

中國醫藥大學中國醫學研究所博士論文

指導教授：謝慶良 教授

共同指導教授：唐娜櫻 副教授

論文題目

阿魏酸對腦缺血-再灌注損傷大鼠
之抗炎症、抗氧化作用及其機轉之探討

**The Anti-Inflammatory and Antioxidative Effects and
Mechanisms of Ferulic acid on Cerebral
Ischemia-Reperfusion Injury in Rats**

研究生：程錦宜

中華民國九十七年十二月

目錄

第一章 前言	1
第二章 文獻探討	5
2-1. 傳統醫學對缺血性腦中風之論述	5
2-1-1. 病因病機之歷史沿革	5
(1). 唐宋以前時期	5
(2). 金元時期	6
(3). 明清時期	6
2-1-2. 治則	7
2-2. 缺血性腦中風之現代研究	7
2-2-1. 臨床表現	7
2-2-2. 病理機轉	8
2-2-3. 臨床治療	9
2-3. 阿魏酸之現代研究	10
2-3-1. 前言	10
2-3-2. 阿魏酸之理化性質	10
2-3-3. 阿魏酸及其衍生物之體內代謝	11
2-3-4. 阿魏酸藥理作用	12
(1). 抗氧化及清除自由基	12
(2). 中樞神經保護作用	14
(3). 心血管保護作用	16
(4). 肝臟保護作用	17
(5). 胃腸消化道保護作用	18
(6). 抗癌病變作用	18
(7). 治療糖尿病作用	19
(8). 抗細胞凋亡作用	20
(9). 抗內皮素-1 作用	21
第三章 材料與方法	22
3-1. 實驗動物	22
3-2. 實驗室藥品與儀器	22
3-3. 中大腦動脈梗塞模型	23
3-4. 實驗步驟	23
3-4-1. 第一階段又分為實驗 A、B 和 C	23
3-4-1-A. 實驗 A	23
(1). 動物分組	23

(2).生理指標偵測 -----	24
(3).圖示中大腦動脈梗塞模型 -----	24
(4).神經學狀態評估 -----	25
(5).圖示神經學狀態評估 -----	25
(6).評估腦梗塞面積 -----	26
(7).實驗 A 流程圖 -----	26
3-4-1-B.實驗 B -----	26
(1).分組 -----	26
(2). Hydroethidium 原位染色及 Hoechst 染色 -----	27
(3). Hydroethidium 原位染色及 Hoechst 染色示意圖 -----	27
(4). ICAM-1、MPO 及 NF- κ B (p50) 免疫組織化學分析染色 -----	28
3-4-1-C.實驗 C -----	28
(1).分組 -----	28
(2). ICAM-1、MPO 及 NF- κ B (p50) 免疫組織化學分析染色 -----	29
(3). ICAM-1、MPO 及 NF- κ B (p50) 免疫組織化學分析染 色示意圖 -----	29
(4).實驗 B、C 流程圖 -----	30
3-4-2.第二階段 -----	30
(1).分組 -----	30
(2).生理指標 -----	30
(3).RNA 萃取 -----	31
(4).半定量反轉錄-聚合酶鏈式反應 -----	31
(5).半定量反轉錄-聚合酶鏈式反應示意圖 -----	34
(6).免疫組織化學分析染色 -----	34
(7).免疫組織化學分析染色示意圖 -----	35
(8).細胞凋亡染色分析 -----	36
(9).細胞凋亡染色分析示意圖 -----	36
(10).免疫組織化學分析雙重染色 -----	37
(11).免疫組織化學分析雙重染色示意圖 -----	37
(12).第二階段實驗流程圖 -----	38
3-5.統計分析 -----	38
第四章 結果 -----	39
4-1. 第一階段實驗結果 -----	39
4-1-1. 生理指標 -----	39
4-1-2. FA 對再灌流 24 小時後腦梗塞面積之影響 -----	40

4-1-3. FA 對再灌流 24 小時後神經學行為缺陷之影響 -----	42
4-1-4. FA 對再灌流 2 小時後 oxidized hydroethidine 螢光染色 陽性細胞表現之影響-----	42
4-1-5. FA 對再灌流 2 小時後 ICAM-1、MPO 及 NF-κB(p50) 陽性細胞表現之影響-----	44
4-1-6. FA 對再灌流 24 小時後 ICAM-1、MPO 及 NF-κB(p50) 陽性細胞表現之影響-----	45
4-2. 第二階段實驗結果-----	49
4-2-1. 生理指標-----	49
4-2-2. FA 對再灌流 2 小時後 ICAM-1 及 Mac-1 mRNA 表現 之影響-----	51
4-2-3. FA 對再灌流 2、10、24 及 36 小時後 Mac-1、4-HNE 及 8-OHdG 陽性細胞表現之影響-----	53
4-2-4. FA 對再灌流 2、10、24 及 36 小時後 TUNEL 陽性細 胞表現之影響-----	54
4-2-5. FA 對再灌流 10 小時後 active caspase 3 及 active caspase 3-NeuN 陽性細胞表現之影響 -----	60
4-2-6. FA 對再灌流 36 小時後 NeuN 陽性細胞表現之影響 ---	60
第五章 討論-----	67
第六章 結論-----	74
參考文獻-----	75
英文摘要-----	96
附錄 (1) 腦缺血-再灌流損傷之機轉圖-----	98
附錄 (2) 第一階段討論之機轉圖-----	99
附錄 (3) 第二階段討論之機轉圖-----	100
附錄 (4) 第一、二階段之綜合機轉圖-----	101

圖目錄

Figure 4-1. Effect of ferulic acid on cerebral infarct in ischemia-reperfusion injured rats -----	41
Figure 4-2. Representative photograph showed the brain coronal section located on the posterior bregma 0.92 mm position----	43
Figure 4-3. Effect of ferulic acid on oxidized hydroethidine fluorescent stain positive cells at 2 h of reperfusion -----	44
Figure 4-4. Effect of ferulic acid on the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) immunoreactive vessels at 2 h and 24 h of reperfusion -----	45
Figure 4-5. Effect of ferulic acid on the nuclear factor- κ B (NF- κ B) and myeloperoxidase (MPO) cells at 24 h of reperfusion -----	47
Figure 4-6. The expression of ICAM-1 and Mac-1 mRNA in the ischemic areas of the cortex and striatum were detected at 2 h of reperfusion -----	52
Figure 4-7. Representative photograph showed the brain coronal section located on the posterior bregma 0.92 mm position---	55
Figure 4-8. Representative photographs depicted the expression of Mac-1 in the penumbra and ischemic core areas at 10, 24, and 36 h of reperfusion -----	56
Figure 4-9. Representative photographs depicted the expression of 4-HNE in the penumbra and ischemic core areas at 10, 24 and 36 h of reperfusion -----	57
Figure 4-10. Representative photographs depicted the expression of 8-OHdG in the penumbra and ischemic core areas at 10, 24 and 36 h of reperfusion. -----	58
Figure 4-11. Photographs depicted the distribution of TUNEL cells in the penumbra and ischemic core areas at 10, 24 and 36 h of reperfusion-----	59
Figure 4-12. Representative photographs depicted active caspase 3 and NeuN expression in the penumbra area at 10 h of reperfusion-----	61
Figure 4-13. Representative photographs depicted NeuN expression in the penumbra and ischemic core areas at 36 h of reperfusion-----	62

表目錄

Table 3-1. Primer sequences -----	32
Table 4-1. Comparison of physiological parameter among the groups---	39
Table 4-2. The expression of oxidized hydroehtidine, ICAM-1, MPO and NF- κ B immunoreactive (positive) cells (vessels) -----	48
Table 4-3. Physiological parameters -----	50
Table 4-4. The effects of ferulic acid on Mac-1, 4-HNE, 8-OHdG and TUNEL positive cells -----	63
Table 4-5. The effects of ferulic acid on active caspase 3 and NeuN-labeled cells -----	65



縮寫對照表

1. **BBB: Blood brain barrier**
2. **BW: Body weight**
3. **ET-1: Endothelin-1**
4. **FA: Ferulic acid**
5. **ICAM-1: Intercellular adhesion molecule-1**
6. **LFA-1: Lymphocyte function associated antigen-1**
7. **Mac-1: Macrophage -1 antigen**
8. **MPO: Myeloperoxidase**
9. **NeuN: Neuronal nuclei**
10. **NF- κ B: Nuclear factor- κ B**
11. **RT-PCR: Reverse transcriptase-polymerase chain reaction**
12. **TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling**
13. **4-HNE: 4-hydroxy-2-nonenal**
14. **8-OHdG: 8-hydroxy- 2'- deoxyguanosine**

阿魏酸對腦缺血-再灌流損傷大鼠之抗炎症、抗氧化作用及其機轉之探討

研 究 生 : 程錦宜
指 導 教 授 : 謝慶良教授
單 位 : 中國醫學研究所

中文摘要

當歸與川芎於傳統中醫藥用於治療腦中風已有數個世紀之久，而阿魏酸為當歸、川芎之主要成分之一，具有神經保護的效用。本實驗最主要目的在於探討阿魏酸對於腦缺血-再灌流損傷大鼠之抗炎症及抗氧化損傷效用及其機轉。老鼠於中大腦動脈梗塞 90 分鐘後分別進行再灌流 2、10、24 及 36 小時。第一階段於再灌流 24 小時進行腦梗塞面積及神經學缺陷評估；另外再灌流 2 小時進行超氧陰離子偵測，再灌流 2 及 24 小時進行細胞間黏附因子-1(ICAM-1)、過氧化骨髓酶(MPO)及核因子- κ B (NF- κ B)等免疫陽性細胞(血管)之評估。第二階段於再灌流 2 小時偵測 ICAM-1 及巨噬細胞-1 抗原(Mac-1) mRNA 之表現；再灌流 2、10、24 及 36 小時偵測 Mac-1、8-氫氧 2'-去氧鳥糞核糖(8-OHdG)、4-羥烯酸(4-HNE)、active caspase 3、神經元核抗原(NeuN) 及 TUNEL 陽性細胞。結果顯示於中大腦動脈梗塞的同時給予阿魏酸劑量 80、100 mg/kg bw，再灌流 24 小時可有效地降低梗塞面積及神經學缺陷分數。阿魏酸(100 mg/kg bw)於再灌流 2 小時可有效地抑制超氧陰離子於腦實質梗塞區的表現且可顯著抑制紋狀體梗塞區 ICAM-1 免疫陽性血管及 ICAM-1、Mac-1 mRNA 之表現；再灌流 24 小時可降低 ICAM-1 及 NF- κ B 於皮質和紋狀體梗塞區之表現，同時亦可於皮質梗塞區調降 MPO 免疫陽性細胞；再灌流 10、24 及 36 小時於半陰影區及梗塞區可顯著抑制 Mac-1、4-HNE 及 8-OHdG 陽性細胞之表現，再灌流 10 小時半陰影及再灌流 24、36 小時半陰影區及梗塞區可顯著抑制 TUNEL 陽性細胞之表現；另外可於再灌流 10 小時半陰影區降低 active caspase 3 的表現及再灌流 36 小時於半陰影區及梗塞區顯著提升 NeuN 陽性細胞的表現。

結論為阿魏酸於再灌流 24 小時具有降低腦梗塞面積及神經學缺陷之

療效，而其神經保護機轉包括再灌流早期超氧陰離子及 ICAM-1 mRNA 抑制作用，而此抗氧化及抗炎症效用可於再灌流晚期進一步抑制 NF- κ B、活化微膠細胞/巨噬細胞、氧化損傷及氧化損傷相關之細胞凋亡。

關鍵詞：阿魏酸；細胞間黏附因子-1(ICAM-1)；核因子- κ B(NF- κ B)；8-氫氧 2'-去氧鳥糞核糖(8-OHdG)；4-羥烯酸(4-HNE)；細胞凋亡



第一章 前言

中風(stroke)為目前造成病患死亡及殘疾(disability)之主因，經統計約六分之一的人口在一生中會歷經至少一次的腦中風⁽¹⁾。在美國腦中風為第三大死因，每年約有七十萬人罹患腦中風，其中有二十萬人為再發性(recurrent attack)⁽²⁾⁽³⁾。2007年在台灣約有一萬二千餘人死於腦血管疾患，高居台灣十大死因第三位，如以性別區分則男性居第三位，而女性居第四位，如以年齡分析發現65歲以上佔腦血管疾患死亡總數之78.6%⁽⁴⁾，可見腦血管疾患實為老年人主要死因之一。在西方國家中，腦中風患者有80%為局限性缺血性腦中風(focal cerebral ischemia)，其中大部分為中大腦動脈阻塞所致；另20%為出血性腦中風(hemorrhages)⁽¹⁾⁽⁵⁾。臨床上缺血性腦中風及續發缺血腦中風(recurrent ischemic stroke)危險因子有高血壓(hypertension)、糖尿病(diabetes)及高膽固醇血症(hypercholesterolemia)⁽⁶⁾。目前對治療急性缺血性腦中風病患較為清楚有效的藥物為tissue plasminogen activator (t-PA)⁽⁵⁾，但t-PA在臨床應用上有嚴苛的限制及很窄的治療窗口(therapeutic time window)(腦梗塞發生3小時內使用)。目前在暫時性腦缺血動物模型中發現有效之神經保護藥物超過700種，除了還在進行臨床試驗之自由基清除劑(free-radical-trapping agent) NXY-059外，其餘的神經保護劑在臨床上尚無足夠證據證實有效⁽¹⁾⁽⁵⁾，可知臨床治療缺血性腦中風目前仍無突破性進展，因而尋找具有潛力之藥物對抗腦缺血損傷實為當務之急。

接著探討急性腦缺血-再灌流之病理機轉，腦缺血後炎症反應(inflammatory response)及氧化損傷(oxidative stress)扮演著重要惡化腦損傷的角色⁽⁷⁾，而於各式暫時性中大腦動脈阻塞模型中發現抑制炎症反應之治療策略則具有神經保護效用⁽⁸⁾⁽⁹⁾。腦缺血事件誘發細胞激素

(cytokines)的產生，而細胞激素進一步促發 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)、 P-selectins 及 E-selectins 等黏附因子的產生，而黏附因子可進一步促進活化白血球(activated leukocytes)黏附及滲透至血管內皮細胞，活化白血球通過血管壁進一步遷移至腦實質梗塞核心區⁽⁹⁻¹³⁾。而活化白血球為腦缺血-再灌流期間活性氧族群(reactive oxygen species; ROS)產生之主要來源⁽¹⁴⁾。ICAM-1 為分子量 76-110 kDa 之單一鏈糖蛋白(glycoprotein)且為免疫球蛋白 supergene family 的一員，可提供 ligand 接合表現於活化白血球上之 CD11a/CD18 (lymphocyte function associated antigen-1 ; LFA-1) 及 CD11b/CD18 (macrophage-1 antigen ; Mac-1)⁽¹⁵⁻¹⁷⁾。Mac-1 為 β_2 -integrin，呈異質性雙聚體蛋白質(heterodimeric protein)包含有 α (CD11b) and β (CD18)次單元，Mac-1 呈現於活化白血球表面上可誘發白血球與內皮細胞間之黏附作用⁽¹⁸⁻²⁰⁾。活化白血球滲透入血管壁進一步遷移至梗塞核心區，而活化白血球於腦實質分布表現可以 myeloperoxidase (MPO)標記加以確認⁽¹⁶⁾。活化白血球在黏附的過程中造成腦梗塞區微血管阻塞(microvascular plugging)及腦-血管障壁(blood-brain barrier; BBB)的損傷，惡化續發性腦損傷⁽¹⁷⁾⁽²¹⁾。另有研究報告指出 Mac-1 亦可作為腦梗塞區內微膠細胞/巨噬細胞(microglia / macrophages)之活化標記⁽²²⁻²⁴⁾。而微膠細胞/巨噬細胞於腦實質遷移至梗塞核心過程中會釋放大量神經損傷產物，包含有活性氧族群、一氧化氮(NO)、細胞激素及脂質過氧化產物(lipid peroxidation products)，進一步惡化續發性腦損傷⁽²⁵⁻²⁷⁾。Nuclear factor- κ B (NF- κ B)為一 proinflammatory 之轉錄因子，平時結合 I κ B α 成非活化態之異合體(heterodimer ; p50/p65)存在於細胞質中。而活化 NF- κ B (p50/p65)接著轉移至細胞核調控 IL-1 β 、TNF- α 及 IL-6 等細胞激素基因以及 ICAM-1 和 E-selectin 等黏附因子基因⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾。由此可知，NF- κ B 亦可藉由 ICAM-1 途徑惡化白血球

之滲透作用。先前許多研究報告指出抗 ICAM-1 抗體、ICAM-1 基因剔除或抑制活化白血球可藉由阻斷活化白血球-內皮細胞作用而達降低腦梗塞體積之效用⁽¹⁷⁾⁽³⁰⁻³⁴⁾。在急性腦缺血-再灌流損傷模型中，細胞壞死(necrosis)及細胞凋亡(apoptosis)為主要細胞死亡型態⁽²⁵⁾。進一步分析得知活化微膠細胞/巨噬細胞釋放大量自由基於腦缺血-再灌流期間攻擊神經細胞重要成分，包括脂質、蛋白質及 DNA，造成細胞核 DNA 氧化及脂質過氧化(lipid peroxidation)⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾。其中超氧陰離子(superoxide anions)最先由粒腺體產生，在細胞內快速轉變成過氧化氫，隨後轉換成具高度神經細胞毒性的氫氧自由基(hydroxyl radical)⁽³⁷⁾，而 2'-deoxyguanosine 之 C-8 位置被氫氧自由基所取代，形成 G:C to T:A 之反轉突變(transversion mutation)⁽³⁶⁾⁽³⁸⁾。目前於細胞 DNA 及脂質所熟知的氧化損傷標記分別為 8-氫氧 2'-去氧鳥糞核糖(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; 8-OHdG)及 4-羥烯酸(4-hydroxy-2-nonenal; 4-HNE)。8-OHdG 主要產生於暫時性腦缺血損傷之神經細胞核，而神經細胞核中累積大量未修復的 DNA 氧化損傷最終導致細胞癌化或凋亡⁽³⁸⁻⁴⁰⁾。4-HNE 為損傷神經元核周質(neuronal perikarya)之氧化產物，可從細胞中未飽和脂肪酸鏈中釋出，經由脂質過氧化造成細胞膜上轉運子(membrane transporters)喪失功能，最後導致細胞凋亡⁽⁴¹⁻⁴³⁾。先前研究報告指出具有抑制活化白血球/微膠細胞之藥物於腦缺血-再灌流損傷中可經由降低炎症反應及氧化損傷相關之細胞凋亡(oxidative stress-related apoptosis)而達到神經保護(neuroprotection)的效用⁽²⁵⁾⁽⁴⁴⁾。

阿魏酸(ferulic acid; FA; 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid)為當歸(*Anglica sinensis* (Olivi) *Didl.*)、川芎(*Ligusticum chuoanxiong* Hort.)之主要有效成分之一(當歸及川芎生藥分別內含約 0.38%及 0.31%之阿魏酸)⁽⁴⁵⁾，而當歸、川芎於傳統中醫藥治療腦中風已數世紀之久。先前研究

指出 FA 於自發性高血壓鼠模型中可顯著去除超氧陰離子及促進血管擴張(vasodilatation)⁽⁴⁶⁾；另外 FA 於 amyloid 致發模型中可於 hippocampal CA1 區域抑制 IL-1 β 的顯現⁽⁴⁷⁾；FA 亦可於中大腦動脈阻塞大鼠模型中具有降低腦梗塞之神經保護效用⁽⁴⁸⁾；且具有抗炎症反應(anti-inflammation)、自由基清除(free radical scavenger)及抗氧化(antioxidation)效用⁽⁴⁹⁾。但確切的神經保護機轉至今仍不明。因而本研究最主要目的在於探討 FA 於暫時性中大腦動脈阻塞大鼠中之腦梗塞療效及其對於重要神經損傷因子：超氧陰離子、ICAM-1、活化白血球(MPO)及 NF- κ B 之調控情形。進一步探討在腦缺血-再灌流損傷期間 FA 於半陰影區(penumbra)及梗塞核心區(ischemic core)對於微膠細胞/巨噬細胞、氧化損傷(8-OHdG、4-HNE)及氧化損傷相關之細胞凋亡之抑制效用。



第二章 文獻探討

2-1.傳統醫學對缺血性腦中風之論述

2-1-1.病因病機之歷史沿革

(1).唐宋以前時期

《內經》中類似中風病的記載相當多，有“偏枯”、“薄厥”、“大厥”、“卒中”等，但無中風的確切病名。如《靈樞·刺節真邪篇》：“虛邪偏客于身半，其入深，內居榮衛，榮衛稍衰，則真氣去，邪氣獨留，發為偏枯。”；《素問·生氣通天論》：“陽氣者，大怒則形氣絕，而血菀于上，使人薄厥。”；《素問·調經論》：“血之與氣，并走于上，則為大厥，厥則暴死，氣復返則生，不返則死。”；《素問·本病論》：“久而化郁，即大風摧拉，折損鳴亂。民病卒中偏痺，手足不仁。”《內經》認為中風主因為人體正氣先虛，外來風邪入于肌腠，侵及經脈，以致營衛氣血運行受阻，進而五臟六腑氣血運行失常，氣血運行逆亂而發為中風⁽⁵⁰⁻⁵⁶⁾。漢代張仲景最早在《金匱要略》中以中風單獨列節，首創中風病名，並對中風有詳細的論述：“夫風之為病，當半身不遂，或但臂不遂者，此為痺，脈微而數，中風使然”。另外於《金匱要略·中風屬節病》有詳盡描述“邪在于絡，肌膚不仁；邪在于經，即重不勝；邪入于腑，即不視人，邪入于臟，舌即難言，口吐涎。”張仲景總結指出中風病發生後，病情較輕者，邪在于絡脈，故見半身不遂；若病邪進一步深入臟腑，則昏不識人⁽⁵⁶⁾。隋·巢元方《諸病源候論·中風候》載：“中風者，風氣中于人也...其為病者，藏于皮膚之間，內不得通，外不得泄。其入經脈，行于五臟者，各隨臟腑而生病焉。”唐·孫思邈《千金方·諸雜風狀》載：“風邪客于肌膚，虛癢成風遂癢瘡，風邪入深，寒相搏則肉枯，邪客半身入深，真氣去則偏枯。”大致與張仲景之說並無大異。宋代醫家

亦延續了內虛外中之說。《濟生方·中風論治》載：“營衛失度，腠理空虛，邪氣乘虛而入，及其感也，半身不遂。”由此可知唐宋之前主張中風病之病因病機為內虛邪中之外風論⁽⁵⁴⁾⁽⁵⁵⁾⁽⁵⁷⁾。

(2).金元時期

唐宋之後，尤其是金元時期，對中風病之病因病機有了大轉變。劉完素、李東垣、朱丹溪等醫家分別提出了對中風的不同認識。劉完素采擷《素問》病機十九條而創“六氣皆從火化”首創火熱中風說，認為“心火暴甚，水不制火”為中風病之發生主因。李東垣則提出正虛本病之中風說，《醫學發明》載：“故中風者，非外來風邪，乃本氣病也。凡人年逾四旬，氣衰者，多有此疾。”朱丹溪於《丹溪心法·中風》載：“多是溼土生痰，痰生熱，熱生風也。”認為中風病主痰溼。另外薛己論中風為“陽化內風”；張子和論中風為“風從火化”。大體來說，唐宋之後外風論受質疑，尤其金元時期之醫家已確立中風內風論⁽⁵⁸⁻⁶¹⁾。

(3).明清時期

此時內因學說在中風病病因的認識中已處於主導的地位。明·張景岳著《景岳全書》創“非風”論，明確指出中風非外感風邪所致，而是內傷裏証。葉天士認為中風為“陽化內風”；吳謙認為是風、火、痰所致；王清任《醫林改錯》則云：“元氣既虛，必不能達于血管，血管必停留而瘀”，創氣虛血瘀之說。清·張伯龍著《類中秘旨》記載“血衝腦氣筋，謂人身知覺專由于腦”，得出“水火內動，肝風上揚，血氣並走于上”的結論；張山雷則對外風說進行全盤否定，強調中風之病機為內風暴動，血氣上衝于腦；張錫純《醫學衷中參西錄》對氣血衝腦說做了進一步的闡釋，提出“肝中所寄相火，掀然暴發，挾氣血而上衝腦，以致昏厥”。明

清時期中風病因病機學說各家紛立，中西互參，此時中風內風論深化豐富，且已發展到一個全面的層次⁽⁵⁰⁾⁽⁵⁵⁾。

2-1-2. 治則

根據統計，於中風的症候分類中，氣虛血瘀型佔了絕大部分約佔中風分型之 73% 以上，氣虛血瘀為缺血性腦中風之主要原因⁽⁶²⁾。因而活血化瘀法治療缺血性腦中風為傳統中醫之最主要治則。活血化瘀藥物當歸、川芎常使用於治療缺血性腦中風，現代醫學研究發現活血化瘀中藥具有擴張血管、改善腦梗塞區血液循環、保護腦神經細胞、清除自由基、抗脂質氧化及抑制腦神經元之凋亡等⁽⁶²⁻⁶⁵⁾。

2-2. 缺血性腦中風之現代研究

2-2-1. 臨床表現

急性腦缺血損傷包括有突然產生神經學缺陷，通常包含有言語困難(dysphasia)、構音困難(dysarthria)、半側盲(hemianopia)、虛弱(weakness)、運動失調(ataxia)、感覺喪失(sensory loss)及表情莫然(neglect)，這些症狀一般呈現單側，病患意識正常或輕微呈現模糊。這些症狀呈現嚴重程度通常和病患的年齡、是否伴隨有心臟疾患和糖尿病以及和梗塞面積大小有密切關聯⁽⁵⁾。據臨床統計嚴重之中大腦動脈阻塞佔所有缺血性腦中風病患近 10%，而這些病患通常伴有程度不同之腦水腫及高死亡率，臨床除了呈現上述症狀外亦有眼睛歪斜(eye deviation)及因腦疝而導致神經學症狀逐漸惡化。臨床發現腦疝明顯產生於腦中風第二天至第四天之間⁽⁶⁶⁾。根據統計西方社會缺血性腦中風三十天之死亡率大約在 10 至 17% 之間⁽⁵⁾。

2-2-2. 病理機轉

缺血性腦中風主要由腦細胞能量耗盡(energy depletion)到細胞死亡之一連串病理事件，其中病理因子包括有細胞間興奮性胺基酸、自由基的生成及炎症反應⁽⁵⁾。在腦缺血數分鐘內，梗塞核心之腦血流急遽下降導致細胞形成永久性缺氧去極化(anoxic depolarization)。而在細胞能量耗竭及離子恆定崩解下於梗塞核心區形成細胞壞死(necrosis)；另一方面，圍繞在梗塞核心周遭的是半陰影區(penumbra)主要是藉由側支循環部分維持細胞的代謝⁽⁶⁷⁾。當血流再次流入缺血梗塞區時，證據顯示此時產生一連串再灌流損傷，其中包括微小血管中活化白血球及巨噬細胞之聚集、黏附及滲透，血小板的聚集以及黏附細胞的顯著表現。隨後形成腦血管障壁(blood-brain barrier)損傷，促發細胞激素(cytokines)、一氧化氮(NO)、cyclooxygenase 及自由基的產生⁽⁶⁷⁾。進一步研究得知再灌流損傷誘發黏附細胞如 ICAM-1、P-selectin 及 E-selectin 顯現於內皮細胞，而活化白血球表面接上 integrins 如 LFA (CD11a/CD18)及 Mac-1 (CD11b/CD18)進行滾動、黏附至內皮細胞，而在腦缺血-再灌流損傷數小時中活化白血球聚集於腦梗塞區微小血管，進一步結合紅血球、纖維蛋白(fibrin)及血小板形成栓塞子(plugging)阻塞微小血管血流，於再灌流期間形成”no-reflow”現象惡化腦梗塞損傷⁽⁶⁷⁾。活化白血球進入腦梗塞區吞噬壞死細胞碎片(necrotic debris)過程中釋放大量細胞激素(cytokines)、chemokines 及自由基進一步惡化神經細胞，而在這炎症反應過程中 NF- κ B 轉錄因子於炎症基因表達及調控上扮演相當重要的角色⁽⁶⁸⁾⁽⁶⁹⁾。另外前面提及在腦缺血數分鐘內梗塞核心細胞能量耗竭及細胞膜缺氧去極化，導致細胞內鈉離子的堆積，大量水分子進入細胞，形成細胞內水腫(intracellular edema)；此外腦血管障壁損傷致使血管壁通透性增加，管腔內蛋白質及液體流出管腔外組織間隙，形成血管性水腫(vasogenic edema)。而導致腦血管障壁

損傷的切確原因仍不完全了解，目前研究指出和一些病理因子如 aquaporins、自由基、proteases、炎症細胞、bradykinin、血管內皮成長因子及 NO 的生成有密切關聯⁽⁶⁶⁾。

2-2-3. 臨床治療

目前已知臨床治療急性缺血性腦中風大致有兩類藥物：血栓溶解藥物 (thrombolytics) 及抗血小板 (antiplatelet)。而 tissue plasminogen activator (t-PA) 是目前臨床唯一證實有效治療急性腦梗塞之血栓溶解劑，但 t-PA 在臨床應用上有嚴苛的限制及很窄的治療窗口 (time window)，一般需在梗塞發生後三小時內給予⁽¹⁾⁽²⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁷⁾。而目前臨床使用抗血小板藥物有 aspirin、ticlopidine、clopidogrel、及 extended-release dipyridamole (ER-DP)。於缺血性腦中風發生 48 小時內使用 aspirin，且連續使用 2 星期可降低續發缺血性腦中風，據統計 aspirin 可降低 15-25% 再發中風的機率⁽³⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾。另外 anticoagulation 藥物如 warfarin 可於心因性栓塞缺血性腦中風 (cardioembolic ischemic stroke)、transient ischemic attack (TIA) 或陣發性心房顫動 (paroxysmal atrial fibrillation) 等特殊情況下給予可避免病患續發中風 (secondary stroke)⁽³⁾⁽⁶⁾，而預防續發性腦中風 aspirin 優於 warfarin⁽⁶⁾。在栓塞中風模型中，血栓溶解劑如 t-PA 和神經保護藥物如 NMDA 受體拮抗劑 MK801 結合治療可同時降低梗塞面積及改善神經學症狀⁽⁶⁸⁾。至於腦水腫，目前臨床上常用的高滲透藥物 (hyperosmotic agents) 為 mannitol 和 glycerol⁽⁶⁶⁾⁽⁶⁸⁾。在局限性腦缺血動物實驗中，低溫 (hypothermia) 治療可顯著降低梗塞面積及改善神經學表現。在動物實驗機轉研究中，發現低溫治療可有效降低細胞能量耗竭、腦-血管障壁損傷、腦水腫、自由基產生、興奮性胺基酸釋放、炎症反應及細胞凋亡⁽⁵⁾⁽⁶⁶⁾⁽⁷⁰⁾。臨床一般急性腦中風低溫治療為 32°C 至 35.5°C 之間，持續時

間為 4 小時⁽⁷⁰⁾，臨床發現低溫治療開始於中風發生 6 小時內，且持續超過 120 小時可降低腦水腫致發之梗塞損傷⁽⁶⁶⁾。另外在實驗模型中腦缺血損傷後神經再生(neurogenesis)因子如 epidermal growth factor (EGF)、brain-derived neurotrophic factor (BDNF) 及 glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)，以及 ICAM-1、E-selectin 和 P-selectin 拮抗劑可有效降低腦缺血損傷⁽²⁾⁽⁶⁷⁾⁽⁷¹⁾。以中藥治療臨床缺血性腦中風方面，目前以紫雲英(Milk vetch)、脈絡寧(Mailuoning)、銀杏(Ginkgo biloba)、川芎嗪(Ligustrazine)、丹參(Danshen agents)、血塞通(Xuesetong)、葛花素(Puerarin)及刺五加 (Acanthopanax)等有較多的研究及較多的實驗病人數，但針對治療缺血性腦中風療效而言，這些中藥仍缺乏有系統的分析及客觀有力的佐證⁽⁷²⁾。

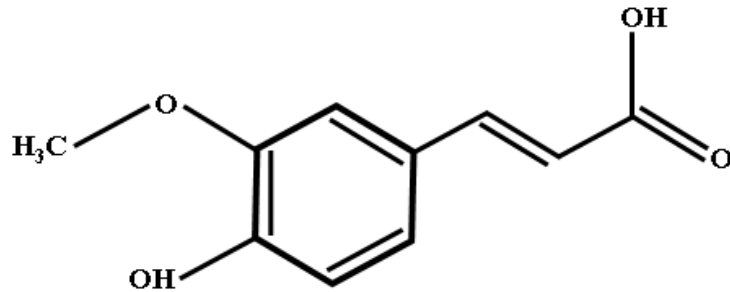
2-3.阿魏酸之現代研究

2-3-1.前言

阿魏酸(ferulic acid; FA)來自於多種植物的一種酚酸，在細胞壁中與多糖和蛋白質結合成為細胞壁骨架。阿魏酸為阿魏、當歸及川芎主要成分之一，此外亦存在於木賊、升麻、梓白皮、芍藥、蜂膠及酸棗仁等中藥，阿魏酸在當歸中的含量豐富，且大多數從當歸中提取，因而又稱為當歸素⁽⁷³⁻⁷⁶⁾。另外食物、水果及蔬菜如米糠、蕃茄及玉米亦普遍存在有阿魏酸⁽⁷⁷⁾，因而阿魏酸可說是人類飲食中含量最豐富的酚酸抗氧化物之一⁽⁷⁸⁾，進一步研究發現在穀類(cereals)食物中阿魏酸最普遍存在的形態是阿魏酸糖酯(ferulic acid sugar esters)，體外研究發現亦具強烈抗氧化能力⁽⁷⁹⁾。

2-3-2.阿魏酸之理化性質

阿魏酸化學名為 3-甲氧基-4-羥基肉桂酸 (4-hydroxy-3-methoxy cinnamic acid)，結構式如下：



阿魏酸分子式為 $C_{10}H_{10}O_4$ ，分子量為 194.18，結構式上有順式和反式兩種產物，順式(cis)為黃色油狀物，反式(trans)為斜方針結晶，一般使用大多為反式。熔點為 170~171.5 °C，阿魏酸見光易分解，有強抗氧化性⁽⁷⁶⁾。

2-3-3. 阿魏酸及其衍生物之體內代謝

Rondini 等⁽⁸⁰⁾以純阿魏酸餵食 SD 大鼠，發現餵食後半小時血漿中主要呈現 FA-sulfate 結合態衍生物(約 50%)，而 1.5 小時後尿液中阿魏酸排除達最大量，且以 FA-sulfate 結合態為主要排出形態(約佔 40%)。結果可知純阿魏酸可在大鼠體內快速被吸收，且在尿液排出前其主要代謝形態為 FA-sulfate 衍生物。Zhao 等⁽⁷⁹⁾分別餵食大鼠阿魏酸及阿魏酸酯類，發現阿魏酸組之大鼠血漿有較高之純阿魏酸及結合態阿魏酸 (FA-glucuronide、FA-sulfate 及 FA-sulfoglucuronide) 含量，但在血漿中持續存在的時間卻比阿魏酸酯類組短。此結果顯示阿魏酸及阿魏酸酯類在體內之生體利用率(bioavailability)主要是取決於糖體(saccharide moiety)的存在與否。Zhao 等⁽⁷⁸⁾研究發現阿魏酸可被大鼠胃快速吸收，吸收之阿魏酸則大部分運送到肝臟進一步代謝成結態如 FA-sulfate、

FA-glucuronide 及 FA-sulfolglucuronide，最終至腎以結合態排泄掉。Rondini 等⁽⁸¹⁾將 SD 大鼠分組，每日分別餵食大鼠含有純阿魏酸(5.15 mg FA/kg body weight (bw))及小麥麩(wheat bran) (4.04 mg FA/kg bw)食物持續 10 天，發現小麥麩組比純阿魏酸組血漿中存在更強之抗氧化活性。進一步分析發現阿魏酸以 arabinoxylans bonds 存在於食物中，食入體內 24 小時後可增加其存在組織器官之含量，且尿液排除阿魏酸量亦顯著下降。結果顯示小麥麩中存在之阿魏酸有較好的生體利用率，可有效地保護器官組織對抗包括初始自由基攻擊所產生之病理損傷。另一方面 Adam 等⁽⁸²⁾研究發現阿魏酸存在穀類中反而具較低之生體利用率，可能是因所含纖維質(fiber)鍵結 arabinoxylans 及 ligins 阻礙代謝所致。

2-3-4.阿魏酸藥理作用

(1).抗氧化及清除自由基

氧自由基攻擊細胞重要成分包括蛋白質、酶及核酸，造成酶活性喪失，影響受體及細胞膜離子通道，引發 DNA 鍵斷裂，最終導致細胞壞死或凋亡。阿魏酸結構中有酚羥基，具有抗氧化活性，為清除自由基之功能基團，對於過氧化氫(H₂O₂)、超氧自由基(O₂⁻)、氫氧自由基(OH⁻)及過氧化亞硝基(ONOO⁻)均有強烈的清除作用⁽⁷³⁾⁽⁸³⁻⁸⁵⁾。Rukkumani 等⁽⁸⁶⁾每日餵食大鼠 20%酒精(7.9 g/kg bw)及高脂食物(15% heated sunflower oil) (內含大量多元不飽和脂肪酸)持續 45 日，結果發現血漿中氧化標記：硫代巴比妥酸反應物(thiobarbituric acid reactive substance)、過氧化氫(hydroperoxides)以及銅和鐵蛋白(ferritin)顯著上升，另一方面抗氧化酶包括 superoxide dismutase、catalase、glutathione peroxidase 則明顯下降。治療組(分 2 組)則除了每日餵食與造模組相同食物外，另分別餵食阿魏酸 20 mg/kg bw 及 40 mg/kg bw，發現治療組可有效降低血漿中氧化標記

含量及提升抗氧化酶表現。結論為阿魏酸可有效地保護組織系統對抗酒精及多元不飽和脂肪酸所致發之氧化損傷(oxidative stress)。張璇等⁽⁸⁷⁾將 SD 大鼠結紮兩側頸總動脈 60 分後鬆綁進行再灌流致發視網膜缺血-再灌流損傷，治療組為再灌流剛開始時及每 24 小時鼠尾靜脈注射阿魏酸(40 mg/kg bw)，發現造模組視網膜組織 malondialdehyde 含量於再灌流 1-24 小時顯著上升，而 superoxide dismutase 於 6-24 小時明顯下降。阿魏酸治療組則於再灌流 6-24 小時間可顯著降低 malondialdehyde 及提升 superoxide dismutase 表現，顯示阿魏酸於大鼠視網膜再灌流期間可抑制自由基及細胞膜脂質過氧化的產生。Sudheer 等⁽⁸⁸⁾於大鼠周邊血中分離出淋巴球(lymphocytes)加入 3 mM 尼古丁暴露 1 小時，治療組(分 5 小組)同時間加入阿魏酸劑量分別為 10、50、100、150 及 300 μ M，得知 150 μ M 效用最顯著。進一步分析發現造模組顯著提升脂質過氧化指標：thiobarbituric acid reactive substance 及 hydroperoxide、DNA 之損傷，同時顯著降低了內生性抗氧化酶：superoxide dismutase (SOD)、catalase (CAT)、glutathione peroxidase (GPx)、reduced glutathione (GSH)、Vitamin A、E 及 C。而阿魏酸治療組(150 μ M)則可有效降低大鼠周邊血淋巴球之脂質過氧化、DNA 損傷及提升內生性抗氧化酶之含量。研究報告指出以雌 albino Wister 大鼠給予皮下注射尼古丁(nicotine) 劑量為 2.5 mg/kg bw，連續注射 22 週產生尼古丁致發之組織損傷，治療組(分三小組)則同一時間以胃管每日給予不同劑量 10、20 及 40 mg/kg bw 連續 22 週。分析血中乳酸脫氫酶(lactate dehydrogenase)、鹼性磷酸酶(alkaline phosphatase)及組織(肺、肝及腎)之脂含量(包含 cholesterol、free fatty acid、triglycerides 及 phospholipids)，得知造模組顯著上升，而阿魏酸 20 mg/kg bw 治療組則顯著調降了上述之損傷標記。進一步分析發現阿魏酸可藉由抗氧化及抗高血脂效用來抑制由尼古丁所誘發之組織損傷⁽⁸⁹⁾；而

另一研究亦發現於尼古丁致發 Wistar 大鼠組織毒性模型中(每天皮下注射尼古丁劑量為 2.5 mg/kg bw, 一週 5 天, 連續注射 22 週), 而治療組(分二小組)則同一時間分別餵食阿魏酸劑量為 20 mg/kg bw 及 N-乙醯半胱氨酸(N-acetylcysteine)劑量為 150 mg/kg bw。結果造模組於血液、肺及肝等組織發現脂質過氧化表現顯著上升, 而內生性 superoxide dismutase、catalase、glutathione peroxidase 及 reduced glutathione 含量均顯著下降, 另外在肺及肝組織則顯著表現 cyclooxygenase-2 及 NF-κB。阿魏酸及 N-乙醯半胱氨酸治療組則可有效地降低血液、肺及肝之脂質過氧化標記: lactate dehydrogenase 及 alkaline phosphatase, 降低血中 DNA single stranded break 及 micronuclei 含量, 同時抑制了肺、肝組織之 cyclooxygenase-2 及 NF-κB 表現, 此外亦提升了血液、肺及肝之內生性抗氧化酶之含量。可知阿魏酸可藉由調降脂質過氧化、炎症反應、DNA 損傷及提升內生性抗氧化酶之效用對抗尼古丁所致發之組織損傷⁽⁹⁰⁾。

(2). 中樞神經保護作用

Wang 等⁽⁴⁸⁾以管腔內阻塞 SD 大鼠之中大腦動脈 2 小時後進行再灌流為腦缺血-再灌流損傷模型, 治療組則於缺血期間腹腔注射阿魏酸(100 mg/kg bw), 再灌流 2 小時明顯降低腦缺血損傷, 並於再灌流 6 小時到 72 小時間顯著提升 extracellular signal regulated kinase (ERK)陽性細胞於梗塞區表現, 推論阿魏酸可能藉由提升 ERK 之表現達到降低腦缺血損傷之效用。Wenk 等⁽⁹¹⁾以 lipopolysaccharide (250 ng)打入大鼠第四腦室致發 chronic neuroinflammation 為模型, 造模組於 14 天後於大鼠顳葉(temporal lobe)中微膠細胞(microglia)顯著活化。治療組則每日皮下注射阿魏酸(30 mg/kg bw)持續 14 天, 發現可顯著抑制微膠細胞活化, 此外阿魏酸亦具有對抗 lipopolysaccharide 致發之氧化損傷及清除氫氧

(hydroxyl radical) 自由基之效用。Jin 等⁽⁴⁷⁾以 amyloid β_{25-35} ($A\beta$) (10 μ l) 注射 SD 大鼠腦室致發 neurotoxicity 為模型，7 天後海馬迴 CA 區內星狀細胞(astrocyte)明顯活化及滲透，此外 IL-1 β 、IL-1 β mRNA、p38 MAPK 亦顯著表現，而 phospho-ERK 及 phospho-Akt/PKB 則顯著下降。造模前 3 星期每日餵食阿魏酸劑量 50、100 及 250 mg/kg bw(分 3 組)，造模後再持續餵食 1 星期可有效抑制星狀細胞活化及 IL-1 β 、IL-1 β mRNA、p38 MAPK 之顯現，另一方面則提升了 phospho-ERK 表現。可知阿魏酸可藉由抑制 p38 MAPK 及提升 phospho-ERK 表現路徑，於 $A\beta$ 致發腦損傷模型中具有神經保護效用。Wang 等⁽⁴⁹⁾以管腔內阻塞 SD 大鼠中大腦動脈 2 小時後進行再灌流為腦缺血-再灌流損傷模型，治療組則於阻塞前 2 小時給予腹腔注射阿魏酸(100 mg/kg bw)，再灌流 24 小時可顯著改善神經學缺陷及抑制 postsynaptic density-95 (PSD-95)於皮質及紋狀體梗塞核心區之表現，而 PSD-95 與離子通道、神經突觸活動及細胞內訊息傳遞調節有關，腦缺血後 PSD-95 促發神經細胞 excitotoxicity 導致細胞死亡，推論阿魏酸可藉由抑制 PSD-95 表現達到腦缺血後神經保護之效用。姜科聲等⁽⁹²⁾以 ICR 小鼠雙側頸總動脈結紮 30 分再灌流 60 分為腦缺血-再灌流損傷模型，治療組則以阿魏酸(800 mg/kg bw)於缺血前連續灌胃七天，於再灌流 1 小時發現可顯著降低腦組織 malondialdehyde 含量及提升 superoxide dismutase 表現，可知阿魏酸藉由降低 malondialdehyde/superoxide dismutase 比值，抑制氧化自由基的損傷及其引發之脂質過氧化反應。周琴等⁽⁹³⁾⁽⁹⁴⁾以管腔內阻塞 Wistar 大鼠之中大腦動脈 2 小時後進行再灌流為腦缺血-再灌流損傷模型，治療組(分 2 組)於再灌流後分別即刻給予腹腔注射 25%當歸注射液(20 ml/kg bw)、阿魏酸(100 mg/kg bw)，得知當歸組與阿魏酸組於再灌流 7 天及 14 天均可顯著改善神經學行為、降低腦梗塞體積及腦含水量(腦水腫)，且發現當歸與

阿魏酸效用相近，推測阿魏酸可能是當歸治療腦缺血再灌流損傷之主要有效成分。

(3).心血管保護作用

Fu 和 He⁽⁹⁵⁾於體外心肌細胞先行前置缺氧(preconditioning) (先缺氧 30 分再給氧 30 分，重覆進行 3 次)，接著缺氧 3 小時，再給氧 1 小時為實驗模型，治療組為前置缺氧後缺氧造模前 20 分鐘給阿魏酸(最終濃度 1.68 mmol/L)，歷經缺氧 3 小時後再度給氧，1 小時後可明顯抑制 lactate dehydrogenase、creatine kinase、malondialdehyde，同時提升 superoxide dismutase 及 glutathione peroxidase 之表現。Yogeeta 等⁽⁹⁶⁾施予大鼠 isoproterenol (ISO) (150 mg/kg bw, i.p.)二天造成心肌壞死為模型，發現造模組心肌及血清明顯提升溶小體水解蛋白酶(lysosomal hydrolases) (包括 β -D-glucuronidase、 β -D-galactosidase、 β -D-N-acetyl glucosaminidase、acid phosphatase 及 cathepsin-D)，同時提升血漿中乳酸(lactate)濃度及心肌細胞膜磷酸酶(phosphatases) (包括 Na^+ - K^+ ATPase、 Ca^{2+} ATPase 及 Mg^{2+} ATPase)。而治療組則於造模前給予餵食阿魏酸(20 mg/kg bw)及抗壞血酸(ascorbic acid) (80 mg/kg bw)連續 6 天，得知阿魏酸及抗壞血酸協同治療可藉由抗氧化損傷效用，降低心肌溶小體水解蛋白酶及細胞膜磷酸酶之含量，進一步分析得知阿魏酸及抗壞血酸可經由直接清除自由基機轉，來達到心肌梗塞壞死後之保護效用。另一研究亦給予 ISO (150 mg/kg bw, i.p.)二天致發大鼠心肌毒性，造模組顯著降低粒腺體呼吸鏈酶(NADH dehydrogenase 及 cytochrome c oxidase)活性、tricarboxylic acid cycle enzymes、粒腺體抗氧化酶及粒腺體磷脂質(phospholipids)，另一方面則顯著增加粒腺體脂質過氧化及粒腺體內膽固醇、三酸甘油酯及 free fatty acids 含量。而治療組則於造膜前給予餵食阿魏酸(20 mg/kg bw)及抗壞血

酸(ascobic acid) (80 mg/kg bw)連續 6 天，則可顯著降低上述異常，復元心肌細胞損傷後之粒腺體功能⁽⁹⁷⁾。Yogeeta 等⁽⁹⁸⁾以上述相同大鼠心肌損傷模型，得知造模組血清及心肌組織之三酸甘油脂、總膽固醇、游離氨基酸(free fatty acids)及游離、酯化膽固醇均顯著增加，此外降低心肌組織之磷脂質及脂質代謝酶(lipid metabolizing enzymes)。而造模前給予餵食阿魏酸(20 mg/kg bw)及抗壞血酸(ascobic acid) (80 mg/kg bw)連續 6 天，則可顯著改善上述異常。綜上可知阿魏酸及抗壞血酸對 ISO 致發心肌細胞脂質代謝異常具有保護效用。

(4).肝臟保護作用

Srinivasan 等⁽⁹⁹⁾以 CCl₄ (3ml/kg bw)皮下注射大鼠致發肝損傷為模型，發現造模組肝細胞活化指數(alanine transaminase、aspartate transaminase、alkaline phosphatase 及 γ -glutamyl transferase)及脂質過氧化指標(thiobarbituric acid reactive substance、hydroperoxides、nitric oxide 及 protein carbony content)分別於血漿及肝組織中顯著增加，另一方面抗氧化酶(superoxide dismutase、catalase、glutathione peroxidase 及 reduced glutathione)則於肝組織內顯著下降。治療組則每日餵食阿魏酸(20 mg/kg bw)連續 90 天發現可有效地降低血漿中肝細胞活化指數及肝組織中之脂質過氧化指標，另可明顯恢復肝組織內抗氧化酶含量。可知阿魏酸於 CCl₄ 致發肝細胞損傷模型中扮演明顯抗氧化效用。Srinivasan 等⁽⁷⁷⁾以分離大鼠肝細胞暴露至 γ 射線(γ -radiation) 1 小時誘發損傷為實驗模型，發現肝細胞 DNA 損傷隨著 γ 射線暴露劑量(1、2 及 4 Gy)增加而加重，此外硫代巴比妥酸反應物亦顯著增加，另一方面 reduced glutathione、Vitamin A、E、C、尿酸及藍包漿素(ceruloplasmin)則明顯下降。給藥組(分三組)則於造模前分別加入阿魏酸 1、5 及 10 μ g/ml 可顯著抑制硫代巴比

妥酸反應物的產生及 DNA 損傷，另外可顯著提升抗氧化酶(reduced glutathione)、Vitamin A、E、C、尿酸及藍包漿素之含量，其中最有效劑量為 10 µg/ml。結果得知事先給予阿魏酸可保護肝細胞對抗 γ 射線所引發之損傷，推測阿魏酸可做為放射線治療中有效之放射保護劑。

(5).胃腸消化道保護作用

Dong 等⁽¹⁰⁰⁾以 8% 醋酸灌腸致發 SD 大鼠結腸炎(colitis)為模型，得知造模組結腸組織之 colon mucosa damage index (CMDI)、histopathological score (HS)、myeloperoxide (MPO)活性、malondialdehyde (MDA)、nitric oxide (NO)、prostaglandin E2 (PGE2)、thromboxane B2 (TXB2)、inducible nitric oxide synthase (iNOS)、cyclooxygenase-2 (COX-2)及 NF-κB 顯著上升，而 superoxide dismutase 活性則明顯下降。阿魏酸治療組(3 組)則分別每日灌腸阿魏酸 200、400 及 800 mg/kg bw 持續 7 天則顯著改善上述異常指標，特別是 400 及 800 mg/kg bw 更具療效。結果得知結腸內給予阿魏酸可藉由抗氧化、抑制花生四烯酸(arachidonic acid)代謝及 NF-κB 表現改善醋酸灌腸致發之結腸炎。Badary 等⁽¹⁰¹⁾給予大鼠腹腔注射 cisplatin (2.5-20 mg/kg bw)致發劑量依賴性(dose-dependent manner)胃排空遲緩為模型。治療組為造模前餵食 50-200 mg/kg bw 阿魏酸，得知可顯著加速腸胃運送及胃排空，且療效呈劑量依賴性。分析發現阿魏酸可藉由增加內生性前列腺素(prostaglandins)刺激腸胃蠕動。

(6).抗癌病變作用

Kawabata 等⁽¹⁰²⁾以每星期皮下注射 azoxymethane (AOM) (15 mg/kg bw) 一次，連續 3 星期致發 F344 鼠結腸癌病變(carcinogenesis)為模型。治療組(分 2 組)則造模期間分別餵食含有阿魏酸 250 及 500 ppm 之食物持續

5 星期，發現結腸中異常腺窩病灶(aberrant crypt foci；ACF)顯著下降，阿魏酸 500 ppm 組進一步降低了結腸每平方公分之 ACF 數。持續餵食至 35 星期，得知阿魏酸治療組(50 及 500 ppm)顯著抑制了結腸癌發生率。進一步研究得知餵食阿魏酸 100 mg/kg bw 可顯著提升大鼠肝及結腸黏膜 phase II 去毒酶(detoxifying enzyme)：quinone reductase (QR)表現，由上推測阿魏酸可藉由增加去毒酶表現抑制 AOM 所誘發之結腸癌病變。Cione 等⁽¹⁰³⁾取出大鼠睪丸組織，萃取分離粒腺體分別以 10、50 及 100 μ M 之阿魏酸溶液培養，得知阿魏酸培養組 10-25 分鐘後呈劑量依賴性促發線粒體通透性轉運孔(mitochondrial permeability transition；MPT)運作，1 小時後促使 cytochrome c 產生，24 小時後促發 active caspase 3 的表現。得知阿魏酸可於睪丸組織細胞誘發粒腺體途徑(mitochondrial pathway)之細胞凋亡，由此推測阿魏酸可能具備對抗睪丸細胞癌症之潛力。

(7).治療糖尿病作用

Sri Balasubashini 等⁽¹⁰⁴⁾以 streptozotocin (STZ) (40 mg/kg bw)腹腔注射致發糖尿病大鼠為模型，其血糖、血漿三酸甘油酯、游離脂肪酸、胆固醇及磷脂質(phospholipids)均顯著上升，阿魏酸治療組(分 2 組)分別給予每日餵食阿魏酸 10 及 40 mg/kg bw 持續 45 天，得知有效地降低糖尿病大鼠高血糖及高脂血(hyperlipidemia)，且低劑量(10 mg)比高劑量(40 mg)更具療效。Thyagaraju⁽¹⁰⁵⁾於 STZ (60mg/kg bw, ip)致發糖尿病鼠模型中，給予每日餵食阿魏酸 50 mg/kg bw，連續 4 週。結果發現造模組大鼠睪丸細胞(包括細胞質及粒腺體)和肝細胞顯著提升了脂質過氧化及活性氧族群的表現，而阿魏酸組則可有效地降低由糖尿病所致發之氧化損傷(oxidative stress)。

(8).抗細胞凋亡作用

鄭志鋒等⁽¹⁰⁶⁾ 先將 Wistar 大鼠雙側椎動脈結紮 48 小時，雙側頸總動脈夾閉 2 分鐘後 24 小時再次夾閉頸總動脈 10 分鐘進行缺血預處理，再以四血管阻斷法(4-vessel occlusion)結紮雙側頸總動脈 30 分鐘為全腦阻塞(global ischemia)模型，治療組則於缺血預處理(ischemia preconditioning)後，造模前 30 分鼠尾靜脈注射阿魏酸(200 mg/kg bw)，缺血七天後可於皮質梗塞區及海馬迴 CA1 區顯著抑制 Fas 陽性細胞及 caspase 8 蛋白的表現，推測阿魏酸可經由抑制 Fas、caspase 8 之細胞凋亡路徑達到神經保護之效用。曲喜英及祝其鋒⁽⁸⁵⁾以過氧化氫(hydrogen peroxide; H₂O₂) (200 nmol/L)加入 PC12 細胞培養 8 小時致發細胞凋亡為模型，治療組則於過氧化氫損傷模型前 1 小時給予阿魏酸(50-250 μmol/L)，可有效抑制前列腺凋亡反應基因-4(prostate apoptosis response; Par-4)及 NF-κB(p65)表現，達到提高細胞存活的效應。彭華等⁽¹⁰⁷⁾以管腔內阻塞 Wistar 大鼠中大腦動脈 2 小時後進行再灌流為急性局限性腦缺血-再灌流損傷模型，治療組則於中大腦動脈阻塞的同時及之後二天同時分別腹腔注射阿魏酸(0.1mg/kg bw) (共 3 次)，再灌流 72 小時於梗塞區可顯著降低凋亡因子 Bax，同時提升抗凋亡因子 Bcl-2 的表現，研究顯示阿魏酸可藉由提升 Bcl-2/Bax 比率途徑，達到抑制凋亡之效用。Ke 等⁽¹⁰⁸⁾將兔之腎下主動脈(infrarenal aorta)夾住阻斷血流 40 分鐘後鬆開進行再灌流 7 天為脊髓缺血-再灌流損傷模型，治療組則於造模前 15 分鐘靜脈注射阿魏酸(50 mg/kg bw)，發現阿魏酸組可於再灌流 1 小時及 7 天顯著抑制脂質氧化標記 malondialdehyde 及凋亡因子 Bax 之表現，同時明顯提升 superoxide dismutase 及抗凋亡因子 Bcl-2。

(9).抗內皮素-1 作用

內皮素(endothelin-1；ET-1)是血管內皮細胞所分泌一種強有力之血管收縮肽，由 21 個氨基酸所組成。內皮素(ET-1, ET-2, ET-3)是一家族的 peptide，而 ET-1 為已知人體中最強有力的血管收縮物。於腦梗塞中，高濃度之 ET-1 引發強烈持久之血管收縮，促發血管內皮平滑肌增生，使血管腔進一步縮小狹窄，加重微循環障礙，惡化腦梗塞損傷；另外，ET-1 亦可致發谷氨酸(glutamate)等興奮性神經傳遞物質釋放增加，形成 excitotoxicity，參與缺血性腦損傷神經細胞毒素的產生⁽¹⁰⁹⁻¹¹³⁾。江文靜等⁽¹¹⁴⁾以管腔內梗塞中大腦動脈為模型，治療組於缺血前 12 小時及缺血後 15 分鐘分別腹腔注射阿魏酸(100 mg/kg bw)，於缺血後 2 小時顯著降低 ET 及明顯提升降鈣素基因相關肽(calcitonin gene related peptide；CGRP)，由此推測阿魏酸可藉由提升 CGRP 擴張腦血管及抑制 ET 之血管收縮，達到腦梗塞區增加血流灌注之效用。陳莉芬等⁽¹¹⁵⁾於腦微血管內皮細胞(BMEC)更換培養液後立即於入內含 95% N₂ 和 5% CO₂ 混合氣體培養室培養 12 小時為缺氧模型，給藥組則於更換培養液時加入阿魏酸(終濃度為 100 mg/L)，2 小時後於入內含 95% N₂ 和 5% CO₂ 混合氣體之培養室培養 12 小時，發現阿魏酸給藥組可顯著抑制 ET-1 及 ET-1 mRNA 的表現。

第三章 材料與方法

3-1. 實驗動物

本研究採用 Sprague Dawley (SD) 雄性大鼠，體重介於 300-350 公克之間，購自國科會動物中心。實驗鼠飼養於中國醫藥大學動物中心，飼養室濕度保持在 $55 \pm 5\%$ ，室溫維持在 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 之間，且一天中光照-黑暗各 12 小時。所有老鼠實驗前一天禁食但可自由喝水。本研究所有實驗過程與步驟均遵循中國醫藥大學動物中心委員會之規範守則。

3-2. 實驗室藥品與儀器

- (1) Chloral hydrate (Merck, Germany)
- (2) Hematoxylin (Merck, Germany)
- (3) 0.9% NaCl (永豐化學工業股份有限公司，台灣)
- (4) Paraformaldehyde (Merck, Germany)
- (5) Sucrose (GERBU, Biotechink GmbH-69251, Gaiberg)
- (6) Heparine (南光化學製藥股份有限公司，台灣)
- (7) PE-50 tube (晶龍科技儀器有限公司，台灣)
- (8) EDTA tube (BD Franklin Lakes NJ, USA)
- (9) 3-0 nylon monofilament (晶龍科技儀器有限公司，台灣)
- (10) KUBOTA 6900 (KUBOTA Co., Japan)
- (11) Blood pressure monitor (Columbus instruments, BP-2, USA)
- (12) Rectal thermometer (晶龍科技儀器有限公司，台灣)
- (13) Cryostat (SHANDON, UK)
- (14) Sterotactic frame (Stoelting Co., USA)

3-3. 中大腦動脈阻塞模型

本實驗採用管腔內套繩(intraluminal suture)阻塞中大腦動脈如先前所述⁽¹¹⁶⁾。簡要敘述，老鼠以氯合水醛(chloral hydrate, 400 mg/kg bw)腹腔注射麻醉，PE-50 管插入右股動脈偵測心跳及血壓，抽取股動脈血進行血液氣體(blood gas)及血糖(blood sugar)分析。另一 PE-50 管則插入股靜脈可進行阿魏酸(FA) (Sigma, Cat:12870-8 , USA)之注射給藥。接著進行頸部中切暴露頸總動脈(common carotid artery)及內頸動脈(internal carotid artery)，將翼顎動脈(ptyergopalatine artery)分支處綁緊，將尖端以火燒鈍且覆蓋 poly-L-lysine (Sigma, USA)之 3-0 尼龍套繩從外頸動脈(external carotid artery)經由頸總動脈進入內頸動脈達 20~25 公釐深處，阻塞中大腦動脈基部血流。中大腦動脈阻塞 90 分鐘後，將 3-0 尼龍套繩緩慢抽出進行再灌流。再灌流 24 小時，老鼠進行神經學行為評估。而在中大腦動脈阻塞前，我們於右大腦表面中大腦動脈血流分布處(窗門側面至 2.5 mm 及窗門後至 2.0 mm 處)磨骨鑽洞，並以都卜勒血流測量儀(DRT4, Moor Instruments Inc. Wilmington, USA)偵測梗塞區表面之中大腦動脈血流，都卜勒血流測量儀呈現血流由阻塞前 500 單位以上降至阻塞後 100 單位以下即確定中大腦動脈阻塞成功，另外整個缺血過程老鼠均以電熱毯加熱保溫，且肛溫維持在 $37.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 之間。

3-4. 實驗步驟

本研究分成第一階段及第二階段。

3-4-1. 第一階段又分為實驗 A、B 和 C 如下所述：

3-4-1-A. 實驗 A

(1). 動物分組

SD 雄性大鼠分成六組，每組 6 隻如下。1) sham 組：右頸總動脈及

內頸動脈暴露，但中大腦動脈並未阻塞；2) control 組：中大腦動脈阻塞 90 分鐘，再灌流 24 小時；3) FA₆₀ 組：同 control 組，但於中大腦動脈阻塞的同時靜脈注射 60 mg/kg (bw) FA；4) FA₈₀ 組：同 FA₆₀ 組，但於中大腦動脈阻塞的同時靜脈注射 80 mg/kg FA；5) FA₁₀₀ 組：同 FA₆₀ 組，但於中大腦動脈阻塞的同時靜脈注射 100 mg/kg FA；6) DFA 組：同 control 組，但於中大腦動脈阻塞後 30 分鐘靜脈注射 100 mg/kg FA。

(2).生理指標偵測

動脈血液(包括有 pH、pO₂ 及 pCO₂)、血糖、平均動脈壓(mean arterial blood pressure; MABP)和心跳速率(heart rate)分別於中大腦動脈阻塞前 10 分鐘、缺血後 90 分鐘及再灌流 10 分鐘偵測。

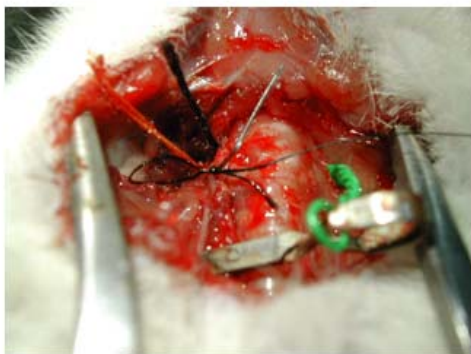
(3).圖示中大腦動脈阻塞模型



The right distal MCA was exposed via a cranial burr hole



A PE-50 catheter was then introduced into the right femoral artery



MCA occlusion

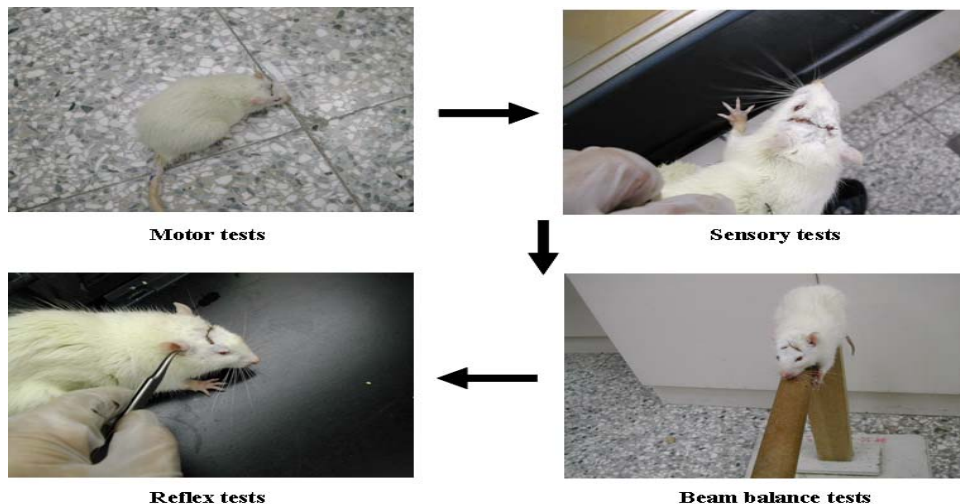


Monitor physiological parameters

(4).神經學狀態評估

再灌流 24 小時後，每隻老鼠由不知實驗分組狀況之研究人員進行神經學狀態評估。神經學缺陷分數(neurological deficit-score)範圍 0 至 18 分，包括有運動(motor)、感覺(sensory)、平衡(balance)及反射(reflex)如前所述⁽¹¹⁷⁾。簡要敘述：運動試驗包括將老鼠放置在地板上(不能走直線記錄為 1 分；向麻痺側繞圈圈記錄為 2 分；轉向麻痺側不能行走記錄為 3 分)及抓起老鼠尾巴(左前肢彎曲記錄 1 分；左後肢彎曲記錄 1 分；頭側彎超過 10 度記錄 1 分)。感覺試驗包含有鬚鬚觸覺試驗(缺損記錄 1 分)及前腳抓力試驗(缺損記錄 1 分)。橫樑平衡試驗包括：老鼠停在橫樑一側記錄為 1 分；如停在橫樑一側有一腳下垂無法抓住橫樑則記錄為 2 分；如停在橫樑一側有二腳下垂無法抓住橫樑則記錄為 3 分；試圖停留在橫樑上但最終掉下來(停留在橫樑時間超過 40 秒) 記錄為 4 分；試圖停留在橫樑上但最終掉下來(停留在橫樑時間少於 20 秒) 記錄為 5 分；完全無法停留在橫樑上，立即掉落橫樑記錄為 6 分；反射缺損及活動異常試驗包括有耳道刺激反射試驗(pinna reflex) 缺損則記錄 1 分；眼角刺激反射試驗(corneal reflex) 缺損則記錄 1 分；驚嚇反射試驗 (startle reflex) 缺損則記錄 1 分；有抽搐異常動作(seizure) 則記錄 1 分。

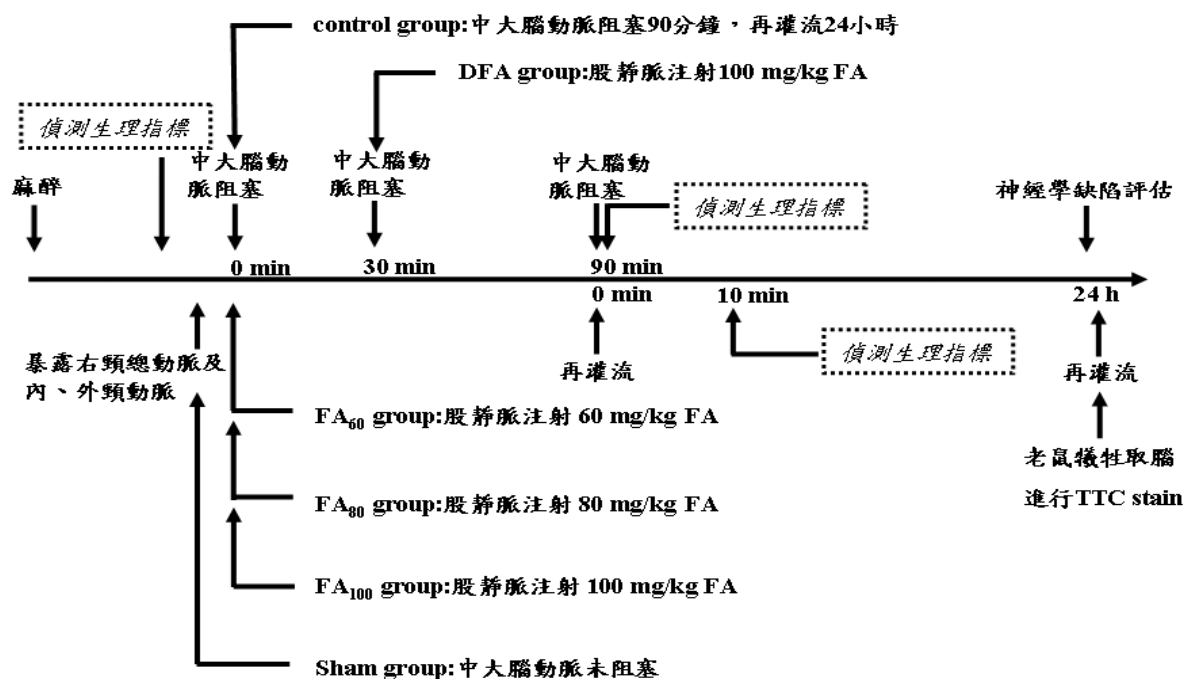
(5).圖示神經學狀態評估



(6). 評估腦梗塞面積

神經學狀態評估之後，老鼠經深度麻醉後犧牲。鼠腦迅速取出置放於腦模型中切成厚度為 2 mm 之腦冠切片，將腦冠切片於 37°C 下以 2% 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC, Merk, Germany) 染色 15 分鐘。腦切片依不同染色分成白色的梗塞區及紫紅色的非梗塞區。以 microscopic image-analysis software (Image-Pro plus, USA) 計算前 6 片腦切片之梗塞面積，最後計算梗塞面積與全部腦切片面積的比率。

(7). 實驗 A 流程圖



3-4-1-B. 實驗 B

(1). 分組

SD 雄性大鼠隨意分成 3 組，每組 6 隻。分組如下：1) sham 組：右頸總動脈及內頸動脈暴露，但中大腦動脈並未阻塞；2) control 組：中

大腦動脈阻塞 90 分鐘，再灌流 2 小時；3) FA₁₀₀ 組：同 control 組，但於中大腦動脈阻塞的同時靜脈注射 100 mg/kg FA。

(2). Hydroethidium 原位染色及 Hoechst 染色

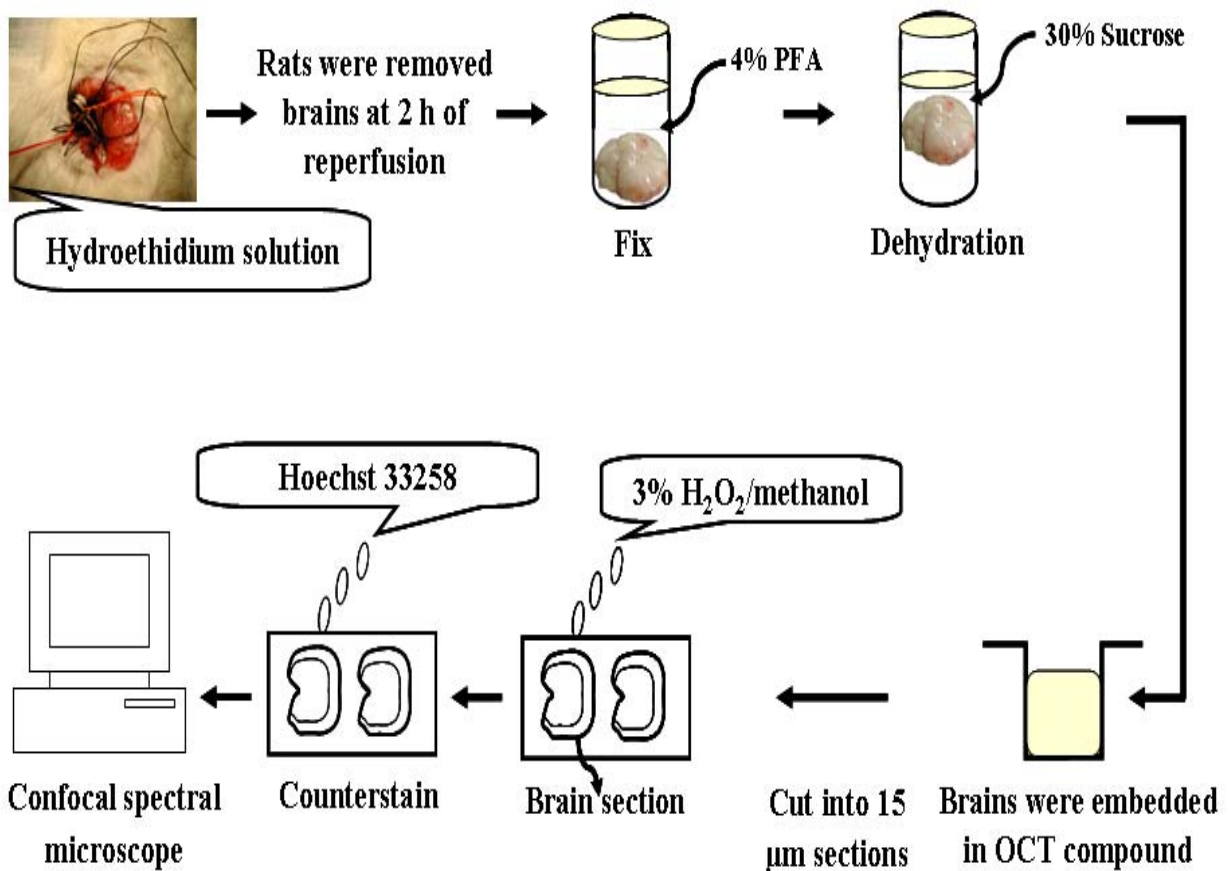
於中大腦動脈阻塞前 10 分鐘從股靜脈打入 0.5 ml 之 hydroethidium solution (1mg/ml)，老鼠於再灌流 2 小時麻醉且犧牲，老鼠以 200 ml 0.9% 之生理食鹽水及 200 ml 4% 之福馬林(paraformaldehyde, pH 7.4)經心臟灌流，鼠腦迅速取出再以 4% 福馬林固定隨後以 30% sucrose 脫水三天，以包埋劑包埋之後至切片機切成厚度 15 μm 之腦切片。接著腦切片於暗室中以 2.5×10^{-3} mg/ml Hoechst 33258 (Molecular Probes) 溶於 PBS solution 中培養 15 分鐘當背景染色，再以水溶性封片膠(Calbiochem, Oncogene, Germany)封片。Hydroethidium 可被超氧陰離子氧化成 oxidized hydroethidine。腦切片以共軛焦螢光顯微鏡(Leica TCS SP2)偵測 oxidized hydroethidine (excitation 510-550 nm and emission 610-650 nm) 陽性細胞於皮質及紋狀體梗塞區表現情形。

(3). ICAM-1、MPO 及 NF- κ B (p50) 免疫組織化學分析染色 (Immunohistochemistry staining; IHC)

選取相鄰 hydroethidium 染色之腦切片(每組 n=5)以 Dulbecco's phosphate buffered saline (1 \times DPBS, Sigma, USA)潤濕，以 0.3% 之 H₂O₂ / methanol 溶液浸泡 15 分鐘去除內生性抗氧化酶活性。腦切片於室溫下以 10% normal animal serum (Zymed, San Francisco, CA, USA)培養 20 分鐘。接著腦切片在 4°C 以一抗(ICAM-1 1:100 dilution, Santa Cruz; MPO 1:500 dilution, Cell Science Inc.; NF- κ B (p50) 1:250 dilution, Santa Cruz) overnight，再以二抗及 avidine-biotin peroxidase complex (ABC kit, Zymed,

CA, USA)培養。腦切片以 3, 3'-diaminobenzidine (DAB)試劑呈色，再以 hematoxylin 當背景染色，最後以封片膠(SP 15-500, New Jersey, USA)封片並置於顯微鏡(Olympus, BX50F4, Japan)下計數定量。

(4) Hydroethidium 原位染色及 Hoechst 染色示意圖⁽¹¹⁸⁾



3-4-1-C. 實驗 C

(1). 分組

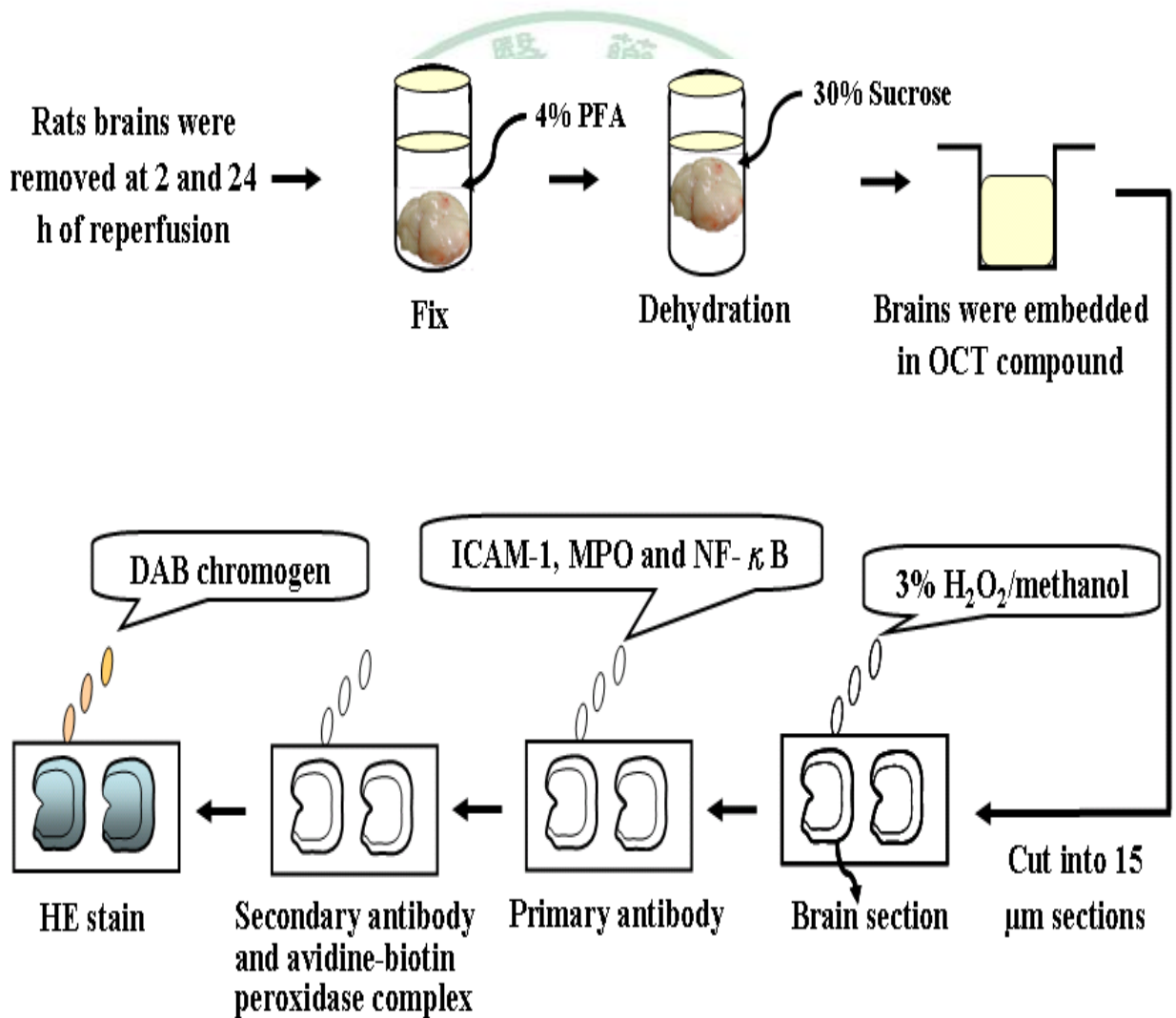
共有 18 隻雄性 SD 大鼠隨意分成 3 組，每組 6 隻。分組如下：1) sham 組：右頸總動脈及內頸動脈暴露，但中大腦動脈並未阻塞；2) control 組：中大腦動脈阻塞 90 分鐘，再灌流 24 小時；3) FA₁₀₀ 組：同 control 組，

但於中大腦動脈阻塞的同時靜脈注射 100 mg/kg FA。

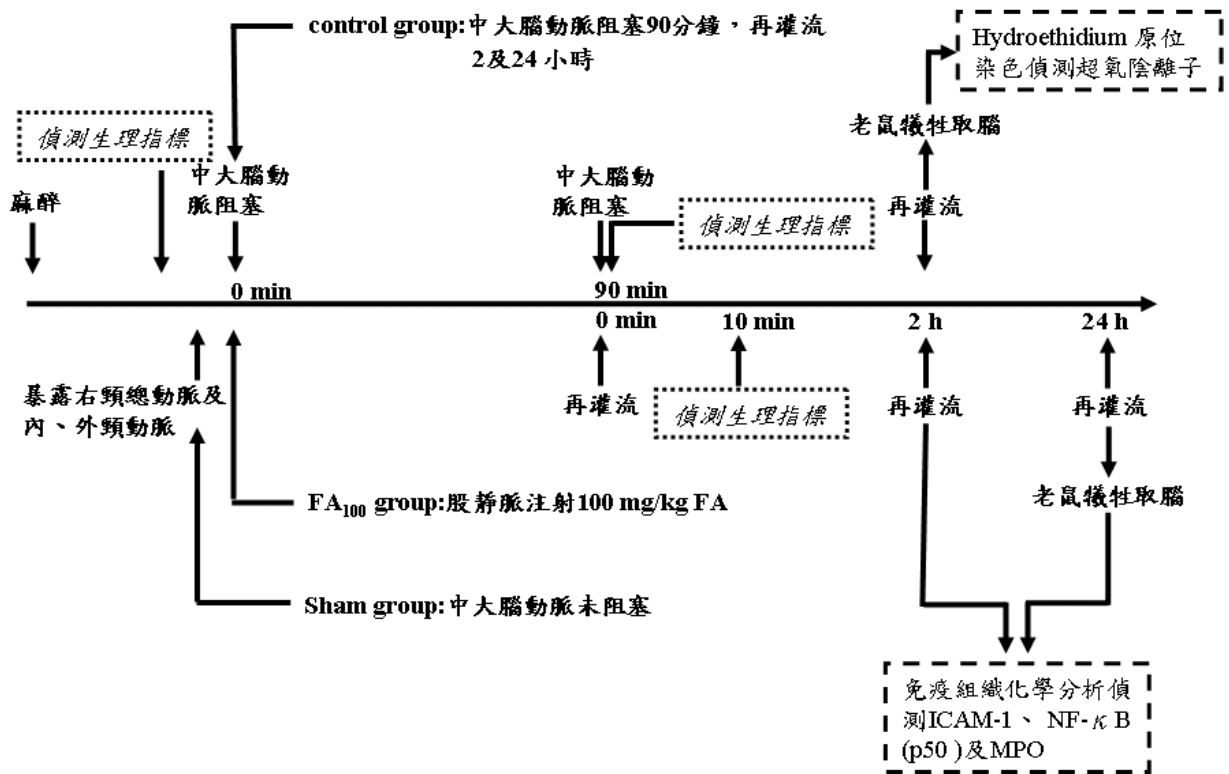
(2). ICAM-1、MPO 及 NF- κ B (p50) 免疫組織化學分析染色

再灌流 24 小時，老鼠麻醉犧牲進行心臟灌流，鼠腦迅速取出，並切成厚度為 15 μ m 之腦切片，接著進行 ICAM-1、MPO 及 NF- κ B (p50) 之免疫組織化學分析染色分析，染色方法及步驟如前所述。

(3). ICAM-1、MPO 及 NF- κ B (p50) 免疫組織化學分析染色示意圖⁽⁸⁾



(4). 實驗 B、C 流程圖



3-4-2. 第二階段

(1). 分組

本實驗 SD 雄性大鼠任意分成三組：FA 組、control 組及 sham 組。老鼠於 FA 組中進行中大腦動脈阻塞同時靜脈注射 100 mg/kg FA，阻塞 90 分鐘後，老鼠於再灌流 2 小時、10 小時、24 小時及 36 小時分批犧牲；老鼠於 control 組除了不給予 FA 外，其餘實驗步驟均與 FA 組相同；老鼠於 sham 組除了不梗塞中大腦動脈血流外，其餘實驗步驟均與 control 組相同。

(2). 生理指標

在實驗過程中，老鼠均以電熱毯加熱保溫，且肛溫維持在 $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 之間。並於缺血前 10 分鐘及缺血後 90 分鐘偵測動脈血中 pH、 pO_2 、 pCO_2

及血糖值。

(3). RNA 萃取

暫時性中大腦動脈阻塞 90 分鐘後，老鼠(n=4)於再灌流 2 小時犧牲且迅速將腦取出。本實驗採用 acid guanidinium thiocyanate-water saturated phenol-chloroform mixture 法⁽¹¹⁹⁾於鼠腦兩側皮質及紋狀體(囟門前 1.7 至 囟門後 4.3mm)進行 RNA 萃取。步驟如下，腦組織取出後稱重並置入適量 denaturing solution (4M guanidinium thiocyanate, 25mM sodium citrate (pH 7.0) and 0.5% (w/v) sodium lauroyl sarcosinate)。組織均質後依序加入 2M sodium acetate (pH 4.0)、water-saturated phenol (pH 4.0) 及 chloroform/isoamyl alcohol mixture (49:1, v/v)，然後將此混合液置放於冰上 15 分鐘。以 14000 rpm 轉速 4°C 下離心 15 分鐘取上層水液層(aqueous phase)。將上層水液層再進行兩次 leader phenol (內含 water-saturated phenol (pH 4.0)、chloroform 及 isoamyl alcohol mixture；比例為 25:24:1) 萃取。取出上層懸浮液(supernatant)加入等量之 ice-cold isopropanol 並貯存於-70°C 下至少 15 分鐘。以 14000 rpm 轉速 4°C 下離心 5 分鐘，沉澱物(pellet)以 DEPC-treated 之去離子水溶解並貯存於-70°C 冰箱中。

(4). 半定量反轉錄 - 聚合酶鏈式反應 (Semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction;RT-PCR)

1 µg RNA 加入含有 0.5 µg/µl oligo dT、10mM dNTP (Promega) 及 DEPC-treated 去離子水之溶液(總共 13 µl)中，於 65°C 的水箱中培養 5 分鐘。接著加入內含 4 µl 之 5× first-strand buffer (Promega)、1 ul of 0.1 M DTT (Promega)、1 µl of 40 U/µl RNasin (Promega)及 1 µl of 200 U/µl superscript III (Invitrogen)混合液，於 37°C 下培養 45 分鐘，95°C 下培養

5 分鐘及 4°C 下培養 5 分鐘進行反轉錄反應。2 μ l 之反轉錄產物(cDNA) 加入 48 μ l 內含 10 μ M primer (ICAM-1、Mac-1、IL-1 β 、TNF- α 或 GAPDH) (Invitrogen) (Table 1)、10 mM dNTP (Promega)、10 \times PCR buffer (Promega)、25 mM MgCl₂ (Promega)、5 U/ μ l Go Taq (Promega)及 DEPC-treated 去離子水進行聚合酶鏈式反應。而聚合酶鏈式反應初始以 94°C 進行 12 分鐘變性(denaturation)，接著 94°C 下 1 分鐘，55°C 下 1 分鐘，72 °C 下 2 分鐘及最後在 72°C 下進行最後延長 6 分鐘，總共進行 33 或 35 循環(Table 3-1)。聚合酶鏈式反應產物於 2% agarose gel 下進行電泳，再以 EtBr 染色。聚合酶鏈式反應產物以 Gel-Pro Analyzer Software 進行定量分析，產物值相對於 GAPDH 產值為最後之百分比值。

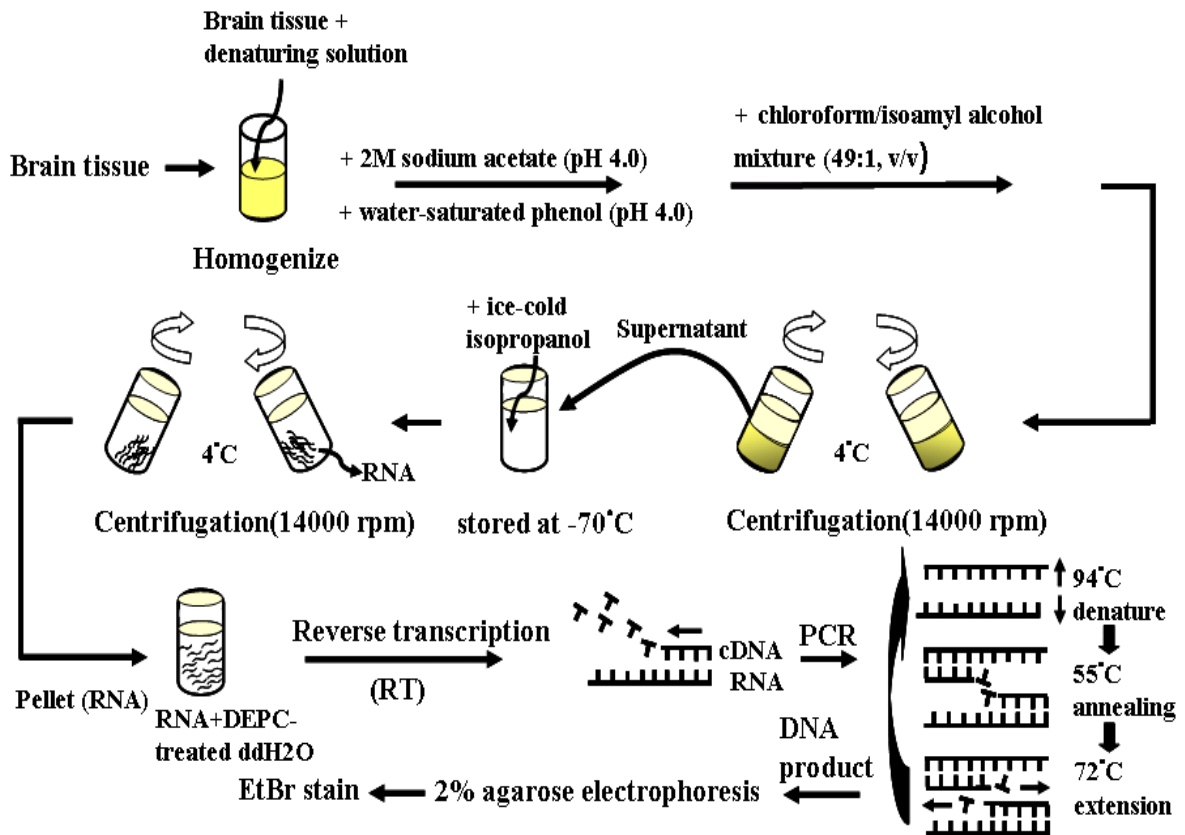
Table 3-1. Primer sequences

Primers (5'→3')	Cycles	Product size (bp)
ICAM-1	33	234
Sense:		
AGACACAAGCAAGAGAAGAA		
Antisense:		
GAGAAGCCCAAACCCGTATG		
Mac-1	35	150
Sense:		
CTGCCTCAGGGATCCGTAAAG		
Antisense:		
CCTCTGCCTCAGGAATGACATC		
IL-1 β	35	241

Table 3-1. 續

Primers (5' → 3')	Cycles	Product size (bp)
Sense: CACCTTCTTTTCCTTCATCTTTG		
Antisense: GTCGTTGCTTGTCTCTCCTTGTA		
TNF- α	35	196
Sense: GTAGCCACGTCGTAGCAAAC		
Antisense: TGTGGGTGAGGAGCACATAGTC		
GAPDH	33	452
Sense: ACCACAGTCCATGCCATCAC		
Antisense: TCCACCACCCTGTTGCTGTA		

(5). 半定量反轉錄-聚合酶鏈式反應示意圖⁽¹¹⁹⁾

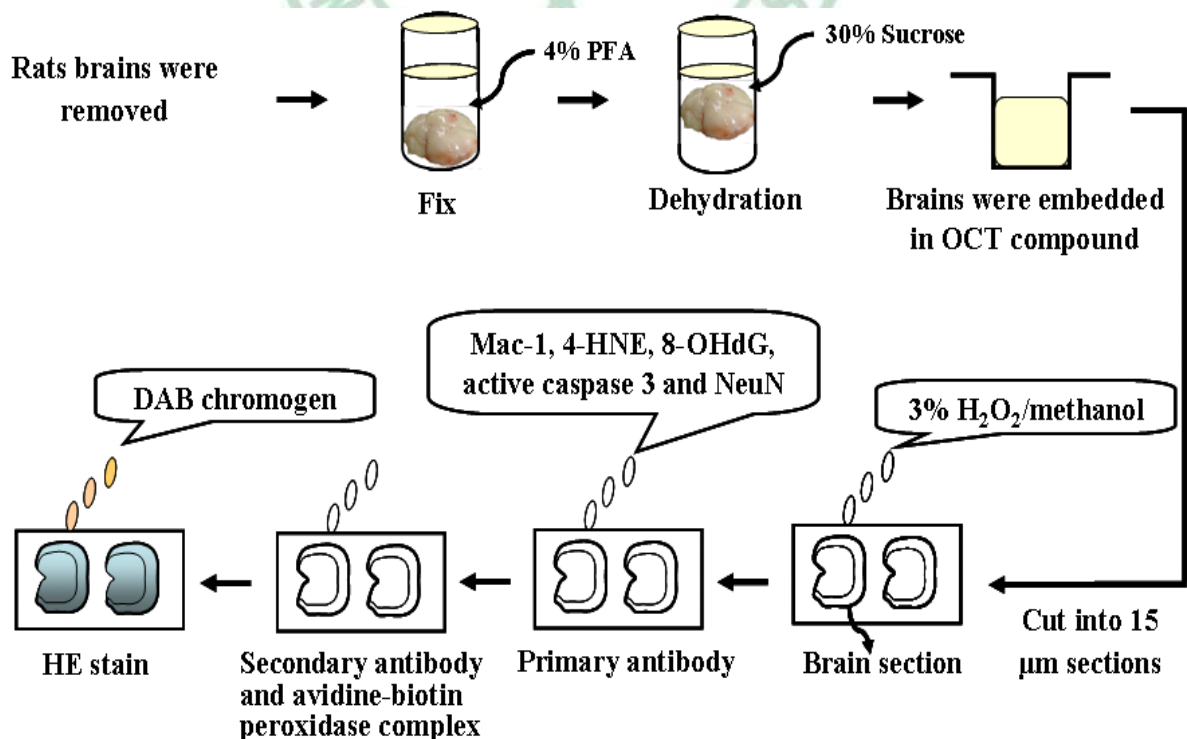


(6). 免疫組織化學分析染色

經過 90 分鐘中大腦動脈阻塞後，老鼠於再灌流 2 (n=6)、10 (n=5)、24 (n=6) 及 36 小時(n=3) 分批深度麻醉犧牲。老鼠以 200 ml 之 0.9% 生理食鹽水及 200 ml 之 4% 福馬林(paraformaldehyde, pH 7.4) 經心臟灌流，鼠腦迅速取出再以 4% 福馬林固定隨後以 30% sucrose 脫水三天，以包埋劑包埋之後至切片機切成厚度 15 μm 之腦切片。腦切片以內含有 0.01% Tween-20 之 Dulbecco's phosphate buffered saline(Sigma, USA) 潤濕再以 3% 之 H_2O_2 /methanol 溶液浸泡 15 分鐘以去除內生性抗氧化酶活性 (endogenous peroxidase activity)。腦切片以 10% normal animal serum (Zymed, CA, USA) 於室溫下培養 20 分鐘，接著分別以 anti-Mac-1 (1:200 dilution, Chemicon) 室溫下培養 1 小時；anti-4-HNE (1:400 dilution, MHN-100P, JaICA) 4°C 下 overnight；anti-8-OHdG (1:100 dilution,

MOG-020P, JaICA) 4°C 下 overnight。另外，我們選取再灌流 10 小時及 36 小時犧牲之腦切片分別以 rabbit anti-active caspase 3 (17kD, 1:100 dilution, Chemicon)及 mouse anti-NeuN (1:200 dilution, Chemicon)於 37°C 下培養 1.5 小時。接著以二抗及 avidine-biotin peroxidase complex (ABC kit, Zymed, CA, USA)培養，再以 3,3'-diaminobenzidine (DAB)呈色，最後以 hematoxylin 培養(active caspase 3 及 NeuN 等一抗之腦切片除外)當背景染色。完成染色之腦切片以封片膠(Assistant-Histokitt, Germany)封片，並在顯微鏡(Axioskop 40, Zeiss)下計數免疫陽性細胞之表現。取相鄰 control 組之腦切片進行去除一抗培養之免疫組織化學分析當成 Mac-1、4-HNE 及 8-OHdG 之 negative control 染色；另外取相鄰 sham 組之腦切片進行去除一抗培養之免疫組織化學分析當成 NeuN 之 negative control 染色。

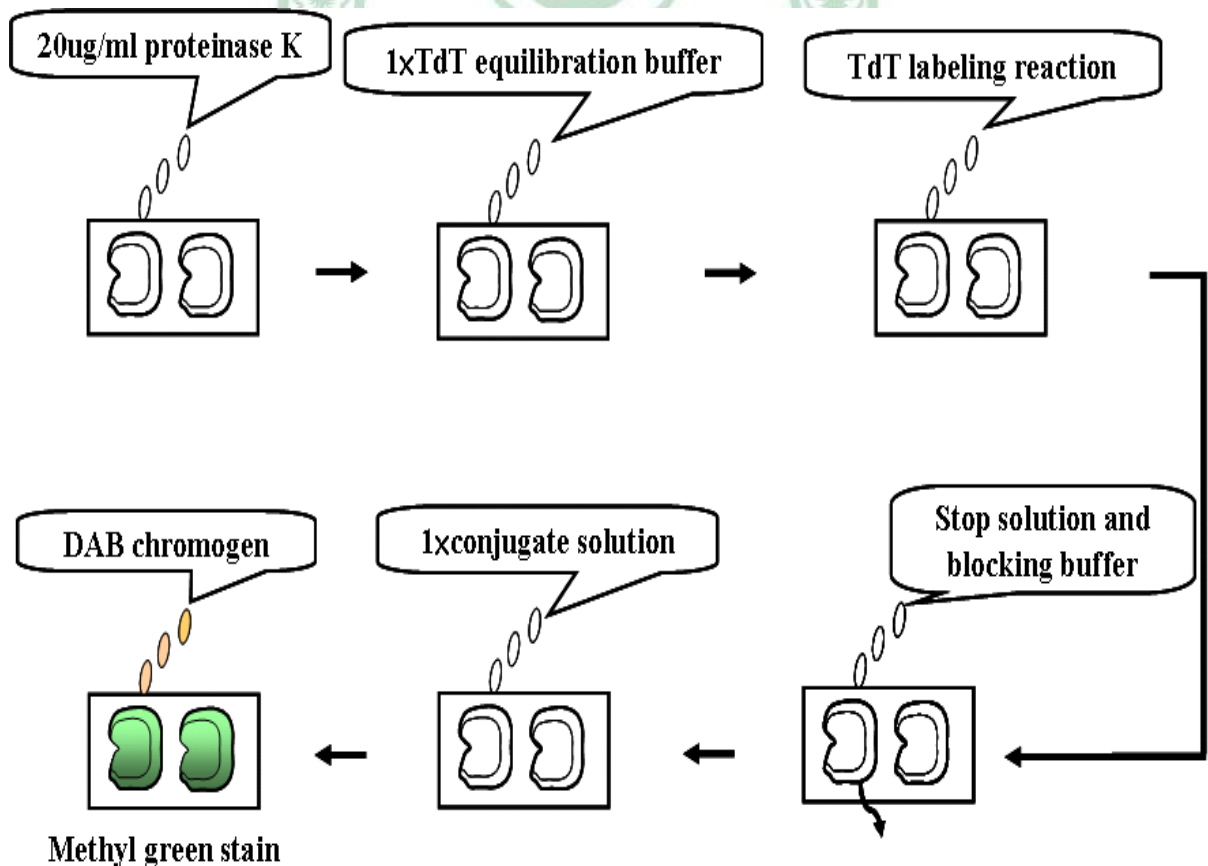
(7). 免疫組織化學分析染色示意圖⁽¹²⁰⁾



(8).細胞凋亡染色分析 (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay; TUNEL)

TUNEL 分析用於確認半陰影區及梗塞核心區之細胞核 DNA 斷裂 (DNA fragmentation)。TUNEL 染色依廠商說明書步驟進行 (Calbiochem)。簡要敘述，取出先前免疫組織化學分析之相鄰腦切片於室溫下以 20 $\mu\text{g/ml}$ proteinase K 培養 20 分鐘，以 TBS 潤濕後以 1 \times TdT equilibration buffer 室溫下培養 30 分鐘，然後於 37 $^{\circ}\text{C}$ 下以 TdT labeling reaction mixture 培養 1.5 小時。加入 stop solution 和 blocking buffer 後，腦切片於室溫下以 1 \times conjugate solution 培養 30 分鐘，再以 DAB kit 呈色。最後腦切片以 methyl green 當背景染色。

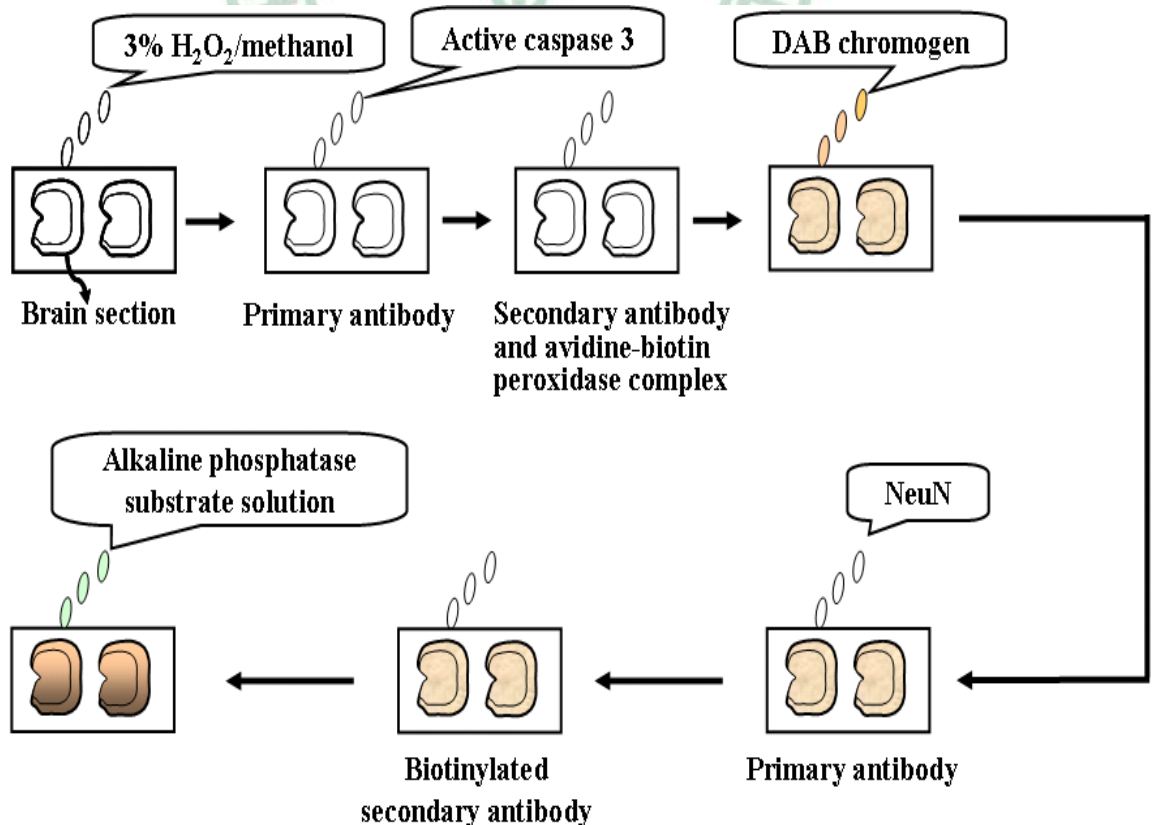
(9).細胞凋亡染色分析示意圖⁽¹²¹⁾



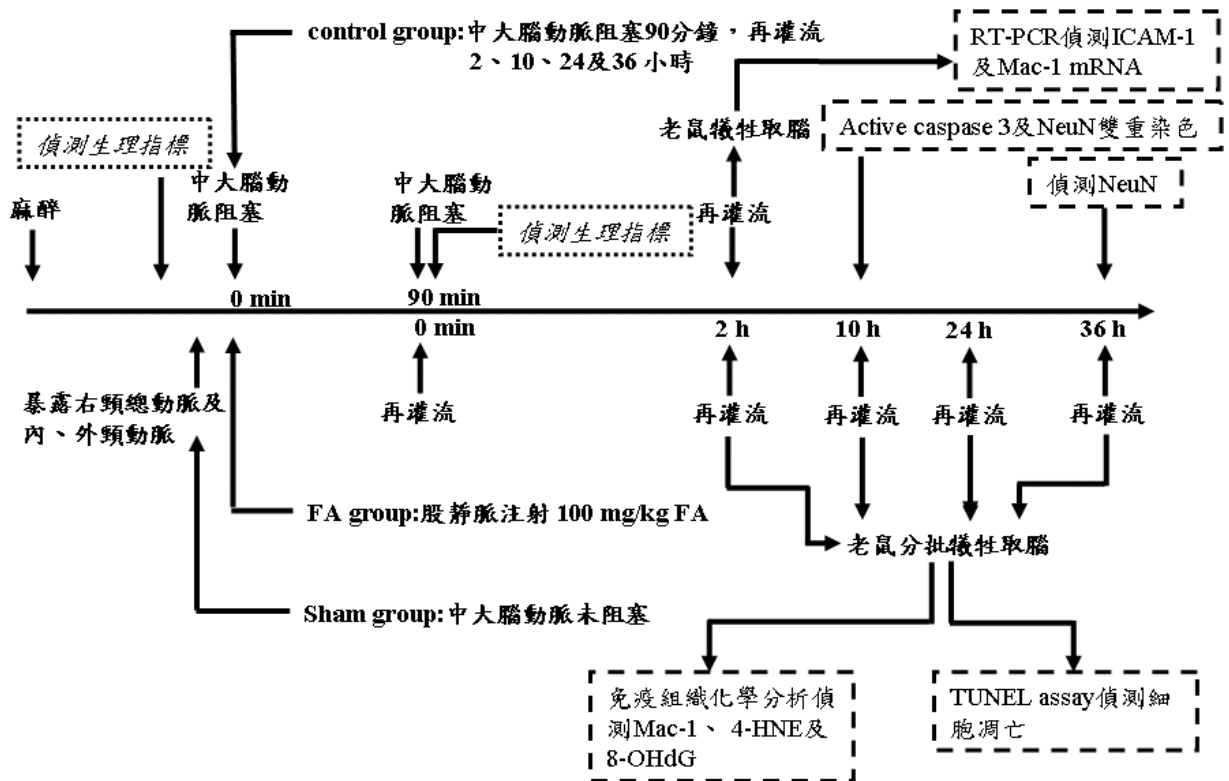
(10). 免疫組織化學分析雙重染色

將先前以免疫組織化學分析法染 active caspase 3 之腦切片於室溫下以 normal blocking serum (Vector) 培養 25 分鐘。接著腦切片以 mouse anti-NeuN (1:200 dilution, Chemicon) 一抗於 37°C 下培養 1.5 小時，以 DPBS 清洗。再以 diluted biotinylated secondary antibody 及 ABC-AP reagent (AK-5002, Vectastain) 培養。腦切片以 alkaline phosphatase substrate solution (SK-5300, Vector Blue) 染色、亮乾再以封片膠封片 (Assistant-Histokitt, Germany)，切片中之免疫陽性細胞以顯微鏡 (Axioskop 40, Zeiss) 計數偵測。而 negative control 染色則是在相鄰 control 組腦切片上以去除 active caspase 3 及 NeuN 等一抗進行和上述相同之免疫組織化學分析雙重染色。

(11). 免疫組織化學分析雙重染色示意圖⁽¹²²⁾



(12). 第二階段實驗流程圖



3-5. 統計分析 (Statistical analysis)

所有數據以平均值±標準差(mean ± SD)表示，各實驗組之數據經由ANOVA 方式以 Scheffe's test 檢定；此外第二階段中組內梗塞區同側腦及對側腦之 mRNA 表現則以 paired t-test 檢定。P 值小於 0.05 被認定具有統計學上的意義。

第四章 結果

4-1. 第一階段實驗結果

4-1-1. 生理指標

於缺血前 10 分鐘、缺血後 90 分鐘及再灌流後 10 分鐘偵測 sham、control、FA₆₀、FA₈₀、FA₁₀₀ 及 DFA 組之 pH、pO₂、pCO₂、blood sugar、MABP 及 heart rate 表現，發現均無統計學上的差異(all p > 0.05; Table 4-1)，顯示各實驗組均在相同的生理狀況下進行實驗。

Table 4-1. Comparison of physiological parameter among the groups

	Sham	Control	FA ₆₀	FA ₈₀	FA ₁₀₀	DFA
<i>10 min before MCAo</i>						
Blood sugar (mg/dl)	103.0±23.1	115.2±23.1	110.2±33.2	123.0±29.1	88.7±23.6	116.2±35.8
pH	7.31±0.03	7.32±0.04	7.31±0.02	7.33±0.04	7.31±0.03	7.31±0.03
pO ₂ (mmHg)	106.0±14.4	95.8±10.9	105.7±11.3	105.5±9.7	98.2±9.9	95.0±8.9
pCO ₂ (mmHg)	27.0±8.4	30.2±3.5	24.0±5.7	30.0±8.1	30.2±5.5	30.8±2.7
MABP (mmHg)	79.2±13.3	81.8±10.2	77.7±8.5	87.2±12.5	74.2±5.0	76.8±9.9
Heart rate (beats/min)	347±68	350±42	393±34	318±50	345±45	324±51
<i>90 min after MCAo</i>						
Blood sugar (mg/dl)	112.7±30.8	101.2±15.2	114.2±15.5	113.7±24.2	103.5±33.4	117.5±20.7
pH	7.33±0.04	7.36±0.03	7.36±0.03	7.36±0.03	7.35±0.05	7.34±0.05
pO ₂ (mmHg)	92.2±11.3	96.7±11.0	97.0±11.5	102.3±8.3	90.3±8.0	92.5±14.3

Data were presented as Mean ± SD. Sham: sham group; Control: control group; FA₆₀: FA₆₀ group; FA₈₀: FA₈₀ group; FA₁₀₀: FA₁₀₀ group; DFA: DFA group; MK: MK group; MCAo: middle cerebral artery occlusion; MABP: mean arterial blood pressure.

Table 4-1. 續

	Sham	Control	FA ₆₀	FA ₈₀	FA ₁₀₀	DFA
pCO ₂ (mmHg)	27.8±7.7	27.1±8.0	23.1±4.9	20.7±3.4	26.7±5.1	22.0±5.0
MABP (mmHg)	82.0±9.6	84.3±9.9	82.3±13.0	87.2±14.3	81.3±16.5	75.2±10.4
Heart rate (beats/min)	340±65	397±89	363±31	407±62	392±72	352±50
<i>10 min after reperfusion</i>						
Blood sugar (mg/dl)	105.8±32.9	99.2±19.8	108.3±25.8	115.7±24.8	125.2±20.9	124.0±33.4
pH	7.34±0.02	7.36±0.03	7.38±0.05	7.36±0.03	7.35±0.04	7.37±0.05
pO ₂ (mmHg)	95.0±6.5	90.8±5.9	100.8±11.4	101.7±10.9	95.8±8.50	92.0±7.2
pCO ₂ (mmHg)	26.6±6.1	24.3±6.5	20.4±3.3	19.6±5.4	24.3±4.9	21.1±4.4
MABP (mmHg)	81.2±12.0	84.3±14.0	88.5±10.2	80.3±14.1	88.5±17.8	77.8±8.0
Heart rate (beats/min)	342±52	436±61	373±51	394±76	414±56	362±56

4-1-2. FA 對再灌流 24 小時後腦梗塞面積之影響

中大腦動脈阻塞 90 分鐘，再灌流 24 小時各實驗組形成腦梗塞(Figure 4-1A)。我們分析發現 control、FA₆₀、FA₈₀、FA₁₀₀ 及 DFA 組之梗塞面積百分比均顯著大於 sham 組($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively)。進一步分析發現 FA₈₀、FA₁₀₀ 及 DFA 組之梗塞面積百分比顯著小於 control 組(all $p < 0.001$)及 FA₆₀ 組($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.05$, respectively) (Figure 4-1B)。

(A)

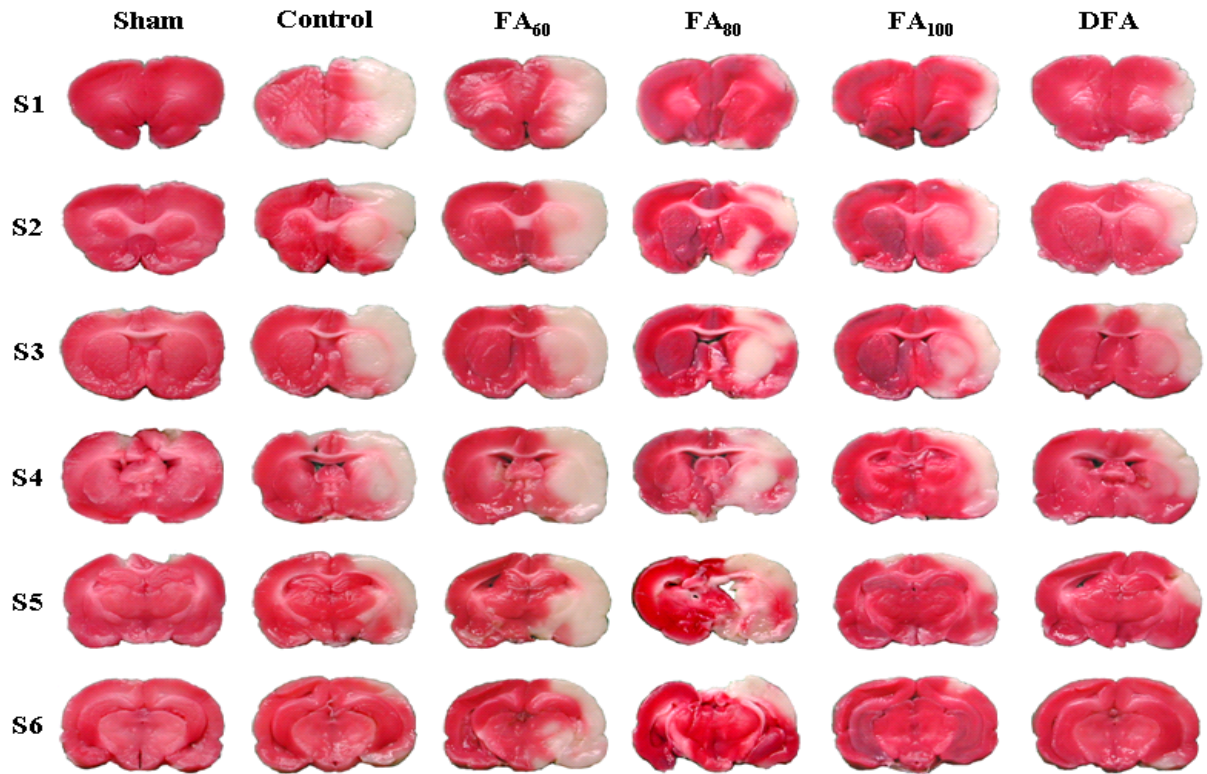
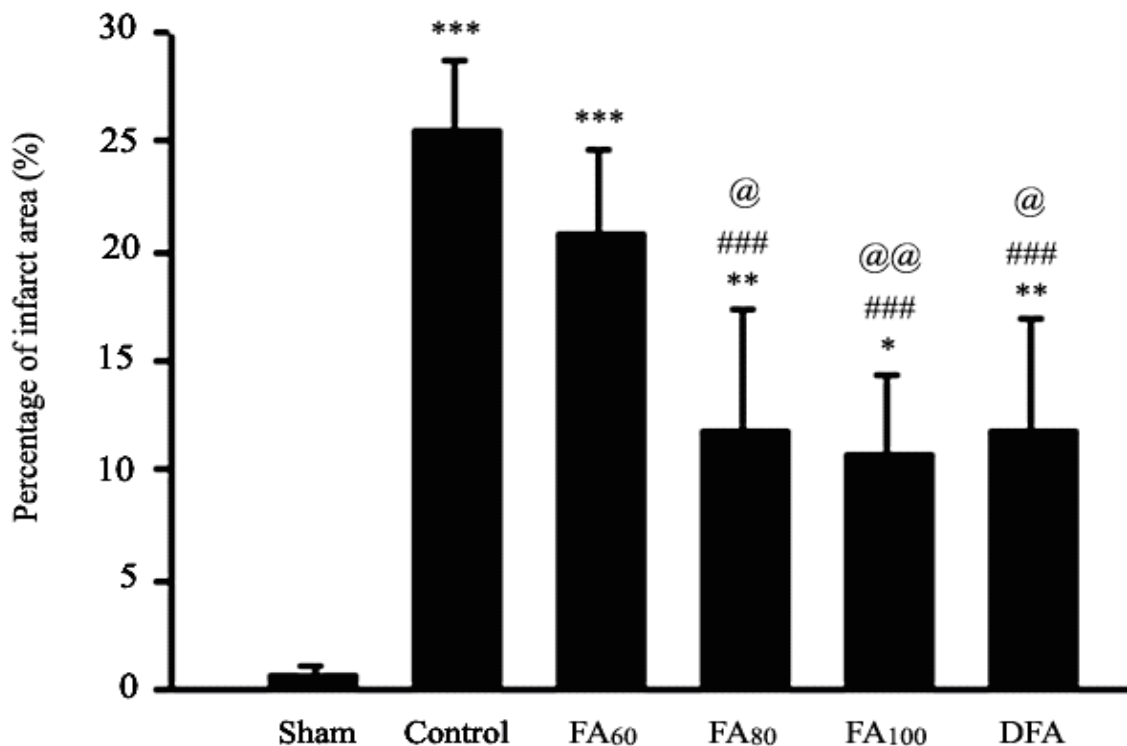


Figure 4-1. Effect of ferulic acid on cerebral infarct in ischemia-reperfusion injured rats. (A) Focal cerebral infarct developed after the middle cerebral artery had been occluded for 90 min followed by 24 h of reperfusion in Sprague-Dawley rats. The 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride stain of the infarct area showed a white color, whereas the non-infarct area was reddish-purple color. Sham: sham group; Control: control group; FA₆₀: FA₆₀ group; FA₈₀: FA₈₀ group; FA₁₀₀: FA₁₀₀ group; DFA: DFA group. Scale bar= 1 cm. (B) Comparison with the percentage of infarct area among the sham, control, FA₆₀, FA₈₀, FA₁₀₀ and DFA groups was measured at 24 h of reperfusion. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with the sham group; #### $p < 0.001$ compared with the control group; @ $p < 0.05$, @@ $p < 0.01$ compared with the FA₆₀ group.

(B)



4-1-3. FA 對再灌流 24 小時後神經學行為缺陷之影響

老鼠於中大腦動脈阻塞 90 分鐘，再灌流 24 小時形成程度不等之神經學缺陷。control (13.5 ± 0.8)、FA₆₀ (11.5 ± 1.5)、FA₈₀ (8.5 ± 0.8)、FA₁₀₀ (8.3 ± 0.5)及 DFA (9.8 ± 1.2) 組之神經學缺陷分數顯著大於 sham (1.2 ± 0.4) 組 (all $p < 0.001$)。然而，FA₈₀、FA₁₀₀ 及 DFA 組之神經學缺陷分數顯著低於 control 組 (all $p < 0.001$)。另外，FA₈₀ 及 FA₁₀₀ 組之神經學缺陷分數亦顯著低於 FA₆₀ 組 ($p < 0.001$, $p < 0.001$, respectively)。

4-1-4. FA 對再灌流 2 小時後 oxidized hydroethidine 螢光染色陽性細胞表現之影響

所有本實驗偵測之免疫陽性(immunoreactive; positive)細胞或血管均

在腦冠切片正方形虛線內計數定量(counts/1mm², Figure 4-2)。再灌流 2 小時，control 組於皮質與紋狀體梗塞區之 oxidized hydroethidine 表現均顯著高於 sham 組 (both $p < 0.001$)；而 FA₁₀₀ 組於皮質與紋狀體梗塞區之 oxidized hydroethidine 表現均顯著低於 control 組(both $p < 0.01$; Figure 4-3, Table 4-2)。

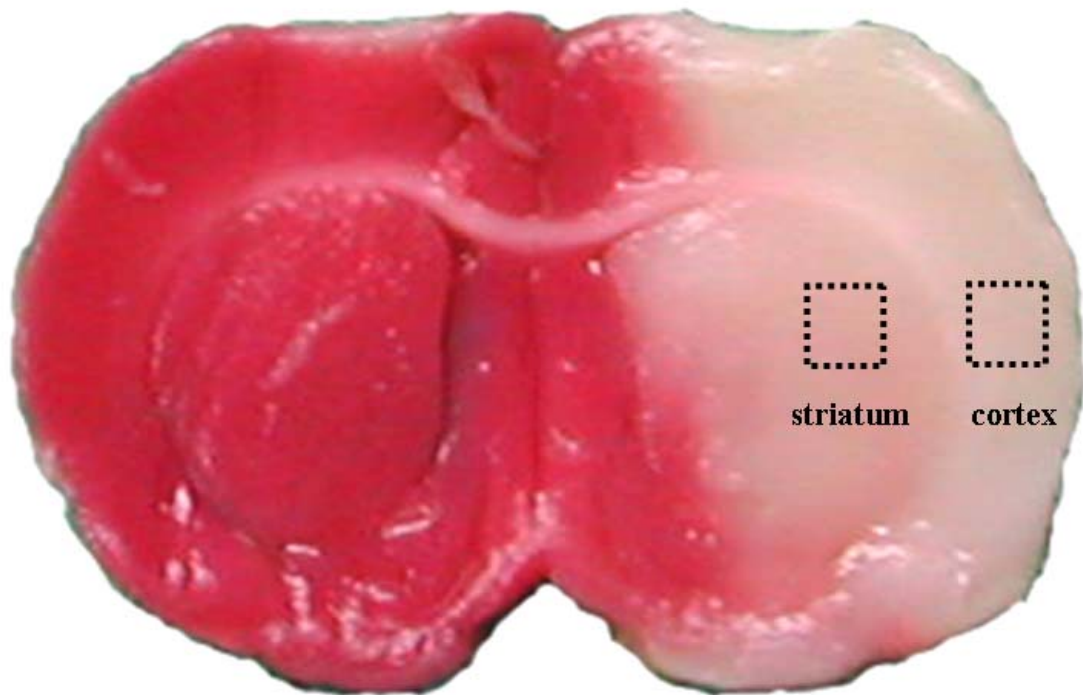


Figure 4-2. Representative photograph showed the brain coronal section located on the posterior bregma 0.92 mm position. The square dotted line within the cerebral infarct zone indicates the region for calculating immunoreactive (positive) cells (vessels). cortex: the ischemic core of cortex; striatum: the ischemic core of striatum. The length and width of square dotted line= 1 mm.

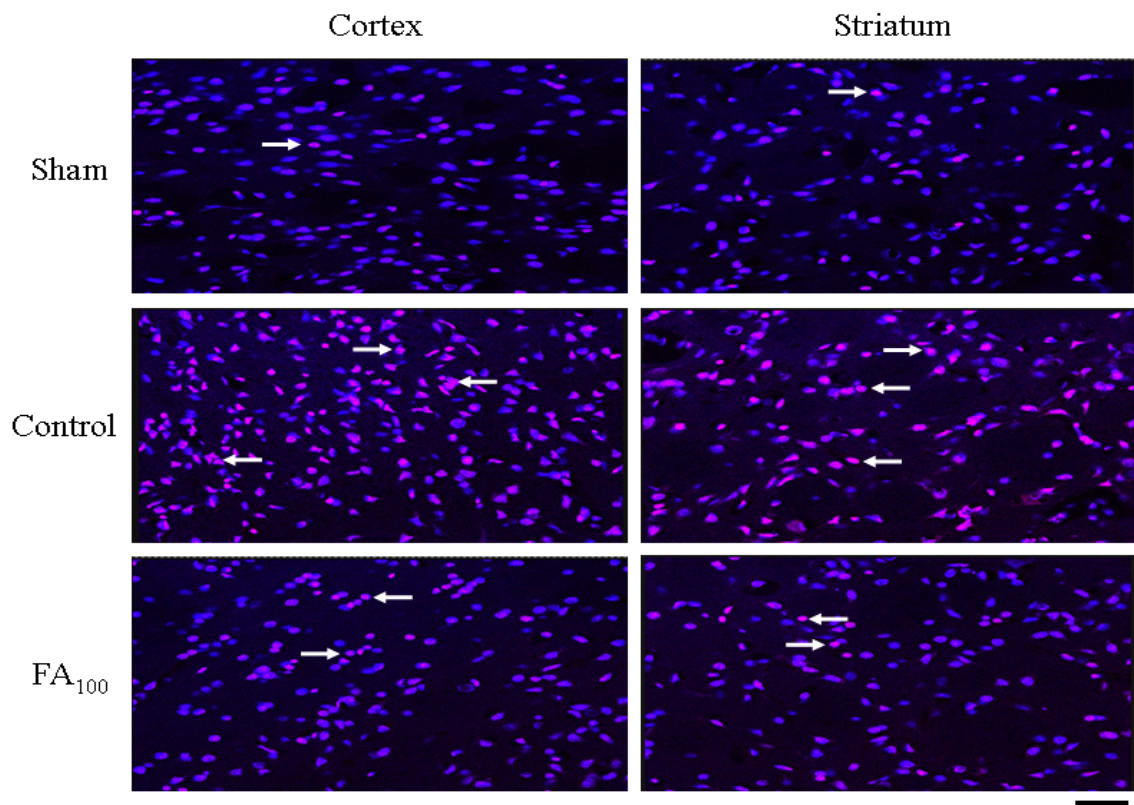


Figure 4-3. Effect of ferulic acid on oxidized hydroethidine fluorescent stain positive cells at 2 h of reperfusion. Sham: sham group; Control: control group; FA₁₀₀: FA₁₀₀ group; Cortex: the ischemic core of cortex; Striatum: the ischemic core of striatum. Arrows indicated oxidized hydroethidine positive cells. Scale bar= 40 μ m.

4-1-5. FA 對再灌流 2 小時後 ICAM-1、MPO 及 NF- κ B (p50)陽性細胞(血管)表現之影響

再灌流 2 小時於皮質梗塞區，ICAM-1 免疫陽性血管數於 sham、control 及 FA₁₀₀ 組表現，彼此之間並無統計學上的差異(Data not shown)。而在再灌流 2 小時紋狀體梗塞區，control 及 FA₁₀₀ 組之 ICAM-1 免疫陽性血管數表現顯著大於 sham 組 ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively; Figure 4-4, Table 4-2)，然而 FA₁₀₀ 組之 ICAM-1 免疫陽性血管數表現顯著低於

control 組 ($p < 0.01$; Figure 4-4, Table 4-2)。而在 MPO 的表現，於皮質及紋狀體梗塞區中，FA₁₀₀ 和 control 組彼此之間並無統計學上的差異 (Data not shown)；另外在 NF- κ B (p50)表現方面，sham、control 及 FA₁₀₀ 組在皮質及紋狀體梗塞區彼此之間並無統計學上的差異 (Data not shown)。

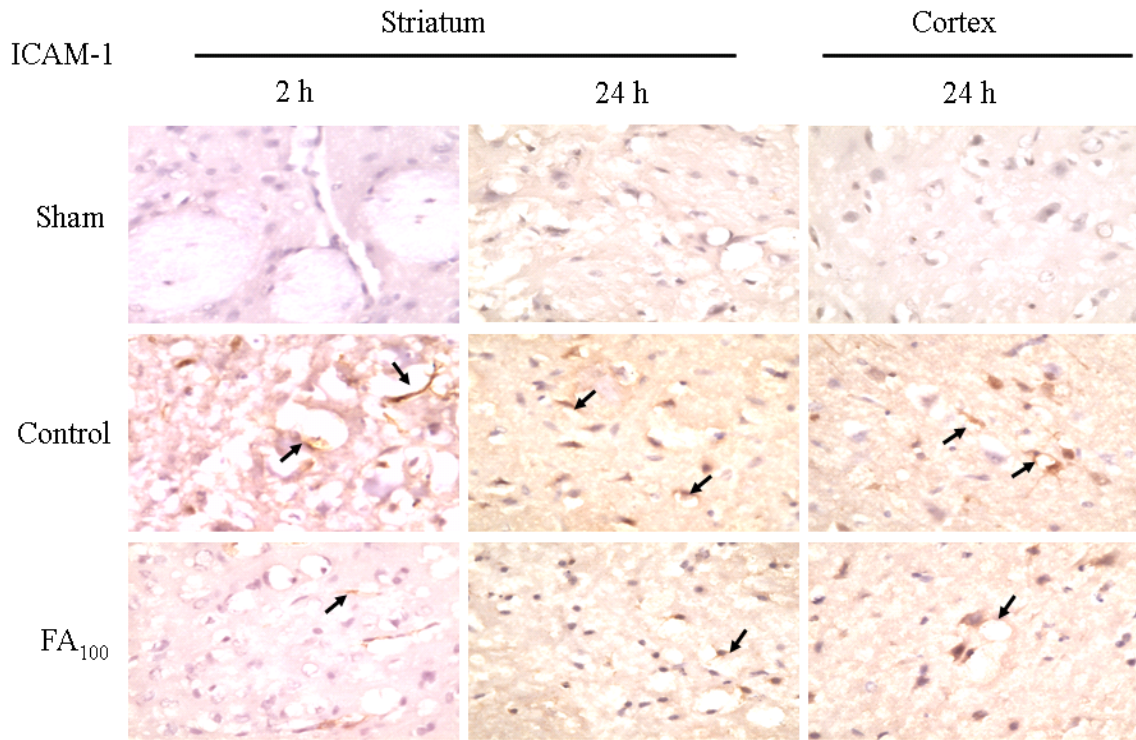


Figure 4-4. Effect of ferulic acid on the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) immunoreactive vessels at 2 h and 24 h of reperfusion. Sham: sham group; Control: control group; FA₁₀₀: FA₁₀₀ group; Cortex: the ischemic core of cortex; Striatum: the ischemic core of striatum; 2 h: at 2 h of reperfusion; 24 h: at 24 h of reperfusion. Arrows indicated ICAM-1 immunoreactive vessels. Scale bar= 40 μ m.

4-1-6. FA 對再灌流 24 小時後 ICAM-1、MPO 及 NF- κ B (p50)陽性細胞(血管)表現之影響

在皮質梗塞區中，再灌流 24 小時 control 及 FA₁₀₀ 組之 ICAM-1 免疫陽性血管數表現顯著大於 sham 組 ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively)，同一時間，FA₁₀₀ 組之 ICAM-1 免疫陽性血管數表現則顯著低於 control 組 ($p < 0.001$; Figure 4-4, Table 4-2)。另外在紋狀體梗塞區中，control 及 FA₁₀₀ 組之 ICAM-1 免疫陽性血管數表現顯著大於 sham 組 ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively)；縱使如此，FA₁₀₀ 組之 ICAM-1 免疫陽性血管數表現仍低於 control 組 ($p < 0.01$; Figure 4-4, Table 4-2)。

MPO 之分析，我們發現 control 及 FA₁₀₀ 組於皮質梗塞區之 MPO 表現顯著高於 sham 組 ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively)；然而 FA₁₀₀ 組之 MPO 表現則顯著低於 control 組 ($p < 0.001$; Figure 4-5, Table 4-2)。另外在紋狀體梗塞區，control 及 FA₁₀₀ 組之 MPO 表現彼此之間並無統計學上的差異(Data not shown)。此外在 NF- κ B (p50)免疫陽性細胞之表現，control 及 FA₁₀₀ 組於皮質梗塞區之 NF- κ B (p50)免疫陽性細胞表現顯著高於 sham 組 ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively)；而 FA₁₀₀ 組之 NF- κ B (p50)免疫陽性細胞表現仍顯著低於 control 組 ($p < 0.001$; Figure 4-5, Table 4-2)。另外我們發現 control 及 FA₁₀₀ 組於紋狀體梗塞區之 NF- κ B (p50)免疫陽性細胞表現顯著高於 sham 組 ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively)；進一步分析得知 FA₁₀₀ 組之 NF- κ B (p50)免疫陽性細胞表現仍低於 control 組 ($p < 0.01$; Figure 4-5, Table 4-2)。

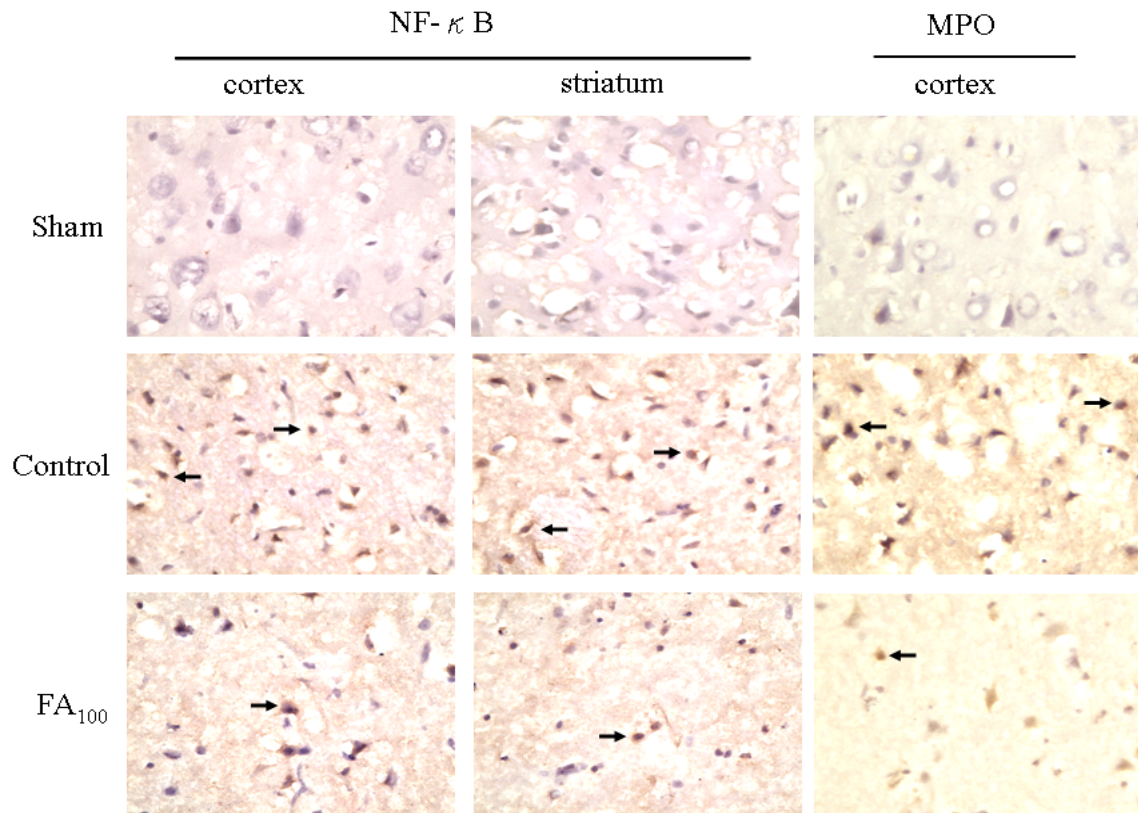


Figure 4-5. Effect of ferulic acid on the nuclear factor- κ B (NF- κ B) and myeloperoxidase (MPO) immunoreactive cells at 24 h of reperfusion. Sham: sham group; Control: control group; FA₁₀₀: FA₁₀₀ group; Cortex: the ischemic core of cortex; Striatum: the ischemic core of striatum; Arrows indicated NF- κ B and MPO immunoreactive cells, respectively. Scale bar= 40 μ m.

Table 4-2. The expression of oxidized hydroethidine, ICAM-1, MPO and NF-κB immunoreactive (positive) cells (vessels) (counts/1mm²)

	2h	24h
<i>Oxidized hydroethidine</i>		
Cortex		
Sham	227.3±28.6	
Control	494.3±83.2†††	
FA ₁₀₀	284.6±49.7**	
Striatum		
Sham	216.7±22.1	
Control	527.8±139.7†††	
FA ₁₀₀	308.5±62.4**	
<i>ICAM-1</i>		
Cortex		
Sham		0.7±1.2
Control		96.0±23.9†††
FA ₁₀₀		30.8±17.0††††
Striatum		
Sham	1.6±2.1	0.3±0.5
Control	42.0±11.6†††	78.8±23.1†††
FA ₁₀₀	19.0±9.1†††	30.2±22.4†††

Data were presented as Mean ± SD. *Oxidized hydroethidine*: oxidized hydroethidine positive cells; *ICAM-1*: ICAM-1 immunoreactive vessels; *MPO*: MPO immunoreactive cells; *NF-κB*: NF-κB immunoreactive cells; Cortex: the ischemic core of cortex; Striatum: the ischemic core of striatum; Sham: sham group; Control: control group; FA₁₀₀: FA₁₀₀ group; 2 h: at 2 h of reperfusion; 24 h: at 24 h of reperfusion. †p<0.05, ††p<0.01, †††p<0.001 compared with the sham group; **p<0.01, ***p<0.001 compared with the control group.

Table 4-2. 續

	2h	24h
MPO		
Cortex		
Sham		0.5±0.8
Control		183.8±21.2†††
FA ₁₀₀		77.0±52.9††***
NF-κB		
Cortex		
Sham		1.3±2.0
Control		267.2±44.0†††
FA ₁₀₀		108.5±59.4††***
Striatum		
Sham		0.3±0.5
Control		307.0±94.6†††
FA ₁₀₀		142.5±52.1††***

4-2. 第二階段實驗結果

4-2-1. 生理指標

於腦缺血前 10 分鐘及腦缺血後 90 分鐘測量生理指標包括有 blood gas(pH、pO₂ 及 pCO₂)及 blood sugar，結果得知 sham 組、control 組及 FA 組相較，彼此之間生理指標並無統計學上的差異(p>0.05; Table 4-3)。

Table 4-3. Physiological parameters

	BS, mg/dl	pH	pO₂, mmHg	pCO₂, mmHg
10 min before ischemia				
2 h (n=6)				
sham	119.0 ± 29.2	7.30 ± 0.03	97.5 ± 10.9	28.7 ± 7.0
control	118.3 ± 26.3	7.32 ± 0.04	96.0 ± 13.3	26.8 ± 3.9
FA	124.7 ± 24.6	7.28 ± 0.03	96.3 ± 5.8	26.2 ± 6.7
10 h (n=5)				
sham	111.8 ± 24.1	7.30 ± 0.04	104.0 ± 12.9	28.4 ± 5.0
control	94.4 ± 2.5	7.27 ± 0.03	108.6 ± 8.2	30.5 ± 4.2
FA	94.0 ± 25.2	7.25 ± 0.03	107.6 ± 8.0	33.1 ± 4.4
24 h (n=6)				
sham	120.0 ± 29.0	7.30 ± 0.05	90.8 ± 6.9	29.9 ± 3.2
control	116.2 ± 23.3	7.29 ± 0.03	103.2 ± 13.6	30.7 ± 6.3
FA	118.8 ± 16.0	7.31 ± 0.03	95.0 ± 7.3	29.7 ± 5.3
36 h (n=3)				
sham	119.3 ± 48.5	7.32 ± 0.02	92.7 ± 8.5	31.5 ± 3.4
control	115.0 ± 20.0	7.29 ± 0.02	110.3 ± 8.6	26.7 ± 5.7
FA	98.3 ± 28.6	7.27 ± 0.03	105.7 ± 9.9	25.2 ± 2.1
90 min after ischemia				
2 h (n=6)				

Data were presented as Mean ± SD. BS: blood sugar; sham: sham group; control: control group; FA: ferulic acid-treated group; 10 min before ischemia: 10 min before cerebral ischemia; 90 min after ischemia: 90 min after cerebral ischemia; 2 h: sacrificed at 2 h of reperfusion; 10 h: sacrificed at 10 h of reperfusion; 24 h: sacrificed at 24 h of reperfusion; 36 h: sacrificed at 36 h of reperfusion.

Table 4-3. 續

	BS, mg/dl	pH	pO ₂ , mmHg	pCO ₂ , mmHg
sham	110.7 ± 26.1	7.31 ± 0.02	102.8 ± 10.3	22.4 ± 5.8
control	104.7 ± 18.5	7.33 ± 0.04	98.3 ± 9.3	23.5 ± 4.8
FA	126.2 ± 3.3	7.35 ± 0.03	91.3 ± 17.4	21.7 ± 5.9
10 h (n=5)				
sham	144.6 ± 43.3	7.33 ± 0.04	87.6 ± 6.3	22.8 ± 3.0
control	128.2 ± 11.8	7.34 ± 0.03	93.0 ± 11.8	22.6 ± 2.1
FA	109.4 ± 28.8	7.35 ± 0.03	89.8 ± 5.1	26.6 ± 4.1
24 h (n=6)				
sham	138.7 ± 44.4	7.31 ± 0.02	93.2 ± 8.7	28.3 ± 4.0
control	135.0 ± 28.7	7.34 ± 0.02	93.2 ± 11.2	23.4 ± 4.3
FA	118.5 ± 28.1	7.35 ± 0.05	92.5 ± 6.2	23.3 ± 3.3
36 h (n=3)				
sham	153.3 ± 30.6	7.34 ± 0.02	81.3 ± 8.3	23.3 ± 5.2
Control	112.0 ± 25.9	7.37 ± 0.01	88.3 ± 12.9	22.4 ± 3.6
FA	120.7 ± 34.2	7.37 ± 0.03	93.7 ± 7.0	20.7 ± 1.1

4-2-2. FA 對再灌流 2 小時後 ICAM-1 及 Mac-1 mRNA 表現之影響

ICAM-1 mRNA 於皮質梗塞區的表現，發現 sham 組、control 組及 FA 組相較，彼此之間並無統計學上的差異($p > 0.05$; Figure 4-6)。而 ICAM-1 mRNA 於紋狀體梗塞區的表現，得知 control 組同側(ipsilateral hemisphere)梗塞區顯著高於 sham 組(2.1-fold, $p < 0.05$; Figure 4-6); 另外 FA 組同側梗塞區 ICAM-1 mRNA 表現則顯著低於 control 組(0.7-fold, $p < 0.05$; Figure 4-6)。而在 control 組中，我們也合理地發現同側梗塞區 ICAM-1 mRNA

的表現顯著高於對側區(1.7- fold, $p < 0.05$; Figure 4-6)。接著分析 Mac-1 mRNA 的表現，在皮質梗塞區表現和 ICAM-1 mRNA 類似，sham 組、control 組及 FA 組相較，彼此之間並無統計學上的差異($p > 0.05$; Figure 4-6)；在紋狀體同側梗塞區方面，sham 組和 control 組並無統計學上的差異($p > 0.05$; Figure 4-6)，而 FA 組之 Mac-1 mRNA 表現則顯著低於 control 組(0.5-fold, $p < 0.05$; Figure 4-6)。此外，control 組與 FA 組於皮質及紋狀體梗塞區之 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表現之比較均無統計學上的差異(Data not shown)。

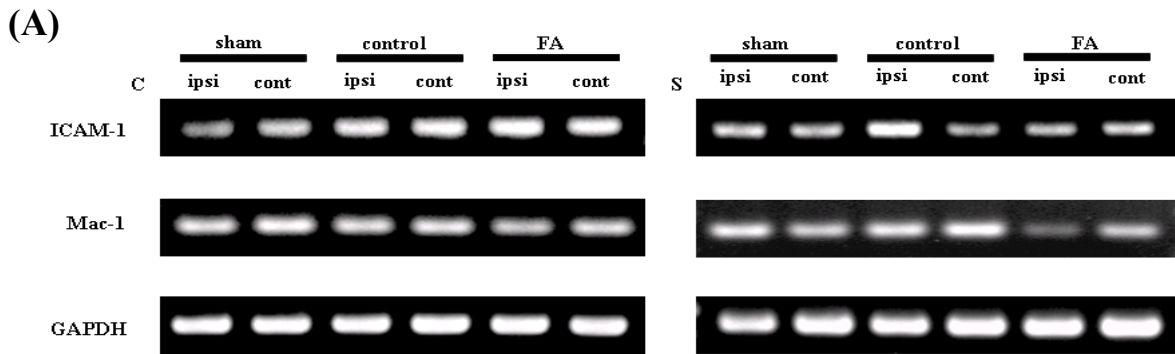
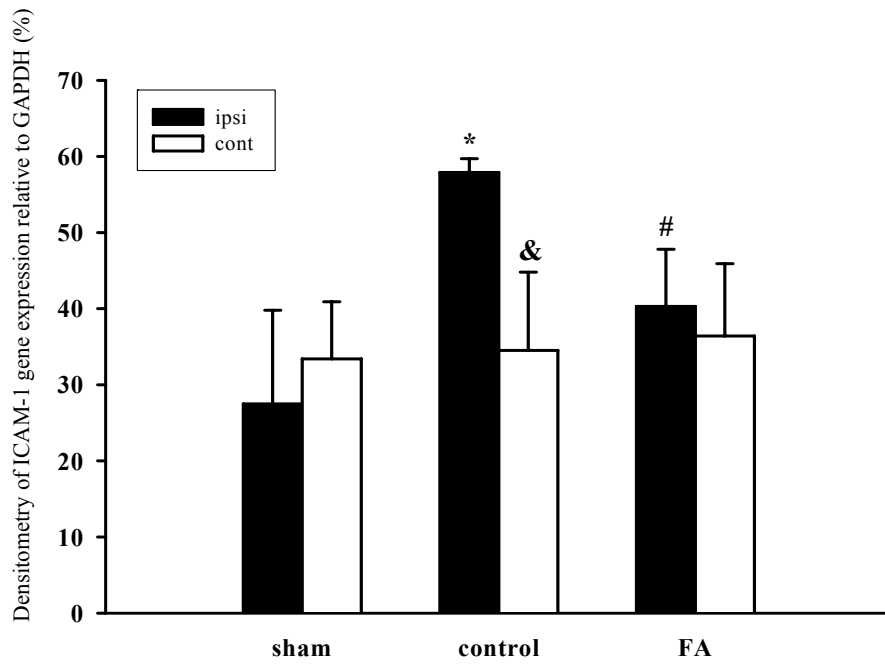
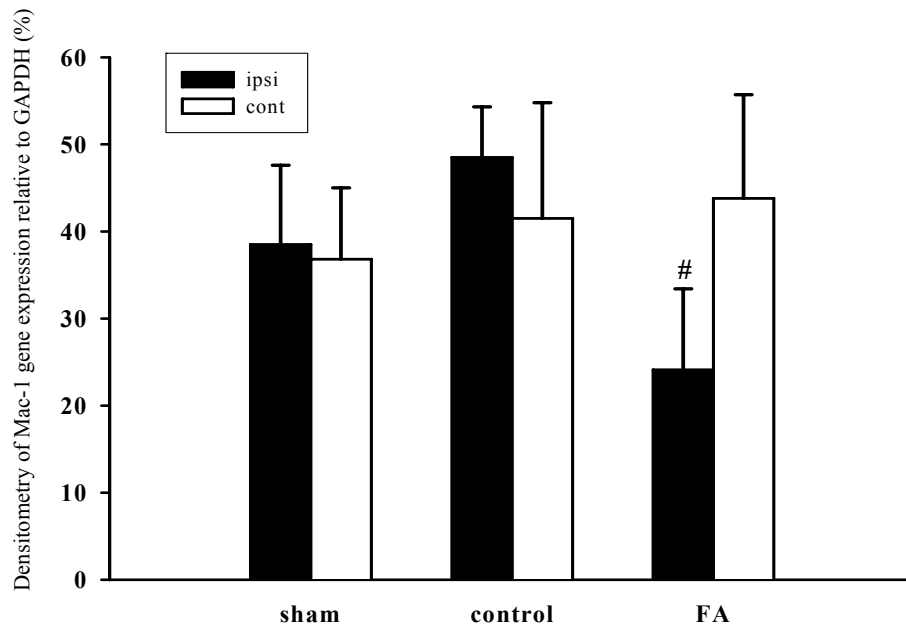


Figure 4-6. The expression of ICAM-1 and Mac-1 mRNA in the ischemic areas of the cortex and striatum were detected at 2 h of reperfusion. (A) Representative RT-PCR signals showed the expression of ICAM-1 and Mac-1 mRNA in the chosen areas of cortex and striatum. C: ischemic cortex; S: ischemic striatum; ipsi: ipsilateral; cont: contralateral; sham: sham group; control: control group; FA: ferulic acid-treated group. GAPDH mRNA was used as the internal control. The relative expression of (B) ICAM-1 and (C) Mac-1 mRNA was quantified in the chosen striatum of the sham, control and FA groups. Data were presented as mean \pm SD. * $p < 0.05$ compared with the sham group; # $p < 0.05$ compared with the control group; & $p < 0.05$ compared with the ipsilateral hemisphere. (n=4)

(B)



(C)



4-2-3. FA 對再灌流 2、10、24 及 36 小時後 Mac-1、4-HNE 及 8-OHdG 陽性細胞表現之影響

本研究所有陽性細胞均在腦冠切片中虛線正方形內(Figure 4-7)計算統計。

Mac-1 抗原表現於活化白血球及微膠細胞中。在半陰影區及皮質、紋狀體梗塞區，再灌流 2 小時 Mac-1 陽性細胞尚未顯現於 sham 組、control 組及 FA 組；直至再灌流 10、24 及 36 小時，與 sham 組相較，control 組及 FA 組之 Mac-1 陽性細胞則顯著呈現(both $p < 0.01$)，進一步分析發現，FA 組之 Mac-1 陽性細胞表現顯著低於 control 組之表現($p < 0.05$; Figure 4-8; Table 4-4)。在半陰影區及梗塞核心區中，再灌流 2 小時 4-HNE 陽性細胞少量呈現於各組，再灌流 10、24 及 36 小時，與 sham 組相較，control 組及 FA 組之 4-HNE 陽性細胞則顯著呈現(both $p < 0.01$)；縱使如此，FA 組之 4-HNE 陽性細胞表現仍低於 control 組($p < 0.05$; Figure 4-9; Table 4-4)。在半陰影區及梗塞核心區中，分析 8-OHdG 陽性細胞得知，再灌流 2 小時 8-OHdG 陽性細胞少量呈現於 sham 組、control 組及 FA 組，隨後再灌流 10、24 及 36 小時，相較於 sham 組，8-OHdG 陽性細胞則顯著呈現於 control 組及 FA 組(both $p < 0.01$)，而在上述各個相同時間點，FA 組與 control 組相較，顯著降低 8-OHdG 陽性細胞之表現($p < 0.05$; Figure 4-10; Table 4-4)。

4-2-4. FA 對再灌流 2、10、24 及 36 小時後 TUNEL 陽性細胞表現之影響

TUNEL 染色主要用於偵測凋亡細胞。再灌流 2 小時僅出現少量 TUNEL 陽性細胞於各組梗塞區中；再灌流 10、24 及 36 小時，與 sham 組相較，control 組及 FA 組之 TUNEL 陽性細胞於半陰影區均顯著增加(both $p < 0.01$)，而 FA 組之 TUNEL 陽性細胞則顯著低於 control 組($p < 0.05$; Figure 4-11; Table 4-4)。在皮質及紋狀體梗塞區中，再灌流 24 及 36 小時，control 組及 FA 組之 TUNEL 陽性細胞數均顯著高於 sham 組(both $p < 0.01$)，然而，FA 組之 TUNEL 陽性細胞仍顯著低於 control 組($p < 0.05$; Figure 4-11; Table 4-4)。

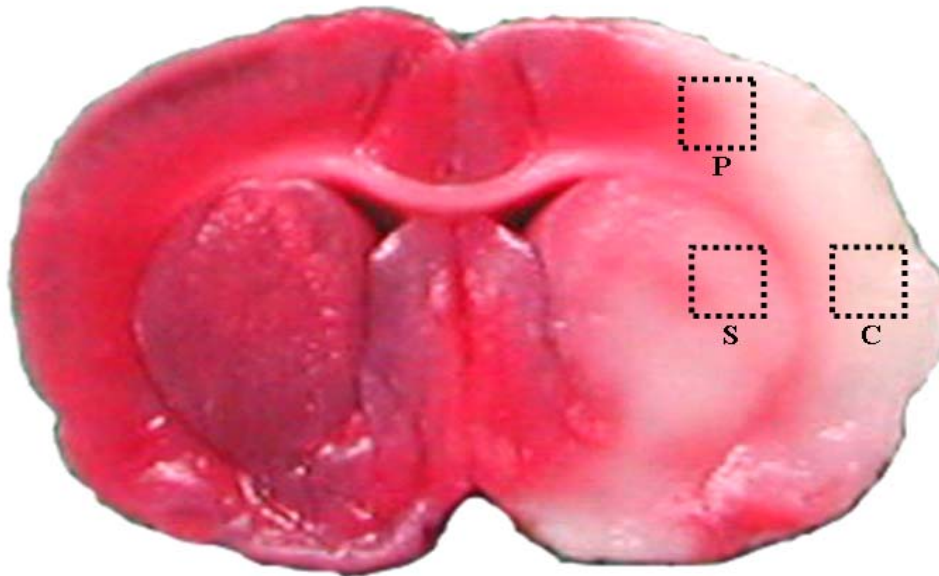


Figure 4-7. Representative photograph showed the brain coronal section (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride stain; TTC stain) located on the posterior bregma 0.92 mm position. The dotted line squares indicated the areas for evaluating positive cells. P: penumbra area of the cortex; C: ischemic core area of the cortex; S: ischemic core area of the striatum. Dotted square=1 mm²

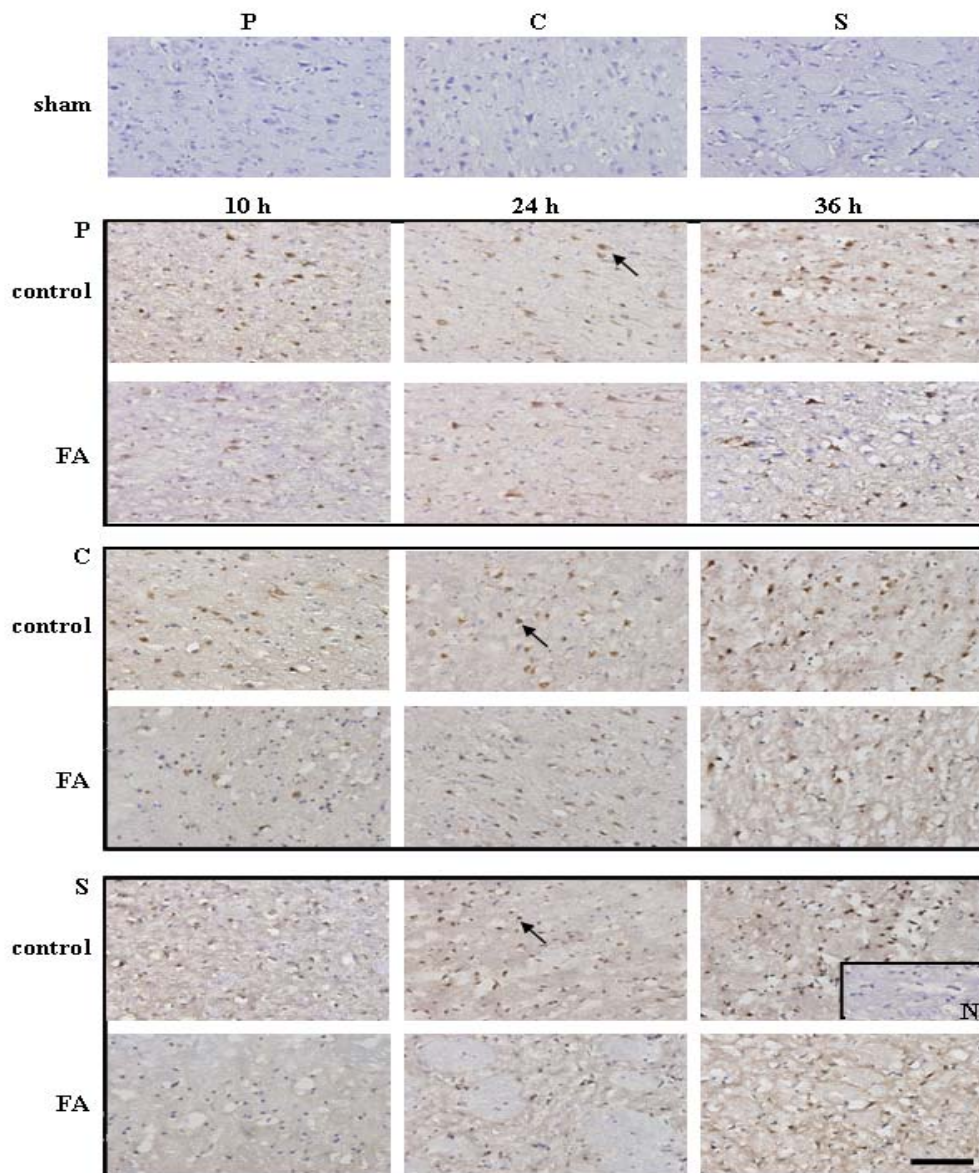


Figure 4-8. Representative photographs depicted the expression of Mac-1 in the penumbra and ischemic core areas at 10, 24, and 36 h of reperfusion. P: penumbra area of the cortex; C: ischemic core area of the cortex; S: ischemic core area of the striatum; N: negative control of stain; 10 h: sacrificed at 10 h of reperfusion; 24 h: sacrificed at 24 h of reperfusion; 36 h: sacrificed at 36 h of reperfusion; sham: sham group; control: control group; FA: ferulic acid-treated group. Arrows indicated Mac-1 positive cells. Scale bar=100 μ m

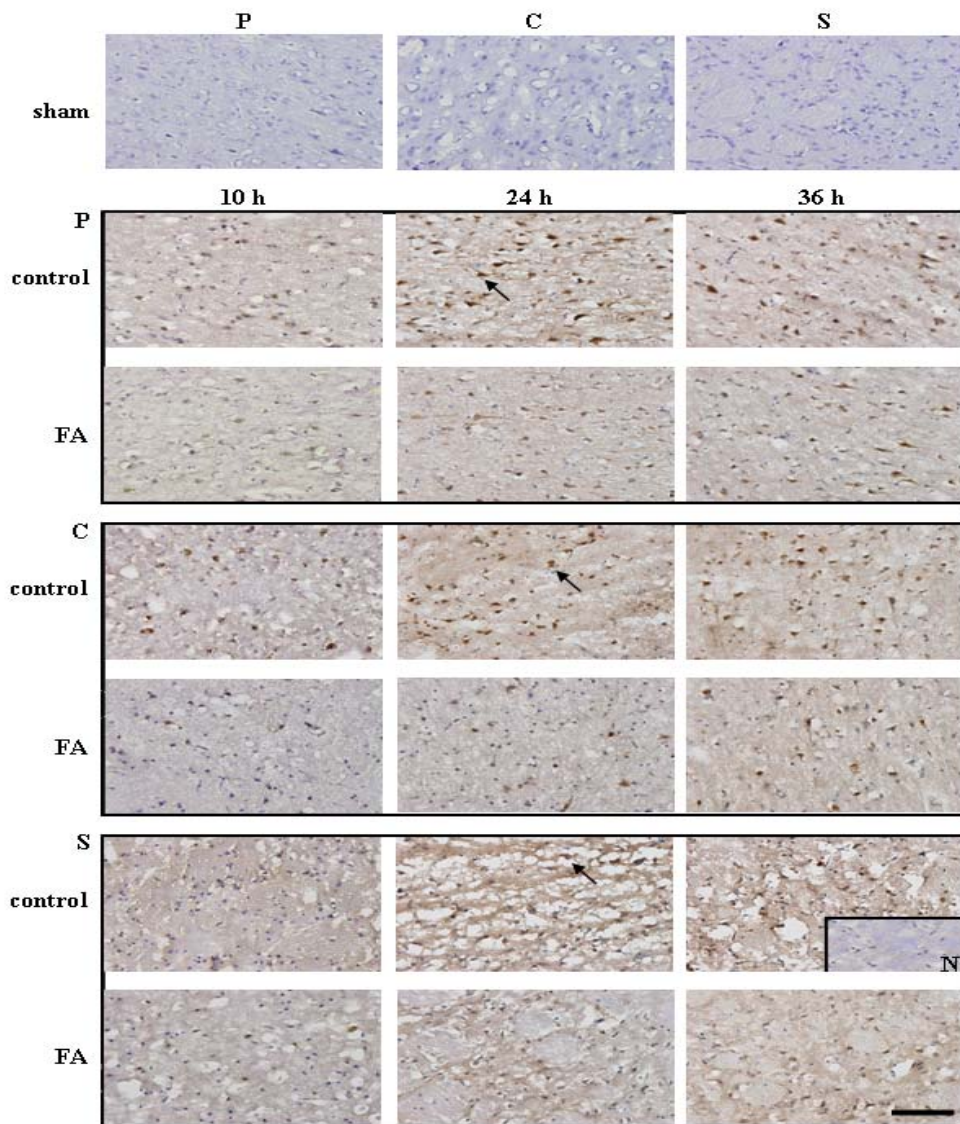


Figure 4-9. Representative photographs depicted the expression of 4-HNE in the penumbra and ischemic core areas at 10, 24 and 36 h of reperfusion. P: penumbra area of the cortex; C: ischemic core area of the cortex; S: ischemic core area of the striatum; N: negative control of stain; 10 h: sacrificed at 10 h of reperfusion; 24 h: sacrificed at 24 h of reperfusion; 36 h: sacrificed at 36 h of reperfusion; sham: sham group; control: control group; FA: ferulic acid-treated group. Arrows indicated 4-HNE positive cells. Scale bar=100 μ m

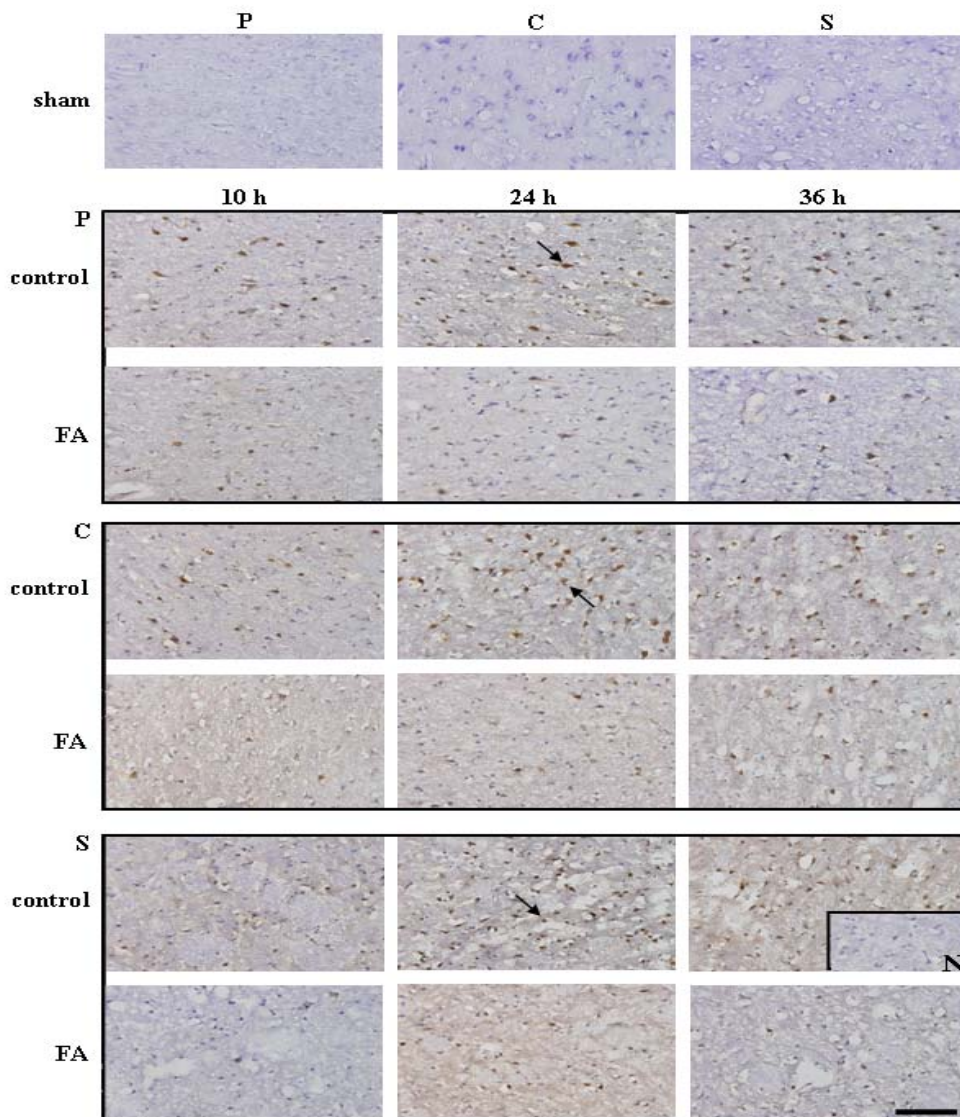


Figure 4-10. Representative photographs depicted the expression of 8-OHdG in the penumbra and ischemic core areas at 10, 24 and 36 h of reperfusion. P: penumbra area of the cortex; C: ischemic core area of the cortex; S: ischemic core area of the striatum; N: negative control of stain; 10 h: sacrificed at 10 h of reperfusion; 24 h: sacrificed at 24 h of reperfusion; 36 h: sacrificed at 36 h of reperfusion; sham: sham group; control: control group; FA: ferulic acid-treated group. Arrows indicated 8-OHdG positive cells. Scale bar=100 μ m

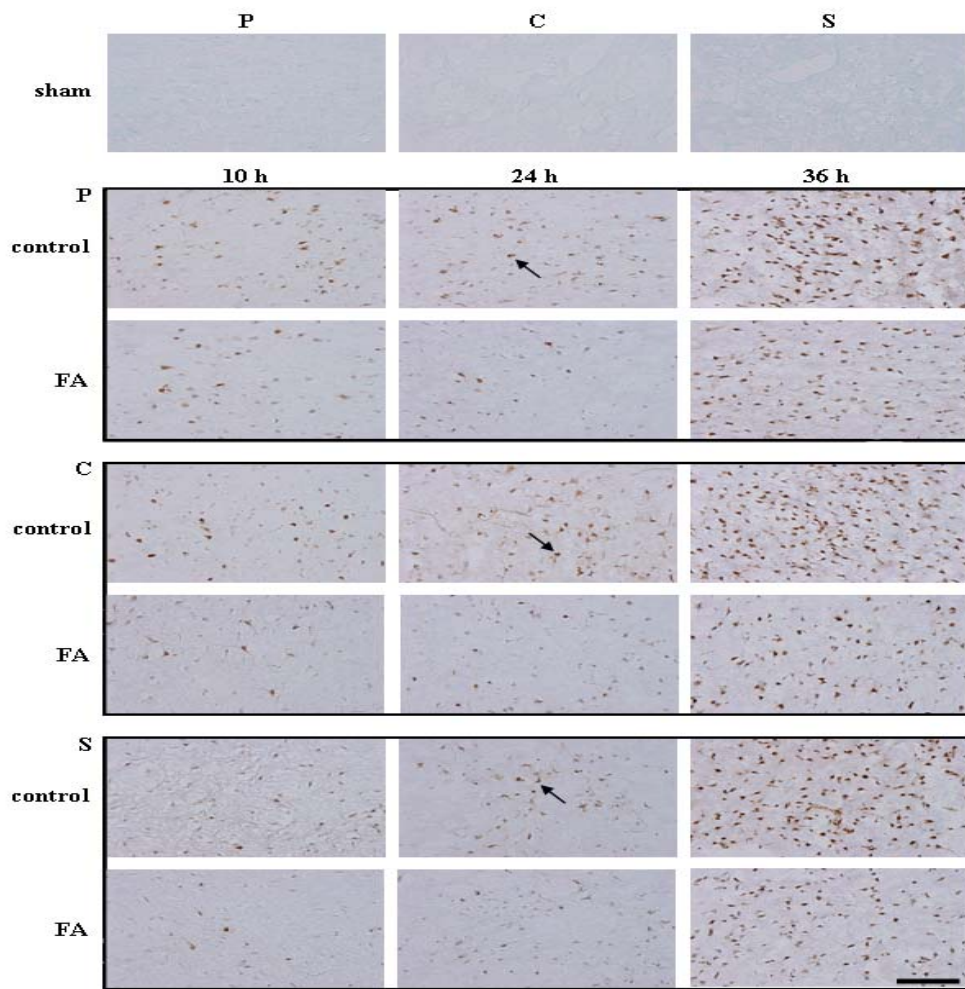


Figure 4-11. Representative photographs depicted the distribution of TUNEL positive cells in the penumbra and ischemic core areas at 10, 24 and 36 h of reperfusion. P: penumbra area of the cortex; C: ischemic core area of the cortex; S: ischemic core area of the striatum; 10 h: sacrificed at 10 h of reperfusion; 24 h: sacrificed at 24 h of reperfusion; 36 h: sacrificed at 36 h of reperfusion; sham: sham group; control: control group; FA: ferulic acid-treated group. Arrows indicated TUNEL positive cells. Scale bar=100 μ m

4-2-5. FA 對再灌流 10 小時後 active caspase 3 及 active caspase 3-NeuN 陽性細胞表現之影響

在 active caspase 3 單獨染色中，再灌流 10 小時 active caspase 3 陽性細胞稀少出現於 sham 組之半陰影區中；同一時間，與 sham 組比較，active caspase 3 陽性細胞於 control 組及 FA 組之半陰影區則顯著呈現(both $p < 0.01$)，而 FA 組於半陰影區之 active caspase 3 陽性細胞則顯著低於 control 組($p < 0.05$; Figure 4-12; Table 4-5)。進一步分析 active caspase 3-NeuN 雙重染色，我們發現 NeuN 陽性細胞大量出現於 sham 組之半陰影區中，而 active caspase 3 陽性細胞同時染上 NeuN 則表現於 control 組及 FA 組中，其 active caspase 3-NeuN 雙重染色陽性細胞所呈現之分布數量型態與 active caspase 3 單獨染色中所呈現相同(Figure 4-12)。

4-2-6. FA 對再灌流 36 小時後 NeuN 陽性細胞表現之影響

NeuN 陽性細胞大量呈現於 sham 組中，而缺血區中之神經元則呈皺縮及三角型狀(Figure 4-13)。相較於 sham 組之半陰影區，control 組之 NeuN 陽性細胞數顯著下降($p < 0.01$)，相反地，FA 組相較於 control 組則顯著上升 NeuN 陽性細胞之表現($p < 0.05$; Figure 4-13; Table 4-5)。在皮質及紋狀體梗塞區中，與 sham 組相較，control 組及 FA 組顯著降低 NeuN 抗原呈現(both $p < 0.01$)，而 FA 組之 NeuN 陽性細胞數則顯著高於 control 組($p < 0.05$; Figure 4-13; Table 4-5)。

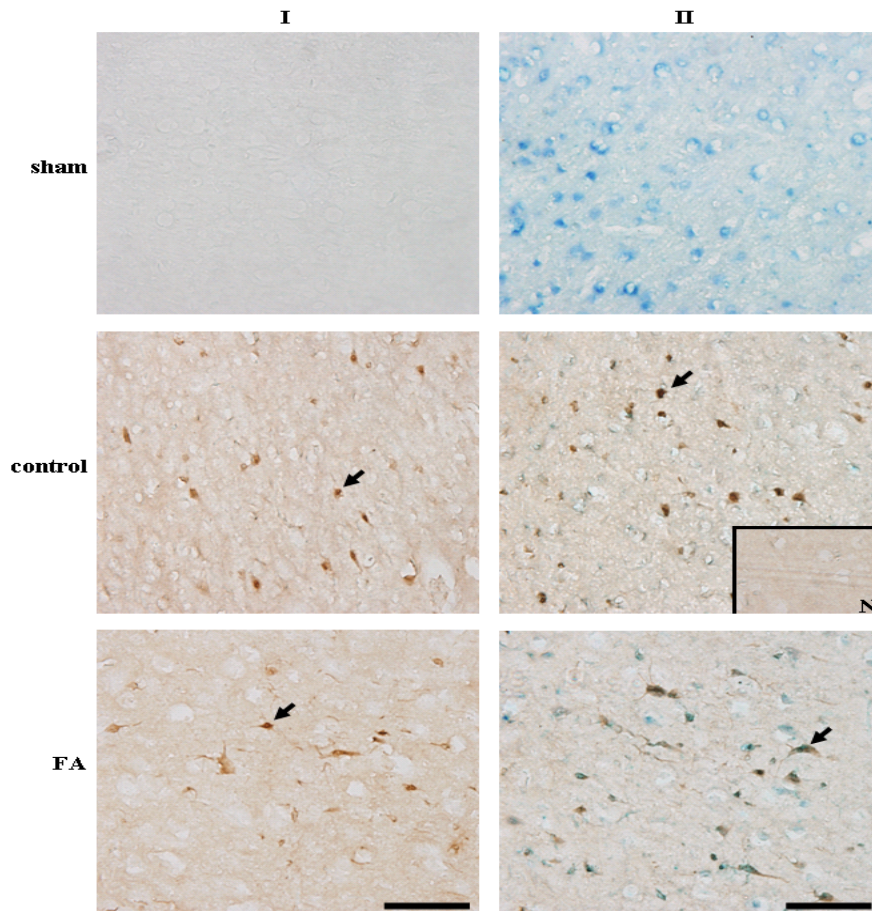


Figure 4-12. Representative photographs depicted active caspase 3 and NeuN expression in the penumbra area at 10 h of reperfusion. Sham: sham group; control: control group; FA: ferulic acid-treated group; I: active caspase 3 single staining; II: active caspase 3-NeuN double staining; N: negative control of stain. Arrows in I and II showed active caspase 3-labeled cells and active caspase 3-NeuN double-labeled cells, respectively. Scale bars=100 μ m

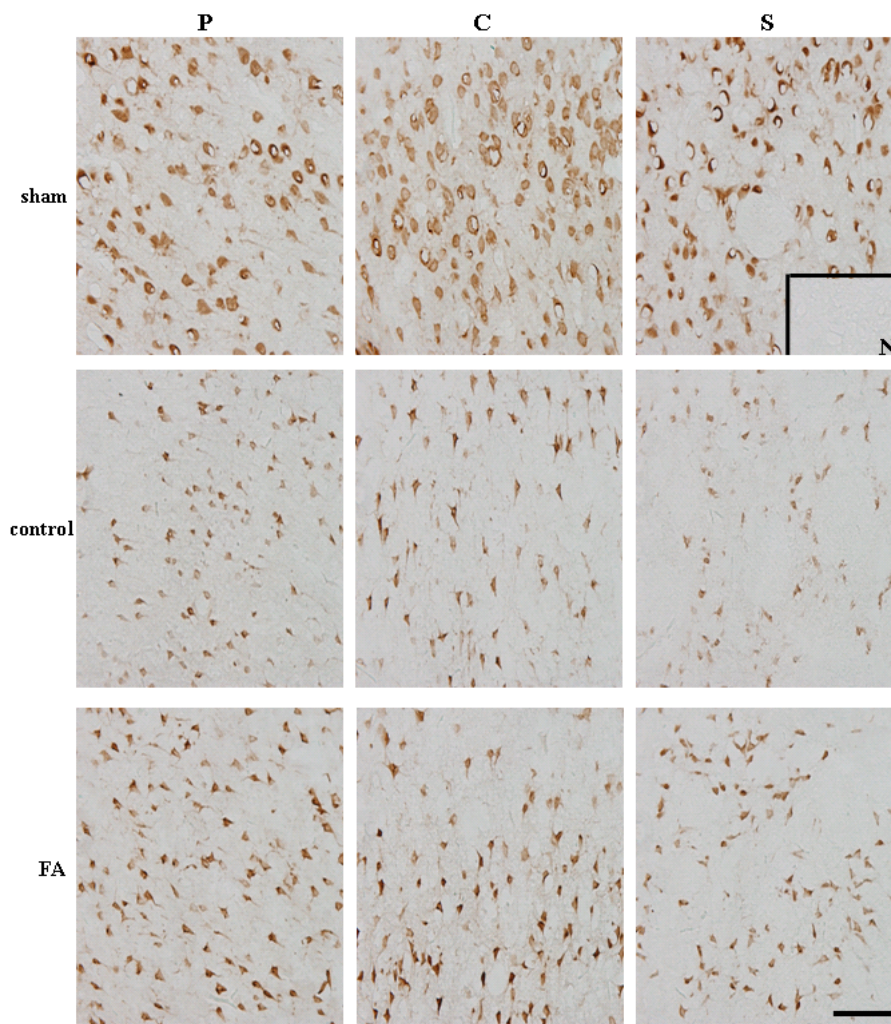


Figure 4-13. Representative photographs depicted NeuN expression in the penumbra and ischemic core areas at 36 h of reperfusion. P: penumbra area of the cortex; C: ischemic core area of the cortex; S: ischemic core area of the striatum; N: negative control of stain; sham: sham group; control: control group; FA: ferulic acid-treated group. Scale bar= 100 μ m

Table 4-4. The effects of ferulic acid on Mac-1, 4-HNE, 8-OHdG and TUNEL positive cells (counts/1 mm²)

	2 h (n=6)	10 h (n=5)	24 h (n=6)	36 h (n=3)
Mac-1				
penumbra				
sham	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.9	0.3 ± 0.8	0.3 ± 0.6
control	0.5 ± 0.8	208.6 ± 30.5*	227.3 ± 29.1*	319.7 ± 49.4*
FA	0.2 ± 0.4	99.6 ± 11.6*#	108.8 ± 27.7*#	156.0 ± 47.2*#
cortex				
sham	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.9	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0
control	0.7 ± 0.8	173.0 ± 24.5*	206.2 ± 41.6*	486.0 ± 56.4*
FA	0.5 ± 0.8	75.0 ± 12.9*#	90.3 ± 20.2*#	188.0 ± 32.1*#
striatum				
sham	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
control	1.3 ± 2.4	116.4 ± 20.3*	194.8 ± 45.0*	345.3 ± 86.5*
FA	1.3 ± 2.4	47.2 ± 15.3*#	84.7 ± 29.7*#	168.7 ± 28.0*#
4-HNE				
penumbra				
sham	0.0 ± 0.0	1.8 ± 3.5	0.7 ± 1.0	0.0 ± 0.0
control	0.2 ± 0.4	208.0 ± 18.3*	320.5 ± 41.0*	302.3 ± 65.5*
FA	1.5 ± 2.4	95.2 ± 16.7*#	175.5 ± 27.4*#	185.3 ± 11.9*#

Data were presented as Mean ± SD. Mac-1: Mac-1 positive cells; 4-HNE: 4-HNE positive cells; 8-OHdG: 8-OHdG positive cells; TUNEL: TUNEL positive cells; penumbra: penumbra area of the cortex; cortex: ischemic core area of the cortex; striatum: ischemic core area of the striatum; sham: sham group; control: control group; FA: ferulic acid-treated group; 2 h: sacrificed at 2 h of reperfusion; 10 h: sacrificed at 10 h of reperfusion; 24 h: sacrificed at 24 h of reperfusion; 36 h: sacrificed at 36 h of reperfusion. *p<0.01 compared with the sham group; #p<0.05 compared with the control group.

Table 4-4. 續

	2 h (n=6)	10 h (n=5)	24 h (n=6)	36 h (n=3)
cortex				
sham	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.5	1.2 ± 2.0	0.0 ± 0.0
control	0.2 ± 0.4	289.0 ± 44.5*	333.3 ± 29.0*	401.7 ± 24.6*
FA	0.2 ± 0.4	126.0 ± 27.6*#	155.2 ± 33.2*#	164.7 ± 30.5*#
striatum				
sham	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.8 ± 1.2	0.0 ± 0.0
control	2.2 ± 4.0	214.4 ± 34.0*	232.5 ± 35.0*	260.7 ± 50.6*
FA	2.7 ± 2.4	78.4 ± 13.2*#	104.8 ± 41.1*#	98.7 ± 17.5*#
8-OHdG				
penumbra				
sham	0.2 ± 0.4	3.8 ± 8.5	0.3 ± 0.8	0.0 ± 0.0
control	0.0 ± 0.0	147.2 ± 23.7*	278.7 ± 48.0*	250.7 ± 52.0*
FA	0.8 ± 1.6	53.8 ± 15.0*#	102.0 ± 21.0*#	137.0 ± 28.2*#
cortex				
sham	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
control	1.0 ± 1.7	155.6 ± 20.6*	334.7 ± 34.8*	430.3 ± 25.9*
FA	0.2 ± 0.4	62.4 ± 17.0*#	140.3 ± 26.0*#	229.3 ± 7.8*#
striatum				
sham	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.5	0.0 ± 0.0	2.0 ± 2.7
control	1.8 ± 3.6	90.4 ± 36.6*	234.5 ± 42.0*	258.0 ± 56.2*
FA	0.0 ± 0.0	31.6 ± 9.2*#	111.0 ± 37.0*#	142.0 ± 13.0*#
TUNEL				

Table 4-4. 續

	2 h (n=6)	10 h (n=5)	24 h (n=6)	36 h (n=3)
penumbra				
sham	0.0 ± 0.0	0.6 ± 1.3	2.3 ± 2.7	3.3 ± 2.9
control	1.5 ± 3.2	102.6 ± 20.7*	184.3 ± 26.4*	587.7 ± 57.1*
FA	0.2 ± 0.4	45.8 ± 20.0*#	93.3 ± 31.2*#	445.3 ± 27.6*#
cortex				
sham	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
control	0.2 ± 0.4	25.3 ± 29.3	119.3 ± 26.6*	506.0 ± 62.4*
FA	0.0 ± 0.0	16.8 ± 12.6	66.0 ± 15.3*#	314.3 ± 49.2*#
striatum				
sham	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
control	0.0 ± 0.0	22.2 ± 9.2	104.0 ± 26.4*	657.0 ± 46.5*
FA	0.2 ± 0.4	13.8 ± 9.1	60.2 ± 11.1*#	445.3 ± 106.6*#

Table 4-5. The effects of ferulic acid on active caspase 3 and NeuN-labeled cells (counts/1 mm²)

	10 h (n=5)	36 h (n=3)
Active caspase 3		
penumbra		
sham	0.1 ± 1.1	

Data were presented as Mean ± SD. Active caspase 3: active caspase 3-labeled cells; NeuN: NeuN-labeled cells; penumbra: penumbra area of the cortex; cortex: ischemic core area of the cortex; striatum: ischemic core area of the striatum; sham: sham group; control: control group; FA: ferulic acid-treated group; 10 h: sacrificed at 10 h of reperfusion; 36 h: sacrificed at 36 h of reperfusion. *p<0.01 compared with the sham group; #p<0.05 compared with the control group.

Table 4-5. 續

	10 h (n=5)	36 h (n=3)
control	115.8 ± 12.9*	
FA	61.8 ± 8.9*#	
NeuN		
penumbra		
sham		1429.0 ± 139.9
control		815.7 ± 147.6*
FA		1178.7 ± 64.4#
cortex		
sham		1624.7 ± 190.9
control		591.0 ± 105.1*
FA		1018.7 ± 151.1*#
striatum		
sham		1650.3 ± 246.3
control		476.3 ± 36.5*
FA		924.3 ± 108.7*#



第五章 討論

在本研究第一階段中，我們發現於中大腦動脈阻塞的同時立即給予 FA 劑量為 80 mg/kg 及 100 mg/kg，於再灌流 24 小時可有效降低腦梗塞面積及改善神經缺陷；同時我們也發現 FA 於中大腦動脈阻塞後 30 分鐘給予劑量 100 mg/kg 亦可抑制梗塞面積及改善神經學之表現。我們實驗結果確認了先前研究⁽⁴⁸⁾發現 FA 於大鼠中大腦動脈阻塞模型中具有抗局限性腦梗塞的效用。此外我們亦發現於暫時性中大腦動脈阻塞模型中，FA 100 mg/kg 具有 30 分鐘之治療窗口(therapeutic window)降低梗塞面積。

在腦缺血-再灌流損傷中，於神經細胞及血管內皮細胞之粒腺體為超氧陰離子產生之主要來源，而腦再灌流期間，超氧陰離子的產生可藉由腦-血管障壁破壞(BBB disruption)及細胞氧化損傷(oxidative cellular injury)引發腦水腫(brain edema)⁽¹²³⁻¹²⁵⁾。目前已有許多證據顯示具有抗氧化能力之藥物可提供神經保護之效用，而在暫時性局限性腦缺血中可降低腦梗塞體積⁽¹²⁶⁾⁽¹²⁷⁾。在本研究中 oxidized hydroethidine 陽性細胞為腦實質梗塞區之超氧陰離子標記⁽¹²⁸⁾，再灌流 2 小時，oxidized hydroethidine 陽性細胞於皮質及紋狀體梗塞區顯著上升，而此時 FA 可有效地抑制超氧陰離子於腦實質梗塞區的顯現。以上結果顯示 FA 可於再灌流早期經由抑制腦實質梗塞區產生超氧陰離子之作用而提供抗氧化之功效(antioxidative effect)。

ICAM-1 表現於微血管之內皮細胞上，於暫時性中大腦動脈阻塞損傷模型中，再灌流 2 小時顯著增加，並於再灌流 46 小時達到高峰⁽¹²⁹⁾⁽¹³⁰⁾。先前研究指出於再灌流期間，ICAM-1 可藉由與活化白血球作用而產生超氧陰離子⁽¹⁴⁾⁽¹³¹⁾，所產生之超氧陰離子進一步促發 ICAM-1 的顯現，

ICAM-1 接著誘發 polymorphonuclear leukocytes (PMN)黏附至血管內皮細胞⁽¹²⁵⁾⁽¹³²⁾。由上可知，ICAM-1 既是超氧陰離子的成因，亦是超氧陰離子誘發產物，兩者形成正迴饋誘發表現。而於再灌流期間，ICAM-1 與超氧陰離子彼此之間相互誘發產生，更進一步惡化續發性腦損傷。先前研究指出 anti-ICAM-1 抗體於暫時性中大腦動脈阻塞損傷中可抑制活化白血球的滲透，而此功用伴隨自由基的抑制，使得 anti-ICAM-1 抗體具有降低腦梗塞損傷之效用⁽¹³³⁾。在本實驗免疫組織化學染色分析中，再灌流 2 小時 ICAM-1 顯著表現於紋狀體梗塞區，再灌流 24 小時 ICAM-1 顯著表現擴展至皮質梗塞區。而 FA 則可於上述時間點有效地抑制 ICAM-1 由紋狀體梗塞區擴展至皮質梗塞區之表現。較早的研究報告已說明了再灌流初期 ICAM-1 於皮質及紋狀體梗塞區之分布差異，並且將此差異歸因於梗塞區受腦缺血-再灌流(ischemia-reperfusion; I/R)損傷的程度⁽³⁴⁾。腦缺血-再灌流初期皮質梗塞區較低的 ICAM-1 表現乃是因皮質梗塞區再灌流初期仍有部分前大腦動脈之側支循環形成較輕微的 I/R 損傷。由上可知，FA 不但具有抗氧化效用，更可於再灌流 2 小時紋狀體 I/R 損傷區有效抑制超氧陰離子與 ICAM-1 彼此之間惡性循環，並於再灌流 24 小時將此抑制 ICAM-1 效應擴展至皮質梗塞區。

MPO 存在於中性球之 azurophilic granules 中，於梗塞區可當成活化白血球之滲透標記⁽³¹⁾⁽¹³⁴⁾⁽¹³⁵⁾。MPO 的顯現可惡化腦缺血-再灌流損傷，於中大腦動脈阻塞損傷中，梗塞核心之 MPO 表現開始於再灌流 12 小時，於再灌流 24-72 小時達到高峰⁽¹³⁶⁾。值得注意的是，活化白血球滲透與腦損傷的進展有密切的關聯，因而在再灌流晚期，皮質梗塞區之 MPO 表現高於紋狀體梗塞區⁽¹³⁵⁾⁽¹³⁶⁾。先前研究報告顯示中性球的滲透和腦梗塞有密切關聯，而在大鼠中大腦動脈阻塞模型中，藥物可經由消耗周邊血循環中之中性球或抑制中性球聚集於梗塞核心區而達到神經保護之效

用⁽³³⁾⁽¹³⁷⁾⁽¹³⁸⁾。在本實驗中，MPO 免疫陽性細胞於再灌流 24 小時皮質梗塞核心區(紋狀體梗塞核心區則無)顯著呈現，在同一時間，FA 則可有效地降低皮質梗塞區之 MPO 免疫陽性細胞表現。根據以上結果，我們推測再灌流 2 小時 ICAM-1 於紋狀體梗塞區即可誘發活化白血球的黏附作用，接著活化白血球逐漸從紋狀體梗塞區遷移且聚集至皮質梗塞核心區，於再灌流晚期白血球的遷移伴隨著腦梗塞的惡化。相反地，FA 有效地抑制 ICAM-1 於紋狀體 I/R 損傷區之顯現，此效用等於阻止活化白血球初始的黏附與遷移，由此可知 FA 抗腦缺血損傷效用開始於再灌流 2 小時。據此，我們更進一步推測 FA 於再灌流 24 小時降低腦梗塞面積及改善神經學缺陷至少部分是來自再灌流早期於紋狀體損傷區調降 ICAM-1 表現之效用。

在黏附及遷移的過程中，活化白血球會大量釋放包括有 ROS 等毒害物質，而 ROS 經由細胞內氧化損傷誘發 I κ B α degradation，形成 NF- κ B 在細胞質活化，通常 NF- κ B 活化開始於腦缺血後 3 小時，並於缺血後 16 小時達到高峰⁽¹³⁹⁾⁽¹⁴⁰⁾。活化之 NF- κ B 會轉置(translocate)至細胞核，結合在特殊的位置上誘發包括 cytokines、chemokines 及 adhesion molecules 等基因的產生。因此，於中大腦動脈阻塞-再灌流期間，ICAM-1 表現與 NF- κ B 的活化呈現正向迴饋關係。近來一些研究報告指出 NF- κ B 具有不同的效應，NF- κ B 究竟是扮演神經保護(neuroprotection)或是神經退化(neurodegeneration)的角色目前仍有爭議⁽¹⁴¹⁾⁽¹⁴²⁾。然而，一些研究報告清楚指出於中大腦動脈阻塞大鼠中可藉由抑制 NF- κ B 活化的治療策略達到抗炎症反應(anti-inflammatory)之效用⁽¹⁴⁰⁾⁽¹⁴²⁾。根據本實驗結果得知，NF- κ B 免疫陽性細胞於再灌流 2 小時皮質及紋狀體梗塞區稀疏呈現，於再灌流 24 小時則大量增加。然而，FA 則可有效地抑制 NF- κ B 免疫陽性細胞的增加。進一步分析得知，FA 可藉由先前再灌流早期於紋狀體梗

塞區抑制 ICAM-1 的表現，進一步於再灌流 24 小時抑制了 ICAM-1 及 NF- κ B 彼此之間惡性循環。由以上實驗結果，我們推測 FA 於再灌流期間抑制了梗塞核心區 ICAM-1 及 NF- κ B 彼此作用所產生的炎症反應，進而發揮神經保護效用。

綜合言之，FA 於再灌流早期抑制超氧陰離子的顯現，且於紋狀體梗塞區抑制 ICAM-1 的表現；接著 FA 亦藉由調降 ICAM-1 與 NF- κ B 彼此之間的作用而抑制 polymorphonuclear leukocytes 遷移至梗塞核心區，進一步於再灌流 24 小時顯著抑制活化白血球遷移至皮質梗塞核心區而發揮神經細胞保護效用。

接著討論本研究第二階段。第二階段實驗老鼠於腦缺血前 10 分鐘及腦缺血後 90 分鐘偵測動脈血液中 pH、pO₂、pCO₂ 及血糖，結果 sham、control 及 FA 組均無統計學的差異，顯示腦缺血過程及 FA 治療均不影響生理指標，且所有老鼠均在相同生理狀況下進行實驗。

先前研究顯示於暫時性中大腦動脈阻塞模型中，ICAM-1 mRNA 於再灌流 1-4 小時顯著呈現於梗塞區⁽¹¹⁾⁽⁴⁴⁾⁽¹⁴³⁾。在本實驗第一及第二階段研究中，我們發現 ICAM-1 mRNA 及其免疫陽性血管於再灌流 2 小時可於紋狀體梗塞區同時顯現，而 FA 有效劑量 100 mg/kg 於中大腦動脈阻塞開始時給予靜脈注射，可顯著降低 ICAM-1 mRNA 及其免疫陽性血管於再灌流 2 小時紋狀體梗塞區之表現；此外在同一時間，雖 Mac-1 mRNA 尚未於紋狀體梗塞區顯著表現，但 FA 有效劑量仍可先行降低 Mac-1 mRNA 之表現量。值得注意的是再灌流 2 小時，FA 並無調降 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 等這些缺血後炎症反應上游基因表現之效用。一些研究報告指出具有再灌流早期抑制 ICAM-1 mRNA 之藥物，其伴隨有抑制活化白血球進入腦實質梗塞區之效用⁽⁴⁴⁾⁽¹⁴³⁾⁽¹⁴⁴⁾。因而，我們合理推測再灌流 10-36 小時 FA 於半陰影區及梗塞核心區有效抑制 Mac-1(microglia /

macrophages 之標記)表現,此乃導因於再灌流早期(2 小時) FA 對 ICAM-1 mRNA 先行抑制所致。

ROS 於再灌流期間主要產生於活化白血球及微膠細胞, ROS 接著損傷神經細胞形成 4-HNE 及 8-OHdG 等氧化損傷副產物, 而這些副產物於局限性腦缺血損傷中再灌流 3 小時顯著增加且可持續至再灌流 72 小時⁽³⁹⁻⁴²⁾⁽¹⁴⁵⁾。近來一些研究報告於腦缺血-再灌流損傷模型中發現抗 4-HNE 及 8-OHdG 藥物具有顯著之神經保護作用⁽³⁵⁾⁽¹⁴⁶⁾。在本實驗免疫組織化學分析中, 我們發現再灌流 10-36 小時於半陰影區及皮質、紋狀體梗塞區 activated microglia / macrophages (Mac-1)的顯現與氧化損傷產物(4-HNE and 8-OHdG)有密切正相關, 另一方面我們發現 FA 可於上述期間於半陰影區及梗塞區有效地抑制氧化損傷產物的表現。進一步分析發現於再灌流 10-36 小時期間 FA 之抗氧化損傷效用至少部分來至於先前降低 activated microglia / macrophages 效用所致。

在腦缺血期間, 嚴重腦缺血損傷造成細胞快速且不可恢復的損傷, 最終形成細胞壞死(necrosis); 另一方面, 細胞忍受輕微的缺血損傷, 維持細胞體及胞器之完整性, 細胞則進行計畫性死亡(programmed cell death)或細胞凋亡(apoptosis)⁽¹⁴⁷⁾。根據細胞型態變化, 腦缺血梗塞區凋亡細胞主要為神經細胞⁽¹⁴⁸⁾⁽¹⁴⁹⁾。在腦缺血損傷中凋亡細胞最早於缺血後 6 小時出現於半陰影區, 而在缺血後 24-48 小時則大量出現於半陰影區及皮質梗塞區⁽¹⁵⁰⁾⁽¹⁵¹⁾。在本研究 TUNEL 分析中, 我們發現再灌流 10 小時凋亡細胞顯現於半陰影區, 而再灌流 24-36 小時則大量顯現於半陰影區及梗塞區, 顯然我們的研究結果和先前的研究報告⁽¹⁵⁰⁾⁽¹⁵¹⁾是一致的。先前研究報告指出, 在腦缺血-再灌流期間自由基攻擊梗塞區神經細胞主要成分, 促發大量導因於氧化損傷之神經細胞凋亡⁽³⁸⁾⁽¹⁵²⁾⁽¹⁵³⁾; 此外, 進一步發現一些具有潛力之抗氧化藥物亦可藉由抑制細胞凋亡來達到神經保

護的效用⁽¹⁴⁵⁾⁽¹⁴⁸⁾⁽¹⁵⁴⁾。先前已提及 FA 具有抑制氧化損傷所引發 4-HNE 及 8-OHdG 之效用，進一步分析得知 FA 再灌流 10 小時於半陰影區開始具有抗細胞凋亡效用，而在再灌流 24 及 36 小時 FA 將此抑制氧化損傷相關之細胞凋亡效用擴展至皮質及紋狀體梗塞區中。

在暫時性中大腦動脈阻塞模型中，細胞凋亡可分為 caspase-dependent 及 caspase-independent 之訊號傳遞路徑。而在 caspase-dependent 及 caspase-independent 的路徑中 DNA 斷裂(DNA fragmentation)之執行者分別為 caspase 3 及 apoptosis-inducing factor⁽¹⁵⁵⁾。先前研究報告指出在腦缺血損傷中 4-HNE 及 8-OHdG 所引發之細胞凋亡和 caspase 3 活化有密切關聯⁽¹⁴⁹⁾⁽¹⁵⁶⁾。Active caspase 3 為重要之細胞凋亡執行者，不可逆地促發細胞進行細胞核濃縮(nuclear condensation)及 DNA 斷裂，此外在腦缺血 6-12 小時，active caspase 3 顯著表現於半陰影區中⁽⁷⁾⁽¹⁵⁷⁾。在 active caspase 3 和 NeuN 的雙重染色中，我們發現 active caspase 3 免疫陽性細胞分布情形相同於細胞凋亡，active caspase 3 存在於神經細胞且於再灌流 10 小時顯現於半陰影區中，縱使如此，FA 仍有效地抑制了 caspase 3 免疫陽性細胞的顯現。根據這些發現，我們合理推測 FA 可於半陰影區降低由 active caspase 3 所促發之細胞凋亡，而這也顯示 FA 再灌流 10 小時於潛在治療介入區(半陰影區)具有神經保護及晚期再灌流期間避免神經細胞進一步擴大損傷之重要效用。

NeuN 為成熟神經細胞之標記，存在於鼠類神經細胞之細胞體及細胞核中⁽¹⁵⁸⁾。直至目前為止，NeuN 免疫陽性細胞是否可當成存活神經細胞的證據仍有些許爭議⁽¹²²⁾⁽¹⁵⁸⁾⁽¹⁵⁹⁾；縱使如此，在本研究中再灌流 36 小時，NeuN 之抗原表現於半陰影區及梗塞區顯著降低，而在此同時，FA 可有效地提升 NeuN 的抗原表現。近來研究指出於暫時性局限性腦缺血中細胞凋亡於 NeuN 免疫陽性細胞中促發產生⁽¹⁶⁰⁾⁽¹⁶¹⁾。令人感到興趣的是，

我們發現再灌流 36 小時細胞凋亡和 NeuN 於各實驗組彼此之間似乎呈現負迴饋(negative feedback)的表現關係，可能在細胞凋亡的過程中致使神經細胞損失 NeuN 抗原或甚至死亡，確切的原因還須進一步探討；但無論如何，可以確定的是，再灌流 36 小時，FA 於細胞凋亡損傷變化中可有效地保存神經細胞。

綜合而言，於再灌流 2 小時紋狀體梗塞區，FA 最先藉由抑制 ICAM-1 mRNA 的顯現提供神經保護的效用，而此效用進一步抑制 Mac-1 mRNA 的表現。當 Mac-1 之表現於紋狀體梗塞區受抑制時，再灌流 10-36 小時 FA 可進一步將此抗 Mac-1 及抗 Mac-1 所誘發氧化損傷(4-HNE 及 8-OHdG)之效用由紋狀體梗塞區擴展至皮質半陰影區及梗塞區。當氧化損傷產物 4-HNE 及 8-OHdG 於半陰影區及梗塞區被抑制時，FA 可於再灌流 10 小時抑制半陰影區氧化損傷相關之細胞凋亡，進而於再灌流 36 小時顯著保存半陰影區及梗塞區之神經細胞而發揮神經保護的療效。本研究第一次發現 FA 可於暫時性中大腦梗塞模型中再灌流期間藉由抑制 ICAM-1 mRNA 的表現來達到神經保護的效用。

先前研究報告指出於腦梗塞之動物模型中，抗 ICAM-1 抗體和纖維蛋白溶解酶原活化因子(plasminogen activator; tPA)結合治療可延長治療窗口⁽¹⁶²⁾⁽¹⁶³⁾。在本研究中，FA 可於再灌流早期降低 ICAM-1 mRNA 的表現，由此推測於暫時性中大腦梗塞損傷中，FA 提供了具潛力延長治療窗口之藥物選擇。

第六章 結論

在中大腦動脈阻塞損傷模型中，阿魏酸(100 mg/kg)於再灌流 24 小時具有降低腦梗塞面積及神經學缺陷之療效，而其神經保護機轉包括再灌流早期超氧陰離子及 ICAM-1 mRNA 抑制作用，而此抗氧化及抗炎症效用可於再灌流晚期進一步抑制 NF- κ B、activated microglia / macrophages、氧化損傷及氧化損傷相關之細胞凋亡。

本論文前面提及目前臨床治療缺血性腦中風較明確有效的是 t-PA，但它在臨床使用有很嚴格的限制及很短的治療窗口(腦缺血發生 3 小時內方可使用)。除此之外，臨床治療還面臨一項相當大的挑戰，即是腦缺血-再灌流後之損傷。血栓去除後氧再度進入病灶，伴隨炎症反應、氧化自由基的產生，加重續發性腦損傷。本研究發現阿魏酸可於腦缺血-再灌流早期藉由抗氧化(抑制超氧陰離子)及抑制 ICAM-1 達到神經保護效用，已有研究指出血管內皮 ICAM-1 的表現與腦缺血-再灌流損傷呈正向關係，而阿魏酸可於再灌流期間抑制 ICAM-1 的表現，這顯示了兩個意義：阿魏酸進到腦病灶血管即可開始進行保護效用，以及具有延長治療窗口至再灌流期間之療效潛力。更重要的是阿魏酸不僅是多種中藥的有效成分，更是普遍存在自然界水果、蔬菜及穀類中，和一些新藥開發動輒數十億美元相比，阿魏酸顯然具備了價廉經濟的莫大優勢。展望今後，除了更深入探討阿魏酸對抗急、慢性腦缺血效用機轉外，在臨床上也應進行有計畫中藥(如當歸、川芎水煎劑)治療缺血性腦中風病患之療效評估。透過不斷且深入之阿魏酸基礎與臨床研究，以期建立更具潛力抗缺血性腦中風之治療策略。

參考文獻

1. Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007;87:179-197.
2. Fan Y, Yang GY. Therapeutic angiogenesis for brain ischemia: a brief review. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2007;2:284-289.
3. Kirshner HS. Prevention of secondary stroke and transient ischaemic attack with antiplatelet therapy: the role of the primary care physician [corrected]. *Int J Clin Pract.* 2007;61:1739-1748.
4. 行政院衛生署: 歷年死因統計 2008.
5. van der Worp HB, van Gijn J. Clinical practice. Acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2007;357:572-579.
6. Dickerson LM, Carek PJ, Quattlebaum RG. Prevention of recurrent ischemic stroke. *Am Fam Physician.* 2007;76: 382-388.
7. Shin DH, Bae YC, Kim-Han JS, Lee JH, Choi IY, Son KH, Kang SS, Kim WK, Han BH. Polyphenol amentoflavone affords neuroprotection against neonatal hypoxic-ischemic brain damage via multiple mechanisms. *J Neurochem.* 2006;96:561-572.
8. Connolly ES, Jr. Winfree CJ, Springer TA, Naka Y, Liao H, Yan SD, Stern DM, Solomon RA, Gutierrez-Ramos JC, Pinsky DJ. Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J Clin Invest.* 1996;97:209-216.
9. Wang GJ, Deng HY, Maier CM, Sun GH, Yenari MA. Mild hypothermia reduces ICAM-1 expression, neutrophil infiltration and

- microglia/monocyte accumulation following experimental stroke. *Neuroscience*. 2002;114:1081-1090.
10. Ding Y, Young CN, Li J, Luan X, McAllister JP, 2nd Clark JD, Diaz FG. Reduced inflammatory mediator expression by pre-reperfusion infusion into ischemic territory in rats: a real-time polymerase chain reaction analysis. *Neurosci Lett*. 2003;353:173-176.
11. Khan M, Elango C, Ansari MA, Singh I, Singh AK. Caffeic acid phenethyl ester reduces neurovascular inflammation and protects rat brain following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem*. 2007;102:365-377.
12. Soriano SG, Coxon A, Wang YF, Frosch MP, Lipton SA, Hickey PR, Mayadas TN. Mice deficient in Mac-1 (CD11b/CD18) are less susceptible to cerebral ischemia/reperfusion injury. *Stroke*. 1999;30:134-139.
13. Yang GY, Gong C, Qin Z, Ye W, Mao Y, Betz AL. Inhibition of TNFalpha attenuates infarct volume and ICAM-1 expression in ischemic mouse brain. *Neuroreport*. 1998;9:2131-2134.
14. Ding C, He Q, Li PA. Diabetes increases expression of ICAM after a brief period of cerebral ischemia. *J Neuroimmunol*. 2005;161:61-67.
15. Kato H, Kogure K, Liu XH, Araki T, Itoyama Y. Progressive expression of immunomolecules on activated microglia and invading leukocytes following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res*. 1996;734:203-212.
16. Yang GY, Mao Y, Zhou LF, Gong C, Ge HL, Betz AL. Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) is reduced in permanent

- focal cerebral ischemic mouse brain using an adenoviral vector to induce overexpression of interleukin-1 receptor antagonist. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999;65:143-150.
- 17.Zhang RL, Chopp M, Li Y, Zaloga C, Jiang N, Jones ML, Miyasaka M, Ward PA. Anti-ICAM-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neurology.* 1994;44:1747-1751.
- 18.Arumugam TV, Salter JW, Chidlow JH, Ballantyne CM, Kevil CG, Granger DN. Contributions of LFA-1 and Mac-1 to brain injury and microvascular dysfunction induced by transient middle cerebral artery occlusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287:H2555-H2560.
- 19.Caimi G, Canino B, Ferrara F, Montana M, Musso M, Porretto F, Carollo C, Catania A, Lo Presti R. Granulocyte integrins before and after activation in acute ischaemic stroke. *J Neurol Sci.* 2001;186:23-26.
- 20.Hickstein DD, Grunvald E, Shumaker G, Baker DM, Back AL, Embree LJ, Yee E, Gollahon KA. Transfected leukocyte integrin CD11b/CD18 (Mac-1) mediates phorbol ester-activated, homotypic cell:cell adherence in the K562 cell line. *Blood.* 1993;82:2537-2545.
- 21.Xu HL, Feng YP. Inhibitory effects of chiral 3-n-butylphthalide on inflammation following focal ischemic brain injury in rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2000;21:433-438.
- 22.Berliner S, Rogowski O, Rotstein R, Fusman R, Shapira I, Bornstein NM, Prochorov V, Roth A, Keren G, Eldor A, Zeltser D. Activated polymorphonuclear leukocytes and monocytes in the peripheral blood of patients with ischemic heart and brain conditions correspond to the

- presence of multiple risk factors for atherothrombosis. *Cardiology*. 2000;94:19-25.
23. Nakase T, Sohl G, Theis M, Willecke K, Naus CC. Increased apoptosis and inflammation after focal brain ischemia in mice lacking connexin43 in astrocytes. *Am J Pathol*. 2004;164:2067-2075.
24. Ueno M, Tomita S, Ueki M, Iwanaga Y, Huang CL, Onodera M, Maekawa N, Gonzalez FJ, Sakamoto H. Two pathways of apoptosis are simultaneously induced in the embryonal brains of neural cell-specific HIF-1alpha-deficient mice. *Histochem Cell Biol*. 2006;125:535-544.
25. Kao TK, Ou YC, Kuo JS, Chen WY, Liao SL, Wu CW, Chen CJ, Ling NN, Zhang YH, Peng WH. Neuroprotection by tetramethylpyrazine against ischemic brain injury in rats. *Neurochem Int*. 2006;48:166-176.
26. Kapadia R, Tureyen K, Bowen KK, Kalluri H, Johnson PF, Vemuganti R. Decreased brain damage and curtailed inflammation in transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta knockout mice following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem*. 2006;98:1718-1731.
27. Miyahara S, Kiryu J, Tsujikawa A, Katsuta H, Nishijima K, Miyamoto K, Yamashiro K, Nonaka A, Honda Y. Argatroban attenuates leukocyte- and platelet-endothelial cell interactions after transient retinal ischemia. *Stroke*. 2003;34:2043-2049.
28. Berti R, Williams AJ, Moffett JR, Hale SL, Velarde LC, Elliott PJ, Yao C, Dave JR, Tortella FC. Quantitative real-time RT-PCR analysis of inflammatory gene expression associated with ischemia-reperfusion brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22:1068-1079.
29. Nurmi A, Vartiainen N, Pihlaja R, Goldsteins G, Yrjanheikki J,

- Koistinaho J. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits translocation of nuclear factor kappa-B in neurons and protects against brain ischaemia with a wide therapeutic time window. *J Neurochem.* 2004;91:755-765.
- 30.Chopp M, Li Y, Jiang N, Zhang RL, Probst J. Antibodies against adhesion molecules reduce apoptosis after transient middle cerebral artery occlusion in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16:578-584.
- 31.Couturier JY, Ding-Zhou L, Croci N, Plotkine M, Margail I. 3-Aminobenzamide reduces brain infarction and neutrophil infiltration after transient focal cerebral ischemia in mice. *Exp Neurol.* 2003;184:973-980.
- 32.Ishikawa M, Cooper D, Russell J, Salter JW, Zhang JH, Nanda A, Granger DN. Molecular determinants of the prothrombotic and inflammatory phenotype assumed by the postischemic cerebral microcirculation. *Stroke.* 2003;34:1777-1782.
- 33.Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Nakamura M, Ninomiya M, Kihara T, Kogure K. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion. *Stroke.* 1994;25: 1469-1475.
- 34.Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Shozuhara H, Ninomiya M, Kihara T, Tamatani T, Miyasaka M, Kogure K. Role of cell adhesion molecules in brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Res.* 1994;656:344-352.
- 35.Imai H, Graham DI, Masayasu H, Macrae IM. Antioxidant ebselen reduces oxidative damage in focal cerebral ischemia. *Free Radic Biol*

Med. 2003;34:56-63.

36. Won MH, Kang T, Park S, Jeon G, Kim Y, Seo JH, Choi E, Chung M, Cho SS. The alterations of N-Methyl-D-aspartate receptor expressions and oxidative DNA damage in the CA1 area at the early time after ischemia-reperfusion insult. *Neurosci Lett.* 2001;301:139-142.
37. Klein JA, Ackerman SL. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J Clin Invest.* 2003;111:785-793.
38. Sakurai M, Nagata T, Abe K, Horinouchi T, Itoyama Y, Tabayashi K. Oxidative damage and reduction of redox factor-1 expression after transient spinal cord ischemia in rabbits. *J Vasc Surg.* 2003;37:446-452.
39. Hayashi T, Sakurai M, Itoyama Y, Abe K. Oxidative damage and breakage of DNA in rat brain after transient MCA occlusion. *Brain Res.* 1999;832:159-163.
40. Nagayama T, Lan J, Henshall DC, Chen D, O'Horo C, Simon RP, Chen J. Induction of oxidative DNA damage in the peri-infarct region after permanent focal cerebral ischemia. *J Neurochem.* 2000;75:1716-1728.
41. Gordon KB, Macrae IM, Carswell HV. Effects of 17beta-oestradiol on cerebral ischaemic damage and lipid peroxidation. *Brain Res.* 2005;1036:155-162.
42. Lee EJ, Lee MY, Chen HY, Hsu YS, Wu TS, Chen ST, Chang GL. Melatonin attenuates gray and white matter damage in a mouse model of transient focal cerebral ischemia. *J Pineal Res.* 2005;38:42-52.
43. McCracken E, Valeriani V, Simpson C, Jover T, McCulloch J, Dewar D. The lipid peroxidation by-product 4-hydroxynonenal is toxic to axons and oligodendrocytes. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20:1529-1536.

44. Storini C, Rossi E, Marrella V, Distaso M, Veerhuis R, Vergani C, Bergamaschini L, De Simoni MG. C1-inhibitor protects against brain ischemia-reperfusion injury via inhibition of cell recruitment and inflammation. *Neurobiol Dis.* 2005;19:10-7.
45. 屈揚、黃熙、任平、張莉、張珊紅、楊喜忠: HPLC 法測定含川芎當歸的常見煎劑中阿魏酸的含量。 *中草藥* 2004; 35: 1123-1125.
46. Suzuki A, Yamamoto M, Jokura H, Fujii A, Tokimitsu I, Hase T, Saito I. Ferulic acid restores endothelium-dependent vasodilation in aortas of spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 2007;20:508-513.
47. Jin Y, Yan EZ, Fan Y, Zong ZH, Qi ZM, Li Z. Sodium ferulate prevents amyloid-beta-induced neurotoxicity through suppression of p38 MAPK and upregulation of ERK-1/2 and Akt/protein kinase B in rat hippocampus. *Acta Pharmacol Sin.* 2005;26:943-951.
48. Wang Q, Xiong LZ, Chen SY. Effect of sodium ferulate on activation of extracellular signal regulated kinase after cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 2003;23:918-921.
49. Wang Q, Chen SY, Xiong LZ, Jin WL, Yang J. Neuroprotective effect of sodium ferulate on transient focal cerebral ischemia by weakening activation of postsynaptic density-95 in rats. *Chin J Traumatol.* 2005;8:297-302.
50. 劉蘇: 缺血性中風病因病機的探討。 *安徽中醫臨床雜誌* 2001; 13: 383-384.
51. 胡建鵬、王鍵: 《內經》相關中風病病因病機淺析。 *中醫藥學刊* 2004; 22: 113-115.
52. 王康鋒、張洪斌: 中風病外風說探討。 *山東中醫藥大學學報* 2005; 29:

- 102-104.
- 53.姚巧林: 中風病的病因病機及歷史形成過程。中國臨床康復 2006; 10: 131-133.
- 54.竇志芳、郭蕾、張俊龍、張鑫: 唐宋以前中風証治規律研究。中西醫結合心腦血管病雜誌 2006; 4: 325-326.
- 55.劉敏、王慶國: 中風病中醫病病因病機學說史略。中國中醫基礎醫學雜誌 2006; 12: 252-253.
- 56.趙云芳、耿宏傳: 淺析《金匱要略》論治中風病。四川中醫 2007; 25: 29.
- 57.劉伍立、歐陽建軍、黃博輝: 中醫文獻對中風病的闡釋與述評。針灸臨床雜誌 2006; 22: 5-8.
- 58.高穎: 中風病的病因病機與辨証論治。中國臨床醫生 2001; 29: 9-11.
- 59.滕晶: 中風病因病機理論探析。中華中醫藥學刊 2007; 25: 692-693.
- 60.潘相安: 中風病因病機的探析及治療。中華中醫藥學刊 2007; 25: 138-141.
- 61.俞麗華、陳亞農、薛敏敏: 缺血性中風病因病機探討。現代中西醫結合雜誌 2007; 16: 1478-1479.
- 62.龐家善: 活血化癥法治療缺血性中風進展。蛇誌 2003; 15: 49-51.
- 63.萬于軍: 辨証論治活血化癥法治療缺血性中風 122 例。現代中西醫結合雜誌 2001; 10: 1926-1927.
- 64.向詩余、曾強: 活血化癥藥防治缺血性中風進展。中國中醫急症 2002; 11: 213-214.
- 65.李俊、葉燁、藍萬成、羅翌: 益氣活血法治療急性缺血性中風的古代認識與現代研究。中國中醫急症 2006; 15: 1150-1151.
- 66.Bardutzky J, Schwab S, Antiedema therapy in ischemic stroke. Stroke.

- 2007; 38: 3084-3094.
67. Sughrue ME, Mehra A, Connolly ES, Jr, D'Ambrosio AL. Anti-adhesion molecule strategies as potential neuroprotective agents in cerebral ischemia: a critical review of the literature. *Inflamm Res*. 2004;53:497-508.
68. Fagan SC, Bowes MP, Berri SA, Zivin JA. Combination treatment for acute ischemic stroke: A ray of Hope? *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 1999; 8:359-367.
69. Yi JH, Park SW, Kapadia R, Vemuganti R. Role of transcription factors in mediating post-ischemic cerebral inflammation and brain damage. *Neurochem Int*. 2007;50: 1014-1027.
70. van der Worp HB, Sena ES, Donnan GA, Howells DW, Macleod MR. Hypothermia in animal models of acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Brain*. 2007;130:3063-3074.
71. Wiltrout C, Lang B, Yan Y, Dempsey RJ, Vemuganti R. Repairing brain after stroke: a review on post-ischemic neurogenesis. *Neurochem Int*. 2007;50:1028-1041.
72. Wu B, Liu M, Liu H, Li W, Tan S, Zhang S, Fang Y. Meta-analysis of traditional Chinese patent medicine for ischemic stroke. *Stroke*. 2007;38:1973-1979.
73. 歐仕益、包惠燕、藍志東：阿魏酸及其衍生物的藥理作用研究進展。
中藥材 2001; 24: 220-221.
74. 靖會、姚凌云、李教社、宋玉喬、曹蔚：國內阿魏酸的藥理研究進展。
西北藥學雜誌 2002; 17: 236-238.
75. 劉會榮：阿魏酸鈉的藥理作用與臨床應用。*中國藥業* 2005; 14; 78-79.

- 76.胡益勇、徐曉玉：阿魏酸的化學和藥理研究進展。中成藥 2006; 28: 253-255.
- 77.Srinivasan M, Sudheer AR, Pillai KR, Kumar PR, Sudhakaran PR, Menon VP. Influence of ferulic acid on gamma-radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant status in primary culture of isolated rat hepatocytes. Toxicology. 2006;228:249-258.
- 78.Zhao Z, Egashira Y, Sanada H. Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in liver. J Nutr. 2004;134:3083-3088.
- 79.Zhao Z, Egashira Y, Sanada H. Ferulic acid sugar esters are recovered in rat plasma and urine mainly as the sulfoglucuronide of ferulic acid. J Nutr. 2003;133:1355-1361.
- 80.Rondini L, Peyrat-Maillard MN, Marsset-Baglieri A, Berset C. Sulfated ferulic acid is the main in vivo metabolite found after short-term ingestion of free ferulic acid in rats. J Agric Food Chem. 2002;50:3037-3041.
- 81.Rondini L, Peyrat-Maillard MN, Marsset-Baglieri A, Fromentin G, Durand P, Tome D, Prost M, Berset C. Bound ferulic acid from bran is more bioavailable than the free compound in rat. J Agric Food Chem. 2004;52: 4338-4343.
- 82.Adam A, Crespy V, Levrat-Verny M A, Leenhardt F, Leuillet M, Demigne C, Remesy C. The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. J Nutr. 2002;132:1962-1968.
- 83.林迎暉、陳文為：阿魏酸鈉的藥理作用及分子改造前景。藥學學報

- 1994; 29: 717-720.
- 84.黃瑾、胡晉紅、朱全剛: 阿魏酸及其衍生物的藥理作用。中藥材 2001; 24: 522-526.
- 85.曲喜英、祝其鋒: 阿魏酸鈉對過氧化氫誘導的 PC12 細胞凋亡保護作用的研究。中國中西醫結合雜誌 2005; 25: 25-29.
- 86.Rukkumani R, Aruna K, Varma PS, Menon VP. Influence of ferulic acid on circulatory prooxidant-antioxidant status during alcohol and PUFA induced toxicity. *J Physiol Pharmacol.* 2004;55:551-561.
- 87.張璇、王劍鋒、姜德咏: 阿魏酸鈉對大鼠缺血再灌注視網膜 SOD , MDA 水平的影響。濰坊醫學院學報 2007; 29: 207-209.
- 88.Sudheer AR, Muthukumaran S, Kalpana C, Srinivasan M, Menon VP. Protective effect of ferulic acid on nicotine-induced DNA damage and cellular changes in cultured rat peripheral blood lymphocytes: a comparison with N-acetylcysteine. *Toxicol In Vitro.* 2007;21:576-585.
- 89.Adhuri RS, Nagarajan D, Periyaswamy V, Venugopal PM. Dose-response effect of ferulic acid against nicotine-induced tissue damage and altered lipid levels in experimental rats: a pathohistological evaluation. *Fundam Clin Pharmacol.* 2008;22:557-567.
- 90.Sudheer AR, Muthukumaran S, Devipriya N, Devaraj H, Menon VP. Influence of ferulic acid on nicotine-induced lipid peroxidation, DNA damage and inflammation in experimental rats as compared to N-acetylcysteine. *Toxicology.* 2008;243:317-329.
- 91.Wenk GL, McGann-Gramling K, Hauss-Wegrzyniak B, Ronchetti D, Maucci R, Rosi S, Gasparini L, Ongini E. Attenuation of chronic neuroinflammation by a nitric oxide-releasing derivative of the

- antioxidant ferulic acid. *J Neurochem.* 2004;89:484-493.
- 92.姜科聲、趙飛、阮琴、胡燕月、陳勤、余袁龍: 阿魏酸對小鼠腦缺血再灌注損傷及大鼠血液流變性的影響。中國現代應用藥學雜誌 2006; 23: 185-188.
- 93.周琴、廖維靖、楊萬同、胡小琴、程明高、任蘭芬、華博: 阿魏酸鈉促進局灶性腦缺血再灌注後神經功能恢復和血管生成作用的研究。中國康復醫學雜誌 2006; 21: 200-203.
- 94.周琴、廖維靖、楊萬同: 當歸與阿魏酸鈉對促進局灶性腦缺血再灌注後神經功能恢復作用的比較。武漢大學學報 2007; 28: 332-335.
- 95.Fu YJ, He M. Protective effect and mechanism of pharmacologic preconditioning induced by sodium ferulate on primary cultured myocardial cell injury by anoxia/reoxygenation. *Yao Xue Xue Bao.* 2004;39:325-327.
- 96.Yogeeta SK, Gnanapragasam A, Senthilkumar S, Subhashini R, Devaki T. Synergistic salubrious effect of ferulic acid and ascorbic acid on membrane-bound phosphatases and lysosomal hydrolases during experimental myocardial infarction in rats. *Life Sci.* 2006;80:258-263.
- 97.Yogeeta SK, Raghavendran HR, Gnanapragasam A, Subhashini R, Devaki T. Ferulic acid with ascorbic acid synergistically extenuates the mitochondrial dysfunction during beta-adrenergic catecholamine induced cardiotoxicity in rats. *Chem Biol Interact.* 2006;163:160-169.
- 98.Yogeeta SK, Hanumantra RB, Gnanapragasam A, Senthilkumar S, Subhashini R, Devaki T. Attenuation of abnormalities in the lipid metabolism during experimental myocardial infarction induced by isoproterenol in rats: beneficial effect of ferulic acid and ascorbic acid.

- Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2006;98:467-472.
- 99.Srinivasan M, Rukkumani R, Ram Sudheer A, Menon VP. Ferulic acid, a natural protector against carbon tetrachloride-induced toxicity. *Fundam Clin Pharmacol.* 2005;19:491-496.
- 100.Dong WG, Liu SP, Yu BP, Wu DF, Luo HS, Yu JP. Ameliorative effects of sodium ferulate on experimental colitis and their mechanisms in rats. *World J Gastroenterol.* 2003;9:2533-2538.
- 101.Badary OA, Awad AS, Sherief MA, Hamada FM. In vitro and in vivo effects of ferulic acid on gastrointestinal motility: inhibition of cisplatin-induced delay in gastric emptying in rats. *World J Gastroenterol.* 2006;12: 5363-5367.
- 102.Kawabata K, Yamamoto T, Hara A, Shimizu M, Yamada Y, Matsunaga K, Tanaka T, Mori H. Modifying effects of ferulic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Cancer Lett.* 2000;157:15-21.
- 103.Cione E, Tucci P, Senatore V, Perri M, Trombino S, Iemma F, Picci N, Genchi G. Synthesized esters of ferulic acid induce release of cytochrome c from rat testes mitochondria. *J Bioenerg Biomemb.* 2008;40:19-26.
- 104.Sri Balasubashini M, Rukkumani R, Menon VP. Protective effects of ferulic acid on hyperlipidemic diabetic rats. *Acta Diabetol.* 2003;40:118-122.
- 105.Thyagaraju BM. Ferulic Acid supplements abrogate oxidative impairments in liver and testis in the streptozotocin-diabetic rat. *Zoolog Sci.* 2008;25:854-860.
- 106.鄭志鋒、李明、汪泱、宋專欣: 缺血預處理聯合阿魏酸鈉對大鼠腦

- 缺血再灌注損傷的保護作用及其機制。中華實驗外科雜誌 2005; 22: 95-97.
- 107.彭華、郭洪志、趙忠新: 阿魏酸鈉對局灶性腦缺血致多器官功能障礙綜合症大鼠模型腦和肺及腎 Bax 和 Bcl-2 表達的影響。實用心腦肺血管病雜誌 2007; 15: 10-13.
- 108.Ke QB, Jiang Y, Huang HB, Zhou QS, Yu QJ, Xiong GX. Protective effect of ferulic acid on neuronal apoptosis of spinal cord subsequent to aortic blood cross-clamping in rabbits. Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue. 2007;19:311-313.
- 109.石永革、趙擁軍、田風臣: 阿魏酸鈉治療急性腦梗死療效觀察。實用神經疾病雜誌 2005; 8: 74-75.
- 110.覃蓮、黃進瑜、廖寶共、唐以德: 阿魏酸鈉治療急性腦梗死患者的血漿內皮素水平變化及臨床療效評定。廣西醫學 2005; 27: 1760-1761.
- 111.齊振祥、孫專梅、邢玉霞: 阿魏酸鈉治療急性腦梗死的臨床研究。實用心腦肺血管病雜誌 2006; 14: 122-123.
- 112.潘廣雯: 阿魏酸鈉治療急性腦梗死的臨床療效觀察。中國醫師雜誌增刊, 2006; 339-340.
- 113.王紅燕、何新霞、高松、韓衛紅、薛燕: 阿魏酸鈉與氧載體透射療法聯合治療急性腦梗死臨床觀察。實用心腦肺血管病雜誌 2006; 15: 599-601.
- 114.江文靜、麻琳、杜濱鋒、郭洪志、徐廣潤、遲兆富: 阿魏酸鈉對局灶性腦梗死大鼠內皮素、降鈣素基因相關肽變化的影響。山東大學學報 2005; 43: 1148-1150.
- 115.陳莉芬、陶陶、余震、胡長林: 阿魏酸鈉對缺氧誘導腦血管內皮細

胞內皮素-1 表達的影響。中國中西醫結合急救雜誌 2005; 12: 344-346.

116. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20:84-91.
117. Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang L, Lu M, Willing AE, Sanchez-Ramos J, Chopp M. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke*. 2001;32:2682-2688.
118. Kawase M, Murakami K, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Gasche Y, Kondo T, Scott RW, Chan PH. Exacerbation of delayed cell injury after transient global ischemia in mutant mice with CuZn superoxide dismutase deficiency. *Stroke*. 1999;30:1962-1968.
119. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156-159.
120. Imai H, Masayasu H, Dewar D, Graham DI, Macrae IM. Ebselen protects both gray and white matter in a rodent model of focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2001;32:2149-2154.
121. Li Y, Chopp M, Powers C, Jiang N. Apoptosis and protein expression after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res*. 1997;765:301-312.
122. Davoli MA, Fourtounis J, Tam J, Xanthoudakis S, Nicholson D, Robertson GS, Ng GY, Xu D. Immunohistochemical and biochemical assessment of caspase-3 activation and DNA fragmentation following transient focal ischemia in the rat. *Neuroscience*. 2002;115:125-136.

123. Gursoy-Ozdemir Y, Can A, Dalkara T. Reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to neurovascular unit after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2004;35:1449-1453.
124. Maier CM, Sun GH, Cheng D, Yenari MA, Chan PH, Steinberg GK. Effects of mild hypothermia on superoxide anion production, superoxide dismutase expression, and activity following transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis*. 2002;11:28-42.
125. Mori T, Asano T, Matsui T, Muramatsu H, Ueda M, Kamiya T, Katayama Y, Abe T. Intraluminal increase of superoxide anion following transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res*. 1999;816:350-357.
126. Hsiao G, Lee JJ, Chen YC, Lin JH, Shen MY, Lin KH, Chou DS, Sheu JR. Neuroprotective effects of PMC, a potent alpha-tocopherol derivative, in brain ischemia-reperfusion: reduced neutrophil activation and anti-oxidant actions. *Biochem Pharmacol*. 2007;73:682-693.
127. Tang LL, Ye K, Yang XF, Zheng JS. Apocynin attenuates cerebral infarction after transient focal ischaemia in rats. *J Int Med Res*. 2007;35:517-522.
128. Kim GW, Lewen A, Copin J, Watson BD, Chan PH. The cytosolic antioxidant, copper/zinc superoxide dismutase, attenuates blood-brain barrier disruption and oxidative cellular injury after photothrombotic cortical ischemia in mice. *Neuroscience*. 2001;105:1007-1018.
129. Ge H, Wen Y, Yang G, Betz AL. Increased expression of intercellular adhesion molecule-1 in mouse focal cerebral ischemia model. *Chin Med J (Engl)*. 2000;113:75-79.
130. Zhang RL, Chopp M, Zaloga C, Zhang ZG, Jiang N, Gautam SC, Tang

- WX, Tsang W, Anderson DC, Manning AM. The temporal profiles of ICAM-1 protein and mRNA expression after transient MCA occlusion in the rat. *Brain Res.* 1995;682:182-188.
- 131.Kuroda S, Siesjo BK. Reperfusion damage following focal ischemia: pathophysiology and therapeutic windows. *Clin Neurosci.* 1997;4:199-212.
- 132.Yeh LH, Kinsey AM, Chatterjee S, Alevriadou BR. Lactosylceramide mediates shear-induced endothelial superoxide production and intercellular adhesion molecule-1 expression. *J Vasc Res.* 2001;38:551-559.
- 133.Jiang Q, Ewing JR, Zhang ZG, Zhang RL, Hu J, Divine GW, Arniago P, Li QJ, Chopp M. Magnetization transfer MRI: application to treatment of middle cerebral artery occlusion in rat. *J Magn Reson Imaging.* 2001;13:178-184.
- 134.Candelario-Jalil E, Gonzalez-Falcon A, Garcia-Cabrera M, Leon OS, Fiebich BL. Post-ischaemic treatment with the cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide reduces blood-brain barrier disruption and leukocyte infiltration following transient focal cerebral ischaemia in rats. *J Neurochem.* 2007;100:1108-1120.
- 135.Furuichi Y, Noto T, Li JY, Oku T, Ishiye M, Moriguchi A, Aramori I, Matsuoka N, Mutoh S, Yanagihara T. Multiple modes of action of tacrolimus (FK506) for neuroprotective action on ischemic damage after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 2004;1014:120-130.
- 136.Lin B, Ginsberg MD, Busto R, Li L. Hyperglycemia triggers massive neutrophil deposition in brain following transient ischemia in rats.

- Neurosci Lett. 2000;278:1-4.
137. Chu K, Lee ST, Koo J.S, Jung KH, Kim EH, Sinn DI, Kim JM, Ko SY, Kim SJ, Song EC, Kim M, Roh JK. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-agonist, rosiglitazone, promotes angiogenesis after focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 2006;1093:208-218.
138. Oh JK, Hyun SY, Oh HR, Jung JW, Park C, Lee SY, Park JH, Kim SY, Kim KH, Kim YK, Ryu JH. Effects of *Anemarrhena asphodeloides* on focal ischemic brain injury induced by middle cerebral artery occlusion in rats. *Biol Pharm Bull.* 2007;30:38-43.
139. Huang FP, Wang ZQ, Wu DC, Schielke GP, Sun Y, Yang GY. Early NFkappaB activation is inhibited during focal cerebral ischemia in interleukin-1beta-converting enzyme deficient mice. *J Neurosci Res.* 2003;73:698-707.
140. Sironi L, Banfi C, Brioschi M, Gelosa P, Guerrini U, Nobili E, Gianella A, Paoletti R, Tremoli E, Cimino M. Activation of NF-kB and ERK1/2 after permanent focal ischemia is abolished by simvastatin treatment. *Neurobiol Dis.* 2006;22:445-451.
141. Duckworth EA, Butler T, Collier L, Collier S, Pennypacker KR. NF-kappaB protects neurons from ischemic injury after middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain Res.* 2006;1088:167-175.
142. Williams AJ, Dave JR, Tortella FC. Neuroprotection with the proteasome inhibitor MLN519 in focal ischemic brain injury: relation to nuclear factor kappaB (NF-kappaB), inflammatory gene expression, and leukocyte infiltration. *Neurochem Int.* 2006;49:106-112.
143. Liu SJ, Zhou SW, Xue CS, Effect of tetrandrine on neutrophilic

- recruitment response to brain ischemia/reperfusion. *Acta Pharmacol Sin.* 2001;22:971-975.
144. Wang YH, Wang WY, Chang CC, Liou KT, Sung YJ, Liao JF, Chen CF, Chang S, Hou YC, Chou YC, Shen YC. Taxifolin ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through its anti-oxidative effect and modulation of NF-kappa B activation. *J Biomed Sci.* 2006;13:127-141.
145. Wang Q, Sun AY, Simonyi A, Jensen MD, Shelat PB, Rottinghaus GE, MacDonald RS, Miller DK, Lubahn DE, Weisman GA, Sun GY. Neuroprotective mechanisms of curcumin against cerebral ischemia-induced neuronal apoptosis and behavioral deficits. *J Neurosci Res.* 2005;82:138-148.
146. Zhang N, Komine-Kobayashi M, Tanaka R, Liu M, Mizuno Y, Urabe T. Edaravone reduces early accumulation of oxidative products and sequential inflammatory responses after transient focal ischemia in mice brain. *Stroke.* 2005;36:2220-2225.
147. Kirino T. Delayed neuronal death. *Neuropathology.* 2000;20 Suppl:S95-S97.
148. Khan M, Sekhon B, Jatana M, Giri S, Gilg AG, Sekhon C, Singh I, Singh AK. Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke. *J Neurosci Res.* 2004;76:519-527.
149. Zhang WR, Hayashi T, Sasaki C, Sato K, Nagano I, Manabe Y, Abe K. Attenuation of oxidative DNA damage with a novel antioxidant EPC-K1 in rat brain neuronal cells after transient middle cerebral artery occlusion. *Neurol Res.* 2001;23:676-680.

150. Hu X, Johansson IM, Brannstrom T, Olsson T, Wester P. Long-lasting neuronal apoptotic cell death in regions with severe ischemia after photothrombotic ring stroke in rats. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2002;104:462-470.
151. Yamada A, Isono M, Hori S, Shimomura T, Nakano T. Temporal and spatial profile of apoptotic cells after focal cerebral ischemia in rats. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 1999;39:575-583; discussion 583-584.
152. Xia CF, Yin H, Borlongan CV, Chao L, Chao J. Kallikrein gene transfer protects against ischemic stroke by promoting glial cell migration and inhibiting apoptosis. *Hypertension*. 2004;43:452-459.
153. Xia CF, Yin H, Borlongan CV, Chao J, Chao L. Postischemic infusion of adrenomedullin protects against ischemic stroke by inhibiting apoptosis and promoting angiogenesis. *Exp Neurol*. 2006;197:521-530.
154. Miyamoto O, Tamae K, Kasai H, Hirakawa H, Hayashida Y, Konishi R, Itano T. Suppression of hyperemia and DNA oxidation by indomethacin in cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol*. 2003;459:179-186.
155. Ferrer I, Friguls B, Dalfo E, Justicia C, Planas AM. Caspase-dependent and caspase-independent signalling of apoptosis in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the adult rat. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2003;29:472-481.
156. Awasthi YC, Sharma R, Cheng JZ, Yang Y, Sharma A, Singhal SS, Awasthi S. Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling. *Mol Aspects Med*. 2003;24:219-230.
157. Cho S, Liu D, Gonzales C, Zaleska MM, Wood A. Temporal assessment of caspase activation in experimental models of focal and global ischemia.

- Brain Res. 2003;982:146-155.
158. Unal-Cevik I, Kilinc M, Gursoy-Ozdemir Y, Gurer G, Dalkara T. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Res.* 2004;1015:169-174.
159. Xu GP, Dave KR, Vivero R, Schmidt-Kastner R, Sick TJ, Perez-Pinzon MA. Improvement in neuronal survival after ischemic preconditioning in hippocampal slice cultures. *Brain Res.* 2002;952:153-158.
160. Lei B, Popp S, Capuano-Waters C, Cottrell JE, Kass IS. Lidocaine attenuates apoptosis in the ischemic penumbra and reduces infarct size after transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience.* 2004;125:691-701.
161. Yin D, Zhou C, Kusaka I, Calvert JW, Parent AD, Nanda A, Zhang JH. Inhibition of apoptosis by hyperbaric oxygen in a rat focal cerebral ischemic model. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23:855-864.
162. Vemuganti R, Dempsey RJ, Bowen KK. Inhibition of intercellular adhesion molecule-1 protein expression by antisense oligonucleotides is neuroprotective after transient middle cerebral artery occlusion in rat. *Stroke.* 2004;35:179-184.
163. Zhang RL, Zhang ZG, Chopp M, Zivin JA. Thrombolysis with tissue plasminogen activator alters adhesion molecule expression in the ischemic rat brain. *Stroke.* 1999;30:624-629.

The Anti-Inflammatory and Antioxidative Effects and Mechanisms of Ferulic acid on Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rats

Name : Chin-Yi Cheng
Major professor : Ching-Liang Hsieh
Institute : Graduate Institute of Chinese Medical Science
China Medical University

Abstract

Both *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels (AS) and *Ligusticum chuanxiong* Hort., (LC) have been used to treat stroke in Traditional Chinese Medicine for centuries. Ferulic acid (4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid, FA), a component of both AS and LC, plays a role in neuroprotection. The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory and antioxidative effects and mechanisms of FA on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. Rats underwent 2, 10, 24 and 36h of reperfusion after 90 min middle cerebral artery occlusion (MCAo). First, the cerebral infarct and neurological deficits were measured at 24 h of reperfusion. Furthermore, the expression of superoxide radicals, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), myeloperoxidase (MPO), nuclear factor- κ B (NF- κ B) immunoreactive cells (vessels) were assessed at 2 and 24 h of reperfusion. Second, ICAM-1 and macrophage-1 antigen (Mac-1) mRNA were detected at 2 h of reperfusion; Mac-1, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), active caspase 3, NeuN and TUNEL positive cells were measured at 2, 10, 24 and 36 h of reperfusion. Administration of 80 and 100 mg/kg of FA at the beginning of MCAo significantly reduced cerebral infarct and neurological deficit-score. FA treatment (100 mg/kg i.v.) effectively suppressed superoxide radicals production in the parenchyma lesion, and the expression of ICAM-1 immunoreactivity, ICAM-1 and Mac-1 mRNA in the ischemic striatum at 2 h of reperfusion; FA reduced the expression of ICAM-1 and NF- κ B in the ischemic cortex and striatum, also down-regulated MPO immunoreactive cells in the ischemic cortex at 24 h of reperfusion. Furthermore, FA reduced the expression of Mac-1, 4-HNE and 8-OHdG positive cells in the ischemic rim and core at 10, 24 and 36 h of reperfusion. FA also decreased TUNEL positive cells in the penumbra at 10 h, and in the ischemic boundary and core at 24 and 36 h of reperfusion. FA

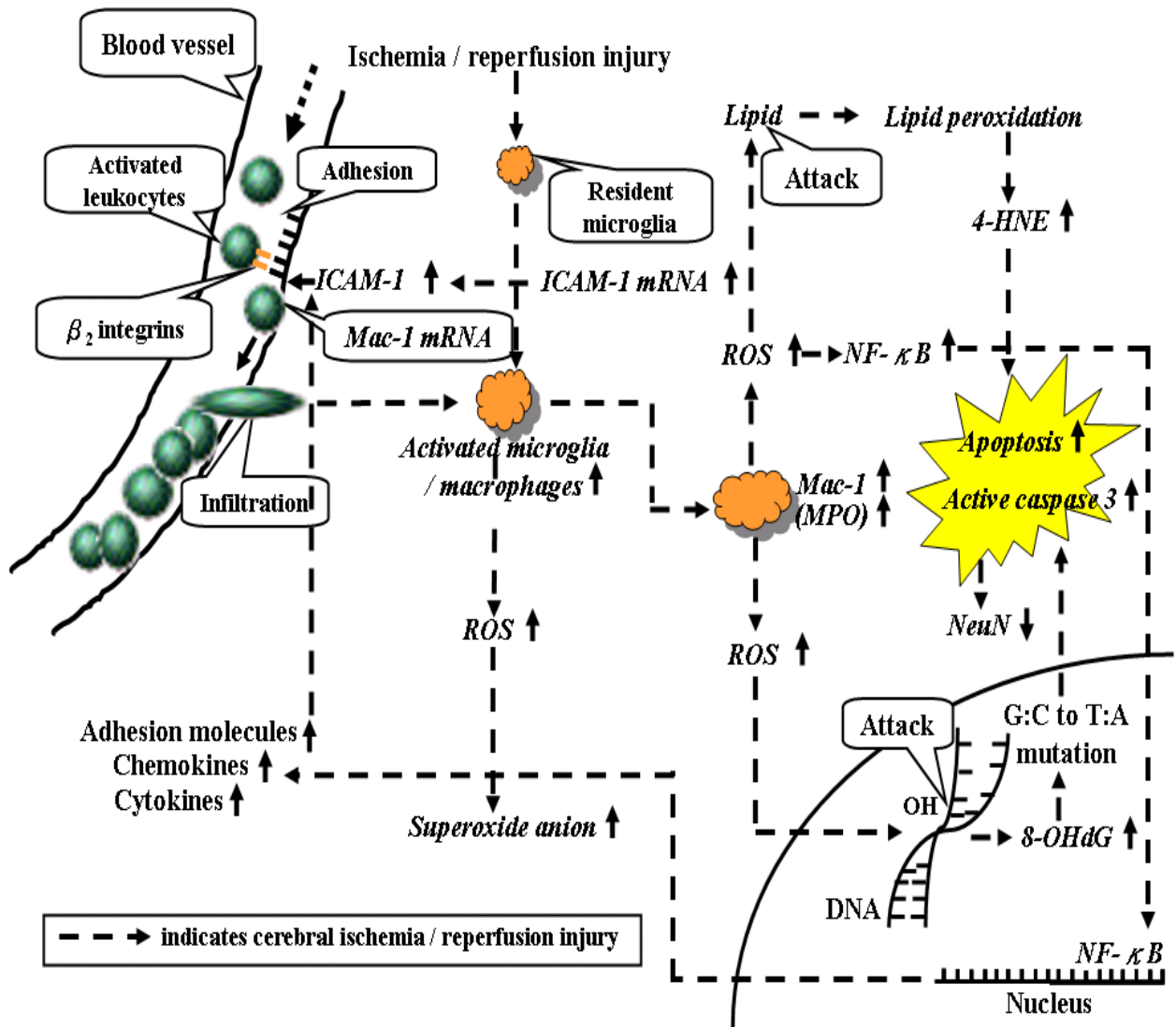
curtailed active caspase 3 enhancement in the penumbra at 10 h and restored NeuN-labeled neurons in the penumbra and ischemic core at 36 h of reperfusion.

FA reduces cerebral infarct area and neurological deficit-score at 24 h of reperfusion, and the neuroprotective mechanism may involve suppression of superoxide radicals production and ICAM-1 mRNA expression in the early reperfusion period, and the antioxidative and anti-inflammatory effects could further down-regulate NF- κ B, activated microglia/macrophages, oxidative stress and oxidative stress-related apoptosis during the late reperfusion period.

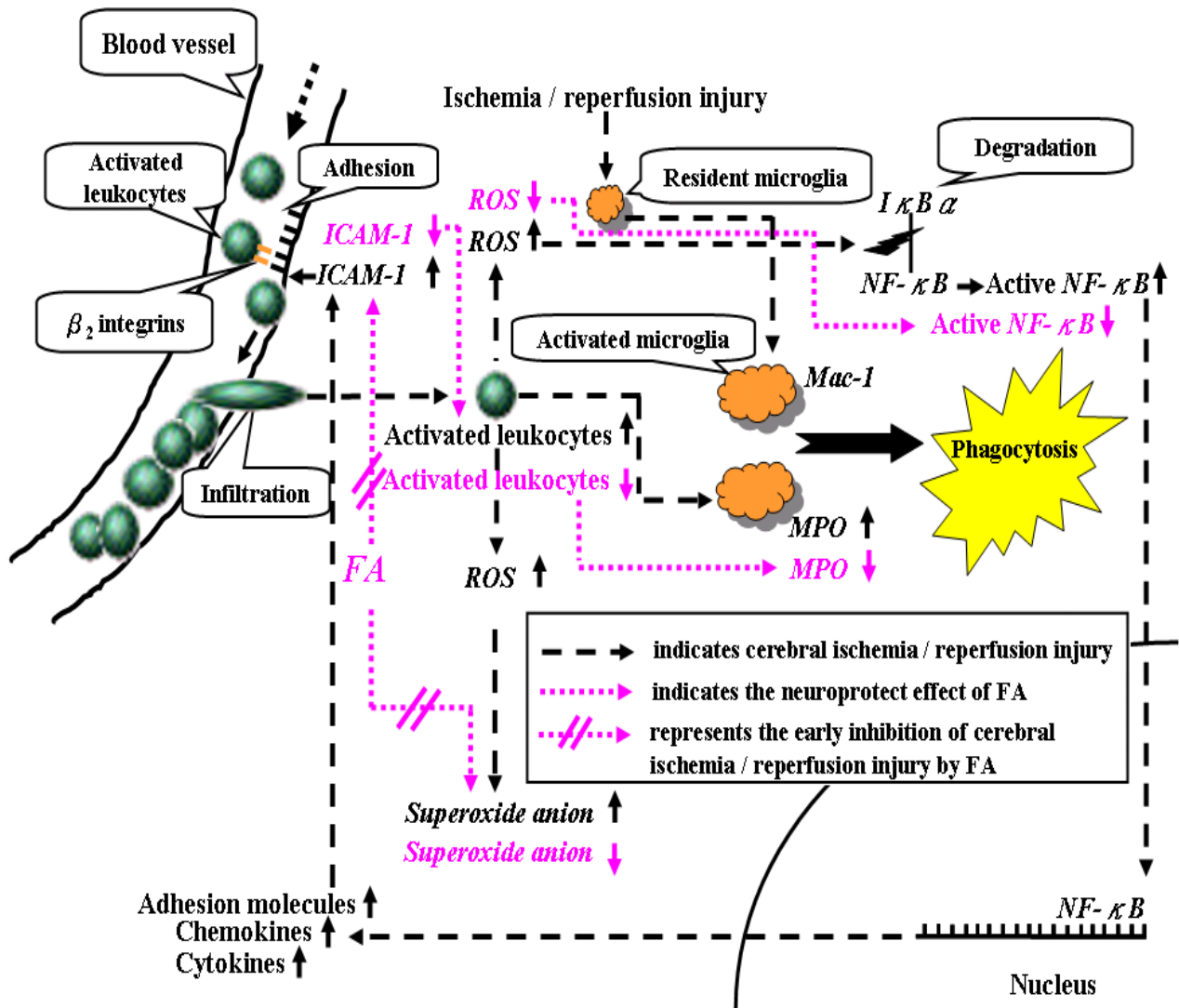
Keywords: Ferulic acid; Intercellular adhesion molecule-1; Nuclear factor- κ B; 8-hydroxy- 2'- deoxyguanosine (8-OHdG); 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE); apoptosis



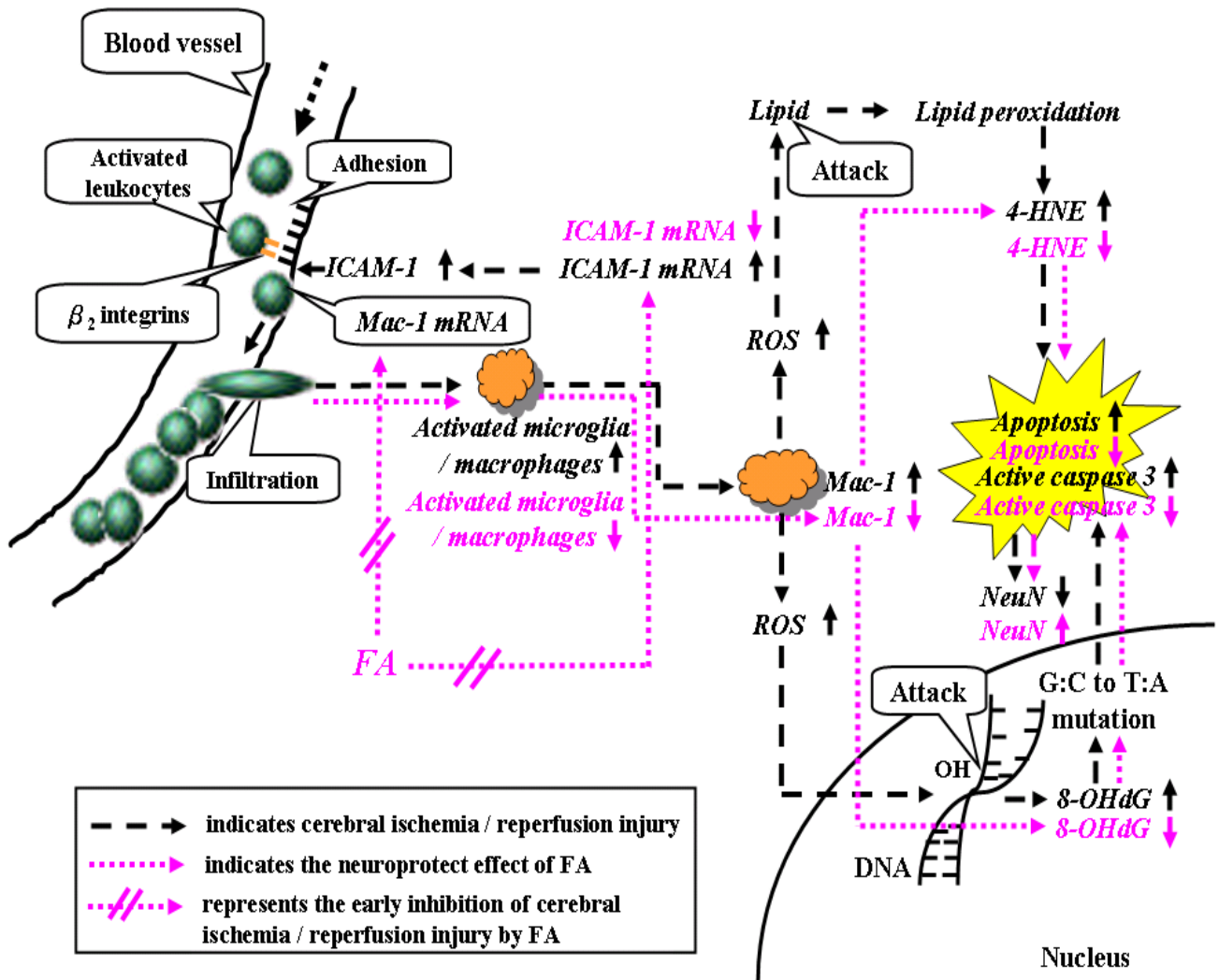
附錄 (1)：腦缺血-再灌流損傷之機轉圖



附錄 (2)：第一階段討論之機轉圖



附錄 (3)：第二階段討論之機轉圖



附錄 (4)：第一、二階段之綜合機轉圖

