編號：CCMP 95-RD-012

PG9502-0107 (26頁)

行政院衛生署中醫藥委員會九十五年度

研究計畫成果報告

葛根之活性成分 Puerarin 併用 Clopidogrel 對預防缺血性腦梗塞之研究

Study the effect of puerarin combined with clopidogrel on ischemic cerebral infarction

執　行　機　構：臺北醫學大學

計 畫 主 持 人：許準榕 教授

研　究　人　員：謝政穎

執　行　期　限：95 年 1 月 1 日至 95 年 12 月 31 日

＊＊ 本研究報告僅供參考，不代表本會意見

編號：CCMP 95-RD-012

葛根之活性成分 Puerarin 併用 Clopidogrel 對預防缺血性腦梗塞之研究

許準榕
臺北醫學大學

摘要

抗血小板藥物已被建議使用在預防各類血管的病變，例如心肌梗塞、中風和心血管疾病。臨床上已有數類抗血小板藥物應用在預防繼發性缺血性中風的產生，包含了 aspirin、ticlopidine 和 clopidogrel 這兩個 ADP antagonist 以及 glycoprotein IIb/IIIa antagonist。在這幾類藥物中，clopidogrel 會經由抑制血小板上 ADP 受體的結合來抑制血小板凝集進而預防血管病變，由於血小板除了會經由 ADP 受體的活化而凝集外，其他刺激劑所造成的血小板凝集反應亦會經由釋出 ADP，來放大血小板凝集反應，造成血栓的形成，故在臨床應用上，clopidogrel 與常用的抗血栓藥物 asipirin 相較，更能有效的降低一些心血管疾病如心肌梗塞、缺血性中風發生的機率。

近來的研究指出葛根的活性成分 puerarin (100 mg/kg)在大鼠的缺血性中風動物模式中，能有效的減少缺血性中風所產生的腦損傷區域，並有保護腦細胞的功能，而其藥理機轉可能是經由抑制腦細胞的細胞凋亡來保護腦細胞進而改善缺血性腦梗塞所造成的傷害。

本計畫的目的主要是併用 puerarin 和 clopidogrel 來探討此兩種不同作用機轉的藥物是否能更有效預防中風的形成，抗血小板藥物在預防中風的臨床應用上，能否經由併用中藥而更增加其效果，並深入的探討其可能的分子機轉，其研究方法為利用大腦中動脈血管阻塞/再灌流模式動物實驗模式來造成缺血性腦中風，進而再評估此兩種藥物併用後之作用效果，其評估方法包括：腦梗塞區域之測定、行為測試、脂質過氧化的測量、神經缺陷分級和抓力測試、及利用西方墨點法及聚合酶連鎖反應實驗來探討其可能的分子機轉。

在進行實驗後，我們發現大腦中動脈血管阻塞/再灌流模式動物實驗模式所造成之缺血性腦中風，會導致數個與發炎及細胞凋亡相關的因子表現，如：iNOS、HIF-1α、TNF-α、caspase-3，並可能經由這些因子的表現而造成腦部傷害的形成及擴大，而單獨給予葛根素(50 mg/kg)，可有效的減少因為大腦中動脈血管阻塞/再灌流引發缺血性腦中風所造成的腦部傷害，而給予葛根素外同時給予 clopidogrel (20 mg/kg)，對腦部傷害的改善情形，並無明顯的增益效果。

關鍵詞：抗血小板藥物、缺血性中風、Puerarin、Clopidogrel

CCMP 95-RD-012

Study the effect of puerarin combined with clopidogrel on ischemic cerebral infarction

Joen-Rong Sheu
Taipei Medical University

ABSTRACT

Antiplatelet drugs were utilized on preventing vascular diseases include myocardial infection (MI), stroke and cardiovascular diseases. Several antiplatelet agents with different mechanisms of action are currently available for secondary prevention of ischemic stroke. They include aspirin, ADP receptor antagonist (ticlopidine and clopidogrel) and glycoprotein IIb/IIIa antagonist. Clopidogrel was a highly potent inhibitor of ADP-induced platelet aggregation. Furthermore, it inhibited collagen or thrombin induced platelet aggregation, because of the involvement of released ADP as an amplifier of the aggregation induced by other agonists. Clopidogrel proved more effective than asipirin in reducing subsequent ischaemic strokes and other vascular events in a large clinical trail with recent ischaemic strokes or other atherosclerosis diseases.

A primary component of most functional extracts of *Pueraria lobata* is puerarin. It was reported that puerarin (100 mg/kg) could reduced infracted site after ischemia reperfusion in rats. The inhibitory mechanism of puerarin may through apoptosis inhibition to protect neuron cells. Puerarin could prevent ischaemic strokes through neuron protection.

Therefore, we want to investigate whether puerarin combined with clopidogrel provide substantial increase in efficacy on cerebral ischemic infarction. We will use the model of middle cerebral artery (MCA) occlusion/reperfusion to study the effect of two drugs on infarct size, behavioral test, lipid peroxidation, neurological deficit, grip test, and investigation of molecular mechanisms through western bloting and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) after transient MCAO in rats.

We found ischemia reperfusion injury that caused brain injury may through several inflammation and apoptosis related factor such as iNOs, HIF-1α, TNF-α, and caspase-3 expression. Pretreatment of puerarin (50 mg/kg) could reduced ischemia reperfusion induced brain injury, and combined therapy of puerarin (50 mg/kg) and clopidogrel (20 mg/kg) did not show obvious benefit as compared to treatment of puerarin (50 mg/kg) alone.

Keywords : antiplatelet drugs, ischaemic stroke, puerarin, clopidogrel

壹、前言

血管內血栓 (intravascular thrombosis) 是引起許多心血管疾病的起始者之一，在動脈性血栓 (arterial thrombosis) 的斑塊剝落 (plaque disruption) 會導致急性血管徵候群 (acute vascular syndromes)，包括心肌梗塞 (myocardial infarction)、不穩定性心絞痛 (unstable angina pectoris) 以及中風 (stroke) (Fuster & Lewis, 1994)。急性缺血性腦中風 (acute ischemic stroke) 通常是由於 cardio- or athero-embolic 的形成，導致腦部的血管阻塞 (Albers et al., 2001)。近年來利用鼠科動物模式造成缺血性中風的研究中發現，在原本被阻塞的重要腦血管之末梢微小血管處，血小板在進行性微小血管產生血栓 (progressive microvascular thrombosis) 的現象中扮演重要角色 (Choudhri et al., 1998)，因為在原先被阻塞之大血管的血栓塊，這些富含 lipid、platelets 和 fibrin (纖維蛋白) 的血栓碎片，也會被遷移至下游末端的小血管 (Okada et al., 1994)，造成缺血後之低灌流效應 (亦即 no-reflow 現象)，即使 reperfusion 能再發生，許多微小血管還是無法受到血液的供應，且更會帶來血小板的進一步凝集反應 (Pinsky et al., 1994)，使腦神經細胞受損；另一項支持 postischemic hypoperfusion 的證據顯示，在使用 intraluminal MCAO (middle cerebral artery occlusion) 產生短暫性缺血性中風時，reperfusion 並不會使 CBF (cerebral blood flow) 恢復至缺血前的標準 (Connolly et al., 1996)；在電子顯微鏡下的觀察，也確認在缺血區遠端的微小血管處呈現 degranulated platelets 以及 fibrin 的累積 (del Zoppo et al., 1991)。然而，對於局部腦缺血造成在腦部微小血管床的 platelets 累積，導致 microvascular no-reflow 以及進一步腦細胞受損的現象，只有引起少部分研究者的注意 (Abumiya et al., 2000)。

造成缺血後之低灌流效應的因子，除了上述提及的血小板外，leukocytes 也參與其過程，在組織缺血後所誘導的初期發炎反應扮演重要角色(Connolly et al., 1996)。由於 leukocytes 是體型大且較僵硬的一種細胞 (stiff cells)，大量的證據顯示，PMN 的吸附分子：P-selectin 和 ICAM-1，分別在腦缺血以及 reperfusion 的前期，會大量的在 lenticulostriate 動脈後的微血管表現，使 leukocytes 緊緊地吸附至內皮細胞並且持續性地活化，導致在局部腦缺血和 reperfusion 的 no-reflow 現象 (Okada & Copeland et al., 1994)；雖然，研究指出在手術前將 neutrophil depletion (Connolly et al., 1996)，或是阻斷 P-selectin (Connolly et al., 1997)，能減少腦梗塞體積和改善同側腦皮質血流，但卻無法完全恢復血流。總而言之，fibrinogen、polymorphonuclear leukocytes 加上活化的 platelets 沈積在腦部 microvessels，是導致

microvascular 阻塞的三要素 (del Zoppo et al., 2000)，使得微小血管的暢通性 (microvascular patency) 喪失。

目前，抗血小板藥物已被建議使用在預防臨床上各類血管的病變，例如心肌梗塞、中風和心血管疾病。

在臨床上，目前已有數類抗血小板藥物應用在預防繼發性缺血性中風的產生，包含了 aspirin、ADP receptor anagonist (ticlopidine 和 clopidogrel)以及 glycoprotein IIb/IIIa antagonist，aspirin 的作用機轉為不可逆的抑制 cyclooxygenase 而減少了 thromboxane A_2 的生合成及抑制血小板的凝集，在這幾類藥物中，由於 aspirin 在預防繼發性缺血性中風的臨床試驗多、證據多、經濟效應好且具有不錯的療效，有23%減少中風發生的危險率及 18%減少中風、心肌梗塞及血管死亡發生的危險率(Antiplatelet Trialists Collaboration, 1994)，所以 aspirin 亦是目前用來預防繼發性缺血性中風的首選藥物，同時為了要提高預防繼發性缺血性中風的效果，已有臨床試驗(ESPS II study)併用兩種不同作用機轉的抗血小板藥物長效型的 dipyridamole 及 aspirin 來做測試，發現的確能提高至 37%減少中風發生的危險率，且在副作用的產生與單獨使用 aspirin 並無意義增加(Diener et al.,1996)，同時亦有另一組臨床試驗(MATCH study)正在評估 clopidogrel 併用 aspirin 來預防中風的效果(Diener et al., 2004)。

近來的研究指出葛根的活性成分 puerarin (100 mg/kg)在大鼠的缺血性中風動物模式中，能有效的減少缺血性中風所產生的腦損傷區域，並有保護腦細胞的功能，而其藥理機轉可能是經由抑制腦細胞的細胞凋亡來保護腦細胞進而改善缺血性腦梗塞所造成的傷害。(Xiaohong Xu et al., 2005)

本計畫的目的主要是併用 puerarin 和 clopidogrel 來探討此兩種不同作用機轉的藥物是否能更有效預防中風的形成，抗血小板藥物在預防中風的臨床應用上，能否經由併用中藥而更增加其效果，其研究方法為利用大腦中動脈血管阻塞/再灌流模式動物實驗模式(許準榕, 民九十四)來造成缺血性腦中風，進而再評估此兩種藥物併用後之作用效果，其評估方法包括：腦梗塞區域之測定、行為測試、脂質過氧化的測量、神經缺陷分級和抓力測試。

下列是有關於本計畫要併用的兩個藥物 puerarin 和 clopidogrel 的背景資料：

葛根學名為 Pueraria lobata (Willd.)，其天然萃取物已被證實在心臟及血管受到缺血性傷害時有保護的效果(Fan LL et al.,1992, Xuan B et al., 1999)。葛根的主要有效成分，屬於異黃酮類的 puerarin，被發現可增加腦部血流量(Chen L et al., 1995)，且可保護缺血性梗塞所造

成的大腦及腦幹的傷害(Wang L et al., 1997)，近來在體外試驗中更發現，puerarin 能有效的保護腦細胞使其不受一些神經興奮物質的傷害(Dong LP et al., 1998)，而在最近的研究更發現了，給予大鼠 puerarin (100 mg/kg)可有效的減少缺血性梗塞所造成的腦部缺損及腦細胞死亡，且深入研究發現 purerin 可能是經由表現細胞凋亡抑制蛋白(XIAP)，進而抑制了細胞凋亡的產生，而保護了腦細胞，進而減少了缺血性梗塞所造成的腦部傷害(Xiaohong Xu et al., 2005)。

抗血栓藥物 Clopidogrel 在 1987 年問世，在 1997 年於西方國家被使用在動脈硬化病人，用來預防缺血性中風、心肌梗塞及血管病變的產生(CAPRIE Steering Committee. 1996)，且在 2002 年經過了一連串的臨床試驗，被認定為是除了 asipirin 外，可使用於急性冠心病的標準抗血栓藥物(Yusuf S et al., 2001)。

Clopidogrel 會經由抑制血小板上 ADP 受體的結合來抑制血小板凝及進而預防血管病變，由於血小板除了會經由 ADP 受體的活化而凝集外，其他刺激劑所造成的血小板凝集反應亦會經由釋出 ADP，來放大血小板凝集反應，造成血栓的形成(Wagner WR et al., 1992)，在血栓的形成中 ADP 所刺激的血小板凝集反應扮演了一個主要的角色(Herbert JM et al., 1992)，是故在許多的動脈血栓實驗模式中，clopidogrel 的抗血栓能力與 asipirin 相較大約強了一百倍，與另一 ADP 受體的拮抗劑 ticlopidine 相較亦強了五十倍左右(Herbert JM et al., 1993)。

臨床上的研究發現，在 19185 個有缺血性中風或是動脈硬化病史的病人，每天給予 75 毫克 clopidogrel 的病人與每天給予 325 毫克 asipirin 的病人相較，給予 clopidogrel 的病人其發生續發性中風及其他血管病變的機率，明顯的較給予 asipirin 的病人較小，對病人來說有較強的保護作用(CAPRIE Steering Committee. 1996)，由目前對 clopidogrel 的研究可知，clopidogrel 在預防血栓形成有極好的效果(Savi P et al., 2005)，且在目前預防續發性中風為第一線用藥(Weinberger J 2005)。

貳、材料與方法

1. 大腦中動脈血管阻塞/再灌流模式

本實驗使用的活體動物為大鼠 250-350 g (品系 Wistar)，參考 Longa 等人 (1989) 以及 Hwang 等人 (2002) 之方法加以修飾。老鼠以 3 % isoflurane (溶於 95 % O_2 和 5 % CO_2) 氣體混和器麻醉並以 2 % isoflurane 維持麻醉。頸部皮膚由中線切開，找出右側總頸動脈 (right common carotid artery)、外頸動脈 (external carotid artery)、與內頸動脈 (internal carotid artery)，將 14-17 mm 長度的 4-0 尼龍線 (nylon thread，前端覆蓋一層矽膠)，經由外頸動脈插入至內頸動脈，當感覺阻力時即造成右側大腦中動脈 (right middle cerebral artery) 之阻塞 (ischemia)，然後縫合傷口，使老鼠自然甦醒。我們將利用行為測試 (behavioral test，詳述如下) 確認大鼠處於成功的單一側的腦部缺血。待一小時後，再麻醉老鼠，移除 4-0 尼龍線以促使血液再灌流 (reperfusion) 至缺血腦區域。二十四小時後，將腦組織取下做進一步的分析。手術過程中老鼠體溫均維持在溫度 37℃。

2. 行為測試 (behavioral test)

參考 Borlongan 等人 (2000)，在缺血一小時的時間內以及二十四小時的血液再灌流後 (犧牲大鼠前)，我們將觀察大鼠的前肢運動是否協調 (稱做 forelimb akinesia，又稱 postural tail-hang test)，以確認大鼠處於成功的單一側的腦部缺血。由於本論文使用之中風模式為阻塞"右"側大腦中動脈，會造成大鼠"左"側肢體運動不協調 (左側偏癱)，因此方法如下 (DeVries et al., 2001)：抓住大鼠尾巴使其懸掛空中，觀察大鼠前肢的姿勢，若前肢向對側未梗塞的腦半球彎曲 (身體呈現左側彎曲現象，c-shape bending)，即為成功的右側大腦中動脈血管阻塞，若無此現象，反之，大鼠的兩前肢能均衡延展向地面，則大鼠未中風，排除於實驗外。

3. 腦梗塞區域 (infarct size) 之測定

參照Bederson & Pitts等人 (1986) 的方法及原理，待二十四小時的血液再灌流後，使用chloral hydrate 200 mg/kg麻醉老鼠，於低溫及含氧下將大腦組織取出，將之冠狀切片成2 mm厚度。以2 % TTC (2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride) 在溫度37℃下染色30分鐘後，隨即放入10 % formaldehyde solution固定。隔天，腦切片用數位相機照相 (Nikon Coolpix 5000)，最後以影像分析軟體 (Image-Pro Plus) 計算腦梗塞體積之百分比 (% infarction volume)，參考Lee等人 (2002) 和 Swanson等人 (1990) 之公式，以排除腦水腫之干擾：

A：同側腦半球 (右腦) 未受損面積

B：對側腦半球 (左腦) 面積
校準後的腦受損率：(B－A)/B ×100 %

4. 脂質過氧化 (lipid peroxidation) 的測量

依照 Okhawa 等人 (1979) 的方法並加以修飾，進行丙二酸醛 (malondialdehyde，作為脂質過氧化的指標) 的測量。將 Wistar 品系大鼠的大腦組織挑除腦膜、結締組織和血管並清洗後，用 Dounce 研磨器配以體積十倍量的冰冷 Krebs buffer [10 mM Glucose、10 mM Hepes、140 mM NaCl 、3.6 mM KCl
、1.5 mM $CaCl_2$、1.4 mM KH_2PO_4、0.7 mM $MgSO_4$，pH 7.4] 加以研磨均質化成腦研磨液。以轉速 3000 rpm 離心十分鐘後，取上清液以進行脂質過氧化實驗。將 lycopene 加入混合溶液在溫度 37℃下反應十分鐘，隨即以亞鐵溶液 (200 μM)
刺激進行反應三十分鐘。加入 10 μl 冰冷 trichloroacetic acid solution [4 % (w/v) in 0.3 N HCl] 終止其反應後，再加入硫化巴比妥酸 (thiobarbituric acid, TBA) 反應試劑 [0.5 % (w/v) thiobarbituric acid in 50 % (v/v) acetic acid]。待十五分鐘加熱呈色後，加入 1 ml 正丁醇 (n-1-butanol) 並劇烈震盪混合均勻，以萃取冷卻三十分鐘後的反應溶液。最後將有機層吸出，並利用分光光譜儀 (Hitachi, Model U3200) 波長 532 nm 測量呈色 n-1-butanol 之吸光值。脂質過氧化程度以 thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) 之產量予以評估。

5. 神經缺陷分級 (neurological deficits)

根據Bederson等人 (1986b) 以及Lee等人 (2002) 所作之分級制度，評估大鼠中風後運動神經受損的程度。分別在第一小時與第二十四小時的血液再灌流時，請旁觀者先判定大鼠的行為模式，再將大鼠處以其他的實驗。此分級制度詳述如下，若大鼠呈現較嚴重的等級，以較嚴重的等級分類。神經學檢查過程歷時 3~5 分鐘。
首先溫和地握住大鼠尾巴使其懸掛距離地面一公尺，觀察前掌彎曲的現象。若大鼠的兩前掌能均衡延展向地面，並且沒有觀察到其他的神經缺損現象，為正常的老鼠，表示 0 級。有腦梗塞的大鼠會將前肢一致性地往腦損傷半球的對側(contralateral) 收縮；而前肢收縮隨著損傷的程度不同而改變，輕度的收縮如腕彎曲、肩內收和肘僵直。較嚴重收縮則造成腕、肘完全彎曲與肩的內收和向內旋轉。大鼠有上述程度的前肢收縮且沒有其他異常時，歸類為第 1 級。大鼠被放置於軟質塑膠塗覆的大紙 (counter protection paper, Kimberly Clarke) 上時，會以爪子緊緊抓住紙張。以手抓住老鼠的尾巴，從肩後施以力量直到大鼠的前肢滑動數英吋。依此步驟從不同的方向操作數次，正常或輕微中風的大鼠對於不同方向的拉力有相同的抵抗力，嚴重中風的大鼠對朝

麻痺體側的橫向施力會減低抵抗力，歸類為第 2 級。接著讓大鼠自由活動，觀察其繞圈的行為，若老鼠往麻痺的體側移動，歸類為第 3 級。若大鼠喪失走路或困難於行走，歸類為第 4 級。

觀察過程假使大鼠呈現間歇性抽搐 (convulsions) 或是持續性意識混亂 (sustained disturbances of consciousness)，將排除於實驗外。原因可能是在手術的過程中，由於細線的插入，產生機械性傷害使腦動脈破裂，導致蜘蛛網膜下腔出血 (Belayev et al., 2003)。

6. 抓力測試 (grip test)

參照 Moran 等人 (1995) 記載的方法進行。所使用的儀器為：豎立兩距離 50 公分支架，支架間以細繩相連接，細繩距離平坦的平面 40 公分。分別在第一小時與第二十四小時的血液再灌流時，將大鼠置於支架與細繩中點，評估老鼠四肢的抓力：

0 級--大鼠掉落。
1 級--大鼠以兩前掌抓於細繩上。
2 級--大鼠以兩前掌抓於細繩上，加上大鼠嘗試爬到細繩上。
3 級--大鼠以兩前掌加上一後掌或兩後掌同時抓於細繩上。
4 級--大鼠除了用所有的腳掌抓於細繩上，還加上尾巴纏繞於細繩。
5 級--大鼠可以從細繩中點爬到兩支柱上而逃跑。

7. 西方墨點法

將實驗處理後取得之以定量之細胞內蛋白質成分以5: 1的體積比例加入6x sample loading dye (350 mM Tris-base, 30 % Glycerol, 350 mM SDS, 175 micromolar Bromophenol blue, 600 mM DTT, pH 6.8)充分混勻，並在100 °C加熱約5分鐘，使蛋白質denature後，快速置於冰上至少5分鐘，以避免回溫過程中酵素影響蛋白質表現，最後在4 °C下以轉速5000 rpm離心5分鐘後備用。再以10 % SDS gel 於running buffer (25 mM Tris-base, 192 mM Glycerol, 0.1 % SDS, pH 8.3)下，以200 V/80 mA進行電泳分離。隨後將膠片置於transfer buffer (1 M Tris-base, 20 % methanol, 150 mM glycine, pH 8.3)下，以70 V/300 mA進行電泳轉漬3小時，使膠片上之蛋白質轉移至nitrocellulose membrane (NC; Hybond-C) 或 Polyvinylidene fluoride microporous membrane (PVDF; Hybond-P)表面，隨後將轉漬膜浸潤在4 °C的blocking buffer (5 % non-fat milk, 10 mM Tris-base, 100 mM NaCl, 0.1 % Tween 20, pH 7.5)中，搖晃40分鐘後，以TBST (10 mM Tris-base, 100 mM NaCl, 0.1 % Tween 20, pH 7.5) 清洗轉漬膜3次，每次10分鐘，之後加入一級抗體(primary antibody)，於室溫下搖晃作用2小時。在用TBST清洗轉漬膜四次，每次7分鐘，之後再加入標記有horseradish

peroxidase (HRP)的二級抗體(secondary antibody)，於室溫下反應1小時，再以TBST清洗轉漬膜四次，每次7分鐘。最後使用冷光反應劑Enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting detection reagent使底片感光，以偵測蛋白質的表現情形。最後將成像後的底片掃描輸入電腦，以影像分析軟體(Bio-1D version 99)作分析處理。

8. 反轉錄-聚合酵素連鎖反應(Reverse transcription-polymerase chain reaction，RT-PCR)

利用 Super Script One-Step RT-PCR with PLATINUN Taq (Invitrogen)之套組，依說明書指示進行RT-PCR實驗。

Component	Volume/50 microliter	Final concentration
2X Reaction Mix	25 microliter	1X
Template RNA 1 microgram	2 microliter	10 pg –
Sense Primer	0.5 microliter	0.2 micromolar
Anti-sense Primer	0.5 microliter	0.2 micromolar
RT/Taq(RT enzyme) Mix	1 microliter	0.2 micromolar
Autoclaved dH_2O	21 microliter	

將以上所列之reagents依序加入至0.2 ml薄壁微量PCR反應管，《注意：上述過程均在冰上操作，且反應管需事先滅過菌並pre-chilled》輕微vortex混合均勻，然後在冰上輕敲，使vortex時沾於管壁上的sample沉降，最後置入PCR反應器(GeneAmp® PCR System 2400)中來進行RT-PCR.

9. 實驗設計：藥物來源、給藥劑量、時間、動物分組及評估

本計劃所使用藥物 puerarin 為高純度 99%來自 Wuhan Yuancheng Technology Development Co,.Ltd，而 clopidogrel 來自安萬特藥廠， 本實驗設計分為 sham control (n=5)、solvent control (n=5)、puerarin (50 mg/kg n=5)、clopidogrel (10 mg/kg 和 20 mg/kg) 併用 puerarin (50 mg/kg n=5)；給藥時間點為 ischemia 前 15 分鐘，ischemia 1 小時後再灌流，24 小時後將大鼠的腦組織取下來，做切片及攝影，然後來做電腦影像分析來評估腦栓塞的大小。另外，這些腦組織亦可利用組織免疫法來分析 nitrotyrosine、western blotting 來分析 iNOS expression 以及利用 chemotactic chamber 來評估 neutrophil migration， 這些都是用來評估藥物對於中風的產生是否有改善，除此之外，我們亦可在犧牲 rat 之前，來評估其中風行為表現是否有改善。

參、結果與討論

首先我們先建立大腦中動脈血管阻塞/再灌流模式(MCAO)動物實驗模式，實驗後發現 Wistar 大鼠經過手術之後，與對照組相較，進行腦部切片後發現有明顯的差異，產生腦梗塞的面積大約為百分之三十(Fig. 1)，證明了此一動物實驗模式確為可行。

接下來為了更近一步的了解缺血性中風造成腦部傷害的分子機轉，將大鼠大腦加以均質化後並抽取其蛋白質及 RNA，利用西方墨點法及逆轉錄聚合酶反應實驗，探知數個與發炎及細胞凋亡相關的因子的表現包括：iNOS、caspase-3、HIF-α其蛋白質的表現及 TNF-α、Bcl-2、c-fos 其 RNA 的表現(Zhang *et al.*, 2002, Love *et al.*, 2003,

Sedarous *et al.*, 2003, Moro *et al*,. 2004)，試圖經由比較 MCAO 手術組與對照組的差異，來驗證這幾個因子在缺血性中風造成的腦部傷害中是否扮演了重要的角色。

實驗結果發現，進行 MCAO 手術的大鼠在進行手術側的腦部中，其 iNOs 的表現明顯的高於對照組(Fig. 2)，而未進行手術的腦部，其實驗組與對照組之間無明顯的差異；同樣利用西方墨點法觀察 caspase-3 及 HIF-1α在腦部的表現，發現進行 MCAO 手術的大鼠在進行手術側的腦部中，其 caspase-3 及 HIF-1α的表現明顯的高於對照組(Fig. 3, 4)，而未進行手術的腦部，其實驗組與對照組之間無明顯的差異；此外在逆轉錄聚合酶反應實驗中，我們發現與對照組相較，進行 MCAO 手術的大鼠，其腦部 TNF-α的表現明顯的較對照組為高(Fig. 5)，然而另外兩個重要的因子Bcl-2 及 c-fos，實驗組與對照組相較，其表現並無明顯的差異(Fig. 6, 7)。

事先給予進行 MCAO 手術的大鼠葛根素(50 mg/kg)，進行腦部切片並加以染色後發現，給予葛根素能有效的減少腦部傷害的區域(Fig. 8)，而葛根素併用 clopidogrel (20 mg/kg)的大鼠，其與未給予藥物的實驗組相較仍能有效的減少腦部傷害面積，單與單獨給予葛根素的大鼠相較，並無明顯的差異，即無明顯的加成作用，至於單獨給予 clopidogrel (20 mg/kg)的大鼠，並未發現明顯改善腦損傷區域；而在

動物行為評估結果上不管是單獨給予葛根素或是併用 clopidogrel 皆未發現明顯的改善現象(Fig. 9)。

肆、結論與建議

本次計畫建立了完善的動物實驗模式，並證實了數個與發炎及細胞凋亡有關的因子，包括 iNOs、HIF-1α、TNF-α及 caspase-3 在缺血性中風所造成的腦部傷害中可能扮演了重要的角色，而葛根素能有效的減少腦部傷害的面積，但併用抗凝血劑 clopidogrel 並無加成的效果；接下來的實驗可進一步的對葛根素對腦部傷害的保護作用，進行其分子機轉的探討，以期中藥的使用在臨床上及學術上更為國際所接受。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會(計畫編號 CCMP-95-RD-012)提供經費贊助，使本計劃得以順利完成，特此感謝。

伍、參考文獻

Abumiya T, Fitridge R, Mazur C, Copeland BR, Koziol JA, Tschopp JF, Pierschbacher MD, del Zoppo GJ. Integrin alpha(IIb)beta(3) inhibitor preserves microvascular patency in experimental acute focal cerebral ischemia. *Stroke* 2000; 31: 1402-9.

Albers GW, Amarenco P, Easton JD, Sacco RL, Teal P. Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke. *Chest* 2001; 119: 300S-20S.

Antiplatelet Trialists Collaboration. Collaborative overview of randomized trials of antiplatelet therapy, I: prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *Br. Med. J.* 1994;308:81–106.

Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 1986; 17: 472-6.

Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 1986; 17: 1304-8.

Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture: neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke* 1996; 27: 1616-23.

Belayev L, Khoutorova L, Deisher TA, Belayev A, Busto R, Zhang Y, Zhao W, Ginsberg MD. Neuroprotective effect of SolCD39, a novel platelet aggregation inhibitor, on transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 2003; 34: 758-63.

Borlongan CV, Yamamoto M, Takei N, Kumazaki M, Ungsuparkorn C, Hida H, Sanberg PR, Nishino H. Glial cell survival is enhanced during melatonin-induced neuroprotection against cerebral ischemia. *FASEB J.* 2000; 14: 1307-17.

CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 1996;348:1329–1339

Chen L, Chai Q, Zhao A, Chai X. Effect of puerarin on cerebral blood flow in dogs. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 1995;20:560-2

Choudhri TF, Hoh BL, Zerwes HG, Prestigiacomo CJ, Kim SC, Connolly ES Jr, Kottirsch G, Pinsky DJ. Reduced microvascular thrombosis and improved outcome in acute murine stroke by inhibiting GP IIb/IIIa receptor-mediated platelet aggregation. *J. Clin. Invest.* 1998; 102: 1301-10.

Connolly ES Jr, Winfree CJ, Springer TA, Naka Y, Liao H, Yan SD, Stern DM, Solomon RA, Gutierrez-Ramos JC, Pinsky DJ. Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J. Clin. Invest.* 1996; 97: 209-16.

Connolly ES Jr, Winfree CJ, Prestigiacomo CJ, Kim SC, Choudhri TF, Hoh BL, Naka Y, Solomon RA, Pinsky DJ. Exacerbation of cerebral injury in mice which express the P-selectin gene: identification of P-selectin blockade as a new target for the treatment of stroke. *Circ. Res.* 1997; 81: 304-10.

del Zoppo GJ, Schmid-Schonbein GW, Mori E, Copeland BR, Chang CM. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* 1991; 22: 1276-83.

del Zoppo GJ, Hallenbeck JM. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb. Res.* 2000; 98: 73-81.

DeVries AC, Nelson RJ, Traystman RJ, Hurn PD. Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research: will it prove useful? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2001; 25: 325-42.

Diener H, Cunha L, Forbes C, Sivenius J, Smets P, Lowenthal A. European stroke prevention study, 2: dipyridamole and acetylsalicylic acid in the secondary prevention of stroke. *J. Neurol. Sci.* 1996;143:1–13.

Diener HC, Bogousslavsky J, Brass LM, Cimminiello C, Csiba L, Kaste M, Leys D, Matias-Guiu J, Rupprecht HJ, on behalf of the MATCH investigators*. Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (MATCH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2004; 364: 331–7.

Dong LP, Wang TY. Effects of puerarin against glutamate excitotoxicity on cultured mouse cerebral cortical neurons. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 1998;19:339-42.

Fan LL, Sun LH, Li J, Yue XH, Yu HX, Wang SY, Dong SQ. Protective effect of puerarin against myocardial reperfusion injury. Myocardial metabolism and ultrastructure. *Chin. Med. J (Engl).* 1992;105:451-6.

Herbert JM, Bernat A, Maffrand JP. Importance of platelets in experimental venous thrombosis in the rat. *Blood* 1992;80:2281–2286

Herbert JM, Frehel D, Vallee E, et al. Clopidogrel, a novel antiplatelet and antithrombotic agent. *Cardiovasc. Drug Rev.* 1993;11:180–198

Lee EJ, Chen HY, Wu TS, Chen TY, Ayoub IA, Maynard KI. Acute administration of Ginkgo biloba extract (EGb 761) affords neuroprotection against permanent and transient focal cerebral ischemia in Sprague-Dawley rats. *J. Neurosci. Res.*2002; 68: 636-45.

Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20: 84-91.

Love S. Apoptosis and brain ischaemia. *Prog Neuropsychoparmacol Biol Psychiat.* 2003; 27: 267-282

Moran PM, Higgins LS, Cordel B, Moser PC Age related learning deficits in transgenic mice expressing the 721-amino acid isoform of human beta-amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 5341-5.

Moro MA, Cardenas A, Hurtado O, Leza JC, Lizasoain I. Role of nitric oxide after brain ischaemia. *Cell calcium.* 2004; 36: 265-275

Okada Y, Copeland BR, Mori E, Tung MM, Thomas WS, del Zoppo GJ. P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. *Stroke* 1994; 25: 202-11.

Okada Y, Copeland BR, Fitridge R, Koziol JA, del Zoppo GJ. Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 1994; 25: 1847-54.

Okhawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay of lipid peroxides in animals tissue by thiobarbituraic acid reaction. *Anal. Biochem.* 1979; 95: 351-8.

Pinsky DJ, Oz MC, Koga S, Taha Z, Broekman MJ, Marcus AJ, Liao H, Naka Y, Brett J, Cannon PJ, et al. Cardiac preservation is enhanced in a heterotopic rat transplant model by supplementing the nitric oxide pathway. *J. Clin. Invest.* 1994; 93: 2291-7.

Savi P, Herbert JM. Clopidogrel and ticlopidine: P2Y12 adenosine diphosphate-receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis. *Semin. Thromb. Hemost.* 2005;31:174-83.

Sedarous M, Keramaris E, O'Hare M. Calpains mediate p53 activation and neuronal death evoked by DNA damage. *J Biol Chem.* 2003; 278: 26031-26038

Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1990; 10: 290-3.

Wagner WR, Hubbell JA. ADP receptor antagonists and converting enzyme systems reduce platelet deposition onto collagen. *Thromb. Haemost.* 1992;67:461–467

Wang L, Zhao A, Wang F, Chai Q, Chai X. Protective effect of puerarin on acute cerebral ischemia in rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 1997;22:752-4, 765.

Weinberger J. Adverse effects and drug interactions of antithrombotic agents used in prevention of ischaemic stroke. *Drugs* 2005;65(4):461-71.

Xu X, Zhang S, Zhang L, Yang W, Zheng X. The Neuroprotection of puerarin against cerebral ischemia is associated with the prevention of apoptosis in rats. *Planta Med.* 2005;71:585-91.

Xuan B, Zhou YH, Yang RL, Li N, Min ZD, Chiou GC. Improvement of ocular blood flow and retinal functions with puerarin analogs. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 1999 ;15:207-16

Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, et al. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N. Engl. J. Med.* 2001;345:494–502

Zhang ZG, Chopp M. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in focal cerebral ischaemia. *Trends Cardiovasc Med.* 2002; 12: 62-66

參考中文期刊

許準榕. 建立中草藥預防中風之動物模式研究.行政院衛生署中醫藥年報23:6 民94.10 頁199-222

陸、圖、表

Fig. 1.

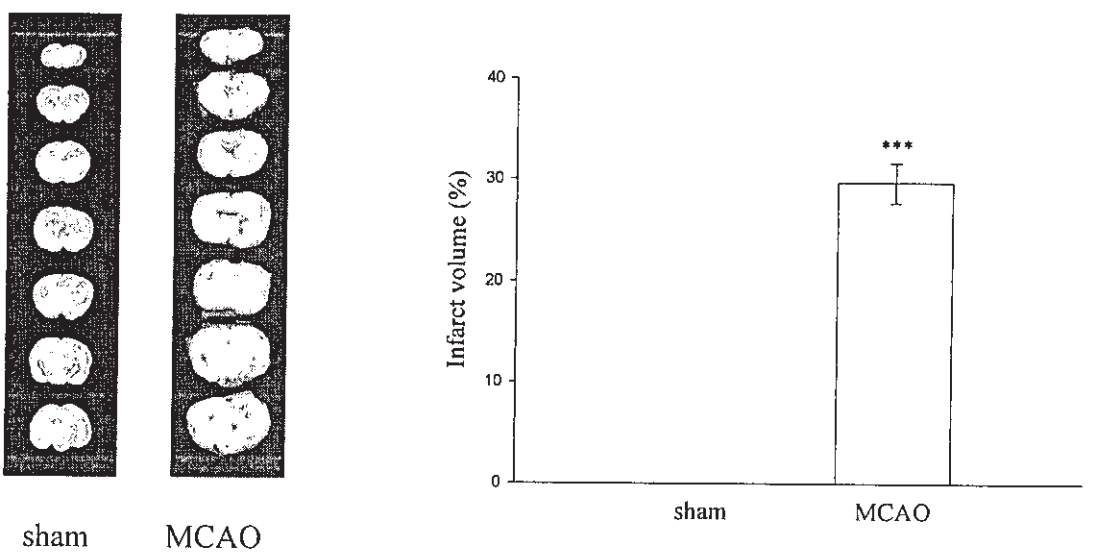


Fig. 1. Middle cerebral artery occlusion (MCAO) ischemia/reperfusion brain injury in rats. Digital photographs show the infarct region in brain sections stained by 2% TTC 24 hours after middle cerebral artery occlusion (MCAO). Data are expressed as percentage (%) of contralateral hemisphere and presented as mean ± SEM ($^{***}P < 0.001$ compared with sham group, n = 8-14).

Fig. 2.

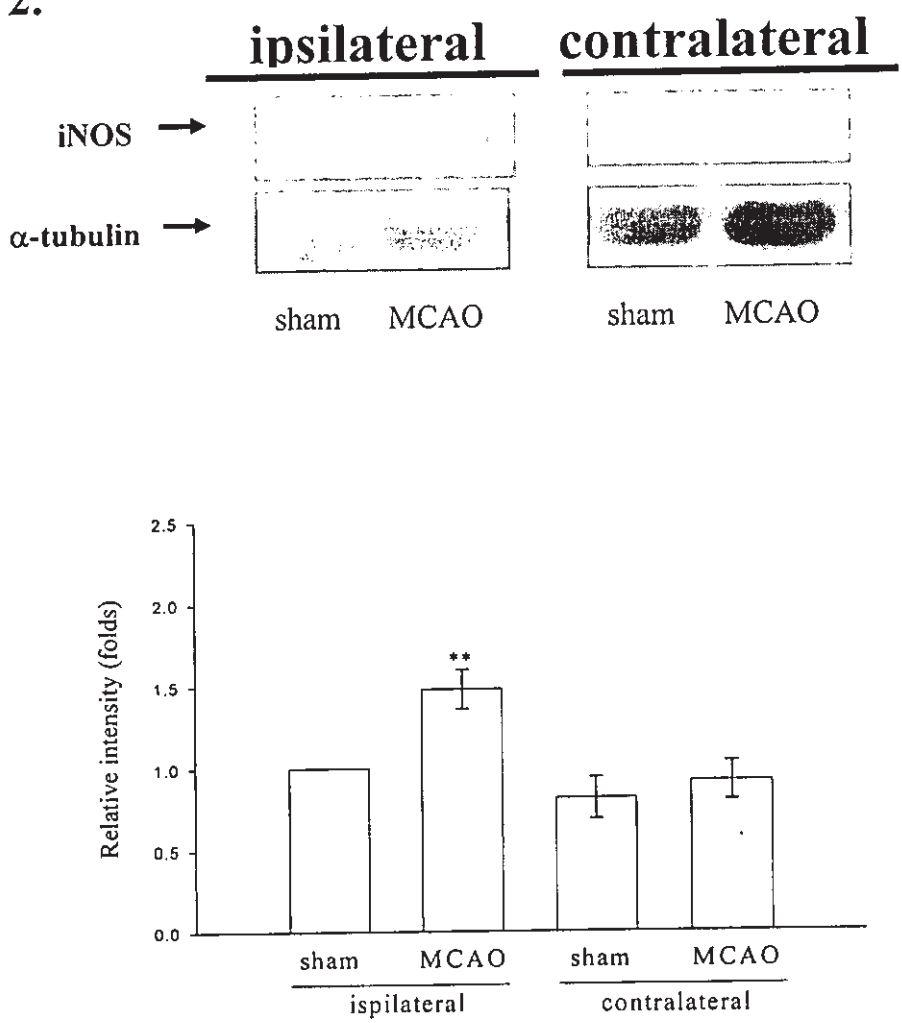


Fig. 2. Expression of iNOS in ispilateral and contralateral brain hemisphere 24 hours after middle cerebral artery occlusion measured by immunoblotting. ($^{**}P < 0.01$ compared with sham control group of ipsilateral brain hemisphere, n = 5).

Fig. 3.

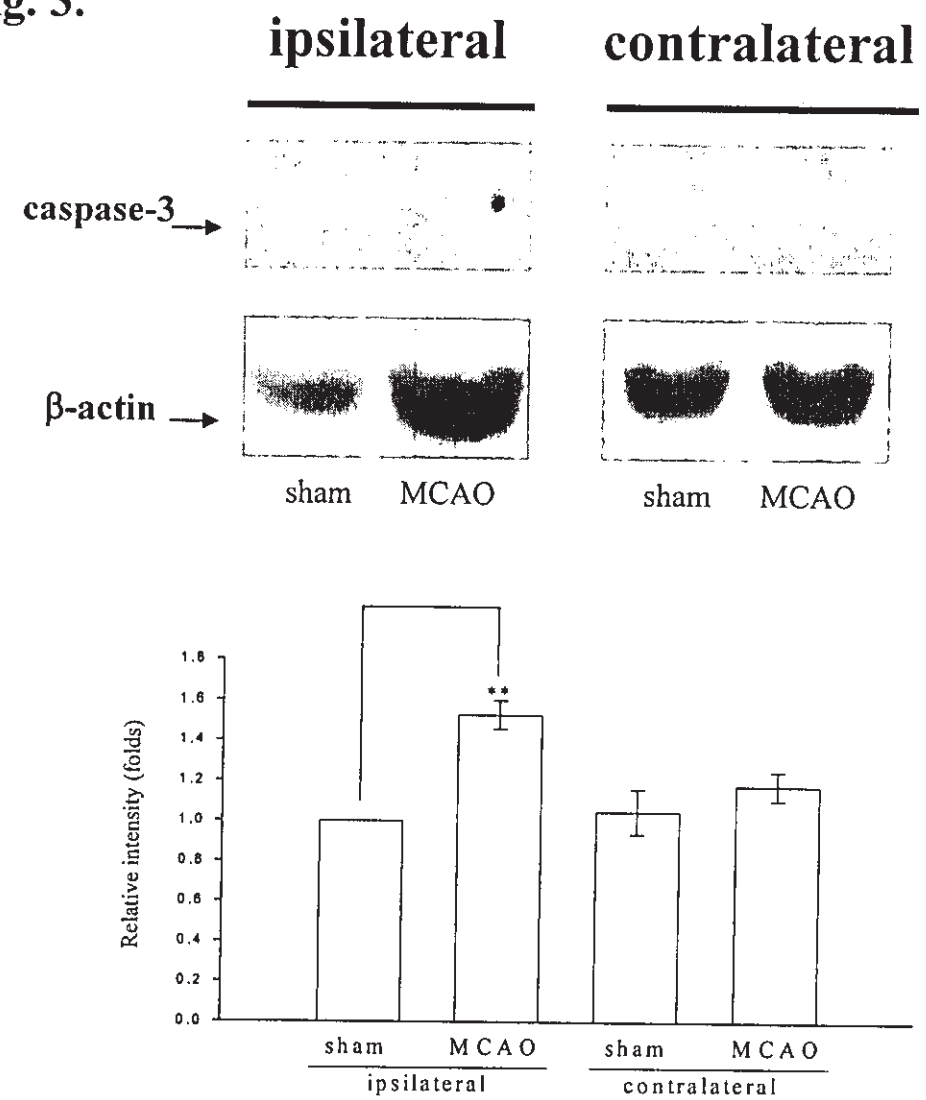


Fig. 3. Expression of caspase-3 in ispilateral and contralateral brain hemisphere 24 hours after middle cerebral artery occlusion measured by immunoblotting. ($^{**}P < 0.01$ compared with sham control group of ipsilateral brain hemisphere, n = 4).

Fig. 4.

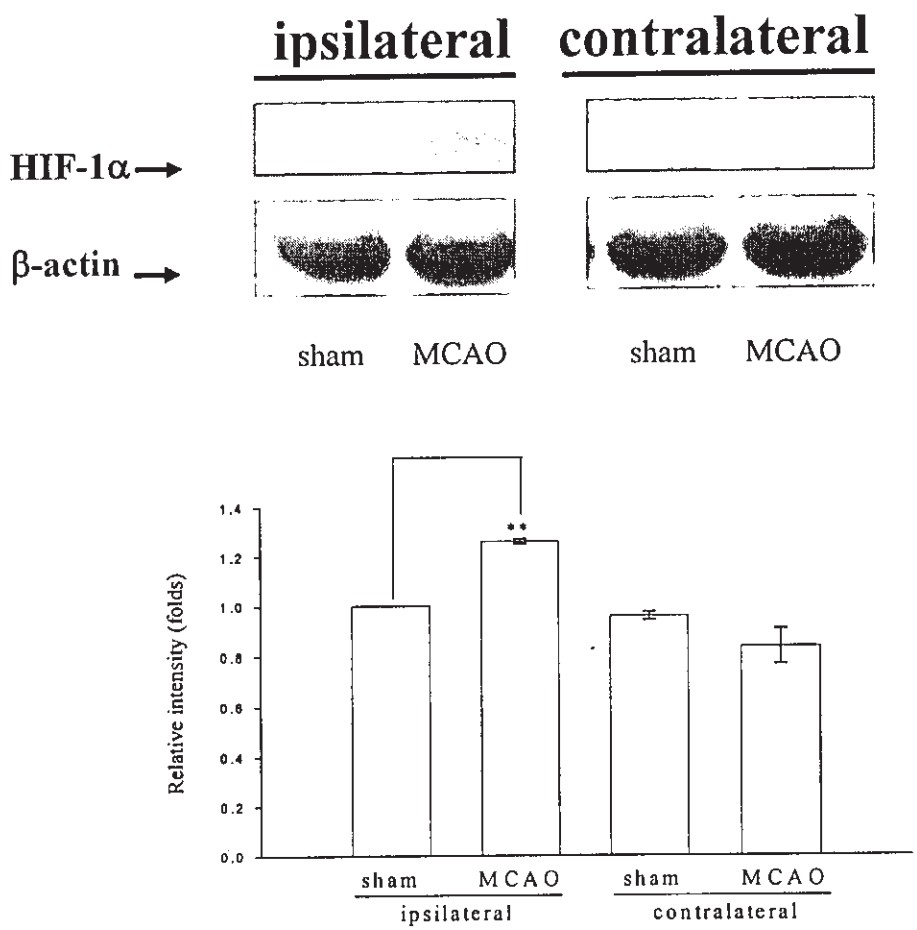


Fig. 4. Expression of HIF-1α in ispilateral and contralateral brain hemisphere 24 hours after middle cerebral artery occlusion measured by immunoblotting. ($^{**}P < 0.01$ compared with sham control group of ipsilateral brain hemisphere, n = 3).

Fig. 5.

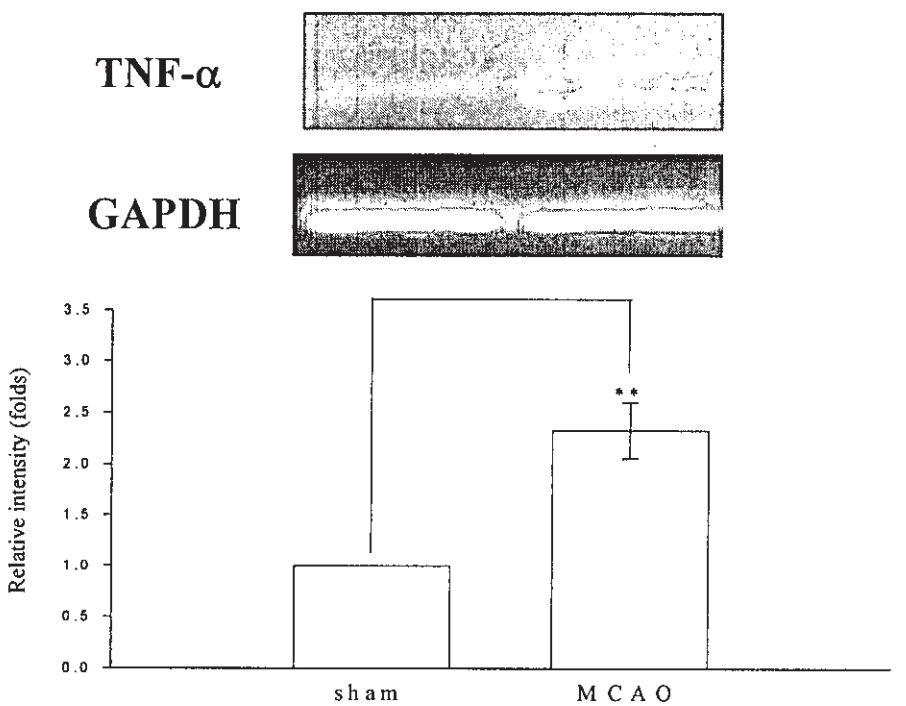


Fig. 5. Expression of TNF-α mRNA on RT-PCR analysis in cerebral cortex 24 hours after middle cerebral artery occlusion (MCAO). The cDNA electrophoretic line represents a sample from separate animal. All animals were subjected to MCAO following 24 hours after reperfusion, and then brains were dissected from ipsilateral cortex. ($^{**}P < 0.01$ compared with sham control group of ipsilateral brain cortex, n = 3).

Fig. 6.

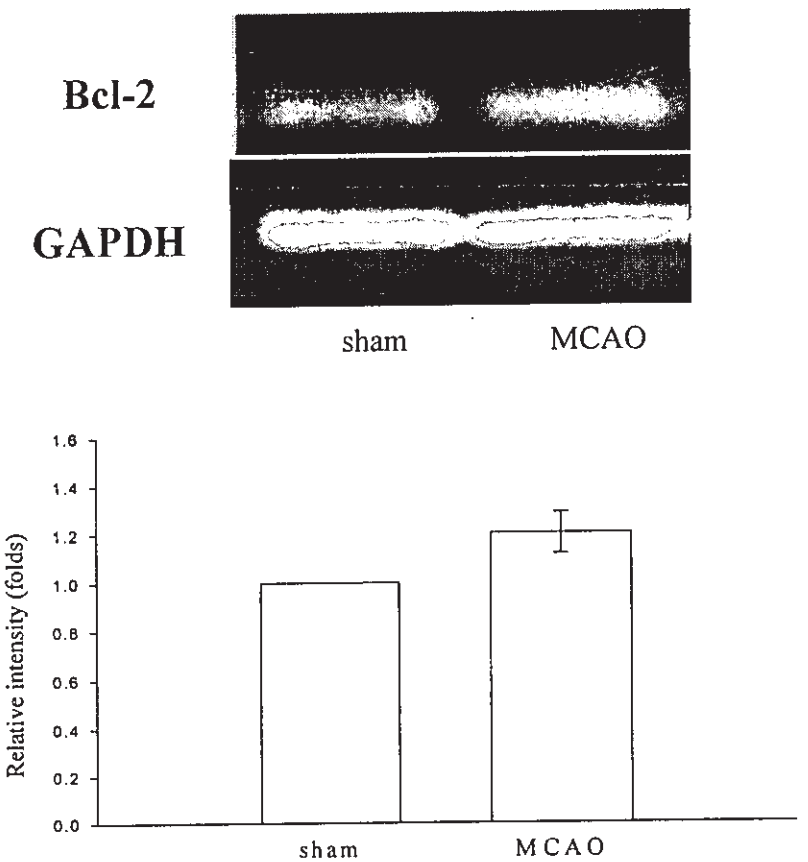


Fig. 6. Expression of Bcl-2 mRNA on RT-PCR analysis in cerebral cortex 24 hours after middle cerebral artery occlusion (MCAO). The cDNA electrophoretic line represents a sample from separate animal. All animals were subjected to MCAO following 24 hours after reperfusion, and then brains were dissected from ipsilateral cortex.

Fig. 7.

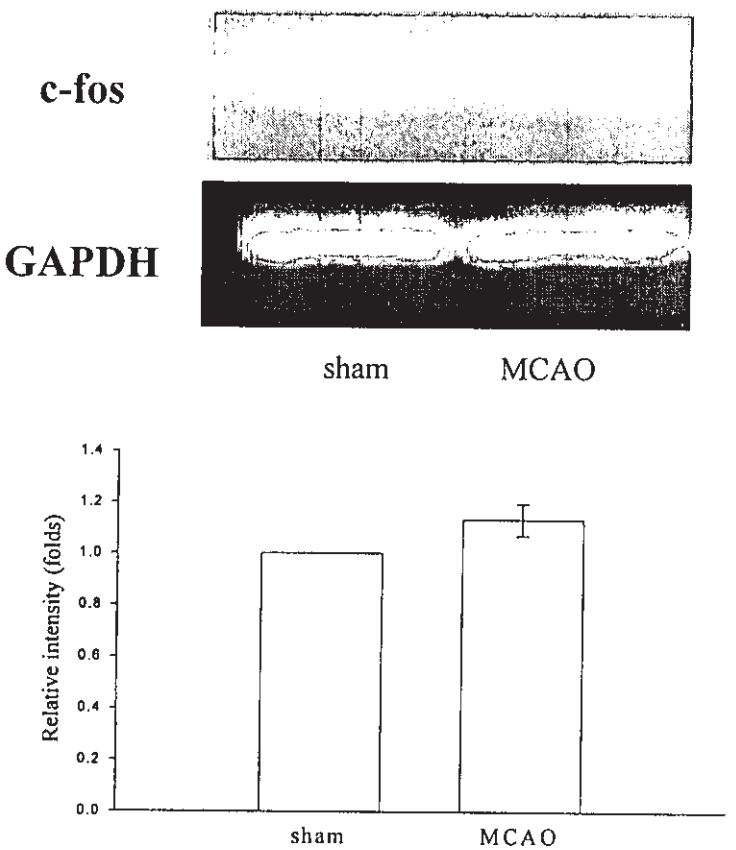
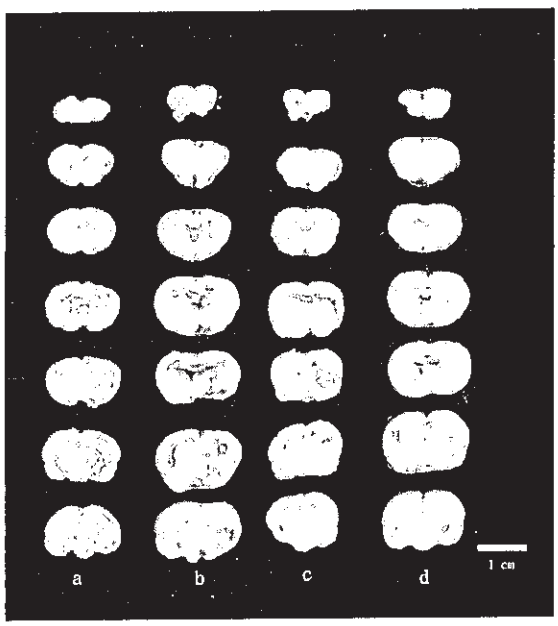
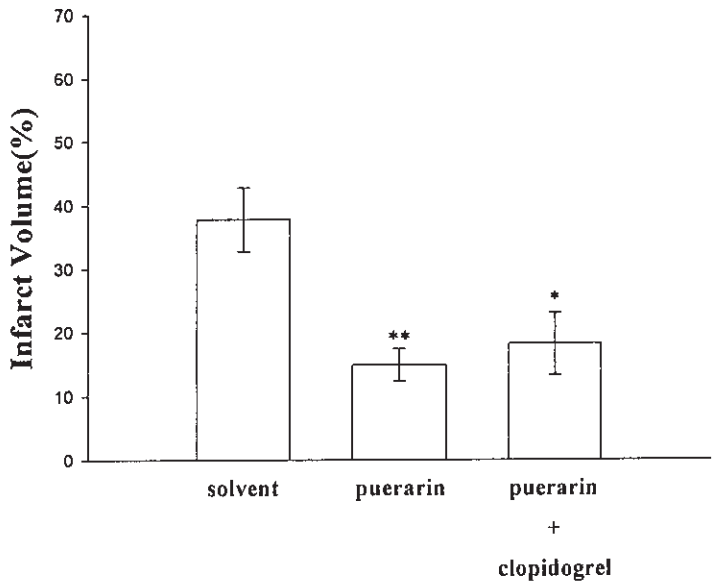


Fig. 7. Expression of c-fos mRNA on RT-PCR analysis in cerebral cortex 24 hours after middle cerebral artery occlusion (MCAO). The cDNA electrophoretic line represents a sample from separate animal. All animals were subjected to MCAO following 24 hours after reperfusion, and then brains were dissected from ipsilateral cortex.

Fig. 8.





sham solvent puerarin puerarin + clopidogrel

MCAO

Fig. 8. Effect of puerarin in ischemia/reperfusion brain injury by middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats. Digital photographs show the infarct region in brain sections stained by 2% TTC 24 hours after middle cerebral artery occlusion (MCAO). Rats were pretreated with vehicle or puerarin (50 mg/kg, ip.) before the onset of MCAO compared to sham control. Panel a means the sham control group. Panel b means the vehicle (cremophor : ethanol : PBS = 1: 1: 4) control. Panel a and b present the damage region enlarged after ischemia and reperfusion cerebral injury, and panel c and d show after the administration of puerarin (50 mg/kg) and puerarin (50 mg/kg) combined with clopidogrel (20 mg/kg), the attenuation of the infarct region. Data are expressed as percentage (%) of contralateral hemisphere and presented as mean ± SEM ($^{*}P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$ compared with solvent group, n = 6).

Fig. 9.

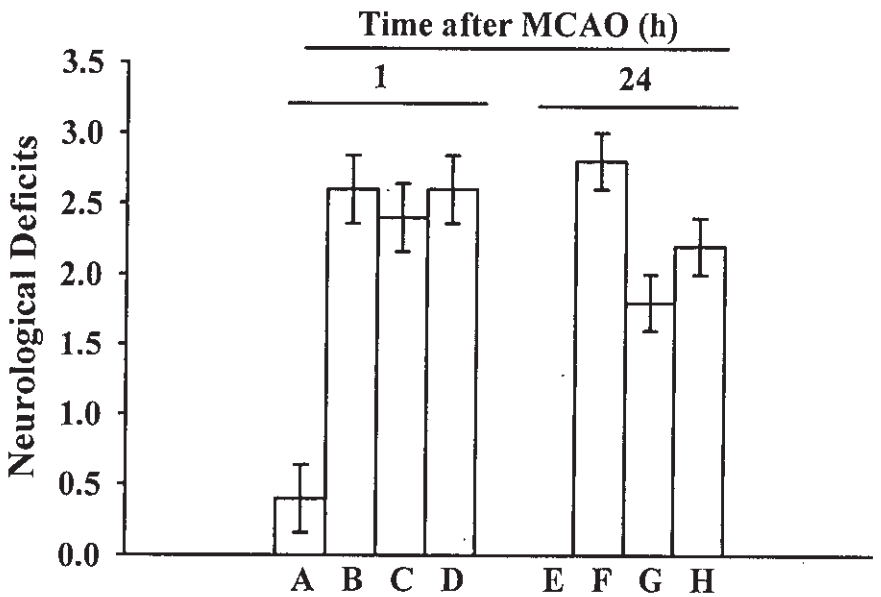


Fig. 9. Effect of puerarin in neurological deficits by middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats. Rats were pretreated with vehicle or puerarin (50 mg/kg, ip.) before the onset of MCAO compared to sham control. Animals were divided into 8 groups: The rats of panel A-D were test at 1 h after MCAO. Panel A means the sham control group . Panel B means the vehicle (cremophor : ethanol : PBS = 1: 1: 4) control, and panel C and D show after the administration of puerarin (50 mg/kg) and puerarin (50 mg/kg) combined with clopidogrel (20 mg/kg). The rats of panel E-H were test at 24 h after MCAO. Panel E means the sham control group. Panel F means the vehicle (cremophor : ethanol : PBS = 1: 1: 4) control, and panel G and H show after the administration of puerarin (50 mg/kg) and puerarin (50 mg/kg) combined with clopidogrel (20 mg/kg).Data are expressed as level of neurological deficits and presented as mean ± SEM .