

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

阿魏酸及相關化合物對氧化壓力而致神經損傷暨細胞凋亡之 保護作用及神經分子機制探討

計畫編號：NSC 92-2320-B-039-042

執行期限：92年8月1日至93年7月31日

主持人：吳啟瑞 執行機構及單位名稱：中國醫藥學大學中國藥學研究所

中英文摘要

本實驗分成四組：(1) 溶媒輸注組 (2) 類澱粉樣蛋白輸注組 (3) 阿魏酸治療組 (4) Vitamin C/E 治療組。結果發現類澱粉樣蛋白輸注組於被動迴避學習操作、水迷宮空間學習操作、參考記憶暨工作記憶等之障礙；阿魏酸於 300 mg/kg 可改善因類澱粉樣蛋白側腦室輸注所誘發之學習操作障礙。而正對照藥物僅 vitamin C/E 具改善作用。其次，類澱粉樣蛋白輸注組可造成皮質及海馬回 Mn-SOD 活性升高、GSSG 及 GSH 含量降低、AChE 活性升高。阿魏酸可降低因類澱粉樣蛋白輸注造成皮質及海馬回 Mn-SOD 活性升高、GSSG 及 GSH 含量降低、AChE 活性升高等現象。正對照藥物 vitamin C/E 亦具類似作用，惟可大幅增加海馬回 GSH 含量。

綜上所述，類澱粉樣蛋白輸注誘發擬似阿茲海默症鼠主要係因側腦室輸注類澱粉樣蛋白後所造成過氧化物及氧化壓力之形成，腦內 Mn-SOD 活性升高及 GSH 含量降低，進而造成被動迴避及水迷宮學習操作及記憶能力之障礙。阿魏酸可改善類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠之被動迴避、水迷宮學習操作及記憶能力障礙，其機轉可能與改善類澱粉樣蛋白所造成的氧化壓力及抑制乙醯膽鹼酯一活性等有關。而 Vitamin C/E 改善類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠被動迴避及水迷宮學習操作及記憶能力障礙之主要機轉可能與抗氧化活性有關。

關鍵詞：阿魏酸、類澱粉樣蛋白、被動迴避學習、水迷宮、氧化壓力

Abstract

Our present results suggest the performance impairment induced by continuous intracerebroventricular infusion of A β -(1-40) might be due to the deterioration of neuronal system and oxidative stress induced in rats. Ferulic acid repaired the performance impairment induced by A β -(1-40) infusion, and the action mechanism might be related to antioxidant and inhibiting acetylcholinesterase activity. Vitamin C/E also repaired the performance impairment, and the mechanism might be mainly related to antioxidant activity.

Keywords: Ferulic acid, amyloid b peptide, Passive avoidance task, Morris water maze, oxidative stress

一、前言

現今社會逐步邁入老年化，老年人在衰老過程所有之生理機能會逐漸衰退，因此其記憶能力亦將隨之減退；同時在生理機能逐漸衰退中，各類疾病亦將隨之罹患，其中癡呆症（dementia）發生率有逐年增加之趨勢，亦被世界衛生組織及各國所重視；老年癡呆症是一種廣泛性腦機能障礙疾病，對人的記憶、人格、行為和情緒均有影響，有報告指出，65歲以上，每20人中有1人；80歲以上，每5人中有1人會被老年癡呆症所困擾；而癡呆症罹患初期之臨床主要徵候為學習記憶之能力逐漸減退，特別是近期記憶喪失及剛學習之事物無法記得；而在病情日趨惡化，近、遠期之記憶會逐次喪失。因此，探討老年癡呆症之防治實為醫藥界未來課題之一。

老化及老年癡呆症發展過程主要相關理論之一為氧化壓力（oxidative stress）之產生，即體內自由基之產生與抗氧化防禦機制不平衡所致；而氧化壓力則肇因於缺血、缺氧暨再灌流下大量氧氣之提供、腦細胞內粒腺體不正常之代謝，造成活性氧化物（reactive oxygen species）之產生。當活性氧化物大量產生時，將造成DNA不正常斷裂、脂質過氧化、advanced glycation endproducts之產生；而膜脂質過氧化之產物如：malondialdehyde（MDA）、4-hydroxy-2-nonenal（4-HNE）…等，則造成神經纖維纏結之產生（老年癡呆症病變之一）、神經元萎縮、代謝不正常、葡萄糖運輸障礙…等，同時在蛋白醱化過程亦會促使 amyloid peptide 之形成與沈積、造成老年斑之產生（老年癡呆症病變之一）；最終會誘發 superoxide dismutase（SOD）、catalase、glutathione peroxidase（GSH-Px）…等防禦酵素活性之變化，並造成細胞膜損壞及細胞凋亡或壞死現象。In vitro 研究中即指出 oxidative stress 將誘發細胞內 amyloid peptide 之產生及聚集。

如上段所述，老年癡呆症一般常見者為阿滋海默氏症（Alzheimer's disease），阿滋海默氏症之主要病理變化有二：一為老年斑（senile plaque）、一為神經纖維纏結（neurofibrillary tangle）。其中，老年斑形成之主因係腦內 oxidative stress 造成 free radical 及 reactive oxygen species 之生成，增加 amyloid precursor protein 不正常裂解與分泌，促使不溶性之 amyloid peptide 1-40 形成，再在乙醯膽鹼分解 |（acetylcholinesterase、AChE）之刺激下，造成不溶性之 amyloid peptide 聚集並沈積於細胞膜上而成。另一方面，amyloid precursor protein 之不正常裂解除因年齡增長而增加，亦因 oxidative stress 造成 free radical 及 reactive oxygen 之生成而增加。離體（In vitro）之研究指出乙醯膽鹼分解 | 可與不溶性之 amyloid peptide 形成一毒性大於不溶性之 amyloid peptide 之穩定複合物，促進不溶性之 amyloid peptide 聚集入 amyloid fibrils，以形成老年斑，造成 neuronal degeneration 及 apoptosis；其中乙醯膽鹼分解 | 與不溶性 amyloid peptide 1-40 形成之穩定複合物毒性又遠大於乙醯膽鹼分解 | 與不溶性 amyloid peptide 1-42 形成之穩定複合物。再者，當乙醯膽鹼分解 | 與不溶性 amyloid peptide 聚集形成老年斑，將減少游離乙醯膽鹼分解 |；因此，在老年癡呆症之神經生化變化上會明顯出現 frontal cortex 及 hippocampus 乙醯膽鹼神經細胞、乙醯膽鹼釋出、乙醯膽鹼合成 |（choline acetyltransferase）及乙醯膽鹼分解 | 之減少。另一方面，當 amyloid peptide 聚集形成老年斑時，會造成 reactive oxygen species，促使 superoxide dismutase、catalase、GSH-Px 之活性明顯減少；因此，amyloid peptide 之形成暨沈積與 oxidative stress 有明顯關係，同時 amyloid peptide 之形成暨沈積亦與 cholinergic systems 有密切關係。

活體（In vivo）之研究指出 amyloid peptide 1-40 單次注射入腦室並不造成學習記憶障礙及乙醯膽鹼合成 | 之減少；但經腦室 infusion 後不僅可減少乙醯膽鹼合成 | 活性，亦可造成學習記憶障礙。而在以 amyloid peptide 1-42 單次注射入 NBM 之研究指出可造成動物行為改變、學習記憶障礙；同時可促使 somatosensory cortex 之 SOD（特別是 MnSOD）之活性明顯減少，且其減少程度與乙醯膽鹼分解之減少程度相應。最終，在 amyloid peptide 誘發之學習記憶障礙暨 neuronal degeneration 之防治研究中，estrogen、MK-801 及 vitamin E 均可藉由避免 free radical 所造成之細胞死亡現象而抑制 amyloid peptide 之神經毒性。而乙醯膽鹼分解 | 抑制劑 tacrine 於離體（in vitro）之研究中，亦

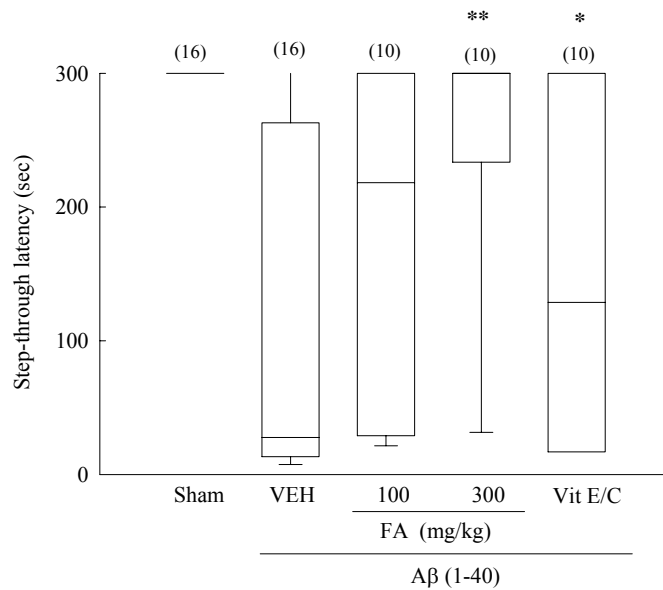
可選擇性抑制 amyloid peptide 之分泌。

二、研究目的

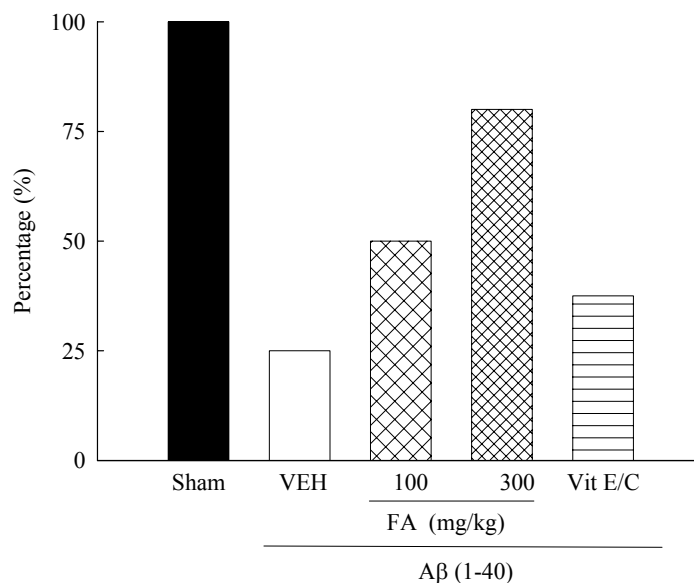
阿魏酸 (ferulic acid) 為繖形科植物當歸或川芎之共同成分，研究指出阿魏酸及相關化合物具抗氧化、抗發炎及抑制 cyclooxygenase 2 之活性；而在我們的研究中亦發現阿魏酸具改善藥物 (cycloheximide...等) 及 neurotoxins (AF64A...等) 誘發學習記憶障礙之作用，近期的研究更指出阿魏酸於離體之神經細胞培養中可保護因 hydroxy 及 peroxy radical 所造成之氧化損傷，且可保護 amyloid peptide 單次大量腦室注射或長期腦室輸注所造成之發炎暨氧化損傷現象。因此，本計畫擬以評估具抗氧化暨神經保護作用之阿魏酸在 amyloid peptide 1-40 誘導 oxidative stress 暨大鼠學習操作障礙之保護作用。

三、結果與討論

如圖所示，amyloid β peptide 1-40 連續輸注八天後，可造成大鼠被動迴避記憶障礙。阿魏酸 (300 mg/kg) 治療組、Vitamin C/E 治療組皆有明顯改善的現象。

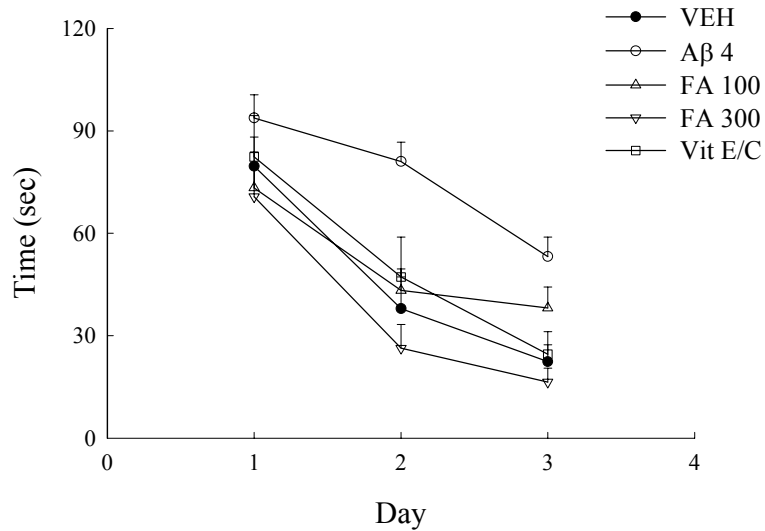


如圖所示，空白對照組 (VEH) 於被動迴避試驗明室滯留達 300 sec 之比率為 100%，amyloid β peptide 1-40 誘發疑似阿茲海默症大鼠於被動迴避試驗明室滯留達 300 sec 之比率僅為 25%；阿魏酸 (100、300 mg/kg) 治療組可使比率明顯提高。

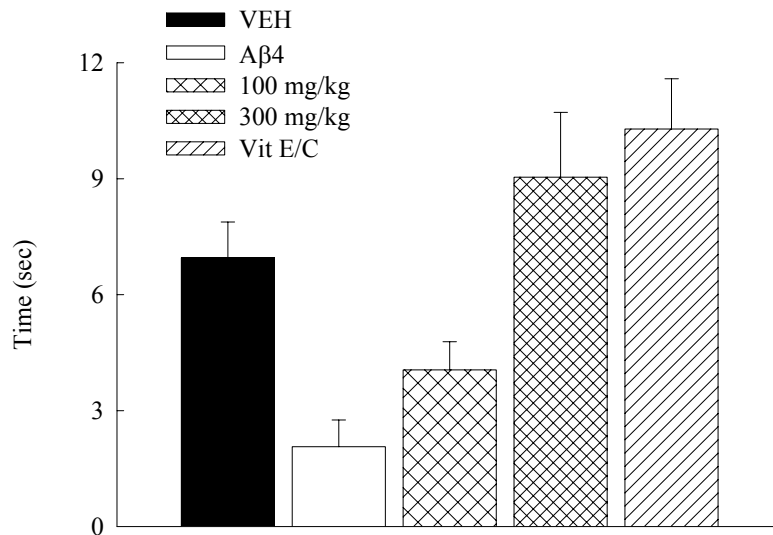


如圖所示，amyloid β peptide 1-40 連續輸注十天後，可造成大鼠於水迷宮空間性學習

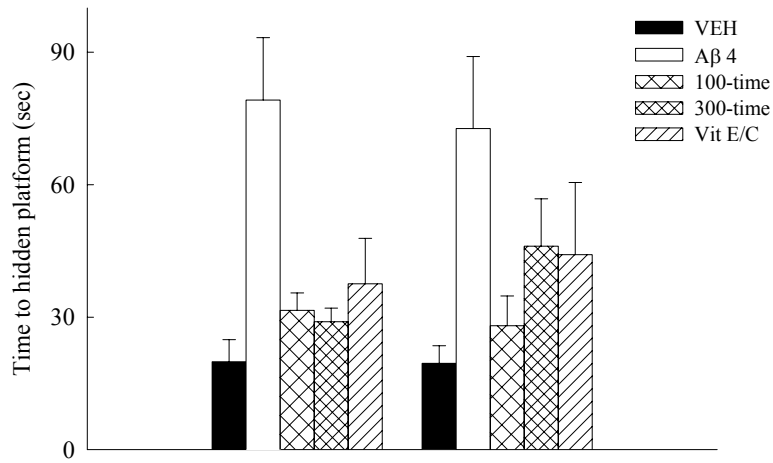
操作之障礙。阿魏酸僅於 300 mg/kg 時可改善 amyloid β peptide 1-40 連續輸注所造成空間學習操作障礙；而正對照組 Vitamin C/E 治療組亦具改善作用。



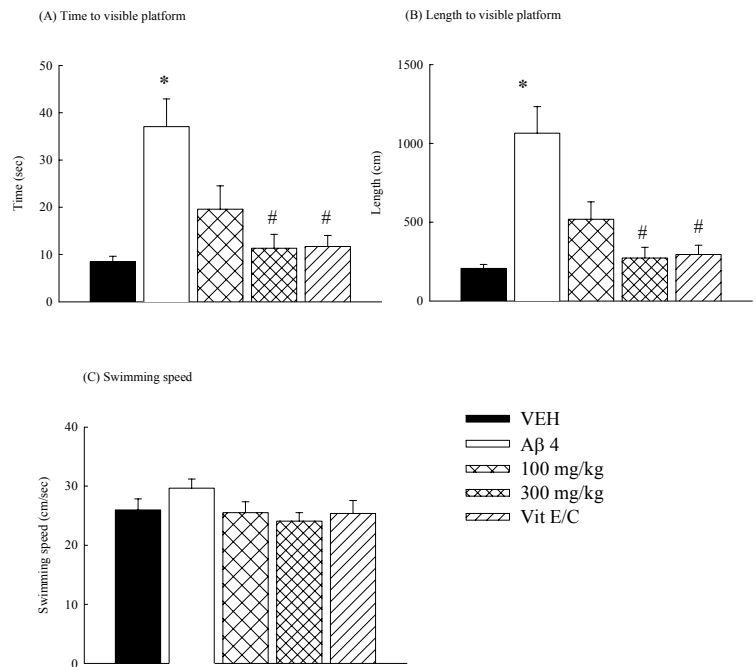
如圖所示，amyloid β peptide 1-40 連續輸注十二天後，可造成大鼠於水迷宮空間性參考記憶之障礙。阿魏酸僅於 300 mg/kg 時可改善 amyloid β peptide 1-40 連續輸注所造成空間參考記憶障礙；而正對照組僅 Vitamin C/E 治療組亦具改善作用。



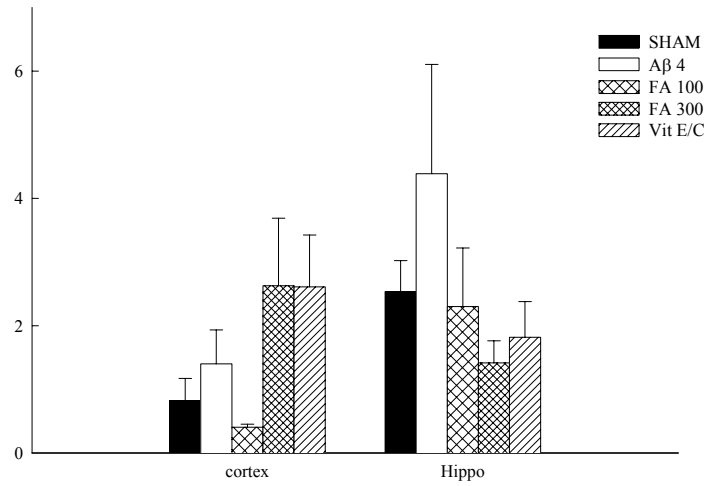
如圖所示，amyloid β peptide 1-40 連續輸注十三天後，可造成大鼠於水迷宮工作記憶之障礙。阿魏酸 (100、300 mg/kg) 治療組、Vitamine C/E 治療組可改善 amyloid β peptide 1-40 連續輸注所造成空間工作記憶障礙。



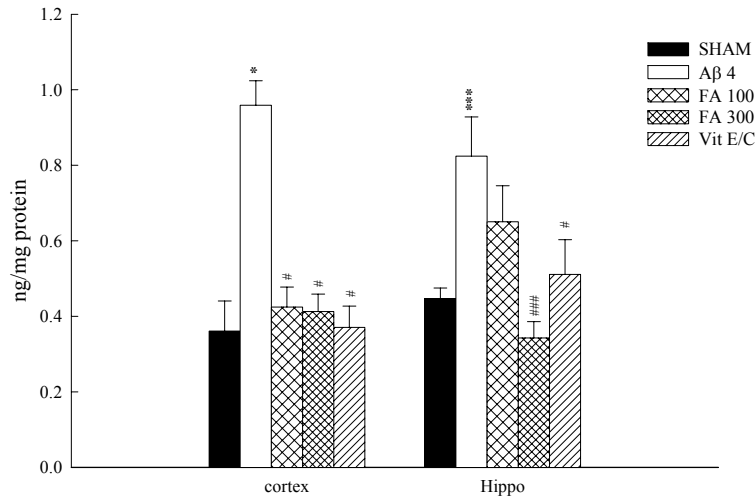
如圖所示，amyloid β peptide 1-40 連續輸注十三天後，可造成大鼠於水迷宮中找尋可見逃逸平台所花的時間及距離明顯增加。阿魏酸（300 mg/kg）治療組、Vitamine C/E 治療組可改善 amyloid β peptide 1-40 連續輸注所造成非空間性游泳操作能力障礙。而在游泳速度方面則無任何影響。



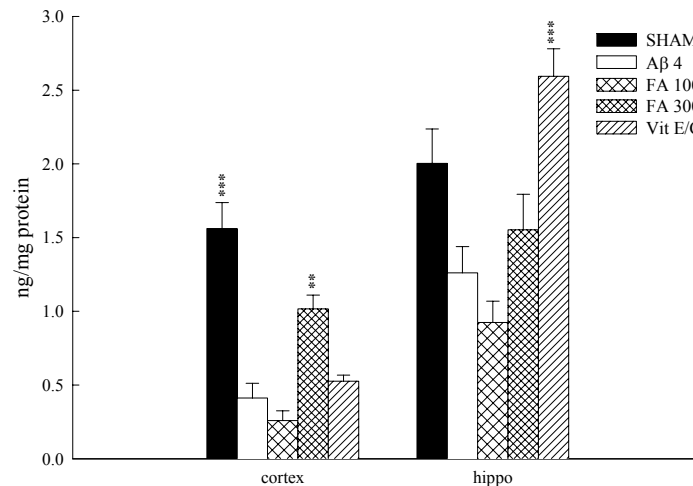
如圖所示，amyloid β peptide 1-40 連續輸注十四天後，大鼠皮質區及海馬回中 Cu/Mn-SOD 比率並無變化。阿魏酸對於 amyloid β peptide 1-40 連續輸注海馬回中 Cu/Mn-SOD 比率並無影響。



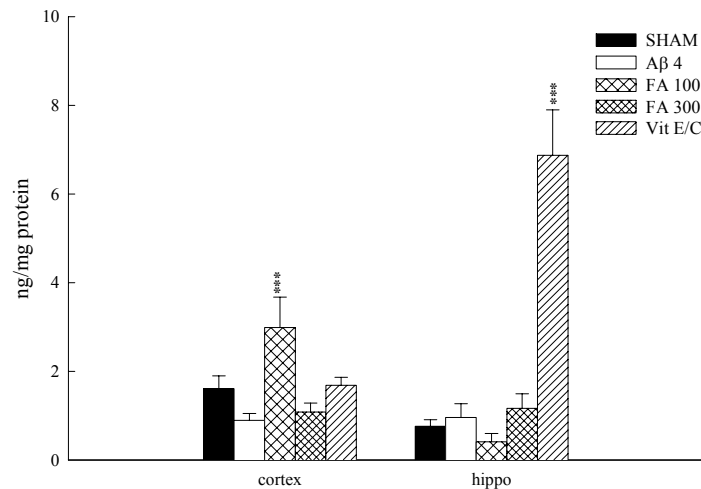
如圖所示，amyloid β peptide 1-40 連續輸注十四天後，可造成大鼠皮質區及海馬回中 acetylcholinesterase 的提高。在皮質區中：阿魏酸 (100、300 mg/kg) 可降低 amyloid β peptide 1-40 連續輸注所造成皮質區中 acetylcholinesterase 提高的作用；而正對照組 Vitamin C/E 治療組亦有降低的作用。在海馬回中：僅阿魏酸 (300 mg/kg) 可降低 amyloid β peptide 1-40 連續輸注所造成海馬回中 acetylcholinesterase 提高的作用；而正對照組 Vitamin C/E 治療組亦具降低之作用。



如圖所示，amyloid β peptide 1-40 連續輸注十四天後，可造成大鼠皮質區 GSSG 的減低。在皮質區中：阿魏酸 (300 mg/kg) 可改善 amyloid β peptide 1-40 連續輸注所造成皮質區中 GSSG 減低的作用。在海馬回中：僅正對照組 Vitamin C/E 治療組具改善作用。



如圖所示，amyloid β peptide 1-40 連續輸注十四天後，對於大鼠皮質區及海馬回中 GSH 無影響。在皮質區中：僅阿魏酸（100 mg/kg）可改善 amyloid β peptide 1-40 連續輸注所造成皮質區中 GSH 減低的作用。在海馬回中：僅正對照組 Vitamin C/E 治療組具改善作用。



綜上所述之結果，我們可知類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠主要係因側腦室輸注類澱粉樣蛋白後所造成過氧化物及氧化壓力之形成，腦內抗氧化機制紊亂（Mn-SOD 活性升高及 GSH 含量降低），而促使被動迴避及水迷宮學習操作及記憶能力之障礙。阿魏酸可改善類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠之被動迴避及水迷宮學習操作及記憶能力障礙，其機轉可能與改善類澱粉樣蛋白所造成的氧化壓力及抑制乙醯膽鹼酯一活性等有關。而 Vitamin C/E 本身即為一為抗氧化劑，因此其改善類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠被動迴避及水迷宮學習操作及記憶能力障礙之機轉可能與抗氧化活性有明確之關係，亦與抑制乙醯膽鹼酯一活性有關。

四、計畫成果自評

本計畫原擬以 3 年時間建立氧化損傷相關之老化暨痴呆的離體暨活體動物模式基礎來評估具抗氧化暨神經保護作用之阿魏酸及相關化合物在 amyloid peptide 1-40 合併 t-butyl hydroperoxide 誘導 oxidative stress 暨大鼠學習操作障礙之保護作用。但計畫僅通過一年，因此依照審查委員之建議直接進入動物模式，以簡單之 amyloid β peptide 1-40 輸注模式評估阿魏酸保護 amyloid β peptide 1-40 輸注所造成氧化損傷與記憶障礙之作用。並已獲致具體之成效發現阿魏酸可改善類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠之被動迴避及水迷宮學習操作及記憶能力障礙，其機轉可能與改善類澱粉樣蛋白所造成的氧化壓力及抑制乙醯膽鹼酯一活性等有關。

五、參考文獻

1. Markesbery WR (2000) Archives of Neurology 56: 1449-1452.
2. Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, Sayre AK, Perry G and Smith MA (2000) Alzheimer Disease & Associated Disorders 14(S1): S62-S66.
3. Hashimoto M, Hsu LJ, Xia Y, Takeda A, Sisk A, Sundsmo M and Masliah E (1999) Neuroreport 10: 717-721.
4. Misonou H, Morishima-Kawashima M and Ihara Y (2000) Biochemistry 39: 6951-6959.
5. Paola D, Domenicotti C, Nitti M, Vitali A, Borghi R, Cottalasso D, Zaccheo D, Odetti P, Strocchi P, Marinari UM, Tabaton M and Pronzato MA (2000) 642-646.
6. Gooch MD and Stennett DJ (1996) American Journal of Health-System Pharmacy 53(13):1545-1557; quiz 1603-1604.

7. Octave JN (1995) *Reviews in the Neurosciences* 6(4):287-316.
8. Iversen LL, Mortishire-Smith RJ, Pollack SJ and Shearman MS (1995) *Biochemical Journal* 311: 1-6.
9. Calderon FH, von Bernhardt R, De Ferrai G, Luza S, Aldunate R, Inestrosa NC (1998) *Molecular Psychiatry* 3: 247-255.
10. Paola D, Domenicotti C, Nitti M, Vitali A, Borghi R, Cottalasso D, Zaccheo D, Odetti P, Strocchi P, Marinari UM, Tabaton M and Pronzato MA (2000) *Biochemical & Biophysical Research Communication* 268: 642-646.
11. Alvarez A, Pazo C, Alarcon R, Garrido J and Inestrosa NC (1997) *Journal of Molecular Biology* 272: 348-361.
12. Opazo C and Inestrosa NC (1998) *Molecular & Chemical Neuropathology* 33: 39-49.
13. Munoz FJ and Inestrosa NC (1999) *FEBS Letters* 450: 205-209.
14. Sberna G, Saez-Valero J, Beyreuther K, Masters CL and Small DH (1997) *Journal of Neurochemistry* 69: 1177-1184.
15. Mimori Y, Nakamura S and Yukawa M (1997) *Behavioral Brain Research* 83: 25-30.
16. Francis PT, Palmer AM, Snape M and Wilcock GK (1999) *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 66(2): 137-147.
17. Yatin SM, Aksenova M, Aksenov M, Markesbery WR, Aulick T and Butterfield DA (1998) *Journal of Molecular Neuroscience* 11: 183-197.
18. Butterfield DA, Yatin SM, Varadarajan S and Koppal T (1999) *Methods in Enzymology* 309: 746-768.
19. Brera B, Serrano A and de Ceballos ML (2000) *Neurobiology of Disease* 7: 395-405.
20. Mattson MP and Pedersen WA (1998) *International Journal of Development and Neuroscience* 16: 737-753.
21. Ivins KJ, Bui ET and Cotman CW (1998) *Neurobiology of Disease* 5(5):365-78.
22. Huang HM, Ou HC and Hsieh SJ (2000) *Life Sciences* 66(19):1879-92.
23. Ekinci FJ, Linsley MD and Shea TB (2000) *Molecular Brain Research* 76(2):389-95.
24. Demeester N, Baier G, Enzinger C, Goethals M, Vandekerckhove J, Rosseneu M and Labeur C (2000) *Molecular Membrane Biology* 17(4):219-28.
25. Anderson I, Adinolfi C, Doctrow S, Huffman K, Joy KA, Malfroy B, Soden P, Rupniak HT and Barnes JC (2001) *Biochem Soc Symp* (67):141-9.
26. Ye L and Qiao JT (1999) *Neuroscience Letters* 275: 187-90.
27. Cleary J, Hittner JM, Semotuk M, Mantyh P and O'Hare E (1995) *Brain Research* 682: 69-74.
28. Nabeshima T and Nitta A (1994) *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 174: 241-249.
29. Nitta A, Itoh A, Hasegawa T and Nabeshima T (1994) *Neuroscience Letters* 170: 63-66.
30. Nitta A, Fukuta T, Hasegawa T and Nabeshima T (1997) *Japanese Journal of Pharmacology* 73: 51-57.
31. Harkany T, Mulder J, Sasvari M, Abraham I, Konya C, Zarandi M, Penke B, Luiten PGM and Nyakas C (1999) *Neurobiology of Disease* 6: 109-121.
32. Bonnefont AB, Munoz FJ and Inestrosa NC (1998) *FEBS Letters* 441: 220-224.
33. Yamada K, Tanaka T, Han D, Senzaki K, Kameyama T and Nabeshima T (1999) *European Journal of Neuroscience* 11: 83-90.
34. Lahiri DK and Farlow MR (1996) *Journal of Molecular Neuroscience* 7: 41-49.
35. Lahiri DK, Farlow MR and Sambamurti K (1998) *Molecular Brain Research* 62: 131-140.
36. VanDenBerg CM, Kazmi Y and Jann MW (2000) *Drugs & Aging* 16: 123-138.

37. Durany N, Munch G, Michel T and Riederer P (1999) *European Archives Journal of Psychiatry & Clinical Neuroscience* 249(S3): 68-73.
38. Behl C (1997) *Cell & Tissue Research* 290: 471-480.
39. Graf E. (1992) *Free Radic Biol Med* 13(4):435-448.
40. Ozaki Y. (1992) *Chem Pharm Bull* 40(4):954-956.
41. Sakai S., Ochiai, H., Nakajima, K., Terasawa, K. (1997) *Cytokines* 9: 242-248.
42. Kikuzaki H, Hisamoto M, Hirose K, Akiyama K, Taniguchi H.(2002) *Journal of Agric Food Chemistry* 50(7):2161-2168.
43. Hsieh MT, Tsai FH, Lin YC, Wang WH, Wu CR. (2002) *Planta Medica* 68: 754-756.
44. Kanski J, Aksenova M, Stoyanova A, Butterfield DA. (2002) *Journal of Nutritional Biochemistry* 13: 273-281.
45. Yan JJ, Cho JY, Kim HS, Kim KL, Jung JS, Huh SO, Suh HW, Kim YH, Song DK. (2001) *Br J Pharmacol* 133(1):89-96.
46. Tsai FH, Hsieh MT and Wu CR (2002) Ferulic acid attenuates amyloid peptide 1-40-induced memory impairment in rats.