

計畫編號：CCMP89-RD-002

行政院衛生署八十九年度科技研究發展計畫

比較中西抗老化藥材在神經退化性疾病之療效—抗
氧化功能探討

委託研究報告

計畫委託機關：國立成功大學

計畫主持人：莊季瑛

研究人員：莊季瑛

執行期間： 88年 7月 1日至 89年 6月 30日

****本研究報告僅供參考，不代表本署意見****

計畫編號：CCMP89-RD-002

各機關研究計畫基本資料庫之計畫編號：

行政院衛生署八十九年度科技研究發展計畫

比較中西抗老化藥材在神經退化性疾病之療效—抗
氧化功能探討

委託研究報告

計畫委託機關：國立成功大學

計畫主持人：莊季瑛

研究人員：莊季瑛

執行期間： 88年7月1日至89年6月30日

編號：CCMP89-RD-002（12 號字，粗體）

行政院衛生署中醫藥委員會八十九年度委託研究計畫成果報告（16 號字）

比較中西抗老化藥材在神經退化性疾病
之療效—抗氧化功能探討

執行機構 國立成功大學
計畫主持人 莊季瑛
研究人員 莊季瑛

執行期限：民國 88 年 7 月 1 日至民國 89 年 6 月 30 日

****本研究報告僅供參考，不代表本會意見****（14 號字）

目 錄

	頁次
中文摘要	2-3
英文摘要	4-5
前 言	6-7
材料與方法	8-10
結 果	11-13
討 論	14-15
結論與建議	16
參考文獻	17-20
圖解	21
圖 (一)	22
圖 (二)	23
圖 (三)	24
圖 (四)	25
圖 (五)	26
圖 (六)	27
圖 (七)	28
自我評估表	29

編號：CCMP89-RD-002

比較中西抗老化藥材在神經退化性疾病之 療效—抗氧化功能探討

莊季瑛

國立成功大學醫學院生理學研究所

摘要

本實驗利用能專一性破壞多巴胺神經細胞的神經毒物 MPP⁺，直接將其注射至大鼠的紋狀體，模擬巴金森氏症的動物模式，探討並比較中藥—茯苓、桑白皮、粉防己、枸杞子和西藥—褪黑激素等抗老化藥材，是否具有治療此神經老化退化性疾病的功效。許多文獻證實：腦中大量自由基的產生和抗氧化功能的降低，是常見的神經老化退化性疾病—如：巴金森氏症及阿采默氏症的重要致病機轉。我們以前的實驗結果指出：給予西藥抗老化及抗氧化藥劑—褪黑激素能有效避免 MPP⁺所誘發的氧化壓力（我們以氧化態麩胺基硫／還原態麩胺基硫含量比值（GSSG/GSH ratio）為氧化壓力的指標）及 nigrostriatal 多巴胺神經細胞的大量死亡。有鑑於此，我們利用此模式探討具有抗氧化及抗老化中藥材—茯苓、桑白皮、粉防己、枸杞子對神經老化退化性疾病—巴金森氏症的療效為何。實驗分為對照組及藥物處理組，對照組為單側直接注射 100 nmole/1 μ l 的 MPP⁺至紋狀體加上由腹腔注射溶劑，藥物處理組為單側紋狀體注射 MPP⁺再加上腹腔注射各種藥材—茯苓或桑白皮或枸杞子的酒精初抽物或 tetrandrine（粉防己的主成分），結果指出：在 MPP⁺注射三天後，與對側的紋狀體比較，MPP⁺破壞側的紋狀體（多巴胺神經細胞末梢所在處），GSH 含量顯著下降，而 GSSG/GSH 比值顯著增高，但不影響麩胺基硫過氧化酶的活性，並且神經細胞大量凋亡，不僅於此，我們也觀察到與 MPP⁺注射同側的中腦黑質區（多巴胺神經細胞本體所在處），多巴胺神經細胞數目（有染上 TH 的細胞）

比對側無 MPP⁺處理的黑質區明顯減少。另一方面，在 MPP⁺注射前 1、後 1、3、5 小時，由腹腔注射 40 mg/kg 的茯苓酒精抽出物或 20 mg/kg tetrandrin 或 1 g/kg 的桑白皮酒精抽出物皆可顯著抑制 MPP⁺所誘發紋狀體的氧化壓力—GSSG/GSH 比值的上升，但是 MPP⁺誘發黑質區的氧化壓力則只能被桑白皮有效的抑制，反之，1 g/kg 枸杞子酒精抽出物的抗氧化壓力作用則不顯著。另一方面，形態結果與生化結果一致，能有效抑制氧化壓力的桑白皮、茯苓和 tetrandrin，皆顯著減弱 MPP⁺所造成的黑質區 TH-positive 多巴胺神經細胞的大量流失和紋狀體 TUNEL-positive 神經細胞凋亡數目。綜合上述結果顯示，長期服用這些抗氧化藥材的確具有治療一些因氧化壓力引起的神經老化退化性疾病的功效。

關鍵詞：茯苓;桑白皮;粉防己;枸杞子;褪黑激素;抗氧化作用;多巴胺神經細胞;巴金森氏症

CCMP89-RD-002

A comparative study in the protective effect of Chinese and western anti-aging medicine in MPP⁺-induced neurodegeneration

Jih-Ing Chuang

Department of Physiology, College of Medicine, National Cheng Kung University

ABSTRACT

The formation of hydroxyl free radical and reduced level of the endogenous antioxidant glutathione (GSH) have been implicated in aging process and in age-related neurodegenerative diseases, as well as 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) induced parkinsonism. Indeed, our previous results had demonstrated that melatonin, a pineal hormone known as an antioxidant and anti-aging molecule, significantly attenuated the oxidative stress and nigrostriatal dopaminergic neuronal damage induced by MPP⁺ (a neurotoxic metabolite of MPTP formed by MAO-B). Therefore, we investigated whether the traditional Chinese anti-aging medicine with antioxidative action also have the same or more potent protective effect than melatonin on MPP⁺-induced neuronal damage. Male Wistar rats weighting 250-300 g were used in this study. One hundred nmole in 1 μ l of MPP⁺ was directly infused to unilateral striatum, and ethanol extraction of Poria or Lycii Fructus or Mori Radicis and tetrandrine (a major compound of Fangji) was injected intraperitoneally at 1 h before, 1 h, 3 h, 5 h after MPP⁺-infusion. The results showed that MPP⁺ caused a severe neuronal apoptosis (shown as TUNEL-positive cells) in the striatum and a significant loss of dopaminergic neurons, as determined by tyrosine hydroxylase (TH) immunostaining, in the ipsilateral side of pars compacta of the substantia nigra (SN) at three days after MPP⁺ infusion. Meanwhile, the nigrostriatal neuronal damage induced by MPP⁺ was accompanied with a significant decrease of GSH level and an increase of GSSG/GSH ratio (oxidized glutathione/ total glutathione, an indicator of oxidative stress) when compared with the controlateral side of striatum or SN. MPP⁺ did not effect on the activity of glutathione peroxidase in the striatum or SN. On the other hand, administration of 50 mg/kg Poria, or 20 mg/kg tetrandrine, or 1 g/kg Mori Radicis significantly attenuated the loss of TH-positive neurons in the substantia nigra and the oxidative stress (as shown in an increase of GSSG/GSH ratio) in the striatum

resulted from the treatment of MPP⁺. Moreover, the reduction of GSH level induced by MPP⁺ in striatum can also be prevented by Poria or tetrandrine treatment. On the contrary, treatment with Lycii Fructus did not prevent the neuronal damage and oxidative stress induced by MPP⁺ in our system. In conclusion, our results demonstrated that all of Poria, Fangji, and Mori Radicis are antioxidants and neuroprotective in function in MPP⁺-induced parkinsonism model. Therefore, we suggest that taking these medicine for longer time may be of benefit in the treatment of certain age-related neurodegenerative diseases.

Keywords: Poria; Lycii Fructus; Fangji Radix; Mori Radicis Cortex; antioxidant; glutathione; MPP⁺; Parkinson's disease

壹、前言

自從 1956 年自由基是造成老化的原因之學說被提出後，近四十年來科學家們指出：氧化壓力(oxidative stress, 自由基的增生或/和抗氧化功能降低)與老化和神經退化性疾病息息相關，甚至也是導致細胞自然凋亡(apoptosis)、壞死(necrosis)及興奮性毒性(excitotoxicity)的重要機轉(reviewed by Beckman & Ames, 1998)。自由基(free radicals)是指粒腺體在進行呼吸電子傳遞鏈將氧氣還原為水的過程中受阻，所產生的半還原中間物—如： $\cdot O_2$ 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$ ，於是粒腺體的功能在老化過程中扮演重要角色，學者們的確發現，愈長壽的動物其身體代謝速率愈低，而且粒腺體產生自由基速率愈低(reviewed by Perez-Campo et al., 1997)。另一方面，在老化過程中抗氧化功能的逐漸減弱也被證實是造成自由基堆積的原因，尤其是內生性抗氧化劑麩胺基硫(glutathione, GSH)在神經系統的角色，GSH 為一能清除 $\cdot OH$ 的內生性抗氧化劑，GSH 是麩胺基硫過氧化西每(glutathione peroxidase, GSH-Px)的受質，當 GSH-Px 將 H_2O_2 轉化為水，以避免 H_2O_2 經由亞鐵離子的作用產生 $\cdot OH$ 的時候，同時會將 GSH 轉化成氧化態的麩胺基硫(glutathione disulfide, GSSG)，因此，GSH-Px 活性的強弱和 GSH 含量的高低，被當作體內抗氧化防禦能力的好與壞，相反的，GSSG/GSH 的比值則被用來當作氧化壓力(oxidative stress)的指標(Meister, 1991; Guo et al., 1992)。許多證據指出，在神經退化性疾病(巴金森氏症和阿采默氏症)患者的腦組織中 GSH 含量顯著減少，若降低實驗動物體內 GSH 含量會增加氧化壓力，造成更多神經細胞死亡，所以能提高或補充 GSH 或許可以避免甚至用來治療神經退化性疾病(reviewed by Bains & Shaw, 1997)。基於此抗老化學說，除了 GSH 以外，許多抗氧化劑都被學者指出是抗老化和防老化的最佳人選。

巴金森氏症是常見的神經退化性疾病，其發病率隨年齡增加而增高，主要是因多巴胺神經細胞大量的流失造成行動異常的疾病，但造成多巴胺神經細胞流失的作用機轉仍不清楚。雖然如此，不論在巴金森氏症病患或

MPP⁺模擬巴金森氏症的動物模式，氧化壓力的增高都被指出是導致多巴胺神經細胞死亡的主要原因之一(Poirier & Thiffault, 1993)，因為在巴金森氏症患者存活的多巴胺神經細胞內，發現內生性的抗氧化劑 GSH 濃度呈顯著下降(Pearce et al., 1997)，顯示抗氧化防禦功能的減弱。另外，更多的證據由 MPP⁺誘發的巴金森氏症動物模式中證實，MPP⁺因可專一性的被多巴胺轉載者(transporter)送至多巴胺神經細胞內(Uhl, 1998)，並藉著抑制粒腺體電子傳遞鏈的 complex I 的活性的能力，促使大量自由基產生及 ATP 的減少而毒殺細胞(Adams et al., 1993)，因具此特性，MPP⁺能選擇性的殺死多巴胺神經細胞，所以 MPP⁺被廣用為一實驗性巴金森氏症的動物模式。這些動物實驗證據指出，注射 MPP⁺會誘發·OH⁻的生成及增加細胞膜的脂質過氧化作用(Sriram et al., 1997; Fallon et al., 1997)，同時，急遽造成 GSH 的含量下降(Sriram et al., 1997; Desole et al., 1993)，所以 GSH 抗氧化系統在保護多巴胺神經細胞抵抗 MPP⁺攻擊上佔重要角色。另一方面，含 SH 的化合物如：cysteamine, vitamin E or MAO-B 抑制劑等，已被證實的確具有減弱 MPP⁺所誘發的氧化壓力而達到保護神經細胞的作用(Oishi et al., 1993; Koller 1997;)，相反的，抑制 GSH 生合成則更加成 MPP⁺的毒性(Wullner et al., 1996)。

綜合上述的文獻資料及一些證據指出：常用的抗老化中藥材中，防己、枸杞子和桑白皮具有清除自由基和抗氧化的作用，所以本計畫的主要目的在於探討常用的抗衰老中藥材：防己、枸杞子、茯苓和桑白皮，對 MPP⁺專一性毒殺多巴胺神經細胞模擬巴金森氏症的動物模式中，是否具有保護神經細胞免於損傷的治療效用，我們以測量 MPP⁺注射區—紋狀體及多巴胺神經細胞本體—黑質區的 GSH 含量和 GSSG/GSH 比值變化，再加上以 TUNEL 染色法和 TH 免疫化學法分別觀察細胞凋亡情形及多巴胺神經細胞數目多寡，進行評估這些中藥材的抗氧化壓力能力和保護神經細胞免於 MPP⁺攻擊的功效，以期能提供實驗證據證實抗衰老中藥材之抗氧化能力在抗神經退化性疾病的療效中扮演重要角色。

貳、材料與方法

實驗動物製備及藥物處理

實驗動物採用成功大學醫學院動物中心所飼養的二個月大重約 250-300 g Wistar 雄大白鼠，實驗動物將飼養在 12 小時燈亮 12 小時燈暗，室溫維持在 22°C 的空調室，不限制飲食。100 隻雄鼠將分為五大組：分別為 MPP⁺處理組、MPP⁺+tetrandrine、MPP⁺+枸杞子、MPP⁺+茯苓、和 MPP⁺+桑白皮。為了直接將 MPP⁺注射至紋狀體，老鼠首先以腹腔注射 50 mg/kg 的 sodium pentobarbital 予以麻醉，將動物固定在腦立體定位儀上，依據 Paxinos and Watson (1982) 所著作的圖譜，將 100 nmole/1 μ l MPP⁺ (Research Biochemical Inc. Wayland, MA) 注射至單側的紋狀體，座標為：以 bregma 為原點，往前 1 mm，往右 3 mm，往下深入 5 mm，除了控制組及 MPP⁺處理組以外，在 MPP⁺注射前 1 及後 1, 3, 5 小時由腹腔注射各種中藥材，之後每天注射藥物一次，三天後，將各組動物犧牲，一部份動物斷頭後，立刻將腦取出並置於冰上，很快的將兩側紋狀體及中腦黑質區分離出來，馬上放在乾冰上使組織結凍，之後儲存在 -80，一直到進行 GSH 及 GSSG 測定，而另一部份動物則予以灌流固定，將紋狀體及中腦以石蜡包埋並切片，進行 Nissl, TUNEL, Tyrosin hydroxylase (TH) 免疫化學法等染色。因為 MPP⁺只注射至右側紋狀體，所以右側紋狀體和黑質區為破壞側，左側相對腦組織則為對照側區域。

中藥材之製備

茯苓、枸杞及桑白皮等中藥材的酒精提取物由嘉南藥理學院藥學科陳莉瑩助理教授所萃取，酒精提取物製備過程及方法：將適量藥材以 50% 酒精浸潤之，在 50°C 下迴流抽取，每次約 4 小時，用紗布過濾，收集濾液，如此反覆 3 次，合併濾液，再經減壓濃縮至乾，即得酒精提取物備用。而防己因市場有各種不同的基源，不易購得純正基源（嘗試向港相蘭公司購買但未購得），再加上可從 Fluka 藥廠購得其主成份 tetrandrine，所以茯苓的實驗改用 tetrandrine 來進行。另外，因為對中藥萃取不熟悉，所以花

了一些時間才請到嘉南藥理學院藥學科陳莉瑩助理教授幫忙抽取，因而導致時間不足，所以此實驗只做酒精抽出物而未比較與水抽出物藥效的差異，相信下次使用複方藥材即可進一步比較各種初抽物及不同劑量療效的異同。

麩胺基硫過氧化西每活性測量方法(glutathione peroxidase, GSH-Px)

GSH-Px 活性測定採用 Jaskot 等人(1983)提出的方法，腦組織(紋狀體或中腦黑質區)加 5 倍的 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 研磨均勻，4°C, 14000 rpm 離心 60 分鐘，取上層液加 0.1 M 磷酸緩衝液(內含有 1.33 mM NADPH, 3.75 mM NaN₃ 和 40 U glutathione reductase) 在 30 °C 反應 5 分鐘，之後加入 10 µl 的 7 mM cumen hydroperoxide，並立刻置於比色光譜儀內，在波長 340 nm 讀取吸光值每分鐘下降速率，活性以 µM NADPH oxidized/min/mg protein 表示。另外取一部分上清液，利用 Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 測量蛋白質含量。

麩胺基硫(還原態的 GSH+氧化態的 GSSG)總含量及 GSSG 濃度測量方法

GSH 和 GSSG 濃度測量方法主要是依據 Anderson (1985) 所提出的方法，取 40 mg 腦組織(紋狀體或中腦黑質區)加 200 µl 的 1% picric acid 研磨均勻，以 4°C, 12500 rpm 離心 15 分鐘，取上清液加 NADPH 緩衝液和 DTNB 溶液在 30°C 反應 4 分鐘，之後加入 5 µl GSSG-R (glutathione reductase) 並立刻置入比色光譜儀內，讀取波長 412 nm 吸光值變化，並製作已知濃度 GSH 的標準曲線以換算出 GSH 總濃度。而 GSSG 濃度之測量則先用 2 µl 2-vinylpyridine 處理 30 分鐘，用來破壞絕大部分還原態 GSH，之後重複上述測總 GSH 濃度的方法，則可測得氧化態的 GSSG 含量。正常細胞 GSSG/GSH 比值約 1~2%。

Tyrosine hydroxylase(TH) 免疫化學法(immunocytochemistry)

動物以 4% paraformaldehyde 灌流固定後，將腦組織取出並且再後固定 6 小時以上，以切片機切出 40 µm 厚薄的腦切片，並將其平貼於鍍有 poly-L-lysine 的載玻片上，加入稀釋 200 倍的 TH (RBI) 初級抗體，背景對

照腦切片則加一般兔子血清而不加 TH 抗體，之後加帶有 avidin-biotin-complex 的二級抗體 (Vector) 至腦切片反應，最後利用 glucose oxidase nickel-diaminobenzidine 的方法進行呈色 (Chen et al., 1994)。

細胞自然凋亡測定 (TUNEL 方法)

以 TdT-mediated dUTP-dioxigenin nick end labeling (TUNEL) 方法偵測細胞自然凋亡(apoptosis)情形。主要是標示出斷裂的 DNA 之 3'端，所有進行步驟依據 kit (ApopTag, Oncor Inc.)操作，TdT 酵素稀釋 40 倍，另外為了去除內生性的過氧化西每的干擾，腦組織切片將先浸泡再含有 0.1M sodium azide (Sigma)的 0.03%雙氧水中 20 分鐘。不加 TdT 酵素的腦組織切片為 negative control，取大白鼠的小腸組織切片當作 positive control。最後在顯微鏡下檢查及計算各種藥物處理的腦組織，TUNEL-positive nuclei 和細胞核斷裂的細胞數目。

參、結果

注射 MPP⁺至紋狀體對多巴胺神經系統(nigrostriatal dopaminergic system)造成的傷害

單側直接注射 MPP⁺至紋狀體，三天後，由圖（一）TUNEL 染色結果指出：與對照側的紋狀體（圖一 A）比較，MPP⁺注射側的紋狀體染上 TUNEL 的細胞（圖一 B，箭頭指示處）數目顯著增加，以此方法在背景對照側紋狀體沒有觀察到任何具有 TUNEL 的呈色。顯示 MPP⁺能直接傷害紋狀體造成嚴重的神經細胞凋亡。另外，由圖（二）TH 免疫化學染色結果也指出：MPP⁺除直接破壞紋狀體以外，更會沿著多巴胺神經軸纖維從神經末梢的紋狀體回溯至遠端中腦黑質區的多巴胺神經細胞本體所在處，並且顯著減少黑質區染上 TH 的多巴胺神經細胞（圖二 B 箭頭所指的細胞）數目，而圖二 A 對照側的黑質區則呈現出許多染上 TH 的多巴胺神經細胞及神經纖維。此結果顯示：MPP⁺非專一性的直接毒殺紋狀體的神經細胞，並且專一性破壞黑質區多巴胺神經細胞，證實並建立 MPP⁺誘發的巴金森動物模式。

中藥材對 MPP⁺毒殺多巴胺神經系統的保護作用

利用我們建立的 MPP⁺動物模式，進行各中藥材的保護作用評估，圖一的紋狀體 TUNEL 染色及圖二的黑質區 TH 免疫染色結果分別指出：茯苓（圖一 C）、桑白皮（圖一 D）、枸杞的酒精初抽物（圖一 E）、和 tetrandrine（圖一 F）皆可明顯減少 MPP⁺所增加的 TUNEL-positive 神經細胞凋亡數目。同時，與 MPP⁺單獨處理的黑質區（圖二 B）比較，圖二 C、D、E、F 分別顯示：茯苓、桑白皮、枸杞的酒精初抽物、和 tetrandrine 都顯著改善 MPP⁺所造成的黑質區 TH-positive 多巴胺神經細胞的流失，所以有處理上述中藥材的 MPP⁺破壞側的黑質區神經細胞數目與對照側的數目較接近。因此圖一及圖二型態的結果證實，注射這些抗老化藥材的確具有保護多巴胺神經系統免於 MPP⁺所造成的傷害。

MPP⁺損毀紋狀體麩胺基硫抗氧化防禦系統並且誘發氧化壓力

MPP⁺注射三天後，將兩側的紋狀體及黑質區取出，測量全部巯胺基硫總量（包括還原態巯胺基硫 GSH 及氧化態巯胺基硫 GSSG）和 GSSG 含量，結果顯示在圖三、四、五、六的 A 圖，我們發現與對照側紋狀體的 GSH 含量相比較，MPP⁺非常顯著降低注射側紋狀體內 GSH 的含量，同時，顯示在各圖的 B 圖中 GSSG/GSH 比值，發現 MPP⁺明顯增高紋狀體的 GSSG/GSH 比值，相反地，相較於紋狀體的變化，對黑質區 GSH 系統的影響則不顯著（圖三、四、五、六的 C 和 D 圖）。此結果與我們以前的結果相符合，證實 MPP⁺直接損毀紋狀體 GSH 抗氧化防禦系統並且誘發氧化壓力（GSSG/GSH 比值上升），但 MPP⁺對黑質區 GSH 含量及 GSSG/GSH 比值的影響不明顯，與我們之前的結果不符，可能是實驗者取到較大範圍的黑質區，因而將變化被稀釋所造成。

茯苓、桑白皮、枸杞和 tetrandrine 抑制 MPP⁺所誘發的氧化壓力

從圖三（茯苓治療組）、圖四（桑白皮治療組）、圖五（tetrandrine 治療組）、圖六（枸杞治療組）得知，除了 1 g/kg 枸杞處理組較不顯著以外，50 mg/kg 茯苓和 1 g/kg 桑白皮的酒精初抽物及 tetrandrine 皆顯著降低 MPP⁺在紋狀體所造成的 GSSG/GSH 比值上升，其中桑白皮更明顯抑制不論是對照側或 MPP⁺注射側的 GSSG/GSH 比值，另外，茯苓和 tetrandrine 還具有減緩 GSH 含量下降的作用。這些結果與型態結果相呼應，證實本實驗所選取的中藥材的確因具有抗氧化壓力的作用，進而達到保護神經細胞免於 MPP⁺的毒殺攻擊，以此在治療神經退化性疾病佔有一席之地。

MPP⁺並未誘發脂質過氧化作用和影響 glutathione peroxidase 的活性

從我們的結果（圖七）發現，MPP⁺不會影響 glutathione peroxidase 的活性，此結果與 Hung & Lee 等人 1998 年的結果想吻合。但是許多文獻皆指出：MPP⁺顯著增加脂質過氧化作用，我們的結果卻偵測不到脂質過氧化作用在 MPP⁺處理三天後明顯的增高，探究其原因可能是 MPP⁺處理的方式、時間、劑量及動物品系的不同或所購買的偵測 kits 敏感度不高所造成，因為必須再進一步釐清 MPP⁺對脂質過氧化作用的影響，所以未將結

果報告。尤其在期末口頭報告時，陳榮基教授特別指出應以小鼠為動物模式較為適當，因此期盼下次計畫能修改這些問題後，將正面結果呈現。

肆、討論

本實驗利用 MPP⁺誘發氧化壓力及選擇性破壞黑質區紋狀體的多巴胺神經系統為巴金森氏症動物模式，我們率先提出證據證實：抗老化中藥材如茯苓、桑白皮和粉防己 (tetrandrine) 都具有抗氧化作用和保護神經細胞的功能，藉此在 MPP⁺誘發巴金森氏症的模式中達到明顯的治療效果。

中藥大辭典中指出：茯苓(*Poria cocos*)最常被用來當作抗利尿劑和鎮靜劑，近年來研究更發現茯苓具有抗老化及抗腫瘤的功效(Kaminaga et al., 1996; Chen & Li, 1993)，但其抗老化的機轉尚不清楚，因為許多文獻都支持大量自由基的堆積是導致老化的重要因素之一，所以物質的抗氧化能力是其是否具有抗老化功能的重要依據，本實驗結果首先證實茯苓具有很顯著的抗氧化作用，茯苓非常顯著地抑制 MPP⁺所誘發的氧化壓力，同時，組織形態的觀察結果也佐證，茯苓具有保護神經細胞的效果，所以明顯改善 MPP⁺所造成的紋狀體神經細胞的凋亡。另一方面在多巴胺神經細胞本體所在處的黑質區，雖然 MPP⁺和茯苓對 GSH 含量及 GSSG/GSH 比值無明顯影響，但從形態上免疫化學染色結果指出，MPP⁺會由紋狀體回溯至黑質區，造成同側黑質區多巴胺神經細胞大量流失，而服用茯苓顯著減少多巴胺神經細胞的流失，並使多巴胺神經細胞數目恢復至與對照側正常黑質區的相接近，另外我們也觀察到注射茯苓後，有明顯的利尿作用及體重下降的現象，證實我們所萃取的茯苓與文獻所記載茯苓的藥效一致，因為截至目前為止並無文獻探討茯苓的抗氧化能力及抗神經退化性疾病的療效，所以我們的結果支持茯苓抗老化的作用機轉之一是其具有抗氧化能力。

從我們的實驗結果指出：桑白皮是四種抗老化藥材中抗氧化能力最強的藥材，桑白皮不僅完全抑制 MPP⁺在紋狀體所誘發的氧化壓力，更顯著降低 MPP⁺注射側黑質區的 GSSG/GSH 比值上升，甚至將其降至比對照側正常黑質區的低，這結果與其他文獻指出桑白皮具有清除自由基的能力互相一致，Ko 等人於 1997 年提出，桑白皮的主要成份之一 betulinic acid (triterpenoid)能有效抑制亞鐵離子所誘發腦組織的脂質過氧化作用，而桑

白皮的另一主要成份 flavonoid 也被證實是一很強的自由基和鐵的清除劑 (Kostyuk & Potapovich, 1998; Noda et al., 1997) , 並且能藉著增加 GSH 含量, 來抑制脂質過氧化作用的增加(Soto et al., 1998) 。本實驗以生化分析加上形態觀察更直接證實桑白皮藉其抗氧化能力有效減緩 MPP⁺所導致的神經細胞凋亡及多巴胺神經細胞流失, 進一步指出桑白皮能有效的治療一些自由基堆積所引起的神經退化性疾病如巴金森氏症。

另外, 粉防己的主要成份 tetrandrine 也被一些學者指出, 除了具有直接清除自由基的能力(Cao, 1996), 也藉由其為鈣離子通道拮抗劑的角色, 有效阻斷興奮性能毒性所誘發的神經細胞死亡(Chen et al., 1996) 。另一方面, 也有文獻指出: 防己的另一成份 Stepholidine 具有類似 D₁ 接受器的角色(Zhang et al., 1998) , 能活化黑質區紋狀體多巴胺神經路徑使活動正常進行 (Starr, 1995), 但防己是否能藉由清除自由基的作用達到治療巴金森氏症的療效則不清楚, 本實驗結果證實 tetrandrine 與茯苓相似, 很有效的抑制 MPP⁺引起的氧化壓力及神經細胞的凋亡和流失, 再一次證明具有抗氧化作用的抗老化中藥材則具有治療神經退化性疾病的療效。

最後我們發現在本實驗模式下, 枸杞子對避免 MPP⁺增高 GSSG/GSH 比值的能力較不顯著, 與其他文獻指出: 枸杞子的主要成份 Betaine, 能透過增強 GSH 抗氧化系統, 達到減緩因氣仿所造成的肝臟毒性(Kim et al., 1998)並且保護 DNA 免除受到 alternariol 的破壞(Xu et al., 1996)的結果並不一致, 針對此結果我們認為枸杞是屬於作用較緩慢溫和的藥材, 本實驗中枸杞只處理三天, 以致於沒有看到較明顯的枸杞抗氧化作用。

伍、結論與建議

本計畫實驗結論是：單方的抗老化藥材茯苓、桑白皮和粉防己（tetrandrine）透過其抗氧化壓力的作用，達到保護多巴胺神經細胞免於MPP⁺的氧化壓力毒殺，因為MPP⁺被指出只專一性破壞黑質區投射至紋狀體的多巴胺神經系統，所以實驗結果顯示這些中藥材在預防和治療巴金森氏症的可行性。另外若將這些中藥材的療效與我們之前對西方抗老化藥材褪黑激素的治療效果的研究相比照，我們發現單獨比較並無差異，但不排除將這些中藥材合併服用後治療效果比褪黑激素好的可能性，因為我們沿用的藥方皆為複方藥劑，其中最重要的概念是藥方中的藥效有互相加成的效果，這也是張主任委員給我們的寶貴意見應該考慮使用複方藥劑，若有機會我們將再以此MPP⁺誘發巴金森氏症動物模式篩選出有效的傳統藥方。

本實驗利用已建立的MPP⁺模擬巴金森氏症的大白鼠動物模式，其主要的優點為 1.在同一隻老鼠同時有受損非常嚴重的區域紋狀體及遠端受損較輕微的黑質區，2.因為只有單側被MPP⁺破壞，所以另一側則為正常對照側，可避免個體差異，3.可同時評估藥物對不同損毀程度的腦組織的治療效果，4.在生化分析時腦組織的重量充足，不需累加幾隻動物才能測量。缺點是不易觀察到巴金森氏症的典型運動障礙—抖動(tremor)及肌肉僵直等症狀。所以往後我們將改用小鼠（文獻指出小鼠較大鼠容易被MPP⁺誘發顫抖及肌肉僵直等運動不協調現象）進行實驗，以利於可直接評估這些中藥材對巴金森氏症的運動行為異常的療效。

陸、參考文獻

- Adams JD, Klaidman JLK, Leung AC: MPP⁺ and MPDP⁺ induced oxygen radical formation with mitochondrial enzymes. *Free Radic Biol Med* 1993;15:181-186.
- Anderson ME: Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Method in Enzymol* 1985;113:548-555.
- Bains JS, Shaw CA: Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res Rev* 1997;25:335-58.
- Beckman KB, Ames BN: The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998;78:547-581.
- Cao ZF: Scavenging effect of tetrandrine of active oxygen radicals. *Planta Medica* 1996;62:413-4.
- Chen JT, Zhang JT, Qu ZW: Protective effect of tetrandrine on neuronal injury in cultured cortical neurons of rats. *Yao Hsueh Hsueh Pao- Acta Pharmaceutica Sinica* 1996;31:161-5.
- Chen K, Li C: Recent advances in studies on traditional Chinese anti-aging materia medica. *J Traditional Chinese Medicine* 1993;13:223-6.
- Chen ST, Chuang JI: The antioxidant melatonin reduces cortical neuronal death after intrastriatal injection of kainate in the rat. *Exp Brain Res* 1999;124:241-247.
- Chen ST, Garey LJ, Jen LS: Bcl-2 proto-oncogene protein immunoreactivity in normally developing and axotomised rat retinas. *Neurosci Lett* 1994;172:11-14.
- Desole MS, Esposito G, Fresu L, Migheli R, Enrico P, Miele M, De Natale G, Meile E: Correlation between 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) levels, ascorbic acid oxidation and glutathione levels in the striatal synaptosomes of the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrapyrindinium (MPTP)-treated rat. *Neurosci Lett* 1993;161:121-123.
- Fallon J, Matthews X, Hyman BT, Beal MF. MPP⁺ produces progressive neuronal degeneration which is mediated by oxidative stress. *Exp Neurol* 1997;144:193-198.
- Fejes S, Kery A, Blazovics A, Lugasi A, Lemberkovics E, Petri G, Szoke E: Investigation of the in vitro antioxidant effect of *Petroselinum crispum*. *Acta Pharmaceutica Hungarica* 1998;68:150-6.

- Floreani, M, Skaper SD, Facci L, Lipartiti M, Giusti P: Melatonin maintains glutathione homeostasis in kainic acid-exposed rat brain tissues. *FASEB J* 1997;11:1309-1315.
- Guo, N, McIntosh C, Shaw C: Glutathione: new candidate neuropeptide in the central nervous system. *Neuroscience* 1992;51:835-842.
- Hung H.C., Lee E.H.Y. MPTP produces differential oxidative stress and antioxidative responses in the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways. *Free Rad. Biol. Med.* 1998; 24:76-84.
- Jaskot, R.H., E.G. Charlet, E.C. Grose, M.A. Grady and J.H. Roycroft: An automated analysis of glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, and reductase activity in animal tissue. *J Anal Toxicol* 1983 ;7:86-88.
- Kaminaga T, Yasukawa K, Kanno H, Tai T, Nunoura Y, Takido M: Inhibitory effects of lanostane-type triterpene acids, the components of *Poria cocos*, on tumor promotion by 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology* 1996;53:382-5.
- Kim SK, Kim YC, Kim YC: Effects of singly administered betaine on hepatotoxicity of chloroform in mice. *Food & Chemical Toxicology* 1998;36:655-61.
- Ko HH, Yu SM, Ko FN, Teng CM, Lin CN: Bioactive constituents of *Morus australis* and *Broussonetia papyrifera*. *J Natural Products* 1997;60:1008-11.
- Koller WC: Neuroprotective therapy for Parkinson's disease. *Exp Neurol* 1997;144:24-28.
- Kotler M, Rodriguez C, Sainz RM, Antolin I, Menendez-Pelaez A: Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J Pineal Res* 1998;24:83-89.
- Kostyuk AV, Potapovich AI: Antiradical and chelating effects in flavonoid protection against silica-induced cell injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1998;355:43-8.
- Meister A: Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. *Pharmac Ther* 1991;51:155-194.
- Noda Y, Anzai K, Mori A, Kohno M, Shinmei M, Packer L: Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JES-FR30 ESR spectrometer system. *Biochemistry & Molecular Biology International* 1997;42:35-44.
- Oishi, T., E. Hasegawa and Y. Murai: Sulfhydryl drugs reduce neurotoxicity

- of 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mouse. *J Neural Transm* 1993;6:45-52.
- Paxinos G, Watson C: The rat brain in stereotaxic coordinates. *New York: Academic Press* 1982.
- Pearce RKB, Owen A, Daniel S, Jenner P, Marsden CD: Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 1997;104:661-677.
- Perez-Campo R, Lopez-Torres M, Cadenas S, Rojas C, Barja G: The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J Comparative Physiol - B, Biochem Systemic, & Environ Physiol* 1998;168:149-58.
- Poirier J, Thiffault C: Are free radicals involved in the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease? *Eur Neurol* 1993;33(suppl 1):38-43.
- Reiter RJ, Pablos MI, Agapito TT, Guerrero JM: Melatonin in the context of the free radical theory of aging. *The Annals of the New York Academy of Sciences* 1996;786:362-378.
- Robert AM, Schaefferbeke M, Schaefferbeke J, Robert L: Aging and brain circulation. Role of the extracellular matrix of brain microvessels. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales* 1997;191:253-60.
- Soto CP, Perez BL, Favari LP, Reyes JL: Prevention of alloxan-induced diabetes mellitus in the rat by silymarin. *Comparative Biochemistry & Physiology. Part C Pharmacology, Toxicology, Endocrinology* 1998;119:125-9.
- Sriram K, Pai KS, Boyd MR, Ravindranath V: Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies in mice. *Brain Res* 1997;749:44-52.
- Starr MS. Glutamate/dopamine D₁/D₂ balance in the basal ganglia and its relevance to Parkinson's disease. *Synapse* 1995;19:264-293.
- Uhl GR: Hypothesis: the role of dopaminergic transporters in selective vulnerability of cells in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1998;43:555-560.
- Wullner U, Loschmann PA, Schulz JB, Schmid A, Dringen R, Eblen F, Turski L, Klockgether T: Glutathione depletion potentiates MPTP and MPP+ toxicity in nigral dopaminergic neurones. *Neuroreport* 1996;7:921-3.
- Xu DS, Kong TQ, Ma JQ: The inhibitory effect of extracts from *Fucus lycii* and *Rhizoma poligonati* on in vitro DNA breakage by alternariol.

Biomedical & Environmental Science 1996;9:67-70.

Zhang XX, Zhu ZT, Jin GZ: Comparison of (-)-stepholidine and D1 or D2 agonists on unit firing of globus pallidus in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Life Sci* 1998;63:537-544.

柒、圖

圖（一）茯苓、桑白皮、枸杞和 tetrandrine 對 MPP⁺ 所造成注射區紋狀體神經細胞凋亡的影響

圖（二）茯苓、桑白皮、枸杞和 tetrandrine 對 MPP⁺ 所造成黑質區多巴胺神經細胞數目減少的影響

圖（三）茯苓對 MPP⁺ 所引起 GSH 含量和 GSSG/GSH 比值變化的影響

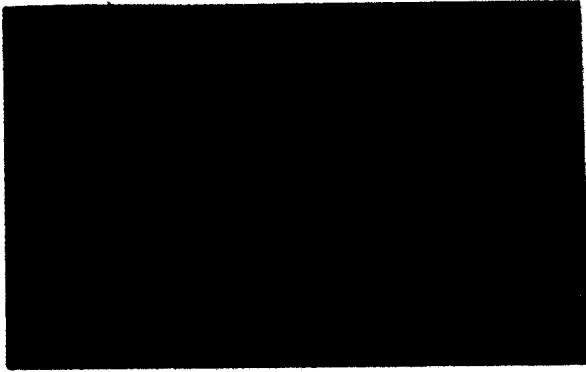
圖（四）桑白皮對 MPP⁺ 所引起 GSH 含量和 GSSG/GSH 比值變化的影響

圖（五）tetrandrine 對 MPP⁺ 所引起 GSH 含量和 GSSG/GSH 比值變化的影響

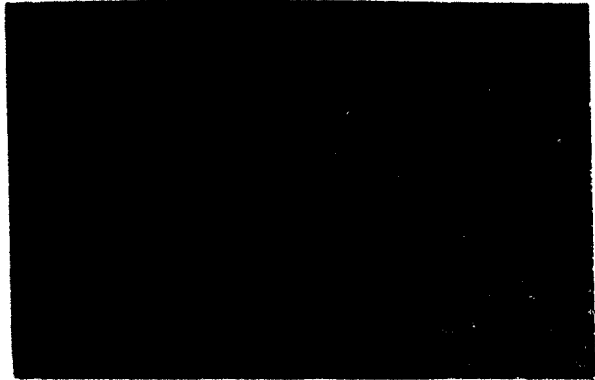
圖（六）枸杞對 MPP⁺ 所引起 GSH 含量和 GSSG/GSH 比值變化的影響

圖（七）MPP⁺ 對 glutathione peroxidase 活性的影響

Contralateral



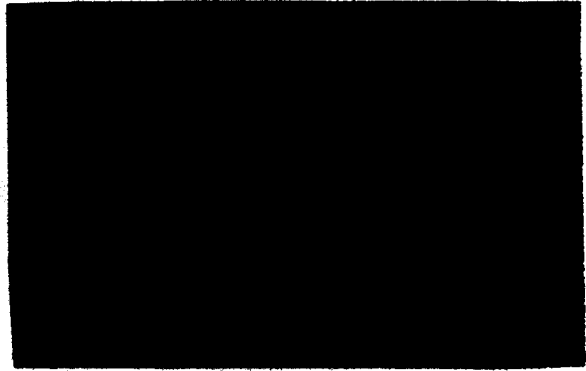
MPP⁺



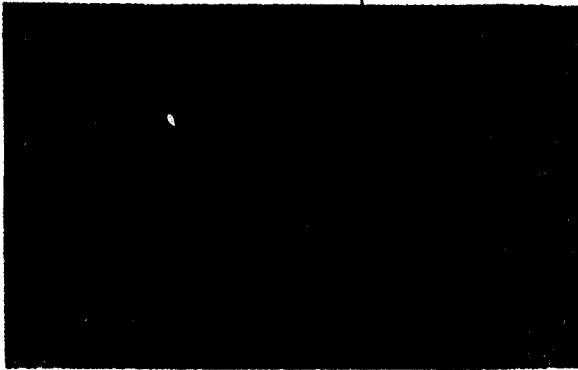
MPP⁺+茯苓



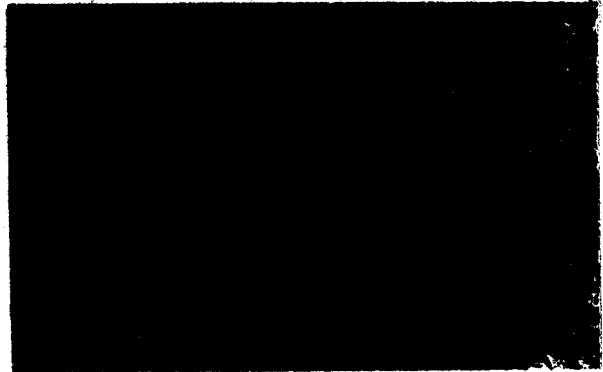
MPP⁺+桑白皮



MPP⁺+Tetrandrine



MPP⁺+枸杞



圖(一): 茯苓、桑白皮、枸杞和tetrandrine對MPP⁺所造成注射區紋狀體神經細胞凋亡的影響。

單側MPP⁺注射至紋狀體，三天後，與對照側(contralateral)比較MPP⁺注射側的紋狀體。TUNEL-positive神經細胞(箭頭所指處)顯著增加，茯苓或桑白皮或tetrandrine處理顯著降低凋亡的細胞(染上TUNEL的)數目，而枸杞處理的抑制效果則不明顯。

Contralateral



MPP⁺



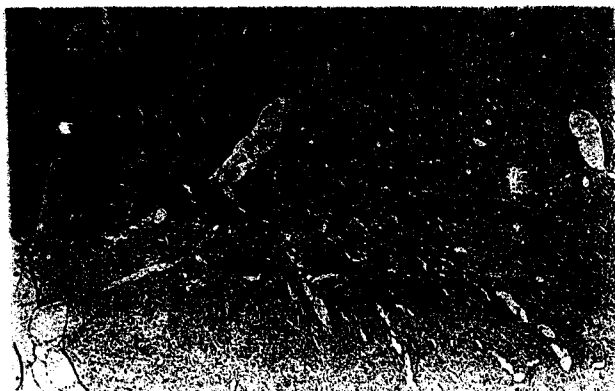
MPP⁺+茯苓



MPP⁺+桑白皮



MPP⁺+Tetrandrine



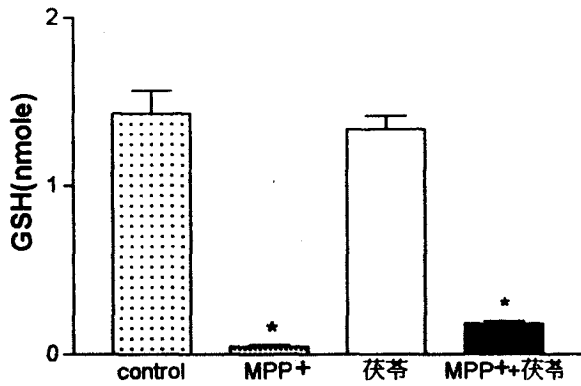
MPP⁺+枸杞



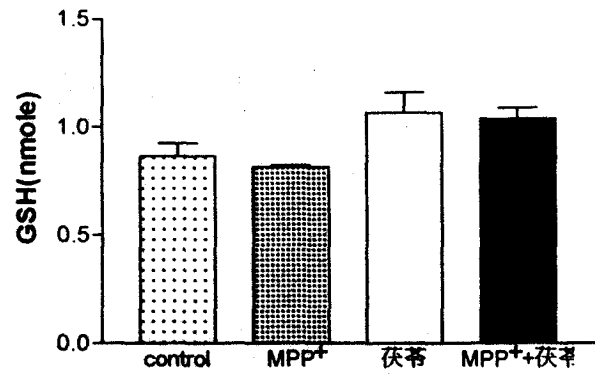
圖(二): 茯苓、桑白皮、枸杞和 tetrandrine 對 MPP⁺ 所造成黑質區多巴胺神經細胞數目減少的影響。

單側 MPP⁺ 注射至紋狀體，三天後，與對照側 (contralateral) 黑質區比較，MPP⁺ 注射同側的黑質區多巴胺神經細胞 (TH-positive, 箭頭所指) 數目顯著減少，而茯苓或桑白皮或 tetrandrine 處理後皆顯著減緩 MPP⁺ 所造成的多巴胺神經細胞流失現象。

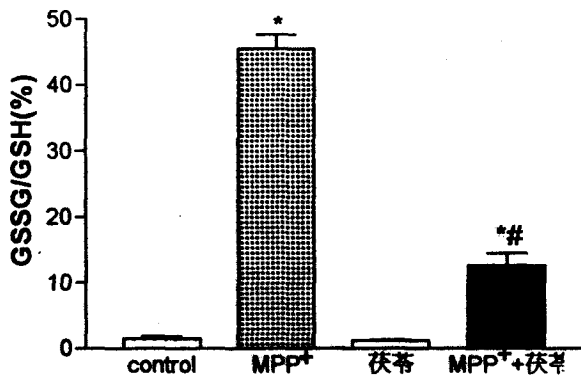
茯苓50 mg/kg (n=4)



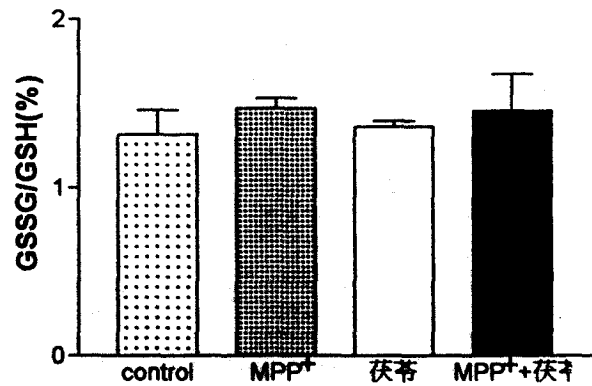
A. striatum



C. substantia nigra



B. striatum

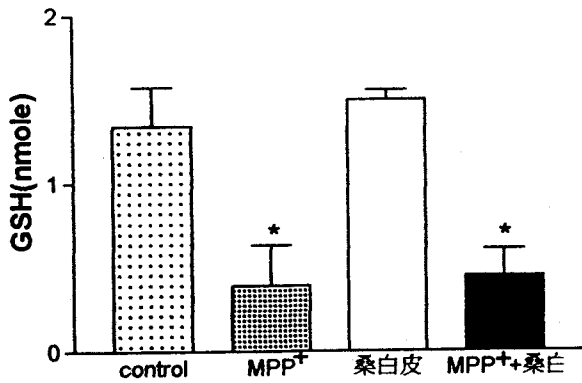


D. substantia nigra

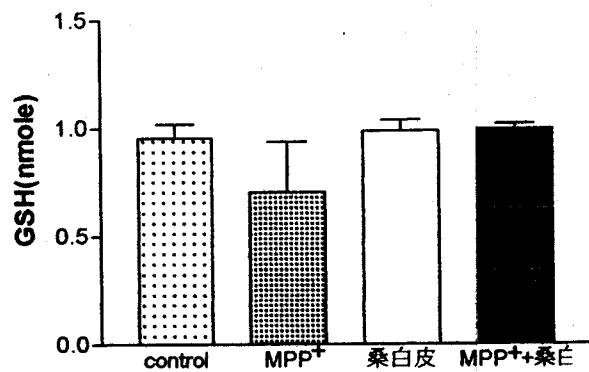
圖(三):茯苓對 MPP⁺所造成 GSH 含量及 GSSG/GSH 比值變化的影響。100nmole/ μ l 的 MPP⁺直接注射至單側紋狀體,三天後分別將兩側的紋狀體及黑質區取出,測量 GSH 及 GSSG 含量的結果。A 及 B 分別顯示紋狀體 GSH 含量及 GSSG/GSH 比值,C 及 D 分別顯示黑質區的 GSH 含量及 GSSG/GSG 比值。

* $p < 0.05$, 與對側腦組織比較, # $p < 0.05$, 與 MPP⁺注射側腦組織比較。
(以 ANOVA 及 Scheffe F-test 鑑定)

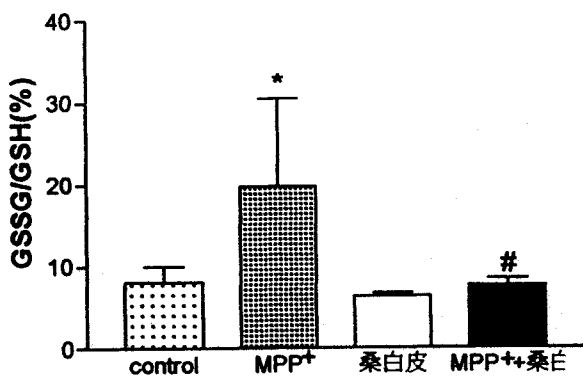
桑白皮 1g/1kg (n=6)



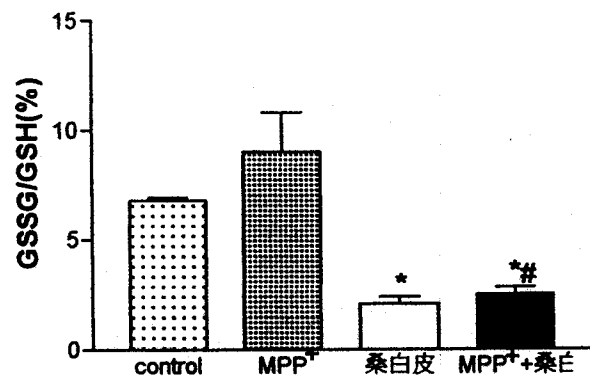
A. striatum



C. substantia nigra



B. striatum



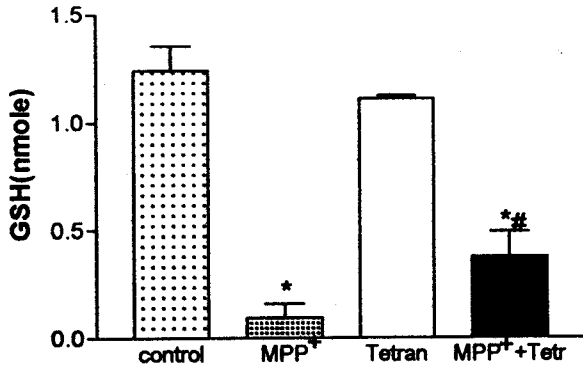
D. substantia nigra

圖(四): 桑白皮對 MPP⁺所造成 GSH 含量及 GSSG/GSH 比值變化的影響。

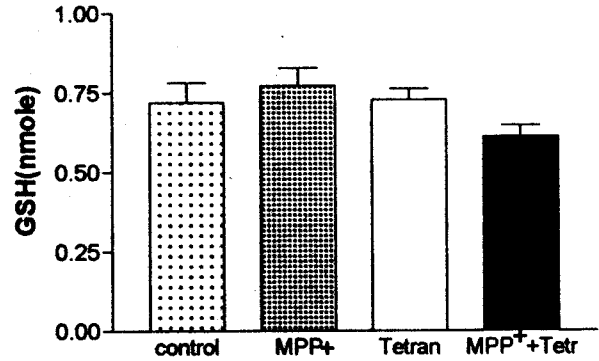
100nmole/ μ l 的 MPP⁺直接注射至單側紋狀體,三天後分別將兩側的紋狀體及黑質區取出,測量 GSH 及 GSSG 含量的結果,A 及 B 分別顯示紋狀體 GSH 含量及 GSSG/GSH 比值,C 及 D 分別顯示黑質區的 GSH 含量及 GSSG/GSG 比值。

* $p < 0.05$, 與對側腦組織比較, # $p < 0.05$, 與 MPP⁺注射側腦組織比較。
(以 ANOVA 及 Scheffe F-test 鑑定)

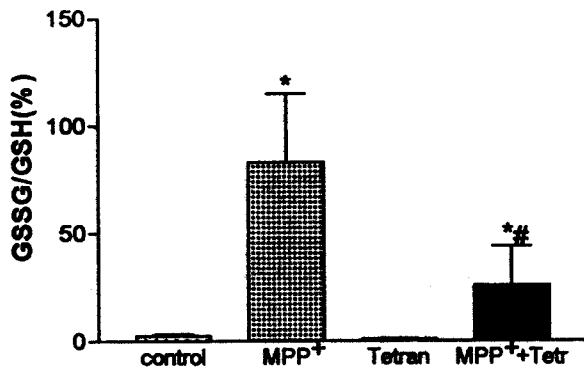
Tetrandrine 20mg/kg (n=6)



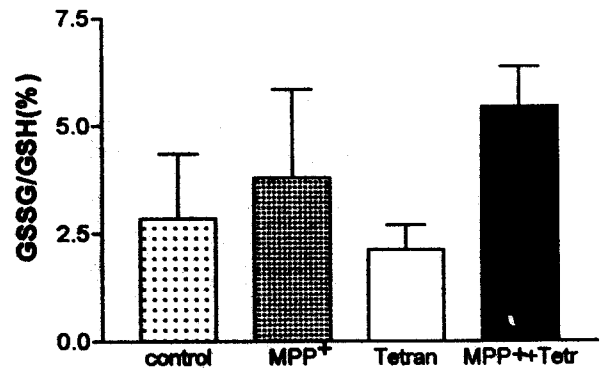
A. striatum



C. substantia nigra



B. striatum

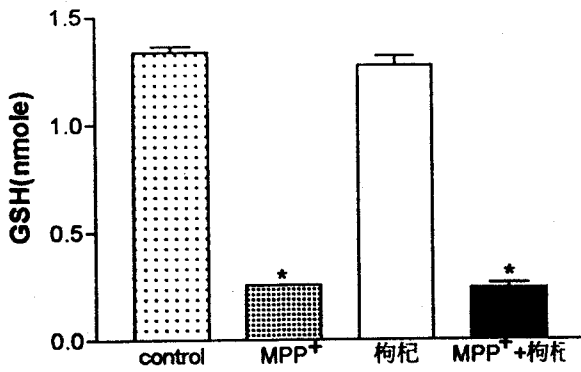


D. substantia nigra

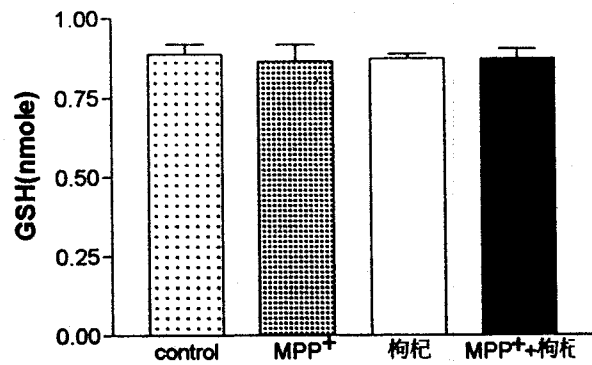
圖(五):粉防己的主要成分 Tetrandrine 對 MPP⁺所造成 GSH 含量及 GSSG/GSH 比值變化的影響。100nmole/ μ l 的 MPP⁺直接注射至單側紋狀體,三天後分別將兩側的紋狀體及黑質區取出,測量 GSH 及 GSSG 含量的結果,A 及 B 分別顯示紋狀體 GSH 含量及 GSSG/GSH 比值,C 及 D 分別顯示黑質區的 GSH 含量及 GSSG/GSH 比值。

* $p < 0.05$, 與對側腦組織比較, # $p < 0.05$, 與 MPP⁺注射側腦組織比較。
(以 ANOVA 及 Scheffe F-test 鑑定)

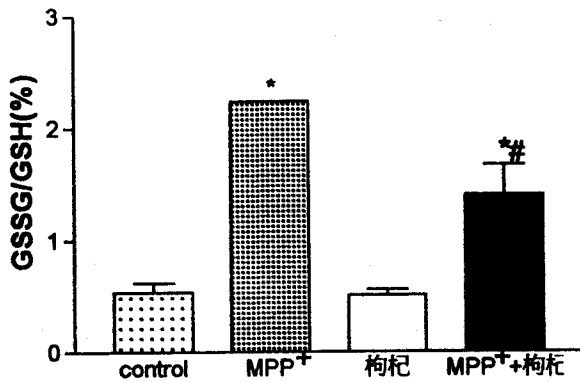
枸杞 1g/kg (n=7)



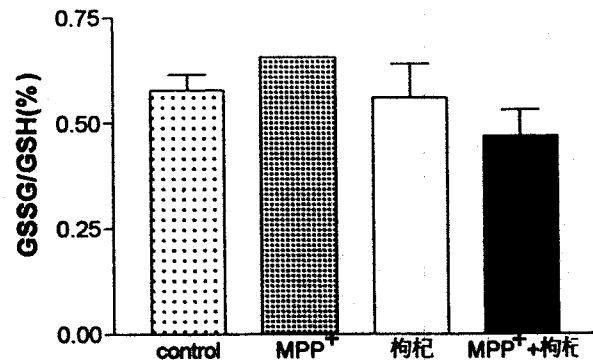
A. striatum



C. substantia nigra

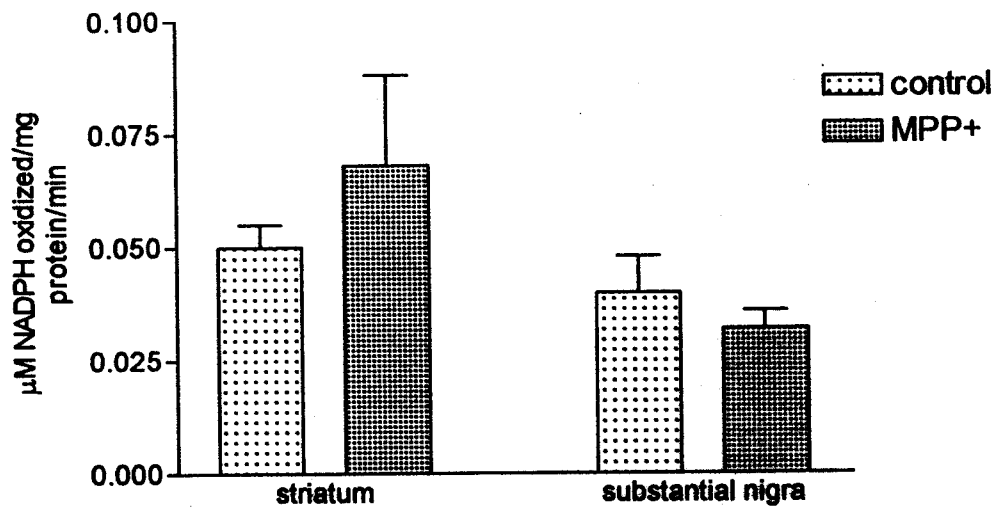


B. striatum



D. substantia nigra

圖(六):枸杞對 MPP⁺所造成 GSH 含量及 GSSG/GSH 比值變化的影響。100nmole/ μ l 的 MPP⁺直接注射至單側紋狀體,三天後分別將兩側的紋狀體及黑質區取出,測量 GSH 及 GSSG 含量的結果。A 及 B 分別顯示紋狀體 GSH 含量及 GSSG/GSH 比值,C 及 D 分別顯示黑質區的 GSH 含量及 GSSG/GSG 比值。
* $p < 0.05$, 與對側腦組織比較, # $p < 0.05$, 與 MPP⁺注射側腦組織比較。
(以 ANOVA 及 Scheffe F-test 鑑定)



圖(七):MPP⁺對麩胺基硫過氧化酶 (glutathione peroxidase) 的活性影響。100nmole/ μl 的 MPP⁺直接注射至單側紋狀體,三天後分別將兩側的紋狀體及黑質區取出,測量 glutathione peroxidase 活性的結果。結果顯示 MPP⁺不會影響 glutathione peroxidase 之活性。