

中國醫藥大學中醫學系博士班
博士論文

指導教授：陳悅生 博士

共同指導教授：黃志揚 博士

論文題目

葛根與黨參對周邊神經再生之影響

**Effect of *Pueraria lobata* and *Codonopsis pilosula* on
regeneration of peripheral nerve**

研究生：陳顯東

中華民國九十九年五月五日

目錄

第一章 前言.....	1
第二章 文獻探討.....	6
第一節 神經系統.....	6
2-1-1 中樞神經系統.....	7
2-1-2 周邊神經系統.....	7
2-1-3 神經元.....	8
第二節 周邊神經再生.....	9
2-2-1 周邊神經損傷在中醫學的定位.....	9
2-2-2 周邊神經損傷之分類.....	10
2-2-3 周邊神經細胞在受傷後的變化.....	11
2-2-4 周邊神經再生過程.....	13
第三節 許旺神經膠細胞(Schwann cell)與神經再生.....	14
第四節 葛根.....	15
2-4-1 古籍文獻探討.....	15
2-4-2 臨床應用.....	18
2-4-3 現代藥理學研究.....	18
第五節 周邊神經斷傷的修復術.....	21
2-5-1 各種神經修補技術.....	21

2-5-2	神經管接合術.....	24
2-5-3	神經管內添加促進神經再生的物質.....	25
2-5-4	矽膠管內神經再生之細胞學變化.....	27
第六節	黨參.....	30
2-6-1	古籍文獻探討.....	30
2-6-2	臨床應用.....	34
2-6-3	現代藥理研究.....	35
第七節	神經再生之訊息傳遞路徑.....	36
2-7-1	IGF-I 協調的訊息增生路徑.....	36
2-7-2	細胞週期.....	37
2-7-3	MAPKs 訊息傳遞路徑.....	39
2-7-4	FGF-2 協調的訊息移動路徑.....	40
第三章	材料與方法.....	42
第一節	實驗材料.....	42
第二節	實驗方法.....	45
3-2-1	PC12 細胞培養.....	45
3-2-2	葛根血清代謝物.....	46
3-2-3	神經元(PC12)細胞型態變化實驗.....	46
3-2-4	蛋白質定量與 Western blot.....	46

3-2-5	神經突突出實驗.....	47
3-2-6	動物坐骨神經之神經管接合術.....	49
3-2-7	電生理檢測.....	51
3-2-8	組織切片與髓鞘染色.....	53
3-2-9	組織學定量分析.....	54
3-2-10	RSC96 細胞培養.....	56
3-2-11	黨參萃取.....	57
3-2-12	細胞存活測定 (MTT assay).....	57
3-2-13	傷口癒合實驗 (Wound healing assay).....	57
3-2-14	細胞移動實驗 (Migration assay).....	58
3-2-15	明膠蛋白酵素電泳法 (Gelatin zymography).....	58
3-2-16	統計.....	59
第四章	結果.....	60
4-1	SMP 對 PC12 細胞型態之影響.....	60
4-2	SMP 對 NGF 所誘導的神經軸突生長之影響.....	61
4-3	SMP 對 PC12 細胞分化指標蛋白質(Synapsin I)表現之影響.....	62
4-4	SMP 對斷傷坐骨神經再生之影響.....	63
4-5	SMP 對再生的神經面積與髓鞘化軸突數目之影響.....	65

4-6	SMP 對再生神經電生理之影響.....	66
4-7	黨參對 RSC96 細胞增生之影響.....	67
4-8	黨參對 ERK 與 p38 訊息依賴性路徑促進作用.....	69
4-9	黨參對 RSC96 細胞存活與誘導細胞週期蛋白表現 促進作用	71
4-10	黨參對 RSC96 細胞移動之影響.....	72
第五章	討論.....	75
第六章	結論.....	81
參考文獻	83
英文摘要	96
謝辭	98

略字表

uPA	Urokinase plasminogen activater
SMP	Serum metabolites of the Puerariae radix
NGF	Nerve Growth Factor
PCNA	Proliferation Cell Nuclear Antigen
IGF-1	Insulin- like growth factor-1
IGF-1R	Insulin- like growth factor-1 receptor
Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
ERK	Extracellular signal-regulated protein kinase
p38	38 kDa Stress Activated Protein Kinase
FGF	Fibroblast growth factor
MMP	Matrix metalloproteinases
CNS	Central Nervous System
PNS	Peripheral Nervous System
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
MAP	Muscle action potentials
MTT	3-(4 , 5)-dimethylthiahiazo(-z-y1)-3 , 5-di- pheny -tetrazoliumromide
CDK	Cyclin-dependent kinase
ECM	Eextracellular matrix
CPPS	Crude polysacchardides
COP-I	Codonopsis polysaccharide-I

圖目錄

圖 2.1	細胞週期(Cell cycle).....	38
圖 2.2	MAPK 訊息路徑.....	40
圖 2.3	胞漿素原活化瀑布(cascade).....	41
圖 3.1	神經斷端與矽膠管縫合之步驟.....	51
圖 3.2	電生理檢測圖示.....	52
圖 3.3	神經肌肉複合動作電位.....	53
圖 3.4	選取組織切片用的再生神經組織.....	54
圖 4.1	SMP 對 PC12 細胞型態之影響.....	61
圖 4.2	SMP 對 NGF 誘導的神經軸突之影響.....	62
圖 4.3	synapsin I 的代表性 western blot 圖和定量結果	63
圖 4.4	再生神經橫切面圖.....	65
圖 4.5	矽膠管內再生神經的型態分析.....	66
圖 4.6	MAPs分析.....	67
圖 4.7	黨參對 RSC96 細胞增生之影響.....	69
圖 4.8	黨參對 ERK 與 p38 訊息依賴性路徑促進作用.....	71
圖 4.9	黨參對 RSC96 細胞存活與誘導細胞週期蛋白促進作用.....	72
圖 4.10	黨參對 RSC96 細胞移動之影響.....	74
圖 5.1	黨參對 Schwann cells 增生與移動機制圖.....	80

表目錄

表 3.1 抗體資料.....44



葛根與黨參對周邊神經再生之影響

陳顯東

指導教授：陳悅生

中國醫藥大學 中國醫學研究所

摘要

中草藥使用於臨床上已有幾千年歷史。然而，有關中草藥對周邊神經再生的影響，至今仍極少被深入研究。本實驗目的為針對葛根與黨參，利用細胞與動物模式，探討對周邊神經再生之影響。

有關葛根的研究，我們利用細胞與動物實驗評估葛根血清代謝物對周邊神經再生之影響。結果顯示葛根血清代謝物在不同濃度顯著引起神經生長因子所協調的 PC12 細胞之神經軸突生長及 synapsin I 蛋白表現。動物實驗顯示充填有葛根血清代謝物之矽膠管做為大鼠坐骨神經端傷間距之架橋，相較於控制組，有較多成長之再生神經、較大的神經切面積與神經內膜面積之總和、以及較多的髓鞘化軸突數目。

有關黨參對周邊神經再生的影響，我們評估黨參對於史旺細胞移動與增生之影響。黨參劑量依賴性的促進增殖細胞核抗原表現、細胞存活與傷口癒合。此外，我們也發現黨參能刺激 IGFs-IGFIR-Akt-Bcl2 訊息路徑蛋白、細胞週期蛋白與 MAPK 訊息路徑調節蛋白 ERK、p38 之表現。在移動方面則是增加 FGF-2-uPA-MMPs 路徑蛋白表現。

葛根可能是一極具潛力的促進神經生長劑；黨參是極具潛力神經再生促進劑。

關鍵字：葛根；周邊神經再生；PC12 細胞；矽膠管；血清代謝物；黨參；增生；轉移；許旺細胞



第一章

前言

神經再生已經成為神經醫學領域熱門重點研究課題。臨床患者罹患中風、脊髓損傷等神經傷害後，無法復原而造成終身殘障，如半身不遂、下肢或四肢癱瘓等，影響家庭和社會甚鉅，尋求有效的治療方法不僅可以改善患者身體的缺憾，也可以減輕政府和社會的經濟負擔壓力，凸顯出神經再生的研究是非常重要的。

神經再生的過程是相當複雜的，生物體內神經分布區域的些許差異，就會產生神經再生難易程度的不同。例如，哺乳類動物的神經系統就區分為中樞神經及周邊神經系統。相較於周邊神經，中樞神經的再生就困難了許多。周邊神經由神經膠細胞、血管、神經外膜、圍神經膜、神經內膜及其內的神經纖維組成。Schwann cell (史旺神經膠細胞) 是周邊神經系統的支持細胞，包覆於軸突的外部，能隔離每個神經細胞間的電子傳遞作用，以避免各種不同神經傳導路徑相互干擾。當神經由於剪切或擠壓等導致神經受傷時，包圍在軸突外的 Schwann cells 會重新進行細胞分裂，並大量增生與移動至受損神經遠端片段；分化形成周邊神經髓鞘以支持軸突再生。同時還能分泌多種生長因子，誘導刺激和調控軸

突的再生和髓鞘的形成¹。倘若神經發生損傷卻無經過適當處理，則很容易產生神經瘤，使得受損神經無法恢復。

神經斷傷(Neurotmesis)，在過去已研究出許多的治療方式。神經斷裂後的間隙，影響了神經再生與預後，所以周邊神經斷裂時，斷裂的間隙距離是選用何種神經接合術時的重要考慮因素。就目前而言，神經因外傷或其他原因造成結斷後，有下列四種修補技術：

1. 斷端直接縫合 (End-to-end suturing)
2. 神經束縫合 (Fascicular suturing)
3. 神經移植 (Nerve grafts)
4. 神經管接合 (Nerve bridges)

神經管接合術是將神經兩斷端置於一圓管的兩端，並利用此圓管來導引及支持再生的神經纖維成長^{2,3}。至今已有許多不同的生物材料被用來製造神經管，如高分子材料^{4,5}，或是動物體內的骨頭、肌肉、動靜脈⁶等。由於矽膠製神經管具有高生物適應性、透明及高柔軟度等優點，近年已被大量使用於神經修補研究中⁷。且矽膠在生物適應上最為穩定；曾有文獻報告，矽膠製神經管甚至在三年人體試驗中也沒有產生嚴重排斥作用⁸。利用神經管來修補最大神經斷隙長度已達 20 mm⁹，但一般仍以 10 mm 內之間隔修補較為成功^{10,11}。

黃酮類 (flavonoids) 又名生物類黃酮化合物 (bioflavonoids) ，是色原酮或色原烷的衍生物，以 C6—C3—C6 結構為基本母核的天然產物，即兩個苯環經過 3 個碳原子結合而成。其中 C3 部分可以是脂鏈，或與 C6 部分形成六元或五元氧雜環。黃酮類廣泛存在於中草藥植物的各個部位，尤其是花、葉部位，主要存在於芸香科、唇形科、豆科、傘形科、銀杏科與菊科中。有文獻估計約有 20% 的中草藥中含有黃酮類化合物，可見其資源之豐富。許多研究已表明黃酮類化合物具有多種生物活性，除利用其抗菌、消炎、抗突變、降壓、清熱解毒、鎮靜、利尿等作用外，在抗氧化、抗癌、防癌、抑制脂肪酶等方面也有顯著效果，然而對神經再生方面的研究則較少探討。

中藥葛根，始載於《本經》¹²。具有擴張冠狀血管和改善心肌缺血缺氧狀態、抗氧化作用及改善腦循環作用等藥理作用。其內含有三種主要成分：大豆素(daidzein)，大豆苷(daidzin)，葛根素(puerarin)。大豆素與大豆苷具有促進軸突自然生長¹³。葛根素為葛根內的主要成分及含量最多之異黃酮物質；除了具有治療糖尿病¹⁴與心肌衰弱¹⁵等多項生物活性外，給予大腦局部缺血動物葛根素，能顯著降低大腦皮層梗塞的體積，並改善神經機能，降低細胞凋亡，具有神經保護之功效¹⁶。另外，葛根素會刺激成骨細胞增生與骨頭形成¹⁷。由於葛根具有神經保護、刺激骨細胞增生與形成之功效；因此，我們推測葛根之血清代謝物(serum

metabolites of the Puerariae radix ; SMP)也許能促進周邊神經再生。為證明這個假設，我們利用細胞與動物探討 SMP 對神經之影響，以證實 SMP 對神經再生之刺激效果。

此外，神經再生的重要機制也分別包括：增生路徑 (IGFs-IGFIR-Akt-Bcl2)與移動路徑(FGF-2-uPA-MMP9)。IGF-I (Insulin-like growth factor-I) 會在增生中的Schwann cell內合成，刺激胎兒神經元生長與分化，及神經軸突生長；再者，IGF-I 於細胞週期中也具有前進因子 (Progression factor) 的功能，致使DNA的合成與細胞增生。IGF-I 也對細胞存活相當重要。近來實驗發現 IGF-I 能透過活化Akt路徑與抗凋亡蛋白表現，而保護神經元免於細胞凋亡的發生。此外，MAPK家族是細胞內許多重要路徑的調節者，如增生。移動方面則是以 FGF-2-uPA-MMP9為主。FGF-2為纖維母細胞生長因子，會大量表現於受傷神經組織中，以促進神經修復；且受傷後成長的細胞會分泌蛋白酶去分解細胞間或細胞與基質間的貼附，而促進細胞移動。

黨參《本經逢原》稱為“上黨人參”，為常用的中藥。臨床上可用於治療慢性低血壓、肝炎、久瀉、十二指腸潰瘍等；藥理學上具有免疫功能增強、保護心肌缺血與防止血栓形成等功效。根據研究文獻指出，黨參成分：含有多種黃酮類（黃酮醇甙）、多糖（葡萄糖甙）、甾醇、揮發油、微量生物鹼及澱粉。其中生物鹼(alkaloids)，能治療失憶、調節乙酰

膽鹼含量，並降低膽鹼酯基轉移酶活性。有關黨參於神經方面相關研究卻相當少。因此，我們推測黨參也許能促進神經再生。為證明這個假設，本篇論文我們使用了許旺細胞株（RSC96），偵測RSC96細胞增生作用及移動情形，以驗證黨參對神經再生的刺激作用；並進一步分析與神經再生相關訊息傳遞路徑，藉此探討出其刺激神經再生之分子機制。



第二章

文獻探討

第一節 神經系統 (Nerve system)

神經系統是訊息傳遞網路 (Communication network)，能讓生物體與環境間有良好的互動¹⁸。神經系統基本上是由一群特化的細胞高度複雜的聚集而成，其功能有感覺偵測、訊息整合和行為運動；另外神經系統也可以執行獨特的功能，諸如學習、記憶、意識及語言等¹⁹。它能藉著感覺要素偵測環境因子；整合要素處理訊息並記憶；再由運動要素產生運動或其他活動，利用此三個基本要素來處理內在與外在的環境資訊^{20,21}。此系統調節著身體全部的生理功能，且具有高度的複雜性²¹。

一般可將人類的神經系統分為兩大類：

(一)中樞神經系統 (central Nervous System ; CNS)：腦 (Brain) 與脊髓 (Spinal cord)所組成。

(二)周邊神經系統 (peripheral Nervous System; PNS)：腦神經 (Cranial nerve)、脊髓神經 (spinal nerve) 與相關之神經節 (ganglia) 組成。

再藉由複雜的神經纖維連結此兩神經系統，使得我們方能因應外界的環境變化而產生適當身體反應，且有思考、記憶、情緒變化的能力。

2-1-1 中樞神經系統 (CNS)

中樞神經系統包含腦與脊髓，於胚胎時期是由神經管 (Neural tube) 分化形成²²；構造組成上可分為灰質 (Gray matter) 與白質 (White matter)。腦是身體的控制中心，可以儲存、計算、整合及傳送訊息；人腦內大約有 10^{12} 個神經元，每個神經元與其他神經元有上千個連接。中樞神經系統內的神經細胞體會聚集成核(Nuclei)，神經軸突則會聚集成束狀的徑 (Track)。神經膠細胞是中樞神經的支持細胞，但它並不會在周邊神經系統中出現。神經膠細胞主要四種型式：星狀細胞(Astrocyte)、寡樹突細胞 (Oligodendrocyte)、微膠細胞 (Microglia) 和室管膜細胞 (Ependymal cell)。神經膠細胞的數量約為神經元的十倍^{18, 20, 21, 23}。

2-1-2 周邊神經系統 (PNS)

腦膜為中樞神經系統與周邊神經系統之分界，且兩系統在功能上則是以寡樹突細胞與 Schwann cell (史旺神經膠細胞)的交界處做為分界。此外，周邊神經系統也可分為兩個主要的部份：軀體神經系統 (Somatic nervous system ; SNS) 以及自主神經系統 (Autonomic nervous system ; ANS)。軀體神經系統中的感覺神經纖維 (Sensory nerve fibers) 可將身體各部份的感覺器官所搜集到的資訊傳送到大腦或脊髓；運動神經纖維 (Motor nerve fibers) 再負責將中樞神經系統所下達的命令傳到骨骼肌以

產生所需的運動。自主神經系統功能則在於調控內臟的平滑肌運動以及內分泌腺體產生內分泌激素。Schwann cell (史旺神經膠細胞) 為周邊神經系統的支持細胞，也是周邊神經的唯一的一種支持細胞¹⁹。

2-1-3 神經元 (Neuron)

神經元 (Neuron) 是神經系統基本的單位功能結構。神經元彼此的大小或形狀也許有所差異，但至少都具有三個基本構造：一個細胞體 (Cell body)、一個或多個樹突 (Dendrite) 及一個軸突 (Axon)。

(一) 細胞體 (Cell body):

包含細胞質與細胞核，是細胞合成神經蛋白質與細胞膜的地方。細胞核 (Nucleus) 通常位於細胞體的中央，典型的細胞核為灰色，形大且圓，染色質顆粒散佈其內。細胞核通常僅有一個明顯的核仁 (Nucleolus)，而該處與核糖酸 (RNA) 合成有關。故較大的核仁可能有比較高的蛋白質合成速率，因為在細胞體以及神經圖中含有大量的細胞質，唯有如此才能維持細胞質內蛋白質的平衡。

(二) 樹突 (Dendrite):

自細胞本體表面放射出來的一個或多個突起，稱為神經突 (Neurite)。負責接受訊息並傳向神經細胞體的稱為樹突。

(三) 軸突 (Axon):

負責將神經衝動傳離細胞體的一條很長神經突，亦稱為神經纖維。軸突的外部會有一層史旺神經膠細胞 (Schwann cell) 包覆，其可以隔離每個神經細胞間的電子傳遞作用，避免各種不同神經傳導路徑相互干擾。

第二節： 周邊神經再生

2-2-1 周邊神經損傷在中醫學的定位

神經系統是近代生物醫學中的名詞，在中醫的基礎理論中雖無神經系統這一名稱的論述，但有關神經系統的宏觀知識，中醫早有論述，只不過在定性、定量和定位方面比較模糊；周邊神經在此認為其與經絡學說的相關性最高。周邊神經，其內有自主神經並行，支配人體的頭面四肢軀幹與各個器官，分布的方式與心血管系統、淋巴系統相似。經脈在《黃帝內經》的定義有《素問·本藏》：經脈者，所以行血氣而榮陰陽，濡筋骨，利關節者也；《靈樞·經脈》：雷公曰：願卒聞經脈之始生。黃帝曰：經脈者，所以能決死生，處百病，調虛實，不可不通；《靈樞·海論》夫十二經脈者，內屬於府臟，外絡於肢節^{24, 25}。莊氏：經脈，即屬今之周邊循環與周邊神經系統，前者包含：動脈、靜脈和淋巴管²⁶。

所以周邊神經可視為經脈的一部分，出入於臟腑筋骨肌肉之間，遍佈於全身上下與頭面四肢。

2-2-2 周邊神經損傷之分類

神經損傷的原因可分為物理、溫度、缺血、化學等因素；大部份多歸因於物理性因素，例如擠壓、牽拉或切斷所致。外傷 (Trauma) 為常見周邊神經損傷因素^{18, 27-29}，其可分為三類：

(一) 撕裂傷 (Avulsions):

牽拉四肢力量過大，造成周邊神經因張力作用導致撕裂傷。

(二) 割裂傷 (Laceration):

由割傷所致或為骨折併發症。骨折時尖端的骨碎片割裂神經，造成神經割裂傷。

(三) 壓迫性神經病變 (Compression neuropathy):

原因為周邊神經受到壓迫，通常以解剖部位區隔。腕隧症候群 (Carpal tunnel syndrom) 是常見的病變，為正中神經在腕的位置受到橫腕韌帶壓迫所引起；其他局部損傷或是腫瘤亦會引起慢性壓迫損傷²⁹。

另外，Sudden 於 1943 年進一步將神經損傷分做為三個不同階段 (Sudden 分類法):

(一) 神經失用 (Neurapraxia):

意指於連續軸突內有局部傳導受阻現象，傳導阻斷通常持續幾星期或幾個月，神經的應激性仍然保存；包括完全的運動麻痺及少量感覺與交感神經之功能障礙。

(二) 軸突斷傷 (Axonotmesis):

為軸突在受傷階層之連續性喪失，但神經內膜仍完整，使得軸突的遠端產生 Wallerian 退化(Wallerian degeneration)。受傷神經功能恢復的時間長短，取決於再生軸突再支配原來目標組織的時間。軸突斷傷後，仍可沿著原本途徑再生與支配原本目標組織，所以預後良好。

(三) 神經斷傷:

除了軸突斷傷外，神經幹其他部份連續性的部分或全部的喪失。神經幹的其他部分包括神經內膜、圍神經膜以及神經外膜。神經斷傷後需手術修復；且神經功能癒後恢復不佳。

2-2-3 周邊神經細胞在受傷後的變化

當神經細胞的軸突被斷傷時，許多的變質性變化 (Degenerative changes) 會發生，而干擾神經的傳導路徑^{18, 28, 30-32}。

(一) 受傷害遠端之軸突部分

在受傷後的 3~5 天內，從損傷處到軸突 (Axon) 末梢切斷部分會開始變化，此過程稱為華氏退化 (Wallerian degeneration)。並且分裂成許多不規則碎片；巨噬細胞和纖維母細胞會充斥於被切斷的神經端之間的空間中，並將這些變質的軸突殘片完全清除。

(二) 傷害近端之軸突部分

連接細胞體的近端軸突部分也會發生類似遠端軸突的變化，但此變化僅蔓延到軸突被破壞處的最近一個蘭氏結處。

(三) 神經元細胞體

軸突受傷後，發生於細胞體的變化稱為逆行性退化 (Retrograde degeneration)。最典型的變化是在損後兩天，細胞體內會發生色素溶解 (Chromatolysis) 並分散至整個細胞質。此外細胞核從中央位置移至細胞的周圍，細胞體腫大變圓；若傷處越接近細胞體，色素溶解和細胞漲大的程度越大。在一些神經元中，靠近細胞體軸突的損傷可能導致神經元的死亡；相反地，傷及最遠端的軸突對細胞體來說，可能不會造成傷害。

2-2-4 周邊神經再生過程

周邊神經軸突因損傷而斷裂後，軸突遠端會逐漸地退化甚至消失。沒有與軸突接觸的 Schwann cells 瞬間增生，形成基底層管內的細胞帶，稱之為 Schwann cell column，是周邊神經系統再生軸突生長到目的地不可缺少的途徑。

神經再生過程分為三個階段：軸突芽 (Axonal sprouts)、再生軸突的生長(Regenerating axon outgrowth) 及恢復再支配原靶器官³³。周邊神經系統包含了神經元與 Schwann cell，神經軸突斷傷後，這兩種細胞的相互作用決定了神經再生的結果。

當神經軸突斷裂後，近端與遠端的軸突會發生退化變成碎片，並被巨噬細胞吞噬；而後會開始再生，產生球狀的肥大，並生成許多軸突芽 (Sprout)。軸突芽生成的同時，Schwann cell 也會開始大量的增生 (proliferation)，並移動 (migration) 到受損的部位，最後形成替代軸突的 Schwann cell column。大約在神經截斷後 2 週，這些軸突芽會被切斷部位生成之結痂所包裹，隨後連結上 Schwann cell 形成的細胞索套³⁴。當連接完成後，只有一個軸突芽可生成新的軸突，其餘地將會變質分解。隨後，Schwann cell 便會生成新髓鞘，圍繞在新的軸突上，最後，整條神經再生完成³⁵。

第三節：許旺神經膠細胞(Schwann cell)與神經再生

約 20 年前，柏恩奇提出了一個假說，質疑是否可將 Schwann cell 從自體神經組織中分離培養，並將培養後的 Schwann cell 植入於受損的神經組織，以促進神經再生³⁶。如今，Schwann cell 對於受損神經的軸突再生促進作用，早已被肯定；而其在周邊神經結構組成中的特殊地位和作用，一直是研究的重點。Schwann cell 在神經再生過程中所扮演的重要角色，可統整出以下兩點：

(一) 增生 (Proliferation)

周邊神經受損及神經纖維變性的同時，包圍在軸突外的 Schwann cell 受到損傷刺激，會重新進行細胞分裂，並大量增生；一旦變性的軸突及髓鞘被清除完後，就形成了 Schwann cell column，此 column 不僅能提供再生軸突生長的方向；待軸突再生完成後，Schwann cell 則會形成新的髓鞘³⁷⁻³⁹。其同時還能分泌神經生長因子 (Nerve growth factor ; NGF)、神經元營養因子 (Neurotrophic factors ; NTFs)、促神經軸突生長因子 (Neurite promoting factors; NPFs)和纖維連結素等 20 多種多肽類活性物質，誘導刺激和調控軸突的再生和髓鞘的形成¹。

(二) 移動 (Migration)

神經受傷後，Schwann cell 會進行增殖並移動到受損的神經遠端片段，分化形成周邊神經的髓鞘以支持軸突再生。此外，Schwann cell 也會藉由和近端的神經片段的神經纖維和基膜索 (Laminin) 交互作用，引導軸突再生^{40,41}。

也正由於 Schwann cell 於神經再生過程中，扮演著極重要的角色。近年來，有不少實驗將 Schwann cell 放至神經管中，用以增加神經再生的效果^{42,43}。有學者便將截斷神經的兩斷端，縫入已事先填入 Schwann cell 之生醫材料製成的神經管中，並藉由 Schwann cell 來引導並促進神經的再生⁴²。另外，有研究指出 Schwann cell 對於類似轉植的臨床應用來說是需要的；且所需的 Schwann cell 也可從新生老鼠周邊神經大量取得⁴⁴。

第四節：葛根

2-4-1 古籍文獻探討

葛根，始載於《本經》¹²。

(一) 別名

甜葛，粉葛根，野葛根⁴⁵，乾葛，甘葛¹²。

(二) 來源

為豆科多年生落葉藤本植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 或甘葛藤 *Pueraria thomsonii* Benth. 的乾燥根⁴⁵。

(三) 產地

主產於河南、湖南、浙江、四川等地，全國大部地區均有分布⁴⁶。

(四) 性狀鑑別

葛為野生之蔓性灌木，全株被濃密之棕色粗毛，三出複葉，有長柄，裏帶白色，夏秋之交，腋出總狀花序，着紫紅色之蝶形花，根大，長達25公尺，徑達20公分⁴⁷。

(五) 炮製

1. 揀去雜質，洗淨，用水淨泡，撈出，潤透，及時切片，曬乾，即生葛根。
2. 或以少量麩皮撒入熱鍋內，待冒煙後，將葛片倒入，上面覆蓋剩下的麩皮，煨至下層麩皮呈焦黃色時，隨即以鐵鏟將葛根與麩皮不斷翻動，至葛根片呈深黃色為度，取出，篩去麩皮，晾透，即煨葛根¹²。

(六) 藥性

性味辛、甘，平；歸脾、胃經¹²。

1. 《本經》：味甘，平。
2. 《名醫別錄》：無毒，生根汁，大寒。
3. 《本草綱目·卷十八·葛》：甘辛，平，無毒。

(七) 功效與主治

1. 《大明諸家本草》：“治胸膈煩熱，發狂，止血痢，通小腸，排膿破血，傳蛇蠱蝮……箭傷。”
2. 《本草備要》：“葛根，辛甘性平，輕揚升發，入陽明經，能鼓胃氣上行，生津止渴，兼入脾經，開腠發汗，解肌退熱，為治療胃虛弱瀉藥之聖藥，療傷寒中風，陽明頭痛，……腸風痘疹。”
3. 《別錄》：“療傷寒中風頭痛，解肌發表，出汗，……止脇風痛。”
4. 《本經》：“消渴，身大熱，嘔吐諸痺，起陰氣，解諸毒⁴⁷。”

(八) 禁忌

《景岳全書》云：“其性涼，易於動嘔，胃寒者所當慎用。”

《本草從新》云：“夏日表虛汗多尤忌¹²。”

(九) 成分

根中主含黃酮類化合物: 大豆素(daidzein), 大豆苷(daidzin), 葛根素(puerarin), 葛根甙(xylopuerarin), 7-葡萄糖甙, 葛根素-7-木糖甙等⁴⁵。

2-4-2 臨床應用

1. 高血壓頸項強痛

2. 早期突發性耳聾

3. 眼底病⁴⁵

4. 止瀉

熱痢需配伍黃芩、黃連等清熱藥同用，如葛根黃芩黃連湯。本品也可用於脾虛泄瀉⁴⁶。

5. 冠心病心絞痛

表明用藥後心肌耗氧指數減低，對限制心肌梗塞範圍有效¹²；另外，有降低血清膽固醇的效應⁴⁵。

2-4-3 現代藥理學研究

(一) 成分之藥理學研究

1. 大豆素 (Daidzein)與大豆苷 (Daidzin)

大豆素 (daidzein)及大豆苷 (daidzin) 皆為葛根中的異黃酮類物質。Daidzein 與 daidzin 具有多項生物活性，包括抗氧化⁴⁸、抗過敏、抗血栓⁴⁹、解酒⁵⁰、退熱(antipyretic)與止痛⁵¹。動物實驗顯示 daidzein 可對抗乙醯膽鹼和氯化鋇所引起的小腸攣縮作用，有解痙作用⁴⁶；此外，也具有促進軸突自然生長的能力¹³。

2. 葛根素 (Puerarin)

為葛根內的主要成分及含量最多之異黃酮物質。除了同樣具有上述 daidzein 與 daidzin 活性外，還能有效治療糖尿病¹⁴、心肌衰弱¹⁵、腦部缺血⁵²、青光眼⁵³與突發性耳聾⁵⁴等。局部缺血-再灌流(ischemia reperfusion)於臨床及實驗顯示會發生心肌、冠狀血管、腦部血管之功能損傷，推測這些功能的損傷可能是因內皮細胞功能失調(endothelium dysfunction)的增加所引起⁵⁵，而導致內皮細胞的鬆弛性降低與收縮度的提高⁵⁶。Puerarin 能有效地藉由 NO 路徑擴張血管與促進血流，達到抗血管收縮目的⁵⁷。在神經方面，puerarin 能降低 PC12 (rat pheochromocytoma) 細胞由於 β -amyloid (為引起阿茲海默症之腦部斑塊的重要蛋白成份) 所造成的細胞傷害；其會藉由增加 Bcl-2/Bax ratio、降低 caspase 3 活化及改變細胞內 ROS (reactive oxygen species)含量，且促進神經細胞存活⁵⁸。此外，給予大腦局部缺血動物 puerarin 後，會顯著

降低大腦皮層梗塞的體積(infarct volume)，並改善神經機能(neurological functions)，降低 caspase 3 活性和凋亡的細胞數，具有神經保護之功效¹⁶。另一方面，研究更進一步指出 puerarin 會透過 PI3K/Akt 路徑刺激成骨細胞(osteoblasts) 增生與骨頭形成(bone formation)¹⁷。

葛根內含有的異黃酮展現許多藥理活性。本實驗探討葛根之血清代謝物 (serum metabolites of the puerariae radix ; SMP) 對於神經再生之影響。

(二) 葛根之藥理學研究

1. 擴張冠狀血管和改善心肌缺血缺氧狀態

能使冠狀動脈擴張，對抗垂體後葉素引起的冠狀痙攣及降低心肌耗氧量¹²。

2. 降壓作用

對高血壓引起的頭痛、頭暈、耳鳴等症狀有明顯療效¹⁴⁹。

3. 改善腦循環作用

使腦血流量增加，腦血管阻力下降，對局部滴加去甲腎上腺素引起的微循環障礙有明顯改善作用¹⁴⁹。

4. 抗氧化作用

葛根中分離的黃酮類成分能顯著抑制氧化損傷引起的紅細胞溶血，對微粒體的活性氧類造成的過氧化脂質生成有抑制作用¹⁵⁰。

5. 對免疫功能的影響

能增強巨噬細胞吞噬碳粒的能力。在體外能增強白細胞吞噬金黃色葡萄球菌的能力⁴⁵。

6. 降血糖作用

會經由提高 glucose transporter (GLUT4)之 mRNA 與蛋白質表現，促進葡萄糖的利用性，而降低 streptozotocin 所誘導的糖尿病鼠之血糖⁴⁵。

第五節：周邊神經斷傷的修復術

2-5-1 各種神經修補技術

神經斷裂後形成的間距為影響神經再生與預後之因素；同時也是選用何種神經接合術的重要考慮點。就目前而言，神經截斷後有下列四種修補技術：

(一) 斷端直接縫合 (End-to-end suturing)

手術前，將兩斷端做一清創，使一有平整面，以易於手術之進行⁵⁹。之後，於高倍鏡下，將兩斷端之神經外膜及血管對齊；最後，以縫線穿過兩斷端之神經外膜，將之縫合。此種手術適合斷裂長度少於數毫米之神經缺損。

此手術的優點為手術過程簡單，且此手術不會對神經造成嚴重的損害。但缺點是不能保證神經幹內的神經數能完全吻合⁶⁰。

(二) 神經束縫合 (Fascicular suturing)

此一修補術的正確名稱應為”神經束群縫合 (Group fascicular repair)”⁶¹。其手術方式為在高倍數下，將神經幹中的神經束群相互分離；而後，再將兩斷端附近之神經外膜移除，並以9-0或10-0縫線將兩斷端相對應之神經束群於圍神經膜處縫合。此手術僅適用於斷裂長度少於數毫米之神經缺損。

手術的優點: 1.使相對應之神經束群能正確地吻合。2.由於手術時移除的部分神經外膜，等於是去除了術後會起反應的結締組織，故可能對於術後神經之復原有所幫助。

手術缺點: 1.在移除神經外膜與分離神經束群過程，可能導致相當程度的組織之外傷；包括血管受傷及術後水腫。2.縫合時，針線穿入圍神經膜，可能導致神經束內之內容物部分脫出及神經束內環境的恢復延遲。

(三) 神經移植 (Nerve grafts)

常被用來移植他段神經的神經是 sural nerve。因為它有較適合的厚度及在兩側下肢可取得較多的長度，再加上此神經內含的神經束，從單一神經束至多重神經束均有，分支相當少，故最適合做為神經移植⁶²。手術時，先將兩斷端的神經瘤及斷端間的疤痕組織移除，借助顯微技術，將兩斷端附近之神經外膜移除，再將兩斷端之神經群束分離，最後將移植入的神經兩端之神經束群與原斷端之神經束群相縫合。但需注意神經縫合處幾乎不能承受任何張力，所以縫合時僅能以非常細的線，如 10-0 nylon 縫 1~2 針，使斷端保持接合狀態即可⁶³。有時，在遠縫合端會有疤痕組織形成，阻礙神經再生；若此現象(Tinel sign)於二至三個月內未改善，則此處必須手術再重新接合一次⁶⁴。神經移植手術適用於較長的神經間隙缺損。

此手術優點為有良好癒後率及避免了免疫反應。

缺點為神經移植段取得之來源十分困難；同時，在取得神經移植段時，可能也會導致其他部位功能的損壞。

(四) 神經管接合 (Nerve bridge)

將神經兩斷端內置於一圓管的兩端，並利用此圓管來導引及支持再生的神經纖維成長。其亦適用於較長的神經間隙缺損；當移植神經的取得有困難時，此不失為一好的替代方式，同時亦不會取得神經移植段，

導致其他部位功能損壞之缺點。

2-5-2 神經管接合術

於神經再生上，神經管接合術為一個廣泛被使用的實驗模式。其可排除許多影響神經再生的外在因素，使得研究者單純的探討神經斷傷後的各個環節。而有關於神經管的材料、神經管內的神經間距與神經管內添加促神經再生的物質，分述如下：

(一) 神經管材料

許多生物和合成材料已被研發製成神經管，理想的神經管必須具備下列特性：

1. 生物適應性。
2. 薄且有彈性。
3. 透明。
4. 可抑制纖維母細胞和結締組織在受傷神經周圍之增生。
5. 促進神經復原和再生。

神經管材料可分為下列幾種：

1. 動物體內的動、靜脈

就源自生物材料而言，為早期最常被應用的^{6,65}。但此些材料與人工合成的材料相較之下，並無特殊優越性^{7,66}。

2. 金屬管

金屬製的人工合成神經管如 tantalum⁶⁷ 和不鏽鋼⁶⁸，雖會造成較少的組織反應，但由於金屬的堅硬及不透明等特性，故造成植入困難⁷。

3. 生物材料

具有多孔的神經管，如 Millipore，是由高生物適應性的聚酯纖維所製成⁶⁹。此種具通透性的材料能使神經外的生長因子進入管內；但也發現此種半滲透管會因細胞外基質，如膠原蛋白液的充填，而阻礙了神經再生⁷⁰。

4. 矽膠

於生物體內不可被分解的材料中，矽膠是使用在神經管上最為被接受的材料之一。不僅因它的穩定性，如矽膠製的神經管在三年的人體實驗中，並沒有產生嚴重的排斥作用⁷¹；此外，其尚具有下列優點：

- a. 不具通透性，能提供再生神經單純生長環境。因此，唯一能影響神經再生的生化因子即是管內的細胞、液體和促進神經生長的物質。
- b. 提供了非常好的架橋，使再生的神經纖維能朝神經遠斷端方向生長。
- c. 由於矽膠的不可吸收性，故能提供再生神經連續的支持力。

2-5-3 神經管內添加促進神經再生的物質

神經斷傷後的間距越大，神經再生會越困難。在神經管的實驗中，單純使用神經管，完整的再生軸突可以通過 10 mm 的間距，此間距稱為關鍵性的間距 (Critical gap length)。一旦神經的斷端超過此關鍵性的間

距，再生的軸突就無法通過神經管；但若在神經管中添加能刺激神經再生之物質，能使斷傷的神經通過比關鍵性間距還大的距離^{28, 72, 73}。而這些物質包括了下列：

1. 神經生長因子 (Nerve growth factor; NGF)

體外實驗發現 NGF 不僅是神經存活因子，亦能促進神經再生和特定功能表現⁷⁴。動物實驗顯示完整的坐骨神經含有少量的 NGF，可當神經被截斷後，兩端的 NGF 上升十五倍之多⁷⁵。當交感神經被截斷後，以 NGF 在局部或再交感神經節附近做治療，發現能防止神經體腫脹和其核內變化⁷⁶。NGF 亦能影響神經生長方向，體外實驗結果指出神經會朝著 NGF 含量多的部位生長⁷⁷。Chen (1989) 在截斷兩側兔子面神經後，兩側均以矽膠管接合斷離的面神經，矽膠管神經間距為 8 mm，形成的神經生長空間(Nerve growth chamber)為 35 μ l，一側填入 NGF，另一側加入沙林。結果發現以 NGF 治療的一側神經再生較沙林治療的一側完好⁷⁸。Bu (1999)發表 12 mm 長的矽膠管內填 NGF，增強兔子下齒槽神經的再生與感覺功能恢復⁷⁹。

2. 膠原蛋白 (Collagen)

Madison 等在 1988 年使用矽膠管對截斷神經做一接合，成功使再生神經於 4~16 週內跨越 20 mm 的間距⁸⁰。Yannas 等亦於 1985 年將大鼠坐骨神經截斷，發現再生神經能順利穿越 15 mm 間距。Chen 等在(2000)

年使用內填 collagen 包覆之 laminin 及 fibronectin 等膠質之矽膠管對截斷神經做一接合，其中，實驗組在 6 週內跨越 10 mm 間距的比率達 90%，而空白組的比率僅達 60%⁸¹。

3. Laminin 與 fibronectin 混合物

細胞附著分子 laminin 是醣蛋白的一種。於體外實驗發現它有明顯促進和支持神經生長的作用⁸²。Laminin 在周邊神經中非常豐富，可由 Schwann 細胞體外培養得到⁸³。他亦是基底層的一種主要成份⁸⁴。當 Schwann 細胞活性越大時，laminin 成份亦多。而 fibronectin 亦和髓鞘的生成有關。神經移植的第二週，fibronectin 能提供細胞移行和血管發生所需的物質。Woolley 和 Bailey 在 1990 及 1993 年成功地使用內含 laminin 和 fibronectin 混合物的矽膠管來接合截斷的大鼠坐骨神經，分別經過六週和四個月時間，使再生神經穿越 18 mm 間距^{85,86}。

2-5-4 矽膠管內神經再生之細胞學變化

以矽膠管進行神經接合手術，修復大鼠截斷的坐骨神經，在矽膠管內神經再生的典型細胞學變化如下：

(一) 液體堆積 (Fluid accumulation)

接合後一天內，矽膠管內立刻充滿淡黃棕色液體。此液體內含有血清及其他細胞體液⁷²；此體液中包含許多成分，如 laminin，fibronectin 及神經營養因子。而這些物質對體外培養的神經元產生促進生長作用⁸⁴。

(二) 纖維橋的形成 (Fibrin bridge)

術後一周內，易碎的纖維橋(含 fibroblast, fibronectin, leukocyte, erythrocyte) 逐漸在管內形成，沿著管的中軸移動，之後將兩斷端接合起來⁷。Williams 等(1987)也指出接合一週，再生神經是由 fibrin matrices 所組成，其中包含 mast cell 和紅血球等⁴。這纖維橋提供了陸續遷入的 fibroblast、Schwann 細胞及軸突一個良好的骨幹。接合後十四天，經染色後的纖維橋，可見非常細絲狀的 laminin 和 fibronectin⁸⁴。

(三) 纖維母細胞移行 (Fibroblast migration)

接合後第七天，纖維母細胞開始增生且從兩斷端進入纖維橋，這些纖維母細胞外觀呈現長條形，缺少基底膜，內部明顯是擴張的粗內質網。一旦纖維母細胞進入纖維橋，這些細胞會在矽膠管內形成向心狀的細胞層，包圍著兩斷端。之後，這些細胞會由斷端進入纖維橋的核心區⁴，十四天後，數層向心狀排列的纖維母細胞已圍繞著纖維橋之核心區⁷。

(四) Schwann 細胞移行 (Schwann cell migration)

Schwann 細胞的增生和遷徙在神經接合後的一週是較明顯的，這個現象與再生神經中的 Schwann 細胞的 mitogenic factor 有關⁷。Schwann 細胞自兩段端進入纖維橋^{4, 84, 87}，它的基底膜提供了再生軸突吸附及生長的基底^{4, 88}。Bailey 等(1993)成功地運用 laminin 和 fibronectin 之複合物，使 Schwann 細胞能較快速的遷徙至被截斷的再生神經，而促進軸突

的再生⁸⁵。

(五) 血管芽形成 (Vascular sprout)

血管細胞在神經軸突生長的环境上，扮演舉足輕重的角色。血管芽在接合後兩週，自斷端長出，血管的移行經常在 Schwann 細胞和 fibroblast 之後，血管可以在再生細胞的邊緣和中央處被發現⁸⁹。Williams 等(1990)觀察到，接合後四週，整條再生神經(10 mm)均可看到血管的存在⁴。Danielsen 等(1987)則發現生長促進物質，如 rat amnion membrane matrix (rAMM)會促進矽膠管內再生神經近端的血管數增加(和接合後十六日的對照組比較)⁸⁷。

(六) 再生單元 (Regeneration units) 和 Schwann 細胞柱

Williams 等(1987)以矽膠管修補被截斷之大鼠坐骨神經(10 mm gap)，發現接合兩週後，距近斷端 1~5 mm 處，Schwann 細胞聚集一起，圍繞再生之無髓鞘軸突的周圍⁴。這些軸突和，Schwann 細胞的聚集體也可以在類似的神經管和術中出現，這些聚合體被稱做“再生單元”⁹⁰。

Williams 等也發現神經接合管接合術中許多細胞聚集在遠斷端 1~3 mm 處的矽膠管內，這些來自遠斷端的聚合物稱為“Schwann 細胞柱”。當組織以 Toluidine blue 染色時，可見蒼白的 Schwann 細胞核⁴。這些 Schwann 細胞柱通常有數個細胞厚，他們的特徵是擁有基底膜，以及在細胞質內有許多的細長絲狀纖維。

(七) 髓鞘化 (Myelination)

周邊神經的髓鞘化是由 Schwann 細胞所形成的。最早期的髓鞘化約在接合後三星期發生，此時再生神經的近端可見軸突 (約 0.1 μm 厚) 和薄且緊密的髓鞘⁷。Le Beau 等在 1988 年的實驗發現，隨著接合後時間的增長，髓鞘的厚度變得越厚⁷²。然而，經由再生過程產生的髓鞘，和正常神經髓鞘比較起來，通常是較薄的。儘管如此，電生理顯示經矽膠管再生的神經之持續興奮期和不反應期，和正常的神經比較起來是一樣的^{91,92}。

綜合上述資料，我們推測若使用內填有含中藥葛根之大鼠血清於矽膠管內，做為斷傷坐骨神經間距之架橋，可能具有促進周邊神經再生的能力，為一極具潛力的研究方向。

第六節： 黨參

2-6-1 古籍文獻探討

《本經逢原》稱黨參為“上黨人參”。

(一) 別名

黃參，潞黨，板黨，紋黨。

(二) 來源

為桔梗科植物黨參 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.、素花黨參 *Codonopsis pilosula* Nannf.L. T. Shen 或川黨參 *Codonopsis tangshen* Oliv. 的乾燥根⁴⁵；野生者稱為台黨、西黨、東黨，栽培者稱為潞黨、川黨⁴⁷。

(三) 產地

原產於山西上黨，現今北方各省及大多數地區均有栽培。春秋兩季採挖，以秋採者為佳¹²。

(四) 性狀鑑別

黨參為多年宿根草，根長數寸，至數尺不等，鬚根多少不一。苗由地下莖上端蘆頭處發生，多數簇生長柄，葉枝長三四尺不等，枝葉繁盛，生長稠密，如碗豆之簇生狀，柔枝細長如蔓。夏季枝間開梅花色豆花形之小花。秋季結莢角，長約寸餘，內藏數粒豆形種子。出結莢角呈青色，成熟時呈黃褐色。深秋苗則乾枯如白絲，翌年春又從宿根而生⁴⁷。

(五) 炮製

將根挖出後除去泥沙、莖苗，邊曬邊搓，使皮部與木質部貼緊，曬乾，切段。生用或蜜炙用¹²。

(六) 藥性

性味甘，平；歸脾、肺經。

(七) 功效與主治

1. 《本草從新》：“主補中益氣，和脾胃，除煩渴，中氣微弱，用以調補，甚為平妥。”

2. 《本草綱目拾遺》：“治肺虛，能益肺氣。”

3. 《本草正義》：“本與人參不甚相遠，其尤可貴者，則健脾運而不躁，滋胃陰而不濕，潤肺而不犯寒涼，養血而不偏滋膩……而無剛燥之弊¹²。”

(八) 禁忌

本品對虛寒證最為適用，如若屬熱證，則不宜單獨使用。反藜蘆，也不宜同用¹²。

(九) 成分⁴⁶

1. 萜類

木栓酮、蒲公英萜醇、蒲公英萜醇乙酸乙酯、齊墩果酸、刺囊酸、倍半萜內酯類化合物蒼朮內酯(atractylenolide)III 和蒼朮內酯 II。

2. 多糖和糖苷類

多糖：CPPS(Crude polysaccharides)、CPPS2、CPPS3，
COP-I(Codonopsis polysaccharide-I)和 COP-II。

糖苷類：正己基- β -D-葡萄糖苷、 α -D-果糖乙醇苷和 β -D-果糖正丁醇苷。

3. 甾體類

甾醇、甾苷和甾酮，包括： α -菠甾醇， α -菠甾酮， Δ 7-豆甾烯醇， Δ 5, 22-豆甾烯醇， α -菠甾醇- β -D-葡萄糖苷，豆甾醇- β -D-葡萄糖苷， Δ 7-豆甾烯醇- β -D-葡萄糖苷， α -菠甾-7, 22-雙烯-3-酮，豆甾-5, 22-雙烯-3-酮和 Δ 7-豆甾烯-3-酮。

4. 黃酮類

柯伊利葉素、苜蓿素、漢黃芩素和木犀草素。

5. 木脂素苷

黨參苷 I、黨參苷 II、黨參苷 III、黨參苷 IV 和丁香苷。

6. 香豆素類

白芷內酯和補骨脂內酯。

7. 生物鹼

黨參鹼和 5-羥基-2-羥甲基吡啶。

8. 揮發油

成分複雜，由數十種成分組成，主要含有醛、醇、脂肪酸、脂肪酸酯、烷烴和烯烴。

9. 有機酸

香莢蘭酸、2-呋喃甲酸、煙酸、琥珀酸、9,10,13-三羥基-反-11-十八烯酸、黨參酸、丁香酸、煙酸、香草酸和阿魏酸。

10. 氨基酸

至少含有 17 種氨基酸，包括人體必需的 7 種氨基酸：蘇氨酸、纈氨酸、蛋氨酸、異亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸和賴氨酸。

11. 其他成分

膽鹼(6R, 7R)-反,反-十四烷-4,12-二烯-8,10-二炔-1,6,7-三醇、尿嘧啶、丁香醛、大黃素、黨參炔苷、lobetyolinin、京尼平苷、5-羥甲基-2-糠醛和 3',4',5,9,9'-pentahydroxy-5,4,7'-epoxylignan。

2-6-2 臨床應用⁴⁵

1. 慢性低血壓。
2. 久瀉、十二指腸潰瘍。
3. 功能失調性子宮出血、貧血。
4. 慢性活動型肝炎。
5. 小兒病毒性腸炎。

2-6-3 現代藥理研究

1. 免疫功能增強

可使小鼠巨噬細胞數目明顯變多，細胞體積增大，吞噬能力增強。此外，報導指出黨參根部萃取出的水溶性多醣類 (Water-soluble polysaccharide; CPP)能劑量依賴性 (Dose- dependent manner) 的促進淋巴球增生⁹³。

2. 對心血管之作用

能明顯增加冠心病患者的左心室收縮力，有一定強心作用。對垂體後葉素所致實驗性心肌缺血有保護作用。

3. 對血液系統之作用

能藉由增加血小板內 cAMP 含量而抑制血小板凝集；其亦可降低血液黏度，防止血栓形成。黨參也可使紅血球細胞數目與血紅蛋白量明顯增加⁴⁵。

4. 神經系統之作用

對中樞神經具有興奮作用⁴⁶。黨參與白果合併使用能增進人體記憶與學習力⁹⁴。Jin 等人發現參耆湯具有抗老化作用⁹⁵。此外，黨參萃取總生

物鹼能強化 NGF 誘導的 PC12 細胞神經軸突之生長與活化 MAPK 訊息路徑⁹⁶。

5. 對消化系統的影響

具有抗潰瘍之作用。能結抗幽門螺旋桿菌，而有降低胃酸和胃蛋白酶之活性⁹⁷。

6. 抗腫瘤作用

用於輔助癌症患者放療期間的保護作用及其對造血及免疫功能的影響¹⁵¹。

由於黨參具有促進 PC12 細胞神經軸突之生長能力⁹⁶，故我們推測黨參可能同樣具有促進許旺細胞 (schwann cell) 增生與移動之潛力。

第七節：神經再生之訊息傳遞路徑

2-7-1 IGF-I 協調的訊息增生路徑

神經再生的重要機制之一為增生作用 (proliferation)。IGF-I (insulin-like growth factor-I) 為一結構類似胰島素 (insulin) 的多胜肽荷爾蒙，會在增生中的 Schwann cell 內合成，進而刺激生長⁹⁸。一些研究發現藉由肌肉衛星細胞 (satellite cells) 增生與分化所協調的肌肉再生及心肌肥大 (hypertrophy)，是由於 IGF-I 調控引起⁹⁹。另外，動物神經實驗顯示提高

IGF-I表現量會增加交感神經元 (sympathetic neuron) 的增生¹⁰⁰；細胞實驗也發現IGF-I會刺激胎兒神經元 (fetal neurons) 生長與分化，及神經軸突 (neurite sprouting) 生長^{101, 102}。再者，IGF-I 於細胞週期中也具有前進因子 (progression factor) 的功能，能允許細胞前進通過 G₁ 期，而繼續整個細胞週期進行，結果致使DNA的合成與細胞增生¹⁰³。

IGF-I除了在控制增生 (proliferation) 上扮演重要角色，也對細胞存活 (survival) 相當重要。近來許多實驗發現 IGF-I 能透過活化Akt (Phosphatidylinositol 3-kinase/serine-threonine kinase) 路徑與阻礙caspase活化，而保護周邊神經系統之神經元免於細胞凋亡 (apoptosis) 的發生¹⁰⁴⁻¹⁰⁶。IGF-I的高度表現，會透過 Akt 訊息路徑，促進受傷的金魚視神經之視網膜神經節細胞 (retinal ganglion cells) 存活與成熟金魚視網膜軸突的再生¹⁰⁶。在Schwann cells 也會經由 Akt 路徑去誘導細胞存活，並劑量依賴性 (dose dependent) 地降低其死亡¹⁰⁷。綜合上述資料，我們推測 Schwann cell在中草藥黨參刺激下，會經由IGF-I所協調的 Akt 訊息傳導路徑去促進細胞存活與增生。因此，提升Schwann cell的存活與增生能力，其同樣也會是另一個研究神經再生有潛力地方向。

2-7-2 細胞週期

黨參的刺激對於 Schwann cell 增生作用之影響，我們除了探討 IGF-I 所協調的 PI3K/Akt 訊息路徑，同時也會偵測和控制細胞生長極

為相關的細胞週期 (cell cycle)。

細胞分裂週期分為幾個階段，依照其發生順序可分為 G₁: DNA 合成前期、S: DNA 合成時期、G₂: 有絲分裂 (mitosis) 前期以及 M: 有絲分裂時期。細胞在 G₁ 時期會開始準備 DNA 複製的材料，接著進入 DNA 複製的 S 期；當 DNA 複製完全後，會進入 G₂ 時期準備細胞分裂的材料；最後進入有絲分裂時期，完成整個細胞週期，如圖 2.1¹⁰⁸。

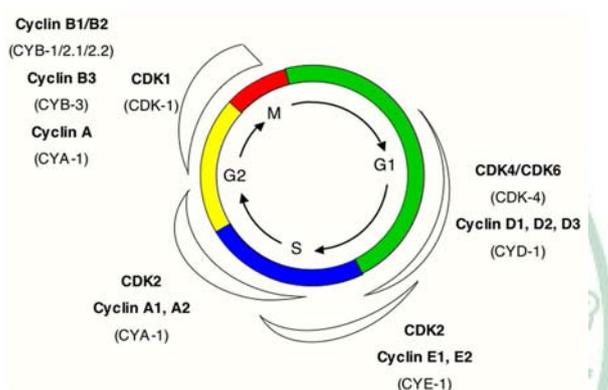


圖2.1 細胞週期(Cell cycle)

細胞週期的進行是由不同的週期蛋白質 (cyclins) 所調控。週期蛋白質這意味著這些蛋白質的表現量會隨著細胞週期進行而有所變化。

G₁期會先表現大量的cyclin D，其次會逐漸由cyclin E 取代，再來是cyclin A、 cyclin B¹⁰⁹。細胞進行複製週期時，cyclin D1會在早期 G₁時期會大量表現，與週期蛋白質依賴激酶 (cyclin-dependent kinase 4/6；CDK4/6) 結合形成複合體後，再磷酸化視網膜細胞瘤蛋白 (Retinoblastoma；Rb)，使得轉錄因子E2F 從Rb上游離出，進而開啓基

因轉錄作用 (transcription)，並刺激細胞週期由 G_1 期進入 S 期¹¹⁰。Cyclin E 則在 G_1 末期開始逐漸表現，大量生成於S期；其功能主要是調控細胞由 G_1 期進入 S 期和啟動 DNA 複製作用¹¹¹。Cyclin E的調控方式與cyclin D1雷同；亦會與 cyclin-dependent kinase (CDK)之一的CDK2 結合後，磷酸化視網膜細胞瘤蛋白(Retinoblastoma；Rb)，開啓基因轉錄作用(transcription)¹¹²。另一方面， cyclin A同時調控了細胞由S期進入 G_2 期及有絲分裂(mitosis) 期；cyclin A會與CDK2結合，且受到cyclin B 調節；cyclin A與cyclin B會共同調控細胞有絲分裂期¹¹³。

2-7-3 MAPKs 訊息傳遞路徑

當細胞受到生長因子 (growth factor) 或細胞激素 (cytokine) 刺激後，MAPKKK (MAP kinase kinase kinase)，如 C-RAF、ASK-1、MEKK1&4，會最先被活化；進而磷酸化MAPKK (MAP kinase kinase)，如 MEK1/2、MKK3/6、MKK4/7；最後再活化磷酸化 MAPK (mitogen-activated protein kinase)，如ERK1/2、P38、JNK1/2，如圖2.2¹¹⁴。MAPK家族是細胞內許多重要路徑的調節者，如分化(differentiation)、發炎 (inflammation)、增生 (proliferation)¹¹⁴。ERK (extracellular signal-regulated protein kinase) 是MAPKs中最為被廣泛研究的成員¹¹⁵。

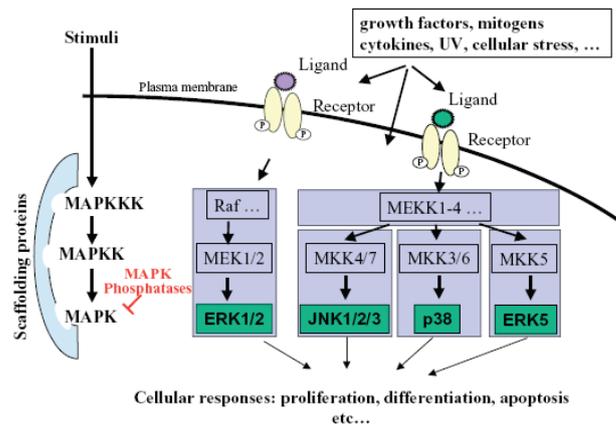


圖2.2 MAPK 訊息路徑

2-7-4 FGF-2 協調的訊息移動路徑

神經再生過程中的另一項重要機制為 Schwann cell 的移動 (migration)。FGF-2 為纖維母細胞生長因子 (fibroblast growth factor)，經腦下垂體分泌。FGF-2 在 *in vitro* 及 *in vivo* 中為有效的血管增生因子，會刺激平滑肌細胞生長，負傷治癒與組織修補。此外，更有文獻指出，於受傷的神經組織中，FGF-2 會大量表現以促進神經修復¹¹⁶。有趣的是在周邊神經再生過程，成長的細胞會分泌蛋白酶去分解細胞間或細胞與基質間的貼附，而促進細胞移動。這些會促進細胞移動的蛋白酶包括 uPA (urokinase plasminogen activator) 及他們的受質胞漿 (plasminogen)。胞漿素 (plasmin) 經由 uPA 活化後，又再進一步活化 MMP9 (matrix metalloproteinase 9) 與 MMP2 (matrix metalloproteinase 2)¹¹⁷，如圖 2.3¹¹⁸。

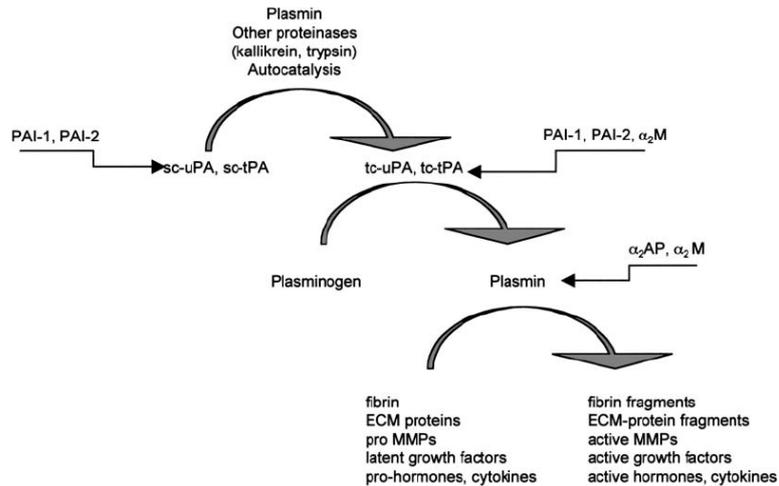


圖2.3 胞漿素原活化瀑布(cascade)

PAs與MMPs，此兩種細胞外基質分解蛋白酶會進行降解作用，促進細胞轉移¹¹⁹。迄今有許多實驗紛紛證明神經受傷後，PAs會被迅速誘導表現^{120, 121}，且PAs缺乏又會進一步影響到MMP9與MMP2活性¹²²。

綜合上述，本研究推測黨參可能會透過IGF訊息路徑與調控細胞週期影響神經細胞增生與存活；此外，亦由FGF-2-uPA-MMP9訊息途徑誘導細胞移動。因此，提升Schwann cell移動能力可能會是另一個研究神經再生有潛力的方向。

第三章

材料與方法

第一節 實驗材料

(一) 細胞培養

1. PC12 細胞株

來自於食品工業研究所菌種保存與發展中心 (CCRC cell no.:60048)。此細胞來源為大鼠腎上腺嗜鉻細胞瘤。為懸浮性細胞，易聚集成小串狀。使用 Ham's F12K medium 1640 + 15% horse serum + 2.5% FBS + 2 mM HEPES + 2 mM L-glutamine。

2. RPMI1640 溶液配置

使 RPMI1640 粉末溶於 900 ml 水中。秤取適量的 NaHCO_3 粉末溶於 100 ml 水中，然後通入 CO_2 氣體至飽和。將溶解且含飽和 CO_2 的 NaHCO_3 溶液加入至 RPMI1640 培養液中。混合後的溶液 pH 應為 7.2 ~ 7.4，接著再以 0.2 μm 無菌過濾膜過濾，於 4°C 存放。配置之培養基需做生長試驗與污染測試。

(二) 處理用藥與材料

1. NGF- 2.5S

NGF- 2.5S 為購自 Sigma (USA)，提取自老鼠下頷下腺。NGF- 2.5S 是 26.5 kD 的聚合物，為 NGF- β 型式。自老鼠下頷下腺分離出來的 NGF 是未經分解的 NGF- 7S，其共有五個次單位 (2α ， 1β ， 2γ)。只有 β 次單

位才有神經營養因子的活性。NGF- 2.5S 在純化中因蛋白水解的關係與 NGF- β 的結構有些不同，其具有神經營養因子的活性。

2. 第一型膠原蛋白 (Type I collagen)

購自 Sigma (USA)，為大鼠尾巴提取的第一型膠原蛋白。25 mg 膠原蛋白溶解於 0.1 N acetic acid 溶液中。以適當的劑量先附蓋在培養盤上，使 PC12 細胞附著在培養盤上。

3. 矽膠管

實驗所用的矽膠管為 Helix Medical Silicone Tubing，內徑 1.5 mm，外徑 1.96 mm (HELIX MDICAL, INC (USA))。

4. Vitrogen® Collagen

Vitrogen® Collagen (Vitrogen®, Cohesion, Palo Alto, CA) 中膠原蛋白的濃度為 2.4 mg/ml。其中 95 ~ 98% 為第一型膠原蛋白，其他為第三型膠原蛋白；特性為中性的 Vitrogen® Collagen 在 37°C 時會產生凝膠作用 (Gelation)。膠原蛋白濃度在 1.0 ~ 1.5 mg/ml 之間形成的膠狀物是透明的，但稍微容易碎掉。

5. Toluidine blue

Toluidine blue (Sigma, USA) 化學式為 $C_{15}H_{16}SCL + ZnCl_2$ 。它對神經組織中蛋白質的碳氧基有高度親和力，它被廣泛地用來當作神經體鞘的染色劑^{19, 123-125}。以 Toluidine blue 染色時，體鞘被染成深藍色，而體鞘環內的軸突則呈現淡白色。

6. **U0126** : MEK inhibitor (Promega , V1121 ; USA)

7. **SB203580** : p38 inhibitor (Promega , V1161 ; USA)

8. **SP600125** : JNK inhibitor (Promega , V1161 ; USA)

9. **MTT** : Thiazolyl blue tetrazilium bromide (MTT) (Sigma , M5655 ; USA)

10. 抗體:

表 3.1 抗體資料

1.st Ab	M.W.(KDa)	2.st Ab	廠牌	貨號
ERK	44	rabbit	SANTA CRUZ	SC-94
p-ERK	44	mouse	SANTA CRUZ	SC-7383
JNK1/2	49/54	mouse	SANTA CRUZ	SC-571
p-JNK	49/54	mouse	SANTA CRUZ	SC-6254
p38	38	mouse	SANTA CRUZ	SC-535
p-p38	38	mouse	SANTA CRUZ	SC-7973
FGF-2	19	rabbit	Upstate	SC-79
uPA	33	rabbit	SANTA CRUZ	SC-14019
PAI-1	50	rabbit	SANTA CRUZ	SC-8979
MMP9	92	rabbit	CHEMICAN	AB19016
MMP2	72	mouse	SANTA CRUZ	SC-13595
PCNA	34~43	rabbit	SANTA CRUZ	SC-7907
Cyclin A	60	rabbit	SANTA CRUZ	SC-751

表 3.1 續

Cyclin E	53	mouse	SANTA CRUZ	SC-25303
Cyclin D1	36	mouse	SANTA CRUZ	SC-246
pIGF1R	100	rabbit	Biosource	44-8064
pAkt	60	rabbit	Cell signaling	9271
pBad	25	rabbit	abcan	ab5687
Bcl ₂	26	mouse	BD bioscience	610539
α-tubulin	57	mouse	SANTA CRUZ	SC-5286

第二節 實驗方法

3-2-1 PC12 細胞培養

PC12 細胞培養在 37°C，5% 二氧化碳環境之下；每隔兩天更換一次培養液。於細胞生長至高密度時，即需稀釋或分殖至新的培養皿中。細胞數維持在 $10^5 \sim 10^6$ cell/ml 之間。二 ~ 三天以 1:3 ~ 1:6 之比例繼代一次。另外，若要冷凍保存細胞便於冷凍前一天更換半量或全量培養液，觀察細胞生長情況，配置冷凍保存溶液(使用前配置): 將 DMSO 加入新鮮培養基中，最後濃度為 10% (90% culture medium + 10% DMSO)，混合均勻後，放置於冰上待用，因 DMSO 溶入溶液中為放熱反應。解凍細胞時，須盡快將細胞從液態氮桶取到 37°C 水浴槽，回溫溶解；培養於 10 cm 培養皿，隔天再更換新培養液即可。

3-2-2 葛根血清代謝物 (Serum metabolites of the *Puerariae radix* ; SMP)

大白鼠口服餵予葛根濃縮散劑 4 g/kg，每公克散劑中 puerarin、daidzin 及 daidzein 之含量分別為 48.0、13.5 及 2.7 μmol 。給藥後 20 分鐘後採血，以四倍體積 MeOH 去蛋白後，經高效液相層析法定量，血清代謝物中 daidzin sulfates/glucuronides 之濃度為 4.5 μM 。

本實驗葛根血清代謝物由中國醫藥大學藥學系李珮端教授提供。

3-2-3 神經元 (PC12) 細胞型態變化實驗

PC12 細胞(8×10^3 cell/cm²) 處理 50 ng/ml NGF 以誘導神經元分化，然後再加入 1 units, 0.1 units 與 0.001 units 的 SMP 於細胞培養液中兩天。此培養液中的 SMP 重要組成 daidzein sulfates 與 glucuronides，最終濃度為 0.5 μM 與 0.029 μM 。

3-2-4 蛋白質定量與 Western blot

將實驗完的細胞以 PBS 清洗 2~3 次，加入約 ice-cold lysate buffer (62.5 mM pH 6.8 Tris、2% sodium dodecyl sulfate、50 mM 1,4-dithio-D-L-threitol)，再以細胞刮棒刮除細胞。4°C 下以 10,000 rpm 離心 10 分鐘，上清液即為細胞之總蛋白質，置於 -80°C 保存。蛋白質濃度以 protein-day kit (Bio-Rad, Hercules, CA) 利用 Bradford protein assay；利用 bovine serum albumin (Sigma Chemical, St. Louis, MO) 做為標準品，測定

595 nm 波長的吸光值，最後使用內插法求出樣品的蛋白濃度。

取同樣蛋白質濃度(10 g)的樣品，置於 95°C denature 5 min，即可進行 SDS-PAGE 電泳分析。SDS-PAGE 上層膠為 4% 之 stacking gel，下層膠為 10% (依所預測定之蛋白質分子量大小決定) 之 separating gel。蛋白質會依不同分子量在膠上進行分離，接著再轉漬至 PVDF 膜。轉漬完後，取出並加入 blocking buffer 室溫下 shaking 1 小時；再加入 synapsin I 的 1 級抗體 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; 1:1000, 見表 3.1)，於 4°C 下反應整夜。接著以 TBS buffer 清洗 PVDF 膜三次，每次 15 min。最後加入 2 級抗體，室溫下反應 1 H，同樣以 TBS buffer 清洗 PVDF 膜三次，每次 15 min；最後以 ECL kit 於冷光數位分析儀器進行冷光呈色反應。

3-2-5 神經突突出實驗

於進行神經突突出實驗前，需先製作膠原蛋白覆蓋的 24 well 培養盤。此培養盤的製備方式為在無菌操作台下操作。第一型膠原蛋白(25 mg)溶於 10 c.c.的 0.1N acetic acid，濃度即為 2500 µg/ml。膠原蛋白覆蓋在培養盤濃度設定為 25 µg/cm²。24 well 培養盤每格的底面積為 2 cm²。所以每格需加入 50 µg 的膠原蛋白。取適量的膠原蛋白溶液，將其濃度稀釋至 250 µg/ml。24 well 培養盤中，每盤需 4.8 c.c.的稀釋液，每格加入 200 µl 的稀釋液。加入試劑後，搖晃培養盤，使溶劑平均分佈在格子底

部；最後於無菌操作台內等待乾燥。

膠原蛋白覆蓋的 24 well 培養盤製備完成後，將細胞移入 well 內。

先設定每平方公分附著的細胞數為 2×10^4 個 ($2 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2 = 200 \text{ cell/mm}^2$)。操作如下：

先了解每次實驗所需組數，評估所需的細胞數量。所需的細胞總數量為 $2 \times 10^4 \times (\text{盤數}) \times (\text{格數})$ 。計算 PC12 細胞瓶中的細胞數，取適量的細胞液，加入 15 ml 離心管中，並以新鮮培養液稀釋至 $8 \times 10^4 \text{ cell/ml}$ 。在無菌操作下，以每格為一操作單位，同時操作一個培養盤。每格先加入新鮮培養基與藥劑到 0.5 ml，並使藥物濃度達到實驗所需濃度(但藥劑劑量盡量不要超過 0.1 ml)，而後再加入 0.5 ml 的繼代細胞液，每格最中含有的 0.1 ml 培養基、試劑與約四萬的細胞。完成後，移入培養箱靜置，讓細胞附於膠原蛋白上。48 小時後觀察，並更換試劑與培養液，使每格藥劑濃度與先前相同。96 小時後，將細胞以福馬林固定(4% formalin, 1X PBS)。在倒立顯微鏡下觀察與拍攝。顯微鏡倍率為 200X。數位相機 (Nikon Coolpix 950, Japan) 拍下數位影像。各培養格取三個特定點拍攝三張，再使用彩色影像分析系統 (Image-Pro Lite Version 3.0, Media Cybernetics, USA) 做計算，並利用 Excel 分析。計算每格所屬的二 ~ 三張相片內所含的細胞數。觀察神經突與細胞體直徑 (Cell body diameter, CBD)，同時計算神經突突出的長度大於一倍細胞體直徑 ($>1 \text{ CBD}$) 或大

於三倍細胞體直徑(>3 CBD)的細胞數。並且計算>1 CBD 與>3 CBD 的細胞數佔所有細胞數的百分比。

3-2-6 動物坐骨神經之神經管接合術

(一) 矽膠管之配置

於無菌操作台中操作。準備矽膠管，每支長 17 mm，前後各 1 mm 用於縫合，實際的間距長度為 15 mm。在管內長 15 mm 的間距，其體積為 25.5 μ l，可供填入試劑。再將矽膠管浸泡於 75% 酒精中消毒，接著取出置於無菌培養皿中；每個培養皿放十支，再置於烘箱中烘乾，保存備用。動物實驗手術前，先準備內填試劑的矽膠管，之後進行凝膠作用。此步驟提供神經管接合術的神經管。實驗分組如下：

第一組 膠原蛋白組 (控制組)

第二組 膠原蛋白組與 1 單位 SMP (1 unit SMP 組)

第三組 膠原蛋白組與 0.1 單位 SMP (0.1 unit SMP 組)

第四組 膠原蛋白組與 0.01 單位 SMP (0.01 unit SMP 組)

和膠原蛋白混合後的 SMP，其混合物中液中的 SMP 重要組成分 daidzein sulfates 與 glucuronides，最終濃度為 0.5 μ M 與 0.029 μ M；和細胞實驗的濃度一樣。

分組完後，接著於矽膠管內注入所需的試劑。在無菌操作台內，以鑷子夾住矽膠管，使用微量注射器注入各組所需的試劑濃度，每管注入

25.5 μl ，每組共十管。使藥劑集中於矽膠管中間 15 mm 處，讓兩端 1 mm 處無試劑存在，以便神經縫合。配製好的矽膠管需避免震動，且保存於 4°C。進行動物實驗手術前，需將此些填入藥劑的矽膠管置於 37°C 溫箱，10 分鐘。讓矽膠管內的試劑進行凝膠作用。

(二) 實驗動物分組

雄性 Sprague-Dawley 大白鼠，36 隻，390 ~ 490 g。依神經管分組，分為四組：控制組、1 unit SMP 組、0.1 unit SMP 組及 0.01 unit SMP 組。利用吸入性麻醉技術 (inhalational anesthetic technique ; AErrane®, Baxter) 使大鼠麻醉；剃毛區以碘酒消毒。

(三) 坐骨神經之神經管接合術

於大鼠右臀延股骨方向切開皮膚，鈍性分離臀部肌肉與筋膜，游離出坐骨神經，長度約 2.5 cm。在距梨狀肌下緣 8 mm 處，用手術刀整齊斷神經幹。取各組大鼠對應的神經管，先在神經幹斷端一側，以 9-0 nylon (Mani, Japan) 將神經斷端經神經外膜縫入於矽膠管的兩端，並以少許張力將神經幹之斷端帶入矽膠管兩端內部 (圖 3.1)；之後，在矽膠管的外側單結固定 (兩斷端神經經固定後，其實際神經間隔為 10 mm 長)。

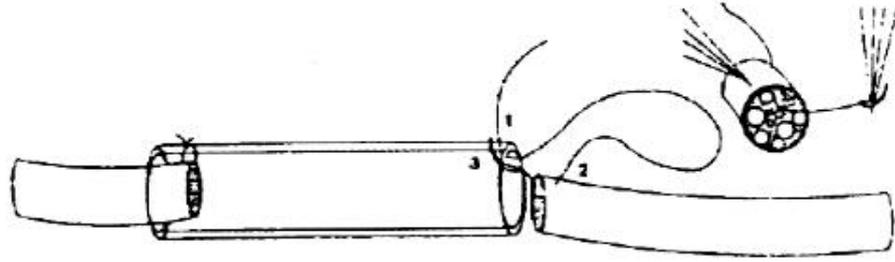


圖 3.1 神經斷端與矽膠管縫合之步驟。(1) 9-0 nylon 自矽膠管外端穿入。(2) 然後穿過斷端之神經外膜。(3)最後自矽膠管之內側穿出，神經藉著少許張力帶入矽膠管內，並在矽膠管的外側打結固定⁷。

神經兩斷端縫入矽膠管兩側後，以 4-0 catgut (Unik, Taiwan) 縫合肌肉，最後以 2-0 silk (Unik, Taiwan) 將皮膚縫合。術後將大鼠置回籠子，照光維持體溫，等待動物甦醒；以抗生素 (四環素) 施打三日，預防感染。

3-2-7 電生理檢測

術後 8 週進行電生理檢測。麻醉同前，肢體妥善固定，暴露坐骨神經(含矽膠管)約 3 cm，以誘發電位儀 (Neuropack Four Mini, Nihon Kohden Co., Japan) 做為神經肌肉複合動作電位之誘發及紀錄器。其原理大致如下:首先於再生神經的近端-刺激電極(stimulating electrode)，並於再生神經側之腓腸肌放至-紀錄電極 (recording electrode)及參考電極 (圖 3.2)，在刺激電極釋放出電流後，經再生神經的傳導，於誘發電位儀上顯示再生神經功能恢復與否。

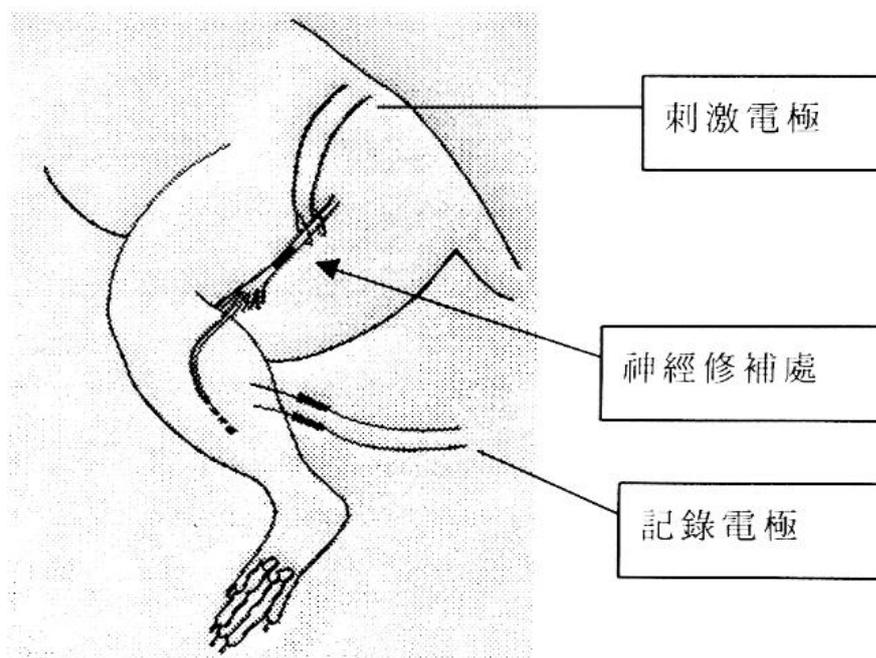


圖 3.2 電生理檢測圖示。

於實際測量時，從矽膠管近端之神經開始刺激，以不同電流強度刺激再生神經，取得最大之振幅圖形。而後，由電腦紀錄、分析，計算出神經肌肉複合動作電位之 Latency 1 (L1)、Latency 2 (L2)、Interval (I)、Peak-to-Peak (PP) 之值(圖 3.3)。

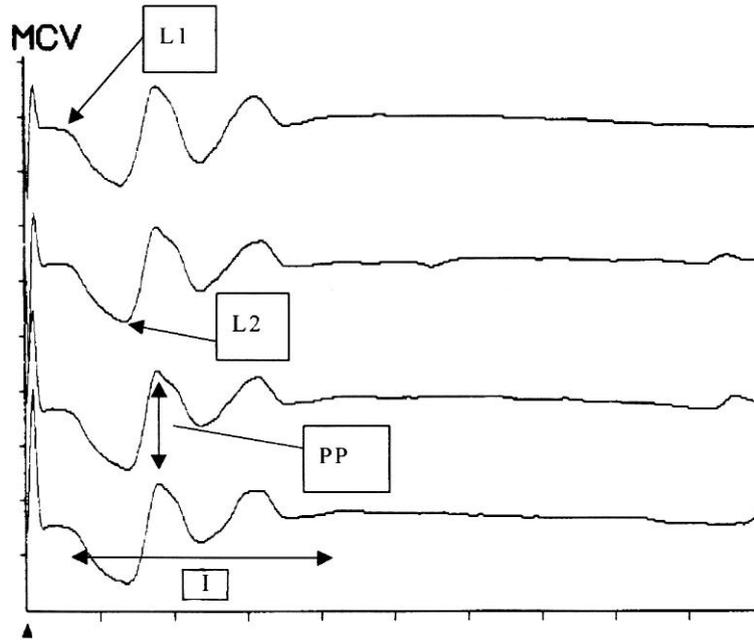


圖 3.3 神經肌肉複合動作電位。

Latency 1 (L1): 為刺激至開始反應 (Take-off point) 所需之時間。

Latency 2 (L2): 為刺激至第一個波峰所需之時間。

Interval (I): 為波開始變化到恢復至基線所需之時間。

Peak to Peak (PP): 為最高波峰與最低波峰之距離。

3-2-8 組織切片與髓鞘染色

做完電生理檢測後，將矽膠管兩側之神經截斷，取再生神經組織的中段(圖 3.4)，並保存於固定液中(4% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, 1X PBS)。

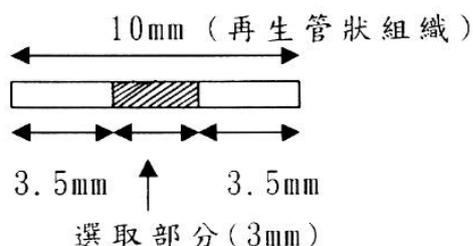


圖 3.4 選取組織切片用的再生神經組織。再生神經組織長約 15 mm，選取中段 5 mm 做為切片觀察的部分。

將再生神經組織從固定液中取出，以超薄切片的包埋程序處理後，進行組織切片。再以 Toluidine blue 對再生神經切片染色將切片所屬的大鼠與組別紀錄好，並加以編號。組織切片經染色後，髓鞘與 Schwann 細胞明顯呈色，置於 25 ~ 1000 倍之光學顯微鏡 (Olympus IX70, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) 下觀察。

觀察再生神經的重點如下：(1)再生神經整體結構是否完整，神經外膜、中膜是否已長成。(2)是否在神經內膜已有帶髓鞘之神經軸突生長或大部分組織中仍只有 Schwann 氏細胞而已。(3)血管於再生神經中是否已形成。

3-2-9 組織學定量分析

以數位式相機 (Nikon Coolpix950, Japan) 拍下數位影像，再利用彩色影像分析軟體 (Image-Pro Lite Verson 3.0, Media Cybernetics, USA) 做計算，試算軟體 EXCEL. 2000 (Microsoft®) 做分析。計算與分析切片的再生神經組織之切面全面積、髓鞘化軸突的數目、髓鞘化軸突的面積、

計算面積、髓鞘化軸突的平均面積、髓鞘化軸突的面積總和與計算面積總和比、髓鞘化軸突密度。顯微鏡 100 倍下，拍攝再生神經組織切片全部；顯微鏡 400 倍時，可以清楚看到髓鞘化軸突，所以沿著再生神經組織的直徑取三個區塊拍攝，照相中心點取在直徑的四分之一、中點、四分之三等三處。若 400 倍可拍攝到切片全景，即拍攝一張；顯微鏡 1000 倍下，拍攝局部型態。而再生神經切面面積與有髓鞘神經軸突的個數與面積，計算方式如下：

(一) 再生神經組織切面全面積之計算

有再生神經組織的大鼠，其所屬的切片就是計算的單元。數位影像 (100X) 在影像分析系統中，以指標圈選的切片外圍之區域，影像分析系統的程式就能計算出切面的全面積。

(二) 髓鞘化軸突數目之計算

需以高倍影像(400X) 計算，每個區塊的數位影像在影像分析系統中，以指標圈選著髓鞘內軸突的區域，影像分析軟體就可以標定區塊內髓鞘化軸突的數目。若該切片有三個拍攝區塊，就分析三個；倘若只有一個區塊，就分析一個。

(三) 髓鞘化軸突數目總和積之計算

若該切片有三個拍攝區塊，就計算三個區塊中髓鞘化軸突數目總和；倘若只有一個區塊，就分析一個。

(四) 計算面積與計算面積總和

每個拍攝照片切片未必充滿整個畫面。每個區塊組織切片外圍之內的面積，稱之為計算面積。若該切片有三個拍攝區塊，三個區塊計算面積的總和就是該切片的計算面積總和；倘若只有一個區塊，此區塊計算就是該片的計算面積總和。

3-2-10 RSC96 細胞培養

以 10% FBS、1.5 g/l Sodium bicarbonate、0.1 mM Non-essential amino acid、0.1 mM Sodium pyruvate 及 1% 抗生素之 DMEM 培養液培養 RSC96 細胞。RSC96 細胞培養在 37°C，5% 二氧化碳環境之下；每隔兩天更換一次培養液，於細胞生長至八分滿時，以 PBS 清洗細胞兩次後，再用 1% Trypsin 將細胞從培養皿上游離下來，接著取約 1/5~1/10 的細胞量至新培養皿做繼代培養。另外，若要冷凍保存細胞便將細胞培養到約八~九分滿，並在準備凍細胞的前一天先換上新鮮培養液。冷凍保存細胞前，先用 PBS 清洗細胞兩次，接著以 1% Trypsin 將細胞從培養皿上游離下來，以轉速 800 rpm 離心 5 min 後，吸掉上清液，再用 10% 的 DMSO-DMEM 稀釋液回溶細胞並均勻打散；最後各取 1 ml 含有細胞的稀釋液至冷凍管，並放入 -80°C 冰箱反應 12~16 h，隔天再放入液態氮桶中保存。解凍細胞時，須盡快將細胞從液態氮桶取到 37°C 水浴槽，回溫溶解；培養於 10 cm 培養皿，隔天再更換新培養液即可。

3-2-11 黨參萃取

秤取 1 克的黨參(科達公司, Ko Da pharmaceutical company) 粉末，溶解於 10 ml 滅過菌的二次水中，並依序稀釋成濃度 0, 100, 200, 300, 400 and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；接著以 0.22 μm filter 過濾，貯存於無菌的 Eppendorf 中。為避免污染，再以 Parafilm 膜將 Eppendorf 蓋子加以密封， -20°C 保存。

3-2-12 細胞存活測定 (MTT assay)

RSC96 細胞培養在 24 孔盤中，加藥前先 1% FBS DMEM 培養細胞約 4 h，使細胞飢餓；再分別加入不同濃度的黨參反應 24 h。接著去除培養基，PBS 清洗細胞 2 次後，再加入 1 ml 0.5 mg/ml MTT，於 37°C 反應 4 h。於 4 h 後去除 MTT 試劑（不要吸到紫色結晶物質），並加入 1 ml 的 Isopropanol 溶解所形成的紫色結晶物，再各取 200 μl 於 96 孔盤中，接著利用 ELISA 測定 570 nm 吸光值。

3-2-13 傷口癒合實驗 (Wound healing assay)

細胞培養至 8 分滿後，用黃色微量吸管 (200 μl tip) 的尖頭從培養皿正中央劃一條直線，接著以 PBS 清洗 3 次把被刮起的漂浮細胞清洗乾淨；隨後換上含 1% FBS 的 DMEM，使細胞飢餓 4 h 後，再換成含 10% FBS 的正常 DMEM，並將細胞依實驗需要做不同試劑處理。然後於 37°C 下培養細胞 24 h，再以 PBS 清洗細胞 3 次，最後利用正相位差顯微鏡觀察及照相。

3-2-14 細胞移動實驗 (Migration assay)

細胞培養於 6 cm 培養皿，約至 7 分滿時，同樣地以 1% FBS DMEM 處理，再將細胞依實驗需求做不同處理。接著，把實驗後的細胞一樣用 1% Trypsin 將細胞從培養皿上游離下來，並溶於 1 ml 含有 1% FBS 的培養液中，計算細胞總數，將每盤細胞稀釋成 1.5×10^4 cells / 50 μ l (30×10^4 cells/1 ml) 之濃度。將 48 well Boyden chambers (Neuro Probe, MD, USA) 打開，於下層容器注入 32 μ l/well 的 10% FBS DMEM。接著於容器上進一步依序放置 8 μ m 孔徑的 polycarbonate 薄膜、塑膠墊、上層容器，再用螺絲將容器 6 個角落都鎖緊；上層容器則加入 50 μ l 之前所稀釋的細胞液，此些過程中應避免氣泡產生。上述步驟皆完成後，用保鮮膜蓋上整組裝置，37°C 培養 4~6 h 後，把容器拆開，小心拿出薄膜，將接近下層較粗糙的面以甲醇固定 10 分鐘，0.5% Giemsa 染色 1 h；接著用二次水退染，之後用拭鏡紙將薄膜背面擦拭乾淨，並將薄膜固定於新培養皿上，在光學顯微鏡下觀察且計算移動的細胞數目。

3-2-15 明膠蛋白酵素電泳法 (Gelatin zymography)

經黨參處理 24 h 的細胞培養液與 5 倍蛋白質 loading dye 混合後，置入 0.1% gelatin - 8% SDS-PAGE 中，120 V 電泳 3~4 h。接著將電泳膠片取下，以 2.5% Triton X-100 溶液搖晃沖洗 30 min 兩次，使蛋白酵素功能還原。再將此膠片培養於 200 ml 的反應液中(40 mM Tris-HCl，

pH 8.0 ; 10 mM CaCl₂ , 0.01% NaN₃) , 37 °C 下 16 小時 ; 最後以 0.25% Coomassie blue R-250 染色 30 min , 再用退染劑 (875 ml ddH₂O , 50 ml 甲醇和 75 ml 醋酸) 脫色。

3-2-16 統計

每個檢體的結果皆為三重複實驗之平均值，採用 Student t-test 軟體分析；P < 0.05 表有顯著性差異。



第四章

結果

4-1 SMP 對 PC12 細胞形態之影響

PC12 細胞附著在有膠原蛋白覆蓋的培養格上，經 48 小時後，顯微鏡觀察發現在沒有 NGF 存在下，幾乎所有細胞型態為圓型或是沒有什麼神經軸的生長 (圖 4.1 a)。相反地，單獨 NGF 處理的組別，則具有刺激神經細胞生長的能力，開始有軸突的向外生長(Neurite outgrowths) (圖 4.1 b)。若將 SMP 與 NGF 同時處理細胞，具有加乘促進生長的作用；大部份的 PC12 細胞會有較長的神經軸突，且其神經軸突會延伸至鄰近細胞，其長度甚至會遠超過三個細胞直徑。神經突的表現有的會呈現單極，有的會呈現雙極，亦或呈現多極 (圖 4.1 c)。

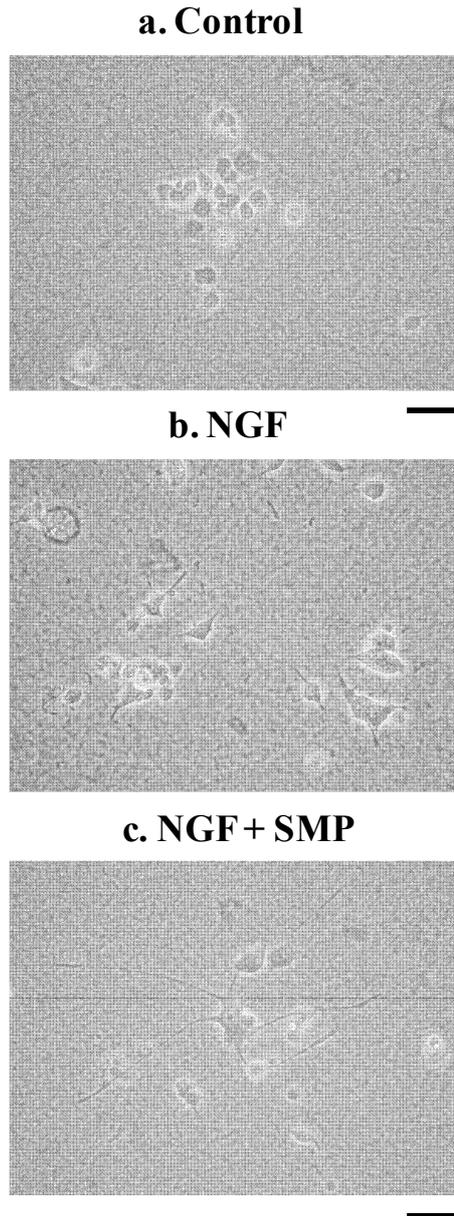


圖 4.1 SMP 對 PC12 細胞型態之影響 (Scale bars = 100 mm.)

4-2 SMP 對 NGF 所誘導的神經軸突生長之影響

進一步利用不同濃度 SMP (1, 0.1, 0.01 unit of the SMP) 處理 PC12 細胞，及定量分析其神經軸突長度。數據顯示相較於只有 NGF 處理組，不論是 1, 0.1 或 0.01 單位的 SMP 添加至細胞中，皆會強力地誘導細胞

神經軸突生長；其中又以 0.01 單位的 SMP 效果最為顯著 (圖 4.2)。

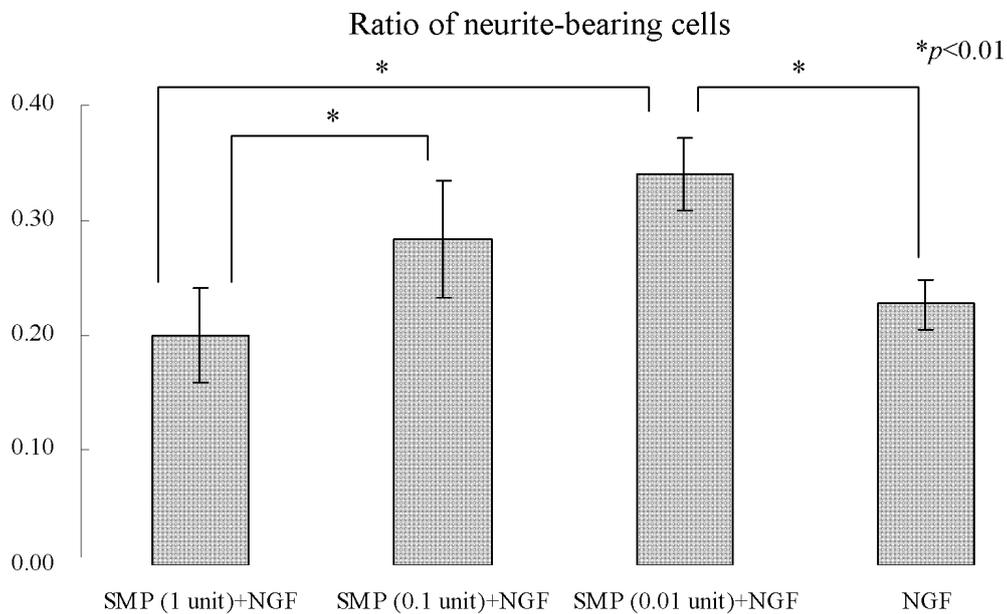


圖 4.2 SMP 對 NGF 誘導的神經軸突之影響

4-3 SMP 對 PC12 細胞分化指標蛋白質(Synapsin I)表現之影響

在 NGF 刺激下，所誘導的 PC12 細胞分化過程中，會大量增加 synapsin I 表現；因此我們利用 Western blot 分析與定量 synapsin I 蛋白質表現情形。如圖 4.3 所示，此實驗結果相近於 PC12 細胞神經軸突生長的情況；凡是 SMP 處理之組別 (1, 0.1, 0.01 unit of the SMP)，隨著時間的增加，synapsin I 蛋白質表現量也隨之大量增加，尤其是 0.01 單位的 SMP 效果更為顯著。

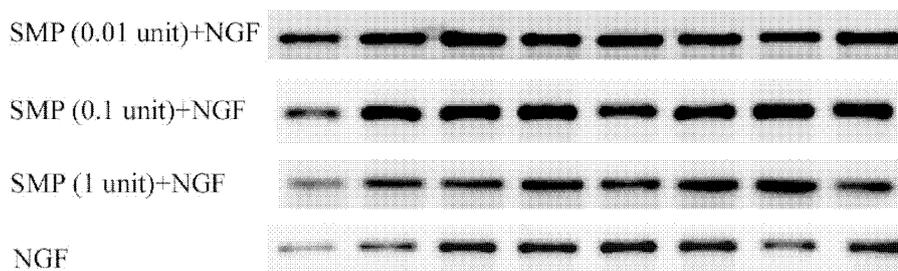
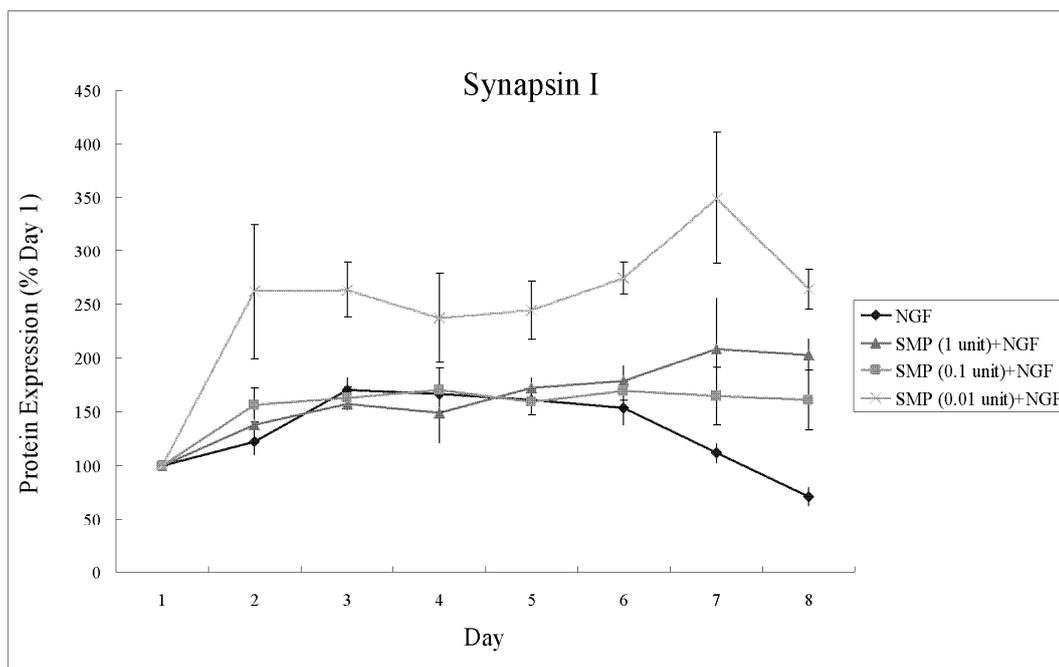


圖4.3 synapsin I的代表性western blot圖和定量結果。數據顯示為平均 ± 標準差。

4-4 SMP 對斷傷坐骨神經再生之影響

坐骨神經之最外層為神經外膜的緻密結締組織所包圍，其內有神經纖維束，每束神經纖維為圍神經膜的結締組織所包圍，在每個神經纖維之間的是鬆細的結締組織(稱為神經內膜)，神經內膜含有具髓鞘的神經纖維、血管、淋巴管等。將各組矽膠管中的白色再生物質，經切片染色後，於顯微鏡下觀察組織型態，包括神經外膜 (Epineurium)、神經內膜

(Endoneurium), Schwann cell包圍的神經纖維及血管等。當以Toluidine blue 染色時,髓鞘會被染成深藍色,而髓鞘內之軸突則呈現較淡白色之顏色。圖4.4 所示為再生神經的橫切面圖。所有SMP處理組 (1, 0.1, 0.01 unit of the SMP)之再生神經皆有相近的超顯微結構組織 (ultrastructural organization)(圖4.4 a ~ c)。藉由Toluidine blue 染色髓鞘時,可以發現有許多被髓鞘化軸突位於神經內膜; Schwann cell之細胞核 (Nuclei) 則散佈在這些軸突中。另一方面,雖然控制組的再生也有相近結構,但充填的膠原蛋白殘跡仍存在於再生之軸突(圖4.4 d); 且有些區域幾乎為空細胞 (void of cells), 而再生的軸突也沒有均勻分布於整個神經內膜。



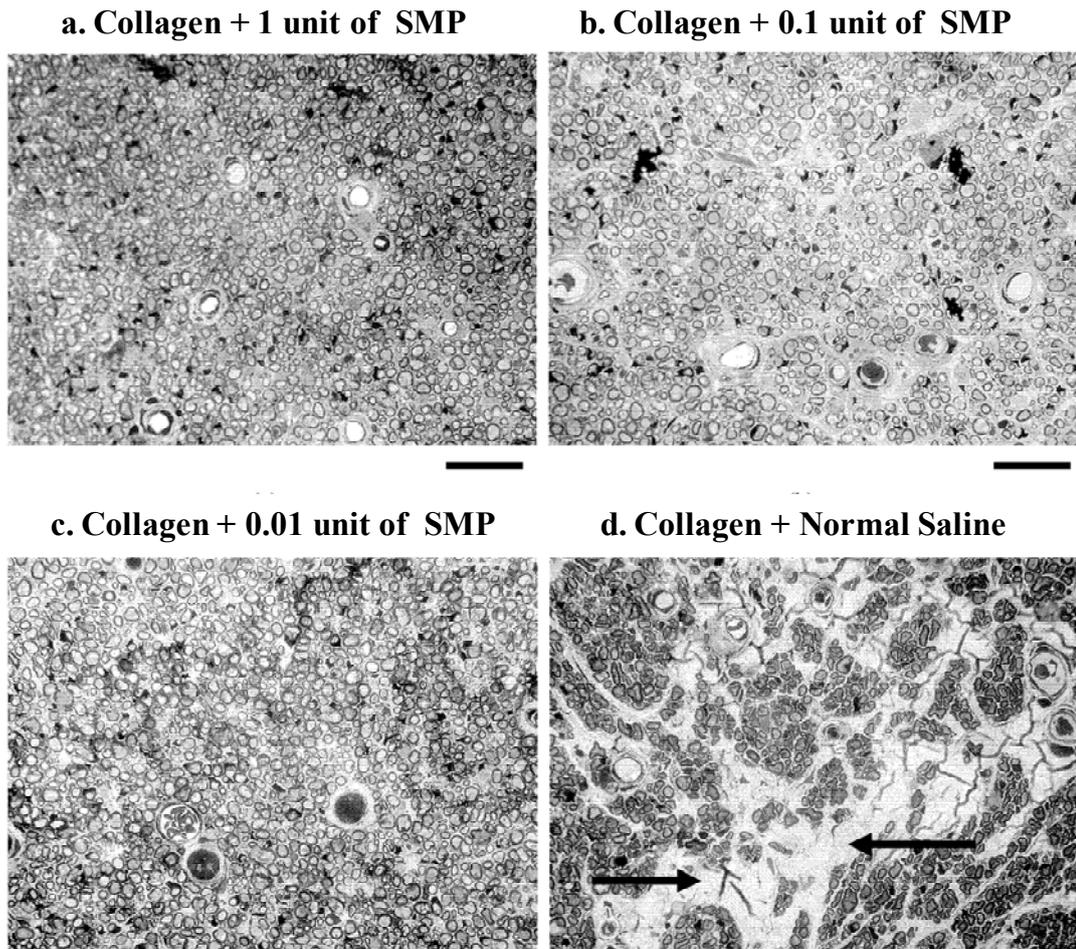


圖4.4 再生神經橫切面圖 (Scales bars = 30 μ m.)

4-5 SMP 對再生的神經面積與髓鞘化軸突數目之影響

接下來我們進一步測試神經之組織形態，以確認於矽膠管中觀察到的神經再生。結果顯示所有經SMP處理組(1, 0.1, 0.01 unit of the SMP)，相較於控制組，會有較大的切面神經面積與神經內膜面積之總和，及最多的髓鞘化軸突數目(圖4.5 a~c)。

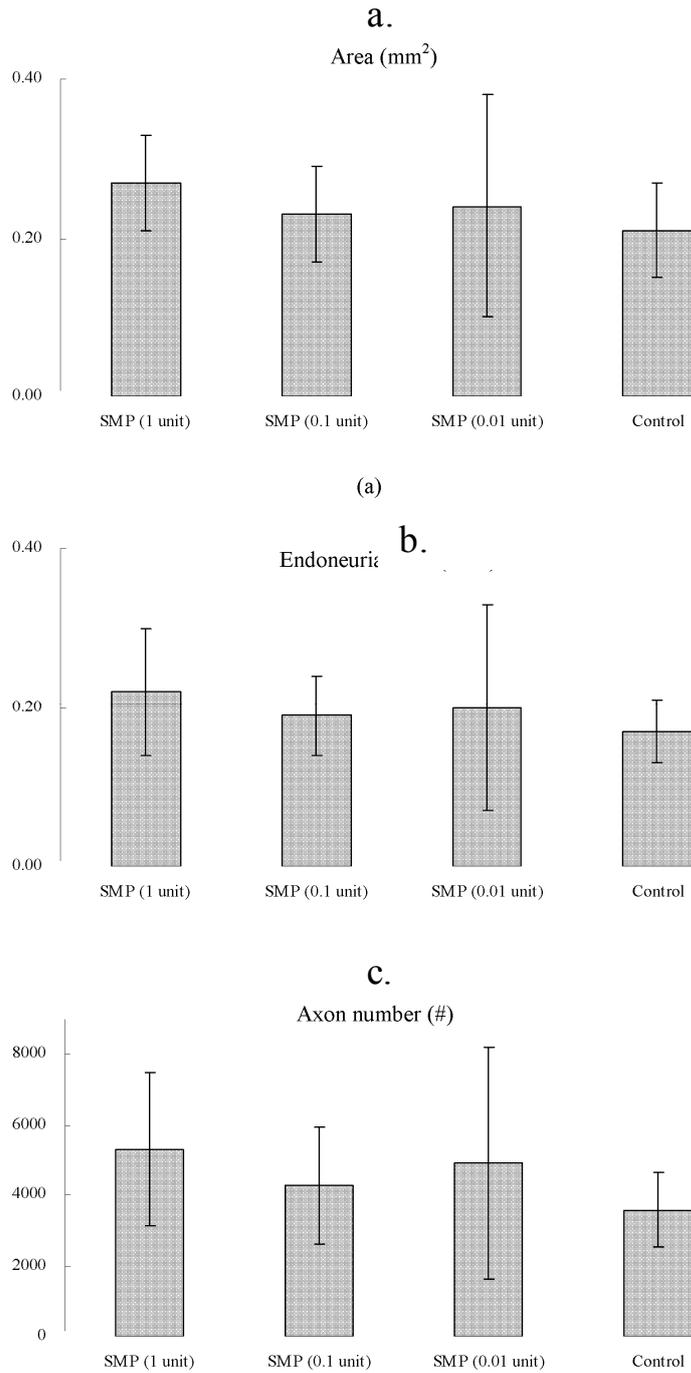


圖4.5 矽膠管內再生神經的型態分析：全部的神經面積(a)，神經內膜面積總和(b)，及被髓鞘化的軸突數目(c)。

4-6 SMP 對再生神經電生理之影響

利用電生理檢測再生神經纖維之成熟度，並計算每條神經動作電位 (muscle action potentials; MAP) 曲線之面積與最大量值 (peak amplitude)

(圖 4.6)。實驗發現再生神經於組織學上觀察之現象和電生理結果沒有關連性。雖然於術後 8 週復原期間，肌肉纖維重新受神經支配並重新活動，但可能是因為嚴重的腓腸肌肉萎縮，導致所有實驗動物組的變異性皆相當大。

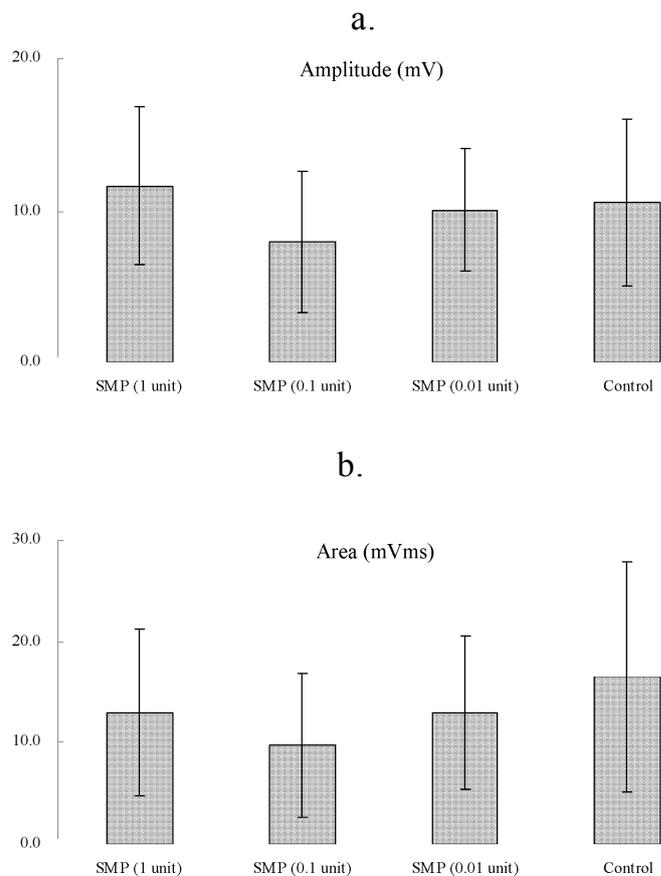


圖4.6 MAPs分析: 最大量值(a) 與MAP 曲線之面積(b).

4-7 黨參對 RSC96 細胞增生之影響

實驗首先為測試不同濃度黨參的細胞毒性。將不同濃度之黨參處理細胞 16 h 後，進行 MTT 測試細此中藥對 RSC96 細胞存活之影響。結果發現相較於控制組，濃度 20 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$ 之黨參能顯著促進細胞增生(圖

4.7 a)；此外，利用 Western blot 分析 PCNA 蛋白(增生指標)表現時，也同樣顯示黨參能劑量依賴性 (dose-dependent manner) 促進 PCNA 蛋白表現 (圖 4.7 b)。在 Wound-healing 實驗也發現黨參不僅能促進細胞增生與存活，且似乎還具有潛在促進移動之效果；且最佳濃度範圍為 20 ~ 40 $\mu\text{g/ml}$ 。

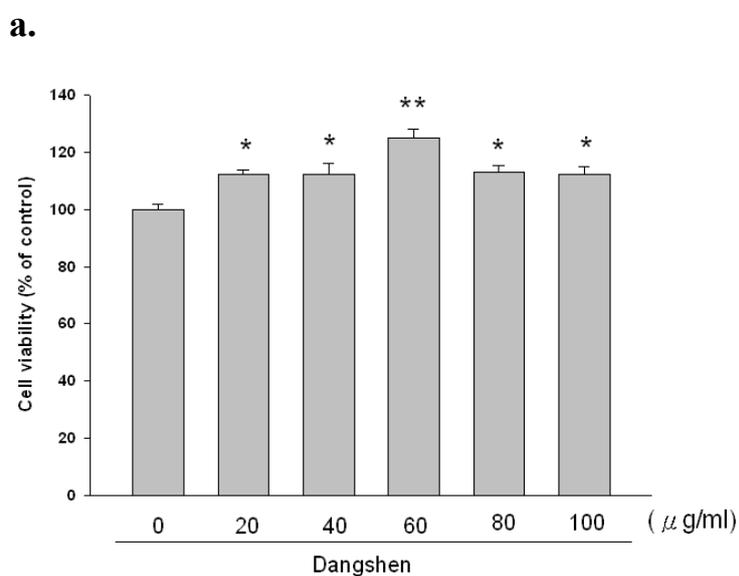
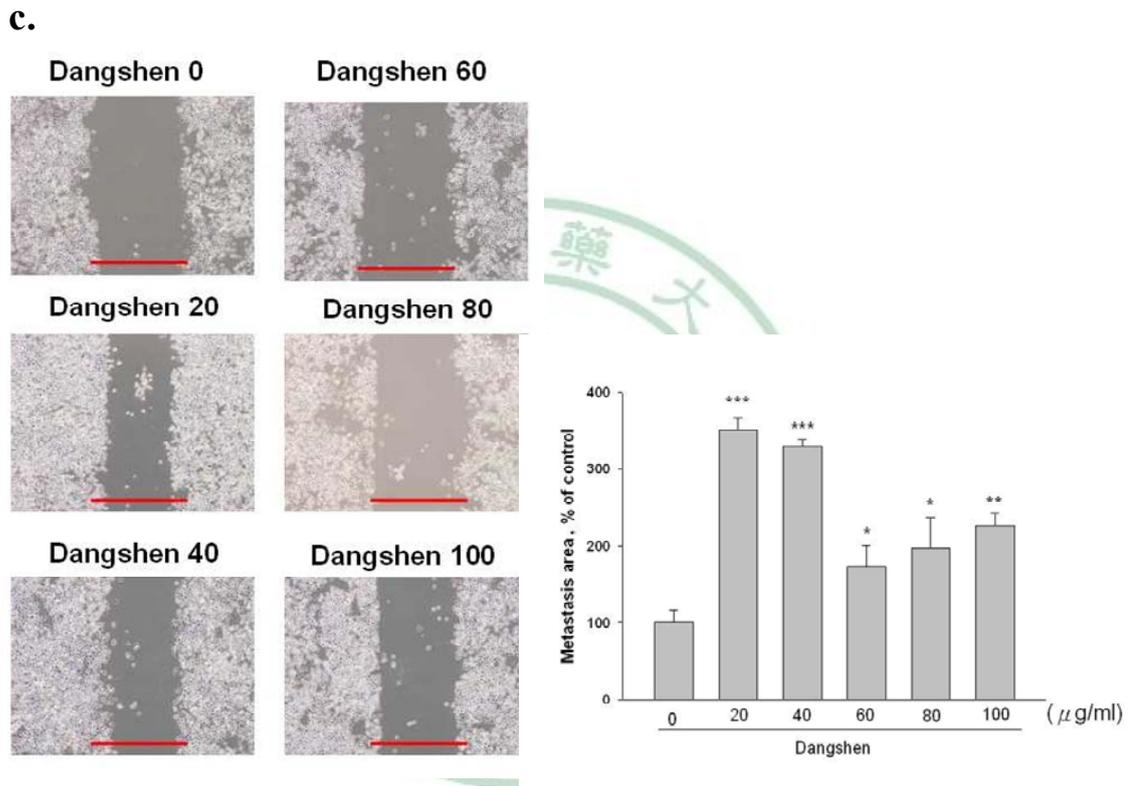
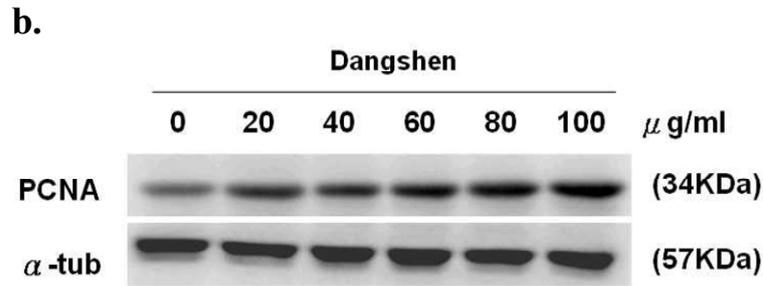


圖4.7 黨參對RSC96 細胞增生之影響。數據顯示為實驗三重複之平均 \pm 標準差； * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs 控制組。



續圖4.7

4-8 黨參對 ERK 與 p38 訊息依賴性路徑促進作用

利用 Western blot 分析 MAPK 訊息路徑分子: ERK1/2, JNK1/2, p38 及它們的磷酸化態。研究發現經黨參處理神經細胞後，原態 ERK 蛋白表現增加，JNK1/2 沒變，而 p38 卻降低。我們推測可能是因原態 p38 轉變為了磷酸化態 p38，所以導致原態 p38 表現降低；事實上，磷酸化態的

p38 確實表現量增加。而磷酸化態 ERK 蛋白表現也增加，但 JNK 的磷酸化態卻沒改變 (圖 4.8 a)。接下來本實驗進一步探討 MAPK 在黨參誘導的增生訊息路徑中所扮演的角色。將 RSC96 細胞經 MAPK 抑制劑處理後，再加入 60 $\mu\text{g/ml}$ 之黨參，觀察此些 MAPK 蛋白的表現是否有受抑制。所使用的 MAPK 抑制劑包括: U0126 (ERK 抑制劑), SP600125 (JNK 抑制劑) and SB203580 (p38 抑制劑)。MTT 結果顯示 ERK 與 p38 抑制劑會降低細胞的增生(圖 4.8 b)；PCNA 蛋白表現也顯著下降(圖 4.8 c)。故這些數據證實了 ERK1/2 與 p38 參與黨參誘導 RSC96 細胞增生效應。

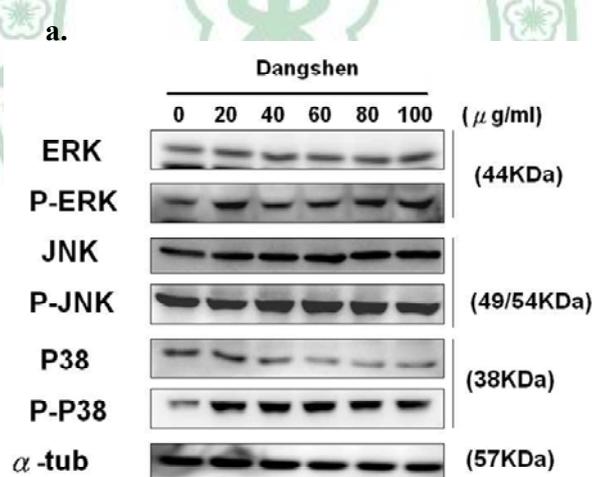
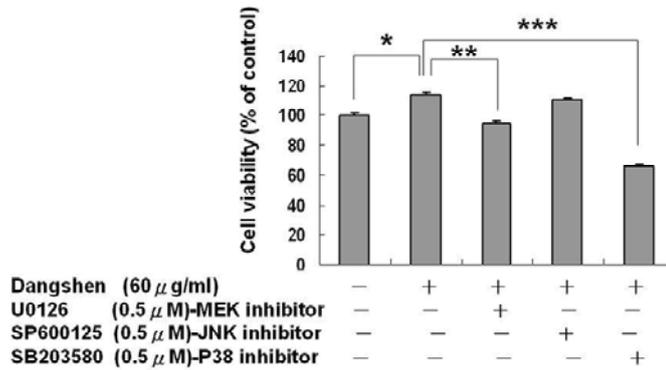
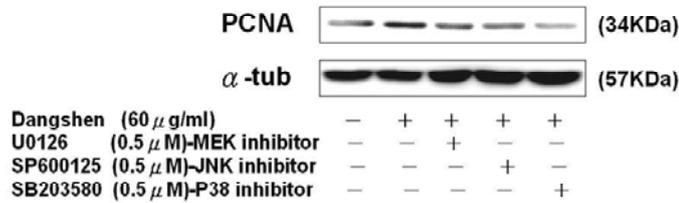


圖 4.8 黨參對 ERK 與 p38 訊息依賴性路徑促進作用。數據顯示為實驗三重複之平均 \pm 標準差； * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs 控制組。

b.



c.



續圖 4.8

4-9 黨參對 RSC96 細胞存活與誘導細胞週期蛋白表現促進作用

我們評估黨參的增生效應對於 Scwann cell 存活路徑(IGFs-IGFIR-Akt-Bcl2) 之影響；此外，此存活路徑會高度調節細胞週期調節蛋白質表現。如圖 4.9 a 所示，RSC96 經黨參處理後，會劑量性依賴地促進 IGF-IR 及 pAkt 與抗凋亡蛋白 pBad、Bcl2 之表現。由於 IGFs-IGFIR- Akt-Bcl2 能高度調節細胞週期訊息表現，故我們同樣利用 Western blot 測量相關的調節蛋白。結果顯示 cyclin D1 及 cyclin E 於低劑量 (20 ~ 40 μ g/ml) 黨參處理下蛋白質表量變明顯增加；然而，cyclin A 則於高劑量(60~80 μ g/ml) 黨參方有大量蛋白表現 (圖 4.9 b)。

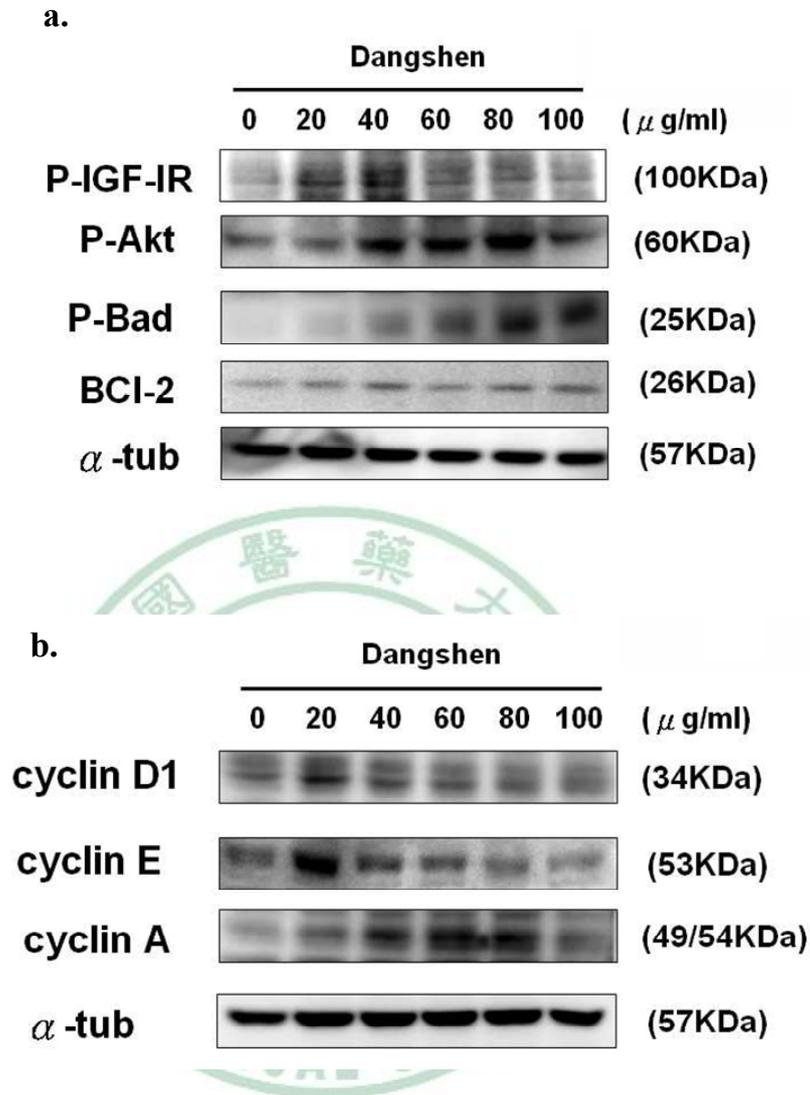


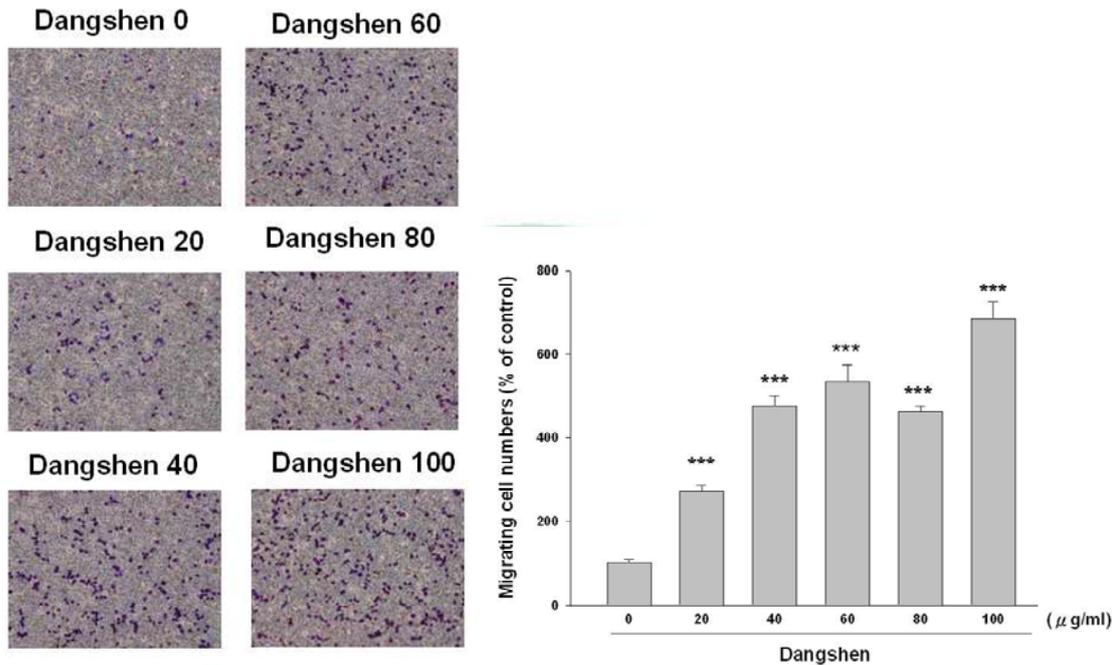
圖 4.9 黨參對 RSC96 細胞存活與誘導細胞週期蛋白促進作用

4-10 黨參對 RSC96 細胞移動之影響

經由上述實驗結果證實黨參能促進 Schwann cell 增生與存活後，再來為探討其對細胞移動之影響。利用 Boyden chamber 觀察 RSC96 移動情形，研究顯示黨參能劑量依賴性地促進細胞移動 (圖 4.10 a)。同樣地，Western blot 圖也顯示黨參會劑量依賴性地促進 FGF2-UPA- MMP 9 路徑

相關蛋白表現 (圖 4.10 b); 相反地, UPA 特異性抑制蛋白: PAI-1 表現量則是降低。Zymography 測量酵素活性, MMP 9 與 MMP 2 亦是活性逐漸提升 (圖 4.10 c)。

a.



b.

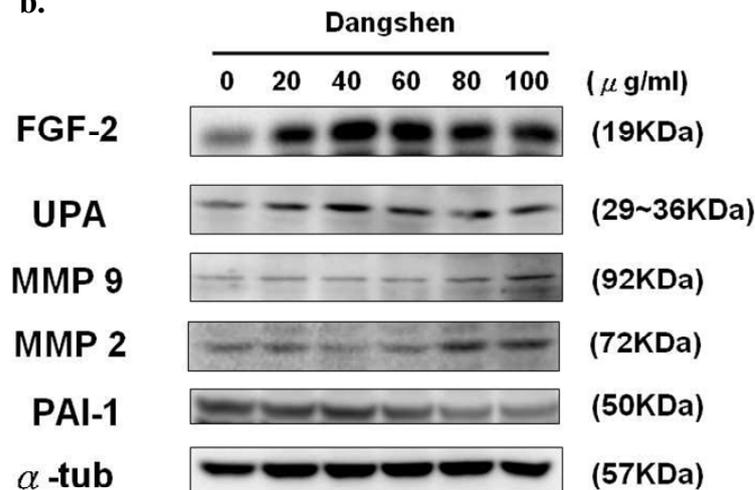
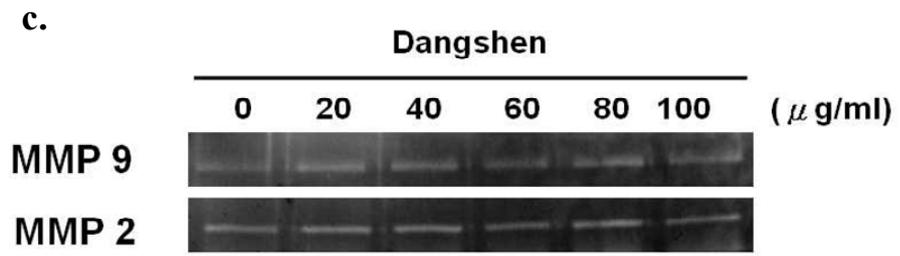


圖 4.10 黨參對 RSC96 細胞移動之影響。數據顯示為實驗三重複之平均 ± 標準差; *** $p < 0.0001$ vs 控制組。



續圖 4.10



第五章

討論

周邊神經再生包含了許多高度專業化的癒合過程¹²⁶。本實驗分析了葛根與黨參對周邊神經再生作用之影響：

葛根實驗方面：本實驗主要利用人造管做為嚴重受損神經之架橋，藉此來探討內置藥物後對神經再生的過程與機轉。我們實驗室先前利用口服餵食大白鼠中藥方劑-補陽還五湯，並使用矽膠管做為坐骨神經被截斷之大鼠神經架橋，以連接斷傷的間距(Gaps)，結果發現能促使斷傷神經再生¹²⁷。再者，我們也成功證明將白果內酯 (Bilobalide; 銀杏成份) 與人參皂苷 Rb1 (Ginsenoside Rb1; 人參成份) 混合充填入矽膠連接管，實驗顯示其可以引導與促進週邊神經通過間距再生^{128, 129}。這些研究僅僅是將中藥萃取後加入矽膠連接管中來探討神經再生的過程，然而，這樣的研究方式與一般口服中藥再經由胃腸吸收代謝後，血清中的代謝物用於神經損傷處誘導再生的機轉不同，因此本實驗則採用葛根之血清代謝物來進行周邊神經再生的相關研究。

有關葛根方面的研究報導越來越多，從多方面證明葛根的功效，例如：林氏¹⁵²證實葛根異黃酮具有對抗癌症的能力，研究發現葛根含藥血清造成凋亡細胞相關蛋白 caspase-3 的活性增加，caspase-9、p53、p21 和 Bax 蛋白質的改變，且葛根異黃酮，也造成 caspase-3 的活性增加，

細胞週期的改變，證實葛根含藥血清及相關異黃酮的確可以降低人類乳癌細胞的增生，並且透過活化 Foxo3a 基因的表現誘導細胞凋亡。Gu L.¹⁵³ 證明葛根素能透過 ASIC (application-specific integrated circuit) blockage 阻止海馬細胞在酸中毒時導致的腦細胞死亡，說明葛根素能在腦細胞缺血時，提供腦神經保護作用。

葛根和其組成份中的異黃酮也被應用於研究化妝品市場，Wen.¹⁵⁴ 比較葛根及其水解物能刺激 NHEK (normal human epidermal keratinocytes) 細胞導致玻尿酸增加，玻尿酸廣泛存在於皮下和結締組織之間，能夠將水份保再組織之間，因此可以被用來作為一種新的化妝品成分，保濕和抗衰老劑。

研究亦曾報導大鼠口服葛根後，異黃酮的藥物代謝動力學¹³⁰，發現血清未檢出原型之葛根素 (puerarin)，大豆苷 (daidzin) 及大豆苷元 (daidzein)，而以大豆苷元之葡萄糖醛酸及硫酸 (daidzein glucuronides 與 sulfates) 結合態代謝物存在於血流。推測這種結合態代謝物在葛根異黃酮之活性上扮演重要的角色。本實驗則利用葛根之血清代謝物分析其對於周邊神經再生之影響。細胞培養實驗：結果發現在培養介添加有 NGF 存在下，SMP 對 PC12 細胞具神經分化 (Nerve-differentiating) 的能力，並大量增加細胞神經軸突生長與 synapsin I 表現。動物實驗方面：SMP 則能促進成熟的再生神經通過矽膠管中的神經間距；此動物實驗雖然統

計上無達到顯著差異，我們推測可能是因實驗動物鼠隻數的限制所致。另外，也可能是因 SMP 對神經再生誘導效應只在早期發展階段；換句話說，SMP 促進神經生長的能力可能只持續某個短暫時期。有研究指出：如 NGF 便只能提升髓鞘化軸突早期的再生¹³¹。然而，本實驗比較了各組神經再生的品質與組織形態叢集分析，皆證實 SMP 處理組 (1, 0.1, 0.01 unit of the SMP) 之神經結構不僅較成熟，也會有較大的神經切面積、神經內膜面積之總和及較多的髓鞘化軸突數目。

目前有關於葛根的期刊文獻研究分析，並未有任何關於神經再生的研究論文發表，因此本研究為第一個證實葛根對於神經生長調節能力的論文。有關葛根對神經刺激的確切機制至今仍不清楚。大豆苷元硫酸 (daidzein sulfates) 結合態代謝物為 SMP 成分之一，被發現其能與雌激素接受體 (estrogen receptor) 結合，而表現出類似雌激素活性¹³²。此雌激素活性會加速軸突生長¹³³。故我們推測葛根所具有的促進軸突生長能力，可能是經由雌激素接受體訊息路徑協調所引起。此外，daidzein 被報導有刺激非特異性免疫效應，因其會增加腹膜巨噬細胞之吞噬能力¹³⁴。Daidzein 也可以經由改變前列腺素合成影響免疫系統¹³⁵。如果巨噬細胞的侵襲 (invasion) 受阻礙，可能會致使周邊神經之再生受損¹³⁶；主要是因為巨噬細胞會經由釋放介白質素-1 (interleukin-1) 與神經親和性因子 (neurotrophic factors) 調節重要神經親和性因子表現，如 NGF、

IGF-I，故其被認為於周邊再生扮演重要角色。所以有可能矽膠管中的 SMP 能活化在退化神經中的巨噬細胞，並釋出神經親和性因子去加速再生神經的成熟。

黨參實驗方面：中藥與生物醫學材料之結合去促進受損的周邊神經再生，近年來受到許多的關注。當神經受傷後，Schwann cell 產生的貼附分子與神經親和性因子對成功的神經再生來說是相當重要¹³⁷。黨參為常用來治療脾及胃相關症狀用藥；黨參對於神經系統有著多樣性之影響。如黨參與銀杏合併使用能提升記憶力與學習力⁹⁴；黨參萃取總生物鹼能強化藉由 NGF 所誘導的 PC12 細胞之神經軸突生長⁹⁶。我們實驗的 MTT 結果發現使用不同劑量黨參 (0, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/ml}$) 處理 RSC96 細胞能劑量依賴性地促進細胞增生，與 PCNA 的蛋白表現。此外，於 wound-healing 研究顯示 20~40 $\mu\text{g/ml}$ 黨參為最佳誘導細胞增生之劑量；此劑量濃度範圍和細胞週期調節蛋白 cyclin D1 與 cyclin E 之大量表現的劑量相同。

MAPKs (mitogen activated protein kinases) 協調了有關細胞增生與分化的重要訊息路徑¹³⁸。MAPKs 有三個家族成員：extracellular signal-regulated kinases (ERK), NH₂-terminal kinases (JNK) 及 p38；它們在器官發展、調節細胞週期、增生、分化和其他細胞生理功能來說相當重要¹³⁸⁻¹⁴⁰。本實驗利用 MAPK 抑制劑證實 Schwann cell 經黨參處理後，

會藉由 ERK 和 p38 訊息途徑促進神經再生過程中的細胞增生。

先前文獻指出由於 IGFs-IGFIR-Akt-Bcl2 具有刺激組織生長¹⁴¹和軸突再生¹⁰⁶之功能；故我們利用 western blot 檢測相關蛋白表現。研究發現黨參會大量表現 IGF-IR 與 pAkt，隨後 pAkt 會刺激抗凋亡蛋白 BCl₂ 表現與磷酸化前凋亡 (pro-apoptosis) 蛋白 pBad 表現；而細胞週期調節蛋白 cyclin A, cyclin D 及 cyclin E 也會大量表現。總括上述實驗結果，本實驗證明了黨參能藉由高度調節 IGFs-IGFIR-Akt-Bcl2 表現，提升細胞存活和細胞週期活性。

纖維母細胞生長因子(fibroblast growth factor；FGF)為 16~18 kDa 分子量大小，是組織潛在親和性因子(trophic factor)，可以促進神經細胞與 Schwann cell 增生與存活^{142, 143}；FGF 可以促進早期再生軸突的延伸¹⁴⁴。這些研究報導皆推測 FGF 表現與受傷後神經元再生有關。本研究結果顯示黨參會刺激 RSC96 細胞會經由提升 FGF-2 表現，刺激 uPA 與 MMP9 蛋白高度表現。細胞外基質降解與腫瘤轉移、組織生長有關，此過程的關鍵性調節者-uPA，可以轉化胞漿素原 (plasminogen) 成胞漿素 (plasmin)，作用於細胞外基質之組成份¹¹⁹。如同 uPA 在轉移的角色一樣，在癌症中高量 uPA 的會有較差的預後現象(Poor prognosis)，細胞增生與分化過程包含了 uPA 催化細胞外基質之降解；有趣的是，FGF 為 uPA 活性的協調者¹⁴⁵⁻¹⁴⁷。相對於 uPA，PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1)

與 uPA 互相產生拮抗作用；從 western blot 實驗結果證實當 uPA 蛋白表現逐漸增加時，PAI-1 表現則會隨之降低¹⁴⁸。

綜合上述，黨參會提升 IGF-I 訊息路徑與細胞週期調節蛋白表現，及透過 ERK 和 p38 依賴性訊息途徑促進細胞增生。此外，黨參也會刺激 FGF-2-uPA-MMP 9 移動路徑誘導 RSC96 細胞移動 (圖 5.1)。

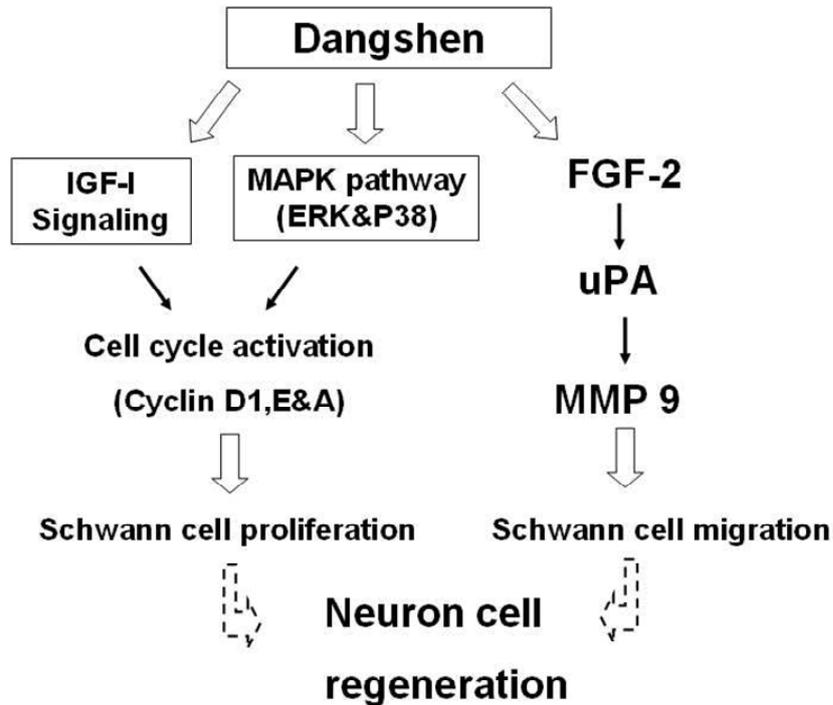


圖 5.1 黨參對 Schwann cells 增生與移動機制圖

第六章

結論

本論文以細胞實驗及動物實驗探討葛根與黨參促進周邊神經再生的能力以及分子機轉，獲得結果如下：

一、葛根之血清代謝物(SMP)促進神經再生：

1. 細胞實驗：SMP 與 NGF 同時處理細胞時，能加乘誘導 PC12 細胞神經軸突生長及分化指標蛋白(synapsin I)表現，尤其是0.01單位的 SMP 效果最明顯。
2. 動物實驗：SMP能促進斷傷坐骨神經結構更完整，增加神經切面面積(Area)、神經內膜面積(Endoneuria)之總和，以及增加髓鞘化軸突數目(Axon number)。

二、黨參促進神經再生：

1. 細胞實驗：黨參(20 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$) 明顯促進許旺細胞(RSC 96)增生，誘導增殖細胞核抗原 (Proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 蛋白依劑量依賴性 (Dose-dependent manner) 增加表現，並且促進許旺細胞受傷後移動。
2. 分子機轉：
 - (1)細胞增生(Schwann cell proliferation)：黨參活化 MAPK 訊息路徑中 pERK1/2 和 p38依賴性訊息途徑蛋白表現。此外，黨參亦參與

促進上游 IGF-IR 與 pAkt 蛋白表現增加，並活化下游抗凋亡蛋白 pBad 與 Bcl2 表現。

(2)細胞週期(cell cycle):黨參活化細胞週期調控蛋白 cyclin D1、cyclin E 和 cyclin A，使其大量表現。這樣的細胞週期蛋白表現，與黨參劑量性依賴地促進 IGF-IR 及 pAkt 與抗凋亡蛋白 pBad、Bcl2 (IGFs-IGFIR-Akt-Bcl2)表現進而調節細胞週期密切相關。

(3)細胞移動(Schwann cell migration):黨參活化 FGF-2，接著刺激 uPA、MMP9 與 MMP2 蛋白表現，並活化 MMP 2 和 MMP9 酵素活性，最後分解細胞間或細胞與基質間的貼附作用，促進了 RSC 96 細胞的移動。

綜合上述結果顯示：葛根之血清代謝物能促進神經元細胞(PC12)生長，為極具潛力的促進神經生長因子；而黨參具有促進許旺細胞移動與增生作用，並且加速神經斷端的修復能力，是一種極具潛力做為治療周邊神經再生之藥物。

参 考 文 献

1. Kushima Y, Nishio C, Nonomura T, Hatanaka H. Effects of nerve growth factor and basic fibroblast growth factor on survival of cultured septal cholinergic neurons from adult rats. *Brain Res* 1992;598: 264-270.
2. Lundborg G, Kanje M. Bioartificial nerve grafts. A prototype. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1996;30: 105-110.
3. Rosen JM, Pham HN, Abraham G, Harold L, Hentz VR. Artificial nerve graft compared to autograft in a rat model. *J Rehabil Res Dev* 1989;26: 1-14.
4. Rodriguez FJ, Gomez N, Perego G, Navarro X. Highly permeable polylactide-caprolactone nerve guides enhance peripheral nerve regeneration through long gaps. *Biomaterials* 1999;20: 1489-1500.
5. Santos X, Rodrigo J, Hontanilla B, Bilbao G. Evaluation of peripheral nerve regeneration by nerve growth factor locally administered with a novel system. *J Neurosci Methods* 1998;85: 119-127.
6. Weiss P, Davis H. Pressure block in nerves provided with arterial sleeves. *Journal of Neurosurgery* 1943;6: 269-286.
7. Fields RD, Le Beau JM, Longo FM, Ellisman MH. Nerve regeneration through artificial tubular implants. *Prog Neurobiol* 1989;33: 87-134.
8. Lundborg G, Rosen B, Abrahamson SO, Dahlin L, Danielsen N. Tubular repair of the median nerve in the human forearm. Preliminary findings. *J Hand Surg Br* 1994;19: 273-276.
9. Madison RD, Da Silva CF, Dikkes P. Entubulation repair with protein additives increases the maximum nerve gap distance successfully bridged with tubular prostheses. *Brain Res* 1988;447: 325-334.
10. Urabe T, Zhao Q, Danielsen N, Lundborg G. Regeneration across a partial defect in rat sciatic nerve encased in a silicone chamber. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1996;30: 7-15.
11. Ohbayashi K, Inoue HK, Awaya A et al. Peripheral nerve regeneration in a silicone tube: effect of collagen sponge prosthesis, laminin, and pyrimidine compound administration. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 1996;36: 428-433.

12. 顏正華. 中藥學 知音出版社,1991.
13. Wang P, Jeng CJ, Chien CL, Wang SM. Signaling mechanisms of daidzein-induced axonal outgrowth in hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;366: 393-400.
14. Hsu FL, Liu IM, Kuo DH, Chen WC, Su HC, Cheng JT. Antihyperglycemic effect of puerarin in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nat Prod* 2003;66: 788-792.
15. Fan LL, Sun LH, Li J, Yue XH, Yu HX, Wang SY. The protective effect of puerarin against myocardial reperfusion injury. Study on cardiac function. *Chin Med J (Engl)* 1992;105: 11-17.
16. Xu X, Zhang S, Zhang L, Yan W, Zheng X. The Neuroprotection of puerarin against cerebral ischemia is associated with the prevention of apoptosis in rats. *Planta Med* 2005;71: 585-591.
17. Zhang Y, Zeng X, Zhang L, Zheng X. Stimulatory effect of puerarin on bone formation through activation of PI3K/Akt pathway in rat calvaria osteoblasts. *Planta Med* 2007;73: 341-347.
18. Robert M, Benre, Matthew N, Lery. Principles of physiology. International Student Edition 1990: 56-68.
19. Nicoli AN, Perego G, Cella GD et al. Effectiveness of a bioabsorbable conduit in the repair of peripheral nerves. *Biomaterials* 1996;17: 959-962.
20. Marieb EN. Human Anatomy & physiology. 4th Edition 1998: 362-403.
21. Kingsley RE. Concise test of neuroscience. 2nd Edition 1999: 1-90.
22. Kjaer I. Neuro-osteology. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9: 224-244.
23. Haines DE. Fundamental Neuroscience 1997: 1-8.
24. 清'張隱菴集註. 黃帝內經素問集註. 上海: 上海科學技術出版社,1992.
25. 清'張隱菴集註. 黃帝內經靈樞集註. 上海: 上海科學技術出版社,1992.
26. 莊宏達. 內經新解, Vol 四版. 台北: 志遠書局,1993.

27. Liveson JA. Peripheral Neurology: case studies in electrodiagnosis., 2nd Edition. edn Info Access & Distribution Pte Ltd.,1992.
28. Lundborg G. Nerve injury and repair. Nerve injury and repair 1988: 1-277.
29. Cotran RS, Kumar V, Colins T. Robbins Pathologic Basis of Disease., 6th Edition edn W.B. Saunders Company.,1999.
30. Bungner O.V. Uber die Degeneration-und Regenerationsvorgange am nerve nach verletzungen. Beitr Pathol 1891:10: 321-387.
31. Waller A. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog and observation of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. Philos 1850:140: 423-429.
32. 胡正利. 針刺及電針對經矽膠管修護之截斷大鼠坐骨神經再生影響的評估 中國醫藥大學,2000.
33. Ide C. Peripheral nerve regeneration. Neurosci Res 1996:25: 101-121.
34. Hall SM. Regeneration in the peripheral nervous system. Neuropathol Appl Neurobiol 1989:15: 513-529.
35. Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. Annu Rev Neurosci 1990:13: 43-60.
36. Rittenhouse JR, Lui PD, Lau BH. Chinese medicinal herbs reverse macrophage suppression induced by urological tumors. J Urol 1991:146: 486-490.
37. Paivalainen S, Nissinen M, Honkanen H et al. Myelination in mouse dorsal root ganglion/Schwann cell cocultures. Mol Cell Neurosci 2008:37: 568-578.
38. Xu XM, Guenard V, Kleitman N, Aebischer P, Bunge MB. A combination of BDNF and NT-3 promotes supraspinal axonal regeneration into Schwann cell grafts in adult rat thoracic spinal cord. Exp Neurol 1995:134: 261-272.
39. Simons M, Trotter J. Wrapping it up: the cell biology of myelination. Curr Opin Neurobiol 2007:17: 533-540.
40. Torigoe K, Tanaka HF, Takahashi A, Awaya A, Hashimoto K. Basic behavior of migratory Schwann cells in peripheral nerve regeneration. Exp Neurol 1996:137: 301-308.
41. Guenard V, Kleitman N, Morrissey TK, Bunge RP, Aebischer P. Syngeneic

- Schwann cells derived from adult nerves seeded in semipermeable guidance channels enhance peripheral nerve regeneration. *J Neurosci* 1992;12: 3310-3320.
42. Pozzi A, Zent R. Integrins: sensors of extracellular matrix and modulators of cell function. *Nephron Exp Nephrol* 2003;94: e77-e84.
 43. Anselin AD, Fink T, Davey DF. Peripheral nerve regeneration through nerve guides seeded with adult Schwann cells. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1997;23: 387-398.
 44. Molteni R, Fumagalli F, Magnaghi V et al. Modulation of fibroblast growth factor-2 by stress and corticosteroids: from developmental events to adult brain plasticity. *Brain Res Brain Res Rev* 2001;37: 249-258.
 45. 梅全喜, 煥新. 現代中藥藥理手冊 中國中醫藥出版社,1998.
 46. 陳克克. 中藥黨參的研究概況. *Journal of Xi'an University of Arts&Science(Nat Sci Ed)* .1988;11(2): 33-39.
 47. 陳欽銘. 當代中藥學 中國醫藥學院出版組,1976.
 48. Bebrevska L, Foubert K, Hermans N et al. In vivo antioxidative activity of a quantified *Pueraria lobata* root extract. *J Ethnopharmacol* 2009.
 49. Choo MK, Park EK, Yoon HK, Kim DH. Antithrombotic and antiallergic activities of daidzein, a metabolite of puerarin and daidzin produced by human intestinal microflora. *Biol Pharm Bull* 2002;25: 1328-1332.
 50. Keung WM, Vallee BL. Kudzu root: an ancient Chinese source of modern antidipsotropic agents. *Phytochemistry* 1998;47: 499-506.
 51. Yasuda T, Endo M, Kon-no T, Kato T, Mitsuzuka M, Ohsawa K. Antipyretic, analgesic and muscle relaxant activities of pueraria isoflavonoids and their metabolites from *Pueraria lobata* Ohwi-a traditional Chinese drug. *Biol Pharm Bull* 2005;28: 1224-1228.
 52. Xie RQ, Du J, Hao YM. [Myocardial protection and mechanism of Puerarin Injection on patients of coronary heart disease with ischemia/reperfusion]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 2003;23: 895-897.
 53. Xuan B, Zhou YH, Yang RL, Li N, Min ZD, Chiou GC. Improvement of ocular

- blood flow and retinal functions with puerarin analogs. *J Ocul Pharmacol Ther* 1999;15: 207-216.
54. Liu JM, Ma L, He WP. [Therapeutic effect of puerarin therapy on sudden deafness]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2002;22: 1044-1045.
 55. Pernow J, Wang QD. Endothelin in myocardial ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1997;33: 518-526.
 56. Stenman E, Edvinsson L. Cerebral ischemia enhances vascular angiotensin AT1 receptor-mediated contraction in rats. *Stroke* 2004;35: 970-974.
 57. Yan LP, Zhuang YL, Chan SW, Chen SL, Shi GG. Analysis of the mechanisms underlying the endothelium-dependent antivasoconstriction of puerarin in rat aorta. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2009;379: 587-597.
 58. Zhang HY, Liu YH, Wang HQ, Xu JH, Hu HT. Puerarin protects PC12 cells against beta-amyloid-induced cell injury. *Cell Biol Int* 2008;32: 1230-1237.
 59. Wilgis EF, Maxwell GP. Distal digital nerve grafts: clinical and anatomical studies. *J Hand Surg Am* 1979;4: 439-443.
 60. Edshage S. Peripheral nerve suture. A technique for improved intraneural topography. Evaluation of some suture materials. *Acta Chir Scand Suppl* 1964;15: suppl.
 61. Kutz JE, Shealy G, Lubbers L. Interfascicular nerve repair. *Orthop Clin North Am* 1981;12: 277-286.
 62. Millesi H. Interfascicular nerve grafting. *Orthop Clin North Am* 1981;12: 287-301.
 63. Kuderna H. DeFibrinklebung peripherer nerve 1985.
 64. Millesi H. Nerve grafts: indications, techniques and prognosis. 1980.
 65. Matson DD, Alexander E Jr, Weiss P. Experiments on the bridging of gaps in severed peripheral nerves of monkeys. *J Neurosurg* 1948;5: 230-248.
 66. Chiu DT, Janecka I, Krizek TJ, Wolff M, Lovelace RE. Autogenous vein graft as a conduit for nerve regeneration. *Surgery* 1982;91: 226-233.
 67. White J.C., Hamlin H. New uses of tantalum in nerve suture, control of neuroma

- formation and prevention of regeneration after thoracic sympathectomy. *Journal of Neurosurgery* 1945:2: 413.
68. Azzam NA, Brightman MW. Regeneration of central nervous system axons into an acellular tube in the absence of distal tissue. *Exp Neurol* 1985;89: 634-644.
 69. Bassett CA, Campbell JB, Girado JM, Rossi JP, Seymour RJ. Application of monomolecular filter tubes in bridging gaps in peripheral nerves and for prevention of neuroma formation; a preliminary report. *J Neurosurg* 1956:13: 635-637.
 70. Valentini RF, Aebischer P, Winn SR, Galletti PM. Collagen- and laminin-containing gels impede peripheral nerve regeneration through semipermeable nerve guidance channels. *Exp Neurol* 1987;98: 350-356.
 71. Lundborg G, Kanje M. Bioartificial nerve grafts. A prototype. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1996;30: 105-110.
 72. Le Beau JM, Ellisman MH, Powell HC. Ultrastructural and morphometric analysis of long-term peripheral nerve regeneration through silicone tubes. *J Neurocytol* 1988;17: 161-172.
 73. Williams LR, Longo FM, Powell HC, Lundborg G, Varon S. Spatial-temporal progress of peripheral nerve regeneration within a silicone chamber: parameters for a bioassay. *J Comp Neurol* 1983;218: 460-470.
 74. Campenot RB. Development of sympathetic neurons in compartmentalized cultures. II. Local control of neurite survival by nerve growth factor. *Dev Biol* 1982;93: 13-21.
 75. Heumann R, Korsching S, Bandtlow C, Thoenen H. Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection. *J Cell Biol* 1987;104: 1623-1631.
 76. Nja A, Purves D. The effects of nerve growth factor and its antiserum on synapses in the superior cervical ganglion of the guinea-pig. *J Physiol* 1978;277: 53-75.
 77. Gundersen RW, Barrett JN. Characterization of the turning response of dorsal root neurites toward nerve growth factor. *J Cell Biol* 1980;87: 546-554.
 78. Chen YS, Wang-Bennett LT, Coker NJ. Facial nerve regeneration in the silicone

- chamber: the influence of nerve growth factor. *Exp Neurol* 1989;103: 52-60.
79. Bu SS, Li JR, Hu CZ, Zhao YF. The influence of exogenous nerve growth factor on inferior alveolar nerve regeneration in silicone tubes. *Chin J Dent Res* 1999;2: 44-48.
 80. Madison RD, Da Silva CF, Dikkes P. Entubulation repair with protein additives increases the maximum nerve gap distance successfully bridged with tubular prostheses. *Brain Res* 1988;447: 325-334.
 81. Chen YS, Hsieh CL, Tsai CC et al. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. *Biomaterials* 2000;21: 1541-1547.
 82. Davis GE, Manthorpe M, Varon S. Parameters of neuritic growth from ciliary ganglion neurons in vitro: influence of laminin, schwannoma polyornithine-binding neurite promoting factor and ciliary neuronotrophic factor. *Brain Res* 1985;349: 75-84.
 83. Davis GE, Manthorpe M, Varon S. Parameters of neuritic growth from ciliary ganglion neurons in vitro: influence of laminin, schwannoma polyornithine-binding neurite promoting factor and ciliary neuronotrophic factor. *Brain Res* 1985;349: 75-84.
 84. Longo FM, Hayman EG, Davis GE et al. Neurite-promoting factors and extracellular matrix components accumulating in vivo within nerve regeneration chambers. *Brain Res* 1984;309: 105-117.
 85. Bailey SB, Eichler ME, Villadiego A, Rich KM. The influence of fibronectin and laminin during Schwann cell migration and peripheral nerve regeneration through silicon chambers. *J Neurocytol* 1993;22: 176-184.
 86. Woolley AL, Hollowell JP, Rich KM. First place--Resident Basic Science Award 1990. Fibronectin-laminin combination enhances peripheral nerve regeneration across long gaps. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1990;103: 509-518.
 87. Danielsen N, Muller H, Pettmann B et al. Rat amnion membrane matrix as a substratum for regenerating axons from peripheral and central neurons: effects in a silicone chamber model. *Brain Res* 1988;467: 39-50.
 88. Madison RD, Da Silva CF, Dikkes P. Entubulation repair with protein additives increases the maximum nerve gap distance successfully bridged with tubular

- prostheses. Brain Res 1988:447: 325-334.
89. Jenq CB, Coggeshall RE. The effects of an autologous transplant on patterns of regeneration in rat sciatic nerve. Brain Res 1986:364: 45-56.
 90. Morris JH, Hudson AR, Weddell G. A study of degeneration and regeneration in the divided rat sciatic nerve based on electron microscopy. II. The development of the "regenerating unit". Z Zellforsch Mikrosk Anat 1972:124: 103-130.
 91. Fields RD, Ellisman MH. Axons regenerated through silicone tube splices. I. Conduction properties. Exp Neurol 1986:92: 48-60.
 92. Fields RD, Ellisman MH. Axons regenerated through silicone tube splices. II. Functional morphology. Exp Neurol 1986:92: 61-74.
 93. Yongxu S, Jicheng L. Structural characterization of a water-soluble polysaccharide from the roots of *Codonopsis pilosula* and its immunity activity. Int J Biol Macromol 2008:43: 279-282.
 94. Singh B, Song H, Liu XD et al. Dangshen (*Codonopsis pilosula*) and Bai guo (*Gingko biloba*) enhance learning and memory. Altern Ther Health Med 2004:10: 52-56.
 95. Jin ZL, Wen J, Li SF. Antiaging effect of Shenqi mixture tonic. Chin Trad Herb Drugs 1996:27: 90-92.
 96. Liu JH, Bao YM, Song JJ, An LJ. *Codonopsis pilosula* (Franch) Nannf total alkaloids potentiate neurite outgrowth induced by nerve growth factor in PC12 cells. Acta Pharmacol Sin 2003:24: 913-917.
 97. Wang ZT, Du Q, Xu GJ, Wang RJ, Fu DZ, Ng TB. Investigations on the protective action of *Codonopsis pilosula* (Dangshen) extract on experimentally-induced gastric ulcer in rats. Gen Pharmacol 1997:28: 469-473.
 98. Schumacher M, Jung-Testas I, Robel P, Baulieu EE. Insulin-like growth factor I: a mitogen for rat Schwann cells in the presence of elevated levels of cyclic AMP. Glia 1993:8: 232-240.
 99. Philippou A, Halapas A, Maridaki M, Koutsilieris M. Type I insulin-like growth factor receptor signaling in skeletal muscle regeneration and hypertrophy. J Musculoskelet Neuronal Interact 2007:7: 208-218.
 100. Zackenfels K, Oppenheim RW, Rohrer H. Evidence for an important role of IGF-I

- and IGF-II for the early development of chick sympathetic neurons. *Neuron* 1995;14: 731-741.
101. Aizenman Y, de VJ. Brain neurons develop in a serum and glial free environment: effects of transferrin, insulin, insulin-like growth factor-I and thyroid hormone on neuronal survival, growth and differentiation. *Brain Res* 1987;406: 32-42.
 102. Caroni P, Grandes P. Nerve sprouting in innervated adult skeletal muscle induced by exposure to elevated levels of insulin-like growth factors. *J Cell Biol* 1990;110: 1307-1317.
 103. Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995;16: 3-34.
 104. Leininger GM, Backus C, Uhler MD, Lentz SI, Feldman EL. Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt effectors mediate insulin-like growth factor-I neuroprotection in dorsal root ganglia neurons. *FASEB J* 2004;18: 1544-1546.
 105. Campana WM, Darin SJ, O'Brien JS. Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase mediate IGF-I- and prosaptide-induced survival in Schwann cells. *J Neurosci Res* 1999;57: 332-341.
 106. Koriyama Y, Homma K, Sugitani K et al. Upregulation of IGF-I in the goldfish retinal ganglion cells during the early stage of optic nerve regeneration. *Neurochem Int* 2007;50: 749-756.
 107. Campana WM, Darin SJ, O'Brien JS. Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase mediate IGF-I- and prosaptide-induced survival in Schwann cells. *J Neurosci Res* 1999;57: 332-341.
 108. Van den HS. Cell-cycle regulation. *WormBook* 2005: 1-16.
 109. Golias CH, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int J Clin Pract* 2004;58: 1134-1141.
 110. Schafer KA. The cell cycle: a review. *Vet Pathol* 1998;35: 461-478.
 111. Mazumder S, DuPree EL, Almasan A. A dual role of cyclin E in cell proliferation and apoptosis may provide a target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2004;4: 65-75.

112. Donnellan R, Chetty R. Cyclin E in human cancers. *FASEB J* 1999;13: 773-780.
113. Yam CH, Fung TK, Poon RY. Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci* 2002;59: 1317-1326.
114. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 2007;26: 3279-3290.
115. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68: 320-344.
116. Anderson KJ, Dam D, Lee S, Cotman CW. Basic fibroblast growth factor prevents death of lesioned cholinergic neurons in vivo. *Nature* 1988;332: 360-361.
117. Murphy G, Atkinson S, Ward R, Gavrilovic J, Reynolds JJ. The role of plasminogen activators in the regulation of connective tissue metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci* 1992;667: 1-12.
118. Myohanen H, Vaehri A. Regulation and interactions in the activation of cell-associated plasminogen. *Cell Mol Life Sci* 2004;61: 2840-2858.
119. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 1997;72: 1-22.
120. Siconolfi LB, Seeds NW. Induction of the plasminogen activator system accompanies peripheral nerve regeneration after sciatic nerve crush. *J Neurosci* 2001;21: 4336-4347.
121. Siconolfi LB, Seeds NW. Mice lacking tPA, uPA, or plasminogen genes showed delayed functional recovery after sciatic nerve crush. *J Neurosci* 2001;21: 4348-4355.
122. Siconolfi LB, Seeds NW. Mice lacking tissue plasminogen activator and urokinase plasminogen activator genes show attenuated matrix metalloproteinase activity after sciatic nerve crush. *J Neurosci Res* 2003;74: 430-434.
123. Lundborg G, Kanje M. Bioartificial nerve grafts. A prototype. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1996;30: 105-110.

124. Rosen JM, Pham HN, Abraham G, Harold L, Hentz VR. Artificial nerve graft compared to autograft in a rat model. *J Rehabil Res Dev* 1989;26: 1-14.
125. Chen YS. Development of a multiple-lumen nerve cuff utilizing growth stimulant for controlled regeneration. 1998.
126. Swaim SF. Peripheral nerve surgery. *Veterinary Neurology*. Philadelphia: WB Saunders:1987.
127. Cheng YS, Cheng WC, Yao CH et al. Effects of buyang huanwu decoction on peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers. *Am J Chin Med* 2001;29: 423-432.
128. Chen YS, Wu CH, Yao CH, Chen CT. Ginsenoside Rb1 enhances peripheral nerve regeneration across wide gaps in silicone rubber chambers. *Int J Artif Organs* 2002;25: 1103-1108.
129. Chen YS, Liu CJ, Cheng CY, Yao CH. Effect of bilobalide on peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 2004;25: 509-514.
130. Chiang HM, Yeh YR, Chao Lee PD et al. Metabolic pharmacokinetics of isoflavones in the root of *Pueraria lobata* in rats. *Mid Taiwan J Med* 2005;10: 57-64.
131. Rich KM, Alexander TD, Pryor JC, Hollowell JP. Nerve growth factor enhances regeneration through silicone chambers. *Exp Neurol* 1989;105: 162-170.
132. Setchell KD, Borriello SP, Hulme P, Kirk DN, Axelson M. Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. *Am J Clin Nutr* 1984;40: 569-578.
133. Tanzer L, Jones KJ. Gonadal steroid regulation of hamster facial nerve regeneration: effects of dihydrotestosterone and estradiol. *Exp Neurol* 1997;146: 258-264.
134. Zhang R, Li Y, Wang W. Enhancement of immune function in mice fed high doses of soy daidzein. *Nutr Cancer* 1997;29: 24-28.
135. Degen GH. Interaction of phytoestrogens and other environmental estrogens with prostaglandin synthase in vitro. *J Steroid Biochem* 1990;35: 473-479.
136. Dahlin LB. Prevention of macrophage invasion impairs regeneration in nerve

- grafts. *Brain Res* 1995;679: 274-280.
137. Jessen KR, Mirsky R. Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. *Trends Neurosci* 1999;22: 402-410.
 138. Dhanasekaran DN, Kashef K, Lee CM, Xu H, Reddy EP. Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene* 2007;26: 3185-3202.
 139. Lei Y, Wang JH, Chen KJ. [Comparative study on angiogenesis effect of *Astragalus membranaceus* and *Angelica sinensis* in chick embryo choriollantoic membrane]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2003;28: 876-878.
 140. Perdiguero E, Ruiz-Bonilla V, Serrano AL, Munoz-Canoves P. Genetic deficiency of p38alpha reveals its critical role in myoblast cell cycle exit: the p38alpha-JNK connection. *Cell Cycle* 2007;6: 1298-1303.
 141. Le RD, Butler AA. Insulin-like growth factors in pediatric health and disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84: 4355-4361.
 142. Besnard F, Perraud F, Sensenbrenner M, Labourdette G. Effects of acidic and basic fibroblast growth factors on proliferation and maturation of cultured rat oligodendrocytes. *Int J Dev Neurosci* 1989;7: 401-409.
 143. Davis JB, Stroobant P. Platelet-derived growth factors and fibroblast growth factors are mitogens for rat Schwann cells. *J Cell Biol* 1990;110: 1353-1360.
 144. Fujimoto E, Mizoguchi A, Hanada K, Yajima M, Ide C. Basic fibroblast growth factor promotes extension of regenerating axons of peripheral nerve. In vivo experiments using a Schwann cell basal lamina tube model. *J Neurocytol* 1997;26: 511-528.
 145. Varnholt H, Asayama Y, Aishima S, Taguchi K, Sugimachi K, Tsuneyoshi M. C-met and hepatocyte growth factor expression in combined hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncol Rep* 2002;9: 35-41.
 146. Zhao J, Bian ZC, Yee K, Chen BP, Chien S, Guan JL. Identification of transcription factor KLF8 as a downstream target of focal adhesion kinase in its regulation of cyclin D1 and cell cycle progression. *Mol Cell* 2003;11: 1503-1515.
 147. Witowsky J, Abell A, Johnson NL, Johnson GL, Cuevas BD. MEKK1 is required for inducible urokinase-type plasminogen activator expression. *J Biol Chem*

2003:278: 5941-5946.

148. Andreasen PA, Georg B, Lund LR, Riccio A, Stacey SN. Plasminogen activator inhibitors: hormonally regulated serpins. *Mol Cell Endocrinol* 1990;68: 1-19.
149. 崔樹德. 中藥大全. 黑龍江科學技術出版社, 1998.
150. Lidiya Bebrevska, Kenne Foubert, Nina Hermans, Shyama Chatterjee, Eric Van Marck, Guido De Meyer, Arnold Vlietinck, Luc Pieters' and Sandra Apers. In vivo antioxidative activity of a quantified *Pueraria lobata* root extract. *Journal of Ethnopharmacology* 2010;127:112-117
151. Zneg XL, Li XA, Zhang BY. Immunological and hematopoietic effect of *Codonopsis pilosula* on cancer patients during radiotherapy. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 1992;12(10):607-8, 581.
152. Lin YJ, Hou YC, Lin CH, Hsu YA, Sheu JJ, Lai CH, Chen BH, Lee Chao PD, Wan L, Tsai FJ. *Puerariae radix* isoflavones and their metabolites inhibit growth and induce apoptosis in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Jan 23;378(4):683-8. Epub 2008 Nov 14.
153. Gu L, Yang Y, Sun Y, Zheng X. Puerarin inhibits acid-sensing ion channels and protects against neuron death induced by acidosis. *Planta Med.* 2010 Apr;76(6):583-8. Epub 2009 Nov 16.
154. Wen KC, Lin SP, Yu CP, Chiang HM. Comparison of *Puerariae Radix* and its hydrolysate on stimulation of hyaluronic acid production in NHEK cells. *Am J Chin Med.* 2010;38(1):143-55.

Effects of *Pueraria lobata* and *Codonopsis Pilosula* on regeneration of peripheral nerve.

Abstract

Hsien-Tung Chen

Major Professor : Yueh-Sheng Chen

Graduate Institute of Chinese Medical Science, China Medical University

With a history of several thousand years, the pharmacology and clinical application of traditional Chinese medicine has been well documented. However, the effects of Chinese herbal medicine on peripheral nerve regeneration are little known. Therefore, this study investigated the effect of *Pueraria lobata* and *Codonopsis Pilosula* on regeneration of peripheral nerve.

In *Pueraria lobata* part, we used that in vitro and in vivo evaluation of rat serum metabolites of the *Pueraria lobata* (SMP) on peripheral nerve regeneration. In the in vitro study, we found that the SMP (1, 0.1, 0.01 unit of the SMP) caused a marked enhancement of the nerve growth factor (NGF)-mediated neurite outgrowth and the expression of synapsin I from PC12 cells. In the in vivo study, silicone rubber chambers filled with the SMP were used to bridge a 10-mm sciatic nerve defect in rats. At the conclusion of 8 weeks, animals from the groups treated with the SMP had a relatively more mature structure with larger mean values of myelinated axon number, endoneurial area, and total nerve area when compared with those in the controls receiving the saline only.

On the other hand, this study also evaluates the proliferative and migrative effects of *Codonopsis Pilosula* on RSC96, Schwann cells. We investigated the molecular signaling pathways, which include: (1) survival signaling, IGFs-IGFIR-Akt-Bcl2 and proliferative signaling, Cell cycle factors and MAPK pathways. (2) migrate and anti-scar signaling, FGF-2-uPA-MMPs. After treated with different concentrations (20 µg/ml , 40 µg/ml , 60 µg/ml , 80 µg/ml , 100 µg/ml) of dangshen. We observed a dose dependent proliferative effect using PCNA western blotting assay, MTT assay and the wound healing test. We also found that dangshen stimulates the protein expression of IGF-I pathway regulators, cell cycle controlling proteins and excites the MAPK signaling pathway regulators ERK and P38. *Codonopsis Pilosula* even stimulates the FGF-2-uPA-MMP 9 migration pathway of RSC 96 Schwann cells. Using MAPK chemical inhibitors, U0126, SB203580, and SP600125, the proliferative effects of *Codonopsis Pilosula* on RSC 96 cells were identified to be ERK- and P38- dependent.

Based on these results we suggest that the serum metabolites of *Pueraria lobata* can be a potential nerve growth-promoting factor. Moreover, applying an appropriate dose of *Codonopsis Pilosula* with biomedical materials would be a potential approach for enhancing neuron regeneration.

Key words: *Pueraria lobata* ; peripheral nerve regeneration ; PC12 cell ; silicone rubber ; serum metabolite ; *Codonopsis Pilosula* ; Proliferate and migrate effect ; Schwann cells

謝 辭

往來台東與台中之間已經數不清有多少里程與分秒，這期間要兼顧行醫、研究與家庭，對自己的身心是一個磨厲與考驗，在此刻能夠順利完成博士學位，內心的悸動和感恩是無法在短短的幾行謝辭中承載滿行。

研究工作能夠順利推展，最需要感激的莫過於指導恩師陳悅生教授，由於他的無私胸懷和不放棄態度，不斷鼓勵，終使自己能堅持完成學業；藥學系李珮端教授在論文初稿完成後，不辭辛勞與盡心盡力的為學生的論文斧正，期許論文品質能夠再提昇，完美呈現在眾人面前，其學術涵養與精神是自己人生的標竿；另外，感謝黃志揚教授慷慨協助自己完成中藥分子機轉探討，使論文能夠順利發表。教授群們點點滴滴的協助與奉獻，都是自己內心無限感謝的泉源，由於他們豐富的知識和學術成就，不吝於提攜和指導後進，將成為自己仿效與追求學術的終生職志。

辦公室王文晴助理，實驗室寧漪、尹婷、青苓、巧楨等助理，都是讓本論文能夠順利完成的幕後功臣，內心除了無限感激外，更敬佩他們默默的付出和奉獻。

內人郁雯的支持與諒解，讓自己無罣礙的往來學校與家庭之間而無後顧之憂，終使論文能夠順利完成，內心深深的感謝！。

最後，將此論文完成後所得到的些許成就和榮耀與對自己期許甚深的父母親共同分享，感謝他們任勞任怨四十多年來養育之恩與耳提面命，自己以身為其子女為榮，感激他們無怨無悔的支持下，最後能順利登上學術生涯的巔峰。



發表論文

Am J Chin Med. 2010;38(2):359-72.

Dangshen (*Codonopsis pilosula*) activates IGF-I and FGF-2 pathways to induce proliferation and migration effects in RSC96 Schwann cells.

Chen HT, Tsai YL, Chen YS, Jong GP, Chen WK, Wang HL, Tsai FJ, Tsai CH, Lai TY, Tzang BS, Huang CY, Lu CY.

Graduate Institute of Chinese Medical Science, China Medical University, Taichung, Taiwan.

Abstract

This study evaluates the proliferative and migrative effects of dangshen on RSC96, Schwann cells. We investigated the molecular signaling pathways, which include: (1) survival signaling, IGFs-IGFIR-Akt-Bcl2 and proliferative signaling, cell cycle factors and MAPK pathways. (2) migrate and anti-scar signaling, FGF-2-uPA-MMPs. After treatment with different concentrations (20 microg/ml, 40 microg/ml, 60 microg/ml, 80 microg/ml, and 100 microg/ml) of dangshen. We observed a dose dependent proliferative effect using PCNA Western blotting assay, MTT assay and the wound healing test. We also found that dangshen stimulates the protein expressions of IGF-I pathway regulators, cell cycle controlling proteins and excites the MAPK signaling pathway regulators ERK and P38. Dangshen even stimulates the FGF-2-uPA-MMP 9 migration pathway in RSC 96 Schwann cells. Using MAPK chemical inhibitors, U0126, SB203580, and SP600125, the proliferative effects of dangshen on RSC 96 cells were identified to be ERK- and P38- dependent. Based on these results, applying an appropriate dose of dangshen with biomedical materials would be a potential approach for enhancing neuron regeneration.

PMID: 20387231 [PubMed - in process]



發表論文

J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2008 Jan;84(1):256-62.

Effect of serum metabolites of *Pueraria lobata* in rats on peripheral nerve regeneration: in vitro and in vivo studies.

Chen HT, Yao CH, Chao PD, Hou YC, Chiang HM, Hsieh CC, Ke CJ, Chen YS.

Laboratory of Biomaterials, Graduate Institute of Chinese Medical Science, China Medical University, Taichung, Taiwan.

Abstract

This study provides in vitro and in vivo evaluation of rat serum metabolites of the *Pueraria lobata* (SMP) on peripheral nerve regeneration. In the in vitro study, we found that the SMP caused a marked enhancement of the nerve growth factor (NGF)-mediated neurite outgrowth and the expression of synapsin I from PC12 cells. In the in vivo study, silicone rubber chambers filled with the SMP were used to bridge a 10-mm sciatic nerve defect in rats. At the conclusion of 8 weeks, animals from the groups treated with the SMP had a relatively more mature structure with larger mean values of myelinated axon number, endoneurial area, and total nerve area when compared with those in the controls receiving the saline only. These results suggest that the serum metabolites of *Pueraria lobata* can be a potential nerve growth-promoting factor.

PMID: 17514670 [PubMed - indexed for MEDLINE]

