

目錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
第一章 緒 言.....	1
第二章 總 論.....	3
第一節 阿魏酸之文獻考察.....	3
一、 阿魏酸之理化性質.....	3
二、 阿魏酸之藥理考察.....	4
第二節 老年癡呆症之文獻考察.....	6
一、 老年癡呆症之分類.....	6
二、 老年癡呆症之成因.....	7
三、 老年痴呆的臨床症狀.....	10
四、 老年癡呆症之治療.....	12
第三節 類澱粉前驅蛋白與類澱粉樣蛋白之關係.....	15
第三章 實驗材料與方法.....	17
第一節 實驗材料.....	17
一、 實驗試劑.....	17
二、 實驗動物.....	18
三、 實驗儀器.....	18
第二節 實驗方法.....	20
一、 擬似阿茲海默症大鼠之誘導.....	20
二、 被動迴避反應.....	21
三、 Morris水迷宮實驗.....	21

四、 腦組織之處理	22
五、 蛋白質之測定	22
六、 Total-SOD、 Mn-SOD 暨 Cu,Zn-SOD 之測定	23
七、 Acetylcholinesterase 活性之測定	24
八、 GSH 及 GSSG 之測定	24
九、 單胺濃度(Monoamine Levels)之測定	24
第三節 數據統計	26
第四章 實驗結果	27
一、 被動迴避反應	27
二、 Morris 水迷宮實驗	29
三、 Total-SOD、 Mn-SOD 暨 Cu,Zn-SOD 之測定	36
四、 Acetylcholinesterase 活性之測定	40
五、 Total-GSH 及其衍生物之測定	41
六、 單胺濃度(Monoamine Levels)之測定	44
第五章 討論	46
參考文獻	54



圖目錄

- 圖一 阿魏酸(100、 300 mg/kg) 石杉鹼甲(0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid β peptide-(1-40) 誘發擬似阿茲海默症大鼠被動迴避試驗滯留明室時間.....27
- 圖二 阿魏酸(100、 300 mg/kg) 石杉鹼甲(0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid β peptide-(1-40) 誘發擬似阿茲海默症大鼠於被動迴避試驗滯留明室達300秒比率之影響.....28
- 圖三 阿魏酸(100、 300 mg/kg) 石杉鹼甲(0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid β peptide-(1-40) 誘發擬似阿茲海默症大鼠水迷宮空間性學習操作障礙之影響.....30
- 圖四 阿魏酸(100、 300 mg/kg) 石杉鹼甲(0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid β peptide-(1-40) 誘發擬似阿茲海默症大鼠水迷宮參考記憶障礙之影響.....32
- 圖五 阿魏酸(100、 300 mg/kg) 石杉鹼甲(0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid β peptide-(1-40) 誘發擬似阿茲海默症大鼠工作記憶障礙暨再現之影響.....34
- 圖六 阿魏酸(100、 300 mg/kg) 石杉鹼甲(0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid β peptide-(1-40) 誘發擬似阿茲海默症大鼠非空間性游泳操作能力之影響.....35
- 圖七 阿魏酸(100、 300 mg/kg) 石杉鹼甲(0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid β peptide-(1-40) 誘發擬似阿茲海默症大鼠皮質區 (cortex) 及海馬回 (hippocampus) Total-SOD 含量之影響.....36
- 圖八 阿魏酸(100、 300 mg/kg) 石杉鹼甲(0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid β peptide-(1-40) 誘發擬似阿茲海默症大鼠皮質區 (cortex) 及海馬回 (hippocampus) Mn-SOD 含量之影響.....37

- 圖九 阿魏酸(100、 300 mg/kg) 石杉鹼甲(0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠皮質區 (cortex) 及海馬回 (hippocampus) Cu,Zn-SOD 含量之影響.....38
- 圖十 阿魏酸(100、 300 mg/kg) 石杉鹼甲(0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠皮質區 (cortex) 及海馬回 (hippocampus) Cu,Zn-SOD 與 Mn-SOD 含量比值之影響..... 39
- 圖十一 阿魏酸(100、 300 mg/kg) 石杉鹼甲(0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠皮質區 (cortex) 及海馬回 (hippocampus) acetylcholinesterase 含量之影響.....40
- 圖十二 阿魏酸(100、 300 mg/kg) 石杉鹼甲(0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠皮質區 (cortex) 及海馬回 (hippocampus) GHX 含量之影響。 含量.....41
- 圖十三 阿魏酸(100、 300 mg/kg) 石杉鹼甲(0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠皮質區 (cortex) 及海馬回 (hippocampus) GSSG 含量之影響.....42
- 圖十四 阿魏酸(100、 300 mg/kg) 石杉鹼甲(0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠皮

質區 (cortex) 及海馬回 (hippocampus) GSH 含量之影響.....43

圖十五 阿魏酸 (100、 300 mg/kg) 石杉鹼甲 (0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠皮質區 (cortex) NE、 VMA、 DOPAC、 HVA、 5-HT、 5-HIAA 含量之影響.....44

圖十六 阿魏酸 (100、 300 mg/kg) 石杉鹼甲 (0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid β peptide-(1-40)誘發阿茲海默症大鼠海馬回 (hippocampus) NE、 VMA、 DOPAC、 HVA、 5-HT、 5-HIAA 含量之影響.....45

阿魏酸對 Amyloid β -peptide-(1-40)誘發大鼠學習障礙改善作用機制

研究生 蔡汎修

中國醫藥學院 中國藥學研究所 藥理學組

摘要

阿茲海默症主要臨床症狀為記憶能力喪失，其病理特徵為老年斑，而老年斑主因類澱粉樣蛋白沉積所致。因此，我們以被動迴避反應及水迷宮來評估阿魏酸對類澱粉樣蛋白連續輸注至大鼠側腦室後誘發擬似阿茲海默症之學習操作暨記憶能力，並以石杉鹼甲及 Vitamin C/E 為正對照組；進一步，我們亦測定其皮質及海馬回 SOD 活性、GSH 含量、單胺濃度暨 AChE 活性，以探討其抗氧化損傷暨神經生化機制。

本實驗分成五組：(1) 溶媒輸注組 (2) 類澱粉樣蛋白輸注組 (3) 阿魏酸皮下給藥治療組 (4) 石杉鹼甲皮下給藥治療組 (5) Vitamin C/E 口服治療組。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；阿魏酸於口服 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，但石杉鹼甲之改善效果則不彰。

本次實驗結果發現，類澱粉樣蛋白輸注組可造成皮質及海馬回 total SOD 及 Mn-SOD 活性升高、GSSG 及 GSH 含量降低、AChE 活性升高及海馬回單胺與代謝物濃度升高。阿魏酸可降低因類澱粉樣蛋白輸注造成皮質及海馬回 total SOD 及 Mn-SOD 活性升高、GSSG 及 GSH 含量降低、AChE 活性升高及海馬回單胺與代謝物濃度升高等現象。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，而石杉鹼甲則具明顯 AChE 活性抑制作用。

綜上所述，類澱粉樣蛋白輸注誘發擬似阿茲海默症大鼠主要係因

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，進而造成海馬回神經傳遞物質（特別是 DA）及其代謝物濃度增加，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大鼠之被動迴避、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、單胺神經系統紊亂及抑制乙醯膽鹼酯 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大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，亦與抑制乙醯膽鹼酯 活性有關。至於，石杉鹼甲改善類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症大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抑制乙醯膽鹼酯 活性有關。

Ferulic acid attenuating amyloid β -peptide-(1-40)- induced memory impairment in rats

Tsai Fan Hsiu

Institute of Chinese Pharmaceutical Science
China Medical College

Abstract

The major clinical sign of Alzheimer's disease (AD) is memory loss. The pathogenic character of AD is senile plaques from aggregation of amyloid β peptide ($A\beta$). We established AD animal model by continuous intracerebroventricular infusion of $A\beta$ -(1-40) in rats, and evaluated the memory function by passive avoidance learning and water maze. Then we further measured superoxide dismutase, acetylcholinesterase activity, monoamine and glutathione levels in rat cortex and hippocampus to understand the mechanism of the attenuating effects of ferulic acid.

In the present studies five groups of rats were used. 1. infused with vehicle, 2. infused with $A\beta$ -(1-40), 3. $A\beta$ -(1-40)-infused rats treated with ferulic acid, 4. $A\beta$ -(1-40)-infused rats treated with huperzine A, 5. $A\beta$ -(1-40)-infused rats treated with Vitamin C/E. The $A\beta$ -(1-40)-infused rats induced the impairment of passive avoidance learning performance and water maze spatial performance, and deficits in reference and working memory. Ferulic acid 300 mg/kg and Vitamin C/E all attenuated the performance impairment and memory deficit induced by continuous intracerebroventricular infusion of $A\beta$ -(1-40), while huperzine A only attenuated the impairment of passive avoidance performance.

We're found in the $A\beta$ -(1-40)-infused rats in cortex and hippocampus higher of SOD and AChE and lower GSH than the rats treated with solvent. For the concentrations of monoamines and their metabolites, the $A\beta$ -(1-40)-infused rats had higher levels of DA, DOPAC and HVA in hippocampus. Ferulic acid reversed the deterioration of the activities of SOD and AChE, GSSG and GSH levels in cortex and hippocampus, and concentrations of DA and DOPAC in hippocampus. Vitamin C/E only selectively reversed the deterioration hippocampus. However, huperzine inhibited higher AChE activities induced by $A\beta$ -(1-40).

From these above results, $A\beta$ -(1-40) infusion performance

impairment and memory deficits in AD rats might be due to the deterioration of neuronal system especially DA via oxidative stress. Ferulic acid repaired the A β -(1-40) induced performance impairment and memory deficits in rats through its antioxidant and inhibition of acetylcholinesterase activity. Vitamin C/E also repaired the performance impairment and memory deficit, might mainly related to their antioxidant activity. However, the attenuating effects of huperzine A on the A β -(1-40) impairment of passive avoidance learning performance might mainly be due to inhibition of acetylcholinesterase activity.

第一章 緒 言

老化是生物必經之路，導致生物的生理功能低下，引發種種老年疾病：如糖尿病、癌症、中風、心血管病變、帕金森氏症、老年癡呆症等皆屬此類。其中，老年癡呆症為近幾年大家所矚目的焦點之一，它為一種隨年齡的增長而引起腦神經系統退化的現象⁽⁵⁶⁻⁵⁹⁾，病人的記憶、行為、情緒、人格等均受到影響，此類型疾病亦增加社會、醫療體系及病人家屬等不小的危險、負擔。在老年癡呆症中阿茲海默症（Alzheimer's Disease）病人佔約有一半以上，足可代表之⁽³²⁾。阿茲海默症的成因頗為複雜，包括基因突變、環境因數與個人習性都可能影響該病的發生及進展；而類澱粉樣蛋白（Amyloid β -peptide）假說則是目前最為學界所接受的理論^(1,2)。該假說指出類澱粉樣蛋白乃是阿茲海默症形成的主要元兇，類澱粉樣蛋白會在大腦皮質（Cortex）及海馬回（Hippocampus）中過度分泌而大量沉積，導致神經元傷害而生老年斑（Senile plaque）和神經纏結（Neurofibrillary tangles）為疾病之病理特徵⁽³⁻⁵⁾。因此，Flood 等人於 1991 年以 Amyloid β -peptide-(1-40)於大鼠側腦室中進行連續輸注來誘導大鼠腦中形成似老年斑塊的沉積，並造成神經損壞與學習操作能力障礙，以作為擬似阿茲海默症之動物模式⁽⁶⁾。

依中醫理論，「腎精虧損」、「氣滯血瘀」、「氣血兩虛」為老年癡呆症之病機^(7,8)。因此，中醫即以補腎活血之龜鹿易智散及當歸芍藥散等用於治療老年癡呆症⁽⁹⁻¹¹⁾。近年研究報告亦指出龜鹿易智散可改善鋁誘導小鼠之癡呆症狀，當歸芍藥散對於 Basal forbrain lesin、AF64A 誘導之學習操作障礙均具改善作用。其中，當歸與其組成中藥亦為活血補血之中藥。最近有學者研究指出當歸及川芎具改善腦缺

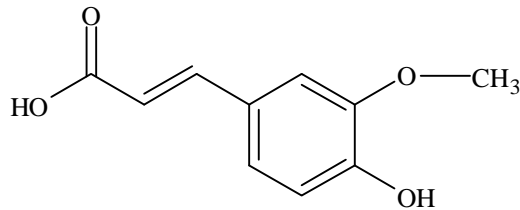
氧之作用^(12,13)。本校謝明村校長之研究亦指出當歸可改善 Scopolamine 及 Cyclohexamine 等誘發之學習記憶障礙⁽¹⁴⁾。事實上，阿魏酸為當歸及川芎之共有成分，且阿魏酸在本校謝明村校長之研究中亦顯現具改善 Scopolamine 及 Cyclohexamine 等誘發之學習記憶障礙之作用⁽¹⁵⁾。因此，本研究擬以被動暨水迷宮學習記憶測定模式，來評估阿魏酸對 Amyloid β -peptide-(1-40)連續側腦室輸注誘發擬似阿茲海默鼠學習操作障礙之改善作用，並以石杉鹼甲及 Vitamin C/E 為正對照組。並進一步測定其皮質區及海馬回區 Acetylcholinesterase (AChE) 活性、單胺濃度、Superoxide dismutase (SOD) 活性及 Glutathione (GSH) 含量，以探討其抗氧化損傷暨神經生化機制。

第二章 總論

第一節 阿魏酸之文獻考察

一、阿魏酸之理化性質⁽¹⁶⁻¹⁸⁾

1. 化學名：3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic acid
2. 分子式及分子量：C₁₀H₁₀O₄；194.19
3. 物理性質：順式為黃色油狀物；反式為斜方針狀結晶，熔點 174。溶於沸水、乙醇及醋酸乙酯，亦易溶於乙醚中，微溶於石油醚及苯中。
4. 結構式：



trans-ferulic acid

5. 來源植物：

繖形科植物阿魏(*Ferula assafoetida* L.)根莖，臭阿魏(*F. foetida*)根乳汁，川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort.)根莖，石松科卷柏狀石松(*Lycopodium selago* L.)全草，紫葳科梓樹(*Catalpa ovata* D.)樹皮、木材，木賊科木賊(*Equisetum hiemale* L.)全草，毛茛科植物升麻(*Cimicifuga foetida* L.)根莖，禾本科植物稻(*Oryza sativa* L.)種皮，百合科植物洋蔥(*Allium cepa* L.)根、球莖、葉，十字花科植物萊菔(*Raphanus sativus* L.)根，菊科植物白花春黃菊(*Anthemis nobilis* L.)花，野茉莉科植物光葉子花(*Bougainvillea glabra* Choisy.)根，唇形科植物筋骨草(*Ajuga iva* L.)地上部分，藜科甜菜(*Beta vulgaris* L.)葉，紅柳科植物希臘紅柳(*Periploca graecan* L.)葉等均含有之。

二、阿魏酸之藥理考察

1. 對血液之作用：

阿魏酸 (0.4-0.6 mg/ml) 能抑制 ADP 和膠原誘導的大鼠血小板聚集⁽¹⁹⁾。其鈉鹽(0.1-0.2 g/kg)靜脈注射亦有同樣的效果⁽²⁰⁾。用 ³H-5HT 標記血小板，觀察血小板聚集與釋放反應的關係，其鈉鹽(1-2 mg/ml)對凝血 誘導的血小板聚集有明顯抑制，同時也抑制 ³H-5HT 從血小板中釋放^(19,21)。與阿斯匹林合併用後，大鼠血小板 TXA₂ 樣物質的釋放顯著受抑制，而動脈壁前列腺素 PGI₂ 樣物質釋放則無明顯變化，說明二藥合用可增強抗血小板作用⁽²²⁾。阿魏酸鈉對兔血小板和動脈壁環氧 活性均有抑制作用，但對血小板 TXB₂ 生成抑制較強⁽²³⁾。

2. 抗氧化作用

阿魏酸能抗氧化和清除自由基，保護膜脂體不受氧化⁽²⁴⁾，對於肝微粒中酵素 Cytochrome P-450 具有選擇性抑制的作用⁽²⁵⁾。此外，鈉鹽 (100 mg/kg) 對預處理乙醇 (11.4 g/kg) 引起肝臟 GSH-Px 活性升高、肝臟 GSH-Re, SOD 活性降低，有明顯拮抗作用⁽²⁶⁾。對於高壓氧致急性氧中毒亦有一定的預防作用⁽²⁷⁾。

3. 抗發炎作用

阿魏酸可抑制過敏反應，影響花生四烯酸 (Arachidonic acid) 的代謝，抑制前列腺素 PGE₂ 的合成，進而降低其釋放量，但無法拮抗組織胺的致炎作用⁽²⁸⁾。

4. 對免疫作用

阿魏酸具有抗細菌、抗真菌、抗肝(細胞)毒，體外可啟動吞噬作用、抗腫瘤和抗有絲分裂等活性⁽²⁹⁾。對於小鼠胸腺和脾臟的重量亦有增加的作用⁽³⁰⁾。

5. 神經保護作用

我們最近的報告亦發現其來源植物 *Angelica sinensis* 對於東莨菪鹼和 Cycloheximide 誘導迴避障礙的情形有減低的作用^(14,15)。與之相應的是最近有學者研究報告指出阿魏酸對於 Amyloid- β peptide 1-42 急性誘發的神經毒性及學習障礙有改善的現象，而可能成為阿茲海默症的化學保護劑⁽³¹⁾。

第二節 老年癡呆症之文獻考察

老年癡呆症包含了阿茲海默症癡呆、血管性癡呆、混合型癡呆和其他癡呆，中以阿茲海默症性癡呆佔所有老年癡呆 40-50 %⁽³²⁾，可謂為老年癡呆的代表性疾病。阿茲海默症為隨年齡的增長而引起腦神經系統退化的疾病之一。成因頗為複雜，包括基因突變、環境因數與個人習性都可能影響該病的發生及進展，其病理特徵在於大腦皮質出現神經纖維結、老年斑塊及神經元細胞嚴重損失⁽³⁻⁵⁾。

一、老年癡呆症之分類

1. 原發性：發病主要與腦的退行性病變有關，一般而言，遺傳佔了相當重要的因素。目前已知比較清楚的包括類澱粉前驅蛋白質基因，位於第 21 對染色體；早老素 1 (Presenilin 1) 位於第 14 對染色體；早老素 2 (Presenilin 2) 位於第 1 對染色；載脂蛋白 E (Apolipoprotein E)，位於第 19 對染色體上⁽³³⁻³⁷⁾。
2. 繼發性：以腦血管障礙為主，一般統稱為血管性癡呆症。
3. 混合型：一、二類型同時存在。
4. 其他類型：如腦外傷、鋁中毒、一氧化碳中毒等引起之癡呆症。

二、老年癡呆症之成因

1. 基因表現：

類澱粉前驅蛋白質基因：位於第 21 對染色體，內含 400 kb DNA 分子轉錄後產生類澱粉樣蛋白的前趨物，經 α 與 β 分泌 裂解後形成含氨基酸 39-43 的類澱粉樣蛋白⁽³⁸⁾，進而引發老年癡呆的種種病症。

早老素 1 (Presenilin 1) 基因，位於第 14 對染色體；早老素 2 (Presenilin 2) 基因，位於第 1 對染色體；早老素是一種橫跨細胞膜的蛋白質酵素，它會影響 α 分泌酵素的活性⁽³⁷⁾。研究指出早老素 1 或早老素 2 的突變都會導致類澱粉樣蛋白的增加。

載脂蛋白 E (Apolipoprotein E) 基因：位於第 19 對染色體上，基因型有 ApoE2、ApoE3、ApoE4 等 3 種為血清中主要脂質轉運蛋白之一⁽³⁹⁾。根據研究指出，ApoE4 與晚發型阿茲海默症有關聯，主要是 ApoE4 對於類澱粉樣蛋白有高度的親合力，原因有可能為加速類澱粉樣蛋白的沉積的結果，原因亦可能是經由防止類澱粉樣蛋白成核能力減弱^(40,41)。此外類澱粉樣蛋白沉積與 ApoE4 含量成正相關⁽⁴²⁾，且 ApoE 等與磷酸化作用亦有關聯^(43,44)。

2. 腦血管障礙

研究指出，一半以上的血管性癡呆是由於腦血管損害的結果⁽³¹⁾。由 Hachinski 等於 1974 年經組織病理研究証實，多發性雙側半球缺血性梗死是導致認知功能下降的直接原因⁽⁴⁵⁾。

3. 外傷

從病理中發現，腦外傷患者的腦組織中有許多神經纏結，故有人認為腦外傷可以產生神經纏結，它是阿茲海默症的病因之一⁽⁴⁶⁾。腦外傷導致阿茲海默症的發病機理被認為是：損害血腦屏障，使體內白細胞穿過血腦屏障與腦組織內抗原發生自身免疫反應；減少腦組織自身產生的安全因素⁽⁴⁷⁾。

4. 病毒

由於 Creutzfeldt-Jakob 病和 Kuru 病均是由病毒引起的慢性神經變性疾病，其臨床表現和病理改變與阿茲海默症有許多相似之處，所以人們自然聯想阿茲海默症可能與病毒感染有關，而支持這學說的為羊癩癢症的感染源與阿茲海默症老年斑的澱粉樣蛋白有許多相同之處⁽⁴⁸⁾。1982 年 Ball 首先報道了單純 疹可能向心性地移到 Meynert 神經核而引起神經變性疾病⁽⁴⁹⁾。1987 年 Renvoize 等發現：在阿茲海默症患者血清中，單純 疹病毒、流感 AB 型病毒和麻疹病毒滴定度較高，但與對照組統計學上無顯著性差異⁽⁵⁰⁾。但至今人們卻未從阿茲海默症患者腦組織中真正找到病毒。

5. 鋁中毒

鋁進入腦內取代 Ca 和 Mg，與氨基酸鏈上的谷氨酸和精氨酸結合形成谷氨酸鋁鹽或精氨酸鹽的穩定複合物而沉積於腦內。鋁在血液中與轉鐵蛋白完全結合，在大腦皮質、海馬回和杏仁核內富有谷氨酸神經元，為此鋁沉積於這些部位，引起雙螺旋蛋白的異常磷酸化反應，最後引起類澱粉樣前趨蛋白的形成而產生老年斑 神經纏結^(51,52)。

6. tau (δ) 蛋白⁽⁵³⁻⁵⁵⁾

神經纏結包含雙股螺旋纖維和直絲。tau 蛋白為一種多功能的蛋白質，一般在體內有穩定微管或與微管相似的作用。當 tau 蛋白於正常狀態下磷酸化時，本身會形成微管或微管的部分；當 tau 蛋白的異常磷酸化時會形成雙股螺旋纖維，與類澱粉樣蛋白及載脂蛋白 E 組成神經纏結。此外，腦中的 tau 蛋白被異常磷酸化，降低微管組裝能力，繼而損害軸漿流，致使一些在胞體與神經末梢之間正常運輸而又不被迅速降解的神經元成分聚集在受累的神經元細胞之內，最終導致神經元細胞退變。

7. 氧化壓力⁽⁵⁶⁻⁵⁹⁾

近年來，有關氧化壓力與自由基毒性在阿茲海默症的重要作用已成為人們研究的焦點。其為大部分老年痴呆病因的中間產物（類澱粉樣蛋白沉澱、鋁中毒、免疫作用等），常造成蛋白質變性、脂質過氧化物、DNA、粒腺體失去功能而使神經老化病變而失去作用，造成老年痴呆的病症。

8. 免疫作用

最近研究指出，腦部受到的損傷（頭部外傷、腦缺血、基因因素、病毒感染等造成神經病變）皆有引起炎症反應⁽⁶⁰⁾。腦中炎症又與致發炎物質以及一氧化氮、超氧分子等自由基去攻擊神經細胞，造成其變性死亡，形成老年痴呆^(61,62)。且類澱粉樣蛋白能誘使神經細胞中星狀細胞及神經膠質細胞活化，生免疫調節因子及補體系統⁽⁶³⁾。

三、老年痴呆的臨床症狀^(64,65)

1. 記憶障礙

記憶障礙是老年癡呆的初發症狀，先是近記憶力受損，隨之遠記憶力也受損，最終遠近記憶力均有障礙，使日常生活受到影響。同樣，記憶力衰退也是腦血管性癡呆早期的核心症狀，最早出現的是近記憶力的缺損，遠記憶力障礙多在後期出現。

2. 空間操作障礙

在老年癡呆早期即有空間操作障礙。不能準確地判斷物品的位置，或在熟悉的環境中迷路。

3. 語言障礙

語言障礙是大腦高級功能障礙的一個敏感指標，老年癡呆患者早期雖有找詞困難，但物品命名可能正常，列名受損則是老年癡呆早期的敏感指標。隨病情發展，自發言語愈益空洞，命名不能也愈益明顯。首先是少用名詞的命名能力受損，隨後對常用物品名稱和親屬的名字也出現命名不能。老年癡呆患者言語的發音、語調及語法結構相對保留至晚期，而語義方面則進行性受損。隨癡呆發展，語言的實用內容逐漸減少，終至生口吃和（或）含糊的咕嚕聲。

4. 書寫困難

書寫困難常在老年癡呆的早期出現。因書寫困難致寫出的內容詞不達意，研究認為書寫錯誤或失寫與遠記憶障礙有關，隨病情發展出現大量錯寫。至病程中後期，患者甚至不認識自己的名字，也寫不出自己的名字。

5. 失用和失認

約 1/3 的患者有視失認。面容認知不能者，不認識親人和熟悉朋友的面貌，進而自我認知受損。

老年性癡呆患者可表現為兩型失用：觀念性失用是不能以手勢正確地做出連續的複雜動作，如裝煙斗、劃火柴、點煙。意想運動性失用是不能按指令做出可自發做出的動作，患者表現為已熟練掌握的技能喪失。

6. 判斷力差，注意力分散

老年癡呆患者均可在早期出現判斷力差、概括能力喪失、注意力分散、失認和意志不集中。血管性癡呆的患者隨著記憶力減退，逐漸也會出現注意力不集中，計算力、定向力、理解力的不同程度的減退。與老年癡呆相比較不同的是，老年癡呆患者可出現智慧的全面減退直至完全喪失，而血管性癡呆患者的智慧減退是並非是全面性的，根據部位不同可出現各種相關的神經性精神症狀。

根據上述疾病信號，臨床診斷還需要進行檢查尤其是高級神經功能檢查，常結合癡呆量表測定。常用的量表有精神狀態簡易速檢表（MMSE）、長谷川簡易智能量表（HDS）以測定病人智力障礙的程度，再應用 Hachinski 缺血量表鑒別癡呆的類型。此外，輔以檢查如腦電圖、頭顱 CT 和 MRI、腦血流測定（r-CBT/ SPECT）及血液生化檢測等進一步加強臨床診斷和鑒別診斷。現今較準確診斷技術為正子射出斷層掃描術（Positron Emission Tomography，簡稱 PET），可用於判斷老年癡呆的病症⁽⁶⁶⁾。

四、老年癡呆症之治療

1. 乙醯膽鹼酯 抑制劑 (Cholinesterase inhibitors)

老年癡呆症造成病人記憶功能失調之原因為膽鹼神經元退化的結果⁽⁶⁷⁾。神經生物化學研究顯示，老年癡呆症患者乙醯膽鹼合成減少，膽鹼乙醯化 活性下降且與癡呆的嚴重程度密切相關⁽⁶⁸⁾。因此，給予直接及間接作用於膽鹼神經系統的藥物為首先考慮之路徑；例如膽鹼酯 抑制劑⁽⁶⁹⁾：Tacrine⁽⁷⁰⁾、Physostigmine、Donepezil、Huperzine A⁽⁷¹⁾等。

雌激素有營養膽鹼神經和保護神經等作用，能防治因卵巢切除所致的膽鹼乙醯轉移 活性降低⁽⁷²⁾，推斷其對於老年癡呆症的症狀有改善或減少的作用，其可能機制可能與降低血膽固醇，或影響 ApoE 的表達所致。

5-HT₃ 具有調控大腦皮層的功能，能抑制腦皮層乙醯膽鹼的釋放，而其拮抗劑如 Ondansetron 則有增加腦皮層乙醯膽鹼的釋放，而有改善老年癡呆症的症狀⁽⁷³⁾。

2. 抗氧化劑

類澱粉樣蛋白纖維束尚可藉由與腦中微膠細胞 (Microglia) 膜上的特殊受器結合而釋致發炎物質以及一氧化氮、超氧分子等自由基去攻擊神經細胞，造成其死亡^(58,59)，而類澱粉樣蛋白經自由基的氧化後又會導致不溶性的類澱粉樣蛋白生成，使疾病更加惡化⁽⁷⁴⁾。當粒腺體缺 O₂ 或 H₂O₂ 和 OH[·] 的形成過多，會導致高反應性 OH[·] 的形成。過氧化物也來源於花生四烯酸的磷脂代謝產物和兒茶酚胺 鐵氧化還原蛋白的自身氧化反應，不飽和脂肪酸受自由基攻擊後形成脂質過氧化，且這一氧化過程是以自催化為特徵的。蛋白質和 DNA 被自由基攻擊，致細胞內的許多穩態系統包括鈣調節系統受損。當細胞內的鈣離子持續升高並同時存在自由基時，會出現惡性循環，即 Ca²⁺ 加速自由基的生成，或相反的，自由基增加胞內

鈣離子的濃度升高⁽⁷⁵⁾。現今實驗發現口服給予抗氧化劑如 Vitamin C 及 Vitamin E 合併製劑可有效減緩阿茲海默症引起的癡呆現象⁽⁷⁶⁾。另外像是 Ceramide，一種天然的神經鞘質，可對抗類澱粉樣蛋白及 FeSO₄ 導致海馬回神經損傷的作用⁽⁷⁷⁾。另一種影響微管聚化的化合物 Cytochalasin，能減低因興奮性毒性或類澱粉樣蛋白所致的細胞毒性⁽⁷⁸⁾。其他如 Selegiline、銀杏抽提物及 Idebenone 等亦有研究指出具有此一方面的作用⁽⁷⁹⁾。

3. 干擾類澱粉樣蛋白形成和沉積的藥物

類澱粉樣蛋白不僅構成老人斑，亦出現於神經纏結中。阻斷類澱粉前趨蛋白因 α 及 β 分泌 作用裂解成有害的類澱粉樣蛋白或提高 α 分泌 的活性都有助於類澱粉樣蛋白的生成⁽³⁸⁾。

4. 神經生長因子 (Nerve growth factor)

神經生長因數是神經細胞生存和分化所必需的物質，可延長 N 軸突，維持 N 細胞生存，調節神經遞質的產生，並對衰老動物神經細胞再生發揮作用⁽⁸⁰⁾。

5. 抗發炎藥物 (Anti-inflammatory drugs)

患者大腦中顯示有活性的發炎細胞 (Activated microglia)，而且流行病學的資料也顯示非類固醇類抗炎藥可減低阿茲海默氏症之發生率⁽⁸¹⁾。

6. 鈣離子穩定劑

研究指出，阿茲海默症神經元損壞與鈣調節變化有關，鈣離子可誘導像神經纏結的變化⁽⁸²⁾。大量的鈣內流經由改變胞內 pH 值、活化蛋白激 破壞胞膜⁽⁸³⁾、干擾粒腺體使細胞能量缺

乏的作用使細胞凋亡，造成神經損傷⁽⁸⁴⁾。因此，給予鈣離子穩定劑或阻斷鈣離子內流入阿茲海默症患者大腦神經元細胞，為考慮發展治療改善阿茲海默症的方向之一。

7. 神經代謝促進劑

老年痴呆病人大腦利用葡萄糖能力降低，造成代謝異常。因此，糾正葡萄糖代謝能力的藥物為此類發展的基礎，如 腎上腺受體阻斷劑，Nootropics、Hydregine 等，為近來用於治療認知障礙的藥物⁽⁸⁵⁾。

促進血液循環的藥物如：GABA 衍生物 Piracetam、Oxiracetam 等，能降低血液對血管的黏稠性⁽⁸⁶⁾。其他像是銀杏製劑，除了有促進血液循環的作用外⁽⁸⁷⁾，還可改善神經元代謝⁽⁸⁸⁾。

第三節 類澱粉前驅蛋白與類澱粉樣蛋白之關係

類澱粉樣蛋白假說是目前最為學界所接受的理論。事實上，早在1984年 Glenner 和 Wong 就於阿茲海默症患者腦膜血管中發現分子量 4 kDa 的 Amyloid⁽³⁾，接著有學者於次年從阿茲海默症患者大腦皮質中的類澱粉沉積純化出類澱粉樣蛋白，發現其含 39 至 43 個氨基酸；1987 年分離出類澱粉樣蛋白的 cDNA⁽⁸⁹⁾，發現該蛋白乃源自於一含 695 個氨基酸的蛋白質，乃將後者命名為類澱粉前驅蛋白質 (Amyloid precursor protein)。類澱粉前驅蛋白質為一穿膜蛋白質，一部份嵌在細胞膜中，另一部分則裸露在細胞外，存在不同種類的細胞中，其基因位於第 21 對染色體上，表現出之初級 RNA 經由不同的剪接途徑產生不同的 mRNA，並轉譯成不同的蛋白質。除了參與蛋白分解酵素活性的調控外，類澱粉前驅蛋白質可促進細胞間和細胞與細胞外基質 (Extracellular matrix) 間交互作用，其亦可促進神經細胞軸突之延展 (Neurite extension)，並藉調控胞內鈣離子的平衡而保護神經細胞，而一般細胞亦可分泌類澱粉前驅蛋白。

當類澱粉前驅蛋白質經過 β 與 α 分泌 (Secretase) 的分解產生類澱粉樣蛋白^(37, 38)，可溶的類澱粉樣蛋白並不具毒性，必須經聚合形成纖維束 (Fibril) 後才可經由破壞胞內鈣離子平衡與引發氧化壓力等機轉毒殺神經細胞。類澱粉樣蛋白聚合物亦能經由促進胞內 tau (τ) 蛋白之過磷酸化 (Hyperphosphorylation) 而干擾軸突之延展，造成細胞死亡。此外，類澱粉樣蛋白纖維束尚可藉由與腦中微膠細胞 (Microglia) 及星細胞 (Astrocyte) 膜上的特殊受器結合，將其活化，前者會釋放多種神經毒素，包括介白素-1 (IL-1)、介白素-6 (IL-6)、腫瘤壞死因子 (TNF- α) 等致發炎物質以及一氧化氮、超氧分子等自由基去攻擊神經細胞，造成其死亡^(59, 60)。

近年發現，位於第19對染色體上的載脂蛋白E (Apo E) 基因與阿茲海默症液相關，其所生載脂蛋白E與類澱粉樣蛋白結合迅速並沉積腦中形成老人斑塊，造成神經細胞的壞死⁽³⁹⁻⁴⁴⁾。

阿茲海默症初期會侵犯額葉，造成腦部喪失分泌乙醯膽鹼的神經元；同時，合成乙醯膽鹼的能力也下降。中樞膽鹼能系統以基底前腦膽鹼系統變化最明顯，包括Meynert基底核和內側隔核，它們投射到海馬回和大腦皮層的廣泛區域，阿茲海默症患者的基底前腦膽鹼能神經元約有90 % 喪失⁽⁹⁰⁾，神經生物化學研究顯示，阿茲海默症患者乙醯膽鹼（Acetylcholine）的合成減少，膽鹼乙醯化（Cholineacetyltransferase）活性下降，且與癡呆的嚴重程度密切相關⁽⁹¹⁾，海馬回和皮層錐體細胞的突觸及突觸菸鹼（Nicotine）受體、突觸前M型受體亦減少。近年來對乙醯膽鹼酯（Acetylcholinesterase）研究較多，儘管有不同的結果，但大多研究顯示阿茲海默症患者腦內乙醯膽鹼酯活性下降，且這可能是乙醯膽鹼酯缺乏的繼發反應，並非阿茲海默症的特徵⁽⁹²⁾。

事實上，除了膽鹼性神經元之外，阿茲海默症患者腦中的 Nicotinic、Muscarinic、Serotonin、Glutamate 受器以及 Serotonin、GABA、Norepinephrine 等神經衝動傳遞因子皆有缺損的現象。

第三章 實驗材料與方法

第一節 實驗材料

一、實驗試劑

(一) 材料配製

本實驗材料均以純品進行之，材料如下：Ferulic acid，購自 Sigma-Aldrich；實驗前以二次水溶解成懸浮液，並緩慢滴加1 N NaOH 直至為澄清液體（100、300 mg/kg，皮下給藥）。Huperazine A，購自 Sigma-Aldrich；實驗前以二次水溶解。L(+)-Ascorbic acid (Vitamin C)，購自 Ferak；(+)- α -Tocopherols acetate (Vitamin E)，購自 Sigma-aldrich。依比例 (Vitamin C/E = 3/1，150 mg/ kg，口服給藥) 以二次水溶解配製⁽⁷⁶⁾。

(二) 實驗試劑

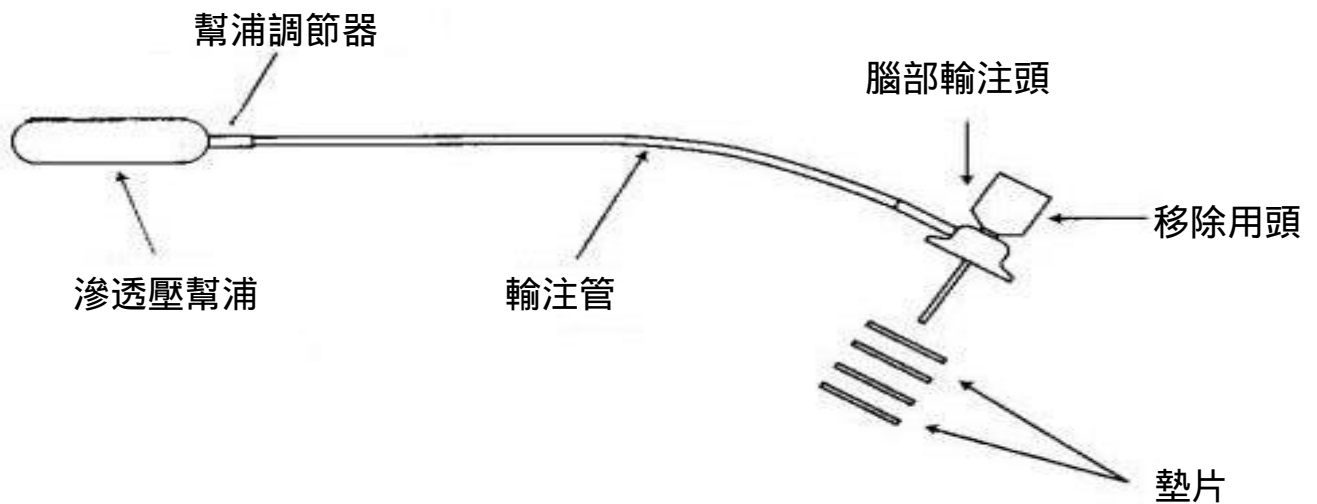
1. Amyloid β -peptide 1-40 (human)，購自 Tocris，實驗前以 35% Acetonitrile/0.1% Trifluoacetic acid 製備(25 pmole/l)
2. Pentobarbital Sodium，購自 Chriskev。
3. Monosodium Phosphate、Disodium Phosphate、EDTA、Acetonitrile、Trifluoacetic Acid、Ortho-Phosphoric acid，以上購自 J.T. Baker。
4. Sodium 1-Octanesulfonate，購自 TCI。
5. 4-Hydro-3-Methoxymandelic acid (VMA)、Norepinephrine (NE)、Dopamine (DA)、Dehydroxyphenylacetic Acid (DOPAC)、Serotonin (5-HT)、5-Hydroxyindoleacetic Acid (5-HIAA)、Riboflavin (Vitamin B₂)、L-Methionine、Nitroblue Tetrazolium (NBT)、Acetylthiocholine Iodine (ACtCh)、5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic) Acid (DTNB)、2-Vinylpyridine、Acetylcholinesterase (AChE)，以上均購自 Sigma-Aldrich。
Glutathione (GSH) Assay kit，購自 Cayman。

二、實驗動物

本研究所採用之動物為中國醫藥學院 動物中心所提供 Sprague-Dawley系雄性大鼠，體重約250-300 g，飼養在空調的房間，溫度維持在 23 ± 1 ，燈光控制採12小時亮12小時暗(08:00燈亮、20:00燈暗)，食物與水不予限制。

三、實驗儀器

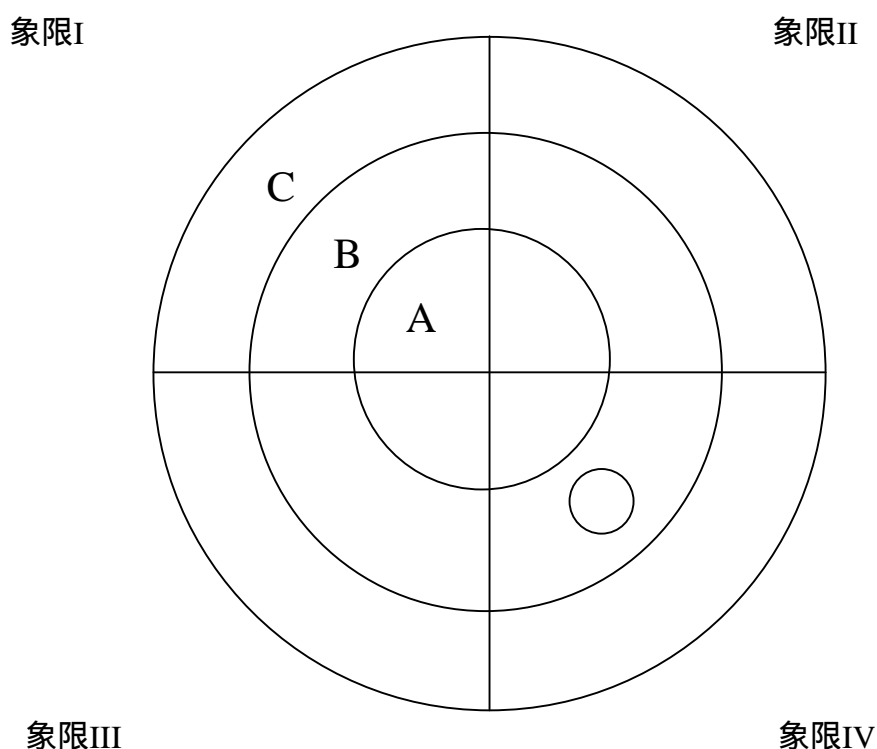
(一)ALZET 幫浦：由滲透壓幫浦(Mini-Osmotic Pump, Model 2002, 輸注速率 $0.5 \mu\text{l/hr}$ ，內容量 $200\mu\text{l}$, Alzet[®])、軟管(長約4-5 cm, 內容量約 $80\mu\text{l}$)、輸注針頭(Brain Infusion Kit II, 3-5 mm, Alzet[®])所構成，如圖所示。



腦部輸注儀器圖

(二) 被動迴避儀：使用「被動迴避學習反應測定裝置」，此裝置分成兩部份：實驗箱係為一經中間閘門分隔為相同大小二室（26×26×30cm）的箱子及其控制器；在實驗裝置處置上，於相同大小二室之其中一室上方置一20W之電燈泡，將相同大小二室區分為明暗二室，中以門閘控制，箱底設有間隔2 cm平行排列的金屬桿(直徑1.5 mm)，並接上電流器。

(三) 水迷宮之設備：由一直徑160 cm、高50 cm、壁厚15 mm不銹鋼泳池及一個逃逸平臺（直徑11 cm、高22 cm，當泳池滿水時，置於水面下1 cm處）所組成，水溫保持 23 ± 1 。水池由電腦劃分為四個象限（I、II、III、IV）、三個環（A、B、C）如圖所示。水迷宮所用之紀錄儀器為：Columbus Instruments VIDEOMEX-V video tacking, Video camera, Video monitor (COLUMBUS INSTRUMENTS INTERNATIONAL CORPORATION)



水迷宮電腦劃分區域示意圖

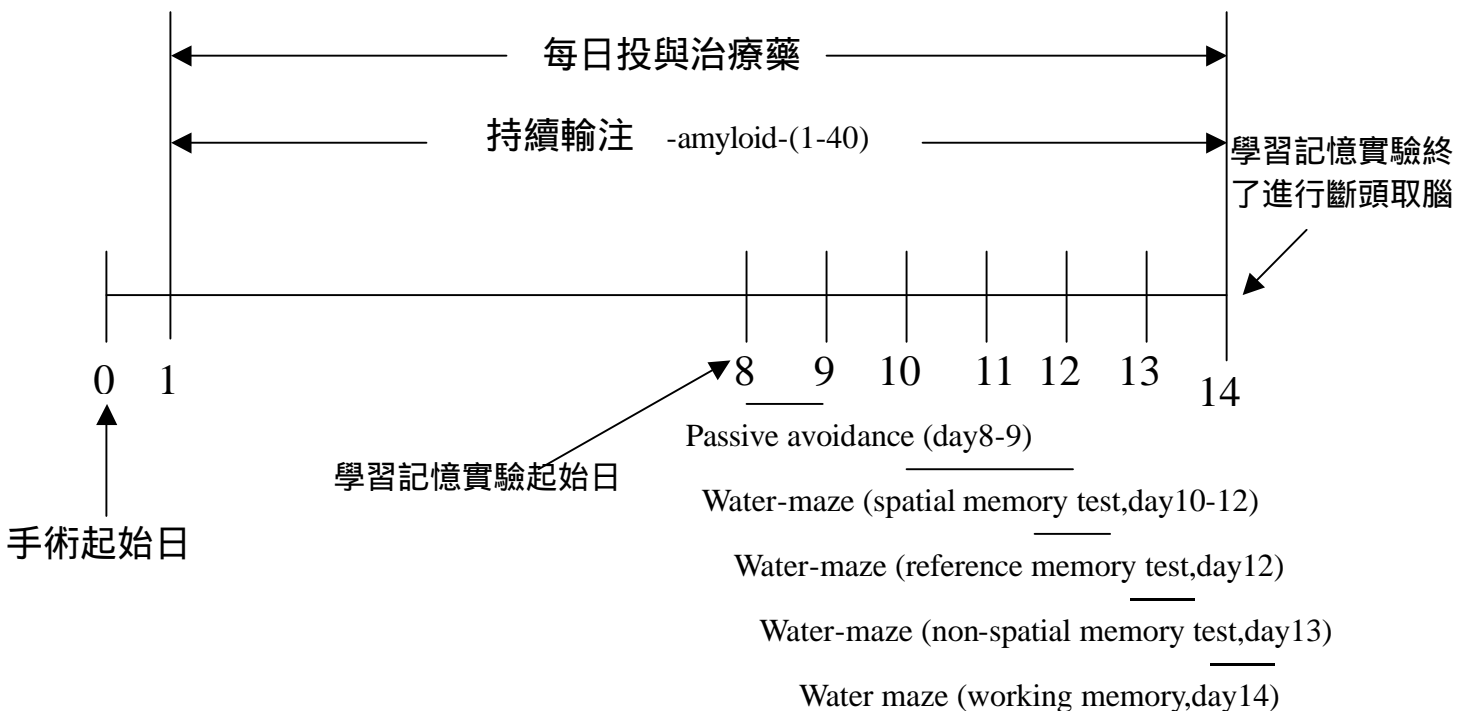
(四) 酵素免疫分析儀：使用 Microplate Spectrophotometer (Powerwave X 340, Bio-TEK instruments INC.)

(五) HPLC之設備：使用High performance liquid chromatography (HPLC PM80, BAS) 檢出器 (Electrochemical Detectors LC-4C, BAS) 分離管柱為Bioanalytic system MF-6026測定之。

第二節 實驗方法

一、擬似阿茲海默大鼠之誘導

製備好之 Amyloid β -peptide 1-40 solution 灌入 Alzet osmotic pump, 接上 brain infusion kit, 並使 amyloid β -peptide 1-40 solution 充滿連接 Pump 及 Kit 之 PE 管。其次, 以 Sodium Pentobarbital (45 mg/kg) 進行大鼠麻醉, 麻醉後, 置於立體定位儀上, 進行側腦室之定位; 待側腦室定位後, 將 Brain infusion kit 置上, 並將 Alzet osmotic pump 置於頸後皮下區。最後進行縫合, 並歸回飼養籠中照顧。對照組 (Sham) 則於 Alzet osmotic pump 填充 35% Acetonitrile/0.1% Trifluoacetic Acid。治療組於埋置好後之次日, 持續於每天固定時刻給予, 直至實驗完成⁽⁶⁾。



實驗流程圖

二、被動迴避反應 (Passive Avoidance Learning)

將大鼠置入明室，同時開啟閘門，待大鼠進入暗室後，關閉閘門，同時於底板通以電流 (1 mA , 2 sec)，待電刺激後 5 秒，自暗室取出大鼠，歸回飼養籠；如老鼠一直沒進入暗室，待 90 秒後將老鼠推至暗室後，關閉閘門，同時於底板通以電流，再歸回飼養籠。測定期：於訓練後 24 小時，再將大鼠置入明室，同時並開啟閘門，記錄大鼠在明室之滯留時間 (Step-Through Latency , STL)。當於明室之滯留時間大於 5 分鐘 (300 秒) 時，則稱大鼠之學習記憶能力正常⁽⁹³⁾。

三、Morris水迷宮實驗 (Morris Water Maze)⁽⁹⁴⁾

實驗於手術完後第十日開始進行，泳池由電腦分成四個象限，逃逸平臺固定置於第四象限上，大鼠頭向外依序分別置入四個象限，每天訓練4次，每次 2 分鐘；若大鼠於 2 分鐘內即找到逃逸平臺，讓大鼠休息 30 秒鐘後，抓出泳池休息 30 秒鐘，然後進行下一次之訓練；但若大鼠於 2 分鐘尚未找到逃逸平臺，則將大鼠抓到逃逸平臺，休息 30 秒鐘後，移出泳池休息 1 分鐘，再進行下一次之訓練；共訓練3天，此三天 (實驗第10-12天) 謂「學習操作」⁽⁹⁵⁾。

水迷宮第三天 (實驗第12天) 於訓練完4小時後將逃逸平臺自水面下取走，再將大鼠置於第一象限，連續測定60秒鐘，記錄大鼠於泳池內游泳之軌跡及於原逃逸平臺所花之時間及游泳距離，此謂之「參考記憶 (Reference memory)」⁽⁹⁶⁾。

水迷宮第四天 (實驗第13天) 再將逃逸平臺置入第四象限並使其露出於水面 1 cm，訓練4次，此謂之「非空間性記憶 (Non-spatial memory)」⁽⁹⁵⁾。

水迷宮第五天 (實驗第14天) 將逃逸平臺置於第二象限，加水使其沈入水面下 1 cm，大鼠先置入第一象限，連續測定120秒鐘或至大鼠找到逃逸平臺，此謂之「再學習 (Reacquisition)」⁽⁹⁷⁾。

水迷宮第五天 (實驗第14天) 於第一次實驗完成後休息4小時，再將大鼠先置入第三象限，亦連續測定120秒鐘或至大鼠找到逃逸平

臺。所有大鼠游泳之軌跡及實驗資料均由電腦自動記錄。第5天稱為「工作記憶 (Working memory)」⁽⁹⁷⁾。

四、腦組織之處理

實驗完成後，將老鼠斷頭取腦，按 Grosvisky 方法⁽⁹⁸⁾分成 Cortex、Hippocampus 區域，分別加入 25 mM phosphate buffer solution (pH = 7.4) (4 ml) 均質。Cortex 分兩次，每次加入 750 μ l buffer 後，均質離心 (14000 rpm ， 30 min ， 4 $^{\circ}$ C)；再合併兩次之上清液，以 25 mM phosphate buffer solution (pH = 7.4) 定量至 1.5 ml。Hippocampus 加入 1 ml buffer 後，均質、離心 (14000 rpm ， 30 min) (4 $^{\circ}$ C)，以 25 mM phosphate buffer solution (pH = 7.4) 定量至 1 ml。保存於-80 $^{\circ}$ C 的冰箱中，待需要時解凍離心 (10000 rpm ， 5 min ， 4 $^{\circ}$ C)，取上清液使用。

五、蛋白質含量之測定

採 Lowery 之方法⁽⁹⁹⁾，以 Bovine Serum albumin 為標準品，將 protein standard 以 50 mM phosphate buffer 稀釋 3 到 5 個濃度，取 5 μ l sample 和 standard 分別置入 microplate 中，每一小格中先後加入 25 μ l 試劑 A 及 200 μ l 試劑 B (試劑購自 Bio-RAD) 混合均勻，靜置 15 分鐘後於波長 750 nm 下測其吸光值。爾後以吸光度求出標準檢量線及公式，再將 Sample 的 Slope 帶入反推 protein 含量。

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
STD1	STD1	STD1	Samp5	Samp5	Samp5	Samp13	Samp13	Samp13	Samp21	Samp21	Samp21	A
STD2	STD2	STD2	Samp6	Samp6	Samp6	Samp14	Samp14	Samp14	Samp22	Samp22	Samp22	B
STD3	STD3	STD3	Samp7	Samp7	Samp7	Samp15	Samp15	Samp15	Samp23	Samp23	Samp23	C
STD4	STD4	STD4	Samp8	Samp8	Samp8	Samp16	Samp16	Samp16	Samp24	Samp24	Samp24	D
Samp1	Samp1	Samp1	Samp9	Samp9	Samp9	Samp17	Samp17	Samp17	Samp25	Samp25	Samp25	E
Samp2	Samp2	Samp2	Samp10	Samp10	Samp10	Samp18	Samp18	Samp18	Samp26	Samp26	Samp26	F
Samp3	Samp3	Samp3	Samp11	Samp11	Samp11	Samp19	Samp19	Samp19	Samp27	Samp27	Samp27	G
Samp4	Samp4	Samp4	Samp12	Samp12	Samp12	Samp20	Samp20	Samp20	Samp28	Samp28	Samp28	H

Protein 之測定時 96-well microplate 上 standard 和 sample 的配置圖

六、Total-SOD、Mn-SOD 暨 Cu,Zn-SOD 測定

採 NBT 之方法⁽¹⁰⁰⁾，每小格加入 200 μ l 反應液 (內含 5 mM Riboflavin 20 μ l、14.9 mg Methionine 及 1.22 mM NBT 820 μ l，以 50 mM，PH7.8 的 phosphate buffer 補到 8 ml)，及 50 μ l 稀釋成不同濃度的樣品液(每樣品至少稀釋 3~5 個濃度)，並以 50 mM phosphate buffer 當對照組，將此微量分析盤置於波長 570 nm 中測其吸光值。光照 10 秒後，測定吸光值，同樣測定第 45 秒、90 秒、135 秒、180 秒、225 秒、270 秒的吸光值。算出對照組與各稀釋濃度七次分析時間內吸光值變化的斜率，並計算樣品的抑制程度，以能抑制 50%NBT 還原的酵素量定義為 1U。帶入回歸公式，算出抑制 50%NBT 還原需多少樣品溶液，再換算成每 μ l 樣品相當多少 Total-SOD 活性，爾後將求得的值除以蛋白質的量。

Mn-SOD 測定同 Total-SOD 之測定，Sample 以含 KCN(及 21×10^{-5} M) 的 phosphate buffer 處理，對照組及反應液的配製則以含 KCN (21×10^{-5} M) 的 phosphate buffer 替代。

Cu,Zn-SOD 的含量則將上述處理過後的 Sample Total-SOD 值減去 Mn-SOD 值即得之。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
A	Blank	blank	blank	blank	blank	Blank	blank	blank	blank	blank	blank	blank	
B	Samp1	Samp1	Samp1	Samp2	Samp2	Samp2	Samp3	Samp3	Samp3	Samp4	Samp4	Samp4	6.25×
C	Samp1	Samp1	Samp1	Samp2	Samp2	Samp2	Samp3	Samp3	Samp3	Samp4	Samp4	Samp4	12.5×
D	Samp1	Samp1	Samp1	Samp2	Samp2	Samp2	Samp3	Samp3	Samp3	Samp4	Samp4	Samp4	25×
E	Blank	blank	blank	blank	blank	Blank	blank	blank	blank	blank	blank	blank	
F	Samp5	Samp5	Samp5	Samp6	Samp6	Samp6	Samp7	Samp7	Samp7	Samp8	Samp8	Samp8	6.25×
G	Samp5	Samp5	Samp5	Samp6	Samp6	Samp6	Samp7	Samp7	Samp7	Samp8	Samp8	Samp8	12.5×
H	Samp5	Samp5	Samp5	Samp6	Samp6	Samp6	Samp7	Samp7	Samp7	Samp8	Samp8	Samp8	25×

Total-SOD 及 Mn-SOD 之測定時 96-well microplate 上 blank 和 sample 的配置圖

七、Acetylcholinesterase 活性測定

Acetylcholinesterase (AChE) 以 Modified Ellmen method 測定之⁽¹⁰¹⁾，以 acetylthiocholine 為受質，使用 DTNB 為反應試劑，將 AChE standard 以 0.1 M Sodium phosphate buffer (pH=7.4) 稀釋 3 到 5 個濃度，取 0.5 μ l sample 和 standard 分別置入 microplate 中，每一小格中加入 4.5 μ l DTNB 並混合均勻，控溫於 26 $^{\circ}$ C 靜置 10 分鐘。爾後每一小格中先後加入 5 μ l Acetylthiocholine (ACtCh) 及 190 μ l Sodium phosphate buffer (pH=8.0) 並混合均勻。將 microplate 置入酵素分析儀中，以波長 412 nm、間隔 1 分鐘測定吸光值的變化。

八、GSH 及 GSSG 之測定

稀釋 GSSG standard 為 3-5 個濃度後，將 50 μ l Standard 或 Sample 個別加入 plate 的 well 中。再加入 150 μ l 新鮮配製的 Assay Cocktail (內含 MES Buffer 11.25 ml、Reconstituted Cofactor Mixture 0.45 ml、Reconstituted Enzyme Mixture 2.1 ml、water 2.3 ml、Reconstituted DTNB 0.45 ml) 後，以 405 或 414 nm 波長來測其吸光值，在 30 分鐘內測 6 點 (亦就是 5 分鐘間隔測 1 點)⁽¹⁰²⁾。

九、單胺濃度 (Monoamine Levels) 測定

取 80 μ l 上清液 (cortex、hippocampus) 加入 20 μ l internal standard solution 【200 ng/ml Isoproterenol (40 ng/ml)】，置於 0.22 μ m Micon Ultrafree-MC centrifugal filter units 進行離心 (14000 rpm, 4 min, 4 $^{\circ}$ C)，取上清液，行 HPLC injection。

HPLC 試驗條件：流速為 0.4 ml/min，移動相內含 o-Phosphoric acid : 600 μ l、EDTA 2Na : 100 mg、Sodium octylsulfonate : 660 mg，以 phosphate-citrate buffer (0.02 M Na₂HPO₄ : 0.01 M Citric acid = 80 : 120 ; pH=2.8) 溶解後，再加入 87 ml Acetonitrile，最後加 phosphate-citrate buffer 定量至 1 L，然後過篩 (0.22 μ m filter) 即製備完成⁽¹⁰³⁾。

ECD (electrochemical dector) 之設定條件：第一氧化電位 (Egen) +0.05 V、第二氧化電位 (AppE) 為+0.75 V , 測定範圍 (Range) 為 10 nA。

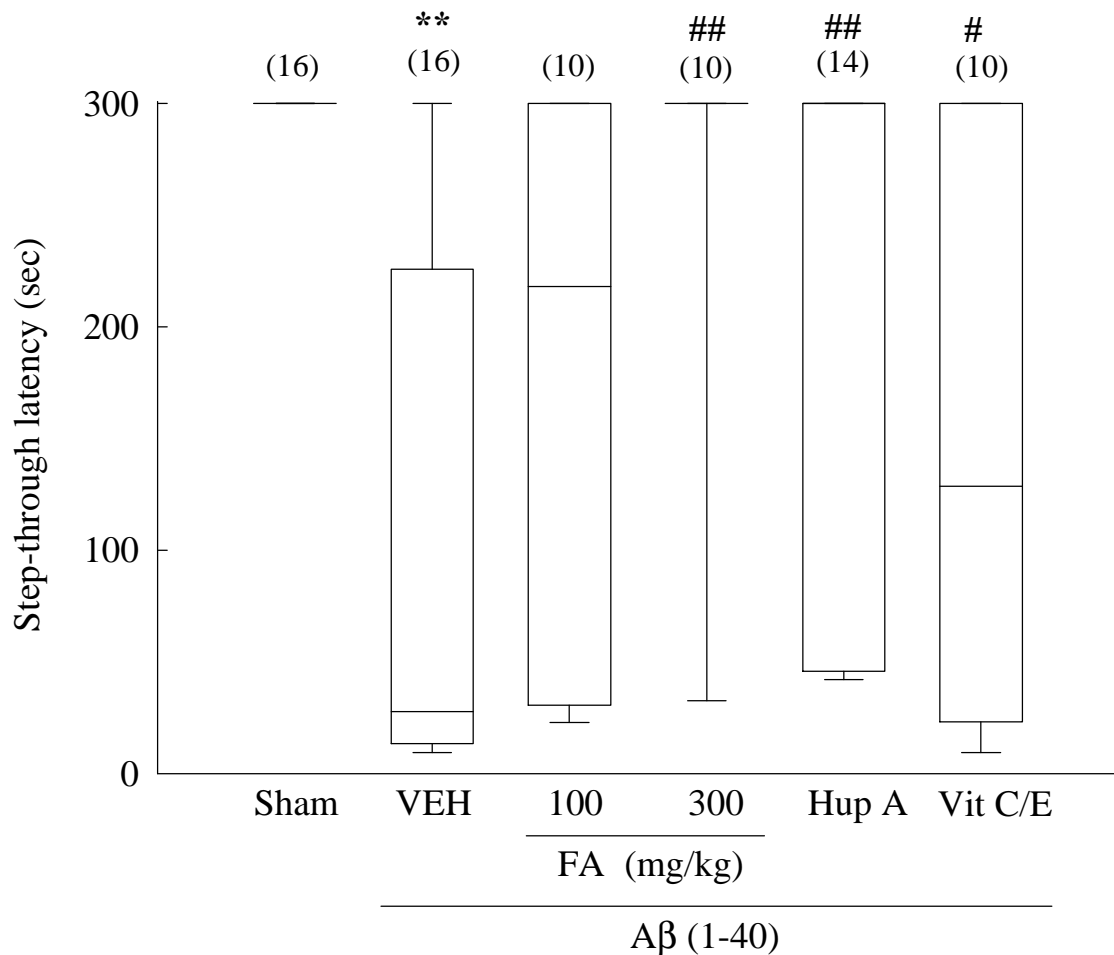
第三節 數據統計

- (一) 被動迴避反應所獲得的 data，以 non-parametric method (Mann-Whitney Utest), 各組間以 Kruskal-Wallis non-parametric one way analysis，來作統計並分析其間差異之顯著性；凡 P 小於 0.05 以下時，則認為有統計意義。
- (二) 水迷宮空間性學習操作、參考記憶暨工作記憶與 SOD、GSH、AChE、單胺濃度等檢測所獲得的 data，以 one-way ANOVA analysis 各組間以 Dunnet's test 及 Scheffe test 來作統計並分析其間差異之顯著性；若 P 小於 0.05 以下時，則認為有統計意義。

第四章 實驗結果

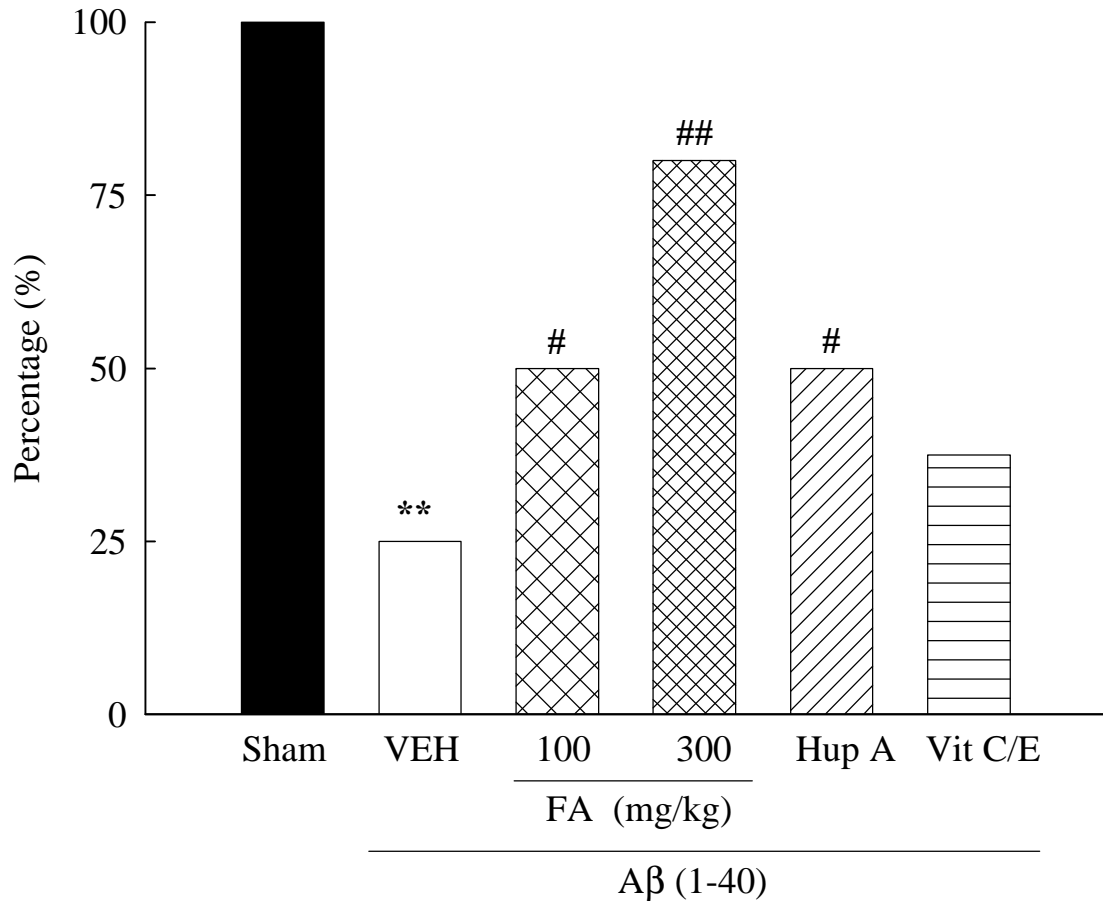
一、阿魏酸對 Amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠被動迴避反應之影響

如圖一所示，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 (VEH, $P < 0.01$)。阿魏酸 (300 mg/kg) 治療組、石杉鹼甲 (0.2 mg/kg) 治療組、Vitamin C/E 治療組皆有明顯改善的現象 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。



圖一 阿魏酸 (100、300 mg/kg) 石杉鹼甲 (0.2 mg/kg) Vitamin C/E對amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠被動迴避試驗滯留明室時間。 ** $P < 0.01$ ，與對照組相比。 # $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ，與Amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠組相比。

如圖二所示，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 \hat{a} peptide-(1-40)誘發擬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 % (P < 0.01) ; 阿魏酸 (100、 300 mg/kg) 治療組、石杉鹼甲 (0.2 mg/kg) 治療組可使比率明顯提高。



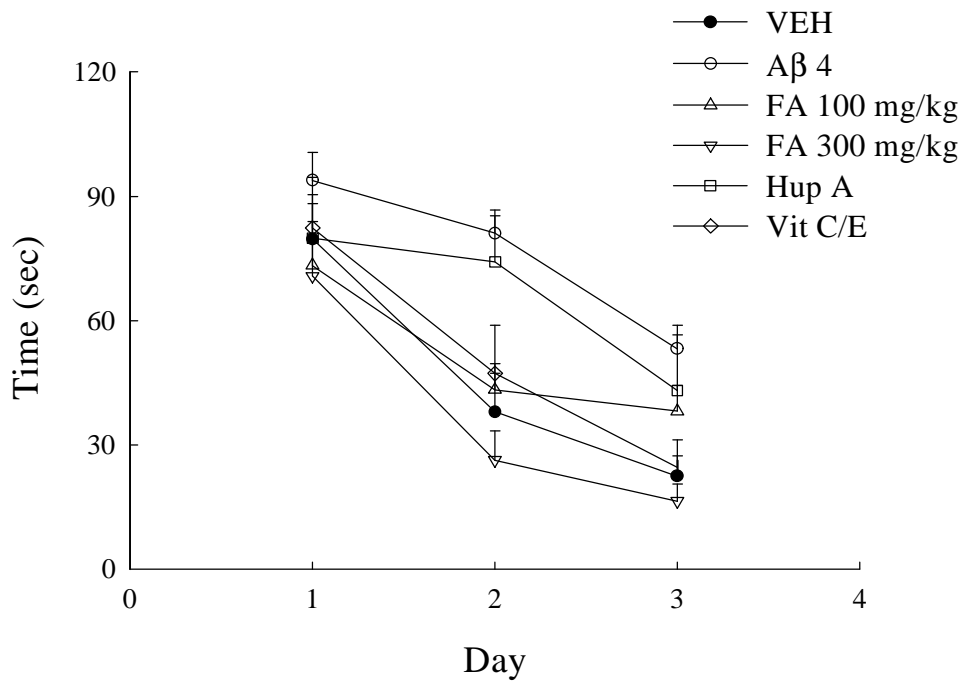
圖二 阿魏酸 (100、 300 mg/kg) 石杉鹼甲 (0.2 mg/kg) Vitamin C/E對amyloid \hat{a} peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠於被動迴避試驗滯留明室達300秒比率之影響。 **P < 0.01 ， 與對照組相比。 #P < 0.05 ， ##P < 0.01 ， 與Amyloid \hat{a} peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠組相比。

二、Morris 水迷宮實驗

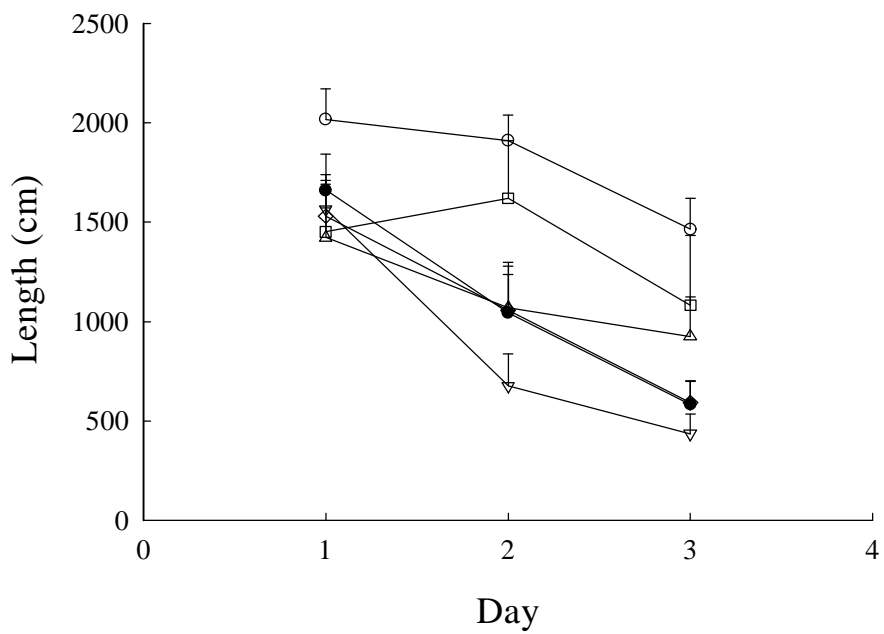
(一) 阿魏酸對 Amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠水迷宮空間性學習操作障礙之影響

如圖三所示，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 ($P < 0.01$)。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 ($P < 0.01$)；而正對照組僅 Vitamin C/E 治療組具改善作用 ($P < 0.01$)，Huperazine A 治療組則無此作用 ($P > 0.05$)。

(A) Time to hidden platform



(B) Length to hidden platform

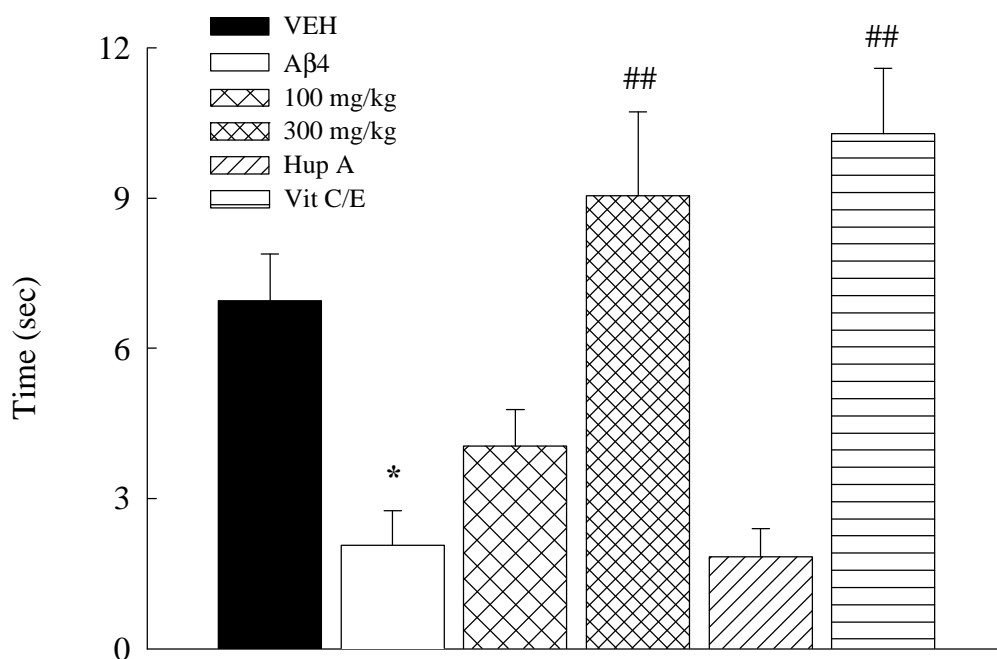


圖三 阿魏酸(100、300 mg/kg) 石杉鹼甲(0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠水迷宮空間性學習操作障礙之影響。

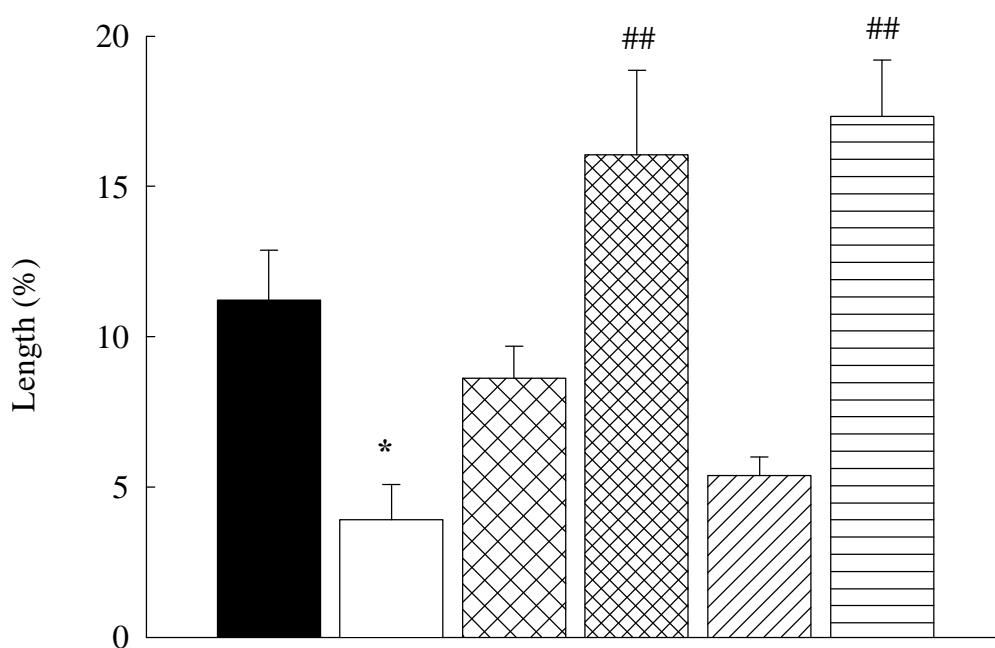
(二)阿魏酸對Amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠水迷宮參考記憶障礙之影響

如圖四所示，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 ($P < 0.05$)。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 ($P < 0.01$)；而正對照組僅 Vitamin C/E 治療組具改善作用 ($P < 0.01$)，Huperazine A 治療組及阿魏酸 (100 mg/kg) 治療組則無此作用 ($P > 0.05$)。

(A) Time spent in the target ring



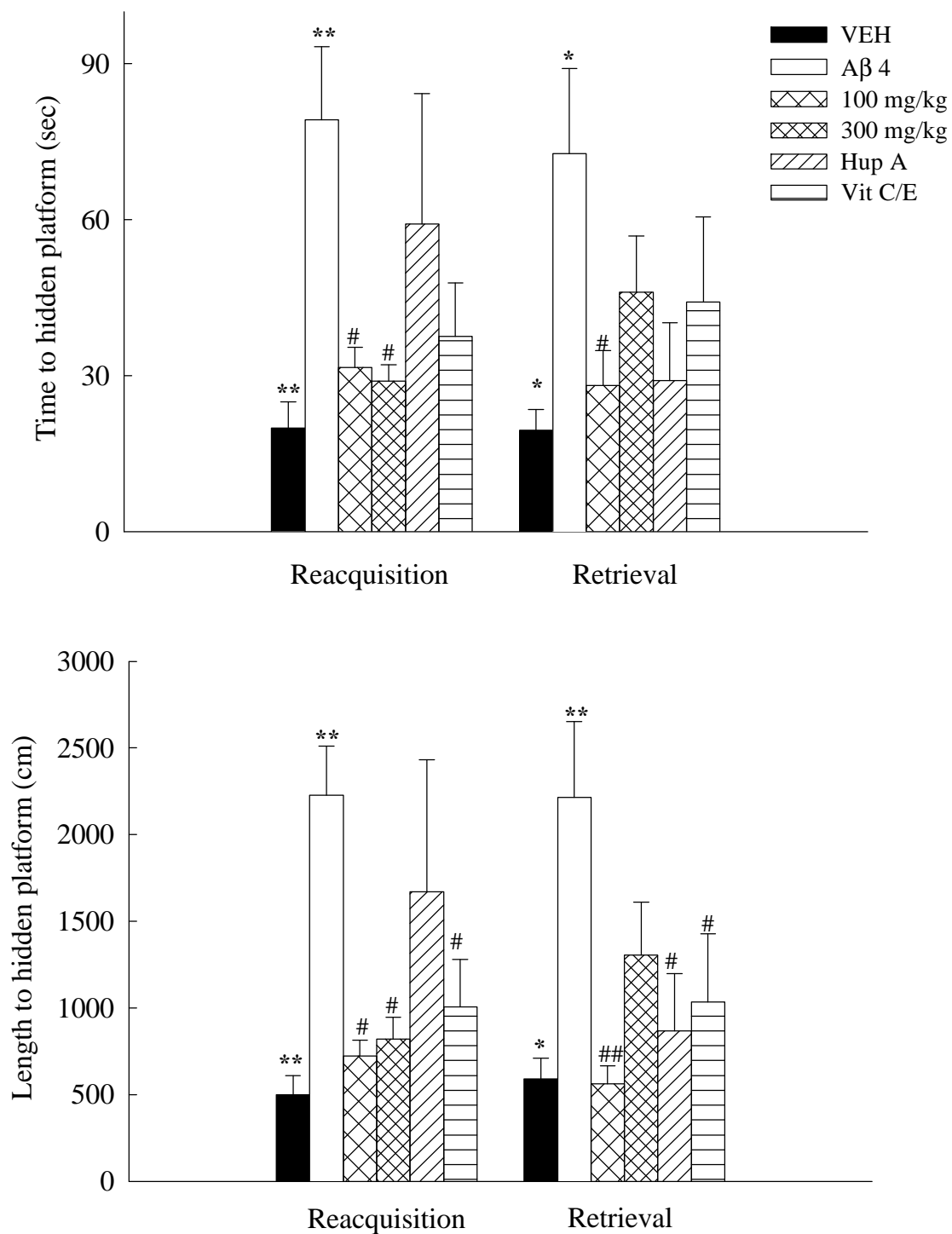
(B) Length spent in the target ring



圖四 阿魏酸 (100、300 mg/kg)、石杉鹼甲 (0.2 mg/kg)、Vitamin C/E對amyloid α peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠水迷宮參考記憶障礙之影響。* $P < 0.05$ ，為與對照組比。# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ，與Amyloid α peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠組相比。

(三)阿魏酸對Amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠水迷宮工作記憶障礙之影響

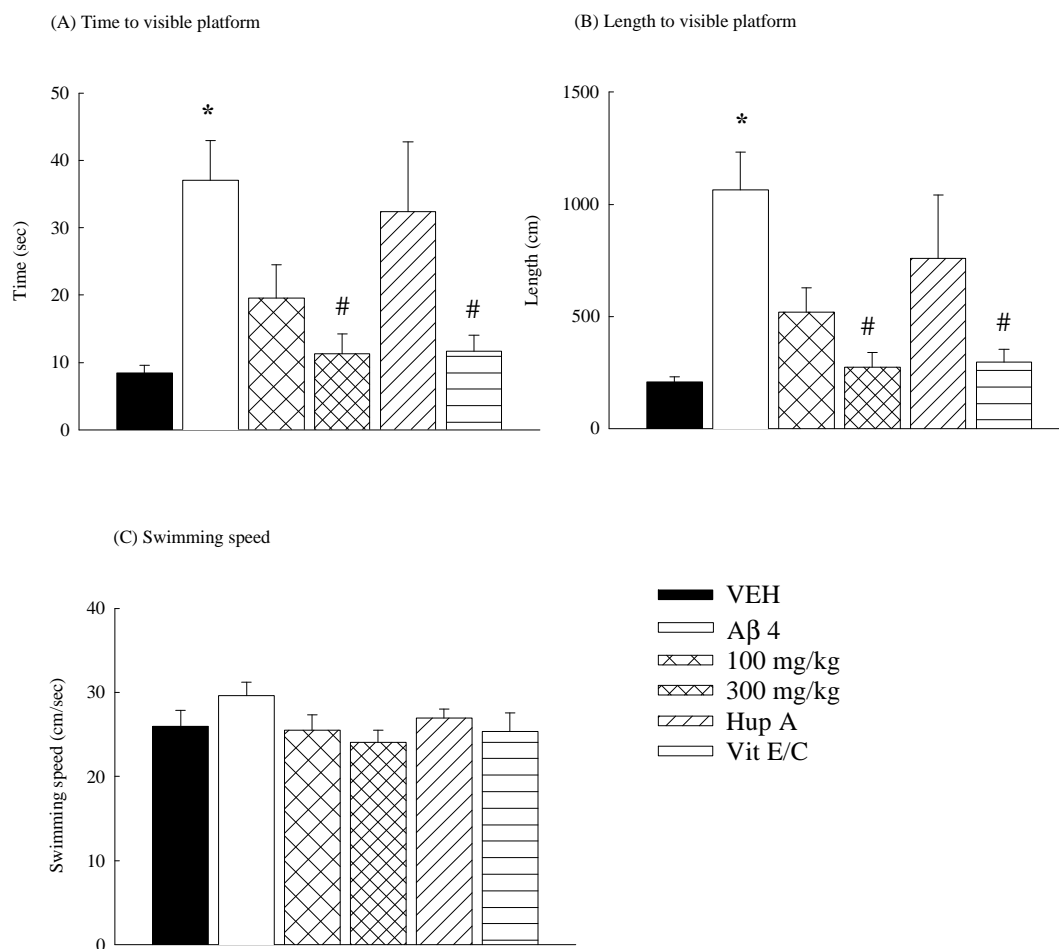
如圖五所示，Amyloid β peptide-(1-40)連續輸注十三天後，可造成大鼠於水迷宮工作記憶之障礙($P < 0.01$)，阿魏酸(100, 300 mg/kg)治療組、Vitamine C/E 治療組可改善 Amyloid β peptide-(1-40)連續輸注所造成空間工作記憶障礙($P < 0.05$)；而正對照組 Huperazine A 治療組及 Vitamin C/E 治療組亦有相同作用($P > 0.05$)。



圖五 阿魏酸 (100、300 mg/kg)、石杉鹼甲 (0.2 mg/kg)、Vitamin C/E對amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠工作記憶障礙暨再現之影響。*P < 0.05, **P < 0.01, 與對照組相比。#P < 0.05, ##P < 0.01, 與Amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠組相比。

(四) 阿魏酸對Amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠水迷宮非空間性游泳操作能力障礙之影響

如圖六所示，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 ($P < 0.05$)。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 ($P < 0.05$)。而在游泳速度方面則無任何影響。

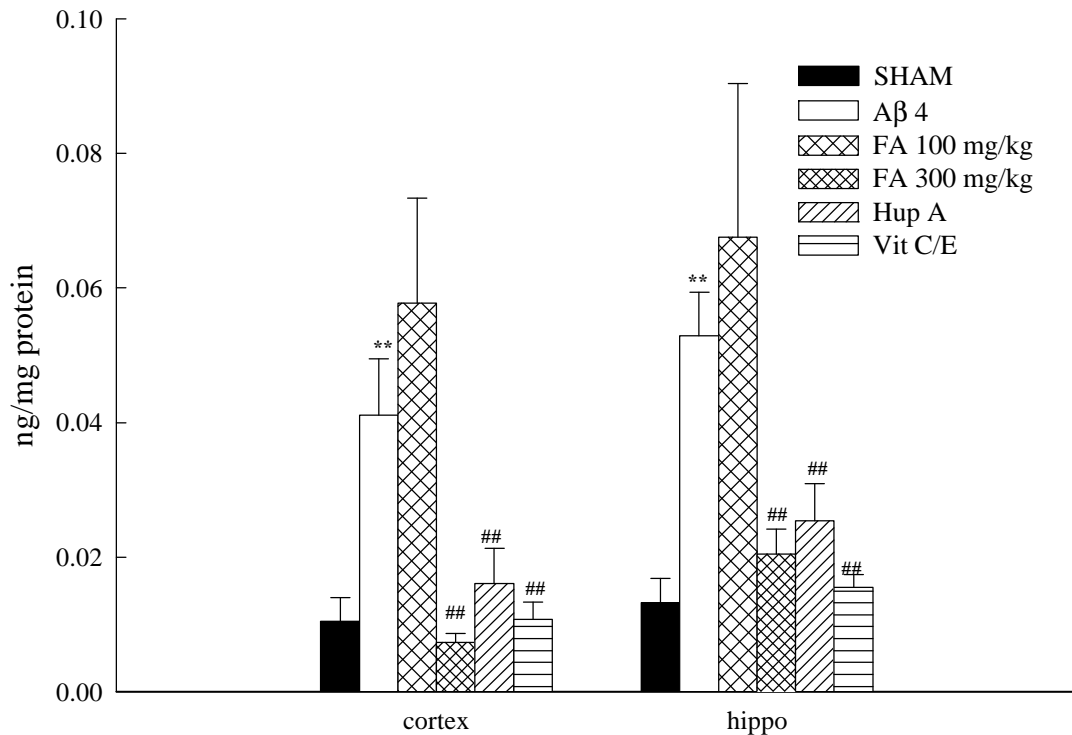


圖六 阿魏酸 (100、300 mg/kg)、石杉鹼甲 (0.2 mg/kg)、Vitamin C/E對amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠非空間性游泳操作能力之影響。* $P < 0.05$ ，與Amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠組相比。# $P < 0.05$ ，與Amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠組相比。

三、Total-SOD、Mn-SOD暨Cu,Zn-SOD測定

(一) 阿魏酸對 Amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠 Total-SOD 之影響

如圖七所示，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 Total-SOD 值的提高 ($P < 0.01$)。阿魏酸僅於 300 mg/kg 時可改善 Amyloid β peptide-(1-40)連續輸注所造成皮質區及海馬回中 Total-SOD 值提高的作用 ($P < 0.01$)；而正對照組 Huperazine A 治療組及 Vitamin C/E 治療組均具改善作用 ($P < 0.01$)。



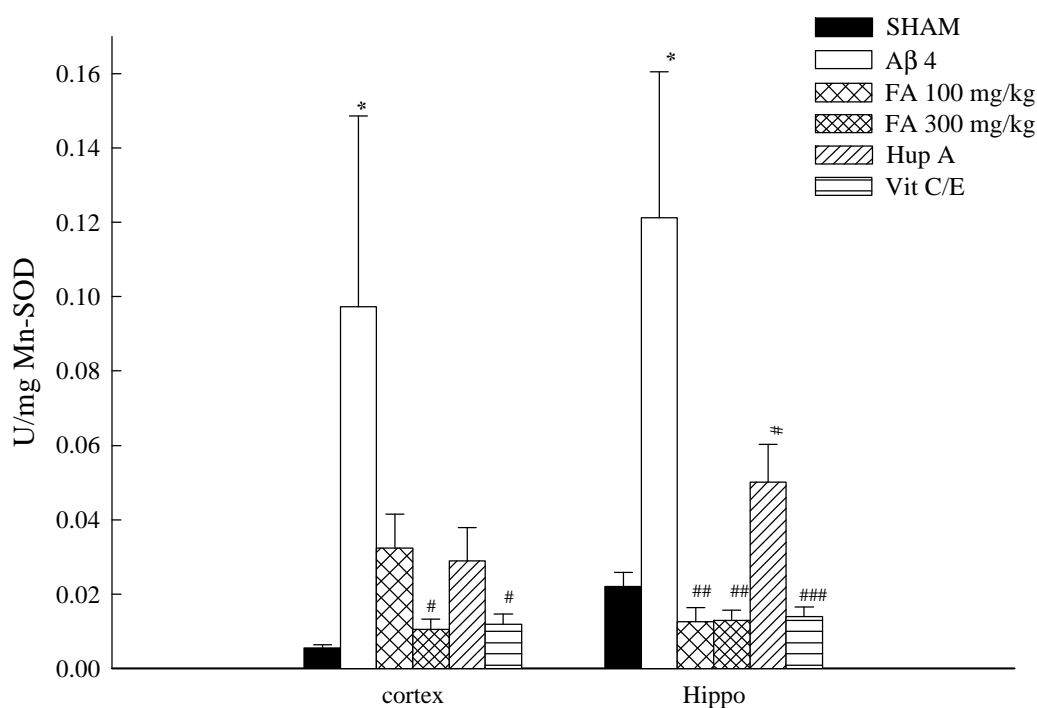
圖七 阿魏酸 (100、300 mg/kg) 石杉鹼甲 (0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠皮質區 (cortex) 及海馬回 (hippocampus, hippo) Total-SOD 含量之影響。** $P < 0.01$ ，為與對照組比。## $P < 0.01$ ，與 Amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠組相比。

(二) 阿魏酸對 Amyloid \hat{a} peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠 Mn-SOD 之影響

如圖八所示，Amyloid \hat{a} peptide-(1-40)連續輸注十四天後，可造成大鼠皮質區及海馬回中 Mn-SOD 值的提高 ($P < 0.05$)。

在皮質區中：阿魏酸 (300 mg/kg) 治療組可改善 Amyloid \hat{a} peptide-(1-40)連續輸注所造成皮質區中 Mn-SOD 值提高的作用 ($P < 0.05$)；而正對照組 Vitamin C/E 治療組亦均具改善作用 ($P < 0.05$)。

在海馬回中：阿魏酸 (100、300 mg/kg) 治療組可改善 Amyloid \hat{a} peptide-(1-40)連續輸注所造成海馬回中 Mn-SOD 值提高的作用 ($P < 0.01$)；而正對照組 Huperazine A 治療組及 Vitamin C/E 治療組亦均具改善作用 ($P < 0.05$, $P < 0.001$)。

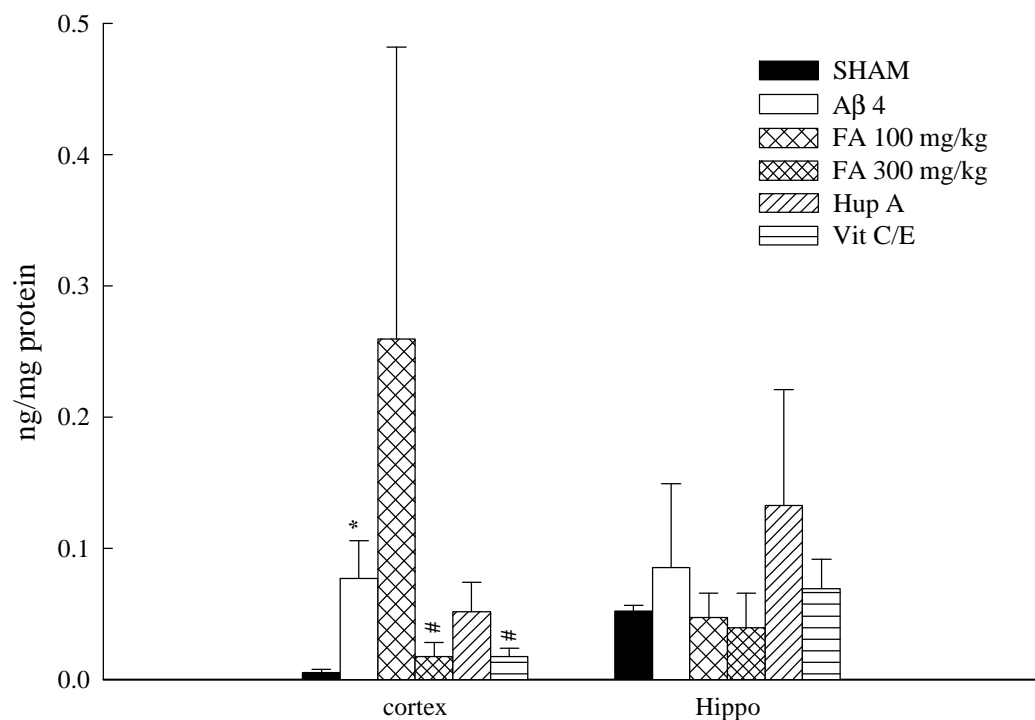


圖八 阿魏酸 (100、300 mg/kg) 石杉鹼甲 (0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid \hat{a} peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠皮質區 (cortex) 及海馬回 (hippocampus, hippo) Mn-SOD 含量之影響。* $P < 0.05$ ，與對照組相比。# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ，### $P < 0.001$ 與 Amyloid \hat{a} peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠組相比。

(三) 阿魏酸對 Amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠 Cu,Zn-SOD 之影響

如圖九所示，Amyloid β peptide-(1-40)連續輸注十四天後，可造成大鼠皮質區中 Cu,Zn-SOD 值的提高 ($P < 0.05$)。

在皮質區中：僅阿魏酸 (300 mg/kg)可改善 Amyloid β peptide-(1-40)連續輸注所造成皮質區中 Cu,Zn-SOD 值提高的作用 ($P < 0.05$)；而正對照組 Vitamin C/E 治療組亦均具改善作用 ($P < 0.05$)。

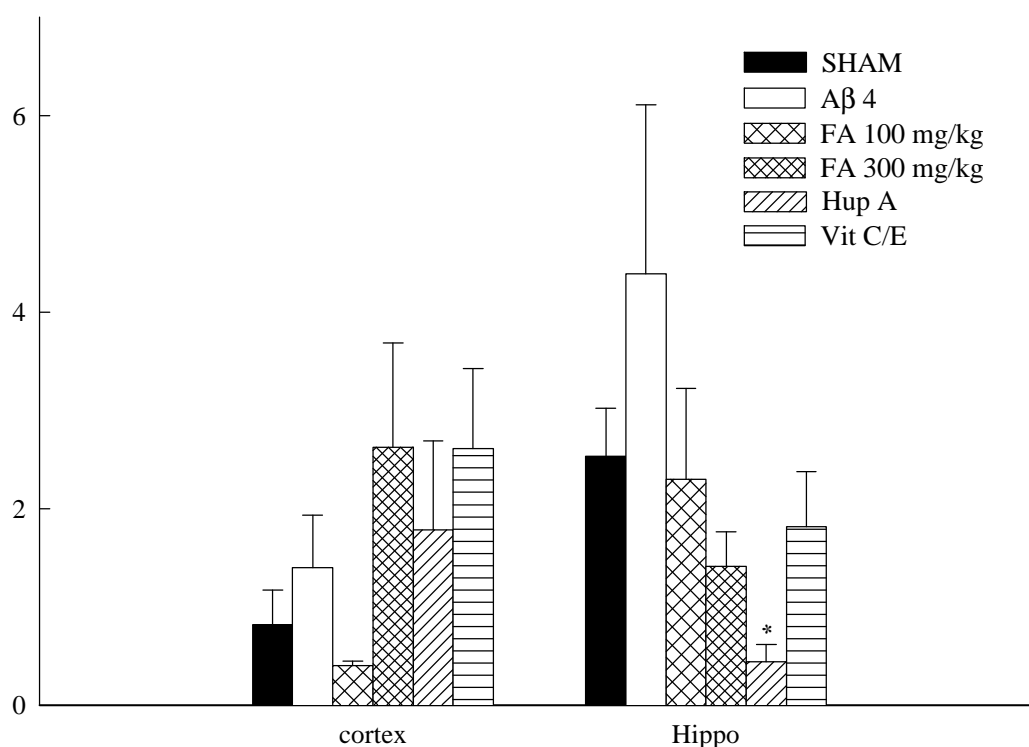


圖九 阿魏酸 (100、300 mg/kg)、石杉鹼甲 (0.2 mg/kg)、Vitamin C/E 對 amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠皮質區 (cortex) 及海馬回 (hippocampus , hippo) Cu,Zn-SOD 含量之影響。* $P < 0.05$ ，與對照組相比。# $P < 0.05$ ，與 Amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠組相比。

(四) 阿魏酸對 Amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠 Cu/Mn-SOD 比率之影響

如圖十所示，Amyloid β peptide-(1-40)連續輸注十四天後，可大鼠皮質區及海馬回中 Cu/Mn-SOD 比率並無變化。

在海馬回中：阿魏酸對於 Amyloid β peptide-(1-40)連續輸注所造成海馬回中 Cu/Mn-SOD 比率並無影響 ($P > 0.05$)；而正對照組 Huperazine A 治療組可降低海馬回中 Cu/Mn-SOD 比率 ($P < 0.05$)。



圖十 阿魏酸 (100、300 mg/kg) 石杉鹼甲 (0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠皮質區 (cortex) 及海馬回 (hippocampus, hippo) Cu,Zn-SOD 與 Mn-SOD 含量比值之影響。* $P < 0.05$ ，與對照組相比。

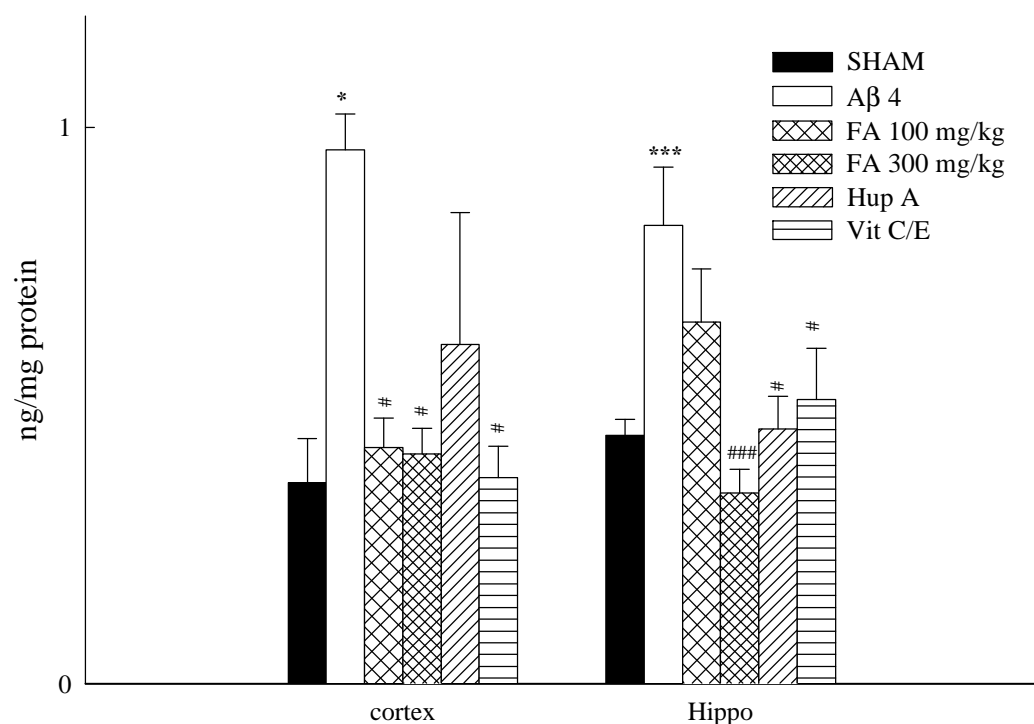


四、Acetylcholinesterase 活性分析

如圖十一所示，Amyloid \hat{a} 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 ($P < 0.05$, $P < 0.001$)。

在皮質區中：阿魏酸 (100、300 mg/kg) 可降低 Amyloid \hat{a} peptide-(1-40)連續輸注所造成皮質區中 Acetylcholinesterase 提高的作用 ($P < 0.05$)；而正對照組 Vitamin C/E 治療組亦均有降低的作用 ($P < 0.05$)。

在海馬回中：僅阿魏酸(300 mg/kg)可降低 Amyloid \hat{a} peptide-(1-40)連續輸注所造成海馬回中 Acetylcholinesterase 提高的作用 ($P < 0.001$)；而正對照組 Huperazine A 治療組及 Vitamin C/E 治療組亦均具降低之作用 ($P < 0.05$)。



圖十一 阿魏酸(100、300 mg/kg) 石杉鹼甲(0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid \hat{a} peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠皮質區 (cortex) 及海馬回 (hippocampus, hippo) acetylcholinesterase 含量之影響。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, 為與對照組比。# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, 與 Amyloid \hat{a} peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠組相比。

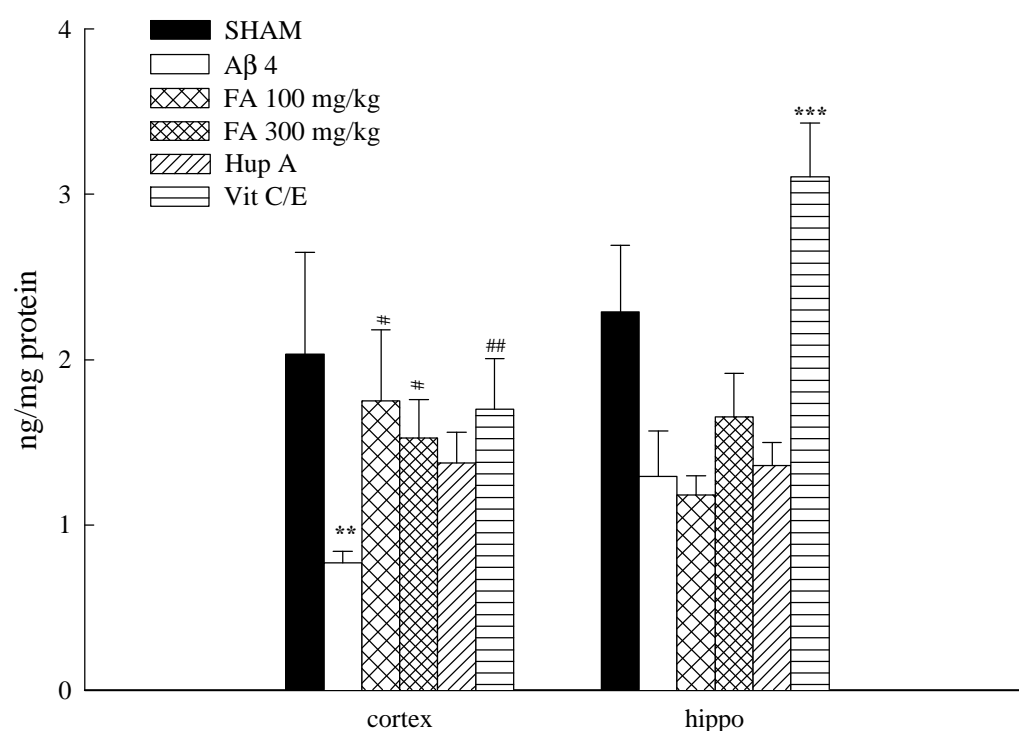
五、Total-GSH 及其衍生物測定

(一) 阿魏酸對 Amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠 GHX 之影響

如圖十二所示，Amyloid β peptide-(1-40)連續輸注十四天後，可造成大鼠皮質區 GHX 的減低 ($P < 0.01$)。

在皮質區中：阿魏酸 (100、300 mg/kg) 治療組可改善 Amyloid β peptide-(1-40)連續輸注所造成皮質區中 GHX 減低的作用 ($P < 0.05$)；而正對照組 Vitamin C/E 治療組亦有改善作用 ($P < 0.01$)。

在海馬回中：阿魏酸 (100、300 mg/kg) 治療組對於 Amyloid β peptide-(1-40)連續輸注所造成海馬回中 GHX 無作用 ($P > 0.05$)；而正對照組僅 Vitamin C/E 治療組具改善作用 ($P < 0.001$)。



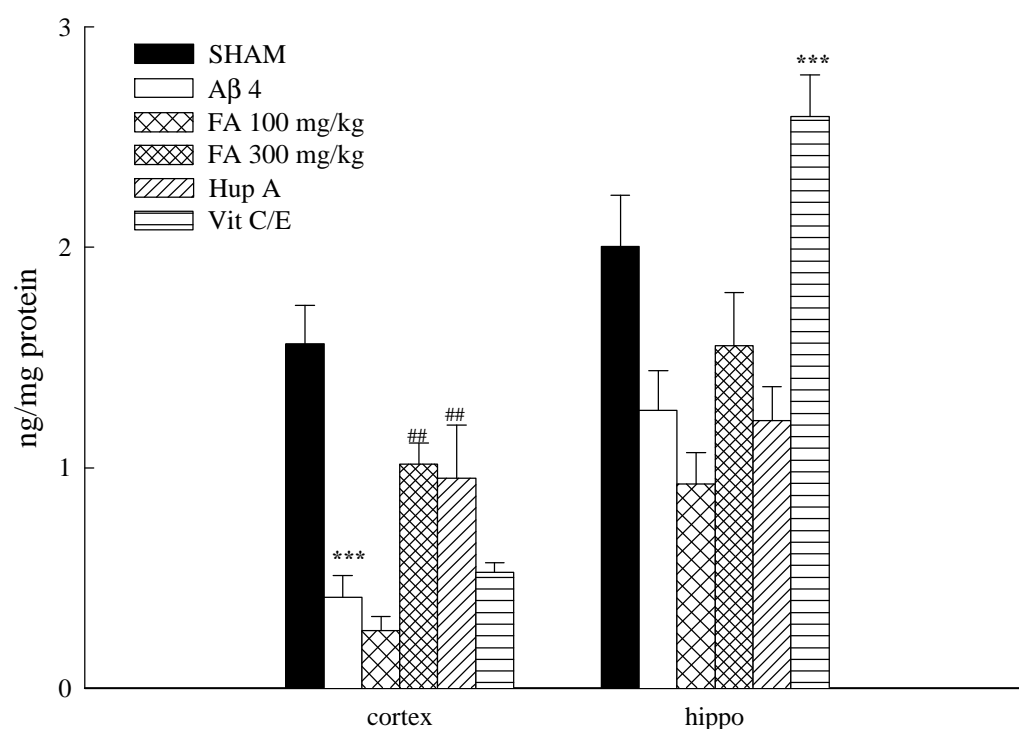
圖十二 阿魏酸(100、300 mg/kg) 石杉鹼甲(0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠皮質區 (cortex) 及海馬回 (hippocampus, hippo) GHX 含量之影響。含量。* $P < 0.05$ ，*** $P < 0.001$ ，與對照組相比。# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ，與 Amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠組相比。

(二) 阿魏酸對 Amyloid \hat{a} peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠 GSSG 之影響

如圖十三所示，Amyloid \hat{a} peptide-(1-40)連續輸注十四天後，可造成大鼠皮質區 GSSG 的減低（皮質區， $P < 0.001$ ）。

在皮質區中：阿魏酸（300 mg/kg）可改善 Amyloid \hat{a} peptide-(1-40)連續輸注所造成皮質區中 GSSG 減低的作用（ $P < 0.01$ ）；而正對照組僅 Huperazine A 治療組具改善作用（ $P < 0.01$ ）。

在海馬回中：僅正對照組 Vitamin C/E 治療組具改善作用（ $P < 0.001$ ）。



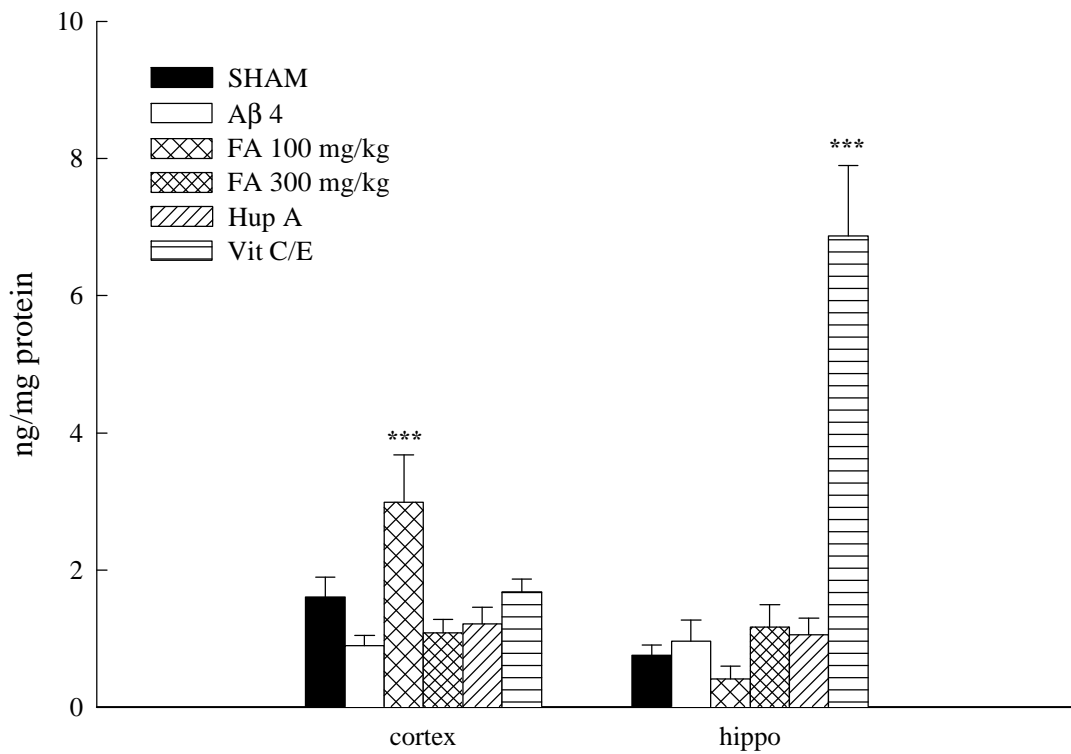
圖十三 阿魏酸(100, 300 mg/kg) 石杉鹼甲(0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid \hat{a} peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠皮質區 (cortex) 及海馬回 (hippocampus, hippo) GSSG 含量之影響。*** $P < 0.001$ ，與對照組相比。## $P < 0.01$ ，與 Amyloid \hat{a} peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠組相比。

(三) 阿魏酸對 Amyloid β peptide-(1-40)誘發阿茲海默症大鼠 GSH 之影響

如圖十四所示，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 ($P < 0.001$)。

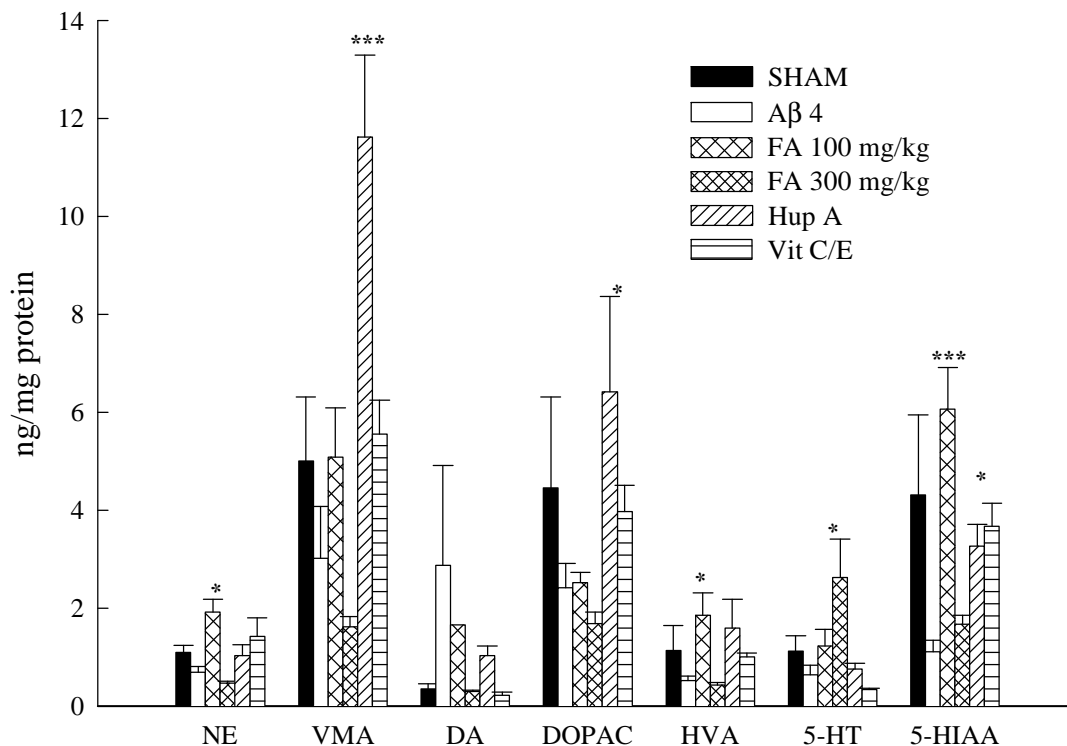
在海馬回中：僅正對照組 Vitamin C/E 治療組具改善作用 ($P < 0.001$)。



圖十四 阿魏酸(100, 300 mg/kg) 石杉鹼甲(0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid β peptide-(1-40)誘發擬似阿茲海默症大鼠皮質區 (cortex) 及海馬回 (hippocampus , hippo) GSH 含量之影響。 *** $P < 0.001$ ，與對照組相比。

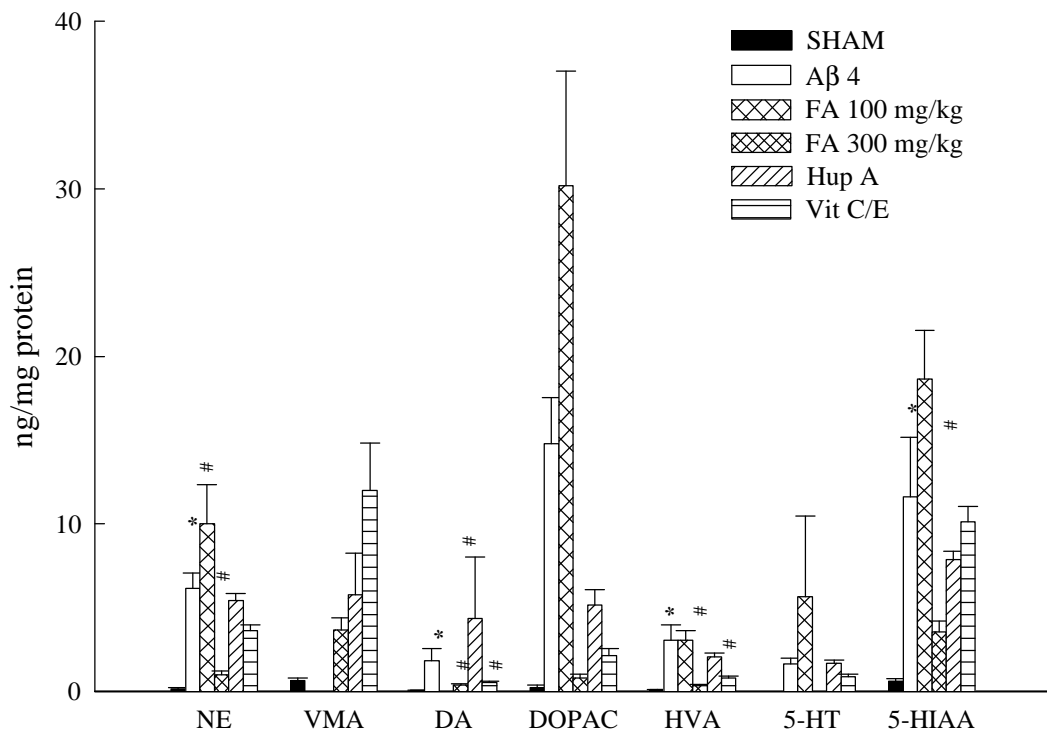
六、單胺濃度 (Monoamine Levels) 測定

(一) 在皮質區測得的結果如圖十五所示：Amyloid β peptide-(1-40) 連續輸注十四天後單胺並無明顯變化 ($P > 0.05$)；而阿魏酸 (100 mg/kg) 治療組皮質區中 5-HIAA、NE、HVA 值有升高的情形 ($P < 0.05$, $P < 0.001$)，VMA、DA、DOPAC、5-HT 值則無作用 ($P > 0.05$)；阿魏酸 (300 mg/kg) 治療組皮質區中僅 5-HT 值提高 ($P > 0.05$)；石杉鹼甲 (0.2 mg/kg) 治療組皮質區中 VMA、DOPAC 值比對照組高 ($P < 0.0001$, $P < 0.05$)，5-HIAA 值比對照組低 ($P < 0.05$)；Vitamin C/E 治療組則無影響 ($P > 0.05$)。



圖十五 阿魏酸(100, 300 mg/kg) 石杉鹼甲(0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid β peptide-(1-40) 誘發擬似阿茲海默症大鼠皮質區 (cortex) NE、VMA、DOPAC、HVA、5-HT、5-HIAA 含量之影響。* $P < 0.05$ ，*** $P < 0.001$ ，與對照組相比。

(二) 在海馬回測得的結果如圖十六所示，Amyloid \hat{a} peptide-(1-40) 連續輸注十四天後海馬回中 NE、DA、HVA、5-HIAA 值比對照組明顯提高($P < 0.05$)，VMA 則因含量過低無法定量；阿魏酸(100 mg/kg) 治療組海馬回中 NE 濃度比對照組高 ($P < 0.05$)，VMA、DA 值則因含量過低無法定量；阿魏酸 (300 mg/kg) 治療組海馬回中 NE、DA、HVA 濃度皆比對照組高($P < 0.05$)，5-HT 值則因含量過低無法定量；石杉鹼甲治療組海馬回中 DA、5-HIAA 濃度皆比對照組高 ($P < 0.05$)；Vitamin C/E 治療組海馬回中 DA、HVA 濃度皆比對照組高 ($P < 0.05$)。



圖十六 阿魏酸(100, 300 mg/kg) 石杉鹼甲(0.2 mg/kg) Vitamin C/E 對 amyloid \hat{a} peptide-(1-40) 誘發阿茲海默症大鼠海馬回 (hippocampus, hippo) NE、VMA、DOPAC、HVA、5-HT、5-HIAA 含量之影響。* $P < 0.05$ ，與對照組相比。# $P < 0.05$ ，與 Amyloid \hat{a} peptide-(1-40) 誘發擬似阿茲海默症大鼠組相比。

第五章 討論

老人癡呆症中，阿茲海默症約佔一半以上，可謂為其代表性疾病⁽³²⁾，主由類澱粉樣蛋白於大腦皮質及海馬回內過度分泌，而和體內的過氧化物形成惡性循環，氧化脂質使神經病變⁽⁵⁶⁻⁵⁹⁾、或是類澱粉樣蛋白與過磷酸化之 tau protein 形成雙股螺旋纖維後，再結合 apoE 引起神經糾結⁽³⁷⁾、或是類澱粉樣蛋白結合於星形膠狀細胞刺激生炎症反應⁽⁶³⁾、或是類澱粉樣蛋白造成胞內鈣離子濃度上升引發神經細胞衰變死亡⁽⁷⁵⁾等等致病途徑，老人癡呆症便由此起始。而阿茲海默症常會造成病人認知與記憶力等的減退，其中類澱粉樣蛋白亦一直是影響學習記憶之重要因子。有研究指出，當在大鼠腦部側腦室內連續輸注類澱粉樣蛋白，可導致似老年斑樣的沉積，並造成神經損壞與學習操作能力障礙，可為擬似阿茲海默症之動物模式⁽⁶⁾。而本研究依此模式於大鼠側腦室連續輸注類澱粉樣蛋白來誘發擬似阿茲海默症鼠學習障礙，按被動迴避反應結果顯示，類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠於被動迴避之學習操作能力比溶媒輸注組差，符合了阿茲海默症之典型現象（記憶衰減）。因此，本研究繼續以此擬似痴呆模式來評估阿魏酸改善學習操作障礙之作用，並選擇石杉鹼甲及 Vitamin C/E 作為正對照治療藥物。發現阿魏酸於 300 mg/kg 時可改善類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室後誘發擬似阿茲海默症鼠之被動迴避學習操作障礙之現象，本結果與 Yan⁽¹⁰⁴⁾之研究相符；而正對照藥物石杉鹼甲及 Vitamin C/E 亦可改善此學習操作障礙現象。

因此，再進一步探討類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠於水迷宮之學習記憶，根據研究報告指出類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默鼠在水迷宮空間性學習操作有障礙的現象⁽⁷⁶⁾。而本實驗結果顯示，類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠在水迷宮空間性學習操作亦有障礙的現象，與上述研究相符；而阿魏酸於 300 mg/kg 時可改善類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室後誘發擬似阿茲海默症鼠之空間性學習操作障礙的現象，本結果與 Yan 之研究相符⁽³¹⁾。而正對照組藥物僅 Vitamin

C/E 亦可改善此空間性學習操作障礙的現象，本結果與 Yamada 之研究相符⁽⁷⁶⁾；但石杉鹼甲則不具改善類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室後誘發擬似阿茲海默症鼠之空間性學習操作障礙效果，此結果與被動迴避操作障礙之結果及 Wang⁽¹⁰⁵⁾之研究不相同。接著，我們繼續探討類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠於水迷宮之參考記憶，根據研究報告指出類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠可造成水迷宮參考記憶障礙的現象。而本研究結果亦顯示，類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠可造成水迷宮參考記憶障礙，此與上述報告相符；而阿魏酸於 300 mg/kg 時可改善類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室後誘發擬似阿茲海默症鼠參考記憶障礙的現象；而正對照組藥物僅 Vitamin C/E 可改善參考記憶障礙的現象，石杉鹼甲則不具改善之作用。最後，我們繼續探討類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠於水迷宮工作記憶之再學習與記憶再現，根據研究報告指出類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠可造成水迷宮工作記憶之再學習與記憶再現障礙⁽¹¹¹⁾。而本研究結果亦顯示，類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠可造成水迷宮工作記憶之再學習與記憶再現障礙，此與上述報告相符；而阿魏酸於 100-300 mg/kg 時均可改善類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室後誘發擬似阿茲海默症鼠工作記憶之再學習障礙，而對工作記憶再現障礙僅 100 mg/kg 時具改善效果；而正對照組藥物 Vitamin C/E 及石杉鹼甲則均不具改善之作用。

因此，由上述結果得知，類澱粉樣蛋白連續輸注大鼠側腦室可誘導擬似阿茲海默症樣痴呆，造成大鼠在被動迴避學習操作及水迷宮空間性學習操作、參考記憶、工作記憶之再學習與再現等學習操作能力之障礙；此結果與其他研究學者針對類澱粉樣蛋白所造成之神經損害及認知能力障礙相符⁽³⁹⁻⁴³⁾，顯示類澱粉樣蛋白經側腦室輸注後確可造成各類學習模式之學習操作能力障礙，亦印證了類澱粉樣蛋白在阿茲海默症之病理角色。其次，在本研究發現阿魏酸於 300 mg/kg 時對類澱粉樣蛋白側腦室輸注所造成大鼠被動迴避學習操作、水迷宮空間性學習操作有改善作用，而此改善作用與 Yan 研究報告相符⁽³¹⁾，顯示阿

魏酸確具改善類澱粉樣蛋白經側腦室輸注後所造成認知能力障礙之作用；本研究更進一步發現阿魏酸於 100-300 mg/kg 時對類澱粉樣蛋白側腦室輸注所造成大鼠參考記憶、工作記憶之再學習及記憶再現障礙有不同程度之改善作用，顯示阿魏酸對類澱粉樣蛋白側腦室輸注所造成大鼠各類形式記憶障礙確有改善作用。因此，從本研究及 Dong 之研究⁽³¹⁾，我們建議阿魏酸可用於作為阿茲海默症之治療選擇藥物。而 Vitamin C/E 對於類澱粉樣蛋白側腦室輸注所造成大鼠被動迴避學習操作、水迷宮空間性學習操作及參考記憶均有改善作用，而此改善作用與研究報告⁽⁷⁶⁾相符，惟對工作記憶障礙之改善效果不佳，顯示 Vitamin C/E 確具改善類澱粉樣蛋白經側腦室輸注後所造成認知能力障礙之作用，但僅選擇性對某些型態記憶能力具改善作用；因此，從本實驗結果我們亦可建議 Vitamin C/E 可用於作為阿茲海默症治療藥物之一。最後，本研究針對臨床前試驗藥物石杉鹼甲進行評估，發現石杉鹼甲對於類澱粉樣蛋白側腦室輸注所造成大鼠被動迴避學習操作及水迷宮空間性學習操作、參考記憶、工作記憶之再學習與再現等學習操作能力障礙並無明顯的改善作用，此結果與其他學者研究報告並不相同⁽⁷⁶⁾，顯示，石杉鹼甲是否可為阿茲海默症之治療藥物，仍須再做進一步之確認。

另因大鼠於水迷宮之空間操作受游泳速度、耐力及視覺能力所影響；因此，我們進一步以可視之浮板做標的物，來評估藥物對大鼠非空間操作能力之影響，以進一步釐清藥物改善空間操作障礙之作用。本研究結果顯示，類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠會造成水迷宮非空間操作能力（僅延遲找到浮板之時間而不影響游泳速度）之障礙；顯示，類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠之空間操作障礙部分係因影響大鼠對泳池之注意及探索所致。而阿魏酸於 300 mg/kg 時可改善類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室後誘發擬似阿茲海默症鼠之非空間操作能力障礙現象；而正對照組藥物僅 Vitamin C/E 可改善非空間操作能力障礙現象。因此，阿魏酸及 Vitamin C/E 對於類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠空間操作障礙之改善作用部分可能因改善大

鼠對泳池之注意及探索所致。

近年來針對阿茲海默症之治療藥物開發著重於抗氧化藥物，且有研究指出，阿茲海默症之神經退化及認知能力障礙現象與氧化壓力有關，而氧化壓力主要又因類澱粉樣蛋白之沉積所致，而在氧化壓力過程中會有大量之過氧化物及自由基產生，經由過氧化物及自由基對神經細胞之攻擊作用，進而造成神經病變及神經喪失⁽⁵⁶⁻⁵⁹⁾。而生物體對於過氧化物及自由基可經由超氧化物歧化 (SOD)，過氧化氫 (catalase)，谷胱甘 GSH-PX) 等加以清除⁽¹⁰⁶⁾。因此，本研究進一步測定類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠皮質區及海馬回中 SOD 的活性。

根據研究報告指出在體外細胞培養中加入類澱粉樣蛋白會有過氧化物的生成，透過氧化及類澱粉樣蛋白沉積造成細胞退行性病變與細胞死亡⁽¹⁰⁷⁾。本研究結果發現類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室誘發擬似阿茲海默症鼠皮質及海馬回之 Total-SOD 活性有上升的現象，與上述研究相符⁽¹⁰⁷⁾。阿魏酸於 300 mg/kg 時可降低因類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室誘發擬似阿茲海默症鼠皮質及海馬回 Total-SOD 活性上升現象。而正對照組藥物石杉鹼甲亦可降低因類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室誘發擬似阿茲海默症鼠皮質及海馬回 Total-SOD 活性上升現象，本結果與 Xiao⁽¹⁰⁷⁾之離體研究相符。Vitamin C/E 亦可降低因類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室誘發擬似阿茲海默症鼠皮質及海馬回 Total-SOD 活性上升現象，本結果與 Xiao⁽¹⁰⁷⁾之離體研究相符。另根據研究報告指出類澱粉樣蛋白會造成胞中粒腺體中 Mn-SOD 過度表現，進而產生過氧化物，使胞膜脂質過氧化而生細胞死亡的現象⁽¹⁰⁹⁾。因此，我們繼續測定類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠於 Mn-SOD 方面之影響。本研究發現類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室誘發擬似阿茲海默症鼠腦中 Mn-SOD 活性有上升的現象，與上述結果⁽¹⁰⁹⁾相符。而阿魏酸於 300 mg/kg 時可降低因類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室誘發擬似阿茲海默症鼠皮質及海馬回 Mn-SOD 活性上升現象。正對照藥物 Vitamin C/E 亦可降低因類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室誘發擬似阿茲海默症鼠

皮質及海馬回 Mn-SOD 活性上升現象；而石杉鹼甲僅可降低因類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室誘發擬似阿茲海默症鼠海馬回 Mn-SOD 活性上升現象。最後，本研究發現類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室誘發擬似阿茲海默症鼠腦中 Cu,Zn-SOD 活性有上升的現象；而阿魏酸於 300 mg/kg 時可降低因類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室誘發擬似阿茲海默症鼠皮質 Cu,Zn-SOD 活性上升現象。正對照藥物 Vitamin C/E 亦可降低因類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室誘發擬似阿茲海默症鼠皮質 Cu,Zn-SOD 活性上升現象；而石杉鹼甲則不影響。最後，我們分析 Cu,Zn-SOD 相對於 Mn-SOD 的比值，發現類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室誘發擬似阿茲海默症鼠之 Cu,Zn-SOD 相對於 Mn-SOD 比值與溶媒輸注組並無任何差異；其次，各治療藥物對類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室誘發擬似阿茲海默症鼠的 Cu,Zn-SOD 相對於 Mn-SOD 的比值亦無任何影響。

另體內抗氧化及清除自由機之另一機制為 GSH 及 GSSG，因此本研究進一步測定類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠皮質區及海馬回中 GSH、GSSG 的含量。結果發現類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室誘發擬似阿茲海默症鼠皮質之 Total GSH 衍生物、GSH、GSSG 的含量明顯減少，而不影響海馬回 Total GSH 衍生物、GSH、GSSG 的含量；顯示類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠之抗氧化機制明顯降低，神經細胞處於氧化壓力狀態下而遭受氧化損傷，進而造成參考記憶及工作記憶等之障礙。阿魏酸於 100-300 mg/kg 可增加因類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室誘發擬似阿茲海默症鼠所造成皮質 Total GSH 衍生物、GSH、GSSG 含量減少之現象。Vitamin C/E 亦可增加因類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室誘發擬似阿茲海默症鼠所造成皮質 Total GSH 衍生物、GSH、GSSG 含量減少之現象，且此作用較阿魏酸為佳。而正對照組藥物石杉鹼甲則此無作用。

綜合上述研究結果，類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室誘發擬似阿茲海默症鼠可造成大鼠皮質及海馬回之 Total-SOD、Mn-SOD 及 Cu,Zn-SOD 活性上升，皮質 Total GSH 衍生物、GSH、GSSG 含量明

顯下降；證實類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室後，促使腦內皮質及海馬回神經細胞處於氧化壓力狀態下，造成腦內抗氧化機制明顯改變，經此造成神經病變及神經喪失，進而造成認知能力之障礙。阿魏酸於 300 mg/kg 時則可降低皮質及海馬回 Total-SOD、Mn-SOD 及皮質中 Cu,Zn-SOD 的活性，增加皮質 Total GSH 衍生物 GSH GSSG 含量，此結果與 Wang⁽¹⁰⁸⁾ 於肝炎實驗中發現阿魏酸可降低 SOD 活性相符；故阿魏酸可能係經由減低腦中過氧化物與自由基的量來降低阿茲海默症之氧化壓力，來產生神經細胞之保護機制，進而對於類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室誘發擬似阿茲海默症鼠各類形式記憶障礙有改善作用。而 Vitamin C/E 依據本研究結果及得知 Vitamin C/E 對於皮質及海馬回 Total-SOD、Mn-SOD 及皮質中 Cu,Zn-SOD 皆有降低的作用，增加海馬回 Total GSH 衍生物 GSH GSSG 含量；因此，Vitamin C/E 減低腦中過氧化物與自由基的量來降低阿茲海默症之氧化壓力，來產生神經細胞之保護機制，對於類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室誘發擬似阿茲海默症鼠各類形式記憶障礙有改善作用。而石杉鹼甲僅對皮質及海馬回 Total-SOD 及海馬回中 Mn-SOD 有降低作用，對於抗氧化壓力作用不大；因此，在前面造成石杉鹼甲對於類澱粉樣蛋白側腦室輸注所造成大鼠水迷宮空間性學習操作、參考記憶、工作記憶之再學習與再現等學習操作能力障礙並無明顯的改善作用。

最終，阿茲海默症的病人中樞神經傳遞物質（包括乙醯膽鹼及單胺等）均有明顯之變化，特別是中樞膽鹼神經系統會出現系統混亂及神經元減少之現象，皮層、基底前腦的膽鹼乙醯轉移（ChAT）、Acetylcholinesterase（AChE）活性均會明顯降低⁽⁹¹⁾，而中樞膽鹼神經系統與學習記憶又有極為密切之關係。因此本研究進一步測定類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠皮質及海馬回中 AChE 之活性。研究發現類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室誘發擬似阿茲海默症鼠其皮質及海馬回中 AChE 活性明顯比對照組高，這可能因腦神經細胞遭類澱粉樣蛋白或氧化等的作用，致神經細胞破裂釋出大量的神經物質，而使短期內腦中 AChE 活性暫時上升；亦可能間接導致中樞乙醯膽鹼活性之

降低而造成認知能力之障礙。治療藥物阿魏酸於 300 mg/kg 可降低因類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室誘發擬似阿茲海默症鼠後皮質及海馬回 AchE 活性升高之現象；正對照藥物 Vitamin C/E 及石杉鹼甲亦可降低因類澱粉樣蛋白連續輸注側腦室誘發擬似阿茲海默症鼠後皮質及海馬回 AchE 活性升高之現象，石杉鹼甲之結果與 Cheng⁽¹⁰⁸⁾之研究相符。另一方面，本研究亦測定類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠後皮質及海馬回單胺濃度之變化。研究發現類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠後皮質單胺及其代謝物之濃度與溶媒輸注組間並無明顯差異；但在海馬回區域類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠後 NE、DA、DOPAC、HVA 之濃度與溶媒輸注組相較有明顯之升高，而 5-HT、5-HIAA 亦有些微升高現象。顯示類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠主要可能因類澱粉樣蛋白促使中樞（特別是海馬回）神經細胞形成過量之過氧化物，造成氧化壓力後，使 SOD（特別是 Mn-SOD）及 AchE 之活性升高、GSH 及 GSSG 之含量降低，腦內抗氧化機制紊亂，進而造成單胺及其代謝物之濃度升高，特別是 DA 及其代謝物 DOPAC、HVA，因其易產生自身氧化現象而造成大量自由基或過氧化物之形成，進而損害神經細胞並造成認知能力之障礙。阿魏酸於 300 mg/kg 時可降低因類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠後海馬回 NE、DA、DOPAC、HVA 濃度升高現象而對 5-HT 及 5-HIAA 亦有些微降低作用；因此，阿魏酸改善類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠被動迴避暨水迷宮學習操作障礙之作用，可能與其抗氧化活性，進而降低氧化損傷及神經系統（包括乙醯膽鹼及單胺神經系統）功能紊亂有關。Vitamin C/E 亦可降低因類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠後海馬回 DA、DOPAC、HVA 濃度升高現象；因此，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暨水迷宮學習操作障礙之作用，可能與其抗氧化活性，進而降低氧化損傷及神經系統（包括乙醯膽鹼及多巴胺神經系統）功能紊亂有關。然阿魏酸與 Vitamin C/E 之作用主要差異在於阿魏酸對皮質及海馬回均有作用，且對 5-HT 神經系統亦有明顯之影響；Vitamin C/E 則主要作用於海馬回部分特

別針對了乙醯膽鹼及多巴胺神經系統；此兩者之差異亦可能與其改善參考記憶及工作記憶障礙之差異有關。而石杉鹼甲卻提升了因類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠後海馬回 DA 濃度升高現象，顯示石杉鹼甲對改善類澱粉樣蛋白誘發擬似阿茲海默症鼠之學習操作障礙並不顯著，其機轉可能與抑制 acetylcholinesterase 有關，而與抗氧化機制無關。

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），進而造成氧化損傷後之中樞神經傳遞物質（特別是海馬回）大量釋出，單胺與其代謝物濃度增加，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、單胺神經系統紊亂及抑制乙醯膽鹼酯活性等有關。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活性有關。至於，石杉鹼甲為一乙醯膽鹼酯抑制劑⁽¹⁰⁹⁾，按本研究結果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主要機轉可能與抑制乙醯膽鹼酯活性有關。

參考文獻

1. Blass JP. Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia?. *J. Neurosci Res.* 2001; 66(5): 851-6.
2. Shoghi-Jadid K., Small GW., Agdeppa ED., Kepe V., Ercoli LM., Siddarth P., Read S., Satyamurthy N., Petric A., Huang SC., Barrio JR. Localization of neurofibrillary tangles and beta-amyloid plaques in the brains of living patients with Alzheimer disease. *Amer Geria Psy.* 2002; 10(1): 24-35.
3. GLENNER G.G. & WONG C.W. Alzheimer's disease : initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; 120: 885-890.
4. Abraham CR., Selkoe DJ., Potter H., Price DL., Cork LC. Alpha 1-antichymotrypsin is present together with the beta-protein in monkey brain amyloid deposits. *Neuroscience.* 1989; 32(3): 715-20.
5. Alzheimer A., Stelzmann RA. Schnitzlein HN. Murtagh FR. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat.* 1995; 8(6):429-31.
6. Flood JF., Morley JE., Roberts E. Amnestic effects in mice of four synthetic peptides homologous to amyloid beta protein from patients with Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1991; 88(8): 3363-6.
7. 李春生、張國璽、陳可冀：我國老年醫學研究的新進展 - 中華醫學會第四次全國老年醫學學術會議述要。中西醫結合雜誌 1990；10(3)：189-192。
8. 朱支波：Alzheimer 病中醫診治概述。江蘇中醫 1995；16(12)：43-44。
9. 廖方正、廖方正、陳建宗、趙學軍：補腎活血法治療老年期痴呆

- 61 例臨床觀察。成都中醫藥大學學報 1996 ; 19(4) : 18-19。
10. 王榮昌：龜鹿益智湯治老年痴呆症體會。江西中醫藥 1998 ; 29(4) : 50。
 11. 魏守建、楊軍、高丹屏：當歸芍藥散治療老年痴呆症的藥理研究進展。安徽中醫學院學報 1997 ; 16(3) : 61-64。
 12. 王玉升：中藥治療腦缺血實驗研究概況。中醫研究 1997 ; 10(4) : 50-53。
 13. 王之梅：川芎的臨床應用。藥學研討 2001 ; 10(1) : 51。
 14. Hsieh M.T., Lin Y.T., Lin Y.C., Wu C.R. Radix angelica sinensis extracts ameliorate scopolamine- and cyclohexamine-induced amnesia, but not p-chloroamphetamine-induced amnesia in rats. 1999; 28(2): 263-272.
 15. Hsieh M.T., Peng W.H., Wu C.R. and Wang W.H. The ameliorating effects of the Cognitive-Enhancing Chinese Herbs on scopolamine-induced amnesia in rats. *Phytother Res.* 1999.
 16. 人民衛生出版社：植物有效成分手冊，457-458 頁。
 17. 孔文基、繩金房編：天然活性成分簡明手冊。中國醫藥科技出版社，237-238 頁。
 18. Merck Index twelfth edition, page 688.4110.
 19. 尹鐘洙：當歸及其成分阿魏酸對大鼠血小板聚集和 5-HT 釋放的影響。藥學學報 1980 ; 15(6) : 321-326。
 20. 徐理納：阿魏酸鈉抗血小板聚集作用機理研究。中國科學院學報 1984 ; (6) : 414。
 21. 張明發：阿魏酸抗動脈粥樣硬化研究進展。中草藥 1990 ; 21(1) : 41-43。
 22. 徐理納、吁文貴、田金英：阿魏酸鈉對花生四烯酸在家兔血小板代謝中的影響。中西醫結合雜誌 1988 ; 8(10) : 614-615。
 23. 李天錫、袁才英、楊俊旺、單春文：阿魏酸衍生物高分子藥物的合成及其對血小板聚集和對 TXB₂, 6-Keto-PGF₁ 釋放的影響。

- 中國藥物化學雜誌 1999 ; 9(2) : 98-101。
24. 徐理納 傅正愷 徐光華 : 阿魏酸納抗兔急性氧中毒脂質過氧化。
中西醫結合雜誌 1988 ; 8(9) : 546-547。
 25. Robert W., Huong H. : Modulation by phytochemicals of cytochrome P450-like enzyme activity. *Cancer Letters*. 1998; 133: 135-141.
 26. Kayahara H., Miao Z., Fujiwara G. Synthesis and biological activities of ferulic acid derivatives. *Anticancer Res*. 1999; 19(5A): 3763-8.
 27. 當歸等中藥及其主要成分對高壓氧致急性氧中毒預防作用的實驗研究。藥學實踐雜誌 1998 ; 16(5) : 263-264。
 28. 胡慧娟 : Ferulic acid 對變態反應的影響。中國藥理學報 1991 ; (5) : 426-430。
 29. Pieters L., Van Dyck S., Gao M., Bai R., Hamel E., Vlietinck A. Lemiere G., Synthesis and biological evaluation of dihydrobenzofuran lignans and related compounds as potential antitumor agents that inhibit tubulin polymerization. *J Med Chem*. 1999; 42(26): 5475-81.
 30. 高向東 : 五種抗衰老藥對小鼠 T-淋巴細胞增殖與 IL-2 產生的影響。中國藥科大學學報 1990 ; 21(1) : 43-45。
 31. Ji-Jing Yan, Jae-young Cho, Hee-Sung Kim, Kyoung-Li Kim, Jun-Sub Jung, Sung-Oh Huh, Hong-Won Suh, Yung-Hi Kim & Dong-Keun Song Protection against β -amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid. *British journal of Pharmacology*. 2001; 133: 89-96.
 32. Myhre A., Tysnes OB. Etiology and genetics of Alzheimer disease. *Tidsskrift for Den Norske Laegeforening*. 2002; 122(1): 50-3.
 33. Holmes C. Genotype and phenotype in Alzheimer's disease. *British Journal of Psychiatry*. 2002; 180: 131-4.
 34. Hannequin D., Campion D., Brice A., Frebourg T., Martinez M., Clerget-Darpoux F., Agid Y. Genetics of Alzheimer's disease. *Revue*

- Med Inter.* 1996; 17(7): 545-50.
35. Roos RA., Cruts M. From gene to disease; presenilins and Alzheimer disease. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde.* 2001; 145(42): 2027-9.
 36. Hannequin D., Campion D., Brice A., Frebourg T., Martinez M., Clerget-Darpoux F., Agid Y. Genetics of Alzheimer's disease. *Revue Med. Inter.* 1996; 17(7): 545-50.
 37. Pericak- Vance MA., Johnson CC., Rimmler JB. Alzheimer disease and apolipoprotein E- 4allele in an Amish population. *Ann Neurol.* 1996; 39(6): 70.
 38. Rubinsztein DC. The genetics of Alzheimer' s disease. *Prog. Neurobiol.* 1997; 52: 447.
 39. Roses AD. On the Metabolism of apolipoprotein E and the Alzheimer' s disease. *Exp. Neurol.* 1995; 132: 149.
 40. Strittmatter W J., Saunders Am., Schmechel D., Apolipoproyein E: high avidity binding to beta- amyloid and increased frequency of type e4 allele in late-onset familial Alzheimer's disease. *Proc Nat. Acad Sci USA.* 1993; 90: 1997-1981.
 41. Ma J., Yee A., Brewer B., Amyloid'associated proteins al antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta protein into filaments. *Nature.* 1994; 372: 92- 94.
 42. Evans KC, Berger EP, Cho CG,et al. Apolipoprotein E is a kinctic but not a themodynamic inhibitor â amyloid formation: implication for the pathogenesis and treatment of Alzheimer disease. *Proc Nati Acad Sci USA.* 1995; 92: 763-767.
 43. Stfittmater W., Weisgraber KH., Gcedert M., Hypothesis: microtubule instability and paired helical filament formation in Alzheimer's disease brain are related to apolipoprotein E geno-type. *Express Neurol.* 1994; 125: 163-171.

44. Huang DY., Goedert m., Jakes R., Isoform-specific interaction of apolipoprotein E with microtubule-associated protein MAP 2c: implications for Alzheimer's disease. *Neurosciences letter*. 1994; 182: 55-58.
45. Radue EW., Boulay GH., Harrison MJ., Thomas DJ. Comparison of angiographic and CT findings between patients with multi-infarct dementia and those with dementia due to primary neuronal degeneration. *Neuroradiology*. 1978; 16: 113-5.
46. Rocca WA., Amaducci LA., Schoenberg BS. Epidemiology of clinically diagnosed Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1986; 19: 415-425.
47. Henderson AS., Wurtman RJ. Epidemiology of dementia disorders Advance in Neurology, Alzheimer's disease. *Publish NY*. 1990; 51: 15-25.
48. Gautrin D., Gauthier S. Alzheimer's disease: environmental factors and etiologic hypotheses. *Canadian J Neurol Sci*. 1989; 16: 365-380.
49. Bancher C., Leitner H., Jellinger K., Eder H., Setinek U., Fischer P., Wegiel J., Wisniewski HM. On the relationship between measles virus and Alzheimer neurofibrillary tangles in subacute sclerosing panencephalitis. *Neurobiol Aging*. 1996; 17(4):527-33.
50. Renvize E.B., Wad I.O., Hambling M.H. A seroepidemiology study of conventional infectious agents in Alzheimer's disease. *Age Ageing*. 1987; 16: 311-320
51. Jones KR., Black MJ., Oorschot DE. Do aluminium and/or glutamate induce Alzheimer PHF-like formation? An electron microscopic study. *J Neurocytol*. 1998; 27(1): 59-68.
52. Quartley B., Esselmont G., Taylor A., Dobrota M. Effect of oral aluminium citrate on short-term tissue distribution of aluminium. *Food Chem Toxicol*. 1993; 31(8): 543-8.

53. 崔行、郝建榮、張月強、張群業：tau 蛋白與 Alzheimer 型老年痴呆。老年醫學與保健，2001；7(3)：136-138。
54. C. Baner, C. Brunner, H. Lassmann, Accumulation of abnormally phosphorylated precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Reserch*. 1989; 477(1): 90.
55. K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, T. Zaidi, Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease. *Lancet*. 1986; 2(8504): 421.
56. Chen S., Fredrickson PCA., Brunden KR. Neuroglial-mediated immunoinflammatory responses in Alzheimer's disease : Complement activation and therapeutic approaches. *Neurobiol Aging*. 1996; 17: 81.
57. Butterfield DA., Hensley K., Harris M., Mattson M., Carney J. beta-Amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence-specific fashion: implications to Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994; 200(2): 710-5.
58. Butterfield DA., Drake J., Pocernich C., Castegna A. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol Med*. 2001; 7(12): 548-54.
59. Lim GP., Chu T., Yang F., Beech W., Frautschy SA., Cole GM. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J Neurosci*. 2001; 21(21): 8370-7.
60. Arvin B., Neville LF., Barone FC., Feuerstein GZ. The role of inflammation and cytokines in brain injury. *Neurosci Biobehavi Revi*. 1996; 20(3): 445-52.
61. McGeer EG., McGeer PL. Brain inflammation in Alzheimer disease and the therapeutic implications. *Curr Pharmaceu Desi*. 1999; 5(10): 821-36.
62. Zingg JM., Ricciarelli R., Azzi A. Scavenger receptors and modified

- lipoproteins: fatal attractions?. *Jubmb Life*. 2000; 49(5): 397-403.
63. Akama K.T., Albanese C., Pestell RG. Amyloid beta-peptide stimulates nitric oxide production in astrocytes through an NfkappaB-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(10): 5795.
64. 騰長青：Alzheimer 病臨床症狀概述。老年醫學與保健。1999；5(1)：15-16。
65. 肖順貞、康曉偉、陳衛紅：群居老人癡呆症發生情況的初步調查與分析。實用護理雜誌。1998；14(6)：283-284
66. Silverman DH., Small GW., Chang CY., Lu CS., Kung DE., Aburto MA., Chen W., Czernin J., Rapoport SI., Pietrini P., Alexander GE., Schapiro MB., Jagust WJ., Hoffman JM., Welsh-Bohmer KA., Alavi A., Clark CM., Salmon E., de Leon MJ., Mielke R., Cummings JL., Kowell AP., Gambhir SS., Hoh CK., Phelps ME., Positron emission tomography in evaluation of dementia: Regional brain metabolism and long-term outcome. *JAMA*. 2001; 286(17): 2120-7.
67. Samlles SC., Davis KL., Enna SJ., Coyle JT. Pharmacological Management of Neurological and Psychiatric Disorders. *New York McGraw-Hill*. 1998; 267-316.
68. Duan WZ., Zhang JT. Effects of clausenamide on anisodine-induced acetylcholine decrease and memory deficits in the brain. *Chin Med J*. 1998; 111(11): 1035-1038.
69. Meagher MW., Illich PA., Salinas JA. Physostigmine's impact on brief shock-induced hypoalgesia parallels its effect on memory. *Neurobiol Lear and Mem*. 1998; 70(3): 374-87.
70. Farlow M. A Controlled Trial of Tacrine in Alzheimer's Disease. *JAMA*. 1992; 327: 1253
71. Xiao XQ., Zhang HY., Tang XC. Huperzine A attenuates amyloid beta-peptide fragment 25-35-induced apoptosis in rat cortical neurons

- via inhibiting reactive oxygen species formation and caspase-3 activation. *J Neurosci Res.* 2002; 67(1): 30-6.
72. Shaywitz BA., Shaywitz SE. Estrogen and Alzheimer disease: plausible theory, negative clinical trial. *JAMA.* 2000; 283(8): 1055-6.
73. Cross AJ. Serotonin in Alzheimer-type dementia and other dementing illnesses. *Ann NY Acad Sci.* 1990; 600: 405-15.
74. Butterfield DA., Hensley K., Hall N., Umhauer S., Carney J. Beta-amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipid peroxidation in sequence specific fashion: implications to Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 200(2): 710.
75. Smith MA., Nunomura A., Zhu X., Takeda A., Perry G. Metabolic, metallic, and mitotic sources of oxidative stress in Alzheimer disease. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2000; 2(3): 413-420.
76. Yamada K., Tanaka T., Han D., Senzaki K., Kameyama T., Nabeshima T. Protective effects of idebenone and alpha-tocopherol on beta-amyloid-(1-42)-induced learning and memory deficits in rats: implication of oxidative stress in beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo. *Eur J of Neurosci.* 1999; 11(1): 83-90.
77. Abousalham A., Hobman TC., Dewald J., Garbutt M., Brindley DN. Cell-permeable ceramides preferentially inhibit coated vesicle formation and exocytosis in Chinese hamster ovary compared with Madin-Darby canine kidney cells by preventing the membrane association of ADP-ribosylation factor. *Biochem J.* 2002; 361(3): 653-61.
78. Yi SM., Harson RE., Zabner J., Welsh MJ. Lectin binding and endocytosis at the apical surface of human airway epithelia. *Gene Therapy.* 2001; 8(24): 1826-32.
79. Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Ameri J Clini Nut.*

2000; 71(2): 621S-629S.

80. Seiger A., Nordberg A., von Holst H., Backman L., Ebendal T., Alafuzoff I., Amberla K., Hartvig P., Herlitz A., Lilja A. Intracranial infusion of purified nerve growth factor to an Alzheimer patient: the first attempt of a possible future treatment strategy. *Behavi Brain Res.* 1993; 57(2): 255-61.
81. Breitner JCS. Inflammatory processes and anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease: A current appraisal. *Neurobiol Aging.* 1996; 17: 789.
82. Trune DR., Hertler CK., Haun DK., Sauter RW. Histochemistry of otic capsule sclerotic lesions in Palmerston North autoimmune strain mice. *Hearing Res.* 1990; 48(3): 241-6.
83. Pollard HB., Arispe N., Rojas E. Ion channel hypothesis for Alzheimer amyloid peptide neurotoxicity. *Cell Mol Neurobiol.* 1995; 15(5): 513-26.
84. Blass JP. Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia? *J Neurosci Res.* 2001; 66(5): 851-6.
85. Gudasheva TA., Konstantinopol'skii MA., Ostrovskaya RU., Seredenin SB. Anxiolytic activity of endogenous nootropic dipeptide cycloprolylglycine in elevated plus-maze test. *Bull Exp Biol Med.* 2001; 131(5): 464-6.
86. Gabryel B., Trzeciak HI., Pudelko A., CieSlik P. Influence of piracetam and oxiracetam on the content of high-energy phosphates and morphometry of astrocytes in vitro. *Pol J Pharmacol.* 1999; 51(6): 485-95.
87. 徐江平、芮耀誠：銀杏提取物對腦血管病防治作用的進展。中國新藥與臨床雜誌。1999；18(5)：315-317。
88. Zhu L., Wu J., Liao H. Antagonistic effects of Glinkgo biloba on

- glutamate neurotoxicity. *Acta Pharmacol Sim.* 1997; 18(4): 344-347.
89. Vitek MP., Rasool CG., de Sauvage F., Vitek SM., Bartus RT., Beer B., Ashton RA., Macq AF., Maloteaux JM., Blume AJ. Absence of mutation in the beta-amyloid cDNAs cloned from the brains of three patients with sporadic Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1988; 464(2): 121-31.
 90. Strada O., Vyas S., Hirsch EC., Ruberg M., Brice A., Agid Y., Javoy-Agid F. Decreased choline acetyltransferase mRNA expression in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer disease: an in situ hybridization study. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1992; 89(20): 9549-53.
 91. Pfefferbaum A., Adalsteinsson E., Spielman D., Sullivan EV., Lim KO. In vivo brain concentrations of N-acetyl compounds, creatine, and choline in Alzheimer disease. *Arch Gene Psychi.* 1999; 56(2): 185-92.
 92. Muñoz, Francisco J., Inestrosa, Nivaldo C. Neurotoxicity of acetylcholinesterase amyloid β -peptide aggregates is dependent on the type of A β peptide and the AChE concentration present in the complexes. 1999; 450(3): 205-209.
 93. Suits E., Isaacson RL. The effects of scopolamine hydrobromide on one-way and two-way avoidance learning in rats. *Int J Neuropharmacol.* 1968; 7: 441-446.
 94. Morris RGM., Anderson E., Lynch GS., Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of LTP by a NMDA receptor antagonist, AP5. *Nature.* 1986; 319: 774-6.
 95. Biessels GJ., Kamal A., Urban IJ., Spruijt BM., Erkelens DW., Gispen WH. Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment. *Brain Res.* 1998; 800(1): 125-35.
 96. Galani R., Weiss I., Cassel JC., Kelche C. Spatial memory,

- habituation, and reactions to spatial and nonspatial changes in rats with selective lesions of the hippocampus, the entorhinal cortex or the subiculum. *Behavi Brain Res.* 1998; 96(1-2): 1-12.
97. Rashidy-Pour A., Motamedi F., Motahed-Larijani Z. Effects of eversible inactivations of the medial septal area on reference and working memory versions of the Morris water maze. *Brain Res.* 1996; 709(1): 131-40.
98. Glowinski J., Iversen L. Regional studies of catecholamines in the rat brain. 3. Subcellular distribution of endogenous and exogenous catecholamines in various brain regions. *Biochem Pharmacol.* 1966; 15(7): 977-87.
99. Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL., Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 100: 265-275.
100. Kasemsri T., Armstead WM. Endothelin production links superoxide generation to altered opioid-induced pial artery vasodilation after brain injury in pigs. *Stroke.* 1997; 28(1): 190-6.
101. Dass PD., Offutt DM., Mejia MB., VanGoethem D., Christenson WR., Landes MM., Stuart BP., Sangha GK., Thyssen JH. Comparative kinetic analysis of cholinesterase methods in rat and human erythrocytes and plasma. *Veter Human Toxicol.* 1997; 39(1): 11-7.
102. Mourad T., Min KL., Steghens JP. Measurement of oxidized glutathione by enzymatic recycling coupled to bioluminescent detection. *Anal Biochem.* 2000; 283(2): 146-52.
103. Kopin IJ., Bron GVR, Cuatrecasas P, Herken H, Schwartz A(Eds.), Plasma levels of catecholamines and dopamine β -hydroxylase. In Catecholamines II, vol II, Spinger-Verlag. *Handbook of Exp*

Pharmacol. 1989: pp. 211-216.

104. Yan JJ., Cho JY., Kim HS., Kim KL., Jung JS., Huh SO., Suh HW., Kim YH., Song DK. Protection against β -amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid. *Bri J Pharmacol.* 2001; 133(1): 89-96.
105. Wang R., Zhang HY., Tang XC. Huperzine A attenuates cognitive dysfunction and neuronal degeneration caused by beta-amyloid protein-(1-40) in rat. *Eur J Pharmacol.* 2001; 421(3): 149-56.
106. Lannert H., Wirtz P., Schuhmann V., Galmbacher R. Effects of Estradiol (-17beta) on learning, memory and cerebral energy metabolism in male rats after intracerebroventricular administration of streptozotocin. *J Neur Trans - General Section.* 1998; 105(8-9): 1045-63.
107. Xiao XQ., Wang R. Tang XC. Huperzine A and tacrine attenuate beta-amyloid peptide-induced oxidative injury. *J Neurosci Res.* 2000; 61(5): 564-9.
108. Wang H., Peng RX., Wang RK., Kong R. Antagonizing effect of sodium ferulate on the changes of hepatic antioxidative function induced by ethanol in mice. Yao Hsueh Hsueh Pao - *Acta Pharmaceutica Sinica.* 1997; 32(7): 511-4.
109. Guo Q., Fu W., Holtsberg FW., Steiner SM., Mattson MP. Superoxide mediates the cell-death-enhancing action of presenilin-1 mutations. *J Neurosci Res.* 1999; 56(5): 457-70.
110. Rawhi A., OmarYJ. Anne C., Andorn, Burkhart P., Nickolaos K., Robakis, Miguel A. Increased Expression but Reduced Activity of Antioxidant Enzymes in Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis.* 1999; 1(3): 139-145.
111. Arendash GW., Gordon MN., Diamond DM., Austin LA., Hatcher JM., Jantzen P., DiCarlo G., Wilcock D., Morgan D. Behavioral

assessment of Alzheimer's transgenic mice following long-term Abeta vaccination: task specificity and correlations between Abeta deposition and spatial memory. *DNA & Cell Biol.* 2001; 20(11): 737-44.