

# 中國醫藥大學中國醫學研究所博士論文

指導教授：謝慶良 博士

共同指導教授：林昭庚 博士

郭重雄 博士

## 論文題目

丹參與槐花對大鼠腦缺血-再灌流損傷引發之腦梗塞的效用  
Effects of *Salvia miltiorrhiza* and *Sophora japonica* on Cerebral  
Infarct Induced by Ischemia-Reperfusion Injury in Rats



中華民國九十四年六月

中國醫藥大學博士班研究生  
論文指導教授推薦書

中國醫學研究所，婁芝瑞君所提之論文  
丹參與槐花對大鼠腦缺血-再灌流損傷引發之腦梗  
塞的效用(題目)，係由本人指導  
撰述，同意提付審查。

指導教授 謝慶良 (簽章)

中華民國 94 年 04 月 15 日

# 中國醫藥大學博士班研究生

## 論文口試委員審定書

中國醫學研究所，姚芝瑞君所提之論文  
丹參與槐花對大鼠腦缺血-再灌流損傷引發之腦梗塞的效用(題目)，經本委員會審議，認為符合  
博士資格標準。

論文口試委員會

委員

陳明豐

(簽章)

鄭重雄

孫勳

江素英

李采娟

唐娜櫻

謝慶良

所長

陳光偉

中華民國 94 年 4 月 15 日

# 目 錄

第一章 前言 .....	1
第二章 文獻探討 .....	5
2.1 歷代中醫有關中風的記載 .....	5
2.1.1 名詞定義 .....	5
2.1.2 唐宋以前對於腦中風之看法 .....	5
2.1.3 河間、東垣、丹溪之理論 .....	7
2.1.4 明、清時代之理論 .....	8
2.2 腦缺血動物模型文獻探討 .....	10
2.2.1 為什麼要使用動物模型來研究腦缺血 .....	10
2.2.2 本研究用齧齒類動物做為腦梗塞實驗模型的理由？ .....	10
2.2.3 腦缺血動物模型分類 .....	11
2.3 丹參的文獻探討 .....	15
2.3.1 基源 .....	15
2.3.2 歷代本草記載功效 .....	15
2.3.3 成份分析 .....	15
2.3.4 藥理作用 .....	16
2.3.5 臨床應用 .....	17
2.3.6 用法、用量與禁忌 .....	17

2.3.7 毒性	17
2.4 槐花的文獻探討	18
2.4.1 基源	18
2.4.2 歷代本草記載功效	18
2.4.3 成份分析	18
2.4.4 藥理作用	18
2.4.5 臨床應用	19
2.4.6 服法與用量	19
2.4.7 毒性	20
2.5 缺血後炎症反應與細胞黏附作用	21
2.6 自由基的產生	23
2.7 細胞凋亡	25
第三章 材料與方法	27
3.1 實驗動物	27
3.2 大鼠腦缺血-再灌流損傷引發梗塞模型之建立	27
3.3 藥物的萃取與給藥方式	29
3.3.1 丹參	29
3.3.2 槐花	30
3.4 實驗步驟	31
3.4.1 丹參組	31

3.4.1.1 實驗分組	31
3.4.1.2 自由基測定	31
3.4.1.3 腦梗塞面積的測定	33
3.4.1.4 統計分析	34
3.4.2 槐花組	34
實驗 A	34
3.4.2.1 實驗分組	34
3.4.2.2 神經學狀態評估	35
3.4.2.3 腦梗塞面積的測定	36
實驗 B	36
3.4.2.4 實驗分組	36
3.4.2.5 免疫組織化學染色分析	36
3.4.2.6 統計分析	40
第四章 結果	41
4.1 丹參組	41
4.1.1 丹參對大鼠腦缺血-再灌流損傷引發腦梗塞之效用	41
4.1.2 丹參對大鼠腦缺血-再灌流損傷引起之氧化自由基的效用	41
4.2 槐花組	42
4.2.1 槐花對大鼠腦缺血-再灌流損傷引發腦梗塞的效用	42

4.2.2 槐花對大鼠腦缺血-再灌流損傷引發大鼠神經學狀態的效用	42
4.2.3 槐花對大鼠腦缺血-再灌流損傷引發 ED1 染色陽性細胞的效用	42
4.2.4 槐花對大鼠腦缺血-再灌流損傷引發 IL-1 $\beta$ 染色陽性細胞的效用	43
4.2.5 槐花對大鼠腦缺血-再灌流損傷引起細胞凋亡(cell apoptosis)的效用	43
第五章 討論	44
第六章 結論	48
參考文獻	62
英文摘要	82
謝辭	85

## 圖 索 引

圖 3.1 丹參組之實驗流程	49
圖 3.2 槐花組之實驗流程	50
圖 3.3 腦梗塞大鼠之神經狀態	51
圖 4.1 丹參對大鼠腦缺血-再灌流損傷引發腦梗塞之效用	53
圖 4.2 丹參對大鼠腦缺血-再灌流損傷引發腦梗塞之效用	54
圖 4.3 丹參對大鼠腦缺血-再灌流損傷後血液 lucigenin-CL 和 luminol-CL counts 的影響	55
圖 4.4 槐花對大鼠腦缺血-再灌流損傷引發腦梗塞之效用	56
圖 4.5 槐花對大鼠腦缺血-再灌流損傷引發腦梗塞之效用	57
圖 4.6 槐花對大鼠腦缺血-再灌流損傷神引發經缺損之效用	58
圖 4.7 從前額葉算起第三片大鼠腦組織之冠狀切片	59
圖 4.8 槐花對大鼠腦缺血-再灌流損傷引發腦梗塞區 ED1、 interleukin-1 $\beta$ 染色陽性細胞和 apoptosis 細胞的效用	60

## 表 索 引

表 4.1 槐花對大鼠腦缺血-再灌流損傷引發腦梗塞區 ED1、 interleukin-1 $\beta$ 染色陽性細胞和 apoptosis 細胞的效用-----	61
---	----

## 縮 寫 索 引

1. CVA : cerebrovascular accident
2. SOD : superoxide dismutase
3. CL : chemiluminescence
4. MCA : middle cerebral artery
5. CCA : common carotid artery
6. SHR : spontaneously hypertensive rats
7. SD : Sprague-Dawley
8. TdT : terminal deoxynucleotidyl transferase
9. TTC: 2,3,5-triphenyl-terazolium chloride
10. PCD: programmed cell death
11. TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor- $\alpha$
12. MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1
13. IL-1 $\beta$  : interleukin-1 $\beta$
14. ICE: interleukin-1-converting enzyme
15. ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1
16. VCAM: vascular cell adhesion molecule

# 丹參與槐花對大鼠腦缺血-再灌流損傷引發之腦梗塞的效用

研究生：婁芝瑞

指導教授：謝慶良 博士

中國醫藥大學 中國醫學研究所

傳統中醫學認為血瘀為腦中風的主要因素之一，因此臨床上常使用活血化瘀的中藥來治療。丹參(*Salvia miltiorrhiza Bge*)、槐花(*Sophora japonica L*)為傳統的中藥。丹參具有活血化瘀的功效，臨床上常用來治療腦中風和缺血性心臟疾病，一些研究報告說明在血瘀證的兔子或老鼠，丹參具有改善微循環、血液黏稠度和紅血球的變形性的能力。槐花具有涼血、止血、清肝瀉火的作用，臨床上常用來治療痔瘡出血。最近的研究發現，槐花與銀杏都含有相同的成份 Rutin 和 Quercetin，銀杏已被廣泛的應用在心血管疾病和腦痴呆的治療。

本研究的目的是探討丹參與槐花對腦梗塞的效用，並探討其可能作用機轉。方法是將 300-350 公克的 Sprague-Dawley(SD)大鼠的兩側總頸動脈和右側中大腦動脈的腦血流阻斷 90 分鐘，經 24 小時的再灌流，建立一個大鼠腦缺血-再灌流損傷引發之腦梗塞之動物模型。總共使用 84 隻 Sprague-Dawley 大鼠，丹參組 30 隻，槐花組 54 隻。丹參組分別使用丹參 15 mg/kg、30 mg/kg，而槐花組分別使用槐花 50 mg/kg、100

mg/kg、200 mg/kg 於腦血流阻斷前 30 分鐘，以及槐花 200 mg/kg 於腦血流阻斷後 30 分鐘，從腹腔注射給藥。經 24 小時再灌流後，將動物犧牲取腦並作成切片，經 2 % 2,3,5-triphenyl-terazolium chloride 染色後，計算腦梗塞面積與切片總面積之百分比。此外，丹參組同時測量周邊血液中的 Luminol-chemiluminescence (CL) counts 和 Lucigenin-CL counts。槐花組觀察大鼠神經缺損等級及計算腦梗塞區域的 ED1、interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 染色陽性細胞和 apoptosis 細胞。以大鼠腦梗塞面積百分比的變化來評估丹參對腦梗塞的效用；以神經缺損等級、腦梗塞面積百分比的變化，來評估槐花對腦梗塞的效用。

結果顯示丹參 15 mg/kg、30 mg/kg 於腦血流阻斷前 30 分鐘給藥能減少梗塞面積和 Luminol-CL counts。槐花 100、200 mg/kg 於腦血流阻斷前 30 分鐘給藥以及槐花 200 mg/kg 於腦血流阻斷後 30 分鐘給藥都能減少腦梗塞面積和神經缺損狀態。另外，槐花 200 mg/kg 於腦血流阻斷前 30 分鐘給藥能減少腦梗塞區的 ED1、IL-1 $\beta$  染色陽性細胞和 apoptosis 細胞的數目。

總結，丹參能減少大鼠的腦梗塞面積和 Luminol-CL count。槐花能減少大鼠腦梗塞和神經缺損狀態，推測丹參與槐花可應用於治療人類的腦梗塞。丹參減少腦梗塞面積的作用部分與自由基的清除有關，而槐花

減少腦梗塞面積的作用與抑制發炎細胞 microglia、IL-1  $\beta$  以及 apoptosis 有關。

# 第一章 前言

腦中風(cerebrovascular accident, CVA)目前仍高居台灣十大死亡原因的第二位。根據臨床統計，缺血性(ischemic)腦中風佔腦中風百分之七十，而出血性腦中風佔百分之二十二<sup>(1)</sup>。缺血性腦中風是因腦動脈的血流阻塞不通或血流量不足所引起，其病理變化為腦細胞壞死、軟化，所以稱之為腦梗塞(cerebral infarct)。腦梗塞好發於中大腦動脈(middle cerebral artery area)的分佈區域。臨床上因梗塞部位的不同產生各式各樣的神經缺陷症狀，包括認知障礙、記憶力減退、意識不清、感覺異常、運動功能喪失或障礙等臨床症狀。目前對於腦梗塞的治療如抗血小板凝集劑 aspirin<sup>(2)</sup>，血栓溶解劑 urokinase，抗凝血劑 heparin 等，仍無突破性的進展，因此尋求安全而又有效的腦中風治療方法是身為一位醫師的責任。

中醫學認為血瘀(blood stasis)是腦中風發病的主要因素之一，因此臨床上常使用具有活血化瘀的中藥來治療<sup>(3)</sup>。丹參(*Salvia miltiorrhiza Bge*)、槐花(*Sophora japonica L.*)為傳統中藥。丹參具有活血化瘀的作用，臨床上已被用來治療腦中風和缺血性心臟疾病<sup>(3)</sup>。一些研究報告說明丹參能改善血瘀症大鼠或兔子的微循環、血液黏稠度和紅血球變形性能力<sup>(4)</sup>。槐花具有涼血、止血的作用，廣泛的應用在痔

瘡出血<sup>(5.6)</sup>。有研究指出槐花與銀杏葉(*Ginkgo biloba*)皆含有相同的成分Rutin (蘆丁, 又稱芸香苷)、Quercetin (槲皮素)<sup>(7.8.9.10.11)</sup>, 兩者都具有清除自由基的活性<sup>(10)</sup>及血管舒張的作用<sup>(12)</sup>。銀杏葉的萃取物能夠減少中大腦動脈阻塞-再灌流腦梗塞小鼠的梗塞面積<sup>(12.13)</sup>。此外, 銀杏葉萃取物具有清除自由基和增加超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性的作用<sup>(14.15)</sup>, 已廣泛的用於治療腦缺血(cerebral ischemia)、腦功能不全(cerebral insufficiency)、周邊循環不良和腦痴呆(dementia)等疾病<sup>(16.17.18)</sup>。

許多研究已說明腦缺血後再灌流所產生的超氧陰離子自由基(superoxide anion radical)是導致腦缺血損傷的重要原因<sup>(19.20.21)</sup>。氫氧自由基(hydroxyl radicals)為一極強的活性氧化劑, 可由superoxide radicals在亞鐵離子的催化下經由一個Haber-weiss反應與nitric oxide radical (NO<sup>·</sup>)反應產生<sup>(20)</sup>。氫氧根自由基已知可導致細胞脂質過氧化(lipid peroxidation)、蛋白質氧化和DNA損傷<sup>(21)</sup>。因此, 缺血後所產生的自由基對神經損傷及死亡, 扮演了一個關鍵性的角色<sup>(22)</sup>。

微膠細胞(microglia), 在正常的情況下呈分葉(ramified form)休眠狀, 但當腦部發生感染、發炎、外傷或缺血時會快速活化而成為

activated microglia，具有強大的吞噬能力，可消除微生物、祛除殘骸碎片(debris)及組織修復和神經再生<sup>(23)</sup>。microglia 可分泌 interleukin-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ )。interleukin-1(IL-1)可誘導星狀細胞(astrocyte)的增殖及調節神經生長因子的合成<sup>(24. 25. 26)</sup>。在大腦缺氧缺血(cerebral hypoxic-ischemia)狀態下微膠細胞可誘導細胞凋亡(apoptosis)，而在中風的治療上可能成為一個目標治療窗口(target therapeutic window)<sup>(27)</sup>。

有報告指出同時阻斷大鼠兩側總頸動脈及右側中大腦動脈的血流，可建立局部腦缺血-再灌注損傷引發之腦梗塞的動物模型<sup>(28. 29. 30)</sup>。此種腦梗塞之病理變化和人類的腦梗塞非常的相似。藉著 2 % 2, 3, 5-Triphenyl-tetrazolium chloride (TTC)的染色可區分出白色的梗塞區和紫紅色的非梗塞區<sup>(31. 32)</sup>。腦梗塞面積的大小與大鼠神經缺損的程度呈現正的相關關係<sup>(33)</sup>。

本研究的目的是利用大鼠建立腦梗塞動物模型來探討活血、涼血中藥：丹參及槐花對腦梗塞的效用，並探討其可能作用機轉。丹參組，將 Sprague-Dawley(SD)大鼠兩側的總頸動脈和右側中大腦動脈的血流阻斷 90 分鐘，隨著 24 小時灌注，從心臟採血後，將大鼠犧牲取腦。同時偵測大鼠週邊血液的 luminol-chemiluminescence (CL)和 lucigenin-CL

counts。槐花組，將 SD 大鼠兩側的總頸動脈和右側中大腦動脈的血流阻斷 90 分鐘，隨著 24 小時灌流，觀察大鼠神經狀態後，將大鼠犧牲取腦，並作成切片，計算腦梗塞區 ED1 和 IL-1 $\beta$  染色陽性細胞和 apoptosis 細胞數目，來探討槐花的作用機轉。

## 第二章 文獻探討

### 2.1 歷代中醫有關中風的記載

#### 2.1.1 名詞的定義

腦中風又稱為腦卒中，而卒中一辭出自《黃帝內經素問·本病論篇》：「民病卒中偏痺，手足不仁<sup>(34)</sup>」。腦中風是指腦血管所引發的疾病，其特徵是突然發作，病人好像被一陣狂風擊倒在地一般，英文為 stroke，或 CVA (Cerebrovascular accident) 或「腦血管意外」。因腦中風發病急劇，病情變化迅速，與自然界「風」的性質相似，所以中醫稱為「中風」<sup>(35)</sup>。

#### 2.1.2 唐宋以前對於腦中風之看法

《素問·風論》：“風中五臟六腑之俞，亦為臟腑之風，各入其門戶，所中則為偏風”<sup>(36)</sup>，認為造成偏風的原因是風邪入侵臟腑。

《靈樞·刺節真邪篇》：“虛邪偏客於身半，其入深，內居營衛。營衛稍衰，則真氣去，邪氣獨留，發為偏枯”<sup>(37)</sup>，提出正氣不足，營衛虛弱，外邪入中，引起偏枯。《素問·調經論》：“血之與氣，並走於上，則為大厥，厥則暴死”<sup>(38)</sup>，說明中風的病變部位主要在頭部，是由氣

血上逆所導致。因此內經時代認為造成中風的原因是由於營衛不固，外邪入中，而發病的部位主要在頭部。

《金匱要略方論·中風歷節病篇》：“邪入於腑，即不識人；邪入於臟，舌即難言，口吐涎”。“夫風之為病，當半身不遂”，“正氣引邪，喎僻不遂”。“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”<sup>(39)</sup>。由此可知漢·張仲景首先提出中風這個名詞，又中經絡中藏腑最主要的區別在於中風發生時有無意識喪失或障礙。

隋·巢元方《諸病源候論·中風候》：“風偏枯者，由氣血偏虛，則腠理開，受於風濕。風濕客於半身，在分腠之間，使血氣凝滯，不能潤養，久不瘥，真氣去，邪氣獨留所致”<sup>(40)</sup>，認為造成中風的主要因素是氣血不足，營衛不固，而導致外邪入侵。

唐·孫思邈《千金要方·論雜風狀》：“中風大法有四：一曰偏枯，二曰風痲，三曰風懿，四曰風痺。夫諸急卒病，多是風。夫風者，百病之長”<sup>(41)</sup>，提出偏枯、風痲、風懿和風痺須做鑑別診斷，然而發病突然的多與風有關。

### 2.1.3 河間、東垣、丹溪之理論

金·劉完素《河間六書·素門玄機原病式·火類》<sup>(42)</sup>：“中風癱瘓者，非謂肝木之風實甚而卒中之也，安非外中於風雨，由於將息失宜，而心火暴甚，腎水虛衰，不能制之，則陰虛陽實，而熱氣怫鬱，心神昏冒，筋骨不用，而卒倒無所知，多因喜怒思悲恐五志有所過極而卒中者，由五志過極，皆為熱甚故也”，劉元素認為中風是由“腎水不足，心火暴盛”所致。

元·李東垣《醫學發明·中風有三》：“中風者，非外來風邪，乃本氣自病也。凡人年逾四旬，氣衰者多有此疾，壯歲之際無有也。若肥盛則間有之，亦形盛氣衰如此”<sup>(43)</sup>，李東垣認為腦中風是因“形盛氣衰，本氣自病”所引起。

元·朱震亨《丹溪心法·論中風》曰：“按《內經》已下，皆謂外中風邪。然地有南北之殊，不可一途而論。…西北二方，亦有真為風所中者，但極少爾。東南之人，多是濕土生痰，痰生熱，熱生風也”<sup>(44)</sup>。

朱丹溪主張中風是由於血虛有痰，因此治療以痰為優先，其次則養血行血。

由以上可總結金元時代認為中風來自於“內風”。

#### 2.1.4 明、清時代之理論

明·張介賓《景岳全書·非風》：“非風一證，即時人所謂中風證也。此證多見於卒倒，卒倒多由昏憤，本皆內傷積損頹敗而然，原非外感風寒所致”。“凡中風等證，當辨其在經在臟。經病者，輕淺可延；臟病者，深重可畏。經病者，病連肢體；臟病者，敗在神氣。雖病在經者，無不由中，而表裏微甚，則各有所主，此經，臟之不可不辨也”（45）。張景岳認為腦中風是由於“內傷積損”所引起，提出“非風”的論點。一般而言中經絡病情較輕，而中藏腑則較嚴重，而且有神智上的變化。

明·李中梓《醫宗必讀·真中風》：“凡中風昏倒，須先順氣，…最要分別閉與脫二證明白，如牙關累閉，兩手握固，即是閉證…，若口開心絕，手撒脾絕，眼合肝絕，遺尿腎絕，聲如鼾肺絕，即是脫証證”（46）。李中梓強調中風須分為閉和脫二證，而且說明五藏脫證的臨床特徵。

清·程鐘齡《醫學心悟·中風不語辨》：“若心經不語，必昏冒全不知人，或兼直視搖頭等證。蓋心不受邪，受邪則殆，此敗症也。若胞絡受邪，則時昏時醒，或時自喜笑；若脾經不語，則人事明白，或唇緩，口角流涎，語言蹇澀；若腎經不語，則腰足痿痺，或耳聾遺尿，以此為辨”（47）。程鐘齡提出中風後所造成的語言障礙之心、脾、腎三經的臨床特徵。

清·葉天士《臨證指南醫案·中風》：“今葉氏發明內風乃身中陽氣之變動，肝為風臟，因精血衰耗，水不涵木，木少滋榮，故肝陽偏亢，內風時起，治宜滋液熄風，濡養營絡，補陰潛陽；若陰陽並損，無陰則陽無以化，治宜故以溫柔濡潤之通補”<sup>(48)</sup>。葉天士認為腦中風的原因是由於精血衰耗，水不涵木而導致肝陽偏亢所引起。

清·王清任《醫林改錯·半身不遂本原》：“半身不遂，虧損之氣，是其本原，若元氣一虧，經絡自然空虛…，無氣則不能動，不能動，名曰半身不遂…，半身無氣，所以跌仆，…非因跌仆得半身不遂，實因氣虧得半身不遂”<sup>(49)</sup>。王清任認為腦中風的跟本原因在於“氣虛”。

由上述可知因朝代的變遷，有關腦中風的理論也隨之改變，也說明腦中風的發生原因是多樣的。

## 2.2 腦缺血動物模型文獻探討

為了有系統的研究腦缺血的病理生理以及治療方法，必須建立一個可以與人類相類似病理變化之動物模型。

### 2.2.1 為什麼要使用動物模型來研究腦缺血(29.50)？

(1) 人類發生腦中風的原因及病變部位變異很大，在研究上無法一致，所以需要動物實驗模型。

(2) 有些組織病理，生化及生理的研究需要侵入性的手術及直接取得腦組織才能進行研究，因牽涉倫理道德，無法於人類執行。

(3) 人類腦中風發生時的資訊不容易獲得，只能藉實驗室來了解。

### 2.2.2 本研究用齧齒類動物(rodents)做為腦梗塞實驗模型的理由？

雖然大型物種如貓、狗、兔和猿類也曾用作腦缺血研究(51.52.53)，但實驗常用齧齒類動物的理由如下：

(1) 動物價格低廉。

(2) 實驗費用較低。

(3) 同血統品系交配繁殖，較有均一性。

(4) 與人類腦血管結構及生理接近。

(5) 腦部體積較小適合固定及冷凍包埋，及做生化分析。

(6) 運動障礙如半身不遂，行為、學習、記憶等容易觀察。

(7) 環境生態或倫理觀點較易被接受。

(8) 尋找參考資料容易。

### 2.2.3 腦缺血動物模型分類

2.2.3.1 全腦缺血模型(models of global ischemia)：大部分為短暫性，影響擴散全腦。

#### 1. The Two-Vessel Occlusion Model of Forebrain Ischemia

將大鼠兩側總頸動脈阻斷，配合全身性血壓降低可造成高度前腦缺血<sup>(54)</sup>。此動物模型易導致海馬區的 CA1 pyramidal、尾核被殼(Caudoputamen)、neocortex 的神經細胞損傷<sup>(55.56)</sup>。

Two-vessel occlusion model 具有開刀一次即可產生高度前腦缺血的優點。適合慢性研究，而且失敗率相當的低。但一段時間的腦缺血後易產生缺血後發作(seizure)<sup>(56)</sup>，又因動物無意識，所以行為改變無法評估。

#### 2. The Four-Vessel Occlusion Model of Forebrain Ischemia

Four-vessel occlusion model 由二個階段所誘導產生<sup>(57)</sup>。

第一階段：從 Wistar 大鼠的腹部頸中線切開，將總頸動脈外露並放置動脈夾。接著將大鼠的背部切開，找出第一頸椎的 alar foramina，

使用一支小單極電凝針，穿過 alar foramina 電凝椎動脈<sup>(57.58)</sup>，這個階段容易損傷腦幹。

第二階段：經過 24 小時後產生前腦缺血，移除動脈夾讓血液再灌流。此種動物模型，大約有 3/4 的大鼠會有反應遲鈍和失去翻正反射。其優點是有足夠缺血反應，可應用在組織病理的評估<sup>(57.59)</sup>。

four-vessel occlusion model 只要 30 分鐘的腦缺血，就會導致海馬組織的傷害，造成記憶損傷<sup>(60)</sup>，但在第一階段只有 50% 的成功存活率，又須防止缺血後癲癇發作所引起的併發症。

### 3. Global ischemia by neck tourniquet

藉著一個圍繞在麻醉大鼠頸部的壓力環帶，以大約 600-700mmHg 的高壓阻斷了頭部的動脈和靜脈血流，而造成腦缺血<sup>(61)</sup>。此模型沒有廣泛的被接受。

### 4. Decapitation

斷頭瞬間即造成無法逆轉的大腦缺血狀態<sup>(62.63.64.65)</sup>，此模型常用於代謝上的研究。

## 5. The Levine Preparation of Hypoxia-Ischemia and Its Modifications

將 Wistar 老鼠的單邊 CCA 結紮一天後，慢慢暴露在缺氧環境大約 45 分鐘，此模型會造成灰質和白質的損傷，尤其海馬區最嚴重<sup>(66)</sup>，其缺點因大腦不是真正的缺血，所以實驗的結果不是由真實全腦缺血所產生。

2.2.3.2 局部腦缺血(models of focal ischemia, with or without reperfusion)：最終導致局部壞死或梗塞。

### 1. Middle Cerebral Artery (MCA) Occlusion

因為與人類腦梗塞臨床表現相似，所以 MCA 阻斷的大鼠模型愈來愈被廣泛應用。

Tamura<sup>(67)</sup>提出由顳骨下(subtemporal)手術方式，可以阻斷 proximal MCA，導致皮質和 caudoputamen 梗塞。Bederson<sup>(33)</sup>的觀察結果發現 MCA 阻斷的位置和程度之不同，會造成不同程度的病理、生理變化。Proximal MCA 阻斷模型已廣泛地應用於評估治療藥物效果，如 calcium channel blockers 和 excitatory amino acid antagonists 等<sup>(68, 69)</sup>。

### 2. The Spontaneously Hypertension Rat (SHR) as a Stroke Model

SHR 老鼠對腦血管阻斷非常敏感<sup>(70)</sup>，若將 SHR 兩邊的 CCA 的血流阻斷，會導致很大的腦梗塞<sup>(71, 72)</sup>面積。SHR 老鼠，阻斷 MCA 血流所導致的皮質梗塞面積比其它正常血壓老鼠大<sup>(73, 74, 75)</sup>。

### 3. Photochemically Induced Focal Cerebral Thrombosis

在組織器官內給予感光性染料，使用特殊波長的光線照射，可誘導血小板凝集<sup>(76)</sup>。Watson 等人應用這個技術，在老鼠的皮質產生血栓梗塞<sup>(77)</sup>，這個模型缺點是與人類的血栓中風不同。

## 2.3 丹參的文獻探討

### 2.3.1 基源

丹參為唇型科鼠尾草植物丹參 *Salvia Miltiorrhiza Bge* 之乾燥根。又名紫丹參。主產於四川 (78)。

### 2.3.2 歷代本草記載功效

《本經》記載丹參：主心腹邪氣，腸鳴幽幽如走水，寒熱積聚；破癥除瘕，止煩，益氣(79)。

《綱目》記載丹參：活血，通心包絡。治疝痛(80)。

《中國藥材學》認為丹參能破宿血，生新血。安生胎，墮死胎。調經脈，功兼四物，為女科要藥(81)。

《中藥現代研究與應用》發現丹參有活血祛瘀止痛，清心除煩的作用。可用於月經不調，經閉痛經，癥瘕積聚及心絞痛(82)等症的治療。

### 2.3.3 成份分析

丹參的脂溶性成份大多為共軛醌和酮類，為橙黃和橙紅色，如丹參酮 I (Tanshinone I)、丹參酮 II A (Tanshinone II A)、丹參酮 II B (Tanshinone II B)、隱丹參酮 (Cryptotanshinon) 等。水溶性成份有丹參素 (Danshensu)，丹參酚等。一般使用丹參的水溶性成份(83)。

## 2.3.4 藥理作用

### 對心臟功能的影響

丹參能擴張天竺鼠、家兔的離體心臟冠狀動脈並能增加冠狀動脈流量，也能促進側枝循環<sup>(84,85)</sup>，以及抑制中性白血球，對心肌梗塞有保護心肌的作用<sup>(86)</sup>。

### 對血液循環的影響

丹參可改善血瘀證兔子或老鼠的微循環、降低血液黏稠度和增加紅血球的變形性能力<sup>(4)</sup>。

### 對肝臟的影響

丹參對肝損傷有保護的作用<sup>(87,88,89)</sup>。

### 對脂質代謝和動脈粥樣硬化的影響

丹參能抑制高膽固醇膳食家兔血清膽固醇的上升，減輕粥樣硬化動脈所造成的管腔狹窄以及延緩動脈粥樣硬化的形成<sup>(90,91)</sup>。

### 對中樞神經系統的作用

丹參對中樞神經系統有抑制作用，能對抗苯丙胺引起精神運動興奮，但無明顯的抗驚厥作用<sup>(92)</sup>。

### 對腦缺血的保護作用

丹參能改善大鼠腦梗塞<sup>(93)</sup>，預防缺氧缺血性新生大鼠腦病後的腦萎縮和軟化<sup>(94)</sup>以及提升實驗性腦損傷後白血球的變形能力<sup>(95)</sup>。

### 2.3.5 臨床應用

#### 行血化淤

丹參可用來治療冠狀動脈硬化，若配決明子，山楂，澤瀉有降血脂作用(81)。

#### 活血通經

丹參可用於經期異常和經色紫暗有血塊以及腹痛和脹的治療。若經時腹部劇痛，可配延胡索、桃仁、香附等。若產後血虛，可用丹參配生化湯(81)。

### 2.3.6 用法、用量與禁忌

丹參一般用 3~5 錢，但孕婦及習慣性流產則須慎用(81)。

### 2.3.7 毒性

有報告指出腹腔注射丹參的 LD<sub>50</sub> 為 80.5 ±3.1g /kg (82)。

## 2.4 槐花的文獻探討

### 2.4.1 基源

槐花，又稱槐蕊。為豆科植物槐樹(*Sophora japonica L.*)的花朵或花蕾。主要產於河北。夏季，花初開放時採收，稱為“槐花”，而花蕾形成時採收稱為“槐米” (96)。

### 2.4.2 歷代本草記載功效

《綱目》記載槐花：“炒香頻嚼，治失音及喉痺。又療吐血，衄，崩中漏下” (97)。

《本草備藥》記載槐花：“治風熱目赤，赤白泄痢，五痔腸風，吐崩諸血” (98)。

《中藥現代研究與應用》認為槐花有涼血、止血，及瀉肝火的作用。可用於痔瘡出血或出血性疾病，如衄血的治療<sup>(5)</sup>。

### 2.4.3 成份分析

槐花，主要含有蘆丁(Rutin)，槲皮素(Quercetin)等，藥典規定蘆丁含量不得少於 20% (99)。

### 2.4.4 藥理作用

凝血、止血作用

槐米炭能縮短凝血和出血時間(6)。

### 抗炎作用

槐花中的蘆丁成份有抗發炎作用(100)。

### 抗真菌作用

槐花的水浸劑能抑制毛癬菌、黃癬菌、小芽胞癬菌等(101)。

### 對心血管系統的影響

槐花對心肌傳導系統有阻滯作用，能用來治療心律不整(102)。

### 降血糖、血脂作用

槐花能降低血糖以及預防和降低實驗性高膽固醇血症，推測與黃酮類物質有關(103)。

### 解痙、抗潰瘍作用

蘆丁和槲皮素能降低平滑肌的張力，對胃潰瘍有保護作用(104)。

## 2.4.5 臨床應用

清熱涼血止血：用於各種出血，如便血，子宮出血和鼻腔出血等(105)。

清熱解毒：能用來治療瘡瘍癰腫(105)。

## 2.4.6 服法與用量

一般用 5-8 錢(105)。

#### 2.4.7 毒性

有報告指出蘆丁腹腔注射的 LD<sub>50</sub> 為 950 mg/kg，而口服槲皮素的 LD<sub>50</sub> 為 160 mg/kg<sup>(5)</sup>。

## 2.5 缺血後炎症反應與細胞黏附作用

當腦缺血發生時，腦梗塞區除神經細胞損傷外，還有缺血後炎症反應(postischemia inflammation response)。當腦缺血時，微膠細胞(microglia)隨之活化與增殖。在正常情況下 microglia 呈分葉(ramified form)休眠狀。但當腦部發炎、缺血或外傷時，會使休眠狀(resting)的 microglia 在短時間內變成大且具有短、堅固突起(process)之 activated microglia，呈 ameboid form，但仍無吞噬功能(nonphagocytic function)，最後形成桿圓狀型態，沒有突起而具有強大吞噬能力(phagocytic function)的 reactive microglia<sup>(106)</sup>。可用 ED1 免疫染色來辨識<sup>(107)</sup>。

前腦短暫性缺血的大鼠，在 dorsal hippocampus 中微膠細胞明顯增加<sup>(108,109)</sup>；而小鼠在中大腦動脈阻斷血流後，活化的微膠細胞的增加提早至 18 小時，而且在 48 小時達到高峰<sup>(110)</sup>。

由許多的研究已知 nitricoxide (NO) 主要是由 microglia 所分泌<sup>(111,112)</sup>。而 NO 與再灌流期間產生大量之超氧陰離子作用形成 ONOO<sup>-</sup>，再反應成 hydroxyl radical 攻擊細胞中的脂質、蛋白質及核酸，加速細胞死亡。

在缺血再灌流之大鼠，其缺血區的膠質細胞會分泌 IL-1 $\beta$  (113)。許多的研究說明 microglia 為 IL-1 $\beta$  和 IL-1 $\beta$  mRNA 的主要分泌來源 (114, 115)。SHR 永久性局部腦缺血的模型中發現於腦缺血後 6 小時，於缺血區的 IL-1 $\beta$  增加，因此認為前驅發炎細胞激素的 IL-1 $\beta$  在缺血後腦損傷扮演了一個關鍵角色 (114)。IL-1 $\beta$  為一強力的發炎介質，主要作用於血管內皮細胞 (endothelial cell)，使其增加黏附細胞分子如 E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) 和 vascular cell adhesion molecule (VCAM) 的表現 (116, 117)。黏附細胞分子的作用使得白血球黏附在腦缺血損傷區之微血管壁導致微循環阻塞 (118, 119)，也因 IL-1 $\beta$  作用在血管內皮細胞，促進白血球的黏附和滲透到腦組織，損傷到了血管內皮細胞而且增加了腦血管障壁 (blood-brain barrier) 的滲透性，使得腦損傷和腦水腫更加惡化 (19)。在暫時性中大腦梗塞再灌流的動物模型，發現血管中活化之白血球黏附至內皮細胞顯現於再灌流後 2-10 小時，而白血球於腦梗塞之聚集顯現於再灌流後 24 小時 (120)。

## 2.6 自由基的產生

一些研究報告已指出在腦缺血後的再灌流期，因無法即時中和瞬間而來的氧分子即形成氧化自由基，包括超氧陰離子(superoxide anion)，氫氧自由基(hydroxyl free radical)等，而這些自由基在啟動神經細胞缺血性損傷，導至神經細胞遲發性的死亡扮演一個重要的角色(21. 23)。

在正常的生理狀態下，腦細胞會產生少量的 NO 作為調節細胞生理活動。NO 是由 L-arginine 經由一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)的催化而產生 NO 和 L-citrulline，而 NOS 分為神經性一氧化氮合成酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)、血管內皮性一氧化氮合成酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)可誘發性一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)等三種型式<sup>(124)</sup>。nNOS 與 eNOS 平日在鈣離子的協調下以固定速率生成少量的 NO，故此兩型 NOS 又稱之為結構性一氧化氮合成酶(constitutive NOS, cNOS)<sup>(122. 123)</sup>。

腦缺血發生的初期，細胞的通透性改變，促使 glutamate 的釋放和鄰近細胞 NMDA receptor 的活性升高，加速細胞外鈣離子湧入使得細胞

內鈣離子濃度增加而活化了鈣離子依賴性之 cNOS 分泌 NO 來調節血管的弛張性，增加局部血流。當 NO 的濃度增加會回饋性抑制 NMDA receptor，降低鈣離子湧入細胞內來保護神經細胞。於缺血後再灌流時，由於局部側枝循環增加，無法即時中和瞬間而來的氧分子( $O_2$ )，產生大量之超氧陰離子( $O_2 \cdot^-$ )。NO 和超氧陰離子結合形成 peroxynitrite anion ( $ONOO^-$ )，peroxynitrite anion 會進一步分解為 hydroxyl free radical ( $\cdot OH$ ) 和 nitrogen dioxide ( $NO_2$ )，而 Hydroxyl free radical 會攻擊細胞造成脂質過氧化作用、蛋白質氧化及攻擊粒腺體及 DNA，造成細胞死亡<sup>(21)</sup>。此外，活化的 microglia 的 iNOS 分泌之 NO 再與 superoxide anion 結合形成 hydroxyl free radical，更加速神經細胞的破壞。

## 2.7 細胞凋亡(apoptosis)

當大鼠腦梗塞後，在缺血核心區(ischemic core)細胞快速死亡，稱為壞死(necrosis)。在陰影區(penumbra area)，神經細胞的損傷較為緩慢，因延遲性損傷，在陰影區主要呈現的是 apoptosis 和發炎反應(26)。壞死源自細胞膜的完整性遭到傷害，正常的離子梯度破壞，粒腺體的功能喪失，最後細胞死亡(26)。

Apoptosis 為腦缺血後神經細胞死亡的另一種模式，有別於壞死(necrosis)，稱為 programmed cell death (PCD)(26,124)，其特點為細胞質膜氣泡化(membrane blebbing)，細胞質、核濃縮(cytoplasmic and nuclear condensation)，染色質聚集(chromatin aggregation)，形成“apoptotic bodies”。在 PCD 的過程中活化了核內切酶(endonuclease)將 DNA 分裂成為核小體斷片(125,126)。當腦缺血發生時，一個缺血炎症反應包括 microglia 和 astrocyte 的活化;細胞激素(cytokine)如 IL-1 $\beta$ 、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)的產生與分泌，發炎細胞的浸潤更加重神經細胞的損傷(19)。IL-1 $\beta$  具有 proapoptotic 和 proinflammatory 的活性。IL-1-converting enzyme (ICE)為 cysteine protease, caspases 的家族成員之一，可將 proIL-1 $\beta$  轉化為 IL-1 $\beta$ 。因此 caspase 於炎症反應及 PCD 過程中扮演著重要且關鍵的角色(127)。此外，在一些研究也說明

在腦缺血、缺氧下由於 glutamate 的釋放，氫氧自由基、超氧自由基、一氧化氮自由基的產生及神經細胞發炎、細胞激素、黏附細胞分子和 IL-1 等皆參與了 apoptosis 的形成(128,129)。

## 第三章 材料與方法

### 3.1 實驗動物

本研究採用之實驗動物皆購自國科會動物中心，飼養於中國醫藥大學動物中心。飼養室內為中央空調，明暗控制各 12 小時，水和飼料每日充足供應，室溫控制在  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。本實驗採用品系為 SD 雄性大鼠，體重介於 300~350 公克之間，共計 84 隻。整個實驗過程都遵守實驗動物倫理規範。

### 3.2 大鼠腦缺血-再灌流損傷引發梗塞模型之建立

首先將 SD 大鼠稱重，然後以水合氯醛(chloral hydrate, 400mg/kg)由腹腔注射，大鼠麻醉後，以電動剃刀將頭顱部及腹側頸部的毛髮剃除。將 SD 大鼠呈仰臥位，然後用手術刀從腹側頸中線切開，長度約為 1 公分，使暴露氣管並於氣管兩旁尋得總頸動脈，分離頸總動脈和迷走神經(vagus nerve)，將两只尼龍繩套(nylon thread, 直徑約 0.5 mm)分別繞過兩側頸總動脈，再放上套管(直徑約為 1.5 mm)。接著將 SD 大鼠呈俯臥位，且將它的頭部固定於立體固定儀(stereotaxic frame)上，於頭部眼角(canthus)及耳翼(pinna)之間作一皮膚中切，再將右側顳肌(temporal muscle)切開，以骨剪進行顳骨切開術(craniectomy)，造成一個直徑約 3-6 mm 的骨窗。以雷射杜普勒血流監視器(Laser Doppler

Blood-Flow Monitor, DRT4, Moor instrument Ltd, England) 尋找並確定中大腦動脈，此時雷射血流監視器呈現刻度 900 LD units，然後將 8-0 尼龍單線微型手術針(8-0 mono-filament nylon tie, ETHILON, Johnson & Johnson juet 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。在雷射杜普勒血流監視器監控下，將套在雙側頸動脈上的繩子套緊，同時可見到雷射杜普勒血流監視器的刻度從 900 降到 200，接著又阻斷右側中大腦動脈的血流，此時雷射杜普勒血流監視器的刻度從 200 降至 50 以下。腦血流阻斷 90 分鐘後鬆脫中大腦動脈活結，並除去兩側總頸動脈管套，使血流再次灌流，以自動縫合器(Royal 35W, Germany)縫合切口後，待其翻正反射後(righting reflex)，置於保溫飼養籠 24 小時，根據不同實驗要求而做相應處理。整個實驗過程都用動物血壓計(LE5001 pressure meter, panlab. SL., Spain)監測血壓的變化以及使用恆溫電毯，維持老鼠體溫  $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。

### 3.3 藥物的萃取與給藥方式

#### 3.3.1 丹參

##### 3.3.1.1 丹參的萃取

取丹參飲片 3 公斤，以 12 公升的逆滲透水浸泡材 30 分鐘，用瓦斯爐加熱至水沸騰後轉為小火再繼續煮 30 分鐘，待冷卻後以 100 目的過濾網上墊數層紗布過濾，取得第一次過濾液。之後再由原藥材以相同的方法取得第二次過濾液，將二次過濾液合併經由減壓濃縮及冷凍乾燥濃縮，製成深褐色粉末，所得粉末經由科達製藥股份有限公司以丹參酮為標準品經高效液相層析法(HPLC)進行鑑定。3 公斤的丹參飲片經由二次的逆滲透水抽提再減壓濃縮及冷凍乾燥後的重量為 639.64g，總抽提率為 21.32%。

##### 3.3.1.2 丹參的給藥方式

給藥量的決定是根據預試驗(pilot study)得知丹參水萃物 30 mg/kg 經腹腔注射能減少缺血-再灌流損傷引發腦梗塞大鼠的腦梗塞面積。因此本研究分別採用丹參水萃物 15、30 mg/kg 的劑量於腦血流阻斷前 30 分鐘，由腹腔注射給藥。

### 3.3.2 槐花

#### 3.3.2.1 槐花的萃取

取槐米 600 公克加逆滲透水 4 公升，煮沸騰後轉為小火煮 4 小時，將水煮出液經紗布過濾，取過濾液，置於冷凍乾燥機中，經 96 小時的冷凍乾燥濃縮，製成褐黃色粉末，經中國醫藥大學藥學系經 HPLC 測定含有 20% 蘆丁。3 公克藥材約可製成一公克的乾燥粉末，以密封低溫 ( $-4^{\circ}\text{C}$ ) 保存，並防其受潮，使用前以逆滲透水新鮮配製。

#### 3.3.2.2 槐花的給藥方式

給藥劑量的決定是根據預試驗得知槐花水萃物 100 mg/kg 經腹腔注射能減少缺血-再灌流引發腦梗塞大鼠的腦梗塞面積。因此本研究分別採用槐花水萃物 50 mg/kg，100 mg/kg 及 200 mg/kg 的劑量於腦血流阻斷前 30 分鐘及槐花 200 mg/kg 於腦血流阻斷後 30 分鐘，由腹腔注射給藥。

## 3.4 實驗步驟

### 3.4.1 丹參組：其實驗流程圖如圖 3.1

3.4.1.1 實驗分組：將 30 隻大鼠任意分為五組，每組六隻 SD 大鼠

(1)假手術組(Sham)：將動物兩側頸總動脈及右側中大腦總動脈暴露，不阻斷血流。

(2)控制組(Cont)：阻斷兩側頸總動脈及右側中大腦動脈血流 90 分鐘，經 24 小時再灌流後，將動物犧牲取腦。

(3)實驗組(SM30)：如控制組，但腦血流阻斷前 30 分鐘，腹腔注射丹參水萃取物 30 mg/kg。

(4)實驗組(SM15)：如同控制組，但腦血流阻斷前 30 分鐘，腹腔注射丹參水萃取物 15 mg/kg。

(5)對照組(PBS)：如同控制組，但腦血流阻斷前 30 分鐘，腹腔注射 PBS 水溶液。

#### 3.4.1.2 自由基的測定

大鼠腦缺血 90 分鐘後，將結紮處鬆綁，使血液再灌流 24 小時，以水合氯醛(Chloral hydrate)深度麻醉，於灌流之前先由心臟抽取 3 cc 全血，其中 2 cc 裝入含 Heparin 且以鋁薄紙包裹避光之試管，置於冰浴中，用來測量自由基。另 1 cc 則裝入含 EDTA 之試管，用來計算白血球

數目。

自由基的測定是採用 chemiluminescence analyzing system (Tohoku electronic industrial Co., Sendai, Japan)。

#### (1)Luminol-CL 的測量：

##### A. 過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)的測量原理

白血球之 myeloperoxidase 於自然狀態下可產生少量過氧化氫，而於 zymosan 刺激下其產量可增加至 10-100 倍。故將化學發光物質 luminol 加入全血中，luminol 可被過氧化氫氧化，而於還原過程中被微量化學發光分析儀偵測到。

##### B. 步驟：

取 0.2 cc 全血加入 0.1 cc PBS 中，經過 200 秒後注入 1.0ml 25  $\mu$ M 之 luminol，再經 600 秒後注入 0.2 ml 之 Zymosan-A，持續測量至 1020 秒為止，計算 Luminol-CL counts 的總數，最後除以 WBC 數而以 CL/1000WBC 來表示。

#### (2)Lucigenin-CL 的測量

##### A. 超氧陰離子的測量原理

血液中之白血球於自然狀態下可產生少量超氧陰離子，而於 zymosan 刺激時其產量可增加至 10-100 倍。若於全血中加入化學發光物質 lucigenin，超氧陰離子會將 lucigenin 氧化，氧化型的 lucigenin 於

還原過程中會放出 photon 能被微量化學發光分析儀偵測到，則可知血中超氧陰離子的多寡。

B. 步驟：

取 0.2 cc 全血加入 0.1 cc PBS 中，經過 200 秒後注入 1.0ml 之 0.01  $\mu$ M lucigenin，再經 600 秒後注入 0.2ml 之 zymosan-A，持續測量至 1020 秒為止，計算 lucigenin-CL counts 的總數，最後除以 WBC 數而以 CL/1000WBC 來表示。

### 3.4.1.3 腦梗塞面積的測定

經 24 小時再灌流後，用水合氯醛(chloral hydrate 400mg/kg)腹腔注射，待大鼠麻醉無痛覺反應後，用剪刀剪開皮膚，使露出胸骨柄，以止血鉗夾住胸骨柄並往上拉，沿著肋骨邊緣將胸腔剪開，露出心臟，立即自左心室快速灌流生理食鹽水(0.9% NaCl，南光化學製藥股份有限公司，台灣)，並在右心房剪一小孔，讓生理食鹽水從左心室灌入，循環全身一周後由右心室流出，清洗大鼠組織中的血流。灌流完成後，迅速取腦置於塑膠鼠腦模型切盒中(brain matrix slicer)冠切(coronal sections)，厚度為 2 mm，從前額葉算起取六片，置於含有 2% TTC 染色劑的 12-well 培養盤中，然後放置於 37°C 恆溫箱中避光，經 15 分鐘的染色，腦梗塞區則呈現白色，而非梗塞區為紫紅色。將 TTC 染色劑回收，加入 10% formalin (Merck, Germany)固定貯存。完成收集 30 隻 SD 大

鼠之腦切片後，取各組鼠腦置於濾紙上，吸乾固定液，微距照相，應用 optic imagine 電腦圖像處理系統，計算每張切片腦梗塞面積。然後算出梗塞面積和與切片總面積之百分比。

#### 3.4.1.4 統計分析

本研究使用單因子變異數分析(one way Analysis of variance, ANOVA scheffe' s test)來檢定各組間的差異，當 P 值 $<0.05$  則認為有統計意義。

### 3.4.2 槐花組— 分為實驗 A 和實驗 B ，其實驗流程如圖 3.2

#### 實驗 A

3.4.2.1 實驗分組：將 42 隻大鼠任意分為七組，每組六隻 SD 大鼠

- (1)假手術組(sham, S):將動物兩側總頸動脈及右側中大腦動脈暴露，不阻斷血流。
- (2)控制組(control, C):將動物兩側總頸動脈及右側中大腦動脈血流阻斷 90 分鐘後，放開再灌流 24 小時，將動物犧牲取腦。
- (3)實驗組(P-50):如同控制組，但腦血流阻斷前 30 分鐘，由腹腔注射槐花水萃取物 50 mg/kg。
- (4)實驗組(P-100):如同控制組，但腦血流阻斷前 30 分鐘，由腹腔注射槐花水萃取物 100 mg/kg。

(5)實驗組(P-200)：如同控制組，但腦血流阻斷前 30 分鐘，腹腔注射槐花水萃取物 200 mg/kg。

(6)對照組(PBS)：如同控制組，但腦血流阻斷前 30 分鐘，由腹腔注射 PBS 水溶液。

(7)實驗組(D-200)：如同控制組，但腦血流阻斷後 30 分鐘，由腹腔注射槐花水萃取物 200 mg/kg。

#### 3.4.2.2 神經學狀態評估

經 24 小時再灌流後，由不知老鼠組別之助理人員觀察並記錄動物行為。SD 大鼠神經狀態的評估是依據 Bederson et al.(1986) <sup>(33)</sup>神經學檢查分級表，如下(圖 3.3)：

(1)第 0 級：輕拉起大鼠尾巴懸空，正常大鼠會呈雙臂向前伸展，沒有神經方面缺陷，為 0 分。

(2)第一級：將大鼠懸空，會使左側前肢屈曲，紀錄為 1 分。

(3)第二級：將大鼠懸空，左側前肢屈曲且掌指抓力減弱，對外力抵抗降低，但行進時不會向左側偏轉(non-circling)，紀錄為 2 分。

(4)第三級：除第二級症狀外，大鼠步行無法保持直線，行進時會向左癱瘓肢環繞(circling)，紀錄為 3 分。

### 3.4.2.3 腦梗塞面積的測定

腦切片的製造、染色與梗塞面積的測定如同上述。

## 實驗 B

### 3.4.2.4 實驗分組：

另取 24 隻 300-350 公克的 SD 大鼠，隨機分為四組，每組六隻如下

- (1)假手術組(S)：將動物兩側總頸動脈及右側中大腦動脈暴露，但不阻斷血流。
- (2)控制組(C)：將動物兩側總頸動脈及右側中大腦動脈血流 90 阻斷分鐘後，放開再灌流 24 小時，將動物犧牲取腦。
- (3)實驗組(P-200)：如同控制組，但腦血流阻斷前 30 分鐘，由腹腔注射槐花水萃取物 200 mg/kg。
- (4)對照組(PBS)：如同控制組，但腦血流阻斷前 30 分鐘，由腹腔注射 PBS 水溶液。

### 3.4.2.5 免疫組織化學染色分析

再灌流 24 小時後，以水合氯醛(400 mg/kg)腹腔注射將大鼠麻醉，然後用碎冰將鼠頭包埋，降低鼠腦溫度來防止腦蛋白質變性，並迅速以 0.9% NaCl 溶液，進行心臟灌流，待鼠腦部血液灌流乾後，再以 4%

paraformaldehyde (Merck, Germany) 300 ml 經心臟灌注固定腦組織約 10-20 分鐘，至實驗鼠四肢均僵硬時取腦。取出鼠腦再度置入裝滿 4% para-formaldehyde 之大試管內，4°C 下靜置三天，待鼠腦完全固定後將 4% paraformaldehyde 倒除，換裝 30 % Sucrose 4°C 下靜置四天，至鼠腦沈入試管底後取出鼠腦，放入塑膠鼠腦模型切盒中冠切，選取腦窗門前 1.00 mm，兩耳間 10.00 mm 處至腦窗門後 4.30 mm，兩耳間 4.70 mm 處之腦組織 (Bregma 1.00 mm, Interaura 10.00 mm 至 Bregma-4.30 mm, Interaural 4.70 mm)，即相當於實驗 A 腦冠狀切片第 3 片至第 5 片之間，將冠切選取之腦組織以前朝上後向下的方位置入由鋁薄紙做成之小圓盒中，以組織包埋劑 (tissue freezing medium, Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC) 包埋，再置入於 -80°C 冰箱中貯存備用。將冰存之鼠腦包埋組織以冷凍切片機 (cryostat, Shandon Scientific Ltd., UK)，進行厚度 20  $\mu$ m 之冠狀切片，並將切取之冠狀切片平鋪於 gelatin coated 之玻片上。4 組共 24 隻實驗鼠腦組織固定選取前窗門後 0.92 mm，兩耳間前 8.08 mm，(Bregma-0.92 mm, Interaural 8.08 mm) 之腦冠狀切片進行 ED1, IL-1 $\beta$ , Apoptosis 之免疫組織化學染色。

(1) ED1 免疫活性細胞測定：

將選取之玻片置於 37°C 恆溫箱中 10 分鐘去除水份，將烘乾之玻片置入玻片架放入內裝有 1X DPBS (Dulbecco's phosphate buffered

saline, Sigma) 的染缸中潤濕，接著將玻片架放入內裝有 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/methanol 之染缸中 15 分鐘去除內生性之 peroxidase，再次以 DPBS 洗清，將玻片擦拭後平放於染色盒上以 10 % 正常動物血清(10% Normal animal serum, LsAB kit, Zymed, San Francisco, CA) 室溫下共同培養 20 分鐘，再加入 ED1 (1:500; Serotec Ltd.) 初級抗體培養 30 分鐘，然後將玻片放回玻片架，放入內裝有 DPBS 的染缸中清洗三次，每次三分鐘；隨後玻片稍擦拭平放於染色盒加入 biotinylated 二級抗體。室溫下培養 10 分鐘，重覆上述步驟再加入 Streptavidin-peroxidase complex 培養 10 分鐘，與 DAB (Liquid DAB Substrate kit, Zymed, San Francisco, CA, USA) 呈色反應一分鐘，以水洗清終止反應，最後以 hematoxylin (Harris hematoxylin solution, Merck, Germany) 做背景染色(counter stain)，以拭鏡紙壓乾，再以封片膠(Histological Mounting Medium Permount Sp15-500, New Jersey, USA) 封片。

將染色封片完成之玻片置於顯微鏡(Zeiss Axioskop, Germany) 連接數位像機(Nikon E950, Japan) 定距以 400X 拍照，經 optia imagine 電腦圖像處理及分析照像，於 400X 下固定位置，即梗塞之核心區，固定面積(1 mm<sup>2</sup>) 進行 ED1 免疫活性細胞之定量分析。

## (2) IL-1 $\beta$ 免疫活性細胞測定：

步驟如同 ED1 染色，使用 IL-1 $\beta$  (1:400; Endogen Ltd.) 初級抗體。

### (3) Apoptosis 細胞測定：

將選取之玻片置於室溫中乾燥，將乾燥之玻片置入玻片架，放入內裝有 TBS 的染缸中潤濕，將玻片擦拭後平放於染色盒上以 proteinase K (20  $\mu$ g/ml) 室溫下共同培養 20 分鐘，然後玻片放回染缸以 TBS 清洗，隨後玻片稍擦拭平放於染色盒加入 DNase I (1  $\mu$ g/ml) 室溫下培養 20 分鐘，再以 TBS 清洗後置入內裝有 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/menthanol 之染缸中 5 分鐘去除內生性之 peroxidase，以 TBS 清洗，再將玻片擦拭後平放於染色盒中加入 1X TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) equilibration buffer 於室溫下培養 30 分鐘，隨後擦拭多餘的 1X TdT equilibration buffer，加入 TdT labeling reaction mixture，每片玻片蓋上 parafilm paper，染色盒中保持濕潤，於 37°C 恆溫箱中培養 30 分鐘後將 parafilm paper 移去，取出玻片以 TBS 清洗，隨後加入 stop buffer solution 於室溫下 5 分鐘，再以 TBS 清洗，隨後加入 blocking buffer 於室溫下 10 分鐘，再加入 1X conjugate 於室溫培養 30 分鐘，再以 TBS 清洗，接著加入 DAB solution 於室溫下反應 10-15 分鐘行呈色反應，待呈色反應完成以水清洗終止反應，最後以 methyl green 做背景染色，再用封片膠封片。將染色封片完成之玻片置於顯微鏡連接數位像機定距以 400X 拍照，以 optica imagine 電腦圖像處理及分析照像，於 400X 下固定位置，即梗塞之核心區、固定面積(1 mm<sup>2</sup>)進行 apoptosis 免疫活性細胞之定量分析。

### 3.4.2.6 統計分析

所得資料的分析方法如同上述。

## 第四章 結果

### 4.1 丹參組

#### 4.1.1 丹參對大鼠腦缺血-再灌流損傷引發腦梗塞的效用

SD 大鼠兩側總頸動脈和右側中大腦動脈血流阻斷 90 分鐘，經 24 小時再灌流之後，經 TTC 染色，梗塞區腦組織為白色，而非梗塞區的腦組織為紫紅色(圖 4.1)。腦梗塞面積之百分比，SM30 組為  $0.63 \pm 1.03\%$ ，SM15 組為  $1.63 \pm 2.19\%$ ，兩者都比 Control (cont) 組的  $9.92 \pm 2.56\%$  和 PBS 組的  $6.86 \pm 1.45\%$  小(all  $p < 0.001$ ；圖 4.1，圖 4.2)。Control 組與 PBS 組之間的腦梗塞面積之百分比相似( $p > 0.05$ ；圖 4.1，圖 4.2)

#### 4.1.2 丹參對大鼠腦缺血-再灌流損傷引起之氧化自由基的效用

Lucigenin-CL counts，Sham 組為  $39038.97 \pm 16667.91$ ，control 組為  $45588.75 \pm 21888.99$ ，SM30 組為  $45196.88 \pm 33064.88$ ，SM15 組為  $46361.77 \pm 17411.41$ ，PBS 組為  $34725.25 \pm 12764.73$ ，它們之間沒有統計上的差異(all  $P > 0.05$ ，圖 4.3)。Luminol-CL counts，Sham 組為  $397672.87 \pm 164862.77$ ，control 組為  $483805.63 \pm 94962.39$ ，SM30 組為  $197470.03 \pm 83656.73$ ，SM15 組為  $343199.72 \pm 93402.79$ ，PBS 組為  $616331.22 \pm 138568.87$ ，SM30 組比 control 組低( $P < 0.01$ ，圖 4.3)。另外，SM30 組和 SM15 組的 luminol-CL count 也比 PBS 組低 ( $P < 0.001$ ， $P < 0.05$ ，圖 4.3)。

## 4.2 槐花組

### 4.2.1 槐花對大鼠腦缺血-再灌流損傷引發腦梗塞面積的效用

SD 大鼠兩側總頸動脈和右側中大腦動脈血流阻斷 90 分鐘，經 24 小時再灌流之後，經 TTC 染色，梗塞區腦組織為白色，而非梗塞區的腦組織為紫紅色(圖 4.4)。腦梗塞面積的百分比，在 control 組為  $9.3 \pm 1.7\%$ ，P-50 組為  $9.0 \pm 2.5\%$ ，PBS 組為  $9.0 \pm 1.7\%$ ，三者都比 P-100 組的  $0.7 \pm 0.7\%$ ，P-200 組的  $1.2 \pm 1.0\%$  和 D-200 組的  $1.6 \pm 1.8\%$  大( all  $p < 0.001$ ；圖 4.4，圖 4.5)。control 組，P-50 組和 PBS 組，三者之間腦梗塞面積之百分比相似( all  $p > 0.05$ ；圖 4.4，圖 4.5)。

### 4.2.2 槐花對大鼠腦缺血-再灌流損傷引起大鼠神經學狀態的效用

SD 大鼠兩側總頸動脈和右側中大腦動脈血流阻斷 90 分鐘，經 24 小時再灌流後，都造成神經缺損。神經缺損等級，在 P-100 組是  $0.2 \pm 0.4$ ，P-200 組是  $0.5 \pm 0.5$  和 D-200 組是  $0.8 \pm 0.4$ ，都比 control 組的  $2.5 \pm 0.5$ ，P-50 組的  $2.0 \pm 0.6$  和 PBS 組的  $2.2 \pm 0.4$  低( all  $p < 0.05$ ；圖 4.6)，而 control 組，P-50 組和 PBS 組，三者之間的神經缺損等級相似(  $p > 0.05$ ；圖 4.6 )。

### 4.2.3 槐花對大鼠腦缺血-再灌流損傷引發 ED1 染色陽性細胞的效用

SD 大鼠兩側總頸動脈和右側中大腦動脈血流阻斷 90 分鐘，經 24 小

時再灌流之後，取鼠腦冠切進行免疫染色。計算從 SD 大鼠鼠腦冠切第三和第四片間右側大腦梗塞區  $1 \text{ mm}^2$  的 ED1 染色陽性細胞在控制組(C)為  $1007.3 \pm 157.4$ ，PBS 組為  $1070.0 \pm 132.1$ ，兩者都比假手術組(S)的  $125.3 \pm 67.5$  多 (both  $P < 0.001$ ；圖 4.8，表 4.1)。槐花 200 mg/kg (P-200)組為  $211.7 \pm 92.7$  比控制組(C)和 PBS 組有較少的 ED1 染色陽性細胞(both  $P < 0.001$ ；圖 4.8，表 4.1)。

#### 4.2.4 槐花對大鼠腦缺血-再灌流損傷引發 IL-1 $\beta$ 染色陽性細胞的效用

大腦梗塞區  $1 \text{ mm}^2$  的 IL-1 $\beta$  染色陽性細胞控制組(C)為  $1453.5 \pm 116.1$ ，PBS 組為  $1289.7 \pm 125.6$ ，兩者都比假手術組(S)的  $182.0 \pm 47.6$  多 (both  $P < 0.001$ ；圖 4.8，表 4.1)。槐花 200 mg/kg (P-200)組為  $394.7 \pm 57.9$  比控制組(C)和 PBS 組有較少的 ED1 染色陽性細胞(both  $P < 0.001$ ；圖 4.8，表 4.1)。

#### 4.2.5 槐花對大鼠腦缺血-再灌流損傷引起細胞凋亡(cell apoptosis)的效用

在控制組(C)為  $423.0 \pm 38.2$ ，PBS 組為  $544.2 \pm 118.1$ ，兩者都比假手術組(S)的  $0.7 \pm 1.6$  多 (both  $P < 0.001$ ；圖 4.8，表 4.1)。槐花 200 mg/kg (P-200)組是  $24.7 \pm 18.7$  比控制組和 PBS 組有較少的 ED1 染色陽性細胞(both  $P < 0.001$ ；圖 4.8，表 4.1)。

## 第五章 討論

由實驗的結果顯示大鼠兩側總頸動脈和右側中大腦動脈血流阻斷 90 分鐘，然後再灌流 24 小時後，所有大鼠都發生腦梗塞，經 TTC 染色後梗塞區為白色，而非梗塞區為紅紫色。動物行為包括左側前肢屈曲且掌指抓力減弱，對外力阻抗降低，以及大鼠行動朝向左癱瘓肢環繞的現象。這個動物模式與人類的腦梗塞非常類似<sup>(28.33)</sup>。而且大鼠的神經缺損與大腦梗塞面積具有正的相關關係<sup>(29.30)</sup>。

研究結果顯示，在大鼠兩側總頸動脈和右側中大腦動脈阻斷前 30 分鐘注射丹參 30 mg/kg 和 15 mg/kg 能減少腦梗塞面積。另外，我們在大鼠兩側總頸動脈和右側中大動脈阻斷前 30 分鐘注射槐花 100 mg/kg 和 200 mg/kg 及腦血流阻斷後 30 分鐘注射 200 mg/kg 能減少腦梗塞面積及改善腦梗塞大鼠的神經缺損。因此我們認為丹參與槐花均可用來治療人類的腦梗塞。

很多研究證實缺血-再灌流會導致組織細胞死亡如缺血性心臟疾病、腦缺血、肝臟和肺臟病疾，而 oxygen-derived free radicals 扮演了一個重要角色<sup>(130.131.132.133.134.135.136)</sup>。一些先前研究已知 oxygen free radicals 包括 superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical 和 nitric oxide 對缺血所造成神經細胞的損傷和誘發延遲性神

經細胞死亡扮演了一個關鍵性的角色<sup>(20,21)</sup>。我們的結果顯示丹參 15 mg/kg、30 mg/kg 能減少缺血-再灌流損傷大鼠的 Luminol-CL counts，而在 Lucigenin-CL counts 則沒有變化，這些結果可能與測量的時間點有關。Lucigenin-CL counts 對 superoxide anion 有反應的特定性<sup>(135,137,138)</sup>，而 Luminol-CL counts 主要是針對 reactive oxygen species，而 reactive oxygen species 包括 superoxide anion, hydroxyl radicals, hydrogen peroxide 和 hypochlorous acid 是由 activated neutrophil 產生<sup>(136,137,138,139,140,141,142)</sup>。有研究發現在腦缺血-再灌流過程中 neutrophil 是 oxygen radicals 的主要來源<sup>(131)</sup>。

當腦缺血發生時，梗塞區休息狀的 microglia 會受激發而增殖與活化成具有吞噬作用的 activated microglia，清除梗塞區的神經細胞碎片，同時在隨後的免疫反應也扮演了一個關鍵的角色<sup>(108)</sup>。有些報告指出活化的 microglia, astrocyte, oligodendrocyte, perivascular macrophage, monocyte 會分泌 IL-1 $\beta$ <sup>(112)</sup>。IL-1 $\beta$  為一強力的發炎介質，作用於血管內皮細胞及黏附細胞如 E-selectin, ICAM-1, VCAM<sup>(119)</sup>。黏附細胞促使血管內白血球黏附、滲透、聚集至缺血組織，導致缺血神經細胞損傷。又由於白血球的黏附作用，傷害到血管內皮細胞，同時增加 blood-brain barrier 的通透性導致腦水腫，更加速腦細胞的損傷<sup>(19,118,119)</sup>。

許多研究發現在中大腦動脈血流阻斷後，腦神經細胞死亡至少有二種形式：一種為早期的壞死性死亡，另一種為神經元的延遲性死亡，涉及 DNA 的損傷<sup>(127)</sup>。在缺氧、缺血的新生大鼠模式可誘發 apoptosis<sup>(27)</sup>。一些研究也說明缺血後，CA1 pyramidal 神經元延遲死亡就是 apoptosis<sup>(143, 144, 145)</sup>。它的產生牽涉到不同的機轉，有別於 necrosis。Apoptosis 發生在較緩和的缺血區，在腦中風的療法上可當作一個指標發展成為一個治療窗口<sup>(26, 27)</sup>。而且，一些研究也說明在腦缺血、缺氧下由於 glutamate 的釋出，氫氧自由基、超氧自由基、一氧化氮自由基的產生及神經細胞發炎、細胞激素、黏附細胞和 IL-1 $\beta$  等皆參與了 apoptosis 的產生<sup>(128, 129)</sup>。

先前研究已知丹參為一很強的 superoxide anion 清除劑，對豬心肌缺血-再灌流模式中由於氧壓力(oxygen stress)所致的脂質過氧化具有保護作用，而且可改善微循環和降低血小板的凝集<sup>(146)</sup>。此外，也有研究說明在兔子心肌梗塞模式，丹參具有抑制循環中 neutrophil 的功能<sup>(86)</sup>。槐花與銀杏(Ginkgo biloba)均含有相同的成分 Rutin 與 Quercetin<sup>(6, 7, 8, 9, 10)</sup>。許多研究指出，銀杏的萃取物在缺血-再灌流動物模式中具有清除自由基、降低自由基生成、減少脂質過氧化、減少腦梗塞面積的作用<sup>(12, 13)</sup>。

本研究結果顯示丹參 15 mg/kg 、30 mg/kg 能減少缺血-再灌流損傷大鼠的腦梗塞面積和 Luminol-CL counts。槐花 100、200 mg/kg 於腦血流阻斷前 30 分鐘給藥；200 mg/kg 於腦血流阻斷後 30 分鐘給藥都能減少缺血-再灌流損傷大鼠的腦梗塞面積和神經缺損狀態。而且槐花 200 mg/kg 於腦血流阻斷前 30 分鐘給藥能減少缺血-再灌流大鼠腦梗塞區的 ED1、IL-1 $\beta$  染色陽性細胞和 apoptosis 細胞的數目。丹參抗腦梗塞的作用可能與自由基的清除有關，而槐花減少腦梗塞面積的作用與抑制發炎細胞 microglia、IL-1 $\beta$  和 apoptosis 有關。

## 第六章 結論

結果顯示丹參 15 mg/kg、30 mg/kg 能減少大鼠腦缺血-再灌流損傷引發的梗塞面積和 Luminol-CL counts。槐花 100、200 mg/kg 於腦血流阻斷前 30 分鐘給藥；200 mg/kg 於腦血流阻斷後 30 分鐘給藥都能減少大鼠腦缺血-再灌流損傷引發的腦梗塞面積和神經缺損狀態。而且槐花 200 mg/kg 於腦血流阻斷前 30 分鐘給藥能減少大鼠腦缺血-再灌流引發腦梗塞區的 ED1、IL-1 $\beta$  染色陽性細胞和 apoptosis 細胞的數目。丹參減少腦梗塞面積的作用部份與自由基的清除有關，而槐花減少腦梗塞面積的作用與抑制發炎細胞 microglia、IL-1 $\beta$  和 apoptosis 有關。丹參和槐花可以使用來治療人類的腦梗塞



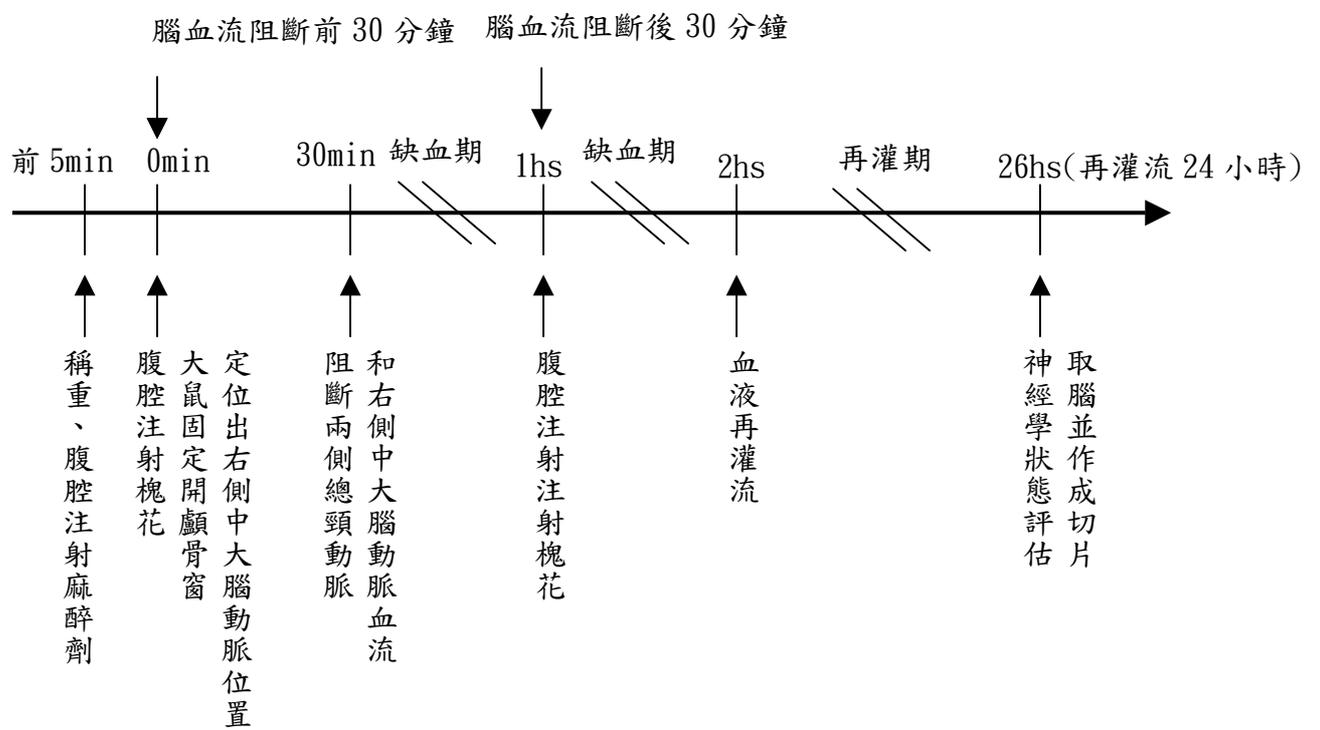


圖 3.2 槐花組之實驗流程

grade 0

grade 1

grade2

### 3.3 腦梗塞大鼠之神經狀態

grade 3

3.1

3.2

3.3

圖 3.3 腦梗塞大鼠之神經狀態

圖 4.1 丹參(SM)對大鼠腦缺血-再灌流引損傷發腦梗塞之效用。

SD 大鼠兩側總頸動脈和右側中大腦動脈血流阻斷 90 分鐘，經 24 小時再灌流，犧牲動物取腦，作成切片(2 mm厚)。經 TTC 染色後，梗塞區為白色，而非梗塞區為紫紅色，腦梗塞區域隨著丹參劑量增加而隨著減少。

Sham：將 SD 大鼠兩側頸總動脈及右側中大腦動脈暴露，但不阻斷血流。

Cont：將 SD 大鼠兩側頸總動脈及右側中大腦動脈血流阻斷 90 分鐘後放開，經 24 小時再灌流後，將動物犧牲取腦。

SM30：如同 Cont 組，但於腦血流阻斷前 30 分鐘，腹腔注射丹參 30 mg/kg。

SM15：如同 Cont 組，但於腦血流阻斷前 30 分鐘，腹腔注射丹參 15 mg/kg。

PBS：如同 SM30 組，但於腦血流阻斷前 30 分鐘，腹腔注射 PBS 溶液。

圖 4.2 丹參(SM)對大鼠腦缺血-再灌流損傷引發腦梗塞之效用。

大鼠於腦血流阻斷前注射丹參 30 mg/kg、15 mg/kg 都能夠劑量相關的減少腦梗塞面積。%：腦梗塞面積與切片總面積之百分比。n 為樣本數。### P<0.001 值與 control 組比較；@@@ P<0.001 值與 PBS 組比較。以 scheffe' s test 分析

Sham(n=6)：將 SD 大鼠兩側頸總動脈及右側中大腦動脈暴露，但不阻斷血流。

Cont(n=6)：將 SD 大鼠兩側頸總動脈及右側中大腦動脈血流阻斷 90 分鐘後放開，經 24 小時再灌流後，將動物犧牲取腦。

SM30(n=6)：如同 Cont 組，但於腦血流阻斷前 30 分鐘，腹腔注射丹參 30 mg/kg。

SM15(n=6)：如同 Cont 組，但於腦血流阻斷前 30 分鐘，腹腔注射丹參 15 mg/kg。

PBS(n=6)：如同 SM30 組，但於腦血流阻斷前 30 分鐘，腹腔注射 PBS 溶液。

(conts)

CL-Count

圖 4.3 丹參(SM)對大鼠腦缺血-再灌流後血液 lucigenin-CL 和 luminol-CL counts 的影響。

丹參 30 mg/kg 和 15 mg/kg 分別於腦血流阻斷前 30 分鐘腹腔注射給藥都能減少周邊血液 luminol-CL counts (  $p < 0.05$  )。

但對 lucigenine-CL counts 則沒有作用(  $p > 0.05$  )。各組 n=6。

##  $P < 0.01$  值與 control 組比較;@  $p < 0.05$ ,@@@  $p < 0.001$  值與 PBS 組比較，以 scheffe' s test 分析。

圖 4.4 槐花(SJ)對大鼠腦缺血-再灌流引發腦梗塞之效用。

SD 大鼠兩側總頸動脈和右側中大腦動脈血流阻斷 90 分鐘，經 24 小時再灌流，犧牲動物取腦，作成切片(2 mm厚)。經 TTC 染色，梗塞區為白色，而非梗塞區為紫紅色，腦梗塞區域隨著槐花劑量的增加而隨著減少。

S：將 SD 大鼠兩側頸總動脈及右側中大腦動脈暴露，但不阻斷血流。

C：將 SD 大鼠兩側頸總動脈及右側中大腦動脈血流阻斷 90 分鐘後放開，經 24 小時再灌流後，將動物犧牲取腦。

P-50：如同 C 組，但於腦血流阻斷前 30 分鐘，腹腔注射槐花 50 mg/kg。

P-100：如同 P-50，但於腦血流阻斷前 30 分鐘，腹腔注射槐花 100 mg/kg。

P-200：如同 P-50，但於腦血流阻斷前 30 分鐘，腹腔注射槐花 200 mg/kg。

PBS：如同 P-50，但於腦血流阻斷前 30 分鐘，腹腔注射 PBS 溶液。

D-200：如同 C 組，但於腦血流阻斷後 30 分鐘，腹腔注射槐花 200 mg/kg。

圖 4.5 槐花(SJ)對大鼠腦缺血-再灌流損傷引發腦梗塞之效用。

大鼠於腦血流阻斷前注射槐花 100 mg/kg、200 mg/kg 及腦血流阻斷後注射槐花 200 mg/kg，都能夠減少大鼠腦梗塞面積。\*\*\*  $p < 0.001$  值與 S 比較；###  $P < 0.001$  值與 C 比較；@@@  $p < 0.001$  值與 P-50 組比較；&&&  $p < 0.001$  值與 PBS 比較。以 scheffe' s test 分析。  
S(n=6)：將 SD 大鼠兩側頸總動脈及右側中大腦動脈暴露，但不阻斷血流。  
C( n=6)：將 SD 大鼠兩側頸總動脈及右側中大腦動脈血流阻斷 90 分鐘後放開，經 24 小時再灌流後，將動物犧牲取腦。

P-50(n=6)：如同控制組，但於腦血流阻斷前 30 分鐘，腹腔注射槐花 50 mg/kg。

P-100(n=6)：如同 P-50，但於腦血流阻斷前 30 分鐘，腹腔注射槐花 100 mg/kg。

P-200(n=6)：如同 P-50，但於腦血流阻斷前 30 分鐘，腹腔注射槐花 200 mg/kg。

PBS(n=6)：如同 P-50，但於腦血流阻斷前 30 分鐘，腹腔注射 PBS 溶液。

D-200(n=6)：如同控制組，但於腦血流阻斷後 30 分鐘，腹腔注射槐花 200 mg/kg。

圖 4.6 槐花(SJ)對大鼠腦缺血-再灌流損傷神經缺損之效用。

大鼠於腦血流阻斷前注射槐花 100 mg/kg、200 mg/kg 及腦血流阻斷後注射槐花 200 mg/kg，都能夠改善大鼠的神經缺損狀態。

Grade：神經狀態等級。\*\*\*  $p < 0.001$  值與 S 比較；###  $p < 0.001$  值與 C 比較；@  $p < 0.05$ ，@@@  $p < 0.001$  值與 P-50 比較；&&  $p < 0.01$ ，&&&  $p < 0.001$  值與 PBS 比較。以 scheffe' s test 分析。

圖 4.7 從前額葉算起第三片大鼠腦組織之冠狀切片。  
白色區域為梗塞區腦組織，紫紅色為非梗塞區腦組織。梗塞區中的點狀  
正方形為計算 ED1、interleukin-1 $\beta$  免疫染色陽性細胞與 apoptosis 細  
胞之區域。

圖 4.8 槐花(SJ)對大鼠腦缺血-再灌流損傷引發腦梗塞區 ED1、interleukin-1 $\beta$  染色陽性細胞和 apoptosis 細胞的效用。

S 組的 ED1、IL-1 $\beta$  和 apoptosis 不明顯，但在 C 組和 PBS 組則大量增加，而 P-200 組則增加不明顯。

ED1：ED1 染色陽性細胞；IL-1 $\beta$ ：interleukin-1 $\beta$  染色陽性細胞；Apoptosis：apoptotic 細胞；S：sham 組；C：control 組；P-200：槐花 200 mg/kg 組；PBS：PBS 溶液組

表 4.1 槐花(SJ)對大鼠腦缺血-再灌流損傷引發腦梗塞區 ED1、interleukin-1 $\beta$  染色陽細胞和 apoptosis 細胞的效用。

Group	ED1	IL-1	Apoptosis
S	125.3 $\pm$ 67.5	182.0 $\pm$ 47.6	0.7 $\pm$ 1.6
C	1007.3 $\pm$ 157.4*	1453.5 $\pm$ 116.1*	423.0 $\pm$ 38.2*
P-200	211.7 $\pm$ 92.7#@	394.7 $\pm$ 57.9#@	24.7 $\pm$ 18.7#@
PBS	1070.0 $\pm$ 132.1*	1289.7 $\pm$ 125.6*	544.2 $\pm$ 118.1*

S(n=6)：將 SD 大鼠兩側頸總動脈及右側中大腦動脈暴露，但不阻斷血流。

C(n=6)：將 SD 大鼠兩側頸總動脈及右側中大腦動脈血流阻斷 90 分鐘後放開，經 24 小時再灌流後，將動物犧牲取腦。

P-200(n=6)：如 C 組，但於腦血流阻斷前 30 分鐘，腹腔注射槐花 200 mg/kg。

PBS(n=6)：如 C 組，但於腦血流阻斷前 30 分鐘，腹腔注射 PBS 溶液。

ED1：ED1 染色陽性細胞。IL-1 $\beta$ ：interleukin-1 $\beta$  染色陽性細胞。

Apoptosis：apoptotic 細胞。\* P<0.001 值與 S 比較；

# P<0.001 值與 C 比較；@ P<0.001 值與 PBS 組比較。以 scheffe's test 分析。

## 參 考 文 獻

1. 張寓智主編：臨床神經學，合記圖書出版社，P230，2002.
2. Bednar, Martin M. MD, PhD; Cordell E. Cross, MD. Antiplatelet therapy in acute cerebral ischemia. Bednar and Gross : 887-893, 1999.
3. Sun, X.H. Therapeutic Principle of Chinese Medicine. Zhi-Yin Publisher, 1992, pp. 246-268.
4. Chen, C. The Method in Pharmacological Research of Chinese Herbs, 1st ed.. People Sanitation Publishers, 1996, pp. 558-573.
5. 鄭虎占、董澤宏：中藥現代研究與應用，學苑出版社，P446-4474，1997.
6. 徐志：槐米炭凝血止血作用的實驗研究，廣西中醫藥，13(1)：44，1990.
7. Chen, S. and Chen, J. Experimental study on extraction of rutin from flower bud of Pagoda tree with supercritical CO<sub>2</sub>. J. Jiangsu University of Science and Technology. 17: 7-9, 1996.
8. Liu, J.D., Qian, Y.C. and Wang, Z.L. Comparison effective compositions between flower of *Sophora japonica* L. and *S. japonica* L. f. *pendula* Lound. Arb. Brit. Primary J. Chinese Materia Medica 16: 17-18. 2002.

9. Qian, Y.C., Liu, J.D., Zhang, S.F., Zou, C.Y. and Yu, W.P. Determination of rutin in flowers of *Sophora japonica* L. f. *pendula* Lound. *Arb. Brit. Research and Practice of Chin. Med.* 17: 17-18, 2003.
10. Ellnain-Wojtaszek, M., Kruczynski, Z. and Kasprzak, J. Investigation of the free radical scavenging activity of *Ginkgo biloba* L. leaves. *Fttoterapia* 74: 1-6, 2003.
11. Nishida, S. and Satoh, H. Comparative vasodilating actions among terpenoid and flavonoids contained in *Ginkgo biloba* extract. *Clinica Chimica Acta* 339: 129-133, 2004.
12. Clark, W.M., Rinker, L.G., Lessov, N.S., Lowery, S.L. and Cipolla, M.J. Efficacy of antioxidant therapies in transient focal ischemia in mice. *Stroke* 32: 1000-1004, 2001.
13. Ikeda, K., Negishi, H. and Yamori, Y. Antioxidant nutrients and hypoxia/ischemia brain injury in rodents. *Toxicology* 189: 55-61, 2003.
14. Pincemail, J., Dupuis, M., Nasr, C., Hands, P., Haag-Berrurier, M., Anton, R. and Deby, C. Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of *Ginkgo biloba* extract. *Experimentia* 45: 708-712, 1989.
15. Oyama, Y., Chikahisa, L., Ueha, T., Kanemaru K. and Noda, K. *Ginkgo biloba* extract protects brain neurons against oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Brain Res.* 712: 349-352, 1996.

16. Curtis-Prior, P., Vere, D. and Fray, P. Therapeutic value of ginkgo biloba in reducing symptoms of decline in mental function. *J. Pharm. Pharmacol.* 51: 535-541, 1999.
17. LeBars, P.L., Katz, M. M., Berman, N., Itil, T. M., Freedman, A. M., Schatzberg, A.F. A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of an extract of ginkgo biloba for dementia. *JAMA* 278: 1327-1332, 1997.
18. Jos Kleijnen, Paul Knipschild. Ginkgo biloba. *Lancet*: 340, 1136-1139, 1992.
19. Hallenbeck, J.M. and Dutka, A.J. Background review and current concepts of reperfusion injury. *Arch. Neurol.* 47: 1245-54, 1990.
20. Nelson, C.W., Wei, E.P., Povlishock, J.T., Kontos, H.A. and Moskowitz, M.A. Oxygen radicals in cerebral ischemia. *Am J Physiol Society* 263: H1356-H1362, 1992.
21. Chan, P.H. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 27: 1124-1129, 1996.
22. Kitagawa, K., Matsumoto, M., Oda, T., Niinobe, M., Hata, R., Handa, N., Fukunaga, R., Isaka, Y., Kimura, K., Maeda, H., Mikoshiba, K. and Kamada, T. Free radical generation during brief period of cerebral ischemia may trigger delayed neuronal death. *Neuroscience* 35(3): 551-8, 1990.

23. Kreutzberg, G.W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *TINS* 19(8): 312-318, 1996.
24. Giulian, D., Baker, T. J., Shih, L. N. and Lachman, L.B. Interleukin-1 of the central nervous system is produced by ameboid microglia. *J. Exp. Med.* 164: 594-604, 1986.
25. Lindholm, D., Heumann, R., Meyer, M. and Thoenen, H. Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in nonneuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature* 330: 658-659, 1987.
26. Linnik, M.D., Zobrist, R. H. and Hatfield, M. D. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 24: 2002-2009, 1993.
27. Pulera, M.R., Adams, L. M., Liu, H., Santos, D.G., Nishimura, R. N., Yang, F., Cole, G. M. and Wasterlain, C.G. Apoptosis in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia. *Stroke* 29: 2622-2630, 1998.
28. Hsieh, C.L., Liao, E.T., Chiang, S. Y., Lao, C. J., Tang, N. Y., Hsieh, C. T. and Lin, J.G. Effect of *Rhizoma Corydalis* on focal cerebral infarct in ischemia-reperfusion injured rats. *Acta Pharmacol Sin.* 22(12): 1143-8, 2001.
29. Ginsberg M., Busto R. Rodent models of cerebral ischemia, *Stroke.* 20(12) : 1642-4672, 1989.

30. Brint Steve, Jacewicz Michael, Kiessling Marika, Tanabe Jody, and Pulsinelli William. Focal brain ischemia in the rat: methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries. *J. cerebral. Blood Flow Meta.* 8: 474-485, 1988.
31. Ito, W.D., Schaarschmidt, S., Klask, R., Hansen, S., Schafer, H. J., Mathey, D. and Bhakdi, S. Infarct size measurement by triphenyltetrazolium chloride staining versus in vivo injection of propidium iodide. *J. Mol. Cell Cardiol.* 29: 2169-75, 1997.
32. Yang, Y., Shuaib, A. and Li, Q. Quantification of infarct size on focal cerebral ischemia model of rats using a simple and economical method. *J Neurosci Meth.* 84: 9-16, 1998.
33. Bederson, J.B., Pitts, L. H., Tsuji, M., Nishimura, M. C., Davis, R. L. and Bartkowski, H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 17(3): 472-6, 1986.
34. 王冰著：黃帝內經素問，文光圖書有限公司，P277， 1975。
35. 張伯臾編：中醫內科學，知音出版社，p452， 1989。
36. 王冰著：黃帝內經素問，文光圖書有限公司，p114， 1975。
37. 王冰著：黃帝內經素問，文光圖書有限公司，p369， 1975。

38. 王冰著：黃帝內經素問，文光圖書有限公司，p160，1993。
39. 張仲景著；金匱要略方論，知音出版社，P131，1990。
40. 巢元方著：諸病源侯論，國立中國醫藥研究所，P1，1981。
41. 孫思邈著：千金要方，中國中醫藥出版社，P146-148，1998。
42. 劉完素著：素問玄機原病式。金元四大書醫學全書，天津科學技術出版社，P26-33，1996。
43. 李東垣著：東垣醫集，人民衛生出版社，P306-311，1996。
44. 朱震亨著：丹溪心法·金元四大家全書，天津科學技術出版社，P1125-1129，1996。
45. 張景岳著：張景岳醫學全書，中國中醫藥出版社，P984-1001，1999。
46. 李中梓著：醫宗必讀·李中梓醫學全書，中國中醫藥出版社，P181-191，1999。
47. 程鐘齡著：醫學心悟·中國醫學大成(46)，牛頓出版股份有限公司，P56-58，1990。
48. 葉天士著：臨證醫案指南，上海科學技術出版社，P1-18，1993。
49. 王清任著：醫材改錯·中國醫學大成(22)，牛頓出版股份有限公司，P5-12，1990。

50. Molinari, G.F. Why model strokes (editorial)? *Stroke*. 19: 1195-1197, 1988.
51. Molinari, G.F., Laurent, J. P. A classification of experimental models of brain ischemia. *Stroke*. 7: 14-17, 1976.
52. Garcia, J.H. Experimental ischemic stroke. A review. *Stroke*. 15: 5-14, 1984.
53. Ponten, U., Ratcheson, R. A., Salford, L. G. Optimal freezing conditions for cerebral metabolites in rats. *J Neurochem*. 21: 1127-1138, 1973.
54. Eklof, B., Siesjo, B. K. The effect of bilateral carotid artery ligation upon the blood flow and energy state of the rat brain. *Acta Physiol Scand*. 86: 155-165, 1972.
55. Smith, M-L., Bendek, G., Dahlgren, N., Rosen, I., Wieloch, T., Siesjo, B. K. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta Neurol Scand*. 69: 385-401, 1984.
56. Smith, M-L., Auer, R. N., Siesjo, B. K. The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)*. 64: 319-332, 1984.
57. Pulsinelli, W.A., Brierley, J. B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*. 10:

- 267-272, 1979.
58. Brown, A.W., Brierley, J. B. The nature, distribution and earliest stages of anoxic-ischemic nerve cell damage in the rat brain as defined by the optical microscope. *Br J Exp Pathol.* 49: 87-106, 1968.
  59. Pulsinelli, W.A., Brierley, J. B., Plum, F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol.* 11: 491-498, 1982.
  60. Volpe, B.T., Pulsinelli, W. A., Tribuna, J., Davis, H. P. Behavioral performance of rats following transient forebrain ischemia. *Stroke.* 15: 558-562, 1984.
  61. Siemkowicz, E., Hansen, A. J. Clinical restitution following cerebral ischemia in hypo-, normo- and hyperglycemic rats. *Acta Neurol Scand.* 58: 1-8, 1978.
  62. Yoshida, S., Busto, R., Watson, B. D., Santiso, M., Ginsberg, M.D. Postischemic cerebral lipid peroxidation in vitro: Modification by dietary vitamin E. *J Neurochem.* 44: 1593-1601, 1985.
  63. Abe, K., Yoshida, S., Watson, B.D., Busto, R., Kogure, K., Ginsberg, M. D. Alpha-tocopherol and ubiquinones in rat brain subjected to decapitation ischemia. *Brain Res.* 273: 166-169, 1983.
  64. Yoshida, S., Harik, S. I., Busto, R., Santiso, M., Martinez, E., Ginsberg, M. D. Free fatty acids and energy metabolites in ischemic cerebral cortex with noradrenaline depletion. *J*

Neurochem. 42: 711-717, 1984.

65. Ikeda, M., Yoshida, S., Busto, R., Santiso, M., Ginsberg, M. D. Polyphosphoinositides as a probable source of brain free fatty acids accumulated at the onset of ischemia, *J Neurochem.* 47: 123-132, 1986.
66. Levine, S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol.* 36: 1-17, 1960.
67. Tamura, A., Graham, D. I., McCulloch, J., Teasdale, G. M. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1: 53-60, 1981.
68. Mohamed, A. A., Gotoh, O., Graham, D. I., Osborne, K. A., McCulloch, J., Mendelow, A. D., Teasdale, G. M., Harper, A. M. Effect of pretreatment with the calcium antagonist nimodipine on local cerebral blood flow and histopathology after middle cerebral artery occlusion. *Ann Neurol.* 18: 705-711, 1985.
69. Gotoh, O., Mohamed, A. A., McCulloch, J., Graham, D. I., Harper, A. M., Teasdale, G. M. Nimodipine and the haemodynamic and histopathological consequences of middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 6: 321-331, 1986.

70. Okamoto, K., Yamori, Y., Nagaoka, A. Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHR). *Circ Res.* 34-35 (Suppl I): I-143 - I-153, 1974.
71. Fujishima, M., Ishitsuka, T., Nakatomi, Y., Tamaki, K., Omae, T. Changes in local cerebral blood flow following bilateral carotid occlusion in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Stroke.* 12: 874-876, 1981.
72. Ogata, J., Fujishima, M., Morotomi, Y., Omae, T. Cerebral infarction following bilateral carotid artery ligation in normotensive and spontaneously hypertensive rats: A pathological study. *Stroke.* 7: 54-60, 1976.
73. Brint, S., Jacewicz, M., Kiessling, M., Tanabe, J., Pulsinelli, W. Focal brain ischemia in the rat: Methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries. *J Cereb Blood Flow Metab.* 8: 474-485, 1988.
74. Duverger, D., MacKenzie, E. T. The quantification of cerebral infarction following focal ischemia in the rat: Influence of strain, arterial pressure, blood glucose concentration, and age. *J Cereb Blood Flow Metab.* 8: 449-461, 1988.
75. Shigeno, T., Teasdale, G. M., McCulloch, J., Graham, D. I. Recirculation model following MCA occlusion in rats. *J Neurosurg.* 63: 272-277, 1985.

76. Rosenblum, W. I., El-Sabban, F. Platelet aggregation in the cerebral microcirculation. Effect of aspirin and other agents. *Stroke*. 40: 320-328, 1977.
77. Watson, B. D., Dietrich, W. D., Busto, R., Wachtel, M. S., Ginsberg, M. D. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol*. 17: 497-504, 1985.
78. 駱和生：中藥免疫藥理與臨床，北京醫科大學、中國協和醫科大學聯合出版社，P326-327，1999。
79. 孫馮翼，孫星衍輯錄：神農本草經，五洲出版社，P29，1992。
80. 李時珍著：本草綱目，中國中醫藥出版社，P323，1998。
81. 謝明村編著：中國藥材學，正中書局，P389-392，1988。
82. 鄭虎占、董澤宏：中藥現代研究與應用，學苑出版社，P1093-1193，1997。
83. 楊雲、馮衛生：中藥化學成份提取分離手冊，中國中醫藥出版社，P65-66，1998。
84. 江文德、陳玉華、王迎平：丹參素及兩種水溶性丹參成分抗心肌缺血和對冠狀動脈作用的研究，上海第一學院學報，9(1):13，1982。
85. 董忠田：丹參水溶性成份[ $\beta$ (3,4-二羥基苯基)]乳酸等藥物對豬冠狀動脈的作用，上海第一學院學報，8(1):79，1981。

86. 李曉輝，唐汝愚：丹參酮抑制中性白細胞功能與防治心肌梗死作用關係，中國藥理學報，12(3): 269， 1991。
87. 張方增：丹參對重型肝炎補體活化的抑制作用，中國中西結合雜誌，14(7): 445， 1994。
88. 戚心廠，稻恒豐：丹參、亦芍對實性肝損傷細胞保護作用的研究，中西醫結合雜誌，11: 102-104， 1991。
89. 金珍靖：丹參和白細胞介素-2 對實驗性肝纖維化老鼠五種光譜的影響，臨床肝膽病雜誌，9(1): 30， 1997。
90. 牟永方：丹參和小劑量醋柳酸預防實驗性動脈粥樣硬化的初步觀察，中華老年醫學雜誌，6(4): 254，1987。
91. 王朋、和穎、范並明：水蛭、丹參對實驗性動脈粥樣硬化及纖溶系統的影響，心肺血管雜誌，15(1): 52，1996。
92. 張慧云：丹參對中樞神經系統的抑制作用，藥學學報，14(5): 288，1979。
93. 龔珊：複方丹參(H<sub>3</sub>O<sub>3</sub>)對鼠腦密閉性缺氧存活率及腦梗塞範圍的影響，蘇州醫學院學報 16(1): 25， 1996。
94. 張偉：丹參防治新生大鼠缺氧缺血性腦病長期療效觀察，北京醫學 18(1): 14， 1996。
95. 張劍寧：實驗性腦損傷後，細胞變形性能力改變及丹參的影響，中國神經精神疾病雜誌，22(1): 39， 1996。

96. 任光友、謝寶忠：現代中藥藥理學，P792-794，1898。
97. 李時珍著：本草綱目，中國中醫藥出版社，P855，1998。
98. 汪昂編著：本草備要註釋，五洲出版社，P16，1981。
99. 楊雲、馮衛生：中藥化學成份提取分離手冊，中國中醫藥出版社，P360-361，1998。
100. 國家醫藥管理局中草藥情報中心站編：植物藥有效成份手冊，人民衛生出版社，P876，1986。
101. 劉壽山：中藥研究文獻摘要，北京科學出版社，P741，1961。
102. 郭治彬：抗心律失常生物碱的研究進展，中國藥理學通報，11(4)：276，1995。
103. 王淑蘭：槐角提取液的藥理作用與研究，張家口醫學院學報，10(2)：1，1993。
104. 梁克軍：槐米及其黃酮類化合物，山西醫藥雜誌，7(1)：53，1979。
105. 謝明村編著：中國藥材學，正中書局，P452-454，1988。
106. Giulian, D., Ameboid microglia as effects of inflammation in the central nervous system, J. Neurosci. Res., 18 : 155-171, 1987.

107. Tzeng, S.F. and Wu, J.P. Responses of microglia and neural progenitors to mechanical brain injury. *NeuroReport* 10: 2287-2292, 1999.
108. Morioka, T., Kalehua, A.N. and Streit, W.J. The microglial reaction in the rat dorsal hippocampus following transient forebrain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Meta.* 11: 966-973, 1991.
109. Korematsu, K., Goto, S., Nagahiro, S. and Ushio, Y. Microglia response to transient focal cerebral ischemia: an immunocytochemical study on the rat cerebral cortex using anti-phosphotyrosine antibody. *J. Cereb. Blood. Flow Meta.* 14: 825-830, 1994.
110. Stevens, S.L., Bao, J., Hollis, J., Lessov, N.S., Clark, W.M. and Stenzel-Poore, M.P. The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cells following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res.* 932: 110-119, 2002.
111. Boje, K.M. and Arora, P.K. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediated neuronal cell death. *Brain Res.* 587: 250-256, 1992.
112. Chao, C.C., Wu, S., Molitor, T.W., Shaskan, E.D. and Peterson, P.K. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J. Immunol.* 149: 2736-2741, 1992.

113. Sairanen, T.R., Lindsberg, P.J., Brenner, M. and Siren, A.L. Cereb, J. Global forebrain ischemia results in differential cellular expression of interleukin-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) and its receptor at mRNA and protein level. *J. Cereb. Blood. Flow Meta.* 17: 1107-1120, 1997.
114. Hetier, E., Ayala, J., Deneffe, P., Bousseau, A., Rouget, P., Mallant, M. and Prochiantz, A. Brain macrophages synthesize interleukin-1 and interleukin-1 mRNA in vitro. *J. Neurosci. Res.* 21: 391-397, 1988.
115. Liu, T., Mc Donnell, P.C., Young, P.R., White, R.F., Siren, A.L., Hallenbeck, J.M., Barone, F.C. and Feuerstein, G.Z. Interleukin-1  $\beta$  mRNA expression in ischemic rat cortex. *Stroke* 24: 1746-1751, 1993.
116. Zhang, Z., Chopp, M., Goussev, A. and Powers, C. Cerebral vessels express interleukin-1  $\beta$  after focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 784: 210-217, 1998.
117. Zhang Ruilan, Chopp Michael, Zhang Zhenggang, Jiang Ning, Powers Cecylia. The expression of P. and E-selectins in three models of middle cerebral artery occlusion. *Brain Res.* 785: 207-214, 1998.
118. Yamasaki, Y., Matsuura, N., Shozuhara, H., Onodera, H., Itoyama, Y. and Kogure, K. Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke* 26: 676-681, 1995.

119. Zhang, R.L., Chopp, M., Jiang, N., Tang, W.X., Probst, J., Manning, A.M. and Anderson, D.C. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the wistar rat. *Stroke* 26: 1438-1443, 1995.
120. Yoshiyuki Matsuo, Onodera Hiroshi, Shiga Yusei, Shozuhara Hidetaka, Ninomiya Mitsuyoshi, et al. Role of cell adhesion molecules in brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Res.* 656: 344-352, 1994.
121. Richard G. Knowles, Moncada Salvador. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 298: 249-258, 1994.
122. Berger C. Von Kummer R: Dose NO regulate the cerebral blood flow response in hypoxia? *Acta Neurol Scand.* 97(2): 118-25, 1998.
123. Malinski T, Bailey F, Zhang ZG, and Chopp M: Nitric oxid measured by a prophyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J cereb Blood Flow Metab.* 13(3): 355-8, May 1993.
124. Pulera, Mark R. MD; Lisa M. Adams; Hantao Liu, MD; Donaldson G. Santos; Robert N. Nishimura, MD; Fusheng Yang, MD; Greg M. Cole, PhD; Glaude G. Wasterlain, MD. Apoptosis in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia. *Stroke:* 2622-2629, December. 1998.

125. Xuesong Liu, Zou Hua, slaughter clive, Wang Xiaodong, DFF, a Heterodimeric Protein That functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89: 175-184, April, 1997.
126. Charriaut-Marlangue, Margaille, I., Represa, A., Popovici, T., Plotkine, M. and Ben-Ari, Y. Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis. *J. Cereb. Blood Flow Meta.* 16: 186-194, 1996.
127. Velier, J.J., Ellison, J.A., Kikly, K.K., Spera, P.A., Barone, F.C. and Feuerstein, G.Z. Caspase-8 and Caspase-3 are expression by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat. *J. Neurosci.* 19(14): 5932-5941, 1999.
128. MacManus, J.P. and Linnik, M.D. Gene expression induced by cerebral ischemia: an apoptotic perspective. *J. Cereb. Blood Flow Meta.* 17: 815-832, 1997.
129. Blibol, B. F. soylemezoglu, Unal, I., Fujii, M., Hirt, L., Huang M., P.L., Moskowitz, A., Dalkara, T. : Nitric oxide is involved in ischemia-induced apoptosis in brain: A study in neuronal nixtric oxide synthase null mice. *Neuroscience.* 105: 79-86, 2001.
130. McCord, J.M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Engl. J. Med.* 312(3): 159-163, 1985.

131. Henry, T.D., Archer, S.L., Nelson, D., Kenneth Weir, E. and From, A.H.L. Enhanced chemiluminescence as a measure of oxygen-derived free radical generation during ischemia and reperfusion. *Circ. Res.* 67(6): 1453-1461, 1990.
132. Turrens, J.F., Freeman, B.A., Levitt, J.G. and Crapo, J.D. The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch. Biochem. Biophys.* 217(2): 401-410, 1982.
133. Werns, S.W. and Lucchesi, B.R. Free radicals and ischemic tissue injury. *Tips(II)*: 161-166, 1990.
134. Caraceni, P., Rosenblum, E.R., van Thiel, H.D. and Borle, A.B. Reoxygenation injury in isolated rat hepatocytes: relation to oxygen free radicals and lipid peroxidation. *Am. J. Physiol.* 266: G799-G806, 1994.
135. Maxwell, S.R.J. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 49(3): 345-361, 1995.
136. Dirnagl, U., Lindauer, U., Them, A., Schreiber, S., Pfister, H.W., Koedel, U., Reszka, R., Freyer, D. and Villringer, A. Global cerebral ischemia in the rat: online monitoring of oxygen free radical production using chemiluminescence in vivo. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15: 929-940, 1995.

137. Hsieh, C.L., Tang, N.Y., Chiang, S.Y., Hsieh, C.T. and Lin, J.G. Anticonvulsive and free radical scavenging actions of two herbs, *Uncaria rhynchophylla* (Miq) Jack and *Gastrodia elata* Bl., in kainic acid-treated rats. *Life Sci.* 65(20): 2071-2082, 1999a.
138. Hsieh, C.L., Chang, C.H., Chiang, S.Y., Li, T.C., Tang, N.Y., Pon, C.Z., Hsieh, C.T. and Lin, J.G. Anticonvulsive and free radical scavenging activities of vanillyl alcohol in ferric chloride-induced epileptic seizures in Sprague-Dawley rats. *Life Sci.* 67: 1185-1195, 2000.
139. Kaever, V., Robitzsch, J.T., Stangel, W., Schleinkofer, L. and Resch, K. Simultaneous detection of whole blood chemiluminescence in microtitre plates. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 30(4): 209-216, 1992.
140. Sun, J.S., Hang, Y.S., Huang, I.H. and Lu, F.J. A simple chemiluminescence assay for detecting oxidative stress in ischemic limb injury. *Free Radic. Biol. Med.* 20(1): 107-112, 1996.
141. Takahashi, R., Edashige, K., Sato, E.F., Inoue, M., Matsuno, T. and Utsumi, K. Luminol chemiluminescence and active oxygen generation by activated neutrophils. *Arch. Biochem. Biophys.* 285(2): 325-330, 1991.

142. Matsuo, Y., Kihara, T., Ikeda, M., Ninomiya, M., Onodera, H. and Kogure, K. Role of neutrophils in radical production during ischemia and reperfusion of the rat brain: effect of neutrophil depletion on extracellular ascorbyl radical formation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15:941-947, 1995.
143. Nitatori, T., Sato, N., Waguri, S., Karasawa, Y., Araki, H., Shibantai, K., Kominami, E. and Uchiyama, Y. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J. Neuroscience.* 15: 1001-1011, 1995.
144. Du, C., Hu, R., Csernansky, C.A., Hsu, C.Y. and Choi, D.W. Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16: 195-201, 1996.
145. Schaper, C., Zhu, Y., Kouklevi, M., Culmsee, C., and Kriegelstein, J. Stimulation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors reduces apoptosis after transient forebrain ischemia in the rat. *Brain Res.* 883: 41-50, 2000.
146. Chi, Y.P. *Pharmacological Action and Application of Blood-activating and Stasis-eliminating Available Composition of Traditional Chinese Medicine*, 1st ed. Heilungkiang Science Technical Publishers, 1999, pp. 94-98.

# Effects of *Salvia miltiorrhiza* and *Sophora japonica* on Cerebral Infarct Induced by Ischemia-Reperfusion Injury in Rats

Chih-Jui Lao

Major Advisor : Ching-Liang Hsieh

Institute of Chinese Medical Science, China Medical University.

According to the theory of traditional Chinese medicine, blood stasis could result in cerebral infarction. It could be improved by the medicine that could quicken the blood and dispell stasis. Both *Salvia Miltorrhiza Bunge* (SM) and *Sophora Japonica L.* (SJ) are traditional Chinese herbs. Since *Salvia Miltorrhiza Bunge* quickens the blood and dispells stasis, it is commonly used to treat disorders of blood stasis such as ischemic brain (cerebral infarct) and heart diseases. Because *Sophora Japonica L.* cools the blood and stops bleeding, it is used to treat hemorrhoid with bleeding. Both the SJ and the Ginkgo biloba have components of quercetin and rutin. Ginkgo biloba has been widely used to treat cerebrovascular disorders and dementia in humans.

The aim of the present study was to investigate the effect of SM and SJ on cerebral infarct. A total of 30 Sprague-Dawley (SD) male rats were used in the SM study and 54 in the SJ study. Focal cerebral infarct was established by occluding both the bilateral common carotid arteries and the right middle cerebral artery for 90 minutes. SM and SJ were administered intraperitoneally 30 minutes prior to blocking the blood flow, respectively. In addition, SJ was administered intraperitoneally 30 minutes after the blood flow occlusion. Twenty-four hrs after reperfusion, the rats were killed and their brain tissue was stained with 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride and the areas of infarct were calculated. The luminol - chemiluminescence (CL) counts and lucigenin-CL counts of peripheral blood were measured in the SM study. The neurological status, ED1, interleukin-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ )-immunoreacting cells, and apoptotic cells were also measured in the cerebral infarct zone in the SJ study.

Pretreatment with the intraperitoneal injection of 30 mg/kg and 15 mg/kg of SM reduced the area of cerebral infarct and the luminol-CL counts of peripheral blood. In addition, pretreatment

with SJ at 100 mg/kg, 200 mg/kg and post-treatment with SJ at 200 mg/kg reduced the area of cerebral infarct by % and the grading scale of neurological deficit. Pretreatment with SJ at 200 mg/kg also reduced ED1, interleukin-1  $\beta$  - immunoreacting cells, and apoptotic cells. These results suggest that the SM and the SJ are potential drugs to protect against the cerebral infarct in humans. The neuroprotective effect of the SM may be partially due to free radical scavenging activities. As for the SJ, its suppressive action of microglia, IL-1  $\beta$  and apoptosis could result in the improvement of the cerebral infarct.

Keyword: *Salvia Miltorrhiza*; *Sophora Japonica*; Cerebral Infarct; Ischemia-reperfusion; Free radicals; ED1; interleukin-1  $\beta$ ; Apoptosis.

## 謝 辭

本論文之完成，承蒙受教於謝教授慶良博士與林教授昭庚博士、郭教授重雄博士三位恩師指導，在此謹誌以最深之謝意。並感謝陳悅生老師的關心與鼓勵及在實驗上的資助。感謝江素瑛、唐娜櫻老師在實驗過程中的建議及高尚德老師在實驗儀器的提供，使我能順利完成實驗。

感謝學弟錦宜、彬貴及恩賜在實驗過程的協助，研究室助理曉韻、寧漪、瑛宜、姿琦及台中榮民總醫院研究助理林乃女小姐在實驗技術、儀器操作與電腦製圖上的協助。感謝錢添發醫師提供實驗用藥，動物室王文信先生在實驗動物的供應使得研究可以順利完成。更感激伴我同甘共苦的愛妻陳素昭女士，因為她的協助與支持，使我無後顧之憂。並感謝雙親多年的培育。

最後再次謝謝恩師謝慶良教授在論文上的協助與對我的提攜與包容，才能順利完成學業，衷心感謝！