

中國醫藥大學中國醫學研究所碩士論文

組別:中醫基礎醫學組

編號:GICMS-303

指導教授：謝慶良 博士

共同指導教授：唐娜櫻 博士

論文題目

丹皮酚不同時間點給藥對缺血—再灌注損傷大鼠腦梗塞效用之
研究

Effect of paeonol at different time administration on cerebral
infarct induced by ischemia-reperfusion injured Sprague-Dawley
rat

研究生:李聰界

中華民國九十五年六月

目錄

第一章 前言	1
1.1 引言	1
1.2 中風的治療	1
1.3 腦梗塞的神經損傷	2
1.4 梗塞後的發炎反應	3
1.5 NF- κ B 與腦缺血的關係	5
1.6 AP-1 對於腦缺血的角色	5
1.7 研究目的	6
第二章 文獻探討	7
2.1 傳統中醫有關腦中風的論述	7
2.2 活血化瘀與腦中風	9
2-3 丹皮的源流及臨床應用	10
2.4 丹皮酚的藥理及現代研究	11
2.5 腦梗塞動物模型的探討	12
第三章 材料與方法	14
3.1 動物	14
3.2 動物模型的建立	14
3.3 丹皮酚的製備、劑量、及給藥方式	16
3.4 第一部分實驗	17
3.4.1 動物分組	17
3.4.2 周邊血液之血球及血糖的測量	17
3.4.3 神經學評估	18
3.4.4 梗塞面積的測量	18
3.5 第二部份實驗	19
3.5.1 動物分組	19
3.5.2 檢體的收集與標定	20
3.5.3 NF- κ B 和 AP-1 活性的測定	20
3.6 統計分析	22

第四章 結果	23
4.1 第一部分實驗	23
4.1.1 缺血—再灌流損傷腦梗塞的動物模型	23
4.1.2 不同時間點投予丹皮酚對缺血—再灌流損傷大鼠腦梗塞面積的效應。	24
4.1.3 不同時間點投予丹皮酚對缺血—再灌流損傷大鼠神經狀態的效應。	24
4.1.4 丹皮酚對腦缺血大鼠直腸溫度、心率及平均動脈壓的影響	28
4.1.5 丹皮酚對腦缺血大鼠血糖的影響	28
4.1.6 丹皮酚對腦缺血大鼠的周邊血球及動脈氣體的影響	28
4.2 第二部分實驗	33
4.2.1 丹皮酚對缺血—再灌流損傷大鼠大腦皮質 NF- κ B 活性的影響	33
4.2.2 丹皮酚對缺血—再灌流損傷大鼠大腦皮質 AP-1 活性的影響	36
第五章 討論	37
5.1 本研究結果前後一致值得信賴	37
5.2 丹皮酚治療腦梗塞其療效與給藥時間點有密關係	37
5.3 丹皮酚不會改變腦缺血狀態的直腸溫度、心率和平均動脈壓	37
5.4 丹皮酚不會改變腦缺血狀態的周邊血液的血球和血糖濃度	38
5.5 丹皮酚減少缺血—再灌流損傷大鼠腦梗塞與 NF- κ B 表現有關	38
5.6 丹皮酚減少缺血—再灌流損傷大鼠腦梗塞與 AP-1 表現的關係，需要進一步的研究	39
第六章 結論	40
參考文獻	41
英文摘要	47

圖目錄

圖 4.1 缺血—再灌流損傷腦梗塞。·····	23
圖 4.2 丹皮酚不同時間點給藥對腦梗塞的效用。·····	25
圖 4.3 不同時間點投予丹皮酚對缺血—再灌流損傷腦梗塞的效應。···	26
圖 4.4 不同時間點投予丹皮酚對缺血—再灌流損傷神經狀態的效應。	27
圖 4.5 丹皮酚對腦切血大鼠血糖的影響。·····	30
圖 4.6 丹皮酚對腦切血大鼠血糖的影響。·····	31
圖 4.7 丹皮酚對缺血—再灌流損傷大鼠大腦皮質 NF- κ B 活性的影響。 ·····	33
圖 4.8 丹皮酚對缺血—再灌流損傷大鼠大腦皮質 NF- κ B 活性的影響。 ·····	34
圖 4.9 丹皮酚對缺血—再灌流損傷大鼠大腦皮質 NF- κ B 活性的影響。 ·····	35
圖 4.10 丹皮酚對缺血—再灌流損傷大鼠大腦皮質 AP-1 活性的影響。	36

表目錄

表 4.1 丹皮酚對腦缺血大鼠直腸溫度、心率和平均動脈壓的影響……	29
表 4.2 丹皮酚對腦缺血大鼠的周邊血球及動脈氣體的影響……	32



丹皮酚不同時間點給藥對缺血—再灌流損傷大鼠腦梗塞效用之研究

研 究 生：李 聰 界

指 導 教 授：謝 慶 良 博 士

單 位：中國醫藥研究所

中國醫學大學

先前我們實驗室的研究結果已知丹皮酚能減少腦梗塞面積和神經損傷等級，因此本研究的目的是探討不同時間點給予丹皮酚對腦梗塞的效用以及與 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 和 activator protein-1 (AP-1) 的關係。方法是將 Sprague-Dawley (SD) 大鼠兩側總頸動脈和右側中大腦動脈的血流阻斷 90 min，之後再灌流 24 h，製造缺血—再灌流損傷腦梗塞動物模型。分別於血流阻斷前 20 min，以及血流阻斷後 30 min 和 60 min 從大鼠右側股靜脈注射丹皮酚 20 mg/kg。丹皮酚的療效指標是根據腦梗塞面積與該切片總面積的百分比，以及神經缺損等級。另外，本研究也測量腦梗塞側和非梗塞側腦組織的 NF- κ B 和 AP-1 活性。結果顯示丹皮酚 20 mg/kg 於血流阻斷前 20 min 和血流阻斷後 30 min 靜脈注射給藥能減少缺血—再灌流損傷大鼠腦梗塞面積百分比和神經缺損等級，但丹皮酚 20 mg/kg 於血流阻斷後 60 min 靜脈給藥則沒有相似的效果。另外，假手術組（沒有阻斷血流）的 NF- κ B 活性最高，其次為丹皮酚治療組，最低的為控制組（阻斷腦血流），而 AP-1 活性則三組間相似。

結論是丹皮酚前治療和血流阻斷後 30 min 治療能減少腦梗塞面積和神經缺損，而血流阻斷後 60 min 則沒有相似的效果，推論丹皮酚對人類腦梗塞的治療有益，但療效與給予丹皮酚治療的 time window 有密切關係。丹皮酚對缺血—再灌流損傷有保護神經細胞的作用，至於與 AP-1 的關係需做進一步的研究。

關鍵詞：丹皮酚、不同時間點、腦梗塞、神經缺損等級、Nuclear factor- κ B、Activator protein-1

第一章 前言

1.1 引言

根據衛生署統計，2004年腦血管疾病仍為十大死因的第三位¹，推論腦血管疾病是目前仍然威脅國人健康的重要慢性疾病。腦血管疾病俗稱腦中風，臨床上可分為梗塞性腦中風和出血性腦中風兩大類，梗塞性腦中風約佔 80%，而出血性腦中風則約佔 20%。造成梗塞性腦中風的原因有動脈斑塊剝離或因動脈硬化造成血管狹窄甚至阻塞，即所謂的血栓，或因其他器官的斑塊如心臟造成腦血管的栓塞。

當腦梗塞發生後，梗塞區核心之神經細胞會造成死亡而導致永久性傷害，但離梗塞核心周圍之半陰影區(penumbra)^{2,3}，因具有豐富的側枝循環若治療得當是一個可以恢復 (reversible) 的區域，許多研究腦中風的重點如藥物的臨床試驗等都針對此區域如何來減少神經損傷。若未對 penumbra 區域做適當的治療則神經細胞會漸漸死亡而出現如同梗塞核心區一般的病理變化。

1.2 中風的治療

臨床上將腦中風分為出血性或梗塞性腦中風，一般而言出血性腦中風以降低腦壓或手術治療為主，而對於梗塞性腦中風的治療，美國國家衛生研究院 (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, NINDS)建議在腦梗塞發生後三小時內，用 alteplase (0.9 mg/kg up to 90

mg) 靜脈注射治療，據統計有 35% 的腦中風患者獲得緩解，若腦梗塞發病超過三個小時，則以保守療法為主，藥物治療著重於中風再發的預防和後遺症的復健，因此本研究的目的於腦梗塞發生前後不同時間點給予丹皮酚觀察對於腦梗塞的效用，尋找治療腦中風最佳的時間窗口。

1.3 腦梗塞的神經損傷

梗塞性腦中風為腦血管壁的硬化、狹窄甚至阻塞不通導致所支配區域產生低灌流或無灌流現象。由於腦組織灌流不足，氧氣的供應逐漸減少，細胞開始利用無氧呼吸來維持運作，但隨著氧氣耗盡，血糖亦隨著逐漸耗竭，ATP 的製造來源不足，影響到需能量的傳輸蛋白 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 無法充分運作，導致胞內的鈉離子上升，胞外鉀離子無法交換進入胞內，胞內的鈣離子無法進入細胞外，而使水分往胞內移動，造成細胞腫脹，細胞被脹破瓦解。此外，由於胞內鈣離子上升，細胞被去極化。並且在缺血期突觸前神經大量釋放出 glutamate，並減少回收 glutamate 而大量結合在突觸後細胞，亦造成鉀離子外流鈉鈣離子內流，又稱為 excitotoxicity，同樣造成造成水腫及神經衝動的發生⁴。神經衝動活化了體內酵素增加，如 phospholipase C 及 phospholipase A2，及 cyclooxygenase-2 的上升，而 phospholipase C 及 phospholipase A2 更進一步產生 MAP kinase (mitogen activated protein kinase)，其會造成 lipid peroxidation，而 cyclooxygenase-2 會誘發氧自由基的產生，對細胞產生攻擊，使細胞死亡，而釋放出的氧自由基、鈣離子、及 iNOS，會進一

步促進發炎反應。星狀細胞 (astroglia)、小神經膠質細胞 (microglia)、內皮細胞 (endothelial cell)、淋巴細胞等，會釋放出細胞激素 (cytokines) 及趨化酵素 (chemokines)，造成發炎細胞的聚集，並且吞噬受傷的組織^{5,6}。Microglia 平時存於神經組織中，大多處在休息狀態 (resting)，構成了 5%~20% 的 glial cell，是最早針對神經損傷做出緊急反應的免疫細胞，有研究發現 microglia 與巨噬細胞 (macrophage)，是分泌發炎介質 tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-1 β (IL-1 β)、tumor growth factor (TGF- β) 的重要來源。此外，白血球 (leukocyte)，是比較晚期聚集的免疫細胞，經由細胞激素所誘發，並且在梗塞後灌流期，會造成細胞發炎且水腫，所以在灌流時期，會造成神經細胞的二次傷害。

1.4 梗塞後的發炎反應

腦梗塞後引發了後續的發炎反應，如白血球、巨噬細胞的浸潤等，其中白血球的浸潤關係到許多血管內皮分泌因子，例如 p-selectin、intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)、vascular adhesion molecule-1 (VAM-1)。並且在發炎反應的過程中，microglia 不僅會分泌細胞激素變成巨噬細胞，將死掉的細胞與碎片吞噬⁷，並且會刺激 Nuclear factor- κ B (NF- κ B) 的活化。NF- κ B 是一種 DNA binding protein，主要做為 transcription factors 用來調節許多基因的表現，如發炎、細胞凋亡等^{8,9}。NF- κ B 主要由 p65 (RelA)，RelB，c-Rel，p50 及 p52 所組成，活化方

式藉由磷酸化其抑制蛋白 I κ B (I κ B α 、I κ B β 、I κ B ϵ)。當細胞遭受如 TNF- α 、IL-1、lipopolysaccharide 刺激後，會促使 I κ B 產生磷酸化，並使 NF- κ B 進入細胞核中，經由轉錄轉譯，產生大量的細胞激素。此外，細胞受傷後會活化許多因子如 NF- κ B、hypoxia inducible factor 1 (Hif-1)¹⁰、Prostaglandin E2 (PG-E2)、interferon regulatory factor-1 (IRF-1)。NF- κ B 經由磷酸化 p56 使 NF- κ B 進入細胞核，結合於 DNA 上，轉譯出更多細胞激素，如 TNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6 等，而 Hif-1¹⁰ 則會促進 vascular endothelial cell derived growth factor (VEGF)，造成 blood brain barrier (BBB) 的 leakage，甚至是水腫。IRF-1 則會產生 γ -interferon，刺激 macrophage 的吞噬，受到趨化因子的影響在梗塞後 48-72 小時達到最大量的浸潤。TNF- α 是多形性的細胞激素 (pleiotropic cytokine)，在腦組織損傷與修復過程中，扮演發炎反應與免疫反應的多重功能，其可以藉由分泌 ICAM-1 誘發白血球附著於血管壁上，亦可促使巨噬細胞的活化與分泌，在梗塞發生後的 1.5 h 會逐漸上升，並且在 6-24 h 後逐漸下降¹¹。IL-1 β 主要是由 microglia、astrocyte、寡樹突細胞 (oligodendrocyte) 分泌¹²。IL-1 β 是一種發炎的前驅物質 (proinflammatory substance)，作用於血管內皮，促使血管內皮分泌 E-selectin、VAM-1、ICAM-1 等因子¹³，以上物質會吸引白血球附著於血管壁上，然後穿透進入梗塞區域，吞噬死掉的細胞和造成發炎、水腫的現象^{6,13,14}。

1.5 NF- κ B 與腦缺血的關係

NF- κ B 是一種 DNA 結合蛋白，凡發炎、免疫反應、細胞凋亡、細胞的存活和分化等都與 NF- κ B 有關。NF- κ B 的組成蛋白有 p65 (Rel A)、RelB、c-Rel、p50 及 p52 等五種，彼此間可以結合成異構物，NF- κ B 平時為不活化狀態，但當組織遭受刺激，其抑制蛋白 I κ B (I κ B α 、I κ B β 、I κ B ϵ) 被磷酸化後，會促使 NF- κ B 成為活化狀態進入細胞核中與 DNA 結合，產生調控接著轉錄轉譯出一些激素與酵素如 proinflammatory cytokines, chemokines, cell adhesion molecules 等物質，進一步產生灌流後之發炎反應¹⁵。在腦缺血—再灌流損傷中，能夠活化 NF- κ B 的物質很多，如 TNF- α 、IL-1 β ¹⁶、hydrogen peroxide、reactive oxygen species¹⁷、increased intracellular calcium¹⁸ 及 glutamate¹⁹ 等。有研究顯示在腦缺血後 NF- κ B 會被活化並且上升^{13, 20, 21}，經由抑制 NF- κ B 的活化可以減少再灌流後的損傷²²。有研究認為 aspirin 治療中風是因 aspirin 能減少 NF- κ B 的活化而產生抗炎作用²³。但另有研究發現 NF- κ B 的產生可以減緩神經細胞的退化²⁴，也有抗細胞凋亡²⁵，以及保護神經細胞的損傷等的作用^{26, 27}。事實上 NF- κ B 究竟扮演促進或抑制胞凋亡，需是其刺激方式和 NF- κ B 作用時間的長短而定。

1.6 AP-1 對於腦缺血的角色

Activator protein-1 (AP-1) 是一種 Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, and Fra-2)

與 Jun (c-Jun, JunB, JunD) 的聚合物，又稱為 Immediate early genes (IEGs)，是一種轉錄調節蛋白，其會接合在某一段的 DNA motif 上而誘發下游的一連串基因表現，在缺血後幾個小時內 AP-1 上升²⁹。在 middle cerebral artery occlusion (MCA) 的動物實驗發現 AP-1 出現在大腦皮質 (cerebral cortex)、海馬 (hippocampus)、視丘 (thalamus) 等區域。AP-1 主要的產生原因是來自於廣泛的梗塞後去極化^{30,31}。有研究顯示 AP-1 對梗塞後的腦組織有保護作用³¹，亦即對其 Fos 的產生拮抗反應導致組織傷害更明顯，但有研究發現癲癇發作、腦缺血發生後，會誘發 Fos, c-Jun, JunB 等基因的快速上升^{32,33}。AP-1 活化主要是在於 c-Jun 之 N-terminal 端的磷酸化，一但被磷酸化後，AP-1 的活性會上升並引發一連串細胞分化作用³⁴。缺血性腦梗塞發生後，導致大量 c-Jun 基因片段表現，這些表現集中在非梗塞區亦即在周邊反應(region surrounding the ischemic cortex)而非梗塞區³⁵。

1.7 研究目的

我們實驗室先前的研究結果已知丹皮酚前治療可以減少腦梗塞面積和神經缺損等級，因此本研究的目的是進一步探討丹皮酚對腦梗塞效用與給藥時間點的關係，同時也觀察丹皮酚效用與 Nuclear factor- κ B 和 AP-1 的關係。

第二章 文獻探討

許多研究已知將 Sprague-dawley (SD) 大鼠兩側總頸動脈及右大腦動脈阻斷血流 90 分鐘，之後再灌流 24 h 可以製造腦梗塞的動物模型^{3,36,37}。另外，從頸外動脈作一切口，將 nylon 線經由內頸動脈，進入威爾氏環 (Willi's circle) 可造成中大腦動脈區域的梗塞，也有經由顱骨切開術，經由下大腦靜脈及嗅束上緣間，結紮中大腦動脈造成缺血性腦梗塞³⁸。腦組織經 2% 2,3,5- triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 染色，則梗塞區呈現白色，而非梗塞區腦組織則呈現紫紅色^{39,40}。

2.1 傳統中醫有關腦中風的論述

中醫有關腦中風的論述大致上可分成外風、內風和外風內風立論等三個時期。腦中風的記載可追溯到最早的黃帝內經，而唐代以前大多遵從黃帝《素問·風論》之：“風之傷人也，或為寒熱，或為熱中……或為偏枯，或為風也，其病各異，其名不同以及”，以及《素問·生氣通天論》之“有傷於筋，縱，其若不容……使人偏枯”的見解，認為腦中風是由於外風入於肌腠，侵犯經脈，進一步內犯臟腑使氣血運作失常，氣機逆亂所致。邪阻經絡，肌膚失於營養會出現麻痺不仁、半身不遂之偏枯的臨床表現；臟腑氣機逆亂則會出現意識障礙之仆昏不知人事等情形。漢代，張仲景於《金貴要略·中風歷節脈證并治第五》中提到“寸口脈浮而緊，緊則為寒，浮則為虛。虛寒相搏，邪在皮膚。浮者血虛，絡脈

空虛。賊邪不瀉，或左或右，邪氣不緩，正氣即急，正氣引邪，歪僻不遂”，由此可知張仲景亦遵從內經以外風立論。唐朝 孫思邈《千金方·諸雜風狀》記載”風邪客於肌膚，虛癢成風疹瘙瘡，風邪入深，寒相搏則肉枯，邪客半身入深，真氣去則偏枯……風邪入臟，寒氣客於中不能發，則瘖瘡喉痹舌緩”，由此可知孫思邈認為腦中風的發生原因也源自於黃帝外風的思想，因此可以結論為唐朝之前以外風立論。

宋朝之後，劉完素的熱極生風論，李杲的氣虛中風，朱丹溪的濕痰生風、薛己的陽化內風等，大多以內風立論。劉完素認為”所以中風有癱瘓者，非謂肝木之風實甚，而卒中風也，亦非外中於風，良由將息失宜，而心火爆甚……多因喜怒悲愁恐，五志過極而卒中者，皆為熱甚極也”，李杲則認為由於人正氣虧損而導致中風，他在《脾胃論·胃虛元氣不足諸病所生論》中說”邪之大者，莫若中風……必中虛”。朱丹溪認為痰濕可以則化熱生風，也可以閉塞經絡，蒙蔽清竅。故曰”半身不遂，大率多痰，痰壅盛者，口眼歪斜者，不能言者，法當吐”。明。薛己則認為中風的發生是由於肝腎虧損所致，而清朝葉天士進一步闡發陽化內風論，他認為是由於肝腎精血虧損，水不涵木，而致肝陽上亢，虛風內動，氣血上逆而致中風”⁴¹。

清代以後將外風與內風結合，如清。吳謙提出”風從外中傷肢體，痰火內發病心官，傷體不仁與不用，心病神昏不因痰濕生風，或由陰虛陽浮於上而成”⁴²。

2.2 活血化瘀與腦中風

漢王堆《治百病方》之第五個方”瘀方”，其藥物有乾當歸、芎藭、牡丹、漏蘆、蜀椒、蟲等；另外，馬王堆漢墓出土的《五十二病方》所論及的疾病包括內、外、婦、兒、五官等，用藥達二百四十餘種，其中有活血化瘀治療”蠱”病的記載。《素問·至真要大論》有”血脈凝泣”，《靈樞·邪氣臟腑病形論》和《素問·刺腰痛論》中有惡血的記載。《素問·調經論》中有留血，以及《素問·五臟生成論》有衄血的記載，這些都與血瘀有關。

黃帝內經《素問·生氣通天論》曰：大怒則形氣絕，而血菀於上，使人薄厥...。《素問·調經論》曰：血之與氣，併走於上，則為大厥，厥則暴死，氣復反則生，不反則死。上述描述的症狀與腦中風的臨床表現有些類似。《素問·陰陽應像大論》曰：審其陰陽，以別剛柔，陽病治陰，陰病治陽，定其血氣，各守其鄉，血實宜決之，氣虛宜掣引之。《素問·至真要大論》曰：堅者削之，客者除之.....結者散之，留者攻之。《素問·針解篇》曰：菀陳者除之者，出惡血也。這些都與血瘀證有關。

內經繼承先秦時期的血瘀證思想，用四烏賊骨、蘆茹丸來治療血枯經閉，其組成為茜草、烏賊骨、鮑魚汁、雀卵等，由此推論內經時代已用活血化瘀來治療疾病。《神農·本草經》約成書於公元前二百多年的西漢時期，書中記載三百六十五種藥物，如丹參”破癥除瘕”、牡丹皮”

除癥堅瘀血”、桃仁”治療血、血閉，癥瘕邪氣”等。東漢 張仲景已用”瘀血”病名及除瘀的方劑，如《金匱要略·驚悸吐衄下血胸滿瘀血病脈證治第十六》的大黃蟪蟲丸。又張仲景在傷寒論及金匱要略中有瘀血、蓄血、血結等的病名的記載。隋唐時代的《諸病源候論》、《千金方》、《外臺祕要》已有瘀血的證候和增添活血化瘀藥物，如唐《新修本草》增加血竭、蘇木、延胡索等破瘀、除瘀的藥物。宋、金、元時代開始出現各種治療血瘀證的專論書籍，如金元四大家對引起血瘀證的原因，提出各自的觀點與治療方針。

活血化瘀藥物的使用在漢墓出土文物中已有當歸、川芎、丹皮等的，《神農·本草經》記載活血化瘀藥物共約三十種，包括植物藥、動物藥和礦物藥並有詳述其主治功用，如”主瘀血”、”破癥瘕”、”主瘀血”、”通血脈”等。唐代的《新修本草》，又稱《唐本草》是有史以來第一部由國家頒佈的藥典，該書比《本草經集注》又增加隋唐以來的新藥品，如血竭、紅花、蘇木、鬱金等藥物。宋代的《開寶本草》、《嘉佑本草》、《證類本草》等又增列了三稜、莪朮等破瘀血的藥物，明、清時代又將活血藥物做分門別類，使其更臻完善。凡具有疏通血管、祛瘀通滯而令血脈暢達的藥物都歸屬於活血化瘀藥⁴¹。

2-3 丹皮的源流及臨床應用

牡丹皮屬於毛茛科芍藥屬植物牡丹（*Paenoina Suffruticosa* Andr）的

根皮，性微寒、味苦、辛，在《神農本草經》被列為中品，有清熱涼血，活血化瘀之功用。牡丹產於山東荷澤，而入藥牡丹是由安徽銅陵引種的“鳳丹”。梁代陶宏景的《集注》、《雷公炮炙論》、《本草綱目》都記載丹皮入藥去心⁴³。

2.4 丹皮酚的藥理及現代研究

牡丹皮的根及根皮含有丹皮酚 paeonol、paeonoside、apiopaeonoside、paeoniflorin、benzoylpaeoniflorin、oxypaeoniflorin、paeonilide⁴³。根據研究丹皮酚 (paeonol) 有：1) 抗動脈粥狀硬化；2) 抗血栓；3) 抗缺血—再灌注損傷；4) 抗心律失常；5) 抗腦出血⁴⁴ 等的作用。丹皮酚可以提升血管擴張因子 (nitric oxide, NO) 而降低血管收縮因子 (endothelin, ET) 的濃度對血管發炎有保護作用⁴⁵；孫文方等發現丹皮酚對 ICAM-1 蛋白有抑制作用⁴⁶；張衛國證明丹皮酚對於心肌缺血—再灌注損傷大鼠有降低缺血心肌組織 MDA 的含量和血中 CPK 的濃度，以及提升 SOD 濃度和減少纖維化的作用，推論丹皮酚能保護心肌⁴⁷。此外，張廣欽等發現丹皮酚降低腦組織 MDA 含量，保護 SOD 活性，並且抑制 Ca²⁺ 的內流，阻止氧化自由基的產生，也能通過抑制環氧酶抑制花生四烯酸的代謝，減少氧化自由基的生成⁴⁸；Sung et al. (2003) 發現丹皮酚能抑制 histamine、TNF- α 的分泌，減少過敏反應的發生⁴⁹；Hsieh et al. (2006) 證

明丹皮酚可以減少腦梗塞和大鼠神經缺損等級，這些作用與抑制 superoxide anion 的生成和減少 microglia 的活化有關⁵⁰；Hirai et al.證明丹皮酚對於血小板凝集和 thromboxane A2 有抑制作用，Zang et al.的研究顯示丹皮酚可以清除自由基。

2.5 腦梗塞動物模型的探討

腦梗塞的動物模型有永久性和暫時性梗塞兩種，以及管腔內阻塞和管腔外阻塞造型。暫時性管腔外阻塞的動物模型即將兩側的總頸動脈和右側中大腦動脈（both common carotid arteries and right middle cerebral artery, BCCA+RMCA）阻斷血流 90 分鐘，之後再灌流 24 小時⁵¹，方法乃藉由使用套管將兩側總頸動脈做阻斷，並且藉由尼龍線經由嗅束上緣及下大腦靜脈間，藉縫針勾繞過中大腦動脈，將中大腦動脈予以活結紮，之後再將結紮鬆脫恢復灌流，此種動物模型梗塞區僅限於皮質。另一種動物腦梗塞模型是管腔內梗塞⁵²⁻⁵⁴，從大鼠頸部正中切開，分離出總頸動脈與外頸動脈，將內頸動脈的分支翼頸動脈打結阻斷，同時亦將外頸動脈的遠心端做一死結，並將一絲線繞過內頸動脈與外頸動脈分叉處，緊接著將總頸動脈用動脈夾阻斷，在外頸動脈離內外頸動脈分叉約 2 mm 處做一切口，此時將一條 4-0 的尼龍線，經由切口處置放入外頸動脈，經由內頸動脈到達威爾氏循環，進入約 2.1 cm 的距離，當發現有阻力時，則視為完成梗塞。此實驗模型因可以同時阻斷前大腦跟中大

腦動脈，故梗塞面積除皮質區外，包括基底核 (basal ganglion)，甚至可到達海馬區域，所以梗塞面積大，因梗塞面積大所以死亡機率也較高，因此管腔內與管腔外等方法的腦梗塞造模各有其優缺點。



第三章 材料與方法

本研究實驗設計分為：第一部份，探討不同時間點給予丹皮酚對腦梗塞的效用；第二部分，探討丹皮酚效用與 NF- κ B 和 AP-1 的關係。

3.1 動物

本研究實驗動物購置自於國科會實驗動物中心，動物為 Sprague-Dawley (SD)種之雄性大鼠，體重介於 250-350 gm 之間，飼養於中國醫藥大學動物中心。飼養環境採用中央空調處理，明暗調節為 12 h，並給予乾淨墊料和每日定量給予食物及飲水。實驗室溫度控制在 25 ± 1 °C，濕度 55 ± 5 %，所有動物飼養和管理以及實驗都合乎實驗動物倫理規範。

3.2 動物模型的建立

用氯化水醛 (chloral hydrate, 400 mg/Kg) 由 SD 大鼠的腹腔注射將動物麻醉，整個實驗過程用 heat pad 將動物適度保溫，並監測直腸溫度 (TM-906A, Dual Channel Thermometer, Taiwan)，以及大鼠之動脈壓、心跳 (0093-101L, BP-2, Columbus, Ohio, USA) 和監測右測中大腦動脈血流區域腦組織的血液灌流量 (Laser Doppler Blood- Flow Monitor, DRT4, Moor instrument Ltd., England)。

將 SD 大鼠秤重後，測量大鼠的直腸溫度，並做成紀錄，用 chloral hydrate (400 mg/Kg) 在大鼠腹腔注射使其麻醉，之後將大鼠頭顱部、頸

正中部及右側大腿鼠蹊處之毛髮剃除，然後將大鼠呈仰臥位，並將四肢固定，用手術刀沿著腹股溝皮膚切開並分離出右股動脈和股靜脈。首先將右股靜脈作一小切口，將 PE-50 管 (cannulated with PE-50 polyethylene catheters) 沿著切口插入右股靜脈中，深度約 1~1.5 cm。緊接著在右股動脈作一切口，並插入含有 heparin (20 unit/ml) 的 PE-50 管，深度約 1~1.5 cm，先將血液回抽沖洗，確定管子通暢後將 PE-50 管的另一端連接於心跳血壓測量儀器 (0093-101L, BP-2, Columbus, Ohio, USA) 監測心跳、血壓。

由大鼠頸正中部切開露出雙側總頸動脈，並分離出迷走神經區，之後用尼龍繩套 (nylon thread, 直徑 0.5 cm)，繞過總頸動脈下方，並加上一個管套 (長度 2 cm, 直徑 1.5 cm)，將兩頭沿著縱軸穿過，以便結紮阻斷血流。上述步驟完成後，將大鼠變成俯臥位，並將大鼠頭部固定於小動物立體固定儀 (stereostatic apparatus) 上，之後用手術刀沿著頭皮正中線前後切開露出頭蓋骨，再沿著右側顳肌骨肉交界處邊緣切開將顳肌向前固定，使暴露右側顳骨，再用骨剪剝離右側顳骨但不破壞腦膜，將頭蓋骨移除後，用雷射血流監測器 (Laser Doppler Blood-Flow Monitor, DRT4, Moor instrument Ltd., England) 的探針尋找右中大腦動脈，若雷射血流監測器的標示大於 600，則確定為右中大腦動脈。然後用持線器將 8-0-0 尼龍單線微型手術針 (8-0-0 mono-filament nylon tie, ETHICON, Johnson & Johnson Ltd., Belgium)，經由嗅束上緣 (olfactory

tract)與下大腦靜脈 (inferior cerebral vein) 中間穿過中大腦動脈。待一切裝備完成，經由右股動脈監測平均動脈壓及心跳，並做成紀錄，然後從股動脈抽血 3.0 cc 測定血液氣體分析 (blood gas)，血糖以及血球。前述步驟完成後，將兩側總頸動脈套管套緊，並經由右中大腦動脈處，藉由 8-0-0 尼龍線作一單套活結，以阻斷右中大腦動脈血流，若雷射血流監測器的標示低於 100，而且探針下腦組織變為白色時，則確定血流阻斷成功，血流阻斷 90 min 後，再抽取股動脈血測定 blood gas、血糖以及血球，並記錄平均動脈壓。之後將活結鬆脫恢復兩側總頸動脈和右側中大腦動脈血流，即再灌流，經 24 h 後，觀察大鼠的神經狀態並將大鼠犧牲取腦。

3.3 丹皮酚的製備、劑量、及給藥方式

丹皮酚來自於國立陽明大學傳統醫藥研究所。將 10 mg 丹皮酚純化物溶於 glycofurol (sigma)300 ul，泡成 0.2 M 的溶液，之後再加入 9.7 ml 之 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4)，置備成濃度 1 mg/ml 之丹皮酚溶液。丹皮酚的劑量是根據我們實驗室先前研究的結果⁵⁰，分別於血流阻斷前 20 min、阻斷後 30 min 及 60 min 從右股靜脈注射丹皮酚 20 mg/kg。

3.4 第一部分實驗

3.4.1 動物分組

將 30 隻雄性 SD 大鼠隨機分為 5 組，每組 6 隻如下：

- (1)假手術組 (sham)：將 SD 大鼠兩側總頸動脈和右側中大腦動脈暴露，但不阻斷血流。
- (2)控制組 (control)：阻斷兩側總頸動脈及右中大腦動脈血流 90 min，之後再灌流 24 h，不施予任何藥物治療。
- (3)P-20 組：方法同(2)控制組，但在血流阻斷前 20 min 從股靜脈注射丹皮酚 (20 mg/kg)。
- (4)D-30 組：方法同(2)控制組，但在血流阻斷後 30 min 從股靜脈注射丹皮酚 (20 mg/Kg)。
- (5)D-60 組：方法同(2)控制組，但在血流阻斷後 60 min 從股靜脈注射丹皮酚 (20 mg/Kg)。

3.4.2 周邊血液之血球及血糖的測量

將裝有 0.5 ml 動脈血之 EDTA 管均勻搖晃後，置於血球分析儀 (System KX-21, SYSTEM Ltd., KOBE, Japan)之探頭下，測定血液中白血球(WBC)、紅血球(RBC)、血紅素(HGB)、血球比容(HCT)。所用試劑包括 cell pack (SAN TUNG Instruments Co., Ltd., Taiwan)、SWH-200 (SYSMEX Co., Ltd., KOBE, Japan)及 cell clean (SYSMEX Co., Ltd., KOBE, Japan)。

將 0.1 ml 的動脈血，經由血糖測量儀器 ACCU-CHEK(Roche Diagnostics Corporation, Germany)，檢測血液中的血糖值。

3.4.3 神經學評估

再灌流 24 h 後，由兩個不知情之觀察者根據 Bederson's et al. (1986)⁴⁰ 0-3 神經損傷等級 (Neurologic Examination Grading System) 來評估大鼠的神經缺損程度，如下：

第 0 級：用手將鼠尾抓起，令其懸空，觀察前肢表現為伸展狀態，則為 0 分。

第 1 級：將大鼠懸空後，其對側前肢彎曲，未完全伸展，則為 1 分。

第 2 級：將大鼠懸空後，其對側前肢彎曲，未完全伸展，並且其對側肢體阻抗不足，則為 2 分。

第 3 級：除了符合第 2 級損傷，其行進時往麻痺側繞圈，則為 3 分。

3.4.4 梗塞面積的測量

神經狀態評估完後，用 chloral hydrate (400 mg/Kg) 於大鼠腹腔注射，將大鼠麻醉後，用剪刀由胸廓剪開，暴露出心臟，再經由左心室，連續注入生理食鹽水，並且在右心房處，作一切口，並予以生理食鹽水 (0.9 % NaCl, 南光化學製藥股份有限公司, 台灣) 灌流將鼠腦血液充分洗出，之後用骨剪將頭骨剝離取腦，放置於腦切片盒中 (brain matrix slicer)，做冠狀切片，除去第一片不取之外，依序往後取六片，平均厚

度約 2 mm。將腦切片放置於 2 % 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC, MERCK, Germany)³⁹ 的 12-well 培養盤 (CELLSTAR, greiner bio-one) 中，並將其放置於 37 °C 恆溫箱中，10 min 後，將培養盤取出，則梗塞區顯示為白色而非梗塞為紫紅色。最後將 TTC 染色劑回收，加入 10 % paraformaldehyde (MERCK, Germany) 固定，放置於蔭涼處避光，待固定後 3~7 天，將腦切片取出，分別以數位相機 (NIKON Coolpix 5200, Japan) 近距離拍照，經由電腦圖像處理分析 (Image-Pro plus, USA) 計算梗塞面積。資料的呈現是切片梗塞面積與該切片總面積的百分比 (%)。

3.5 第二部份實驗

3.5.1 動物分組

將 18 隻雄性 SD 大鼠隨機分成三組，每組 6 隻，如下：

- (1) 假手術組 (sham)：將 SD 大鼠兩側總頸動脈和右側中大腦動脈暴露，但不阻斷血流。
- (2) 控制組 (control)：阻斷兩側總頸動脈及右中大腦動脈血流 90 min，之後再灌流 24 h，不施予任何藥物治療。
- (3) P-20 組：方法同(2)控制組，但在血流阻斷前 20 min 從股靜脈注射丹皮酚 (20 mg/Kg)。

再灌流 24 h 之後，將大鼠犧牲取腦並分離出四個部份，依序是右大腦皮質、左大腦皮質等兩部份，然後依下列步驟：測量腦重量 (gm) 並

加入等倍 buffer A mix (10 x buffer A, 100 mM DTT, 100 x protease inhibitor mixture, 100 % IGEPAL (NP-40), DDW), 然後將檢體均質, 離心 (UBOTA6900, UBOTA Co., Japan) 30 min (4 °C), 測量底層沉澱物重量 (克), 並加入等倍的 low salt buffer(1x Buffer H, 20 % Glycerol, 1 mM DTT, 1 x Protease inhibitor mixture, 1 x Phosphate inhibitor mixture DDW), 並將檢體予以 Vortex, 然後加入總克數乘以 0.72 的 high salt buffer (1 x Buffer H, 1 M KCl, 20 %Glycerol, 1 mM DTT, 1 x Protease inhibitor mixture, 1 x Phosphate inhibitor mixture DDW), 將加入 high salt buffer 的檢體, 置於 4 °C 下, 並 rotate 1 hr, 待 1 hr 後將其置於 4 °C 下並高速離心 12000 rpm 20 min, 取上清液分裝並儲存在 -80 °C 中^{55,56}。

3.5.2 檢體的收集與標定

將離心後底層的沈澱物分裝, 取出 5 μ l 做 OD 值檢測, 分別測量蛋白質濃度, 並依不同蛋白質濃度做標定。

3.5.3 NF- κ B 和 AP-1 活性的測定

本研究 NF- κ B 和 AP-1 活性的測定是使用 electrophoretic mobility shift assay (EMSA)⁵⁷ 法, 首先組 PAGE (miui-protein II), 接著泡 gel (acrylamide, 10 X TBE, DDW, 10%APS, TEMED), 灌膠至全滿, 插上梳子並且靜置 20~30 分, 緊接著泡製檢體, 操作順序都在冰上製作, 先泡製 Pre-mixer (1 μ g/ μ l Poly dIdC, 3 μ l 5 x shift buffer, 1.5 μ l 10

x phosphatase inhibitor, 1 μ l NF- κ B DNA (10 ng/ μ l) 或 AP-1, 分裝 6.5 μ l 至各管 tube, NF- κ B 與 AP-1 DNA 序列分別為 biotin-AGTTGAG GGGACTTTCCCAGGC'、biotin-CGCTTGATGACTCAGCC GGAA 各管 補 DDW, 最後加上各管的 protein, 然後 spin down, 接著將 sample 置 入水浴鍋中 (25.2 $^{\circ}$ C, 30 min), 然後待 gel 完成後拔掉梳子, 以針頭清 well, 吸出多餘的膠, 此外將 sample 起鍋, 加上 6 x loading dye 3 μ l /tube, 加上 sample 12 μ l, 正式跑膠 0.25 TBE, 30 V, 2 h 30 min, 4 $^{\circ}$ C。待跑 膠完成, 拆開灌膠的玻璃, 用刀將牙齒切除並刮除, 放上 3 M paper, 用 20 ml 玻璃 tip 輕輕滾過以排除氣泡, 緊接著利用乾的 3M paper 將 gel 扯離玻璃, 並放在大玻璃中央, 在 gel 上放一張 nylon membrane, 並用 20 ml 玻璃 tip 輕輕滾過以排除氣泡, 再壓上兩張 3 M paper 並且再滾過 以移除氣泡, 再覆蓋上大玻璃, 並以重物壓製保存在室溫中 1 h, 然後 用 95%酒精消毒過的平鑷將 nylon membrane 夾起, 放入鋪有紙張的保鮮 盒中, 並用 95%酒精消毒過(去除油脂)的鉛筆做記號, 將保鮮盒移入 37 $^{\circ}$ C 的 incubator, 10 min, 照 UV (120 MJ/cm², 波長 254 nm), 待曝光結束 後, 於保鮮盒內倒入 50 ml wash buffer (100 ml 10 X maleic acid, 3 ml Tween 20, DDW), 120 rpm, 2 min, 接著泡製 1 X blocking buffer (6.5 ml/ 片, 13 ml 10 X maleic acid, 100 ml DDW, 13 ml 10 blocking solution), 將 50 ml blocking buffer 倒入保鮮盒內, 室溫下 120 rpm, 30 min, 然後 泡製 antibody solution 10 ml/片 (blocking buffer 10 ml, 1 μ l streptavidin),

加入 antibody solution 10ml, 室溫下 120 rpm, 30 min, 然後倒入 50 ml wash buffer, 室溫下 120 rpm, 15 min 2 次, 之後倒 detection buffer 10ml/片, 室溫下 120 rpm, 5 min, 然後在避光過程中, 操作螢光物質, 首先泡製 (CSPD 742.5 μ l detection buffer 泡 CSPD 7.5 μ l), 將 membrane 移至塑膠袋中, 並在 membrane 正面平行滴下 CSPD, 闔上塑膠袋, 並以 20 ml 玻璃 tip 平行滾過 membrane 以趕走氣泡, 並用錫箔紙將塑膠袋裹平放置 5 min, 將多餘的 CSPD 移除, 並再用玻璃 tip 將氣泡趕走, 用錫箔紙將塑膠袋包裹, 移至 37 °C incubator 靜置 10 min, 之後將塑膠袋四角固定於片夾之中, 並再將氣泡趕出, 將 membrane 帶至暗房壓片。將底片沖洗後, 以電腦做 optical density 分析彼此間的差異度。

待底片清洗晾乾後, 接著使用 PhotoImpact 10 掃描所壓製的圖, 緊接著用掃描軟體 Gel-Pro-Analyzer 做圖片分析, 並加以計算, DNA+dye 的吸光值(optical density)。

3.6 統計分析

本實驗數據以平均值 \pm 標準差 (Mean \pm SD) 來表示, 利用單因子變異數分析 (ANOVA) 的 scheffe's test 來比較各組間的差異。本研究定義 $P < 0.05$ 為有意義差。

第四章 結果

4.1 第一部分實驗

4.1.1 缺血—再灌流損傷腦梗塞的動物模型

將 SD 大鼠兩側總頸動脈及右中大腦動脈阻斷血流 90 min，再灌流 24 h 後，鼠腦組織切片經 TTC 作染色後，梗塞區域呈現白色而非梗塞區則為紫紅色（圖 4.1, 圖 4.2）。

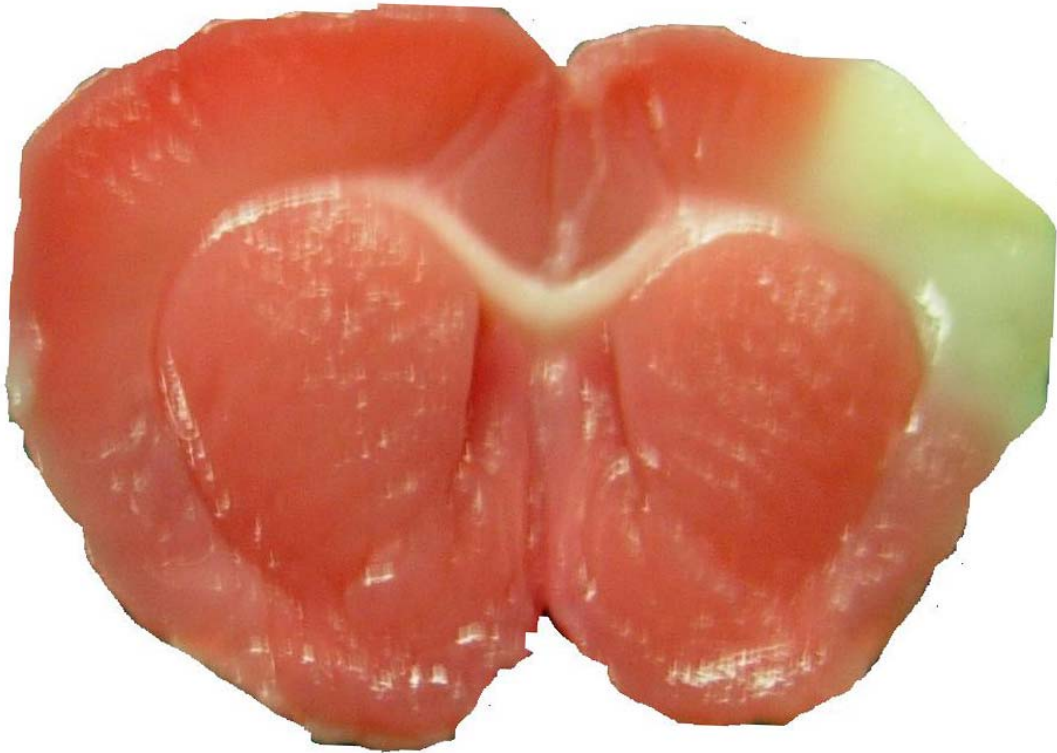


圖 4.1 缺血—再灌流損傷腦梗塞。經 TTC 染色後腦梗塞區呈現白色，而非梗塞區則為紫紅色。

4.1.2 不同時間點投予丹皮酚對缺血—再灌流損傷大鼠腦梗塞面積的效應。

控制組、P-20 組、D-30 組和 D-60 組腦梗塞面積的百分比分別為 $11.06 \pm 1.59\%$ ($p < 0.01$)、 $6.40 \pm 1.0\%$ ($p < 0.01$)、 $4.3 \pm 1.75\%$ ($p < 0.05$) 和 $11.48 \pm 0.85\%$ ($p < 0.01$) 都比假手術組的 $0.88 \pm 1.96\%$ 有更大的百分比 (圖 4.2, 圖 4.3)。P-20 組 ($p < 0.05$) 和 D-30 組 ($p < 0.01$) 比控制組有更小的梗塞面積百分比 (圖 4.2, 圖 4.3)。另外, P-20 組和 D-30 組比 D-60 組有更小的梗塞面積百分比 (both $p < 0.01$; 圖 4.2, 圖 4.3), 而 P-20 組和 D-30 組梗塞面積百分比相似 ($p > 0.05$; 圖 4.2, 圖 4.3)。

4.1.3 不同時間點投予丹皮酚對缺血—再灌流損傷大鼠神經狀態的效應。

控制組、P-20 組、D-30 組和 D-60 組的神經缺損等級分別為 2.33 ± 0.52 ($p < 0.01$)、 1.17 ± 0.41 ($P < 0.01$)、 1 ± 0 ($p < 0.05$)、 2 ± 0.63 ($p < 0.01$) 都比假手術組 0.33 ± 0.52 有較大的神經缺損等級 (圖 4.4)。P-20 組、D-30 組比控制組和 D-60 組有較小的神經缺損等級 (all $p < 0.01$; 圖 4.4)。P-20 組和 D-30 組的神經缺損等級相似 ($p > 0.05$; 圖 4.4), 而控制組和 D-60 組的神經缺損等級也相似 ($p > 0.05$; 圖 4.4)。

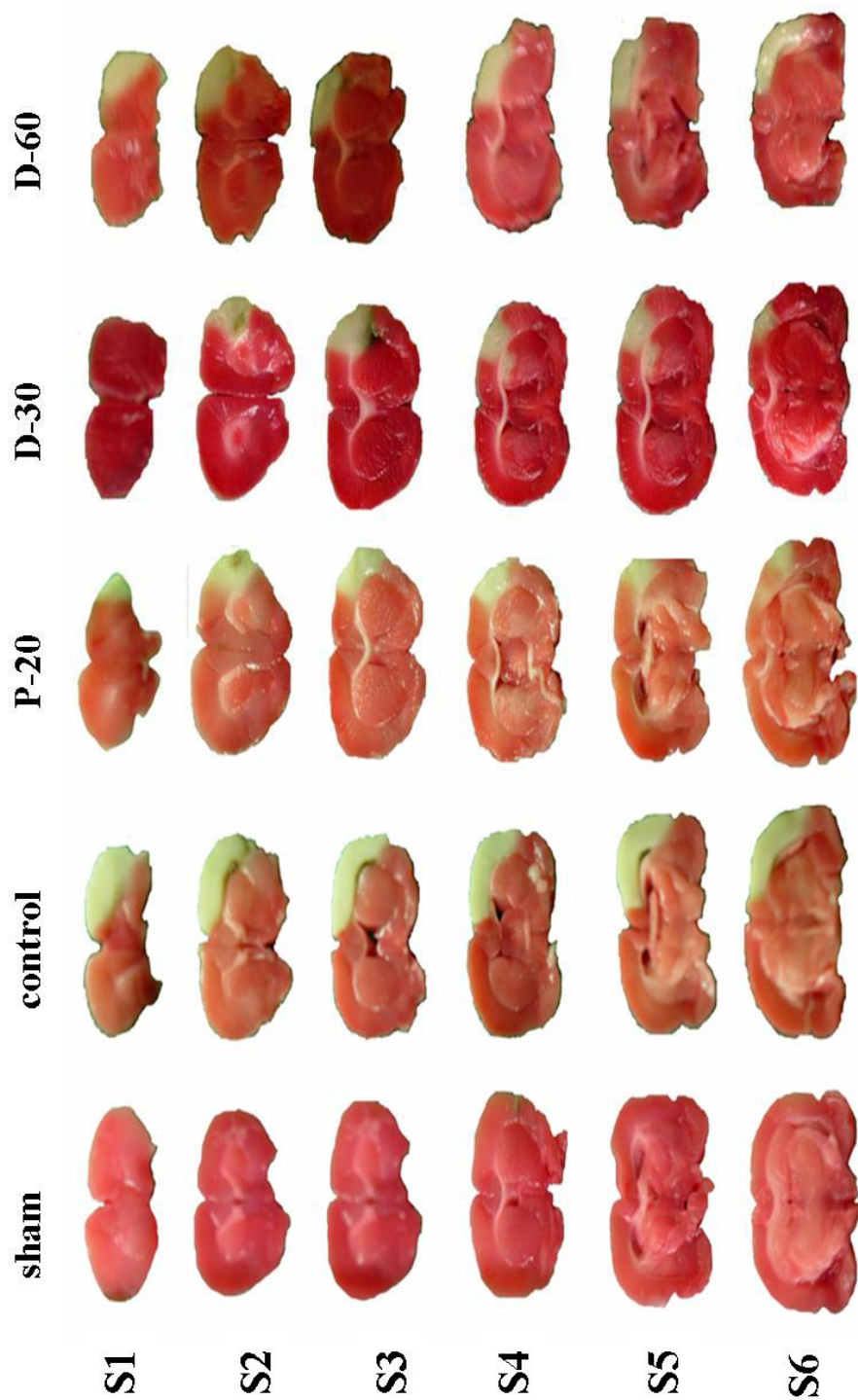


圖4.2 丹皮酚不同時間點給藥對腦梗塞的效用。丹皮酚於血流阻斷前20min (P-20) 和血流阻斷後30 min給藥 (D-30) 都能減少腦梗塞面積，但血流阻斷後60 min((D-60) 給藥則不能減少梗塞面積。本表及以下各表，sham：假手術組；control：控制組；P-20：血流阻斷前20 min給予丹皮酚20 mg/kg；D-30：血流阻斷後30 min給予丹皮酚20 mg/kg；D-60：血流阻斷後60 min給予丹皮酚20 mg/kg。S1：從前額葉算起第1片；S2：從前額葉算起第2片；S3：從前額葉算起第3片；S4：從前額葉算起第4片；S5：從前額葉算起第5片；S6：從前額葉算起第6片。

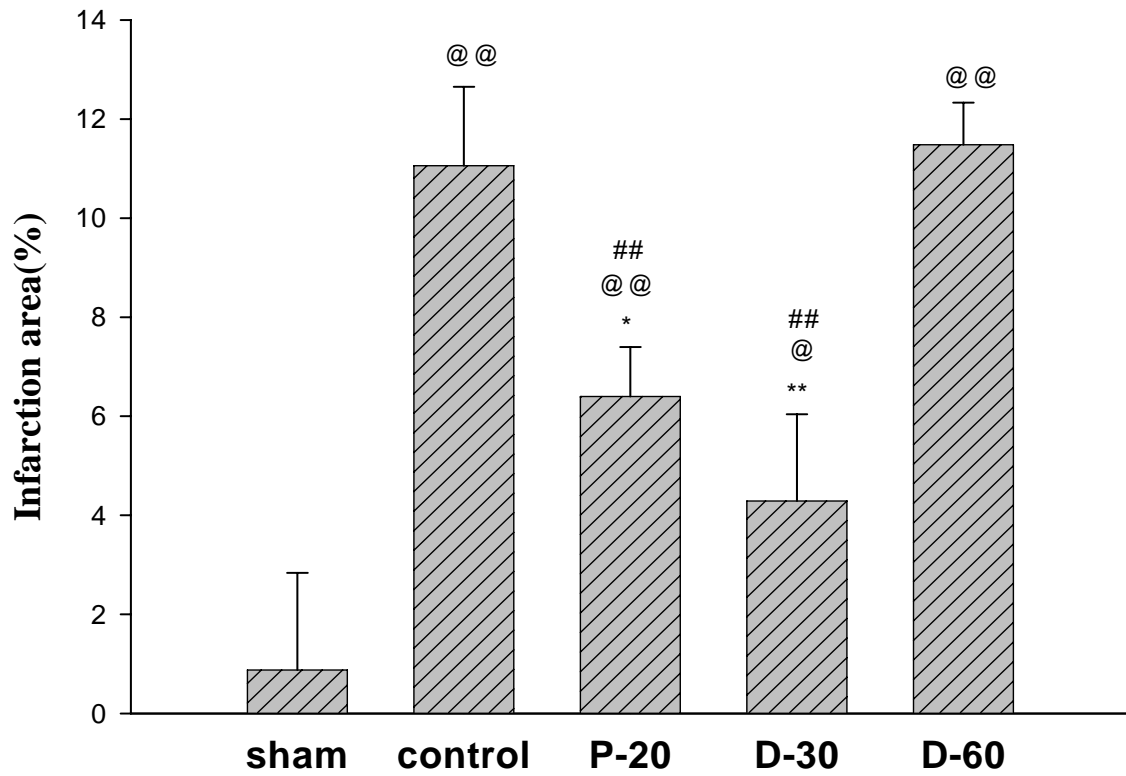


圖 4.3 不同時間點投予丹皮酚對缺血—再灌流損傷腦梗塞的效應。P-20 組和 D-30 組比控制組和 D-60 組有更小的腦梗塞面積百分比。@ $p < 0.05$ ，@@ $p < 0.01$ 值與假手術組相比；* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ 值與 control 相比較；## $p < 0.01$ 值與 D-60 相比較。

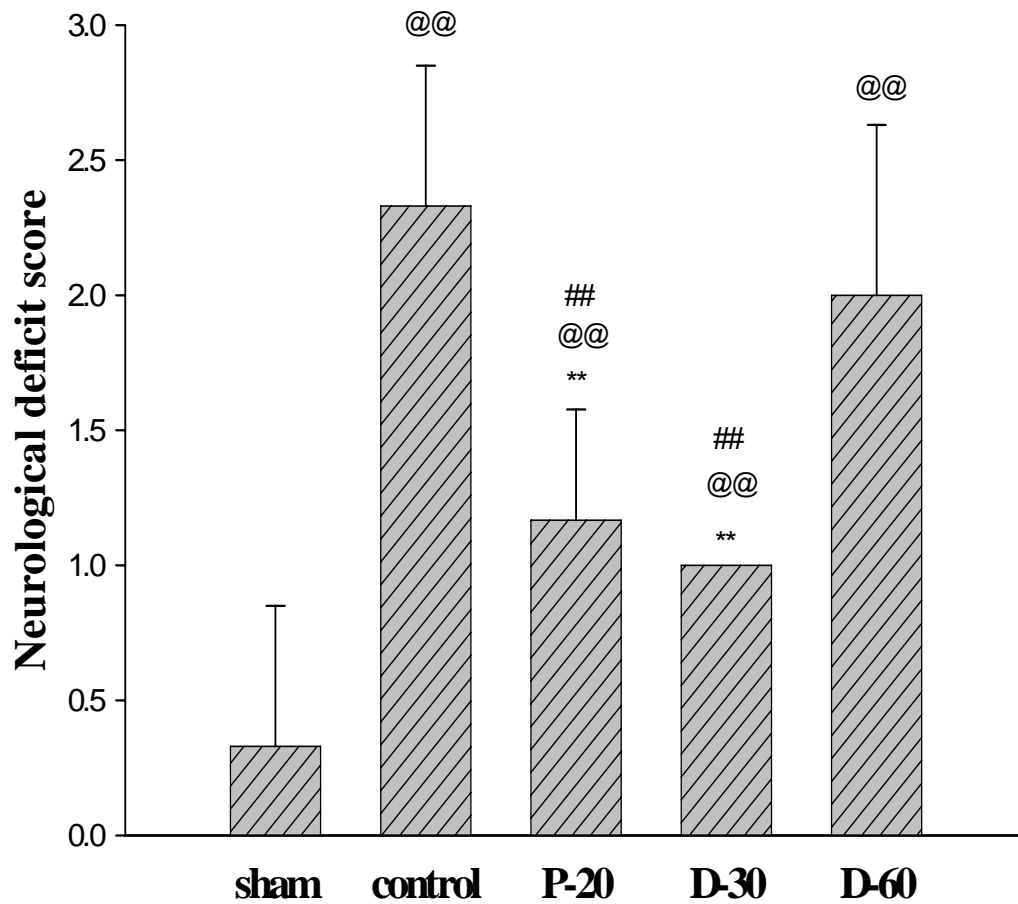


圖 4.4 不同時間點投予丹皮酚對缺血—再灌流損傷神經狀態的效應。P-20 組和 D-30 組比控制組和 D-60 組有更小的神經缺損等級。@ $p < 0.05$ ，@@ $p < 0.01$ 值與假手術組相比較；** $p < 0.01$ 值與控制組相比較；## $p < 0.01$ 值與 D-60 組相比較。

4.1.4 丹皮酚對腦缺血大鼠直腸溫度、心率及平均動脈壓的影響

SD 大鼠的直腸溫度於兩側總頸動脈和右中大腦動脈血流阻斷前，及血流阻斷後 90 min 時假手術組、控制組、P-20、D-30 和 D-60 之間都沒有統計的有意義差 (all $p > 0.05$ ；表 4.1)。

4.1.5 丹皮酚對腦缺血大鼠血糖的影響

SD 大鼠的直腸溫度於兩側總頸動脈和右中大腦動脈血流阻斷前假手術組、控制組、P-20 組、D-30 組和 D-60 組的血糖濃度分別為 234.5 ± 75.5 、 183.8 ± 66 、 208.2 ± 85.7 、 166.3 ± 41.0 、 210.0 ± 37.4 mg/dl，各組間都沒有統計上的意義差 (all $p > 0.05$ ；圖 4.5，圖 4.6)。血流阻斷 90 時假手術組、控制組、P-20 組、D-30 組和 D-60 組的血糖濃度分別為 260.3 ± 105.0 、 200.8 ± 36.7 、 204.7 ± 64.1 、 149.5 ± 52.5 、 248.3 ± 83.2 ，各組間都沒有統計上的意義差 (all $p > 0.05$ ；圖 4.5、4.6)。

4.1.6 丹皮酚對腦缺血大鼠的周邊血球及動脈氣體的影響

兩側總頸動脈及右中大腦動脈血流阻斷前和阻斷 90 min 時假手術組 (sham)、控制組 (control)、P-20 組、D-30 組和 D-60 組的周邊血液 WBC、RBC、HGB、HCT，以及動脈血 pH 值、 PO_2 和 PCO_2 的分壓各組都沒有統計的有意義差 (all $p > 0.05$ ；表 4.2)。

表4.1. 丹皮酚對腦缺血大鼠直腸溫度、心率和平均動脈壓的影響

組	直腸溫度 (°C)		心率 (beats/min)		平均動脈壓 (mmHg)	
	前	後	前	後	前	後
假手術組	37.17±0.21	36.85±0.19	348.17±34.63	490.67±124.83	76.61±13.02	89.45±10
控制組	36.92±0.16	36.78±0.17	367.83±46.83	410.67±51.30	81.72±12.91	92.50±6.18
P-20組	37.07±0.38	36.78±0.17	332±73.39	459±71.05	91.168±16.72	92.95±9.78
D-30組	37.17±0.29	36.82±0.18	381.83±37.24	405±41.12	99.56±7.81	85.45±9.01
D-60組	37.03±0.25	35.3±4.07	330.5±55.72	488.67±77.48	80.28±10.12	90.39±5.07

Mean±SD。本表及以下各表，前：血流阻斷前；後：血流阻斷90 min時。

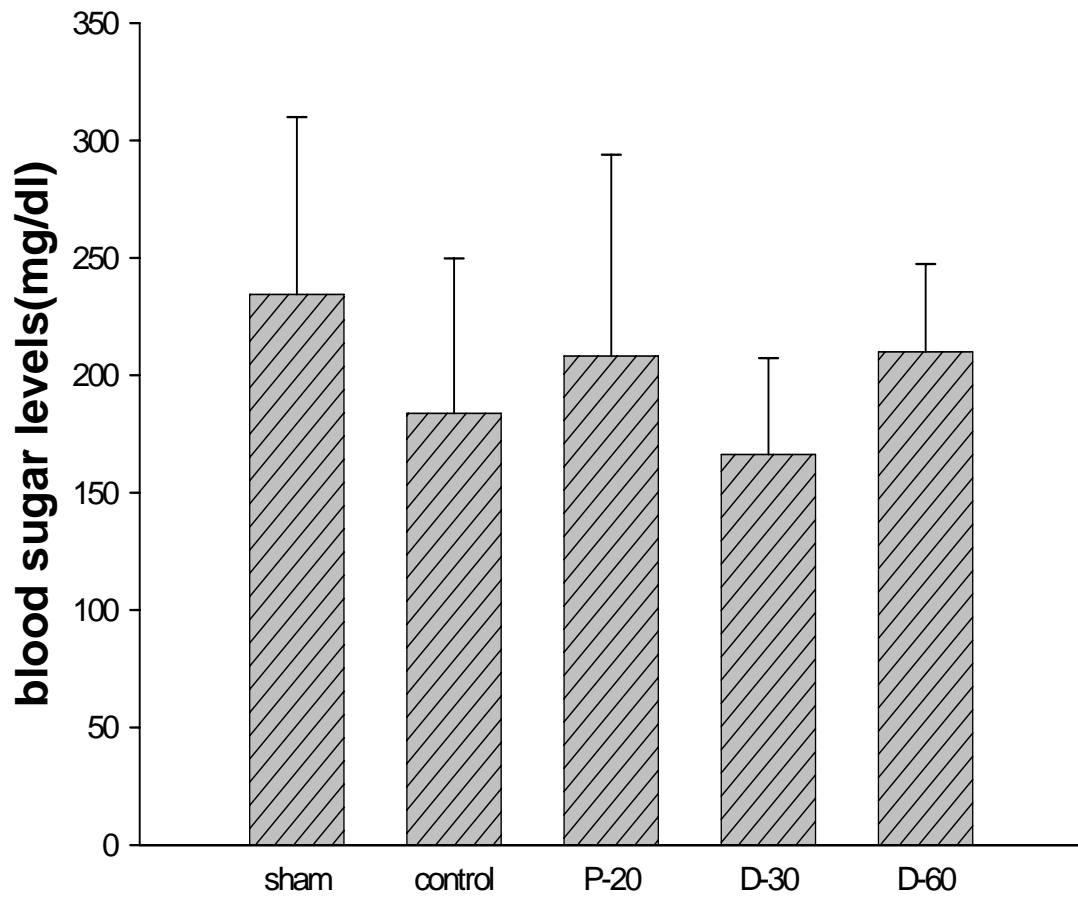


圖 4.5 丹皮酚對腦切血大鼠血糖的影響。血流阻斷前的血糖濃度，血流阻斷前假手術組 (sham)、控制組 (control)、P-20 組、D-30 組和 D-60 組的血糖濃度相似。

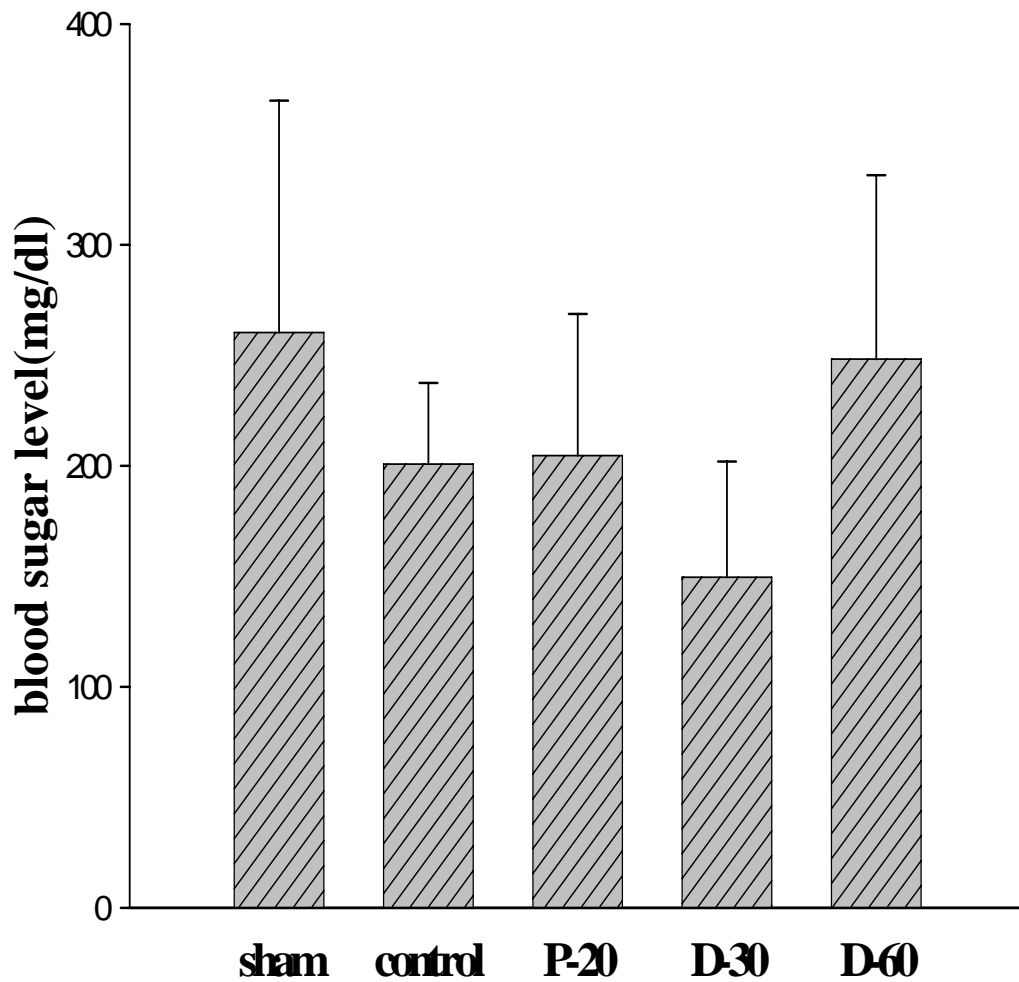


圖 4.6 丹皮酚對腦切血大鼠血糖的影響。血流阻斷後 90 min 時的血糖濃度，血流阻斷後 90 min 假手術組 (sham)、控制組 (control)、P-20 組、D-30 組和 D-60 組的血糖濃度相似。

表4.2 丹皮酚對腦缺血大鼠的周邊血球及動脈氣體的影響

組	血流阻斷	WBC ($10^3/l$)	RBC ($10^6/l$)	HGB (G/l)	HCT (%)	pH	PO2 (mmHg)	PCO2 (mmHg)
假手術組		7.19±2.36	8.16±0.62	15.60±1.35	45.27±3.00	7.30±0.02	93.17±6.31	40.22±3.74
	後	11.38±3.37	9.20±0.81	17.68±1.73	51.63±3.80	7.29±0.06	108.17±17.27	32.77±7.40
控制組	前	7.65±1.51	8.18±0.98	15.83±1.39	46.05±4.28	7.32±0.04	105.17±9.58	34.85±3.41
	後	16.56±7.84	8.62±1.94	16.55±3.54	48.40±9.43	7.37±0.05	103.50±11.64	26.48±5.99
P-20	前	8.84±4.52	8.16±0.50	15.60±1.20	44.75±3.68	7.29±0.04	99.33±11.72	41.88±5.59
	後	16.20±9.23	8.46±0.77	16.07±1.60	47.12±4.09	7.31±0.06	104.83±17.73	34.48±7.57
D-30	前	9.59±2.20	8.45±0.52	17.00±1.48	48.60±3.45	7.33±0.03	100.83±14.44	34.92±7.80
	後	12.42±3.88	8.04±0.68	16.03±1.57	46.68±4.78	7.36±0.03	105.33±19.33	27.72±4.12
D-60	前	8.63±2.93	8.27±0.86	15.77±1.10 ₁	45.82±1.46	7.30±0.03	108.00±12.31	41.00±7.80
	後	12.92±5.08	8.76±0.97	16.62±1.38	48.77±2.73	7.36±0.06	102.00±4.05	30.10±7.98

Mean±SD。WBC：white blood cell；RBC：red blood cell；HGB：hemoglobin；HCT：hemocrit；PO2：動脈O₂壓；PCO2：動脈CO₂壓。

4.2 第二部分實驗

4.2.1 丹皮酚對缺血—再灌流損傷大鼠大腦皮質 NF- κ B 活性的影響

SD 大鼠兩側總頸動脈和右中大腦動脈血流阻斷 90 min，再灌流 24 h 後右側大腦皮質 NF- κ B 的活性假手術組、控制組和 P-20 組分別為 100 %、45 %和 78 %，以假手術組為最高、其次為 P-20 組，而最低的為控制組 ($p < 0.01$, $p < 0.05$ ；圖 4.7、4.8)。左側 NF- κ B 的活性假手術組、控制組和 P-20 組之間沒有顯著的差異 (圖 4.7、4.9)。

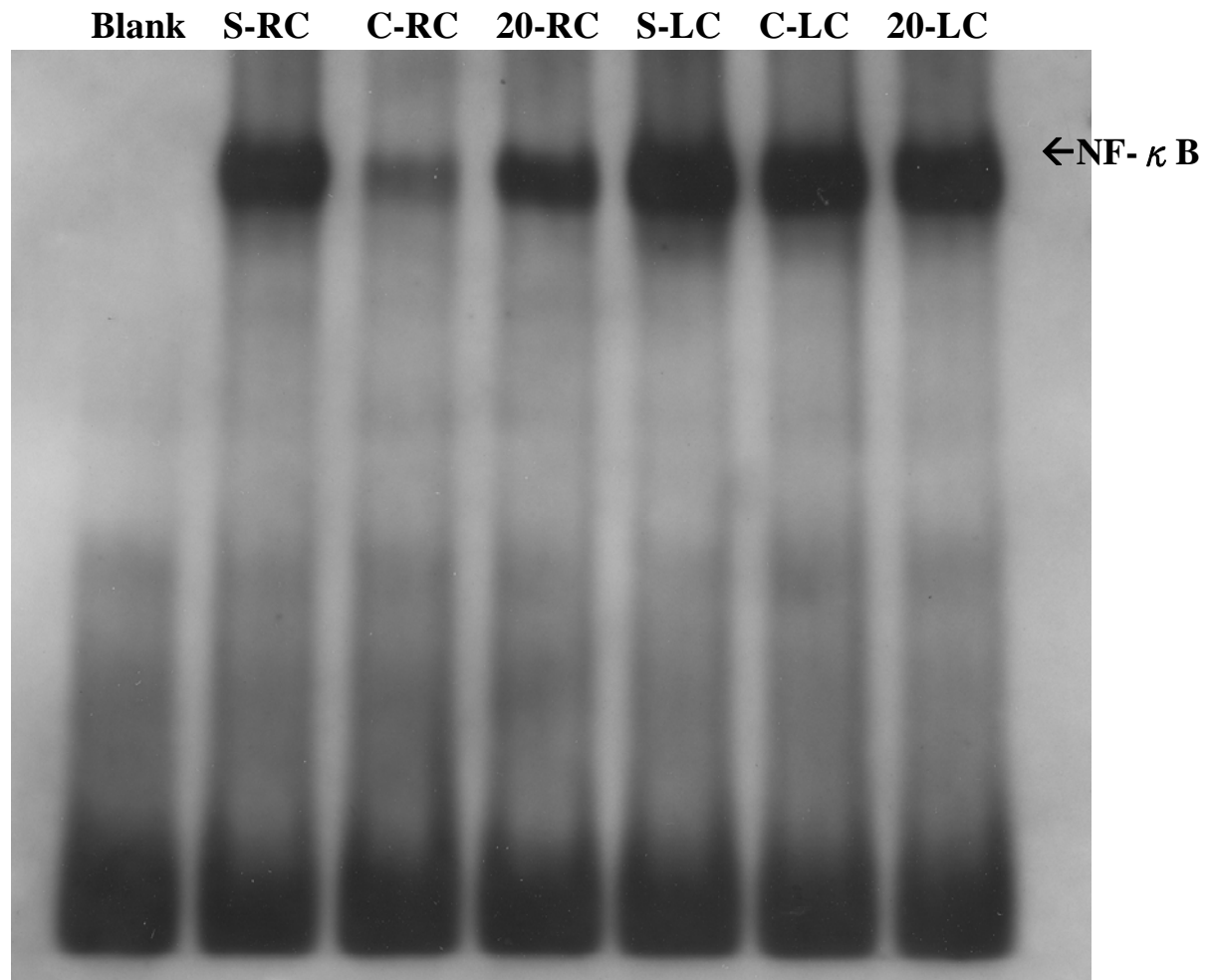


圖 4.7 丹皮酚對缺血—再灌流損傷大鼠大腦皮質 NF- κ B 活性的影響。右側大腦皮質的 NF- κ B 活性假手術組 (S-RC) 最高、其次為 P-20 組 (20-RC)，最低的為控制組 (C-RC)。左側大腦皮質假手術組 (S-LC)、控制組 (C-LC) 和 P-20 組 (20-LC) 之間則相似。

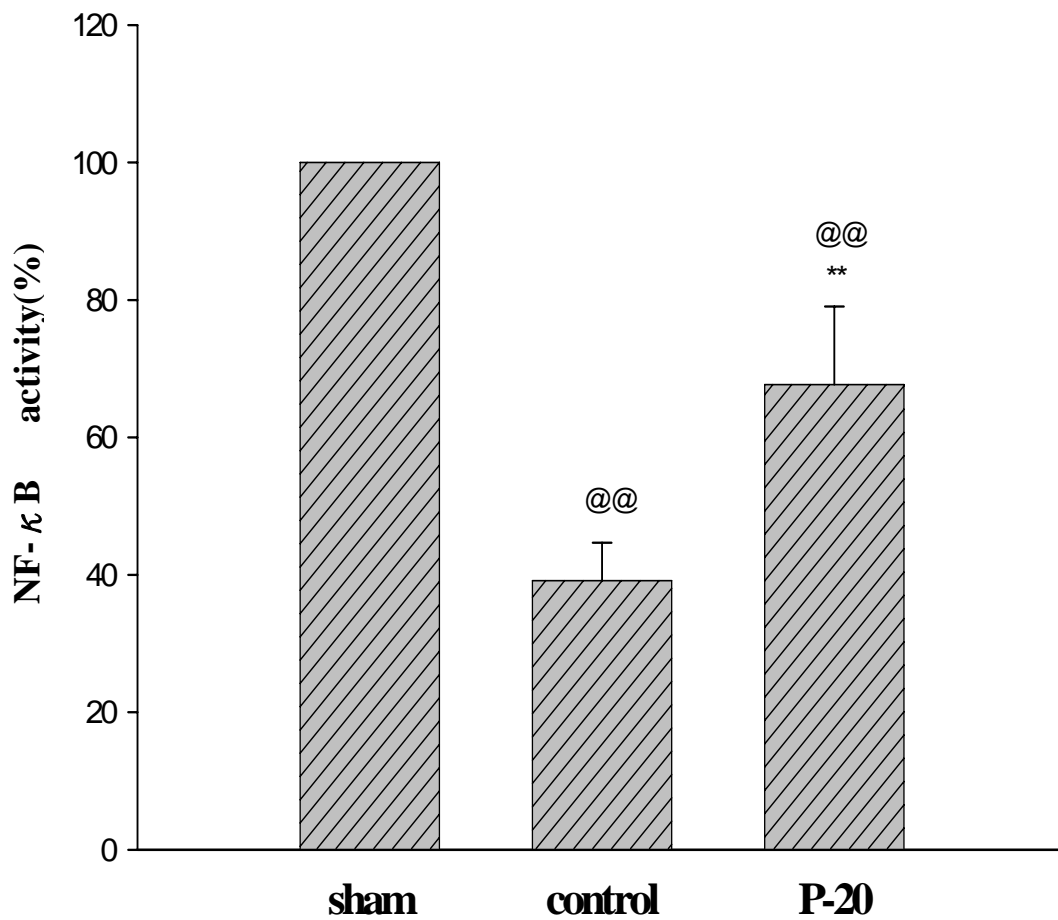


圖 4.8 丹皮酚對缺血—再灌流損傷大鼠大腦皮質 NF- κ B 活性的影響。右側大腦皮質的 NF- κ B 活性假手術組最高、其次為 P-20 組，最低的為控制組。 $*p<0.05$ ， $**p<0.01$ 值與 control 組相比較； $@p<0.05$ ， $@@p<0.01$ 值與 sham 相比較。

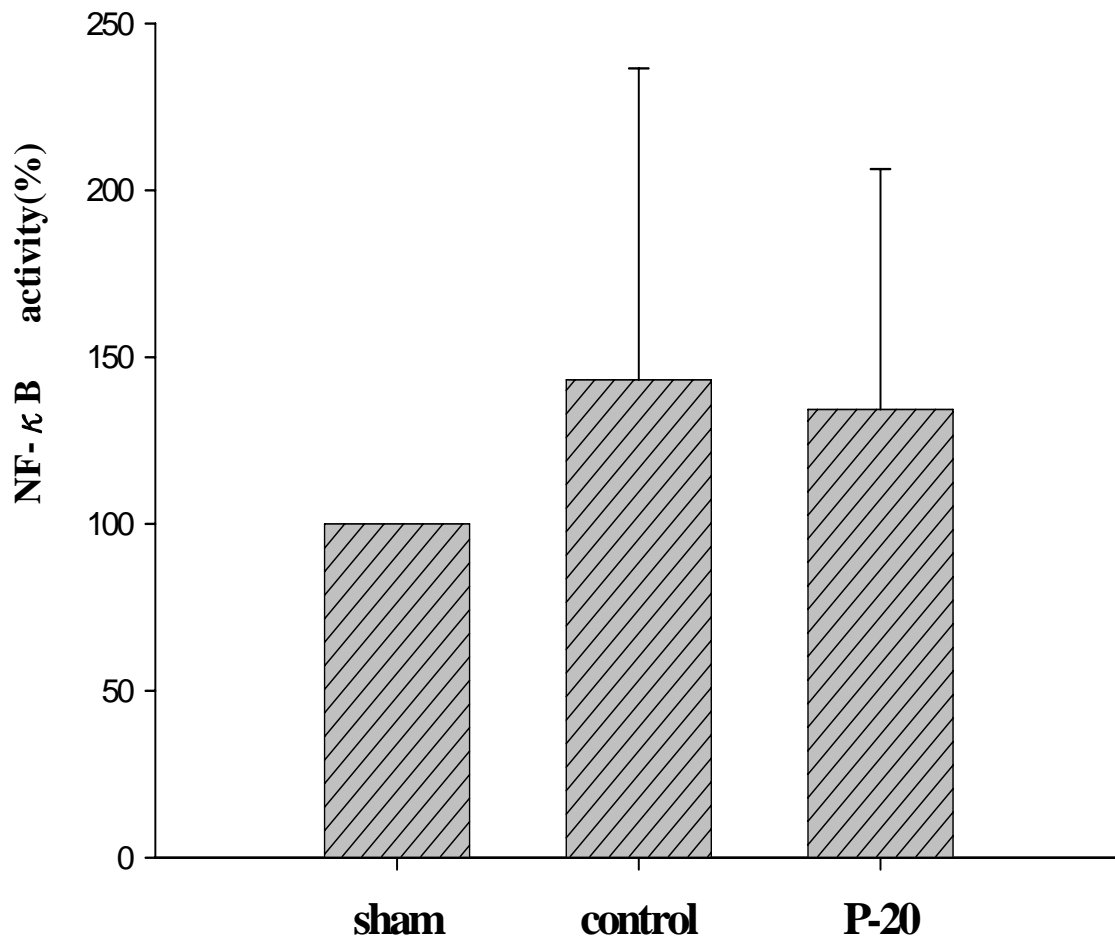


圖 4.9 丹皮酚對缺血—再灌流損傷大鼠大腦皮質 NF- κ B 活性的影響。左側大腦皮質 NF- κ B 的活性假手術組 (sham)、控制組 (control) 和 P-20 組之間相似。

4.2.2 丹皮酚對缺血—再灌流損傷大鼠大腦皮質 AP-1 活性的影響

SD 大鼠兩側總頸動脈和右中大腦動脈血流阻斷 90 min，再灌流 24 h 後左側和右側大腦皮質 AP-1 活性假手術組、控制組和 P-20 組之間都沒有顯著差異 (all $p > 0.05$ ；圖 4.10)。

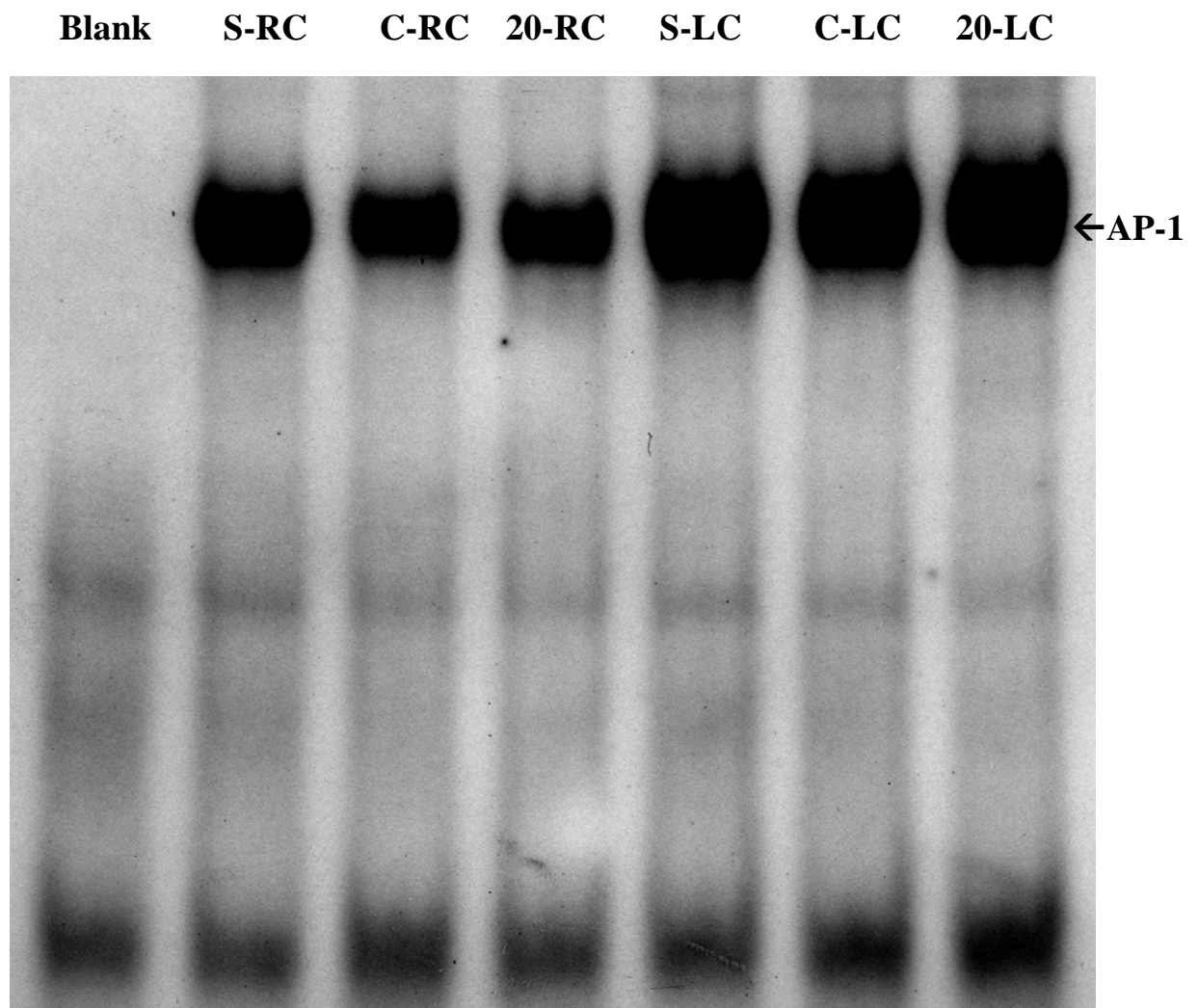


圖 4.10 丹皮酚對缺血—再灌流損傷大鼠大腦皮質 AP-1 活性的影響。右側大腦皮質的 AP-1 活性假手術組 (S-RC)、P-20 組 (20-RC) 和控制組 (C-RC) 之間相似。左側大腦皮質的 AP-1 活性假手術組 (S-LC)、P-20 組 (20-LC) 和控制組 (C-LC) 之間也相似。

第五章 討論

5.1 本研究結果前後一致值得信賴

本研究的結果顯示 SD 大鼠兩側總頸動脈和右中大腦動脈阻斷血流 90 min，經 24 h 再灌流後，大鼠出現腦梗塞及神經缺損。丹皮酚 20 mg/kg 於血流阻斷前 20 min 靜脈注射能減少大鼠的梗塞面積和神經缺損等級，這個結果與我們先前研究的結果一致⁵⁰，說明本研究前後結果一致值得信賴。

5.2 丹皮酚治療腦梗塞其療效與給藥時間點有密關係

本研究的結果顯示丹皮酚 20 mg/Kg 於兩側總頸動脈和右中大腦動脈血流阻斷前 20 min 和阻斷後 30 min 靜脈注射給藥，兩者都能減少大鼠的梗塞面積和神經缺損，但血流阻斷後 60 min 則沒有相似的結果，這個結果推測丹皮酚能有效用於腦梗塞的治療，但其療效與治療的 time widow 有密切關連。

5.3 丹皮酚不會改變腦缺血狀態的直腸溫度、心率和平均動脈壓

本研究的結果顯示假手術組、控制組和丹皮酚治療組於兩側總頸動脈和右中腦動脈血流阻斷前，以及阻斷 90 min 時的直腸溫度、心率和平均動脈壓都相似，說明丹皮酚不會改變腦缺血 SD 大鼠的直腸溫度、心

率和平均動脈壓。

5.4 丹皮酚不會改變腦缺血狀態的周邊血液的血球和血糖濃度

本研究的結果顯示假手術組、控制組和丹皮酚治療組於兩側總頸動脈和右中腦動脈血流阻斷前，以及阻斷 90 min 時 SD 大鼠周邊血液的 WBC、RBC、HBG、HCT 以及血糖濃度相似，說明丹皮酚不會改變腦缺血 SD 大鼠的 WBC、RBC、HBG、HCT 以及血糖濃度。

5.5 丹皮酚減少缺血—再灌流損傷大鼠腦梗塞與 NF- κ B 表現有關

有研究發現 NF- κ B 活性上升是發炎細胞的浸潤的指標⁵⁸，NF- κ B 在缺血—再灌流後的 15-30 min 明顯的上升，但在 60 min 後到 120h 間會逐漸下降至基礎值⁵⁹，推測 NF- κ B 的活性變化與時間有關。另有研究認為缺血—再灌流的 24 h 內 NF- κ B 的活性不會上升^{35,60}。本研究的結果顯示腦梗塞側大腦假手術組的 NF- κ B 的活性最高、其次為丹皮酚治療組，最低的為控制組，但非梗塞側大腦則三組相似，推測丹皮酚有保護神經細胞的作用，這種推論是因我們的結果顯示丹皮酚前治療或血流阻斷後 30 min 治療都能減少腦梗塞面積。丹皮酚具有抗發炎止痛，能抑制發炎物質已被報告⁶¹。有研究發現 NF- κ B 的活性在腦梗塞發生後的 3 h 達到高峰⁶²，而另有研究則認為梗塞發生後的 5-7 天³⁵。另外，我們認為 NF- κ B 活性在控制組呈現最低的原因是由於神經細胞大量的

死亡，而丹皮酚發揮神經保護作用而減少神經細胞的死亡，我們的推論與右大腦缺血誘發神經細胞死亡可以減少 NF- κ B 活性一致⁶²。

5.6 丹皮酚減少缺血—再灌流損傷大鼠腦梗塞與 AP-1 表現的關係，需要進一步的研究

本研究的結果顯示假手術組、控制組和丹皮酚治療組的 AP-1 活性於腦梗塞側和非梗塞側三者相似，這個結果代表何種意義不知，因此有必要更進一步的研究。



第六章 結論

本研究說明丹皮酚前治療和血流阻斷後 30 min 治療能減少腦梗塞面積和神經缺損，而血流阻斷後 60 min 則沒有相似的效果，推論丹皮酚對人類腦梗塞的治療有益，但療效與給予丹皮酚治療的 time widow 有密切關係。丹皮酚對於神經的保護作用可能與 NF- κ B 的途徑相關，至於與 AP-1 的關係需做進一步的研究，以釐清其彼此間的相互關係。



參考文獻

1. 衛生署 2010 年 衛生指標白皮書.
2. Astrup J, Siesjo BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke*. 1981;12:723-725
3. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20:84-91
4. Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part ii: Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg*. 1992;77:337-354
5. Emsley HC, Tyrrell PJ. Inflammation and infection in clinical stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22:1399-1419
6. del Zoppo GJ, Becker KJ, Hallenbeck JM. Inflammation after stroke: Is it harmful? *Arch Neurol*. 2001;58:669-672
7. Stoll G, Jander S, Schroeter M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol*. 1998;56:149-171
8. Baldwin AS, Jr. Series introduction: The transcription factor NF-kappa B and human disease. *J Clin Invest*. 2001;107:3-6
9. Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Neumann H, Wekerle H, Baeuerle PA. Constitutive nf-kappa b activity in neurons. *Mol Cell Biol*. 1994;14:3981-3992
10. Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci*. 2003;26:248-254
11. Uno H, Matsuyama T, Akita H, Nishimura H, Sugita M. Induction of tumor necrosis factor-alpha in the mouse hippocampus following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997;17:491-499
12. Sairanen TR, Lindsberg PJ, Brenner M, Siren AL. Global forebrain ischemia results in differential cellular expression of interleukin-1beta (IL-1 beta) and its receptor at mrna and protein level. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997;17:1107-1120
13. Zhang Z, Chopp M, Goussev A, Powers C. Cerebral vessels express interleukin 1

- beta after focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 1998;784:210-217
14. Minami M, Kuraishi Y, Satoh M. Effects of kainic acid on messenger rna levels of IL-1 beta, IL-6, tnf alpha and lif in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;176:593-598
 15. Nichols TC. NF-kappa B and reperfusion injury. *Drug News Perspect.* 2004;17:99-104
 16. Krasnow SW, Zhang LQ, Leung KY, Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1, and phorbol myristate acetate are independent activators of nf-kappa b which differentially activate t cells. *Cytokine.* 1991;3:372-379
 17. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and hiv-1. *Embo J.* 1991;10:2247-2258
 18. Pahl HL, Baeuerle PA. The er-overload response: Activation of NF-kappa B. *Trends Biochem Sci.* 1997;22:63-67
 19. Guerrini L, Molteni A, Wirth T, Kistler B, Blasi F. Glutamate-dependent activation of NF-kappa B during mouse cerebellum development. *J Neurosci.* 1997;17:6057-6063
 20. Huang CY, Fujimura M, Noshita N, Chang YY, Chan PH. Sod1 down-regulates nf-kappab and c-myc expression in mice after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001;21:163-173
 21. Schneider A, Martin-Villalba A, Weih F, Vogel J, Wirth T, Schwaninger M. NF-kappa B is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia. *Nat Med.* 1999;5:554-559
 22. Peng M, Huang L, Xie ZJ, Huang WH, Askari A. Oxidant-induced activations of nuclear factor-kappa b and activator protein-1 in cardiac myocytes. *Cell Mol Biol Res.* 1995;41:189-197
 23. Grilli M, Pizzi M, Memo M, Spano P. Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of nf-kappab activation. *Science.* 1996;274:1383-1385

24. Mattson MP, Goodman Y, Luo H, Fu W, Furukawa K. Activation of nf-kappab protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: Evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration. *J Neurosci Res.* 1997;49:681-697
25. de Erasquin GA, Hyrc K, Dorsey DA, Mamah D, Dokucu M, Masco DH, Walton T, Dikranian K, Soriano M, Garcia Verdugo JM, Goldberg MP, Dugan LL. Nuclear translocation of nuclear transcription factor-kappa B by alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors leads to transcription of p53 and cell death in dopaminergic neurons. *Mol Pharmacol.* 2003;63:784-790
26. Tamatani M, Che YH, Matsuzaki H, Ogawa S, Okado H, Miyake S, Mizuno T, Tohyama M. Tumor necrosis factor induces bcl-2 and bcl-x expression through nfkappab activation in primary hippocampal neurons. *J Biol Chem.* 1999;274:8531-8538
27. Tagliatela G, Robinson R, Perez-Polo JR. Inhibition of nuclear factor kappa b (nfkappab) activity induces nerve growth factor-resistant apoptosis in PC 12 cells. *J Neurosci Res.* 1997;47:155-162
28. Lezoualc'h F, Behl C. Transcription factor nf-kappab: Friend or foe of neurons? *Mol Psychiatry.* 1998;3:15-20
29. Bijur GN, De Sarno P, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3beta facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis. Protection by lithium. *J Biol Chem.* 2000;275:7583-7590
30. Collaco-Moraes Y, Aspey BS, de Belleruche JS, Harrison MJ. Focal ischemia causes an extensive induction of immediate early genes that are sensitive to mk-801. *Stroke.* 1994;25:1855-1860; discussion 1861
31. Gass P, Spranger M, Herdegen T, Bravo R, Kock P, Hacke W, Kiessling M. Induction of fos and jun proteins after focal ischemia in the rat: Differential effect of the n-methyl-d-aspartate receptor antagonist mk-801. *Acta Neuropathol (Berl).* 1992;84:545-553

32. Herdegen T, Leah JD. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: Control of gene expression by jun, fos and krox, and creb/atf proteins. *Brain Res Brain Res Rev.* 1998;28:370-490
33. Dragunow M, Beilharz E, Sirimanne E, Lawlor P, Williams C, Bravo R, Gluckman P. Immediate-early gene protein expression in neurons undergoing delayed death, but not necrosis, following hypoxic-ischaemic injury to the young rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 1994;25:19-33
34. Kockel L, Zeitlinger J, Staszewski LM, Mlodzik M, Bohmann D. Jun in drosophila development: Redundant and nonredundant functions and regulation by two mapk signal transduction pathways. *Genes Dev.* 1997;11:1748-1758
35. Salminen A, Liu PK, Hsu CY. Alteration of transcription factor binding activities in the ischemic rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;212:939-944
36. Ginsberg MD, Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke.* 1989;20:1627-1642
37. McAuley MA. Rodent models of focal ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1995;7:153-180
38. Memezawa H, Minamisawa H, Smith ML, Siesjo BK. Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *Exp Brain Res.* 1992;89:67-78
39. Ito WD, Schaarschmidt S, Klask R, Hansen S, Schafer HJ, Mathey D, Bhakdi S. Infarct size measurement by triphenyltetrazolium chloride staining versus in vivo injection of propidium iodide. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29:2169-2175
40. Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke.* 1986;17:1304-1308
41. 陳可冀. 血瘀證與活血化瘀研究. 1999:1-26
42. 郭會昌. 中風病因學說的形成和發展. 雲南中醫學院學報. 1995;18:24-25
43. 李方軍. 牡丹皮化學成分及藥理作用研究進展. 安徽醫藥. 2004;8:9-10
44. 趙良才. 丹皮酚的心血管系統藥理研究進展. 安徽醫藥. 2005;9:725-726

45. 戴敏. 丹皮酚對高脂血症大鼠動脈內皮細胞的保護作用. 中國中醫基礎醫學雜誌. 2001;7:38-40
46. 孫文芳. 丹皮酚對大鼠腦缺血再灌注後細胞間黏附分子-1 表達的影響. 中國臨床康復. 2004;8:3792-2793
47. 張衛國. 丹皮酚抗大鼠心肌缺血再灌注損傷與抗膜脂質過氧化作用. 藥學學報. 1994;29:145-148
48. 張廣欽. 丹皮酚對大鼠反覆性腦缺血的保護作用. 中藥材. 1997; 20:626-628
49. Kim SH, Kim SA, Park MK, Kim SH, Park YD, Na HJ, Kim HM, Shin MK, Ahn KS. Paeonol inhibits anaphylactic reaction by regulating histamine and tnf-alpha. Int Immunopharmacol. 2004;4:279-287
50. Hsieh CL, Cheng CY, Tsai TH, Lin IH, Liu CH, Chiang SY, Lin JG, Lao CJ, Tang NY. Paeonol reduced cerebral infarction involving the superoxide anion and microglia activation in ischemia-reperfusion injured rats. J Ethnopharmacol. 2006
51. 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. 1988;8:474-485
52. J K. Experimental studies of ischemic brain edema, i: A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. Jpn J Stroke. 1986;8:1-8
53. Nishigaya K, Yoshida Y, Sasuga M, Nukui H, Ooneda G. Effect of recirculation on exacerbation of ischemic vascular lesions in rat brain. Stroke. 1991;22:635-642
54. Longa E. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke. 1989;20:84-91
55. Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. Nucleic Acids Res. 1983;11:1475-1489
56. Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa b. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86:2336-2340

57. Hsiang CY, Wu SL, Cheng SE, Ho TY. Acetaldehyde-induced interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha production is inhibited by berberine through nuclear factor-kappab signaling pathway in hepg2 cells. *J Biomed Sci.* 2005;12:791-801
58. Stephenson D, Yin T, Smalstig EB, Hsu MA, Panetta J, Little S, Clemens J. Transcription factor nuclear factor-kappa b is activated in neurons after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20:592-603
59. Carroll JE, Howard EF, Hess DC, Wakade CG, Chen Q, Cheng C. Nuclear factor-kappa b activation during cerebral reperfusion: Effect of attenuation with n-acetylcysteine treatment. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998;56:186-191
60. Gabriel C, Justicia C, Camins A, Planas AM. Activation of nuclear factor-kappab in the rat brain after transient focal ischemia. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999;65:61-69
61. Chou TC. Anti-inflammatory and analgesic effects of paeonol in carrageenan-evoked thermal hyperalgesia. *Br J Pharmacol.* 2003;139:1146-1152
62. Irving EA, Hadingham SJ, Roberts J, Gibbons M, Chabot-Fletcher M, Roshak A, Parsons AA. Decreased nuclear factor-kappab DNA binding activity following permanent focal cerebral ischaemia in the rat. *Neurosci Lett.* 2000;288:45-48

Effect of paeonol at different time administration on cerebral infarct induced by ischemia-reperfusion injured Sprague-Dawley rat

TSUNG-CHIEH LI

Major Professor:Ching-Liang Hsieh

Institute of Chinese Medical Science

China Medical University

According to our previous study that the paeonol can decrease the brain infarction area and neurological deficit grading score. This time, the purpose of our study is to investigate the effect of paeonol at different time and the relation to nuclear factor- κ B(NF- κ B) and activator protein-1 (AP-1). The model of the ischemia-reperfusion injured cerebral infarct was bilateral common carotid arteries and right middle cerebral artery occluded and reperfusion for 24 hours. The paeonol 20 mg/Kg was administered, respectively, from right femoral vein of rat before 20 min and 30、60 min after the cerebral blood was occluded. The therapeutic index of the paeonol is according to the cerebral infarcted area and neurological deficit score. Our study also investigate the NF- κ B and AP-1 activity between the infarcted side and non-infarcted side. The results revealed that the paeonol 20 mg/Kg before 20 min and 30 min after the occluded from right femoral i.v injection can decrease the ischemia- reperfusion rats cerebral infarcted area and neurological deficit score. But the paeonol 20 mg/Kg i.v injection after the occlusion 60 min doesn't have the same effect. In addition, the NF- κ B binding activity in the sham group (the cerebral artery didn't occluded) have the highest level. The second is the paeonol treated group and followed the control group(the cerebral artery was occluded). Besides, the AP-1 binding activity were the same among the triple group.

In conclusion, paeonol pretreatment and 30 min after the occlusion can decrease cerebral infarcted area and neurological deficit score , but the

60 min after occluding the cerebral blood flow doesn't have the same effect. Therefore, we suggest that paeonol have the benefit of the human cerebral infarction. And the treatment effect is related with the time window of paeonol closely. Otherwise, paeonol have the neuron protection but the relation with the AP-1 should be for advanced study.

Keywords: Paeonol, Different time , Cerebral infarct, Neurological deficit, NF- κ b, Activator protein-1

