PG9601-0237 (36頁)

計畫編號：CCMP 96-RD-023

附件 1

行政院衛生署中醫藥委員會九十六年度
研究計畫成果報告

穿心蓮及血府逐瘀湯對缺血性-再灌流引起之腦梗塞之療效評估

Neuroprotective effects of andrographolide and SHIEE FUU JWU IU TANG in brain ischemia-reperfusion

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： 96 年 5 月 1 日至 97 年 4 月 30 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 ＊＊

附件 2

編號：CCMP 96-RD-023

穿心蓮及血府逐瘀湯對缺血性-再灌流引起之腦梗塞之療效評估

許準榕

台北醫學大學

摘要

腦血管梗塞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，相關的缺血性腦梗塞的病理機轉受到廣泛的研究，但由於其突發性的關係，關於腦血管梗塞治療藥物的發展，一直沒有很大的進展；而中草藥對於腦血管梗塞及其所導致腦部傷害的保護作用的相關研究，雖然有持續的進行，但其研究的完善性仍嫌不足，也較不易令人信服。

本計劃希望能建立一個完整的模式來評估藥物對腦血管梗塞的保護作用，從活體外實驗及活體試驗來清楚的得知藥物保護作用可能的機制，而經由對於腦梗塞過程的研究，我們發現血小板的凝集及嗜中性白血球的活性在腦血管梗塞所造成的腦部傷害中扮演了一個非常重要的部分，因此本次計畫決定經由這兩個活體外的實驗作為評估藥物初步的一個篩選及可能的機制的探討。

穿心蓮的活性成分 andrographolide，我們認為因為它抗自由基的能力、抗發炎性質及保護神經細胞的功能，在治療腦梗塞所造成的腦部傷害上，或許有很好的效果，只可惜目前對於 andrographolide 在此方面的研究並不多，且對於 andrographolide 如何抑制血小板凝集反應的作用機轉及 andrographolide 對腦部傷害直接的保護作用沒有相關的研究；此外，在中藥的臨床應用上一像是以複方為主，故本次計劃亦會探討中醫藥傳統方劑血府逐瘀湯對腦部傷害的保護作用，因此，本計劃擬對穿心蓮的活性生物鹼 andrographolide 及中醫藥傳統方劑血府逐瘀湯對缺血性腦梗塞所造成的腦部傷害的保護作用，同時從活體外實驗及活體內實驗，來評估它對腦部的保護作用及其可能的作用機制，以期能有一完整的研究及評估。

實驗結果發現，事先給予大鼠穿心蓮活性成分 andrographolide 30 mg/kg 可有效的改善缺血性再灌流手術引起腦血管梗塞所造成的腦部傷害，而連續餵食血府逐瘀湯 980 mg/kg 兩個星期亦可有效減少手術造成的腦部傷害，且 andrographolide 的保護作用可能經由抑制嗜中性白血球的活化及血小板凝集而來；在 andrographolide 影響血小板凝集反應的分子機轉探討中發現，給予不同濃度的 andrographolide (35, 75 μM)可濃度相關性的抑制 collagen 引發的血小板凝集反應及血小板鈣離子的釋出、PKC 的活化和 TXA2 的生成，且抑制血小板自由基的釋放，並會經由 cGMP 及 cAMP 引發 VASP 的磷酸化增加。

關鍵詞： 缺血性腦血管梗塞、血小板凝集、嗜中性白血球活化、穿心蓮活性成分 andrographolide、血府逐瘀湯

CCMP 96-RD-023

附件 3

Neuroprotective effects of andrographolide and SHIEE FUU JWU IU TANG in brain ischemia-reperfusion

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. Researches of herbal medicines of the protective effects of ischemic stroke were ongoing but uncompleted.

This project wants to establish a complete model to estimate the protective effects of herbal medicines of ischemic stroke by *in vitro* and *in vivo* studies. Platelet aggregation and neutrophil activation play important roles in the pathology of ischemic stroke. This project will make an investigation of the protective effects of herbal medicines in the two important part of ischemic stroke by *in vitro* studies.

Andrographolide, an active compound of *Andrographis paniculata*, may have protective effects in ischemic stroke through its free radicals scavenging, anti-inflammation and neuroprotective properties. But the research of andrographolide on ischemic stroke is still absent. The mechanisms of andrographolide in anti-platelet aggregation and the neuroprotective effect are still unclear now. Besides, we also want to investigate the effects of the chinese traditional compound medicine-SHIEE FUU JWU IU TANG on ischemic stroke. This project will have a complete model to estimate the neuroprotective effects and the possible mechanisms of andrographolide by *in vivo* and *in vitro* studies.

The results show that pretreatment with andrographolide (30 mg/kg) could inhibit ischemia reperfusion induced brain injury, and feed of SHIEE FUU JWU IU TANG (980 mg/kg/day) for two weeks also has protective effect in brain injury. The protective effect of andrographolide in ischemic brain injury may through inhibition of neutrophil activation and platelet aggregation. Andrographolide (35, 75 μM) could inhibit collagen induced platelet aggregation activation accompanied by $[Ca^{2+}]i$ immobilization, protein kinase C (PKC) activation, thromboxane A2 (TxA2) formation and free radicals formation. Andrographolide markedly increased levels of NO/cyclic guanosine monophosphate (GMP) and cyclic adenosine monophosphate (AMP), and cyclic GMP and cyclic AMP induced vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation.

Key words: ischemic stroke, platelet aggregation, neutrophil activation, andrographolide, SHIEE FUU JWU IU TANG

附件 4

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, 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)，其中活化態的 neutrophil 亦會經由釋放自由基及誘導型一氧化氮合成酶的表現造成 NO 的上升(Lipton et al., 1999)，使神經細胞死亡造成了腦部的傷害；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。

穿心蓮 (Andrographis paniculata)具有解熱抗發炎的效果，在傳統中醫歷史中也廣被使用於治療發燒風寒、喉嚨發炎 (laryngitis)、下痢(diarrhea)和風濕性關節炎等疾病(Chang & But, 1987)。由研究結果顯示，由穿心蓮所抽取的活性生物鹼具有多重的藥理活性，如前述抗發炎外，亦具有抗病毒感染(Yao et al., 1992)及刺激體內免疫系統的活化(Puri et al., 1993)等功能。在其眾多活性生物鹼中，被認為最具活性且含量最多的當屬 andrographolide，其化學結構屬於 bicyclic diterpenoid lactone 類的化合物；由最近的研究顯示，andrographolide 對於敗血性休克所引起的血壓下降或者對 inducible NO synthase (iNOS)的合成，具有明顯的抑制活性(Chiou et al., 1998)；Amroyan et al. (1999)曾研究發現 andrographolide 具有抑制 PAF 所引起的血小板凝集反應，在極低的濃度下(5 μM) 就具有明顯的抑制活性，另外亦有研究發現，andrographolide 可抑制 reactive oxygen species (ROS)，如 hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion ($O_2^{\cdot}$)等含氧自由基的產生 (Shen et al., 2002)；而在 2004 年更發現 andrographolide 會經由抑制 microglia 的活性而有保護神經細胞的功能，也會經由活化 PI3K/AKT 路徑來抑制內皮細胞的凋亡(Wang et al., 2004, Chen et al., 2004)，最近的研究也深入的瞭解到 andrographolide 抑制式中性白血球釋放發炎因子可能是經由對轉錄因子的干擾 (Hidalgo et al., 2005)。

本實驗是在之前已建立評估中草藥預防中風之動物模式且已刊載在行政院衛生署中醫藥年報 (許準榕, 民九十四)，此次計劃希望能建立一個完整的模式來評估藥物對腦血管梗塞的保護作用，從活體外實驗及活體試驗來清楚的得知藥物保護作用可能的機制，而經由對於腦梗塞過程的研究，我們發現血小板的凝集及嗜中性白血球的活性在腦血管梗塞所造成的腦部傷害中扮演了一個非常重

要的部分，因此本次計畫決定經由這兩個活體外的實驗作為評估藥物初步的一個篩選及可能的機制的探討，而在活體實驗上更直接的去觀察藥物對腦血管梗塞造成的腦部傷害的保護作用。而此次計畫所選擇的藥物 andrographolide 近年來有眾多相關的研究被進行著，我們認為因為它抗自由基的能力、抗發炎性質及保護神經細胞的功能也抑制了 PAF 所引起的血小板凝集反應，在治療腦梗塞所造成的腦部傷害上，或許有很好的效果，而在我們最近初步的研究顯示，andrographolide (5-20 μM) 隨著濃度的增加而有效的抑制各種活化劑 (如 ADP, collagen 及 U46619) 所引起之人類血小板凝集反應及 ATP 的釋放反應，只可惜目前對於 andrographolide 在此方面的研究並不多，且對於 andrographolide 如何抑制血小板凝集反應的作用機轉及 andrographolide 對腦部傷害直接的保護作用沒有相關的研究；因此，本計劃擬對穿心蓮的活性生物鹼 andrographolide 對缺血性腦梗塞所造成的腦部傷害的保護作用，從同時活體外實驗及活體內實驗，來評估它對腦部的保護作用及其可能的作用機制，以期能有一完整的研究及評估，提供其臨床應用之參考依據，對中藥的推廣也有更大的作用。

貳、材料與方法

活體外實驗

1.探討 andrographolide 抗血小板凝集作用機轉探討之實驗方法

(1) 人類血小板懸浮液(platelet suspension; PS)的製備

將抗凝劑 Acid/Citrate/Dextrose (A.C.D.)與健康志願者之全血以 1:9 (v/v)的比例混合，在室溫下，立即以 120 g 離心 10 分鐘，取上層富含血小板血漿，加入 heparin (6.4 I.U/ml)、PGE_1 (0.5 μM) 混合後，於 37℃下 10 分鐘；再進一步用 500 g 離心 10 分鐘，除去上層血漿，下層即為血小板顆粒(platelet pellet)，用 5 ml 的 Tyrode 溶液，pH 7.3 [NaCl (11.9 mM), KCl (2.7 mM), $MgCl_2$ (2.1 mM), NaH_2PO_4 (0.4 mM), $NaHCO_3$ (11.9 mM)和 glucose (11.1 mM), BSA (3.5 mg/ml)]將血小板顆粒打散，使均勻分佈在 Tyrode 溶液中，apyrase (1 U/ml), PGE_1 (0.5 μM)和 heparin (6.4 I.U/ml)，於 37℃下，溫浴 30 分鐘，再以 500 g 離心 10 分鐘，除去上層液，再用 Tyrode 溶液將血小板顆粒打散，apyrase (1 U/ml)，於 37℃下溫浴 10 分鐘，接著以 500 g 離心 10 分鐘，清除上層液，最後用 Tyrode 溶液配製成血小板懸浮液，再以 Coulter counter (Model ZM)計數，使血小板懸浮液的濃度約為每毫升含

4.5×10^8 個血小板。此時，血小板懸浮液中鈣離子濃度調成 1 mM。

(2) 血小板凝集與 ATP 釋放反應的測定

以 Lumi-aggregometer (Payton, Canda)測之。將製備好的血小板 400 μl 加入經 silicone 包衣的小玻璃管中，並以小磁棒做每分鐘 1200 轉的攪拌。凝集程度的計算，係以 PRP 或 PS 的吸光度做為 0 %的血小板凝集，以 PPP 或 Tyrode 溶液的吸光度作做為 100 %的血小板凝集，整個凝集反應至少進行 6 分鐘。Andrographolide 抑制血小板凝集程度的表示法係在加入 andrographolide 後的凝集程度和未加入 andrographolide (對照組)的凝集程度的相對百分比。ATP 釋放反應的測定，是以 luciferase/luciferin 和 ATP 反應後所產生的螢光，來測定血小板釋放反應的大小，其程度以相對值表示。

(3) FITC-triflavin 與血小板上 glycoprotein IIb/IIIa complex 結合的測定

製備人類血小板懸浮液，並調整血小板數目為 4.5×10^8 platelets/ml，取 0.9 ml 的血小板懸浮液置入試管中，分別加入不同濃度的 andrographolide 或 Tyrode 溶液，使最後各管體積都調整為 1 ml，在 37℃下溫浴後，避光加入 FITC-triflavin (2 μg/ml)反應 2 分鐘，再加入 collagen (5 μg/ml)，8 分鐘後以 Flow Cytometer (Becton Dickinson, FACS-can Sys.)測定，且每次收集 50,000 個血小板分析。

(4) 血小板內鈣離子的測定

以 A.C.D.為抗凝劑與健康人血以 1:9 (v/v)之比例混合，在室溫下立即以 120 g 離心 10 分鐘，所得上層液，再以 500 g 離心 10 分鐘，而後，除去上清液，將下層的血小板以 Tyrode 溶液懸浮之，並加入 Fura 2-AM (5 μM), EDTA (2 mM)和 PGE_1 (0.5 μM)，於 37℃下避光溫浴 40 鐘後，再加入 apyrase (1 U/ml)，並一併溫浴 5 分鐘，再依照製備血小板懸浮液的方法製備懸浮液。其化學成份如下: NaCl (136.9 mM), KCl (2.7 mM), $MgCl_2$ (1.05 mM), NaH_2PO_4 (0.4 mM), $NaHCO_3$ (11.9 mM), glucose (11.1 mM), bovine serum albumin (3.5 mg/ml)，pH 調至 7.35。

經 Fura 2-AM 處理過之血小板懸浮液，在加入凝集劑後與鈣離子作用所產生的螢光以螢光分光儀(CAF-110 Intracellular Ion Analyzer, JASCO, Japan)記錄之 excitation wavelength (339 and 380 nm), emission wavelegth (505 nm)，然後利用 Grynkiewictz et al. (1985)之方法計算細胞內鈣離子濃度。

(5) [^{3}H]-Inositol monophate 生成的測定

將以 A.C.D (1:9 v/v)為抗凝劑的人類富含血小板血漿於室溫下離心 500 g 10

分鐘，除去上層液，將下層血小板顆粒懸浮於不含鈣離子及 BSA 的 Tyrode 溶液中，並外加 1 mM EDTA 及 75 μCi/ml 的[^{3}H] inositol。於 37℃下溫浴 2 小時，再以 500 g 離心 4 分鐘，所得的血小板顆粒用含 BSA (3.5 mg/ml)，不含 EDTA 的 Tyrode 溶液懸浮之，然後稀釋至所須的濃度(5×10^8/ml)。將 1 ml 的血小板懸浮液加入經 silicone 包衣的 3.5 ml 小玻璃管中，並以小磁棒作每分鐘 1200 轉的攪拌並維持在 37℃下，然後加入 5 mM LiCl 反應 2 分鐘， 接著加入 andrographolide 或者等量的 Tyrode 溶液(對照組)，在 37℃下反應，最後再加入血小板凝集劑 collagen (10 μg/ml)引發凝集反應，6 分鐘後加入等體積 10% (w/v)冰冷的 trichloroacetic acid (TCA)以中止反應，接著以 1,000 g 離心 4 分鐘，所得上清液 (1 ml)以乙醚(10 ml)抽取殘存的 TCA 三次，用 80℃的熱水浴將殘存的乙醚趕走，用 1 N NaOH 調整 pH 值至 7~8，最後用蒸餾水調整體積至 4 ml，然後取 3.5 ml 加入含 Dowex-1 之陰離子交換樹脂管柱中(50 %，w/v，1 ml)以下列沖流液分別沖流出[^{3}H]inositol, [^{3}H]glycerophosphoinositol, [^{3}H]IP_1，[^{3}H]IP_2和[^{3}H]IP_3。

(1) 15 ml　myoinositol (5 mM)
(2) 30 ml　sod. tetraborate (5 mM) / sod. formate (60 mM)
(3) 20 ml　$HCOON_4$ (0.2 M) / HCOOH (0.1 M)
(4) 20 ml　$HCOON_4$ (0.4 M) / HCOOH (0.1 M)
(5) 20 ml　$HCOON_4$ (1.0 M) / HCOOH (0.1 M)

沖流液分別以試管收集(每管 1 ml)加入 counting solution (atomlight) 後，以 Liquid Scintillation Counter (Beckman Model 2200)測定所含放射線的強度。由於 inositol bisphosphate (IP_2)及 inositol trisphosphate (IP_3) 的含量都很低。因此，結果以 inositol monophosphate (IP_1)當做一指標，代表全部 inositol phosphates 生成的量。

(6) 血小板細胞內 thromboxane B_2 的測定

人類血小板懸浮液(0.4 ml，4.5×10^8/ml)與 andrographolide 先混合反應後，加入 collagen (5 μg/ml)引發血小板活化，反應進行 6 分鐘後，加入 EDTA (2 mM)和 indomethacin (50 μM)以終上 thromboxane 的生合成，經由離心機 Sigma-201 M 在 14,000 r.p.m 下離心 3 分鐘，取出上清液。上清液中所含的 thromboxane B_2 的量利用 thromboxane B_2 EIA Kit 測定之。

(7) 蛋白質磷酸化(protein phosphorylation)的測定

將人血與抗凝劑(A.C.D.)以 9 : 1 (v/v)混合，取得 PRP 再以 32,000 r.p.m.離心 10 分鐘，把下層血小板顆粒懸浮於含 NaCl (140 mM), Tris-HCl (15 mM)及 glucose

(5.5 mM)的 Tris-saline 緩衝液中(pH = 7.4)，調整其血小板數目為 $2x10^9$ platelets/ml 後，加入 2 mM EDTA 及 0.5 mCi/ml 的 phosphorus-32 於 37℃下溫浴 60 分鐘，然後以 Tris-saline 緩衝液沖洗 2 次即獲得已標定上 phosphorus-32 的血小板。

將血小板懸浮液在 37℃下與待測物反應，溫浴時間依實驗設計而定，而後加入 0.1 μM PDBu 反應 20 分鐘，加入 2 倍的 Laemmli sample buffer [β-mercaptoethanol (5 %), bromophenol blue (0.001 %), Tris (0.0625 M), SDS (2 %), glycerol (10 %); pH 6.8]於 95 ℃加熱器中加熱 5 分鐘，冷卻取反應物 10 μl 進行電泳實驗。

將 12.5 % (w/v) polyacrylamide gel 做成 slab gels (含 0.1 % SDS)，在置入待測物後，以固定電壓 250 伏特進行電泳反應。電泳完成後，以 0.1 % Coomassie Brilliant Blue 染液(0.1 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 % methanol, 10 % acetic acid)，浸泡 1 小時，再以洗液(50 % methanol, 10 % acetic acid)去除膠片之背景，以反應物所走之距離與已知分子量的標準品蛋白質(包括 97.4 kDa 的 phosphorylase b, 66.2 kDa 的 BSA, 45 kDa 的 ovalbumin, 31 kDa 的 carbonic anhydrase, 21.5 kDa 的 soybean trypsin inhibitor 及 14.4 kDa 的 lysozyme)比較後得知何段為 47 kDa。

將所得 SDS-PAGE 之膠片經乾燥後暴露在 Kodar X-Omat film 上，在-70℃下使其暴露 40 小時，以便進行 autoradiography；另外，以 image analyzer 來定量各段放射量的差異，以比較蛋白質磷酸化的程度。

(8) 血小板細胞內 cyclic AMP 與 cyclic GMP 含量的測定

將血小板懸浮液在 37℃，1200 r.p.m.攪拌溫浴 1 分鐘後，加入 IBMX (100 μM) 反應 2 分鐘，隨後加入 andrographolide、PGE_1 或 nitroglycerin 隨即加入 10 mM EDTA 後，立即煮沸 5 分鐘，再置入冰浴中冷卻，並以 EIA kits 分別測定 cyclic AMP 與 cyclic GMP 的含量。

(9) 血小板細胞內 NO 的含量測定

將不同濃度的 andrographolide 與血小板懸浮液反應後，立即以 14,000 r.p.m. 離心 8 分鐘，取上清液 100 μl 加入兩倍體積的無水酒精，均勻搖盪攪拌，接著在 4℃冷藏 30 分鐘，再離心 14,000 r.p.m. 8 分鐘，取上清液待測，此目的為除去待測物中的蛋白質。取 10 μl 打入反應槽中，以 VCl_3 當還原劑，將待測物中的 nitrate、nitrite 還原成 NO，利用氦氣將 NO 帶入一氧化氮分析儀(NO Chemiluminscence Analyzer, Model 280, Sievers Co. Ltd.)中與臭氧反應，並偵測反

應後釋出 600 nm 以上的螢光，並以 $NaNO_3$ 做 standard curve，藉此可推算待測物的濃度。

2. 探討 andrographolide 對嗜中性白血球活性影響及藥物清除自由基能力之實驗方法

(1) 嗜中性白血球活性測定

參照 Hsiao 等人(2001 年)的實驗方式加以修飾，利用葡萄聚糖及 Ficoll/Hypague 所造成的濃度梯度的離心方式將嗜中性白血球從健康的人血中純化出來，在這個實驗中過氧化物的釋出代表著嗜中性白血球的活化，利用 lucigenin-enhanced chemiluminescence (LCL)的方式來測定釋出的過氧化物的量，藉以代表著嗜中性白血球的活性。純化出來的嗜中性白血球置於 Hank's balanced salt solution (HBSS)中進行給藥，事先給予不同濃度的 andrographolide 後，加入 lucigenin 反應並在微盤冷光儀(Orion®, Berthold, Germany)中紀錄散發出來的基礎冷光一分鐘後，加入 fMLP (800 nM)或 PMA (320 nM)刺激並紀錄冷光值五分鐘，針對所得到的值扣除基礎值後，加以統計及比較，以得知 andrographolide 對嗜中性白血球活性的影響。

(2) 自由基測定方法

本實驗利用 Bruker EMX ESR spectrometer (電子順磁共振儀)來測定自由基的表現，測定時儀器的參數如下： 3456 ± 50 G; power of 0.635 mW; a modulation frequency of 100 kHz; a frequency of 9.663 GHz; a modulation amplitude of 1 G; receiver gain of 6.3×10^{-4}; a time constant of 81.92 ms; and a conversion time of 327.68 ms. 試管中自由基的產生來自於 H_2O_2/NaOH/DMSO 的反應(Yamaguchi F. et al., 1999)。在反應的過程中加入 andrographolide，在試管中直接測定 andrographolide 是否會直接的抑制自由基的產生。抑制比例的換算公式為：1 − [signal height (andrographolide)/ signal height (solvent control)].

活體內實驗

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度 37℃。

2. 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 %

3. 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) in0.3 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。

4.實驗設計：給藥劑量、時間、動物分組及評估

本實驗設計在體外實驗組中，分成 1) 未給藥控制組、2) 給予刺激劑組、3) 溶劑控制組、4) 給予低劑量 andrographolide 組及 5) 給予高劑量 andrographolide 組，給藥時間點為刺激劑給與前；而體內試驗之給藥時間點為 ischemia 後 15 分鐘予以腹腔注射給藥，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，而體內試驗的分組分為：1) 未進行手術控制組、2) 進行手術造成腦梗塞組、3) 溶劑控制組、4) 給予低劑量 andrographolide 組、5) 給予高劑量 andrographolide 組(高低劑量之判定根據之前有關 andrographolide 的研究加以判斷，體外試驗將在 5-30 μM、體內試驗將在 2-10 mg/kg，其間做藥物劑量的篩檢，設定進行實驗所需之高低劑量)，6) 給予穿心蓮萃取物組，7) 給予血府逐瘀湯組及 8) 給予西藥 aspirin 組進行對照

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 andrographolide 組之間的差異，活體外實驗以 Student's t-test 做統計分析，活體內實驗的統計則以 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，證明了此一動物實驗模式確為可行。事先給予進行 MCAO 手術的大鼠 andrographolide (30 mg/kg)，進行腦部切片並加以染色後發現，給予穿心蓮內酯 andrographolide 能有效的減少腦部傷害的區域(Fig. 1)，而事先餵食傳統方劑血府逐瘀湯(980 mg/kg/day)兩個星期的大鼠，與對照組相較亦有明顯的腦部保護作用(Fig. 2)。

接下來的研究發現穿心蓮內酯 andrographolide 對腦部保護作用的可能機轉，可能經由抑制嗜中性白血球的活化(Fig. 3)及抑制血小板凝集反應的作用(Fig. 5)而來，但對脂質過氧化並無明顯的影響(Fig. 4)；而從穿心蓮內酯之前的研究論文對照，其強效的抗發炎反應及其抗氧化的性質(Burgos et al., 2005; Mathad et al., 2006)，亦有可能是其腦部保護作用的主因。

穿心蓮內酯對血小板凝集反應的抑制作用在之前的研究已被發現(Thisoda et al., 2006)，但其分子機轉並無詳盡的研究，在我們的研究中發現，穿心蓮內酯(35, 75 μM)成濃度相關性的抑制 collagen 引發的血小板凝集反應，而在較高濃度下(200 μM)亦能抑制 thrombin 引發的血小板凝集(Fig. 6)，而 Figure 7 的結果我們發現穿心蓮內酯並不會經由與 glycoprotein IIb/IIIa 受體的結合來抑制血小板的凝集反應，血小板凝集的最終步驟就是 glycoprotein IIb/IIIa 受體的活化，也就是藥物只要阻斷這個受體，例如 triflavin，就能抑制血小板的凝集 (Sheu *et al.*, 1992)；然而，血小板之間的凝集是以 fibrinogen 為中間橋樑，fibrinogen 是一個二聚物(dimmer)，它含有 RGD (Arg-Gly-Asp)序列，它就是利用這個 RGD 序列結合到活化的 glycoprotein IIb/IIIa 受體，將血小板聯結在一起(Rooney *et al.*, 1998)。

血小板受到collagen活化後產生的凝集反應，一開始是經由活化PLCγ使細胞膜上的 phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate(PIP_2) 水解生成 inositol-1,4,5

trisphosphate (IP_3)與1,2-diacyglycerol (DAG). 1,2-diacyglycerol (DAG)會大量增加protein kinase C (PKC)對鈣離子的親和力，而使protein kinase C (PKC)容易活化導致47 kDa protein之磷酸化(Siess and Lapetina, 1989)，造成血小板形狀改變(shape change)，細胞骨架重新排列(cytoskeleton rearrangement)，促使granule釋出其內容物活化。其中鈣離子濃度的增加以及PKC的活化對於血小板的釋放反應有協同性的作用(Sano *et al.*, 1983)。在in vitro的環境下若直接活化PKC亦可發生血小板的凝集反應(Siess and Lapetina, 1989)。為了放大血小板之凝集程度，TxA_2的釋出扮演很重要的角色(Borsch-Haubold *et al.*, 1995)。TxA_2會釋出至細胞膜外與血小板上特定受體(thromboxane receptor ; TR)結合而活化guanine-nucleotide-binding-regulatory-protein (G-protein)，透過Gq活化PLCβ路徑；亦可透過Gi抑制AC(adenylate cyclase)，減少cAMP產生(Paul *et al.*, 1999)，藉此放大整個凝集反應的程度。TxA_2的釋出速率主要跟PLA_2的活性有關，PLA_2可將細胞膜上的磷脂質水解為AA (arachidonic acid)，接著藉由COX (cyclooxygenase)將AA環化合成為PGG_2/PGH_2，再經由thromboxane synthetase (TS)的作用形成thromboxane A_2 (TxA_2) (Borsch-Haubold *et al.*, 1995)。有文獻指出，血小板內PLA_2的活性可經由許多路徑來調控。collagen活化的過程中會使細胞內鈣離子大量增加，導致Ca^{2+}-dependent PLA_2 活性提高，且collagen也會刺激血小板產生H_2O_2及hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$)，接著活化PLA_2與COX使TxA_2生成，目的是放大血小板活化反應(Wachowicz *et al.*, 2002)。

實驗結果發現穿心蓮內酯能有效的抑制血小板活化造成的 TXA2 的生成(Table 1)及鈣離子的釋出(Fig. 8)，根據實驗結果，我們認為穿心蓮內酯抑制 TXA2 及鈣離子的釋出可能是因為其抑制 PKC 活化的作用(Fig. 9)，且穿心蓮內酯抑制 PKC 活化的作用，在其他細胞的研究中亦有同樣的作用機轉(Shen et al., 2002; Hsu et al., 2004)。

除了 PLCγ pathway 和 PLA_2 pathway 這兩條路徑外，cAMP 和 cGMP 在調控血小板的活性也扮演著重要負性作用的角色，cAMP 和 cGMP 的生成分別受到

adenylate cyclase 和 guanylate cyclase 調控，cAMP 和 cGMP 的分解受到不同型的 phosphodiesterases (PDEs)調控。當 cAMP 或 cGMP 含量增加會進一步的活化 cAMP-dependent protein kinase (CAK；PKA)或 cGMP-dependent protein kinase (CGK；PKG)，CAK 及 CGK 都可將 vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) 磷酸化(Butt *et al.*, 1994)；cAMP 已被指出能抑制血小板的凝集、吸附(adhesion) 和 granule release，同時，cAMP 及 cGMP 亦能促進血小板內鈣離子的排出 (Johansson and Haynes, 1992)。然而，CGK 抑制 thrombin 所誘導 PLCγ的活化 (Azula *et al.*, 1996)，進而減少內鈣離子的增加，減少血小板的活化，且 CAK 及 CGK 均能抑制 thrombin 所誘導 P-selectin 的表現(Schwarz *et al.*, 2000)，顯示 cAMP 與 cGMP 相關的機轉能夠調控血小板的活性。在我們的研究結果中亦發現，穿心蓮內酯會有效的促進 NO 的生成(Table 2)及經由 cAMP 和 cGMP 路徑造成 VASP 的磷酸化(Fig. 11, Fig. 12)，因此我們認為穿心蓮內酯針對 NO-cGMP-PKC-$[Ca^{2+}]i$ 及 cAMP, cGMP 引發 VASP phosphorylation 這兩條影響血小板活化路徑都有其作用。

在血小板凝集反應及血栓的形成過程中，血小板自由基的釋放也扮演了重要的角色(Sheu et al., 1997; Chou et al., 2005)，穿心蓮內酯明顯的抑制了血小板自由基的釋放(Fig. 10)，此一作用亦可能是穿心蓮內酯的血栓溶解作用機轉之一。

肆、結論與建議

實驗結果發現，事先給予大鼠穿心蓮活性成分 andrographolide 30 mg/kg 可有效的改善缺血性再灌流手術引起腦血管梗塞所造成的腦部傷害，而連續餵食血府逐瘀湯 980 mg/kg 兩個星期亦可有效減少手術造成的腦部傷害，且 andrographolide 的保護作用可能經由抑制嗜中性白血球的活化及血小板凝集而來；在 andrographolide 影響血小板凝集反應的分子機轉探討中發現，給予不同濃度的 andrographolide (35, 75 μM)可濃度相關性的抑制 collagen 引發的血小板凝集反應及血小板鈣離子的釋出、PKC 的活化和 TXA2 的生成，且抑制血小板自由基的釋放，並會經由 cGMP 及 cAMP 引發 VASP 的磷酸化增加來影響血小板凝集反應。

此一計畫的完成及論文的發表讓中草藥的能見度更高，在國際上能更為人接受，除了這些關於穿心蓮內酯的腦部保護作用及抑制血小板凝集的機轉探討外，接下來亦可以動物實驗來測試穿心蓮內酯的血栓溶解反應，讓整個研究更為完整。

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-96-RD-023)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: 1402-1409.

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

Amroyan E, Gabrielian E, Panossian A, Wikman G, Wagner H. Inhibitory effect of andrographolide from *Andrographis paniculata* on PAF-induced platelet aggregation. *Phytomedicine* 1999; 6: 27-31.

Aszodi A, Pfeifer A, Ahmad M, Glauner M, Zhou XH, Ny L, Andersson KE, Kegrel B, Offermanns S & Fassler R. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO Journal* 1999; 18: 37–48.

Azula FJ, Alzola ES, Conde M, Trueba M, Macarulla JM, Marino A. Thrombin-stimulated phospholipase C activity is inhibited without visible delay by a rapid increase in the cyclic GMP levels induced by sodium nitroprusside. *Mol Pharmacol* 1996; 50: 367-379.

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.

Borsch-Haubold AG, Kramer RM, Watson SP. Cytosolic phospholipase A2 is phosphorylated in collagen- and thrombin-stimulated human platelets independent of protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. *J Biol*

Chem 1995; 270: 25885-25892.

Butt E, Abel K, Krieger M, Palm D, Hoppe V, Hoppe J, Walter U. cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J Biol Chem* 1994; 269: 14509-14517.

Burgos RA, Seguel K, Perez M, Meneses A, Ortega M, Guarda MI, Loaiza A, Hancke JL. Andrographolide inhibits IFN-gamma and IL-2 cytokine production and protects against cell apoptosis. *Planta Med.* 2005; 71:429-434

Chang HM, But PPH. Pharmacology and Application of Chinese Material Medica. Vol I: World Scientific,Singapore . 1987; 918-928.

Chen JH, Hsiao G, Lee AR, Wu CC, Yen MH. Andrographolide suppresses endothelial cell apoptosis via activation of phosphatidyl inositol-3-kinase/Akt pathway. *Biochem. Pharmacol.* 2004; 67: 1337-1345

Chiou WF, Lin JJ, Chen CF. Andrographolide suppresses the expression of inducible nitric oxide synthase in macrophage and restores the vasoconstriction in rat aorta treated with lipopolysaccharide. *Br. J. Pharmacol.* 1998; 125: 237-234.

Chou DS, Hsiao G, Shen MY, Tsai YJ, Chen TF & Sheu, JR. ESR spin-trapping of a carbon-centered free radical from agonist-stimulated human platelets. *Free Radical Biology and Medicine* 2005; 39: 237–248.

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: 1301-1310.

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: 209-216.

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: 304-310.

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: 1276-1283.

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

Fuster V. Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation* 1994; 90: 2121-2146

Grynkiewicz G, Poenie M, Ysien RY. A new generation of Ca+2 induces with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 1985; 260: 3440-3450.

Hidalgo MA, Romero A, Figueroa J, Cortes P, Concha II, Hancke JL, Burgos RA. Andrographolide interferes with binding of nuclear factor-kappaB to DNA in HL-60-derived neutrophilic cells. *Br. J .Pharmacol.* 2005;144: 680-686.

Hsiao G, Teng CM, Sheu JR, Cheng YW, Lam KK, Lee YM, Wu TS, Yen MH. Cinnamophilin as a novel antiperoxidative cytoprotectant and free radical scavenger. *Biochim. Biophys. Acta.* 2001; 1525: 77-88.

Hsu JH, Liou SS, Yu BC, Cheng JT, Wu YC. Activation of alpha1A-adrenoceptor by andrographolide to increase glucose uptake in cultured myoblast C2C12 cells. *Planta Med.* 2004;70:1230-1233.

Johansson JS, Haynes DH. Cyclic GMP increases the rate of the calcium extrusion

pump in intact human platelets but has no direct effect on the dense tubular calcium accumulation system. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1105: 40-50.

Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* 1999;79:1431-568.

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

Mangin P, Yuan Y, Goncalves I, Eckly A, Freund M, Cazenave JP. Signaling role for phospholipase C gamma 2 in platelet glycoprotein Ib alpha calcium flux and cytoskeletal reorganization. Involvement of a pathway distinct from FcR gamma chain and Fc gamma RIIA. *J Biol Chem* 2003; 278: 32880–32891..

Mathad VT, Kumar S, Raj K. Oxidation studies on Andrographolide. Nat Prod Res. 2006; 20: 1053-1058.

McDonald LJ & Murad F. Nitric oxide and cyclic GMP signaling. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1996; 211: 1–6.

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: 202-211.

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: 1847-1854.

Okhawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay of lipid peroxides in animals tissue by thiobarbituraic acid reaction. *Anal. Biochem.* 1979; 95: 351-358.

Paul BZ, Jin J, Kunapuli SP. Molecular mechanism of thromboxane A(2)-induced platelet aggregation. Essential role for p2t(ac) and alpha(2a) receptors. *J Biol Chem* 1999; 274: 29108-29114.

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: 2291-2297.

Puri A, Saxena R, Saxena RP, Saxena KC, Srivastava V, Tandon JS. Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata*. *J. Natl. Prod.* 1993; 56: 995-999.

Rooney M M, Farrell DH, van Hemel BM, de Groot PG, Lord ST. The contribution of the three hypothesized integrin-binding sites in fibrinogen to platelet-mediated clot retraction. *Blood* 1998; 92: 2374-2381.

Sano K., Takai Y, Yamanishi J, Nishizuka Y. A role of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase in human platelet activation. Comparison of thrombin and collagen actions. *J Biol Chem* 1983; 258: 2010-2013.

Sala C, Roussignol G, Meldolesi J, Fagni L. Key role of the postsynaptic density scaffold proteins Shank and Homer in the functional architecture of Ca2+ homeostasis at dendritic spines in hippocampal neurons. *J Neurosci* 2005; 25: 4587–4592

Schwarz UR, Kobsar AL, Koksch M, Walter U, Eigenthaler M. Inhibition of agonist-induced p42 and p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation and CD40 ligand/P-selectin expression by cyclic nucleotide-regulated pathways in human platelets. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1399-1407.

Shen YC, Chen CF, Chiou WF. Andrographolide prevents oxygen radical production by human neutrophils: possible mechanism(s) involved in its anti-inflammatory effect. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 135: 399-406

Sheu JR, Teng CM, Huang TF. Triflavin, an RGD-containing antiplatelet peptide, binds to GpIIIa of ADP-stimulated platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189: 1236-1242.

Sheu JR, Yen MH, Hung WC, Lee YM, Su CH & Huang TF. Triflavin inhibits platelet-induced vasocontraction in deendothelialized aorta. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1997; 17: 3461–3468.

Siess W, Lapetina EG. Platelet aggregation induced by alpha 2-adrenoceptor and protein kinase C activation. A novel synergism. *Biochem J* 1989; 263: 377-385.

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.

Wachowicz B, Olas B, Zbikowska HM, Buczynski A. Generation of reactive oxygen species in blood platelets. *Platelet* 2002; 13: 175-182.

Wang T, Liu B, Zhang W, Wilson B, Hong JS. Andrographolide reduces inflammation-mediated dopaminergic neurodegeneration in mesencephalic neuron-glia cultures by inhibiting microglial activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004; 308: 975-983.

Yao XJ, Wainberg MA, Parniak MA. Mechanism of inhibition of HIV-1 infection *in vitro* by purified extract of *Prunella vulgaris*. *Virology* 1992; 187: 56-62.

Yamaguchi F, Yoshimura Y, Nakazawa H, Ariga T. Free radical-scavenging activity of grape seed extract and antioxidants by electron spin resonance spectrometry in an H_2O_2/NaOH/DMSO system. *J. Agric. Food. Chem.* 1999; 47: 2544-2548.

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

Table 1. 穿心蓮內酯對 collagen 刺激人類血小板釋放 thromboxane B2 的抑制效果

Effect of andrographolide on collagen-induced thromboxane B_2 formation in washed human platelets

	concentration	thromboxane B_2 (ng/ml)
resting		0.4 ± 0.2
collagen	1 μg/ml	17.3 ± 3.0 *
+ andrographolide	35 μM	9.0 ± 1.6 #
	75 μM	6.5 ± 1.6#

於人類血小板懸浮液中，在 37 ℃下事先給予不同濃度的穿心蓮內酯(35 and 75 μM)處理三分鐘，再加入 collagen (1 μg/ml) 刺激血小板釋放 thromboxane A_2 ，觀察穿心蓮內酯的作用。

Washed human platelet suspensions (3.6×10^8/ml) were preincubated with andrographolide (35 and 75 μM) for 3 min 37 ℃, then collagen (1 μg/ml) was added to trigger thromboxane A_2 formation. Data are presented as the means ± S.E.M. (n= 5). * $P < 0.05$ as compared with the resting group; # $P < 0.05$ as compared with the collagen group.

Table 2. 穿心蓮內酯對 collagen 刺激人類血小板釋放 nitrate 的影響結果

Effect of andrographolide and collagen on nitrate formation in washed human platelets

	concentration	nitrate (μM)
resting		0.3 ± 0.1
collagen	1 μg/ml	2.0 ± 0.5 *
andrographolide	35 μM	0.4 ± 0.1
	75 μM	0.6 ± 0.1 *

於人類血小板懸浮液中，在 37 ℃下事先給予不同濃度的穿心蓮內酯(35 and 75 μM)處理三分鐘，再加入 collagen (1 μg/ml) 刺激血小板釋放 nitrate ，觀察穿心蓮內酯的作用。

Washed human platelets suspensions (2.4×10^8/ml) were preincubated with andrographolide (35 and 75 μM) for 3 min at 37 ℃. Addition of collagen (1 μg/ml) to platelet suspensions served as positive control. Data are presented as the means ± S.E.M (n=5). $^*P < 0.05$ as compared with the resting group.

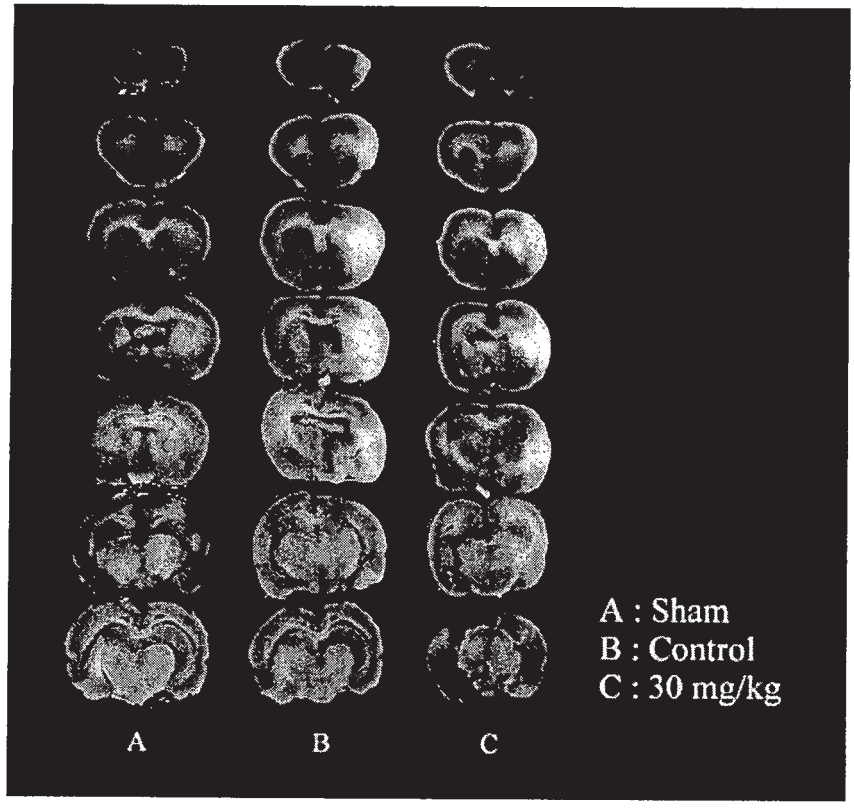

Figure 1. 穿心蓮內酯對MCAO手術造成大鼠腦梗塞的保護效果

Effect of andrographolide on MCAO-induced cerebral ischemia in rats.

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，實驗分組共分為三組：(A)未進行手術控制組，(B)溶媒控制組，(C)事先腹腔注射給予穿心蓮內酯(30 mg/kg)組。

Coronal sections of TTC-stained brains in 24 h after MCAO-reperfusion rats. Cerebral infarction in (A) sham-operated (sham, *n*=3) or MACO-reperfusion rats is from representative animals that received (B) solvent (solvent; cremophor: ethanol: normal saline 1:1:4, *n*=14) or (C) andrographolide (30 mg/kg, *n* =3) intraperitoneally.

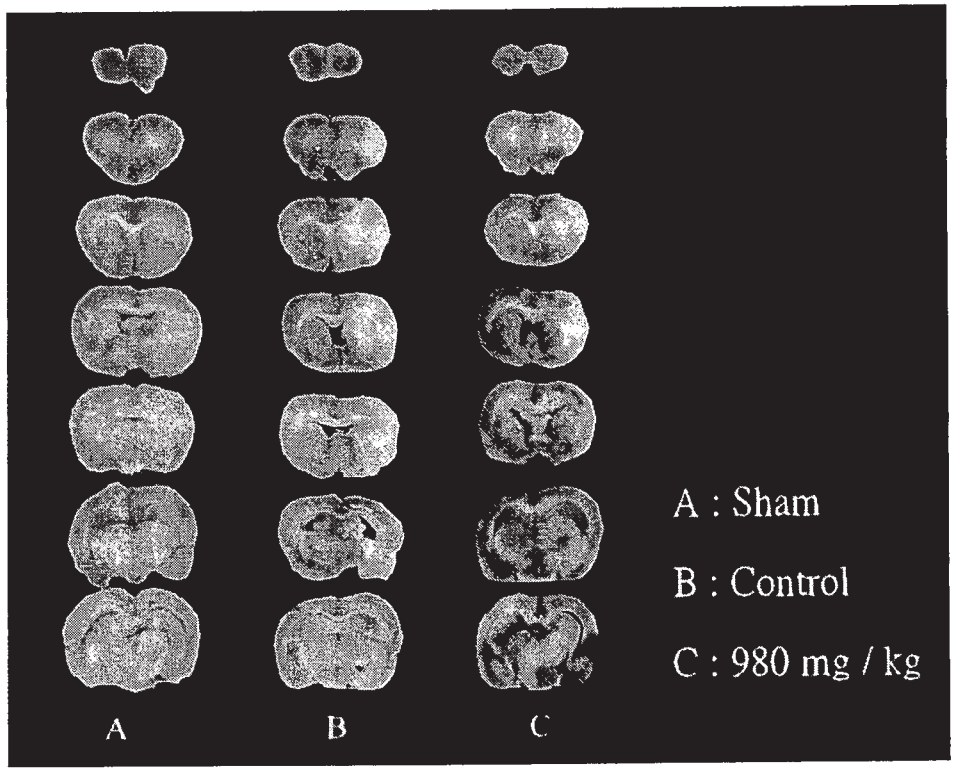

Figure 2. 血府逐瘀湯對MCAO手術造成大鼠腦梗塞的保護效果

Effect of SHIEE FUU JWU IU TANG on MCAO-induced cerebral ischemia in rats.

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，實驗分組共分為三組：(A)未進行手術控制組，(B)溶媒控制組，(C)手術前兩個禮拜每天口服給予血府逐瘀湯(980 mg/kg/day)組。

Coronal sections of TTC-stained brains in 24 h after MCAO-reperfusion rats. Cerebral infarction in (A) sham-operated (sham, n=3) or MCAO-reperfusion rats is from representative animals that received (B) solvent (solvent; normal saline) or (C) SHIEE FUU JWU IU TANG (980 mg/kg/day) oral administration.

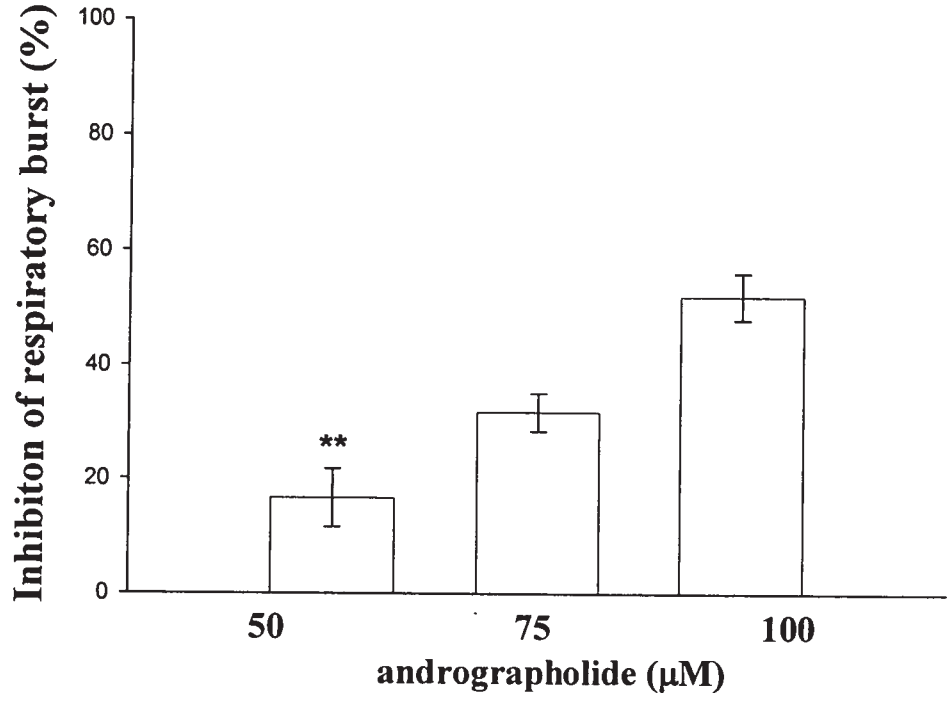

Figure 3. 穿心蓮內酯對人類嗜中性白血球活化反應的抑制效果

Effect of andrographolide on respiratory bursts in human neutrophils.

於嗜中性白血球中，事先給予溶媒(0.5% DMSO)及不同濃度的穿心蓮內酯(50, 75, and 100 μM)之後，再加入 fMLP (800 nM)去刺激嗜中性白血球的活化，以觀察穿心蓮內酯的作用。

Washed neutrophil suspensions (2×10^6 cells/ml) were preincubated with the solvent control (0.5% DMSO) or various concentrations of andrographolide (50, 75, and 100 μM) followed by the addition of fMLP (800 nM) to trigger neutrophil respiratory bursts. Data are presented as a percent inhibition of the solvent control (means ± S.E.M., n=4).

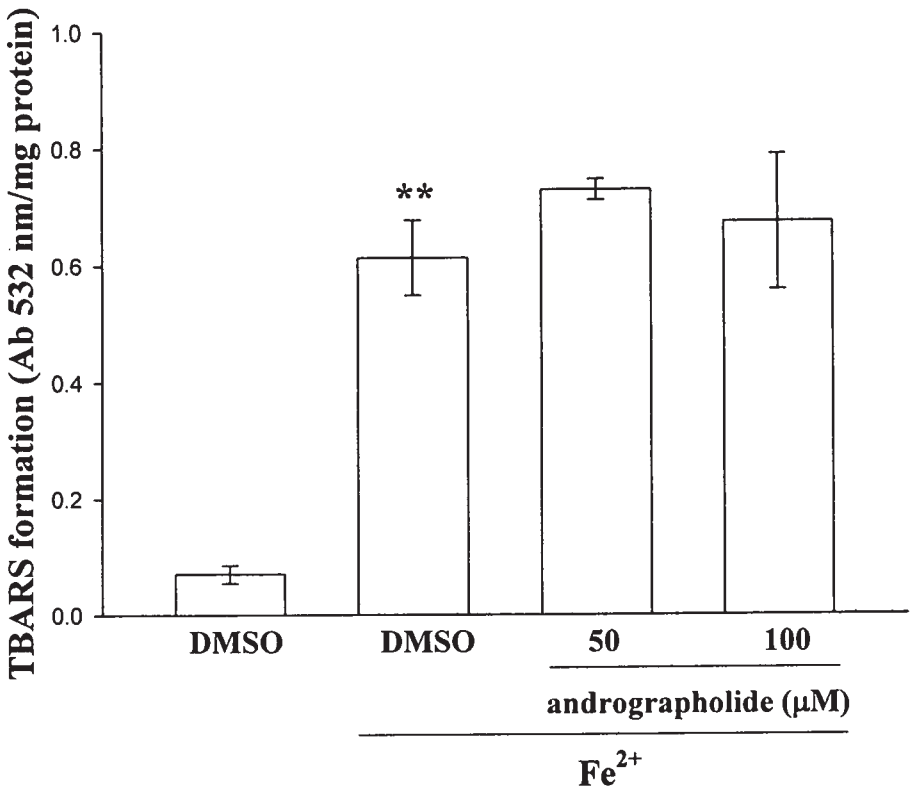

Figure 4. 穿心蓮內酯對脂質過氧化的影響結果

Effect of andrographolide on lipid peroxidation in rat brain homogenate.

於老鼠大腦均質化組織液中，事先給予溶媒(DMSO)及不同濃度的穿心蓮內酯(50 and 100 μM)，反應十分鐘後再加入200 μM Fe^{2+} 造成脂質過氧化，以觀察穿心蓮內酯的效果。

The brain homogenates were preincubated with solvent (DMSO) or various concentrations of andrographolide (50 and 100 μM) for 10 min followed by the addition of 200 μM Fe^{2+}. Results are presented as the absorbance at 532 nm/mg protein in brain homogenates. Data are presented as the means ± SEM (n=3). $^{**}P <$ 0.01 as compared with the DMSO group (resting). Andrographolide did not interfere with the thiobarbituric acid test, since the color formation was not changed if it was added after the incubation with thiobarbituric acid reagents.

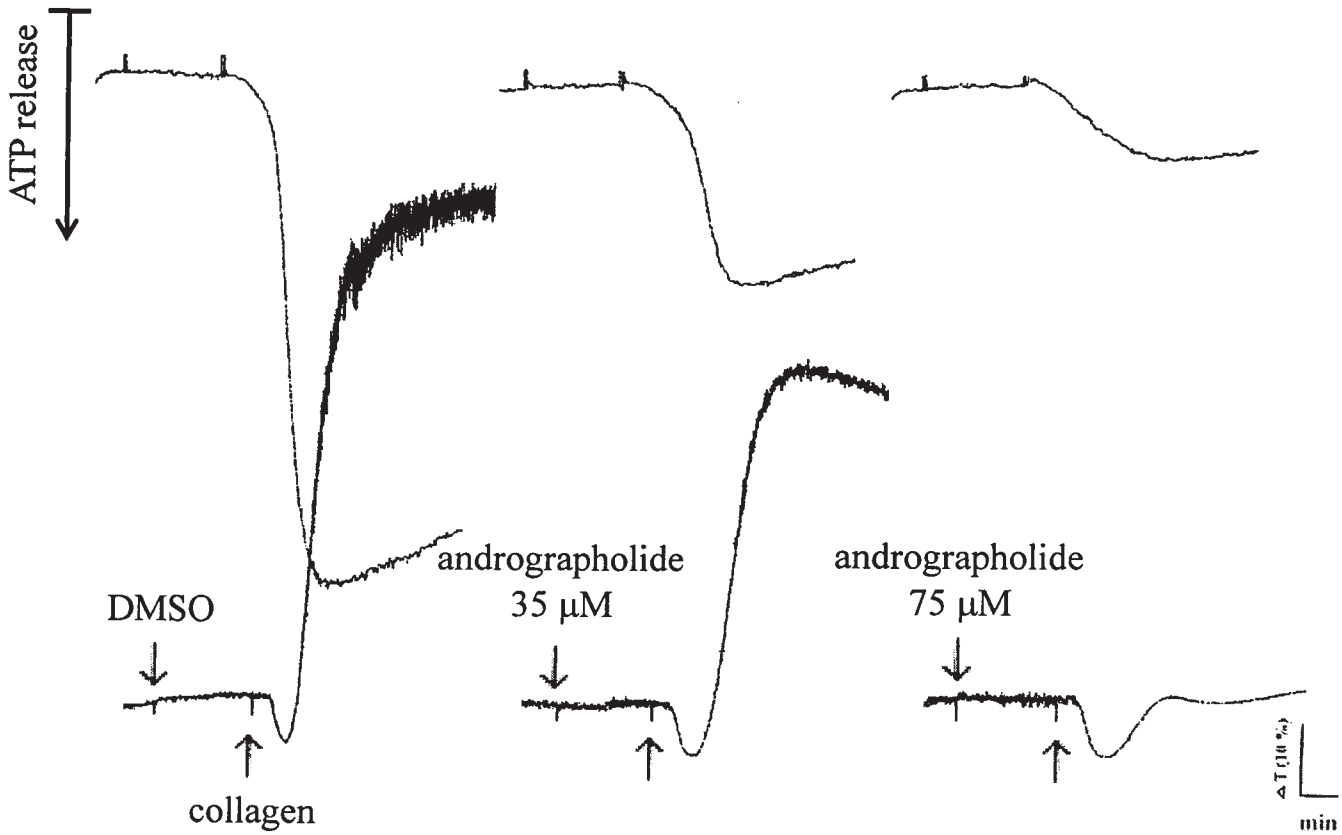

Figure 5. 穿心蓮內酯對collagen 刺激人類血小板凝集反應的抑制效果

Effect of andrographolide on collagen-induced aggregation in human platelet suspensions.

於人類血小板懸浮液中，事先給予不同濃度的穿心蓮內酯(35 and 75 μM)反應三分鐘後，再加入collagen (1 μg/ml)刺激血小板凝集及ATP的釋放，觀察穿心蓮內酯的抑制效果。

Platelets were preincubated with andrographolide (35 and 75 μM) and stirred for 3 min, then collagen (1 μg/ml) was added to trigger the platelet aggregation (lower tracing) and ATP release (upper tracing). Luciferin-luciferase (15 μl) was added 1 min before the agonist in order to measure the ATP release reaction. The profiles are representative examples of five similar experiments.

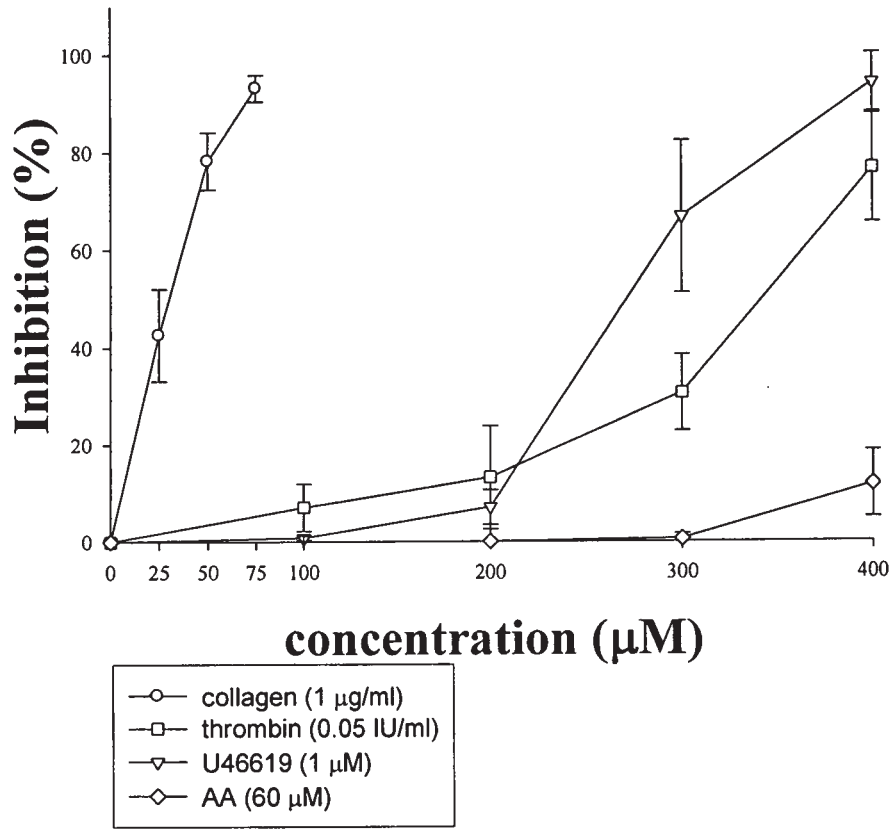

Figure 6. 穿心蓮內酯對不同刺激劑刺激血小板凝集反應的抑制效果
Concentration-inhibition curves of andrographolide on collagen (1 μg/ml, ○)-, U46619 (1 μM, ▽)-, thrombin (0.05 U/ml, □)-, or arachidonic acid (60 μM, ◇)-induced platelet aggregation in human platelet suspension.

於人類血小板懸浮液中，事先給予不同濃度的穿心蓮內酯 37 ℃下反應三分鐘後，再給予不同的刺激劑刺激血小板凝集，觀察穿心蓮內酯的抑制效果。

Human platelet suspensions were preincubated with various concentrations of andrographolide (25-400 μM) at 37 ℃ for 3 min, and agonists were then added to trigger platelet aggregation. Data are presented as percent inhibition of the control (means ± S.E.M., n=5).

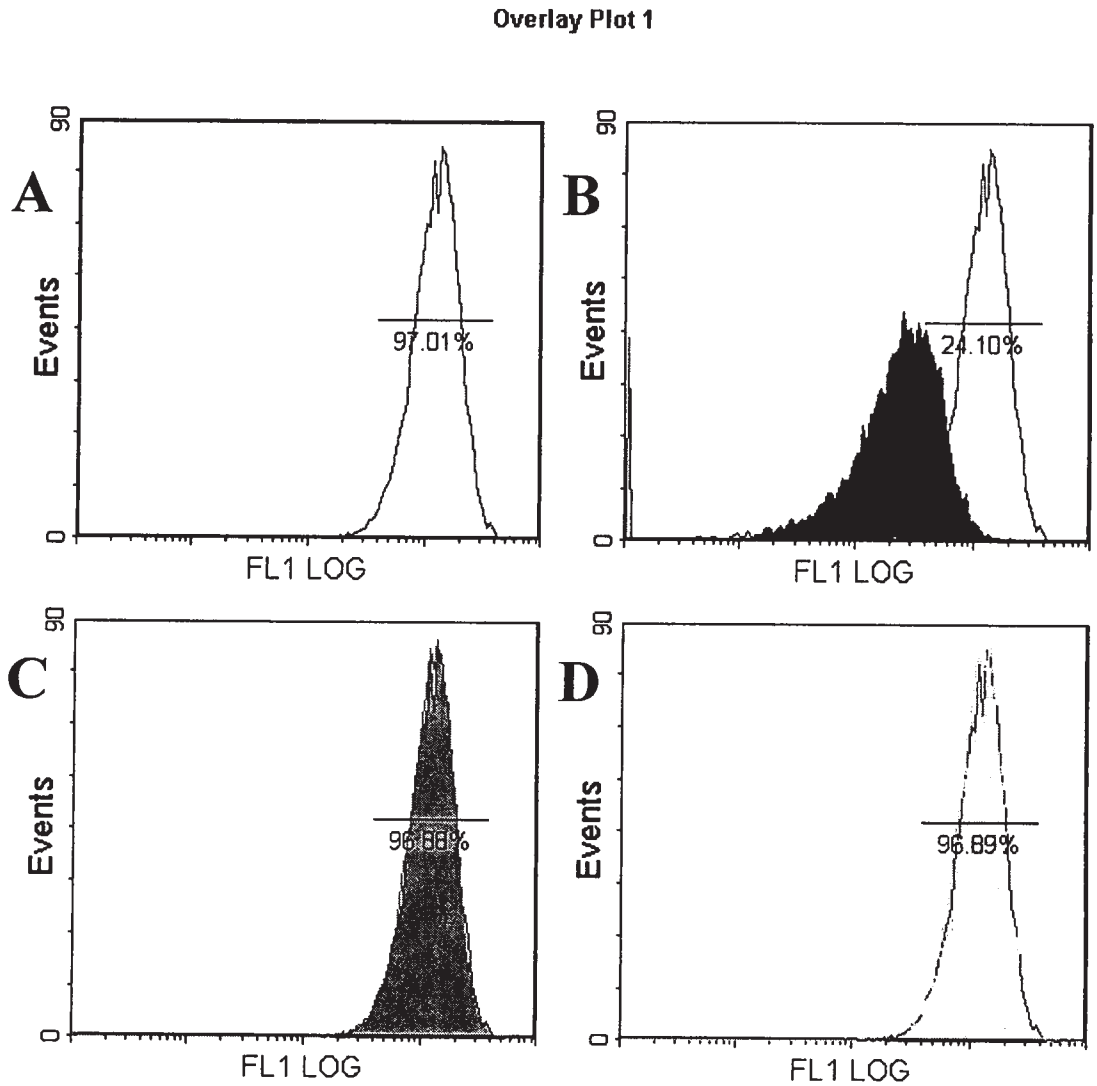

Figure 7. 利用流式細胞儀觀察穿心蓮內酯對 FITC-triflavin 連接到人類血小板是否有其抑制效果

Flow cytometric analysis of FITC-triflavin binding to human platelets in the absence or presence of andrographolide (35 μM and 75 μM).

(A)圖代表的是 FITC-triflavin (2 μg/ml) 連接上人類血小板的對照組，(B)圖代表的是事先給予 EDTA (5 mM) 可抑制其連接反應的對照組，(C)圖及(D)圖代表的是事先給予不同濃度的穿心蓮內酯對此一作用的影響。

(A)The solid line represents the fluorescence profiles of only FITC-triflavin (2 μg/ml) the absence of andrographolide as a positive control; (B) in the presence of EDTA (5 mM) as the negative control; or in the presence of andrographolide (C) 35 μM and (D) 75 μM. The profiles are representative examples of six similar experiments.

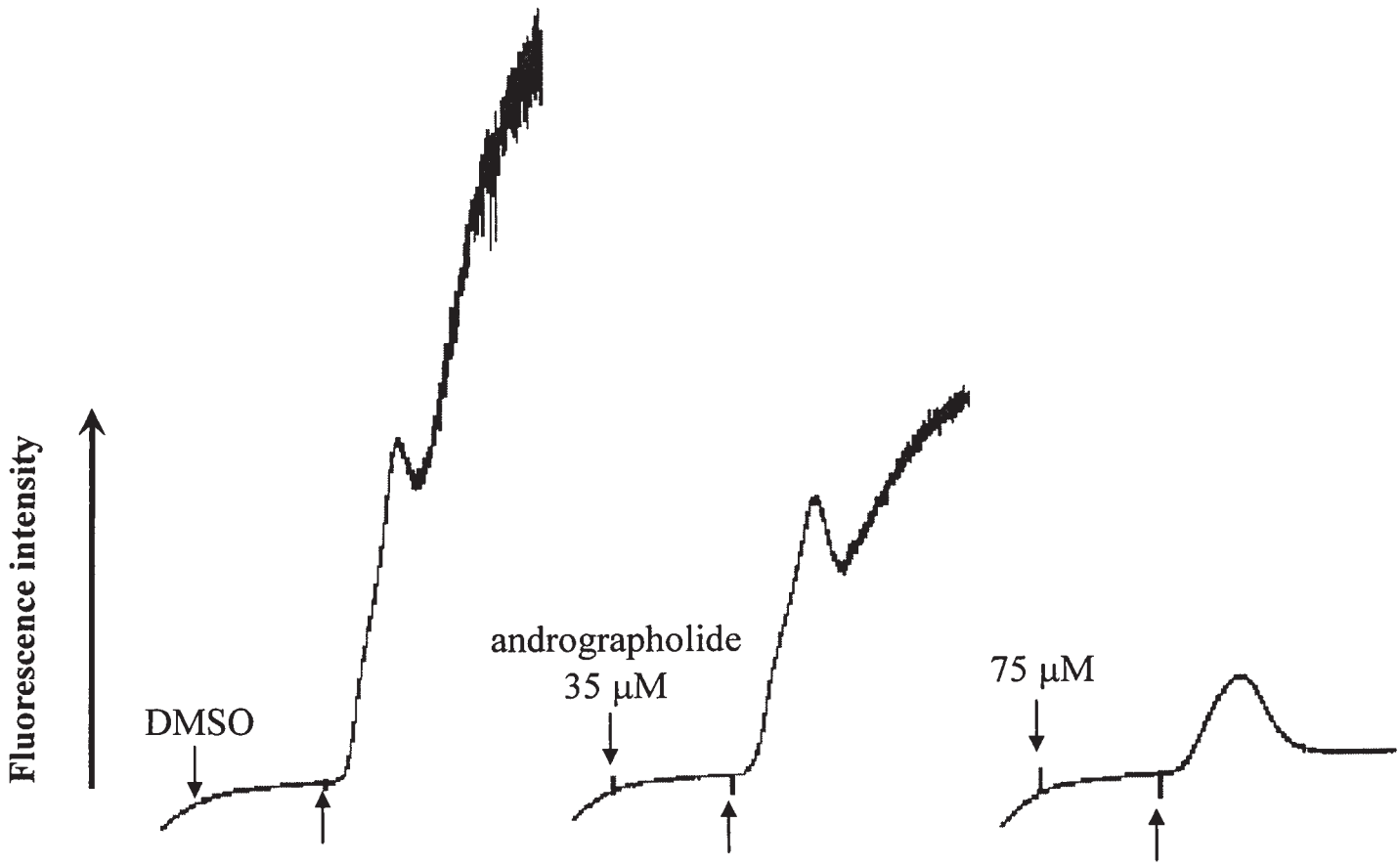

Figure 8. 穿心蓮內酯對 collagen 刺激人類血小板鈣離子釋放的抑制反應

Effect of andrographolide on collagen-induced intracellular Ca^{2+} mobilization of Fura 2-AM loaded human platelets.

於血小板懸浮液中，於 37 ℃下加入 Fura 2-AM (5 μM)反應一個小時，在給予不同濃度的穿心蓮內酯(35 and 75 μM)三分鐘後，加入 collagen (1 μg/ml) 刺激鈣離子的釋放，觀察穿心蓮內酯的抑制效果。

Platelet suspensions were incubated with Fura 2-AM (5 μM) at 37 ℃ for 60 min, followed by the addition of collagen (1 μg/ml) in the absence or presence of andrographolide (35 and 75 μM), which was added 3 min prior to the addition of collagen. The profiles are representative examples of five similar experiments.

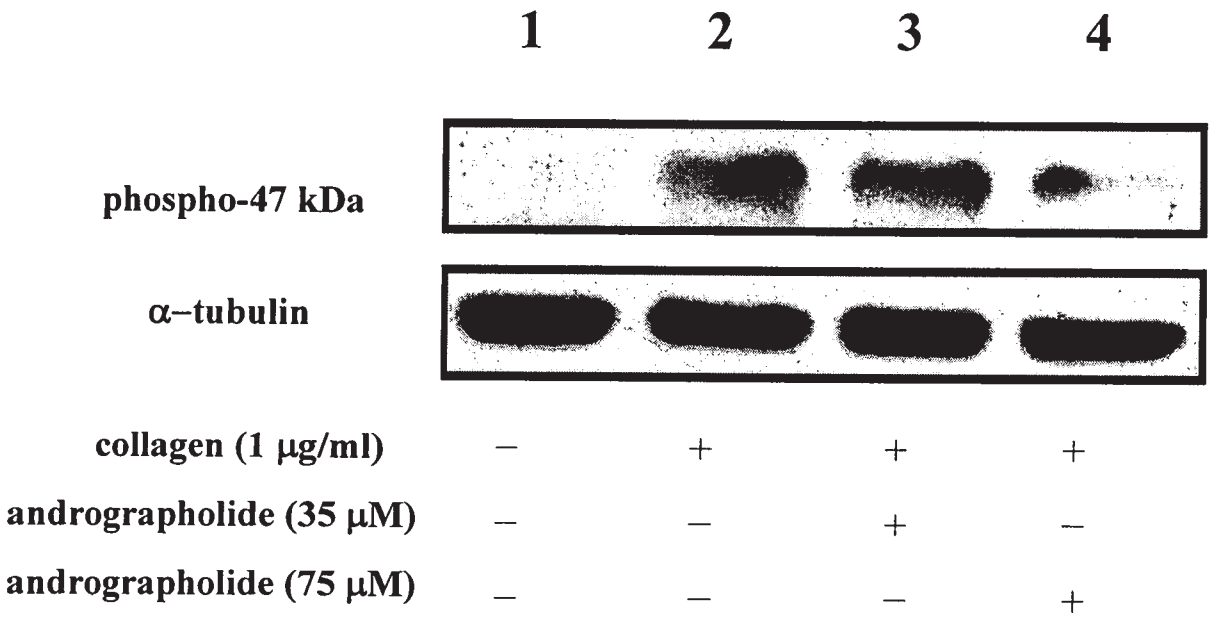

Figure 9. 穿心蓮內酯對collagen 刺激人類血小板p47蛋白質磷酸化的抑制效果
Effect of andrographolide on phosphorylation of a protein of *Mr* 47,000 (p47) in human platelets challenged with collagen.

於人類血小板懸浮液中，事先給予溶媒及不同濃度的穿心蓮內酯(35 and 75 μM)後，在加入collagen刺激PKC的活化，並進而造成p47的磷酸化，利用西方墨點法觀察穿心蓮內酯對p47的磷酸化的抑制效果。

Platelets were preincubated with Tyrode's solution only (lane 1), or platelets were preincubated with isovolumetric solvent control (0.5% DMSO, lane 2) or andrographolide (35 μM, lane 3 ; 75 μM, lane 4) followed by the addition of collagen (1 μg/ml) to trigger protein kinase C activation. The bar graph depicts the ratios of quantitative results obtained by scanning the anti-phospho-47 kD and anti-α-tubulin reactive bands and quantify optical density using Bio-1D version 99 image software. Data are presented as means ± S.E.M. (*n*=3).

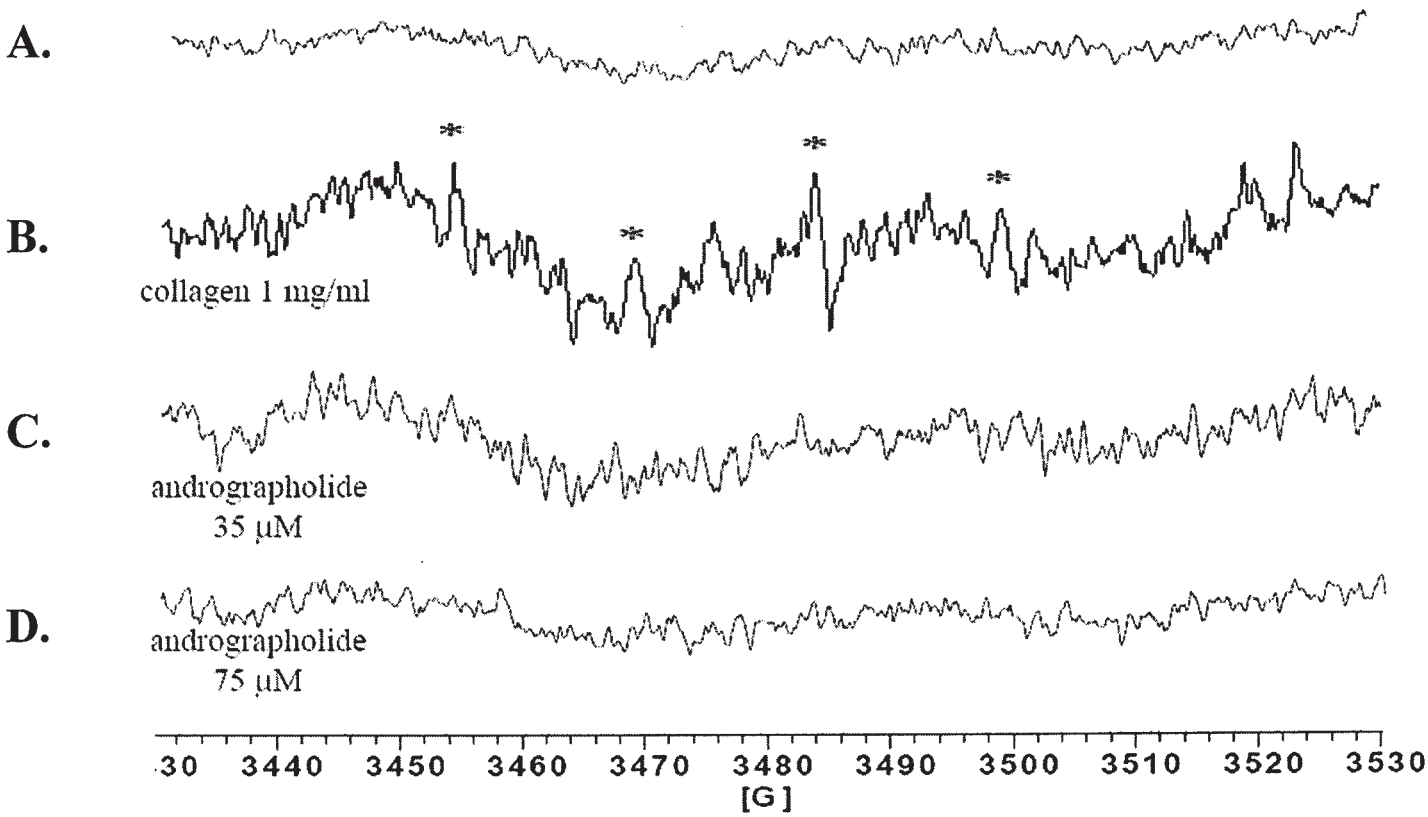

Figure 10. 利用ESR觀察穿心蓮內酯對collagen刺激血小板自由基產生的抑制效果

ESR spectra of the effect of andrographolide in hydroxyl radical formation in collagen-activated platelets.

(A)代表的是未加刺激劑的控制組，(B)代表的是加入溶媒的溶媒控制組，(C)及(D)代表的是事先給予不同濃度穿心蓮內酯(35 and 75 μM)的實驗對照組，經過處理後的血小板懸浮液再加入DMPO (100 mM)以進行ESR實驗，以觀察穿心蓮內酯對自由基產生的抑制效果。

(**A**) Resting platelet suspensions or platelet suspensions were preincubated with isovolumetric solvent control (0.5% DMSO) (**B**) or andrographolide at (**C**) 35 μM and (**D**) 75 μM for 3 min, and then collagen (1 μg/ml) was added to trigger platelet activation. The reaction was allowed to proceed for 5 min, followed by the addition of DMPO (100 mM) for ESR experiments. The spectrum is a representative example of three similar experiments.

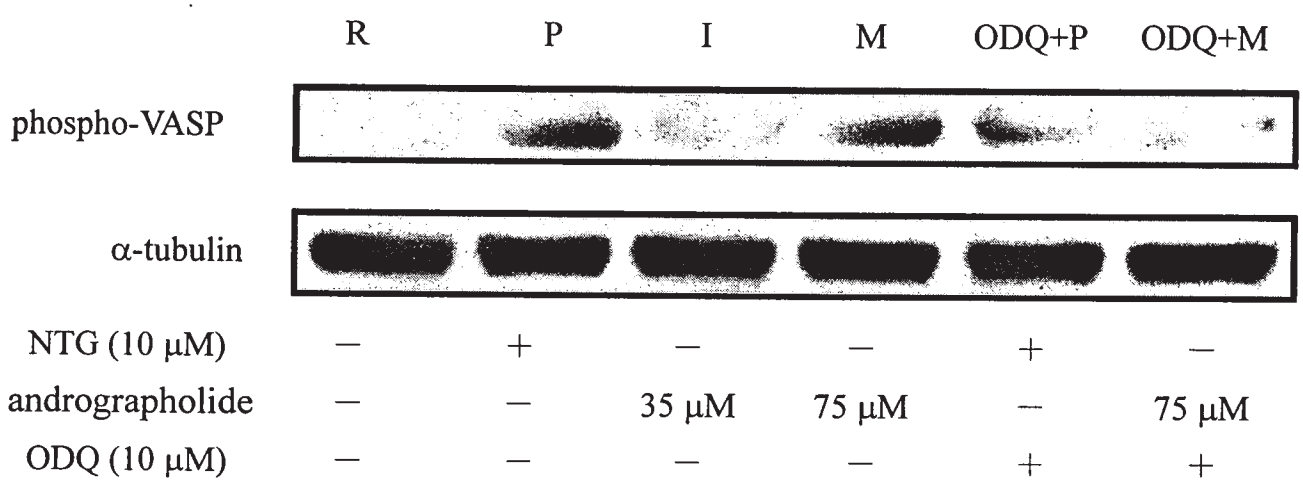

Figure 11. 於血小板懸浮液中，事先給予nitroglycerin (10 μM)及不同濃度的穿心蓮內酯(35 and 75 μM)後，並利用cGMP抑制劑ODQ (10 μM)的給予，以西方墨點法來證實穿心蓮內酯是否可經由cGMP的路徑來刺激VASP的磷酸化。

Platelets were incubated with nitroglycerin (10 μM) and andrographolide (35 and 75 μM) in the absence or presence of ODQ (10 μM) and were solubilized directly in SDS-PAGE sample buffer. Phosphorylation of VASP at Ser^{157} was detected by immunoblotting with a monoclonal antibody specifically recognizing Ser^{157}-phosphorylated -VASP.

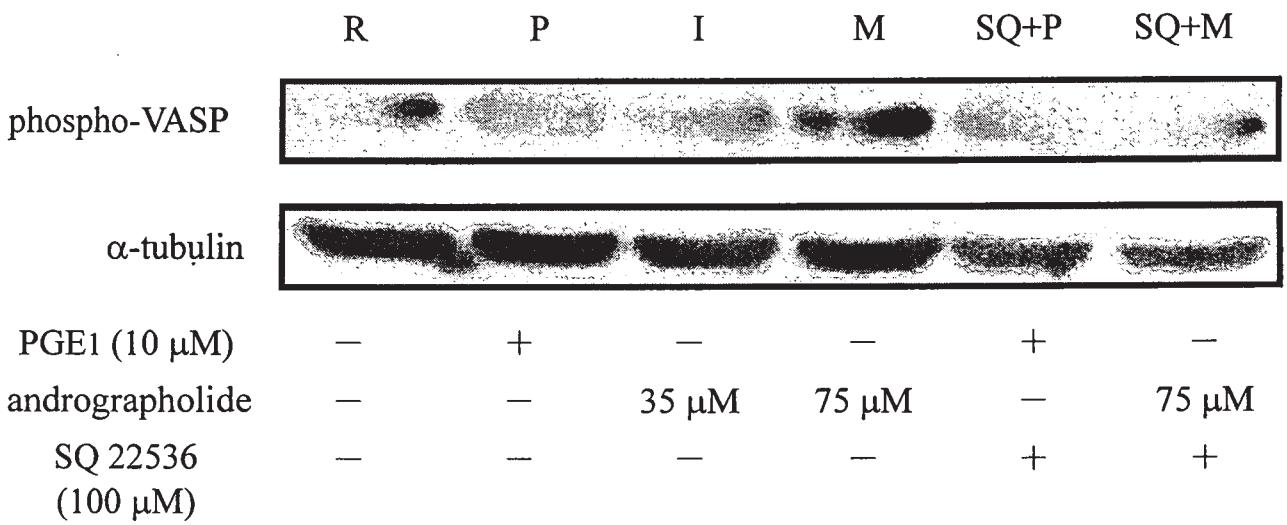

Figure 12. 於血小板懸浮液中，事先給予prostaglandin E_1 (10 μM)及不同濃度的穿心蓮內酯(35 and 75 μM)後，並利用cAMP抑制劑SQ22536 (100 μM)的給予，以西方墨點法來證實穿心蓮內酯是否可經由cAMP的路徑來刺激VASP的磷酸化。Platelets were incubated with prostaglandin E_1 (10 μM) and andrographolide (35 and 75 μM) in the absence or presence of SQ 22536 (100 μM) and were solubilized directly in SDS-PAGE sample buffer. Phosphorylation of VASP at Ser^{157} was detected by immunoblotting with a monoclonal antibody specifically recognizing Ser^{157}-phosphorylated -VASP.