

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

電針百會穴對腦缺血大白鼠的超氧化物歧化…影響之研究

Effect of electroacupuncture at the Bai-Hui acupoint on the superoxide dismutase in ischemic rats

計畫類別： 個別型計畫          整合型計畫

計畫編號：NSC 89-2320-B-039-042-

執行期間：89年8月1日至90年7月31日

計畫主持人：張永賢

共同主持人：許朝添、吳介信

E-Mail Address：張永賢    yhchang@mail.cmc.edu.tw

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：中國醫藥學院中西醫結合研究所

中 華 民 國 九 十 年 十 月 二 十 三 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 電針百會穴對腦缺血大白鼠的超氧化物歧化...影響之研究

Effect of electroacupuncture at the Bai-Hui acupoint on the superoxide dismutase in ischemic rats

計畫編號：NSC 89-2320-B-0390-042

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：張永賢

中國醫藥學院中西醫結合研究所

共同主持人：許朝添

中國醫藥學院附設醫院病理部

共同主持人：吳介信

中國醫藥學院藥理學科

### 一、中文摘要

本計畫旨在探討中風之大白鼠經電刺激百會穴(陽電極穴位)及風府穴(陰電極穴位),其大腦皮質的抗氧化酵素基因表現的變化,包括兩種超氧化物分解酵素(superoxide dismutase; SOD)及過氧化物分解酵素(glutathione peroxidase (GPX)),並與對照組(非穴位)比較。因此,老鼠依照常用的方法分成控制組(control)、缺血組(ischemia)及缺血又重灌流組(ischemia-reperfusion)等三組。

由北方點墨法的結果得知,經電針刺激(15 Hz, 10 mA)在非穴位30分鐘後,在缺血又重灌流組的老鼠之Mn-SOD的mRNA表現量較沒有處理的控制組更低( $p < 0.05$ ),然而,在穴位處施予電針刺激的老鼠則無此現象;Mn-SOD的mRNA表現量會恢復。可是,Cu,Zn-SOD及GPX的mRNA表現量在各組間則無顯著異差。另外,Cu,Zn-SOD的蛋白量,在控制組及缺血組接受穴位電針刺激的老鼠,與相同處理之非穴位電針刺激的老鼠相比,蛋白量有減少的情形。然而,在缺血又重灌流組接受非穴位電針刺激之老鼠,其Cu,Zn-SOD蛋白量則較同組接受穴位電

針刺激的老鼠更為減少( $p < 0.05$ )。而且,當電針刺激穴位時,Cu,Zn-SOD蛋白量與控制組或缺血組接受非穴位電針刺激的老鼠相近。Cu,Zn-SOD的酵素活性,在缺血又重灌流組接受非穴位電針刺激的老鼠較同組接受穴位電針刺激者為低。在缺血組接受電針刺激非穴位的老鼠,可觀察到Mn-SOD蛋白量的增加,可是,在同組接受穴位電針刺激的老鼠,卻無此現象。缺血又重灌流組接受非穴位電針刺激的老鼠,其Mn-SOD蛋白量,與控制組的老鼠相比,呈現下降的現象。然而,此現象在缺血又重灌流組接受穴位電針刺激的老鼠,並無發現。Mn-SOD的酵素活性,在控制組接受穴位電針刺激的老鼠較接受非穴位電針刺激者為低。缺血組接受非穴位電針刺激的老鼠其Mn-SOD的酵素活性則會顯著的增加,但在電針穴位的同組老鼠則沒有觀察到此一現象。此外,缺血又重灌流組接受穴位電針刺激的老鼠,Mn-SOD的酵素活性則較同組接受非穴位電針刺激的老鼠為高。GPX蛋白量的表現趨勢與Cu,Zn-SOD類似,而且,缺血又重灌流組接受穴位電針刺激的老鼠,其GPX的蛋白量與控制組接受非穴位電針刺激的老鼠相比,仍較顯著的減少( $p < 0.05$ )。

由所得的結果顯示，電針在百會及風府二穴道的刺激，對缺血又重灌流老鼠的抗氧化酵素功能，有顯著的改善作用；值得進一步去研究其臨床的實用性。

**關鍵詞：**電針、百會穴、超氧化物歧化…  
、缺血-重灌流、大白鼠

## ABSTRACT

In an attempt to know the effect of acupuncture on the cerebral stroke, the present study performed electrostimulation at Bai-Huei acupoint of rats receiving the clamping of bilateral carotid artery. Then, changes of gene expression of free radical scavenging enzymes including superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPX) in cerebrocortex were investigated. Rats were divided into three groups, sham-operated control group, ischemia group and ischemia-reperfusion group. Depending on the difference of electrostimulation site, each group was further separated into two subclasses, one was at acupoint and the other was at non-acupoint. Electrostimulation (15Hz, 10 mA) at Bai-Huei acupoint (positive charge) and Fon-Fu acupoint (negative charge) for desired time was indicated as acupoint-treated animal. Similar electrostimulation at soleus muscle of rat was used as non-acupoint control.

The data from Northern blotting analysis showed that mRNA level of Mn-SOD was reduced in cerebrocortex of rats received ischemia-reperfusion and it can be reversed by electrostimulation at

Bai-Huei acupoint. However, the mRNA level of Cu,Zn-SOD or GPX was not markedly modified by ischemia or ischemia-reperfusion. Otherwise, the enzyme amount of Mn-SOD characterized by Western blotting analysis was also decreased in cerebrocortex of rats received ischemia-reperfusion in a way can be reversed by electrostimulation at Bai-Huei acupoint. In rats receiving ischemia-reperfusion, the activity of Mn-SOD was higher in acupoint-stimulated group than that in non-acupoint-treated control. Similar increase of enzyme activity in rats received ischemia-reperfusion was observed from the comparison of Cu,Zn-SOD activity between acupoint-stimulated group and non-acupoint-treated control. The change of GPX enzyme was close to that of Cu,Zn-SOD.

The results obtained suggest that electrostimulation at Bai-Huei acupoint is helpful in the recovery of damage induced by ischemia-reperfusion. The finding in rats needs to be confirmed in the clinic in advance.

**Keywords:** Electroacupuncture, acupoint, Bai-Hui, ischemia, superoxide dismutase, rat

## 二、緣由與目的

針灸在傳統醫學（中醫）早已廣泛的被使用，而且，深具療效。位於頭頂正中央的「百會穴」，在古書記載，位於後髮際

正中直上 7 寸和兩耳尖聯線交會處，以現代的解剖學的定義則是位於頭頂頸部矢狀縫之上，主治頭痛，眩暈，中風失語，失眠，癲狂，癲癇，脫肛，陰挺，昏厥等症。現代臨床醫學及基礎醫學的研究上，刺激百會穴也被證明具有調控腦部血管及回復腦部的功能[1]。風府穴則位於後髮際正中直上 0.5 寸處，主治中風不語，半身不遂，頭暈強痛，癲狂，癲癇等症狀，與百會均屬於督脈的要穴[2]。

文獻指出，自由基的增加會使細胞膜的脂質發生過氧化的反應，進而影響到細胞膜的功能，使不飽和脂肪酸減少；不飽和脂肪酸減少又使得細胞膜的流動性下降，對細胞會造成重大傷害[3]。此外，自由基可對蛋白質進行過氧化反應，形成自由基蛋白質，進一步引起蛋白質分子的聚合及結鍵斷裂，破壞了蛋白質的結構，因而降低了酵素的活性[4]。同時，自由基也會改變鹼基而對核酸造成傷害使核酸…鍵斷裂，甚而造成染色體的突變[5]。正常情況下，細胞內的抗氧化酵素都可消除大部分的自由基，可是，當自由基形成的速率一旦遠超過細胞可以修補的程度，例如：過多輻射線曝曬、營養失調、有毒物質累積及藥物濫用等，造成自由基大量產生，抗氧化酵素卻來不及消除，於是，疾病就會產生。自由基的增加被認為是惡化中風 (stroke) 的危險因子[6]，因此，瞭解自由基的代謝變化將有助於中風疾病的治療及預防。

細胞有數種不同的抗氧化酵素可以抵抗細胞內的氧化壓力。其中，超氧化物分解酵素 (superoxide dismutase; SOD) 及過氧化物分解酵素 (glutathione peroxidase (GPX)) 扮演著重要的角色。1968 年美國學者 J. M. McCord 與 I. Fridovich 首先發現，SOD 可將超氧自由基 ( $O_2^{\cdot -}$ ) 歧化成

雙氧水 ( $H_2O_2$ )，進一步藉由過氧化氫分解酵素 catalase (CAT) 及過氧化物分解酵素 glutathione peroxidase (GPX) 分解成水及氧氣[7]。若雙氧水沒被代謝掉則形成更活躍的氫氧自由基 ( $OH^{\cdot}$ ) 造成更大的傷害[8]。真核細胞的 SOD，至少有兩種以上的亞型存在，其中，Cu,Zn-SOD 位在細胞的細胞質內，在正常的生理狀態持續表現及被製造，而另一種型 Mn-SOD 則主要存在於粒線體[9]，當氧化壓力 (oxidative stress) 增加時，會被誘導而表現及被合成。兩種 SOD 都是催化氧自由基轉化成過氧化氫及氧氣，而過氧化氫可以在小體內被過氧化氫分解酵素，或在細胞質內的 GPX 分解，再轉化成無害的水。氰化氫 (HCN) 在 1 mM 會抑制 Cu,Zn-SOD 的活性，對 Mn SOD 則不會影響，因此，常依此法來鑑別兩種不同 SOD 的活性[10]。

由於百會穴及風府穴在典籍皆記載可以治療中風等痼疾，而且，腦部抗氧化酵素的表現又與自由基的含量或中風的惡化因素息息相關[11]。可是，目前對於刺激百會穴及風府穴引致腦部抗氧化酵素的變化之相關研究甚少。因此，本計畫設計不同的處理，觀察在各種處理中，以電針刺激百會穴 (陽極穴位) 及風府穴 (陰極穴位) 後，其抗氧化酵素基因的表現情形，與電針刺激不屬於經絡部位的肌肉組織 (非穴位) 所得對照者相比，以闡明針灸刺激百會穴對中風的可能影響。同時，本計畫利用北方點墨法 (Northern blot) 來偵測細胞 SOD 及 GPX 的 mRNA 表現，西方點墨法 (Western blot) 來評估 SOD 及 GPX 的蛋白表現，並以酵素活性檢測 (enzymatic activity assay) 來研究 SOD 及 GPX 等酵素的活性。

### 三、實驗步驟與方法

#### (一) 實驗動物來源

購自國立成功大學醫學院動物中心的 Wistar 品系的雄性大白鼠，年齡在 8 週以上，體重 200-250g 之間。飼養於該中心以空調維持室溫在  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  的動物室，光照時間與黑暗時間各為 12 小時，老鼠可自由的進食與飲水。老鼠分為三組，「控制組」僅在百會穴及風府穴（穴位）或不屬於經絡部位的肌肉組織（非穴位）施以電針刺激 30 分鐘，「缺血組」則是將老鼠先以電針刺激正確部位 15 分鐘後，經 Pentobarbital (30 mg/ml/kg) 麻醉的老鼠，將兩側頸動脈以夾血栓繫住，保持無血流通過狀態 15 分鐘，並同時以電針刺激 15 分鐘。然後，犧牲老鼠供使用。「缺血 - 重灌流組」則是將老鼠先以電針刺激正確部位 15 分鐘後，以 Pentobarbital (30 mg/ml/kg) 麻醉的老鼠，將兩側頸動脈以夾血栓繫住，保持無血流通過狀態 15 分鐘，同時亦以電針刺激 15 分鐘。然後，鬆開夾血栓，並縫合傷口，經廿四小時後再犧牲老鼠。

#### (二) 電針刺激穴位及非穴位

本計劃所稱之穴位，指的是刺激百會（陽極）及風府（陰極）兩個穴道，進針的位置及方法如下：百會穴，耳朵前緣基部與中線督脈的交叉點往後進針 0.6 公分，風府穴，頭蓋骨後緣第一頸椎下方進針。至於非穴位，則是指不屬於奇經八脈及正經十二脈等經絡的組織，本計劃所使用的位置在比目魚肌的 (soleus muscle) 內側，第一點位於進膝蓋處，第二點位於第一點下方 1.5 公分處。而且，電針頻率為 15 Hz，10 mA，用來刺激非穴位或穴位處。

#### (三) 北方點墨法

RNA 的萃取使用 BIOETCX 公司所生產的 Ultraspect-II RNA kit，其步驟如下：將培養皿中的培養液吸出，每一盤細胞加入 1 ml 之 Ultraspec<sup>TM</sup> RNA (guanidine salt/urea/phenol 混合物) 來打破細胞，並以細胞刮勺刮下細胞，以微量吸管上下吸放均質之，加入 0.2 ml 之 chloroform，搖動 15 秒混合之，再靜置於 4 下反應 5 分鐘。反應後，萃取液以 12,000g 轉速離心 15 分鐘，並取出上層液的五分之四至新的試管中，加入二分之一體積的 isopropanol 與上層液混合，再加入廿分之一體積的 resin 與之混合，並充分反應 1 分鐘後，以 12,000g 轉速離心 1 分鐘 傾倒出上清液後，以 75% 酒精來回沖洗沈澱物，並以上述轉速離心之，30 秒後取出，重複一次酒精沖洗及離心之步驟，最後將酒精的殘餘取盡，倒立靜置 30 分鐘，待沈澱物將乾未乾之際，加入適量之 DEPC 水溶出沈澱物中的 RNA，保存於  $-70^\circ\text{C}$  的冰箱中。

取 RNA 濃縮液 1  $\mu\text{l}$  溶於 399  $\mu\text{l}$  之 DEPC 水中，混合均勻後測量在 260 nm 及 280 nm UV 光譜下 (Hitachi V-2000) 之吸光值，並計算 260/280 吸光值之比值以鑑別 RNA 之品質，260/280 值介於 1.8-2.0 時，計算 RNA 濃度。

製備 1.2% 之 agarose gel，內含 1.1% 之 formaldehyde，及 1 x MOPS buffer，RNA sample 之製備將 30  $\mu\text{g}$  total RNA 溶於 20.5  $\mu\text{l}$  溶液中，內含 0.48 x MOPS buffer、6.31% formaldehyde、48.3% formamide，於 55 下水浴反應 15 分鐘後，取出靜置於 4

下 5 分鐘，加入 1  $\mu\text{l}$  之 ethidium bromide (EtBr) 染色，再置於 agarose gel 之凹槽內，以 1 x MOPS buffer 為電泳液，100 伏特之電壓進行電泳。電泳分離完之 agarose gel 以 UV 光觀察 28s、18s rRNA 之完整性

。再將 RNA 轉移至 Hybon-N membrane(Amersham) (transfer solution: 20 X SSC solution)。轉移完之 RNA 以 UV 光照射固定之 (Stratagene crosslinker), 以無菌 M.Q.清洗 30 分鐘沖掉多餘的鹽類, 晾乾 membrane 後收於透明塑膠袋中備用。

<sup>32</sup>-P labeled probe 之製備:

SOD 及 GPX cDNA 為 Dr. Y.S. Ho 所提供; 做為 internal standard 之 glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH), cDNA 則由劉校生教授所提供。<sup>32</sup>-P labeled 之 probe 製備採用 Amersham 公司之 megaprime DNA kit, 為 random prime system, cDNA 取量 600 ng 2  $\mu$ l, 加 26  $\mu$ l M.Q.水稀釋, 加入 5  $\mu$ l primer, 於 100  $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘進行 denature 後, 取出靜置回溫至室溫, 加入 reaction buffer 10  $\mu$ l、5  $\mu$ l <sup>32</sup>-P labeled dCTP、及 2  $\mu$ l klenow fragment, 混合均勻後於 37  $^{\circ}$ C 下進行合成反應 15 分鐘, 取出置於 -20  $^{\circ}$ C 冰箱中備用。

cDNA 雜交 (cDNA hybridization) 之方法乃採用 Quik Hyb kit (Amersham)。簡述如下: 將尼龍膜置入 hybridization tube 中, 加入適量之 Quik Hyb 溶液, 使溶液可以浸潤所有尼龍膜。放入 68  $^{\circ}$ C 之恆溫箱中預熱 30 分鐘。取出製備好之 probe 及 salmon sperm DNA (ssDNA) 回溫, 每 10  $\mu$ l probe 與 1 mg ssDNA 混合, 於 100  $^{\circ}$ C 下加熱 5 分鐘, 再取出冰浴 5 分鐘後, 將溶液加入已完成預熱的 hybridization tube 中, 在 68  $^{\circ}$ C 下進行雜交。反應完成後, 依序以 2 x SSC、0.1% SDS 溶液於室溫下漂洗兩次, 再以 0.1 x SSC、0.1% SDS 溶液於 40  $^{\circ}$ C 下漂洗尼龍膜。清洗完之尼龍膜以透明膠袋封好, 置於 x-ray 片夾中, 於暗房

內進行壓片後, 置於 -70  $^{\circ}$ C 冰箱中曝光。數小時至數天後取出沖洗之。

#### (四) 西方點墨分析法

將老鼠大腦皮質以均質機研磨後, 將組織的均質液離心 (4  $^{\circ}$ C, 1,400g, 5 min) 取其上清液, 並把沉澱物再加入適量之 Buffer A (Tris-HCl, 50 mM, EGTA, 2 mM, Dithiothreitol, 2 mM, PMSF, 0.5 mM, Leupeptin, 0.1 mg/ml, pH=8.0) 予以均質化。均質液再離心一次 (4  $^{\circ}$ C, 1,400g, 5 min) 取其兩次的上清液, 高速離心 (4  $^{\circ}$ C, 4,500g, 10 min), 沉澱物即是 Cu,Zn-SOD。並使 Cu,Zn-SOD 溶在適量之 Buffer A。上述之上清液, 超高速離心 (4  $^{\circ}$ C, 11,000g, 60 min), 丟棄上清液, 沉澱物即含粒線體。將沉澱物溶於 Buffer B (2% Triton X-100 in Buffer A) 並利用超音波打破粒線體使 Mn-SOD 釋放出來。離心 (4  $^{\circ}$ C, 1,200 rpm), 並取其上清液, 此即為 Mn-SOD。

依照一般常用的方法, 使用 Protein Assay Kit 分別偵測其蛋白質含量, 方法簡述如下: 取胎牛血清蛋白 (bovine serum albumin) 作標準品, 稀釋成不同濃度, 取 20  $\mu$ l 標準品, 加至 1 ml 之 reagent 中在 595 nm 波長下測吸光度, 得到的回歸曲線方程式, 用以計算樣品中蛋白質的含量。接著, 製備 12% 之下層凝膠, 待下層凝固後再倒入 5% 之上層凝膠。將電泳緩衝液倒入電泳槽內, 再將適量蛋白質注入到每一個 well, 進行蛋白質的分離。之後, 將跑完電泳之凝膠放在已濕潤的濾紙上, 將事先以甲醇浸泡過的 PVDF 轉漬膜放於凝膠上, 再以溼潤的濕潤覆蓋於 PVDF 膜上方, 置於轉漬槽內, 於 4  $^{\circ}$ C 的環境下進行轉漬。待轉漬完成後, 將 PVDF 膜以 PBST buffer 清洗 15 分鐘, 再將 PVDF 浸潤於含 3% BSA 的 PBS (phosphate-buffer saline)

buffer 中，於室溫下將 PVDF 膜上的非特异性結合位 ( nonspecific binding ) 阻斷。接著，將 PVDF 浸潤於含 3%BSA 及適量的 sheep anti-rat SOD、GPX、GAPDH 等 antibody 的 PBS buffer 中，於 4℃ 冷房內緩慢振盪隔夜 之後，以 PBST buffer 洗 PVDF 六次，每次 10 分鐘。再將 PVDF 浸潤於含 3% BSA 及適量的 anti-sheep IgG antibody 的 PBS buffer 中，於室溫下緩慢振盪 2 小時。重覆以 PBST buffer 洗 PVDF 六次，每次 10 分鐘。最後，將 PVDF 膜上水漬滴乾，加入 ECL detection kit，將 PVDF 封存於塑膠袋中，再以 X-光片予以壓片。

#### (五) 超氧化物分解酵素的活性測試

本實驗是依照文獻[12]的 NBT 還原方法，採用和光純藥工業株式會社製造的 SOD activity Assay Kit 來測定 SOD 的活性，方法簡述如下：每 0.1 克細胞加入 1ml 0.32M sucrose solution。利用刮勺刮下細胞，再用 pipette 吸放 10~20 次，使細胞充分打碎而加以作用並予以均質化。超高速離心 ( 4℃, 40,000 rpm, 60 min )。取其上清液，測 cytosolic SOD activity。沉澱物則溶在適量 PBS 供測 particulate SOD activity。同時，取適量沉澱物溶液在 5mM KCN 存在下測定 Mn SOD activity。並分別測量上清液及沉澱物溶液的蛋白質含量，以求出  $SOD\ activity = U/mg\ protein$ 。則  $Cu/Zn\ SOD\ activity = cytosolic\ SOD\ activity + particulate\ SOD\ activity - Mn\ SOD\ activity$ 。另外，GPX 的酵素活性則使用市售的 Assay Kit ( No. 703102, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI48108, USA )，依照 ELISA 的原理來檢測。

#### (六) 定量及統計

SOD、GAPDH mRNA 及蛋白質的定量，乃使用 densitometer 計算 x-ray film 上曝光點強度，即可知 SOD、GAPDH mRNA 及蛋白質的相對產率。不同處理的組別以變異數分析 ( analysis of variance, ANOVA ) 計算其統計上之差異，p 值小於 0.05 時，代表各處理具有組間差異。

## 四、結果

(一) 電針刺激對超氧化物分解酵素 ( superoxide dismutase; SOD ) 基因表現的影響：

### (I) 錳型 SOD ( Mn-SOD )

錳型 SOD ( Mn-SOD ) 的 mRNA 表現在缺血又重灌流組接受電針刺激非穴位的老鼠，較控制組或缺血組的老鼠明顯地減少。可是，缺血又重灌流組的老鼠接受穴位電針刺激後，Mn-SOD 的 mRNA 表現則較同組接受非穴位刺激處理的老鼠增加 ( 圖一及圖二 )

在控制組，電針刺激穴位的老鼠，Mn-SOD 的蛋白量明顯低於非穴位刺激的老鼠 ( 圖三、表一 )。在缺血組，電針非穴位的老鼠，其 Mn-SOD 的蛋白量則明顯的較其他各種處理的老鼠為高。然而，在缺血又重灌流組，電針刺激非穴位的老鼠，其 Mn-SOD 的蛋白量顯著的減少；無論是與控制組電針刺激非穴位組的老鼠相比，或是與同組接受穴位刺激者對照，均呈相同的情形 ( 圖三、表一 )。Mn-SOD 的酵素活性變化與蛋白表現量類似，在缺血又重灌流組，電針非穴位的老鼠之 Mn-SOD 的酵素活性雖然與控制組非穴位電針刺激相比並無異差，但是，相較於同組接受穴位電針刺激的老鼠，其 Mn-SOD 的酵素活性則顯著的增加 ( 圖三、表一 )。

## (II) 銅，鋅型 SOD (Cu,Zn-SOD)

銅，鋅型 SOD (Cu,Zn-SOD) 的 mRNA 表現，在各組間均無顯著異差 (圖一及圖二) 在控制組及缺血組接受穴位電針刺激的老鼠，其 Cu,Zn-SOD 的蛋白量均明顯較相同處理但刺激非穴位者為低 (圖三，表三) 在缺血又重灌流組接受非穴位電針刺激的老鼠，其 Cu,Zn-SOD 蛋白量則較同組接受穴位刺激的老鼠為低。

Cu,Zn-SOD 的酵素活性與蛋白的表現量也有相同的變化。在控制組及缺血組接受穴位電針刺激的老鼠，其 Cu,Zn-SOD 的酵素活性均明顯較相同處理但刺激非穴位者為低。在缺血又重灌流組，電針刺激非穴位的老鼠之 Cu,Zn-SOD 酵素活性則較同組接受穴位刺激的老鼠為低 (圖三、表三)。

### (二) 電針刺激對 glutathione peroxidase (GPX) 基因表現的影響：

北方點墨法的結果得知，GPX 的 mRNA 表現在各處理組間均無顯著差異 (圖一及圖二)。GPX 蛋白量的表現情形則與 Cu,Zn-SOD 類似 (圖三，表三)。然而，缺血又重灌流組接受穴位電針刺激的老鼠，其 GPX 的蛋白量雖然較同組接受非穴位刺激者有顯著的增加，可是，仍較普通 (即控制組接受非穴位電針刺激) 的老鼠更為顯著的減少 (圖三，表三)。GPX 的酵素活性，在控制組及缺血組接受穴位電針刺激的老鼠均顯著的較相同處理但接受非穴位電針刺激組為低。在缺血又重灌流組，接受穴位電針的老鼠，GPX 的酵素活性則較同組接受非穴位電針處理者更高 (圖三，表三)。

## 五、討論

刺激百會穴及風府穴用來治療中風或偏頭痛等疾病，早在古代典籍就已記載[13]。近代的醫學也指出，刺激百會穴可以治療中風、及中風所引起的意識不清或失語的症狀[14]。其中，曾有文獻指出，電針刺激百會穴會提高老鼠腦部的運動神經活性，可能與刺激百會穴所致的療效有關[15]。

由於自由基的增加所引起的細胞病變，可能是導致中風的危險因子，而組織又可藉由不同的抗氧化酵素協力合作，如 superoxide dismutase (SOD) 及 glutathione peroxidase (GPX) 等，來調節自由基的生成[16]。銅鋅型的 SOD 在組織或是細胞中持續不斷的被表現及合成，因此，該酵素也被認為在減少自由基的生成的途徑，扮演著重要的角色；可以保護細胞免於細胞膜或脂質的過氧化[17]。此外，當體內的自由基濃度增加時，可以誘使另一種型式的 SOD 酵素產生，即是錳型的 SOD (Mn-SOD)，特別是當血管短暫缺血後，再重行灌流血液時，會在短時間內產生大量的自由基，可能導致嚴重的細胞病變，甚至中風。此時，Mn-SOD 的表現也會隨之增加，用來加速自由基的清除[18]。GPX 酵素在清除自由基的過程也是重要的一員，負責代謝由 SOD 催化所得的產物，使之變成無害的氧氣[19]。如果其功能低下，可能使形成的雙氧水轉變為更毒的氫氧自由基 ( $\text{OH}^\cdot$ )，造成更大的傷害[20]。因此，組織 GPX 的調控，對於自由基的清除也是相當重要。

本次的結果顯示，無論是控制組，缺血組，或是缺血又重灌流組的老鼠，電針刺激穴位或非穴位對於抗氧化酵素的 mRNA 表現，除了 Mn-SOD 的 mRNA 表現，在缺血又重灌流組較為減少以外，其餘的抗氧化酵素的 mRNA 表現量並無顯

著的異差。Mn-SOD 的 mRNA 表現量減少，與其 mRNA 的半衰期較短有關[21]。因此，缺血又重灌流組的腦內 Mn-SOD 的 mRNA 表現量減少可能與其耗量的增加有關。

Mn-SOD 的蛋白量及酵素活性，在缺血又重灌流組接受非穴位刺激的老鼠大腦皮質，有明顯的低下現象；顯示經缺血又重灌流處理後廿四小時，老鼠的 Mn-SOD 的功能已經減弱。然而，相同處理之下，接受穴位電針刺激的老鼠，其 Mn-SOD 的蛋白量及酵素活性則較非穴位刺激組為高。由此可知，電針刺激穴位可以恢復 Mn-SOD 的功能；對降低自由基的生成應有正面的助益。這項結果支持了刺激百會穴可以改善中風治療的報告[14]。而且，這項作用在控制組及缺血組並沒有出現，顯示電針刺激穴位對清除自由基的助益，較容易出現在已有腦部傷害的老鼠。

同樣的，儘管 Cu,Zn-SOD 的 mRNA 在各組的老鼠或電針穴位與否之間並無明顯的變化，然而，在蛋白表現量及酵素活性的變化，則與 Mn-SOD 有相同之處。在缺血又重灌流組接受非穴位電針刺激的老鼠，其 Cu,Zn-SOD 的蛋白量及酵素活性皆顯著的減少，可是，在同組接受穴位電針刺激的老鼠，這種情形卻不復存在。GPX 的蛋白表現量及酵素活性也有類似的結果。

因此，當老鼠接受缺血又重灌流處理後的 24 小時，可以明顯的呈現三種抗氧化酵素的功能低下。然而，經過電針刺激穴位(百會穴及風府穴)，這項低下的現象就會因而消失；顯示穴位的電針刺激可恢復抗氧化酵素的功能。這項效果可助益於清除腦部增加的自由基，減輕腦部傷害的繼續惡化[22]。

雖然，在控制組及缺血組的老鼠，穴

位電針刺激對這些抗氧化酵素的功能似乎較非穴位刺激者為差；這可能是在腦部未受到嚴重傷害的狀況之下，穴位電針刺激會促使老鼠體內釋放某種物質，它會降低抗氧化酵素的功能。只是，這項物質仍有待解明。然而，由於缺血又重灌流組的老鼠比較符合中風患者的變化現象，因此，電針穴位可恢復抗氧化酵素的功能是不容置疑的。

## 六、結論

本計劃探討電針刺激百會穴(陽極穴位)及風府穴(陰極穴位)兩處對於抗氧化酵素基因表現的影響，結果顯示，電針刺激穴位，可使因缺血又重灌流所導致腦部傷害的老鼠，其大腦皮質的抗氧化酵素恢復較佳的功能。

## 七、參考文獻

1. Wang DS. (1991) Origin of zhenjiu and early literatures. In DS. Wang (Ed.), China Zhenjiuology Tianjin Sci Tech Translat & Pub Co, Tianjin City, China, 161-197.
2. 魯桂珍, 李約瑟, 周輝政, 洪榮貴。針灸：歷史與理論。聯經出版社，民國 84 年，52-55 頁。
3. Mano T, Sinohara R, Sawai Y, Oda N, Nishida Y, Mokumo T, Asano K, Ito Y, Kotake M, Hamada M. (1995) Changes in lipid peroxidation and free radical scavengers in the brain of hyper- and hypothyroid aged rats. J Endocrinol 147:361-365.
4. McCord JM, Fridovich I. (1978) The

- biology and pathology of oxygen radicals. *Ann Intern Med* 89:122-127.
5. Henle ES, Linn S. (1997) Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/ hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 272:19095-19098.
  6. El Kossi MM, Zakhary MM. (2000) Oxidative stress in the cortex of acute cerebrovascular stroke. *Stroke* 31:1889-1892.
  7. McCord JM, Fridovich I. (1968) The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 243:5753-5760.
  8. Frank L, Massaro D. (1980) Oxygen toxicity. *Am J Med* 69:117-126.
  9. Ho YS, Dey MS, Crapo JD. (1996) Antioxidant enzyme expression in rat lungs during hyperoxia. *Am J Physiol* 270: L810-L818.
  10. Ravindranath SD, Fridovich I. (1975) Isolation and characterization of a manganese-containing superoxide dismutase from yeast. *J Biol Chem* 250:6107-6112.
  11. Kimoto S, Nishida S, Funasaka K, Nakano T, Teramoto K, Tomura TT. (1995) Regional distribution of superoxide dismutase in the brain and myocardium of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Clin Exper Pharmacol Physiol* 22 :S160-S161.
  12. Ogawa K, Kanematsu S, Asada K. (1997) Generation of superoxide anion and localization of CuZn-superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls: their association with lignification. *Plant Cell Physiol* 38:1118-1126.
  13. 吳謙, 外科, 卷上, 編輯外科心法要訣。醫宗金鑑, 西元 1742 年。
  14. . Wong AM, Su TY, Tang FT, Cheng PT, Liaw MY. (1999) Clinical trial of electrical acupuncture on hemiplegic stroke patients. *Am J Physic Med Rehabil* 78:117-122.
  15. Chang YH, Hsieh MT, Cheng JT. (1996) Increase of locomotor activity by acupuncture on Bai-Hui point in rats. *Neurosci Lett* 211:121-124.
  16. Franco AA, Odom RS, Rando TA. (1999) Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. *Free Radical Biol Med* 27:1122-1132.
  17. van Gorp RM, Hornstra G, van Dam-Mieras MC, Heemskerk JW. (2000) Function of glutathione peroxidase in endothelial cell vitality. *Arch Biochem Biophys* 382:63-71.
  18. Mattson MP. (1997) Neuroprotective signal transduction: relevance to stroke. *Neurosci Biobehavior Rev* 21:193-206.
  19. Cadenas E, Sies H. Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity. *Advan Enzyme Regul* 23:217-237.
  20. Mashima R, Yamamoto Y, Yoshimura S. (1998) Reduction of phosphatidylcholine hydroperoxide by apolipoprotein A-I: purification of the hydroperoxide-reducing proteins from human blood plasma. *J Lipid Res* 39:1133-1140.

21. Berkovich A, Massaro D, Clerch LB. (1996) Pertussis toxin alters the concentration and turnover of manganese superoxide dismutase in rat lung. *Am J Physiol* 271:L875-L879.
22. Levasseur JE. Patterson JL Jr. Ghatak NR. Kontos HA. Choi SC. Combined effect of respirator-induced ventilation and superoxide dismutase in experimental brain injury. *Journal of Neurosurgery*. 71(4):573-7, 1989

表一、不同處理的大白鼠，經電針刺激非穴位或穴位後，大腦皮質 Mn-superoxide dismutase ( Mn-SOD ) 蛋白量及酵素活性的變化。

Treatments		Mn-SOD/actin (Relative amount)	Activity (pmol/min/mg protein)
控制組	( 非穴位 )	1.00 ± 0.02	23.22 ± 1.32
	( 穴位 )	0.62 ± 0.07*	16.31 ± 1.40**
缺血組	( 非穴位 )	1.39 ± 0.05	29.27 ± 2.60
	( 穴位 )	1.07 ± 0.05*	20.04 ± 2.10*
缺血又重灌流	( 非穴位 )	0.56 ± 0.04	23.46 ± 2.13
	( 穴位 )	1.03 ± 0.05**	27.12 ± 3.87*

數據以平均值 ± 標準差表示，N=6。\*p<0.05, \*\*p<0.01 vs 各項處理同組之非穴位的數值。

表二、不同處理的大白鼠，經電針刺激非穴位及穴位後，老鼠大腦皮質 Cu,Zn-superoxide dismutase ( Cu,Zn-SOD ) 蛋白量及酵素活性的變化。

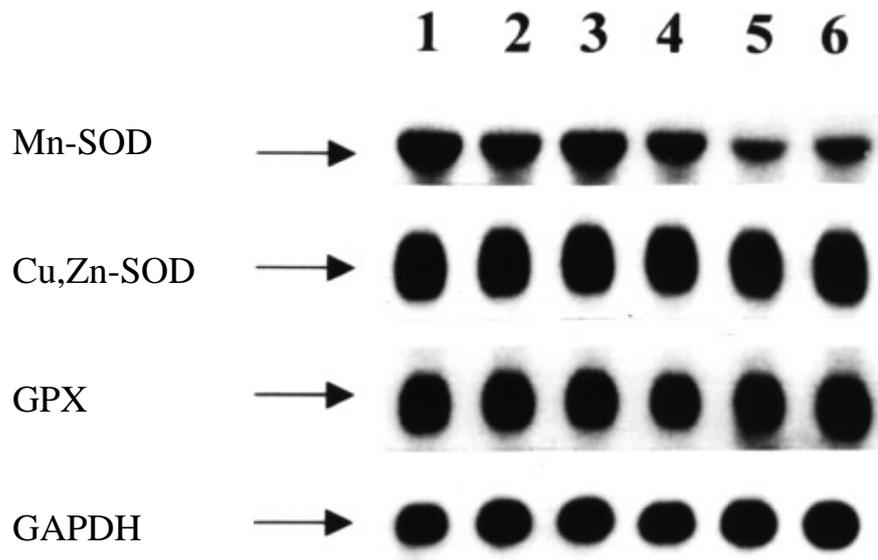
Treatments		Cu,Zn-SOD/actin (Relative amount)	Activity (nmol/mg protein)
控制組	( 非穴位 )	1.00 ± 0.03	4.14 ± 0.42
	( 穴位 )	0.33 ± 0.06**	3.48 ± 0.38*
缺血組	( 非穴位 )	1.00 ± 0.06	5.97 ± 0.91
	( 穴位 )	0.31 ± 0.05**	4.32 ± 0.40*
缺血又重灌流	( 非穴位 )	0.27 ± 0.02	2.18 ± 0.24
	( 穴位 )	1.10 ± 0.04**	5.61 ± 0.57**

數據以平均值 ± 標準差表示，N=6。\*p<0.05, \*\*p<0.01 vs 各項處理同組之非穴位的數值。

表三、不同處理的大白鼠，經電針刺激非穴位及穴位後，老鼠大腦皮質 glutathione peroxidase (GPX) 蛋白量及酵素活性的變化。

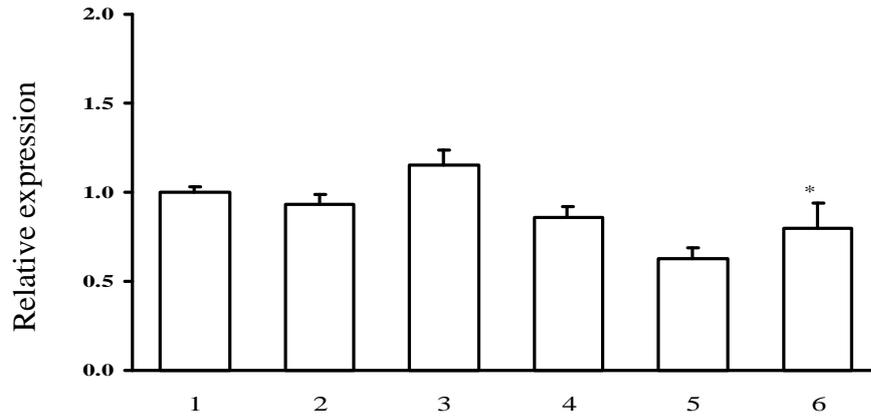
Treatments		GPX/actin (Relative amount)	Activity (pmol/min/mg protein)
控制組	(非穴位)	1.00 ± 0.06	137.37 ± 10.33
	(穴位)	0.42 ± 0.05**	79.66 ± 9.40**
缺血組	(非穴位)	1.01 ± 0.06	101.56 ± 13.50
	(穴位)	0.52 ± 0.02**	81.93 ± 10.94
缺血又重灌流	(非穴位)	0.24 ± 0.02	84.79 ± 5.93
	(穴位)	0.38 ± 0.04*	95.40 ± 3.48*

數據以平均值 ± 標準差表示，N=6。\*p<0.05, \*\*p<0.01 vs 各項處理同組之非穴位的數值。

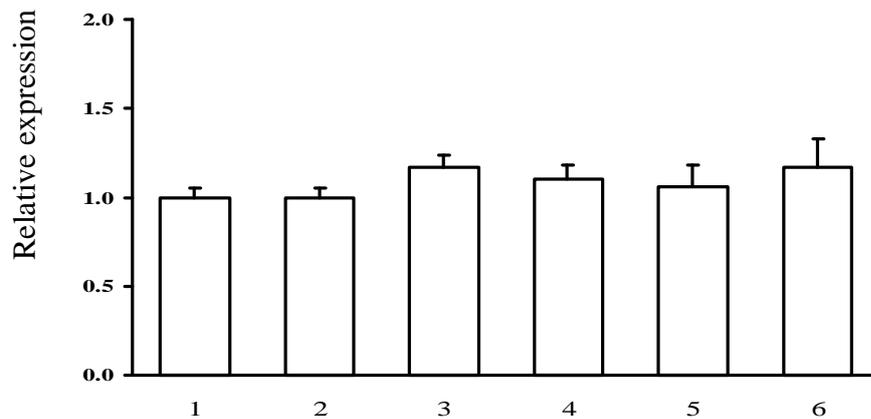


圖一、不同處理的大白鼠，經電針刺激非穴位及穴位後，大白鼠大腦皮質部位之 Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD)、Cu,Zn-superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD)及 glutathione peroxidase (GPX) mRNA 變化的代表圖。動物分為三組：正常組接受電針刺激非穴位(1)及穴位(2)，缺血組接受電針刺激非穴位(3)及穴位(4)，缺血又重灌流組接受電針刺激非穴位(5)及穴位(6)。

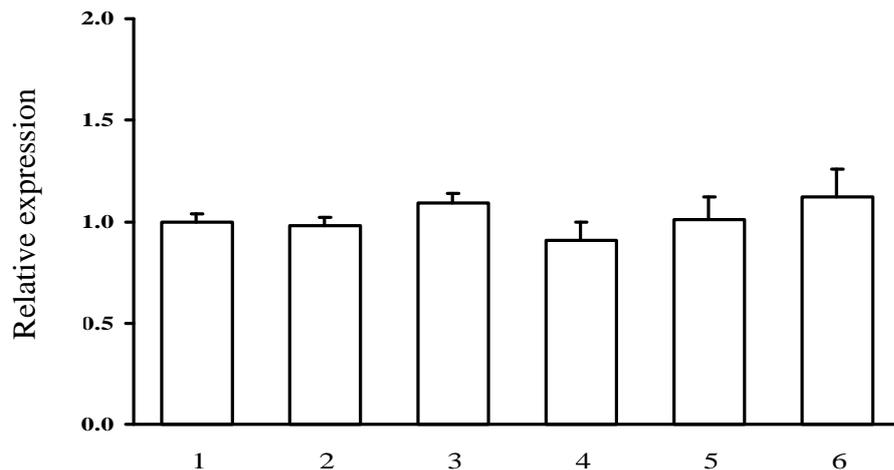
### Mn-SOD



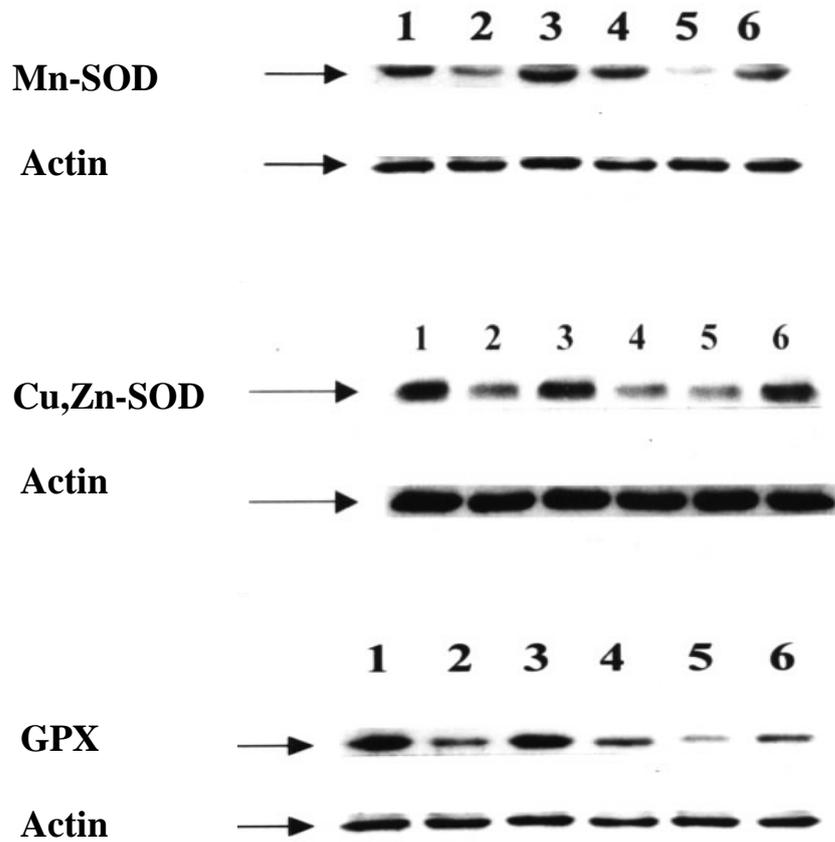
### Cu,Zn-SOD



### GPX



圖二、不同處理的大白鼠，經電針刺激非穴位及穴位後，大白鼠大腦皮質部位之 Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD)、Cu,Zn-superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD)及 glutathione peroxidase (GPX) mRNA 變化的統計圖表。動物分為三組：正常組接受電針刺激非穴位(1)及穴位(2)，缺血組接受電針刺激非穴位(3)及穴位(4)，缺血又重灌流組接受電針刺激非穴位(5)及穴位(6)。\* $p < 0.05$  vs 各項同組接受非穴位刺激的數值， $N=6$ 。



圖三、不同處理的大白鼠，經電針刺激非穴位及穴位後，大白鼠大腦皮質部位之 Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD)、Cu,Zn-superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD)及 glutathione peroxidase (GPX) 蛋白量變化的西方點墨照片。動物分為三組：正常組接受電針刺激非穴位(1)及穴位(2)，缺血組接受電針刺激非穴位(3)及穴位(4)，缺血又重灌流組接受電針刺激非穴位(5)及穴位(6)。