

中國醫藥學院中國醫學研究所碩士論文

組別:針灸組 編號:GICMS-251

指導教授：林昭庚 博士

侯庭鏞 博士

論文題目

中醫藥神經細胞分化促進劑及其分子機制之研究

Study on the Molecular Mechanism of the
Chinese Medicinal Herbs in the Promotion of
Neurite Growth

研究生：李昌誠

中華民國九十二年七月三日

中國醫藥學院碩士班研究生
論文指導教授推薦書

中國醫學研究所，李昌誠君所提之論文
中醫藥神經細胞分化促進劑及其分子機制之研究(題目)，
係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授 林昭庚 (簽章)

中華民國 九十二年 七月三日

中國醫藥學院碩士班研究生
論文口試委員審定書

中國醫學研究所，李昌誠君所提之論文
中醫藥神經細胞分化促進劑及其分子機制之研究(題目)，
經本委員會審議，認為符合碩士資格標準。

論文口試委員會 委員 黃蘭如 (簽章)

林昭庚

侯庭鏞

所長 高尚德

中華民國 九十二年 七月三日

目 錄

第一章、前言	1
第二章、文獻探討	2
第三章、材料與方法	8
第四章、結果	13
第五章、討論	36
第六章、結論	38
參考文獻	41
附錄一	44
附錄二	45
英文摘要	46
謝辭	49

圖目錄

圖 2.1 神經滋養因子作用分子機轉	3
圖 2.2 神經生長因子作用機轉	4
圖 2.3 長期記憶形成機轉	6
圖 2.4 Ginkgolide 相關結構	7
圖 3.1 實驗流程及步驟	8
圖 3.2 MTT 實驗流程	10
圖 3.3 Western blot 實驗流程	12
圖 4.1 SH-SY5Y 細胞在不同濃度 VPA 培養基生長圖	15
圖 4.2 GA,GB,VPA 各組不同濃度在 0.25% GM 血清濃度培養	16
圖 4.3 64 種中藥及成份篩選	17
圖 4.4 不同種類黃酮類篩選	22
圖 4.5 SH-SY5Y 神經細胞在不同濃度 GA 培養基生長圖	24
圖 4.6 SH-SY5Y 神經細胞在不同濃度 GB 培養基生長圖	25
圖 4.7 SH-SY5Y 神經細胞在 VPA 陽性對照組培養基生長圖	26
圖 4.8 GA,GB,VPA 各組不同濃度在 0.5%GM 血清濃度培養	27
圖 4.9 VPA 在不同時間西方墨點法實驗結果	28
圖 4.10 不同濃度 GB 在 30 分鐘西方墨點法實驗結果	29
圖 4.11 不同劑量 VPA,GA,GB MTT 培養 48 小時之 SHSY5Y 活性圖	30
圖 4.12 VPA 不同視野劑量分組: Mock 組	31
圖 4.13 VPA 不同視野劑量分組: 0.1 mM VPA 組	32
圖 4.14 VPA 不同視野劑量分組: 1 mM VPA 組	33
圖 4.15 SH-SY5Y 細胞在不同濃度 VPA 培養基視野突觸長度平均值統計圖	35
圖 6.1 未來實驗流程	39
圖 6.2 未來實驗步驟	40

表目錄

表 4.1 SH-SY5Y 神經細胞在不同培養基視野突觸長度分析統計	34
--	----

中醫藥神經細胞分化促進劑及其分子機制之研究

李昌誠

指導教授：林昭庚 博士

中國醫藥學院中國醫學研究所

本實驗以觀察一種人類神經胚母細胞 (SH-SY5Y) 的生長分化為實驗起點，並以一種已經證明具有刺激神經生長及分化的藥物 Valproic acid (VPA) 為陽性對照組。建立開發促進神經生長物質即所謂神經營養因子的實驗模型。並由相關典籍查詢可能促進神經生長之中藥及成份，進行篩選及求證其療效及機轉。

本實驗中，我們以 64 種中藥材萃取液與常用藥物成份進行初步篩選，發現其中中藥成份黃酮類表現良好，故選定中藥成份中常見的 26 種黃酮類進行進一步之的篩選，發現 Rutin, Hyperin, Ginkgolid B 三種成份具有良好的促進神經生長作用。Ginkgolid B 組尤其表現特別良好，故選定 Ginkgolid B 為接下來的實驗用藥。分別以不同劑量的 VPA 及 Ginkgolid A、Ginkgolid B 在不同培養基進行實驗觀察，並以 MTT assay 測試觀察其對細胞活性之影響。在定量方面，我們以 Image-pro plus 4.0 影像分析軟體計算突觸長度以定量細胞生長。並以西方墨點法研究 Ginkgolid A、Ginkgolid B 是否透過 AP-1 促進神經生長。

結果

1. GA、GB 均表現出對神經生長的促進作用，且 GB 組優於 GA 組，但均未超越陽性對照組中 VPA 1.0 m M 組之效果。
2. 在西方點墨法 Western blot 實驗之結果顯示：(1) 在陽性對照 VPA 組 time course 實驗中，在 30 mins 時 ERK~P 有上升，顯示其生長作用有先透過 ERK 磷酸化作用活化 ERK。(2) 在 GA、GB 組 ERK~P 初期均未有上升，有可能在初期先透過其它路徑活化，再關聯到 AP-1 途徑。

3. MTT 試驗結果顯示，在短時間(48 hrs)未有急性之毒性作用。

結論 本論文所設定之定性與定量分析模式，均可廣泛運用於神經細胞生長促進劑之開發研究。並可進一步利用動物及臨床試驗驗證其促進神經生長的效果。

關鍵字:神經滋養(neurite growth)、神經營養因子(neurotrophic factors,NTFs)、活化蛋白-1 (Activator protein-1, AP-1)、神經分化(nerve differentiation)、智力(wisdom)、記憶(memory)、長期增益效應(long-term potentiation, LTP)、學習 (Learning)

第一章 前言

近年來隨著科學的進步，科學家對於神經的生長、分化、再生、退化及損傷修復和思考、學習、記憶等腦部活動的進一步瞭解，神經的滋養生長和智力的開發將成為跨入二十一世紀，人類最具挑戰性也迫切亟欲解決的問題之一。

目前研究中的藥物中 NGF 及一種抗癲癇及穩定精神用藥 VPA(Valproic acid) 為已知可促進神經細胞的生長的物質，與中醫藥傳統方藥調節身體氣血陰陽生長之特性類似，並且由文獻中顯示神經細胞的生長與 AP-1 升高有關，故考慮以透過 ERK 及 AP-1 作用的 VPA 為對照組，並試圖以細胞 SH-SY5Y 為神經細胞生長促進效果之測定標準，尋找與 NGF 及 VPA 類似促進神經生長分化效果的藥物。以建立尋找及評估誘發神經細胞生長分化藥物的快速搜尋平台系統。未來經此系統分析有效的中醫藥療法可考慮進一步納入動物實驗或臨床實驗加以求證。

第二章 文獻探討

1.傳統藥物中可能具有刺激神經生長的中藥藥物及方劑

傳統藥物中可能具有刺激神經生長包括促進生長發育的補養藥；促進受傷組織復原的活血化瘀藥及中醫骨傷科用藥；可以輕身延年及增進記憶的益智安神藥；和促進腦部意識恢復的醒腦開竅藥及其它藥物。簡列如下：

一、藥物：

- 1.補養藥：人參、黨參、西洋參、何首烏、冬蟲夏草、龍眼肉、胡桃、大棗、蜂蜜、葡萄、黑木耳、雞蛋、鹿茸。
- 2.通竅藥：菖蒲、遠志。
- 3.益智安神：遠志、百合。
- 4.活血化瘀：桃仁、赤芍、川芎。
5. 傷科用藥：骨碎補、一條根。
6. 平肝藥：天麻、鉤藤、珍珠。
7. 補腎藥：巴戟天、鹿茸。
8. 其他藥：銀杏葉。

二、方劑：天王補心丹、孔聖枕中丹、加味道遙散。

2.神經滋養因子(neutrophic factors, NTFs)

神經滋養因子(neutrophic factors, NTFs)是目前研究中具有刺激神經生長及分化的物質，它的家族包括有nerve growth factor (NGF),brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3(NT-3),及NT-4/5 (Lewin and Barde, 1996)。神經滋養因子透過與接受體接合產生作用，接受體分為Trk (Tyrosine kinase)與p75兩個次單元部份，Trk分為A,B,C三種，NGF主要與Trk A結合，BDNF及NT-4/5主要與Trk B結合，NT-3主要與Trk C結合。(Lee et al., 2001;Patapoutian and Reichardt, 2001),(附圖2.1) 神經滋養因子與Trk結合後會透過下游的MAPK pathway(Segal and Greenberg, 1996)，並藉訊息傳導路徑ERKs、JNKs及p38 kinases 三條路徑活化AP-1(Iyer et al., 1999)。

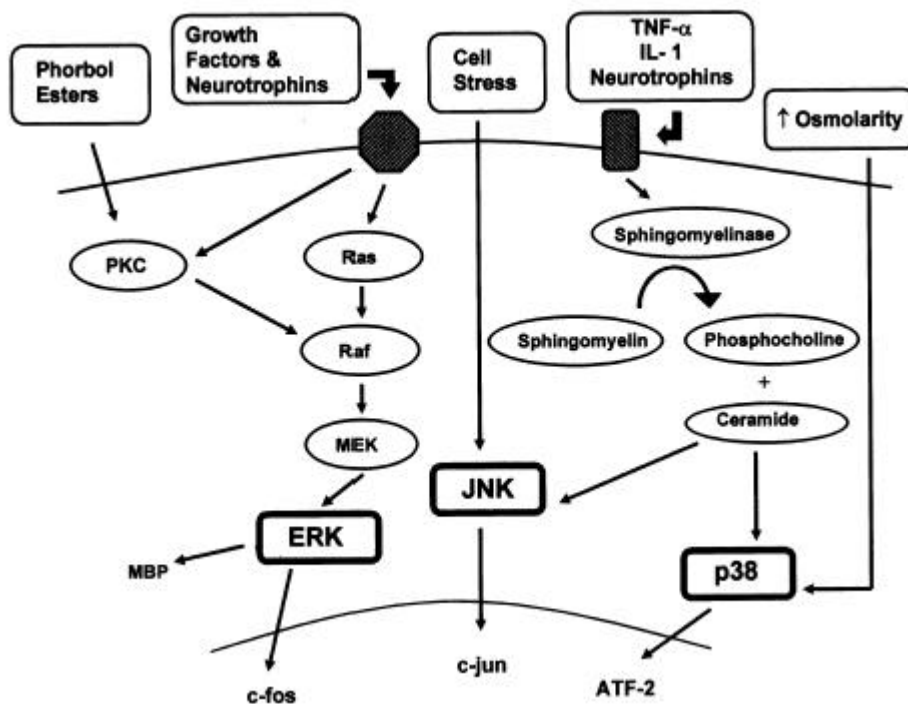


圖 2.1 神經滋養因子作用分子機轉 (Rochelle and Seung, 2001)

3.神經生長因子 (NGF)

神經生長因子 (nerve growth factor, NGF) 是最早發現可促進神經細胞生長分化的神經滋養因子，文獻中指出其作用機轉是經過 ERK 及 AP-1 路徑來進行(附圖 2.2)，透過提高 AP-1 活性可達成與 NGF 類似的促進神經生長分化效果。

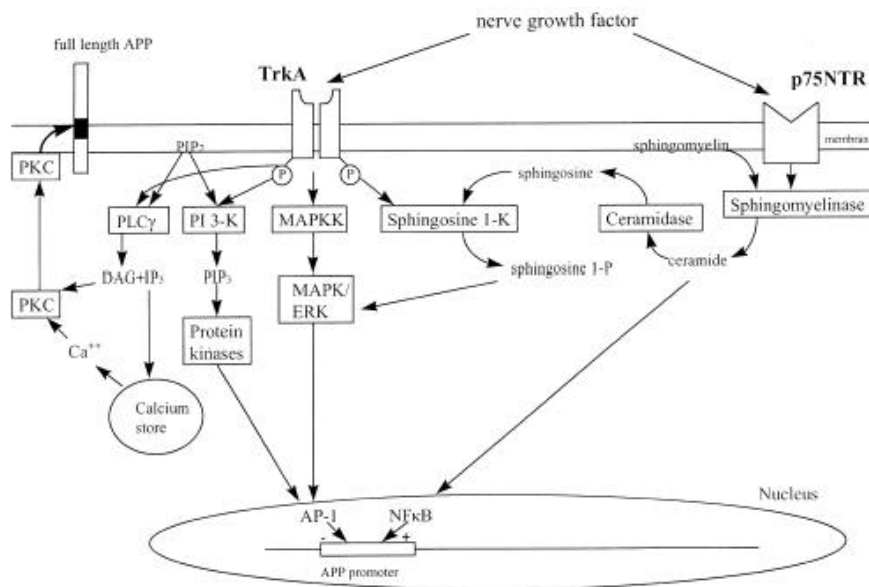


圖 2.2 神經生長因子作用機轉 (Rossner *et al.*,1998)

4. Activator protein 1 (AP-1) 的文獻介紹

(1) Activator protein 1 的介紹

AP-1 為調控細胞增殖及分化之即發性早期蛋白，可參與多種基因轉錄調節的過程 (Herschman et al., 1991)。AP-1 是由 Jun 和 Fos 蛋白質所組成的 dimer，其中 Jun family 包含 c-Jun、JunB 及 JunD，而 Fos family 則包含 c-Fos、FosB、Fra-1、Fra-2、FosB2 和 ATF2 (Angel and Karin, 1991)。當給予細胞生長因子和細胞激素的刺激時，可藉由 mitogen-activated protein kinases (MAPK) 之 ERKs 訊息傳導路徑來活化 AP-1，進而調控細胞的生長 (Lewis et al., 1998)

(2) Activator protein 1 上游的活化

AP-1 藉助之訊息傳導路徑主要為 ERKs、JNKs 及 p38 kinases 三條路徑。在生長停滯的 fibroblasts 中添加血清，證實有 300 個基因可進行新生合成，而這些被血清所誘發表現的基因，其啟動子上均含有 AP-1 反應的位置。(Iyer et al., 1999)。

(3) Activator protein 1 對神經生長分化及記憶產生的活化方式

以 NGF 刺激 PC12 神經細胞引發 MAPK 的連鎖反應可同時觀察到生長分化表現 (Kutcher et al., 2003)。在所有 AP-1 蛋白質中，c-Jun 蛋白質是神經退化及神經保護最好的研究對象。在神經細胞死亡中，c-Jun 及它活化的 JNKs 已經被功能突觸所決定。在細胞中，神經形成已經顯示依賴 ASK - JNK 途徑，Rac - JNK 途徑 (Leppa et al., 1998)。報導也指出，可促進神經生長分化的神經生長因子 NGF，同時給予 PDF98059 及 NGF 可抑制 PC12 神經細胞生長分化，顯示 NGF 是透過 PDF98059 所抑制的 AP-1 ERK 路徑所作用。阻止 AP-1 及 MAPK 上游的 MAPKK 磷酸化酵素會阻斷誘發分化 (Pang et al., 1995)，這提示 AP-1 及 MAPK 在神經分化上扮演了決定性的角色。NGF 也被證實具有多方面功能，與學習、記憶等神經活動有密切關係 (Mu et al.,

1999)。除了在正常腦的生理功能上，c-Jun 及它的上游活化物 JNKs 也牽涉了神經再生或神經保護的過程。在缺血情況下，海馬迴神經的死亡是關連到神經中 c-Jun 的選擇性誘發，否則在缺乏 c-Jun 時死亡。(Sommer et al., 1995)。自 1990 即有報告指出大鼠經形迷宮視覺辨別作業後，腦部的海馬迴 c-fos mRNA 表達立即出現短暫性升高，二小時後恢復到基礎水準。(Rose et al., 1991)。在腦部記憶新生蛋白產生機轉中，透過 Glutamine 作用於 NMDA receptor 可引起大量 Ca^{2+} 離子升高，經由 Adenyl cyclase 產生的 cAMP 可活化 Protein kinase A 而使 AP-1 產生增加而進一步啟動基因轉錄作用產生新生蛋白及塑造出長期記憶所需的分子結構變化及改變。(圖 2.3)

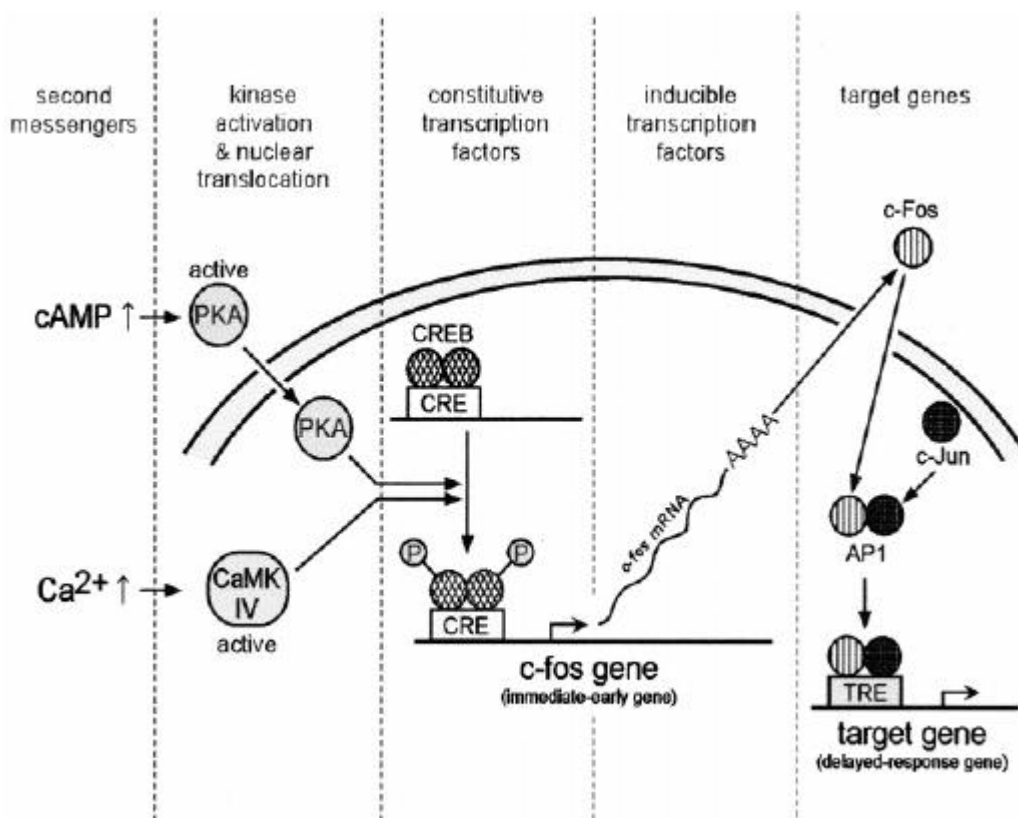


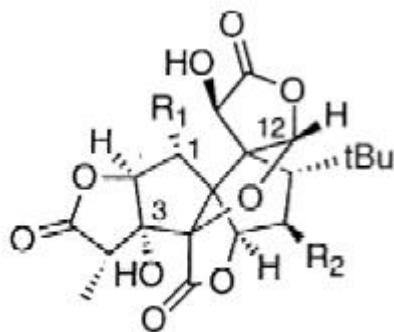
圖 2.3 長期記憶形成機轉 (Platenik et al., 2000)

5. VPA (Valproic acid)

VPA (Valproic acid)為西藥使用中的抗癲癇及穩定精神用藥，本藥物會提高腦中 GABA 的濃度，因而產生抗癲癇的作用。目前也被使用在穩定精神病患的情緒 常見的副作用有噁心 嘔吐 鎮靜 皮膚疹等 在期刊中提到抗癲癇藥如 Lithium, 及 VPA 皆可誘發 AP-1 的升高(Yuan et al., 2001), 並提到 VPA 誘發的 AP-1 升高量與神經生長成正相關，故本實驗以 VPA 為西藥的陽性對照組(positive control)。

6. Ginkgolide B

銀杏葉專利粗萃取物為 EGb-761, 包含了 24 % flavonoids, 7 % proanthocyanidine and 6 % terpenoid , flavonoids 主要成份為 Ginkgolides 的衍生物 Ginkgolide A, B, C, J (Karyn et al., 2002), (圖 2.4)。Ginkgolides B 在已知研究中顯示具有自由基清除的作用，但主要作用為血小板活化因子(plate activity factors, PAF) 接受器的競爭性拮抗作用劑(Braquet et al., 1987)。



G-A: $R_1 = R_2 = H$

G-B: $R_1 = OH, R_2 = H$

G-C: $R_1 = R_2 = OH$

G-J: $R_1 = H, R_2 = OH$

圖 2.4 Ginkgolide 相關結構 (Van Beek TA., 2002)

第三章 材料與方法

1. 研究材料與實驗流程

(1) 試驗細胞介紹

SH-SY5Y 細胞株是一個由人類神經細胞選殖可表現許多有用性質的神經細胞模型。目前被良好運用於神經研究如神經生長因子 (NGF) 的神經影響因子的實驗模型。以神經生長因子 (NGF) 處理 SH-SY5Y 細胞可誘發分化及生存。以含有 10 %胎牛血清(Hyclone)的 Dulbecco 's Modified Eagle Medium (GIBCO) DMEM , 培養於 37 的培養箱中。

(2) 實驗流程及步驟 (圖 3.1)

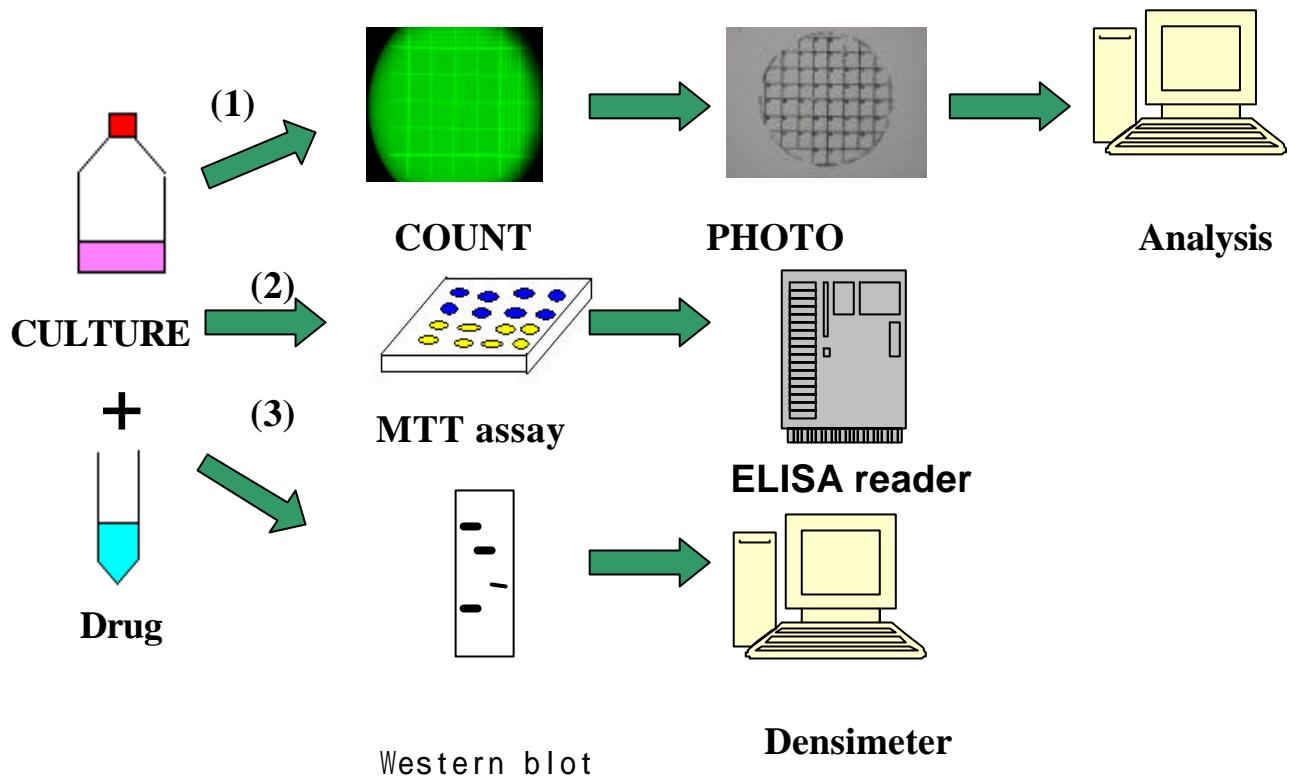


圖 3.1 實驗流程及步驟

2. MTT test 介紹

把細胞培養在 96 孔盤,過了 24 小時後加入以 DMEM 稀釋的藥物反應在固定時間後,加入 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) , 反應 4 小時,加入 0.1% SDS-HCl (含 10 mM HCl, 20% SDS, DDW) , 24 小時後,以 570 nm 的波長測定吸光度的強弱,來代表細胞的活性;吸光度越強,代表細胞活性越佳,用來描述藥物對細胞活性的影響。

實驗流程如下(圖 3.2) :

以一個 75T 培養瓶的 SH-SY5Y 細胞置於 96 well microplate 中 over night

吸去 100 μ l 培養液,加 100 μ l 藥液處理 48 小時

吸去上清液,加入 10 μ l MTT 黃色染料 (5 mg / ml), 37 $^{\circ}$ C , 4 小時

吸去上清液,加 100 μ l SDS/HCl 溶解,混合均勻,以 EIA reader 在 570 nm 讀

取吸光值

細胞存活率 = 細胞加藥處理的吸光度 / 不加藥處理的細胞對照組吸光度 x 100 %

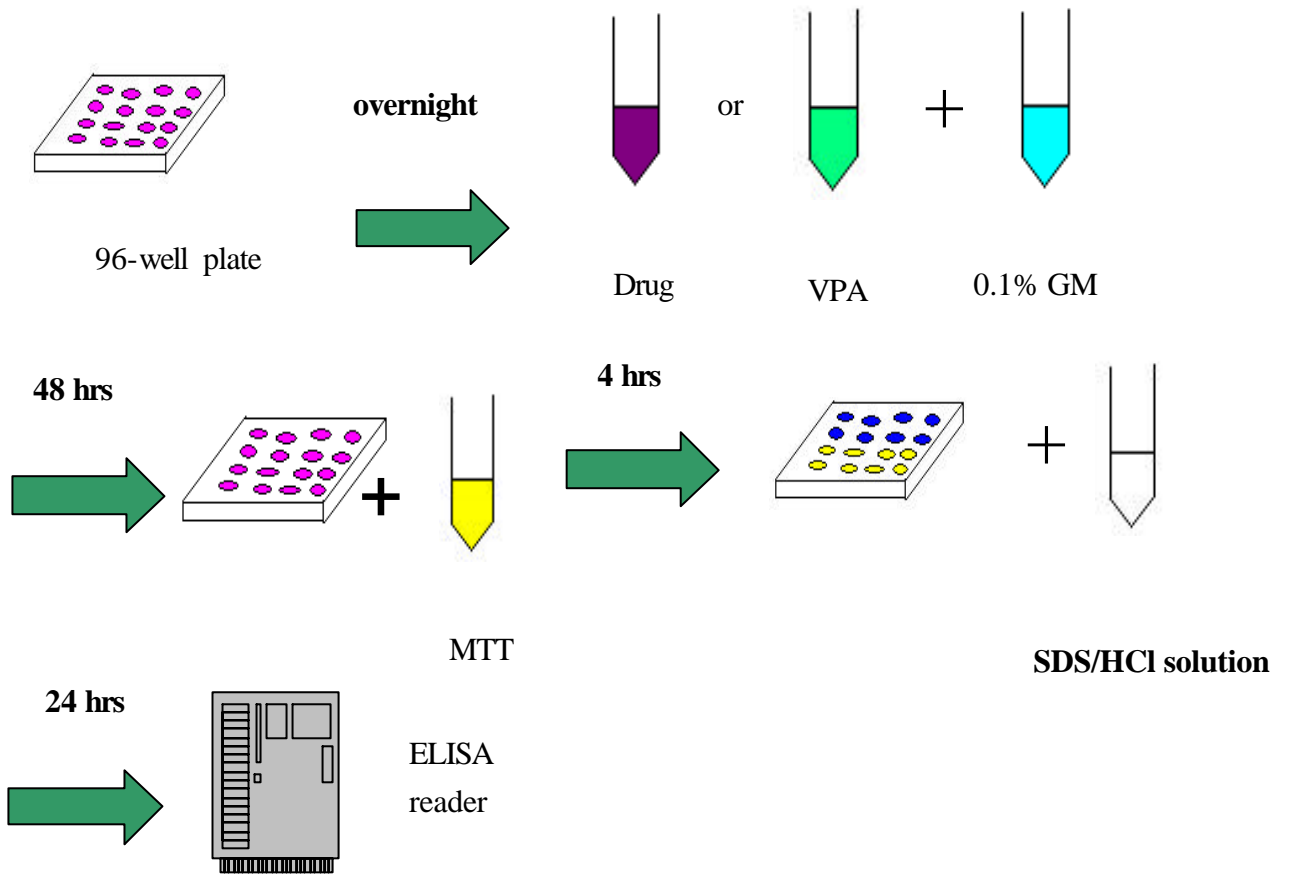


圖 3.2 MTT 實驗流程

3.西方墨點法(Western blot)

細胞在 25T flask 中，培養至全滿，移去上層之培養基後，加入以 DMEM 稀釋的藥物，反應固定時間後把細胞放在冰上，中止反應，並以冰冷的一倍 PBS 清洗，加入 SDS sample buffer (含 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% Glycerol, 50 mM DTT, 0.1% Bromophenol blue)溶解細胞，以超音波震盪器震盪 10 秒，擊碎細胞後，再以 4℃、12000 rpm、離心 5 分鐘後，以 100℃ 煮沸 5 分鐘後，用含 10 % polyacrylamide 的膠體做蛋白質電泳，並以硝酸纖維薄膜(Nitrocellulose paper, NC paper, Amersham) 轉印,再加入用 Blocking buffer(含 1 倍 Tris buffer saline (TBS), 0.1% Tween-20, 5% Nonfat dry milk)稀釋的抗 ERK , phospho-ERK, JNK, phospho-JNK, p38,phospho-p38 和 I κ B,phospho-I κ B 的抗體(NEB)做雜合反應後，加入抗兔子的 IgG 抗體，最後以 ECL (Amersham)呈色最後以 X 光底片顯影(圖 3.3)。

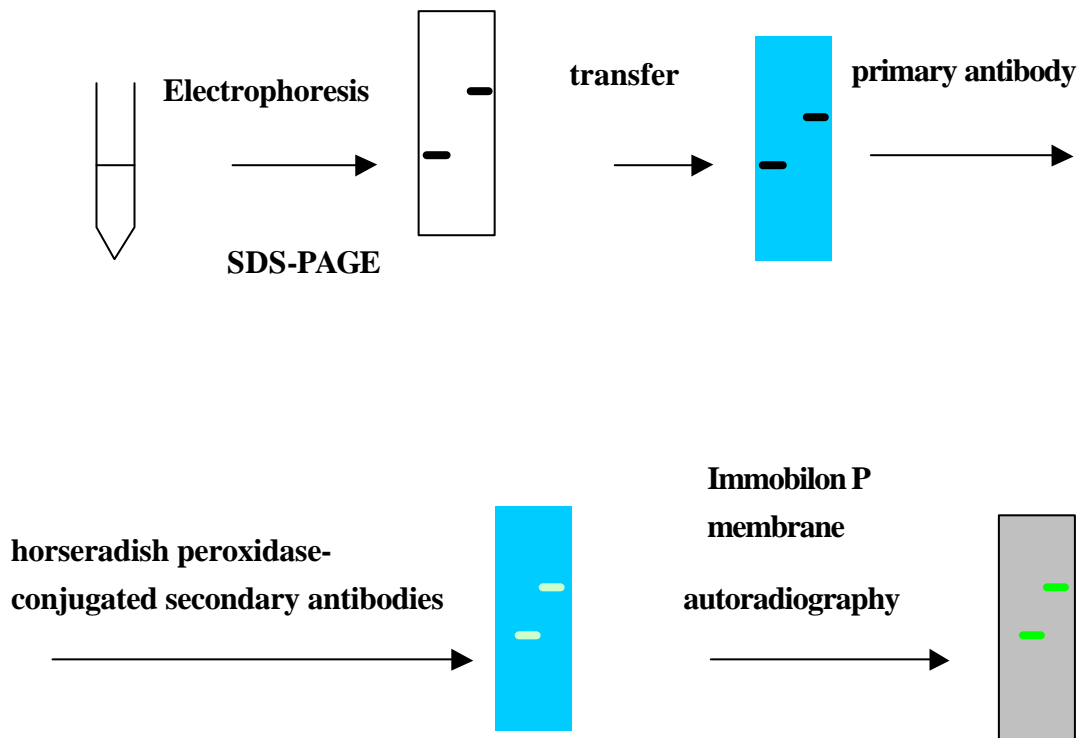


圖 3.3 Western blot 實驗流程

第四章 結果

1. 陽性對照組實驗：

VPA 在不同濃度均能刺激 SH-SY5Y 神經細胞生長(圖 4.1)，且在期刊所提示的藥物濃度(VPA 1.0 mM)組刺激下，神經生長遠大於 VPA 其它濃度與空白對照組。VPA 組在低濃度生長培養基 (0.25% GM)，仍能表現促進神經生長作用(圖 4.2)。

2. 在 64 種中藥材萃取液(附錄一)與常用藥物的初步篩選前二十名藥品名如下：

乳香、骨碎補、一條根、赤芍、桃仁、當歸、川芎、三稜、仙鶴草、續斷、靈芝、斛寄生、羌活、加味道遙散及中藥成分 Baiclein、Baicalin、Formonetin、Gingkgolid A、Gingkgolid B 及 VPA (西藥對照組) (圖 4.3)。

3. 因在初步篩選中中藥成份黃酮類表現良好，故選定常用之 26 種黃酮類進行

進一步之篩選，前三名之藥品名為 Rutin, Hyperin, Gingkgolid B。Gingkgolid B 組尤其表現特別良好之刺激神經生長作用，故選定 Gingkgolid B 為接下來之實驗用藥(圖 4.4)。

4. 在 Gingkgolid A、Gingkgolid B (以下簡稱為 GA、GB)與 VPA 劑量反應實驗上，有以下兩點結論：

<1> GA、GB 均表現有促進 SH-SY5Y 細胞生長的作用，且 GB 組優於 GA 組，但均未超越陽性對照組中 VPA 1.0 mM 組之效果(圖 4.5-4.7)。

<2> GB 在中劑量生長基 0.5% GM 存在下表現較 VPA 0.1 mM 組好，但未超越陽性對照組中 VPA 1.0 mM 組之效果(圖 4.8)。

5. 在西方點墨法 Western blot 實驗之結果顯示及結論如下：

<1> 在陽性對照 VPA 組 time course 實驗中，在 30 mins 時 ERK~P 有上升，顯示其生長作用有先透過 ERK 磷酸化作用活化 ERK，與先前之期刊報告結論相符合(圖 4.9)。

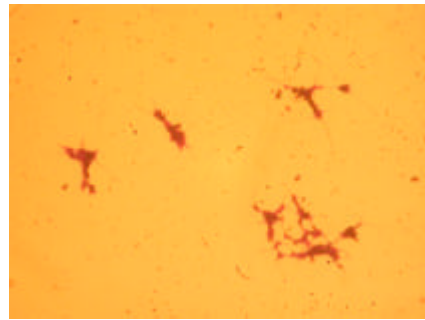
<2> 在 GA, GB 組 ERK~P 初期均未有上升，但隨時間增加，反而有下降變化，

有可能在初期先透過其它路徑活化，在關聯到 ERK 磷酸化途徑(圖 4.10)。

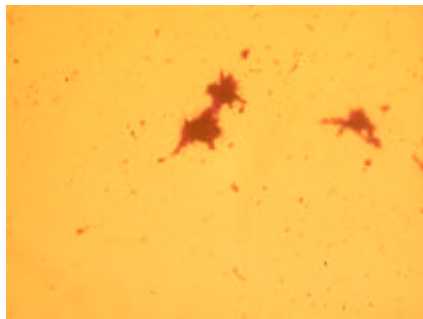
6. 在藥物與細胞活性 MTT 試驗結果顯示, 在短時間(48 hrs) 未有急性之毒副作用(圖 4.11)。
7. GB 表現雖未超越陽性對照組中 VPA 1.0 mM 組之效果, 但其投與劑量僅為其十分之一, 在低劑量(100 μ M) 下即有效用, 故也值得進一步開發研究。
8. 定量實驗中, VPA 在高劑量生長基 10 %GM 存在下 VPA 0.1 mM 組表現較好(表 4.1, 圖 4.12-4.15)。



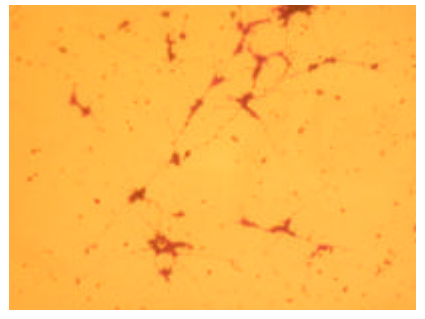
Mock



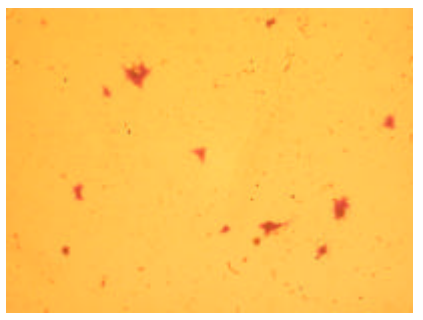
0.01mM



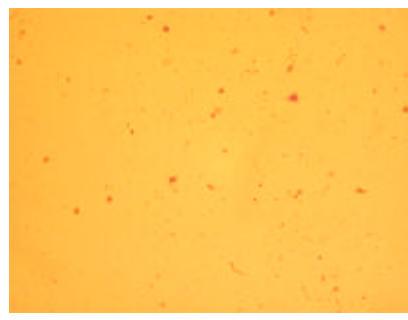
0.1mM



1 mM



2 mM



5 mM

圖4.1 SH-SY5Y神經細胞在不同濃度VPA培養基生長圖

SH-SY5Y神經細胞在不同濃度VPA培養基培養24天後以Nicon 995 數位相機在焦距3.6, 100倍視野下拍攝之生長狀況。

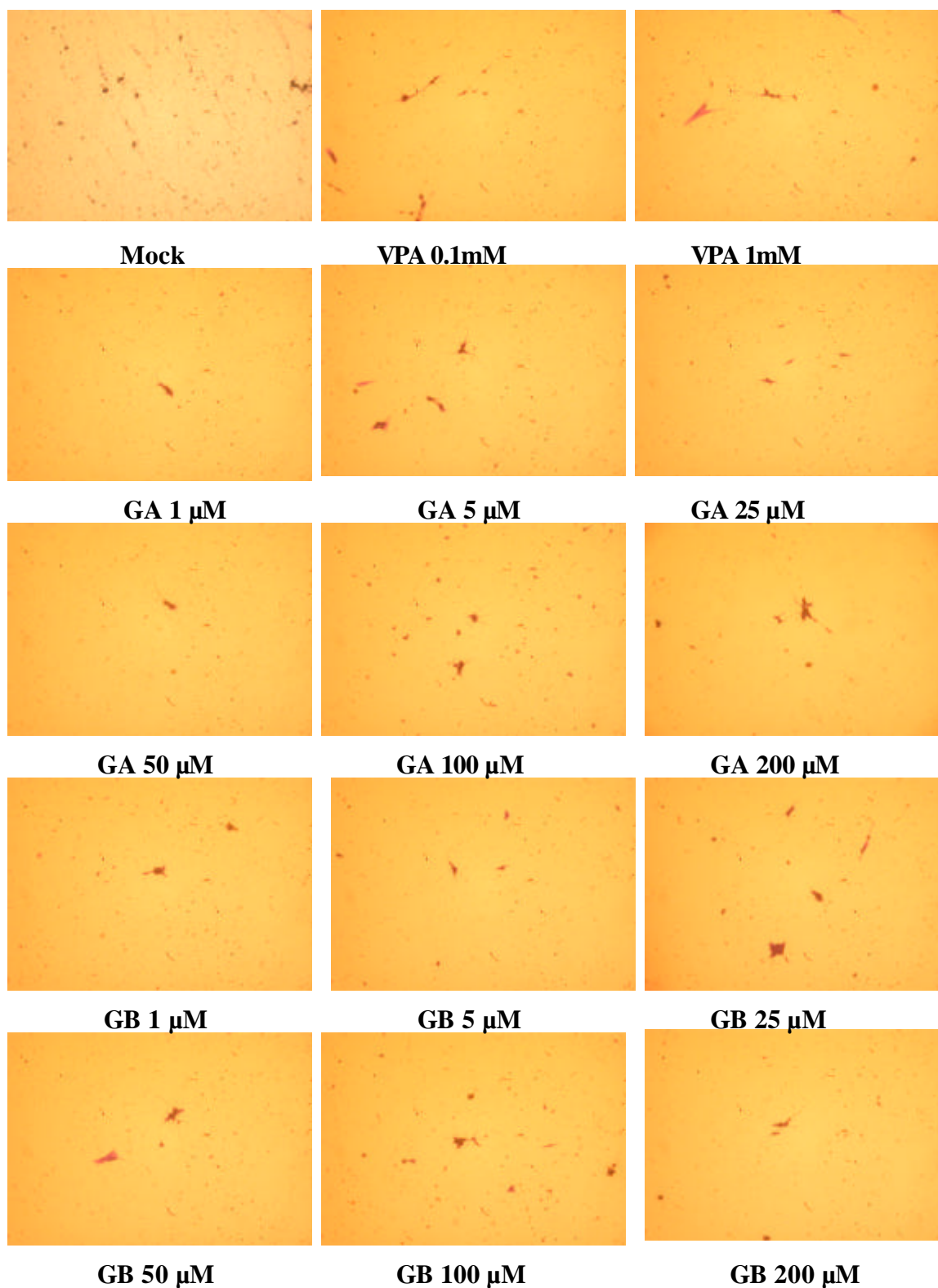


圖4.2 GA,GB,VPA各組不同濃度在0.25 %GM 血清濃度培養
 SH-SY5Y神經細胞在0.25 %GM 血清濃度培養生長10天後以Nicon 995數位相機
 在焦距3.6,100倍視野下拍攝。

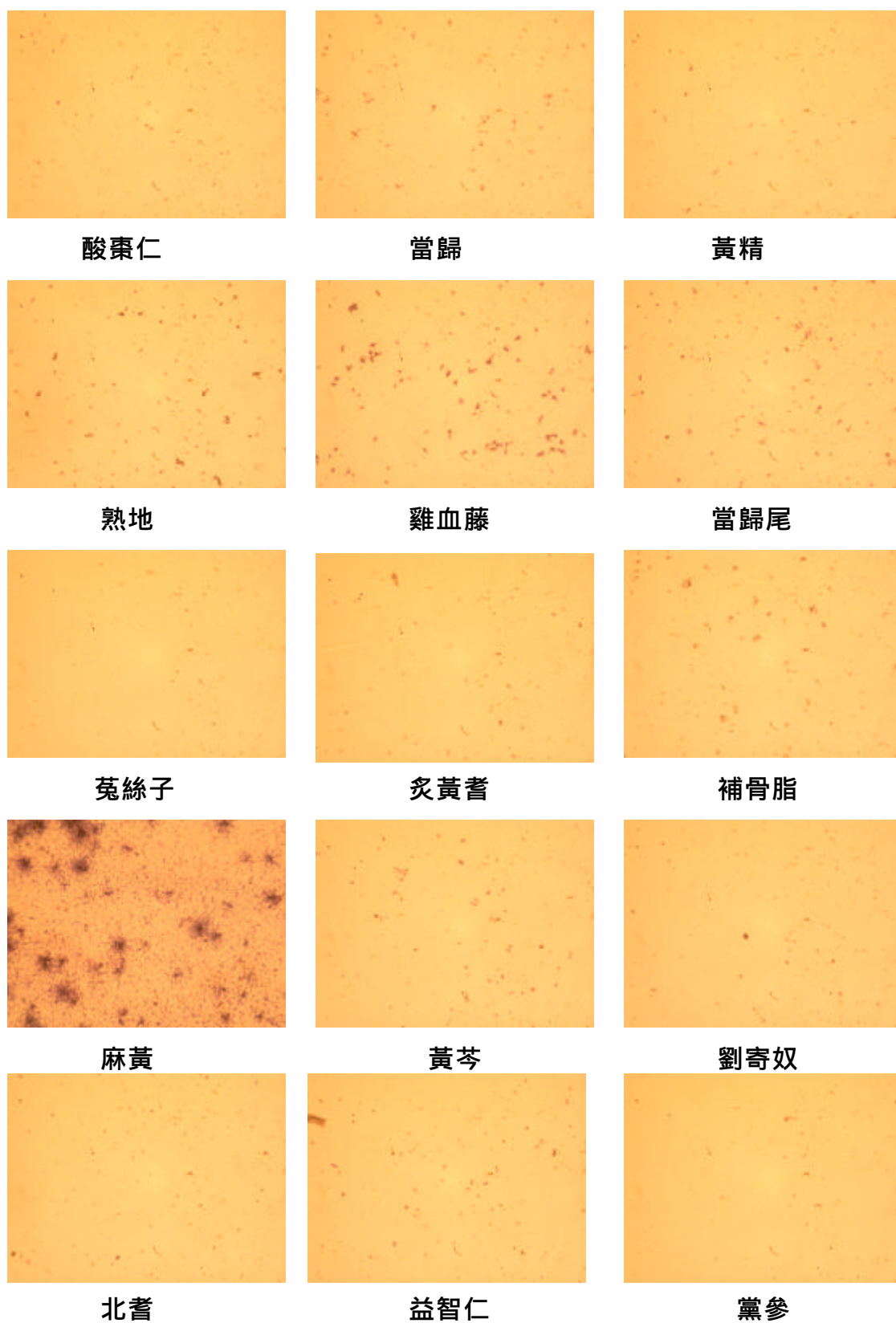
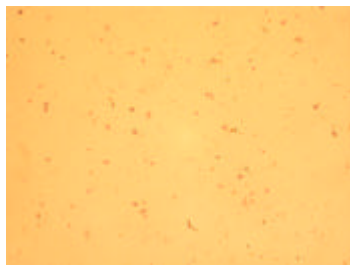
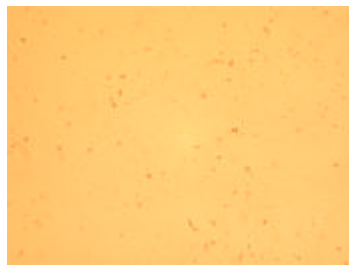


圖4.3 64種中藥及成份篩選

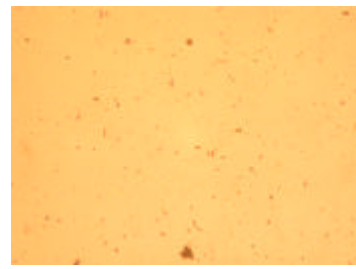
SH-SY5Y神經細胞在不同種類中藥甲醇萃取物加入培養基培養14天後以Nicon 995數位相機在焦距3.6, 100倍視野下拍攝之生長狀況。



杜仲



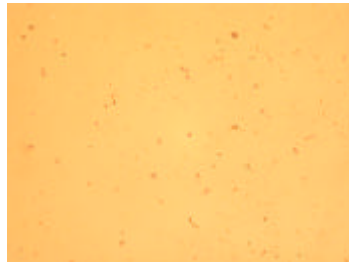
天麻



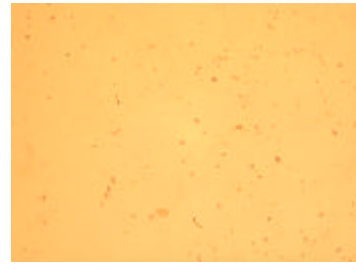
獨活



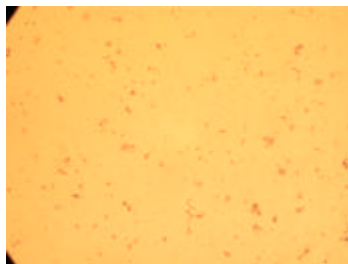
肉苁蓉



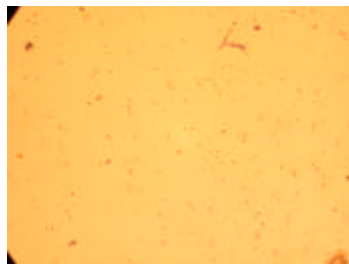
懷牛膝



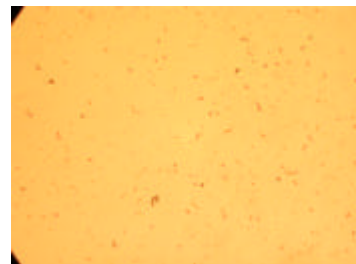
紅參鬚



益母草



巴戟天



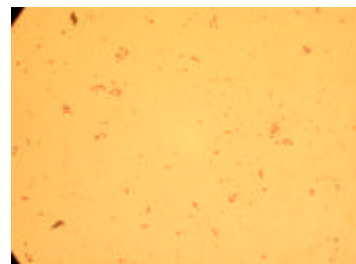
狗脊



鉤藤



沒藥



當歸



秦艽

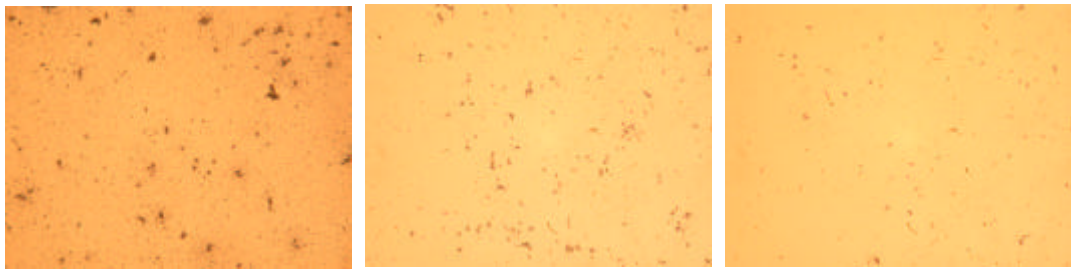


白芷



阿膠

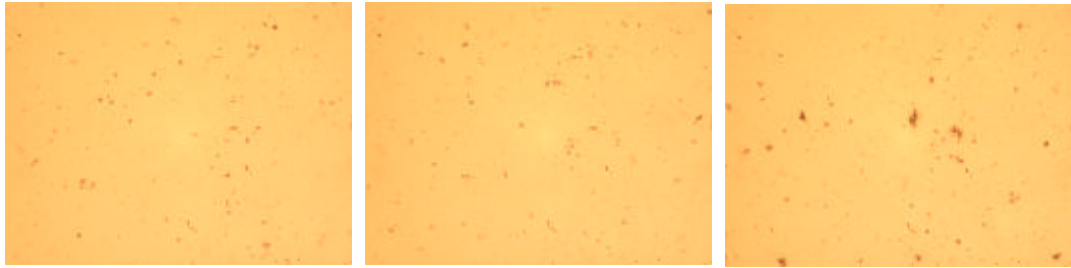
圖4.3 續



銀杏葉

鎖陽

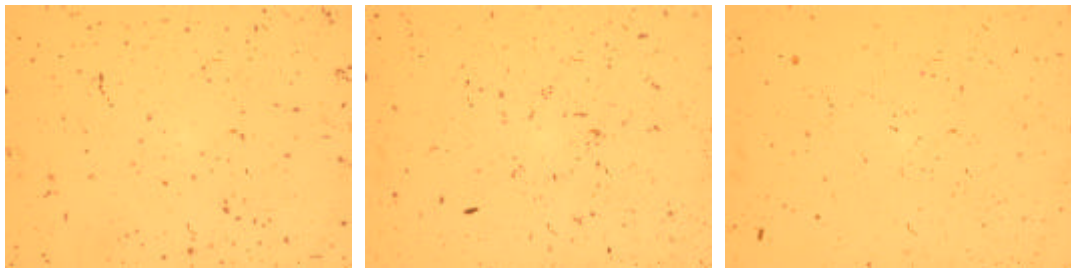
三七



威靈仙

? 板

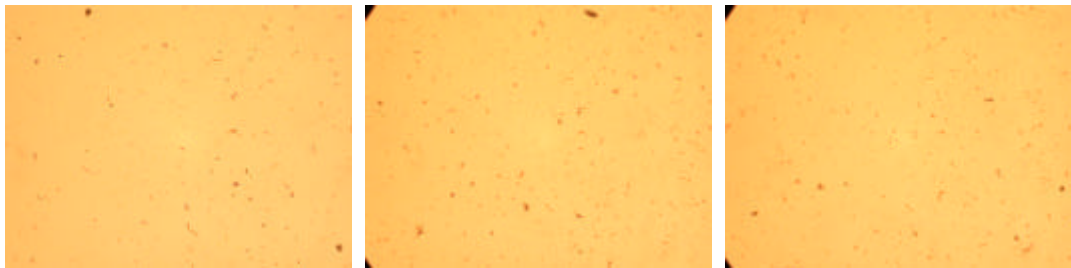
乳香



骨碎補

一條根

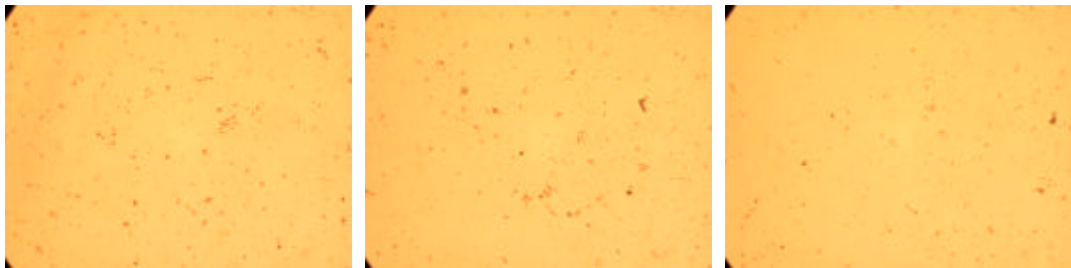
貫仲



王不留行

莪朮

桃仁



赤芍

桃仁

澤蘭

圖4.3 續

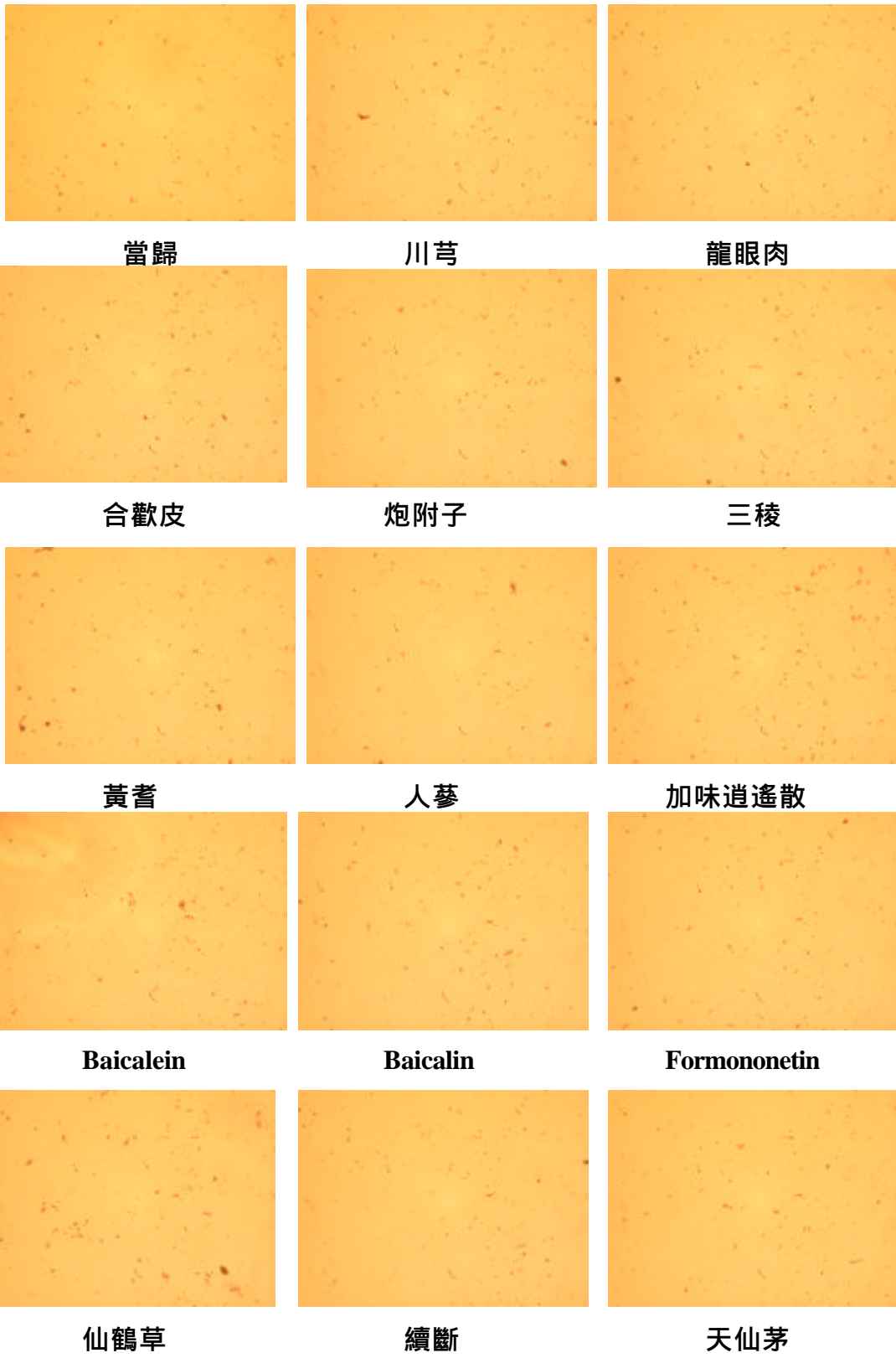
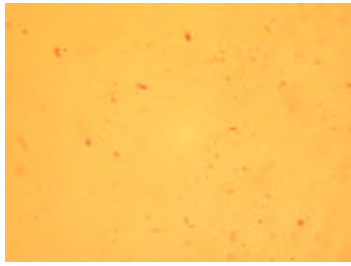
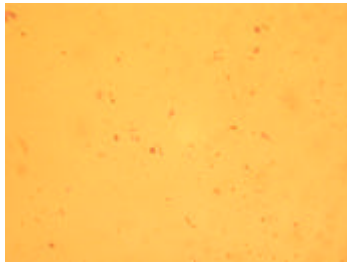


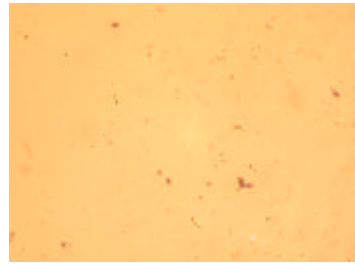
圖4.3 續



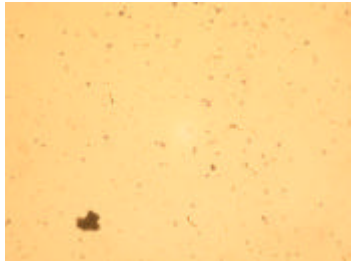
全蝎



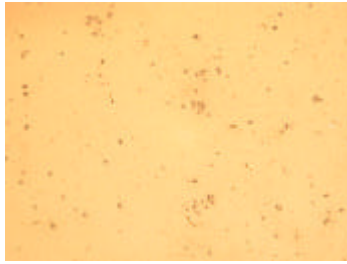
水蛭



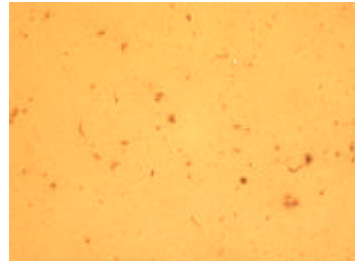
山藥



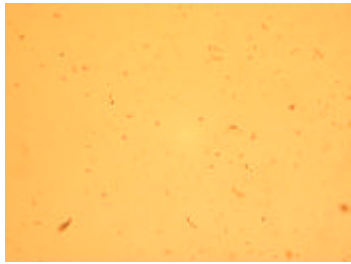
靈芝



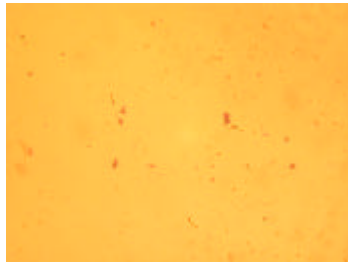
槲寄生



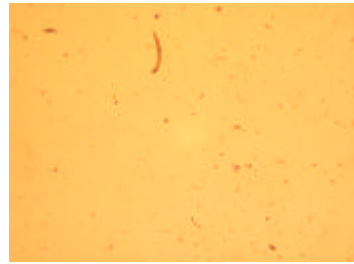
羌活



GA



GB



VPA



Mock

圖4.3 續

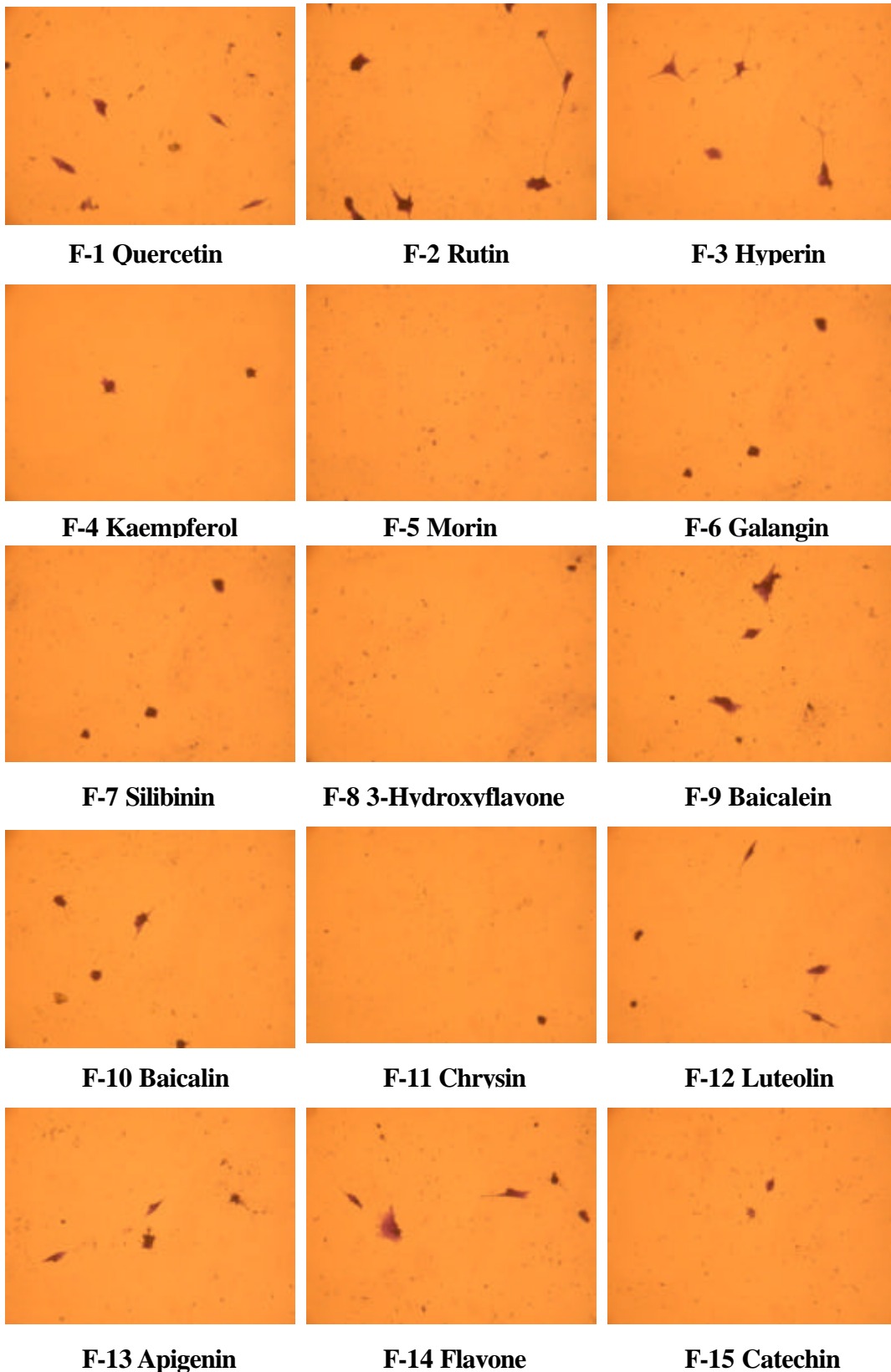


圖4.4 不同種類黃酮類篩選

SH-SY5Y神經細胞在不同種類黃酮類培養基培養7天後以Nicon 995數位相機在焦距3.6, 100倍視野下拍攝之生長狀況。

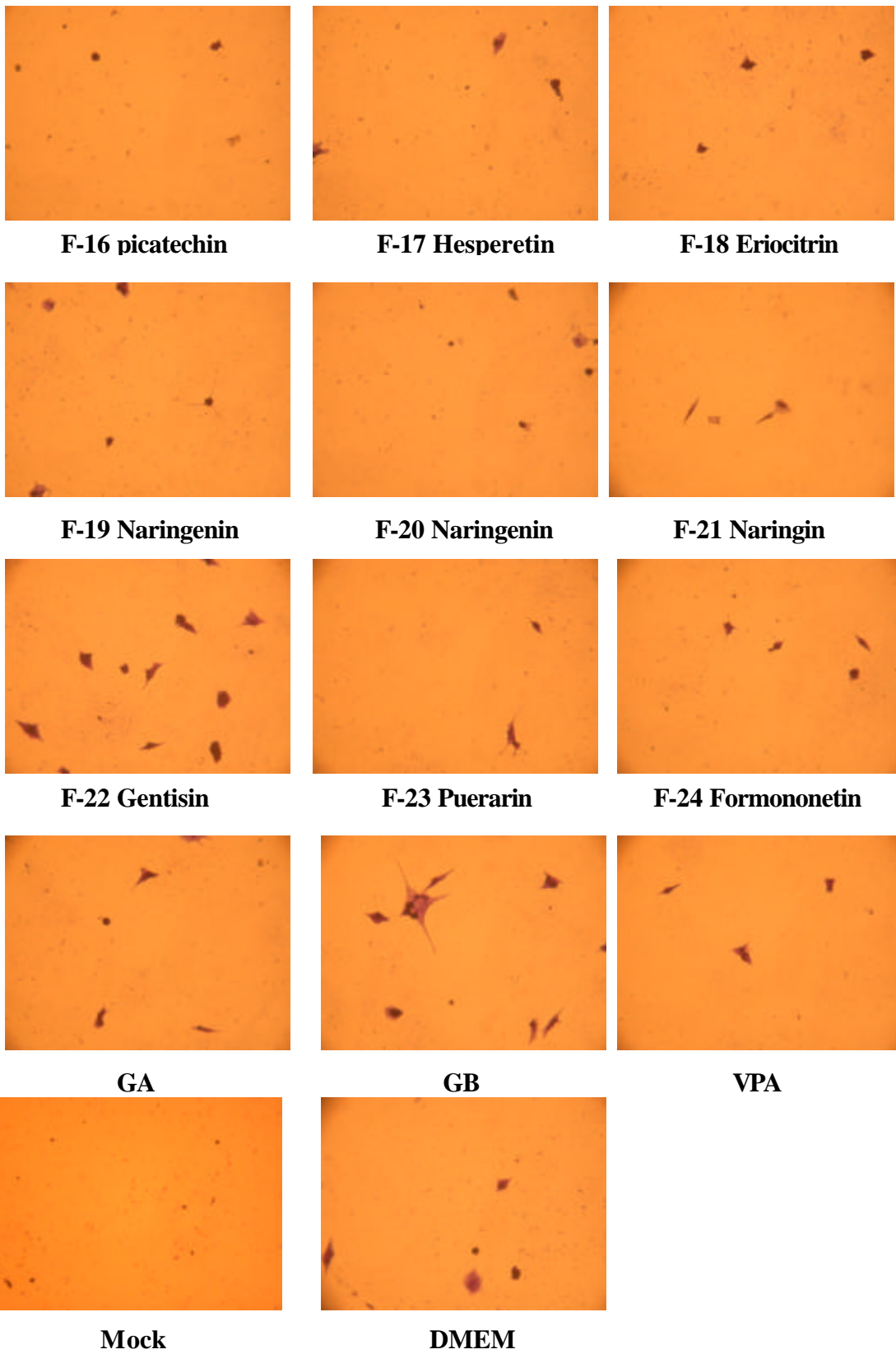
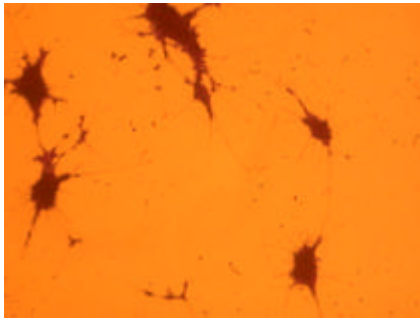
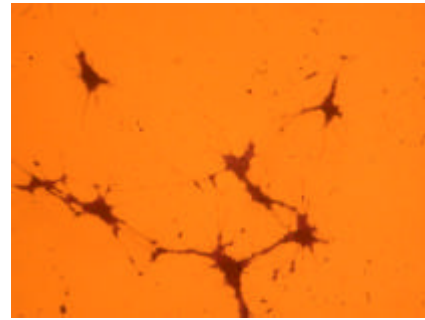


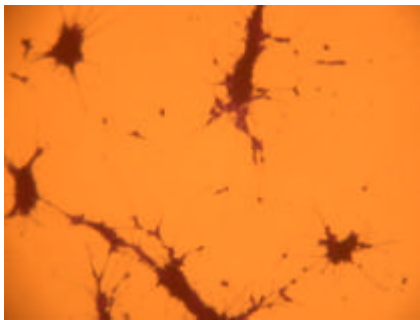
圖4.4 續



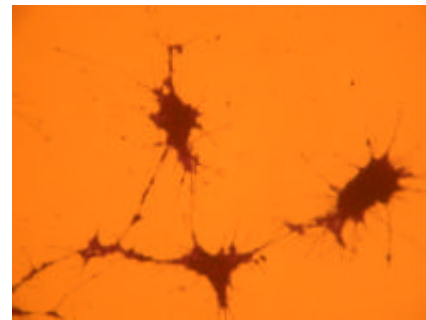
Mock



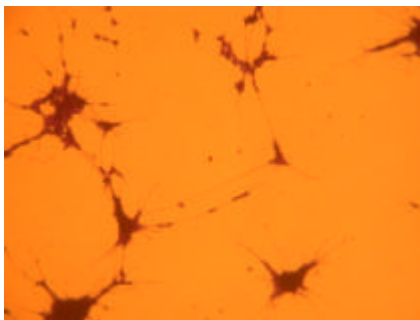
1 μM



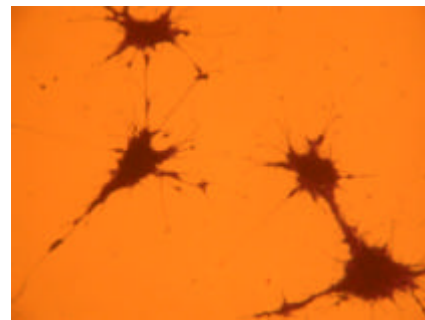
5 μM



25 μM



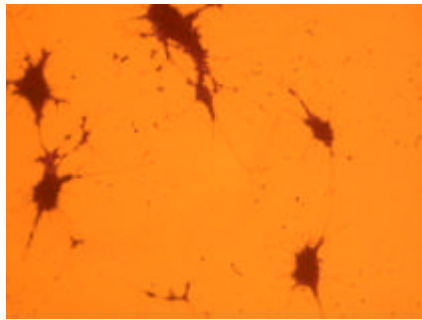
50 μM



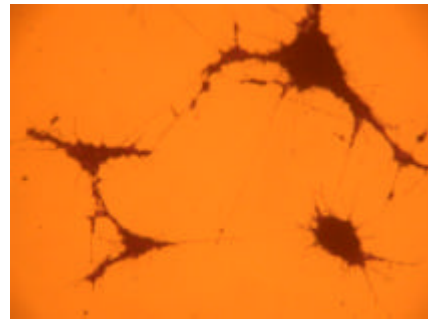
100 μM

圖4.5 SH-SY5Y神經細胞在不同濃度GA培養基生長圖

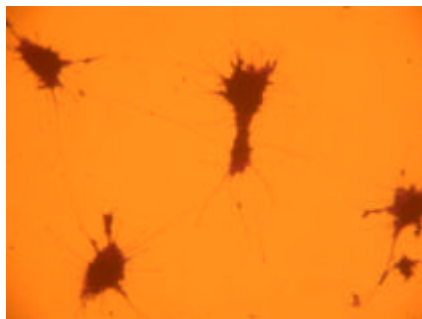
SH-SY5Y神經細胞在不同濃度GA培養基培養19天後以Nicon 995數位相機在焦距3.6, 100倍視野下拍攝之生長狀況。



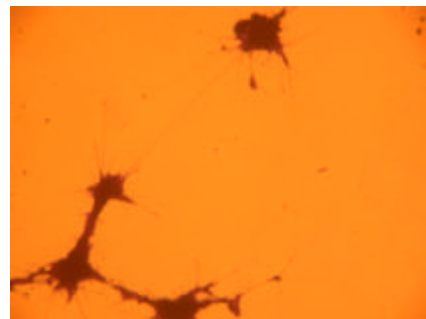
Mock



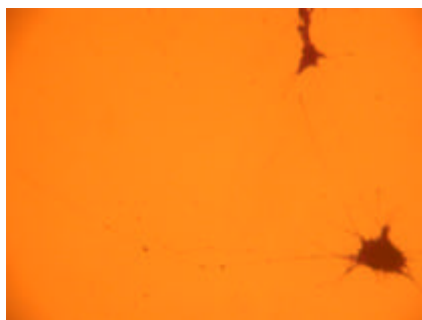
1 μM



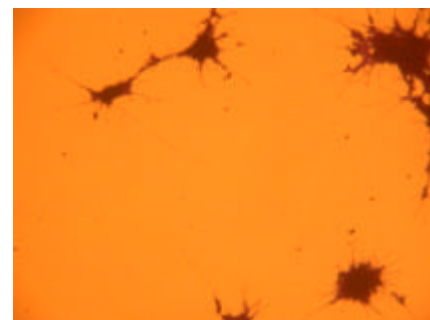
5 μM



25 μM



50 μM



100 μM

圖4.6 SH-SY5Y神經細胞在不同濃度GB培養基生長圖
SH-SY5Y神經細胞在不同濃度GB培養基培養19天後以Nicon 995數位相機在
焦距3.6, 100倍視野下拍攝之生長狀況。

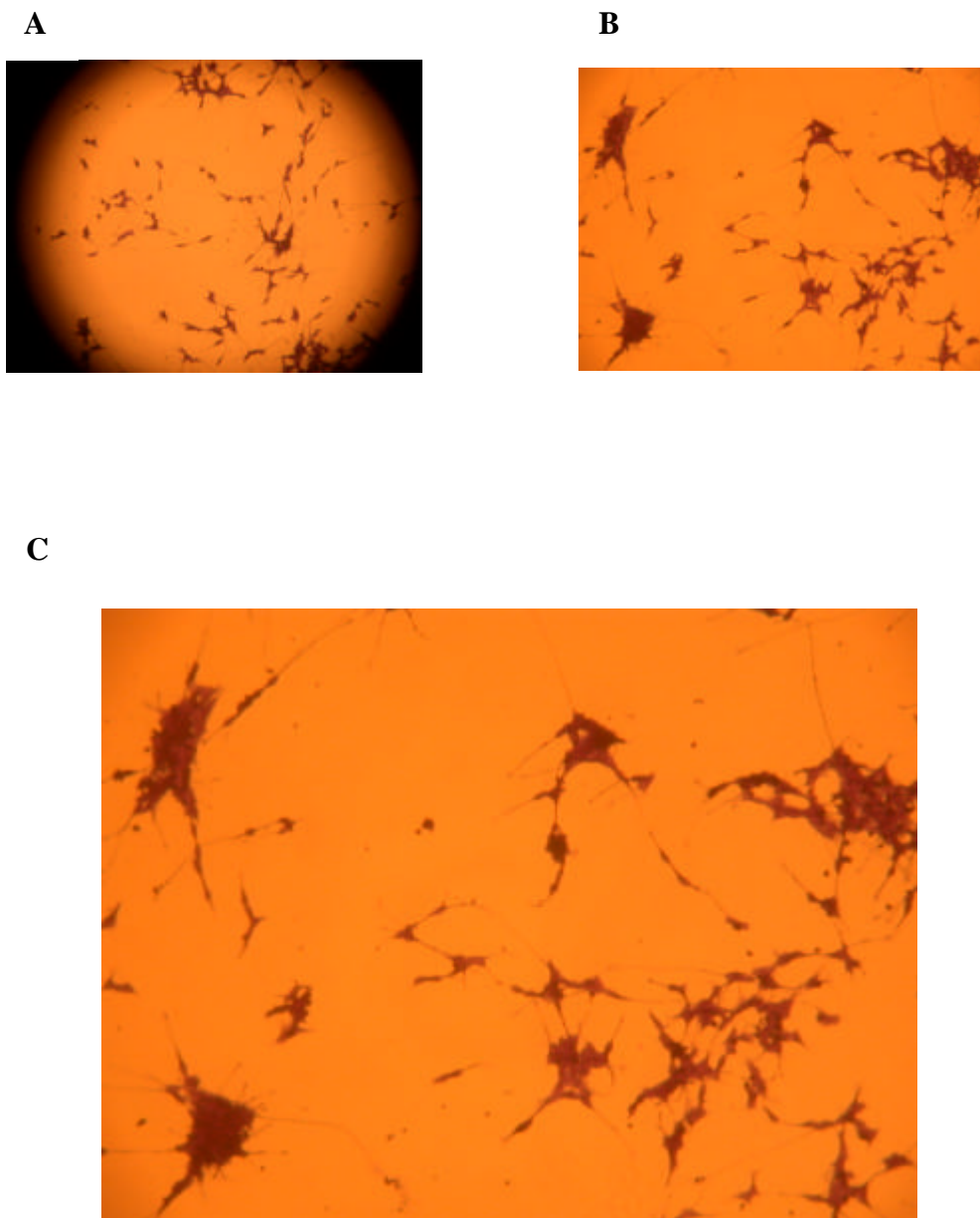


圖4.7 SH-SY5Y神經細胞在VPA陽性對照組培養基生長圖
SH-SY5Y神經細胞在陽性對照組VPA 1.0 mM培養基培養19天後以Nicon 995數位相機在100倍視野不同焦距下拍攝之生長狀況。圖A為焦距3.0，圖B為焦距3.6，圖C為放大圖。

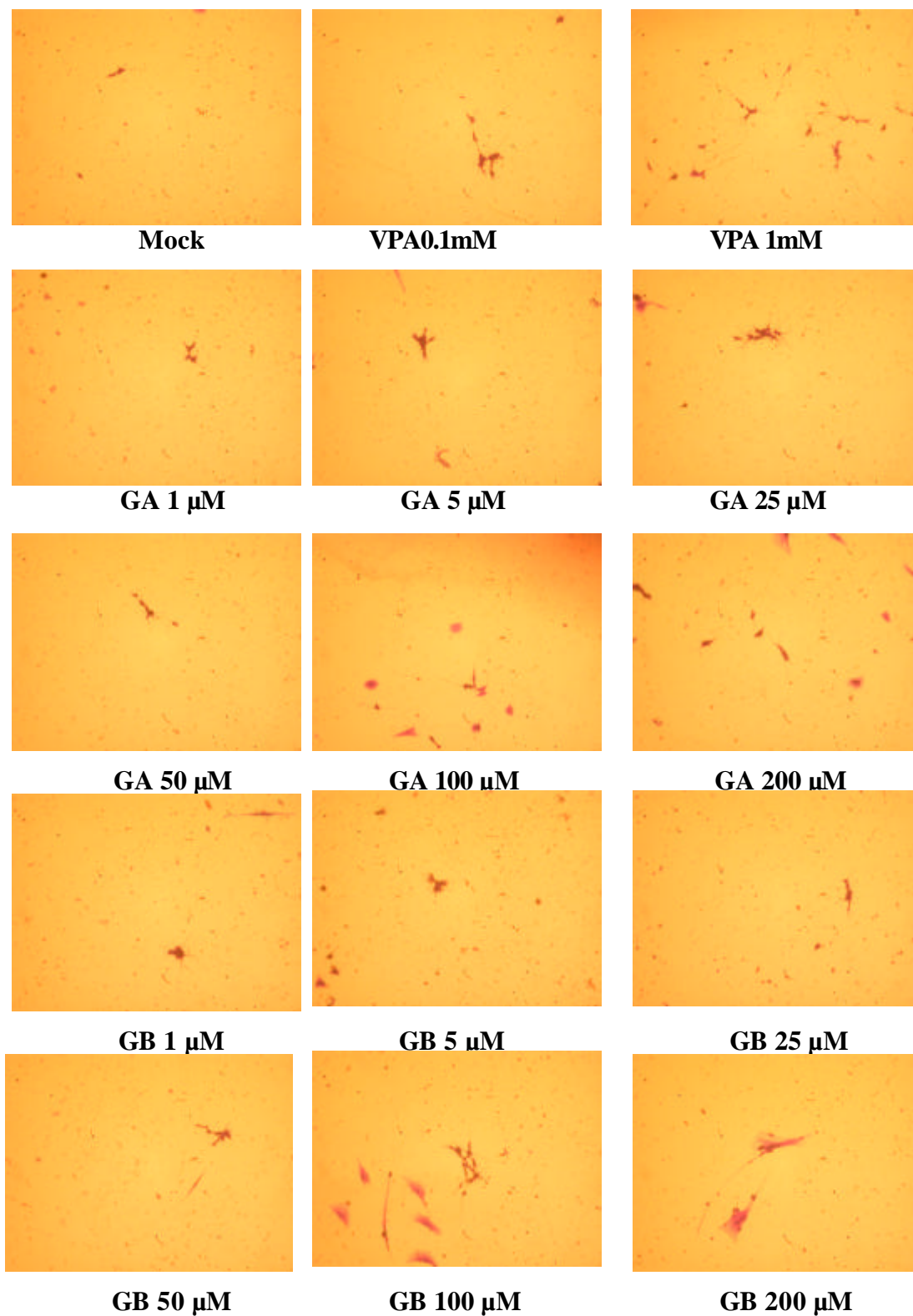


圖4.8 GA,GB,VPA各組不同濃度在0.5% GM 血清濃度培養
SH-SY5Y神經細胞在0.5% GM 血清濃度培養生長16天後以Nicon 995數位相機在焦距3.6,100倍視野下拍攝。

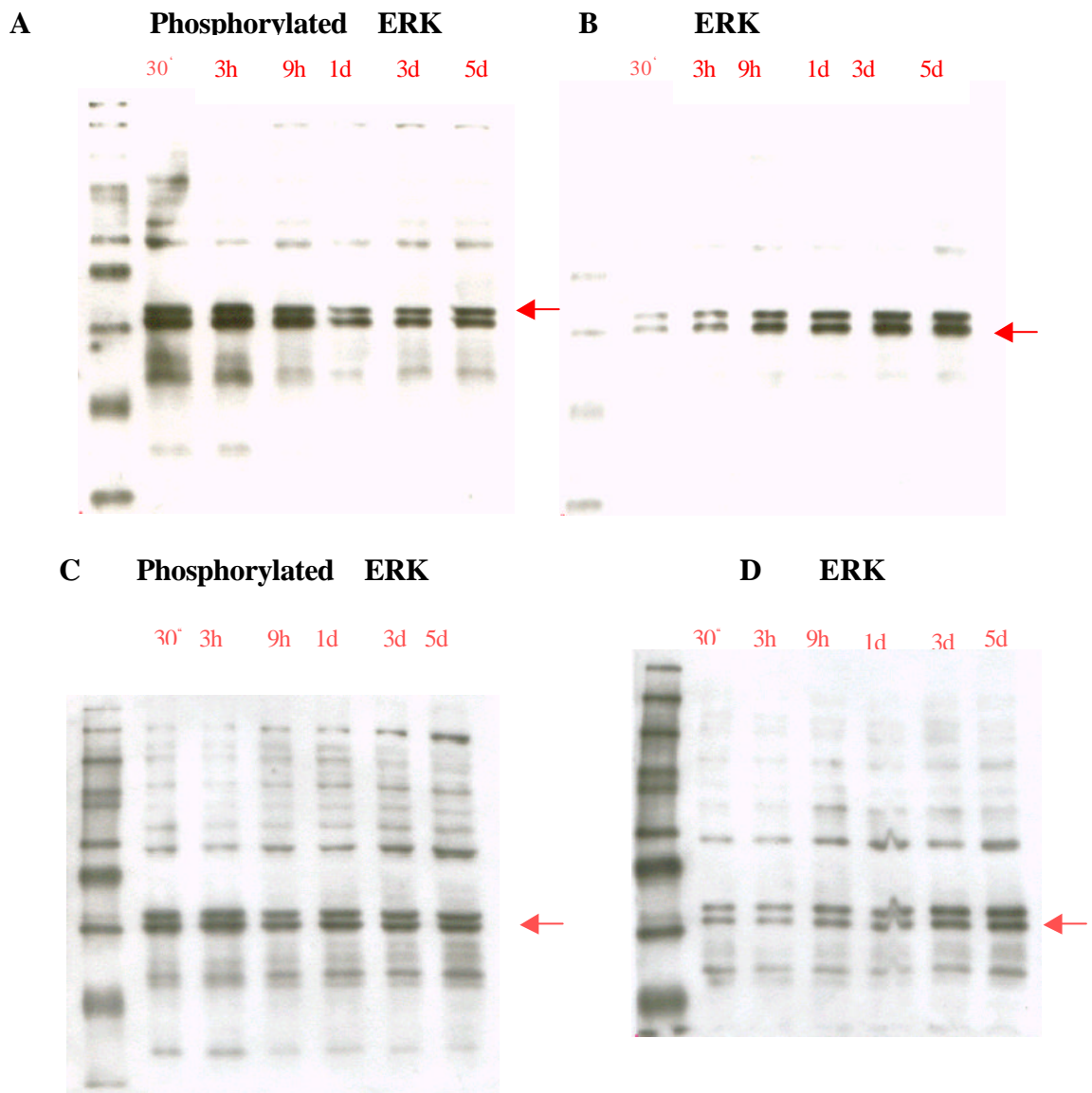
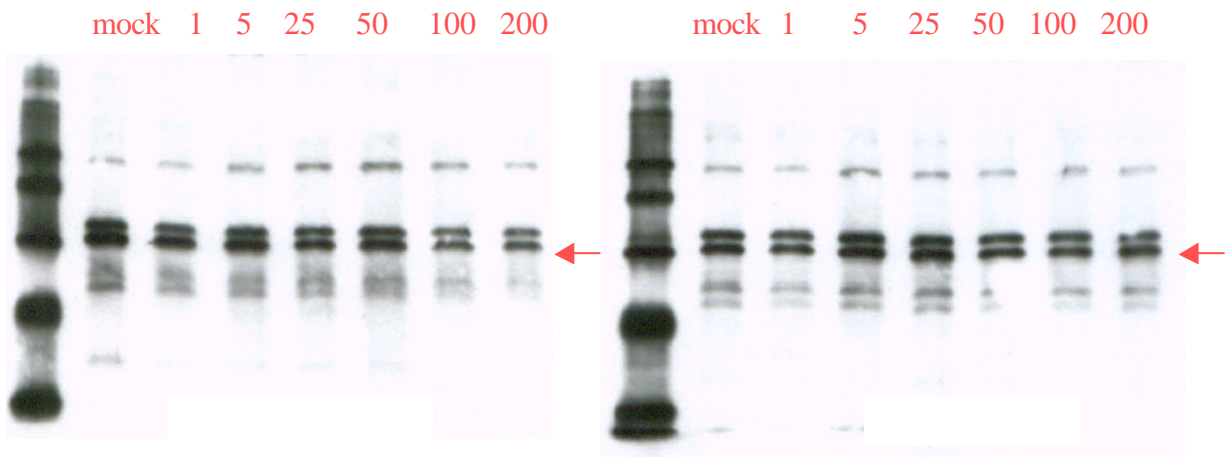


圖 4.9 VPA 在不同時間西方墨點法實驗結果

圖 A,B 分別為 VPA 在不同時間(30 mins, 3 hrs, 9 hrs, 1 day, 3 days, 5 days)之 ERK 磷酸化及 ERK 蛋白質活化情形(箭頭所指) , 其中 ERK 磷酸化在 30 分鐘時濃度有活化上升。

圖 C,D 分別為 Mock 組在不同時間(30 mins, 3 hrs, 9 hrs, 1 day, 3 days ,5 days)之 ERK 磷酸化及 ERK 蛋白質活化情形(箭頭所指) , 其中 ERK 磷酸化在 30 分鐘時濃度未有活化上升。



A Phosphorylated ERK

B ERK

圖 4.10 不同濃度 GB 在 30 分鐘西方墨點法實驗結果

圖 A,B 分別為含不同濃度 GB 在 30 分鐘時 ERK 磷酸化及 ERK 蛋白質活化情形(箭頭所指), 結果顯示未見明顯差異。

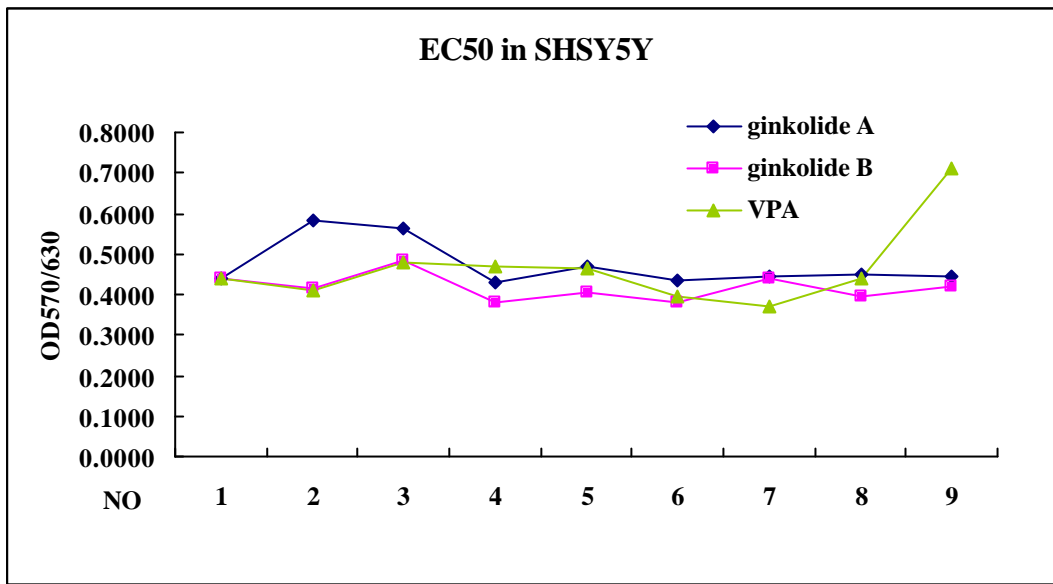


圖 4.11 不同劑量 VPA,GA,GB MTT 培養 48 小時之 SHSY5Y 活性圖

本圖是在波長 570nm 及參考波長 630nm 條件下所測定之吸光度 GA 組及 GB 組在 1-9 號樣品藥物濃度分別為 0, 0.2, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200 μM , VPA 組在 1-9 號樣品藥物濃度為 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 2, 4, 8, 10 mM

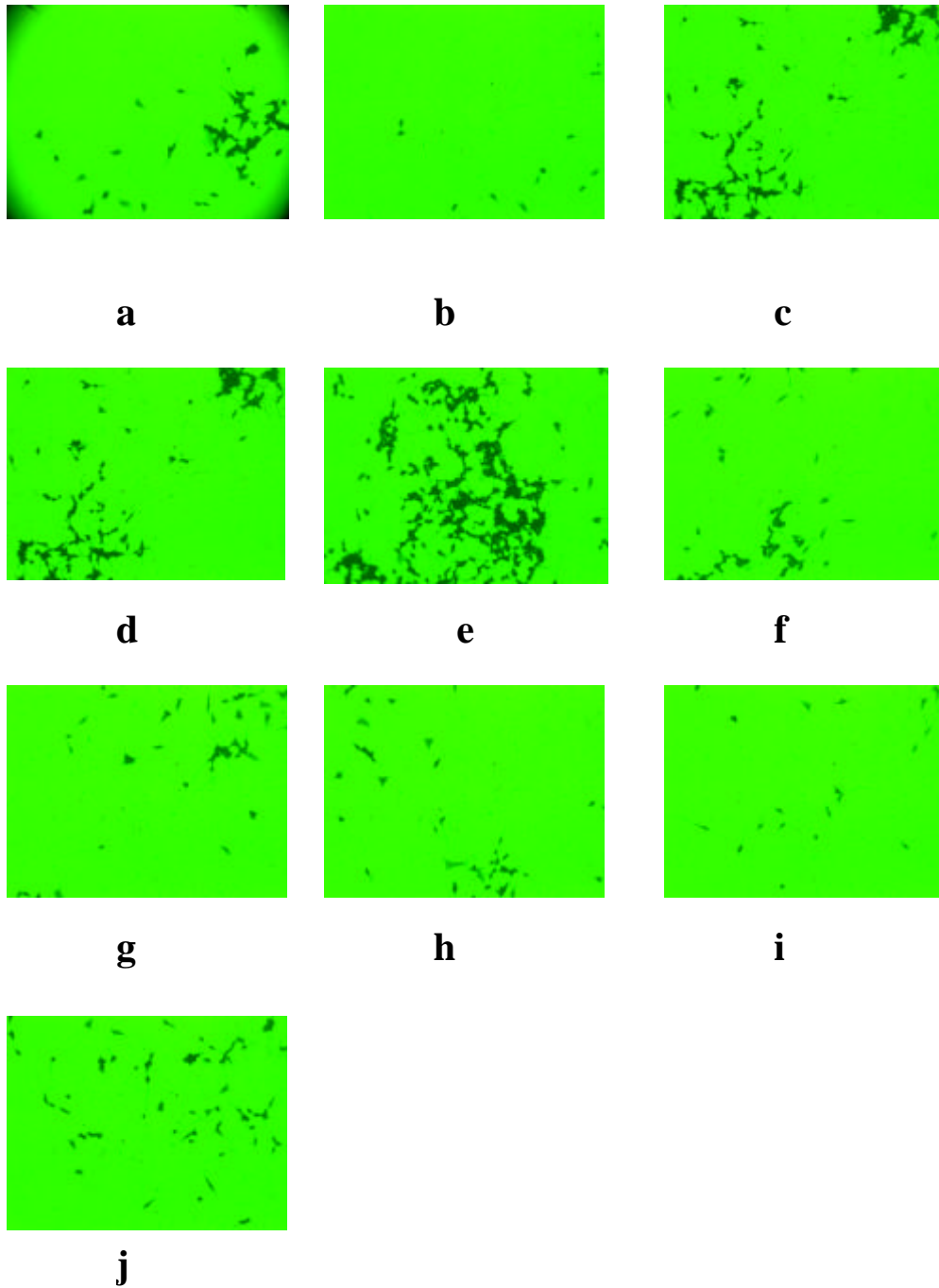


圖4.12 VPA 不同視野劑量分組 Mock 組

SH-SY5Y 細胞在含10%血清培養基條件下培養14天後，在亂數隨機選取的不同視野下，以Nicon 995數位相機在Nicon TS-100型顯微鏡100倍視野下拍攝之生長狀況。(此為不含VPA之MOCK組)，a-j分別為在視野30,43,80,95,10,04,06,96,38,27下所拍攝之照片。

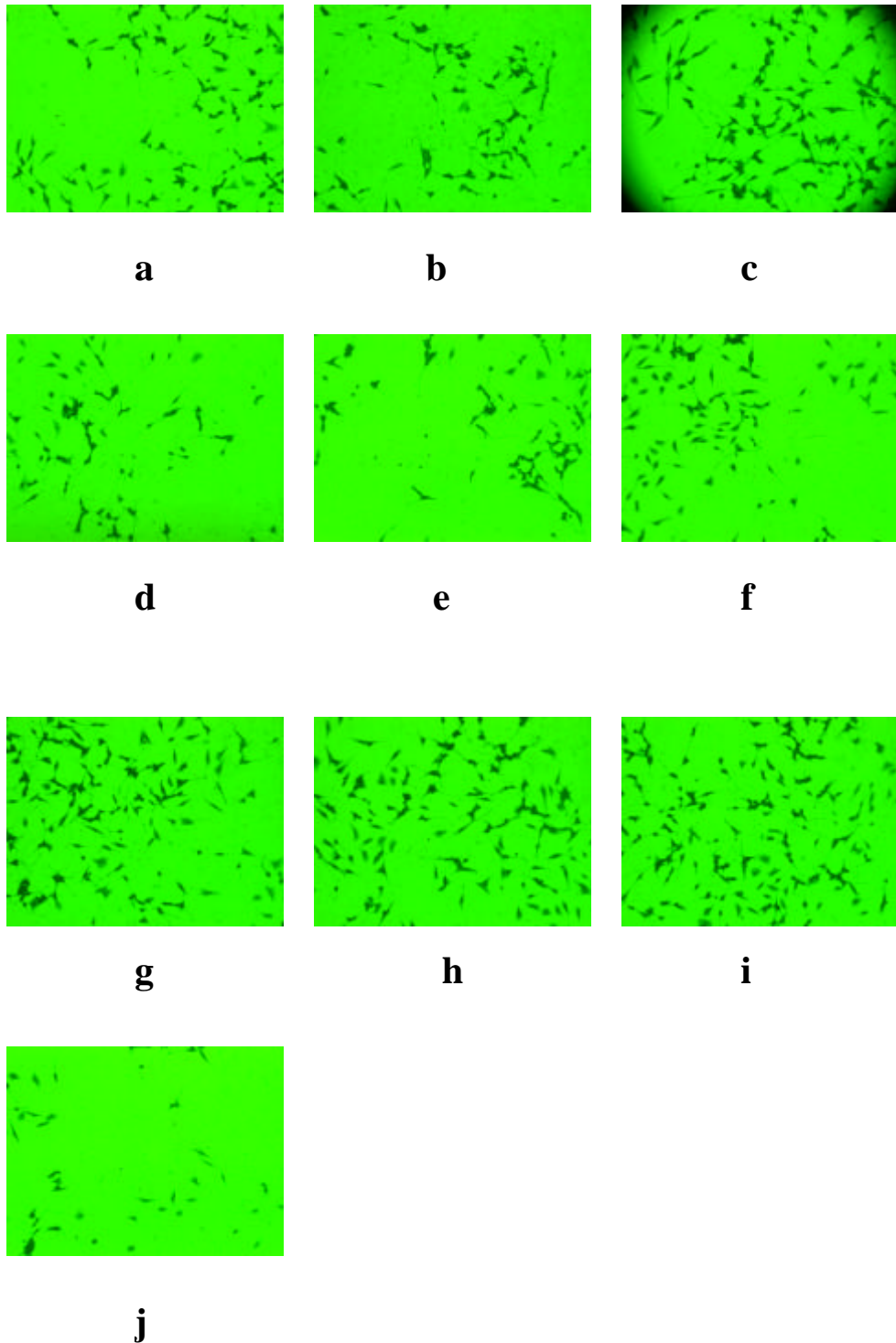


圖4.13 VPA 不同視野劑量分組 0.1mM VPA組
 SH-SY5Y 細胞在含10%血清培養基條件下培養14天後，在亂數隨機選取的不同視野下，以Nicon 995數位相機在Nicon TS-100型顯微鏡100倍視野下拍攝之生長狀況。(此為含VPA 0.1 mM組)，a-j分別為在視野30,43,80,95,10,04,06,96,38,27下所拍攝之照片。

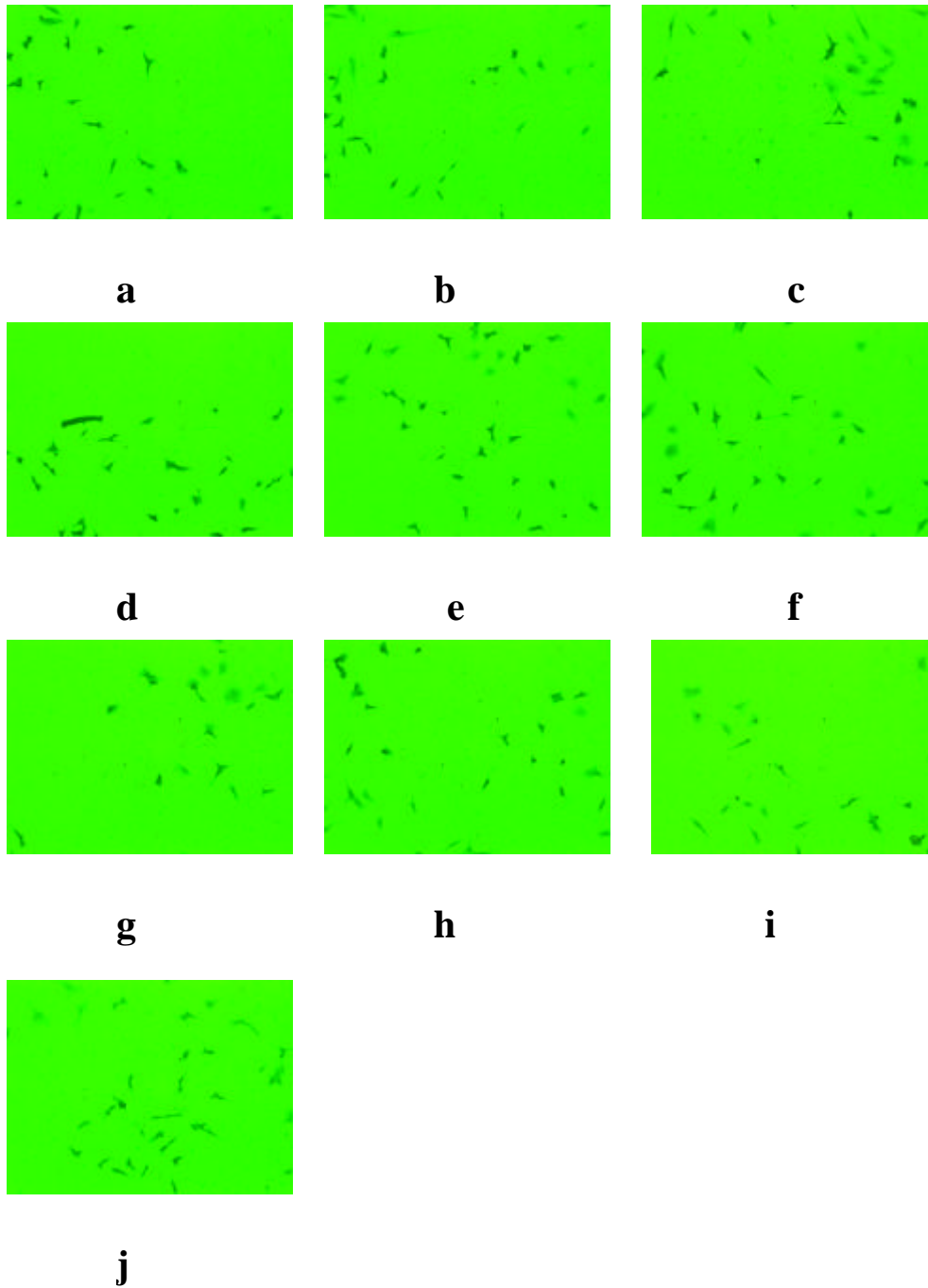


圖4.14 VPA 不同視野劑量分組 1 mM VPA組

SH-SY5Y 細胞在含10%血清培養基條件下培養14天後，在亂數隨機選取的不同視野下，以Nicon 995數位相機在Nicon TS-100型顯微鏡100倍視野下拍攝之生長狀況。(此為含VPA 1 mM組)，a-j分別為在視野30,43,80,95,10,04,06,96,38,27下所拍攝之照片。

表 4.1 SH-SY5Y 神經細胞在不同培養基視野突觸長度分析統計

視野	濃度	突觸長度	照片編號	濃度	突觸長度	照片編號	濃度	突觸長度
4	0	0.372624	4354	0.1	0.754540	4355	1	0.452152
4	0	0.397025	4354	0.1	0.846502	4355	1	0.474448
4	0	0.472023	4354	0.1	0.898686	4355	1	0.319932
6	0	1.076071	4357	0.1	0.717431	4358	1	0.435305
6	0	0.530115	4357	0.1	1.515663	4358	1	0.311023
6	0	0.695375	4357	0.1	0.911136	4358	1	0.210809
10	0	0.819664	4349	0.1	0.955142	4350	1	0.437730
10	0	0.821258	4349	0.1	1.147168	4350	1	0.488537
10	0	0.739381	4349	0.1	1.057677	4350	1	0.440300
27	0	0.542543	4366	0.1	0.705439	4367	1	0.234437
27	0	0.513792	4366	0.1	0.578113	4367	1	0.235418
27	0	0.424551	4366	0.1	0.689299	4367	1	0.184355
30	0	0.638783	4320	0.1	0.714829	4323	1	0.660292
30	0	0.751547	4320	0.1	0.848287	4323	1	0.365019
30	0	0.584247	4320	0.1	0.837483	4323	1	0.475173
38	0	0.554369	4363	0.1	0.754701	4364	1	0.754701
38	0	0.421127	4363	0.1	0.774361	4364	1	0.774361
38	0	0.159696	4363	0.1	0.773546	4364	1	0.773546
43	0	0.155682	4336	0.1	0.922538	4337	1	0.144977
43	0	0.253336	4336	0.1	0.877991	4337	1	0.132428
43	0	0.136882	4336	0.1	0.918200	4337	1	0.129278
80	0	0.699072	4342	0.1	1.150675	4341	1	0.313632
80	0	0.653619	4342	0.1	1.468223	4341	1	0.339596
80	0	0.642239	4342	0.1	1.698736	4341	1	0.136882
95	0	0.985984	4345	0.1	1.265550	4346	1	0.299728
95	0	0.608906	4345	0.1	0.927309	4346	1	0.228137
95	0	0.454969	4345	0.1	1.686760	4346	1	0.243346
96	0	0.702122	4360	0.1	0.995326	4361	1	0.325692
96	0	0.804505	4360	0.1	0.715668	4361	1	0.277405
96	0	0.746688	4360	0.1	0.774868	4361	1	0.222378
平均長度	0	0.578606		0.1	0.962728		1	0.360700

以Nicon 995相機在100倍視野下拍攝之圖4.1之上述各組照片分別選取各視野中最長的三段突觸，經Image pro plus 4.0影像分析軟體計算突觸長度後列表及統計

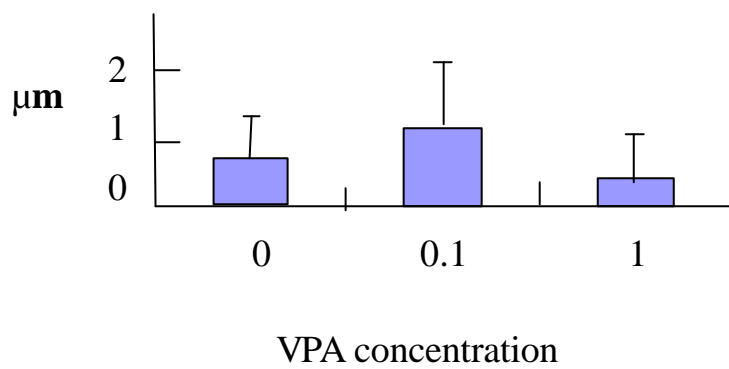


圖 4.15 SH-SY5Y 神經細胞在不同濃度 VPA 培養基視野突觸長度平均值統計圖
表 4.1 0,0.1 mM ,1.0 mM VPA 各組之突觸長度平均數值，以 Excel 統計軟體分析後作圖

第五章 討論

1. VPA 治療濃度為 50-150 $\mu\text{g/ml}$ (0.41-1.04 mM) (McElroy et al., 1995), 用在抗躁症的藥效試驗的濃度為 150 $\mu\text{g/ml}$ (1.041 mM) (Bowden et al., 1994), 1 mM 是最常使用在實驗時的濃度, 此與我們實驗時所用 VPA 的最佳濃度(1 mM)相同。
2. VPA 在血中濃度 200 $\mu\text{g/ml}$ (1.388 mM) 以上出現臨床毒性 (McElroy et al., 1995)。就細胞毒性來說, 我們在 MTT 細胞活性試驗中 10 mM 於短時間(48 hrs) 未發現有急性毒性, 此為細胞試驗與臨床試驗不同之處。
3. 在先前的報導指出: VPA 藉由活化上游 ERK 訊息傳導路徑調控活化 AP-1 及促進細胞生長分化(Yuan et al., 2001), 此與我們實驗中 VPA 組在西方墨點法中 30 分鐘時 ERK 的磷酸化有活化上升之結果相符。GB 組 30 分鐘時 ERK 的磷酸化未上升, 可能先透過其它路徑活化, 再關聯至此路徑。
4. 以 ERK 訊息傳導路徑阻斷劑 PD098059 可阻斷 ERK 訊息傳導路徑及 AP-1 活化 (Karin, 1995), 應可觀察到 SH-SY5Y 神經細胞生長分化抑制, 這是我們在進一步研究 ERK 訊息傳導路徑是否為共同路徑時可採用的方法。
5. 在評估神經細胞生長方面, 與神經細胞生長相關的蛋白 GAP-43 (growth cone association protein 43) 也是一個很常用且很好的指標 (Fu, 1997)。
6. 在測定神經細胞功能方面, 我們可以 $^3\text{H-NE}$ (norepinephrin) 測定 SH-SY5Y 分泌及回收 NE 的功能代表神經細胞功能(Yuan et al., 2001)。
7. 在觀察神經細胞突觸生長方面, 免疫組織染色法 (Immunocytochemistry) (Leventhal et al., 1997) 及免疫螢光法 (Immunofluorescence stain, FITC) (Wang et al., 1998) 都可考慮在進一步研究時採用。
8. 在細胞存活方面, 我們之所以採用 MTT 細胞活性試驗, 而不以細胞凋亡相關的 Bcl-2 生化指標代表。是因有些期刊指出, 引起細胞凋亡的 Bcl-2 生化指標

在神經細胞分化生長時亦有上升 (Merry and Korsmeyer, 1997) , 故僅採用 MTT 細胞活性試驗代表細胞存活。

9. 銀杏葉中的成份多半被定義為抗血栓的 PAF 抑制劑, 但 PAF 在長期記憶形成的長期增益效應(long term potentiation, LTP)過程中在中樞神經海馬迴中所扮演的角色為訊息傳導物質(Wieraszko et al.,1993) , 故 GB 與長期記憶形成的關係, 尚待進一步實驗探討。
10. 在給予不同劑量 VPA 提高重組細胞 SH-SY5Y/AP-1/Luc 產生冷光的量與神經細胞的生長成正相關, 證明 AP-1 的活化與神經細胞生長成正相關(Yuan,2001)。以往的研究發現, 投與 GB 可提高細胞 c-fos,c-jun 的量(Squinto et al.,1989) , 我們也可以測定其產生蛋白質 Fos,Jun 的量或藉由 SH-SY5Y/AP-1/Luc 重組細胞測定冷光強度, 驗證 GB 或其他促進神經細胞生長物質(neutrophic factors,NTFs)促進神經細胞生長是否皆藉由 AP-1 活化及與 AP-1 活化的相關性。
11. 銀杏葉在文獻中多半提到神經保護作用, 較少有文章針對促進神經細胞生長分再生進行研究, 故這是可以考慮開發的新用途及領域。

第六章 結論

1. 本論文所設定之定性與定量分析模式，均可廣泛運用於神經細胞生長促進劑之開發研究。本實驗所初步篩選之中藥可比照此方法進行進一步的篩選及開發研究。

2. 未來預期繼續之工作

單複方或電針各組選出可使細胞存活且高冷光反應的藥物方法者進一步進行動物動物記憶試驗(如走迷宮，雛雞實驗等)進一步求證及篩選。

3. 未來展望

此系統可用於尋找與神經生長因子 (NGF) 作用類似之藥物或治療 (如電磁效應) 以尋求及評估促進神經生長分化之各種治療方法 (圖 6.1, 6.2)。我們的實驗室目前擁有 500 餘種甲醇萃取之中藥庫(附錄二)，未來一年將擴充超過 500 種以上，利用以 SH-SY5Y/AP-1/LUC 重組細胞中 Luciferase 產生之冷光強度為 AP-1 活性指標作為神經細胞生長之測定標準，可以建立尋找及評估誘發神經細胞生長分化藥物的快速搜尋平台系統。未來經此系統分析有效的中醫藥療法可考慮進一步納入動物實驗或臨床實驗加以求證，可縮短減少開發流程時間及成本。

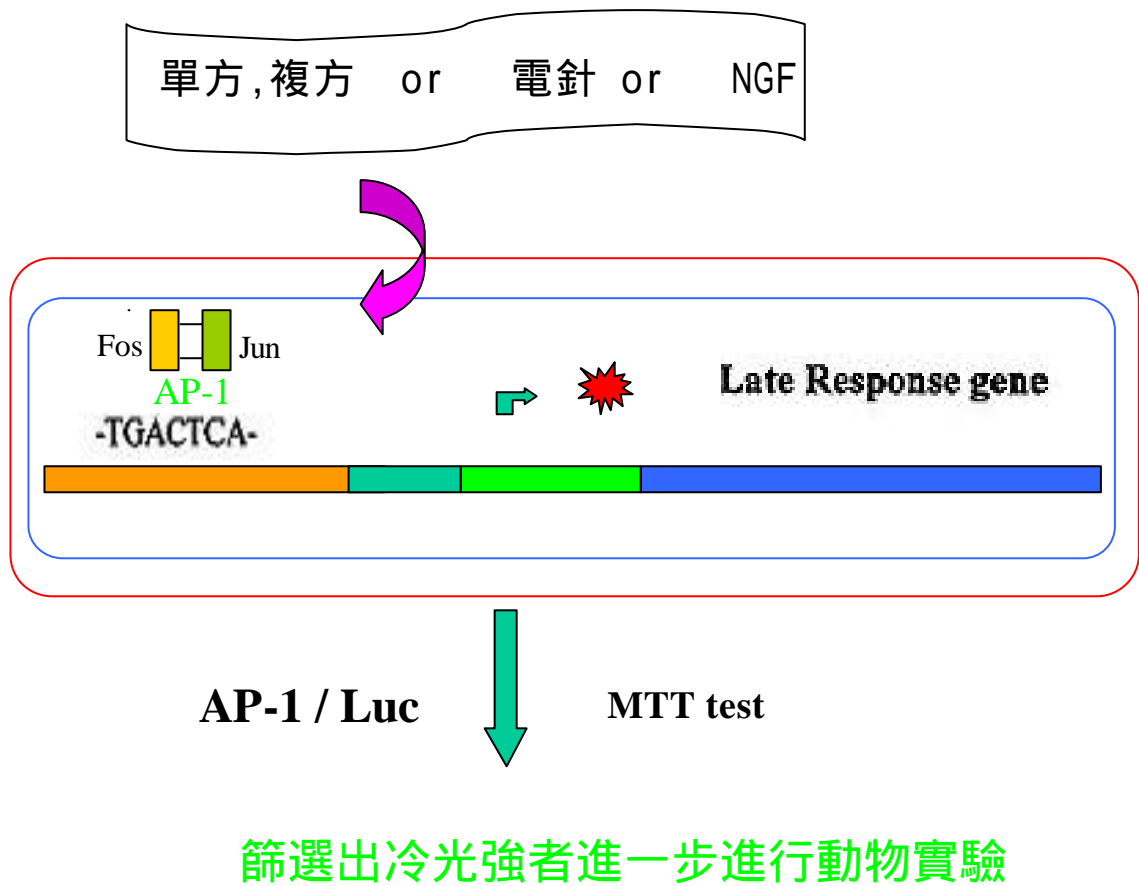


圖 6.1 未來實驗流程

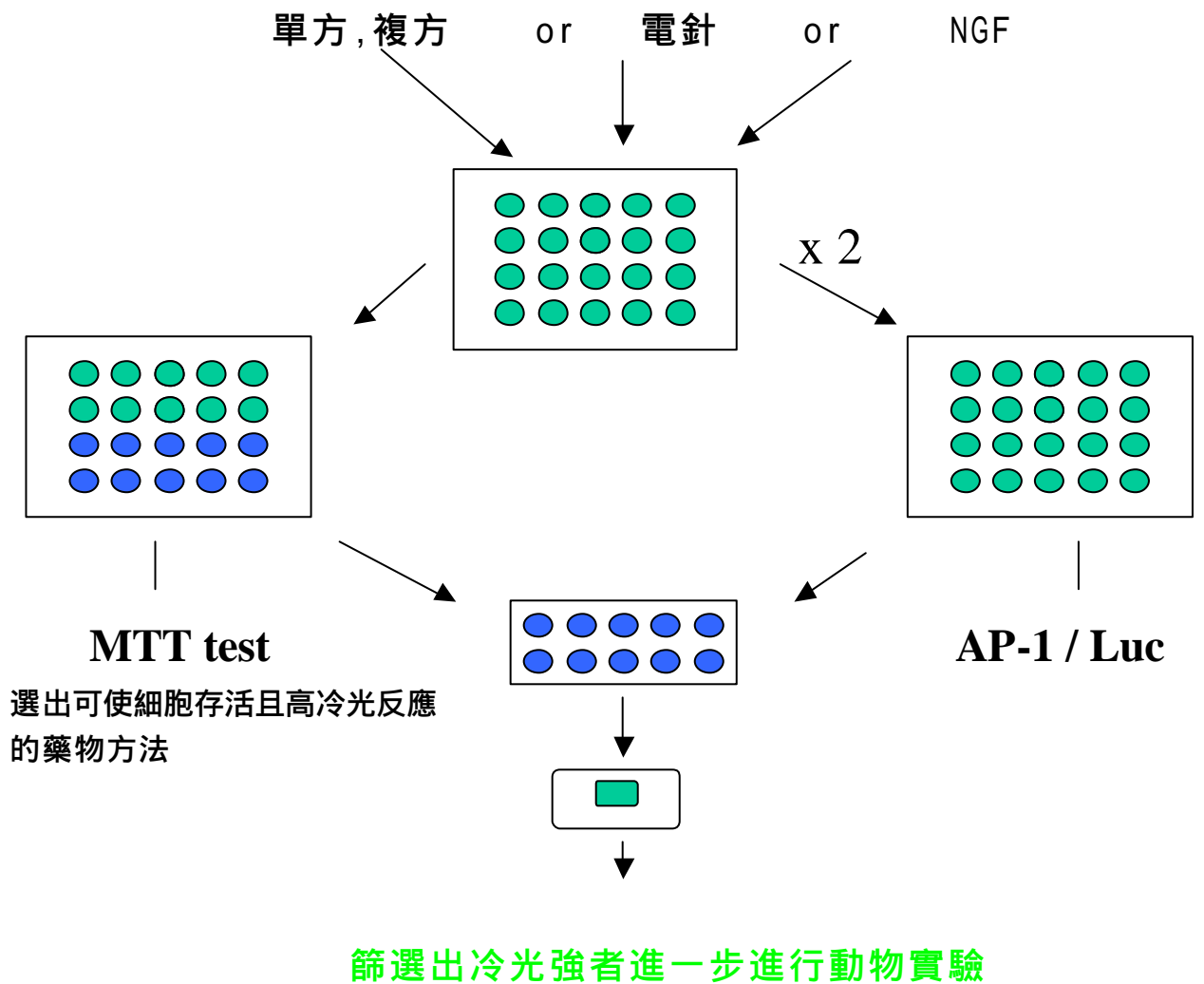


圖 6.2 未來實驗步驟

參考文獻

Angel, P., and Karin, M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* 1991;1072: 129-157.

Bowden, C.L., Brugger, A.M., Swann, A.C., Calabrese, J.R., Janicak, P.G, Petty, F., Dilsaver S.C., Davis, J.M., Rush, A.J., and Small, J.G, et al. Efficacy of divalproex vs lithium and placebo in the treatment of mania. *JAMA* 1994;271 (12):918-24.

Braquet, P., The ginkgolides: potent platelet-activating factor antagonists isolated from *Ginkgo biloba* L.: chemistry, pharmacology and clinical applications. *Drugs Future* 1987;12:643–699.

Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol.* 1997;14(1-2):67-116.

Herschman, H.R. Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu. Rev. Biochem.* 1991; 60: 281-319.

Iyer, V.R., Eisen, M.B., Ross, D.T., Schuler, G., Moore, T., Lee, J.C.F., Trent, J.M., Staudt, L.M., Hudson, J., Boguski, M.S., Lashkari, D., Shalon, D., Botstein, D., and Brown, P.O. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* 1999;283: 83-87.

Karin, M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol. Chem* 1995 ;270(28):16483-16486.

Kutcher LW, Beauman SR, Gruenstein EI, Kaetzel MA, Dedman JR. Nuclear CaMKII inhibits neuronal differentiation of PC12 cells without affecting MAPK or CREB activation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;284(6):1334-1345.

Lee, F.S., Kim, A.H., Khursigara, G., Chao, M.V. The uniqueness of being a neurotrophin receptor. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2001a;11:281-286.

Leppä,S., Saffrich, R., Ansorge,W.,and Bohmann,D. Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC12 cell differentiation EMBO J. 1998;17:4404–4413.

Leventhal, P.S., Shelden, E.A., Kim, B., and Feldman, E.L. Tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase during insulin-like growth factor-I-stimulated lamellipodial advance. J Biol Chem. 1997;272(8):5214-5218.

Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. Annu Rev Neurosci. 1996;19:289-317.

Lewis, T.S., Shapiro, P.S., and Ahn, N.G. Signal transduction through MAP kinase cascades. Adv. Cancer Res. 1998.;74: 49-139.

Maclennan KM, Darlington CL, Smith PF. The CNS effects of Ginkgo biloba extracts and ginkgolide B. Prog Neurobiol. 2002;67(3):235-57.

McElroy SL, Keck PE Jr, Friedman LM. Minimizing and managing antidepressant side effects. J Clin Psychiatry. 1995;56(2):49-55.

Merry DE, Korsmeyer SJ. Bcl-2 gene family in the nervous system. Annu Rev Neurosci. 1997;20:245-67.

Mu JS, Li WP, Yao ZB, Zhou XF. Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats. Brain Res. 1999; 835(2):259-65.

Pang, L., Sawada, T., Decker, S.J., and Saltiel, A.R. Inhibition of MAP kinase kinase blocks the differentiation of SH-SY5Y cells induced by nerve growth factor. J. Biol. Chem. 1995;270:13585 -13588.

Patapoutian, A., Reichardt, L.F.. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. Curr. Opin. Neurobiol. 2001;11: 272-280.

Platenik J, Kuramoto N, Yoneda Y. Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. Life Sci. 2000;67(4):335-64.

Rochelle L.S, Seung U.K Mitogen-activated protein kinase signalling in oligodendrocytes: a comparison of primary cultures and CG-4. Int. J. Devl Neuroscience 2001;19: 427–437.

Rose SP. How chicks make memories: the cellular cascade from c-fos to dendritic remodelling. Trends

Neurosci. 1991;14(9):390-7.

Rossner S, Ueberham U, Schliebs R, Perez-Polo JR, Bigl V. The regulation of amyloid precursor protein metabolism by cholinergic mechanisms and neurotrophin receptor signaling. *Prog Neurobiol.* 1998 ;56(5):541-69.

Segal RA, Greenberg ME. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci.* 1996;19:463-89.

Sommer C, Gass P, Kiessling M. Selective c-JUN expression in CA1 neurons of the gerbil hippocampus during and after acquisition of an ischemia-tolerant state. *Brain Pathol.* 1995;5(2):135-44.

Squinto SP, Block AL, Braquet P, Bazan NG. Platelet-activating factor stimulates a fos/jun/AP-1 transcriptional signaling system in human neuroblastoma cells. *J Neurosci Res.* 1989;24(4):558-66.

Van Beek TA. Chemical analysis of Ginkgo biloba leaves and extracts. *J Chromatogr A.* 2002;967(1):21-55.

Wang, K.K., Posmantur, R., Nath, R., McGinnis, K., Whitton, M., Talanian, R.V., Glantz, S.B., and Morrow, J.S. Simultaneous degradation of alphaII- and betaII-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells. *J Biol Chem.* 1998;273(35):22490-22497.

Wieraszko A, Li G, Kornecki E, Hogan MV, Ehrlich YH. Long-term potentiation in the hippocampus induced by platelet-activating factor. *Neuron.* 1993;10(3):553-7.

Yuan, P.X., Huang, L.D., Jiang, Y.M., Gutkind, J.S., Manji, H.K., and Chen, G. 2001 The mood stabilizer valproic acid activates mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth. *J Biol Chem.* 2001;276(34):31674-83.

附錄一 本實驗選用的藥物

1. 六十四種中藥篩選：

補氣補血：黃精、熟地、兔絲子、炙黃耆、補骨脂、北黃耆、黃耆、益智仁、黨參、杜仲、肉蓯蓉、懷牛膝、紅參、益母草、巴戟天、狗脊、阿膠、鎖陽、歸板、當歸、人參、仙茅、山藥、靈芝、斛寄生

行氣活血：雞血藤、當歸尾、劉寄奴、獨活、沒藥、秦艽、三七、威靈仙、骨碎補、一條根、乳香、貫眾、王不留行、莪朮、桃仁、澤蘭、川芎、三稜、水蛭

益智：益智仁、天麻、龍眼肉

安神：酸棗仁、鉤藤、合歡皮

其他：麻黃、黃芩、白芨、銀杏葉、炮附子、仙鶴草、續斷、全蝎、羌活

中藥成份：Baicalein, Baicalin, Formononetin, Ginkgolide A, Ginkgolide B

西藥：Valproic acid (VPA)

複方：加味道遙散

2. 二十六種黃酮類篩選：

Flavonols:

Quercetin Rutin Hyperin Kaempferol Morin Galangin
Silibinin 3-Hydroxyflavone

Flavones: Baicalein Baicalin Chrysin Luteolin Apigenin Flavone

Flavanols: (+)-Catechin (-)-Epicatechin

Flavanones: Hesperetin Hesperidin Eriocitrin Naringenin Naringin

Isoflavones: Gentisin Puerarin Formononetin

Ginkgoflavones: Ginkgolide A, Ginkgolide B

附錄二 本實驗室目前收集的中藥庫的收集

一支香、一條根、乙香(鬱金)丁香、丁力子、丁豎朽、人參、九層塔千里光、千年健、三稜、三七、川芎、川烏、川棟子、土茯苓、小茴香、小金櫻、大棗、大黃、大丁廣、大小薊、大金櫻、大風草、大風藤、大腹皮、大青葉、山藥、山查、山豆根、山茱萸、女貞子、水丁香、牛蒡子、牛膝、木瓜、木通、木香、木賊草、化石草、升麻、不留行、天麻、天仙藤、天仙茅、天南星、天門冬、火麻仁、丹參、內金、五味子、五加皮、五靈脂、五倍子、巴戟天、玄參(元參)、白花蛇舌草、白芫、白朮、白芷、白前、白果、白豆蔻、白花草、白花蓮、白介子、白扁豆、白頭翁、白殭蠶、白鮮皮、白椿皮、白椿根、白蘘、白薇、白茅根、白雞冠花、石膏、石斛、石榴皮、石決明、北沙參、冬瓜子、冬葵子、仙鶴草、代赭石、生薑、生地黃、半枝蓮、半夏、甘草、玉竹、百合、百部、艾葉、艾頭、竹茹、全蠍、合歡皮、地榆、地龍、地骨皮、地膚子、血竭、肉豆根、肉豆蔻、肉蓯蓉、自然銅、燈心草、旱蓮草、芒硝、谷芽、谷精、皂刺、決明子、何首烏、車前草、車前子、杏仁、牡蠣、牡丹皮、良薑、辛夷、沒藥、沈香、赤芍、赤苓、赤小豆、赤藥、防風、貝母、沙苑子、忍冬、杜仲、吳茱萸、佛手、板藍根、知母、延胡索(元胡)、定經草、芡實、阿膠、乳香、青箱子、青皮、青蒿、佩蘭、使君子、夜交藤、金蟬、金錢草、金銀花、松節、狗脊、枇杷葉、昆布、羌活、虎杖、刺五加、扁柏、栝樓仁、栝樓實、栝樓根、栝樓皮、威靈仙、炮附子、香薷、香附子、柴胡、前胡、苦參根、苦參子、砂仁、紅花、紅骨蛇、紅薊蔥、厚朴、胖大海、故紙花、柏子仁、枸杞子、枸杞根、胡麻仁、胡桃、郁李仁、柿蒂、枳實、枳殼、枳椇子、草果、草豆蔻、荔枝核、神麴、骨碎補、射干、烏梅、烏甜、烏藥、倒地蜈蚣、馬勃、馬兜鈴、馬蹄金、馬鞭草、降真香、茯神、茯苓、茵陳、荊芥、桔梗、桂枝、桂皮、桃仁、夏枯草、桑葉、桑枝、桑白皮、桑螵蛸、秦艽、秦皮、茜草、海藻、海蛤粉、海螵蛸、益智仁、益母草、穿山龍、菴蔚子、浮海石、浮小麥、淫羊藿、蛇床子、常山、通草、牽牛子、釣藤鉤、連翹、乾薑、敗醬草、魚腥草、旋覆花、淡竹葉、淡豆豉、麥芽、麥門冬、莪朮、陳皮、麻黃、麻黃根、烏不宿、細辛、梔子、菖蒲、貫眾、黃柏、黃連、黃耆、黃精、黃水茄、桑寄生(黃寄生)、黃金桂、黃芩、萊菔子、絲瓜絡、紫草、紫苑、紫河車、紫蘇葉、紫蘇梗、紫花地丁、訶子、番瀉葉、番麥鬚、無名異、菊花、補骨脂、筆仔草、款冬花、絞股藍、菜子、粳米、菟絲子、葶藶、萬點金、滑石、當歸(川)、當歸(尾)、葛根、蔥白、楮實子、路路通、篇蓄、遠志、豨薟草、鳳尾草、蒼朮、蒼耳子、曼陀羅花、漢防己、蒲黃、蒲公英、蒺藜、漏蘆、槐花、酸棗仁(川)、蒙花、蓮葉(荷葉)、蓮子、蓮子心、蓮鬚、蔓荊子、劉寄奴、蕤仁、熟地黃、豬苓、豬膽、澤蘭、澤瀉、獨活、橘紅、橘核、蕎麥、薏苡仁、檀香、龍骨、龍眼花、龍膽草、薤白(久白)、薄荷葉、薑黃、瞿麥、鎖陽、覆盆子、龜板、檳榔、鵝不食草(石湖荑)、藕節、蘇子、蘇木、黨參、蘆根、藿香、雞香藤、雞血藤、雞骨草、續斷(六汗)、鱉甲等 500 餘種。

Study on the Molecular Mechanism of the Chinese Medicinal Herbs in the Promotion of Neurite Growth

Chang-Hsien Lee

Major professor: Jaung-Geng Lin

Institute of Chinese Medical Science, China Medical college
Taichung, Taiwan, ROC

Background and Goal

We began to observe the human neuroblasma cell (SH-SY5Y) in this experiment, and used a drug (Valproic acid) to be a positive control group. Valproic acid (VPA) is a proofed stimulate substance to improve nerve growthing in magazine. We want to build a experiment model to develop and find new neutrophic factors (NTFs,a substance which can promote nerve growth) soon.

Material and Method

SH-SY5Y cell is a human neuroblasma cell which possess many nerve properties to be a nerve cell model . SH-SY5Y cell is good used to be a nerve growth model to invest NGF (nerve growth factor) or other NTFs .

In this experiment ,we used sixty-four species of Chinese herb extracts

to select best twenty NTFs . In the best twenty NTFs ,we find some flavon ingredients from Chinese herbs have good effect in prompting nerve growth.

We followed to select twenty-six common flavon ingredients in advance experiment. The best three ingredients are Rutin, Hyperin, Gingkgolid B (GB). GB has especially effect to prompt SH-SY5Y cell growth among this three ingredients,so we select Gingkgolid B in following experiment.

We added Gingkgolid A, B and VPA individually in a different dose growth medium to SH-SY5Y cell and observe the cell activity by MTT assay test.

In quantitative measurement experiment, we import the digital camera photos into computer to calculate the SH-SY5Y cell axon lengths in different petri dish and analysis by Image-pro Lite software.

NGF is the first found and known substance as a NTFs . Many scholars indicate it prompt nerve growth through ERK and AP-1 pathway. AP-1 is a early immediate response protein to regulate the gene activity to control cell differentiation and proliferation. We investigate GB molecule mechanism by western blot electrophoresis method to explore GB prompt nerve growth by AP-1 pathway or other pathway.

Result

1. Both GA and GB are the substance to prompt nerve growth.

2. In western blot electrophoresis method , we find:
 - <1>In VPA group (positive control group), ERK~P increase in 30 mins .
The result is same to the experiment result in previous papers .
 - <2> In GB group (experiment group), ERK~P does not increase in 30 mins .
It decrease graduate. It is possible, GB prompt nerve growth by active other pathway substance first, and ERK~p is involved secondly.

3. The MTT assay result show: GA, GB and VPA do not possess acute poison (in 48 hours).

Conclusion

First, we can use the qualitative and quantitative measurement experiment method to elevates the neutrophil effect of new NTFs widely. Secondly, we can invest the best twenty herbs which we screen from sixty-four Chinese herbs and ingredients by the same method. In the future, we can confirm the neutrophil effect by animal or clinical experiment in advance in the future.

誌謝

感謝指導教授林昭庚老師及共同指導教授侯庭鏞老師在實驗上及生活上對我的關懷付出，讓我不只在實驗上受益良多，瞭解到在面對實驗時所應秉持的態度和精神，也在生活上感受到兩位老師的親切關懷及照拂。並感謝口試委員黃蘭如老師對本論文辛勞審查，給予我非常多的寶貴意見及指正，使此論文得以更為完善。

高尚德所長、張永賢副院長、謝慶良副院長、謝明村校長、吳啟瑞老師、張芳嘉老師、陳悅生老師、江素瑛老師、李采娟老師、項千芸老師、林文聰老師、許清祥博士及校內各老師的關懷指導，使我受益匪淺。

研究期間並受到賴羿如學姐、劉旭然學長、鄭欣怡同學、吳宏乾學長、魏以斌醫師、陳昱辰醫師、何永鑽醫師、趙德澂醫師、彭彥鈞醫師、王家男同學、林慶鐘主任、陳延年主任、黃上邦醫師、李恩錫醫師、蔡文演醫師、余鳳慧醫師、張仲達醫師、嘉穗學妹、欣裕學弟、佳橙學弟、暖螢學妹在實驗工作上的協助與生活上的關心。以及同窗好友劉倩如、程錦宜、蔡宏銘、林伯欣、林志堅、李育臣、及中醫所周美惠助教、葉如芳助教、針灸研究室助理楊佩琪小姐等人在這兩年的指導及幫忙。

最後要感謝我的父母、家人和內子攸真，由於他們的鼓勵及辛苦劬勞與支持使得學業得以順利進行，願將一切結果及喜悅與他們分享。