

中國醫藥大學  
醫學研究所  
碩士學位論文

不同動情素接受體致效劑對魚藤酮誘發之  
巴金森氏症的影響

Effects of Different Estrogen Receptor Agonists on  
Rotenone-induced Parkinsonism in Rats

指導教授：陳卓昇 副教授

共同指導教授：王慧如 副教授

研究生：雷玉潔

中華民國九十五年七月

## 誌謝

時光飛逝，能如期完成本論文感謝所有支持我及幫助我的人，首先要感謝指導教授王慧如老師在論文內容悉心的批閱與指引以及在學識、技術上的教導與指正，使本論文得以順利完成，也感謝口試委員陳卓昇老師、楊齊生老師對本論文詳盡審閱與指導使論文得以更加完整。十二萬分感謝許明志慷慨提供實驗室，使我能順利完成實驗，也感謝生理科老師的指導。

感謝弘光科技大學楊齊生老師引領我踏入研究領域及雷若莉老師、王文綺老師、陳瑞輝老師您們的支持與鼓勵，使我能在感性思維中以理性的心情與角度完成每項動物實驗，堅決踏進研究所生涯，兩年研究所生涯，衷心的感謝王文綺老師在這兩年給予我精神支持與鼓勵使我能堅持完成學業。

感謝白綾綉學姊的指導使我有效率的完成每項實驗，以及趙勇全醫師的幫忙。也感謝竹苑、玲瑜學姊在實驗的指導及好姐妹雅亭與芝奇及好友佩玉、佩融、瓊昭、曉嵐在我鬱悶時帶給我歡愉、放鬆與開示也讓兩年時光更多采多姿，以及同學們文玲、蓉蓉、祐瑄、立人、旻珊、菁秀、、、在課業與實驗上的幫忙，更要感謝天國的老鼠為此論文的貢獻。

最後要感謝我摯愛的家人，爸爸、媽媽、哥哥、小阿姨的栽培與支持讓我順心完成學業。

謹以此論文將獻給所有支持與愛護我的家人、師長及朋友們，謝謝



# 目 錄

圖目錄.....	2
中英文縮寫對照表.....	5
英文摘要.....	6
中文摘要.....	7
壹、 前言.....	8
貳、 材料與方法.....	27
參、 結果.....	35
肆、 討論.....	39
伍、 結論.....	45
陸、 參考文獻.....	62



# 圖目錄

圖一	黑質-紋狀系統的投射路徑.....	11
圖二	多巴胺的合成與代謝.....	13
圖三	腦部冠狀切面圖顯示黑質網狀 (SNr) 及致密區 (SNc) 起 始端之解剖位置.....	45
圖四	腦部冠狀切面圖顯示黑質網狀 (SNr) 及致密區 (SNc) 末 端之解剖位置.....	46
圖五	雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對去除卵巢並接受 魚藤酮處理後之大白鼠體重變化之影響.....	47
圖六	雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對去除卵巢並接受 魚藤酮處理後之大白鼠水平移動之影響.....	48
圖七	雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對去除卵巢並接受 魚藤酮處理後之大白鼠水平移動百分比變化之影響.....	49
圖八	雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對去除卵巢並接受 魚藤酮處理後之大白鼠垂直移動之影響.....	50
圖九	雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對去除卵巢並接受 魚藤酮處理後之大白鼠垂直移動百分比變化之影響.....	51
圖十	雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對去除卵巢並接受	

	魚藤酮處理後之大白鼠抓握測試之影響.....	52
圖十一	雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對去除卵巢並接受魚藤酮處理後之大白鼠抓握測試百分比變化之影響.....	53
圖十二	免疫染色法測量雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對去除卵巢並接受魚藤酮處理後之大白鼠，黑質中酪胺酸水合酶神經元數目之影響.....	54
圖十三	免疫染色法測量雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對去除卵巢並接受魚藤酮處理後之大白鼠，黑質中酪胺酸水合酶細胞形態之影響.....	55
圖十四	免疫染色法測量雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對去除卵巢並接受魚藤酮處理後之大白鼠，黑質中酪胺酸水合酶細胞形態之影響.....	56
圖十五	雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對去除卵巢並接受魚藤酮處理後之大白鼠，黑質中 Cu/Zn-SOD 表現量之影響.....	57
圖十六	雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對去除卵巢並接受魚藤酮處理後之大白鼠，黑質中 Mn/SOD 表現量之影響..	
圖十七	雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對去除卵巢並接受魚藤酮處理後之大白鼠，黑質中 Bcl <sub>2</sub> 表現量之影響.....	59

圖十八 雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對去除卵巢並接受魚藤酮處理後之大白鼠，黑質中酪胺酸水合酶表現量之影響.....60



## 英文對照縮寫表

Cu/Zn-SOD	Cu/Zn superoxide dismutase	銅/鋅-過氧化歧化酶
ER $\alpha$	Estrogen receptor-alpha	甲型動情素接受體
ER $\beta$	Estrogen receptor-beta	乙型動情素接受體
DA	Dopamine	多巴胺
DPN	2, 3-bis (4-hydroxyphenyl) -propionitrile	乙型動情素接受體致 效劑
GSH-PX	Glutathione peroxidase	麩胱胺肽過氧化酶
Mn-SOD	Mn superoxide dismutase	錳-過氧化歧化酶
OVX	Ovariectomy	卵巢切除手術
PPT	1, 3, 5-tris (4-hydroxyphenyl) -4-propyl-1H-pyrazole	甲型動情素接受體致 效劑
PD	Parkinson's disease	巴金森氏症
SOD	Superoxide dismutase	超氧化歧化酶
TH	Tyrosine hydroxylase	酪胺酸水合酶

## 英文摘要

The aim of this study was to investigate the neuroprotective effect of selective estrogen receptor (ER) agonists on the nigro-striatal system.

Parkinsonism was induced in ovariectomized rats by treatment of rotenone via subcutaneous osmotic minipump (3 mg/kg/day) for 2 weeks.

These rats simultaneously received daily injection of estradiol (10 ug/kg) or selective estrogen receptor (ER) agonists (1 mg/kg). Locomotor activities were observed before and 2 weeks after rotenone treatment. The results revealed that ER alpha agonist improved the locomotor activities in rotenone-treated rats. Tyrosine hydroxylase (TH) levels in substantia nigra were not different among treatment groups. Levels of Mn-SOD and Bcl<sub>2</sub> also were not altered. Cu/Zn-SOD was decreased by rotenone treatment. However, ER agonist failed to prevent the reduction. These data suggest that ER alpha may be involved in the neuroprotective effects of estrogen on nigro-striatal system.

# 中文摘要

本實驗目的在探討不同的動情素接受體在黑質-紋狀體中的神經保護效果。雌性大白鼠皆在卵巢切除後兩週，先進行為測試，之後皮下植入含有魚藤酮（3 mg/day）的微量滲透幫浦以誘發巴金森氏症，並連續兩週每天分別給予芥花油、雌二醇（10 ug/day）、甲型動情素接受體致效劑（PPT，1 mg/kg/day）或乙型動情素接受體致效劑（DPN，1 mg/kg/day）。結果顯示PPT能改善魚藤酮處理後之行為表現。但黑質中酪胺酸水解酶（TH）的表現，並無差異。錳-過氧化歧化酶（Mn-SOD）、 $Bcl_2$  的表現量亦未因藥物的處理而改變。魚藤酮處理可顯著減少銅/鋅-過氧化歧化酶（Cu/Zn-SOD）的表現量，但動情素接受體致效劑並無改善效果。

由以上結果推知，甲型動情素接受體在黑質-紋狀體中可能扮演神經保護的角色。

# 第一章、前言

## 第一節、研究背景

### 巴金森氏症之簡介

#### 發生率與盛行率：

巴金森氏症為進行性的神經系統退化疾病，發生率次於阿茲海默氏症。巴金森氏症好發於中老年人，罹患率隨年齡而增加。巴金森氏症的盛行率約為0.1%，六十歲以上老人的盛行率約為1%，八十五歲以上盛行率約4-5% (Lang et al., 1998 a; Lang & Lozano 1998 b)。

#### 病因：

造成巴金森氏症的原因至今仍未完全明瞭，流行病學家認為遺傳基因（家族遺傳性巴金森氏症約佔 5-10%）、老化（正常的腦部黑質細胞數量在 50~90 歲中每 10 年會減少 4.7~6.0%）、環境毒素等是導致巴金森氏症的主要原因 (Sherer et al., 2002)。

在遺傳基因的研究中已有證據顯示  $\alpha$ -synuclein、parkin、DJ-1、UCHL 等基因與家族性的巴金森氏症有相關 (Dawson & Dawson 2003)；環境毒素：農村環境、從事農耕、飲用井水、農藥暴露（如：殺蟲劑、除草劑）、一氧化碳及重金屬（如：錳）、工業毒物等均會

造成罹患巴金森氏症的危機 (Priyadarshi et al., 2001 ; Lapointe et al., 2004)。

巴金森氏症的致病機轉為大腦基底神經節(basal ganglia)系統中黑質 (substantia nigra) 內多巴胺神經元活性降低，造成活動能力缺失。

## 基底神經節之解剖定義

基底神經節解剖構造包含蒼白球(globus pallidus)、尾狀核(caudate nucleus)、視丘下核 (subthalamic nucleus)、殼核 (putamen) 和黑質等區域。

黑質又分為致密區(pars compacta, SNci)與網狀區 (pars reticulata, SNr)；蒼白球，又分為內核 (internal segment, Gpi)與外核 (external segment, Gpe)。

尾狀核、殼核與蒼白球合稱紋狀球體(corpus striatum)；而尾狀核與殼核合稱為紋狀體 (striatum)。

## 黑質-紋狀系統的投射路徑

紋狀體主要以直接和間接途徑 (direct and indirect pathway) 調控運動，直接途徑與活動產生有關，而間接途徑與活動抑制有關，二者途徑以興奮性與抑制性訊息相互拮抗方式調節。

## 直接途徑

大腦皮質釋放麩氨酸 (glutamate) 刺激紋狀體釋放GABA，因而抑制蒼白球內核/黑質網狀區釋放GABA，故興奮視丘訊息，而活化視丘-皮質路徑 (圖一)。

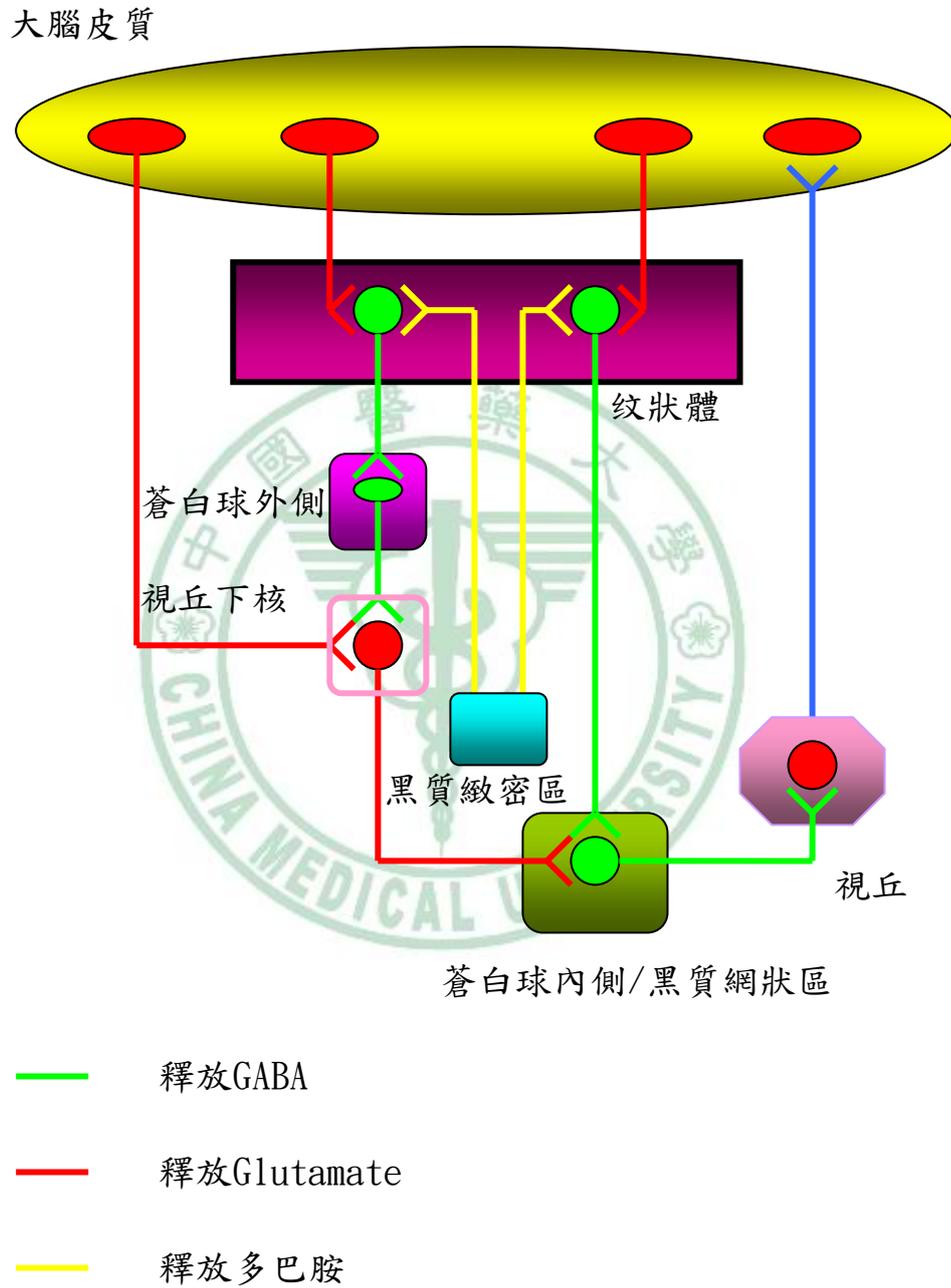
## 間接途徑

大腦皮質釋放麩氨酸刺激紋狀體釋放GABA，經由抑制蒼白球外核釋放GABA，造成視丘下核的活化。因此視丘下核釋放麩氨酸增加，刺激蒼白球內核/黑質網狀區釋放GABA，結果抑制視丘傳出之訊息，因此視丘-皮質路徑被抑制 (圖一)。

## 多巴神經元的投射途徑

黑質緻密區主要以多巴胺調控紋狀體活性。一般而言多巴胺作用於D<sub>1</sub>接受體活化直接途徑，而經由D<sub>2</sub>接受體抑制間接途徑。黑質之多巴胺神經元受損導致紋狀體多巴胺量減少時，蒼白球內核的D<sub>1</sub>接受體較少被活化，直接途徑因而受到抑制，而蒼白球外核的D<sub>2</sub>接受體也接受到較少的多巴胺，因此間接途徑被活化；所以綜合而言運動的功能會受到抑制 (圖一) (DeLong, 2000)。

圖一 黑質-紋狀系統的投射路徑



## 多巴胺的合成與代謝

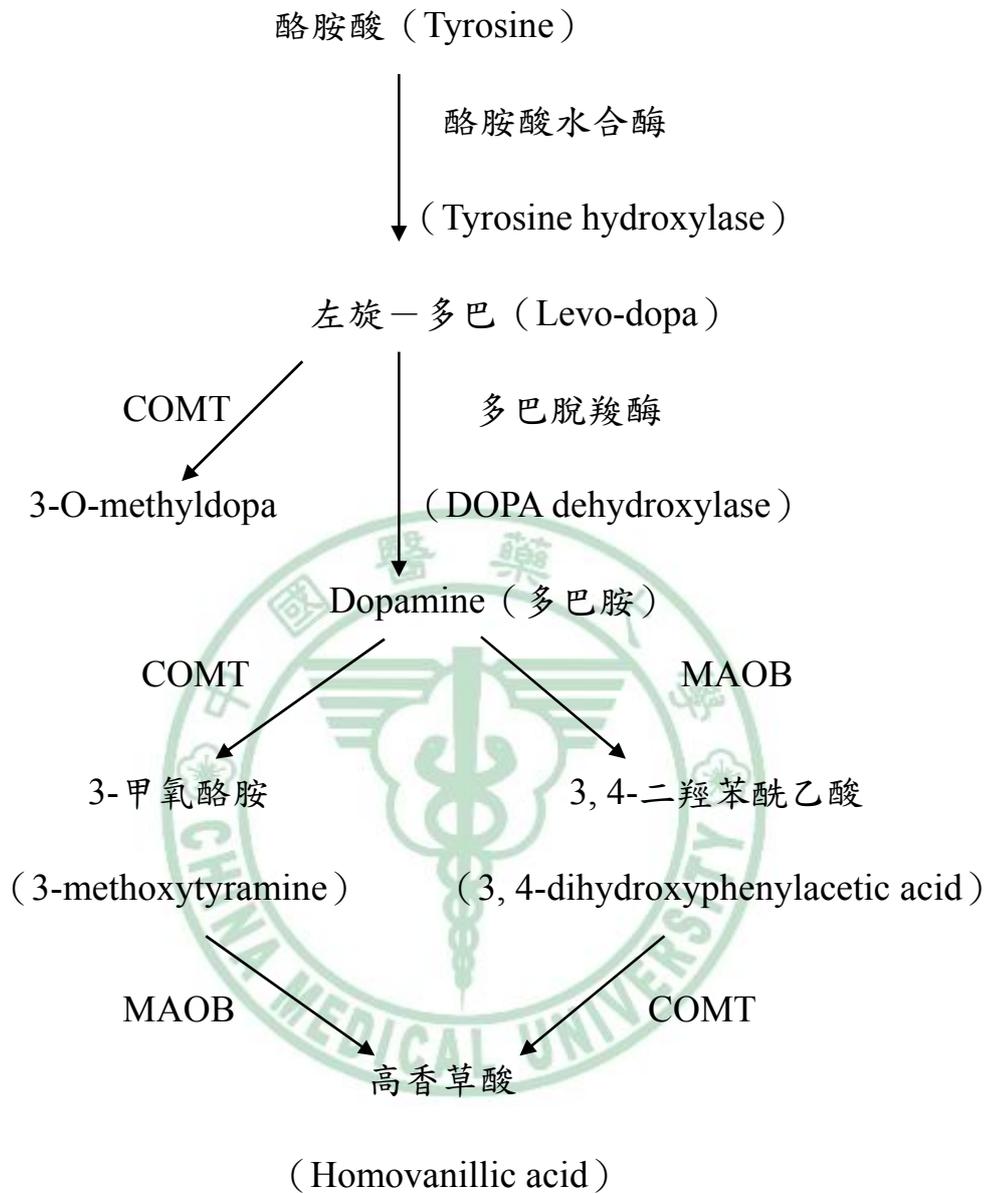
酪胺酸 (tyrosine) 經由酪胺酸水合酶 (tyrosine hydroxylase) 作用轉換成左旋-多巴(L-DOPA), 左旋-多巴再經由多巴脫羧酶(dopa decarboxylase) 轉換成多巴胺, 其後經由單胺氧化酶 (monoamine oxidase) 分解, 最終產物為3, 4-二羥苯酰乙酸

(3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC) 及高香草酸 (homovanillic acid) (Clarke, 2004) (圖二); 多巴胺亦是新腎上腺素的前驅物質。在精神病學上多巴胺缺乏會引發憂鬱症, 過高則形成躁症或精神分裂症 (Kandel, 2000)。

## 巴金森氏症之症狀：

黑質內之細胞喪失達80%時, 病徵才會出現 (Lang et al., 1998 a), 臨床主要的表徵為靜止時震顫 (resting tremor)、肢體僵硬 (rigidity)、步態不穩 (postural instability)、運動遲緩(bradykinesia)、臉部表情僵硬 (masked face) 等。

圖二 多巴胺的合成與代謝



COMT：兒茶酚氧甲基轉移酶 (Catechol-O-methyltransferase)

MAOB：B 型單胺氧化酶 B (Monoamine oxidase B)

## 氧化壓力與巴金森氏症

巴金森氏症病人死後的分析研究顯示，氧化壓力是導致偶發性巴金森氏症 (sporadic PD) 的重要原因之一 (Jenner & Olanow 1998)。巴金森氏症病人黑質部位中的麩胱胺肽 (glutathione, GSH) 亦有減少的情形 (Pearce et al., 1997)。

多巴胺本身易被B型單胺氧化酶 (monoamine oxidase B, MAO-B) 氧化或自行氧化而導致反應性氧分子的產生，多巴胺釋放量正常時，多巴胺神經元細胞可有效清除多巴胺自行氧化所產生的自由基，但若多巴胺過量的被釋放，其反應性氧分子即會攻擊周遭之蛋白質、核酸及膜磷脂而對細胞造成毒性 (Beal, 1992)。

## 人體的抗氧化防禦系統-抗氧化酵素

粒腺體功能異常造成反應性氧分子 (reactive oxygen species, ROS) 產生而導致氧化壓力增加 (Zhang et al., 2000)。反應性氧分子導致細胞死亡的途徑為細胞膜脂質過氧化、蛋白質氧化、去氧核糖核酸受損、抗過氧化酵素活性受抑制 (Alam et al., 1997 a; Alam et al., 1997 b; Dexter et al., 1989)。人體內含有多種抗氧化酵素，如：超氧化歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、麩胱胺肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GSH-PX) 和觸酶 (catalase)，為對抗過氧化物(自由基)的首要防線。在過氧化物產生時，這些酵素立即利用氧化還原作用將過氧

化物轉換為毒害較低或無害的物質（陳 等, 1998）。

### 超氧化歧化酶（SOD）

SOD 是一種金屬酵素(metalloenzymes)，普遍存在於所有好氧性生物體內，主要作用是將超氧陰離子（superoxide anion）轉變為過氧化氫（H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>），為防禦系統中的首要防線。SOD 分為三種型式存在於粒腺體和細胞質中，進行的歧氧化作用由金屬離子所催化，目前已知的 SOD 包含 Mn-SOD（粒線體）、Cu/Zn-SOD（細胞質中）與 Fe-SOD（原核細胞微粒體中）（呂, 1993）。

當粒腺體功能的異常時，SOD 首先將超氧陰離子轉變為過氧化氫，而過氧化氫則被麩胱胺肽過氧化酶及觸酶分解成水（呂, 1993）。

### 麩胱胺肽過氧化酶（GSH-PX）

GSH-PX 主要存在於血液、肝臟、粒腺體、和細胞質中，在生物體內負責清除過氧化氫，其可將過氧化氫或過氧化物（ROOH）還原成水以降低生物體內氧化壓力的產生（呂, 1993）。



### 觸酶

普遍存在於人體的各組織中，利用過氧化氫做雙分子的歧化作用，將2分子過氧化氫轉換成氧與2分子的水（呂, 1993）。

## 粒腺體功能異常與巴金森氏症

粒腺體功能異常是造成神經退化性疾病的重要因素如巴金森氏症 (Greenamyre et al., 2001)。粒腺體呼吸鏈中的複合體I活性受損會導致反應性氧分子增加，及腺嘌呤核苷三磷酸的合成減少，此造成氧化壓力的產生 (Van der Walt et al., 2000)。巴金森氏症病人的腦、肌肉組織與血小板粒線體中的複合體I均有減少的情形 (Cardellach et al., 1993)。

魚藤酮 (Rotenone) 主要作用為抑制粒線體呼吸鏈中複合體I，在離體實驗中發現細胞暴露於濃度5 nM魚藤酮28天後，其麩胱氨酸會減少，且去氧核糖核酸及蛋白質均受到自由基攻擊，粒腺體膜釋放出 Cytochrome C 導致 Caspase 3 活化，細胞因此走向凋亡 (Greenamyre et al., 2001)。SK-N-MC 人類神經母瘤細胞 (human neuroblastoma cell) 暴露於濃度10-1000 nM 魚藤酮後，腺嘌呤核苷三磷酸的含量隨魚藤酮濃度增加而顯著減少，且氧化傷害及細胞死亡量亦隨魚藤酮濃度增而增加，當給予抗氧化劑 (維生素E) 處理時則可減輕魚藤酮所誘發的毒性 (Sherer et al., 2003)。

## 誘發動物巴金森氏症的模式

6-羥多巴胺 (6-hydroxy dopamine, 6-OHDA)、1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氫嘧啶 (1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6- tetrahydropyridine, MPTP) 與魚藤酮為目前用以誘發動物巴金森氏症的藥物。6-OHDA最先被採用於誘發動物巴金森氏症，主要作用於兒茶酚胺的路徑上。將6-OHDA注射於紋狀體後，多巴胺含量顯著減少80%-90% (Ungerstedt, 1968)。其鄰近的神經元亦會受損害；1980年代發現部份海洛英毒癮者陸續出現類似巴金森氏症的症狀，研究分析發現乃因毒品中含有MPTP化合物所導致 (Langston & Ballard, 1983)。將小鼠以MPTP處理後，其黑質部位之多巴胺神經元會嚴重受損，紋狀體中多巴胺含量亦減少，動物並出現巴金森氏症的症狀 (Uversky, 2004)。流行病學家指出暴露於環境中的殺蟲劑 (如：魚藤酮) 與除草劑會增加罹患巴金森氏症的危機 (Mouradian, 2002)。魚藤酮主要由植物 (如：魚藤根部、豆薯種子) 提煉而得，對粒線體複合體I有特異性的抑制作用 (Marshall & Himes, 1978; Turrens & Boveris, 1980)，它也會使微小管去聚合化，在多巴神經元中微小管去聚合化使囊泡運輸受到瓦解，導致囊泡在細胞本體積聚，因此造成多巴胺氧化而增加氧化壓力，最終造成細胞死亡 (Ren et al., 2005) 含有魚藤酮之微量滲透幫浦植入大鼠皮下，80%會作用於周邊器官產生如：胃肌變薄、胃酸缺

乏、肝細胞壞死等症狀，小於20%則作用於腦中之黑質與紋狀體，造成神經元退化 (Lapointe et al., 2004)。MPTP、魚藤酮均可通過血腦屏障；MPTP在通過血腦障壁後經由B型單胺氧化酶轉變成MPP<sup>+</sup> (1-methyl- 4-phenylpyridine)。6-OHDA、MPP<sup>+</sup>可藉由多巴胺轉運子 (dopamine transporter) 將藥物運送進入多巴胺神經元，並聚集在粒線體中抑制電子傳遞鏈中複合體I的活性 (Schober, 2004)。導致細胞腺嘌呤核苷三磷酸大量減少，亦增加電子從複合體 I 漏損，亦提高粒線體中反應性氧分子的含量，進而造成細胞死亡。

## 巴金森氏的症性別差異

流行病學研究顯示男性罹患巴金森氏症比率較多於女性，比率為3：2 (Mayeux et al., 1992)，而在治療巴金森氏症時通常女性對於L-Dopa的需求量也少於男性 (Lyons et al., 1998)。這些證據代表巴金森氏症的產生可能和性激素有關，或者性激素可能調節了黑質-紋狀體中神經元的功能。

## 動情素與巴金森氏症

停經後的巴金森氏症的婦女，若接受動情素治療可增加其日常獨立生活的能力 (Fernandez & Lapane, 2000)，並且可改善活動測試得分 (Saunders-Pullman et al., 1999)。年紀較輕的巴金森氏症女性患者，

在月經前期症狀有惡化情形；臨床研究指出一位罹患巴金森氏症的年輕女性，給予左旋-多巴治療後，於排卵前動情素達高峰時，會出現運動機能過度的情形，而於月經前此現象則明顯減少（Dluzen & Horstink, 2003）。亦有研究指出罹患巴金森氏症的婦女在月經期其症狀會惡化（Kompoliti et al., 2000）。因此動情素與巴金森氏症症狀的產生似乎有一相反的關係。

### 動情素與多巴胺神經元活性的關係

雌鼠動情週期(estrus cycle) 可分為四期：動情前期(proestrus)、動情期 (estrus)、動情間期I (diestrus I) 和動情間期(diestrus II)。，動情素於動情前期達最高峰，而黃體素則於低水平；動情期時動情素分泌最低；動情間期I和動情間期II時動情素開始上升，隨後進入另一個動情週期（Smith et al., 1975）。

文獻指出在雌性大鼠中多巴胺的濃度會隨動情週期而改變，動情前期與動情間期時紋狀體中多巴胺含量增加（Greengrass & Tonge, 1971）；紋狀體中的多巴胺再吸收結合位置（dopamine reuptake site）密度於動情前期達最高（Morissette & Di Paolo, 1993）；多巴胺的代謝產物高香草酸在動情期會增加，且多巴胺轉換率亦達高峰（Jori et al., 1979）；動情間期多巴胺的再吸收比率為最高（Davis et al., 1977）。由黑質核-紋狀體系統（nigrostriatal system, NSDA）中多巴胺的轉換

速率 (DA turnover rate) 及高香草酸/多巴胺比率得知在動情期中多巴胺神經元活性明顯增加，在動情前期時其神經元活性減少；但酪胺酸水合酶在動情期活性為最低，於動情間期活性達最高 (Fernandez-Ruiz et al., 1991)。由此可知動情素可防止因多巴胺過度合成因而降低氧化壓力。

切除卵巢後的大鼠在經由腹腔注射動情素可迅速增加紋狀體中多巴胺的合成，直接將動情素注射到紋狀體中可增加新的多巴胺生成但並沒有改變多巴胺釋放與3,4-二羥苯醌乙酸含量。動情素亦可引發原本存在的酪胺酸水合酶磷酸化，亦即表示酪氨酸水合酶被活化 (Pasqualini et al., 1995)。這些證據顯示動情素可以增加多巴胺的合成，因而調節多巴胺神經元的活性。

### 動情素的神經保護作用

在切除卵巢並給予 MPTP 的小鼠，動情素具有保護多巴胺神經元的功能 (Dluzen et al., 1996)。雄性小鼠重覆給予動情素處理，則可防止 MPP<sup>+</sup> 所誘發的多巴胺耗損 (Ramirez et al., 2003)。在離體實驗中動情素可保護經 MPP<sup>+</sup> 處理的中腦神經元免於走向凋亡途徑 (Sawada et al., 2002)。

動情素可經由抗氧化的機制達到神經保護的作用。離體實驗證明動情素可明顯減輕麩胺酸對腹側中腦 (ventral mesencephalon) 所產

生的氧化傷害 (Sawada et al., 1998)。

動情素可增加神經細胞內環化腺嘌呤核苷單磷酸 (cAMP) 的含量，進而活化蛋白質激酶 A (Protein Kinase A, PKA) 使 CREB 磷酸化而引發特定蛋白質的合成與分泌。例如動情素可能藉由 cAMP-PKA -CREB pathway 增加抗細胞凋亡蛋白質 -Bcl<sub>2</sub> 的表現進而提升神經細胞的存活率 (Ji et al., 1996 ; Kew et al., 1996 ; Kienlen Campard et al., 1997 ; Rydel & Greene, 1988 ; Kobayashi & Shinozawa, 1997)。

## 動情素

動情素在停經前主要是由卵巢 (ovary) 的顆粒細胞 (granulosa cell) 所合成、分泌。膽固醇 (cholesterol) 經由芳香化細胞色素酵素 P450 (cytochrome P450 aromatase, P450arom ) 轉化成雄烯二酮 (androstenedione) ，部份直接擴散入卵巢的顆粒細胞，轉化成不具活性的雌素酮 (estrone, E<sub>1</sub>) ，再經硫酸雌素酮酶 (estrone sulfatase) 催化，行成硫酸雌素酮 (estrone sulfate) ；E<sub>1</sub> 亦可經由 17β-羥類固醇脫氫酶 (17β-hydroxy-steroid dehydrogenase) 作用還原成雌二醇 (17β-estradiol, E<sub>2</sub>) (Hsueh et al., 1984 ; Miller, 1988)

雌二醇為生物活性最高的動情素，它可通過血腦屏障，對中樞神經系統產生作用。雌二醇可以有兩種方式作用：

(一) 基因作用方式 (genomic mechanism) ：固醇類激素必須通過

細胞膜以及細胞核膜後，才能與激素接受體結合。動情素藉由擴散作用進入細胞並與核上之接受體結合，形成動情素-接受體複合體，再結合到 DNA 上的動情素反應單元(estrogen response elements, ERE)，導致 mRNA 和蛋白質的合成改變

(二) 非基因作用方式 (nongenomic mechanism)：動情素直接作用於細胞膜表面上之接受體，再藉由第二訊息的傳送如：環化腺嘌呤核苷單磷酸進而產生後續的細胞反應 (Nilsson et al., 2001; Simoncini, 2003)。這些位於細胞膜上的接受體至今仍未純化出來，其結構並不清楚。

### 動情素接受體的種類與其作用機轉

傳統動情素接受體 (classical estrogen receptor) 或稱甲型動情素接受體 (estrogen receptor-alpha; ER $\alpha$ ) 於一九八六年由 Green S 報告 (Green et al., 1986)。一九九六年 Kuiperz 又發現新的動情素接受體—乙型動情素接受體 (estrogen receptor-beta; ER $\beta$ ) (Kuiper et al., 1996)，目前已知的人類甲型動情素接受體是由人類乳癌細胞 (MCF-7 cells) 中被選殖 (cloned) 出來，其基因序列長度為 2092 bp，可轉譯成含 595 氨基酸的蛋白質。乙型動情素接受體最先從大鼠的前列腺 (prostate) 和卵巢中選殖出，基因序列長度為 1560 bp，可轉譯成含

477 氨基酸的蛋白質 (Gustafsson, 1999 ; Pettersson & Gustafsson, 2001)。

乙型動情素接受體與傳統甲型動情素接受體均含有五個領域 (domain)，一個基因結合領域 (DNA-binding domain, DBD)，一個樞紐領域 (hinge area)，一個荷爾蒙結合領域 (hormone-binding domain, HBD)，二個執行轉錄激活區 (activation function-1, 和 activation function-2) (Gustafsson, 1999 ; Pettersson & Gustafsson, 2001)。

兩種動情素接受體的基因結合領域有 95% 的相同度，賀爾蒙結合領域則有 55% 的相同度，雌二醇與兩種接受體的親和力約略相同 (Gustafsson, 1999)。動情素是透過結合至其特異的接受體，進而調節動情素反應單元，並改變下游基因的轉錄活動。

## 動情素接受體在體內的分佈

甲型動情素接受體廣泛表現在子宮、陰道、大腦；乙型接受體主要表現肺臟、卵巢、前列腺、大腦；骨骼及腦下垂體同時會出現此二種接受體 (Gustafsson, 1999)。

## 動情素接受體在腦中的分佈

在齧齒目動物中，大腦皮質（cerebral cortex）、海馬迴（hippocampus）、下視丘的視叉上核(suprachiasmatic nucleus)、室旁核(paraventricular nucleus)、視索上核(supraoptic nucleus)、乳頭狀核(mammillary nuclei)等區域，含有較多的乙型動情素接受體的訊息核糖核酸，而僅有少量的甲型接受體表現；而於中腦黑質部位則只有乙型接受體分布（Shughrue et al., 1997 a；Shughrue et al., 1997 b）。

下視丘之弓型核（arcuate nuclei）、腹內核(ventromedial nucleus) 含有較多的甲型動情素接受體的訊息核糖核酸，乙型接受體的訊息核糖核酸僅有少量表現（Shughrue & Komm.1996；Shughrue et al., 1997 a）。

同時具有甲型和乙型接受體訊息核糖核酸的區域包括：終紋狀核（bed nucleus of the stria terminalis）、杏仁核(amygdala)、視前區(preoptic Area)、藍斑核(locus coeruleus)、periaqueducal gray（Shughrue, et al., 1997 c）等。

## 動情素接受體致效劑

雌二醇對甲型及乙型接受體之親合力相仿，無法明顯區別出二者之作用，故須選擇特異性高的致效劑以辨別不同型之動情素接受體在神經系統中扮演的角色。

DPN (2, 3-bis (4-hydroxyphenyl) -propionitrile) 為乙型動情素接受體致效劑，分子量為239.20對乙型動情素接受體的親和力為甲型的70倍 (Kraichely & Sun, 2000)。

PPT (1, 3, 5-tris (4-hydroxyphenyl) -4-propyl-1H-pyrazole) 為甲型動情素接受體致效劑，分子量為 390.95，對甲型動情素接受體的親和力為乙型的 410 倍 (Stauffer et al., 2000)。



## 第二節、實驗目的

- 1 觀察雌二醇或甲型及乙型動情素接受體致效劑對給予魚藤酮處理後之大白鼠的行為表現之影響。
- 2 以免疫組織化學染色法測量雌二醇或甲型及乙型動情素接受體致效劑對多巴胺神經元是否能有保護效果。
- 3 以西方點墨法偵測雌二醇或甲型及乙型動情素接受體致效劑是否能增進抗氧化壓力相關蛋白質之表現。



## 第二章、材料與方法

### 實驗動物

動物來源為國家動物中心與樂斯科生物科技公司之 Sprague-Dawley (SD) 品系之雌性大白鼠，體重介於 200-300 克，飼養於光照期 12 小時光照(0800-2000)，12 小時黑暗(2000-0800)之動物房，溫維持在  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。動物在適應期間以五隻為一籠飼養，手術後則個別飼養於  $37 \times 25 \times 17$  公分之飼養籠。動物在適應期與實驗期間均給予充足之飼料與水。

### 卵巢切除手術 (Ovariectomy ; OVX)

實驗動物以腹腔注射 (intraperitoneal injection ; IP) chloral hydrate (360 mg/Kg, Merck) 進行麻醉，由背部進行卵巢摘除手術，並於傷口縫合後，連續給予三天腹腔注射盤尼西林 (penicilline, 3000 IU/rat) 以防傷口感染，經兩週後再進行行為監測並植入微量滲透幫浦 (Alzet Corporation, Palo Alto, CA)。

### 微量滲透幫浦之植入

#### 藥品配製

雌二醇、甲型動情素接受體致效劑 (PPT) 與乙型動情素接受體

致效劑 (DPN) 均溶於canola oil溶液中；魚藤酮溶於1:1之 DMSO + polyethylene glycol (PEG)溶液中。

於植入幫浦的前一天將配製好之魚藤酮或溶劑(DMSO+PEG)填充入微量滲透幫浦後，浸潤於 37°C 無菌生理食鹽水中。卵巢摘除達兩週之雌鼠，以 chloral hydrate (360 mg/Kg, Merck) 麻醉後，將微量滲透膠囊植入背部皮下，並於傷口縫合後，連續三天腹腔注射盤尼西林以防傷口感染。

## 實驗流程

實驗動物皆在卵巢切除後兩週，未給任何藥物之前先進行行為測試，之後皮下植入含有魚藤酮 (3 mg/kg/day) 或溶劑的微量滲透幫浦並隨機分配為：控制組+canola oil、魚藤酮+canola oil、魚藤酮+雌二醇、魚藤酮+甲型動情素接受體致效劑 (PPT;Tocris)、魚藤酮+乙型動情素接受體致效劑 (DPN;Tocris) 五組；PPT與DPN以每天皮下注射方式給予1 mg/kg/day，雌二醇 (10 ug/kg/day) 亦以相同方式注射。

動物於給藥兩週後再進行一次行為測試，隨後立即犧牲以進行西方墨點法，或灌流以進行免疫組織染色。

## 實驗一

### 甲型及乙型動情素接受體致效劑對行為表現之影響

卵巢切除兩週，行為測試後隨機分組，將含有魚藤酮或溶劑之微量膠囊植入大白鼠背部皮下，並開始連續兩週每天給予大白鼠皮下注射雌二醇、甲型動情素接受體致效劑(PPT)或乙型動情素接受體致效劑(DPN)對照組則單獨給予溶劑，於給藥兩週後再度進行行為測試。

### 行為監測

#### 活動量試驗 (Open Field Activity Test)

於 1000~1200 (光照時) 將雌鼠置於 45 cm × 45 cm × 45 cm 之透明壓克力盒，盒底分成 25 個 9 cm × 9 cm 之正方形格子，雌鼠之行為以攝影機紀錄 30 分鐘，大鼠每通過底部一個格線，紀錄為 1 次水平移動，當動物僅以後腿站立時，則紀錄為 1 次垂直移動。

#### 水平抓握測試 (Horizontal Bar Test)

使動物兩前肢抓握住一距離地面 50 公分、直徑 1 公分之圓桿，並紀錄其抓握秒數，每隻老鼠測試 3 次取其平均值。

各組結果以給藥後除以給藥前的比例表示，並且採用單項變方分析 (One-way ANOVA) 與 LSD 來檢驗其結果，當  $p < 0.05$  時即視為有顯著差異性。

## 實驗二

皮下給予甲型及乙型動情素接受體致效劑對多巴胺神經元之保護效果

### 灌流犧牲

同實驗一之組別，給藥兩週後之大白鼠以經腹腔注射過量的 sodium pentobarbital 深度麻醉後，在心臟停止跳動前，將胸腔切開露出心臟，先由左心室注入 1000 IU 的肝素( heparin )，再以 18 號軟針刺穿經過左心室至主動脈出口後，依序注入含 2 % 亞硝酸鈉( Na nitrite ) 之生理食鹽水以及 4 % 副福馬林( paraformaldehyde ) 以施行灌流。

將灌流完畢後的腦組織取出，並置於 4 % 副福馬林中，隔夜再浸潤於 30 % 的蔗糖溶液中保存，直至組織完全沉澱後再進行冷凍切片。

### 組織切片

將腦組織置於冷凍切片機中，以 40 $\mu$ m 的厚度做連續冠狀切片，並將腦組織切片保存於含有 0.1 M 磷酸氫鈉緩衝液、30 % 蔗糖、30 % ethylene glycol 與 1 % polyvinylprolidone 的抗凍液中。

## 免疫組織化學染色法 (Immunocytochemistry, ICC)

將腦組織從抗凍液中取出，以 0.05M 磷酸氫鉀緩衝液( potassium phosphate buffered saline, KPBS )清洗，之後浸泡於 0.3 %  $H_2O_2$  中 15 分鐘，以減少內生性過氧化酶反應，再以 0.05 M KPBS 清洗以終止其反應。接著於室溫下將組織與酪胺酸水合酶 ( tyrosine hydroxylase, TH ) 的一級抗體 ( 1 : 50000, Chemicon ) 反應 1 小時，再置於 4°C 冰箱中反應 48 小時。

切片以 0.05 M KPBS 清洗後，加入稀釋 600 倍之二級抗體 (biotin-conjugated anti-mouse IgG) 於室溫下反應 1 小時；組織再度以 KPBS 清洗並加入與過氧化酶 (horse-radish peroxidase ; HRP) 結合之卵白素-生物素複合物溶液中 (avidin-biotin complex ; Vector Laboratories, Burlingame, USA) 於室溫下反應 1 小時。再將組織切片浸泡於呈色溶液(含 0.05 M 的 Tris、0.025 % 的過氧化氫與 0.2 mg/ml diaminobenzidine ) 中反應，結果呈現褐色。

所有完成染色之組織切片，依序排列至載玻片上，封片後置於光學顯微鏡下，依據 Paxinos 提供的位置( Paxinos & Watson, 1986 ) 分析黑質 ( Bregma : A-P : -4.8~6.3 mm , D-V : 7.3~8.6 mm , M-L : 1~1.3 mm ) 之 TH 總數及形態 ( Paxinos & Watson, 1986 )。

### 實驗三

以西方墨點法偵測甲型及乙型動情素接受體致效劑對  
氧化壓力相關蛋白質之影響

#### 組織蛋白質萃取

同前實驗處理之大白鼠在給藥處理兩週後，以腹腔注射過量的 sodium pentobarbital 深度麻醉後，立即斷頭取腦並貯存於 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

腦組織自 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出後，放置於冰上分離出黑質，置於 $4^{\circ}\text{C}$  Lysis buffer 中（含 62.5 mM, pH:6.8 Tris-HCl、2% SDS、50 mM DTT）。先以小剪刀將組織剪碎，之後以超音波均質，再於 $4^{\circ}\text{C}$ 離心（13000 rpm、10 分鐘），取上清液進行蛋白質定量或冰存於 $-20^{\circ}\text{C}$ 。

#### 蛋白質定量

原理：確定蛋白質的體積濃度，並使其均一化，以利實驗之進行。

蛋白質檢量線製作：

牛血清白蛋白配製成濃度為 0、5、10、15、20、25 $\mu\text{g/ml}$  的標準液，蛋白質量以 Bradford 法（BIO-RAD, Hercules, California, USA）於 590 nm 光波下測定吸光值，以測得的標準品吸光值與蛋白質濃度畫出回歸曲線，求得趨勢線方程式。

### 樣品蛋白質濃度測定：

取 10  $\mu\text{l}$  的樣品以 Bradford 法測定吸光值。並代入趨勢線方程式，推算出樣品蛋白質濃度。

### 蛋白質電泳 (SDS-PAGE)

組合鑄膠檯，依序先注入 12% 下層膠 (separation gel) 再注入 5% 上層膠 (stacking gel)。下層膠含有 1.5 M Tris (pH 8.8)、10% SDS、40% Acrylamide/bisacrylamide (29:1)、10% APS、0.1% TEMED (N, N, N, N-Tetramethyl-ethylenediamine; Pharmacia, Sweden)。

5% 上層膠則含有 0.5 M Tris (pH 6.8)、10% SDS、40% Acrylamide/bisacrylamide (29:1)、10% APS、0.1% TEMED。

蛋白質樣品加熱後 (95°C、5 分鐘) 立即置於冰上冷卻至少 30 秒，隨後將分子量標記 (Marker, 5 $\mu\text{l}$ ) 和樣品 (17  $\mu\text{l}$ ) 加入電泳膠凹槽內，以 100 伏特進行電泳約 2.5 小時，電泳緩衝液 (running buffer)，含 24 mM Tris、192 mM Glycine、3.46 mM SDS。

### 西方墨點法 (Western blot)

PVDF 轉漬膜和膠體固定在轉漬夾上置於轉漬緩衝液 (transfer buffer；含 20 mM Tris、192 mM glycine、15% methanol)，冰上以 100 伏特轉漬 1 小時，將轉漬後的 PVDF 膜放入 5% 脫脂奶粉 1 小時 (溶於 0.1% Tween 20 + phosphate buffered saline)，再以 0.1% PBST 清洗

後，加入一級抗體，置於 4°C 冰箱搖晃。一級抗體分別為 TH (1:50000, Chemicon)、Cu-Zn/SOD(1:1000, Upstate)、Mn/SOD (1:1000, Upstate)、Bcl<sub>2</sub> (1:3000, Chemicon) 等。翌日以 0.1 % PBST 清洗，將轉漬膜放入二級抗體 (goat-anti mouse-IgG-HRP、goat-anti rabbit-IgG-HRP) 室溫反應 1 小時，取出轉漬膜以 0.1% PBST 清洗後浸泡於 ECL kit (Amersham, UK) 混合液中約 30 秒，將轉漬膜 (正面朝上) 放置於 X 光底片上 (Iomax light film; Kodak) 進行曝光 (依轉漬膜上冷光亮度決定曝光時間)。再以顯影劑及定影劑沖洗底片，將底片風乾保存之後以影像分析器 (AlphaImager<sup>TM</sup> 2200, USA) 讀取吸光值。



## 第三章、研究結果

### 實驗一.

#### 皮下給予甲型及乙型動情素接受體致效劑對行為表現之影響

##### 切除卵巢後雌性大白鼠接受魚藤酮處理之體重變化

切除卵巢後之大白鼠經過兩週藥物處理後，凡是給予魚藤酮的動物不論是否接受動情素接受體致效劑，其體重變化均顯著降低 ( $P < 0.01$ ) (圖五)。

##### 活動量試驗 (Open Field Activity Test)

###### 水平移動

藥物處理前，各組水平移動次數並無顯著差異 (結果未以圖顯示)。經過兩週藥物處理後，凡是有給予魚藤酮的大鼠不論是否接受動情素接受體致效劑，其水平移動均顯著低於對照組 ( $P < 0.05$ ) (圖六)。以藥物處理後的變化比率表示，也有類似的結果 (圖七)。

###### 垂直移動

藥物處理前，各組垂直移動次數並無顯著差異 (結果未以圖顯示)。給予魚藤酮處理兩週後雌鼠的垂直移動明顯低於控制組，而PPT可以顯著改善魚藤酮引發的抑制作用，給予PPT + Rotenone之動物的垂

直移動亦高於魚藤酮+DPN 與魚藤酮+雌二醇組的移動次數 ( $P < 0.01$ )，但控制組與魚藤酮 + PPT 二組間並無統計差異 ( $P > 0.1$ ；圖八)。以藥物處理後的變化比率表示，結果亦相同 (圖九)。

### 抓握測試 (Horizontal Bar Test)

藥物處理前，各組抓握測試並無顯著差異 (結果未以圖顯示)。雌鼠在連續兩週藥物處理後，魚藤酮+PPT組抓握的時間顯著多於其他四組 ( $P < 0.05$ )，此外魚藤酮+動情素則顯著高於控制組與魚藤酮+oil組 ( $P < 0.05$ )，而魚藤酮+DPN亦顯著多於魚藤酮+oil ( $P < 0.05$ ；圖十)。以藥物處理後的變化比率表示，結果亦相同 (圖十一)。



## 實驗二

皮下給予甲型及乙型動情素接受體致效劑對多巴胺神經元之保護之影響

### 定量分析

雌鼠在連續兩週藥物處理後各組與控制組比較在黑質部位TH的表現量均無差異。(圖十二)

### 定性分析

單獨給予魚藤酮之動物其黑質TH細胞多呈現圓形且顏色為淡褐色，而注射雌二醇、DPN、PPT之組別，較少圓形細胞且顏色多呈深褐色，控制組則無圓形之細胞形態且為深褐色(十三、十四)。



### 實驗三

## 以西方墨點法偵測甲型及乙型動情素接受體致效劑對 氧化壓力相關蛋白質之影響

雌鼠連續兩週魚藤酮處理後黑質中的Cu-Zn/SOD蛋白質表現量均明顯少於控制組 ( $P < 0.05$ )，雌二醇、PPT或DPN皆不影響Cu-Zn/SOD蛋白質之表現，而各組間Mn/SOD、TH、Bcl<sub>2</sub>表現量皆無統計上的差異 (圖十五、十六、十七、十八)。



## 第四章、討論

魚藤酮為呼吸鏈中複合體 I 之抑制劑，文獻指出以皮下植入微量滲透幫浦方式給予大鼠魚藤酮後有 80% 會作用於周邊器官如：胃肌變薄、胃酸缺乏、肝細胞壞死，小於 20% 作用於腦中之黑質與紋狀體中造成神經元退化 (Lapointe et al., 2004)。

子宮部位只有甲型動情素接受體存在，本實驗室先前的實驗中給予去除卵巢大鼠甲型動情素接受體致效劑 PPT 後，其子宮重量顯著多於控制組，乙型動情素接受體致效劑 DPN 處理之動物子宮重並未增加 (葉, 2004)，由此可知 PPT、DPN 為專一性極高的動情素接受體致效劑。

紋狀體可區分為紋狀體腹外側 (ventrolateral striatum)、腹內側 (ventromedial striatum)、背外側 (dorsolateral striatum)、背內側 (dorsomedial striatum) 四區域 (Morissette & Di Paolo, 1993)。

口腔的活動主要受紋狀體腹外側區所調控 (Kelley et al., 1988)，當紋狀體腹外側之多巴胺耗損，導致大腦前葉之多巴胺耗盡，而造成食物攝取與飼料效能 (動物累積之總體重變化除以總進食克數) 降低 (Salamone et al., 1990)。本實驗中經魚藤酮處理後之大鼠體重有顯著下降，推測可能魚藤酮在胃部造成損害以及於紋狀體腹外側區受損導致攝食降低有關。

紋狀體背外側主要與後肢活動的控制有關 (Jicha & Salamone, 1991)。分別在大白鼠紋狀體腹外側、背外側、腹內側區直接注射 6-OHDA 後，紋狀體腹外側區缺失會導致食物攝取明顯降低而咀嚼明顯增加，但水平移動與垂直移動並無受影響，紋狀體背外側受損則會造成垂直移動顯著減少 (Jicha & Salamone, 1991)。本實驗發現無論是單獨給予魚藤酮或同時接受魚藤酮與動情素致效劑之去除卵巢大白鼠，其水平活動量均有降低，但魚藤酮 + 甲型動情素接受體致效劑組行為表現量多於魚藤酮之組別。在垂直移動方面給予魚藤酮 + 甲型動情素接受體致效劑組之大鼠的移動次數與控制組相似，此二組垂直移動量均多於其他給予魚藤酮處理的大鼠。在抓握測試試驗中給予魚藤酮 + 甲型動情素接受體致效劑組之大鼠其行為表現均優於其他各組。由垂直移動與水平移動結果推測大鼠接受魚藤酮處理後在紋狀體背外側區應已受損，由體重改變結果推測紋狀體腹外側區也應已受損。

文獻指出紋狀體部位有甲型動情素接受體存在 (Khan et al., 2005)，但在黑質部位則只有乙型接受體 (Shughrue & Lane, 1997 b)。動情素亦可藉由甲型接受體作用增加小鼠活動量與滾輪奔跑活動次數 (Ogawa et al., 2003)。亦有文獻指出甲型動情素接受體在中風所引發的腦損傷中扮演了神經保護的角色 (Dubal et al, 2001)，且在腦損傷後甲型動情素接受體有增加的現象 (Dubal et al, 1999)。因此由以上行為

測試得知：甲型動情接受體可能扮演保護黑質-紋狀系統之角色。

Ferrante 等人 (Ferrante et al., 1997) 的實驗指出以靜脈方式給予魚藤酮 7~9 天後，紋狀體及蒼白球會明顯受損，但於黑質部位並未受影響。在 Greenamyre 等持續以靜脈方式給予魚藤酮 2 天~3 個月，發現紋狀體背外側為首先受損之區域，隨後會遍佈紋狀體其他區域，並且漸進逆行性的影響黑質中的多巴胺神經元 (Greenamyre et al, 1999)。在本次實驗中黑質部位 TH 神經元數目與 TH 含量無顯著差異，推測可能連續 14 天的魚藤酮處理對黑質部位尚無法造成影響。儘管在定量上黑質的 TH 神經元未受到魚藤酮處理而減少，但仔細觀察 TH 免疫染色結果，顯示控制組細胞型狀皆呈梭狀，顏色為深褐色，而單獨接受魚藤酮組許多 TH 細胞形態較圓且有脹大情形，顏色亦較淡。魚藤酮+動情素接受體致效劑處理之組別只有部份 TH 神經元呈圓狀及脹大，顏色卻為深褐色。雖然我們未計算圓形脹大細胞的比例，但由此判斷魚藤酮的確可改變黑質多巴胺神經元的生理功能，造成部分神經元脹大而趨向死亡，而 PPT 或 DPN 則可部份阻止魚藤酮的效果。由此推測黑質中部分多巴胺神經元可能對魚藤酮較敏感，這些細胞受損後對大白鼠的行為表現產生影響，但它們所佔的比例可能不足以改變整個系統中多巴胺神經元的數目，此外雌二醇與動情素接受體致效劑對黑質中之多巴胺神經元應具有保護影響，提高劑量或延長給藥時間才會出現顯著的差異。

以皮下方式給予小鼠高劑量魚藤酮（15 mg/kg）在 24 小時內會造成紋狀體中多巴胺代謝產物：3, 4-二羥苯醌乙酸及高香草酸大量增加，但多巴胺量則無改變；而在給予 5 或 10 mg/kg 的魚藤酮 7 天後紋狀體中之 3, 4-二羥苯醌乙酸、高香草酸亦明顯減少，但多巴胺量仍無變化。另外當給予 10 mg/kg 的魚藤酮 14 天後紋狀體多巴胺、3, 4-二羥苯醌乙酸、高香草酸量均無改變，而以 1.5 mg/kg 的魚藤酮 21 天處理後只有高香草酸會減少情形（Thiffault et al., 2000）。由此可知大鼠接受高劑量魚藤酮處理 24 小時內會造成紋狀體多巴胺代謝產物大量增加，但多巴胺本身並無顯著改變。以低劑量方式給予魚藤酮在短期內無法對黑質-紋狀體的多巴胺含量和代謝有明顯影響。本實驗中以微量滲透幫浦的方式緩慢給予 3 mg/kg/day 的魚藤酮是屬於較低劑量的範圍，推測對於多巴胺代謝應無影響。

切除卵巢後的大鼠腹腔注射雌二醇可迅速增加紋狀體中多巴胺的合成（Pasqualini et al., 1995），直接將雌二醇注射到紋狀體中可增加新的多巴胺生成，但不改變多巴胺釋放與 3, 4-二羥苯醌乙酸含量（Pasqualini et al., 1996）。至於雌二醇是經由甲型或乙型接受體達到這些效果，目前仍未明瞭，因此給予 PPT 或 DPN 是否可以改變基底神經節中多巴胺的生成和代謝，仍需進一步研究證實。

動情素可藉由 cAMP- PKA -CREB pathway 增加抗細胞凋亡蛋白質

—Bcl<sub>2</sub> 的表現進而提升神經細胞的存活率 (Ji et al., 1996 ; Kienlen Campard et al., 1997 ; Kew et al., 1996 ; Rydel & Greene, 1988)。Bcl<sub>2</sub> 為一種為抗凋亡蛋白，可阻斷細胞的死亡。Dubal 等人指出大腦缺血時雌二醇可藉由乙型動情素接受體的作用而增加 Bcl<sub>2</sub> 的表現進而達到神經保護的機制 (Dubal et al., 1999)，我們此次實驗中各組黑質 Bcl<sub>2</sub> 的表現均無顯著之影響，這個結果與黑質 TH 免疫染色和西方點墨的結果相吻合，推測 14 天之魚藤酮處理在黑質部位並未造成顯著影響，而動情素接受體致效劑亦未產生作用，至於紋狀體中 Bcl<sub>2</sub> 之表現量則需再做進一步研究。但由行為的結果推論乙型動情素接受體對於非長期 (2 週) 魚藤酮的破壞作用應無太大的保護效果。

Cu/Zn-SOD、Mn-SOD、麩胱胺肽過氧化酶之訊息核糖核酸遍佈基底神經節中，在黑質的緻密區 Cu/Zn-SOD 與 Mn-SOD 訊息核糖核酸的表現量明顯多於基底神經節其它區域 (Kunikowska & Jenner, 2002)。由此可知正常黑質中含有的高量的抗氧化酵素以防止多巴胺神經元多巴胺在代謝過程中產生的氧化壓力傷害。

魚藤酮為粒線體複合 I 抑制劑並會造成氧化壓力增加，氧化壓力會降低內生性抗氧化劑的效能而使巴金森病人更易受自由基的傷害 (Jollow & McMillan, 2001)。雌性大鼠以 6-OHDA 處理後在紋狀體、蒼白球、及黑質緻密區的 Cu/Zn-SOD mRNA 表現量明顯減少

(Kunikowska & Jenner, 2001)。而在巴金森氏症病人的研究指出 Mn-SOD 蛋白質表現量增加即表示粒線體功能異常 (Abraham et al., 2005)。但本實驗魚藤酮處理過之動物黑質中 Cu/Zn-SOD 蛋白質表現量顯著減少，Mn-SOD 蛋白質量並無顯著差異。推測大白鼠經 14 天魚藤酮處理後在黑質部位首先會消耗細胞質中之 Cu/Zn-SOD，而粒線體 Mn-SOD 可能須再延長給藥時間才有顯著影響。許多研究指出雌二醇並無法調節成熟雌性大白鼠腦中 Cu/Zn-SOD 的含量 (Ozgonul et al., 2003)，本實驗結果亦顯示經魚藤酮處理之雌性大白鼠黑質中 Cu/Zn-SOD 含量不受動情素接受體致效劑之影響。

動情素對澱粉狀蛋白  $\beta$  胜肽 (Amyloid  $\beta$ -peptide) 在 HT-22 細胞造成的毒性亦具有神經保護的效果，而 GSH 可增強動情素的作用 (Green et al., 1998)。當 ROS 增加時，細胞內的 GSH 會減少，使細胞走向凋亡。GSH 的表現量會受 Bcl<sub>2</sub> 調節，當 Bcl<sub>2</sub> 減少時則 GSH 量會增加，反之亦然 (Hockenbery et al., 1993; McCullough et al., 2001)。巴金森氏症病人黑質部位中的麩胱胺酸 (glutathione, GSH) 會降低 (Pearce et al., 1997)。但是否與 Bcl<sub>2</sub> 有關仍不清楚；而魚藤酮處理是否影響大白鼠黑質部位中 GSH 的含量則需再做探討。本實驗未發現黑質 Bcl<sub>2</sub> 含量會因藥物處理而改變，可能與魚藤酮作用的時間不夠長有關。

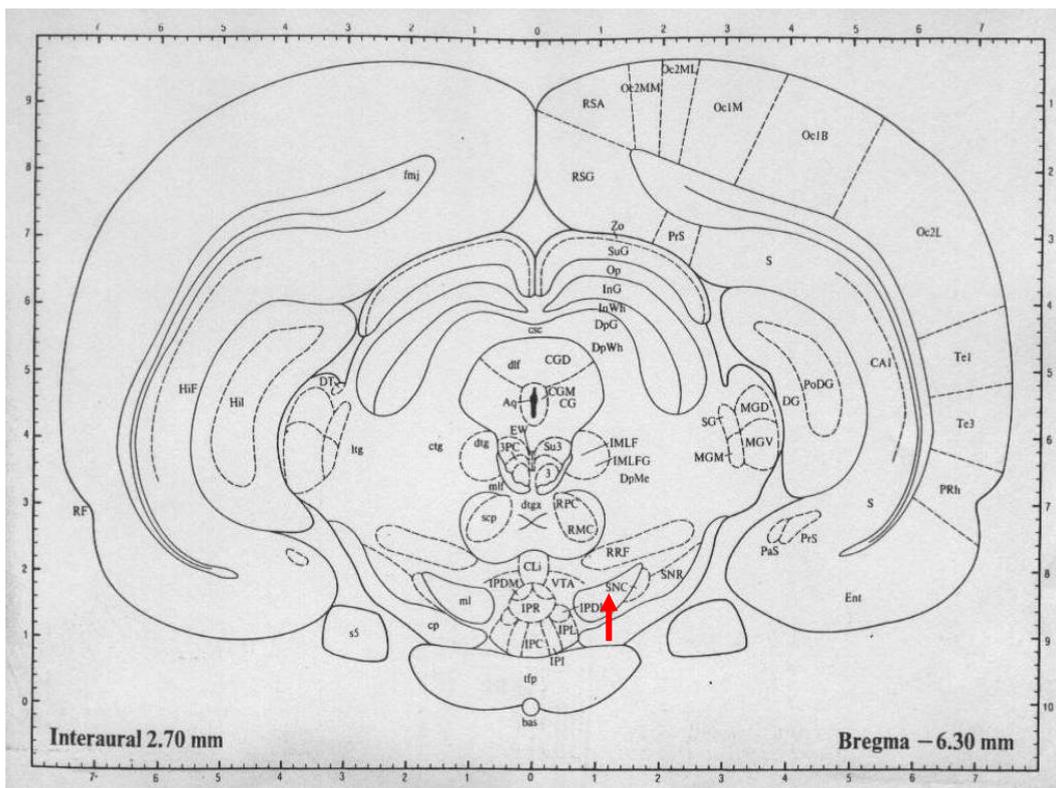
成熟大鼠之紋狀體與黑質部位均有神經生長因子如 (brain-derived

neurotrophic factor ; BDNF) 和神經滋養因子 3 (neurotrophin-3 , NT3) 表現 (Miranda et al., 1994) ; 而動情素可調節胚胎時期中腦 BDNF 的表現 (Ivanova et al., 2001) , 動情素是否藉由甲型動情素接受體調節神經滋養因子表現仍須再進一步證明。

## 第五章、結論

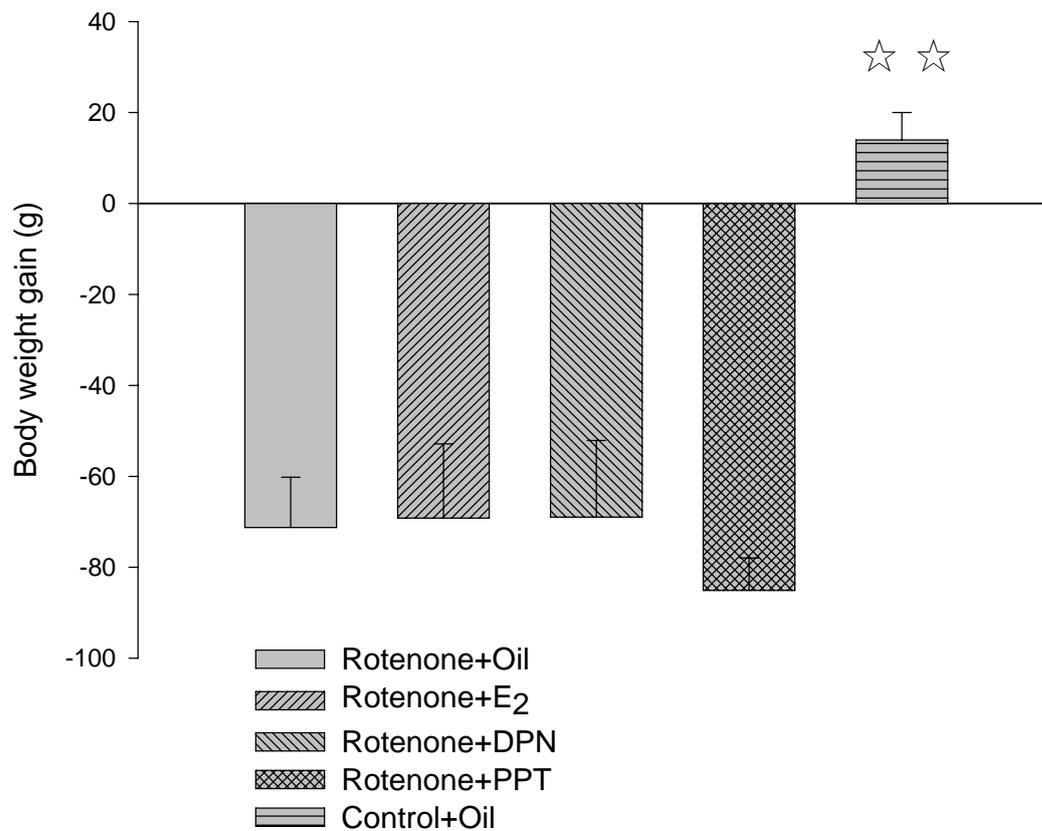
經兩週魚藤酮處理之雌性大白鼠黑質中 TH 雖不受動情素接受體致效劑影響，但在垂直移動及抓握試驗中觀察到同時接受甲型動情素接受體致效劑處理的組別表現均優於其他給予魚藤酮處理之動物，水平移動亦有部分改善，因此推測魚藤酮處理後在大白鼠之紋狀體已受損，而甲型動情素接受體在基底神經節中媒介動情素的神經元保護作用；並無證據顯示乙型動情素接受體在此動物模式中扮演重要的角色。至於 PPT 保護黑質-紋狀體神經的機轉仍需進一步探討。





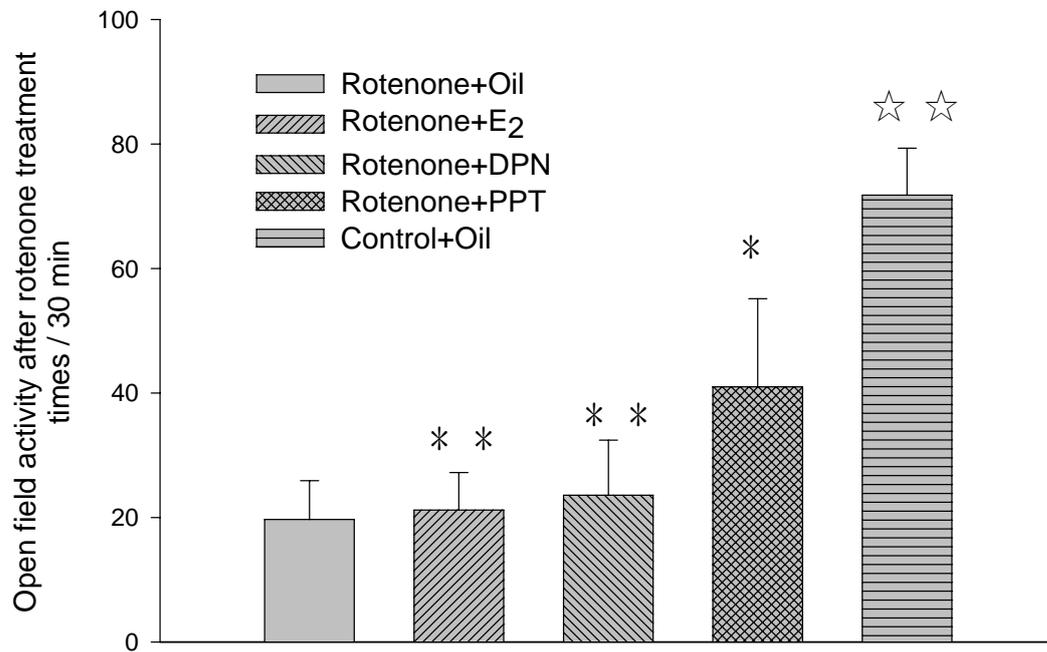
圖四

腦部冠狀切面圖顯示黑質網狀 (SNr) 及致密區 (SNc) 末端之解剖位置，箭號為分析處。



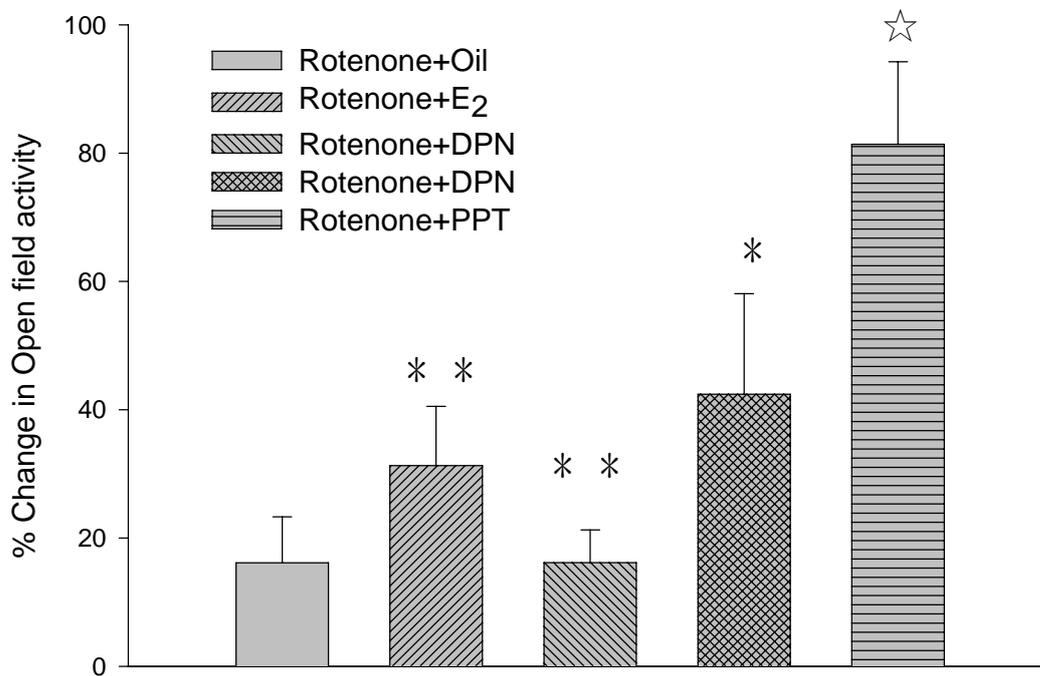
圖五

皮下給予雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對去除卵巢並接受魚藤酮處理之大白鼠體重之影響 (n = 5~6)。各組以 mean ± SEM 表示，☆☆  $p < 0.01$  v.s Rotenone (Rotenone: 魚藤酮，DPN: 乙型動情素接受體致效劑，PPT: 甲型動情素接受體致效劑)



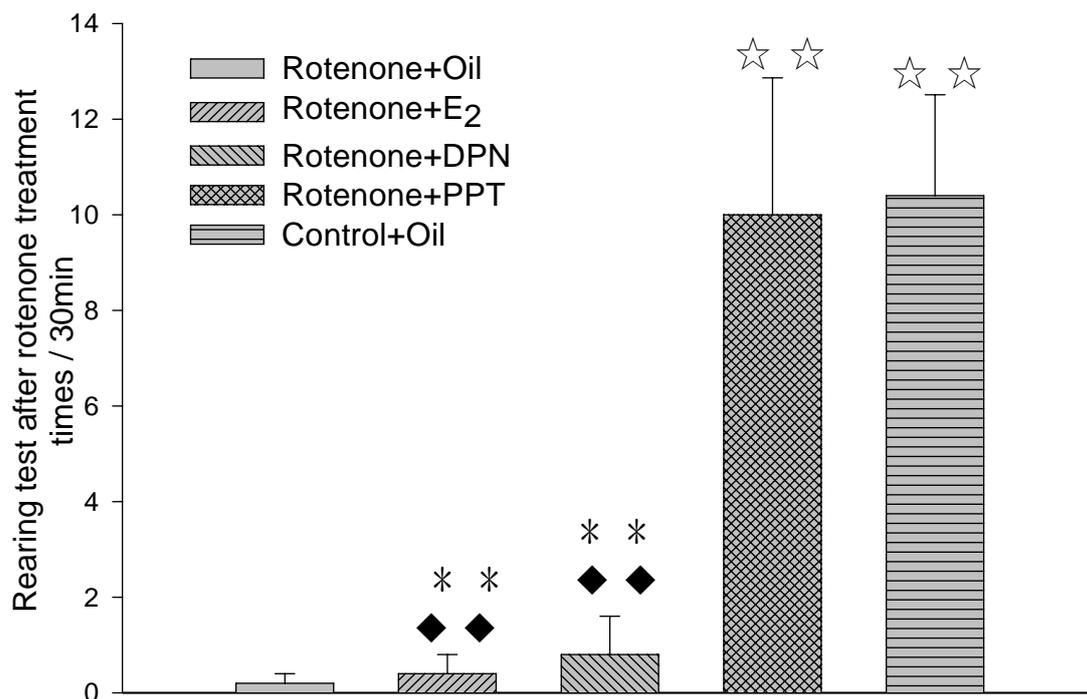
圖六

皮下給予雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對去除卵巢並接受魚藤酮處理之大白鼠水平移動的影響 (n = 5~6)。各組以 mean ± SEM表示，☆☆  $p < 0.01$  v.s Rotenone ; \*  $p < 0.05$  v.s control ; \* \*  $p < 0.01$  v.s control (Rotenone:魚藤酮，DPN :乙型動情素接受體致效劑，PPT :甲型動情素接受體致效劑)



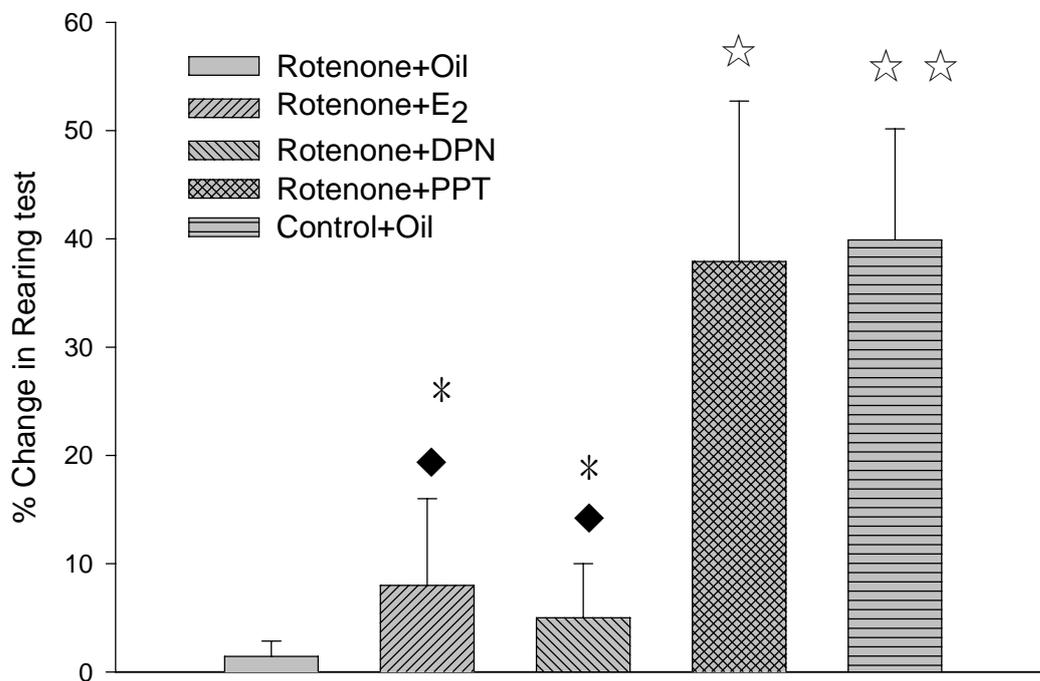
圖七

皮下給予雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對去除卵巢並接受魚藤酮處理之大白鼠水平移動的影響 (n = 5~6)。各組以 mean ± SEM 表示，☆  $p < 0.05$  v.s Rotenone ; \*  $p < 0.05$  v.s control ; \*\*  $p < 0.01$  v.s control (Rotenone: 魚藤酮，DPN: 乙型動情素接受體致效劑，PPT: 甲型動情素接受體致效劑)



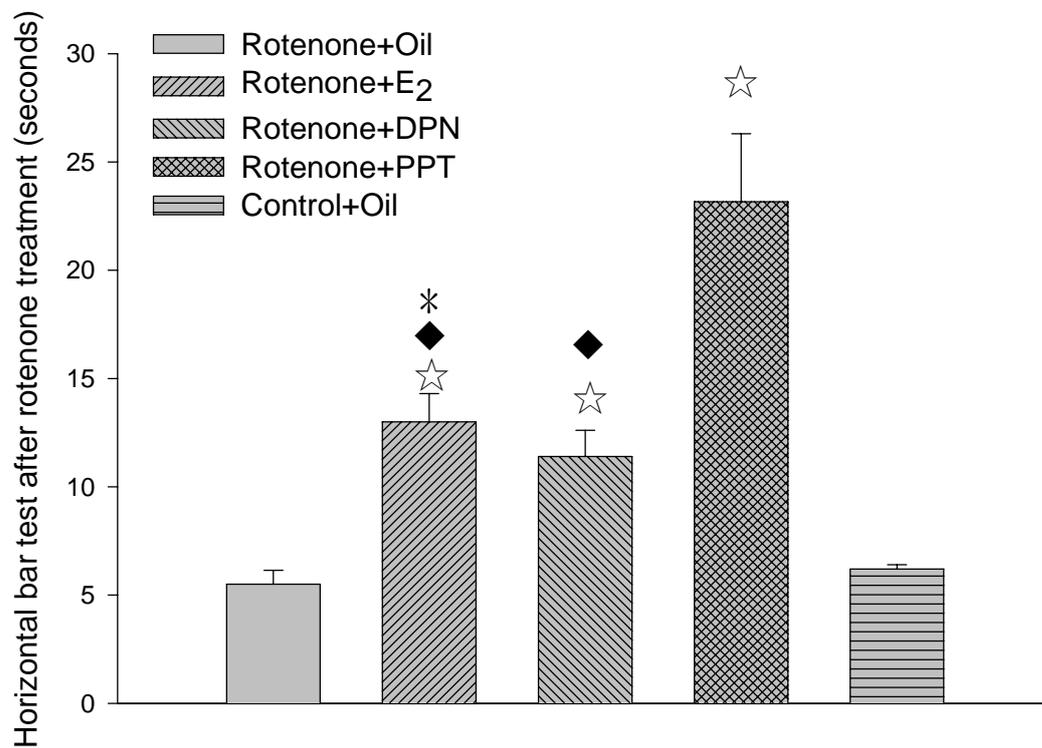
圖八

皮下給予雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對去除卵巢並接受魚藤酮處理之大白鼠垂直移動的影響 (n=5)。各組以 mean ± SEM 表示，☆☆  $p < 0.01$  v.s Rotenone；\*\*  $p < 0.01$  v.s control；◆  $p < 0.05$  v.s PPT；◆◆  $p < 0.01$  v.s PPT (Rotenone : 魚藤酮，DPN : 乙型動情素接受體致效劑，PPT : 甲型動情素接受體致效劑)



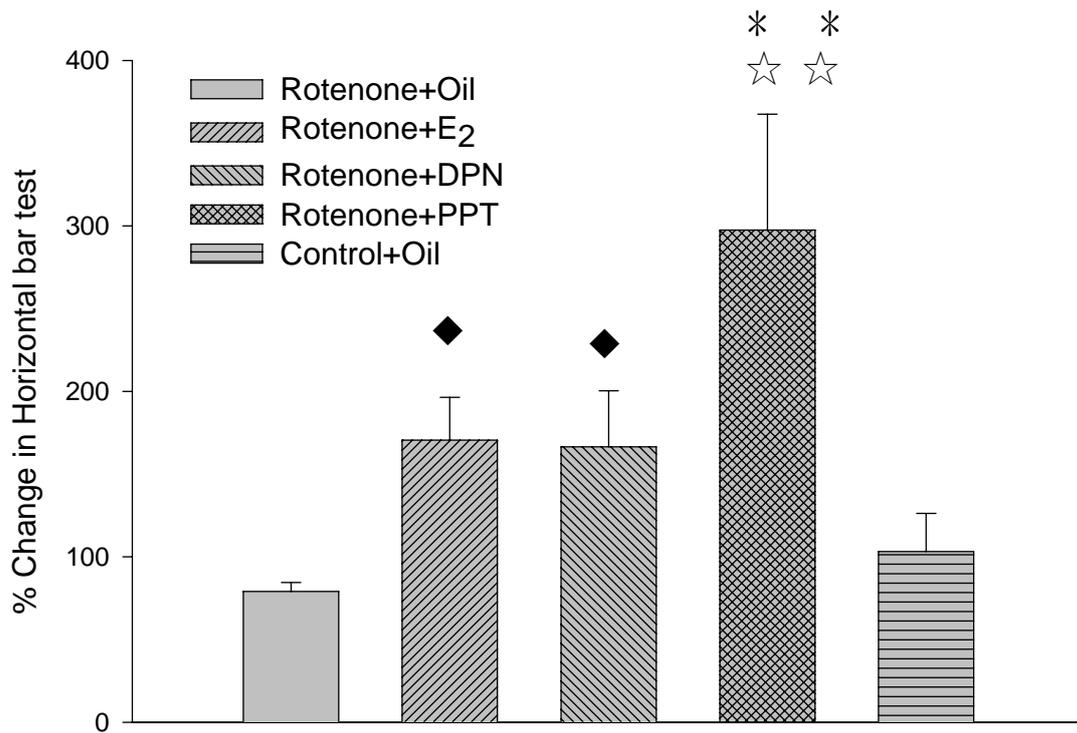
圖九

皮下給予雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對去除卵巢並接受魚藤酮處理之大白鼠垂直移動的影響 (n=5)。各組以 mean ± SEM 表示，☆☆  $p < 0.01$  v.s Rotenone；☆  $p < 0.05$  v.s Rotenone；\*  $p < 0.05$  v.s control；◆  $p < 0.05$  v.s PPT (Rotenone: 魚藤酮，DPN: 乙型動情素接受體致效劑，PPT: 甲型動情素接受體致效劑)



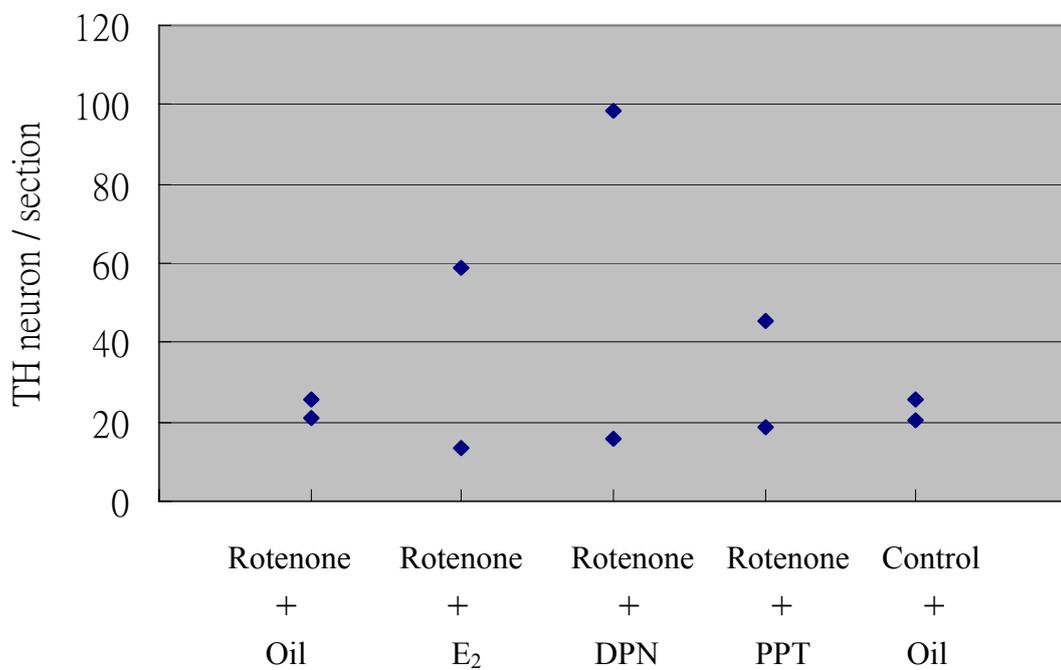
圖十

皮下給予雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對去除卵巢並接受魚藤酮處理之大白鼠抓握測試的影響 (n = 5~6)。各組以 mean ± SEM 表示，☆  $p < 0.05$  v.s Rotenone ; \*  $p < 0.05$  v.s control ; ◆  $p < 0.05$  v.s PPT (Rotenone: 魚藤酮，DPN: 乙型動情素接受體致效劑，PPT: 甲型動情素接受體致效劑)



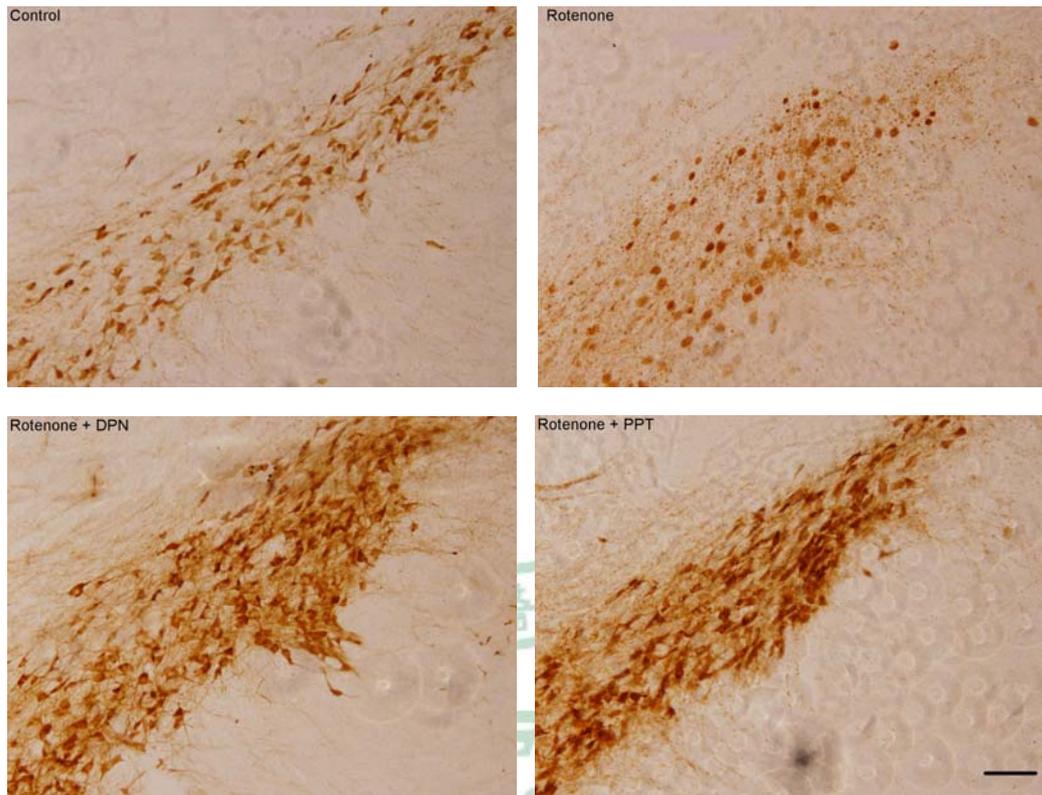
圖十一

皮下給予雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對去除卵巢並接受魚藤酮處理之大白鼠抓握測試的影響 (n = 4~6)。各組以 mean ± SEM 表示，☆☆  $p < 0.01$  v.s Rotenone ; \*\*  $p < 0.01$  v.s control ; \*\*  $p < 0.01$  v.s control ; ◆  $p < 0.05$  v.s PPT (Rotenone: 魚藤酮，DPN: 乙型動情素接受體致效劑，PPT: 甲型動情素接受體致效劑)



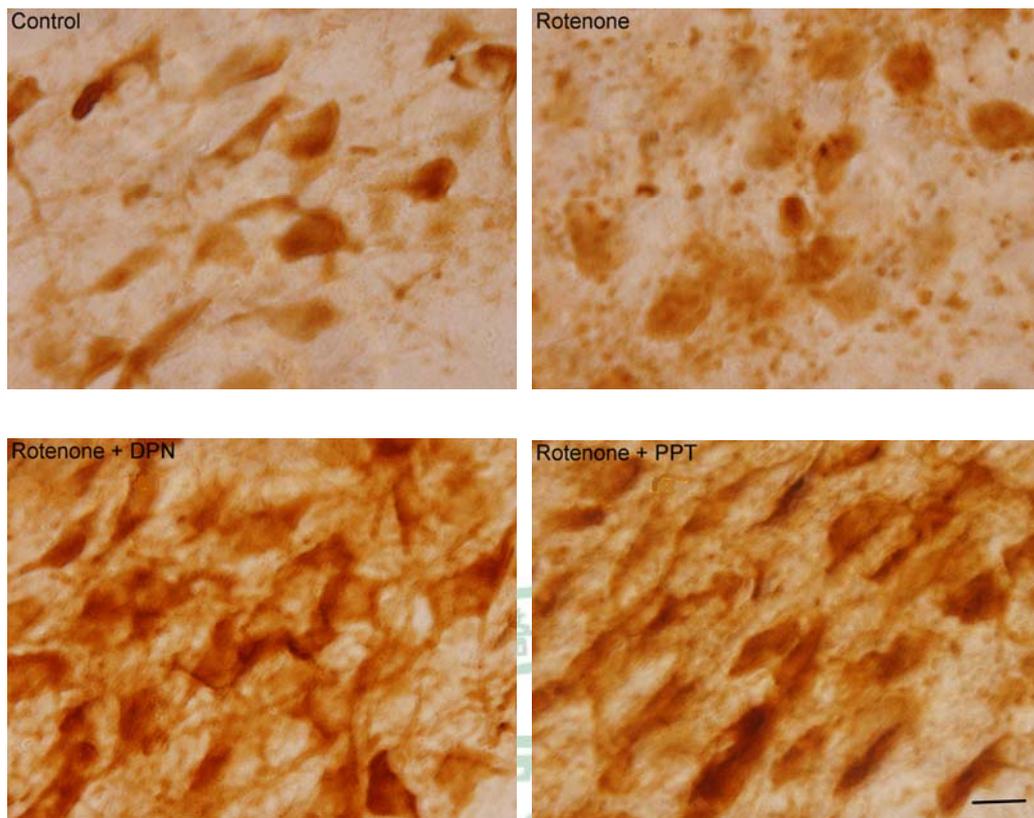
圖十二

免疫染色法測量雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對雌性大白鼠接受魚藤酮處理後，黑質中TH神經元之數目（未作統計，每一點代表一隻動物之神經元數）。



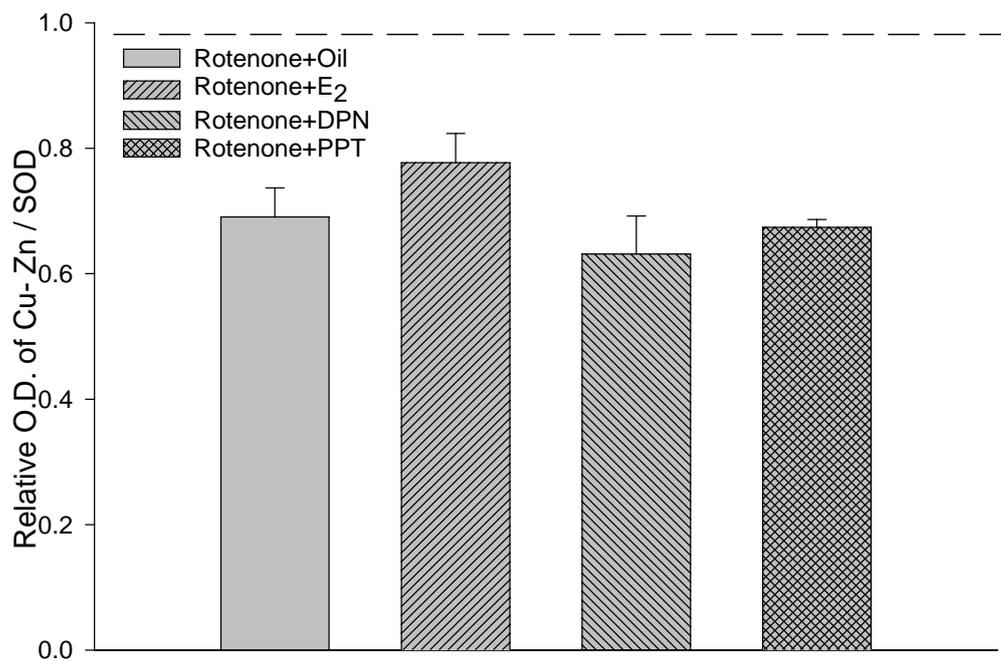
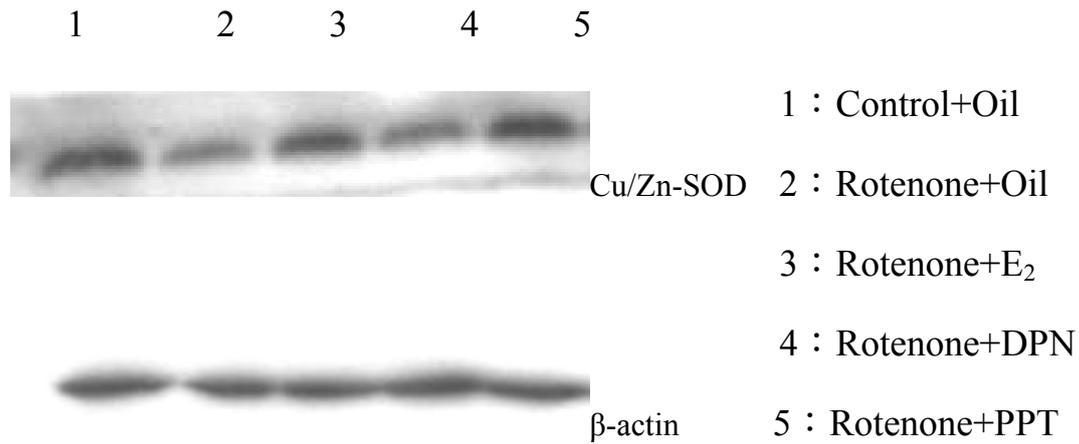
圖十三

低放大倍率圖顯示切除卵巢之大白鼠接受雌二醇、乙型 (DPN) 及甲型 (PPT) 動情素接受體致效劑對黑質部位 TH 神經元的形態表現之影響。—— 為 100 um



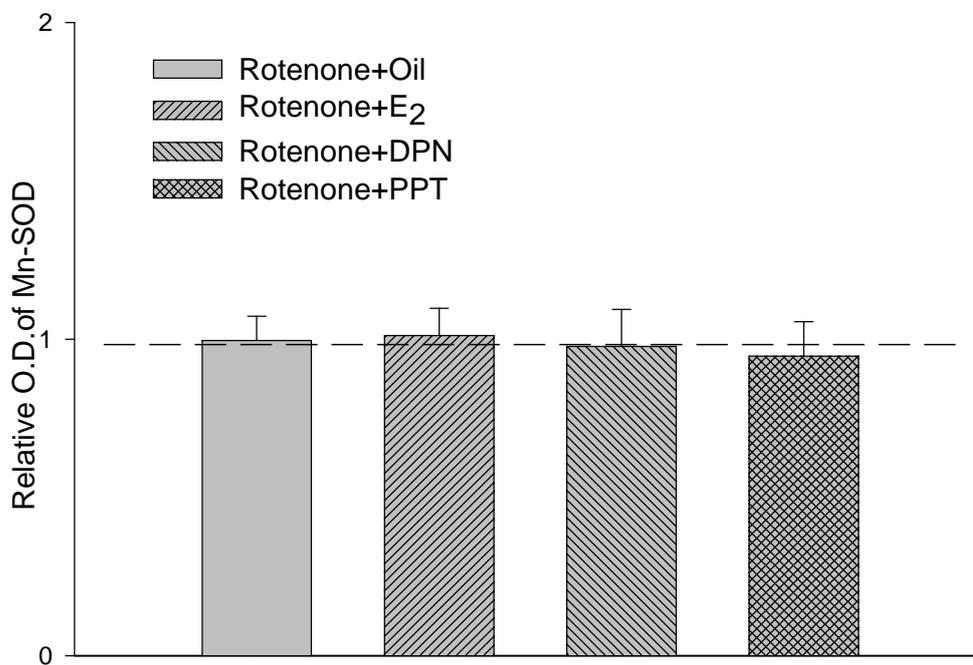
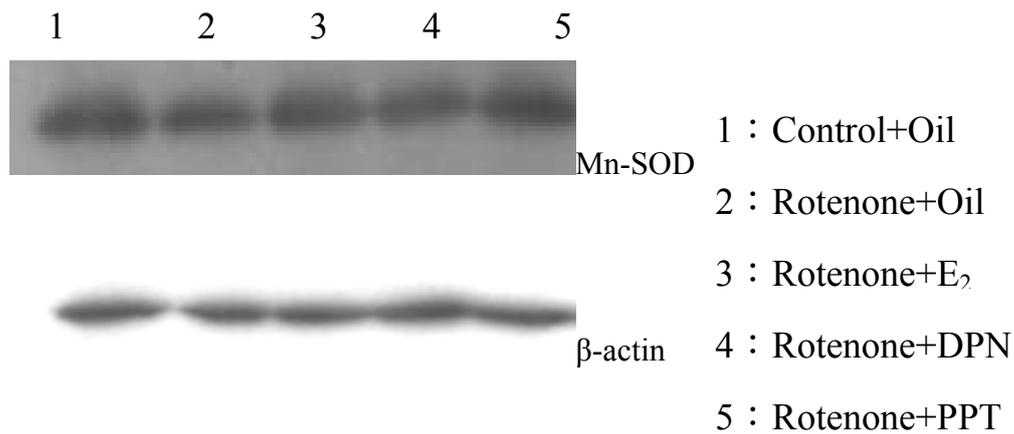
圖十四

高放大倍率圖顯示切除卵巢之大白鼠接受雌二醇、乙型 (DPN) 及甲型 (PPT) 動情素接受體致效劑對黑質部位 TH 神經元的形態表現之影響。——為 10um



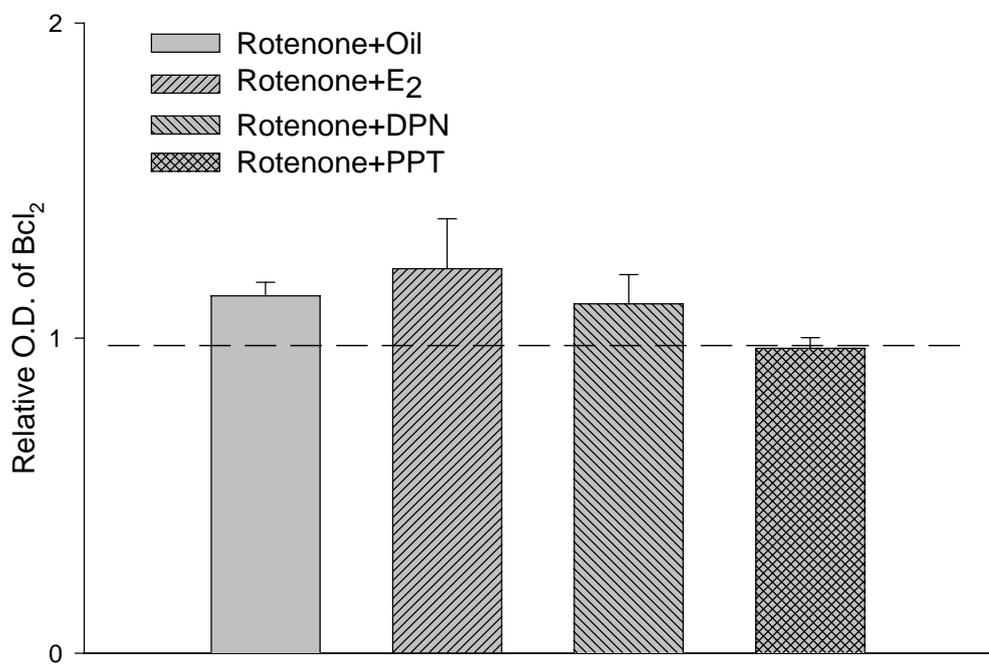
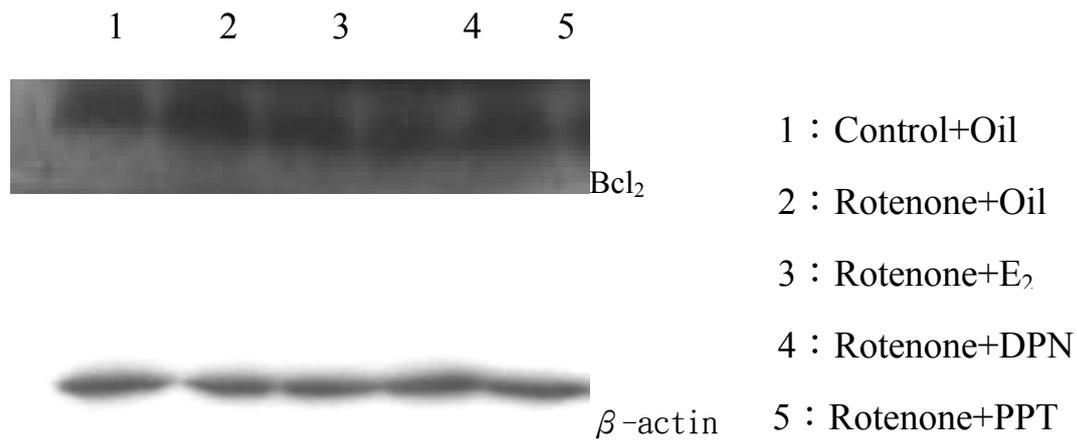
圖十五

皮下給予雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對去除卵巢並接受魚藤酮處理之大白鼠黑質中Cu/Zn-SOD表現之影響 (n = 3)。各組以 mean ± SEM表示，虛線為對照組數值，各組之相對吸光值均除以 β-actin 而得；經魚藤酮處理後各組之Cu/Zn-SOD表現量均顯著少於控制組 ( $P < 0.05$ )。(Rotenone:魚藤酮，DPN:乙型動情素接受體致效劑，PPT:甲型動情素接受體致效劑)



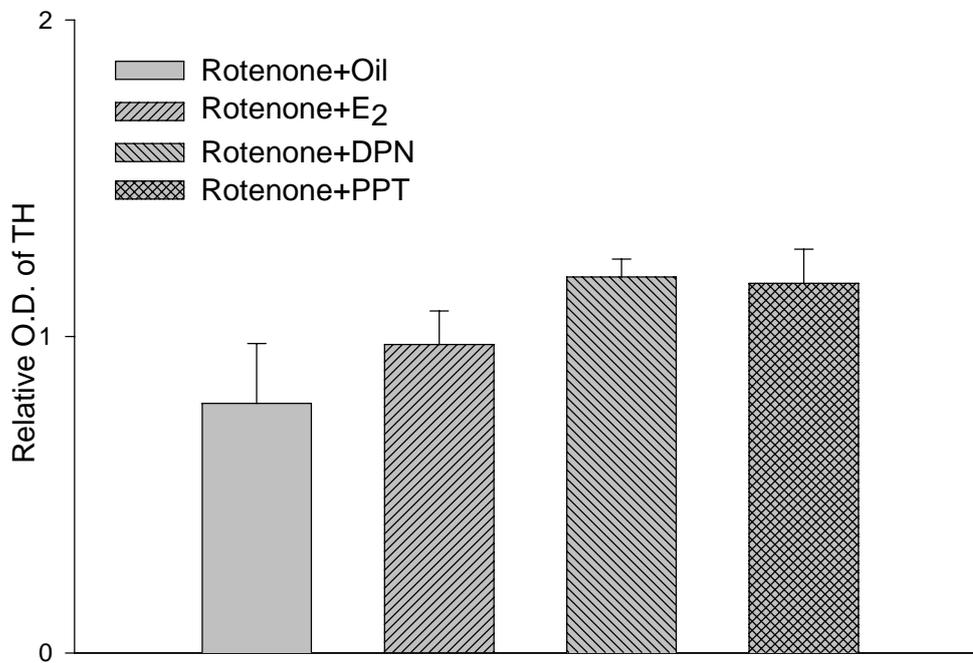
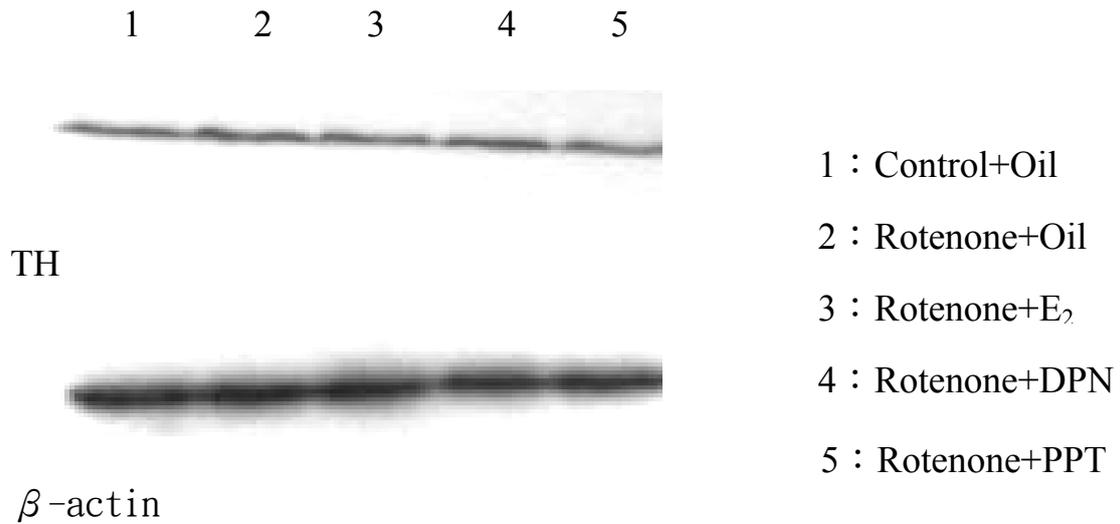
圖十六

皮下給予雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對去除卵巢並接受魚藤酮處理之大白鼠黑質中Mn-SOD表現之影響 (n=4)。各組以 mean  $\pm$  SEM表示，虛線為對照組數值，各組之相對吸光值均除以  $\beta$ -actin 而得。(Rotenone:魚藤酮，DPN:乙型動情素接受體致效劑，PPT:甲型動情素接受體致效劑)



圖十七

皮下給予雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對去除卵巢並接受魚藤酮處理之大白鼠黑質中Bcl<sub>2</sub>表現之影響 (n = 4)。各組以 mean ± SEM表示，虛線為對照組數值，各組之相對吸光值均除以  $\beta$ -actin 而得。(Rotenone:魚藤酮，DPN:乙型動情素接受體致效劑，PPT:甲型動情素接受體致效劑)



圖十八

皮下給予雌二醇、甲型及乙型動情素接受體致效劑對去除卵巢並接受魚藤酮處理之大白鼠黑質中TH表現之影響 (n=4)。各組以 mean  $\pm$  SEM表示，虛線為對照組數值，各組之相對吸光值均除以  $\beta$ -actin 而得。(Rotenone:魚藤酮，DPN:乙型動情素接受體致效劑，PPT:甲型動情素接受體致效劑)

## 第六章、參考文獻

Abraham S., Soundararajan CC., Vivekanandhan S., Behari M. Erythrocyte antioxidant enzymes in Parkinson's disease. *J Med Res.* 2005;121:111-115.

Alam ZI., Daniel SE., Lees AJ., Marsden DC., Jenner P., Halliwell B. A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease. *J Neurochem.* 1997a;69:1326-1329.

Alam ZI., Jenner A., Daniel SE., Lees AJ., Cairns N., Marsden CD., Jenner P., Halliwell B. Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem.* 1997b;69:1196-1203.

Beal MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann Neurol.* 1992;31:119-130.

Cardellach F., Marti MJ., Fernandez-Sola J., Marin C., Hoek JB., Tolosa E., Urbano-Marquez A. Mitochondrial respiratory chain activity in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease. *Neurology.* 1993;43:2258-2262.

Clarke CE. Neuroprotection and pharmacotherapy for motor symptoms in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2004;3:466-474.

Davis CF., Davis BF., Halaris AE. Variations in the uptake of 3H-dopamine during the estrous cycle. *Life Sci.* 1977;20:1319-1332.

Dawson TM., Dawson VL. Rare genetic mutations shed light on the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Clin. Invest.* 2003;111:145-151.

Delong MR . The basal ganglia. In Kandel ER.ED. *Principles of neural science.* 4<sup>th</sup> ED. McGraw Hill .pp.853-867. 2000.

Dexter DT., Carter CJ., Wells FR., Javoy-Agid F., Agid Y., Lees A., Jenner P., Marsden CD. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is

increased in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 1989 ; 52:381-389.

Dluzen D., Horstink M. Estrogen as neuroprotectant of nigrostriatal dopaminergic system: laboratory and clinical studies. *Endocrine.* 2003;21:67-75.

Dluzen DE., McDermott JL., Liu B. Estrogen alters MPTP-induced neurotoxicity in female mice: effects on striatal dopamine concentrations and release. *J Neurochem.* 1996;66:658-666.

Dubal DB., Shughrue PJ., Wilson ME., Merchenthaler I., Wise PM. Estradiol modulates bcl<sub>2</sub> in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J. Neurosci.* 1999;19:6385-6393.

Dubal DB., Zhu H., Yu J., Rau SW., Shughrue PJ., Merchenthaler I., Kindy MS., Wise PM. Estrogen receptor  $\alpha$  not  $\beta$  is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:1952-1957.

Fernandez HH, Lapane KL. Estrogen use among nursing home residents with a diagnosis of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2000 ;15:1119-1124.

Fernandez-Ruiz JJ., Hernandez ML., de Miguel R., Ramos JA. Nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic activities were modified throughout the ovarian cycle of female rats. *J Neural Transm Gen Sect.* 1991;85:223-229.

Ferrante RJ, Schulz JB, Kowall NW, Beal MF. Systemic administration of rotenone produces selective damage in the striatum and globus pallidus, but not in the substantia nigra. *Brain Res.* 1997;753:157-162.

Green PS., Gridley KE., Simpkins JW. Nuclear estrogen receptor-independent neuroprotection by estratrienes: a novel interaction with glutathione. *Neuroscience.* 1998;84:7-10.

Green S., Walter P., Kumar V., Krust A., Bornert JM., Argos P., Chambon P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature.* 1986;320:134-139.

Greenamyre JT., MacKenzie G., Garcia-Osuna M., Betarbet R. A novel model of slowly progressive Parkinson's disease: chronic pesticide exposure. *Mov. Disord.* 1999;14:900.

Greenamyre JT., Sherer TB., Betarbet R., Panov AV. Complex I and Parkinson's disease. *IUBMB Life.* 2001;52:135-141.

Greengrass PM., Tonge SR. Changes in brain monoamine concentrations during the oestrous cycle in the mouse: possible pharmacological implications. *J Pharm Pharmacol.* 1971;23:897-898.

Gustafsson JA. Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol.* 1999;163:379-383.

Hockenbery DM., Oltvai ZN., Yin XM., Milliman CL., Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* 1993 ;75:241-251.

Hsueh AJ., Adashi EY., Jones PB., Welsh TM Jr. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev.* 1984;5:76-127.

Ivanova T., Kupperts E., Engele J., Beyer C. Estrogen stimulates brain-derived neurotrophic factor expression in embryonic mouse midbrain neurons through a membrane-mediated and calcium-dependent mechanism. *J Neurosci Res.* 2001;66:221-230.

Jenner P., Olanow CW. Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1998;44(3 Suppl 1):S72-84.

Ji L., Mochon E., Arcinas M. and Boxer LM. CREB proteins function as positive regulators of the translocated bcl-2 allele in t(14; 18) lymphomas. *J. Biol. Chem.* 1996;271:687-691.

Jicha GA., Salamone JD. Vacuous jaw movements and feeding deficits in rats with ventrolateral striatal dopamine depletion: possible relation to parkinsonian symptoms. *J Neurosci.* 1991;11:3822-3829.

Jollow DJ., McMillan DC. Oxidative stress, glucose-6-phosphate dehydrogenase and the red cell. *Adv Exp Med Biol.* 2001;500:595-605.

Jori A., Colturani F., Dolfini E., Rutzynski M. Modifications of the striatal dopamine metabolism during the estrus cycle in mice. *Neuroendocrinology.* 1976;21:262-266.

Kandel ER. Disorder of thought and volition : Schizophrenia In Kandel ER. ED. 4<sup>th</sup> *Principles of neural science.* McGraw Hill. pp.1188-1207. 2000.

Kelley AE., Lang CG., Gauthier AM. Induction of oral stereotypy following amphetamine microinjection into a discrete subregion of the striatum. *Psychopharmacology (Berl).* 1988;95:556-559.

Kew JN., Smith DW., Sofroniew MV. Nerve growth factor withdrawal induces the apoptotic death of developing septal cholinergic in vitro: protection by cyclic AMP analogue and high potassium. *Neuroscience.* 1996;70:329-339.

Khan MM., Hadman M., Wakade C., De Sevilla LM., Dhandapani KM, Mahesh VB, Vadlamudi RK, Brann DW. Cloning, expression, and localization of MNAR/PELP1 in rodent brain: colocalization in estrogen receptor-alpha-but not in gonadotropin-releasing hormone-positive neurons. *Endocrinology.* 2005;146(12):5215-5227

Kienlen Campard P., Crochemore C., Rene F., Monnier D., Koch B., Loeffler JP. PACAP type I receptor activation promotes cerebellar neuron survival through the cAMP/PKA signaling pathway. *DNA Cell Biol.* 1997;16:323-333.

Kobayashi Y., Shinozawa T. Effect of dibutyryl cAMP and several reagents on apoptosis in PC12 cells induced by a sialoglycopeptide from bovine brain. *Brain Res.* 1997;778:309-317.

Kompoliti K, Comella CL., Jaglin JA., Leurgans S., Raman R., Goetz CG. Menstrual-related changes in motoric function in women with Parkinson's disease. *Neurology.* 2000;55:1572-1575.

Kraichely DM., Sun J., Katzenellenbogen JA., Katzenellenbogen BS. Conformational changes and coactivator recruitment by novel ligands for estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta: correlations with biological character and distinct differences among SRC coactivator family members. *Endocrinology*. 2000;141:3534-3545.

Kuiper GG, Enmark JM., Peltö-Huikko E., Nilsson M., Gustafsson J-A S. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Sci. USA* 1996;93:5925-5930.

Kunikowska G., Jenner P. 6-Hydroxydopamine-lesioning of the nigrostriatal pathway in rats alters basal ganglia mRNA for copper, zinc- and manganese-superoxide dismutase, but not glutathione peroxidase. *Brain Res*. 2001;922:51-64.

Kunikowska G., Jenner P. The distribution of copper, zinc- and manganese-superoxide dismutase, and glutathione peroxidase messenger ribonucleic acid in rat basal ganglia. *Biochem Pharmacol*. 2002;63:1159-1164.

Lang AE., Lozano AM. Parkinson's disease. First of two parts. *New Engl. J. Med*. 1998 a ;339:1044-1053.

Lang AE., Lozano AM. Parkinson's disease. Second of two parts. *New Engl. J. Med*. 1998b;339:1130-1143.

Langston JW., Ballard PA. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 5, 6-tetrahydropyridine. *N Engl J Med*. 1983;309:310.

Lapointe N., St-Hilaire M., Martinoli MG., Blanchet J., Gould P., Rouillard C., Cicchetti F. Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity. *FASEB J*. 2004;18:717-719.

Lyons KE, Hubble JP, Troster AI, Pahwa R, Koller WC. Gender differences in Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol*. 1998 ;21:118-121.

Marshall LE., Himes RH. Rotenone inhibition of tubulin selfassembly. *Biochim Biophys Acta*. 1978;543: 590-594.

Mayeux R., Denaro J., Hemenegildo N., Marder K., Tang MX., Cote LJ., Stern Y. A population-based investigation of Parkinson's disease with and without dementia. Relationship to age and gender. *Arch Neurol*. 1992;49:492-497.

McCullough KD., Martindale JL., Klotz LO., Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol*. 2001;21:1249-1259.

Miller WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev*. 1988;9:295-318.

Miranda RC., Sohrabji F., Toran-Allerand D. Interactions of estrogen with the neurotrophins and their receptors during neural development. *Horm Behav*. 1994;28:367-375.

Morissette M., Di Paolo T. Effect of chronic estradiol and progesterone treatments of ovariectomized rats on brain dopamine uptake sites. *J Neurochem*. 1993;60:1876-1883.

Mouradian MM. Recent advances in the genetics and pathogenesis of Parkinson disease. *Neurology*. 2002;58:179-185.

Nilsson S., Makela S., Treuter E., Tujague M., Thomsen J., Andersson G., Enmark E., Pettersson K., Warner M. and Gustafsson JA. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*. 2001;81:1535-1565.

Ogawa S., Chan J., Gustafsson JA., Korach KS., Pfaff DW. Estrogen increases locomotor activity in mice through estrogen receptor alpha: specificity for the type of activity. *Endocrinology*. 2003;144:230-239.

Ozgonul M, Oge A, Sezer ED, Bayraktar F, Sozmen EY. The effects of estrogen and raloxifene treatment on antioxidant enzymes in brain and liver of ovariectomized female rats. *Endocr Res*. 2003 ;29:183-189.

Pasqualini C., Olivier V., Guibert B., Frain O., Leviel V. Rapid stimulation of striatal dopamine synthesis by estradiol. *Cell Mol Neurobiol.* 1996;16:411-415. No abstract available.

Pasqualini C., Olivier V., Guibert B., Frain O., Leviel V. Acute stimulatory effect of estradiol on striatal dopamine synthesis. *J Neurochem.* 1995;65:1651-1657.

Paxinos G., Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 2<sup>nd</sup> ED. Academic Press Inc;1986.

Pearce RK., Owen A., Daniel S., Jenner P., Marsden CD. Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 1997;104:661-677.

Pettersson K., Gustafsson JA. Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu Rev Physiol.* 2001;63:1685-1692.

Priyadarshi A., Khuder SA., Schaub EA., Priyadarshi SS. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ.Res.* 2001;86:122-127.

Ramirez AD., Liu X, Menniti FS. Repeated estradiol treatment prevents MPTP-induced dopamine depletion in male mice. *Neuroendocrinology.* 2003;77:223-231.

Ren Y., Liu W., Jiang H., Jiang Q., Feng J. Selective vulnerability of dopaminergic neurons to microtubule depolymerization. *J Biol Chem.* 2005;280:34105-34112.

Rydel RE., Greene LA. cAMP analogs promote survival and neurite outgrowth in cultures of rat sympathetic and sensory neurons independently of nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:1257-1261.

Salamone JD., Zigmond MJ., Stricker EM. Characterization of the impaired feeding behavior in rats given haloperidol or dopamine-depleting

brain lesions. *Neuroscience*. 1990;39:17-24.

Saunders-Pullman R., Gordon-Elliott J., Parides M., Fahn S., Saunders HR., Bressman S. The effect of estrogen replacement on early Parkinson's disease. *Neurology*. 1999 ;52:1417-1421.

Sawada H., Ibi M, Kihara T., Urushitani M., Akaike A., Shimohama S. Estradiol protects mesencephalic dopaminergic neurons from oxidative stress-induced neuronal death. *J Neurosci Res*.1998;54:707-719.

Sawada H., Ibi M., Kihara T., Honda K., Nakamizo T., Kanki R., Nakanishi M., Sakka N., Akaike A., Shimohama S. Estradiol protects dopaminergic neurons in a MPP<sup>+</sup> Parkinson's disease model. *Neuropharmacology*. 2002;42:1056-1064.

Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson s disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res*. 2004;318:215-224.

Sherer TB., Betarbet R., Greenamyre JT. Environment, mitochondria, and Parkinson's disease. *Neuroscientist*. 2002;8:192-197.

Sherer TB., Betarbet R., Testa CM., Seo BB., Richardson JR., Kim JH., Miller GW., Yagi T., Matsuno-Yagi A., Greenamyre JT. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosc* .2003;23 :10756-10764.

Shughrue P., Scrimo P., Lane M., Askew R., Merchenthaler I. The distribution of estrogen receptor- $\beta$ mRNA in forebrain regions of the estrogen receptor- $\alpha$ knockout mouse. *Endocrinology*. 1997 a;138:5649-5652.

Shughrue PJ., Komm B., Merchenthaler I. The distribution of estrogen receptor- $\beta$ mRNA in the rat hypothalamus. *Steroids*.1996;61:678-681.

Shughrue PJ., Lane M V., Merchenthaler I. Comparative distribution of estrogen receptor $\alpha$ and $\beta$ mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol*. 1997 b;88:507-525.

Shughrue PJ., Lane MV., Merchenthaler I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* 1997 c ;388:507-525.

Simoncini T and Genazzani AR. Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol.*2003;148:281-292.

Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology.* 1975;96:219-226.

Stauffer SR., Coletta CJ., Tedesco R., Nishiguchi G., Carlson K., Sun J., Katzenellenbogen BS., Katzenellenbogen JA. Pyrazole ligands: structure-affinity/activity relationships and estrogen receptor-alpha-selective agonists. *J Med Chem.* 2000;43 :4934-4937.

Thiffault C., Langston JW., Di Monte DA. Donato A. Increased striatal dopamine turnover following acute administration of rotenone to mice. *Brain Research.* 2000;885:283-288.

Turrens JF., Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* 1980;191:421-427.

Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol.* 1968;5:107-110.

Uversky VN. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. *Cell Tissue Res.* 2004;318:225-241.

Van der Walt JM., Nicodemus KK., Martin ER., Scott WK., Nance MA., Watts RL., Hubble JP., Haines JL., Koller WC., Lyons K., Pahwa R., Stern MB., Colcher A., Hiner BC., Jankovic J., Ondo WG., Allen FH Jr., Goetz CG., Small GW., Mastaglia F., Stajich JM. Zhang Y., Dawson VL., Dawson TM. Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2000;7:240-250.

Zhang Y., Dawson VL., Dawson TM. Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.*2000;7:240-250.

呂鋒洲。抗氧化酵素之介紹。自由基生物學與醫學。1993；1：1-17.

陳惠英，顏國欽。自由基、抗氧化防禦與人體健康。營養科學期刊 1998；  
23：105-121.

葉玲瑜。不同雌性素接受體對於攝食量及體重的調控作用與下視丘神經勝肽表現量的影響。中國醫藥大學碩士學位論文。2004。



## 作者簡歷

姓名：雷玉潔

學歷：私立中國醫藥大學基礎醫學研究所

私立弘光科技大學 護理系

### 期刊論文

1. Yang C-S. J., Lei Y-J., Wang H-J. (2002) : Effect of Inosine 5'-Monophosphate of Food Intake and Water Intake in Male and Female Rats. 中國醫藥科學雜誌 3 (4) : 333-342.

### 會議論文

1. Y.J. Lei, C.S. J. Yang, H-J. Wang. (2006) : Effects of different estrogen receptor agonists on rotenone-induced parkinsonism in rats. 生物醫學聯合學術年會 (Abstracts)
2. M.J. Yeh, J.W. Lee, Y.J. Lei, C.S. J. Yang, H-J. Wang. (2005) : Effects of selective estrogen receptor agonists on energy balance. 生物醫學聯合學術年會 (Abstracts)
3. Y.J. Lei, S.H. Lo, S.M. Lu, S.N. Liao, R.H. Chen, M.Y. Shiau, Y.T. Hsu, H-J. Wang, C.S. J. Yang. (2002) : Effects of inosine 5'-monophosphate on body weight gain, feeding and water intake in adult male rats. 生物醫學聯合學術年會 (Abstracts)