PG9703-0013 (>>頁)

計畫編號：CCMP 97-RD-008

行政院衛生署中醫藥委員會九十七年度
研究計畫成果報告

中藥傳統方劑桃紅四物湯預防缺血性腦中風之療效評估

Neuroprotective effects of Tao Hong Si Wu TANG in ischemic cerebral infarction

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 2 月 29 日至 97 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.....3

英文摘要.....4

壹、前言.....5

貳、材料與方法.....9

參、結果.....13

肆、討論.....14

伍、結論與建議.....16

陸、參考文獻.....17

柒、圖表.....19

編號：CCMP 97-RD-008

中藥傳統方劑桃紅四物湯預防缺血性腦中風之療效評估

許準榕

台北醫學大學

中文摘要

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；中醫藥傳統方劑在腦血管中風的臨床治療上使用已久，然其研究的完善性及科學性仍嫌不足，也較不易令人信服。本計劃之目的在利用完善的研究模式，來探討中藥傳統方劑桃紅四物湯對缺血性腦中風之療效。

本計畫利用大鼠之中腦動脈血管阻塞/再灌流模式以及小鼠之螢光染料引發腸繫膜血管血栓之實驗模式，來評估桃紅四物湯治療缺血性腦中風所造成腦部傷害的效果，並利用西方墨點法更深入的探討桃紅四物湯預防腦部傷害的相關因子的機轉，以期了解桃紅四物湯療效的分子作用機制。

研究結果發現桃紅四物湯(1.2 及 2.4 g/kg)能有效的減少 MCAO 手術所造成之腦部傷害，且有抗血栓及抑制膠原蛋白引發之血小板凝集的作用，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抗血栓能力及抑制 HIF-1α的表現進而影響 TNF-α及 iNOS 的產生而減少 active caspase-3 的產生進而達到保護腦部的效果。

關鍵詞：缺血性中風，中腦動脈血管阻塞/再灌流模式 ，桃紅四物湯

CCMP 97-RD-008

Neuroprotective effects of Tao Hong Si Wu TANG in ischemic cerebral infarction

Joen-Rong Sheu

Taipei medical university

ABSTRACT

Stroke is a main mortal cause of vascular diseases, and affects human health critically. Unfortunately, the therapy of ischemic stroke is still not good enough because stroke is unpredictable. Traditional Chinese medicine formula is used for stoke therapy for a long time, but its effects and mechanisms are still unconvincing. The aim of this study is to investigate the protective effect of Tao Hong Si Wu TANG on ischemic stroke through completed study models.

This study will utilize middle cerebral artery occlusion (MCAO) model to evaluate the effect of Tao Hong Si Wu TANG on MCAO induced brain injury in rat. We also use fluorescein sodium induced thrombosis model to detect the anti-thrombosis function of Tao Hong Si Wu TANG in mice. Furthermore, we will investigate the molecular mechanisms of Tao Hong Si Wu TANG through western blotting. This study will estimate the effects of Tao Hong Si Wu TANG on stroke completely.

The results show that Tao Hong Si Wu TANG (1.2 and 2.4 g/kg) could reduce MCAO-induced brain injury, and had anti-thrombus and anti-aggregation effects. Tao Hong Si Wu TANG also could inhibit MCAO-induced HIF-1α, TNF-α, iNOS and active caspase-3 expression. The protective effect of Tao Hong Si Wu TANG on MCAO-induced brain injury may through its anti-thrombus effect and the inhibition of HIF-1α expression.

Keywords：ischemic stroke, MCAO, Tao Hong Si Wu 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。

桃紅四物湯源自醫宗金鑑，由桃仁、紅花、當歸、川芎、赤芍及生地組成，其功效為養血活血，臨床多用於血瘀證的治療，具有極佳的功效，已為中醫臨床廣泛使用的活血化瘀方劑之一，臨床應用上適用於月經不調、痛經、經閉、不孕症、盆腔炎、中期妊娠引產，及偏頭痛、腦血腫、三叉神經痛、眼外傷、青光眼、視網膜炎等症。在現代藥理學的研究上發現，桃紅四物湯的主要成分：桃仁、紅花、赤芍、川芎能擴張血管、改善血液循環，川芎和紅花的成分可以減少血管阻力並增加血流量，當歸、川芎、紅花則有收縮子宮及鎮痛的功效。在中國大陸對桃紅四物湯的研究亦相當的豐富，對桃紅四物湯的抗血栓能力亦有所著墨，然而其研究的結果與模式未與國際接軌，並沒有發表在國際相關的醫學期刊上，因此這些研究結果的可信度值得保留。本計畫擬利用本實驗室已建立好的大鼠中腦動脈梗塞實驗(MCAO, middle cerebral artery occlusion) (許準榕, 民九十四)及小鼠的血栓形成實驗，在配合相關的分子生物學方法，期待能更深入的研究桃紅四物湯治療腦血管梗塞的藥理活性與機轉；透過我們的研究相信能為桃紅四物湯此一傳統中藥方劑提出一個合理且科學化的治療依據。

貳、材料與方法

1. 本計畫中所使用之傳統方劑桃紅四物湯，為 GMP 藥廠出品之流浸膏劑型，其將桃仁 5.0 g、紅花 2.5 g、當歸 5.0 g、川芎 2.5 g、白芍 5.0 g 及熟地黃 5.0 g 製成浸膏 4.5 g，而本計畫所使用之劑量以人類與大鼠的代謝率作換算，乘以人類之建議用量作為實驗劑量。

2. 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) 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℃。

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. 組織蛋白質抽取及西方墨點法

大鼠經中大腦動脈缺血/再灌流手術廿四小時之後，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。

5. 組織 RNA 萃取與定量

分別將 sham-control 及給藥之大鼠，於中大腦動脈阻塞再灌流手術後 24 小時注射劑量 400 mg/kg 水合氯醛(chloral hydrate)加以麻醉後，利用 PBS 約 50-100 ml 於左心室開始灌流，將全身血液清洗乾淨，小心取出腦部，並將左右半腦皮質部份取下，立刻冰至液態氮中冷卻於-70˚C 保存。開始萃取 RNA 時，先將之前取出之腦部皮質退冰，於 4˚C 下，加入 1 ml/100 mg TRIZOL Reagent 研磨成腦均質液，靜置 5 分鐘後，使用 12000xg 於 4˚C 離心 10 分鐘，取出上清液室溫下靜置 5 分鐘，加入 0.2 ml chloroform/1 ml TRIZOL Reagent，並將試管封好，劇烈振盪約 15 秒後於室溫下靜置 3 分鐘，使用 12000xg 於 4˚C 下離心 15 分鐘，混合液會分成上下兩層，上層為澄清水層含 RNA，下層為紅色有機層含 DNA 及蛋白質，小心取出上清液分成三管 eppendorf 各 0.5 ml，分別加入 0.5 ml isopropyl alcohl/1 ml TRIZOL reagent，溫和地混合均勻後於室溫下靜置 10 分鐘後，使用 12000xg 於 4˚C 下離心 10 分鐘，RNA 會在 eppendorf 底部形成 gel-like 的沉澱物，除去上清液後，加入至少 1 ml 75 % ethanol (以 0.001% DEPC-H_2O 及 99.5 %無水酒精配製而成)/1 ml TRIZOL reagent，混合振盪後使用 7500xg 於 4˚C 下離心 10 分鐘，除去上清液後，快速將 RNA 沉澱物風乾，加入含 RNAse 之滅菌水 DEPC-H_2O 將 RNA 完全溶解後，靜置 10 分鐘，取少量 RNA 至 microcuvette 中，使用 GeneQuant Pro 分析儀以 260/280 nm 之波長來偵測樣品 RNA 之純度與濃度。測定完後分裝保存於-70˚C 備用。

6. 反轉錄-聚合酶連鎖反應(Reverse transcription-polymerse chain reaction；RT-PCR)

依照 Super Script One-step RT-PCR with Platinum Taq Kit (Invitrogen)以進行實驗。

(a) Pre-PCR(聚合酵素連鎖反應前步驟)即為 cDNA 的反轉錄合成步驟：

於 50˚C 下反應 30 分鐘，可將樣品 RNA 反轉錄為 cDNA，再於 95˚C 反應 3 分鐘，使 cDNA 雙股螺旋解開為以進入 PCR 放大過程中。

(b) PCR amplification(放大反應)：

樣品先於 95˚C 下反應 30 秒，確保 cDNA 由雙股解開為單股狀態，再分別以 62˚C 及 63˚C 反應 40 秒進行 anneal preimers 的動作，使 primers 粘上 cDNA，再以 72˚C 反應 40 秒使 cDNA 進行複製動作，如此再跳回 95˚C 重複之前三步驟，為一個循環，共重複 40 個循環，再進入最後一個循環的反應。

(c) Final extension(最後一個循環反應)：

樣品以 72˚C 反應 5 分鐘，使最後一個循環之複製動作結束後，降到 4˚C 保存備用，以避免 cDNA 降解，若要長期保存則置於-80˚C。

7. 以螢光染料引發小鼠腸繫膜血管引發血栓

根據 1984 年 Sato&Ohshima 的方法加以修正，ICR 小鼠(15-20 g)以 chloral hydrate (400 mg/kg)加以麻醉，切開腹腔將一段帶有腸繫膜的小腸拉出，置於顯微鏡底下觀察；經由頸靜脈給藥方式打入 fluorescein sodium (15 mM)，三分鐘後利用 Epiilumination 系統，由一百瓦特汞燈發出光線，經過 dichroic mirrow(DM505, Nikon)與濾光器(B-2A)濾掉波長小於 520 nm 的光線之後，照射於選定的腸繫膜靜脈(約 30-40 μm)，同時經由顯微鏡及計時器來觀察血栓的形成，此實驗的原理為利用濾過光激發 fluorescein sodium 使其產生一些毒性物質如自由基，來破壞血管內皮細胞，造成血小板的附著與凝集形成血栓，依血栓形成的時間來評估藥物的血栓清除能力。

8. 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 大鼠及 ICR 小鼠不同劑量的桃紅四物湯兩個星期後，再進行實驗；實驗分組分為：(1) 未進行手術控制組 (sham group)、(2) 溶劑(餵食等量生理食鹽水) 控制組、(3) 餵食低劑量(10 g/kg/day)桃紅四物湯組、(4) 餵食高劑量(20 g/kg/day)桃紅四物湯組，觀察其腦部傷害面積大小及血栓形成的時間。

9. 數據分析

實驗數據皆以平均值±標準誤差(mean ± S.E.M.)表示，控制組與桃紅四物湯組之間的差異，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

(一)、從圖一 A 中可看到，事先餵食大鼠桃紅四物湯 1.2 及 2.4 g/kg/day 可有效的減少 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)，桃紅四物湯可有意義且成濃度相關性的抑制 MCAO 手術造成的腦部傷害。

(二)、本實驗利用螢光物質引發小鼠腸繫膜血管血栓的形成，並於刺激前自頸靜脈給予桃紅四物湯，從圖二的血栓形成時間統計圖中我們可發現，桃紅四物湯 16 mg/g 可有效的延長血栓形成時間。

(三)、此外，我們利用血小板凝集儀直接測量桃紅四物湯對血小板凝集反應的影響，圖三 A 中顯示桃紅四物湯(20 及 40 μg/ml)可有效的抑制 collagen (1 μg/ml)引發的血小板凝集反應，圖三 B 中的統計圖更證實了桃紅四物湯有意義且成濃度相關性的抑制血小板凝集。

(四)、接下來我們更深入的討論桃紅四物湯是否會影響與腦部傷害表現因子的表現，圖四中我們發現，MCAO 手術後的大鼠腦部其 HIF-1α、TNF-α、iNOS 及 active caspase-3 的表現有明顯的增加，而餵食不同劑量的桃紅四物湯 1.2 及 2.4 g/kg/day 兩個禮拜就可有效且成濃度相關性的抑制 HIF-1α、TNF-α、iNOS 及 active caspase-3 的表現。

肆、討論

首先本計劃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。事先餵食兩個禮拜桃紅四物湯(1.2 及 2.4 g/kg/day)再進行 MCAO 手術的大鼠，進行腦部切片並加以染色後發現，事先餵食傳統方劑桃紅四物湯兩個星期的大鼠，與對照組相較呈獻明顯的腦部保護作用(圖一)。這個結果與二零零五年大陸中華實用醫學誌的研究中，餵食桃紅四物湯可保護小鼠腦部缺氧模式所造成腦部傷害的結果相類似，顯示出桃紅四物湯其可能的腦部保護機制。

接下來利用小鼠的螢光物質引發血栓形成模型來測試桃紅四物湯的抗血栓形成能力，實驗結果發現桃紅四物湯在此實驗中，約需要大鼠劑量的 6 倍(圖二)，才有明顯的抗血栓形成能力，我們認為這可能是因為小鼠的代謝率較大鼠更為高，且此實驗設計之螢光物質引發血栓形成，其形成之強度可能減弱了桃紅四物湯之抗血栓形成能力。但在圖三中發現，桃紅四物湯在低劑量下就可以抑制膠原蛋白引發之血小板凝集反應，這個結果顯示桃紅四物湯有其一定的抗血栓形成能力，且與二零零五年大陸的研究相較發現，桃紅四物湯有抑制膠原蛋白引發小鼠體內血栓形成之作用；綜合以上幾點，我們認為桃紅四物湯抑制血栓形成能力，可能經由抑制膠原蛋白引發之血小板凝集而來。

圖四中顯示，有進行 MCAO 手術的大鼠，其大腦組織中 HIF-1α、TNF-α和 iNOS 的表現量均有明顯的增加，而餵食不同劑量桃紅四物湯(1.2 及 2.4 g/kg/day)兩個禮拜的大鼠，與對照組相較，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-1 的增加(Bergeron et al., 2000)，而 HIF-1 會很快的引發 HIF-1α的穩定化而提高 HIF-1 的活性(Sharp and Bernaudin, 2004)，活化的 HIF-1 會結合到 hypoxia response elements (HRE)上，造成 TNF-α和 iNOS 的大量表現(Chu et al., 2008; Matrone et al., 2004)，此外 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)，所以我們認為桃紅四物湯可能是經由抑制 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，達到保護腦細胞減少腦部傷害的效果。

伍、結論與建議

桃紅四物湯能有效的減少 MCAO 手術所造成的腦部傷害，而其保護作用可能是經由其抗血栓作用及抑制 HIF-1α的表現而來。本計劃的完成對桃紅四物湯臨床上於中風病例的使用，增加了其學理根據，使中醫藥傳統方劑的應用能更為世所認同，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

1. 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-008)提供經費贊助，使本計劃得以順利完成，特此感謝。
2. 在此特別感謝港香蘭藥廠桃紅四物湯流浸膏劑型的提供。

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

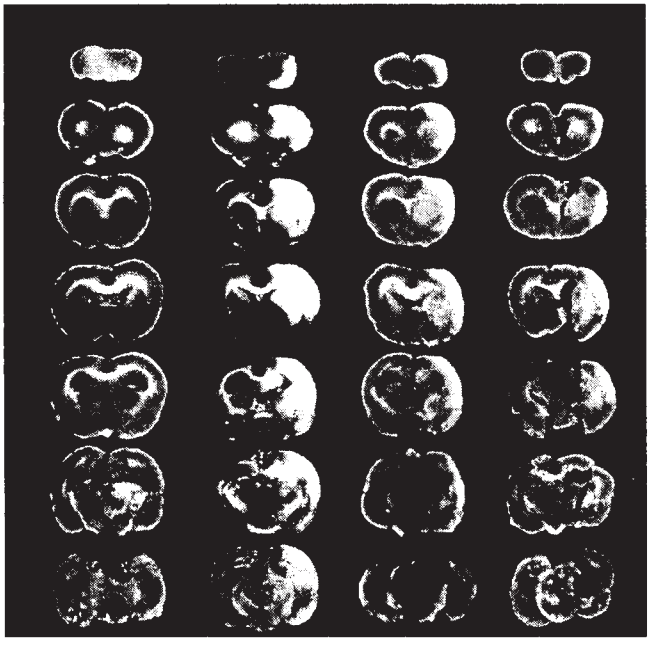
Stewart VC, Heales SJ. Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration. *Free Radic Biol Med* 2003; 34:287–303

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.

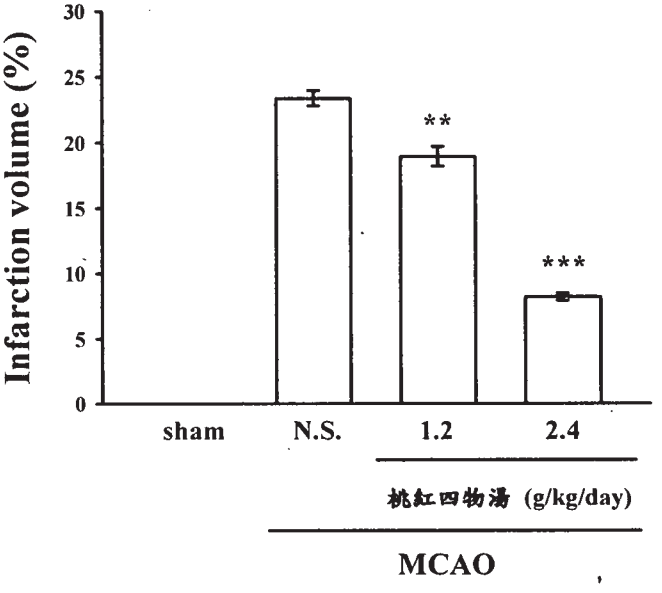
柒、圖、表

A.



(a) (b) (c) (d)

B.



圖一、桃紅四物湯對MCAO手術造成大鼠腦梗塞的保護效果

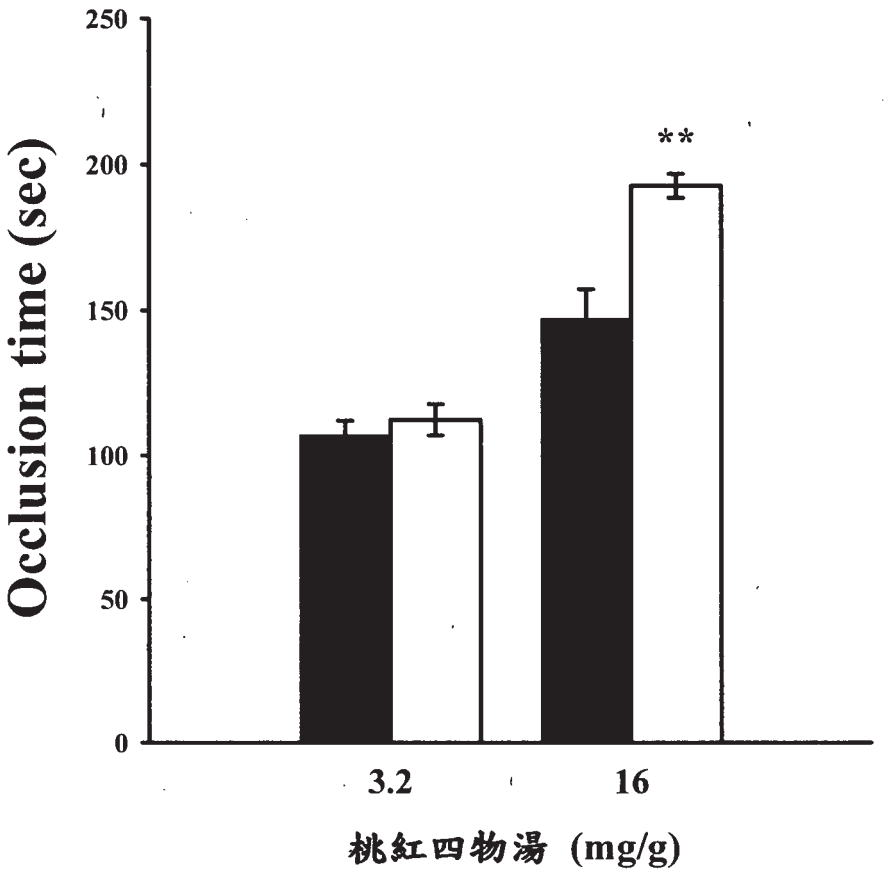
Figure 1. Effect of Tao Hong Si Wu TANG on MCAO-induced cerebral ischemia in rats.

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，實驗分組共分為四組：(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桃紅四物湯(1.2 g/kg/day)組，(d)、手術前兩個禮拜每天口服給予桃紅四物湯(2.4 g/kg/day)組。實驗動物數量每組各為三隻。

B. 腦部傷害面積統計圖

A. 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, n=6) (c) Tao Hong Si Wu TANG (1.2 g/kg/day, n=3) oral administration or (d) Tao Hong Si Wu TANG (2.4 g/kg/day, n=3) oral administration.

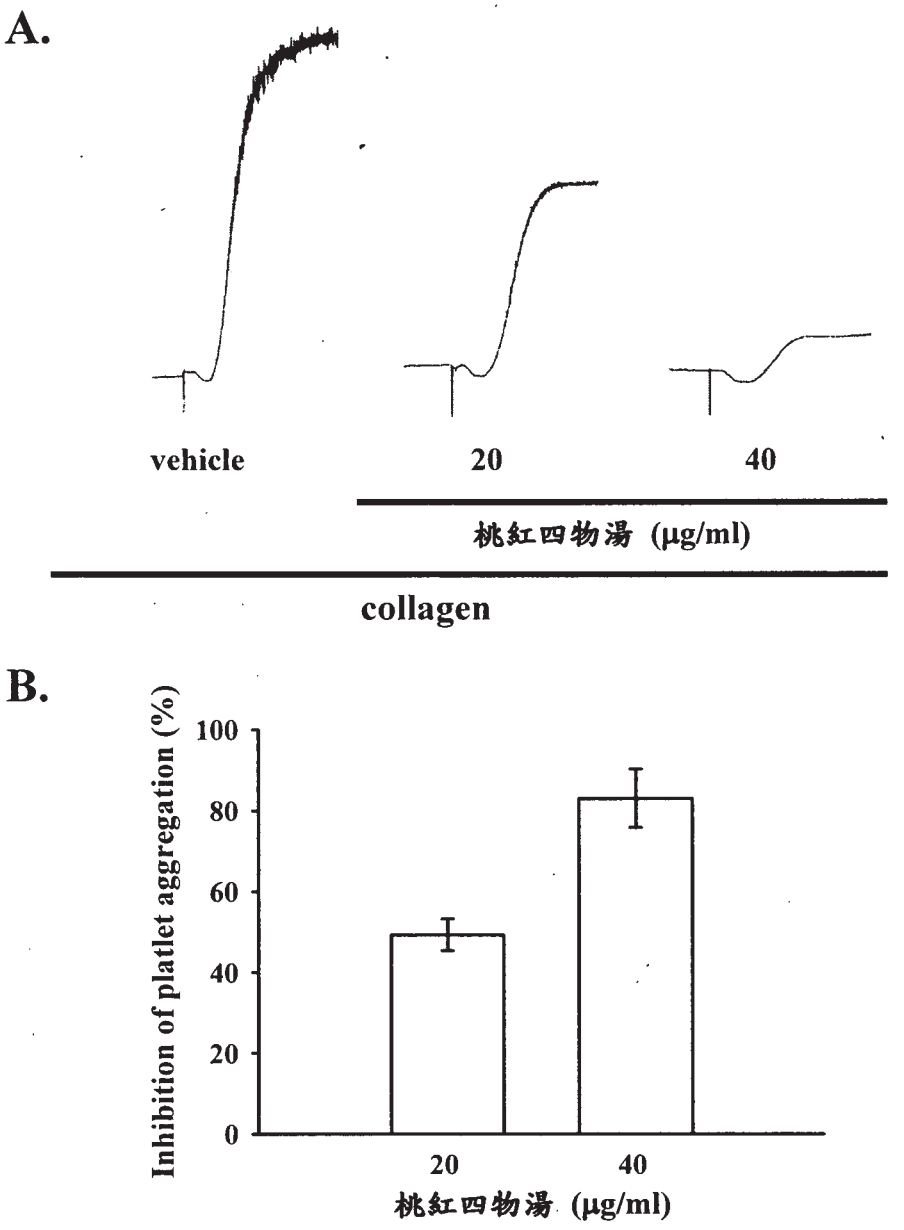
B. Infarction volume statistical graph. Data are presented as the infarct volume for each animal in the group as well as the means ± S.E.M. $^{**}P<0.01$ and $^{***}P<0.001$ as compared with the solvent-treated group.



圖二、桃紅四物湯對螢光引發小鼠腸繫膜微血管血栓形成之抗血栓能力評估
Figure 2. Effect of Tao Hong Si Wu TANG on fluorescein sodium-induced platelet thrombi in mesenteric microvessels of mice.

進行抗血栓能力實驗時，桃紅四物湯(3.2及16 mg/g)自頸靜脈給藥之後，再給予小鼠腸繫膜血管刺激使血栓產生，並計錄其血栓形成時間，觀察其與投與溶媒時之血栓形成時間差異。實驗動物數量每組各為四隻。

For the thrombotic experiments of platelet plug formation, mice were administered sovent control (normal saline) or Tao Hong Si Wu TANG (3.2 and 16 mg/g), after which the mesenteric venules were then selected for irradiation to produce microthrombus formation. Data of the bar graphs are presented as the means±S.E.M. of the occlusion time (s) for inducing platelet plug formation (n=4). **P<0.01 compared with the individual solvent control group.



圖三、桃紅四物湯對collagen 刺激人類血小板凝集反應的抑制效果

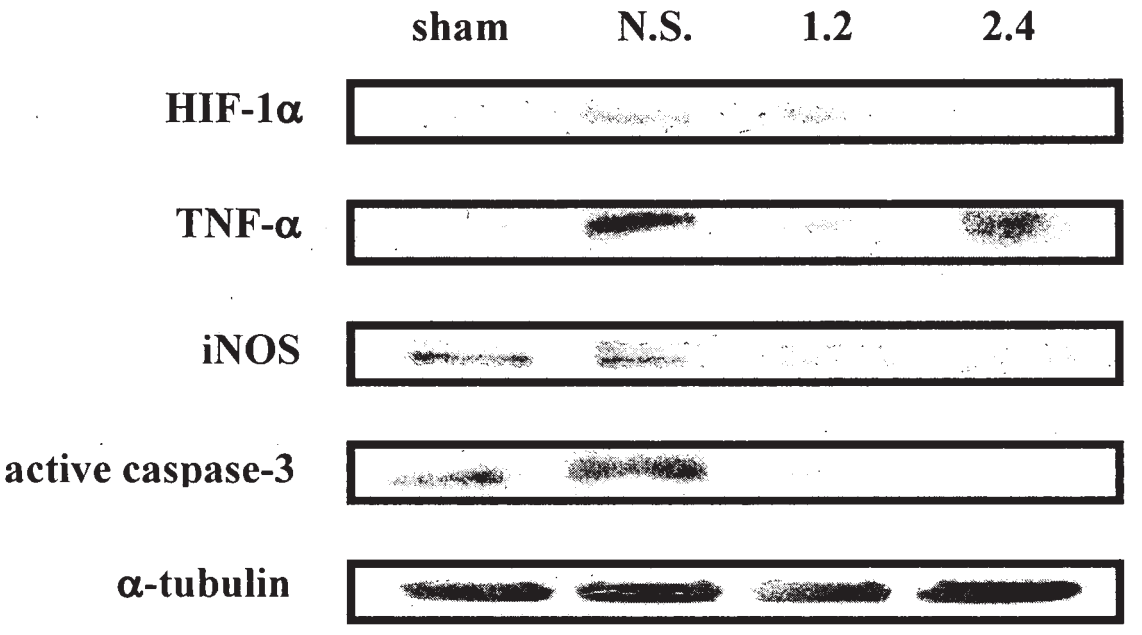
Figure 3. Effect of Tao Hong Si Wu TANG on collagen-induced aggregation in human platelet suspensions.

A. 於人類血小板懸浮液中，給予不同濃度的桃紅四物湯(20和40 μg/ml)反應三分鐘後，再加入collagen (1 μg/ml)刺激血小板凝集，觀察桃紅四物湯的抑制效果。實驗N值為五次。

B. 血小板凝集抑制百分比統計圖

A. Platelets were preincubated with Tao Hong Si Wu TANG (20 and 40 μg/ml) and stirred for 3 min then collagen (1 μg/ml) was added to trigger the platelet aggregation. The profiles are representative examples of five similar experiments.

B. Concentration-inhibition statistical graph of Tao Hong Si Wu TANG on collagen induced platelet aggregation



圖四、桃紅四物湯對MCAO手術誘發HIF-1α，TNF-α，iNOS及active caspase-3表現的抑制效果

Figure 4. Effect of Tao Hong Si Wu TANG on MCAO-induced HIF-1α, TNF-α, iNOS and active caspase-3 expression.

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N值為三次。

Fresh brains from sham-operated (sham) or solvent-treated (normal saline (N.S.)), and Tao Hong Si Wu TANG (1.2 and 2.4 g/kg/day)-treated rats were removed then homogenized, and centrifuged. The supernatant (50 μg protein) was then subjected to SDS-PAGE, and transferred onto membranes for analysis of HIF-1α, TNF-α, iNOS and active caspase-3 expression. Equal loading in each lane is demonstrated by similar intensities of α-tubulin. The profiles are representative examples of three similar experiments.