

# 目錄

致謝	1
中文摘要	2
英文摘要	4
表目錄	6
圖目錄	6
符號與縮寫	7
前言	8
材料與方法	19
結果	26
討論	31
參考資料	36
作者簡歷	51
碩士論文電子檔案上網授權書	52



## 誌 謝

『浮生恰似冰底水，日夜東流人不知』轉眼間兩年研究所的生活已成往事，回想當初的自己是個懵懵懂懂的新生，抱著初生之犢，不畏虎的心情向研究所的生活挑戰。研究所的生活，讓我知道如何對專業知識的專研及應用，然而在這裡的一切一切隨著論文的完成，象徵兩年研究所的生涯將劃下完美的句點！回首來時路，是由許多的歡笑與淚水堆砌而成！兩年中學習與體會到的事情雖談不上經歷大風大浪，但也是數不清的，難以用言語形容。而這一切的收穫，都要歸功於教導我兩年的指導教授陳卓昇老師，不厭其煩的指正各項基本實驗技巧，不辭辛勞對我的栽培與指導，老師的恩情我會僅記在心。也感謝就職於弘光科技大學的楊齊生老師，是他引導我進入研究的領域，因此造就今日的我。另外也感謝在台中榮民總醫院擔任助理研究員的洪玲蓉博士她對我的論文建議及指導。藥理科謝文聰老師，以及生理科張文正、蔡宗統、王慧如、林靜茹、閔明源、許明志、盧敏吉、黃怡萍等所有老師在此也一併深深致謝！

感謝同實驗室的學長姐雅貞學姊及邦衍學長指導我各種實驗技術。玫真學姐，協助我熟悉學校及實驗室的環境。另外也要感謝並且感到榮幸能與他們同窗兩年的同班同學靜嫻、竹苑、瓊文、玲瑜、慧淇、瓊瑤、信忠、珮蓓、湯姐、程姐、致芬及昆翰，是他們協助我度過在研究所裡遇到的瓶頸，是他們指點我原文雜誌的問題，是他們突破我課業上的疑問，是他們讓嚴肅的實驗室氣氛變活潑。對於大家對我諸多的支持協助，在此也致上我最誠摯的感謝！

在此感謝的是我的好朋友正湛，幫忙我解決許多電腦方面疑問，並且一直支持我、激勵我以及陪伴我度過無數的難關，幫我能排除萬難朝著目標前進，這些的點點滴滴會一直銘記於心。

最後要感謝的是辛勞養育我的父母，一直在我身旁支持及鼓勵，有他們的親情的鼓勵及支持，讓我能順利完成學業，最後，由衷的要說：願將這份雀躍的喜悅，與我尊敬、我感謝的人共同分享之！

## 中文摘要

血液中不正常的膽固醇累積，是造成粥狀動脈硬化的危險因子。高膽固醇血症的動物體內一氧化氮（NO）量是增加的，而且高膽固醇血症的動物感壓反射敏感度（baroreflex sensitivity, BRS）是變差的。有證據顯示 NO 會影響 BRS，因此，高膽固醇血症的 BRS 變差，也許與 NO 有關。中藥厚朴被證實能夠改善高膽固醇血症，但是否能夠改善感壓反射並不清楚的。另外，在失血的特殊生理狀態下，身體的感壓反射功能也會改變，高膽固醇血症的動物在失血時感壓反射功能的表現，與正常的動物的反應是否有差異，其機轉是否也與 NO 有關，是否也受中藥厚朴的影響等問題，目前仍然是不清楚的。因此在我們的實驗中，主要的目的是在探討高膽固醇血症的病理狀況下，失血前後的感壓反射敏感度改變，是否與 NO 有關，同時也探討中藥厚朴對這些改變是否有影響。

實驗將紐西蘭雄性大白兔分別分為三組：1.控制組(control group, 餵食正常兔飼料) 2.膽固醇組(cholesterol group, 餵食 0.5%高膽固醇飼料) 3. 厚朴組 (magnolia group, 餵食 0.5%高膽固醇飼料中加 1%厚朴粹取液), 每天各 100 克。在飼養 4 或 8 週, 分別, 記錄基礎血壓及心跳, 並且測量血中膽固醇含量, 及 BRS。BRS 係以升壓劑 phenylephrine 改變血壓, 並造成反射性心跳改變, 然後以線性迴歸方式分析。另外在第 8 週, 也進行失血處理。並分別在失血前或失血後, 給予 L-NAME (20mg/kg,iv.) 抑制體內 NO 的製造, 然後觀察

血壓、心跳及 BRS 等之改變。失血程度是以血壓降至 50-60mmHg，並且同時看到原來變快的心跳，轉變成心跳減慢等條件為依據。

在 4 週時，血壓、心跳以及 BRS 三組間並無顯著性之差異。在 8 週時，膽固醇及厚朴組動物的總膽固醇比控制組高，在統計上有顯著性的差異。而三酸甘油酯、心跳方面，三組間並無顯著性之差異。在血壓方面，膽固醇組及厚朴組也比控制組高。在 BRS 方面，則是控制組的高於膽固醇組及厚朴組，而厚朴組的又比膽固醇組還高。給予 L-NAME 抑制 NO 後，三組皆發現血壓增加，但是反射性心跳下降方面，只有膽固醇組才有統計差異。在 BRS 方面，膽固醇組及厚朴組在加 L-NAME 之後 BRS 皆提高。開始失血時，心跳會增加，到重度失血時心跳反而下降，降到一定程度後心跳值趨於穩定值。在失血後，膽固醇組的 BRS 依然低於控制組的失血後 BRS，而厚朴組在失血前雖低於控制組，失血後，與控制組並無差異。失血後加 L-NAME，各組的 BRS 皆有改善至未失血前之水準。

所以，本實驗發現高膽固醇血症的兔子，其 BRS 顯著變差，可能與 NO 有關。失血也使 BRS 降低，也與 NO 有關。厚朴組的 BRS 雖比控制組低，但是不管失血前、失血後皆比高膽固醇的高，因此對高膽固醇引起的 BRS 減弱，有改善的作用，但是可能與 NO 無關。

## Abstract

Hypercholesterolemia is an important pathogenic factor in atherogenesis. In hypercholesterolemia, nitric oxide (NO) production was enhanced. Over production of NO was found to attenuate baroreflex function. This is consistent with the findings that baroreflex sensitivity (BRS) was depressed in hypercholesterolemia. The Chinese herb, *Magnolia officinalis*, was shown to improve hypercholesterolemia. However, whether the *Magnolia officinalis* could also improve BRS is not known. In some pathophysiological states, such as in hemorrhage, BRS was also depressed and could be attributed to NO. Whether the BRS depression in hypercholesterolemia in hemorrhage is also related to NO or whether it could be ameliorated by *Magnolia officinalis* remains unknown. The present study, therefore, was undertaken to investigate the following hypotheses: 1. the BRS in hypercholesterolemia may be attenuated in severe hemorrhage, 2. the attenuation of BRS may be mediated by NO, 3. besides improvement of hypercholesterolemia, *Magnolia officinalis* could also improve BRS in normal state as well as in severe hemorrhagic state, and 4. the action of *Magnolia officinalis* on BRS in hypercholesterolemia may be mediated by NO.

Male New Zealand white rabbits were divided into 3 groups: 1. Control group (normal diet), 2. Cholesterol group (0.5% w/w cholesterol diet), or 3. Magnolia group (same as Cholesterol group but plus 1% w/w *magnolia officinalis* crude methanol extract). The animals were

continuously treated under the designated diet for 4 or 8 weeks. BRS in the control of heart rate was determined by linear regression method. Hemorrhage was induced by bleeding from the arterial catheter, until a paradoxical decrease of heart rate from peak tachycardia and a drop of mean arterial blood pressure below 70 mmHg were both observed.

The results demonstrated that arterial blood pressure (BP), heart rate (HR), and BRS were not different among groups after 4 weeks of diet treatment. However, after 8 weeks of treatment, plasma total cholesterol was significantly elevated in the Cholesterol and Magnolia groups. The BP was also increased in the Cholesterol and Magnolia groups. The BRS of the Cholesterol and Magnolia groups was both significantly depressed. However, the BRS of the Magnolia group was significantly greater than that of the Cholesterol group. After L-NAME (*N*-nitro-L-arginine methyl ester, 20mg/kg, iv.), the BRS of the Cholesterol group was significantly improved. In response to hemorrhage, BRS was depressed in all 3 groups. But BRS was improved by L-NAME treatment in all 3 groups. In hemorrhage, the BRS of the Magnolia group was greater than that of the Cholesterol.

The data suggested that BRS was depressed in hypercholesterolemia, and it can be related to NO. Hemorrhage also caused decrease in BRS in hypercholesterolemia, and it may also be attributed to the NO. Magnolia apparently improved the BRS of the hypercholesterolemia group, but it is likely that it is not related to NO.

## 表目錄、圖目錄

表一、第 8 週血液中總膽固醇、三酸甘油酯含量-----	41
表二、第 4 週、第 8 週兔子的基礎血壓、心跳及感壓反射敏感度--	42
表三、NO 抑制對血壓及心跳的影響-----	43
表四、失血前後的血壓、心跳-----	44
圖一、不同飼料對感壓反射敏感度的影-----	45
圖二、NO 抑制後血壓及心跳反應的實驗紀錄圖-----	46
圖三、抑制 NO 對感壓反射敏感度的影響-----	47
圖四、失血前後血壓及心跳的實驗紀錄圖-----	48
圖五、失血的情況下，NO 抑制對感壓反射敏感度的影響-----	49

## 符號與縮寫

Magnolia	<i>Magnolia officinalis</i>
BP	blood pressure
ABP	arterial blood pressure
MBP	mean arterial pressure
HR	heart rate
BRS	baroreflex sensitivity
PE	phenylephrine
L-NAME	N <sup>ω</sup> -nitro-L-arginine methyl ester
CHO	cholesterol
TG	triglycerides
EOP	endogenous opioid peptide



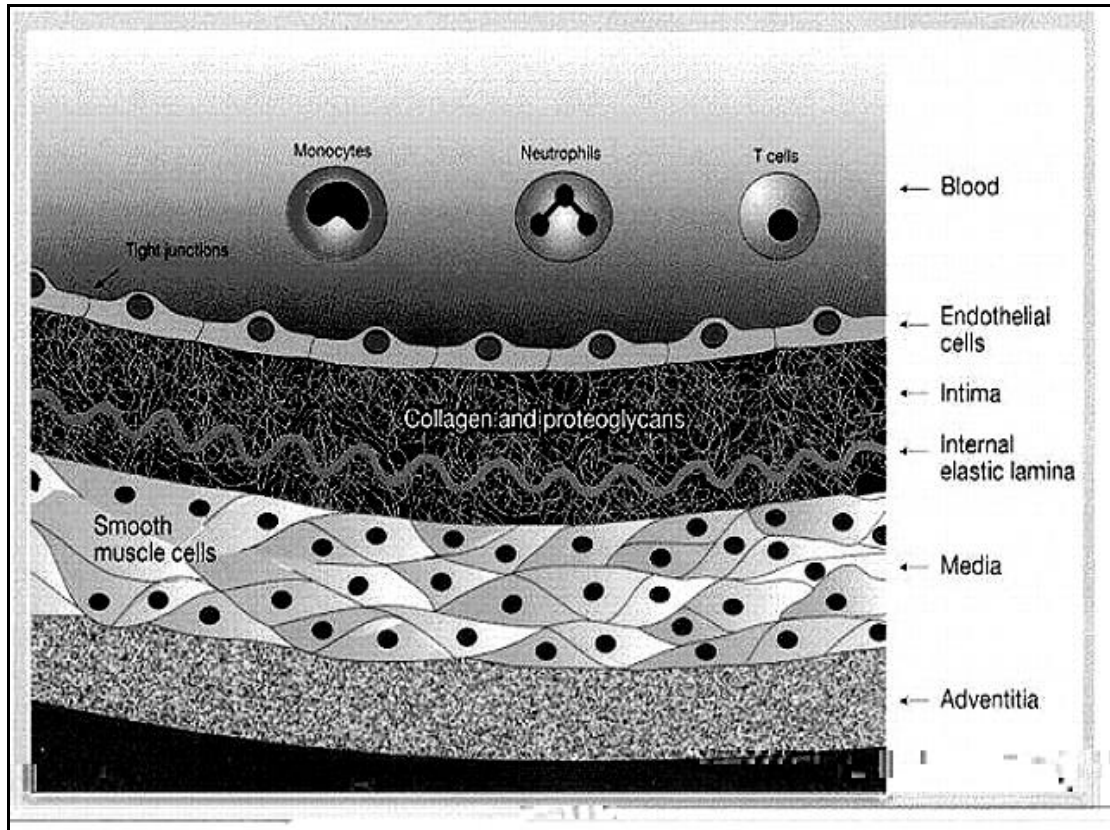
# 前言

因隨著國民生活水準的提高，國人飲食及勞動習慣也隨之改變，罹患心血管疾病如高血壓、粥狀動脈硬化的情形也逐漸增加。依行政院衛生署於九十一年公佈十大死亡原因中，腦血管疾病與心臟疾病分別居第二位及第三位，而粥狀動脈硬化 (atherosclerosis) 是引起腦血管疾病及冠狀動脈疾病的重要致病原因之一 (Braum et al., 2002)，其中高膽固醇血症 (Hypercholesterolemia) 是個重要的危險因子 (Ross, 1999)。這些慢性病的形成，與血中膽固醇及低密度脂蛋白 (LDL) 的代謝失衡有關。參與脂蛋白代謝的各個成分只要發生異常，就會導致血漿中脂蛋白的含量異常，造成病變。而高膽固醇血症是血管病變的高危險因子，嚴重時會造成粥狀動脈硬化。

## 壹、 粥狀動脈硬化(atherosclerosis)之形成

粥狀動脈硬化是一種漸進性之疾病 (Lusis et al., 2000)，其形成的主要原因一般認為是血中的膽固醇（尤其是低密度脂蛋白）含量過高，浸潤到大動脈的血管壁，引發細胞及分子間一連串複雜的慢性發炎反應，形成泡沫細胞 (foam cell) 的過度堆積、進而造成血管平滑肌增生及遷移、血管發炎組織之纖維化鈣化等所導致而成 (Schwartz et al., 1993)。

正常的血管結構可分為血管內皮細胞層(endothelial cells)、血管壁內層 (intima)、血管壁中層 (media)、血管壁外層 (adventitia)等四層，如下圖所示 (Lusis AJ, *Nature* 2000; 407: 233)：



在高血脂環境下，低密度脂蛋白極易穿過動脈內皮細胞層而受到活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的作用，變成氧化態低密度脂蛋白 (oxidized LDL, ox-LDL) (Garg et al., 1989)。氧化態的 LDL 會激發血管內皮細胞表現一些細胞激素 (cytokines) 或旁激素 (paracrine)，例如：血管細胞黏著分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、細胞間黏著分子 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) (Collin et al., 2000)，或單核白血球趨化性蛋白

(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) (Shih et al., 1998)。而其中 MCP-1 可誘使單核白血球 (monocyte) 穿越血管內皮細胞，並進入血管壁。單核白血球是白血球的一類，且是吞噬性巨噬細胞 (macrophage) 的先驅細胞，它進入血管壁後會受到巨噬細胞單核白血球群落激發因子 (macrophage monocyte-colony-stimulating factor, M-CSF) 之影響，轉形成巨噬細胞 (Smith et al., 1995)。

氧化態的 LDL 中之 apoB100 不再與 LDL 接受器鍵結，反之，氧化態的 LDL 經由分布在巨噬細胞上的清除者接受器之攝取進入巨噬細胞 (Podrez et al., 2000)。然而由於巨噬細胞上清除者接受器不受調控，因此會造成脂質過度負載形成泡沫細胞 (foam cell) (Schwartz et al., 1993)。久而久之，越多的泡沫細胞會聚集在動脈管壁，造成脂肪紋脈 (fatty streak) 的形成。經一連串複雜的反應產生了脂肪紋脈後，在血管腔形成纖維蓋 (fibrous cap)，而此纖維蓋之下，含有白血球、脂質、巨噬細胞及一些物質包埋在裡面，漸漸的形成一壞死的核心 (necrotic core)，整個稱為纖維性斑塊 (fibrous plaques) (Ross, 1999)。

然而，在纖維性斑塊的邊緣，有些巨噬細胞會釋放出一些含金屬蛋白質分解酵素 (metalloproteinases)，而另外 T 細胞也會產生干擾素- $\gamma$  (interferon -  $\gamma$ )，抑制平滑肌細胞合成膠原蛋白 (collagen)，

因此巨噬細胞及 T 細胞可破壞纖維性斑塊的結構，使斑塊內部的膠原蛋白及脂質暴露至血液中，之後，可能進而引起血小板的吸附及血栓的形成，甚至形成所謂的粥狀動脈硬化 (Libby, 1999)。另外，這個時期 T 細胞及巨噬細胞也會分泌可調節細胞生長的物質如：細胞激素 (cytokine)、血小板相關的生長因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、介白質-1 (interleukin-1, IL-1)、腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor, TNF)。這些因子也可以激發平滑肌細胞的增生，並游移至靠近動脈血管壁內層部位 (Lusis et al., 2000)，這更能進一步造成動脈肥厚 (hypertrophy)，增加血管阻力及血管異常。因此，血管粥狀動脈硬化後會使得血管變窄阻塞，容易引起心血管疾病。目前世界各國心血管疾病都占十大死因的前茅，在醫學上，學者專家也致力於改善粥狀動脈硬化之研究。

研究發現動脈粥狀硬化、高血壓、及缺氧，可能都和一氧化氮 (nitric oxide, NO) 有關。一些研究指出患有高膽固醇血症顯示出會提高 NO 的產生 (Ling et al., 2003)，但也有一些研究報導指出會抑制 NO 的產生 (Oemar et al., 1998, Jimenez et al., 2001)，且會引起動物的高血壓 (Matsumura et al., 1998)。

## 貳、 NO 的生理功能

所謂的內皮衍生舒張因子 (endothelium-derived relaxing factor ,EDRF), 也就是 NO, 在血管平滑肌的舒張作用上扮演重要角色。NO 是 L-精胺酸 ( L-arginine) 經由 NO 合成酶(NO synthase, NOS) 催化合成的。而 NOS 有三種 isoform, 分別為 eNOS (內皮 NO 合成酶, endothelial NOS)、iNOS (可誘發 NO 合成酶, inducible NOS) 及 nNOS (神經 NO 合成酶, neuronal NOS)。在血管系統方面, 血管內皮細胞的 NO 產生, 主要為 eNOS 催化反應生成的 (Moncada et al., 1993)。NO 經由活化血管平滑肌 guanylyl cyclase, 產生 cGMP (Murad et al., 1990), 而 cGMP 引起血管平滑肌細胞內鈣離子濃度降低, 最後造成血管平滑肌的舒張 (Palmer et al., 1988)。

長期的 NO 抑制會引起實驗動物的高血壓, 此乃是由於交感神經過度的活化及感壓反射的敏感度降低所致 (Souza et al., 2001, Peotta et al., 2001)。

## 參、 失血

當體內的血液流失時, 所有的血管的填充度將會下降, 便產生各種程度的生理反應或臨床症狀, 嚴重時, 更會造成休克或死亡。靜

脈填充度降低，靜脈壓降低，故靜脈回流至心臟因而減少，最後心輸出量也減少。心輸出量減少後，造成動脈填充度降低，動脈壓降低。動脈壓的減低，至器官的灌流量便減少，因此產生生理上的影響。此時，會啟動一些生理代償機轉，例如：(1)動脈感壓反射 (arterial baroreceptor reflex)，(2)化學反射 (chemoreceptor reflex，如果血壓降至 60-70 mmHg 以下)，及 (3)腦缺血反應 (cerebral ischemia responses，如果血壓降至 40-50 mmHg 以下)。這些代償機轉，通常包括交感神經的興奮、副交感神經的抑制、及一些賀爾蒙系統的活化，例如：腎上腺素 (epinephrine)、腎素-血管張力素-醛固酮系統 (rennin-angiotensin-aldosterone system)、血管增壓素 (vasopressin) 或稱抗利尿激素 (antidiuretic hormone, ADH)。這些生理反應會引起靜脈收縮，靜脈壓增高，血液回心量增加；再加上動脈的收縮，增加週邊血管阻力；心跳增快增強，心輸出增加，如此血壓可以回升。另外，腎臟會對鹽分及水分的再吸收，增加血液容積，增加靜脈壓，如此，多重管道的協助下，血壓可以回升 (Berne et al., 1998)。在輕度或中度失血時，經過生理代償機轉 (如感壓反射) 的調控，心跳常見有加速 (tachycardia) 的情形，此乃是因交感神經的興奮、副交感神經的抑制及腎上腺素作用的關係，最後使血壓維持正常 (Fujisana et al., 1999)。但是，一旦到了重度失血時，卻反而常會看到隨著血壓下降，

心跳不但不上升，反而有心跳過緩 (bradycardia) 的情形，此乃因交感神經的抑制、副交感神經的興奮所造成，顯然感壓反射受到抑制或作用減弱，然而，其改變之機轉不明 (Morita et al., 1985, Gonzalez et al., 1995)。

在失血過程中，除了上述的生理代償機轉，也會增加 NO 的產生 (Thiemermann et al., 1993)，而生理上 NO 的增加，可能是為了避免血管過度收縮及維持適當的器官灌流。然而失血時的異常的心跳抑制，則可能與 NO、交感神經異常抑制、或感壓反射敏感度減弱有關。

#### **肆、 動脈感壓反射**

動脈感壓反射是生理上對心臟血管功能重要的調控機轉，尤其是對於急性血壓 (blood pressure) 變動的調控，扮演一個重要角色。許多疾病或病理生理狀態下，都可看到感壓反射的異常。例如：高血壓 (Bribbin et al., 1969, Timmers et al., 2004)，心臟衰竭 (Grassi et al., 1995, Zucker et al., 2004)，粥狀動脈硬化 (Klaus et al., 2000, Patterson et al., 2002)，或失血 (Chen et al., 1978, Zollei et al., 2004)，……。有些情況下如心衰竭，甚至發現感壓反射敏感度越弱，病人的死亡率越高 (Grassi et al., 1995)。

當血壓改變時，血管壁便跟著受到牽張 (stretch)，因此刺激到感壓接受器 (baroreceptor)。不同程度的刺激，將引起傳入神經纖維產生不同程度的放電頻率，傳送到延腦 (medulla)，再藉由延腦，調控傳出之交感神經、副交感神經、及內分泌 (如 EPI、ADH、AII...) 的作用，產生生理上的反應，例如：對心跳、腎交感神經、血壓的反應。

感壓接受器主要位於主動脈弓 (aortic arch) 及頸動脈竇 (carotid sinus) 的血管壁上。主動脈弓的神經衝動是經由迷走神經 (vagus nerve) 傳送至延腦的孤立束神經核 (nucleus tractus solitarius, NTS)；頸動脈竇的神經衝動則是經由舌咽神經 (glossopharyngeal nerve)，傳到延腦的孤立束神經核，再經傳出的自主神經系統，控制心跳及血壓，使血壓維持在恆定的狀態 (Berne et al, 1998, Kirchheim, 1976)。

## 伍、 厚朴 (*Magnolia officinalis*)

### 一、 成分

1. 學名：川厚朴
2. 科別：木蘭科 (*Magnoliaceae*) 植物



3. 中藥分類：芳香化濕類

4. 化學成分：

(1) 生物鹼：magnocurarine, magnoflorine, helarbin 及 liriodenine

(2) 精油類：-eudesmol, cryptomeridiol ...等

(3) 酚類：厚朴酚 (magnolol), 異厚朴酚 (honokiol), 四氫厚朴酚 (tetrahydro magnolol)...等

其中，在這些化合物中，magnolol 及 honokiol 被發現具多樣的藥理活性，例如：中樞神經抑制作用、肌肉鬆弛作用、抗菌作用、及心血管系統作用 (黃，2000；賴，陳，2000)。

## 二、厚朴對心血管系統的藥理作用：

### 1. 抗氧化作用

由於低密度脂蛋白的氧化反應，是造成粥狀動脈硬化中泡沫細胞形成的主要步驟，這些不正常的情形皆被認為與脂質的過氧化有關，而氧化還原最主要的場所是在粒線體。magnolol 及 honokiol 能保護大白鼠心臟的粒線體以防止脂質過氧化 (蔡, 1997)。

### 2. 對血壓及心律的作用

Magnolol 對大白鼠胸大動脈具有放鬆作用。在另一缺血再灌流的實驗中，首先小鼠行冠狀動脈結紮手術，引發心肌缺血，三十分

鐘後將結紮處放開，產生血液再灌流，會引發心律不整，如在結紮前十五分，靜脈給予 magnolol 能減少心律不整及心肌梗塞的範圍 (Hong et al., 1996)。

### 3. 抑制血小板聚集的作用

Magnolol 及 Honokiol 能抑制膠原蛋白 (Collagen) 和花生四烯酸 (Arachidonic acid) 和血栓烷 B<sub>2</sub> ( thromboxane B<sub>2</sub> ) 所引起的兔子血小板凝集 (Chen et al., 1999)。

## 陸、實驗的目的

分別已經有證據顯示，動脈感壓反射在失血 (Chen et al., 1978) (Zollei et al., 2004) 高膽固醇血症 (Klaus et al., 2000) 及 NO (Souza et al., 2001, Lo et al., 2004) 的影響下，其功能均有改變。可是高膽固醇血症對於破壞感壓反射是以何種機轉造成的，目前並不清楚，這將是我們所研究的方向。而中藥厚朴已經證實能夠預防高膽固醇血症 (吳介信, 2000)，但是否能夠改善感壓反射將是本研究另一重點。如果是肯定，那此機轉是否與 NO 有關，這也是本論文所要探討的。另外在失血的特殊生理狀態下，高膽固醇血症的動物在失血時感壓反射功能的表現，與正常的動物的反應，是否有差異，其機轉是否也與 NO 有關，是否也受中藥厚朴的影響，在本論文中也將一併探討。因此，本論文的研究目的如下：

1. 探討在高膽固醇時，感壓反射敏感度 (baroreflex sensitivity, BRS) 減弱，是否與 NO 的有關？

2. 探討中藥厚朴是不是可以改善感壓反射？如果可以，並探討其改善機轉是不是經由 NO 的影響？
3. 探討在失血時，高膽固醇動物感壓反射敏感度 ( BRS )，與正常動物比較，是否有不同？這種不同，是不是與 NO 的產生有關？中藥厚朴是不是可以改善感壓反射？

# 材料與方法

## 壹、 實驗動物

本實驗採用純種紐西蘭白兔(New Zealand white rabbit, NZW rabbit)，體重約為 2-3 公斤。動物購自本校動物中心，飼養於本校動物中心，環境維持於：光照明暗週期為 12/12 小時 (7AM-7PM)、室內溫度約維持於  $23\pm 3$ ，每天餵食 100 g 的飼料，飲水則不予控制，共飼養 8 週。在第 0 週開始餵食含有高膽固醇飼料或高膽固醇飼料中加厚朴，利用此種方式誘導正常兔子產生高膽固醇血症(吳介信，2000)。

## 貳、 實驗藥品

以下實驗藥品除了厚朴購自欣隆公司，及在使用前以 95 % 甲醇 (Methanol) 萃取濃縮外，其餘的藥品均溶於生理食鹽水(N/S, 0.9 % NaCl)及均為 Sigma 公司製造。藥品包括：

- 1.膽固醇
- 2.厚朴 (*Magnolia officinalis*)
- 3.Sodium Pentobarbital
- 4.Heparin
- 5.Phenylephrine
- 6.L-NAME (N<sup>-</sup>-nitro-L-arginine methyl ester)

## 參、 中藥製備

### 一、 儀器：

Rotary vacuum evaporator N-11 (EYELA, Tokyo, Japan)

### 二、 試劑：

99.98 % Methanol ( TEDIA, Fairfield, Ohio, USA )

厚朴生藥 20 kg, 以 80 公升之 HPLC 級 99.98 % 甲醇( CH<sub>3</sub>OH ) 當溶媒, 於溫浸槽溫浸 60 3 天, 再至 Rotary vacuum evaporator N-11 ( 減壓濃縮機 ) 45 650-660 mmHg 至穩定無突沸後, 調高至 670-700 mmHg, 得到厚朴之總抽出物 4-5 kg。

## 肆、 飼料配製

### 一、 試劑：

95 % Ethanol ( 公賣局, Taichung, Taiwan )

### 二、 飼料：

正常實驗兔飼料購自福壽飼料公司。

#### 1. 0.5 % 膽固醇飼料配製方法

利用小火將 10 ml 不含膽固醇之玉米油加熱後, 加入 0.5g 膽固醇, 使其完全溶解於玉米油中, 再加入正常實驗兔飼料 100g, 並且充分攪拌均勻即可 ( 即為含 0.5% 高膽固醇飼料 ) ( 吳介信, 2000 )。

## 2. 加藥飼料配製方法

將 1g 已濃縮之厚朴萃取液，溶於 95 % 乙醇 (ethanol)，均勻淋在 100g 正常實驗兔飼料，之後置於 60 烘箱 4 小時烘乾，使乙醇揮發 (飼料中厚朴甲醇萃取濃縮物含量 1%)。再用小火將 10 ml 玉米油加熱，加入 0.5g 膽固醇，使其完全溶解於玉米油中，之後關火待冷卻至約 40 ，再加入已烘乾拌勻藥物之 100g 兔飼料再充分攪拌均勻即可 (即為含厚朴之 0.5% 高膽固醇飼料) (吳介信，2000)。

## 伍、 兔子血液中 Cholesterol、 Triglycerides 的測量

### 一、 儀器：

分光光度計 ( Spectrophotometer U-2000, Hitachi)

### 二、 試劑：

Cholesterol reagent (D-65558 Holzheim , Germany)

Triglycerides reagent (D-65558 Holzheim , Germany)

### 三、 步驟：

抽血前兔子先禁食，12 小時後使用 3 ml 23G 注射針筒採兔子耳動脈血 1.5 ml，放入含抗凝血劑的試管，再以 3000 rpm 離心 10 分鐘，取 10 $\mu$ l 血清，分別加入 Cholesterol reagent、 Triglycerides reagent 各 1 ml，再以分光光度計測量。分光計讀出值後，再以下列公式計算：

$$\text{Triglycerides (mg/dL)} = \text{sample/cal} \times 231 \text{ (mg/dl)}$$

$$\text{Cholesterol (mg/dL)} = \text{sample/cal} \times 233 \text{ (mg/dl)}$$

## 陸、 動物手術

### 一、 麻醉

動物以耳靜脈內注射 Sodium Pentobarbital (30 mg/kg , iv.) 方式進行麻醉，待動物麻醉後，以棉線將四肢固定於木板上，再利用剃毛刀將動物的鼠蹊部毛髮剔除，進行手術及實驗。在實驗過程中，再依需要，以原全劑量五分之一的 Pentobarbital, 維持穩定的麻醉狀態。

### 二、 股動靜脈插管

動物麻醉後，在左、右兩側的鼠蹊部分別找出並分離股動、靜脈，再以充滿肝素 (Heparin , 100 IU ; 國際單位)的 PE-90 導管插入左右股動脈血管內。一邊股動脈導管用來測量血壓並計算心跳，另一邊股動脈導管用來失血。而股靜脈則是利用 PE-50 進行血管內插管，此一導管是用來施打藥物。

## 柒、 生理參數測量

### 一、 動脈血壓 (Arterial blood pressure, ABP)、 平均動脈壓 (Mean arterial pressure , MBP)及心跳速率 (Heart rate, HR)之測量紀錄

連接股動脈的 PE 管接上 Gould 壓力轉換器 (Pressure transducer) , 再經血壓放大器 (Pressure processor amplifier, Model



NO.20-4615-52) 將訊號放大，之後輸出 ABP、MBP 及 HR 值。

## 二、感壓反射敏感度 (Baroreflex sensitivity, BRS) 評估

感壓反射是生理上對心臟血管功能重要的調控機轉，能控制血壓的恆定。當血壓升高時，經感壓反射的調節後，造成心跳速率反射性的下降；反之，當血壓下降時，心跳速率則反射性的增加。因此測量感壓反射敏感度是以不同劑量的升壓劑 Phenylephrine (0.25、0.5、0.75、1  $\mu$ g/kg, iv.) 誘導不同程度的血壓增加，同時引起不同程度的反射性心跳下降，再依據不同程度血壓的增加，相對於不同程度心跳

的下降，做成一條迴歸直線，並以迴歸直線的斜率 (bpm/mmHg)，當作感壓反射敏感度的指標。

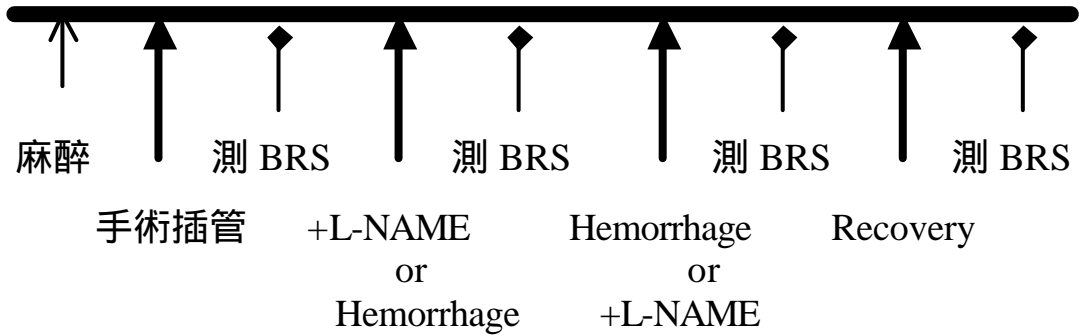
## 捌、失血性休克模式

以含有肝素 (Heparin, 100 IU/ml) 的注射筒，從股動脈插管緩慢將血液抽出，直到血壓降至並維持在 50-60 mmHg、並且同時觀察到心跳出現先升後降的情形為基準。此步驟平均在 10-15 分鐘完成，失血量平均是總血量 25-30%。

## 玖、實驗步驟

本實驗依動物餵食不同飼料的方式分為三組，分別為：1.控制組 (Control group, 餵食正常兔飼料) 2.膽固醇組 (Cholesterol group, 餵食 0.5%高膽固醇飼料) 3. 厚朴組 (Magnolia group, 餵食 0.5%高膽固醇加 1%厚朴粹取液) 飼料，每天各 100 克。飼養 8 週後，動物行一般外科手術並將導管連接至紀錄器，進行血壓及心跳的紀錄，等待血壓及心跳穩定後，記錄基礎血壓心跳，然後靜脈給予不同劑量之 Phenylephrine，評估基礎的感壓反射敏感度。之後，從耳靜脈加入 L-NAME (20 mg/Kg, iv. ), 等待 10 分，再測量給藥後的感壓反射敏感度。接著等到血壓穩定後，從動脈導管將血液抽出，直到血壓降至 50-60 mmHg、並且同時觀察到心跳出現先升後降的情形，此為本論文實驗之失血標準。等失血達到標準並且血壓心跳穩定時，再測量在抑制 NO 狀況下失血的感壓反射敏感度。最後，將血液由動脈打回體內，再測一次感壓反射敏感度。另一實驗步驟，測完基礎的感壓反射敏感度後，等到血壓穩定後，即從動脈導管將血液抽出，直到血壓降至 50-60 mmHg、及看到心跳出現先升後降的情形，再測量在 NO 未被抑制下的失血狀況之感壓反射敏感度。最後，從耳靜脈加入 L-NAME，等待 10 分，再測量在抑制 NO 狀況下失血的感壓反射敏感度。

實驗步驟，如下圖：



## 拾、統計分析

實驗結果之各項生理參數及感壓反射敏感度，以平均值 ± 標準誤 (mean ± SE) 來表示。統計分析採用 two-way 檢定各種處理間之差異，偵測出有統計差異，再以 Student -Newman-Keul test 做組間的比較。部分統計，基於需要，以 paired t-test 來比較給藥前後的變化。而  $P$  值小於 0.05 ( $P < 0.05$ )，視為有統計上的顯著差異。

# 結果

## 壹、高膽固醇血症對兔子感壓反射敏感度的影響

### 一、實驗動物之基礎生理參數

本實驗中，表一為各組動物第 8 週的總膽固醇、三酸甘油酯。控制組及膽固醇組的總膽固醇分別是  $70\pm 5$ ， $781\pm 60$  (mg/dL)，膽固醇和控制組相比較在統計上有顯著性的差異。而控制組及膽固醇組的三酸甘油酯並無顯著性之差異。

表二為各組動物的基礎血壓、心跳及感壓反射敏感度。在實驗第四週，各組動物的血壓、心跳以及感壓反射的敏感度並無顯著的差異；在第八週，血壓方面，控制組及膽固醇組的值分別為  $96\pm 2$ ， $109\pm 2$  (mmHg)，膽固醇組比控制組高。在心跳方面，二組間並無顯著性的差異。

圖一所示，在感壓反射敏感度方面，控制組、膽固醇組的數值分別為  $-2.26\pm 0.21$ ， $-1.28\pm 0.05$  (bpm/mmHg)，控制組的感壓反射高於膽固醇組。

### 二、周邊 NO 抑制對血壓、心跳及感壓反射的影響

圖二為同一隻動物在給 NO 的抑制劑後血壓及心跳的實驗記錄圖。血壓有上升，心跳有下降情形。表三為加 L-NAME 前後血壓

及心跳的比較。在血壓方面，未加 L-NAME 前控制組、膽固醇組的值分別為  $88\pm 4$ ， $98\pm 3$  (mmHg)，膽固醇組的血壓明顯高於控制組。加 L-NAME 後，控制組、膽固醇組的值分別為  $99\pm 5$ ， $114\pm 4$  (mmHg)，膽固醇組的血壓依然明顯高於控制組。在比較加 L-NAME 前後的反應方面，加 L-NAME 之後二組血壓，皆比加 L-NAME 前還高。在心跳方面，未加 L-NAME 前控制組 膽固醇組的值分別為  $247\pm 9$ ， $252\pm 9$  (bpm)，二組間並無顯著的差異。加 L-NAME 後控制組、膽固醇組的值分別為  $222\pm 15$ ， $201\pm 12$  (bpm)，二組間依然無顯著的差異。在比較加 L-NAME 前後的反應方面，膽固醇組加 L-NAME 之後心跳比加 L-NAME 前還高。

圖三為感壓反射敏感度的評估。膽固醇組在加 L-NAME 之後的值  $-1.77\pm 0.10$  高於加 L-NAME 前的值  $-1.28\pm 0.05$  (bpm/mmHg)。

## 貳、 失血對高膽固醇兔子感壓反射敏感度的影響

### 一、 失血前後基礎生理參數

圖四所示，一隻動物在失血前、失血中、失血後血壓及心跳的實驗記錄圖。

表四為當開始失血時，血壓開始下降，降至平均 60 mmHg，即停止失血。當開始失血時，心跳會增加，到重度失血時心跳反而下

降，降到一定程度後心跳值趨於穩定值。

## 二、失血時抑制 NO 對血壓、心跳及感壓反射的影響

圖五為失血時，抑制 NO 後，感壓反射敏感度 (BRS) 的變化。在失血時，膽固醇組的 BRS  $-0.87 \pm 0.05$  低於控制組的  $-1.37 \pm 0.13$  (bpm/mmHg)。在失血後，加 L-NAME (抑制 NO) 的情況下，膽固醇組的 BRS  $-1.33 \pm 0.19$  依然低於控制組的  $-2.04 \pm 0.2$  (bpm/mmHg)。

## 參、厚朴對高膽固醇血症兔子感壓反射的影響

### 一、失血前實驗動物之基礎生理參數

本實驗中，表一為各組動物第 8 週的總膽固醇、三酸甘油酯。膽固醇組及厚朴組的總膽固醇分別是  $781 \pm 60$ ， $514 \pm 139$  (mg/dL)，兩組之比較在統計上無顯著性的差異。而三酸甘油酯在兩組的值分別為  $164 \pm 3$ ， $191 \pm 27$ ，統計上並無顯著性之差異。

表二為各組動物的基礎血壓、心跳及感壓反射敏感度。在四週的實驗中，各組動物的血壓、心跳以及感壓反射的敏感度並無顯著的差異；在八週的實驗當中，血壓方面膽固醇組及厚朴組的值分別為  $109 \pm 2$ ， $109 \pm 2$  (mmHg)，統計上無顯著性差異。心跳方面，兩組間並無顯著性的差異。

圖一所示，在感壓反射敏感度方面，膽固醇組、厚朴組的數值分別為 $-1.28\pm 0.05$ ， $-1.65\pm 0.11$  (bpm/mmHg)，厚朴組的感壓反射比膽固醇組還高。

圖二為同一隻動物在給 NO 的抑制劑後血壓及心跳的實驗記錄圖。血壓有上升，心跳有下降情形。

表三為加 L-NAME 前後血壓及心跳的比較。在血壓方面，未加 L-NAME 前膽固醇組、厚朴組的值分別為  $98\pm 3$ ， $108\pm 4$  (mmHg)，膽固醇組及厚朴組的血壓無明顯差異。加 L-NAME 後，膽固醇組、厚朴組的值分別為  $114\pm 4$ ， $121\pm 5$  (mmHg)，膽固醇組及厚朴組的血壓依然無明顯差異。在比較加 L-NAME 前後的反應方面，加 L-NAME 之後兩組血壓，皆比加 L-NAME 前還高。在心跳方面，未加 L-NAME 前膽固醇組、厚朴組的值分別為  $252\pm 9$ ， $277\pm 32$  (bpm)，兩組間並無顯著的差異。加 L-NAME 後膽固醇組、厚朴組的值分別為  $201\pm 12$ ， $197\pm 30$  (bpm)，兩組間依然無顯著的差異。在比較加 L-NAME 前後的反應方面，只有膽固醇組加 L-NAME 之後心跳皆比加 L-NAME 前還高。

圖三為在感壓反射敏感度的評估。只有膽固醇組在加 L-NAME 之後的值 $-1.77\pm 0.10$  高於加 L-NAME 前的值 $-1.28\pm 0.05$  (bpm/mmHg)。

## 二、失血後實驗動物之基礎生理參數

表四為同一隻動物在失血前、失血中、失血後血壓及心跳的實驗紀錄圖。當開始失血時，血壓開始下降，降至平均 60 mmHg，即停止失血。當開始失血時，心跳會增加，到重度失血時心跳反而下降，降到一定程度後心跳值趨於穩定值。

圖五為失血時，抑制 NO 後，感壓反射敏感度 (BRS) 的變化。在失血時，只有膽固醇組的 BRS  $-0.87 \pm 0.05$  低於厚朴組的 BRS  $-1.12 \pm 0.10$  (bpm/mmHg)。在失血後，加 L-NAME (抑制 NO) 的情況下，膽固醇組的 BRS  $-1.33 \pm 0.19$  和厚朴組的 BRS  $-1.56 \pm 0.16$  (bpm/mmHg)，相比無顯著差異。



## 討論

本實驗發現高膽固醇血症的兔子，其感壓反射敏感度顯著變差，變差的原因可能與 NO 有關。

由實驗結果顯示，飼養不同飼料四週後，各組間其血壓、心跳及感壓反射敏感度並無顯著性差異。在第四週的各項結果中無差異性，我們推測可能的原因是膽固醇在體內的累積量不多，或作用時間不夠長，故不足以影響基本的生理調控機轉。

在飼養八週後，具有高膽固醇血症的兔子，其總膽固醇、血壓有增高情形，感壓反射敏感度則變差。在 Wilfert et al. (2000)及 Li et al. (1996)的實驗中分別顯示飼養膽固醇的兔子並無血壓增高的情形，這是與本實驗有所不同的，這可能的原因是，各個實驗中所使用的油品、膽固醇的比例不同及飼養時間長短不一，故有不同的結果。

不同的神經體液因素 (neurohumoral factors) 可影響感壓反射敏感度，例如，有文獻報導具有粥狀動脈硬化的兔子，在血管的血管壁中層 (media) 有 AII type 1 receptor 大量表現 (Yang et al., 1998) 及 angiotensin-converting enzyme 活性增加 (Song et al., 1998)，因此增加總周邊阻力 (total peripheral resistance)，導致感壓反射敏感度降低 (Wilfert et al., 2000)。也有研究指出長期的 NO 抑制也會引起動物的感壓反射的敏感度降低 (Souza et al., 2001)。

在產生粥狀動脈硬化的過程中，oxygen-derived free radicals 的累積會抑制感壓反射敏感度 (Li et al., 1996)。另外，有研究指出因大動脈的管腔內血液裡的含有過高低密度脂蛋白，會浸潤到大動脈的血管壁，引發細胞及分子間一連串複雜的慢性發炎反應，形成泡沫細胞的過度堆積，因此增加了血管的硬度 (vascular stiffness)，故使得血管的結構產生改變，當血管結構改變硬化時，因為需要一個更大的血壓變化，才能使動脈管壁擴張以及活化 stretch-sensitive baroreceptors，也因此改變了感壓反射的敏感度 (Gianaros et al., 2002)。

在餵養厚朴飼料八週後的兔子，其總膽固醇、血壓仍然有增高情形，然而和膽固醇組比較，感壓反射敏感度變好。同樣也有實驗發現，給予兔子 magnolol 後並不能改善高血壓 (Huang et al., 2000)，這個結果和本實驗的實驗結果相似。

關於感壓反射敏感度變差是否與 NO 有關，本實驗發現不論是餵食控制組、膽固醇組或是厚朴組的兔子，對於 NO 抑制劑 L-NAME 的反應一致，皆可發現血壓增高、心跳下降。不過，在感壓反射敏感度方面，卻發現高膽固醇血症的兔子給 L-NAME 後，能使感壓反射敏感度變好。

NO 在血管平滑肌的舒張作用扮演重要角色，因此 NO 的抑制，造成血管收縮與血壓上升，是可預期的。另外 NO synthase 抑制，

也會使交感神經活性增加，所以血管的收縮更為明顯。心跳的下降，應是血壓增高造成的反射性心跳變慢。雖然有研究指出長期讓老鼠口服 NOS 抑制劑 L-NAME 之後，同樣誘發高血壓與交感神經過度的活化，但是感壓反射敏感度會降低 (Souza et al., 2001)。但是也有文獻報導指出，在清醒的兔子，靜脈給予 NO 抑制劑，感壓反射敏感度增加、反射性的心跳及交感神經的活性也增加 (Liu et al., 1996)，這與我們的發現一致。總之，高膽固醇血症的兔子靜脈給 L-NAME，對感壓反射敏感度有顯著之影響，因此在高膽固醇血症的兔子，感壓反射敏感度的改變，可能與 NO 有關。

關於本論文中厚朴的實驗，有報告指出，magnolol 所產生抗心律不整作用可被 NO 的拮抗劑 L-NAME 給抑制住，所以 magnolol 的部分作用機轉和 NO 的傳導路徑有某種程度的關聯 (Hong et al., 1996)。而在我們的厚朴實驗中，餵食厚朴飼料八週後，給予 L-NAME 後，感壓反射敏感度卻無增加的情形，我們推測厚朴雖然可以經由 NO 的路徑影響心律，但是與感壓反射調控的關係，可能與 NO 無關，故不能改善感壓反射敏感度。

在失血狀況下，高膽固醇血症的兔子感壓反射敏感度是更差，此時，將 NO 抑制後，是可以改善感壓反射敏感度。我們在嚴重失血時可見到感壓反射敏感度是抑制，這跟之前文獻相同 (Chen et al.,

1978)。嚴重的失血狀態下，感壓反射敏感度變差的機轉，目前並未有定論。有學者陸陸續續對嚴重的失血狀態下，感壓反射抑制的原因，更進一步的研究。有實驗證據顯示，當雄性大白鼠體內大量失血時，大白鼠的大動脈內含 noradrenaline 及 potassium 比正常未失血鼠還少；而急性的血管擴張之下，例如 endotoxin shock 情況發生時，血漿中的 tumor necrosis factor- (TNF- $\alpha$ ) 含量是增加的。而一旦 TNF- $\alpha$  增加，會促使 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 的表現 (Thiemermann et al.,1993)。而將 iNOS 抑制，會使交感神經活性增加，noradrenaline 也大量表現，故能增加 cardiac output、blood pressure 及 venous tone (Tabrizchi,1998)。

在 1997 年 Sato 等人指出，嚴重失血時，體內的 NO 會增加，而 NO 對交感神經具有抑制作用。另外有一些文獻指出，患有高膽固醇血症，NO 的產生也會增加 (Ling et al., 2003)，但是也有文獻指出在高膽固醇血症之下，NO 的產生是會降低的(Thompson et al.,2004)。因此在嚴重失血時，高膽固醇血症兔子心跳的減緩、感壓反射受到抑制等現象，可能是因在失血時，NO 大量的增加，引起交感神經受抑制造成的。而在出血性休克 (hemorrhagic shock) 狀態下，體內也會釋放出內生性類鴉片生? (endogenous opioid peptid, EOP) (Lang et al.,1982)，而其中 EOP 也會抑制感壓反射敏感度 (Rubin et al.,1983，

Miyawaki et al.,2002)。因此，失血時，正常及高膽固醇血症兔子感壓反射敏感度的降低，除了 NO，其他的因素如 EOP，也可能扮演著重要的角色。

在厚朴組方面，在失血狀況下的感壓反射比膽固醇組好。在失血的情況下飼養厚朴的兔子的感壓反射雖然是變差，但還是有改善，這可能是因為在失血狀態下，magnolol 經由 NO 的路徑 (Hong et al, 1996)，才得改善感壓反射敏感度。

綜論以上，我們可以得知在高膽固醇血症的病理狀態下，動物 BRS 變差，原因可能與 NO 有關。若給與中藥厚朴後，雖然可以改善感壓反射敏感度，但改善的原因可能與 NO 無關。另外，在嚴重失血狀況下，高膽固醇血症的兔子 BRS 也是變差，變差的原因也是可能與體內的 NO 會增加有關，此時，將 NO 抑制後，可以改善感壓反射敏感度。同樣的在厚朴組方面，在失血狀況下感壓反射比膽固醇組好，所以厚朴改善失血時的 BRS，可能是經由 NO 的路徑。

## 參考資料

- Braum A., Trigatti BL., Post MJ., Sato K., Simons M., Edelberg JM., Rosenberg RD., Schrenzel M., Krieger M. Loss of SR-BI expression leads to the early onset of occlusive atherosclerotic coronary artery disease, spontaneous myocardial infarctions, severe cardiac dysfunction and premature death in apolipoprotein. *Circ Res.* 2002;90:270-276.
- Bribbin B., Honour AJ, Pickering GW, Sleight P, Smyth HS. Diminished baroreflex sensitivity in high blood pressure. *Circulation.* 1969;34:48-54.
- Berne RM, Levry MN, Koepf BM, Stanton BA. Physiology. 4th ed. Mosby Inc., St. Louis, Missouri, U.S.A. PP.450-453, 508-509,1998.
- Chen HI. Stinnett HO .Peterson DF. Bishop VS. Enhancement of vagal restraint on systemic blood pressure during hemorrhage.*Am J Physiol.* 1978;234:H192-H198.
- Chen CC, Chen HY, Shiao MS, Lin YL, Kuo YH, Ou JC. Inhibition of low density lipoprotein oxidation by tetrahydrofuran lignans from *Forsythia suspensa* and *Magnolia coco.**Planta Med.*, 1999 ; 65, 709-711.
- Collin RG. P-selection or intercellular adhesion molecule deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med.* 2000;191:189-194.
- Fujisana Y, Mori N, Yube K, Miyanaka H, Miyatake A, Abe Y. Role of nitric oxide in regulation of renal sympathetic nerve activity during hemorrhage in conscious rats. *Am J Physiol.* 1999;277:H8-14.
- Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilator and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.*

1989; 83:1774-1777.

Gianaros PJ, Jennings Richard, Benedikt OG, Andrew S, Sutton TK, Muldoon MF, Manuck SB. Greater intima media thickness in the carotid bulb is associated with reduced baroreflex sensitivity.

*Am J Hypert.* 2002;15:486-491.

Gianfranco P, Rienzo MarcoDi, Mancia Giuseppe. How to measure baroreflex sensitivity: from the cardiovascular laboratory to daily life.

*J Hypert.* 2000;18:7-19.

Grassi G, Seravalle G, Cattaneo BM, Lanfranchi A, Vailati S, Giannattasio C. Sympathetic activation and loss of reflex sympathetic control in mild congestive heart failure. *Circulation* 1995;92:3206-3211.

Gonzalez GJ, Valeriano JJC, Rodriguez MF. Autonomic mediation of short-term cardiovascular oscillations after acute hemorrhage in conscious rats. *Journal of the Autonomic Nervous System.* 1995;55:123-130.

Hong CY, Huang SS, Tsai SK. Magnolol reduces infarct size and suppresses ventricular arrhythmia in rats subjected to coronary ligation. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1996;23:660-664.

Huang CH, Hong CY, Tsai SK, Lai ST. Effect of magnolol on coronary vascular resistance in rabbit: measurement with pulsed Doppler velocimetry. *J Formos Med Assoc.* 2000;99:554-558.

Jimenez A, Arriero MM, Almudena L-B, Fernando G-F, Garcia R, Fortes J, Millas I, Velasco S, Miguel LSD, Rico L, Farre J, Casado S, Antonio LF. Regulation of endothelial nitric oxide synthase expression in the vascular wall and in mononuclear cells from hypercholesterolemic rabbits. *Circulation.* 2001;104:1822-1830.

Kalinowski L, Malinski T. Endothelial NADH/NADPH-Dependent enzymatic Sources of Superoxide Production : Relationship to Endothelial Dysfunction. *Acta Biochimica Polonica.* 2004;51:459-469

Kirchheim HR. Systemic arterial baroreceptor reflexes. *Physiol Rev.*

1976;56:100-176.

Lang RE, Bruckner UB, Hermann K, Kempf B, Rascher W, Sturm V, Unger TDG. Effect of hemorrhagic shock on the concomitant release of endorphin and enkephalin like peptides from the pituitary and adrenal gland in the dog. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 1982; 33:363-368.

Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med.* 1999; 247:349-358.

Li Z, Hui Z, Abboud FM, Chapleau MW. Oxygen-derived free radicals contribute to baroreceptor dysfunction in atherosclerotic rabbits. *Circ Res.* 1996;79:802-811.

Lo WC, Hsiao M, Tung CS, Tseng CJ. The Cardiovascular Effects of Nitric Oxide and Carbon Monoxide in The Nucleus Tractus Solitarii of Rats. *J Hypertens.* 2004;22:1182-1190.

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407:233-241.

Matsumura K, Tsuchihashi T, Kagiya S, Abe I, Fujishima M. Role of nitric oxide in the nucleus of the solitary tract of rats. *Brain Res.* 1998;789:232-238.

Miyawaki T, Goodchild AK, Pilowsky PM. Activation of mu-opioid receptors in rat ventrolateral medulla selectively locks baroreceptor reflexes while activation of delta opioid receptors blocks somato-sympathetic reflexes. *Neuroscience.* 2002;109:133-144.

Morita H, Vatner S. Effects of hemorrhage on renal nerve activity in conscious. *Circ.Res.* 1985;57:788-793.

Moncada S, Higgs EA. The L-arginine -nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;329:2002-2012.

Murad F, Ishii K, Forstermann U, Gorsky L, Kerwin JF, Pollock J, Hiller M. EDRF is an intracellular second messenger and autacoid for



regulate cyclic GMP synthesis in many cells. *Adv Sec Messeng Phosphoprot Res.* 1990;24:441-448.

Oemar BS, Tschudi MR, Godoy Nelson, Brovkovich V, Malinski T, Luscher TF. Reduced Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression and Production in Human Atherosclerosis. *Circulation.* 1998;97:2494-2498.

Palmer RMJ, Rees DD, Ashton DS. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;153:1251-1256.

Patterson D, Dick JBC, Struthers AD. Intensive Statin Treatment Improves Baroreflex Sensitivity: Another Cardioprotective Mechanism for Statins? *Heart.* 2002;88:415-416.

Peotta VA, Vasquez EC, Meyrelles SS. Cardiovascular Neural Reflexes in L-NAME-Induced Hypertension in Mice. *Hypertension.* 2001;38:555.

Podrez EA. Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest.* 2000;105:1095-1108.

Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999 ; 340: 115-123.

Rubin PC, Mclean K, Reid JL. Endogenous opioid and baroreflex control in humans. *Hypertension.* 1983;5:535-538.

Schwartz CJ, Valente AJ, Sprage EA. A modern view of atherogenesis. *Am J Cardiol.* 1993;71:9B-14B.

Shih PT. Blocking very late antigen-4 integrin decreases leukocyte entry and fatty streak formation in mice fed an atherogenic diet. *Circ Res.* 1998;84:345-351.

Smith JD. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor and apolipoprotein E. *Proc Natl*

*Acad Sci.* 1995;92:8264-8268.

Song K, Shiota N, Takai S, Takashima H, Iwasaki H, Kim S, Miyazaki M. Induction of angiotensin converting enzyme and angiotensin II receptors in the atherosclerotic aorta of high-cholesterol fed cynomolgus monkeys. *Atherosclerosis.* 1998;138:171-182.

Souza HCD, Ballejo G, Salgado MCO, Diasdasilva VJ., Salgado HC. Cardiac sympathetic overactivity and decreased baroreflex sensitivity in L-NAME hypertensive rats. *Am J Physiol.* 2001; 280: H844-H850.

Tabrizchi R. Cardiovascular effects of noradrenaline in hypovolemic haemorrhage: role of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol.* 1998;361:227-234.

Timmers HJLM, Wieling W, Karemaker J, Lenders JW. Cardiovascular Responses to Stress after Carotid Baroreceptor Denervation in Humans. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1018:515-519.

Thiemermann C, Szab C, Mitchell JA, Vane JR. Vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agents and hemodynamic decompensation in hemorrhagic shock is mediated by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci.* 1993;90:267-271.

Thiemermann C. The role of the L-arginine:nitric oxide pathway in circulatory shock. *Adv Pharmacol.* 1994;28:45-79.

Thompson MA, Henderson KK, Woodman CR, Turk JR, Rush JW, Price E, Laughlin MH. Exercise preserves endothelium-dependent relaxation in coronary arteries of hypercholesterolemic male pigs. *J Appl Physiol.* 2004;96:1114-1126.

Tao L, Liu HR, Gao E, Teng ZP, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL, Ines BH, Willette RN, Ohlstein EH, Yue TL. Antioxidative, Antinitrative, and vasculoprotective effects of a peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonist in hypercholesterolemia. *Circulation.* 2003; 108: 2805-2810.

- Wilfert K, Drischel K, Unbehaun A, Guski H, Persson PB, Stauss HM. Vascular response to angiotensin II in atherosclerosis role of the baroreflex. *Hypertension*. 2000;35:685
- Yang BC, Phillips MI, Mohuczy D, Meng H, Shen L, Mehta P, Mehta JL. Increased angiotensin II type 1 receptor expression in hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1433-1439.
- Zollei E, Paprika D, Makra P, Gingl Z, Vezendi K, Rudas L. Human Autonomic Responses to Blood Donation. *Autonomic Neuroscience : Basic and Clinical*. 2004;110:114-120.
- Zucker IH, Schultz HD, Li YF, Wang Y, Wang W, Patel KP. The Origin of Sympathetic Outflow in Heart Failure: the Roles of Angiotensin II and Nitric oxide. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*. 2004;84:217-232.
- 蔡勝國. 厚朴的抗氧化成分對大白鼠心肌保護作用的研究. *行政院衛生中醫藥年報*. 1997;15:334-346
- 吳介信. 厚朴及澤瀉抗動脈粥狀硬化之研究. *行政院衛生中醫藥年報*. 2000;18:673-686
- 賴榮祥, 陳美睦. 厚朴的種種問題及其相關生藥製劑之應用. *生藥資訊*. 2000;8:1-18.
- 黃瑞東. 厚朴的成分與藥理. *生藥資訊*. 2000;8:19-21.

**Table 1.****Plasma levels of cholesterol (CHO) and triglycerides (TG) of rabbits fed with various diets at the 8th week.**

Group	Control (7)	Cholesterol (3)	Magnolia (9)
CHO (mg/dL)	70±5	781±60*	514±139*
TG (mg/dL)	138±5	164±3	191±27

All values are expressed as means  $\pm$  SE (standard error of means). The sample sizes are indicated in parentheses. The Control group were fed with normal rabbit chow. The Cholesterol group were fed with normal rabbit chow plus 10 % (w/w) corn oil and 0.5 % (w/w) cholesterol. The Magnolia group were fed with the same diet as the Cholesterol group, but plus 1% (w/w) *Magnolia officinalis* methanol extract (see text for detail).\* : P < 0.05, compared with the Control group.

**Table 2. Baseline systemic blood pressure (BP), heart rate (HR) and BRS of rabbits fed with various diets at the 4th and 8th week.**

Group	Control		Cholesterol		Magnolia	
	4 ( 14 )	8 ( 21 )	4 ( 9 )	8 ( 18 )	4 ( 8 )	8 ( 12 )
BP (mmHg)	95±1	96±2	94±2	109±2*	101±4	109±2*
HR (bpm)	248±8	255±5	233±10	257±5	246±5	274±11
BRS(bpm/mmHg)	-2.22±0.29	-2.26±0.21	-1.71±0.35	-1.28±0.05*	-1.94±0.22	-1.65±0.11*#

All values are expressed as means  $\pm$  SE (standard error of means). The sample sizes are indicated in parentheses. The Control group were fed with normal rabbit chow. The Cholesterol group were fed with normal rabbit chow plus 10 % (w/w) corn oil and 0.5 % (w/w) cholesterol. The Magnolia group were fed with the same diet as the Cholesterol group, but plus 1% (w/w) *Magnolia officinalis* methanol extract (see text for detail).\* : P < 0.05, compared with the Control group of the same week. # P < 0.05, compared with the Cholesterol group of the same week.

**Table 3. Effects of NO synthase blockade with L-NAME on the systemic blood pressure (BP) and heart rate (HR) of rabbits fed with various diets at the 8th week.**

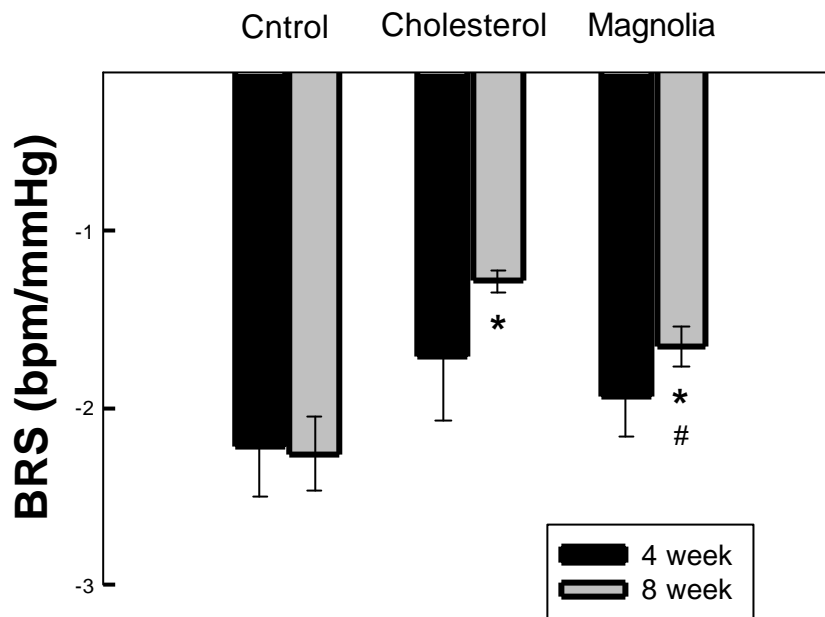
Group	BP ( mmHg )			HR ( bpm )		
	Control ( 9 )	Cholesterol ( 7 )	Magnolia ( 4 )	Control	Cholesterol	Magnoli a
Before	88 ±4	98±3*	108 ±4*	247 ±9	252±9	277±32
After	99±5#	114 ±4**#	121 ±5**#	222 ±15	201 ±12#	197 ±30
%Change	12 ±3	16 ±2	12 ±2	-10±6	-21±3	-28±6

All values are expressed as means ± SE (standard error of means). The sample sizes are indicated in parentheses. The Control group were fed with normal rabbit chow. The Cholesterol group were fed with normal rabbit chow plus 10 % (w/w) corn oil and 0.5 % (w/w) cholesterol. The Magnolia group were fed with the same diet as the Cholesterol group, but plus 1% (w/w) *Magnolia officinalis* methanol extract (see text for detail). \* : P < 0.05, compared with the Control group before L-NAME was added . \*\* : P < 0.05, compared with the Control group after L-NAME was added . # : P < 0.05, compared with the same group before L-NAME was added.

**Table 4. Systemic blood pressure (BP) and heart rate (HR) profile during induction of hemorrhage in rabbits fed with various diets at the 8th week.**

Group	BP (mmH)			HR (bpm)		
	Control(8)	Cholesterol(9)	Magnolia(6)	Control	Cholesterol	Magnoli a
Baseline	94±4	112±3	108±3	288 ±13	271 ±12	260 ±20
PeakHR	71±3	78±3	76±6	310 ±17	296±12	335±20
Lowest HR	58±3	56 ±3	58 ±3	274 ±15	247±10	236±15
Lower plateau	76±8	74±4	66±3	296±10	278±13	293±23

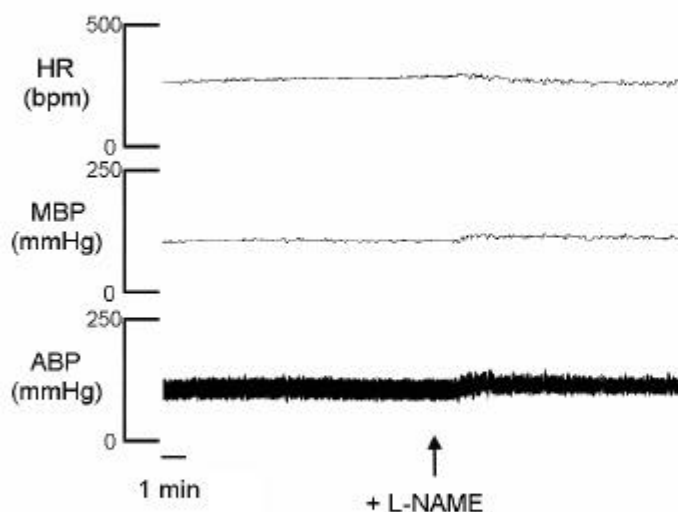
All values are expressed as means  $\pm$  SE (standard error of means). The sample sizes are indicated in parentheses. The diet treatment of each group was the same as described in Table 1. Baseline: baseline BP and HR before induction of hemorrhage. Peak HR: phase of hemorrhage when HR reached the highest level. Lowest HR: phase of hemorrhage after HR was decreased from peak HR to a lowest point before developed to a steady plateau. Lower plateau: phase of hemorrhage when criteria of hemorrhage were reached, and both BP and HR reached a plateau (also see text and Fig. 4 for more detail).



**Fig 1. BRS of rabbits fed with different diets at the 4th and 8th week.**

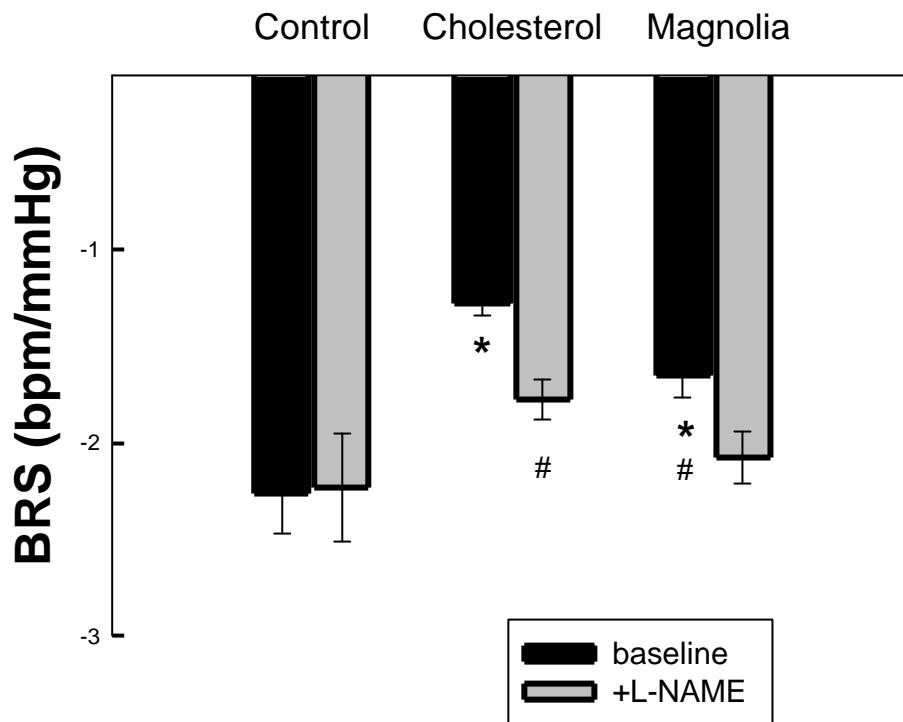
All values are expressed as means  $\pm$  SE (standard error of means). The sample sizes are indicated in parentheses. The Control group were fed with normal rabbit chow. The Cholesterol group were fed with normal rabbit chow plus 10 % (w/w) corn oil and 0.5 % (w/w) cholesterol. The Magnolia group were fed with the same diet as the Cholesterol group, but plus 1% (w/w) *Magnolia officinalis* methanol extract (see text for detail).\* : P < 0.05, compared with the Control group of the same week. #: P < 0.05, compared with the Cholesterol group of the same week.





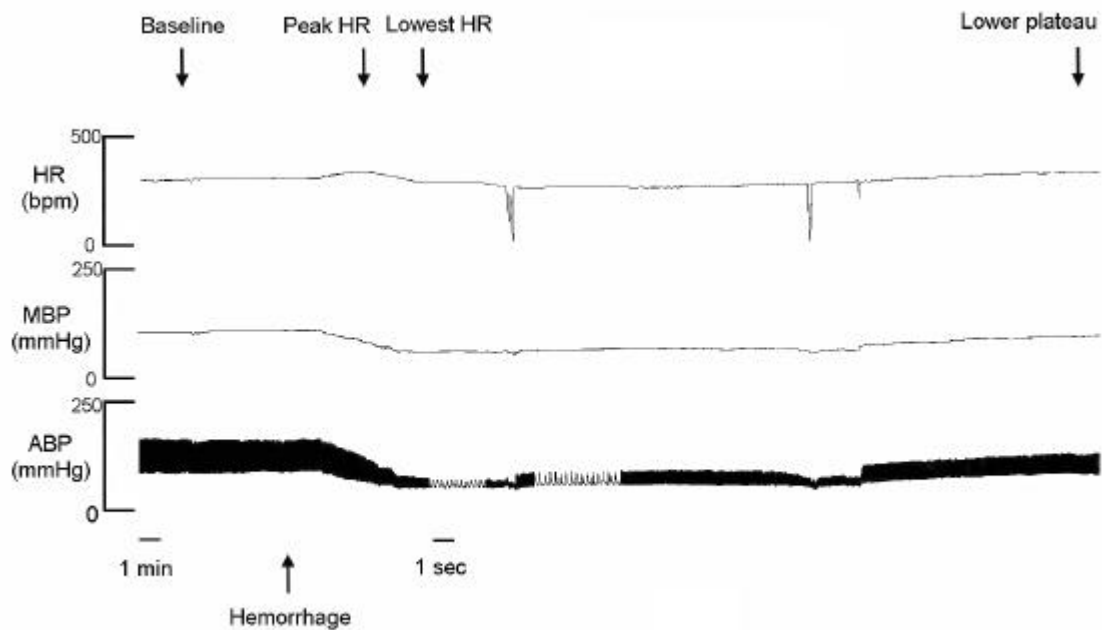
**Fig. 2. Effects of NO synthase blockade with L-NAME on the systemic blood pressure and heart rate in rabbits fed with different diets.**

The Control group were fed with normal rabbit chow. The Cholesterol group were fed with normal rabbit chow plus 10 % (w/w) corn oil and 0.5 % (w/w) cholesterol. The Magnolia group were fed with the same diet as the Cholesterol group, but plus 1% (w/w) *Magnolia officinalis* methanol extract (see text for detail).



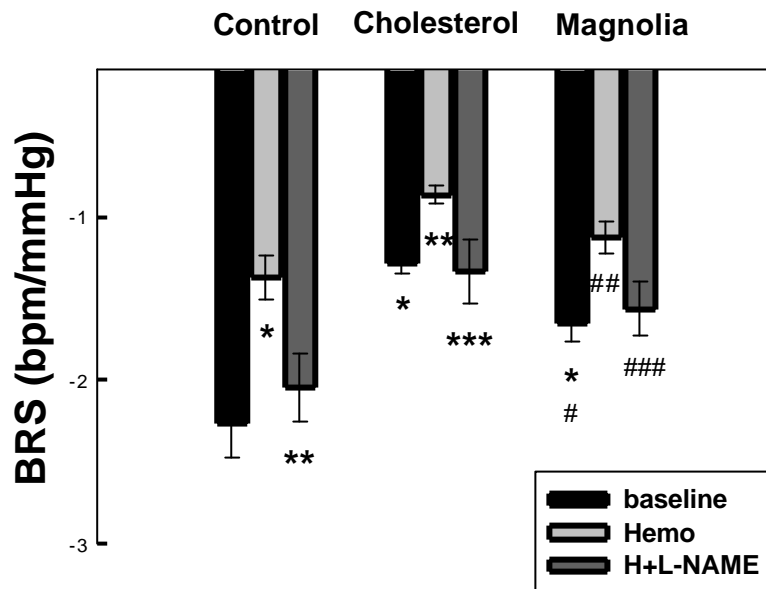
**Fig 3. Effects of NO synthase blockade with L-NAME on BRS in rabbits fed with different diets.**

The Control group were fed with normal rabbit chow. The Cholesterol group were fed with normal rabbit chow plus 10 % (w/w) corn oil and 0.5 % (w/w) cholesterol. The Magnolia group were fed with the same diet as the Cholesterol group, but plus 1% (w/w) *Magnolia officinalis* methanol extract (see text for detail). \* : P < 0.05, compared with the baseline values (before L-NAME) of the Control group. # : P < 0.05, compared with the baseline values of the Cholesterol group.



**Fig. 4. Changes of systemic blood pressure and heart rate during the induction of hemorrhage.**

After the Baseline was recorded, procedure of hemorrhage was initiated (arrow). Note that the hemorrhage started with a non hypotensive phase with a gradual increase in heart rate. Then the hemorrhage developed into a hypotensive phase with a further increase of heart rate (Peak HR). However, as hemorrhage progressed into a more severe phase, the heart rate was paradoxically decreased. The hemorrhage was continued until the mean arterial blood pressure dropped below 70 mmHg (Lowest HR), and then the procedure of hemorrhage was terminated. The blood pressure and heart rate would then level off (Lower plateau).



**Fig.5. Effects of NO synthase blockade with L-NAME on BRS during hemorrhage in rabbits fed with different diets.**

$P < 0.05$  was considered statistically significant. Statistical notations are defined as follows. \* : compared with the baseline of the Control group. #: compared with the baseline of the Cholesterol group. \* \* : compared with the hemorrhagic state (Hemo) of the Control group. ##: compared with the hemorrhagic state (Hemo) of the Cholesterol group. \* \* \* : compared with the hemorrhagic state with NO synthase blockade (H+L-NAME) of the Control group. ###: compared with the hemorrhagic state with NO synthase blockade (H+L-NAME) of the Cholesterol group. The Control group were fed with normal rabbit chow. The Cholesterol group were fed with normal rabbit chow plus 10 % (w/w) corn oil and 0.5 % (w/w) cholesterol. The Magnolia group were fed with the same diet as the Cholesterol group, but plus 1% (w/w) *Magnolia officinalis* methanol extract (see text for detail).

## 作者簡歷

姓名：周佩玉

學歷：弘光科技大學護理系畢業

期刊論文：

C.S.J. Yang, J.W. Lee, P.U. Chou, H.J. Wang (2002) : Effects of Guanosine 5'-Monophosphate, GMP on Food and Water Intake in Male Rats. *Bulletin on Hung Kuang Institute of Technology*. 2002 ; 39 : 125-128.

會議論文：

C.S.J. Yang, J.W. Lee, P.U. Chou, H.J. Wang (2002) : Effects of Guanosine 5'-Monophosphate, GMP on Food and Water Intake in Male Rats. 生物醫學聯合學術年會.

P.U. Chou, W.C. Chang, J.S. Chen (2004) : Effects of Hypercholesterolemia on Baroreflex Function in Rabbits. 生物醫學聯合學術年會