

中國醫藥大學營養學系

碩士論文

鼠尾草酸對6-OHDA誘發的類帕金森氏症模式的神經保護作用

Neuroprotective effects of carnosic acid in 6-OHDA-treated
models

研究生：蔡佳玟 撰 Chia-Wen Tsai

指導教授：蔡佳文 博士 Chia-Wen Tsai, Ph D.

中華民國一百零二年七月

目錄

目錄.....	i
圖目錄.....	iii
表目錄.....	vi
縮寫對照表.....	vii
中文摘要.....	ix
Abstract.....	xi
第一章 前言.....	1
第二章 文獻探討.....	3
一、帕金森氏症.....	3
二、帕金森氏症的致病機轉.....	4
(一) 氧化壓力.....	4
(二) 環境毒素.....	5
(三) 發炎反應.....	5
(四) 家族遺傳與錯誤蛋白質堆積.....	6
三、帕金森氏症的治療方法.....	12
(一) 藥物治療.....	12
(二) 手術.....	12
(三) 基因治療.....	12
(四) 幹細胞移植.....	13
四、帕金森氏症的誘導藥物.....	14
(一) MPTP.....	14
(二) 6-OHDA.....	15
五、抗氧化機制與帕金森氏症.....	16
(一) GSH.....	16
(二) SOD.....	16
(三) GPx.....	16
(四) GSR.....	17
六、鼠尾草酸 (Carnosic acid, CA).....	18
(一) 抗氧化.....	19
(二) 抑制癌症.....	20
(三) 抗發炎功能.....	20
(四) 抗菌.....	21
(五) 抗肥胖.....	21
(六) 神經保護.....	21

第三章 研究動機與目的	23
第四章 實驗材料及方法	24
一、實驗架構	24
二、實驗材料	26
三、實驗方法	33
四、統計分析	41
第五章 結果	42
(一) CA 在 6-OHDA 處理下對 SH-SY5Y 神經細胞之其細胞存活率之影響	42
(二) CA 在 6-OHDA 處理下對 SH-SY5Y 神經細胞凋亡相關蛋白質之影響	42
(三) CA 在 6-OHDA 處理下對 SH-SY5Y 神經細胞抗氧化酵素相關蛋白質之影響	42
(四) CA 在 6-OHDA 處理下對 SH-SY5Y 神經細胞蛋白酶體活性的影響	43
(五) 不同 CA 時間點對 SH-SY5Y 神經細胞 PINK1 和 parkin 蛋白質之影響	43
(六) 不同 6-OHDA 時間點對 SH-SY5Y 神經細胞 PINK1 和 parkin 蛋白質之影響	44
(七) CA 對 SH-SY5Y 神經細胞 PINK1 和 parkin 蛋白質之影響	44
(八) CA 對 SH-SY5Y 神經細胞 p65 蛋白質之影響	44
(九) CA 透過 parkin 達到神經保護功效	44
(十) CA 對 6-OHDA 誘發 PD 模式大鼠運動量之影響	45
(十一) CA 在 6-OHDA 誘發 PD 模式大鼠對於 apomorphine 誘發對側旋轉的影響	45
(十二) CA 對 6-OHDA 誘發 PD 模式大鼠腦部黑質 GSH 含量和脂質過氧化物之影響	45
(十三) CA 對 6-OHDA 誘發 PD 模式大鼠腦部紋狀體抗氧化酵素相關蛋白之影響	46
(十四) CA 對 6-OHDA 誘發 PD 模式大鼠腦部紋狀體凋亡蛋白質之影響	46
(十五) CA 對 6-OHDA 誘發 PD 模式大鼠腦部紋狀體 TH 蛋白質之影響	46
(十六) CA 對 6-OHDA 誘發 PD 模式大鼠腦部紋狀體 PINK1 及 parkin 的蛋白質之影響	47
第六章 討論	67
第七章 結論	72
第八章 參考文獻	73

圖目錄

文獻探討

圖一、Overview of the ubiquitin–proteasome system (UPS)	8
圖二、Parkin 的調控角色	9
圖三、PINK1 調控 parkin 的活化	10
圖四、A model of the putative neuroprotective mechanisms of PINK1	11
圖五、MPTP 的神經毒性機制	14
圖六、6-OHDA 的神經毒性機制	15
圖七、鼠尾草酸(carnosic acid, CA) 結構	18
圖八、CA 及 6-OHDA 作用機制	72

結果

Figure 1. Protective effect of carnosic acid (CA) against 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced toxicity in SH-SY5Y cells	48
Figure 2. Effect of carnosic acid (CA) on the protein expression of Bcl-2 and Bax in 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-stimulated SH-SY5Y cells	49
Figure 3. Effect of carnosic acid (CA) on the protein expression of caspase 3 and PARP in 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-stimulated SH-SY5Y cells.	50
Figure 4. Effect of carnosic acid (CA) on the protein expression of GCLC, GCLM, GPx, GSR, and SOD in 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-stimulated SH-SY5Y cells.	51
Figure 5. Effect of carnosic acid (CA) on proteasome activity in 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-stimulated SH-SY5Y cells	52
Figure 6. Carnosic acid (CA) induced the protein expression of PINK1 and parkin in SH-SY5Y cells.	53

Figure 7. 6-OHDA decrease the protein expression of PINK1 and parkin.	54
Figure 8. Effect of carnosic acid (CA) on the protein expression of PINK1 and parkin in 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-stimulated SH-SY5Y cells.....	55
Figure 9. Effect of carnosic acid (CA) on the protein expression of p65 in 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-stimulated SH-SY5Y cells.	56
Figure 10. Carnosic acid (CA)-inhibited the activation of caspase 3, and PARP were reversed by parkin-siRNA in SH-SY5Y cells	57
Figure 11. Effect of carnosic acid (CA) on locomotor activity in the striatum of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-treated rats.	58
Figure 12. Effect of carnosic acid (CA) on the roration in the striatum of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) treated rats.....	59
Figure 13. Effect of carnosic acid (CA) on the level of GSH in the right substantia nigra of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-treated rats.	60
Figure 14. Effect of carnosic acid (CA) on the level of TBARS in the right substantia nigra of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-treated rats.....	61
Figure 15. Effect of carnosic acid (CA) on the content of GCLC, GCLM, GSR, and SOD in the right striatum of 6-OHDA-treated rats.	62
Figure 16. Effect of carnosic acid (CA) on the protein expression of Bcl-2, Bax, caspase 3 and PARP in the right striatum of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) treated rats.....	63
Figure 17. Effect of carnosic acid (CA) on the protein expression of caspase 3 and PARP in the right striatum of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) treated rats.....	64
Figure 18. Effect of carnosic acid (CA) on the content of TH in the right striatum of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-treated rats.	65

Figure 19. Effect of carnosic acid (CA) on the protein expression of PINK1 and parkin in the right striatum of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-treated rats. 66



表目錄

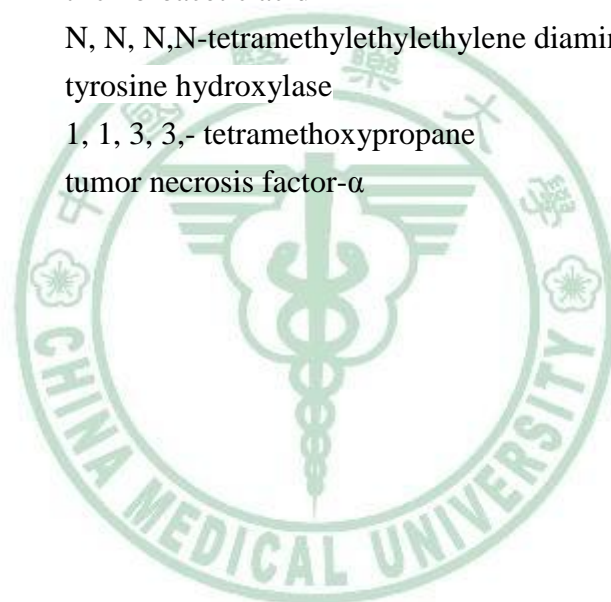
表一、與帕金森氏症相關的基因	6
表二、抗體名稱與廠牌	28
表三、Proteasome activity reagents	32
表四、電泳 separating gel 配方	37
表五、電泳 stacking gel 配方	37
表六、Lysis buffer 配方	39
表七、ATP regenerating system buffer	40



縮寫對照表

縮寫	全名
APS	ammonium persulfate
ATP	adenosine triphosphate
BHT	butylated hydroxytoluene
BSO	L-buthionine-sulfoximine
CA	carnosic acid
CCCP	carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone
CDNF	cerebral dopamine neurotrophic factor
CMC	sodium carboxymethylcellulose
COX-2	cyclooxygenase-2
DAT	dopamine transporter
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ESCs	embryonic stem cells
EDTA	ethylenediaminetetracetic acid
GCLC	glutamate-cysteine ligase catalytic subunit
GCLM	glutamate-cysteine ligase modifier subunit
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
GSH	glutathione
GPx	glutathione peroxidase
GSR	glutathione reductase
HSP90	heat shock protein 90
6-OHDA	6-hydroxydopamine
HYOU1	hypoxia up-regulated protein 1
iNOS	inducible nitric oxide synthase
LPS	lipopolysaccharide
LRRK2	leucine-rich repeat kinase 2
MAPKs	mitogen-activated protein kinases
MAO	monoamine oxidase
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolim bromide
NDK	nucleoside diphosphate kinase
NF- κ B	nuclear factor κ B
NO	nitric oxide

NQO	NAD(P)H-quinone oxidoreductase
PD	Parkinson's disease
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PINK1	PTEN induced putative kinase 1
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PVDF	polyvinylidene difluoride transfer membrane
RA	rosmarinic acid
ROS	reactive oxygen species
SOD	superoxide dismutase
TBA	2-thiobarbituric acid
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances
TCA	trichloroacetic acid
TEMED	N, N, N,N-tetramethylethylenediamine
TH	tyrosine hydroxylase
TMP	1, 1, 3, 3,- tetramethoxypropane
TNF- α	tumor necrosis factor- α



中文摘要

帕金森氏症(Parkinson's disease, PD)屬於神經退化性疾病，會造成動作失調。本實驗室在先前的細胞實驗研究發現迷迭香多酚類化合物鼠尾草酸(carnosic acid, CA)能夠改善 6-羥基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)誘發的 SH-SY5Y 神經細胞死亡，且此保護效果可能藉由抑制 JNK 和 p38 路徑以及活化 GSH 相關路徑。而本實驗則進一步以動物模式來探討 CA 是否能夠改善 6-OHDA 造成大鼠的神經損傷，並在細胞中探討其相關保護機轉。首先，在動物實驗的部分，我們將六週齡 Wistar 大鼠隨機分成三組：[1]假手術組(sham, S)；[2] 6-OHDA 處理組(lesion, L)；[3] CA + 6-OHDA 組(CA+L)。先以灌食的方式給予 20 mg/kg CA 三週後，再開腦進行單側注射 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 6-OHDA，於兩週後進行犧牲，大鼠犧牲前皆先進行運動行為測試，再取黑質與紋狀體來進行分析。在動物實驗結果發現 CA 可以回復 6-OHDA 引起的大鼠運動能力與時間降低和腦部 tyrosine hydroxylase 蛋白表現減少，也可以避免大鼠黑質中的 thiobarbituric acid reactive substances (TBRAS)增加和 glutathione (GSH)量降低；而 6-OHDA 增加 apomorphine 引起的對側旋轉，以 CA 預處理的組別可以獲得改善；另外，CA 可以減緩大鼠因 6-OHDA 降低的抗氧化酵素(glutamate-cysteine ligase catalytic subunit、glutamate-cysteine ligase modifier subunit、superoxide dismutase 和 glutathione reductase)和 tyrosine hydroxylase (TH)蛋白、Bcl-2/Bax 比值與蛋白酶體活性(proteasome activity)以及增加的 caspase 3 和 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 之裂解比例；細胞預處理 CA 則可以避免 6-OHDA 降低的 PTEN induced putative kinase 1 (PINK1)和 parkin 蛋白的表現。之後在細胞實驗部分，細胞先以 0.1 % dimethyl sulfoxide (DMSO)或 1 μM CA 預處理 8 小時，再將 CA 和 100 μM 6-OHDA 共處理 18 小時後收細胞，結果發現 CA 在細胞中也可以減緩 6-OHDA 造成的 Bcl-2/Bax 比值降低、caspase 3 和 PARP 之裂解增加、抗氧化酵素蛋白降低、蛋白酶體活性(proteasome activity)降低，以及 PINK1 和 parkin 蛋白降低。若將細胞先以基

因轉殖方式送進 parkin siRNA，CA 則無法保護細胞免於 6-OHDA 所造成的細胞死亡與 caspase 3 和 PARP 之裂解，因此，由此可知，在動物與細胞實驗中 CA 皆具有神經保護作用，未來可能具有用來預防帕金森氏症的潛力。

關鍵字：鼠尾草酸、6-羥基多巴胺、帕金森氏症、Wistar 大鼠、SH-SY5Y 神經細胞

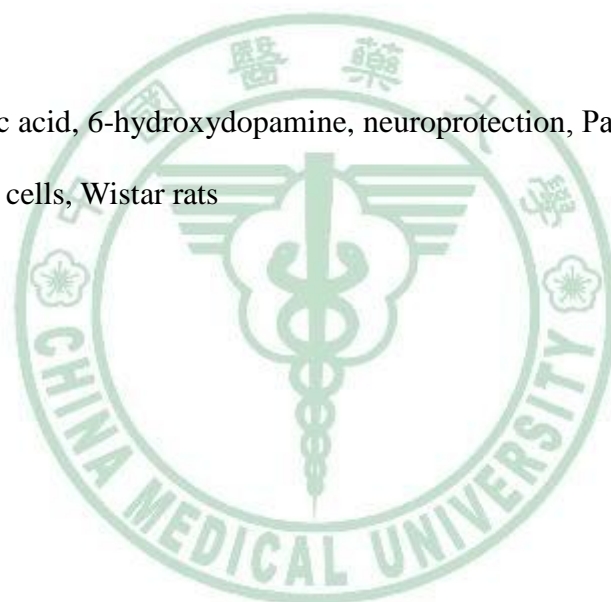


Abstract

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder, which is caused by loss of dopaminergic neurons in the striatum and substantia nigra. In our previous study, rosemary carnosic acid (CA) modulated the neurotoxic effects of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in SH-SY5Y cells is associated with the synthesis of glutathione, which in turn down-regulates the c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) and p38 signaling pathways. In the present study, we used *in vivo* and *in vitro* models to investigate the neuroprotective effects of CA 1 μ M on 6-OHDA-induced PD and its related mechanisms. In *in vivo* experiments, the Wistar rats were divided into four groups: sham (S) and vehicle (saline, orally); vehicle-treated 6-OHDA lesioned group (L); CA-treated 6-OHDA lesioned group (CA+L). Rats were treated with 20 mg/kg of CA for 3 weeks. On day 22, 2.5 μ l of 6-OHDA (5 μ g/ μ l in 0.5% in ascorbic acid-saline) was infused into the right striatum, while the sham group received 2.5 μ l of vehicle. The animals were sacrificed after behavior test and their brain tissues were taken out. The results indicated that CA significantly improved the locomotor activity and tyrosine hydroxylase protein expression in 6-OHDA-lesioned rats. CA prevented 6-OHDA-increased lipid peroxidation and stimulated glutathione (GSH) content in the substantia nigra. Pretreatment with CA significantly increase the protein expression of glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC), glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCLM), superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GRd) and glutathione peroxidase (GSR) compared with 6-OHDA-lesioned rats. Pretreatment with CA significantly decreased apoptotic cell death in down-regulated cleaved-caspase 3, cleaved-poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), Bax and up-regulated Bcl-2 in protein levels compared with 6-OHDA-lesioned rats. In *in vitro* experiments, cells were pretreated with CA for 8 h followed by treatment with 100

μM 6-OHDA for 18 h results indicated that CA significantly decreased 6-OHDA-induced apoptotic cell death by down-regulation of cleaved-caspase 3 or cleaved- PARP, and up-regulation of Bax/Bcl-2 ratio. CA also significantly increased the 6-OHDA-reduced the proteasome activity and the protein expression of antioxidant enzymes, PINK1 and parkin. Moreover, silencing of parkin expression alleviated the inhibition of the protein expression of cleaved-caspase 3 and cleaved-PARP by CA in SH-SY5Y cells. These results suggest that CA may be a promising candidate for neuroprotection in Parkinson's disease.

Keywords: Carnosic acid, 6-hydroxydopamine, neuroprotection, Parkinson's disease, SH-SY5Y neuronal cells, Wistar rats



第一章 前言

帕金森氏症(Parkinson's disease, PD)為老年人常見的神經退化性疾病，是一種慢性中樞神經系統退化性失調，其盛行率在60歲以上的老年人口約佔百分之一，隨著老年人口的增加與暴露於環境毒素的風險提升，現代人罹患PD的機率可能增加。PD的致病原因為中腦黑質(substantia nigra)中選擇性的巴胺神經元損失，導致多巴胺分泌不足影響神經傳導，進而影響患者的動作協調，主要症狀包括靜止時不自主顫動、肌肉僵直、手足顫抖、動作緩慢、站立不穩和運動遲緩等，儘管PD的症狀不會致命，但是卻深深地影響著患者的生活機能。根據文獻指出許多因素都會造成PD，比如：家族遺傳、氧化壓力、發炎反應與粒線體相關蛋白質的突變及錯誤摺疊，皆可能讓多巴胺神經元細胞死亡或退化(Hwang, 2013)。其中許多研究發現氧化壓力會導致腦部多巴胺神經元受損與神經細胞的瓦解，其機轉乃是透過抑制粒線體的complex I (Chaturvedi and Flint Beal, 2013)，當細胞ATP合成受阻、粒線體呼吸鏈被抑制，最終引起神經細胞的死亡(Keeney et al., 2006)。而除了氧化壓力之外，近年來蛋白聚集(protein aggregation)也可能和帕金森氏症的發生有關，其中以parkin基因的突變關係備受討論，文獻指出神經毒素(MPTP或6-hydroxydopamine, 6-OHDA)皆會降低parkin的表現，導致蛋白錯誤摺疊，進而堆積在細胞內造成神經細胞死亡(Chin et al., 2010)。因此，若能有效降低或清除體內的氧化壓力與蛋白摺疊錯誤的堆積，將有助於PD的預防。目前已發現有許多存於蔬果和中草藥的植化素都具有預防PD的效果，例如：銀杏(ginkgo)(Ahmad et al., 2005)、桑葚(Mulberry fruit) (Kim et al., 2010)、薑黃素(curcumin) (Banji et al., 2013)、黃芩素(baicalein) (Zhang et al., 2012)和芸香素(rutin) (Khan et al., 2012)等。

鼠尾草酸(carnosic acid, CA)為迷迭香(*Rosmarinus officinalis*)中的雙萜酚類，具有抗氧化、抗發炎、抑制癌症發展、抗肥胖、抗菌及神經保護作用等功能。其中在神經保護方面，研究發現CA有利於腦部健康，也能預防神經退化性疾病，在近期的研究指出在PC12 細胞中、鼠尾草酸(carnosic acid)和迷迭香酸(rosmarinic acid)都能透過

調控壓力相關蛋白比如：heat shock protein 90 (HSP90)等，而影響神經保護系統及增加神經細胞的耐熱性(A et al., 2012)。PC12細胞在缺氧的模式下，CA能夠增強細胞存活力、防止乳酸脫氫酶的釋放、清除活性氧(reactive oxygen species, ROS)、增加超氧化物歧化酶活性，並減少脂質過氧化、前列腺素E₂和NO產生與降低mitogen-activated protein kinases (MAPKs)活化，達到抗發炎和抗氧化功能(Hou et al., 2012)。在我們先前的實驗中我們也探討CA的神經保護，發現CA能夠改善6-OHDA誘發的SH-SY5Y神經細胞凋亡，且此保護效果可能藉由抑制JNK和p38路徑以及活化GSH相關路徑。然而，對於CA的神經保護作用仍有很多地方有待釐清，因此，在本篇研究中，我們將以動物模式來觀察CA的神經保護作用，並以細胞模式來深入探討其相關機轉。



第二章 文獻探討

一、 帕金森氏症

帕金森氏症(Parkinson's disease, PD)為老年人常見的神經退化性疾病，屬於一種慢性中樞神經系統退化性失調，繼阿茲海默氏症，PD是排行第二的神經退化性疾病(Mayeux, 2003)，在60歲以上的老年人口約佔1%，初期沒有明顯症狀，可能只有疲倦、輕度的肌肉酸痛等，這些症狀不易察覺，當發現罹患帕金森氏症時通常已惡化(Fang et al., 2012)。PD影響到患者的主要症狀有：靜止時不自主顫動 (resting tremor)、肌肉僵直 (muscular rigidity) (Braak et al., 2003)、手足顫抖、動作緩慢和站立不穩等，同時合併有臉部表情木然、多口水、小碎步的步行和行動遲緩 (bradykinesia) 等(Lees et al., 2009)，其病理特徵是腦部黑質中多巴胺神經元大量受損以及紋狀體中多巴胺神經元耗竭(Hirsch et al., 1988)，造成多巴胺分泌不足，而影響神經的傳導。至於黑質細胞如何死亡的機制目前仍不清楚，但目前已有文獻指出粒線體的失調也可能是導致PD的因素之一，粒線體主宰著能量產生，若伴隨著氧化壓力、泛素化系統失調及細胞毒素都有可能導致細胞瓦解(Keeney et al., 2006)，許多研究顯示黑質細胞中的粒線體complex I 失調導致呼吸鏈受損或粒線體的蛋白突變，都會導致PD的發生(Kitada et al., 1998)。

二、帕金森氏症的致病機轉

(一) 氧化壓力

腦部為生命中樞，為了維持正常的運作與功能，往往需要消耗大量的氧氣和 adenosine triphosphate (ATP)，因此腦部比起其他組織更容易處於一個高氧化壓力的環境(Lepoivre et al., 1994)。而且多巴胺的代謝所產生的自由基也會是腦部氧化壓力的另一個來源，在多巴胺神經末端，大多數釋放出去的多巴胺會從神經末端回收，一部分重新使用，一部分則經過粒線體膜上單胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO)氧化後排出，但是每氧化一分子的多巴胺便會產生一分子的過氧化氫，且當有過渡金屬離子存在時，過氧化氫便變成氧化能力更強的羥自由基(hydroxyl radical)，因此，當腦部過多的自由基無法清除時，會造成脂質過氧化、蛋白質錯誤摺疊與細胞 DNA 受損，之後引起細胞的功能失調與結構瓦解，最終導致細胞走向死亡。且由於粒線體的功能是產生 ATP 供細胞存活使用，存在黑質與紋狀體細胞中的粒線體若是被自由基破壞，則會干擾粒線體呼吸鏈的進行，影響神經細胞存亡(Keeney et al., 2006)。有文獻發現 PD 患者的腦部黑質 DNA 易受到氧化傷害，在腦部神經細胞中可發現到有過高的 8-hydroxyguanosine 表現(Dexter et al., 1989)。然而，改善細胞的氧化壓力狀態，除了減少氧化壓力的產生之外，也可以藉由增加清除這些有害自由基的抗氧化酵素，如過氧化氫酶(catalase)、穀胱甘肽過氧化酶(glutathione peroxidase, GPx)及超氧化歧化酶(superoxide dismutase, SOD)，以降低神經退化的發生。最近幾年有許多研究都涉及到蔬果中植化素的補充可改善腦部抗氧化酵素的含量，進而達到神經保護的效果，例如：薑黃素(curcumin) (Banji et al., 2013)、黃芩素(baicalein) (Zhang et al., 2012)和芸香素(rutin) (Khan et al., 2012)等。

(二) 環境毒素

近年來的研究指出，環境中的有毒物質也可能是引發帕金森氏症的重要原因之一，這類的環境毒素包含：除草劑1,1'-dimethyl-4, 4'-bipyridinium (paraquat)、殺蟲劑和農藥等(Brown et al., 2006; Grant et al., 1980)，這些毒素會使腦內多巴胺神經元分泌多巴胺的能力受到阻遏(Brooks et al., 1999)，根據動物研究指出，paraquat與1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)的處理之下，會使C57 bl/6小鼠有行為障礙、腦內黑質多巴胺神經元密度和多巴胺合成限制酵素酪氨酸羥化酶(tyrosine hydroxylase, TH)減少(Brooks et al., 1999)。另外，流病研究也指出長期使用paraquat的人，其罹患PD的機率會增加(Wesseling et al., 2001)，可能機轉包括透過抑制粒線體complex I、阻礙蛋白分解體系統和生成ROS等，導致黑質體中多巴胺神經元退化(Liang et al., 2013; Yang and Tiffany-Castiglioni, 2005)。而魚藤酮(rotenone)是常用殺蟲劑和農藥，研究發現在動物及細胞模式之下處理rotenone會減少穀胱甘肽(glutathione, GSH)，增加 α -synuclein的堆積，並形成路易氏體(Bove et al., 2005; Li et al., 2004)。

(三) 發炎反應

發炎對於PD的發展也不容忽視。有研究指出在MPTP誘導的PD模式下，NADPH 氧化酶及 inducible nitric oxide synthase (iNOS)會向上調節而促進動物腦部受損區塊的增加(Liberatore et al., 1999)。有文獻指出 NADPH 氧化酶及 iNOS 會促使小鼠會產生超氧陰離子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 和一氧化氮 ($NO\cdot$)，進而促使在MPTP誘發的模式之下PD的發展(Wu et al., 2002)。另外，過多的 cyclooxygenase-2 (COX-2)活化也可能引起MPTP模式之下的動物產生發炎反應，繼而導致腦部多巴胺分泌量減少和多巴胺神經細胞死亡(Jackson-Lewis and Smeyne, 2005)。

(四) 家族遺傳與錯誤蛋白質堆積

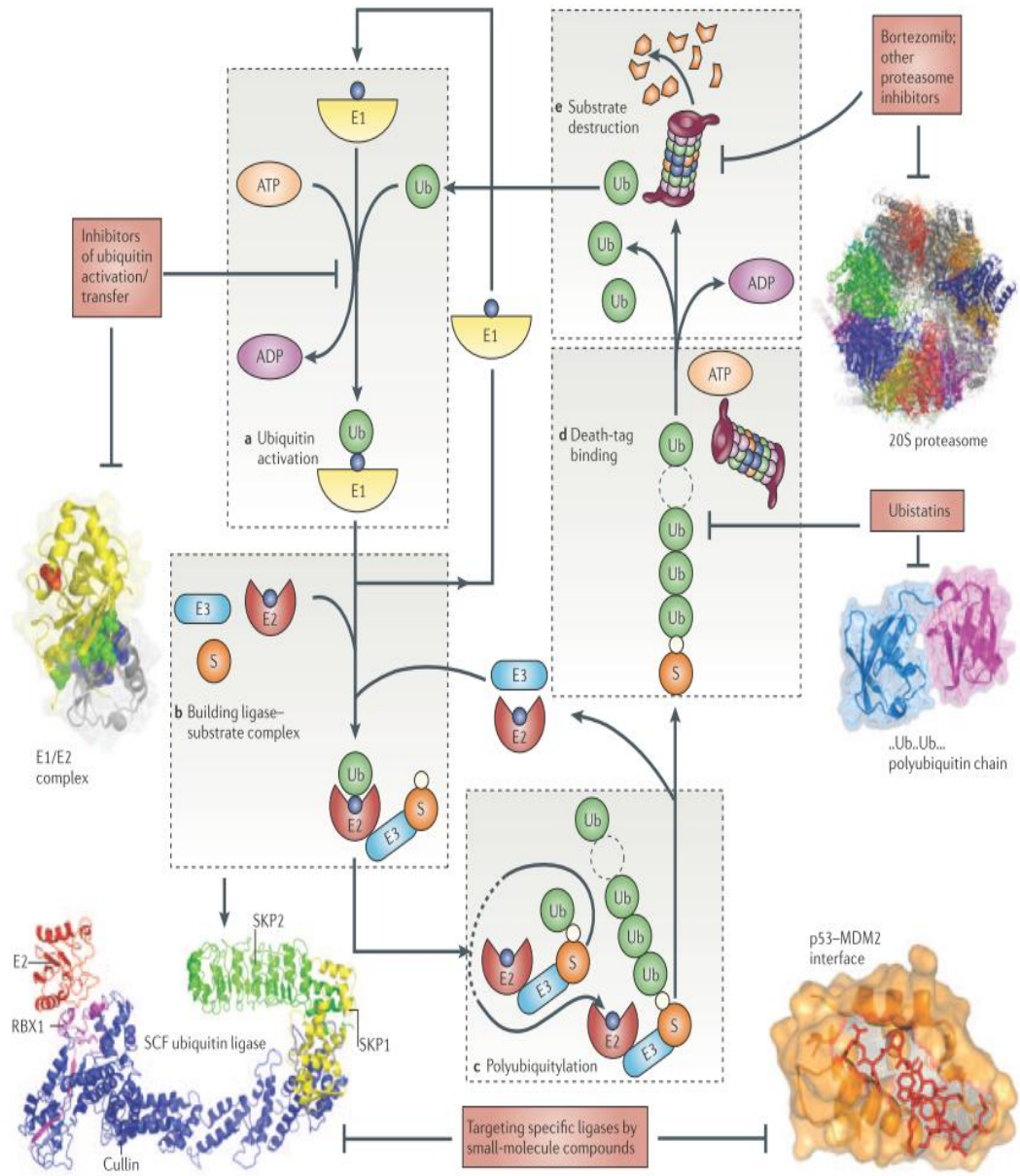
PD的患者中約有10%與家族性遺傳有關，目前已知有許多基因的突變是引起遺傳性PD的致病因，包括:1997年首先被發現的 α -synuclein基因 (PARK1) (Kasten and Klein, 2013)及之後陸續發現的parkin基因 (PARK2)、DJ-1基因(PARK7)、leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)和PTEN induced putative kinase 1 (PINK1)等(Trempe and Fon, 2013)(表一)，在這些研究指出PD的致病機轉牽涉到粒線體功能失調、不正常折疊的蛋白質堆積、泛素蛋白酶體系統(ubiquitin-proteasome system)功能失常以及氧化壓力(oxidative stress)失去平衡等(Beilina et al., 2005)。許多研究皆指出在PD患者黑質中GSH的含量很低，大量的ROS堆積，有些蛋白質會產生錯誤的折疊，包括 α -synuclein (Kasten and Klein, 2013)、DJ-1 (Li et al., 2013a)、Parkin (Vandiver et al., 2013)和PINK1 (Esposito et al., 2013)等，這些基因的突變與家族性PD的發展有關聯。

Locus	Inheritance	Gene	Comments
PARK1	AD	α -Synuclein	First PD gene identified. Protein is a major component of Lewy-body
PARK2	AR	Parkin	Most common form of autosomal-recessive juvenile parkinsonism
PARK3	AD	SPR?	Gene not known with certainty
PARK4	AD	α -Synuclein	Duplications and triplications of the SNCA gene
PARK5	AD	UCH L1	Role uncertain
PARK6	AR	PINK1	Second most common form of AR-JP
PARK7	AR	DJ-1	Rare
PARK8	AD	LRRK2	Most common form of dominant PD
PARK9	AR	ATP13A2	Complex phenotype with parkinsonism, spasticity and dementia
PARK11	AD	GIGYF2 ?	Role of gene not yet certain
PARK13	AD ?	OMI/HtrA2	No cosegregation shown to support pathogenicity

表一、與帕金森氏症相關的基因(Gasser, 2009)

Parkin

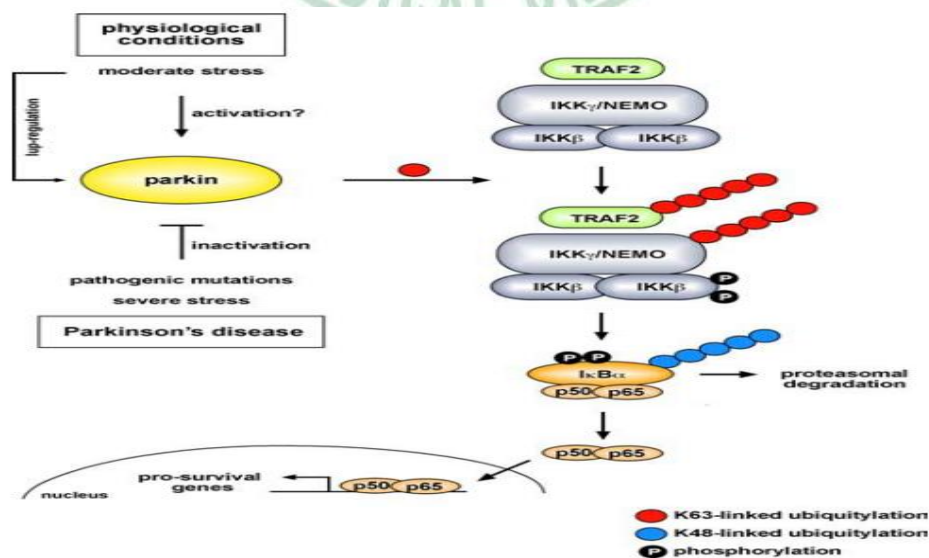
Parkin是泛素蛋白酶體系統(圖一)中的一種泛素連接酶E3 (ubiquitin protein ligase E3)，功能為辨識摺疊錯誤的蛋白質，讓ubiquitin在此蛋白質上接合(ligation)形成一長鏈，以送至蛋白酶體降解，減少體內錯誤蛋白質的堆積，因此parkin的突變可能會造成泛素蛋白酶體系統異常，而造成摺疊錯誤的蛋白質堆積於細胞，增加神經元的死亡(Pawlyk et al., 2003)。確實，臨床上發現有些PD患者神經元死亡的原因與泛素化過程受阻，蛋白堆積有關(Imai and Takahashi, 2004)。研究也指出神經毒素(如：MPP⁺、6-OHDA和rotenone或paraquat)的處理下會降低parkin表現，導致泛素蛋白酶體系統活性下降而引起神經細胞死亡(Koch et al., 2009; Um et al.; Wang et al., 2005)。若以基因轉殖方式大量表現parkin則能夠保護SH-SY5Y神經細胞抵抗6-OHDA多巴胺產生的氧化壓力和capase 3活化，避免細胞凋亡的發生(Henn et al., 2007; Higashi et al., 2004; Wang et al., 2005)。由此可知parkin的表現與多巴胺神經元細胞的生存可能有極密切關係，在PD的發展過程中其角色是不容忽視的，因此若能由飲食因子上調parkin的表現，將有助於帕金森氏症的預防。



圖一、Overview of the ubiquitin-proteasome system (UPS) (Nalepa et al., 2006)

研究指出parkin也可能參與了粒線體的保護機制(Nalepa et al., 2006)，免於粒線體受到過多ROS的破壞(Keane et al., 2011)。在PD果蠅模式中parkin基因的突變會使粒線體電子傳遞鏈complex I 活性受到抑制，影響ATP的產生(Greene et al., 2003)；從缺乏parkin的果蠅中發現parkin的突變會影響粒線體complex I，使呼吸鏈效能降低，並減少血清中的抗氧化能力與增加脂質及蛋白質的過氧化能力(Palacino et al., 2004)。在將人類突變的parkin以基因轉殖方式送至果蠅的體內模式中，發現帶有R275W突變parkin的果蠅會隨著年齡或處理神經毒素毒藤酮(rotenone為complex I 抑制劑)而增加神經的退化與運動失調，顯示parkin的突變會增加PD的發生。

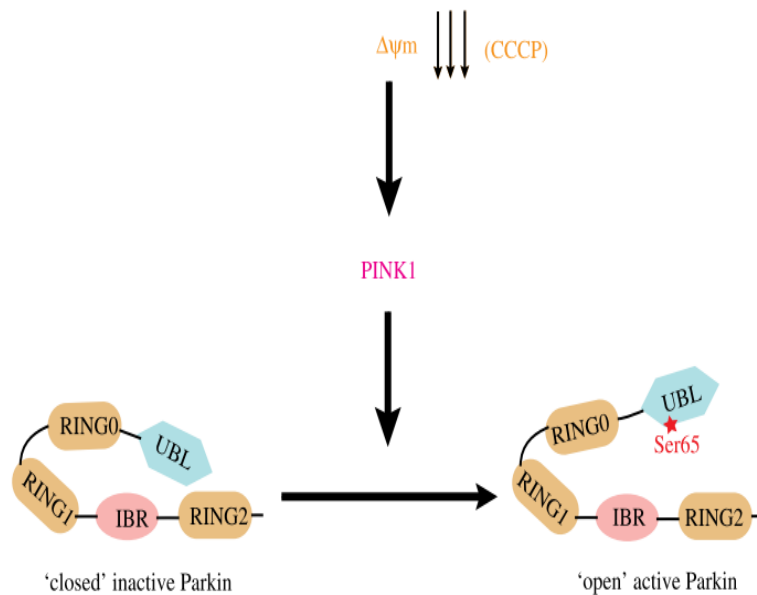
除此之外，研究也發現parkin的神經保護作用也與I κ B kinase (IKK)/NF- κ B的路徑調控有關，parkin可能透過將IKK γ 進行degradation-independent的Lys63-linked ubiquitination而活化IKK複合物，影響下游的I κ B發生降解，使轉錄因子NF- κ B進到細胞核內，並調控下游的促生存基因(pro-survival gene)之轉錄作用，以維持人類HEK293T和SH-SY5Y神經細胞的生存(Henn et al., 2007)(圖二)。另外，parkin的Lys63-linked ubiquitination也會幫助錯誤摺疊蛋白質形成的聚集體(aggresome)，經由細胞自噬(autophagy)清除(Olzmann and Chin, 2008)。



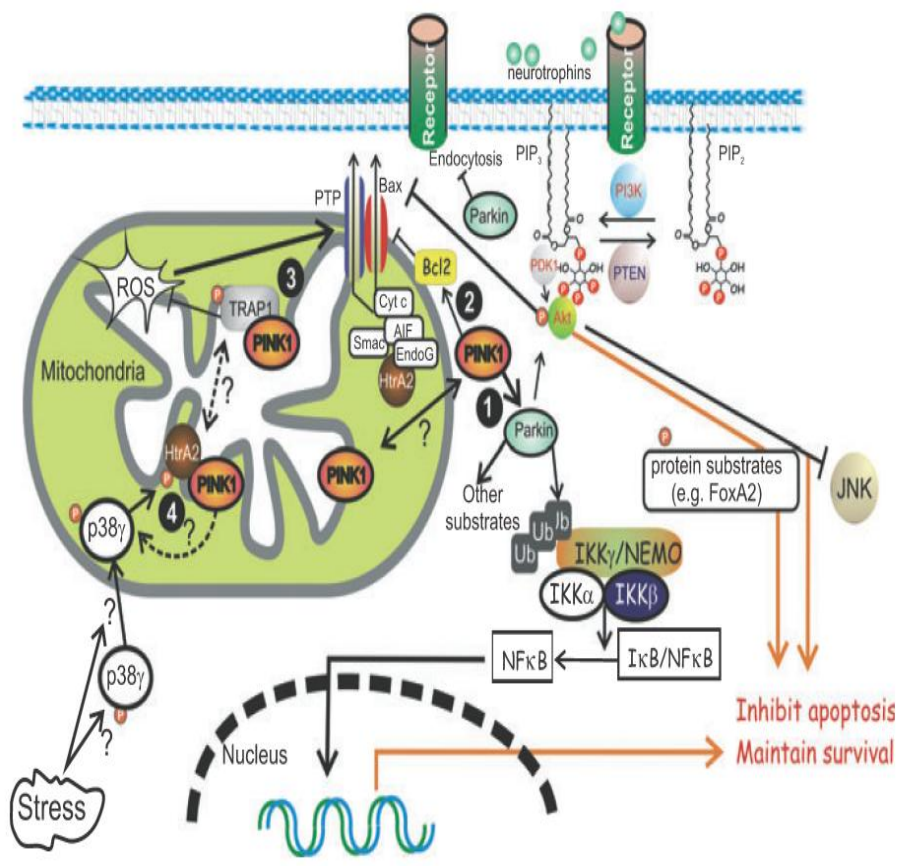
圖二、Parkin 的調控角色(Henn et al., 2007)

PTEN induced putative kinase 1 (PINK1)

PINK1是位於粒線體內膜的serine/threonine蛋白激酶，其功能為保護細胞粒線體免於壓力的破壞，當對哺乳動物細胞處理去耦合劑CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone)，PINK1受粒線體膜電位去極化所活化並藉由磷酸化作用刺激parkin E3 ligase活化(Silvestri et al., 2005) (圖三)(Kondapalli et al., 2012)，而PINK1也會活化parkin進而調控NF- κ B，發揮神經保護作用(Sha et al., 2010)。PINK1基因的突變與PD的進展有關，PINK1在粒線體調控著粒線體的完整性與裂變，進而可能影響多巴胺突觸和促進多巴胺神經元變性(Kondapalli et al., 2012)。在SH-SY5Y細胞實驗中6-OHDA的處理下PINK1的突變會誘導線粒體氧化壓力的產生、線粒體瓦解和自噬作用，並影響鈣離子的動態平衡進而使細胞凋亡(圖四)(Chien et al., 2013; Dehorter et al., 2012)。



圖三、PINK1 調控 parkin 的活化 (Chien et al., 2013)



圖四、A model of the putative neuroprotective mechanisms of PINK1. (Mills et al., 2008)

三、帕金森氏症的治療方法

PD 患者產生動作不協調的生活障礙主要歸因於腦內多巴胺的含量不足所導致，因此臨床上多以增加多巴胺合成，或是避免多巴胺降低為目標進行治療，目前的治療方法包括藥物治療、手術、基因治療和幹細胞移植。

(一) 藥物治療

由於多巴胺本身不能通過血腦屏障，因而PD患者需要靠藥物的給予做補充，常用的藥物有單胺氧化酶B抑制劑(monoamine oxidase B inhibitors)、多巴胺受體激動劑(dopamine agonists)、N-甲基-D-天冬氨酸受體拮抗劑 (N-methyl-D-aspartate antagonists)和左旋多巴(levodopa)等，其中，以左旋多巴治療PD的效果最佳(Muller, 2013)。

(二) 手術

當藥物治療無法解決 PD 患者的症狀時，外科手術治療便成為另一種選擇。目前的研究中，手術的方法包含腦部丘腦底腦刺激深層的電刺激(Kim et al., 2013)、電腦輔助立體定向方法(Xue et al., 2013)或丘腦底核與蒼白球的灼燒切開術等(Weintraub et al., 2013)。

(三) 基因治療

根據近期的研究發現基因治療為治療 PD 的另一種方式，腦部多巴胺神經營養因子(cerebral dopamine neurotrophic factor, CDNF)已被發現在 PD 誘發模式的大鼠及小鼠中扮演一個神經保護的角色。在此研究中，作者將帶有 CDNF 蛋白的 recombinant adeno-associated viral serotype 2 載體送進大鼠紋狀體以觀察對 6-OHDA 誘導 PD 模式下的神經保護作用，從蛋白質的表現來看此載體能有效地傳遞神經營養因子到大腦，減少 amphetamine 引發的對側旋轉，並且部分增加酪氨酸羥化酶 (tyrosine hydroxylase, TH)的作用，因此認為以基因治療方給予 CDNF 也能作為一種治療 PD

的方式(Airavaara et al., 2012; Back et al., 2013)。

(四) 幹細胞移植

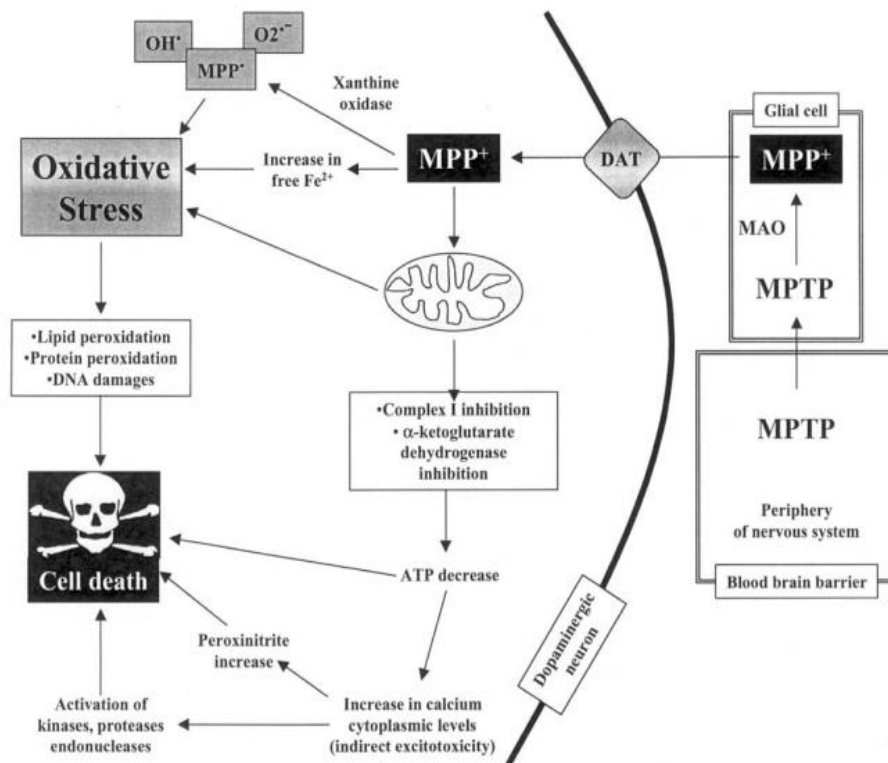
胚胎幹細胞(embryonic stem cells, ESCs)移植也被認為具有治療 PD 的潛力，此種方法能夠取代 PD 患者腦內原先受損的神經細胞，實驗期間，將大鼠植入預先設計好的鼠類 CGR8 胚胎幹細胞，使其在紋狀體及黑質受損的 PD 模式大鼠穩定表現出膠質細胞源性神經營養因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)和 TH，結果發現，胚胎幹細胞的移植能改善 6-OHDA 引起的運動失調與多巴胺降低，因此也認為此方法有可能發展成為治療 PD 的方式(Liu et al., 2013)。



四、帕金森氏症的誘導藥物

(一) MPTP

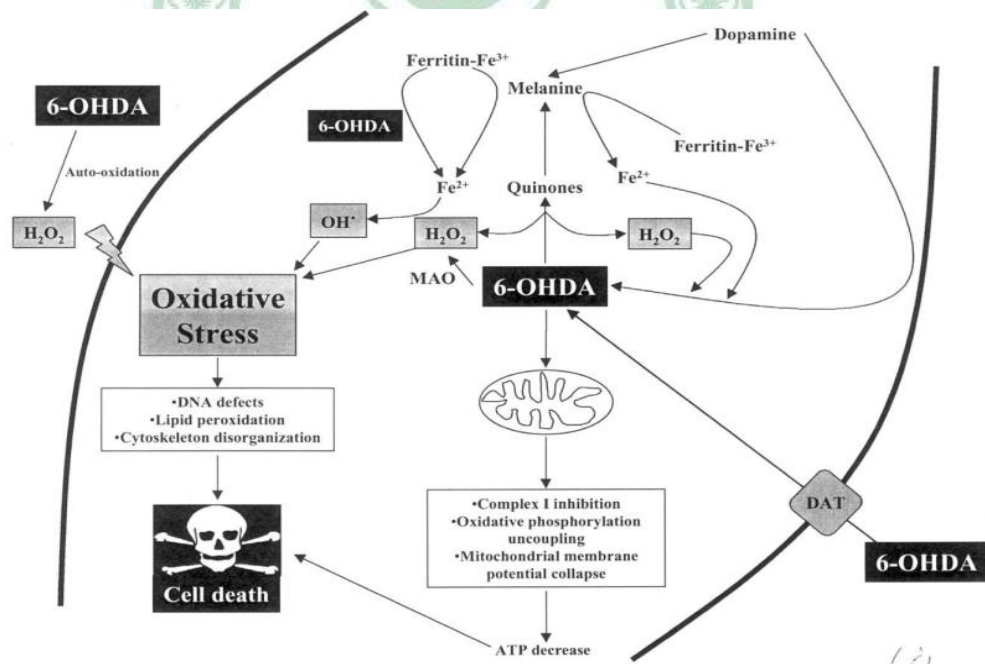
MPTP 屬於一種脂溶性神經毒素，能夠破壞黑質中的多巴胺神經元而導致類似帕金森氏症的症狀，目前已被運用於帕金森氏症的相關研究。MPTP 能通過血腦屏障，當 MPTP 進入大腦之後，會被神經膠質細胞的 MAO 代謝成有毒的 MPP^+ (Jiang et al., 2012)。當 MPP^+ 經由 dopamine transporter (DAT) 攜帶進入細胞會產生氫氧自由基、超氧陰離子及游離鐵離子，進而產生氧化壓力引起細胞脂質及蛋白質的過氧化和 DNA 損傷，而破壞大腦中黑質緻密部的多巴胺神經元，使細胞死亡。另外， MPP^+ 也會干擾線粒體代謝中的電子傳鏈 complex I，抑制 α -ketoglutarate dehydrogenase 的作用，使 ATP 產生減少，此二種路徑皆會產生大量的自由基堆積及粒線體抑制，造成細胞死亡，作用機制如圖五 (Blum et al., 2001)。



圖五、MPTP 的神經毒性機制 (Blum et al., 2001)

(二) 6-OHDA

6-OHDA 也是一種神經毒素，它主要的作用是導致黑質神經損傷。6-OHDA 結構類似多巴胺，因為無法通過血腦屏障，6-OHDA 必須使用開腦定位注射的方式給予。在 PD 大白鼠動物模式中，通常注射到紋狀體、黑質或內側前腦束中，以破壞黑質多巴胺神經元，產生類似 PD 的症狀。研究中常單側給予 6-OHDA 誘發黑質多巴胺神經元退化，之後再給予多巴胺促動劑，會使動物產生不對稱的旋轉行為，藉此評估黑質多巴胺神經元破壞的程度(Latchoumycandane et al., 2011)，其作用機制如圖六所示(Blum et al., 2001)。6-OHDA 會經由 DAT 攜帶進入細胞，經 MAO 代謝後產生過氧化氫、氫氧自由基、鐵離子，而鐵離子也會與過渡金屬反應造成氧化壓力。而 6-OHDA 也會抑制粒線體 complex I、干擾氧化磷酸化、使粒線體膜電位降低，導致 ATP 產量減少，造成細胞的死亡。另外，6-OHDA 本身也會自氧化作用產生過氧化氫，過多的氧化壓力會造成細胞脂質過氧化、DNA 損傷進而引起死亡。



圖六、6-OHDA 的神經毒性機制 (Blum et al., 2001)

五、抗氧化機制與帕金森氏症

(一) GSH

GSH 是一種很強的抗氧化劑，在腦部當中扮演極重要的清除自由基角色，它可清除 H_2O_2 和過氧化物，在清除的過程中，氧自由基會氧化 GSH 形成氧化型 GSSG，GSSG 可經麩胱甘肽還原酶(glutathione reductase, GSR)反應再生，以維持抗氧化平衡(Meister, 1988)。有研究數據指出，在 6-OHDA 注射誘導 PD 的大鼠，其腦內 GSH 含量顯著地減少(Khan et al., 2012)，目前的研究中發現植物中的某些成分能夠提高腦內 GSH 的含量，比如是薑黃素(curcumin) (Agrawal et al., 2012)。

(二) SOD

超氧歧化酶(SOD)的生理作用為促使具毒性的超氧陰離子轉變成過氧化氫，減少細胞內的超氧陰離子的堆積，其反應如下：

$2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (Freeman and Crapo, 1982)，而 H_2O_2 可進一步由觸酶(catalase)轉換成 H_2O 。研究指出在 6-OHDA 誘導 PD 大鼠動物實驗模式下，腦內會蓄積大量自由基，引起細胞膜脂質過氧化，SOD 的含量明顯少於正常組，但若有 rutin 的處理則可以回復 SOD 的酵素活性表現(Khan et al., 2012)。

(三) GPx

麩胱甘肽過氧化酶(GPx)主要功能是還原過氧化氫或過氧化脂質成為氧與水等產物。此功能是將 GSH 氧化成 GSSG，也因此 GPx 的含量也關係著 GSH 的氧化還原平衡，GSH 是腦部最重要的抗氧化劑，GPx 若在神經毒素 6-OHDA 處理之下，GPx 及 GSH 的表現量與控制組相比也會顯著降低，若有 rutin 的處理則可以回復 GPx 及 GSH 的表現量(Khuwaja et al., 2011a)。

(四) GSR

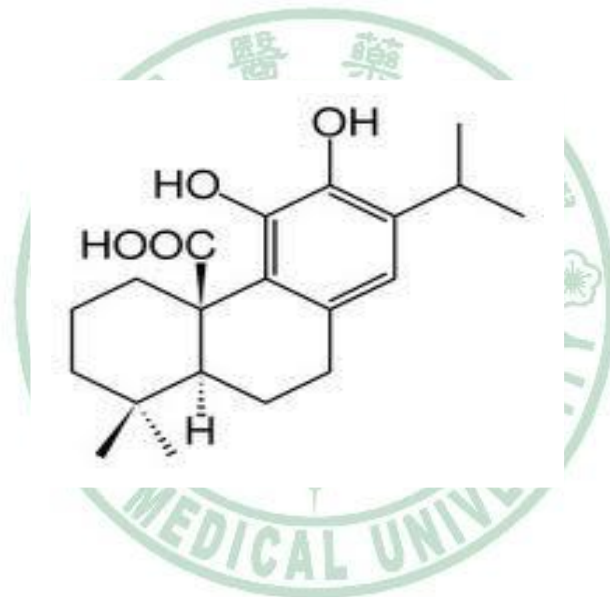
麩胱甘肽還原酶(GSR)，是GSSG還原成GSH所需的酵素，其反應如下：

$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$ 。一般細胞狀況下GSH/GSSG比值高，但GSSG濃度增加時，就需要GSR將GSSG還原成GSH，以維持體內抗氧化酵素系統的平衡。許多抗氧化酵素的降低都涉及了PD的發展，研究發現6-OHDA處理下大鼠腦內GSR也顯著地降低(Khuwaja et al., 2011a)。



六、鼠尾草酸(carnosic acid, CA)

CA 是迷迭香(rosemary, *Rosmarinus officinalis L*)中的雙萜酚類，約佔迷迭香葉子乾重的 5% (Kosaka and Yokoi, 2003)，具有很強的抗氧化能力，為迷迭香中所有抗氧化成分中比例最高者(約 90%以上) (Aruoma et al., 1992)。研究指出 CA 具有抗氧化 (Sato et al., 2008)、抗發炎(Hadad and Levy, 2012)、抑制癌症發展(Petiwala et al., 2013)、抗肥胖(Gaya et al., 2013)、抗菌(Jordan et al., 2012)及神經保護作用(A et al., 2012)等功能，其結構如圖七。



圖七、鼠尾草酸(carnosic acid, CA)結構

(一) 抗氧化

CA在許多文獻中皆指出具有抗氧化的功效，Sato等人2008年即發現在HT22神經細胞中，處理CA能夠透過活化Keap1/Nrf2路徑，活化hemeoxygenase-1，NAD(P)H-quinone oxidoreductase和 γ -glutamyl cysteine ligase，啟動抗氧化作用保護神經細胞免於游離羧酸(free carboxylic acid)的損傷(Sato et al., 2008)。鼠尾草酚和鼠尾草酸，對於降低脂質過氧化、自由基之清除、預防DNA片斷化都有極佳的功效。(Aruoma et al., 1992)。我們實驗室曾探討CA和CS對大鼠Clone 9肝細胞株其解毒酵素基因表現之影響，我們則發現CA和CS可能藉由p38-Nrf2-ARE路徑上調NQO1基因，且其中以CA效果較好(Tsai et al., Journal of Nutrition, 2011)。另外，在食品應用方面CA以及迷迭香酸(rosmarinic acid, RA)的抗氧化性質也用於防止肉品的脂質過氧化，研究指出CA能夠降低游離脂肪酸並防止脂質過氧化的作用(Basappa Maheswarappa et al., 2013)。在lipopolysaccharide (LPS)誘導大鼠肝毒性的模式之下，CA的給予能夠抑制肝損傷、改善脂質代謝之外，也能藉由降低脂質過氧化、降低蛋白質carbonylation及血清中的nitric oxide，抑制LPS所誘導的氧化傷害。因此補充CA能夠藉由提高superoxide dismutase、glutathione peroxidase、glutathione增加體內的抗氧化防禦系統的能力(Xiang et al., 2013)。

(二) 抑制癌症

文獻指出CA能有效地抑制抑制Caco-2、HT29和LoVo等結直腸癌細胞的生長，並呈劑量關係，而CA透過降低如尿激酶型纖維溶酶原激活劑(uPA)和金屬蛋白酶(MMPs)蛋白酶的活性抑制細胞的黏附和遷移(Barni et al., 2012)。CA亦能抑制ER陰性人乳腺癌細胞的增殖，使細胞週期停滯於G1期 (Einbond et al., 2012)。

(三) 抗發炎功能

CA在抗發炎方面有文獻指出在phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)誘發小鼠耳炎的模式中，CA (10.20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)能夠降低IL-1 β 和TNF- α 的mRNA表現，從組織病理學分析染色組織也發現CA顯著地減少白血球細胞浸潤(leukocyte infiltration)，在RAW 264.7小鼠巨噬細胞中也觀察到CA能夠降低一氧化氮(NO)的過度產生，並呈現濃度依賴關係，由此可知在體內或體外實驗皆可看到CA具有抗發炎的特性(Mengoni et al., 2011)。另外，Oh等人(2012年)在最近的研究也發現CA顯著地抑制HaCaT角質細胞用sodium lauryl sulfate和retinoic acid刺激所產生的IL-6、IL-8且能夠阻斷RAW 264.7小鼠巨噬細胞由peptidoglycan、pam3CSK和LPS所產生的一氧化氮、TNF- α 和前列腺素E₂，進一步研究也發現這些抑制效應與CA抑制NF- κ B、Syk/Src和phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt等路徑有關(Oh et al., 2012)。

(四) 抗菌

在迷迭香葉子和莖的萃取物的抗菌研究，顯示葉子萃取物對於引發齲齒的變形鏈球菌和遠緣鏈球菌其抑制效果較佳，且其成分經過鑑定後發現CA和CS為主要的活性成分(Bernardes et al., 2010)。另外，在水溶性及脂溶性迷迭香萃取物抑制芽孢桿菌、金黃色葡萄球菌、和沙門氏菌的實驗中也發現脂溶性鼠尾草酸的抗菌效率最高(Klancnik et al., 2009)。

(五) 抗肥胖

研究指出CA具有抗肥胖的功能，在3T3-L1細胞模式之下，CA的處理能抑制3T3-L1前脂肪細胞分化 (Gaya et al., 2013)。在動物實驗方面CA對ob / ob小鼠有降低體重、減少內臟脂肪、降低血清甘油三酯和膽固醇，也能改善葡萄糖耐受性，也因此認為CA有抗肥胖的功能(Wang et al., 2011)。

(六) 神經保護

研究文獻指出CA能夠保護海馬神經元，防止大鼠的神經退化及改善記憶 (Azad et al., 2011)。CA對於神經保護作用在近幾年也陸續有不少相關的研究，Hou等人2012年指出CA可保護大鼠腦部因缺血/再灌流所造成的損傷，且在PC12細胞缺氧的模式下，CA能夠增強細胞存活力、防止乳酸脫氫酶的釋放、清除活性氧(reactive oxygen species, ROS)、增加超氧化物歧化酶活性，並減少脂質過氧化、前列腺素E₂和NO產生與降低mitogen-activated protein kinases (MAPKs)活化，因此CA在缺血/缺氧條件下保護神經細胞的機制是透過清除活性氧和NO的產生與抑制MAPKs路徑而達到抗發炎和抗氧化功能(Hou et al., 2012)。而CA在我們先前的細胞實驗中也發現具有神經保護作用，在SH-SY5Y神經細胞以1 μM CA處理12小時，可以依濃度關係減少6-OHDA造成的細胞毒性和ROS生成以及JNK和p38磷酸化；且CA會隨處理時間增加GSH含量和γ-glutamylcysteine ligase蛋白表現，若預處理GSH合成抑制劑

L-buthionine-sulfoximine (BSO)，則會降低carnosic acid抑制細胞傷害和凋亡的能力
(Chen et al., 2012)



第三章 研究動機與目的

PD乃居老年人神經退化性疾病第二位，當腦內黑質的多巴胺神經元損傷百分之80以上，造成多巴胺分泌量不足，就導致動作不協調的症狀。許多文獻也指出多種引起PD的成因，如：氧化壓力、環境毒素、家族遺傳、蛋白質突變及粒線體功能失調等，皆可能引起ROS的累積，造成神經細胞死亡或退化。因此如何避免細胞內的自由基過度累積及神經元的退化是預防或改善PD的主要目標。而CA已被研究發現是迷迭香中很強的抗氧化成份，近幾年來CA的神經保護作用也被廣泛的研究，然而其作用機轉仍有很多未釐清，因此本研究將欲探討CA在動物和細胞6-OHDA誘導PD模式之下，對行為表現、抗氧化酵素和泛素蛋白酶體系統等的神經保護效果。

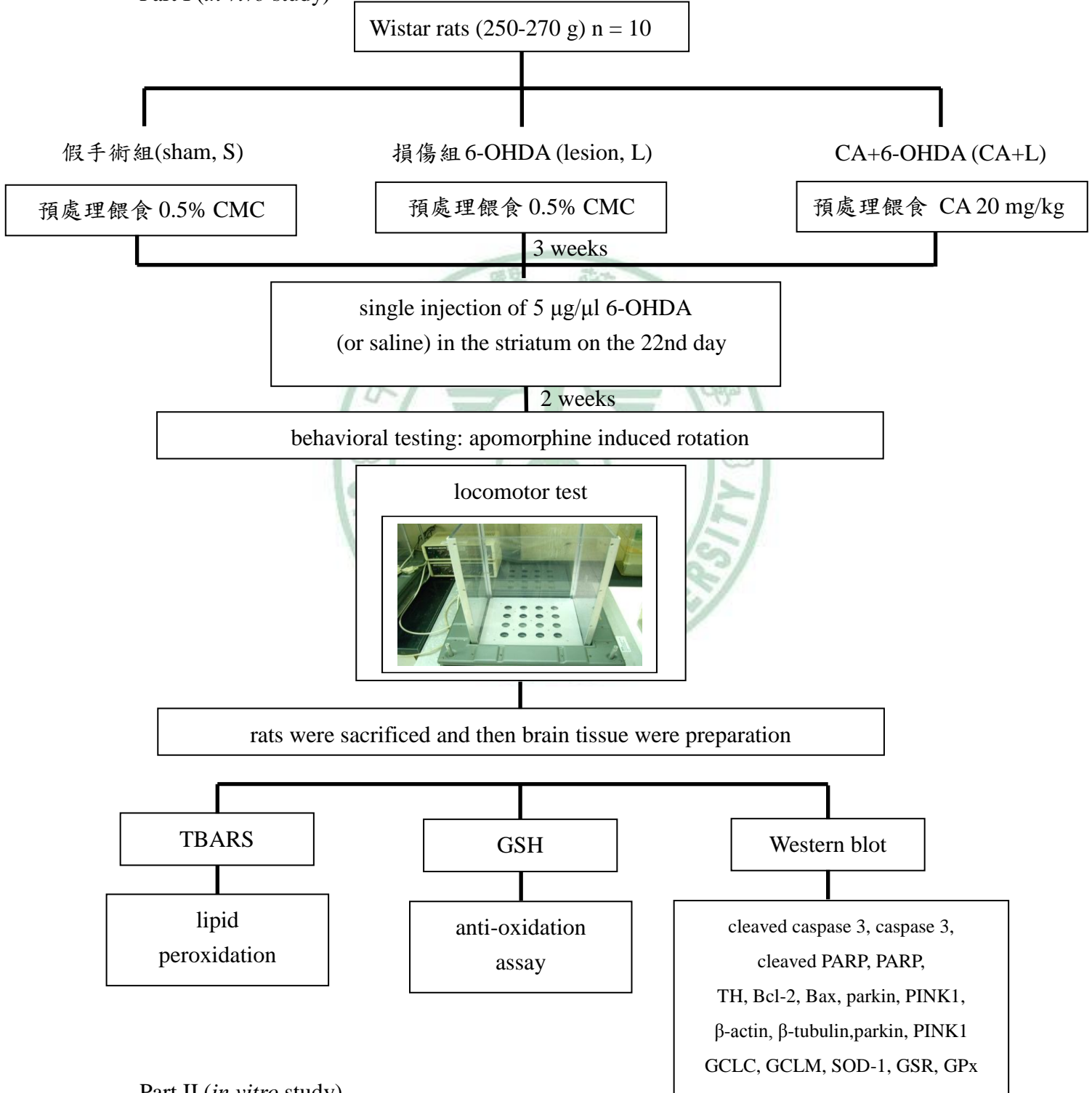


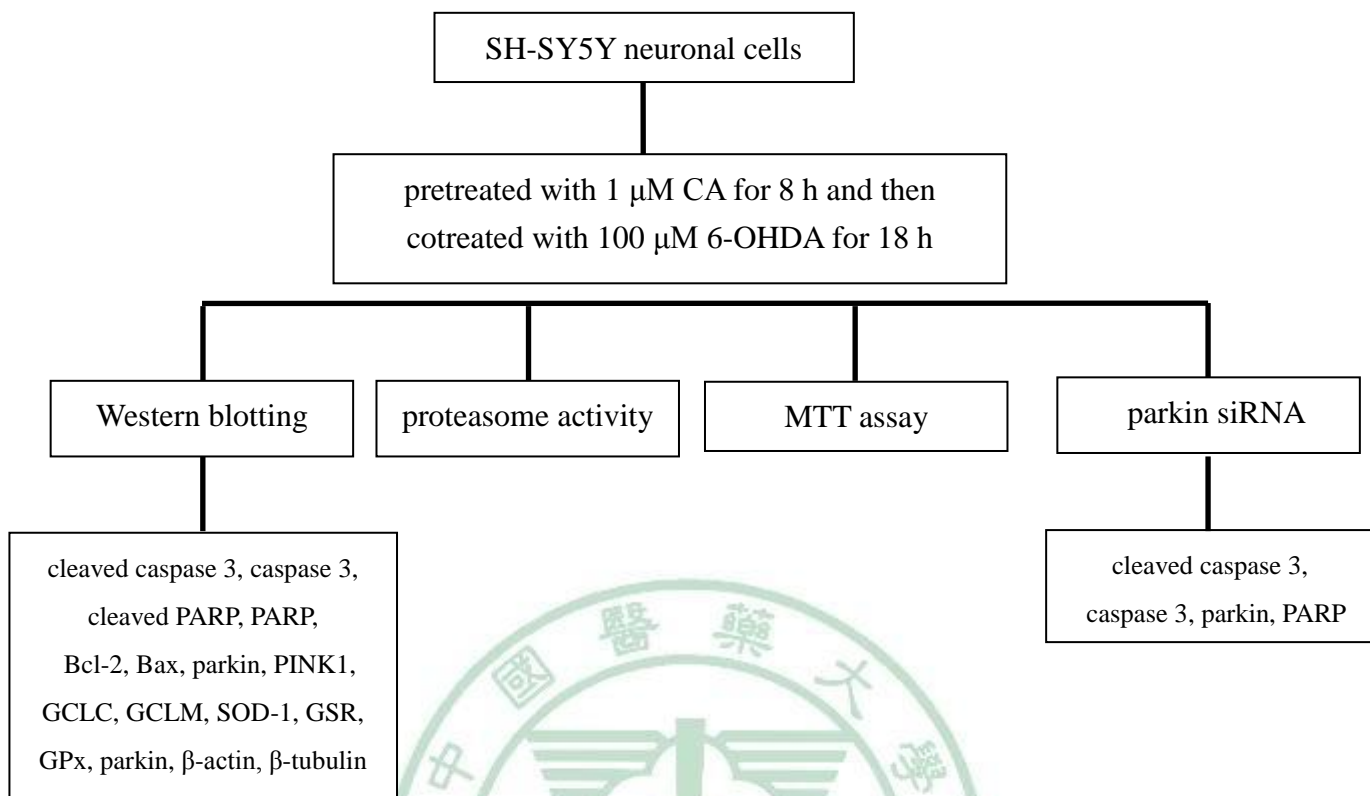
第四章 實驗材料及方法

一、實驗架構

實驗設計

Part I (*in vivo* study)





二、實驗材料

(一)實驗動物

本實驗採用樂斯科生物科技股份有限公司提供的 Wistar 系 6 週雄性大鼠，體重約 250 g，飼養於溫度控制在 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的空調飼養室，採 12 小時晝、和 12 小時夜 (08:00 燈亮和 20:00 燈暗) 的燈光控制系統，期間食物與飲水供應不限制。

(二)鼠尾草酸 (carnosic acid, CA)

動物購自昶安科技有限公司: 純度 $\geq 95\%$

溶於 0.5% 羧甲基纖維素鈉 (sodium carboxymethylcellulose, CMC)

(三)神經毒素(6-hydroxydopamine,6-OHDA)

購自 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)

(四)動物組織處理、採集用藥

購自 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)

Heparin

Ethylenediaminetetracetic acid (EDTA)

(五)臟器均質液

購自 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)

Potassium phosphate dibasic anhydrous (K_2HPO_4)

Potassium phosphate monobasic anhydrous (KH_2PO_4)

Potassium chloride (KCl)

(六)運動量測定儀

運動量測定儀為一 $50\text{ cm} \times 50\text{ cm} \times 40\text{ cm}$ 的測試箱，實驗軟體為:

TRU ScanTM photobeam sensor E63-12

(七)蛋白質定量

購自 Pierce Chemical Company (Rockford, IL)

Comassive Plus Protein assay reagent kit

(八)西方墨點法試劑

1. 購自 United States Biological (Swampscott, MA)

30% lipid Acrylamide

Glycine

Tris-Base Ultrapure

2. 購自 Bio Rad Laboratory

Ammonium persulfate (APS)

3. 購自 Perkin-Elmer Life Science (Boston, MA)

Enhanced chemiluminescence kit

4. 購自 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)

N, N, N,N-tetramethylethyethylene diamine (TEMED)

Polyoxyethyleneosorbitan monolaurate (Tween 20)

Ponceau S solution

5. 購自 Merck Chemical Company (Darmstadt, Germany)

99.8% Ethanol

Isopropanol

6. 購自 Millipore (Bedford, MA)

Polyvinylidene difluoride transfer membrane (PVDF)

(九) 抗體名稱與廠牌 (表二)

抗體名稱	廠商	濃度	時間
Rabbit-anti-caspase 3 antibody #9662	Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA)	1:1000	overnight
Rabbit-anti-cleaved caspase 3 (Asp175) Antibody #9661	Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA)	1:1000	overnight
Rabbit-anti- PARP antibody # 9532	Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA)	1:1000	overnight
Rabbit-anti-cleaved PARP (Asp214) antibody	Cell Signaling Technology Inc.(Beverly, MA)	1:1000	overnight
Rabbit-anti- Bcl-2 antibody # 2876	Cell Signaling Technology Inc.(Beverly, MA)	1:1000	overnight
Rabbit-anti- Bax antibody # 2772	Cell Signaling Technology Inc.(Beverly, MA)	1:1000	overnight
Anti-GCS polyclonal antibody Ab17926	Abcam (Cambridge, MA, USA)	1:1000	overnight
γ -GCLm polyclonal antibody sc-22754	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz)	1:1000	overnight
Rabbit anti-actin monoclonal antibody	Sigma Chemical Company (St. Louis, MO)	1:2000	1 h
Tyrosine hydroxylase sc-374048	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz)	1:1000	overnight
Anti- β -tubulin monoclonal antibody	Sigma Chemical Company (St. Louis, MO)	1:2000	1 h

Rabbit anti-GPx-1 antibody GTX116040	Gene Tex	1:1000	overnight
Rabbit anti-GRd antibody GTX114199	Gene Tex	1:1000	overnight
Rabbit anti-SOD-1 antibody GTX100659	Gene Tex	1:1000	overnight
Rabbit anti-PINK1 antibody sc-33796	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz)	1:1000	overnight
Mouse anti-Parkin antibody #4211	Cell Signaling Technology Inc.(Beverly, MA)	1:1000	overnight
Rabbit anti-Lamin B1 antibody GTX 103292	Gene Tex	1:1000	overnight
Mouse anti-p65 antibody #06-418	Millipore Corporation (Beaford, MA, USA)	1:1000	overnight

(十) Glutathione, reduced (GSH)測定試劑

1.購自 United States Biological (Swampscott, MA)

Tris-Base Ultrapure

2.購自 Sigma Chemical Company (St, Louis, MO)

Butylated hydroxytoluene (BHT)

GSH

5, 5 Dithiobis (2-nitro-benzoic acid)

Trichloroacetic acid (TCA)

Ethylenediaminetetracetic acid (EDTA)

(十一) 脂質過氧化測定

購自 Sigma Chemical Company (St, Louis, MO)

2-Thiobarbituric acid (TBA)

Trichloroacetic acid (TCA)

1, 1, 3, 3,-Tetramethoxypropane (TMP)

(十二)細胞來源

人類神經母細胞瘤 SH-SY5Y 購自 American Type Culture Collection (ATCC) , 因 SH-SY5Y 細胞能夠表現出多巴胺活性因此常被用來做為研究 PD 的模式(Xie et al., 2010)。

(十三)細胞化學試劑

1. 購自 GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD)

0.05% Trypsin/0.53 mmol/L EDTA

Penicillin/streptomycin

L L-Glutamine

Non-Essential Amino Acid

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

2. 購自 Hyclone (USA)

Fetal bovine serum (FBS)

3. 購自 Merck Chemical Company (Darmstadt, Germany)

Sodium chloride (NaCl)

4. 購自 Sigma Chemical Company (St.Louis, MO)

Sodium bicarbonate (NaHCO_3)

Sodium pyruvate, $\geq 99\%$ ($\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3$)

Sodium phosphate dibasic heptahydrate ACS reagent ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

(十四)細胞處理試劑

1. 購自 Sigma Chemical Company (St.Louis, MO)

Carnosic acid (CA), 純度 \geq 91%

Dimethyl sulfoxide, minimum 99.5% GC (DMSO, C₂H₆OS)

(十五)細胞質液萃取

1. 購自 Sigma Chemical Company (St.Louis, MO)

Aprotinin

Ethylenediaminetetracetic acid (EDTA)

Leupeptin

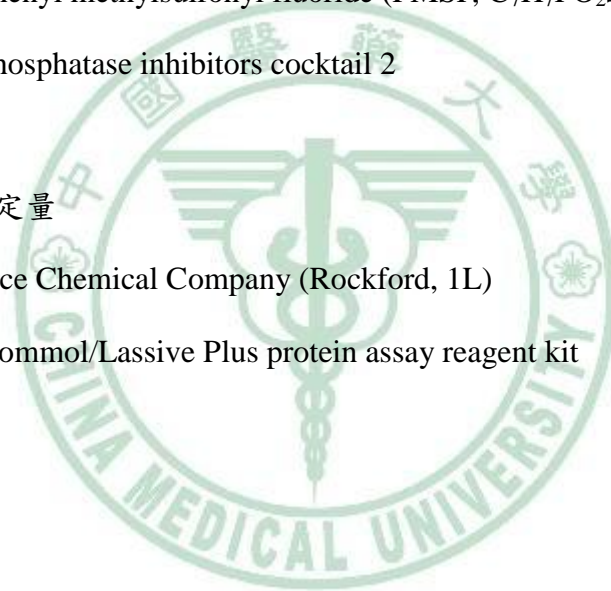
Phenyl methylsulfonyl fluoride (PMSF, C₇H₇FO₂S)

Phosphatase inhibitors cocktail 2

(十六)細胞蛋白質定量

1. 購自 Pierce Chemical Company (Rockford, IL)

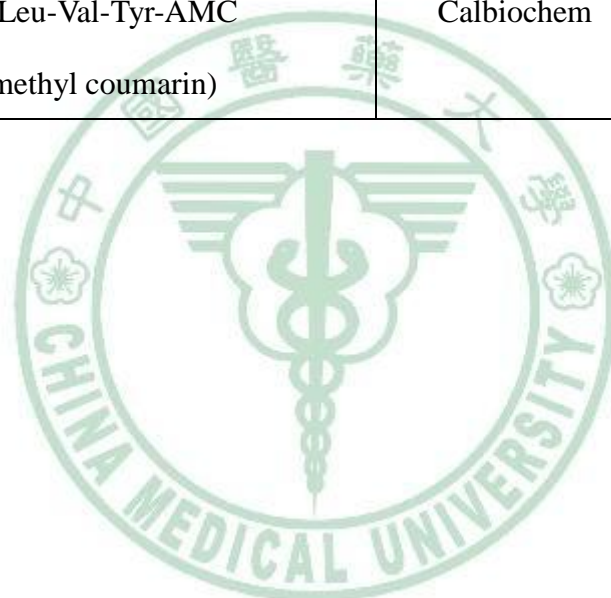
Commol/Lassive Plus protein assay reagent kit



(十七)蛋白酶體活性測試

表三、Proteasome activity reagents (表三)

	廠牌	Cat. No.
ATP (Adenosine 5'- triphosphate disodium salt)	Sigma	A6419
Phosphocreatine	Sigma	P7936
Phosphocreatinekinase	Sigma	C3755
Mg(CH ₃ COO) ₂	Merck	
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (aminomethyl coumarin)	Calbiochem	539142



三、實驗方法

(一)實驗動物飼養

六至八週齡的 Wistar 系雄性大鼠由樂斯科生物科技股份有限公司購入之後，飼養於晝夜 12 小時控制之下的環境，室溫維持在 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的空調飼養室，期間自由進食及飲水，適應一週後即可開始進行實驗。將大白鼠隨機分成三組，每組 10~11 隻：[1]假手術組(sham, S)；[2] 6-OHDA 處理組(lesion, L)；[3] CA + 6-OHDA (CA+L)組，首先，大鼠先以管灌餵食的方式分別給予 CA (20 mg/kg)及 0.5%羧甲基纖維素鈉(carboxymethylcellulose sodium, CMC)，連續灌食三週，每週灌食三天，每兩天給予一次，於第 22 天再進行 6-OHDA ($5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)注射，2 週後進行犧牲，每天皆記錄其體重。

(二)鼠尾草酸(carnosic acid, CA)之配置

將 CA 保存於 -20°C 冰箱中，於給予當天新鮮配置，以 0.5% CMC 混合之，再以研碎磨細，使其均勻懸浮於 0.5% CMC。

(三)單側 6-OHDA 注射

本實驗採用右紋狀體單側誘發損傷，以腹腔注射舒泰 0.15 c.c./100 g weight (購自台灣維克法蘭斯股份有限公司)麻醉後，將大鼠放置於立體定位儀，於紋狀體右側區注入 $2.5 \mu\text{l}$ 的 $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 6-OHDA (假手術組則注射 $2.5 \mu\text{l}$ 含 0.5% ascorbic acid 的 saline)，其注射位置：AP (antero posterior): +1.5mm； L (lateral): -4mm； V (dorso-ventral): -7.2 mm，給藥速度設定在 $1 \mu\text{l}/\text{min}$ ，給藥完停針 1 min，以避免藥物流出。注射後縫合切口皮膚並擦上優碘，大鼠立即以 0.1 ml 抗生素 cefadol (購自優良

化學股份有限公司)進行肌肉注射連續三天，待動物清醒後，歸回飼養籠中照顧，於2週後進行行為測定。

(四)動物組織處理

實驗完成後，動物以舒泰麻醉，將大鼠進行斷頭，取出全腦後，再將大腦分成左右紋狀體和左右黑質，包上鋁箔放於夾鏈袋後，置於液態氮，之後保存於-80°C。

(五)腦組織蛋白質液之製備

將右側紋狀體或右黑質加入8倍體積含1.15% KCl之0.1 M 磷酸鉀緩衝溶液 (potassium phosphate buffer, PPB, 含7.4 mM K_2HPO_4 、2.6 mM KH_2PO_4 和 154.2 mM KCl, pH7.4), 使用超音波震盪儀進行均質，直至樣品沒有塊狀為止，再於4°C以15000 rpm 離心，之後取上清液，並將樣品保存於-80°C。

(六)運動行為測定

運動量測定儀為一個50 cm × 50 cm × 40 cm 的測試箱，實驗軟體為:TRU Scan™ photobeam sensor E63-12, 大鼠於測驗前15分鐘先進行皮下注射，給予0.25 mg/kg apomorphine (0.1 c.c / 100 g weight) 誘發旋轉。首先開啟軟體 TruScan 2.070-00，設定測試箱與紅外線連接器後在軟體設定 PD model，輸入 operator 和 session 後按 run 即可開始測試，完成測試後顯示為藍色 finish 字樣，抓回老鼠後需以70% 酒精清理測試箱，以避免氣味殘留影響測試，並需注意不可將其他待測老鼠放在附近，避免模仿。

(七)蛋白質校正

取 5 μ l BSA 標準品及動物蛋白質液於 96 孔盤中，再加入 150 μ l dye reagent，之後將 96 孔盤蓋上鋁箔避光，置於迴轉式震盪器，以 70 rpm 搖晃 10 分鐘，再以 ELISA 於波長 595 nm 下測定吸光值，之後與標準濃度曲線比較，即可算出樣本的蛋白質濃度。

(八)脂質過氧化測定

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)是脂質過氧化程度的方法，本測量是根據(Khuwaja et al., 2011b)的實驗方法，在酸性環境下，脂質氧化代謝所產生的 malondialdehyde (MDA)可與 thiobarbituric acid (TBA)生成粉紅色的反應物質(TBA reactive substances, TBARS)，利用 ELISA 於波長 535 nm 下讀取吸光值，以判斷脂質過氧化程度。將右側黑質加入 8 倍體積含 0.5 mM BHT 的磷酸鉀緩衝溶液(pH 7.4)進行均質，取 150 μ l 的 1, 1, 3,3-tetramethoxy propane (TMP)標準品或均質液(含 0.5 mM BHT 的 PPB)，依序加入 150 μ l 5% TCA 和 300 μ l 0.67% TBA，混合均勻，以 1,000 \times g 離心 15 分鐘，之後取上層液至另一管，於 100 $^{\circ}$ C 乾熱器加熱 10 分鐘，取 100 μ l 至 96 孔盤，以 ELISA 於波長 535 nm 讀取吸光值。與標準曲線做計算，即可得到 TBARS 的含量。

(九) GSH 測定

GSH 是組織中主要的非蛋白質的硫基化合物，為 GPX 和 GST 兩種酵素的基質，為這二種酶分解氫過氧化物所必需，由 GSH 的高低可間接反映發生氧化損傷的程度。本實驗利用 DTNB 能被-SH 基團還原，產生 2-硝基-5-巰基苯甲酸，而苯甲酸陰離子呈現黃色，於 412 nm 波長下有吸收峰，因此可求得 GSH 的含量。右側黑質加

入 8 倍體積含 0.5 mM BHT 之磷酸鉀緩衝溶液進行均質，取 300 μ l 標準品或均質液，再加入 300 μ l 5% TCA，以 5,000 \times g 離心 10 分鐘，取上清液 100 μ l，依序加入 200 μ l Tris buffer 和 20 μ l DTNB，Vortex 後靜置 5 分鐘，於波長 412 nm 讀取吸光值再與標準曲線做計算，即可得到樣品中 GSH 的含量。

(十)西方墨點法

樣本經過蛋白質定量後，用 5X sample buffer (10 mL 0.5M Tris、17.5 mL 20% SDS、2.5 mL β -mercaptoethanol、0.05 g bromophenol blue(w/v)、10 mL glycerol 及 8 mL ddH₂O)和滅菌水將蛋白質濃度調整至 1 μ g/ μ L 左右，於乾熱器以 95 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘，使蛋白質變性。取等量蛋白質(10 μ g)之樣品注入 SDS-PAGE 的電泳槽中以含 Tank buffer (25 mM Tris-HCl、192 mM glycine 及 0.1% SDS, pH 8.3)的電泳液，在 100 伏特下跑膠。結束電泳後，拿出膠片，切除上膠 (stacking gel, 配方如表五)，將下膠 (separating gel, 配方如表四) 浸泡於 transfer buffer (25 mM Tris-HCl、192 mM glycine 及 20% methanol)中，同時將 PVDF 膜浸泡在 99.5%酒精 5 分鐘，之後將 PVDF 膜放入 transfer buffer 浸泡約 5 分鐘。依序放上海綿、濾紙、膠片、PVDF 膜、濾紙、海綿於三明治塑膠夾中，確認沒有氣泡後固定好即可放入轉漬槽中，在冰浴中以 90 伏特轉漬 80 分鐘。轉漬完成後取出 PVDF 膜，浸泡於 cold buffer A (25 mM Tris-HCl、150 mM NaCl 和 0.3% Tween 20, pH 7.4)中清洗一次，再將 PVDF 膜放入 ponceau S solution 中染色，標記好要裁剪的蛋白質位置後即可裁剪，再用 cold buffer A 清洗 3 次，每次 5 分鐘，最後浸泡於含 5%脫脂牛奶的 buffer B (25 mM Tris-HCl 和 150 mM NaCl, pH 7.4)中，於 4 $^{\circ}$ C 冰箱 blocking overnight。Blocking 後，PVDF 膜再以 cold buffer A 清洗 3 次，每次 5 分鐘，之後加入一級抗體 (1:1000)，於 4 $^{\circ}$ C 下 overnight，再取出 PVDF 膜以 cold buffer A 洗 3 次，每次 5 分鐘，再加入二級抗體(1:1000)，於 4 $^{\circ}$ C 下反應 1 或 2 小時。二級抗體結束後，以 cold buffer A 洗 3 次，每次 5 分鐘，利用 enhanced chemiluminescence reagent (ECL kit)呈色，再至冷光螢光數位分析儀

(LAS-4000, FUJIFILM, Japan)拍照分析蛋白質表現。

表四、電泳 separating gel 配方

separating gel	7.5%	10%	11%	12.5%	13%
30% Acryamine (ml)	2.5	3.33	3.74	4.16	4.33
1.5 M Tris-HCl (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
H ₂ O (ml)	5	4.17	3.66	3.24	3.06
10% SDS (μl)	100	100	100	100	100
10% ASP (μl)	50	50	50	50	50
TEMED (μl)	10	10	10	10	10

表五、電泳 stacking gel 配方

stacking gel	4%
30% acryamine (ml)	0.67
0.5 M Tris-HCl (ml)	1.25
H ₂ O (ml)	3.1
10% SDS (μl)	50
10% ASP (μl)	25
TEMED (μl)	7.5

(十一)動物腦組織細胞質(cytosol)的製備

首先將腦組織加入 8 倍體積含 1.15% KCl 之 0.1 M PPB 均質至無塊狀，先以 15,000 rpm 離心 30 分鐘，取上清液，放入超高速離心機(Optima TM L-90K Ultracentrifuge, Beckman Coulter)，以 33,700 rpm 離心 1 h，離心前樣品需先對稱，重量秤至小數點後三位，之後再取上層液即是 cytosol。

(十二)細胞解凍及培養

將 SH-SY5Y 細胞從液態氮取出，於 37°C 水浴槽快速解凍，再移至含有 10% FBS 的 DMEM 培養液 (含 2 mmol/L L-glutamine、1.5 g/L sodium bicarbonate、0.1 mmol/L non-essential amino acids、1.0 mmol/L sodium pyruvate、 1×10^5 unit/L penicillin 及 100 mg/L streptomycin) 中，以 1,500 rpm 離心 5 分鐘，除去上清液，加入 DMEM 均勻打散細胞，並種入 10 公分培養皿，置於 37°C 含 5% CO₂ 的培養箱中，於隔日更換培養液，之後每兩天換一次培養液，實驗使用之代數最多至 15 代。

(十三)細胞分盤

細胞滿盤後，先以 PBS (Na₂HPO₄·7H₂O 4.2g/L、NaH₂PO₄·H₂O 0.551g/L、NaCl 8.2g/L, pH7.3) 清洗一次，再加入 1 mL 0.25% Trypsin/0.53 mM EDTA，將細胞刮下，吸取細胞液移至含 9 mL DMEM 的離心管中，1,500 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，再加入培養液均勻打散細胞，並取 10 μl 細胞液至細胞計數盤，計算之後吸取含 1.2×10^6 個細胞的細胞液，與培養液均勻混合，種入 3.5 公分培養皿中，待細胞八分滿時即可做處理，細胞實驗部分分成四個處理：[1] 控制組；[2] 6-OHDA 處理組；[3] CA 1 μM + 6-OHDA 組；[4] CA 處理組。實驗皆先以 0.1% 1 μM CA 預處理 8 小時，再共處理 1 μM CA 和 100 μM 6-OHDA 18 小時後收細胞，分別分析其抗氧化酶

素、凋亡相關蛋白和粒線體相關蛋白的表現。

(十四)細胞處理用藥配製

CA 和 6-OHDA 溶於 DMSO 中，震盪後配成 stock 濃度 50 mmol/L，分裝後保存於-20°C 冰箱。

(十五)細胞蛋白質液

取出細胞後，將細胞平鋪於冰上，除去培養液後，以 PBS 清洗一次，移除 PBS，每盤加入 150 μ l lysis buffer (配方如表六)，並用刮杓將細胞刮下，以超音波震盪機 (Micro Ultrasonic Cell Disrupter, KONTES, Vineland, NJ) 震破細胞，再於 4°C 以 14,000 \times g 離心 20 分鐘，上清液即為細胞蛋白質液。

表六、Lysis buffer 配方

Lysis buffer	Stock	Final	(μ l)
Tris-HCl	100 mM	25 mM	250
NaCl	1.5 M	150 mM	150
Triton X-100	0.5%	0.5%	5
Glycerol	>99%	10%	100
EDTA	50 mM	2 mM	40
PMSF	50 mM	1 mM	20
Leupeptin	1 mg/ml	1 μ g/ml	1
Aporotinin	1.6 mg/ml	1 μ g/ml	0.625
Phosphatase inhibitors cocktail (1:100)			10
ddwater			475
total			1 ml

(十六) Proteasome activity

蛋白酶體是一個由 20S 催化顆粒、11S 調控因子和 2 個 19S 調節顆粒所組成的，具有辨識錯誤蛋白質，再將其降解的功能，作用酵素為 calpain, chymotrypsin, 和 ingensin，實驗首先我們以其受質 Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC 進行螢光素標記，根據測定釋放的螢光強度，反應蛋白酶體 20S 的酶活性。首先配置 ATP regenerating system buffer，取 80 μl 細胞蛋白質液至新的 eppendorf，快速地加入 160 μl ATP regenerating system buffer(表七)，混合均勻後取 160 μl 至 96 孔白盤中(Molecular Devices Gemini XPS, USA)，移至培養箱中，於 37°C 培養 30 分鐘，利用螢光光譜儀於 excitation 355 nm 及 emission 460 nm 下測其吸光值，最後再與蛋白質濃度做校正，即可測得 proteasome activity。

表七、ATP regenerating system buffer

proteasome activity	stock conc.	final conc.	volume
Tris-HCl, pH 8.2	500 mM	50 mM	24 μl
KCl	180 mM	18 mM	24 μl
Mg(CH ₃ COO) ₂	30 mM	3 mM	24 μl
MgCl ₂	30 mM	3 mM	24 μl
DTT	0.5 M	1.1 mM	0.53 μl
ATP	60 mM	6 mM	24 μl
Phosphocreatine	50 mM	5 mM	24 μl
Phosphocreatinekinase	9.1 mg/910 μl	0.2 units	12.5 μl
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (aminomethyl coumarin)	20 mM	0.2 mM	2.4 μl
total			240 μl

四、統計分析

實驗所得的數據，以平均值加減一個標準差(mean ± SD)表示，使用 SAS 系統中的單因子變異數分析(one-way analysis of variance, ANOVA)及 Tukey's test 進行統計，當 $p < 0.05$ 代表有顯著差異。



第五章 結果

(一) CA 在 6-OHDA 處理下對 SH-SY5Y 神經細胞之其細胞存活率之影響

由 MTT 方法結果所示(圖一)，SH-SY5Y 細胞以 100 μ M 6-OHDA 單獨處理 18 小時顯著地降低 38.3% 細胞存活率，而在有 1 μ M CA 預處理 8 小時下，則能提高 23.4% 細胞存活率($p < 0.05$)，而 CA 的單獨處理則不會影響細胞存活率。

(二) CA 在 6-OHDA 處理下對 SH-SY5Y 神經細胞凋亡相關蛋白質之影響

由 western blot 結果發現單獨以 6-OHDA 處理顯著地降低 Bcl-2/Bax 的比例(圖二)，而在有 CA 預處理的組別則能顯著地提高 Bcl-2/Bax 的比例；而在 caspase 與 PARP 蛋白質部分，6-OHDA 會增加 cleaved caspase 3 和 cleaved PARP 的蛋白表現，並降低 caspase 3 和 PARP 的蛋白表現(圖三)，以 CA 處理則能顯著地減少 caspase 3 和 PARP 的裂解比例($p < 0.05$)。由以上結果可知 CA 有抗凋亡的功能。

(三) CA 在 6-OHDA 處理下對 SH-SY5Y 神經細胞抗氧化酵素相關蛋白質之影響

PD 的發展與氧化壓力有關(Chen et al., 2012)，我們也進一步探討 CA 是否能透過增加抗氧化酵素而保護 6-OHDA 所誘導的細胞損傷。結果如圖四所示，SH-SY5Y 神經細胞單獨處理 6-OHDA 會降低 GCLC、GCLM、GPx、GSR 和 SOD 的蛋白質表現，CA 預處理則能顯著地回復 GCLC、GCLM、GPx、GSR 和 SOD 的蛋白質表現，與 6-OHDA 組別相比較，分別增加為 1.3、0.9、0.7、0.3 和 0.7 倍，因此我們也認為 CA 也可能透過誘發抗氧化酵素達到神經保護效果。

(四) CA 在 6-OHDA 處理下對 SH-SY5Y 神經細胞蛋白酶體活性的影響

氧化壓力會導致蛋白質的錯誤折疊，降低蛋白酶體活性(Pickering and Davies, 2012)，因此我們將探討 6-OHDA 的處理是否會影響蛋白酶體活性，結果如圖五所示，以 6-OHDA 處理 12、18 和 24 h，會使細胞的蛋白酶體活性降低，其中以 18 和 24 h 最明顯(圖五 A)。而在 CA 是否具有改善 6-OHDA 降低的蛋白酶體活性，我們則發現細胞以 CA 預處理 8 小時能顯著地回復 19.2%的蛋白酶體活性(圖五 B)。因此，我們認為 CA 可能透過提高蛋白酶體活性去改善由 6-OHDA 所引起的神經傷害。

(五) 不同 CA 時間點對 SH-SY5Y 神經細胞 PINK1 和 parkin 蛋白質之影響

蛋白質的突變也與 PD 的進展有關，其中 parkin 蛋白所扮演的角色是泛素蛋白酶體系統(ubiquitin-proteasome system)中的連接酶 E3(ubiquitin protein ligase E3)，主要辨識錯誤摺疊的蛋白質，再將其送至蛋白酶體進行降解(Trempe and Fon, 2013)。有文獻指出 PINK1 會活化 parkin 進而調控神經保護作用(Sha et al., 2010)，因此我們也將探討 CA 是否能夠透過 parkin 達到神經保護功效。由 western blot 結果(圖六)發現在 CA 處理 0.5 h 至 12 h 皆能誘發 PINK1 的蛋白質表現，其中以 3 小時最強，而 parkin 蛋白則在 0.5 和 1 小時會顯著地誘發 ($p < 0.05$)，在 12 小時則與控制組無顯著差異。因此由以上結果可得知 CA 的處理之下能誘導粒線體保護相關蛋白 parkin 和 PINK1 的蛋白質表現。

(六) 不同 6-OHDA 時間點對 SH-SY5Y 神經細胞 PINK1 和 parkin 蛋白質之影響

由圖七結果發現，以 6-OHDA 處理會隨時間顯著地降低 parkin 和 PINK1 的蛋白質表現，而以 24 小時降低 parkin 的蛋白質表現為最顯著。

(七) CA 對 SH-SY5Y 神經細胞 PINK1 和 parkin 蛋白質之影響

進一步我們將探討 CA 是否能夠改善 6-OHDA 所降低的 parkin 及 PINK1 的蛋白質表現降低，如圖八結果所示，SH-SY5Y 細胞單獨處理 6-OHDA 顯著地降低 parkin 及 PINK1 的蛋白質表現，而在有 CA 預處理的組別則能顯著地提高 parkin 及 PINK1 的蛋白質表現($p < 0.05$)。因此我們認為 CA 能夠回復 6-OHDA 所降低的 parkin 及 PINK1 蛋白質，而增加細胞保護機制。

(八) CA 對 SH-SY5Y 神經細胞 p65 蛋白質之影響

Parkin 的神經保護作用也可能透過 I κ B kinase (IKK)/NF- κ B 的路徑，而增加下游促存活基因的表現(Henn et al., 2007)，因此將進一步探討 CA 在 6-OHDA 處理下，是否也影響 NF- κ B 的蛋白質表現。由圖九結果顯示 SH-SY5Y 神經細胞單獨處理 6-OHDA 會顯著地降低 p65 的蛋白質表現，而 CA 預處理則能顯著地回復 p65 的蛋白質表現，單獨的 CA 處理則不影響 p65 蛋白質表現。

(九) CA 透過 parkin 達到神經保護功效

為了進一步確認 CA 是否藉由調節 parkin 而有神經保護之功效，我們利用 parkin siRNA 來觀察 CA 對 6-OHDA 引起 SH-SY5Y 神經細胞凋亡蛋白的影響，首先，將細胞以 parkin siRNA 進行轉殖 24 h 後，再以 CA 預處理 8 小時，之後再與 6-OHDA 共處理 18 小時，結果由圖十所示，在 si-control 的組別，6-OHDA 會顯著地增加 caspase 3 和 PARP 裂解及降低 parkin 的蛋白質表現，預處理 CA 則會減少 caspase 3 和 PARP 裂解及增加 parkin 的蛋白質表現，但經 parkin siRNA 轉殖後，CA 的降低

作用便會消失，因此，CA 可能透過 parkin 蛋白而減少 6-OHDA 引起的神經細胞凋亡，以達到神經保護效果。

(十) CA 對 6-OHDA 誘發 PD 模式大鼠運動量之影響

接下來我們則以動物實驗來觀察 CA 對於右側紋狀體注射 6-OHDA 誘發 PD 模式大鼠其活動量的影響，運動測量時間共為 15 分鐘，結果發現 6-OHDA 損傷組(L)的大鼠活動時間和活動距離顯著低於假手術組(圖十一)，而在預處理 CA 的組別(CA+L)與損傷組(L)組相比則能增加大鼠活動時間和活動距離，分別為 27%和 33%。

(十一) CA 在 6-OHDA 誘發 PD 模式大鼠對於 apomorphine 誘發對側旋轉的影響

由圖十二結果顯示，與假手術組比較，6-OHDA 損傷組(L)的大鼠明顯地增加由 apomorphine 引起的對側旋轉圈數和旋轉時間，而有 CA 預處理(CA+L)的大鼠，則能顯著降低大鼠旋轉圈數和旋轉時間($p < 0.05$)。

(十二) CA 對 6-OHDA 誘發 PD 模式大鼠腦部黑質 GSH 含量和脂質過氧化物之影響

在 6-OHDA 誘發 PD 的模式中，我們發現單獨注射 6-OHDA 的組別(L)其 GSH 的含量顯著地減少，而在有 CA 預處理的組別(CA+L)則能顯著增加 GSH 的含量($p < 0.05$) (圖十三)。而在腦部脂質過氧化物方面，結果則發現 6-OHDA 的大鼠(L)顯著地增加黑質脂質過氧化物，而在有 CA 預處理的大鼠(CA+L)則能降低腦部黑質脂質過氧化程度($p < 0.05$) (圖十四)，顯示大鼠給予 CA 能改善由 6-OHDA 所引起的氧化壓力。

(十三) CA 對 6-OHDA 誘發 PD 模式大鼠腦部紋狀體抗氧化酵素相關蛋白之影響

根據之前細胞實驗的結果顯示，6-OHDA 的處理會降低抗氧化酵素相關蛋白質的表現，若有 CA 的預處理則能回復抗氧化酵素的降低，也因此動物模式之下，也以 western blot 方法檢測 CA 對由 6-OHDA 誘導 PD 模式大鼠腦部紋狀體中抗氧化酵素的蛋白質表現。其結果發現到單獨注射 6-OHDA (L) 顯著地降低 GCLC、GCLM、GSR 和 SOD 的蛋白質表現(圖十五)，而在有 CA 預處理的組別(CA+L)則能顯著地增加 GCLC、GCLM、GSR 和 SOD 的蛋白質表現($p < 0.05$)。

(十四) CA 對 6-OHDA 誘發 PD 模式大鼠腦部紋狀體凋亡蛋白質之影響

由圖十六發現動物實驗結果與細胞實驗相類似，6-OHDA 損傷組(L)比假手術組相顯著地降低 Bcl-2/Bax 的比例，而在有 CA 預處理的組別(CA+L)則能顯著地提高 Bcl-2/Bax 的比例；而在 caspase 與 PARP 蛋白質部分，6-OHDA 損傷組(L)的大鼠會增加 cleaved caspase 3 和 cleaved PARP 的蛋白表現，並降低 caspase 3 和 PARP 的蛋白表現(圖十七)，處理 CA 的組別(CA+L)則能顯著地減少 caspase 3 和 PARP 的裂解比例($p < 0.05$)。由以上結果可知，CA 無論在體內或體外實驗皆具有抗凋亡的作用。

(十五) CA 對 6-OHDA 誘發 PD 模式大鼠腦部紋狀體 TH 蛋白質之影響

TH 是合成多巴胺的限制酵素(Ren et al., 2013)，我們以 Western blot 方法檢測 CA 在 6-OHDA 誘導 PD 模式大鼠腦部紋狀體中 TH 蛋白質的表現。其結果發現單獨注射 6-OHDA (L) 顯著地降低 TH 的蛋白質表現，而在有 CA 預處理的組別(CA+L)則能顯著地增加 95 % 的 TH 蛋白質表現($p < 0.05$) (圖十八)，由此可看出 CA 有改善腦部 TH 的功能。

(十六) CA 對 6-OHDA 誘發 PD 模式大鼠腦部紋狀體 PINK1 及 parkin 的蛋白質之影響

在 6-OHDA 誘發 PD 的模式中，我們發現單獨注射 6-OHDA 的大鼠(L)顯著地降低腦部紋狀體的 PINK1 和 parkin 的蛋白質表現(圖十九)，而在有 CA 預處理的組別(CA+L)則能回復 PINK1 和 parkin 的蛋白質表現($p < 0.05$)，由此可得知 CA 在體內或體外皆能誘發 PINK1 和 parkin 等神經保護相關蛋白質的表現。



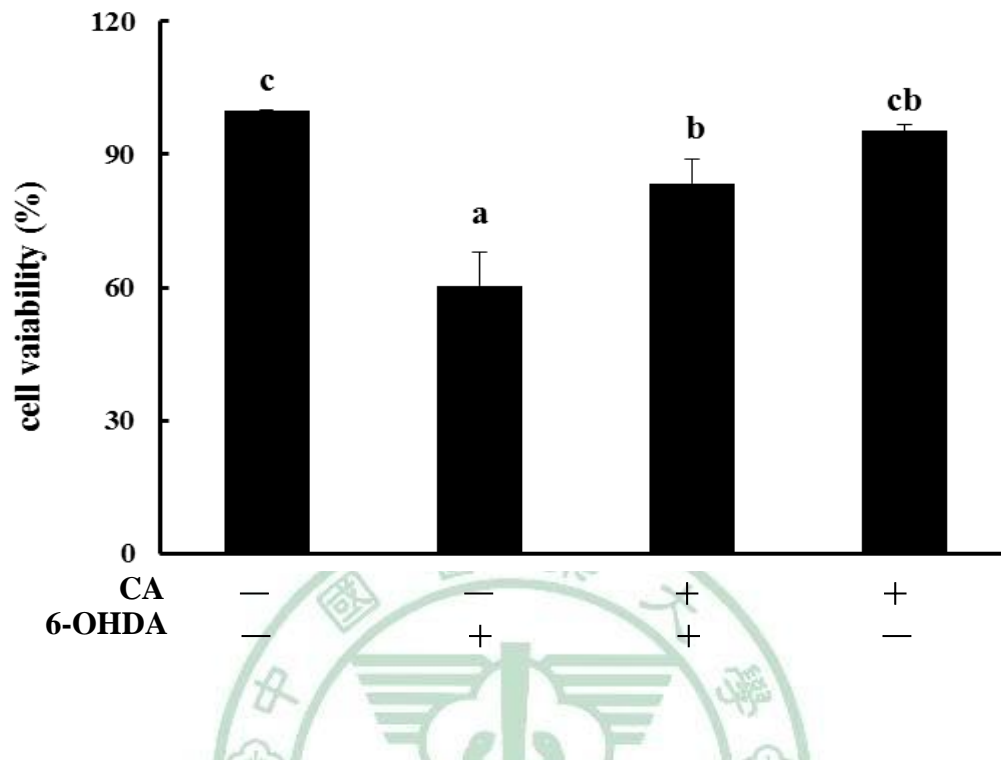


Figure 1. Protective effect of carnosic acid (CA) against 6-hydroxydopamine

(6-OHDA)-induced toxicity in SH-SY5Y cells. Cell viability was measured by the

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Cells were

pretreated with 0.1% dimethylsulfoxide alone (—) or with CA 1 μ M for 8 h and then with

100 μ M 6-OHDA for an additional 18 h. The level in control cells was regarded as 100

%. Values are expressed as the means \pm SD of three independent experiments. Groups not

sharing a common letter differ significantly, $p < 0.05$.

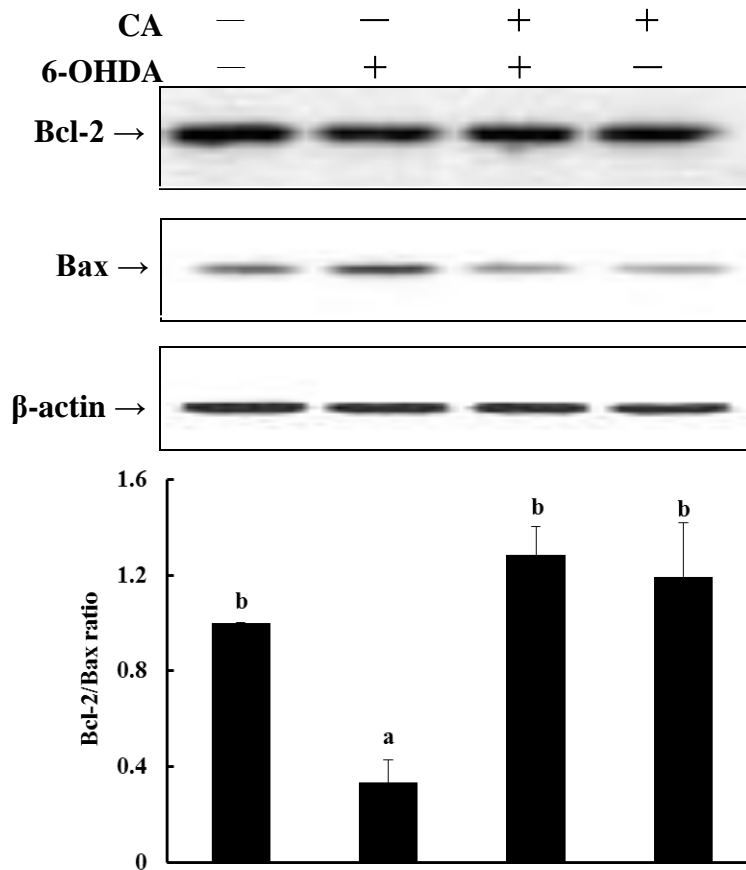


Figure 2. Effect of carnosic acid (CA) on the protein expression of Bcl-2 and Bax in 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-stimulated SH-SY5Y cells. Cells were pretreated with 0.1 % dimethylsulfoxide alone (—) or with CA 1 μ M for 8 h and then with 100 μ M 6-OHDA for an additional 18 h. The protein was determined by Western blotting. Changes in protein expression were measured by densitometry. The level in control cells was regarded as 1. One representative immunoblot out of three independent experiments is shown. Values are means \pm SD of three independent experiments. Groups not sharing a common letter differ significantly, $p < 0.05$.

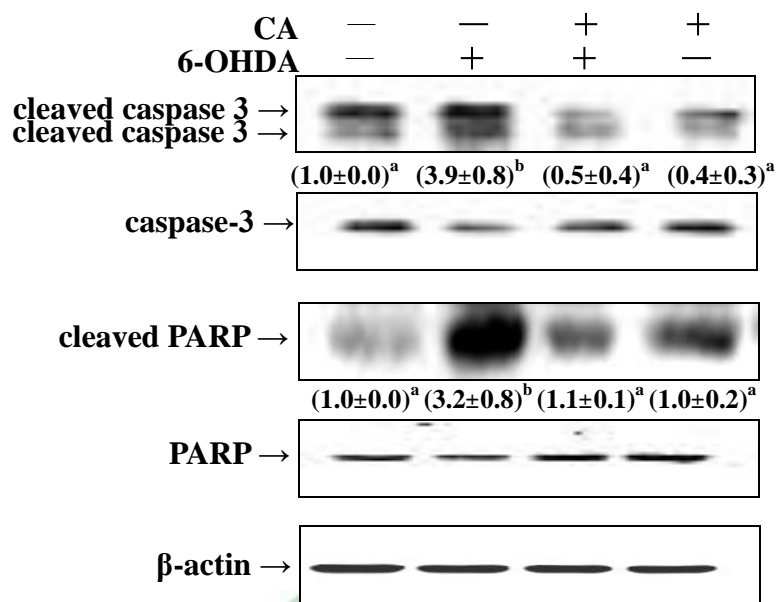


Figure 3. Effect of carnosic acid (CA) on the protein expression of caspase 3 and PARP in 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-stimulated SH-SY5Y cells. Cells were pretreated with 0.1% dimethylsulfoxide alone (—) or with CA 1 μ M for 8 h and then with 100 μ M 6-OHDA for an additional 18 h. The protein was determined by Western blotting. Changes in protein expression were measured by densitometry. The level in control cells was regarded as 1. One representative immunoblot out of three independent experiments is shown. Values are cleaved caspase 3/caspase 3/actin and cleaved PARP/PARP/actin. Values are means \pm SD of three independent experiments. Groups not sharing a common letter differ significantly, $p < 0.05$.

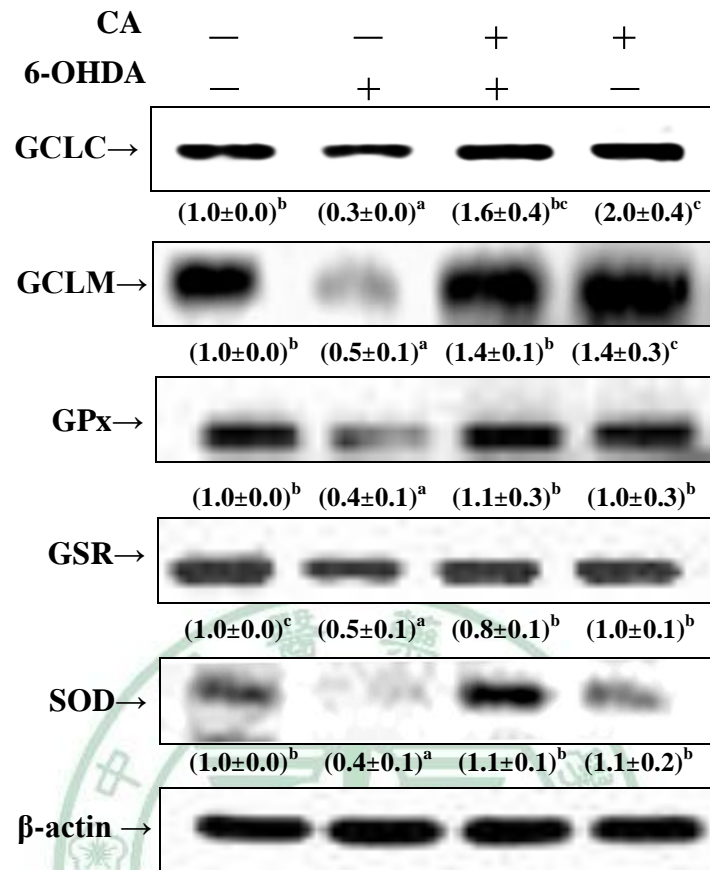
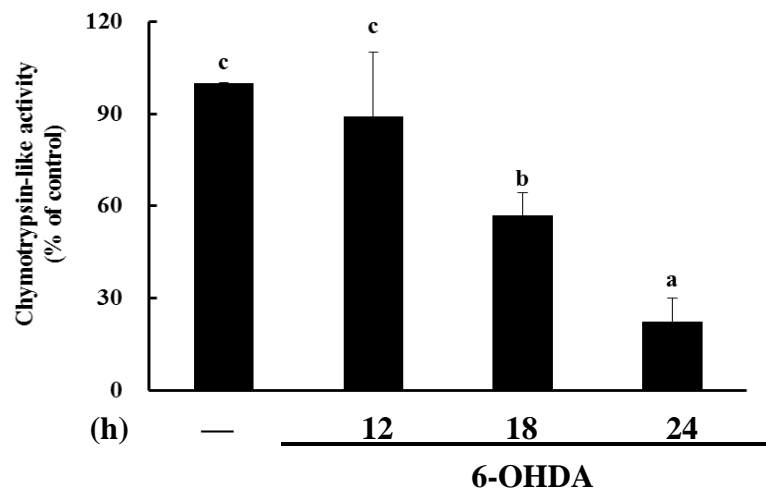


Figure 4. Effect of carnosic acid (CA) on the protein expression of GCLC, GCLM, GPx, GSR, and SOD in 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-stimulated SH-SY5Y cells. Cells were pretreated with 0.1% dimethylsulfoxide alone (—) or with CA 1 μ M for 8 h and then with 100 μ M 6-OHDA for an additional 18 h. The proteins were determined by Western blotting. Changes in protein expression were measured by densitometry. The level in control cells was regarded as 1. One representative immunoblot out of three independent experiments is shown. Values are means \pm SD of three independent experiments. Groups not sharing a common letter differ significantly, $p < 0.05$.

A



B

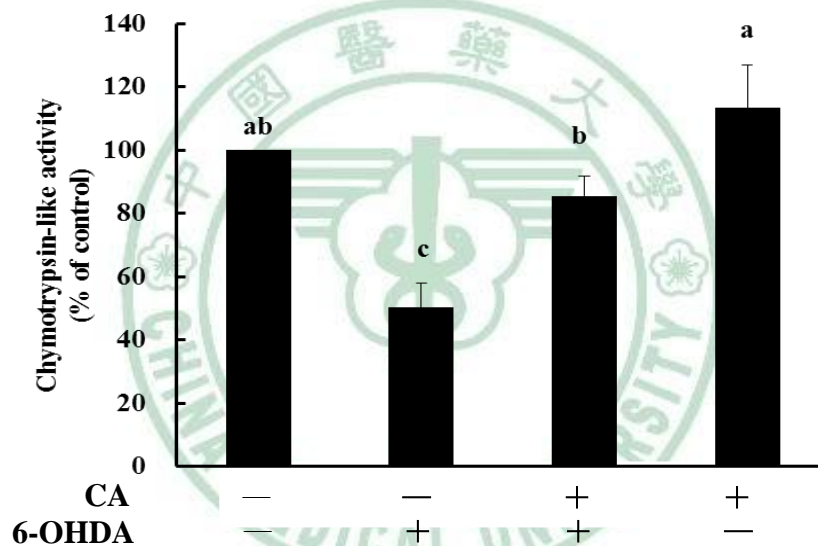


Figure 5. Effect of carnosic acid (CA) on proteasome activity in 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-stimulated SH-SY5Y cells. Cells were cultured with 0.3% dimethylsulfoxide alone or 100 μ M 6-OHDA for 12, 18, and 24 h. (B) Cells were pretreated with 0.1% dimethylsulfoxide alone (—) or with CA 1 μ M for 8 h and then with 100 μ M 6-OHDA for an additional 18 h. The level of proteasome activity in control cells was regarded as 1. One representative immunoblot out of three independent experiments is shown. Values are means \pm SD of three independent experiments. Groups not sharing a common letter differ

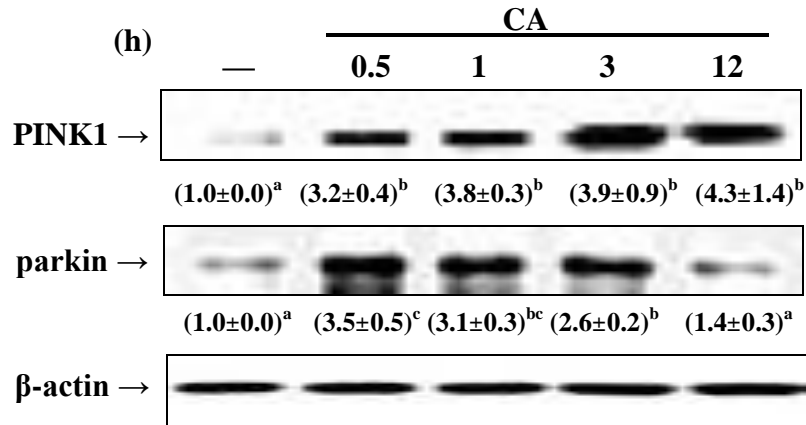


Figure 6. Carnosic acid (CA) induced the protein expression of PINK1 and parkin in SH-SY5Y cells. Cells were incubated with 1 μ M CA for 0.5, 1, 3, and 12 h. The protein expression of PINK1 and parkin were determined by Western blot assay. Changes in protein expression were measured by densitometry. The level in control cells was regarded as 1. One representative immunoblot out of three independent experiments is shown. Values are means \pm SD of three independent experiments. Groups not sharing a common letter differ significantly, $p < 0.05$.

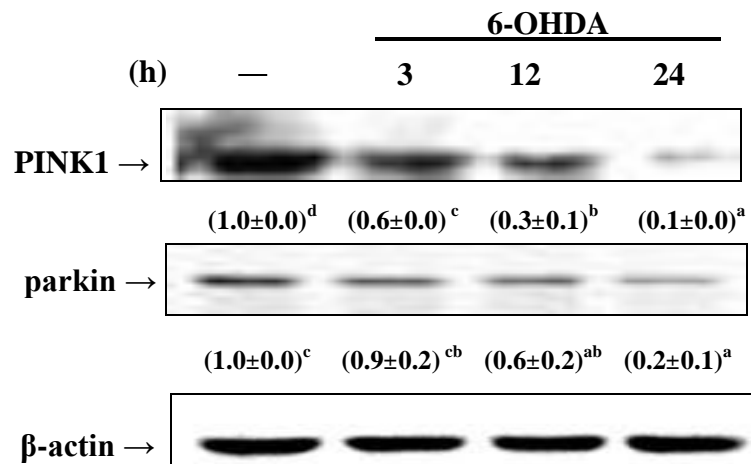


Figure 7. 6-OHDA decrease the protein expression of PINK1 and parkin.

Cells were incubated with 100 μ M 6-OHDA for 3, 12, and 24 h.

Values are mean \pm SD of three independent experiments. Groups not sharing a common letter differ significantly, $p < 0.05$.

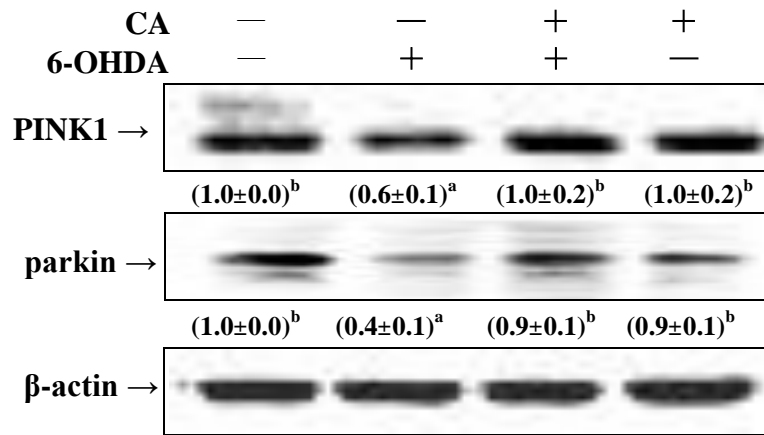


Figure 8. Effect of carnosic acid (CA) on the protein expression of PINK1 and parkin in 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-stimulated SH-SY5Y cells.

Cells were pretreated with 0.1% dimethylsulfoxide alone (—) or with CA 1 μ M for 8 h and then with 100 μ M 6-OHDA for an additional 18 h. The protein was determined by Western blotting. Changes in protein expression were measured by densitometry. The level in control cells was regarded as 1. One representative immunoblot out of three independent experiments is shown. Values are means \pm SD of three independent experiments. Groups not sharing a common letter differ significantly, $p < 0.05$.

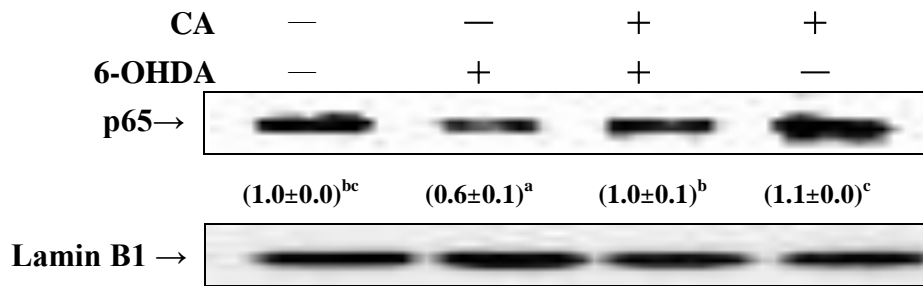


Figure 9. Effect of carnosic acid (CA) on the protein expression of p65 in 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-stimulated SH-SY5Y cells. Cells were pretreated with 0.1% dimethylsulfoxide alone (—) or with CA 1 μ M for 8 h and then with 100 μ M 6-OHDA for an additional 18 h. The p65 protein was determined by Western blotting. Changes in protein expression were measured by densitometry. The level in control cells was regarded as 1. One representative immunoblot out of three independent experiments is shown. Values are means \pm SD of three independent experiments. Groups not sharing a common letter differ significantly, $p < 0.05$.



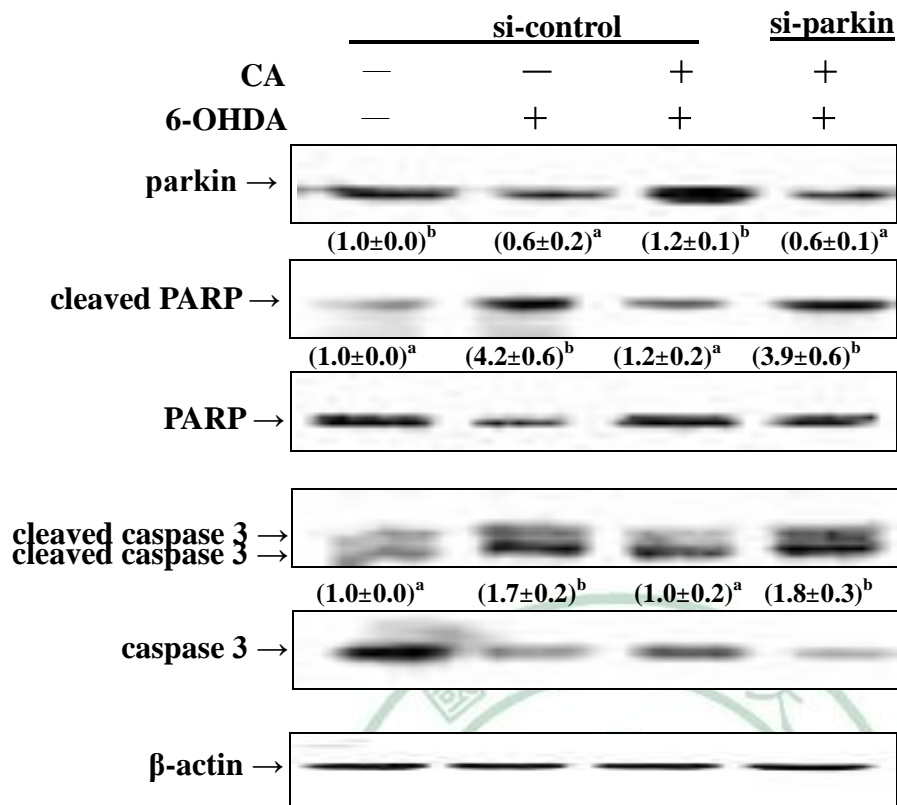
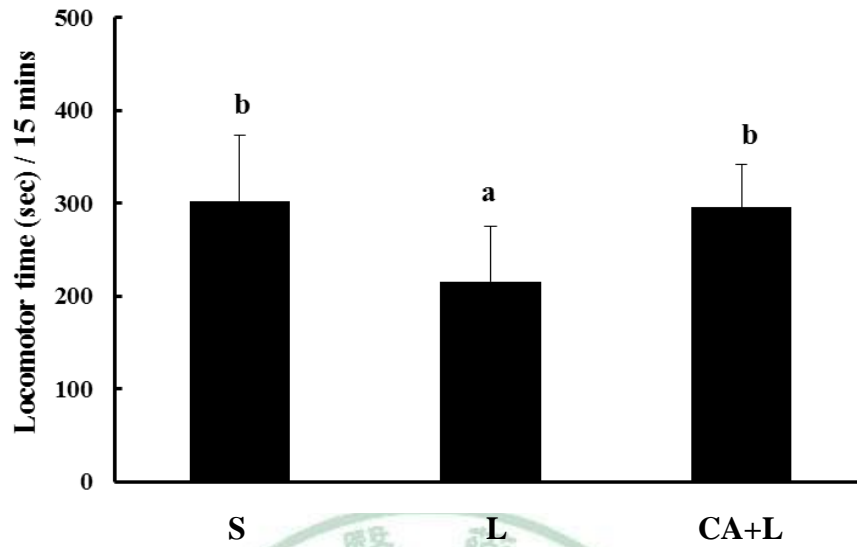


Figure 10. Carnosic acid (CA)-inhibited the activation of caspase 3, and PARP were reversed by parkin-siRNA in SH-SY5Y cells. Cells were transfected with parkin-siRNA (si-parkin) or nontargeting control siRNA (si-control) for 24 h. The transfected cells were treated with 0.1% dimethylsulfoxide alone (—) or with CA 1 μ M for 8 h and then with 100 μ M 6-OHDA for an additional 18 h. The proteins we determined by Western blotting. Changes in protein expression were measured by densitometry. The level in control cells was regarded as 1. One representative immunoblot out of three independent experiments is shown. Values are cleaved caspase 3/caspase 3/actin and cleaved PARP/PARP/actin. Values are means \pm SD of three independent experiments. Groups not sharing a common letter differ significantly, $p < 0.05$.

A



B

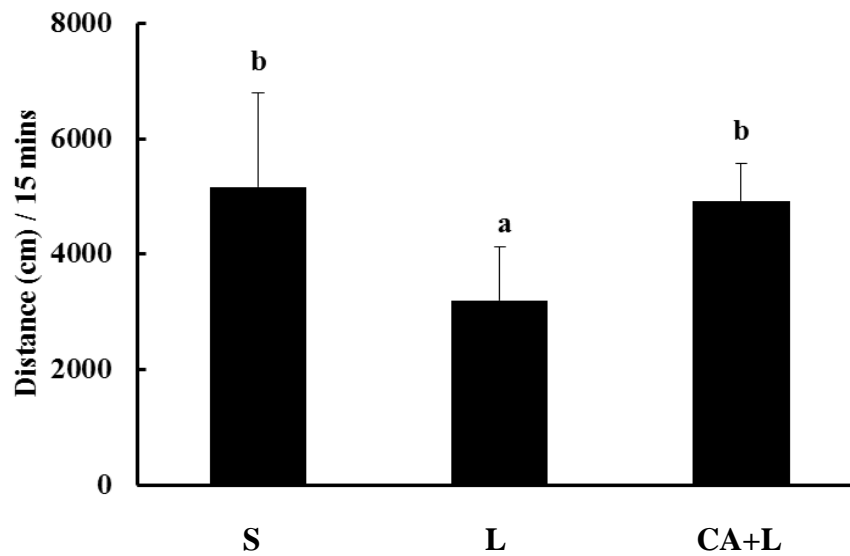
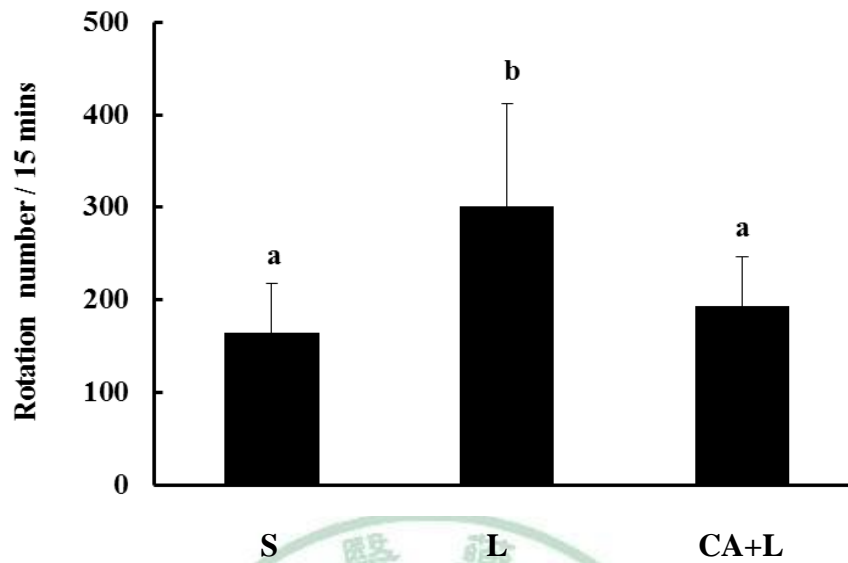


Figure 11. Effect of carnosic acid (CA) on locomotor activity in the striatum of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-treated rats. Effect of CA on locomotor time (sec) (A) and distance travelled (cm) (B) study in 6-OHDA unilaterally lesioned rats. Values are means \pm SD of seven independent experiments. Groups not sharing a common letter differ significantly, $p < 0.05$.

A



B

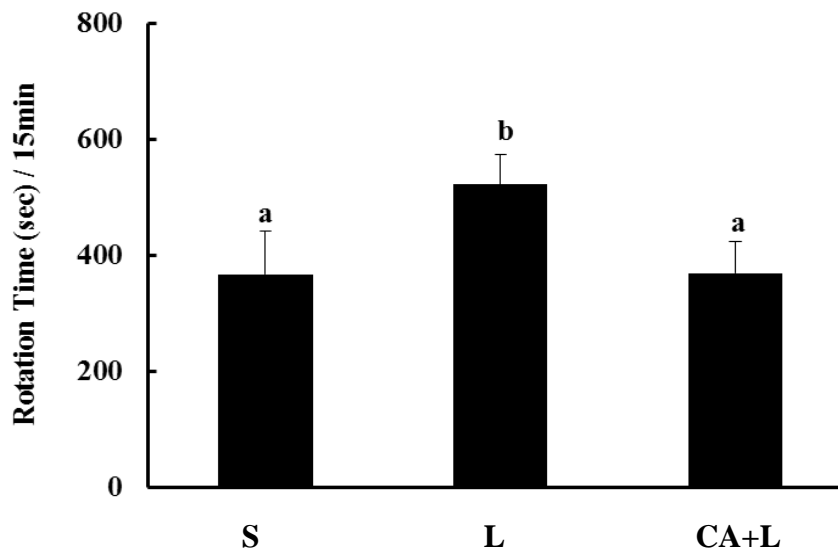


Figure 12. Effect of carnosic acid (CA) on the rotation in the striatum of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) treated rats. Effect of CA on rotation number (A) and rotation time (B) study in 6-OHDA unilaterally lesioned rats. Values are means \pm SD of seven independent experiments. Groups not sharing a common letter differ significantly, $p < 0.05$.

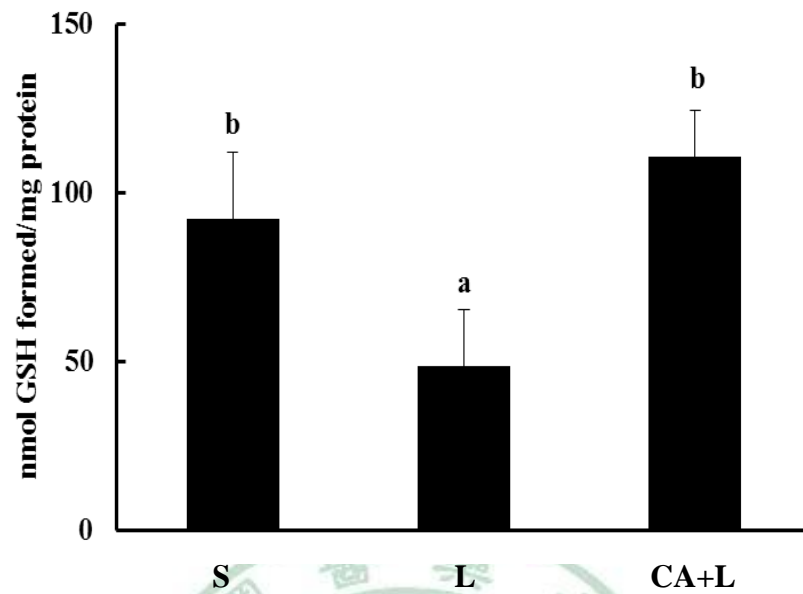


Figure 13. Effect of carnosic acid (CA) on the level of GSH in the right substantia nigra of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-treated rats. Values are means \pm SD of seven independent experiments. Groups not sharing a common letter differ significantly, $p < 0.05$.

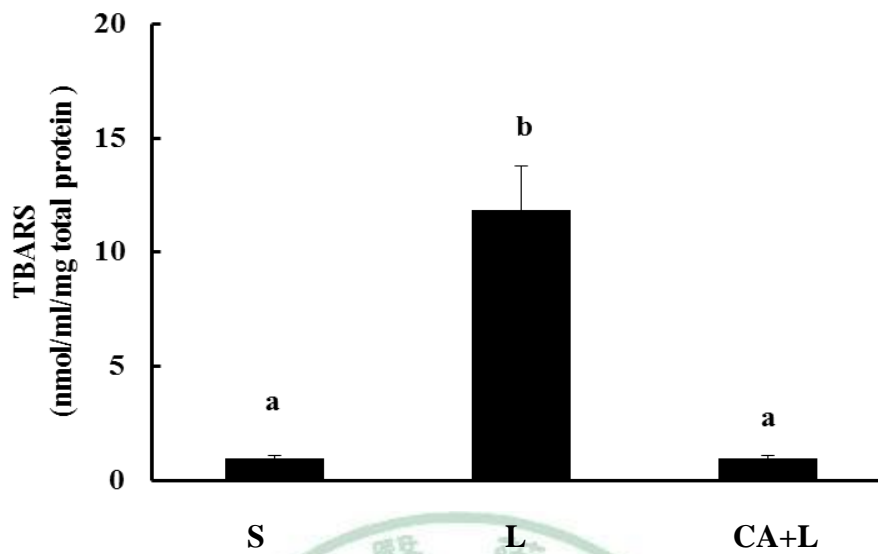


Figure 14. Effect of carnosic acid (CA) on the level of TBARS in the right substantia nigra of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-treated rats. Values are means \pm SD of seven independent experiments. Groups not sharing a common letter differ significantly, $p < 0.05$.

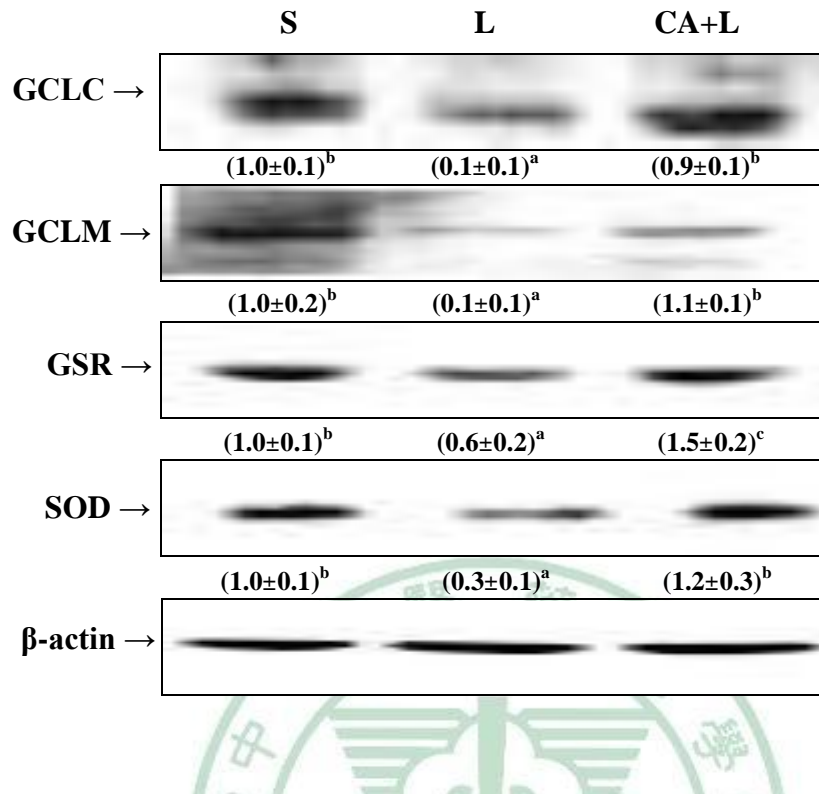


Figure 15. Effect of carnosic acid (CA) on the content of GCLC, GCLM, GSR, and SOD in the right striatum of 6-OHDA-treated rats. The proteins were determined by Western blotting. Changes in protein expression were measured by densitometry. The level in control cells was regarded as 1. Values are means±SD of six independent experiments. Groups not sharing a common letter differ significantly, $p < 0.05$.

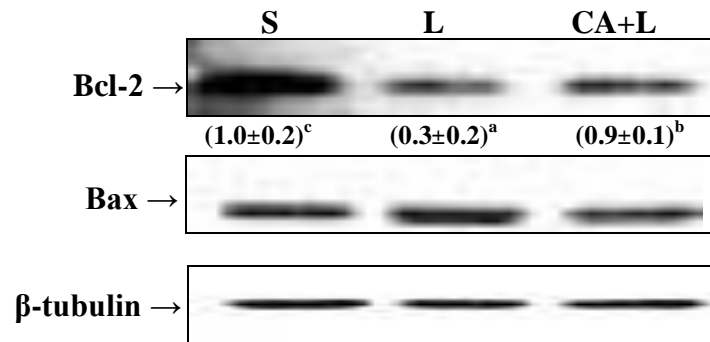


Figure 16. Effect of carnosic acid (CA) on the protein expression of Bcl-2, Bax, caspase 3 and PARP in the right striatum of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) treated rats. The Bcl-2 and Bax protein were determined by Western blotting. Changes in protein expression were measured by densitometry. The level in control cells was regarded as 1. Values are Bcl-2/Bax/ β -tubulin. Values are means \pm SD of six independent experiments. Groups not sharing a common letter differ significantly, $p < 0.05$.

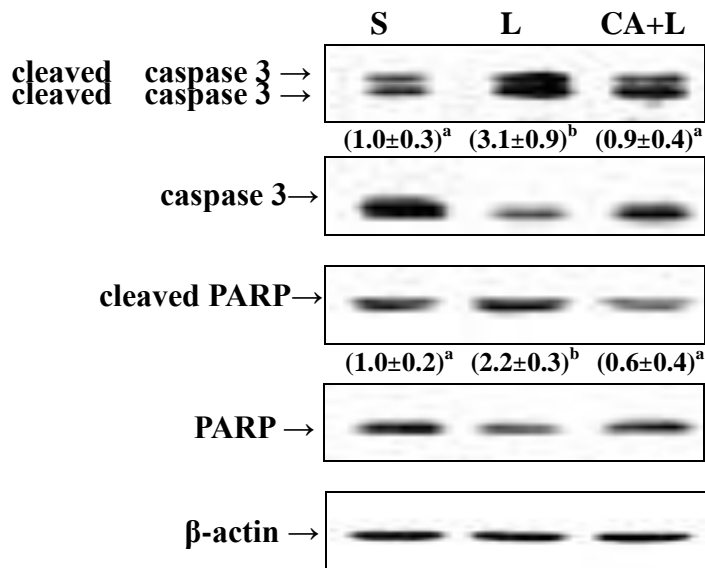


Figure 17. Effect of carnosic acid (CA) on the protein expression of caspase 3 and PARP in the right striatum of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) treated rats.

The caspase 3 and PARP protein were determined by Western blotting. Changes in protein expression were measured by densitometry. The level in control cells was regarded as 1. Values are cleaved caspase 3/caspase 3/ β -actin and cleaved PARP/PARP/ β -actin. Values are means \pm SD of six independent experiments. Groups not sharing a common letter differ significantly, $p < 0.05$.

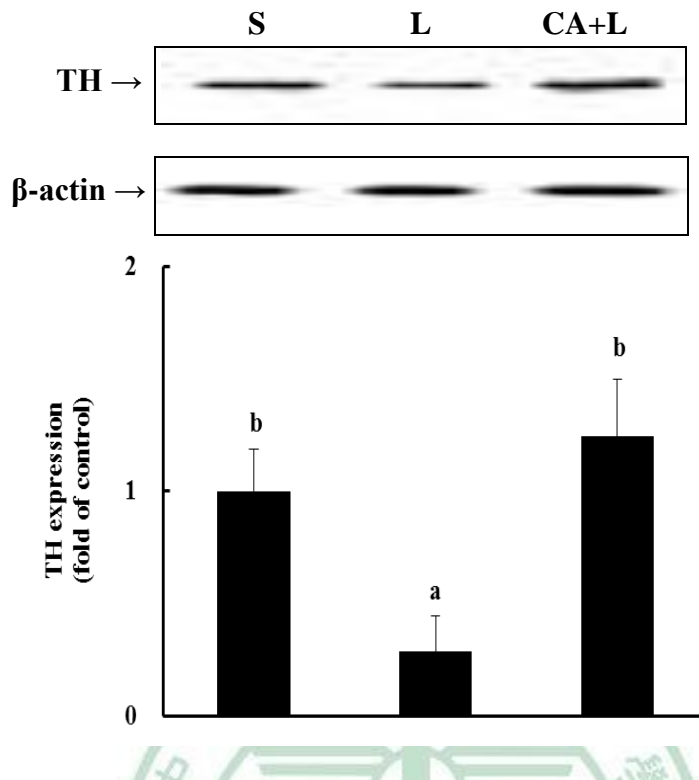


Figure 18. Effect of carnosic acid (CA) on the content of TH in the right striatum of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-treated rats. The TH protein was determined by Western blotting. Changes in protein expression were measured by densitometry. The level in control cells was regarded as 1. Values are means \pm SD of six independent experiments. Groups not sharing a common letter differ significantly, $p < 0.05$.

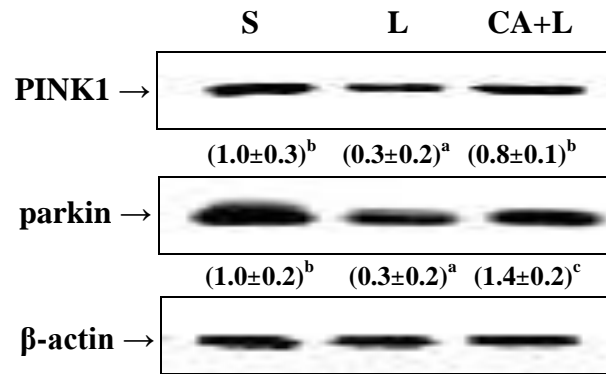


Figure 19. Effect of carnosic acid (CA) on the protein expression of PINK1 and parkin in the right striatum of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-treated rats. The proteins were determined by Western blotting. Changes in protein expression were measured by densitometry. The level in control cells was regarded as 1. Values are means±SD of six independent experiments. Groups not sharing a common letter differ significantly, $p < 0.05$.

第六章 討論

氧化傷害、細胞凋亡及蛋白質錯誤折疊是引起帕金森氏症(Parkinson's disease, PD)的重要原因(Lees et al., 2009)，因而從飲食中尋找預防作用的食材或其活性成份已是現今重要的研究方向。許多研究指出不少植化素具有延緩 PD 的功效，比如銀杏萃取物 EGb761(R)在雄性 Wistar 大鼠對於放射線(γ -irradiation)誘導的 PD 模式中，能透過提高 GSH 的含量而改善醌氧化還原酶(NAD(P)H-quinone oxidoreductase, NQO) 的活性，並減少脂質過氧化物、粒線體功能障礙和細胞凋亡而達到神經保護效果(El-Ghazaly et al., 2013)。另外存在十字花科蔬菜中的含硫配醣體(sulforaphane)對於單側注射 6-OHDA 誘導 PD 模式的小鼠能夠改善其行為活動力、降低 DNA 片斷化和 caspase 3 的裂解，並透過增加 glutathione-S-transferase 和 glutathione reductase 的酵素含量達到神經保護功效(Morrone et al., 2013)。羥基紅花黃色素 A (hydroxysafflor yellow A)是具有單查爾酮苷類結構的化合物，對於 6-OHDA 誘導 PD 模式的 Sprague-Dawley 大鼠，具有改善由 apomorphine 誘導的旋轉能力與腦部 TH 的含量，並透過增加腦部黑質中神經膠細胞的營養因子(glial cell line-derived neurotrophic factor)和腦源性神經營養因子(brain-derived neurotrophic factor)達到神經保護功效(Han et al., 2013)。葛根素(puerarin)對於 6-OHDA 誘導 PD 模式之大鼠，也能夠透過活化 Nrf2/ARE 路徑，增加腦部黑質中 GCLC、GSH、和腦部多巴胺含量，並減少 apomorphine 所誘導的對側旋轉以及增加腦源性神經營養因子，而達到神經保護作用(Li et al., 2013b)。

迷迭香主要活性成份為 CA、鼠尾草酚(carnosol)、迷迭香酸(rosmarinic acid)、熊果酸(ursolic Acid)和齊墩果酸(oleanic acid)，其中以 CA 最受矚目，它是迷迭香中主要的抗氧化成份(Bernardes et al., 2010)。已知 CA 具有神經保護的效果(Fischedick et al., 2013; Meng et al., 2013; Rezaie et al., 2012)，研究文獻指出 CA 能夠保護海馬神經元，防止大鼠的神經退化及改善記憶(Azad et al., 2011)，而且在我們已發表的研究中也發現在 SH-SY5Y 神經細胞中 CA 可以減少 6-OHDA 所造成的細胞毒性、活性

氧(reactive oxygen species, ROS)生成以及 JNK 和 p38 磷酸化；CA 會隨處理時間增加 glutathione 含量和 GCLC 蛋白表現，預處理 GSH 合成抑制劑 L-buthionine-sulfoximine (BSO)，則會降低 CA 抑制細胞傷害和凋亡的能力(Chen et al., 2012)。而本實驗則發現在 6-OHDA 誘導 PD 的動物模式，CA 可以改善大鼠因 6-OHDA 引起的運動失調和對側旋轉；且在細胞和動物實驗中 CA 皆可以抑制 caspase 3 和 PARP 的裂解，以減少神經細胞的死亡；進一步探討其機轉則發現 CA 可能透過活化 GSR、GPx 和 SOD 等抗氧化酵素與 PINK 和 parkin 等神經保護蛋白，而減少 6-OHDA 所誘導的神經損傷。

在 PD 的大鼠實驗模式之下，6-OHDA 的注射會引起動作行為的失調，這些行為障礙的發生主要歸因於神經元損傷(Ham et al., 2013; Kuruvilla et al., 2013; Schwarting et al., 1991)，在我們實驗中也確實發現在 6-OHDA 誘導的細胞和動物 PD 模式之下，皆會增加 caspase 3 及 PARP 的裂解，並降低細胞存活率(圖一、圖三和圖十七)。使用多巴胺促動劑 apomorphine 能使其產生對側旋轉(contralateral rotation)此現象可能表示腦部中黑質多巴胺神經元已經損失 74%以上(Sindhu et al., 2006)，而我們給予 20 mg/kg CA 之後能改善大白鼠因 apomorphine 產生的對側旋轉，且在 locomotor test 的實驗當中觀察到 CA 對於 6-OHDA 減少 PD 大鼠的運動時間和距離具有改善的功效(圖十一、圖十二)。另外，CA 也能夠抑制 caspase 3 和 PARP 的裂解與提高 Bcl-2 / Bax 的比例(圖十六、圖十七)，表示 CA 不論在細胞或動物實驗中皆可以增加神經細胞的存活，並改善 PD 所造成的運動失調。

另外許多文獻指出 PD 的成因有可能是氧化壓力與抗氧化系統之間的失衡所引起。腦部細胞的細胞膜富含脂質，若被過量自由基攻擊，易引起脂質過氧化(Nowak, 2013)，因此我們也認為改善腦部脂質過氧化程度也是預防 PD 的重要項目之一，且當腦部產生脂質過氧化時也常伴隨著 GSH 的耗損(Zafar et al., 2003)，使得抗氧化系統失調，當 GSH 耗損，細胞內的 H_2O_2 不能清除會損傷細胞(Mytilineou et al., 1998)，也因此如何提高 GSH 含量及相關抗氧化酵素也是改善 PD 的方法。GSH 是腦部最主

要的抗氧化分子，扮演腦部清除自由基的角色，GSH 以兩種形式存在，氧化態 GSSG 及還原態 GSH，GSH 能夠藉由 GPx 氧化成 GSSG 而達到清除過氧化氫及有機過氧化物的目的，而 GSSG 再藉由 GSR 還原為 GSH，以達到細胞內抗氧化的平衡(Meister, 1988)。Glutamate-cysteine ligase (GCLC)及 glutamate--cysteine ligase regulatory subunit (GCLM) 是合成 GSH 的第一限制酵素(Yang et al., 2012)，GPx 主要功能是還原過氧化氫或過氧化脂質成為氧與水等產物，GPx 也參與將 GSH 氧化成 GSSG 的作用，也因此 GPx 的含量也關係著 GSH 的氧化還原平衡(Bensadoun et al., 1998)，GSR 則是 GSSG 還原成 GSH 所需的酵素，與 GPx 一同維持體內 GSH 的平衡。SOD 的生理作用為促使具毒性的超氧陰離子轉變成過氧化氫，減少細胞內的超氧陰離子的堆積(Kunikowska and Jenner, 2001; Perumal et al., 1992)。許多抗氧化酵素的降低都涉及了 PD 的發展，研究發現 6-OHDA 處理下大鼠腦內 GSR、SOD 和 GPx 也顯著地降低(Khan et al., 2012)。有研究指出十字花科蔬菜對於 6-OHDA 誘導 SH-SY5Y 神經細胞有助於提高 GSH、GCLC、SOD、GPx、GST 及 NQO1 的活性及含量而達到神經保護效果(Jia et al., 2009)。在兒茶素(catechin)對於 6-OHDA 誘導的 PD 模式研究中，兒茶素的預處理不僅能夠改善 apomorphine 誘導的對側旋轉，也能增加腦部 GSH 的含量，改善抗氧化酵素系統(Teixeira et al., 2013)。而從我們的實驗結果來看 6-OHDA 會增加大鼠腦部的脂質過氧化物，而 CA 的預處理除了能夠使腦部回復 GSH 的含量和降低脂質過氧化物，亦能藉由誘發 GCLC、GCLM、GSR 和 SOD 改善腦部抗氧化的防禦能力(圖十三、圖十五)。

在 6-OHDA 單側誘導 PD 模式的大鼠，注射 6-OHDA 的部位往往造成多巴胺神經元的受損，使得多巴胺分泌不足，在這個受損的區塊的多巴胺接受器會增加(dopamine receptors)以利汲取多巴胺，也因此 PD 的鼠類腦部中，多巴胺接受器的增加是很明顯的病理現象(Ahmad et al., 2005)。TH 為多巴胺合成所必需，有文獻指出預處理薑黃素或銀杏能夠降低多巴胺接受器的密度，而在組織的免疫染色實驗中，也發現 6-OHDA 損傷組的大鼠紋狀體中 TH 染色的表現與假手術組相比是顯著

減少的，若有預處理薑黃素或銀杏，則有顯著回復 TH 的含量(Ahmad et al., 2005; Khuwaja et al., 2011a)，在雄性小鼠的 PD 模式中也指出 PD 誘導組別的 TH 蛋白質表現是顯著少於假手術組的(Khasnavis et al., 2013)，而我們的結果也與這些研究相類似，發現在注射 6-OHDA 的大鼠紋狀體中，TH 蛋白的表現顯著減少於假手術組，而在有 CA 的預處理組別，則顯著地提升 TH 的蛋白質表現(圖十八)，顯示 CA 具有改善多巴胺神經元的功能。

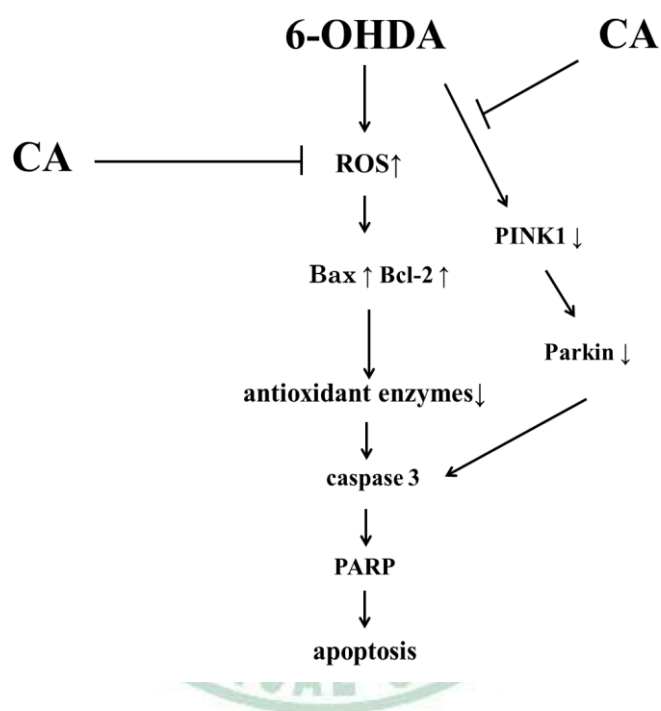
自 1998 年 Tohru Kitada 等人的研究即發現到 parkin 的突變也與 PD 的進展有關(Kitada et al., 1998)，parkin 所扮演的角色是泛素蛋白酶體系統中的連接酶 E3 的角色，主要辨識錯誤摺疊的蛋白質，再將其送至蛋白酶體進行降解。氧化壓力會導致蛋白質的錯誤折疊，parkin 的神經保護作用即是讓細胞粒線體免於神經毒素的破壞，根據文獻指出 parkin 可能透過(I κ B kinase (IKK)/nuclear factor κ B, NF- κ B)路徑而達到神經保護效果(Henn et al., 2007)。有文獻指出生長素(ghrelin)能夠透過調控 NF- κ B 的 translocation 降低細胞的 ROS，減少 Bax/Bcl2 的比例，並增加抗氧化酵素 SOD 和 catalase 的表現以保護 MES23.5 神經細胞免於 MPP⁺ 的神經傷害(Liu et al., 2010)。在人體血液分離出的蛋白酶體活性實驗研究中也指出銀杏萃取物 EGb761 能夠增加泛素蛋白酶體活性促進損傷蛋白質的降解(Voss et al., 2006)。另外研究也發現兒茶素(epigallocatechin gallate)能夠顯著地改善暴露於 paraquat 之下的 knock-down parkin 果蠅其活動力降低(Bonilla-Ramirez et al., 2013)。而從我們的動物及細胞實驗中看到 6-OHDA 的處理之下會使 parkin 的蛋白質表現降低(圖八、圖十九)，若有預處理 CA 的組別則能回復 parkin 的蛋白質表現(圖八)、(圖十九)，而在對於泛素蛋白酶體系統功能方面也發現 6-OHDA 的處理之下會顯著地降低 proteasome activity，若預處理了 CA 則能回復 proteasome activity(圖五)，也因此我們認為 CA 能夠改善泛素蛋白酶體系統功能，以避免錯誤蛋白質的堆積，減少神經傷害。但 parkin 是否透過 NF- κ B pathway 活化去達到神經保護效果則不清楚，因此我們收核蛋白看 p65 的蛋白質表現，也確實發現到 6-OHDA 的處理之下會顯著降低 p65 的蛋白質表現，

若預處理了 CA 則能回復 p65 的蛋白質表現(圖九)。而且為了更進一步確認 parkin 的神經保護角色，我們也利用 parkin siRNA 的實驗去探討 CA 對於 6-OHDA 誘導細胞凋亡的影響，結果發現，6-OHDA 的處理會增加 caspase 3 的裂解，有 CA 的預處理細胞則顯著降低 caspase 3 的裂解現象，然而有轉染 parkin siRNA 的組別 CA 的預處理則無法降低 caspase 3 的裂解現象，因此確定 CA 能夠透過誘導 parkin 去達成神經保護功效(圖十)。

而近幾年與parkin相關的PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1)也被認為有神經保護功效，且可能與parkin有類似的作用，PINK1是位於粒線體內膜的 serine/threonine 蛋白激酶，其功能為保護細胞粒線體免於壓力的破壞，並藉由磷酸化作用刺激 parkin E3 ligase 活化(Kondapalli et al., 2012)，然而目前植化素並未有這方面的相關研究，因此我們將探討CA是否有透過此路徑而達到神經保護之作用。因此我們也使用CA處理SH-SY5Y細胞探討是否誘導PINK1達到神經保護作用?經由細胞和動物實驗顯示6-OHDA的處理之下確實會降低PINK1的蛋白質表現，使用CA預處理的組別則能回復PINK1的蛋白質表現(圖八)。經過以上的實驗我們認為PINK1可能藉由磷酸化作用刺激 parkin E3 ligase 活化，parkin 又透過NF- κ B pathway 達到神經保護效果。從我們動物及細胞的實驗結果顯示CA能夠藉由降低腦部脂質過氧化、提高GSH含量和增加抗氧化酵素蛋白表現，而改善6-OHDA所引起的氧化傷害；並透過誘發 PINK1和parkin蛋白與增加蛋白酶體活性，減少錯誤摺疊蛋白堆積，以保護6-OHDA所引起的細胞凋亡，進而因此我們認為CA有神經保護之功效，也希望將來能應用在預防PD上。

第七章 結論

CA 的處理能改善大鼠由 6-OHDA 引起的運動能力降低、對側旋轉和腦部 TH 表現減少；並在 6-OHDA 誘發 PD 的細胞和動物的模式中，降低 6-OHDA 提升的氧化壓力增加與細胞凋亡，其機轉可能透過降低細胞凋亡、增加抗氧化酵素和上調 PINK1/parkin 路徑，由以上結果發現 CA 在細胞和動物實驗皆具有神經保護功效，因此未來可運用於神經保護或預防帕金森氏症的可能性。



圖八、CA 及 6-OHDA 作用機制

第八章 參考文獻

- A E. L. O., Han J., Ben Abdrabbah M. and Isoda H., 2012. Down regulation effect of *Rosmarinus officinalis* polyphenols on cellular stress proteins in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Cytotechnology* 64, 231-40.
- Agrawal S. S., Gullaiya S., Dubey V., Singh V., Kumar A., Nagar A. and Tiwari P., 2012. Neurodegenerative Shielding by Curcumin and Its Derivatives on Brain Lesions Induced by 6-OHDA Model of Parkinson's Disease in Albino Wistar Rats. *Cardiovasc Psychiatry Neurol* 2012, 942981.
- Ahmad M., Saleem S., Ahmad A. S., Yousuf S., Ansari M. A., Khan M. B., Ishrat T., Chaturvedi R. K., Agrawal A. K. and Islam F., 2005. Ginkgo biloba affords dose-dependent protection against 6-hydroxydopamine-induced parkinsonism in rats: neurobehavioural, neurochemical and immunohistochemical evidences. *J Neurochem* 93, 94-104.
- Airavaara M., Harvey B. K., Voutilainen M. H., Shen H., Chou J., Lindholm P., Lindahl M., Tuominen R. K., Saarma M., Hoffer B. and Wang Y., 2012. CDNF protects the nigrostriatal dopamine system and promotes recovery after MPTP treatment in mice. *Cell Transplant* 21, 1213-23.
- Aruoma O. I., Halliwell B., Aeschbach R. and Loligers J., 1992. Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica* 22, 257-68.
- Azad N., Rasoolijazi H., Joghataie M. T. and Soleimani S., 2011. Neuroprotective effects of carnosic Acid in an experimental model of Alzheimer's disease in rats. *Cell J* 13, 39-44.
- Back S., Peranen J., Galli E., Pulkkila P., Lonka-Nevalaita L., Tamminen T., Voutilainen M. H., Raasmaja A., Saarma M., Mannisto P. T. and Tuominen R. K., 2013. Gene therapy with AAV2-CDNF provides functional benefits in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Behav* 3, 75-88.
- Banji D., Banji O. J., Dasaroju S. and Kumar Ch K., 2013. Curcumin and piperine abrogate lipid and protein oxidation induced by d-galactose in rat brain. *Brain Res.*
- Barni M. V., Carlini M. J., Cafferata E. G., Puricelli L. and Moreno S., 2012. Carnosic acid inhibits the proliferation and migration capacity of human colorectal cancer cells. *Oncol Rep* 27, 1041-8.
- Basappa Maheswarappa N., Subbaiah V., Muthupalani M., Yamagani P. K., Mohan K., Keshapaga U. R., Vaikkathukattil Asokan S. and Kalappurakkal R. C., 2013. Antioxidant activity of carnosic acid and rosmarinic acid in raw and cooked ground chicken patties. *J Sci Food Agric.*
- Beilina A., Van Der Brug M., Ahmad R., Kesavapany S., Miller D. W., Petsko G. A. and

- Cookson M. R., 2005. Mutations in PTEN-induced putative kinase 1 associated with recessive parkinsonism have differential effects on protein stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5703-8.
- Bensadoun J. C., Mirochnitchenko O., Inouye M., Aebischer P. and Zurn A. D., 1998. Attenuation of 6-OHDA-induced neurotoxicity in glutathione peroxidase transgenic mice. *Eur J Neurosci* 10, 3231-6.
- Bernardes W. A., Lucarini R., Tozatti M. G., Souza M. G., Silva M. L., Filho A. A., Martins C. H., Crotti A. E., Pauletti P. M., Groppo M. and Cunha W. R., 2010. Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens: relevance of carnosic acid and carnosol. *Chem Biodivers* 7, 1835-40.
- Blum D., Torch S., Lambeng N., Nissou M., Benabid A. L., Sadoul R. and Verna J. M., 2001. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 65, 135-72.
- Bonilla-Ramirez L., Jimenez-Del-Rio M. and Velez-Pardo C., 2013. Low doses of paraquat and polyphenols prolong life span and locomotor activity in knock-down parkin *Drosophila melanogaster* exposed to oxidative stress stimuli: implication in autosomal recessive juvenile Parkinsonism. *Gene* 512, 355-63.
- Bove J., Prou D., Perier C. and Przedborski S., 2005. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx* 2, 484-94.
- Braak H., Del Tredici K., Rub U., de Vos R. A., Jansen Steur E. N. and Braak E., 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24, 197-211.
- Brooks A. I., Chadwick C. A., Gelbard H. A., Cory-Slechta D. A. and Federoff H. J., 1999. Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Res* 823, 1-10.
- Brown T. P., Rumsby P. C., Capleton A. C., Rushton L. and Levy L. S., 2006. Pesticides and Parkinson's disease--is there a link? *Environ Health Perspect* 114, 156-64.
- Chaturvedi R. K. and Flint Beal M., 2013. Mitochondrial Diseases of the Brain. *Free Radic Biol Med* 63C, 1-29.
- Chen J. H., Ou H. P., Lin C. Y., Lin F. J., Wu C. R., Chang S. W. and Tsai C. W., 2012. Carnosic acid prevents 6-hydroxydopamine-induced cell death in SH-SY5Y cells via mediation of glutathione synthesis. *Chem Res Toxicol* 25, 1893-901.
- Chien W. L., Lee T. R., Hung S. Y., Kang K. H., Wu R. M., Lee M. J. and Fu W. M., 2013. Increase of oxidative stress by a novel PINK1 mutation, P209A. *Free Radic Biol Med* 58, 160-9.
- Chin L. S., Olzmann J. A. and Li L., 2010. Parkin-mediated ubiquitin signalling in aggresome formation and autophagy. *Biochem Soc Trans* 38, 144-9.

- Dehorter N., Lozovaya N., Mdzomba B. J., Michel F. J., Lopez C., Tsintsadze V., Tsintsadze T., Klinkenberg M., Gispert S., Auburger G. and Hammond C., 2012. Subthalamic lesion or levodopa treatment rescues giant GABAergic currents of PINK1-deficient striatum. *J Neurosci* 32, 18047-53.
- Dexter D. T., Carter C. J., Wells F. R., Javoy-Agid F., Agid Y., Lees A., Jenner P. and Marsden C. D., 1989. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem* 52, 381-9.
- Einbond L. S., Wu H. A., Kashiwazaki R., He K., Roller M., Su T., Wang X. and Goldsberry S., 2012. Carnosic acid inhibits the growth of ER-negative human breast cancer cells and synergizes with curcumin. *Fitoterapia* 83, 1160-8.
- El-Ghazaly M. A., Sadik N. A., Rashed E. R. and Abd El-Fattah A. A., 2013. Neuroprotective effect of EGb761(R) and low-dose whole-body gamma-irradiation in a rat model of Parkinson's disease. *Toxicol Ind Health*.
- Esposito G., Vos M., Vilain S., Swerts J., De Sousa Valadas J., Van Meensel S., Schaap O. and Verstreken P., 2013. Aconitase Causes Iron Toxicity in *Drosophila pink1* Mutants. *PLoS Genet* 9, e1003478.
- Fang F., Chen H., Feldman A. L., Kamel F., Ye W. and Wirdefeldt K., 2012. Head injury and Parkinson's disease: a population-based study. *Mov Disord* 27, 1632-5.
- Fischedick J. T., Standiford M., Johnson D. A. and Johnson J. A., 2013. Structure activity relationship of phenolic diterpenes from *Salvia officinalis* as activators of the nuclear factor E2-related factor 2 pathway. *Bioorg Med Chem* 21, 2618-22.
- Freeman B. A. and Crapo J. D., 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47, 412-26.
- Gasser T., 2009. Mendelian forms of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1792, 587-96.
- Gaya M., Repetto V., Toneatto J., Anesini C., Piwien-Pilipuk G. and Moreno S., 2013. Antiadipogenic effect of carnosic acid, a natural compound present in *Rosmarinus officinalis*, is exerted through the C/EBPs and PPARgamma pathways at the onset of the differentiation program. *Biochim Biophys Acta* 1830, 3796-806.
- Grant H., Lantos P. L. and Parkinson C., 1980. Cerebral damage in paraquat poisoning. *Histopathology* 4, 185-95.
- Greene J. C., Whitworth A. J., Kuo I., Andrews L. A., Feany M. B. and Pallanck L. J., 2003. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4078-83.
- Hadad N. and Levy R., 2012. The synergistic anti-inflammatory effects of lycopene, lutein, beta-carotene, and carnosic acid combinations via redox-based inhibition of NF-kappaB signaling. *Free Radic Biol Med* 53, 1381-91.
- Ham A., Kim D. W., Kim K. H., Lee S. J., Oh K. B., Shin J. and Mar W., 2013. Reynosin

- protects against neuronal toxicity in dopamine-induced SH-SY5Y cells and 6-hydroxydopamine-lesioned rats as models of Parkinson's disease: Reciprocal up-regulation of E6-AP and down-regulation of alpha-synuclein. *Brain Res.*
- Han B., Hu J., Shen J., Gao Y., Lu Y. and Wang T., 2013. Neuroprotective effect of hydroxysafflor yellow A on 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease in rats. *Eur J Pharmacol.*
- Henn I. H., Bouman L., Schlehe J. S., Schlierf A., Schramm J. E., Wegener E., Nakaso K., Culmsee C., Berninger B., Krappmann D., Tatzelt J. and Winklhofer K. F., 2007. Parkin mediates neuroprotection through activation of IkappaB kinase/nuclear factor-kappaB signaling. *J Neurosci* 27, 1868-78.
- Higashi Y., Asanuma M., Miyazaki I., Hattori N., Mizuno Y. and Ogawa N., 2004. Parkin attenuates manganese-induced dopaminergic cell death. *J Neurochem* 89, 1490-7.
- Hirsch E., Graybiel A. M. and Agid Y. A., 1988. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334, 345-8.
- Hou C. W., Lin Y. T., Chen Y. L., Wang Y. H., Chou J. L., Ping L. Y. and Jeng K. C., 2012. Neuroprotective effects of carnosic acid on neuronal cells under ischemic and hypoxic stress. *Nutr Neurosci.*
- Hwang O., 2013. Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Exp Neurobiol* 22, 11-7.
- Imai Y. and Takahashi R., 2004. How do Parkin mutations result in neurodegeneration? *Curr Opin Neurobiol* 14, 384-9.
- Jackson-Lewis V. and Smeyne R. J., 2005. MPTP and SNpc DA neuronal vulnerability: role of dopamine, superoxide and nitric oxide in neurotoxicity. Minireview. *Neurotox Res* 7, 193-202.
- Jia Z., Zhu H., Li Y. and Misra H. P., 2009. Cruciferous nutraceutical 3H-1,2-dithiole-3-thione protects human primary astrocytes against neurocytotoxicity elicited by MPTP, MPP(+), 6-OHDA, HNE and acrolein. *Neurochem Res* 34, 1924-34.
- Jiang J., Kim J. J., Kim D. Y., Kim M. K., Oh N. H., Koppula S., Park P. J., Choi D. K., Shin Y. K., Kim I. H., Kang T. B. and Lee K. H., 2012. *Acorus gramineus* inhibits microglia mediated neuroinflammation and prevents neurotoxicity in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced mouse model of Parkinson's disease. *J Ethnopharmacol.*
- Jordan M. J., Lax V., Rota M. C., Loran S. and Sotomayor J. A., 2012. Relevance of carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid concentrations in the in vitro antioxidant and antimicrobial activities of *Rosmarinus officinalis* (L.) methanolic extracts. *J Agric Food Chem* 60, 9603-8.

- Kasten M. and Klein C., 2013. The many faces of alpha-synuclein mutations. *Mov Disord*.
- Keane P. C., Kurzawa M., Blain P. G. and Morris C. M., 2011. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis* 2011, 716871.
- Keeney P. M., Xie J., Capaldi R. A. and Bennett J. P., Jr., 2006. Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J Neurosci* 26, 5256-64.
- Khan M. M., Raza S. S., Javed H., Ahmad A., Khan A., Islam F., Safhi M. M. and Islam F., 2012. Rutin protects dopaminergic neurons from oxidative stress in an animal model of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 22, 1-15.
- Khasnavis S., Ghosh A., Roy A. and Pahan K., 2013. Castration induces Parkinson's disease pathologies in young male mice via inducible nitric oxide synthase. *J Biol Chem*.
- Khuwaja G., Khan M. M., Ishrat T., Ahmad A., Raza S. S., Ashafaq M., Javed H., Khan M. B., Khan A., Vaibhav K., Safhi M. M. and Islam F., 2011a. Neuroprotective effects of curcumin on 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats: behavioral, neurochemical and immunohistochemical studies. *Brain Res* 1368, 254-63.
- Khuwaja G., Khan M. M., Ishrat T., Ahmad A., Raza S. S., Ashafaq M., Javed H., Khan M. B., Khan A., Vaibhav K., Safhi M. M. and Islam F., 2011b. Neuroprotective effects of curcumin on 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats: behavioral, neurochemical and immunohistochemical studies, Vol. 1368, pp. 254-63.
- Kim H. G., Ju M. S., Shim J. S., Kim M. C., Lee S. H., Huh Y., Kim S. Y. and Oh M. S., 2010. Mulberry fruit protects dopaminergic neurons in toxin-induced Parkinson's disease models. *Br J Nutr* 104, 8-16.
- Kim H. J., Jeon B. S., Yun J. Y., Kim Y. E., Yang H. J. and Paek S. H., 2013. Initial cognitive dip after subthalamic deep brain stimulation in Parkinson disease. *J Neurol*.
- Kitada T., Asakawa S., Hattori N., Matsumine H., Yamamura Y., Minoshima S., Yokochi M., Mizuno Y. and Shimizu N., 1998. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392, 605-8.
- Klancnik A., Guzej B., Kolar M. H., Abramovic H. and Mozina S. S., 2009. In vitro antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *J Food Prot* 72, 1744-52.
- Koch A., Lehmann-Horn K., Dachsel J. C., Gasser T., Kahle P. J. and Lucking C. B., 2009. Proteasomal inhibition reduces parkin mRNA in PC12 and SH-SY5Y cells. *Parkinsonism Relat Disord* 15, 220-5.

- Kondapalli C., Kazlauskaitė A., Zhang N., Woodroof H. I., Campbell D. G., Gourlay R., Burchell L., Walden H., Macartney T. J., Deak M., Knebel A., Alessi D. R. and Muqit M. M., 2012. PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. *Open Biol* 2, 120080.
- Kosaka K. and Yokoi T., 2003. Carnosic acid, a component of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), promotes synthesis of nerve growth factor in T98G human glioblastoma cells. *Biol Pharm Bull* 26, 1620-2.
- Kunikowska G. and Jenner P., 2001. 6-Hydroxydopamine-lesioning of the nigrostriatal pathway in rats alters basal ganglia mRNA for copper, zinc- and manganese-superoxide dismutase, but not glutathione peroxidase. *Brain Res* 922, 51-64.
- Kuruvilla K. P., Nandhu M. S., Paul J. and Paulose C. S., 2013. Oxidative stress mediated neuronal damage in the corpus striatum of 6-hydroxydopamine lesioned Parkinson's rats: Neuroprotection by Serotonin, GABA and Bone Marrow Cells Supplementation. *J Neurol Sci*.
- Latchoumycandane C., Anantharam V., Jin H., Kanthasamy A. and Kanthasamy A., 2011. Dopaminergic neurotoxicant 6-OHDA induces oxidative damage through proteolytic activation of PKCdelta in cell culture and animal models of Parkinson's disease. *Toxicol Appl Pharmacol* 256, 314-23.
- Lees A. J., Hardy J. and Revesz T., 2009. Parkinson's disease. *Lancet* 373, 2055-66.
- Lepoivre M., Flaman J. M., Bobe P., Lemaire G. and Henry Y., 1994. Quenching of the tyrosyl free radical of ribonucleotide reductase by nitric oxide. Relationship to cytostasis induced in tumor cells by cytotoxic macrophages. *J Biol Chem* 269, 21891-7.
- Li B., Yu D. and Xu Z., 2013a. Edaravone Prevents Neurotoxicity of Mutant L166P DJ-1 in Parkinson's Disease. *J Mol Neurosci*.
- Li J., Zhu M., Rajamani S., Uversky V. N. and Fink A. L., 2004. Rifampicin inhibits alpha-synuclein fibrillation and disaggregates fibrils. *Chem Biol* 11, 1513-21.
- Li R., Liang T., Xu L., Zheng N., Zhang K. and Duan X., 2013b. Puerarin attenuates neuronal degeneration in the substantia nigra of 6-OHDA-lesioned rats through regulating BDNF expression and activating the Nrf2/ARE signaling pathway. *Brain Res*.
- Liang L. P., Kavanagh T. J. and Patel M., 2013. Glutathione Deficiency in Gclm Null Mice Results in Complex I Inhibition and Dopamine Depletion following Paraquat Administration. *Toxicol Sci*.
- Liberatore G. T., Jackson-Lewis V., Vukosavic S., Mandir A. S., Vila M., McAuliffe W. G., Dawson V. L., Dawson T. M. and Przedborski S., 1999. Inducible nitric oxide

- synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med* 5, 1403-9.
- Liu L., Xu H., Jiang H., Wang J., Song N. and Xie J., 2010. Ghrelin prevents 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced cytotoxicity through antioxidation and NF-kappaB modulation in MES23.5 cells. *Exp Neurol* 222, 25-9.
- Liu T. W., Ma Z. G., Zhou Y. and Xie J. X., 2013. Transplantation of mouse CGR8 embryonic stem cells producing GDNF and TH protects against 6-hydroxydopamine neurotoxicity in the rat. *Int J Biochem Cell Biol* 45, 1265-1273.
- Mayeux R., 2003. Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 26, 81-104.
- Meister A., 1988. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 263, 17205-8.
- Meng P., Yoshida H., Matsumiya T., Imaizumi T., Tanji K., Xing F., Hayakari R., Dempoya J., Tatsuta T., Aizawa-Yashiro T., Mimura J., Kosaka K., Itoh K. and Satoh K., 2013. Carnosic acid suppresses the production of amyloid-beta 1-42 by inducing the metalloprotease gene TACE/ADAM17 in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neurosci Res* 75, 94-102.
- Mengoni E. S., Vichera G., Rigano L. A., Rodriguez-Puebla M. L., Galliano S. R., Cafferata E. E., Pivetta O. H., Moreno S. and Vojnov A. A., 2011. Suppression of COX-2, IL-1beta and TNF-alpha expression and leukocyte infiltration in inflamed skin by bioactive compounds from *Rosmarinus officinalis* L. *Fitoterapia* 82, 414-21.
- Mills R. D., Sim C. H., Mok S. S., Mulhern T. D., Culvenor J. G. and Cheng H. C., 2008. Biochemical aspects of the neuroprotective mechanism of PTEN-induced kinase-1 (PINK1). *J Neurochem* 105, 18-33.
- Morrone F., Tarozzi A., Sita G., Bolondi C., Zolezzi Moraga J. M., Cantelli-Forti G. and Hrelia P., 2013. Neuroprotective effect of sulforaphane in 6-hydroxydopamine-lesioned mouse model of Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 36, 63-71.
- Muller T., 2013. Pharmacokinetic considerations for the use of levodopa in the treatment of Parkinson disease: focus on levodopa/carbidopa/entacapone for treatment of levodopa-associated motor complications. *Clin Neuropharmacol* 36, 84-91.
- Mytilineou C., Leonardi E. K., Radcliffe P., Heinonen E. H., Han S. K., Werner P., Cohen G. and Olanow C. W., 1998. Deprenyl and desmethylselegiline protect mesencephalic neurons from toxicity induced by glutathione depletion. *J Pharmacol Exp Ther* 284, 700-6.
- Nalepa G., Rolfe M. and Harper J. W., 2006. Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Drug Discov* 5, 596-613.

- Nowak J. Z., 2013. Oxidative stress, polyunsaturated fatty acids-derived oxidation products and bisretinoids as potential inducers of CNS diseases: focus on age-related macular degeneration. *Pharmacol Rep* 65, 288-304.
- Oh J., Yu T., Choi S. J., Yang Y., Baek H. S., An S. A., Kwon L. K., Kim J., Rho H. S., Shin S. S., Choi W. S., Hong S. and Cho J. Y., 2012. Syk/Src pathway-targeted inhibition of skin inflammatory responses by carnosic acid. *Mediators Inflamm* 2012, 781375.
- Olzmann J. A. and Chin L. S., 2008. Parkin-mediated K63-linked polyubiquitination: a signal for targeting misfolded proteins to the aggresome-autophagy pathway. *Autophagy* 4, 85-7.
- Palacino J. J., Sagi D., Goldberg M. S., Krauss S., Motz C., Wacker M., Klose J. and Shen J., 2004. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem* 279, 18614-22.
- Pawlyk A. C., Giasson B. I., Sampathu D. M., Perez F. A., Lim K. L., Dawson V. L., Dawson T. M., Palmiter R. D., Trojanowski J. Q. and Lee V. M., 2003. Novel monoclonal antibodies demonstrate biochemical variation of brain parkin with age. *J Biol Chem* 278, 48120-8.
- Perumal A. S., Gopal V. B., Tordzro W. K., Cooper T. B. and Cadet J. L., 1992. Vitamin E attenuates the toxic effects of 6-hydroxydopamine on free radical scavenging systems in rat brain. *Brain Res Bull* 29, 699-701.
- Petiwalla S. M., Puthenveetil A. G. and Johnson J. J., 2013. Polyphenols from the Mediterranean herb rosemary (*Rosmarinus officinalis*) for prostate cancer. *Front Pharmacol* 4, 29.
- Pickering A. M. and Davies K. J., 2012. Differential roles of proteasome and immunoproteasome regulators Pa28alpha, Pa28gamma and Pa200 in the degradation of oxidized proteins. *Arch Biochem Biophys* 523, 181-90.
- Ren X., Zhang T., Gong X., Hu G., Ding W. and Wang X., 2013. AAV2-mediated striatum delivery of human CDNF prevents the deterioration of midbrain dopamine neurons in a 6-hydroxydopamine induced parkinsonian rat model. *Exp Neurol*.
- Rezaie T., McKercher S. R., Kosaka K., Seki M., Wheeler L., Viswanath V., Chun T., Joshi R., Valencia M., Sasaki S., Tozawa T., Satoh T. and Lipton S. A., 2012. Protective effect of carnosic acid, a pro-electrophilic compound, in models of oxidative stress and light-induced retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 7847-54.
- Satoh T., Izumi M., Inukai Y., Tsutsumi Y., Nakayama N., Kosaka K., Shimojo Y., Kitajima C., Itoh K., Yokoi T. and Shirasawa T., 2008. Carnosic acid protects neuronal HT22 Cells through activation of the antioxidant-responsive element in

- free carboxylic acid- and catechol hydroxyl moieties-dependent manners. *Neurosci Lett* 434, 260-5.
- Schwartz R. K., Bonatz A. E., Carey R. J. and Huston J. P., 1991. Relationships between indices of behavioral asymmetries and neurochemical changes following mesencephalic 6-hydroxydopamine injections. *Brain Res* 554, 46-55.
- Sha D., Chin L. S. and Li L., 2010. Phosphorylation of parkin by Parkinson disease-linked kinase PINK1 activates parkin E3 ligase function and NF-kappaB signaling. *Hum Mol Genet* 19, 352-63.
- Silvestri L., Caputo V., Bellacchio E., Atorino L., Dallapiccola B., Valente E. M. and Casari G., 2005. Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Hum Mol Genet* 14, 3477-92.
- Sindhu K. M., Banerjee R., Senthilkumar K. S., Saravanan K. S., Raju B. C., Rao J. M. and Mohanakumar K. P., 2006. Rats with unilateral median forebrain bundle, but not striatal or nigral, lesions by the neurotoxins MPP+ or rotenone display differential sensitivity to amphetamine and apomorphine. *Pharmacol Biochem Behav* 84, 321-9.
- Teixeira M. D., Souza C. M., Menezes A. P., Carmo M. R., Fonteles A. A., Gurgel J. P., Lima F. A., Viana G. S. and Andrade G. M., 2013. Catechin attenuates behavioral neurotoxicity induced by 6-OHDA in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 110C, 1-7.
- Trempe J. F. and Fon E. A., 2013. Structure and Function of Parkin, PINK1, and DJ-1, the Three Musketeers of Neuroprotection. *Front Neurol* 4, 38.
- Um J. W., Park H. J., Song J., Jeon I., Lee G., Lee P. H. and Chung K. C., Formation of parkin aggregates and enhanced PINK1 accumulation during the pathogenesis of Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 393, 824-8.
- Vandiver M. S., Paul B. D., Xu R., Karuppagounder S., Rao F., Snowman A. M., Ko H. S., Lee Y. I., Dawson V. L., Dawson T. M., Sen N. and Snyder S. H., 2013. Sulfhydration mediates neuroprotective actions of parkin. *Nat Commun* 4, 1626.
- Voss P., Horakova L., Jakstadt M., Kiekebusch D. and Grune T., 2006. Ferritin oxidation and proteasomal degradation: protection by antioxidants. *Free Radic Res* 40, 673-83.
- Wang C., Ko H. S., Thomas B., Tsang F., Chew K. C., Tay S. P., Ho M. W., Lim T. M., Soong T. W., Pletnikova O., Troncoso J., Dawson V. L., Dawson T. M. and Lim K. L., 2005. Stress-induced alterations in parkin solubility promote parkin aggregation and compromise parkin's protective function. *Hum Mol Genet* 14, 3885-97.
- Wang T., Takikawa Y., Satoh T., Yoshioka Y., Kosaka K., Tatemichi Y. and Suzuki K., 2011. Carnosic acid prevents obesity and hepatic steatosis in ob/ob mice. *Hepatology* 53, 87-92.

- Weintraub D., Duda J. E., Carlson K., Luo P., Sagher O., Stern M., Follett K. A., Reda D. and Weaver F. M., 2013. Suicide ideation and behaviours after STN and GPi DBS surgery for Parkinson's disease: results from a randomised, controlled trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.
- Wesseling C., van Wendel de Joode B., Ruepert C., Leon C., Monge P., Hermosillo H. and Partanen T. J., 2001. Paraquat in developing countries. *Int J Occup Environ Health* 7, 275-86.
- Wu D. C., Jackson-Lewis V., Vila M., Tieu K., Teismann P., Vadseth C., Choi D. K., Ischiropoulos H. and Przedborski S., 2002. Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J Neurosci* 22, 1763-71.
- Xiang Q., Liu Z., Wang Y., Xiao H., Wu W., Xiao C. and Liu X., 2013. Carnosic acid attenuates lipopolysaccharide-induced liver injury in rats via fortifying cellular antioxidant defense system. *Food Chem Toxicol* 53, 1-9.
- Xie H. R., Hu L. S. and Li G. Y., 2010. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl)* 123, 1086-92.
- Xue Y., Li X., Pang S., Wang Y., Yao J., Zhou J. and Hao P., 2013. Efficacy and safety of computer-assisted stereotactic transplantation of human retinal pigment epithelium cells in the treatment of Parkinson disease. *J Comput Assist Tomogr* 37, 333-7.
- Yang L., Chen J. H., Xu T., Zhou A. S. and Yang H. K., 2012. Rice protein improves oxidative stress by regulating glutathione metabolism and attenuating oxidative damage to lipids and proteins in rats. *Life Sci* 91, 389-94.
- Yang W. and Tiffany-Castiglioni E., 2005. The bipyridyl herbicide paraquat produces oxidative stress-mediated toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: relevance to the dopaminergic pathogenesis. *J Toxicol Environ Health A* 68, 1939-61.
- Zafar K. S., Siddiqui A., Sayeed I., Ahmad M., Salim S. and Islam F., 2003. Dose-dependent protective effect of selenium in rat model of Parkinson's disease: neurobehavioral and neurochemical evidences. *J Neurochem* 84, 438-46.
- Zhang Z., Cui W., Li G., Yuan S., Xu D., Hoi M. P., Lin Z., Dou J., Han Y. and Lee S. M., 2012. Baicalein protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity through activation of Keap1/Nrf2/HO-1 and involving PKC α and PI3K/AKT signaling pathways. *J Agric Food Chem* 60, 8171-82.