PG9711-0153 (24頁)

計畫編號：CCMP97-RD-044

行政院衛生署中醫藥委員會97年度
研究計畫成果報告

評估血府逐瘀湯併用血栓溶解劑 rt-PA 在大鼠自體血塊引發腦血管梗塞的加成效應

Synergic Effect of Xue Fu Zhu Yu Tang and rt-PA in Rat Thromboembolic Stroke Model

執　行　機　構：台北醫學大學

計 畫 主 持 人：許準榕

研　究　人　員：謝政穎

執　行　期　限：97年11月26日至98年12月31日

＊＊ 本研究報告僅供參考，不代表本會意見，依合約之規定：如對媒體發布研究成果應事先徵求本會同意 ＊＊

目錄

中文摘要..... 5

英文摘要..... 6

壹、前言..... 7

貳、材料與方法..... 11

參、結果.....15

肆、討論.....17

伍、結論與建議.....18

陸、參考文獻.....19

柒、圖、表.....21

評估血府逐瘀湯併用血栓溶解劑 rt-PA 在大鼠自體血塊引發腦血管梗塞的加成效應

許準榕

台北醫學大學

摘要

腦血管中風是血管性疾病致死及發病的主要原因之一，影響人類健康甚鉅，但由於其突發性，其治療藥物的發展，一直沒有很大的進展；中醫活血化瘀法作為治療腦血管中風病人的基本治療在臨床中已廣泛應用，而血府逐瘀湯為一中醫在臨床廣泛使用的活血化瘀方劑。本計劃併用血府逐瘀湯與血栓溶解劑 rt-PA，評估兩者在治療腦血管中風之加成效應及其可能之分子機轉，希望為血府逐瘀湯在腦血管中風的治療上提出一個合理且科學化的依據。

本計畫利用大鼠自體血塊引發腦血管梗塞模式，來評估血府逐瘀湯併用血栓溶解劑 rt-PA 治療腦血管中風所造成腦部傷害的加成效應，並利用西方墨點法深入探討其影響腦部傷害相關因子的表現，以期進一步了解併用兩者之療效的分子作用機制。

研究結果發現血府逐瘀湯(1.5 及 3 g/kg/day)併用 rt-PA(8 mg/kg)能有效的減少 MCAO 手術所造成之腦部傷害，並會抑制 HIF-1α、TNF-α、iNOS 及 active caspase-3 的表現。其腦部保護作用可能經由其抑制 HIF-1α的表現進而影響 TNF-α及 iNOS 的產生而減少 active caspase-3 的表現進而達到保護腦部的效果。

關鍵詞：腦血管中風，血府逐瘀湯，血栓溶解劑

CCMP97-RD-044

Synergic Effect of Xue Fu Zhu Yu Tang and rt-PA in Rat Thromboembolic Stroke Model

Joen-Rong Sheu

Taipei Medical University

ABSTRACT

Stroke is a main mortal cause of vascular diseases, and affects healthy critically. Pathological mechanisms of ischemic stroke were studied intensely, but did not have well therapy of ischemic stroke because it is unpredictable. Traditional Chinese medicine formula is used for stoke therapy clinically, but the studies of its effects and mechanisms are still uncompleted and unconvincing. The Chinese medicine therapy method of promoting blood circulation and removing blood stasis is used in stroke therapy widely. Yilin Gaicuo is one of the therapy formulas of promoting blood circulation and removing blood stasis and Xue Fu Zhu Yu Tang is used in blood stasis syndrome widely. The aim of this study is to investigate the protective effect of Xue Fu Zhu Yu Tang on ischemic stroke through completed study models.

This study utilizes thromboembolic middle cerebral artery occlusion (MCAO) model to evaluate the effect of Xue Fu Zhu Yu Tang on MCAO-induced brain injury in rat. Furthermore, we investigate the molecular mechanisms of Xue Fu Zhu Yu Tang through Western blotting. This study also estimates the effects of Xue Fu Zhu Yu Tang on stroke completely.

Our results show that Xue Fu Zhu Yu Tang (1.5 and 3 g/kg) reduced MCAO-induced brain injury. Xue Fu Zhu Yu Tang also inhibited MCAO-induced HIF-1α, TNF-α, iNOS, and active caspase-3 expression. The protective effect of Xue Fu Zhu Yu Tang on MCAO-induced brain injury may mediate through inhibition of HIF-1α expression and sequentially suppressed TNF-α and iNOS expressions, and finally inhibited the apoptosis-related proteins such as active caspase-3 activation.

Keywords : ischemic stroke, rt-PA, Xue Fu Zhu Yu Tang

壹、前言

腦中風，也稱作急性腦血管病變，為台灣僅次於癌症的第二大死因，若將癌症依照不同的種類來排名統計，則腦中風為所有單一類疾病致死率的第一位。腦中風屬於心血管疾病的其中一類，主要影響通到腦部以及腦內部的血管，當血管被血液的栓塊或是因為破裂而造成血液無法正常供應氧氣及養分至腦部時，就會發生腦中風的現象。一但腦部發生血液供應不足的情形，在短短數秒內，腦部的細胞就會開始死亡。腦中風的種類主要分為缺血性和出血性兩大類。根據統計，在台灣地區，有百分之八十是阻塞性的腦中風，出血性腦中風大約佔百分之二十。本計畫所要探討的主要是缺血性中風的藥物治療，因此以下將對缺血性中風作詳細的介紹。

一、 缺血性中風(ischemic stroke)病理學之介紹

缺血性中風一般又可分為腦血栓或腦栓塞，通常是由於血栓所形成的部位不同而作區別：腦血栓是指動脈本身粥狀硬化，血管壁逐漸變厚，管腔狹窄，終至完全阻塞，以致其所灌流的腦細胞因缺血及缺乏養分供應而壞死；腦栓塞是指腦內血管被血液中來自體內其他部位所產生之栓子阻塞後，以致血流中斷而產生缺血性壞死。這類的栓子多由心臟或頸動脈而來。

缺血性中風的病人當中，約有三分之二的病患於早期症狀較輕微時得以生存，但大部分的人會因為局部腦細胞壞死而產生明顯地感覺運動方面或是意識上的障礙。在腦中風四十八小時以上之患者腦部發現，部分腦組織會呈現間斷性去極化作用發生，稱作缺血半影區(penumbra)，也就是缺血較不嚴重之區域，它是環繞在缺血中心(core)周圍組織部份，在沒有積極治療的情況下，缺血半影(penumbra)會逐漸阻塞導致更進一步的反應產生，如：興奮性毒害，去極化的蔓延以及缺血後之發炎反應產生。如果可以維持此區域的血液灌流強度及養分供應，藉以使得神經細胞生存，可以避免長期性的腦部傷害發生(Obrenovitch *et al.*, 1995；Strong *et al.*, 2000；Phan *et al.*, 2002)。

然而，腦中風所造成的傷害機轉是一種很複雜的反應，主要的傷害源自於血流受阻而產生低血氧(hypoxia)及血糖過低(hypoglycemia)。當養分供應受阻導致能量下降將會引發一連串的相關反應。細胞內主要能量來源為腺甘三磷酸(adenosine 5′-triphospate; ATP)，當 ATP 下降之後會造成許多需要能量來作用之

酵素或生理反應無法正常進行，而造成後續的傷害產生，例如：位在細胞膜控制細胞內外離子平衡的鈉-鉀幫浦為一種需要ATP供應能量而活化之腺甘三磷酸水解酶(ATPase)，當細胞缺乏 ATP 時，這種離子幫浦的功能就會降低，而導致細胞外鉀離子及細胞內鈣、鈉、氯等離子蓄積。然而，細胞本身具有回饋機制可調控此種離子不平衡狀態，乃利用離子交換幫浦(transporter)設法調控細胞膜各離子電位至穩定的狀態，但其副作用卻會造成大量的鈣離子內流至細胞膜內，如此一來便會引起神經末梢一種興奮型的胺基酸，麩氨酸(glutamate)的大量釋放。當麩氨酸通過突觸前麩氨酸通道接到下游突觸受體上，這些受體分成兩種：離子通道型(ionotropic glutamate receptor)與代謝型(metabotropic glutamate receptor)，離子通道型為 *N*-methyl-d-aspartate (NMDA)、2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl- isoxazol-4-yl) proprionate (AMPA)、kainate 接受體以及代謝型為 GTP-binding protein。離子型的麩氨酸接受體活化主要會使鈉、鈣、鉀離子的通透性變高；代謝型的麩氨酸接受體活化後，主要使一些儲存於突觸後神經元內之儲存性鈣離子釋放，這些突觸後接受體的活化就是造成神經興奮性毒害產生的主因 (Arundine *et al.*, 2003)。興奮性毒害除了鈣離子內流外，還包括鈉、氯離子以及水分被動傳輸至細胞膜內，進一步產生水腫(edema)、細胞膜損傷(plasma membrane failure)、神經壞死(neuronal necrosis)等傷害；除此之外，細胞內鈣的提高，也會造成粒線體鈣離子大量蓄積，使 ATP 的製造停止，鈣離子活化磷脂質分解酶(phospholipases)、蛋白酶(proteinases)及內切酶(endonucleases)，進而將磷脂質、蛋白質及核酸大量分解，以及使麩氨酸大量的釋出傳播到鄰近的細胞造成興奮性毒害擴散(Arundine *et al.*, 2003；Moro *et al.*, 2004；Slevin *et al.*, 2005)。

二、 缺血性腦中風之藥物治療與開發

缺血性中風的治療主要可以分為兩大類：一、血栓溶解劑。二、神經保護製劑。於血栓溶解劑方面，這類用藥的選擇並不多，目前唯一為美國 FDA 所核可的藥物是 recombinant tissue-type plasminogen activator (rt-PA)，在發生缺血性中風三個小時內投與 rt-PA 治療可以有效改善中風病患神經行為模式方面的損害，預後也較佳，但是由於其使用時機之緊迫性以及費用過高等問題，導致 rt-PA 治

療上的限制過於嚴苛。若是 rt-PA 的使用超過它的黃金時段，很可能會造成更嚴重的副作用產生，反而使病人因為顱內出血而導致死亡危險性增加。其他相關藥物不是效果不佳就是仍停留在研究階段，不過，目前也已經有類似血栓溶解劑之藥物正在研究是否可以有更長的時效及更少的副作用藉以取代 rt-PA 之應用。另一方面為神經保護製劑。當缺血性中風發生時，局部血栓阻塞造成缺血性神經壞死，但是圍繞在缺血中心外之缺血半影區細胞，仍然具有部分生理活性，如果血栓未移除或是血液的再灌流可能會導致神經細胞的二度傷害。然而，這類藥物目的就是要使這些二度傷害的程度減少，進而對腦部神經具有保護作用。但目前這樣的藥物並沒有任何一種被核可使用於人體上，並具有有效地保護腦部神經避免缺血性中風傷害之作用。因此，這類藥物的研究對於中風進程治療上即占了非常重要的一環(Ren *et al.*, 2004)。

一、 中醫在缺血性中風的治療

中醫學以其起病急驟，症狀多端，變化迅速，猶如風邪善行而數變，故中醫學將之歸於中風範疇，發病機理多為氣血虧虛、肝鬱化火，或痰濕內盛、臟腑功能失調，加之勞倦內傷、憂思惱怒、酗酒飽食、用力過度等誘因，導致氣血阻滯，腦脈痹阻而成。病位在腦，與心、肝、脾、腎臟器關係密切。病理屬性為本虛標實、上實下虛。以肝腎不足、氣血虧虛為本，痰濁、風火、肝陽、瘀血為標。中醫活血化瘀法作為治療中風病的基本治療大法在臨床中已廣泛應用，臨床上無論缺血性中風、出血性中風後遺症的病人，活血化瘀法是最常用的治法。

活血化瘀藥具有活血行氣、祛瘀生新、疏通經絡、調理臟腑的作用，臨床應結合缺血性腦血管病急性期不同病機特點進行辨證論治。現代醫學研究證實，在腦梗死的急性期，尤其是超早期(發病 6 小時以內)，病灶周圍這部分腦細胞尚未完全死亡，尚有恢復其功能的可能性。因此，恢復腦細胞功能便是腦梗塞治療的首要任務。超早期溶解血栓技術的開展為梗塞部位神經功能恢復提供了可能。許多活血化瘀中藥尤其破血逐瘀藥如水蛭、地龍等具有不同程度的溶血栓、抗凝血等作用。因此，在缺血性中風急性期，在辨證治療的基礎上適當加入活血化瘀藥物治療，在臨床上已廣泛應用。如臨床常用腹蛇抗栓酶、蚓激酶。

活血化瘀法能夠消除腦水腫，改善血液循環，保護神經細胞免受損傷，而應活血止血。目前亦有人應用活血化瘀方劑如複元活血湯、血府逐瘀湯、桃紅四物湯、通竅活血湯及單味藥中藥水蛭、大黃、三七、三棱等治療小劑量腦出血取得了較好的療效。但對於大量腦出血，處於昏迷狀態，伴顱內壓升高，生命表徵不穩定應慎用。至於用藥後是否能引起再出血問題以及急性期應用問題，目前仍有爭議。

在現代藥理研究中發現，血府逐瘀湯具有多種藥理作用機制。首先，對心血管系統能夠降血壓，抗心律失常，改善微循環，抗動脈粥樣硬化，增加冠狀動脈和腦血流量，解除血管痙攣；其次，對血液系統可以改善血液流變性，抑制血小板凝集，增強纖維蛋白的溶解；第三，對免疫系統具有增強機體免疫功能的作用，具有抗炎、減少炎症滲出、促進炎症滲出物吸收等作用。此外，它還有抗肝纖維化、鎮靜、鎮痛等多方面的藥理作用。為了中醫藥的使用在缺血性中風的臨床治療上能更為完備，且為國際所接受，本實驗室特邀美國約翰霍普金斯大學童瑞恭教授，協助建立最新的大鼠自體血塊引發缺血性中風模式(thromboembolic stroke model)，此一動物模式更符合病患中風時的狀況，對中風的臨床治療提供更為完善的研究模式，利用此一模式研究中醫藥治療，將讓中醫治療更為人所接受。透過本研究計畫，相信能為血府逐瘀湯此一傳統中藥方劑在治療缺血性腦中風上，提出一個合理且科學化的依據，同時也對 rt-PA 的臨床治療上提供一個相輔的中藥來配合治療，相信對於有效的降低 rt-PA 的劑量以及減少其副作用的產生，具有臨床上相當的意義。

貳、材料與方法

一、大鼠自體血塊引發中腦動脈血管阻塞/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 Krueger 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)，將前一天製備好之大鼠血塊，經由外頸動脈插入至內頸動脈，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，利用 rt-PA(8 mg/kg)溶解血塊以促使血液再灌流 (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℃。

二、 腦梗塞區域 (infarct size) 之測定

參照Bederson & Pitts等人 (1986a) 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 %

三、組織蛋白質抽取及西方墨點法

大鼠經手術廿四小時之後，腹腔注射劑量 400 mg/kg 水合氯醛(chloral hydrate)加以麻醉，再以 50-100 ml 之 PBS 由大鼠左心室進行灌流，並剪開右心房讓血液與灌流液流出。大鼠在灌流後，小心的取下大腦並將其冠狀切片，從

腦前頂端部分開始算起，取 3-9 mm 的部分再分離成左右大腦半球，以液態氮急速冷卻後儲存於 −70°C 備用。組織由-70°C 回溫之後，於 4°C 下加入 lysis buffer (50 mM HEPES buffer, containing 100 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM NaH_2PO_4, EDTA 5 mM and protease inhibitors including aprotinin 10 μg/ml, PMSF 1 mM, and leupeptin 10 μg/ml, and phosphatase inhibitors including NaF 10 mM, sodium orthovanadate 1 mM and sodium pyrophosphate 5 mM) 加以研磨。經研磨過後之均質液於 4°C、10000 xg 下離心 30 分鐘，小心抽取其上清液保存於 -70°C 。將均質液依 Bradford(1976)的方法測定其蛋白質含量，並使用牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)為標準品。

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6 x sample loading dye (350 mM Tris-base, 30 % Glycerol, 350 mM SDS, 175 μM 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。

四、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)。

五、實驗設計：給藥劑量、時間、動物分組及評估

本實驗之給藥設計為每天餵食 Wistar 大鼠不同劑量的血府逐瘀湯兩個星期後，再進行實驗；實驗分組分為六組：(1)未進行手術控制組 (sham group)、(2) 溶劑 (預先餵食等量生理食鹽水) 兩周後進行手術，術後給予 rt-PA (8 mg/kg) 控制組、(3)手術後單獨給予 rt-PA (8 mg/kg) 組、(4) 預先餵食低劑量血府逐瘀湯 (1.5

g/kg/day) 兩周後進行手術，術後給予 rt-PA (8 mg/kg) 組、(5) 預先餵食高劑量血府逐瘀湯 (3 g/kg/day) 兩周後進行手術，術後給予 rt-PA (8 mg/kg) 組，(6)預先單獨餵食血府逐瘀湯 (3 g/kg/day) 兩周後進行手術組。以上組別則在實驗後分別觀察其腦部傷害面積大小及各項中風治療指標。

六、數據分析

實驗數據皆以平均值±標準誤差(mean ± S.E.M.)表示，控制組與血府逐瘀湯組之間的差異，實驗的統計則以 one-way ANOVA 作統計分析。若有意義差別，再以 Newman-Keuls 方法比較各組間的差異性，若 $P < 0.05$ 則表示有意義的差別。

參、結果

一、從鼠腦冠狀切片染色(圖一 A)中可看到，相較於餵食溶液的控制組(lane 2)，rt-PA(8 mg/kg)併用血府逐瘀湯(1.5 及 3 g/kg/day)(lanes 4 和 5)明顯的減少 MCAO 手術造成的腦部傷害，且將此腦部傷害面積資料加以統計後發現(圖一 B)，血府逐瘀湯(1.5 及 3 g/kg/day)併用 rt-PA(8 mg/kg)可有意義且成濃度相關性的抑制 MCAO 手術造成的腦部傷害。另外，血府逐瘀湯併用 rt-PA 的組別(lanes 4 和 5)相較於單獨使用血府逐瘀湯(3 g/kg/day)或 rt-PA(8 mg/kg)的組別(lanes 3 和 6)，則較有效的減少 MCAO 手術造成的腦部傷害。

二、圖二顯示進行手術後不論是否併用血府逐瘀湯與 rt-PA，相對於未進行手術之控制組皆會造成神經行為缺陷。另外我們發現在 solvent control (line ○)以及給予血府逐瘀湯(3 g/kg/day) + rt-PA (8 mg/kg) (line ■)的組別，兩組間因缺血性中風所導致神經缺陷引起行為變化的等級，具有統計上的差異。

三、我們更深入的討論 rt-PA 併用血府逐瘀湯是否會影響與腦部傷害相關因子的表現。單獨餵食溶劑並進行 MCAO 手術之控制組(lane 2)的大鼠腦部其 HIF-1α(圖三)、 iNOS (圖四)、TNF-α (圖五)及 active caspase-3 (圖六)的表現有明顯的增加，而血府逐瘀湯(1.5 及 3 g/kg/day)併用 rt-PA(8 mg/kg) 的組別(lanes 4 和 5)，相較於餵食溶劑的組別(lane 2)則有統計意義且成濃度相關性的減少大鼠腦部其 HIF-1α、iNOS、TNF-α及 active caspase-3 的表現。另外，單獨使用 rt-PA(8 mg/kg)的組別(lane 3)，相較於餵食溶劑的組別(lane 2)，有統計意義的減少手術後腦部 TNF-α (圖五)的表現，但在減少 HIF-1α(圖三)及 iNOS (圖四) 及 active caspase-3 (圖六)之表現則沒有統計上的差異；單獨使用血府逐瘀湯(3 g/kg/day) 的組別(lane 6)，相較於餵食溶劑的組別(lane 2)，有統計意義的減少手術後腦部 TNF-α (圖五)、iNOS (圖四)及 active caspase-3 (圖六)的表現，但在減少 HIF-1α(圖三) 之表現則沒有統計上的差異。

肆、討論

一、首先本計劃先建立大鼠自體血塊引發中動脈血管阻塞/再灌流模式(MCAO)動物實驗模式，單獨餵食溶劑之控制組進行手術後，腦部切片相較於未進行手術的組別有明顯的差異，產生腦梗塞的面積大約為百分之三十，證明了此一動物實驗模式確為可行。依實驗分組進行實驗，結果顯示預先餵食兩個禮拜血府逐瘀湯(1.5 及 3 g/kg/day)後進行 MCAO 手術，且併用 rt-PA(8 mg/kg)的組別與單獨餵食溶劑之控制組相比，染色後的腦部切片及統計數據，皆呈現明顯的腦部保護作用(圖一)，顯示血府逐瘀湯併用 rt-PA 其可能具有的腦部保護療效。

二、在圖二中我們則發現在 solvent control (line ○)以及給予血府逐瘀湯(3 g/kg/day) + rt-PA (8 mg/kg) (line ■)的組別，其因缺血性中風所導致神經缺陷引起行為變化的等級，具有統計上的差異。說明了的確血府逐瘀湯併用 rt-PA 治療缺血性腦中風，具有其改善動物中風後行為表現的效果。

三、圖三至圖六顯示，相對於未進行手術的組別(lane 1)，單獨餵食溶劑並進行 MCAO 手術之控制組(lane 2)，其大腦組織中 HIF-1α、TNF-α和 iNOS 的表現量均有明顯的增加，而餵食不同劑量血府逐瘀湯(1.5 及 3 g/kg/day)兩個禮拜的大鼠(lanes 4 和 5)與控制組(lane 2)相較，這些 MCAO 引發的傷害因子的表現均有明顯的抑制現象；此外，在之前的研究中發現腦部的局部缺血會引發 HIF-1α的增加(Bergeron et al., 2000)，進一步 HIF-1α會結合到 hypoxia response elements (HRE)上，造成 TNF-α和 iNOS 的大量表現(Matrone et al., 2004；Chu et al., 2008)，另外 TNF-α亦可以引發 iNOS 的產生(Heneka et al., 1998)，而 iNOS 所造成的 NO 大量產生，會造成細胞的死亡及細胞凋亡標記蛋白 active caspase-3 的表現(Chung et al., 2001; Stewart and Heales, 2003)，所以我們認為 rt-PA 併用血府逐瘀湯可能是經由抑制 HIF-1α的表現，進而減少了 TNF-α和 iNOS 的產生，使得 NO 不會大量生成，而抑制了細胞凋亡標記蛋白 active caspase-3 的表現，達到保護腦細胞以減少腦部傷害的效果。

四、相較於手術後單獨給予 rt-PA (8 mg/kg) 組及預先單獨餵食血府逐瘀湯

(3 g/kg/day)兩周後進行手術控制組，併用血府逐瘀湯及 rt-PA 具有更好的神經保護效用。這顯示合併使用的確較單獨使用兩者具有治療缺血性腦中風的加成效應。

伍、結論與建議

血府逐瘀湯併用 rt-PA 能有效的減少 MCAO 手術所造成的腦部傷害，且較單獨使用 rt-PA 或單獨使用血府逐瘀湯具有更好的神經保護作用；而其保護作用可能是經由其抑制 HIF-1α的表現，進而抑制其下游細胞凋亡因子如：TNF-α、iNOS 及 active caspase-3 而來。本計劃的完成對血府逐瘀湯臨床上於中風病例的使用，增加了其學理根據，使中西藥兩者併用的治療方式更為醫學界所認同，但在臨床的使用劑量及用法，則須更多的臨床應用實例，來加以印證。

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-97-RD-044)提供經費贊助，使本計劃得以順利完成，特此感謝。

陸、參考文獻

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

陳漢銳，連樂，鄭創華，羅偉淵，廖雪珍，廖惠芳. 桃紅四物湯抗腦缺血缺氧及抗血栓形成的實驗研究. 中華實用醫藥雜誌 第五卷；十五期，二零零五年

Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell calcium.* 2003; 34: 325-337

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: 472-476.

Bergeron M, Gidday JM, Yu AY, Semenza GL, Ferriero DM, Sharp FR. Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain. *Ann Neurol* 2000; 48: 285-296.

Chu K, Jung KH, Kim SJ, Lee ST, Kim J, Park HK, Song EC, Kim SU, Kim M, Lee SK, Roh JK Transplantation of human neural stem cells protect against ischemia in a preventive mode via hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization in the host brain. *Brain Res* 2008; 1207: 182-192

Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282:1075–9

Heneka MT, Löschmann PA, Gleichmann M, Weller M, Schulz JB, Wüllner U, **Klockgether T**. Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor-alpha/lipopolysaccharide. *J Neurochem* 1998; 71: 88–94

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

Matrone C, Pignataro G, Molinaro P, Irace C, Scorziello A, Di Renzo GF, Annunziato L. HIF-1alpha reveals a binding activity to the promoter of iNOS gene after permanent middle cerebral artery occlusion. *J Neurochem* 2004; 90: 368–378

Moro MA, De Alba J, Leza JC, Lorenzo P, Fernandez AP, Bentura ML, Bosca L,

Rodrigo J, Lizasoain I. Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Eur. J. Neurosci.* 1998; 10:445-456

Obrenovitch TP. The ischaemic penumbra: twenty years. *Cerebrovasc. Brain Metab.* 1995; 7: 297-323

Phan TG, Wright PM, Markus R. Salvaging the ischaemic penumbra: more than just reperfusion. *Clin. Exptl. Pharmacol.* 2000; 29: 1-10

Ren M, Leng Y, Jeong M, Leeds PR, Chuang DM. Valproic acid reduces brain damage induced by transient focal cerebral ischemia in rats: potential roles of histone deacetylase inhibition and heat shock protein induction. *J. Neurochem.* 2004; 89: 1358-1367

Sato M, Ohshima N. Platelet thrombus induced in vivo by filtered light and fluorescent dye in mesenteric microvessels of the rat. *Thromb. Res.* 1984; 1: 35: 319-334

Sharp FR, Bernaudin M. HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 437–448

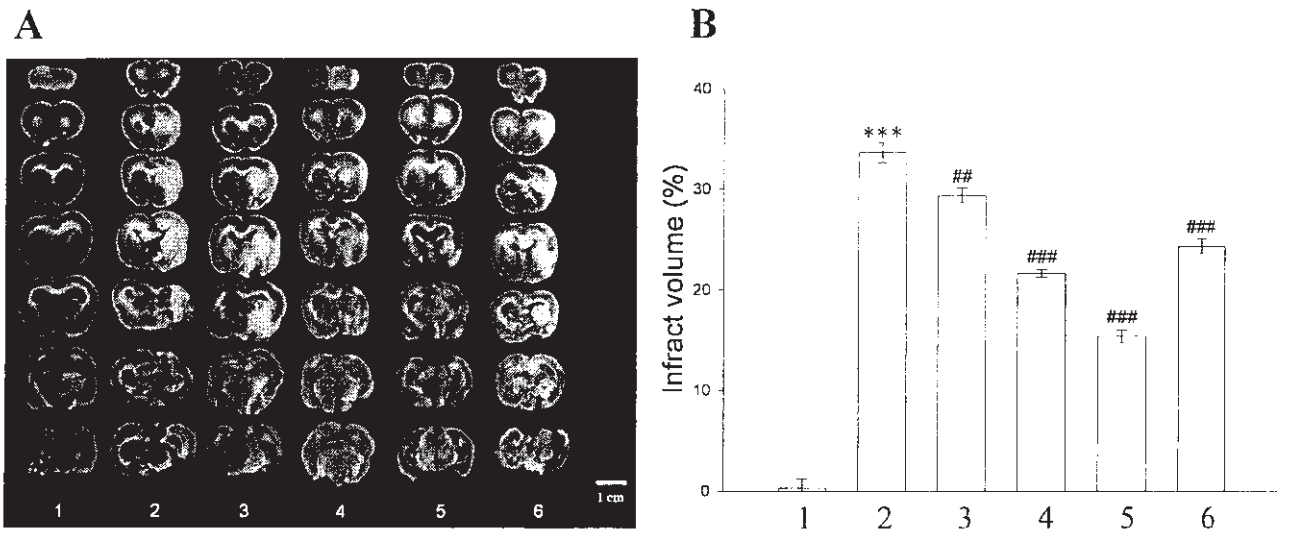
Slevin M, Krupinski J, Kumar P, Gaffney J, Kumar S. Gene activation and protein expression following ischaemic stroke: strategies towards neuroprotection. *J. Cell Mol. Med.* 2005; 9: 85-102

Stewart VC, Heales SJ. Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration. *Free Radic Biol Med* 2003; 34:287–303

Strong A, Smith S, Whittington D, Meldrum B, Parsons A, Krupinski J, Hunter J, Patel S, Robertson C. Factors influencing the frequency of fluorescence transients as markers of peri-infarct depolarisations in focal cerebral ischaemia. *Stroke* 2000; 31: 214-222

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: 290-293.

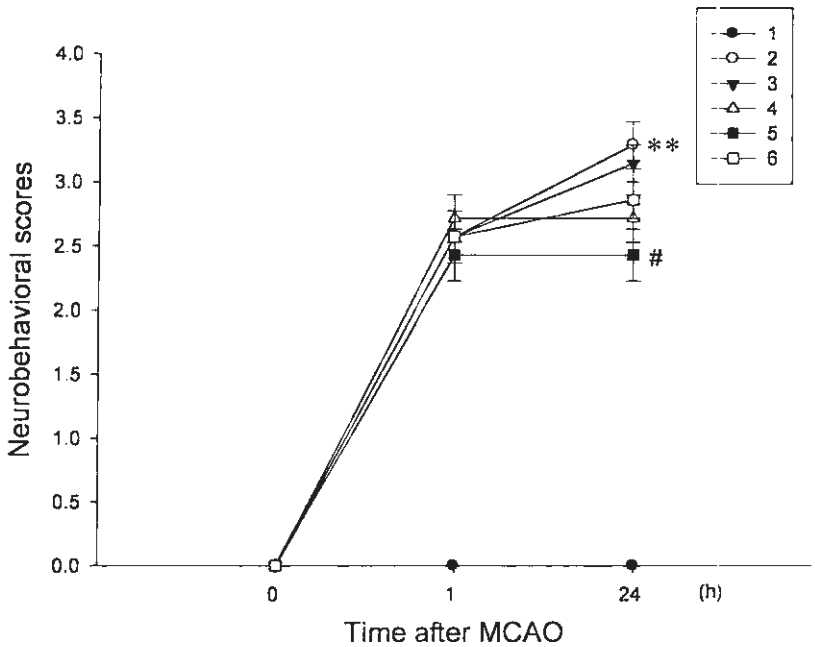
柒、圖、表



圖一、rt-PA併用血府逐瘀湯對MCAO手術造成大鼠腦梗塞的保護效果

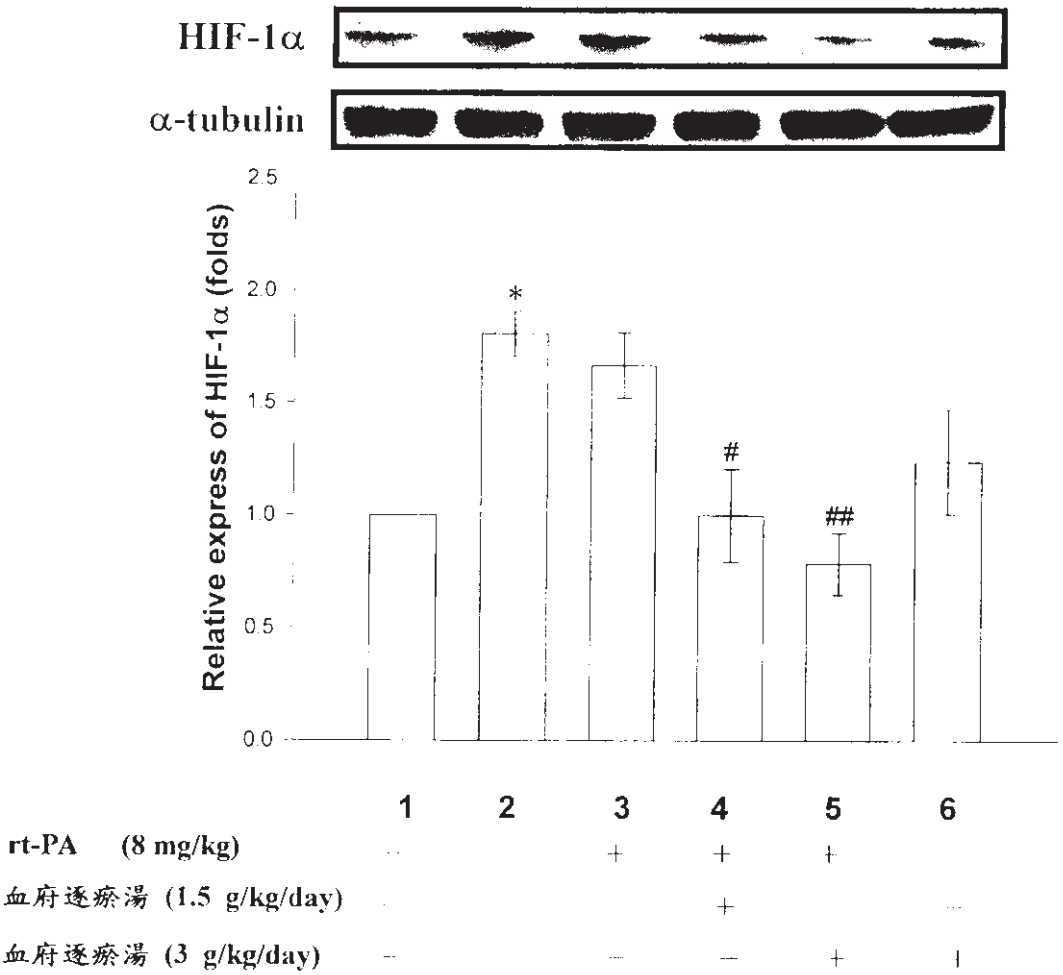
A. MCAO手術後24小時將大鼠大腦取出並加以切片染色，以觀察其腦部傷害面積，實驗分組共分為六組：(lane 1)未進行手術控制組 (sham group)、(lane 2)預先餵食等量生理食鹽水兩周後進行手術、(lane 3)手術後單獨給予rt-PA (8 mg/kg) 組、(lane 4) 預先餵食低劑量血府逐瘀湯 (1.5 g/kg/day)兩周後，進行手術，術後給予rt-PA (8 mg/kg)組、(lane 5)預先餵食高劑量血府逐瘀湯(3 g/kg/day)兩周後進行手術，術後給予rt-PA (8 mg/kg)組、(lane 6)預先單獨餵食血府逐瘀湯(3 g/kg/day) 兩周後進行手術控制組。實驗動物數量每組各為五隻。

B. 腦部傷害面積統計圖。溶劑控制組(lane 2)相對於未進行手術控制組(lane 1)具有統計上的差異($^{***}P<0.001$)；手術後單獨給予rt-PA (8 mg/kg) (lane 3)、預先單獨餵食血府逐瘀湯 (3 g/kg/day)組 (lane 6)、併用血府逐瘀湯(1.5或 3 g/kg/day)及 rt-PA (8 mg/kg)組 (lanes 4和5)，相對於溶劑控制組(lane 2)皆具有統計上的差異($^{##}P<0.01$ and $^{###}P<0.001$)。



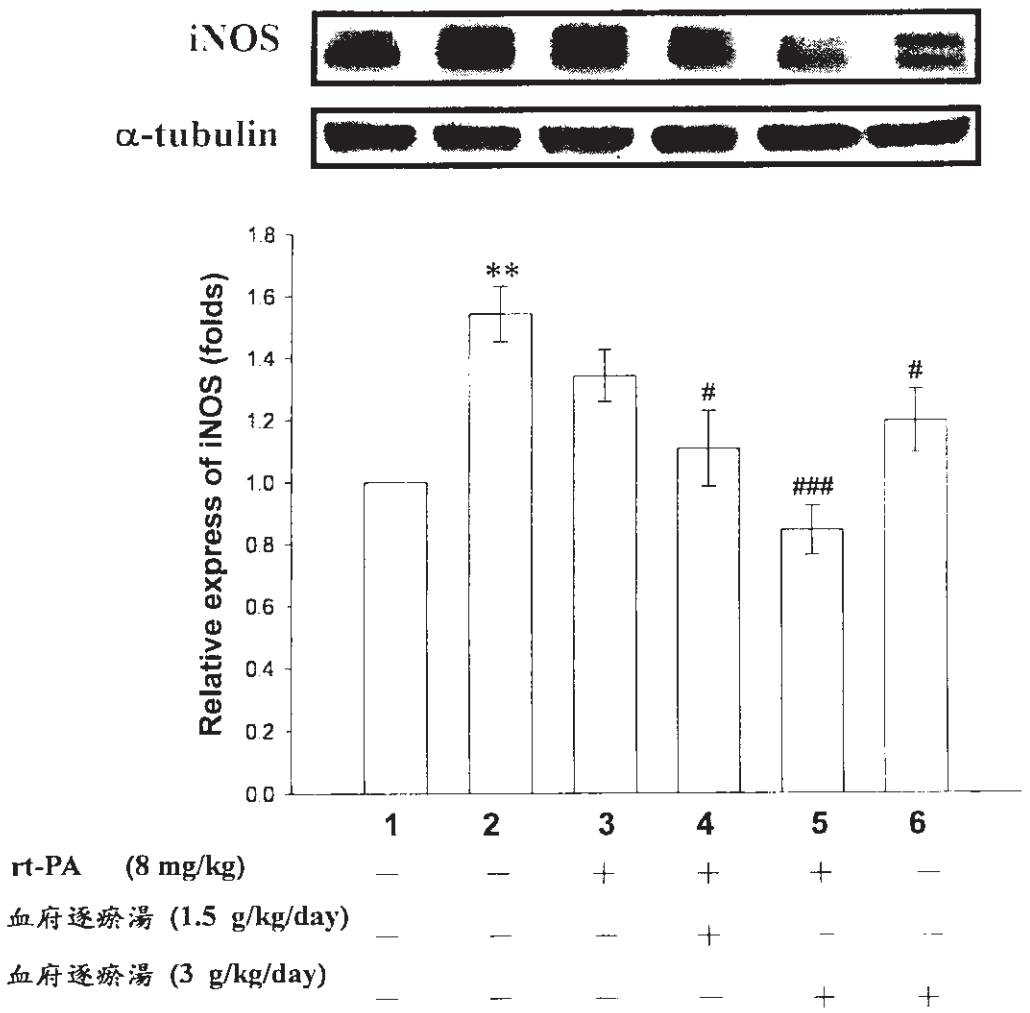
圖二、rt-PA 併用血府逐瘀湯對 MCAO 手術造成大鼠腦梗塞後的神經缺陷等級

MCAO手術後大鼠進行神經行為缺陷測試，分級方式如實驗方法中所敘述。實驗分組共分為六組：(line ●)未進行手術控制組 (sham group)、(line ○)預先餵食等量生理食鹽水兩周後進行手術、(line ▼)手術後單獨給予rt-PA (8 mg/kg)組、(line △) 預先餵食低劑量血府逐瘀湯 (1.5 g/kg/day)兩周後，進行手術，術後給予rt-PA (8 mg/kg)組、(line ■)預先餵食高劑量血府逐瘀湯(3 g/kg/day) 兩周後進行手術，術後給予rt-PA (8 mg/kg)組、(line □)預先單獨餵食血府逐瘀湯(3 g/kg/day) 兩周後進行手術控制組。實驗動物數量每組各為七隻。溶劑控制組(line ○)相對於未進行手術控制組(line ●)具有統計上差異($^{**}P<0.01$)；併用血府逐瘀湯(3 g/kg/day)及rt-PA (8 mg/kg)組(line ■)，相對於溶劑控制組(line ○)具有統計上的差異($^{\#}P<0.05$)



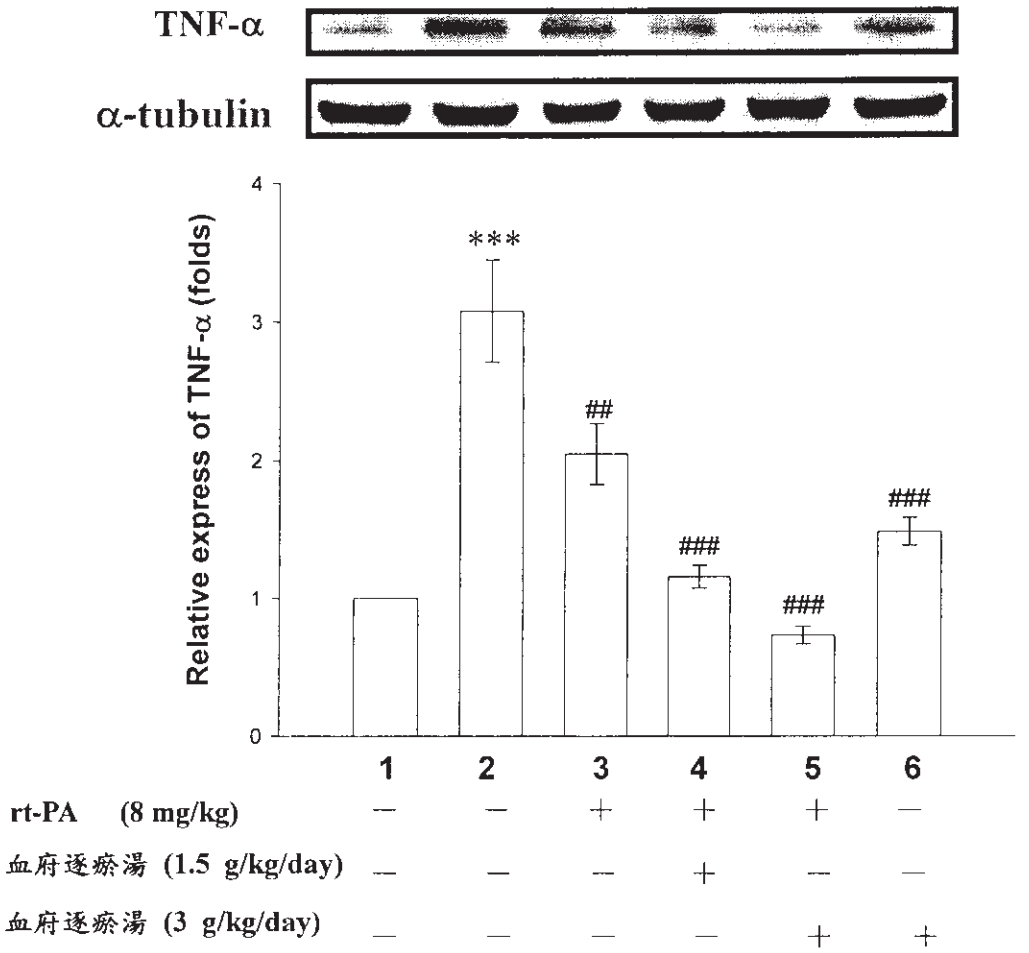
圖三、rt-PA併用血府逐瘀湯對MCAO手術誘發HIF-1α表現的抑制效果

將不同實驗組之大鼠腦部組織加入細胞分解液研磨並離心，將上清液中所獲取之蛋白質利用西方墨點法加以分析。實驗分組共分為六組：(lane 1)未進行手術控制組 (sham group)、(lane 2)預先餵食等量生理食鹽水兩周後進行手術、(lane 3)手術後單獨給予rt-PA (8 mg/kg) 組、(lane 4) 預先餵食低劑量血府逐瘀湯 (1.5 g/kg/day)兩周後，進行手術，術後給予rt-PA (8 mg/kg)組、(lane 5)預先餵食高劑量血府逐瘀湯(3 g/kg/day) 兩周後進行手術，術後給予rt-PA (8 mg/kg)組、(lane 6)預先單獨餵食血府逐瘀湯 (3 g/kg/day) 兩周後進行手術控制組。溶劑控制組(lane 2)相對於未進行手術控制組(lane 1)具有統計上差異($^{*}P<0.05$)；併用血府逐瘀湯(1.5或 3 g/kg/day)及rt-PA (8 mg/kg)組(lanes 4和5)，相對於溶劑控制組(lane 2)具有統計上的差異($^{\#}P<0.05$)；($^{\#\#}P<0.01$)。實驗N值為三次。



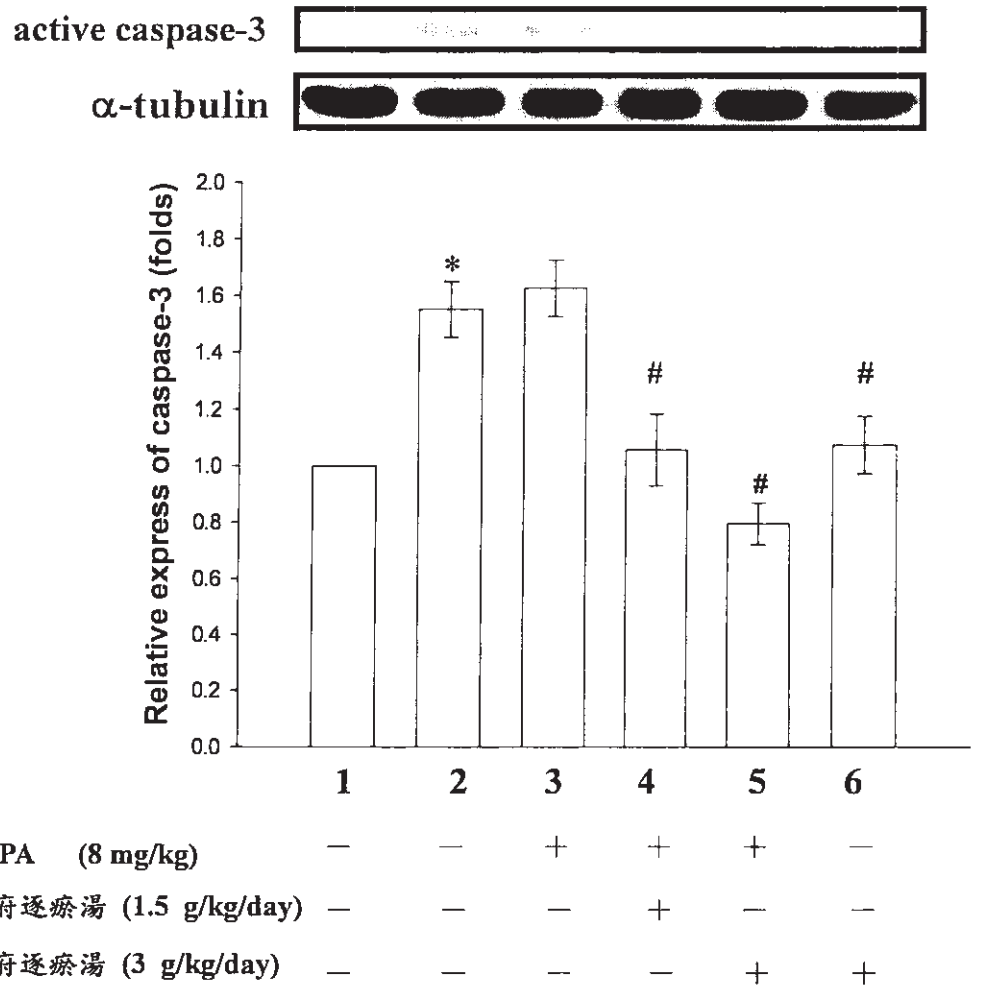
圖四、rt-PA併用血府逐瘀湯對MCAO手術誘發iNOS表現的抑制效果

將不同實驗組之大鼠腦部組織加入細胞分解液研磨並離心，將上清液中所獲取之蛋白質利用西方墨點法加以分析。實驗分組共分為六組：(lane 1)未進行手術控制組 (sham group)、(lane 2)預先餵食等量生理食鹽水兩周後進行手術、(lane 3)手術後單獨給予rt-PA (8 mg/kg) 組、(lane 4) 預先餵食低劑量血府逐瘀湯 (1.5 g/kg/day)兩周後，進行手術，術後給予rt-PA (8 mg/kg)組、(lane 5)預先餵食高劑量血府逐瘀湯(3 g/kg/day) 兩周後進行手術，術後給予rt-PA (8 mg/kg)組、(lane 6)預先單獨餵食血府逐瘀湯 (3 g/kg/day) 兩周後進行手術控制組。溶劑控制組(lane 2)相對於未進行手術控制組(lane 1)具有統計上差異($^{**}P < 0.01$)；單獨餵食血府逐瘀湯(3 g/kg/day)組(lane 6)、併用血府逐瘀湯(1.5或 3 g/kg/day)及rt-PA (8 mg/kg)組(lanes 4和5)，相對於溶劑控制組(lane 2)具有統計上的差異($^{\#}P < 0.05$)；($^{\#\#\#}P < 0.001$)。實驗N值為三次。



圖五、rt-PA併用血府逐瘀湯對MCAO手術誘發TNF-α表現的抑制效果

將不同實驗組之大鼠腦部組織加入細胞分解液研磨並離心，將上清液中所獲取之蛋白質利用西方墨點法加以分析。實驗分組共分為六組：(lane 1)未進行手術控制組 (sham group)、(lane 2)預先餵食等量生理食鹽水兩周後進行手術、(lane 3)手術後單獨給予rt-PA (8 mg/kg) 組、(lane 4) 預先餵食低劑量血府逐瘀湯 (1.5 g/kg/day)兩周後，進行手術，術後給予rt-PA (8 mg/kg)組、(lane 5)預先餵食高劑量血府逐瘀湯(3 g/kg/day) 兩周後進行手術，術後給予rt-PA (8 mg/kg)組、(lane 6)預先單獨餵食血府逐瘀湯 (3 g/kg/day) 兩周後進行手術控制組。溶劑控制組(lane 2)相對於未進行手術控制組(lane 1)具有統計上意義($^{***}P < 0.001$)；手術後單獨使用rt-PA(8 mg/kg)控制組(lane 3)、單獨餵食血府逐瘀湯(3 g/kg/day)組(lane 6)、併用血府逐瘀湯(1.5或3 g/kg/day)及rt-PA(8 mg/kg)組(lanes 4和5)，相對於溶劑控制組(lane 2)皆具有統計上的差異($^{##}P < 0.01$)；($^{###}P < 0.001$)。實驗N值為三次。



圖六、rt-PA併用血府逐瘀湯對MCAO手術誘發active caspase-3表現的抑制效果

將不同實驗組之大鼠腦部組織加入細胞分解液研磨並離心，將上清液中所獲取之蛋白質利用西方墨點法加以分析。實驗分組共分為六組：(lane 1)未進行手術控制組 (sham group)、(lane 2)預先餵食等量生理食鹽水兩周後進行手術、(lane 3)手術後單獨給予rt-PA (8 mg/kg) 組、(lane 4) 預先餵食低劑量血府逐瘀湯 (1.5 g/kg/day)兩周後，進行手術，術後給予rt-PA (8 mg/kg)組、(lane 5)預先餵食高劑量血府逐瘀湯(3 g/kg/day) 兩周後進行手術，術後給予rt-PA (8 mg/kg)組、(lane 6)預先單獨餵食血府逐瘀湯 (3 g/kg/day) 兩周後進行手術控制組。溶劑控制組(lane 2)相對於未進行手術控制組(lane 1)具有統計上意義($^{*}P<0.05$)；單獨餵食血府逐瘀湯(3 g/kg/day)組(lane 6)、併用血府逐瘀湯(1.5或3 g/kg/day)及rt-PA(8 mg/kg)組(lanes 4和5)，相對於溶劑控制組(lane 2)皆具有統計上的差異($^{\#}P<0.05$)。實驗N值為三次。