

國立臺灣大學生物資源暨農學院食品科技研究所
碩士論文

Graduate Institute of Food Science and Technology
College of Bioresources and Agriculture
National Taiwan University
Master Thesis

芝麻酚與槲本內酯改善老化促進小鼠之學習記憶能力與阿
滋海默症病理特徵之潛力

Potentials to Ameliorate Learning / Memory Impairment and
Alzheimer's Disease Pathophysiology of Sesamol and
Z-Ligustilide in Senescence-accelerated Mouse Prone-8
(SAMP8) Mice

邱博恩

Po-En, Chiu

指導教授：孫璐西 博士

Advisor: Lucy Sun Hwang, Ph.D.

中華民國 100 年 06 月

June, 2011

謝誌

首先，我必須向我的父母親表達最高的敬意與感謝，由於父母親給予我一個能夠完全自我成長以及訓練自己的環境，使我擁有能夠不斷督促與檢視自己的個性，並在一路求學階段給予我數不盡無形與有形的支持，才能成就今日的我，並且完成碩士學位修業與此研究。也藉此希望你們永遠身體健康，平安喜樂。

此外，我必須感謝於麗山高中求學期間，各位數學科、生物科、物理科與化學科的各位老師給予我在科學研究上的啟蒙、指導以及身為全台第一所科學高中賦予我們豐富的研究資源、制度與環境，以奠定我在基礎科學研究的基本功。再者，我深深感謝國立中興大學食品暨應用生物科技學系賴麗旭教授曾經給我的指導與照顧，賴教授給予我一個能夠完全自由發揮與獨立思考訓練的研究環境，促使我在短短不到兩年的時間，能夠完成一個豐碩又有趣的研究結果。

在碩士學位修業期間，非常感謝我的指導教授孫璐西博士給予的指導與教誨，孫教授對於我們不論在做事的態度與方法；說話的技巧與內容；演講的竅門與掌握；做科研的想法等等，這些都在短短兩年中，讓我達到最大幅度的成長與進步，唯有孫教授的用心與指點，我才能如現在這樣的成熟與穩重。而這些不僅僅對於我們在完成學位與做研究有益，對於我們未來在職場的表現、人生的規劃，我相信都將有長遠的影響。在內在能力的提升外，孫教授更讓我擁有一個身為碩士生難得又珍貴的研究資源與視野，讓我能夠的在各種不同的領域和面向中不斷的學習，我想這是對於一個碩士學生相當珍貴的經驗和禮物。

我也要感謝國立台灣大學心理學系梁庚辰教授與本所謝淑貞教授，每當與兩位教授討論研究，我都能深深的感受到兩位教授心中那種與我們學生一樣的研究熱誠與好奇心，兩位教授總能適時的以不同的角度讓我們體會到我們研究面臨的問題並讓我們看到更清晰的方向。

本研究更受到各個領域資深研究學者的幫助與支持，首先，必須鄭重感謝靜宜大學食品營養學系，現任元培科技大學校長王銘富教授，無私的提供我們老化促進小鼠。我也相當感謝梁庚辰教授，熱心提供我們飼養動物的良好環境，更給予我們在動物飼養、行為實驗、數據分析等方面細心又專業的指導。接著為給予我們許多關鍵又重要建議的何其儻教授與魏國晉教授，唯有兩位教授給與我們在芝麻酚配製飼料程序的建議，以及何其儻教授熱情提供實驗材料，我們才能順利完成實驗；林志城教授、林山陽教授則熱情教導我們在飼料造粒與打錠製程上的調整，以及財團法人藥技中心大方提供我們人力與設備，也是幫助我們完成研究的一大幫手。國立台灣大學獸醫學系郭宗甫教授、國立中興大學廖俊旺教授、國立陽明大學腦科學研究所鄭菡若教授、本所謝淑貞教授更在百忙之中給予我們在組織免疫染色、開腦與取腦技巧、老化促進小鼠相關研究上的各種珍貴建議與幫助，我們才能完成許多我們原本無法完成的事情。


在短短兩年的研究期間，我還必須鄭重感謝何承璋博士、簡永亮博士與洪偉倫學長，在動物行為實驗研究期間，你們每天為研究犧牲睡眠，在寒冷又漆黑的清晨就陪伴我一起在心理系動物房進行實驗，我永遠都不會忘記你們的熱情與那段經驗難得的回憶。此外，我也要感謝呂玟蓓博士、簡永亮博士與洪偉倫學長在動物飼養、動物犧牲、各種檢體和樣品處理、樣品分析的教學與指導，乃至於各種實驗的小技巧，由於你們無私、有耐心、專業又帶親和力的教學，我才能在短短兩年的研究期間不斷精進實驗技巧。

我也必須感謝靜宜大學食品營養學系的陳英如學姊、汪志文學長、在老化促進小

鼠育養與動物行為實驗的教學，都是給予我在接觸動物實驗與認知行為實驗重要的入門；以及國立台灣大學心理學系劉姿蘭學姊、田欣華學姊在動物行為實驗的指導與平時給我的鼓勵，因為你們的熱情與笑容，才融化我一開始面對長期動物行為實驗的壓力與恐懼。也要感謝元培科技大學生物科技系的朱豐穗學弟與施宜廷學姊在飼料造粒與打錠製程的大力幫助；國立中興大學獸醫病理所吳昭慧學姊、楊珊盈學姊以及張淑菁學姊熱情的教導我組織免疫染色方法以及病理切片等等；國立陽明大學腦科學研究所張文瀚同學和我們熱情的交換意見和研究心得；國立台灣大學毒理所林師儀學姊在組織免疫染色的掃描定量教學。

另外，我也要感謝本研究室文安學姊、怡卉學姊、怡君學姊與凱元學長，雖然只有短短一年的相處，但你們給我的幫助、支持和鼓勵卻是讓我堅持不斷走下去的動力之一；以及好同學們家慧、依潔和孟穎，感謝你們在忙碌的實驗生活，還給予我的實驗許多幫忙和建議，更重要的是平時聊天打鬧，更是在實驗後疲累中充電的好夥伴；還有可愛的瑋珊、耀云和逸婷學妹，你們三個為 218 帶來新的色彩和氣息，也要謝謝你們平時給予我的許多幫助和鼓勵，還有最重要的敏瑄和釧如，你們是我們能夠完成研究最重要的後勤補給。

最後，我想感謝我的好友們，宏昇、韋廷、育瑩、明論、女儀、雅方、維君時常聽我發泄我的負面情緒和分享複雜又難解的研究心得。虞積凱博士更在這三年來也給予我許多鼓勵、支持與照顧。以及我的女友若琳，容我自私的跑到台灣大學尋求不一樣的自我與截然不同的學習環境，縱使相隔兩百公里的距離，若琳仍然不斷給予我支持及鼓勵。再次鄭重的感謝大家，謹以此微不足道的成果與你們分享。



邱博恩 謹誌於
國立台灣大學食品科技研究所
中華民國一百年六月

摘要

阿滋海默症(Alzheimer's disease)是失智症所有類型中最廣泛發生的一型，是一種會導致認知能力下降以及情緒與行為產生改變的神經退化性疾病。阿滋海默症的主要病理特徵主要包含細胞外的類澱粉胜肽沉積以及細胞內的 Tau 蛋白過磷酸化產生神經糾結而進一步造成記憶喪失。老化促進小鼠(Senescence-accelerated mouse prone-8, SAMP8)模式是一種以年齡為發展基礎而非基因轉殖的動物模式。就阿滋海默症的類型而言，SAMP8 小鼠更加貼近以年齡為危險因子的晚發型阿滋海默症。此外，SAMP8 小鼠也會隨著老化產生認知能力下降以及類澱粉胜肽的沉積。因此，本研究的目的是藉由在飲食中添加芝麻酚或藜本內酯以探討其對於 SAMP8 小鼠是否具有延緩學習與記憶能力損傷以及降低阿滋海默症病理特徵之潛力。本研究藉由餵食老化促進小鼠十二週芝麻酚與藜本內酯，並發現其對於鞏固 SAMP8 小鼠之恐懼記憶有顯著的效果，並且也能夠促進空間的學習記憶能力。進一步使用酵素連結免疫分析法，餵食藜本內酯與芝麻酚具有使類澱粉胜肽下降的趨勢，而在組織免疫染色中也可以看到類似的結果。以肝臟過氧化產物分析 SAMP8 小鼠的氧化壓力，也發現餵食藜本內酯與芝麻酚有下降氧化壓力的趨勢。進行認知行為時間結果、類澱粉胜肽含量、氧化壓力進行交叉比較，可進一步發現認知行為的損傷與類澱粉胜肽並沒有顯著的高度相關性；氧化壓力與類澱粉胜肽也無顯著相關性。由本研究可推測類澱粉胜肽與氧化壓力在 SAMP8 小鼠模式中，並非是造成認知能力損傷的主要原因。

關鍵字：阿滋海默症、老化促進小鼠、SAMP8 小鼠、學習記憶能力損傷、薑黃素、藜本內酯、芝麻酚、莫氏水迷津、被動迴避試驗

Abstracts

Alzheimer's disease is the most common form of dementia. It is a neurodegenerative disorder characterized by impairment in cognitive functions and changing in mood and behavior. The hallmarks of this disease are the presence of extracellular beta-amyloid deposition and intracellular hyperphosphorylated tau protein. Senescence-accelerated mouse prone-8 (SAMP8) is an age-accelerated mice model rather than gene-mutated mice model. In addition, SAMP8 mice also show the cognitive impairment and beta amyloid deposition. The objectives of this study were to investigate the potentials of sesamol and Z-ligustilide to ameliorate learning / memory impairment and Alzheimer's disease pathophysiology in SAMP8 mice. Our results demonstrated that a 12-week oral administration of Z-ligustilide or sesamol could consolidate the fear-conditioning memory of SAMP8 mice and also slightly improved the spatial learning and memory. Using immunohistochemical (IHC) staining for certain brain sections of mice, we found that there was a decreasing trend in the deposition of beta amyloid after administration of sesamol and Z-ligustilide. Using ELISA to detect beta amyloid, the results were similar to IHC staining; however the treatment groups were not significantly different from the control group. To evaluate the oxidative stress status of the mice, liver TBARS were determined. We found that treatment groups had lower TBARS level. To correlate the results of behavior tests, beta amyloid content, and oxidative stress status, we concluded that there was neither strong correlation between cognitive impairment and beta amyloid, nor oxidative stress and beta amyloid. These results suggested that beta amyloid and oxidative stress may not be the crucial factors to influence cognitive ability in SAMP8 mice.

Keywords: Alzheimer's disease, senescence-accelerated mouse prone-8 (SAMP8) mice, learning and memory impairment, curcumin, Z-ligustilide, sesamol, Morris water maze, inhibitory avoidance task

縮寫表

| Abreviation | Full name | 中文 |
|--------------|--|---------------|
| ACH | Air change per hour | 換氣速率 |
| AICD | Amyloid intracellular domain | 類澱粉次單元 |
| ALT | Alanine transaminase | 丙胺酸轉胺酶 |
| APP | Amyloid Precursor Protein | 類澱粉前驅蛋白 |
| AST | Aspartate transaminase | 天門冬胺酸轉胺酶 |
| AUC | Area under the curve | 曲線下面積 |
| A β | β -amyloid peptide | 類澱粉胜肽 |
| BBB | Blood brain barrier | 血腦障壁 |
| BUN | Blood urea nitrogen | 尿素氮 |
| C | Control | 控制組 |
| C max | Maximum concentration of drug in the blood | 最高血中藥物濃度 |
| CAT | Catalase | 過氧化氫酶 |
| Cdk5 | Cyclin dependent kinase 5 | 細胞週期依賴性蛋白激酶-5 |
| CR | Creatinine | 肌苷酸 |
| Cur | Curcumin | 薑黃素 |
| DAB | Diaminobenzidine peroxidase substrate | 基氨基偶氮苯 |
| GPx | Glutathione peroxidase | 麩胱甘肽過氧化酶 |
| GRd | Glutathione reductase | 麩胱甘肽還原酶 |
| GSH | Glutathione | 麩胱甘肽 |
| GSK3 β | Glycogen synthase kinase-3 beta | 肝醣合成激酶 3beta |
| GST | Glutathione S-transferase | 麩胱甘肽硫基轉移酶 |
| H&E staining | Hematoxylin & Eosin staining | 常規染色 |
| HL | High dose of Z-ligustilide | 高劑量橐本內酯 |
| HS | High dose of sesamol | 高劑量芝麻酚 |
| IA | Inhibitory avoidance | 被動迴避 |
| IHC staining | Immunohistochemical staining | 組織免疫染色 |
| IVC | Individual Ventilated Cage | 獨立進氣系統 |
| LD 50 | Lethal dose 50% | 半致死劑量 |
| LL | Low dose of Z-ligustilide | 低劑量橐本內酯 |
| LS | Low dose of sesamol | 低劑量芝麻酚 |
| LTD | Long term depression | 長期抑制現象 |
| LTP | Long term potentiation | 長期增益現象 |
| MDA | Malondialdehyde | 丙二醛 |
| MuLV | Murine leukemia virus | 鼠類白血病毒 |
| MWM | Morris water maze | 莫氏水迷津 |
| NFTs | Neurofibrillary tangles | 神經纖維絲糾結 |
| NMDA | N-methyl-D-aspartate | N-甲基-D 天門冬胺酸 |
| NSAIDs | Non-steroid Anti-inflammtory drugs | 非類固醇抗發炎藥物 |
| OF | Open field test | 活動量測試 |
| PS | Presenilin | 老化素 |
| RNS | Reactive nitrogen species | 活性氮物質 |

| | | |
|------------------|---|----------------|
| ROS | Reactive oxygen species | 活性氧物質 |
| SAM | Senescence-accelerate mice | 老化促進小鼠 |
| SAMP8 mice | Senescence-accelerated mouse prone-8 mice | 老化促進小鼠 |
| SAMR mice | Senescence-accelerated resistance mice | 抗快速老化小鼠 |
| SOD | Superoxide dismutase | 超氧歧化酶 |
| SPF | Specific pathogen free | 無特定病原菌 |
| T _{1/2} | Half time | 半衰期 |
| T max | The needed time to achieve C max | 達到 C max 所需之時間 |
| TC | Total cholesterol | 總膽固醇 |
| TG | Total triglycerides | 總三酸甘油酯 |
| Y | Young | 五月齡年輕小鼠 |



目錄

| | |
|--|------|
| 謝誌..... | I |
| 摘要..... | III |
| Abstracts..... | IV |
| 縮寫表..... | V |
| 目錄..... | VII |
| 表目錄..... | XI |
| 圖目錄..... | XIII |
| 壹、前言..... | 1 |
| 貳、文獻整理..... | 2 |
| 一、失智症與阿滋海默症..... | 2 |
| 二、阿滋海默症之藥物開發現況..... | 10 |
| 三、研究阿滋海默症之動物模式發展現況與簡介..... | 11 |
| (一)、空間導向學習試驗(Spatial navigation tests)..... | 19 |
| 1. 莫氏水迷津(Morris water maze, MWM)..... | 19 |
| 2. 八臂迷宮(Eight-arm radial arm maze)..... | 20 |
| 3. 巴恩氏迷宮(Barnes maze)..... | 21 |
| (二)、線索與環境制約試驗(Cued/contextual learning tests)..... | 21 |
| 被動迴避(Passive inhibitory avoidance test, IA)與主動迴避(Active avoidance test)..... | 21 |
| 五、老化促進小鼠..... | 22 |
| (一)、老化促進小鼠的發展與現況..... | 22 |
| (二)、SAMP8 小鼠之行為模式表現..... | 25 |
| (三)、SAMP8 小鼠之腦部類澱粉胍肽沉積..... | 27 |
| (四)、SAMP8 小鼠腦部之過磷酸化 tau 蛋白沉積..... | 28 |
| (六)、SAMP8 小鼠與基因轉殖小鼠的比較分析..... | 31 |
| 六、實驗樣品..... | 34 |
| (一)、薑黃素..... | 34 |
| (二)、芝麻酚..... | 35 |
| (三)、藜本內酯..... | 36 |
| 參、研究目的與實驗架構..... | 38 |
| 肆、材料與方法..... | 40 |
| 一、實驗材料..... | 40 |
| (一)、薑黃素 C3 與胡椒鹼複合物 (Curcumin C3 complex + Bioperine)..... | 40 |
| (二)、芝麻酚 (sesamol)..... | 40 |
| (三)、藜本內酯 (Z-ligustilide)..... | 40 |
| (四)、AIN-93M diet..... | 40 |
| (五)、Purina 5001 rodent chow diet..... | 40 |
| 二、化學試劑與儀器設備..... | 40 |
| (一)、化學藥品..... | 40 |
| (二)、酵素套組..... | 42 |
| (三)、一般實驗用儀器設備..... | 43 |

| | |
|---|----|
| (四)、動物飼養相關設備與行為實驗儀器與軟體..... | 43 |
| (五)、組織切片觀察與定量儀器與軟體..... | 44 |
| 三、實驗動物、飼料配製與飼養條件與環境豐富度..... | 44 |
| (一)、實驗動物..... | 44 |
| (二)、飼料配製、動物飼養環境與組別設定..... | 44 |
| (三)、飼料造粒與打錠..... | 47 |
| 1.樣品配置與飼料粉造粒程序..... | 47 |
| 2.打錠程序..... | 47 |
| 四、動物認知行為實驗..... | 47 |
| (一)、活動量測試 (Open Field Activity Test, OF) 與試驗分組..... | 47 |
| 1.儀器..... | 47 |
| 2.測定程序..... | 48 |
| 3.試驗分組..... | 48 |
| 4.試驗測定時間..... | 48 |
| (二)、被動迴避試驗(Inhibitory Avoidance Task, IA)..... | 48 |
| 1.儀器與環境設定..... | 48 |
| 3. 試驗程序..... | 48 |
| (三)、水迷津試驗(Morris Water Maze, MWM)..... | 49 |
| 1.儀器與環境設定..... | 49 |
| 2.訓練程序..... | 49 |
| 五、SAMP8 小鼠組織病理分析與外觀老化指數判定..... | 50 |
| 六、動物犧牲與組織檢體收集..... | 51 |
| (一)、犧牲程序..... | 51 |
| (二)、血清分離程序..... | 51 |
| (三)、肝臟均質液處理..... | 51 |
| 七、血清生化數值分析..... | 52 |
| 八、抗氧化酵素表現分析..... | 52 |
| (一)、麩胱甘肽過氧化酶 Glutathione peroxidase (GPx)..... | 52 |
| (二)、Glutathione reductase (GRd)..... | 52 |
| (三)、Glutathione S-transferase (GST)..... | 53 |
| (四)、超氧歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)..... | 53 |
| (五)、Catalase (CAT)..... | 53 |
| (六)、麩胱甘肽(Glutathione, GSH)..... | 53 |
| (七)、肝臟脂質過氧化物 TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances)測定..... | 53 |
| 九、腦部類澱粉胜肽之免疫組織化學染色分析..... | 54 |
| 染色步驟..... | 54 |
| (一)、免疫組織化學染色前處理..... | 54 |
| (二)、切片脫蠟與回水處理..... | 54 |
| (三)、回復組織形態處理..... | 54 |
| (四)、阻斷內生性過氧化氫酶處理..... | 55 |
| (五)、阻斷非特异性蛋白結合..... | 55 |
| (六)、一級抗體..... | 55 |
| (七)、二級抗體..... | 55 |
| (八)、Vectastain ABC reagent 作用..... | 55 |
| (九)、Diaminobenzidine peroxidase substrate (DAB)呈色..... | 55 |
| (十)、脫水處理與封片..... | 56 |
| (十一)類澱粉胜肽定量分析..... | 56 |
| 十、使用酵素連結免疫分析法(Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay, ELISA)偵測老化促進 小鼠腦部類澱粉胜肽(beta amyloid _{1-40/1-42})之定量分析..... | 56 |
| (一)、樣品前處理..... | 56 |

| | |
|---|-----|
| (二)、酵素連結免疫分析法..... | 57 |
| 十一、統計分析 | 57 |
| 伍、結果與討論 | 59 |
| 一、個別餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠基本生理狀況的影響..... | 59 |
| (一)、薑黃素、芝麻酚與槲本內酯對 SAMP8 小鼠攝食量的影響..... | 59 |
| (二)、個別餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠體重的影響 | 61 |
| 二、個別餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠之存活率與其他併發症影響 | 64 |
| 三、SAMP8 小鼠長期飼養後的外觀老化指數分析與飼養期間因老化死亡的病理分析..... | 69 |
| 個別 | 74 |
| 四、 餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠之學習與記憶能力之影響..... | 74 |
| (一)、個別餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠活動量之影響 | 74 |
| (二)、個別餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠之空間記憶能力之影響 | 85 |
| (三)、個別餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對老化促進小鼠之恐懼記憶之影響..... | 97 |
| 五、個別餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠其臟器重量的影響 | 104 |
| 六、個別餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠之血清生化值的影響..... | 107 |
| 七、個別餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠其腦中類澱粉胍肽之影響 | 110 |
| 八、個別餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠肝臟抗氧化酵素系統與脂質過氧化產物之影響..... | 118 |
| 九、綜合討論..... | 129 |
| 陸、結論 (Conclusion) | 131 |
| 柒、參考文獻(Reference) | 132 |
| 捌、附錄..... | 147 |
| 附錄一、本論文正式實驗結果補充資料..... | 147 |
| 附錄二、預實驗結果..... | 165 |
| 一、實驗目的 | 165 |
| 二、實驗設計 | 165 |
| 三、活動量測試..... | 166 |
| 四、體重變化與攝食量 | 167 |
| 五、被動迴避試驗 | 168 |
| 六、水迷津試驗 | 169 |
| 七、血清生化數值分析 | 171 |
| 八、腦部類澱粉胍肽之組織免疫染色 | 172 |
| 九、預實驗結論 | 172 |
| 附錄三、AIN93M 飼料打錠結果 | 173 |
| 附錄四、芝麻酚於 AIN-93M 飼料打錠後之含量測定與 SAMP8 小鼠經長期餵食後其腦部樣品含量測定分析結果..... | 174 |
| <萃取方法>..... | 174 |
| <分析方法>..... | 174 |
| 附錄五、使用本研究建立之組織免疫染色法針對約七月齡 J20、B6 小鼠以及 SAMR1 小鼠腦部染色結果..... | 176 |
| 附錄六、使用 6E10, A11 與 LOC 抗體針對十月齡 SAMP8 小鼠腦部切片染色比較 | 180 |
| 附錄七、使用 6E10 抗體針對十月齡 SAMP8 小鼠腦部切片染色 beta amyloid cluster 形態圖 | 181 |

| | |
|---|-----|
| 附錄八、SAMP8 小鼠於實驗期間意外死亡後之病理分析..... | 182 |
| 附錄九、本研究中 SAMP8 小鼠由出生後到犧牲食用之飼料組成比較表 | 185 |
| 附錄十、本研究針對 SAMP8 小鼠腦部組織切片 Thioflavine-S 染色方法..... | 188 |
| 附錄十一、本研究中使用動物飼養與行為設定儀器照片..... | 189 |
| 附錄十二、使用 H&E 染色針對 SAMP8 小鼠腦部海馬迴區之組織形態觀察 | 190 |
| 附錄十三、本研究中各項實驗的相關性分析 | 191 |
| 附錄十四、距離窗門-2.25 mm~-2.54 mm 與-1.55~-1.58 mm 位置腦區中，海馬迴區 CA1, CA2, CA3, Dentate，以及 Entorhinal cortex, Piriform cortex 部位的類澱粉胍肽沉積數目 | 201 |
| | 201 |
| 附錄十五、動物實驗申請審查同意書..... | 204 |
| 附錄十六、學位口試各委員之提問與答覆..... | 205 |



表目錄

| | |
|--|-----|
| 表一、研究阿滋海默症之動物模式所需之邏輯標準 | 11 |
| 表二、各種動物品種與品系作為阿滋海默症動物模式的標準評估 | 12 |
| 表三、各種不同基因背景應用於阿滋海默症動物模式的基因轉殖小鼠 | 15 |
| 表四、以類澱粉胜肽與 tau 蛋白過度表現基因交互建立的基因轉殖小鼠模式 | 15 |
| 表五、應用於失智症藥物開發的齧齒類動物模式 | 17 |
| 表六、對於阿滋海默症動物模式針對記憶能力失調的動物行為實驗 | 18 |
| 表七、日本老化促進小鼠研究協議會對目前老化促進小鼠各亞系的分類與病徵 | 24 |
| 表八、目前以老化促進小鼠模式評估不同物質改善其學習與記憶能力之功效性試驗 | 26 |
| 表九、不同應用於阿滋海默症動物模式在各種指標上的效度評分 | 32 |
| 表十、各種不同阿滋海默症動物模式在各種病徵的發病期示意圖 | 32 |
| 表十一、基因轉殖小鼠與 SAMP8 小鼠於阿滋海默症動物模式上應用之優劣分析 | 33 |
| 表十二、薑黃素、芝麻酚與槲本內酯的生物可利用率分析 | 36 |
| 表十三、AIN-93M 飼料之基本成分組成與樣品劑量比例 | 46 |
| 表十四、個別餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對於 SAMP8 小鼠攝食量的影響 | 60 |
| 表十五、個別餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對於 SAMP8 小鼠體重的影響 | 62 |
| 表十六、個別餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚實驗期間各組 SAMP8 小鼠存活率 | 66 |
| 表十七、實驗期間死亡之 SAMP8 小鼠的病理分析 | 67 |
| 表十八(A)、五月齡 SAMP8 小鼠於活動量測試中各項參數表現。 | 77 |
| 表十九、各組六月齡 SAMP8 小鼠於餵食三個月後對於其於活動量趨勢整體分析 | 84 |
| 表二十、被動迴避試驗以 Kruskal-Wallis ANOVA by rankings 分析組間之差異 | 101 |
| 表二十一、被動迴避試驗以 Mann-Whitney U test by variable treatment 分析兩兩處理 間差異 | 101 |
| 表二十二、針對各處理組間的亮室滯留時間不同程度的卡方分析 | 103 |
| 表二十三、個別餵食基礎飼料、薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠臟器 重量的影響 | 105 |
| 表二十四、個別餵食基礎飼料、薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠臟器 相對重量的影響 | 106 |
| 表二十五、餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 SAMP8 小鼠 15 週對其血清生化值的影響 | 109 |
| 表二十六、各組別 SAMP8 小鼠肝臟中 SOD, GRd, CAT, GPx, GST 活性與 GSH, TBARS 含量 | 128 |
| 表二十七、餵食銀杏萃取物 SRM3247 對 SAMP8 小鼠之活動量影響 | 166 |
| 表二十八、餵食銀杏萃取物 SRM3247 對 SAMP8 小鼠之活動量影響(續) | 166 |
| 表二十九、餵食銀杏萃取物 SRM3247 對 SAMP8 小鼠體重的影響 | 167 |
| 表三十、餵食銀杏萃取物 SRM3247 對 SAMP8 小鼠攝食量的影響 | 167 |
| 表三十一、餵食銀杏萃取物 SRM3247 對 SAMP8 小鼠臟器重量的影響 | 171 |
| 表三十二、餵食銀杏萃取物 SRM3247 對 SAMP8 小鼠血清生化指標之影響 | 171 |
| 表三十三、AIN-93M 飼料之基本成分組成 | 185 |

表三十四、Lab Diet 5001 飼料之基本成分組成 186
表三十五、福壽牌飼料之基本成分組成 187



圖目錄

| | |
|---|----|
| 圖一、類澱粉胛肽的胺基酸序列以及由類澱粉前驅蛋白形成類澱粉胛肽的過程..... | 4 |
| 圖二、Tau 蛋白的過磷酸化過程造成微小管結構降解的過程與神經絲糾結的形成... | 7 |
| 圖三、Tau 蛋白與類澱粉胛肽之間交互作用的三種假說與阿滋海默症 Tau 蛋白的進程 使突觸細胞易受到類澱粉胛肽的毒性傷害..... | 7 |
| 圖四、阿滋海默症突觸失調機制的示意圖..... | 8 |
| 圖五、阿滋海默症中氧化壓力上升與粒線體功能喪失的示意圖..... | 8 |
| 圖六、類澱粉胛肽與發炎反應的關係..... | 9 |
| 圖七、目前阿滋海默症用藥與劑量..... | 10 |
| 圖八、老化促進小鼠各品系的發展分支圖..... | 24 |
| 圖九、SAMP8 小鼠腦部各種不同胺基酸位置 tau 蛋白沉積的狀況..... | 28 |
| 圖十、(A)SAMP8 小鼠的阿滋海默症病徵產生過程示意圖..... | 29 |
| 圖十一、餵食 Tg2576 小鼠薑黃素與四氫薑黃素對於其腦部類澱粉胛肽的組織免疫染 色分析與定量..... | 35 |
| 圖十二、本研究實驗樣品之化學結構式 (A).薑黃素、(B).槲本內酯、(C)芝麻酚..... | 37 |
| 圖十三、實驗架構..... | 39 |
| 圖十四、個別餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚適應預養期到正式實驗 15 週 SAMP8 小鼠的體重變化。..... | 63 |
| 圖十五、個別餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚實驗期間各組 SAMP8 小鼠存活率曲線 | 66 |
| 圖十六、SAMP8 小鼠外觀判定標準之照片與分數..... | 70 |
| 圖十七、SAMP8 小鼠外觀判定標準之照片與分數(續)..... | 71 |
| 圖十八、SAMP8 小鼠外觀老化指數。..... | 72 |
| 圖十九、五月齡 SAMP8 小鼠活動量的表現。(A)移動總距離；(B)站立時間；(C)站立 次數；(D)在中央停留的時間；(E)糞便顆數。..... | 78 |
| 圖二十、各組六月齡 SAMP8 小鼠於餵食三個月後其活動量測試 移動總距離 的表現 | 79 |
| 圖二十一、各組六月齡 SAMP8 小鼠於餵食三個月後其活動量測試 站立次數 的表現 | 80 |
| 圖二十二、各組六月齡 SAMP8 小鼠於餵食三個月後其活動量測試 站立時間 的表現 | 81 |
| 圖二十三、各組六月齡 SAMP8 小鼠於餵食三個月後其活動量測試於 測試區域中央所 停留的時間 | 82 |
| 圖二十四、各組六月齡 SAMP8 小鼠於餵食三個月後其活動量測試中的 糞便顆粒數 | 83 |
| 圖二十五、SAMP8 小鼠在水迷津測試中的脫離時間的表現(隱沒平台試驗)..... | 90 |
| 圖二十六、SAMP8 小鼠在水迷津測試中之學習趨勢(隱沒平台試驗)..... | 91 |
| 圖二十七、SAMP8 小鼠在水迷津測試中的短期記憶狀況(隱沒平台試驗)..... | 92 |
| 圖二十八、SAMP8 小鼠在水迷津測試中的長期記憶狀況(隱沒平台試驗)..... | 93 |
| 圖二十九、SAMP8 小鼠在水迷津測試中的表現(象限偏好測試)..... | 94 |
| 圖三十、SAMP8 小鼠在水迷津測試之游泳總距離變化趨勢(隱沒平台試驗)..... | 95 |
| 圖三十一、SAMP8 小鼠在水迷津測試中游泳速度的表現..... | 96 |
| 圖三十二、SAMP8 小鼠在被動迴避試驗中被電擊的次數..... | 99 |

| | |
|--|-----|
| 圖三十三、SAMP8 小鼠在被動迴避試驗中在亮室所停留的時間..... | 100 |
| 圖三十四、人類類澱粉胜肽與齧齒類動物類澱粉胜肽胺基酸位置差異替換比較圖 | 111 |
| 圖三十五、本研究做組織免疫染色的 SAMP8 小鼠腦部切片位置示意圖與不同位置腦 部切片之各腦區分布。..... | 113 |
| 圖三十六、餵食基礎飼料、薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠腦部距 吻門-2.25 到-2.54 mm 位置之類澱粉胜肽沉積佔半腦區面積之比例影響..... | 114 |
| 圖三十七、餵食基礎飼料、薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠半腦中 皮質與海馬迴區之類澱粉胜肽 1-40 片段之含量影響..... | 115 |
| 圖三十八、餵食基礎飼料、薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠半腦中 皮質與海馬迴區之類澱粉胜肽 1-42 片段之含量影響..... | 116 |
| 圖三十九、餵食基礎飼料、薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠半腦中 皮質與海馬迴區之類澱粉胜肽 1-42 / 1-40 片段比例之含量影響..... | 117 |
| 圖四十、餵食基礎飼料、薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠超氧歧化 酶活性之影響..... | 121 |
| 圖四十一、餵食基礎飼料、薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠 glutathione peroxidase (GPx)活性之影響..... | 122 |
| 圖四十二、餵食基礎飼料、薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠 Glutathione reductase (GRd)活性之影響..... | 123 |
| 圖四十三、餵食基礎飼料、薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠 catalase (CAT)活性之影響..... | 124 |
| 圖四十四、餵食基礎飼料、薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠 glutathione S-transferase (GST)活性之影響..... | 125 |
| 圖四十五、餵食基礎飼料、薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠 Glutathione 含量之影響..... | 126 |
| 圖四十六、餵食基礎飼料、薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠肝臟 TBARS 含量之影響..... | 127 |
| 圖四十七、各種造成 SAMP8 小鼠認知能力下降之可能路徑示意圖..... | 130 |
| 圖四十八、SAMP8 小鼠在水迷津測試中的脫離時間的表現(隱沒平台試驗)..... | 147 |
| 圖四十九、SAMP8 小鼠在水迷津測試中的長期記憶狀況..... | 148 |
| 圖五十、SAMP8 小鼠在水迷津測試中象限偏好測試中的表現..... | 149 |
| 圖五十一、SAMP8 小鼠在水迷津測試中象限偏好測試中的表現..... | 150 |
| 圖五十二、SAMP8 小鼠在水迷津測試中游泳總距離表現..... | 151 |
| 圖五十三、各組別於水迷津試驗中象限偏好試驗之游泳軌跡。..... | 154 |
| 圖五十四、被動迴避試驗中，SAMP8 小鼠在電擊後 24 小時的滯留亮室表現分數 | 155 |
| 圖五十五、被動迴避試驗中，SAMP8 小鼠在電擊後 48 小時的滯留亮室表現分數 | 156 |
| 圖五十六、被動迴避試驗中，SAMP8 小鼠在電擊 72 小時的滯留亮室表現分數.... | 157 |
| 圖五十七、被動迴避試驗中，老化促進小鼠在電擊後 120 小時的滯留亮室表現分數 | 158 |
| 圖五十八、被動迴避試驗中，SAMP8 小鼠在電擊後 168 小時的滯留亮室表現分數 | 159 |
| 圖五十九、餵食基礎飼料、薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠腦部距 吻門-1.55 到-1.58 mm 位置之類澱粉胜肽沉積佔半腦區面積之比例影響..... | 160 |
| 圖六十、餵食基礎飼料、薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠腦部距吻 | |

| | |
|--|-----|
| 門 0.245 到 0.62 mm 位置之類澱粉胜肽沉積佔半腦區面積之比例影響..... | 161 |
| 圖六十一、餵食基礎飼料、薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠腦部距 窗門-1.55 到-1.58 mm 位置之類澱粉胜肽沉積團簇數目影響 | 162 |
| 圖六十二、餵食基礎飼料、薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠腦部距 窗門-2.25 到-2.54 mm 位置之類澱粉胜肽沉積團簇數目影響 | 163 |
| 圖六十三、餵食基礎飼料、薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠腦部距 窗門 0.245 到 0.62 mm 位置之類澱粉胜肽沉積團簇數目影響..... | 164 |
| 圖六十四、預實驗設計 | 165 |
| 圖六十五、餵食 SAMP8 小鼠銀杏萃取物 SRM 3247 三個月的體重變化 | 168 |
| 圖六十六、餵食 SAMP8 小鼠銀杏萃取物 SRM 3247 三個月後的被動迴避表現 | 168 |
| 圖六十七、餵食 SAMP8 小鼠銀杏萃取物 SRM 3247 三個月後的水迷津空間記憶表現 | 169 |
| 圖六十八、脫離時間趨勢分析 | 170 |
| 圖六十九、餵食 SAMP8 小鼠銀杏萃取物 SRM 3247 三個月後在水迷津試驗中象限偏 好測試的表現 | 170 |
| 圖七十、餵食 SAMP8 小鼠銀杏萃取物 SRM 3247 三個月後在水迷津試驗中象限偏好 測試的表現 | 170 |
| 圖七十一、完成打錠後之 AIN-93M 飼料。 | 173 |
| 圖七十二、(A) 添加兩倍量 sesamol 打錠後之芝麻酚含量測定。 | 175 |
| 圖七十三、使用 6E10 抗體針對約七月齡 J20 小鼠腦部切片染色結果..... | 176 |
| 圖七十四、使用 6E10 抗體針對約七月齡 B6 小鼠腦部切片染色結果..... | 177 |
| 圖七十五、使用 6E10 抗體針對九月齡 SAMR1 小鼠腦部切片染色結果 | 178 |
| 圖七十六、使用 6E10 抗體針對九月齡 SAMR1 小鼠腦部切片染色結果(局部放大圖) | 179 |
| 圖七十七、使用 6E10, A11 與 LOC 抗體針對十月齡 SAMP8 小鼠腦部切片染色比較 | 180 |
| 圖七十八、使用 6E10 抗體針對十月齡 SAMP8 小鼠腦部切片染色 beta amyloid cluster 形態..... | 181 |
| 圖七十九、死亡之 SAMP8 小鼠器官照片。 | 182 |
| 圖八十、針對死亡之 SAMP8 小鼠進行病理分析。 | 183 |
| 圖八十一、針對死亡的 SAMP8 小鼠進行病理分析。 | 184 |
| 圖八十二、本研究中使用動物飼養與行為設定儀器照片。 | 189 |
| 圖八十三、SAMP8 小鼠腦部海馬迴區組織形態觀察..... | 190 |
| 圖八十四、SAMP8 小鼠腦部類澱粉胜肽沉積面積與各項實驗之相關性分析..... | 192 |
| 圖八十五、SAMP8 小鼠腦部類澱粉胜肽沉積面積/以 ELISA 偵測類澱粉胜肽 ₁₋₄₀ 片段 與各項實驗之相關性分析 | 192 |
| 圖八十六、SAMP8 小鼠腦部以 ELISA 偵測類澱粉胜肽 ₁₋₄₀ 片段與各項實驗之相關性分 析 | 193 |
| 圖八十七、SAMP8 小鼠腦部以 ELISA 偵測類澱粉胜肽 ₁₋₄₂ 片段與各項實驗之相關性分 析 | 194 |
| 圖八十八、SAMP8 小鼠腦部以 ELISA 偵測類澱粉胜肽 ₁₋₄₂ 片段與各項實驗之相關性分 析(續)..... | 195 |
| 圖八十九、SAMP8 小鼠腦部以 ELISA 偵測類澱粉胜肽 _{1-42/1-40} 片段比例與各項實驗之 相關性分析 | 196 |

| | |
|--|-----|
| 圖九十、SAMP8 小鼠腦部以 ELISA 偵測類澱粉胜肽 1-42 / 1-40 片段比例與各項實驗之相關性分析(續)..... | 197 |
| 圖九十一、本研究中各項動物行為實驗結果之相關性分析 | 198 |
| 圖九十二、SAMP8 小鼠腦部類澱粉胜肽團簇數目與各項行為實驗之相關性分析.. | 199 |
| 圖九十三、SAMP8 小鼠腦部類澱粉胜肽團簇數目與各項行為實驗之相關性分析(續) | 200 |
| 圖九十四、海馬迴區 CA1, CA2, CA3, entorhinal cortex 與 piriform cortex 的區域示意圖 | 201 |
| 圖九十五、距離穹門-1.55 mm~ -1.58mm 位置腦區中，海馬迴區 CA1, CA2, CA3, Dentate, 以及 Entorhinal cortex, Piriform cortex 部位的類澱粉胜肽沉積數目 (n=57) | 202 |
| 圖九十六、距離穹門-2.25 mm~ -2.54 mm 位置腦區中，海馬迴區 CA1, CA2, CA3, Dentate, 以及 Entorhinal cortex, Piriform cortex 部位的類澱粉胜肽沉積數目(續) (n=57)..... | 203 |



壹、前言

根據世界衛生組織以及台灣失智症協會的統計，失智症的發生率與罹患人口隨著人口高齡化趨勢而隨之上升。目前，台灣約有十七萬名失智症人口。除了少數歐美先進國家外，人口正在爆炸性成長的印度、中國以及我們所在的台灣，都極度缺乏針對失智症患者長期照護的保障與措施。台灣立法院於民國一百年五月方才通過長期照顧服務法草案，雖然法規已將失能、失智與精神障礙等納入照顧對象，但卻未針對對於失智症患者較好的社區式照顧模式提供明確的方案與準則，法規內容反而偏向針對患者的集中化處理以及醫療體系照顧的方向。顯然，已屬已開發國家以及擁有成熟健康保險制度的台灣，對於失智症患者長期照顧的發展仍有很長一段路要走。

另一方面，針對失智症中最廣泛的一型-阿滋海默症的藥物開發，目前僅開發出能夠延緩疾病病程的藥物，能夠根治阿滋海默症的藥物尚未開發出。此外，目前對於阿滋海默症的確實成因與機制尚不了解，因此，如何預防阿滋海默症更顯示出其重要性。本研究將基於前人對於藁本內酯與芝麻酚在生物體內反應與生物活性之相關研究上，進一步在食物中添加藁本內酯與芝麻酚，並藉由以年齡為發展基礎的老化促進小鼠動物模式，以探討其是否能夠對於老化促進小鼠(SAMP8 小鼠)產生延緩認知能力下降與預防晚發型阿滋海默症發生之潛力。從食品做疾病預防的角度，來評估樣品在晚發型阿滋海默症預防上的可行性。

貳、文獻整理

一、失智症與阿滋海默症

根據世界衛生組織(WHO)統計，目前全世界罹患失智症人口已經超過三千五百萬人，光是美國，就超過五百五十萬名患者，約有六成患者來自中低收入國家，世衛組織推測未來二十年內，東亞與南亞國家的患者將增加一倍以上。此外，人口數早已超越十億的印度與中國，不僅人口老化趨勢明顯，更缺乏針對失智症的公共衛生政策，顯然失智症對於未來人類社會的衝擊將越來越明顯。在台灣，根據台灣失智症協會統計，台灣失智症社區盛行率在 65 到 69 歲為 1.2%、70 到 74 歲為 2.2%、75 到 79 歲為 4.3%、80 到 84 歲為 8.4%、85 到 89 歲為 16.3%、90 歲以上則為 30.9%。在民國九十八年年底，以失智症社區盛行率計算，並加上長期照顧機構中的失智症病患，台灣總失智人口估計超過 17 萬人(台灣失智症協會官方網站)。

失智症的並非指單一的疾病發生，而是指各種不同症狀的產生，這些症狀包含記憶能力衰減、包括語言、空間、計算、邏輯判斷、抽象思維、專注力等認知功能的退化，並且可能伴隨行為與個性的改變以及妄想和幻覺的產生，而進一步影響維持日常生活能力、人際關係與工作能力。美國精神學會診斷及統計手冊第四版(DSM-IV)明確定義失智症為因疾病造成在認知能力的多重性損傷，以記憶力缺損為主要，並伴隨失語症(Aphasia)、失用症(Apraxia)、失認症(Agnosia)、執行功能障礙(Disturbance in executive functioning)四種障礙中至少一項以上。

失智症可為三大類型，一為退化型失智症如阿滋海默症(Alzheimer's disease)、額顳葉型失智症(Frontotemporal lobe dementia)、路易氏體失智症(Dementia with Lewy Bodies)與亨廷頓氏症(Huntington's disease)進一步造成的失智症；二為血管型失智症，此多為因腦中風或腦血管病變，導致腦部血液循環不正常，使腦部神經細胞死亡而造成的智力減退。三則為長期缺乏維生素 B12 與葉酸、水腦症、腦部腫瘤、腦部創傷、甲狀腺機能低下、中樞神經系統受到病毒感染、藥物或酒精中毒等特定原因造成(Querfurth and LaFerla, 2010)。

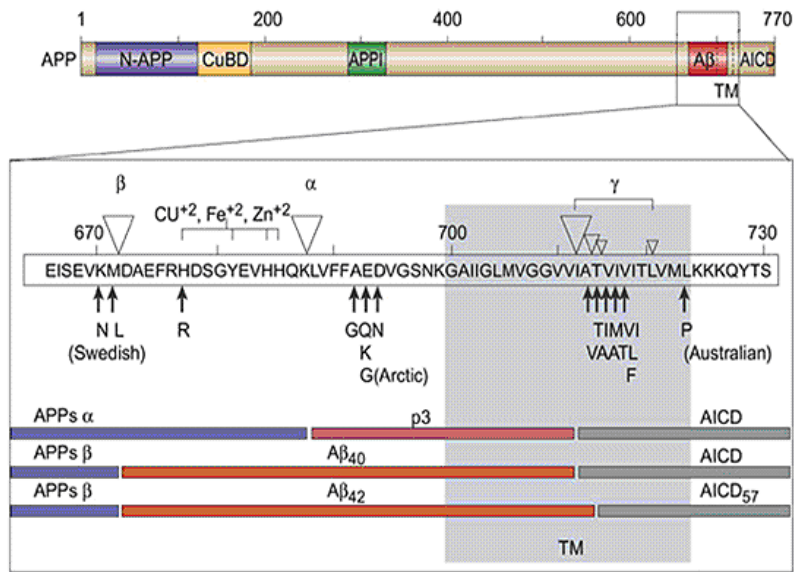
失智症中大約有 50 到 56%的失智症病患為阿滋海默症，因此，阿滋海默症是目前了解的失智症中最廣泛的一種，阿滋海默症最早是由德國 Alois Alzheimer 醫師在 1906 年所診斷出，阿滋海默症早期在外在行為最主要的病徵就是記憶的喪失，而經

由電腦斷層與核磁共振可觀察到患者大腦的萎縮情形，藉由病理切片可發現異常的老化斑塊沉積與神經纖維糾結。一般來說，阿滋海默症患者從被確定診斷出罹患阿茲海默症到死亡，僅需三到九年不等時間。藉由解剖等臨床鑑定，約有 13 到 17% 的病患也同時患有腦血管病變(Intracerebral vascular disease)，由於，年齡是阿滋海默症病患最重要的危險因子，因此阿滋海默症患者本身在神經系統上的退化，再加上腦血管疾病的風險，其有可能是造成阿滋海默症患者情況惡化以及導致死亡的原因之一。巨觀上，阿滋海默症患者腦部的顳葉與額葉都有明顯的萎縮，而從患者的行為來看，可以觀察到患者在語言、情緒都會有明顯的改變，日常生活中的基本習慣開始需要他人協助，阿滋海默症患者甚至會遺忘親友、迷路、無法使用基本對話用字且伴隨嚴重的短期記憶喪失症狀。微觀上，阿滋海默症的主要病理特徵包括大腦中充滿類澱粉胜肽(β -amyloid peptide, A β)、新皮質區 terminal field 的神經軸突營養不良以及內側顳葉產生大量的神經纖維絲糾結(Neurofibrillary tangles, NFTs)。這些不正常的蛋白質累積，進一步造成神經細胞死亡、發炎、氧化壓力上升促使大腦細胞中粒線體與突觸不正常化以及易使患者產生在大腦白質區的嗜剛果紅血管症(Congophilic angiopathy)，從而造成某些特定腦區功能的喪失與退化。

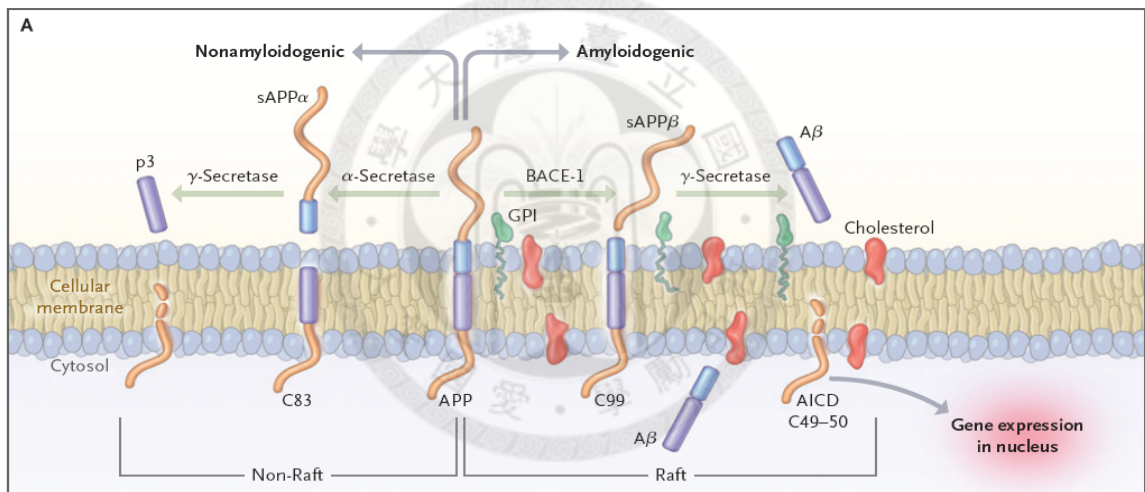
導致阿滋海默症各大病理特徵的病理機轉假說大致可分為三大方向：一為蛋白質不正常化的表現。二為突觸功能喪失與神經滋養因子的缺乏。三為粒腺體的不正常化進而造成氧化壓力上升、引起發炎反應、胰島素訊息傳遞路徑改變、鈣離子調控失衡與膽固醇代謝不正常等(Querfurth and LaFerla, 2010)。

從蛋白質不正常化表現層面來說，主要又可分為兩大類型，一為類澱粉胜肽的累積，二為神經纖維糾結的產生。

類澱粉胜肽的來源為細胞上的一個貫膜蛋白，類澱粉先驅蛋白(Amyloid Precursor Protein, APP)在一連串非正確的酵素切割後而形成，類澱粉胜肽主要是由 36 個到 43 個胺基酸所組成(圖一 A)，由這些胜肽片段被切割後被釋放出細胞外，逐漸由單體類澱粉胜肽累積為寡體，再進一步累積為纖維絲(Fibril)與斑塊(Plaque) (圖一 B)，當其體積在細胞間質造成神經細胞間訊息傳遞與營養吸收的阻礙時，使大腦形成記憶與學習的過程無法順利完成，進而導致記憶的喪失而產生我們了解的阿滋海默症。



(A)



(B)

圖一、類澱粉胜肽的胺基酸序列以及由類澱粉前驅蛋白形成類澱粉胜肽的過程
 Figure 1. (A)The amino acid sequence of beta-amyloid peptide and (B) the processing of amyloid precursor protein. (Figure 1(A) is from Dr. David R. Brown's website at university of Bath)

類澱粉先驅蛋白(Amyloid Precursor Protein, APP)是一貫膜蛋白，在正常程序下，經由 alpha-secretase 切割產生一個胞外的大片段的胜肽鏈(sAPP α)，胞內則產生含有 83 個殘基的梭基片段(C83)，而 C83 會被 gamma-secretase 消化作用，並進一步產生胞外的 p3 片段一個胞內的類澱粉次單元(Amyloid intracellular domain, AICD)。在阿滋海默症患者腦部中，上述 APP 經由一系列酵素切割的程序會不正常化，APP 轉而由 beta-secretase 切割而產生一個較短的胜肽鏈，在此稱為 sAPP β ，在胞內則產生 C99 片段。C99 為 gamma-secretase 的受質，經過其進一步作用後，則產生 beta-amyloid 與 AICD (Querfurth and LaFerla., 2010)。

阿滋海默症的另一病徵為 tau 蛋白的過磷酸化，此現象主要發生於細胞內的細胞骨架上，維持細胞功能的微小管(Microtubule)上有 tau 蛋白以維持其穩定與緊密性。tau 蛋白正常的磷酸化主要是針對 Serine 以及 Threonine 的殘基作用。但當 GSK-3 β , cdk5, 次單元 p25 或是 MAPK 表現時會造成 Proline 的磷酸化作用。當這些激酶過度表現，會促使 tau 蛋白與微小管分離，並且開始聚集為成對的螺旋形結構(paired helical structure)，而微小管的穩定性也會隨之下降，進一步導致細胞骨架崩解，產生軸突傳輸功能喪失(圖二)。Ittner and Gotz (2010)更提出類澱粉胜肽與 tau 蛋白過磷酸化互相關交互作用，進一步造成細胞毒性的假設(圖三)。由圖三可之，其假說認為 tau 蛋白過磷酸化從 Axon 開始發生，類澱粉胜肽則在樹狀突(dendrite)細胞間質外不斷造成細胞毒性，最後進一步造成樹狀突的 tau 蛋白過磷酸化也開始發生。

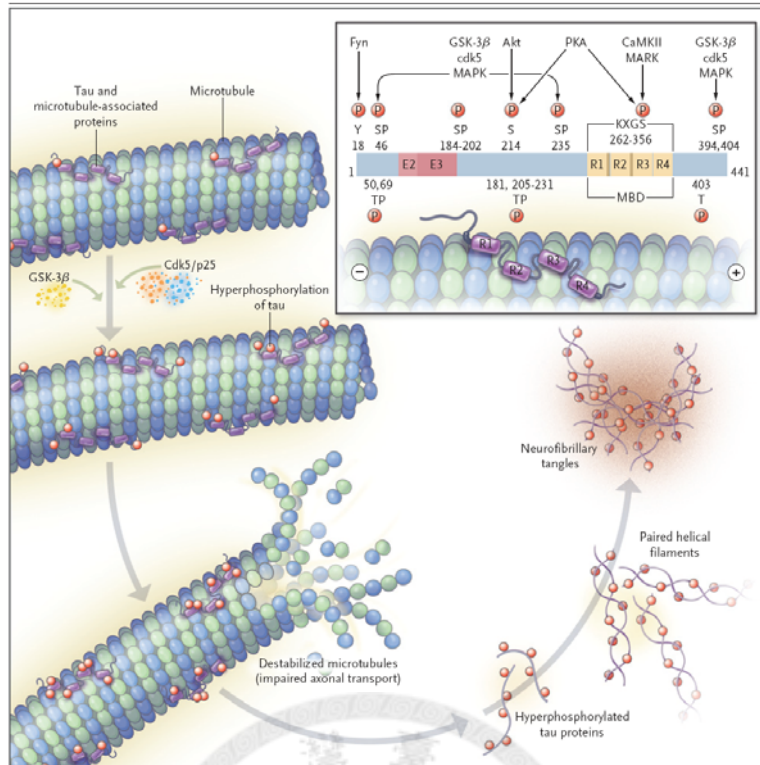
另一個阿滋海默症的假說機制為突觸功能失調(Synaptic Dysfunction)，是目前與阿滋海默症患者的認知能力缺陷最具高度相關性的一項指標。類澱粉胜肽會使突觸 plasticity 功能失調，並干擾神經傳導過程的長期增益現象(long-term potentiation, LTP)以及短期增益現象(long-term depression, LTD)階段。此外，類澱粉胜肽亦會促使 N-甲基-D-天門冬氨酸鹽(N-methyl-D-aspartate, NMDAr)受器以及 alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid 受器增加胞飲作用(endocytosis)以及造成乙醯膽鹼(nicotinic acetylcholine, Ach)受器訊號傳輸的阻礙(圖四)。一般來說，許多研究認為阿滋海默症主要是由於突觸功能失調(Synaptic failure)所開始引起的，隨著疾病的進程，突觸的數目與神經元相比，會不成比例的下降，此狀況多發生於海馬迴的齒狀迴區域(Querfurth and LaFerla, 2010)。

另一方面，也有研究指出，類澱粉胜肽屬於一種潛在的活性氧(Reactive oxygen

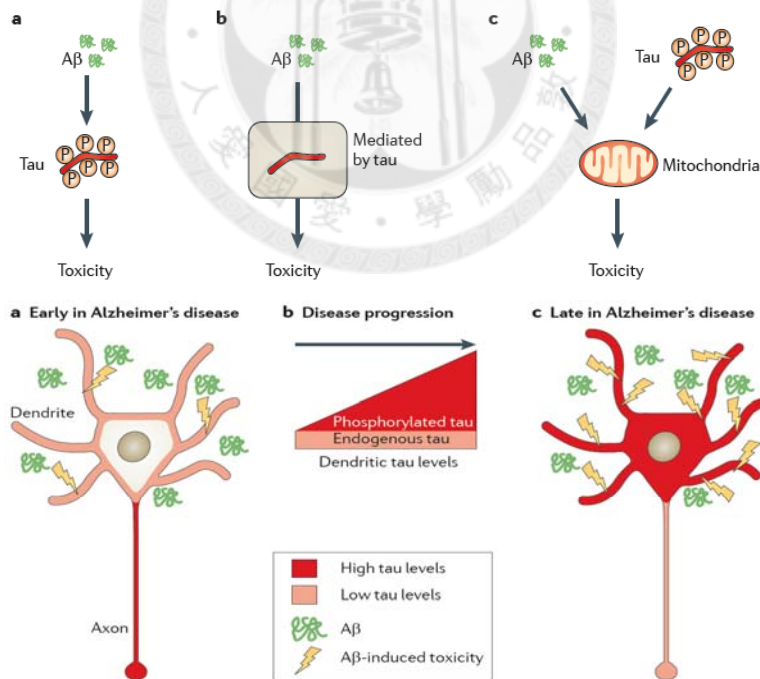
species, ROS)以及活性氮物質(Reactive nitrogen species, RNS)生成者，而其促氧化的效果，會針對神經細胞、微膠細胞以及腦血管細胞不斷作用。這會使粒腺體不斷生成過氧化氫到細胞質中，並進一步與金屬離子催化的羥基(hydroxyl group)自由基產生反應。這些氧化作用會造成細胞膜上脂質產生具有毒性的醛類，並且提升細胞膜對於鈣離子的通透性、葡萄糖運輸的不平衡現象。此外，也會間接造成細胞質中的二價金屬離子濃度提升，如鐵、銅、鋅離子等，而進一步促使 tau 蛋白的聚集與糾結(圖五)。

除了氧化壓力，發炎反應也有許多研究提出其對於阿滋海默症的影響。由於類澱粉蛋白主要是在細胞間質的累積，在腦部，微膠細胞與星狀細胞會被類澱粉蛋白刺激，其進一步開始針對類澱粉蛋白進行清除作用。在這個過程中，會分泌出許多促發炎的細胞激素與反應物，而造成發炎反應。這些發炎反應有可能進一步造成神經元的改變(neuritic changes)以及血腦障壁(Blood brain barrier, BBB)的損傷(圖六)。

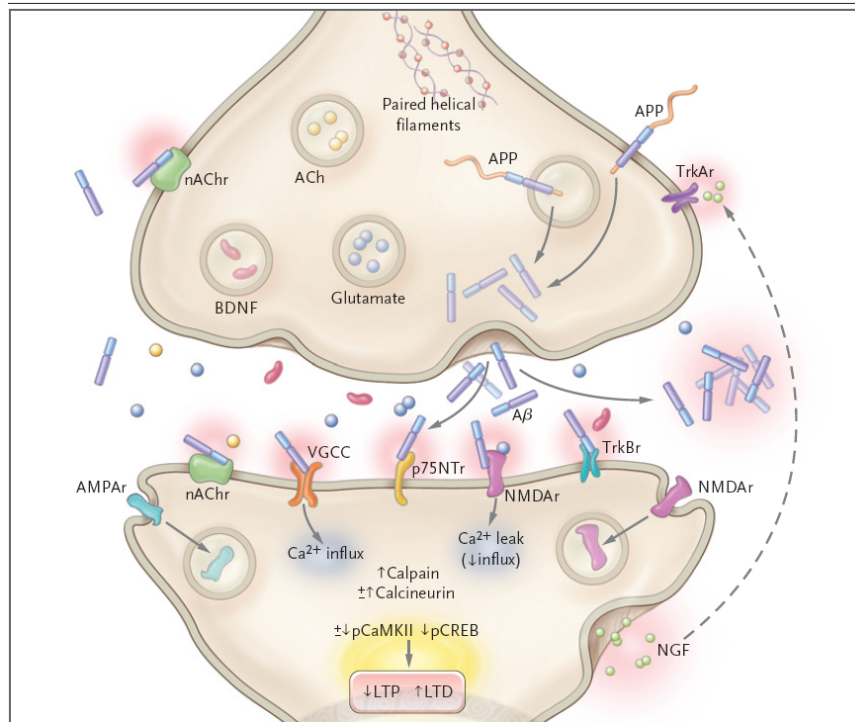




圖二、Tau 蛋白的過磷酸化過程造成微小管結構降解的過程與神經絲糾結的形成
 Figure 2. Tau structure and the processing of neurofibrillary tangles.

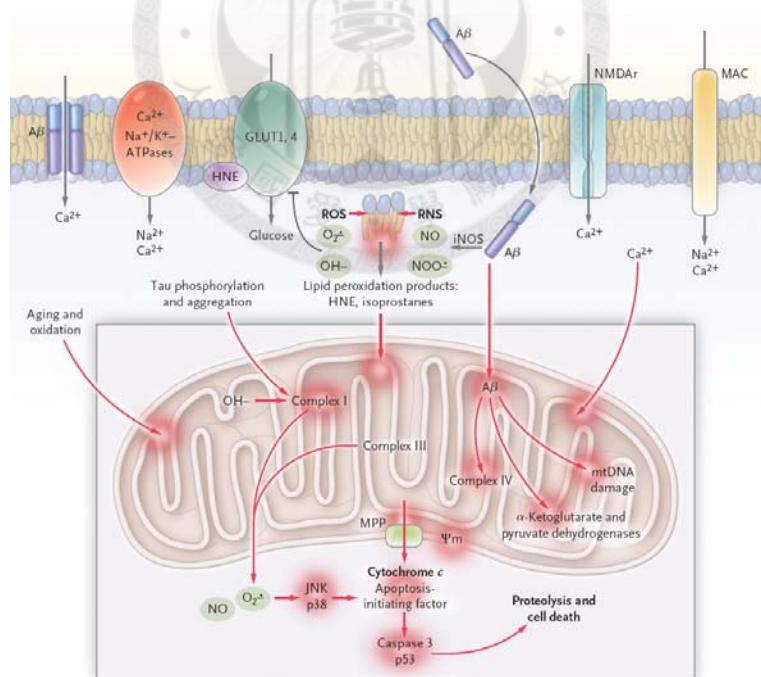


圖三、Tau 蛋白與類澱粉胜肽之間交互作用的三種假說與阿滋海默症 Tau 蛋白的進程
 使突觸細胞易受到類澱粉胜肽的毒性傷害
 Figure 3. Beta amyloid and tau: three possible models of interaction / Proposed tau axis hypothesis' of Alzheimer's disease: progressively increasing levels of dendritic tau make neurons vulnerable to beta amyloid.(Ittner and Gotz., 2010)



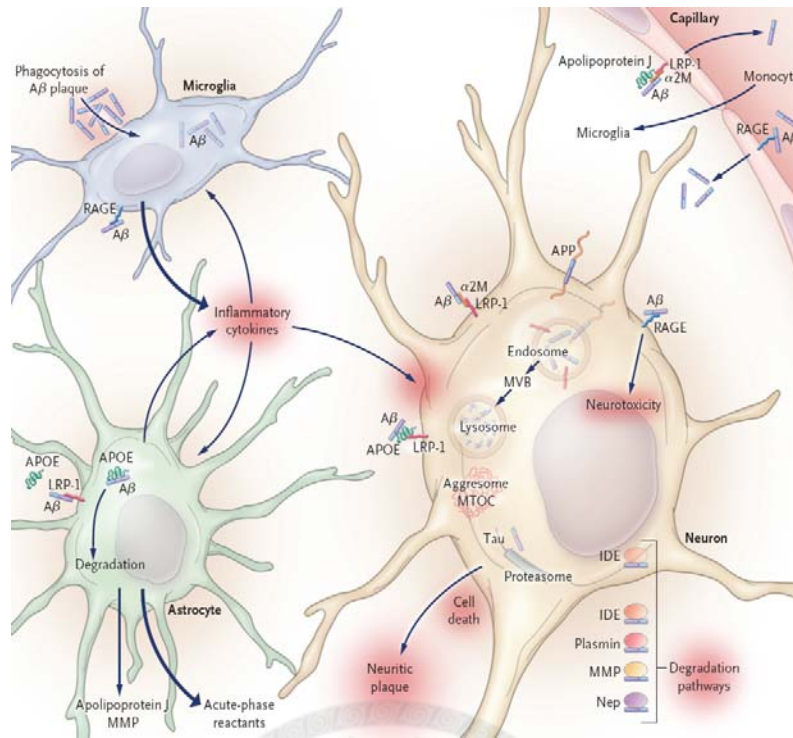
圖四、阿滋海默症突觸失調機制的示意圖

Figure 4. Synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. (Querfurth and LaFerla., 2010)



圖五、阿滋海默症中氧化壓力上升與粒線體功能喪失的示意圖

Figure 5. Oxidative stress and mitochondrial failure. (Querfurth and LaFerla., 2010)



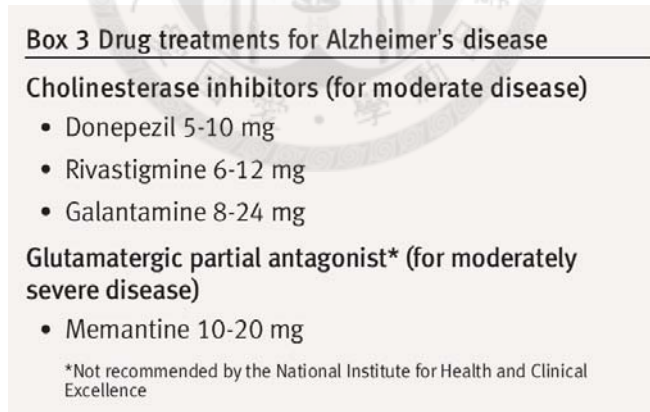
圖六、類澱粉胜肽與發炎反應的關係

Figure 6. Inflammation and mechanisms of beta amyloid clearance.

(Querfurth and LaFerla., 2010)

二、阿滋海默症之藥物開發現況

目前用於治療阿滋海默症的藥物可分為乙醯膽鹼酶抑制劑與麩胺酸受體拮抗劑，主要目標是延緩患者的認知退化情形，並藉由搭配不同的抗精神病、抗憂鬱症藥物以改善精神行為症狀。目前乙醯膽鹼酶抑制劑的臨床用藥包括愛憶欣(Aricept, donepezil)、憶思能(Exelon, rivastigmine)、利憶靈(Reminyl, galantamine)；麩胺酸受體拮抗劑則有憶必佳(Ebixa, memantine)與威智(Witgen, memantine)等(Burns and Iliffe, 2009)(圖七)。此外，更有採用皮膚貼片的憶思能(Exelon)，一天貼一片則相當於一天服藥兩次。近年對於阿滋海默症藥物開發現況分析中，除了已上市的乙醯膽鹼酶抑制劑與 memantine，並沒有其他有效的藥物，而以上兩類型藥物也僅能對於延緩阿滋海默症發展進程有些許的作用，卻無法根治疾病。近年陸續完成的臨床第三期試驗如銀杏(Ginkgo biloba)萃取物、非類固醇抗發炎藥物(Non-steroid anti-inflammatory drugs, NSAIDs)、Phenserine、Statins、Tarenflurbil、Tramiprosate 等藥物在試驗中皆未看到良好的療效 (Sabbagh, 2009)。因此，有學者進一步提出阿滋海默症藥物開發應開始以 tau 蛋白過磷酸化為研究導向 (Brunden et al., 2009)。



| Box 3 Drug treatments for Alzheimer's disease |
|--|
| Cholinesterase inhibitors (for moderate disease) |
| • Donepezil 5-10 mg |
| • Rivastigmine 6-12 mg |
| • Galantamine 8-24 mg |
| Glutamatergic partial antagonist* (for moderately severe disease) |
| • Memantine 10-20 mg |
| <small>*Not recommended by the National Institute for Health and Clinical Excellence</small> |

圖七、目前阿滋海默症用藥與劑量

Figure 7. The current drug for Alzheimer's disease and dosage

(Burns and Iliffe, 2009)

三、研究阿滋海默症之動物模式發展現況與簡介

以動物模式做為阿滋海默症研究的進一步模型主要原因，主要是因大部分以細胞模式了解的阿滋海默症致病機轉，對於各種治療手段的切入與操作與實際仍有一段差距。動物模式則可以從更接近人體的生理結構與治療手段的切入，藉此確認阿滋海默症的致病原因與可能的治療手段。

一般而言，作為適當的阿滋海默症動物模式大致上需要符合三大標準，一為效度、二為實驗室裡與不同實驗室的可信度，三為治療手段的可行性(Woodruff-Pak, 2008)。就效度而言，作為阿滋海默症動物模式，無論在基因、分子層次、神經系統中關鍵蛋白質與荷爾蒙的表現、神經生理狀態、神經解剖學與行為上的記憶學習認知能力都需要與阿滋海默症相類似甚至相同。以基因為例，許多阿滋海默症基因轉殖小鼠即為經轉殖一到多個人類家族性阿滋海默症相關基因至小鼠體內，使其進一步表現某些特定的阿滋海默症病徵，如類澱粉胨沉積與學習記憶能力損傷等。就動物模式的可信度而言，主要為此動物模式為容易繁殖、性狀穩定並且維持的物質與時間成本不過份高昂的條件下，才可能成為能夠廣泛作為研究的動物模式。最後在治療方法的切入方面，也需有已知的藥物或是治療方法能夠針對此動物模式減輕或是復原其阿滋海默症病徵，否則其動物模式對於研究上的意義也就容易喪失(表一)。

表一、研究阿滋海默症之動物模式所需之邏輯標準

Table 1. Logical criteria for evaluating animal models of Alzheimer's disease

| |
|--|
| <i>Validity – parallels to human AD at the:</i> |
| 1. Genetic level. |
| 2. Molecular level. |
| 3. Neurochemical level. |
| 4. Neurophysiological level. |
| 5. Neuroanatomical level. |
| 6. Behavioral (emotional) level. |
| 7. Learning, memory, and cognitive level. |
| <i>Intra- and inter-laboratory reliability</i> |
| 8. Model is reproducible. |
| 9. Model is cost-effective. |
| 10. Model is time-effective. |
| <i>Therapeutics</i> |
| 11. Drugs currently used to treat AD are effective in the model. |
| 12. Model has utility in the development of novel therapies. |

(Woodruff-Pak, 2008)

表二為在各種不同動物模式針對模擬阿滋海默症在各種不同層次的評分，由此表顯示，以果蠅為動物模式的重大優點為基因的相似度極高，主要原因為目前研究對於果蠅本身的基因已大致了解，且在果蠅模式的基因轉殖技術也較成熟；相反的，果蠅模式在神經生理、神經解剖與行為上的學習記憶認知則沒有有效的模擬程度。而以兔子、狗與靈長類動物作為動物模式則在基因表現上有較大的限制，此外，在物質與時間消耗的成本也相對提高。由此可知，大鼠與小鼠模式在基因操控難易度上界於果蠅模式與靈長類動物之間，且其飼養與操作上也較符合一般研究單位的需求，並在神經生理、神經解剖與動物行為學習認知表現也較適合做為阿滋海默症相關的研究與療法切入。

表二、各種動物品種與品系作為阿滋海默症動物模式的標準評估

Table 2. Logical criteria for evaluating animal models of Alzheimer's disease applied to species in this issue.

| VALIDITY | Fruit Fly | | Rat | Rabbit | Dog | Primate | Mouse | | | | |
|--|-----------|-----|-----|--------|-----|---------|-------|-------------|-----------|--------|------------------|
| | A β | tau | | | | | SAMP8 | APP/NOS2-/- | Triple-Tg | Tau Tg | A β PP/PS1 |
| <i>Genetic</i> | *** | *** | | * | | * | * | * | * | * | * |
| <i>Molecular</i> | *** | *** | ** | *** | ** | ** | *** | *** | ** | * | * |
| <i>Neurochemical</i> | ** | ** | | *** | | *** | ** | ** | | | |
| <i>Neurophysiological</i> | * | | * | *** | | ** | ** | ** | * | * | * |
| <i>Neuroanatomical</i> | | | ** | *** | *** | *** | ** | ** | * | * | * |
| <i>Behavioral (emotional)</i> | | | | | *** | * | | | | | |
| <i>Learning, memory, and cognition</i> | ** | | ** | *** | *** | *** | ** | ** | ** | ** | ** |
| RELIABILITY | | | | | | | | | | | |
| <i>Reproducible</i> | *** | *** | ** | *** | *** | ** | *** | ** | *** | *** | *** |
| <i>Cost-effective</i> | *** | *** | ** | * | * | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| <i>Time-effective</i> | *** | *** | ** | * | * | *** | ** | ** | ** | ** | ** |
| THERAPEUTICS | | | | | | | | | | | |
| <i>Current drugs</i> | | | ** | *** | | | | *** | | *** | *** |
| <i>New therapies</i> | *** | *** | | *** | *** | ** | *** | *** | ** | *** | *** |

(Woodruff-Pak, 2008)

目前，主要的動物模式又以小鼠作為基因轉殖動物為最多。第一種能夠表現阿滋海默症之類澱粉胬肽斑塊病徵的基因轉殖小鼠品系為PDAPP，此為轉殖入 human APP V717F (Indiana) 突變基因的小鼠 (Games et al., 1995; Kobayashi and Chen., 2005)。在基因轉殖後發現，其腦部 beta amyloid₁₋₄₀ 與₁₋₄₂ 片段與原本非基因轉殖小鼠相比上升了 14 倍。此外，由類澱粉胬肽形成的類斑塊沉積 (plaque-like depositions) 在十二月齡時可在大腦皮質與海馬迴中觀察到，更多個高密度核心 (Dense core) 與擴散 (diffuse) 的類澱粉胬肽斑塊。在老化的 PDAPP 小鼠中，可以觀察到過磷酸化的 tau 蛋白，但未觀察到有進一步糾結 (tangles) 的產生。在突觸與神經元總數方面，亦有觀察到顯著的下降。然而，突觸與神經元的數目下降與萎縮的海馬迴、穹窿 (fornix) 與胼胝體 (corpus callosum) (Kobayashi and Chen., 2005)，都在觀察到類澱粉胬肽沉積前就已發生，因此由此模式可推論類澱粉胬肽沉積並非造成認知能力下降的主要原因，亦有可能由生理

時鐘亂序(disturbed sleep-wake rhythms)、快速動眼期的學習下降(learning deficits in the eye blink conditioning paradigm)與恐新症(Neophobia)都可能是造成學習記憶能力下降的影響因子。

另一種常見的阿滋海默症基因轉殖小鼠為 Tg2576 (Hsiao., 1996)，此模式主要是表現阿滋海默症 Swedish double mutant form of APP695 (K670 and M671L)的突變基因。經過基因轉殖後，hAPP 較原本未轉殖小鼠上升 5.5 倍(Hsiao., 1996)。而其發病期與 PDAPP 相似，大約需經一年，其腦部的外皮區(cortical area)，包含額葉(frontal)、顳葉(temporal)、嗅內區(entorhinal)以及海馬迴、海馬支角(subiculum)與小腦(cerebellum)才會形成 beta amyloid₁₋₄₀ 與 _{1-42/43} 片段的沉積。在 Tg2576 小鼠的行為模式方面與 PDAPP 相似，其認知記憶能力在類澱粉斑塊沉積前就已下降，然而，在認知記憶能力下降的月齡，卻可以觀察到可溶性類澱粉寡肽(soluble beta-amyloid oligomers)的累積(Westerman et al., 2002)。

除上述兩種基因轉殖小鼠外，APP23 小鼠則是同時轉殖入 Swedish (K670N and M671L)以及 London (V717I)兩種人類阿滋海默症突變基因，這也是第一種同時轉殖入多個人類突變基因的轉殖小鼠。在此小鼠模式中，可以發現在海馬迴與外皮區約比未轉殖小鼠多七倍的 hAPP 表現，而在 12 個月齡後，可以觀察到腦血管的類澱粉肽沉積(cerebrovascular depositions of amyloid)並伴隨血流量下降(decreased blood flow)與大腦微出血現象(cerebrum microhemorrhages)。此外，高密度斑塊核心發生期則較早，相較於 PDAPP 與 Tg2576 小鼠，APP23 小鼠在六月齡時就有許多斑塊核心產生，且其不可溶性的 beta amyloid 1-42 片段在三月齡到六月齡會快速上升約四倍；除類澱粉肽沉積外，APP23 小鼠還伴隨神經膠變性(Gliosis)、樹狀突萎縮(Dystrophic neurites)、突觸喪失(loss of synapses)、膽鹼能細胞死亡(cholinergic cell loss)與過磷酸化 tau 蛋白的發生。而記憶喪失與焦慮行為則早在三月齡即可觀察到(Sturchler-Pierrat et al., 1997; Bondolfi et al., 2002)。

TgCRND8 基因轉殖小鼠則是被同時植入 APP23 與 Tg2576 的人類阿滋海默症突變基因，植入後的表型則可明顯觀察到在三月齡時，其認知能力與空間記憶已明顯下降，且類澱粉肽沉積狀況也相當旺盛。beta amyloid₁₋₄₀ 與 ₁₋₄₂ 片段在一到三月齡間，上升約兩百倍；而在海馬迴與皮質中的高密度斑塊核心與神經軸變性則在三到五月齡即可觀察到。由此可知，Swedish (K670N and M671L)與 Indiana (V717F) mutation 這兩種基因的同時表現，確實影響到類澱粉肽沉積與進一步影響認知學習能力的發生

時間。但此基因轉殖小鼠的一大缺點為，其產後存活率是相當低的，可見對於成為一成熟與廣泛的動物模式有一定的困難度(Teunissen and Cammen., 2007)。

另一種基因轉殖小鼠 J20，被轉殖的基因與 TgCRND8 相同，但 TgCRND8 小鼠是利用 C3H/B6 strains 所培育出。而 J20 則是由 C57BL/6 X DBA/2J 小鼠所培育出。因品種背景的不同，J20 小鼠在海馬迴與皮質的類澱粉斑塊沉積與空間記憶能力下降約延後到五到七月齡出現，此外也伴隨在海馬迴與齒狀迴的突觸密度與鈣離子結合蛋白量下降(Hsia et al., 1999)。

以上基因轉殖小鼠大多為以 human APP 為主要轉殖目標，另有以早衰蛋白 (Presenilin 1 or Presenilin 2) 為導向的基因轉殖小鼠，並搭配 human APP 的表現。以 PS/APP 小鼠為例，其利用 Tg2576 小鼠與 PS1 突變小鼠進行雜交，使其同時表現 Swedish double mutant form of APP695 (K670 and M671L) 與 PS1 (PS1 M146L) 基因，結果可使小鼠腦部之 beta amyloid₁₋₄₀ 與 ₁₋₄₂ 沉積發生期較一般僅進行 APP 轉殖小鼠更早；而 APP23/PS45 小鼠則是使其表現與人類家族性阿滋海默症有關的 G384A mutant presenilin-1，則能夠在一月齡時，就可在海馬迴與新皮質區觀察到神經斑塊的產生 (Qing et al., 2008)。

但阿滋海默症的主要病徵除類澱粉胜肽沉積外，還有 tau 蛋白過磷酸化而進一步形成的神經絲糾結(Neurofibrillary tangles, NFTs)。因此，進一步發展了 tau 蛋白表現相關基因為主要導向並同樣搭配 APP 或是 PS1/PS2 基因轉殖藉以發展更類似於人類阿滋海默症之基因轉殖小鼠。如 rTg (tau P301L) 4510 小鼠與 rTg3696AB 小鼠因轉殖入人類 tau P301L 基因與同時表現 human APP，成功使小鼠產生神經糾結的發生與類澱粉胜肽沉積，並且使其大腦產生萎縮與神經元減少，其病徵更加類似人類阿滋海默症病患。

因此，Oddo et al (2003)發展出同時植入 Swedish double mutant form of APP695 (K670 and M671L)、PS1 M146V 以及 human tau P301L 三種突變基因亦成功使其表現類澱粉胜肽沉積與神經糾結，並且發現突觸功能喪失現象也已發生，而進一步影響小鼠之學習記憶能力。Dam and Deyn (2006)也在失智症藥物研究中，做了齧齒類動物模式在基因轉殖方面不同發展方向的簡介(表三、表四)。

表三、各種不同基因背景應用於阿滋海默症動物模式的基因轉殖小鼠

Table 3. Rodent models of dementia in drug discovery and development

| Model | Relevance to AD | | Main role in AD research and drug discovery pipeline | Disadvantages |
|--------------------------|--|--|--|--|
| | Pathophysiological level | Behavioural level | | |
| <i>Transgenic models</i> | | | | |
| APP-based | <ul style="list-style-type: none"> • Aβ pathology • Neurodegeneration • Neurotransmitter and synaptic dysfunction • Inflammation | <ul style="list-style-type: none"> • Cognitive decline • Behavioural alterations | <ul style="list-style-type: none"> • Confirmation of central role of APP and Aβ • Target identification • Preclinical evaluation of various symptomatic and disease-modifying drugs | <ul style="list-style-type: none"> • No development of NFT |
| PSEN-based | <ul style="list-style-type: none"> • Increased Aβ_{42}/Aβ_{40} ratio in some models | <ul style="list-style-type: none"> • Few cognitive and behavioural abnormalities | <ul style="list-style-type: none"> • Basis for double tg APP/PSEN models | <ul style="list-style-type: none"> • No development of NFT • No Aβ pathology |
| Tau-based | <ul style="list-style-type: none"> • NFT pathology • Neuronal loss | <ul style="list-style-type: none"> • Cognitive decline • Behavioural alterations | <ul style="list-style-type: none"> • Increased knowledge of tau pathology including development of NFT • Basis for double tg APP/tau models | <ul style="list-style-type: none"> • No Aβ pathology |
| Double transgenic models | <ul style="list-style-type: none"> • Increased Aβ_{42}/Aβ_{40} ratio in APP/PSEN versus single APP model • Accelerated Aβ pathology in APP/PSEN versus single APP model • Accelerated tau pathology in APP/tau models • Neuronal loss • Inflammation | <ul style="list-style-type: none"> • Cognitive decline • Behavioural alterations | <ul style="list-style-type: none"> • APP/PSEN models support the modifying role of PSEN • APP/tau models support amyloid cascade hypothesis with Aβ pathology mediating tau pathology • Preclinical evaluation of various symptomatic and disease-modifying drugs | <ul style="list-style-type: none"> • No NFT pathology in APP/PSEN models • Spatial expression of AD relevant pathology |
| Triple transgenic models | <ul style="list-style-type: none"> • Aβ pathology • NFT formation • Neurodegeneration and neuronal loss • Inflammation • Neurotransmitter and synaptic dysfunction | <ul style="list-style-type: none"> • Cognitive decline (+ behavioural alterations ?) | <ul style="list-style-type: none"> • Support amyloid cascade hypothesis • AD-relevant spatial and temporal expression of AD hallmarks • Stable genetic background • Cost-effective breeding • Preclinical evaluation of various symptomatic and disease-modifying drugs | <ul style="list-style-type: none"> • General limitations and dangers of a rodent system to model a complex human condition involving higher cognitive functions |

AD, Alzheimer's disease; APP, amyloid precursor protein; A β , amyloid- β ; NFT, neurofibrillary tangles; PSEN, presenilin; tg, transgenic.

(Dam and Deyn, 2006)

表四、以類澱粉胜肽與 tau 蛋白過度表現基因交互建立的基因轉殖小鼠模式

Table 4. Combinatorial amyloid-tau mouse studies.

| Year | Amyloid model | Tau model | Phenotype in double or triple tg mice | Refs |
|------|--|--|---|------|
| 2001 | Tg2576 (K670N/M671L-APP ₆₉₅) | JNPL3 (P301L-(0N4R) tau) | (p-tau, NFTs) | 40 |
| 2001 | Synthetic A β_{1-42} | pR5 (P301L-(2N4R) tau) | (p-tau, NFTs) | 42 |
| 2003 | 3xTg AD (K670N/M671L-APP ₆₉₅ + M146V-PS1) | (P301L-(0N4R) tau) | Combined amyloid- β and tau pathology | 62 |
| 2007 | APP23 (K670N/M671L-APP ₇₅₁) | JNPL3 (P301L-(0N4R) tau) on C57Bl/6 | (p-tau, NFTs); late onset pathology | 63 |
| 2007 | J20 (K670N/M671L/V717F-APP ₇₅₁) | <i>Tau</i> ^{-/-} | Prevents memory deficits and premature deaths of J20 line | 20 |
| 2007 | J20 (K670N/M671L/V717F-APP ₇₅₁) | <i>Tau</i> ^{-/-} | Prevents amyloid- β -induced NPY expression and calbindin loss in hippocampus | 64 |
| 2008 | APP-V717I (V717I-APP ₆₉₅) | tau-P301L (P301L-(2N4R) tau) | (p-tau), increased GSK3 β activity | 41 |
| 2010 | APP152 (K670N/M671L-APP ₇₅₁ + N141I-PS2) | pR5 (P301L-(2N4R) tau) | (p-tau, NFTs) | 65 |
| 2010 | Tg2576 (K670N/M671L-APP ₆₉₅) | <i>Tau</i> ^{-/-} | Increased memory deficits in aged mice | 52 |
| 2010 | ADnnPP7 (795InsTTTAATTTGT-BRI2) | TauP301S | (p-tau, NFTs) | 44 |
| 2010 | APP23 (K670N/M671L-APP ₇₅₁) | pR5 (P301L-(2N4R) tau) | Increased premature death rate | 26 |
| 2010 | APP23 (K670N/M671L-APP ₇₅₁) | <i>Tau</i> ^{GFP/GFP} (GFP knock-in) | Prevents memory deficits and premature death of APP23 line | 26 |
| 2010 | APP23 (K670N/M671L-APP ₇₅₁) | Δ tau74 (1-255aa tau) | Prevents memory deficits and premature deaths of APP23 line | 26 |

A β , amyloid β ; APP, amyloid precursor protein; GFP, green fluorescent protein; GSK3 β , glycogen synthase kinase 3 β ; NFTs, neurofibrillary tangles; NPY, neuropeptide Y; p-tau; phosphorylated tau; tg; transgenic.

(Ittner and Gotz., 2010)

除了以人類阿滋海默症突變基因發展的基因轉殖小鼠外，如自發性動物模式、化學誘導動物模式與以中樞神經系統特定缺陷之動物模式，都是具有成為研究阿滋海默症潛力的動物模式(表五)。以自發性動物模式為例，自然老化的齧齒類動物因其自身產生的某些神經系統的退化與喪失進一步造成的認知能力下降，對於阿滋海默症仍有某種程度的相似度，但此動物模式的缺點為需要長時間的維持動物的生長，此外，其動物模式不一定會成功發展出阿滋海默症的兩大病徵，類澱粉胨沉積與神經糾結的發生(Woodruff-Pak, 2008; Dam and Deyn, 2006)。

由京都大學 Takeda 教授培育出的老化促進小鼠模式(senescence-accelerated mice, SAM)則成功克服了一般自然老化動物模式在時間消耗與產生阿滋海默症病徵的缺點。在老化促進小鼠模式中，其中適合做為阿滋海默症動物模式的亞系主要有 SAMP8 與 SAMP10，其特徵為自發性的學習記憶能力下降、腦部類澱粉胨沉積與 tau 蛋白過磷酸化的現象，且其相關的病徵發生並非由特定阿滋海默症基因表現，而是由其因年齡老化產生的體內氧化壓力上升或是免疫機能喪失能造成兩大病徵的產生，進一步引起學習記憶能力的下降，而其最大的優點就是此動物模式因老化過程而造成記憶衰退的過程更類似於大部分晚發期(late onset Alzheimer's disease)的阿滋海默症病患，更有利於治療阿滋海默症療法的發展與進步(Woodruff-Pak, 2008)。

在化學誘導動物模式最常見的是將類澱粉胨藉由開腦手術後，以微注射器單次單一劑量或是慢性長期釋放的方式，直接將特定片段的類澱粉胨片段注射到動物腦室中，並藉由同樣以注射器注射或是採取餵食樣品以了解其對於阿滋海默症的影響效果。但此動物模式有許多缺點，例如此模式無法模擬一般疾病逐漸發展的病程，也不符合一般病理發展的邏輯，此外，也必須確認類澱粉胨打入動物體內前的聚集程度與其毒性的關係；二為無法產生阿滋海默症的主要病徵；三為如以同樣方法注射藥物進入腦部，無法了解藥物是否直接降低類澱粉胨對於神經的毒性，也屏除了藥物動力學應考慮的生物體內代謝轉換與血腦屏障的穿透效率的變數。

表五、應用於失智症藥物開發的齧齒類動物模式

Table 5. Rodent models of dementia in drug discovery and development

| Model | Relevance to AD | | Main role in AD R&D pipeline | Disadvantages |
|---|--|--|---|---|
| | Pathophysiological level | Behavioural level | | |
| <i>Spontaneous models</i> | | | | |
| Aged rodents | <ul style="list-style-type: none"> Cholinergic hypofunction and other neurotransmitter alterations Morphological alterations | <ul style="list-style-type: none"> Cognitive decline Behavioural alterations | <ul style="list-style-type: none"> Increased knowledge of neural mechanisms of cognitive deficits Defining normal ageing versus pathological states | <ul style="list-style-type: none"> No pathological AD hallmarks |
| SAM models (for example, SAMP8) | <ul style="list-style-type: none"> Progressive AD related altered gene expression and protein abnormalities Aβ pathology in SAMP8 | <ul style="list-style-type: none"> Cognitive decline Behavioural alterations with ageing | <ul style="list-style-type: none"> Increased knowledge of neural mechanisms of cognitive deficits Defining normal ageing versus pathological states | <ul style="list-style-type: none"> No NFT pathology Limited Aβ pathology |
| <i>Induced models: chemical</i> | | | | |
| Scopolamine | <ul style="list-style-type: none"> Cholinergic hypofunction | <ul style="list-style-type: none"> Cognitive deficits | <ul style="list-style-type: none"> Increased insight into role of cholinergic system in cognition Preclinical evaluation of cholinomimetics | <ul style="list-style-type: none"> No pathological AD hallmarks No disease progression |
| A β infusion (single or chronic) | <ul style="list-style-type: none"> Increased Aβ levels | <ul style="list-style-type: none"> Cognitive deficits Behavioural alterations | <ul style="list-style-type: none"> Increased insight into Aβ toxicity Preclinical evaluation of Aβ targeting drugs | <ul style="list-style-type: none"> No pathological AD hallmarks Hyperphysiological Aβ levels required No disease progression with single administration |
| Chemicals affecting specific pathways | <ul style="list-style-type: none"> Neuronal loss Synaptic dysfunction Cellular inflammatory activation | <ul style="list-style-type: none"> Cognitive deficits Behavioural alterations | <ul style="list-style-type: none"> Increased insight into roles of specific pathophysiological pathways in neurodegeneration Preclinical evaluation of drugs targeting specific pathway | <ul style="list-style-type: none"> No pathological AD hallmarks |
| <i>Induced models: CNS-specific lesions</i> | | | | |
| Basal forebrain | <ul style="list-style-type: none"> Cholinergic hypofunction | <ul style="list-style-type: none"> Cognitive deficits | <ul style="list-style-type: none"> Increased knowledge of neural mechanisms of cognitive deficits Evaluation of neuroprotective drugs if neurotoxic lesion Preclinical evaluation of cholinomimetics | <ul style="list-style-type: none"> No pathological AD hallmarks |
| Other brain regions relevant to cognition | <ul style="list-style-type: none"> Neurotransmitter dysfunctions | <ul style="list-style-type: none"> Cognitive deficits Behavioural alterations | <ul style="list-style-type: none"> Increased knowledge of neural mechanisms of cognitive deficits Evaluation of neuroprotective drugs if neurotoxic lesion | <ul style="list-style-type: none"> No pathological AD hallmarks No disease progression Selected lesions |

(Dam and Deyn, 2006)

四、以齧齒類動物模式測定學習記憶能力常見的動物行為實驗

以基因轉殖、自發性、化學或其他方式成功誘導之動物模式之後，除在基因、病理特徵、病發時期與進一步產生的後續影響需要評估與觀察外，如何藉以適當的測定方法來檢測動物在學習記憶行為與認知能力是非常重要的課題。

Dam and Deyn (2006)整理了在阿滋海默症動物模式中常見的動物行為試驗(表六)，大致上可分為兩大類型，一為空間導向試驗，包含常見的莫氏水迷津(Morris water maze, MWM)以及八臂迷宮(radial arm maze)；二為主動與被動迴避學習試驗(Passive/active avoidance learning tests)，此試驗通常是使用穿梭箱與搭配電擊、聲音或光線來評估動物的記憶能力。而較詳細的行為實驗分類見表六。

表六、對於阿滋海默症動物模式針對記憶能力失調的動物行為實驗
Table 6. Rodent models of dementia in drug discovery and development

| Task/test | Description of task/test | AD symptoms modelled | Advantages | Disadvantages |
|---|--|--|---|---|
| <i>Spatial navigation tests</i> | | | | |
| Wet mazes (for example, Morris water maze) | During the acquisition phase animals swim to find a hidden platform using visual cues surrounding the maze. A probe trial with the platform removed tests retention of spatial information | Deficits in visual-spatial learning and memory | <ul style="list-style-type: none"> • High cognitive level tested • Built-in control for bias by motor or sensory dysfunction | <ul style="list-style-type: none"> • Stressful for animal • Strenuous for animal |
| Dry-land mazes (for example, radial arm maze and Barnes maze) | Maze with food (radial maze) or escape to a small dark hole (Barnes maze) as a positive reinforcing stimulus | Deficits in visual-spatial learning and memory | <ul style="list-style-type: none"> • Less stressful • Less strenuous • Based on natural (scavenging) behaviours | <ul style="list-style-type: none"> • Radial maze requires food deprivation |
| <i>Passive/active avoidance learning tests</i> | | | | |
| For example, step-through box, shuttle box | The stimulus is a mild electric foot shock eliciting an avoidance response to the location in which the foot shock was received during acquisition | Deficits in non-spatial learning and memory | <ul style="list-style-type: none"> • Quick assessment | <ul style="list-style-type: none"> • Poor built-in control for sensory and motor dysfunction bias |
| <i>Cued/contextual learning tests</i> | | | | |
| For example, assessment of freezing behaviour | Fear conditioning tasks measuring ability to learn and remember an association between an aversive stimulus (for example, foot shock) and environmental stimuli (for example, light, tone, change in direct environment) | Deficits in non-spatial learning and memory | <ul style="list-style-type: none"> • Quick assessment of cued and contextual freezing responses • Based on natural (survival) behaviour • No complex test arena required | <ul style="list-style-type: none"> • Difficult to objectively score freezing • Bias from strain or species dependent sensory or motor abilities |
| <i>Schedule-induced learning tasks</i> | | | | |
| For example, protocols in operant conditioning box | Animal is placed in a chamber equipped with response levers or nose poke units, light stimuli and a food dispenser delivering single food pellets. Delayed matching and delayed non-matching to stimuli protocols possible | Deficits in non-spatial learning and memory | <ul style="list-style-type: none"> • Complex tasks and wide variety of possible protocols • Complete automation • Strict experimental control • High level of precision | <ul style="list-style-type: none"> • Long training time, experiment often run over several months, therefore difficult for age-dependent assessment • Poor operant learning performance in mice |

AD, Alzheimer's disease.

(Dam and Deyn, 2006)

(一)、空間導向學習試驗(Spatial navigation tests)

1.莫氏水迷津(Morris water maze, MWM)

莫氏水迷津是在 1980 年代由 Morris 教授所發展出，藉以了解大鼠的空間學習與記憶能力。莫氏水迷津主要在一個空房間中架設一個圓形泳池、於泳池中的平台、牆壁或是鄰近泳池旁的特定圖案作為空間線索以及搭配一套攝影紀錄系統所構成。泳池的大小，因大小鼠而異，直徑從 80 到 200 公分不等，泳池高度則從 10 到 50 公分不等。實驗進行時，通常會控制水面高度、水溫、房間光線與固定位置的高對比幾何圖形線索以避免實驗誤差。水面高度關係到老鼠游泳時對於特定圖案的視角；水溫對於不同品系老鼠會有不同的影響，例如水溫過高，老鼠可能會偏好於水中游泳而非登上平台；房間光線則會影響到攝影紀錄系統對於背景與老鼠的對比值，而一般實驗用大白鼠，池水通常會以染料染黑，以增加對比，如老鼠為黑色，反之亦然；而固定於水池周遭的高對比幾何圖形線索是使動物能夠針對不同的圖案辨別出相對於平台的空間位置(Crawley, 2007)。

莫氏水迷津試驗中，因平台配置的不同又可分為兩大種類，一為隱沒式平台試驗(Hidden platform test)以及可見式平台試驗(Visible platform test)。平台大小大約為 10 到 12 平方公分，而越大的平台有助於加速動物找尋平台的時間。隱沒式平台試驗中，平台約會隱沒於水面下 1 到 2 公分；而可見式平台試驗則搭配約高於水面 1 到 5 公分的平台，可見式平台試驗的目的為加強動物在試驗中的學習與記憶能力。

一般而言，整個莫氏水迷津的實驗設計可分為三階段，第一階段為預訓練試驗(Pretraining)，通常由操作者放入可見式平台上(Visible platform test)，使動物在水中游泳一小段時間，並重複操作，以動物熟悉實驗的進行，並藉由可見式平台以測定動物的視力(visual ability)與運動神經能力(motor ability)，加強老鼠對平台於周遭環境較精確的相對位置認知，並藉以作為進行水迷津試驗前的篩選，確認各組間動物的視力與運動神經能力一致。第二階段為訓練試驗(Training trials)，訓練試驗中通常以低於水面的平台來訓練老鼠(Hidden platform test)，而此訓練試驗的天數因實驗設計而異，例如每天進行兩次嘗試，共進行十天；或是每天進行四次嘗試，共進行三天，其訓練時間依據不同品系動物來作調整。

在訓練試驗中的每次嘗試中，給與動物 60 秒到兩分鐘的時間尋找並登上平台，

並紀錄每次動物從下水開始到登上平台的時間，紀錄為脫離時間(Escape latency)。就正常動物而言，其逃脫時間應隨著訓練天數的增加而下降。完成訓練試驗後，則在最後一天進行象限偏好試驗(Probe test)，象限偏好試驗為僅進行一天一個嘗試的記憶測試，其主要目的為測試經由訓練試驗後，動物是否對於平台的空間記憶有顯著改善，測定方法為將動物放入沒有平台的泳池，使其自由游泳一分鐘，藉以測定動物在各象限所待的時間以及通過原平台位置的次數，了解動物的空間記憶能力。

有多項研究發現，不論在大鼠或小鼠的相關研究中，其空間學習與記憶能力下降現象因海馬迴損傷有顯著的關係(Morris et al., 1982; Eichenbaum et al., 1990; Logue et al., 1997a)。除海馬迴以外，在內側隔 (medial septum)、斜束帶(diagonal band)、內嗅皮質(Entorhinal cortex)、嗅緣皮質(perirhinal cortex)損傷以及經由服用乙醯膽鹼抑制劑或麩胺酸受器抑制劑等藥物皆會造成在莫氏水迷津的表現不佳(Decker and Majchrzak, 1992; McNamara and Skelton, 1993; Nilsson and Gage, 1993; McAlanon et al., 1995; Nagahara et al., 1995; Roulet and Sara, 1998)。

除在大腦特定區域的損傷會引起在莫氏水迷津中空間學習與記憶力下降外，基因背景也是相當重要的因子。在某些特定的品系上，其在莫氏水迷津的表現較佳，有些則較差。此外，視力也是相當重要的因素，在莫氏水迷津的訓練過程，動物必須高度依賴視力來觀察環境的線索(Visually cued task)，藉以判斷出平台相對於各個線索的位置。故如患有白化症小鼠(Albino mice)或帶有視網膜退化相關基因(Retinal degeneration genes)之老鼠在莫氏水迷津中的表現都較差(Wehner and Silva, 1996; Wahlsten et al., 2001; Montkowski et al., 1997)。除動物本身對於莫氏水迷津有不同的表現程度外，Crawley (2007)也闡明，某些品系確實在進行莫氏水迷津時，可能表現為漂浮於水面(floating)甚至沉降(sinking)至水面下；由平台跳回水中(Immediately jumping off the platform back into the water)；或是以固定的半徑不斷繞圈(circling)，這些行為在莫氏水迷津中會造成結果上的干擾。

2.八臂迷宮(Eight-arm radial arm maze)

除利用莫氏水迷津測定空間學習記憶能力外，也有使用八臂迷宮(Eight-arm radial arm maze)作為測量動物空間學習與記憶能力的工具。此工具通常直徑大約兩百公分，由八到十二個臂所構成。而中央則是實驗開始前放置小鼠的起始箱(central start

box)。實驗通常需數天到數週，並搭配對於老鼠的禁食來作為誘導的動力，一般而言，需要達到 85% 的禁食才能順利進行實驗。實驗過程則是利用在特定位置放置食物，以測定動物對於空間位置的辨認與記憶並尋找食物，藉由測定動物的正確與錯誤選擇的次數、在每個臂所花的時間和次數來分析小鼠的空間記憶學習能力(Crawley, 2007)。

3. 巴恩氏迷宮(Barnes maze)

巴恩氏迷宮則是建立在小鼠的趨暗特性所建立的測定空間記憶學習能力試驗。巴恩氏迷宮由一個圓形光亮的壓克力板構成，上面平均約有 18 個圓洞分布在圓板的外圍，其中會有一個圓洞通往一個黑暗的逃避目標箱，供小鼠尋找與躲避。此實驗藉由紀錄小鼠尋找目標箱的路線、嘗試錯誤的次數來分析其空間記憶學習能力(Crawley, 2007)。

(二)、線索與環境制約試驗(Cued/contextual learning tests)

被動迴避(Passive inhibitory avoidance test, IA)與主動迴避(Active avoidance test)

主動與被動迴避試驗與線索與環境制約試驗(Cued/contextual learning tests)類似，主要是以動物的恐懼制約(fear conditioning)反應來量測對於動物對於厭惡經驗(aversive experience)與環境線索(environmental cues)的關係以反映出在其學習與記憶能力(Fanselow, 1980; Wehner and Radcliffe, 2004; Fanselow and Poulos, 2005)。通常可藉由恐懼制約測定的行為試驗與莫氏水迷津試驗搭配進行來完整測定動物的記憶學習能力，其主要原因為恐懼制約與空間導向學習記憶所依賴的感官與運動神經能力顯著的不同，其測定的目標並不重複，因此對於同一隻動物可以進行兩種試驗(Crawley, 2007)。而一般而言，藉由厭惡經驗所誘發的情緒記憶，與一般空間學習記憶的差異在於，情緒記憶較容易誘發、學習且持續性較久的特性，此外，藉由微弱的線索即可激起原本產生的記憶。恐懼制約記憶主要能夠使動物對於環境有適應性，對於自身產生一些保護的作用。一般而言，恐懼制約記憶產生的區域主要位在大腦的杏仁核區(Fanselow, 1994; LeDoux, 1995)。而線索與環境制約試驗與空間學習記憶試驗也有一些不同點，例如線索與環境制約試驗所需的訓練與測定時間都較短，而在進行試驗當中，試驗者也可觀察到動物是否有產生恐懼下的靜止行為(Freezing)，在動物行為學上，靜止行為的定義為動物除了呼吸以外，其他全身皆處於靜止(immobility)的狀態。

藉由這個直觀的狀態來評估動物對於恐懼記憶的狀態(Blanchard and Blanchard, 1969; LeDoux, 1996)。

五、老化促進小鼠

(一)、老化促進小鼠的發展與現況

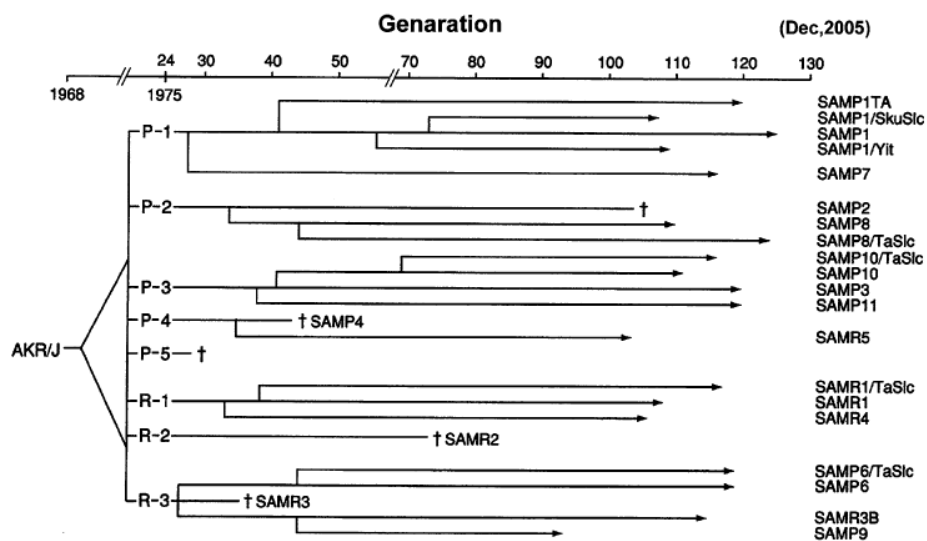
老化促進小鼠(Senescence-accelerated prone mouse, SAMP)是由日本京都大學 Takeda 教授於 1968 年以 ARK/J 小鼠種內配交所培育而成的品系。圖八為 Takeda 教授整理從 1968 年至 2005 年老化促進小鼠在配種與各亞系的發展分支圖。目前為止，老化促進小鼠共包含十二種亞系。十二種亞系可分為九種快速老化小鼠 (Senescence-accelerated prone mice, SAMP)與三種正常老化小鼠 (Senescence-accelerated resistance mice, SAMR)，表列出日本老化促進小鼠研究協議會對目前老化促進小鼠各亞系的分類與病徵的整理。不同亞系的老化促進小鼠都有各自不同的病理特徵表現，例如 SAMP6 小鼠會產生骨質疏鬆症；SAMP1 與 SAMP2 會產生免疫機能不全與腎臟萎縮；SAMP10 則會產生學習記憶力的退化與大腦萎縮；SAMP8 則會產生學習記憶力退化、免疫機能不全與生理時鐘亂序等病徵。雖然各亞系的老化促進小鼠都會發展出各自獨特的病徵，但 Takeda 教授也指出某些老化促進小鼠的病徵可能會因飼養環境衛生的要求度不同，而有不同程度的影響，例如 SAMP1 的腎臟萎縮與腦中類澱粉胜肽累積與 SAMR1 的非胸腺淋巴瘤都可因飼養於 SPF(Specific Pathogen Free)環境而有所改善(表七)。

其中 SAMP8 小鼠在老化研究與神經退化性疾病等相關研究中扮演重要的角色，因此，已有許多研究指出，SAMP8 小鼠大腦中會產生類澱粉胜肽堆積、tau 蛋白過磷酸化、學習與記憶能力喪失，以上三種病徵都是阿滋海默症的主要症狀。而 Alzforum (<http://www.alzforum.org>)中也提到，SAMP8 小鼠在 APP 與人類有 89.2%的相似度，且並未有相關研究發現此老鼠模式擁有相關人類家族性遺傳阿滋海默症基因。此外，SAMP8 亦有免疫機能喪失、焦慮與生理時鐘亂序等症狀。因此 SAMP8 小鼠已廣泛應用於許多阿滋海默症相關研究中。

SAMP8 小鼠除了會發展出類似阿滋海默症主要病徵的病理外，也有許多研究指出，SAMP8 小鼠也有隨著老化而發展出許多神經退化性疾病的特徵，如 Axonal

dystrophy 的現象(Kawamata et al., 1994)、Alterations in receptors / synapses / membranes 於腦部神經細胞的退化跡象(Sugiyama et al., 1987)、腦部 Neuronal atrophy / loss 的現象(Kawamata et al., 1990a, 1990b)，以及 Astrogliosis (Kato-Semba and Kato, 1994)與 blood-brain barrier dysfunction(Ueno et al., 1993)等現象。





圖八、老化促進小鼠各品系的發展分支圖

Figure 8. Genealogical chart for the development of SAM strains as of Dec 2005. (Takeda, 2009)

表七、日本老化促進小鼠研究協議會對目前老化促進小鼠各亞系的分類與病徵

Table 7. Pathobiological phenotypes in the major SAM strains

| SAM 各系統的特徵的形質 | | |
|----------------------------|---------------------|------------------------------------|
| SAMP 促進老化 短寿命 | SAMP1 | 老化アミロイドーシス、免疫機能不全、腎萎縮、聴覚障害、老年性肺過膨張 |
| | SAMP2 | 老化アミロイドーシス、免疫機能不全、腎萎縮 |
| | SAMP3 | 顎関節の変形性骨関節症、続発性アミロイドーシス |
| | SAMP6 | 老年性骨粗鬆症、続発性アミロイドーシス、大腸炎 |
| | SAMP7 | 老化アミロイドーシス、胸腺腫 |
| | SAMP8 | 学習・記憶障害、免疫機能不全、概日リズムの異常 |
| | SAMP9 | 白内障、老化アミロイドーシス |
| | SAMP10 | 脳萎縮を伴う学習・記憶障害、老化アミロイドーシス |
| | SAMP11 | 老化アミロイドーシス、腎萎縮 |
| | SAMR 正常老化 | SAMR1 |
| SAMR4 | | - |
| SAMR5 | | - |

(SAM 研究協議会について, 2011)

(二)、SAMP8 小鼠之行為模式表現

SAMP8 小鼠的學習記憶能力退化表現已在許多研究中被證明，Abe et al., (1994) 指出，SAMP8 小鼠於二月齡時即在被動迴避實驗中發現有學習記憶能力衰退之情形，在腦幹發現有海綿狀退化(Spongiform degeneration)情形以及於五月齡時可發現其梨狀皮質(Piriform cortex)有萎縮的情形。Abe et al.,(1994)更進一步認為 SAMP8 小鼠在老化過程中，其對於適應環境壓力以及維持生理恆定狀態(homeostasis)的能力會下降，並伴隨學習與記憶能力與免疫功能的衰退，例如 T 細胞的數量下降、較低的 NK 細胞與 CD4⁺細胞活性。而已有許多研究指出，SAMP8 的學習與記憶能力損傷可藉由某些特定化合物，以長期餵食後而有明顯的改善。例如 Li et al., (2009)藉由添加於飲用水中 0.05%與 0.1%綠茶兒茶素，長期餵食六個月後，在莫氏水迷津行為實驗發現，未餵食兒茶素的 10 月齡的 SAMP8 小鼠的逃脫時間(Escape latency)經過長達七天的訓練後，並未有明顯的改善；而 4 月齡 SAMP8 小鼠與 10 月齡的 SAMR1 小鼠在脫離時間的學習表現相似，此顯示年輕的老化促進小鼠在學習記憶能力表現仍相當強；而經過餵食六個月的兒茶素後，可觀察到兒茶素可以顯著改善 10 月齡的 SAMP8 小鼠在莫氏水迷津中空間記憶與學習的表現能力，但兩種劑量(0.05% and 0.1% in drinking water)的兒茶素組別，並沒有顯著的劑量效應。在莫氏水迷津七天訓練後的象限偏好測試中，可以發現 4 月齡 SAMP8 小鼠與 10 月齡的 SAMR1 小鼠對於原本放置平台之象限偏好程度顯著高於 10 月齡的 SAMP8 小鼠，而未餵食兒茶素的 SAMP8 小鼠控制組的象限偏好程度最低，但經由餵食兒茶素六個月後，對於 SAMP8 小鼠在象限的偏好程度有提高的作用；而在同樣的象限偏好測試中，紀錄游泳一分鐘內穿越原放置平台位置的次數，也有相同的趨勢，顯示兒茶素對於 SAMP8 小鼠在空間記憶學習能力確實具有提升的潛力。Zhao et al., (2009)也針對長期餵食人參皂甘予老化促進小鼠，在莫氏水迷津也可顯著改善老化促進小鼠的空間記憶與學習能力。

在 Shih et al.,(2010)的研究中也發現，餵食 100 mg/kg bw 與 500 mg/kg bw 桑椹萃取物三個月後，在被動迴避試驗中，電擊訓練結束後之 24、48、72、168 小時後進行記憶測試，可發現雖然在 24 小時的記憶測試中並未發現各組間未有顯著差異，但隨著時間越長，可看到未餵食桑椹萃取物的 SAMP8 小鼠控制組在被動迴避表現上下降的較快，不如 SAMR1 與餵食桑椹萃取物組別能夠維持被動迴避表現，此外，餵食桑椹萃取物組別之被動迴避表現與此實驗中餵食黑醋栗萃取物作為正控制組的表現幾乎相當。表八為整理目前針對 SAMP8 小鼠所做的認知行為能力相關功效型實驗。

表八、目前以老化促進小鼠模式評估不同物質改善其學習與記憶能力之功效性試驗

Table 8. Evaluation of the potential to ameliorate learning and memory in SAMP8 mice of different compounds

| Compound | Dose | Cognitive Behavior test | Results | AD pathology | Results | Molecular mechanism | Reference |
|---------------------------------|-----------------------------------|--|---------|---|---------|--|-------------------|
| Green tea catechin | 0.05 / 0.1% GTC in water | Morris water maze | + | Beta-amyloid 1-42 | + | PKA, p-CREB BDNF, PSD95 CaMKII | Li et al., 2009 |
| Anthocyanin-rich mulberry | 0.09 / 0.18% diet | Inhibitory avoidance test | + | Beta-amyloid | + | p-JNK, p-p38 ERK, Nuclear Nrf2 | Shih et al., 2010 |
| Toona sinensis | 1% diet | Active avoidance test | + | Beta-amyloid | + | - | Liao et al., 2006 |
| Hydrogen water | 0.55-0.65 mmol | Morris water maze | + | Number of neurons | + | - | Gu et al., 2010 |
| Kangen-karyu | 100mg/kg/day, p.o. | Object recognition test Object location test Elevated plus-maze test | + | - | - | NMDAR1, p-CREB CaMKII, VEGF BDNF | Zhao et al., 2010 |
| Lotus seedpod proanthocyanidins | 60, 90, 120mg/kg/day o.g. | Y-maze test | + | - | - | - | Gong et al., 2008 |
| Ginsenoside Rg1 | 2.5, 5.0, 10mg/kg i.p. | Step down test Y-maze test | + | Beta-amyloid 1-40 | + | PKA, p-CREB BDNF | Shi et al., 2010 |
| Gensenoside | 0.3, 0.6, 1.2mg/mL in water | Open field test Morris water maze Step-down test | + | Beta-amyloid 1-42 Hippocampus cell count | + | NMDAR, CaMKII PKAC β , CREB BDNF | Zhao et al., 2009 |
| Ginkgo biloba | | Morris water maze | + | - | - | | Yeunhwa et al., |

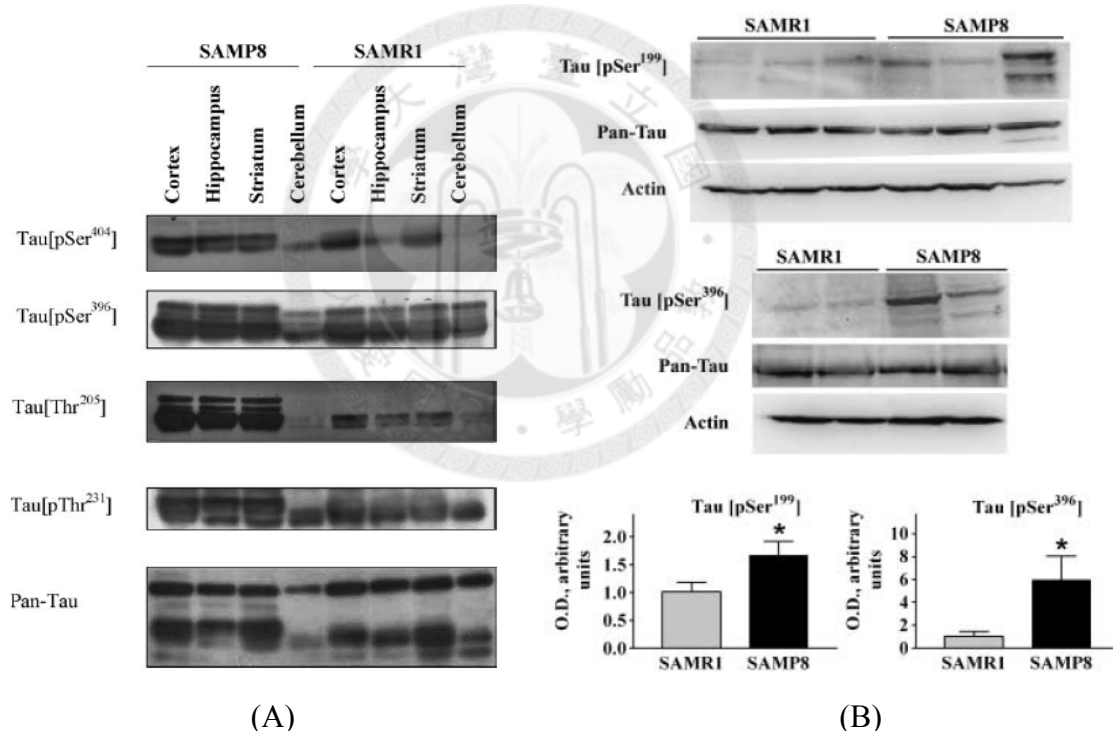
(三)、SAMP8 小鼠之腦部類澱粉胜肽沉積

在 SAMP8 小鼠腦部的類澱粉胜肽研究方面，Valle et al., (2010)針對不同月齡 ICR-CD1, SAMP8, SAMR1 小鼠腦部的類澱粉沉積做組織免疫染色，由結果可看出，一般 ICR-CD1 小鼠與 SAMR1 小鼠從三月齡到十二月齡之前，並未觀察到顯著的類澱粉團簇 (Cluster)；相反的在 SAMP8 小鼠上，從三月齡開始就可以觀察到類澱粉團簇開始生成，而隨著月齡增加而不斷上升。且在十二月齡到十五月齡。此研究也特別針對不同大小的類澱粉胜肽做更進一步分析，4G8 抗體主要辨認類澱粉胜肽胺基酸 17-24 的位置，而 12F4 抗體則辨認類澱粉胜肽_{1-42}}位置；B40 則辨認類澱粉胜肽_{1-40}}位置。結果發現在 SAMP8 小鼠的類澱粉團簇的增加量在統計上皆達顯著差異。而利用 12F4 抗體與 B40 抗體，皆可發現與 4G8 抗體相同的趨勢。此研究結果顯示，老化促進小鼠腦部生成的類澱粉胜肽與人類阿滋海默症的類似，主要由類澱粉胜肽_{1-40}}以及_{1-42}}所組成。Valle et al., (2010)進一步利用共軛焦顯微鏡觀察，而發現，SAMP8 小鼠會因月齡的增加，其腦部類澱粉團簇的累積會快速增加，且團簇的胜肽組成主要是由毒性較高的 Abeta_{1-42}}胜肽所組成。Shih et al., (2010)餵食老化促進小鼠三個月桑椹萃取物後，以西方點漬法測定腦部海馬迴中類澱粉胜肽沉積量。由此研究結果可了解，SAMP8 小鼠腦部的類澱粉胜肽量明顯高於 SAMR1 小鼠，但經餵食桑椹萃取物與黑醋栗後發現，可顯著降低 SAMP8 小鼠大腦海馬迴部份的類澱粉胜肽累積量。而進一步分析老化促進小鼠認知行為表現與類澱粉胜肽累積量的相關性分析中可看出，兩因子呈現負相關，可見降低大腦中海馬迴類澱粉胜肽量可有助於認知能力的改善。Li et al., (2009)也發現藉由餵食老化促進小鼠綠茶茶多酚可以有效降低其腦部類澱粉胜肽的含量。

(四)、SAMP8 小鼠腦部之過磷酸化 tau 蛋白沉積

Canudas et al., (2005)針對 SAMP8 小鼠腦部 tau 蛋白的過磷酸化進行分析，發現 SAMP8 小鼠腦部 cdk5 表現量顯著增加，與 tau 過磷酸化的表現呈相關性，但是 GSK3beta 則無差異。但研究針對不同胺基酸上過磷酸化的狀態下發現，在 SAMP8 小鼠模式，確實老化與 tau 蛋白的修飾與磷酸化作用有顯著的關係(圖九)。由以上可知，老化促進小鼠不只僅表現出類澱粉胜肽，阿滋海默症的另一大病徵，tau 蛋白的過磷酸化也有顯著的表現。

Orejana et al., (2011)也以餵食昔多芬(Sildenafil, 威而剛學名)四週於 SAMP8 小鼠後，可顯著改善 SAMP8 小鼠於莫氏水迷津的表現，並且可觀察到其 tau 蛋白過磷酸化現象有下降的情形。此外，更進一步觀察到與 tau 蛋白過磷酸化有關的第五型細胞週期素依賴型蛋白(cyclin-dependent kinase 5, cdk5)表現量亦有下降的趨勢，可見 tau 蛋白在 SAMP8 小鼠模式中，確實也是影響其空間記憶學習能力的因素之一。

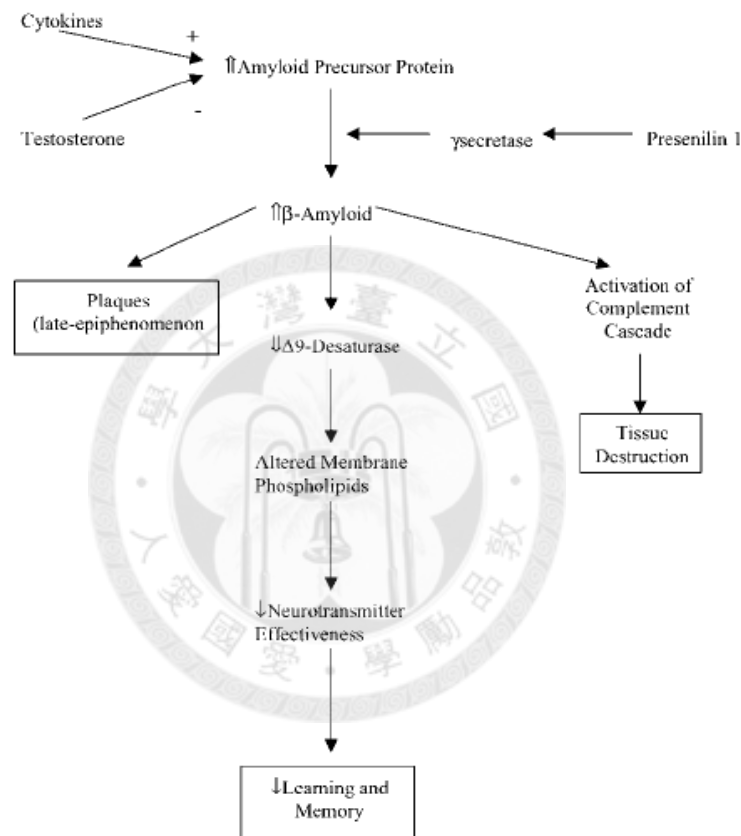


圖九、SAMP8 小鼠腦部各種不同胺基酸位置 tau 蛋白沉積的狀況

Figure 9. (A) Phosphorylation of tau protein in SAMP8 and SAMR1, 5 month-old. Tau phosphorylation was assessed using phosphorylation-dependent polyclonal antibodies Anti-tau [pSer404], anti-tau [pSer396], anti-tau [pThr205] and anti-tau [pThr231]. (Canudas et al., 2005); (B) Representative immunoblots and densitometry analysis of tau protein phosphorylation in SAMR1 and SAMP8 astrocyte cultures. Tau phosphorylation was assessed using phosphorylation-dependent antibodies anti-tau [pSer199] and anti-tau [pSer396]. (Garcia-Matas et al., 2008)

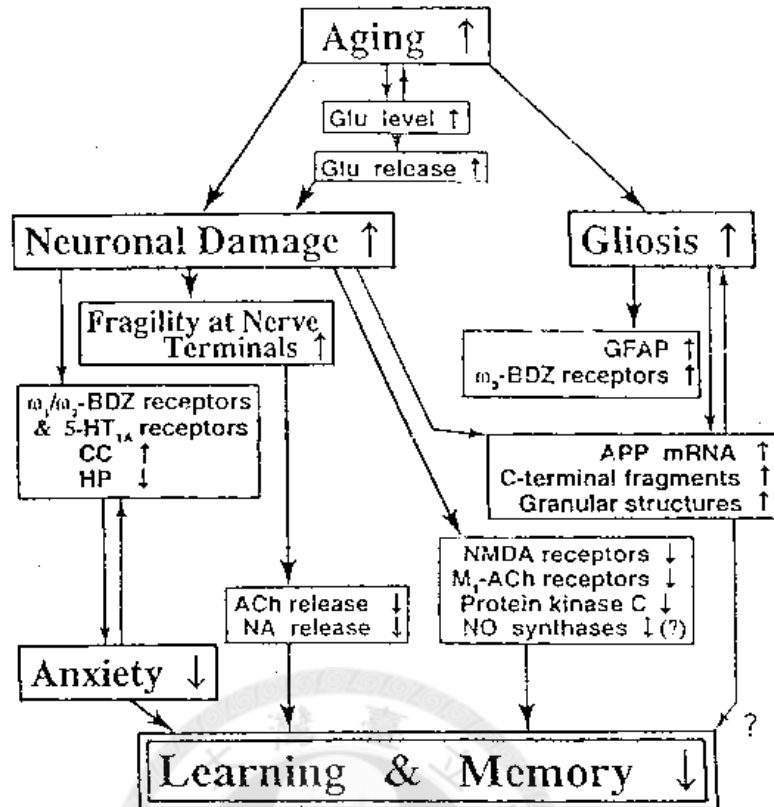
(五)、SAMP8 小鼠模式中阿滋海默症相關病理特徵之發展進程

綜合以上有關 SAMP8 小鼠在認知行為損傷、類澱粉胍肽以及 tau 蛋白過磷酸化的介紹，且這些病理特徵皆會隨著年齡而有一些漸進性的發展，Morley (2002), Valle et al (2010), Woodruff (2008)與 Pallas et al (2008)等學者皆認為 SAMP8 小鼠是用來研究阿滋海默症相當好的動物模式。Nomura et al., (1994)以及 Morley (2002)也針對 SAMP8 小鼠的一些特定生理表現，推測 SAMP8 小鼠腦部類澱粉胍肽沉積以及進一步導致學習記憶能力下降的原因做出詳細的機制路徑探討(圖十)。



圖十、(A)SAMP8 小鼠的阿滋海默症病徵產生過程示意圖
Figure 10 (A). Pathophysiology of the memory deficit in the SAMP8 mouse.

(Morley, 2002)



圖十、(B) SAMP8 小鼠模式中造成其學習與記憶能力下降之可能機制

Figure 10 (B). Possible mechanism of dysfunction of learning and memory in the brain of SAMP8 mice. BDZ: benzodiazepine; CC: cerebral cortex; HP: hippocampus; Glu: glutamate; GFAP: glial fibrillary acidic protein; APP: amyloid precursor protein; NMDA: N-methyl-D-aspartate; NO: nitric oxide; Ach: acetylcholine; NA: noradrenaline.

(Nomura et al., 1994)

(六)、SAMP8 小鼠與基因轉殖小鼠的比較分析

目前已有許多研究將目前常見的基因轉殖小鼠與 SAMP8 老化促進小鼠分別針對阿滋海默症常見的 APP 蛋白表現、Tau 蛋白、腦澱粉樣血管病、膽鹼能缺乏、神經死亡、突觸不正常化、神經膠變性與學習記憶能力下降等症狀來做分析。由表九可知，APP/NOS2, Triple-Tg 以及 APP/PS1 三種基因轉殖小鼠確實因轉殖人類家族性遺傳之阿滋海默症基因而能夠表現 human APP，反之，藉由自然快速老化而產生 APP 的 SAMP8 小鼠則表現小鼠的 APP。相較於 tau 蛋白也有類似的情形，但是如果基因轉殖小鼠並未轉入有關 tau 蛋白之上游表現基因，就無法表現 tau 蛋白的表現，也就無法完全反映出阿滋海默症病理特徵中，應同時會發現類澱粉胨堆積和 tau 過磷酸化的情形。除兩大阿滋海默症病理特徵外，在神經元細胞、神經膠與乙醯膽鹼不正常化都有不同的表現狀態。此外，表十顯示出隨著不同的時間，各種不同基因轉殖小鼠與 SAMP8 小鼠在各種不同阿滋海默症病徵呈現的時間點也有所不同。例如，Tg2576 小鼠從八月齡開始會產生氧化壓力，十月齡時會觀察到類澱粉胨沉積與認知能力的下降，進一步到十二月齡以後，則會產生 tau 蛋白的過磷酸化與神經膠變性等病徵。而 3xTg-AD 小鼠的發病期則較早，於約四月齡時就會發生類澱粉胨沉積與 tau 蛋白過磷酸化進一步造成認知障礙。在 SAMP8 小鼠方面，則從三月齡時，其體內之氧化壓力就已上升，而在六月齡時則會產生 tau 蛋白過磷酸化，在老年期時，則可以觀察到已形成斑塊的類澱粉胨沉積。表十一為本研究針對基因轉殖小鼠與老化促進小鼠的優劣點進行的分類，由此可知，SAMP8 小鼠的病理發展更類似於人類的阿滋海默症。

表九、不同應用於阿滋海默症動物模式在各種指標上的效度評分

Table 9. Some qualities of mouse models of Alzheimer36f1cd86b}

| AD-related quality | SAMP8 | APP/NOS2 -/- | Triple-Tg | Tau Tg | A β PP/PS1 |
|-------------------------------------|-------|--------------|-----------|--------|------------------|
| <i>AβPP</i> | | | | | |
| <i>mutated human mouse</i> | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| <i>Tau</i> | | | | | |
| <i>mutated human mouse</i> | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| <i>Cerebral amyloid angiopathy</i> | | ✓ | ✓ | | ✓ |
| <i>Cholinergic deficit</i> | ✓ | | ✓ | | |
| <i>Neuron loss</i> | | ✓ | | | |
| <i>Synaptic disruption</i> | | ✓ | ✓ | | |
| <i>Gliosis</i> | ✓ | | | | |
| <i>Impaired learning and memory</i> | ✓ | ✓ | ✓ | | ✓ |

(Woodruff-Pak, 2008)

表十、各種不同阿滋海默症動物模式在各項病徵的發病期示意圖

Table 10. Chronology of appearance of AD-like pathology and cognitive decline in various transgenic mouse models of AD.

| AD-like phenotypes | 2 Months | 4 Months | 6 Months | 8 Months | 10 Months | 12 Months | 12+ Months |
|----------------------------------|------------------------|---------------------------------------|-------------------------|----------|----------------------|-----------|--------------------|
| Cognitive Deficits (Hippocampal) | | APP23 JNPL3 TauP301L 3xTg-AD | PDAPP CRND8 SAMP8 | | Tg 2576 | PSAPP | hPS1-2 Tg |
| Oxidative Stress | PSAPP SAMP8 (3M) | | | Tg 2576 | APP23 | PDAPP | |
| Amyloid- β | | CRND8 3xTg-AD PSAPP | APP23 | | Tg 2576 hPS1-2 Tg | PDAPP | SAMP8 [#] |
| Tau phosphorylation | | JNPL3 TauP301L 3xTg-AD | SAMP8 (5M) | | | APP23 | PDAPP Tg 2576 |
| Gliosis | | | | SAMP8 | | | Tg 2576 |

[#] Amyloid- β plaques occur around 18 months. Increased levels of soluble amyloid- β are detected at 8 months.

(Pallas et al., 2008)

表十一、基因轉殖小鼠與 SAMP8 小鼠於阿滋海默症動物模式上應用之優劣分析
 Table 11. Pros and cons between transgenic mice and SAMP8 mice for application on Alzheimer's disease animal model.

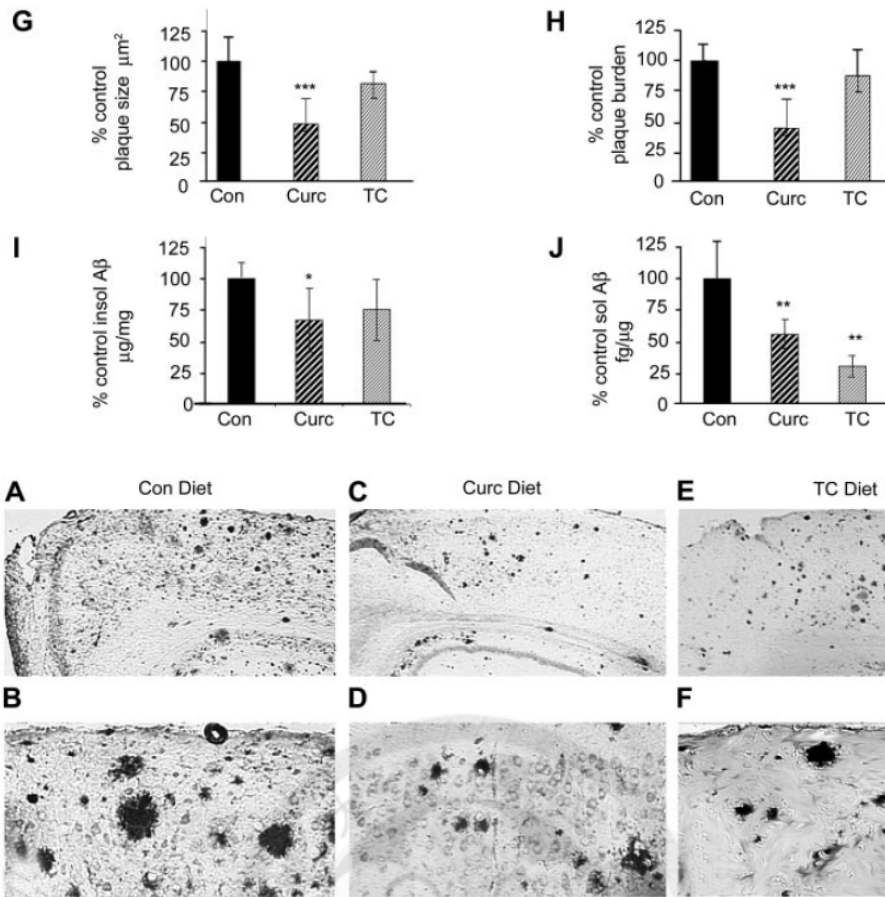
| | Transgenic mice | Senescence-accelerated mouse prone-8 (SAMP8) mice |
|------------|---|---|
| Advantages | Perfect copies of human A β PP and presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) which implicated in familial AD. Easy to produce doubly transgenic for A β PP + PS1. | SAMP8 mice model is based on age rather than on mutation, which is more closed to sporadic Alzheimer's disease. The APP of SAMP8 mice having 89.2% homology with human APP. |
| Drawbacks | The compact plaques produced in mice generally exhibit a less dense and a more amorphous morphology than those observed in AD patients. Lacking the extensive post-translational modifications on A β . | Poor immune system and shorter life span. High mortality than normal rodent model. Less dense and a more amorphous beta amyloid deposition than human. |
| Reference | Kokjohn and Roher, 2010 Woodruff-Pak, 2008 | Woodruff-Pak, 2008 Alzforum website: http://www.alzforum.org |

六、實驗樣品

(一)、薑黃素

薑黃素是薑黃(*Curcuma longa*)中的主要成份之一，是一種多酚類物質。在化學結構上，是 bis-alpha, beta-unsaturated beta-diketone，又通稱為 diferuloylmethane。一般市售的薑黃素，大部份是由 diferuloylmethane, demethoxycurcumin 以及 bisdemethoxycurcumin，各以約 77%, 17%和 6%組成的 curcuminoid。許多研究指出，薑黃素具有抗發炎、抗氧化、抗菌等作用，Hamaguchi et al.,(2010)更針對 curcumin 與阿滋海默症做了一系列的 review，在其中可以發現 curcumin 在阿滋海默症動物模式中，可以發現有降低 insoluble abeta(Begum et al., 2008; Lim et al., 2001), soluble abeta (Lim et al., 2001), abeta plaque burden (Lim et al., 2001; Frautschy et al., 2001; Begum et al., 2008), A11 antibody positive oligomer(Hamaguchi et al., 2009)以及 tau 蛋白的過磷酸化(Ma et al., 2009)，此外，也能夠下降氧化壓力所造成的損傷(Frautschy et al., 2001)。在動物行為模式中，以 Tg2576 小鼠為例，薑黃素可以有效的降低動物腦部的類澱粉胍肽沉積(圖十一)(Begum et al., 2008)。Pan et al., (2008)使用 200 ppm 薑黃素餵食昆明鼠(Kunming mice)亦有效增進小鼠於 step-through test 的表現。而在其他阿滋海默症動物模式中也有類似的發現(Lim et al., 2001; Yang et al., 2005)，而利用幫浦注入類澱粉胍肽到腦部的動物模式中，在餵食薑黃素後也可有效的降低認知能力的損傷(Frautschy et al., 2001)。

但進一步針對動物以及人體試驗發現，生物體對於薑黃素的生物可利用率卻相當低，而最近有許多研究則發現，服用薑黃素時與胡椒鹼(piperine)一起服用，以其作為佐劑(adjuvant)，以抑制干擾葡萄糖醛酸的反應(glucuronidation)，以提升薑黃素的生物可利用率；此外，也有利用微膠囊化的製程，或是奈米化技術等方法提升生物體對於薑黃素的吸收程度(Anand et al., 2007)。根據 Shoba et al., (1997)以及 Suresh and Srinivasan (2010)針對以薑黃素與胡椒鹼同時食用，不僅在大鼠模式看到顯著提升生物可利用率的效果，在人體中的吸收幅度更大為上升。在藥物動力學參數中，可以發現，同時食用薑黃素與胡椒鹼，可以提升薑黃素的半衰期(Half time, $T_{1/2}$)，也降低了動物於糞便中排除薑黃素的含量，生物可利用率則可提高約 154%。



圖十一、餵食 Tg2576 小鼠薑黃素與四氫薑黃素對於其腦部類澱粉胜肽的組織免疫染色分析與定量

Table 11. Dietary curcumin seems more effective than tetrahydrocurcumin in reducing plaque pathology in the Tg2576 APPsw mouse, but both reduce soluble beta amyloid levels.

(Begum et al., 2008)

(二)、芝麻酚

芝麻酚(benzo [1,3]dioxol-5-ol)為一分子量為 138 的酚類化合物，為植物油或豬油中的抗氧化劑之一，具有良好的抗氧化活性(Suja et al., 2004; Dachtler et al., 2003)，但其穩定性則較差。芝麻酚是 sesamol 熱裂解後的產物之一，但其在芝麻中的含量卻相當少，一般而言，經過炒焙後的芝麻，其芝麻酚含量才會較高(張，2009)。本研究團隊的研究指出，芝麻酚在大鼠模式中，其口服生物可利用率可高達 35.5%，且在服用後，在 24 小時內會分布於各組織器官與血漿中。進一步針對不同器官中的芝麻酚含量測定，發現經口服餵食 50 mg/kg BW 十小時後，仍可在腦部偵測到 $2\mu\text{g}/\text{g}$ tissue，最高濃度可達到 $8\mu\text{g}/\text{g}$ tissue。有此可知，芝麻酚具有能夠通過血腦障壁的能力(Jan et al., 2008)。由於生物體對於芝麻酚的吸收程度相當高，為確保其潛在毒性對於生物體的影響，在 Little (1991)進一步針對芝麻酚做一系列的毒理試驗，並計算出芝麻酚的 LD_{50} 為 470 mg/kg。Hirose et al., (1997)在餵食 104 週芝麻酚以測定其致癌性，則發現會稍微提高老鼠乳頭狀瘤的發生率(15.8%)。

在芝麻酚對動物行為表現研究方面，Kuhad and Chopra (2008)則發現餵食芝麻酚予鏈脲佐菌素 Streptozotocin (STZ)誘導之糖尿病大鼠，對於其莫氏水迷津中之空間學習與記憶能力有顯著的改善。

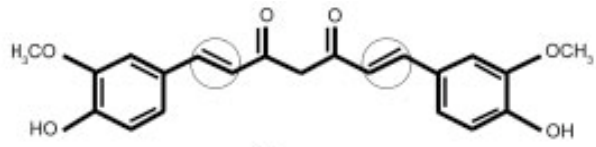
(三)、藁本內酯

藁本內酯(Z-ligustilide)是當歸(*Angelica sinensis*)以及川穹(*Ligusticum chuanxiong*)中的主要成份。分子量為 288，具有親脂特性。本研究室團隊也成功建立從當歸中分離純化並鑑定出此化合物(Ho et al., 2009)。本實驗室也進一步發現，在分化後的 PC-12 細胞中，藁本內酯具有抑制類澱粉胜肽₁₋₄₀的細胞毒性。Kuang et al., (2009)也利用注入類澱粉胜肽₂₅₋₃₅於大鼠腦部誘發神經毒性與發炎反應的模式，進一步餵食藁本內酯後發現其具有降低其空間記憶學習能力損傷的能力。而其他研究指出，大鼠對於藁本內酯的生物可利用率約 2.6% (Yan et al., 2008)，但 Shi et al., (2006)針對藁本內酯的組織代謝分布實驗中發現，雖然其生物可利用率低，但經由口服餵食(20mg/kg BW)藁本內酯仍可進入腦部(1µg/g tissue)，顯示其也有通過血腦障壁的能力。表十二是針對本研究使用的實驗樣品的藥物動力學參數進行的整理。

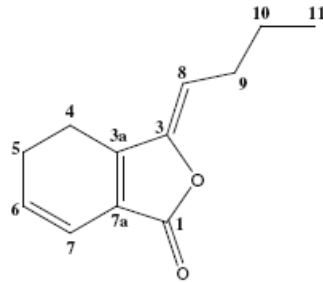
表十二、薑黃素、芝麻酚與藁本內酯的生物可利用率分析

Table 12. The Pharmacokinetic parameters of curcumin, sesamol, and Z-ligustilide

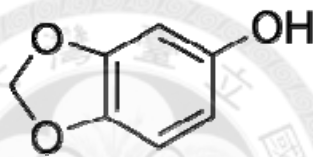
| Parent compound | Curcumin | | Sesamol | | Z-ligustilide | |
|--------------------------------|-------------------|-----------|------------------|-------------|------------------|-----------|
| | i.v. | p.o. | i.v. | p.o. | i.v. | p.o. |
| Route | i.v. | p.o. | i.v. | p.o. | i.v. | p.o. |
| Dosing (mg/kg) | 10 | 500 | 5 | 50 | 15.6 | 500 |
| AUC (min ug/ml) | 7.2±1.2 | 3.6±0.6 | 141.4±9.0 | 501.3±200.8 | 28.236 | 23.5 |
| T _{max} (min) | - | 41.7±5.4 | - | 2.5±1.2 | - | 36±1.9 |
| C _{max} (ug/mL) | 0.36±0.05 | 0.06±0.01 | 2.3±0.6 | 1.4±0.7 | 13.19±0.84 | 0.66±0.23 |
| t _{1/2} (min) | 28.1±5.6 | 44.5±7.5 | 29.2±6.1 | 563.7±36.9 | 31±12 | 223±61 |
| Oral Bioavailability (F) | 1 | | 35.5 | | 2.6 | |
| Enter into BBB | Yes | | Yes | | Yes | |
| Reference | Yang et al., 2007 | | Jan et al., 2008 | | Yan et al., 2008 | |



A. 薑黃素(Curcumin)



B. 稟本內酯(Z-ligustilide)



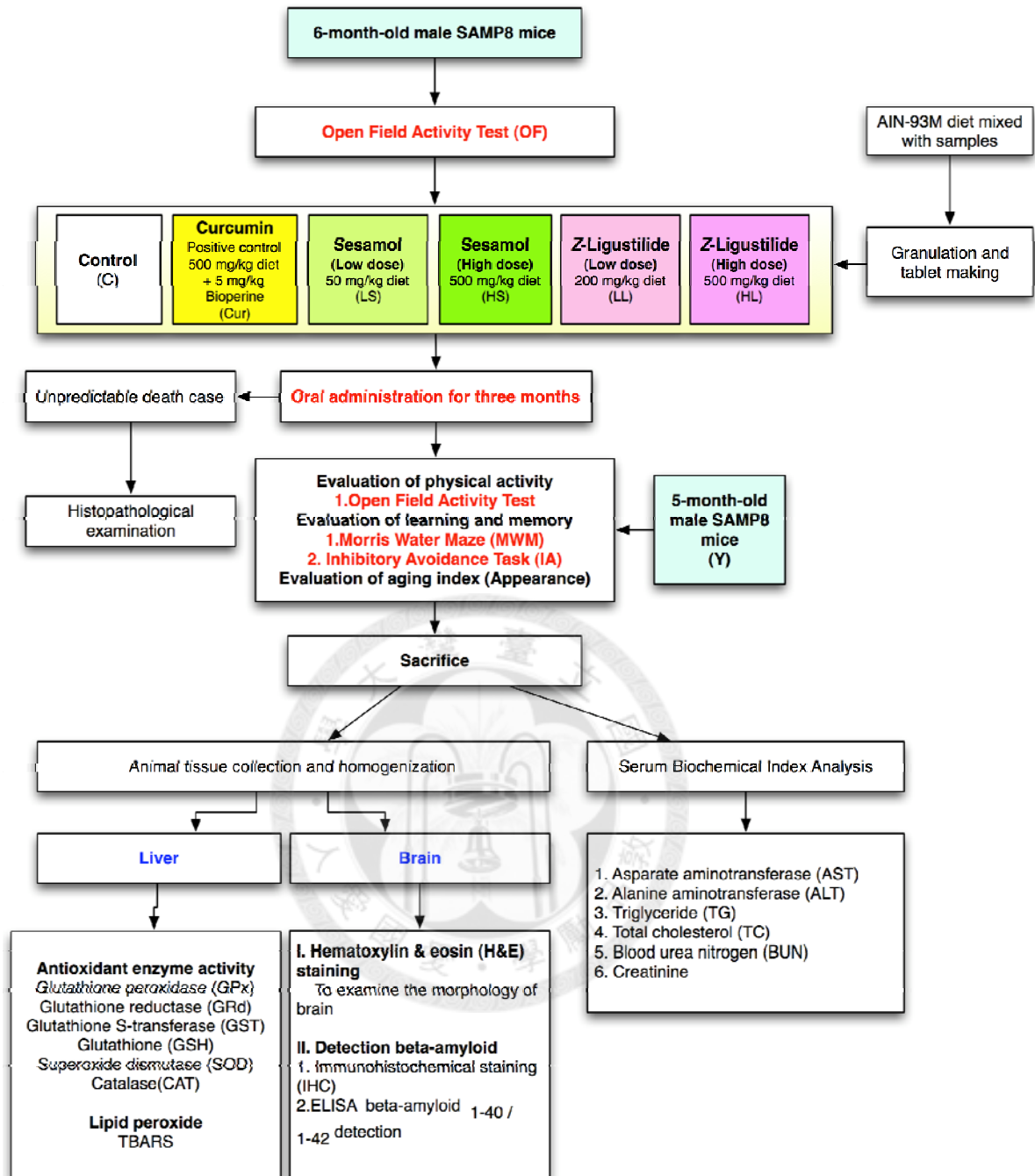
C. 芝麻酚(sesamol)

圖十二、本研究實驗樣品之化學結構式 (A). 薑黃素、(B). 稟本內酯、(C) 芝麻酚
Figure 12. Structure of (A) curcumin, (B) Z-ligustilide, (C) sesamol

參、研究目的與實驗架構

本研究使用六月齡之 SAMP8 小鼠進行實驗，以活動量測試中之移動總距離之參數進行分組，以確保各組小鼠之活動量範圍相同，並藉此剔除活動量異常之小鼠，剔除標準為該小鼠移動總距離與全部小鼠之平均值差異超過兩個標準差。活動量測定完成後以 S 型進行分組。餵食過程以 AIN-93M 飼料粉末與樣品混合後，進行造粒與打錠進行餵食十二週後，再次進行活動量測試與學習記憶能力行為實驗。餵食過程中因免疫功能下降而造成死亡的 SAMP8 小鼠會移出進行病理分析。餵食十二週後進行之莫氏水迷津與被動迴避試驗需約三週，該期間仍然以原樣品飼料進行餵食，待所有行為實驗結束後，會進行犧牲，測定餵食樣品十五週，以血清生化指標檢測小鼠的健康狀況；以肝臟抗氧化酵素與脂質過氧化物檢測小鼠的抗氧化酵素系統狀況與氧化壓力情形；利用組織免疫染色與 ELISA 方式檢測小鼠腦部的類澱粉胨含量，並針對類澱粉胨、氧化壓力情形與認知行為能力進行相關性分析，以探討 SAMP8 小鼠是否可藉由個別餵食稟本內酯或芝麻酚以改善認知行為能力損傷與其阿滋海默症病理特徵之潛力。





圖十三、實驗架構

Figure 13. Flowchart of this study

肆、材料與方法

一、實驗材料

(一)、薑黃素 C3 與胡椒鹼複合物 (Curcumin C3 complex + Bioperine)

承蒙美國 Rutgers 大學食品科學系何其儻教授提供之 Sabinsa 公司產品。

(Bangalore, Karnataka, India) (Batch No. C101109E-P)

(二)、芝麻酚 (sesamol)

購自 Fluka 公司 (St. Louis, MO, USA) (Cat. No. 85070, Lot & Filling code:

1358697 40709043)。純度>98%。

(三)、橐本內酯 (Z-ligustilide)

承蒙美國 Rutgers 大學食品科學系由何其儻教授提供。純度 50%，配置飼料時以兩倍量添加。

(四)、AIN-93M diet

購自 MP 公司 (Solon, OH, USA) Cat. No 96039。

(五)、Purina 5001 rodent chow diet

購自 Purina 公司 (St. Louis, MO, USA)。

二、化學試劑與儀器設備

(一)、化學藥品

飼料打錠：

1. 硬脂酸鎂 (1303-5350):購自 Showa 公司 (Gyoda, Saitama, Japan)
2. 二氧化矽 (S9887):購自 Sigma-aldrich 公司(St. Louis, MO, USA)

動物標記與行為實驗相關：

1. 苦味酸 (80492)：購自 Fluka 公司(St. Louis, MO, USA)
2. 黑色廣告顏料：購自飛龍公司 (Tokyo, Japan)

組織免疫染色：

1. Vectastain ABC kit (Elite PK-6100)：購自 Vector 公司 (Burlingame, CA, USA)
2. ImmPACT DAB peroxidase substrate kit (SK-4105)：購自 Vector 公司 (Burlingame, CA, USA)

3. Concentrated (10X) Antigen Retrieval AR-10 solution
(Tris-EDTA)(HK057-5K) : 購自 Biogenex 公司 (San Ramon, CA, USA)
4. Immunity staining guard pen : 購自 Cirisc 公司 (Japan)
5. Horse serum (Cat. No. 16050-122):購自 Gibco 公司(Grand Island, NY, USA)
6. Triton X-100 : 購自 Sigma-aldrich 公司(St. Louis, MO, USA)
7. Mounting solution : 購自 Bio SB 公司(Santa Barbara, CA, USA)
8. Molecular sieve 0.4 nm : 購自 Riedel-deHaen 公司(St. Louis, MO, USA)
9. Beta amyloid, 1-16 (6E10) monoclonal antibody (SIG-39320) : 購自 Covance 公司(Emeryville, CA, USA)
10. Anti-oligomer antibody (A11)(AHB0052) : 購自 Invitrogen 公司 (Camarillo, CA, USA)
11. Anti-amyloid fibrils LOC antibody (AB2287) : 購自 Millipore 公司 (Temecula, CA, USA)
12. Biotinylated anti-mouse / anti rabbit IgG antibody (BA-1400) : 購自 Vector 公司 (Burlingame, CA, USA)

Mouse beta amyloid₁₋₄₀ ELISA 測定樣品前處理:

1. Potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄) : 購自 E. Merck 公司 (Darmstadt, Germany)
2. Potassium chloride (KCl) : 購自 E. Merck 公司 (Darmstadt, Germany)
3. Sodium chloride (NaCl) : 購自 E. Merck 公司 (Darmstadt, Germany)
4. Bovine serum albumin (BSA) (Cat. No. A4503):購自 Sigma-aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)
5. Tween 20(Cat. No. P5927) : 購自 Sigma-aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)

Mouse beta-amyloid₁₋₄₀ / 1-42 ELISA:

1. Guanidine hydrochloride (G3272) : 購自 Sigma-aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)
2. Trizma hydrochloride (T5941) : 購自 Sigma-aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)
3. Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA) (E6511): 購自 Sigma-aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)

4. Protease Inhibitor Cocktail for use with mammalian cell and tissue extracts, DMSO solution (P8340) : 購自 Sigma-aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)

GPx 測定:

1. Di Potassium hydrogen phosphate (1.05104.1000):購自 Merck 公司(Darmstadt, Germany)
2. Potassium phosphate monobasic (04243) : 購自 Sigma-aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)
3. NADPH (N1630) : 購自 Sigma-aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)
4. GSH reductase (G3664) : 購自 Sigma-aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)
5. Glutathione (G4251) : 購自 Sigma-aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)
6. Sodium azide (13412) : 購自 Riedel-de Haen 公司 (Seelze, Germany)
7. Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA) (E6511):購自 Sigma-aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)
8. Hydrogen peroxide solution, 3 wt% in H₂O:購自 Sigma-aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)

GRd 測定 :

1. Magnesium chloride hexahydrate (1.05833.0250) : 購自 Merck 公司(Darmstadt, Germany)
2. NADPH (N1630) : 購自 Sigma-aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)
3. Glutathione oxidized disodium salt, GSSG (G4626):購自 Sigma-aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)

GST 測定 :

- 1.1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB):購自 Sigma-aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)

SOD 測定 :

2. Pyrogallol:購自 Sigma-aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)
Superoxide dismutase, SOD, from bovine erythrocyte : 購自 E. Merck 公司 (Darmstadt, Germany)

(二)、酵素套組

1. Glutathione Assay Kit (Cat. No. 703002) : 購自 Cayman 公司 (Ann Arbor, MI, USA)

Mouse beta amyloid₁₋₄₀ ELISA kit (Cat. No. KMB3481): 購自 Invitrogen 公司 (Frederick, MD, USA)

2. Mouse beta-amyloid₁₋₄₀ ELISA kit (Cat. No. KMB3481) : 購自 Invitrogen 公司 (Camarillo, CA, USA)

3. Mouse beta-amyloid₁₋₄₂ ELISA kit (Cat. No. KMB3441) : 購自 Invitrogen 公司 (Camarillo, CA, USA)

(三)、一般實驗用儀器設備

1. 分析天平 (Analytical balance): Model 1712, 購自 Sartorius 公司 (Goettingen, Germany)

2. -20°C 冰箱 (Refrigerator) : Model RT-4502GS, 購自 Westinghouse 公司授權聲寶公司製造 (Taipei, Taiwan)

3. 組織均質機 (Homogenizer) : Model DC-CH40, 購自 Pyrex 公司 (Tokyo, Japan)

4. -80°C 冷凍櫃 (Ultra-low Freezer) : Model NU-6511, 購自 NuAire 公司 (Polymouth, MN, USA)

5. 超高速離心機 (Ultracentrifuge): Model LE-80K, 購自 Beckman 公司 (Palo Alto, CA, USA)

6. 桌上型高速離心機 (Tabletop Ultracentrifuge): Model Mikro 22R, 購自 Hettich 公司 (Baujahr, Germany)

7. 恆溫水浴槽 (Water bath): Model 905, 購自 Hotech 公司 (Taipei, Taiwan)

8. 酸鹼度計 (pH meter) : Model SP2200, 購自 Suntex (Taipei, Taiwan)

9. 多功能全光譜分析儀 (Multi-detection microplate reader): SynergyTMHT, 購自 Bio-tek 公司 (Atlanta, GA, USA)

10. 加熱攪拌器 (Stirrer/ Heater): Model PC351, 購自 IWAKI 公司。

11. 細胞破碎機 : Misonix ultrasonic liquid processors 購自 Misonix 公司。

(四)、動物飼養相關設備與行為實驗儀器與軟體

- 1.被動迴避電擊器(Constant current shocker model 58006)：購自 Lafayette instrument 公司 (Indiana, USA)
- 2.時間控制器(Control timer, model 58010)：購自 Lafayette instrument 公司 (Indiana, USA)
- 3.Ethovision 攝影紀錄系統：購自 Noldus information technology (Netherland)
- 4.活動量測定儀(E63-10)：購自 Coulbourn instruments (PA, USA)
- 5.活動量感測儀(E63-12)：購自 Coulbourn instruments (PA, USA)
- 6.Tru Scan 活動量分析軟體
- 7.Gaphic state 被動迴避軟體
- 8.IVC 獨立進氣動物飼養系統：購自 biozone 公司(Ramsgate, Kent,,UK)
- 9.單層迴轉式打錠機(JCMCO JC-RT-16HSP-028):鎮江公司(豐原，台灣)

(五)、組織切片觀察與定量儀器與軟體

1. 類流式定量組織細胞分析儀(Multichannel immunofluorescence tissue analysis system)：購自 TissueGnostics 公司(Los Angeles, CA, USA)
2. TissueQuest 2.02.0252 掃描定量軟體：購自 TissueGnostics 公司(Los Angeles, CA, USA)

三、實驗動物、飼料配製與飼養條件與環境豐富度

(一)、實驗動物

本研究使用之實驗小鼠為 Senescence-accelerated mouse prone-8 mice (SAMP8 mice) 老化促進小鼠，由靜宜大學食品營養學系王銘富教授提供，以下簡稱 SAMP8 小鼠。

(二)、飼料配製、動物飼養環境與組別設定

本試驗一切遵照國立台灣大學動物管理委員會之規範與操作守則。本研究選取五月齡之 SAMP8 小鼠進行開始進行試驗，每組約十隻。第一組為五月齡年輕 SAMP8 小鼠對照組，第二組為 SAMP8 小鼠控制組，控制組皆餵食基礎飼料。第三組為 SAMP8 正控制組，飼料中含有 500 mg/kg diet 薑黃素，劑量相當於 66.67 mg/kg bw。第四、五組分別為 SAMP8 小鼠 ligustilide 處理組，分別餵食低劑量 (200 mg/kg diet) 與高劑量 (500mg/kg diet) ligustilide，分別相當於 26.67 及 66.67 mg/kg bw。第六、七組分別為 SAMP8 小鼠 sesamol 處理組，分別餵食低劑量(50 mg/kg diet)與高劑量(500

mg/kg diet) 芝麻酚，分別相當於 6.667 及 66.67 mg/kg bw。除五月齡年輕 SAMP8 小鼠對照組外，其他組別皆以一般 chow diet (Lab 5001) 預養一個月後，才進行正式實驗。飼料在打錠後，使用厚 1mm 不透光之真空包裝袋進行真空包裝，每包真空包裝量約為食用三到四天之量，包裝完後置於-20 完後冷藏。餵食方式採自由進食，每天傍晚五點至七點間更換飼料。每次更換飼料僅放置前一天該籠攝食量再加約五克，隔天未食用完之飼料則移出，以避免飼料中之抗氧化物質及其他活性物質裂變造成實驗誤差。動物行為試驗期間則於每天早上五點至六點間更換飼料；自由攝取水分，動物房溫度與相對濕度分別控制在 $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ 與 $65\pm 5\%$ 之環境。生活週期為 12 小時光照，自早上五點至下午五點。動物飼養於 Biozone 獨立進氣系統 (Individual Ventilated Cage, IVC) (Ramsgate, Kent, UK)，獨立進氣系統之壓力維持在 1 到 1.4 Pa，換氣率 (Air Change per Hour, ACH) 維持在 $100\pm 10\%$ ，獨立進氣系統濾網、飼養盒進出過濾海綿、動物飼養盒與墊料每週更換一次。墊料使用德國 JRS 公司 IVC 系統專用玉米梗墊料 (MK2000)。

SAMP8 小鼠使用 0.03% 之苦味酸分別在頭部、背部、尾部進行標記，以利未來動物行為試驗與各項參數統計分析之進行。

表十三、AIN-93M 飼料之基本成分組成與樣品劑量比例
 Table 13. Proximate composition and dose of sample in AIN-93M diet

| Ingredient | Amount of each component in AIN-93M diet (Percentage, %) | | | | | |
|---------------------------------|---|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Control | Cur | LL | HL | LS | HS |
| Casein | 14.0000 | 14.0000 | 14.0000 | 14.0000 | 14.0000 | 14.0000 |
| Dextrinized corn starch | 15.5 | 15.5 | 15.5 | 15.5 | 15.5 | 15.5 |
| Sucrose | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 |
| Corn starch | 46.5692 | 46.5692 | 46.5692 | 46.5692 | 46.5692 | 46.5692 |
| Alphacel, non-nutritive bulk | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| Soybean oil | 4.0 | 4.0 | 4.0 | 4.0 | 4.0 | 4.0 |
| AIN-93M mineral mix | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| L-cystine | 0.18 | 0.18 | 0.18 | 0.18 | 0.18 | 0.18 |
| AIN-93M-VX vitamin mix | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Choline bitartrate | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| <i>tert</i> -butylhydroquinone | 0.0008 | 0.0008 | 0.0008 | 0.0008 | 0.0008 | 0.0008 |
| <i>Total</i> | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| <i>Additional adding</i> | | | | | | |
| Curcumin | - | 0.05 | - | - | - | - |
| Z-ligustilide | - | - | 0.02 | 0.05 | - | - |
| Sesamol | - | - | - | - | 0.005 | 0.05 |
| Magnesium stearate | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| Silicon Dioxide | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |

(三)、飼料造粒與打錠

1.樣品配置與飼料粉造粒程序

本造粒方法由元培科技大學生物科技系林山陽教授與林志城教授技術指導，造粒方法為採用溼式造粒法（Wet granulation），以 AIN-93M 飼料粉與樣品由小到大量均勻混合之後，每批造粒飼料量固定為一公斤的 AIN-93M 粉末，將 AIN-93M 粉末放於直徑約三十六公分之盆中，酌量分次加入 160 毫升之 Q 水，並將粉末與水分搓打均勻後，以 20 mesh 篩網過篩，將過篩後粉末平鋪在不鏽鋼盤上，以 35°C 熱風乾燥三小時，乾燥過程中，每小時需將粉末攪拌、翻面以確保乾燥完全。乾燥後粉末以兩層夾鏈袋包裝，並放於乾燥箱保存。未造粒前與造粒後之乾燥粉末不可冷藏與冷凍，以避免油脂析出與結塊。

2.打錠程序

本打錠方法由元培科技大學生物科技系林山陽教授與林志城教授技術指導與財團法人醫藥工業技術發展中心之技術支援，打錠程序為將乾燥 AIN-93M 粉末倒入打錠機進口處，以連續式打錠機進行打錠，為確保打錠過程粉體流動性與降低粉體間之鍵結與摩擦力，AIN-93M 乾燥粉末中會添加 0.5%硬脂酸鎂作為脫模劑，以防止飼料粉末黏著在模具上；以及添加 0.5%二氧化矽，作為減少粉體摩擦力的介質。打錠機打錠時以四沖到六沖為主，錠型為 800mg 的扁圓形錠劑。

四、動物認知行為實驗

進行動物認知行為實驗前一週，於每天早上五點半，將小鼠從籠中取出，讓小鼠在行為實驗操作者手上進行操弄五分鐘，使其習慣行為實驗操作者對小鼠的操弄與手法，降低其緊迫行為，以避免實驗誤差。於動物認知行為測試期間，實驗進行前皆將鼠籠移至行為測試房間外的走廊，使其適應環境半小時。

(一)、活動量測試（Open Field Activity Test, OF）與試驗分組

1.儀器

以活動量測定儀（E63-10, Coulbourn instruments, PA, USA）測定，測定儀由一方形平台（25.4 x 25.4 x 40.64, L x W x H）、兩組紅外線偵測環（E63-12）與 Tru Scan 軟體組成。

2. 測定程序

測定時間固定為實驗當天早上五點半開始，測定空間為亮室。測定程序為將老鼠輕放於方形平台中央，蓋上壓克力上蓋後，開始計時十分鐘，由電腦分析每隻 SAMP8 小鼠在十分鐘內之移動總距離 (Total distance, cm)、站立次數 (Number of rearing, n)、站立總時間 (Time in rearing, sec)、小鼠於方形平台中央所待之總時間 (Time in the central arena, sec)、SAMP8 小鼠於試驗結束後其排出之糞便顆數 (Number of fecal boluses, n)。每隻小鼠之試驗結束後，固定以 20%酒精擦拭方形平台與壓克力上蓋，並清除所有尿液與糞便，以避免對於下一隻小鼠的試驗影響。

3. 試驗分組

為確保分組後，每組內 SAMP8 小鼠個體間的活動量分佈相同，以活動量測試中之移動總距離參數，由高到低排列，以 S 型分組法，將 SAMP8 小鼠平均分配，並搭配 One-way ANOVA repeated measure 接 post-hoc Fisher's LSD tests 確認組間之移動總距離無統計上之顯著差異。

4 試驗測定時間

SAMP8 小鼠於進入平均月齡六個月之前一天進行第一次活動量測試，測試完畢後，則於隔天依據移動總距離分組，並開始進行三個月之長期餵食。餵食三個月後，測定第二次活動量測試，以評估各組因老化與餵食樣品而造成在各項參數之變化。

(二)、被動迴避試驗(Inhibitory Avoidance Task, IA)

1. 儀器與環境設定

被動迴避試驗以分隔為兩室之穿梭箱 (35 x 25 x 25, W x D x H, shuttle cage, Coulbourn instruments, Model E10-15GD) 搭配 animal shocker (H13-15) 與 shock floor 以及 Graphic state 軟體組成。試驗進行中，試驗房間須關閉燈源，避免有其他光源於該試驗環境出現，以暗室中進行試驗為原則。

3. 試驗程序

試驗程序主要分為三階段，第一為預訓練階段(Pre-exposure stage)、第二為訓練階段(Training stage)、第三為記憶測試訓練(Testing stage)。

第一天為預訓練階段(Pre-exposure stage)，讓 SAMP8 小鼠熟悉此作業行為模式與實驗者之操弄。將 SAMP8 小鼠置入穿梭箱之亮區中央，並背對活門，待 SAMP8 小鼠進入暗區後，即關閉活門，於二十秒後將 SAMP8 小鼠由暗區取出，再放回亮區。如在一分鐘內，SAMP8 小鼠未進入暗區，則強迫其進入暗區，同樣使其待在暗區二十秒。此訓練程序共連續重複三次，完成自亮區至暗區之移動過程並不歷經任何傷害。

第二天為訓練階段(Training stage)，將 SAMP8 小鼠同樣以背對活門方式至於亮區，訓練階段過程給予每隻 SAMP8 小鼠五分鐘，過程中活門均不放下，待 SAMP8 小鼠四肢皆進入暗區一秒後，給予足部電擊，電擊強度為 0.5 mA/1.0 sec，如 SAMP8 小鼠在接受電擊後，五秒內未回到亮區，則再給予一次足部電擊；如 SAMP8 小鼠接受電擊後，又再度由亮區回到暗區，則再次給予電擊，訓練期間並記錄五分鐘內被電擊之次數。

記憶測試訓練(Testing stage)在訓練階段後 24, 48, 72, 120, 168 小時進行。測試時，將受過訓練之 SAMP8 小鼠放入亮區，並開始計時，若 SAMP8 小鼠對於訓練階段之電擊經驗有記憶，則其會傾向待在亮區而不進入暗區，滯留於亮區時間越久，代表其記憶越好，測試時間共五分鐘。

(三)、水迷津試驗(Morris Water Maze, MWM)

1.儀器與環境設定

水迷津試驗儀器主要由一圓形防水之塑膠泳池（直徑 1.1 公尺，高 19 公分）、平台（12 x 12 x 14 公分，W x D x H）並搭配 Ethovision（Noldus information technology, Netherland）影像追蹤軟體與攝影系統組成。

試驗進行中，水溫控制於 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，水深約 15 公分，使水面超越平台約一公分。試驗前，須以黑色廣告顏料將水染黑，並於周遭環境維持四盞黃燈，確保攝影系統能夠維持 SAMP8 小鼠與背景之對比值。泳池於四個象限外，各設立特定圖案，以供 SAMP8 小鼠做為空間記憶與辨認之線索，其圖案分別黑色之正三角形、圓形、長方形與婁空之長方形。

2.訓練程序

訓練程序共七天，分為三階段，一為預練習階段(Pre-training stage)、二為隱沒式平台試驗(Hidden platform test)、最後為象限偏好測試(Probe test)。

第零天為預練習階段(Pre-training stage)，將 SAMP8 小鼠放入插有氣球且平台高於水面約 0.5 公分之水池(Visible platform test)。本階段之目的為使 SAMP8 小鼠熟悉水池與四周環境，並藉以測試 SAMP8 小鼠之視力無顯著差異。訓練時，平台固定於第四象限距離池壁三十公分處。SAMP8 小鼠以面向池壁方式放入水池中，並給予最多一分鐘時間自由游泳並找到平台且站立其上為止。SAMP8 小鼠未在一分鐘內登上平台，實驗者則直接將 SAMP8 小鼠取上平台。無論小鼠自行登上或由實驗者置於其上，均使小鼠待於平台一分鐘，以熟悉水池四周環境。完成後放入鼠籠，完成一個學習嘗試(Trail)。待所有 SAMP8 小鼠進行完第一次學習嘗試後，在進行第二次學習嘗試，一天共四次學習嘗試，且每次學習嘗試之放入象限均不同。每次學習嘗試紀錄由放入水池到站上平台之逃離時間(Escape latency)、游泳速度(Swimming Velocity)與總游泳距離(Total swimming distance)。

第一天到第五天為進行隱沒式平台試驗(Hidden platform test)，一般測試階段為將 SAMP8 小鼠放入平台隱沒在水面下一公分之水池中(Hidden platform test)，同樣給予一分鐘時間供 SAMP8 小鼠自由游泳並登上平台為止，並記錄逃離時間、游泳速度與總游泳距離。每天同樣給予四次各不同象限之學習嘗試。平台同樣固定於第四象限距離池壁三十公分處。

第六天為象限偏好測試(Probe test)，將 SAMP8 小鼠放入未設有平台之水池，同樣給予 SAMP8 小鼠一分鐘供其自由游泳並記錄其一分鐘內游泳軌跡並分析在不同象限所待之時間，如 SAMP8 小鼠於原平台位置象限所待時間越久，代表其對於前六天之測試中對於平台之空間記憶越好。象限偏好測試每隻 SAMP8 小鼠僅有一次測試機會，下水象限固定為第二象限。整體水迷津試驗的象限配置圖與每天下水象限順序請參考附錄一。

五、SAMP8 小鼠組織病理分析與外觀老化指數判定

飼養期間，因老化而提前死亡之 SAMP8 小鼠，會將其心臟、肝臟、肺臟、脾臟、腎臟、睪丸、腦部與脊椎取出，放入福馬林保存，並委託國立中興大學獸醫病理學研究所廖俊旺教授進行病理分析。

飼養期間三個月結束後，於進行第二次活動量測試時，利用測試十分鐘的時間，觀察小鼠的外觀各項老化指數，並且利用數位相機拍照記錄。判定項目分別為小鼠皮毛光澤程度與粗糙程度；小鼠皮毛脫落現象；小鼠眼瞼周遭潰爛發炎情形；脊椎彎曲現象；以及小鼠生殖器不正常萎縮與潰爛情形。其中項目分別為小鼠皮毛光澤程度與粗糙程度；小鼠皮毛脫落現象以 1 到 3 分記，分數愈高代表老化程度越差；小鼠眼瞼周遭潰爛發炎情形；脊椎彎曲現象；以及小鼠生殖器不正常萎縮與潰爛情形以 1 到 4 分記，分數越高代表老化程度越差。各項評定分數單獨評分後，會再以全部個體的各项分數加總，進一步計算該組的總老化指數。

六、動物犧牲與組織檢體收集

(一)、犧牲程序

SAMP8 小鼠犧牲前，使其進行約十六小時空腹禁食。犧牲於上午十時到十一時左右開始進行犧牲，以二氧化碳昏迷後自心臟採血，解剖取出心臟、肝臟、脾臟、肺臟、腎臟與腦部。心臟、肝臟、脾臟、肺臟、腎臟取出秤重後，放置於液態氮中保存，犧牲結束後轉置-80°C 保存。腦部以刀片分為左右半腦，左半腦放置於液態氮中保存，待酵素連結免疫分析法備用；右半腦於福馬林中保存，待製作組織切片染色備用。

(二)、血清分離程序

將 SAMP8 小鼠犧牲後，以 23G 針頭自心臟採血，放於無抗凝血劑之微量離心管中保存，並放於室溫中一小時後，以桌上型高速離心機(Model Mikro 22R, Hettich, Baujahr, Germany)以 3000rpm 離心十五分鐘，離心程序重複兩次，確保無血球污染血清，分離出上層血清後，以氮氣填充並以 parafilm 封住微量離心管，保存於-80°C，待血清生化分析。

(三)、肝臟均質液處理

將 SAMP8 小鼠之肝臟大葉，稱取 0.5 克，並加入 20mM PBS (8mM KH_2PO_4 , 12mM K_2HPO_4 , 1.5% KCl, pH 7.4) 4.5mL 於冰浴下均質一分鐘，製成 10%肝臟均質液，以 10000 x g 離心 30 分鐘，吸取上清液於 4°C 下以 105000 x g 離心 60 分鐘，吸取上清液至微量

離心管，並充入氮氣，放入-80°C 冰箱中保存。

七、血清生化數值分析

以血清生化儀(Chiron Diagnostics Corporation, Oberlin, OH, USA)檢測血清生化酵素值，包括 Aspartate aminotransferase (AST, GOT), Alanine aminotransferase (ALT, GPT), Blood urea nitrogen (BUN), creatinine, Total cholesterol (TC), and Triglyceride (TG)等項目。此部份檢測委託國立中興大學獸醫病理學研究所廖俊旺教授實驗室分析。

八、抗氧化酵素表現分析

(一)、麩胱甘肽過氧化酶 Glutathione peroxidase (GPx)

參考 Lawrence and Bark (1976)之方法並進行部份修改，利用過氧化物 H_2O_2 作為 GPx 的受質，GSH 經 GPx 催化後可將 H_2O_2 還原，GSH 則轉變成 GSSG，GSSG 利用麩胱甘肽還原酶(Glutathione reductase)與 NADPH 將其還原成 GSH。故利用在波長 340nm 下測定 NADPH 濃度，以間接計算酵素活性。取出肝臟均質液 10 μ L 加入 90 μ L 20mM 磷酸鉀緩衝液(pH 7.0)，加入 800 μ L 100mM 磷酸鉀緩衝溶液之反應混合液(含有 1mM EDTA, 1mM NaN₃, 0.2mM NADPH, 1 U/mL GSH reductase 與 1 mM GSH, pH 7.0)，於室溫靜置五分鐘，加入 100 μ L 2.5 μ M H_2O_2 ，馬上取 150 μ L 至 96 孔石英盤，以多功能全光譜分析儀測定 340nm 下，三分鐘之 NADPH 減少之速率。間接求出 GPx 活性。其中 GPx 活性以 nmol NADPH / min / mg protein 表示。酵素活性以 $E_{340}=6220 M^{-1}cm^{-1}$ 計算。

(二)、Glutathione reductase (GRd)

參考 Bellomo et al., (1987)並進行部份修改，利用 GRd 與 NADPH 將 GSSG 還原為 GSH，並參照上述方法，在波長 340nm 波長下測定 NADPH 濃度。取 10 μ L 肝臟均質液加入 900 μ L 已混合均勻的 1mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 50 mM GSSG 以及 0.1 mM NADPH 之 100mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 混合均勻後，於室溫下反應三分鐘，馬上取 150 μ L 至 96 孔石英盤，並以多功能全光譜分析儀測定 340nm 下，三分鐘內的吸光值變化。酵素活性以 $E_{340}=6220M^{-1}cm^{-1}$ 計算。

(三)、Glutathione S-transferase (GST)

參考 Habig (1974)方法並進行部份修改，取 100 μ L 肝臟均質液加入 880 μ L 已配製完成的 100mM GSH, 100mM potassium phosphate buffer (pH 6.5)與 20 μ L 50mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)混合溶液，混合均勻後，馬上取 150 μ L 至 96 孔石英盤，以多功能全光譜分析儀測定 340nm 下，三分鐘內的吸光值變化。酵素活性以 $E_{340}=9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 計算。

(四)、超氧歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)

參考 Marklund et al., (1974)的方法並加以修改，取 10 μ L 肝臟均質液與標準品，加入 0.5M Tris-HCl buffer / 10 mM Na₂EDTA 183 μ L，最後加入 pyrogallol 7 μ L，於 420 nm 下測定十分鐘，並計算單位時間內 pyrogallol 自氧化 50%的 SOD 酵素量，進一步計算肝臟均質液相對於 SOD 單位量之活性。

(五)、Catalase (CAT)

參考 Aebi (1984)方法並進行部份修改，取 100 μ 肝臟均質液，加入 900 μ L 25mM H₂O₂ / 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)，馬上取 150 μ L 至 96 孔石英盤，以多功能全光譜分析儀紀錄在波長 240 nm 下兩分鐘吸光值變化量。單位以 nmol H₂O₂ / min / mg protein 表示之。酵素活性以 $E_{240}=43.6\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 計算。

(六)、麩胱甘肽(Glutathione, GSH)

參考 Hu et al., (1994)之方法，利用 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)被 GSH 還原後呈現黃色的 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB)，於 405nm 下測定，並計算 GSH 的含量。將肝臟均質液與 DTNB, glutathione reductase, NADP⁺, glucose-6-phosphate dehydrogenase 混合後，取至 96-well plate，於 405 nm 下測定三十分鐘，每五分鐘測量一次，本方法使用 Cayman 測定 Glutathione 的 ELISA kit (Cat. 703002)測定。

(七)、肝臟脂質過氧化物 TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances)測定

此方法參考 Ohkawa et al., (1979)方法並進行部份修改，取 0.5 克肝臟加入冰 KP buffer 1.5 mL 均質加入 10% TCA 0.5 mL 震盪均質，製成 20%肝臟均質液，以 1370 g 離心五分鐘，取上清液 0.5 mL 置於玻璃試管中，加入 0.4% BHT 0.05 mL 及 0.4% TBA 0.5

mL，震盪混勻後置於 90°C 水浴中反應一小時，取出後立刻冰浴冷卻 3 分鐘，加入 1 mL n-butanol，震盪萃取一分鐘，靜置分層後取上層，以螢光光度計測定 Ex 515nm 與 Em 550nm 吸光。標準曲線為利用 1,1,3,3-tetra-methoxy propane (TMP)與酸中會水解生成 MDA 的特性，將 TMP 及 0.02N 鹽酸配製並以 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 nmole / mL 做序列稀釋。

九、腦部類澱粉胜肽之免疫組織化學染色分析

染色步驟

本研究包埋組織與空白切片委託國立中興大學獸醫病理所廖俊旺教授研究室與財團法人動物科技研究所王琇真小姐製作。染色步驟以國立中興大學獸醫病理所廖俊旺教授研究室與國立台灣大學獸醫所郭宗甫教授研究室之操作步驟為原則並參考台灣大學食品科技研究所謝淑貞教授之建議作細部參數調整。

(一)、免疫組織化學染色前處理

製作完成之空白切片厚度約 4 μ m，將空片放置於 56°C 烘箱熱風處理 12 小時。使組織可以較牢固的貼於玻片上。

(二)、切片脫蠟與回水處理

將熱風處理後之切片依序放入純二甲苯溶液中進行脫蠟。脫蠟時間十分鐘，並以不同梯度之酒精進行回水，其依序為 50%二甲苯/50%酒精、99.5%酒精、95%酒精、70%酒精、50%酒精，每缸處理時間三分鐘。最後使用去離子水浸潤五分鐘。每缸之溶液如顏色變黃則需更換，染缸上均以鋁箔加以覆蓋以避免揮發。

(三)、回復組織形態處理

將回水後之組織切片放入處於室溫的 Tris-EDTA buffer，一起於加熱板上加熱處理 45 分鐘，45 分鐘加熱過程中包含 15 分鐘的加熱期與 30 分鐘維持強力沸騰期間，並避免氣泡於切片與切片間形成與滯留，以避免回復組織形態之完整度。加熱結束，使切片於溶液中緩慢降至室溫一個小時，再將切片放入室溫的蒸餾水中降溫十分鐘，結束後使用 immunity staining guard pen 畫出組織區隔區。

(四)、阻斷內生性過氧化氫酶處理

以 3%過氧化氫處理，於室溫下作用 10 分鐘，以阻斷內生性過氧化氫酶作用來確保防止偽陽性反應。處理完畢使用 PBS 清洗，作用三分鐘，以下作用過程皆放入溼潤的密閉盒中，以避免組織乾燥。此步驟開始，所有切片皆置於一避光之密閉塑膠盒中，塑膠盒底部鋪上沾水後之衛生紙，維持盒中的濕度，以避免切片組織乾燥。

(五)、阻斷非特異性蛋白結合

使用 10% 馬血清藉以阻斷抗體與非特異性蛋白之結合。作用時間 30 分鐘。馬血清溶液組成內容為 3% 之 10%Triton X100、10%馬血清以及 87% PBS。此步驟完成不須潤洗。

(六)、一級抗體

以 6E10 anti-beta amyloid 抗體、A11 anti-oligomer 抗體、LOC anti-plaque 抗體滴於組織上於 37°C 烘箱作用 30 分鐘，濃度 1:100。抗體使用 2%馬血清(Horse serum) 溶液配製，並含 3% 10%Triton X100。作用完後，使用 PBS 清洗浸漬三分鐘。

(七)、二級抗體

使用 polyvalent biotinylated antibody agent 作用 45 分鐘，濃度 1:100。抗體同樣使用 2%馬血清溶液配製，並含 3% 10%Triton X100。作用完後，使用 PBS 清洗浸漬三分鐘。

(八)、Vectastain ABC reagent 作用

使用 Vectastain ABC reagent 作用 30 分鐘。Vectastain ABC reagent 需在使用半小時前配製，配方為 10 μ L reagent A 與 reagent B 加入 1 毫升之 PBS。作用完後，使用 PBS 清洗浸漬三分鐘。

(九)、Diaminobenzidine peroxidase substrate (DAB)呈色

使用 Diaminobenzidine peroxidase substrate (DAB)作呈色反應，濃度為 10 μ L DAB chromogen concentrate 加入 1 毫升之 DAB Diluent。作用時間依樣品而有所不同，大約 5 分鐘，作用時需避光處理，完畢後，使用自來水瓢洗五分鐘。結束即可使用光學顯微鏡進行觀察與紀錄。

(十)、脫水處理與封片

以梯度酒精由低到高濃度處理，每缸潤洗一分鐘，依序為 50%酒精、70%酒精、95%酒精、99.5%酒精（重複兩次）並待切片乾燥後，置入二甲苯溶液中透明化後，以封片膠進行封片。

(十一) 類澱粉胜肽定量分析

本實驗採兩種計算方式，一為免疫染色後，直接利用光學顯微鏡針對不同腦區進行類澱粉胜肽團簇數目；二為使用台灣大學醫學院林泰元教授研究室的類流式定量組織細胞分析儀(The multi-channel immunofluorescence tissue analysis system)，並搭配 TissueQuest 定量分析軟體定量類澱粉胜肽於腦部切片的面積比例，使用 RGB [144,66,2], Gauss 7, Sigma 150; RGB [30,11, 4], Gauss 7, Sigma 200; RGB [52, 26, 11], Gauss 7, Sigma 200 三種顏色進行選取及面積分析，並選取面積 $160\mu\text{m}^2$ 作為門檻篩選，去除非類澱粉胜肽 DAB 呈色的背景值。分析後，並計算半腦內類澱粉胜肽 DAB 呈色區域佔半腦區的比例。以上分析方法，針對每隻老化促進小鼠皆對其距窗門 (Bregma)位置 -1.55~-1.58 mm、-2.25~-2.54 mm 以及 0.245~0.62 mm 的腦部切片進行分析。

十、使用酵素連結免疫分析法(Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay, ELISA)偵測老化促進小鼠腦部類澱粉胜肽(beta amyloid_{1-40/1-42})之定量分析

(一)、樣品前處理

此方法參考 Invitrogen ELISA kit for Mouse beta-amyloid₁₋₄₀ (KMB3481/KMB34441)之操作手冊以及 Hyslop and Bender (2002)方法加以修飾。

1. 秤取老化促進小鼠半腦之皮質與海馬迴於兩毫升微量離心管中，並加入八倍重量冰 5M guanidine HCl / 50 mM Tris HCl 溶液。
2. 使用超音波細胞破碎機於冰浴中製成組織均質液，均質條件為破碎力道 30，以 10 秒為單位，重複三次。
3. 將組織均質液放於試管振盪器，使其均勻震盪，保持 4°C 下震盪四小時，震盪後置於 -80°C 待定量分析。

- 4.分析當天，解凍組織均質液，並以 15080 x g 於 4°C 下離心二十分鐘。在預試驗中，必須試出適當的稀釋倍數，樣品如需稀釋，則使用 BSAT-DPBS 溶液(0.2g/L KCl, 0.2g/L KH₂PO₄, 8.0g/L NaCl, 1.150g/L Na₂HPO₄, 5% BSA, 0.03% Tween-20, pH 7.4)
- 5.離心後取出上清液於冰浴上備用。

(二)、酵素連結免疫分析法

1. 將樣品或配製好的標準品 100μL 加入 ELISA kit 中的 96-well plate，於室溫反應兩小時，以供樣品與標準品中的 beta amyloid₁₋₄₀ 與 coating 在 well 底部的抗體作用。(Chromogen blank well 不可加入溶液)。
2. 吸出樣品與標準品，並以 400μL Wash buffer 浸泡每一格 well 約 20 秒後，再吸出 wash buffer，此步驟共重複四次。
3. 加入 100μL Mouse beta amyloid₁₋₄₀ or ₁₋₄₂ Detection antibody，輕敲 96-well plate 邊緣，使溶液均勻反應，並於室溫反應一小時。(Chromogen blank well 不可加入溶液)
4. 重複 2.的清洗步驟，共四次。
5. 加入 100μL Anti-Rabbit IgG HRP working solution，反應 30 分鐘。(Chromogen blank well 不可加入溶液)
6. 重複 2.的清洗步驟，共四次。
7. 加入 100μL Stabilized Chromogen，避光下反應 25 分鐘。
8. 加入 100μL Stop solution，使其溶液由藍色轉為黃色。以上作用反應過程於等待時間時，皆需使用塑膠上蓋蓋住 96-well plate，不可使用鋁箔紙包覆。
9. 使用全光譜分析儀在 450 nm 下進行分析，並計算出 beta amyloid₁₋₄₀ 與 ₁₋₄₂ 的含量，以及進一步計算 42/42 含量比例。

十一、統計分析

老化促進小鼠之進食量、體重變化、臟器重量、血清生化值之結果以平均值(mean)±標準差(standard deviation)表示，並以 One-way ANOVA repeated measure 進行組間比較，post-hoc 以 Fisher's LSD tests 是否有顯著差異。

活動量測試部份以平均值(mean) \pm 標準誤(standard error)表示，並以 Mixed design two-way ANOVA repeated measure 進行組間與餵食樣品前後之差異，post-hoc 以 Fisher's LSD tests 檢測是否有顯著差異；並搭配 student t-test 判定兩兩組間之差異。

水迷津試驗以以平均值(mean) \pm 標準誤 standard error)表示，並以二因子重複量數變異數分析(Mixed design two-way ANOVA repeated measure)進行組間比較，post-hoc 以 Fisher's LSD tests 是否有顯著差異。

被動迴避試驗以中位數(median) \pm 四分位距(inter-quartile range)表示，並以無母數統計分析法(non-parametric analysis)的 Kruskal-Wallis ANOVA by ranking 進行組間比較，並利用 One-tailed Mann-Whitney U test 比較兩兩組間之差異。設定兩種不同程度之被動迴避試驗分析，以 Chi-square 分析是否有顯著差異。

腦部類澱粉胞肽團簇數目、面積與類澱粉胞肽₁₋₄₀、抗氧化酵素、GSH、肝臟 TBARS 之結果以平均值(mean)值標準差(standard deviation)表示，並以 One-way ANOVA repeated measure 進行組間比較，post-hoc 以 Fisher's LSD tests 是否有顯著差異。

各項實驗結果之相關性分析，每一個體之個別數據以線性迴歸進行分析比較。

本研究使用統計軟體 One-way ANOVA 分析使用 Statistics analysis system (SAS) for windows 9.0 (SAS institute Inc., Cary, NC, USA)。Mixed-deign two-way ANOVA repeated measure, Chi-square, one-tailed Mann-Whitnet U test, and Kruskal-Wallis ANOVA by ranking 分析使用 Statistica 8.0 (Tulsa, OK, USA)。

伍、結果與討論

一、個別餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠基本生理狀況的影響

(一)、薑黃素、芝麻酚與槲本內酯對 SAMP8 小鼠攝食量的影響

本研究參考 Shih (2010) 等人以及靜宜大學王銘富教授研究室之研究，實驗樣品添加於 AIN-93M 飼料中餵食 SAMP8 小鼠。而飼料配製方式，為針對本研究試驗樣品芝麻酚之小分子量、低沸點等較不穩定的物化特性，則改以造粒與打錠方式，進一步保持各組別的飼料口感與質地相同，故全部組別飼料皆以造粒與打錠方式取代原本利用冷凍乾燥飼料處理方式。為確保飼料中樣品含量於製備過程中未流失，本研究也建立分析飼料中芝麻酚萃取與分析方法，由 AIN-93M 飼料中芝麻酚之含量測定結果可確定芝麻酚的含量(見附錄四)。表十四顯示實驗期間以薑黃素(Cur)、芝麻酚(HS, LS)與槲本內酯(HL, LL)配製於 AIN-93M 飼料中，對 SAMP8 小鼠攝食量之影響。雖進入正式餵食實驗前兩週，各組老鼠的攝食量皆從原 Lab diet 5001 換為未添加任何樣品的 AIN-93M 飼料使其適應，但各組老鼠在進行餵食第一個月時的差異仍較第二、三、四個月為大。在第一個月的各組攝食量由 3.45 g/day 到 4.37g/day 不等，其中以餵食薑黃素組別的攝食量最少，餵食高劑量芝麻酚組別的攝食量最多；而第二個月後，各組攝食量將皆維持在 4.23g/day 以上，在第二與第三個月，各組攝食量仍有些微差異，但餵食至第四個月，各組的攝食量已無顯著差異。而從第一個月到第四個月的攝食量差異，大約增加 12~37%，其中以餵食薑黃素組別的增加量為最高，而餵食高劑量芝麻酚組別為最低，乃因其第一個月的攝食量不同所致。

表十四、個別餵食薑黃素、藜本內酯與芝麻酚 15 週對於 SAMP8 小鼠攝食量的影響
 Table 14 Food intake of SAMP8 mice fed with control diet, curcumin, Z-ligustilide, and sesamol for 15 weeks (n=7~9).

| Group | Food intake (g) | | | |
|-------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| | 1st month | 2nd month | 3rd month | 4th month |
| C | 3.85±0.13 ^{bc} | 4.54±0.27 ^{ab} | 4.38±0.50 ^{ab} | 4.49±0.39 ^a |
| Cur | 3.45±0.21 ^c | 4.84±0.63 ^a | 4.40±0.72 ^{ab} | 4.73±0.48 ^a |
| LL | 3.68±0.37 ^{bc} | 4.75±0.32 ^a | 4.69±0.36 ^a | 4.95±0.52 ^a |
| HL | 3.97±1.17 ^{ab} | 4.30±0.25 ^b | 4.71±0.32 ^a | 4.66±0.24 ^a |
| LS | 4.04±0.36 ^{ab} | 4.23±0.32 ^b | 4.31±0.26 ^{ab} | 4.90±0.55 ^a |
| HS | 4.37±0.10 ^a | 4.66±0.21 ^a | 4.21±0.15 ^b | 4.90±0.79 ^a |

Control, SAMP8 mice with normal AIN-93M diet.

Cur, SAMP8 mice with AIN-93M diet containing **Curcumin** (500mg/kg diet)

LL, SAMP8 mice with AIN-93M diet containing **Low dose of ligustilide** (200mg/kg diet)

HL, SAMP8 mice with AIN-93M diet containing **High dose of ligustilide** (500mg/kg diet)

LS, SAMP8 mice with AIN-93M diet containing **Low dose of sesamol** (50mg/kg diet)

HS, SAMP8 mice with AIN-93M diet containing **High dose of sesamol** (500mg/kg diet)

Values are expressed as mean ± S.D. and analyzed by one-way ANOVA and Fisher's LSD tests.

Means with difference letters within the same column differ significantly $p < 0.05$.

(二)、個別餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠體重的影響

本實驗的分組依據主要利用 SAMP8 小鼠在活動量測試中的活動總距離(Total distance)為指標，但依此指標分組後發現，各組間體重也無顯著差異。由表十五可知，進行餵食約四個月內，各組平均體重雖有些微變化，但在第六十天與犧牲前一天的各組體重皆無顯著差異。而從開始餵食到犧牲前，各組體重平均約增加 5.65~12.08g 不等，其中以餵食薑黃素對於體重增加量的影響最低，而餵食低劑量槲本內酯、低劑量芝麻酚與高劑量芝麻酚在體重增加量方面則分別高達 11.47, 12.08 以及 10.28g。體重變化與攝食量結果相比較，並無顯著的關連性，由此可知，其體重的差異可能原因有二，一為來自 SAMP8 小鼠個體間的差異，對於營養吸收的不同或是其免疫系統失調造成的結果；二為飼料中添加之薑黃素、芝麻酚與槲本內酯帶來的抑制或促進食慾而造成的。

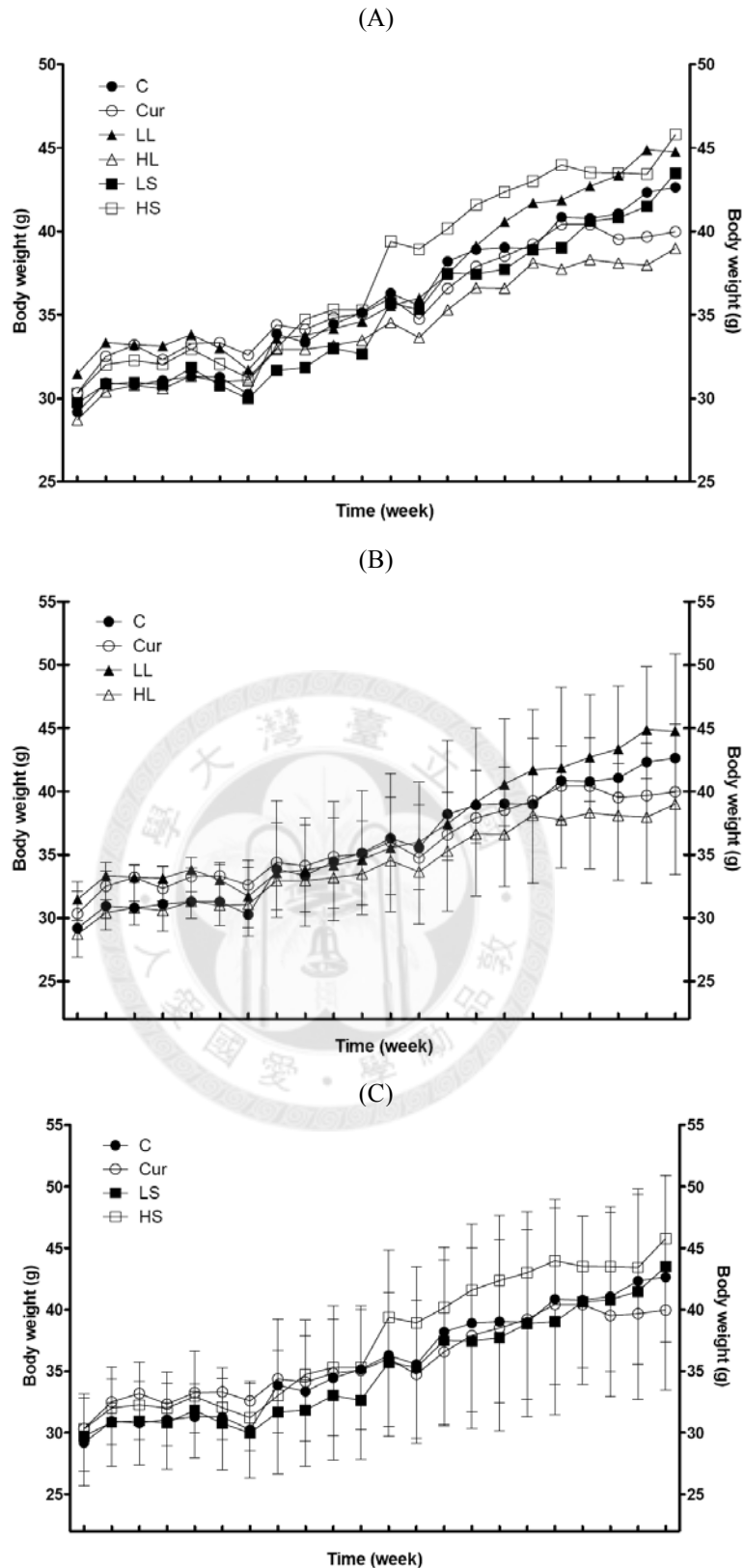
由圖十四可看到 SAMP8 小鼠自靜宜大學食品營養學系王銘富教授研究室取回後，移至台灣大學心理系動物房飼養，由各兩周的 lab diet 5001 與 AIN-93M diet 適應期到維持四個月的長期餵食的各組體重變化。由圖十四可知，在四周的適應期中，可能因老鼠仍在適應環境、飼料與飲水，其體重並無明顯變化，但開始進入長期餵食階段後，其體重隨著時間慢慢增加，其中又以餵食低劑量槲本內酯與高低劑量的芝麻酚最為顯著。而餵食薑黃素與高劑量槲本內酯組別的體重增加趨勢則較其他組不明顯，其中體重上升的主要原因，推測為 AIN-93M 飼料中富含較高品質的酪蛋白與其他營養物質所造成。

表十五、個別餵食薑黃素、藜本內酯與芝麻酚 15 週對於 SAMP8 小鼠體重的影響
 Table 15. Body weight of SAMP8 mice fed with basal diet, curcumin, Z-ligustilide and sesamol for 15 weeks (n=7~9).

| Group | Body weight (g) | | | | |
|-------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | 0 day | 30 day | 60 day | 90 day | Before sacrifice |
| C | 33.86±5.40 ^a | 35.56±5.20 ^{ab} | 38.98±7.50 ^a | 42.34±7.51 ^{ab} | 42.88±8.05 ^a |
| Cur | 34.39±4.37 ^a | 34.57±5.22 ^{ab} | 39.24±6.51 ^a | 39.68±6.94 ^{ab} | 40.04±6.41 ^a |
| LL | 33.57±2.94 ^a | 36.00±3.77 ^{ab} | 41.71±3.82 ^a | 44.89±3.84 ^a | 45.04±4.64 ^a |
| HL | 32.94±4.58 ^a | 33.64±5.29 ^b | 38.13±6.09 ^a | 37.98±5.82 ^b | 39.93±5.82 ^a |
| LS | 31.68±5.03 ^a | 35.31±6.18 ^{ab} | 38.89±7.57 ^a | 41.50±5.92 ^{ab} | 43.76±6.37 ^a |
| HS | 33.02±3.64 ^a | 38.94±4.57 ^a | 43.01±4.95 ^a | 43.42±5.96 ^{ab} | 43.30±3.77 ^a |

Values are expressed as mean±S.D. and analyzed by one-way ANOVA and Fisher's LSD tests. Means with difference letters within the same column differ significantly $p < 0.05$. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.





圖十四、個別餵食薑黃素、藜本內酯與芝麻酚適應預養期到正式實驗 15 週 SAMP8 小鼠的體重變化。圖(A),(B)和(C)分別為全部組別、藜本內酯與芝麻酚處理組別。

Figure 14. Effects of curcumin, Z-ligustilide, sesamol on SAMP8 mice body weight during adaptation and experimental period. (A), (B) and (C) is all groups, Z-ligustilide treatments, and sesamol treatments, respectively. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

二、個別餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠之存活率與其他併發症影響

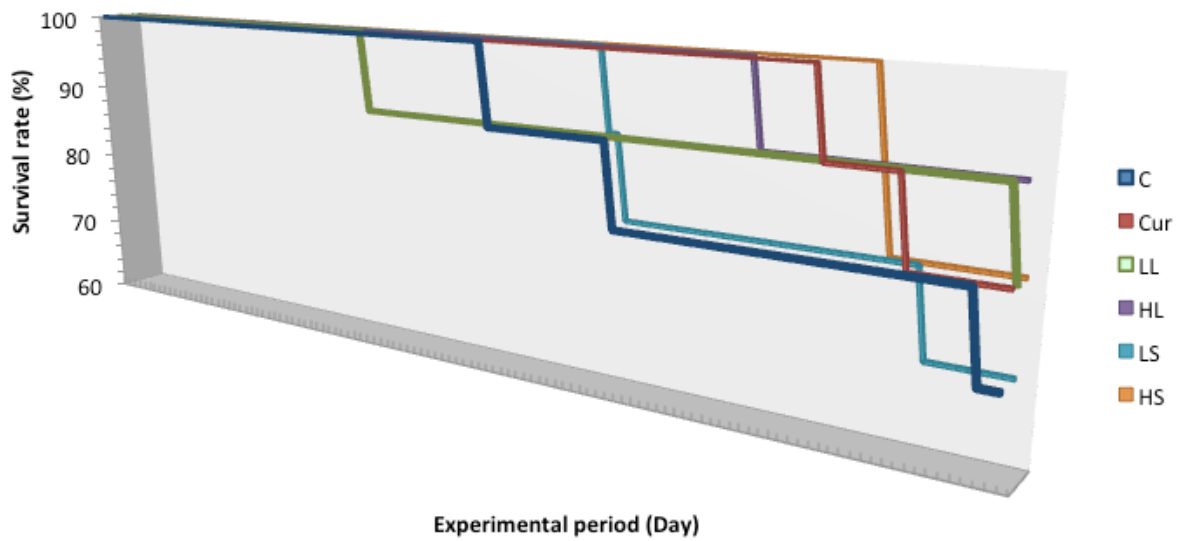
進行餵食薑黃素、芝麻酚與槲本內酯的 SAMP8 小鼠各組皆有發生在長期餵食期間均因其免疫功能失調與品系原易發生的白血症病變造成死亡的狀況(圖十五)。在長期餵食期間結束並完成各項認知行為實驗後,各組存活率約在 70~90% 之間(表十六),而各組死亡的時間點也不盡相同,就控制組、餵食薑黃素、芝麻酚與槲本內酯等組別相比,並未觀察到存活率與餵食處理間有顯著的相關性。但原則上,餵食薑黃素、高低劑量槲本內酯與高劑量的芝麻酚組別的存活率都維持在 80~90%高於控制組的 70%。

針對非預期死亡的 SAMP8 小鼠進行病理分析(表十七),各組別在長期餵養約四個月中,各組皆有一到三隻個體因免疫功能失調造成胸腺瘤(Thymoma)或白血症(Leukemia)等原因導致死亡,由此可以判定,餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚並無顯著延緩 SAMP8 小鼠因老化產生其他併發症且降低死亡率的改善。其中,又因個體不同差異而可觀察到有些個體僅為局部病變(Focal)或是擴散(Diffuse)到其他器官。病變程度由輕到重分為 1 到 5 分,其中以負責免疫功能為主的脾臟與胸腺的病變情況最為嚴重,此外則是因個體差異擴散至肝臟、腎臟、心臟、肺臟或是脊椎等部位。在飼養過程中,可以從這些提前死亡的 SAMP8 小鼠的外觀觀察到一些變異,而進一步生理機能異常接著到死亡,這段時間大約一天到三周不等,在此過程中,生理機能異常的表現例如可以觀察到該個體的眼睛開始嚴重突出、眼睛周遭發炎現象、嘴巴閉合呼吸的次數頻繁且明顯,攝食量、體重與活動量皆明顯下降,且失去自行清理皮毛與生殖器附近殘留排泄物的能力,進一步造成腹部下體體表殘留之尿液、糞便和飼養環境中墊料與汙物混合而造成嚴重發炎的現象。在其死亡後解剖可以進一步發現,其產生白血症並已擴散(Leukemia, diffuse)的胸腺體積占據大部分的胸腔體積,顯示胸腺已嚴重壓迫到消化道與肺臟的空間,推斷其是造成 SAMP8 小鼠的攝食量嚴重下降與呼吸困難而造成死亡的主要原因。

Stoye and Coffin (1987)、Mio et al., (1994)與 Ye et al., (2004)皆指出, SAMP8 小鼠因由 AKR 品系小鼠所種內配交出的品系,而 AKR 品系小鼠是一種具有終身性毒血症的特性(life-long viremia),因此,進一步可以在 SAMP8 小鼠體內中觀察到具

有高量的鼠科白血症病毒(Murine leukemia virus, MuLV)，MuLV 是一種反轉錄病毒(Retroviruses)，屬於 RNA 腫瘤病毒(Meeker et al., 2004)，而有許多研究指出，MuLV 會進一步造成中樞神經系統的疾病(Hoffman et al., 1992)，其中又以腦部中的病毒含量最為明顯。有上可知，這可能是造成大部份死亡的 SAMP8 小鼠皆因不同器官中發生不同程度 Leukemia 病變的主要原因。





圖十五、個別餵食薑黃素、藁本內酯與芝麻酚實驗期間各組 SAMP8 小鼠存活率曲線
 Figure 15. The survival timeline of SAMP8 mice during experimental period
 Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

表十六、個別餵食薑黃素、藁本內酯與芝麻酚實驗期間各組 SAMP8 小鼠存活率
 Table 16. Survival rate (%) of 6-month-old SAMP8 mice fed with AIN-93M diet containing
 curcumin, Z-Ligustilide or sesamol for 15 weeks.

| Group | C | Cur | LL | HL | LS | HS |
|--------------|----|-----|----|----|----|----|
| Survival (%) | 70 | 80 | 80 | 90 | 70 | 80 |

Values expressed as percentage of survival rate (%)
 Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

表十七、實驗期間死亡之 SAMP8 小鼠的病理分析
 (本資料由國立中興大學獸醫病理所廖俊旺教授分析)

Table 17. Histopathological findings of SAMP8 mice during experimental period

| Group of mouse | | C | | Cur | | LL | | HL | LS | | | HS | | |
|----------------|-------------------------------------|-----|---|-----|----|----|---|----|-----|-----|----|----|-----|----|
| Code of mouse | | 21T | 7 | 7T | 27 | 18 | 6 | 8H | 16H | 14M | 14 | 23 | 13T | 20 |
| Brain | Leukemia, focal | | 2 | | | | | | | | | | | |
| Heart | Leukemia, focal | 2 | | | 5 | | 2 | | | 3 | | | 3 | 3 |
| | Pericarditis, focal | | 3 | | | | | | | | 1 | | | |
| | Calcification, focal | | 2 | | | | | | | | | | | |
| | Thymoma, metastasis, focal | | | 2 | | | | | | | | | | |
| Kidney | Leukemia, focal | 1 | | | 2 | | 5 | | | 4 | 2 | 2 | 1 | 3 |
| | Hydronephrosis | | | | | | | | | | | 3 | | |
| | Leukemia, diffuse | | 5 | | | | | 5 | | | | | | |
| | Amyloidosis, diffuse, glomerulus | | | | | | | 5 | | | | | | |
| | Thymoma, metastasis, focal | | | 1 | | | | | | | | | | |
| Adipose | Leukemia, focal | | 5 | | | | | | | | | | | |
| Liver | Leukemia, focal | | 3 | | 3 | 3 | 5 | | 2 | 5 | 3 | | 5 | 3 |
| | Fatty change, focal | 5 | | | 5 | 3 | | | 5 | 5 | 5 | 2 | 3 | 5 |
| | Nerosis | | | | | | | | | | | | | 4 |
| | Leukemia, diffuse | | | | | | | 4 | | | | | | |
| | Thymoma, metastasis, focal | | | 2 | | | | | | | | | | |
| Lymph node | Leukemia, focal | | | | | | 5 | | | | | | | |
| Lung | Leukemia, focal | 2 | | | 3 | 2 | 3 | | | 3 | | | 3 | 3 |
| | Thymoma, metastasis, focal | | | 2 | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Stomach | Leukemia, serosa, focal | 3 | | | | | | | | 3 | | | |
| | Leukemia, diffuse | | | | | | | 4 | | | | | |
| Spleen | Leukemia, diffuse | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | Thymoma, metastasis, focal | | | | | | | 4 | | | | | |
| Thymus | Leukemia, diffuse | | 5 | | | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | Thymoma, metastasis, focal | | | | | | | 5 | | | | | |
| Epididymis | Leukemia, diffuse | | | | | | | | 5 | | | | |
| Dorsal back | | | | | | | | | | | | | |
| | Leukemia, focal | | | | | | | | | 5 | | 5 | 5 |
| Intestine | Leukemia, serosa, focal | | | | | | | | 5 | | | 4 | 3 |
| | Leukemia, diffuse, payer's patches | | 5 | | | | | | | 5 | | | |
| | Thymoma, metastasis, focal | | | | | | | | | | | | 1 |
| Pancreas | Leukemia, focal | | | | | | | | | | | | 2 |
| Spinal cord | Leukemia, focal | | | | | | | | | | | | 4 |

Degree of lesions was graded from one to five depending on severity: 1 = minimal (< 1%); 2 = slight (1-25%); 3 = moderate (26-50%); 4 = moderate/severe (51-75%); 5 = severe/high (76-100%).

Severity of lesions was graded according to the methods described by Shackelford et al. (2002) (*Toxicologic Pathology* 30: 93-96, 2002)

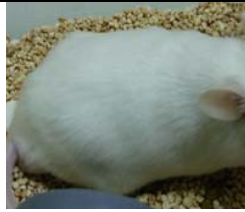


Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.




三、SAMP8 小鼠長期飼養後的外觀老化指數分析與飼養期間因老化死亡的病理分析





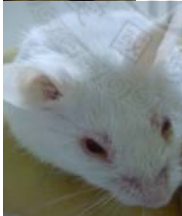
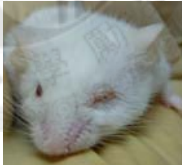


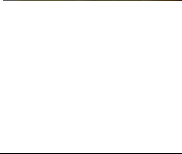

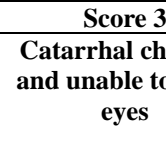

SAMP8 小鼠的老化指數判定標準由 Takeda et al (1981)所發表的研究作為參考，由於本研究已藉由活動量測試評定 SAMP8 小鼠的活動量與焦慮情緒程度，並搭配被動迴避試驗探討其 SAMP8 小鼠對於電擊的反應狀態，因此在老化指數評定標準中的行為部份，其中包含反應性(Reactivity)以及被動反應性(Passivity)，在此研究中不予評定。在外觀老化指數判定部份，則進一步以 Takeda et al (1981)的判定標準加以修改，分為毛皮的光澤粗糙度(Glossiness and Coarseness)、脫毛現象(Loss of hair)、眼睛周遭的眼瞼潰爛狀態(Periophthalmic lesion)以及脊椎彎曲(Lordokyphosis of the spine)。原判定標準中在毛皮部份有針對皮膚潰瘍(Skin ulcer)部份，因在飼養動物的過程中，除觀察到因眼瞼周遭潰爛情形在某些個體有延伸到接近鼻子的情形，在其他部位皆無皮膚潰瘍的發生狀況，因此在此分析中也不予記分。而在本實驗中，有觀察到 SAMP8 小鼠的生殖器有萎縮消失以及潰爛的現象，因此將此加進外觀判定標準中。

記分方式在毛皮光澤粗糙度與脫毛現象以 1 到 3 分記，1 分為無顯著；3 分為顯著；在眼瞼潰爛、脊椎彎曲和生殖器萎縮與發炎現象以 1 到 4 分記。而各項評分中，五月齡 SAMP8 小鼠則均以 1 分記以作為標準，各單一評定分數與 SAMP8 小鼠外觀對照圖請參考圖十六與圖十七。

由圖十八可知，不論在毛皮光澤粗糙度、脫毛現象、眼瞼潰爛、脊椎彎曲與生殖器不正常等現象，各處理組並無顯著的差異，在飼養期間的觀察，主要仍是因老化以及個體的差異，而某些個體的老化指數有較高的現象，有些個體較低。依此也可推測，餵食薑黃素、橐本內酯與芝麻酚等樣品並無顯著延緩 SAMP8 小鼠老化的情形。

| (A). Glossiness/Coarseness of hair | | |
|---|---|--|
|  |  |  |
| Score 1 | Score 2 | Score 3 |
| Natural gloss and no coarseness | Decrease in gloss and coarse less half dorsum | Decrease in gloss and coarse more than half dorsum |

| (B). Loss of hair | | |
|---|---|---|
|  |  |  |
| Score 1 | Score 2 | Score 3 |
| Neither loss or thinning of hair | Loss of hair in less half dorsum and head | Loss of hair in more than half dorsum and head |

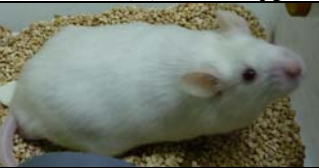



| (C). Periophthalmic lesion of eyes | | | |
|---|---|---|---|
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
| Score 1 | Score 2 | Score 3 | Score 4 |
| No changes | Catarrhal changes limited around periophthalmic area | Catarrhal changes and unable to open eyes | Eyes damaged and lose the ability of vision |





圖十六、SAMP8 小鼠外觀判定標準之照片與分數

(A)、SAMP8 小鼠皮毛光澤度與粗糙度；(B)、SAMP8 小鼠皮毛脫落現象；(C)、SAMP8 小鼠眼瞼周圍潰爛情形。(A),(B): 1 分到 3 分；1 分為最好；3 分為最差。(C).1 分到 4 分；1 分為最好；4 分為最差。

Figure 16. The aging index of appearance in SAMP8 mice (A). Glossiness/Coarseness of hair; (B). Loss of hair; (C). Periophthalmic lesion of eyes. (A) and (B): Score 1 to score 3; 1 is the best, 3 is the worst.

(C): Score 1 to score 4; 1 is the best. 4 is the worst.

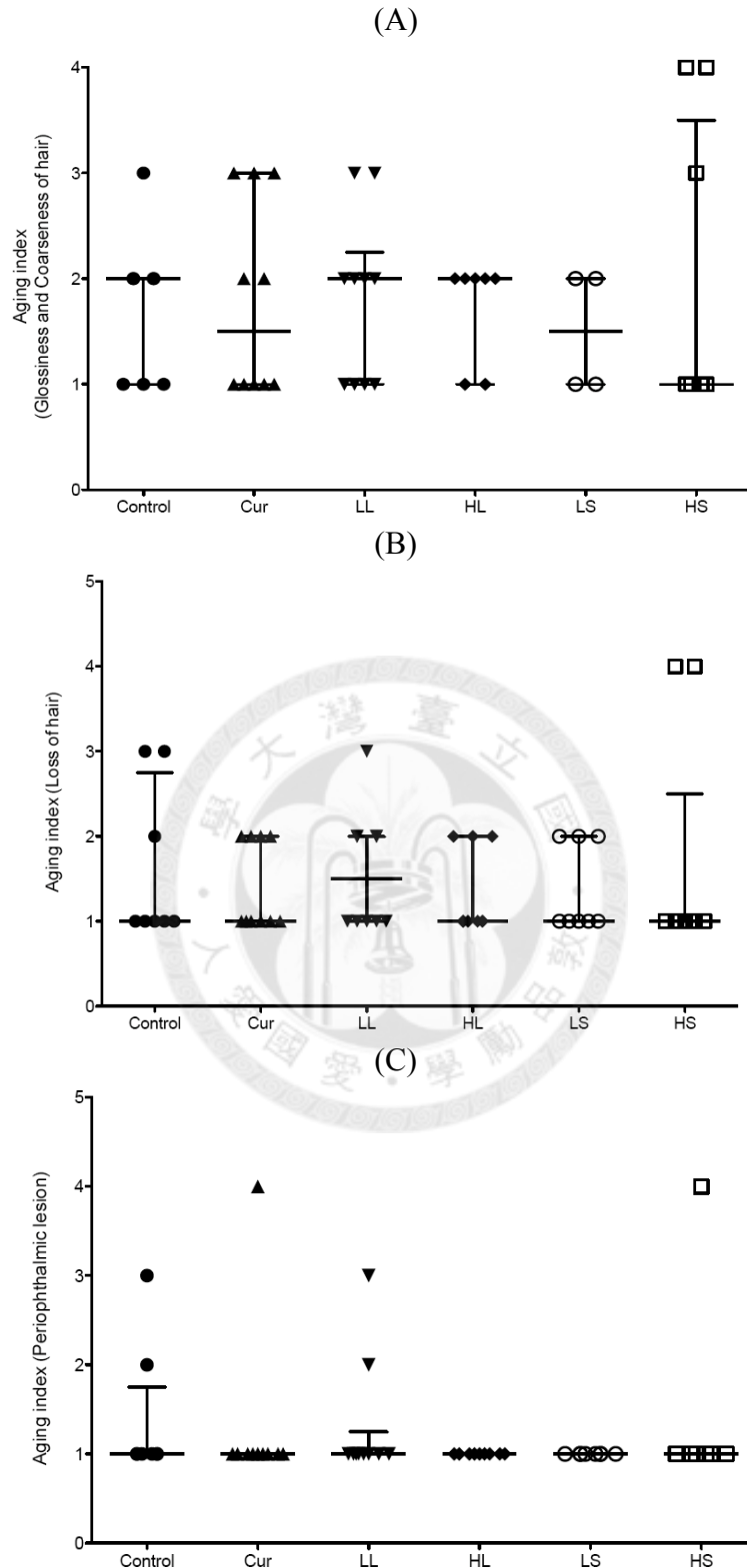
| (D). Lordokyphosis of the spine | | | |
|---|--|--|--|
|  | | | Score 1 Natural anteroposterior curvature |
|  | | | Score 2 Slight curvature |
|  | | | Score 3 Apparent curvature |
|  | | | Score 4 Severe curvature |

| (E). Abnormality and ulcer of reproductive organ | | | |
|---|---|--|---|
|  |  |  |  |
| Score 1 Normal | Score 2 Shrinkage and disappearance | Score 3 Score 2 level with inflammation | Score 4 Severe inflammation and ulceration |

圖十七、SAMP8 小鼠外觀判定標準之照片與分數(續)

(D)、SAMP8 小鼠脊椎彎曲；(E)、SAMP8 小鼠生殖器不正常與潰爛情形。(D)(E).1 分到 4 分；1 分為最好；4 分為最差。

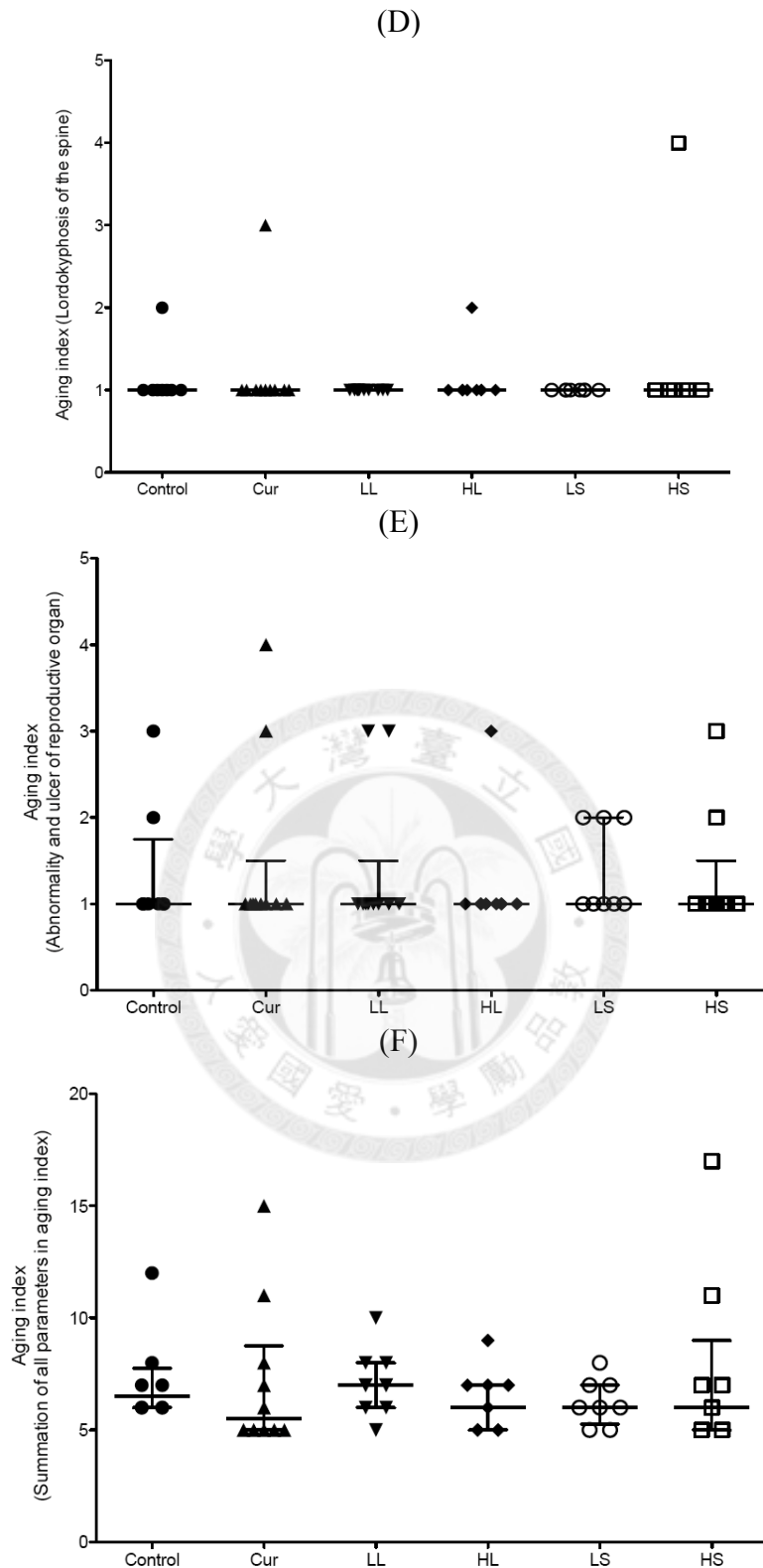
Figure 17.The aging index of appearance in SAMP8 mice (D). Lordokyphosis of the spine (E). Abnormality and ulcer of reproductive organ. (D), (E) : Score 1 to score 4; 1 is the best. 4 is the worst.



圖十八、SAMP8 小鼠外觀老化指數。

(A) SAMP8 小鼠皮毛光澤粗糙度；(B) SAMP8 小鼠皮毛脫落情形；(C) SAMP8 小鼠眼瞼周圍潰爛情形

Figure 18. The aging index of appearance in SAMP8 mice. (A) Coarseness and glossiness of hair (B) Loss of hair (C) Periophthalmic lesion (n=7-9). Values are expressed as mean \pm S.D. and analyzed by two-way ANOVA, followed by Fisher's LSD tests. There is no significant difference among treatments in all evaluation. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.



圖十八、SAMP8 小鼠外觀老化指數(續)。

(D) SAMP8 小鼠脊椎彎曲情形；(E) SAMP8 小鼠生殖器不正常與潰爛情形；(F) SAMP8 小鼠個體之各項老化指數加總評分。

Figure 18. The aging index of appearance in SAMP8 mice. (D) Lordokyphosis of the spine (E) Abnormality and ulcer of reproductive organ (F) Summation of all parameters in aging index (n=7-9). Values are expressed as mean \pm S.D. and analyzed by two-way ANOVA, followed by Fisher's LSD tests. There is no significant difference among treatments in all evaluation. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

四、 個別餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠之學習與記憶能力之影響

(一)、個別餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠活動量之影響

針對五月齡 SAMP8 小鼠、實驗前的六月齡 SAMP8 小鼠及餵食薑黃素、芝麻酚與槲本內酯十二週後再進行一次活動量測試。由表十八可知，五月齡 SAMP8 小鼠(Y)與餵食實驗前的六月齡控制組 SAMP8 小鼠(C)在移動總距離 (Total distance)、站立次數 (Number of rearing)、站立時間 (Time in rearing) 在統計上並無顯著差異 ($p < 0.05$)，但在測定象限中央的時間 (Time in the central arena) 與測試時間十分鐘內，SAMP8 小鼠在象限內遺留的固體排泄物數目 (Number of feces)，則有顯著的差異。五月齡 SAMP8 小鼠於象限中央停留的時間僅約兩分多鐘，但六月齡 SAMP8 小鼠則高達三到四分鐘。在動物行為學上，動物在自然環境中活動時，會有被接觸的趨向，尋求環境接觸帶來的刺激，例如沿著岩石、岸邊或是牆壁行動，此行為稱為趨觸性 (Thigmotaxis)。一般來說，老鼠因趨觸行為而偏好沿著牆壁邊走，一方面也降低暴露危險的機會，因此，老鼠如果在測定象限中央所待的時間愈長，顯示其趨觸性行為較低，也代表其抗焦慮性行為 (Anxiolytic-like behavior) 也較高 (Prut and Belzung, 2003)。而由六月齡 SAMP8 小鼠在象限中央待的時間顯著高於五月齡 SAMP8 小鼠來看，推測六月齡 SAMP8 小鼠表現出其抗焦慮行為的程度較高。除了以在象限中央停留的時間來評估 SAMP8 小鼠的焦慮情緒行為之外，也有研究以活動量測定時間所遺留的固體排泄物個數作為評分 (Li et al., 2009)，該研究中指出 SAMR1 小鼠遺留糞便數明顯少於 SAMP8 小鼠，顯示藉由糞便數量的比較也可以判斷出 SAMR1 小鼠的情緒焦慮行為較 SAMP8 小鼠為低。本研究也觀察到五月齡的 SAMP8 小鼠遺留的糞便數顯著高於六月齡的老化促進小鼠顯示 SAMP8 小鼠的抗焦慮行為程度以糞便數與測定在象限中央所停留的時間的結果相符合，皆以五月齡小鼠的焦慮情緒較高。而造成此結果的主要原因推測為，五月齡 SAMP8 小鼠在從靜宜大學王銘富教授研究室移入台灣大學心理系後，僅有兩週的環境適應期，但將進入長期餵食的六月齡 SAMP8 小鼠則有一個月的環境適應期，因此推測可能五月齡小鼠可能因環境適應時間不足，而造成在評估其抗焦慮行為上的差異。

六月齡 SAMP8 小鼠在進行第一次活動量測試後，利用根據其移動總距離進行 S 型分組，並以統計分析確認分組後各組於進入餵食實驗前(0 month)其移動總距離無顯著性差異，以確保各組 SAMP8 小鼠之活動量落在相同範圍，以避免影響長期餵食後的認知行為實驗的結果(圖二十)。

各組 SAMP8 小鼠分別以基礎飼料、薑黃素、高低劑量的芝麻酚與稟本內酯進行餵食十二週(三個月)後，進行第二次活動量測試結果如圖二十所示，結果發現除了餵食薑黃素與低劑量芝麻酚的 SAMP8 小鼠，其移動總距離都較進實驗前為低，如控制組與餵食高劑量芝麻酚組別，其餵食前後的移動總距離達到極顯著性差異($p < 0.01$)，而餵食高低劑量的稟本內酯也達到顯著差異($p < 0.05$)。顯示上述各組 SAMP8 老鼠因老化而造成其活動量下降，而餵食薑黃素之 SAMP8 小鼠在移動總距離表現仍可維持與五月齡的 SAMP8 小鼠相同，餵食低劑量芝麻酚之 SAMP8 小鼠則略低於五月齡之表現，但其表現與餵食前無顯著差異。

活動量測試的站立次數方面，餵食未添加其他樣品的控制組十二週後，其站立次數顯著下降($p < 0.001$)，餵食低劑量與高劑量的稟本內酯 SAMP8 小鼠也有些微下降，分別達到.05 與.01 的顯著差異，但並沒有劑量效應；餵食薑黃素與高低劑量芝麻酚的 SAMP8 小鼠其站立次數均值皆較餵食前低，但並未達到統計上之顯著差異(圖二十一)。站立時間方面，不論是控制組、餵食薑黃素與高低劑量芝麻酚之 SAMP8 小鼠其表現與五月齡 SAMP8 小鼠無顯著差異，餵食低劑量稟本內酯則些微提升其站立時間，餵食高劑量稟本內酯則些微下降，且高劑量稟本內酯組別之 SAMP8 小鼠餵食前後的站立時間則有顯著的下降($p < 0.01$)(圖二十二)。

進一步將站立次數與站立時間的結果交叉分析，可以發現，在站立次數顯著下降的控制組與低劑量稟本內酯組別在站立時間卻無統計上之差異，其隱含的意義應該解釋為站立次數下降，但每次的站立時間卻有一定程度的提升。反之，餵食高劑量稟本內酯的 SAMP8 小鼠在站立次數與站立時間皆有顯著的下降，因次可以推測餵食高劑量稟本內酯的 SAMP8 小鼠其活動量確實有下降的情形。

綜合以上三項活動量評估指標，如餵食後其結果能夠維持與餵食前之表現給予正向評分，如無法維持其表現則給予負向評分(表十九)，可得知薑黃

素與低劑量芝麻酚在維持 SAMP8 小鼠的活動量表現效果最佳，其次為控制組與低劑量稟本內酯，而不論餵食薑黃素或是稟本內酯，在餵食高劑量 (500mg/kg diet) 下對於其活動量的維持效果最差。

在評估其抗焦慮行為的在象限中央的時間與固體排泄物的顆數方面，各組在餵食前後皆無顯著差異(圖二十三與圖二十四)。固體排泄物顆數則僅有餵食低劑量稟本內酯之 SAMP8 小鼠有顯著的提升($p < 0.05$)，其他組別皆無顯著差異。由於 Miyamoto et al., (1992) 發現 SAMP8 小鼠隨著老化會有焦慮行為下降的趨勢(Reduced anxiety-like behavior)，由上述結果來看，僅差約兩週進行實驗的 SAMP8 小鼠，六月齡 SAMP8 小鼠的焦慮情緒確實較低，但餵食三個月後，卻沒有發現明顯焦慮情緒下降的趨勢，因此，推斷 SAMP8 小鼠的抗焦慮情緒可能在約五到六月齡已降低到某個程度，以致於往後測定無法進一步觀察出差異，而五月齡與六月齡 SAMP8 小鼠在焦慮情緒上的差異，推測仍以環境適應程度的差異為主要的影響原因。



表十八(A)、五月齡 SAMP8 小鼠於活動量測試中各項參數表現。

Table 18(A) The locomotion behavior and emotional reactivity of five-month-old SAMP8 mice in open field test (n=10).

| Parameters | Total distance (inch) | Number of rearing (times) | Time in Rearing (sec) | Time in the central arena (sec) | Number of fecal boluses (n) |
|-------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| Y | 1304±130.4 ^a | 74.8±15.9 ^a | 127.2±31.5 ^a | 136.7±26.9 ^b | 4.1±2.1 ^a |
| C (0 month) | 1412.4±60.5 ^a | 83.1±4.5 ^a | 157.2±10.8 ^a | 226.3±11.7 ^a | 1.2±0.4 ^b |

Values are expressed as mean ± S.D. and analyzed by one-way ANOVA and Fisher's LSD tests.

Mean with different letters within the same column differs significantly $p < 0.05$

表十八(B)、六月齡與十月齡 SAMP8 小鼠於活動量測試中各項參數表現。

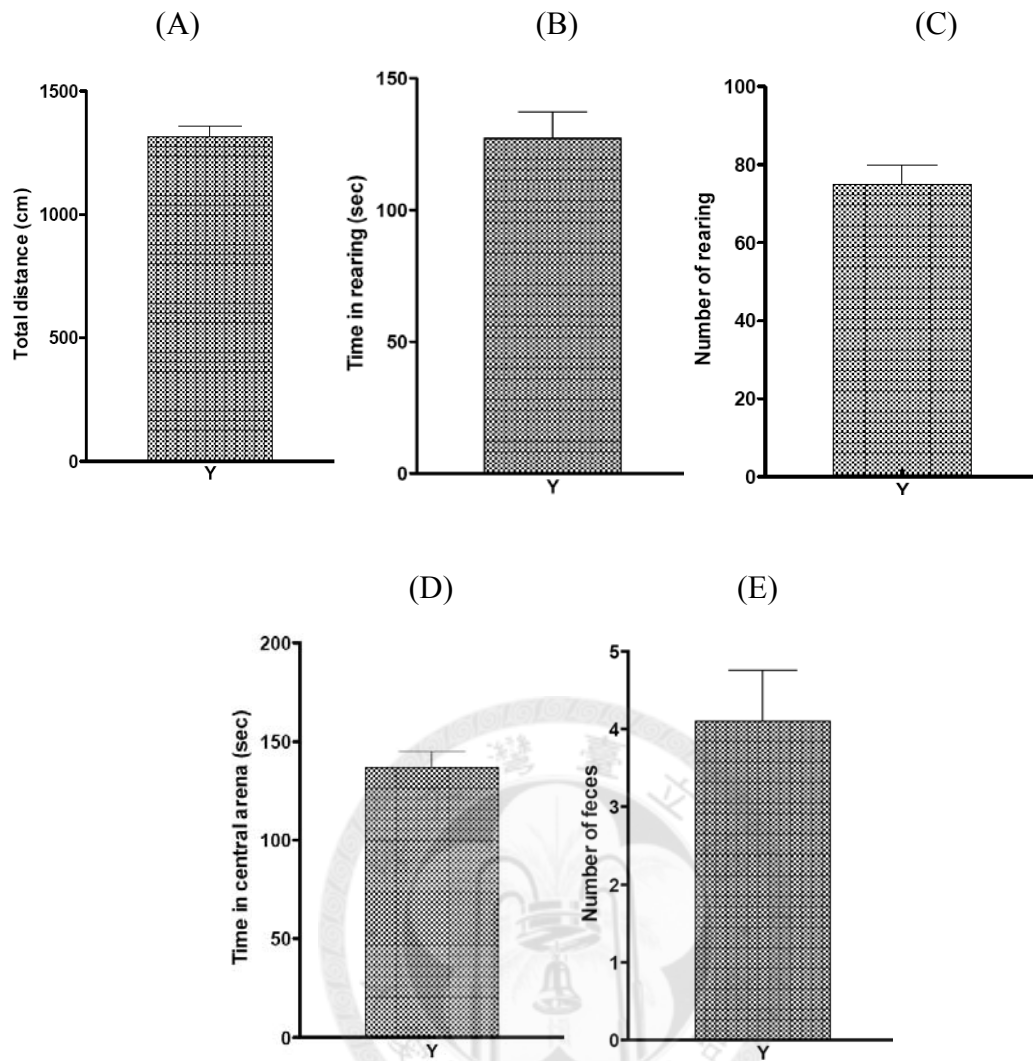
Table 18(B). The locomotion behavior and emotional reactivity of ten-month-old SAMP8 mice in open field test (n=7-10).

| Parameters | Total distance (inch) | | Number of rearing (times) | | Time in Rearing (sec) | | Time in the central arena (sec) | | Number of fecal boluses (n) | |
|------------|--------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------------|-------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 | 3 |
| C | 1412.4±60.5 ^a | 1095±190.7 ^{ab} | 83.1±4.5 ^a | 55.4±4.9 ^a | 157.2±10.8 ^a | 122.2±12.6 ^{ab} | 226.3±11.7 ^a | 221.5±11.9 ^a | 1.2±0.4 ^a | 1.8±0.3 ^{ab} |
| Cur | 1345.9±67.8 ^a | 1317.5±190.7 ^a | 70.2±6.1 ^a | 50.5±8.9 ^a | 129.3±12.8 ^a | 112.9±19.8 ^{ab} | 199.9±20.0 ^a | 213±26.8 ^a | 1.0±0.3 ^a | 1.3±0.3 ^{ab} |
| LL | 1365.7±61.4 ^a | 1127.8±58.8 ^{ab} | 80.4±5.0 ^a | 66.7±3.6 ^a | 141.7±9.3 ^a | 138.8±11.0 ^a | 224.8±20.8 ^a | 217.3±24.2 ^a | 0.6±0.2 ^a | 2.1±0.5 ^a |
| HL | 1278.6±44.0 ^a | 1074.8±76.8 ^{ab} | 71.3±4.0 ^a | 50.8±4.9 ^a | 132.1±8.8 ^a | 95.9±8.8 ^b | 188.2±19.6 ^a | 199.4±16.2 ^a | 0.9±0.4 ^a | 0.8±0.3 ^b |
| LS | 1318.2±67.2 ^a | 1113.5±73.2 ^{ab} | 70.2±5.1 ^a | 59±5.4 ^a | 126.7±12.4 ^a | 121.1±12 ^{ab} | 227.2±12.5 ^a | 214.7±18.5 ^a | 0.6±0.3 ^a | 0.9±0.4 ^b |
| HS | 1384.8±88.1 ^a | 911.9±116.3 ^b | 84.5±3.9 ^a | 75.2±22.8 ^a | 158.8±8.5 ^a | 105.4±18.1 ^{ab} | 199.1±12.2 ^a | 191.4±24.5 ^a | 0.4±0.2 ^a | 1.4±0.5 ^{ab} |

Values are expressed as mean ± S.D. and analyzed by one-way ANOVA and Fisher's LSD tests.

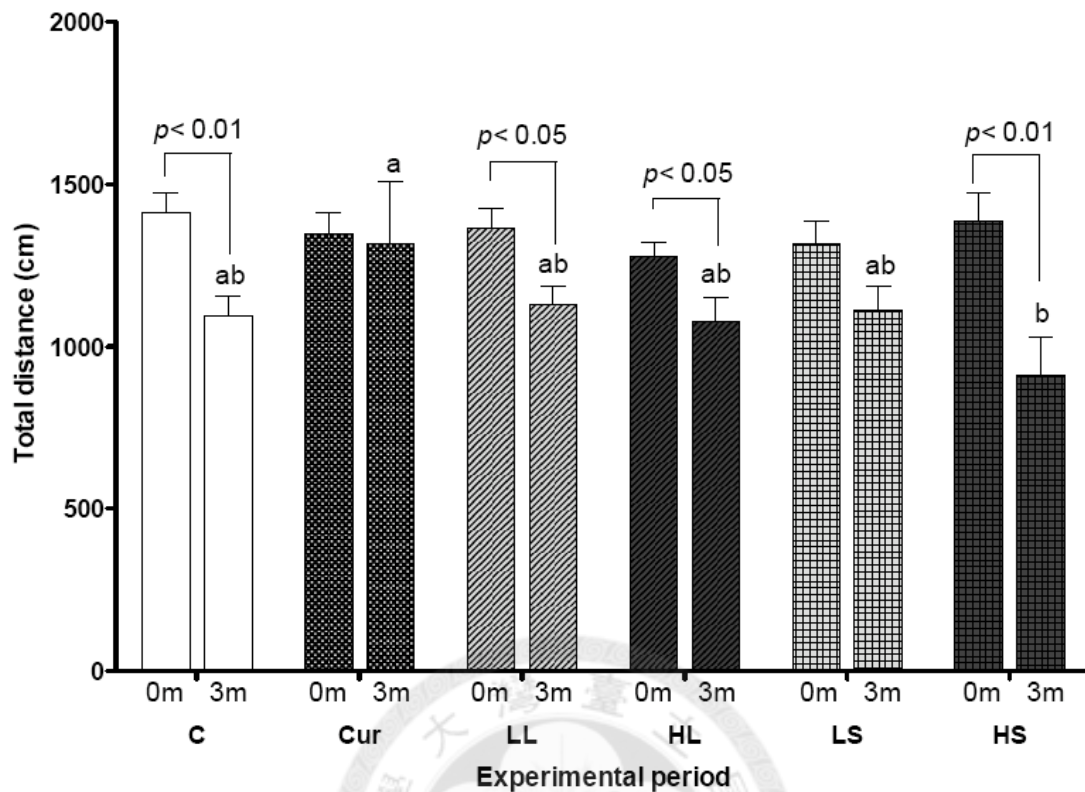
Mean with different letters within the same column differs significantly $p < 0.05$

Y indicates 5-month-old young SAMP8 mice; Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.



圖十九、五月齡 SAMP8 小鼠活動量的表現。(A)移動總距離；(B)站立時間；(C)站立次數；(D)在中央停留的時間；(E)糞便顆數。

Figure 19. Performance in open field activity tests of 5-month-old SAMP8 mice.(A) total distance ; (B) time in rearing ; (C) number of rearing ; (D) time in central arena ; (E) number of feces (n=10).



圖二十、各組六月齡 SAMP8 小鼠於餵食三個月後其活動量測試**移動總距離**的表現

Figure 20. Total distance in open field activity test of 6-month-old SAMP8 mice fed with AIN-93 diet containing curcumin, Z-ligustilide, or sesamol for 3 months (n=7-10).

Values are expressed as mean \pm S.E.M. and analyzed by two-way ANOVA repeated measure and Fisher's LSD tests.

Means with different letters among groups (3-month) indicates different significantly ($p < 0.05$).

There is no significant difference among all groups in 0-month.

Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

Two-way ANOVA analysis conducted with all 3-month SAMP8 mice

Treatment: $F=1.289$, $p=0.276892$;

Time: $F=16.661$, $p=0.000141^{***}$

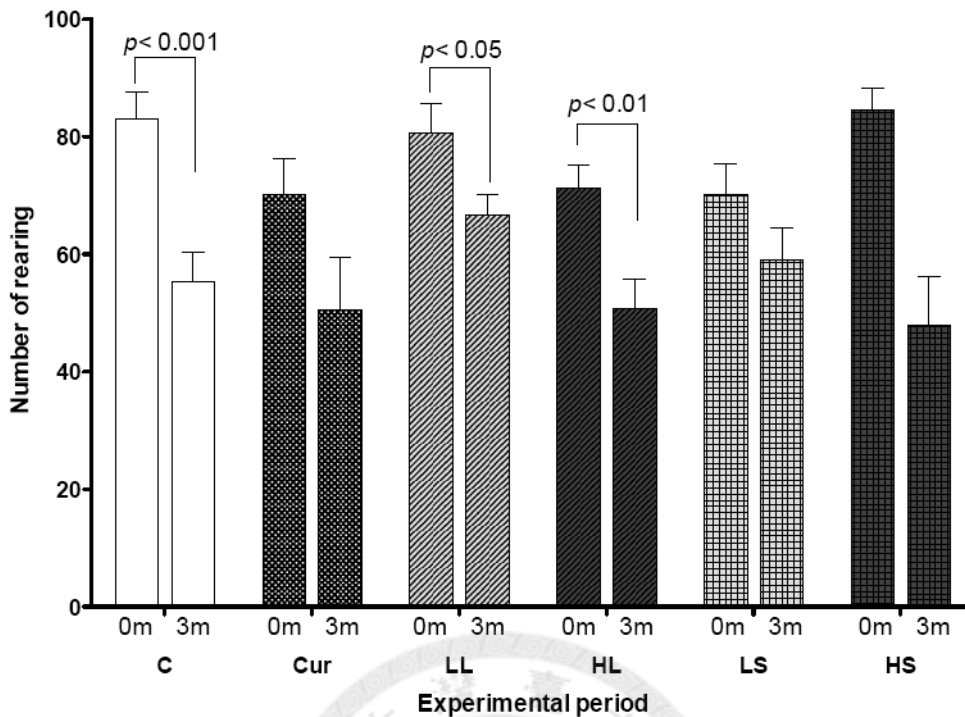
Treatment*Time: $F=1.732$, $p=0.130077$

(Without young SAMP8)

Treatment: $F=1.112$, $p=0.366336$

Time: $F=16.117$, $p=0.000208^{***}$

Treatment*Time: $F=1.236$, $p=0.307104$



圖二十一、各組六月齡 SAMP8 小鼠於餵食三個月後其活動量測試站立次數的表現

Figure 21. Number of rearing in open field activity test of 6-month-old SAMP8 mice fed with AIN-93 diet containing curcumin, Z-ligustilide, or sesamol for 3 months (n=7-10).

Values are expressed as mean \pm S.E.M. and analyzed by two-way ANOVA repeated measure and Fisher's LSD tests.

There is no significant difference among all groups in 0-month.

There is no significant difference among all groups in 3-month.

Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

Two-way ANOVA analysis conducted with all 3-month SAMP8 mice

Treatment: $F=1.997$, $p=0.081079$

Time: $F=8.461$, $p=0.005166^{**}$

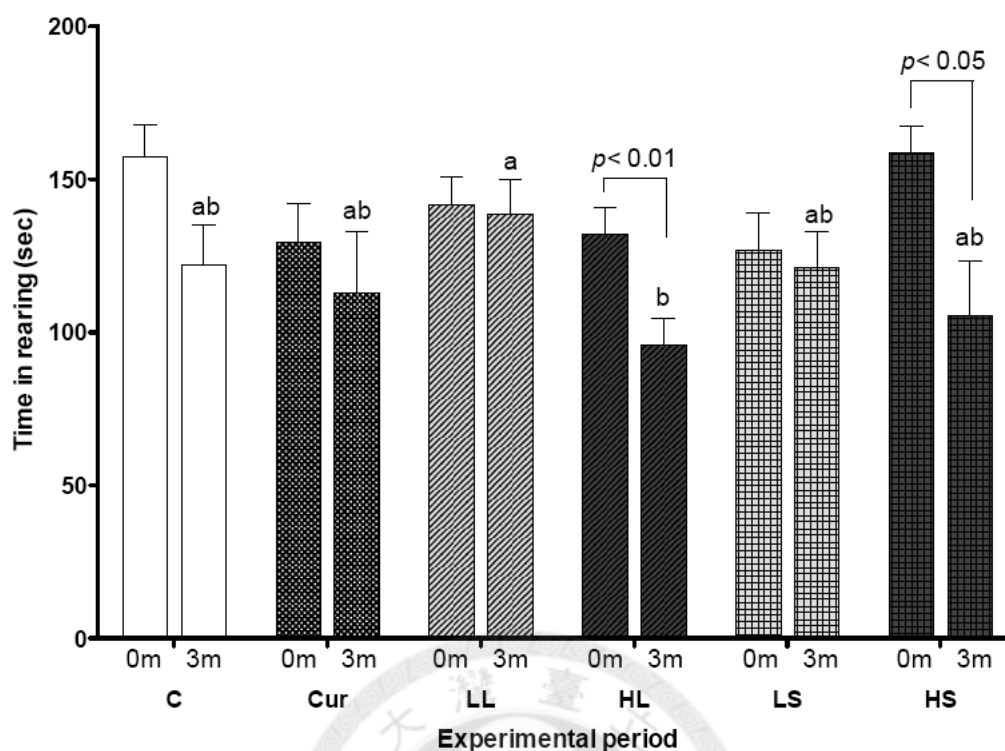
Treatment*Time: $F=0.521$, $p=0.789860$

(Without young SAMP8)

Treatment: $F=2.0728$, $p=0.085178$

Time: $F=8.1846$, $p=0.006239^{**}$

Treatment*Time: $F=0.2732$, $p=0.925589$



圖二十二、各組六月齡 SAMP8 小鼠於餵食三個月後其活動量測試站立時間的表現

Figure 22. Time in rearing in open field activity test of 6-month-old SAMP8 mice fed with AIN-93 diet containing curcumin, Z-ligustilide, or sesamol for 3 months (n=7-10). Values are expressed as mean \pm S.E.M. and analyzed by two-way ANOVA repeated measure and Fisher's LSD tests.

Means with different letters among groups (3-month) indicates different significantly ($p < 0.05$).

There is no significant difference among all groups in 0-month.

Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

Two-way ANOVA analysis conducted with all 3-month SAMP8 mice

Treatment: $F=1.425$, $p=0.221092$

Time: $F=9.668$, $p=0.002926$

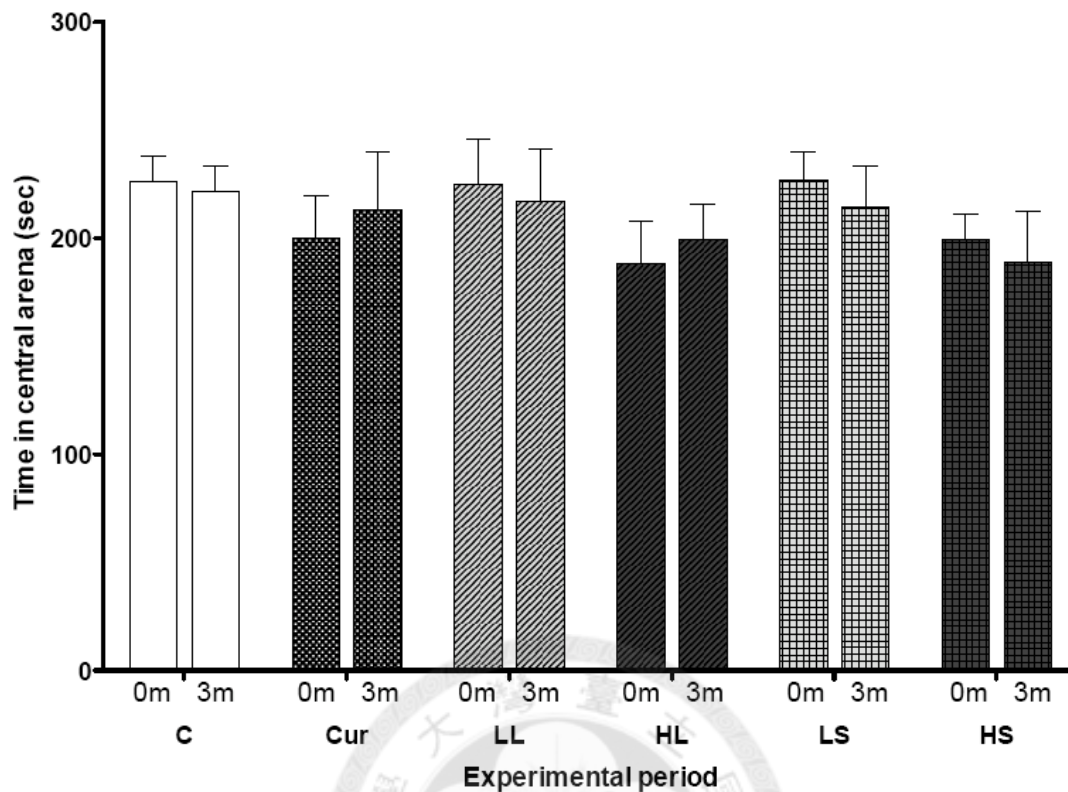
Treatment*Time: $F=1.425$, $p=0.221061$

(Without young SAMP8)

Treatment: $F=1.821$, $p=0.1264$

Time: $F=9.352$, $p=0.003636^{**}$

Treatment*Time: $F=1.133$, $p=0.355698$



圖二十三、各組六月齡 SAMP8 小鼠於餵食三個月後其活動量測試於測試區域中央所停留的時間

Figure 23. Time in central arena in open field activity test of 6-month-old SAMP8 mice fed with AIN-93 diet containing curcumin, Z-ligustilide, or sesamol for 3 months (n=7-10).

Values are expressed as mean \pm S.E.M. and analyzed by two-way ANOVA repeated measure and Fisher's LSD tests.

There is no significant difference among all groups in 0-month.

There is no significant difference among all groups in 3-month.

Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

Two-way ANOVA analysis conducted with all 3-month SAMP8 mice

Treatment: $F=4.961$, $p=0.000380^{***}$

Time: $F=0.001$, $p=0.981068$

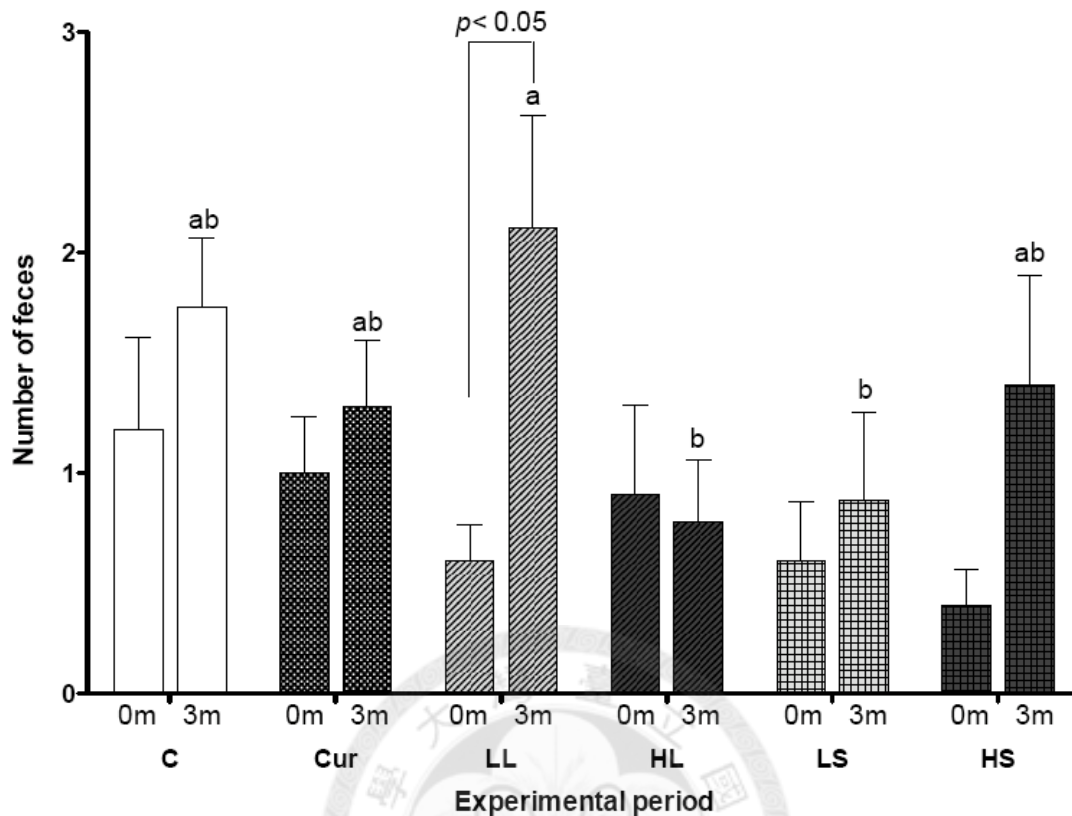
Treatment*Time: $F=0.295$, $p=0.936930$

(Without young SAMP8)

Treatment: $F=0.919$, $p=0.4676984$

Time: $F=0.001$, $p=0.981394$

Treatment*Time: $F=0.298$, $p=0.911654$



圖二十四、各組六月齡 SAMP8 小鼠於餵食三個月後其活動量測試中的糞便顆粒數

Figure 24. Number of feces in open field activity test of 6-month-old SAMP8 mice fed with AIN-93 diet containing curcumin, Z-ligustilide, or sesamol for 3 months (n=7-10).

Values are expressed as mean \pm S.E.M. and analyzed by two-way ANOVA repeated measure and Fisher's LSD tests.

Means with different letters among groups (3-month) indicates different significantly ($p < 0.05$).

Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

There is no significant difference among all groups in 0-month.

Two-way ANOVA analysis conducted with all 3-month SAMP8 mice

Treatment: $F=11.2406$, $p=0$

Time: $F=8.4599$, $p=0.005167^{**}$

Treatment*Time: $F=1.6450$, $p=0.151568$

(Without young SAMP8)

Treatment: $F=1.43189$, $p=0.229951$

Time: $F=8.18393$, $p=0.006241^{**}$

Treatment*Time: $F=1.39325$, $p=0.243646$

表十九、各組六月齡 SAMP8 小鼠於餵食三個月後對其於活動量趨勢整體分析
 Table 19. The integrative analysis of open field tests in SAMP8 mice fed with AIN-93M diet containing curcumin, Z-ligustilide, or sesamol for 3 months.

| Group | Total distance | Number of rearing | Time in rearing | Integrative ranking on performance |
|---------|----------------|-------------------|-----------------|------------------------------------|
| Control | X | X | ✓ | B |
| Cur | ✓ | ✓ | ✓ | A |
| LL | X | X | ✓ | B |
| HL | X | X | X | C |
| LS | ✓ | ✓ | ✓ | A |
| HS | X | X | X | C |

- ✓ Maintain the physical activities. A is the best to maintain physical activities; C is the worst.
- X Fail to maintain the physical activities.

Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

Integrative ranking: A is the best to maintain physical activities; C is the worst.



(二)、個別餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠之空間記憶能力之影響

六月齡 SAMP8 小鼠於移入台灣大學心理系動物房四週後，利用活動量測定其移動總距離予以分組後，分別餵食薑黃素、高低劑量之槲本內酯與芝麻酚十二週後，開始進行認知行為測定實驗，實驗分為三大部份，一為活動量測試、二為水迷津試驗、三為被動迴避試驗。全部實驗共需約二十五天，不同行為實驗間隔天數約三天，以讓動物得到充分的休息。作為年輕對照組的五月齡 SAMP8 小鼠則在移入台灣大學心理系動物房適應兩週後開始進行實驗。

1. 餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠在水迷津試驗中第零天可見式平台試驗(Visible platform test)的影響

由圖二十五可知，無論是五月齡或十月齡 SAMP8 小鼠，在第零天的 Visible platform test 中各組間並無顯著差異，顯示 SAMP8 小鼠能夠順利進行莫氏水迷津試驗，並且可以依靠其視覺與空間辨認能力找到平台位置。

2. 餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠在水迷津試驗中第一天到第五天隱沒式平台試驗(Hidden platform test)在脫離時間(Escape latency)的影響

由圖二十五則為傳統水迷津試驗的計算方法，將每隻小鼠該天四次試驗的脫離時間平均後，並分析各組 SAMP8 小鼠的空間記憶學習能力是否有差異。有圖二十五可觀察出隨著訓練天數的增加，脫離時間都有明顯下降的趨勢，其中以五月齡 SAMP8 小鼠與高劑量芝麻酚組別表現最佳，控制組與餵食薑黃素組別最差，就第五天各組的平均脫離時間來看，五月齡 SAMP8 小鼠表現最佳，依表現程度由高到低為高劑量芝麻酚、槲本內酯、低劑量芝麻酚、槲本內酯，最後則為薑黃素與控制組。但經過二因子多變量分析後，雖然在訓練天數上有顯著差異，但處理則無，在兩項因子的交感後導致無統計上之差異，主要推測為 SAMP8 小鼠的個體差異較大以致無法在處理上看到效果。

因此，進一步針對各組在訓練天數第一到第五天的平均脫離時間做趨勢分析(圖二十六)，可以發現其脫離時間的下降趨勢由趨勢線方程式的斜率做指標，可以發現五月齡 SAMP8 小鼠的斜率最大(-5.015)，其他依序為餵食高劑量芝麻酚(-3.5875)、低劑量槲本內酯(-3.6694)、高劑量槲本內酯(-3.2694)、低劑量芝麻酚(-2.9536)，表現最差的兩組則為餵食薑黃素(-1.2536)與控制組(-1.2719)。此結果顯示餵食槲本內酯以及高劑量的芝麻酚對於提升其空間記憶學習能力有最好的效果，其次為低劑量的芝麻酚。而原預期作為正控制組的薑黃素表現則劣於槲本內酯與芝麻酚。此外，也進一步發現，SAMP8 小鼠在活動量測試與水迷津的結果並無顯著相關性(附錄)。

3. 餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠在水迷津試驗中的短期記憶影響

圖二十七為將每一隻 SAMP8 小鼠在水迷津試驗中每一天第一與第四次試驗的脫離時間相減，一般來說，每天的第一次試驗應是依賴前一天試驗所帶來的長期記憶所產生的，每天的第四次試驗則依賴當天前三次試驗所產生的短期記憶的結果，藉由此方法，可以了解不同組別之 SAMP8 小鼠的短期記憶狀況。理論上，而第一次試驗所需的脫離時間應較第四次為長，所以兩次脫離時間相減，正值越大代表其短期記憶的能力越佳。由圖二十七可知，僅五月齡 SAMP8 小鼠可在訓練天數前三天維持正值，但第四與第五天則為負值，主要推測為最後兩天的訓練對於年輕的 SAMP8 小鼠所需要的脫離時間已經相當短(約十五到十六秒左右，見圖二十五)，因此其進步的空間有效，因而導致此計算方式導致為負值的原因，另一方面，推測也可能是第四與第五天的第一次下水的象限對於小鼠較容易到達平台所致。而餵食低劑量芝麻酚、低劑量槲本內酯、高劑量槲本內酯組別 SAMP8 小鼠雖然在訓練第一與第二天為負值，但可以觀察到其隨著訓練第一到第四天，此三組的表現漸入佳境，在第三與第四天時已經爬升到正值。而餵食薑黃素與高劑量芝麻酚組別則無明顯的趨勢。

4. 餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠在水迷津試驗中的長期記憶影響

圖二十八則為藉由水迷津試驗判定 SAMP8 小鼠的長期記憶能力。計算方式為紀錄每天第一次試驗的脫離時間，主要原因為每天第一次試驗的脫離時間主要是建立在前一天試驗所帶來的記憶。由圖二十八可以觀察出隨著訓練天數的增加，其每天的脫離時間下降的趨勢，在訓練天數第三天時其脫離時間皆較高，主要原因可能是因為第三天的第一次試驗 SAMP8 老鼠皆從距離平台最遠的第二象限開始游泳，而造成其所需的脫離時間較長。整體而言，五月齡 SAMP8 小鼠與餵食高劑量的槲本內酯與芝麻酚的 SAMP8 小鼠，其長期記憶的狀態最佳。而針對此進行兩因子多變量分析，分別以處理與訓練天數作為變因，可以觀察到訓練天數對於脫離時間確實有顯著的提升，但是不同處理則未達顯著差異，主要原因推測為動物個體間的差異過大，雖然均值上可看出趨勢但卻無法達到統計意義上之差異。

5. 餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠在水迷津試驗中象限偏好試驗的影響

進行完從第零天到第五天的訓練過程，最後則針對各組 SAMP8 小鼠進行象限偏好試驗，將放置平台的象限(第四象限)定義為目標象限，其他三個象限為非目標象限。初步以各組別對於目標象限中所花的時間進行統計分析，發現無法看到顯著的差異，因此進一步採用各組分別對於目標象限與非目標象限所花的時間進行差異比較，由圖二十九可知，除五月齡 SAMP8 小鼠具有顯著性的象限偏好外($p < 0.01$)，僅有控制組與餵食薑黃素的 SAMP8 小鼠有顯著性的象限偏好($p < 0.01$)，餵食高低劑量槲本內酯與芝麻酚的 SAMP8 小鼠在象限偏好上皆無達到顯著性差異，但其對於目標象限偏好的均值仍然大於非目標象限。造成此結果的主要原因，大致可歸納以下幾點，一為從 SAMP8 小鼠預養到進入長期餵食與行為實驗，皆可發現各組 SAMP8 小鼠的個體差異相當大，此外，進行長期餵食後，進行行為實驗的 SAMP8 小鼠月齡已接近十月齡，無論在游泳速度、下水試驗期

間游泳的總距離以及實驗現場目測的小鼠狀態，其運動協調能力都顯著的下降，甚至有個別 SAMP8 小鼠的協調能力不佳，無法自由操控游泳的方向(此個體之結果不會進行統計分析)，而進行象限偏好試驗時，一律將 SAMP8 小鼠放置於距離目標象限最遠的第二象限區，其可能更加提升 SAMP8 小鼠進入目標象限的困難度。

進一步將第二象限設為非目標象限，剔除原有的第一與第三象限，對於五月齡 SAMP8 小鼠的統計分析結果並無顯著影響(見附錄一，圖五十)，控制組與薑黃素組別結果之顯著差異則降為 $p < 0.05$ 。對於其他組別則皆無影響。如將目標象限的嚴格度進一步下降為將第一、三與四象限皆設為目標象限，而僅設第二象限為非目標象限(見附錄一，圖五十一)，各組結果皆無顯著差異。由此可知，接近十月齡的 SAMP8 小鼠，在象限偏好試驗中，並非因為空間認知記憶的誤差而導致無法精確到達目標象限，其對於目標象限旁的第一與第三象限皆無顯著的偏好存在，由上二度改變目標與非目標象限的計算調整仍無法觀察出顯著的差異，而推測十月齡 SAMP8 小鼠可能因老化以及其訓練天數已達第七天，可能在運動協調能力、訓練天數造成 SAMP8 小鼠的緊迫(Stress)、體力下降以及象限偏好試驗僅為最後一天單次試驗的結果，因而造成無法真實反應前五天的空間記憶訓練成果。

由附錄一圖五十三是各組別於象限偏好試驗中的游泳軌跡，由此圖可以觀察到，五月齡的 SAMP8 小鼠對於目標象限的偏好程度最為明顯，其他處理組別則可以觀察到組內因個體的差異，某些個體表現較佳，某些個體則較差，但無法顯示出在不同樣品處理上所造成的差異性。

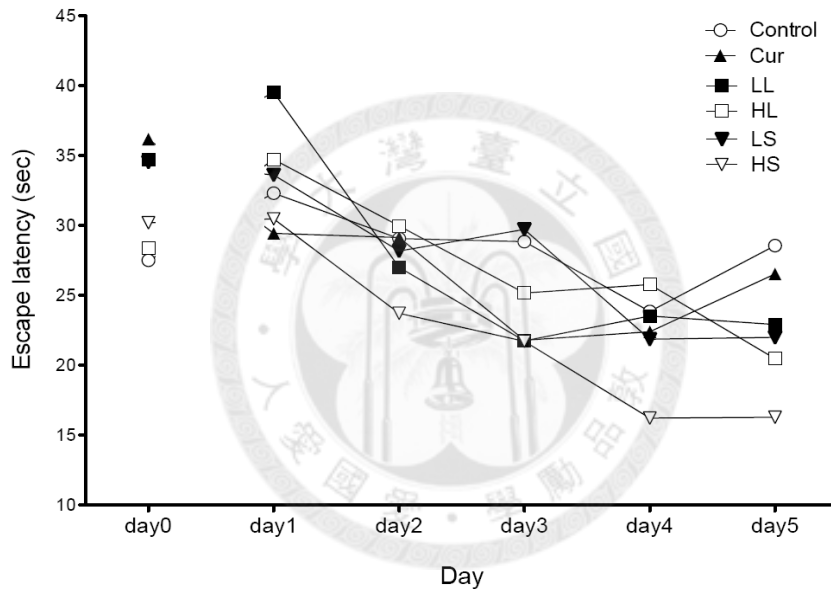
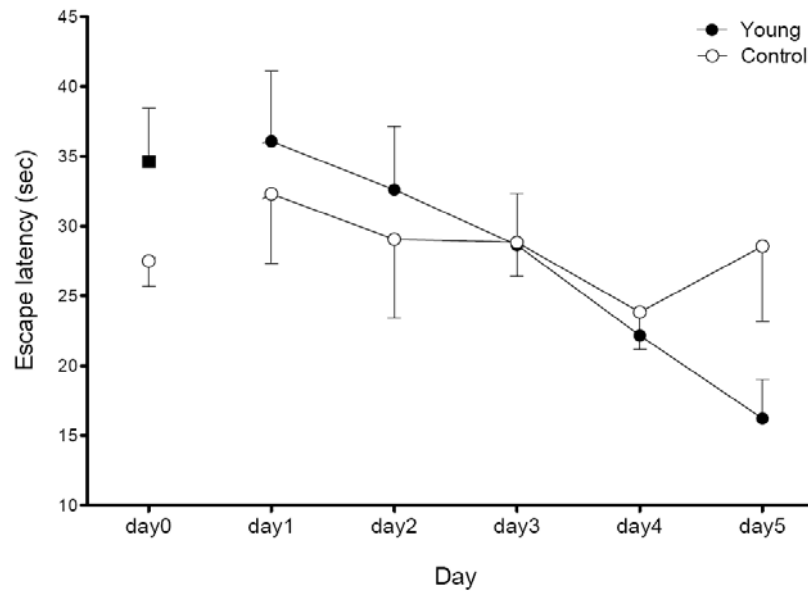
6. 餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠在水迷津試驗中游泳總距離與游泳速度的影響

由圖三十可知，SAMP8 小鼠在游泳總距離的變化趨勢，其中五月齡 SAMP8 小鼠的總距離下降趨勢最為明顯，趨勢斜率達到-72，顯示其能夠快速辨認平台於空間的相對位置，游泳總距離隨著訓練天數快速下降。而表現最好的處理組別則為餵食高低劑量的芝麻酚，其次為高低劑量之槲本內酯，最差則為控制組與薑黃素組別。

五月齡與十月齡的 SAMP8 小鼠在水迷津表現相比，五月齡的游泳速度可達到平均每秒十五公分以上，但十月齡的 SAMP8 小鼠則只能維持每秒十公分左右，且不論餵食薑黃素與高低劑量的稟本內酯與芝麻酚皆無顯著的提升(圖三十一)。此與活動量測試的結果較不符合，餵食薑黃素與低劑量芝麻酚的 SAMP8 小鼠在活動量測試有較好的表現，但在水迷津試驗中，餵食薑黃素與低劑量芝麻酚之 SAMP8 小鼠的游泳速率均值則低於其他組別，其趨勢在第四與第五訓練天數時最為明顯，反之，餵食高劑量的稟本內酯與芝麻酚 SAMP8 小鼠則有較高的游泳速率。

統整水迷津試驗各處理組相對於五月齡 SAMP8 小鼠以及控制組的分析比較，其中可以發現，各兩兩組別分析後大部分僅能在處理天數上可以看到顯著差異，但處理(treatment)則無，表示個體間的差異太大造成無法達到統計上之顯著。





圖二十五、SAMP8 小鼠在水迷津測試中的脫離時間的表現(隱沒平台試驗)

Figure 25. Escape latency in Morris water maze test of 6-month-old SAMP8 mice fed with AIN-93 diet containing curcumin, Z-ligustilide, or sesamol for 15 weeks and compared with 5-month-old SAMP8 mice (n=7-10). (4 trails/day)

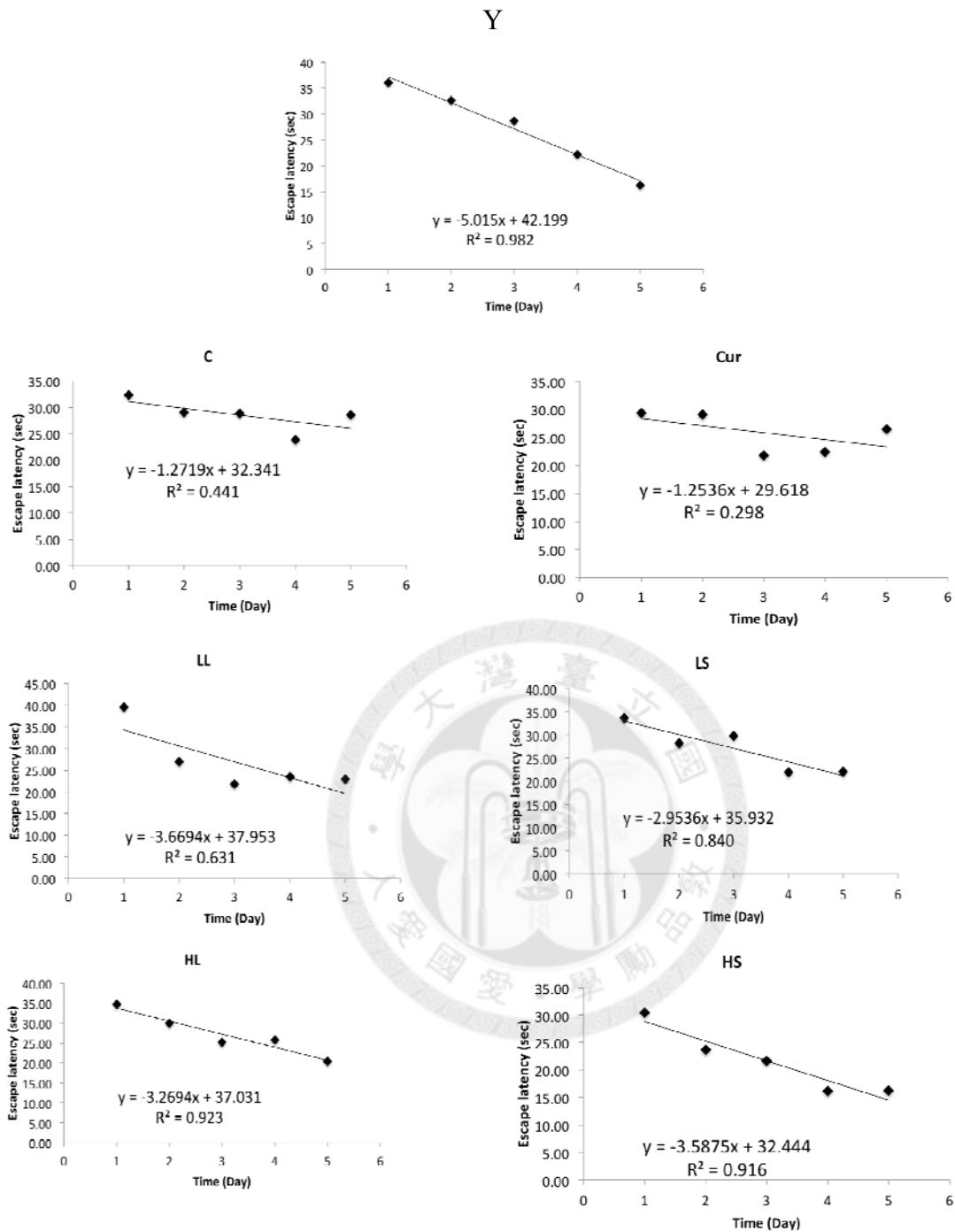
Values are expressed as mean \pm SEM and analyzed by mixed design two-way ANOVA repeated measures.

Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

Treatment: $F=0.5163$, $p=0.762397$

Day: $F=12.2121$, $p=0$

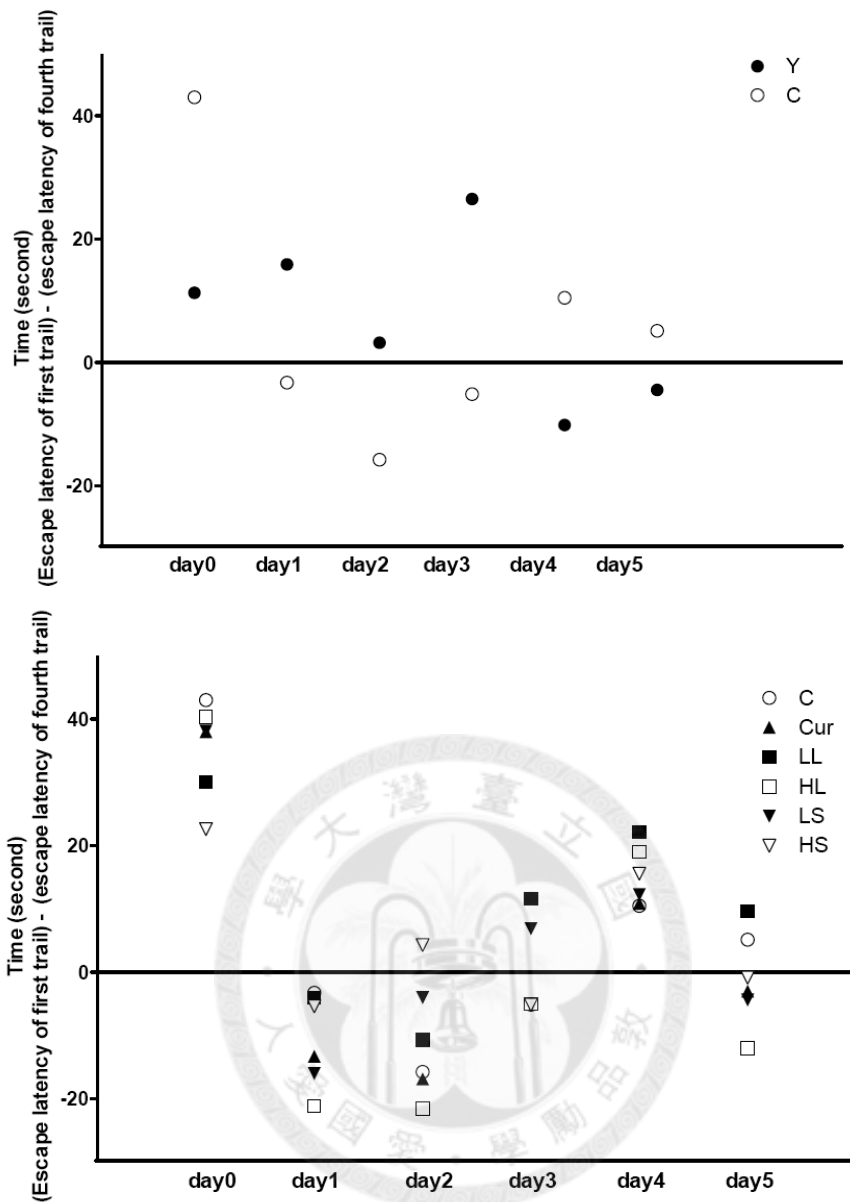
Treatment*Day: $F=0.8287$, $p=0.676309$



圖二十六、SAMP8 小鼠在水迷津測試中之學習趨勢(隱沒平台試驗)

Figure 26. Escape latency regression in Morris water maze test of 5-month-old SAMP8 mice (Y) and SAMP8 mice fed with AIN-93M diet containing curcumin, Z-ligustilide, and sesamol for 15 weeks (n=7-10).

Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.



圖二十七、SAMP8 小鼠在水迷津測試中的短期記憶狀況(隱沒平台試驗)

Figure 27. Time calculated as the escape latency of first trail minus the fourth trail in Morris water maze test, which can be regarded as the potential of short-term memory of 6-month-old SAMP8 mice fed with AIN-93 diet containing curcumin, Z-ligustilide, or sesamol for 15 weeks and compared with 5-month-old SAMP8 mice (n=7-10). Values are expressed as mean \pm SEM and analyzed by mixed design two-way ANOVA repeated measures. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

Two-way ANOVA analysis conducted with all SAMP8 mice

Treatment: $F=0.92690$, $p=0.483735$

Day: $F=23.93606$, $p=0$

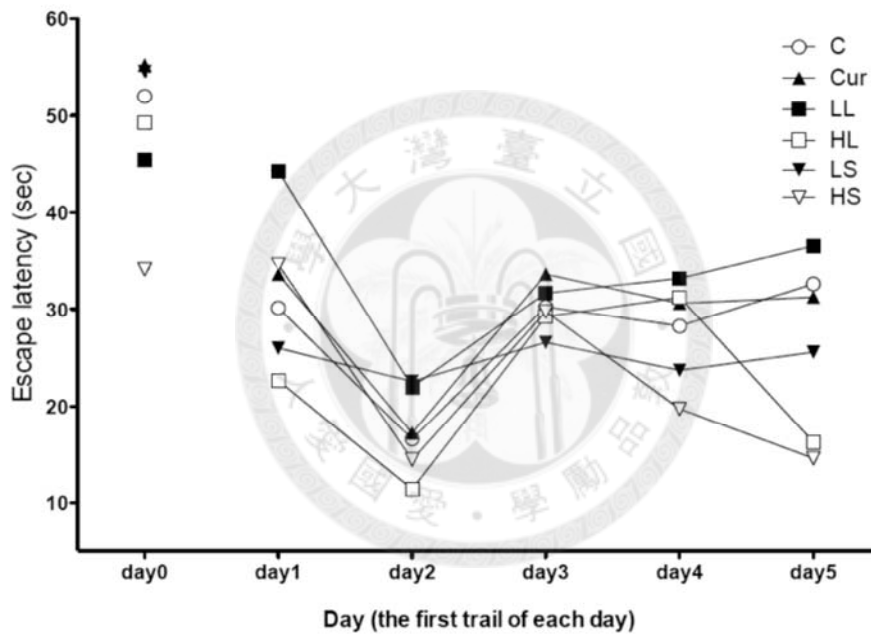
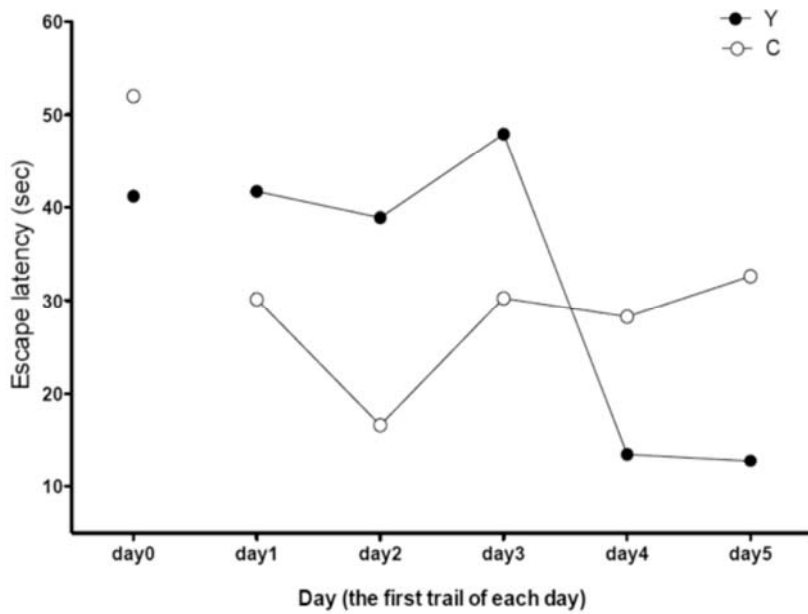
Treatment*Day: $F=2.09567$, $p=0.001151$

(Without young SAMP8)

Treatment: $F=1.74870$, $p=0.144615$

Day: $F=10.76532$, $p=0$

Treatment*Day: $F=0.74700$, $p=0.772616$



圖二十八、SAMP8 小鼠在水迷津測試中的長期記憶狀況(隱沒平台試驗)

Figure 28. Escape latency of first trail each day in Morris water maze test, which can be regarded as the potential of long-term memory of 6-month-old SAMP8 mice fed with AIN-93 diet containing curcumin, Z-ligustilide, or sesamol for 15 weeks and compared with 5-month-old SAMP8 mice (n=7-10). Values are expressed as mean \pm SEM and analyzed by mixed design two-way ANOVA repeated measures. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

Two-way ANOVA analysis conducted with all SAMP8 mice

Treatment: $F=0.9718$, $p=0.453557$

Day: $F=6.4418$, $p=0.000066^{***}$

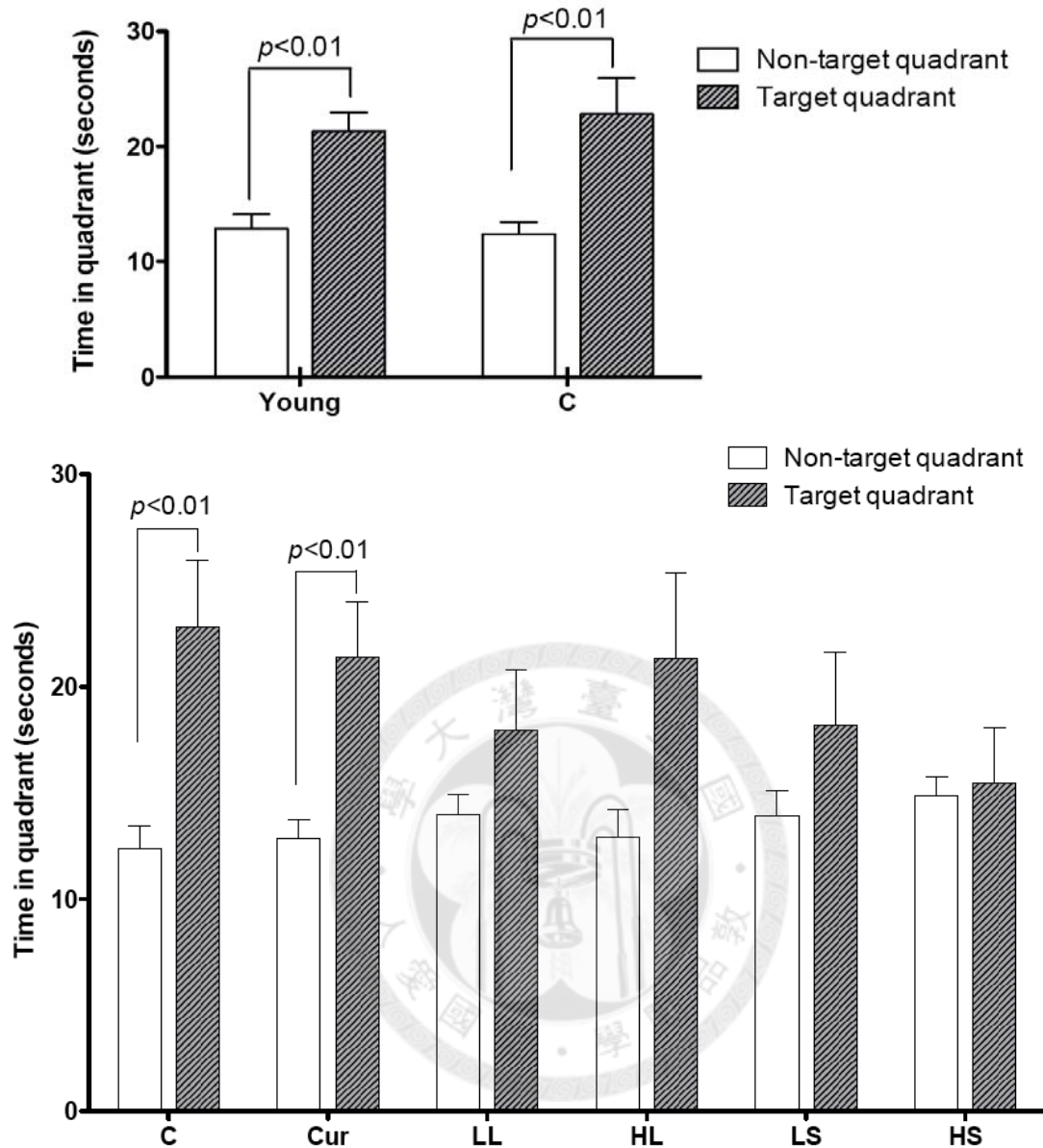
Treatment*Day: $F=2.0358$, $p=0.004255$

(Without young SAMP8)

Treatment: $F=0.8837$, $p=0.500253$

Day: $F=5.8507$, $p=0.000194^{***}$

Treatment*Day: $F=0.7397$, $p=0.780838$

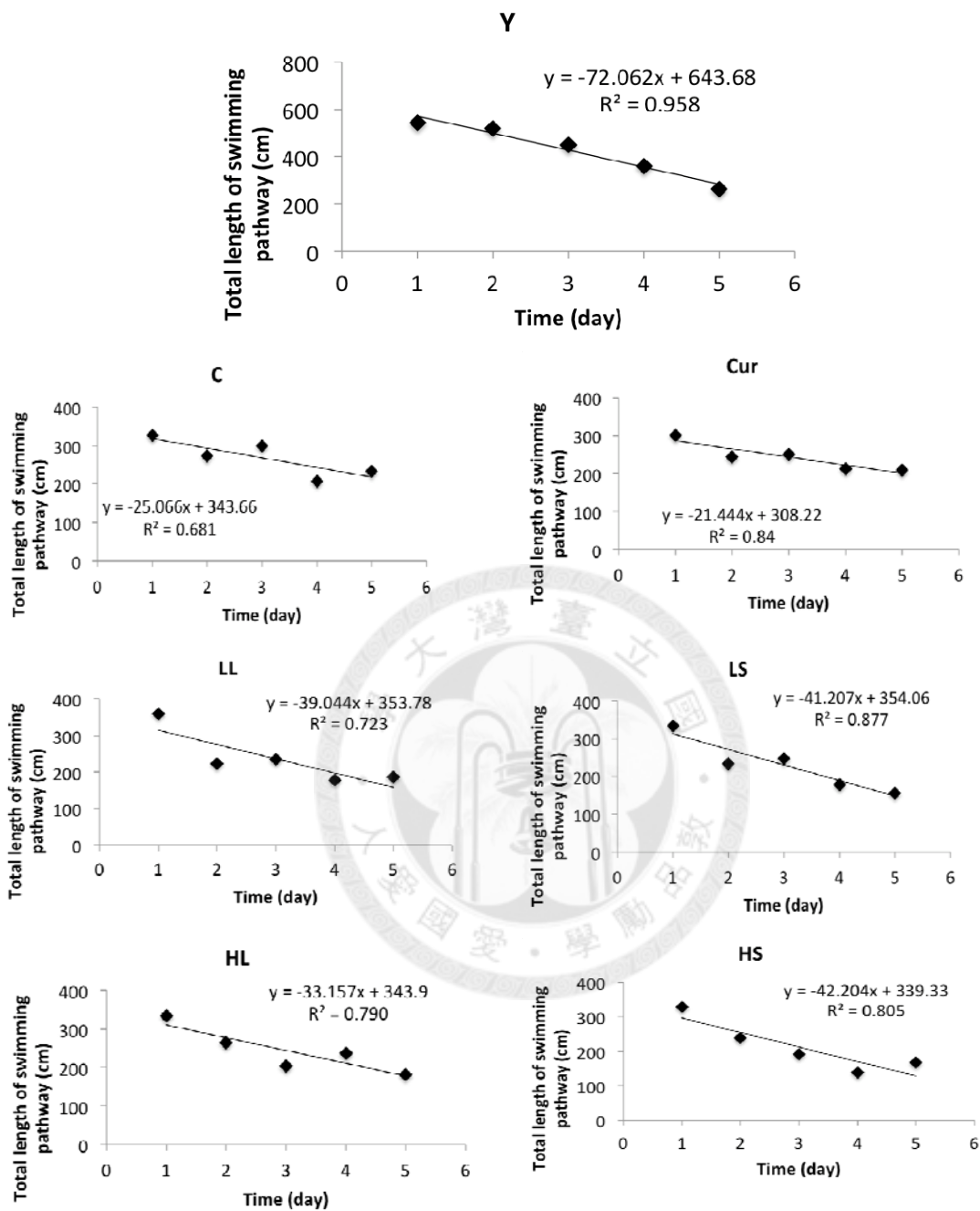


圖二十九、SAMP8 小鼠在水迷津測試中的表現(象限偏好測試)

Figure 29. Preference for target (zone IV) and non-target quadrant (zone I, II, III) in Morris water maze test of 6-month-old SAMP8 mice fed with AIN-93 diet containing curcumin, Z-ligustilide, or sesamol for 15 weeks and compared with 5-month-old SAMP8 mice (n=7-10).

Values are expressed as mean \pm S.E.M. and analyzed by one-way ANOVA, followed by Fisher's LSD tests.

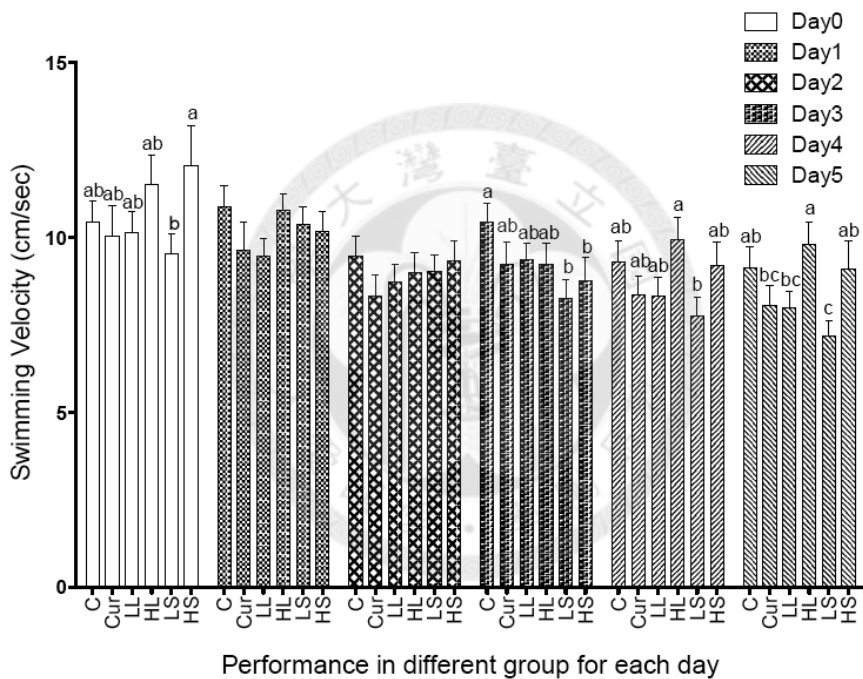
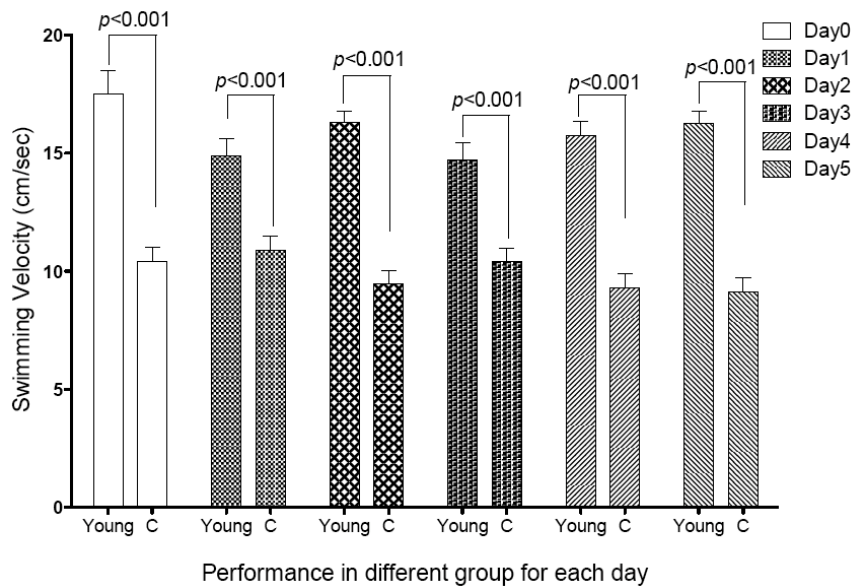
Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.



圖三十、SAMP8 小鼠在水迷津測試之游泳總距離變化趨勢(隱沒平台試驗)

Figure 30. Total length of swimming pathway in Morris water maze of SAMP8 mice fed with AIN-93 diet containing curcumin, Z-ligustilide, or sesamol for 15 weeks and compared with 5-month-old SAMP8 mice. (n=7-10).

Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.



圖三十一、SAMP8 小鼠在水迷津測試中游泳速度的表現

Figure 31. Swimming velocity in Morris water maze of 6-month-old SAMP8 fed with AIN-93 diet containing curcumin, Z-ligustilide, or sesamol for 15 weeks compared with 5-month-old SAMP8 mice (n=7-10).

Values are expressed as mean \pm S.E.M. and analyzed by mixed design two-way ANOVA repeated measures.

Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

(三)、個別餵食薑黃素、藥本內酯與芝麻酚 15 週對老化促進小鼠之恐懼記憶之影響

本研究利用被動迴避試驗來測定餵食不同樣品對於 SAMP8 小鼠對於其恐懼記憶的影響。在本研究的預實驗當中，被動迴避在第二天的電擊訓練，僅給予一次一秒中 0.25mA 之電擊，而進一步在電擊後的 24 小時進行的記憶測試訓練中，並未觀察到 SAMP8 小鼠任何對於暗室趨避性的現象，而進一步，再針對同一批小鼠進行 0.38mA 以及 0.5mA 之電擊才觀察到 SAMP8 小鼠因電極產生之恐懼記憶而產生的亮室滯留結果(見附錄二、圖六十六)。因此，在正式實驗中，第二天的電極訓練設計為每隻 SAMP8 小鼠給予五分鐘的時間，暗室與亮室間的活門不關閉，使 SAMP8 小鼠可以自由進出暗亮室，當小鼠進入暗室後一秒給予一次 0.5mA 的電極，如電擊後五秒內，小鼠無返回亮室，則再次給予電擊。

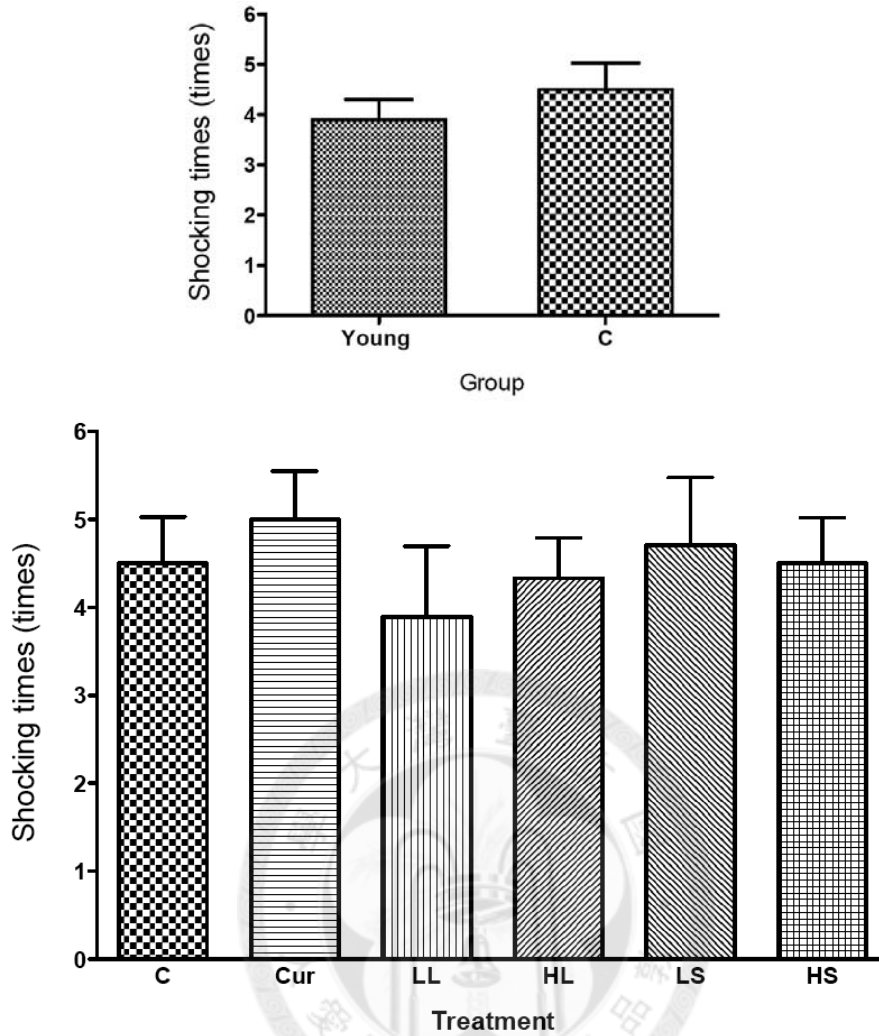
圖三十二為各組在第二天電擊訓練中，SAMP8 小鼠接受電極的次數，顯示各組 SAMP8 小鼠在五分鐘內來回暗亮室間，平均約被電極四次到五次不等，由此結果以及預實驗的結果可知 SAMP8 小鼠對於電極的敏感度較一般小鼠為低，且造成其產生恐懼記憶而對於暗室有趨避性的行為也較難形成。而由圖三十二中，各組間的電擊次數統計上無顯著的差異，顯示在第二天電擊訓練中，我們給予各組 SAMP8 小鼠的恐懼基準值是相似的。

在電擊訓練後的第一、二、三、五與七天的測試中可觀察到五月齡 SAMP8 小鼠對於電擊造成的恐懼記憶有顯著的影響(圖三十三)，但其記憶也隨著天數的增加而隨之減落，在第五天時，該組亮室滯留時間中位數已從第一天的接近三百秒落到約一百秒，但在第七天又提升到兩百五十秒左右，但可觀察到第七天，該組的四分位距已顯著拉大，顯示有些 SAMP8 小鼠的恐懼記憶已經逐漸消失，而有些小鼠仍存在。此可解釋為在恐懼記憶行為中常見的自發性回復 (Spontaneous recovery)，主要原因為因恐懼產生的記憶易由微細的線索而提取記憶，而導致部份小鼠在第七天時，可能因某些因素造成其在亮室滯留時間提高。

餵食基礎飼料的控制組 SAMP8 小鼠，從電擊後一天到七天的亮室滯留時間中位數約介在 120 到 190 秒之間，僅有少數 SAMP8 小鼠可在電擊後一到七天達到 300 秒的亮室滯留，但由圖三十三，可以觀察出控制組 SAMP8 小鼠在

亮室滯留情形逐漸下降，代表其恐懼記憶消退的程度較快。反觀餵食薑黃素、高低劑量槲本內酯與芝麻酚之 SAMP8 小鼠，其每次測試的亮室滯留中位數可以達到最佳的 300 秒，且組內之四分位距除較控制組小外，也較五月齡 SAMP8 小鼠佳。其中，餵食薑黃素組別的 48 小時內、餵食高劑量槲本內酯的 72 小時內、餵食高劑量芝麻酚的 72 小時內，大部份 SAMP8 老鼠都可以達到 300 秒的亮室滯留程度，其中已餵食高劑量芝麻酚的效果最佳，以上結果顯示無論餵食薑黃素、槲本內酯或芝麻酚皆有顯著鞏固 SAMP8 小鼠之恐懼記憶能力的效果。

進一步針對被動迴避試驗結果進行統計分析發現，五月齡 SAMP8 小鼠與控制組的恐懼記憶皆會隨著時間變化而下降，餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚之小鼠則可以記得，故到電擊後 72 與 120 小時後，在 Kruskal-Wallis ANOVA 分析中可以看到處理組別達到顯著的差異($p < 0.05$)(表二十)。進一步以 One-tailed Mann-Whitney U test 分析可以看到，各處理組別相對於控制組與五月齡 SAMP8 小鼠的表現，可達到顯著的差異(表二十一)。而針對各個不同時間點，將亮室滯留時間分為 300 秒與低於 300 秒兩個階段進行卡方檢定，以分析各組在 300 秒與低於 300 秒兩個階段中，是否有差異存在。由表二十二可知，隨著時間變化，可以看到顯著差異有越來越明顯的趨勢，同樣可以在電擊後 72 與 120 小時看到顯著的差異($p < 0.0492$ 以及 $p < 0.0163$)。

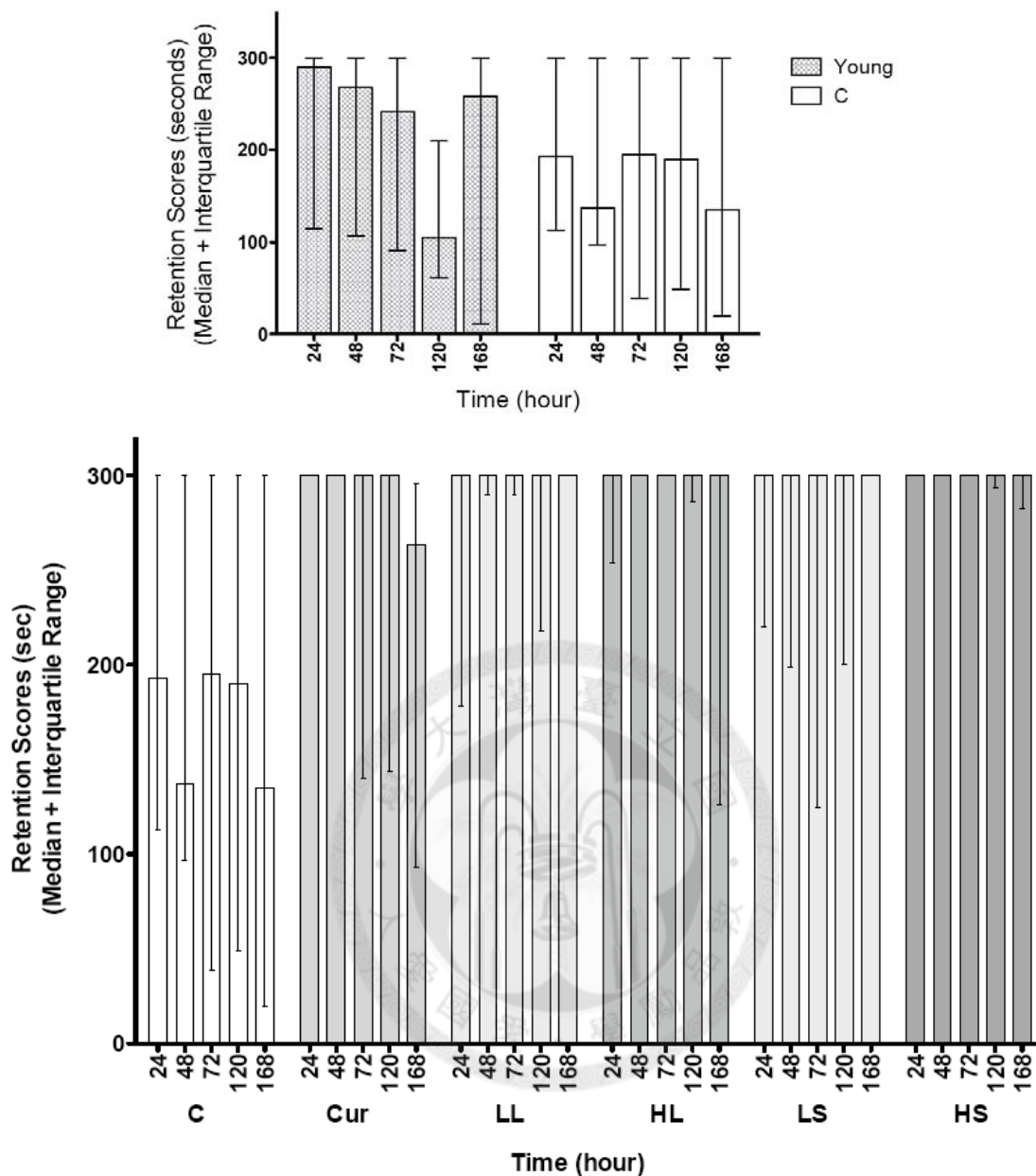


圖三十二、SAMP8 小鼠在被動迴避試驗中被電擊的次數

Figure 32. Average of shocking times for each group in inhibitory avoidance task of 6-month-old SAMP8 mice fed with AIN-93 diet containing curcumin, Z-ligustilide, or sesamol for 15 weeks and compared with 5-month-old SAMP8 mice (n=7-10).

Values are expressed as mean \pm S.D. and analyzed by one-way ANOVA analysis.

Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.



圖三十三、SAMP8 小鼠在被動迴避試驗中在亮室所停留的時間

Figure 33. Retention scores after electronic shocking 24 to 168hr in inhibitory avoidance task of 6-month-old SAMP8 mice fed with AIN-93 diet containing curcumin, Z-ligustilide, or sesamol for 15 weeks and compared with 5-month-old young SAMP8 mice (n=7-10). Values are expressed as median \pm interquartile range. Between subjects analyzed by Kruskal-Wallis test; Pair comparison analyzed by one-tailed Mann-Whitney U test.

Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

表二十、被動迴避試驗以 Kruskal-Wallis ANOVA by rankings 分析組間之差異
 Table 20. Kruskal-Wallis ANOVA by rankings in inhibitory avoidance task

| Test after shocking | H | p value | Significance |
|---------------------|-------|---------|--------------|
| 24hr | 6.231 | 0.3978 | - |
| 48hr | 12.04 | 0.0610 | - |
| 72hr | 13.19 | 0.0401 | $p < 0.05$ |
| 120hr | 15.47 | 0.0169 | $p < 0.05$ |
| 168hr | 10.05 | 0.1224 | - |

表二十一、被動迴避試驗以 Mann-Whitney U test by variable treatment 分析兩兩處理間差異

Table 21. Mann-Whitney U test by variable treatment in inhibitory avoidance task

| Test after shocking | Pair | U | p value | Significance |
|---------------------|-------|--------|----------|--------------|
| 24hr | C/Y | 32 | 0.4184 | |
| | C/Cur | 15.5 | 0.0491* | $p < 0.05$ |
| | C/LL | 26 | 0.2799 | |
| | C/HL | 18 | 0.0647 | |
| | C/LS | 17.5 | 0.1788 | |
| | C/HS | 17 | 0.0737 | |
| | Y/Cur | 24.5 | 0.0562 | |
| | Y/LL | 39 | 0.3086 | |
| | Y/HL | 33 | 0.1480 | |
| | Y/LS | 26.5 | 0.1910 | |
| | Y/HS | 25.5 | 0.0692 | |
| 48hr | C/Y | 28 | 0.2555 | |
| | C/Cur | 10 | 0.0111* | $p < 0.05$ |
| | C/LL | 15 | 0.0309* | $p < 0.05$ |
| | C/HL | 10 | 0.0053** | $p < 0.01$ |
| | C/LS | 14 | 0.0859 | |
| | C/HS | 14 | 0.0388* | $p < 0.05$ |
| | Y/Cur | 23.5 | 0.0452* | $p < 0.05$ |
| | Y/LL | 30.5 | 0.0933 | |
| | Y/HL | 26 | 0.0336* | $p < 0.05$ |
| | Y/LS | 26.5 | 0.1910 | |
| Y/HS | 27.5 | 0.0120 | | |
| 72hr | C/Y | 34 | 0.4798 | |
| | C/Cur | 20 | 0.1637 | |
| | C/LL | 20.5 | 0.1008 | |

| | | | | |
|-------|-------|------|-----------|-------------|
| | C/HL | 13.5 | 0.0123* | $p < 0.05$ |
| | C/LS | 19.5 | 0.2621 | |
| | C/HS | 12 | 0.0175* | $p < 0.05$ |
| | Y/Cur | 29 | 0.1529 | |
| | Y/LL | 29 | 0.0795 | |
| | Y/HL | 18 | 0.0075** | $p < 0.01$ |
| | Y/LS | 27 | 0.2140 | |
| | Y/HS | 10 | 0.0382* | $p < 0.05$ |
| 120hr | C/Y | 26.5 | 0.2159 | |
| | C/Cur | 20 | 0.1637 | |
| | C/LL | 22 | 0.1469 | |
| | C/HL | 18.5 | 0.0642 | |
| | C/LS | 16.5 | 0.1443 | |
| | C/HS | 15 | 0.0513 | |
| | Y/Cur | 17 | 0.0197* | $p < 0.05$ |
| | Y/LL | 16 | 0.0085** | $p < 0.05$ |
| | Y/HL | 12.5 | 0.0033** | $p < 0.01$ |
| | Y/LS | 13.5 | 0.0180* | $p < 0.05$ |
| | Y/HS | 5 | 0.0008*** | $p < 0.001$ |
| 168hr | C/Y | 33 | 0.4405 | |
| | C/Cur | 23 | 0.2996 | |
| | C/LL | 14.5 | 0.0223 | |
| | C/HL | 19 | 0.0874 | |
| | C/LS | 15 | 0.1097 | |
| | C/HS | 12 | 0.0293* | $p < 0.05$ |
| | Y/Cur | 40 | 0.4820 | |
| | Y/LL | 24 | 0.0266 | |
| | Y/HL | 32 | 0.1349 | |
| | Y/LS | 25 | 0.1577 | |
| | Y/HS | 24 | 0.0706 | |

Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

表二十二、針對各處理組間的亮室滯留時間不同程度的卡方分析

Table 22. The retention scores of each mouse in different retention level (n=7-10)

| Time | Number of mice in different level retention range (n) | | | | | | |
|-----------------------------------|---|---|-----|----|----|----|----|
| | Y | C | Cur | LL | HL | LS | HS |
| Retention scores* | | | | | | | |
| 24hr | | | | | | | |
| 300 | 5 | 3 | 7 | 6 | 6 | 5 | 7 |
| Below 300 | 5 | 4 | 1 | 3 | 3 | 2 | 1 |
| Chi-square=6.279, df=6, p=0.3927 | | | | | | | |
| 48hr | | | | | | | |
| 300 | 5 | 2 | 7 | 7 | 8 | 5 | 7 |
| Below 300 | 5 | 5 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| Chi-square=11.9, df=6, p=0.0642 | | | | | | | |
| 72hr | | | | | | | |
| 300 | 5 | 3 | 6 | 7 | 9 | 5 | 8 |
| Below 300 | 5 | 4 | 2 | 2 | 0 | 2 | 0 |
| Chi-square=12.63, df=6, p=0.0492* | | | | | | | |
| 120hr | | | | | | | |
| 300 | 1 | 3 | 6 | 7 | 7 | 5 | 6 |
| Below 300 | 9 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Chi-square=15.57, df=6, p=0.0163* | | | | | | | |
| 168hr | | | | | | | |
| 300 | 4 | 2 | 2 | 8 | 6 | 5 | 5 |
| Below 300 | 6 | 5 | 6 | 1 | 3 | 2 | 3 |
| Chi-square=11.42, df=6, p=0.0763 | | | | | | | |

*Retention scores are divided two parts into 300sec and below 300 sec.

Values are expressed as number mouse in different range of retention scores and analyzed by Chi-square analysis.

Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

五、個別餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠其臟器重量的影響

各組 SAMP8 小鼠進行不同樣品餵食後，其臟器的重量分析如表二十三所示，五月齡 SAMP8 小鼠與十月齡控制組小鼠，僅在肝臟重量有統計上之差異。由先前病理分析以及犧牲過程可以明顯觀察到十月齡 SAMP8 小鼠與五月齡 SAMP8 小鼠相比，其脂肪肝的情形相當嚴重，由血清生化值之結果(表二十五)可知，SAMP8 小鼠有肝臟脂質過高的問題，因此推測此為造成控制組小鼠肝臟重量明顯上升的原因。而在大腦、心臟、脾臟、肺臟、腎臟則無顯著差異。而比較各處理組的臟器重量比較可以發現，在大腦、心臟、脾臟、肺臟與腎臟有些微差異，但無統計上之顯著性。在肝臟部分，可以發現餵食芝麻酚的兩組小鼠其肝臟重量最重，但與其他處理組別無顯著差異。由此結果可推知，餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚皆無顯著改善 SAMP8 肝臟脂質過高的問題。

為進一步排除個體體重不同所造成臟器重量的誤差，利用相對臟器重量進行分析(表二十四)，可以發現五月齡 SAMP8 小鼠的大腦相對重量為各組間最重，控制組、薑黃素、高劑量槲本內酯次之，餵食低劑量之槲本內酯則是最低，並無顯著的劑量效應。由此可了解十月齡 SAMP8 小鼠腦部重量略為減輕，推測可能有萎縮的現象，各處理組間沒有顯著差異，但餵食槲本內酯之 SAMP8 小鼠，可以觀察到餵食高劑量槲本內酯有減緩腦部重量下降的現象，但進一步與控制組相比，並沒有統計上的差異。心臟方面，以五月齡 SAMP8 小鼠最重，而十月齡 SAMP8 小鼠則皆顯著變輕的現象，尤其以餵食低劑量槲本內酯與高劑量芝麻酚組別最為明顯，而餵食薑黃素則能有維持 SAMP8 小鼠的心臟重量。五月齡 SAMP8 小鼠的肝臟相對重量仍舊最輕，而十月齡 SAMP8 小鼠的肝臟重量則有顯著的上升，其中又以餵食芝麻酚最為明顯，由此分析結果也可觀察到，肝臟重量的組內差異較大，推測個體間因老化產生的體內生理病變發生時間不同，有些可能因脂肪肝、白血症等導致肝臟的病變所造成。腎臟、脾臟與肺臟各組在統計上無顯著差異。

表二十三、個別餵食基礎飼料、薑黃素、藜本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠臟器重量的影響

Table 23. Organ weight of 6-month-old SAMP8 mice fed with control diet, curcumin, Z-ligustilide, or sesamol for 15 weeks and compared with 5-month-old young SAMP8 mice.

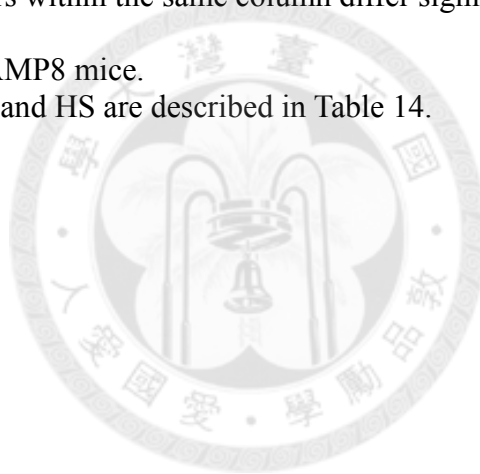
| Group | Brain | Heart | Liver | Spleen | Lung | Kidneys |
|-------|------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Y | 0.43±0.04 ^a | 0.17±0.04 ^b | 1.65±0.27 ^c | 0.08±0.03 ^a | 0.25±0.05 ^b | 0.56±0.08 ^b |
| C | 0.43±0.02 ^a | 0.19±0.03 ^{ab} | 2.89±0.97 ^{ab} | 0.11±0.05 ^a | 0.28±0.07 ^{ab} | 0.63±0.10 ^{ab} |
| Cur | 0.44±0.03 ^a | 0.20±0.03 ^a | 3.05±1.33 ^{ab} | 0.25±0.36 ^a | 0.27±0.04 ^{ab} | 0.62±0.09 ^{ab} |
| LL | 0.44±0.03 ^a | 0.19±0.03 ^{ab} | 3.09±0.81 ^{ab} | 0.14±0.10 ^a | 0.31±0.06 ^a | 0.64±0.06 ^a |
| HL | 0.44±0.02 ^a | 0.19±0.02 ^{ab} | 2.31±0.09 ^{bc} | 0.14±0.13 ^a | 0.31±0.04 ^a | 0.60±0.06 ^{ab} |
| LS | 0.45±0.03 ^a | 0.20±0.02 ^a | 3.57±1.31 ^a | 0.28±0.30 ^a | 0.32±0.07 ^a | 0.63±0.06 ^{ab} |
| HS | 0.44±0.02 ^a | 0.19±0.02 ^{ab} | 3.53±1.11 ^a | 0.27±0.35 ^a | 0.29±0.04 ^{ab} | 0.67±0.09 ^a |

Values are expressed as mean ± S.D. and analyzed by one-way ANOVA, followed by Fisher's LSD tests.

Means with difference letters within the same column differ significantly $p < 0.05$ (n=7-10).

Y indicates 5-month-old SAMP8 mice.

Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.



表二十四、個別餵食基礎飼料、薑黃素、藜本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠臟器相對重量的影響

Table 24. Relative organ weight of 6-month-old SAMP8 mice fed with control diet, curcumin, Z-ligustilide, or sesamol for 15 weeks and compared with 5-month-old young SAMP8 mice.

| Group | Brain | Heart | Liver | Spleen | Lung | Kidneys |
|-------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| Y | 1.35±0.11 ^a | 0.53±0.11 ^a | 5.08±0.55 ^c | 0.25±0.08 ^a | 0.77±0.13 ^a | 1.71±0.10 ^b |
| C | 1.05±0.24 ^{bc} | 0.45±0.05 ^{bcd} | 6.63±1.13 ^{abc} | 0.26±0.09 ^a | 0.66±0.13 ^a | 1.49±0.10 ^b |
| Cur | 1.12±0.21 ^{bc} | 0.52±0.12 ^{ab} | 7.41±2.28 ^{ab} | 0.57±0.75 ^a | 0.69±0.10 ^a | 1.57±0.34 ^{ab} |
| LL | 0.96±0.10 ^c | 0.42±0.06 ^d | 6.66±1.33 ^{abc} | 0.30±0.22 ^a | 0.69±0.15 ^a | 1.40±0.11 ^b |
| HL | 1.12±0.18 ^b | 0.49±0.09 ^{abc} | 5.73±1.19 ^{bc} | 0.34±0.33 ^a | 0.77±0.09 ^a | 1.52±0.22 ^{ab} |
| LS | 1.04±0.18 ^{bc} | 0.47±0.06 ^{abcd} | 7.95±1.92 ^a | 0.61±0.59 ^a | 0.74±0.13 ^a | 1.45±0.13 ^b |
| HS | 1.03±0.10 ^{bc} | 0.45±0.06 ^{cd} | 8.12±2.45 ^a | 0.63±0.84 ^a | 0.67±0.11 ^a | 1.56±0.24 ^{ab} |

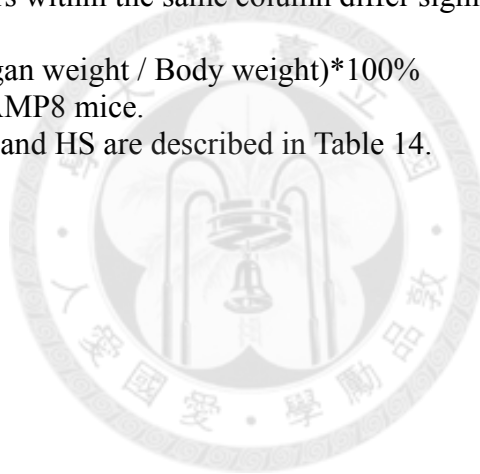
Values are expressed as mean ± S.D. and analyzed by one-way ANOVA, followed by Fisher's LSD tests.

Means with difference letters within the same column differ significantly $p < 0.05$ (n=7-10).

Relative organ weight = (organ weight / Body weight) * 100%

Y indicates 5-month-old SAMP8 mice.

Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.



六、個別餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠之血清生化值的影響

在血清生化值方面，丙胺酸轉胺酶(Alanine aminotransferase, ALT)與天門冬胺酸轉胺酶(Aspartate aminotransferase, AST)是肝臟細胞內常見的酵素，其主要在於胺基酸代謝扮演重要的角色，除肝臟外，ALT 與 AST 也分布於骨骼肌、心臟、胰臟、腎臟中。一般而言，在肝臟受到損傷導致細胞破裂與死亡，位在肝臟細胞細胞質中的 ALT 與 AST 就被釋放出，回流到血液循環中。因此檢測血清 ALT 與 AST 濃度高低，可作為判定肝臟病變情形的指標。由表二十五可知，就 AST 而言，五月齡 SAMP8 小鼠平均值落在 250U/L，與十月齡控制組無顯著差異，而經由不同樣品長期餵食後的十月齡 SAMP8 小鼠，其 AST 範圍則落在 205~317U/L 的範圍，顯示 SAMP8 小鼠自五月齡開始有肝臟相關的病變與損傷，而隨著時間而老化，因個體的差異而有所不同，整體而言，各組間的血清 AST 濃度統計上並無顯著差異，但可以觀察到隨著老化，組內的個體在 AST 的指標變化相當大。ALT 方面，可以觀察到五月齡 SAMP8 小鼠的濃度相當低，約落在 40U/L，反觀接近十月齡的控制組 SAMP8 小鼠，上升到 140U/L 左右，餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚並沒有顯著降低 ALT 的濃度，反而可觀察出提升 ALT 的趨勢，但並未有顯著的劑量效應。根據 *Clinical Pathology of Laboratory Animal* (Hall, 2007) 針對小鼠(Mouse)的各項生化指標項目參考範圍，不論是五月齡或十月齡的 SAMP8 小鼠的血清 AST 濃度皆偏高，而餵食低劑量槲本內酯、高低劑量芝麻酚之 SAMP8 小鼠血清 ALT 濃度也有偏高的現象。

Ye et al., (2004) 的研究指出，由於 SAMP8 小鼠體內高濃度的鼠科白血症病毒，可能是進一步造成肝臟病變與 ALT 與 AST 上升的主要原因。但該研究中，SAMP8 小鼠的 ALT 與 AST 大約上升到 160 到 180 左右，但本研究中卻可以觀察到某些個體的 SAMP8 小鼠 ALT 與 AST 上升到 300 以上。

根據本實驗針對部份非預期死亡的 SAMP8 小鼠，委託國立中興大學獸醫病理所廖俊旺教授進行病理分析的結果顯示，藉由肝臟病理切片可觀察到部份 SAMP8 小鼠無法正常代謝三酸甘油酯(Triglyceride, TG)而導致肝臟內脂肪過高，而進一步堆積在肝臟中並形成空泡。針對各組的禁食空腹 16 小時後的 TG 檢測可發現，十月齡 SAMP8 小鼠不論經由餵食何種樣品，其 TG 皆顯著高於五

月齡 SAMP8 小鼠($p<0.05$)，在禁食的條件下，此結果搭配病理分析結果，發現部份 SAMP8 小鼠因老化而造成三酸甘油脂已無法正常運往脂肪細胞中儲存，產生脂質代謝不正常的問題，推測此可能是導致血清中 TG 濃度大量增加，而由表二十六也可發現經由薑黃素、藜本內酯與芝麻酚長期餵食皆無改善的效果。

血清總膽固醇(Serum total Cholesterol)方面，可以觀察到五月齡 SAMP8 小鼠可維持在 110mg/dL 左右，十月齡控制組小鼠則上升到約 150 mg/dL，餵食薑黃素則可顯著下降血清總膽固醇濃度，餵食高低劑量之藜本內酯與芝麻酚皆可些微降低其濃度，且餵食藜本內酯對於降低血清總膽固醇有些微的濃度效應。

在腎功能指標方面，尿素氮(Blood Urine Nitrogen, BUN)與肌酐酸(Creatinine)則無觀察到明顯的惡化趨勢，BUN 是生物體內蛋白質代謝產物，正常經由腎臟分泌後，會藉由尿液而排除，因此，當 BUN 濃度上升，通常作為腎臟損傷的指標，五月齡 SAMP8 小鼠之 BUN 濃度維持在約 26mg/dL 左右，反觀餵食高劑量藜本內酯與高低劑量芝麻酚的 SAMP8 小鼠相較於五月齡 SAMP8 小鼠則可顯著降低 BUN 濃度($p<0.05$)。肌酐酸在各組間則無顯著的趨勢與變化。



表二十五、餵食薑黃素、藜本內酯與芝麻酚 SAMP8 小鼠 15 週對其血清生化值的影響

Table 25. Serum biochemical analysis of 6-month-old SAMP8 mice fed with control diet, curcumin, Z-ligustilide, or sesamol for 15 weeks and compared with 5-month-old young SAMP8 mice.

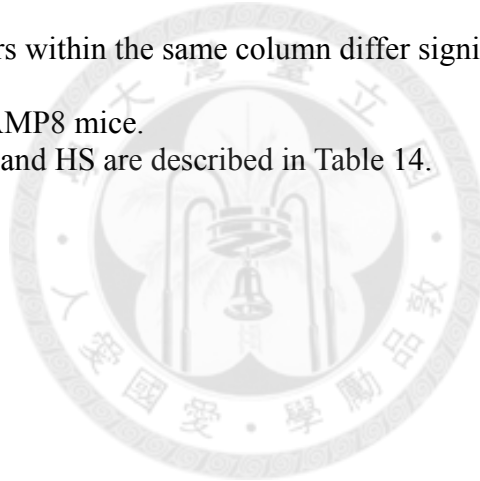
| Group | AST (U/L) | ALT (U/L) | TG (mg/dL) | TC (mg/dL) | BUN (mg/dL) | Creatinine (mg/dL) |
|-------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Y | 252.1±62.5 ^a | 38.4±9.36 ^c | 87.3±24.9 ^b | 112.3±17.3 ^{abc} | 25.8±5.2 ^a | 0.4±0.03 ^{abc} |
| C | 205.6±87.7 ^a | 141.9±67.9 ^{bc} | 171.1±30.5 ^a | 149.1±49.3 ^a | 19.29±3.15 ^{bc} | 0.4±0.06 ^{abc} |
| Cur | 222.5±185.4 ^a | 171.3±148.4 ^{ab} | 145.9±41.0 ^a | 99.1±45.2 ^c | 22.9±10.1 ^{ab} | 0.4±0.07 ^{ab} |
| LL | 317.6±336.2 ^a | 187.1±128.4 ^{ab} | 176.5±34.8 ^a | 139.1±36.5 ^{abc} | 15.4±1.7 ^c | 0.35±0.05 ^c |
| HL | 136.9±62.3 ^a | 110.2±52.0 ^{bc} | 167.3±63.6 ^a | 106.7±34.3 ^{bc} | 16.6±3.0 ^c | 0.44±0.09 ^a |
| LS | 280.0±212.8 ^a | 253.6±106.4 ^a | 148.1±31.2 ^a | 121.1±39.5 ^{abc} | 15.6±3.1 ^c | 0.34±0.05 ^c |
| HS | 271.3±161.9 ^a | 204.0±149.4 ^{ab} | 144.9±26.2 ^a | 143.2±45.2 ^{ab} | 18.5±5.1 ^{bc} | 0.36±0.05 ^{bc} |

Values are expressed as mean ± S.D. and analyzed one-way ANOVA, followed by Fisher's LSD tests.

Means with difference letters within the same column differ significantly $p < 0.05$ (n=7-10).

Y indicates 5-month-old SAMP8 mice.

Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.



七、個別餵食薑黃素、藥本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠其腦中類澱粉胜肽之影響

經組織免疫染色，分別利用 6E10、A11 與 LOC 抗體針對五月齡老化促進小鼠與經不同樣品長期餵食後的十月齡 SAMP8 小鼠的腦部染色切片比較。僅 6E10 抗體可以偵測到 SAMP8 小鼠腦部的類澱粉胜肽沈積，而在 A11 與 LOC 抗體染色中則無法偵測到類澱粉胜肽沈澱(附錄六)。因此我們推論，SAMP8 小鼠腦部中的類澱粉胜肽可能無法聚集為寡聚合物以及斑塊。由於 A11 抗體主要是針對與類澱粉胜肽寡聚合物構型(conformation)的結構產生專一性的結合，LOC 抗體則是針對類澱粉胜肽聚集而成的斑塊而產生專一性的結合。由於 SAMP8 小鼠並非為轉殖入人類阿滋海默症的類澱粉胜肽表現基因，因此其生成的胜肽與人類的不同，由圖三十四可知，以類澱粉胜肽 1-42 為例，啮齒類動物與人類體中的胺基酸序列差異。可以觀察到在第五、十、十三等位置的胺基酸，可以觀察到啮齒類動物的三個胺基酸由 Arg 換成 Gly、Tyr 換成 Phe 以及 His 換成 Arg。其中，可以看到第五個位置，由原屬於鹼性胺基酸換為無側鏈的 glycine；第十個位置由芳香族類的胺基酸 Tyr 換為少一個 OH 基的 Phe；第十三個位置則由鹼性的 Histine 換為直鏈的 Arg。由以上可知，其結構差異可能進一步造成啮齒類動物的類澱粉胜肽聚合過程與人類的有所不同，而產生在 A11 與 LOC 抗體無法染出類澱粉胜肽進一步聚集的結果。

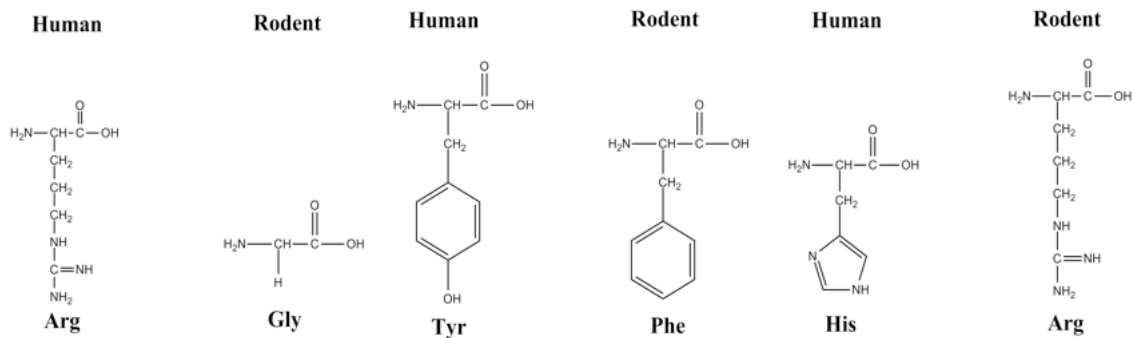
Beta-amyloid 1-42, human

Asp - Ala - Glu - Phe - **Arg** - His - Asp - Ser - Gly - **Tyr** - Glu - Val - **His** - His - Gln - Lys - Leu - Val - Phe - Phe - Ala - Glu - Asp - Val - Gly - Ser - Asn - Lys - Gly - Ala - Ile - Ile - Gly - Leu - Met - Val - Gly - Gly - Val - Val - Ile - Ala

Beta-amyloid 1-42, mouse, rat

Asp - Ala - Glu - Phe - **Gly** - His - Asp - Ser - Gly - **Phe** - Glu - Val - **Arg** - His - Gln - Lys - Leu - Val - Phe - Phe - Ala - Glu - Asp - Val - Gly - Ser - Asn - Lys - Gly - Ala - Ile - Ile - Gly - Leu - Met - Val - Gly - Gly - Val - Val - Ile - Ala

(Anaspec, 2011)



(A) Arg 替換為 Gly ; (B) Tyr 替換為 Phe ; (C) His 替換為 Arg

圖三十四、人類類澱粉胜肽與啮齒類動物類澱粉胜肽胺基酸位置差異替換比較圖
Figure 34. The difference amino acid between beta amyloid in human and rodent

針對 6E10 抗體腦部組織免疫染色的結果，概觀而論，SAMP8 小鼠的類澱粉胜肽沈澱多位於視丘、下視丘、皮質區，反而海馬迴區較少。從五月齡與十月齡 SAMP8 小鼠的結果來看，距離窗門不同位置的腦部切片中的類澱粉胜肽堆積量也會有所不同。而本實驗中觀察到 SAMP8 小鼠的類澱粉胜肽多呈現粒狀(Granular)與不定形(Amorphous)的狀態，符合先前研究針對 SAMP8 小鼠做類澱粉胜肽的研究結果(Valle et al., 2010; Takemura, 1994; Akiguchi et al., 1994)。

本研究選擇距離窗門位置-1.55 到-1.58 mm、-2.25 到-2.54 mm 以及 0.245 到 0.62 mm 位置以製作為腦部切片，主要原因為-1.55 到-1.58 mm、-2.25 到-2.54 mm 可以同時觀察到皮質區、海馬迴區、視丘、下視丘與杏仁核等位置，我們可以藉由觀察這些位置的切片來判定類澱粉胜肽對於認知功能影響較大的區域，如海馬迴，的影響狀況。而 0.245 到 0.62 mm 位置則無法看到海馬迴，但藉此可以看到較偏前半腦的皮質區域(圖三十五)，並進一步分析各個不同位置的腦部切片其類澱粉胜肽沉積的狀態是否一致。本研究的腦部切片位置判定為使用腦部外觀做參考，將腦部分為四大塊，待切片製作完成後，使用 The mouse brain in coordinates 3rd edition (Franklin and Paxinos., 2007)以及 Allen institute for brain science (<http://www.brain-map.org>)做參考，標定該腦區距離窗門的位置。

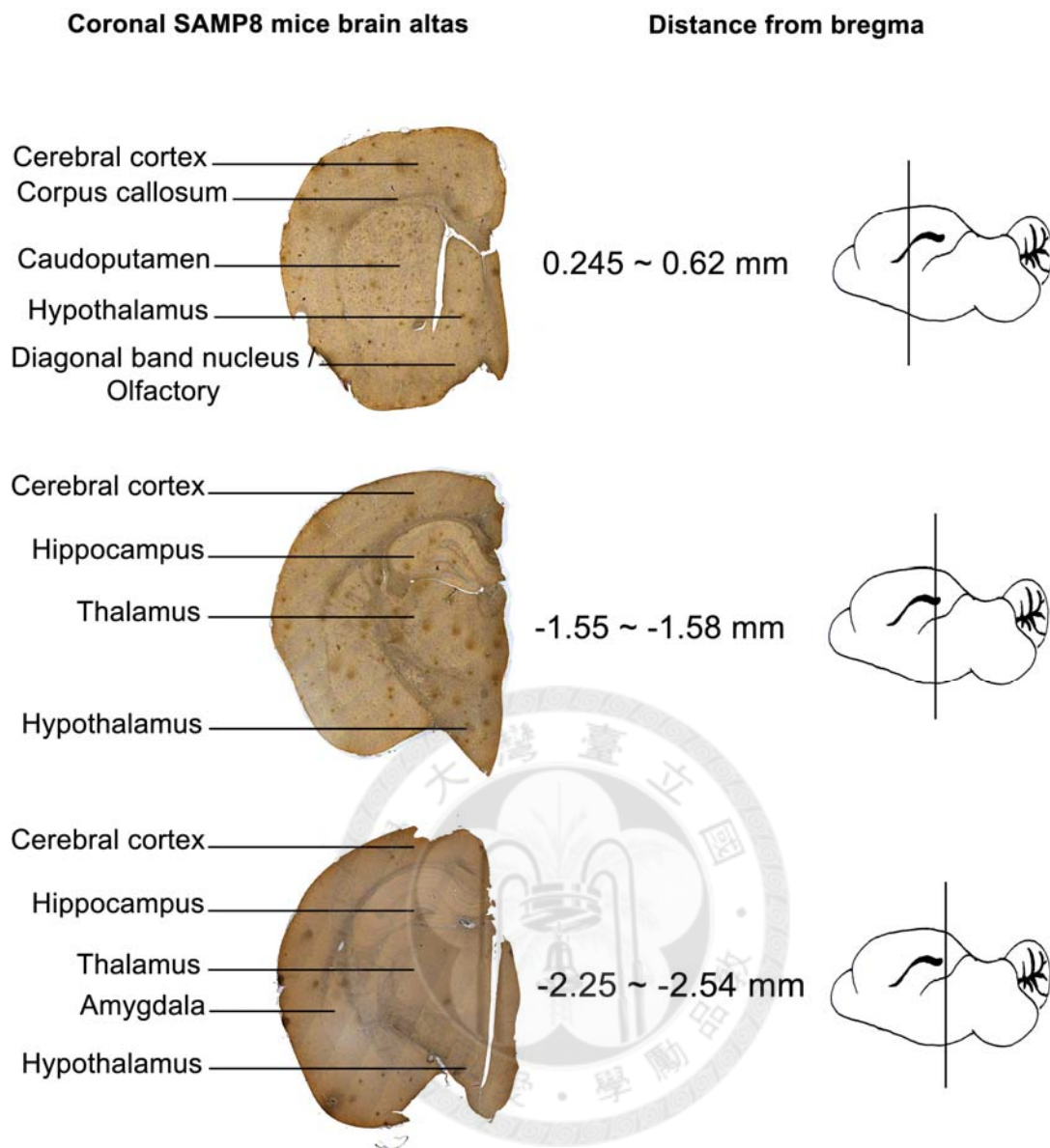
針對本研究利用 6E10 染色的結果，並使用類流式細胞組織定量分析儀進行定量，最後我們發現-2.25 到-2.54 mm 位置的組織免疫染色(圖三十六)並搭配半腦的皮質與海馬迴所進行的 ELISA 類澱粉胜肽 1-40 片段(圖三十七)的檢測最具代表性，由此可知，平均而言，控制組 SAMP8 小鼠腦部的類澱粉胜肽所佔的面積較五月齡 SAMP8 小鼠為多，而進行薑黃素、槲本內酯與芝麻酚處理後，

可以發現樣品對於類澱粉胜肽沉積有減緩的趨勢，但並無法看到統計上顯著的差異，而進一步從 ELISA 檢測的結果來看可知，控制組小鼠的類澱粉胜肽量顯著高於五月齡 SAMP8 小鼠，但處理組間則無顯著差異，僅可觀察到類澱粉胜肽平均量有較低的趨勢。有此可知，藁本內酯與芝麻酚可能有降低 SAMP8 小鼠腦部類澱粉胜肽的功效。但進一步檢測 SAMP8 小鼠腦部的類澱粉胜肽 1-42 片段與計算 42/40 比例，並無觀察出明顯的趨勢和劑量效應。

而-1.55 到-1.58 mm 與 0.245 到 0.62 mm 位置的腦部切片，在類澱粉胜肽團簇所佔半腦區面積比例的結果仍可以觀察出與處理組別有降低類澱粉胜肽的趨勢，但統計上並無顯著差異，此外，也無法觀察出樣品處理間有明顯的劑量效應，進一步與 ELISA 定量結果做比較，仍然無法觀察出特定的趨勢(附錄一圖六十一到圖六十三)。

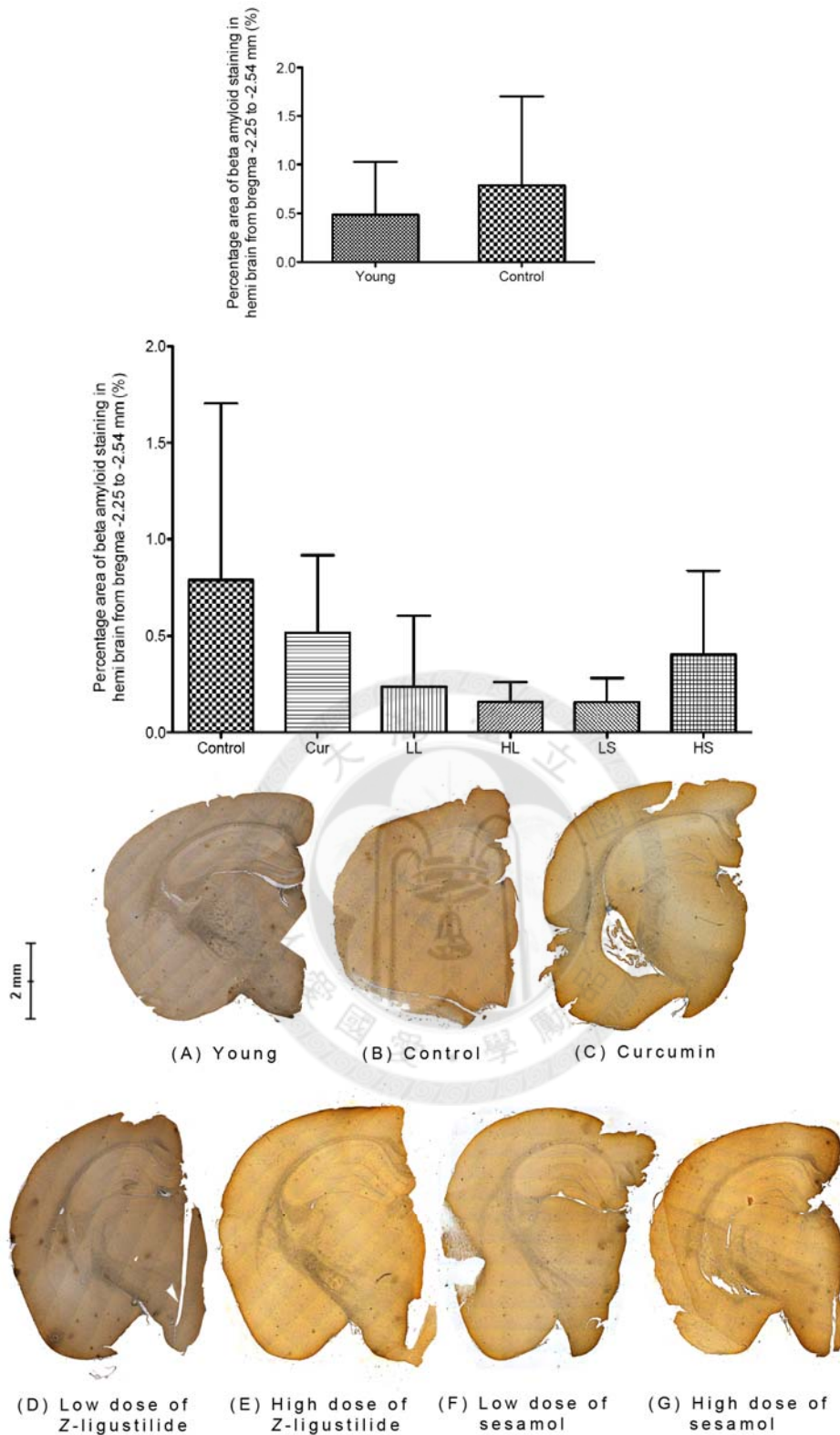
本研究也發現。針對各個腦區以統計類澱粉胜肽團簇數目並無法呈現出有效的意義。由於團簇所占的面積有大有小，僅針對數目進行統計無法真實呈現出動物體內的真實情形，雖然從團簇數目的結果可以看出某些處理在特定腦區可以有效的降低類澱粉胜肽團簇的數目，但其結果無法與類澱粉胜肽所佔的半腦面積與 ELISA 結果作進一步的輔助與探討(見附錄一圖六十一到圖六十三)。

而由以上的結果可知，本研究並無法看到類澱粉胜肽與學習記憶能力損傷有顯著的關係。五月齡 SAMP8 小鼠在莫氏水迷津與被動迴避都有相當好的表現，但其腦部仍然有一定程度的類澱粉胜肽，反觀，控制組小鼠的學習記憶表現卻相當差，但其類澱粉胜肽的表現量，不如預期中有顯著提升的現象。



圖三十五、本研究做組織免疫染色的 SAMP8 小鼠腦部切片位置示意圖與不同位置腦部切片之各腦區分布。

Figure 35. The brain slides on different position from bregma of SAMP8 mice and the distribution of different zone.

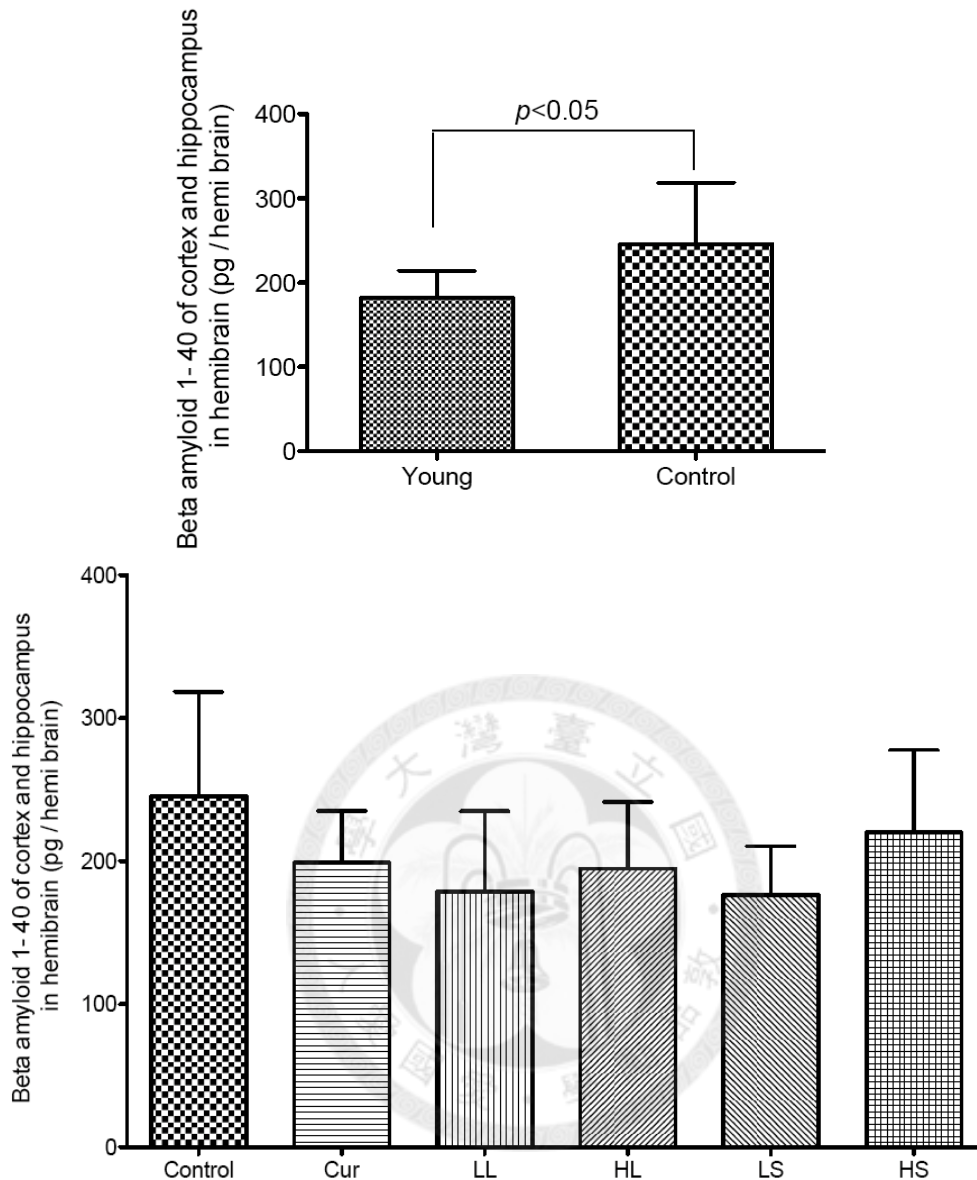


圖三十六、餵食基礎飼料、薑黃素、槲皮素與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠腦部距門-2.25 到-2.54 mm 位置之類澱粉性沉積佔半腦區面積之比例影響

Figure 36. The percentage area of beta-amyloid staining with 6E10 antibody in the hemi brain from bregma -2.25 to -2.54 mm of SAMP8 mice (n=7-10).

Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Fisher's LSD tests to evaluate treatment effect. Means with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.



圖三十七、餵食基礎飼料、薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠半腦中皮質與海馬迴區之類澱粉胍肽₁₋₄₀ 片段之含量影響

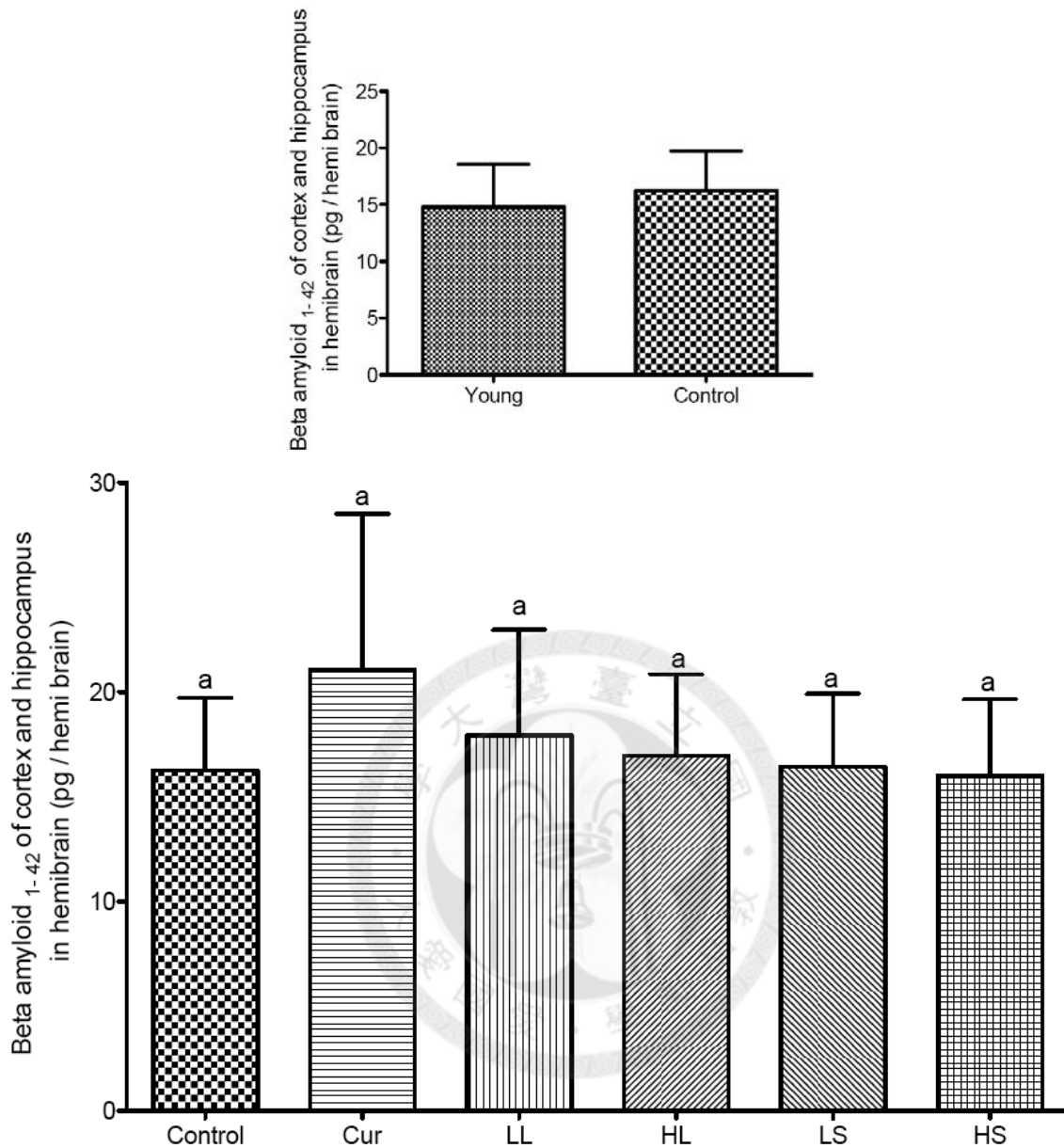
Figure 37. The beta-amyloid₁₋₄₀ quantification of cortex and hippocampus in hemi brain in SAMP8 mice by ELISA method (n=7-10).

Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Fisher's LSD tests to evaluate treatment effect.

Means with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

* $p < 0.05$ when compared with control SAMP8 mice only.

Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.



圖三十八、餵食基礎飼料、薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠半腦中皮質與海馬迴區之類澱粉胥肽₁₋₄₂ 片段之含量影響

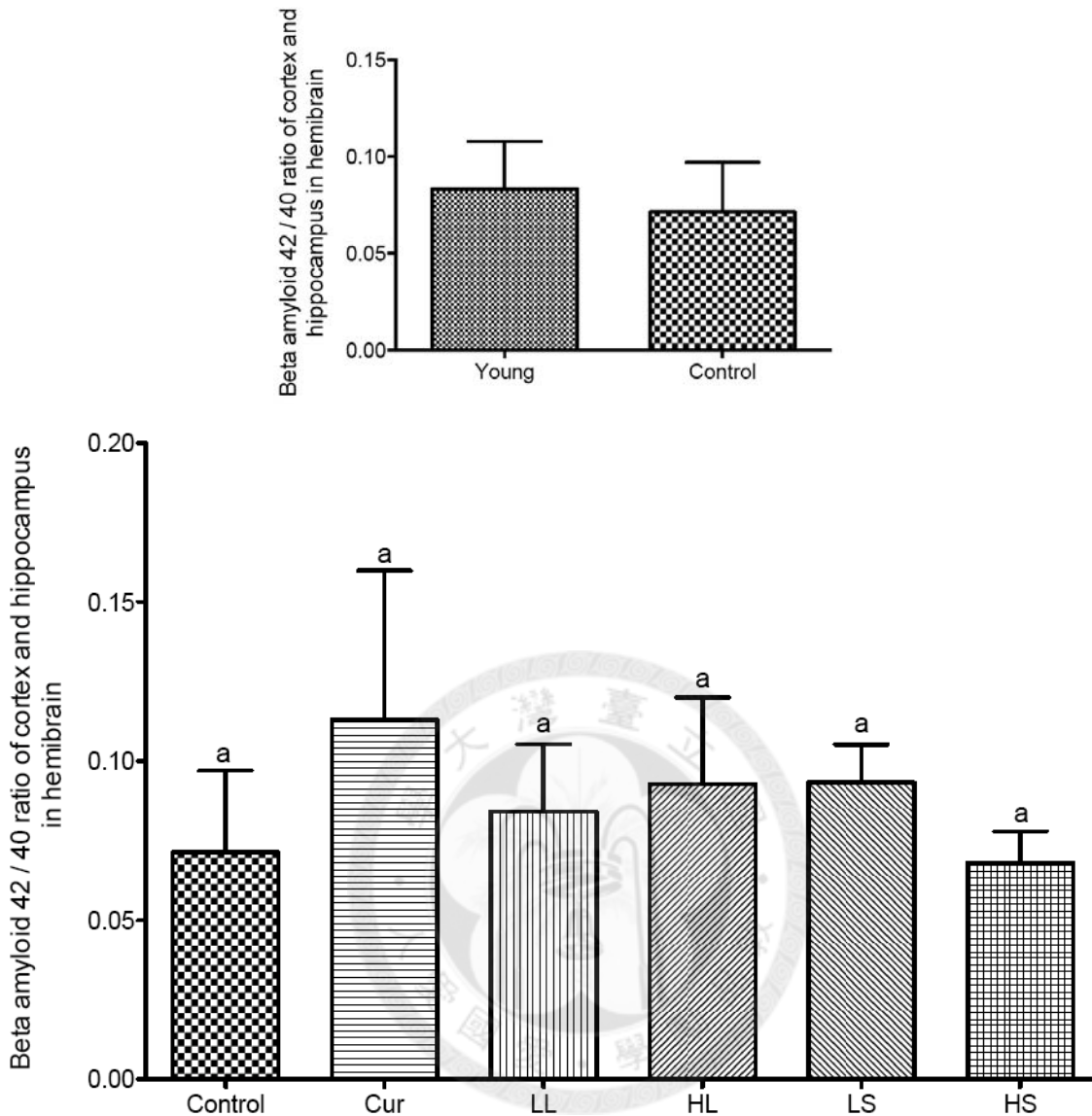
Figure 38. The beta-amyloid₁₋₄₂ quantification of cortex and hippocampus in hemi brain in SAMP8 mice by ELISA method (n=7-10).

Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Fisher's LSD tests to evaluate treatment effect.

Means with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

* $p < 0.05$ when compared with control SAMP8 mice only.

Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.



圖三十九、餵食基礎飼料、薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠半腦中皮質與海馬迴區之類澱粉胜肽_{1-42/1-40} 片段比例之含量影響

Figure 39. The beta-amyloid_{1-42/1-40} ratio of cortex and hippocampus in hemi brain in SAMP8 mice by ELISA method (n=7-10).

Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Fisher's LSD tests to evaluate treatment effect. Means with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

* $p < 0.05$ when compared with control SAMP8 mice only.

Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

八、個別餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠肝臟抗氧化酵素系統與脂質過氧化產物之影響

生物體內的抗氧化防禦系統大致可分為兩大類型，一類為酵素型抗氧化系統，如體內的 Superoxide dismutase (SOD)、Glutathione peroxidase (GPx)、Glutathione reductase (GRd)、Glutathione S-transferase (GST)與 Catalase (CAT) 等；二為非酵素型抗氧化系統，如 Glutathione (GSH)、維生素 C、維生素 E 等。酵素型抗氧化系統的主要作用目的為清除 H_2O_2 與其他可能產生氫過氧化物的物質，以降低其產生自由基而造成體內氧化壓力的狀態。以 GPx 為例，廣泛存在於血液、肝臟細胞中的 GPx 其可催化 GSH 為 GSSG 以進一步將 H_2O_2 還原成 H_2O 。而 GRd 則藉由消耗 NADPH 來將 GSSH 還原成 GSH 以供 GPx 使用。CAT 則存在於生物體各個組織與器官中，CAT 可直接將 H_2O_2 分解為水與氧分子。SOD 是存在於粒腺體與細胞質的酵素，通常與銅離子或錳離子結合，產生 Cu-SOD 或 Mn-SOD 則可將體內已產生的自由基物質，轉化為 H_2O_2 ，再藉由 GPx, GRd, CAT 進行清除 H_2O_2 的反應。非酵素型系統方面，本研究針對 GSH 做檢測，GSH 是由 Glutamic acid, Cysteine 與 Glycine 三個胺基酸所結合成的物質，當 GSH 以還原態在生物體內時，其藉其本身的還原力進行清除自由基的作用，作用完成後即轉變回氧化態的 GSSG。有許多研究指出，體內 GSH 的缺乏與許多疾病發生有密切的相關，主要因為 GSH 同時扮演了抗氧化劑、去毒素以及活化免疫細胞的功能，因此，當疾病發生或產生老化進程，生物體內的氧化還原能力下降、蛋白質合成下降，脂質過氧化物物質的累積都可藉由 GSH 含量來評估。

SOD 分析結果如圖四十所示，五月齡 SAMP8 小鼠之 SOD 活性顯著高於十月齡的控制組老鼠，顯示 SAMP8 小鼠因老化而造成 SOD 活性下降。經由餵食不同樣品後發現，薑黃素並無法提升 SAMP8 小鼠 SOD 活性，反而會造成該組 SAMP8 小鼠之 SOD 活性下降($p < 0.05$)；而餵食槲本內酯與芝麻酚之 SOD 活性則與控制組以及五月齡 SAMP8 小鼠無顯著差異。

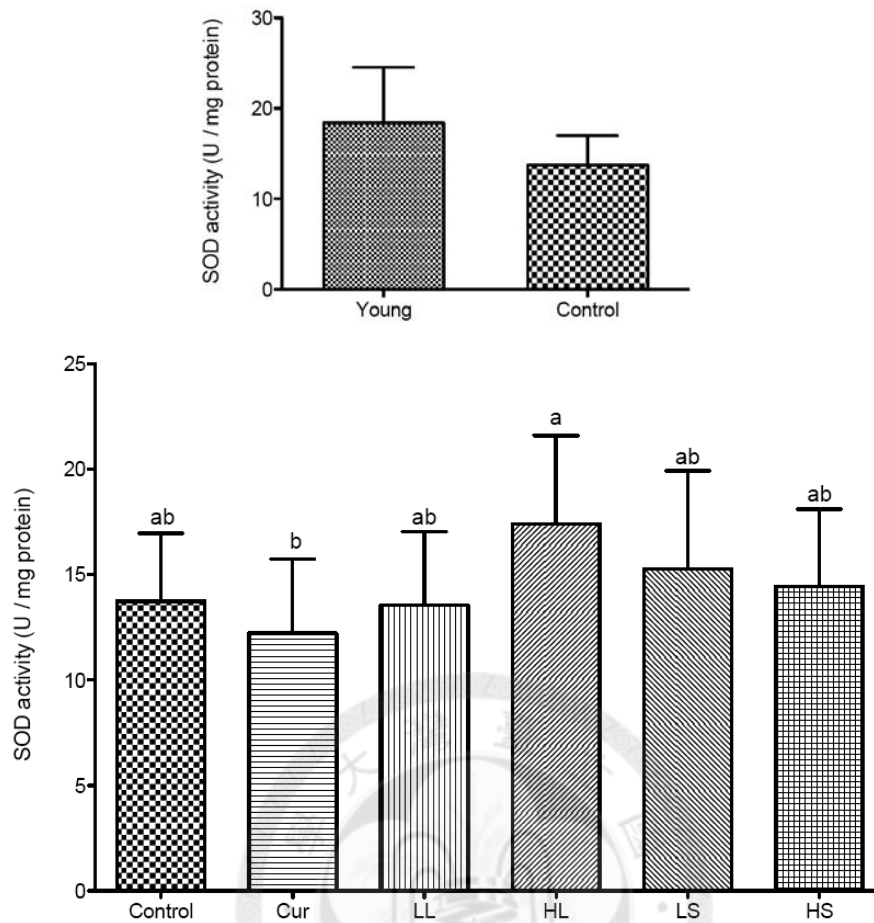
進一步分析 GPx、GRd、CAT 活性(圖四十一到圖四十三)，可發現此三個抗氧化酵素在五月齡 SAMP8 小鼠的活性平均值皆高於十月齡 SAMP8 小鼠，但不論針對控制組或是不同樣品與劑量的處理組，統計上皆未達顯著差異。GST

活性在不同年齡與不同樣品、劑量處理組間趨勢與 GPx、GRd 以及 CAT 相同，但餵食高劑量芝麻酚之 SAMP8 小鼠的 GST 活性則顯著低於五月齡 SAMP8 小鼠($p<0.05$)(圖四十四)。而從 GPx 與 GST 結果中可以發現，餵食高劑量槲本內酯可以有效的提升 GPx 與 GST 的活性，但整體而言，由以上結果，五月齡與十月齡 SAMP8 小鼠之各項抗氧化酵素指標並無顯著差異，餵食槲本內酯與芝麻酚後並無觀察到顯著改善整體抗氧化酵素系統的功能，而餵食高劑量芝麻酚反而具有降低 GST 酵素活性之潛力。由以上可知，針對不同的抗氧化酵素活性進行測試，整體而言，五月齡 SAMP8 小鼠有稍高的酵素活性，十月齡則較低，經由不同樣品處理並未觀察到特定的趨勢和劑量效應，我們推測，SAMP8 小鼠仍然是屬於自然老化的一種動物模式，並非與某些人為誘導氧化壓力的動物模式，例如注射 *t*-BHP 等物質進入生物體內，使其氧化壓力升高的人為處理的動物模式(江，2010)，而生物體內對於各個抗氧化酵素皆有特定的正、負回饋機制，以調控各個抗氧化酵素的活性與含量，因此，這推測可能是造成無法在處理間看到顯著差異的原因。

GSH 分析方面，則與抗氧化酵素系統有不同的趨勢，由圖四十五可以發現，經由長期餵食的 SAMP8 小鼠，不論是控制組、薑黃素、槲本內酯與芝麻酚，其 GSH 皆顯著高於五月齡 SAMP8 小鼠($p<0.05$)。其中分別餵食低劑量的槲本內酯與低劑量的芝麻酚組別，更與五月齡 SAMP8 小鼠達到極顯著差異($p<0.01$)。血漿中脂質過氧化物 TBARS 的分析結果也與 GSH 相似(圖四十六)，五月齡 SAMP8 小鼠 TBARS level 可達到約 30 nmole MDA/mL，但經過長期餵食後，各組皆與五月齡 SAMP8 小鼠達到極顯著差異($p<0.001$)。由此，推測可能是因 AIN-93M 飼料富含高品質的 casein，此為良好的蛋白質來源，而 GSH 是由 Glycine, Glutamine 以及 Cysteine 所組成的分子，而其中 Glycine 以及 Glutamine 可由平時飲食獲取足夠的量，但 Cysteine 因此為促進生物體合成 GSH 的關鍵，因此在本研究中，推測可能因高品質的酪蛋白作為蛋白質來源，進一步補充了 SAMP8 小鼠 cysteine 的含量，導致 GSH 含量上升。而 GSH 雖存在所有的器官中，但其在肝臟的濃度最高，其又扮演解毒的角色，因此可能由於其含量與合成的量上升，最終導致肝臟 TBARS 的下降。而針對樣品的效應可看出，有餵食薑黃素、槲本內酯與芝麻酚的肝臟 TBARS 有較控制組為低的趨勢，可見樣品處理對於 SAMP8 小鼠氧化壓力的狀況又有進一步改善的作用。但此效應在

GSH 含量測定中，並未觀察到顯著的趨勢和劑量效應。





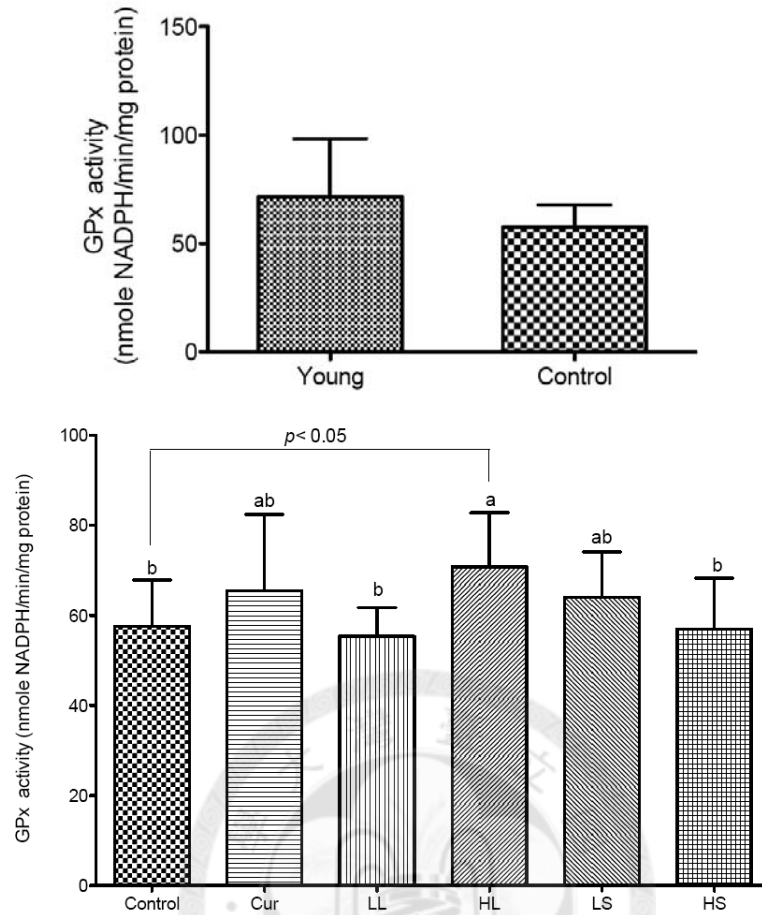
圖四十、餵食基礎飼料、薑黃素、藜本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠超氧歧化酶活性之影響

Figure 40. Effect of curcumin, Z-ligustilide, and sesamol on superoxide dismutase (SOD) in SAMP8 mice (n=7-10).

Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Fisher's LSD tests to evaluate treatment effect.

Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

Means with different letters differ significantly ($p < 0.05$).



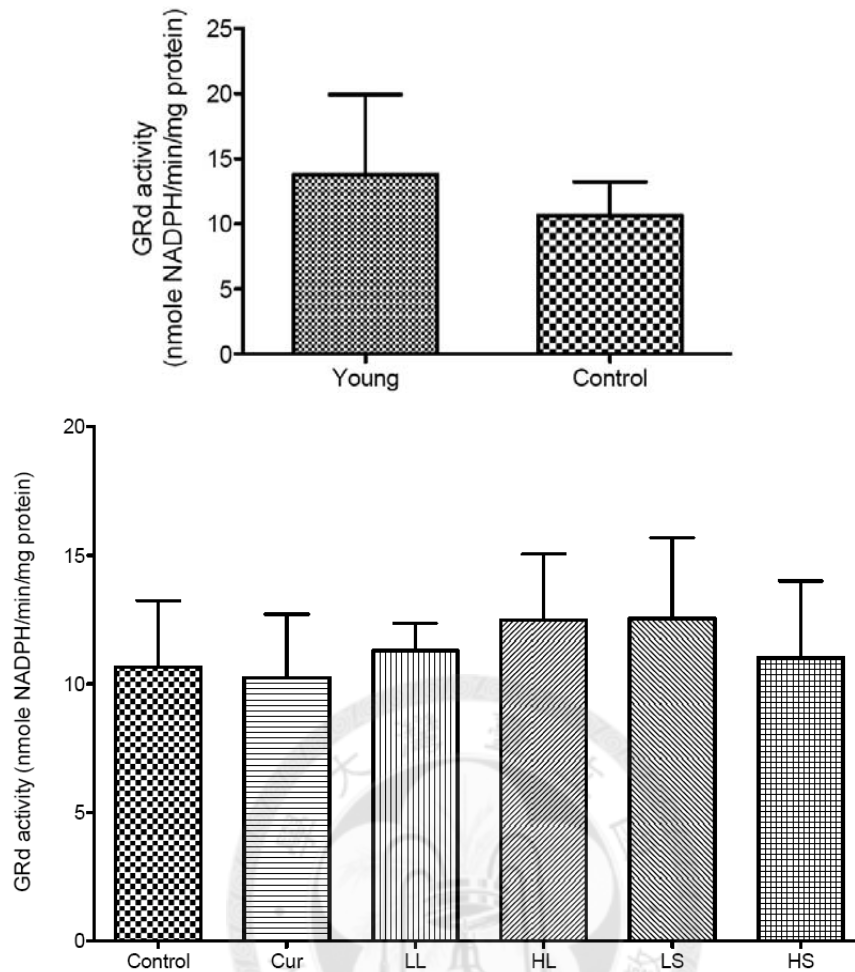
圖四十一、餵食基礎飼料、薑黃素、藜本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠 glutathione peroxidase (GPx) 活性之影響

Figure 41. Effect of curcumin, Z-ligustilide, and sesamol on glutathione peroxidase (GPx) in SAMP8 mice (n=7-10).

Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Fisher's LSD tests to evaluate treatment effect.

Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

Means with different letters differ significantly ($p < 0.05$).



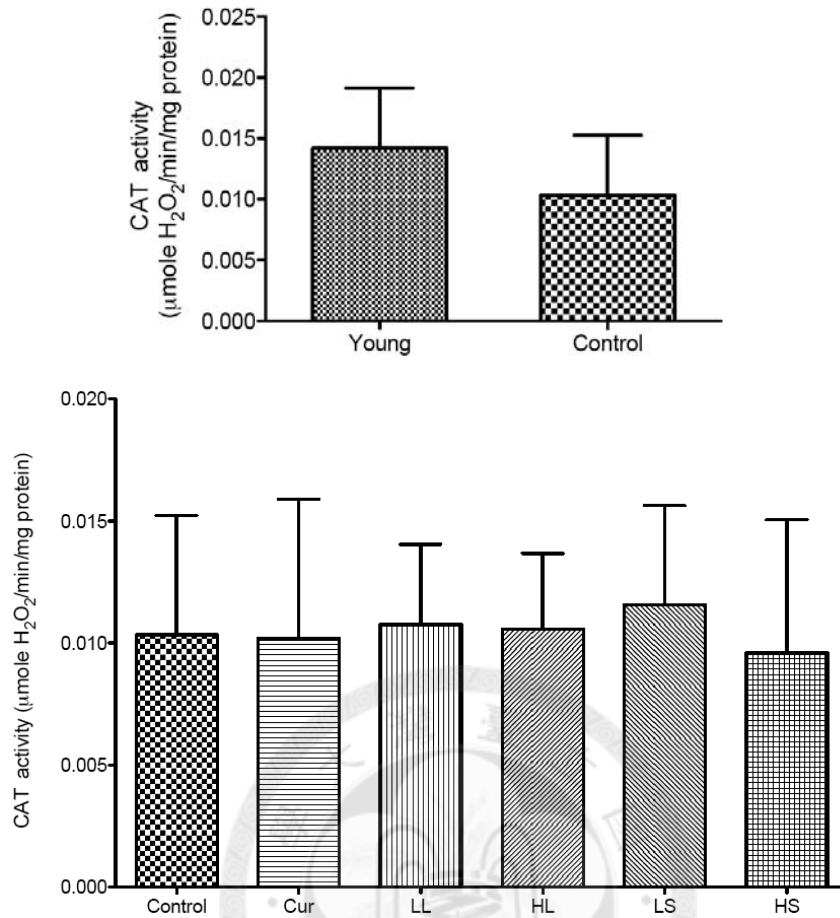
圖四十二、餵食基礎飼料、薑黃素、藜本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠 Glutathione reductase (GRd) 活性之影響

Figure 42. Effect of curcumin, Z-ligustilide, and sesamol on glutathione reductase (GRd) in SAMP8 mice (n=7-10).

Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Fisher's LSD tests to evaluate treatment effect.

Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

There is no difference among all treatments.



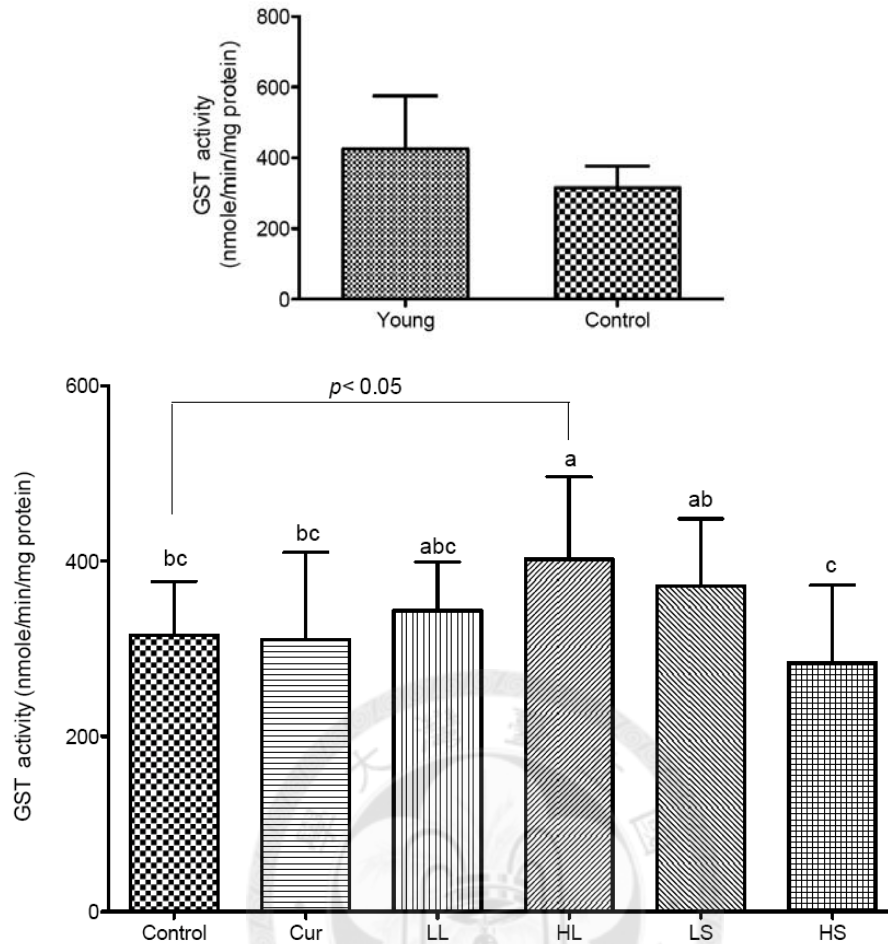
圖四十三、餵食基礎飼料、薑黃素、藜本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠 catalase (CAT) 活性之影響

Figure 43. Effect of curcumin, Z-ligustilide, and sesamol on catalase (CAT) in SAMP8 mice (n=7-10).

Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Fisher's LSD tests to evaluate treatment effect.

Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

There is no difference among all treatments.



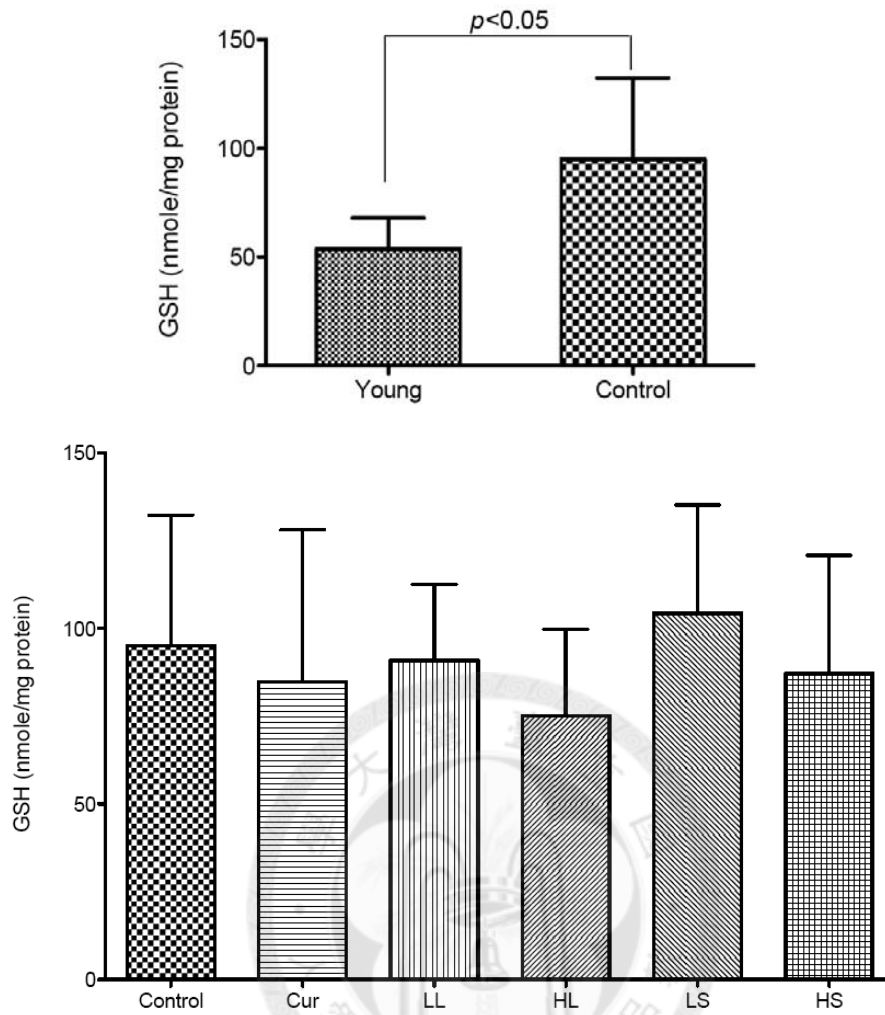
圖四十四、餵食基礎飼料、薑黃素、藜本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠 glutathione *S*-transferase (GST) 活性之影響

Figure 44. Effect of curcumin, Z-ligustilide, and sesamol on glutathione *S*-transferase (GST) in SAMP8 mice (n=7-10).

Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Fisher's LSD tests to evaluate treatment effect.

Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

Means with different letters differ significantly ($p < 0.05$).



圖四十五、餵食基礎飼料、薑黃素、藜本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠 Glutathione 含量之影響

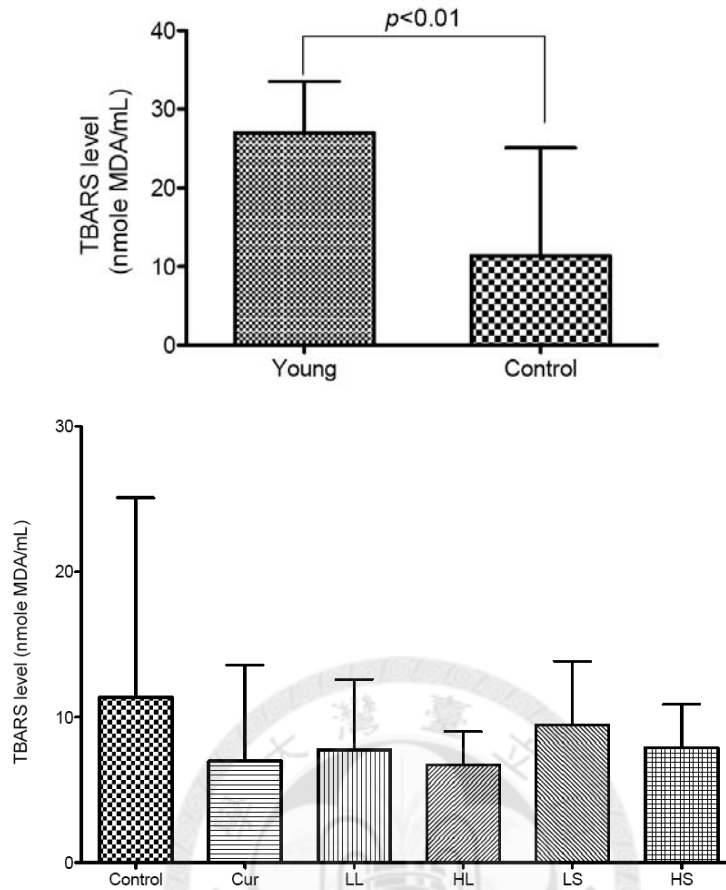
Figure 45. Effect of curcumin, Z-ligustilide, and sesamol on glutathione (GSH) on SAMP8 mice (n=7-10).

Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Fisher's LSD tests to evaluate treatment effect.

Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

Means with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

There is no difference among all treatments.



圖四十六、餵食基礎飼料、薑黃素、藜本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠肝臟 TBARS 含量之影響

Figure 46. Effect of curcumin, Z-ligustilide, and sesamol on liver TBARS in SAMP8 mice (n=7-10).

Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Fisher's LSD tests to evaluate treatment effect.

Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

There is no difference among all treatments.

表二十六、各組別 SAMP8 小鼠肝臟中 SOD, GRd, CAT, GPx, GST 活性與 GSH, TBARS 含量

Table 26. Activities of SOD, GRd, CAT, GPx, GST, GSH and level of liver TBARS in SAMP8 mice among different groups (n=7-10).

| Group | SOD | GRd | CAT | GPx | GST | GSH | Liver TBARS |
|-------|---------------------------|----------------------------------|---|----------------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Unit | (U/mg protein) | (nmole NADPH/ min/mg protein) | (μ mole H ₂ O ₂ / min/mg protein) | (nmole NADPH/ min/mg protein) | (nmole/ min/mg protein) | (nmole/mg protein) | (nmole MDA/mL) |
| Y | 18.4±6.16 ^a | 13.78±6.15 ^a | 0.014±0.005 ^a | 71.6±26.68 ^a | 426.24±148.93 ^a | 56.63±14.37 ^b | 27.03±6.5 ^a |
| C | 13.74±3.22 ^{bc} | 10.66±2.58 ^{ab} | 0.01±0.005 ^{ab} | 57.64±10.2 ^{bc} | 315.4±61.63 ^{bc} | 95.04±37.27 ^a | 11.36±13.73 ^b |
| Cur | 12.22±3.52 ^c | 10.25±2.47 ^b | 0.01±0.006 ^{ab} | 65.48±17.03 ^{abc} | 310.6±99.72 ^c | 84.8±43.32 ^a | 6.97±6.63 ^b |
| LL | 13.56±3.49 ^{bc} | 11.29±1.07 ^{ab} | 0.011±0.003 ^{ab} | 55.37±6.44 ^c | 343.86±55.52 ^{abc} | 90.89±21.77 ^a | 7.75±4.84 ^b |
| HL | 17.4±4.2 ^{ab} | 12.49±2.56 ^{ab} | 0.011±0.003 ^{ab} | 70.8±12.03 ^{ab} | 402.19±93.99 ^{ab} | 75.2±24.62 ^{ab} | 6.71±2.3 ^b |
| LS | 15.29±4.63 ^{abc} | 12.55±3.15 ^{ab} | 0.012±0.004 ^{ab} | 64.04±10.05 ^{abc} | 372.09±76.39 ^{abc} | 104.36±30.88 ^a | 9.46±4.38 ^b |
| HS | 14.45±3.65 ^{abc} | 11.02±3.00 ^{ab} | 0.01±0.005 ^b | 56.78±11.33 ^{bc} | 283.95±88.89 ^c | 87.17±33.67 ^a | 7.89±2.99 ^b |

Data were expressed as mean ± S.D. and analyzed by one-way ANOVA, followed by Fisher's LSD tests to evaluate treatment effect.

Means with difference letters within the same column differs significantly $p < 0.05$.

Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

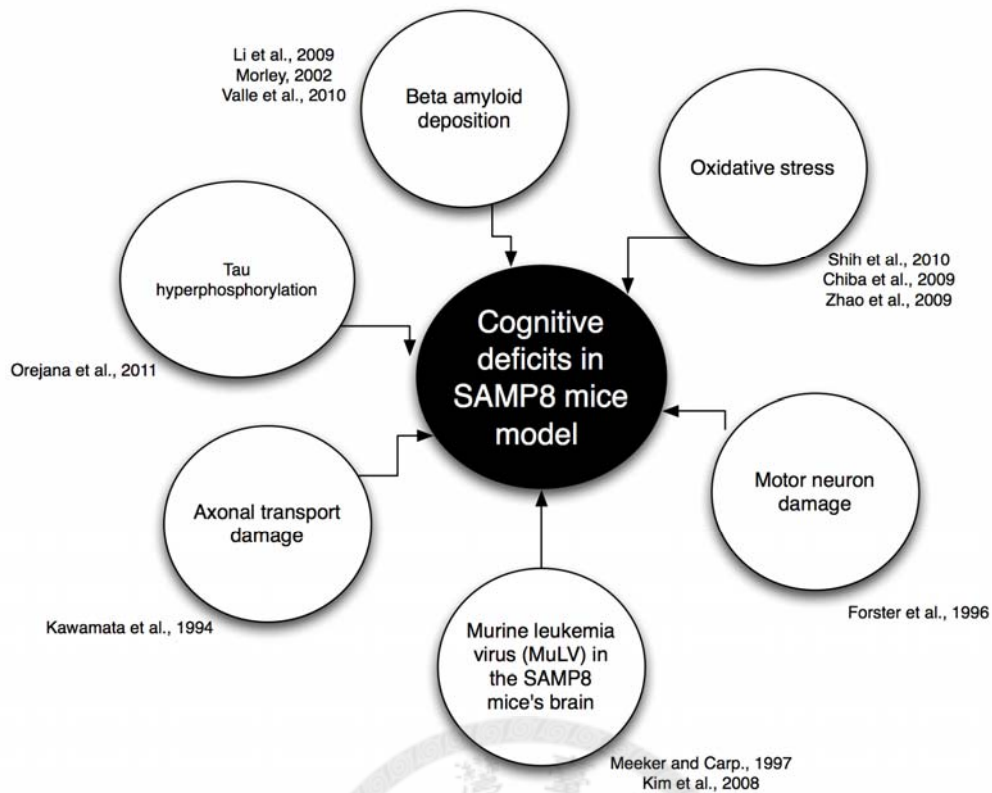
九、綜合討論

本研究發現，SAMP8 小鼠的個體差異較大，不論在外觀表徵、認知行為表現以及體內的各項生理指標，如血清生化值、類澱粉胍肽的沉積、因 MuLV 造成白血症的情形都有程度上的差異。本研究自靜宜大學引進 84 隻 SAMP8 小鼠，經過外觀與行為異常之初步篩選並進一步將活動量測試後的異常老鼠剔除後，僅剩 72 隻。且在接下來四個月的餵食與認知行為實驗亦可發現到明顯的個體間差異。故推測此為造成本研究在某些實驗無法在統計上觀察到顯著差異之原因。

此外，經由將本研究中的各項實驗結果，以個別老鼠在各項指標的表現，進一步做交叉相關性分析可以發現(見附錄十三)，無論是針對論文中已提及的較具代表性的-2.25 到-2.54mm 位置的腦部切片類澱粉胍肽染色面積或是 ELISA 測定類澱粉胍肽 1-40 片段、1-42 片段或是 42/40 含量比例之結果與水迷津第五天脫離時間表現、水迷津試驗學習趨勢、象限偏好試驗、被動迴避試驗電擊後 120 小時的亮室滯留時間表現、活動量測試、各項抗氧化酵素活性與肝臟 TBARS 的相關性皆相當低。

而依據前人研究針對 SAMP8 小鼠之學習記憶能力損傷之相關研究可以大致歸納出圖四十七，可知，許多學者推測造成 SAMP8 小鼠認知能力損傷的可能原因相當多，其中包括腦部類澱粉胍肽沉積、氧化壓力、tau 蛋白過磷酸化、軸突運送功能喪失、腦部高量的內生型鼠類白血症病毒(MuLV)，以及運動神經元功能喪失等原因。而本研究藉由個別餵食薑黃素、芝麻酚與槲皮素於 SAMP8 小鼠，並分析其認知學習能力、腦中類澱粉胍肽沉積與分佈以及 SAMP8 小鼠體內各項抗氧化酵素活性與 TBARS 含量發現，並無法看到類澱粉胍肽沉積含量與認知學習能力損傷；TBARS 與認知學習能力損傷有高度相關性。由此結果可以推測，由於認知學習能力是相當複雜的機制，由前端動物對於環境的刺激學習、接受訊息、整合；中端必須在腦部進行資訊整合，產生記憶；後端還必須搭配動物再次對於環境刺激而產生的反應，此階段更需搭配動物本身的運動協調與反應能力，由本研究進行的過程中可以發現，SAMP8 小鼠對於環境接受刺激的能力與一般動物相比較低，且由於其老化造成行動與反應能力下降，進一步造成無法在某些困難度較高的動物行為實驗中反應出其表現能力，例如水迷津試驗。未來建議可針對 SAMP8 小鼠進行八臂迷宮或是巴恩氏迷津，以評估其空間記憶學習能力，對於 SAMP8 小鼠的緊迫程度預估會較莫氏水迷津小，並有效評估程度也有提高的機會。

此外，有本研究結果推測，在 SAMP8 小鼠模式中，其腦部類澱粉胍肽沉積應僅為其老化過程中的一種現象，而並非是造成 SAMP8 小鼠學習記憶能力損傷的主要原因。因此，未來欲評估 SAMP8 小鼠的學習記憶能力，可能需考慮到圖四十七中提到的其他各項指標。



圖四十七、各種造成 SAMP8 小鼠認知能力下降之可能路徑示意圖

Figure 47. Possible pathways and mechanisms to cause the cognitive deficits of SAMP8 mice.

陸、結論 (Conclusion)

1. 個別餵食稟本內酯與芝麻酚對於鞏固 SAMP8 小鼠之恐懼記憶能力有顯著的效果，對空間記憶能力則有些微提升的效果，本研究使用莫氏水迷津進行空間學習記憶能力的評估，但 SAMP8 小鼠在運動能力上因老化而受限，未來建議可使用八臂迷宮或其他空間認知行為實驗進行評估。
2. 稟本內酯與芝麻酚分別對於 SAMP8 小鼠腦部類澱粉胜肽累積有減緩的趨勢，但統計上並未達到顯著差異。
3. 稟本內酯與芝麻酚分別對於 SAMP8 小鼠之體內氧化壓力有降低之趨勢，但統計上並未達到顯著差異。
4. 本研究發現，在 SAMP8 小鼠模式中，認知能力下降與類澱粉胜肽累積量；認知能力下降與體內氧化壓力並無顯著相關性，需要進一步的實驗驗證探討 SAMP8 小鼠是否是因老化造成運動神經元以及軸突運送功能失調，而進一步造成在認知行為實驗表現不佳的狀況。

柒、參考文獻(Reference)

- 劉姿蘭。2004。終紋床核在記憶穩固歷程終的角色麩胺酸與正腎上腺素之互動。國立台灣大學心理學系碩士論文。台北。台灣。
- 施秉孝。2009。桑椹萃取物對老化促進小鼠抗氧化及認知能力之影響。國立中興大學食品暨應用生物科技學系博士論文。台中。台灣。
- 鐘淑英。2007。銀杏葉萃取物在腦組織損傷及腦組織退化動物之研究。靜宜大學食品營養學系博士論文。台中。台灣。
- 汪志文。2009。靈芝對老化促進小鼠學習記憶能力及抗老化之影響。靜宜大學食品營養學系碩士論文。台中。台灣。
- 葉汶沁。2009。天貝對老化促進小鼠學習記憶能力及生殖功能之探討。靜宜大學食品營養學系碩士論文。台中。台灣。
- 許雅淨。2009。綠藻萃取物對老化促進小鼠延緩衰老之研究。靜宜大學食品營養學系碩士論文。台中。台灣。
- 侯怡卉。2010。數種天然物對於Abeta₁₋₄₀引起PC-12及分化後PC-12細胞死亡的保護效果。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。台北。台灣。
- 江怡君。2010。龍眼花Proanthocyanidin A2萃出物與純物質Proanthocyanidin A2在大鼠體內抗氧化活性之探討。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。台北。台灣。
- 張壽昌。2009。一粒芝麻、吃遍天下；吃出健康、美夢成真（上）（下）。食品資訊
- 謝欣玲。2005。芝麻酚在大白鼠之口服生物可利用率。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。台北。台灣。

廖濤、王飛、張占軍、邱雷、鄭璐、吳潤果薑黃素對癡呆模型小鼠學習記憶能力的改善作用及對細胞凋亡的影響 *中國藥理學通報* **2009**, *10*, 1359-1363.

社團法人台灣失智症協會 2011.05.20 取自 <http://www.tada2002.org.tw/>

Abei, Y.; Yuasa, M.; Kajiwara, Y.; Hosono, M.; Low immunopotentially of T cells and natural killer (NK) cells in the senescence-accelerated mouse, SAMP8: a strain with learning & memory deficits. In: The SAM model of senescence. Takeda, T. (Editor), Excerpta Medica, Elsevier Science B.V., Amsterdam, **1994**, pp.187-190.

Aebi, H.; Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. **1984**, *105*, 121-126.

Akiguchi, I.; Yagi, H.; Ueno, M.; Takemura, M.; Kitabayashi, T.; Seriu, N.; Kawamata, T.; Nakamura, S.; Shimada, A.; Takeda, T. Age related morphological changes in the brain of senescence-accelerated mouse (SAMP8) In: The SAM model of senescence. Takeda, T. (Editor), Excerpta Medica, Elsevier Science B.V., Amsterdam, **1994**, pp.67-72.

Alzheimer Research Forum 2010.12.15 取自 <http://www.alzforum.org/>

Allen institute for brain science 2011.04.20 取自 <http://www.brain-map.org/>

American psychiatric association The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM-IV 2000 American Psychiatric Publishing; 4th edition

Amand, P.; Kunnumakkara, A.B.; Newman, R.A.; Aggarwal, B.B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular pharmaceutics*. **2007**, *4,6*, 807-818.

Anaspec 2011.03.15 取自 <http://www.anaspec.com>

Begum, A.N.; Jones, M.R.; Lim, G.P.; Morihara, T.; Kim, P.; Heath, D. D.; Rock, C.L.; Pruitt, M.A.; Yang, F.; Hudspeth, B.; Hu, S.; Fauli, K.F.; Teter, B.; Cole, G.M.; Frautschy, S.A. Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of

neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **2008**, *326*, 196-208.

Bellomo, G.; Mirabelli, F.; Dimonte, D.; Richelmi, P.; Thor, H.; Orrenius, C.; Orrenius, S.; Formation and reduction of glutathione-protein mixed disulfides during oxidative stress. *Biochemical Pharmacology*. **1987**, *36*, 1313-1320.

Blanchard, D.C.; Blanchard, R.J. Crouching as an index of fear. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. **1969**, *67*, 370-375.

Brunden, K.R.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M-Y. Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nature Review Drug discovery*. **2009**, *8*, 783-793.

Brown, D.R.'s website Neuroscience Network, University of Bath 2010.09.10 取自
<http://www.bath.ac.uk/neuroscience/people/brown.html>

Bondilfi, L.; Calhoun, M.; Ermini, F.; Kuhn, H.G.; Wiederhold, K.H.; Walker, L. Amyloid-associated neuron loss and gliogenesis in the neocortex of amyloid precursor protein transgenic mice. *Journal of Neuroscience*. **2002**, *22*, 515-522.

Burns, A.; Iliffe, S. Clinical review: Alzheimer's disease. *British Medical Journal*. **2009**, *338*, 467-471.

Canudas, A.M.; Gutierrez-Cuesta, J.; Rodriguez, M.I.; Acuna-Castroviejo, D.; Sureda, F.X.; Camins, A.; Pallas, M. Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM) *Mechanisms of Ageing and Development* **2005**, *126*, 1300-1304.

Chiba, Y.; Shimada, A.; Kumagai, N.; Yoshikawa, K.; Ishii, S.; Furukawa, A.; Takei, S.; Sakura, M.; Kawamura, N.; Hosokawa, M. The senescence-accelerated mouse (SAM): a higher oxidative stress and age-dependent degenerative disease model. *Neurochemical Research*. **2009**, *34*, 679-687.

Crawley, J.N. What's wrong with my mouse ? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice. **2007**, 2nd ed. Wiley-Interscience, New Jersey, U.S.A.

Dam, D.V.; Deyn, P.P.D. Drug discovery in dementia: the role of rodent models. *Nature Drug Discovery*. **2006**, *5*, 956-970.

Decker, M.W. Models of neurological disease (Alzheimer's disease): Spatial discrimination water maze test in septal-lesioned rats. *Current Protocols in Pharmacology*. **1998**, 5.14.1-5.14.10.

Decker, M.W.; Majchrzak, M.J. Effects of systemic and intracerebroventricular administration of mecamylamine, a nicotinic cholinergic antagonist, on spatial memory in rats. *Psychopharmacology*. **1992**, *107*, 530-534.

Fanselow, M.S. Conditional and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlovian Journal of Biological Science*. **1980**, *15*, 177-182.

Fanselow, M.S. Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. *Psychonomic Bulletin Review*. **1994**, *1*, 429-438.

Fanselow, M.S.; Poulos, A.M. The neuroscience of mammalian associative learning. *Annual Review of Psychology*. **2005**, *56*, 207-234.

Franklin, K.B.J.; Paxinos, G.; The mouse brain in stereotaxic coordinates 3rd edition 2007. Elsevier, New York, USA.

Frautschy, S.A.; Hu, W; Kim, P.; Phenolic antiinflammatory antioxidant reversal of Abeta-induced cognitive deficits and neuropathology. *Neurobiology of Aging*. **2001**, *22*, 993-1005.

Forster, M.J.; Dubey, A.; Dawson, K.M.; Stutts, W.A.; Lal, Harbans,; Sohal, R.S.; Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **1996**, *93*, 4765-4769.

- Games, D.; Adams, D.; Alessandrini, R.; Barbour, R.; Berthelette, P.; Blackwell, C.; Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature*. **1995**, *373*, 523-527.
- Garcia-Matas, S.; Gutierrez-Cuesta, J.; Coto-Montes, A.; Rubio-Acero, R.; Diez-Vives, C.; Camins, A.; Merce, P.; Sanfeliu, C.; Cristofol, R. Dysfunction of astrocytes in senescence-accelerated mice SAMP8 reduces their neuroprotective capacity. *Aging Cell*. **2008**, *7*, 630-640.
- Goedert, M.; Spillantini, M.G. A century of Alzheimer's disease. *Science*. **2006**, *314*, 777-781.
- Gong, Y.; Liu, L.; Xie, B.; Liao, Y.; Yang, E.; Sun, Z. Ameliorative effects of lotus seedpod proanthocyanidins on cognitive deficits and oxidative damage in senescence-accelerated mice. *Behavioural Brain Research*. **2008**, *194*, 100-107.
- Guntern, R.; Bouras, C.; Hof, P.R.; Vallet, P.G. An improved thioflavine S method for staining neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **1992**, *48*, 8-10.
- Habig, W.H.; Pabst, M.J.; Jakoby, W.B. Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*. **1974**, *249*, 7130-7139.
- Hall, R.L. Clinical pathology of laboratory animal. **2007**, Taylor & Francis. New York, U.S.A.
- Hamaguchi, T.; Ono, K.; Yamada, M. Curcumin and Alzheimer's disease. *CNS Neuroscience & Therapeutics* **2010**, *16*, 285-297.
- Ho, C.C.; Kumaran, A.; Hwang, L.S. Bio-assay guided isolation and identification of anti-Alzheimer active compound from the root of *Angelica sinensis*. *Food Chemistry*. **2009**, *114*, 246-252.

Hoffman, P.H.; Cimino, E.F.; Robbins, D.S.; Broadwell, R.D.; Powers, J.M.; Ruscetti, S.K.; Cellular tropism and localization in the rodent nervous system of a neuropathogenic variant of friend murine leukemia virus. *Laboratory Investigation*. **1992**, *67*, 314-321.

Hsia, A.Y.; Masliah, E.; McConlogue, L.; Yu, G.Q.; Tatsuno, G.; Hu, K. Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **1999**, *96*, 3228-3233.

Hsiao, K.; Chapman, P.; Nilsen, S.; Eckman, C.; Harigaya, Y.; Younkin, S. Correlative memory deficits, abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*. **1996**, *274*, 99-102.

Hu, M.L. Measurement of plasma protein thiols and GSH. *Methods in Enzymology*. **1994**, *233*, 380-385.

Hyslop, P.A.; Bender, M.H. Methods for sample preparation for direct immunoassay measurement of analytes in tissue homogenates: ELISA assay of amyloid beta-peptides. *Current Protocols in Neuroscience*. **2002**, 7.20.1-7.20.11

Jan, K.C.; Ho, C.T.; Hwang, L.S. Bioavailability and tissue distribution of sesamol in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**, *56*, 7032-7037.

Karlberg, J.P.E. Trends in disease focus of drug development. *Nature Review Drug Discovery*. **2008**, *7*, 639-640.

Kato-Semba, R; Kato, K. Age-related changes in levels of beta-subunit of nerve growth factor in selected regions of the brain: comparison between senescence-accelerated (SAMP8) and senescence-resistant (SAMR1) mice. *Neuroscience Research*. **1994**, *20*, 251-256.

Kawamata, T.; Nakamura, S.; Akiguchi, I.; Kimura, J.; Kameyama, M.; Kimura, H.;

- Takeda, T. Effect of aging on NADPH-diaphorase neurons in laterodorsal tegmental nucleus and striatum of mice. *Neurobiology of Aging*. **1990a**, *11*, 185-192.
- Kawamata, T.; Nakamura, S.; Akiguchi, I.; Kimura, J.; Kameyama, M.; Kimura, H.; Takeda, T. Effect of aging on NADPH-diaphorase neurons in laterodorsal tegmental nucleus and striatum of senescence-accelerated mouse (SAM). In: *Basic Clinical and Therapeutic aspects of Alzheimer's and Parkinson's disease*. vol. 1 Nagatsu, T. (Editor), Plenum Press, New York, **1990b**. 705-709.
- Kawamata, T.; Nakamura, S.; Akiguchi, I.; Tooyama, I.; Seriu, N.; Takemura, M.; Kimura, J.; Kimura, H.; McGeer, E.G., McGeer, P. L.; Higuchi, K.; Hosokawa, M.; Takeda, T. Dystrophic changes in axons accumulating nitric oxide synthase are accelerated with age in dorsal column nuclei of senescence-accelerated mice (SAMP8). In: *The SAM model of senescence*. Takeda, T. (Editor), Excerpta Medica, Elsevier Science B.V., Amsterdam, **1994**. 347-350.
- Kawamata, T.; Akiguchi, I.; Yagi, H.; Irino, M.; Sugitama, H.; Akiyama, H.; Shimada, A.; Takemura, M.; Ueno, M.; Kitabayashi, T.; Ohnishi, K.; Seriu, N.; Higuchi, K.; Hosokawa, M.; Takeda, T. Neuropathological studies on strains of senescence-accelerated mice (SAM) with age-related deficits in learning and memory. *Experimntal Gerontology*. **1997**, *32*, 161-169.
- Kokjohn, T.A.; Roher, A.E. Amyloid precursor protein transgenic mouse models and Alzheimer's disease: understanding the paradigms, limitations and contributions. *Alzheimer's & Dementia*. **2009**, *5,4*, 340-347.
- Kobayashi, D.T.; Chen, K.S. Behavioral phenotypes of amyloid-based genetically modified mouse models of Alzheimer's disease. *Genes, Brain and Behavior*, **2005**, *4*, 173-196.
- Kuang, X.; Du, J.R.; Chen, Y.S.; Wang, J.; Wang, Y.N. Protective effect of Z-ligustilide against amyloid beta-induced neurotoxicity is associated with decreased pro-inflammatory markers in rat brains. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **2009**, *92*, *4*, 635-641.

- Kuhad, A.; Chopra, K. Effect of sesamol of diabetes-associated cognitive decline in rats. *Experimental Brain Resesarch*. **2008**, *185*, 411-420.
- Lawrence, R.A.; Burk, R.F.; Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **1976**, *71*, 952-958.
- LeDoux, J.E. Emotion: Clues from the brain. *Annual review of psychology*. **1995**, *46*, 209-235.
- Li, Q.; Zhao, H.F.; Zhang, Z.F.; Liu, Z.G.; Pei, X.R.; Wang, J.B.; Li, Y. M.; Takeda, T. Neuropathological studies on strains of senescence-accelerated mice (SAM) with age-related deficited in learning and memory. *Experimental Gerontology*. **1997**, *32*, 161-169.
- Li, Q.; Zhao, H.F.; Zhang, Z.F.; Liu, Z.G.; Pei, X.R.; Wang, J.B.; Li, Y. Long-term green tea catechin administration prevents spatial learning and memory impairment in senescence-accelerated mouse prone-8 mice by decreasing abeta 1-42 oligomers and upregulating synaptic plasticity-related proteins in the hippocampus. *Neuroscience*, **2009**, *163*, 741-749.
- Liao, J.W.; Hsu, C.K.; Wang, M.F.; Hsu, W.M.; Chan, Y.C. Beneficial effect of *Toona sinensis* Roemor on improving cognitive performance and brain degeneration in senescence-accelerated mice. *British Journal of Nutrition*. **2006**, *96*, 400-407.
- Lim. G.P.; Chu, T.; Yang, F.; Beech, W.; Frautschy, S.A.; Cole, G.M. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer's transgenic mosue. *The Journal of Neuroscience*. **2001**, *21*, 8370-8377.
- Marklund, S.L.; Midander, J.; Westman, G. Cu Zn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in glutathione-deficient human fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1984**, *798*, 302-305.
- McAlanon, G.M.; Dawson, G.R.; Wilkinson, L.O.; Robbins, T.W.; Everitt, B.J. The effects

of AMPA-induced lesions of the medial septum and vertical limb of the diagonal band of Broca on spatial delayed non-matching to sample and spatial learning in the water maze. *European Journal of Neuroscience*. **1995**, 7, 1034-1049.

McNamara, R.K.; Skelton, R.W. The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. *Brain Research Reviews*. **1993**, 18, 33-49.

Melnikova, I. Therapies for Alzheimer's disease. *Nature Review Drug Discovery*. **2007**, 6, 341-342.

Mio, Li.; Kitado, H.; Higuchi, K.; Takeda, T. Molecular biological study of the AKR-type thymoma in SAM. In: The SAM model of senescence. Takeda, T. (Editor), Excerpta Medica, Elsevier Science B.V., Amsterdam, **1994**, pp.121-124.

Miyamoto, M.; Kiyota, Y.; Nishiyama, M. Senescence-accelerated mouse (SAM): age-related reduced anxiety-like behavior in the SAM-P/8 strain. *Physiology & Behavior*. **1992**, 51, 979-985.

Montkowski, A.; Poettig, M.; Mederer, A.; Holsboer, F. Behavior performance in three substrains of mouse strain. *Brain research*. **1997**, 762, 12-18.

Morley, J.E. The SAMP8 mouse: a model of Alzheimer's disease. *Biogerontology*. **2002**, 3, 57-60.

Morris, R.G.M. Spatial localization does not depend on the presence of local cues. *Learning and Motivation*. **1981**, 12, 239-260.

Morris, R. Development of water-maze procedure for studying spatial learning in the rats. *Journal of Neuroscience*. **1984**, 11, 47-60.

Nagahara, A.H.; Otto, T.; Gallagher, M. Entorhinal-perirhinal lesions impair performance of rats on two versions of place learning in the Morris water maze. *Behavioral Neuroscience*. **1995**, 109, 3-9.

- Nilsson, O.G.; Gage, F.H. Anticholinergic sensitivity in the aging rat septohippocampal system as assessed in a spatial memory task. *Neurobiology of Aging*. **1993**, *14*, 487-497.
- Nomura, Y.; Kitamura, Y.; Zhao, X.H.; Ohnuki, T.; Takei, M.; Tamanaka, Y.; Kitayma, Y.; Nishiya, T.; Neurochemical studies on aging in SAM brain. In: The SAM model of senescence. Takeda, T. (Editor), , Excerpta Medica, Elsevier Science B.V., Amsterdam, **1994**, pp.67-72.
- Ohta, A.; Ueno, M.; Takemua, M.; Matushita, T.; Takeda, T. Deficit of short-term memory in SAMP8 In: The SAM model of senescence. Takeda, T. (Editor), Excerpta Medica, Elsevier Science B.V., Amsterdam, **1994**, pp.377-380.
- Orejana, L.; Barros-Minones, L.; Jordan, J.; Puerta, E.; Aguirre, N.; Sildenafil ameliorates cognitive deficits and tau pathology in senescence-accelerated mouse model. *Neurobiology of Aging*. 2011, *Article in press*.
- Pallas, M.; Camins, A.; Smith, M.A.; Perry, G.; Lee, H.G.; Casadesus, G. From aging to Alzheimer's disease unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8) *Journal of Alzheimer's disease*, **2008**, *15*, 615-624.
- Pan, R.; Qie, S.; Lu, D.X.; Dong, J. Curcumin improves learning & memory ability and its neuroprotective mechanism in mice. *Chinese Medical Journal*. **2008**, *121*, 9, 832-839.
- Polachira, K.; Jayalekshmy, A.; Arumughan, C. Free radical scavenging behavior of antioxidant compounds of sesame (*Sesamum indicum* L.) in DPPH system *Jorunal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**, *52*, 912-915.
- Pierce. R.C.; Kalivas, P.W. Locomotion behavior. *Current protocols in neuroscience*. **2007**. 8.1.1-8.1.9.
- Prut, L.; Belzung, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*. **2003**, *463*,

Qing, H.; He, G.; Ly, P.T.T; Fox, C.J.; Staufenbiel, M.; Cai, F.; Zhang, Z.; Wei, S.; Sun, X.; Chen, C.H.; Zhou, W.; Wang, K.; Song, W. Valproic acid inhibits beta amyloid production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models. *The Journal of Experimental Medicine*. **2008**, *205*, 12, 2781-2789.

Querfurth, H.W.; LaFerla, F.M. Mechanism of disease: Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*. **2010**, *362*, 329-344

Ray, B.; Lahiri, D.K. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: different molecular targets and potential therapeutic agents including curcumin. *Current Opinion in Pharmacology*. **2009**, *9*, 433-444.

Roullet, P.; Sara, S. consolidation of memory after its reactivation: involvement of beta-noradrenergic receptors in the late phase. *Neural Plasticity*. **1998**, *6*, 63-68.

Sabbagh, M.N. Drug development for Alzheimer's disease: where are we now and where are we headed? *The American Journal of Geriatric Pharmacotherapy*. **2009**, *7*, 3, 167-185.

Saitoh, Y.; Hosokawa, M.; Shimada, A.; Watanabe, Y.; Yasuda, N.; Murakami, Y.; Takeda, T. Age-related hearing impairment in senescence-accelerated mouse (SAM) In: The SAM model of senescence. Takeda, T. (Editor), Excerpta Medica, Elsevier Science B.V., Amsterdam, **1994**, pp.255-258.

SAM 研究協議会について SAM マウスとは? 2010 年 12 月 15 日取自

<http://samrc.md.shinshu-u.ac.jp/>

Shackelford, C.; Long, G.; Wolf, J.; Okerberg, C.; Herbert, R. Qualitative and quantitative analysis of nonneoplastic lesions in toxicology studies. *Toxicology Pathology*. **2002**, *30*, 1, 93-96.

Shi, Y.; He, L.; Wang, S. Determination of ligustilide in rat blood and tissues by capillary

gas chromatography/mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. **2006**, *20*, 993-998.

Shi, Y.Q.; Huang, T.W.; Chen, L.M.; Pan, X.D.; Zhang, J.; Zhu, Y.G.; Chen, X.C. Gensenoside Rg1 attenuates amyloid beta content, regulates PKA/CREB activity, and improves cognitive performance in SAMP8 mice. *Journal of Alzheimer's disease*. **2010**, *19*, 977-989.

Shih, P.H.; Chan, Y.C.; Liao, J.W.; Wang, M.F.; Yen, G.C. Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. **2010**, *21*, 598-605.

Shoba, G.; Joy, D.; Joseph, T.; Majeed, M.; Rajendran, R.; Srinivas, P.S.S.R. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Medica*. **1998**, *64*, 353-356.

Sturchler-Pierrat, C.; Abramowski, D.; Duke, M.; Wiederhold, K.H.; Mistl, C.; Rothacher, S. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer's disease-like pathology. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. **1997**, *94*, 13287-13292.

Stoye, J.P.; Coffin, J.M. The four classes of endogenous murine leukemia virus: structural relationships and potential for recombination. *Journal of Virology*, **1987**, *61*, 9 2659-2669.

Sugiyama, H., Akiyama, H.; Akiguchi, I.; Kameyama, M.; Takeda, T. Loss of dendritic spines in hippocampal CA1 pyramidal cells of senescence accelerated mouse (SAM). A quantitative Golgi study. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. **1987**, *27*, 841-845.

Suresh, D.; Srinivasan, K. Tissues distribution & elimination of capsaicin, piperine & curcumin following oral intake in rats. *Indian Journal of Medical Research*. **2010**, *131*, 682-691.

Teuissen, C.E.; Cammen, T.J.M. Alzheimer's disease. Smith, H.J.; Simon, C.; Sewell, R.E. Protein misfolding in neurodegenerative disease: mechanisms and therapeutic strategies. **2007** CRC press, New York, U.S.A.

Takeda, T. Senescence-accelerated mouse (SAM): a biogerontological resource in aging research. *Neurobiology of Aging*. **1999**, 20, 105-110.

Takeda, T. Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochemical Research*. **2009**, 34, 639-659.

Takemura, M.; Nakamura, S.; Akiguchi, I.; Ueno, M.; Oka, N.; Ishikawa, S.; Shimada, A.; Kimura, J.; Takeda, T. beta/A4 protein-like immunoreactive granular structures in the brain of senescence-accelerated mouse (SAM) In: The SAM model of senescence. Takeda, T. (Editor), Excerpta Medica, Elsevier Science B.V., Amsterdam, **1994**, pp.367-370.

Ueno, M.; Akiguchi, I.; Yagi, H.; Naiki, H.; Fukuyama, H.; Kimura, J.; Takeda, T. Age-related changes in barrier function in mouse brain I. Accelerated age-related increase of brain transfer of serum albumin in accelerated senescence prone SAM-P/8 mice with deficits in learning and memory. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. **1993**, 16, 233-248.

Unzu, E.; Shimajiri, K.; Nakama, H.; Miyagi, S.; Moriyama, T.; Uezu, K.; Yamamoto, S. Passive avoidance behavior and sleep pattern of SAMP8 mice. In: The SAM model of senescence. Takeda, T. (Editor), Excerpta Medica, Elsevier Science B.V., Amsterdam, **1994**, pp.397-400.

Wahlsten, D.; Crabbe, J.C.; Dudek, B.C. Behavioral testing of standard inbred and 5HT1B knockout mice: implications of absent corpus callosum. *Behavioral Brain Research*. **2001**, 125, 23-32.

Westerman, M.A.; Cooper-Blacketer, D.; Mariash, A.; Kotilinek, L.; Kawarabayashi, T.; Younkin, L.H.; The relationship between abeta and memory in the Tg2576 mouse

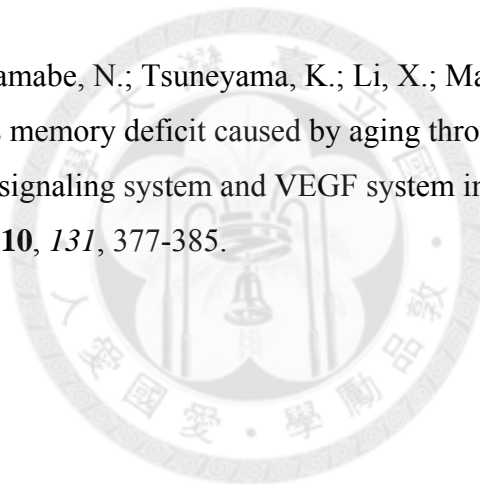
- model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*. **2002**, 22, 1858-1867.
- Wehner, J.M.; Silva, A. Importance of strain differences in evaluations of learning and memory processes in null mutants. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*. **1996**, 2, 243-248.
- Wenk, G.L. Assessment of spatial memory using the radial arm maze and Morris water maze. *Current protocols in Neuroscience*. **2004**, 8.5.A.1-8.5.A.12.
- Wichitnithad, W.; Jongaroonngamsang, N.; Pummangura, S.; Rojsitthisak, P. A simple isocratic HPLC method for the simultaneous determination of curcuminoids in commercial turmeric extracts. *Phytochem Anal Journal*. **2009**, 20, 314-319.
- Woodruff-Pak, D.S. Animal models of Alzheimer's disease: Therapeutic implications. *Journal of Alzheimer's disease*. **2008**, 15, 507-521
- Yan, R.; Ko, N.L.; Li, S.L.; Tam, Y.K.; Lin, G. Pharmacokinetics and metabolism of ligustilide, a major bioactive component in Rhizoma Chuanxiong, in the rat. *Drug Metabolism and Disposition*. **2008**, 36, 2, 400-408.
- Yang, F.; Lim, G.P.; Begum, A.N.; Ubeda, O.J.; Simmons, M.R.; Ambegaokar, S.S.; Chen, P.; Kaye, R.; Glabe, C.G.; Frautschi, S.A.; Cole, G.M. Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *The journal of biological chemistry*. **2005**, 280, 7, 5892-5890.
- Yang, K.Y.; Lin, L.C.; Tseng, T.Y.; Wang, S.C.; Tsai, T.H. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. *Journal of Chromatography*. **2007**, 853, 183-189.
- Ye, X.; Meeker, H.C.; Kozlowski, P.B.; Wegiel, J.; Wang, K.C.; Imaki, H.; Carp, C.I. Pathological changes in the liver of a senescence accelerated mouse strain (SAMP8): a mouse model for the study of liver diseases. *Histology and histopathology*. **2004**, 19, 1141-1151.

Yeunhwa, G.U.; Yuka, I.; Tota, I.; Junko, T.; Kenji, M.; Michinao, Y.; Hidetaka, I.; Noriko, S.; Masami, O.; Ki-Mun, K.; Takenori, Y.; Torao, I. Effect of ginkgo biloba on aging of senescence-accelerated mouse (SAM) P8 strain: quantitative studies of systemic oxidative stress, 5-hydroxytryptamine in the brain, spatial learning and hippocampal neurons. **200902** 鈴鹿醫療科學大學報告, 13-34.

Yeunhwa, G.U.; Huang, C.S.; Inoue, T.; Yamashita, T.; Ishida, T.; Kang, K-M; Nakao, A. Drinking hydrogen water ameliorated cognitive impairment in senescence-accelerated mice. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. **2010**, *46*, 269-276.

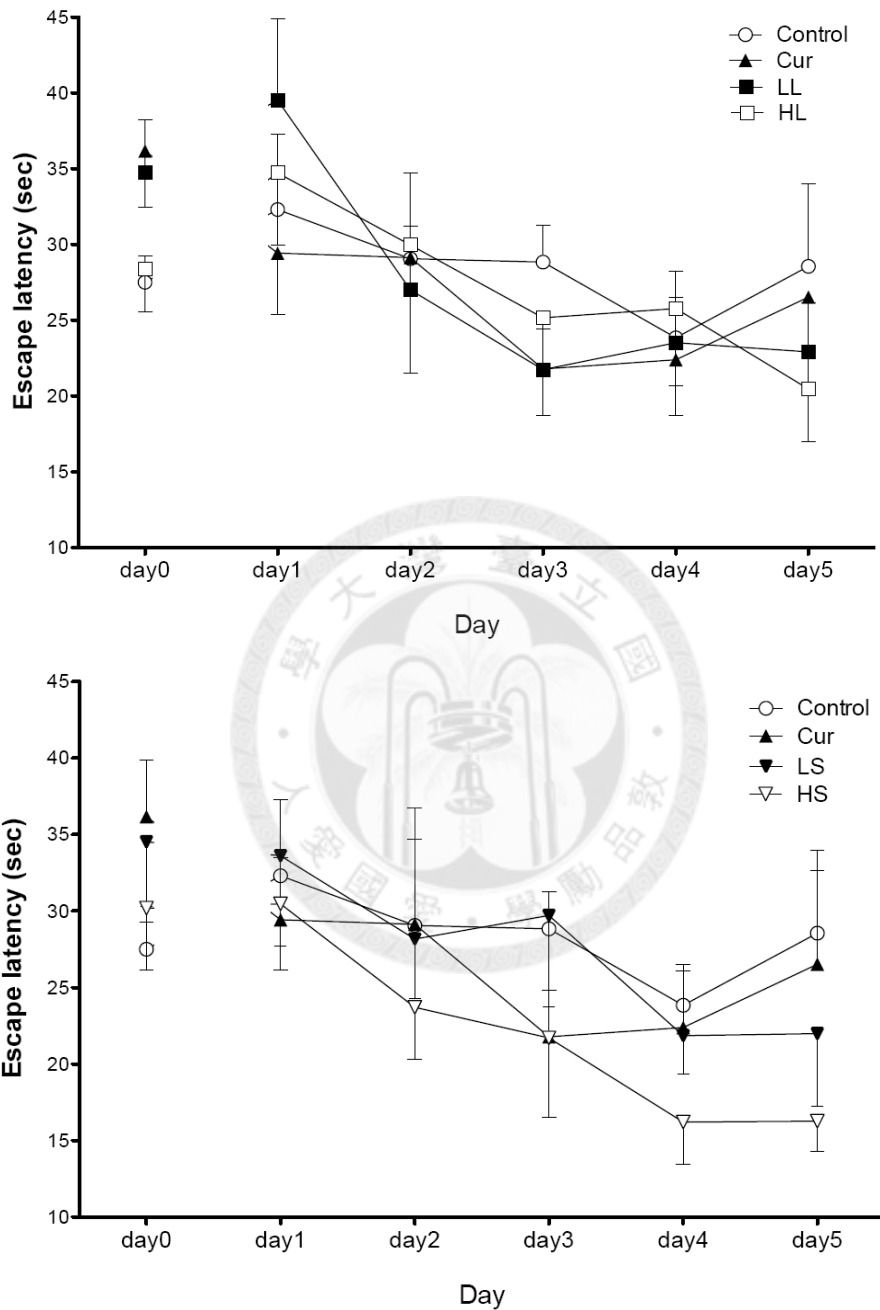
Zhao, H.; Li, Q.; Zhang, Z.; Pei, X.; Wang, J.; Li, Y. Long-term ginsenoside consumption prevents memory loss in aged SAMP8 mice by decreasing oxidative stress and up-regulating the plasticity-related proteins in hippocampus. *Brain research*. **2009**, *1256*, 111-122.

Zhao, Q.; Yokozawa, T.; Yamabe, N.; Tsuneyama, K.; Li, X.; Matsumoto, K. Kangen-karyu improves memory deficit caused by aging through normalization of neuro-plasticity-related signaling system and VEGF system in the brain. *Journal of Ethnopharmacology*. **2010**, *131*, 377-385.



捌、附錄

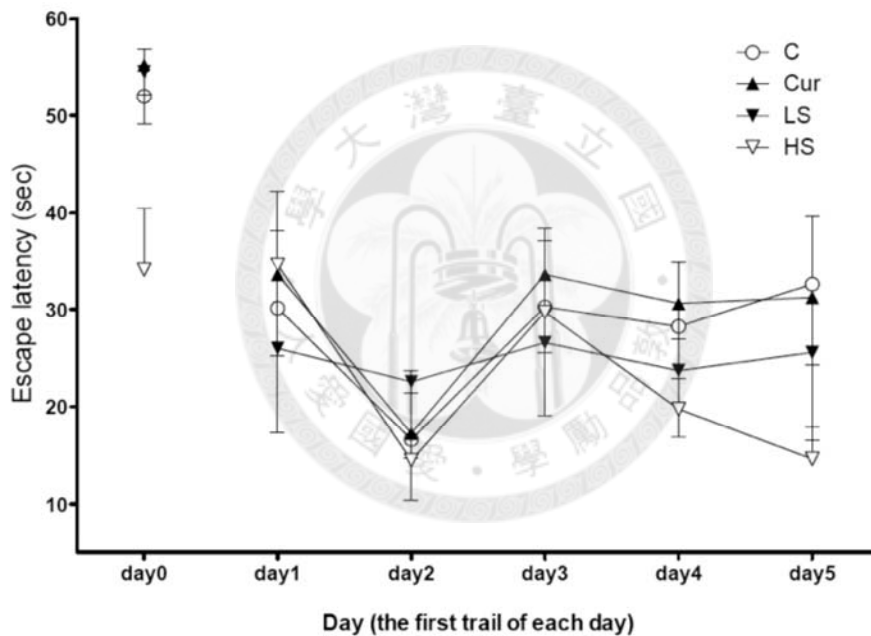
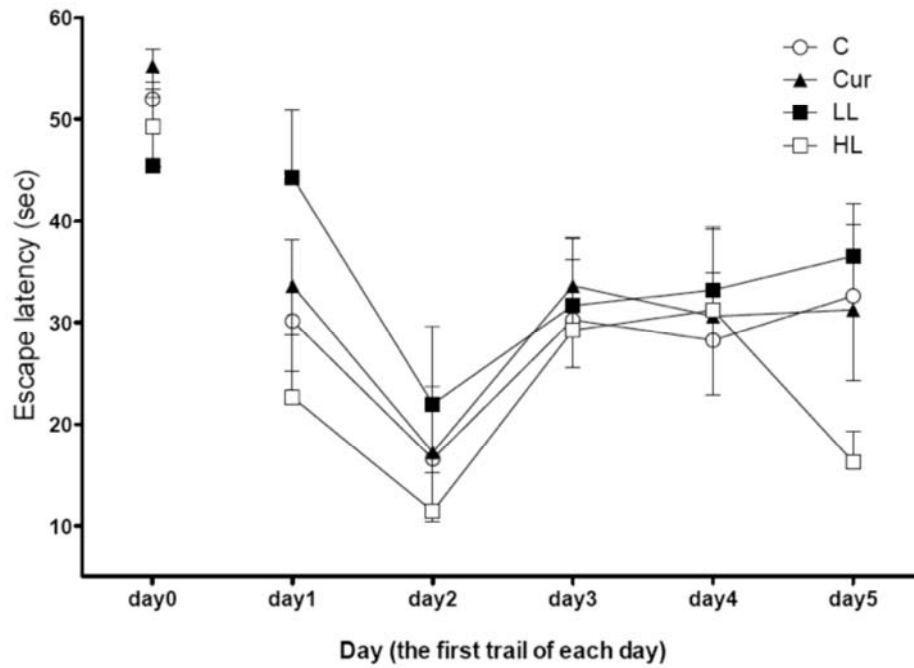
附錄一、本論文正式實驗結果補充資料



圖四十八、SAMP8 小鼠在水迷津測試中的脫離時間的表現(隱沒平台試驗)

Figure 48. Escape latency in Morris water maze test of 6-month-old SAMP8 mice fed with AIN-93M diet containing curucmin, Z-ligustilide, or sesamol for 15 weeks and compared with 5-month-old young SAMP8 mice (n=7-10).

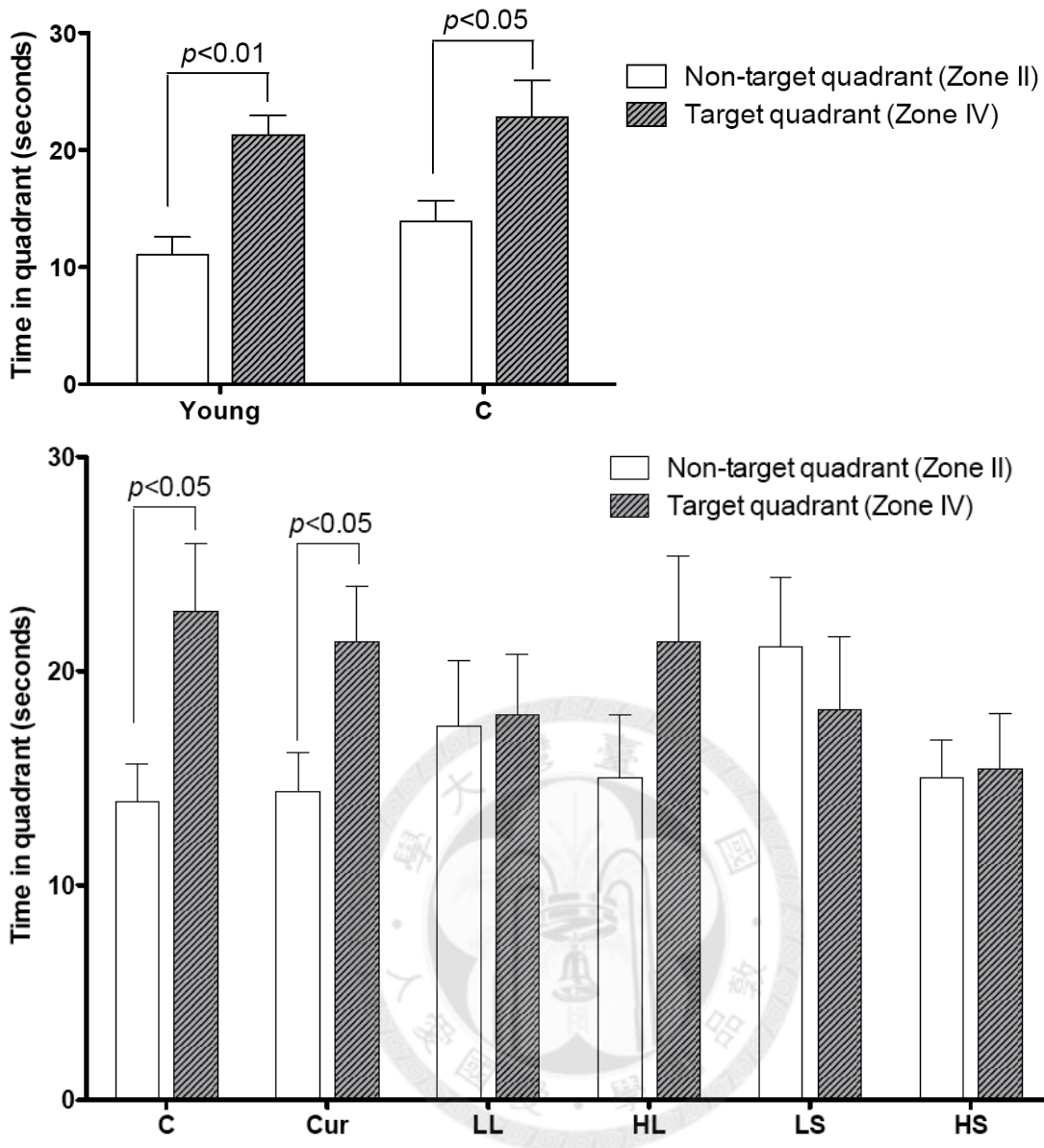
Values are expressed as mean \pm S.E.M. and analyzed by mixed design two-way ANOVA repeated measures. Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.



圖四十九、SAMP8 小鼠在水迷津測試中的長期記憶狀況

Figure 49. Escape latency of first trail each day in Morris water maze test, which is regarded as the potential of long-term memory of 6-month-old SAMP8 mice fed with AIN-93M diet containing curucmin, Z-ligustilide, or sesamol for 15 weeks and compared with 5-month-old young SAMP8 mice (n=7-10).

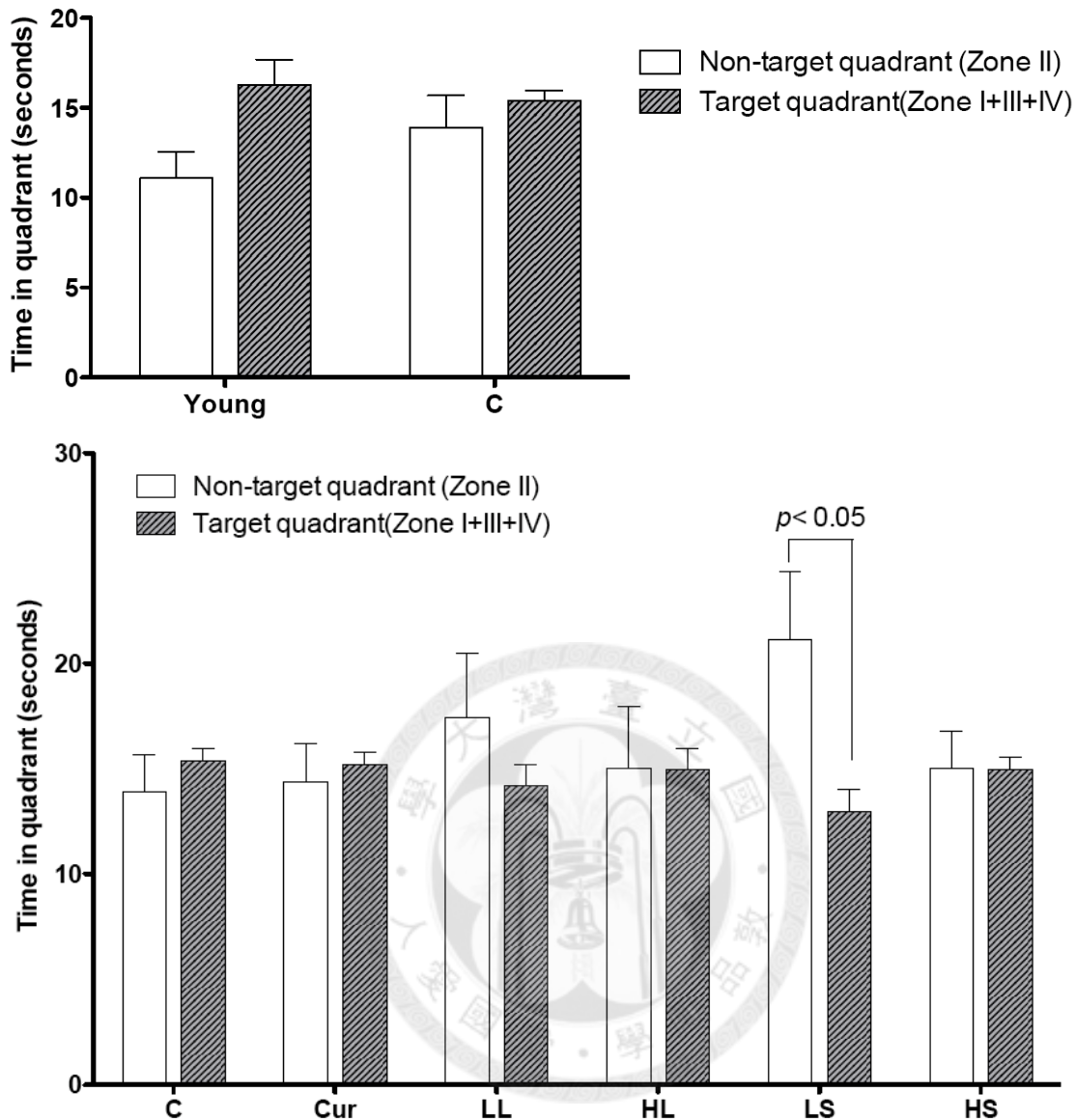
Values are expressed as mean \pm S.E.M. and analyzed by mixed design two-way ANOVA repeated measures. Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.



圖五十、SAMP8 小鼠在水迷津測試中象限偏好測試中的表現

Figure 50. Preference for target (zone IV) and non-target quadrant (zone II) in Morris water maze test of 6-month-old SAMP8 mice fed with AIN-93M diet containing curcumin, Z-ligustilide, or sesamol for 15 weeks and compared with 5-month-old young SAMP8 mice (n=7-10).

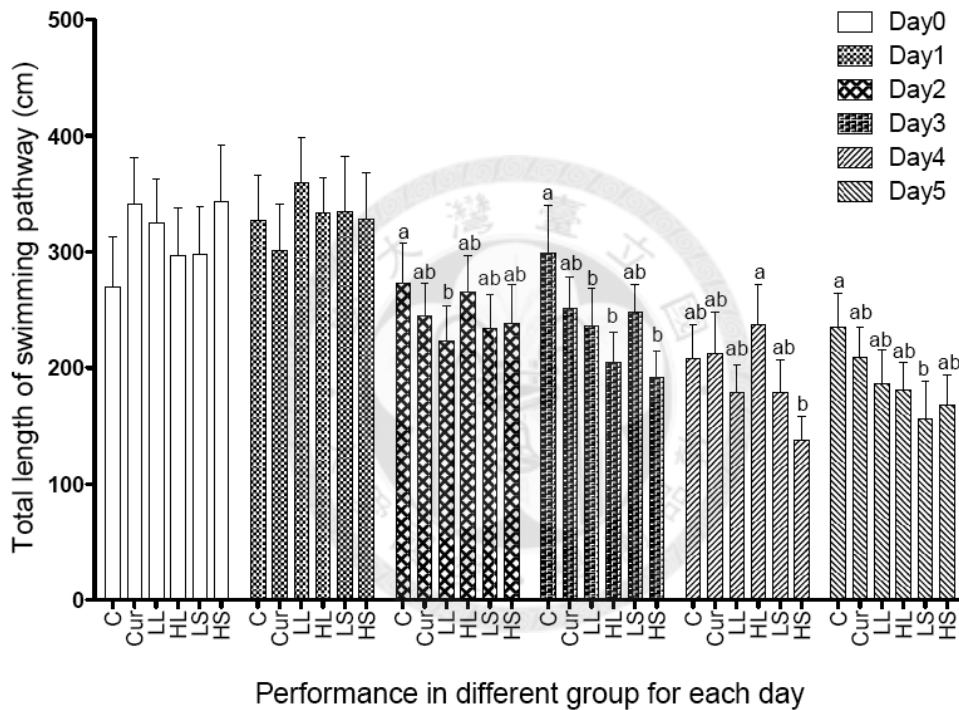
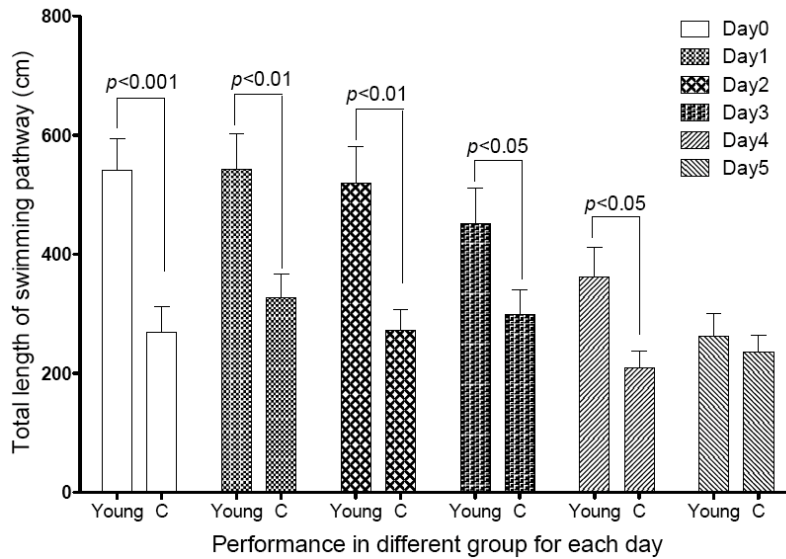
Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.



圖五十一、SAMP8 小鼠在水迷津測試中象限偏好測試中的表現

Figure 51. Preference for target (zone I+III+IV) and non-target quadrant (zone II) in Morris water maze test of 6-month-old SAMP8 mice fed with AIN-93M diet containing curucmin, Z-ligustilide, or sesamol for 15 weeks and compared with 5-month-old young SAMP8 mice (n=7-10).

Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.



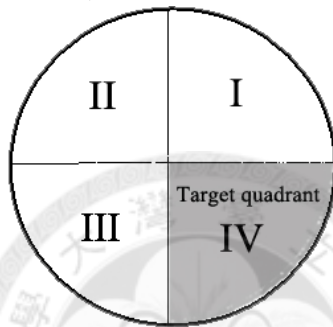
圖五十二、SAMP8 小鼠在水迷津測試中游泳總距離表現

Figure 52. Total length of swimming pathway in Morris water maze of 6-month-old SAMP8 fed with AIN-93M diet containing curcumin, Z-ligustilide, or sesamol for 15 weeks and compared with 5-month-old young SAMP8 mice (n=7-10). Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

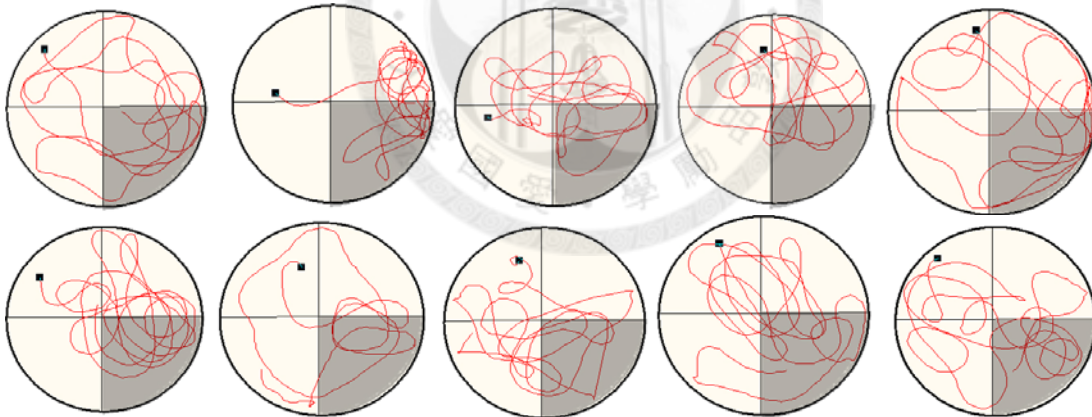
本研究水迷津試驗各訓練天數中各單一試驗的象限下水順序
 . Ordering for mouse enter into water in each trail

| 訓練天數 | 試驗次數 | | | | |
|-------|------|-----|-----|-----|----------|
| | 第一次 | 第二次 | 第三次 | 第四次 | 第五次 |
| Day 0 | I | II | III | IV | C (水池中央) |
| Day 1 | III | IV | I | II | - |
| Day 2 | IV | I | II | III | - |
| Day 3 | II | III | IV | I | - |
| Day 4 | I | II | III | IV | - |
| Day 5 | III | IV | I | II | - |
| Day 6 | | II | | | - |

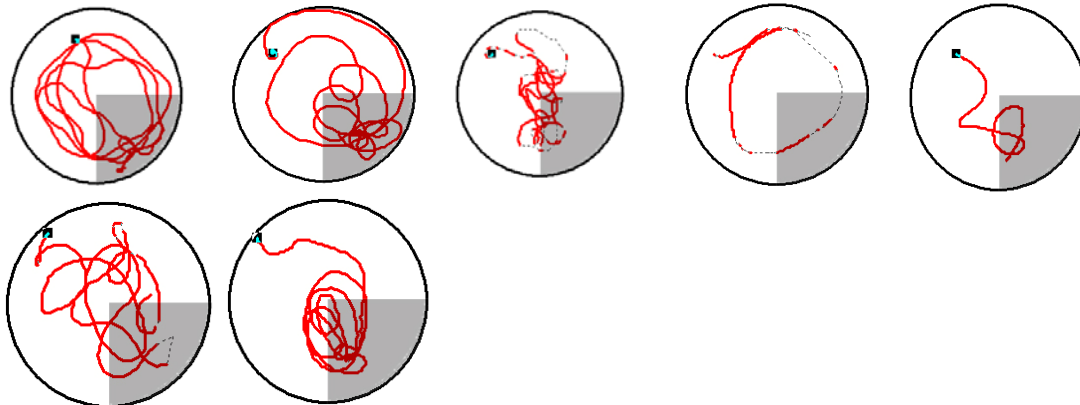
(A).水迷津象限編號平面示意圖



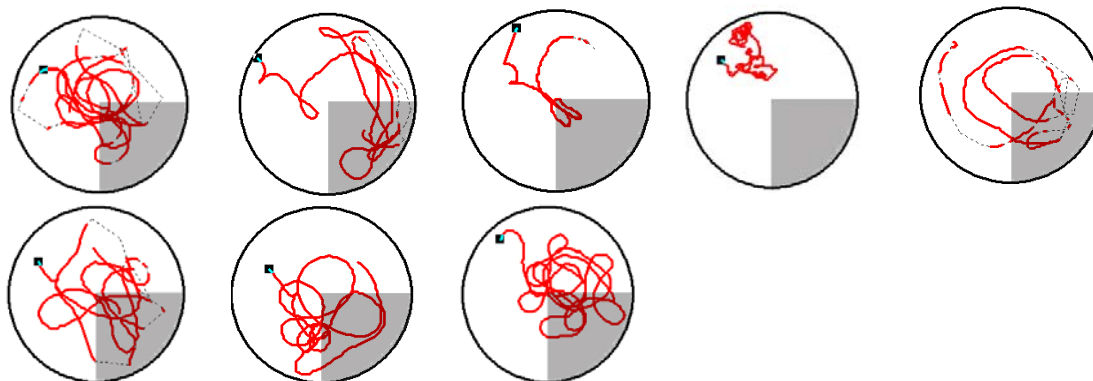
(B).五月齡 SAMP8 小鼠於水迷津試驗之象限偏好試驗的游泳軌跡(n=10)



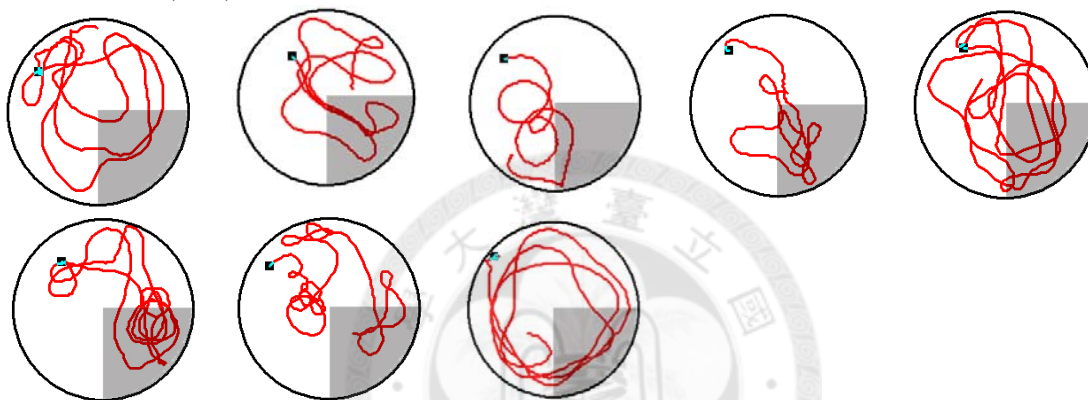
(C).十月齡 SAMP8 小鼠控制組小鼠於水迷津試驗之象限偏好試驗的游泳軌跡 (n=7)



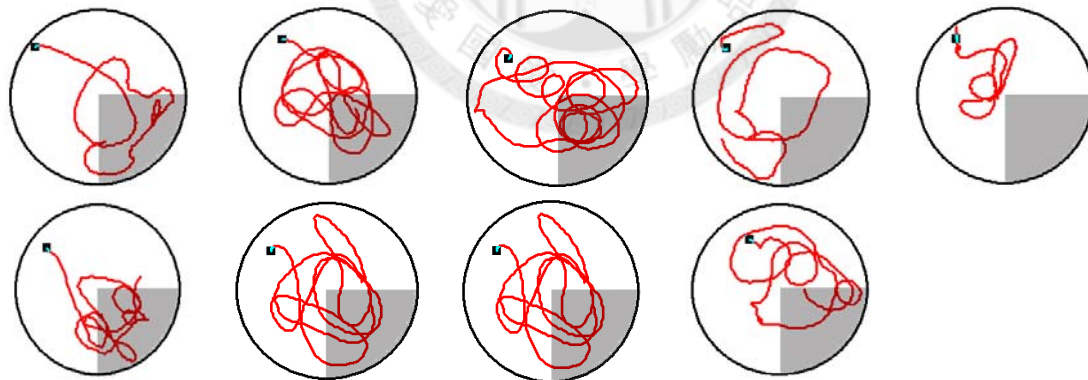
(D).十月齡 SAMP8 小鼠薑黃素組別小鼠於水迷津試驗之象限偏好試驗的游泳軌跡(n=8)



(E).十月齡 SAMP8 小鼠低劑量槲皮素組別小鼠於水迷津試驗之象限偏好試驗的游泳軌跡(n=8)

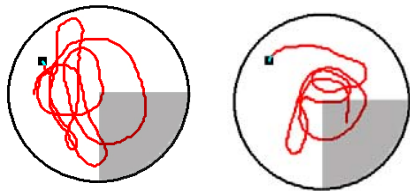


(F).十月齡 SAMP8 小鼠高劑量槲皮素組別小鼠於水迷津試驗之象限偏好試驗的游泳軌跡(n=9)

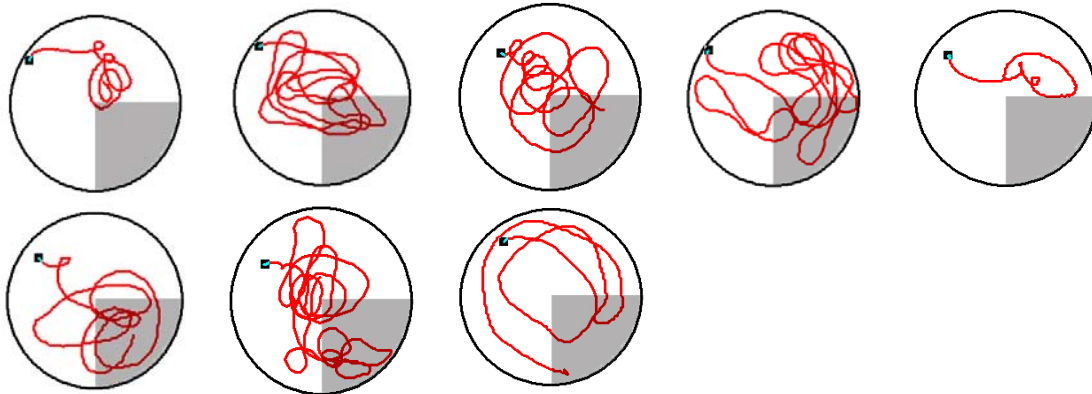


(G).十月齡 SAMP8 小鼠低劑量芝麻酚組別小鼠於水迷津試驗之象限偏好試驗的游泳軌跡(n=7)





(H).十月齡 SAMP8 小鼠高劑量稟本內酯組別小鼠於水迷津試驗之象限偏好試驗的游泳軌跡(n=8)



圖五十三、各組別於水迷津試驗中象限偏好試驗之游泳軌跡。
 黑色方塊為小鼠下水之位置；灰色區域為目標象限，即為原放置平台之象限(第四象限)；紅色軌跡為小鼠於象限偏好試驗一分鐘內的游泳軌跡。

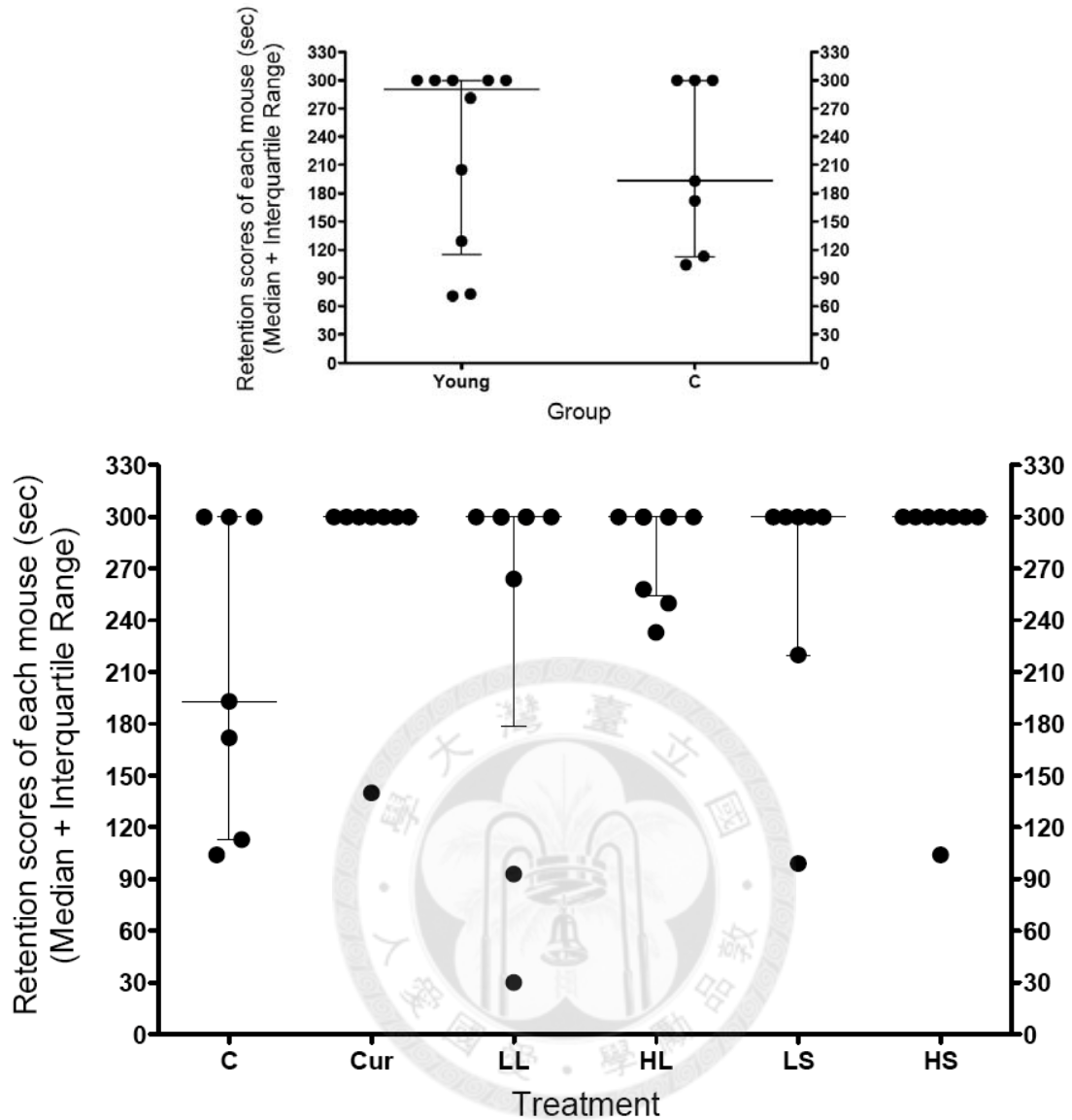
Figure 53. The swimming pathway of SAMP8 mice in the probe test of the Morris water maze (n=7-10).

Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

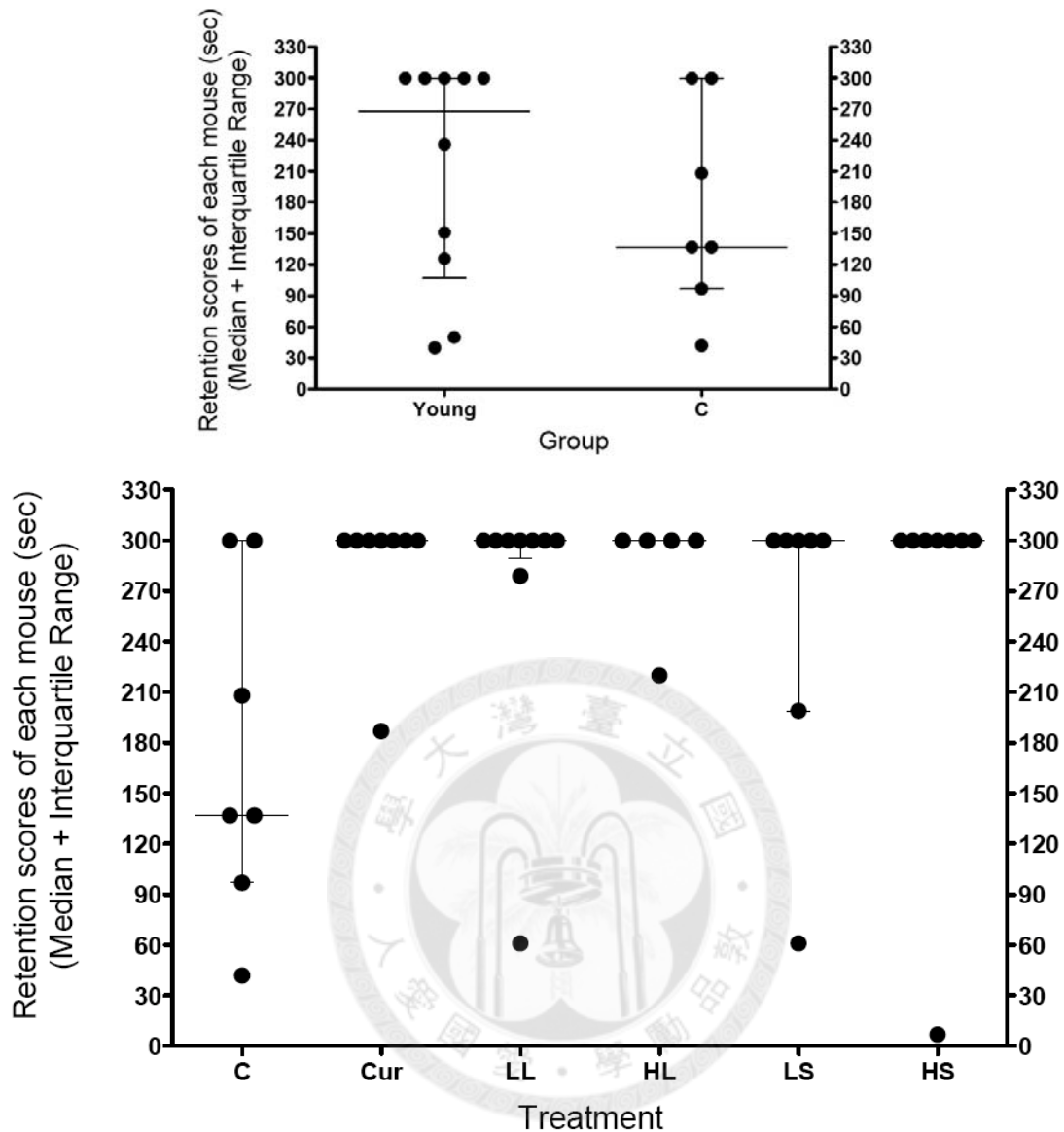
Black square indicates that the start point for SAMP8 mice to swim.

Gray zone indicates that the target quadrant.

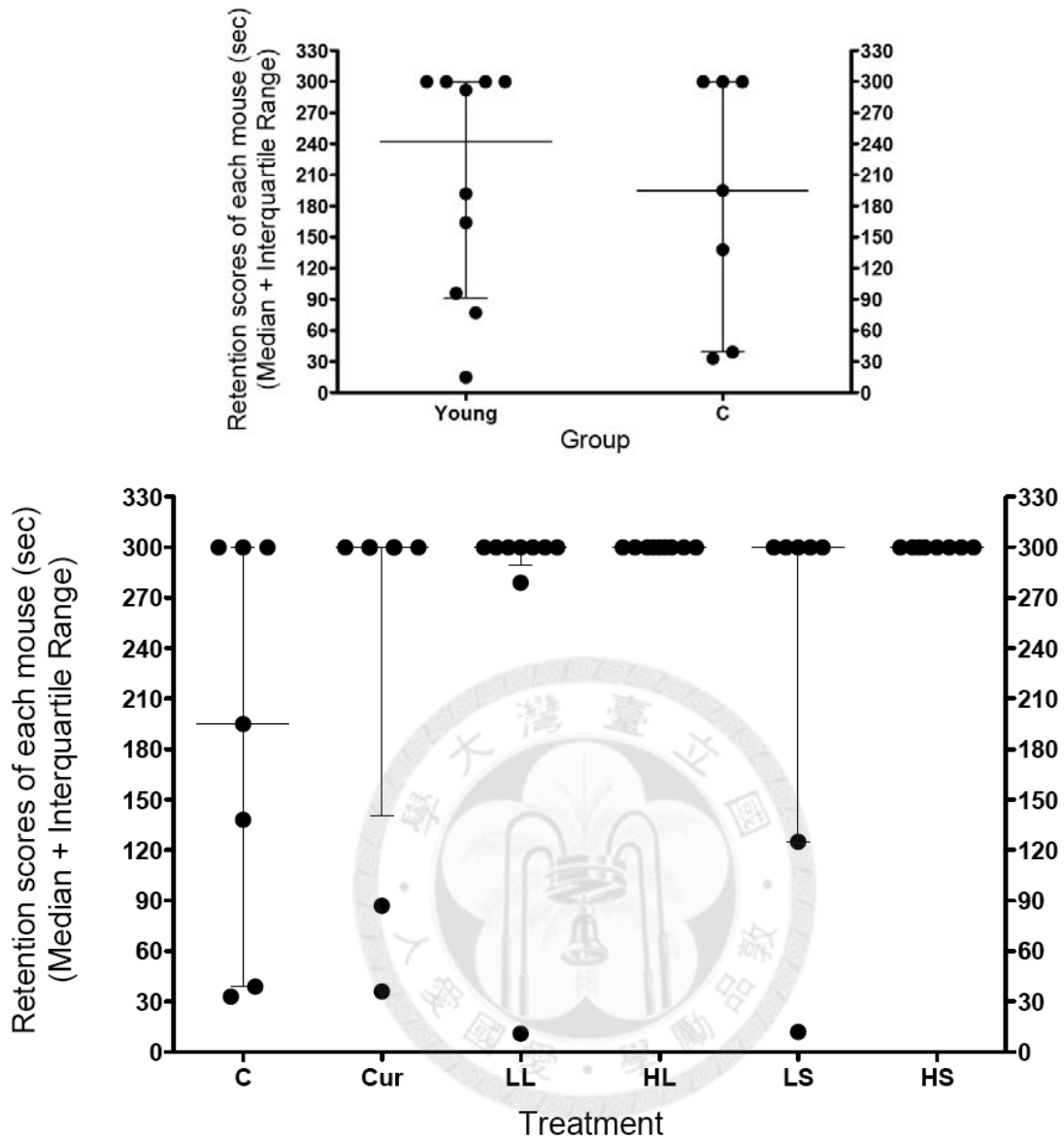
Red pathway indicates that the swimming pathway of each SAMP8 mice in the probe test.



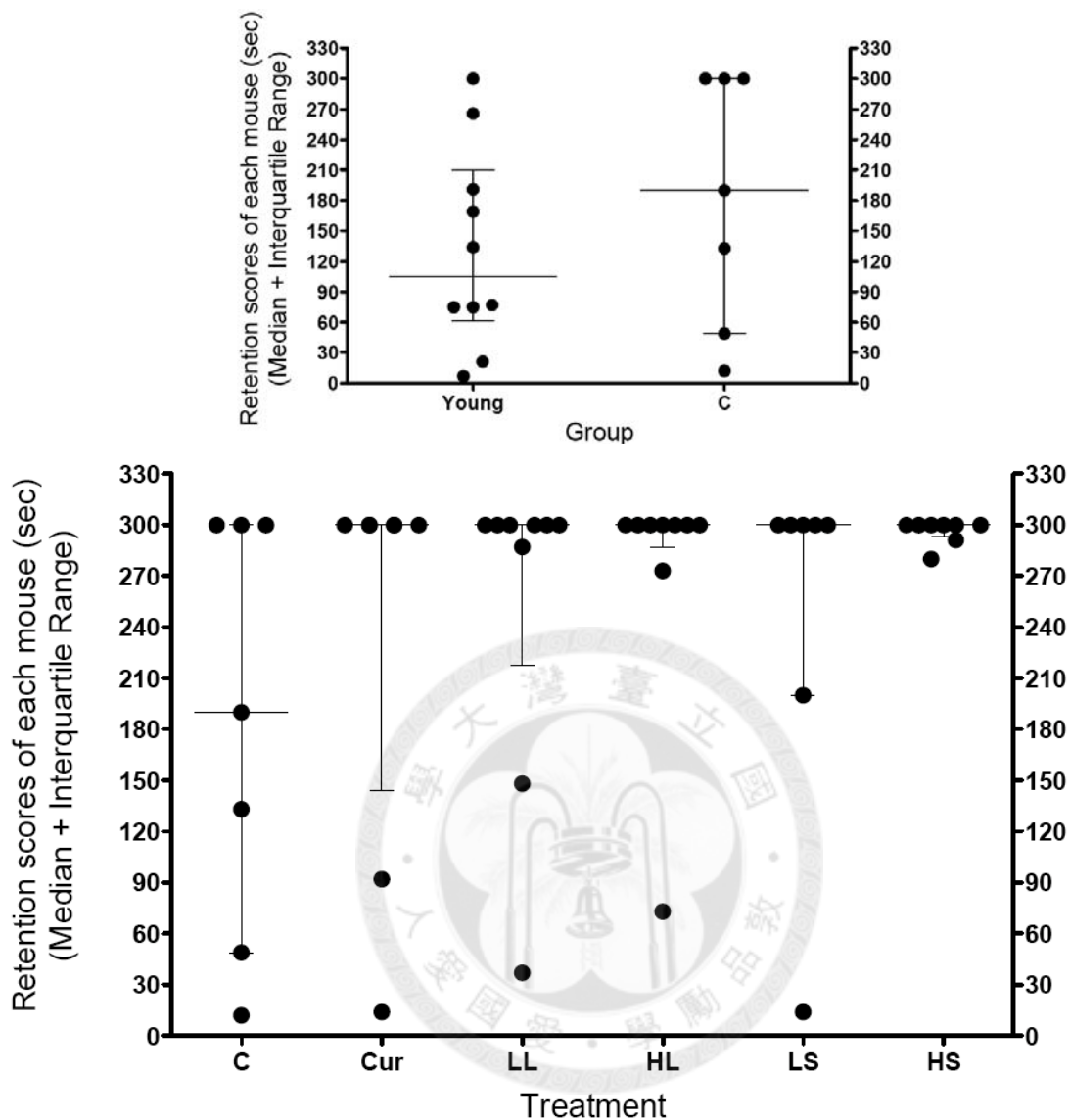
圖五十四、被動迴避試驗中，SAMP8 小鼠在電擊後 24 小時的滯留亮室表現分數
 Figure 54. Retention scores after electronic shocking 24hr of each mouse in inhibitory avoidance task of 6-month-old SAMP8 mice fed with AIN-93M diet containing curucmin, Z-ligustilide, or sesamol for 15 weeks and compared with 5-month-old young SAMP8 mice (n=7-10).
 Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.



圖五十五、被動迴避試驗中，SAMP8 小鼠在電擊後 48 小時的滯留亮室表現分數
 Figure 55. Retention scores after electronic shocking 48hr of each mouse in inhibitory avoidance task of 6-month-old SAMP8 mice fed with AIN-93M diet containing curucmin, Z-ligustilide, or sesamol for 15 weeks and compared with 5-month-old young SAMP8 mice (n=7-10).
 Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

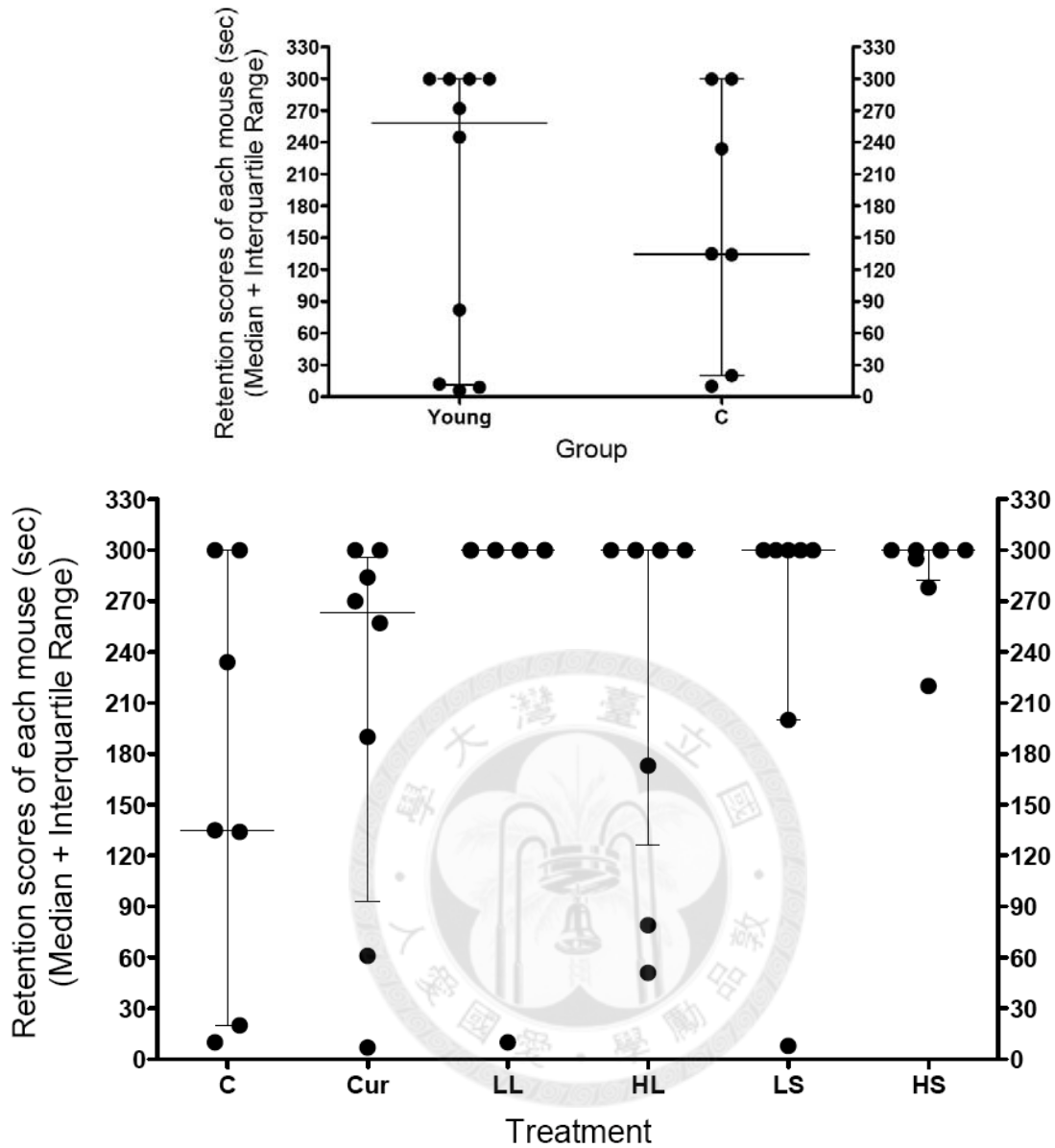


圖五十六、被動迴避試驗中，SAMP8 小鼠在電擊 72 小時的滯留亮室表現分數
 Figure 56. Retention scores after electronic shocking 72hr of each mouse in inhibitory avoidance task of 6-month-old SAMP8 mice fed with AIN-93M diet containing curucmin, Z-ligustilide, or sesamol for 15 weeks and compared with 5-month-old young SAMP8 mice (n=7-10).
 Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.



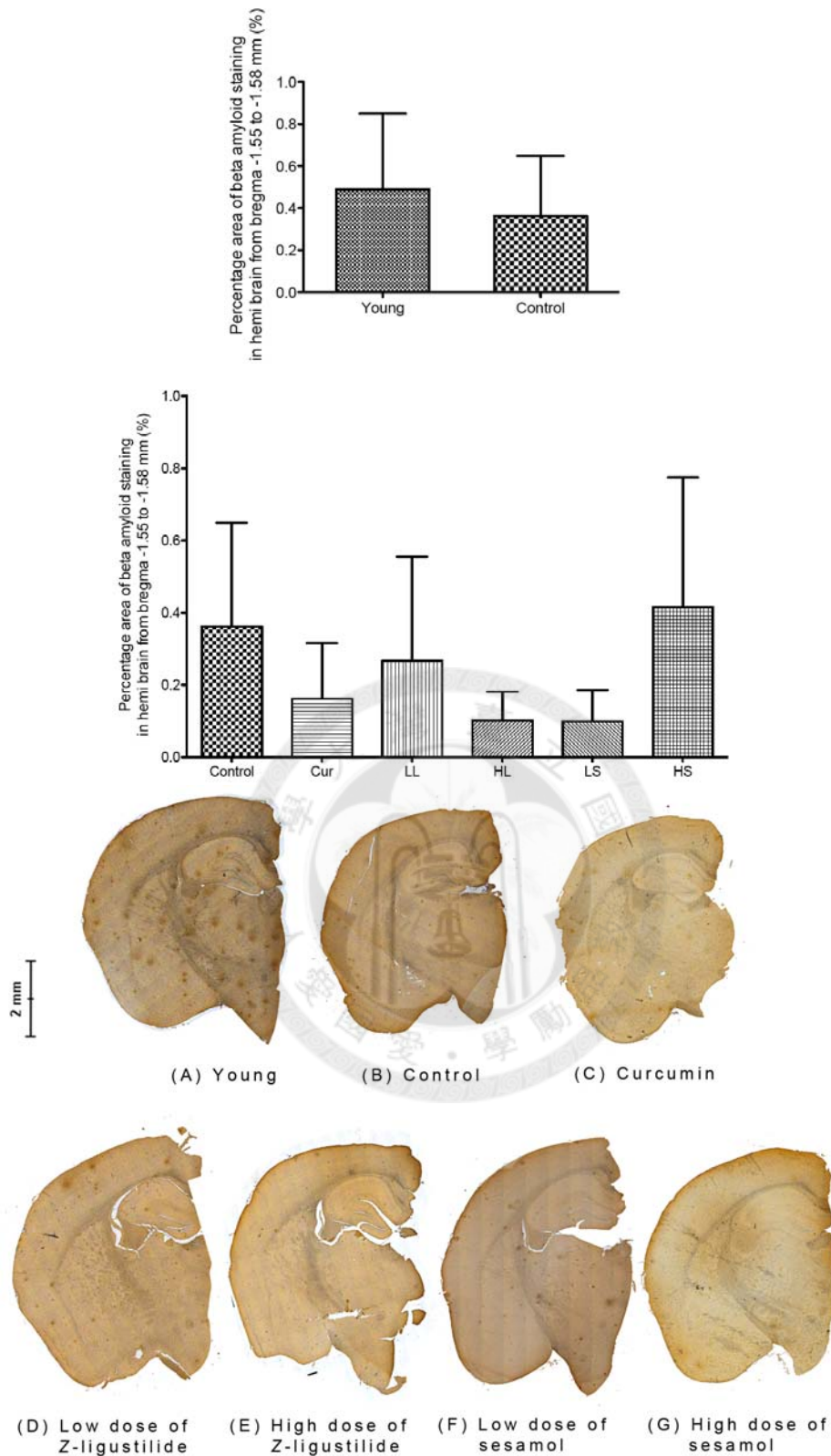
圖五十七、被動迴避試驗中，老化促進小鼠在電擊後 120 小時的滯留亮室表現分數
 Figure 57. Retention scores after electronic shocking 120hr of each mouse in inhibitory avoidance task of 6-month-old SAMP8 mice fed with AIN-93M diet containing curucmin, Z-ligustilide, or sesamol for 15 weeks and compared with 5-month-old young SAMP8 mice (n=7-10).

Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.



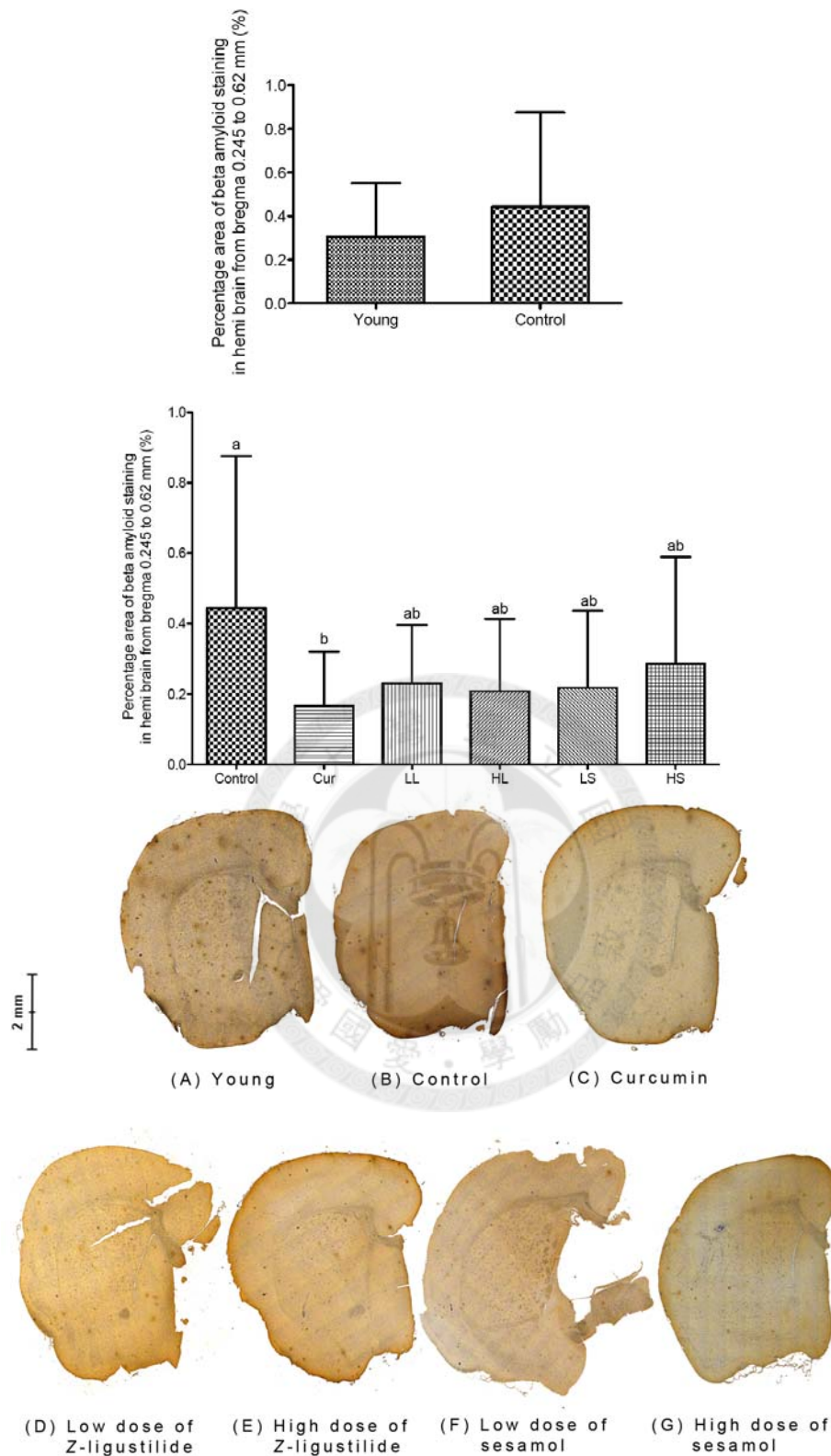
圖五十八、被動迴避試驗中，SAMP8 小鼠在電擊後 168 小時的滯留亮室表現分數
 Figure 58. Retention scores after electronic shocking 168hr of each mouse in inhibitory avoidance task of 6-month-old SAMP8 mice fed with AIN-93M diet containing curucmin, Z-ligustilide, or sesamol for 15 weeks and compared with 5-month-old young SAMP8 mice (n=7-10).

Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.



圖五十九、餵食基礎飼料、薑黃素、藥本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠腦部距腦門-1.55 到-1.58 mm 位置之類澱粉胜肽沉積佔半腦區面積之比例影響

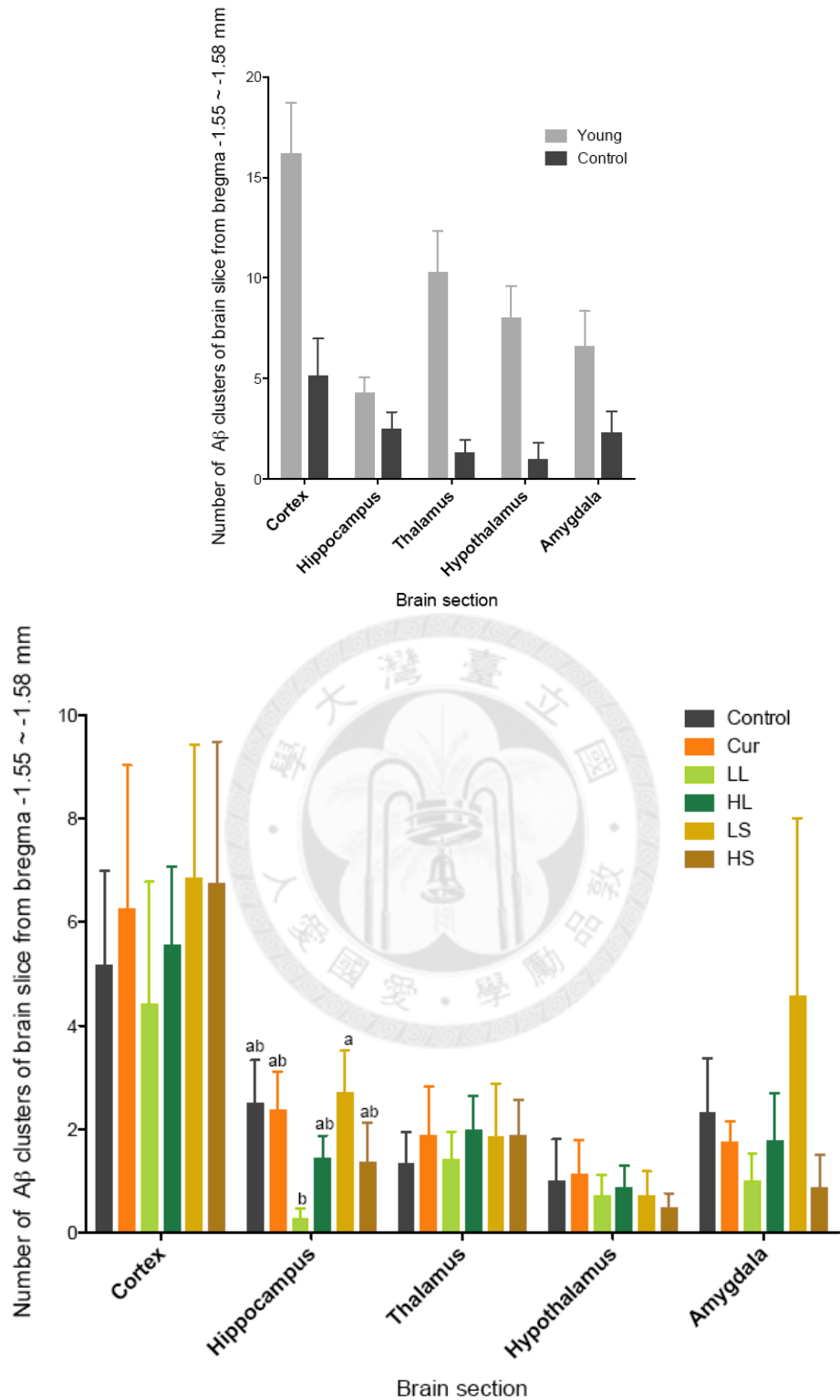
Figure 59. The percentage area of beta-amyloid staining with 6E10 antibody in the hemi brain from bregma -1.55 to -1.58 mm of SAMP8 mice (n=7-10). Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Fisher's LSD tests to evaluate treatment effect. Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.



圖六十、餵食基礎飼料、薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠腦部距窗門 0.245 到 0.62 mm 位置之類澱粉胜肽沉積佔半腦區面積之比例影響

Figure 60. The percentage area of beta-amyloid staining with 6E10 antibody in the hemi brain from bregma 0.245 to 0.62 mm of SAMP8 mice. Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Fisher's LSD tests to evaluate treatment effect ($n=7-10$).

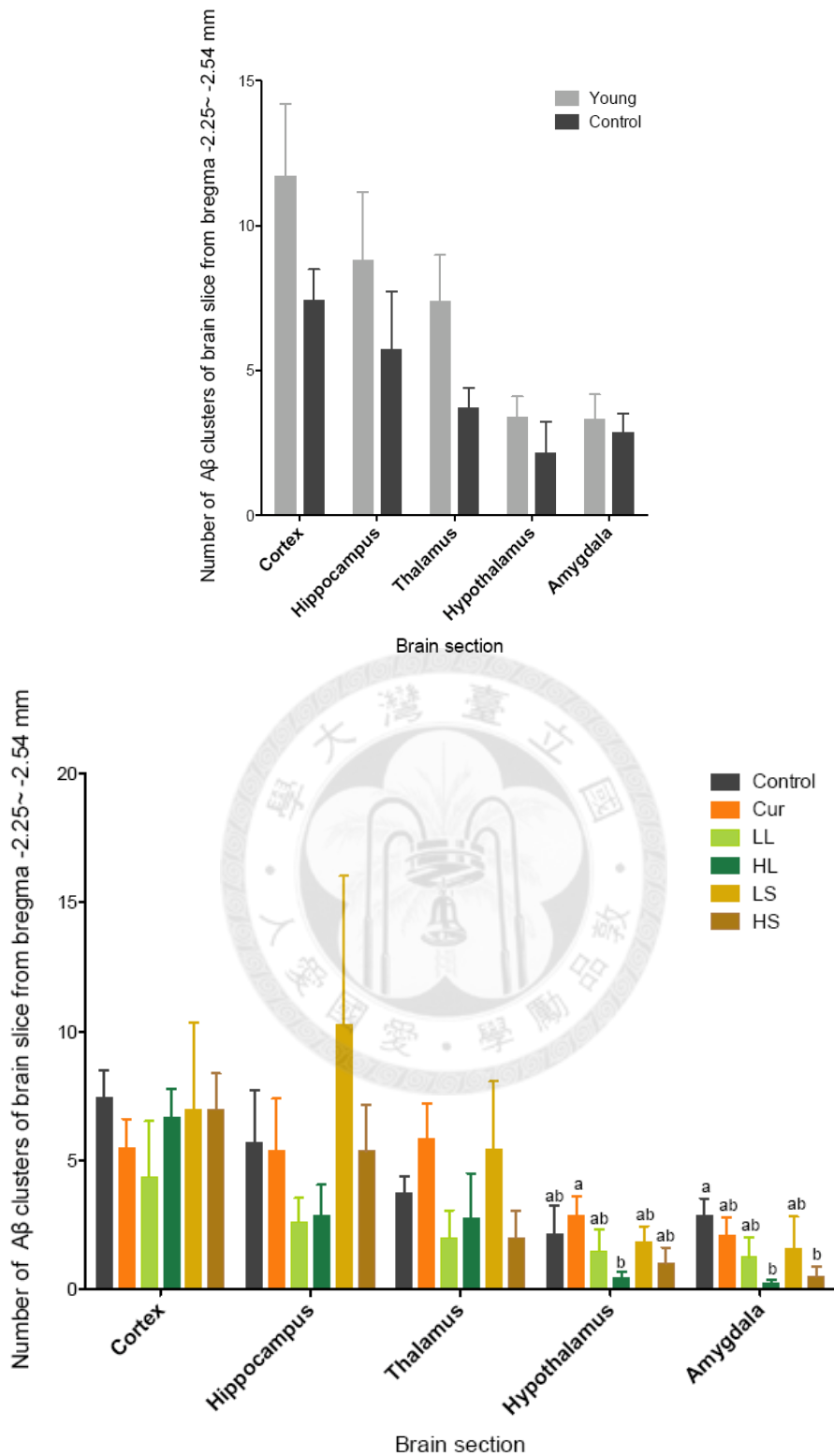
Means with different letters differ significantly ($p<0.05$). Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.



圖六十一、餵食基礎飼料、薑黃素、藻本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠腦部距窗門-1.55 到-1.58 mm 位置之類澱粉胜肽沉積團簇數目影響

Figure 61. Amount of clusters beta-amyloid peptide in the brain coronal sections stained with 6E10 antibody on SAMP8 mice from bregma -1.55~-1.58 mm (n=7-10).

Means with different letters differ significantly ($p < 0.05$). Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

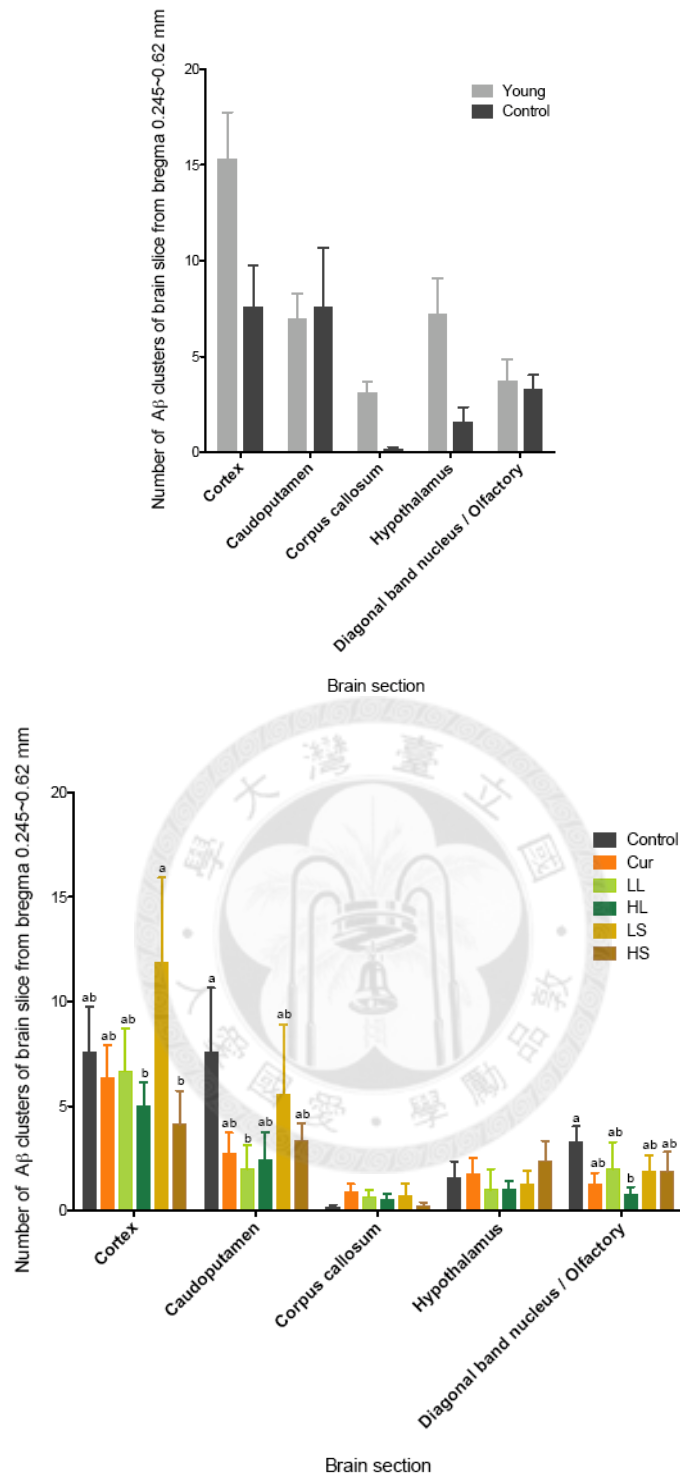


圖六十二、餵食基礎飼料、薑黃素、藥本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠腦部距穹門-2.25 到 -2.54 mm 位置之類澱粉胜肽沉積團簇數目影響

Figure 62. Number of beta-amyloid staining in SAMP8 mice brain coronal section from bregma-2.25 to -2.54 mm (n=7-10).

Means with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.



圖六十三、餵食基礎飼料、薑黃素、槲本內酯與芝麻酚 15 週對 SAMP8 小鼠腦部距函門 0.245 到 0.62 mm 位置之類澱粉胜肽沉積團簇數目影響

Figure 63. Number of beta-amyloid staining in SAMP8 mice brain coronal section from bregma 0.245 to 0.62 mm (n=7-10).

Means with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

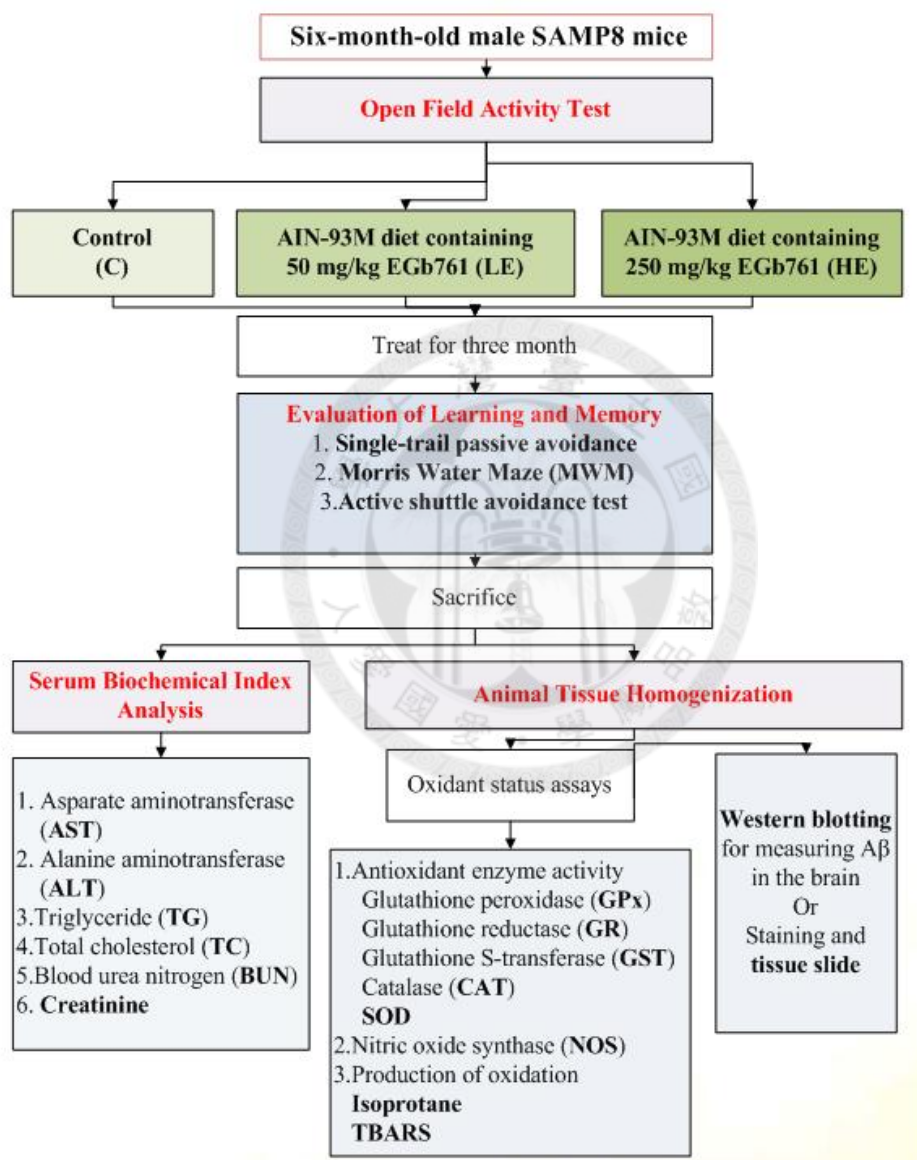
Y indicates 5-month-old SAMP8 mice. Group C, Cur, LL, HL, LS, and HS are described in Table 14.

附錄二、預實驗結果

一、實驗目的

本研究之預實驗以銀杏萃取物餵食 SAMP8 小鼠以探討促進學習記憶與抗阿滋海默症之潛力，並藉以此次預實驗評估活動量測試、被動迴避、水迷津試驗與類澱粉胬肽免疫染色等實驗之各項參數與實驗設計之可行性。

二、實驗設計



圖六十四、預實驗設計

Figure 64. The flowchart of this preliminary study

三、活動量測試

表二十七、餵食銀杏萃取物 SRM3247 對 SAMP8 小鼠之活動量影響

Table 28. The locomotion behavior and emotional reactivity of SAMP8 mice in open field test

| Group | Total distance (inch) | | Time in the central arena (sec) | |
|-------|-----------------------|----------------|---------------------------------|-------------|
| | 0 day | 60 day | 0 day | 60 day |
| C | 1386.18±185.43 | 1353.35±271.91 | 111.25±42.19 | 159.8±36.32 |
| LE | 1351.43±157.70 | 1321.49±190.53 | 113.13±21.20 | 141.8±23.25 |
| HE | 1321.15±210.91 | 1293.6±176.68 | 132.88±34.89 | 158.9±30.6 |

The locomotor behavior was analysis by two-way ANOVA and Duncan's multiple range tests.

* Means with difference letters within the same raw in same parameter and within the same column in the same day differ significantly $p < 0.01$ (n=8).

表二十八、餵食銀杏萃取物 SRM3247 對 SAMP8 小鼠之活動量影響(續)

Table 29. The locomotion behavior and emotional reactivity of SAMP8 mice in open field test

| | Number of rearing (times) | | Time in rearing (sec) | | Number of fecal boluses | |
|----|---------------------------|-------------|-----------------------|--------------|-------------------------|-----------|
| | 0 day | 60 day | 0 day | 60 day | 0 day | 60 day |
| C | 87.63±10.08 | 81.13±20.52 | 167.88±32.33 | 174.62±55.66 | - | 4.25±2.25 |
| LE | 77.88±13.16 | 73.13±20 | 133.25±32.72 | 140±59.79 | - | 4.25±2.71 |
| HE | 81.63±11.48 | 70.13±20 | 153.75±27.50 | 162±59.11 | - | 3.63±2.45 |

The locomotor behavior was analysis by two-way ANOVA and Duncan's multiple range tests.

* Means with difference letters within the same raw in same parameter and within the same column in the same day differ significantly $p < 0.01$ (n=8).

四、體重變化與攝食量

表二十九、餵食銀杏萃取物 SRM3247 對 SAMP8 小鼠體重的影響

Table 30. Body weight of SAMP8 mice fed with or without SRM 3247 for 15 weeks

| Group | Body weight (g) | | | | |
|-------|-----------------|------------|------------|------------|------------|
| | 0 day | 30 day | 60 day | 90 day | 112 day |
| C | 34.99±3.62 | 34.55±3.11 | 36.68±3.53 | 37.61±5.34 | 38.97±5.03 |
| LE | 32.54±2.79 | 33.39±3.78 | 36.99±5.24 | 38.85±5.73 | 38.85±6.54 |
| HE | 35.64±3.82 | 37.16±4.22 | 40.09±5.08 | 42.66±4.89 | 40.49±5.35 |

Control, SAMP8 mice with normal AIN-93M diet.

LE, SAMP8 mice with AIN-93M diet containing **SRM 3247** (50mg/kg diet)

HE, SAMP8 mice with AIN-93M diet containing **SRM 3247** (250mg/kg diet)

Values are expressed as mean ± S.D. and analyzed two-way ANOVA and Duncan's multiple range tests.

Means with difference letters within the same column differ significantly $p < 0.01$ (n=8).

In 112days, the control group only conclude seven mice

表三十、餵食銀杏萃取物 SRM3247 對 SAMP8 小鼠攝食量的影響

Table 31. Food intake of SAMP8 mice fed with or without SRM 3247 for 15 weeks

| Group | Food intake (g) | | | |
|-------|-----------------|-------------|-------------|------------|
| | 1st month | 2nd month | 3rd month | 4th month |
| C | 3.97±0.22b | 3.17±0.86b | 3.77±0.33ab | 4.07±0.29a |
| LE | 3.76±0.35b | 3.79±0.37ab | 3.69±0.35b | 3.81±0.33a |
| HE | 4.29±0.25a | 4.04±0.36a | 4.10±0.33a | 3.86±0.48a |

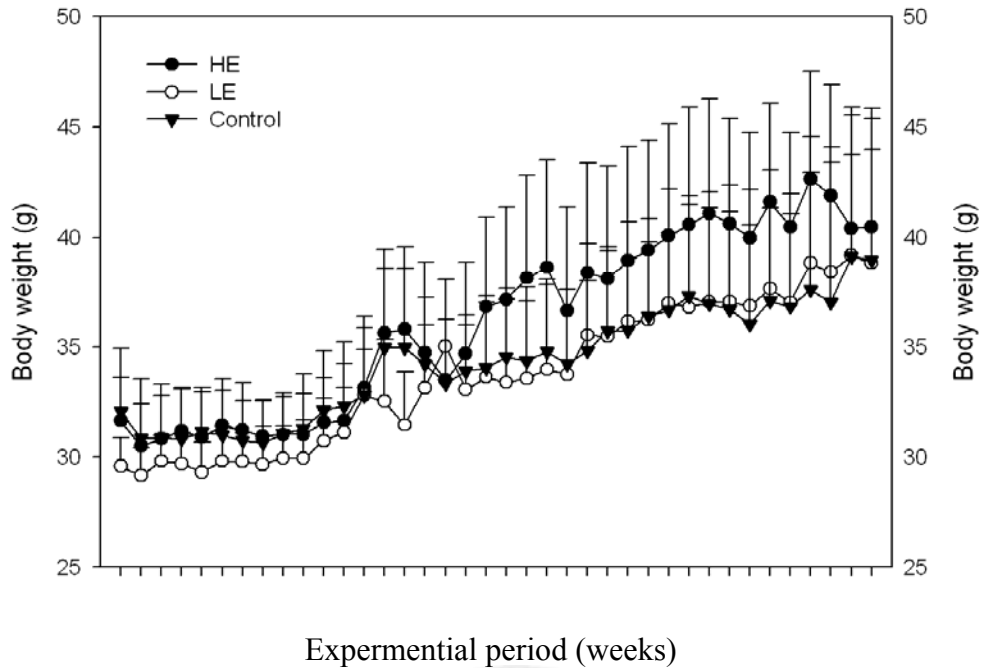
Control, SAMP8 mice with normal AIN-93M diet.

LE, SAMP8 mice with AIN-93M diet containing **SRM 3247** (50mg/kg diet)

HE, SAMP8 mice with AIN-93M diet containing **SRM 3247** (250mg/kg diet)

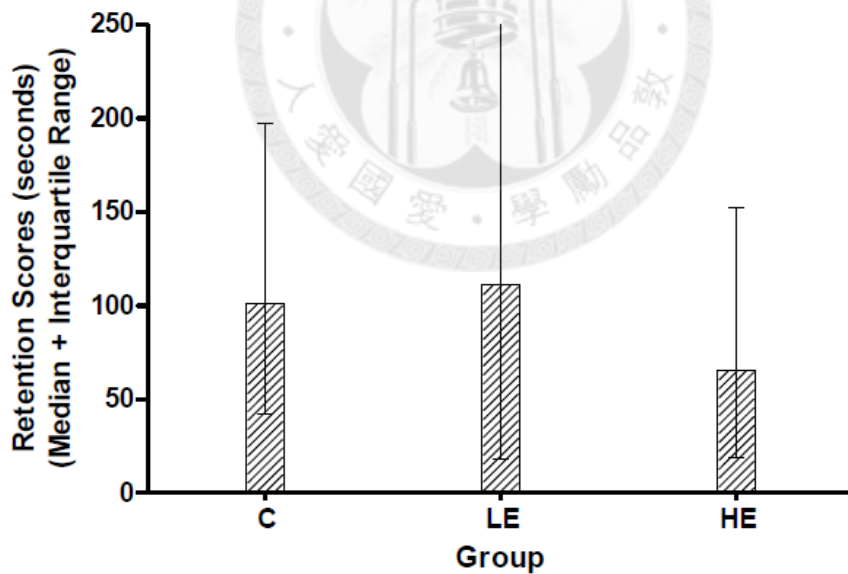
Values are expressed as mean ± S.D. and analyzed two-way ANOVA and Duncan's multiple range tests.

Means with difference letters within the same column differ significantly $p < 0.05$ (n=8).



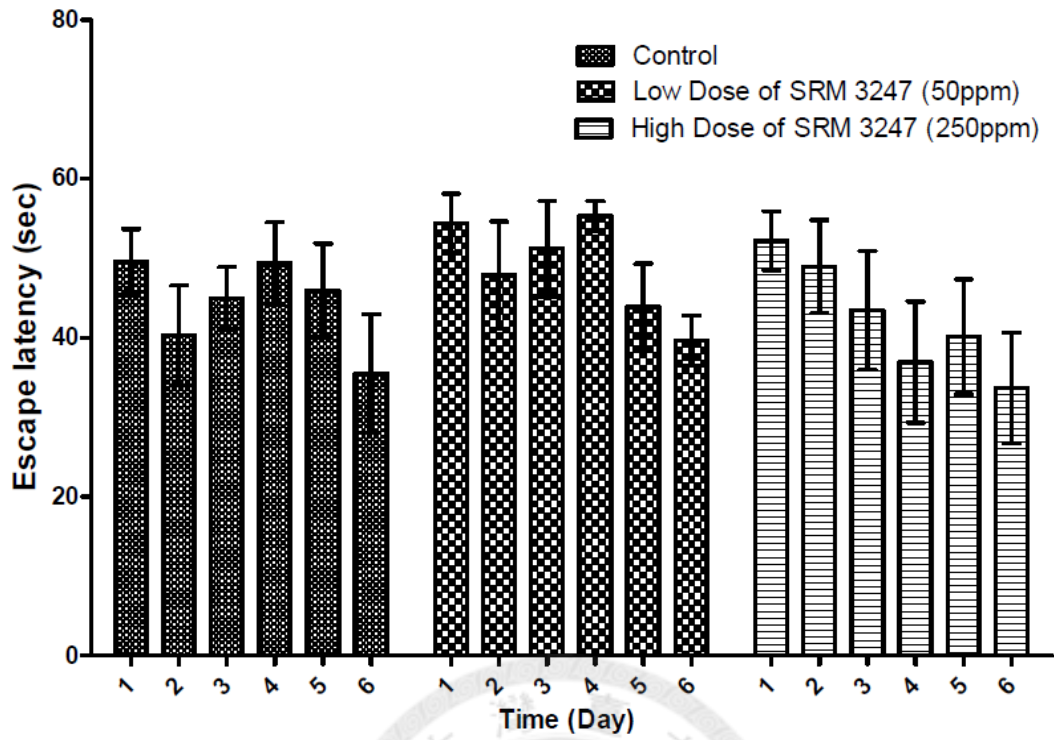
圖六十五、餵食 SAMP8 小鼠銀杏萃取物 SRM 3247 三個月的體重變化
 Figure 65. The variation in body weight during experimental period of SAMP8 mice

五、被動迴避試驗

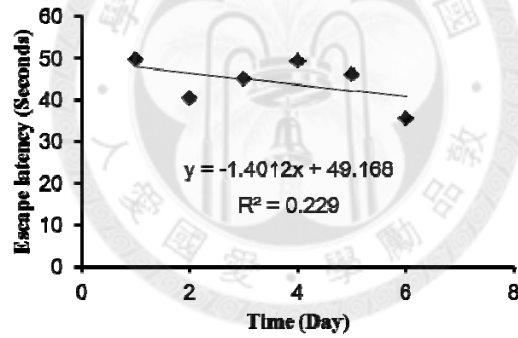


圖六十六、餵食 SAMP8 小鼠銀杏萃取物 SRM 3247 三個月後的被動迴避表現
 Figure 66. Inhibitory Avoidance Task of 6-month-old SAMP8 mice fed with or without SRM 3247 for 15 weeks. Inhibitory Avoidance Task was performed after training 24 hours. (Shocking is given 0.5 mA for 1 sec and just 1 time) (n=8)

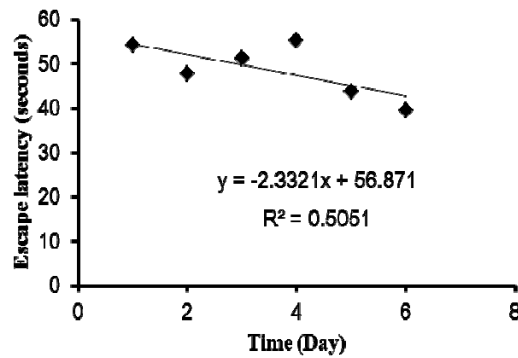
六、水迷津試驗



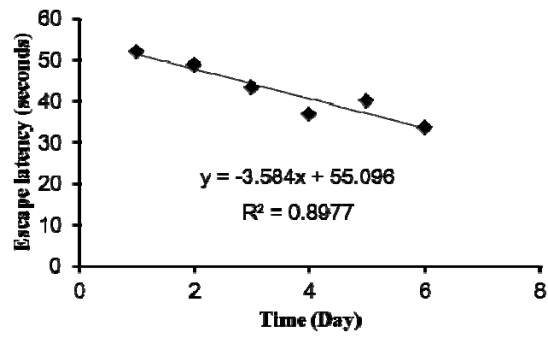
圖六十七、餵食 SAMP8 小鼠銀杏萃取物 SRM 3247 三個月後的水迷津空間記憶表現



Control Group

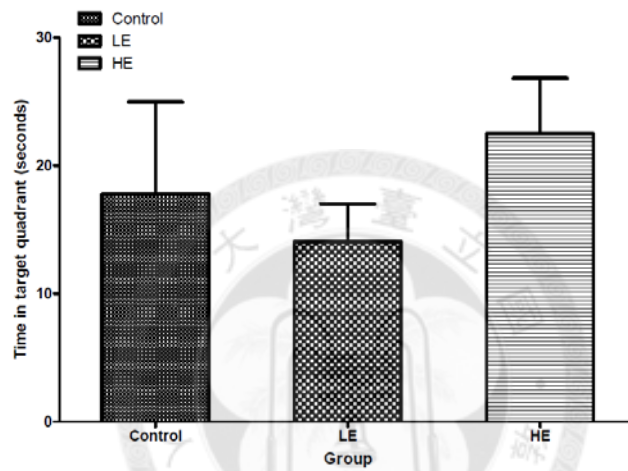


LE Group



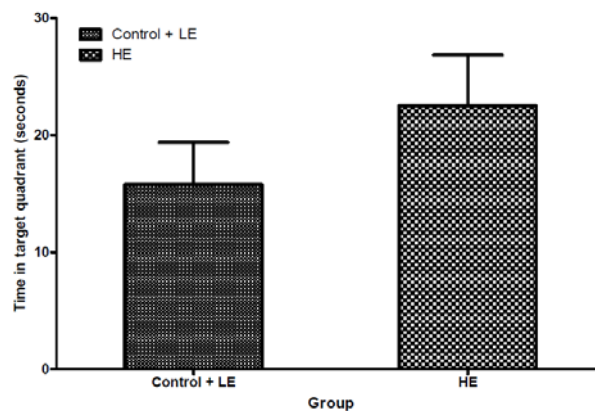
HE Group

圖六十八、脫離時間趨勢分析
Figure 68. Trend analysis of Escape latency



圖六十九、餵食 SAMP8 小鼠銀杏萃取物 SRM 3247 三個月後在水迷津試驗中象限偏好測試的表現

Figure 69. Probe test (n=8)



圖七十、餵食 SAMP8 小鼠銀杏萃取物 SRM 3247 三個月後在水迷津試驗中象限偏好測試的表現

Figure 70. Probe test (n=8)

七、血清生化數值分析

表三十一、餵食銀杏萃取物 SRM3247 對 SAMP8 小鼠臟器重量的影響

Table 32. Organ weight of SAMP8 mice fed with or without SRM 3247 for 15 weeks

| Group | Organ weight (g) | | | | | |
|-------|------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Brain | Heart | Lung | Spleen | Kidney | Liver |
| C | 0.44±0.04a | 0.17±0.03a | 0.24±0.04a | 0.09±0.01a | 0.57±0.07a | 2.44±0.65a |
| LE | 0.43±0.04a | 0.17±0.02a | 0.22±0.03a | 0.09±0.03a | 0.56±0.04a | 2.71±0.74a |
| HE | 0.44±0.02a | 0.18±0.03a | 0.22±0.03a | 0.10±0.03a | 0.59±0.08a | 2.90±0.77a |

Control, SAMP8 mice with normal AIN-93M diet.

LE, SAMP8 mice with AIN-93M diet containing EGb761 (50mg/kg diet)

HE, SAMP8 mice with AIN-93M diet containing EGb761 (250mg/kg diet)

Values are expressed as mean ± S.D. and analyzed two-way ANOVA and Duncan's multiple range tests.

Means with difference letters within the same raw differ significantly $p < 0.05$ (n=8).

表三十二、餵食銀杏萃取物 SRM3247 對 SAMP8 小鼠血清生化指標之影響

Table 33. Serum Biochemical Analysis of SAMP8 Mice fed with or without SRM 3247 for 15 weeks

| | C | LE | HE |
|-------------------|----------------|---------------|----------------|
| AST(U/L) | 212.33±106.05a | 116.10±30.25b | 154.69±41.12ab |
| ALT(U/L) | 131.62±68.67a | 107.38±61.18a | 95.94±38.82a |
| TG(mg/dL) | 146.43±30.88b | 230.50±49.39a | 238±87.60a |
| TC(mg/dL) | 114.86±14.30b | 139.13±27.13a | 99.50±12.74b |
| BUN(mg/dL) | 18.69±3.72a | 30.05±30.33a | 17.92±2.14a |
| Creatinine(mg/dL) | 0.19±0.04a | 0.24±0.11a | 0.21±0.04a |

Control, SAMP8 mice with normal AIN-93M diet.

LE, SAMP8 mice with AIN-93M diet containing EGb761 (50mg/kg diet)

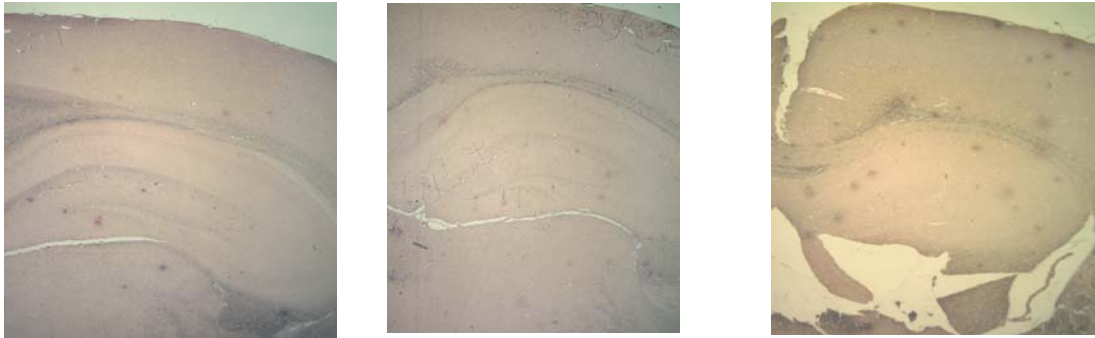
HE, SAMP8 mice with AIN-93M diet containing EGb761 (250mg/kg diet)

Values are expressed as mean ± S.D. and analyzed two-way ANOVA and Duncan's multiple range tests.

Means with difference letters within the same raw differ significantly $p < 0.05$ (n=8).

八、腦部類澱粉胜肽之組織免疫染色

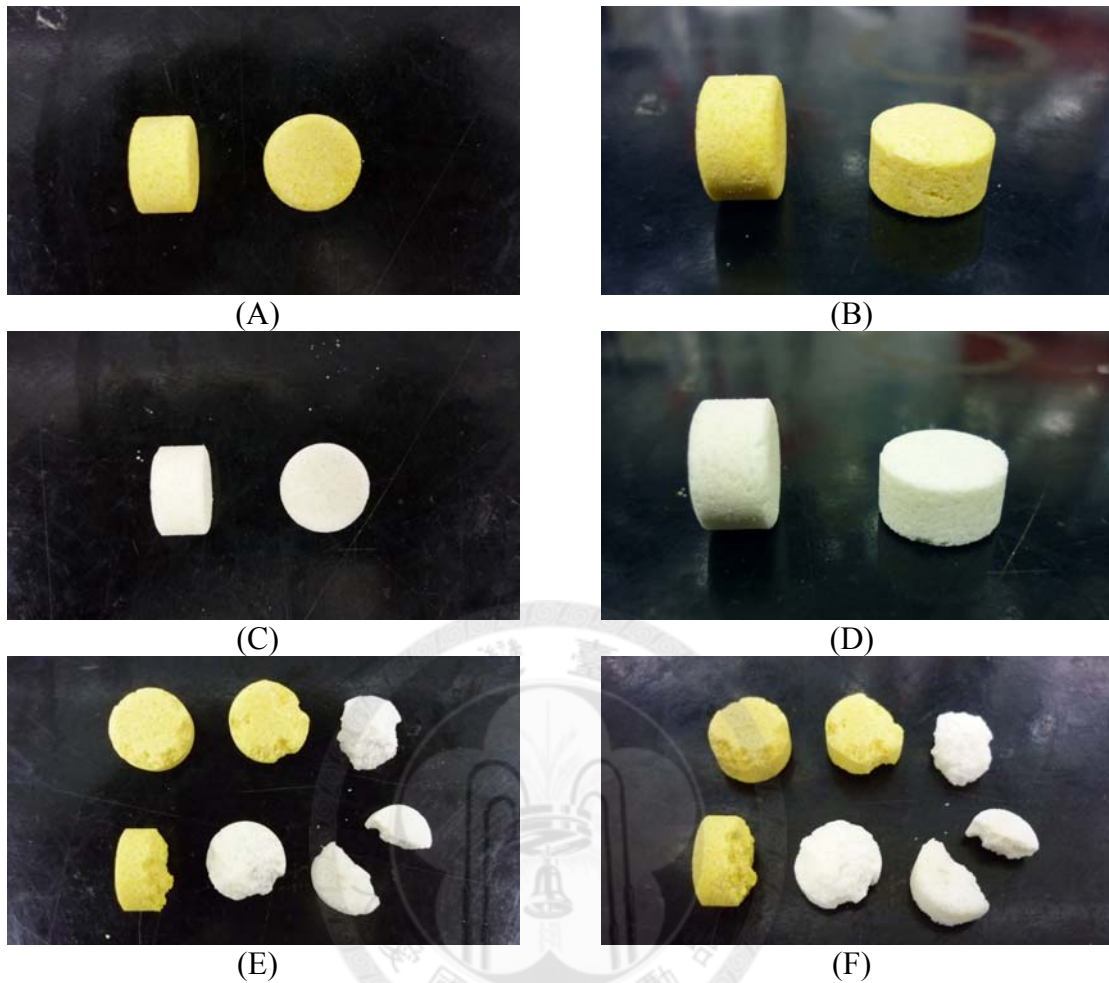
Hippocampus



九、預實驗結論

本預實驗發現 SAMP8 小鼠進行認知行為能力試驗時，必須給予其較多的訓練次數才能使其產生學習的效果，例如莫氏水迷津每日次數應由一天兩次提升為一天四次；被動迴避試驗給予的電擊需要提高到與大鼠相當的 0.5mA/1sec，並且給予多次電擊。此結果符合 Ohta et al., (1994) 以及 Uenz et al., (1994) 在 SAMP8 小鼠中發現其對於短期記憶缺損及被動迴避試驗中需要較強的刺激。本研究預實驗也針對 SAMP8 小鼠進行驚跳反應之恐懼增益作業 (fear-potentiated startle)，但由於本試驗高度依賴 SAMP8 小鼠的聽覺能力，而 Saitoh et al., (1994) 中提及 SAM 品系小鼠有隨著老化而聽力下降的趨勢，而由本研究結果發現，SAMP8 小鼠確實無法在試驗中觀察出顯著的差異與典型的小鼠反應，故推測 SAMP8 小鼠不適合進行此類需要高度依賴聽力的學習記憶能力試驗。而本預實驗也成功建立組織免疫染色方法針對 SAMP8 小鼠腦部的類澱粉胜肽的測定。

附錄三、AIN93M 飼料打錠結果



圖七十一、完成打錠後之 AIN-93M 飼料。

(A)與(B)為含 500mg/kg diet curcumin 之 AIN-93M 飼料；(C)與(D)為含 500mg/kg diet Z-ligustilide 之 AIN-93M 飼料由於內含 sesamol 之飼料與含 Z-ligustilide 飼料相似，照片省略；(E)與(F)為經 SAMP8 小鼠啃食後的剩餘飼料，顯示經本研究之造粒與打錠程序，其不會因為短時間擺放或是啃食後而崩解，以利做為動物飼料與測定攝食量。

附錄四、芝麻酚於 AIN-93M 飼料打錠後之含量測定與 SAMP8 小鼠經長期餵食後其腦部樣品含量測定分析結果

活性成份殘留量鑑定分析

A. 含芝麻酚 AIN-93M diet 萃取與分析方法

<萃取方法>

將兩克配製完成的 AIN-93M 飼料使用研鉢中磨碎，並使用三十網目過篩，統一粉末大小，置於五十毫升離心管後，加入五毫升甲醇，以超音波震盪十分鐘並 Vortex 萃取一分鐘，此步驟重複兩次。萃取完成後，使用以 3000 rpm 離心十分鐘，取上清液，補回五毫升體積後，使用 .45 μ m 過濾膜過濾，並置於-20 過濾保存待分析。

<分析方法>

使用高效能液相層析系統(HPLC system)分析。

紫外線偵測器(UV-Vis detector): Model L-7420 (Hitachi 公司)

分離管柱: Phenomenex Luna C18 (4.6 mm id x 250 mm, 5 μ m particle size)

偵測波長: 290 nm

注射量: 20 μ L

沖提條件: Isocratic condition: water: MeOH=40:60 (v/v)

流速: 1 mL/min

管柱壓力維持在 150~158 MPa

B. SAMP8 小鼠經長期餵食後，腦部原形態芝麻酚含量測定方法

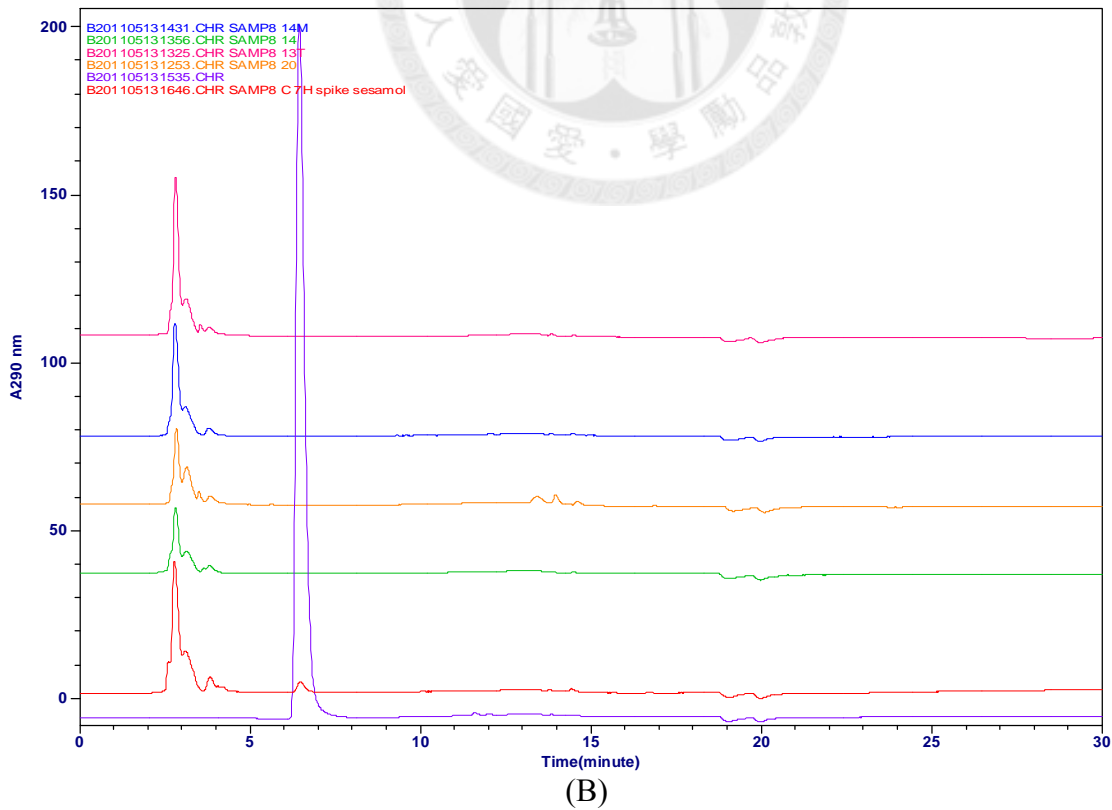
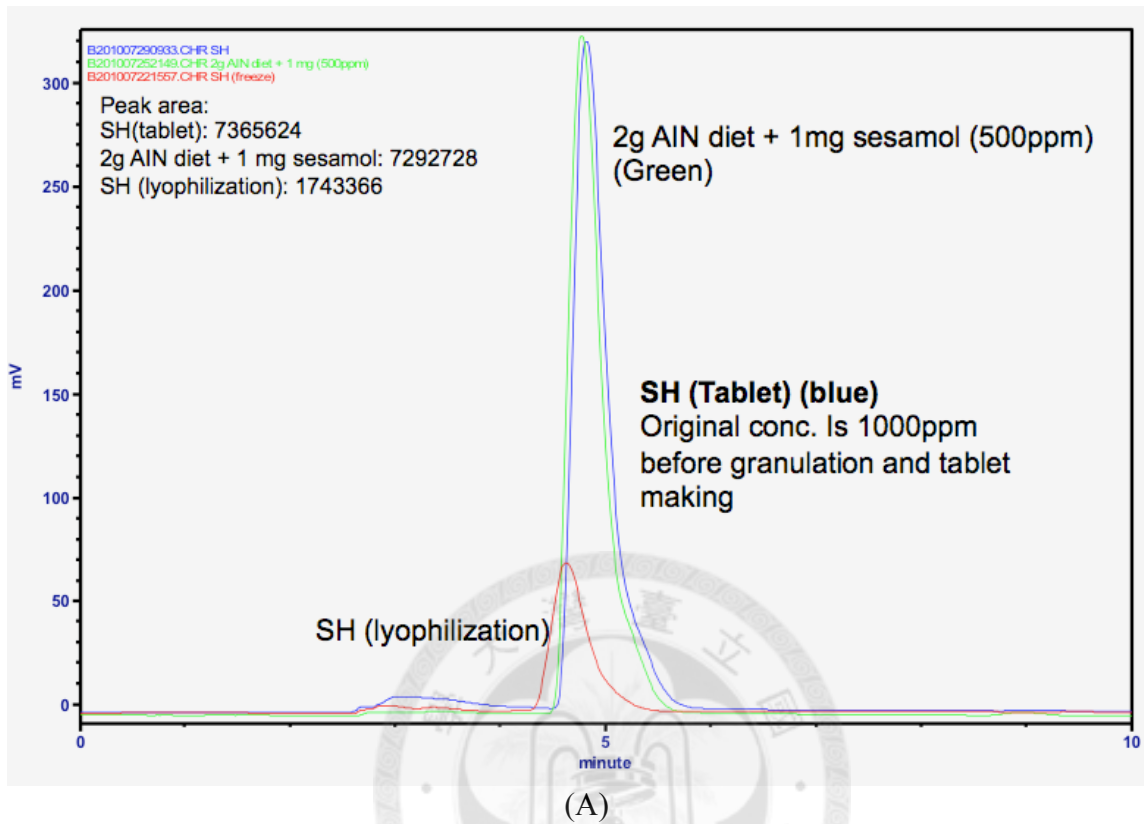
<SAMP8 腦組織萃取方法>

1. 秤取腦組織。
2. 加入等倍重量的生理蒸餾水。
3. 以細胞破碎機以 30 力道均質十秒。
4. 加入兩倍體積 Acetonitrile 沈澱蛋白質。
5. 離心 10000rpm，十分鐘。
6. 取上清液。
7. 使用氮氣吹乾。
8. 加入一毫升 NaOAc 回溶，並過 0.45 μ m 濾膜。
9. 使用 HPLC 分析。

<分析方法>

1. HPLC 方法參照分析飼料中芝麻酚方法。

2. 沖提溶劑改為：Methanol / H₂O = 50:50 (v/v)，在五分鐘內線性增加至 Methanol / H₂O = 80:20 (v/v)，十分鐘內線性增加至 Methanol / H₂O = 100:0 (v/v)；1 mL/min；檢測波長：290 nm。



圖七十二、(A) 添加兩倍量 sesamol 打錠後之芝麻酚含量測定。
 (B) SAMP8 小鼠餵食芝麻酚 15 週後，以 HPLC 分析腦部芝麻酚含量。

附錄五、使用本研究建立之組織免疫染色法針對約七月齡 J20、B6 小鼠以及 SAMR1 小鼠腦部染色結果

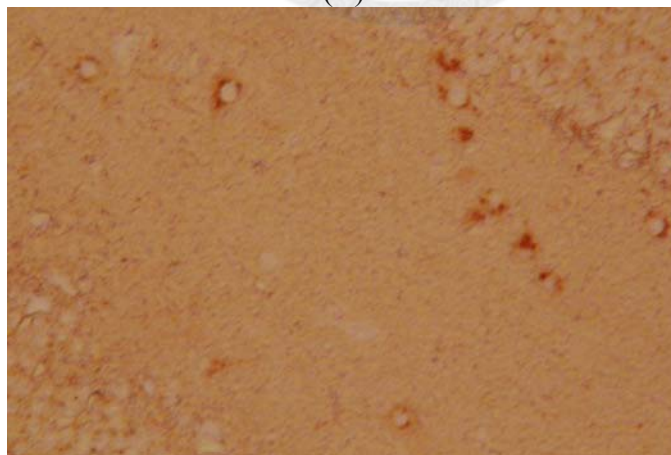
SAMR1 小鼠由靜宜大學食品營養系詹吟菁教授提供；J20 與 B6 小鼠由陽明大學腦科學研究所鄭菡若教授提供。



(A)



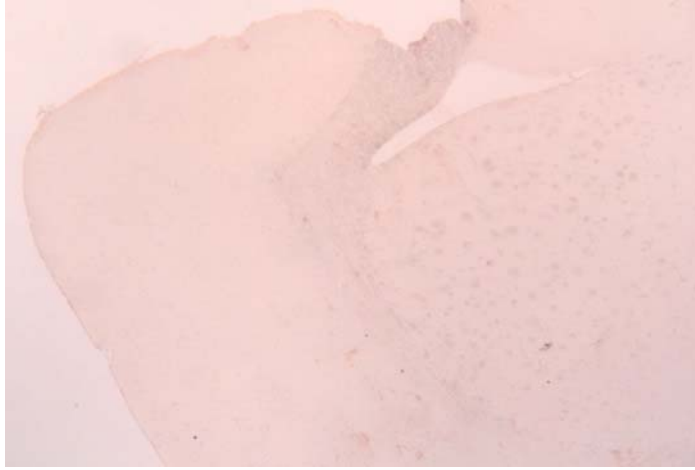
(B)



(C)

圖七十三、使用 6E10 抗體針對約七月齡 J20 小鼠腦部切片染色結果

Figure 73. Beta-amyloid staining with 6E10 antibody in the J20 mice's brain.



(A)

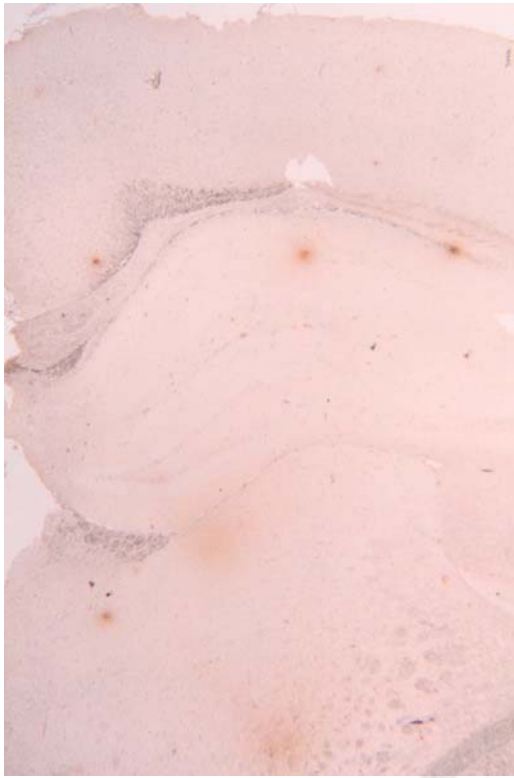


(B)

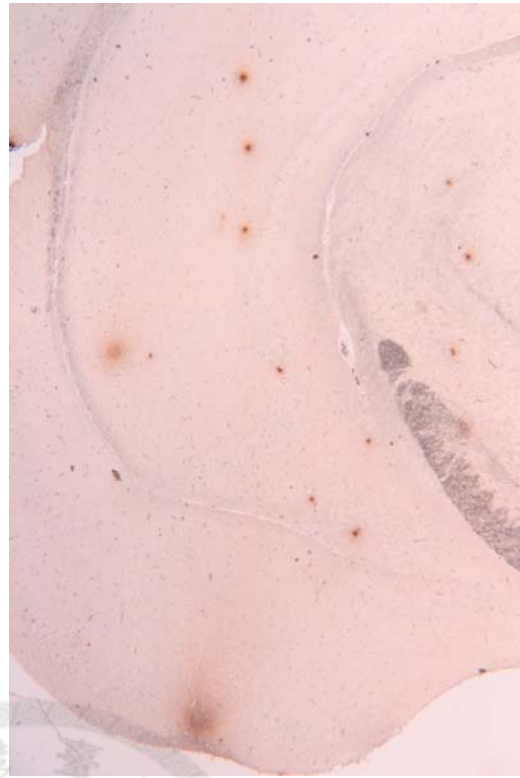


(C)

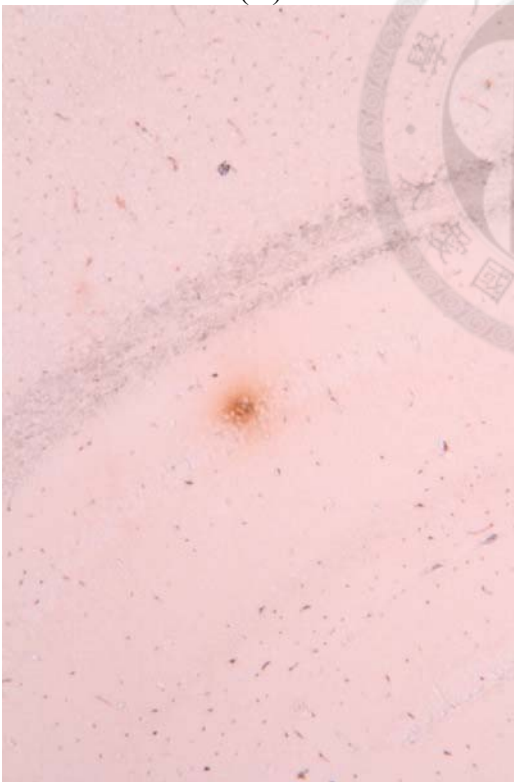
圖七十四、使用 6E10 抗體針對約七月齡 B6 小鼠腦部切片染色結果
Figure 74. Beta-amyloid staining with 6E10 antibody in the B6 mice's brain.



(A)



(B)

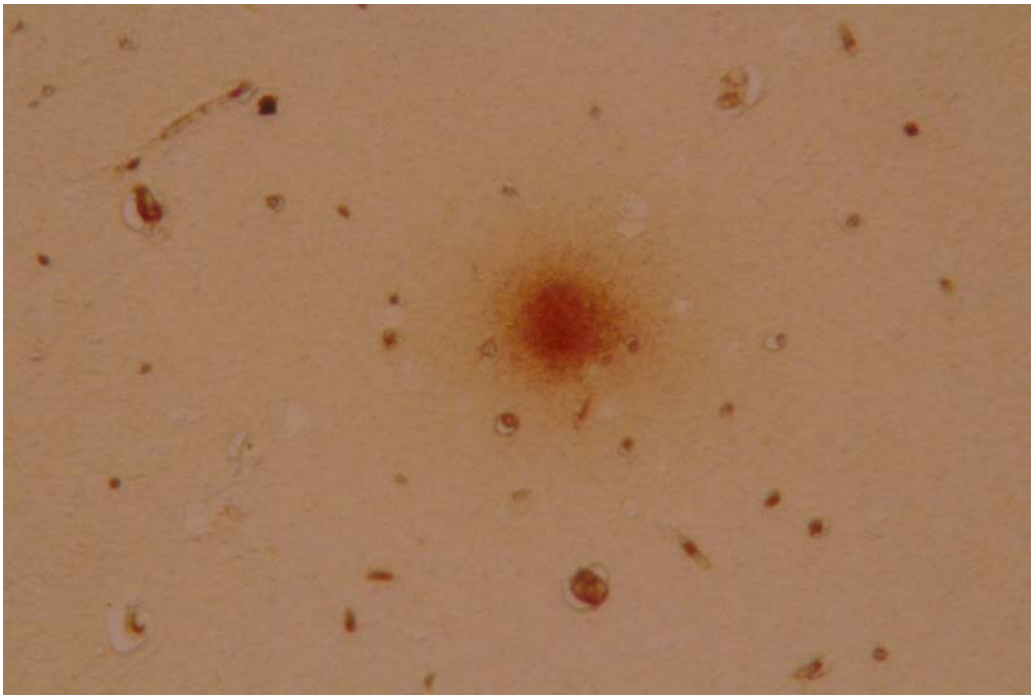


(C)



(D)

圖七十五、使用 6E10 抗體針對九月齡 SAMR1 小鼠腦部切片染色結果
Figure 75. Beta-amyloid staining with 6E10 antibody in the SAMR1 mice's brain.



(A)

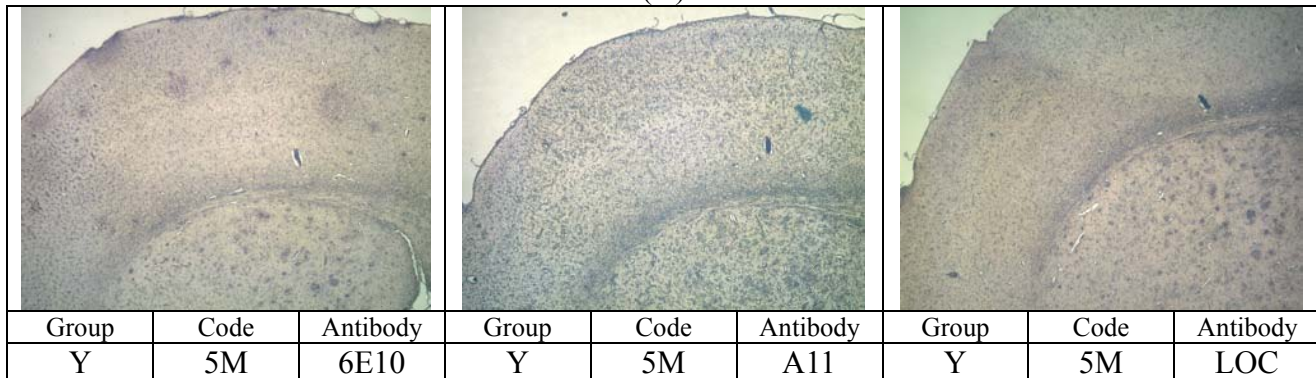


(B)

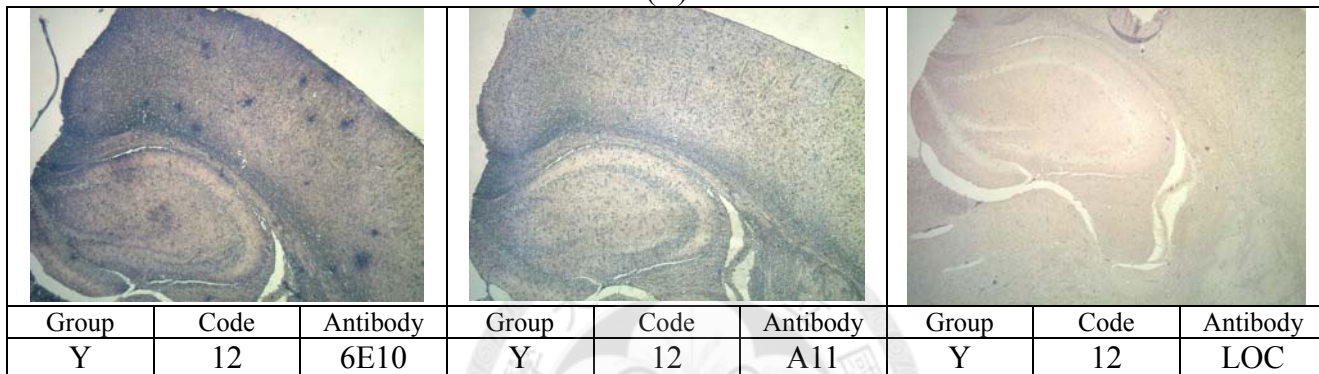
圖七十六、使用 6E10 抗體針對九月齡 SAMR1 小鼠腦部切片染色結果(局部放大圖)
Figure 76. Details of beta-amyloid staining with 6E10 antibody in the SAMR1 mice brain.

附錄六、使用 6E10, A11 與 LOC 抗體針對十月齡 SAMP8 小鼠腦部切片染色比較

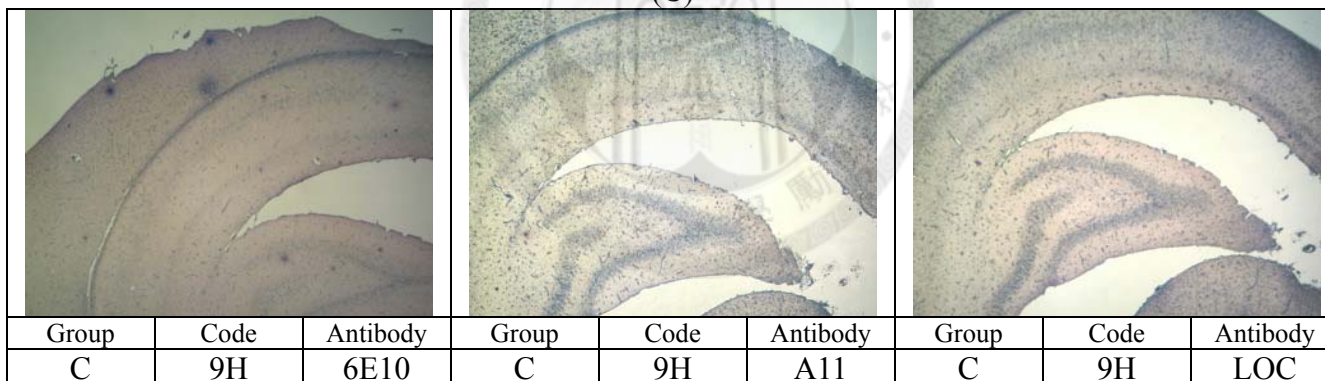
(A)



(B)

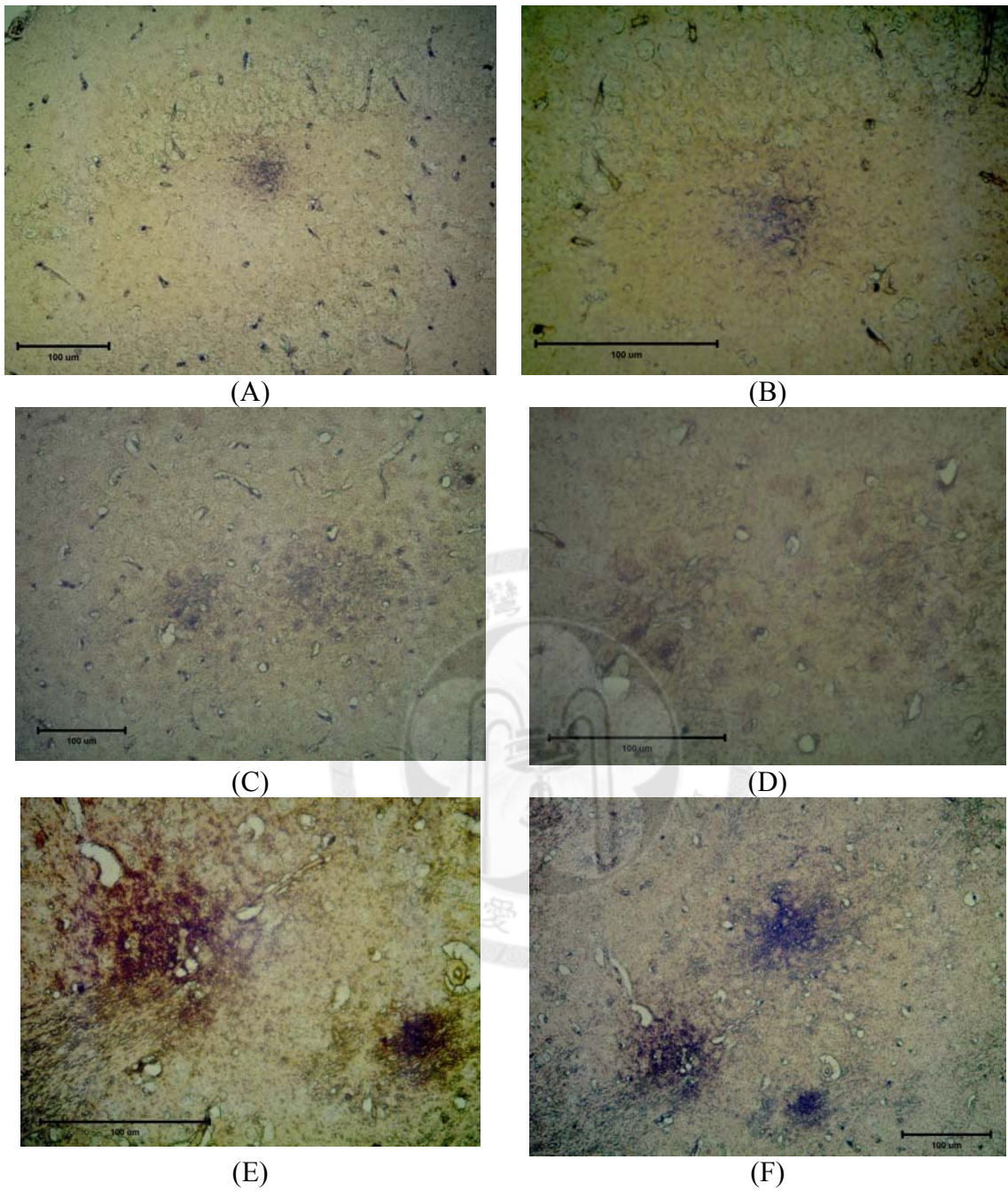


(C)



圖七十七、使用 6E10, A11 與 LOC 抗體針對十月齡 SAMP8 小鼠腦部切片染色比較
Figure 77. The comparison among beta-amyloid staining with 6E10, A11 and LOC on the 10-month-old SAMP8 mice's brain.

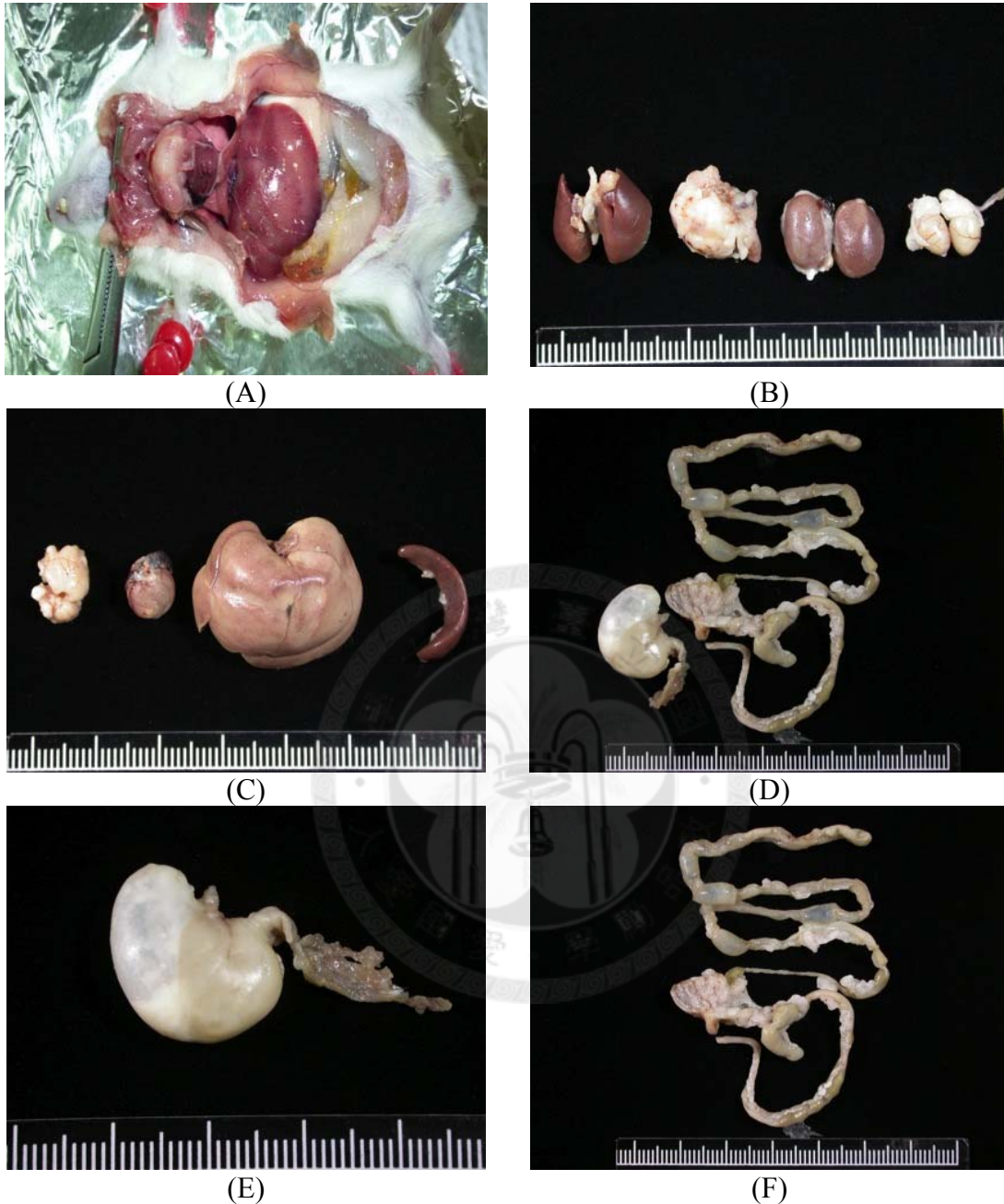
附錄七、使用 6E10 抗體針對十月齡 SAMP8 小鼠腦部切片染色 beta amyloid cluster 形態圖



圖七十八、使用 6E10 抗體針對十月齡 SAMP8 小鼠腦部切片染色 beta amyloid cluster 形態

Figure 78. Details of beta-amyloid staining with 6E10 antibody in the SAMP8 mice's brain.

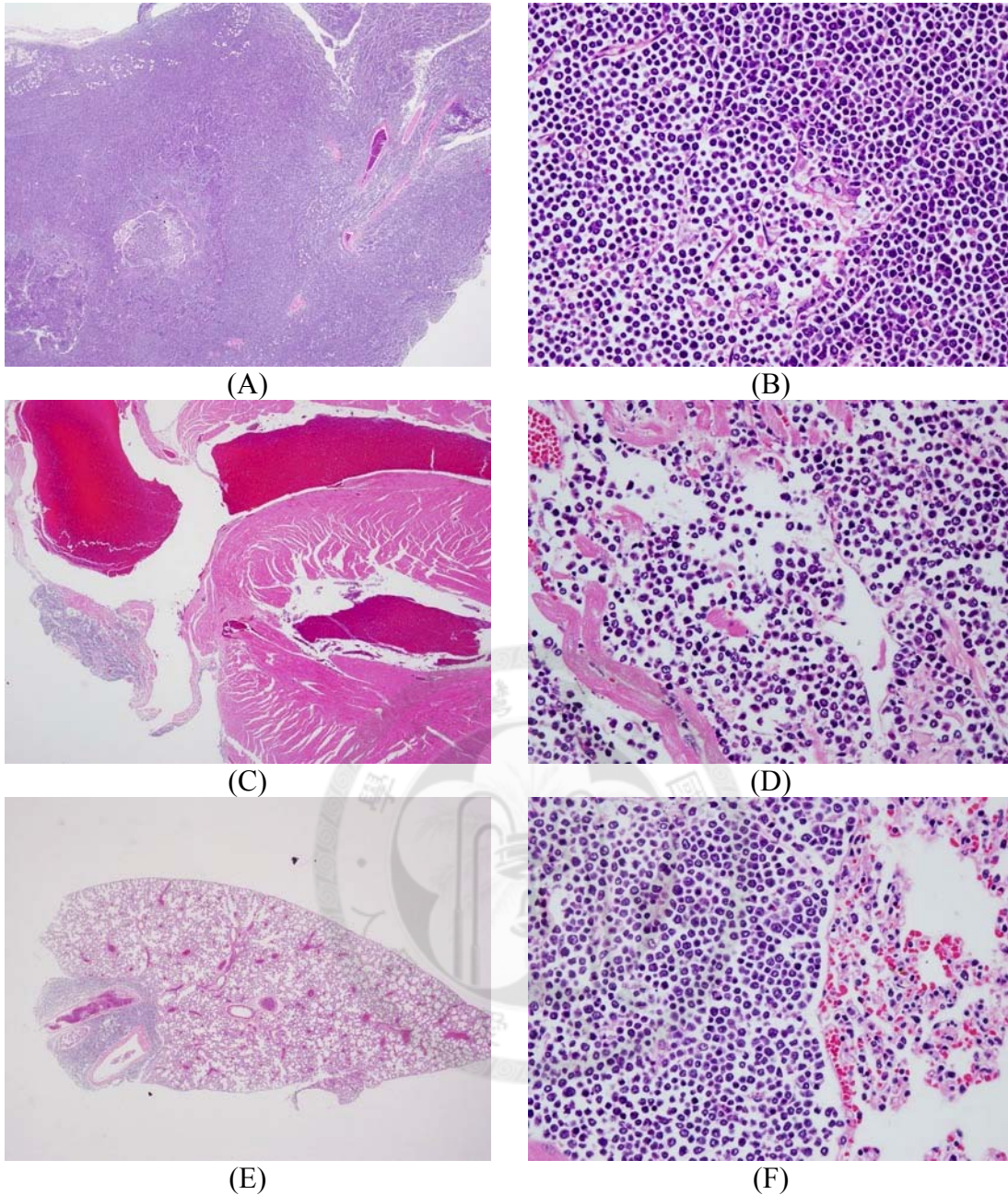
附錄八、SAMP8 小鼠於實驗期間意外死亡後之病理分析
(以控制組 SAMP8 小鼠為例，老鼠編號為 7T，死亡日期:2010/09/05)
(此部份照片由國立中興大學獸醫病理所廖俊旺老師拍攝)



圖七十九、死亡之 SAMP8 小鼠器官照片。

由此可發現明顯的胸腺瘤，胸腺與脾臟的腫大(A and B)；胃的腫脹(D and E)；小腸則沒有觀察到明顯病變(F)。

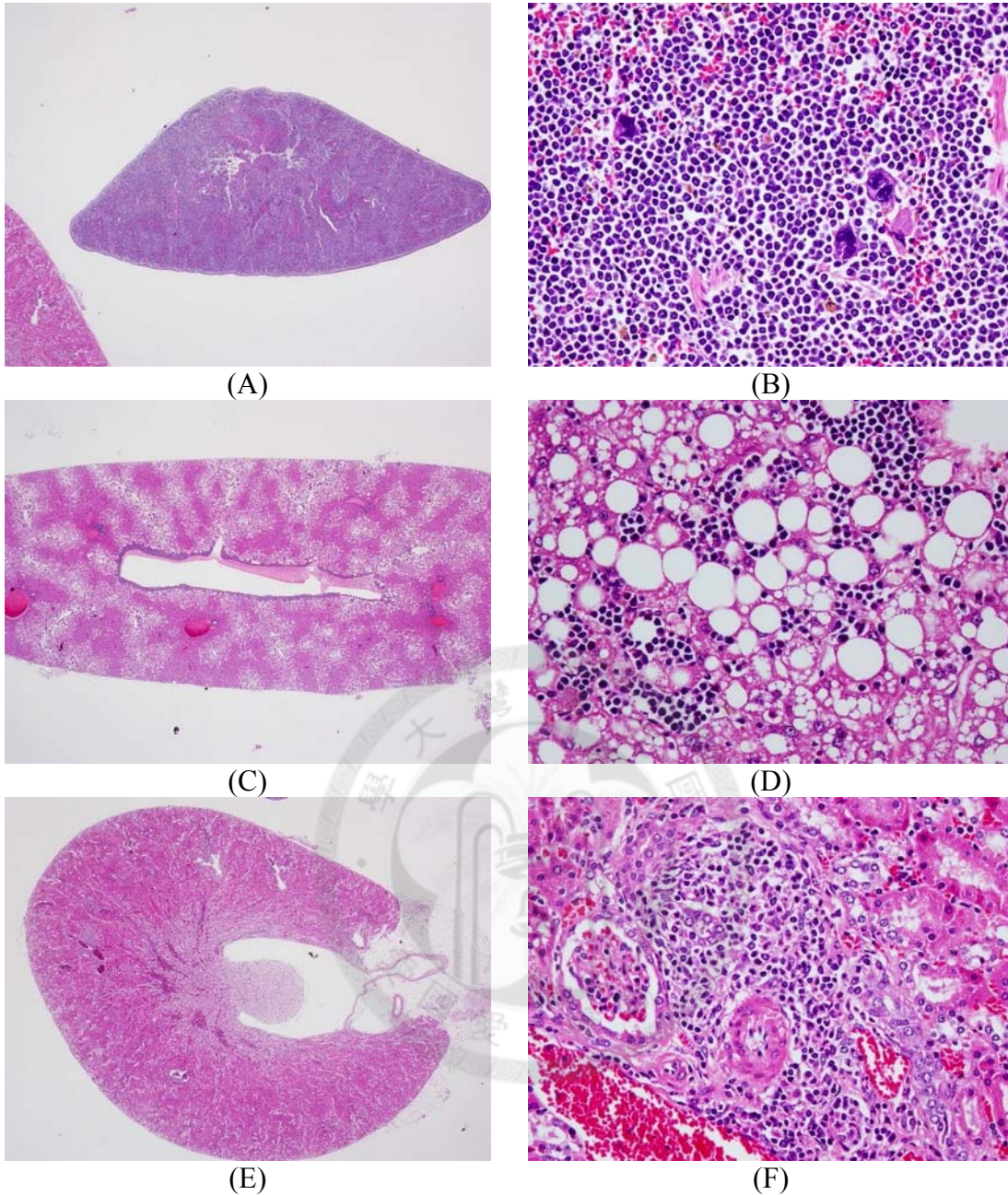
Figure 79. Gross findings of organs in a thymoma SAMP8 mouse. Marked enlargement of thymus and spleen (A and B) and distention of stomach (D and E) were found in mouse. No gross lesion was noted in the intestinal (F).



圖八十、針對死亡之 SAMP8 小鼠進行病理分析。

有此可發現於胸腺中可以觀察到淋巴樣細胞浸潤(A and B)；心臟也可發現腫瘤細胞轉移(C and D)；肺臟細胞也可發現腫瘤細胞(E and F)。

Figure 80. Histopathological findings of thymoma in a SAMP8 mouse. Diffuse severe/high lymphoid cell infiltration was found in thymus (A. 20x, B. 400x), tumor cells also metastatsis to adjective lymphoid tissues of heart (C. 40x, D. 400x), lung (E. 40x, F. 400x).H&E stain.



圖八十一、針對死亡的 SAMP8 小鼠進行病理分析。

由此可發現脾臟中發現有腫瘤細胞轉移(A and B)；肝臟有脂肪代謝問題(C and D)；
腎臟中發現有腫瘤細胞(E and F)

Figure 81. Histopathological findings of thymoma in a SAMP8 mouse. Tumor cells also metastatsis to spleen (A. 40x, B. 400x), liver with spontaneous fatty change related to aging (C. 40x, D. 400x), and kidney (E. 40x, F. 400x).H&E stain.

附錄九、本研究中 SAMP8 小鼠由出生後到犧牲食用之飼料組成比較表

表三十三、AIN-93M 飼料之基本成分組成
Table 34. Proximate composition in AIN-93M diet

Composition of the AIN-93M (For Maintenance of adult rodents):

| Ingredient | Amount |
|------------------------------|----------|
| Casein | 14.0000% |
| Dextrinized Cornstarch | 15.5% |
| Sucrose | 10.0% |
| Corn Starch | 46.5692% |
| Alphacel, Non-Nutritive Bulk | 5.0% |
| Soybean Oil | 4.0% |
| AIN-93M Mineral Mix | 3.5% |
| L-Cystine | 0.18% |
| AIN-93-VX Vitamin Mix | 1.0% |
| Choline bitartrate | 0.25% |
| tert-Butylhydroquinone | 0.0008% |

AIN-93M Mineral Mix (For maintenance of adult rodents. Not Available in Pellet Form):

| Ingredient | Amount |
|---|-----------|
| Calcium Carbonate | 35.7% |
| Monopotassium phosphate | 25.0% |
| Potassium Citrate monohydrate | 2.8% |
| Sodium Chloride | 7.4% |
| Potassium Sulfate | 4.66% |
| Magnesium Oxide | 2.4% |
| Ferric Citrate | 0.606% |
| Zinc Carbonate | 0.165% |
| Manganese Carbonate | 0.063% |
| Copper Carbonate | 0.03% |
| Potassium Iodate | 0.001% |
| Sodium Selenate, Anhydrous | 0.001025% |
| Ammonium Molybdate.4H ₂ O | 0.000795% |
| Sodium Metasilicate.9H ₂ O | 0.145% |
| Chromium Potassium Sulfate.12H ₂ O | 0.0275% |
| Lithium Chloride | 0.00174% |
| Boric Acid | 0.00815% |
| Sodium Fluoride | 0.00635% |
| Nickel Carbonate | 0.00318% |
| Ammonium Vanadate | 0.00066% |
| Powdered Sugar | 20.9806% |

AIN-93-VX Vitamin Mix (Not Available in Pellet Form):

| Ingredient | Amount (gm/kg) |
|---|----------------|
| Nicotinic Acid | 3.00 |
| D-Calcium Pantothenate | 1.60 |
| Pyridoxine HCl | 0.70 |
| Thiamine HCl | 0.60 |
| Riboflavin | 0.60 |
| Folic Acid | 0.20 |
| D-Biotin | 0.02 |
| Vitamin B ₁₂ (0.1% triturated in mannitol) | 2.50 |
| α-Tocopherol Powder (250 U/gm) | 30.00 |
| Vitamin A Palmitate (250,000 U/gm) | 1.60 |
| Vitamin D ₃ (400,000 U/gm) | 0.25 |
| Phylloquinone | 0.075 |
| Powdered Sucrose | 959.655 |

表三十四、Lab Diet 5001 飼料之基本成分組成
Table 35. Proximate composition in Lab Diet 5001 diet

| Laboratory Rodent Diet | | 5001* |
|---|-------------|---|
| C H E M I C A L C O M P O S I T I O N ¹ | | |
| Nutrients² | | |
| Protein, % | 23.9 | Sulfur, % 0.36 |
| Arginine, % | 1.41 | Sodium, % 0.40 |
| Cystine, % | 0.31 | Chlorine, % 0.67 |
| Glycine, % | 1.21 | Fluorine, ppm 16 |
| Histidine, % | 0.57 | Iron, ppm 270 |
| Isoleucine, % | 1.14 | Zinc, ppm 79 |
| Leucine, % | 1.83 | Manganese, ppm 70 |
| Lysine, % | 1.41 | Copper, ppm 13 |
| Methionine, % | 0.67 | Cobalt, ppm 0.90 |
| Phenylalanine, % | 1.04 | Iodine, ppm 1.0 |
| Tyrosine, % | 0.71 | Chromium, ppm 1.2 |
| Threonine, % | 0.91 | Selenium, ppm 0.30 |
| Tryptophan, % | 0.29 | |
| Valine, % | 1.17 | Vitamins |
| Serine, % | 1.19 | Carotene, ppm 2.3 |
| Aspartic Acid, % | 2.81 | Vitamin K (as menadione), ppm . 1.3 |
| Glutamic Acid, % | 4.37 | Thiamin Hydrochloride, ppm . . 16 |
| Alanine, % | 1.43 | Riboflavin, ppm 4.5 |
| Proline, % | 1.49 | Niacin, ppm 120 |
| Taurine, % | 0.02 | Pantothenic Acid, ppm 24 |
| Fat (ether extract), % | 5.0 | Choline Chloride, ppm 2250 |
| Fat (acid hydrolysis), % | 5.7 | Folic Acid, ppm 7.1 |
| Cholesterol, ppm | 200 | Pyridoxine, ppm 6.0 |
| Linoleic Acid, % | 1.22 | Biotin, ppm 0.30 |
| Linolenic Acid, % | 0.10 | B ₁₂ , mcg/kg 50 |
| Arachidonic Acid, % | <0.01 | Vitamin A, IU/gm 15 |
| Omega-3 Fatty Acids, % | 0.19 | Vitamin D ₃ (added), IU/gm 4.5 |
| Total Saturated Fatty Acids, % . 1.56 | | Vitamin E, IU/kg 42 |
| Total Monounsaturated | | Ascorbic Acid, mg/gm — |
| Fatty Acids, % | 1.60 | |
| Fiber (Crude), % | 5.1 | Calories provided by: |
| Neutral Detergent Fiber, % 15.6 | | Protein, % 28.507 |
| Acid Detergent Fiber ⁴ , % 6.7 | | Fat (ether extract), % 13.496 |
| Nitrogen-Free Extract | | Carbohydrates, % 57.996 |
| (by difference), % | 48.7 | *Product Code |
| Starch, % | 31.9 | 1. Formulation based on calculated values from the latest ingredient analysis information. Since nutrient composition of natural ingredients varies and some nutrient loss will occur due to manufacturing processes, analysis will differ accordingly. |
| Glucose, % | 0.22 | 2. Nutrients expressed as percent of ration except where otherwise indicated. Moisture content is assumed to be 10.0% for the purpose of calculations. |
| Fructose, % | 0.30 | 3. NDF = approximately cellulose, hemi-cellulose and lignin. |
| Sucrose, % | 3.70 | 4. ADF = approximately cellulose and lignin. |
| Lactose, % | 2.01 | 5. Physiological Fuel Value (kcal/gm) = Sum of decimal fractions of protein, fat and carbohydrate (use Nitrogen Free Extract) x 4,9,4 kcal/gm respectively. |
| Total Digestible Nutrients, % . 76.0 | | |
| Gross Energy, kcal/gm 4.07 | | |
| Physiological Fuel Value⁵, | | |
| kcal/gm | 3.36 | |
| Metabolizable Energy, | | |
| kcal/gm | 3.02 | |
| Minerals | | |
| Ash, % | 7.0 | |
| Calcium, % | 0.95 | |
| Phosphorus, % | 0.66 | |
| Phosphorus (non-phytate), % . . 0.39 | | |
| Potassium, % | 1.18 | |
| Magnesium, % | 0.21 | |

LabDiet
www.labdiet.com

表三十五、福壽牌飼料之基本成分組成
Table 36. Proximate composition in Fu-Sow diet

福壽實驗鼠飼料營養成份

2011.01.01

| 項目 | 含量(%) |
|-------------|-----------|
| 粗蛋白 | 23.5 |
| 粗脂肪 | 4.8 |
| 粗纖維 | 3.8 |
| 灰份 | 6.5 |
| 水份 | 11 |
| 無氮抽出物 | 50.4 |
| 鈣 | 0.95~1.05 |
| 磷 | 0.70~0.8 |
| ME(Kcal/kg) | 3100 |

| 胺基酸 | 含量(%) |
|------------|-------|
| alanine | 0.99 |
| arginine | 1.38 |
| cystine | 0.38 |
| glycine | 1.20 |
| histidine | 0.60 |
| isoleucine | 1.05 |
| leucine | 1.80 |
| lysine | 1.25 |
| methionine | 0.43 |
| serine | 1.14 |
| threonine | 0.86 |
| tryptophan | 0.27 |
| tyrosine | 0.66 |
| valine | 1.10 |

| 維生素 | 含量 |
|------------------|-------------|
| vit A | 16000 IU/kg |
| vit D | 3300 IU/kg |
| vit E | 66 IU/kg |
| vit K | 2 mg/kg |
| vit B1 | 20 mg/kg |
| vit B2 | 10 mg/kg |
| vit B6 | 10 mg |
| vit B12 | 60 mcg/kg |
| niacin | 100 ppm |
| choline | 2200 ppm |
| folic acid | 3 ppm |
| pantothenic acid | 25 ppm |
| biotin | 0.5 ppm |

| 礦物質 | 含量 |
|-----|-------------|
| 鈣 | 0.95~1.05 % |
| 磷 | 0.70~0.80 % |
| 鈉 | 0.33% |
| 鉀 | 0.80% |
| 鎂 | 0.20% |
| 鋅 | 85 ppm |
| 銅 | 20 ppm |
| 鐵 | 250 ppm |
| 錳 | 100 ppm |
| 碘 | 0.9 ppm |
| 鈷 | 0.63 ppm |
| 硒 | 0.3 ppm |

附錄十、本研究針對 SAMP8 小鼠腦部組織切片 Thioflavine-S 染色方法

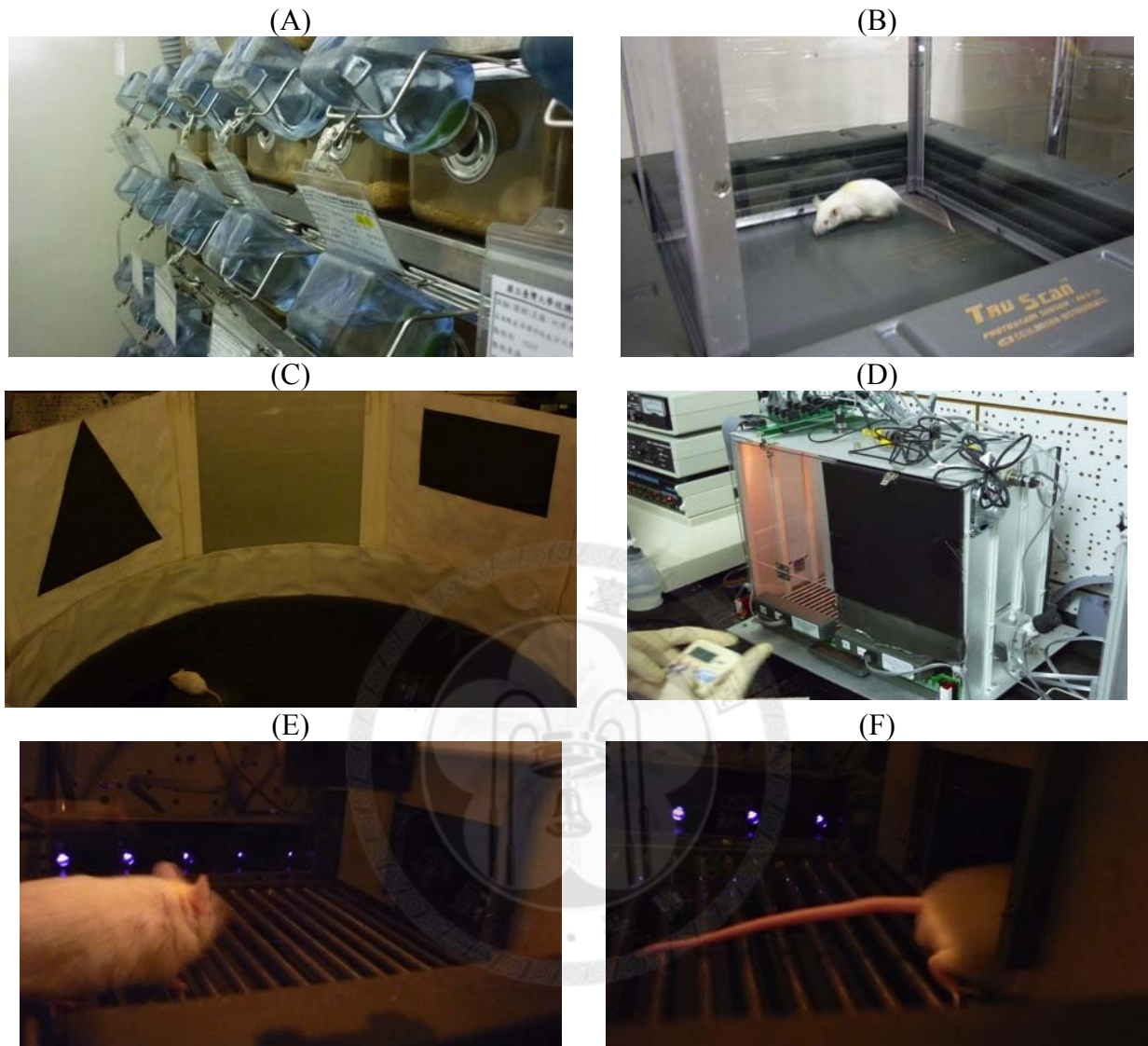
本步驟參考 Guntern et al., (1992)與 Modified thioflavin S for senile plaques (amyloid) in staining manual- nerve tissue.

1. 使用 xylene, alcohol 與水脫蠟，參考材料與方法組織切片免疫染色步驟。
2. 以 0.25% Potassium permanganate (0.25g KMnO_4 in 100 mL water)浸漬組織 20 分鐘。
3. 使用去離子水浸漬組織五分鐘。
4. 使用 Bleaching solution(1g Potassium metabisulfite, 1g oxalic acid in 100 mL water)浸漬組織兩分鐘。
5. 使用去離子水浸漬組織五分鐘。
6. Blocking 20 分鐘。
7. 使用去離子水浸漬組織五分鐘。
8. 使用 0.25% acetic acid 浸漬組織五秒鐘。
9. 使用去離子水浸漬組織五分鐘。
10. 在避光下，使用 1% Thioflavin S (Sigma, St. Louis, USA)浸漬組織五分鐘。
11. 使用 50% ethanol 沖洗切片兩次。
12. 使用去離子水沖洗切片兩次。
13. 封片。

實驗結果：

本研究餵食後之 SAMP8 小鼠，經 thioflavine-S 染色後，在螢光顯微鏡下並無法看到染色切片中有受到 Thioflavine-S 嵌合而產生的螢光，推測 SAMP8 小鼠腦部的類澱粉胜肽無法進一步形成 beta-sheet 的 conformation，導致無法看到 Thioflavine-S positive 的結果。Akiguchi et al., (1994), Kawamata et al., (1997)與 Takeda (2009)的研究中也都相繼提及無法在 SAMP8 小鼠腦部中看到使用 Congo red 或是 thioflavine-S 而染色的類澱粉胜肽的結構。Shi et al., (2010)以 gensenoside Rg1 餵食 SAMP8 小鼠，可看到 gensenoside Rg1 對於降低 SAMP8 小鼠腦部中類澱粉胜肽 1-40 片段的趨勢，且在 IHC 染色中可以利用抗體看到類澱粉胜肽在 SAMP8 小鼠腦部的分布，而此研究也發現，thioflavine-S 並無法針對對於抗體有專一性的類澱粉胜肽進行進一步的結合與反應。

附錄十一、本研究中使用動物飼養與行為設定儀器照片

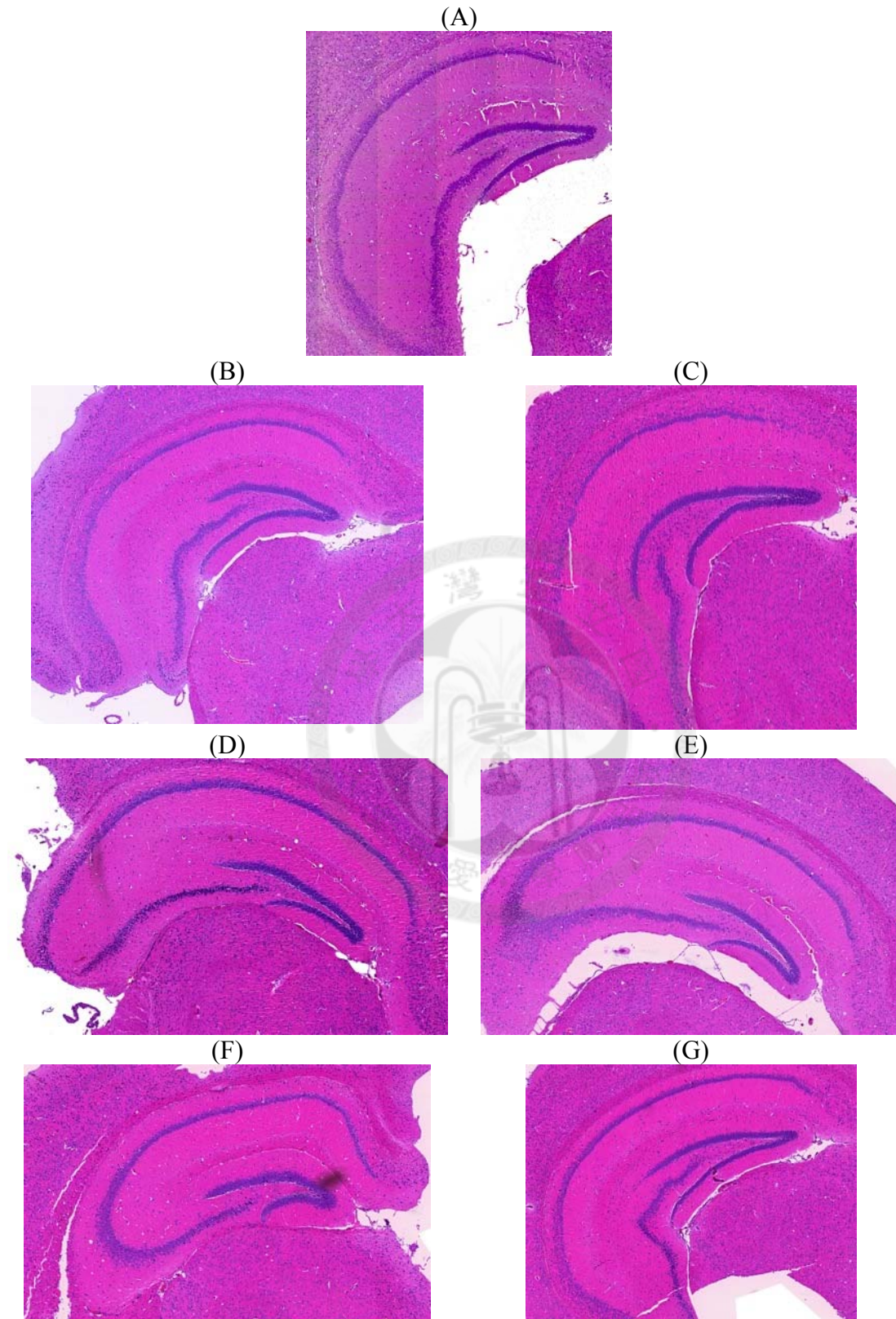


圖八十二、本研究中使用動物飼養與行為設定儀器照片。

(A)、IVC獨立進氣飼養系統；(B)、SAMP8小鼠正在進行活動量測試；(C)、SAMP8小鼠停留於水迷津試驗中平台上，週遭為高對比幾何圖型；(D)、被動迴避試驗儀器；(E)(F)、SAMP8小鼠於亮室中以及穿越活門準備進入暗室之情形。

Figure 82. Photos of IVC system and apparatus for behavior tests in this study. (A) IVC system; (B) a SAMP8 mouse in the open field test.; (C) A SAMP8 mouse is on the platform in the Morris water maze, which is surrounded by high contrast figure.; (D) the apparatus for inhibitory avoidance task. (E)(F) A SAMP8 mouse is in the light room in IA test and entering into dark room.

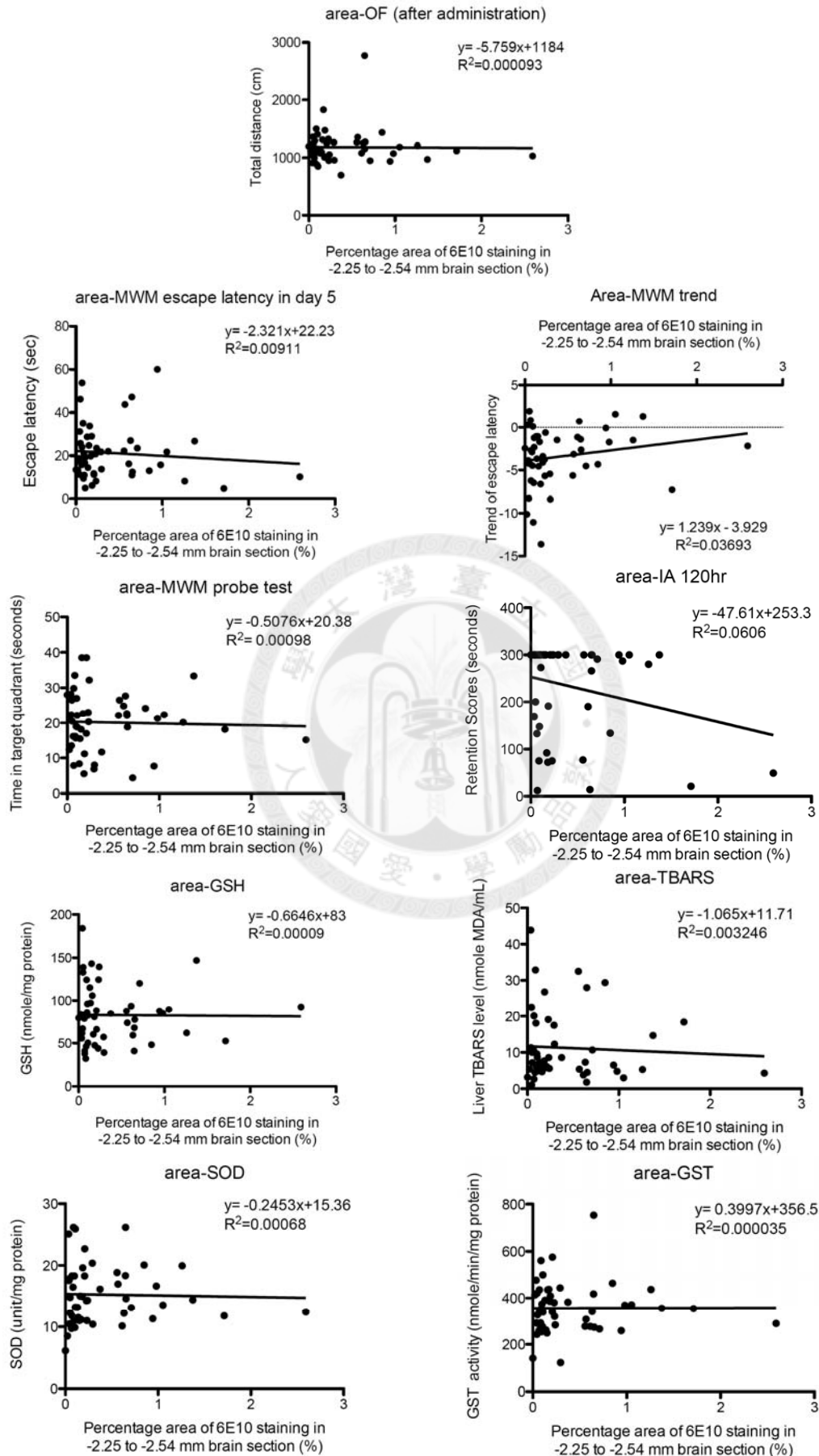
附錄十二、使用 H&E 染色針對 SAMP8 小鼠腦部海馬迴區之組織形態觀察



圖八十三、SAMP8 小鼠腦部海馬迴區組織形態觀察
(A)五月齡 SAMP8 小鼠;(B) 控制組;(C) 薑黃素;(D)低劑量藜本內酯;(E) 高劑量藜本內酯;(F) 低劑量芝麻酚;(G) 高劑量芝麻酚。

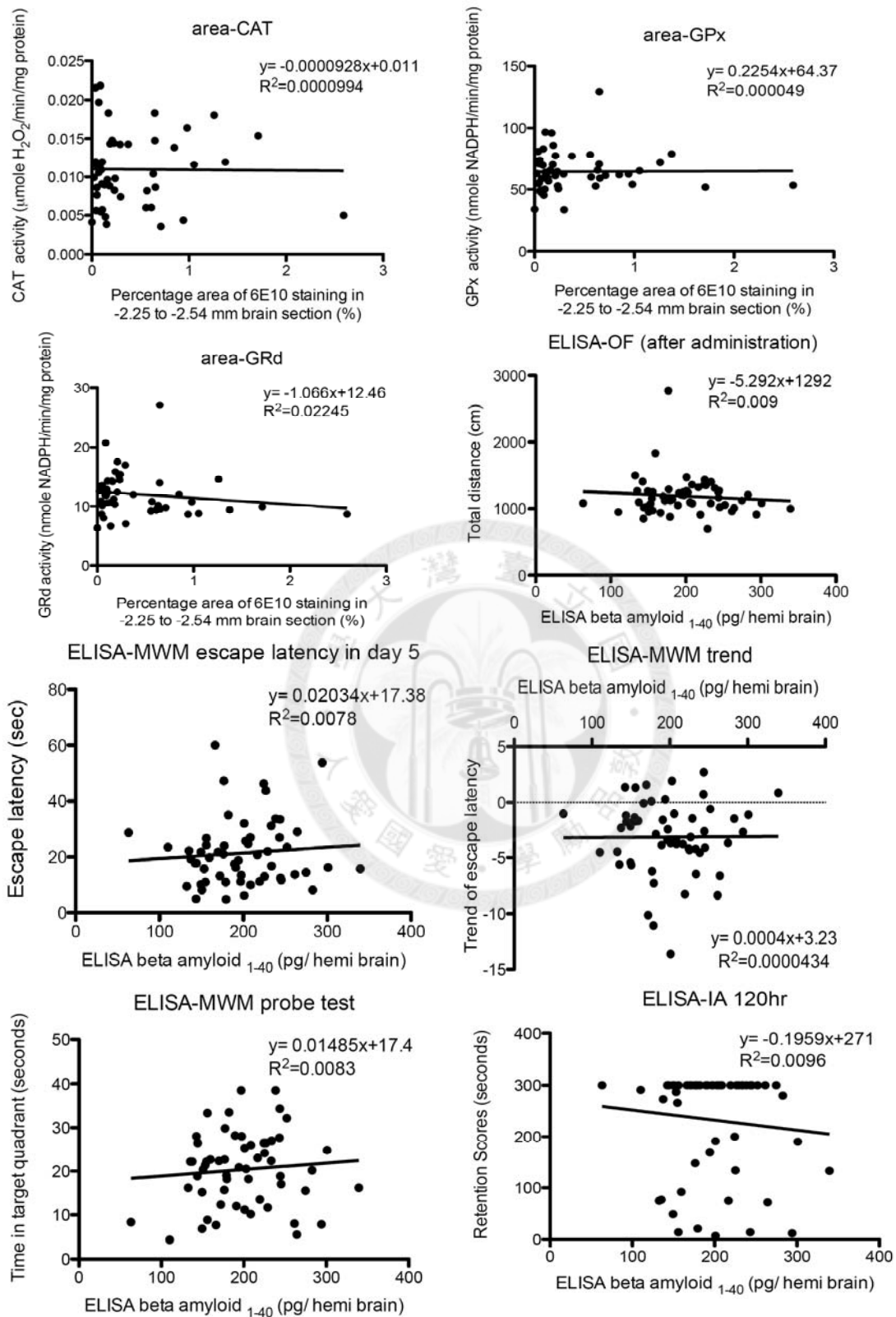
Figure 83 . Morphology of hippocampus in SAMP8 mice's brain. (A)Y; (B) Control; (C) Cur; (D) LL; (E) HL; (F) LS; (G) HS.

附錄十三、本研究中各項實驗的相關性分析



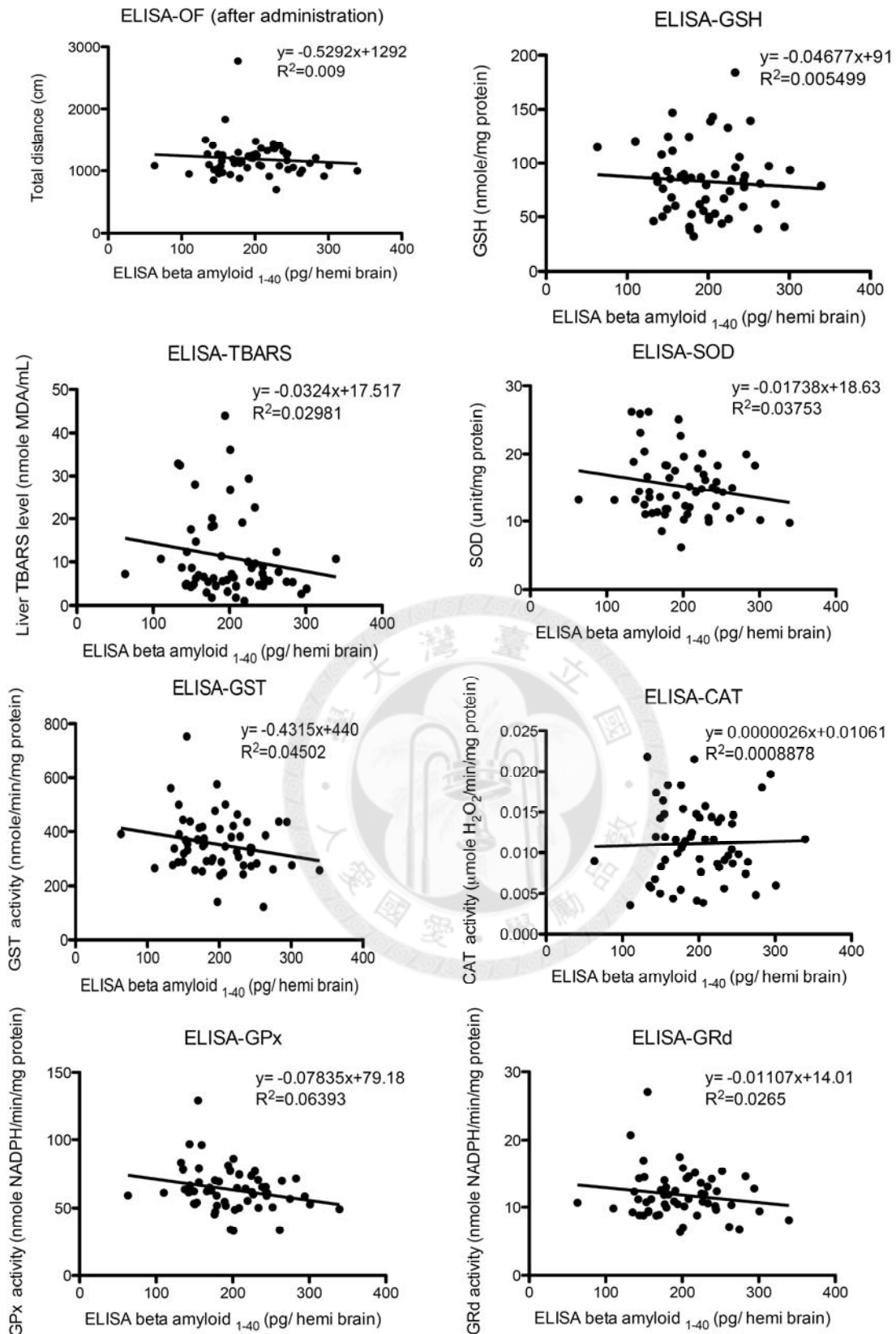
圖八十四、SAMP8 小鼠腦部類澱粉胍肽沉積面積與各項實驗之相關性分析

Figure 84. The correlation of beta amyloid staining area between different parameters in this study (n=57)

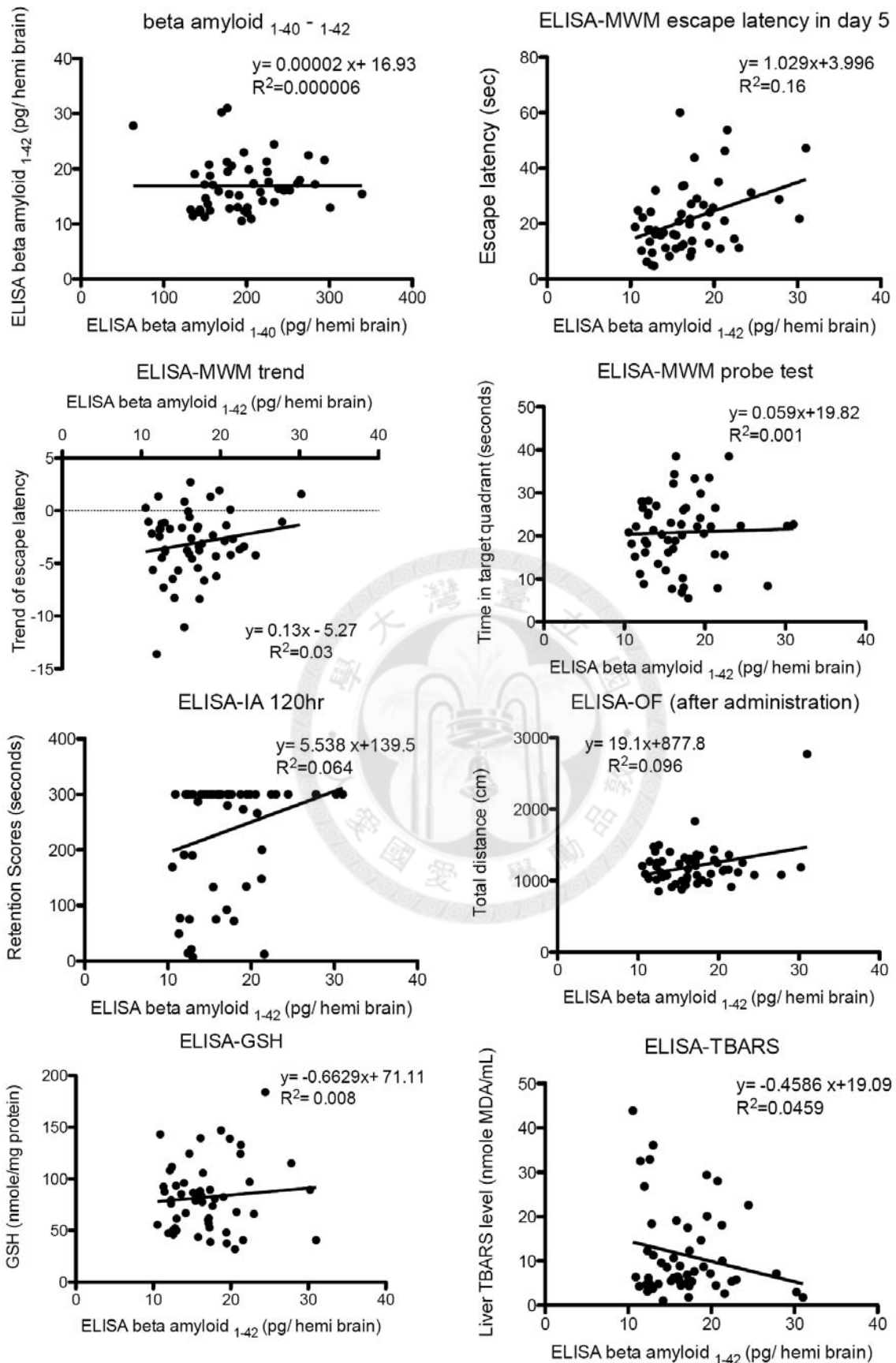


圖八十五、SAMP8 小鼠腦部類澱粉胍肽沉積面積/以 ELISA 偵測類澱粉胍肽 $_{1-40}$ 片段與各項實驗之相關性分析

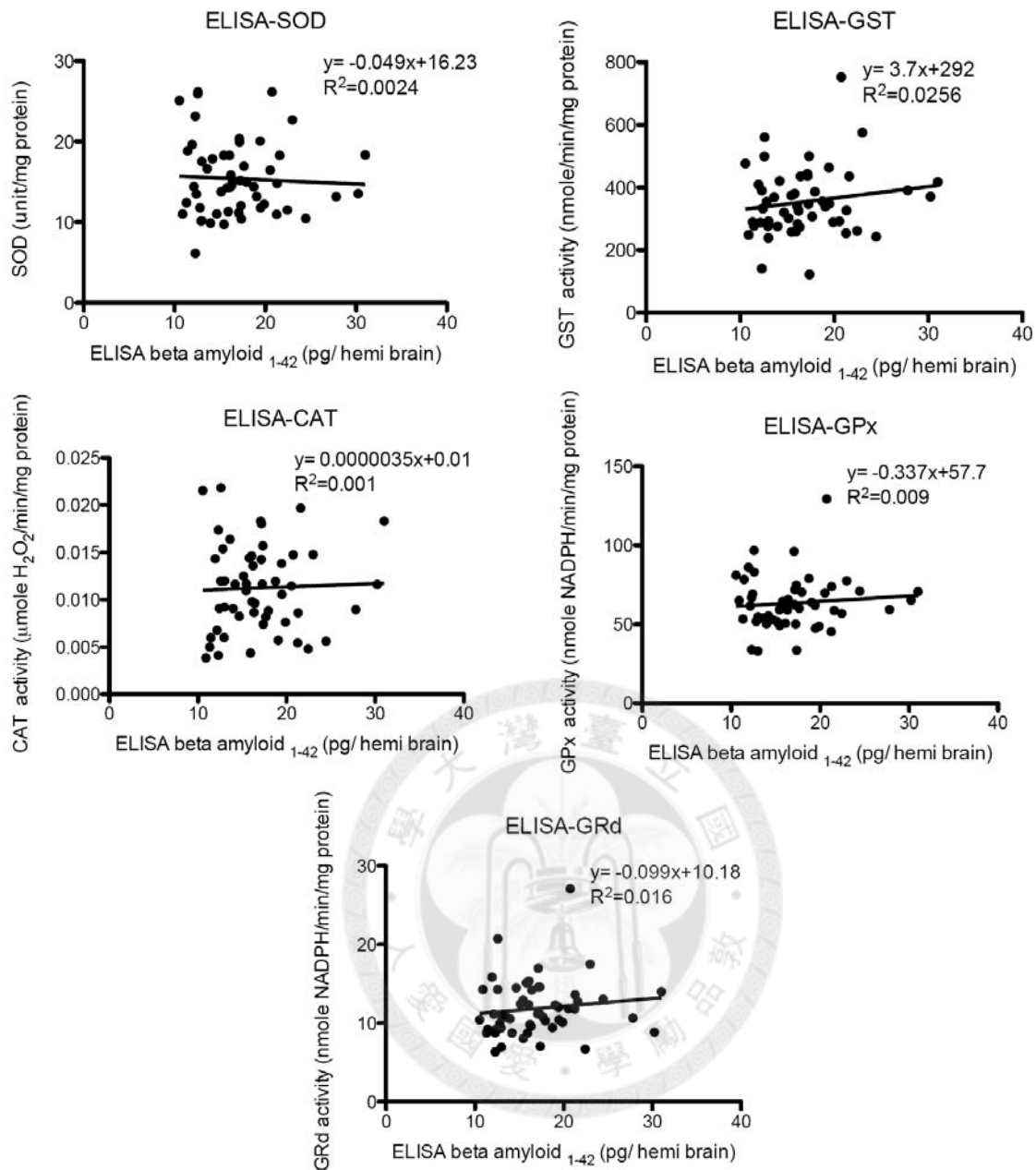
Figure 85. The correlation of beta amyloid staining area / beta amyloid $_{1-40}$ peptide between different parameters in this study (continued) (n=57)



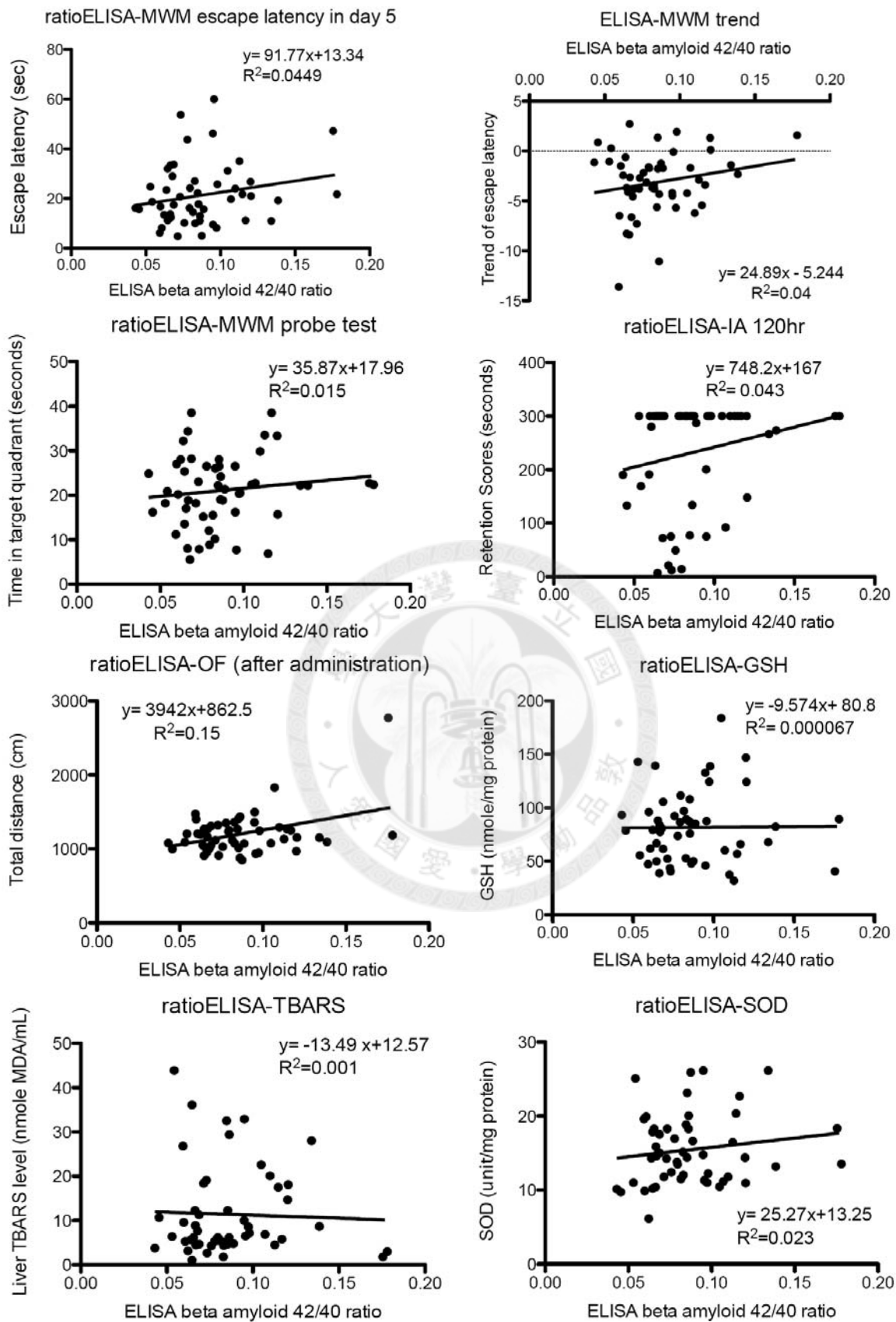
圖八十六、SAMP8 小鼠腦部以 ELISA 偵測類澱粉胜肽₁₋₄₀ 片段與各項實驗之相關性分析
 Figure 86. The correlation of beta amyloid₁₋₄₀ peptide between different parameters in this study (continued) (n=57)



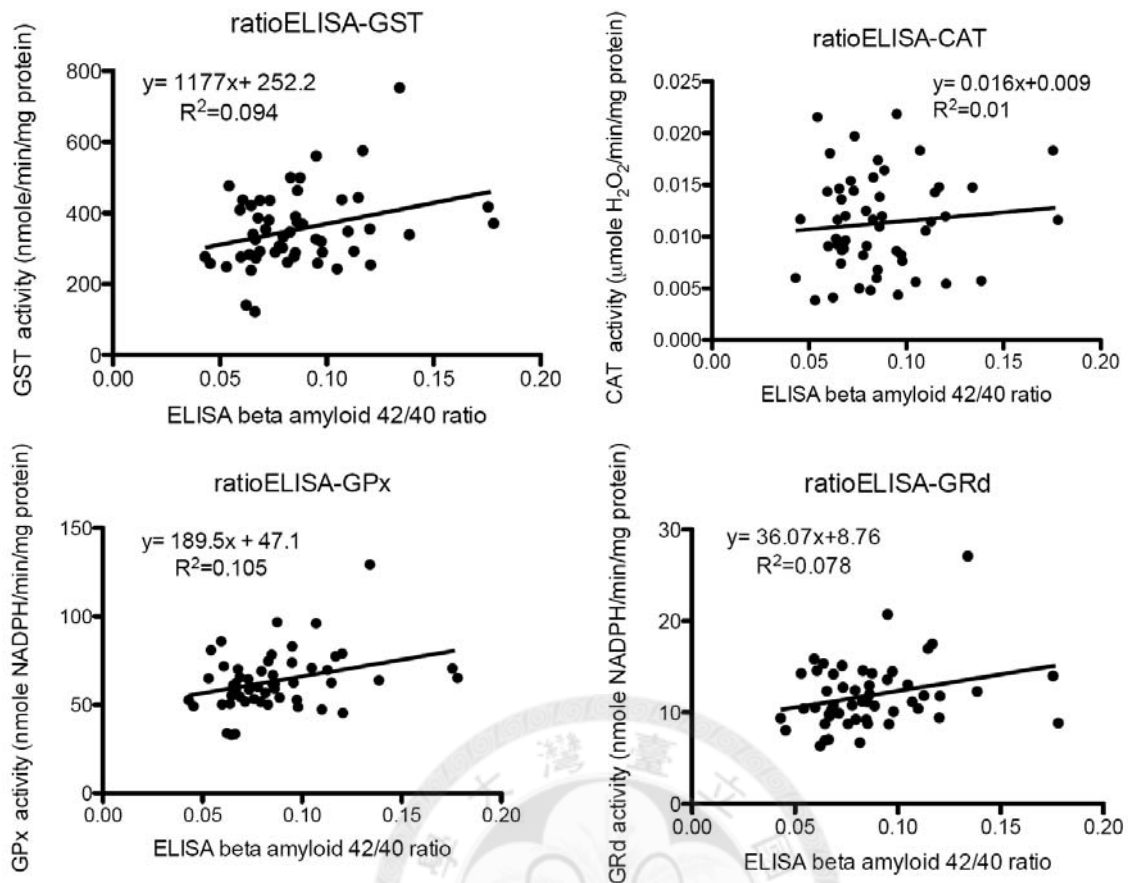
圖八十七、SAMP8 小鼠腦部以 ELISA 偵測類澱粉狀蛋白₁₋₄₂ 片段與各項實驗之相關性分析
Figure 87. The correlation of beta amyloid₁₋₄₂ peptide between different parameters in this study (n=57)



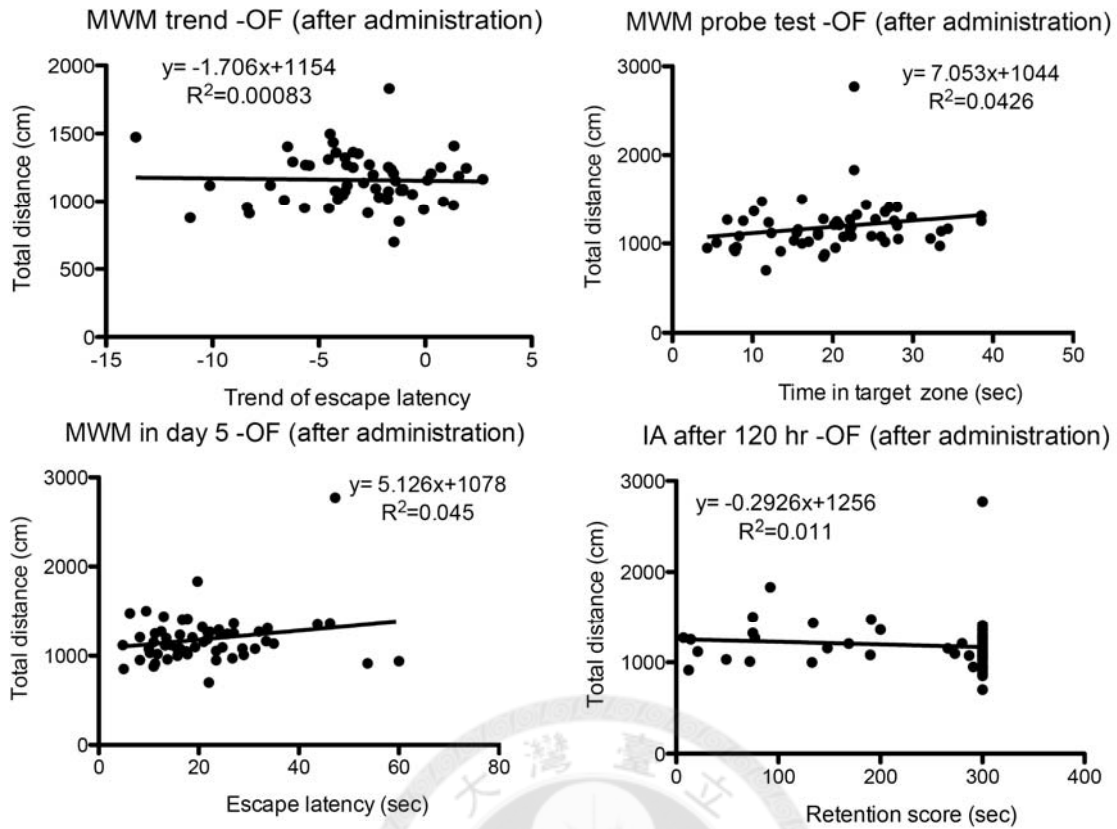
圖八十八、SAMP8 小鼠腦部以 ELISA 偵測類澱粉胍肽₁₋₄₂ 片段與各項實驗之相關性分析(續)
 Figure 88. The correlation of beta amyloid₁₋₄₂ peptide between different parameters in this study (continued)
 (n=57)



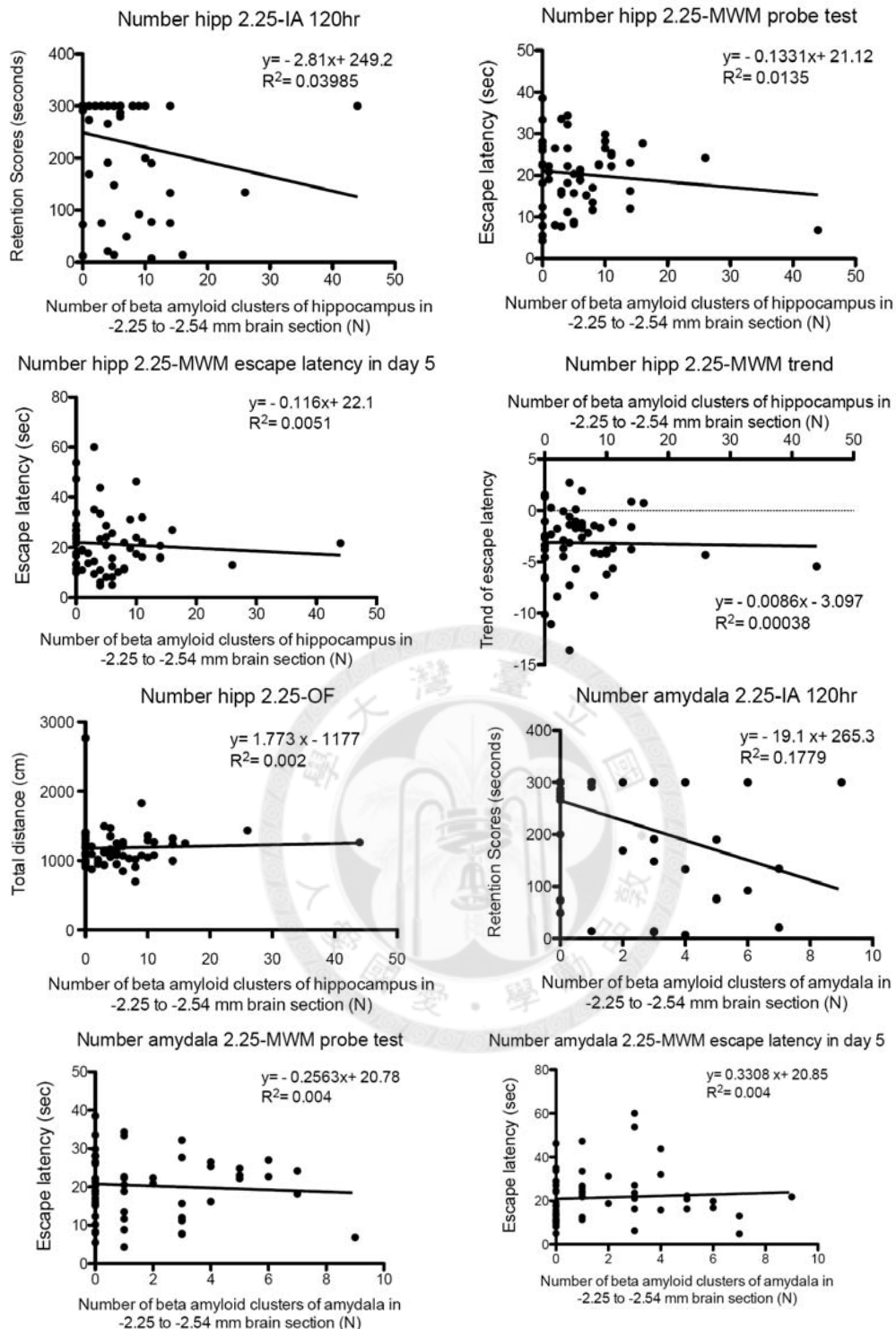
圖八十九、SAMP8 小鼠腦部以 ELISA 偵測類澱粉狀蛋白 1-42/1-40 片段比例與各項實驗之相關性分析
Figure 89. The correlation of beta amyloid_{1-42/1-40} peptide ratio between different parameters in this study (n=57)



圖九十、SAMP8 小鼠腦部以 ELISA 偵測類澱粉胜肽_{1-42/1-40} 片段比例與各項實驗之相關性分析(續)
 Figure 90. The correlation of beta amyloid_{1-42/1-40} peptide ratio between different parameters in this study (continued) (n=57)

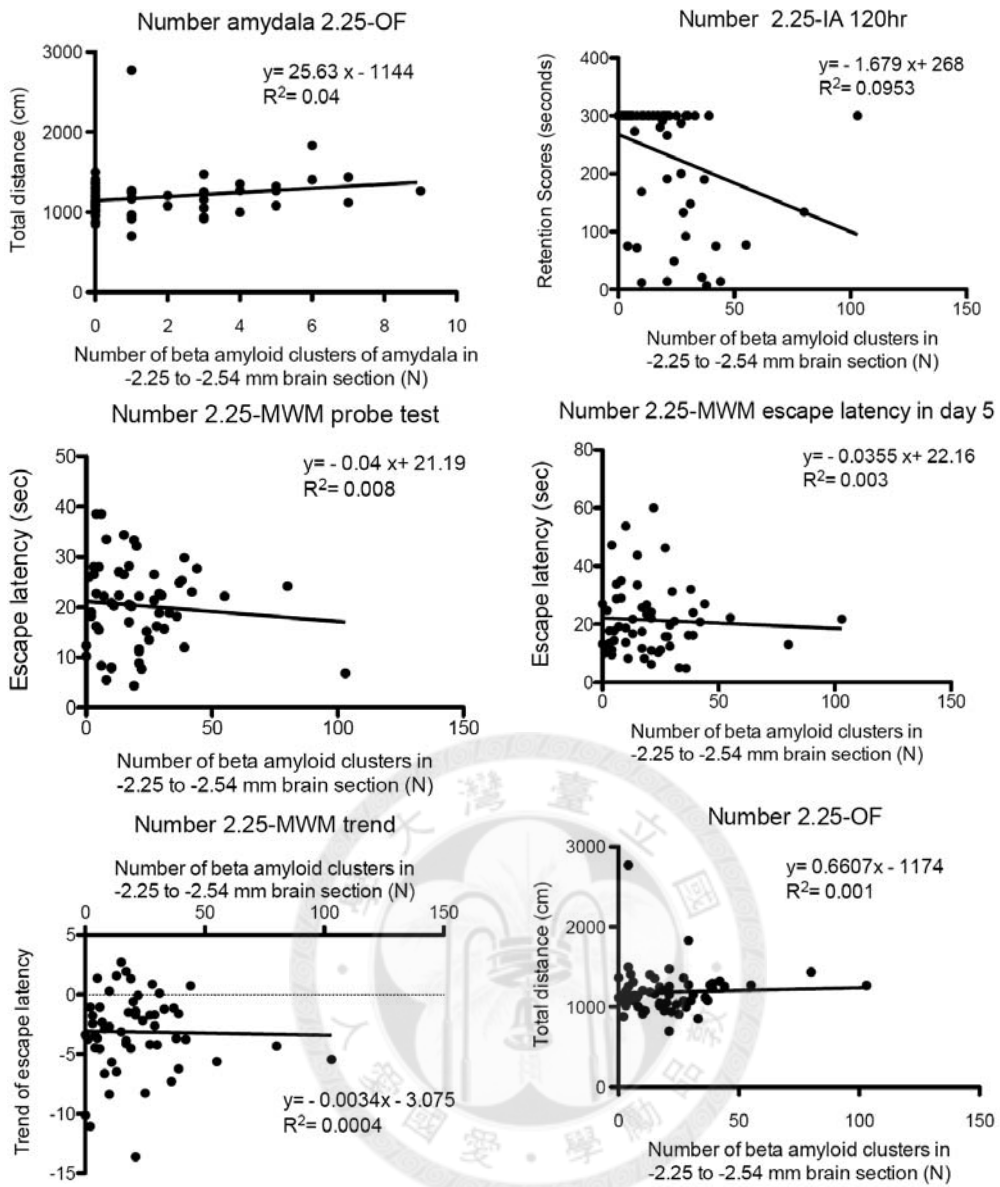


圖九十一、本研究中各項動物行為實驗結果之相關性分析
Figure 91. The correlation of different cognitive behaviors in this study (n=57)



圖九十二、SAMP8 小鼠腦部類澱粉胾肽團簇數目與各項行為實驗之相關性分析

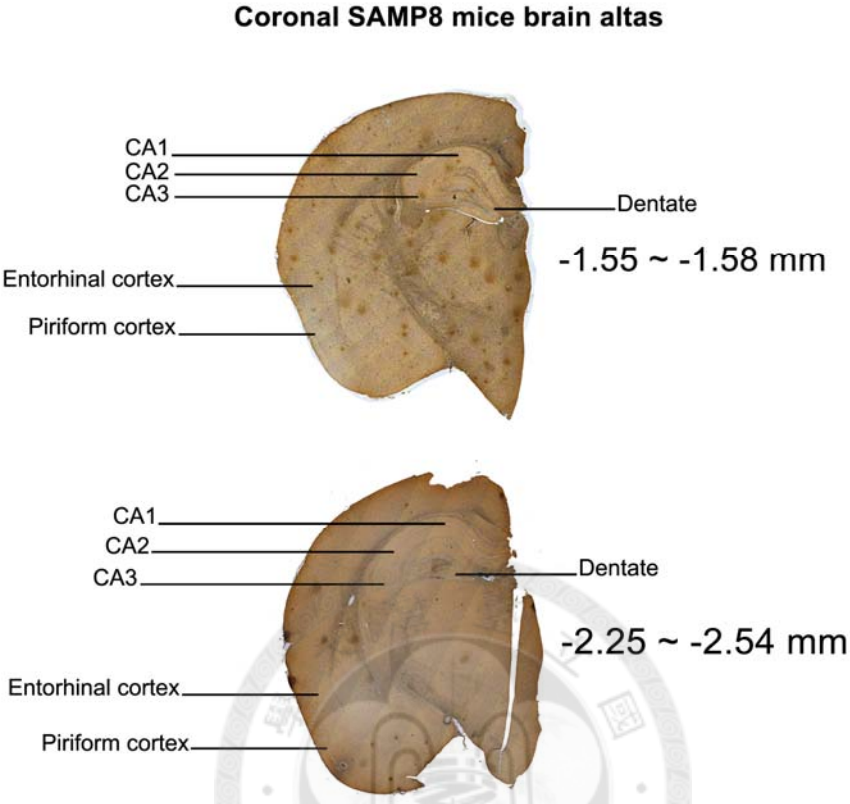
Figure 92. The correlation of beta amyloid cluster number between different parameters in this study (n=57)



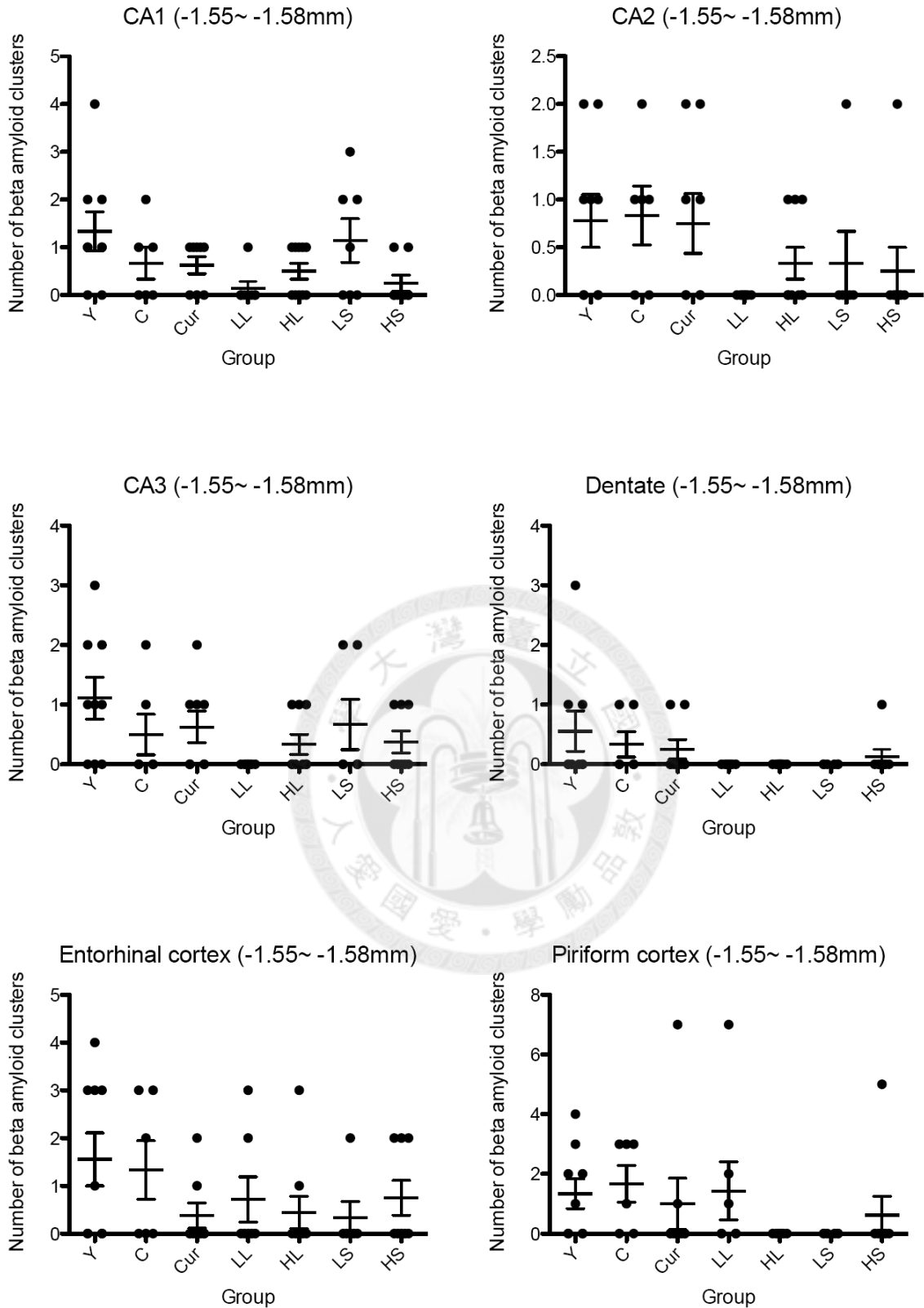
圖九十三、SAMP8 小鼠腦部類澱粉胜肽團簇數目與各項行為實驗之相關性分析(續)

Figure 93. The correlation of beta amyloid cluster number between different parameters in this study (continued) (n=57)

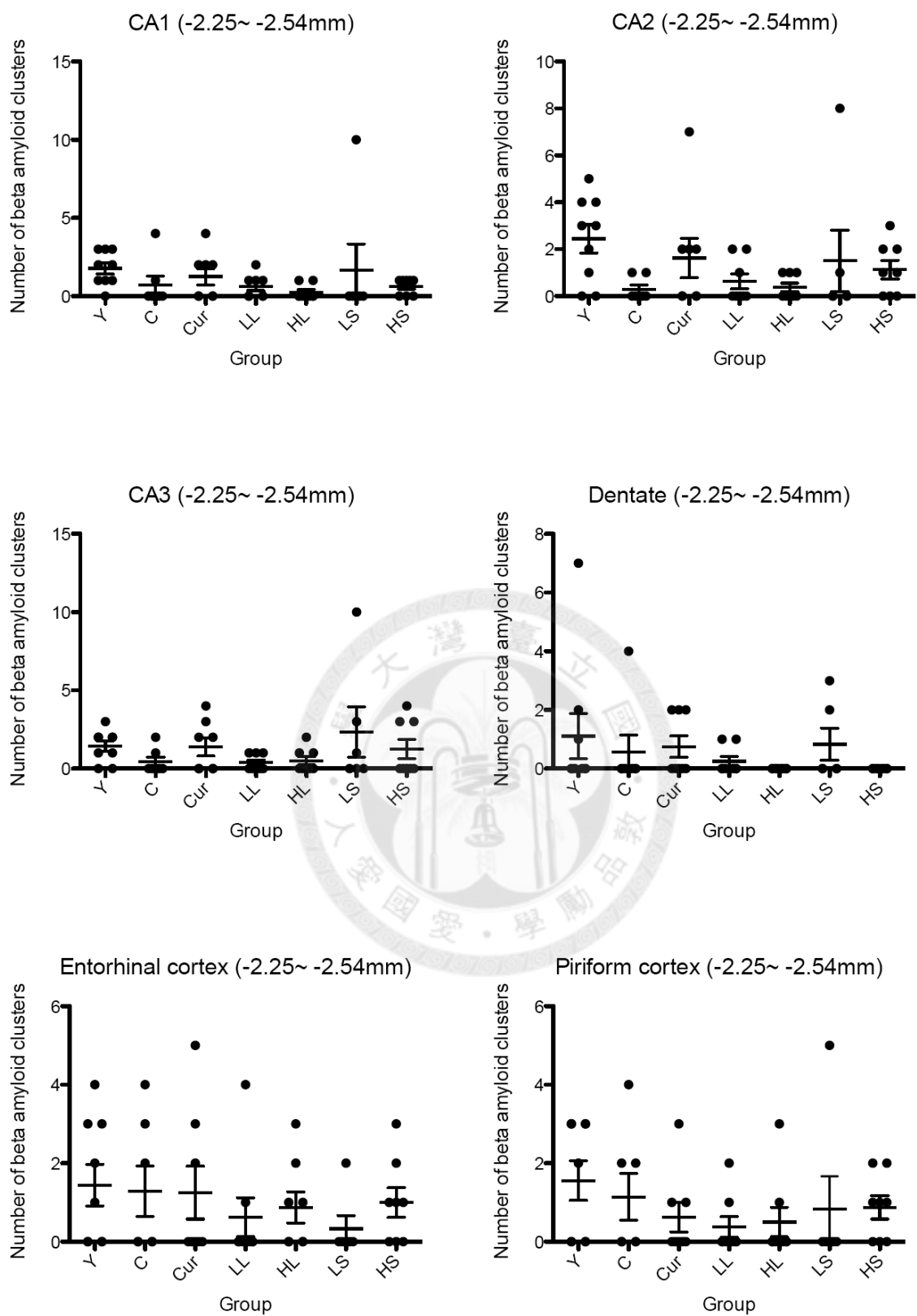
附錄十四、距離窗門-2.25 mm~-2.54 mm 與-1.55~-1.58 mm 位置腦區中，海馬迴區 CA1, CA2, CA3, Dentate，以及 Entorhinal cortex, Piriform cortex 部位的類澱粉胍肽沉積數目



圖九十四、海馬迴區 CA1, CA2, CA3, entorhinal cortex 與 piriform cortex 的區域示意圖



圖九十五、距離窗門-1.55 mm~-1.58mm 位置腦區中，海馬迴區 CA1, CA2, CA3, Dentate，以及 Entorhinal cortex, Piriform cortex 部位的類澱粉胜肽沉積數目 (n=57)



圖九十六、距離窗門-2.25 mm~-2.54 mm 位置腦區中，海馬迴區 CA1, CA2, CA3, Dentate，以及 Entorhinal cortex, Piriform cortex 部位的類澱粉胨沉積數目(續) (n=57)

附錄十五、動物實驗申請審查同意書

國立臺灣大學動物實驗申請案審查同意書
Affidavit of Approval of Animal Use Protocol
National Taiwan University

動物實驗申請表暨同意書編號：97實證字第54號

計畫申請人：孫璐西 職 稱：教授

單 位：食品科技研究所

飼養/應用地點：食科所動物舍

計畫名稱：以細胞與動物模式探討抗阿滋海默症之保健功效成分

本計畫之「動物實驗申請表」業經實驗動物管理與使用委員會
V 實質 形式審查通過。

本計畫預定飼養應用之動物如下：

| <u>動物種類</u> | <u>動物數量</u> | <u>計畫執行期間</u> |
|--------------|-------------|-------------------|
| 懷孕母鼠(SD rat) | 30 隻 | 98年8月1日至101年7月31日 |
| 新生大鼠(SD rat) | 約 200 隻 | 98年8月1日至101年7月31日 |
| Mouse/SAMP8 | 約 200 隻 | 98年8月1日至101年7月31日 |
| Mouse/SAMR1 | 約 30 隻 | 98年8月1日至101年7月31日 |

The animal use protocol listed below has been reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) .

Protocol Title : Investigation on the phytochemicals for its potential use as anti-Alzheimer's agent using cell and animal model systems

IACUC Approval No : 97實證字第54號

Period of Protocol : Valid From: 08/01/2009 To: 07/31/2012

Principle Investigator (PI) : Lucy Sun Hwang

動物實驗計畫書審核小組召集委員：李力群
實驗動物管理與使用委員會召集委員：李力群 日期：98/01/21

IACUC Chairman Lih-Seng Yeh Date 01/21/2009

Institutional Animal Care and Use
Committee (IACUC) NTU

碩士學位口試 Q&A

芝麻酚與藜本內酯改善老化促進小鼠之學習記憶能力與阿滋海默症病理特徵之潛力
Potentials to Ameliorate learning/memory impairment and Alzheimer's disease
pathophysiology of sesamol and Z-ligustilide in senescence-accelerated mouse
prone-8 (SAMP8) mice

指導教授:孫璐西 終身特聘教授

學生:邱博恩 R98641011

口試日期:100.6.23

王銘富教授：

1. 飼料造粒與打錠之目的？

答：本研究發現利用冷凍乾燥程序進行製作飼料，因凍乾程序中的低壓高溫會因芝麻酚本身的低分子量與低沸點的特性造成其含量急速下降，無法進行長期餵食之動物實驗，因此以溼式造粒與打錠之方法避免飼料存在於高溫與低壓的環境進一步導致芝麻酚的裂解與損失，並於配置飼料時，添加目標含量之兩倍量芝麻酚，即可製備出含有目標含量的芝麻酚飼料。(造粒與打錠方法由元培科技大學林山陽教授與林志城教授技術指導)

鄭菡若教授：

1. 雖前人研究芝麻酚與藜本內酯可被動物體吸收，請問本實驗是否有做相關的吸收試驗？有無檢測腦部的含量？

答：本研究亦有針對 SAMP8 小鼠腦部進行樣品殘留量之測定，但並未在 HPLC 檢測方法中發現芝麻酚的殘留，推測造成此結果的主要因為芝麻酚進入動物體內後的 $t_{1/2}$ 相當短(約 500 分鐘)，且動物進行犧牲前的十二到十六小時，我們會針對動物進行禁食，此可能是進一步造成無法在 SAMP8 小鼠腦部組織中檢測出芝麻酚的主要原因。

2. 飼料中的芝麻酚與藜本內酯是否會在儲存過程中發生變化？

答：請參考論文附錄。

3. 五月齡 SAMP8 小鼠是否真正適合作為控制對照組？

答：就認知行為表現方面，我們認為五月齡 SAMP8 小鼠應適合作為控制對照組，但針對 SAMP8 小鼠本身的類似阿滋海默症之生理病變，如類澱粉胨於腦部的累積以及其他進一步造成小鼠學習記憶能力損傷的因素，需要進一步探討以評估是否適合作為研究阿滋海默症相關的研究。

4. 針對類澱粉胨測定是否也要測 1-42 片段？

答：請參考論文圖三十八與圖三十九。

5. 水迷津試驗中是否可剔除第四象限的數據，以剔除運氣成份造成的實驗誤差？

答：下圖為將 SAMP8 小鼠於第四象限下水之脫離時間數據排除後之結果，由此可以發現，排除可能因運氣造成的較短脫離時間，趨勢變為餵食低劑量芝麻酚之 SAMP8 小鼠表現最佳，其次為五月齡年輕 SAMP8 小鼠、高劑量藜本內酯與芝麻酚，其餘趨勢與原始結果相同。但除低劑量芝麻酚組別外，其他組別的趨勢與原結果皆相同，代表 SAMP8 小鼠於第四象限下水應不致於造成學習認知行為結果的誤差。

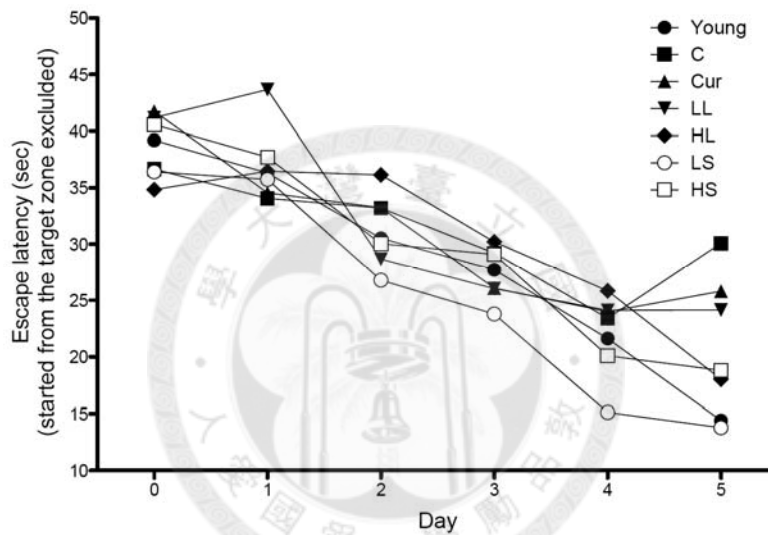
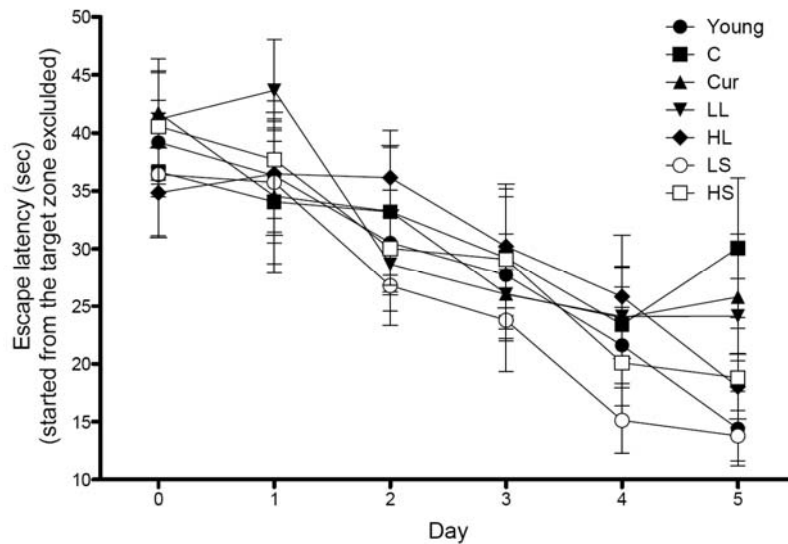


圖 A、踢除由第四象限下水數據後的水迷津空間記憶能力表現

6. 染色切片圖需要補 scale bar。

答：已修正，請參考論文圖三十六。

7. 老化指數的表示方法可參照附錄一圖五十一的表示方法。

答：請論文參考圖十八。

梁庚辰教授：

1. 生化相關分析是否可注重腦部部份，因肝臟的表現與認知行為之相關性可能較低？

答：原計畫欲測定視丘部的 TBARS，以分析其與認知行為的相關性，但經過進一步規劃與評估後，小鼠腦部視丘部的量較少，不適合用來測定 TBARS 含量。(相關試劑比例請參考下表)

表 A. 評估腦部 TBARS 測定步驟之試劑使用量與可行性

| 項目 | 肝臟 TBARS 測定方法 臟器重量與使用試劑之比例 | 評估測定腦部 TBARS 所需使 用的試劑比例 |
|-----|--|---|
| 步驟一 | 0.5g liver tissue + 1.5mL KP buffer + 10% TCA 0.5 mL 製成 20%肝 臟均質液 | SAMP8 小鼠視丘部約 0.07g 0.21 mL KP buffer 10% TCA 0.07 mL 製成 20%肝 |

| | | |
|-----|---|---|
| | | 臟均質液 |
| 步驟二 | 離心五分鐘 | 離心五分鐘 |
| 步驟三 | 取上清液 0.5mL 並加入 0.4% BHT 0.05mL 以及 0.4% TBA 0.5 mL 90°C 水浴一小時 | 總體積僅約 350uL 取上清液，上清液預估約 100uL 加入 0.4% BHT 10uL 以及 0.4% TBA 100uL 90°C 水浴一小時 |
| 步驟四 | 冰浴三分鐘 | 冰浴三分鐘 |
| 步驟五 | 震盪萃取一分鐘 | 震盪萃取一分鐘 |
| 步驟六 | 取 150 uL 於 96 well plate 中 測定 Ex 515nm / Em 550 nm，並做三重複 | 預估總體積僅約 210uL 由於 96 well plate 測定每個 well 需 120 到 150 uL 以上才落 於其吸光讀值之準確範圍，故 本研究欲測定小鼠 TBARS 上 較不適合。 |

2. 是否可針對某些特定的腦區進行相關性分析，例如海馬迴 CA1, CA2 或是內鼻皮質？

答：以第四題之相關性可以發現，藉由半腦區、海馬迴區以及杏仁核區的類澱粉胾肽數目可以發現，其相關性相當低，因此進一步推論，看特定海馬迴 CA1, CA2 等區域的相關性也不顯著，詳細資料將附於論文附錄。

3. 相關性分析可將其以對數方式表示，再進行相關性分析，如果仍無法看出顯著，可利用 Pearson correlation 進行分析。

答：由於以線性迴歸分析發現，各項指標間的相關性相當低，故推論各項指標在 SAMP8 小鼠動物模式中並非關鍵的參考參數。

4. 針對類澱粉胾肽斑塊數目的統計分析，可利用其變異性較大的優勢進行相關性分析。

請參考論文附錄十三，由其相關性分析可知，SAMP8 小鼠腦部類澱粉胾肽團簇數目與各項行為實驗與各項行為時間仍沒有顯著相關性。

郭宗甫教授：

1. 病理分析方面，需要注意 diffuse 與 metastasis 用字的差異。

答：本問題已請教廖俊旺教授，diffuse 之中譯由擴散改為瀰漫性，以論文 p.62 第二段第五行為例，將改寫為“有些個體僅為局度病變(Focal)或是瀰漫性(diffuse)並轉移(metastasis)到其他器官”。

2. 論文 p.67 老化指數部份，脫毛現象的英文是否應改為 alopecia，脊椎彎曲的英文是否需改為 lordosis？

答：Alopecia 通常指病態的脫髮或脫毛現象，但 SAMP8 小鼠的掉毛現象程度並未達到非常嚴重的病態病理程度，因此，該用字仍參考 Takeda et al., (1981) 使用之 Loss of hair。Lordosis 定義上為脊椎前凸；Kyphosis 為脊椎後凸(駝背)；Scoliosis 為脊椎側彎。Takeda et al., (1981)的用字為 Lordokyphosis，就字源上囊括了脊椎前凸與後凸的定義，但本研究中僅針對 SAMP8 小鼠外觀進行觀察，並未進一步將其脊椎骨取出，針對其形態學與病理分析做更詳細的觀察與研究，無法進一步確認 SAMP8 小鼠是否只產生 lordosis 與 kyphosis 其中一種特徵，或是兩種都有發生，故本研究仍參考 Takeda et al., (1981)之用字

lordokyphosis。

何其儻教授：

1. AIN-93M 飼料中為何使用 TBHQ 這個抗氧化劑？

答：此為本實驗設計時的疏忽，當時並未考慮到 AIN-93M 飼料中之抗氧化劑成份，但由於其含量約占飼料 0.0008%，推測其影響效應相對較小，且實驗樣品含量較高，其範圍在 0.005 到 0.05%。但往後實驗仍建議自行配置 AIN 飼料，以避免 TBHQ 造成的影響。

2. 為何不測定腦部的 TBARS？

答：由於腦部已進行 IHC 以及 ELISA¹⁻⁴⁰ 與¹⁻⁴² 的檢測，組織可供分析的量有限，將進一步討論其是否具有可以進一步檢測腦部 TBARS 含量的可行性。(可參考針對梁庚辰教授之提問第一題)

廖俊旺教授：

1. p. 12: 研究 Alzheimer's disease 動物模式中，SAMP8 mice 與其他 transgenic mice 其腦部 β -amyloid plaques 形成是否與 antigen-antibody immunocomplex deposition (lipofusion) 有關？可能與神經元細胞變性或死亡有關？分佈位置是否相似？

答：脂褐質(lipofusion)為一種棕黃色的色素顆粒。生物體內的脂質過氧化或是梅納反應產生的物質，進一步分解成 carbonyls 產物。這些產物進一步會與其他分子產生連結或聚合，進一步產生棕色或具螢光性的物質，即成為脂褐質，其會隨著年齡累積於神經元、心肌細胞與視網膜色素細胞上，如在視網膜累積，會逐漸形成所謂的黃斑性退化(Yin et al., 1996)。先前有研究指出，SAMP8 小鼠腦部因老化會產生脂褐質沉積(lipopigmentation)(徐等，2003)。本研究未針對 lipofusion 進行分析，但推測其與 beta amyloid 可能有某些關連性。但一般基因轉殖小鼠皆針對 beta amyloid 或是 tau hyperphosphorylation 進行 overexpression 的表現(見附錄五)，因此，基因小鼠的 beta amyloid 理論上應與 age-related 的 lipofusion 較無關連。故在神經元細胞變性、死亡以及 lipofusion 方面與 beta amyloid 的相關性皆需進一步研究探討。

6E10 IHC staining in J20 mice



6E10 IHC staining in SAMP8 mice



56

圖 C. J20 與 SAMP8 小鼠腦部類澱粉胜肽沉積之差異

2. p. 26: Table 8 目前以 SAMP8 mice 評估不同試驗物質改善學習記憶功效性試驗中，雖然於行為試驗中均有改善功效，但腦部 β -amyloid 病理表現結果卻不一，分子檢測表現項目亦不同，該如何解釋？

答：Table 8 中的使用 kangen-karyu(冠心二號)與 lotus seedpod proanthocyanidins 餵食 SAMP8 小鼠，並未針對 beta amyloid 進行檢測。各研究中針對不同的分子調控項目進行檢測，主要是因各研究中探討的方向不同所致，例如 Mitogen-activated

protein kinase (MAPKs)是調控細胞週期與分化、凋亡具重要的角色。其中，如 p38, JNK 或 ERK 對於調控抗氧化酵素具有相關表現(Shih et al., 2010)。也有研究針對與 AD 相關的 synaptic plasticity in hippocampus 做相關的研究，進一步探討 postsynaptic density-95 (PSD-95)，phospho-N-methyl-D-aspartate receptor 1 (p-NMDAR-1)、protein kinase C gamma subunit (PKC gamma)等表現情形。而 Table 8 僅列出各研究對於不同分子調控的測定項目，其結果以及其與阿滋海默症的關連性，需要進一步整理分析。

**3. p. 43: 飼料中含有 curcumin, sesamol and Z-ligustilide 之劑量選擇依據??
sesamol and Z-ligustilide 具改善學習記憶功效，但 curcumin 結果未如預期有效，
是否與劑量有關?**

答：雖本研究使用薑黃素做正控制組，並且添加胡椒鹼以提升其生物可利用率，但並無法看到顯著的效果，與一般於基因轉殖小鼠實驗結果較不一致，造成此結果的主要原因一為推測基因轉殖小鼠與老化促進小鼠模式中導致認知行為能力下降的機制不盡相同，其於基因轉殖小鼠有效的路徑可能不適用於老化促進小鼠。二為由本研究針對 beta amyloid 沉積結果，薑黃素有降低其沉積的效果，但無法提升其學習記憶能力，推測老化促進小鼠之 beta amyloid 與學習記憶能力可能無高度相關性。三為老化促進小鼠的個體差異大，造成無法真實反應出樣品的效果。在劑量方面，Pan et al., (2008)更以 200 ppm curcumin 餵食小鼠，即可觀察出具有改善學習記憶能力的效果。



表 B. 本研究中使用之試驗樣品劑量計算與參考文獻

| Compound | Curcumin | Sesamol | Z-ligustilide |
|---|--|---|--|
| Reference | Begum et al., (2008) Pan et al., (2008) | Jan et al., (2008) | Kuang et al., (2009) |
| Dose | 500 ppm | 100 mg/kg bw (rat) | 40 mg/kg bw (rat) |
| Strain | Tg2576 mice | SD rat (bioavailability) | SD rat (surgery) |
| Bioavailability | 7-10% | 35.5% | 2.6% |
| Effects | To reduce beta amyloid deposition Improve learning and memory | - | Improve learning and memory |
| Calculation of dose for SAMP8 mice (Assume 35 g mouse, 7 g food intake) | Dose: 500 mg/kg diet | 0.35 mg/kg bw = 50 mg/kg diet 500 mg/kg diet for high dose | 200 mg/kg diet 500 mg/kg diet for high dose |

4. p. 62: 各組小鼠存活率為 70-90%，以 leukemia 為主，請補說明各組發病死亡時間是否相近？各組實驗數據結果是否應扣除發病鼠隻再進行統計？

答：

表 C. 本研究長期餵食 SAMP8 小鼠時，因病死亡小鼠數目與日期統計表

| Treatment | Death date | Survival rate (%) |
|-----------|-------------------|-------------------|
| C | 9/5, 9/20, 10/26 | 70 |
| Cur | 10/11, 10/19 | 80 |
| LL | 8/18, 10/28 | 80 |
| HL | 10/4 | 90 |
| LS | 9/17, 9/19, 10/20 | 70 |
| HS | 10/15, 10/16 | 80 |

長期餵食實驗期間：2010/7/1 – 2010/11/18

最早發生死亡的組別為低劑量槲本內酯，其次為控制組。餵食薑黃素、高劑量槲本內酯與高劑量芝麻酚組別的最早死亡時間，可推遲到約十月齡左右。但樣品是否確實對於存活率有顯著影響，需進一步研究。

除第一次活動量測試數據，全部數據分析皆剔除病鼠進行統計分析。發病鼠的體重與攝食量皆刪除，病鼠無法進行血清生化分析與行為實驗所有 beta amyloid 定量實驗僅分析完成所有認知行為實驗之小鼠。

5. p. 67: 各組 SAMP8 mice 老化數值是否與 Takeda 所發表之老化數值相符?

答：Takeda (1999) 提及八月齡 SAMP8 小鼠的老化指數為 3.67 分，與同月齡之 SAMR1 相比，高出約三倍，R1 僅 1.26 分。由於本研究使用之老化指數依照 Takeda 教授發表之標準進行微調，主要因為本研究期間無觀察到皮膚潰瘍 (skin ulcer)，且文字內容敘述並無法真實呈現出本研究觀察到 SAMP8 小鼠之外觀。故本研究評分與 Takeda 教授研究中之結果可能無法比較 (論文 p67)。

本研究十月齡 SAMP8 小鼠各項老化指數約落在 1 到 3 分之間 (論文 p70)。

但 Takeda 一系列針對 SAMP8 相關的研究中，並無針對各種不同月齡之 SAMP8 小鼠的老化指數進行分析與討論。

6. p. 108: SAMP8 mice 腦部 β -amyloid 以 6E10 抗體 IHC 染色可以表現，但 A11 及 LOC 兩種抗體則無法表現，其差異性為何?

答：

表 D. 本研究進行 IHC 染色使用的抗體、特性介紹與針對 SAMP8 小鼠的染色結果

| Antibody | Type | Results |
|--------------|--|---------|
| 6E10 | Reactive to amino acid residue 1-16 of beta amyloid. The epitope lies within amino acids 3-8 of beta amyloid (EFRHDS). 6E10 reacts to beta amyloid and its precursor forms. | + |
| A11 | A11 reacts with soluble beta amyloid 40 and 42 oligomers. A11 reacts with common conformation-dependent structure rather than sequence. A11 does not react with APP, but may reacts with similar conformation structure. | ND |
| LOC | LOC reacts with amyloid fibrils and fibrillar oligomers, but not monomers, prefibrillar oligomers. | ND |
| Thioflavin S | beta sheet conformation of peptide | ND |

Dot blotting of 6E10, A11 and LOC antibody for beta amyloid

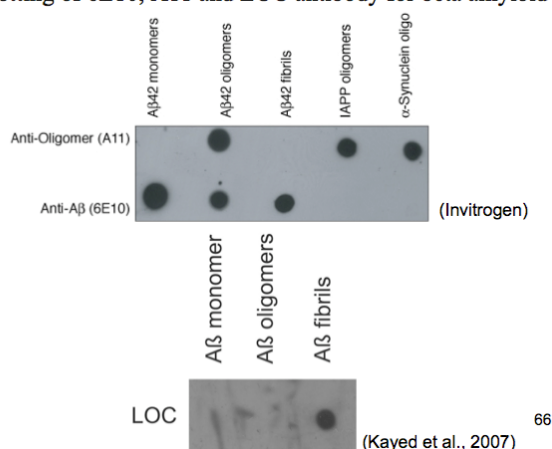


圖 D. 不同抗體針對不同聚集程度 beta amyloid 的染色結果

由本研究實驗結果推論，A11 與 LOC 抗體確認 SAMP8 小鼠腦中的 beta amyloid 不會進一步聚集為 oligomers 與 fibrils。進一步以 Thioflavin S 確認，

仍然無法看到 Thioflavin S positive 結果，其表示 beta amyloid 不會進一步聚集並產生具有 beta sheet conformation 的 fibrils。Th-S 結果也與許多文獻相符合 (論文 p179)。

Thioflavin S reacts with beta-sheet conformation of beta amyloid

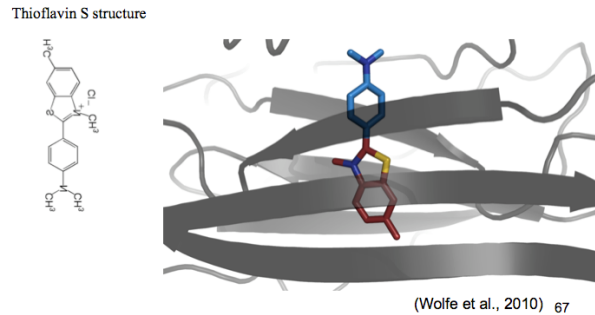


圖 E. Thioflavin S 的結構以及其針對類澱粉肽結構 beta sheet 產生鍵結的示意圖。

SAMP8 小鼠與一般基因轉殖小鼠在此抗體染色的主要差異在 beta amyloid 聚集的狀況顯著不同的原因，推斷 SAMP8 小鼠之 beta amyloid 中的胺基酸組成與人類的不同為可能的原因之一(論文 p108)。

Beta-amyloid 1-42, mouse, rat
 N- Asp - Ala - Glu - Phe - Gly - His - Asp - Ser - Gly - Phe - Glu - Val - Arg - His - Gln - Lys -
 Leu - Val - Phe - Phe - Ala - Glu - Asp - Val - Gly - Ser - Asn - Lys - Gly - Ala - Ile - Ile -
 Gly - Leu - Met - Val - Gly - Gly - Val - Val - Ile - Ala -C

Beta-amyloid 1-42, human
 N- Asp - Ala - Glu - Phe - Arg - His - Asp - Ser - Gly - Tyr - Glu - Val - His - His - Gln - Lys -
 Leu - Val - Phe - Phe - Ala - Glu - Asp - Val - Gly - Ser - Asn - Lys - Gly - Ala - Ile - Ile -
 Gly - Leu - Met - Val - Gly - Gly - Val - Val - Ile - Ala -C

64

此外，也可能是 SAMP8 小鼠中的 beta amyloid，因在其快速老化過程中的產物之一，與目前我們所認知的人類阿滋海默症中所形成的 beta amyloid plaque 可能有所不同。

7. p. 109: SAMP8 mice 腦部β-amyloid 以 6E10 抗體染色表現以視丘、下視丘、皮質區為多，海馬迴區則少。圖 36 顯示各組β-amyloid 總面積為 0.2-0.6%，另以 ELISA 分析，值落於 200-250 pg/hemi brain，組間差異不顯著，兩種方式表現相似度高，但β-amyloid 總面積與人類阿滋海默症比較是否達到真正老化病變？

答:目前並未看到針對人類半腦或全腦區的 beta amyloid IHC staining，因此無法進一步精確比較其與 SAMP8 小鼠的結果。

本研究發現 SAMP8 小鼠腦部 beta amyloid 所佔面積約 0.2~0.6%,僅少數個體可以達到 1%,推測其與人類阿滋海默症病變仍有一段距離。但不論 SAMP8 小鼠或是基因轉殖小鼠，其阿滋海默症病理特徵皆與人類阿滋海默症有許多差異性。屏除面積的議題，動物模式中與人類阿滋海默症患者中的 beta amyloid 也有顯著的不同(論文 p32)，因此可能無法單純以 beta amyloid 總面積判定 SAMP8 小鼠的老化情形，只能推斷其因老化具有某些類阿滋海默症的病理特徵。

8. p. 124: 實驗結果推測 SAMP8 mice 因老化或因白血症致肌肉運動能力不足，引起學習記憶數據之退化假象，除迷宮及主被動迴避試驗外，您認為是否還有更適合的評估方式？

答：本實驗結果推測 SAMP8 小鼠因老化、白血症病變或其他原因，導致小鼠運動協調能力或是 axon transport 功能不佳，進一步導致在認知能力行為實驗結果表現不佳。而水迷宮所需要較強的運動協調能力、視力、體力與認知能力。此對於

老化的 SAMP8 小鼠可能較不適合。因此 eight-arm radial arm maze 或是 Barnes maze 或許是未來針對 SAMP8 小鼠進行認知能力測定較好的選擇，此類實驗主要是藉由對於小鼠進行禁食，再以食物誘導；或是利用其趨暗特性，誘導其進入暗室。這兩類實驗對於小鼠的 stress 也較小(論文 p20-21)。

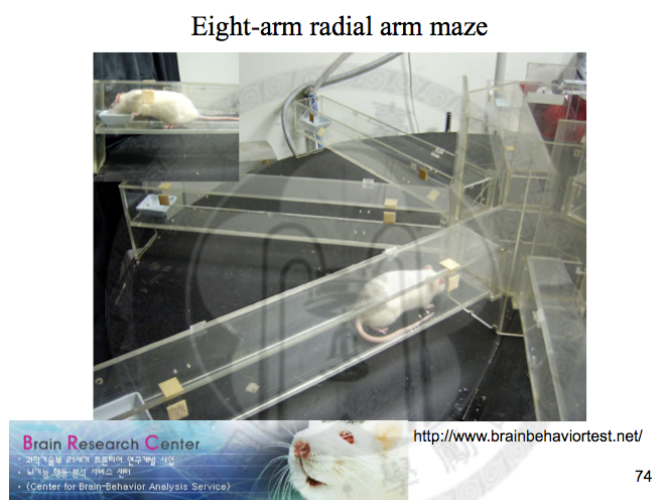
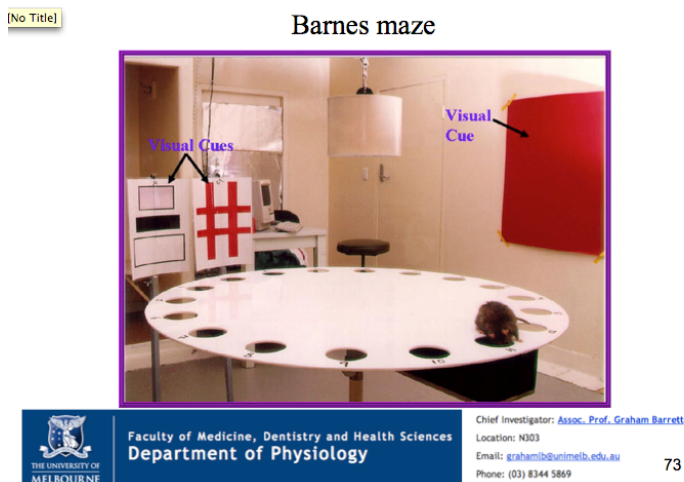


圖 F.本研究建議未來針對 SAMP8 小鼠進行空間認知行為實驗的建議模式
巴恩氏迷宮(上)與八臂迷宮(下)

9. 老化指數應加上一組加總分數。

答:請參考論文圖十八。十月齡 SAMP8 小鼠的總老化指數約落在 5 到 17 分左右，但各組間並未觀察出顯著的劑量效應與趨勢。