行政院國家科學委員會專題研究計畫　成果報告

探討中藥金銀花對神經細胞興奮毒性的保護機制-從自由基與抗氧化系統的角度研究

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：NSC92-2320-B-039-038-
執行期間：92 年 08 月 01 日至 93 年 07 月 31 日
執行單位：中國醫藥大學解剖學科

計畫主持人：柯妙華

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1 年後可公開查詢

中　華　民　國 93 年 9 月 20 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫名稱：探討中藥金銀花對神經細胞興奮毒性的保護機制
-從自由基與抗氧化系統的角度研究
計畫編號：**NSC92－2320－B－039－038**
執行期限：92 年 08 月 01 日至 93 年 07 月 31 日
主持人　：柯妙華
執行機構及單位名稱：中國醫藥大學、醫學系解剖學科

一、中文摘要

綠原酸，是中國藥草金銀花提煉出來的主要化學成份之一。相關研究顯示，綠原酸可以清除肝臟細胞內的自由基與一氧化氮。然而這些研究大多以肝臟細胞與肝癌細胞為主題，綠原酸對於神經細胞興奮毒性是否具有相同的保護作用？其保護機轉又為何？至今仍然不清楚，這也是我們極欲探索的。我們取出生後第七天的大白鼠之海馬體神經細胞進行體外培養，處理 150 μM kainate，在 kainate 處理 2 小時後，造成自由基產量增加 124%，及造成神經細胞的損傷。若在 kainate 處理之前先給予綠原酸，結果顯示能 dose-dependent 地抑制 kainate 所引發的細胞死亡，並且降低 kainate 所誘發 ROS 產量上升。這結果證明綠原酸具有保護神經細胞，免於興奮性毒性的傷害。

關鍵詞：中藥金銀花、綠原酸、興奮毒性、自由基、抗氧化系統

Abstract

Chlorogenic acid, an active principal isolated from the chinese herb “Lonicera joponica Thunb”, has been shown as a scavenger of free radicals in liver cells. The effects and mechanisms of chlorogenic acid on neuronal excitotoxicity induced by kainate are still unknown. We induced excitotoxicity in cultured rat hippocampal neurons by exposure to 150 μM kainate, the effect of kainate on mitochondrial membrane potential (MMP) and reactive-oxygen species (ROS) production in cultured rat hippocampal neurons were investigated. Kainate induced a maximum decrease of 29% in MMP in 1 h, a maximum increase of 124% in ROS production in 2 h, and increase of 43% in calcium accumulation in mitochondria. Furthermore, we also investigated the effects of chlorogenic acid on kainate-induced ROS production, decrease in MMP, and excitotoxicity. The result demonstrated that pretreatment with chlorogenic acid inhibited the ROS production, the decrease of MMP, and the excitotoxicity induced by kainate.

Keywords: Lonicera joponica Thunb, Chlorogenic acid, Excitotoxicity, Free radicals, Antioxidants

二、緣由與目的

興奮毒性(excitotoxicity)，即是神經細胞過度興奮。事實上，臨床上常見的神經疾病，如 Parkinson’s disease、Huntington disease 與阿茲海默氏症

(Alzheimer's disease)等，均可發現腦內興奮性神經傳遞物質異常分泌、興奮性神經傳遞物質之接受器(receptors)過度活化，導致神經細胞過度活化興奮的現象。目前已知神經細胞過份的興奮，容易造成細胞死亡(Choi 1992；Coyle and Puttfarcken 1993)。

Glutamate 是內生性的興奮性神經傳遞物質(neurotransmitter)，它可以活化至少五種亞型的 Glutamate 受体（receptor），即 NMDA (N-methyl-D-aspartate)、kainate、AMPA (amino-3-hydroxyl-5-methoisoxasole-4-propionate)、L-AP4(L2-amino–4– phosphono- butyric acid)和 metabotropic receptors。當腦部血糖過少、缺氧或撞傷，均會導致神經細胞急性損傷，此時 NMDA 受体扮演調節細胞的興奮程度（Watkin et al., 1966；Olney et al., 1976；Young 1991；Hayes et al., 1992）的重要角色。Kainate 受體在脊髓側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis)與阿茲海默氏症(Alzheimer's disease)會過度表現，造成細胞興奮毒性而死亡(Geddes et al., 1992)。Kainate 所誘發的神經細胞死亡，並不如 NMDA 來的直接和快速，神經細胞必須曝露在含有 kainate 的培養液中好幾個小時，才能導致細胞損傷與死亡(Koh et al., 1990；Kate et al., 1991)。Kainate 所造成神經細胞慢性毒殺的機制，至今仍不清楚，但其所發生的種種細胞反應，卻引起廣泛的討論。當 kainate 與 kainate 受體結合後，細胞內鈣離子大量堆積，引發一連串的生化反應產生；如活化 phospholipase A2，進而抑制 GABA 受体的作用，GABA 受体是中樞神經系統主要的抑制性受体（Schwartz et al., 1988）；同時 phospholipase 的活化，將會提高自由基的產量(Halliwell and Gutteridge 1991)，更加強對細胞的損傷。因此自由基與神經細胞興奮毒性是因果相輔、息息相關的。

近年來，越來越多的研究顯示，氧自由基與神經細胞興奮毒性息息相關。Koh 等（1990）與 Cheng 與 Sun (1994)將 kainate 加入大腦皮質細胞的培養皿中，發現大腦皮質細胞會產生 slow neurotoxicity 的現象，即細胞受損並觀察到大量自由基的生成。Dutrait 等(1995)將 Kainate 放入培養液 3 小時，神經細胞已有乳酸去氫 °(LDH)的釋放，同時會產生大量的 superoxide anion，此一損傷情形，會因事先加入 EGTA (Ca^{++} chelator)而避免，由此可見 kainate 所造成的興奮毒性是需要依賴鈣離子存在的。事實上，kainate 不僅造成自由基的生成，亦會產生脂質過氧化的現象（Puttfarcken et al., 1993）與粒腺體膜電位的改變(Prehn, 1998)。

進一步研究指出，不論在生物體內(in vivo)或離體實驗(in vitro)，若先降低自由基的生成，則可以抑制神經細胞興奮所引發的細胞死亡情形(Prehn et al., 1992；Patel et al., 1996)。

綠原酸，是中國藥草金銀花提煉出來的主要化學成份之一，其分子式為 $C_{16}H_{18}O_9$。相關研究顯示，綠原酸可以清除肝臟細胞內的自由基與一氧化氮(Kono et al., 1995; 1997; 1998)。然而這些研究大多以肝臟細胞與肝癌細胞為主題，綠原酸對於神經細胞興奮毒性是否具有相同的保護作用？其保護機轉又為何？至今仍然不清楚，這也是我們極欲探索的。

三、結果與討論

以 PI 及 DAPI 來計量細胞受損的百分比，結果顯示：控制組為 18.0 ± 4.0% ，以 150 μM kainate 處理組為 49.3 ± 2.3%，以 1 μM 綠原酸及 150 μM kainate 共同處理組為 33.0 ± 4.0%，以 5 μM 綠原酸及 150 μM kainate 共同處理

為組 22.3 ± 1.4%。經由 one way ANOVA LSD – test 的統計結果顯示，以 150 μM kainate 處理培養中的海馬體神經細胞 24 小時，會造成細胞受損百分比顯著的增加 ($P < 0.01$)。以 5 μM 綠原酸事先處理培養中的海馬體神經細胞 5 分鐘，再加入 150 μM kainate 共同處理 24 小時，則能明顯降低細胞受損的百分比 ($P < 0.01$)。

以 150 μM kainate 處理 2 小時，其 DCF 的相對螢光強度為 122.7 ± 6.3%，以 5 μM 綠原酸和 150 μM kainate 共同處理 2 小時為 102.3 ± 5.4%。經由 one way ANOVA LSD – test 的統計結果顯示，以 150 μM kainate 處理海馬體神經細胞 2 小時造成 ROS 產量明顯的增加 ($P < 0.05$)，以 5 μM 綠原酸事先處理 5 分鐘，再加入 150 μM kainate 共同處理 2 小時，能明顯降低 ROS 的量 ($P < 0.05$)。

四、參考文獻

(1) Cheng Y., and Sun A.Y., 1994, Oxidative mechanisms involved in kainate-induced cytotoxicity in cortical neurons. Neurochemical Res. 19(12): 1557- 1564.

(2) Choi D.W. 1992 Excitotoxic cell death J. Neurobiol . 23:1261-176.

(3) Coyle J.T., and Puttfarcken P., 1993, Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. (Review) Science 262 (5134): 689-95.

(4) Dutrait N., Culcasi M., Cazevieille C., Pietri S., Tordo P., Bonne C., and Muller A., 1995, Calcium-dependent free radical generation in cultured retinal neurons injured by kainate. Neurosci. Letter 198:13- 16.

(5) Geddes J.W., Ulas J., Brunner L.C., Choe W., and Cotman C.W., 1992, Hippoca,pal excitatory amino acid receptors in elderly, normal individuals and those with Alzheimer's disease: non-NMDA receptors. Neurosci. 50(1): 23-34.

(6) Halliwell B and Gutteridge JMC 1991 Protection against oxidants in biological system: the superoxide theory of oxygen toxicity.In Free radical in Biology and Medicine,2nd ed.pp87-187.

(7) Hayes RL., Jenkins LW, and Lyeth BG., 1992. Neurotransmitter-mediated mechanisms of traumatic brain injury: Acetylcholine and excitatory amino acids. J. Neurotrauma 9(Suppl.1): S173-87.

(8) Kato K.,Puttfarchen P.S., Lyons W.E., and Coyle J.T.,1991 Developmental time course ionic dependence of Kainate-mediated toxicity in rat cerebellar granule cell cultures .J . Pharm. Exp.Therap.265:402-11

(9) Koh JY., Goldberg MP, Hartley DM and Choi DW., 1990 Non-NMDA receptor-mediated neurotoxicity in cortical culture. J. Neurosci. 10: 693-705.

(10) Kono Y., Shibata H., Kodama Y., Sawa Y., 1995 The suppression of the N-nitrosating reaction by

chlorogenic acid. Biochemical J. 312: 947- 953.

(11) Kono Y., Kobayashi K., Tagawa S., Adachi K., Ueda A., Sawa Y., Shibata H., 1997. Antioxidant activity of polyphenolics in diets. Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. Biochimica et Biophysica Acta. 1335: 335- 342.

(12) Kono Y., Kashine S., Yoneyama T., Sakamoto Y., Matsui Y., Shibata H., 1998. Iron chelation by chlorogenic acid as anatural antioxidant. Bioscience, Biotechology & Biochemistry. 62(1): 22- 27.

(13) Olney JW, Misra CH and Rhee V., 1976. Brain and retinal damage from lathyrus excitotoxin, b-N-oxalyl-a,b-diaminopropionic acid. Nature 264: 659-61.

(14) Patel M,Day BJ,Crapo JD, Fridovich I, McNamara JO 1996 Requirement for superoxide in excitotoxic cell death . Neuron 16:345-355

(15) Prehn JHM,Karkoutly C, Nuglisch J,Peruche B,Krieglstein J 1992 Dihydrolipoate reduces neuronal injury after cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 12:78-87.

(16) Prehn J.H.M.1998 Mitochondrial transmembrane potential and free radical production in excitotoxic neurodegeneration. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 357:316-322.

(17) Puttfarcken P.S., Getz R.L., and Coyle J.T., 1993 ,Kainic acid-induced lipid peroxidation : protection with butylated hydroxy-toluene and U78517F in primary cultures of cerebellar granule cells . Brain Res.624:223-232.

(18) Schwartz,R., Skolnick,P. and Paul,S.M., 1998 Regulation of gaminobutyric acid/barbiturate receptor-gated chloride channel ion flux in brain vesicles by phospholipase A_2:possible role of oxygen radicals, J. Neurochem., 50: 565-571

(19) Watkins KC, Curtis DR, and Biscoe TJ., 1966 .Central effects of b-N-oxalyl-a,b-diaminopropionic acid and other lathyrus factors.Nature 211:637.

(20) Young AB., 1991. Role of Exicitotoxins in heredito-degenerative neurological disease. Research Publication-Association for Research in Nervous & Mental Disease 71:175-89