

厚朴酚對腦缺血之治療評估

顏茂雄

國防醫學院

摘要

氧代謝物 (Reactive Oxygen Metabolites; ROM)，包括：過氧離子、氫氧游離基以及過氧化氫，它是身體生理代謝反應及中樞神經功能運作下之產物。ROM 被認為和許多腦疾病之病變過程有關。關於這方面已有許多研究報告間接證明：游離基氧化反應和腦外傷、缺血、神經退化疾病如：巴金森氏症、老年癡呆症及多發性硬化等、及神經中毒時引起組織損傷有關。基於上述有關游離基氧化物對於神經病理角色之瞭解，目前正積極從基礎與臨床兩方面研究，以期開發有效之抗氧化藥物，希望對因游離基引起之中樞病變有好的預防與治療效果。在中醫方面，中藥厚朴 (*Magnolol officinalis*) 曾用於多種處方，民間常用於治療發燒、頭痛、焦慮、腹瀉等。已知厚朴酚 *magnolol* 為分離純化自厚朴之主要成分。根據最近文獻報導厚朴中藥成份 *magnolol* 具有強效之抗氧化作用，其抗氧化之強度約為 α -tocopherol 之 1000 倍，為目前已知中藥成份與合成化合物中抗氧化作用最強之藥物。因此本實驗以中樞腦缺血-再循環模式，探討厚朴酚 *magnolol* 對缺血引起腦組織損傷之保護與治療效果。大白鼠經中腦動脈結紮一小時後，給予再循環二十四小時。實驗結果顯示：厚朴酚 *magnolol* 給藥組 (15 & 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 可明顯改善腦缺血-再循環後之腦組織壞死現象 (控制組： $150 \pm 21 \text{ mm}^3$, *magnolol* 7.5: $145 \pm 25 \text{ mm}^3$, *magnolol* 15: $75 \pm 22 \text{ mm}^3$, *magnolol* 60: $48 \pm 15 \text{ mm}^3$)，並且明顯降低腦缺血-再循環後腦組織內之 myeloperoxidase (MPO) 含量 (控制組： 60 ± 10 , *magnolol* 7.5: 48 ± 7 , *magnolol* 15: 25 ± 5 , *magnolol* 60: 18 ± 6)

units/g wet weight)。由上結果顯示：厚朴酚 magnolol 對腦缺血確實具有良好的保護作用，且其所使用之劑量極低，可見其具有很強的藥效，極具開發價值，期望未來可應用於臨床之疾病治療。

關鍵詞：氧游離基、腦缺血、再循環損傷、厚朴酚

ABSTRACT

Reactive oxygen metabolites (ROM), namely superoxide and hydroxyl free radicals and hydrogen peroxide, are produced as a consequence of the physiological metabolic reactions and functioning of the central nervous system. ROM have also been implicated in the processes of a number of pathological conditions of the brain. While primarily indirect, evidence for this view is accumulating, and credence for the participation of free radical oxidative interactions in promoting tissue injury in such conditions as brain trauma, ischaemia, and toxicity, and in neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease, Alzheimer's dementia, multiple sclerosis, and lipofuscinosis, is growing. Concomitant with this new understanding of the injurious role free radical oxidants in neural pathology, is the increasing appreciation for the need for both fundamental and clinical research into the development of the potential preventative and therapeutic benefits that are now being foreseen for a variety of antioxidant nutritional and pharmacological interventions. In Chinese medicine, magnolol officinalis was included in many prescriptions. In traditional medicine, magnolol was used to treat fever, headache, anxiety, diarrhea etc. Magnolol, an active component, were extracted and purified from magnolol officinalis. Recently, it has been reported that magnolol is a potent antioxidant and free radicals scavenger. The antioxidant activity was 1000 fold of tocopherol. It is the most potent antioxidant of Chinese herbs, so far. Therefore, the aim of this project is to

evaluate the effect of magnolol on the cerebral ischemia-reperfusion injury model in rats. Results demonstrated that treatment of magnolol (15 & 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$) could significantly reduce the infarct volume induced by 1 hr middle cerebral artery ligation followed by 24 hr reperfusion (*control*: $150\pm 21 \text{ mm}^3$, *magnolol 7.5*: $145\pm 25 \text{ mm}^3$, *magnolol 15*: $75\pm 22 \text{ mm}^3$, *magnolol 60*: $48\pm 15 \text{ mm}^3$). Similarly, magnolol treatment (15 & 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$) groups, a significant reduction of the activity of myeloperoxidase in ischemic region was observed (*control*: 60 ± 10 , *magnolol 7.5*: 48 ± 7 , *magnolol 15*: 25 ± 5 , *magnolol 60*: 18 ± 6 units/g wet weight). In conclusion, magnolol possesses a pronounced cerebroprotective effect in rats. This effect may be achieved by its antioxidant action and suppressing neutrophils migration. Magnolol is a potential drug to be applied clinically in future.

Key words: cerebral ischemia, magnolol, reperfusion, free radicals

壹、前言

游離基為生物組織中生化反應之中間代謝產物，其普遍性與重要性漸受學者重視並被廣泛研究。游離基與多種疾病有密切關係，如：心臟血管疾病、腦病變、老化及癌症等 (1-6)。游離基為一高度反應物質，其對生物分子，如：蛋白質，脂質及 DNA 均有強氧化損傷作用 (7-9)。

相較於身體其他器官，中樞神經對游離基所引起之損傷特別敏感，其理由可從許多生化、生理及解剖方面說明如下：(1) 氧化代謝活性速率高；(2) 中樞神經元細胞膜不飽和脂肪酸受氧化濃度高；(3) 具保護之抗氧酶 catalase 及 glutathione peroxidase 之濃度低；(4) 由專一性神經化學反應產生內生性 ROM；(5) 特化神經傳導及聯會神經傳遞活性依賴有效細胞膜功能；(6) 細胞膜表面積與 cytoplasmic volume 之比例高；(7) 神經網路較易被破壞；(8) 神經細胞不能再複製。

身體某些疾病之致病因是歸因於身體受到氧化破壞與抗氧化防

衛系統之間不平衡所致，理論上增強抗氧化防衛系統應可限制氧化損傷及疾病之進行。目前許多研究報告顯示：游離基清除劑及抗氧化劑確實可減輕缺血引起組織損傷。最近，羅等研究者指出厚朴酚 magnolol 具有強效之抗氧化作用，其抗氧化作用約為 α -tocopherol 之 1000 倍 (10)，且我們實驗室初步發現：magnolol 對心臟缺血引起之心律不整及缺血再循環引起組織損傷，具有顯著之保護作用。根據衛生署流行病學統計報告，腦中風仍為國內十大死亡原因之一，而腦中風所引發之一連串後遺症導致影響家庭生計及生活品質與社會負擔。因此，為配合國家政策積極研究其致病因及開發新治療藥是刻不容緩的課題，由以上諸因素促使我們有興趣觀察厚朴酚 magnolol 對腦缺血引起組織損傷之保護作用，並進一步研究其作用機轉，以期能開發更有效治療腦中風之藥物。

貳、材料與方法

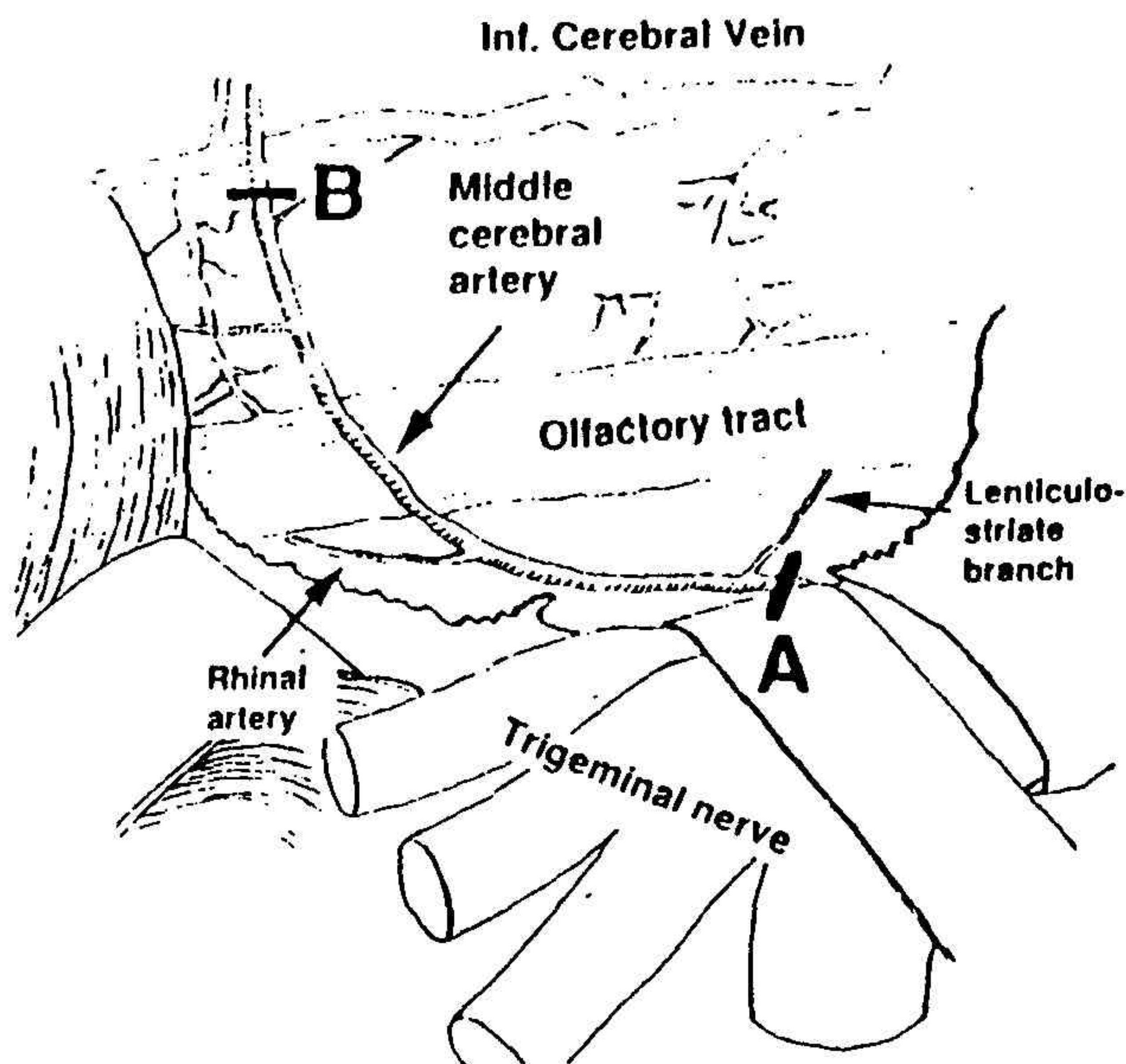
(一)、動物準備

雄性、重約 280–350 g 之 Sprague-Dawley (SD) 大白鼠，以 sodium pentobarbital 50 mg/kg，腹腔注射麻醉後，予進行左側股動、靜脈插管，以分別記錄血壓，心跳及給藥之用。給予實驗動物照射紅外線燈，以維持肛溫於 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。實驗過程並監測動物之血糖、動物血之 Pco_2 、 Po_2 及 pH 值，使其維持在正常範圍內。

(二)、中腦動脈 (middle cerebral artery; MCA) 結紮手術 (見下圖說明) (11)

首先將眼眶至外耳道間的毛皮剪開，接著將大白鼠下顎骨做冠狀切除，以露出顳骨下凹窩 (inferotemporal fossa)。在卵圓孔 (foramen ovale) 外上方開個直徑 3-4 mm 的小孔，以露出 MCA 的近側端，將 MCA 挑起，於接近豆狀核與紋狀體的分枝 (lenticulostriate branches) 處結紮 (圖 A 處)。接著進行 MCA 的遠端結紮：同樣的將 MCA 挑起，於接近下腦靜脈 (inferior cerebral vein) 處結紮 (圖 B 處)。大部份的動物做完此二處結紮後會造成腦波明顯變小的現象。將

MCA 的遠端結紮可造成大部分的大腦皮質壞死，而近端的結紮可進而造成剩餘的皮質及紋狀體處的壞死。



(三)、實驗分組：

動物共分成二大組：(1) 控制組：於 MCA 結紮前 15 分鐘及再循環前 3 分鐘分別各給與一次 vehicle。(2) Magnolol 給藥組：此組又分成三小組，即於 MCA 結紮前 15 分鐘及再循環前 3 分鐘分別各給與一次 magnolol 7.5 或 15 或 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。動物腦缺血 60 分鐘後，再予恢復血液循環 24 小時，結束後於麻醉狀態下犧牲動物取出腦部，經染色後測量壞死區域的大小。

(四)、測量壞死區域的大小

實驗步驟完成後，在麻醉狀態下將大白鼠斷頭，立即取出大腦，並冷凍 (-30°C)。以冷凍切片機 (-20°C) 將腦切片以 thionin 傳統

染色法染色，如此可明顯地看出壞死區域。將壞死大小小心地描繪在投影片上，以影像分析儀測量壞死區域。

(五) Myeloperoxidase activity (MPO) 活性測定

MPO 為嗜中性白血球中嗜天青性顆粒 (azurophilic granule) 所釋出的酵素，故可以 MPO 活性作為組織嗜中性白血球含量的指標，若藥物能降低腦組織的 MPO 活性，表示能減少嗜中性白血球的侵入。根據文獻報告(12,13)，實驗步驟如下：

a. 樣本蒐集

將腦組織秤重後儲存於 -70°C 之冷凍庫中。

b. 研磨 (homogenized) 組織

將腦組織置於 potassium phosphate solution (含 K_2HPO_4 , 20 mM, pH 6) 中 (每公克腦組織中加入 10 毫升)，以 20,000 g (4°C) 離心三十分鐘，去除上清液後，將之冷凍於 -70°C 冷凍室。

c. 震碎腦組織

腦組織解凍後加入含 0.5% hexacyltrimethylammonium bromide (HTAB) 及 5 U/ml aprotinase 之 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6) 約 0.5 ml，以超音波器 (sonicator) 震碎細胞後，以 40,000g (4°C) 離心三十分鐘，取上清液進行以下實驗。

d. 吸光度測定

取上清液 0.1 毫升，加入 0.9 毫升之含 o-dianisidine dihydrochloride (0.167 mg/ml) 及 0.0005 % H_2O_2 之 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6) 後測定二十分鐘內在波長 405 nm 的吸光度變化。

e. MPO 活性之定義

MPO 活性之定義是在 25°C 下每分鐘分解 1 mmol 過氧化氫的 MPO 的量，在此以每公克腦組織每分鐘於 405 nm 吸光度的變化為一單位 (unit/g wet weight) 表示。

(五)、統計方法

本研究所得之結果以 means \pm standard error of means (S.E.M.) 表示。結果以單向變異數分析 (one-way analysis of variance) 加以統計，若具統計上之明顯差異 ($p < 0.05$)，再以 Newman-Keuls method 作事後比較。

參、實驗結果

(一)、測量壞死區域的大小

圖一顯示，控制組腦組織可以明顯看出壞死區域，而給藥組則可以明顯減少缺血再循環所引起之腦組織壞死現象。圖二則顯示統計結果：壞死腦組織總體積：控制組為 $150 \pm 21 \text{ mm}^3$ ，而預處理 magnolol $7.5 \text{ }\mu\text{g/kg}$ 無法達到保護作用 ($145 \pm 25 \text{ mm}^3$)，但 15 及 $60 \text{ }\mu\text{g/kg}$ 二組分別為 $75 \pm 22 \text{ mm}^3$ 及 $48 \pm 15 \text{ mm}^3$ ，與控制組相較明顯改善腦組織壞死，具統計上之差異 ($p < 0.05$)，但二組之間並無統計上的差異。

(二)、MPO 活性測定

控制組之 MPO 活性為 $60 \pm 10 \text{ units/g wet weight}$ ，三組 magnolol ($7.5, 15, 60 \text{ }\mu\text{g/kg}$) 給藥組分別為 $48 \pm 7, 25 \pm 5, 18 \pm 6 \text{ units/g wet weight}$ (見圖三)，僅較高劑量之二組明顯降低 MPO 活性 ($p < 0.05$)，但二組之間並無統計上的差異。

肆、討論

缺血後給予再循環時會產生大量的自由基，自由基會直接損傷細胞膜，造成細胞內鈣離子過度負荷，並破壞粒線體，使損傷更加嚴重。臨床上常見的腦血管疾病如中風，在缺血一定時間後經由藥物治療後，即使血管恢復暢通，但神經功能卻未見好轉，學者認為這可能與再循環時產生自由基有關。研究報告亦指出，自由基清除劑或抗氧化劑，例如維生素 E 對腦缺血-再循環損傷具有保護作用

(14)。本實驗結果亦顯示，預處理 magnolol (15 & 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$)，明顯降低腦缺血再循環後之壞死區域大小，並大幅提升了大鼠的存活率。根據文獻報告：嗜中性白血球產生的大量自由基是缺血-再循環時造成腦細胞及血管損傷的重要原因之一 (15)，因此抑制嗜中性白血球的活化便可產生腦神經的保護作用。一般學者以 MPO 的活性作為組織內嗜中性白血球含量的指標，若藥物能降低 MPO 活性就表示能降低嗜中性白血球在腦組織的堆積，也就是對大腦具有保護的作用。本實驗中預處理 magnolol 均可明顯降低 SD 大鼠因腦缺血所誘發之 MPO 活性，而控制組 MPO 活性幾乎為給藥組的約兩倍。此結果表示 magnolol 可抑制嗜中性白血球進入腦缺血區域，因此可能藉由此機轉而減少自由基產生，而對缺血腦組織產生保護作用。有文獻指出 (15)，減少再循環時血液中所含之白血球，可以降低缺血-再循環所造成的壞死面積。由於在缺血-再循環的過程，會刺激嗜中性白血球而活化其表面的 NADPH oxidase 使氧分子轉變為超氧自由基及過氧化氫，並且會活化 phospholipase A_2 釋出 arachidonic acid (AA) 及 lyso-platelet activating factor (lyso-PAF)，而 AA 經由 5-lipoxygenase 作用產生 LTA_4 然後水解為 LTB_4 ，同時 lyso-PAF 經 acetyltransferase enzyme 作用變為 PAF，這些物質包括 AA、PAF 及 LTB_4 等會更進一步產生大量超氧自由基。另一方面，活化的嗜中性白血球也會將一些蛋白質分解酵素 (proteolytic enzyme) 釋出，例如嗜中性白血球內的嗜天青性顆粒 (azurophilic granule) 會釋放出 MPO。在 MPO 及氯離子 (chloride) 的存在下會產生 hypochlorous acid (HOCl)，高反應性的 HOCl 會進一步與氮化合物 (nitrogenous compound) 產生 monochloramine (NH_2Cl)，此化合物是親脂性的氧化劑，具有高度的通透性，會與細胞膜反應，故當缺血再循環時活化嗜中性白血球產生了 NH_2Cl 後，它可能會破壞細胞膜並攻擊細胞內胞器 (organelles) (16)。由此可知 magnolol 因此可降低缺血區域嗜中性白血球的含量，因此可能藉此而有效地降低腦組織的壞死區域。

由代謝的觀點來看，急性腦缺血造成的腦細胞變化是可逆的，然而若缺血時間過長，會進一步地降低細胞內的 pH 值、ATP 及 creatinine phosphate，最後由於 ATP 嚴重的耗損，導致細胞不可逆

的損傷 (17)。但是再循環時大量的鈣離子及自由基會造成細胞膜破損，並使粒線體受損，導致細胞失去合成ATP的能力，更加重其嚴重程度。雖然，缺血期間腦的氧氣供應減少或者根本無法獲得，並不表示完全不會產生自由基，相反地，缺血時的代謝改變會促使自由基由殘留的氧分子產生，但相較之下，再循環時產生自由基的量遠大於缺血期間。

Magnolol 則是由中藥厚朴 (*Magnolia officinalis*) 所抽取，經純化分離後得到的產物之一，而厚朴是傳統中醫臨床上經常使用的藥物，用於治療頭痛、發燒、焦慮、腹瀉及中風等症狀。過去研究報告證實，magnolol 有許多藥理活性作用，包括抗血小板凝集作用 (18)、抗發炎作用 (19)、抗菌作用 (20)、血管擴張作用 (21) 及中樞神經抑制作用 (22)，並且是一個強抗氧化劑 (23)。研究顯示，magnolol 抑制大鼠心臟粒線體產生脂質過氧化反應的能力竟達 α -tocopherol (即維生素E) 的一千倍 (23)。除此之外，magnolol 可清除穩定性氮屬自由基 diphenyl-*p*-picrylhydrazyl (DPPH)，推論 magnolol 為一自由基清除劑，然其清除自由基的能力較維生素E稍弱 (23)。因此我們認為，magnolol 可能主要是透過其抗氧化以及部分經由清除自由基作用，以達保護因腦缺血-再循環產生的損傷作用。

伍、參考文獻

1. Hall ED, Branghler JM, Free radicals in CNS injury. Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.71:81-105,1993.
2. Lesnefsky EJ, Repine JE, Horwitz LD, Deferoxamine pretreatment reduce canine infarct size and oxidative injury. J. Pharmacol. Exp.Ther .253:1103-1109, 1993.
3. Jenner P, Oxidative damage in neuro-denerative disease. Lancet, 344:796-798, 1994.
4. Witztum JL, The oxidation hypothesis of atherosclerosis. Lancet: 344:793-797, 1994.

5. Lubec G, The hydroxyl radical: from chemistry to human disease. *J. Invest. Med.* 44:324-347, 1996.
6. Gey KF, Prospects for the prevention of free radical disease, regarding cancer and cardiovascular disease. *Br. Med. Bull.* 49:679-699, 1993.
7. Evans PH, Free radical in brain metabolism and pathology. *Br. Med. Bull.* 49:577-587, 1993.
8. Fuciarelli AF, Sisk EC, Thomas RM, Miller DL, Induction of base damage in DNA solutions by ultrasonic cavitation. *Free Rad. Biol. Med.* 18:231-238, 1995.
9. Maxwell RJ, Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 49:345-361, 1995.
10. Lo YC, Teng CM, Chen CF, Chen CC, Hong CY, Magnolol and honokiol isolated from *Magnolia officinalis* protect rat heart mitochondria against lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 47:549-553, 1994.
11. Zhang F, Iadecola C, Stimulation of the Fastigial Nucleus enhances EEG recovery and reduces tissue damage after focal cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 12: 962-970, 1992.
12. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD: Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.* 78: 206-209, 1982.
13. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD: Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.* 78: 206-209, 1982.
14. Clemens JA, Panetta JA: Neuroprotection by antioxidants in models of global and focal ischemia. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 738:250-256, 1994.

15. Matsuo Y, Kihara T, Ikeda M, Ninomiya M, Onodera H, Kogure K: Role of neutrophils in radical production during ischemia and reperfusion of the rat brain: effect of neutrophil depletion on extracellular ascorbyl radical formation. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 15:941-7, 1995.
16. Grisham MB, Jefferson MM, Thomas EL: Role of monochloramine in the oxidation of erythrocyte hemoglobin by stimulated neutrophils. *J. Biol. Chem.* 259: 6766-6772, 1984.
17. Hunter AJ, Mackay KB, Rogers DC: To what extent have functional studies of ischaemia in animals been useful in the assessment of potential neuroprotective agents? *Trends in Pharmacological Sciences* 19:59-66, 1998.
18. Teng CM, Chen CC, Ko FN, Lee LG, Huang TF, Chen YP, Hsu HY: Two antiplatelet agents from *Magnolia officinalis*. *Thromb. Res.* 50: 757-765, 1988.
19. Wang JP, Hsu MF, Raung SL, Chen CC, Kuo JS, Teng CM: Anti-inflammatory and analgesic effects of magnolol. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 346: 707-712, 1992.
20. Clark AM, Elferaly FS, Li WS: Antimicrobial activity of phenolic constituents of *Magnolia grandiflora* L. *J. Pharm. Sci.* 70: 951-952, 1981.
21. Teng CM, Yu SM, Chen CC, Huang YL, Huang TF: EDRF-release and Ca²⁺-channel blockade by magnolol, an antiplatelet agent isolated from Chinese herb *Magnolia officinalis*, in rat thoracic aorta. *Life Sci.* 47: 1153-1161, 1990.
22. Watanabe K, Watanabe H, Goto Y, Yamaguchi M, Yamamoto N, Hagino K: Pharmacological properties of magnolol and honokiol extracted from *Magnolia officinalis*: central depressant effects. *Planta. Med.* 49: 103-108, 1983.

- 23 Lo YC, Teng CM, Chen CF, Chen CC, Hong CY: Magnolol and honokiol isolated from *Magnolia officinalis* protect rat heart mitochondria against lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 47: 549-553, 1993.

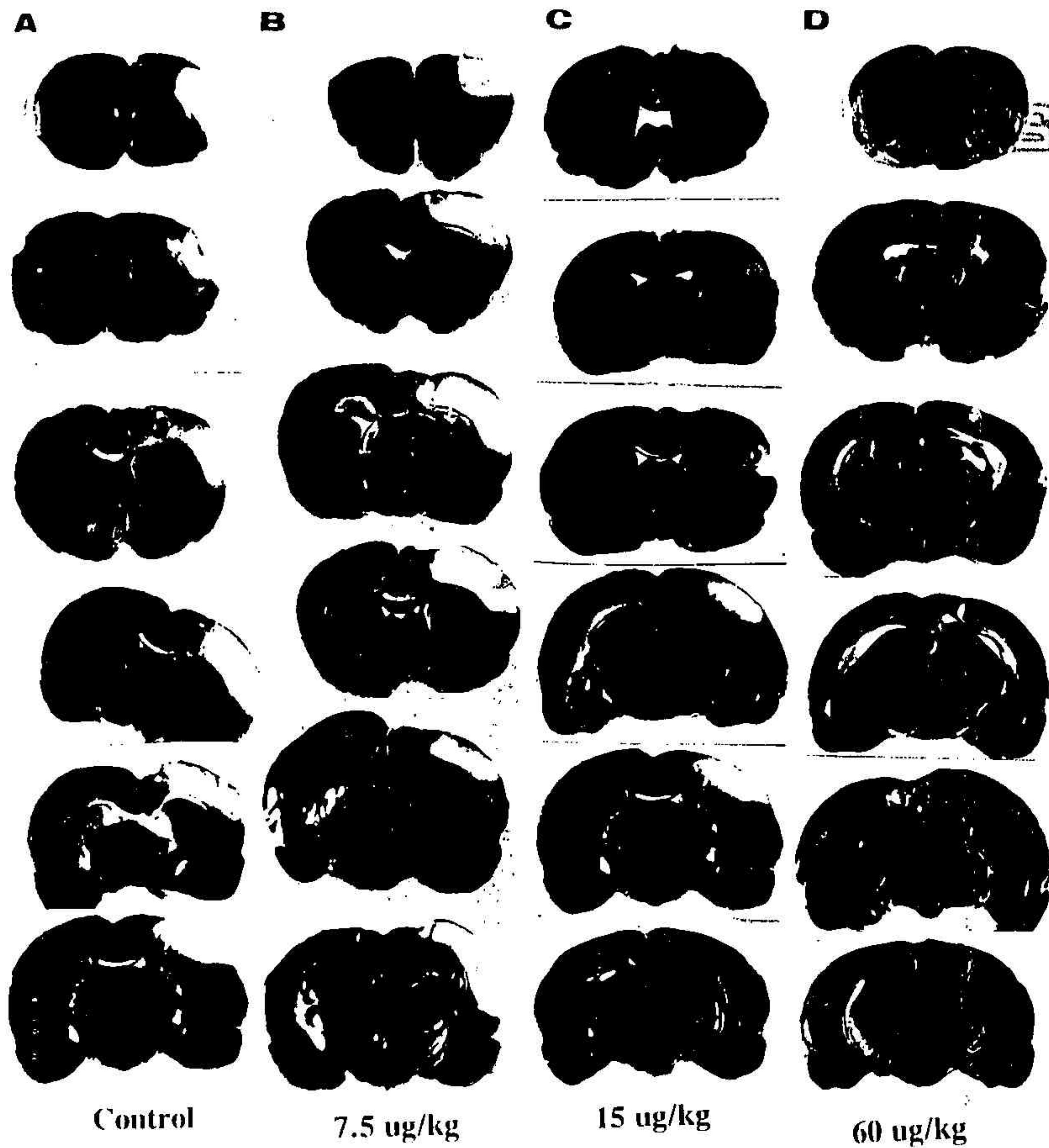


Fig. 1 Distribution of the cross-sectional area of the infarct resulting from the occlusion of the middle cerebral artery in rats.

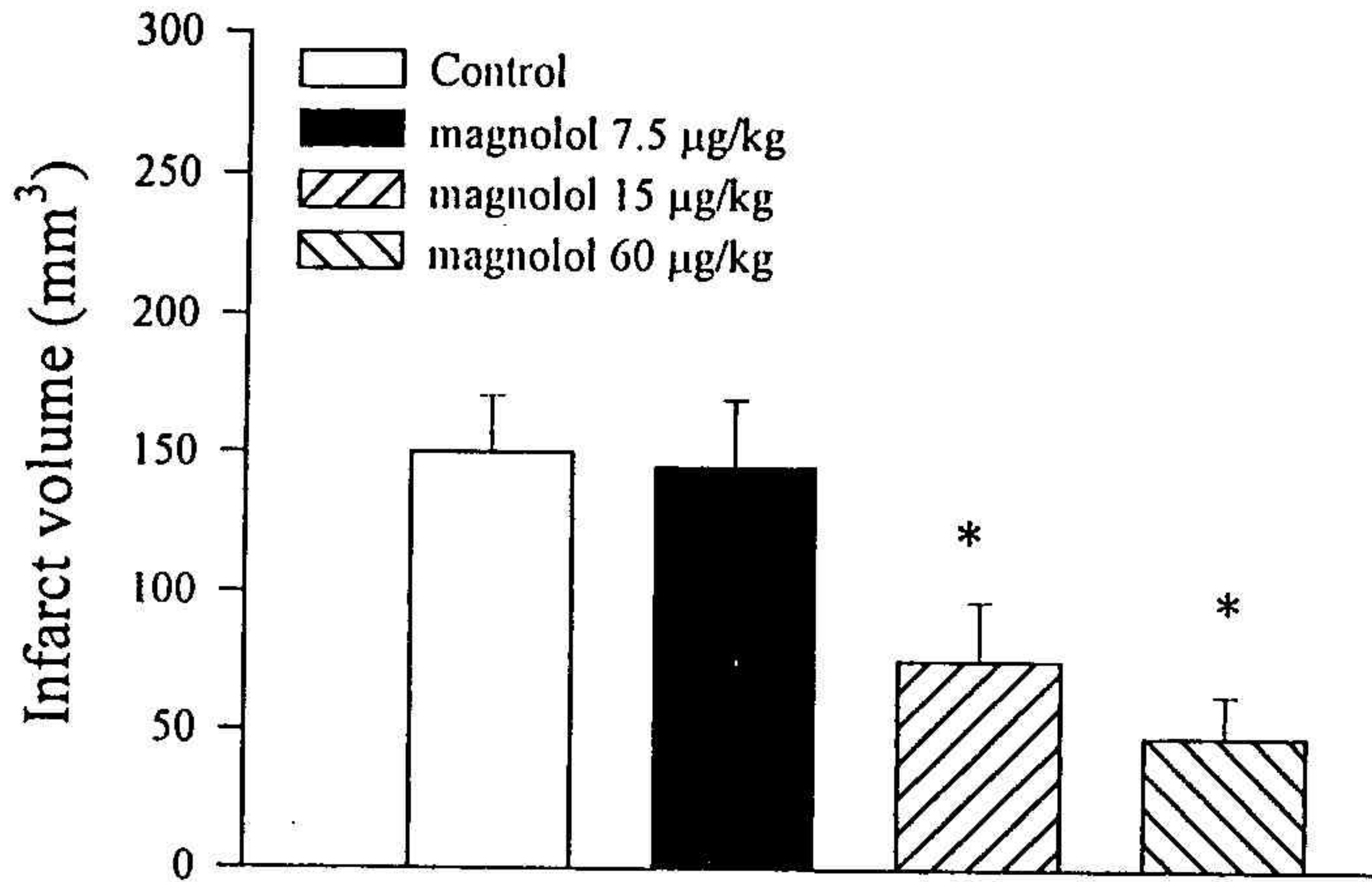


Fig 2 Effects of mangolol on infarct volume in SD rats undergoing 1 hr of middle cerebral artery ligation followed by 24 hr of reperfusion. Values are expressed as means + S.E.M., *P<0.05 vs control group.

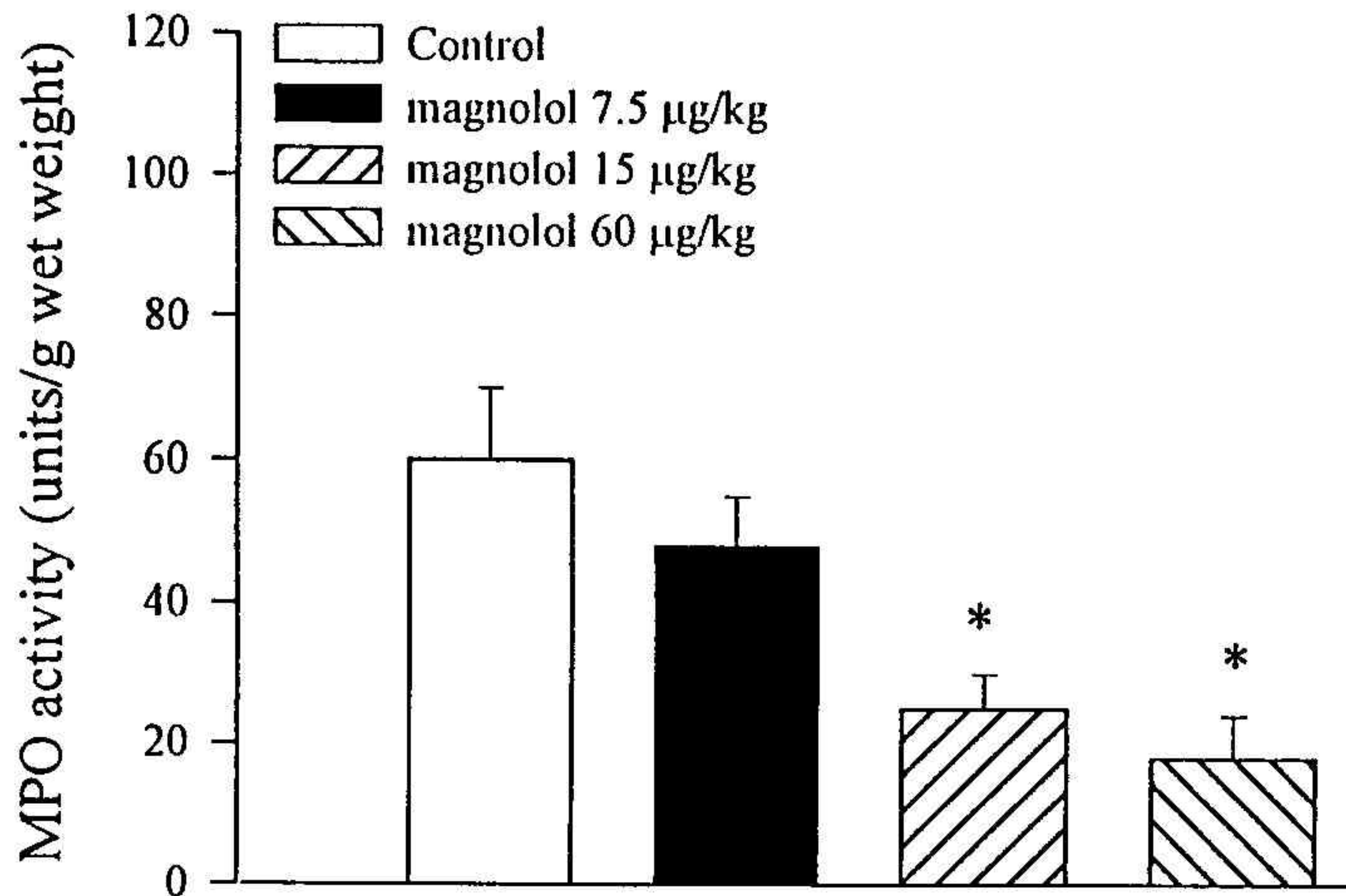


Fig 3 Effects of mangolol on myeloperoxidase (MPO) in SD rats undergoing 1 hr of middle cerebral artery ligation followed by 24 hr of reperfusion. Values are expressed as means + S.E.M., *P<0.05 vs control group.

