

第一章 前言

1-1. 缺血性中風的流行病學、病理生理學

根據衛生署 2002 年公佈的「台灣地區十大死亡原因」中，腦血管疾病名列第二⁽¹⁾。缺血性中風 (ischemic stroke) 佔所有腦血管疾病 (cerebrovascular disease) 的 80% 以上⁽²⁾。發生缺血性中風的原因，主要是由於供給腦組織的血管發生狹窄或完全閉塞，致使其供給的腦組織血流降低，無法獲得充分的氧氣和養分，而導致該區域腦組織的損傷，甚至壞死，稱為腦梗塞。造成供給腦組織血管狹窄或閉塞的原因有血栓和栓塞兩種⁽²⁾。臨床上將梗塞區分為梗塞核心區 (ischemic core area) 和梗塞旁區 (ischemic penumbra)。梗塞核心區的腦組織由於血液供應低於臨界值⁽³⁾，因此產生不可逆損傷的細胞壞死 (necrosis)，而梗塞旁區由於仍有側支循環供應血流，其神經損傷是可逆的，因此成為治療學上發展的重心。

1-2. 缺血性中風的治療概況、研究方向及瓶頸

急性缺血性腦中風若發生於 3 小時內，原則上可用血栓溶解劑 t-PA 來治療⁽⁴⁾。根據 1999 年美國心臟醫學會及臨床神經醫學會所共同制訂的 t-PA 治療準則，建議治療以靜脈注射 recombinant tPA (0.9 mg/kg, max. 90 mg with 10% of the dose given as a bolus followed by a 60-minute infusion) 為主，但必須符合並排除以下情形才可使用⁽⁴⁾。它主要目的是在拯救梗塞旁區 (Ischemic penumbra) 內的神經細胞，但由於治療的黃金時間只有 3 小時十分狹窄，而且使用上限制很多，因此只有少數的患者 (

約 5 % to 8 %) 合乎條件而施行治療。自 1996 年 FDA 核准該療法後⁽⁵⁾，對於缺血性腦梗塞的研究方向便著重於如何延長其治療的 time window, 於是有關神經細胞保護劑、自由基清除劑、NMDA 受體阻斷劑、發炎反應調節劑等的研究陸續被開展起來。

1-3. 缺血性中風發生後腦組織的分生變化

缺血性中風產最主要的原因是粥狀動脈硬化或癥塊掉落產生的血栓或來自心臟的血栓，造成頸動脈或大腦血管的狹窄，甚至阻塞。在梗塞核心區，由於腦血流低於臨界值⁽³⁾，因此腦組織缺乏足夠的氧氣和能量，進而引發一連串細胞在分子層次變化的產生，造成梗塞核心區立即性、不可逆的神經細胞死亡以及梗塞旁區延遲性的細胞損傷或死亡⁽³⁾。又隨著因缺血、再灌流的產生，導致神經細胞更多分子生物事件的相繼發生⁽⁶⁾，如發炎反應 (inflammation)、神經細胞毒性 (excitotoxicity)、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 的生成、自由基產生所造成的損傷 (free radical damage)、以及細胞凋亡 (apoptosis) 等。這些因腦組織缺血所引起的病理變化，稱為缺血後事件 (ischemic cascade)⁽³⁾。腦組織缺血所帶來一連串的病理變化所涉及層面相當複雜，但可簡單歸納如下：1) 因能量供應不足，而產生離子幫浦、粒腺體的失能；2) 神經細胞軸突末梢所分泌大量神經刺激物質，所形成的神經細胞毒性；3) 細胞內鈣離子超載所啟動的後續事件；4) 氧化自由基、NO 的生成，以及對細胞的攻擊；5) 細胞激素產生所啟動的發炎反應，都會進一步形成延遲性神經細胞的損傷。

1-4. 發炎前驅細胞激素(proinflammation cytokines)與缺血性中風的關係

細胞激素的產生會伴隨著發炎反應、免疫反應的啟動、細胞分化或細胞死亡。缺血性中風後，啟動的發炎前驅細胞激素中，最重要為 interleukin-1 (IL-1) 和 tumor necrosis factor-a (TNF-a)⁽⁷⁻¹⁰⁾，它們的產生會加重缺血後的腦損傷⁽¹¹⁻¹³⁾。在大腦當中，分泌發炎前驅細胞激素最主要的細胞是微膠細胞 (microglia)^(3,11,12,14)。缺血事件發生後，由微膠細胞分泌釋放的 TNF-a、interleukin-1 β (IL-1 β) 會進一步對微膠細胞產生活化作用，而 microglia 被活化的結果會釋出更大量的細胞激素，並誘導、活化周邊的白血球，產生內皮細胞黏附因子、化學趨化因子，使白血球黏附並穿透已被蛋白酵素破壞的腦血管障壁 (blood brain barrier , BBB)⁽¹⁵⁻²⁵⁾。當大量的白血球進入梗塞區域後，會不斷的釋放更多的細胞激素、氧化自由基，而導致二次腦損傷⁽¹¹⁾。因此，如何降低腦梗塞後的發炎反應，成為治療上研究的重點。

1-5. 中醫應用活血化癥中藥的源流

中醫對活血化癥藥的應用，最早可追溯至兩千多年前，考古學上發現最早的醫書「治百病方」，其書中五個醫方中就有活血化癥藥當歸、川芎、牡丹皮的記載。「五十二病方」中記載用芍藥、川芎、茜草、鬱金、牛膝和酒來治療疾病⁽²⁶⁾。公元前 200 多年，西漢時期的神農本草經書中，就記載了 41 味具有活血化癥作用的藥物，如丹參、牡丹皮、芍藥、蒲黃、川芎、大黃、及動物類藥的蟪蟲、水蛭等，這些藥物具有活血化癥、破血消癥或攻癥的作用。唐代政府所頒佈的「新修本草」，堪稱為世界上第一部藥典，又稱為「唐本草」，其書中新增補了近 30 種具有活血化

瘀的藥物，如血竭、蘇木、紅花、延胡索等，進一步豐富了活血化瘀藥的內容⁽²⁶⁾。宋朝時期，唐慎微所著的「証類本草」，集宋以前本草之大成，更運用活血化瘀藥來治療各種疾病，如三稜、莪朮等。金元四大家臨床上常用桃仁、五靈脂及紅花等來治療疾病。明朝李時珍的「本草綱目」，記載 100 多種活血化瘀的藥物，其中又添了川七、穿山甲、月季花等藥。清代趙學敏的「本草綱目拾遺」，對活血化瘀藥有更詳盡的論述，又增加土牛膝、雞血藤、玫瑰花、一枝蒿等活血化瘀藥。應用活血化瘀藥物來治療疾病，以及對於活血化瘀有關的論述，到了清代可說是蓬勃發展。

由以上得知活血化瘀藥的記載始於「神農本草經」，發揮於唐宋的「唐本草」、「類証本草」，豐富於明代「本草綱目」，完善於清代「本草拾遺」⁽²⁶⁾

1-6 活血化瘀藥對缺血—再灌流損傷腦梗塞之研究

現代研究顯示，活血化瘀藥可歸納為以下五個主要作用：1) 擴張血管，改善微循環；2) 降低血小板的凝集、增強纖維蛋白溶解和防止血栓形成；3) 調節組織能量代謝、促進組織修復和減少疤痕化；4) 抗發炎作用；5) 調節身體免疫反應⁽²⁶⁾。另外，有些活血化瘀藥具有抗發炎反應、自由基清除、抑制神經細胞毒性等作用。本實驗室先前的研究顯示，在缺血—再灌流損傷腦梗塞大鼠的模型中，活血化瘀藥或方劑如丹參、延胡索、牡丹皮、槐花、補陽還五湯等，能夠減少梗塞面積⁽²⁷⁾。

1-7. 本研究之目的

本研究之目的在探討活血化瘀藥當中，在清代—王清任「醫

林改錯」中出現頻率很高的活血化瘀藥紅花，應用腦梗塞動物模型，客觀的評估其對腦梗塞的作用。我們應用我們實驗室先前所建立的腦梗塞動物模型，將 Sprague-Dawley (SD) 大鼠兩側的總頸動脈和右側的中大腦動脈阻斷腦血流 90 分鐘，再經 24 小時的再灌流。腦梗塞效用的評估是根據腦梗塞面積的大小和神經缺損的程度。同時我們也測量周邊血液的 luciferin-chemiluminescence (CL) counts 來觀察超氧陰離子，以及計算腦梗塞區 TNF- α 和 IL-1 β 染色陽性細胞，來觀察 TNF- α 和 IL-1 β 與紅花的關係。

第二章 文獻探討

2-1. 中醫治療中風理論之源流

急性腦血管疾病，屬於中醫“中風”、“偏枯”的範圍。黃帝內經⁽⁹⁾就有中風相關徵候的描述，如“偏風”、“瘖痺”、“大厥”、“煎厥”、“薄厥”、“偏枯”、“喎斜”等。《素問·調經論》⁽⁹⁾有“血之與氣，並走于上，則為大厥，厥暴則死”的記載，說明中風的發生與與氣血有密切的關係，而且病勢發展快速凶猛，會置人於死地。《素問·生氣通天論》⁽²⁸⁾中說：“陽氣者，大怒則形氣絕，而血菀于上，使人薄厥”，提示說情緒劇烈變動，也是中風發病的誘因之一。

西漢張仲景在《金匱要略·中風歷節篇》⁽²⁹⁾中首先提出中風的病名，並用中臟、中腑、中經、中絡來作為中風的分類。如“邪在於絡，肌膚不仁；邪在於經，即重不勝；邪入於腑，即不識人；邪入於臟，舌即難言，口吐涎”。他們認為中風的發病是因內虛引致外風的侵入，即「內虛邪中」，故以「外風」立論⁽²⁹⁾。唐宋時代認為中風來自於外感風邪，所以治療以辛溫疏散，發汗逐表為主，如大秦朮湯、大小續命湯、候氏黑散等，這些方中都含有麻桂之品。自漢代仲景至唐宋之間，對於中風病的治療大體上以疏散外邪為主流，但嚴用和在《濟生方·中風論治》認為“若內因七情而得之者，法當調氣，不當治風；外因六淫而得之者，亦先當調氣，然後依所感六氣，隨證治之”，提出治療以調氣為優先，因為“大抵人之有生，以元氣為根，榮衛為本。若根本強壯，榮衛和平，腠裡緻密，外邪客氣就不能為害，所以治療中風應首重「調整內虛」⁽¹¹⁾。

金元時期的醫家體會出，在治療中風時不能將內風外風混為一談，故在病因病機上另闢蹊徑⁽³⁰⁾，如劉河間在《素問玄機原病式·火類》中提出“中風癱瘓者，非為肝木之風實甚而卒中之也，亦非外中於風爾；由乎將息失宜，而心火暴甚，腎水虛衰，不能制之，則陰虛陽實”^(30,31)，他認為“熱為本，風為標”，因此提倡用「辛涼開竅」、「滋陰」等方法來治療中風，但仍不脫離唐宋外風立論的束縛，所以有“中風外有六經之形證，先以加減續命湯隨證治之”以及“內有便溺之阻格，復以三化湯主之”的論點。李東垣認為“中風為百病之長，乃氣血閉而不行”，因此強調“痰”在中風的重要性^(30,31)。朱丹溪在《丹溪心法》中提出：“中風大率主血虛有痰，治痰為先，次養血行血”的觀點，主張“初得即當順氣，乃日久即當活血”^(30,31)。

明朝之後，認為“木必先枯也，而後風摧之，人必先虛之，而後風入之”，所以趨向以肝風論點來說明中風發病的原因，治療上偏重理虛及氣、血、痰兼治⁽³⁰⁾。戴思恭、王綸、吳昆等承襲丹溪痰氣學說的論點，提出“痰生於脾”、“風痰源於血虛”、“痰本於脾胃氣虛”的觀點，而主張用「順氣化痰」、「補益脾氣」、「養血活血通絡」等方法來治療中風^(30,31)。王肯堂則沿襲河間“心火暴甚”學說，而提出「降心火、平肝木」的治療方法⁽³²⁾。趙獻可認為中風的根源在腎，主張滋補腎陰，溫補腎陽，對口舌歪斜，提出「潤燥熄風法」來治療。張景岳則從內傷積損立論，對卒中氣脫主張「急用大劑參附峻補元氣」、繼而「填補真陰以培其本、痰壅以開痰」，病緩則用「溫脾強腎」來治本，肝血虛則「養血以除燥，則真陰復而假風自散」等^(31,32)。繆希雍認為中風是“內虛暗風”立論，“法當「清熱順氣開痰以救其標」；次當

治本，「分陰虛、陽虛、氣血兩虛而治之」”(33)。李中梓用「開閉、固脫」的治療法則，認為卒中、不語、半身不遂、口舌歪斜應分別論治(33)。

清中葉以前，承襲明末肝風內動理論，主張用「滋陰治風法」、「潛陽鎮攝法」等的滋水涵木方法來治療中風。爾後西學東漸，融入西醫病理解剖觀念後，產生「活血化癥法」的觀念來治療中風(30)，如葉天士在《臨證指南醫案》書中主張“精血衰耗，水不涵木，木少滋榮，故肝陽偏亢，內風時起”的觀點，所以提唱「滋液熄風」、「濡營養絡」、「補陰養陽」的治療方法(32,33)。張錫純在《衷中參西錄》中，認為中風是“氣血並走於上”，提出“陰損肝陽化風，夾氣血上衝”的發病論點，主張加入龍骨牡蠣潛鎮之品來治療中風(32,33)。張山雷的《中風斟權》和張伯龍的《雪雅堂醫案》兩者都提倡「潛陽鎮攝」、「開泄痰涎」、「順氣降逆」、「滋養心肝腎陰」等方法來治療中風(33)。王清任在《醫林改錯》書中提出「氣虛血瘀」的理論，採用補養還五湯，重用黃耆為君，加入活血化癥之品，首先以「補氣活血」的方法來治療中風(31)。

2-2. 紅花之文獻探討

2-2-1 紅花的品種

本實驗所使用的紅花為菊科 (Compositae) 草本植物的乾燥花，又稱為草紅花 (Carthamus tinctorious L.) 與鳶尾科 (Iridaceae) 的番紅花 (藏紅花, Crocus sativus L.) 不能混為一談。兩種藥材，科屬不同、產地不同，用法用量也有區別。藏紅花的正規藥材名稱應為番紅花或西紅花，因為西藏本身並不出產所謂的藏紅

花，該品原產於西班牙、義大利、希臘、土耳其、利比亞、阿爾及利亞等地中海沿岸國家，英國大量掠奪，然後殖民印度，又從印度走私到西藏，再從西藏傳入中國大陸，因而有藏紅花之名產生。因此在《本草綱目拾遺》中有“藏紅花來自西藏”之記載⁽³⁴⁾。本研究所用的川紅花，其實為草紅花的一種。草紅花的產地在新疆、西北、華北、東北一帶，原產地為埃及，擴種至波斯，然後轉入西域，爾後由東漢張騫出使西域將種子帶入內地，而新疆紅花的栽培是在絲綢之路暢通後，由內地輸出農業技術，將紅花在新疆栽培，因此草紅花由於產地不同而名稱各異，如懷紅花（河南）、川紅花（四川）、杜紅花（浙江）、雲紅花（雲南）等。在藥材植物學上，應只有紅花（草紅花）、藏紅花兩種，其分述如下：

紅花：學名為 *Carthamus tinctorius* L.，生藥名為 *flos carthani*，英文名為 *safflower*、*False saffron*、*African saffron*、*Bastard saffron*、*Thisfle saffron*。科屬為菊科，門屬為雙子葉植物門，一年生，入藥用乾燥花花冠。

藏紅花學名為 *Coecus sativus* L.，生藥學名為 *Stigma croci*，英文名—為 *Saffron*、*Crocus*。科屬為鳶尾科，門屬為單子葉植物門，多年生，入藥用雌蕊柱頭⁽³⁴⁾。

2-2-2 草紅花與番紅花作用的區別：

草紅花是破血、行血、和血、補血之主藥，它性味辛、溫。歸肝、心二經、入肝經血分。能通利經脈、能瀉能補、能破能養、可行可導⁽³⁴⁾。使用劑量上在明朝，賈所學所著《藥品化義》中記載“紅花善通利經脈，為血中氣藥，能瀉而又能補，各有妙義。

若多用三四錢，則過於辛溫，使血走散若多用三、四錢，則過於辛溫，使血走散。若少用七、八分，以疏肝氣，以助血海，大補血虛，此其調暢而和血也。若只用二、三分，入心以配心血，解散心經邪火，令血調和，此其滋養而生血也。”典籍上記載草紅花作用如下《朱氏集驗醫方》-“治女子經脈不通，如血膈者”；《景岳全書》-“「脫花煎」治難產經日或胎衣不下”；《金匱要略》“「紅藍花酒」治婦人 62 種風及腹中血氣刺痛”。

番紅花性味甘平，入心肝二經，能活血化瘀、散鬱開結。一般認為其活血化瘀之效力較草紅花為佳。“實驗證明，拌入 15% 的草紅花做飼料，小白鼠即行死亡，但拌入 2% 的番紅花作為小白鼠飼料也會馬上死亡。如果毒性與療效呈正相關存在，那麼 7.5 份的草紅花就約等於 1 份番紅花的效力”。但從價值上來看，每千克番紅花的價值要比草紅花貴上 63-120 倍，但番紅花的療效卻只有草紅花的數倍而已⁽³⁴⁾。“為什麼番紅花會如此貴？最大的原因在於採集上要花費太多的人工，且採之不易。番紅花是用花的雌蕊柱頭，每千克藥材需要在清早露水未乾時翻山越嶺採集 10 萬朵鮮花，帶回家後要去其花瓣、雄蕊、子房，單取也三分裂的柱頭，10 萬朵花只可獲得 5000 克的雌蕊柱頭，而乾濕比又為 5：1，故最後僅獲得 1000 克乾品，亦即 100 朵鮮花只能獲得 1 克的乾品，貴就貴在手工上”⁽³⁴⁾。

番紅花與草紅花在功能主治上雖不完全相同，但同樣具有活血化瘀、降血壓、以及對子宮的興奮作用，在番紅花不易獲得且價格昂貴的情況下，用草紅花來代用，還是行之有效⁽³⁴⁾。

2-3. 紅花之現代藥理研究

紅花含黃酮類，如 Carthamin (C₂₁H₂₂O₁₁)，約含 0.4-0.6 % 及其他黃酮類 Carthamone (C₂₁H₂₀O₁₁)、Neocarthmain (C₂₁H₂₂O₁₁) 及木脂類多炔類等。另外，含紅花色素黃 (safflor yellow) 為 28-36 %，為多種水溶性成分棕黃色粉末。其主要成分歸納如下：水分—4.5-11.5 %、溶於水的黃色素 20-30 %、溶於鹼的黃色素 2.1-6.1 %、紅花素 0.3-0.6 %、蛋白質 1.7-8.0 %、似蠟物質 0.6-1.5 %、提取物 3.6-6.5 %、纖維素 38.4-50.4 %、灰分 2.5-3.0 %。另外，紅花富涵微量元素如鉻、錳、鋅、鉬等，具有保護心血管、防治糖尿病的作用^(34,35)。

2-3-1 紅花富含黃酮類，具有抗氧化作用：

許多研究報告指出，紅花含有抗氧化作用的成分，在紅花組織培養中分離出 Kinobion A 這個成分，具有抗氧化作用。在 NADPH-induced microsomal lipid peroxidation system 評估方法當中顯示，Kinobion A 這個成分具有清除超氧陰離子的作用⁽³⁶⁾。進一步分析其可能的作用機轉，顯示 Kinobion A 這個成分可能為 tyrosinase inhibitor⁽³⁷⁾。

從紅花分離出八種黃酮類物質，包含一種新的成分：quercetin-7-O- (6''-O-acetyl) -beta-D-glucopyranoside 以及七種已知成分：luteolin, quercetin, luteolin 7-O-beta-D- glucopyranoside, luteolin-7-O- (6''-O-acetyl) -beta- D-glucopyranoside , quercetin 7-O-beta-D- glucopyranoside , acacetin 7-O-beta-D- glucuronide and apigenin-6-C-beta-D- glucopyrano syl-8-C- beta- D- glucopyranoside 。其中強抗氧化劑為 luteolin-acetyl-glucoside 、 quercetin-acetyl-glucoside ，其次 Luteolin , quercetin, and their corresponding

glycosides，亦具有較強的抗氧化作用，而其它兩種 acacetin glucuronide、apigenin-6,8-di-C-glucoside，則較不具抗氧化作用⁽³⁸⁾

2-3-2 紅花成分當中具有抗發炎作用：

紅花所含的成分當中，紅花色素黃 (Safflower yellow –SY) 注射至老鼠腹腔內，可以抑制血清中 lysozyme 的濃度、以及降低腹膜巨噬細胞及白血球的吞噬能力進而抑制發炎反應⁽³⁹⁾。

紅花當中所含的 Herbimycin A (HERB)、HHI 屬於 Src tyrosine kinase inhibitors，可以通過抑制 IL-1beta, TNF-alpha 以及 IL-6，降低 COX-2 mRNA、PGE2 濃度，進而防止骨質的過度再吸收而導致的骨質流失⁽⁴⁰⁾。

紅花萃取物—N- (p-coumaroyl) serotonin (CS) 以及其 3 種衍生物 N- (trans-cinnamoyl) serotonin (Cin.S), N-(trans-cinnamoyl) tryptamine (Cin.T)、N-(p-coumaroyl) tryptamine (CT)，可以抑制受 LPS 刺激後的人類單核球釋出發炎前驅細胞介質 (pro-inflammation cytokins) 如 IL-1alpha, IL-1beta, IL-6, IL-8, and TNF-alpha。其中 Cin.S、CS 具有強自由基清除作用；CS 以及 CT 對於發炎前驅細胞介質具有強力的抑制作用；而 Cin.S 僅能抑制 IL-1alpha、IL-1beta；Cin.T 則無抑制作用⁽⁴¹⁾。

2-3-3 紅花成分當中具有抑制 glutamate-mediated 損傷，產生神經細胞保護作用：

在體內及體外實驗中發現，由紅花萃取出的紅花色素黃 (hydroxysafflor yellow A-HSYA) 可以延長老鼠的凝血時間，並有效的降低缺血性中風後的梗塞面積。在動物實驗中以 Wistar-Kyoto (WKY) rats 進行中大腦動脈阻斷 (MCAO)，發

現經舌下靜脈注射給予單一劑量 HSYA 3.0 mg/kg、6.0 mg/kg 與注射生理食鹽水組比較，可以明顯降低神經學缺陷分數（neurological deficit scores）以及大腦梗塞面積。而 6.0 mg/kg 的治療效果與西藥組-鈣離子阻斷劑 nimodipine- 0.2 mg/kg 相當。在細胞培養當中，以 glutamate 及 sodium cyanide（NaCN）當作神經毒性物質，並加入 HSYA 做評估，發現 HSYA 對 glutamate-mediated 神經元損傷的保護作用明顯優於 NaCN 所導致的神經元損傷。以上研究顯示，紅花萃取物—紅花色素黃（HSYA），具有神經保護作用，可以用來治療局部缺血性中風⁽⁴²⁾。

在視網膜缺血性損傷的研究發現，紅花可以對抗缺血後神經細胞所分泌的 glutamate、N-methyl-D-aspartate、kainate、quisqualate，產生的毒性作用，並能減緩神經細胞退化性病變的發生⁽³⁹⁾。

綜上可知，紅花所含的成分當中，具有抗氧化作用、抗發炎作用以及神經細胞保護作用，因此，本實驗將採「暫時性-局部缺血性中風」的疾病動物模式，來驗證紅花對缺血性中風具有治療作用、保護作用的假說，並進一步針對其可能的作用機轉進行研究。

2-4 研究缺血性中風的動物模型

缺血性中風的研究主軸及實驗方式依中風時間長短來分，主要模型有二，一為永久性阻塞（permanent occlusion）；另一為暫時性阻塞（transient occlusion）。另外，依手術方式來分，主要可分為管腔內阻斷（intra-luminal occlusion）、管腔外阻斷（extra-luminal occlusion）。

不同的模型所觀察的病理生理變化不完全相同，而本實驗室

使用的模型為暫時性、管腔外阻斷，簡稱為 BCCA+RMCAO 係根據⁽⁴³⁾所提出的實驗方法 modified 而來，屬於暫時性局部中大腦動脈阻斷模型 (transient focal middle cerebral artery occlusion)。簡言之，就是透過手術方式，以套管將兩側總頸動脈阻斷，並經開腦手術，以外科縫合線將右側中大腦動脈於下大腦靜脈及嗅束上緣用活結結紮形成的暫時性血流阻斷與再灌流，而造成局部缺血—再灌流損傷腦梗塞的動物模型，其梗塞區域侷限於中大腦動脈血流供應的大腦皮質區 (neocortex area)。本實驗室先前的研究，均採用此模型⁽²⁷⁾，利用 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium (TTC) 染色，可用肉眼區分出梗塞區域為白色，而正常腦組織為紫紅色⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾。另外一種阻斷方式為管腔內阻斷，簡言之，是以尼龍質外科縫線尺寸為 4-0-0，在線的前端用矽膠類物質覆蓋，從頸外動脈做一個切口，將外科縫線從此穿入，進入頸內動脈後，往顱底方向送入縫線，最後使前端矽膠覆蓋處的位置進入 Willis circle 後，直達前大腦動脈與前交通支交界處，如此便可完全阻斷中大腦動脈之血流。目前有許多文獻採用這個方法來製造缺血—再灌流動物模型，但其梗塞區域就不限於大腦皮質區，因為中大腦動脈會發出許多穿通動脈進入基底核區，因此此一模型的梗塞面積會包含中大腦動脈灌流的基底核以及皮質區，用 TTC 進行染色，同樣可以看到梗塞區域呈現白色、正常腦組織呈現紫紅色。

2-5. 缺血性腦梗塞後之神經細胞毒性物質之產生及傷害 (excitotoxicity) :

當缺血性腦梗塞產生後，由於血液供應不足使得神經細胞獲得的能量下降，因此使 Na-K ATPase 受到抑制，導致星狀細胞 (

astrocyte) 外鉀離子濃增高，進而會使突觸前神經細胞軸突 (pre-synaptic terminal) 產生去極化作用，在突觸前釋出大量的 glutamate⁽⁴⁷⁾；另一方面由於能量供應不足使 Na-K ATPase 受到抑制會使鈉離子無法由星狀細胞內運送出，導致細胞外鈉離子濃度降低，進而抑制 Na- dependent glutamate 回收作用，而加重細胞外 glutamate 濃度之升高。最後的淨結果就是突觸前細胞 (pre-synaptic terminal) 大量釋放出 glutamate (圖 2.1)⁽⁴³⁾。

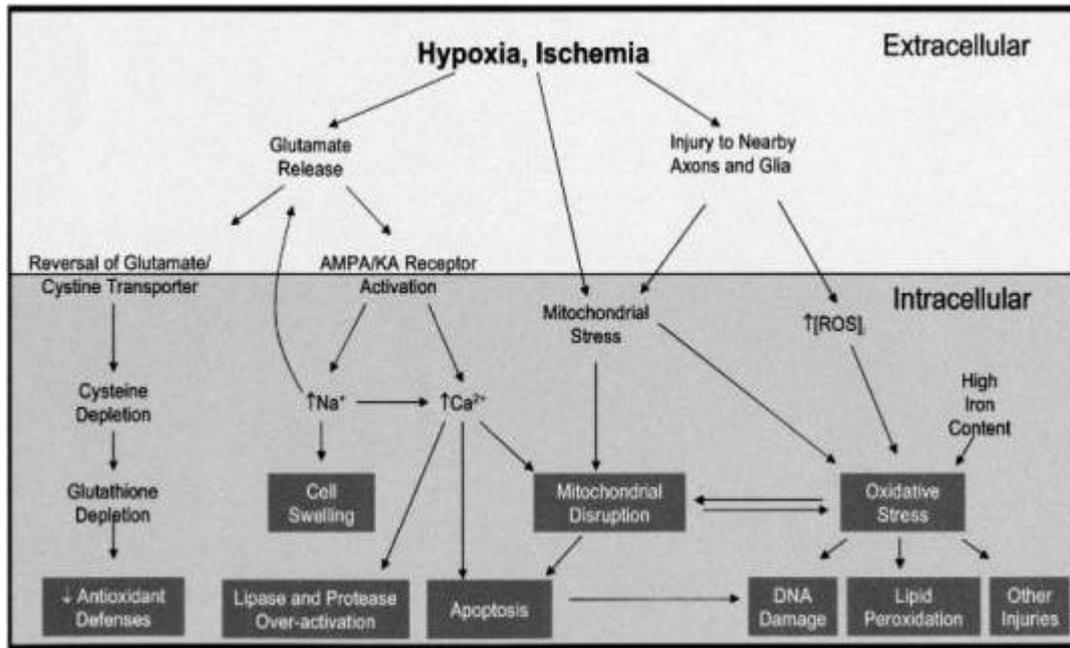


圖 2.1 缺血性腦梗塞後事件(Ischemic cascade)

Glutamate 是一個具有強作用力的神經傳導物質 (neurotransmitter) , 一方面它會與陽離子幫浦上的受體結合 (inotropic receptors) 如 NMDA receptor、AMPA receptor , 進而開啟離子幫浦 (cation channels) 導致細胞外鈉、鈣離子大量流入突觸後神經元 ; 另一方面 glutamate 會催化次級傳導訊號 (second messenger) — inositol-1,4,5- triphosphate (IP3) , 進而使突觸後神經元細胞內的平滑內質網 (smooth endoplasmic reticulum-SER) 釋出大量的鈣離子。鈣離子超載 (Ca-overload) 的結果 , 會活化神經細胞內的酵素系統如 protease、phospholipase、endonucleases 及其他酵素 , 最後導致神經細胞死亡 (圖 2.1)^(5, 47)。

2-6. 缺血性腦梗塞後自由基的產生和傷害：

當腦缺血發生時，由於腦血流的減少，產生腦部供氧不足，但經過再灌流後，無論是自發性或是經血栓溶解劑的治療，重新進入缺血腦組織的氧氣會和胞器內或粒腺體內許多細胞氧化酵素發生作用，產生活性氧化自由基(reactive oxygen radicals , ROS)。正常生理狀態下，粒腺體是細胞產生氧化自由基的來源，據研究報告指出，約有 2% -5% 腦細胞內粒腺體中的電子流會製造出 superoxide anion (O_2^-) 以及 hydrogen peroxide (H_2O_2)⁽⁴⁸⁾。這些正常生理狀態中所製造出來的氧化自由基會被體內的抗氧化系統給清除如 superoxide dismutase (SOD) glutathione peroxidase (GSHPx), 以及 catalase。另一方面，其他較小的抗氧化分子如 glutathione (GSH) ascorbic acid、以及 a-tocopherol 也有清除氧化自由基對細胞的毒性作用⁽⁴⁹⁾。缺血—再灌流所產生的神經細胞損傷，主要來自於內生性抗氧化系統與氧化自由基之間的平衡關係遭到破壞，導致細胞內大量氧化自由基的產生，進而引發一連串的攻擊作用。在缺血性的再灌流時期，氧化自由基的來源，一為 cytosolic prooxidant enzyme、另一來源就是粒腺體。當大腦發生缺血性時，cytosolic prooxidant enzyme 包含以下三大類酵素可製造自由基⁽⁴⁹⁾：(1) nitric oxide synthases (NOS) ; (2) cyclooxygenases (Cox), xanthine dehydrogenase(XDH), xanthine oxidase (XO) NADPH oxidase(NADPHO) ;(3) myeloperoxidase (MPO)、 monoamine oxidase (MAO) (見表 2.1)。

2-6-1 氧化自由基的產生

* 第一類細胞內氧化前驅酵素 NOS 及其產生的自由基：

NOS 包含三種異構物，分別為存在於大腦實質的 neuronal nitric oxide synthase (nNOS , NOS1), 持續存在於大腦神經細胞；第二種為經誘導產生的 NOS, 稱為 inducible nitric oxide synthase (iNOS, NOS2), 由 microglia/macrophages 以及 astrocytes 誘導後產生；第三種 NOS 就是持續存在於血管內皮細胞, 稱為 endothelial nitric oxide synthase (eNOS, NOS3)。nNOS 和 eNOS 的活化屬於 Ca^{2+} -dependent, 而 iNOS 的活化是屬於 Ca^{2+} -independent。有研究已證明 nNOS 以及 iNOS 製造出來的 NO 對缺血後的大腦產生損傷作用；相反的 eNOS 所製造出來的 NO, 卻因具有血管擴張的效果, 而具有神經保護作用⁽⁴⁹⁾。

* 第二類細胞內氧化前驅酵素及其產生的自由基：

這類酵素包含 cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2 (COX-2)、xanthine dehydrogenase (XDH)、xanthine oxidase (XO) 以及 NADPH oxidase (NADPHO) 等, 主要產生的自由基為超氧陰離子, 除了 COX-2 路徑為腦缺血性發生後經誘導產生外, 其他都是持續表現。來自 leukocyte 所產生的超氧陰離子, 主要是經過 NADPHO 的作用。Nogawa et al. (1998) 研究指出, 腦缺血性發生後, iNOS 產生的 NO 會加強 COX-2 的活性, 而製造出大量的超氧陰離子, 而且 iNOS-positive neutrophils 十分靠近 COX-2-positive neuron^(49,50)。

* 第三類細胞內氧化前驅酵素

這類酵素包含 myeloperoxidase(MPO) 以及 monoamine oxidase (MAO)。MPO 主要位於巨噬細胞 (macrophage), 會釋放出大量的 hypochlorous acid (HOCL), 而 MAO 主要位於神經

細胞、星狀細胞以及血管內皮細胞會釋放出 H_2O_2 。

2-6-2 活性氧化自由基對缺血後大腦細胞攻擊產生的損傷

ROS 包括 superoxide anion, hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($OH\cdot$), nitric oxide (NO), peroxy-nitrite anion ($OONO^-$) 等⁽⁵¹⁾。ROS 會對細胞內的大分子產生直接攻擊，而導致脂質過氧化作用 (lipid peroxidation)、蛋白質氧化作用 (protein oxidation)、DNA 的氧化傷害 (DNA oxidative damage)，最後導致缺血後腦損傷⁽⁵²⁻⁵⁴⁾。另外，越來越多的研究顯示，ROS 也可透過氧化還原訊息傳遞的路徑 (redox signal transduction pathways)，攻擊粒腺體、DNA 修復酵素 (APE/Ref-1)，以及核轉錄因子 (nuclear transcription factors)，而導致細胞死亡^(55,56)。

表 2.1 腦缺血後的氧化酵素 (prooxidant enzymes in ischemic brain)

Enzyme	Gene/protein	Oxidant	Ca ²⁺ activation	Expression	Cell
Neuronal nitric oxide synthase	NOS1	NO	+	Constitutive	Neuron
Inducible nitric oxide synthase	NOS2	NO	-	Inducible	L, M, A, E
Endothelial nitric oxide synthase	NOS3	NO	+	Constitutive	Endothelium
Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase	XDH/XO	O ₂ ⁻	+	Constitutive	Endothelium
Cyclooxygenase-1	COX-1	O ₂ ⁻	-	Constitutive	N, A, M, E
Cyclooxygenase-2	COX-2	O ₂ ⁻	-	Inducible	N, A, M, E
NADPH oxidase	NADPHO	O ₂ ⁻	-	Constitutive	Leukocyte
Myeloperoxidase	MPO	HOCl	-	Constitutive	M
Monoamine oxidase	MAO	H ₂ O ₂	-	Constitutive	N, A, E

NOS, nitric oxide synthase; NO[·], nitric oxide radical; +, Ca²⁺-dependent; -, Ca²⁺-independent; L, leukocyte; M, microglia/macrophage; A, astrocyte; E, endothelium; O₂⁻, superoxide anion; N, neuron; HOCl, hypochlorous acid; H₂O₂, hydrogen peroxide.

2-7. 缺血性腦梗塞後的發炎反應：

發炎反應包括分子層次和細胞層次⁽¹¹⁾。研究顯示，中風後的發炎反應進行的核心地帶，發生在於血液與微血管內皮細胞之間的交互作用^(11,12)、大腦中的微膠細胞、星狀細胞以及血管內皮細胞會釋放出一些發炎前驅細胞激素如 TNF- α 、IL-1 β ，而加重缺血後大腦發炎反應的產生^(11,13)。在腦缺血發生後的數分鐘至數小時內，

來自周邊的白血球 (leukocyte) 會開始聚集、活化、進而黏附至腦微循環中的血管壁上。由於活化的白血球大量聚集、黏附於大腦微循環中，會進一步阻塞腦中微血管，使供血不足的情形更加的惡化^(11,57)。另一方面，穿過血管壁的中性球 (neutrophils) 以及單核球/巨噬細胞 (monocytes/ macrophages) 也開始進入腦梗塞區域^(11,58)。再灌流後，來自周邊的白血球大量聚集至腦部，也會加重缺血後的發炎反應，甚至影響血栓溶解劑的效果^(11,59)。

一些研究已指出，當大腦受到直接的傷害、缺血性傷害、神經毒性作用、病毒感染 (virus infection)，或免疫反應的攻擊 (immunological challenge)，都會產生一種應激反應，使神經膠細胞活化 (activation)^(3,14)。當神經膠細胞受到細胞激素的刺激後，大腦內處於不活化的神經膠細胞會開始活化、增生、變形，進而演變成具有吞噬能力的微膠細胞或巨噬細胞 (macrophage)。當腦缺血事件發生，而致使神經膠細胞活化，利用免疫染色的方法，最早在腦缺血發生後 2 小時就可以觀察到活化狀態的微膠細胞 (activated microglia)⁽¹²⁾。另外一方面，活化的神經膠細胞會大量的釋放出細胞激素，引發更嚴重的發炎反應。因此發炎反應、細胞素的製造與神經膠細胞的活化，三者之間形成密不可分的關係⁽³⁾。以下為需要解決的問題：

第一：可以活化神經膠細胞的細胞激素為何？

細胞激素包括 TNF- α 、IL-1 β 以及 interferon- α 等都能活化神經膠細胞⁽¹⁵⁻²⁰⁾。

第二：中樞神經系統內可以製造細胞激素的細胞為何？

Microglia、astrocytes、endothelial cells、以及 neurons 等都能製

造細胞激素⁽²⁰⁻²⁵⁾。

第三：TNF- α 、IL-1 β 在缺血性腦梗塞發生後的發炎反應，所扮演的角色為何？

由於 TNF- α 、IL-1 β 、chemokines (IL-8)、黏附因子 (adhesion molecules) 以及 proteinases (MMP familys) 等的共同作用下，來自周邊組織的發炎細胞可以滲入大腦梗塞區。TNF- α 、IL-1 β 的釋放可以活化黏附因子 ICAM-1、化學驅化因子 (chemokine 如 IL-8)，使白血球由周邊被活化並吸引至大腦微血管系統中，經由黏附因子的作用，使周邊發炎細胞能貼附大腦微血管壁，由於蛋白酵素的作用而破壞血腦屏障，然後在趨化因子 (chemokines) 的作用下，活化的周邊白血球進而產生穿透作用而滲入梗塞區⁽¹⁵⁻²⁵⁾。

第四：周邊發炎細胞浸潤會對缺血後損傷的大腦產生何種作用？

首先，在缺血性腦損傷產生後，來自周邊組織的細胞如 mononuclear phagocytes、T-lymphocytes、natural killer cells、and polymorphonuclear leukocytes (PMNs) 也會製造並釋放出細胞激素，導致中樞神經系統更嚴重的發炎反應產生、神經膠細胞活化。

其次，中性球的浸潤 (leukocyte infiltration) 不僅會導致脂肪性膜的過氧化 (lipid-membrane peroxidation)，也會因大量聚積，且黏附於血管壁造成嚴重的阻塞作用。此外，被活化的白血球也會不斷的釋放出活性氧化自由基以及細胞激素，這些對於已受缺血而產生損傷的腦組織更是雪上加霜。利用免疫染色的方法在大腦微血管內，可以看見梗塞區域內塞滿了許多白血球、梗塞核心區外的腦組織，則是呈現水腫狀態。許多微血管內的白血球 (大多是中性球)，緊黏著微血管壁、甚至有些已經穿透微血管壁，

進入梗塞核心區域的大腦皮質區⁽¹¹⁾。

綜合以上可以整理如下：當腦缺血性發生後，缺血區的神經細胞、微膠細胞、星狀細胞或血管內皮細胞會受到刺激，分泌細胞激素如 TNF- α 、IL-1 β 以及 interferon- α ，促進神經膠細胞活化，進一步釋出大量的細胞激素。TNF- α 、IL-1 β 會在進一步的吸引來自周邊的白血球，使之活化，並經由黏附因子、化學趨化因子，使這些白血球黏附並穿透已被蛋白酵素破壞的 BBB，最後進入梗塞區，並不斷的釋放更多的細胞激素、氧化自由基，產生腦缺血性後的二次腦損傷。

2-7-1 發炎反應所啟動的發炎前驅基因

腦缺血發生後的早期，許多基因表現會隨著大腦缺血事件的發生而被誘發^(3,11)。許多發炎前驅基因如轉錄因子 (transcription factors)、熱休克蛋白 (heat shock proteins)、細胞激素 (cytokines)、化學趨化因子 (chemokines)、黏附因子 (adhesion molecules) 會被正向調控 (upregulated)。在體外實驗發現，許多被正向調控的基因如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、NOS、cyclooxygenase-2 (COX-2)、intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)，是透過核轉錄因子- κ B (NF- κ B) 的調控^(11,60)。有報告顯示在人類大腦梗塞後，神經膠細胞內會有 NF- κ B 的誘導產生^(7,11,60)。

2-7-2 發炎反應所啟動的細胞激素

細胞激素屬於 polypeptides 類結構，通常會伴隨著發炎反應、免疫反應的啟動、細胞分化或細胞死亡而產生。在周邊組織，受細胞激素作用而活化的細胞包括巨噬細胞、單核球、淋巴球、

內皮細胞、纖維母細胞、血小板等。在中樞神經系統內，受細胞激素活化的主要細胞是微膠細胞⁽¹¹⁾。當腦缺血性後，啟動的發炎前驅細胞激素中最重要的兩個細胞激素為 IL-1 和 TNF-a⁽⁷⁻¹⁰⁾，他們的產生會加重缺血後的腦損傷；但也有保護性的細胞激如 IL-1-receptor antagonist (IL-1ra)、interleukin-10 (IL-10) 等。

2-7-3 細胞激素—TNF-a 在缺血性中風作用的相關研究

有研究研究發現，不管是暫時性或永久性的中大腦動脈阻塞模型中，缺血性中風發生後，都可以發現在缺血區的大腦皮質有 TNF-amRNA 的誘導產生^(11,61-63)。有研究研究發現，給予 TNF-receptor I (sTNF-RI) 可以抑制 TNF-a 的活性，進而減少局部缺血性腦損傷^(11,64,65)若給予抗 TNF-a 的單株抗體，同樣的也可以降低梗塞面積^(66,67)，但注射 TNF-a，則會加劇中風的程度^(11,19,65)。但有研究卻顯示 TNF-a 對缺血性中風有保護作用，由於在基因上剔除 TNF-a 受體的大鼠，其誘發缺血性中風後，腦損傷的程度反而會加重^(10,21,68)。

有研究顯示，在大鼠缺血性中風發生後的 1-3 小時內，TNF-a mRNA 以及 protein 的表現升高⁽¹⁵⁻¹⁷⁾。在梗塞皮質區內，TNF-a mRNA 的濃度最早在梗塞後 1 小時就會升高、濃度達最高值的時間為梗塞後 12 小時，持續至梗塞後 5 天。由於 TNF-a mRNA 表現的時間早於白血球穿透入梗塞區域的時間，顯示 TNF-a 的表現與白血球穿入梗塞核心區的反應有關。用免疫標定細胞來探討梗塞發生時 TNF-a 來自何種細胞時，發現以 Double-label immunofluorescence 方法標定出早期的 TNF-a 位於神經細胞上而非星狀細胞，但缺血後 5 天，來自神經細胞的 TNF-a 減少，

這時所標定出 TNF-a 的位置大多為發炎細胞。而 TNF-a 究竟透過什麼樣的機轉使得缺血性中風後腦損傷加重？由以下學者的研究報告可以看出一些端倪：在直接使用 micro-injection 注射 TNF-a 進入鼠腦皮質的實驗中發現，TNF-a 可以使白血球更易黏附至大腦微血管內皮。有人發現局部缺血性中風後，在活化的微膠細胞以及巨噬細胞中可找到快速升高的 TNF-a mRNA 以及 protein，再次證明 TNF-a 屬於缺血性中風後內生性發炎反應的一環⁽⁶²⁾。有研究認為 TNF-a 可以誘導白血球去黏附大腦微循環的血管內皮，進而啟動缺血性中風後最早期的腦微血管發炎反應⁽⁶¹⁾。

2-7-4 細胞激素—IL-1 β 在缺血性中風的作用的相關研究

研究顯示，在中樞神經系統內許多細胞皆能製造 IL-1 β 如微膠細胞、星狀細胞、神經細胞以及血管內皮細胞等^(68,69,70)。如同 TNF-a，許多研究發現 IL-1 β 具有誘導發炎反應產生的性質，而在中樞神經系統內也可以找到其受體^(15,18,67)。在大鼠暫時缺血性腦中風模型的研究中發現，中風後 IL-1 β mRNA 的 expression 上升^(3,13,60)。大鼠若注射 IL-1 β 也會加重其缺血後腦損傷的程度^(15,71,72)。Liu et al. (1993) 發現，在中大腦動脈阻塞中風後 3-6 小時，IL-1 β mRNA 會迅速的增加，於第 12 小時後達極大值，但第 5 天後又回復到中風前的水平⁽⁶³⁾。近年來由於研究技術的進步，經由免疫組織化學標定方法，利用抗體在缺血性中風後大鼠的大腦血管、微膠細胞以及巨噬細胞中標定出 IL-1 β ，更證實 IL-1 β 在缺血後腦損傷所扮演的角色^(18,73,74)。IL-1 在缺血性中風後會被大量的誘導產生，在缺血後 6 小時達到頂峰，並會持續至

數天，而產生 IL-1 的細胞以腦血管內皮細胞和微膠細胞為主^(74,75)。IL-1 的產生會使缺血性損傷更加惡化，同時也會產生選擇性的細胞死亡以及大腦水腫⁽⁷⁶⁾。研究顯示，若能阻斷 IL-1，則能減少大腦缺血後損傷^(75,77)，由於抑制 IL-1 可以使細胞黏附因子 ICAM 的產生下降、並減少其他發炎前驅因子的作用⁽⁷⁵⁾。Mulcahy et al. (2003) 的研究也顯示，給予缺血性腦中風大鼠注射 IL-1 受體阻斷劑 (IL-1 receptor antagonist)，可以對腦損傷產生保護作用^(77,78)。

2-8. 非鈣離子依賴性 NMDA 受體阻斷劑-MK801 之研究：

MK801 屬於一種非鈣離子依賴性的 NMDA receptor antagonist，許多研究已證實它具有神經保護作用，能減少實驗動物中風後的梗塞面積。MK801 透過與 glutamate 競爭 NMDA 受體，使離子幫浦不因突觸前 glutamate 濃度大量升高而被開啟，如此，便不會使大量的鈉、鈣離子流入突觸後的神經細胞內，因而抑制鈣離子超載及其後續事件的產生、防止神經細胞因鈉離子滲入而產生的細胞毒性水腫 (cytotoxic edema)。有研究顯示，MK801 在暫時性顳側中大腦動脈梗塞再灌流的模型中，可以降低大腦水腫以及梗塞面積⁽⁸⁰⁾。Collaco-Moraes et al. (1994) 的研究更進一步顯示，給予 MK-801 (3 mg/kg) 術前治療，可以抑制中大腦動脈阻塞 (MCAO) 大鼠大腦中 c-fos mRNA 的產生，進而產生神經保護作用⁽⁸¹⁾。Bertorelli et al. (1998) 的研究發現，給予 MK801 可以降低永久性 MCAO 模型大鼠腦組織中 TNF-a 的濃度，並減少梗塞面積⁽⁸²⁾。Gorgulu et al. (2000) 的研究也顯示，在缺血後 15 分鐘給予 MK801，可以降低大腦水腫的程度，並降低梗塞面

積⁽⁸³⁾。因此，本實驗採用 MK801 作為與實驗組對照的陽性控制組。

第三章 材料與方法

本研究分為兩部分，實驗一的目的在於探討紅花對缺血-再灌流損傷大鼠腦梗塞之效用。首先探討其藥物作用劑量，其次探討在不同給藥時間下，最有效劑量組在術前給藥、梗塞後 30 分鐘後給藥、再灌流後 30 分鐘給藥之效用差別，以探討其治療時機。另外，我們採用文獻記載 NMDA 拮抗劑-MK801 為陽性控制組，一來驗證本實驗模型是否穩定、二來可以使紅花與之比較作用效果；實驗二的研究目的則是對紅花在缺血-再灌流損傷大鼠腦梗塞作用機轉之探討。

3-1. 動物：

本研究所採用之實驗動物品系為 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠，體重介於 300-400 g 之間，實驗分為兩部份：實驗一分為 9 組，每組 6 隻，共計 54 隻；實驗二分為 3 組，每組 6 隻，共計 18 隻。所有的動物來源皆購自國家實驗動物中心，飼養於中國醫藥大學動物中心，飼養環境採室內中央空調、明暗控制各 12 小時，水和飼料每日充足供應。實驗室室溫控制在 25 ± 1 ，所有的實驗過程皆合乎動物倫理原則。

3-2. 動物模型之建立：

本實驗之麻醉劑使用氯化水醛 (chloral hydrate, 400 mg/Kg)，採腹腔注射方式給藥麻醉。在實驗過程當中持續監測大鼠之生理指標-平均動脈壓、心跳 (0093-101L, BP-2, Columbus, Ohio, USA)、直腸溫度(TM-906A, Dual Channel Thermometer, Taiwan)、中大腦動脈腦血流 (Laser Doppler Blood-Flow Monitor, DRT4, Moor instrument Ltd, England)。

實驗採用中大腦動脈缺血性梗塞模型：管腔外阻斷方式⁽²⁵⁾再加上兩側總頸動脈阻斷，簡稱 RMCAO+BCCAO (right middle cerebral artery occlusion and bilateral common carotid artery occlusion)。過程敘述如下：

首先將大鼠秤重、測量直腸溫度，若溫度超過 38.5 度者，予以排除本實驗，然後依大鼠體重給予腹腔注射麻醉 (chloral hydrate, 400 mg/Kg)。將大鼠頭顱部、腹側頸部、鼠蹊部之毛髮剃除，並使呈仰臥姿勢，以利進行頸部手術。以手術刀沿大鼠頸正中線切開，長度約 1 公分，暴露出氣管，在氣管兩旁游離出總頸動脈，並將總頸動脈旁的迷走神經 (vagus nerve) 分離，用兩只尼龍繩套 (nylon thread, 直徑約 0.5mm) 分別繞過兩側總頸動脈，再放上套管 (直徑約 1.5 mm)。

其次，進行股動脈插管監測心跳、平均動脈壓，其步驟簡述如下：以手術刀從 SD 大鼠右側鼠蹊部切開成一個約長 2.5 cm 的傷口，分離出右股動脈，然後插入 PE-50 管 (cannulated with PE-50 polyethylene catheters)，並用少量 heparin (25 unit/ml) 溶液沖洗 PE-50 管，以防止凝固。PE-50 管的另一端，則連接於心跳血壓測量儀 (0093-101L, BP-2, Columbus, Ohio, USA)。整個實驗過程中，連續監測平均動脈壓及心跳的變化，並記錄之。

插入 PE-50 管後，將大鼠呈俯臥位，並將頭部固定於小動物立體固定儀 (stereotaxic apparatus) 上，從頭部左右眼角 (canthux) 的正中線及左右耳翼間的正中線切開，使暴露出頭骨。將右側顳肌 (temporal muscle) 沿顳骨緣切開，用骨剪進行顳骨切開術 (craniectomy)，剪成一個直徑約 5-10 mm 的骨窗。手術過程當中，若發現腦膜破裂產生大量出血，則動物被排除實驗。以雷射血流監

視器(Laser Doppler Blood-Flow Monitor, DRT4, Moor instrument Ltd, England) 的探針來尋找並確定中大腦動脈，當監測刻度大於 800 LD units 時，則確定為中大腦動脈。用 8-0-0 尼龍單線微型手術針 (8-0-0 mono-filament nylon tie, ETHICON, Johnson & Johnson Ltd, Belgium) 於嗅束上緣 (Olfactory tract) 與下大腦靜脈 (Inferior cerebral vein) 之間穿過中大腦動脈。麻醉 30 分鐘後，將兩側總頸動脈上的套管套緊，並將 8-0-0 尼龍線以單套活結綁緊至活結下游中大腦動脈供血區腦膜變白，而雷射血流監視器的刻度出現 50 LD units 以下時，則可確定血流阻斷成功。

3-3 藥物製備、給藥劑量及方式

3-3-1 藥物來源及製備：

紅花之來源及製備：

紅花的製劑委託科達製藥股份有限公司製作。首先秤取 80 克紅花原生藥 (原產地中國大陸四川省)，將藥材置入不鏽鋼鍋，加入 7 倍水，加熱沸騰煎煮 50 分鐘，以 100 目篩網過濾。將藥渣加入 5 倍水，加熱沸騰煎煮 50 分鐘後以 100 目篩網過濾，收集二次濾液進行濃縮，最後產物為 27.48 克 (34.35 %)。取濕浸膏 25 g，加入 131.7 ml phosphate buffer saline (PBS, PH7.4) 成為濃度 0.2 g/ml 之紅花溶液。

MK801 購自 SIGMA 藥廠(SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH P.O. 1120, 89552 Steinheim, Germany 49-7329-970)，用 phosphate buffer saline(PBS, PH 7.4) 配置為濃度 1 mg/Kg，分裝保存於 4 的冰箱中。

3-3-2 給藥劑量：

紅花給藥劑量之決定：

紅花劑量的決定是根據預試驗 (pilot study) 的結果得知紅花 0.2 g/Kg 腹腔注射能夠減小缺血—再灌流損傷大鼠腦梗塞面積，因此本實驗採 0.2 g/Kg、0.4 g/Kg、0.6 g/Kg，分別於腦血流阻斷前 10 分鐘施行腹腔注射。另外，採用紅花 0.4 g/Kg 分別於血流阻斷後 30 分鐘，及再灌流後 30 分鐘施行腹腔注射。

3-4. 動物分組及流程

3-4-1 實驗一

3-4-1-1 動物分組

將 54 隻 SD 大鼠以隨機分為 9 組，每組 6 隻(圖 3.1)：

- (1) 控制組(C)：阻斷兩側總頸動脈和右中大腦動脈的血流 90 分鐘，然後再灌流 24 小時，不施予任何藥物治療。
- (2) 空白對照組(PBS)：方法同 C，但於腦血流阻斷前 10 分鐘腹腔注射 0.2 ml/Kg PBS。
- (3) 陽性對照組(MK)：方法同 C，但於腦血流阻斷前 10 分鐘腹腔注射 MK801 1mg/Kg。
- (4) 假手術組(S)：只用 8-0-0 尼龍線穿過中大腦動脈，但不阻斷腦血流
- (5) P-0.2 組：方法同 C，但於腦血流阻斷前 10 分鐘腹腔注射紅花 0.2 g/Kg。
- (6) P-0.4 組：方法同 C，但於腦血流阻斷前 10 分鐘腹腔注射紅花 0.4 g/Kg。
- (7) P-0.6 組：方法同 C，但於腦血流阻斷前 10 分鐘腹腔注射紅花 0.6 g/Kg。

- (8) O-0.4 組：方法同 C，於腦血流阻斷後 30 分鐘腹腔注射紅花 0.4 g/Kg
- (9) R-0.4 組：方法同 C，但於再灌流後 30 分鐘腹腔注射紅花 0.4 g/Kg

3-4-1-2 實驗流程

實驗一之實驗流程如圖 3.1 所示如下：

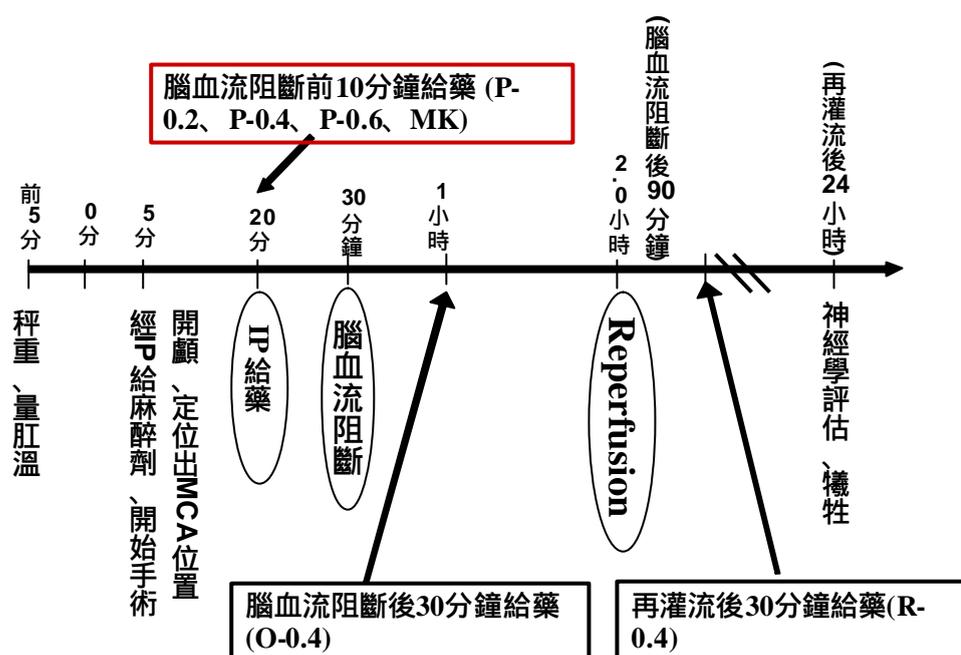


圖 3.1 實驗一流程圖。實驗前先測量大鼠的體重和肛溫，然後用 chloral hydrate 於大鼠腹腔注射，將大鼠麻醉。將大鼠固定於立體定位儀上，剔除頭上毛髮後，用骨剪在大鼠頭顱打一個洞，找出中大腦動脈 (MCA)。阻斷兩側總頸動脈和右側大腦動脈腦血流阻斷前 10 分鐘，腹腔注射 (i.p. 不同濃度的紅花 0.2 g/kg (P-0.2)、0.4 g/kg (P-0.4)、0.6 g/kg (P-0.6) 和 MK 801 (1 mg/kg)。於腦血流阻斷後的 30 分鐘腹腔注射紅花 0.4 g/kg (O-0.4) 和再灌流的 30 分鐘腹腔注射紅花 0.4 g/Kg (R-0.4)。再灌流後施行神經評估，然後將大鼠犧牲取腦。

3-4-2 實驗二

將 18 隻 SD 大鼠隨機分為 3 組，每組 6 隻（圖 3.2）：

- (1) 控制組(C)：阻斷兩側總頸動脈和右中大腦動脈的血流 90 分鐘，然後再灌流 24 小時，不施予任何藥物治療。
- (2) 對照組(MK)：方法同 C，但於腦血流阻斷前 10 分鐘腹腔注射 MK801 1mg/Kg。
- (3) 治療組：方法同 C，但於腦血流阻斷前 10 分鐘腹腔注射紅花 0.4 g/Kg。

每一組都分別於腦血流阻斷前 15 分鐘，阻斷後 90 分鐘，以及再灌流後 2 小時分別從 PE-50 管抽股動脈血 0.3cc。其中 0.1cc 血置入 EDTA 管中，另 0.2cc 則置入 heparin coated 的試管中。

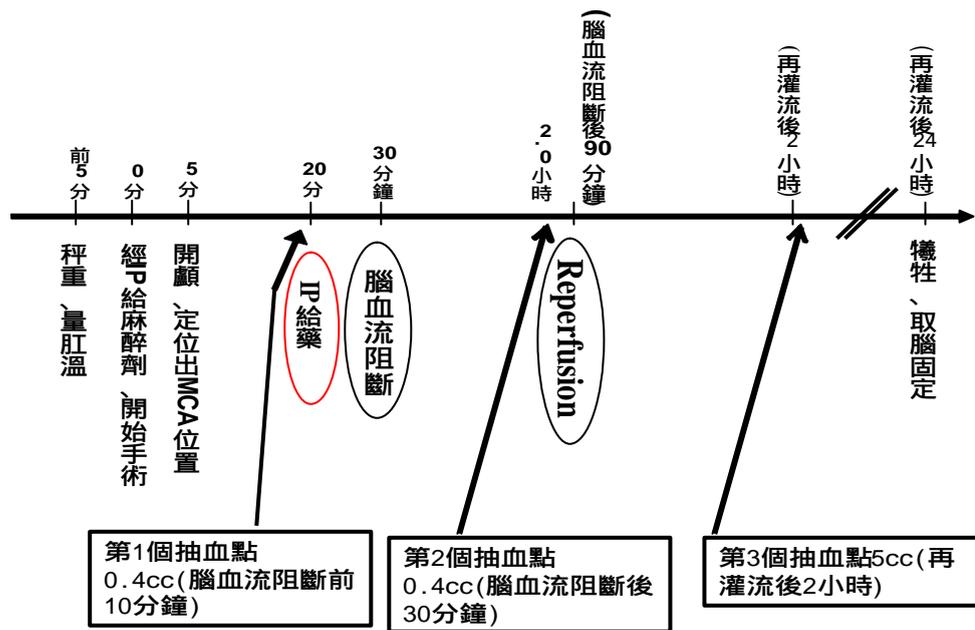


圖 3.2 實驗二流程圖。實驗前先大鼠秤重並測量肛溫。然後用 chloral hydrate 腹腔注射，待大鼠麻醉後，將 PE-50 管插入大鼠右股動脈，分別於腦血流阻斷前 15 分鐘，阻斷後 90 分鐘，以及再灌流後 2 小時分別從 PE-50 管抽股動脈血 0.3cc。再灌流 24 小時後，從心臟灌流，將大鼠犧牲取腦，固定做成切片，做組織免疫染色。

3-5. 生理、生化指標之測定

整個實驗過程中，大鼠的生理指標都被監測。同時生化值也被測定。

3-5-1 體重的測量：

於實驗厭前及再灌流 24 小時動物被犧牲前，大鼠的體重分別被測量。

3-5-2 肛溫的測定：

於實驗前，再灌流 2 小時及 24 小時犧牲前大鼠的肛溫分別被測定。另外，腦血流阻斷後再灌流前，大鼠的肛溫每 15 分鐘測定一次。

3-5-3 心跳、動脈壓的監測：

整個實驗過程，大鼠的平均動脈壓及心跳，每 15 分鐘測定一次。

3-5-4 周邊血液的測定：

再灌流 24 小時後，動物犧牲前，用注射空針從股靜脈抽血 3.0 cc，測定周邊血液的血球及生化。

將裝有 0.5 ml 靜脈血之 EDTA 管均勻搖晃後，置於血球分析儀 (System KX-21, SYSTEM Ltd., KOBE, Japan) 之探頭下，測定血液中白血球 (WBC)、紅血球 (RBC)、血紅素 (HGB)、血球比容 (HCT)、平均血球體積 (MCV)、平均血球血紅素 (MCH)、平均血球血紅素濃度 (MCHC)、血小板 (PLT)、淋巴球 (Lym) 及淋巴球百分比 (Lym%)。所用試劑包括：cell pack (SAN TUNG Instruments Co. Ltd., Taiwan)、SWH-200 (SYSMEX Co. Ltd, KOBE, Japan) 及 cell clean (SYSMEX Co. Ltd., KOBE, Japan)。

將裝有 2.5 ml 靜脈血之離心管靜置半小時後，置於離心機（KUBOTA 6900, KUBOTA Co., Japan）中，用 3400 rpm 離心 10 分鐘後，用 dropper 吸取上清液至小試管中，再放至 -80 °C 冰箱中冰存，待 54 隻 SD 大鼠血清收集齊全後，將之解凍，置於生化分析儀上（Roche, COBUS, MIRA）中，測定 GOT、GPT、BUN、Creatinine、血糖的濃度。所用試劑包括 GOT、GPT、BUN、Sugar（以上試劑來源—RAICHEM, San Diego, CA, US）及 Creatinine（Bayer Co., NY, USA）。

3-6. 神經學狀態評估

再灌流 24 小時後犧牲前，進行神經學狀態評估⁽⁴⁶⁾。神經狀態的評估是由不知道實驗分組的助理人員執行，神經狀態等級如下（圖 3.3）：

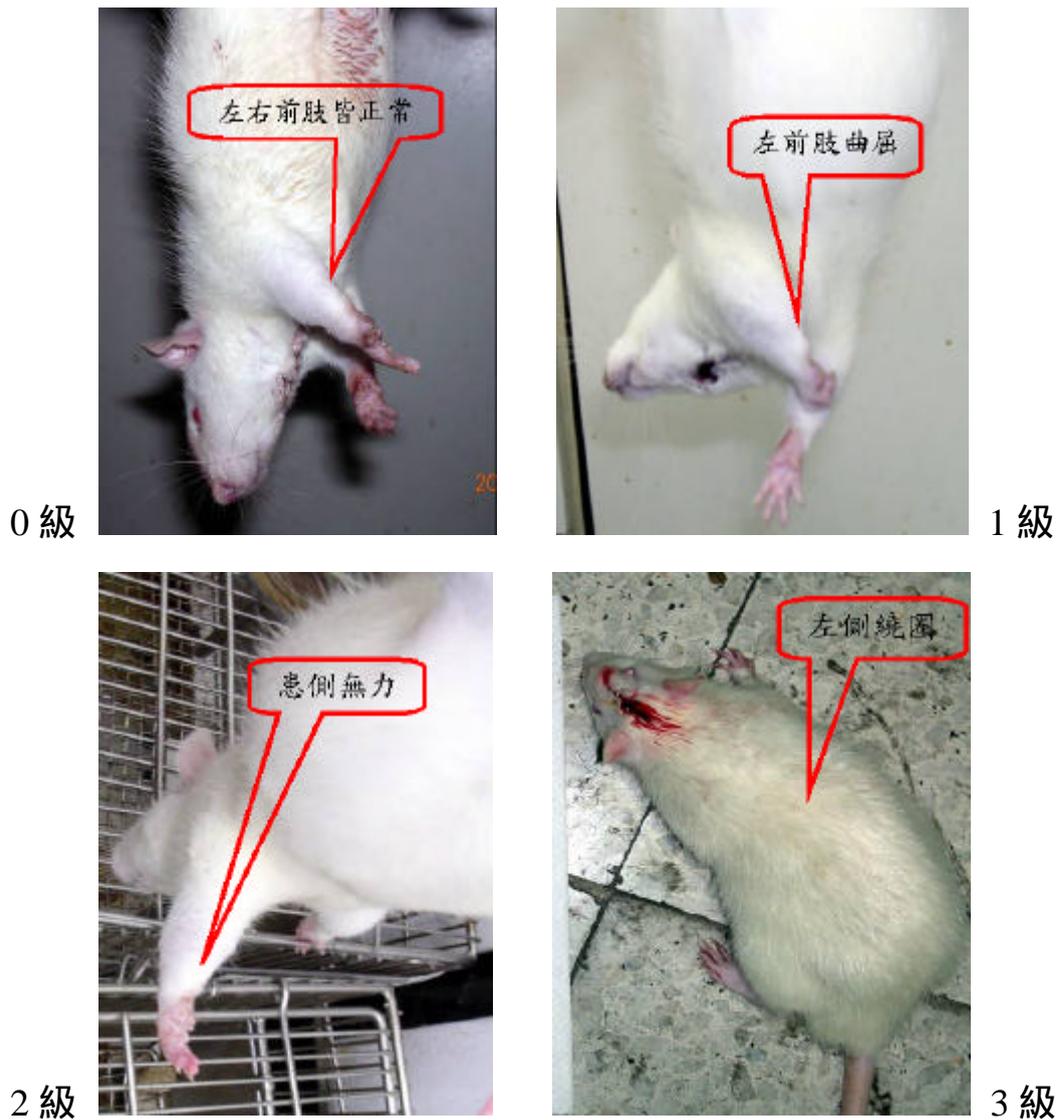


圖 3.3、神經狀態的等級劃分。0 級：用手從鼠尾將大鼠拉上，使老鼠懸空，老鼠兩側前肢伸展，則為 0 級（左上）；1 級：用手從鼠尾將大鼠拉上，使老鼠懸空，與手術施行之對側前肢彎曲，則為 1 級（右上）。2 級：輕拉鼠尾，使老鼠懸空兩前肢抓住鐵籠，若從對側肩部施壓，麻痺測的阻力降低，則為 2 級（左下）。3 級：除了第二級的現象外，大鼠自由行進時，向麻痺繞圈，則為 3 級（右下）。

。

3-7. 腦梗塞面積之測量

再灌流 24 小時，經神經學評估後，用 chloral hydrate (400mg/Kg) 腹腔注射將大鼠麻醉。以手術刀從大鼠的左蹠部皮膚切開，分離出左股靜脈，然後用空針從靜脈取血 3 cc，其中 0.5 cc 放入 EDTA 管中，進行周邊血液的測量。另外，2.5 cc 裝入離心管，離心後取其上清液以進行周邊血液生化值的測量。

最後從大鼠的胸廓剪開，暴露出心臟，將右心房用手術刀劃一小洞，並於左心室以生理食鹽水 (0.9 % NaCl, 南光化學製藥股份有限公司, 台灣) 快速灌流 3-5 分鐘後，將鼠腦取出置於腦切片盒中 (brain matrix slicer) 冠切 (coronal sections) 為厚度 2 mm 的切片，從前額葉算起取前六片 (圖 3.4)，將之置於含有 2 % 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC, MERCK, Germany) 染色劑的 12-well 培養盤中 (CELLSTAR, greiner bio-one)，並將培養盤放入 37 °C 恆溫箱中。20 分鐘後，將培養盤取出，此時可見梗塞處呈白色、非梗塞部位則是成紫紅色，將 TTC 染色劑回收後，加入 10 % (MERCK, Germany) 固定，將鼠腦各切片取出、擦乾後以數位相機 (Nikon Coolpix 3100, Japan) 定距離照相 (圖 3.4)，然後置入電腦圖像處理系統 (Image-Pro plus, USA) 中計算梗塞面積。

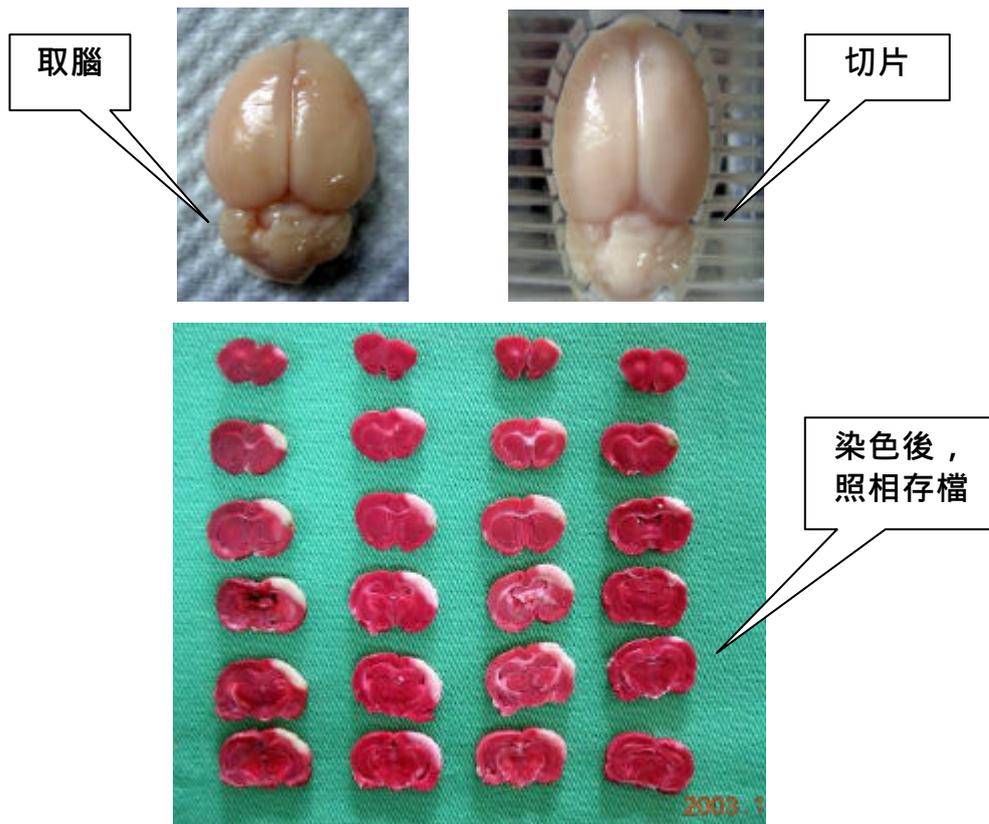


圖 3.4 腦梗塞面積的測量。首先取腦，做成切片，用 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色後梗塞區域成白色，而非梗塞區則為紫紅色。將經 TTC 染色後的腦組織照相，置入電腦圖像處理系統中計算梗塞面積。

3-8. 超氧陰離子 (superoxide anion; O_2^-) 的測定

超氧陰離子是使用微量化學發光分析儀 (Chemiluminescence analyzer system, CLD-110, SCINICS Co. Ltd., Japan) 來測定，這套儀器包括 water circulation (Model CH-201) \ photon detector (Model CLD-110) \ chemiluminescence counter (Model CLC-10) 以及一台 32-bit IBM 個人電腦等四部分。測定方法是根據較早期的研究報告^(27,83,84)，簡言之，將 0.2 cc 之全血與 0.1 cc 緩衝液 (PBS, PH7.4) 混合後，放入偵測槽中、置入 photon detector

(Model CLD-110) 的密閉腔室中，啟動 chemiluminescence counter (Model CLC-10) 開始計數 chemiluminescence (CL) counts。200 秒後將 1.0 cc 濃度為 0.01 mM 的 Lucigenin 溶液注射入儀器-photon detector 的不鏽鋼偵測槽中，CL counts 持續測量至 600 秒後，再將 0.2 cc 的 Zymosan-A 注射入不鏽鋼偵測槽中，爾後持續計數至 1020 秒為止。CL 值除去血液中 WBC 數目，最後以 CL counts/ 1000 WBC 的發光值表示 測量步驟如圖 3.5 所示如下：

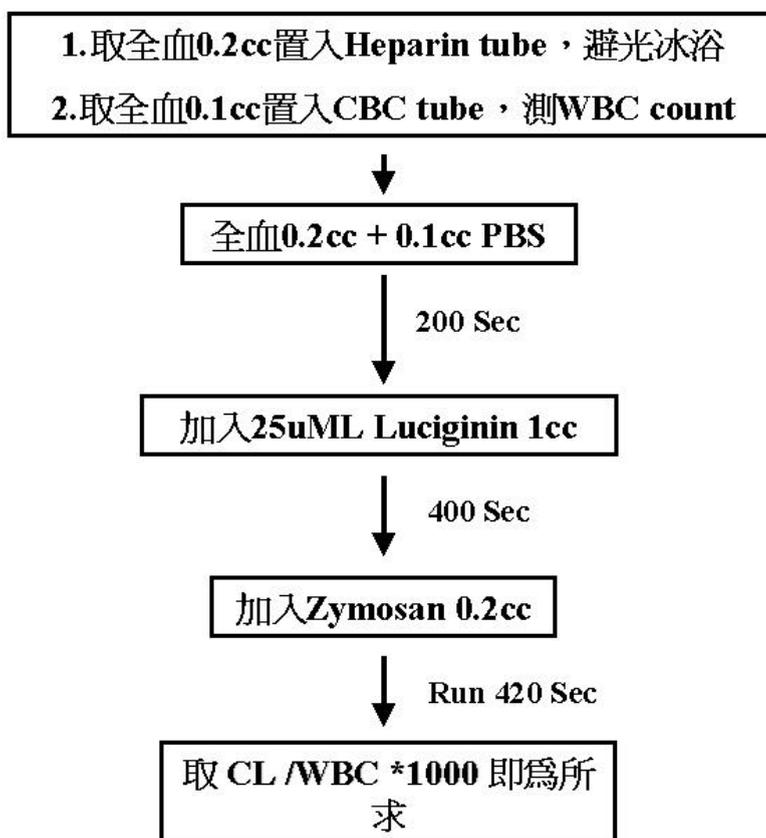


圖 3.5 使用微量化學發光儀測量超氧陰離子的步驟圖。

3-9. 免疫組織化學染色

3-9-1 腦組織切片的製作：

再灌流 24 小時後，用 Chloral hydrate (400 mg/Kg) 腹腔注射，將大鼠麻醉後，用生理食鹽水進行心臟灌流後，再以 4 % paraformaldehyde (MERCK, Germany) 200 cc 經心臟灌流，將腦組織固定約 10 分鐘，待大鼠兩前肢僵硬時取腦。將取出之鼠腦置入裝滿 4 % paraformaldehyde 之大試管內，靜置於 4 °C 冰箱中 3 天。將 4 % paraformaldehyde 倒除，換成 30 % Sucrose (GERBU, Biotechnik GmbH D-69251, Gaiberg) 溶液，放置於 4 °C 的冰箱 3 天待鼠腦沈入試管底部後取出，放入鼠腦塑膠模型中做成冠狀切片，選擇從前額葉算起的第 3 至 5 切片之腦組織，用組織包埋劑 (Tissue Freezing Medium, TRIANGLE BIOMEDICAL SCIENTIFIC Ltd., UK) 將這些腦組織包埋後，放入 -20 °C 冰凍切片機中切成厚度 20 μ m 冠狀切片。將這些切片平鋪於 gelatin coated 之玻片上，選取距額葉後 0.92 mm、大腦正中線旁開 8.08 mm 處腦組織，進行 IL1- β 、TNF- α 之免疫組織染色。

3-9-2 IL1- β 和 TNF- α 免疫染色

將腦切片置入玻片架上，然後放置於含有 PBS (Phosphate Buffer Saline) 緩衝液中 (D 的染缸內使其濕潤、再置入另一裝有 3 % H₂O₂/methanol 之染缸中 15 分鐘，以去除內生性之 peroxidase 、再以 PBS 清洗。爾後將玻片取出玻片架，擦拭周圍後平置於染色盒上，以 10 % 正常動物血清 (Normal animal serum, LsABkit. Zymed, San Francisco, CA) 室溫下培養 20 分鐘後，直接加入 IL1- β 抗體 (Dilution 1:200) 或 TNF- α 抗體 (Dilution 1:200) 使之作用

約 30 分鐘。爾後將玻片放回染缸，再以 PBS 清洗 3 次，每次 3 分鐘，再將玻片平置，並加入 biotinylated 二級抗體於室溫培養 10 分鐘，重複以 PBS 清洗 3 次，再加入 LS-AB-peroxidase complex 3 級抗體培養 10 分鐘，與 DAB (Liquid DAB substrate kit, Zymed, San Francisco, CA, USA) 呈色反應 2-3 分鐘，以水清洗終止反應，最後以 hematoxylin (HARRIS hematoxylin solution, MERCK, Germany) 做背景染色、再以拭鏡紙壓乾、用 Histological Mounting Medium Permount SP15-500 (New Jersey, USA) 封片。

將染色封片置於光學顯微鏡 (Zeiss Axioskop, Germany) 下，連接數位相機 (Nikon E950, Japan) 定距拍照，以 optical imagine 電腦圖像處理，於 400 X 顯微鏡下，選擇腦梗塞區域中心，計算 1 mm^2 面積區域的 IL1- β 或 TNF- α 陽性染色細胞的數目。

3-10. 統計分析

實驗數據以平均值 \pm 標準差來表示 (Mean \pm SD)，以單因子變異數分析 (ANOVA) 的 Scheffe`s test 來比較各組間差異。本研究定義 $P < 0.05$ 為有意義的差異。

第四章 結果

4-1. 缺血-再灌流損傷大鼠腦梗塞動物模型

大鼠於兩側總頸動脈和右側中大腦動脈阻斷腦血流 90 分鐘，再灌流 24 小時後都發生腦梗塞，TTC 染色後梗塞區呈白色，而非梗塞區為紫紅色（圖 4.1）。

4-2. 紅花對缺血-再灌流損傷腦梗塞大鼠的效用

C 組沒有藥物治療（ $15.70 \pm 2.22\%$ ）和 PBS 組用 PBS 治療（ $15.72 \pm 2.16\%$ ）兩者都比 S 組沒有阻斷腦血流（ $0.61 \pm 0.65\%$ ）有較大的腦梗塞面積比率（all $p < 0.001$ ，圖 4.1，圖 4.2）。P-0.2 組用紅花 0.2 g/kg（ $9.46 \pm 1.82\%$ ）P-0.4 組用紅花 0.4 g/kg（ $5.60 \pm 2.57\%$ ）P-0.6 組用紅花 0.6 g/kg（ $6.52 \pm 1.93\%$ ）和 MK 組用 MK801 1.0 mg/kg（ $5.59 \pm 2.62\%$ ）於腦血流阻斷前 10 分鐘治療，以及 O-0.4 組用紅花 0.4 g/kg（ $8.33 \pm 1.56\%$ ）於腦血流阻斷後 30 分鐘治療都比 C 組或 PBS 組有更小腦梗塞面積的比率（all $p < 0.05$ ，圖 4.1，圖 4.2）。R-0.4 組用紅花 0.4 g/kg（ $12.24 \pm 3.29\%$ ）於再灌流 30 分鐘治療的腦梗塞面積比率和 C 組或 PBS 組相似（all $p > 0.05$ ，圖 4.1，圖 4.2）。

4-3. 紅花對缺血-再灌流損傷腦梗塞大鼠神經學缺損的效用

阻斷兩側總頸動脈和右中大腦動脈腦血流 90 分鐘，再灌流 24 小時後所有 SD 大鼠都發生神經缺損 C 組沒有藥物治療（ $2.67 \pm 0.52\%$ ）和 PBS 組用 PBS 治療（ $2.50 \pm 0.55\%$ ）兩者都比 S 組沒有阻斷腦血流（ $0.33 \pm 0.52\%$ ）有較大的神經缺損等級（all $p < 0.001$ ，圖 4.3）。P-0.4 組用紅花 0.4 g/kg（ $1.17 \pm 0.41\%$ ）P-0.6 組用紅花

0.6 g/kg (1.33 ± 0.52 %) 和 MK 組用 MK801 1.0 mg/kg (1.00 ± 0.00 %) 於腦血流阻斷前 10 分鐘治療都比 C 組或 PBS 有更小的神經缺損等級 ($p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.001$, respectively , 圖 4.3)。P-0.2 組用紅花 0.2 g/kg 於腦血流阻斷前 10 分鐘治療 (1.67 ± 0.52 %) , O-0.4 組用紅花 0.4 g/kg 於腦血流阻斷後 30 分鐘治療 (2.00 ± 0.63 %) , 以及 R-0.4 組用紅花於再灌流 30 分鐘治療 (1.83 ± 0.75 %) 的神經缺損都和 C 組或 PBS 組相似 (all $p > 0.05$, 圖 4.3)。

4-4. 紅花對缺血—再灌流損傷腦梗塞大鼠的生理、生化效用

C 組、PBS 組、S 組、P-0.2 組、P-0.4 組、P-0.6 組、O-0.4 組和 R-0.4 組間 , 於兩側總頸動脈和右中大腦動脈血流阻斷時 , 以及阻斷後 15、30、45、60、75 分鐘和再灌流時的直腸溫度都相似 (all $p > 0.05$, 表 4.1)。

C 組、PBS 組、S 組、P-0.2 組、P-0.4 組、P-0.6 組、O-0.4 組和 R-0.4 組間 , 於兩側總頸動脈和右中大腦動脈血流阻斷時 , 以及阻斷後 15、30、45、60、75 分鐘和再灌流時的平均動脈壓和心跳速率都相似 (all $p > 0.05$, 表 4.2 , 表 4.3)。

C 組、PBS 組、S 組、P-0.2 組、P-0.4 組、P-0.6 組、O-0.4 組和 R-0.4 組間 , 於兩側總頸動脈和右中大腦動脈血流阻斷前 , 以及再灌流 24 小時後的體重變化都相似 (all $p > 0.05$, 圖 4.4)。

C 組、PBS 組、S 組、P-0.2 組、P-0.4 組、P-0.6 組、O-0.4 組和 R-0.4 組間 , 於兩側總頸動脈和右中大腦動脈血流阻斷 90 分鐘 , 再灌流 24 小時後的周邊血球計數包括 WBC、RBC、HGB、HCT、MCV、MCHC、PLT、LYM (%)、LYM counts 都相似 (all $p > 0.05$,

圖 4.4)。

C 組、PBS 組、S 組、P-0.2 組、P-0.4 組、P-0.6 組、O-0.4 組和 R-0.4 組間，於兩側總頸動脈和右中大腦動脈血流阻斷 90 分鐘，再灌流 24 小時後的 GOT、GPT、BUN、Creatinine 以及血糖 (blood sugar) 濃度等都相似 (all $p > 0.05$, 圖 4.5)。

4-5. 紅花對缺血-再灌流損傷腦梗塞大鼠超氧陰離子之效用

兩側總頸動脈和右中大腦動脈腦血流阻斷前 (Before) , C 組的 lucigenin-CL counts 是 19767.03 ± 3807.78 , P-0.4 組是 19427.45 ± 2366.50 、MK 組是 15954.70 ± 3270.56 , , 三組間沒有顯著有意義的差異 (all $p > 0.05$, 圖 4.5)。

腦血流阻斷後 90 分鐘 (O-90) 後 , C 組的 lucigenin-CL counts 是 24650.03 ± 3163.19 , P-0.4 組是 20535.83 ± 4530.85 , MK 組是 23164.90 ± 3449.99 , 三組間沒有顯著有意義的差異 (all $p > 0.05$, 圖 4.5)。

再灌流後 2 小時 (R-2) 後 , C 組的 lucigenin-CL counts 是 29343.92 ± 6262.63 比 P-0.4 組的 14780.74 ± 3081.87 , 或 MK 組 16323.64 ± 4525.50 高 ($p < 0.001$, $p < 0.05$, respectively , 圖 4.5) 。 P-0.4 組和 MK 組 , 兩組間的 lucigenin-CL counts 相似沒有顯著的意義差 ($p > 0.05$, 圖 4.5) 。

另外 , O-90 時 MK 組的 lucigenin-CL counts 較 Before 時高 ($p < 0.05$, 圖 4.5) , R-2 時 , C 組的 lucigenin-CL counts 較 Before 時高 ($p < 0.05$, 圖 4.5) , R-2 時 , P-0.4 組或 MK 組的 lucigenin-CL counts 比 O-90 時低 ($p < 0.001$, $p < 0.05$, respectively 圖 4.5) 。

4-6. 紅花對缺血-再灌流損傷腦梗塞大鼠腦梗塞區域 TNF-a 染色陽性細胞之效用

阻斷兩側總頸動脈和右中腦動脈腦血流 90 分鐘，再灌流 24 小時後，第三和第四腦切片梗塞區域 1 mm^2 的 TNF-a 染色陽性細胞，控制組 (C) 沒有藥物治療是 337.5 ± 47.1 比 P-0.4 組用紅花 0.4 g/kg 前治療是 107.7 ± 17.8 或 MK 組用 MK801 1.0 mg/kg 前治療是 92.7 ± 18.8 高 (all $p < 0.001$ ，圖 4.6，圖 4.9)。

4-7. 紅花對缺血-再灌流損傷腦梗塞大鼠梗塞區域 IL-1 β 染色陽性細胞之效用

阻斷兩側總頸動脈和右中腦動脈腦血流 90 分鐘，再灌流 24 小時後，第三和第四腦切片梗塞區域 1 mm^2 的 IL-1 β 免疫染色陽性細胞，控制組 (C) 沒有藥物治療是 378 ± 53.7 比 P-0.4 組用紅花 0.4 g/kg 前治療 96 ± 21.5 或 MK 組用 MK801 1.0 mg/kg 前治療 82.7 ± 13.3 高 (all $p < 0.001$ ，圖 4.7，圖 4.9)。

