

編號：CCMP93-CT-103

# 建立中草藥預防中風之動物模式研究

許準榕

台北醫學大學醫學研究所

## 摘 要

當供給腦組織養分的血管阻塞或破裂，導致腦細胞無法維持正常生理活性的情況，稱為「腦中風」(stroke)。腦中風依其產生的病理機轉分為缺血性(ischemic)與出血性(hemorrhagic)中風。因為血塊阻塞血流所引起的中風為缺血性中風，發生率約佔所有腦中風病人的七至八成，缺血性中風的潛在因子之一為血管壁脂質不正常堆積，也稱為動脈粥狀硬化(atherosclerosis)，依其發生部位的不同可能進一步引起血栓性(thrombotic)或栓塞性(embolic)的缺血性中風。脆弱的腦血管破裂所引起的出血性中風，可能由動脈瘤(aneurysm)或是血管畸形(arteriovenous malformation)所引發。

針對缺血性中風所引起的腦組織傷害，已有許多藥物進行動物實驗或是臨床研究，包括鈉、鉀、鈣離子阻斷劑(sodium, potassium, calcium channel blockers)、NMDA 拮抗劑(NMDA antagonists)、AMPA 拮抗劑(AMPA antagonists)、鎂鹽(magnesium)、GABA 刺激劑( $\gamma$ -aminobutyric acid agonist)、自由基清除劑(free radical scavengers)、吸附分子拮抗劑(anti-adhesion molecule agents)、基質金屬蛋白酵素抑制劑(matrix metallo-proteinase inhibitors)等。

TMPZ (2, 3, 5, 6-tetramethyl-pyrazine) 為中藥常用活血化癥藥「川芎」的成分，已被證實具有抑制血小板凝集、促使血管擴張(vasodilation)的作用。本篇論文探討 TMPZ 對缺血與再灌流(ischemia-reperfusion)大鼠腦中風實驗模式所引起傷害的保護作用根據腦組織切片染色的實驗結果顯示 TMPZ 隨劑量關係(10 與 20 mg/kg)可減少腦中風引起之腦組織傷害，尤其在高劑量(20 mg/kg)時更有意義的減少腦部中大腦動脈(middle cerebral artery)引起梗塞區域神經細胞的傷害，但對大鼠神經缺損等級無明顯之影響。此外，從組織免疫染色(immunohistochemical staining)結果顯示 TMPZ 在劑量為 20 mg/kg 即可抑制

大鼠腦內過氧化亞硝酸之堆積，尤其對腦組織異常 iNOS (inducible nitric oxide synthase) 表現也有減低之效果。

綜合實驗的結果，TMPZ 可以保護活體大鼠缺血性腦中風所引起的傷害，至於 TMPZ 在腦組織不同細胞層面詳細的作用與機轉，尚待進一步的探討。

關鍵詞：腦中風、中大腦動脈、缺血與再灌流、TMPZ

Number : CCMP93-CT-103

# **Set up of stroke animal model for evaluation of Chinese herbal medicine**

Joen-Rong Sheu

Graduate Institute of Medical Sciences, Taipei Medical University

## **ABSTRACT**

Stroke is the state of ischemia that localized tissue is unable to maintain physiological condition due to obstruction or rupture of blood vessels in the brain. According to the pathological mechanisms, stroke is classified into two main types, ischemic and hemorrhagic stroke. Ischemic strokes are caused by blood clots that form and obstruct a blood vessel. Ischemic strokes are caused in part by atherosclerosis which is the process of abnormal lipid deposit around the vessel wall. Ischemic strokes are subtyped to thrombotic and embolic strokes according to where the blood clot forms and where it causes obstruction. Hemorrhagic stroke is defined as the rupturing of cranial blood vessels caused in part by aneurysm or arteriovenous malformation.

Various drugs have been intensively researched in many animal experiments and clinical trials for the treatment of stroke including sodium, potassium and calcium channel blockers, NMDA (N-methyl-D-aspartate), and AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole) anta-gonists, magnesium,  $\gamma$ -aminobutyric acid agonist, free radical scavengers, anti-adhesion molecule therapy, matrix metalloproteinase inhibitors and therapeutic hypothermia.

TMPZ (2, 3, 5, 6-tetramethylpyrazine) is extracted from the root of *Ligusticum wallichii*, a common herb used in traditional Chinese medicine. TMPZ has antiplatelet and vasodilation activity. It is shown to improve changes in microcirculation of patients with acute cerebral thrombosis. In this study we

evaluated the protective effects of TMPZ in a cerebral ischemia-reperfusion injury model in rats.

Volumes of cerebral infarct decreased when rats were pretreated with 20 mg/kg TMPZ. However, the neurological deficits didn't change after drug treatment. Moreover, immunohistochemical staining showed that the accumulation of peroxynitrite in cerebrum with infarct was reduced by TMPZ pretreatment.

According to the findings, TMPZ have protective effects against cerebral infarction. However, the exact mechanisms of their protective effects at cellular level need to be clarified in the future.

Keywords: stroke, ischemia-reperfusion, TMPZ

## 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 & 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。

缺血性腦中風在臨床上的重要性，刺激了許多動物腦缺血實驗模式的發展，包括 global 或 regional、complete 或 incomplete、permanent 或 transient 的實驗模式。雖然已有廣泛的動物種類被應用在這些實驗模式，但多數人認為研究腦血管損傷 (cerebrovascular dysfunction) 最佳的動物種類是大鼠 (rat)，除了便宜好操作外，在過去十年裡對大鼠的 neurotransmitter systems、neurochemistry、neuropharmacology 研究也最清楚，並且大鼠與人類在腦循環的解剖 (比起其餘種類例如沙鼠、貓或狗)，具有較大的相似性 (Tamura et al., 1981)。早期以大鼠做腦缺血實驗模式包括：bilateral carotid occlusion、intracranial compression、unilateral carotid occlusion plus hypoxia or hypotension 或 four-vessel occlusion 等，但並非造成局部性腦缺血 (focal cerebral ischemia) (Bederson et al., 1986b)。

在中風的病患裡，大腦中動脈 (middle cerebral artery, MCA) 是最常發生阻塞的一條血管 (Karpiak et al., 1989)。早在 1975 年，已有研究者使用 MCAO 實驗模式在大鼠身上以產生局部性腦缺血 (Robinson et al., 1975)。其中被廣泛使用於 MCAO 的技術是利用開腦的方式將 MCA 灼蝕，但此模式相對比較具侵襲性且不允許血液再灌流 (reperfusion) 至缺血的腦組織 (Tamura et al., 1981)；當人類發生缺血性腦中風時，特別是栓塞性中風，發生血液再循環 (recirculation) 至腦部的頻率是很高的 (Ringelstein et al., 1992)，故建立一個相似人類發生腦血管疾病的動物實驗模式實屬必要。其餘造成 MCAO 的方法例如有：機械性地鉗住 MCA (Buchan et al., 1992) 或是利用注入螢光劑後以光照遠端 MCA 產生局部腦血栓 (Markgraf et al., 1994) 等，但這些實驗過程也涉及侵襲性的開腦方式。

1986 年 Koizumi 等人發展了一套新的、相對性非侵襲性的 MCA 阻滯方法，係利用置入一條尼龍線至血管管腔內，以達到可逆性的 MCAO；隨後 Zea Longa 等人 (1989) 將此法做修飾，且詳述其實驗過程與技術，目前已被廣泛使用於研究缺血性腦中風；此方法雖然有上述的優點，但其缺點包括了有：(1) 死亡率高；(2) 不易將細線推進至欲達到的顱內區域 (intracranial location)；(3) 蜘蛛網膜下腔出血 (subarachnoid hemorrhage) (Belayev et al., 1996)。

因此本動物實驗模式的設計也採用類似 Zea Longa 等人之方法 (大腦中動脈血管阻塞/再灌流模式) 並加以改良，提供中藥活性物質對於缺血性腦中風所造成腦損傷之研究發展。

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 和吞嚥困難 (Beijing, 1977)。另外，Wang (1984) 證明，TMPZ 在治療急性腦血管堵塞上，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 和 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 (Ho et 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 (5M) 所誘導的 phosphoinositide breakdown 及 thromboxane A<sub>2</sub> 的產生，在高濃度下 (1mM)，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)。

所以在本計畫中，我們是採用中草藥川芎之 TMPZ 來評估它對活體大鼠腦內中腦動脈缺血與再灌流所引起傷害的保護作用。

## 貳、材料與方法

### 一、中大腦動脈缺血與再灌流 (ischemia-reperfusion) 模式

中大腦動脈 (middle cerebral artery, MCA) 阻塞缺血實驗模式依據 Longa (1989) 與 Nagasawa (1989) 等人的方法加以修飾，使用的動物為雄性大鼠 (Wistar 品系)，體重控制在 250 至 350 公克之間。將 95% O<sub>2</sub> 與 5% CO<sub>2</sub> 以氣體混合器混合 3% 的 Isoflurane 使大鼠吸入麻醉。大鼠頸部沿中線切開，找出右側總頸動脈 (common carotid artery, CCA)、外頸動脈 (external carotid artery, ECA) 與內頸動脈 (internal carotid artery, ICA)。於外頸動脈近心端與遠心端分別結紮，近心端結紮處距離內頸動脈與外頸動脈分枝處約 3 mm，將兩處結紮點剪斷，分離出外頸分枝方便進行下述操作。取一段手術縫合用 25 mm 長度的單股尼龍線 (4-0 nylon suture)，前端以矽膠牙材 (Surflex F) 塗覆，經外頸動脈將尼龍線插入內頸動脈至無法推入為止，即可阻塞中大腦動脈 (middle cerebral artery) 造成大腦局部缺血 (focal cerebral ischemia)。Sham 控制組所使用的尼龍線長度為 15 mm，以此長度之尼龍線無法成功阻塞住中大腦動脈之血流。縫合傷口使大鼠自然甦醒，利用行為測試 (behavioral test，詳述如下) 以確認大鼠單側動脈缺血手術成功。未成功阻塞中大腦動脈之大鼠將排除於實驗之外不列入統計。一個小時之後，將大鼠再度以氣體麻醉，取出尼龍線並將傷口縫合，完成血液再灌流 (reperfusion)。缺血手術時間控制在半個小時之內，再灌流手術時間控制在 10 分鐘之內。手術過程中，利用電熱毯使老鼠肛溫維持在 37 到 37.5°C 之間。

### 二、行為測試 (behavioral test) 神經缺陷分級 (neurological deficits)

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。



### 三、腦梗塞區域 (infarct area) 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°C 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：

(一) 同側腦半球 (右腦) 未受損面積

(二) 對側腦半球 (左腦) 面積

校準後的腦受損率： $(B - A) / B \times 100 \%$

### 四、神經缺陷分級 (neurological deficits)

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

首先溫和地握住大鼠尾巴使其懸掛距離地面一公尺，觀察前掌彎曲的現象。若大鼠的兩前掌能均衡延展向地面，並且沒有觀察到其他的神經缺損現象，為正常的老鼠，表示 0 級。有腦梗塞的大鼠會將前肢一致性地往腦損傷半球的對側 (contralateral) 收縮；而前肢收縮隨著損傷的程度不同而改變，輕度的收縮如腕彎曲、肩內收和肘僵直。較嚴重收縮則造成腕、肘完全彎曲與肩的內收和向內旋轉。大鼠有上述程度的前肢收縮且沒有其他異常時，歸類為第 1 級。大鼠被放置於軟質塑膠塗覆的大紙 (counter protection paper, Kimberly Clarke) 上時，會以爪子緊緊抓住紙張。以手抓住老鼠的尾巴，從肩後施以力量直到大鼠的前肢滑動數英寸。依此步驟從不同的方向操作數次，正常或輕微中風的大鼠對於不同方向的拉力有相同的抵抗力，嚴重中風的大鼠對朝麻痺體側的橫向施力會減低抵抗力，歸類為第 2 級。接著讓大鼠自由活動，觀察其繞圈的行為，若老鼠往麻痺的體側移動，歸類為第 3 級。若大鼠喪失走路或困難於行走，歸類為第 4 級。

觀察過程假使大鼠呈現間歇性抽搐 (convulsions) 或是持續性意識混亂

(sustained disturbances of consciousness)，將排除於實驗外。原因可能是在手術的過程中，由於細線的插入，產生機械性傷害使腦動脈破裂，導致蜘蛛網膜下腔出血 (Belayev et al., 2003)。

## 五、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 (2002) 等人的方法加以修飾。大鼠經中大腦動脈缺血與再灌注手術廿四小時之後腹腔注射劑量 400 mg/kg 水合氯醛加以麻醉，再分別以 30-50 mL 之生理食鹽水及 4% paraformaldehyde 由大鼠左心室進行灌注，並剪開右心房作為血液與灌注液出口。大鼠灌注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  $\mu$ 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 (phosphate-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 (cortex) 與紋狀體 (striatum) nitrotyrosine 產生量的差異。

## 六、數據分析

實驗數據以平均值 $\pm$ 標準誤差 (mean $\pm$ S.E.M.) 表示。大鼠神經缺陷分級數據以 Kruskal-Wallis test 作統計分析，其餘實驗數據皆以 Student's t-test 作統計分析。若  $P < 0.05$  則表示實驗數據具有意義之差異。

## 參、結果

### 一、TMPZ 對大鼠中大腦動脈梗塞面積的影響

進行大鼠中大腦動脈缺血與再灌注手術時，於大鼠吸入氣體麻醉劑昏迷之後即刻腹腔注射給予單一劑量之 TMPZ (10 與 20 mg/kg) 或溶解 TMPZ 之溶劑 (cremophor: ethanol: normal saline = 1: 1: 4)。於手術後廿四小時，給予劑量 400mg/kg 之水合氯醛使大鼠麻醉，接著犧牲大鼠取出大腦組織，冠狀切片成 2 mm 後以 TTC 呈色。正常腦組織能將 TTC 還原成深紅色之 formazan (Figure 10A)，梗塞區域則呈現原來組織之乳白色 (Figure 10B, C and D)。中大腦動脈缺血與再灌注主要會造成右側大腦距腦尖 (frontal pole) 3-9 mm 的區域產生損傷。使用數位相機與 ImageJ 影像分析軟體分析梗塞區域之面積，並將數據依公式計算扣除腦水腫之影響。Sham 控制組其梗塞面積比率為  $-0.3 \pm 1.5\%$  ( $n = 6$ )，未給予任何藥物之控制組 (control) 的梗塞面積比率為  $41.4 \pm 2.8\%$  ( $n = 10$ )，溶劑控制組的梗塞面積比率為  $38.5 \pm 6.5\%$  ( $n = 6$ )，給予 TMPZ 10 或 20 mg/kg 劑量之實驗組梗塞面積比率與溶劑控制組比較呈現與濃度相關之保護作用，例如當 TMPZ 劑量為 10 mg/kg 時，呈現輕微之保護作用 ( $22.6 \pm 4.0\%$ ,  $n = 6$ ,  $P > 0.05$ )，而且給予 TMPZ 20 mg/kg 劑量之實驗組梗塞面積比率與溶劑控制組比較更呈現有意義的減少 ( $13.9 \pm 1.5\%$ ,  $n = 6$ ,  $P < 0.01$ ) (Figure 1, 2)。

### 二、TMPZ 對中大腦動脈梗塞大鼠神經缺損等級的影響

在手術後一個小時比較神經缺損等級，sham 控制組等級為  $0.5 \pm 0.3$  ( $n = 6$ )，溶劑控制組等級為  $2.3 \pm 0.3$  ( $n = 6$ )，給予 TMPZ 10 mg/kg 劑量之實驗組神經缺損的等級為  $2.5 \pm 0.2$  ( $n = 6$ )，給予 TMPZ 20 mg/kg 劑量之實驗組神經缺損的等級為  $2.7 \pm 0.3$  ( $n = 6$ )，兩者與溶劑控制組比較並無明顯意義差別 ( $P > 0.05$ , Kruskal-Wallis test)。而在梗塞手術後廿四小時比較缺損等級，sham 控制組等級為  $0 \pm 0$  ( $n = 6$ )，溶劑控制組等級為  $2.1 \pm 0.4$  ( $n = 6$ )。給予 TMPZ 10 mg/kg 劑量之實驗組神經缺損的等級為  $1.3 \pm 0.3$  ( $n = 6$ )，而給予 TMPZ 20 mg/kg 劑量之實驗組神經缺損的等級為  $1.2 \pm 0.3$  ( $n = 6$ )，兩者與溶劑控制組比較同樣無明顯意義差別 ( $P > 0.05$ ) (Figure 3)。

### 三、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。大腦缺血部位包括皮質 (cortex) 與紋狀體 (striatum) 都可見到 nitrotyrosine 的堆積

(Figure 4A, B)，給予 TMPZ (20 mg/kg) 的大鼠其產生 nitrotyrosine 區域的面積與密度會減少 (Figure 4C, D)，而 sham control 大腦半球之染色則幾乎沒有發現 nitrotyrosine 的產生 (Figure 4E, F)。

## 肆、討論

動物中風實驗模型的建立可以增進人類對中風的了解與進行藥物之開發。其中，最不具侵入性 (invasive) 的方法是以尼龍絲線阻塞血管以達到暫時 (transient) 或永久 (permanent) 中腦動脈栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 之目的，這樣的方法最近已廣為學術界所接受，因為不需要進行開腦的手術，所以不會影響腦脊髓液的動態平衡或傷害中腦動脈周圍的神經叢 (Koizumi et al., 1986)。本研究所使用的大鼠中腦動脈栓塞手術主要是依據 Longa (1989) 以及 Nagasawa (1989) 等人所發表的方法，由外頸動脈插入尼龍線來達到阻塞中腦動脈的目的。手術的過程中需要結紮並剪斷右側外頸動脈，而右側外頸動脈結紮不可避免地會影響到咀嚼和頸部肌肉如咽喉、舌頭、唾腺、外/中耳與腦膜。研究指出，外頸動脈缺血會影響大鼠的進食導致體重下降的表現，但短期而言並不影響中腦動脈損傷區域的大小 (Dittmar et al., 2003)。

中腦動脈栓塞實驗中，進行手術前給予單一劑量之 TMPZ 呈現與濃度相關減少大鼠梗塞體積，且高劑量之 TMPZ 更能有意義減少大鼠梗塞體積，而對於大鼠中腦動脈栓塞手術後第 24 小時所得到神經缺損等級雖然隨著劑量增加呈現改善的傾向，但是仍然不具統計上的意義。從以上的結果可以發現，大鼠組織學 (histology) 上的改善未必伴隨著神經行為學 (neurological behavior) 上的改善 (Yamamoto et al., 1991; Belayev et al., 2003)。可能的原因包括大鼠功能性的代償或復原 (functional compensation or recovery) 作用，或是組織學上的限制 (histological limitations) 所引起 (DeVries et al., 2001)。

目前常被使用來評估 MCAO 後造成組織損傷的方法如影像分析損傷區域 (volume of infarcted area) 或由形態學 (morphology) 直接計算死亡與存活的神經細胞數目，這些方法雖然可以分辨存活或死亡的組織，但是卻無法得知非中腦動脈掌管區域 (non-MCA territory) 形態學的改變 (Aronowski et al., 1996)。再者，僅區別神經細胞的死亡或存活，並不能了解細胞內 (intracellular) 或細胞間 (intercellular) 訊息傳遞的過程，因為歷經缺氧傷害的神經細胞可能存活下來，但並不能完全發揮其原有之功能，例如研究指出海馬迴區域缺血所引起

的傷害可能無法表現於組織學的定量法，但仍可影響認知與行為學上的表現 (Aoyagi et al., 1998; Sopala et al., 2000)。又如分析某些區域內神經細胞死亡的程度，由行為學上的方法來評估會比僅只分析損傷區域的大小來的有意義 (De Ryck et al., 1992)。因此，本研究除了希望由傳統組織學或形態學層面分析藥物保護缺血性中風造成損傷的效果之外，還希望進一步瞭解藥物作用在細胞與組織層面的機轉，例如藥物影響嗜中性白血球功能性的探討和分析缺損腦組織內與發炎相關細胞激素的表現。

細胞激素 (cytokines) 是和免疫有關的小分子，由與免疫有關 (如 T 細胞、巨嗜細胞和神經膠細胞) 或無關之細胞 (如神經細胞和星狀細胞) 所分泌，可以調控免疫與發炎反應。目前已經被發現的細胞激素多達四十餘種 (Kogure et al., 1996)。這些細胞激素可以分成四大類：介白素 (interleukins, ILs)、腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factors, TNFs)、干擾素 (interferons, IFNs) 與營養因子 (trophic factors)。腦中風時會引起許多細胞激素產生，例如第一型介白素 (interleukine-1, IL-1) 和  $\alpha$  型腫瘤壞死因子 (tumor necrotic factor- $\alpha$ , TNF $\alpha$ )，這些細胞激素會活化誘導型一氧化氮合成酵素的表現，並且產生大量的一氧化氮與自由基，兩者結合後會產生對腦組織具強烈毒性之過氧化亞硝酸。過氧化亞硝酸與酪胺酸結合成 nitrotyrosine，可在發炎的組織或與發炎有關的免疫細胞 (如嗜中性白血球) 中發現。過氧化亞硝酸非常不穩定，容易與其他物質反應，而 nitrotyrosine 則比過氧化亞硝酸穩定，因此測量 nitrotyrosine 可作為過氧化亞硝酸含量之指標。由組織免疫染色結果發現，在缺血受損的大腦半球會產生大量 nitrotyrosine，但是在對側腦半球則幾乎沒有發現 nitrotyrosine 的表現，因此推測過氧化亞硝酸的傷害主要可能集中於缺血引起受損的組織。給予 TMPZ 可以抑制缺血受損組織內 nitrotyrosine 的產生，且有研究指出 TMPZ 具有抗氧化的作用 (Burton et al., 1986; Zhang et al., 2003)，可以有效減少梗塞所引起的自由基傷害。

腦動脈栓塞的效果，本研究已有初步的成果，證實 TMPZ 可以透過減少大鼠大腦內超氧自由基的含量，或透過抑制嗜中性白血球的活化，以及減少大鼠大腦內一氧化氮合成酵素的表現而產生保護作用。但是對於組織或細胞層面詳細的作用機轉尚未十分明瞭，需要進一步的實驗來證實。

## 伍、結論與建議

在大鼠中腦動脈栓塞模式中，給予高劑量的 TMPZ 可以具有保護腦組織的效果，並減少因缺血與再灌流引起的組織傷害。而 TMPZ 保護腦組織的作用機轉可能 TMPZ 本身所具有的抗氧化或抗凝血能力有關，或與減少嗜中性白血球生成超氧自由基以及抑制腦內 iNOS 的活化有關。

透過本研究，讓我們可以更進一步了解 TMPZ 保護大腦缺血與再灌流引起傷害的機轉與作用，而未來可對 TMPZ 作用在細胞層面的機轉，如對腦內微神經膠細胞、星狀細胞或神經細胞的作用進行研究，期望能讓我們對腦中風的治療有新的發現與認識。

## 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 CCMP93-CT-103 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

1. 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.
2. Albers GW, Amarenco P, Easton JD, Sacco RL, Teal P. Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke. *Chest* 2001; 119: 300S-20S.
3. Aoyagi A, Saito H, Abe K, Nishiyama N. Early impairment and late recovery of synaptic transmission in the rat dentate gyrus following transient forebrain ischemia in vivo. *Brain Res.* 1998; 799: 130-137.
4. Aronowski J, Samways E, Strong R, Rhoades HM, Grotta JC. An alternative method for the quantitation of neuronal damage after experimental middle cerebral artery occlusion in rats: analysis of behavioral deficit. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996; 16: 705-713.
5. 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.
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.
7. Beijing Institute of Pharmaceutical Industry. Studies of active components of *Ligusticum Wallichii* Franch. I. Extraction, isolation and Structure identification of tetramethylpyrazine. *Chin Med J* 1977, 7: 420-421.
8. Beijing Institute of Pharmaceutical Industry. Studies of active components of *Ligusticum Wallichii* Franch. II. Pharmacological studies on tetramethylpyrazine. *Chin Med J* 1977, 8: 464-466.
9. 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: 467-469.
10. 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.
11. 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.
  12. 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.
  13. Buchan AM, Xue D, Slivka A. A new model of temporary focal neocortical ischemia in the rat. *Stroke* 1992; 23: 273-9.
  14. Burton GW, Cheng SC, Webb A, Ingold KU. Vitamin E in young and old human red blood cells. *Biochim Biophys Acta.* 1986; 860: 84-90.
  15. 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.
  16. 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.
  17. 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.
  18. 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.
  19. del Zoppo GJ, Hallenbeck JM. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb. Res.* 2000; 98: 73-81.
  20. De Ryck M, Van Reempts J, Duytschaever H, Van Deuren B, Clincke G.



- Neocortical localization of tactile/proprioceptive limb placing reactions in the rat. *Brain Res.* 1992; 573: 44-60.
21. 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.
  22. Dittmar M, Spruss T, Schuierer G, Horn M. External carotid artery territory ischemia impairs outcome in the endovascular filament model of middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke.* 2003; 34: 2252-2257.
  23. Han HS, Qiao Y, Karabiyikoglu M, Giffard RG, Yenari MA. Influence of mild hypothermia on inducible nitric oxide synthase expression and reactive nitrogen production in experimental stroke and inflammation. *J Neurosci.* 2002; 22: 3921-3928.
  24. Ho WKK, Web HL, Lee CM Tetramethylpyrazine for treatment of experimentally induced stroke in Mongolian gerbils. *Stroke* 1989, 20: 96-99.
  25. Hui KK, Yu JL, Tse E, Borst S The effect of tetramethylpyrazine on the human platelet alpha2-adrenergic receptor adenylate cyclase system. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1987, 8: 3-14.
  26. 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.
  27. Jeffreys JAD, The alkaloids of pereunial ryegrass (*Lolium Perenne L.*) IV. Isolation of a new base, perlolyrine. The crystal structure of its hydrobromide dihydrate and the synthesis of the base. *J Chem Soc* 1970, 8: 1091-1095.
  28. Karpiak SE, Tagliavia A, Wakade CG. Animal models for the study of drugs in ischemic stroke. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1989; 29: 403-14.
  29. Kogure K, Yamasaki Y, Matsuo Y, Kato H, Onodera H. Inflammation of the brain after ischemia. *Acta Neurochir Suppl.* 1996; 66: 40-3.
  30. Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn. J. Stroke* 1986; 8: 1-8.
  31. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20: 84-91.

32. 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.
33. Liu SY, Sylvaster DM Antithrombotic/antiplatelet activity of tetramethylpyrazine. *Thromb Res.* 1990, 58: 129-40.
34. Markgraf CG, Green EJ, Watson B, McCabe PM, Schneiderman N, Dietrich WD, Ginsberg MD. Recovery of sensorimotor function after distal middle cerebral artery photothrombotic occlusion in rats. *Stroke* 1994; 25: 153-9.
35. 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.
36. Nagasawa H, Kolgure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke.* 1989; 20: 1037-1043.
37. Ojewole JAO Blockade of adrenergic and cholinergic transmission by tetramethylpyrazine. *Planta Medica* 1981, 43: 1-10.
38. 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.
39. 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.
40. Okhawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay of lipid peroxides in animals tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 1979; 95: 351-8.
41. 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 Pharmacol* 1996, 119: 1063- 1071.
42. 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.

43. Ringelstein EB, Biniek R, Weiller C, Ammeling B, Nolte PN, Thron A. Type and extent of hemispheric brain infarctions and clinical outcome in early and delayed middle cerebral artery recanalization. *Neurology* 1992; 42: 289-98.
44. Robinson RG, Shoemaker WJ, Schlumpf M, Valk T, Bloom FE. Effect of experimental cerebral infarction in rat brain on catecholamines and behaviour. *Nature* 1975; 255: 332-4.
45. 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.
46. 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.
47. Sopala M, Frankiewicz T, Parsons C, Danysz W. Middle cerebral artery occlusion produces secondary, remote impairment in hippocampal plasticity of rats – involvement of N-methyl-D-aspartate receptors? *Neurosci Lett.* 2000; 281: 143-146.
48. 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.
49. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1981; 1: 53-60.
50. 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: 121-124.
51. Xue Q. Effect of Chuanxiongqin (tetramethylpyrazine) on microcirculatory perfusion in hamsters and capillary permeability in rat. *Proc Cams Punc* 1989, 4: 224-228.
52. Yamamoto M, Tamura A, Kirino T, Shimizu-Sasamata M, Sano K. Effects of thyrotropin-releasing hormone on behavioral disturbances in middle cerebral artery-occluded rats. *Eur J Pharmacol.* 1991; 197: 117-123.

53. 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: 2465-2472.

[\(6-11 圖表\)--CCMP93-CT-103.doc](#)