

# 第一章 緒論

健忘(amnesia)是癡呆症主要臨床症狀之一，與學習記憶能力有密切的關係。現今已開發之智能增進劑有 cholinergic agents 如 tacrine, nootropics 如 piracetam<sup>(1)</sup>。至於自中藥開發之智能增進劑如 huperizine A 及本所十年來探討約二十種中藥及其方劑，如天麻、當歸、地黃、六味地黃丸等具改善學習記憶障礙之作用<sup>(2)</sup>。

中醫對於「衰老」理論主要在於「腎衰」、「氣衰」及「血瘀痰瘀」，因此防治「衰老」多以溫腎壯陽中藥為主，其次為滋腎養陰，活血化瘀類<sup>(3)</sup>。蛇床子為繖形科植物蛇床(*Cnidium monnieri*(L.)CUSSON)之乾燥成熟果實，始著錄於神農本草經上品，主溫腎壯陽，女子帶下陰癢，子宮寒冷不孕等功效；現代藥理研究證實蛇床子具有雌性激素樣、抗氧化及抗老化等作用，且於1997年之研究蛇床子成分蛇床子素對於氫化可體松(hydrocortisone)誘發的腎陽虛大鼠之學習障礙具改善作用<sup>(4)</sup>。

根據流行病學之研究，癡呆症之罹患率以女性居多，女性每十萬人約有28人罹患癡呆症，而男性每十萬人約有16人罹患癡呆症<sup>(5)</sup>。且於近期研究指出，在動物學習模式中，有性別操作之差異，其原因可能是 testosterone 及 estradiol 與 hippocampal formation 有關係<sup>(6)</sup>；另一方面，estrogen 具有增強智能及改善智

能障礙之作用，且可用於預防或治療老年癡呆症或 Alzheimer's disease，並對停經後婦女之智能有所助益<sup>(7)</sup>。因此，本論文之目的：擬探討蛇床子及其成分蛇床子素對卵巢去除雌性大鼠在動物學習模式學習操作能力之作用。

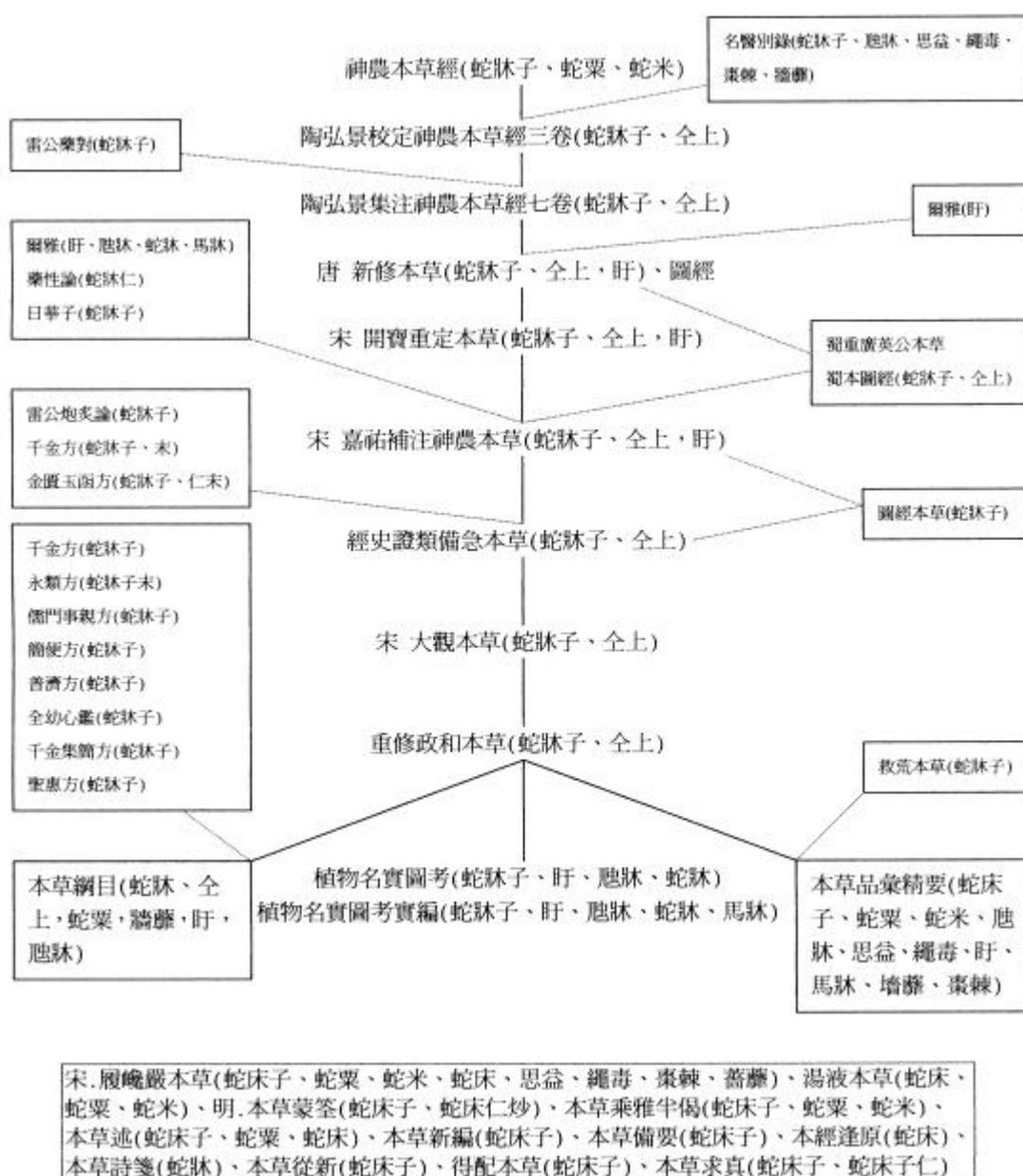
而智能增進劑之開發，應於各類學習模式，如：被動迴避學習反應(passive avoidance learning)及水迷宮(water maze)等；均應具增強或改善作用。因此，本論文之另一目的，擬探討蛇床子及其成分蛇床子素(osthole)對被動迴避學習反應、水迷宮等動物學習模式之智能增進作用。另一方面，神經傳遞物質對於學習記憶扮演重要之角色，scopolamine(SCOP)為乙醯膽鹼 acetylcholine muscarinic receptor 拮抗劑，能影響學習獲得及短期記憶，其作用機轉與週邊及中樞神經系統有關。且 nootropics 類藥物(piracetam)，智能增進作用之機轉，認為其作用可能經由影響腎上腺機能，使體內之 glucose 利用率增加，腦內血糖濃度增加，因而增加腦內能量之供給，活化腦內神經系統<sup>(8)</sup>。而中藥蛇床子為溫腎壯陽、滋陰補腎藥，因此，本研究更進一步探討蛇床子及其成分蛇床子素增強動物學習模式學習操作與腎上腺機能之關係；及其改善學習記憶之作用機轉與週邊及中樞神經系統之相關性。

# 第二章 總論

## 第一節 蛇床子之本草及其文獻考察

### 一、蛇床子之本草考察

#### 1. 蛇床子之本草系統圖



## 2. 藥名之考訂

蛇 子之名，首先著錄於神農本草經<sup>(9)</sup>之本經上品，以降諸家本草如別錄<sup>(10)</sup>、新修<sup>(11)</sup>、開寶<sup>(12)</sup>、嘉祐<sup>(13)</sup>、圖經<sup>(14)</sup>、證類<sup>(15)</sup>及重修政和<sup>(16)</sup>等皆因襲之。更早之古籍爾雅除以盱為正名外，復以蛇 為別名，迄本草綱目則沿用蛇 原植物之名為正名<sup>(17)</sup>。俗書作床，與麻相近，各本誤作麻，今訂正。可知蛇 子，即蛇床子，二物正名相通，而蛇 、蛇床亦同，以蛇床為原植物之正名者，尚有湯液本草、本經逢源等二書，由此可知，蛇 、蛇床為植物名，蛇 子、蛇床子為藥材名。

至於蛇 、蛇床之名義，於明本草綱目釋名時珍曰：蛇 喜臥于下，食其子，故有蛇 、蛇粟諸名。其葉似蘼蕪，故曰牆蘼。爾雅云：盱，虺 也。皆通述其名義與別名乎。

至於蛇 子之別名，本經曰：一名蛇粟，一名蛇米。名醫別錄增衍曰：一名虺 ，一名思益，一名繩毒，一名棗棘，一名牆蘼。爾後歷代諸家本草如陶弘景校定及集注本草經、新修、蜀本、嘉祐、大觀、重修政和、嶼巖本草、救荒本草、本草品彙精要及本草綱目皆沿用著錄上述別名；迄新修本草注引爾雅：一名盱，而後開寶、蜀本、嘉祐、証類、品彙精要、綱目、圖考及長編，亦並錄盱為別名；嘉祐後引爾雅注盱，一名虺 、蛇 、馬 ，並見馬 別名；復因所引諸書與方劑，有用子、仁、末、仁末、子末、子仁或仁炒等不同之敘述供藥用，明指其子實，去種皮之仁，或子、仁等研末及炒用，或因種子貌小如粟米而有蛇粟、蛇米，或因蛇喜臥其下食其子，而有蛇 子、蛇床子、思益等別名。牆蘼別名，乃指田野墟落間或牆壁間甚多，花葉正似蘼蕪。馬

別名，乃其形於每枝上有花頭，百餘結同一窠，似馬芹類。復於長編引廣雅疏證：粟，也，此與蛇字俗書相近；御覽引吳普本草云：一名蛇珠；山居賦：蛇實為九實之一，即也，其義皆通，誠如粟米、珠，即小實也。詳蛇子之本草系統圖可知其藥名之記述情形。

據文獻並綜如上述，蛇子、蛇床子之名稱，歷代諸家本草概指其子實供藥用，皆以蛇、蛇床為植物名，蛇子、蛇床子為藥材名，乃蛇喜臥其下食其子，因而得名。至於其別名，有蛇粟、蛇米、虺、思益、繩毒、棗棘、牆靡、盱、馬、蛇仁、蛇末、蛇仁末、蛇子末、粟、，皆因形狀象形，文字古今寫法，義含用辭、用部、方用炒製及其對蟲害毒性之義等之會意名辭或功用之意義名詞矣！

### 3. 型態、產地、藥用部位之考訂

本經、別錄未載蛇子之形態，陶注始論蛇子云：近道田野墟落間甚多，花葉正似蘼蕪。至嘉祐謹案蜀本圖經云：似小葉芎藭，花白，子如黍，粒黃白色，生下濕地，今所在皆有，出揚州、襄州者良，採子暴乾。此蜀本圖經乃新修實施全國生藥大普查時之圖經，明指該植物似小葉芎藭，同陶注花葉正似蘼蕪，可知蛇子為繖形科植物，花白，子如黍，粒黃白，為繖形花序。至圖經本草援引別錄、陶注及蜀本圖經之產地云：蛇子生臨淄川谷及田野，今處處有之，而揚州、襄州者勝。三月生苗，高三、四尺，葉青翠，作叢似蒿枝，每枝上有花頭，百餘結同一窠，似馬芹類，四、五月開白花，仁似散水，子黃褐色，如黍米至輕虛，

五月採實，陰乾。爾後救荒本草及本草蒙筌傳承別錄、圖經本草等之文，救荒曰：蛇床子，生臨淄川谷田野，今處處有之。苗高一、二尺，青碎作叢似蒿枝，葉似黃葉。又似小葉蘼蕪，又似本葉。每枝上有花頭百餘，結同一窠，開白花如傘蓋狀，結子米黍大，黃褐色。救飢：採嫩苗葉焯熟，水浸淘洗淨，油鹽調食。蒙筌云：在處田野俱產，揚州、襄州獨勝。春生苗，葉成叢，青翠彷彿蒿狀。開白花細綴百餘一窠，四、五月間開。結黃子輕虛粒如黍米。近秋採收，背日陰乾。

本草品彙精要分項敘述曰：時生，三月生苗；採，五月取實。收陰乾。用子。質類蒔蘿而細。色黃褐。迄本草綱目〔集解〕時珍曰：其花如碎米攢簇，其子兩片合成，似蒔蘿子而細，亦有細稜。凡花實似蛇床者，當歸、芎藭、水芹、本、胡蘿蔔是也。至本草乘雅半偈覆曰：生臨淄川谷，及田野墟落間。三月生苗，高二、三尺，葉似蘼蕪，枝上有花頭百餘，同結一窠。四月放花白色，結子攢簇，兩片合成，極輕虛，似蒔蘿子，亦有細稜。至本草述更綜述曰：蛇子，又名蛇粟，因蛇虺喜臥其下，食其子，故有此名。生下溼地，所在皆有，三月生苗，高二、三尺，葉青翠，作叢似蒿枝，每枝上有花頭百餘，結成一窠，四、五月乃開白花，其子黃褐色，兩片合成，至輕虛，似蒔蘿子而細，亦有細稜，凡花實似蛇床者，當歸、芎藭、水芹、本、胡蘿蔔是也。迄本草備要及本草從新則曰：似小茴而細。至植物名實圖考引救荒本草之形態，復引淮南汜論訓云：夫亂人者，芎藭之與本也，蛇之與蘼蕪也，此皆相似。說林訓云：蛇似蘼蕪而不能芳。故實際植物外形相似，質地芳香實有所差異矣！

關於蛇 子之產地，別錄曰：生臨淄川谷及田野。臨淄川谷即臨淄縣治區，為齊郡治，并為青州治，故治在今江蘇省六合縣東南。蜀本圖經曰：揚州、襄州者良或勝或稱獨勝，揚州仍古九州之一，唐改曰昇州，尋復曰揚州，又改為廣陵郡，在今江蘇省邗縣及江都縣治。襄州者，乃唐之襄陽郡，故治乃今湖北省襄陽縣<sup>(18)</sup>。

綜觀蛇 子之產地，並參考圖經、嶮巖本草、大觀、重修政和、品彙精要、救荒本草、綱目及圖考等之各種藥圖，由其苗、葉、枝、花白、子如黍，兩片合成，花頭如傘蓋狀，似小葉芎藭，蒔蘿、當歸、水芹……等之形態，可推定為雙懸果 Umbelliferae(繖形科)*Cnidium*(芎藭屬)植物無疑。並得以確知蛇 子之品種雖單一，但其類似代用植物為數不少，其藥材之偽品或代用品有多種。其產地古以臨淄、揚州、襄州為道地，然喜生於山坡溼地草叢中，或田間、路旁、處處可見，廣佈中國大部分地區。主產河北、山東、江蘇、浙江等地，此外廣西、四川、陝西、山西亦產。

#### 4. 性味、藥能之考訂

本經曰：「蛇 子。味苦、辛、甘，平。主婦人陰中腫痛，男子陰痿濕癢，除痺氣，利關節，癩癧，惡瘡，久服輕身。」而別錄曰：「蛇 子。無毒。溫中下氣，令婦人子藏熱，男子陰強，好顏色，令人有子。」兩者性能，相輔相成，自漢唐迄宋初期，未見增益其功能，至嘉祐除引本經、別錄、陶注、唐本草原文外，並引藥性論云：「蛇 仁，君，有小毒。治男子女人虛，濕痺，毒 痛，去男子腰疼，浴男女陰，去風冷，大益陽事，主大風身

癢，煎湯浴之差，療齒痛及小兒驚癇。」復引日華子云：「治暴冷，煖丈夫陽氣，助女人陰氣，撲損瘀血，腰跨疼，陰行濕癬，四肢頑痺，赤白帶下，縮小便，凡合藥服食，即掇去皮殼，取仁微炒殺毒，即不辣，作湯洗病，則生用之。」二書亦修飾其溫腎助陽，祛風，燥濕，殺蟲及強陰，赤白帶下，疥癬濕瘡等相當於今日念珠球菌病況，並首論有小毒，生用可做湯洗浴之效。

至南宋 王介之履巉巖本草載錄本經之功及別名，迄金元 王好古之湯液本草合錄本經及別錄之文，更無新增療效，大抵皆從古說之為用。於本草品彙精要云：「性平、散。氣厚於味，陽中之陰。味臭。主除風益陽。合治合豬脂，治小兒癬瘡。」於本草蒙筌云：「治婦人陰戶腫疼，溫煖子臟；療男子陰囊濕癢，堅舉尿莖。斂陰汗，卻癩癧，掃瘡瘍，利關節。主腰跨腫痛，祛手足痺頑。大風身癢難當，作湯洗愈；產後陰脫不起，絹袋燙收。婦人無妊，最宜久服。」二書所論，略增注功能，亦對性味有所補益，彌足珍貴。迄綱目發明項時珍曰：「蛇 乃右腎命門少陽三焦氣分之藥。神農列之上品，不獨補助男子，而又益婦人，世人拾此而求補藥於遠域，豈非賤目貴耳乎。」反譏世風眉眼高額，求補藥於他方，賤田野隨處可得之品，棄之不用之愚乎。

本草乘雅半偈曰：「蛇 子，苦、平，無毒。蛇性竄疾，獨居處隱僻，稟風木善行數變之體用耳。蛇床功用，靡不 合。設非氣性相似，寧為蛇虺所嗜。男子陰痿濕癢，婦人陰中腫痛，正厥陰隱僻之地，氣閉不通所致。蛇床宣大風力，鼓舞生陽，則前陰疏泄，竄疾自如。并可伸癩癧之氣逆于藏，與關節之壅塞不開，痺去則身輕，肝榮則色其色矣。真堪作把握陰陽，維持風色之良



自應入心與肺矣，蓋命門為元氣之根，而心肺即為氣之用也，為氣之用，所以紫蘇為宣劑。故本經言治男子陰痿溼癢，婦人陰中腫痛，除痺氣，利關節，非指其用而言乎。而別錄謂令女子子臟熱，男子陰強，非指其體而言乎！夫元氣之體用，全具於坎離，然而坎中孕離，離中宅坎，皆由其得全氣也，金為水母，火為金夫，惟水中有金，故坎中孕離，而水為火用，則元氣以生。惟火中有金，故離中蓄坎，而火為水用，則元氣以化，茲物乘夏火以結實，卻火氣盡歸金味，賦輕虛以攢成，而金味仍是火質，火歸金，故令火為水用而暢陰。夫從妻也，金化火，乃得水為火用而達陽，子隨母也，此味由化歸生，復由生歸化，元氣之體用全者，於茲味可窺一斑也。或曰：如之頤所云：宣大風力，鼓舞生陽，其義不相戾歟。曰：蛇床所治諸證，皆由陽氣之不得鼓舞以暢其用，無非屬風虛之為病也，為溼痺，為毒氣，皆本諸此，如金火合而氣化，雖微物，而有天氣至地，地氣至天之化機，是即所以補風虛也。試觀其華實於夏火，而為質輕虛，豈非陰溼化為陽明，有鼓之舞之以暢天氣者乎！天氣暢，則至地，地氣達，則至天，火為水用而暢陽，此天氣至地，水為火用而達陽，此地氣至天。蓋陰陽則降而陽隨之，陽達則升，而陰隨之也。是物以達陽而升為終事，卻以暢陰而降為始事。始事終事之義也，是此，未樞要語。此乃金火合而歸於命門之實際也，金火合則陰暢，元氣乃歸於命門，歸於命門是非三焦之氣盛，能補風虛，原與足厥陰通者，能合而行上乎，此所謂地氣達至天也。升降原相因，惟其地氣達則至天，故方書有用之治喉痺，并耳溼癢及齒牙周痛者，其方見本草綱目，準繩治腎虛耳聾二方，用蛇床子。或曰：據斯義，是

不止療溼而且療風，不止療風淫，更且療風虛矣，第如甄權所謂治男女虛溼痺毒風痛者，得與本經所云不少為差別否。曰：風與溼之用，人身具足，而風與溼之為病，無不相感以相化也。本經但未詳盡耳，大抵溼之痺，由於風虛，風虛乃病於陰氣，而為痺毒風之，由於溼淫，濕淫乃病於陽氣，陽氣即指陰中之陽，而為痛，又何異同之有，第雖有天氣地氣之分，然咸不越於氣交以為治，經所謂氣交之分，人氣從之，萬物由之者也。故別錄於此味，云有溫中下氣之義，蓋脾腎肝同起於下，而別錄於此味，更云甘辛，辛合於甘以歸腎，是由母趨子，故得致津液而化陰中之陽，如兔絲、覆盆、蛇床，皆補陰氣之方劑，非苦辛熱偏勝也。或曰：蛇床子之用，所謂天氣至地，地氣至天者，於何徵之曰：本草所云：強陰是天氣至徵而方書於健忘丸中用之，地氣至天也，此猶同宮水火之氣耳，若上以治面瘡，下以療痔疾，夫非上下極至之微歟！更有可參者，如內補鹿茸丸，治赤白濁，由於勞傷思想，陰陽兩虛者，其益陽之味頗多，即桂附亦有用之矣，豈猶藉此味以達陽歟！是蓋因思想傷陰，是陽中之陰不化，陰傷而及於陽也，或藉此以化陽中之陰，而後真陽乃得復歟！更如消瘴之白茯苓丸，因消中之後，胃熱入腎，消爍腎脂，令腎枯燥，遂致此疾，而丸中用腎陰，并除胃腎之枯燥者是矣，乃反用此味以達陽歟，母亦陽陷於陰中而不化，藉此由陰之化以散陽歟，即此二治推之，則用此味，不得但勦陳說，抵以去溼達陽盡之矣。」

由上述所論，得以了解陰陽、天地、五行、母子、生剋、濕痺、氣味、內治、外治、補陰、助陽、勝衰、上下、合治之用藥理論之奧妙，果是否如此，當以現代科學原理予以探討。其以下

諸本草所論功用等，大抵同綱目之說，其全文暫略，以省篇幅。

綜如上述，蛇床子自本經以下以迄明清近代諸本草，味辛，苦，溫，無毒。惟藥性論謂有小毒。主溫腎助陽，祛風，燥濕，殺蟲。治男子陽痿，陰囊濕癢，女子帶下陰癢，子宮寒冷不孕，風濕痺痛，疥癬濕瘡。

### 5. 修治、方用與禁忌之考訂

關於蛇床子之採收，別錄曰：「五月採實，陰乾。」嘉祐引蜀本圖經云：「採子暴乾。」迄圖經本草及品彙精要均沿用別錄之說，品彙精要更衍曰：「採，五月取實。收陰乾。用子。質類蒔蘿而細。」湯液本草曰：「五月採，陰乾。」本草蒙筌曰：「近秋收採，背日陰乾。入藥取仁炒用，浴湯帶殼生煎。」迄明長編引救荒曰：「採嫩苗葉燂熟，水浸淘洗淨，油鹽調食。」可知蛇床子自古以五月採實，陰乾為主，子則暴乾或秋季採收，背日陰乾。花期 4~7 月。果期 6~8 月。果實成熟，呈黃色時採收，割取全株如蒿枝，打落果實，曬乾。

關於蛇床子之炮製，最早於嘉祐引日華子曰：「凡合藥服食，即掇去皮殼，取仁微炒殺毒，即不辣，作湯洗病，則生用之。」證類引炮炙論曰：「凡使，須用濃藍汁并百部草根、自然汁，二味同浸三伏時，漉出，日乾，卻用生地黃汁相伴蒸，從午至亥，日乾用。」本草乘雅半偈修治同上，迄本草述希雍曰：「修治，入丸散用，布色掇去皮殼取仁為炒，殺毒即不辣也，作湯洗浴則生用之。酒浸一宿，以生地汁伴，久蒸焙乾用。愚按：蛇床子之用，全在辣甚，炒猶不宜，不如雷氏用生地伴蒸之為當也。」本

草備要、本草從新二書曰：「似小茴而細，微炒。殺毒則不辣。以地黃汁拌蒸，三遍佳。」得配本草曰：「去殼取仁，微炒，殺其毒則不辣，酒浸日乾，以地黃汁拌蒸，焙乾用。或用濃藍汁、百部汁，同浸漉出，晒乾，再以生地汁拌蒸，晒乾用。若作湯洗瘡，生用。」可知蛇床子炮製，宜揀去雜質，篩去泥沙，洗淨再如得配本草所論最為詳盡。

配伍禁忌方面，藥對曰：「惡牡丹、巴豆、貝母。」爾後諸家本草皆沿用而並錄之，湯液本草及明品彙精要等亦同，本草蒙筌稱：「所惡之藥有三：牡丹、巴豆、貝母。」至本草述希雍曰：「蛇床。性溫燥腎，有火及下部有熱者勿服。」本草新編曰：「若欲修合丸散，用之於參、歸、地、山茱之中，實有利益，然又宜乎陰寒無火之人，倘陰虛火動者，服之非宜也。」本經逢源曰：「但腎火易動，陽強精不固者勿服。」本草詩箋曰：「只有陽強精不固，忌他溫性味辛香。」本草從新曰：「腎火易動者勿服。」本草求真曰：「但性溫燥，凡命門火熾及下部有熱者切忌，惡丹皮、巴豆、貝母。」由上可知蛇床子宜忌，惡牡丹、巴豆、貝母。凡下焦有溼熱，或腎陰不足，相火易動以及精關不固者忌服。

蛇床子之方用，證類引千金方曰：「治產後陰下脫，蛇床子絹帶盛，蒸燙之，亦治陰戶痛。治小兒癬瘡，杵蛇床末，和豬脂塗之。」

金匱玉函方曰：「溫中坐藥，蛇床子散方，蛇床子仁為末，以白粉少許，和令勻，相得如棗大，綿裹內之，自然溫矣。」

本草綱目〔附方〕新十一。千金方：「陽事不起，蛇床子、五味子、菟絲子，等分為末，蜜丸梧子大，每服三十丸，溫酒下，

日三服。」

儒門事親方：「赤白帶下，月水不來，用蛇子、枯白礬，等分分為末，醋麵糊丸彈子大，胭脂為衣，綿裹納入陰戶，如熱極再換，日一次。」

千金方：「婦人陰痛。」

永類方：「男子陰腫，脹痛，蛇子末，雞子黃調傅之。」

經驗方：「大腸脫肛，蛇子、甘草各一兩，為末，每服一錢，白湯下，日三服，并以蛇子末傅之。」

簡便方：「痔瘡腫痛，不可忍，蛇子煎湯薰洗。」

普濟方：「小兒甜瘡，頭面耳邊連引，流水極癢，久久不愈者，蛇子一兩，輕粉三錢，為細末，油調搽之。」

全幼心鑑：「耳內濕瘡，蛇子、黃連各一錢，輕粉一字，為末吹之。」

千金、集簡方：「風蟲牙痛，千金用蛇子燭燼，同研塗之。集簡方用蛇子煎湯，乘熱漱數之，立止。」

聖惠方：「冬月喉痺，腫痛不可下藥者，蛇子燒煙於瓶中，口含瓶嘴吸煙，其疫自出。」

本草述：「同巴戟天、牛膝、何首烏、陽起石，治男子陰痿濕癢。愚按陰痿濕癢，多由肝經濕熱，璆氏以辛溫之味，治之恐有未當。同巴戟天、牛膝、杜仲、續斷、地黃、黃蘗、白膠，治婦人陰中腫痛。同黃蘗、山茱萸肉、五味子、茯苓、車前子、香附、川續斷、補骨脂，治一切帶下，赤者加白膠、阿膠。」附方：「陽事不起，蛇床子、五味子、兔絲子，等分為末，蜜丸梧子大，每服三十丸，溫酒下，日三服。赤白帶下，月水不來，用蛇床子、

枯白礬，等分為末，醋麵糊丸，彈子大，胭脂為衣，綿裹納入陰戶，如熱極再換，日一次。」

綜如上述，蛇床子，自古以五月採實，陰乾為主，用子則暴乾或秋季採收，背日陰乾。炮製則揀去雜質，篩去泥沙，洗淨，曬乾。去殼取仁，微炒，殺其毒則不辣，酒浸日乾，以地黃汁拌蒸，焙乾用。或用濃藍汁、百部汁，同浸漉出，曬乾，再以生地汁拌蒸，曬乾用。若作湯洗瘡，生用。宜忌惡牡丹、巴豆、貝母。凡下焦有溼熱，或腎陰不足，相火易動以及精關不固者忌服。方用並治產後陰下脫，小兒癬瘡，溫中坐藥，陽事不起，赤白帶下，月水不來，婦人陰痛，男子陰腫脹痛，大腸脫肛，痔瘡腫痛，小兒甜瘡，耳內濕瘡，風蟲牙痛，冬月喉痺，男子陰痿濕癢，婦人陰中腫痛，帶下赤白，滴蟲性陰道炎，婦人子腫挺出，小兒唇口邊肥瘡等症。

## 二、蛇床子之生藥學考察<sup>(19)</sup>

### 1. 蛇床子之性狀

本品為雙懸果，成橢圓形，長 2~4mm，直徑約 2mm。表面灰黃色或灰褐色，頂端有 2 枚向外彎曲的柱基，基部偶有細梗。分果的背面有薄而凸起的縱稜 5 條，接合面平坦，有 2 條棕色略突起的縱稜線。果皮鬆脆，揉搓易脫落，種子細小，灰棕色，顯油性。氣香，味辛涼，有麻舌感。

### 2. 蛇床子之鑑別

(1) 本品分果橫切面：外果皮為 1 列扁平細胞，外被角質層。中果皮較厚，縱稜異常突出，中部有維管束，其周圍有厚壁木化網紋細胞；背面縱稜間各有橢圓形一個，接合面有油管 2 個，共有 6 個。內果皮為 1 列扁平細胞。種皮為 1 列淡棕色細胞。胚乳細胞含多數糊粉粒，澱粉粒及草酸鈣簇晶。

(2) 取本品粉末 2g，加乙醇 20ml，加熱回流 30 分鐘，濾過。取濾液數滴，點於白瓷板上，置紫外光燈(365nm)下觀察，顯藍紫色螢光；另取濾液 2ml，加等量的 3% 碳酸鈉溶液，加熱 5 分鐘，放冷，再加新製的重氮對硝基苯胺試液 1~2 滴，即顯櫻紅色。

(3) 取本品粗粉 0.3g，加乙醇 5ml，離心處理 5 分鐘，放置，取上清液作為供試品溶液。另取蛇床子素對照品，加乙醇配成每 1ml 含 1mg 的溶液，作為對照品溶液。依照薄層色譜法試驗，吸

取上述兩種溶液各 2 $\mu$ l，分別點於同一片甲基纖維素鈉為粘合劑的矽膠 G 薄層板上，以苯 - 醋酸乙酯(30 : 1)為展開劑，展開，取出，晾乾，置紫外光燈(365nm)下檢視。供試品色譜中，在與對照品色譜相映的位置上，顯現相同顏色的螢光斑點。

### 3. 蛇床子之含量測定

精密秤取在五氧化二磷乾燥器中減壓乾燥至恒重的本品粉末(過三號篩)1g，置具塞錐形瓶中，精密加入乙醇 20ml，振搖後放置過夜，濾過，取續濾液，作為供試品溶液。依照薄層色譜法試驗，精密吸取上述兩種溶液各 1 $\mu$ l，分別交叉點於同一 TLC 薄層板上，以苯 - 醋酸乙酯(30 : 1)為展開劑，展開，取出，晾乾，照薄層色譜法進行螢光掃描，激發波長： $\lambda = 365\text{nm}$ ，測量供試品與對照品螢光強度積分值，計算，即得。

本品含蛇床子素( $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3$ )不得少於 1.0 %

### 4. 蛇床子及其混偽品芹菜子之鑑別

#### (1) 蛇床子為繖形科植物

蛇床 *Cnidum monnieri*(L.)CUSSON 之乾燥成熟果實，在台灣有紅蘿蔔種子混雜其中，在大陸常有一種穗粒略小，外觀性狀十分相似之果實種子混在蛇床子中，或完全以該種子冒充蛇床子，經鑒定該種子為繖形科植物旱芹 *Apium graveolens* L. var. *dulce* DC 之乾燥成熟果實及芹菜子

## (2) 蛇床子與芹菜子之性狀鑑別

市售蛇床子發現以偽品旱芹果實混雜其中，依張誌輝報告兩者性狀與鑑別如下<sup>(20)</sup>：

### A. 種子常數值之測定：靜止角

靜止角：蛇床子 42°；芹菜子 39°

比重：蛇床子 0.263g/ml；芹菜子 0.481g/ml

千粒重：蛇床子 0.392g；芹菜子 0.385g

### B. 現代鑑別

水試法：將少量蛇床子投放盛有清水之燒杯中，蛇床子漂浮在水面，不下沉。芹菜子陸續下沉。因此兩者之混和品，可用水試法區分。

TLC:取樣品粉末 2g(60mesh),於 flask 中加 ether 6ml 塞緊，冷浸 4hr，濾過，將濾液濃縮至乾，殘渣用氯仿溶解至 10ml，並以 osthole 對照標準品點樣。

展開劑：石油醚：乙酸乙酯(1：1)

### C. 組織顯微特徵：

蛇床子：

- (a) 具五條翅狀果稜，形成不等分之五角形
- (b) 中果皮具多層薄壁細胞
- (c) 每條果核中間各有一個外勒形維管束，並有少數纖維
- (d) 種皮為一系列廢細胞，內含紅棕色物質

芹菜子:

- (a) 具五條突起果稜，形成近等分五角形
- (b) 中果皮為數層薄壁細胞
- (c) 與上相似
- (d) 含黃色油脂

5. 台灣芎藭(*Cnidium formosanum* Y<sub>ABE</sub>)

產地台灣。夏秋採全草，曬乾稱野芎藭。為強壯劑，治腰骨神經痛、陰痿。用量 4-75 公克。果稱蛇床子。

### 三、蛇床子之成分文獻考察

#### 1.揮發油

蛇床子果實含揮發油 1.3 % ,其中主要成分為左旋蒎烯(L-pinene)、樟腦烯(L-camphene)、纈草酸龍腦酯(bornyl-isovalerate)、異龍腦(isoborneol)、蛇床明素(cnidimine)及蛇床子素(osthole)等<sup>(21)</sup>

另從果實乙醇提取物中分離得到：異虎耳草素(isopimpinellin)、佛手內酯(bergapten)、二氫歐山芹醇(columbianetin)、當歸酸酯(columbianaclin)、圓當歸素(archangelicin)、蛇床定(cnidiadin)、*o*-乙醯二氫歐山芹素(*o*-acetyl-columbianetin)、*o*-異戊醯二氫歐山芹素(*o*-isovaleryl-columbianetin)及3'-異丁醯-*o*-乙醯二氫歐山芹素(3'-isobutyloxy-*o*-acetylcolumbianetin)<sup>(21)</sup>

#### 2.香豆素類化合物(coumarins)

含歐前胡腦(esthole)、蛇床子素(osthole)、花椒毒內酯(xanthotoxin)、異虎耳草素(isopimpinellin)、佛手內酯(bergapten)、歐芹屬素乙(imperatorin)、白芷素(edultin)、花椒毒酚(xanthotoxol)、別歐芹素乙(alloimperatorine)等<sup>(21)</sup>。

#### 3.其他

還含有棕櫚酸(palmitic acid)、 $\beta$ -sitosterol 及銅、錳、鋅等元素。

#### 四、蛇床子及蛇床子素之藥理作用文獻考察

##### 1. 對呼吸系統之影響

肺支氣管灌流實驗證明，給蛇床子素 15mg，5 分鐘後，即能增加豚鼠肺灌流量，其作用強於氨茶鹼，說明本品有較強的支氣管擴張作用。給豚鼠蛇床子總香豆素 200mg/kg，灌胃一次可使磷酸組織胺和氯化乙醯膽鹼所致豚鼠哮喘發作時間明顯延長。體外實驗證明，總香豆素 0.5mg/ml，對組織胺所致離體豚鼠氣管收縮有較強的拮抗作用。上述作用可被阻斷而對麻醉動物心率和血壓無影響，說明蛇床子總香豆素可能是選擇地興奮支氣管平滑肌上的  $\alpha_2$  受體，產生解痙和止喘作用<sup>(22, 23)</sup>。

小鼠灌服蛇床子總香豆素 15mg/隻，能明顯增加酚紅排出量，說明本品具有較強的祛痰作用<sup>(23)</sup>。

##### 2. 免疫抑制

大鼠腹腔注射蛇床子素 50mg/kg 和 100mg/kg，能抑制天花粉所致大鼠腹腔肥大細胞脫顆粒，抑制率為 56.40 % 和 78.60 %，與對照組比較差異顯著<sup>(23)</sup>。於引喘前給豚鼠灌服蛇床子素 100 和 200mg/kg，均能明顯減少哮喘的發生率，說明有預防作用。體外實驗證明蛇床子素 20  $\mu$ g/ml 和 40  $\mu$ g/ml 時，和蛇床子總香豆素 20mg/ml 可以明顯對抗由慢反映物質所致的豚鼠回腸收縮。濃度在 5、10、20 和 30  $\mu$ g/ml 蛇床子素可明顯抑制 Schultz-Dale 反映，其抑制作用有劑量依賴關係。給小鼠一次灌服蛇床子素 100 mg 和 200mg 對小鼠被動皮膚過敏反應(PCA)有較強的抑制作用<sup>(23-24)</sup>。

### 3. 抗心率失常

給小鼠一次腹腔注射蛇床子水提取物 50g/kg，可預防氯仿所致心室性纖顫；一次靜脈注射 8.75g/kg，可明顯對抗大鼠心室性纖顫。在這一劑量下對烏頭鹼誘發的心率失常亦有預防與治療作用。蛇床子素有鈣拮抗劑活性，因此推論抑制鈣離子內流，可能是蛇床子抗心率失常的機理之一<sup>(25)</sup>。

### 4. 抗病原微生物

蛇床子流浸膏(1:2)在 37℃ 培養液中，經 17.5 分鐘將陰道滴蟲全部殺死<sup>(26)</sup>。顯微鏡下觀察，當滴入蛇床子素後滴蟲立即停止活動，而對照組可活動 1 小時以上。但也有人觀察蛇床子提取物在體外並無殺陰道滴蟲的作用<sup>(27)</sup>，但濃度為 1g/ml 的蛇床子浸出液，在培養基中稀釋倍數為 1:10 對絮狀表皮癬菌和石膏樣小芽胞菌有抑菌作用，在 1:20 時對羊毛樣小芽胞菌有抑菌作用<sup>(28)</sup>。對雞胚培養的病毒有一定抑制作用，對流感病毒有明顯抑制作用。

### 5. 激素樣作用

小鼠皮下注射蛇床子浸膏液 20mg/次，每日 1 次，連續 32 日，能延長交尾期，縮短交尾休期；對去勢雌性小鼠，以同樣劑量，連續給藥 21 日，出現交尾期，並能使子宮、卵巢重量增加。蛇床子醇提取物也有類似作用。以前列腺、精囊、提肛肌增加重量的方法證明：蛇床子提取物對小鼠也有雄性激素樣作用<sup>(29)</sup>。

## 6. 局部麻醉作用

100 % 蛇床子醇煎液可完全阻滯蟾蜍離體坐骨神經動作電位的產生，其強度與 10 % 普魯卡因相同。停藥後能恢復正常傳導功能。皮丘法實驗對豚鼠呈現一定浸潤麻醉效果，可被鹽酸腎上腺素所增強，但局部麻醉作用時間較 10 % 普魯卡因為短。對家兔進行椎管麻醉，1 分鐘內顯效，持續  $15.3 \pm 9.2$  分鐘。對兔眼角膜沒有表面麻醉作用。

用豚鼠皮丘法試驗，蛇床子提取液 0.2ml 有一定浸潤麻醉作用，但局部麻醉作用較普魯卡因短。在提取液中加入微量腎上腺素後，不僅麻醉作用強度增強，局部麻醉持續時間也明顯延長<sup>(30)</sup>。

## 7. 對學習記憶之影響

依沈麗霞教授等以被動迴避、跳台及 Y 型水迷路實驗觀察蛇床子素對小鼠學習記憶的影響，結果顯示可改善記憶獲得、鞏固及方向辨別障礙，但對記憶再現無效<sup>(31)</sup>。

## 8. 抑制 B 型肝炎作用

蛇床子素對於 B 型肝炎表面抗原以 MS-G<sub>2</sub> 及 HuH7 細胞培養，體外試驗具有抑制 B 型肝炎病毒之分泌，其作用機轉與增加 B 型肝炎表面抗原之糖化作用(glycosylation)有關<sup>(32)</sup>。

## 9. 對兔陰莖海綿體鬆弛作用

蛇床子素對於兔陰莖海綿體具有鬆弛作用，其作用機轉與釋放陰莖海綿體內皮細胞之 NO 有關，且係經由抑制 phosphodiesterase 而增加 cGMP 與 cAMP 所致<sup>(33)</sup>。

## 10. 毒性

(1) 急性毒性：小鼠腹腔注射蛇床子提取液 20g/kg，半小時內小鼠活動減少，呈鎮靜作用，觀察 48 小時未見死亡；小鼠口服蛇床子總香豆素的 LD<sub>50</sub> 為 2.44 ± 0.05g/kg<sup>(22)</sup>。

(2) 亞急性毒性：Wistar 大鼠灌服蛇床子總香豆素 60 mg/kg 和 140mg/kg，每日 1 次，連續 31 日，結果體重、血象、生化指數及主要臟器組織型態檢查均在正常範圍內與對照組比較無明顯差異<sup>(22)</sup>。

## 五、蛇床子之臨床應用

### 1. 外陰騷癢

用蛇床子、地膚子、苦參、花椒煎劑外洗，治療外陰濕癢症 500 例，總有效率 97.2 %<sup>(34)</sup>。用蛇黃洗劑，蛇床子、黃柏、沒食子、枯礬外洗，治療 82 例，總有效率 100 %<sup>(35)</sup>。

### 2. 滴蟲性陰道炎

用參百蛇洗劑：蛇床子、苦參、生百部煎汁 2000ml，薰洗坐浴，治療 56 例，總有效率 96 %<sup>(36)</sup>。用蛇床子、百部、苦參、枯礬煎液濃縮為 250ml 沖洗陰道，治療 156 例，有效率 100 %<sup>(37)</sup>。

### 3. 外陰部硬化萎縮性苔癬

用蛇床子、青黛軟膏，每週塗 2~4 次，2 月為一療程，治療 82 例，兩個療程治癒率 75.61 %<sup>(38)</sup>。

### 4. 子宮頸糜爛

用消糜栓：硼砂、蛇床子、川椒、枯礬、血竭等，陰道用藥，每次一粒，隔日 1 次，5~8 次為一療程，治療 524 例，總有效率 94 %<sup>(39)</sup>。

## 5. 不育、不孕症

(1)蛇羊養精活血湯：蛇床子、淫羊藿、巴戟天、紅花等加減煎服，治療不育症 39 例，治癒率 92.36 %<sup>(40)</sup>。

(2)十子六君湯：蛇床子、菟絲子、桑椹子、五味子、枸杞子、金櫻子、女貞子、覆盆子等煎服、治療缺無精子症 10 例，均全愈<sup>(41)</sup>。

(3)補腎活血胎孕湯：蛇床子、當歸、菴蓉、益母草、菟絲子等煎服、治療不孕症 624 例，治癒率 49.20 %<sup>(42)</sup>。

## 6. 手足癬

用蛇床子、黃精、丁香、白蒺藜煎汁 1500ml 浸洗，治療足癬 54 例，總有效率 98.15 %<sup>(43)</sup>。用蛇床子、苦參、白鮮皮、生百部加減煎液外洗，每次浸泡 20~30 分鐘，每日 2 次，治療鵝掌風 90 例，總有效率 97 %<sup>(44)</sup>。

## 7. 溼疹

溼疹散-蛇床子、密陀僧、白礬、大黃等研磨外敷，配合四黃三子湯：蛇床子、地膚子、蒼耳子、黃連、黃芩、大黃局部外洗，治療 512 例，治癒率 91.96 %<sup>(45)</sup>。用苦蛇椒礬煎：蛇床子、苦參、白礬、川椒煎劑外洗、治療急性濕疹 104 例，有效率 100 %<sup>(46)</sup>。用蛇床子軟膏治療嬰兒濕疹也有一定療效<sup>(47)</sup>。

## 8. 銀屑病

用蛇床子、苦參、白鮮皮、地膚子、殭蠶、蜈蚣、荊芥等組方，治療 143 例，總有效率為 95.60 %<sup>(48)</sup>。

## 9. 哮喘及喘息性支氣管炎

口服蛇床子總香豆素，80mg/日，每日一次，連續 3 日，治療 118 例，總有效率 87.3 %<sup>(49)</sup>。用蛇床子、陳皮、半夏、細辛、五味子治療小兒支氣管哮喘 36 例，總有效率 96.2 %<sup>(50)</sup>。

## 六、蛇床子素之結構與理化性質

1. 蛇床子素(osthole):於 1972 年日本學者 Hata 等從其果實中分離得到蛇床子素<sup>(51)</sup>,事實上,顏焜熒教授於 1959 年就從白芷(*Angelica dahurica* BENTH. et HOOK var. formosana YEN)之根部分離得到,爾後顏焜熒教授又從台灣北部海濱採集濱當歸(*Angelica hirsutiflora* LIU, CHAO et CHUANG)之根部亦分離得到蛇床子素<sup>(52)</sup>。

### 2. 蛇床子素之分離

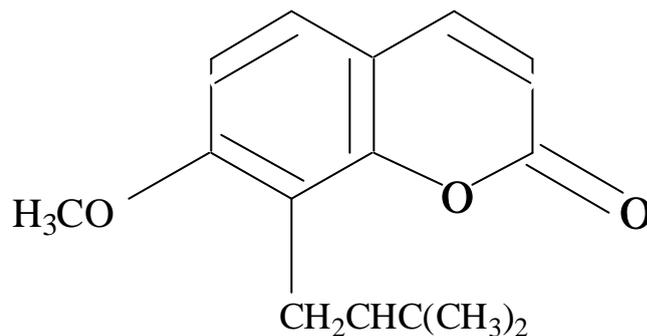
蛇床子藥材以乙醇抽取蛇床子素之效率最佳,且真空減壓分段蒸餾法較適合於純化取得蛇床子素<sup>(53)</sup>。

### 3. 蛇床子素之性質<sup>(54)</sup>

#### (1) 化學名

7-methoxy-8-[3-methylpent-2-enyl] coumarin

#### (2) 結構式



#### (3) 分子式及分子量

分子式： $C_{15}H_{16}O_3$

分子量：244.29

#### (4)理化性質

熔點：83-84

沸點：145-150

易溶於甲醇、乙醇，不溶於水。

## 第二節 神經化學及內分泌與學習記憶之關係

### 一、神經傳遞物質與學習記憶之關係：

本所吳啟瑞博士等人，曾發表中藥增強學習記憶與神經傳遞物質之相關性<sup>(55)</sup>。記憶是經過學習而獲得的經驗或行為的保持。學習記憶之基本過程，當外界之刺激訊息輸入後以致記憶形成，可分為學習獲得(acquisition)、記憶鞏固(consolidation)、及記憶再現(retrieval)三個階段<sup>(56)</sup>而在形成過程一旦接受外界訊息之刺激，人體第一步反應使神經活性改變，使突觸前神經傳遞物質釋出。至於神經傳遞物質與學習記憶之關係，略述如下：

#### 1. Acetylcholine(Ach)與學習記憶關係：

據 Drachman 及 Leavitt 1974 年發現年輕人在服用 acetylcholine 接受器拮抗劑 scopolamine 後，會產生類似老人癡呆症之進行性健忘症(anterograde amnesia)症狀<sup>(57)</sup>，又 Quartermain 及 Leo 發現大鼠給 scopolamine 後，可使腦內 Ach 神經消失，並會造成學習行為操作之障礙<sup>(58)</sup>，另 Worms 等發現乙醯膽鹼 M1 接受器之拮抗劑 pirenzepine<sup>(59)</sup>，Glicks 等發現乙醯膽鹼尼古丁接受器之拮抗劑 mecamlamine<sup>(60)</sup>，及 Walsh 等發現乙醯膽鹼神經毒素 AF64A<sup>(61)</sup>，均會造成大鼠學習行為操作之障礙。因此，在增進學習記憶之能力，Ach 確具重要之參與角色。故本研究使用 scopolamine 等作為誘發學習獲得障礙之動物模式。

## 2. Norepinephrine 與學習記憶關係：

據 Pisa 及 Fibiger 指出 norepinephrine 在空間性記憶能力及注意力扮演重要之角色<sup>(62)</sup>，在老年智能障礙患者，單胺類神經物質系統失衡為第二項較重要之因素，阿耳滋海默氏病人在藍斑區 (locus ceruleus) 之正腎上腺素 (norepinephrine) 之合成酵素 dopamine  $\beta$ -hydroxylase 有明顯減少，腦內正腎上腺素濃度及其代謝物濃度亦有減少<sup>(63)</sup>。據 Zis 等以 6-OHDA 破壞 nigro-striatal bundle，可造成主動迴避反應之操作障礙<sup>(64)</sup>，若將 striatum 區之神經損壞，可阻斷刺激 amygdala 區誘發之學習記憶能力增加現象<sup>(65)</sup>，當 amygdala 區給予  $\beta$ -接受器拮抗劑 propranolol 會造成學習的障礙，因此智能增進劑會被經 amygdala 區給予 propranolol 所阻斷<sup>(66)</sup>。

## 3. Serotonin 與學習記憶關係：

據 Arai 等人研究指出阿耳滋海默氏病人在腦部背側大縫核 (dorsal raphe nucleus) 之血清素 (serotonin) 及其接受器密度有明顯減少<sup>(63)</sup>，但據 Essman 認為在脊椎動物之學習行為模式研究中，serotonin 扮演著負向性之角色<sup>(67)</sup>，因此 serotonin 之釋出促進劑 p-chloroamphetamine 可增加中樞 serotonin 之活性而造成學習獲得障礙<sup>(68)</sup>。且蛋白質合成抑制劑 cycloheximide 誘發記憶鞏固障礙，主要是經由中樞 serotonergic system 之活性以間接降低中樞 cholinergic system 之活性<sup>(69)</sup>。

5-HT 接受器在學習記憶亦扮演重要之角色，5-HT<sub>1A</sub> 接受器致效劑 8-OH-DPAT 會造成學習記憶及工作記憶之障礙<sup>(70)</sup>，另當

以 serotonergic neurotoxin 5,7-DHT 投在 neocortex 亦可造成學習記憶損傷<sup>(71)</sup>。

神經傳遞物質除 acetylcholine, norepinephrine 與 serotonin 與學習記憶有關外，尚有興奮性胺基酸(excitatory amino acid)在參與神經可塑性之初期過程 腦部發展及學習記憶之過程扮演重要之角色；enkephalin 在學習記憶亦扮演重要角色；神經荷爾蒙在學習記憶過程之作用與單胺神經系統有密切關連；另外蛋白質合成亦為記憶鞏固過程之必要因素。

## 二、內分泌與學習記憶之關係：

### 1. 腎上腺與學習記憶關係

依據 Bialik 等人於 1984 年研究報告指出大鼠在去腎上腺後會造成被動記憶障礙<sup>(72)</sup>。又 Adem 等人於 1994 年發現腎上腺摘除後會引起海馬迴中 dentate granule 及 CA1-4 區域中神經細胞的損失及死亡<sup>(73)</sup>，而造成學習記憶障礙。

腎上腺皮質荷爾蒙 adrenocortical hormone(cortisol)之合成，係由下視丘所分泌之 gonadotropin releasing hormone(GnRH)刺激腦下垂體釋放 adrenocorticotropic hormone(ACTH)，最後刺激腎上腺皮質分泌 cortisol。當腎上腺摘除後，cortisol 的分泌量減少，在腎上腺摘除手術後 1-3 日即造成記憶的障礙，而記憶的障礙在腎上腺摘除手術後第 7 日才得到修復。因血中 ACTH 濃度在腎上腺摘除手術後第 3 日開始下降，在腎上腺摘除手術後第 7 日才回復正常水平<sup>(74)</sup>，所以 ACTH 關係著 corticosterone 及 aldosterone 的分泌，且干擾腎上腺兒茶酚胺(catecholamines)及醣類的變化<sup>(75,76)</sup>，進而影響記憶之機制。智能增進劑如 piracetam 會因腎上腺切除而阻斷其增強記憶之作用，但此現象可因給予 corticosterone 及 aldosterone 而恢復，因此發現 piracetam 之增強記憶作用與調控腎上腺分泌 corticosterone 及 aldosterone 有關<sup>(74,77)</sup>。因此本研究以大鼠去腎上腺作為誘發學習障礙之動物模式。

## 2. Estrogen 與學習記憶關係

Estrogen 之合成係由下視丘之弓狀核(arcuate nucleus)所分泌之 gonadotropin releasing hormone(GnRH) 促使腦下垂體釋放 follicle-stimulating hormone(FSH) , 再刺激卵巢分泌 estrogen 而來。estrogen 除了調節生殖系統生理作用外 , 在中樞神經系統亦扮演了相當重要的角色 ; 且作用於學習記憶相關的神經傳遞路徑 (如下視丘、海馬迴)藉以影響著學習記憶。根據研究發現 , 去卵巢後的大鼠皮質及海馬迴之膽鹼乙醯轉胺? (choline acetyltransferase)活性降低<sup>(78)</sup>。故大鼠去卵巢後因 acetylcholine 及 estrogen 減少而造成工作記憶障礙<sup>(79)</sup> ; 另外 , 給予 estrogen 對於短暫性腦缺血時去卵巢大鼠的腦部具保護作用<sup>(80)</sup> ; 對於進入更年期的婦女採用 estrogen 替代療法 , 可增強認知和記憶的功能<sup>(81)</sup>。estrogen 具有保護腦部神經細胞作用 , 其作用機轉主要經由本身之血管性作用與神經生長因子(nerve growth factors)及神經生長因子接受器(trks)直接或間接保護腦部神經細胞<sup>(82,83)</sup>。另對於因  $\beta$ -amyloid protein、kainic acid 誘導繼發性神經凋亡 , estrogen 具有抗細胞凋亡作用 , 其作用機轉主要是能增加抗凋亡蛋白 Bcl-xL 的合成<sup>(84)</sup> , 並改變細胞傳遞物質如胞外信號調節? (extracellular signal-regulated kinase)等的表現<sup>(85)</sup>。因此本研究以大鼠去卵巢作為誘發學習障礙之動物模式。

# 第三章 材料與方法

## 第一節 實驗材料

### 一、蛇床子之抽提流程

本研究材料蛇床子(*Cnidii Fructus*)購自欣隆藥行，經謝文全教授鑑定為繖形科植物蛇床*Cnidium monnieri* (L.)C<sub>USSON</sub>之乾燥成熟果實。實驗抽提，先用甲醇萃取後再用石油醚萃取，迴流抽取四 五次，每次約四小時，合併抽取液，經減壓濃縮乾燥後，得石油醚粗萃取物(簡稱CF)，萃取率為6.26 %。

### 二、實驗試劑

1. 蛇床子素 osthole(OST)購自山本製藥(日本)，以95 % 酒精溶解後，加入少許Tween 80後，再加水至需要濃度。

#### 2. 基本實驗試劑之製備：

本實驗所使用試劑均購自Sigma(如一覽表)其製備如下：

(1)SCOP, M- SCOP, PHEN, PROP 以saline溶解

(2)6-OHDA, 5,7-DHT 以saline(含0.5 % vit C, 防止氧化)溶解

(3)AF64A 以NaNO<sub>2</sub>溶解後再以1N HCl調整pH至7.4

(4)YOH以0.2 % 酒精溶解

藥物全名	簡稱	作用機制
Scopolamine hydrobromide	SCOP	muscarinic receptor antagonist
Scopolamine methylbromide	M-SCOP	乙醯膽鹼週邊拮抗劑
6-hydroxydopamine	6-OHDA	catecholaminergic neurotoxin
Ethylcholine aziridinium	AF64A	cholinergic neurotoxin
5,7-dihydroxytryptamine	5,7-DHT	serotonergic neurotoxin
Phenoxybenzamine	PHEN	腎上腺素 <sub>1</sub> 拮抗劑
Propranolol	PROP	腎上腺素拮抗劑
Yohimbine	YOH	腎上腺素 <sub>2</sub> 拮抗劑

### 三、實驗動物

本實驗採用行政院國科會國家實驗繁殖及研究中心所提供 Sprague-Dawley 系雄性或雌性大鼠，體重 220-250 公克，飼養在空調的飼養室，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。

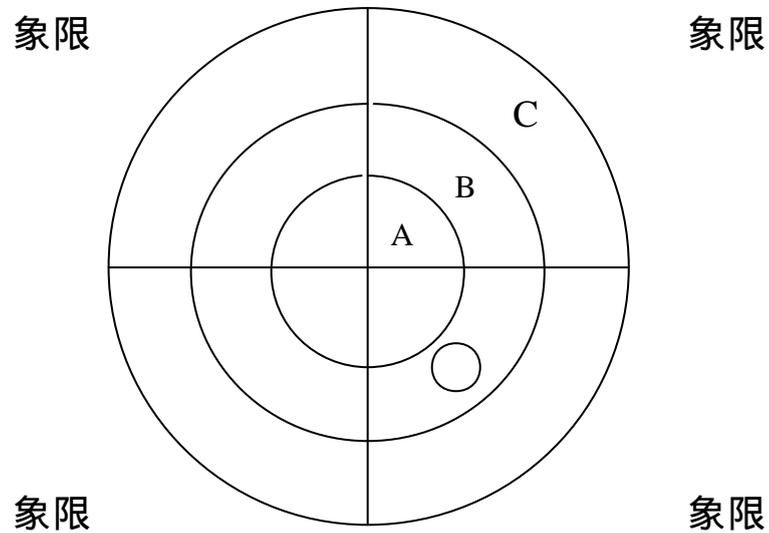
## 四、實驗儀器

### 1. 被動迴避學習之設備

使用「條件反應測定裝置」(Muromachi Kikai Co. Ltd. Japan)，此裝置分成兩部分：實驗箱(Shuttle Box)係為一經中間閘門分隔為相同大小二室(48 ×20 ×30cm)的箱子及其控制器(MCU-101 Controller，Muromachi Kikai Co. Ltd. Japan)；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，中以閘門控制，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。

### 2. 水迷宮之設備

由一直徑 160 cm、高 50 cm、壁厚 15 mm 之不銹鋼水池及一個逃逸平台(直徑 11 cm、高 22 cm，當泳池充滿水時，置於水面下 1 cm 處)所組成，而且水溫需保持在  $23 \pm 1$  <sup>(86)</sup>。水池由電腦劃分為四個象限(、)、A、B、C 三個環(自圓心往壁緣依序為 A、B、C 環)如下圖所示



水迷宮實驗所使用之紀錄儀器：Columbus Instruments' VIDEOMEX-V video tracking , Video Camera , Video monitor(COLUMBUS INSTRUMENTS INTERNATIONAL CORPORATION)

實驗所使用之軟體為 Columbus Instruments' Water Maze Program.

## 第二節 實驗方法

### 一、被動迴避學習反應實驗

於實驗步驟上，先將大鼠置入明室，同時開啟閘門，以大鼠在90秒內進入暗室者，供做本實驗。

訓練期：將篩選過之大鼠，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。

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<sup>(87)</sup>。

誘發障礙物質：scopolamine(0.5 mg/kg, i.p.)<sup>(88)</sup>

### 二、水迷宮實驗

本實驗利用 Morris Water Maze 來進行學習記憶測試<sup>(89, 90)</sup>，其訓練過程如下：

第一天至第三天前段：將泳池分成四個象限，逃逸平台固定置於第四象限的 B 區，而大鼠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台，讓大鼠休息 30 秒鐘後，抓出泳池休息 30 秒鐘，再進行下一次之訓練；但若大鼠於 2 分鐘尚未找到逃逸平台，則將大鼠抓到逃逸平台，休息 30 秒鐘後，抓出泳池休息 30 秒鐘，在進行下一次之訓練；共訓練 3 天，此三天稱之為「學習操作」<sup>(91)</sup>。

第三天後段：於第三天訓練完 2-4 小時後，將逃逸平台自水面下取走，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台所花之時間及游泳距離，此階段稱之為「參考記憶(reference memory)」<sup>(92)</sup>。

第四天：於第四天再將逃逸平台置入第四象限並使其露出於水面 1 cm, 訓練 4 次, 稱之為「非空間性記憶(non-spatial memory)」<sup>(91)</sup>。

第五天前段：於第五天將逃逸平台置於第二象限，加水使其沉入水面 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台，稱之為「再學習(reacquisition)」<sup>(93)</sup>。

第五天後段：第五天前段結束後休息 2-4 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台，此稱之為「記憶再現(retrieval)」<sup>(93)</sup>。所有大鼠游泳之軌跡及實驗資料均由電腦自動記錄。第五天前段與後段總稱為「工作記憶(working memory)」。

### 三、去除腎上腺大鼠

於訓練 5 天前，雄或雌性大鼠腹腔注射 sodium pentobarbital(45 mg/kg)麻醉後，去除兩側之腎上腺，待大鼠清醒後，歸回飼養籠。蛇床子石油醚粗抽物及其成分 osthole 或正對照組，於每天訓練前 30 分鐘腹腔注射給藥；或於訓練完成後測定前 30 分鐘腹腔注射給予，進行大鼠學習記憶能力之評估。

#### 四、去除卵巢雌性大鼠

於訓練 21 天前，雌性大鼠腹腔注射 sodium pentobarbital(45 mg/kg)麻醉後，去除卵巢，待大鼠清醒後，歸回飼養籠。蛇床子石油醚粗抽物及其成分 osthole 或正對照組，於每天訓練前 30 分鐘腹腔注射給藥；或於訓練完成後測定前 30 分鐘腹腔注射給予，進行大鼠學習記憶能力之評估。

### 第三節 數據分析

水迷宮空間性學習操作所獲得之 data，以 one-way repeated measures analysis of variance，各組之間以 Dunnet's test 來作分析；若 P 值小於 0.05 以下時，則認為有統計意義；其餘之水迷宮參考記憶暨工作記憶，所獲得之結果均以 Independent-Sample T Test，統計並分析其間差異之顯著性，凡 P 值小於 0.05 以下時，則認為有統計意義。而於被動迴避實驗，則以無母數分析法統計，先以 Kruskal-Wallis 單因子變異數分析各組間之變異數差異，再以 Mann-Whitney U-test 檢定其間差異之顯著性，凡 P 值小於 0.05 以下時，則認為有統計意義。

## 第四章 實驗結果

### 一、蛇床子石油醚萃取層對雄性大鼠由 scopolamine 誘發被動迴避學習暨水迷宮學習操作之影響

於訓練前 30 分鐘腹腔注射給予 scopolamine 0.5 mg/kg，將造成雄性大鼠在被動迴避學習操作之障礙；當蛇床子石油醚萃取層於訓練前 60 分鐘口服給予時，在 0.1 - 0.6 g/kg 劑量下可明顯改善 scopolamine 誘導之被動迴避學習操作障礙(如圖 1)。而在水迷宮之學習操作實驗中，於每日學習操作前 30 分鐘腹腔注射給予 scopolamine 0.5 mg/kg，亦可造成雄性大鼠在水迷宮學習操作之障礙；當蛇床子石油醚萃取層於訓練前 60 分鐘口服給予時，在 0.05 - 0.6 g/kg 劑量下可明顯改善 scopolamine 誘導之水迷宮學習操作障礙(如圖 2)

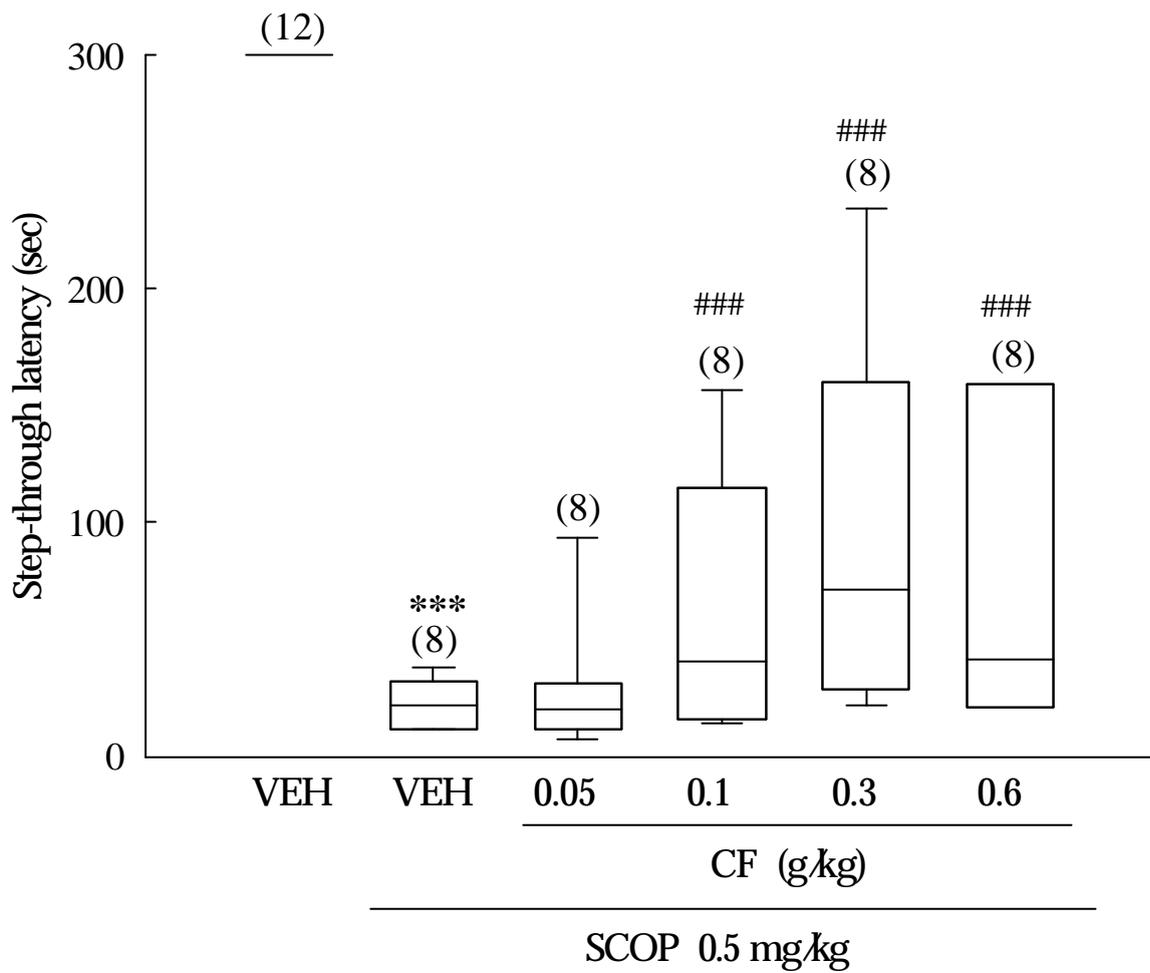


Fig 1. Effect of petroleum ether fraction of Cnidii Fructus (CF) on impairment of passive avoidance performance induced by SCOP with high stimulus (1 mA, 2 sec) footshock in male rats. \*\*\* P<0.001 compared with VEH group. ###P<0.001 compared with VEH/SCOP group.

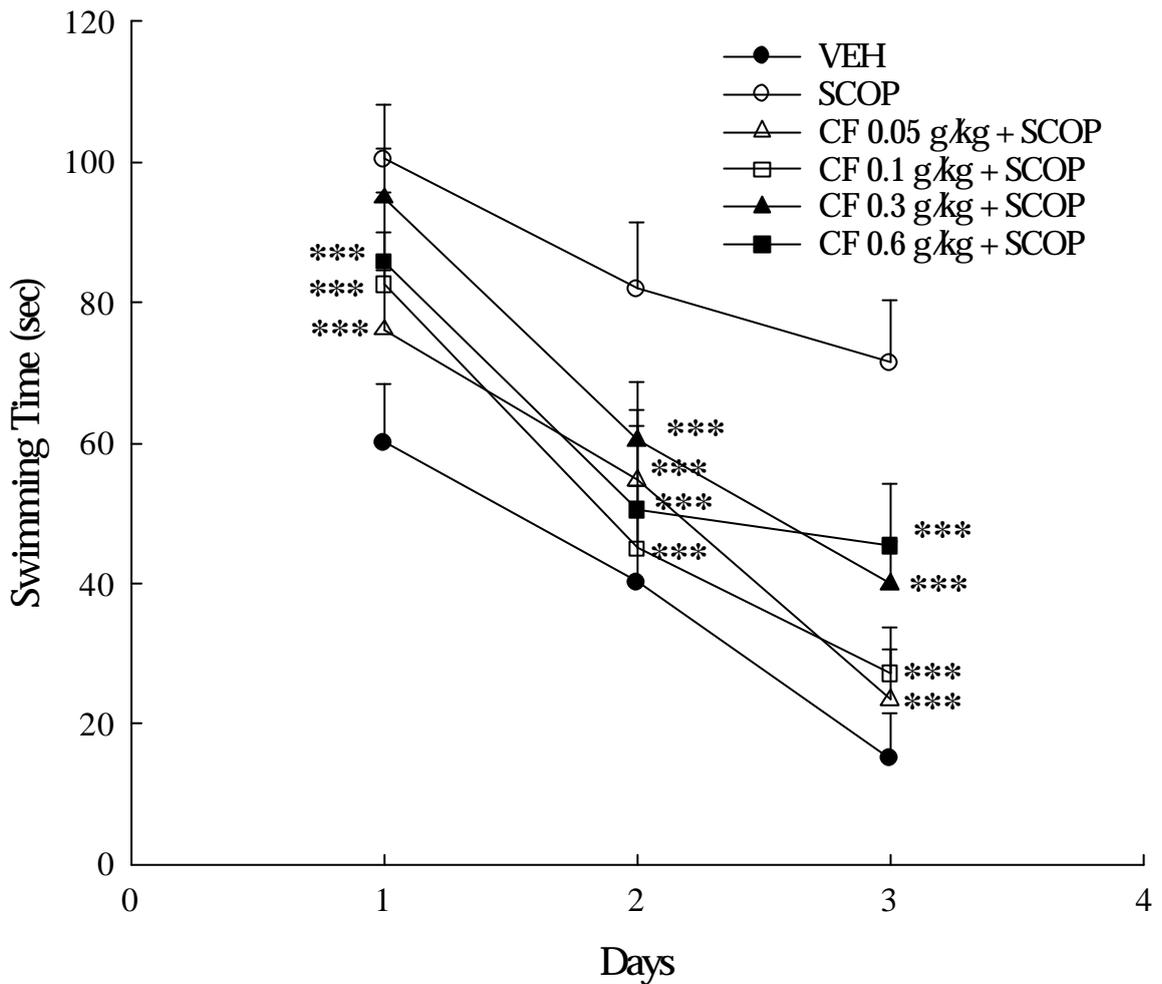


Fig 2. Effect of petroleum ether fraction of Cnidii Fructus (CF) on impairment of water maze performance induced by SCOP in male rats.\*\*\*P<0.001 compared with SCOP group.

## 二、蛇床子石油醚萃取層改善學習記憶與週邊神經之關係

### 1. 週邊乙醯膽鹼拮抗劑 M-SCOP 對蛇床子石油醚萃取層改善學習記憶之影響

蛇床子石油醚萃取層在雄性大鼠學習記憶障礙改善作用之週邊機轉進行探討。首先選擇乙醯膽鹼週邊拮抗劑 scopolamine methylbromide(M-SCOP)做為併用藥物，以探討週邊乙醯膽鹼神經系統在蛇床子石油醚萃取層改善雄性大鼠於被動迴避學習操作障礙之角色。乙醯膽鹼週邊拮抗劑 scopolamine methylbromide(0.5 mg/kg)於訓練前 30 分鐘腹腔注射給予雄性大鼠，本身並不會造成學習記憶之障礙。在本研究乙醯膽鹼週邊拮抗劑 M-SCOP 亦不會造成雄性大鼠被動迴避學習操作障礙，同時對訓練前 60 分鐘口服給予 0.1 g/kg 蛇床子石油醚萃取層之改善學習障礙作用亦不具阻斷作用(如圖 3)。顯示蛇床子石油醚萃取層之改善學習障礙作用與週邊乙醯膽鹼神經系統無關。

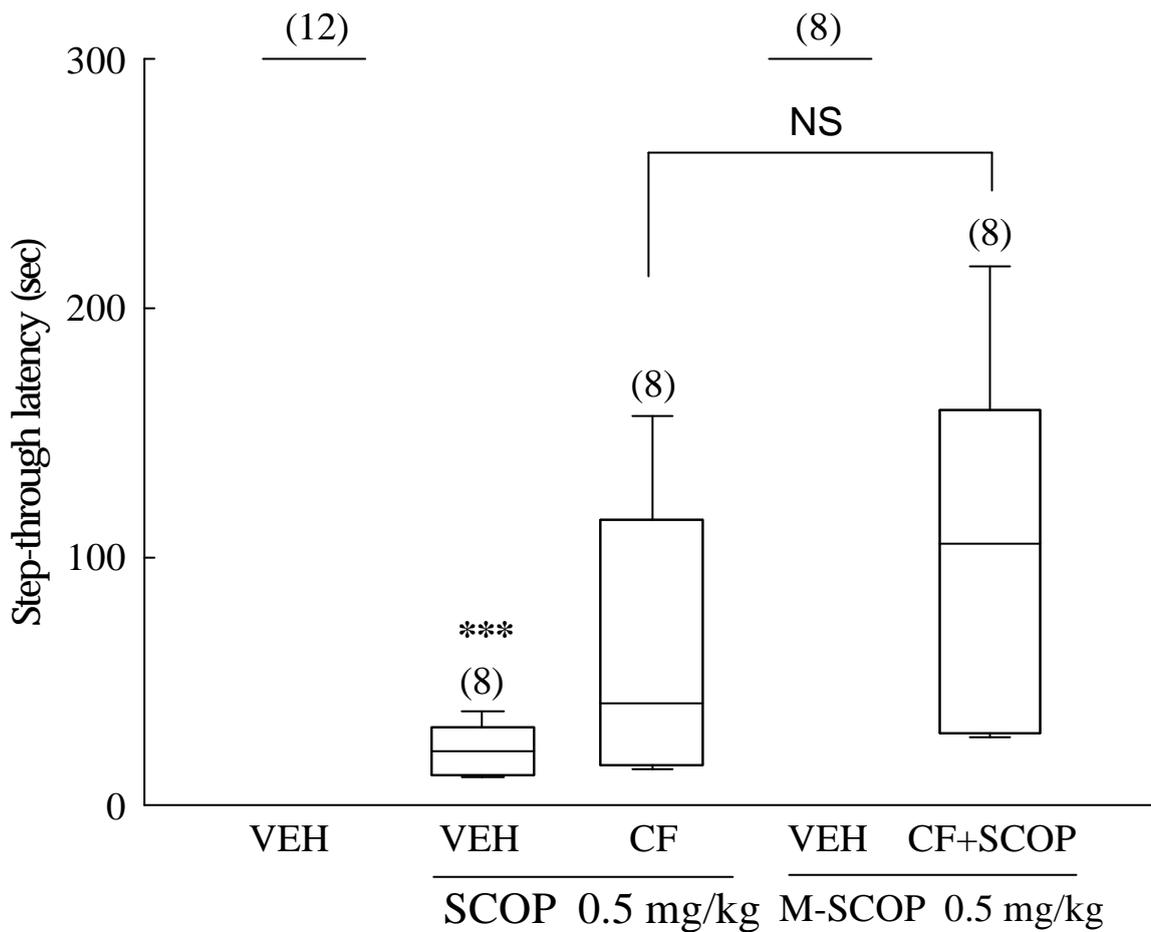


Fig 3. Effect of scopolamine methylbromide (M-SCOP, 0.5 mg/kg) on the reversal from SCOP-induced impairment of passive avoidance performance treated with petroleum ether fraction of *Cnidii Fructus*(CF 0.1 g/kg) in male rats. \*\*\* P<0.001 compared with VEH group.NS:Not significant.

## 2. 週邊 catecholamine 神經毒素 6-OHDA 對蛇床子石油醚萃取層改善學習記憶之影響

選擇週邊交感神經毒素 6-hydroxydopamine(6-OHDA)做為併用藥物，探討週邊 catecholamine 神經系統在蛇床子石油醚萃取層改善雄性大鼠於被動迴避學習操作障礙之角色。週邊交感神經毒素 6-OHDA 25 mg/kg 於訓練前一天靜脈注射給予雄性大鼠，本身並不會造成學習記憶之障礙。在本研究週邊交感神經毒素 6-OHDA 亦不會造成雄性大鼠被動迴避操作障礙，同時對訓練前 60 分鐘口服給予 0.1 g/kg 蛇床子石油醚萃取層之改善學習障礙作用亦不具阻斷作用 如圖 4。顯示蛇床子石油醚萃取層之改善學習障礙作用與週邊 catecholamine 神經系統無關。

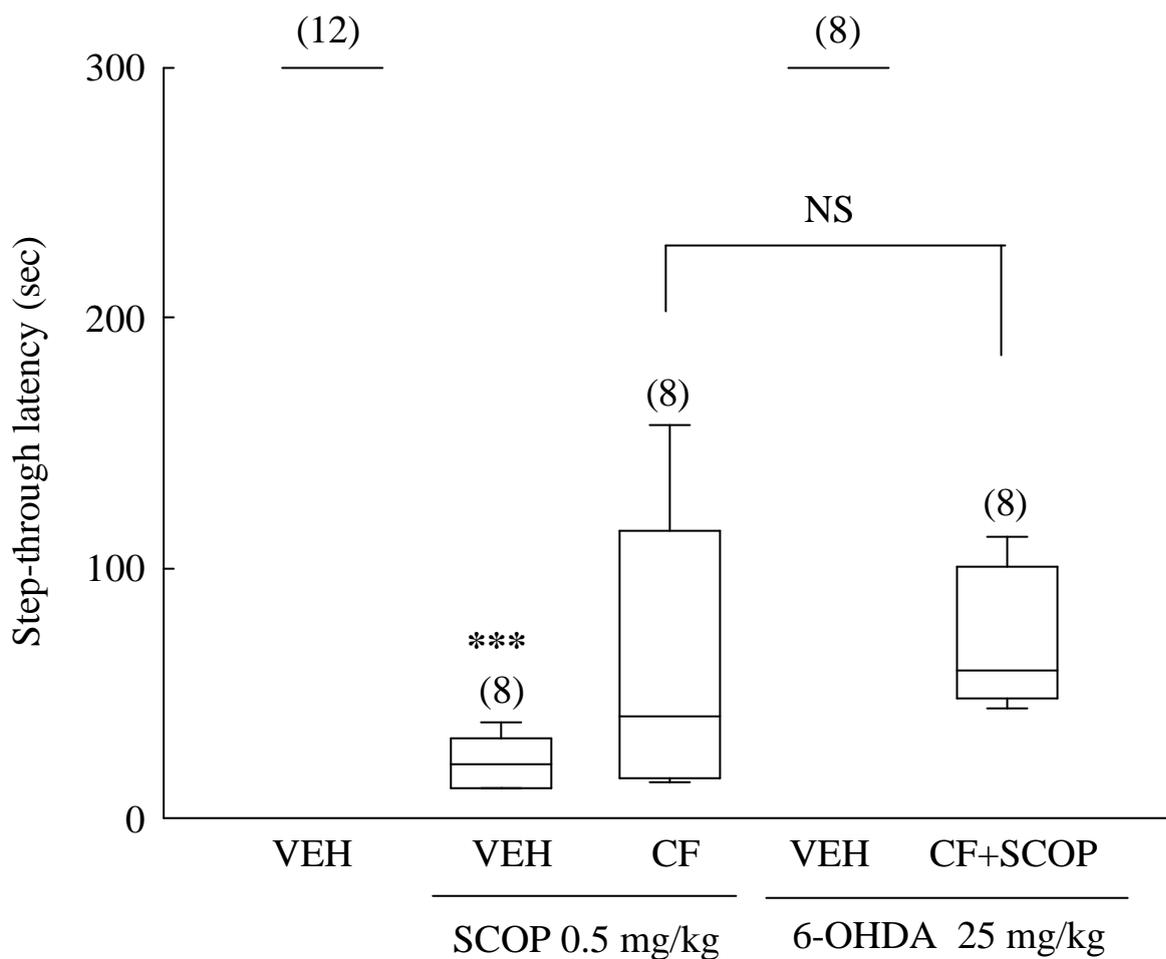


Fig 4. Effect of 6-hydroxydopamine (6-OHDA, 25 mg/kg, i.v.) on the reversal from SCOP-induced impairment of passive avoidance performance treated with petroleum ether fraction of *Cnidii Fructus* (CF 0.1g/kg) in male rats.\*\*\* P<0.001 compared with VEH group. NS:Not significant.

### 三、腎上腺去除對蛇床子石油醚萃取層改善學習記憶之關係

本研究繼續採腎上腺切除方式，以探討腎上腺在蛇床子石油醚萃取層改善雄性大鼠於被動迴避學習操作障礙之角色。雄性大鼠經腎上腺切除後於 5-7 天，因 ACTH 之迴饋增加，故不影響其學習操作能力。本研究採雄性大鼠腎上腺切除後 5 天進行學習操作能力之評估，亦發現不會造成雄性大鼠被動迴避學習操作障礙，但對訓練前 60 分鐘口服給予 0.1 g/kg 蛇床子石油醚萃取層之改善學習障礙作用則具部分阻斷作用( $P < 0.01$ ，如圖 5)。顯示蛇床子石油醚萃取層之改善學習障礙作用與腎上腺系統有關。

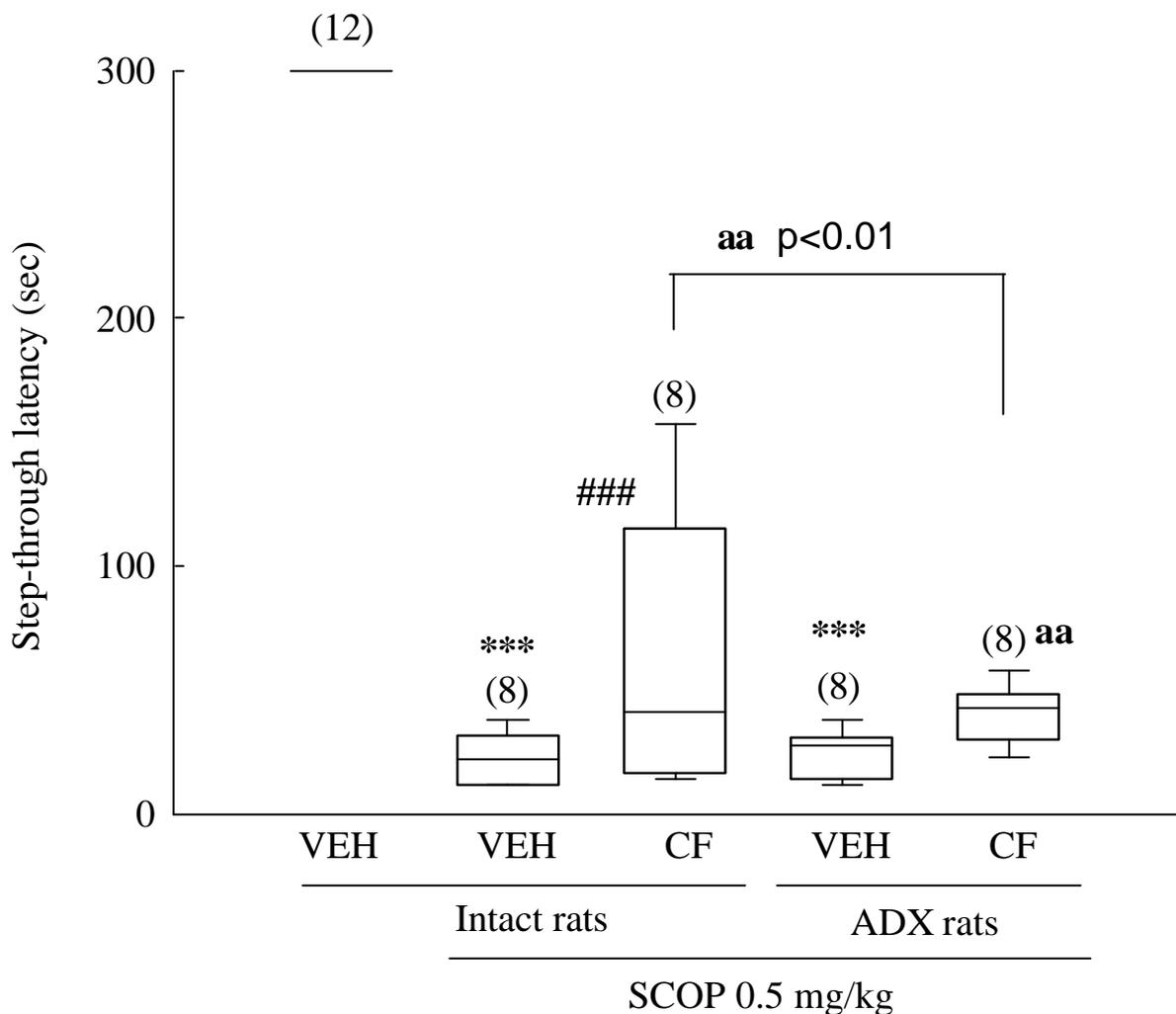


Fig 5. Effect of petroleum ether fraction of Cnidii Fructus(CF 0.1g/kg) on impairment of passive avoidance performance induced by SCOP with high stimulus (1 mA, 2 sec) footshock in intact or ADX male rats.\*\*\* P<0.001 compared with VEH group. ###P<0.001 compared with VEH/SCOP group. aa P<0.01 compared with SCOP/CF intact group.

#### 四、蛇床子石油醚萃取層對雌性大鼠由 scopolamine 誘發被動迴避學習暨水迷宮學習操作之影響

以 scopolamine(SCOP 0.5 mg/kg)誘發雌性大鼠在被動迴避學習操作之障礙；當蛇床子石油醚萃取層於訓練前 60 分鐘口服給予時，僅在 0.3 g/kg 劑量下可明顯改善 SCOP 誘導之被動迴避學習操作障礙 如圖 6。而在水迷宮之學習操作實驗中，於每日學習操作前 30 分鐘腹腔注射給予 SCOP 0.5 mg/kg，亦可造成雌性大鼠在水迷宮學習操作之障礙；當蛇床子石油醚萃取層於訓練前 60 分鐘口服給予時，在 0.3 0.6 g/kg 劑量下可明顯改善 SCOP 誘導之水迷宮學習操作障礙 如圖 7。當雌性大鼠於被動迴避學習暨水迷宮學習操作模式評估後，所有雌性大鼠抽血以測定血中 estradiol 及 progesterone 之濃度，結果發現給予 SCOP 之雌性大鼠血中 estradiol 的濃度遠低於正常鼠；而服用蛇床子石油醚萃取層之雌性大鼠可使血中 estradiol 之濃度恢復至與正常鼠相當；但對 progesterone 則均不影響 如圖 8。

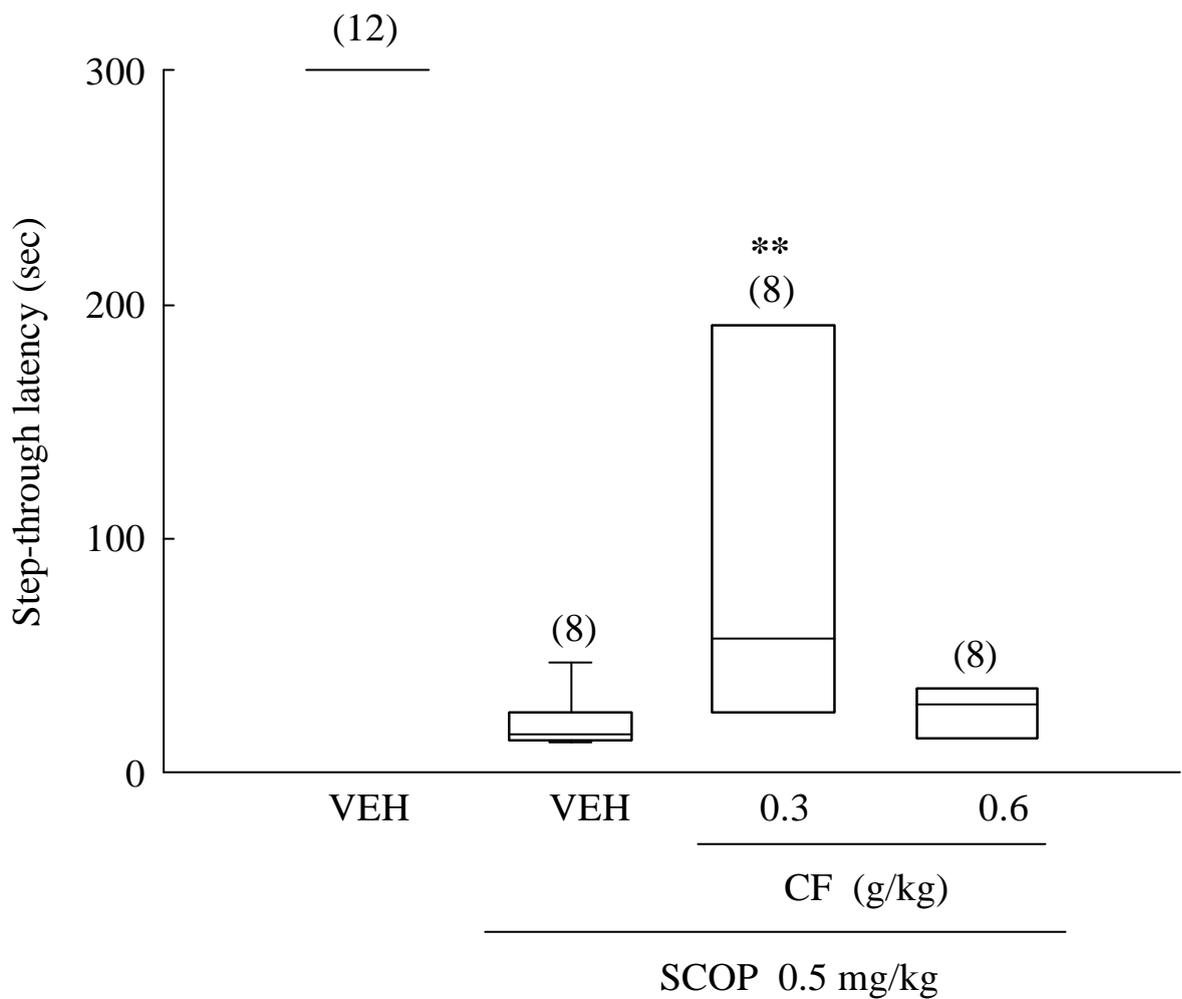


Fig 6. Effect of petroleum ether fraction of *Cnidii Fructus* (CF) on impairment of passive avoidance performance induced by SCOP with high stimulus (1 mA, 2 sec) footshock in female rats. \*\*  $P < 0.01$  compared with VEH/SCOP group.

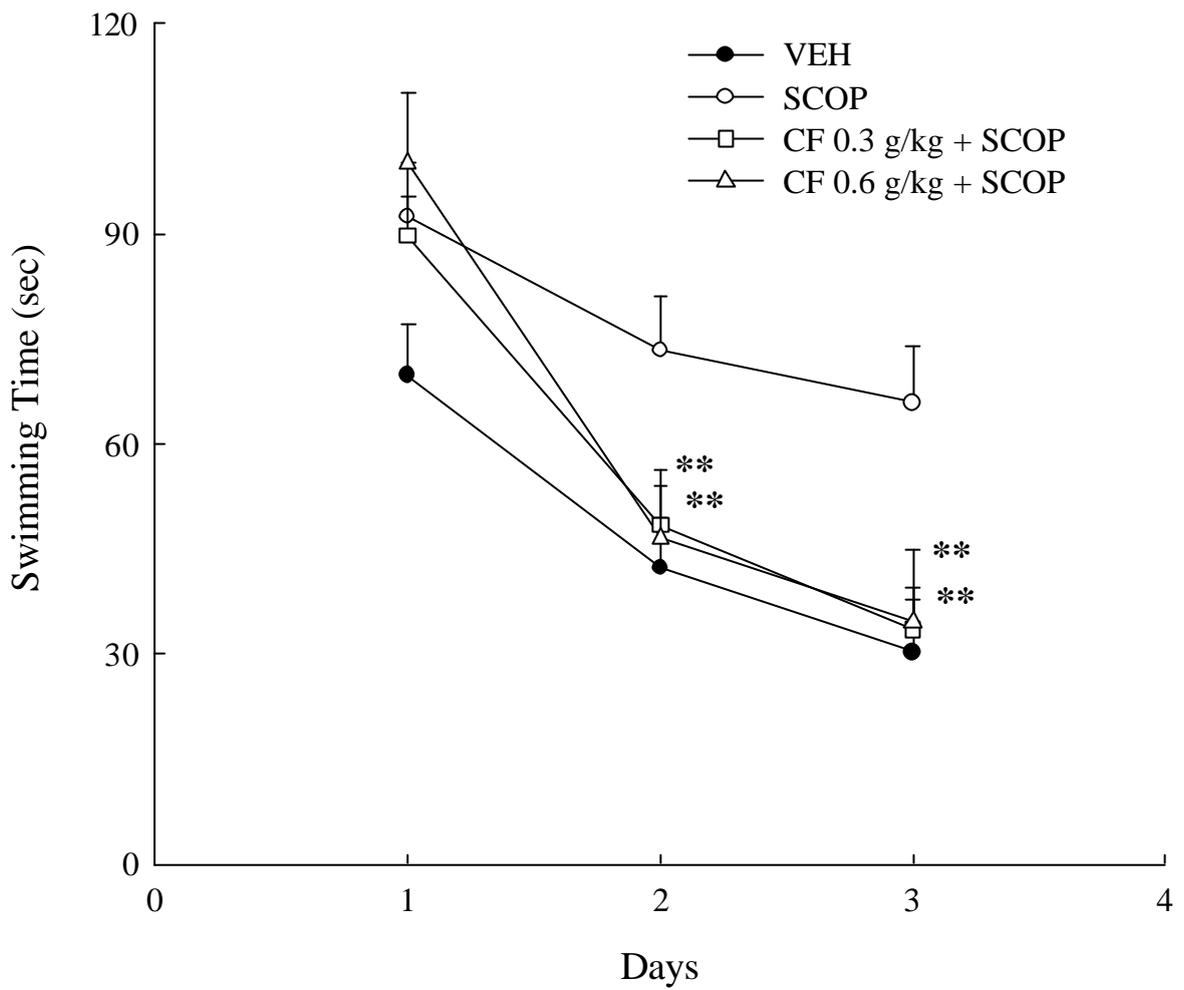


Fig 7. Effect of petroleum ether fraction of Cnidii Fructus (CF) on impairment of water maze performance induced by SCOP in female rats. \*\*P<0.01 compared with SCOP group.

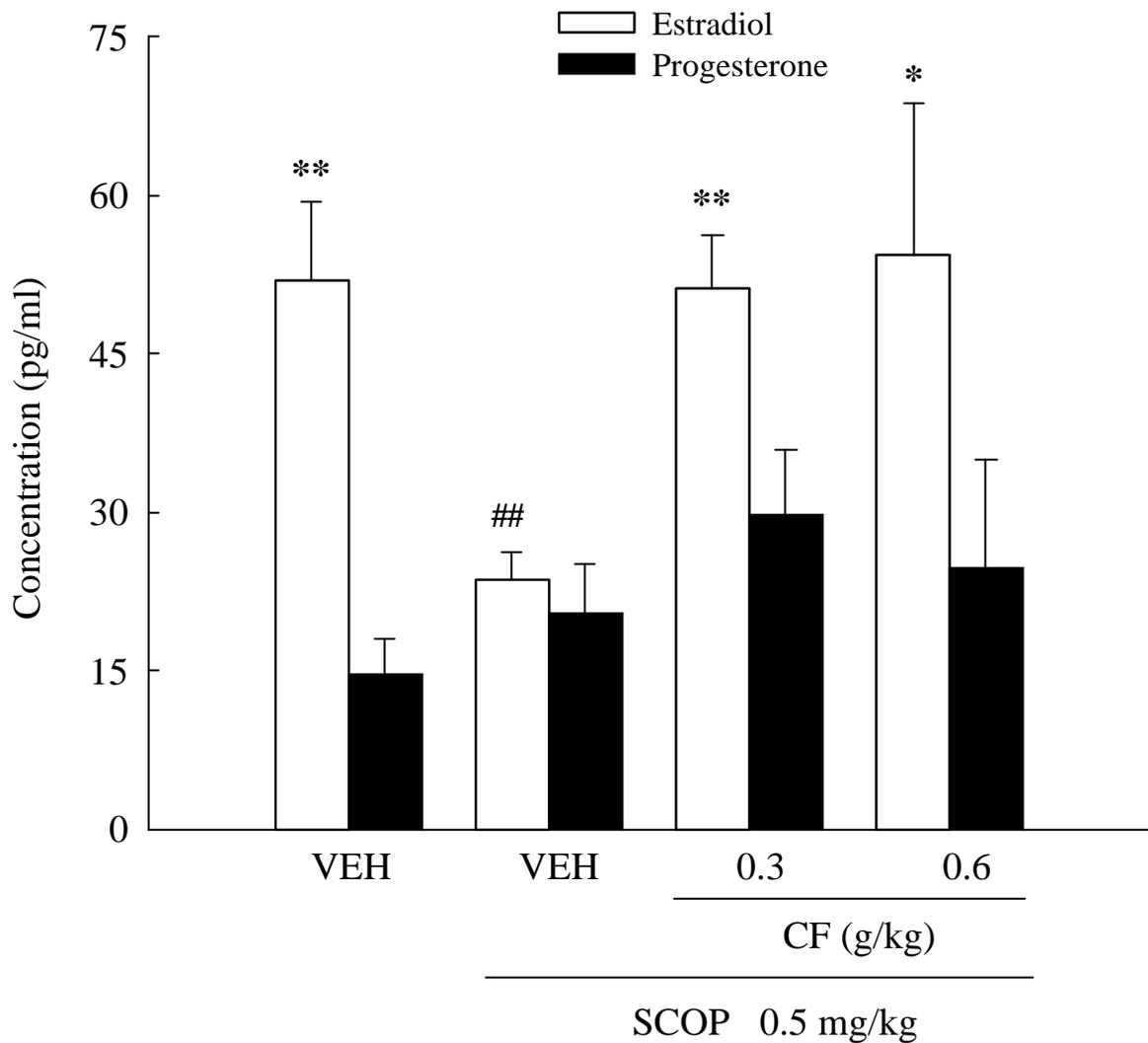


Fig 8. Effect of petroleum ether fraction of Cnidii Fructus (CF) in combination with SCOP on the levels of plasma estradiol and progesterone in female rats. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  compared with VEH/SCOP group. ##  $P < 0.01$  compared with VEH group.

## 五、卵巢去除對蛇床子石油醚萃取層在被動迴避學習操作之影響

卵巢切除造成雌性大鼠停經之動物模式，卵巢切除後之雌性大鼠其被動迴避學習能力明顯出現障礙；蛇床子石油醚萃取層僅 0.6 g/kg 可改善被動迴避學習操作障礙之現象 如圖 9 。至於，其血中 estradiol 之濃度則低於本研究所用檢測方法之檢測範圍。

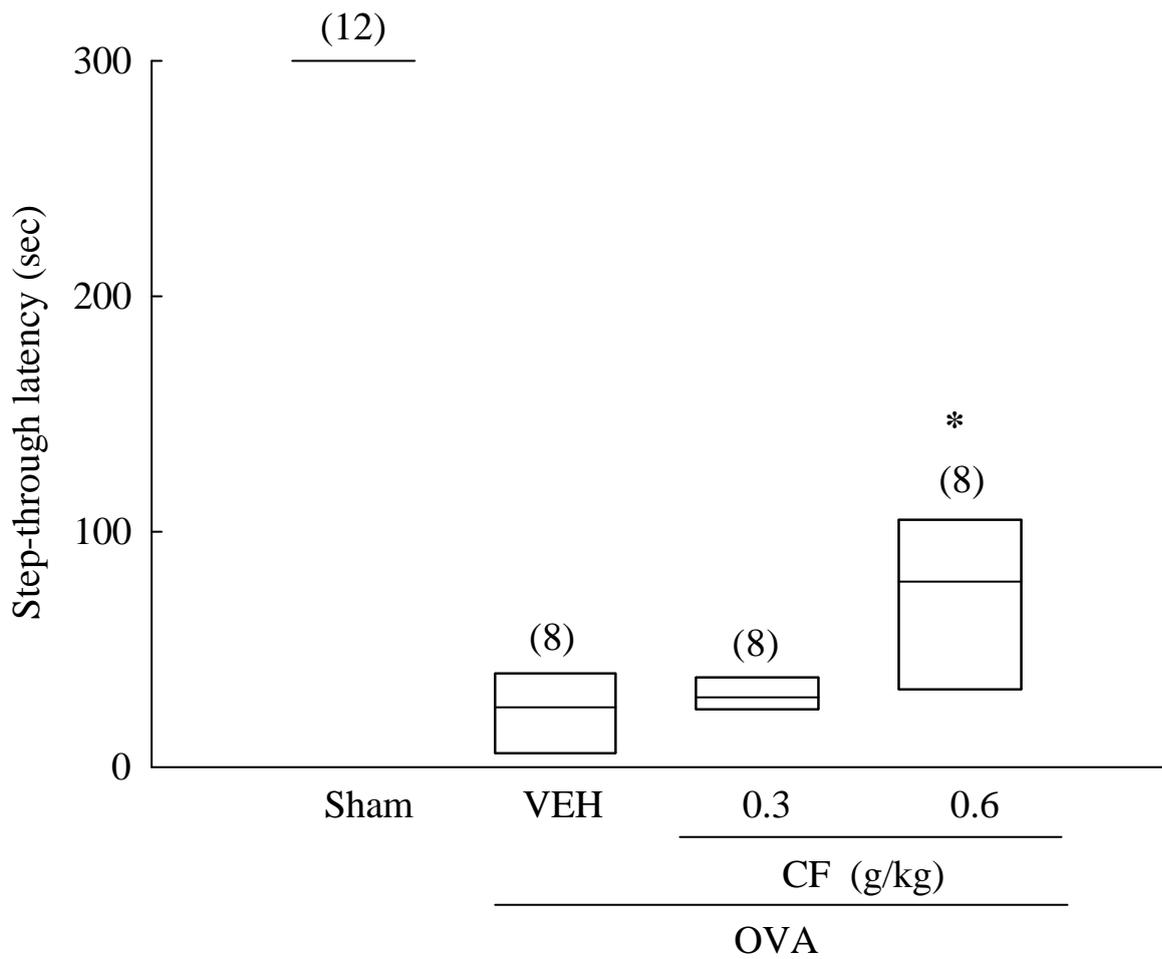


Fig 9. Effect of petroleum ether fraction of Cnidii Fructus (CF) on impairment of passive avoidance performance with high stimulus (1 mA, 2 sec) footshock in ovariectomized (OVA) female rats.  
 \* P<0.05 compared with VEH/OVA group.

## 六、蛇床子素對卵巢切除後在水迷宮學習記憶之影響

我們對蛇床子油溶性主要成分 osthole 在雌性大鼠暨卵巢切除後之停經大鼠進行學習操作能力之評估；同時並探討 osthole 週邊給藥與中樞給藥作用之差別，以期瞭解 osthole 之作用。本研究發現卵巢切除後之停經大鼠在水迷宮之學習操作能力亦明顯出現障礙；當 3, 10 mg/kg osthole 於訓練前經皮下注射給予卵巢切除後之停經大鼠時，可明顯改善水迷宮中學習操作能力障礙之現象(如圖 10)。而在游泳第五天更換浮板位置後之工作性記憶評估中，3, 10 mg/kg osthole 於訓練前經皮下注射僅可改善記憶再現能力，而對再學習過程則不影響，但對記憶再現有改善(如圖 11)。其次，若 osthole (10, 30  $\mu$ g/brain)經腦室給藥可改善 SCOP 對雌性大鼠在水迷宮之學習操作障礙(如圖 12)，但對再學習及記憶再現不具改善作用(如圖 13)。同時對卵巢切除後停經大鼠之水迷宮中學習操作能力障礙現象亦具改善作用(如圖 14)。至於在工作性記憶方面，osthole(10, 30  $\mu$ g/brain)經腦室給藥僅可改善再學習過程，而對記憶再現能力則不影響(如圖 15)。綜合上述之研究結果，蛇床子油溶性主要成分 osthole 不論週邊給藥或中樞給藥均具增強雌性大鼠水迷宮學習操作能力之作用，亦可改善卵巢切除後停經大鼠水迷宮學習操作能力障礙之現象。

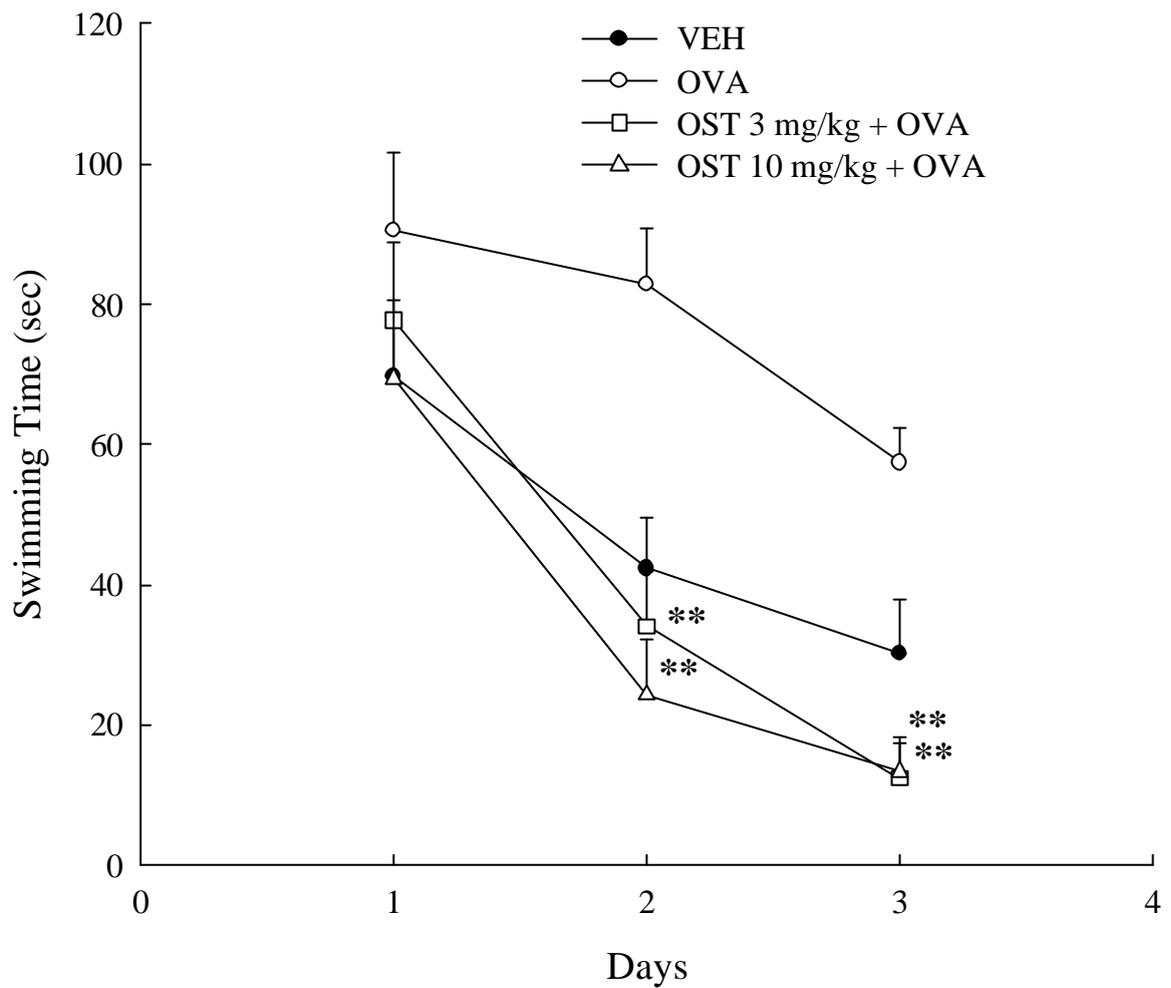


Fig 10. Effect of osthole (OST 3 and 10 mg/kg, s.c.) on impairment of water maze performance in ovariectomized(OVA) female rats. \*\* P<0.01 compared with OVA group.

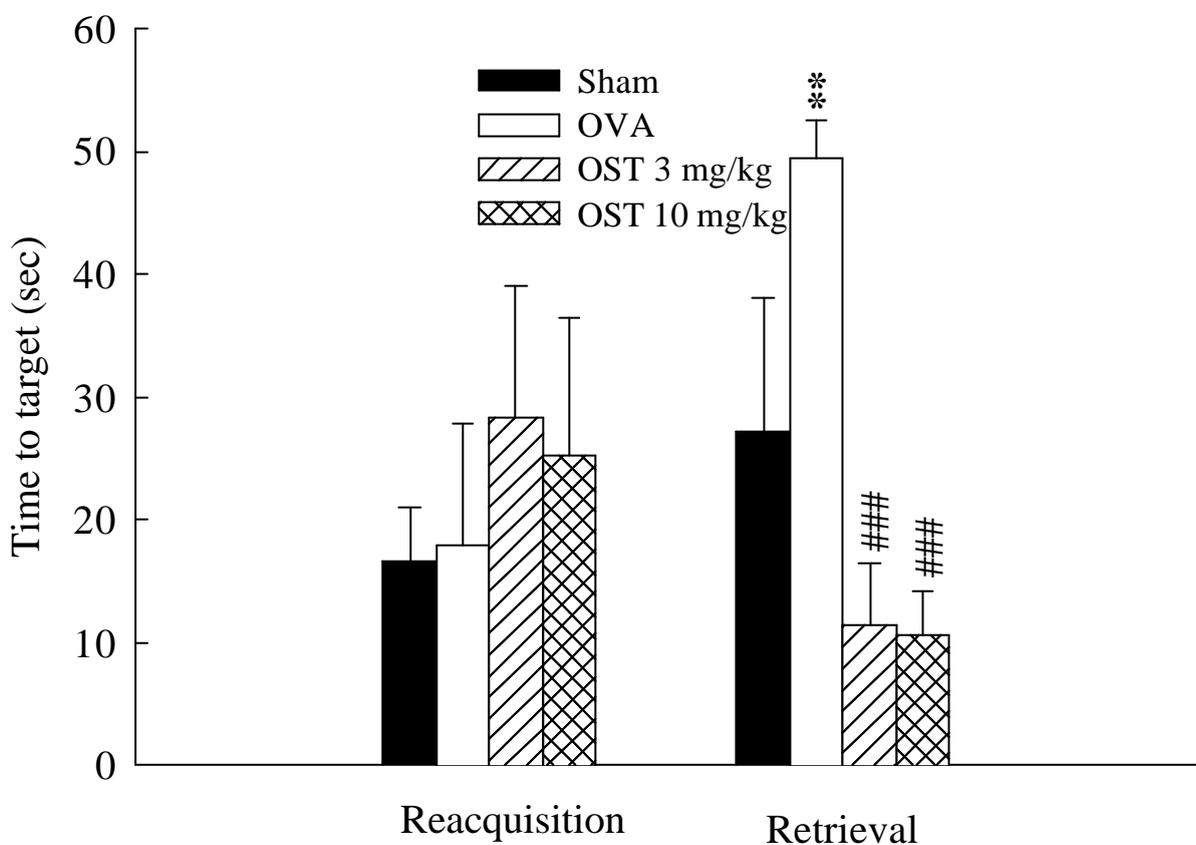


Fig 11. Effect of osthole (OST 3 and 10 mg/kg, s.c.) on reacquisition and retrieval of water maze in ovariectomized(OVA) female rats. \*\* P<0.01 compared with sham group, ### P<0.001 compared with OVA group.

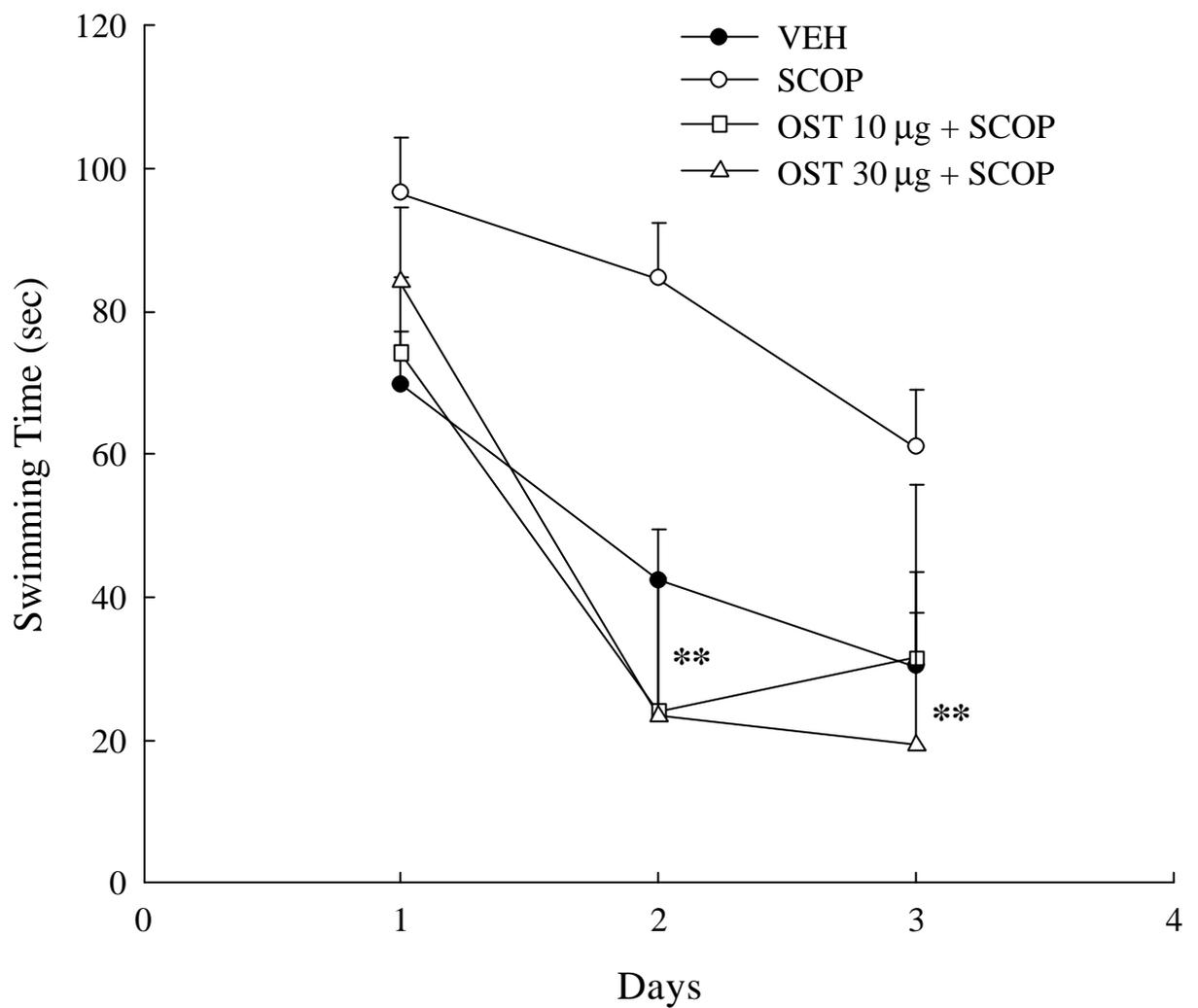


Fig 12. Effect of osthole (OST 10, 30 µg/brain, i.c.v.) on swimming time to target on the hidden platform of water maze in female rats. \*\* P<0.01 compared with SCOP group.

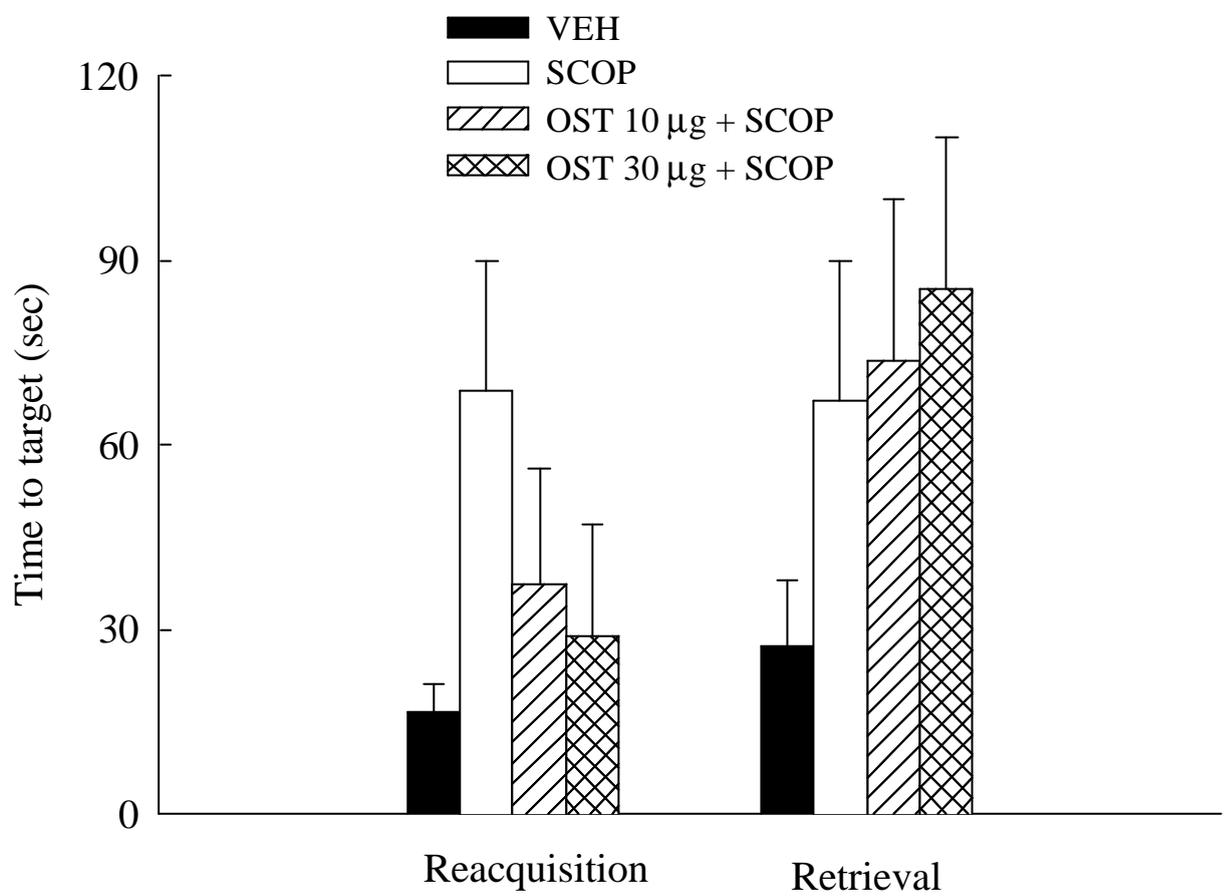


Fig 13. Effect of osthole (OST 10, 30 µg/brain, i.c.v.) on reacquisition and retrieval of water maze in female rats.

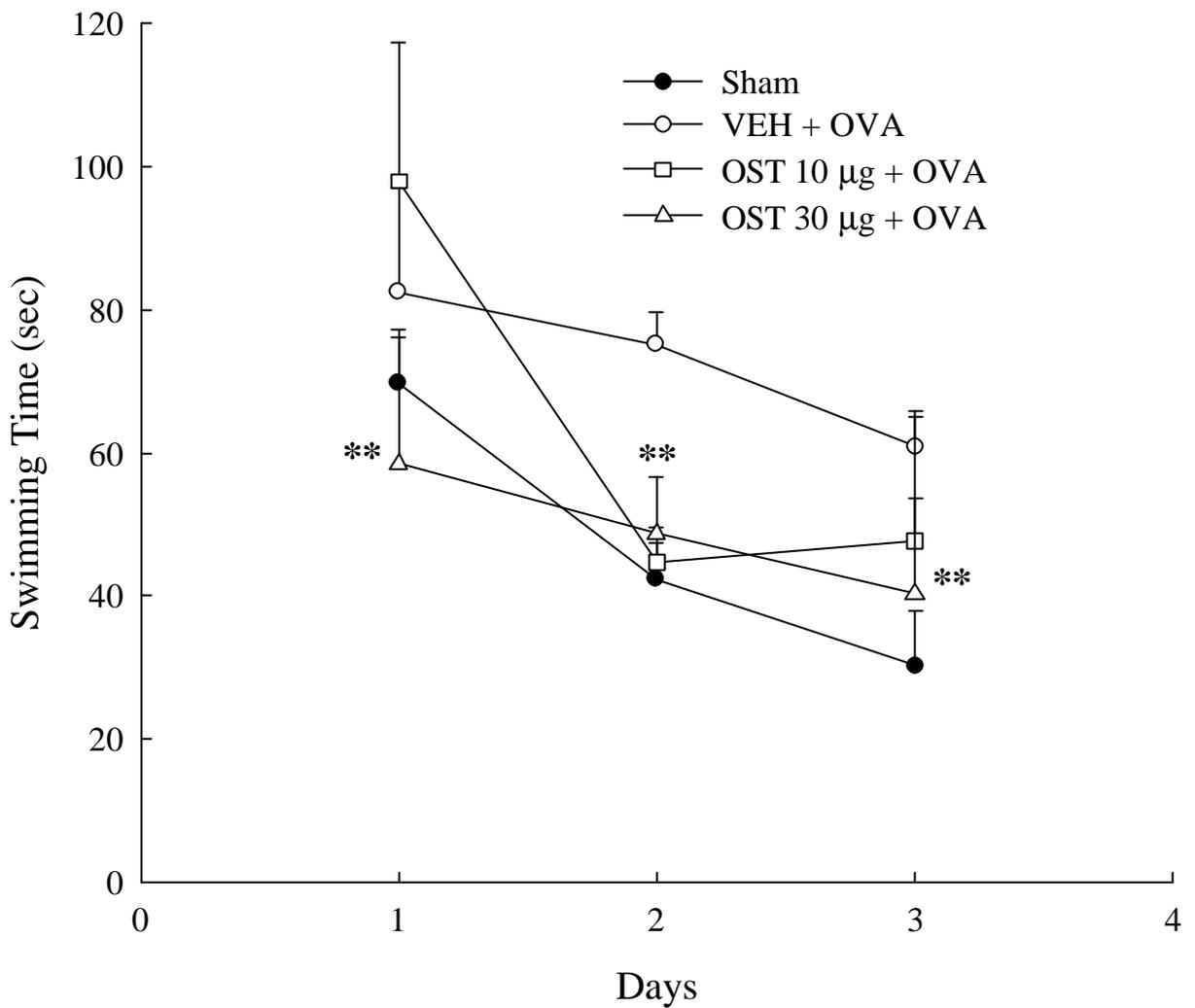


Fig 14. Effect of osthole (OST 10, 30 µg/brain, i.c.v.) on swimming time to target on the hidden platform of water maze in ovariectomized(OVA) female rats. \*\* P<0.01 compared with sham group.

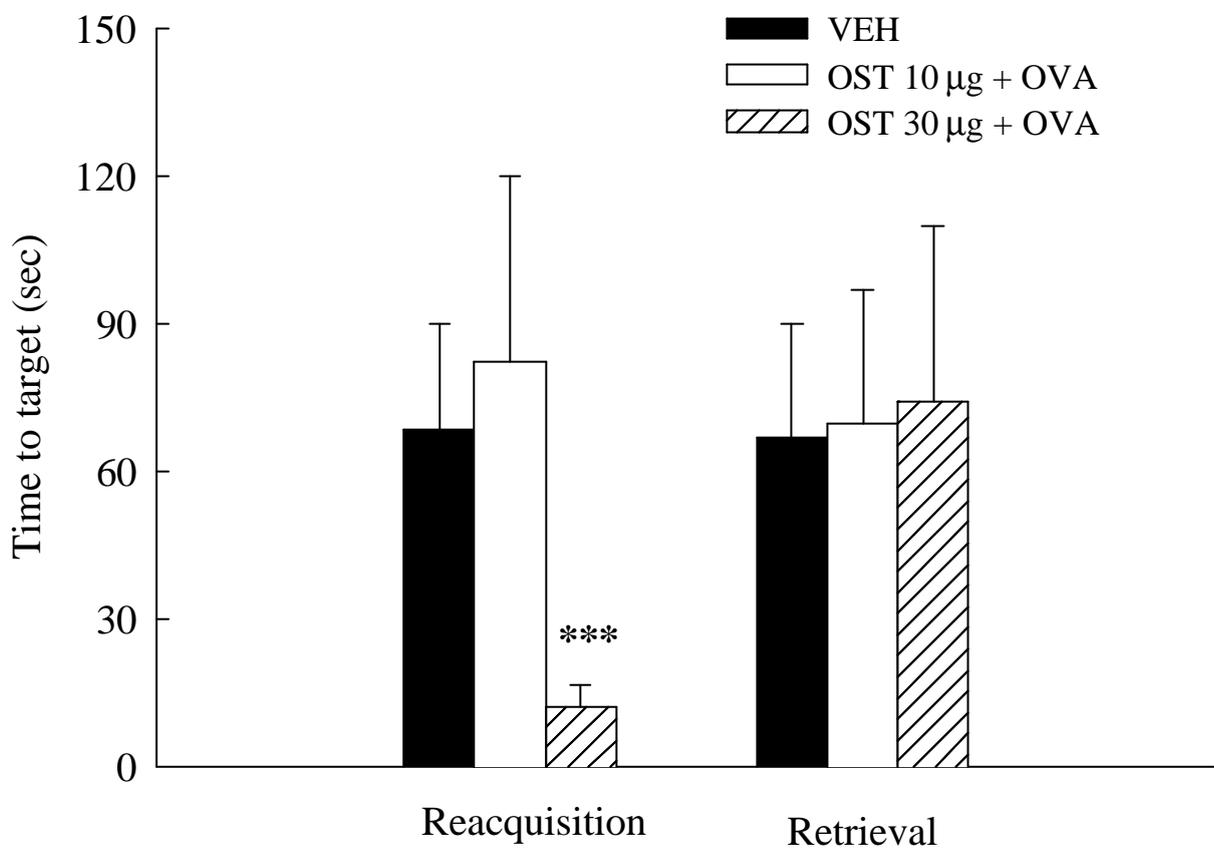


Fig 15. Effect of osthole (OST 10, 30 µg/brain, i.c.v.) on reacquisition and retrieval of water maze in ovariectomized(OVA) female rats. \*\*\*P<0.001 compared with VEH group.

## 七、蛇床子素改善學習記憶與中樞神經系統之關係

### 1. 蛇床子素對中樞膽鹼神經毒素 AF64A 誘發水迷宮學習記憶障礙之影響

針對 osthole 在雄性大鼠學習記憶障礙改善作用之中樞機轉進行探討。首先選擇神經毒素 AF64A 做為併用藥物，以探討中樞膽鹼系統在 osthole 改善大鼠水迷宮學習操作障礙之角色。結果發現，在 AF64A(3 $\mu$ g/brain)於訓練前 10 天腦室給藥，學習操作能力明顯出現障礙，而在學習操作前腦室給予 osthole(10 $\mu$ g)並不具有改善學習障礙作用(如圖 16)；進一步探討參考記憶與工作記憶，圖 17、圖 18 顯示給予 AF64A 在參考記憶與工作記憶明顯出現學習操作能力障礙，而 osthole 並不具有改善的作用。由此可知，osthole 改善學習障礙作用與中樞膽鹼神經系統無關。

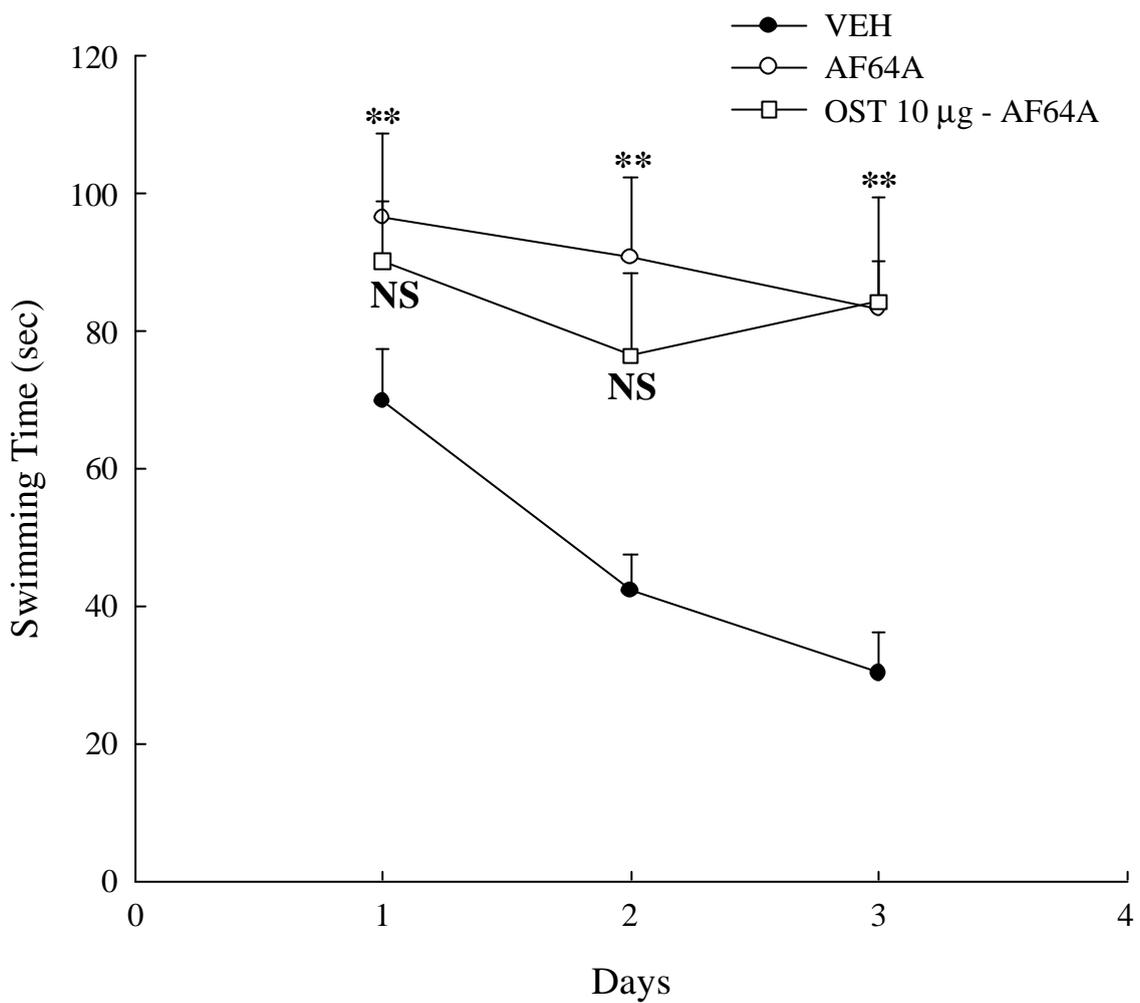


Fig 16. Effect of osthole(OST 10μg/brain, i.c.v.) on impairment of water maze performance induced by AF64A. \*\*P<0.01 compared with VEH group. NS: Not significant.

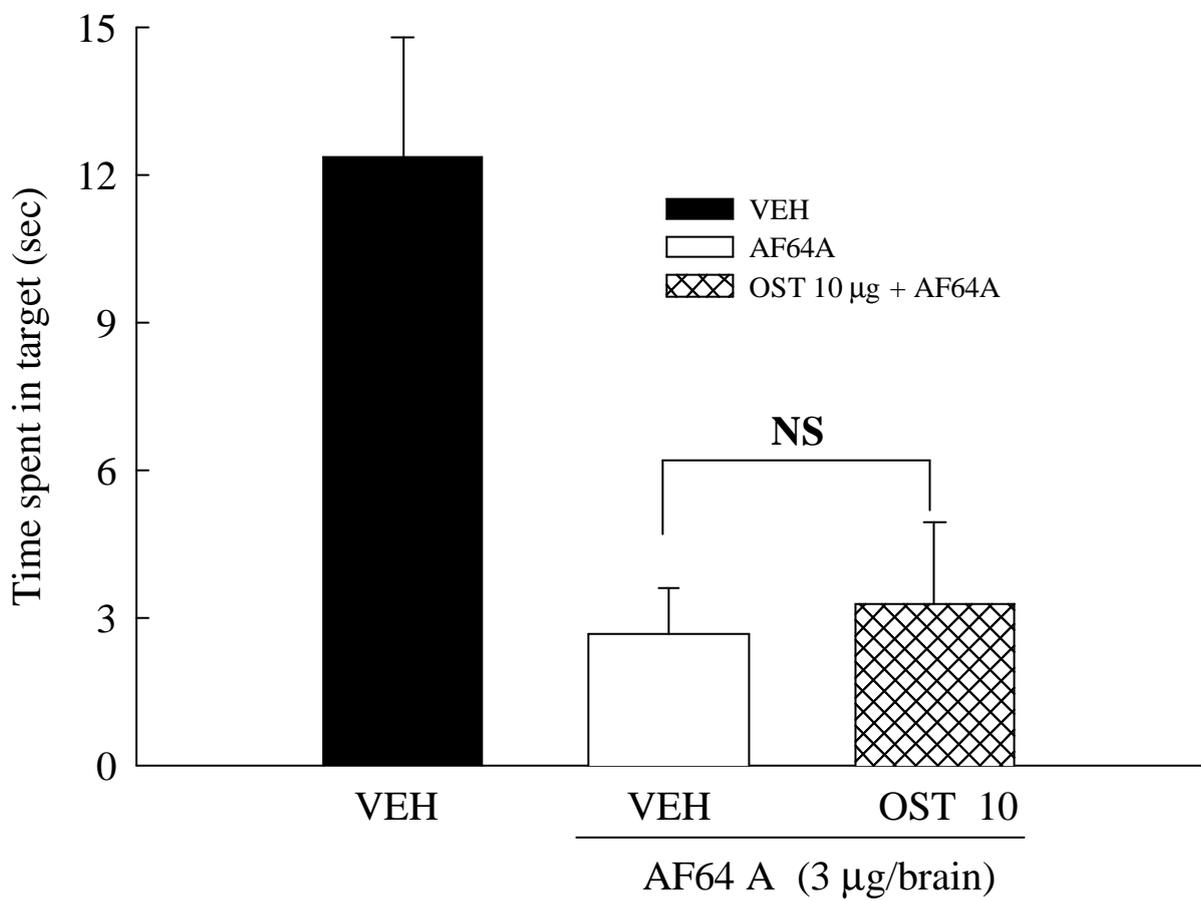


Fig 17. Effect of osthole(OST 10µg/brain, i.c.v.) on reference memory of water maze induced by AF64A. NS: Not significant.

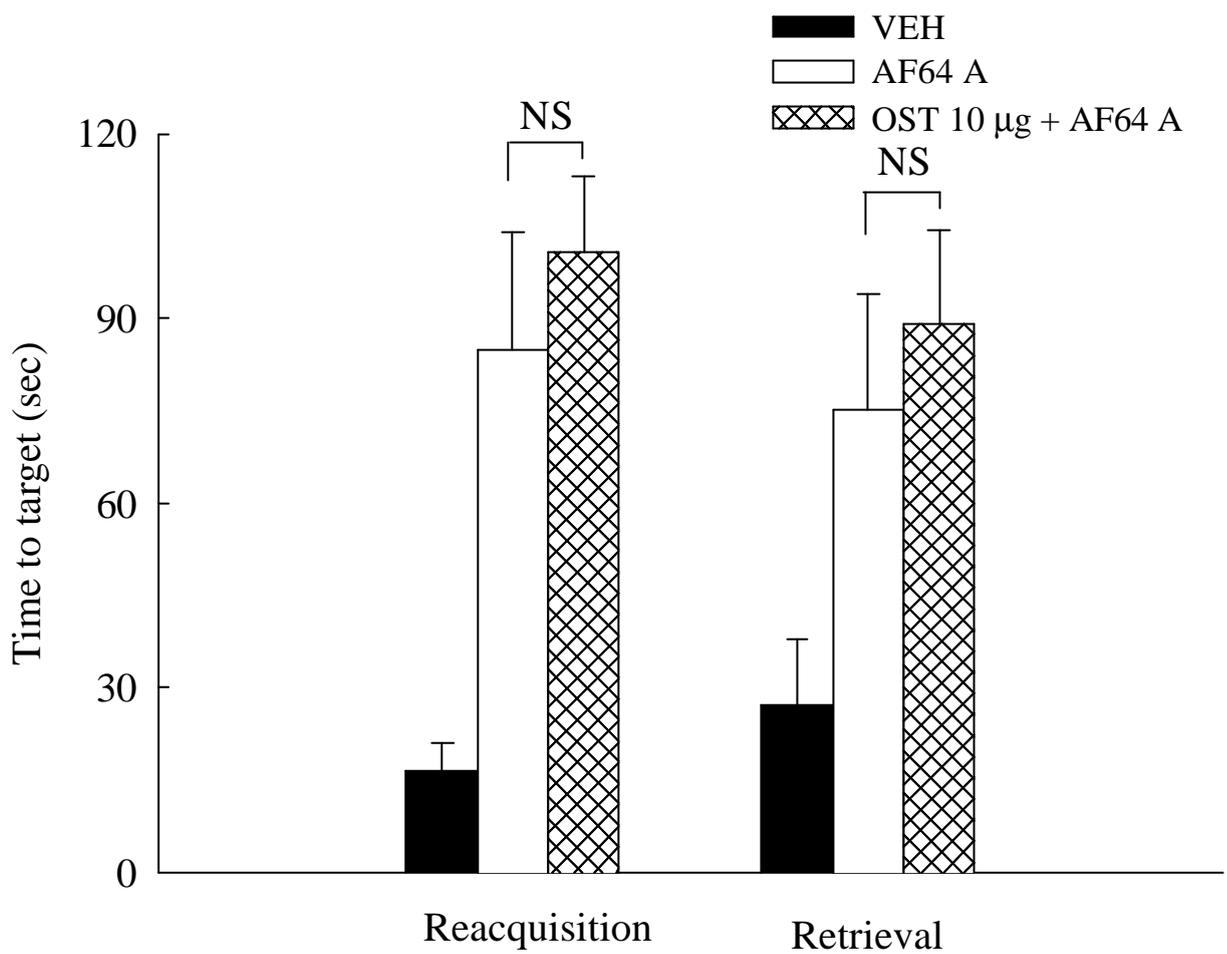


Fig 18. Effect of osthole(OST 10 $\mu$ g/brain, i.c.v.) on reacquisition and retrieval of water maze induced by AF64A. NS: Not significant.

## 2. 蛇床子素對中樞血清素神經毒素 5,7- DHT 誘發水迷宮學習記憶障礙之影響

選用血清素神經毒素 5,7- DHT 做為併用藥物，以探討中樞血清素神經系統在 osthole 改善大鼠水迷宮學習操作障礙之角色。結果發現，在 5,7- DHT (25 $\mu$ g/brain)於訓練前 14 天腦室給藥，學習操作能力明顯出現障礙，而在學習操作前腦室給予 osthole(10 $\mu$ g)不具改善學習障礙作用(如圖 19)；進一步探討參考記憶與工作記憶，圖 20、圖 21，顯示給予 5,7- DHT 在參考記憶與工作記憶明顯出現學習操作能力障礙，而給予 osthole 不具改善的作用。由此可知，osthole 改善學習障礙作用與中樞血清素神經系統無關。

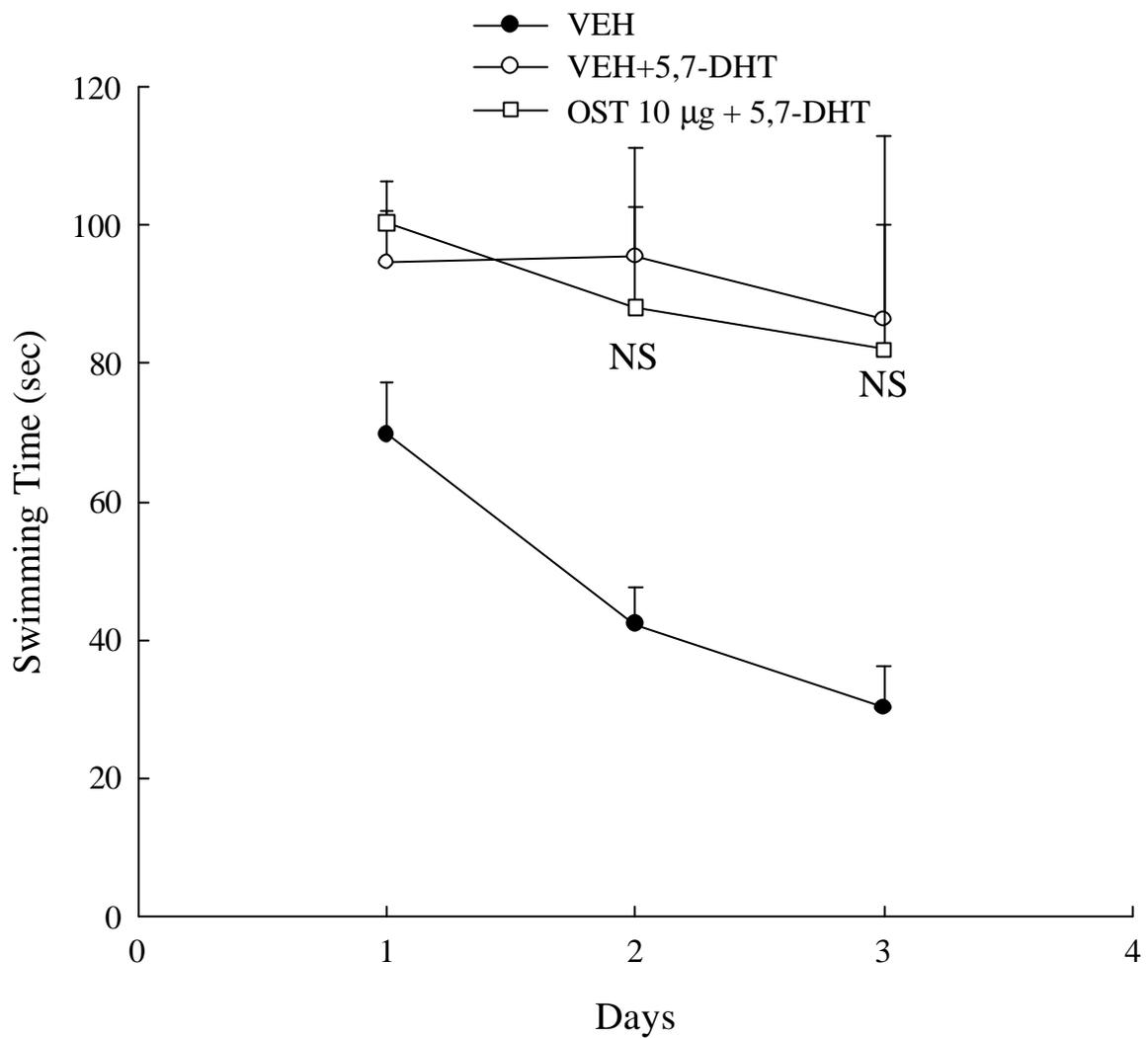


Fig 19. Effect of osthole(OST 10μg/brain, i.c.v.) on impairment of water maze performance induced by 5,7-DHT. NS: Not significant.

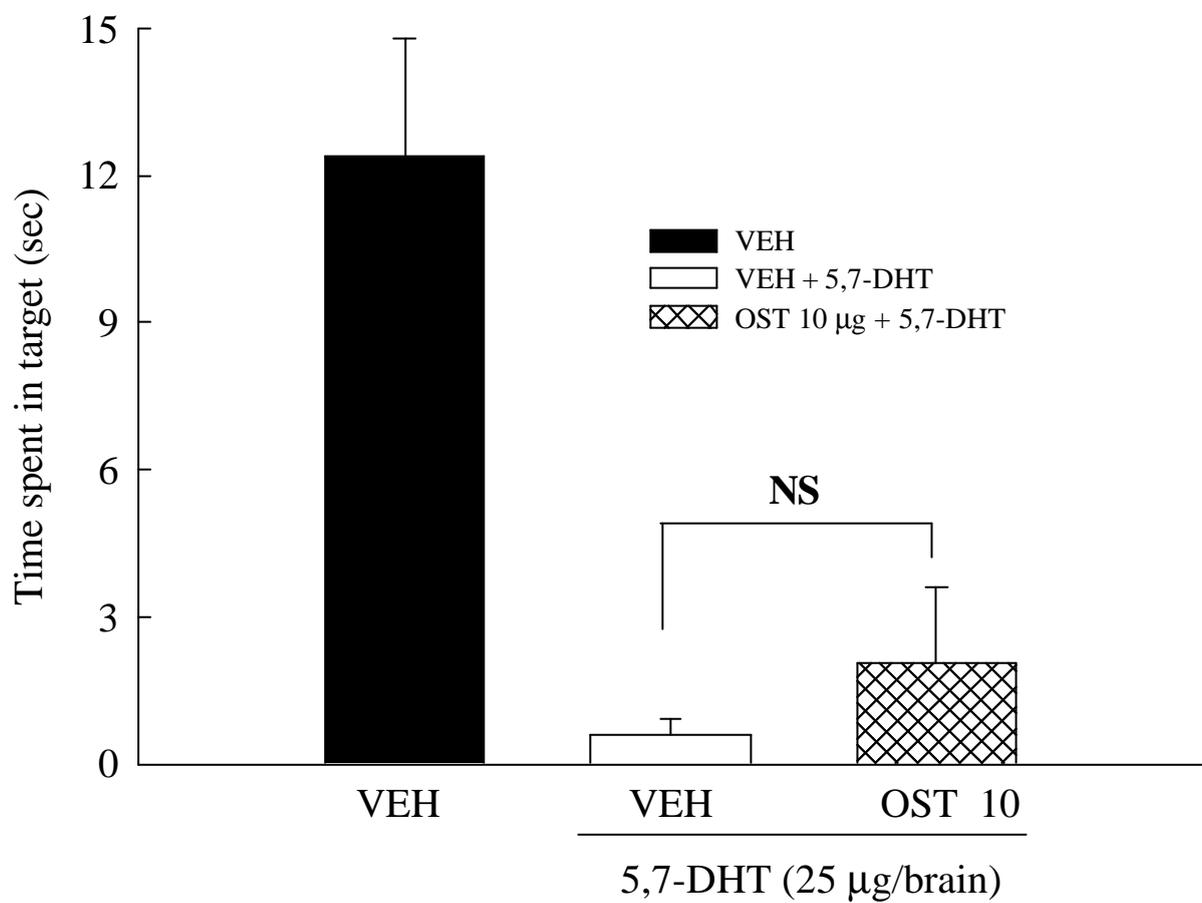


Fig 20. Effect of osthole(OST 10 $\mu$ g/brain, i.c.v.) on reference memory of water maze induced by 5,7-DHT. NS: Not significant.

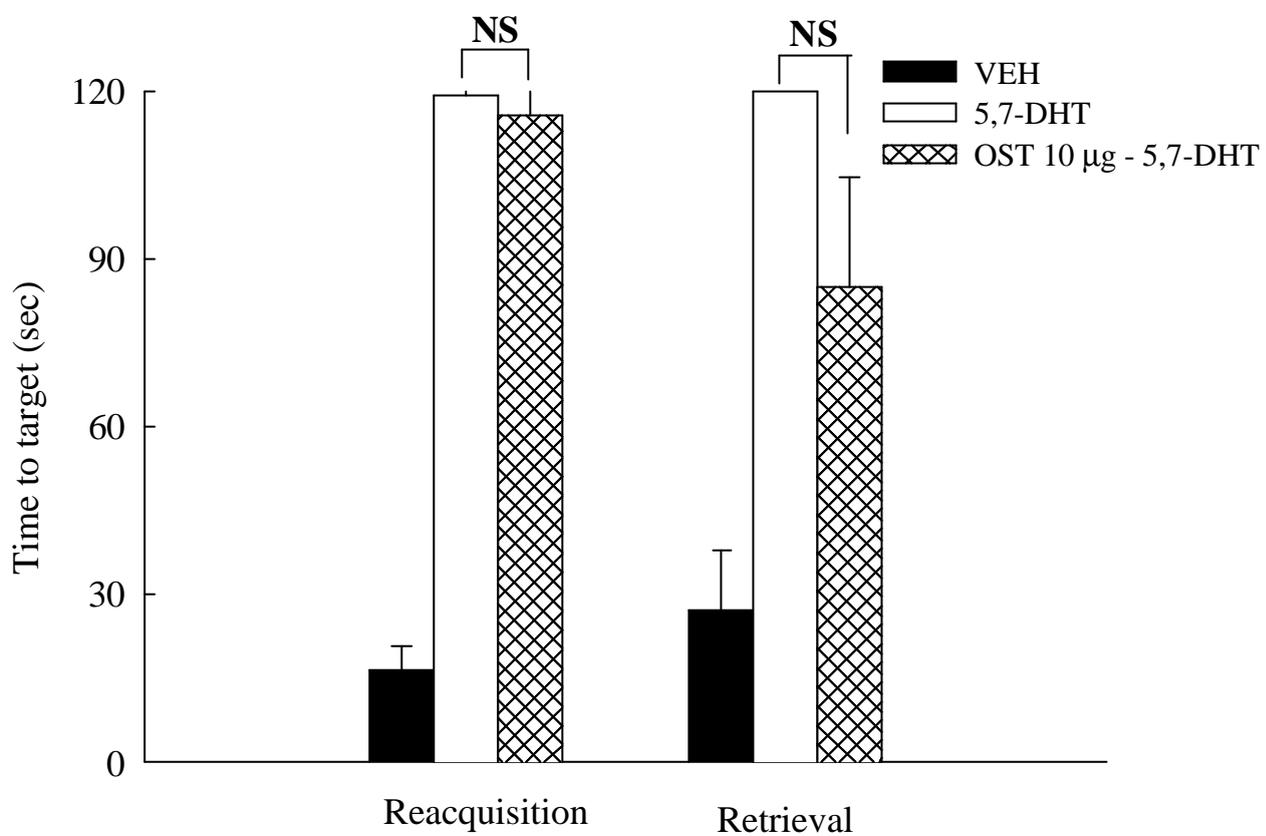


Fig 21. Effect of osthole(OST 10 µg/brain i.c.v.) on reacquisition and retrieval of water maze induced by 5,7-DHT. NS: Not significant.

### 3. 蛇床子素對中樞 catecholamine 神經毒素 6-OHDA 誘發水迷宮學習記憶障礙之影響

以 catecholamine 神經毒素 6-OHDA 做為併用藥物，以探討中樞 catecholamine 神經系統在 osthole 改善大鼠水迷宮學習操作障礙之角色。結果發現，在 6-OHDA (25 $\mu$ g/brain)於訓練前 14 天腦室給藥，學習操作能力明顯出現障礙，而在學習操作前腦室給予 osthole(10 $\mu$ g)能夠明顯改善學習障礙作用(如圖 22)；進一步探討參考記憶與記憶再現，圖 23、圖 24，顯示給予 6-OHDA 在參考記憶與記憶再現明顯出現學習操作能力障礙，而給予 osthole 有明顯的改善作用。由此可知，osthole 改善學習障礙作用與 catecholamine 神經系統有關。

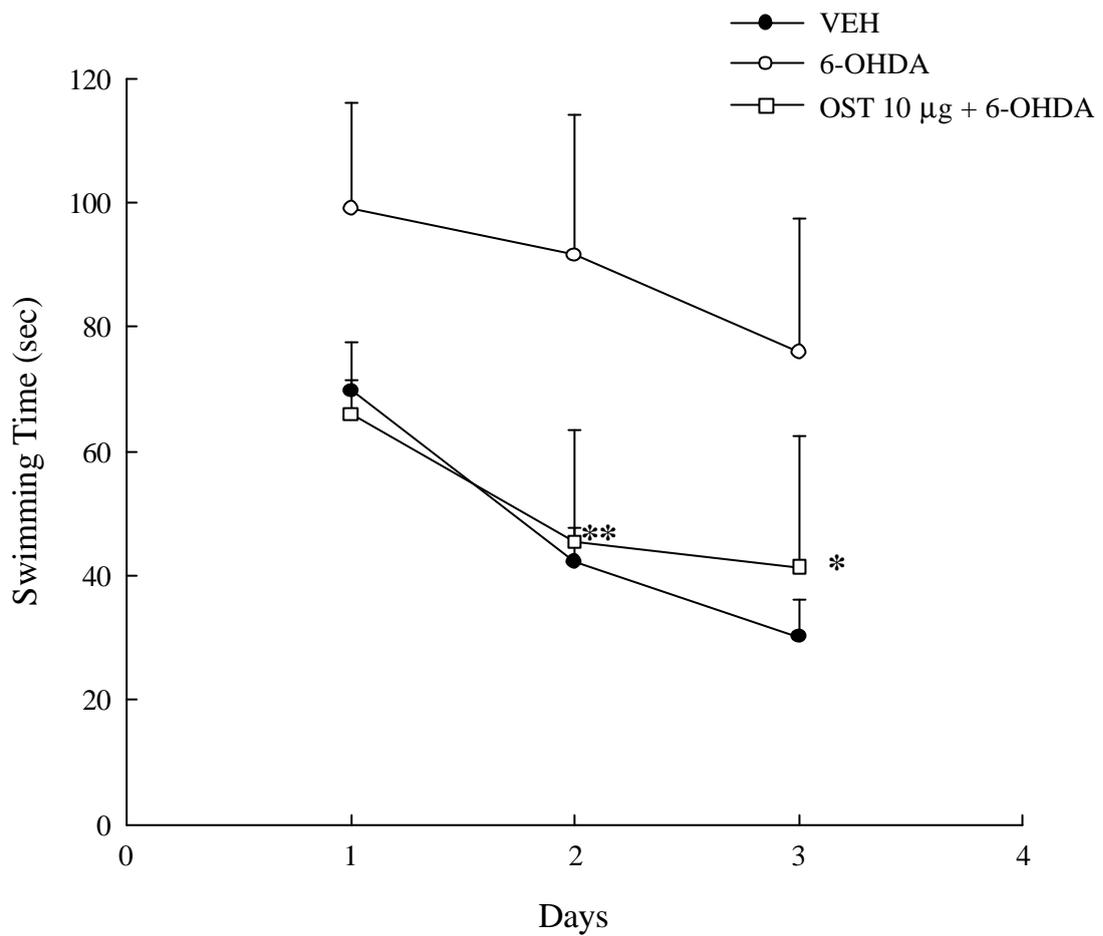


Fig 22. Effect of osthole(OST 10 µg/brain, i.c.v.) on impairment of water maze performance induced by 6-OHDA. \*P<0.05, \*\*P<0.01 compared with 6-OHDA

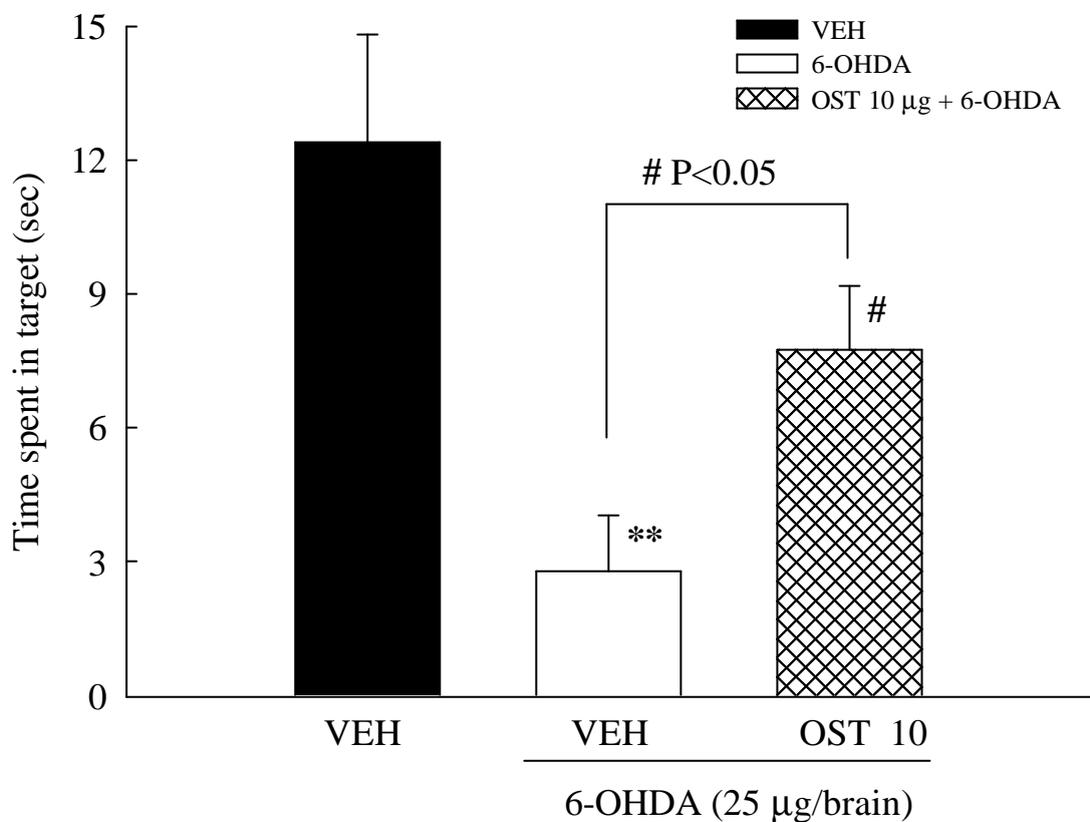


Fig 23. Effect of osthole(OST 10 µg/brain, i.c.v.) on reference memory of water maze induced by 6-OHDA. \*\*P<0.01 compared with VEH group. #P<0.05 compared with 6-OHDA group.

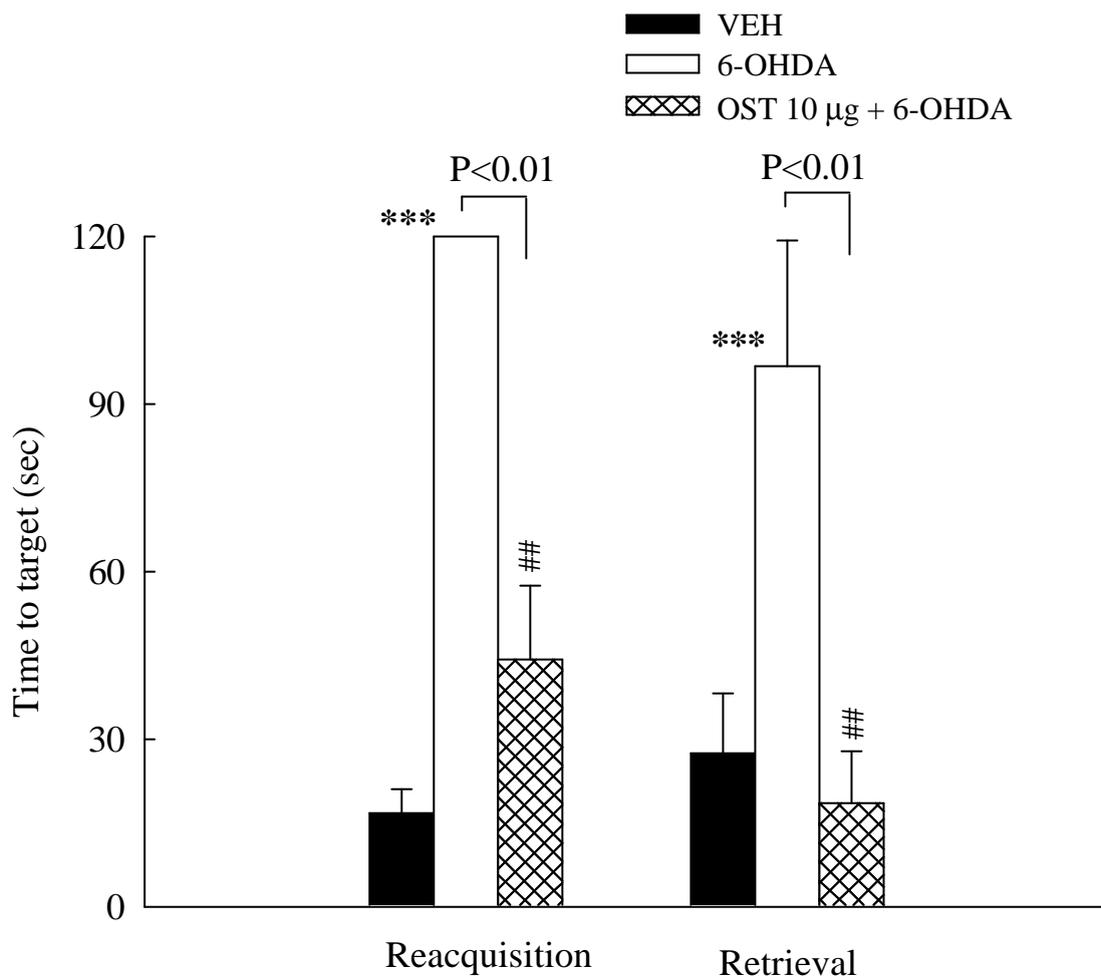


Fig 24. Effect of osthole(OST 10 µg/brain, i.c.v.) on reacquisition and retrieval of water maze induced by 6-OHDA. \*\*\*P<0.001 compared with VEH group. ##P<0.01 compared with 6-OHDA group.

#### 4. 蛇床子素對中樞腎上腺素 拮抗劑 propranolol 誘發水迷宮學習記憶障礙之影響

選用腎上腺素 拮抗劑 propranolol (PROP) 做為併用藥物，以探討中樞腎上腺素 接受器在 osthole 改善大鼠水迷宮學習操作障礙之角色。結果發現，在 PROP (80ng/brain) 於訓練前雙側海馬迴給藥，學習操作能力明顯出現障礙，而在學習操作前腦室給予 osthole (10 $\mu$ g) 不具改善學習障礙作用(如圖 25)；進一步探討參考記憶與工作記憶，圖 26、圖 27，顯示給予 PROP 在參考記憶與工作記憶明顯出現學習操作能力障礙，而給予 osthole 不具有改善的作用。由此可知，osthole 改善學習障礙作用與中樞腎上腺素 接受器無關。

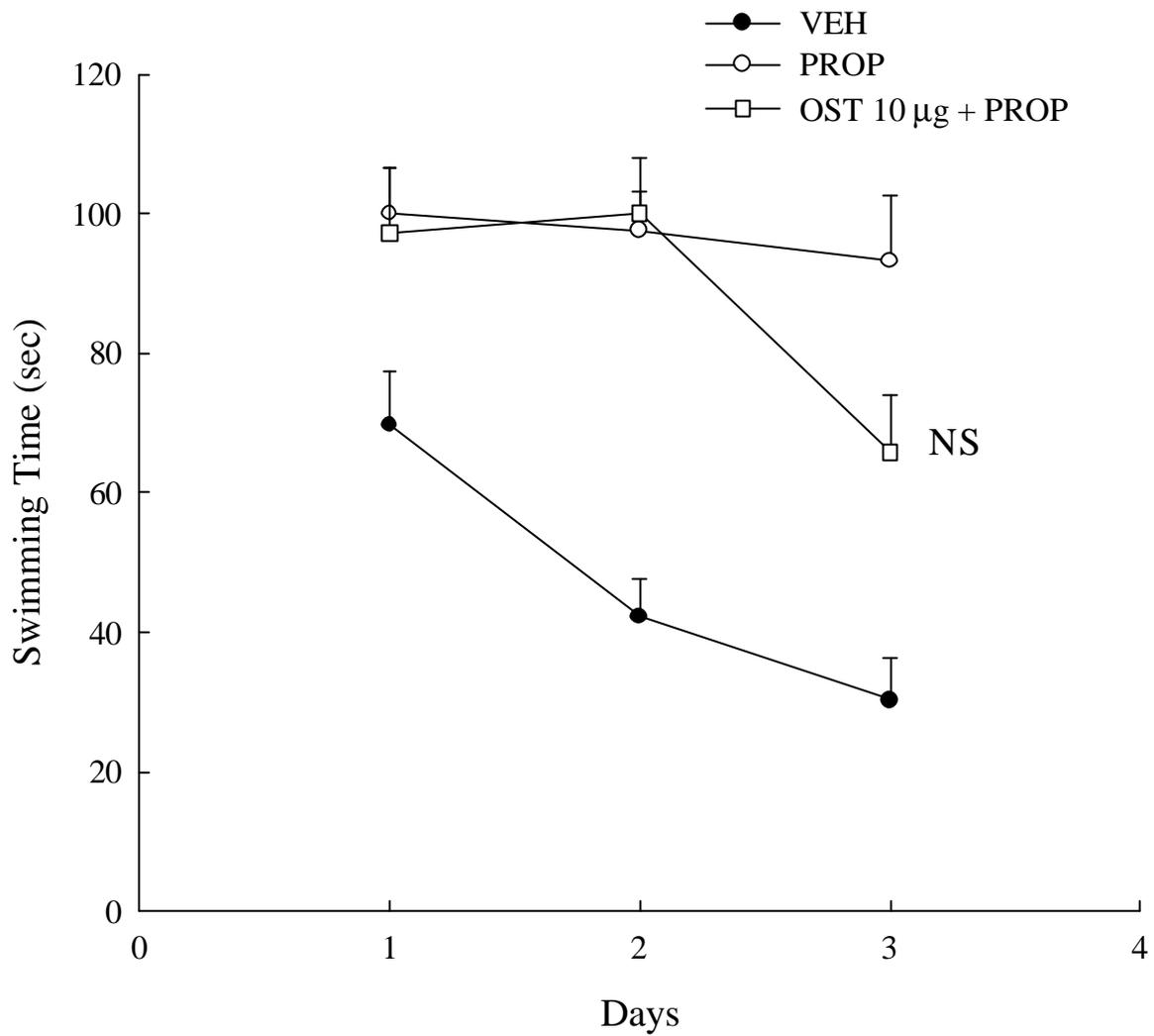


Fig 25. Effect of osthole(OST 10 µg/brain, i.c.v.) on impairment of water maze performance induced by PROP. NS: Not significant.

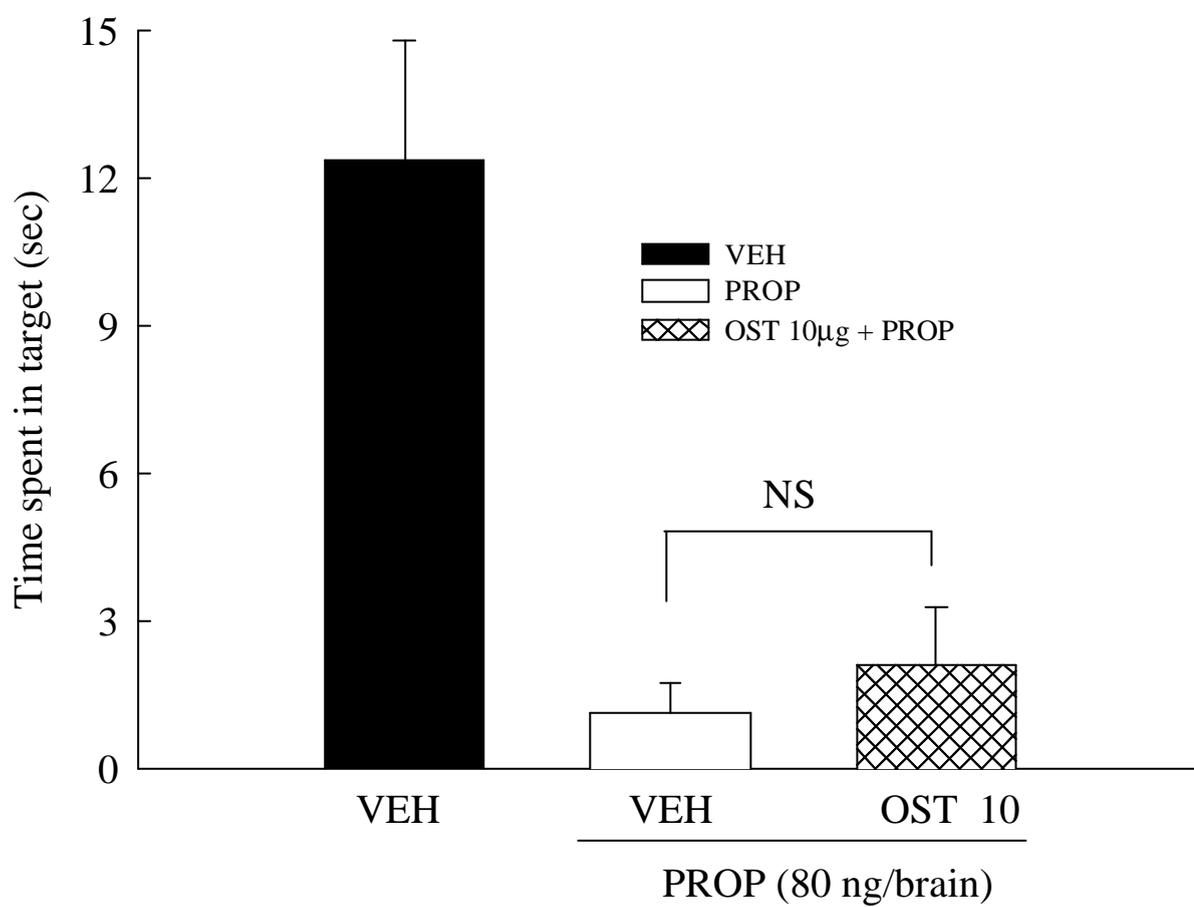


Fig 26. Effect of osthole(OST 10  $\mu$ g/brain, i.c.v.) on reference memory of water maze induced by PROP. NS: Not significant.

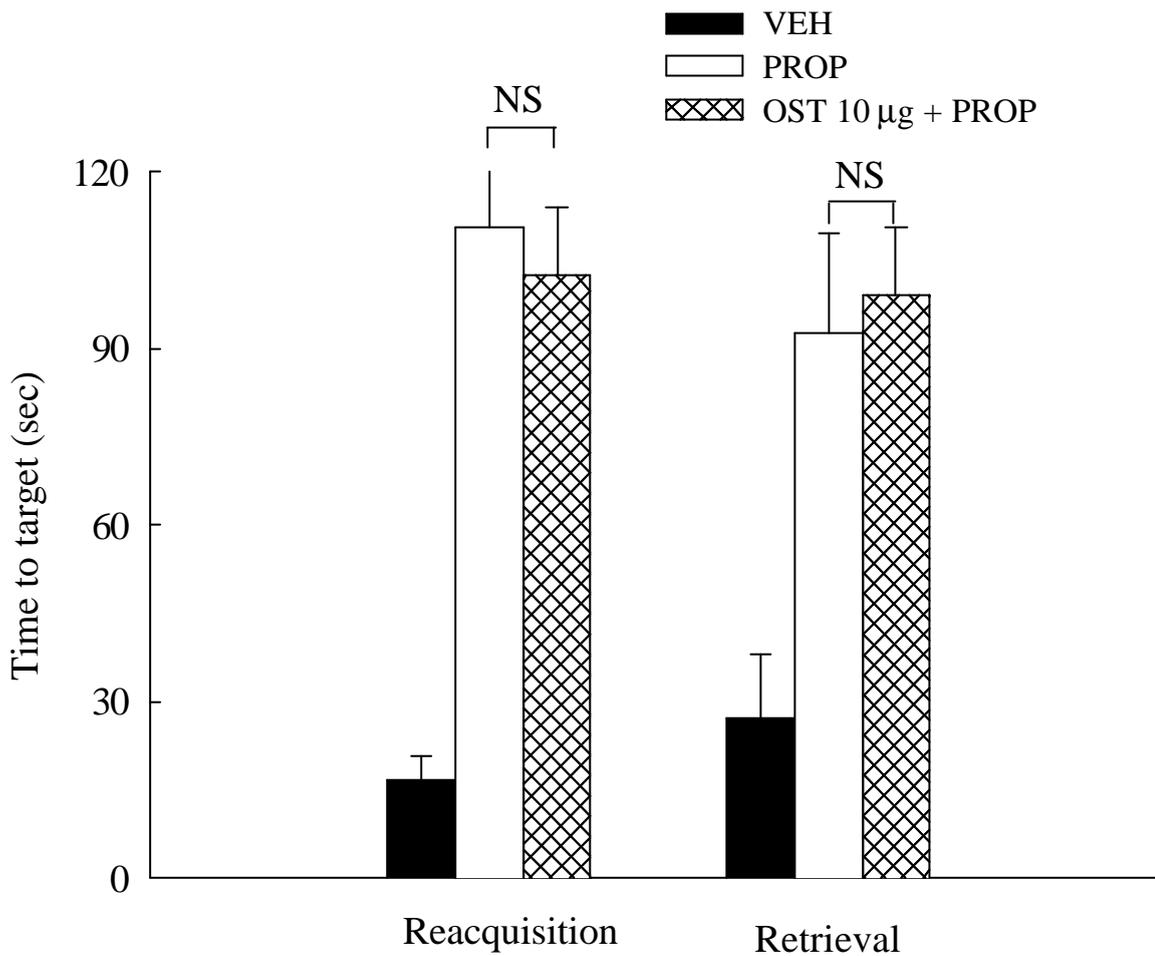


Fig 27. Effect of osthole(OST 10  $\mu\text{g}$ /brain, i.c.v.) on reacquisition and retrieval of water maze induced by PROP. NS: Not significant.

## 5. 蛇床子素對中樞腎上腺素 $\alpha_2$ 拮抗劑 yohimbine 誘發水迷宮學習記憶障礙之影響

用腎上腺素  $\alpha_2$ 拮抗劑 yohimbine(YOH)做為併用藥物，以探討中樞腎上腺素  $\alpha_2$ 接受器在 osthole 改善大鼠水迷宮學習操作障礙之角色。結果發現，在 YOH (80ng/brain)於訓練前雙側海馬迴給藥，學習操作能力明顯出現障礙，而在學習操作前腦室給予 osthole(10  $\mu$ g)不具改善學習障礙作用(如圖 28)；進一步探討參考記憶與工作記憶，圖 29、圖 30，顯示給予 YOH 在參考記憶與工作記憶明顯出現學習操作能力障礙，而給予 osthole 不具改善作用。由此可知，osthole 改善學習障礙作用與中樞腎上腺素  $\alpha_2$ 接受器無關。

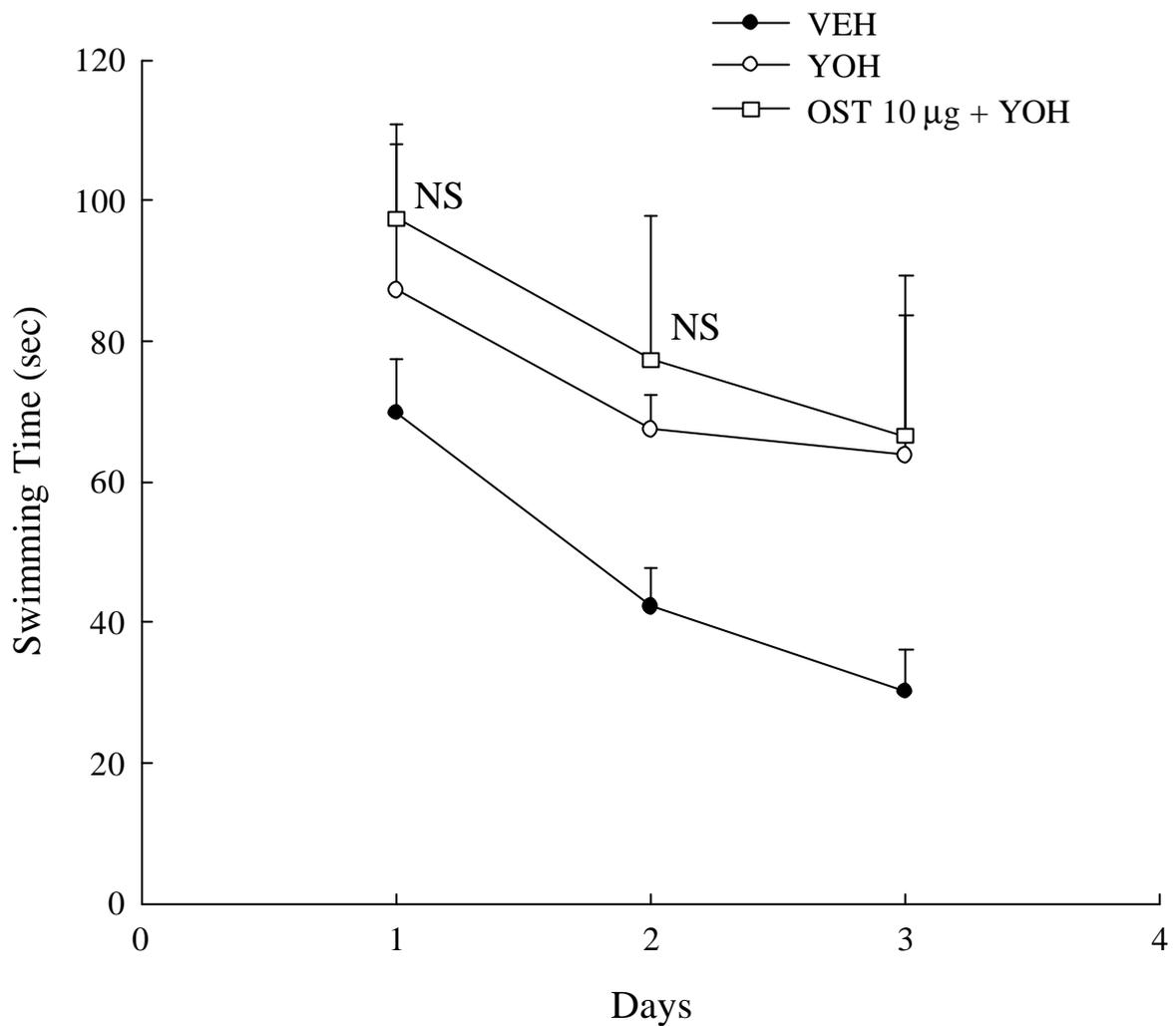


Fig 28. Effect of osthole(OST 10 μg/brain, i.c.v.) on impairment of water maze performance induced by YOH. NS: Not significant.

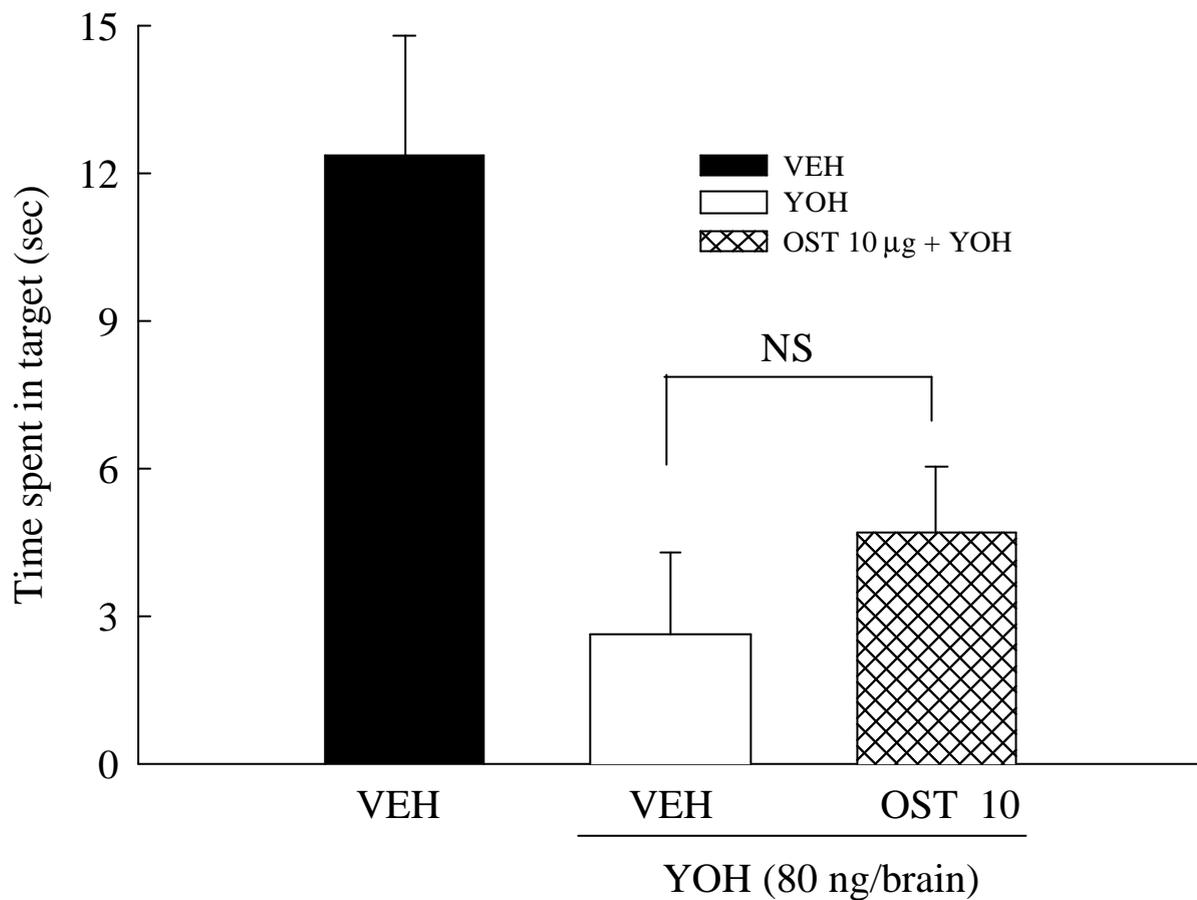


Fig 29. Effect of osthole(OST 10µg/brain, i.c.v.) on reference memory of water maze induced by YOH. NS: Not significant.

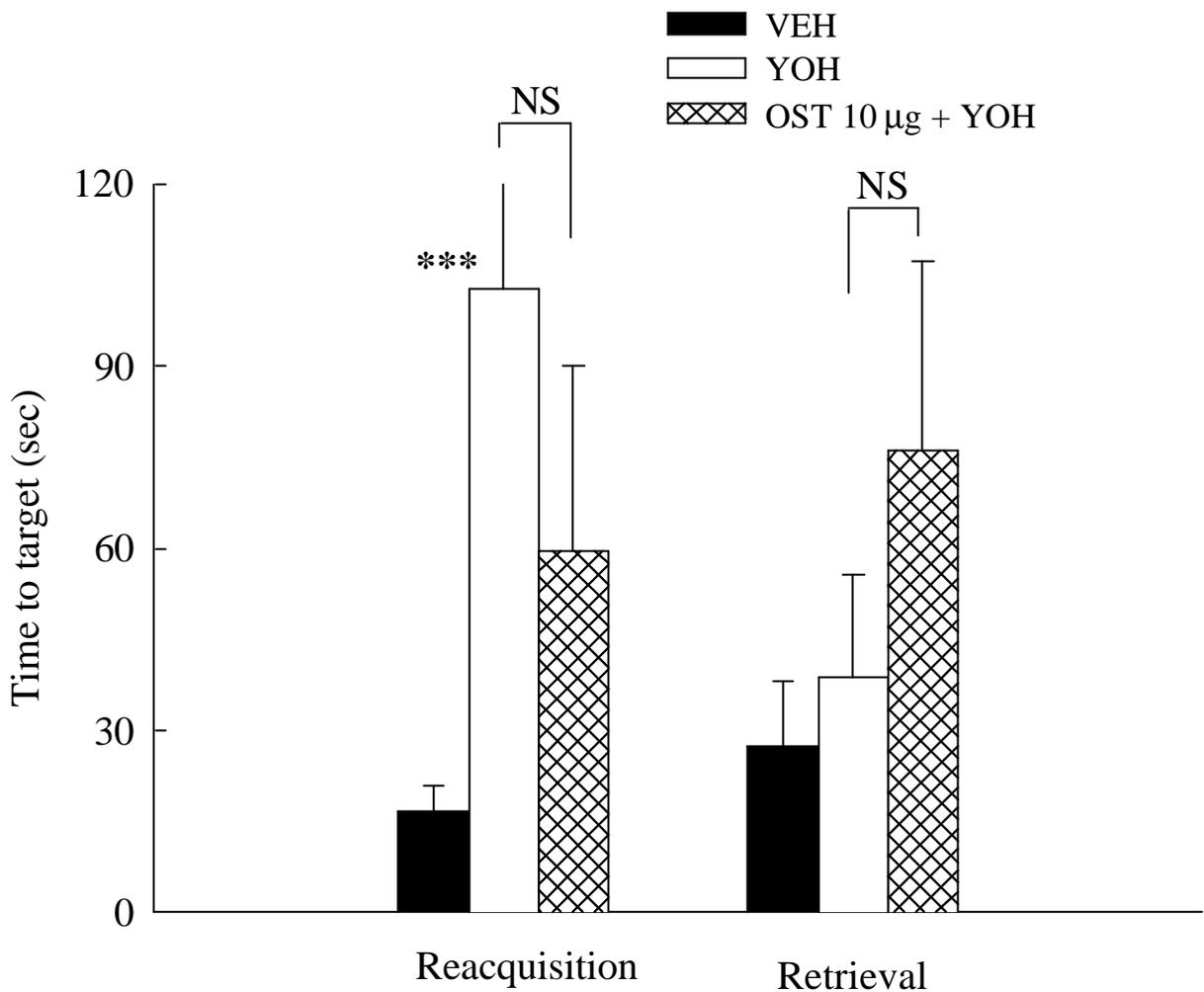


Fig 30. Effect of osthole(OST 10  $\mu\text{g}$ /brain, i.c.v.) on reacquisition and retrieval of water maze induced by YOH. \*\*\* $P < 0.001$  compared with VEH group. NS: Not significant.

## 6. 蛇床子素對中樞腎上腺素<sub>1</sub>拮抗劑 phenoxybenzamine 誘發水迷宮學習記憶障礙之影響

以腎上腺素<sub>1</sub>拮抗劑 phenoxybenzamine(PHEN)做為併用藥物，以探討中樞腎上腺素<sub>1</sub>接受器在 osthole 改善大鼠水迷宮學習操作障礙之角色。結果發現，在 PHEN (80ng/brain)於訓練前雙側海馬迴給藥，學習操作能力明顯出現障礙，而在學習操作前腦室給予 osthole(10 $\mu$ g)能夠明顯改善學習障礙作用(如圖 31)；進一步探討參考記憶與工作記憶，圖 32、圖 33，顯示給予 PHEN 在參考記憶與工作記憶明顯出現學習操作能力障礙，而給予 osthole 有明顯改善的作用。由此可知，osthole 改善學習障礙作用與中樞腎上腺素<sub>1</sub>接受器有關。

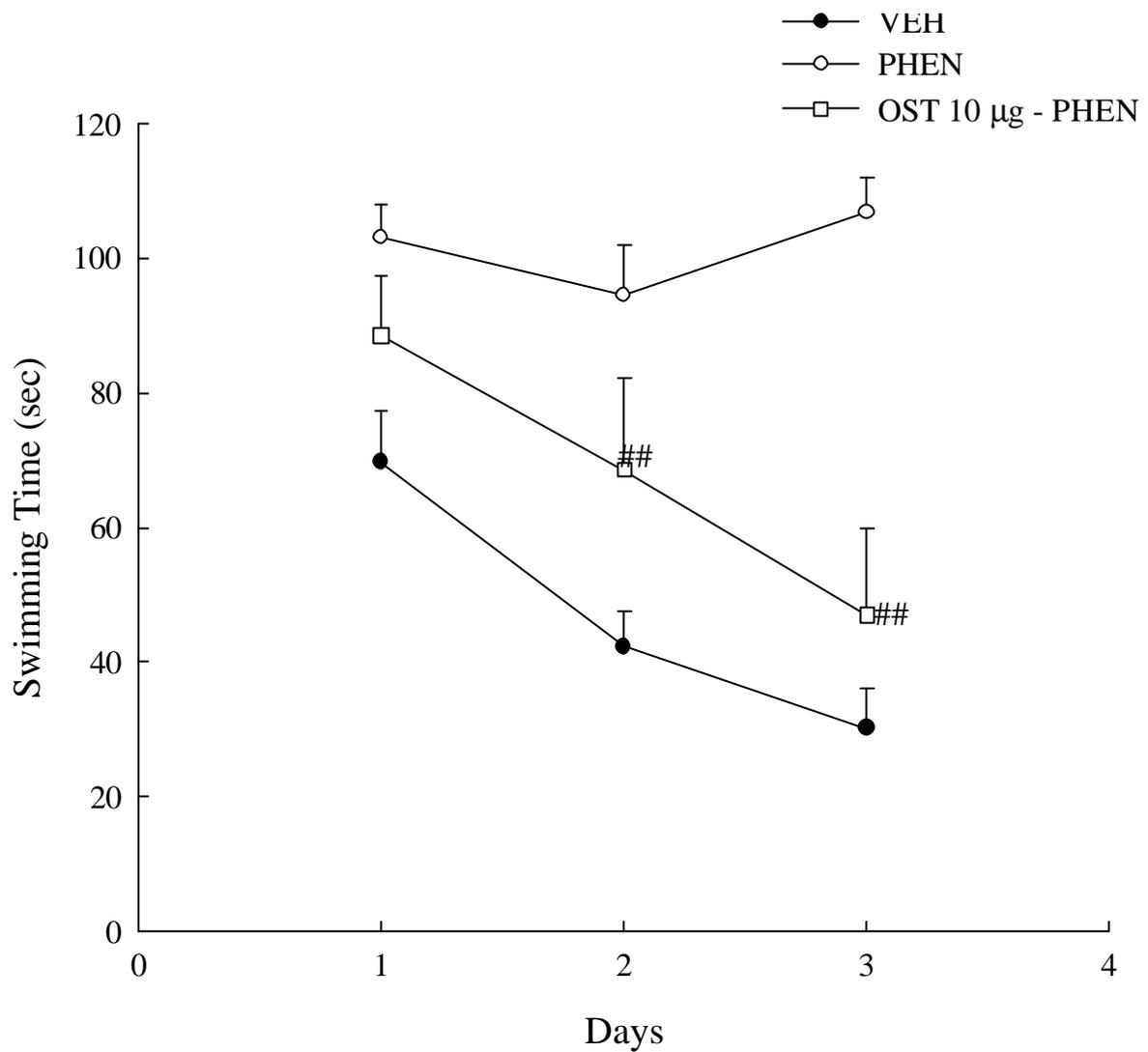


Fig 31. Effect of osthole(OST 10µg/brain, i.c.v.) on impairment of water maze performance induced by PHEN. ##P<0.01 compared with PHEN group.

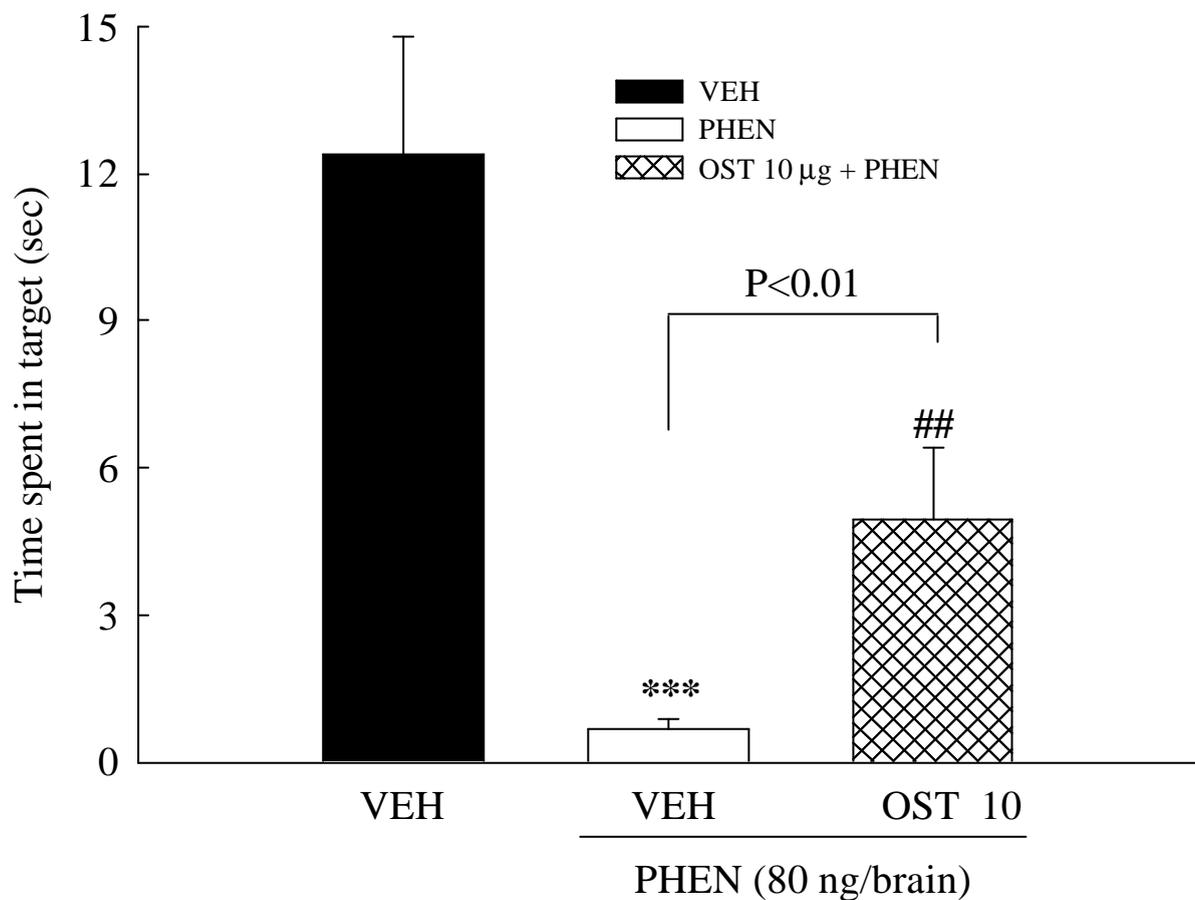


Fig 32. Effect of osthole(OST 10 $\mu$ g/brain, i.c.v.) on reference memory of water maze induced by PHEN. \*\*\*P<0.001 compared with VEH group. ##P<0.01 compared with VEH/PHEN group.

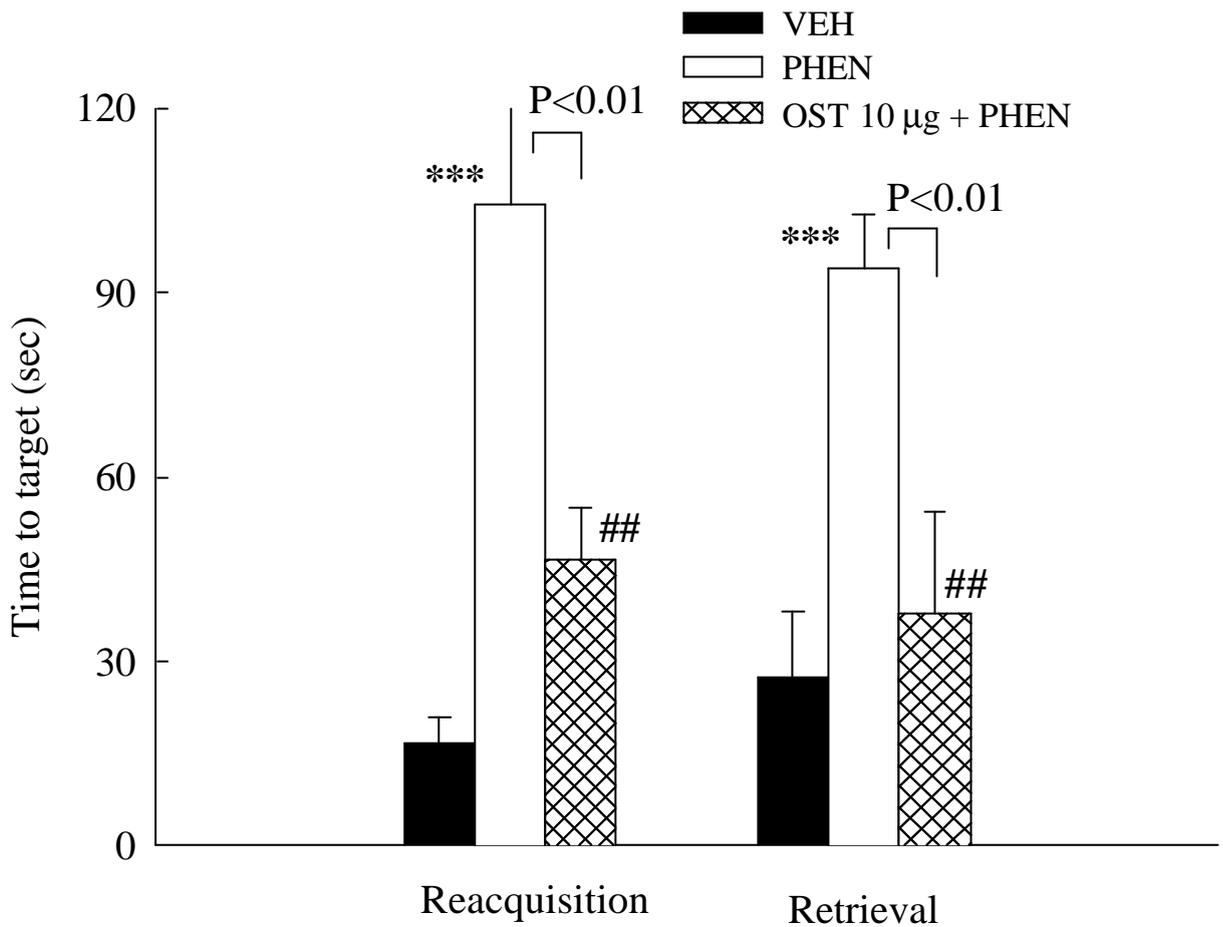


Fig 33. Effect of osthole(OST 10 $\mu\text{g}$ , i.c.v.) on reacquisition and retrieval of water maze induced by PHEN. \*\*\*P<0.001 compared with VEH group. ##P<0.01 compared with PHEN group.

## 第五章 討 論

傳統中醫藥有關抗衰老藥物，在典籍上均著錄有益氣輕身、不老增年、延年益壽、增益智慧、耳聰目明、不忘強志等功效。中醫醫理認為人體老化取決於體內因素者為因，如臟腑之虛損，尤以腎氣虛衰為本。蓋素問 上古天真論曰：腎者主水，受五臟六府之精而藏之。故腎氣直接導致並控制著整個人體之老化過程。復中醫對於衰老理論，除腎氣虛衰外，尚有氣衰、血瘀、痰瘀等病因機理所致，因此，臨床上防治衰老之方藥多以溫腎、益氣及活血化瘀類治之。但據有關現代中藥藥理探討抗衰老藥物與增強記憶開發之研究，均著重在氣衰之益氣藥物為多，如人參<sup>(94)</sup>、黃精<sup>(95)</sup>等。然對於溫腎藥與增強記憶之相關性研究著墨較少。因此本研究針對溫腎藥蛇床子探討其對於改善學習記憶障礙作用之研究。

蛇床子為繖形科植物蛇床 *Cnidium monnieri*(L.)CUSSON 之乾燥成熟果實，始著錄於神農本草經上品，迄明清近代諸家本草皆因襲之。蛇床子神農本草經主婦人陰中腫痛、男子陰痿、濕癢、久服輕身；本草綱目：久服好顏色、令人有子，不獨補助男子，而又有助益於婦人，入腎經，其功效為主溫腎助陽、祛風燥濕、殺蟲。據現代藥理研究有抗過敏作用<sup>(23)</sup>、雌性激素樣作用<sup>(96)</sup>，及其粗總香豆素(coumarin)能改善 hydrocortisone 所誘發陽虛大鼠之學習障礙<sup>(4)</sup>，及沈麗霞教授等人於 1999 年曾觀察蛇床子素可改善記憶獲得、鞏固及方向辨別障礙，但未深入探討其機制<sup>(33)</sup>。然要探討中藥與學習記憶之相關性，應以神經傳遞物質為主

軸，因學習過程中，突觸後(postsynaptic)細胞膜如對乙醯膽鹼之敏感性增加，會導致記憶形成；但當敏感性降低或受阻礙時，便發生健忘現象。因此當 cholinergic system 之活性增加時，將促使學習記憶之形成，反之，活性降低時便會造成學習獲得障礙<sup>(97)</sup>。據 Drachman 及 Leavitt 發現年輕人在服用 acetylcholine 接受器拮抗劑 scopolamine 後，會產生類似老人癡呆症之進行性健忘症(anterograde amnesia)症狀<sup>(57)</sup>，又 Quartermain 及 Leo 發現大鼠給 scopolamine(muscarinic receptor blocker)後，可使腦內 cortex、hippocampus、striatum 等區域之 acetylcholine 減少，造成學習行為操作之障礙<sup>(58)</sup>。

因此本研究以 scopolamine hydrobromide (SCOP)誘發產生學習獲得及短期記憶障礙，當作 anti-amnestic drugs 之篩選作用模式。復人類記憶型態很多，因此實驗之動物學習行為模式亦甚多，其中以被動迴避學習反應為多數學者所採用，因其學習型態較簡單，且屬抑制本能行為之學習型態<sup>(87)</sup>，又水迷宮是屬較複雜之空間性學習型態(spatial performance)，屬強迫性之學習，可廣泛用於探討短期性及長期性之學習記憶<sup>(89、90)</sup>。

因此智能增進劑之開發研究，應於對各類學習行為模式是否具有改善作用以作為評估之標的。故本研究首先以蛇床子石油醚萃取物，對雄性大鼠由 scopolamine 誘發被動迴避學習障礙暨水迷宮學習操作之影響。實驗結果口服 CF(0.1~0.6g/kg)均能增強大鼠學習獲得記憶。此增強記憶作用與神經傳遞物質有何關聯性是本研究探討之重點。

據 Wenk 於 1989 年指出智能增進劑改善學習記憶之作用機轉,與活化週邊神經系統、中樞神經系統及腎上腺 (adrenal gland) 有關<sup>(76)</sup>。故本研究接著針對蛇床子改善學習記憶作用與活化週邊神經系統機轉進行探討。已有許多學者報告指出智能增進劑之活化週邊乙醯膽鹼神經系統被週邊(cholinergic muscarinic receptor antagonist scopolamine methylbromide)(簡稱 M-SCOP)所抑制,以證明他與週邊乙醯膽鹼神經系統有關<sup>(98)</sup>,因 M-SCOP 以 methyl group 取代 hydrogen,不能通過 blood-brain-barrier。當蛇床子石油醚萃取物與 M-SCOP 併用,其增強學習記憶作用不被阻斷,顯示其作用與週邊乙醯膽鹼神經系統無關。然週邊神經 catecholaminergic system 與學習記憶亦扮演重要角色<sup>(99)</sup>,許多學者報告指出智能增進劑之活化週邊 catecholaminergic neuron 活性被週邊交感神經毒素 6-hydroxydopamine(6-OHDA)所阻斷,以證明它與週邊 catecholamine 神經系統有關<sup>(100)</sup>,當 CF 與 6-OHDA 併用,其增強學習記憶作用不被阻斷,顯示其作用與週邊 catecholamine 神經系統亦無關。

中醫黃帝內經是最早論述腎之生理、病理及其病證,所謂中醫概念的腎,依素問 陰陽應象大論:「腎生骨髓,腎主耳」, 素問 六節藏象論:「腎者主蛰,封藏之本,精之處也」,及靈樞脈度篇:「腎和則耳能知五音矣」。綜合論述腎在五臟之重要性,因此中醫的腎虛致衰說,證之以現代生理學,它與下視丘-垂體-腎上腺(HPA)系統有密切關係<sup>(101)</sup>,因 HPA 中腎上腺所分泌之 corticosterone 及 aldosterone 與智能增進劑之增強記憶作用有關<sup>(74, 77)</sup>,據 Bialik 等人於 1984 年研究報告指出,大鼠在去腎上腺

後會造成迴避學習障礙<sup>(72)</sup>，又 Adem 等人於 1994 年發現腎上腺摘除後所造成的之學習記憶障礙機轉，係因會引起海馬迴中 dentate granule 及 CA1-CA4 區域中神經細胞之損失及死亡<sup>(73)</sup>。因此本研究以大鼠去腎上腺作為誘發學習障礙之動物模式。當口服 CF(0.1g/kg)其改善學習障礙作用被阻斷，顯示其改善學習障礙作用與腎上腺系統有關。至於其作用機轉，與海馬迴神經細胞或 corticosterone、aldosterone 之相關性有待於進一步探討。

據本草綱目：蛇床子，不獨補助男子，而又有益於婦人。證之以現代藥理學研究，蛇床子不僅有 estrogen-like 作用<sup>(96)</sup>，且可防治大鼠去卵巢停經後之骨質疏鬆現象<sup>(102)</sup>，足資加以說明蛇床子古典籍記載之功效。Estrogen 除了調節生殖系統外，在中樞神經系統作用於學習記憶相關神經傳遞路徑(如海馬迴)亦扮演了相當重要的角色。根據研究發現，去卵巢後的大鼠海馬迴之膽鹼乙醯轉胺? (choline acetyltransferase)活性降低<sup>(78)</sup>，致 acetylcholine 及 estrogen 減少而造成工作記憶障礙<sup>(79)</sup>。因此本研究再以大鼠去卵巢作為誘發學習障礙之動物模式。

本研究發現當給予 scopolamine 之雌性大鼠，其血中 estradiol 濃度低於正常鼠，而口服 CF(0.3、0.6g/kg)之雌性大鼠可使血中 estradiol 之濃度提升至與正常鼠相當。因此本研究更進一步探討蛇床子油溶性成分蛇床子素(osthole)在雌性大鼠卵巢切除後之停經大鼠進行學習操作能力之評估；同時探討蛇床子素週邊給藥與中樞給藥作用之差別。實驗結果發現蛇床子素皮下注射(3、10mg/kg)可明顯改善因卵巢切除後在水迷宮空間學習操作之障

礙，且對記憶再現亦有改善；其次蛇床子素腦室給藥(10、30ug/brain)亦可改善因卵巢切除後在水迷宮空間學習操作之障礙。上述之作用機轉可能與提升 estradiol 有關。此結果與 Sherwin BB 等人於 1998 年之研究報告 estrogen 具有增強智能及改善智能障礙之作用相符<sup>(7)</sup>。由此推論蛇床子之 estrogen-like 作用可使用於進入更年期婦女，可增強其認知和記憶的功能。至於蛇床子素是否有與 estrogen 相同，對於腦部神經細胞具有保護作用，且其機轉與神經生長因子(nerve growth factors)<sup>(74)</sup>，或改變細胞傳遞物質如胞外信號調節(extracellular signal-regulated kinase)的表現有相關性<sup>(85)</sup>，亦有待於進一步探討。

探討蛇床子素之改善學習記憶障礙作用與中樞神經系統突觸前或突觸後接受器之關係。首先探討蛇床子素腦室給藥併用中樞膽鹼神經毒素 AF64A，因 AF64A 為中樞膽鹼神經毒素，可造成突觸前乙醯膽鹼神經節之截斷退化且可造成動物學習記憶操作能力之障礙<sup>(103)</sup>。實驗結果，蛇床子素對於 AF64A 誘發產生參考記憶與工作記憶障礙均不具改善作用，顯示蛇床子素改善學習障礙作用與中樞膽鹼神經系統無關。其次蛇床子素併用 5,7-DHT，因 5,7-DHT 為中樞 serotonergic system 之神經毒素，可造成突觸前 serotonin 神經節之截斷退化且造成動物學習記憶操作能力之障礙<sup>(104)</sup>，實驗結果蛇床子素對於 5,7-DHT 誘發產生參考記憶與工作記憶障礙均不具改善作用，顯示蛇床子素改善學習障礙作用與中樞血清素神經系統亦無關。再將蛇床子素併用 6-OHDA，因 6-OHDA 為中樞 catecholamine 神經毒素，可造成突觸前 catecholamine 神經節之截斷退化且造成動物學習記憶操

作能力之障礙<sup>(105)</sup>，實驗結果蛇床子素對於 6-OHDA 誘發產生參考記憶與記憶再現學習操作能力障礙有明顯的改善作用。由此可知，蛇床子素改善學習障礙作用與中樞 catecholamine 神經系統有關。

再者神經傳遞物質於中樞腦部區域對於學習記憶扮演非常重要的角色，據 Mishkin 於 1995 年研究指出 hippocampus 在學習過程扮演重要角色<sup>(106)</sup>，且 O'Keefe J 等認為 hippocampus 區主要負責儲存空間性記憶<sup>(107)</sup>，又 Teyler TJ 及 Discenna P 於 1986 年更明確指出 hippocampus 區負責一切學習型態之刺激與反應間之聯絡區<sup>(108)</sup>。故中樞 hippocampus 區域負責了學習記憶之統合。又據 Mondadori C 等研究指出，智能增進劑之改善學習記憶作用因腎上腺切除而阻斷，其作用機轉是因腎上腺參與學習記憶過程而調節中樞神經系統對外界刺激的反應<sup>(109)</sup>。本研究結果蛇床子改善學習作用，因腎上腺切除而阻斷，證明其改善學習障礙作用與腎上腺有關，至於其作用機轉是否與中樞腎上腺素神經系統有關聯性，有進一步探討之必要，因此本研究在針對蛇床子素於腦室 hippocampus 給藥，併用 adrenergic  $\alpha$ 、 $\beta$  等接受器拮抗劑亦於腦室 hippocampus 區域給藥，以探討蛇床子素改善學習記憶作用與中樞腎上腺神經系統之關係。首先探討蛇床子素腦室 hippocampus 區域給藥，併用 propranolol，因 propranolol 為中樞腎上腺素非選擇性突觸後  $\beta$  接受器拮抗劑，可造成突觸後  $\beta$  接受器之截斷且可造成動物學習記憶操作能力之障礙<sup>(110)</sup>，實驗結果蛇床子素對於 propranolol 誘發產生參考記憶與工作記憶障礙不具改善作用，顯示蛇床子素改善學習障礙作用與中樞腎上腺素  $\beta$  接受器無關。

其次蛇床子素併用 yohimbine, yohimbine 為中樞腎上腺素選擇性突觸後  $\alpha_2$  接受器拮抗劑, 可造成突觸後  $\alpha_2$  接受器之截斷且可造成動物學習記憶操作能力之障礙<sup>(111)</sup>, 實驗結果蛇床子素對於 yohimbine 誘發參考記憶與工作記憶障礙不具改善作用, 顯示蛇床子素改善學習障礙作用與中樞  $\alpha_2$  接受器無關。再將蛇床子素併用 phenoxybenzamine, phenoxybenzamine 為中樞腎上腺素選擇性突觸後  $\alpha_1$  接受器拮抗劑, 可造成突觸後  $\alpha_1$  接受器之截斷且可造成動物學習記憶操作能力之障礙<sup>(112)</sup>, 實驗結果蛇床子素對於 phenoxybenzamine 誘發參考記憶與工作記憶具有明顯的改善作用, 顯示蛇床子素改善學習記憶障礙作用與腎上腺素  $\alpha_1$  接受器有關。

綜合以上溫腎藥蛇床子及其成分蛇床子素以行為藥理學及神經藥理學研究方法加以探討, 結果顯示均能改善由 scopolamine 誘發被動迴避學習暨水迷宮空間學習操作障礙之作用, 其改善學習操作障礙之作用機轉與週邊乙醯膽鹼、週邊 catecholamine 神經系統、中樞乙醯膽鹼神經系統、中樞血清素神經系統、腎上腺素  $\alpha_2$  接受器、腎上腺素  $\alpha_1$  接受器無關。但與 estrogen 及腎上腺素  $\alpha_1$  接受器有關, 並且其作用機轉與增加 estrogen, 活化中樞 catecholamine 神經系統, 及腎上腺素  $\alpha_1$  接受器有關。

依 Gold PE 等人研究報告指出腦內 catecholamine release 可調控腦部新資訊之儲存<sup>(113)</sup>, 此論述經 Stancheva S 等研究加以證實, 即腦部 hippocampus catecholamine 濃度與學習記憶有關, 當 Adrenergic neurotransmitter system 促進 catecholamine system 之活化時可增強記憶<sup>(114)</sup>。因此蛇床子素增強記憶之機轉可推論是經由 Adrenergic  $\alpha_1$  而活化 catecholamine system。復依 Fink G 等人研究指出 estrogen 之作用與中樞 monoamine neurotransmitter 有

關，即 estrogen 可經由 5-HT<sub>2A</sub> receptor、D<sub>2</sub> receptor 而產生作用，且 estrogen 與學習記憶有關，estrogen 可當作 ” Nature’s psychoprotectant<sup>(115)</sup>，Luine VN 等人於 1997 年指出 hormones 於 hippocampus 對神經可塑性扮演重要角色，estradiol 可促進空間學習操作<sup>(116)</sup>，且 Heikkinen T 等人於 2002 年更指出 estrogen 改善學習操作記憶與 hippocampus neurotransmitter 有關<sup>(117)</sup>，因此本研究可另推論蛇床子素增強學習記憶之作用機轉是因其具 estrogen-like 活性而活化 hippocampus neurotransmitter 有關。至於腎上腺切除可阻斷智能增進劑之作用，此阻斷作用可服用 corticosterone 及 aldosterone 而恢復之<sup>(118)</sup>，但其作用機轉與中樞 catecholamine 之相關性並未見有報告，因此本研究雖證實其改善學習記憶與腎上腺素  $\alpha_1$  接受器有關，但其作用機轉有待更進一步研究。

最後因近代分子生物學的興起，使刺激細胞變化與形成記憶的理論相關性不斷被提出，如神經信號血清素、正腎上腺素、基因表現物 CREB(cAMP responsive element-binding protein)等。最近本所謝明村教授等學習記憶研究小組，已利用微陣列 (microarray) 研究 scopolamine 影響之下的大鼠海馬迴基因差異表現，找出 28 個顯著差異的基因<sup>(119)</sup>，因此本研究未來將以此為基點探討蛇床子素在學習記憶的分子表現機制。

## 第六章 結 論

本論文的研究結果顯示，蛇床子之石油醚萃取層(簡稱 CF)對大鼠由 scopolamine 誘發被動迴避學習暨水迷宮空間學習操作，能增強學習記憶。其增強學習記憶作用不被週邊乙醯膽鹼拮抗劑 scopolamine methylbromide、或週邊交感神經毒素 6-hydroxydopamine 所阻斷，顯示 CF 之改善學習障礙作用機轉與週邊乙醯膽鹼及週邊交感神經系統無關；但當大鼠切除腎上腺及卵巢後，CF 之改善學習記憶障礙作用被阻斷，且提升 estradiol 濃度，顯示 CF 改善學習記憶障礙作用與腎上腺系統及卵巢有關。

其次探討蛇床子成分蛇床子素 osthole 改善學習障礙及其作用機轉，初步結果蛇床子素皮下或腦部給藥均具改善雌性大鼠卵巢切除後水迷宮空間操作能力障礙之現象，顯示蛇床子素改善學習障礙之作用與提升 estradiol 有關。

本研究更進一步探討蛇床子素增強學習記憶與中樞神經系統之關係。其增強學習記憶不受中樞乙醯膽鹼神經毒素 AF64A、中樞血清素神經毒素 5,7-DHT、中樞腎上腺素拮抗劑 propranolol、及中樞腎上腺素<sub>2</sub>拮抗劑 yohimbine 影響，顯示蛇床子素改善學習障礙作用與中樞乙醯膽鹼神經系統、血清素神經系統、腎上腺素<sub>1</sub>、<sub>2</sub>接受器無關。但受中樞 catecholamine 神經毒素 6-OHDA，及中樞腎上腺素<sub>1</sub>拮抗劑之影響，因此蛇床子素增強記憶之機轉可推論是經由 Adrenergic<sub>1</sub> 而活化 Catecholaminergic system；及因其具 estrogen-like 活性而活化 hippocampal neurotransmitters。

## 謝 辭

本論文之完成首先感謝張所長永勳、前陳所長忠川、葉教授豐次、邱技正年永等恩師的鼓勵，並感謝藥學系劉主任正雄，及指導教授彭教授文煌、謝教授文全、吳教授啟瑞及授課之恩師的指導教誨與支持鼓勵，方得以順利完成，衷心感謝，永誌難忘。研究期間動物中心王文信先生於實驗動物上之協助，及林穎誌、林立偉、吳國任、蔡汎修、呂宗俊、林君茹、林湧達等諸位學弟妹於研究過程中之協助，使我在就學期間給我的關心與支持，共同走過難忘的博士班求學階段。本論文承蒙國科會專題計劃編號 NSC89-2314-B-039-004 ， NSC89-2320-B-039-049 ， 及 NSC90-2320-B-039-040，及本校 CMC90-CPS-01 之經費補助，謹此一併誌謝。

最後感謝我最愛的家人，進修的這些年，由於先生陳嘉聖的體恤與付出，以及可愛怡文、怡之所給予的溫馨。將此論文獻給我最敬愛的父母及公婆，我學到了您們處世的努力與堅毅的精神，誠實的為人與勵誌的為學態度。感謝您們的教誨與栽培，我將永銘於心。

## 參考文獻

1. Giurgea, C. Pharmacology of integrative activity of the brain. Attempt at nootropic concept in psychopharmacology. *Actual Pharmacol (Paris)*. 1972;25:115-56.
2. Hsieh MT, Wu CR, Hsieh CC. Ameliorating effect of p-hydroxybenzyl alcohol on cycloheximide-induced impairment of passive avoidance response in rats: interactions with compounds acting at 5-HT1A and 5-HT2 receptors. *Pharmacol Biochem Behav*. 1998;60(2):337-343.
3. 喻國雄、陳漢平：中西醫抗衰老學說的回顧與展望。遼寧中醫雜誌。1990;4:44-48.
4. 秦路平、張家慶、石漢平：蛇床子香豆素對腎陽虛模型大鼠腺垂體-腎上腺皮質軸功能的影響。中國中西醫結合雜誌，1997;17(4):227-229
5. McGonigal G, Thomas B, McQuade C, Starr JM, MacLennan WJ, Whalley LJ. Epidemiology of Alzheimer's presenile dementia in Scotland, 1974-88. *BMJ*. 1993;306(6879):680-683.
6. Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H, Rune GM. Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus*. 2003;13(2):226-234.
7. Sherwin BB. Estrogen and cognitive functioning in women. *Endocr Rev*. 2003 Apr;24(2):133-151.
8. Messier C, Durkin T, Mrabet O, Destrade C. Memory-improving action of glucose: indirect evidence for a facilitation of hippocampal acetylcholine synthesis. *Behav Brain Res*. 1990 9;39(2):135-143.

9. 孫星衍、孫馮翼重輯：神農本草經，五洲出版社，台北，1985；卷之1，31。
10. 尚誌鈞輯校：名醫別錄，人民衛生出版社，北京，1986；47。
11. 蘇敬？撰，岡西為人重輯：重輯新修本草，國立中國醫藥研究所刊行，台北，1972；187。
12. 劉翰、馬誌？撰，那琦、謝文全、林豐定重輯：重輯開寶本草，中國藥學研究所，台中，1998；100。
13. 掌禹錫？撰，那琦、謝文全、李一宏重輯：重輯嘉祐補注神農本草，中國藥學研究所，台中，1989；80。
14. 蘇頌？撰，那琦，謝文全重輯：重輯圖經本草，中國藥學研究所，台中，1993；pp247-248。
15. 唐慎微撰，艾晟校定，吳家鏡譯述：經史證類大觀本草，正言出版社，台北，1977；195。
16. 唐慎微撰，張存惠重刊，那琦解題並序，魏德文索引刊行：重修政和經史證類備用本草，南天書局有限公司，台北，1965；186。
17. 李時珍著：圖解本草綱目，上冊，文光圖書有限公司，台北，1970；pp489-490。
18. 臧勵齋等編：古今地名大辭典，商務印書館發行，台北，1987；pp897-1290、2980。
19. 行政院衛生署編 中華民國中藥典範第二冊 1985;pp789-791。
20. 張志輝:蛇床子與偽品旱芹果實之鑑別 中藥材 1992;15(2): 21
21. 向仁德,等.蛇床子揮發油化學成分初步研究.中國藥科大學學報 1989;20 ( 2 ) :92-93
22. 陳志春,等 蛇床子總香豆素止喘作用機理探討.中國中藥雜誌 1990;15(5):304-306

23. 陳志春, 等 蛇床子總香豆素藥理研究. 中藥通報 1986;11(2):50-53
24. 秦增祥, 等 蛇床子藥理作用及臨床應用的研究概述浙江中醫雜誌 1990;25(10):475-476
25. 連其深, 等 蛇床子水提物的抗心律失常作用. 中國中藥雜誌 1992;17(5):306-307
26. 中國醫學科學院藥物研究所 中藥誌 ( ) 第一版. 北京: 人民衛生出版社 1984:593
27. 崔樹德 中藥大全 第一版. 黑龍江科學出版社 1989:719
28. 鄭武飛 普通中國草藥在試管內對致病性及非致病性真菌的抗真菌力. 中華醫學雜誌 1952;38(4):315
29. 王浴生主編. 中藥藥理與應用. 第一版. 北京: 人民衛生出版社 1983;1040
30. 連其深, 等. 蛇床子提取液的局部麻醉作用 中藥通報 1988;13(9):552-554
31. 沈麗霞、張力、常潔琴: 蛇床子素對學習記憶的影響及機制分析 藥理學報 1999;34(6):405-409
32. Huang RL, Chen CC, Huang YL, Hsieh DJ, Hu CP, Chen CF, Chang C. Osthole increases glycosylation of hepatitis B surface antigen and suppresses the secretion of hepatitis B virus in vitro. *Hepatology*. 1996 ; 24(3):508-15.
33. Chen J, Chiou WF, Chen CC, Chen CF. Effect of the plant-extract osthole on the relaxation of rabbit corpus cavernosum tissue in vitro. *J Urol*. 2000; 163(6):1975-80.
34. 李治牢, 等. 中藥外洗治療慢性搔癢性皮膚病 500 例, 陝西中醫 1985;6 ( 10 ) :446-447
35. 王效平. 蛇黃洗劑治療陰部搔癢 82 例. 四川中醫 1986;4(7):53
36. 何國興. 參百蛇洗劑治療霉菌性滴蟲性陰道炎 100 例. 河北中醫 1986;(1):18

37. 陳金鳳.陰道沖劑治療 156 例陰道炎宮頸炎臨床觀察,江蘇中醫雜誌 1985;8:18
38. 余秀芝.蛇床子青黛軟膏治療外陰苔癬.中國醫院藥學雜誌 1988;8(8):379
39. 劉淑琴.消糜栓治療子宮頸糜爛 542 例臨床觀察.北京中醫 1986;(5):36
40. 閻遠超.蛇羊養精活血湯治療男性不育症 39 例,湖北中醫雜誌 1988;(3):32
41. 張世雄.中醫治療缺無精子症的臨床經驗.陝西中醫 1985:6(4):165
42. 李國蘭.補腎活血胎孕湯加減治療不孕症 642 例.湖北中醫雜誌 1988;(5):16-17
43. 曾慶發.足癬洗方治療足癬 54 例.廣西中醫藥 1988;11(3):123
44. 唐玉勤.中藥外洗治療鵝掌風 90 例.遼寧中醫雜誌 1988;12(3):27
45. 陳茂森.521 例皮炎濕疹的治療觀察 北京中醫 1988;12(6):31-33
46. 楊承先.苦蛇椒礬煎治濕疹 104 例.四川中醫 1986,4(7):52
47. 郭定九.中藥蛇床子外用治療一些皮膚病的臨床觀察.中華皮膚科雜誌 1957;(2):154
48. 李淑芬.中藥治療銀屑病 143 例臨床觀察 吉林中醫藥 1988;(4):17
49. 陳志春.等.蛇床子總香豆素的平喘療效觀察.中草藥 1988;19(9):410-411
50. 陳勇.自擬蛇床子湯治療小兒支氣管哮喘 26 例 湖北中醫雜誌 1989;(5):47
51. Hata K, Kozawa M, Baba K. Coumarins from chinese crude drug "She Huangzi," the fruits of *Cnidium* sp. and from *Cnidium japonicum* Miq. *Yakugaku Zasshi*. 1972 ;92(10):1289-94.

52. Hsu HY: The chemical constituents of oriental herbs, oriental Healing Arts Institute. 1982;314
53. 余建誌 陳益昇 詹道明: 蛇床子藥材中蛇床子素之分離暨氣相層析定量 藥物食品分析 2002;10(3):154-158
54. Susan Budavari. The Merck Index, Merck & Co, INC. 1996;1182
55. Hsieh MT, Kuo LH, Tsai FH, Wang WH, Wu CR. Effects of puerarin on scopolamine-,mecamylamine-p-chloroamphetamine- and dizocilpine-induced inhibitory avoidance performance impairment in rats. *Planta Med.* 2002;68(10):901-905.
56. Graham RB : Memory. In: Graham RB (Eds.), *physiological psychology*, A Division of Wadsworth Inc.,California,1990; pp611-648.
57. Drachman DA, Leavitt J: Human memory and the cholinergic system:A relationship to aging. *Arch Neurol* 1974;30.113-121.
58. Quartermain D, Leo P: Strength of scopolamine-induced amnesia:A function of time between training and testing. *Behav Neural Biol* 1988; 50:300-310.
59. Worms P, Gueudet C, Perio A, Sorbrie P: Systemic injection of pirenzepine induced a deficit in passive avoidance learning in rats.*Psychopharmacology* 1989;98:286-288.
60. Glick SD, Greenstein S:Differential effects of scopolamine and mecamylamine on passive avoidance behavior. *Life Sci*, 1972;11:169-179
61. Walsh TJ, Tilson HA, Dehaven DL, Mailman RB, Fisher A, Hanim I:AF64A, a cholinergic neurotoxin, selectively depletes acetylcholine in hippocampus and cortex,and produces long term passive avoidance and redial-arm maze deficits in the rat. *Brain Res* 1984;32:91-102.

62. Pisa M, Fibiger HC; Evidence against a role of the rats dorsal noradrenergic bundle in selective attention and place memory. *Brain Res*, 1983;272:319-329.
63. Arai H, Kosaka X, Iizuka R: Change of biogenic amines and their metabolites in postmortem brain from patients with Alzheimer-type dementia. *J Neurochem* 1984; 43:388-393.
64. Zis AP, Fibiger HC, Phillopps AG: Reversal by L-dopa of impaired learning due to destruction of the dopaminergic nigro-neostriatal projection. *Science* 1974;185:960-962.
65. Liang KC, Chen L: Lesions of striatal terminals attenuate the amnesic effect of amygdaloid stimulation on avoidance response. *Brain Res* 1983;274:309-318.
66. Gallagher M, Kapp BS, Musty RE, Driscoll PA: Memory formation: Evidence for a specific neurochemical system in the amygdala. *Science* 1977;198:423-425.
67. Essman WB: Serotonin in learning and memory. In: Essman, WB (Eds), *Clinical pharmacology of learning and memory*, Spectrum Public Inc., New York, 1983; pp43-67.
68. Ogren SO: Evidence of a role of brain serotonergic neurotransmission in avoidance learning. *Acta Physiol. Scand Suppl* 1985;544:1-71.
69. Nabeshima T, Itoh K, Kawashima K, Kameyama T: Effects of 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist on cycloheximide-induced amnesia in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1989; 32:787-790.
70. Meneses A, Hong E: Mechanism of action of 8-OH-DPAT on learning and memory. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;49:1083-1086.

71. Ismailova KY, Gasanov GG, Semenova TP, Bobkova NV, Nesterova IV, Gromova EA: Influence of local injection of 5,7-DHT and 6-OH-DA into the neocortex on learning and exploratory behavior for rats in the open field. *Neurosci Behav Physiol* 1990;6:493-499.
72. Bialik RJ.; Pappas, B. S.; Roberts, D. C. S.: Deficits in conditioned avoidance responding following adrenalectomy and central norepinephrine depletion are dependent on postsurgical recovery period and phase of the diurnal cycle. *Behav Neurosci* 1984;5:847-857.
73. Adem A, Islam A, Bogdanovic N, Carlström K and Winblad B. Loss of neurones after long-term adrenalectomy in the adult rat hippocampal formation. *Neuro Report*. 1994;5:2285-2288.
74. Häusler, A.; Persoz, C.; Buser, R.; Mondadori, C.; Bhatnagar, A.: Adrenalectomy, corticosteroid replacement and their importance for drug-induced memory-enhancement in mice. *J Steroid Biochem* 1992;41:785-789.
75. Borrell, J., DeKloet, E.R., Versterg, D.H.G. and Bohus, B., Inhibitory avoidance deficit following short-term adrenalectomy in the rat: the role of adrenal catecholamines, *Behav. Neural Biol.* 1983;39:241-258.
76. Wenk, G.L., An hypothesis on the role of glucose in the mechanism of action of cognitive enhancers, *Psychopharmacology*. 1989; 99: 431-438.
77. Mondadori, C. and Häusler, A. Aldosterone receptors are involved in the mediation of the memory-enhancing effects of piracetam, *Brain Res* 1990; 524:203-207.

78. Wu X, Glinn MA, Ostrowski NL, Su Y, Ni B, Cole HW, Bryant HU, Paul SM. Raloxifene and estradiol benzoate both fully restore hippocampal choline acetyltransferase activity in ovariectomized rats. *Brain Res* 1999; 847(1):98-104.
79. Markowska AL, Savonenko AV. Effectiveness of estrogen replacement in restoration of cognitive function after long-term estrogen withdrawal in aging rats. *Neurosci* 2002;22(24):10985-10995.
80. Alkayed NJ, Harukuni I, Kimes AS, London ED, Traystman RJ, Hurn PD. Gender-linked brain injury in experimental stroke. *Stroke*. 1998;29:159-165.
81. Dubal DB, Kashon ML, Pettigrew LC. Estradiol protects against ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998,18:1253 .
82. Woolley CS, McEwen BS. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *Neurosci* 1992;12:2549-2554.
83. Gibbs RB, Wu D, Hersh LB, Pfaff DW. Effects of estrogen replacement on the relative levels of choline acetyltransferase, trkA, and nerve growth factor messenger RNAs in the basal forebrain and hippocampal formation of adult rats. *Exp Neurol* 1994; 29:70-80.
84. Liu Y, Shimizu I, Omoya T, Ito S, Gu XS, Zuo J. Protective effect of estradiol on hepatocytic oxidative damage. *World J Gastroenterol* 2002; 8(2):363-366.
85. Wong CW, McNally C, Nickbarg E, Komm BS, Cheskis BJ. Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(23):14783-14788.

86. Biessels GJ. Kamal A. Ramakers GM. Urban IJ. Spruijt BM. Erkelens DW. Gispen WH. Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 1996 ; 45(9):1259-1266.
87. Yaffe, K., Sawaya, G., Lieberburg, I. And Grady, D. Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia. *JAMA* 1998;279:688-685.
88. Babar E, Melik E, Ozgunen T, Kaya M, Polat S. Effects of excitotoxic median raphe lesions on scopolamine-induced working memory deficits in inhibitory avoidance. *Int J Neurosci* 2002 ;112(5):525-535.
89. Morris RG. Garrud P. Rawlins JN. O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 1982 ; 297(5868):681-683.
90. Conway EL. Brain lesions and delayed water maze learning deficits after intracerebroventricular spermine. *Brain Research*. 1998 ; 800(1):10-20.
91. 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):125-135.
92. 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. *Behav Brain Res*. 1998; 96(1-2):1-12.
93. Rashidy-Pour A, Motamedi F, Motahed-Larijani Z. Effects of reversible inactivations of the medial septal area on reference and working memory versions of the Morris water maze. *Brain Res*. 1996; 709(1):131-140.

94. 王曉英, 張均田. 人參皂? R<sub>g1</sub> 對 -澱粉樣 (25-35)側腦室注射所致小鼠學習記憶障礙的改善作用及其機制. 藥學學報 2001;36(1):1-4.
95. 孫隆儒, 郭月英, 李竹. 黃精改善小鼠學習記憶障礙等作用的研究. 瀋陽藥科大學學報 2001;18(4):286-289.
96. 李朝陽, 吳鐵, 李青男. 蛇床子素對去卵巢大鼠近側脛骨代謝影響的定量研究. 藥學學報 1996;31(5):327-332
97. Deutsch JA. The cholinergic synapse and the site of memory. Science. 1971; 174(11):788-794.
98. Hsieh MT, Wu CR, Lin LW, Hsieh CC, Tsai CH. Reversal caused by n-butylidenephthalide from the deficits of inhibitory avoidance performance in rats. Planta Med 2001; 67(1):38-42.
99. McGaugh JL. Peripheral and central adrenergic influences on brain systems involved in the modulation of memory storage. Ann N Y Acad Sci 1985;444:150-161.
100. Martinez JL Jr, Jensen RA, Messing RB, Vasquez BJ, Soumireu-Mourat B, Geddes D, Liang KC, McGaugh JL. Central and peripheral actions of amphetamine on memory storage. Brain Res 1980 20;182(1):157-166.
101. 陳可冀主編 抗衰老中藥學 中醫古籍出版社 1987;pp48-50
102. 李青男 樑念慈 吳鐵. 蛇床子總香豆素對去卵巢骨骼的影響. 中國藥理學報 1994;15(6):528-532
103. Hanin I. The AF64A model of cholinergic hypofunction: an update. Life Sci 1996;58(22):1955-1964.
104. Patel TD, Azmitia EC, Zhou FC. Increased 5-HT<sub>1A</sub> receptor immunoreactivity in the rat hippocampus following 5,7-dihydroxytryptamine lesions in the cingulum bundle and fimbria-fornix. Behav Brain Res. 1996;73(1-2):319-323.

105. Narang N, Wamsley JK. Time dependent changes in DA uptake sites, D1 and D2 receptor binding and mRNA after 6-OHDA lesions of the medial forebrain bundle in the rat brain. *J Chem Neuroanat* 1995;9(1):41-53.
106. Mishkin M. Memory in monkeys severely impaired by combined but not by separate removal of amygdala and hippocampus. *Nature* 1978 25;273(5660):297-298.
107. O'Keefe J, Conway DH. Hippocampal place units in the freely moving rat: why they fire where they fire. *Exp Brain Res.* 1978 Apr 14;31(4):573-590.
108. Teyler TJ, DiScenna P. The hippocampal memory indexing theory. *Behav Neurosci* 1986;100(2):147-154.
109. Mondadori C, Ducret T, Petschke F. Blockade of the nootropic action of piracetam-like nootropics by adrenalectomy: an effect of dosage? *Behav Brain Res* 1989 1;34(1-2):155-158.
110. Nielson KA, Czech DA, Laubmeier KK. Chronic administration of propranolol impairs inhibitory avoidance retention in mice. *Neurobiol Learn Mem* 1999; 71(2):248-257.
111. Li BM, Mao ZM, Wang M, Mei ZT. Alpha-2 adrenergic modulation of prefrontal cortical neuronal activity related to spatial working memory in monkeys. *Neuropsychopharmacology* 1999; 21(5):601-610.
112. Marighetto A, Durkin T, Toumane A, Lebrun C, Jaffard R. Septal alpha-noradrenergic antagonism *in vivo* blocks the testing-induced activation of septo-hippocampal cholinergic neurones and produces a concomitant deficit in working memory performance of mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1989; 34(3):553-558.

113. Gold PE, Welsh KA. Regional brain catecholamines and memory: effects of footshock, amygdala implantation, and stimulation. *Behav Neural Biol* 1987;47(2):116-129.
114. Stancheva S, Papazova M, Alova L, Lazarova-Bakarova M. Impairment of learning and memory in shuttle box-trained rats neonatally injected with 6-hydroxydopamine. Effects of nootropic drugs. *Acta Physiol Pharmacol Bulg* 1993;19(3):77-82.
115. Fink G, Sumner BE, Rosie R, Grace O, Quinn JP. Estrogen control of central neurotransmission: effect on mood, mental state, and memory. *Cell Mol Neurobiol* 1996;16(3):325-344.
116. Luine VN. Steroid hormone modulation of hippocampal dependent spatial memory. *Stress* 1997;2(1):21-36.
117. Heikkinen T, Puolivali J, Liu L, Rissanen A, Tanila H. Effects of ovariectomy and estrogen treatment on learning and hippocampal neurotransmitters in mice. *Horm Behav* 2002 ;41(1):22-32.
118. Hausler A, Persoz C, Buser R, Mondadori C, Bhatnagar A. Adrenalectomy, corticosteroid replacement and their importance for drug-induced memory-enhancement in mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;41(3-8):785-789.
119. Hsieh MT, Hsieh CL, Lin Li-Wei, Wu CR , Huang G. S. Differential gene expression of scopolamine-treated rat hippocampus-application of cDNA microarray technology. *Life Sci* 2003 (in press)