

黃芩葛根對細胞抗發炎活性及荷蘭仔女牛下痢之影響⁽¹⁾

李國華⁽²⁾ 林文宏⁽³⁾ 趙俊炫⁽²⁾ 林宗毅⁽²⁾ 陳志毅⁽²⁾⁽⁴⁾

收件日期：111 年 5 月 6 日；接受日期：112 年 2 月 1 日

摘 要

為探討具保健效果的植生素 (phytogenics)，本試驗旨在探討黃芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi) 與葛根 (*Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi) 對細胞抗發炎活性及添加於仔牛飼糧對其下痢改善之效果。體外細胞試驗，將黃芩與葛根水萃液依不同濃度分別作用於巨噬細胞株 (mouse BALB/c macrophage RAW 264.7) 進行抗發炎活性之檢測。動物體內試驗則將 20 頭約 8 週齡之荷蘭種雌性仔牛隨機均分成兩組，分別為對照組：未添加黃芩葛根，平均體重 74.6 kg；試驗組：每日每頭添加 5 g 黃芩葛根 (1:1)，平均體重 74.1 kg，試驗為期 30 天，進行仔牛體重、精料採食量、乾草採食量、糞便分數及血清生化值之量測。細胞試驗結果顯示，添加 10% 黃芩水萃液組可抑制一氧化氮 (nitric oxide, NO) 與間白素 -6 (interleukin-6, IL-6) 的產生，相較於 LPS 正對照組分別可減少 47.8 及 81.6% 之生成量；在腫瘤壞死因子 - α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 方面則無抑制之效果。添加 10% 葛根水萃液組可抑制 IL-6 的產生，相較於 LPS 正對照組可減少 24.1% 之生成量；對 NO 與 TNF- α 之生成則無抑制效果。另添加 10% 之黃芩及葛根水萃液組對細胞存活率均無顯著影響。動物試驗結果顯示，飼糧中添加黃芩葛根 30 天之試驗組，相較於對照組有顯著提升仔牛之糞便分數 (3.2 ± 0.4 vs. 2.1 ± 0.6 , $P < 0.05$)，顯示對仔牛下痢有改善；但是在日增重、精料採食量、乾草採食量及血清生化檢測均未受到試驗處理影響。綜上，黃芩及葛根水萃液對細胞發炎激素的生成有抑制作用，具抗發炎活性。飼糧添加黃芩與葛根雖然對仔牛之生長性能與血清生化檢測無顯著影響，但對仔牛下痢情形有顯著改善之效果。

關鍵詞：細胞發炎激素、下痢、荷蘭仔女牛、葛根、黃芩。

緒 言

仔牛育成率的高低攸關乳牛場經營規模的命脈，仔牛的飼養期約為 6 個月，包括哺乳期與生長期，新生仔牛經過約 8 週左右之哺乳期後進行斷乳，再進入仔牛生長期迄至 6 月齡左右止，此飼養過程之轉換，仔牛因會受到環境的適應性、斷乳、飼糧轉換及社會位序的改變等因子的影響而造成極大的緊迫，在此緊迫壓力下就容易發生仔牛消化系統之不適及出現下痢 (diarrhea) 現象，如病情嚴重者甚至會引發死亡，造成酪農嚴重的經濟損失 (吳，2002)。根據美國 2007 年國家動物健康監測系統的報告 (USDA, 2008) 指出，在美國有 57% 離乳仔牛的死因是與下痢有關，在韓國也有相近的仔牛死亡率 (53.4%) 是與下痢有關 (Hur *et al.*, 2013)。在挪威每年仔牛產量為 280,000 頭，但在 2006 年仔牛死亡相關的經濟損失估算約為 1,000 萬美元 (Østerås *et al.*, 2007)。因此，仔牛下痢是一種普遍且常見的疾病，亦是造成全球酪農經濟損失的主因之一，另當仔牛斷乳後進入生長期的前 30 天，則是仔牛下痢好發之關鍵期 (沈，1987)。

當細菌或內毒素入侵動物體內後會引發一連串的免疫反應，促使巨噬細胞活化以對抗外來病原 (細菌或內毒素)，降低其對體內之傷害。巨噬細胞具吞噬作用是身體防禦異物入侵的主要機制之一，被激活的巨噬細胞會參與炎症反應、增強吞噬作用與釋放 TNF- α 等細胞激素 (Hirayama *et al.*, 2017)。以內毒素 (endotoxin) 刺激巨噬細胞時，所生成的物質可分為三類：(1) 高反應性含氧分子 (reactive oxygen species, ROS)：如一氧化氮 (nitric oxide, NO)，(2) 脂質衍生物：包括血小板活化因子及發炎分子如白三烯素 (leukotrienes)、前列腺素 (prostaglandins) 及血栓凝集素 (thromboxan) 及 (3) 蛋白質：通常是間白素 (interleukin, IL，如 IL-1、IL-6、IL-8)、腫瘤壞死因子 - α (tumor necrosis

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2732 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所。

(3) 仁德醫護管理專科學校口腔衛生科兼任助理教授。

(4) 通訊作者，E-mail: jychen@mail.tlri.gov.tw。

factor- α , TNF- α) 及干擾素- γ (interferon- γ , IFN- γ)，其中 IL-1、IL-6 及 TNF- α 為促發炎細胞激素 (pro-inflammatory cytokines)，在急性發炎反應中扮演重要角色，這三種細胞激素會增加血管通透性，因而導致紅、腫、熱、痛等發炎反應 (inflammatory response)，為發炎反應之主要調節者，可持續刺激活化巨噬細胞以分泌更多的促發炎的細胞激素。文獻指出脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS) 是革蘭氏陰性菌 (如大腸桿菌) 外膜的主要成分，也是一種內毒素，可間接經由免疫調節分子 (如 TNF- α 、IL-1 及 IL-6 等) 誘導動物產生強烈的免疫反應，所以常利用 LPS 進行體外巨噬細胞抗發炎物質之功效評估。

由於抗生素在動物保健及醫療上的過度使用，導致抗藥性病原菌的產生，造成全球性公衛問題，所以如何減少抗生素的使用為當前最重的研究課題。植生素 (phytochemicals) 具保健的功效，其中傳統的中藥草應用於人類及動物的疾病醫療保健，已超過二千年的歷史 (Sun *et al.*, 2013)，近來年有許多研究報告指出中藥草對動物健康深具功效潛能，如山藥、白朮、甘草、大棗及桔梗等之粉末組合作為離乳仔豬飼料添加物，可提升多形性嗜中性球之免疫活性，改善仔豬下痢情形與提高生長性能 (黃, 2009)。Abdallah *et al.* (2019) 研究指出，傳統中草藥 (traditional Chinese herbal medicine, TCHM) 副產物含有大量的生物活性化合物，可作為飼料添加物並提升動物健康。當動物受到病原體感染入侵時，最先引起的就是發炎反應，造成組織之病理性傷害如腸道發炎、腸黏膜及絨毛受損，引發疾病出現臨床症狀。文獻指出具有抗發炎活性的中藥草，如黃芩及葛根 (徐等, 2013)，可能是減緩腸道發炎的潛在候選者。黃芩具清濕熱、瀉肺火，傳統文獻《傷寒論》指出黃芩具解表清裡之效，可用於動物下痢的解緩 (賈及黃, 2004)。Li *et al.* (2004) 亦指出黃芩是最廣泛被用於胃腸道的抗發炎中藥草之一。葛根具解肌退熱、生津止渴，經常被用於潰瘍性結腸炎 (ulcerative colitis, UC) 的解緩，UC 是一種炎症性腸病，伴有腹痛、腹瀉及直腸出血 (Guo *et al.*, 2017)。Jeon *et al.* (2020) 在人為誘發結腸炎之小鼠模型下給予葛根素進行處理，結果發現可減少小鼠結腸的病理解傷程度，以及抑制促炎細胞激素的分泌，證明葛根素應用在結腸炎小鼠模型中具有抗發炎之功效。由於黃芩及葛根對腸道之功效性廣，值得進一步應用於畜禽產業。因此本試驗進行黃芩及葛根對細胞抗發炎活性之探討，以及應用黃芩葛根添加於飼糧中評估其對荷蘭仔女牛下痢改善之功效。

材料與方法

I. 細胞抗發炎活性之體外試驗測定項目

- (i) 樣品萃取方法：試驗組之黃芩葛根粉購自科達製藥股份有限公司 (桃園市)，中文品名：黃芩、英文品名：Hwang Chyn (Huang Qin)、組成 / 成分：黃芩。中文品名：葛根、英文品名：Ger Gen (Ge Gen)、組成 / 成分：葛根。將黃芩及葛根樣品各在 60°C，經 8 – 10 h 烘乾，再以研磨機研磨過篩，粒徑大小為 160 目 (96 μ m)，並使其水分含量為 5% 以下。秤取乾燥研磨完成之黃芩粉或葛根粉 100 mg 添加純水 10 mL，於 25°C，150 rpm 震盪 2h 後，經 5,000 rpm 離心 5 min，收取上層水溶液即為黃芩或葛根水萃液原液 (將此原液濃度在本試驗定義為 100%)，提供進行後續之細胞測試，但未進行功能性成分分析。
- (ii) 細胞存活率測試 (viability of cells)：試驗所用之巨噬細胞 (mouse BALB/c macrophage RAW 264.7, BCRC 60001) 購於食品工業發展研究所，巨噬細胞於 37°C、5% 二氧化碳之 96 孔培養盤內培養 24 h，每孔置入 100 μ L 培養液，成分為 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco/BRL) 內含有 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco/BRL) 及 50 μ g/mL gentamicin (Gibco/BRL)，每孔內含 50,000 cells 與各種不同濃度的黃芩或葛根水萃液 (各 2.5、5 及 10%，此三濃度是從本試驗定義之 100% 水萃液原液稀釋而得)，利用 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylthiazolium bromide (MTT assay) 來檢測細胞存活率 (Kao *et al.*, 2001)，並以未添加黃芩或葛根水萃液之細胞當作對照組。吸取 10 μ L MTT (5 mg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 加入到培養液內，經過 4h、37°C 的培養，再加入等量的 0.04 N HCl 去溶解 MTT formazan (1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyl formazan, Thiazolyl blue formazan)，接著設定在波長 570 nm 的條件下測試吸光值，以未被黃芩或葛根作用的細胞之 formazan 吸光值定義為 100%。
- (iii) 一氧化氮 (NO) 分析：巨噬細胞在 10.0 μ g/mL 細菌脂多醣 (Escherichia coli serotype O111:B4; Sigma-Aldrich, Cat. No. L4391) 作用 24 h 後，利用 Griess reaction 方法 (Yeh *et al.*, 2007)，檢測在細胞培養液中 NO 的濃度。取培養液 100 μ L/well，加入等量新鮮配置的 Griess 試劑 [由 Griess A 試劑 (0.1% N-(1-Naphthyl) ethylenediamine) 與 Griess B 試劑 (1% Sulfanilamide/5% H₃PO₄) 等比例混合, Sigma-Aldrich]，避光反應 10 分鐘後，用酵素免疫分析儀 (SpectraMax M2 Microplate Reader, Molecular Devices) 測量波長 550 nm 的吸光值。以新鮮之 100 μ L 細胞培養液當作空白對照組，未添加黃芩或葛根之細胞當作對照組。
- (iv) IL-6 及 TNF- α 分析：發炎相關細胞因子調節功效測試，分析黃芩與葛根水萃液 (2.5、5 及 10%) 在受到 10.0

$\mu\text{g/mL}$ LPS 活化的巨噬細胞株培養液中，以 ELISA 的方法檢測 IL-6 及 TNF- α 發炎細胞因子之生成量變化 (Yoon *et al.*, 2009)。本試驗採用之 Mouse IL-6 ELISA Max Deluxe Set 與 Mouse TNF- α ELISA Max Deluxe Set 分析試劑套組購買自 BioLegend 公司 (San Diego, California)，使用雙抗體三明治結合的方式，進行酵素連結免疫吸附分析法分析，第二級抗體連結有 Horseradish Peroxidase 酵素，透過 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine 呈色後，以盤式酵素免疫分析儀進行波長 450 nm 吸收光測定，以新鮮之 100 μL 細胞培養液當作空白對照組，未添加黃芩或葛根之細胞當作對照組，濃度參考標準品的呈色比較後，換算樣品中所含 IL-6 與 TNF- α 之濃度。

II. 動物體內試驗及飼養管理

使用荷蘭種仔女牛，飼養在行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所傳統牛舍，選擇 8 週齡左右且體重相近 (約 74 kg) 已斷乳之荷蘭種仔女牛 20 頭，逢機均分為兩組，每頭每天添加 0 g (對照組, $n = 10$) 或 5 g 黃芩葛根粉 (黃芩: 葛根 = 1:1) (試驗組, $n = 10$)。於每天早上提供少量精料時混合其中後餵飼。試驗設計採完全逢機試驗為期 30 天。試驗牛均分別群飼於同一棟牛舍之兩處牛欄 (分別為長 7 m、寬 5 m 及高 1.5 m)，依飼養管理標準作業流程照顧，提供以磨碎玉米為主之精料 (主含磨碎玉米、次為大豆粕、糖蜜、磷酸二鈣、碳酸氫鈉、維生素預混料及礦物預混料) (2 – 4 kg/day/head)，以及百慕達乾草及乾淨飲水則任食。試驗期間記錄每頭仔牛每天排便之糞便分數 (fecal consistency score)，範圍是 1 – 5 分，判定標準為水樣便 1 分、中等水便 2 分及正常糞便 3 分、糞便稍乾硬 4 分、糞便乾硬結塊 5 分 (Cockcroft, 2015)。仔牛生長性能分析為試驗前一天與試驗結束後一天，於上午 10 時於餵飼後測量所有牛隻之體重。紀錄每組牛隻每天之精料與乾草採食量。於試驗前一天與試驗結束後一天下午 3 時進行牛隻採血及血清生化值分析，從牛隻頸靜脈處經 75% 酒精棉擦拭消毒後，以 18 號針頭及無菌真空採血管 (不含任何抗凝血劑)，採集約 9 mL 血液於採血管內，靜置 10 分鐘後，離心 2,000 $\times g$ 、15 分鐘，分離血清於血清瓶中，並保存於 -20°C 的冰箱，直到要進行血清生化值分析時才解凍使用，以血清生化儀 (VITROS Chemistry System DT60 and DTSC, Johnson & Johnson Inc., USA) 根據使用說明方法操作，分析天門冬胺酸轉胺酶 (aspartate aminotransferase, AST)、丙胺酸轉胺酶 (alanine aminotransferase, ALT)、肌酸酐 (creatinine)、尿酸 (uric acid) 與血中尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 濃度，以評估飼糧添加黃芩葛根粉對仔牛之肝與腎功能指數的影響。本試驗所使用之動物均通過行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所實驗動物照護與使用小組 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) 之審核 (同意書編號: 畜試竹動字 107-3)。

III. 統計分析

依試驗所得之數據，以單因子變方分析，並使用一般線性模式程序 (general linear model procedure, GLM)，進行變方分析，再以鄧肯式新多變測定法 (Duncan's new multiple rang test) 比較各組平均值間之差異顯著性 (SAS, 2003)。

結果與討論

I. 體外細胞試驗

利用體外細胞誘發發炎細胞激素之抗發炎活性測試，黃芩粉水萃液及葛根粉水萃液分別以 2.5、5 及 10% 三種不同濃度，進行發炎反應相關之細胞激素生成調節活性測試。分析受發炎刺激的巨噬細胞株培養液中，三種發炎細胞因子之生成量變化，包括 NO、IL-6 及 TNF- α ，結果顯示：

- (i) 黃芩粉水萃液對於受到細菌 LPS 活化的巨噬細胞株，其細胞存活率分析結果顯示，黃芩粉水萃液在本測試之添加濃度 (2.5、5 及 10%) 對巨噬細胞之存活率無顯著影響 (圖 1)。測其抗發炎活性方面，添加 2.5、5 及 10% 之黃芩水萃液皆顯著抑制 NO 及 IL-6 之生成量 (圖 2 及 3)，其中添加 10% 黃芩水萃液組對 NO 與 IL-6 的生成量分別為 52.2 (圖 2) 及 18.4 (圖 3)，相較於 LPS 正對照組極顯著減少 47.8 及 81.6% 的生成量 ($P < 0.001$)。然對 TNF- α 之生成則無下降之效果 (圖 4)。此結果與謝及周 (2012) 報告相似。Gong *et al.* (2018) 研究報告指出，黃芩萃取物中的黃酮類化合物，具抑制誘導 RAW264.7 巨噬細胞中之炎症生成反應。另黃芩在大鼠肺泡巨噬細胞株 (NR8383) 也得到相似之抗發炎作用，黃芩萃取物能抑制 NO、誘導型一氧化氮合成酶 (iNOS) 及核因子活化 B 細胞 κ 輕鏈增強子 (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κB) 等的釋放及表現緩解肺炎之功效 (Chen *et al.*, 2017)。
- (ii) 葛根粉水萃液對於受到細菌 LPS 活化的巨噬細胞株，其細胞存活率分析結果顯示，葛根粉水萃液在本測試之添加濃度 (2.5、5 及 10%) 對巨噬細胞之存活率無顯著影響 (圖 5)。其在抗發炎活性方面，僅可顯著降低

LPS 誘發細胞之 IL-6 之生成量。添加 10% 葛根水萃液對細胞之 IL-6 生成量為 75.9% (圖 7)，相較於 LPS 正對照組明顯減少 24.1% 的生成量 ($P < 0.05$)。對 NO (圖 6) 及 TNF- α (圖 8) 之生成則無抑制效果。

II. 黃芩葛根之動物試驗

飼糧添加黃芩葛根對荷蘭種仔牛乾草採食量、精料採食量及體重之影響如表 1。試驗結果顯示，每日每頭飼糧中添加 5g 黃芩葛根粉 30 天，試驗組之隻日精料採食量及乾草採食量分別為 3.70 ± 0.52 及 0.77 ± 0.18 kg；對照組則為 3.58 ± 0.48 及 0.70 ± 0.19 kg，兩組無顯著差異存在。在隻日增重方面，試驗組為 0.82 ± 0.10 kg；對照組則為 0.73 ± 0.19 kg，兩組無組間差異存在。在仔牛糞便檢測之糞便分數平均，試驗組糞便分數平均 3.2 ± 0.4 ，顯著高於對照組 2.1 ± 0.6 ($P < 0.05$)，顯示試驗組牛隻之下痢比率較少。本試驗在飼糧添加黃芩葛根的用量設計為每日每頭 5 g，從試驗結果顯示未有顯著提升牛隻增重的表現，但能降低仔牛下痢的發生率。Heller and Chigerwe (2017) 的報告指出仔牛下痢的機制有：1. 輪狀病毒 (rotavirus) 及冠狀病毒 (coronavirus) 感染造成消化道吸收下降；2. 滲透壓、分泌及蠕動異常；3. 消化道發炎：腸道通透性增加，提高體液從腸道流失。下痢的結果往往導致仔牛體液和離子不平衡，一旦超過患者所能代償，會出現臨床症狀如虛弱、無力、躺臥、脫水、低血壓、代謝性酸血症及甚至循環衰竭 (休克) 而死亡。黃芩含小檗鹼、黃連素、甲基黃連鹼等多種生物鹼，具有很廣的抗菌範圍，尤其對痢疾桿菌、傷寒桿菌，綠膿桿菌、大腸桿菌、葡萄球菌及溶血性鏈球菌等均有較顯著的抑制作用，能增強白細胞的吞噬能力 (賈及黃，2004)。黃芩的藥理作用包括抗腫瘤，保肝和抗菌作用 (Saralamma *et al.*, 2017)，其所含之黃酮類化合物如黃芩苷、糖苷配基黃芩素及漢黃芩素是主要的生物活性物質。黃芩另具有抑制腸管蠕動等功能 (賈及黃，2004)。在葛根方面，主要含黃酮類物質：大豆素、大豆甙、葛根素、葛根素-7-木糖甙、葛根醇、葛根藤素及異黃酮甙 (賈及黃，2004)。《神農本草經》指出：葛根味甘，性平。主消渴、身大熱、嘔吐及諸痺。有助於治療感冒及腸胃疾病。徐等 (2013) 應用葛根於小鼠腹瀉之止瀉試驗，結果指出葛根可顯著改善小鼠腹瀉之作用。綜上，本試驗組仔牛有較低之下痢分數，推測可能與黃芩葛根內含之抗發炎等活性成分相關。

表 1. 飼糧添加黃芩葛根對荷蘭種仔牛增重、精料、乾草採食量及糞便分數之影響

Table 1. Effects of adding *Scutellaria baicalensis* Georgi and *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi in diet on body weight, intake of concentrate and hay, and fecal consistency score of Holstein female 8-wk-old calves

Items	Control	Treatment ¹
No.	10	10
Initial weight, kg/head	$74.6 \pm 8.1^*$	74.1 ± 8.5
Final weight, kg/head	96.5 ± 14.9	98.7 ± 10.5
Body weight gain, kg/head	21.9 ± 11.1	24.3 ± 5.1
Daily gain, kg/head	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.1
Daily concentrate intake, kg/head	3.6 ± 0.5	3.7 ± 0.5
Daily hay intake, kg/head	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.2
Average fecal consistency score	2.1 ± 0.6^a	3.2 ± 0.4^b

*Mean \pm SD.

¹ Calves received diets with 5 g *Scutellaria baicalensis* Georgi and *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi powder administration (the ratio = 1:1) for 30 days.

^{a, b} Means with the different superscript differ ($P < 0.05$).

飼糧添加黃芩葛根對荷蘭種仔牛血清生化檢測值之影響如表 2。結果顯示，在血清生化指數之肝與腎 (AST、ALT、creatinine、uric acid 及 BUN) 功能方面，對照組 AST、ALT、creatinine、uric acid 及 BUN 試驗前 vs. 試驗後之平均值依序為 42.8 ± 11.5 vs. 43.1 ± 10.1 U/L、 37.3 ± 10.3 vs. 37.0 ± 9.2 U/L、 0.9 ± 0.1 vs. 0.8 ± 0.1 mg/dL、 1.0 ± 0.3 vs. 1.1 ± 0.3 mg/dL 及 6.2 ± 1.4 vs. 5.8 ± 1.2 mg/dL；試驗組 AST、ALT、creatinine、uric acid 及 BUN 試驗前 vs. 試驗後之平均值依序為 42.9 ± 10.8 vs. 40.2 ± 9.5 U/L、 44.3 ± 12.2 vs. 40.1 ± 8.6 U/L、 0.8 ± 0.1 vs. 0.7 ± 0.1 mg/dL、 1.2 ± 0.4 vs. 1.2 ± 0.3 mg/dL 及 5.9 ± 1.6 vs. 5.2 ± 1.2 mg/dL。兩組間無統計上之差異 ($P > 0.05$)，在試驗前與後兩組平均 AST、ALT、creatinine、uric acid 及 BUN 值皆在正常值範圍內 (沈，1987)，顯示餵食黃芩葛根粉牛隻在肝腎功能參考指數上沒有立即的影響。

表 2. 飼糧添加黃芩葛根對荷蘭種仔女牛之血清生化檢測值之影響

Table 2. The effects of addition of *Scutellaria baicalensis* Georgi and *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi on the clinical blood biochemical values of dairy calves

Item	Control (n = 10)		Treatment (n = 10)		Normal range ¹
	Before	After	Before	After	
AST (U/L)*	42.8 ± 11.5**	43.1 ± 10.1	42.9 ± 10.8	40.2 ± 9.5	21 – 100
ALT (U/L)	37.3 ± 10.3	37.0 ± 9.2	44.3 ± 12.2	40.1 ± 8.6	–
Creatinine (mg/dL)	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	< 1.5
Uric acid (mg/dL)	1.0 ± 0.3	1.1 ± 0.3	1.2 ± 0.4	1.2 ± 0.3	< 35
BUN (mg/dL)	6.2 ± 1.4	5.8 ± 1.2	5.9 ± 1.6	5.2 ± 1.2	2.9 – 8.9

* AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; BUN: blood urea nitrogen.

** The data are given as mean ± SD.

¹ 沈永紹。1987。獸醫實驗診斷學提要。

結 論

在 LPS 誘導下的 RAW 264.7 巨噬細胞，添加 2.5、5 或 10% 之黃芩水萃液皆顯著抑制 NO 及 IL-6 的產生，而葛根水萃液在 5 及 10% 的濃度下能抑制 IL-6 的產生。飼糧添加黃芩葛根對荷蘭種仔女牛增重及血清生化肝腎功能指數無顯著影響，但使用的黃芩葛根的仔女牛具較低的糞便分數，對下痢有改善緩解之效，而其作用機制仍須再進行更深入之探討與研究，以臻更完善。

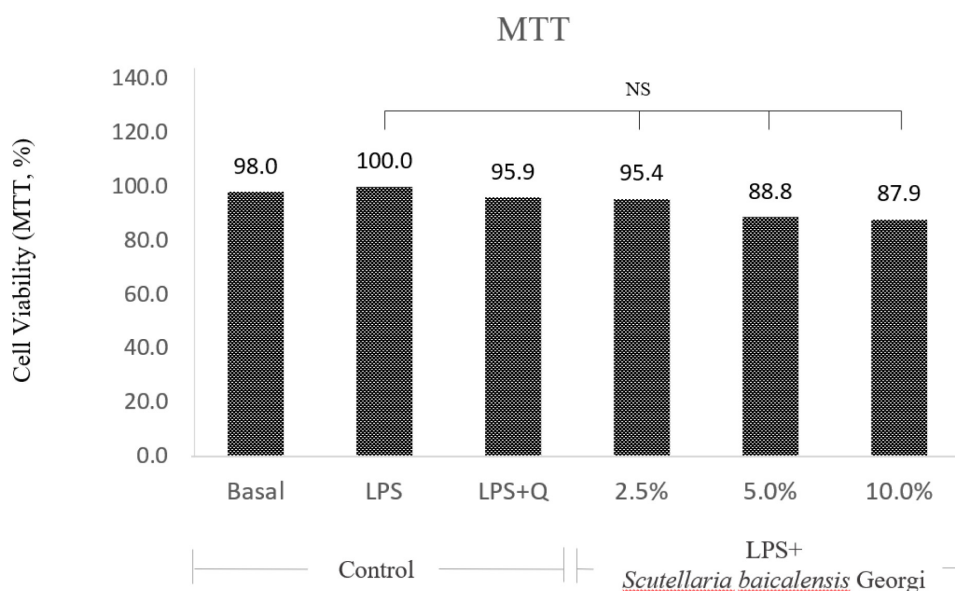


圖 1. 經 LPS (10.0 µg/mL) 處理的巨噬細胞株與黃芩粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 共同培養 24 小時後對細胞存活率的影響。

Basal：空白對照組。

LPS：添加 LPS 但未添加黃芩粉水萃液之細胞當作對照組。

LPS + Q：LPS 與 Quercetin (槲皮素) 共同作用，為抗發炎陽性對照組。

LPS + *Scutellariae baicalensis* Georgi：LPS 與黃芩粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 作用之試驗組。Fig. 1. The macrophage cells were treated by LPS (10.0 µg/mL) and *Scutellaria baicalensis* Georgi (SB) extract with various concentrations 2.5%, 5% and 10% for 24 hours to measure the effect on the cell viability.

Basal was the blank control group.

LPS was the cells with LPS but no SB extract added as the control group.

LPS + Q (Quercetin): an anti-inflammatory positive control group.

LPS + *Scutellaria baicalensis* Georgi: the treatment group of LPS and SB extract (2.5, 5 or 10%).

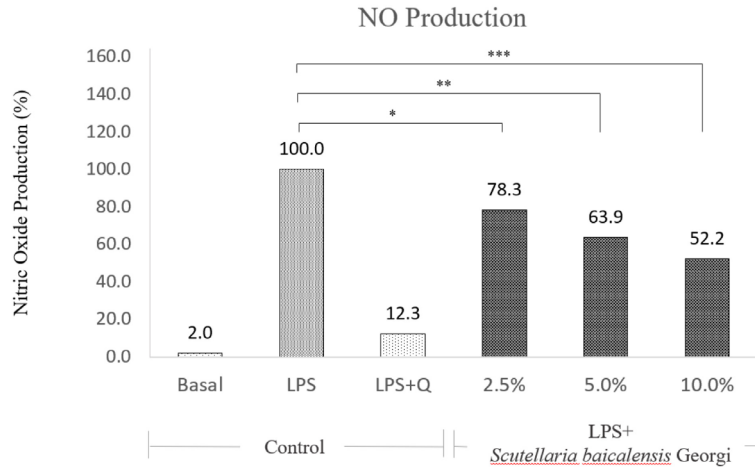


圖 2. 經 LPS (10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 處理的巨噬細胞株與黃芩粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 共同培養 24 小時後對 NO 生成的影響。

Basal：空白對照組。

LPS：添加 LPS 但未添加黃芩粉水萃液之細胞當作對照組。

LPS + Q：LPS 與 Quercetin (槲皮素) 共同作用，為抗發炎陽性對照組。

LPS + *Scutellariae baicalensis* Georgi：LPS 與黃芩粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 作用之試驗組。

Fig. 2. The macrophage cells were treated by LPS (10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and *Scutellaria baicalensis* Georgi (SB) extract with various concentrations 2.5%, 5% and 10% for 24 hours to measure the effect on the amounts of NO.

Basal was the blank control group.

LPS was the cells with LPS but no SB extract added as the control group.

LPS + Q (Quercetin): an anti-inflammatory positive control group.

LPS + *Scutellaria baicalensis* Georgi: the treatment group of LPS and SB extract (2.5, 5 or 10%).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

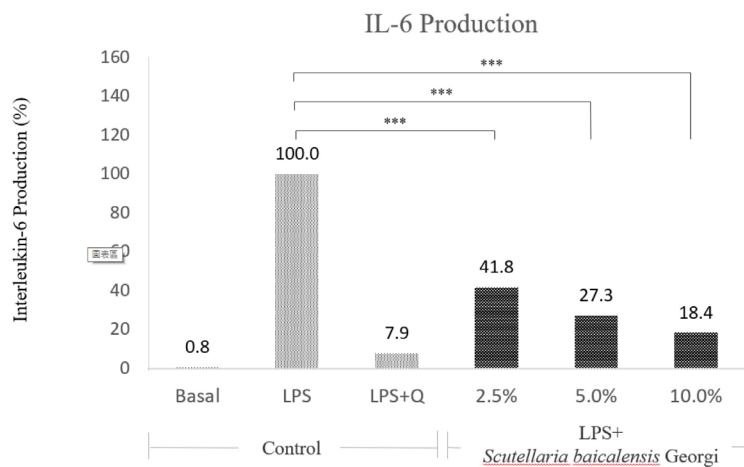


圖 3. 經 LPS (10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 處理的巨噬細胞株與黃芩粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 共同培養 24 小時後對 IL - 6 生成的影響。

Basal：空白對照組。

LPS：添加 LPS 但未添加黃芩粉水萃液之細胞當作對照組。

LPS + Q：LPS 與 Quercetin (槲皮素) 共同作用，為抗發炎陽性對照組。

LPS + *Scutellariae baicalensis* Georgi：LPS 與黃芩粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 作用之試驗組。

Fig. 3. The macrophage cells were treated by LPS (10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and *Scutellaria baicalensis* Georgi (SB) extract with various concentrations 2.5%, 5% and 10% for 24 hours to measure the effect on the amounts of IL-6.

Basal was the blank control group.

LPS was the cells with LPS but no SB extract added as the control group.

LPS + Q (Quercetin): an anti-inflammatory positive control group.

LPS + *Scutellaria baicalensis* Georgi: the treatment group of LPS and SB extract (2.5, 5 or 10%).

*** $P < 0.001$.

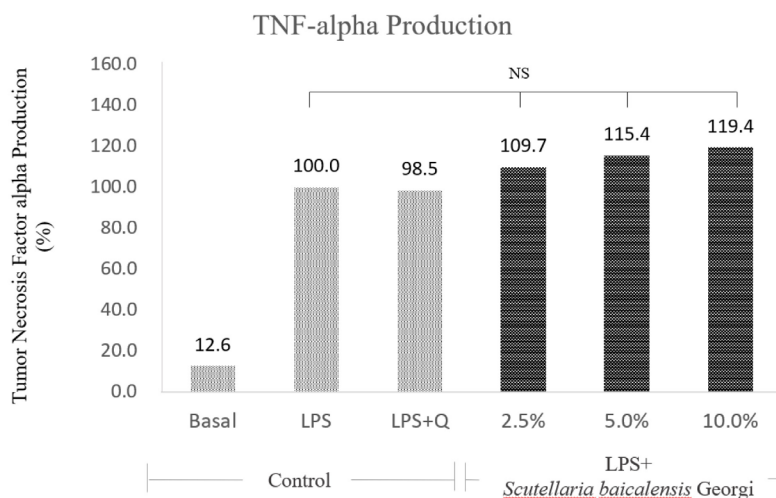


圖 4. 經 LPS (10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 處理的巨噬細胞株與黃芩粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 共同培養 24 小時後對 TNF- α 生成的影響。

Basal：空白對照組。

LPS：添加 LPS 但未添加黃芩粉水萃液之細胞當作對照組。

LPS + Q：LPS 與 Quercetin (槲皮素) 共同作用，為抗發炎陽性對照組。

LPS + *Scutellariae baicalensis* Georgi：LPS 與黃芩粉水萃液 (2.5、5 及 10%) 作用之試驗組。

Fig. 4. The macrophage cells were treated by LPS (10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and *Scutellaria baicalensis* Georgi (SB) extract with various concentrations 2.5%, 5% and 10% for 24 hours to measure the effect on the amounts of TNF- α .

Basal was the blank control group.

LPS was the cells with LPS but no SB extract added as the control group.

LPS + Q (Quercetin): an anti-inflammatory positive control group.

LPS + *Scutellaria baicalensis* Georgi: the treatment group of LPS and SB extract (2.5, 5 or 10%).

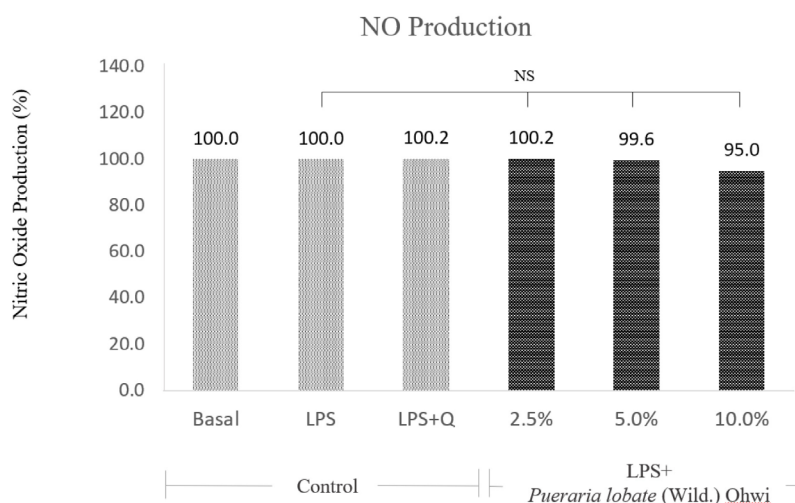


圖 5. 經 LPS (10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 處理的巨噬細胞株與葛根粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 共同培養 24 小時後對細胞存活率的影響。

Basal：空白對照組。

LPS：添加 LPS 但未添加葛根粉水萃液之細胞當作對照組。

LPS + Q：LPS 與 Quercetin (槲皮素) 共同作用，為抗發炎陽性對照組。

LPS + *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi：LPS 與葛根粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 作用之試驗組。

Fig. 5. The macrophage cells were treated by LPS (10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi (PL) extract with various concentrations 2.5%, 5% and 10% for 24 hours to measure the effect on the amounts of cell viability.

Basal was the blank control group.

LPS was the cells with LPS but no PL extract added as the control group.

LPS + Q (Quercetin): an anti-inflammatory positive control group.

LPS + *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi: the treatment group of LPS and PL extract (2.5, 5 or 10%).

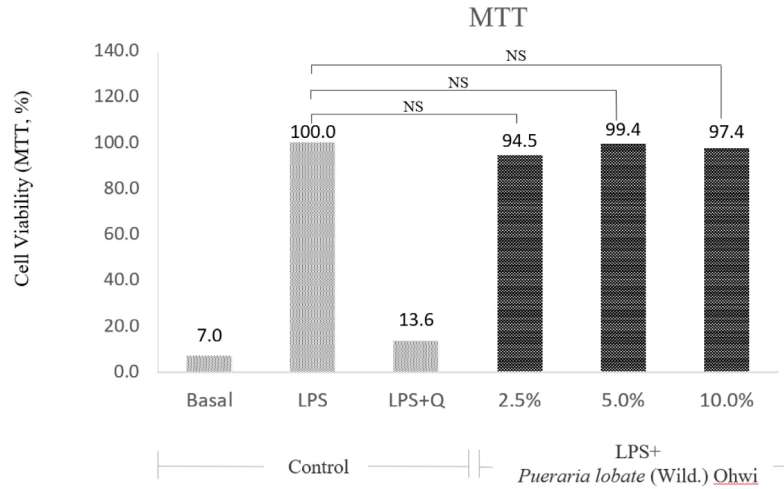


圖 6. 經 LPS (10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 處理的巨噬細胞株與葛根粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 共同培養 24 小時後對 NO 生成的影響。

Basal：空白對照組。

LPS：添加 LPS 但未添加葛根粉水萃液之細胞當作對照組。

LPS + Q：LPS 與 Quercetin (槲皮素) 共同作用，為抗發炎陽性對照組。

LPS + *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi：LPS 與葛根粉水萃液 (2.5%、5% 或 10%) 作用之試驗組。

Fig. 6. The macrophage cells were treated by LPS (10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi (PL) extract with various concentrations 2.5%, 5% and 10% for 24 hours to measure the effect on the amounts of NO.

Basal was the blank control group.

LPS was the cells with LPS but no PL extract added as the control group.

LPS + Q (Quercetin): an anti-inflammatory positive control group.

LPS + *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi: the treatment group of LPS and PL extract (2.5, 5 or 10%).

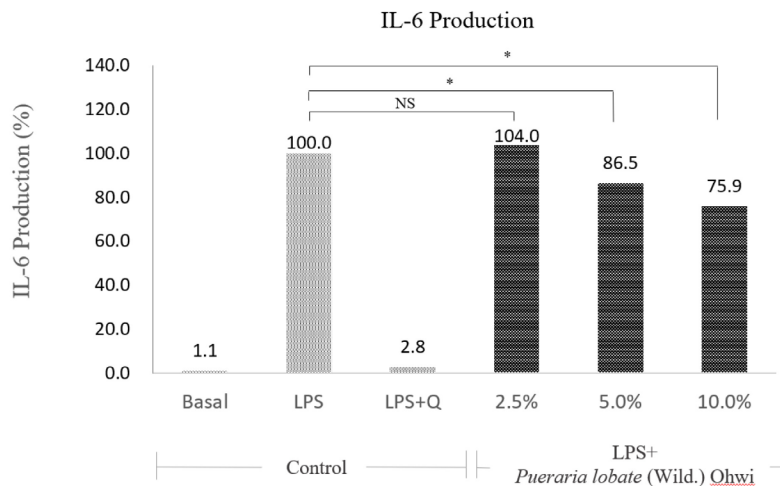


圖 7. 經 LPS (10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 處理的巨噬細胞株與葛根粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 共同培養 24 小時後對 IL - 6 生成與細胞存活率的影響。

Basal：空白對照組。

LPS：添加 LPS 但未添加葛根粉水萃液之細胞當作對照組。

LPS + Q：LPS 與 Quercetin (槲皮素) 共同作用，為抗發炎陽性對照組。

LPS + *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi：為 LPS 與葛根粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 作用之試驗組。

Fig. 7. The macrophage cells were treated by LPS (10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi (PL) extract with various concentrations 2.5%, 5% and 10% for 24 hours to measure the effect on the amounts of IL-6.

Basal was the blank control group.

LPS was the cells with LPS but no PL extract added as the control group.

LPS + Q (Quercetin): an anti-inflammatory positive control group.

LPS + *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi: the treatment group of LPS and PL extract (2.5, 5 or 10%).

* P < 0.05.

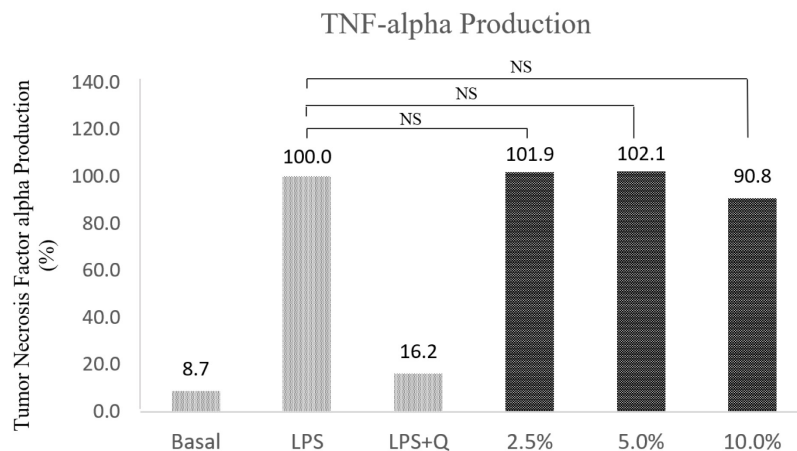


圖 8. 經 LPS (10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 處理的巨噬細胞株與葛根粉水萃液 (2.5、5 或 10%) 共同培養 24 小時後對 TNF- α 生成的影響。

Basal：空白對照組。

LPS：添加 LPS 但未添加葛根粉水萃液之細胞當作對照組。

LPS + Q：LPS 與 Quercetin (槲皮素) 共同作用，為抗發炎陽性對照組。

LPS + *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi：LPS 與葛根粉水萃液 (2.5%、5% 或 10%) 作用之試驗組。

Fig. 8. The macrophage cells were treated by LPS (10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi (PL) extract with various concentrations 2.5%, 5% and 10% for 24 hours to measure the effect on the amounts of TNF- α .

Basal was the blank control group.

LPS was the cells with LPS but no PL extract added as the control group.

LPS + Q (Quercetin): an anti-inflammatory positive control group.

LPS + *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi: the treatment group of LPS and PL extract (2.5, 5 or 10%).

* $P < 0.05$.

誌 謝

本試驗承蒙行政院農業委員會之動物保健計畫 (108 農科 -21.1.2- 畜 -L1(1)) 經費之支持、本分所獸醫團隊及潘有恩同仁之現場牛隻採樣及試驗飼養管理，協助試驗如期完成，特此誌謝。

參考文獻

- 沈永紹。1987。獸醫實驗診斷學提要。華香園出版社，臺北市，pp. 310-311。
- 吳永惠。2002。牛病學。藝軒圖書出版社，臺北，pp. 154-159。
- 黃建璋。2009。評估中藥草作為早期離乳仔豬飼料添加物之效果。臺中，國立中興大學碩士論文。
- 謝明學、周瑞玲。2012。黃芩及其活性成分之抗發炎作用研究。元培學報 19：23-32。
- 徐郁雯、蕭淳方、許靜宜、黃耿侯、邵立珠。2013。葛根功效探討。藥學雜誌 29(3)：16-20。
- 賈敬敦、黃璐琦。2004。獸醫本草。中國醫藥科技出版社，北京，pp. 39-41。
- Abdallah, A., P. Zhang, Q. Zhong, and Z. Sun. 2019. Application of traditional Chinese herbal medicine by-products as dietary feed supplements and antibiotic replacements in animal production. *Curr. Drug Metab.* 20(1): 54-64.
- Chen, Q. Y., C. Q. Wang, Z. W. Yang, Q. Tang, H. R. Tan, X. Wang, and S. Q. Cai. 2017. Differences in anti-inflammatory effects between two specifications of *Scutellariae radix* in LPS-induced macrophages in vitro. *Chin. J. Nat. Med.* 15(7): 515-524.
- Cockcroft, P. D. 2015. *Bovine medicine*. Wiley Blackwell, Singapore, pp. 355-356.
- Gong, G., H. Wang, X. Kong, R. Duan, T. T. X. Dong, and K. W. K. Tsim. 2018. Flavonoids are identified from the extract of *Scutellariae radix* to suppress inflammatory-induced angiogenic responses in cultured RAW264.7 macrophages. *Sci. Rep.* 8(1): 17412-17420.
- Guo, B. J., Z. X. Bian, H. C. Qiu, Y. T. Wang, and Y. Wang Y. 2017. Biological and clinical implications of herbal medicine

- and natural products for the treatment of inflammatory bowel disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1401(1): 37-48.
- Heller, M. C. and M. Chigerwe. 2017. Diagnosis and treatment of infectious enteritis in neonatal and juvenile ruminants. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 34(1): 101-117.
- Hirayama, D., T. Iida, and H. Nakase. 2017. The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 92-98.
- Hur, T. Y., Y. H. Jung, C. Y. Choe, Y. I. Cho, S. J. Kang, H. J. Lee, K. S. Ki, K. S. Baek, and G. H. Suh. 2013. The dairy calf mortality: the causes of calf death during ten years at a large dairy farm in Korea. *Korean J. Vet. Res.* 53: 103-108.
- Jeon, Y. D., J. H. Lee, Y. M. Lee, and D. K. Kim. 2020. *Puerarin* inhibits inflammation and oxidative stress in dextran sulfate sodium-induced colitis mice model. *J. Biopha.* 124: 109847-109858.
- Kao, S. T., C. C. Yeh, C. C. Hsieh, M. D. Yang, M. R. Lee, H. S. Liu, and J. G. Lin. 2001. The Chinese medicine Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang inhibited proliferation of hepatoma cell lines by inducing apoptosis via G0/G1 arrest. *Life Sci.* 69: 1485-1496.
- Li, H. B., Y. Jiang, and F. Chen. 2004. Separation methods used for *Scutellaria baicalensis* active components. *J. Chr. B. Ana. Technol. Biomed. Life Sci.* 812(1): 277-290.
- Østerås, O., M. S. Gjestvang, S. Vatn, and L. Sølvørød. 2007. Perinatal death in production animals in the Nordic countries -incidence and costs. *Acta. Vet. Scand.* 49(1): 14-22.
- Saralamma, V. V. G., H. J. Lee, G. E. Hong, H. S. Park, S. Yumnam, S. Raha, W. S. Lee, E. H. Kim, N. J. Sung, and S. J. Lee. 2017. Korean *Scutellaria baicalensis* Georgi flavonoid extract induces mitochondrially mediated apoptosis in human gastric cancer AGS cells. *Oncol. Lett.* 14: 607-614.
- SAS Institute. 2003. *Statistics User Guide. Version 9.1.* SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Sun, Z. K., H. Q. Yang, and S. Di. 2013. Traditional Chinese medicine: a promising candidate for the treatment of Alzheimer's disease. *Transl. Neurodegener.* 2: 6-12.
- USDA. 2008. *Dairy 2007 Part II: Changes in the U.S. Dairy Cattle industry, 1991-2007.* USDA-APHIS-VS, CEAH, Fort Collins, pp. 57-61.
- Yeh, C. C., S. J. Kao, C. C. Lin, S. D. Wang, C. J. Liu, and S. T. Kao. 2007. The immunomodulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin in vivo and in vitro. *Life Sci.* 80: 1821-1831.
- Yoon, S. B., Y. J. Lee, S. K. Park, H. C. Kim, H. Bae, H. M. Kim, S. G. Ko, H. Y. Choi, M. S. Oh, and W. Park. 2009. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. *J. Ethnopharmacol.* 125(2): 286-290.

The effects of *Scutellaria baicalensis* Georgi and *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi on the anti-inflammatory activity in cultured macrophage cells and on the incidence of diarrhea for Holstein heifer calf⁽¹⁾

Kuo-Hua Lee⁽²⁾ Wen-Hung Lin⁽³⁾ Chun-hsuan Chao⁽²⁾ Tsung-Yi Lin⁽²⁾ and Jih-Yi Chen⁽²⁾⁽⁴⁾

Received: May. 6, 2022; Accepted: Feb. 1, 2023

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the effects of *Scutellaria baicalensis* Georgi (SB) and *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi (PL) on anti-inflammatory activity of cells and on the incidence of calf diarrhea. The in vitro test of cell anti-inflammatory activity was to detect on macrophage cell line (mouse BALB/c macrophage RAW 264.7) treated by the water extracts of SB and PL. The results showed that the 10% SB water extract administration on cells could inhibit the production of nitric oxide (NO) and interleukin-6 (IL-6) by 47.8% and 81.6%, respectively. The tumor necrosis factor- α (TNF- α) was not affected. The 10% PL water extract administration inhibited the production of IL-6 by 24.1% and had no inhibitory effect on NO and TNF- α production. MTT assay showed that 10% concentration of SB and PL water extract administration had no significant effect on the survival rate of macrophages. A total of 20 calves (Holstein heifer) were randomly divided into two groups. Calves received diets with 0 (control group) or 5 g SB and PL powder administration (the ratio = 1:1) (treatment group) for 30 days. At start and end of the experiment, the hay intake, concentrate intake, body weight, fecal consistency score and the blood biochemical parameters were analyzed. The results showed that calves fed with SB and PL powder had a significantly ($P < 0.05$) increased fecal consistency score (3.2 ± 0.4 vs. 2.1 ± 0.6) compared to the control group. However, the hay intake, concentrate intake, body weight, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, creatinine, uric acid and blood urea nitrogen showed no significant difference between control group and treatment group. In conclusion, the 10% concentration of SB and PL water extract administration can inhibit the production of cell inflammatory cytokines. The results suggested the SB and PL could be good dietary supplements to lower the incidence of diarrhea for dairy calves.

Key words: Cytokines, Diarrhea, Holstein heifer calf, *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi, *Scutellaria baicalensis* Georgi.

(1) Contribution No. 2732 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Hsinchu Branch, COA-LRI, Miaoli 36841, Taiwan, R. O. C.

(3) Adjunct Assistant Professor, Department of Oral Hygiene, Jen-Teh Junior College of Medicine, Nursing and Management, Miaoli 35664, Taiwan, R. O. C.

(4) Corresponding author, E-mail: jychen@mail.tlri.gov.tw.