PG9403-0154 (46 頁)
CCMP94-RD-031

編號：CCMP94-RD-031

附件 1-3

行政院衛生署中醫藥委員會　94　年度
研究計畫成果報告

川芎之活性生物鹼tetramethylpyrazine併用aspirin對預防缺血性腦梗塞之研究

Study the effect of tetramethylpyrazine combined with aspirin on ischemic cerebral infarction

執　行　機　構：台北醫學大學醫學研究所

計 畫 主 持 人：許準榕

執　行　期　限：94　年 1 月 1 日 至 94 年　12 月 31 日

目　錄

頁碼

封面

目錄

壹、 中文摘要 (3)

貳、 英文摘要 (4)

參、 計畫內容 (5)

壹、前言 (5)

貳、材料與方法 (8)

參、結果 (13)

肆、討論 (19)

伍、結論與建意 (28)

誌謝 (29)

陸、參考文獻 (29)

柒、圖、表 (36)

自我評估表 (47)

肆、 附件

成果報告資料交付項目一覽表

資料讀我檔案

成果報告全文公開意願表

重要研究成果

職級學歷分析表

編號：CCMP　94-RD-031　　附件 2

川芎之活性生物鹼 tetramethylpyrazine 併用 aspirin 對預防缺血性腦梗塞之研究

計畫主持人：許準榕

執行單位：台北醫學大學醫學研究所

摘要

本實驗目的在探討TMPZ 20 mg/kg併用aspirin 5 mg/kg在大鼠的中大腦動脈梗塞再灌流實驗中，是否能有意義加強預防腦受損之效果，以及研究其分子機轉，並且期待能夠降低藥物使用劑量以符合臨床之應用，減少長期服用之副作用產生。

本實驗主要利用大鼠中大腦阻塞再灌流之動物模式，並且利用腦組織去分析相關重要誘導腦受損之因子，包括(1)利用西方墨點法 (Western blotting) 測定腦梗塞引起誘發性一氧化氮合成酵素 (iNOS)、HIF-1α 和 caspase-3 之表現含量，(2) 利用組織免疫染色法 (Immunohistochemical staining) 觀察腦梗塞後nitrotyrosine 的生成，(3)腦部脂質過氧化體外試驗(Lipid peroxidation)和(4)反轉錄-聚合酵素連鎖反應(Reverse transcription-polymerse chain reaction；RT-PCR)來偵測mRNA的表現含量。

TMPZ (20 mg/kg)能夠明顯具有意義地減少59.3%由缺血再灌流傷害所引起之梗塞面積。接著實驗再進一步從分子層面測試TMPZ對此傷害之神經保護機轉，經由西方墨點法及免疫螢光染色法分析後，發現預防性投與TMPZ能明顯減少iNOS、nitrotyrosine、HIF-1α及caspase-3表現；經由反轉錄-聚合酵素連鎖反應方法分析發現，TMPZ能夠抑制TNF-α mRNA 表現。除此之外，從大鼠腦部均質液之脂質過氧化試驗中，發現TMPZ並不能抑制鐵離子所造成之過氧化作用；另一方面，TMPZ併用aspirin沒有意義加強其作用效果，雖然本實驗並沒有發現TMPZ合併aspirin有提高腦保護的作用，但是我們推測TMPZ及aspirin在本實驗所使用的劑量下已達到其閾值，所以我們預期如將此兩藥的劑量降低便可觀察到此兩藥合併之效果，而且在臨床上便能夠大大降低因長期服用所產生的副作用，在未來，我們可以利用降低劑量來做更進一步探討TMPZ合併aspirin對於缺血/再灌流實驗中所造成之影響，以及分子機轉之探討。

關鍵詞【至少三項】：中大腦動脈，阻塞再灌流，TMPZ，aspirin

Study the effect of tetramethylpyrazine combined with aspirin on ischemic cerebral infarction

Joen-Rong Sheu

Graduate Institute of Medical Sciences, Taipei Medical University

ABSTRACT

In this study, we investigated whether TMPZ 20 mg/kg combined with aspirin 5 mg/kg could potentiate their protective effect on the brain injury and determined their molecular mechanisms in the middle cerebral artery occlusion/reperfusion model in rats. Furthermore, we expected to decrease dosage of TMPZ and aspirin in order to decrease size effect and correspond to clinical application.

In addition to analysis of infarct size, we also utilized brain tissue to (1) measure the content of iNOS, HIF-1α and caspase-3 by western blotting, (2) study nitrotyrosin formation by immunohistochemical staining, (3) test lipid peroxidation in vitro and (4) analyze TNF-α mRNA expression by Reverse transcription-polymerse chain reaction (RT-PCR).

We tested the effects of TMPZ in transient focal cerebral ischemia and reperfusion rat modal. TMPZ (20 mg/kg ip.) markedly attenuated the infarct volume about 59.3 % at 24 hours after middle cerebral artery occlusion. Subsequently, we examined the neuropreotective mechanisms of TMPZ in the molecular and cellular pathophysiology of brain injury after focal ischemia. By the data of western and immunofluorescent analysis, we found that pretreatment of TMPZ could significantly reduce the expression of iNOS, nitrotyrosine, HIF-1α and caspase-3. By reverse transcription-polymerase chain reaction analysis, TMPZ also suppressed the expression of TNF-α mRNA. Moreover, we found that TMPZ couldn't improve lipid peroxidation in rat's brain homogenates *in vitro*. On the other hand, our study found that TMPZ combined with aspirin didn't potentiate their protective effect on the brain injury, compared with TMPZ or aspirin alone. We postulated that the dosage of TMPZ or aspirin almost reached optimal protective effect on the brain injury in this study. Therefore, it was hard to discriminate whether TMPZ combined with aspirin could potentiate their protective effect on the brain injury. In the future, we will decrease the dosage of TMPZ and aspirin and this approach will largely decrease size effect and correspond to clinical application.

Keywords：**middle cerebral artery , occlusion/reperfusion, TMPZ, aspirin**

壹、前言

附件 4

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

造成缺血後之低灌流效應的因子，除了上述提及的血小板外，leukocytes 也參與其過程，在組織缺血後所誘導的初期發炎反應扮演重要角色(Connolly et al., 1996)。由於 leukocytes 是體型大且較僵硬的一種細胞 (stiff cells)，大量的證據顯示，PMN 的吸附分子：P-selectin 和 ICAM-1，分別在腦缺血以及 reperfusion 的前期，會大量的在 lenticulostriate 動脈後的微血管表現，使 leukocytes 緊緊地吸附至內皮細胞並且持續性地活化，導致在局部腦缺血和 reperfusion 的 no-reflow 現象 (Okada & Copeland et al., 1994)；雖然，研究指出在手術前將 neutrophil depletion (Connolly et al., 1996)，或是阻斷 P-selectin (Connolly et al., 1997)，能減少腦梗塞體積和改善同側腦皮質血流，但卻無法完全恢復血流。總而言之，fibrinogen、polymorphonuclear leukocytes 加上活化的 platelets 沈積在腦部 microvessels，是導致 microvascular 阻塞的三要素 (del Zoppo et al., 2000)，使得微小血管的暢通性

(microvascular patency) 喪失。

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

在臨床上，目前已有數類抗血小板藥物應用在預防繼發性缺血性中風的產生，包含了 aspirin、ADP receptor anagonist (ticlopidine 和 clopidogrel)以及 glycoprotein IIb/IIIa antagonist，aspirin 的作用機轉為不可逆的抑制 cyclooxygenase 而減少了 thromboxane A2 的生合成及抑制血小板的凝集，在這幾類藥物中，由於 aspirin 在預防繼發性缺血性中風的臨床試驗多、證據多、經濟效應好且具有不錯的療效，有 23%減少中風發生的危險率及 18%減少中風、心肌梗塞及血管死亡發生的危險率(Antiplatelet Trialists Collaboration, 1994)，所以 aspirin 亦是目前用來預防繼發性缺血性中風的首選藥物，同時為了要提高預防繼發性缺血性中風的效果，已有臨床試驗(ESPS II study)併用兩種不同作用機轉的抗血小板藥物長效型的 dipyridamole 及 aspirin 來做測試，發現的確能提高至 37%減少中風發生的危險率，且在副作用的產生與單獨使用 aspirin 並無意義增加(Diener et al.,1996)，同時亦有另一組臨床試驗(MATCH study)正在評估 clopidogrel 併用 aspirin 來預防中風的效果(Diener et al., 2004)。

由於我們先前的計畫利用川芎之活性生物鹼 tetramethylpyrazine (TMPZ)來預防中風的動物模式中，我們發現 TMPZ (20 mg/kg)能有義意的減少腦梗塞面積約 60%的相對減少率($P<0.01$)，其可能的作用機轉包含了 1.抗血小板活性的作用：TMPZ 能夠促進 cGMP 的含量增加以及抑制 phospholipase C 的活性，2. 抗氧化的作用。

所以，本計畫的目的主要是併用 TMPZ 和 aspirin 來探討此兩種不同作用機轉的抗血小板藥物是否能更有效預防中風的形成，其研究方法為利用大腦中動脈血管阻塞/再灌流模式動物實驗模式來造成缺血性腦中風，進而再評估此兩種藥物併用後之作用效果，其評估方法包括：腦梗塞區域之測定、行為測試、脂質過氧化的測量、神經缺陷分級和抓力測試。

下列為 TMPZ 及 aspirin 兩個藥物的背景資料：

Tetramethylpyrazine (TMPZ)是由川芎中所萃取之有效生物鹼，可促進血液循環及減緩疼痛(Beijing, 1977)。TMPZ 早期源自於 Bacillus Sultitis 的代謝物(Jeffreys et al., 1970)，且它的萃取、純化和結構已於 1977 年被確立。在中國大陸，一般用於治療急性腦血管疾病，TMPZ (40-120 mg/day)以 i.v.注射體內 1-3 星期後，約有 90 %的病患有明顯的改善 myodynamic 和吞嗑困難(Beijing, 1977)。另外，Wang (1984)證明，TMPZ 在治療急性腦血管栓塞上，有助於改善 nail fold microcirculation 的情

形，而且 TMPZ 本身沒有明顯的副作用。另有研究報告指出，TMPZ 具有降血壓和抑制血小板凝集的作用(Ojewole, 1981)，降低動脈阻力且增加腦血管(Zeng et al., 1982)及冠狀動脈血流(Beijing, 1977)。TMPZ 同時有助於促進 microcirculation 及減少微血管的通透性(Xue, 1989)。Liu Sylvester (1990)的研究報告指出，TMPZ 於動物實驗中可抑制血栓的形成；由於 TMPZ 可抑制多種活化劑(如 collagen, thrombin 和 ADP)所誘發之血小板凝集(Hoet al., 1989)，故其抑制血栓形成的作用可能部分源自於其抑制了血小板的凝集。再者，Hui et al.(1987)發現，TMPZ 本身亦是一種 2-adrenergic 受體的部分活化劑。因此，推測 TMPZ 抑制血小板的凝集反應可經由其它途徑。雖然 TMPZ 的結構亦不屬於 nitrovasodilator 的藥物，但目前有研究報告顯示，TMPZ 對肺動脈的鬆弛作用為 endothelium-dependent 及 nitric oxide-mediated 的機制(Peng et al., 1996)，的確在我們之前的研究也證實 TMPZ 能有意義促進血小板增加 NO 及 cGMP 的產生，其機轉可能是經由活化 NO synthase (NOS) (Sheu et al., 2000)，我們並且也證實 TMPZ 在低濃度下(0.5 mM)能抑制 phospholipase C，抑制 collagen (5 M)所誘導的 phosphoinositide breakdown 及 thromboxane A2 的產生，在高濃度下 (1 mM)，TMPZ 能夠干擾 GP IIb/IIIa 受體，進而抑制了血小板的凝集 (Sheu et al., 1997)。

Aspirin 是全世界最廣泛被使用的藥物之一，其源由白柳樹中的一個苦味成份 salicin (Maclagan, 1876)，然後再商業化的合成 salicylic acid，在 1897 年成功的合成出 acetylsalicylic acid，同時命名為 aspirin。在最早期的時候，aspirin 主要用在解熱(Stone, 1760)，在 1890 年代的晚期已被使用在治療各類的發炎反應(Dreser, 1899)，而在 1970 年代的早期，它的抗血栓的作用才被建立(Weiss & Aledort, 1967)，並且直到最近幾十年來，它才漸漸被應用在預防及治療血管疾病上。Aspirin 的作用機轉為不可逆地抑制血小板 cyclooxygenase enzyme (COX-1) (Roth & Majerus, 1975)，減少 arachidonic acid 轉變成 prostaglandin 和 thromboxane A_2，thromboxane A_2 是一個很強的促凝血劑及血管收縮劑，所以，aspirin 的抗血栓作用主要是抑制了 thromboxane A_2 的形成，除外，aspirin 亦可藉由 neutrophil 來促進抑制血小板活化，其機轉是經由 NO/cGMP-dependent process (Lopez-Farre et al., 1995)，以及 aspirin 抑制 postacyclin 的合成會促進內皮細胞合成 NO (Bolz & Pohl U, 1997)，這都是會幫助抑助血小板活化。在臨床上，使用 aspirin 來治療心血管疾病，是由於它能避免 LDL 被氧化進而能減少動脈粥狀硬化形成(Steer et al., 1997)，同時它亦可改善內皮受損的情形(Husain et al., 1998)，其機轉被推測 aspirin 是一個抗氧化物(Ghiselli et al., 1992)；並且已有相當多的臨床試驗發現 aspirin 的確能意義地減少已患有心肌梗塞及缺血性中風的病人的再發生率及死亡率(Awtry & Loscalzo, 2000)。

貳、材料與方法

1. 大腦中動脈血管阻塞/再灌流模式

本實驗使用的活體動物為大鼠 250-350 g (品系 Wistar)，參考 Longa 等人 (1989) 以及 Hwang 等人 (2002) 之方法加以修飾。老鼠以 3 % isoflurane (溶於 95 % O2 和 5 % CO2) 氣體混和器麻醉並以 2 % isoflurane 維持麻醉。頸部皮膚由中線切開，找出右側總頸動脈 (right common carotid artery)、外頸動脈 (external carotid artery)、與內頸動脈 (internal carotid artery)，將 14-17 mm 長度的 4-0 尼龍線 (nylon thread，前端覆蓋一層矽膠)，經由外頸動脈插入至內頸動脈，當感覺阻力時即造成右側大腦中動脈 (right middle cerebral artery) 之阻塞(ischemia)，然後縫合傷口，使老鼠自然甦醒。我們將利用行為測試(behavioral test，詳述如下) 確認大鼠處於成功的單一側的腦部缺血。待一小時後，再麻醉老鼠，移除 4-0 尼龍線以促使血液再灌流 (reperfusion) 至缺血腦區域。二十四小時後，將腦組織取下做進一步的分析。手術過程中老鼠體溫均維持在溫度 37℃。

2. 行為測試 (behavioral test)

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

3. 腦梗塞區域 (infarct size) 之測定

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

A：同側腦半球 (右腦) 未受損面積

B：對側腦半球 (左腦) 面積

校準後的腦受損率：(B－A)/B x100 %

4. 脂質過氧化 (lipid peroxidation) 的測量

依照 Okhawa 等人 (1979) 的方法並加以修飾，進行丙二酸醛 (malondialdehyde，作為脂質過氧化的指標) 的測量。將 Wistar 品系大鼠的大腦組織挑除腦膜、結締組織和血管並清洗後，用 Dounce 研磨器配以體積十倍量的冰冷 Krebs buffer [10 mM Glucose、10 mM Hepes、140 mM NaCl 、3.6 mM KCl · 、3.6 mM KCl、1.5 mM CaCl2、1.4 mM KH2PO4、0.7 mM MgSO4，pH 7.4] 加以研磨均質化成腦研磨液。以轉速 3000 rpm 離心十分鐘後，取上清液以進行脂質過氧化實驗。將 lycopene 加入混合溶液在溫度 37℃下反應十分鐘，隨即以亞鐵溶液 (200 μM) 刺激進行反應三十分鐘。加入 10 μl 冰冷 trichloroacetic acid solution [4 % (w/v) in 0.3 N HCl] 終止其反應後，再加入硫化巴比妥酸 (thiobarbituric acid, TBA) 反應試劑 [0.5 % (w/v) thiobarbituric acid in 50 % (v/v) acetic acid]。待十五分鐘加熱呈色後，加入 1 ml 正丁醇 (n-1-butanol) 並劇烈震盪混合均勻，以萃取冷卻三十分鐘後的反應溶液。最後將有機層吸出，並利用分光光譜儀 (Hitachi, Model U3200) 波長 532 nm 測量呈色 n-1-butanol 之吸光值。脂質過氧化程度以 thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) 之產量予以評估。

5. 神經缺陷分級 (neurological deficits)

根據 Bederson 等人 (1986b) 以及 Lee 等人 (2002) 所作之分級制度，評估大鼠中風後運動神經受損的程度。分別在第一小時與第二十四小時的血液再灌流時，請旁觀者先判定大鼠的行為模式，再將大鼠處以其他的實驗。此分級制度詳述如下，若大鼠呈現較嚴重的等級，以較嚴重的等級分類。神經學檢查過程歷時 3~5 分鐘。

首先溫和地握住大鼠尾巴使其懸掛距離地面一公尺，觀察前掌彎曲的現象。若大鼠的兩前掌能均衡延展向地面，並且沒有觀察到其他的神經缺損現象，為正常的老鼠，表示 0 級。有腦梗塞的大鼠會將前肢一致性地往腦損傷半球的對側(contralateral) 收縮；而前肢收縮隨著損傷的程度不同而改變，輕度的收縮如腕彎曲、肩內收和肘僵直。較嚴重收縮則造成腕、肘完全彎曲與肩的內收和向內旋轉。大鼠有上述程度的前肢收縮且沒有其他異常時，歸類為第 1 級。大鼠被放置於軟質塑膠塗覆的大紙 (counter protection paper, Kimberly Clarke) 上時，會以爪子緊緊抓住紙張。以手抓住老鼠的尾巴，從肩後施以力量直到大鼠的前肢滑動數英吋。依此步驟從不同的方向操作數次，正常或輕微中風的大鼠對於不同方向的拉力有相同的抵抗力，嚴重中風的大鼠對朝麻痺體側的橫向施力

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

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

6. 抓力測試 (grip test)

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

0 級--大鼠掉落。

1 級--大鼠以兩前掌抓於細繩上。2 級--大鼠以兩前掌抓於細繩上，加上大鼠嘗試爬到細繩上。

3 級--大鼠以兩前掌加上一後掌或兩後掌同時抓於細繩上。

4 級--大鼠除了用所有的腳掌抓於細繩上，還加上尾巴纏繞於細繩。

5 級--大鼠可以從細繩中點爬到兩支柱上而逃跑。

7. 西方墨點法 (Western blotting) 測定腦梗塞引起誘發性一氧化氮合成酵素 (iNOS) 之含量

西方墨點法測定腦梗塞引起誘發性一氧化氮合成酵素的堆積，其方法參照 Radrigo 等人(Radrigo et al., 2001)的方法加以修飾。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 加以研磨。萃取之蛋白質再去做 western blotting 的分析，分別加入一級抗體(anti-iNOS、aniti-HIF-1α、anti-caspase-3、α-tubulin and β-actin primary antibody) 於室溫下一小時，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-Profil)定

量分析。

8. 組織免疫染色法 (Immunohistochemical staining) 觀察腦梗塞影響 nitrotyrosine 的生成

組織免疫染色是依據 Han 等人(Han et al., 2002)的方法加以修飾。大鼠經中大腦動脈缺血與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)加以麻醉後，由大鼠左心室進行灌流，以 5 ml/min 之流速使用 PBS 灌流十分鐘接著 4 % paraformaldehyde 灌流五分鐘，並剪開右心房作為血液與灌流液出口。大鼠灌流後小心取下大腦並以 4 % paraformaldehyde 固定(fixation)兩小時，接著使用 30 %蔗糖溶液脫水至大腦完全沈降至容器底部為止。利用冷凍切片法(cryostat) 將大腦組織冠狀切片(coronal section)成厚度約 10 M 的薄片，並沾黏於已塗覆 silane 之載玻片，待乾燥後冷凍於-70˚C 加以保存。

切片由 -70˚C 回溫後以緩衝液 (phospate-buffered saline, PBS) 稍加潤溼，再移至染色壺 (coplin jar) 中清洗三次，每次五到十分鐘。將切片組織分別以 2 % BSA (bovine serum albumin) 反應卅分鐘以減少抗體產生非選擇性的結合。接著以 anti-nitrotyrosine 一級抗體 (monoclonal primary antibody, 1:50) 反應兩小時，最後使用螢光標定之二級抗體 (FITC-conjugated secondary antibody, 1:100) 反應一個小時。在螢光顯微鏡 (excitation: 450-490 nM, emission: 520 nM) 下觀察比較大腦切片組織其皮質 nitrotyrosine 產生量的差異。

9. 反轉錄-聚合酵素連鎖反應(Reverse transcription-polymerse chain reaction；RT-PCR)

(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：

TNF-α及 GAPDH 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)：

TNF-α及 GAPDH 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)：

TNF-α及 GAPDH 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。

(d) 膠體電泳(Agarose gel elctrophoresis)

將 RT-PCR 處理所取得放大之 cDNA 產物以 4：1 的體積比例加入 5 倍 sample loading dye (25 % glycerol 和 0.25 % bromophenol blue)充分混合均勻，將每一管 sample loading 在 1.5 % 洋菜膠片(含 0.5 μg/ml) ethidium bromide，其具螢光染色 cDNA 之能力)，於 0.5 % TBE buffer 下，以 150 V/33 mA 條件下進行電泳分離步驟。TNF-α及 GAPDH 之 mRNA 經由反轉錄後之 cDNA 分別於 203 bps 及 493 bps 被偵測。最後，將膠片置於影像分析系統(Viber Lormat；France)，以 CCD 拍攝轉為數位影像儲存，再利用電腦之影像分析軟體(Bio-1D version 99)進行影像分析處理。TNF-α cDNA 之相對含量須以 GAPDH 做內部校正，實驗結果以此當作數值表示後，方可以以此數值作為統計。

10.實驗設計：給藥劑量、時間、動物分組及評估

本實驗設計分為 sham control (n=5)、solvent control (n=5)、TMPZ (10 mg/kg 和 20 mg/kg, n=5)、TMPZ (10 mg/kg 和 20 mg/kg)加上 aspirin 30 mg/kg (n=5)；給藥時間點為 ischemia 前 15 分鐘，在 ischemia 1 小時後再灌流，之後 24 小時，將 rat 的腦組織取下來，做切片及攝影，然後來做電腦影像分析來評估腦栓塞的大小。另外，這些腦組織亦可利用組織免疫法來分析 nitrotyrosine、western blotting 來分析 iNOS expression 以及利用 chemotactic chamber 來評估 neutrophil migration， 這些都是用來評估藥物對於中風的產生是否有改善，除此之外，我們亦可在犧牲 rat 之前，來評估其中風行為表現是否有改善。(以上內文為 14 號字)

參、結果

一、預防性投與 TMPZ 對於大鼠中大腦動脈梗塞與再灌流腦損傷面積之影響

中大腦動脈於梗塞/再灌流手術後 24 小時，將腦部取出並切成 2 mm 冠狀切片共七片，使用 2 % TTC 染色後，利用數位攝影並使用 imageJ 統計軟體加以分析。正常的腦部組織會呈現紅色，缺血再灌流之損害面積為白色區域，如圖(Figure 1)。由實驗結果發現，在大鼠腦部距腦尖(frontal pole) 3-9 mm 的部分傷害最為明顯，此區域也是中大腦動脈主要的灌流區域，腦部傷害區域加以統計之後則算出腦傷害面積百分比(Cole *et al*,. 2001)。實驗大鼠共分為四組，(a) sham control (b) vehicle control (cremophor：ethanol：PBS = 1: 1: 4) (c) TMPZ 10 mg/kg (d) TMPZ 20 mg/kg，其中，vehicle 與 TMPZ 10 mg/kg 或 20 mg/kg 於大鼠中大腦梗塞前十分鐘腹腔注射投與，結果如圖(Figure 1)。由溶劑的腦中風控制組之腦部冠狀切片形態顯示，經腦缺血再灌流傷害之後，呈現傷害之白色部分與未受傷之半腦比較有明顯之表現，且因為缺血性腦傷害而有水腫之情形產生；若與 sham 控制組比較缺血同側之半腦，顯示經中大腦梗塞再灌流手術之後，確實造成明顯且有意義的損傷面積。然而，在投 TMPZ 10 mg/kg 之實驗組顯示，TMPZ 於低濃度也有部分且具有意義地減少腦梗塞損傷區域。另外，於 TMPZ 20 mg/kg 高濃度投與後，則是有相當明顯地抑制缺血性再灌流所引起之傷害面積，水腫的情形也沒有如溶劑的腦中風控制組明顯。使用 imageJ 統計軟體加以分析後之統計結果如圖(Figure 2)，Sham 控制組其梗塞面積比率為 -0.3 ± 1.5 % (n = 6)，未給予任何藥物之溶劑的腦中風控制組(vehicle control)的梗塞面積比率為 35.8 ± 2.1 % (n = 14)，Sham 控制組使用的尼龍線較短，無法使大鼠產生成功

的中大腦動脈缺血，且於 laser doppler flowmetry 監測下並未有中大腦動脈血流下降情形發生。溶劑的腦中風控制組則是給予大鼠溶解藥物之溶劑。未給予藥物之溶劑的腦中風控制組其損傷面積比率明顯大於 sham 控制組($P < 0.001$, Figure 2)，表示只有使用標準長度(22 mm)之尼龍線及在雷射都卜勒微流儀監測下之血流有明顯下降情形，才能使大鼠產生成功的中大腦動脈缺血與再灌流損傷。給予 TMPZ 10 或 20 mg/kg 劑量之實驗組其梗塞面積呈現與劑量相關之保護作用，當給予 TMPZ 10 mg/kg 劑量之實驗組其損傷面積比率與溶劑的腦中風控制組比較呈現有意義的保護作用(23.8 ± 2.9 %, n = 8, $P<0.05$)；而給予 TMPZ 20 mg/kg 高劑量之實驗組其梗塞面積與溶劑的腦中風控制組比較呈現相當明顯且具有統計意義之減少，約為原梗塞面積之 40.8 % (14.6 ±1.3%, n = 8, $P < 0.001$) (Figure 2)。

二、 TMPZ 之預防性給藥對於中大腦動脈缺血與再灌流所引起傷害面積序列影響

將大鼠之腦部冠狀切片共七片，利用 2 % TTC 染色後，依照與腦前頂端部位之距離分析每片腦冠狀切片傷害面積之大小，實驗共分二組，溶劑的腦中風控制組(1：25.4 ± 13.8 %；2：48.7 ± 7.6 %；3：58.6 ± 4.1%；4：57.1 ± 4.1 %；5：48.0 ± 5.5 %；6：24.5 ± 7.4 %；7：12.8 ± 4.8 %)，TMPZ 20 mg/kg 給藥組(1：5.0 ± 2.3 %；2：18.7 ± 5.1 %；3：37.6 ± 4.7 %；4：31.1 ± 5.6 %；5：8.0 ± 9.0 %；6：1.6 ± 1.5 %；7：0.6 ± 0.8 %)，由分析結果中發現，在腦部冠狀切片中，距腦頂端 3-9 mm 之部位，及第二、三、四片冠狀切片，缺血所造成的傷害最為明顯(Figure 3)。經 TMPZ (20 mg/kg)預防性投預後，分別有意義的下降 62.7 % ($P<0.01$)、36.9 % ($P<0.01$)、45.6 % ($P<0.01$)，此區域主要與中大腦動脈之灌流部位相符，

相當於大鼠腦部皮質部位，此外，具腦前端 3-9 mm 之區域其傷害最為嚴重，因此藥物的保護效果將更有意義地大於次要傷害於 9-13 mm 區域之保護作用。接續之實驗進一步地想要探討於具腦前端 3-9 mm 區域所發生的缺血與再灌流引起之分子病理機轉。以下利用西方墨點法及反轉錄-聚合酵素連鎖反應分析缺血性傷害之機轉。另外，免疫螢光染色法則取傷害最明顯之第二片冠狀切片區域 (即-0.3 mm from bregma)。

三、TMPZ 對大鼠中腦動脈栓塞與再灌流所引起 nitrotyrosine 生成之影響

TMPZ 對大鼠中腦動脈栓塞引起 nitrotyrosine 生成之影響，利用組織免疫染色法評估給予 TMPZ 抑制 nitrotyrosine 生成的效果。取 10 μm 之腦部冠狀冷凍切片(-0.3 mm from bregma)作免疫螢光染色，發現大腦缺血半腦之皮質(cortex)部位會表現大量螢光，即為產生大量 nitrotyrosine 堆積(Figure 4B)。給予 TMPZ (20 mg/kg)能顯著地減少產生 nitrotyrosine 區域的分佈與密度(Figure 4C)，而位於缺血大腦半球之對側則幾乎沒有 nitrotyrosine 的產生(Figure 4D, 4E and 4F)。

四、TMPZ 對大鼠中腦動脈栓塞與再灌流所引起一氧化氮合成酵素表現之影響

有關 TMPZ 對大鼠中腦動脈栓塞與再灌流所引起一氧化氮合成酵素表現之影響，實驗方法及原理與前述相同。因此，以西方墨點法(Western blotting)利用大鼠腦部局部缺血/再灌流手術後 24 小時，分析左右半腦一氧化氮合成酵素的表現程度，iNOS 之表現可以被偵測於轉漬膜上 130 kDa 之分子量大小位置。實驗各組分別為 sham control、溶劑的腦中風控制組(vehicle control)及 TMPZ (20 mg/kg)給藥組。各組 iNOS 表現量之表示法為分別與缺血同側之半腦做比值而得。Sham 控制組

(ipsilateral: 1.00 ± 0.00, contralateral: 0.82 ± 0.23)，溶劑的腦中風控制組(ipsilateral: 1.48 ± 0.07, contralateral: 1.04 ± 0.07)，TMPZ 20 mg/kg 給藥組(ipsilateral: 1.13 ± 0.06, contralateral: 0.97 ± 0.07)。經由實驗結果比較發現，於大鼠腦部局部缺血再灌流手術後 24 小時，與 sham control 比較，缺血同側半腦一氧化氮合成酵素的表現確實有明顯的上升，約達 sham control 之 iNOS 表現的 1.5 倍(Figure 5, P <0.01)，表示在經由中大腦缺血與再灌流傷害後，能夠具有意義地提高 iNOS 之表現，而 TMPZ 20 mg/kg 預防性投與藥物的情況下，發現 TMPZ 能夠明顯地抑制缺血所造成一氧化氮合成酵素表現增加的情形，並且與溶劑的腦中風控制組比較則具有非常明顯之差異(P <0.001)。另外，與缺血異側之半腦，於實驗當中各組並無明顯之統計差異。

五、TMPZ 對大鼠中腦動脈栓塞與再灌流所引起 caspase-3 表現之影響

有關 TMPZ 對大鼠中腦動脈栓塞與再灌流所引起 caspase-3 表現之影響，實驗方法及原理與前述相同。活化態的 caspase-3 被切為 17-19 kDa 之片段，因此，我們利用西方墨點法分析蛋白質表現，可以從轉漬膜上偵測到 17 kDa 蛋白質，即為 caspase-3 之表現位置(Figure 6)，各組樣本皆於大鼠腦部局部缺血/再灌流手術後 24 小時，取出大腦分成左右半腦以分析 caspase-3 之表現，實驗共分三大組各取左右半腦為六小組，lane 1、2 及 3 為缺血同側之半腦，lane 4、5 及 6 為缺血異側半腦，lane 1 及 4 為 sham 控制組(ipsilateral: 1.0 ± 0.0, contralateral: 1.06 ± 0.12)，lane 2 及 5 為溶劑的腦中風控制組(ipsilateral: 1.51 ± 0.07, contralateral: 1.02 ± 0.07)，lane 3 及 6 為 TMPZ 20 mg/kg 給藥組(ipsilateral: 1.11 ± 0.06, contralateral: 0.91 ± 0.09)，各組統計之表示法皆以與缺血半腦之比值而

得(n = 4)。由實驗結果發現，大鼠經由腦部局部缺血/再灌流手術 24 小時後，缺血同側半腦之 caspase-3 表現確實有明顯上升，約達 sham control 之 caspase-3 表現的 1.5 倍(P<0.01)，然而在預防性給藥後發現，TMPZ 20 mg/kg 能夠具有統計意義之抑制腦部缺血與再灌流傷害所引起的 caspase-3 之表現(P<0.05)。另外，與缺血異側之半腦，於實驗當中各組並無發現明顯之統計差異。

六、TMPZ 對大鼠中腦動脈栓塞與再灌流所引起 HIF-1α表現之影響

本實驗之方法及原理與前述相同，利用西方墨點法分析大鼠經中大腦梗塞/再灌流手術 24 小時後，左右半球 HIF-1α之表現，經電泳分析後，HIF-1α會出現在分子量 120 kDa 之位置，實驗共分三大組各取左右半腦為六小組(Figure 7)，lane 1、2 及 3 為缺血同側之半腦，lane 4、5 及 6 為缺血異側半腦。lane 1 及 4 為 sham 控制組(ipsilateral: 1.0 ± 0.0, contralateral: 0.95 ± 0.0)，lane 2 及 5 為溶劑的腦中風控制組(ipsilateral: 1.27 ± 0.00, contralateral: 0.96 ± 0.00)，lane 3 及 6 為 TMPZ 20 mg/kg 給藥組(ipsilateral: 0.98 ± 0.00, contralateral: 0.99 ± 0.00)，各組統計之表示法皆以與缺血半腦之比值而得(n = 1)。由實驗結果發現，經過缺血再灌流傷害 24 小時後，HIF-1α之表現有上升的情形，於 TMPZ 20 mg/kg 預防性給藥之後，對於缺血再灌流傷害引起之 HIF-1α表現有抑制作用。另外，缺血異側之半腦各組之間並未有明顯差異。

七、TMPZ 對於腦部均質液脂質過氧化作用影響

本實驗利用二價鐵離子刺激大鼠腦均質液使細胞膜產生非酵素性引起脂質過氧化作用，進而探討 TMPZ 直接抗氧化之能力。TMPZ 於濃度 0.5 μM、1.25 μM、2.5 μM 及 5 μM，皆沒有抑制二價鐵離子所引起之

脂質過氧化反應，但是當 TMPZ 單獨加入與 thiobarbituric acid 試劑混合反應而不加二價鐵離子時，其本身並不會干擾 thiobarbituric acid 所生成的顏色變化(Figure 8)。

八、TMPZ 於腦部皮質經中大腦梗塞再灌流後對 TNF-α mRNA 表現之影響

當腦部於缺血情況下，往往會使神經膠細胞活化，包括星狀神經膠細胞及神經微膠細胞，導致一些發炎前趨物質及毒性的細胞激素產生，進而毒害神經細胞。TNF-α即為頗具代表性的發炎前趨細胞激素之一，然而，當腦部受到外在的刺激，如感染、免疫反應、有毒物質、創傷或是缺血狀態下，都能夠引起 TNF-α之表現造成發炎反應的產生使腦部微血管通透性增加，進而促使淋巴球黏附與浸潤使腦部受到傷害。本實驗利用反轉錄-聚合連鎖反應來偵測，當腦部經由缺血/再灌流手術後 24 小時於大鼠腦部皮質部位 TNF-α之 mRNA 表現，其表現約可在 203bps 之鹼基對被偵測出。本實驗共分為三組進行比較，sham 控制組、溶劑的腦中風控制組及 TMPZ 20 mg/kg 給藥組，各取缺血同側之皮質分析，發現經中大腦梗塞再灌流手術後 24 小時皮質之 TNF-α mRNA 表現與 sham 控制組比較確實有明顯增加約 1.29 倍，當 TMPZ 20 mg/kg 預防性給藥後，可以發現 TMPZ 有明顯的抑制 TNF-α之 mRNA 之含量(Figure 9)。

九、TMPZ 合併 aspirin 對於大鼠中大腦動脈梗塞與再灌流腦損傷之影響

由 Figure 10 及 11 得知單獨使用 TMPZ 或 aspirin 能有意義預防中腦大動脈阻塞再灌流所造成的腦受損面積，此兩藥物合併時之效果與此兩單獨使用無有意義的差異。

肆、討論

於本實驗中，證實了 TMPZ 均在 20 mg/kg 高劑量藥物預防性投與之後，從型態學方面著眼，由 2 % TTC 染色結果得知可以有效的降低腦部缺血/再灌流 24 小時後所造成的傷害面積，於此時間點，我們想要進一步了解，TMPZ 以何機轉來達到神經的保護作用，因此，利用西方墨點法及免疫螢光染色法來偵測腦部 iNOS、nitrotyrosine、caspase-3、HIF-1α等蛋白質之變化，接著在使用反轉錄-聚合酵素連鎖反應分析 TNF-α之 mRNA 表現。

經由大鼠中大腦動脈梗塞手術前 10 分鐘預防性地投與 TMPZ 20 mg/kg，能夠減少中大腦動脈缺血/再灌流損害於缺血半腦區域所引起的 (a) iNOS 的表現上升 (b) nitrotyrosine 大量表現 (c) HIF-1α之表現上升 (d) TNF-α之 mRNA 表現增加 (e) caspase-3 之表現上升，證明 TMPZ 可以透過抑制發炎相關之 iNOS、peroxynitrite 及 TNF-α mRNA 表現，推測可能為因為減少氧化壓力之傷害，且抑制發炎細胞激素而降低發炎反應產生，進而對腦部具有神經保護作用。另一方面，TMPZ 也能夠抑制細胞凋亡路徑 caspase 之活化，進而減少細胞凋亡造成的腦神經細胞退化。

缺血性中風常伴隨著顯著的發炎反應發生，接著引起許多細胞激素的表現(Rothwell *et al.*, 1993)。然而，一些重要的媒介物質甚至會於各種形式之神經細胞引起 iNOS 的表現(Galea *et al.*, 1992)，且此表現不需經由鈣離子活化產生。然而，近來的研究發現，缺血所引起的 iNOS 表現會造成細胞傷害。事實上，在一些暫時性及永久性的缺血性動物中風模式中或是體外的腦缺血模式已經證實在缺血的情況下的確會造成 iNOS mRNA、蛋白質及酵素活性的大量表現(Iadecola *et al.*, 1995)。體內實驗

方面，iNOS 之免疫反應於缺血後 12-24 小時之間表現最為明顯，且能夠於受傷腦部之多型核嗜中性球(polymorphonuclear neutrophils)、星狀膠質細胞(astrocyte)及血管細胞，甚至是神經細胞中被發現(Iadecola *et al.*, 1995)。然而，缺血性中風調控 iNOS 表現之機轉到目前為止還不甚完全明瞭，但是許多的發炎前細胞激素已經被證實會於各種細胞系統中引起 iNOS 之表現。其中值得注意的是 interleukin-1β (IL-1β)、TNF-α及 interferon-γ，這些細胞激素能夠在腦部缺血性傷害數小時內被快速地誘發，而其表現之部位與 iNOS 表現於星狀膠質細胞、微膠質細胞、多型核細胞及巨噬細胞浸潤之梗塞區域，甚至是神經細胞不謀而合(Minc-Golomb *et al.*, 1996)。於基因層面而言，iNOS 主要可藉由 NF-κB 所調控，NF-κB 被認為是 iNOS 基因表現所需之轉錄因子(Xie *et al.*, 1994)。然而，NF-κB 也被證實能於缺血情況下被許多細胞激素刺激而活化(Moro *et al.*, 1998)。除此之外，iNOS 也會藉由 interferon-γ所需之 interferon regulatory factor-1 (IRF-1)這種位於 iNOS 基因之啟動子而活化(Xie *et al.*, 1994)。經由缺血所引起之氧化壓力本身會再度刺激產生 iNOS。在一項研究中發現，一種特殊的與 iNOS 相關之表現路徑能夠於缺氧狀態下被誘發。hypoxia indusible factor-1α (HIF-1α)同樣位於 iNOS 之啟動子區域而能調控 iNOS 之基因表現。因此，iNOS 也被認為是缺氧誘發基因之一 (Melillo *et al.*, 1995)。

於體外腦缺血試驗中發現，由缺血所造成之興奮性毒害，引起 glutamate 等興奮性神經傳導物質釋放而活化 NMDA 受體路徑之中包含 iNOS 之表現，而此 iNOS 表現為透過鈣離子活化 NF-κB 所調控(Cardenas *et al.*, 2000)。然而，有關 glutamate 引起 iNOS 表現的詳細機轉，還並不是很清楚，但仍可以從一些蛛絲馬跡中推測 NMDA 受體活化導致的氧

化壓力，是由於刺激氧自由基的形成而來，例如超氧陰離子自由基(superoxide anion) (Lafon-Cazal *et al.*, 1993)。除此之外，某些細胞激素會因為接觸到具毒性濃度之興奮性胺基酸而被釋放或表現(Bock *et al.*, 1996)。依據先前的研究指出，glutamate 能夠增加 TNF-α convertase (TACE)表現，接著引起 TNF-α釋放(Hurtado *et al.*, 2001)。另一個可能性為 glutamate 透過轉錄因子 NF-κB 之活化導致 iNOS 表現(Guerrini *et al.*, 1995)。

然而，在一篇研究中已證實 TACE/ TNF-α路徑參與在 iNOS 表現過程中，他們利用 TACE 抑制劑 1,10-phenanthroline 或 BB3103 不僅能夠抑制經由缺血引起之 TNF-α釋放同時也會抑制 iNOS 表現(Hurtado *et al.*, 2001)。事實上，同一篇研究當中指出，利用 TNF-α的抗體將 TNF-α中和能夠抑制 iNOS 表現，接著外加入 TNF-α後會逆轉於缺血狀態BB3103 所引起 iNOS 之抑制作用，首次建立了 TNF-α參與在中樞神經系統缺血性傷害所引起之 iNOS 表現。

利用選擇性的 iNOS 抑制劑(aminoguanidine 或 1400W)可以用來研究腦缺血狀態所引起之 iNOS 表現(Zhang *et al.*, 1996)。於缺血的狀態下，數小時內便會引發 iNOS 表現，經由中大腦動脈梗塞後 12-24 小時投與 iNOS 抑制劑發現，在 iNOS 已經被表現的情況下，選擇性 iNOS 抑制劑仍可以抑制腦部傷害面積約 30-40 %(Iadecola *et al.*, 1995)。利用 antisense 之 oligodeoxynucleotide 對 iNOS 產生抑制作用也同樣能夠保護腦部避免腦缺血所造成的傷害(Parmentier-Batteur *et al.*, 2001)，此外，利用基因轉殖技術之小鼠，剔除 iNOS 表現之基因後，經由腦缺血/再灌流模式之研究也能夠證實此論點(Iadecola *et al.*, 1997)。綜合以上結果得知，腦缺血性與再灌流傷害導致 NO 的釋放是經由 iNOS 表現而來。

本實驗中，於大鼠中大腦動脈梗塞手術前 10 分鐘預防性給藥(TMPZ 20 mg/kg)，確實能減少腦部經過 24 小時缺血/再灌流之傷害，且經由西方墨點法及反轉錄-酵素連鎖反應方法得知此保護作用可能是透過抑制 iNOS 及 TNF-α產生。缺血後血液的再灌流會加重腦部傷害程度(Barinaga *et al.*, 1996)並且伴隨著發炎反具腦前端 3-9 mm 之區域應，特別是嗜中性白血球及巨噬細胞所引起的(Feuerstein, 1994)。這些發炎細胞進一步產生大量的 NO 及 $O_2^{\cdot -}$ 並且快速地形成 peroxynitrite。透過 iNOS 或 nNOS 抑制劑減少 NO 生成進而避免 peroxynitrite 產生，能夠明顯地降低缺血/再灌流傷害(Hirabayashi *et al.*, 2000)。因此，NO 及 $O_2^{\cdot -}$ 及它們的反應性生成物(peroxynitrite)對於缺血再灌流引起之腦部傷害探討，扮演著一個重要的角色。

於本實驗中，利用免疫螢光染色法偵測大鼠腦部皮質 nitrotyrosine 於 24 小時缺血再灌流傷害後之表現。Nitrotyrosine 是 peroxynitrite 與 tyrosine 反應生成物，由於 peroxynitrite 非常不穩定，很容易與其他物質結合，因此，藉由免疫螢光染色偵測 nitrotyrosine 產生量，用來作為 peroxynitrite 表現程度指標。從我們的研究結果發現，確實在缺血部位之大腦皮質偵測到大量的 nitrotyrosine 生成，但是由於缺血異側之半腦皮質幾乎沒有 nitrotyrosine 表現，因此推測中大腦動脈缺血/再灌流後 24 小時後，peroxynitrite 會大量表現在於缺血腦部組織而產生傷害，且可能是透過 iNOS 及 nNOS 所釋放之 NO 或是其他 reactive oxygen spacies (ROS)所造成。預防性投與 TMPZ 20 mg/kg 皆可以抑制受到缺血再灌流傷害之腦組織所引起的 nitrotyrosine 表現。此結果也可進一步佐證，TMPZ 可以經由抑制 iNOS 表現，使 NO 生成減少而達到保護腦部避免缺血/再灌流引起之氧化性傷害產生。另一方面，TMPZ 於此實驗中並沒

有發現直接抗氧化之能力，然而，於 Zhang 等人(Zhang *et al.*, 2003)之研究指出，在人類多型核淋巴球細胞 TMPZ 可以清除由 fMLP 刺激之 superoxide anion 產生，而具有抗氧化作用。因此，此方面之效果可能需要再做進一步的實驗確認。

TNF-α為一種於局部腦缺血情況下能被增加調控的免疫調節及發炎前趨細胞激素，然而，詳細的機轉仍被研究中。根據近年來的研究發現，TNF-α具有雙向作用，及損害性(Dawson *et al.*, 1996)或保護性作用(Bruce *et al.*, 1996)，此取決於與 TNF-α接觸之時間與濃度。TACE 於腦部在一般生理狀態能持續被表現(Karkkainen *et al.*, 2000)，其扮演著釋放水溶性 TNF-α活化態(membrane-anchored precursor)之必要角色(Black *et al.*, 1997)；TACE 主要表現在神經細胞、星狀神經膠質細胞及內皮細胞(Goddard *et al.*, 2001)。培養的前腦細胞(cultured forebrain slices)於缺氧與缺糖分試驗中能表現 TACE，並且確認水溶性 TNF-α能被刺激而增加表現(Hurtado *et al.*, 2001)。近年來的文獻指出，藉由投與選擇性 TACE 抑制劑 DPH-067517 在大鼠腦栓塞模式中發現具有神經保護效果，另外水溶性之 TNF-α也會明顯下降，推測可能為 TACE 的抑制所造成。因此，降低水溶性 TNF-α釋放可能會避免缺血性傷害而具有神經保護作用(Wang *et al.*, 2004)。

近年來的研究中提及缺血性/再灌流傷害引起細胞激素釋放之理論，在一些動物實驗中發現，投與細胞激素受體抑制劑，確實能夠有效減少缺血性傷害發生，從本實驗中反轉錄-聚合酵素連鎖反應偵測 TNF-α mRNA 表現之結果可以加以佐證：腦部於缺血性傷害後 24 小時的情況下，依然可以被偵測到 TNF-α累積，表示腦部缺血區域神經細胞，仍然受到刺激而持續釋放發炎前趨物質 TNF-α而產生發炎反應，在

投與 TMPZ 20 mg/kg 之後發現藥物能夠有效抑制 TNF-α mRNA 表現，並減少發炎反應造成之腦部傷害。

Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)為一種能在各種細胞中表現之轉錄因子，特別是在缺氧或是鐵離子刺激的情況下被活化(Matrone *et al.*, 2004)。它具有兩個次單元(subunits)，HIF-1α及 HIF-1β，主要透過α單元來主導 HIF-1 之活性。在正常含氧的環境下，HIF-1α會持續地維持製造及降解反應(ubiquitin-proteasome system)平衡，使之保持於穩定的狀態；相對地，HIF-1β則是穩定的表現。正常的生理反應下，HIF-1 扮演轉錄因子之角色，能夠啟動下游數種基因表現，然而這些基因表現是為了使細胞能夠適應缺氧的狀態下所產生，如此之調和作用，包含了紅血球生成 (erythropoiesis) 、 血 管 新 生 (angiogenesis) 、 鐵 離 子 平 衡 (iron hemeostasis)、葡萄糖及能量代謝(glucose and energy metabolism)、細胞增生(cell proliferation)及細胞存活(cell survival)。Erythropoietin (EPO)於 1992 年代發現這種蛋白質之低氧反應標的基因(hypoxia response target gene)正是 HIF-1。同樣地，vascular endothelial growth factor (VEGF) 也是必須依靠 HIF-1 才能表現，產生新生血管藉以提供缺氧細胞更多的血流供給氧氣及養分。另外，還有 glycolytic enzymes 及 insulin-like growth factor 2 (IGF-2)等，都是透過增加氧氣的運送來提供於缺氧組織或細胞代謝所需(Matrone *et al.*, 2004)。

近來許多研究指出，HIF-1 具有促進細胞存活的能力，這項論點讓我們聯想到，HIF-1 是否為抗細胞凋亡因子。支持這項論點的研究提及 HIF-1 可以避免細胞缺氧而走向凋亡，因此，HIF-1 被認為能夠在低氧的狀況下能夠對組織或細胞產生保護作用。在這層關係下，低氧所誘發之 HIF-1 能抑制 p53 活化導致細胞存活(Li *et al.*, 2004)。另一方面，低氧

狀態確實可以誘發抗凋亡蛋白質表現，如 inhibitor of apoptosis protein-2 (IAP-2)或是 apoptosis repressor with caspase recruitment domain (ARC)，雖然這些作用並非透過 HIF-1 相關路徑而來。在一項相反的結果指出，缺氧會造成細胞走向凋亡，特別是透過 HIF-1 的路徑產生。根據支持此項論點之研究提及 HIF-1 能夠增加調控凋亡前訊息蛋白質，如 BNIP3 或 NIX，藉由影響 Bcl-2 family 引起細胞凋亡產生。然而，有關 HIF-1 與細胞凋亡機轉之關聯性仍需要更多的證據加以佐證(Goda *et al.*, 2002)。根據 Schmid 等人(Schmid *et al.*, 2004)的研究指出，低氧造成 HIF-1α累積及活化，在更嚴重之低氧甚至無氧狀態，p53 開始活化並與 HIF-1α競爭與 p300 結合。低氧接近無氧狀態情形越久，p53 的表現越強，相對地 HIF-1α降解越多，表示低氧引起細胞死亡。於缺氧前期，HIF-1 之轉錄活性能保護細胞並免凋亡產生。隨著缺氧時間越久，HIF-1 與隨之而來的 p53 活化將決定細胞是否走向凋亡路徑或是保護細胞避免凋亡產生。

缺血/再灌流傷害會造成細胞壞死及細胞凋亡，然而，細胞凋亡的路徑有相當多種，其中大部份需要 caspases 活化參與。Caspases 為 cysteine aspartyl-specific protease，平時以 zymogens 或 pro-caspase 的形態表現，當它活化時會被切斷成 aspartic acid residues。Caspases 可分為兩大類，一是上游之發動者(caspase-8，-9，-10)，再來是下游之終結者(caspase-3，-6，-7)，須先將本身切成小段，才能活化進而摧毀細胞體，其餘之 caspase-1，-2，-4，-5，-11，-12 則是兩者皆可。其中，又以 caspase-3 為 caspase 相關之細胞凋亡路徑中，最終的訊息傳遞步驟。因此，利用偵測 caspase-3 之表現，能夠了解目前細胞凋亡進程與程度。

由本實驗之結果顯示，在大鼠中大腦動脈缺血/再灌流 24 小時後，發現 HIF-1α及 caspase-3 有增加的情形，表示細胞凋亡正在產生，投與

TMPZ 20 mg/kg 預防性給藥能夠減少 HIF-1α及 caspase-3 的表現，減少細胞凋亡產生。另外發現發炎反應之發炎前趨細胞激素 TNF-α能夠促進 caspase-3 活化，HIF-1α也能透過 p53 之作用間接影響 caspase-3 之活性，進而影響細胞凋亡路徑產生。因此，我們推測 TMPZ 經由抑制 HIF-1α表現之結果顯示，藥物可能透過保護作用進而使缺血所造成的傷害降低，而造成缺氧所引起之 HIF-1α不會大量表現。另一方面，藥物並不是抑制 HIF-1α促進細胞存活之能力而導致凋亡，反而是抑制 HIF-1α累積所造成之細胞凋亡路徑產生，此推論可進一步由 caspase-3 之抑制加以佐證。

本實驗於藥物預防缺血性中風產生發炎反應之研究，可作更深入的探討，未來可以利用西方墨點法偵測 TNF-α之蛋白質表現，確認藥物是否能抑制缺血性中風所造成之 TNF-α產生，甚至更進一步探討與發炎反應相關之發炎前趨物質及吸附因子等，或是利用不同種類之神經細胞，作更深入的發炎反應訊息傳遞，藉以更深一層了解 TMPZ 對於腦部缺血/再灌流傷害之保護機轉。另一方面，有關細胞凋亡之研究，也可以經由研究更上游之凋亡訊息傳遞路徑及免疫染色偵測凋亡細胞表現，進一步佐證藥物抑制細胞凋亡路徑產生。

在我們的實驗發現 TMPZ 併用 aspirin 之效果並沒有比此兩藥單獨使用的好，可能原因是在 TMPZ 20mg/kg 或 aspirin 5 mg/kg 劑量下已能達到不錯之腦保護之效果以及其閥值，所以在這些劑量下可能看不出其合併使用之效果，如是如此更能符合我們當初合併藥物之要求，儘量把藥物劑量降低，以達到降低副作用的產生亦能達到有效之預防效果。

缺血性中風之神經保護製劑到現在仍不斷地被研究，目前有很多進入臨床試驗之研究藥物正在進行中，但是這類藥物目前臨床上並未有任

何一種正式進入第四期臨床試驗。因此，若是 TMPZ 併用 aspirin 能夠被證實於人類缺血性中風也能夠具有保護作用，預防中風造成腦部傷害之進程，對於減少病患之痛苦及減輕家人及整個國家的醫療照護社會成本，都會有極大的幫助。

伍、結論與建議

綜合以上之結果顯示，TMPZ 能夠經由抑制 iNOS 表現，接著抑制 nitrotyrosine 產生，減少發炎反應產生，其中，抑制 iNOS 的作用可能是透過抑制 TNF-α mRNA 表現及 HIF-1α而得，另一方面 TMPZ 並無直接抗氧化作用， 因此還需異更進一步的測試，才能確定 TMPZ 的保護腦部缺血/再灌流傷害是否由其抗氧化作用所造成。另外，TMPZ 透過 TNF-α mRNA 及 HIF-1α之抑制，能進一步調控細胞凋亡的發生，導致 caspase-3 表現降低。雖然本實驗並沒有發現 TMPZ 合併 aspirin 有提高腦保護的作用，但是我們推測 TMPZ 及 aspirin 在本實驗所使用的劑量下已達到其閾值，所以我們預期如將此兩藥的劑量降低便可觀察到些兩藥合併之效果，而且在臨床上便能夠大大降低因長期服用所產生的副作用，在未來，我們可以利用降低劑量來作更一步探討 TMPZ 合併 aspirin 對於缺血/再灌流實驗中所造成之影響，以及分子機轉之探討。

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 CCMP94-RD-031 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

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

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

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

Awtry EH, Loscalzo J. Aspirin. *Circulation* 2000; 101: 1206 –18.

Barinaga M. Finding new drugs to treat stroke. Science. 1996; 272: 664-6.

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

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

Beijing Institute of Pharmaceutical Industry. Studies of active components of Ligusticum Wallichii Franch. I. Extraction, isolation and Stucture identification of tetramethylpyrazine. *Chin. Med. J.* 1977, 7: 420-1.

Beijing Institute of Pharmaceutical Industry. Studies of active components of Ligusticum Wallichii Franch. II. Pharmacological studies on tetramethylpyrazine. *Chin. Med. J.* 1977, 8: 464-6.

Beijing Institute of Pharmaceutical Industry. Studies of active components of Ligusticum Wallichii Franch. III. A report of the treatment of tetramethylpyrazine in 218 patients with ischemia cerebrovascular diseases. *Chin. Med. J.* 1977, 8: 467-9.

Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture: neurological and

pathological evaluation of an improved model. *Stroke* 1996; 27: 1616-23.

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

Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. Nature. (Lond) 1997; 385: 729-33.

Bolz SS, Pohl U. Indomethacin enhances endothelial NO release: evidence for a role of PGI2 in the autocrine control of calcium-dependent autacoid production. *Cardiovasc. Res.* 1997;36:437– 44.

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

Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, Holtsberg FW, and Mattson MP. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. Nat Med. 1996; 2: 788-94

Cardenas A, De Alba J, Moro MA, Leza JC, Lorenzo P, Lizasoain I. Protective effect of N-(3-(aminomethyl)benzyl) acetamidine, an inducible nitric oxide synthase inhibitor, in brain slices exposed to oxygen-glucose deprivation. Eur J Pharmacol. 1998; 354: 161-5.

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

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

Connolly ES Jr, Winfree CJ, Prestigiacomo CJ, Kim SC, Choudhri TF, Hoh

BL, Naka Y, Solomon RA, Pinsky DJ. Exacerbation of cerebral injury in mice which express the P-selectin gene: identification of P-selectin blockade as a new target for the treatment of stroke. *Circ. Res.* 1997; 81: 304-10.

Dawson DA, Martin D, and Hallenbeck JM. Inhibition of tumour necrosis factor-alpha reduces focal cerebral ischemic injury in the spontaneously hypertensive rat. Neurosci Lett. 1996; 218: 41-4.

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

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

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

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

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

Dreser H. Pharmacologisches u¨ber Aspirin (Acetylsalicyl-sau¨ re). Pflugers Arch 1899;76:306– 18.

Galea E, Feinstein DL, Reis DJ. Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. Proc Natl Acad Sci. USA. 1992; 89: 10945-9.

Ghiselli A, Laurenti O, De Mattia G, Maiani G, Ferro-Luzzi A. Salicylate hydroxylation as an early marker of in vivo oxidative stress in diabetic patients. Free *Radic. Biol. Med.* 1992;13:621– 6.

Goda N, Dozier SJ, Johnson RS. HIF-1 in cell cycle regulation, apoptosis, and tumor progression. Antioxid Redox Signal. 2003; 5: 467-73.

Goddard DR, Bunning RA, and Woodroofe MN. Astrocyte and endothelial

cell expression of ADAM 17 (TACE) in adult human CNS. Glia. 2001; 34: 267-71.

Guerrini L, Blasi F, Denis-Donini S. Synaptic activation of NF-kappa B by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro. Proc Natl Acad Sci. USA. 1995; 92: 9077-81

Hirabayashi H, Takizawa S, Fukuyama N, Nakazawa H, Shinohara Y. Nitrotyrosine generation via inducible nitric oxide synthase in vascular wall in focal ischemia-reperfusion. Brain Res. 2000; 852: 319-325.

Ho WKK, Web HL, Lee CM Tetramethylpyrazine for treatment of experimentally induced stroke in Mongolian gerbils. *Stroke* 1989, 20: 96-9.

Hui KK, Yu JL,. Tse E, Borst S The effect of tetramethylpyrazine on the human platelet alpha$_2$-adrenergic receptor adenylate cyclase system. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 1987, 8: 3-14.

Hurtado O, Cardenas A, Lizasoain I, Bosca L, Leza JC, Lorenzo P, Moro MA. Up-regulation of TNF-alpha convertase (TACE/ADAM17) after oxygen-glucose deprivation in rat forebrain slices. Neuropharmacol. 2001; 40: 1094-102.

Husain S, Andrews NP, Mulcahy D, Panza JA, Quyyumi AA. Aspirin improves endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 1998; 97:716 –20.

Hwang YS, Shin CY, Huh Y, Ryu JH. Hwangryun-Hae-Dok-tang (Huanglian-Jie-Du-Tang) extract and its constituents reduce ischemia-reperfusion brain injury and neutrophil infiltration in rats. *Life Sci.* 2002; 71: 2105-17.

Iadecola C, Ross ME. Molecular pathology of cerebral ischaemia: delayed gene expression and strategies for neuroprotection. Ann N Y Acad Sci. 1997; 835: 203-17.

Iadecola C, Zhang F, Xu S, Casey R, Ross ME. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 1995; 15: 378-84.

Jeffreys JAD, The alkaloids of pereunial ryegrass (Lolium Perenne L.) IV. Isolation of a new base, perlolyrine. The crystal structure of its hydrobromide dihydrateand the synthesis of the base. *J. Chem. Soc.* 1970, 8: 1091-5.

Karkkainen I, Rybnikova E, Pelto-Huikko M, and Huovila AP.

Metalloprotease-disintegrin (ADAM) genes are widely and differentially expressed in the adult CNS. *Mol Cell Neurosci.* 2000; 15: 547-60.

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

Li J, Zhang X, Sejas DP, Bagby GC, Pang Q. Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53. J Biol Chem. 2004; 279: 41275-9.

.Liu SY, Sylvaster DM Antithrombotic/antiplatelet activity of tetramethylpyrazine. *Thromb. Res.* 1990, 58: 129-40.

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

Lopez-Farre A, Caramelo C, Esteban A, Alberola ML, Millas I, Monton M, Casado S. Effects of aspirin on platelet-neutrophil interactions: role of nitric oxide and endothelin-1. *Circulation.* 1995;91:2080 –8.

Maclagan TJ. The treatment of acute rheumatism by salicin. *Lancet* 1876; i: 342– 83.

Matrone C, Pignataro G, Molinaro P, Irace C, Scorziello A, Di Renzo G F, Annunziato L. HIF-1alpha reveals a binding activity to the promoter of iNOS gene after permanent middle cerebral artery occlusion. J Neurochem. 2004; 90: 368-78.

Melillo G, Musso T, Sica A, Taylor LS, Cox GW, Varesio L. A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. J Exp Med. 1995; 182: 1683-93.

Minc-Golomb D, Yadid G, Tsarfaty I, Resau JH, Schwartz JP. In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in cerebellar neurons. J Neurochem. 1996; 66: 1504-9

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: 445-56.

Moran PM, Higgins LS, Cordel B, Moser PC Age related learning deficits

in transgenic mice expressing the 721-amino acid isoform of human beta-amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 5341-5.

Ojewole JAO Blockade of adrenergic and cholinergic transmission by tetramethylpyrazine. *Planta. Medica.* 1981, 43: 1-10.

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

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

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

Parmentier-Batteur S, Bohme GA, Lerouet D, Zhou-Ding L, Beray V, Margaill I, Plotkine M. Antisense oligodeoxynucleotide to inducible nitric oxide synthase protects against transient focal cerebral ischemia-induced brain injury. J Cereb Blood Flow Metab. 2001; 21: 15-21.

Peng W, Hucks D, Priest RM, Ward JPT. Ligustrazine-induced endothelium-dependent relaxation in pulmonary arteries via an NO-mediated and exogenous L-arginine-dependent mechanism. *Br. J. Pharmaco.* 1996, 119: 1063-71.

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

Roth GJ, Majerus PW. The mechanism of the effect of aspirin on human platelets, I: acetylation of a particulate fraction protein. *J. Clin. Invest.* 1975;56:624–32.

Rothwell NJ, Relton JK. Involvement of cytokines in acute neurodegeneration in the CNS. *Neurosci Biobehav Rev.* 1993; 17: 217-27.

Schmid T, Zhou J, Brune B. HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia. J Cell Mol Med. 2004; 8: 423-31.

Sheu JR, Kan YC, Hung WC, Ko WC, Yen MH. Mechanisms involved in

the antiplatelet activity of tetramethylpyrazine in human platelets. *Thromb. Res.* 1997 Nov 1;88(3):259-70.

Sheu JR, Kan YC, Hung WC, Lin CH, Yen MH. The antiplatelet activity of tetramethylpyrazine is mediated through activation of NO synthase. *Life Sci.* 2000 Jul 14;67(8):937-47.

Steer KA, Wallace TM, Bolton CH, Hartog M. Aspirin protects low density lipoprotein from oxidative modification. *Heart.* 1997; 77: 333–7.

Stone E. An account of the success of the bark of the willow tree in the cure of agues. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 1763;53:195–200.

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

Wang WJ Changes of nail fold microcirculation in 28 cases of acute cerebral thrombosis treated with Ligustrazine (original in Chinese). *Chin. J. Neurol. Psychiatry* 1984, 17: 121-4.

Wang X, Feuerstein GZ, Xu L, Wang H, Schumacher WA, Ogletree ML, Taub R, Duan JJ, Decicco CP, Liu RQ. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme by a selective antagonist protects brain from focal ischemic injury in rats. Mol Pharmacol. 2004; 65 :890-6.

Weiss HJ, Aledort LM. Impaired platelet-connective-tissue reaction in man after aspirin ingestion. *Lancet.* 1967; 2: 495– 7.

Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. J Biol Chem. 1994; 269: 4705-8.

Xue Q Effect of Chuanxionqin (tetramethylpyrazine) on microcirculatory perfusion in hamsters and capillary permeability in rat. *Proc. Cams. Pumc.* 1989, 4: 224-8.

Zhang F, Casey RM, Ross ME, Iadecola C. Aminoguanidine ameliorates and L-arginine worsens brain damage from intraluminal middle cerebral artery occlusion. Stroke. 1996; 27: 317-23.

Zhang Z, Wei T, Hou J, Li G, Yu S, Xin W. Tetramethylpyrazine scavenges superoxide anion and decreases nitric oxide production in human polymorphonuclear leukocytes. Life Sci. 2003; 72: 2465-72.

柒、圖、表

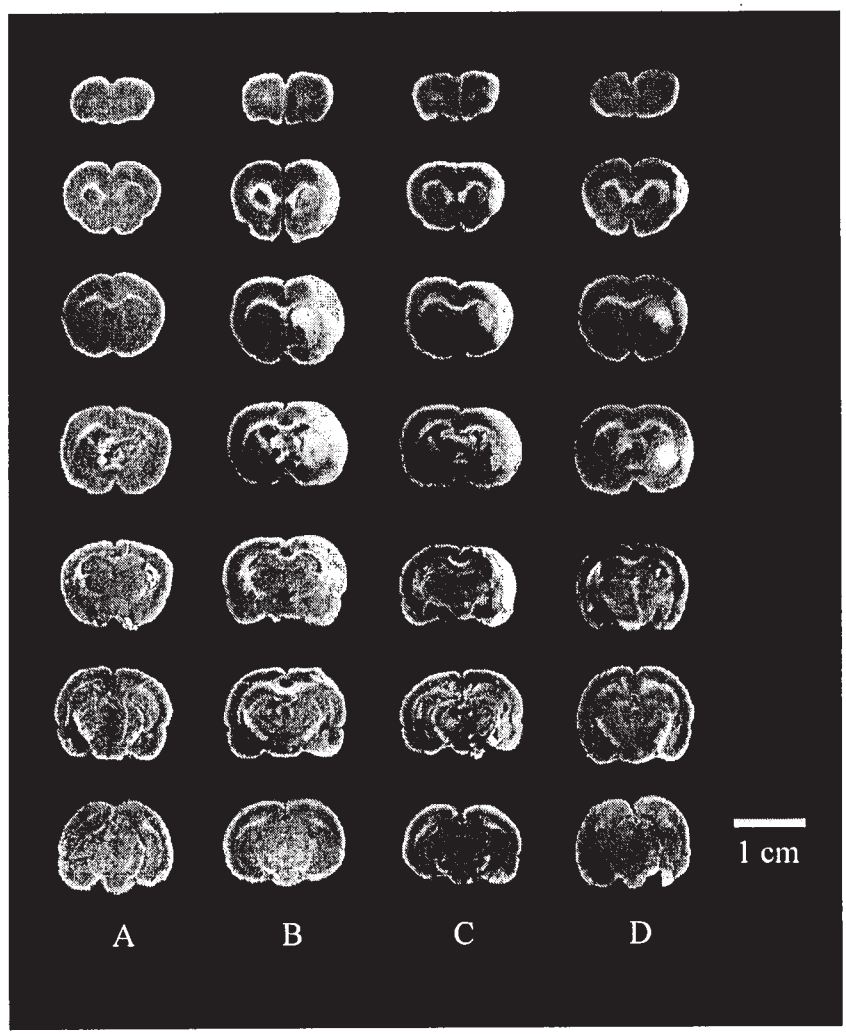


Figure 1. Effect of TMPZ in ischemia/reperfusion brain injury by middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats. Digital photographs show the infarct region in brain sections stained by 2% TTC 24 hours after middle cerebral artery occlusion (MCAO). Rats were pretreated with vehicle or TMPZ (10 or 20 mg/kg, ip.) before the onset of MCAO compared to sham control. Panel A means the sham control group. Panel B means the vehicle (cremophor ： ethanol ： PBS = 1: 1: 4) control. Panel A and B present the damage region enlarged after ischemia and reperfusion cerebral injury, and panel C and D show after the administration of TMPZ (10 or 20 mg/kg), the attenuation of the infarct region.

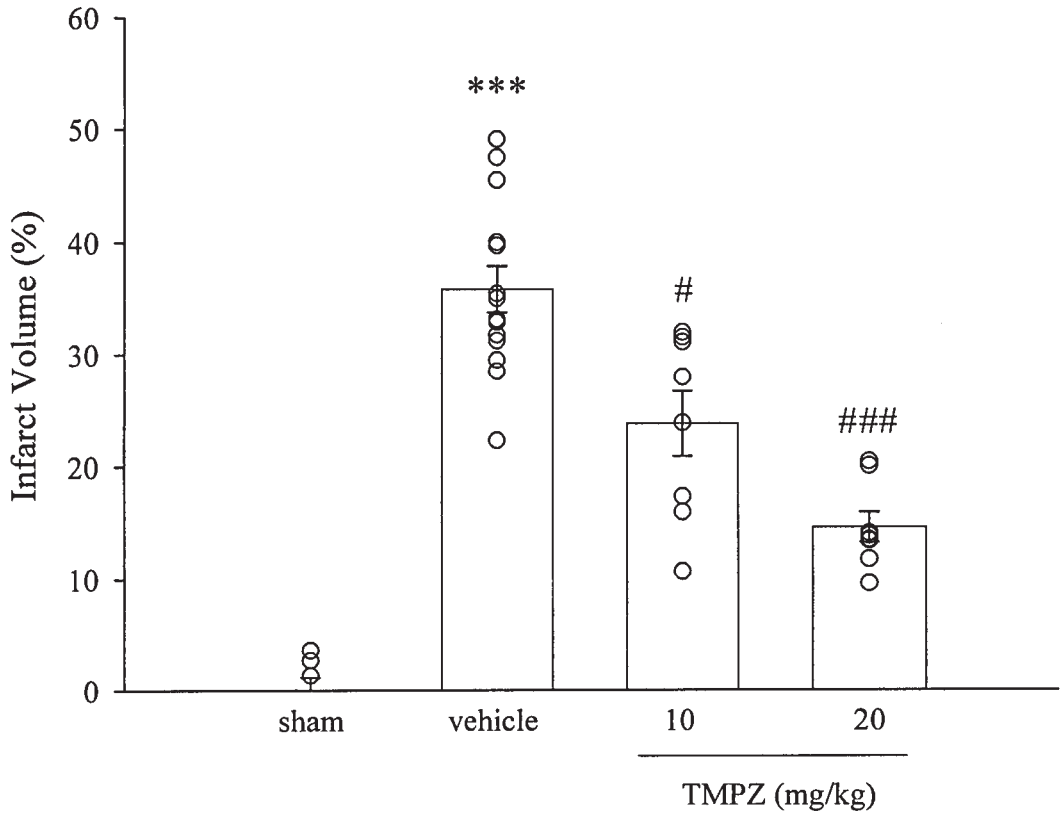


Figure 2. Dose-response curves of TMPZ in ischemia/reperfusion brain injury induced by middle cerebral artery occlusion in rats. Rats were pretreated with TMPZ (10 mg/kg or 20 mg/kg) or vehicle (cremophor : ethanol : PBS = 1: 1: 4) 15 mins before MCAO compared to sham control. Data are expressed as percentage (%) of contralateral hemisphere and presented as mean ± SEM ($^{***}P < 0.001$ compared with sham group, $^{\#}P < 0.05$ and $^{\#\#\#}P < 0.001$ compared with vehicle group, n = 8-14).

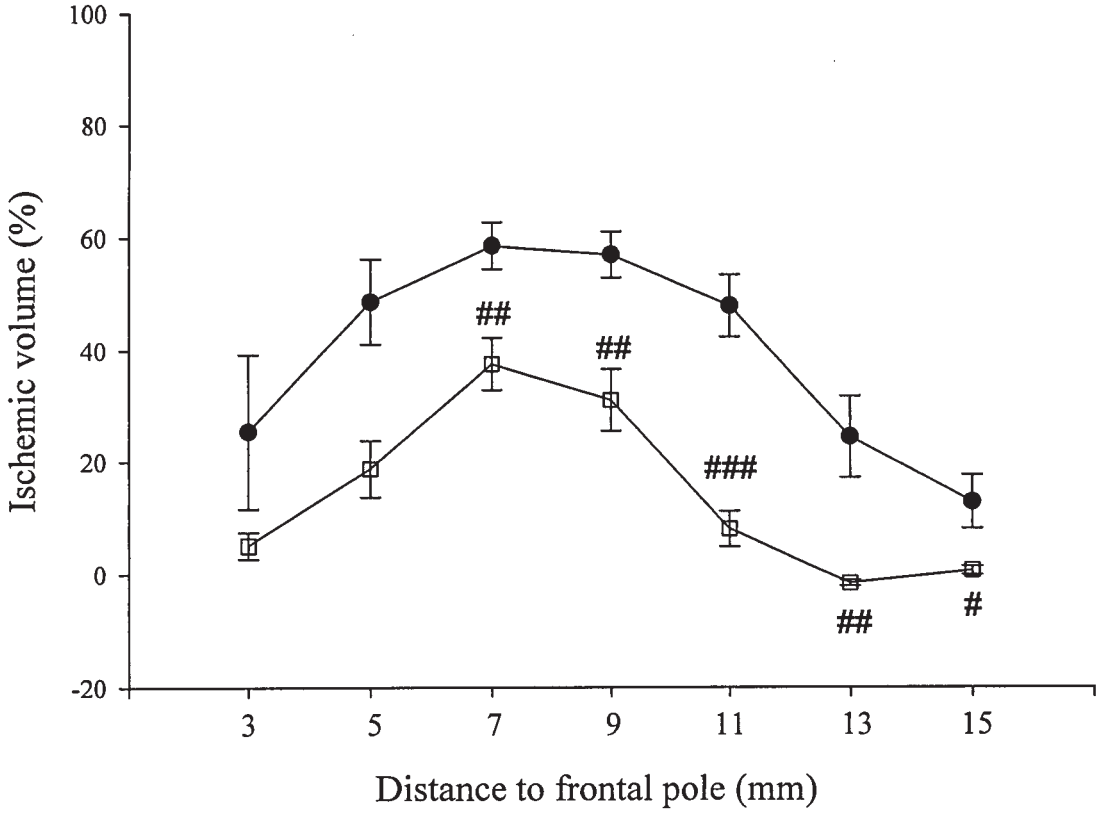


Figure 3. Effects of TMPZ in attenuating the infarct volume at slices. Brains were dissected 24 hours from reperfusion and sectioned at 2mm thickness in the region from 1 mm to 15 mm of distance to frontal pole. Digital photographs of Infarct area (%) stained by 2%TTC after 1 h MCAO and 24 h reperfusion was showed in each brain sections. [vehicle control group (●) and TMPZ 20 mg/kg group (□)]. The infarct size of the third section was largest than others. The ischemic region was attenuated by the treatment of TMPZ 20 mg/kg in sections. ($^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ and $^{\#\#\#}P < 0.001$ means TMPZ compared with vehicle control group)

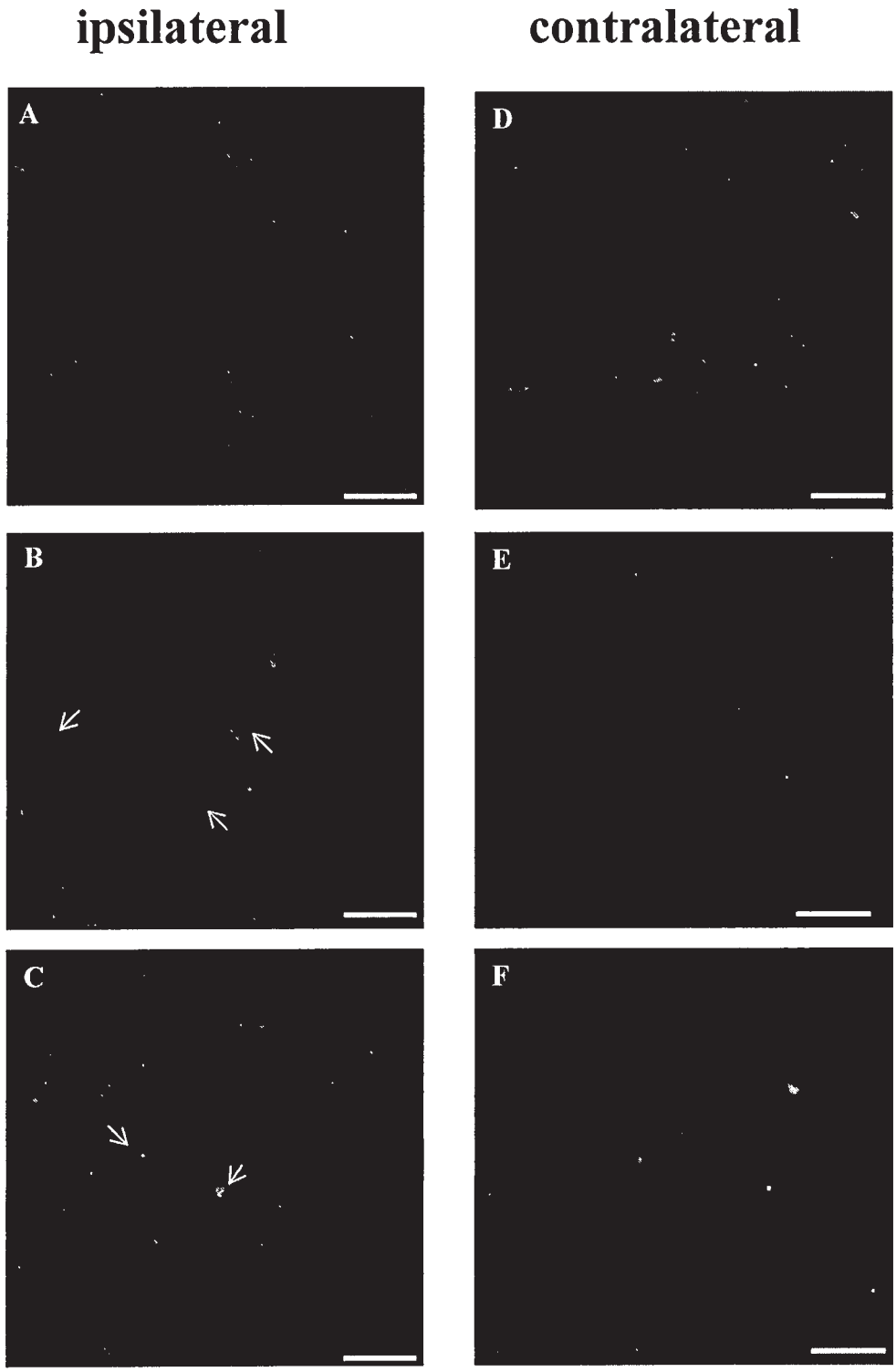


Figure 4. Effect of TMPZ reduced expression of nitrotyrosine in ipsilateral brain cortex against ischemia and reperfusion injury. Immunofluorescent staining of nitrotyrosine in ipsilateral and contralateral brain hemisphere (-0.3 mm from the Bregma) 24 hours after middle cerebral artery occlusion. A, B and C are ipsilateral cortex. D, E and F are contralateral cortex. A and D are sham control. B and E are vehicle control. C and F are pretreated with TMPZ (20 mg/kg) (scale bar = 100 μm in A-F. Magnification: x200).

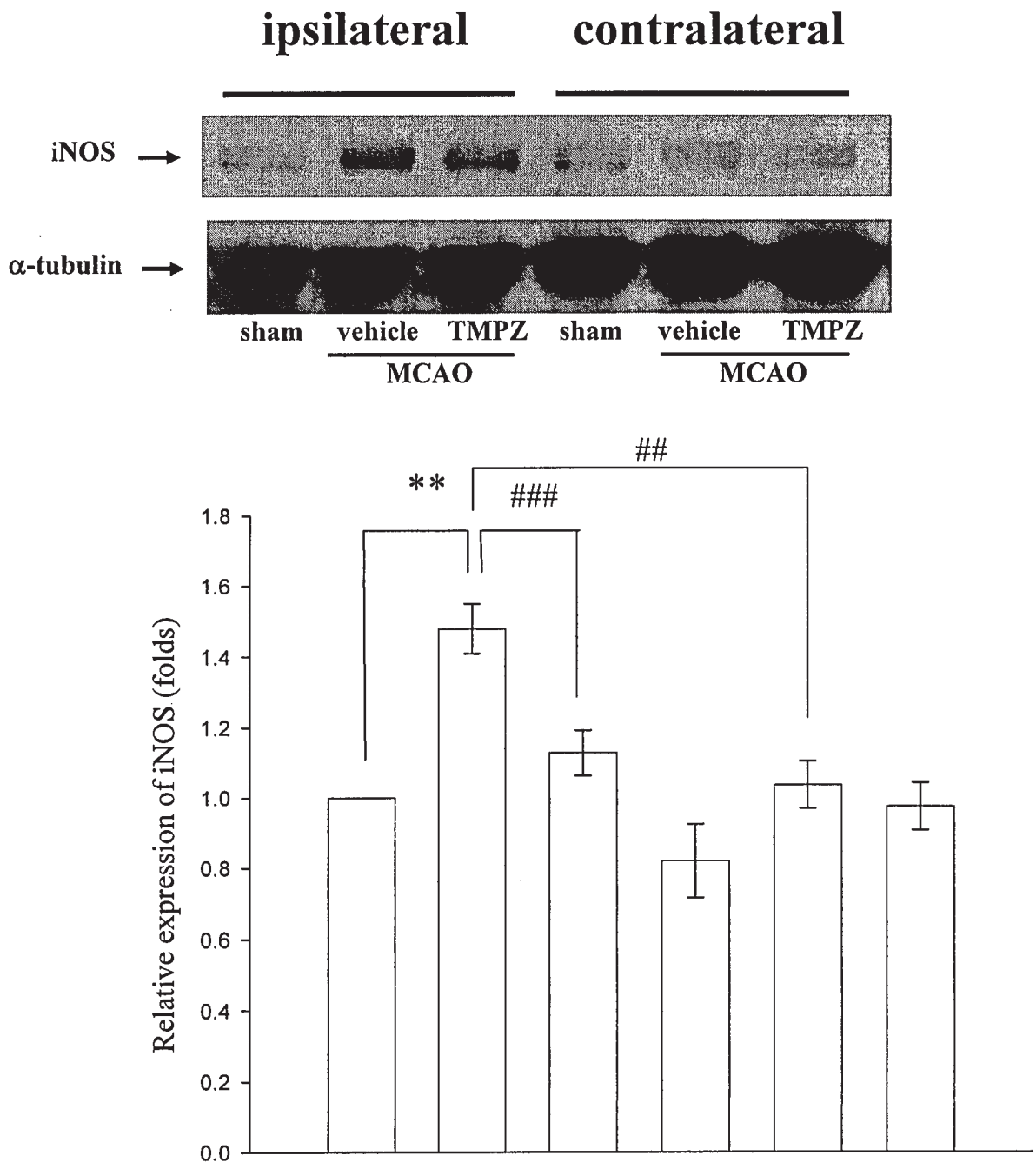
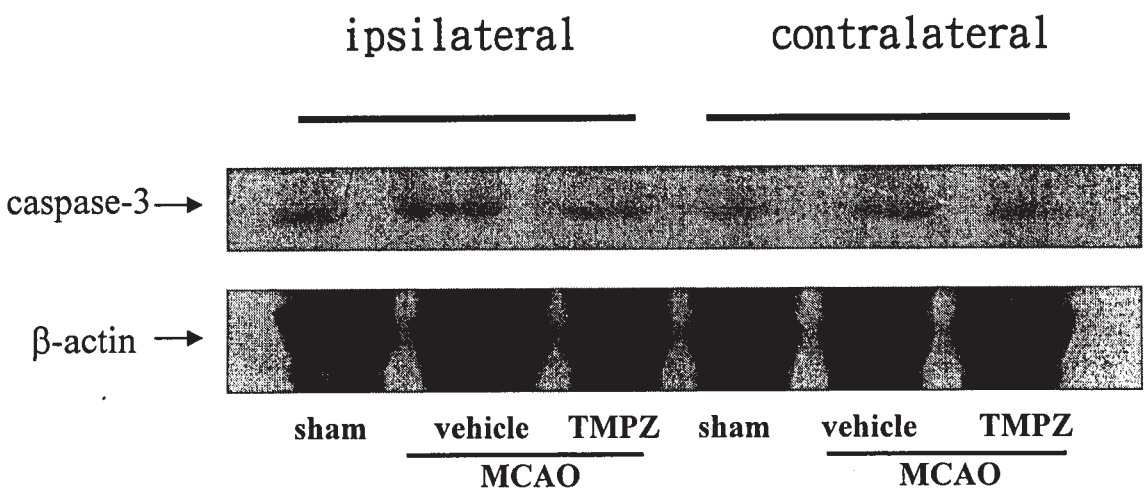


Figure 5. Expression of iNOS in ispilateral and contralateral brain hemisphere 24 hours after middle cerebral artery occlusion measured by immunoblotting. Rats are pretreated with TMPZ (20 mg/kg) before ischemia compared with vehicle or sham control. 1, 2 and 3 are represented as ipsilateral hemisphere. Land 4, 5 and 6 are represented as contralateral. Lane 1 and 4 are sham control. Lane 2 and 5 are treated with vehicle. Lane 3 and 6 are treated with TMPZ. ($^{**}P < 0.01$ compared with sham control group of ipsilateral brain hemisphere, $^{\#\#}P < 0.01$ and $^{\#\#\#}P < 0.001$ compared with vehicle control group of ipsilateral brain hemisphere, n = 5).



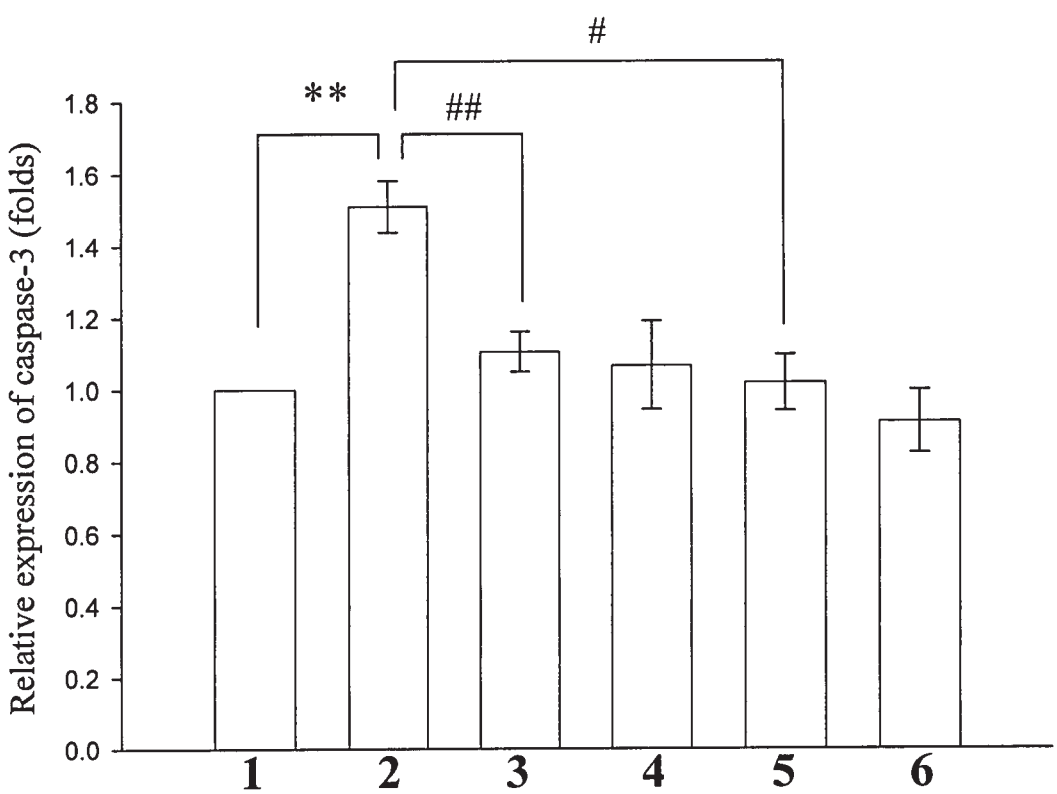


Figure 6. Expression of caspase-3 in ispilateral and contralateral brain hemisphere 24 hours after middle cerebral artery occlusion measured by immunoblotting. Rats were pretreated with TMPZ (20 mg/kg) before ischemia compared with vehicle or sham control, and the group pretreated TMPZ 20 mg/kg was significantly decrease ischemia-induced caspase3-activated in rat ipsilateral brain hemisphere Lane 1, 2 and 3 are represented as ipsilateral hemisphere. Lane 4, 5 and 6 are represented as contralateral. Lane 1 and 4 are sham control. Lane 2 and 5 are treated with vehicle. Lane 3 and 6 are treated with TMPZ. ($^{**}P < 0.01$ compared with sham control group of ipsilateral brain hemisphere, $^{\#}P < 0.05$ and $^{\#\#}P < 0.01$ compared with vehicle control group of ipsilateral brain hemisphere, n = 4).

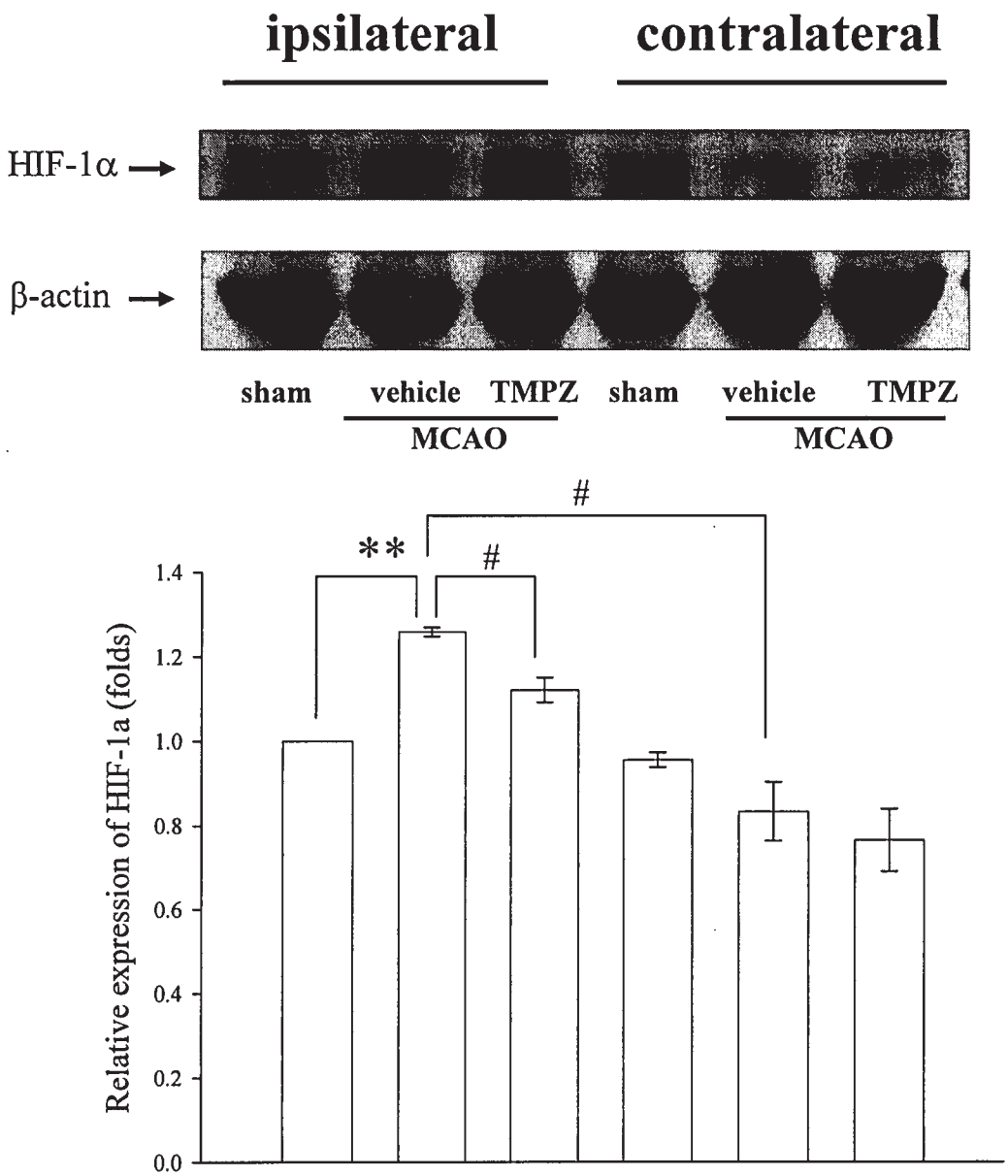


Figure 7. Expression of HIF-1α in ispilateral and contralateral brain hemisphere 24 hours after middle cerebral artery occlusion measured by immunoblotting. Rats are pretreated with TMPZ (20 mg/kg) before ischemia compared with vehicle or sham control. Lane 1, 2 and 3 are represented as ipsilateral hemisphere. Lane 4, 5 and 6 are represented as contralateral. Lane 1 and 4 are sham control. Lane 2 and 5 are treated with vehicle. Lane 3 and 6 are treated with TMPZ. ($^{**}P < 0.01$ compared with sham control group of ipsilateral brain hemisphere, $^{\#}P < 0.05$ compared with vehicle control group of ipsilateral brain hemisphere, n = 3).

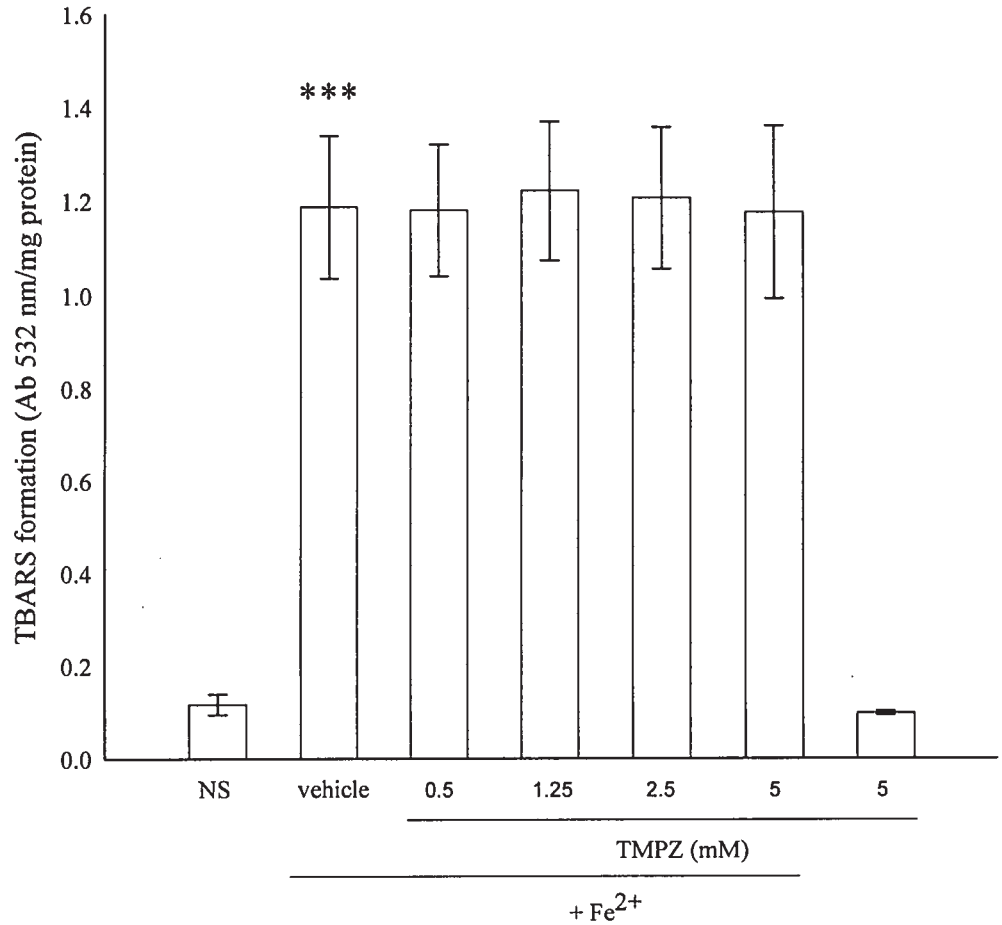


Figure 8. Effect of TMPZ on lipid peroxidation in rat brain homogenate. The brain homogenates were preincubated with vehicle or various concentrations of TMPZ (0.5, 1.25, 2.5 and 5 mM) for 10 min followed by the addition of 200 μM Fe^{2+}. Results are presented as the absorbance at 532 nm/mg protein in brain homogenates. Data are presented as the means ± SEM (n = 3). $^{***}P <$ 0.001 as compared with the normal saline (NS, resting group). TMPZ 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.

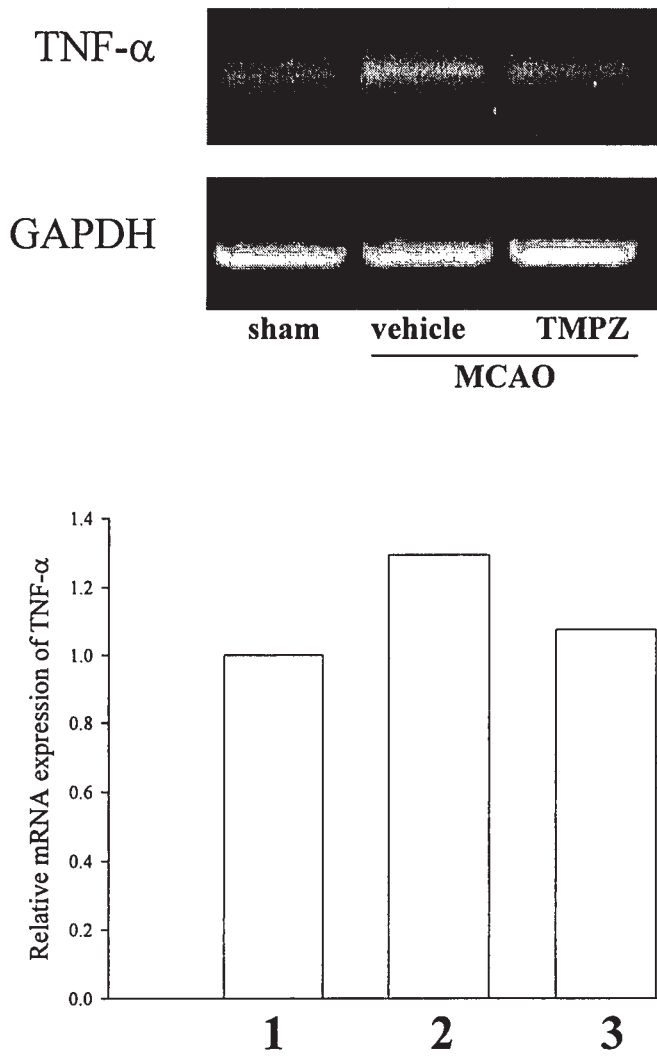


Figure 9. Effect of TMPZ attenuated expression of TNF-α mRNA on RT-PCR analysis in cerebral cortex 24 hours after middle cerebral artery occlusion (MCAO). The cDNA electrophoretic line represents a sample from separate animal. All animals were subjected to MCAO following 24 hours after reperfusion, and then brains were dissected from ipsilateral cortex. Samples were divided into three groups. Lane 1 means sham control group. Lane 2 means vehicle control group. Lane 3 means TMPZ (20 mg/kg) group.

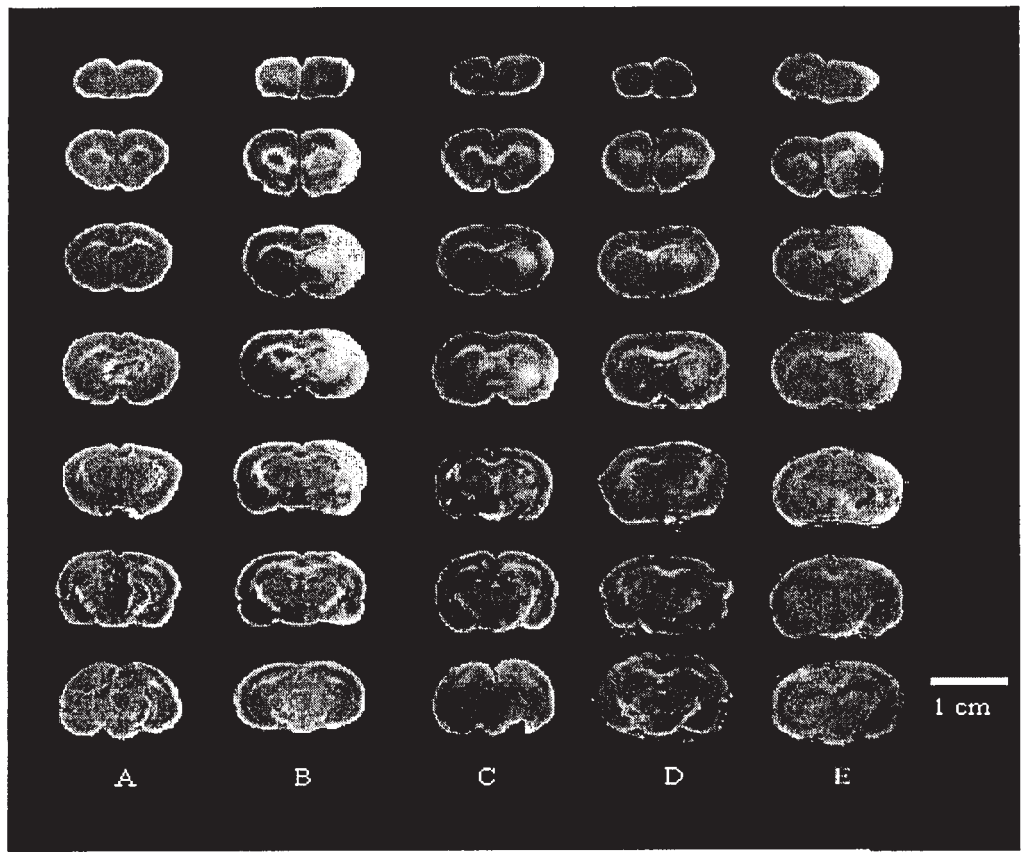


Figure 10. Effect of TMPZ in ischemia/reperfusion brain injury by middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats. Digital photographs show the infarct region in brain sections stained by 2% TTC 24 hours after middle cerebral artery occlusion (MCAO). Rats were pretreated with vehicle or TMPZ (10 or 20 mg/kg, ip.) before the onset of MCAO compared to sham control. Panel A means the sham control group. Panel B means the vehicle (cremophor : ethanol : PBS = 1: 1: 4) control. Panel A and B present the damage region enlarged after ischemia and reperfusion cerebral injury, and panel C and D show after the administration of TMPZ (10 or 20 mg/kg), the attenuation of the infarct region.

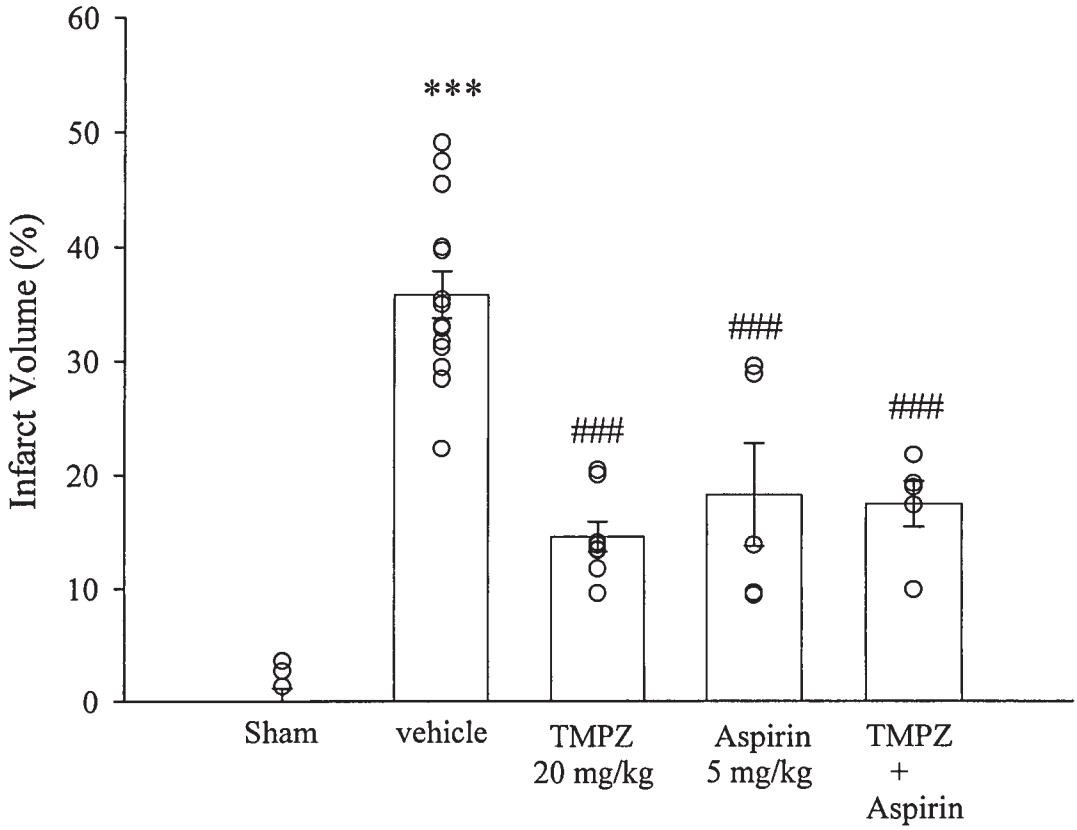


Figure 11. effects of TMPZ combined with aspirin in ischemia/reperfusion brain injury induced by middle cerebral artery occlusion in rats. Rats were pretreated with TMPZ 20 mg/kg, aspirin 5mg/kg, TMPZ 20 mg/kg plus aspirin 5mg/kg or vehicle (cremophor : ethanol : PBS = 1: 1: 4) 15 mins before MCAO compared to sham control. Data are expressed as percentage (%) of contralateral hemisphere and presented as mean ± SEM ($^{***}P < 0.001$ compared with sham group, $^{###}P < 0.001$ compared with vehicle group, n = 8-14).