

### 第三章 歸脾湯對去卵巢大鼠氧化應力相關指標的影響

#### 前言

如總論所述，停經後婦女的阿茲海默癡呆症與缺雌激素有關，有文獻指出雌激素主要經由增強膽鹼性作用，減輕阿茲海默失憶症的危險性 (Gibbs and Aggarwal, 1998)。另一方面，阿茲海默癡呆症的發生與腦神經受到自由基的傷害也有密切的關係，氧化應力假說也深受重視 (Markesbery, 1997; Markesbery and Carney, 1999; Benzi and Moretti, 1995)。前章的實驗結果顯示，去卵巢大鼠腦部受到氧化應力的傷害明顯上升，此傷害可因雌激素的處理而改善。

歸脾湯的藥理研究顯示有改善小鼠學習記憶障礙之作用<sup>7,8</sup>，及抗氧化作用<sup>9</sup>。歸脾湯臨床上可用於更年期綜合症<sup>4,5</sup>，更年期綜合症主要是雌激素缺乏所致。本章實驗的目的在於探討歸脾湯對去卵巢大鼠產生的腦部氧化應力傷害是否有改善作用，同時也探討對抗氧化酵素系統活性的影響。

#### 材料與方法

##### 一、歸脾湯之製備

本實驗所用歸脾湯組成係依照『校註婦人良方』所載。其方味及比例如下：

方藥名及其基源		比例
白朮	<i>Artactylodes macrocephala</i> KOIDZ (Compositae)	4
茯神	<i>Pachyma holer</i> ROMPHIUS (Polyporaceae)	4
黃耆	<i>Astragalus membranaceus</i> (FISCH.) BGE. (Leguminosae)	4
酸棗仁	<i>Zizyphus jujuba</i> MILL var. <i>Spinosa</i> Hu (Rhamnaceae)	4
龍眼肉	<i>Euphoria longan</i> (LOUR.) STEUD. (Sapindaceae)	4
人參	<i>Panax ginseng</i> C.A. MEYER (Araliaceae)	4
木香	<i>Saussurea lappa</i> CLARKE (Compositae)	2
生薑	<i>Zingiber officinale</i> ROSC (Zingiberaceae)	2
大棗	<i>Zizyphus jujuba</i> MILL. (Rhamnaceae)	1
炙甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCHER et Dc. (Leguminosae)	1
當歸	<i>Angelica sinensis</i> (OLIV.) DIELS (Umbelliferae)	4
遠志	<i>Polygala tenuifolia</i> WILLDENOW (Polygalaceae)	4

上述藥材購自藥材行，除經本校中藥所生藥學鑑定外，並保留標本。將上述藥材按組成比例混合，以水浸泡 4 小時後，煎煮 2 小時，共 2 次，合併濾液，於 60°C 下減壓濃縮至適當濃度，分裝儲存於 -30°C。臨用時解凍以水稀釋至所需濃度。本製備物以 HPLC 定兩種指標成分，即當歸的 Ferulic acid，每公克乾燥抽出物含 0.226 mg，和甘草的 glycyrrhizin，每公克乾燥抽出物含 1.545 mg。

## 二、動物

使用雌性 Sprague-Dawley 大鼠，購自國科會動物中心。飼養室控制溫度  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，相對濕度  $55\pm 5\%$ ，明暗各 12 小時的環境。餵食加有不同濃度歸脾湯的福壽牌飼料，自動飲水系統供水。

大鼠三個月齡時，在 pentobarbital (30 mg/kg, i.p.) 麻醉下，由背部切除兩側卵巢，去卵巢手術是否成功，於最後動物犧牲時加以檢視，手術失敗的動物檢體不使用。手術組分為五組，其中 4 組每日餵食含歸脾湯 0 %、1 %、3 % 或 5 % 的飼料連續十二週，另一組餵食含歸脾湯 0 % 的飼料且每日皮下注射  $17\beta$ -estradiol (6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; E2)。對照組大鼠進行偽手術，每日餵食含歸脾湯 0 % 的飼料。大鼠每週稱體重一次，做為給藥劑量的依據，每週亦稱大鼠攝食量一次。投藥終了在乙醚麻醉下將大鼠犧牲，取下主要臟器以冰冷生理食鹽水洗淨，以濾紙吸乾水分後， $-80^{\circ}\text{C}$  下儲存備用。腦部依據 Glowinski and Iversen (1966) 的方法，在冰上取出大腦皮質、海馬、紋狀體和腦幹等，即刻冰凍備用。

## 三、脂質過氧化的測定

### 1. 加鐵反應

$\text{FeCl}_2$ -ascorbic acid 誘發腦均漿脂質過氧化的測定依據 Garrido et al. (1993) 的方法。以 tris-HCl (pH 7.4) 製備 2-10 % (w/v) 腦均漿。取腦均漿 0.3

ml 加入 0.0625 mM 的 ascorbic acid 0.05 ml、 2.5 mM  $\text{FeCl}_2$  0.05ml 及 0.05 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 於 37 °C 水浴中放置 30 分鐘反應。反應終了依據 Ohkawa et al. (1979) 的方法測定脂質過氧化的量, 即上述均漿順序加入 0.2 ml sodium dodecyl sulfate (8.1 %)、 1.5 ml 2-thiobarbituric acid (0.8 %), 再以去離子水調整容積為 4 ml, 99 °C 熱水中加熱一小時。取出, 以自來水冷卻, 加入 1 ml 去離子水、 5 ml n-butanol / pyridine 混合液 (15 : 1, v/v), 混均後, 在 25 °C、 4000 rpm 下離心 10 分鐘, 取有機層以分光光度計(Hitachi U-2001; Japan)測定 532 nm 的吸光值, 組隻的脂質過氧化量以 nmol malondialdehyde (MDA) / mg protein 表示。均漿蛋白質依照 Lowry et al. (1951)的方法測定, 以牛血漿蛋白為標準品。

$\text{FeCl}_2$ -ascorbic acid 誘發肝臟、心臟和子宮均漿脂質過氧的測定依據 Kimuya et al. (1981)的方法。以 tris-HCl (pH 7.4)製備 10 % (w/v)均漿。取均漿 0.5 ml tris-HCl buffer 0.15ml, 加入 0.1 mM 的 ascorbic acid 0.05 ml、 4.0 mM  $\text{FeCl}_2$  0.05ml 及 0.05 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 於 37 °C 水浴中放置 1 小時反應。反應終了依據 Ohkawa et al. (1979)的方法使用 2- thiobarbituric acid 測定 MDA 的量。

## 2. 不加鐵反應

不加鐵誘發的 LPO 測定方法和加鐵的方法類似, 唯反應系統以相同二次水體積取代  $\text{FeCl}_2$ -ascorbic acid。

#### 四、SOD 活性測定

測定方法詳第二章材料與方法。

#### 五、過氧化氫酵素(Catalase)活性之測定

詳第二章材料與方法

#### 六、Glutathione peroxidase (GSH-Px)活性之測定

詳第二章材料與方法

#### 七、脂褐素 (Lipofuscin) 測定

脂褐素測定參照 Sohal(Sohal and Donato.,1979)氏等人提出的方法。取大腦腦幹 100 mg , 用 chloroform-methanol (2 : 1)液 4 ml 製備均質液。而後加入等量去離子水據烈振盪 3 分鐘, 3000 rpm 離心 10 分鐘 吸取 chloroform 層至另一試管中 , 加 chloroform 至 5 ml。紫外燈下照射 30 秒。使用螢光光度計激發波長 360 nm, 發射波長 450 nm 測定樣品螢光強度 以每 ml 0.05 mol/L 硫酸含 0.1  $\mu$ g Quinine sulfate 溶液的螢光強度為 10 單位 t , 計算每克濕組織螢光計數單位 , 以 U/g 表示。

#### 八、統計方法

以單尾變異數分析(one-way analysis of variance )方法分析 , 並進行 Dunnet 測試 , 以 P 值小於 0.05 認為有顯著差異。

## 結 果

### 一. 攝食量與體重變化

**Table 3-1.** Mean food intake

Total intake(g/rat/day)	
Sham	18.4 ± 0.4
Control	20.7 ± 1.1
E2	19.4 ± 0.8
1% GPT	20.7 ± 0.9
3% GPT	23.8 ± 1.5
5% GPT	22.8 ± 0.9

All values are mean ± S.E (n=9)

**Table 3-2.** Body weight changes in rat treated with GPT for 12 weeks.

Wks	Sham	Control	E2	GPT		
				1%	3%	5%
0	255.3 ± 3.2	262.9 ± 7.1	270.9 ± 6.2	259.1 ± 5.3	267.7 ± 7.4	266.4 ± 4.2
1	261.9 ± 3.1	283.3 ± 8.0	272.4 ± 6.2	279.9 ± 6.9	285.2 ± 7.3	285.2 ± 4.2
2	277.2 ± 3.6	308.1 ± 7.9 <sup>#</sup>	281.6 ± 7.6*	304.6 ± 7.5	304.2 ± 8.0	310.8 ± 4.6
3	285.8 ± 4.5	331.7 ± 8.4 <sup>##</sup>	297.6 ± 6.5*	337.1 ± 9.0	326.2 ± 11.0	338.4 ± 5.7
4	295.5 ± 4.2	350.3 ± 9.0 <sup>###</sup>	308.7 ± 5.6*	352.9 ± 10.7	340.6 ± 14.0	358.1 ± 4.8
6	312.8 ± 4.9	371.1 ± 11.0 <sup>##</sup>	323.4 ± 7.1*	365.6 ± 14.6	358.3 ± 13.3	383.2 ± 5.1
8	321.0 ± 6.6	381.3 ± 13.1 <sup>###</sup>	339.0 ± 7.8*	382.1 ± 13.7	381.4 ± 10.5	391.8 ± 4.5
10	337.5 ± 7.4	383.6 ± 11.2 <sup>#</sup>	341.0 ± 7.3*	404.8 ± 14.6	403.4 ± 11.0	412.9 ± 5.4
12	336.6 ± 7.5	394.6 ± 15.2 <sup>##</sup>	347.8 ± 7.5*	396.8 ± 15.3	406.8 ± 12.1	418.9 ± 9.1

All values are means ± S.E. (n=9)<sup>#</sup> P<0.05, <sup>##</sup> P<0.01, <sup>###</sup> P<0.001 compared with sham operated group. \* P<0.05 compared with control group.

去卵巢大鼠每日平均攝食量如表 3-1 所示，各組之間沒有明顯差異。依攝食量概略換算每日歸脾湯攝取量，餵食 1%，3%，5% 歸脾湯飼料的大鼠每日相當攝取歸脾湯 20.7、71.4、114 mg / rat/ day。

如表 3-2 所示，實驗前 6 組動物平均體重沒有差異，控制組於去卵巢後第二週起至第十二週體重明顯高於偽手術組。E2 的處理明顯降低去卵巢大鼠體重。去卵巢大鼠餵食含歸脾湯飼料 (1 ~ 5 % )，其體重與控制組比較，無顯著變化。

## 二、腦部脂質過氧化

如圖 3-1 所示，大鼠去卵巢 12 週後，大腦皮質脂質過氧化程度在不加鐵誘發和加鐵誘發兩種實驗條件下均較偽手術組高，E2 的處理可以降低此兩種條件下誘發的脂質過氧化值。餵食含歸脾湯飼料(1 % ~ 5 %)顯著減少此兩種條件下誘發的脂質過氧化值。加鐵誘發和不加鐵誘發脂質過氧化的差值，去卵巢大鼠組高於偽手術組，E2 或歸脾湯(1 % ~ 5 %)的處理可以降低此差值。

如圖 3-2 所示，大鼠去卵巢 12 週後，紋狀體脂質過氧化程度在不加鐵誘發和加鐵誘發兩種實驗條件下均較偽手術組高，E2 的處理可以降低此兩種條件下誘發的脂質過氧化值。餵食含歸脾湯飼料(1 % ~ 5 %)也可以減少此兩種條件下誘發的脂質過氧化值。加鐵誘發和不加鐵誘發脂質過氧化的差值，去卵巢大鼠組高於偽手術組，E2 或歸脾湯(5 %)的處理可以降低此

差值。

如圖 3-3 所示，大鼠去卵巢 12 週後，海馬迴脂質過氧化程度在不加鐵誘發和加鐵誘發兩種實驗條件下均較偽手術組高，E2 的處理可以降低此兩種條件下誘發的脂質過氧化值。餵食含歸脾湯飼料(3 % 或 5 %)可以減少此兩種條件下誘發的脂質過氧化值。加鐵誘發和不加鐵誘發脂質過氧化的差值，去卵巢大鼠組高於偽手術組，E2 或歸脾湯(1 % ~5 %)的處理可以降低此差值。

### 三、腦部 SOD、catalase 和 GSH-Px 的活性

如圖 3-4 所示，大鼠去卵巢 12 週後，大腦皮質的 SOD、catalase 和 GSH-Px 的活性與偽手術組比較無顯著差異。E2 的處理對此三種抗氧化酵素的活性也沒有影響。餵食含歸脾湯飼料(3 % 和 5 %)可以降低 SOD 的活性。

如圖 3-5 所示，大鼠去卵巢 12 週後，紋狀體 SOD 和 GSH-Px 的活性與偽手術組比較無顯著差異，但 catalase 活性較偽手術組低。E2 的處理可以提升 catalase 的活性，但對 SOD 和 GSH-Px 的活性沒有影響。餵食含歸脾湯飼料對此三種抗氧化酵素的活性沒有影響。

如圖 3-6 所示，大鼠去卵巢 12 週後，海馬迴 SOD、catalase 和 GSH-Px 的活性較偽手術組低。E2 的處理可以提升 SOD、catalase 和 GSH-Px 活性。餵食含歸脾湯飼料(1 % ~5 %)可以增加 SOD 的活性，歸脾湯高劑量也可以



提升 catalase 的活性，但對 GSH-Px 活性沒有影響。

#### 四、腦部脂褐素

如圖 3-7 所示，去卵巢大鼠大腦腦幹的脂褐素含量與偽手術組比較無顯著差異。E2 的處理，對去卵巢大鼠大腦腦幹的脂褐素之含量無顯著差異，歸脾湯(1%，3%)對去卵巢大鼠腦幹脂褐素之含量有降低作用。

#### 五、肝臟脂質過氧化

如圖 3-8 所示，大鼠去卵巢 12 週後，肝臟脂質過氧化程度在不加鐵誘發和加鐵誘發兩種實驗條件下均較偽手術組高，E2 的處理對此兩種條件下誘發的脂質過氧化值有降低的傾向，但不具統計意義。餵食含歸脾湯飼料(1% ~ 5%)可以減少此兩種條件下誘發的脂質過氧化值。加鐵誘發和不加鐵誘發脂質過氧化的差值，去卵巢大鼠組與於偽手術組之間沒有差異，E2 或歸脾湯的處理與去卵巢控制組比較也沒有差異。

#### 六、肝臟 SOD、catalase 和 GSH-Px 的活性

如圖 3-9 所示，大鼠去卵巢 12 週後，肝臟 SOD 的活性較偽手術組低，catalase 和 GSH-Px 的活性與偽手術組比較沒有差異。E2 的處理可提升 SOD 和 GSH-Px 的活性，對 catalase 活性沒有影響。餵食含歸脾湯飼料(1% ~ 5%)可以增加 SOD 的活性，但對 catalase 和 GSH-Px 活性沒有影響。





















## 討 論

腦部病變產生的脂質過氧化作用，往往有二價鐵的參與(Aust et al., 1985)。微量元素假說，也指出鐵在阿茲海默癡呆症病理上的重要性(Markesbery and Ehmann, 1993)。二價鐵可引發 Fenton 反應，增加氫氧自由基，導致脂質過氧化反應明顯上升(Aust et al, 1985)。因此在本章實驗也進行加鐵誘發腦均漿脂質過氧化反應，和其他實驗相同，所有組別大鼠的大腦皮質、紋狀體及海馬迴加鐵誘發反應產生的脂質過氧化值遠較不加鐵誘發反應高。

已知腦部抗氧化系統較弱(Evans,1993)，因此加鐵誘發產生的脂質過氧化作用較其他組織強，在本實驗也可發現腦組織加鐵誘發與不加鐵誘發脂質過氧化的差值遠較肝臟的差值高。

大鼠去卵巢後 12 週，大腦皮質、紋狀體及海馬迴加鐵與不加鐵誘發產生的脂質過氧化值較偽手術組高，E2 的處理可以防止這兩種實驗條件誘發的脂質過氧化值上升。這些與前一章的實驗結果類似。另外，加鐵與不加鐵誘發產生的脂質過氧化差值，去卵巢組較偽手術組高，此差值也可因 E2 的給予而減少，顯示 E2 確實能增強腦組織的抗氧化力，可抑制二價鐵誘發脂質過氧化反應。

去卵巢大鼠長期餵食含歸脾湯的飼料 12 週，大腦皮質、紋狀體及海馬迴加鐵與不加鐵誘發產生的脂質過氧化值較去卵巢對照組低，加鐵與不加

鐵誘發產生的脂質過氧化差值，也較去卵巢對照組低。這些支持歸脾湯具有抗氧化作用的說法<sup>9</sup>，在第四章的歸脾湯活體外抗氧化實驗，也證實了歸脾湯可以清除含氧自由基，及能螯合二價鐵的作用。

老年動物細胞內常有一種帶棕色、有自發螢光的不溶性顆粒物質堆積，被稱為脂褐素(Yin, 1996)。脂褐素的生成與自由基有關，自由基傷害的產物之一脂類過氧化物，分解時會產生 malondialdehyde，其可與蛋白質、磷脂或核酸交聯，形成的化合物即為具有螢光的脂褐素(Yin, 1996)。脂褐素被認為是評估衰老可靠的指標，尤其是在固定分裂後的神經細胞(Yin, 1996)。在本實驗去卵巢大鼠腦幹脂褐素含量沒有比偽手術組高，E2 的處理也對脂褐素含量也沒有影響。雖然如此，長期餵食歸脾湯的去卵巢大鼠，其腦幹組織脂褐素的含量明顯下降，其他實驗也證實歸脾湯能減少小鼠腦部的脂褐素<sup>9</sup>，這些顯示歸脾湯有減少脂褐素累積的作用，具有一定的抗老化作用，此作用與雌激素無關。

組織中抗氧化酵素的活性，與其整體的抗氧化能力調節有關，十分複雜，難有一致的變化。例如阿茲海默癡病人腦部 SOD 活性上升，被認為是阿茲海默癡呆病人腦部氧化應力增加 (Lovell et al., 1995)。另外，生物體隨著年齡遞增，機體的生理功能下降，抗氧化酵素的活性的活性會隨著年齡的增加而遞減(Tian et al., 1998; Sahoo and Chainy, 1997)。

前一章實驗探討了大鼠去卵巢後 4 或 24 週腦部抗氧化酵素活性的變

化，本章實驗也探討了大鼠去卵巢後 12 週腦部抗氧化酵素活性的變化，發現大腦皮質三個抗氧化酵素活性沒有改變，紋狀體的 catalase 活性下降，海馬迴的三個抗氧化酵素活性均下降。E2 的處理可以提升紋狀體 catalase 及海馬迴的三個抗氧化酵素的活性，此說明了這些變化與缺乏雌性素有關係，這些結果與前章去卵巢 24 週後的變化類似。歸脾湯的處理對紋狀體 catalase 及海馬迴 GSH-Px 的活性下降沒有提升作用，但對海馬迴 SOD、catalase 的活性下降有提升作用，這些顯示歸脾湯的作用與雌激素不同。

去卵巢大鼠大腦皮質 SOD 活性與偽手術組比較沒有變化，但歸脾湯可以降低大腦皮質 SOD 的活性，此或許可以歸脾湯具有清除自由基作用，因此 SOD 的活性可以不用太高來解釋。

大鼠去卵巢 12 週後可影響多種臟器重量如腦下垂體、子宮、胸腺、腎臟及肝臟等(詳附錄)，歸脾湯的處理僅能改善肝臟重量，因此在本章實驗也探討歸脾湯對大鼠去卵巢所誘發肝臟氧化應力的影響。

大鼠去卵巢 12 週後肝臟加鐵與不加鐵誘發脂質過氧化值較偽手術組高，E2 的處理無法降低此兩條件誘發的脂質過氧化值，此結果與前章類似。歸脾湯的處理可以明顯降低此兩條件誘發的脂質過氧化值，此進一步說明了歸脾湯的抗氧化作用與 E2 不同。

大鼠去卵巢 12 週後，肝臟加鐵與不加鐵誘發脂質過氧化差值很低，也沒有較偽手術組高，E2 或歸脾湯處理的差值與去卵巢組比較也沒差異。此

說明了肝臟本身有很強的抗氧化防禦作用，加鐵所能誘發的脂質過氧化值有限，因此沒有明顯差異。

大鼠去卵巢 12 週後，肝臟 SOD 活性明顯下降，但對 catalase 和 GSH-Px 的活性沒有響，E2 的處理可以提升 SOD 的活性，此與前章的結果相同。歸脾湯的處理也能提升肝臟 SOD 活性。

本章實驗證實去卵巢大鼠長期投予歸脾湯對腦部的自由基傷害有保護作用，歸脾湯的抗氧化保護作用也能經由活化抗氧化酵素來參與。這些保護作用是否能延緩老年癡呆、巴金森氏病等的發生有待進一步的探討。