段，利用低劑量的 STZ (streptozotocin) 誘發小鼠產生糖尿病症狀。結果發現糖尿病對照組小鼠食用澱粉後，其血糖值大幅上升 127 ± 39 mg/dL，而給予 200 mg/kg 日本筋骨草萃取物之治療組糖尿病小鼠，其血糖變化幅度則分別降為 45 ± 44 mg/dL，顯著低於糖尿病組，血糖上升抑制率達 65%。綜合各試驗結果之數據，顯示日本筋骨草萃取物具有調控血糖的潛力。

關鍵字：筋骨草，降血糖，黃酮類化合物，纖維水解酵素，超音波萃取

ABSTRACT

The study of hypoglycaemic activity of *Ajuga* species is not perfect. In this study, we used five *Ajuga* species in Taiwan, including *Ajuga decumbens*, *Ajuga nipponensis*, *Ajuga pygmaea*, *Ajuga taiwanensis*, *Ajuga dictyocarpa* to establish a platform for hypoglycemic activity. First, comparison of ultrasonic-assisted extraction and supercritical fluid extraction of flavonoids, ecdysterone, α -glucosidase inhibitory activities and promoting rate of glucose uptake from *Ajuga* species. The results show that *A. nipponensis* has highest flavonoids (7.86 ± 0.18 mg/g) and ecdysterone (0.785 ± 0.031 mg/g) content then the four *Ajuga* species. α -Glucosidase inhibitory activities and promoting rate of glucose uptake was $28.62 \pm 1.56\%$ and $54.15 \pm 2.56\%$, respectively. Second, *A. nipponensis* pre-treatment based on ultrasound assisted enzymatic hydrolysis was different temperature for the extraction of bioactive compounds. At 40°C , the yields of flavonoids and ecdysterone were increased to 9.45 ± 0.14 mg/g and 0.973 ± 0.032 mg/g, respectively. α -Glucosidase inhibitory activities and promoting rate of glucose uptake was $35.66 \pm 1.21\%$ and $67.55 \pm 2.55\%$, respectively. Therefore, the present method may contribute to improving the throughput of bioactive compounds contents and function. Last, we use of low doses of STZ (streptozotocin)-induced diabetic symptoms in mice. The results showed that diabetic mice after eating starch, its blood glucose levels increased significantly 127 ± 39 mg/dL. When given 200 mg/kg in *A. nipponensis* extracts treated diabetic mice, its blood glucose were reduced to 45 ± 44 mg/dL. Subsequent STZ-induced diabetic mice administration of *A. nipponensis* extracts moderately decreased postprandial blood glucose levels in. Thus *A. nipponensis* extracts may be a potential remedy for diabetes in the future.

Key Words : *Ajuga* species, hypoglycaemic activity, flavonoids, cellulase, ultrasonic-assisted extraction

誌謝

很快的兩年碩士生活及研究一下就過去了，一邊工作一邊讀書，剛開始自己一直覺得真的很辛苦，但還好有我的指導教授謝昌衛博士，一路來的教導與鼓勵，讓我再研究上可以一點一滴累積專業知識，也得到了許多的實務經驗；謝教授在專業的領域上有相當豐富的知識，也在待人處事方面給了我很多的啟發及教導，不僅提昇了我的專業能力，也讓我在每個事情的處理能力更能面面俱到。另外非常感謝張淑微教授與劉寧漢教授於百忙之中，出席擔任口試委員，給了我相當寶貴的意見及建議，使得論文更加完整。

感謝實驗室的同學，謝謝他們在這兩年的研究生活中對我的課業幫忙及交流，讓我在學習上獲得更多的幫助。

由衷感謝我的家人、老闆、同事及朋友給我莫大的支持與鼓勵，謝謝你們默默付出及支持我念研究所，能讓我可以上班之餘還可以無憂無慮專心於研究上，順利取得學位。

目錄

封面內頁	
簽名頁	
中文摘要	iii
誌謝	v
目錄	vi
圖目錄	ix
表目錄	x
1. 前言	1
2. 文獻回顧.....	2
2.1 糖尿病的簡介.....	2
2.1.1 糖尿病的定義.....	2
2.1.2 糖尿病之診斷標準	3
2.1.3 糖尿病的分類.....	4
2.1.4 治療方式.....	5
2.2 筋骨草屬植物簡介	6
2.2.1 台灣產筋骨草屬植物型態及分佈簡介.....	7
2.2.2 筋骨草屬植物研究概況	9
2.2.3 筋骨草屬植物的主要化學成分簡介.....	11
2.3 超音波輔助萃取	13
2.3.1 熱學原理.....	14
2.3.2 機械作用	14
2.3.3 空化作用	15

2.4	超臨界流體萃取	15
2.5	藥物誘發第二型糖尿病模式	16
2.5.1	葡萄糖胺 (Glucosamine, GlcN)	16
2.5.2	四氧嘧啶 (alloxan).....	17
2.5.3	鏈佐酶素 (Streptozotocin, STZ).....	17
3.	材料與方法	19
3.1	實驗流程.....	19
3.2	實驗材料.....	19
3.3	試驗動物.....	19
3.4	實驗試藥	19
3.5	實驗儀器	23
3.6	實驗方法.....	24
3.6.1	樣品前處理.....	24
3.6.2	超臨界流體萃取	24
3.6.3	超音波輔助萃取	24
3.6.4	黃酮類化合物分析	25
3.6.5	蛻皮甾酮含量分析	25
3.6.6	抑制 α -glucosidase 活性試驗.....	26
3.6.7	細胞攝取葡萄糖試驗	27
3.6.8	不同水解溫度實驗	30
3.6.9	動物試驗.....	31
3.7	統計分析.....	33
4.	結果與討論	34
4.1	筋骨草品種之體外降血糖功效篩選平台建立	34

4.1.1 五種台灣產筋骨草總黃酮含量	34
4.1.2 五種台灣產筋骨蛇皮甾酮含量	34
4.1.3 五種台灣產筋骨草抑制 α -glucosidase 活性試驗	36
4.1.4 五種台灣產筋骨草萃取物對 HepG2 細胞存活率影響	37
4.1.5 五種台灣產筋骨草萃取物對 HepG2 細胞攝取葡萄糖影響	37
4.2 體外降血糖篩選平台綜合評估	39
4.3 優化萃取以提升筋骨草萃取物對降血糖之功效	39
4.3.1 總黃酮含量分析	40
4.3.2 蛇皮甾酮含量	41
4.3.3 抑制 α -glucosidase 活性試驗	41
4.3.4 HepG2 細胞對葡萄糖攝取試驗	42
4.4 動物試驗平台	42
4.4.1 糖尿病小鼠模式之建立	42
4.4.2 筋骨草萃取物療效之評估	43
5. 結論	61
6. 參考文獻	62

圖目錄

圖 1. 實驗流程架構圖	20
圖 2. 五種台灣產筋骨草萃取物之總黃酮含量	46
圖 3. 五種台灣產筋骨草萃取物之蛻皮甾酮含量	47
圖 4. 五種台灣產筋骨草之 α -glucosidase 活性抑制率	48
圖 5. 胰島素、二甲雙胍與五種台灣產筋骨草萃取物之 HepG2 細胞存活率	49
圖 6. 胰島素、二甲雙胍與五種台灣產筋骨草萃取物之 HepG2 細胞對葡萄糖的攝取促進率影響	51
圖 7. 不同水解溫度對日本筋骨草之總黃酮含量影響	52
圖 8. 不同水解溫度對日本筋骨草之蛻皮甾酮含量影響	53
圖 9. 不同水解溫度之日本筋骨草萃取物對 α -glucosidase 活性 抑制率影響	54
圖 10. 不同水解溫度之日本筋骨草萃取物之 HepG2 細胞對葡 萄糖攝取的促進率	55
圖 11. 動物實驗平台建立過程	56
圖 12. STZ 誘發糖尿病小鼠經餵食澱粉與日本筋骨草萃取物之 餵食後血糖上升情形	58
圖 13. STZ 誘發糖尿病小鼠經口服投與糖尿病治療藥物或筋骨 草萃取物後之抑制血糖上升情形	60

表目錄

表 1. 胰島素、二甲雙胍與五種台灣產筋骨草萃取物對 HepG2 細胞攝取葡萄糖影響	50
表 2. STZ 誘發糖尿病小鼠經餵食澱粉與不同劑量日本筋骨草萃 取物的混合飼料之前後血糖值變化情形	57
表 3. STZ 誘發糖尿病小鼠經口服給予糖尿病治療藥物或筋骨草 萃取物之前後血糖值變化情形	59

1. 前言

由於中藥對於舒緩糖尿病的臨床症狀與預防糖尿病的慢性併發症有一定效果，因此，我們希望能尋求可供在臨床上作為輔助治療的中藥，以提供糖尿病患更好的生活品質。文獻指出，植物中的多酚類、黃酮類化合物與萜類化合物等物質能抑制 α -glucosidase 活性的發揮，延緩雙醣水解為單醣，穩定血糖上升速度 (Haraguchi et al., 1996; Hashimoto et al., 1994; Vessal et al., 2003)，而筋骨草中就含有許多多酚類、黃酮類化合物與萜類化合物等活性化合物，例如槲皮素、蛻皮甾酮與木犀草素，亦有文獻指出筋骨草具有降血糖之作用 (El-Hilaly et al., 2004; 蕭, 2007)，但台灣產筋骨草對於降血糖之效果尚未十分清楚，故值得進一步深入探究。

而本研究為建立具有鑑別筋骨草之降血糖功效的體外篩選平台，以總黃酮類含量分析、蛻皮甾酮含量分析、 α -glucosidase 抑制率與 HepG2 細胞攝取葡萄糖試驗作為筋骨草篩選平台，可藉由篩選平台比較超音波輔助萃取與超臨界流體萃取兩種萃取法間的萃取效益，以及筋骨草品種對血糖調控的能力測試。且為提升萃取效果，本研究中再將經篩選後的筋骨草品種以纖維水解酵素於樣品前處理步驟中進行水解，藉以達到優化萃取的效果，並探討最適化水解條件。後段實驗則將建立動物試驗平台，以 STZ (streptozotocin, 鏈佐酶素) 誘導小鼠產生第二型糖尿病，再藉由實驗驗證體外篩選平台所篩選出來的萃取方法與筋骨草品種其萃取物之降血糖功效。

2. 文獻回顧

2.1 糖尿病的簡介

隨著經濟蓬勃，國人飲食習慣也逐漸改變。高油脂、高蛋白質等過度加工之再製食品，導致了許多文明病的發生，例如糖尿病。糖尿病，中醫稱消渴症，意為「消瘦、煩渴」，主要是指血液中糖類不正常堆積所引起的疾病。糖尿病主要表現為血糖高，是一種愈趨嚴重的代謝性疾病 (Harris et al., 1987)。2011 年，全球約有 8% 人有糖尿病，根據專家的估計，到 2030 年時，全球將會有 10% 的糖尿病人，相當於每十名成年人就會有一位罹患糖尿病 (Akter et al., 2014)。根據衛生署統計，全台糖尿病患者已突破 150 萬人，平均每年增加 2.5 萬人。事實上，糖尿病近幾年有年輕化的趨勢，20 至 44 歲的糖尿病患者增加 1 倍，而糖尿病患者罹患心血管疾病的風險較一般人高出 2 至 4 倍 (行政院衛生署，2013)。

2.1.1 糖尿病的定義

糖尿病屬於一種慢性的代謝異常疾病，主要原因是因為體內的胰島素缺乏或功能有缺陷，對糖類的利用能力減低，而造成高血糖的現象。臨床症狀最常見的為多尿、多喝、多吃，體重減輕 (三多一少)、視力模糊，容易受到感染造成其他病變等 (Ceriello, 1998)。由於長期的高血糖，亦會使得組織蛋白和大分子物質受到

醱化，使一些器官如眼睛、腎臟、神經，心臟和血管等受損，造成身體機能障礙 (Bessesen, 2001)。另美國糖尿病學會 (American Diabetes Association, ADA) 指出，糖尿病患者因長期處於高血糖狀態，會促使器官受損及功能障礙，因而造成大、小血管病變，除此之外，亦會增加動脈粥狀硬化等心血管疾病之發生率。

2.1.2 糖尿病之診斷標準

ADA 於 1995 年成立一個「糖尿病的診斷與分類專家委員會」，蒐集自 1979 年以後的所有糖尿病醫學文獻，定期聚會交換意見，最後於 1997 年 7 月對糖尿病的診斷標準和分類做了最新的修正，主要有三種診斷標準，如果符合以下任一項診斷標準，且經過兩次確定即可診斷為糖尿病，診斷標準說明如下：

- (1) 隨意血漿血糖值 ≥ 200 mg/dL，並伴隨有典型症狀，如多吃、多喝、多尿及體重減輕等。
- (2) 空腹至少 8 小時之禁食血糖值 (Fasting plasma glucose, FPG) ≥ 126 mg/dL。
- (3) 口服葡萄糖耐受試驗 (oral glucose tolerance test, OGTT) 2 小時後的血漿血糖值 ≥ 200 mg/dL。

另外，若空腹 8 小時之禁食血糖濃度為 110-125 mg/dL 時，則為空腹血糖異常 (Impaired fasting glucose, IFG)。OGTT 2 小時之血糖濃度為 140-199 mg/dL 時，為葡萄糖耐受異常 (Impaired glucose tolerance, IGT)。IFG 與 IGT 合稱為糖尿病前期 (Pre-diabetes)。

2.1.3 糖尿病的分類

世界衛生組織將糖尿病簡單分為四類 (WHO, 1999)：

(1) 第一型糖尿病

第一型糖尿病是因為胰臟內的 β 細胞受到自體免疫的作用而無法分泌、或分泌極少胰島素所導致，並會間接造成體內醣類、脂肪與蛋白質代謝的紊亂。當循環的血液中缺乏胰島素，糖分就無法進入細胞，殘留於血液中，造成血糖濃度升高。這種多發生在兒童或青少年期，必須長期注射胰島素以補充身體所不足的份量 (Göke and Herrmann-Rinke, 1998；梅約醫學中心，2002)。因此，又稱胰島素依賴型糖尿病 (insulin dependent diabetes mellitus；IDDM) (Qureshi et al., 2002)。

(2) 第二型糖尿病

第二型糖尿病在成人中最常見，比例約為 90~95%，又稱為非胰島素依賴型糖尿病 (non-insulin dependent diabetes mellitus；NIDDM)。不過第二型糖尿病不是自體免疫系統的疾病，而是其他多種複雜原因導致，可能是不良的飲食習慣，缺乏運動或長期生活壓力累積造成。其病人的胰臟仍可以分泌胰島素，只是分泌的不夠或組織對胰島素產生抗拒，使糖無法正常進入細胞而累積在血液中 (梅約醫學中心，2002)。且大部分第二型糖尿病患者皆有體重過重的問題發生 (Qureshi et al., 2002)。

(3) 妊娠期糖尿病

指懷孕前沒有糖尿病，而在懷孕時因過多賀爾蒙分泌，使身體產生對胰島素的抗性，產生高血糖現象，發生率約 1% 到 3%。

對母親常見的合併症，如流產、早產、妊娠高血壓、高血糖、子宮胎盤血管病變與低血糖及酮酸血症等。對新生兒的影響則可能造成胎兒生長遲緩、早產、巨嬰，或出生後易有低血糖、低鈣、黃疸等症狀。所以醫師建議在懷孕二十四至二十八週之間，可接受「妊娠糖尿病篩檢」(Glucose Challenge Test) (梅約醫學中心，2002；王，2008)。

(4) 其他類型糖尿病

這包括許多其他原因所造成的，如人體本身之染色體、基因的變異；如胰島素 (insulin) 作用的基因缺陷；如營養失調或感染造成；如內分泌系統的疾病；如藥物的影響...等等，這些都須藉由專業醫師診斷是否為糖尿病，不過這部分患者只占了約 1~2%。

2.1.4 治療方式

有效控制糖尿病患者血糖之治療方式，最常見的是飲食控制、正常生活作息、適時紓解壓力、藥物治療和定期運動等 (Ceriello, 1998)，而心理治療也是很重要的一環，因為擁有樂觀的情緒有利人體內分泌的穩定，悲觀的情緒反而會引起一些激素 (如腎上腺素、去甲腎上腺素、腎上腺皮質激素及胰高血糖素) 的分泌，造成拮抗胰島素，引起體內血糖升高。所有第一型糖尿病患者需要每天注射胰島素，以補足胰臟無法製造的胰島素，因為胰島素的化學結構會在人體消化道中被破壞，因此無法製成藥錠供人食用；第二型糖尿病人只需要改變生活習慣就可有效控制血糖，但如果無法有效控制，就必須依不同病情給予患者不同的藥

物治療 (梅約醫學中心, 2002)。

其降血糖藥物類型有 (Waring, 2007 ; 胡, 2002) :

- (1) 胰島素類 (Insulin)
- (2) 磺醯尿素類 (Sulfonylurea) : Gliclazide
- (3) 雙胍類 (Biguanides) : Metformin
- (4) Thiazolidinedione 類衍生物 (TZD) : Pioglitazone
- (5) α -glucosidase 抑制劑 (AGI) : Acarbose、Voglibose
- (6) 非磺醯尿素類 (Non-Sulfonylurea)藥物 : Meglitinide
- (7) 類 Glucagon 或升糖素類似胜肽 (Glucagon-like peptide-1 analogues, GLP-1 analogues) : Liraglutide
- (8) DPP-IV抑制劑 : Sitagliptin

2.2 筋骨草屬植物簡介

筋骨草屬植物, 為唇型花科多年生草本植物, 全球約有 40-50 種, 主要分佈於歐、亞、非三大洲, 也有部份的品種分佈於澳洲與北美洲 (劉等, 2001)。其特徵為花冠假單唇, 上唇極短, 二深裂或淺裂, 不為盔狀; 下唇大, 三裂, 中裂片及發達, 平展; 子房四淺裂; 小堅果四粒, 倒卵狀三菱型, 表面具凹陷網格 (謝, 1998; 劉等, 2001)。

依據台灣植物誌分類 (黃等, 1998), 台灣目前有產五種筋骨草, 分別為: 匍匐筋骨草 (*Ajuga decumbens*)、日本筋骨草 (*Ajuga nipponensis*)、矮筋骨草 (*Ajuga pygmaea*)、臺灣筋骨草 (*Ajuga*

taiwanensis)、網果筋骨草 (*Ajuga dictyocarpa*)。在其他國家，筋骨草屬植物也常被作為藥用植物，包括中國大陸、日本、歐洲、非洲摩洛哥等均為常用的草藥 (賴，2010)。

此屬植物在國外被研究過的尚有有苞筋骨草 (*Ajuga bracteosa*)、紫唇花 (*Ajuga reptans*) 等 (蕭，2007；Terahara et al., 2001; El-Hilaly and Lyoussi, 2002; El-Hilaly et al., 2004)。筋骨草屬植物別名尚有百症草、散血草、白尾蜈蚣、金瘡小草、石灰菜、紫貝金盤、白毛夏枯草、散血丹、破血丹等 (鍾，1997；邱和張，2001)。

2.2.1 台灣產筋骨草屬植物型態及分佈簡介

2.2.1.1 匍匐筋骨草

本種分佈於日本、韓國、中國中部，此種在台灣為一歸化種，僅分佈於奮起湖鐵道附近，推測可能與山葵一起引進至台灣本島。其外觀特徵為：平臥或斜上升，具匍匐莖，全體略被白色長柔毛。基生葉較莖生長而大，葉柄具狹翅，倒披針型至匙型，長 3-9 公分，寬 1-2.5 公分，花萼漏斗狀，花冠淡藍色至淡紅紫色，內面近基部具毛環中裂片狹扇形或倒心形。小堅果倒卵狀三稜形，背部具網狀皺紋 (黃等，1998；劉等，2001；楊等，1999)。

2.2.1.2 日本筋骨草

一年或二年生草本，在台灣分佈於苗栗、新竹等北部西岸沿海沙地，尚分佈於日本、韓國、中國大陸中部。其外觀特徵：莖直立或斜上；幾無基生葉；葉橢圓形至橢圓狀狹卵形，長 3-7 cm，寬 1-2.5 cm，粗鋸齒狀牙齒緣，被長柔毛。花冠白色，內面近基部具毛環（黃等，1998；謝，1998）。

2.2.1.3 矮筋骨草

為矮小草本，分布於台灣北部沿海地區，尚分布於日本、琉球。其外觀特徵為：植株具走莖，僅具基生葉；葉倒披針形至長橢圓狀倒披針形，長 2-4 cm，寬 0.5-1 cm，疏被長柔毛，波狀鉅齒緣；葉柄 1.5-3 cm。花冠藍紫色，內面近基部具毛環（黃等，1998；楊等，1999）。

2.2.1.4 台灣筋骨草

多年生草本，本種在台灣分布於中低海拔各地區，尚分布於琉球、菲律賓及廣東。其外觀特徵為：莖直立及斜上，具基生葉及莖生葉；葉倒卵形至倒披針形，長 6-15 cm，寬 1-4 cm，波狀緣，被短毛。花冠淡藍紫色至淡紅紫色（黃等，1998；謝，1998；蕭，2007）。

2.2.1.5 網果筋骨草

分佈於台灣北部低海拔開闊沙質潮濕地，尚分佈於中國中南部、琉球與越南等地。其外觀特徵為：莖直立或斜上，無基生葉；葉橢圓形或菱狀卵形，長 3-6 cm，寬 2-5 cm，粗鋸齒緣，兩面被短毛；葉柄長 1-4 cm。花冠淡藍白色或粉紅色（黃等，1998；謝，1998；楊等，1999）。

2.2.2 筋骨草屬植物研究概況

筋骨草屬植物含有豐富的植物性甙皮甙類化合物及黃酮類化合物（吳，1997）。在傳統用藥上筋骨草屬植物具有止血、治療腹瀉、痢疾、肝膽疾病、肺部疾病、化痰、抗菌、抗瘧疾、治療牙痛、頭痛、發燒等效果（劉等，2001；Kariba, 2001）。自 80 年代以來，對於抗腫瘤、減少心血管疾病與降血糖具有一定療效而被重視（吳，1997）。在相關動物實驗部分也具有保肝（馬和黃，2002）、降血糖（El-Hilaly et al., 2004）、減少血中膽固醇（Chenni et al., 2007）、抗腫瘤（曾等，2003；Konoshima et al., 2000）以及預防心血管疾病（El-Hilaly et al., 2004）等功效。

2.2.2.1 降血糖

在非洲摩洛哥，當地小鎮居民將筋骨草屬植物用來控制糖尿病。El-Hilaly 等研究非洲摩洛哥產伊娃筋骨草 (*Ajuga iva*)，研究結果發現，此種筋骨草水萃物可有效降低 STZ 誘導糖尿病大鼠之高血糖情形，連續餵食 21 天後，更可有效控制高血糖症狀，

推測作用機制可能是增進細胞組織對血糖的利用，進而降低血糖值 (El-Hilaly et al., 2004)。

2.2.2.2 保肝功能

在護肝研究部份，馬和黃在匍匐筋骨草的初步研究中，以 CCl₄ 誘導大鼠產生肝損傷情形，並餵食匍匐筋骨草的粗黃酮萃取物，發現可治療大鼠肝損傷症狀。推測其作用機制與黃酮類化合物抗氧化活性有關，進而降低自由基破壞肝臟受損程度，此結果也證實，在傳統用藥上筋骨草屬植物為何常被用來治療肝臟方面疾病 (馬和黃，2002)。

2.2.2.3 降血脂及減少血中膽固醇

Chenni 等將伊娃筋骨草水萃物餵食具有高膽固醇症狀之大白鼠，觀察大白鼠體內血脂含量後發現，伊娃筋骨草水萃物可有效降低大白鼠血液中低密度脂蛋白 (VLDL, very low density lipoprotein)、膽固醇以及降低血漿和組織中脂質過氧化反應，更可減少小腸對膽固醇的吸收 (Chenni et al., 2007)。

2.2.2.4 抑制腫瘤

曾等以匍匐筋骨草水萃物進行抑制腫瘤實驗，發現其水萃物可有效抑制小鼠 S₁₈₀ 肉瘤，抑制率達 81%，證明匍匐筋骨草水萃

物具有抗癌功效，但其作用機制不明（曾等，2003）。

2.2.2.5 治療燒燙傷

王等取新鮮匍匐筋骨草榨汁，將汁液稀釋成不同濃度，並塗抹於二度燙傷小鼠皮膚，連續塗抹 25 天後，發現於第 10 天時可有效癒合嚴重燙傷之傷口（王等，2003）。

2.2.3 筋骨草屬植物的主要化學成分簡介

目前筋骨草屬植物因本身所含化學成分多且複雜，再加上因品種不同成分也會有所差異，因此在成分的研究尚未完整了解，筋骨草屬植物在化學成分的研究可歸類為下四大類（劉等，2001）。

(1) 植物性蛻皮甾體類化合物 (Phytoecdysteroids)

如：蛻皮甾酮 (Ecdysterone)

(2) 黃酮類化合物 (Flavonoids)

如：木犀草素 (Luteolin)

(3) 環烯醚萜苷類化合物 (iridoid glycosides)

如：8-乙醯基哈帕苷

(4) 二萜類化合物 (Diterpenoids)

如：金瘡小草素 A、B、C、D 等

2.2.3.1 蛻皮甾酮

目前的相關研究指出，蛻皮甾酮為筋骨草屬植物中較主要的活性成分之一。蛻皮甾酮 (ecdysterone) 又稱為 β - 蛻皮激素 (β -Ecdysone)，化學式 $C_{22}H_{44}O_7$ ，分子量為 480.63，存在於植物體中，其類似甲殼類昆蟲前胸腺激素的蛻皮激素，具有促進昆蟲蛻皮的生物活性，屬甾醇類代謝產物 (邱和邢，1998)。

蛻皮甾酮也具有多項生理活性，例如：調節免疫功能和中樞神經系統，改善和治療缺氧和缺血性腦損傷，並促進哺乳動物的多種組織和器官蛋白質與核酸的合成，增進醣類和脂質代謝、改善高血糖和高血脂症狀 (徐等，2005；Chen et al., 2006)。除了上述活性之外，蛻皮甾酮還具有較高的抗氧化活性、抗內皮細胞損傷、促進表皮細胞分化、增強生命力和延緩老化等 (武等，2001；吳等，2006)。

2.2.3.2 黃酮類化合物

黃酮類化合物 (flavonoids) 廣泛的存在於植物體內，幾乎所有的植物都含有黃酮類物質，目前為止已發現 2,000 多種黃酮類物質。黃酮類屬多酚化合物，在結構上有 $C_6-C_3-C_6$ 的基本結構。經由苯丙胺酸 (phenylalanine) 經一連串代謝路徑衍生而來。主要可分為：黃酮 (flavones)、黃酮醇 (flavonols)、黃烷酮 (flavanones)、黃烷醇 (flavanols)、異黃酮 (isoflavones)、黃烷酮醇 (flavanonols) 及其衍生物：查耳酮 (chalcone)、花青素 (anthocyanidin) 等 (賴，2010)。由於每種植物所含的類黃酮均不同，且都有其特殊之類黃酮物質存在，而主要以黃酮及黃酮醇分

佈較廣 (林和唐，2005；蔡和陳，2006)。為天然的抗氧化物質之一，許多研究指出，黃酮類化合物具有許多生理活性，例如：抗氧化、抗菌、抗病毒、抗突變和抗癌等效果。黃酮類化合物之抗氧化活性與其構造之排列有關，包含兩個苯環及一個含氧酚基，其中羥化作用之位置及程度決定了抗氧化活性，使得黃酮類具有抗氧化性。

除了顯著的抗氧化作用及清除自由基外，並有擴張心臟血管、防止低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 氧化、心血管保護作用及保護血管內皮細胞等功效 (蔡和陳，2006；龍等，2006)。在其他相關的研究中也發現，黃酮類化合物具有調節血糖功能 (俞，2002)。

2.3 超音波輔助萃取

超音波是指頻率為 $2 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ Hz 的音波，它超越了人耳朵收聽頻率的範圍 (華等，2007)。具有高頻率、穿透力強及聲波具有方向性等特點，並藉由機械振動方式在介質傳播中產生力學效應、空穴效應及熱效應等特殊物理性功能 (Cares, 2010)，因利用超音波輔助萃取不需要高溫的輔助下達到最高萃取效果，並能有效地縮短萃取時間，將物質細胞壁有效破壞，釋出其功能性成分，並且在萃取過程中所添加的萃取溶劑，可選擇能與萃取出物質相容之溶劑作為萃取溶劑，進一步縮短萃取後所需的濃縮純化步驟及時間。

超音波輔助萃取為近年來廣泛應用於中草藥活性成分萃取之技術，其原理為利用超音波在震盪時所產生的熱能、機械作用以及空用，加速溶劑向物質中滲透，使目標成分萃取效率提高並縮短萃取時間，同時也可大量萃取以降低成本 (Wu et al., 2001)。

2.3.1 熱學原理

超音波能量會轉化為熱能，其震動能量不斷被物質或溶劑吸收進而轉變為熱能，這種吸收聲能而引起溫度稍高是穩定的，所以超音波可以在瞬間使內部溫度升高，加速成分的溶解 (嚴等，2002)。

2.3.2 機械作用

超音波產生屬於非熱學原理的線性交變震動作用，在傳播過程中可因起介質質點的交替壓縮和伸張，雖然介質質點的震盪位移及速度不大，但其加速度卻非常大 (Albu et al., 2004)。由於超音波頻率高時，它的波長短且具強穿透力，因此能使萃取液達到充分混合而增強萃取效果。此作用可以造成天然物細胞組織的變形以及溶劑與物質間不同之加速度而造成磨擦，加速化學成分的分離 (嚴等，2002)。

2.3.3 空化作用

此作用為超音波輔助萃取較主要及顯著的作用，當一定強度的超音波在液體媒質中傳播時，因音波為一縱波，縱波推動介質時的作用會使液體中壓力發生變化而產生無數微小的真空氣泡，使液體中的微氣泡震盪生成、增大、收縮、崩潰，導致微氣泡附近的液體產生強烈的激波，當這些真空微小氣泡受壓之後隨即產生爆破，形成局部點的極端高溫高壓其所產生的強大衝擊力，可以增強萃取的效果（嚴等，2002；龔，2006）。

2.4 超臨界流體萃取

超臨界流體技術是近年來快速發展中的技術，在超臨界狀態下物質兼具氣相和液相特性，具有高溶解力及高擴散性，其處理後的殘留物質分解成為 H_2O 和 CO_2 ，除了在食品純化、天然物萃取、纖維染色技術、半導體清洗、特殊藥用成分萃取、奈米級藥劑生產等用途上都顯示出它的特點（張與胡，2005；曾，2002）。

二氧化碳超臨界流體萃取在中草藥開發及產業化中具有許多獨特的優點，二氧化碳在溫度高於臨界溫度 $T_c=31.26^\circ C$ 、壓力高於臨界壓力 $P_c=7.2 MPa$ 的狀態下，性質會發生變化，其密度近於液體，粘度近於氣體，擴散係數為液體的 100 倍，因而具有驚人的溶解能力（張，2000）。用它可溶解多種物質，然後提取其中的有效成分，具有廣泛的應用前景。流體的溶解能力與其密度的

大小相關，而溫度、壓力的微小變化會引起流體密度的大幅度變化，並影響其溶解能力。所以可以通過調節操作壓力、溫度，可減少雜質使有效成分被提取出來，萃取效率高，且無溶劑殘留(陳，2007)。而超臨界二氧化碳萃取不是只純化某一組成分，而是將有效成分進行選擇性分離，更有利於中藥複方優勢的發揮，且二氧化碳具有無毒、無害、不易燃易爆、粘度低，表面張力低、沸點低，不易造成環境污染等等優點(談，2002)。

2.5 藥物誘發第二型糖尿病模式

目前常使用來誘發糖尿病高血糖動物模式的藥物為葡萄糖胺、四氧嘧啶以及鏈佐酶素。

2.5.1 葡萄糖胺 (Glucosamine, GlcN)

GlcN 為經由六糖胺途徑 (hexosamine pathway) 所產生之產物，在葡萄糖代謝途徑中，97% 經由糖解、肝醣合成和檸檬酸循環 (TCA cycle) 所代謝，另外 3% 則進入六糖胺代謝途徑。GlcN 除嚴重抑制胰島素刺激 GLUT4 (Glucose transporter type 4) 的轉位作用，亦嚴重損害 Akt (protein kinase B) 之活性，抑制胰島素刺激細胞吸收葡萄糖，造成胰島素阻抗 (Bailey and Turner, 2004)。

2.5.2 四氧嘧啶 (alloxan)

四氧嘧啶具有類似環狀尿素 (cyclic urea) 結構，可產生永久的高血糖現象，它主要的作用是破壞胰臟分泌胰島素的 β 細胞 (Abdel-Rahman et al., 1992)。

2.5.3 鏈佐酶素 (Streptozotocin, STZ)

STZ 是由鏈黴菌 (*Streptomyces achromogenes*) 發酵而來的一種合成抗生素，在臨床上主要用於治療胰臟的內分泌腫瘤，特別是胰島細胞癌 (islet cell carcinomas)。由於 STZ 的構形和葡萄糖衍生物的 N-乙酰葡萄糖胺 (N-acetyl-D-glucosamine) 相似，所以 STZ 可以藉由葡萄糖轉運蛋白2 (glucose transporter 2, GLUT2) 進入胰臟 β 細胞，造成胰臟 β 細胞不可逆的破壞。而 STZ 常用以分別誘發第一型與第二型糖尿病，其 LD_{50} 約為 130 mg/Kg BW (Rodrigues et al., 1976)。

許多研究利用 GlcN 模擬第二型糖尿病，但有研究指出利用 3T3-L1 脂肪細胞所作的研究發現高濃度葡萄糖與 GlcN 所引起胰島素阻抗的機制並不盡相同 (Nelson et al., 2000)，因此雖然利用 GlcN 誘發第二型糖尿病具有其應用價值，但是 GlcN 是否能夠完全模擬第二型糖尿病則有待進一步的探討研究。而 alloxan 及 STZ 兩者作用機制稍有不同，但皆會造成胰臟 β 細胞的破壞，導致動物體內胰島素分泌不足，進而導致動物高血糖現象 (Szkudelski, 2001; Lenzen, 2008)。在兩者的化學特性比較之下，STZ

的半衰期較 alloxan 長，表示 STZ 在生物體環境內較 alloxan 穩定 (Szkudelski, 2001)。亦有實驗指出，以 STZ 誘發高血糖動物模式之成功率較 alloxan 誘發為高，且較無動物死亡之問題 (Lenzen, 2008；王，2001)。因此本實驗選用 STZ 來做為誘發血糖及血脂異常之糖尿病動物模式所使用的藥物。

3. 材料與方法

3.1 實驗流程

實驗流程架構如圖 1 所示。

3.2 實驗材料

本實驗選用之匍匐筋骨草、日本筋骨草、矮筋骨草、臺灣筋骨草及網果筋骨草均產製於台灣並由大葉大學藥用植物與保健學系林德勳老師提供，種植地點為台中與南投山區，各品種均於 2011 年 6 月間進行採集，採集後置於 -20°C 環境保藏。

3.3 試驗動物

購自國家實驗動物中心之 6 週齡以上的雄性小鼠 (129/Sv)，每組 6 隻以上。

3.4 實驗試藥

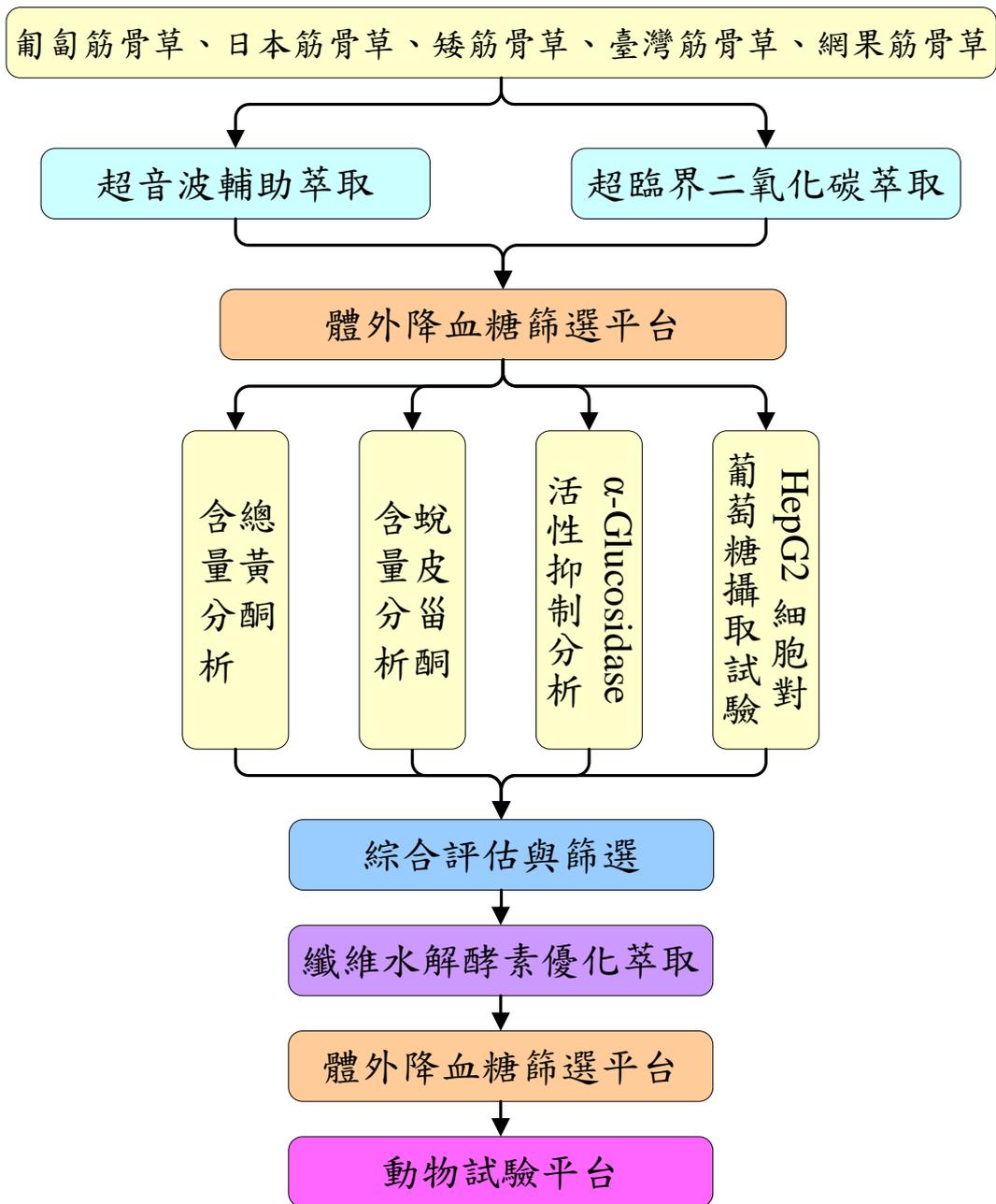


圖 1. 實驗流程架構圖

Figure 1. Flow sheet for the design of this experiment.

1. 95% Ethanol (乙醇) 購自片山試藥株式會社 (大阪, 日本)
2. 4-nitrophenyl α -D-glucopyranoside 購自 Sigma- Aldrich 公司 (Saint Louis, 美國)
3. 20-Hydroxyecdysone 98% (蛻皮甾酮) 購自 Sigma-Aldrich 公司 (Saint Louis, 美國)
4. Acarbose (阿卡波糖) 購自 Sigma-Aldrich 公司 (Saint Louis, 美國)
5. Aluminium Chloride (氯化鋁) 購自片山試藥株式會社 (大阪, 日本)
6. Bovine serum albumin (BSA, 牛血清蛋白) 購自片山試藥株式會社(大阪, 日本)
7. Cellulase from *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (纖維水解酵素) 購自 Sigma-Aldrich 公司 (Saint Louis, 美國)
8. CH₃COOK 購自片山試藥株式會社 (大阪, 日本)
9. Dulbecco's modified eagle's Medium/high glucose 25mM (DMEM) 購自 Sigma-Aldrich 公司 (Saint Louis, 美國)
10. Dimethyl sulfoxide (DMSO) 購自 Sigma-Aldrich 公司 (Saint Louis, 美國)
11. Dulbecco's phosphate buffer saline (DPBS) 購自 Sigma-Aldrich 公司 (Saint Louis, 美國)
12. Fetal bovine serum (FBS) 購自 Gibco 公司 (Scotland, 英國)
13. HCl 購自片山試藥株式會社 (大阪, 日本)
14. HepG2 (BCRC 60025) 購自新竹財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中/國家衛生研究院細胞庫 (新

- 竹，台灣)
15. Insulin (胰島素) 購自 Sigma-Aldrich 公司 (Saint Louis, 美國)
 16. Intestinal acetone powders (小鼠腸道丙酮粉) 購自 Sigma-Aldrich 公司 (Saint Louis, 美國)
 17. Laboratory Rodent Diet 5001 (固形飼料) 購自 PMI Feed 公司 (Missouri, 美國)
 18. Metaphosphoric acid (偏磷酸) 購自 Sigma-Aldrich 公司 (Saint Louis, 美國)
 19. Methyl alcohol (甲醇) 購自片山試藥株式會社 (大阪，日本)
 20. Metformin (二甲雙胍) 購自 Sigma-Aldrich 公司 (Saint Louis, 美國)
 21. Penicillin-Streptomycin (盤尼西林) 購自 Sigma-Aldrich 公司 (Saint Louis, 美國)
 22. Quercetin dehydrate (槲皮素) 購自 Sigma-Aldrich 公司 (Saint Louis, 美國)
 23. Sodium bicarbonate (碳酸氫鈉) 購自片山試藥株式會社 (大阪，日本)
 24. Sodium carbonate anhydrous AR (Na_2CO_3 , 無水碳酸鈉) 購自 Ferak 公司 (Schnelldorf, 德國)
 25. Sodium citrate (檸檬酸鈉) 購自片山試藥株式會社 (大阪，日本)
 26. Streptomycin solution (硫酸鏈黴素) 購自 Sigma-Aldrich

公司 (Saint Louis, 美國)

27. Streptozotocin (鏈佐酶素) 購自 Sigma-Aldrich 公司 (Saint Louis, 美國)
28. Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT, 二甲基硫醇二苯基四唑溴) 購自 Sigma-Aldrich 公司 (Saint Louis, 美國)
29. Trypsin-EDTA (胰蛋白酶) 購自 Gibco 公司 (Scotland, 英國)

3.5 實驗儀器

1. 高速均質機：RT-08，榮聰鐵工廠，台灣。
2. 超音波輔助萃取裝置：訂製，台超科技股份有限公司，台灣。
3. 分光光度計：U-2800A，HITACHI，日本。
4. 冷凍乾燥機：FD-5030/8530，泛群科技有限公司，台灣。
5. 減壓濃縮機：N-1000，Eyela，日本。
6. 鍍金機：E-1010，HITACHI，日本。
7. 三氣培養箱：NAPCO 7001，Jouan，法國。
8. 超音波震盪水槽：3510-DTH，Branson，台灣
9. 超臨界流體萃取 (Supercritical fluid extraction)：訂製，台超科技股份有限公司，台灣。
10. 攜帶式血糖監測系統：OneTouch[®] UltraEasy[™] Blood glucose monitoring system，LifeScan，Milpitas，美國。

3.6 實驗方法

3.6.1 樣品前處理

匍匐筋骨草、日本筋骨草、矮筋骨草、臺灣筋骨草及網果筋骨草採集後將新鮮之葉片使用去離子水洗淨後，以冷凍乾燥機進行乾燥，將乾燥後筋骨草葉片以密封罐封閉保存，此為未經粉碎之母樣品，備用。自母樣品中取適量乾燥筋骨草，以均質機粉碎後，過篩 (60 mesh) 保存於密閉容器並置於乾燥器中。

3.6.2 超臨界流體萃取

參考 Chiu 等人的方法並加以修改，精秤磨粉樣品 3.0 g，加入溶劑 100 mL (70% 乙醇)，置於萃取槽體中密封，加熱至 50°C 萃取 50 min，萃取完成後將萃取物以抽氣過濾方式去除殘渣，所得之濾液過 0.45 μm 濾膜，樣品儲存於 4°C 下待測 (Chiu et al., 2002)。

3.6.3 超音波輔助萃取

精秤樣品 5.0 g，加入溶劑 100 mL (70% 乙醇)，置於萃取槽體中密封，於 60°C 溫度下萃取 50 min，萃取完成後將萃取物以 NO.4 濾紙過濾去除殘渣，所得之濾液再以 0.45 μm 濾膜過濾後檢測總黃酮與抑制 α -glucosidase 活性試驗，殘渣部分以冷凍乾

燥機進行乾燥，將乾燥後之殘渣以密封罐封閉保存，以備觀察。

3.6.4 黃酮類化合物分析

3.6.4.1 總黃酮分析

採用 AlCl_3 呈色法原理，分析流程參考 (Lin and Tang, 2007) 之總黃酮分析步驟：取不同濃度之萃取樣品 (0.01、0.05、0.1、0.5、1 mg/mL) 0.5 mL 加入 1.5 mL 95% 乙醇，再加入 0.1 mL (10%) AlCl_3 、0.1 mL (1M) CH_3COOK 與 2.8 mL 去離子水，室溫下靜置 40 分鐘，利用分光光度儀測其 415 nm 吸光值。

3.6.4.2 標準曲線建立

不同濃度之槲皮素代替樣品以上述方式作標準曲線，不同濃度槲皮素標準品配置方式如下：精秤 10.0 mg 槲皮素，以分析級甲醇定量至 10 mL，即得槲皮素母液 (1.0 mg/mL)，再自母液分別精密吸取 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mL 至 10 mL 定量瓶中，加入甲醇稀釋至 10 mL 定量瓶刻度，即得不同濃度槲皮素 (0.01~0.09 mg/mL) 以吸光值 (Y) 對相應濃度 (X) 作標準曲線 $Y=ax+b$ ，並計算 R^2 值。

3.6.5 蛻皮甾酮含量分析

3.6.5.1 分析條件

參考蕭 (蕭, 2007) 之蛻皮甾酮分析方法, 條件如下:

Column: RP-18 Column

Mobile phase: methanol/water = 40:60(v/v)

Detector: UV248 nm

Flow rate: 0.1 mL/min

Injection volume: 20 μ l

3.6.5.2 蛻皮甾酮標準曲線建立

將蛻皮甾酮標準品, 以分析級甲醇配製成不同濃度 (0.01~0.1 mg/mL), 以前述 HPLC 分析條件進行分析, 以面積 (Y) 相對應濃度 (X) 做標準曲線 $Y=ax+b$, 並計算 R^2 值。

3.6.6 抑制 α -glucosidase 活性試驗

取 intestinal acetone powders 0.5 g 加入 4.5 mL 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 6.8) 中, 於 0 $^{\circ}$ C 環境下以超音波震盪 30 分鐘, 之後以 8000 rpm 離心 20 分鐘, 取上清液當酵素液, 參考 Shim 等人 (Shim et al., 2003) 之方法, 取 20 μ L 酵素液加入 100 μ L 的萃取物 (0.1M 磷酸緩衝液 pH 6.8) 混合後, 再加入 380 μ L 4-nitrophenyl α -D-glucopyranoside (0.53 mM) 於 37 $^{\circ}$ C 下反應 20 分鐘後, 加入 500 μ L Na₂CO₃ (0.1 M) 充分混合, 使酵素失活而終

止反應，以分光光度計於 400 nm 測吸光值，此為實驗組之吸光值。而控制組則以 0.1 M 磷酸緩衝液取代萃取物，背景組是指只有萃取物之吸光值。並以阿卡波糖當參考樣品。

A. 實驗組：酵素 + 基質 + 萃取物 + Na₂CO₃

B. 控制組：酵素 + 基質 + buffer + Na₂CO₃

C. 背景組：buffer + buffer + 萃取物 + Na₂CO₃

抑制率之計算方式：

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{\text{B吸光值} - (\text{A吸光值} - \text{C吸光值})}{(\text{B吸光值})} \times 100\%$$

3.6.7 細胞攝取葡萄糖試驗

肝臟為人體內最大器官，其中肝臟細胞約佔肝臟總體積之 92.5 %，但初代之人類肝細胞 (primary human hepatocyte) 因易有器官短缺，取得不易，再者無法嚴格控管細胞來源，如捐贈者之特異性，且難以體外培養等因素，以致無法大量提供實驗所需。人類肝癌細胞之來源可依其分化程度概分成，分化程度為高等之 HepG2 及 Hep3B，中等之 J5 及低等之 Mahlavu、SK-Hep-1，而自人類肝胚細胞瘤 (hepato-blastoma) 中所分離出之人類肝癌細胞株 (human hepatocellular carcinoma cells, HepG2)，屬於不規則多角形之上皮細胞 (貼附型)，為分化程度高等之人類肝癌細胞來源，其表現型態明顯易於觀察，並保有許多實質性細胞功能，能表現多數正常之肝細胞特徵及毒性機制，有益於毒性評估 (Aden et al., 1979)，又兼具有易於體外培養及大量取得之優點被廣泛作為

正常人類肝細胞之應用，且 HepG2 可用來作為人造生物肝臟之來源 (Hoekstra and Chamuleau, 2002; Kataoka et al., 2005)，因此適用為本實驗觀察體外正常肝臟細胞模式之選擇材料，本研究將試驗分為控制組、胰島素組、二甲雙胍組以及實驗組（五種筋骨草萃取物）。

3.6.7.1 細胞培養

HepG2 細胞培養於 DMEM 培養基中。一公升 DMEM 培養基之配置方法，為將 DMEM 粉末溶於二次去離子水，並添加 3.7 g/L Sodium bicarbonate，均勻混合後，以 1N HCl 溶液校正其 pH 值至 7.2~7.4。經 0.22 μm 過濾膜過濾除菌後，再加入 1 % 100 U/mL penicillin 與 100 U/mL streptomycin solution 及 10 % 胎牛血清，儲存於 4°C 備用。

3.6.7.2 活化細胞

從液態氮桶中取出冷凍小管，為防止冰晶重新形成而傷害細胞，須快速置於 37°C 水浴中回溫，待全溶後，將冷凍小管移入無菌操作台內。事先準備含有 9 mL 培養基之 10 公分培養皿備用，並取出冷凍小管內之細胞液，緩慢加入培養皿中，混合均勻，移至培養箱中進行培養 (37°C、5% CO₂)。

3.6.7.3 繼代培養

當 HepG2 細胞生長約 8、9 分滿時，將舊的培養基吸除，以 DPBS 清洗 1~2 次。之後加入 1 mL Trypsin-EDTA (1 x) 潤濕細胞後吸除，待三分鐘後，加入適量之 DMEM 培養基，並沖下細胞液收集於離心管中，經 300 x g 離心 3 分鐘後吸除上清液，加入適量 DMEM 培養基，混合均勻後，吸取 1 mL 細胞液於已含有 9 mL 新鮮培養基之 10 公分培養皿中，置於 37°C、5% CO₂ 之恆溫培養箱中進行培養，每 3 天需繼代一次。

3.6.7.4 冷凍保存

冷凍 HepG2 細胞時，須使用 DMSO 作為抗凍劑以保護細胞免受低溫的傷害，其添加容許範圍為 7~10%。利用繼代細胞之方式切下細胞並收集其細胞液，並以血球計數器計數細胞數，調整細胞濃度為 $2 \sim 5 \times 10^6$ cells/mL，並與 7% DMSO 混合均勻，取 1 mL 細胞液置於冷凍小管中，以緩慢凍結方式，即 -20°C 下 30 分鐘，再置於 -80°C 下隔夜，最後放進液態氮桶中長期冷凍保存。

3.6.7.5 細胞存活率之測定

參考 Mosmann 之方法並加以修飾 (Mosmann, 1983)，於 HepG2 細胞攝取葡萄糖試驗細胞培養 24 小時之後，各取 20 μ L 之 MTT 溶液 (5 mg/mL，以 DPBS 配製) 加到反應後的孔盤中，繼續培養 4 小時，然後將培養液移除，以 DPBS 清洗各孔，每孔再加入 200 μ L DMSO，於 37°C 反應 10 分鐘，檢測其 570

nm 吸光值。其計算方式為：實驗組吸光值控制組吸光值

$$\text{細胞存活率(\%)} = \frac{\text{實驗組吸光值}}{\text{控制組吸光值}} \times 100\%$$

3.6.7.6 HepG2 細胞葡萄糖攝取試驗

將 HepG2 細胞接種於 96 孔盤，每橫排 12 個孔為一組，其中第 1、6、12 孔為空白試驗不接種細胞，待細胞長至盤底 60% 後將原培養基移出，換入含 0.2% BSA 的 DMEM 培養基繼續培養。12 小時後再將培養基移出，換上含活性物（組別分別為 0.1% 筋骨草萃取物、 1×10^{-3} mol/L 之二甲雙胍 與 1×10^{-4} mol/L 胰島素）之 0.2% BSA 與培養基，第 1、6、12 空白孔中亦一同加上，培養 24 小時後再將培養基移出，並用葡萄糖氧化酶法培養基中的含糖量。用 1、6、12 空白孔葡萄糖含量的平均值減去其餘各孔的含糖量，即是 24 小時各孔細胞葡萄糖攝取量。

3.6.8 不同水解溫度實驗

精秤樣品 5.0 g，以固液比 1:20 時，加入 100 mg 纖維水解酵素（酵素活性為 350 units/g），分別於 20°C、30°C、40°C、50°C、60°C 溫度下以轉速 125 rpm 下震盪並進行水解 120 分鐘。水解完畢後，將水解液以 NO. 4 濾紙去除殘渣，所得之濾液再經 0.45 μ m 濾膜過濾後進行超音波萃取。

3.6.9 動物試驗

3.6.9.1 動物分組

使用 6 週齡的雄性 129/Sv 小鼠 24 隻為試驗動物，餵食固形飼料 1 週後，依體重隨機分為 4 組（正常對照、糖尿病、降血糖藥物、實驗組），分組前 12 小時要進行禁食，除正常對照組以外的小鼠，以 STZ (60 mg/kg BW) 溶於生理食鹽水，並含有檸檬酸鈉 (10 mM) 為緩衝 (pH 4.5)，以腹腔注射方式給予誘導為第二型糖尿病鼠 (Nakamura et al., 2006)。之後繼續以固形飼料飼養 1 週後，採血測量隔夜空腹 (17~24 小時) 血糖值，若達或超過 13 mM (230 + 10 mg %) 時，則視為有糖尿病。確定均有糖尿病之症狀後，再依小鼠血糖及體重隨機分為 3 組，每 6 隻 1 組，分別為糖尿病控制組、降血糖藥物對照組和筋骨草萃取物的試驗組 3 組進行試驗。

3.6.9.2 動物飼養及樣品收集

小鼠飼養在動物室的不鏽鋼籠中 ($22.5 \times 18 \times 17.5 \text{ cm}^3$)，鋼籠先以 75% 酒精消毒，動物室溫度保持於 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ，濕度 40-60%，每天光週期為 12 小時 (AM 8:00-PM 7:59 亮，PM 8:00-AM 7:59 暗)，飼料與蒸餾水採自由飲食方式，每週記錄一次體重。

3.6.9.3 試驗藥物及前處理

經冷凍乾燥之筋骨草萃取物先以 95% 酒精復溶後，以蒸餾水配成濃度為 20 mg/mL 之懸浮溶液 (含 15% 乙醇之 vehicle)，再以餵藥器投予每隻小鼠劑量為 200 mg/kg BW。

3.6.9.4 空腹血糖值之測定

高血糖動物給予受試物一定時間後，採血測定隔夜空腹血糖值。測定方法目前常用的是利用攜帶式血糖監測系統進行測定。其原理為利用葡萄糖脫氫酶電極法，先插入試紙，滴血在血糖儀以外的試紙端上，滴血後自動起反應計時，不必抹去血滴，反應產生的電流轉換為血糖數值而顯示在螢幕上。此法不用光學系統比色，可避免污染引起的誤差。近年來已有很多文獻證明小型血糖機測定儀器品質可靠，且結果完全可供臨床上決定治療措施之用。

3.6.9.5 糖尿病小鼠活體內血糖上升抑制試驗

本方法係參考 Youn 等人之方法並稍做修飾 (Youn et al., 2004)。在小鼠確定已誘發糖尿病之後，給予自由飲水並禁食至少 16 小時以上，以剪尾方式採血測定空腹血糖值後，以餵藥器投予每隻小鼠劑量為 2 g/kg 的糊化澱粉溶液，隨後治療組小鼠則分別經口餵食 25 mg/kg 配製於 15% 乙醇溶液 (vehicle) 之糖尿病藥

物阿卡波糖或筋骨草萃取物 200 mg/kg，未治療之糖尿病控制組小鼠則餵食 0.1 mL/10 g BW 之 15% 乙醇溶液。經 1 小時後再次經由尾部採血測定血糖值變化。

3.7 統計分析

本實驗除細胞實驗與動物試驗採 6 重複算，其餘試驗皆採 3 重複計算，實驗結果以 Statistical Analysis System (SAS) 統計軟體進行數據的變異數分析 (ANOVA)，平均值間差異的顯著性以 Tukey's HSD Test 或 Duncan's multiple range test 來檢驗，顯著水準為 $p < 0.05$ 比較其差異性 (SAS, 1997)。若有差異再以 Fisher's LSD (Least Significant Difference) 最小顯著差異法作進一步事後比較分析，當 $p < 0.05$ 時表示兩組間具有統計上差異，而圖形則利用 Sigma Plot 軟體繪製。

4. 結果與討論

4.1 筋骨草品種之體外降血糖功效篩選平台建立

本研究結合筋骨草萃取物之總黃酮含量、蛻皮甾酮含量、 α -glucosidase 抑制率與 HepG2 細胞對葡萄糖的攝取促進率等體外試驗項目來建立筋骨草降血糖功效之篩選平台。

4.1.1 五種台灣產筋骨草總黃酮含量

黃酮類化合物為具降血糖功效之活性成分 (Haraguchi et al., 1996; Hashimoto et al., 1994)，所以本實驗以此分析項目做為台灣產五種筋骨草篩選條件之一，結果如圖 2 所示，經過超音波輔助萃取的台灣產五種筋骨草之萃取物其總黃酮含量分別為 7.76 ± 0.21 mg/g (匍匐筋骨草)、 7.86 ± 0.18 mg/g (日本筋骨草)、 6.33 ± 0.25 mg/g (矮筋骨草)、 6.58 ± 0.25 mg/g (臺灣筋骨草)、 5.21 ± 0.22 mg/g (網果筋骨草)，而經過超臨界流體萃取的筋骨草萃取物總黃酮含量分別為 5.11 ± 0.19 mg/g (匍匐筋骨草)、 5.34 ± 0.22 mg/g (日本筋骨草)、 4.68 ± 0.18 mg/g (矮筋骨草)、 4.25 ± 0.23 mg/g (臺灣筋骨草)、 3.98 ± 0.19 mg/g (網果筋骨草)，結果顯示匍匐筋骨草與日本筋骨草的總黃酮含量最高而網果筋骨草的含量最低且超音波輔助萃取的萃取物總黃酮含量較高於超臨界流體萃取之萃取物。

4.1.2 五種台灣產筋骨草蛻皮甾酮含量

研究指出，蛻皮甾酮為筋骨草屬植物中較主要的活性成分之一 (邱和邢, 1998)，且具提升醣類和脂質代謝、改善高血糖和高血脂症狀等功效 (徐等, 2005; Chen et al., 2006)，所以本實驗以此分析項目做為台灣產五種筋骨草篩選條件之一。實驗結果顯示於圖 3，利用超音波輔助萃取的五種台灣筋骨草萃取物的蛻皮甾酮含量最高的是日本筋骨草 (0.785 ± 0.031 mg/g)，臺灣筋骨草 (0.624 ± 0.029 mg/g) 次之，其他三品種筋骨草則分為 0.584 ± 0.036 mg/g (匍匐筋骨草)、 0.403 ± 0.014 mg/g (矮筋骨草)、 0.449 ± 0.044 mg/g (網果筋骨草)，而超臨界流體萃取之五種筋骨草萃取物的蛻皮甾酮含量分別為 0.247 ± 0.029 mg/g (匍匐筋骨草)、 0.498 ± 0.033 mg/g (日本筋骨草)、 0.126 ± 0.019 mg/g (矮筋骨草)、 0.286 ± 0.031 mg/g (臺灣筋骨草)、 0.198 ± 0.036 mg/g (網果筋骨草)。

結果顯示經兩種萃取方法萃取後的五品種筋骨草萃取物的蛻皮甾酮含量以日本筋骨草的含量最高，臺灣筋骨草次之，顯示日本筋骨草應用於血糖控制有較高的潛力。而萃取方法影響結果表明超音波輔助萃取之萃取物的蛻皮甾酮含量優於超臨界流體萃取之萃取物，且有顯著性差異。

文獻指出黃酮類化合物為筋骨草水萃物中主要組成之一 (El-Hilaly and Lyoussi, 2002)，且在糖尿病患者中具有降低氧化逆境和避免胰臟 β 細胞受損等保護作用 (Coskun et al., 2005; Fan et al., 2012)。此外，筋骨草中所含蛻皮甾酮可能藉由促使葡萄糖結合或提升胰島素感受性來達到降血糖的作用 (Chen et al., 2006)。由圖 2 和 3 的結果得知日本筋骨草較其他四中種筋骨草有高含量的黃酮類化合物和蛻皮甾酮，因此可能具有較好的降血糖潛力。

日本筋骨草內有許多二次代謝產物已有被分離出來，包括：neo-clerodane diterpenoids 還有 phytoecdysteroids (Israili and Lyoussi, 2009)。實際上，亞洲地區分布的筋骨草因為具有 20-hydroxyecdysone (phytoecdysteroids 的一種) (Coll et al., 2007) 且已有相關降血糖活性的研究 (Kizelsztejn et al., 2009; Kutepova et al., 2001)。

4.1.3 五種台灣產筋骨草抑制 α -glucosidase 活性試驗

α -Glucosidase 是能夠水解含糖苷鍵化合物，進而產生單糖的一類酵素總稱，而 α -glucosidase 抑制劑可競爭性地抑制小腸內 α -glucosidase 之活性，延緩或抑制葡萄糖在腸道內的吸收，從而有效地降低餐後血糖值，調整血糖的水平 (Fujisawa et al., 2005)。

為確認五種台灣產筋骨草中具最高抑制 α -glucosidase 的效果之品種，將樣品已超音波輔助萃取技術所萃取之萃取物進行 α -glucosidase 活性抑制試驗，並以阿卡波糖為對照組，實驗結果如圖 4 所示。結果顯示阿卡波糖之 α -glucosidase 活性抑制率為最高，達 $58.94 \pm 1.33\%$ ，皆顯著高於所有品種之台灣產筋骨草。五種台灣產筋骨草之 α -glucosidase 活性抑制率則以日本筋骨草最高 ($28.62 \pm 1.56\%$)，臺灣筋骨草次之 ($25.12 \pm 0.96\%$)，其他品種之 α -glucosidase 活性抑制率分別為匍匐筋骨草 ($15.22 \pm 1.22\%$)、矮筋骨草 ($16.12 \pm 0.93\%$) 以及網果筋骨草 ($20.35 \pm 1.34\%$)。而超臨界流體萃取之筋骨草萃取物的 α -glucosidase 活性抑制率分別為 $12.34 \pm 0.99\%$ (匍匐筋骨草)、 $24.79 \pm 1.13\%$ (日本筋骨草)、 $11.55 \pm$

0.88% (矮筋骨草)、 $18.36 \pm 1.09\%$ (臺灣筋骨草)、 $16.98 \pm 0.97\%$ (網果筋骨草)。

雖然筋骨草萃取物之實驗結果遠低於阿卡波糖組之 α -glucosidase 活性抑制率，但阿卡波糖為糖尿病治療用藥，會有腹瀉、胃脹氣等的副作用 (Mertes, 2001)，而筋骨草為天然植物性食品，所以其萃取物未來可以應用於日常生活保健，期望能達到預防醫學之效果。

4.1.4 五種台灣產筋骨草萃取物對 HepG2 細胞存活率影響

本試驗結果如圖 5 所示，胰島素、二甲雙胍與五種台灣產筋骨草萃取物之細胞存活率均無顯著性差異，細胞存活率約為 98.8% 至 99.8%，顯示胰島素、二甲雙胍與五種台灣產筋骨草萃取物均對 HepG2 細胞無明顯細胞毒性。

4.1.5 五種台灣產筋骨草萃取物對 HepG2 細胞攝取葡萄糖影響

肝臟是葡萄糖代謝的中心，也是胰島素作用的最重要的器官 (Chen et al., 2006)。以 HepG2 細胞作為葡萄糖攝取的模型，二甲雙胍作為本實驗的控制組。二甲雙胍廣泛的用於第二型糖尿病的治療用藥，主要的作用為減少糖質新生 (hepatic gluconeogenesis) 和增加周圍的葡萄糖攝取 (peripheral glucose uptake) (Johnston et al., 2013; Takahara et al., 2012)。

表 1 顯示胰島素、二甲雙胍與五種台灣產筋骨草萃取物對 HepG2 細胞攝取葡萄糖的影響，胰島素、二甲雙胍與五種台灣產

筋骨草的超音波輔助萃取之萃取物均可促進 HepG2 細胞對於葡萄糖的攝取，攝取量分別為 2.58 ± 0.30 mol/L (胰島素)、 3.25 ± 0.24 mol/L (二甲雙胍)、 2.62 ± 0.19 mol/L (匍匐筋骨草)、 3.16 ± 0.25 mol/L (日本筋骨草)、 2.77 ± 0.16 mol/L (矮筋骨草)、 2.56 ± 0.21 mol/L (臺灣筋骨草) 以及 2.61 ± 0.18 mol/L (網果筋骨草)。而超臨界流體萃取筋骨草之萃取物對 HepG2 細胞攝取葡萄糖的攝取量結果分別為 2.31 ± 0.14 mol/L (匍匐筋骨草)、 2.66 ± 0.22 mol/L (日本筋骨草)、 2.08 ± 0.26 mol/L (矮筋骨草)、 2.17 ± 0.19 mol/L (臺灣筋骨草) 以及 2.59 ± 0.21 mol/L (網果筋骨草)。

將其數據計算成細胞對葡萄糖攝取促進率，結果如圖 6 所示，藥物組結果為 26.47% (胰島素)、59.31% (二甲雙胍)，而超音波輔助萃取之筋骨草萃取物於 HepG2 細胞對葡萄糖的攝取促進率分別為 28.43% (匍匐筋骨草)、54.9% (日本筋骨草)、35.78% (矮筋骨草)、25.49% (臺灣筋骨草) 與 27.45% (網果筋骨草)，而超臨界流體萃取之筋骨草萃取物則為 13.24% (匍匐筋骨草)、30.39% (日本筋骨草)、1.96% (矮筋骨草)、6.37% (臺灣筋骨草) 與 26.96% (網果筋骨草)。

由結果顯示超臨界流體萃取之筋骨草萃取物對 HepG2 細胞攝取葡萄糖的促進率較低於超音波輔助萃取，除網果筋骨草之萃取物外，兩萃取方法有顯著性差異。

其中超音波輔助萃取之日本筋骨草萃取物添加量 1 mg/mL 對促進 HepG2 細胞攝取葡萄糖的效果與糖尿病治療藥物二甲雙胍濃度為 1.66×10^{-1} mg/mL 時接近，顯示日本筋骨草較其他台灣產筋骨草之品種具有開發成輔助降血糖功效替代品的潛力。

4.2 體外降血糖篩選平台綜合評估

由上述實驗結果得知，超臨界流體萃取之筋骨草萃取物的總黃酮含量、蛻皮甾酮含量、 α -glucosidase 抑制率與 HepG2 細胞對葡萄糖的攝取促進率較超音波輔助萃取筋骨草萃取物來的低，顯示超音波輔助萃取法較超臨界流體萃取法適用於萃取筋骨草中降血糖功效成分，且由於超臨界流體和加速溶劑萃取受限於設備成本高和技術複雜，因此超音波輔助萃取法則較適合於未來工業應用 (譙等, 2002)，為因應未來工業化製程之可行性與發展性，因此本實驗判定超音波輔助萃取法為較適合於萃取筋骨草中降血糖物質的萃取方法，所以後續實驗均以超音波輔助萃取法進行實驗。

體外降血糖篩選平台檢測結果中顯示日本筋骨草對各項檢測之效果最佳，所以後段實驗選用之筋骨草品種為日本筋骨草，並以動物實驗驗證其降血糖功效。

4.3 優化萃取以提升筋骨草萃取物對降血糖之功效

筋骨草雖經過超音波輔助進行萃取，但因植物組織會有細胞壁等結構，導致有效物質可能無法有效被萃取出來，為了將有效成分萃取出來，因此本研究於進行超音波萃取之前先將筋骨草以纖維水解酵素進行水解的步驟，並檢測萃取物之總黃酮含量、蛻皮甾酮含量、 α -glucosidase 抑制率與 HepG2 細胞對葡萄糖的攝

取促進率等試驗項目，來探討纖維水解酵素的添加對於提升降血糖功效是否有所幫助，因上述篩選平台試驗中日本筋骨草對各項檢測之效果最佳，所以本段實驗所選用的筋骨草品種為日本筋骨草。

4.3.1 總黃酮含量分析

日本筋骨草分別在 20、30、40、50 以及 60°C 環境下進行萃取前之水解步驟，水解物再經超音波輔助萃取，結果如圖 7 所示，其萃取物之總黃酮含量分別為 8.24 ± 0.21 mg/g (20°C)、 8.33 ± 0.15 mg/g (30°C)、 9.45 ± 0.14 mg/g (40°C)、 9.31 ± 0.12 mg/g (50°C) 以及 8.76 ± 0.15 mg/g (60°C)，樣品經纖維水解酵素水解後，其總黃酮含量均高於未進行水解步驟之萃取物 (7.86 ± 0.21 mg/g)，且有顯著性差異 ($p < 0.05$)，其中水解溫度為 40°C 時總黃酮含量最高，而當水解溫度高於 50°C 之後總黃酮含量開始降低。

植物的細胞壁主要由纖維素構成，纖維水解酵素可以將纖維素水解成水溶性糖，經纖維酵素處理後的植物細胞壁水解破裂，有利於胞內生物活性物質溶出。而超音波輔助萃取可引起細胞內的物質運動，使細胞漿流動、細胞震盪，從而使細胞壁變薄，利於溶劑與植物細胞內部的相互滲透，增加了有效成分在溶劑中的溶解。高等和郭和謝分別以山楂和枇杷花利用纖維水解酵素進行預處理後再經超音波輔助萃取，會比只有超音波輔助萃取或纖維水解酵素進行萃取的產率高 (高等，2013；郭和謝，2013)。

4.3.2 蛻皮甾酮含量

日本筋骨草分別在 20~60°C 環境下進行萃取前之水解步驟，水解物再經超音波輔助萃取，蛻皮甾酮含量分析結果如圖 8 所示，經不同溫度中水解處理再進行萃取之萃取物，其蛻皮甾酮含量分別為 0.824 ± 0.022 mg/g (20°C)、 0.889 ± 0.023 mg/g (30°C)、 0.973 ± 0.032 mg/g (40°C)、 0.954 ± 0.028 mg/g (50°C) 以及 0.813 ± 0.032 mg/g (60°C)，由實驗結果得知樣品經纖維水解酵素水解後，蛻皮甾酮的含量均高於未進行水解步驟之萃取物 (0.785 ± 0.031 mg/g)，且兩組數據有顯著性差異 ($p < 0.05$)，其中水解溫度為 40°C 時蛻皮甾酮含量最高，而當水解溫度高於 50°C 之後蛻皮甾酮含量開始降低。

4.3.3 抑制 α -glucosidase 活性試驗

不同溫度反應之水解物進行超音波萃取後萃取物之 α -glucosidase 活性抑制率實驗結果顯示於圖 9， α -glucosidase 活性抑制率分別為 $28.57 \pm 1.33\%$ (20°C)、 $31.15 \pm 1.15\%$ (30°C)、 $35.66 \pm 1.21\%$ (40°C)、 $33.28 \pm 1.09\%$ (50°C) 以及 29.25 ± 0.98 (60°C)，經酵素水解後的萃取物之 α -glucosidase 活性抑制率均優於未進行水解步驟之萃取物 ($28.63 \pm 1.24\%$)，並有顯著性差異 ($p < 0.05$)，且抑制率隨著水解溫度的提高而上升，但於 50°C 後開始有下降趨勢。

4.3.4 HepG2 細胞對葡萄糖攝取試驗

不同溫度反應之水解物進行超音波萃取後萃取物進行葡萄糖攝取試驗後，將細胞對葡萄糖攝取量計算成細胞對葡萄糖攝取促進率，其實驗結果如圖 10 所示，促進率分別為 57.25 ± 2.15 (20°C)、 $61.42 \pm 3.24\%$ (30°C)、 $67.55 \pm 2.55\%$ (40°C)、 $67.43 \pm 2.65\%$ (50°C) 以及 59.33 ± 1.33 (60°C)，結果顯示日本筋骨草經酵素水解後的萃取物，其促進 HepG2 細胞對葡萄糖攝取能力均較優於未進行水解步驟之萃取物 ($54.15 \pm 2.11\%$)，並且兩組實驗結果有顯著性差異 ($p < 0.05$)，且抑制率隨著水解溫度的提高而上升，然於 60°C 後開始有下降趨勢。

日本筋骨草經纖維水解酵素於 40°C 反應後，再以超音波輔助進行萃取，測得其總黃酮含量為 $9.45 \pm 0.14 \text{ mg/g}$ ，蛻皮甾酮含量為 $0.973 \pm 0.032 \text{ mg/g}$ ， α -glucosidase 活性抑制率為 $35.66 \pm 1.21\%$ ，且 HepG2 細胞對葡萄糖的攝取促進率為 $67.55 \pm 2.55\%$ 。與先前研究結果相比，日本筋骨草經纖維水解酵素處理後，再以超音波輔助進行萃取，可有效提升功效性成分含量，且體外降血糖試驗結果更具有調控血糖之效果。

4.4 動物試驗平台

4.4.1 糖尿病小鼠模式之建立

動物試驗平台建立過程如圖 11 所示，在給予 STZ 前，正常對照組與誘發糖尿病組小鼠的血糖值分別為 101 ± 20 mg/dL 及 105 ± 17 mg/dL，均為正常且組間無顯著差異。實驗組小鼠在給予每日 1 次腹腔注射 60 mg/kg 的 STZ 經 1 週後，正常對照組老鼠的血糖值為 98 ± 12 mg/dL，誘發組老鼠的血糖值上升到 169 ± 75 mg/dL，已顯著高於正常對照組，但其中約有 50% 的小鼠血糖值未達到 230 mg/dL 以上，故繼續以 STZ 再誘導 1 週後，使誘發糖尿病組小鼠全組的平均血糖值達 293 ± 49 mg/dL，即顯著達到糖尿病小鼠之空腹血糖值範圍。在臨床症狀方面，經誘發高血糖的 129/Sv 小鼠，均出現頻渴、多食、多尿等現象，顯示已確定成功誘發小鼠之糖尿病症狀，後續即將小鼠依體重及血糖值隨機分配至糖尿病、降血糖藥物、實驗組等 3 組試驗組中，每組至少 6 隻以上。

4.4.2 筋骨草萃取物療效之評估

在小鼠給予 STZ 確定已誘發糖尿病之後，自完成第 2 週各項監測值檢測完後，開始口服投予糊化澱粉溶液 2 g/kg BW，再分別餵食 50、100、200、300 mg/kg 之筋骨草萃取物，其結果如表 2 所示，未給予萃取物之小鼠其餐後血糖值為 407 ± 18 mg/dL，而合併餵食筋骨草萃取物的小鼠，其餐後血糖值上升程度較少，且抑制血糖上升效果會隨著餵食劑量的增加而更為明顯。阿卡波糖為有效的 α -glucosidase 活性抑制劑，廣泛的應用於第二型糖尿病的治療，用以減緩碳水化合物的分解，使得糖尿病患者

的糖化血色素 (glycosylated haemoglobin) 表現量降低 (Johnston et al., 2013; Scheen, 1998)。

圖 12 為小鼠餵食不同劑量之筋骨草萃取物，其餐後血糖上升變化情形，顯示小鼠餐後血糖質變化程度會隨著萃取物劑量的增加而減少，且於 200 mg/kg 此劑量時下降程度趨緩，為顧及未來人體安全與產品經濟效益，後續實驗選用 200 mg/kg 此劑量與降血糖藥物進行比較。

治療組則再併服降血糖藥物阿卡波糖或實驗組筋骨草萃取物。結果如表 3 所示，3 組小鼠之體重及給予治療前之空腹血糖值經統計均無顯著差異。經口服投予澱粉 1 個小時後，糖尿病對照組小鼠之血糖值大幅上升至 401 ± 52 mg/dL，變化值達 127 ± 39 mg/dL，而同時給予糖尿病藥物阿卡波糖的治療組，其變化幅度則為 14 ± 28 mg/dL，顯著低於糖尿病組 ($p < 0.005$)，顯示經由阿卡波糖抑制了腸胃道中 α -amylase 的分解而抑制糖分吸收，達到降血糖作用。而合併投予筋骨草萃取物後之糖尿病小鼠，進食後 1 小時之血糖值上升幅度為 45 ± 44 mg/dL，亦顯著低於糖尿病對照組之小鼠 ($p < 0.05$)。

若以進食後 1 小時之血糖值上升變化百分率來看，將未加以治療的糖尿病小鼠之血糖上升變化訂為 100%，則以糖尿病藥物阿卡波糖治療的小鼠之血糖值上升變化為對照組的 $11 \pm 10\%$ ，而服用筋骨草萃取物後之糖尿病小鼠，其血糖值上升變化則為對照組的 $35 \pm 18\%$ ，換言之，進食後併服 25 mg/kg 阿卡波糖或 200 mg/kg 之筋骨草萃取物，其對血糖上升的抑制率約分別為 89% 及 65%，並具有統計上的顯著差異，顯示筋骨草萃取物具有抑制飯後

血糖值上升的潛力功效，而其作用推測與直接抑制消化道中的澱粉酶作用有關，從而影響糖分於消化道中的吸收，達到抑制血糖上升的功效。

然而，日本筋骨草提取物具有延遲碳水化合物的消化作用，可能是由於其富含黃酮類和蛻皮甾酮，從而改善了血糖。有研究指出，在東北摩洛哥已有使用伊娃筋骨草的地上部作為傳統的抗糖尿病藥用植物 (Ziyyat et al., 1997)。在動物實驗的降血糖作用的相關研究指出，發現其抗糖尿病的能力，可能是由於其抗氧化能力 (El-Hilaly and Lyoussi, 2002; Taleb-Senouci et al., 2009)。

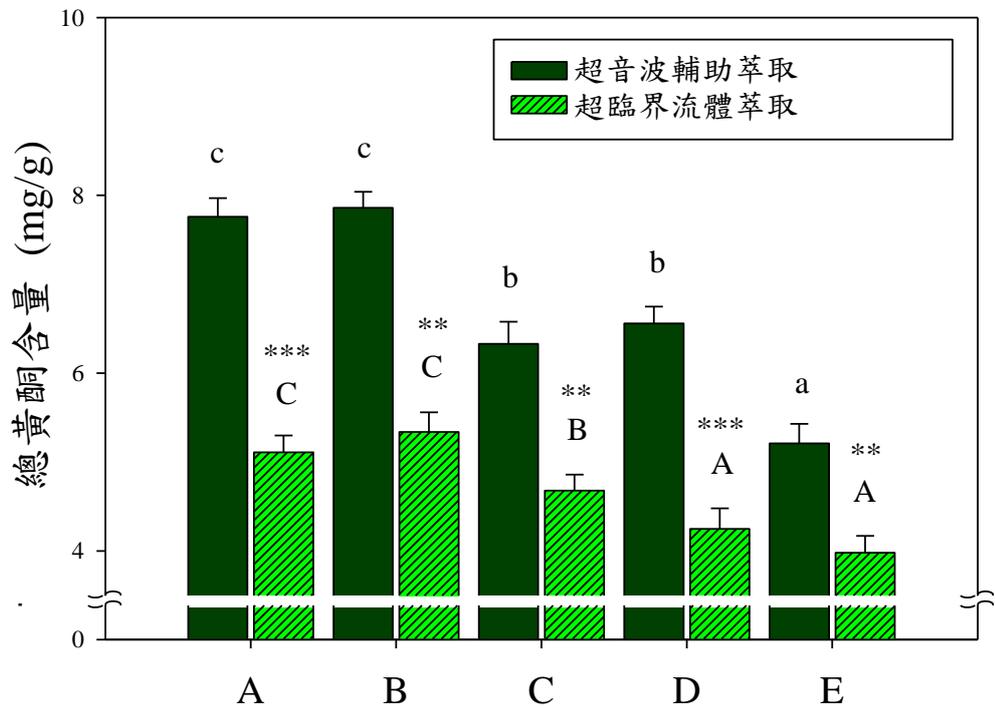


圖 2. 五種台灣產筋骨草萃取物之總黃酮含量

Figure 2. Total flavonoid contents of five common *Ajuga* species in Taiwan.

A：匍匐筋骨草

B：日本筋骨草

C：矮筋骨草

D：臺灣筋骨草

E：網果筋骨草

註：平均值±標準差 (3 重覆)。*：顯著性差異 ($p < 0.5$)，**：顯著差異 ($p < 0.1$)，***：顯著差異 ($p < 0.01$)。

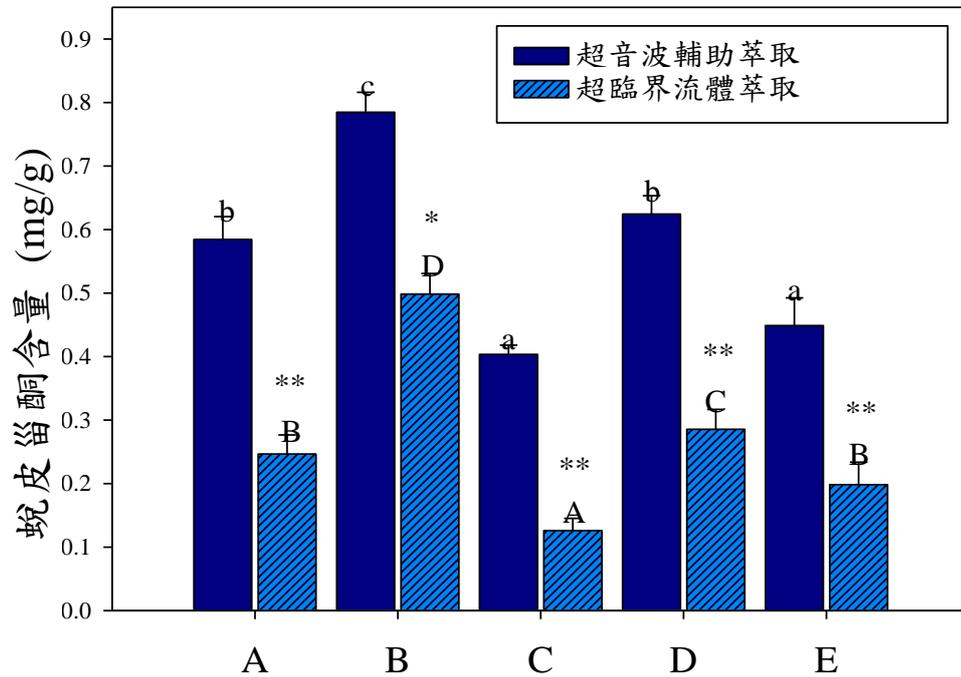


圖 3. 五種台灣產筋骨草萃取物之蜕皮甾酮含量

Figure 3. Total cdysterone contents of five common Ajuga species in Taiwan.

A：匍匐筋骨草

B：日本筋骨草

C：矮筋骨草

D：臺灣筋骨草

E：網果筋骨草

註：平均值±標準差 (3 重覆)。*：顯著性差異 ($p < 0.5$)，**：顯著差異 ($p < 0.1$)。

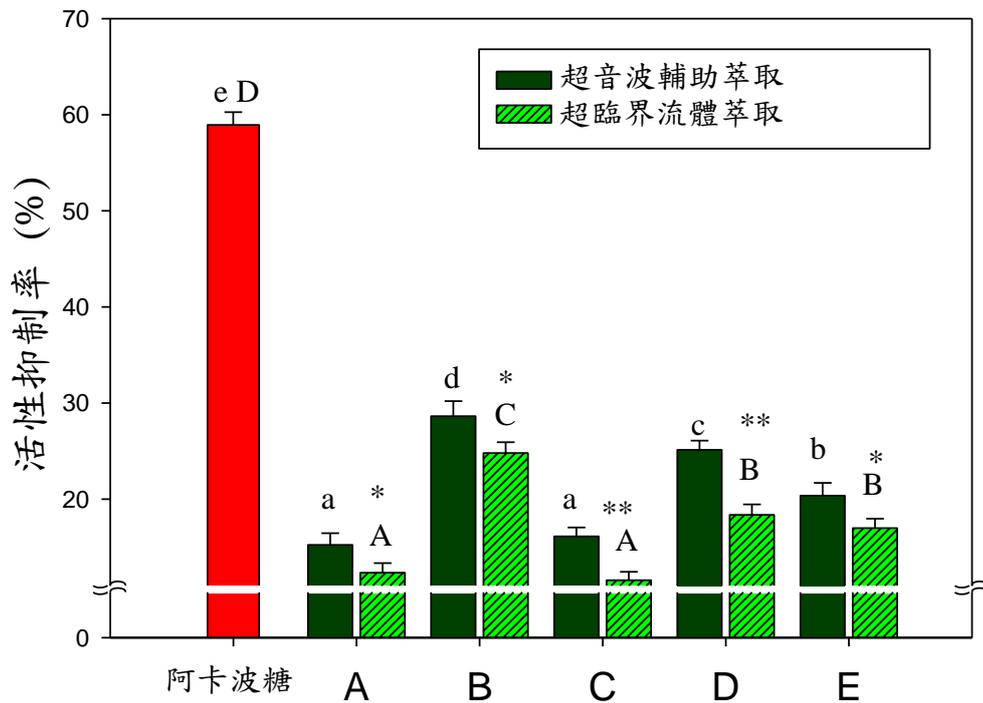


圖 4. 五種台灣產筋骨草之 α -glucosidase 活性抑制率

Figure 4. α -Glucosidase inhibitory activities of five common Ajuga species in Taiwan.

A：匍匐筋骨草

B：日本筋骨草

C：矮筋骨草

D：臺灣筋骨草

E：網果筋骨草

註：平均值 \pm 標準差 (3 重覆)。*：顯著性差異 ($p < 0.5$)，**：顯著差異 ($p < 0.1$)。

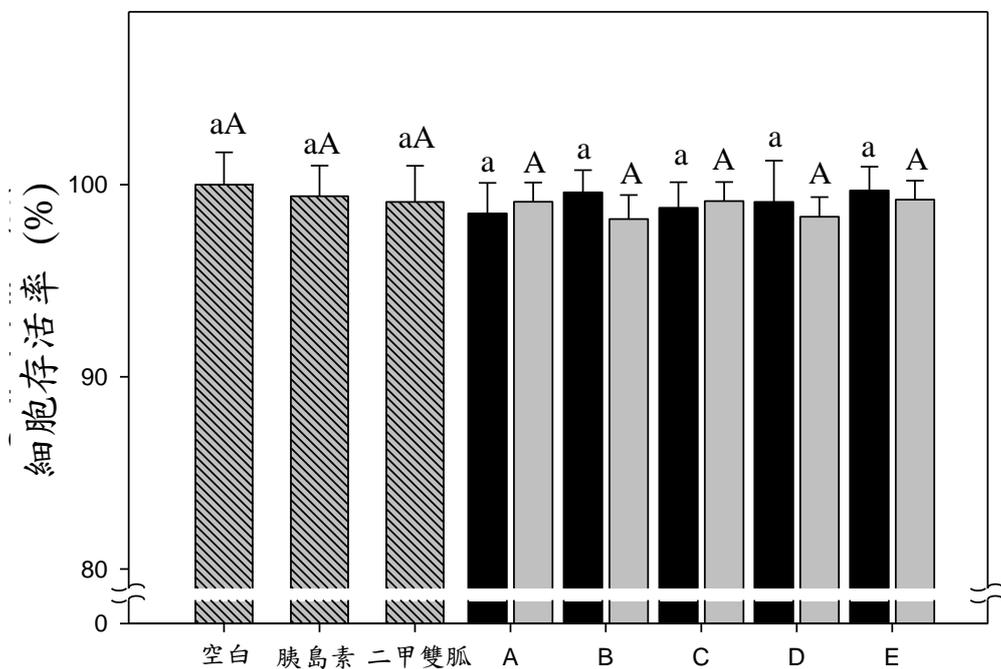


圖 5. 胰島素、二甲雙胍與五種台灣產筋骨草萃取物之 HepG2 細胞存活率

Figure 5. Cell viability of insulin, metformin and five common *Ajuga* species in Taiwan on the HepG2 cells.

- A：匍匐筋骨草
- B：日本筋骨草
- C：矮筋骨草
- D：臺灣筋骨草
- E：網果筋骨草

表 1. 胰島素、二甲雙胍與五種台灣產筋骨草萃取物對 HepG2 細胞攝取葡萄糖影響

Table 1. Glucose uptake effects of insulin, metformin and five common *Ajuga* species in Taiwan on the HepG2 cells.

	劑量 (mg/mL)	葡萄糖攝取 (mol/L)	
		超音波輔助萃取	超臨界流體萃取
空白組		2.04 ± 0.32 ^{aA}	
胰島素	5.808×10 ⁻⁴	2.58 ± 0.30 ^{bB}	
二甲雙胍	1.66×10 ⁻¹	3.25 ± 0.24 ^{cC}	
A	1	2.62 ± 0.19 ^b	2.31 ± 0.14 ^A
B	1	3.16 ± 0.25 ^c	2.66 ± 0.22 ^B
C	1	2.77 ± 0.16 ^b	2.08 ± 0.26 ^A
D	1	2.56 ± 0.21 ^b	2.17 ± 0.19 ^A
E	1	2.60 ± 0.18 ^b	2.59 ± 0.21 ^B

平均數 (6 重覆) ± 標準差

^{a-c} : 在同一行中不同字母的表示具有顯著性差異 (p < 0.05)

^{A-C} : 在同一行中不同字母的表示具有顯著性差異 (p < 0.05)

A : 匍匐筋骨草

B : 日本筋骨草

C : 矮筋骨草

D : 臺灣筋骨草

E : 網果筋骨草

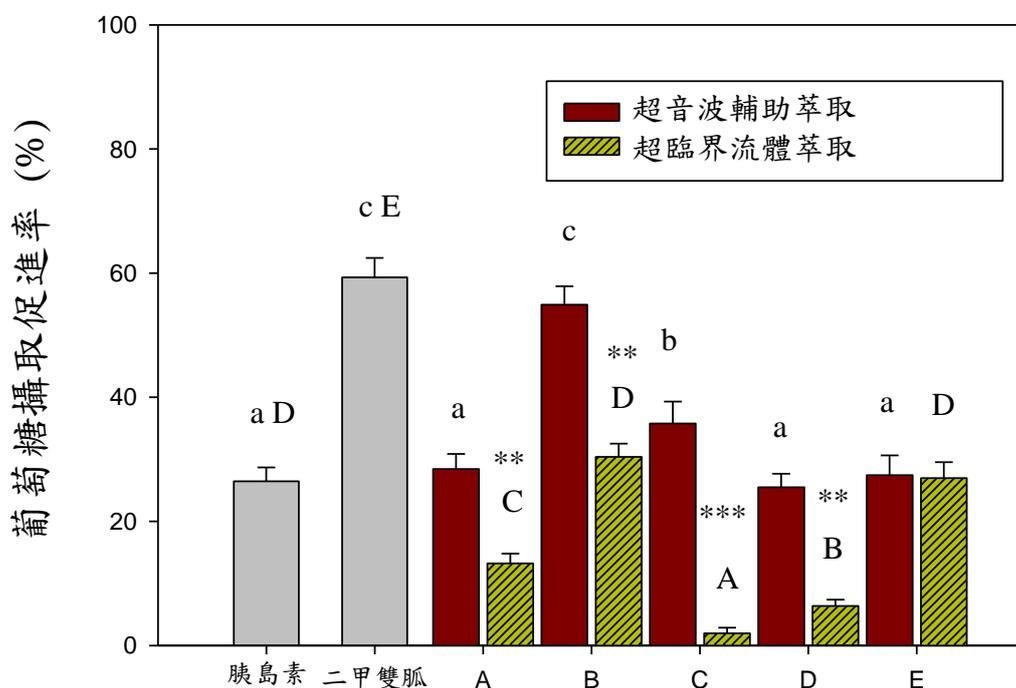


圖 6. 胰島素、二甲雙胍與五種台灣產筋骨草萃取物之 HepG2 細胞對葡萄糖的攝取促進率影響

Figure 6. Promote glucose uptake rate impact of insulin, metformin and five common Ajuga species in Taiwan on the HepG2 cells.

A：匍匐筋骨草

B：日本筋骨草

C：矮筋骨草

D：臺灣筋骨草

E：網果筋骨草

註：平均值±標準差 (6 重覆)。*：顯著性差異 ($p < 0.5$)，**：顯著差異 ($p < 0.1$)，***：顯著差異 ($p < 0.01$)。

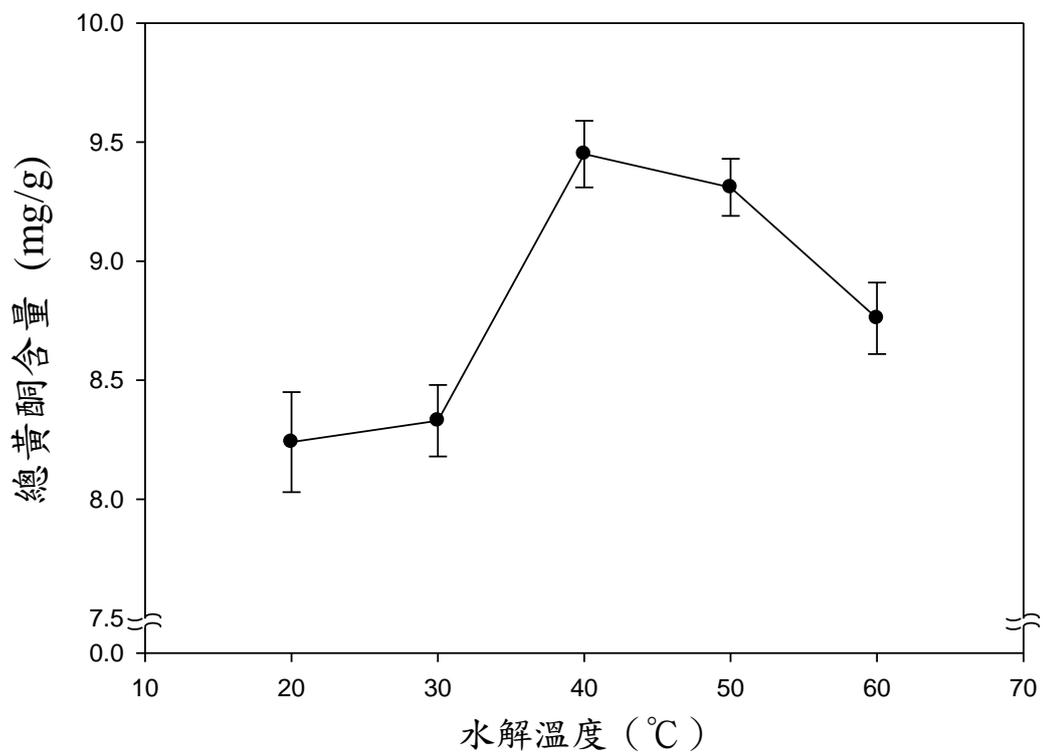


圖 7. 不同水解溫度對日本筋骨草之總黃酮含量影響

Figure 7. Effect of total flavonoids contents for *A. nipponesis* extracts with different hydrolysis temperature.

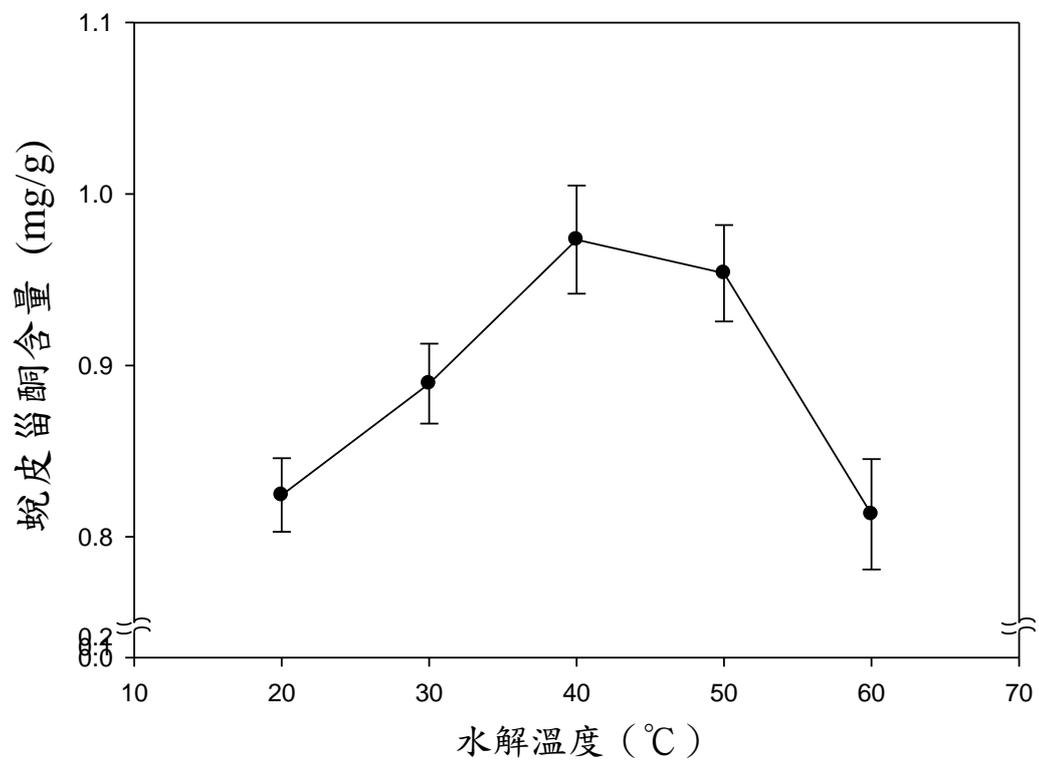


圖 8. 不同水解溫度對日本筋骨草之蛻皮甾酮含量影響

Figure 8. Effect of total ecdysterone contents for *A. nipponesis* extracts with different hydrolysis temperature.

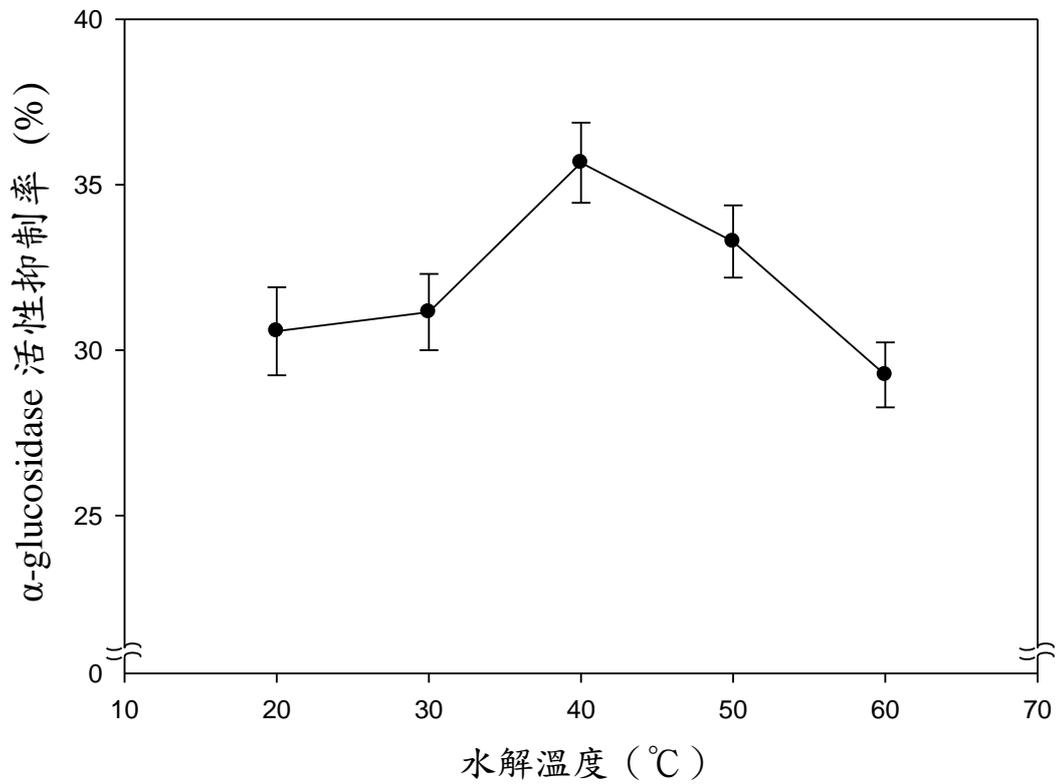


圖 9. 不同水解溫度之日本筋骨草萃取物對 α -glucosidase 活性抑制率影響

Figure 9. Effect of α -glucosidase inhibitory activities for *A. nipponesis* extracts with different hydrolysis temperature.

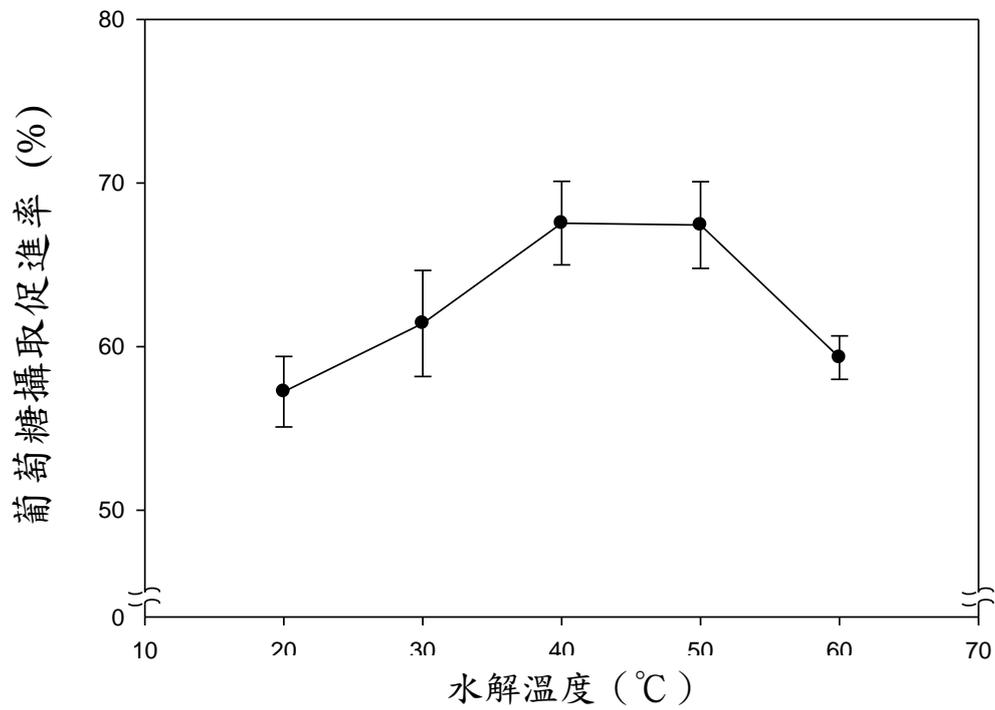


圖 10. 不同水解溫度之日本筋骨草萃取物之 HepG2 細胞對葡萄糖攝取的促進率

Figure 10. Effect of promoting rate of glucose uptake for *A. nipponesis* extracts with different hydrolysis temperature.



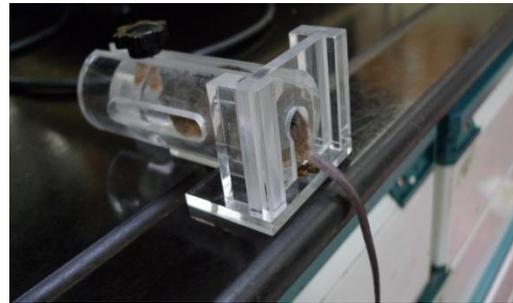
129/Sv 小鼠



以 STZ 誘導為 Type II DM



腹腔注射後，繼續餵食 1 週



禁食空腹 8 小時，以保定架固定



由尾部採血



紀錄血糖值測定結果與小鼠體重

圖 11. 動物實驗平台建立過程

Figure 11. Animal experiments platform building process.

表 2. STZ 誘發糖尿病小鼠經餵食澱粉與不同劑量日本筋骨草萃
取物的混合飼料之前後血糖值變化情形

Table 2. Pre/post-prandial blood glucose levels in STZ-induced
diabetic mice treated A. nipponesis extracts.

日本筋骨草萃取 物劑量 (mg/kg BW)	實驗鼠重量 (g)	餐前血糖值 (mg/dL)	餐後血糖值 (mg/dL)
0	21 ± 3 ^a	281 ± 68 ^a	407 ± 18 ^b
50	19 ± 2 ^a	293 ± 19 ^a	396 ± 15 ^b
100	20 ± 4 ^a	286 ± 22 ^a	361 ± 18 ^b
200	21 ± 3 ^a	294 ± 16 ^a	349 ± 13 ^a
300	19 ± 3 ^a	309 ± 19 ^a	358 ± 18 ^a

平均數 (6 重覆) ± 標準差

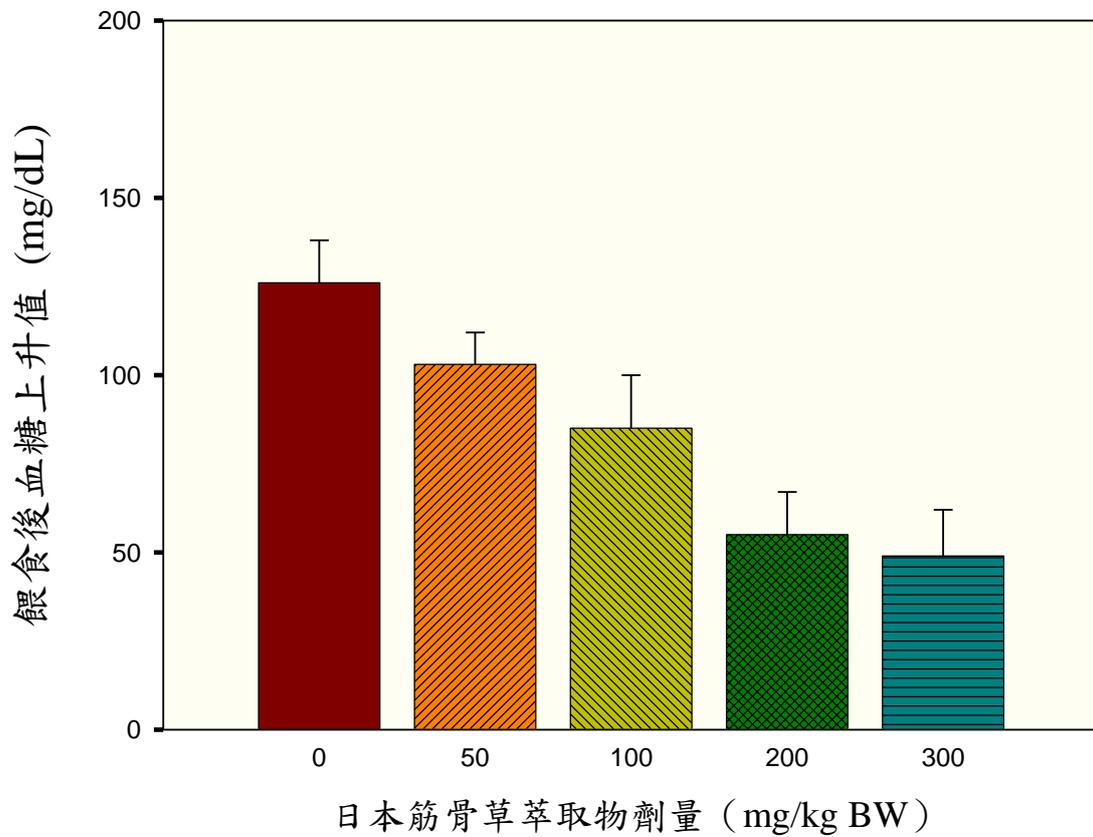


圖 12. STZ 誘發糖尿病小鼠經餵食澱粉與日本筋骨草萃取物之餵食後血糖上升情形

Figure 12. Blood glucose level in STZ-induced diabetic mice of A. nipponesis extracts.

表 3. STZ 誘發糖尿病小鼠經口服給予糖尿病治療藥物或筋骨草
萃取物之前後血糖值變化情形

Table 3. Pre/post-prandial blood glucose levels in STZ-induced
diabetic mice treated A. nipponesis extracts or acarbose.

	劑量 (mg/kg BW)	實驗鼠重量 (g)	餐前血糖值 (mg/dL)	餐後血糖值 (mg/dL)	血糖變化率 (%)
空白	-	21 ± 4	274 ± 34	401 ± 52	100 ± 15
阿卡波糖	25	19 ± 2	290 ± 68	304 ± 77	11 ± 10 **
日本筋骨草 萃取物	200	22 ± 2	310 ± 88	354 ± 116	35 ± 18 *

平均值±標準差 (6 重覆)。*: 顯著性差異 (p < 0.05), **: 顯著差異 (p < 0.005)。

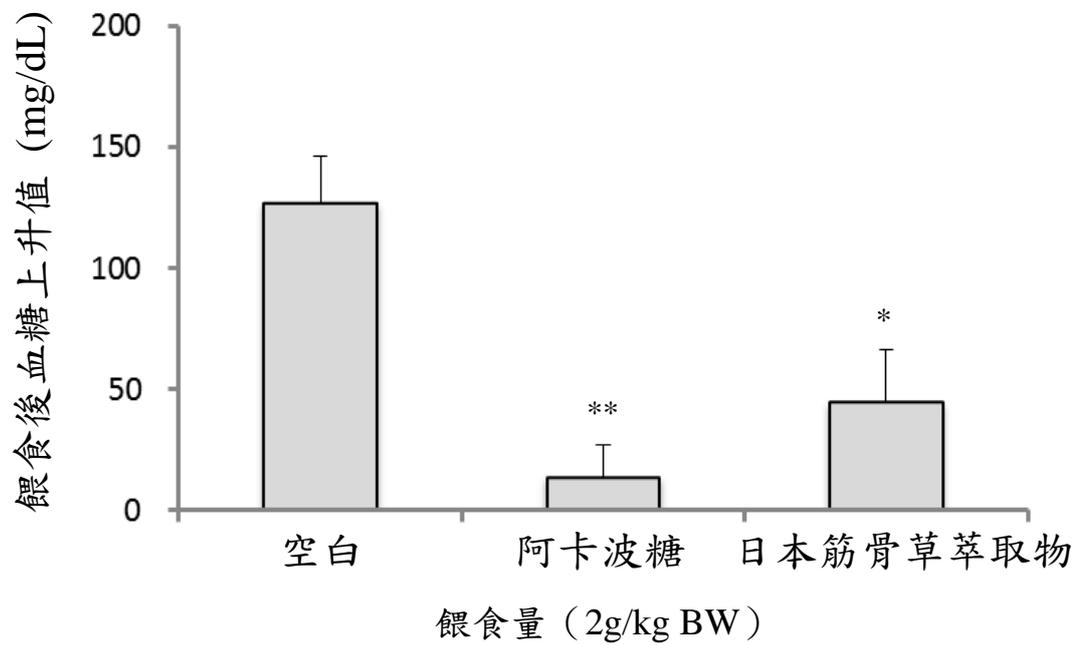


圖 13. STZ 誘發糖尿病小鼠經口服投與糖尿病治療藥物或筋骨草萃取物後之抑制血糖上升情形

Figure 13. Blood glucose level in STZ-induced diabetic mice of A. nipponesis extracts or acarbose.

註：平均值±標準差 (6 重覆)。*：顯著性差異 ($p < 0.05$)，**：顯著差異 ($p < 0.005$)。

5. 結論

藉由本實驗所建立之體外降血糖篩選平台試驗結果得知，五種台灣產筋骨草品種經超音波輔助萃取之萃取物的實驗結果優於超臨界流體萃取。且經實驗得知台灣產筋骨草萃取物均有降血壓功能性之潛力，其中又以經超音波輔助萃取的日本筋骨草萃取物實驗數據最為優異。

為提高筋骨草有效成分的萃取率，以纖維水解酵素進行萃取前之水解步驟，實驗結果顯示，水解溫度為 40°C 時效果最佳，經水解後之日本筋骨草萃取物與未經水解步驟之萃取物相比，其總黃酮含量、蛻皮甾酮含量、 α -glucosidase 活性抑制率與 HepG2 細胞葡萄糖攝取促進率皆有提升，顯示纖維水解酵素的添加可有效提升萃取物的功能性。

本實驗亦建立糖尿病動物實驗模組，成功利用 STZ 誘發實驗鼠產生糖尿病症狀，並以超音波輔助萃取的日本筋骨草萃取物進行實驗，其試驗結果驗證日本筋骨草具有調節血糖的潛力，且動物實驗模組可作為未來申請認證降低血糖濃度健康食品的前驅試驗。

6. 參考文獻

1. 王初、周曉芳和陳偉英。2003。白毛夏枯草鮮汁治療燙傷的實驗研究。中國現代應用藥學雜誌 20 (4): 311-312。
2. 王佳慧。2008。綠藻水解物對 α -葡萄糖苷酶之抑制與活性物質的純化。海洋大學食品科學學系碩士論文。
3. 王珮憶。2001。椿葉水萃取液在 Alloxan 所誘發的糖尿病鼠中降血糖作用之研究。高雄醫學大學醫學研究所碩士論文。
4. 行政院衛生署。2013。101 年國人十大死亡死因統計。
5. 邱年永和張光雄。2001。原色台灣藥用植物圖鑑 (6)。南天書局有限公司。第 181-184 頁。台北。台灣。
6. 邱明華和邢其毅。1998。具有生理活性的天然有機化合物。化學進展 10 (3) : 265-272。
7. 吳旭、王武軍、張軍花、熊俊和侯量。2006。植物藥有效成分 β -蛻皮激素抑制血管內皮細胞的凋亡。中國臨床康復 10 (19) : 72-73。
8. 吳德峰。1997。淺析筋骨草的藥用價值。福建畜牧獸醫 (1) 32-33。
9. 林進和唐仕榮。2005。論天然黃酮類化合物及其抗氧化作用。徐州工程學院學報 20 : 187-190。
10. 武繼彪、隋在雲和張玲。2001。 β -蛻皮甾酮延緩衰老的初步實驗研究。天然產物研究與開發 13 (5) : 28-29。
11. 胡智伯。2002。口服降血糖製劑與天然調節血糖物質。食品工

業 34 (6) : 19-37。

12. 俞靈鶯。2002。桑葉總黃酮對糖尿病大鼠降血糖效應的研究。浙江大學營養與食品衛生學系碩士論文。
13. 高文秀、祝波和王亞紅。2013。酶解法協同超聲波法提取山楂中總黃酮的工藝條件優化。江蘇農業科 41 (3) : 252-254。
14. 徐世清、戈志強、戴漩穎、喬洪根、司馬楊虎和鄭必平。2005。20-羥基蛻皮酮的藥理作用和醫學應用研究進展。科技通報 21 (1) : 56-62。
15. 馬志平和黃榕。2002。筋骨草有效部位黃酮類粗品的保肝試驗。海峽藥學 14 (5) : 40-41。
16. 郭欣和謝三都。2013。酶解結合超聲波提取枇杷花黃酮類物質工藝優化。漳州職業技術學院學報 15 (3) : 1-6。
17. 陳泰成。2007。以超臨界流體二氧化碳萃取楊桃多酚。高苑科技大學高分子環保材料研究所碩士論文。高雄縣，台灣。
18. 梅約醫學中心 著，王誠之 譯。2002。糖尿病。第 11-16 頁。天下雜誌。台北。台灣。
19. 張遠超和陸付耳。2004。 α -葡萄糖苷酶抑制劑治療糖尿病的研究進展。中國中西醫結合消化雜誌 12 (2) : 125-127。
20. 張德權及胡曉丹。2005。食品超臨界 CO₂ 流體加工技術，化學工業出版社。北京，中國大陸。
21. 張鏡澄。2000。超臨界流體萃取。化學工業出版社。北京，中國大陸。
22. 華良武、趙振東、Vinatoru Mircea、陳元平、李冬梅、古研和王婧。2007。超音波技術在生物質資源加工領域的應用研究進

- 展。林業化學和工業 27：138-142。
23. 曾茂貴、賈伽和吳符火。2003。筋骨草對小鼠 S180 肉瘤的抑瘤試驗。福建中醫學院學報 13 (2)：30-31。
 24. 曾繁銘。2002。超臨界流體與應用發展趨勢。工研院能環所。新竹，台灣。
 25. 黃增泉、謝宗欣、鄭武燦。1998。臺灣植物誌 第二版。第四卷。第 436-442 頁。台北。台灣。
 26. 楊遠波、劉和義、彭鏡毅、施炳霖和呂勝由編著。1999。臺灣維管束植物簡誌第四卷。第 133 頁。行政院農業委員會。台北。台灣。
 27. 蔡昊都和陳皓君，2006。蔬果中類黃酮之抗氣化作用與生物活性。化學 64 (3)：315-353。
 28. 劉斌、石任兵、葛小俠、周瑩和周靜。2001。筋骨草屬植物化學成分與藥理活性。國外醫藥 (植物藥分冊) 16 (3)：96-101。
 29. 談駿嵩。2002。超臨界流體的應用。科學發展 359：12-17。
 30. 賴建福。2010。四種台灣產筋骨草活性成分含量及其抗氧化能力之分析比較。大葉大學生物產業科技學系碩士論文。
 31. 蕭久富。2007。不同萃取方法對台灣筋骨草及匍匐筋骨草活性成分之分析比較研究。大葉大學生物產業科技學系碩士論文。
 32. 龍春、高志強、陳鳳鳴和王林。2006。黃酮類化合物的結構-抗氣化活性關係研究進展。重慶文理學院學 (自然科學) 5 (2)：13-17。
 33. 謝宗欣。1998。台灣筋骨草屬植物介紹。自然保育季刊。21：21-27。

34. 譙斌宗、楊元和高玲。2002。微波萃取在衛生檢驗中的應用。中國衛生檢驗雜誌 12 (5)：632-634。
35. 鍾錠全。1997。青草世界彩色圖鑑。鍾錠全。第 273 頁。台北，台灣。
36. 嚴偉、李淑芬和田松江。2002。超聲波協助提取技術。化工進展 21 (9)：649-651。
37. 龔慧敏。2006。小公英萃取物之生物活性分析。元培科學技術學院影像醫學系碩士論文。
38. Abdel-Rahman, M. S., Elrakhawy, F. I. and Iskander, F. A. 1992. Protection of B cells against the effect of alloxan. *Toxicol Lett.* 63 (2): 155-64.
39. Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. and Knowles, B. 1979. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma derived cell line. *Nature.* 282(5): 615-616.
40. Akter, S., Rahman, M. M., Abe, S. K. and Sultana, P. 2014. Prevalence of diabetes and prediabetes and their risk factors among Bangladeshi adults: a nationwide survey. *Bulletin of the World Health Organization.* 92: 204-213.
41. Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J. P. and Mason, T. J. 2004. Potential for the use of ultrasound in the extraction of the antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrason. Sonochem.* 11(2): 261-265.
42. Bailey, C. J. and Turner, S. L. 2004. Glucosamine-induced insulin resistance in L6 muscle cells. *Diabetes Obes Metab.* 6(4): 293-298.
43. Bessesen, D. H. 2001. The role of carbohydrates in insulin resistance. *Journal of Nutrition.* 131(8): 2782-2786.
44. Cares, M. G, Vargas, Y., Gaete, L., Sainz, J. and Alarcón, J. 2010. Ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from *Quillaja Saponaria* Molina.

- Physics Procedia. 3(1): 169-178.
45. Ceriello, A. 1998. The emerging role of post-prandial hyperglycaemic spikes in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetic Medicine*. 15: 188-193.
 46. Chen, Q., Xia, Y. and Qiu, Z. 2006. Effect of ecdysterone on glucose metabolism in vitro. *Life Sci*. 78(10): 1108-1113.
 47. Chenni, A, Yahia, D. A., Boukortt, F. O., Prost, J., Lacaille-Dubois, M. A. and Bouchenak, M. 2007. Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high-cholesterol diet. *J. Ethnopharmacol*. 109(2): 207-213.
 48. Chiu, K., Cheng, Y., Chen, J., Chang, C. and Yang, P. 2002. Supercritical fluids extraction of Ginkgo ginkgolides and flavonoids. *J Supercrit Fluid*. 24(1): 77-87.
 49. Coll, J., Tandro n, Y. A. and Zeng, X. N. 2007. New phytoecdysteroids from cultured plants of *Ajuga nipponensis* Makino. *Steroids*, 72: 270-277.
 50. Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A. and Oter, S. 2005. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Pharmacol. Res*. 51: 117-123.
 51. El-Hilaly, J. and Lyoussi, B. 2002. Hypoglycaemic effect of the lyophilised aqueous extract of *Ajuga iva* in normal and streptozotocin diabetic rats. *J. Ethnopharmacol*. 80(2): 109-113.
 52. El-Hilaly, J., Lyoussi, B., Wibo, M. and Morel, N. 2004. Vasorelaxant effect of the aqueous extract of *Ajuga iva* in rat aorta. *J. Ethnopharmacol*. 93(1): 69-74.
 53. Fan, J., Zhu, W., Kang, H., Ma, H. and Tao, G. 2012. Flavonoid constituents and antioxidant capacity in flowers of different Zhongyuan tree penoy cultivars. *J Funct Foods*. 4(1): 147.157.
 54. Fujisawa, T., Ikegami, H., Inoue, K., Kawabata, Y. and Ogihara, T. 2005. Effect of two α -glucosidase inhibitors, voglibose and acarbose, on postprandial hyperglycemia correlates with subjective abdominal symptoms. *Metabolism*. 54: 387-390.

55. Göke, B. and Herrmann-Rinke, C. 1998. The evolving role of alpha-glucosidase inhibitors. *Diabetes metabolism reviews. Suppl*: S31-8.
56. Haraguchi, H., Ohmi, I., Sakai, S. and Fukuda, A. 1996. Effect of Polygonum hydropiper sulfated flavonoids on lens aldose reductase and related enzymes. *J. Nat. Prod.* 59(2): 443-445.
57. Harris, M. I., Hadden, W. C., Knowler, W. C. and Bennett, P. H. 1987. Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance and plasma glucose levels in the U.S. population aged 20-74 yr. *Diabetes.* 36(4): 523-534.
58. Hashimoto, K., Matsunaga, N. and Shimizu, M. 1994. Effect of vegetable extracts on the transepithelial permeability of the human intestinal caco-2 cell monolayer. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58: 1345-1346.
59. Hoekstra, R. and Chamuleau, R. A. 2002. Recent developments on human cell lines for the bioartificial liver. *Int J Artif Organs.* 25(2): 182-191.
60. Israili, Z. H. and Lyoussi, B. 2009. Ethnopharmacology of the plants of genus *Ajuga*. *Pak J Pharm Sci.* 22: 425-462.
61. Johnston, C. S., Quagliano, S. and White, S. 2013. Vinegar ingestion at mealtime reduced fasting blood glucose concentrations in healthy adults at risk for type 2 diabetes. *J Funct Foods.* 5(4): 2007-2011.
62. Kariba, R. M. 2001. Antifungal activity of *Ajuga remota*. *Fitoterapia.* 72: 77-178.
63. Kataoka, K., Nagao, Y., Nukui, T., Akiyama, I., Tsuru, K., Hayakawa, S., Osaka, A. and Huh, N. H. 2005. An organic-inorganic hybrid scaffold for the culture of HepG2 cells in a bioreactor. *Biomaterials.* 26(15): 2509-2516.
64. Kizelsztejn, P., Govorko, D., Komarnytsky, S., Evans, A., Wang, Z., Cefalu, W. T. and Raskin, I. 2009. 20-Hydroxyecdysone decreases weight and hyperglycemia in a diet-induced obesity mice model. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 296: E433-E439.
65. Konoshima, T., Takasaki, M., Tokuda, H. and Nishino, H. 2000. Cancer chemopreventive activity of an iridoid glycoside, 8-acetylharpagide, from *Ajuga*

- decumbens. *Cancer Lett.* 157: 87-92.
66. Kutepova, T. A., Syrov, V. N., Khushbaktova, Z. A. and Saatov, Z. 2001. Hypoglycemic activity of the total ecdysteroid extract from *Ajuga turkestanica*. *Pharm. Chem. J.* 35(11): 608-609.
 67. Lenzen, S. 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin- induced diabetes. *Diabetologia.* 51:216-26.
 68. Lin, J. Y. and Tang, C. Y. 2007. Determination of total phenolics and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chem.* 101(1): 140-147.
 69. Mertes, G. 2001. Safety and efficacy of acarbose in the treatment of Type 2 diabetes: data from a 5-year surveillance study. *Diabetes Res Clin Pract.* 52(3): 193-204.
 70. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods.* 65(1): 55-63.
 71. Nelson, B. A., Robinson, K. A. and Buse, M. G. 2000. High glucose and glucosamine induce insulin resistance via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes.* 49: 981-91.
 72. Qureshi, A. A., Sami, S. A. and Khan, F. A. 2002. Effects of stabilized rice bran, its soluble and fiber fractions on blood glucose levels and serum lipid parameters in humans with diabetes mellitus Types I and II. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 13: 175-187.
 73. Rodrigues, B., Poucheret, P., Battell, M. L. and McNeill, J. H. 1976. Diabetic polyneuropathy: the importance of insulin deficiency, hyperglycemia and alterations in myoinositol metabolism in its pathogenesis. *N Engl J Med.* 295: 1416-1421.
 74. Scheen, A. J. 1998. Clinical efficacy of acarbose in diabetes mellitus: A critical review of controlled trials. *Diabetes and Metabolism.* 24: 311-320.

75. Shim, Y. J., Doo, H. K., Ahn, S. Y., Kim, Y. S., Seong, J. K., Park, I. S. and Min, B. H. 2003. Inhibitory effect of aqueous extract from the gall of *Rhus Chinensis* on α -glucosidase activity and postprandial blood glucose. *J. Ethnopharmacol.* 85(2): 283-287.
76. Szkudelski, T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 50: 536-46.
77. Taleb-Senouci, D., Ghomari, H., Krouf, D., Bouderbala, S., Prost, J., Lacaille-Dubois, M. A. and Bouchenak, M. 2009. Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine.* 16: 623–631.
78. Terahara, N., Callebaut, A., Ohba, R., Nagata, T., Ohnishi-Kameyama, M. and Suzuki, M. 2001. Acylated anthocyanidin 3-sophoroside- 5-glucosides from *Ajuga reptans* flowers and the corresponding cell cultures. *Phytochemistry.* 58(3): 493-500.
79. Vessal, M., Hemmati, M. and Vasei, M. 2003. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 135(3): 357-364.
80. Waring, W. S. 2007. Antidiabetic drugs. *Medicine.* 35(11): 590-591.
81. World Health Organization. 1999. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva.
82. Wu, J. Y., Lin, L. D. and Chau, F. T. 2001. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. *Ultrason. Sonochem.* 8(4): 347-352.
83. Youn, J. Y., Park, H. Y. and Cho, K. H. 2004. Anti-hyperglycemic activity of *Commelina communis* L.: inhibition of α -glucosidase. *Diabetes Res Clin Pract.* 66: S149–S155.
84. Ziyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M. and

Benjelloun, W. 1997. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *J. Ethnopharmacol.* 58, 45–54.