

公開

密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：010201a128

行政院農業委員會九十七年度科技計畫研究報告

計畫名稱：**開發小葉葡萄應用於預防神經退化疾病之功能研究 (第2年/全程2年)**

(英文名稱) **Study of the preventive effects of *Vitis thunbergii* on the neurodegenerative diseases**

計畫編號：**97農科-1.2.1-科-a1(28)**

全程計畫期間：**96年1月1日至97年12月31日**

本年計畫期間：**97年1月1日至97年12月31日**

計畫主持人：**梁有志**

執行機關：**私立台北醫學大學**



一、中文摘要：

由於小葉葡萄中富含多酚類化合物，尤其是resveratrol，我們認為小葉葡萄的相關產品，極可能可以保護腦神經細胞並可預防腦神經退化的相關疾病。在本年度研究計畫中，我們使用小葉葡萄所萃取出來的純化物ampelopsin C, (+)-??-viniferin, (+)-vitisin A及VTTR2，在体外體 試驗其抗腦神經退化的活性。首先在BV2微小膠細胞中，發現VTTR2顯著抑制iNOS蛋白質表現、NO產生以及COX-2蛋白質表現。在初代培養的大鼠神經細胞中，處以kainic acid (KA) 發現可引起活性氧分子的產生，並會引起神經細胞死亡。使用VTTR2可顯著抑制活性氧分子的產生及KA所引起的神經細胞死亡。在動物試驗方面，腹腔注射KA會引起小鼠癲癇、海馬迴神經細胞的死亡及小鼠的死亡。而餵食VTTR2，在50 mg/kg的劑量下未能降低小鼠發生癲癇，癲癇發作的時間，及未能保護海馬迴神經細胞的傷害，可能原因是劑量不足及VTTR2未能通過腦屏蔽障礙。先前第一年的計畫，已發現小葉葡萄支幹粗萃取物具有保護腦神經的活性，然小葉葡萄所萃取出來的純化物VTTR2卻未能在動物體保護腦神經。雖然小葉葡萄支幹粗萃取物，可以發展成保護腦神經的健康食品，但我們尚未發現具有保護功能的小葉葡萄純化物。

二、英文摘要：

It is very possible that the extracts of *Vitis thunbergii* can prevent neurodegenerative-related diseases, because *Vitis thunbergii* is rich in polyphenols, especially resveratrol. In this plan, we have used the purified chemical ampelopsin C, (+)- α -viniferin, (+)-vitisin A, and VTTR2 from *Vitis thunbergii* extracts to examine the protective function in neurodegenerative diseases in vivo and in vitro. We found that VTTR2 significantly inhibited iNOS protein expression and nitric oxide production as well as cyclooxygenase-2 protein expression in BV2 microglia. Using primary neurons, we found that kainic acid (KA) could induce reactive oxygen species (ROS) production in a dose-dependent manner and finally resulted in neuron cells death. VTTR2 also significantly inhibited the ROS production, and prevented the cell death induced by KA. In animals study, we found that i.p. injecting KA caused seizure, neurons cells death in hippocampus area, furthermore induced mice death in C57BL/6 mice. Administration of VTTR2 (under 50 mg/kg) could not delay the onset time of seizure and the hippocampus neurons cells death. The possible reasons are that the effective dosage might be more than 50 mg/kg and VTTR can't pass through the blood-brain barrier. However, our previous plan has found that branch extracts of *Vitis thunbergii* have a potential to be developed as anti-neurodegenerative food. In the further, we will go to identify which purified chemicals are effective in animal experiments.

三、計畫目的：

小葉葡萄中富含槲皮素(querletin)、白藜蘆醇(resveratrol)及其他多酚類化合物，這些多酚類化合物在很多研究中，被證實具有保護心血管疾病、抗癌、抗衰老及改善腦神經退化性疾病(neurodegenerative diseases)。由於小葉葡萄中富含多酚類化合物，尤其是resveratrol，我們認為小葉葡萄的相關產品，極可能可以保護腦神經細胞並可預防腦神經退化的相關疾病。在上一年度計畫中，我們初步證實小葉葡萄萃取物可以防止微小膠細胞發炎及防止KA引起的神經凋亡，動物試驗中小葉葡萄萃取物也可保護KA引起的腦神經細胞的死亡。在本研究計畫中，我們將針對各種小葉葡萄萃取之純化物，運用in vitro 及in vivo 的實驗，探討其預防腦神經退化性疾病的可能性。以小葉葡萄萃取之純化物進行實驗，篩選有效的小葉葡萄純化物; 並以細胞培養方式，探討其可能的機轉。

四、重要工作項目及實施方法：

主要的實驗方法如下所示：

- A. 使用初代培養的cortical cells (含neurons 及microglia)，以kainic acid 引起氧化壓力增加及神經細胞凋亡，並使用小葉葡萄萃取之純化物來抑制其反應。
- B. 培養的小鼠微小膠細胞株BV2，以 β -amyloid 或LPS/IFN- γ 引起細胞發炎，並使用小葉葡萄萃取之純化物來抑制其發炎反應。
- C. 以kainic acid 引起小鼠腦神經毒性並退化的動物模式，來探討活體中，小葉葡萄萃取之純化物是否也可以保護神經細胞。

五、結果與討論：

結果

1. 建立篩選平台，並由其他子計畫提供之小葉葡萄純化物中，篩選出VTTR2純化物，而其他純化物在50 μ g以下，未發現有強烈的抗發炎活性，所以未進一步試驗。
2. 在BV2 microglia細胞中隨劑量的增加(6.25~25 μ g), VTTR2可抑制LPS所活化的iNOS及COX-2的表現；並抑制NO的產生。
3. 在初代培養的大鼠神經細胞中，kainic acid隨劑量的增加 (0.1~1 mM) 可引起神經細胞的活性氧分子(ROS)增加及神經細胞的死亡; 而VTTR-2隨劑量的增加(6.25~25 μ g), 可抑制kainic acid(0.5 mM)所引起的ROS產生及神經細胞的死亡。
4. 体外細胞實驗證實，VTTR-2可有效防止微小膠細胞的發炎及神經細胞的死亡。
5. 在動物試驗方面，餵食VTTR2 (<50 mg/kg)卻未能降低小鼠發生癲癇，癲癇發作的時間，及未能保護海馬迴神經細胞的傷害。

討論

在細胞試驗中，VTTR2具有各種保護神經的活性；然動物試驗中卻未能發揮作用。檢討其原因有以下幾種可能：

1. VTTR2使用劑量小於50 mg/kg, 可能是劑量太小不足以發揮作用。
 2. VTTR2在腸道中的吸收不佳，或與其他物質有很高的親和性，因而降低血中濃度。
 3. 雖然有吸收，但VTTR2未能通過腦屏蔽障礙，無法在腦中作用。
- 此外可能是具有保護活性的化合物，未被純化出來。我們需再繼續試驗其他的小葉葡萄純化物。

六、結論

先前第一年的計畫，已發現小葉葡萄支幹粗萃取物具有保護腦神經的活性，然小葉葡萄所萃取出來的純化物VTTR2卻未能在動物體保護腦神經。所以未來我們將1.繼續從小葉葡萄粗萃取物中發掘有保護腦神經活性的單一純化物。2.小葉葡萄支幹粗萃取物，已初步證實具有保護腦神經的活性，我們將繼續追加試驗補強其證據，之後尋找合適的廠商合作發展成保護腦神經的健康食品。3.先前第一年的計畫結果已撰寫成論文，目前投稿審查中，後續將視審查結果，做適當的處置。

七、參考文獻：

1. Sun A.Y., Cheng Y., and Sun G.Y. (1992) Kainic acid-induced excitotoxicity in neurons and glial cells. *Prog. Brain Res.* 94, 271—280.
2. Cheng Y. and Sun A.Y. (1994) Oxidative mechanisms involved in kainate-induced cytotoxicity in cortical neurons. *Neurochem. Res.* 19, 1557—1564.
3. Wang Q., Yu S., Simonyi A., Rottinghaus G., Sun G.Y., and Sun A.Y. (2004) Resveratrol protects against neurotoxicity induced by kainic acid. *Neurochem. Res.*, 29, 2105—2112.
4. Ikeda K, Negishi H, Yamori Y. Antioxidant nutrients and hypoxia/ischemia brain injury in rodents. *Toxicology.* 2003 Jul 15;189(1-2):55-61.
5. Bi XL, Yang JY, Dong YX, Wang JM, Cui YH, Ikeshima T, Zhao YQ, Wu CF. Resveratrol inhibits nitric oxide and TNF-alpha production by lipopolysaccharide-activated microglia. *Int Immunopharmacol.* 2005 Jan;5(1):185-93.
6. Lorenz P, Roychowdhury S, Engelmann M, Wolf G, Horn TF. Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide.* 2003 Sep;9(2):64-76.
7. Kim YA, Lim SY, Rhee SH, Park KY, Kim CH, Choi BT, Lee SJ, Park YM, Choi YH. Resveratrol inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in beta-amyloid-treated C6 glioma cells. *Int J Mol Med.* 2006 Jun;17(6):1069-75.
8. Marambaud P, Zhao H, Davies P. Resveratrol promotes clearance of Alzheimer s disease amyloid-beta peptides. *J Biol Chem.* 2005 Nov 11;280(45):37377-82.
9. Han YS, Zheng WH, Bastianetto S, Chabot JG, Quirion R. Neuroprotective effects of resveratrol against beta-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons: involvement of protein kinase C. *Br J Pharmacol.* 2004 Mar;141(6):997-1005.
10. Savaskan E, Olivieri G, Meier F, Seifritz E, Wirz-Justice A, Muller-Spahn F. Red wine ingredient resveratrol protects from beta-amyloid neurotoxicity. *Gerontology.* 2003 Nov-Dec;49(6):380-3.

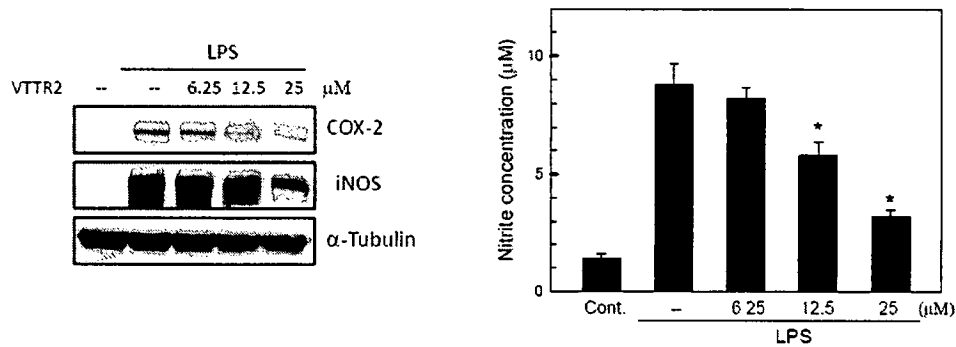


Fig. 1 BV2 microglia 培養在含有 10% FBS 的培養基內，先處理 VTTR-2 (6.25~25 μ M) 30 分鐘，再處理 LPS (100 ng/ml) 24 小時，之後收集其蛋白質與培養基，以 (A)Western blot 偵測 iNOS 的表現; (B)以 Griess 試劑偵測 NO 的產生。

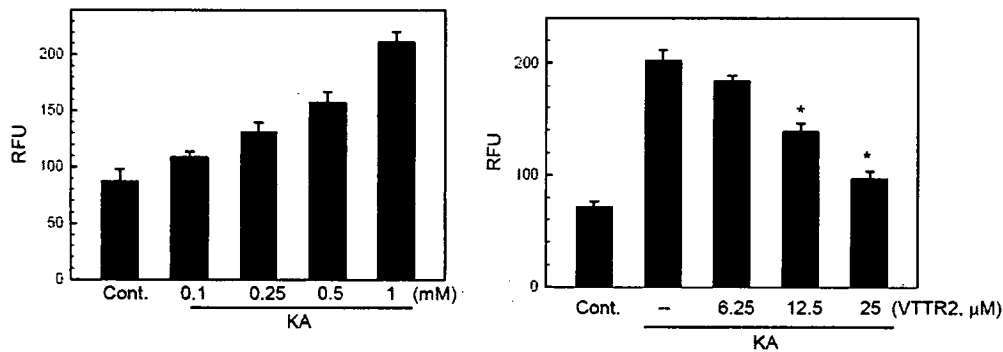


Fig. 2 (A)初代培養的大鼠神經細胞，處理各種濃度的 kainic acid (KA) 3 小時，之後加入 DCF-DA，再以螢光光譜儀偵測 ROS 的產生。(B) 初代培養的大鼠神經細胞先，處理 VTTR-2 (6.25~25 μ M) 30 分鐘，再處理各種濃度的 kainic acid (KA) 3 小時，之後加入 DCF-DA，再以螢光光譜儀偵測 ROS 的產生。

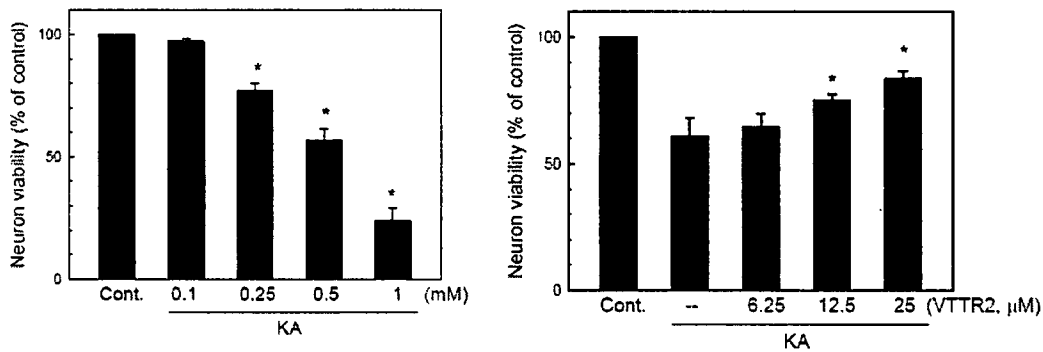


Fig. 3 (A) 初代培養的大鼠神經細胞，處理各種濃度的 kainic acid (KA) 24 小時，之後以 MTT 方法，偵測神經細胞的死亡。(B) 初代培養的大鼠神經細胞先，處理 VTTR-2 (6.25~25 μ M) 30 分鐘，再處理各種濃度的 kainic acid (KA) 24 小時，之後以 MTT 方法，偵測神經細胞的死亡。

Table 1. Effects of VTTR2 on the KA-induced seizure, death, and pathological changes in mice.

Groups	Onset number/time	Pathological scores of survival mice*
Control	0/0	0.0.0.0.0.0
KA	3/3 min. 6 min	3. 5. 5
KA + VTTR2 (10 mg/kg)	4/2 min. 3min, 5 min, 8 min	4, 5
KA + VTTR2 (25 mg/kg)	4/3 min. 5 min, 5 min, 7 min	3, 5
KA + VTTR2 (50 mg/kg)	3/2 min. 5 min, 8 min	2. 4. 5

Mice were i.p. injected with 50 mg/kg KA. After 7 days, hippocampus were stained with Nissl's dye. Brain sections were scored using a semiquantitative grading system: 0, normal; 1, light shrinkage of neurons (5–15 neurons); 2, moderate shrinkage of neurons (16–40 neurons); 3, severe shrinkage of neurons (more than 40 neurons); 4, light loss of neurons (5–10% neuron loss in the area CA3); 5, moderate loss of neurons (11–40% neuron loss in the area CA3); 6, severe loss of neurons (more than 40% neuron loss in the area CA3).

中文說明：小葉葡萄的萃取物保護活體小鼠腦神經細胞的影響。

給予 KA 前 24 小時及 2 小時前，分別以胃管灌食小葉葡萄的萃取物 VTTR2，再腹腔給予 50 mg/kg KA，之後觀察 3 小時，記錄癲癇發作時間及死亡數目。(n=6)