

謝誌

在碩班這三年的時間，從研究果蠅到培養細胞，讓我學習許多的事情，也有了不同經驗。在求學期間，被迫成長的辛苦，我要感謝那些曾幫助我的人。首先，要特別感謝我的指導教授詹銘煥老師和師母陳慧誠老師，由於我是非本科系的背景，但多虧老師耐心的教導我，甚至在過年期間還抽空指導我實驗上的技術，以至於我能於實驗上有所成果。另外，非常感謝詹東榮老師和趙知章老師於口試期間適時提供寶貴之意見，使得我能順利完成此論文。

此外，在研究果蠅的時間，感謝王培育老師、政文學長、祐陞(柚子)學長、慧茹(橘子)學姊、俊伊學姐、籃球一哥乃軒、郁潔(小潔)、筱玉(小玉)和映安。不管是課業實驗上的指導幫忙或是籃球休閒活動上的參與，都有一起努力過的回憶。也感謝趙知章老師提供資源讓我學習西方墨點法和教我的鉉豐、之懿、潮永和禎廷。還有魏爸總是會分享社會經驗讓我面對問題時能有更多的方向，其他實驗室的學長姐及同學也提供我實驗上的協助。當然也少不了貫穿所上的靈魂人物于姐，感謝于姐總是不辭辛勞地幫我們學生處理事務兼心理輔導，讓我們可以更專注於實驗上。

在國衛院這段時間，感謝詹老師和師母陳老師提供資源讓我完成論文，願意對我犯的錯誤寬容和教導。謝謝雅貞學姐、瑞霽學姐、明輝學長、Mallik、偉唐學長和靖則對於我實驗上的建議幫忙及英文對話的機會，寶誼學姐帶我做動物行為實驗，映伶學姐對我在廖老師 rotation 時的指導，還有曾經借過實驗器材的謝奉勳老師、何英剛老師、陳嘉祥老師和陶寶綠老師實驗室學長姐們。

最後，要感謝家人之前，也謝謝老師對於我論文的修改，使得這篇論文更臻完善。我要將這個小小成果獻給我最親愛父母家人，有了你們的支持和鼓勵，讓我可以完成碩士學業。在此，我由衷的感謝幫助過我的人，因為有了您們，這篇論文才能產生也才有意義。

中文摘要

微小膠質細胞在神經退化性疾病中所扮演的角色與機制，在目前許多研究中發現與氧化壓力和發炎反應有關。和厚朴酚 (honokiol) [2-(4-hydroxy-3-prop-2-enylphenyl)-4-prop-2-enylphenol] 又稱異厚朴酚，為木蘭科植物厚朴 (*Magnolia officinalis*) 的主要活性成份之一，結構為具有雙丙烯基的多酚化合物 ($C_{18}H_{18}O_2$, MW=266.33)，且具有抗氧化和抗發炎的作用。ST-24 化合物為和厚朴酚的衍生物，用和厚朴酚分子結構為主體修飾而成的化合物，本研究針對和厚朴酚與 ST-24 化合物在細菌性脂多醣刺激微小膠質細胞活化反應中的抗氧化與抗發炎能力作探討。實驗以 3-(4,5-dimethyl-2 thiazoyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 分析細胞粒線體的還原能力，藉此判斷細胞的存活率。吉爾任試劑 (Griess reagent) 用來測量藥物對活化後的微小膠質細胞產生活性氮自由基 (reactive nitrogen species, RNS) Nitric oxide ($NO\cdot$) 的影響。MTT 與吉爾任試劑分析結果顯示，和厚朴酚與 ST-24 在低濃度不會造成細胞死亡且具有減緩細菌性脂多醣刺激微小膠質細胞過度活化所產生的活性氮自由基。本論文的目標除了比較和厚朴酚與 ST-24 化合物的抗氧化及抗發炎能力外，也探討減緩微小膠質過度活化可能的分子機制。透過觀察細胞型態和西方墨點法，發現給予和厚朴酚與 ST-24 藥物可以減少微小膠質細胞因為 LPS 刺激所產生的偽足、iNOS 及 COX-2 蛋白質表現。而給予和厚朴酚與 ST-24 藥物，則會回復 iNOS 上游分子 PI3K/Akt 蛋白質表現。實驗結果顯示和厚朴酚與 ST-24 可能透過 PI3k/Akt 這個分子機制去調控微小膠質細胞過度活化，但仍需進一步的實驗確認。

關鍵字:和厚朴酚、ST-24、微小膠質細胞、抗氧化和抗發炎。



Abstract

The role and mechanisms of microglia cell in neurodegenerative diseases might be related to oxidative stress and inflammatory responses. Honokiol is one of the main constituents from *Magnolia officinalis*. The structure of honokiol possesses a biphenolic structure with two allyl groups ($C_{18}H_{18}O_2$, MW=266.33) that has anti-oxidative and anti-inflammatory effects. In addition, the anti-oxidative and anti-inflammatory properties of honokiol and ST-24 compounds were explored as well as their inhibitory effect on over-activated microglial cells in this study. In the present study, the 3-(4,5-dimethyl-2 thiazoyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay was used to assess mitochondrial activity, reflecting cell survival. The Griess reagent was used to detect the effects of (reactive nitrogen species, RNS) Nitric oxide ($NO\cdot$) in activated microglial cells with honokiol and ST-24. The results show that honokiol and ST-24 did not induce cell death in lower concentrations. Both biphenolic compounds attenuated nitric oxide free radical productions in LPS-stimulated over-activated microglial cells. Besides compared honokiol and ST-24 capability of anti-oxidation and anti-inflammation, this study also explored the biological molecular mechanisms of attenuating over-activated microglial cells. By observation of cell morphology and Western blot, we found that honokiol and ST-24 can reduce pseudopodia, and increases in iNOS and COX-2 protein expression

induced by LPS in microglia .Honokiol and ST-24 could restore the upstream molecular PI3K/Akt protein expression. The results suggested that honokiol and ST-24 regulated excessive activation of microglia through PI3K/Akt pathway.

Key words: Honokiol; ST-24; Microglial cells; Anti-oxidantion; Anti-inflammation.



目錄

謝誌	I
中文摘要	II
ABSTRACT	IV
目錄	VI
表次	VIII
圖次	IX
縮寫對照表	XI
中英文名詞對照表	XII
第一章 緒論及文獻回顧	1
第一節、前言	1
第二節、自由基的簡介及發炎反應	4
第三節、微小膠質細胞的簡介	10
第四節、雙酚類化合物之簡介	14
第五節、實驗目的與假說	17
第二章 實驗材料與實驗方法	18
第一節、實驗材料	18
第二節、實驗方法	20
第三節、實驗數據分析	24
第三章 實驗設計	25
目標(一) 建立內毒素(脂多醣)對微小膠質細胞活化之模式	25
目標(二) 評估內毒素(脂多醣)與藥物所引起微小膠質細胞過度活化及細胞凋亡	26
目標(三) 評估雙酚類化合物對內毒素引起微小膠質細胞型態改變之影響	27
目標(四) 評估觀察同時給予內毒素(脂多醣)和不同藥物後對內毒素(脂多醣)所引起微小膠質細胞過度活化之作用	27
目標(五) 確認 HONOKIOL 及 ST-24 號化合物是否是透過 PI3K/AKT 路徑改善內毒素(脂多醣)所引起微小膠質細胞過度活化之分子機制	28
第四章 實驗結果	29
一、內毒素(脂多醣)對微小膠質細胞存活之影響	29

二、雙酚類化合物對內毒素引起微小膠質細胞活化及細胞死亡之影響	32
三、雙酚類化合物對內毒素引起微小膠質細胞型態改變之影響	35
四、雙酚類化合物對內毒素引起微小膠質細胞發炎反應之影響	45
五、雙酚類化合物抑制內毒素引起微小膠質細胞活化反應之分子機制	48
第五章 討論	51
第六章 結論	56
第七章 參考文獻	57
1. 期刊論文	57
2. 書籍論文	67
3. 網路資源	67
附錄	XIII



表次

表 一、木蘭科植物依其不同分布地點的主要組成成分。..... 15



圖次

圖 一、THE EFFECTS OF LPS ON CELL VIABILITY OF MICROGLIAL CELLS CULTURED IN DIFFERENT CELL NUMBERS.	30
圖 二、THE EFFECTS OF LPS ON NO PRODUCTION IN DIFFERENT CELL NUMBERS OF MICROGLIAL CELLS.	31
圖 三、THE EFFECTS OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF BIPHENOLIC COMPOUNDS ON CELL VIABILITY OF MICROGLIAL CELLS STIMULATED BY LPS.	33
圖 四、THE EFFECTS OF BIPHENOLIC COMPOUNDS ON NO PRODUCTION OF MICROGLIAL CELLS STIMULATED BY LPS.	34
圖 五、THE EFFECTS OF BIPHENOLIC COMPOUNDS ON THE MORPHOLOGY OF MICROGLIAL CELLS STIMULATED BY LPS FOR 24 HOURS.	36
圖 六、THE EFFECTS OF BIPHENOLIC COMPOUNDS ON THE MORPHOLOGY OF MICROGLIAL CELLS STIMULATED BY LPS FOR 1 HOUR.	38
圖 七、THE EFFECTS OF BIPHENOLIC COMPOUNDS ON THE MORPHOLOGY OF MICROGLIAL CELLS STIMULATED BY LPS FOR 6 HOURS.	40
圖 八、THE EFFECTS OF BIPHENOLIC COMPOUNDS ON THE MORPHOLOGY OF MICROGLIAL CELLS STIMULATED BY LPS FOR 12 HOURS.	42
圖 九、THE EFFECTS OF BIPHENOLIC COMPOUNDS ON THE MORPHOLOGY OF MICROGLIAL CELLS STIMULATED BY LPS FOR 24 HOURS.	44

圖 十、THE EFFECTS OF BIPHENOLIC COMPOUNDS ON NO GENERATION FROM MICROGLIAL CELLS STIMULATED BY LPS. 45

圖 十一、THE EFFECTS OF BIPHENOLIC COMPOUNDS ON LPS-STIMULATED iNOS AND COX-2 PROTEIN EXPRESSION IN MICROGLIAL CELLS. 48

圖 十二、EFFECT OF BIPHENOLIC COMPOUNDS ON PI3K PROTEIN EXPRESSION IN LPS-STIMULATED MICROGLIAL CELLS. 50



縮寫對照表

LPS	Lipopolysaccharide
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen
iNOS	inducible nitric oxide synthase
COX	cyclooxygenase
PRRs	pattern recognition receptors
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
IL-1	interleukin-1
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
DAMPs	damage- or danger-associated molecular patterns
PBS	phosphate buffer saline
ROS	reactive oxygen species
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

中英文名詞對照表

英文全名	中文全名
Lipopolysaccharide	細菌性脂多醣
inducible nitric oxide synthase	誘導型一氧化氮合成酶
proinflammatory cytokines	促炎細胞因子
glutathione- <i>S</i> -transferase	穀胱甘肽- <i>S</i> -轉移酶
familial amyotrophic lateral sclerosis	家族性肌萎縮性脊髓側索硬化症
peripheral myeloid progenitor cells	周邊骨髓先驅細胞
type I integral membrane glycoproteins	整合膜醣蛋白 I 型
Dimethyl sulfoxide	二甲基亞砜
pattern recognition receptors	模式識別受體
pathogen-associated molecular patterns	病原體相關分子模式
reactive oxygen species	活性氧

第一章 緒論及文獻回顧

第一節、前言

在已開發國家（含開發中），由於人均壽命的延長，神經退化性疾病的發病率與致死率有顯著的提升 (Hebert, Beckett et al. 2001)，其中以阿茲海默症 (Alzheimer's disease, AD) 與帕金森氏症 (Parkinson's disease, PD) 所佔的比例最多。現在已知兩者共同的發病機制為錯誤摺疊蛋白的聚集和沉積導致中樞神經系統漸進式的傷害，而且氧化壓力也參與其中 (Koppula, Kumar et al. 2012)。氧化壓力 (oxidative stress) 與自由基 (free radical) 的生成有關，自由基泛指具有高反應性未配對的價電子，這些包括超氧自由基 (O_2^-)，羥基自由基 ($OH\cdot$)，過氧化亞硝酸陰離子 ($ONOO^-$) 等 (Inoue, Sato et al. 2003)。自由基不斷通過各種途徑產生，包括酶催化反應和非酶反應 (Pelicano, Carney et al. 2004)，當人體內生理防衛性之抗氧化系統無法對抗時，氧化所造成的傷害即會在體內累積。這種氧化與抗氧化的平衡系統失去平衡的情況，就稱為氧化壓力。自由基的產生對神經造成的直接影響是藉由活化幾種發炎的酶，例如：菸草醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸鹽 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen, NADPH) 氧化酶、誘導型一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 的表達、脂氧合酶 (lipoxygenase) 和環氧合酶 (cyclooxygenase, COX) (Koppula, Kumar et al. 2012)。

近來有許多文獻指出神經退化性疾病與微小膠質細胞活化所產生的自由基相關，有阿茲海默症 (McGeer, Rogers et al. 2006)、帕金森氏症 (Kim and Joh 2006) 等。微小膠質細胞是神經膠質細胞的一種，其細胞膜表面有模式識別受體 (pattern recognition

receptors , PRRs) , 用來鍵結病原體相關分子模式 (pathogen-associated molecular patterns , PAMPs) 來辨認不同病原 (pathogens) 的主要結構或成份 (Akira, Uematsu et al. 2006) , 因此是中樞神經系統重要的先天免疫細胞 , 也有人稱它為大腦巨噬細胞 (brain macrophage) 。微小膠質細胞膜上的 Toll-like receptors (TLRs) 是目前被廣泛研究的其中一種模式識別受體 , 用來了解病原體刺激微小膠質細胞發生發炎反應的相互關係。目前在哺乳動物中 , 發現 TLR 家族有 13 個成員可以辨認細菌、真菌、寄生蟲、病毒和宿主本身的病原體相關分子模式 (PAMPs) (Akira, Uematsu et al. 2006) , 而其中 TLRs 的 1-9 在微小膠質細胞膜上被發現 (Jack, Arbour et al. 2005) 。TLR 家族與微小膠質細胞活化和神經毒性相關 , 經由不同的配體活化 TLR2 , TLR4 和 TLR9 誘導微小膠質細胞產生 NO (Ebert, Gerber et al. 2005) 。微小膠質細胞適度的活化可以清除細胞碎片 (Harry, McPherson et al. 2004) 、執行免疫功能和釋放神經滋養和抗發炎因子促進神經存活 (Morgan, Taylor et al. 2004) 。另外在成熟的大腦中 , 微小膠質細胞可以引導幹細胞遷移 (migrate) 到發炎和受傷的位置進行修復 (Aarum, Sandberg et al. 2003) , 並可能參與神經新生 (neurogenesis) (Walton, Sutter et al. 2006) 。

但是有許多因素會造成微小膠質細胞過度的活化 , 例如環境中毒素的殺蟲劑魚藤酮 (rotenone) 、除草劑百草枯 (paraquat) 、損壞或死亡的神經元 , 進而產生大量的 NO 、細胞素 (cytokines) 、化學趨素 (chemokines) 等發炎因子造成神經死亡。所以研究天然或合成的藥物減緩微小膠質細胞過度的活化 , 或是抗氧化劑 , 將可治療神經退化性疾病。

在其他的研究指出植物多酚類是一種重要的抗氧化劑，其抗氧活性主要是由於它們的還原性，對於抑制細胞所產生的 H_2O_2 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 OH^- 及清除 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 等自由基有相當的顯著的實驗結果 (莊, 2009)。而其中的多酚類化合物有綠茶中的茶多酚 (tea polyphenol) 及蔬果中的花青素 (anthocyanosides) 已經被證實可以清除自由基並且商業化，所以多酚類化合物具有抗氧化藥物的潛力。和厚朴酚 (honokiol)，為木蘭科植物厚朴 (*Magnolia officinalis*) 的主要活性成份之一。且有文獻指出和厚朴酚有抗氧化和抗發炎的作用，分別是降低小鼠腦區因為栓塞所產生的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) (Chen, Liu et al. 2007)，和保護大鼠心臟因為心肌缺血再灌注所造成的損傷 (Wang, Zhang et al. 2013)。另外在小腦顆粒細胞 (cerebellar granule cell) 研究上，顯示和厚朴酚對於興奮性氨基酸、葡萄糖剝奪及過氧化氫所誘導的神經毒性造成神經細胞的損傷具有保護作用及功能 (Lin, Chen et al. 2006)。因此開發出與和厚朴酚具有相似或更好的抗氧化及抗發炎藥物，是具有治療神經退化性疾病的潛力。

第二節、自由基的簡介及發炎反應

一、自由基的定義

自由基狹義的解釋是指任何原子或分子具有一個或多個未成對的電子，就可以定義為自由基。廣義的解釋是本身雖然不是自由基，但當它進入生物體內後，會誘發生物體內部產生自由基的分子或原子。由於自由基外圍的電子軌域具有未成對的電子，所以非常不穩定。為了維持穩定性，自由基會與其他原子或分子鍵結形成電子對，成為一穩定的分子。而因為自由基鍵結而失去電子的分子則形成新的帶有不成對電子的自由基，進行下一個氧化反應。因此單一存在的自由基即可開啟一連串的電子轉移連鎖反應 (Barron 1954)，如果發生在動物體內卻沒有酵素或還原劑終止自由基連鎖反應，往往會造成蛋白質、碳水化合物、醣類、脂肪及核酸之損害。當過量之自由基產生並超過細胞的解毒能力時，便會引起細胞損傷或死亡，甚至造成生物體之老化與疾病 (Halliwell and Gutteridge 1990)。

二、自由基的種類

自由基目前被發現數十種以上之多，與人體相關的分為活性氧與活性氮 (reactive nitrogen species, RNS) 二大類 (Florence 1995)。

活性氧

1. 氧分子 (Molecular oxygen ; O_2)

根據自由基的定義，處於基態 (ground-state) 的氧分子有2對未成對電子 ($::O=O::$) 所以被分類在活性氧。氧分子在人體內被代謝的過程，會產生活性氧自由基，例如：超氧陰離子 ($O_2\cdot^-$)。

2. 羥基自由基 (Hydroxyl radical ; HO·)

破壞力最強的自由基，其產生來源是因為過氧化氫的代謝以及各式輻射線所產生，羥基自由基會攻擊細胞膜造成細胞的死亡也會攻擊我們所食用的不飽和脂肪酸，造成油脂的過氧化而劣變。

3. 超氧陰離子 (Superoxide anion ; O₂⁻·)

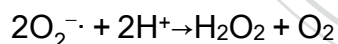
人體中最先產生、最多的一種自由基，亦會誘發其他種類的自由基的產生。

4. 單態氧分子 (Singlet oxide ; ¹O₂)

屬於非自由基型態，但因為活性比氧氣高，更容易破壞細胞，所以被歸類為活性氧。主要來源為眼睛中視網膜接受的光子 (photo) 與黃素 (flavin) 反應所產生。黃素為一種光感應器。

5. 過氧化氫 (Hydrogen peroxide ; H₂O₂)

屬於非自由基型態，但被歸類為活性氧。雖然本身屬於弱的氧化劑，但是比水更容易通過細胞膜進入細胞核或粒線體，與 NADPH 作用產生 HO· 而傷害細胞。其來源主要是由超氧陰離子代謝後產生，也有可能是由身體其他的吞噬細胞經氧化還原作用而產生。



6. 過氧化脂質 (Lipid peroxide ; LOOH)

自由基破壞脂質之後的產物，但此物質對於細胞是具有毒性的。因此，也可以當作是細胞氧化後受害的指標。

7. 烷氧自由基 (Alkoxy radical ; RO·)

8. 過氧自由基 (Peroxy radical ; ROO·)

9. 半醌自由基 (Semiquinone radical ; Q⁻·)

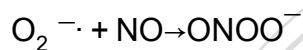
活性氮

1. 一氧化氮 (Nitric oxide ; NO)

一氧化氮與人體神經及免疫系統的運作有極重要的關係，但大量的一氧化氮則會引起免疫系統失調而致病。

2. 過氧化亞硝酸陰離子 (Peroxynitrite anion ; ONOO⁻)

由 NO 與 O₂^{-·} 反應所產生，過氧化亞硝酸陰離子會與脂質、DNA 和蛋白質產生氧化反應進而造成細胞損傷。



3. 過氧化亞硝酸 (Peroxynitrous acid ; ONOOH)

三、自由基 (RNS) 的簡介

上述的自由基皆會造成細胞損傷，其中與神經系統和免疫反應最為相關的是活性氮。一氧化氮 (NO) 存在於所有脊椎動物中，扮演調節血流量、血栓形成 (thrombosis) 和神經活性。生物體所產生的 NO 對宿主本身的非特異性防禦提供重要的功能，但 NO 本身無法殺死細胞內病原體和腫瘤。雖然 NO 被認為是具有高毒性與高活性的分子，但事實上並非一定如此。美國食品與藥物管理局批准吸入低濃度的氣態 NO 治療新生兒持續性的肺動脈高壓 (Ballard, Truog et al. 2006)。此外在人腦內神經元所製造的 NO 可以長達 80 年沒有明顯的毒性 (Pacher, Beckman et al. 2007)。但矛盾的是在腦缺血的狀態下，NO 卻可以在幾分鐘內破壞相同的神經元。近來研究發現 NO 與超氧陰離子 (O₂^{-·}) 形成更強大的氧化劑過氧化亞硝酸陰離子 (ONOO⁻)，是造成細胞損傷的另一個關鍵因素。

四、腦內一氧化氮的來源

在大腦中有許多 NO 合成酶，第一個被發現並純化的是 nNOS (neuronal NOS) 也稱為 NOS1 (Bredt, Hwang et al. 1990)。在家族性肌萎縮性脊髓側索硬化症 (familial amyotrophic lateral sclerosis) 基因轉殖鼠中，表示將 nNOS knock-out 並沒有明顯的改善功用 (Facchinetti, Sasaki et al. 1999)。第二個被發現的 NO 合成酶是從巨噬細胞中分離出來的 NOS2 也稱為 iNOS (inducible NOS)，原因是它容易被促炎細胞因子 (proinflammatory cytokines) 誘導而產生。與 nNOS 或 eNOS 同功酶 (endothelial NOS isoenzymes) 不同的是 iNOS 並不受細胞內鈣離子變化的調控，但是在純化 iNOS 的製備上卻發現鈣調蛋白 (calmodulin) 共同被純化出來，且與 iNOS 緊密的結合 (Cho, Xie et al. 1992)，因此 iNOS 並不會對生理上鈣濃度的變化出現反應。由於 iNOS 可藉由促炎刺激被強烈誘導，也被認為是 NO 高輸出 (high-output) 的來源。然而 iNOS 實質上產生 NO 的比率並沒有大於 nNOS 或 eNOS (endothelial NOS)，只是比較多的蛋白質能夠瞬間被誘導，而且正常的鈣水平都足以活化 iNOS (Nathan and Xie 1994)。第三個被發現的 NO 合成酶是 eNOS 也稱為 NOS3。eNOS 與細胞膜上的小窩 (caveolin) 鍵結 (Feron, Belhassen et al. 1996)，並藉由鈣離子透過細胞膜上受體進入而活化，本身也受磷酸化調控 (Sase and Michel 1997)。eNOS 除了在內皮細胞外，同樣存在於神經元和其他組織中。

五、發炎反應與自由基的關聯

一般來說，發炎反應是先天免疫作用 (innate immunity) 中重要的一部分，也是啟動適應性免疫 (adaptive immunity) 的重要關鍵。生物體受到創傷感染或外來微生物入侵時，受感染組織受到由巨噬細胞、樹突細胞 (dendritic cells) 和單核白血球 (monocytes) 所分泌的活性氧、細胞激素 (cytokines) 和趨化因子 (chemokines) 等介質刺激發炎反應中最常被探討的調控因子為 (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B)。NF- κ B 是轉錄因子，可以促進參與促炎症反應中基因的轉錄 (Simmonds and Foxwell 2008)。在巨噬細胞中，NF- κ B 可以被發炎的細胞外訊號所活化，例如：細菌性脂多醣 (LPS)、白細胞介素-1 (interleukin-1, IL-1)、腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 和 NO (Muller, Ziegler-Heitbrock et al. 1993)。巨噬細胞 (macrophages) 為人體中主要的免疫細胞之一。John Hibbs 為了調查巨噬細胞如何殺死癌細胞，作了許多觀察與研究。首先，觀察到不同批的小牛血清，會影響在體內巨噬細胞的殺瘤活性 (tumoricidal activity)。其次，發現內毒素可以活化巨噬細胞，使巨噬細胞為了維持殺瘤活性而將培養基裡的精胺酸 (arginine) 氧化為瓜胺酸 (citrulline)，產生亞硝酸 (nitrite) 和硝酸 (nitrate) (Hibbs, Taintor et al. 1987)。但他並沒有表明巨噬細胞直接產生 NO 及過氧化亞硝酸陰離子。直到西元 1989 年才由 Stuehr and Nathan 提出巨噬細胞產生 NO (Stuehr and Nathan 1989)，而產生過氧化亞硝酸陰離子的發現由 Ischiropoulos 等人西元 1992 年提出 (Ischiropoulos, Zhu et al. 1992)。事實上，活化的巨噬細胞同時製

造 NO 與超氧陰離子，所以腫瘤細胞中粒線體的不活化可能是由過氧化亞硝酸陰離子所調節 (Radi, Rodriguez et al. 1994)。

六、過氧化亞硝酸陰離子可能調節的細胞訊號

蛋白激酶 B (Akt 蛋白) 是一種絲胺酸-蘇胺酸蛋白，在整合細胞生長因子和其他細胞外訊號扮演關鍵的角色。Akt 的活化也代表著重要的保護機制去限制因為氧化壓力所造成的細胞凋亡 (apoptotic)。活化 Akt 需要藉由產生 3' -磷酸肌醇的磷酸化 (Martindale and Holbrook 2002)。在許多研究中，過氧化亞硝酸陰離子調節 PI3K/Akt 訊號途徑是具有爭議的 (附錄一)，在大鼠肝癌細胞株中，過氧化亞硝酸陰離子活化 PI3K 和 Akt 磷酸化導致活化轉錄因子 Nrf2/ARE 和誘導解毒酵素穀胱甘肽-S-轉移酶 (glutathione-S-transferase) (Kang, Choi et al. 2002)。Schroeder 等人 (Schroeder, Klotz et al. 2001) 提出過氧化亞硝酸陰離子活化 Akt 蛋白是藉由巰基 (R-SH) 氧化而不是酪胺酸硝化，原因是在小鼠內皮細胞中，過氧化亞硝酸陰離子活化的 Akt 蛋白沒有因為給予硝化抑制劑表兒茶素 (epicatechin) 而改變，也且酪胺酸也沒有被修飾。在一些相反的研究指出，過氧化亞硝酸陰離子在幾個細胞株中抑制 PI3K 的訊號和 Akt 的活化，包括 RAW 264.7 巨噬細胞 (Hellberg, Boggs et al. 1998)，3T3-L1 脂肪細胞 (Nomiyama, Igarashi et al. 2004)，PC12 細胞 (Spear, Estevez et al. 1997)，牛內皮細胞 (Zou, Hou et al. 2002)，和視網膜細胞 (el-Remessy, Bartoli et al. 2005) 是假設經由硝化 P85 蛋白的酪胺酸殘基機制調節 PI3K 亞基。

第三節、微小膠質細胞的簡介

一、微小膠質細胞之發現與定義

微小膠質細胞的概念在西元 1932 年所出版的“神經系統的細胞學和細胞病理學”一書中，由 Pio del Rio-Hortega 所提出 (Kettenmann, Hanisch et al. 2011)，並建立了以下的假設：1) 微小膠質細胞為變形蟲形態，起源於中胚層並參予大腦早期的發育過程。2) 微小膠質細胞使用血管和白質 (white matter) 去移動追蹤目標和進入各腦區。3) 在更加成熟的腦中，轉變成分枝型態 (在目前已知是休息的微小膠質細胞型態)。4) 在成熟的大腦中，微小膠質細胞幾乎均勻地分佈於中樞神經系統。5) 每一個微小膠質細胞似乎占據了特定的區域。6) 當病理事件發生時，微小膠質細胞轉變成類似在早期發育過程中的變形蟲形態。7) 微小膠質細胞具有遷移 (migrate)、增殖 (proliferate) 和吞噬 (phagocytose) 的能力。這些假設即使到現代神經科學教科書仍然被使用。在西元 1919-1927 年之間，Pio del Rio-Hortega 根據他對微小膠質細胞所提出的假設並使用了改良的碳酸銀染去標示微小膠質細胞且在學術上發表了一系列的文章。Pio del Rio-Hortega 將他所發現新的細胞稱為微小膠質細胞和單個細胞的“microgliocyte”。一些當代的出版物甚至以“Hortega cells”代表微小膠質細胞。在經過 World War II 後，這些細胞已經被命名為微小膠質細胞 (microglia cells)，而被沿用至今。

簡言之，微小膠質細胞是膠質細胞的一種。它是從周邊骨髓先驅細胞 (peripheral myeloid progenitor cells) 所分化而成，在胚胎發育過程中進入中樞神經系統。平時為分支狀，當大腦中有病原體、聚集的蛋白質或死掉的神經細胞時，微小膠質細胞會被誘發成阿米巴變形蟲狀態，這時候微小膠質細胞會釋放一氧化氮 (NO) 和細胞素

(cytokine)，例如：IL-6、IL-1 β 等介質刺激免疫系統產生發炎反應。

二、微小膠質細胞與發炎反應簡介

當大腦中的血腦障壁 (blood brain barrier) 遭到損害時，例如：車禍、腦震盪、老化或中風等損傷，體內循環中所帶的血清或病原體會透過損害的血腦障壁誘發微小膠質細胞活化釋放發炎介質刺激免疫系統，使得感染或受傷部位血流量以及通透性增加，並將白血球吸引到組織受傷處，使白血球發揮抵抗病原菌和吞噬病原菌等功能，引起發炎反應。此時微小膠質細胞會從分支狀變成阿米巴變形蟲狀。在神經退化性疾病腦切片中，已經證實微小膠質細胞會大量的表現，這種現象稱為 microgliosis，顯示微小膠質細胞與神經退化性疾病有強烈的關聯 (Block, Zecca et al. 2007)。

三、微小膠質細胞的活化與形態

在中樞神經系統中的免疫功能主要由微小膠質細胞所負責，來保護神經系統不被外來物所破壞。微小膠質細胞廣泛分布於大腦中，分佈的密度會隨腦區的不同而有所增減，其細胞數佔大腦神經系統細胞的 15~20%。微小膠質細胞在結構上具有細的小胞體且呈現分枝狀。這種外觀顯然與典型的巨噬細胞不同，此時的微小膠質細胞稱為休息態 (resting state)。任何對中樞神經系統造成現實或潛在的危險，使得腦內平衡受到干擾或虧損，可以喚起微小膠質細胞在形狀、基因表達和功能行為快速而深刻的變化，被定義為“微小膠質細胞活化” (microglial activation) (Colton and Wilcock 2010)。微小膠質細胞從休息態的分枝狀活化成變形蟲狀，透過將它們的分枝收回 (retracting) 再吸收進入細胞體內。中間幾個步驟可以被明顯觀察到，包含：分支的收回、轉型 (transition) 或過度分枝化 (hyper-ramification) 和隨後形成微小膠質細胞的突部 (protrusions) 運動組織 (Lynch 2009)。微小膠質細胞在體外培養通常不具有分枝狀，它們顯示異構

(heterogeneous) 的形狀，從梭狀 (spindle) 和桿狀 (rod-shaped)、具有短而粗的細胞偽足 (lamellipodia) 的變形蟲狀擴張成圓型細胞。這些形狀可藉由給予不同的活化劑，如細菌性脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 刺激微小膠質細胞活化達到細胞型態重組 (abd-el-Basset and Fedoroff 1995)。根據不同的損害 (insult)，細胞型態上的反應也不同 (Streit and Xue 2009)，例如：變成濃密 (bushy) 分支或具有雙極或三極分支的形態、梭狀或桿狀型態 (Rezaie, Trillo-Pazos et al. 2002)。而微小膠質細胞從分支態的形狀逐漸變成類巨噬細胞樣 (macrophage-like) 的變形蟲態，這些型態轉變的發生被認為是不變的程序 (Stence, Waite et al. 2001) 且具有其功能性，例如：絲狀偽足的突起 (filopodia protrusion) 是為了提供微小膠質細胞進行定向的遷移 (directed migration)。

微小膠質細胞對外源性的威脅，如病毒和細菌，作為中樞神經系統主要免疫細胞的第一道防線。在微小膠質細胞中模式識別受體 (PRRs) 大量表達，且檢測傳染性病原體入侵並協助適當免疫反應的控制 (Hanisch, Johnson et al. 2008)。類鐸受器 (toll-like receptor) 是其中一種模式識別受體，屬於整合膜醣蛋白 I 型 (type I integral membrane glycoproteins)，與白細胞界素-1 (interleukin-1 receptor, IL-1R) 家族的結構域 (domains) 同源，稱為 Toll/IL-1R(TIR) domains (Sims and Smith 2010)。其特徵在於含有豐富的亮氨酸 (leucine) 重覆序列。以 TLR4 為例，含有大量的亮氨酸重複序列的 TLR4 在細胞膜外部形成馬蹄狀結構，其凹下的表面可能用來與激動劑 (agonists) 相互作用。TLRs 除了可以辨別外來的病毒與細菌外，也可以偵測細胞受傷所釋放的分子，這些分子被稱為傷害或危險相關分子模式 (damage- or danger-associated

molecular patterns , DAMPs)。

Toll receptor 的發現及名稱的由來，是德國的生物學家 Christiane Nüsslein-Volhard 在西元 1985 年時，從突變果蠅上所發現，並驚呼 “Das war ja toll!” (Hansson and Edfeldt 2005)，後來研究證實與果蠅的免疫相關 (Lemaitre, Nicolas et al. 1996)。與 toll receptor 類似的受體稱為 toll-like receptor，在哺乳動物中，目前在人類至少發現 11 種，而老鼠發現 13 種 (Okun, Griffioen et al. 2009)。在大腦中，toll-like receptor 主要表達在神經膠質細胞，尤其是微小膠質細胞。不同的 toll-like receptor 會針對不同的外源性威脅產生不一樣的反應，例如：TLR3 識別病毒特異性的雙鏈核糖核酸，並刺激微小膠質細胞活化釋放出 IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- β (Alexopoulou, Holt et al. 2001)；TLR4 識別細菌性脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS)，革蘭陰性細菌菌株一個主要的細胞壁組成部分，並刺激微小膠質活化分泌 NO, IL-6 和 TNF- α (Okun, Griffioen et al. 2009)。再者，有文獻更進一步指出，TLR4 也參與乙醇誘導微小膠質細胞活化 (Fernandez-Lizarbe, Pascual et al. 2009)。

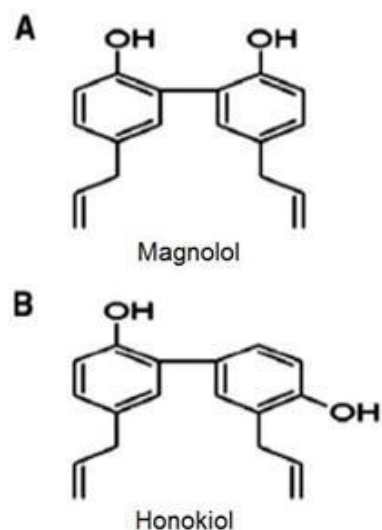
第四節、雙酚類化合物之簡介

一、和厚朴酚之簡介

和厚朴酚 (honokiol) [2-(4-hydroxy-3-prop-2-enylphenyl)-4-prop-2-enylphenol]，為木蘭科落葉喬木植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. 或凹葉厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. var. *biloba* Rehd. et Wils. 的枝皮、幹皮或樹皮萃取物中主要化合物成分之一 (Fujita, Itokawa et al. 1973)。和厚朴酚也有一名稱為異厚朴酚，主要原因是與另一厚朴樹皮萃取化合物厚朴酚 (magnolol) 又稱木蘭酚為同分異構物 ($C_{18}H_{18}O_2$, MW=266.33)。



Magnolia grandiflora



左圖為開花的厚朴樹樣貌，來源:(Wang, Martin et al. 2013)；中圖為乾燥的厚朴樹皮，來源:中藥知識學習網；右圖 A 為厚朴酚化學結構式，B 為和厚朴酚化學結構式，來源:(Lee, Lee et al. 2011)。

和厚朴酚具有強力抗脂質過氧化能力，但其活性較厚朴酚低 (Lo, Teng et al. 1994)。木蘭科落葉喬木植物厚朴目前被發現分布於中國、日本和韓國等區域，且主要有二種。分別是 *Magnolia officinalis*. 分布於中國，而 *Magnolia obovata*. 分布於日本與韓國。

且依據種類與分布區域不同，厚朴樹皮中具有生物活性化合物的比例也不同，僅列出四種較多人研究的化合物（參照表一）(Lee, Lee et al. 2011)

表一、木蘭科植物依其不同分布地點的主要組成成分。

Compounds	MW	Contents on methanol or ethanol extract				
		M. obovata	M. obovata	M. obovata	M.officinalis	M.officinalis
Magnolol	266.3 (C ₁₈ H ₁₈ O ₂)	7.65%	2%	0.78%	1%	1.25%
Honokiol	266.3 (C ₁₈ H ₁₈ O ₂)	0.55%	1.25%	1.25%	0.17%	1.81%
4-O-methylHonokiol	280.4 (C ₁₉ H ₂₀ O ₂)	0.012%	0.21%	0.13%	0.0003%	1.24%
Obovatol	282.3 (C ₁₈ H ₁₈ O ₃)	0.33%	0.125%	0.078%	—	—

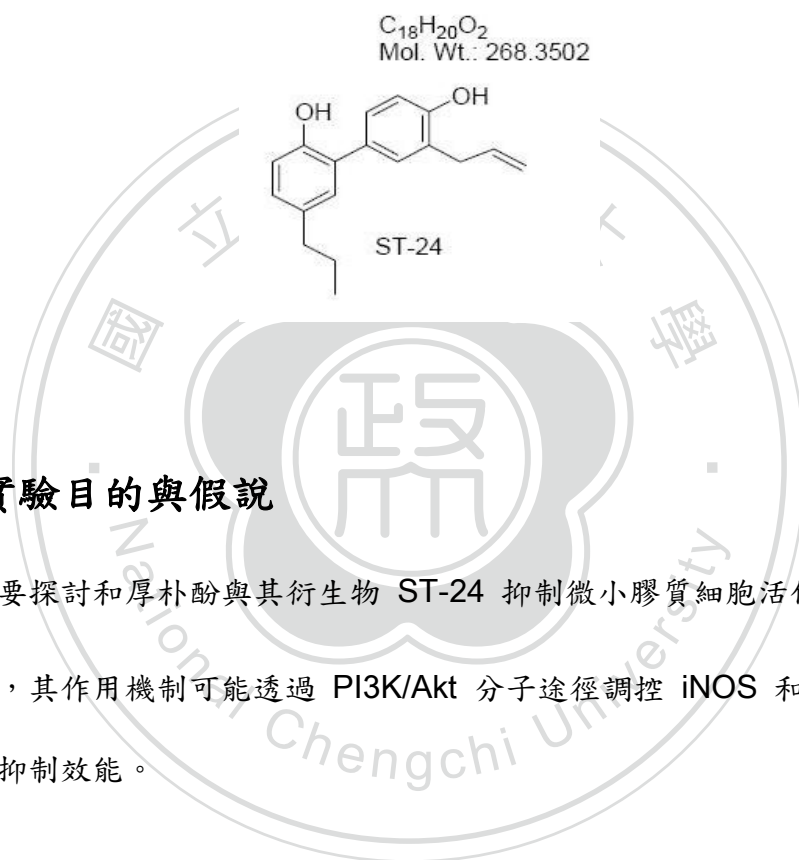
在中國、日本和韓國的傳統中藥應用上，和厚朴酚被廣泛運用在治療減緩發燒、頭痛、焦慮、腹瀉、咳嗽、氣喘及中風等症狀 (顏, 1994)。

二、藥理作用

近年來許多學者研究其藥理活性及機制，包括：抗癌作用 (Choi, Ha et al. 2002)、抗發炎作用 (Kang, Lee et al. 2008) 和抗氧化作用 (Kong, Tsai et al. 2000)。在中樞神經系統中，和厚朴酚顯示抗壓力、抗焦慮 (Weeks 2009)、抗憂鬱 (Xu, Yi et al. 2008)、抗阿茲海默症和抗中風作用。在心血管系統，和厚朴酚顯示血管舒張 (Teng, Yu et al. 1990)、抗血小板凝集和抗動脈粥樣硬化。在胃腸系統中，和厚朴酚顯示抗食管阻塞，抗胃潰瘍，抗腹瀉和保肝作用 (Park, Kim et al. 2006)。以抗癌作用為例，在體外的實驗，和厚朴酚可以活化相關的分子，如 caspases-3, -8 和 -9 誘導白血病細胞 (B-cell chronic lymphocytic leukemia ; B-CLL) 進行細胞凋亡 (Battle, Arbiser et al. 2005)。在內皮細胞株 SVR 發現可以抗血管生成 (anti-angiogenic)；在體內的實驗，和厚朴酚 (3mg/day) 可以在植入血管肉瘤的鼠老鼠模型中，減少 50% 腫瘤的生長 (Bai, Cerimele et al. 2003)。而在抗氧化及抗發炎方面，在過去的動物實驗中指出和厚朴酚可以抑制腦缺血時所產生的自由基 (ROS) 產量。而體外實驗，在小鼠 B 細胞株上表達人類嵌合受體 CD40-LMP1，給予和厚朴酚可以減少 NF- κ B 和 AP-1 的活化和 TNF- α 、IL-6 的產生 (Munroe, Arbiser et al. 2007)。

三、ST-24 號化合物之簡介

其結構為和厚朴酚4號碳原子上的丙烯基不飽和雙鍵 (CH₂=CHCH₂-) 加入氫原子合成飽和鍵的丙烷基 (CH₃-CH₂CH₂-)，成為 (C₁₈H₂₀O₂, MW=268.35) 的化合物，以模擬天然的抗氧化藥物和厚朴酚。下圖為 ST-24 化合物化學結構式。



第五節、實驗目的與假說

本實驗目的主要探討和厚朴酚與其衍生物 ST-24 抑制微小膠質細胞活化的抗氧化能力與抗發炎反應，其作用機制可能透過 PI3K/Akt 分子途徑調控 iNOS 和 NO 表現量，並比較兩者之抑制效能。

第二章 實驗材料與實驗方法

第一節、實驗材料

一、實驗細胞

本研究實驗所使用之細胞株 SM826 為鼯鼠微小膠質細胞株 (murine microglial cell line, BALB/c)，從 BALB/c mice primary microglia 自然發育而來，由國衛院謝奉勳老師實驗室所提供。SM826 細胞株培養於二氧化碳培養箱，條件設定為 37°C，5 % CO₂，每二週添加無菌水。

二、實驗儀器

低溫高速離心機 (KUBOTA 3500)

酵素免疫分析儀 (OPTImax)

膠體電泳系統 (gel electrophoresis system, Mini-Protean II, BIO-RAD)

蛋白轉印系統 (blot transfer system, Mini Trans-Blot Transfer cell, BIO-RAD)

電源供應器 (power supplies, PowerPac 200 ; PowerPac 300, BIO-RAD)

迴轉式搖盪機 (orbital shaker, YIH DER INSTRUMENTS. CO., LTD)

恆溫加熱器 (digital water bath model, DS LAB)

酸鹼度計 (pH meter, Basic, Denver Instrument)

去離子水製造機 (Milipore)

三、實驗藥品

Bovine serum albumin; BSA 購自 Sigma 公司

Protein assay-Dye reagent concentrate 購自 Bio-Rad

Protein marker 購自 Femantas

SDS 購自 J.T.Baker 公司

TEMED 購自 J.T.Baker 公司

Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide 購自 Sigma 公司

40% Acrylamide/Bis 購自 J.T.Baker 公司

四、實驗藥品配製

1. 和厚朴酚之 stock 試劑皆先溶於 DMSO 中，之後以 100 μ L (0.1mM 和厚朴酚) + 900 μ L (ddH₂O)，配製成 1mL 的 0.01mM 和厚朴酚作為後續實驗使用。

2. ST-24 之 stock 試劑皆先溶於 DMSO 中，之後以 100 μ L (0.1mM ST-24) + 900 μ L (ddH₂O)，配製成 1mL 的 0.01mM ST-24 作為後續實驗使用。

對照組則給予同樣劑量的 DMSO (0.1 % or 0.3 %)。

第二節、實驗方法

一、細胞株培養與繼代培養

小鼠微小膠質細胞株 (murine microglial cells, BALB/c) SM826，以培養基 DMEM (dulbecco's modified eagle medium) 加入 10% 胎牛血清、1% 抗生素 (penicillin-streptomycin) 以及 2mM L-glutamine 在 37°C/5% CO₂ 培養箱中培養。當細胞長滿 15cm 培養盤後，將細胞以細胞用刮刀刮下移至 50mL 離心管以常溫 25±1°C、310 相對離心力 (relative centrifugal force; rcf.) 數率，離心 10 分鐘，將離心後上清液移除，加入新鮮培養基，均勻混和細胞液後可進行繼代培養或加藥試驗。

二、細胞計數方法與保存

抽取 20 μL 細胞液添加 980 μL 1X PBS 水溶液進行 50 倍稀釋，再以 trypan blue 進行 1:1 細胞染色。利用血球計數器加入 10μL 細胞染液計數細胞濃度。若計數 5 個區域有 n 個細胞，則細胞濃度為 $= (n/5) \times \text{稀釋倍數} \times 10^4$ (個/mL)。將生長密度達八至九分滿之培養盤，包含培養基以細胞刮刀刮取貼附在培養盤上的細胞，移至 50mL 離心管以常溫 25±1°C、310 相對離心力數率，離心 10 分鐘，將離心後上清液移除，加入含有 10% DMSO 新鮮培養基至 1.5mL 冷凍管中放置漸凍盒內，以 -20°C 冰箱放至二天、-80°C 冰箱一天，接著放入液態氮桶中保存。

三、細胞存活率試驗 (Cell survival) MTT assay

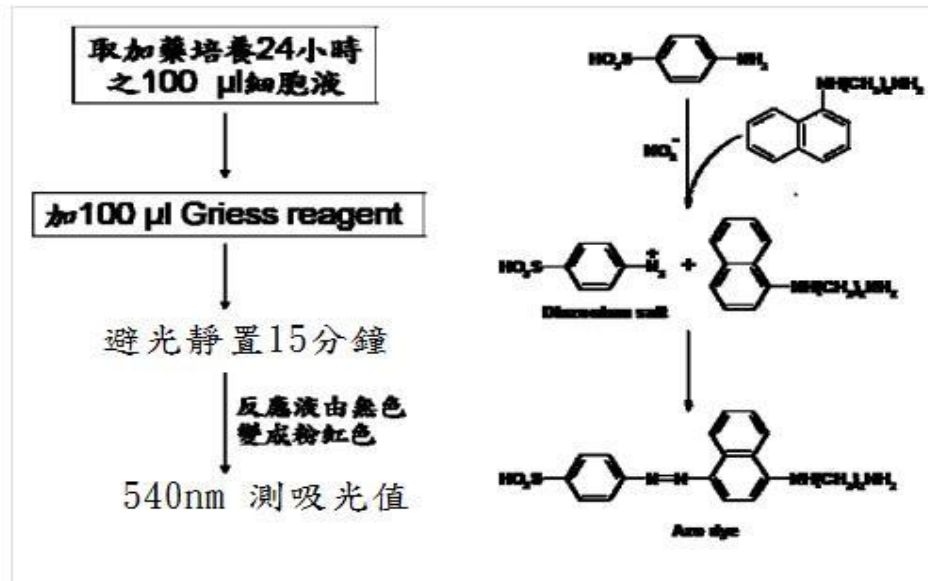
3-(4,5-dimethyl-2 thiazoyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay 測量細胞粒線體的還原能力來判斷細胞的存活率。MTT 為黃色化合物，是一種接受氫離子的染料，可作用於活細胞粒腺體中的呼吸鏈，在琥珀酸脫氫酶 (SDH) 和細胞色素 C 的作用下 tetrazolium 環開裂，生成藍色的 formazan 結晶，formazan 結晶的生成量與活細胞數目成正比（死細胞中琥珀酸脫氫酶消失，不能將 MTT 還原）。所以可以利用測 O.D. 值的方式得知細胞還原 MTT 的能力（formazan 形成量），此 O.D. 值代表了粒線體的活性，即活細胞數目，故 MTT assay 可為細胞存活率的指標。

四、一氧化氮生成測定 (Assay of nitric oxide synthesis)

一氧化氮在人體內極易代謝形成 nitrite/nitrate 的穩定代謝產物，因此以細胞培養液中 nitrite/nitrate 的濃度來評估 NO 的釋放量及 NOS 的活性。本實驗使用之吉爾任試劑 (Griess reagent (modified)) 可與 nitrite 反應產生呈色反應，在 540nm 波長下有最大吸光值。故細菌內毒素 LPS 刺激 NO 產生之能力可由 nitrite 不同濃度產生之吸光值而得之，吸光值愈高表示 LPS 刺激效果愈佳。

實驗使用的吉爾任試劑 (Sigma-G4410-10G) 買來時是白色粉末，將 10g 的粉末溶於 250mL ddH₂O。取等量的細胞培養液 (24 well 是 150 μ L，96 well 是 100 μ L) 與 Griess reagent (0.1% *N*-(1-Naphthyl) ethylenediamine, 1% sulfanilamide, 2.5% H₃PO₄) 依比例 1:1 混和放入 microplate 中，於室溫下避光反應 15 分鐘後，以 Microplate reader 讀取於波長 540 nm 吸光值，估算培養液中 nitrate 濃度。

以 culture 於 96well 為例：



五、西方墨點法 (Western blot)

一. 鑄膠

本實驗使用 bio rad 的 western blot 器具。以鑄一片膠 (10% SDS-PAGE) 為例：首先用 75% 酒精擦拭厚薄玻璃，將鑄膠器具組好。之後配製下膠溶液：混合 ddH₂O、40% acrylamide (29:1)、pH 8.8 Tris buffer、10% SDS、10% APS 和 TEMED 加入 1.5mm 厚度玻璃夾縫後，再用 95% 酒精充滿夾縫，並排除氣泡，靜置凝固等候 30 分至 1 小時。

等待下膠凝固後，配置上膠溶液：混和 ddH₂O、40% acrylamide (29:1)、pH 6.8 Tris buffer、10% SDS、10% APS 和 TEMED 加入 14 格的齒梳 (comb) 靜置，等待凝固。

二. 聚丙烯醯胺膠體電泳 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

製備 1 倍 running buffer，組合電泳槽，將 14 格的齒梳 (comb) 小心取出，接著加入 1 倍 running buffer 進行滲漏測試。

加入適量 buffer，並排除膠體孔 (well) 中的氣泡，於左側加入蛋白質分子量標誌，再將待測蛋白質樣品注入膠體孔中。再次檢查並補充 running buffer，使內槽全滿，外槽 1/3 滿 (過導線) 即可。設定電壓固定於 80V，電流 30mA，時間約 3 小時至 dye front 顏色到膠體下緣。

三. 轉漬 (Transfer)

電泳完成，將膠體自電泳槽取出後，去除上膠 (stacking gel) 部分並裁切適當大小，將其浸潤在 1 倍轉漬緩衝液 (transfer buffer) 中。將轉漬膜 (PVDF 膜, Amersham Biosciences, USA) 浸泡在 100% 甲醇 (methanol) 中，輕微搖晃 30 秒後，與膠體、濾紙、海綿組裝 (組裝過程避免氣泡產生)。將上述組裝好的轉漬物件放入轉漬槽中，並加入冰涼的 1 倍轉漬緩衝液至允許轉漬的容量。之後把整組轉漬槽置入 4°C 冷房，條件設定為電壓 100V，電流 30 mA，轉漬時間 90 分鐘。

四. Blocking 以及免疫轉印 (Immunoblotting)

將轉漬好的膜放入準備好的 5% 脫脂奶粉 (溶於 0.1% TBST)，在室溫下搖晃 2 小時，以阻斷 PVDF 膜上非特異性的結合，之後以 0.1% TBST 緩衝溶液清洗三次各 5 分鐘。之後，裁剪出欲進行免疫轉印之蛋白質分子量所在區域，將此區加入 0.1% TBST 緩衝溶液所配製的初級抗體於 4°C 冷房內過夜反應 16 小時。初級抗體包含 mouse

anti-iNOS antibody (1:2000,BD)、mouse anti-COX-2 (1:750,BD)、rabbit GAPDH antibody (1:10000, Genetex)、mouse PI3 Kinase, p85 antibody (1:1000,Millipore) and rabbit phospho-Akt (Thr308) antibody (1:1000,Cell Signaling)。初級抗體反應完後，自 4°C 冷房取出並回收抗體，之後以 0.1% TBST 緩衝溶液清洗三次各 5 分鐘。清洗完後，加入以 0.1% TBST 緩衝溶液所配製的二級抗體，於室溫下以 40 rpm 之轉速反應 1 小時。反應完後以 0.1% TBST 緩衝溶液清洗三次各 5 分鐘，清洗完成後，加入 ECL 呈色劑並放入電泳膠影像系統進行照相。

第三節、實驗數據分析

實驗結果數據則利用 Excel 軟體統計。本論文中主要是在實驗組與多組劑量對照組之間的差異，one-way ANOVA 統計方式來進行分析。統計分析結果差異表示方式：*表示 $p < 0.05$ ，**表示 $p < 0.01$ ，*** 表示 $p < 0.001$ 。

第三章 實驗設計

目標(一) 建立內毒素(脂多醣)對微小膠質細胞活化之模式

本實驗以 3-(4,5-dimethyl-2 thiazoyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay 測量細胞粒線體的還原能力來判斷細胞的存活率。並以吉爾任試劑測量不同細胞數產生的 NO，以求找到適合的模式。實驗中設計了四種不同的細胞數 (6×10^6 、 4×10^6 、 2×10^6 和 1×10^6)/mL \times 0.1 mL，同時給予 LPS 200 ng/mL 的濃度 24 小時後，看是否會影響細胞的存活率，以便之後實驗條件的設計。

實驗流程:將 SM826 微小膠質細胞以四種不同的細胞數貼於 96 孔盤 24 小時後，移去 96 孔盤內培養基的混合液。以 1X PBS 洗過一次，再給予 LPS 200 ng/mL 濃度 100 μ L/well 24 小時。經過 LPS 刺激 24 小時，將移去 96 孔盤內培養基的混合液加入等量的吉爾任試劑避光反應 15 分鐘，以 1X PBS 洗過一次，加入 MTT 溶液 (0.5 mg/mL) 100 μ L/well。經過 4 小時後產生 formazan 藍色結晶，將 MTT 溶液移出，加入 100 μ L/well 的 DMSO 溶出藍色結晶避光反應 15 分鐘。之後將 96 孔盤置於震盪器 5 分鐘後測吸光值波長 570 nm。

目標(二) 評估內毒素 (脂多醣) 與藥物所引起微小膠質細胞過

度活化及細胞凋亡

本實驗將微小膠質細胞貼於 96 孔盤 24 小時後，給予 LPS (10、30、50、100、200) ng/mL 與不同濃度 (0.1、0.3) μM 的藥物 honokiol 和 ST-24。經過 24 小時刺激後，用 MTT assay 定量不同濃度的 LPS 與藥物是否會對細胞的存活率造成影響，並以吉爾任試劑測量 LPS 不同濃度與不同濃度的藥物刺激微小膠質細胞所產生的 NO，以求找到適當的藥物及 LPS 濃度。

實驗流程：將 SM826 微小膠質細胞以細胞數 $2 \times 10^6/\text{mL} \times 0.1 \text{ mL}$ 貼於 96 孔盤 24 小時，移去 96 孔盤內培養基的混合液，以 1X PBS 洗過一次，給予不同濃度的 LPS (10、30、50、100、200) ng/mL 與不同濃度 (0.1、0.3) μM 的藥物 honokiol 和 ST-24。經過 24 小時的刺激後，移去 96 孔盤內培養基的混合液，以 1X PBS 洗過一次，加入 MTT 溶液 (0.5 mg/mL) 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 。經過 4 小時後產生 formazan 藍色結晶，將 MTT 溶液移出，加入 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 的 DMSO 溶出藍色結晶避光反應 15 分鐘。之後將 96 孔盤置於震盪器 5 分鐘後測吸光值波長 570 nm。

目標(三) 評估雙酚類化合物對內毒素引起微小膠質細胞型態改變之影響

為了觀察微小膠質細胞活化其中一項特徵，型態的改變，我們將細胞數 (1×10^6)/mL \times 0.5 mL 種在消毒後的蓋玻片上，將蓋玻片置於 6 孔盤中，加入適量培養基蓋過蓋玻片，讓細胞貼附 24 小時。24 小時後，將舊的培養基移出，用 1X PBS 洗滌一次後，給予 LPS 200 ng/mL 與 0.3 μ M 的 honokiol 與 ST-24 刺激微小膠質細胞，並觀察細胞型態在 4 個時間點，分別是 1、6、12 和 24 小時。在到達不同的時間點時，先將含有藥物的培養基移出，用 1X PBS 洗滌一次後，加入 3.7% paraformaldehyde 固定細胞，用 nail polish (butyl acetate, ethyl acetate, nitrocellulose and phthalic anhydride) 封片後，在正立顯微鏡 1000X 油鏡下觀察。

目標(四) 評估觀察同時給予內毒素（脂多醣）和不同藥物後對內毒素（脂多醣）所引起微小膠質細胞過度活化之作用

(1) 吉爾任試劑分析

本實驗用吉爾任試劑測量 NO 產量來判斷微小膠質細胞活化的程度是否有受到藥物影響減緩活化。

(2) 西方墨點法

以西方墨點法觀察氧化反應和發炎反應幾個重要指標性蛋白質表現量，例如：iNOS、COX-2，是否有受到藥物抑制效果。

目標(五) 確認 honokiol 及 ST-24 號化合物是否是透過 PI3K/Akt 路徑改善內毒素（脂多醣）所引起微小膠質細胞過度活化之分子機制

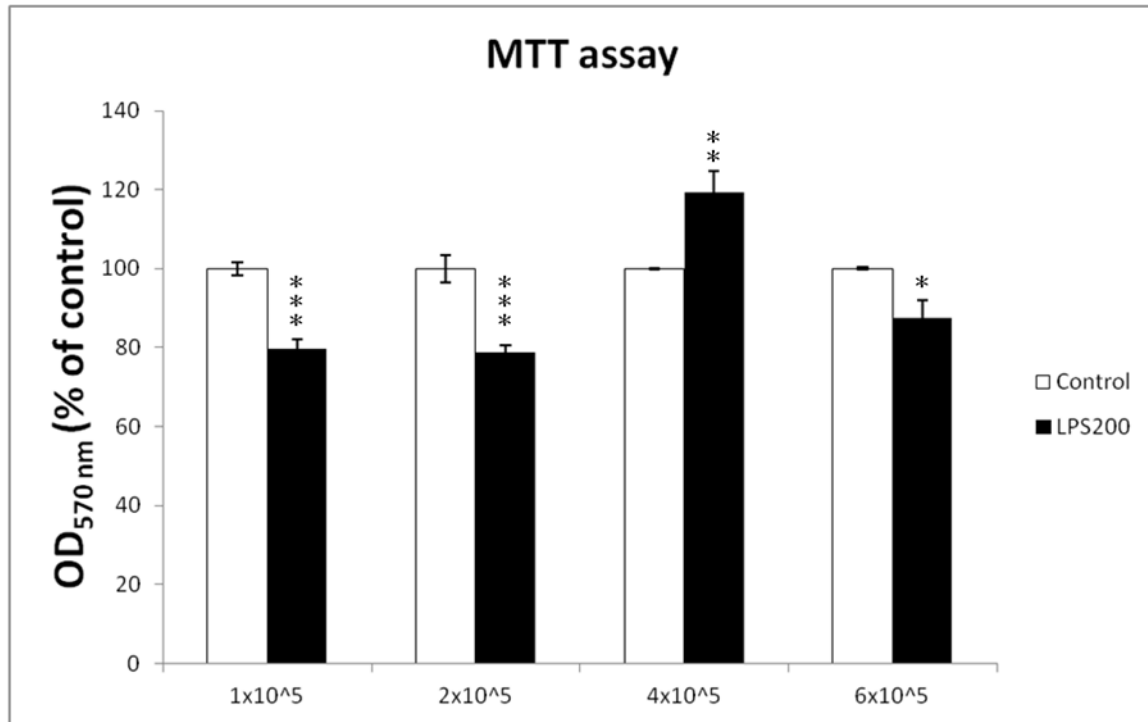
以西方墨點法觀察 PI3K 和 p-Akt 蛋白質表現量是否有因為添加藥物而回復。



第四章 實驗結果

一、內毒素（脂多醣）對微小膠質細胞存活之影響

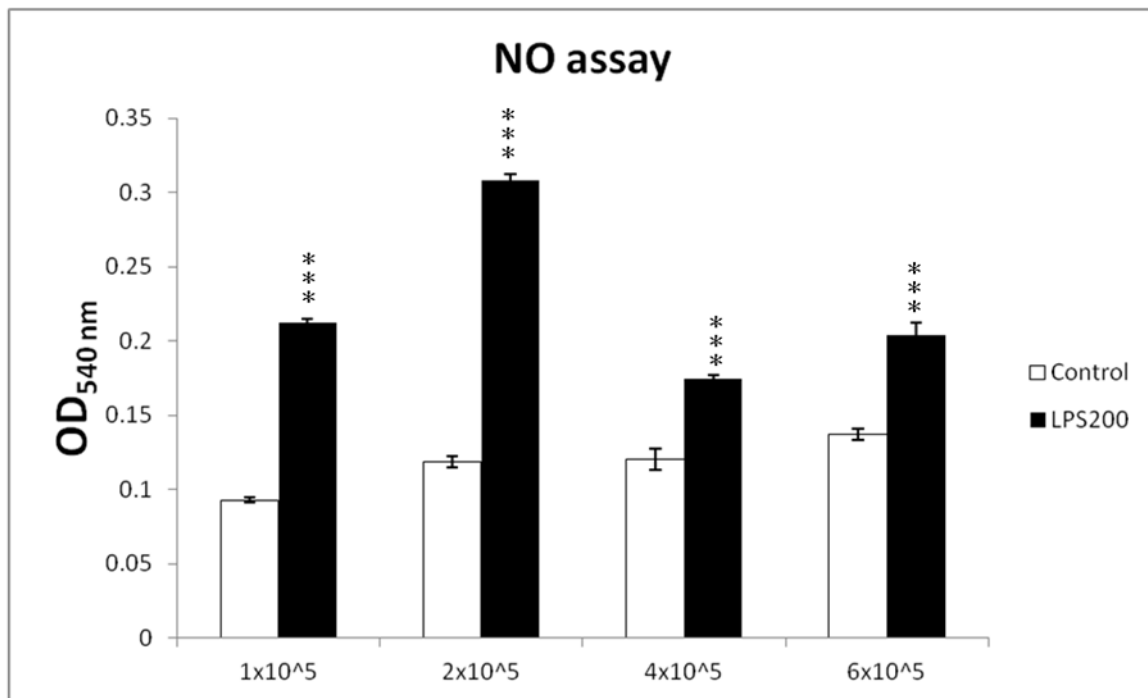
MTT 實驗結果顯示在 96 孔盤中四種不同的細胞數 6×10^5 、 4×10^5 、 2×10^5 和 1×10^5 ，給予 LPS 200 ng/mL 相同的濃度 24 小時後， 4×10^5 的細胞數在粒線體還原反應上結果會增加。但是在 6×10^5 、 2×10^5 和 1×10^5 的細胞數下，細胞粒線體的還原反應有降低，在統計上有顯著差異。顯示在 6×10^5 、 2×10^5 和 1×10^5 的細胞數下給予 LPS 200 ng/mL 濃度 24 小時會降低細胞的存活率。而用吉爾任試劑測量 NO 產量，發現在 2×10^5 細胞濃度條件下有最好的效果。比較 MTT 及 NO 產量結果，所以之後 96 孔盤的細胞實驗條件採用每個 well 細胞數條件為 2×10^5 。



圖一、The effects of LPS on cell viability of microglial cells cultured in different cell numbers.

在四種不同細胞數條件下 6×10^5 、 4×10^5 、 2×10^5 和 1×10^5 ，給予 LPS 200 ng/mL，跟個別 control 組比較，發現給予 LPS 會對細胞存活率造成影響。柱狀圖均以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示。*:compared with Control ; *:P < 0.05 , **:P < 0.01 , ***:P < 0.001 , Student's t-test 。

本實驗重複三次，每次 n=4。



圖二、The effects of LPS on NO production in different cell numbers of microglial cells.

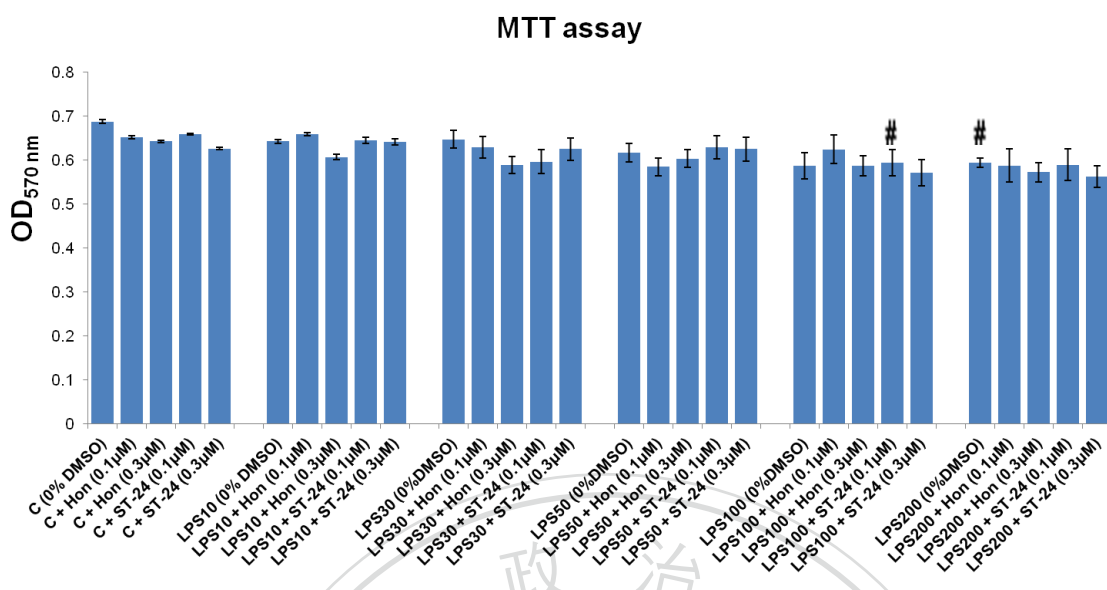
在四種不同細胞數條件下 6×10^5 、 4×10^5 、 2×10^5 和 1×10^5 ，給予 LPS 200 ng/mL 刺激微小膠質細胞活化而產生 NO，跟個別 control 組比較。結果顯示在 2×10^5 細胞數條件下有最大的 NO 產量。柱狀圖均以 mean \pm SEM 表示。

*:compared with Control ; ***:P < 0.001 , Student's t-test。本實驗重複三次，每次 n=4。

二、雙酚類化合物對內毒素引起微小膠質細胞活化及細胞死亡之

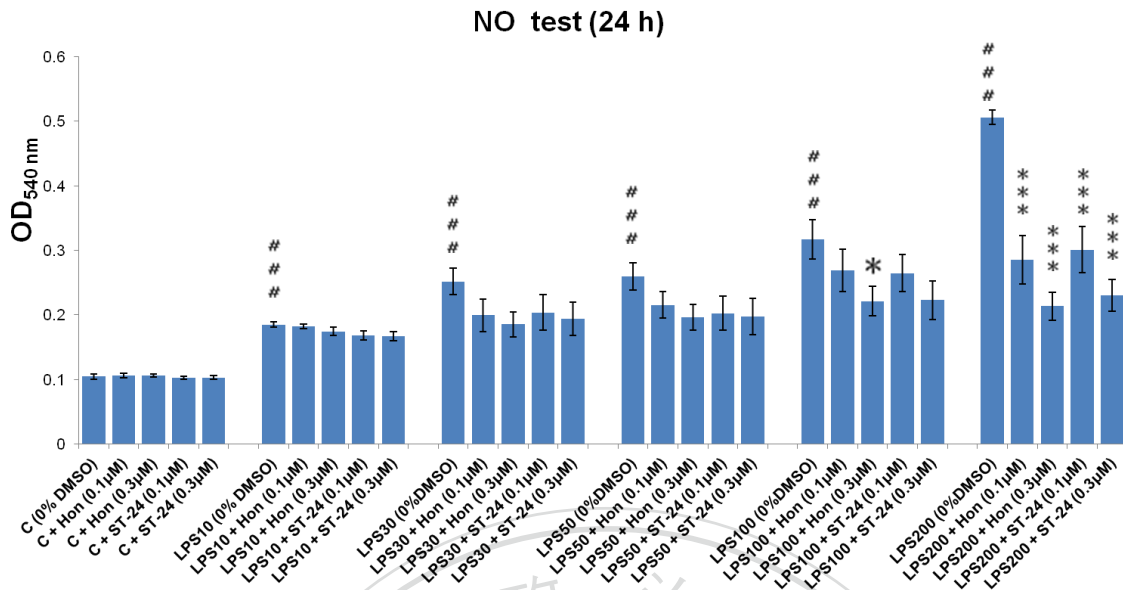
影響

MTT 的實驗結果顯示給予不同 LPS 濃度在 10、30、50、100 及 200 ng/mL 與不同濃度 0.1 及 0.3 μM 的藥物 honokiol 和 ST-24，在同時給予 LPS 100 ng/mL 和 0.1 μM ST-24 這組及 LPS 200 ng/mL 這組與對照組做比較，些微抑制細胞存活率（圖 3）。吉爾任試劑結果顯示，在給予不同 LPS 濃度（10、30、50、100 及 200 ng/mL）與不同濃度（0.1 和 0.3 μM ）的藥物 honokiol 和 ST-24，發現隨著 LPS 的濃度增加而提高 NO 的產生，而在 LPS 200 ng/mL 濃度下給予 0.1 及 0.3 μM 的藥物 honokiol 和 ST-24 同時有抑制 LPS 對微小膠質細胞的刺激作用。所以後續實驗我們採用 LPS 濃度為 200 ng/mL 為實驗條件。



圖三、The effects of different concentrations of biphenolic compounds on cell viability of microglial cells stimulated by LPS.

柱狀圖均以 mean±SEM 表示。#: compared with control; p#: <0.05, Student's t-test。本實驗重複三次，每次 n=2。

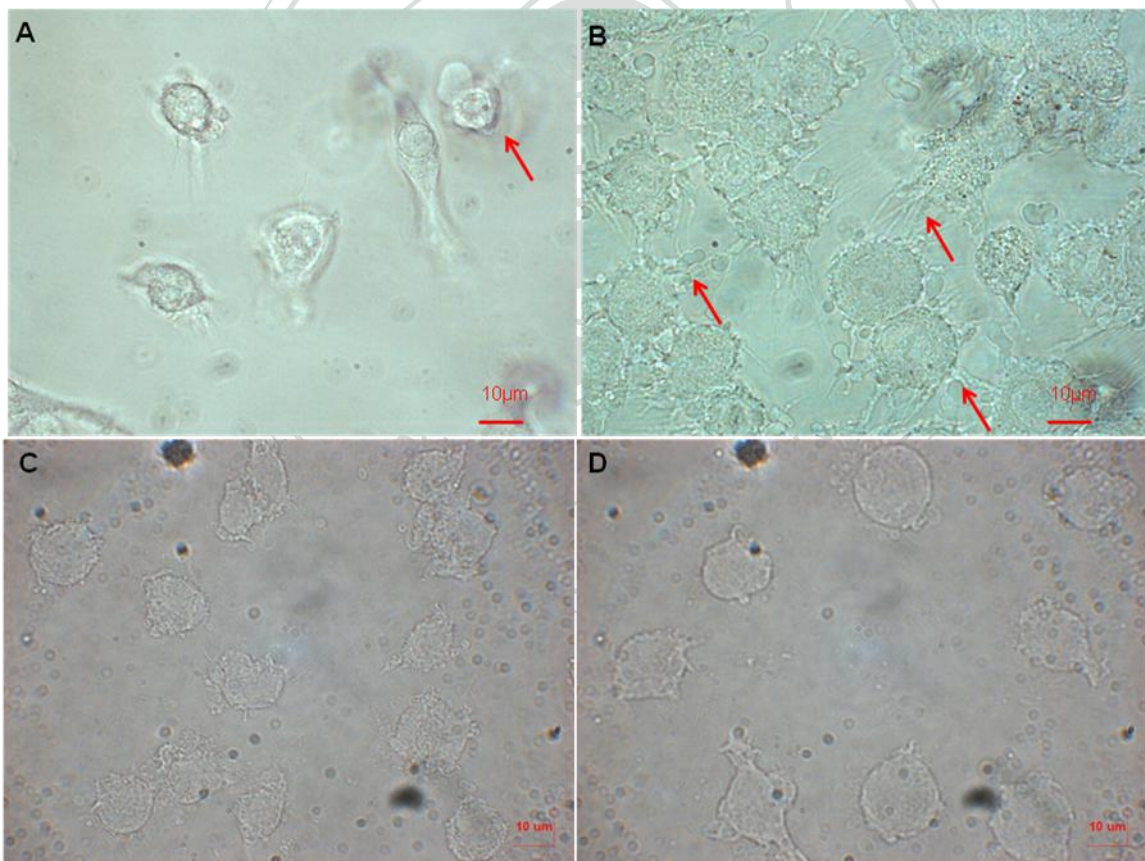


圖四、The effects of biphenolic compounds on NO production of microglial cells stimulated by LPS.

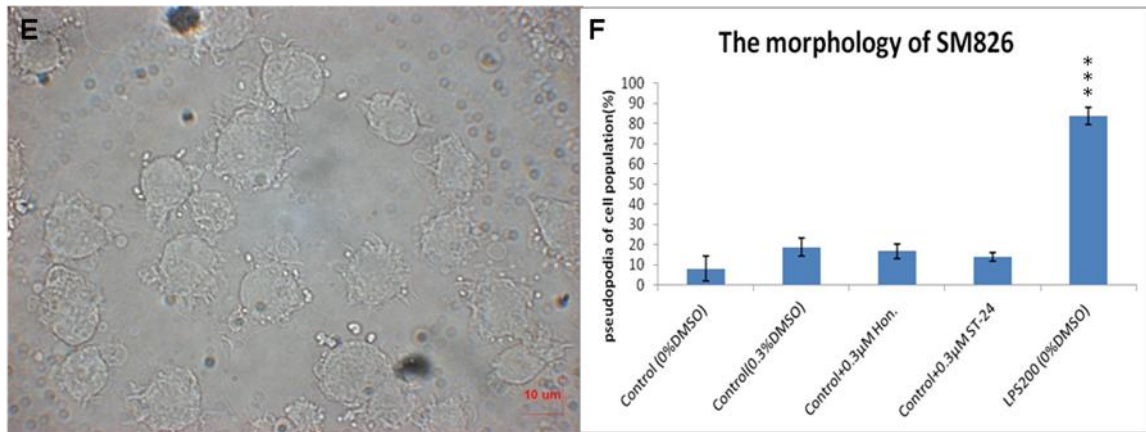
在給予不同濃度 LPS 及不同濃度的 honokiol 和 ST-24，結果顯示微小膠質細胞在給予 LPS 10 ng/mL 濃度下即可活化微小膠質細胞促進 NO 釋放，但要在 LPS 200 ng/mL 下給予 honokiol 與 ST-24 才有抑制效果。柱狀圖均以 mean ± SEM 表示。
#:compared with control; p###:<0.001; *:compared with LPS 200; p*:<0.05, p***:<0.001, Student's t-test。本實驗重複三次，每次 n=2。

三、雙酚類化合物對內毒素引起微小膠質細胞型態改變之影響

首先我們先觀察微小膠質細胞受到 LPS 刺激 24 小時後的影響並觀察藥物本身是否會造成細胞型態改變。發現給予 LPS 確實讓微小膠質細胞活化型態發生改變長出偽足，但是雙酚類化合物本身並不會影響細胞型態，考量 honokiol 是脂溶性必須以 DMSO 為溶劑，所以有多一組 control 添加 0.3% DMSO，發現給予 DMSO 並不會影響 SM826 的細胞型態。



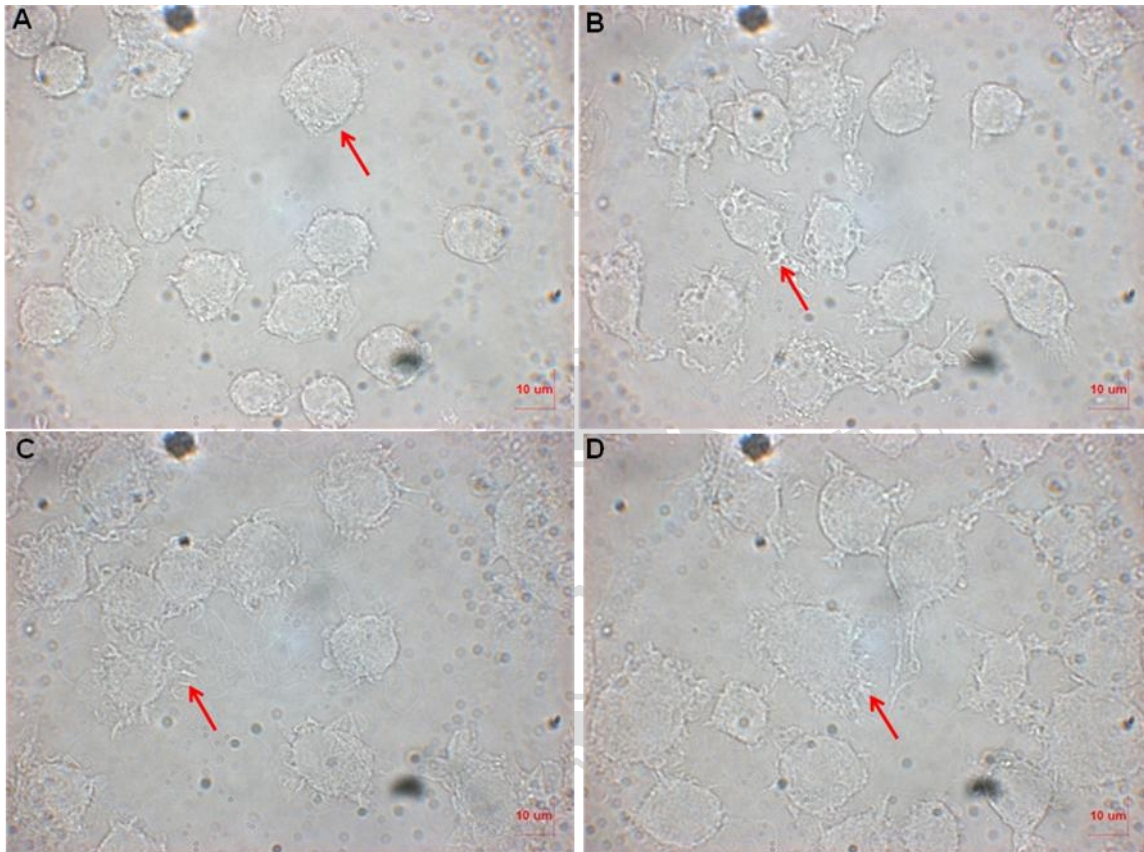
(續前頁)



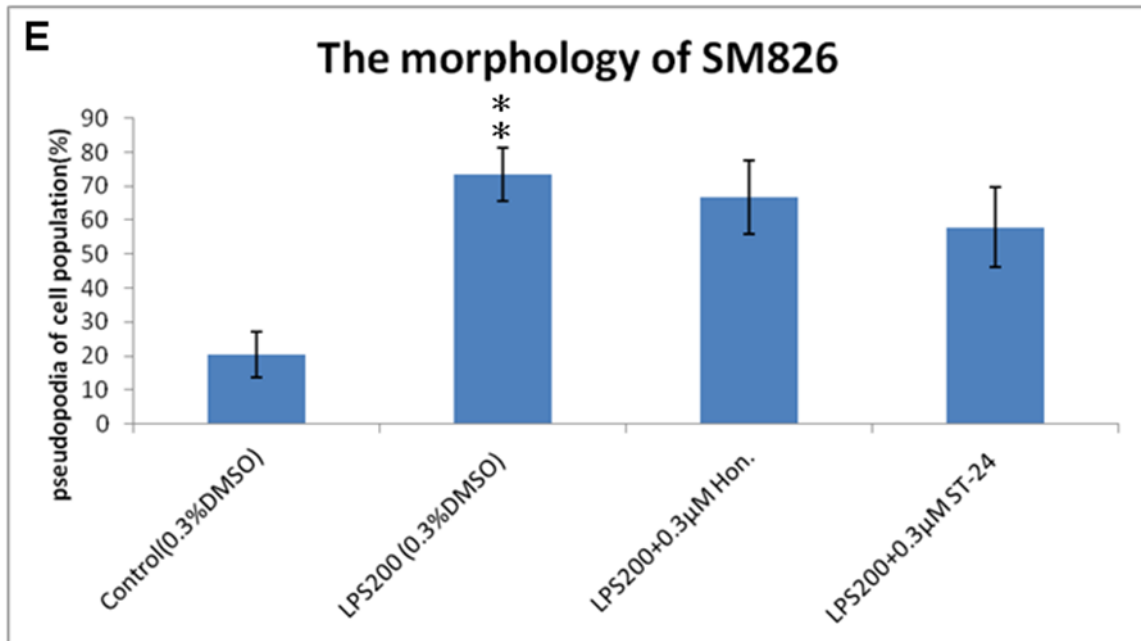
圖五、The effects of biphenolic compounds on the morphology of microglial cells stimulated by LPS for 24 hours.

A 圖為 control，B 圖為給予 LPS 刺激微小膠質細胞活化 24 小時，C 圖為 control (0.3% DMSO)，D 圖為 0.3 µM honokiol，E 圖為 0.3 µM ST-24，F 圖為偽足量化統計圖。統計結果顯示 0.3 µM honokiol、0.3 µM ST-24 與 0.3% DMSO 不會影響細胞偽足量的產生。柱狀圖均以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示。*:compared with control ; p***:<0.001, Student's t-test。本實驗重複三次。

實驗結果表示雙酚類化合物和 DMSO 本身並不會影響細胞型態，接下來我們分四個時間點觀察雙酚類化合物是何時影響活化的微小膠質細胞型態的改變。首先是給藥 1 小時，發現微小膠質細胞已經被 LPS 誘導為活化態，但是 honokiol 與 ST-24 此時並沒有抑制效果。



(續前頁)



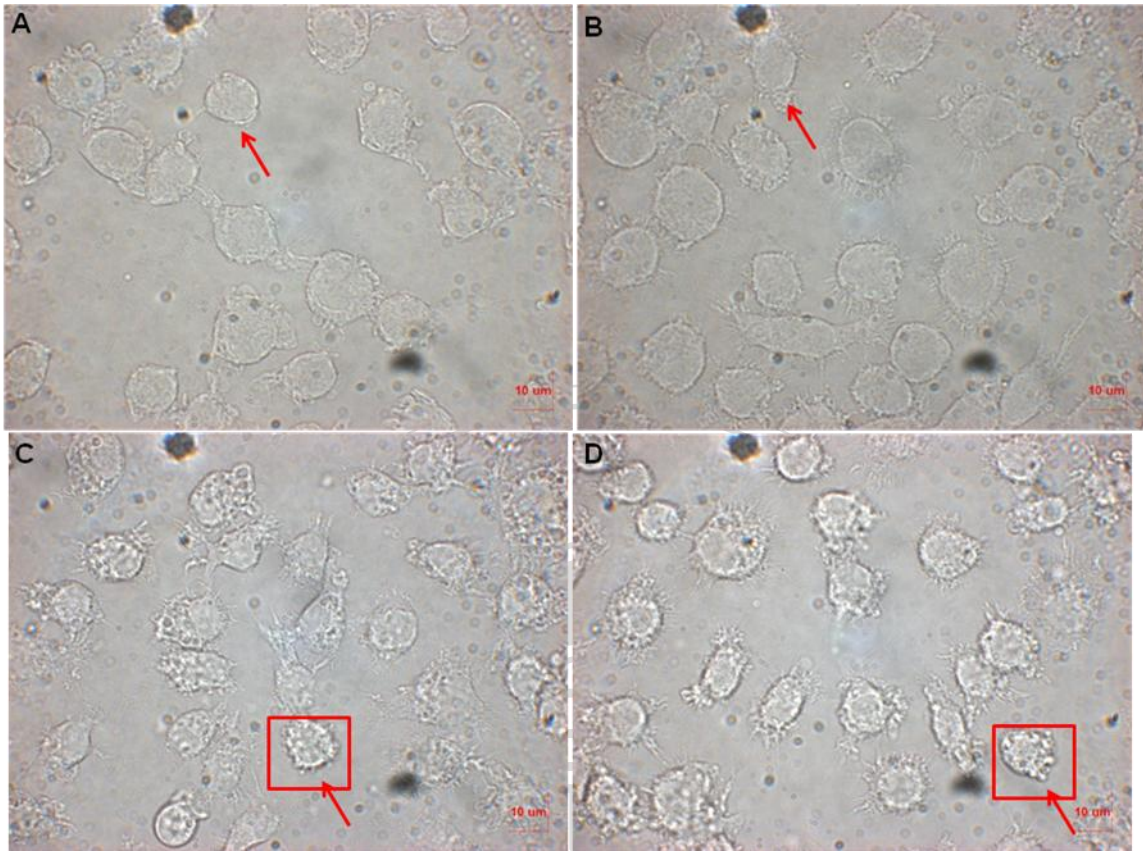
圖六、The effects of biphenolic compounds on the morphology of microglial cells stimulated by LPS for 1 hour.

圖A為 control (0.3% DMSO)，圖B為給予 LPS，圖C為給予 LPS + 0.3 µM honokiol，圖D為給予 LPS + 0.3 µM ST-24，圖E為偽足量化統計圖。依據相片統計結果顯示 LPS + 0.3 µM honokiol、LPS + 0.3 µM ST-24，給予藥物 1 小時尚未改變活化的微小膠質細胞型態。

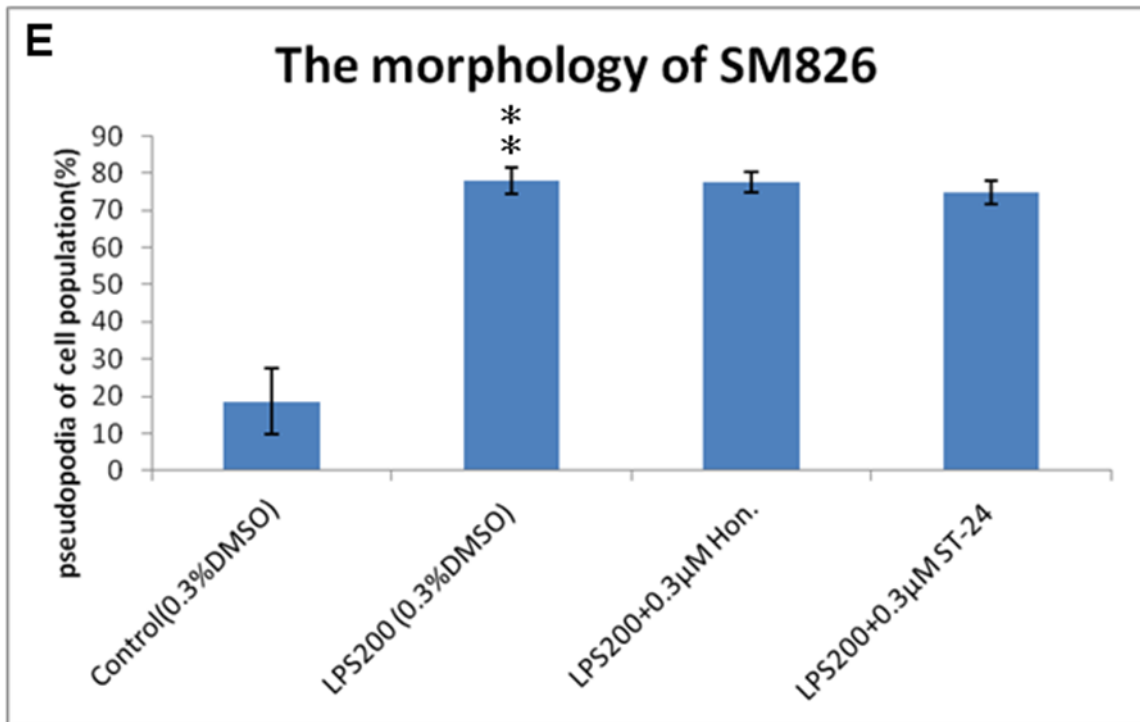
柱狀圖均以 mean±SEM 表示。*:compared with control ; p**:<0.01, Student's t-test。

本實驗重複三次。

接下來我們觀察給藥 6 與 12 小時是否會影響活化的微小膠質細胞型態的改變，結果發現有些細胞型態已經慢慢開始改變，但是在統計上沒有顯著差異。

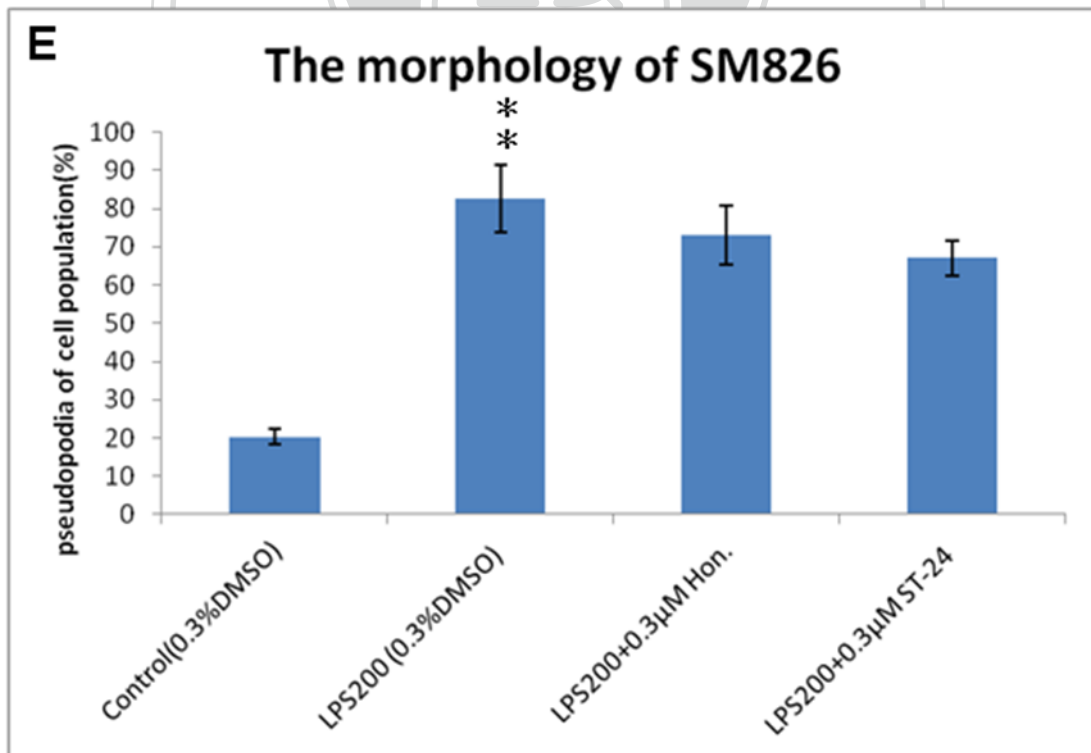
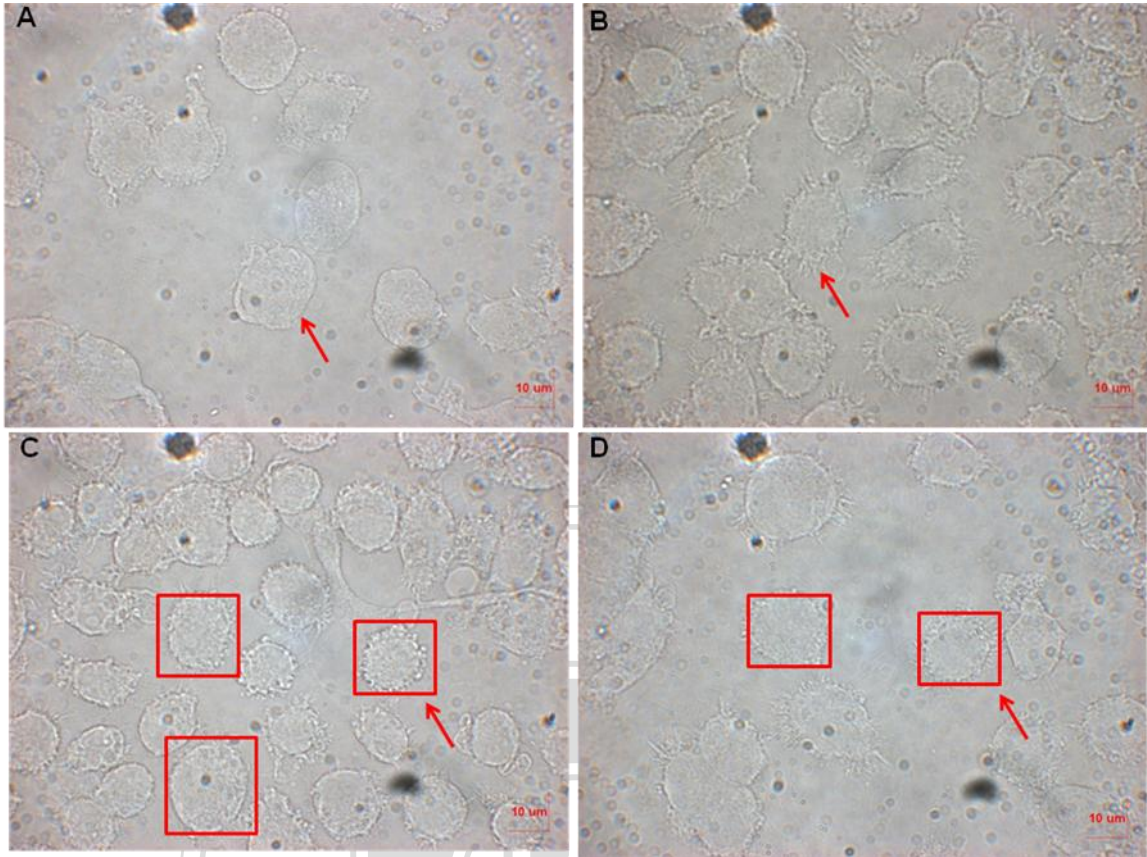


(續前頁)



圖七、The effects of biphenolic compounds on the morphology of microglial cells stimulated by LPS for 6 hours.

圖A為 control (0.3% DMSO)，圖B為給予 LPS，圖C為給予 LPS + 0.3 µM honokiol，圖D為給予 LPS + 0.3 µM ST-24，圖E為偽足量化統計圖。依據相片統計結果顯示 LPS + 0.3 µM honokiol、LPS + 0.3 µM ST-24，給予藥物 6 小時已經開始改變活化的微小膠質細胞型態，但是在統計上沒有顯著差異。柱狀圖均以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示。*:compared with control ; $p^{**}: < 0.01$, Student's t-test。本實驗重複三次。



(續前頁)

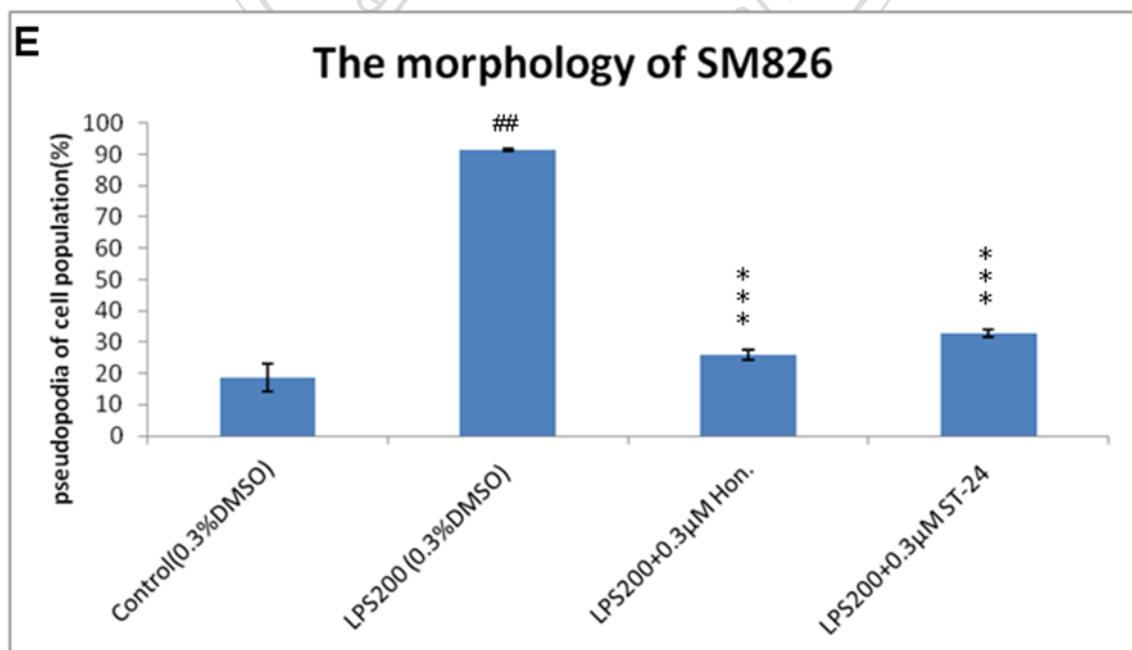
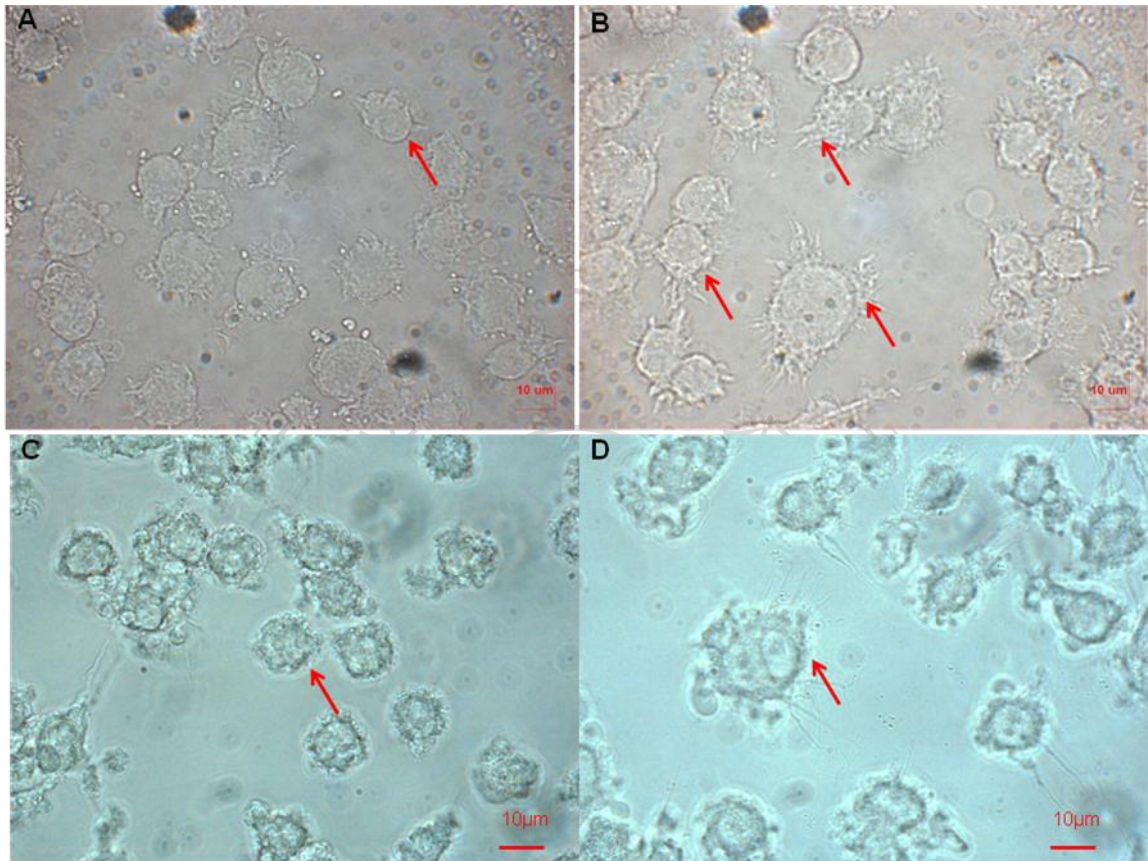
圖 八、The effects of biphenolic compounds on the morphology of microglial cells stimulated by LPS for 12 hours.

圖 A 為 control (0.3% DMSO)，圖 B 為給予 LPS，圖 C 為給予 LPS + 0.3 μ M honokiol，圖 D 為給予 LPS + 0.3 μ M ST-24，圖 E 為偽足量化統計圖。依據相片統計結果顯示 LPS + 0.3 μ M honokiol、LPS + 0.3 μ M ST-24，給予藥物 12 小時已經開始改變活化的微小膠質細胞型態，但是在統計上沒有顯著差異。柱狀圖均以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示。

*:compared with control ; p**:<0.01, Student's t-test。本實驗重複三次。



接下來我們觀察給藥 24 小時是否會影響活化的微小膠質細胞型態的改變，發現給予 0.3 μM honokiol 與 ST-24 皆可以減少 LPS 誘導微小膠質細胞活化時所產生的偽足。



(續前頁)

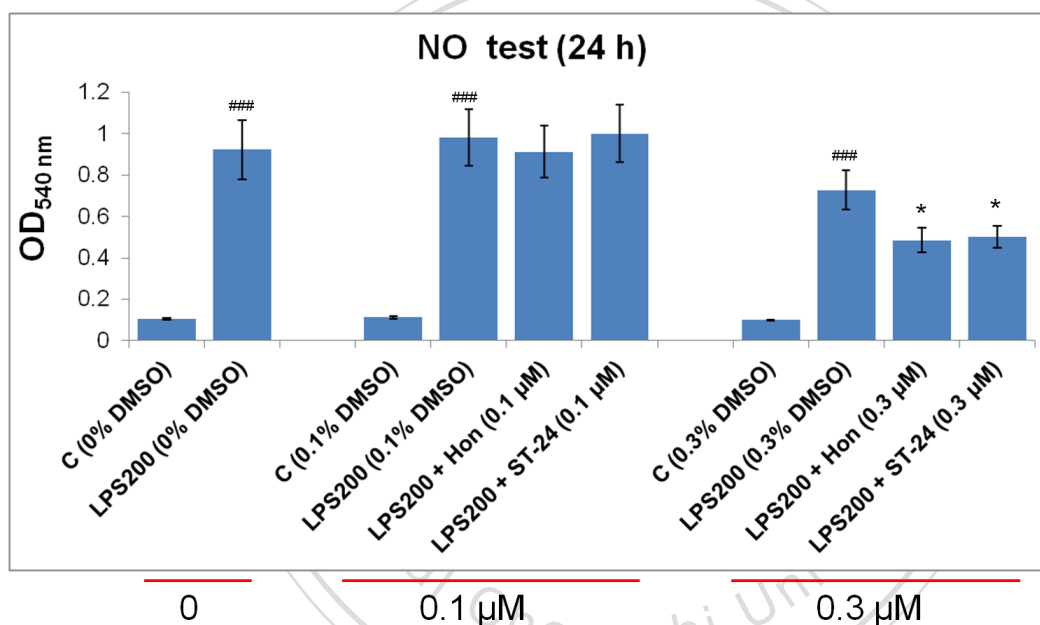
圖九、The effects of biphenolic compounds on the morphology of microglial cells stimulated by LPS for 24 hours.

圖 A 為 control (0.3% DMSO)，圖 B 為給予 LPS，圖 C 為給予 LPS + 0.3 μ M honokiol，圖 D 為給予 LPS+0.3 μ M ST-24，圖 E 為偽足量化統計圖。依據相片統計結果顯示 LPS + 0.3 μ M honokiol、LPS + 0.3 μ M ST-24，給予藥物 24 小時可以減少活化微小膠質細胞所產生的偽足型態，而且在統計上有顯著差異。柱狀圖均以 mean \pm SEM 表示。
#:compared with control;p^{##}:<0.01 ; *:compared with LPS 200;p^{***}:<0.001, Student's t-test。本實驗重複三次。



四、雙酚類化合物對內毒素引起微小膠質細胞發炎反應之影響

首先我們用吉爾任試劑測試雙酚類藥物對微小膠質細胞活化所產生的 NO 是否有影響，細胞數條件為了配合西方墨點法每個 well 使用 2×10^6 /mL \times 0.5 mL 種在 24 孔盤。實驗結果顯示在給予濃度 0.3 μ M 的 honokiol 與 ST-24 下，可以減緩微小膠質細胞所產生的 NO。而因為藥物是以 DMSO 為溶劑，所以我們以相同濃度的 DMSO 加在 LPS 及 control 組。



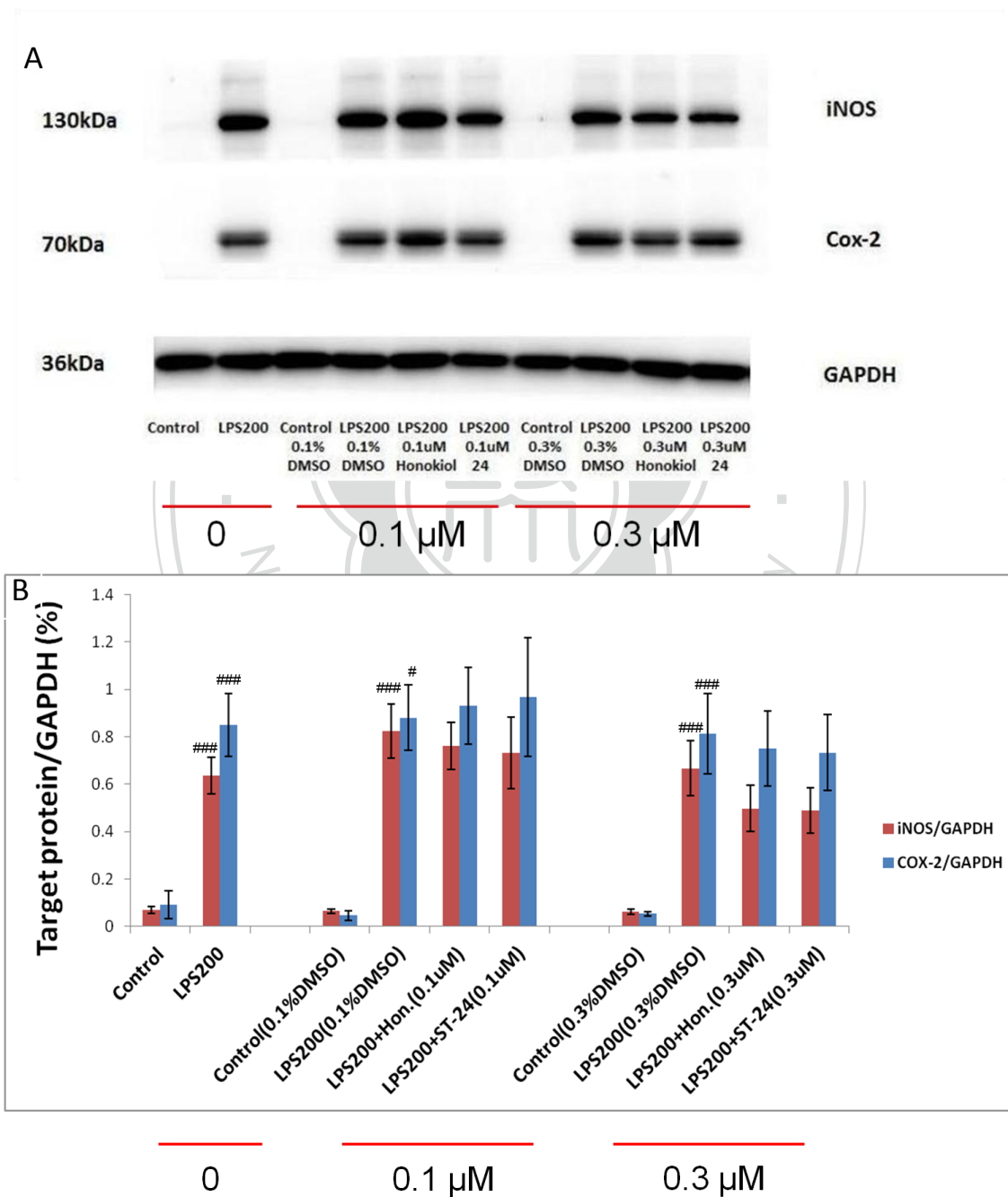
圖十、The effects of biphenolic compounds on NO generation from microglial cells stimulated by LPS.

實驗使用 0.1 與 0.3 兩個濃度觀察藥物對微小膠質細胞活化所產生 NO 的影響。結果顯示在 0.3 μ M 濃度下，honokiol 與 ST-24 可以減緩 LPS 誘導微小膠質細胞活化所產生的 NO。柱狀圖均以 mean \pm SEM 表示。#:compared with respective control; p###:<0.001 ; *:compared with LPS200; p*:<0.05, Student's t-test。本實驗重複五次，

每次 $n=4$ 。



之後我們使用西方墨點法觀察產生 NO 的 iNOS 與促發炎因子 COX-2 蛋白質表現量，發現在給予 0.3 μM 的和厚朴酚與 ST-24 對 iNOS 蛋白質表現有減少，與抑制 NO 的反應結果一致，但是在定量上統計無顯著差異。而促發炎因子 COX-2 的蛋白質表現量在 0.3 μM 藥物濃度下也有減少的效果，但是在定量上統計無顯著差異。



(續前頁)

圖 十一、The effects of biphenolic compounds on LPS-stimulated iNOS and COX-2 protein expression in microglial cells.

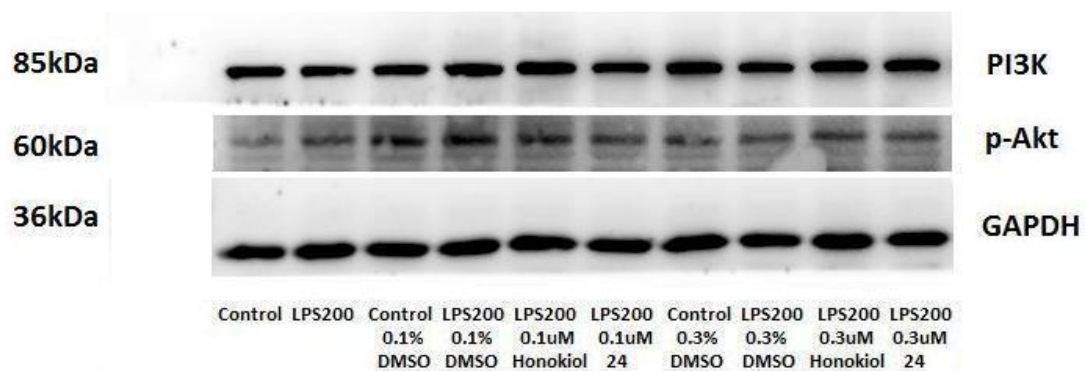
實驗使用 0.1 與 0.3 兩個濃度觀察藥物對微小膠質細胞活化所產生 iNOS 與 COX-2 蛋白質表現的影響。A 圖為西方墨點法結果顯示在 0.3 μ M 濃度下, honokiol 與 ST-24 可以減緩 LPS 誘導微小膠質細胞活化所產生的 iNOS 及 COX-2。B 圖為定量統計圖, 柱狀圖均以 mean \pm SEM 表示。#:compared with control;p####:<0.001 ; ;本實驗重複四次。

五、雙酚類化合物抑制內毒素引起微小膠質細胞活化反應之分子機制

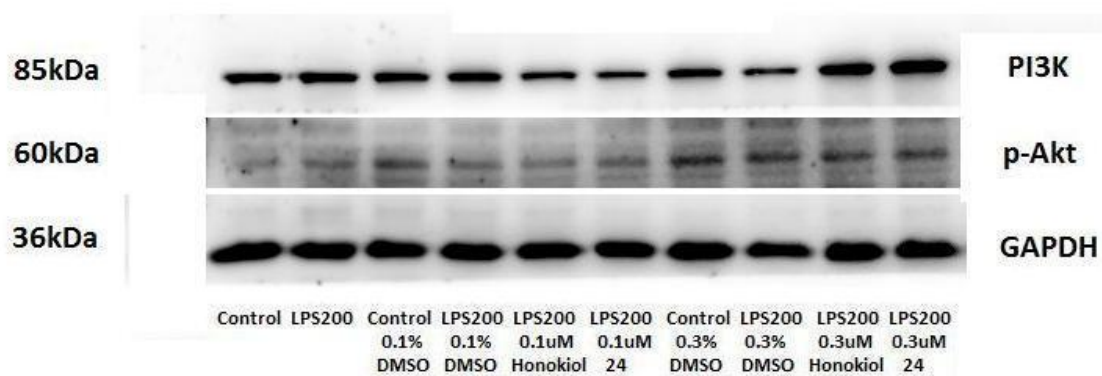
為了瞭解和厚朴酚與 ST-24 如何調控 LPS 所誘發微小膠質細胞活化 iNOS 蛋白質的表現, 我們參考過去的文獻, 調控 iNOS 蛋白其中一個分子機制為 PI3K/Akt, 所以我們使用西方墨點法來看和厚朴酚與 ST-24 是否透過 PI3K/Akt 途徑來調控 iNOS 蛋白質表現。實驗結果顯示給予 LPS 一小時刺激微小膠質細胞會讓 PI3K 蛋白質減少, 而給予和厚朴酚與 ST-24 二小時則會回復 PI3K 蛋白質的表現量, 但是在定量上統計無顯著差異。而磷酸化的 Akt 則沒有看到回復的效果。

A

1 hour treatment



2 hours treatment



(續前頁)

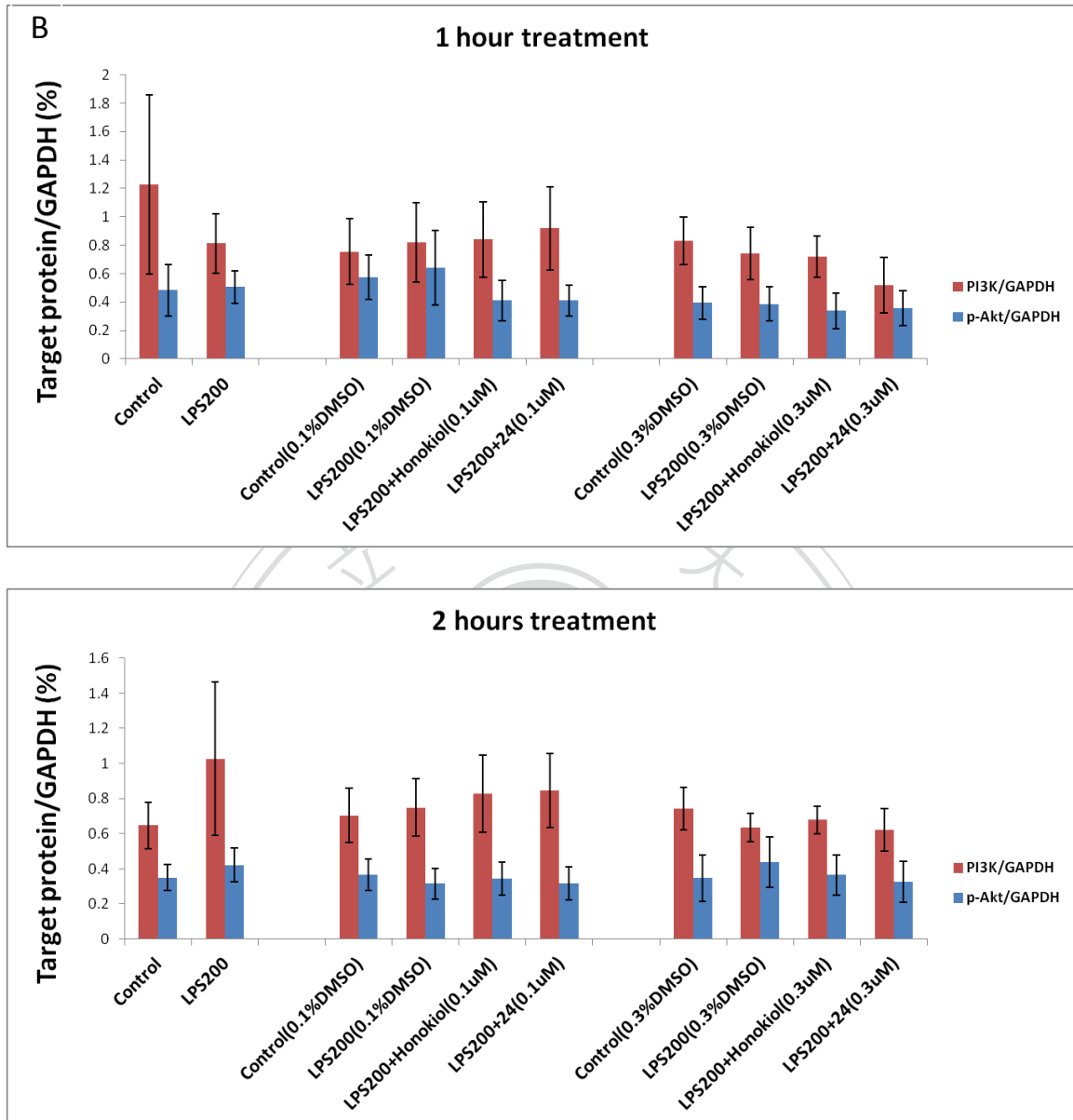


圖 十二、Effect of biphenolic compounds on PI3K protein expression in

LPS-stimulated microglial cells.

實驗使用 0.1 與 0.3 兩個濃度觀察藥物在不同時間點對微小膠質細胞活化所產生

PI3K 與 p-Akt 蛋白質表現的影響。A 圖為西方墨點法，結果顯示在 0.3 μ M 濃度給藥

2 小時情況下，honokiol 與 ST-24 可以回復 LPS 誘導微小膠質細胞活化所減少的

PI3K。B 圖為定量統計圖，柱狀圖均以 mean \pm SEM 表示。本實驗重複三次。

第五章 討論

本論文主要探討和厚朴酚與 ST-24 是否能減緩 LPS 刺激微小膠質細胞活化及所產生的氧化和發炎因子。顯示 ST-24 與和厚朴酚在利用 SM826 微小膠質細胞株下實驗時，同樣具有抗氧化及抗發炎功能可以降低 iNOS 及 COX-2 蛋白質的表現，且可以降低微小膠質細胞活化所產生的偽足。在本論文的實驗中無法證實 ST-24 與和厚朴酚抗氧化及抗發炎能力的優劣，而且尚未以動物實驗或臨床實驗證實 ST-24 藥物與和厚朴酚一樣可以順利通過血腦屏障進入腦中抑制腦部的發炎作用，仍需做更深層的實驗才能證實並應用於臨床治療上。但是在化學結構方面，由於 ST-24 比和厚朴酚具有更穩定的結構，可作為未來藥物開發之研究方向。以下列出幾點針對實驗結果、過去文獻、實驗改善及未來展望綜合討論。

一、微小膠質細胞株 SM826 的確認及其對不同 LPS 濃度的反應

在我們的 MTT 實驗中 LPS 在 200 ng/mL 時對微小膠質細胞的生存能力有影響，我們推測是過度活化的結果。LPS 造成細胞凋亡已經被過去的文獻所報導，原因是 LPS 誘發微小膠質細胞活化產生過量的一氧化氮扮演著自分泌細胞毒性調控者的角色 (Lee, Lee et al. 2001)。而在其他使用同樣細胞株的研究文獻中，LPS 的濃度是使用 10 ng/mL 誘發微小膠質細胞株 SM826 活化(卓, 2010)，但是因為實驗設計的關係並沒有使用更高的濃度也沒有 MTT 分析的數據呈現。而在我們的實驗中亦證明了 LPS 在 10 ng/mL 的確可以使刺激微小膠質細胞活化使一氧化氮的產量增加，但由於我們的實驗是要探討 LPS 與藥物共同給予微小膠質細胞所造成的影響並尋求藥物的有效濃度。所以我們根據 MTT 與吉爾任試劑的實驗結果，發現在同時給予 LPS 200

ng/mL 及 0.3 μ M 和厚朴酚及 ST-24 可以減緩 SM826 細胞株的活化。而雖然我們認定 SM826 細胞株是微小膠質細胞，因為給予 LPS 會大量表現誘導型一氧化氮合成酶蛋白質，所以具有微小膠質細胞的特性。但我們並沒有使用微小膠質細胞專一性的標誌，例如:CD11b、Iba-1 來處理 SM826，如果有這方面的實驗資料，將使得本篇論文更加嚴謹。

二、微小膠質細胞的活化與發炎反應

在 LPS 刺激微小膠質細胞活化的模型中，有促發炎因子和發炎因子可以被觀察到。在我們的實驗中是觀察 iNOS 與 COX-2 蛋白質的表現量。環氧合酶 (COX) 是主要負責將花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 轉化為前列腺素 (prostaglandin, PG) H₂，這是主要的不同的前列腺素的前趨物，在特別是前列腺素 E₂。COX 有三種不同的亞型:COX-1, -2, -3。COX-1，在許多組織中，如腎臟和胃皆會表現。經由 COX-1 所製造的前列腺素具有組織保護作用與維持正常生理性功能。COX-2，是由前發炎介質、內毒素等誘導而表現，且可以在發炎區域生成大量的前列腺素 (Smith, Garavito et al. 1996)。

三、細胞型態上偽足的界定及藥物的作用

在本實驗中使用人為的觀察界定有偽足的細胞數並不精準，F-actin (肌動蛋白微絲) 與細胞的骨架有密切相關。Phalloidin 可以用來專門染 F-actin。我們可以藉由定量 F-actin 的多寡來判別雙酚類藥物是否有減緩微小膠質細胞活化所產生的偽足。而在其他的研究中指出 LPS 可以使 BV-2 小鼠微小膠質細胞株活化製造大量的一氧化氮，但也引發 BV-2 微小膠質細胞明顯聚集為群落 (楊, 2005)，這與我們初步的觀察相吻合，

所以我們才會將 SM826 微小膠質細胞株在顯微鏡下放大 1000X 觀察型態。

四、PI3K/Akt 在細胞訊號上所扮演的角色

PI3K 在細胞訊息傳遞與細胞的生存和調節許多生長因子，例如血小板生長因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、內皮生長因子 (epidermal growth factor, EGF)、胰島素和類胰島素生長因子 I (insulin and insulin-like growth factor I, IGF-I)。扮演調節運送葡萄糖藉由胰島素誘發細胞表面的 GLUT (glucose transporter)。在以果蠅以及老鼠為模型研究延緩老化的實驗中，發現卡路里節制可以調控類胰島素生長因子訊號傳導和增加抗氧化壓力達到延緩老化的效果。在動物實驗中餵食果蠅天然多酚化合物兒茶素及花青素可以調控胰島素分泌的訊號以及抗氧化的效果。在我們的實驗中，給予 LPS 及藥物是在無血清的培養基環境中，讓細胞處於飢餓的狀態，所以和厚朴酚及 ST-24 有可能是調節細胞使用糖類為能量來源的方式，達到抗氧化的功能。

細胞的生存訊號主要分為兩大路徑：phosphoinositide-3-kinase (PI3K)/AKT pathway 與 ERK1-2 pathway，其中 PI3K/AKT pathway 同時抑制計畫性細胞凋亡之指標物質 caspases 的活化，並同時拮抗粒線體通透化的產生 (Stiles 2009)，PI3K/AKT pathway 主要透過細胞受到神經滋養物質 (neurotrophin) 的刺激而活化 (Wymann and Marone 2005)，神經滋養物質同樣藉由與細胞膜上的受器結合，接受器於細胞內的一端接受到訊號後則進行自我磷酸化 (auto-phosphorylation)，爾後吸引 PI3K 前來，將磷酸化之訊號傳下去，活化 PI3K，活化後的 PI3K 將細胞膜內的磷脂質 (phosphatidylinositol)，如：phosphatidylinositol-4-phosphate (PI-4-P) 與 PI-4,5-P₂ 轉變為 PIP₃，作為第二級訊息傳遞分子 (the second messengers) (Cantley 2002)，PIP₃ 能吸引細胞質內的

AKT 移動 (translocation) 到細胞膜內側，進而將 AKT 磷酸化。AKT 是一個激酶 (kinase)，其活化來自於 ser473 與 thr308 這兩個胺基酸位置的磷酸化所調控，活化的 AKT (p-AKT) 可以促進 anti-apoptotic BCL-2 之活化，維持粒線體的完整性 (Stiles 2009)。目前的研究指出微小膠質細胞的活化，在許多神經系統疾病的致病機轉中，扮演著相當重要的角色，其中包含了多發性硬化症 (multiple sclerosis)、神經外傷 (neurotrauma)、腦部缺血 (brain ischemia)、阿茲海默症 (Alzheimer's disease)、帕金森氏症 (Parkinson disease) 等。這些疾病都與微小膠質細胞因過度活化所產生的過量 proinflammatory cytokines 及一氧化氮有關。我們的研究顯示和厚朴酚及 ST-24 藥物能夠降低微小膠質細胞的活化程度，這對於運用在保護神經細胞免於受到微小膠質細胞的過度活化而死亡，提供一個新的治療方式。

五、DMSO 的影響

DMSO 是製作紙張時所產生的副產物，本身是無色液體且具有極性。可以溶解大多數的極性與非極性小分子。和厚朴酚為脂溶性物質，不受血腦屏障限制，以 DMSO 為溶劑。在本論文的實驗使用吉爾任試劑測試 LPS 誘發微小膠質細胞活化產生 NO 的影響時，發現給予 DMSO 會影響 NO 的產量。在過去的文獻中提到 DMSO 可以扮演清除自由基(Regoli and Winston 1999)以及抗發炎(Goodnough, Allen et al. 1980)的角色。所以我們可以合理的推測，LPS 誘發 SM826 微小膠質細胞株活化所產生的 NO 也許有部分被 DMSO 所抑制。然而不管任何藥物都有其安全劑量的範圍，DMSO 的副作用是在靜脈注射高於 40% 的 DMSO 時，會造成血管內溶血，使尿液含有血紅蛋白，其原因似乎是 DMSO 滲透紅血球所引起，但是在小於 30% 的 DMSO 則可減少這種情形發生。在細胞層面上，使用 10% 的 DMSO 用來冷凍保存幹細胞(Jacob and de la Torre 2009)。本實驗使用的 DMSO 小於 1%，考量其造成細胞毒害的可能性可以降至最小。

第六章 結論

和厚朴酚與 ST-24 皆有減緩微小膠質細胞過度活化所產生型態上偽足增加的效果，且可以減少誘導型一氧化氮合成酶蛋白質、一氧化氮自由基及環氧合酶-2 蛋白質的產生。雖然我們有探討其上游可能的調控分子途徑 PI3K/Akt，但可能因為技術的問題使得結果不明確，仍有其討論的空間。



第七章 參考文獻

1. 期刊論文

Aarum, J., et al. (2003). "Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia." Proc Natl Acad Sci U S A 100(26): 15983-15988.

abd-el-Basset, E. and S. Fedoroff (1995). "Effect of bacterial wall lipopolysaccharide (LPS) on morphology, motility, and cytoskeletal organization of microglia in cultures." J Neurosci Res 41(2): 222-237.

Akira, S., et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell 124(4): 783-801.

Alexopoulou, L., et al. (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." Nature 413(6857): 732-738.

Bai, X., et al. (2003). "Honokiol, a small molecular weight natural product, inhibits angiogenesis in vitro and tumor growth in vivo." J Biol Chem 278(37): 35501-35507.

Ballard, R. A., et al. (2006). "Inhaled nitric oxide in preterm infants undergoing mechanical ventilation." N Engl J Med 355(4): 343-353.

Barron, E. S. (1954). "The role of free radicals and oxygen in reactions produced by ionizing radiations." Radiat Res 1(1): 109-124.

Battle, T. E., et al. (2005). "The natural product honokiol induces caspase-dependent apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells." Blood 106(2):

690-697.

Block, M. L., et al. (2007). "Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms." Nat Rev Neurosci 8(1): 57-69.

Bredt, D. S., et al. (1990). "Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide." Nature 347(6295): 768-770.

Cantley, L. C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway." Science 296(5573): 1655-1657.

Chen, C. M., et al. (2007). "Honokiol, a neuroprotectant against mouse cerebral ischaemia, mediated by preserving Na⁺, K⁺-ATPase activity and mitochondrial functions." Basic Clin Pharmacol Toxicol 101(2): 108-116.

Cho, H. J., et al. (1992). "Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages." J Exp Med 176(2): 599-604.

Choi, J. H., et al. (2002). "Costunolide triggers apoptosis in human leukemia U937 cells by depleting intracellular thiols." Jpn J Cancer Res 93(12): 1327-1333.

Colton, C. and D. M. Wilcock (2010). "Assessing activation states in microglia." CNS Neurol Disord Drug Targets 9(2): 174-191.

Ebert, S., et al. (2005). "Dose-dependent activation of microglial cells by Toll-like receptor agonists alone and in combination." J Neuroimmunol 159(1-2): 87-96.

el-Remessy, A. B., et al. (2005). "Oxidative stress inactivates VEGF survival signaling

in retinal endothelial cells via PI 3-kinase tyrosine nitration." J Cell Sci 118(Pt 1): 243-252.

Facchinetti, F., et al. (1999). "Lack of involvement of neuronal nitric oxide synthase in the pathogenesis of a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis." Neuroscience 90(4): 1483-1492.

Fernandez-Lizarbe, S., et al. (2009). "Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol." J Immunol 183(7): 4733-4744.

Feron, O., et al. (1996). "Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells." J Biol Chem 271(37): 22810-22814.

Florence, T. M. (1995). "The role of free radicals in disease." Aust N Z J Ophthalmol 23(1): 3-7.

Fujita, M., et al. (1973). "[Studies on the components of Magnolia obovata Thunb. 3. Occurrence of magnolol and honokiol in M. obovata and other allied plants]."

Yakugaku Zasshi 93(4): 429-434.

Goodnough, J., et al. (1980). "The effect of dimethyl sulfoxide on gray matter injury in experimental spinal cord trauma." Surg Neurol 13(4): 273-276.

Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1990). "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview." Methods Enzymol 186: 1-85.

Hanisch, U. K., et al. (2008). "Toll-like receptors: roles in neuroprotection?" Trends Neurosci 31(4): 176-182.

Hansson, G. K. and K. Edfeldt (2005). "Toll to be paid at the gateway to the vessel wall." Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 25(6): 1085-1087.

Harry, G. J., et al. (2004). "Trimethyltin-induced neurogenesis in the murine hippocampus." Neurotox Res 5(8): 623-627.

Hebert, L. E., et al. (2001). "Annual incidence of Alzheimer disease in the United States projected to the years 2000 through 2050." Alzheimer Dis Assoc Disord 15(4): 169-173.

Hellberg, C. B., et al. (1998). "Phosphatidylinositol 3-kinase is a target for protein tyrosine nitration." Biochem Biophys Res Commun 252(2): 313-317.

Hibbs, J. B., Jr., et al. (1987). "Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite." Science 235(4787): 473-476.

Inoue, M., et al. (2003). "Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life." Curr Med Chem 10(23): 2495-2505.

Ischiropoulos, H., et al. (1992). "Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide." Arch Biochem Biophys 298(2): 446-451.

Jack, C. S., et al. (2005). "TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes." J Immunol 175(7): 4320-4330.

Jacob, S. W. and J. C. de la Torre (2009). "Pharmacology of dimethyl sulfoxide in cardiac and CNS damage." Pharmacol Rep 61(2): 225-235.

Kang, J. S., et al. (2008). "Antiinflammatory activity of methanol extract isolated from stem bark of *Magnolia kobus*." Phytother Res 22(7): 883-888.

Kang, K. W., et al. (2002). "Peroxynitrite activates NF-E2-related factor 2/antioxidant response element through the pathway of phosphatidylinositol 3-kinase: the role of nitric oxide synthase in rat glutathione S-transferase A2 induction." Nitric Oxide 7(4): 244-253.

Kettenmann, H., et al. (2011). "Physiology of microglia." Physiol Rev 91(2): 461-553.

Kim, Y. S. and T. H. Joh (2006). "Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease." Exp Mol Med 38(4): 333-347.

Kong, C. W., et al. (2000). "Magnolol attenuates peroxidative damage and improves survival of rats with sepsis." Shock 13(1): 24-28.

Koppula, S., et al. (2012). "Reactive oxygen species and inhibitors of inflammatory enzymes, NADPH oxidase, and iNOS in experimental models of Parkinson's disease." Mediators Inflamm 2012: 823902.

Lee, P., et al. (2001). "NO as an autocrine mediator in the apoptosis of activated microglial cells: correlation between activation and apoptosis of microglial cells." Brain Res 892(2): 380-385.

Lee, Y. J., et al. (2011). "Therapeutic applications of compounds in the Magnolia family." Pharmacol Ther 130(2): 157-176.

Lemaitre, B., et al. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults." Cell 86(6): 973-983.

Lin, Y. R., et al. (2006). "Neuroprotective activity of honokiol and magnolol in cerebellar granule cell damage." Eur J Pharmacol 537(1-3): 64-69.

Lo, Y. C., et al. (1994). "Magnolol and honokiol isolated from Magnolia officinalis protect rat heart mitochondria against lipid peroxidation." Biochem Pharmacol 47(3): 549-553.

Lynch, M. A. (2009). "The multifaceted profile of activated microglia." Mol Neurobiol 40(2): 139-156.

Martindale, J. L. and N. J. Holbrook (2002). "Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival." J Cell Physiol 192(1): 1-15.

McGeer, P. L., et al. (2006). "Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: the last 12 years." J Alzheimers Dis 9(3 Suppl): 271-276.

Morgan, S. C., et al. (2004). "Microglia release activators of neuronal proliferation mediated by activation of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and delta-Notch signalling cascades." J Neurochem

90(1): 89-101.

Muller, J. M., et al. (1993). "Nuclear factor kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects." Immunobiology 187(3-5): 233-256.

Munroe, M. E., et al. (2007). "Honokiol, a natural plant product, inhibits inflammatory signals and alleviates inflammatory arthritis." J Immunol 179(2): 753-763.

Nathan, C. and Q. W. Xie (1994). "Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls." Cell 78(6): 915-918.

Nomiyama, T., et al. (2004). "Reduction of insulin-stimulated glucose uptake by peroxynitrite is concurrent with tyrosine nitration of insulin receptor substrate-1." Biochem Biophys Res Commun 320(3): 639-647.

Okun, E., et al. (2009). "Toll-like receptors in neurodegeneration." Brain Res Rev 59(2): 278-292.

Pacher, P., et al. (2007). "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease." Physiol Rev 87(1): 315-424.

Park, E. J., et al. (2006). "Honokiol reduces oxidative stress, c-jun-NH2-terminal kinase phosphorylation and protects against glycochenodeoxycholic acid-induced apoptosis in primary cultured rat hepatocytes." Planta Med 72(7): 661-664.

Pelicano, H., et al. (2004). "ROS stress in cancer cells and therapeutic implications." Drug Resist Updat 7(2): 97-110.

Radi, R., et al. (1994). "Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite."

Arch Biochem Biophys 308(1): 89-95.

Regoli, F. and G. W. Winston (1999). "Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxynitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals."

Toxicol Appl Pharmacol 156(2): 96-105.

Rezaie, P., et al. (2002). "Motility and ramification of human fetal microglia in culture: an investigation using time-lapse video microscopy and image analysis." Exp Cell Res

274(1): 68-82.

Sase, K. and T. Michel (1997). "Expression and regulation of endothelial nitric oxide synthase." Trends Cardiovasc Med 7(1): 28-37.

Schroeder, P., et al. (2001). "Epicatechin selectively prevents nitration but not oxidation reactions of peroxynitrite." Biochem Biophys Res Commun 285(3): 782-787.

Simmonds, R. E. and B. M. Foxwell (2008). "Signalling, inflammation and arthritis: NF-kappaB and its relevance to arthritis and inflammation." Rheumatology (Oxford)

47(5): 584-590.

Sims, J. E. and D. E. Smith (2010). "The IL-1 family: regulators of immunity." Nat Rev

Immunol 10(2): 89-102.

Smith, W. L., et al. (1996). "Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2." J Biol Chem 271(52): 33157-33160.

Spear, N., et al. (1997). "Nerve growth factor protects PC12 cells against peroxynitrite-induced apoptosis via a mechanism dependent on phosphatidylinositol 3-kinase." J Neurochem 69(1): 53-59.

Stence, N., et al. (2001). "Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices." Glia 33(3): 256-266.

Stiles, B. L. (2009). "PI-3-K and AKT: Onto the mitochondria." Adv Drug Deliv Rev 61(14): 1276-1282.

Streit, W. J. and Q. S. Xue (2009). "Life and death of microglia." J Neuroimmune Pharmacol 4(4): 371-379.

Stuehr, D. J. and C. F. Nathan (1989). "Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells." J Exp Med 169(5): 1543-1555.

Teng, C. M., et al. (1990). "EDRF-release and Ca⁺⁺-channel blockade by magnolol, an antiplatelet agent isolated from Chinese herb *Magnolia officinalis*, in rat thoracic aorta." Life Sci 47(13): 1153-1161.

Walton, N. M., et al. (2006). "Microglia instruct subventricular zone neurogenesis." Glia 54(8): 815-825.

Wang, H. J., et al. (2013). "Honokiol blocks store operated calcium entry in CHO cells expressing the M3 muscarinic receptor: honokiol and muscarinic signaling." J Biomed

Sci 20: 11.

Wang, Y., et al. (2013). "Honokiol protects rat hearts against myocardial ischemia reperfusion injury by reducing oxidative stress and inflammation." Exp Ther Med 5(1): 315-319.

Weeks, B. S. (2009). "Formulations of dietary supplements and herbal extracts for relaxation and anxiolytic action: Relarian." Med Sci Monit 15(11): RA256-262.

Wymann, M. P. and R. Marone (2005). "Phosphoinositide 3-kinase in disease: timing, location, and scaffolding." Curr Opin Cell Biol 17(2): 141-149.

Xu, Q., et al. (2008). "Antidepressant-like effects of the mixture of honokiol and magnolol from the barks of *Magnolia officinalis* in stressed rodents." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 32(3): 715-725.

Zou, M. H., et al. (2002). "Modulation by peroxynitrite of Akt- and AMP-activated kinase-dependent Ser1179 phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase." J Biol Chem 277(36): 32552-32557.

2. 書籍論文

顏正華, “中藥學(上)”, 知音出版社, 民國八十三年二月初版二刷, 320 頁。

莊朝欽。(2009)。和厚朴酚抑制巨噬細胞中細菌內毒素所誘發之細胞激素表現。國立台灣海洋大學食品科學系碩士論文。

卓俊宏。(2010)。芳香煙受體在微小膠細胞活化過程中所扮演的角色。台北醫學大學 醫學院 醫學科學研究所碩士論文。

楊雅婷。(2005)。細胞自然凋亡與發炎反應參與在脂多醣刺激腦微膠細胞移動及聚集現象。國立陽明大學解剖暨細胞生物學研究所碩士論文。

3. 網路資源

中藥知識學習網



附錄

一、

TABLE 2. Major signaling pathways shown to be influenced by peroxynitrite in vitro

Signaling Protein	Mode of Action of Peroxynitrite (Activation vs. Inhibition)	Cell Type	Reference Nos.
EGFR	A	Fibroblasts, myofibroblasts	687, 1434
EGFR	I	A431, Caco-2B cells	1301, 1316
PDGFR	A	Fibroblasts	687
TrkB	A	Fibroblasts	1427
CD95	I	Hepatocytes	1072
Src	A	RBCs, astrocytes, synaptosomes, SH-SY5Y, endothelial cells	519, 638, 760, 829, 836-838, 840, 1470
ERK	A	Fibroblasts, neutrophils, cardiomyocytes, VSMCs, endothelial, neural cells	57, 191, 638, 645, 735, 1024, 1099, 1307, 1434, 1477
JNK	A	Alveolar, endothelial, bronchial cells, cardiomyocytes, fibroblasts	23, 450, 922, 1024, 1128, 1162
p38	A	Endothelial, bronchial, neural cells, VSMCs, cardiomyocytes, hepatocytes	120, 354, 414, 450, 638, 922, 965, 1024, 1120, 1128, 1307, 1440
PKC	A	Cardiomyocytes, endothelial cells	52, 195
PKC	I	Neural cells	689
PI3K/PKB	A	Hepatocytes, fibroblasts, endothelial cells	652, 687, 1133
PI3K/PKB	I	Macrophages, adipocytes, PC12, endothelial, retinal cells	348, 536, 949, 1193, 1471
NFκB	A	Neutrophils, monocytes, L8 rat myoblasts	58, 391, 640, 674, 851, 1477
NFκB	I	Cardiomyocytes, EAHY-926, HMEC-I, SHSY-5Y, HEK293, P19 cells	749, 1006

A, activation; I, inhibition; NFκB, nuclear factor kappa B; PKC, protein kinase C; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; ERK, extracellular-regulated kinase; JNK, Janus kinase; EGFR, epidermal growth factor receptor; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; TrkB, truncated tyrosine protein kinase.

(Pacher, Beckman et al. 2007)

