

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

當歸和川芎共同成分阿魏酸對缺血一再灌流損傷腦梗塞大鼠
神經保護機制之研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 96-2320-B-039-017-

執行期間：96年08月01日至97年07月31日

計畫主持人：謝慶良

共同主持人：唐娜櫻、羅婉瑜

計畫參與人員：蒲曉韻

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中國醫藥大學

中華民國九十七年九月二十五日

中文摘要

我們先前的研究結果已知當歸和川芎的共同成分阿魏酸 (*ferulic acid*, FA) 在 Sprague-Dawley (SD) 大鼠能減少缺血-再灌流損傷的腦梗塞面積和減少神經缺損，以及腦缺血後再灌流 2 小時時降低周邊血液及缺血核心的超氧陰離子濃度，同時降低紋狀體 (striatum) 缺血核心區的 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) 表現；此外，FA 也能在腦缺血後再灌流 24 小時時降低皮質梗塞核心區 nuclear factor- κ B (NF- κ B)、ICAM-1 及 myeloperoxidase (MPO) 表現。因此，本研究的目的是探討 FA 於缺血後再灌流期之時間與空間的神經保護作用。利用管腔內縫合技術將 Sprague-Dawley (SD) 大鼠的中大腦動脈暫時阻塞。缺血 90 分鐘後，分別於再灌流 2 小時、10 小時、24 小時和 36 小時時將大鼠犧牲。再灌流 2 小時時利用半定量 RT-PCR 法測量 ICAM-1 和 macrophage-1 antigen (Mac-1) mRNA 的濃度。再灌流 2 小時、10 小時、24 小時和 36 小時時測量 Mac-1、8-hydroxy- 2'-deoxyguanosine (8-OHdG)、4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE)、TUNEL、active caspase 3 和 NeuN 染色陽性細胞。結果顯示於再灌流 2 小時時，FA (100 mg/kg, iv.) 抑制紋狀體 ICAM-1 和 macrophage-1 antigen (Mac-1) mRNA 的表現；於再灌流 10 小時、24 小時和 36 小時時，FA 減少缺血核心和其邊緣區 Mac-1、4-HNE 和 8-OHdG 免疫染色陽性細胞；於再灌流 10 小時時，FA 也能抑制缺血周邊半陰影區 TUNEL 陽性細胞，以及於再灌流 24 和 36 小時時 FA 抑制缺血核心和邊界區的 TUNEL 陽性細胞；於再灌流 10 小時時，FA 減少缺血周邊半陰影區 active caspase 3 的增加，以及於再灌流 36 小時時保存缺血核心及其周邊半陰影區的 NeuN-labeled 神經細胞。

結論是 FA 減少 ICAM-1 mRNA 和 microglia/macrophages，接著調降炎症反應所引發之氧化損傷及以氧化損傷所致發之 apoptosis，如此推測 FA 在缺血-再灌流損傷大鼠是經由 ICAM-1 mRNA 的抑制提供神經保護作用。

關鍵詞：*Ferulic acid*; Intercellular adhesion molecule-1 mRNA; Macrophage-1 antigen mRNA; 8-hydroxy- 2'- deoxyguanosine; 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE); Apoptosis

Abstract

Our previous studies have known that *ferulic acid* (FA), a common component of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels (AS) and *Ligusticum chuanxiong* Hort., (LC) can reduce cerebral infarction volume and neurological deficit induced by ischemia-reperfusion injured in Sprague-Dawley (SD) rats. FA also can reduce superoxide anion of ischemic core area, and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the ischemic core of striatum at 2 h after reperfusion. In addition, FA reduced nuclear factor- κ B (NF- κ B), ICAM-1 and myeloperoxidase (MPO) expression in the ischemic core of cortex at 24 h after reperfusion. Therefore, the aim of this study was to investigate the temporal and spatial neuroprotection of FA during reperfusion period after cerebral ischemia. Rats were underwent transient MCA occlusion with intraluminal suture technique. After 90 min ischemia, rats were subjected reperfusion and sacrificed at 2, 10, 24 and 36 h of reperfusion. ICAM-1 and macrophage-1 antigen (Mac-1) mRNA were detected using semi-quantitative RT-PCR at 2 h of reperfusion. Mac-1, 8-hydroxy- 2'- deoxyguanosine (8-OHdG), 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), TUNEL cells, active caspase 3 and NeuN were measured at 2, 10, 24 and 36 h of reperfusion. The Results indicated that FA (100 mg/kg, iv.) inhibited ICAM-1 and Mac-1 mRNA expression in the striatum at 2 h of reperfusion, and reduced the performance of Mac-1, 4-HNE and 8-OHdG immunoreactive cells in the ischemic rim and core at 10, 24 and 36 h of reperfusion. FA also decreased TUNEL positive cells firstly in the penumbra area at 10 h and later in ischemic boundary and core areas at 24 and 36 h of reperfusion. Additionally, FA curtailed active caspase 3 enhancement in the penumbra area at 10 h and restored NeuN-labeled neurons in the penumbra and core areas at 36 h after reperfusion.

In conclusion, FA decreased ICAM-1 mRNA and microglia/macrophages performance, and also down-regulated oxidative stress-induced apoptosis, suggesting that FA mediated via inhibition of ICAM-1 mRNA to provide neuroprotection in ischemia-reperfusion injured rats.

Keywords: *Ferulic acid*; Intercellular adhesion molecule-1 mRNA; Macrophage-1 antigen mRNA; Deoxyguanosine (8-OHdG); 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE); Apoptosis.

一、前言

當歸和川芎兩者都是常用的活血化癥中藥，根據中醫理論不論是梗塞型或出血型腦中風其發病原因都與血癥有密切關係，因此自清朝王清任的《醫林改錯》出世以來（王清任 1995），活血化癥方藥治療腦中風已成為主流。川芎和當歸組成芎歸湯，根據醫方集解能治療產後血虛，頭痛，胎動下血（汪訥庵 1999），現代研究已知當歸和川芎兩者都含有阿魏酸（*ferulic acid*, FA）（陳可冀和歐興長 1995）。我們的實驗室先前的研究結果已知 FA 80mg/kg 和 100 mg/kg 能減少大鼠缺血-再灌注損傷的腦梗塞面積和神經缺損。FA 於缺血後，再灌注 2 小時時會同時降低周邊血液和腦缺血區的超氧陰離子（superoxide anions）濃度，以及降低紋狀體（striatum）缺血區黏附因子 intercellular adhesion molecule-1（ICAM-1）的表現；此外，FA 於腦缺血後，再灌注 24 小時時能抑制 nuclear-factor- κ B（NF- κ B）、ICAM-1 及 myeloperoxidase（MPO）等的表現（Cheng et al., in press）。由於 ICAM-1 在仲介白血球-內皮細胞的黏附（leucocyte-endothelial adhesion），促進白血球從微血管移動進入腦缺血區扮演一個極為重要的角色（Connolly et al., 1996; Zhang et al., 1999a; Xu and Feng 2000），而 anti-ICAM-1 抗體抑制白血球的浸潤（infiltration）減少中大腦動脈阻塞大鼠的腦梗塞面積（Zhang et al., 1995b; Vemuganti et al., 2004），因此推論 FA 減少腦梗塞面積與 ICAM-1 有密切關係。MPO 是白血球浸潤缺血核心區的一個標記（Connolly et al., 1996; Zhang et al., 1995a; Xu and Feng 2000）。NF- κ B 是 pro-inflammatory cytokine tumor necrosis- α （TNF- α ）和 interleukin-1 β （IL-1 β ）的上游，因此推論 FA 減少腦梗塞面積和神經缺損與其抑制 ICAM-1 和 NF- κ B 扮演一個抗炎作用（anti-inflammatory action）有關。

有研究報告指出超氧陰離子可於細胞膜雙脂層（lipid bilayer）過氧化花生四烯酸（arachidonic acid）形成 4-hydroxynonenal（4-HNE），是脂質過氧化之損傷標記。超氧陰離子氧化損傷細胞核 DNA，形成 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine（8-OHdG），是 DNA 氧化損傷的標記與細胞的 apoptosis 有關（Zhang et al., 2005; Hayashi et al., 2005; Nagotani et al., 2005）。許多的研究發現中大腦動脈阻塞後再灌注 3 小時時，在梗塞核心區有 4-HNE 及 8-OHdG 的表現，而這種表現持續至再灌注 7 天（Miyamoto et al., 2003; Hwang et al., 2004; Zhang et al., 2005; Hayashi et al., 2005; Nagotani et al., 2005）。另外，腦中風後炎症反應的細胞激素（cytokine）有 TNF- α 、IL-1 β 及 interferon- γ （IFN- γ ），這些細胞激素會進一步誘發 ICAM-1 於血管內皮細胞大量表現（Dustin et al., 1986; Sobel et al., 1990; Wellicome et al., 1990; Wang et al., 1994; Yang et al., 1999; Ding et al., 2003）。ICAM-1 誘發血管中活化白血球黏附、滲透及遷移至梗塞核心區，並於再灌注期間促進腦損傷區更加的惡化。探討有關時間點表現差異的研究發現 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 及 ICAM-1 之 mRNA 的表現在缺血後 3 小時即顯著增加（Wang et al., 1994; Yang et al., 1999; Wang et al., 2001; Berti et al., 2002; Zhu et al., 2006）。NF- κ B 為炎症轉錄因子，可為 IL-1 β 及 TNF- α 所誘發，而 NF- κ B 又可回過頭來轉錄 IL-1 β 及 TNF- α 之基因，彼此之間形成一正回饋關係，而擴大了腦中風後之炎症反應（Berti et al., 2002）。

二、研究目的

本研究延續我們先前的研究，進一步探討 FA 減少缺血-再灌注損傷腦梗塞的神經保護機制。我們觀察缺血-再灌注時缺血周邊和中心區之 FA 抗 microglia/macrophages，氧化損傷（oxygen stress），以及氧化損傷相關細胞凋亡（oxygen stress-related apoptosis）。

三、研究方法

(一) 動物與研究藥物

本研究採用 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠，體重介於 300-350 克之間，購置於樂斯科動物科技股份有限公司，飼養於中國醫藥大學動物中心。所有大鼠於實驗前一天均禁食，但可自由飲水，整個實驗過程有關動物使用的處理都經過中國醫藥大學動物中心委員會審查通過，所有實驗過程完全遵照中國醫藥大學動物倫理委員會規範進行。

本研究使用 *ferulic acid* 購置於美國 (USA) Sigma 公司。

(二) 缺血-再灌流損傷腦梗塞動物模型的建立：an intra-luminal suture method (Zea-Longa et al., 1989).

首先將 300-350 克之雄性 SD 大鼠，稱重、測直腸溫度後，以氯合水醛 (chloral hydrate, 400mg/kg) 及 atropine (0.1ml) 腹腔注射將大鼠麻醉，之後將大鼠的頭部固定於立體固定儀上，用手術刀片橫切頭部皮膚使暴露出顱骨窗門。在窗門後 2.0 mm、側邊 2.5 mm 兩側處進行磨骨 (直徑 3 mm，深度 0.5 mm)，使頭蓋骨變薄可清楚看見大鼠的腦組織後，將雷射血流監視器 (Laser Doppler Blood-Flow Monitor, DRT4, Moor instrument Ltd., England) 放置於頭蓋骨上監測中大腦動脈區的血液灌流量 (正常 > 500 min/div)。

其次，將大鼠仰臥，用剪刀除去大鼠右鼠蹊部毛髮，並剪開皮膚長約 2.5 公分，分離出右股動脈及股靜脈。之後將充滿 heparin (25 U/ml) 的 PE-50 管插入股動脈中，而 PE-50 管另一端接心跳血壓測量儀 (0093-101L, BP-2, columbus, Ohio, USA)，監測大鼠的心率和血壓。另外，用一條 PE-50 管插入股靜脈中，而另一端作為注射藥物用。接著用手術刀片從大鼠頸部中線切開常約 1.5 cm，暴露氣管並尋得右頸總動脈，分離頸總動脈和迷走神經。以細絲線綁緊外頸動脈遠側端及內頸動脈分支翼顎動脈 (ptergopalatine)，然後以動脈夾暫時阻斷頸總動脈及內頸動脈血流。於外頸動脈遠側端及頸總動脈分叉處之間剪開一個半切口，將表面沾有 poly-L-lysine (Sigma, USA) 的 3-0 尼龍縫線 (線頭燒鈍) 放入，再以 6-0 細絲縫線 (silk suture) 活套綁住半切口。將 3-0 尼龍縫線經由頸總動脈分叉處插入內頸動脈 1.8~2.2 cm，完全阻斷右中大腦動脈源頭。接著將活套綁緊，此時雷射血流監視器中大腦動脈灌流區的血液灌流量的標記下降至 100 min/div 以下，則確定腦缺血模型 (阻斷中大腦動脈血流) 成功。中大腦動脈血流阻斷 90 分鐘後，將 3-0 尼龍縫線取出進行再灌流 (再灌流)。本實驗於中大腦動脈血流阻斷前、阻斷 90 分鐘時，及再灌流 10 分鐘時分別記錄心跳、血壓，並抽取 0.3ml 動脈血測量血糖、血液氣體分析 (pH、PaO₂、PaCO₂) 及全血計數。整個實驗過程都以電熱毯加熱，維持大鼠肛溫介於 36.5~37.5°C 之間。

(三) 動物分組

將 SD 大鼠隨機分為三組如下：

1. 假手術組 (sham group)：暴露出大鼠的頸總動脈，但不阻斷血流。
2. 控制組 (control group)：阻斷大鼠右中大腦動脈血流 90 分鐘，之後再灌流。
3. 治療組 (FA group)：方法同控制組，但於右中大腦動脈血流阻斷的同時從股靜脈注射 FA 100 mg/kg。

本研究分別於再灌流 2 小時 (n=6)、10 小時 (n=5)、24 小時 (n=6) 和 36 小時 (n=3) 時將動物犧牲取腦，並做成切片。

(四) 反轉錄聚合酶鏈式反應之準備及 RNA (ribonucleic acid) 的抽取

阻斷右中大腦動脈血流 90 分鐘後，再灌流 2 小時 (n=4) 時用氯合水醛 (400mg/kg) 在大鼠腹腔注射，待大鼠麻醉後以生理食鹽水經心臟灌流後，迅速取腦，切取腦窗門前 1.7

mm 至腦窗門後 4.3mm 之間腦組織，並將左右腦切開，分別取出紋狀體和皮質區域的腦組織。取 0.06~0.1g 之腦組織置入 0.8ml 之 solution D (4M Guanidinium thiocyanate, 25mM Sodium citrate, 0.5% Sodium lauryl sarcosinate) 中。將腦組織均質 (homogenized)，再依序加入 60 μ l 2M NaOAc (pH 4.0)，600 μ l water-saturated phenol (pH 4.0) 及 120 μ l chloroform/isoamyl alcohol (49:1)，置於冰上 15 分鐘，每 5 分鐘手搖混合 15 秒。然後以 14000 \times g 4 $^{\circ}$ C 下離心 20 分鐘，取上清液。加入等量 ice-cold isopropanol，混合均勻，置於 -80 $^{\circ}$ C 冰箱至少 15 分鐘。之後以 14000 \times g 4 $^{\circ}$ C 下離心 15 分鐘，將上清液去除，再以 1ml 之 ice-cold 75% ethanol 溶解 RNA 團塊。以 14000 \times g 4 $^{\circ}$ C 下離心 5 分鐘，去除上清液，再以濃縮乾燥機 (Speed Vac) 乾燥。最後加入 50 μ l 之 RNase-free DDW，水浴 65 $^{\circ}$ C 5 分鐘。

(五) ICAM-1 mRNA 和 Mac-1 mRNA 表現之測量

以 1 μ g RNA 當模板，加入 0.5 μ g/ μ l oligo(dT)₁₆ primer 及 10mM dNTPs，水浴 65 $^{\circ}$ C 5 分鐘，然後置於冰上 5 分鐘。加入 5 \times First-stand buffer、0.1M DTT、40U/ μ l RNasin 及 Superscript III，水浴 55 $^{\circ}$ C 1 小時，接著水浴 70 $^{\circ}$ C 15 分鐘進行反轉錄。組合成之互補 DNA 貯存於 -80 $^{\circ}$ C 冰箱備用。IL-1 β 正向引子為 5'-CACCTTCTTTTCCTTCATCTTTG-3'，而逆向引子為 5'-GTCGTTGCTTGTGTCTCCTTGTA-3' (Zhai et al., 1997)；TNF- α 正向引子為 5'-GTAGCCACGTCGTAGCAAAC-3'，逆向引子為 5'-TGTGGGTGAGGAGCACATAGTC-3' (Zhai et al., 1997)；ICAM-1 正向引子為 5'-AGACACAAGCAAGAGAAGAA-3'，而逆向引子為 5'-GA GAAGCCCAAACCCGTATG-3' (Kawai et al., 2000) (TaqMan)。GAPDH 為本實驗之內控制組，GAPDH 之正向引子為 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'，而逆向引子為 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。將 10 mM dNTPs、10 \times PCR buffer、25mM MgCl₂、5 U/ μ l Taq 及 IL-1 β 正反向引子(或 TNF- α 或 ICAM-1 正反向引子)加入內含 1 μ l cDNA 之聚合酶鏈式反應(PCR)混合試劑中(25 μ l)。94 $^{\circ}$ C 下進行變性(denaturing)1 分鐘，55 $^{\circ}$ C 下進行緩冷配對 (annealing) 1 分鐘，72 $^{\circ}$ C 下進行鏈伸展(extension)2 分鐘，共 33 或 35 循環，及最後 72 $^{\circ}$ C 下進行鏈伸展 6 分鐘，擴增 IL-1 β (TNF- α 及 ICAM-1)之 DNA 產量。PCR 產物於 2%之 agarose gel 進行電泳，並以 1-kb 梯狀 DNA 當標準(Gibco, BRL)，最後 DNA 以 ethidium bromide 染色呈現。

(六) 免疫組織化學分析染色 (immunohistochemistry stain, IHC)

大鼠於阻斷中大腦動脈血流 90 分鐘後，再灌流 2 小時、10 小時、24 小時和 36 小時時，用氫合水醛 (400mg/kg) 在大鼠腹腔注射，待大鼠麻醉後迅速以 200 ml 生理食鹽水進行心臟灌流，待大鼠腦部血液洗淨後，再以 4% paraformaldehyde (MERCK, Germany) 200 ml 經心臟灌流固定腦組織約 10 分鐘，待大鼠兩前肢都呈現僵硬時取腦。將鼠腦再度置入裝滿 4% paraformaldehyde 之大試管內，4 $^{\circ}$ C 下靜置 5~6 天，待固定完全後將 4% paraformaldehyde 倒除，換裝 30% Sucrose (GERBU, Biotechnik GmbH D-69251, Gaiberg) 4 $^{\circ}$ C 下四天，待鼠腦沉入試管底後取出鼠腦，放入腦切盒冠切，選取腦窗門前 1.00 mm、兩耳間 10.00 mm 處至腦窗門後 4.30 mm、兩耳間前 4.70 mm 處之腦組織，將冠狀切選取之腦組織以前上後下方位置入由鋁薄紙做成之小圓盒中，以組織包埋劑 (TRIANGLE BIOMEDICAL SCIENCES Durham, N.C.) 包埋。將冰存之鼠腦取出至冷凍切片機 (SHANDDN SCIENTIFIC Ltd., UK) 進行厚度 15 μ m 之冠切片，並將切片平鋪於 gelatin coated 之玻片上。將切片置於 37 $^{\circ}$ C 恆溫箱中 10 分鐘 (以去除水份)，將烘乾之玻片置入玻片架再放至染缸中內裝有 1 \times DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, Sigma) 潤濕。將玻片架放入內裝有 0.3% H₂O₂/methanol 之染缸中 15 分鐘 (以去除內生性之 peroxidase)，再次以 1 \times DPBS 清洗，將玻片擦拭後平放

於染色盒上以 10% 正常動物血清 (10% normal animal serum, LsABkit, Zymed, San Francisco, CA) 室溫下共同培養 20 分鐘，再加入欲偵測之初級抗體培養 30 分鐘，然後玻片放回染缸以 DPBS 清洗三次，每次三分鐘。隨後玻片稍擦拭平放於染色盒加入 biotinylated 二級抗體培養室溫下 10 分鐘，重覆上述步驟再加入 LS-AB-peroxidase complex 培養 10 分鐘，與 DAB (Liquid DAB substrate kit, Zymed, San Francisco, CA, USA) 呈色反應一分鐘，以水清洗終止反應。最後以 hematoxylin (HARRIS hematoxylin solution, MERCK, Germany) 做背影染色 (counter stain)，以拭鏡紙壓乾，再以封片膠 (histological mounting medium, Permount SP15-500, New Jersey, USA) 封片。將染色封片完成之玻片置於顯微鏡 (Olympus BX50F4, Japan) 定距，以 400x 拍照，以 optica imagine 電腦圖像處理及分析照像，於 400x 下固定位置 (皮質及紋狀體之缺血或梗塞核心區)、固定面積 (1 mm²) 進行觀察免疫染色陽性細胞。

觀察 Mac-1 免疫染色陽性細胞，加入一抗 Mac-1 (1:200, Chemicon) 於室溫下培養 1 小時，最後 DAB 呈色時間為 3 分鐘；觀察 4-HNE 免疫染色陽性細胞，則加入一抗 4-HNE (1:400; MHN-20, JICA, Shizuoka, Japan) 於 4°C 下培養 24 小時，最後 DAB 呈色時間為 3 分鐘；觀察 8-OHdG 免疫染色陽性細胞，則加入一抗 8-OHdG (1:100; MOG-20, JICA) 於 4°C 下培養 24 小時，最後 DAB 呈色時間為 3 分鐘。本研究免疫染色陽性細胞數值以 counts/1 mm² 表示。

(七) Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) assay

TUNEL assay was used to identify cells with nuclear DNA fragmentation in the penumbra and ischemic core areas. TUNEL stain was subjected according to the manufacturer's instructions (Calbiochem). Briefly, adjacent brain sections from 2, 10, 24 and 36 h of reperfusion time points were incubated with 20 ug/ml proteinase K for 20 min at RT and rinsed with TBS with 1×TdT equilibration buffer for 30 min at RT, then was incubated with TdT labeling reaction for 1.5 h at 37°C. After addition of stop solution and blocking buffer, sections were incubated with 1×conjugate solution for 30 min at RT and TUNEL positive cells were visualized with a DAB kit. Finally, sections were counterstained with methyl green.

(八) IHC 雙重染色 (double stain)

Brain sections that had been subjected to single staining of active caspase 3 were incubated with diluted normal blocking serum (Vector) for 25 min at RT. Sections were incubated with mouse anti-NeuN (1:200 dilution, Chemicon) for 1.5 h at 37°C and washed with DPBS. After incubation with diluted biotinylated secondary antibody and ABC-AP reagent (AK-5002, Vectastain), sections were stained with alkaline phosphatase substrate solution (SK-5300, Vector Blue), dried and mounted with mounting media (Assistant-Histokitt, Germany). Finally, the immunoreactive cells were detected under a microscopy (Axioskop 40, Zeiss). The negative control stain was subjected to the same IHC double assay on the adjacent section in the control without active caspase 3 and NeuN antibodies.

(九) 統計分析

實驗結果以平均值±標準差表示 (mean±SD)，以單因子變異數分析 (ANOVA) 之 Scheffe's test 檢定比較各組差異，本研究當 $p < 0.05$ 則認為有統計意義。

四、結果和討論

1. ICAM- and Mac-1 mRNA 在缺血後再灌流二小時時的表現

ICAM-1 mRNA 在皮質缺血區的表現假手術組、控制組和 FA 組，三組之間的表現沒有統計上的意義差 ($p > 0.05$)。控制組在紋狀體 (striatum) 缺血區域同側的 ICAM-1 mRNA 表現增加，而 FA 治療能減少這些增加 ($p < 0.05$)。另外，控制組於缺血同側 ICAM-1 mRNA 的表現比對側高 ($p < 0.05$)。

Mac-1 mRNA 表現與 ICAM-1 mRNA 表現相似，於皮質缺血區域的 Mac-1 mRNA 表現假手術組、控制組和 FA 組，三組之間沒有統計上的意義差 ($p > 0.05$)。同側紋狀體缺血區的 Mac-1 mRNA 表現，假手術組和控制組兩者之間沒有顯著差異 ($p > 0.05$)，而 FA 組的 Mac-1 mRNA 表現低於控制組 ($P < 0.05$)。在缺血區的 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表現於 FA 組和控制組，兩者之間沒有顯著差異 ($P > 0.05$)。

2. 缺血後再灌流 2 小時、10 小時、24 小時和 36 小時時，Mac-1、4-HNE 和 8-OHdG 免疫染色陽性細胞

於缺血後再灌流 2 小時時，假手術組、控制組和 FA 組於皮質和紋狀體的缺血核心 (ischemic core) 和周邊半陰影區 (pneumbra) 的 Mac-1 免疫染色陽性都很少，而控制組和 FA 組於缺血後再灌流 10 小時、24 小時和 36 小時時 Mac-1 ameboid cells 比假手術組明顯增加 ($p < 0.01$)。FA 組的 Mac-1 免疫染色陽性細胞比控制組低 ($p < 0.05$)。

於缺血區的邊緣和核心區，在缺血後再灌流 2 小時時 4-HNE 陽性細胞無論是假手術組、控制組以及 FA 組都幾乎不被發現，而 FA 和控制組於缺血後再灌流 10 小時、24 小時和 36 小時時 4-HNE 陽性細胞與假手術組相較有明顯增加 ($p < 0.01$)，但 FA 組的 4-HNE 陽性細胞比控制組少 ($p < 0.05$)。

於缺血區的邊緣和核心區，在缺血後再灌流 2 小時時 8-OHdG 陽性細胞無論是假手術組、控制組和 FA 組都幾乎不被發現，而 FA 和控制組於缺血後再灌流 10 小時、24 小時和 36 小時時 8-OHdG 陽性細胞與假手術組相較有明顯增加 ($p < 0.01$)，但 FA 組的 8-OHdG 陽性細胞比控制組少 ($p < 0.05$)。

3. TUNEL 染色陽性細胞在缺血後再灌流 2 小時、10 小時、24 小時和 36 小時時的表現

於缺血後再灌流 2 小時時，假手術組、控制組和 FA 組於皮質和紋狀體的缺血區域的 TUNEL 染色陽性都很少，而控制組和 FA 組缺血周邊的半陰影區於缺血後再灌流 10 小時、24 小時和 36 小時時 TUNEL 染色陽性細胞比假手術組明顯增加 ($p < 0.01$)，而 FA 組的 TUNEL 染色陽性細胞比控制組低 ($p < 0.05$)。於缺血後再灌流 24 小時和 36 小時時，在 FA 和控制組缺血核心區的 TUNEL 陽性細胞比假手術組多 ($p < 0.01$)，但 FA 組的 TUNEL 染色陽性細胞比控制少 ($p < 0.05$)。

4. Active caspase 3 和 active caspase 3-NeuN 於缺血後再灌流 10 小時時的表現

Active caspase 3-labeled cells 於缺血後再灌流 10 小時時，FA 組和控制組比假手術組有明顯增加 ($p < 0.01$)。在缺血後再灌流 10 小時時，Active caspase 3-labeled cells 在缺血區域周邊半陰影區的數目 FA 組比控制組呈現有意義的減少 ($p < 0.05$)。我們發現在假手術組有許多 NeuN-labeled cells 表現。Active caspase 3-labeled cells co-localizing with NeuN stain 在 FA 組和控制組的表現分佈和 Active caspase 3-labeled cells 相似。

5. NeuN-labeled cells 在缺血後再灌流 36 小時時的表現

在假手術組，全腦區域都可觀察到豐富的 NeuN-labeled cells。缺血的神經細胞其形狀呈現皺縮和三角狀。控制組缺血周邊半陰影區的 NeuN-labeled neurons 明顯的比假手術組減少 ($p < 0.01$)，而 FA 組的 NeuN-labeled neurons 比控制組多 ($p < 0.05$)。FA 組和控制組梗塞核心區的 NeuN antigenicity 比假手術組減少 ($p < 0.01$)，而 FA 組的

NeuN-labeled neurons 數目比控制組多 ($p < 0.05$)。

我們的研究結果顯示在缺血後再灌流 2 小時時 ICAM-1 mRNA 在紋狀體缺血區的表現增加，這個增加能被 FA 100 mg/kg 治療減少。另外，FA 也同時減少 Mac-1 mRNA 的表現，我們的結果與暫時性中大腦動脈阻塞動物模型顯示 ICAM-1 mRNA 在缺血後再灌流 1~4 小時顯著增加的報告一致 (Liu et al., 2001; Storini et al., 2005; Khan et al., 2007)。缺血後再灌流損傷，ICAM-1 的活化可以引發循環中的白血球橫過微血管內皮進入損傷的腦區而激起發炎反應 (Kapadia et al., 2006)。許多研究報告已指出於再灌流的早期抑制 ICAM-1 mRNA 就能抑制動員(recruit leucocyte)的白血球進入缺血的腦實質區 (Liu et al., 2001; Storini et al., 2005; Wang et al., 2006)。Mac-1 免疫染色陽性細胞是 microglia / macrophages 的標記，因此推論 FA 於再灌流 10~36 小時減少缺血核心和其周邊半陰影區的 Mac-1 免疫染色陽性細胞導因於 ICAM-1 mRNA 的抑制。ICAM-1 可以仲介著發炎反應促進 recruit leucocyte 產生活化氧族群 (reactive oxygen species, ROS) (Vemugant et al., 2004)。

當再灌流時 ROS 損傷神經細胞形成 4-HNE 和 8-OHdG 的副產物，這些副產物在缺血後再灌流的 3 小時出現而持續到 72 小時 (Hayashi et al., 1999; Nagayama et al., 2000; Gordon et al., 2005; Lee et al., 2005; Wang et al., 2005)。本研究顯示在缺血後再灌流的 10~36 小時，於皮質和紋狀體缺血核心和其周邊半陰影區之 activated microglia/macrophage 和氧化損傷 (oxygen stress) 標記物 4-HNE 和 8-OHdG 增加，而 FA 治療能減少這些增加，說明 FA 能對抗發炎所誘發氧化損傷。

TUNEL 染色陽性細胞代表細胞凋亡 (apoptosis)。本研究的結果顯示再灌流 10 小時時缺血周邊半陰影區的 apoptosis 增加，以及於再灌流 24~36 小時時缺血核心和邊緣區的 apoptosis 大量增加，這個結果與一些先前的研究報告一致 (Yamada et al., 1999; Hu et al., 2002)。一些研究報告發現當缺血後再灌流期自由基 (free radicals) 攻擊細胞成分加重氧化損傷所誘發的 apoptosis (Sakurai et al., 2003; Xia et al., 2004, 2006)。又強力的抗氧化劑有神經保護作用能減少缺血後再灌流損傷所引發的 apoptosis (Miyamoto et al., 2003; Khan et al., 2004; Wang et al., 2005)。FA 治療減少再灌流開始 10 小時時梗塞周邊的 4-HNE and 8-OHdG 以及 apoptosis，之後擴展至再灌流 24~36 小時皮質和紋狀體之缺血核心區。

有研究指出腦缺血傷害之 4-HNE 或 8-OHdG 誘發的神經細胞 apoptosis 與 caspase 3 的活化有密切關係 (Zhang et al., 2001; Awasthi et al., 2003)。Active caspase 3 是一個重要的 apoptosis 執行者，引起細胞不可逆地細胞核濃縮和 DNA 斷裂 (Cho et al., 2003; Shin et al., 2006)。我們發現 active caspase 3-labeled cells 位於神經細胞的部位與 apoptosis 的密度一致，FA 治療於再灌流 10 小時時於缺血周邊半陰影區明顯的抑制 active caspase 3-labeled cells。如此推論 FA 能降低 active caspase 3 誘發的神經細胞 apoptosis 提供一個神經保護作用。

NeuN 是成熟神經細胞的標記出現於齧齒類動物的細胞體和核 (Unal-Cevik et al., 2004)。我們研究的結果顯示再灌流 36 小時時梗塞的核心及邊界區 NeuN 的抗原性 (antigenicity) 明顯的減少，而 FA 治療能有效的保留 NeuN 型態和抗原性。我們發現於再灌流 36 小時時各實驗組之間 apoptosis 和 NeuN 的表現存在一個負向回饋的環狀關係。在細胞凋亡崩解下也許神經細胞喪失 NeuN 的抗原性甚至死亡，而 FA 治療可以發揮救援。綜合上述，FA 於灌流 2 小時時紋狀體區首先經由 anti-ICAM-1 mRNA 和抗 Mac-1 mRNA 切斷 activated microglia / macrophages 對最初損傷的擴大。其次，FA 減少氧化損傷 (降低 4-HNE 及 8-OHdG)，以及減少氧化損傷所誘發的 apoptosis 扮演神經保護作用。

五、結論

FA 於再灌流的早期有意義的減少 ICAM-1 mRNA 和提供神經保護作用以防止神經細胞的傷害，推測 FA 可以應用於缺血性中風。

六、參考資料

1. Awasthi YC, Sharma R., Cheng JZ, Yang Y, Sharma A, Singhal SS, Awasthi S. Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling. *Mol Aspects Med.* 24: 219-230, 2003.
2. Berti R, Williams AJ, Moffett JR, Hale SL, Velarde LC, Elliott PJ, Yao C, Dave JR, Tortella FC. Quantitative real-time RT-PCR analysis of inflammatory gene expression associated with ischemia-reperfusion brain injury. *J. Cereb Blood Flow Metab.* 22: 1068-1079, 2002.
3. Cheng CY, Ho TY, Lee EJ, Su SY, Tang NY, Hsieh CL.. Ferulic acid reduces cerebral infarct through Its antioxidative and anti-inflammatory effects following transient focal Cerebral ischemia in rats. *Amer J Chin Med.* (in press)
4. Cheng CY, Su SY, Tang NY, Ho TY, Chiang SY, Hsieh CL. Ferulic acid provides neuroprotection against oxidative stress-related apoptosis after cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting ICAM-1 mRNA expression in rats injury by inhibiting ICAM-1 mRNA expression in rats. *Brain Res.* 1209: 136-150, 2008.
5. Cho S, Liu D, Gonzales C, Zaleska MM, Wood A. Temporal assessment of caspase activation in experimental models of focal and global ischemia. *Brain Res.* 982: 146-155, 2003.
6. Connolly ES, Winfree CJ, Springer TA, Naka Y, Liao H, Yan SD, Stern DM, Solomon RA, Gutierrez-Ramos JC, Pinsky DJ. Cerebral protection in Homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. *The Journal of Clinical Investigation* 97: 209-216, 1996.
7. Ding Y, Young CN, Li J, Luan X, McAllister II JP, Clark JD, Diaz FG. Reduced inflammatory mediator expression by pre-reperfusion infusion into ischemic territory in rats: a real-time polymerase chain reaction analysis. *Neurosci Lett.* 353:173-176, 2003.
8. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon- γ : tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol.* 137: 245-254, 1986.
9. Gordon KB, Macrae IM, Carswell HV. Effects of 17beta-oestradiol on cerebral ischaemic damage and lipid peroxidation. *Brain Res.* 1036: 155-162, 2005.
10. Hayashi T, Sakurai M, Itoyama Y, Abe K. Oxidative damage and breakage of DNA in rat brain after transient MCA occlusion. *Brain Res.* 832: 159-163, 1999.
11. Hayashi T, Hamakawa K, Nagotani S, Jin G, Li F, Deguchi K, Sehara Y, Zhang H, Nagano I, Shoji M, Abe K. HMG CoA reductase inhibitors reduce ischemic brain injury of Wistar rats through decreasing oxidative stress on neurons *Brain Res.* 1037: 52-58, 2005.
12. Hu X, Johansson IM, Brannstrom T, Olsson T, Wester P. Long-lasting neuronal apoptotic cell death in regions with severe ischemia after photothrombotic ring stroke in rats. *Acta Neuropathol (Berl).* 104: 462-470, 2002.
13. Hwang IK, Yoo KY, kim DS, jeong YK, Kim JD, Shin HK, Lim SS, Yoo ID, Kang TC, Kim DW, Moon WK, Won MH. Neuroprotective effects of grape seed extract on neuronal injury by inhibiting DNA damage in the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. *Life Sci.* 75: 1989-2001, 2004.
14. Kapadia R., Tureyen K., Bowen KK, Kalluri H, Johnson PF, Vemuganti R. Decreased brain

- damage and curtailed inflammation in transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta knockout mice following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem.* 98: 1718-1731, 2006.
15. Khan M, Sekhon B, Jatana M, Giri S, Gilg AG, Sekhon C, Singh I, Singh AK. Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke. *J Neurosci Res.* 76: 519-527, 2004.
 16. Khan M, Elango C, Ansari MA, Singh I, Singh AK. Caffeic acid phenethyl ester reduces neurovascular inflammation and protects rat brain following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem.* 102: 365-377, 2007.
 17. Lee EJ, Lee MY, Chen HY, Hsu YS, Wu TS, Chen ST, Chang G.L. Melatonin attenuates gray and white matter damage in a mouse model of transient focal cerebral ischemia. *J Pineal Res.* 38: 42-52, 2005.
 18. Liu SJ, Zhou SW, Xue CS. Effect of tetrandrine on neutrophilic recruitment response to brain ischemia/reperfusion. *Acta Pharmacol Sin.* 22: 971-975, 2001.
 19. Liu Z. and Schey K. Optimization of a MALDI TOF-TOF mass spectrometer for intact protein analysis. *J. Am. Soc. Mass Spectrom* 16: 482-490, 2005.
 20. Miyamoto O, Tamae K, Kasai H, Hirakawa H, Hayashida Y, Konishi R, Itano T. *Eur J Pharmacol.* 459:179-186, 2003.
 21. Nagayama T, Lan J, Henshall DC, Chen D, O'Horo C, Simon RP, Chen J. Induction of oxidative DNA damage in the peri-infarct region after permanent focal cerebral ischemia. *J Neurochem.* 75: 1716-1728, 2000.
 22. Nagotani S, Hayashi T, Sato K, Zhang W, Deguchi K, Nagano I, Shoji M, Abe K. Reduction of cerebral infarction in stroke-prone spontaneously hypertensive rats by statins associated with amelioration of oxidative stress. *Stroke.* 36: 670-672, 2005.
 23. Sakurai M, Nagata T, Abe K, Horinouchi T, Itoyama Y, Tabayashi K. Oxidative damage and reduction of redox factor-1 expression after transient spinal cord ischemia in rabbits. *J Vasc Surg.* 37: 446-452, 2003.
 24. Shin DH, Bae YC, Kim-Han JS, Lee JH, Choi IY, Son KH, Kang SS, Kim WK, Han BH. Polyphenol amentoflavone affords neuroprotection against neonatal hypoxic-ischemic brain damage via multiple mechanisms. *J Neurochem.* 96: 561-572, 2006.
 25. Sobel RA, Mitchell ME, Fondren G. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cellular immune reactions in the human central nervous system. *Am J Pathol.* 136:1309-1316, 1990.
 26. Storini C, Rossi E, Marrella V, Distaso M, Veerhuis R, Vergani C, Bergamaschini, L, De Simoni MG. C1-inhibitor protects against brain ischemia-reperfusion injury via inhibition of cell recruitment and inflammation. *Neurobiol Dis.* 19: 10-7, 2005.
 27. Unal-Cevik I, Kilinc M, Gursoy-Ozdemir Y, Gurer G, Dalkara T. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Res.* 1015: 169-174, 2004.
 28. Vemuganti R, Dempsey RJ, Bowen KK. Inhibition of intercellular adhesion molecule-1 protein expression by antisense oligonucleotides is neuroprotective after transient middle cerebral artery occlusion in rat. *Stroke* 35: 179-184, 2004.
 29. Wang X, Siren AL, Liu Y, Yue TL, Barone FC, Feuerstein GZ. Upregulation of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on brain microvascular endothelial cells in rat ischemic cortex. *Mol Brain Res.* 26: 61-68, 1994.
 30. Wang H, Xu L, Vemkatchalam S, Trzaskos JM, Friedman SM, Feuerstein GZ, Wang X. Differential regulation of IL-1 β and TNF- α RNA expression by MEK1 inhibitor after focal cerebral ischemia in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 286: 869-874, 2001.
 31. Wang Q, Sun AY, Simonyi A, Jensen MD, Shelat PB, Rottinghaus G.E, MacDonald RS, Miller DK, Lubahn DE, Weisman G.A, Sun GY. Neuroprotective mechanisms of curcumin against cerebral ischemia-induced neuronal apoptosis and behavioral deficits. *J Neurosci*

Res. 82: 138-148, 2005.

32. Wang YH, Wang WY, Chang CC, Liou KT, Sung YJ, Liao JF, Chen CF, Chang S, Hou YC, Chou YC, Shen YC. Taxifolin ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through its anti-oxidative effect and modulation of NF-kappa B activation. *J Biomed Sci.* 13: 127-141, 2006.
33. Wellicome SM, Thornhill MH, Pitzalis C, Thomas DS, Lanchbury JSS, Panay GS, Haskard DO. A monoclonal antibody that detects a novel antigen on endothelial cells that is induced by tumor necrosis factor, IL-1, or lipopolysaccharide. *J Immunol.* 144:2558-2565, 1990.
34. Xia CF, Yin H, Borlongan CV, Chao L, Chao J. Kallikrein gene transfer protects against ischemic stroke by promoting glial cell migration and inhibiting apoptosis. *Hypertension.* 43: 452-459, 2004.
35. Xia CF, Yin H, Borlongan CV, Chao J, Chao L. Postischemic infusion of adrenomedullin protects against ischemic stroke by inhibiting apoptosis and promoting angiogenesis. *Exp Neurol.* 197: 521-530, 2006.
36. Xu HL, Feng YP. Inhibitory effects of chiral 3-n-butylphthalide on inflammation following focal ischemic brain injury in rats. *Acta Pharmacologica Sinica* 21: 433-438, 2000.
37. Yamada A, Isono M., Hori S, Shimomura T, Nakano T. Temporal and spatial profile of apoptotic cells after focal cerebral ischemia in rats. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 39: 575-83; discussion 583-584, 1999.
38. Yang GY, Schielke GP, Gong C, Mao Y, Ge HL, Liu XH, Betz AL. Expression of tumor necrosis factor-alpha and intercellular adhesion molecule-1 after focal cerebral ischemia in interleukin-1 β converting enzyme deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 19: 1109-1117, 1999.
39. Zea-Longa E, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20: 84-91, 1989.
40. Zhang RL, Chopp M, Zaloga C, Zhang ZG, Jiang N, Gautam SC, Tang WX, Tsang W, Anderson DC, Manning AM. The temporal profiles of ICAM-1 protein and mRNA expression after transient MCA occlusion in the rat. *Brain Research* 682: 182-188, 1995a
41. Zhang RL, Chopp M, Jiang N, Tang WX, Probstak J, Manning AM, Anderson DC. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat. *Stroke* 26: 1438-1443, 1995b.
42. Zhang, W.R., Hayashi, T., Sasaki, C., Sato, K., Nagano, I., Manabe, Y., Abe, K. Attenuation of oxidative DNA damage with a novel antioxidant EPC-K1 in rat brain neuronal cells after transient middle cerebral artery occlusion. *Neurol Res.* 23: 676-680, 2001.
43. Zhang N, Komine-Kobayashi M, Tanaka R, Liu M, Mizuno Y, Urabe T. Edaravone reduces early accumulation of oxidative products and sequential inflammatory responses after transient focal ischemia in mice brain. *Stroke.* 36: 2220-2225, 2005.
44. Zhu Y, Saito K, Murakami Y, Asano M, Iwakura Y, Seishima M. Early Increase in mRNA levels of pro-inflammatory cytokines and their interactions in the mouse hippocampus after transient global ischemia. *Neurosci Lett.* 393: 122-126, 2006.
45. 醫林改錯 清·王清任 力行書局有限公司 1995
46. 汪訥庵 醫方及解 大孚書局有限公司 台南市 1999 年 pp. 117.
47. 陳可冀 歐興長 活血化癥藥化學藥理與臨床 山東科學技術出版社 濟南市 1995 年 pp. 47-53 及 pp. 78-100.

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告自我評估表

計畫名稱	當歸和川芎共同成分阿魏酸對缺血一再灌流損傷腦梗塞大鼠神經保護機制之研究	計畫編號	NSC 96-2320-B-039-017
執行機構	中國醫藥大學	主持人	謝慶良

自我評估項目：

一、研究方法是否與原計畫之設計相同

完全相同 少部分不同 大部分不同 完全不同

未"完全相同"者請說明不同之項目與原因：

二、研究成果內容與原計畫書目的之相符程度

完全相符 少部分不符 大部分不符 完全不符

未"完全相符"者請說明不符之項目與原因：

三、研究成果是否達成預期目標

已達成且超過預期目標 已達成預期目標 部分未達成 均未達成

均請說明，未達成目標請務必說明原因：

四、對該研究成果應用價值之自我評估：(可複選)

可列為中醫師或中藥從業人員在職繼續教育專題演講之內容

具出版專籍參考之價值

具發表於學術期刊之價值

具備申請專利或技術移轉之潛力

其他 _____

五、其他

